

新疆雪莲叶片高效再生植株体系的建立

韦善君, 武运芳, 杨林, 罗云燕, 可祥, 周宜君

(中央民族大学 生命与环境科学学院, 北京 100081)

摘要:以新疆雪莲快繁无菌苗为试材,研究了新疆雪莲高效植株再生的条件。结果表明:长势健壮的无菌苗叶片切段可以通过2种途径高效再生不定芽;直接器官再生途径:长3~5 mm的叶切段在MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L的培养基上先后暗诱导3周和光诱导4周,分化率达(73.3±3.8)%,平均出芽量(5.0±0.3)个芽/块;间接器官再生途径:叶切段在MS+NAA 0.2 mg/L+TDZ 0.5 mg/L培养基上暗诱导3周,愈伤组织诱导率100%,愈伤组织在MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L的培养基上光诱导4周,分化率达(88.9±5.9)%,平均(5.5±0.4)个芽/块;不定芽在MS+NAA 0.05 mg/L+6-BA 0.3 mg/L培养基中壮苗和增殖培养后,在MS+IBA 0.5 mg/L+0.1%活性碳的培养基中生根率达100%;2种植株再生途径均可用于新疆雪莲的诱变育种和转基因育种研究。

关键词:新疆雪莲;快繁无菌苗;植株再生;激素;诱导

中图分类号:S 567 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)05-0098-06

新疆雪莲属菊科(Compositae)凤毛菊属(*Saussurea*)多年生一次结实的高山草本植物^[1],又称天山雪莲,我国的新疆、青海、甘肃等省3 000 m左右的高原寒带山区有分布,主产于新疆境内的天山山脉、阿勒泰山脉和昆仑山脉雪线附近,多生长于高山冰碛石、流石滩石隙及高山草甸上^[2],是高山植被的重要组成成分。其生境常年积雪不化,气候严寒,土壤贫瘠,条件十分恶劣。种子在0℃发芽,3~5℃生长,幼苗能经受-21℃的严寒;全年生长期不到2个月。自然条件下生长5~8 a后开花^[3]。

新疆雪莲为稀有资源,特殊的生长环境使其具有独特而神奇的药理作用。在西藏、新疆、青海、甘肃、云南、四川等地,雪莲入药的习用已久,主要用于祛寒、除风湿,治疗关节炎、妇科疾病,增强免疫、抗癌等。化学分析表明,雪莲含有黄酮类、生物碱类、香豆素类、三萜类、多糖类、挥发油类以及鞘胺醇等化学成分^[4-7]。现代药理学研究表明,新疆雪莲具有抗炎镇痛、抗癌、扩张血管、降血压、清除自由基、抗疲劳、终止妊娠和收缩子宫

等作用^[7-11]。除了药用价值之外,在雪地中盛开的雪莲还有吉祥的寓意。由于特殊的药用价值和寓意,不当采集严重破坏了自然生长的雪莲资源,现已被列为国家二级保护植物^[12]。

组织培养与离体再生植株是弥补自然资源稀缺的理想途径。通过组织培养产生不定芽或胚状体可以实现雪莲种质的快速繁殖,有助于发展雪莲的人工种植,还为进一步的诱变或转基因育种奠定基础;通过细胞培养方法获得有效次生代谢产物,具有周期短、不受季节和气候等自然条件限制等的优点。目前,关于雪莲组织培养与植株再生研究已有相关报道^[13-17],多数采用种子萌发的幼苗子叶、真叶、下胚轴和根作为外植体,但由于雪莲种子不易采收,发芽率低,因而外植体不易获得^[18-19]。此外,关于雪莲的研究文献中所报道的培养条件、愈伤组织状态、再生率等差异很大。为进一步提高雪莲组织培养的效率,该试验以增殖培养的无菌叶片和茎为外植体,从激素组合、培养时间、光照条件三方面进行研究,以期建立新疆雪莲稳定高效的植株再生体系,为其快速繁殖和转基因研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试新疆雪莲种子由新疆药用植物研究所贾晓光研究员提供。参考傅晓春等^[17]和武利勤等^[18]的方法萌发种子和增殖培养无菌苗。试验用基本培养基为MS,添加蔗糖30 g/L,琼脂7.0 g/L,pH 5.8~5.9。培养基的灭菌条件为121℃、20 min。

第一作者简介:韦善君(1975-),女,博士,讲师,研究方向为植物生理与分子生物学。E-mail:wei.s.j@163.com.

