

# 枸杞炭疽病菌滤液对枸杞愈伤组织生长及分化的影响

曲 玲<sup>1</sup>, 石 志 刚<sup>1</sup>, 焦 恩 宁<sup>1</sup>, 李 彦 龙<sup>1</sup>, 张 宗 山<sup>2</sup>, 曹 有 龙<sup>1</sup>

(1. 宁夏农林科学院 国家枸杞工程技术研究中心, 宁夏 银川 750002; 2. 宁夏农林科学院 植物保护研究所, 宁夏 银川 750002)

**摘 要:**采用 Czapek-Dox 培养液, 通过振荡培养、过滤、离心, 获得枸杞炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) 培养滤液, 配制含不同比例粗毒素液的枸杞愈伤组织培养与分化培养基, 研究培养滤液对枸杞叶片愈伤组织生长和分化的影响。结果表明: 枸杞炭疽病菌粗毒素液具有较强的生物活性, 对枸杞愈伤组织生长及分化均具有一定的毒害和抑制作用; 多步正选择法与一步正选择法相比, 经过由低到高的选择压力逐级筛选后, 可相对提高叶片愈伤组织对毒素的抗性, 抗性细胞系筛选的上限浓度可定为浓度 50% (v/v), 抗性细胞变异系分化培养基中的粗毒素液含量可定为 20% (v/v)。

**关键词:**枸杞炭疽病菌; 培养滤液; 愈伤组织; 筛选方法与压力; 毒害作用

**中图分类号:**S 436. 639 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)23-0112-04

枸杞炭疽病 (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) 又名枸杞黑果病, 是枸杞生产中危害性最大的病害之一, 在宁夏、甘肃、陕西、河南、河北、山东等国内枸杞产区都有发生, 病原菌危害枸杞的果实、花和花蕾, 也危害嫩枝和叶, 可导致严重减产。自 20 世纪 80