责任作者:周宜君(1964-),女,博士,教授,研究方向为分子遗传学。E-mail:queenzhou@263.net.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31100507);中央民族大学青年科学基金资助项目(0910KYQN51);中央高校基本科研业务费专项资金资助项目;中央民族大学大学生创新训练资助项目(URTP201411)。

收稿日期:2013-11-13

1.2 试验方法

1.2.1 不同外植体诱导愈伤组织 取增殖培养 4~5 周的无菌苗叶片和茎作为外植体。分成植株底部 1~3 叶和 4 叶以上 2 类,切成长度为 3~5 mm 的片段,茎段长度 2~3 mm。根据雷亮等^[19]的配方,试验选用的培养基为 MS+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L。将 3 种外植体分别接种于培养基上,每培养皿接种 15 个片段,每处理 3 皿。于(23±2)℃条件下暗培养,6 周后记录愈伤组织的发生率和生长状况。愈伤组织诱导率(%)=产生愈伤组织的外植体块数/总接种的外植体块数×100%;分化率(%)=分化的组织块数/总接种的组织块数×100%。

1.2.2 不同激素诱导愈伤组织 为比较不同植物生长调节剂组合诱导愈伤组织的效果,该试验设计了以 4 叶以上叶片为外植体,在 10 种培养基上进行诱导(表 1)。

表 1 不同诱导愈伤组织激素组合

编号	培养基/mg·L ⁻¹
1	MS+NAA 2.0+6-BA 0.1
2	MS+NAA 2.0+6-BA 0.5
3	MS+NAA 2.0+6-BA 1.0
4	MS+NAA 0.5+6-BA 1.0
5	MS+NAA 0.5+6-BA 1.5
6	MS+NAA 0.5+6-BA 2.0
7	MS+NAA 1.0+TDZ 0.5
8	MS+NAA 0.5+TDZ 1.0
9	MS+NAA 0.2+TDZ 0.5
10	MS+NAA 0.2+TDZ 0.25

1.2.3 愈伤组织细胞压片观察 取长势旺盛的愈伤组织,用刀片切取表面单层细胞薄片,置于载玻片上,加 1 滴蒸馏水后制成临时压片。在 Leica 显微镜下观察愈伤组织的细胞形态特征。

1.2.4 不定芽诱导 直接诱导不定芽:以植株中上部生长健壮的叶片作为直接诱导不定芽的外植体,每培养皿接种 12~15 块,每处理 3 皿,诱导方法见表 4。光照强度 40 μmol·m⁻²·s⁻¹,光周期 14 h/d,温度(25±1)℃。有暗期培养的材料光诱导 4 周,无暗期培养的材料直接光诱导 6 周。记录各处理不定芽发生率及生长状况。间接诱导不定芽:采用诱导的愈伤组织,材料分别为 1.2.1 中诱导 6 周产生的 I、II、III 型组织以及在 MS+NAA 0.2 mg/L+TDZ 0.5 mg/L 培养基中诱导 3 周产生的愈伤组织,分化用培养基为 MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L,诱导条件同上。

1.2.5 生根诱导及移栽 将诱导产生的不定芽转至 MS+NAA 0.05 mg/L+6-BA 0.3 mg/L 的培养基上,培养 3~4 周,将苗丛拆成单株,接种到生根培养基上诱导生根,每瓶 3 株,每处理接种 5 瓶,培养条件同 1.2.4。4 周后统计生根率,测量根长。取生根良好的植株清洗干净,移栽到营养土:珍珠岩:蛭石为 2:1:1 的培养基

质中,温室培养 2 周后统计存活率。

1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 17.0 的单因素方差分析法(ANOVA)进行处理分析,比较不同处理间的差异。

2 结果与分析

2.1 不同外植体产生愈伤组织效果比较

由表 2 可知,在该培养基上诱导的愈伤组织色泽偏暗,淡黄色,内部较硬实。相同条件下,植株底部 1~3 叶愈伤组织发生率较低,叶柄的效果较叶片好;4 叶以上的叶片、叶柄切段愈伤组织诱导率近 100%;茎段愈伤组织诱导率为 100%,并有 2~3 株丛生的腋芽长出。说明年龄适中的叶片和茎段具有很好的愈伤组织发生能力。因叶片数量多且材料易得,相同的诱导效果下,更适宜用作外植体。

表 2 不同外植体产生愈伤组织效果比较

外植体类型	诱导率/%
底部 1~3 叶	叶片 37.8±4.4 c 叶柄 53.3±3.8 b
4 叶以上	叶片 100.0±0 a 叶柄 97.8±2.2 a
茎段	100.0±0 a

注:同栏数字后不同字母表示处理间在 0.05 水平差异显著,下同。

2.2 不同激素组合诱导愈伤组织效果的比较

2.2.1 愈伤组织发生时间及发生率比较 由表 3 可知,在添加 NAA 与 6-BA 的诱导培养基上,叶片切段培养 10~12 d 后在切口处开始膨大,2 周后愈伤组织可见,3~4 周后为愈伤组织发生高峰期。在添加 NAA 与 TDZ 的培养基中,外植体活动时间相对较早,培养 6~7 d 后切口处膨大,10 d 后可见愈伤组织,2 周左右为愈伤组织发生高峰期。在 10 种培养基中,叶片切段容易被诱导产生愈伤组织,在生长调节剂浓度相对较低的 4、5 号处理中,诱导率低于 80%,其它处理中诱导率接近 100%。

2.2.2 愈伤组织的结构特点比较 根据颜色、硬度和表面湿润程度,将获得的愈伤组织分为 4 种类型:I 型为表面水渍状、硬而密实的组织;II 型为表面干燥、白色颗粒状组织(图 1-A1);III 型介于 I 型和 II 型之间,为略湿润的颗粒状,白色至淡黄色(图 1-B1);IV 型是完全水渍状、较松软的组织。观察 II、III 型愈伤组织的细胞形态可以发现,II 型中细胞多为圆形,细胞质相对较浓(图 1-A2);III 型的细胞多为腊肠形,有的为 2~3 个细胞连在一起呈弯月状,细胞质较淡(图 1-B2)。不同类型培养基诱导的愈伤组织差异较大,当 NAA 浓度为 2.0 mg/L 时(1~3 号),愈伤组织以 I 型为主,6-BA 浓度越低时,外层组织越薄且水渍状,偏灰色;随着 6-BA 浓度的升高,外层松软组织增多,水渍状减少,转淡黄色和白色,出现 III 型和少量 II 型组织。在 6-BA/NAA 比值较高的培养基中(4~6 号),愈伤组织以 II 型和 III 型为主,其中 6-BA 浓度为 2.0 mg/L

表3 不同生长调节剂组合对愈伤组织诱导的影响

编号	诱导率/%	愈伤组织状态
1	97.8±2.2 a	组织块较小,内部硬实,表层湿软,灰白色
2	100.0±0 a	组织块较小,较硬,湿润,灰白色
3	100.0±0 a	组织块较大,较硬,湿润,灰白至淡黄色,约1/4有小芽
4	66.7±7.7 c	组织块较小,颗粒状,淡黄色或灰白色,约1/5有小芽
5	77.1±2.1 b	组织块较小,颗粒状,淡黄色至白色,约1/2有小芽
6	95.6±4.4 a	组织块较大,颗粒状,淡黄色至白色,1/2有小芽
7	95.7±2.2 a	组织块很大,水渍颗粒状,较硬,淡黄色至白色,1/2~2/3有小芽
8	100.0±0 a	组织块很大,略水渍的颗粒状,淡黄色至白色,约2/3有小芽
9	100.0±0 a	组织块较大,颗粒状,白色,表面较干,约2/3有小芽
10	94.4±2.9 a	组织块较小,颗粒状,白色,表面干,约1/2有小芽

时诱导率和生长量均明显增加,但Ⅱ型没有明显增加。当以 TDZ 取代 6-AB 与 NAA 组合时(7~10 号),愈伤组织中Ⅱ型的比例明显增加,其中以 NAA 0.2 mg/L+TDZ 0.5 mg/L 组合效果最好。TDZ 浓度为 1.0 mg/L 时愈伤组织块最大,但水渍程度较重,浓度为 0.25 mg/L 时组织块较小;NAA 浓度为 0.5 mg/L 及以上时,组织块硬度和水渍程度加重。

2.3 不定芽诱导

2.3.1 外植体直接分化不定芽诱导 由表 4 可知,在附加

表4 生长调节剂及光照条件对外植体直接分化不定芽的影响

培养基/mg·L ⁻¹	诱导方法	分化率/%	出芽量/个·块 ⁻¹	芽的形态	玻璃化率/%
MS+NAA 0.5+6-BA 2.0	暗6周+光4周	24.5±2.2 d	3.3±0.3 cd	略弯曲	70
	暗4周+光4周	42.2±5.9 c	3.6±0.4 cd	伸展	25
	暗3周+光4周	73.3±3.8 ab	5.0±0.3 bc	伸展	10
	暗2周+光4周	62.2±4.5 b	4.2±0.4 bcd	伸展	5
	光6周	24.5±2.2 d	2.5±0.3 d	伸展	5
MS+NAA 0.2+TDZ 0.5	暗4周+光4周	82.2±2.2 a	8.9±1.0 a	卷曲为点状	75
	暗3周+光4周	75.6±1.0 ab	8.0±1.1 a	点状或扭曲	50
	暗2周+光4周	84.4±5.9 a	5.7±0.8 b	点状或扭曲	25
	光6周	26.7±3.8 d	3.2±0.5 cd	短粗或扭曲	25

2.3.2 愈伤组织间接分化不定芽诱导 由表 5 可知,Ⅱ型分化率达 93.3%,平均出芽量(7.2±0.4)个/块,芽多单生,略弯曲,约 20%玻璃化。Ⅲ型和Ⅰ型分化率较低,玻璃化程度较高。外植体在 MS+NAA 0.2 mg/L+TDZ 0.5 mg/L 培养基中暗诱导 3 周产生的愈伤组织,以Ⅱ型为主,少量为Ⅲ型。该类组织的再生率可达 88.9%,与Ⅱ型组织的分化率无显著差异;出芽量(5.5±0.4)个/块低于Ⅱ型组织,但是玻璃化程度明显减轻,芽的伸展性较好,更健壮(图 1-D)。

表5 不同类型愈伤组织分化不定芽效果

愈伤组织类型	分化率/%	出芽量/个·块 ⁻¹	芽的形态	玻璃化率/%
I	6.7±3.8 c	1.4±0.2 d	弯卷	100
II	93.3±3.8 a	7.2±0.4 a	略弯曲	20
III	51.1±5.9 b	2.6±0.3 c	略弯曲	70
暗诱导 3 周	88.9±5.9 a	5.5±0.4 b	伸展	10

2.4 不定芽的增殖培养、生根诱导及再生植株移栽
分化产生的不定芽,转到 MS+NAA 0.05 mg/L+

加 NAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L 的培养基上,叶片切口先膨大,可直接发生不定芽。外植体若全光照培养,不定芽发生率为(24.5±2.2)%,平均出芽量(2.5±0.3)个/块,有少量芽玻璃化(约 5%);若先经适当的暗培养再转光照培养,不定芽发生率和出芽量均显著提高,其中以暗培养 3 周效果最好,分化率和出芽量分别为(73.3±3.8)%和(5.0±0.3)个/块(图 1-C),但约 10%的芽玻璃化;暗诱导 4 周以上时,分化率降低,玻璃化程度加重。在附加 NAA 0.2 mg/L+TDZ 0.5 mg/L 的培养基上,以适当暗诱导再进行光培养的芽分化效果好,外植体膨大的切口处产生颗粒状突起,发育为不定芽。暗诱导 2、3、4 周的处理中芽分化率皆为 80%左右,差异不显著($P>0.05$),但显著高于全光照处理的分化率(26.7±3.8)%;暗诱导 3 周和 4 周的出芽量最高(8~9 个/块);暗诱导 2 周的芽玻璃化较轻。总体上,在该培养基上分化的芽多数纤细而扭曲,玻璃化较重,暗处理时间长时甚至不能长出芽,呈绿色点状。综合考虑分化率、出芽量和芽健壮程度,外植体在 MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L 培养基中暗诱导 3 周、再光诱导 4 周,直接发生不定芽效果最好。

6-BA 0.3 mg/L 的培养基中培养 3~4 周后,芽生长健壮,茎基部发出 1~3 株的新芽,形成密集的不定芽丛(图 1-E)。将不定芽转接到表 6 所示的培养基中诱导不定根。结果表明,当培养基中无生长调节剂时,没有根形成;当含有适量浓度的 NAA 或 IBA 时,2 周后茎基部发出不定根。从生根率、生根量和根长来看,以 IBA 0.5 mg/L 处理的效果最好(表 6,图 1-F)。若在该培养基中添加 0.1%的活性碳时,根更细且白色。生根良好的植株移栽成活率 100%,生长健壮(图 1-G)。

表6 生长调节剂对不定芽生根的影响

培养基	生根率/%	生根量/条	根长/cm
MS	0.0	0.0 e	0.0 c
MS+NAA 0.05	100.0	6.8±0.5 cd	3.3±0.5 a
MS+NAA 0.1	100.0	8.5±0.6 c	2.8±0.7 a
MS+NAA 0.5	100.0	19.8±0.8 a	<0.2 b
MS+IBA 0.1	45.0±4.3	6.6±0.4 d	3.2±0.8 a
MS+IBA 0.5	100.0	11.2±0.5 b	3.3±0.7 a
MS+IBA 0.5+0.1%活性碳	100.0	10.9±0.7 b	3.4±0.9 a

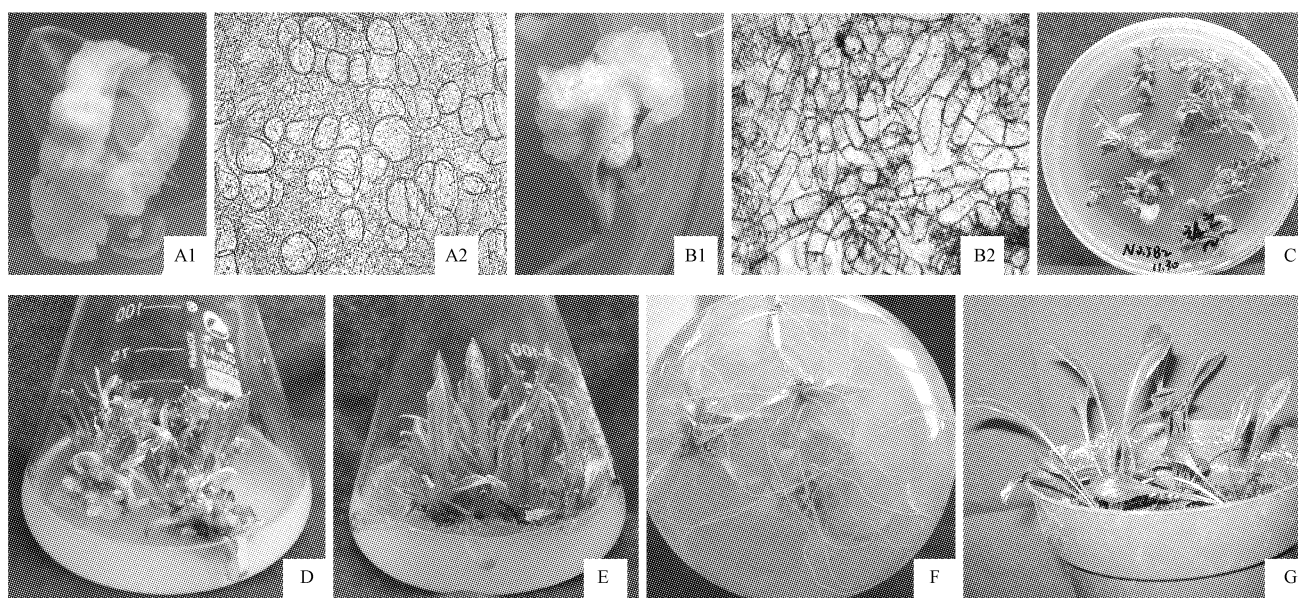


图1 新疆雪莲的愈伤组织和再生植株

注:A1.Ⅱ型愈伤组织;A2.Ⅱ型愈伤组织的细胞(40×);B1.Ⅲ型愈伤组织;B2.Ⅲ型愈伤组织的细胞(40×);C.外植体在MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L培养基中诱导产生的不定芽;D.在MS+NAA 0.2 mg/L+TDZ 0.5 mg/L培养基中暗诱导3周产生的愈伤组织,在MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L的培养基中分化的不定芽;E.不定芽在MS+NAA 0.05 mg/L+6-BA 0.3 mg/L培养基中壮苗培养;F.生根植株;G.移栽后的再生植株。

3 讨论与结论

瓦·古巴诺娃等^[13]1990年首次报道了新疆雪莲的组织培养研究,以幼嫩小头状花序作为外植体获得了再生植株,后来诸多的研究中皆以种子萌发幼苗的各部分组织为外植体。自然条件下新疆雪莲生长5~8 a后开花^[3],人工栽培植株2~3 a后开花。种子有冠毛,易随风飘走,需在种子完熟前用透气的布袋将花朵包裹住花序,可采收90%的种子。种子萌芽率通常为50%~70%^[18-21],随着贮存年限的延长萌芽率显著下降。上述因素限制了种子萌发幼苗的获得。雪莲的幼芽在适宜的培养基上可以增殖产生大量无菌苗^[17]。该研究以增殖培养4~5周无菌苗的中上部叶为外植体,在含适合生长调节剂的培养基中,直接分化不定芽率可达(73.3±3.8)%,通过愈伤组织再生不定芽比率可达(88.9±5.9)%。无菌苗切去叶片后余下的基部,在增殖培养基中可以长出新的叶子供再次使用。说明无菌苗的叶是一种有效、易得的外植体,可以替代种子萌发的幼苗。无菌苗1~3叶的愈伤组织发生率低,可能与叶龄相对较大有关。在已有的一些报道中,叶片愈伤组织诱导率高低不一^[22-23],除了植物生长调节剂的配方差异外,在一定程度上可能与选用的叶片幼嫩程度不同有关。

生长素和细胞分裂素类物质的种类和浓度对外植体或愈伤组织再生植株有重要影响。该试验用于愈伤组织诱导或继代培养的10种培养基配方中,当NAA浓度为1.0 mg/L以上时,愈伤组织多为硬实、表面湿润的

组织,该类组织生长慢,分化能力很低。林侃等^[14]也曾报道2,4-D浓度高时诱导的愈伤组织硬实,说明生长素类物质浓度高时可使新疆雪莲愈伤组织硬化。当培养基中附加浓度为0.5 mg/L 6-BA及以上浓度时,促进白色颗粒状、表面干燥愈伤组织的产生,该类组织再生植株能力强。当培养基中含有6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L时,外植体先经3周的暗培养后转光培养,可直接产生不定芽。TDZ是人工合成的苯基脲衍生物(N-苯基-N'-1,2,3-噁二唑-5-脲),已被广泛用于植物组织培养中^[24],在新疆雪莲组织培养中的研究很少有报道。该试验结果表明,TDZ在新疆雪莲的愈伤组织的培养中有很好的效果,浓度为0.5 mg/L的TDZ与NAA 0.2 mg/L配合使用时,愈伤组织发生较NAA和6-BA组合早5 d左右,Ⅱ型的比例较高。但是,使用TDZ替代6-BA时,无论是诱导外植体直接分化不定芽,还是通过愈伤组织分化不定芽,均有一定程度的扭曲甚至不能长出,说明TDZ可以促进雪莲不定芽的发生,但对芽的发育有抑制作用。先用含有TDZ的培养基诱导愈伤组织3周左右,再用含有6-BA的培养基诱导愈伤组织分化,可明降低TDZ的抑制作用,获得伸展良好的不定芽。Huetteman等^[25]和Lu^[26]曾总结,TDZ在植物特别是木本植物的不定芽诱导中非常有效,但在诱导芽变成完整植株存在一些问题,例如分化不出完整芽且叶片卷曲,不利于伸长生长,玻璃化较重,生根困难等。因此TDZ应用于新疆雪莲组织培养时应注意控制浓度或作用时间,抑制玻璃苗等畸化现象的发生。

适当的暗诱导结合光照培养促进新不定芽的分化。由于光促进分化,抑制脱分化,所以在植物组织培养中,通常是在无光的条件下进行愈伤组织的诱导和继代培养,在光照条件下诱导芽分化。师校欣等^[27]研究表明,2~3周的暗培养能够显著提高葡萄离体叶片不定芽的再生率和出芽数。该研究也发现,新疆雪莲离体叶片经过2~3周的暗培养后,直接分化或通过愈伤组织分化不定芽效率明显提高,更长时间的暗培养愈伤组织生长较好,但分化率明显下降,再生苗易玻璃化。

综合该研究结果,可以得出新疆雪莲2种高效的植株再生途径。直接器官再生途径:无菌苗叶段在MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L的培养基上暗诱导3周,转光诱导4周,即可获得较多丛生芽;间接器官再生途径:无菌苗叶切段在MS+NAA 0.2 mg/L+TDZ 0.5 mg/L培养基上暗诱导3周产生愈伤组织,转到MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L培养基上光诱导4周,可获得大量不定芽。不定芽在MS+NAA 0.05 mg/L+6-BA 0.3 mg/L培养基中增殖和壮苗培养3~4周后,转到MS+IBA 0.5 mg/L+0.1%活性炭培养基中诱导生根,即可获得再生植株。

参考文献

- [1] 谭敦炎,朱建雯,姚芳,等.雪莲的生殖生态学研究 I. 生境、植物学及物候学特性[J]. 新疆农业大学学报,1998,21(1):1-5.
- [2] 安争夕,沈观冕,翟大彤,等.新疆植物志[M]. 5卷. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999.
- [3] 卓娅,刘杰龙,古巴诺娃,等.天山雪莲生态适应特性及人工繁殖的研究[J]. 新疆师范大学学报(自然科学版),1993,13(3):81-84.
- [4] 杨峻山,谢凤指,刘庆华,等.新疆雪莲的香豆素类化学成分的研究[J]. 中国药理学杂志,2006,41(23):1774-1776.
- [5] 李燕,郭顺星,王春兰.新疆雪莲黄酮类化学成分的研究[J]. 中国药理学杂志,2007,42(8):19-21.
- [6] 侯朋艺,黄健,孙博航,等.新疆雪莲化学成分的分析与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报,2011,28(2):120-123.
- [7] 肖皖,李宁,波拉提·马卡比力,等.雪莲化学成分和药理活性研究进展[J]. 现代药物与临床,2011,26(5):344.
- [8] 李君山,蔡少青.雪莲花类药材的化学和药理研究进展[J]. 中国药理学杂志,1998,33(8):499-452.
- [9] 杨伟鹏,周钟鸣,熊玉兰,等.野生雪莲和培养雪莲总黄酮主要药效作用比较研究[J]. 中国中医药信息杂志,2006,13(1):32-36.
- [10] 翟科峰,段红,荆建国,等.天山雪莲提取物纯化前后各部位抗炎镇痛作用[J]. 中国医院药学杂志,2010,30(5):374-377.
- [11] 王一凡,柳茵,刘维军,等.雪莲对动脉粥样硬化大鼠血脂和C反应蛋白的影响[J]. 中国药理学通报,2011,27(6):884-885.
- [12] 国家环境保护局,中国科学院植物研究所.中国珍稀濒危保护植物名录[M]. 北京:科学出版社,1987.
- [13] 瓦·古巴诺娃,刘杰龙,石玉瑚.新疆雪莲的组织培养[J]. 新疆农业科学,1990(5):221-222.
- [14] 林佩,王晓军,赵民安.新疆天山雪莲体胚诱导与分化研究[J]. 西北植物学报,2006,26(7):1351-1354.
- [15] 杨林,覃筱燕.新疆雪莲的组织培养及植株再生[J]. 中央民族大学学报(自然科学版),2006,15(1):26-29.
- [16] Guo B, Gao M, Liu C Z. *In vitro* propagation of an endangered medicinal plant *Saussurea involucre* Kar. et Kir[J]. Plant Cell Report, 2007, 26: 261-265.
- [17] 傅晓春,王晓军,赵民安,等.新疆雪莲体外直接器官发生的快繁研究[J]. 干旱区研究,2008,25(2):248-253.
- [18] 武利勤,郭顺星,肖培根.新疆雪莲胚芽的组织培养和植株再生[J]. 中国中药杂志,2005,30(11):814-816.
- [19] 雷亮,赵兵,徐春明,等.低温条件对新疆雪莲愈伤组织反应器培养后再分化能力的影响[J]. 过程工程学报,2006,6(6):942-947.
- [20] 康喜亮,王晓军,牛力涛,等.濒危药用植物天山雪莲种子萌发特性研究[J]. 种子,2010,29(5):81-85.
- [21] 朱军,李晓瑾,王月娥,等.天山雪莲种子萌发特性研究[J]. 种子,2010,29(6):67-70.
- [22] 覃建兵,庞红霞,祝长青.植物激素对新疆雪莲愈伤组织诱导和分化的影响[J]. 华中师范大学学报(自然科学版),2009,43(4):633-637.
- [23] 覃建兵,庞红霞,曹兴芹.新疆雪莲愈伤组织诱导及总黄酮的测定[J]. 西北植物学报,2010,30(6):1264-1270.
- [24] 徐晓峰,黄学林. TDZ:一种有效的植物生长调节剂[J]. 植物学通报,2003,20(2):227-237.
- [25] Huetteman C A, Preece J E. TDZ: a potent cytokinin for woody plant tissue culture[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1993, 33: 105-109.
- [26] Lu C Y. The use of TDZ in tissue culture[J]. In Vitro Cellular and Developmental Biology, 1993, 29: 92-96.
- [27] 师校欣,杜国强,贺柱,等.外植体及培养条件对葡萄不定芽再生的影响[J]. 果树学报,2008,25(4):585-588.

Establishment of High Frequency Plant Regeneration System From the Leaf of *Saussurea involucre*

WEI Shan-jun, WU Yun-fang, YANG Lin, LUO Yun-yan, KE Xiang, ZHOU Yi-jun
(College of Life and Environmental Sciences, Minzu University of China, Beijing 100081)

Abstract: Taking proliferated sterile seedlings of *Saussurea involucre* as plant material, appropriate conditions for high frequency plant regeneration of *Saussurea involucre* were investigated. The results showed that robust leaves of the seedlings could be induced to regenerate the plant in two ways. Direct regeneration way: leaf fragments in length of 3~5 mm were inoculated on the medium of MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L. The differentiation rate could reach (73.3±3.8)% after being cultured for 3 weeks in darkness and 4 weeks under the light. The fragments could produce

十种杀菌剂对欧李褐腐病菌的室内毒力测定

周 芳, 郝晓娟, 程 超, 王美琴, 李新凤, 王建明

(山西农业大学 农学院, 山西 太谷 030801)

摘 要:以 10 种杀菌剂为试材,以欧李褐腐病菌为研究对象,采用菌丝生长速率法和孢子萌发抑制法测定了 10 种杀菌剂对欧李褐腐病菌(*Monilinia fructicola*)的室内毒力,以筛选出防治欧李褐腐病的有效药剂。结果表明:430 g/L 戊唑醇悬浮剂、24% 腈苯唑悬浮剂、10% 苯醚甲环唑水分散粒剂、80% 多菌灵可湿性粉剂、70% 甲基硫菌灵可湿性粉剂、500 g/L 异菌脲悬浮剂、50% 腐霉利可湿性粉剂对欧李褐腐病菌菌丝生长的半致死浓度(EC_{50})均低于 0.700 mg/L,其中 430 g/L 戊唑醇悬浮剂对菌丝的抑制效果最好, EC_{50} 为 0.027 mg/L;80% 代森锰锌可湿性粉剂对菌丝的抑制效果最差, EC_{50} 为 57.645 mg/L。供试的 10 种药剂对孢子萌发的 EC_{50} 均低于 2.500 mg/L,抑制作用最强的是 500 g/L 异菌脲悬浮剂, EC_{50} 为 0.024 mg/L;效果最差的是 80% 代森锰锌可湿性粉剂, EC_{50} 为 2.496 mg/L。24% 腈苯唑悬浮剂、430 g/L 戊唑醇悬浮剂、500 g/L 异菌脲悬浮剂可以用于欧李褐腐病的防治。

关键词:欧李褐腐病;美澳型核果链核盘菌;杀菌剂;毒力

中图分类号:S 436.62 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)05-0103-03

欧李(*Cerasus humilis*)广泛分布于我国华北、西北、东北及华东等地区,其果实钙含量居所有经济型水果之首,因此又名“钙果”^[1]。除含钙丰富外,欧李果实中还含有多种维生素、氨基酸及铁锌硒等矿物元素,具有降压、降胆固醇、抗炎症和抗癌作用^[2],是我国特有的新一代保健型果品^[3-4]。近年来,欧李种植发展势头迅猛,但随着种植面积的增加,病害问题日益突出。欧李褐腐病 2011 年首次报道于辽宁省^[5],在山西省欧李种植区同样

发生普遍,生长后期如遇多雨潮湿天气,引起果实腐烂,发病率高达 80% 以上,使果实丧失经济价值。杜俊杰等^[6]认为褐腐病是欧李生产中危害最为严重的病害。褐腐病菌主要以菌丝体在僵果上越冬,翌年僵果表面产生大量分生孢子,通过风雨传播引起初次侵染。国内尚未发现该病菌的有性阶段,因此分生孢子在初侵染中起主要作用。适宜条件下,病部可产生大量分生孢子,进行再次侵染。目前欧李褐腐病防治及药剂筛选尚鲜见报道,筛选出能有效抑制欧李褐腐病菌菌丝生长和分生孢子萌发的化学药剂,对该病害的有效防控至关重要。现采用菌丝生长速率法和孢子萌发抑制法测定了 10 种杀菌剂对欧李褐腐病菌(美澳型核果链核盘菌)*Monilinia fructicola* 的室内毒力,以期筛选出防治欧李褐腐病的有效药剂,为该病害的化学防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试欧李褐腐病菌(*Monilinia fructicola*),由山西

第一作者简介:周芳(1988-),女,河南开封人,硕士研究生,现主要从事植物真菌病害及生物防治等研究工作。E-mail:zhoufangluck@163.com.

责任作者:郝晓娟(1977-),女,山西晋中人,博士,副教授,现主要从事植物病害生物防治等研究工作。

基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(31000873);山西省科技攻关资助项目(20120311016-2);山西农业大学中青年学术骨干基金资助项目(XG201210)。

收稿日期:2013-11-15

healthy adventitious shoot clusters with an average number of (5.0 ± 0.3) shoots/explant. Indirect regeneration way: calli were induced from leaf fragments inoculated on the medium of MS+NAA 0.2 mg/L+TDZ 0.5 mg/L for 3 weeks in darkness, and then were cultured on medium of MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L for 4 weeks under the light. $(88.9 \pm 5.9)\%$ of calli could produce adventitious shoot with an average number of (5.5 ± 0.4) shoots/callus. After growing on the medium of MS+NAA 0.05 mg/L+6-BA 0.3 mg/L for 3 to 4 weeks, the shoots proliferated and became stronger. Thus, almost 100% of the shoots could root well on the medium of MS+IBA 0.5 mg/L+0.1% active carbon. The two protocols could be used for genetic transformation research of *S. involucre*.

Key words: *Saussurea involucre*; proliferated sterile seedlings; plant regeneration; hormone; induce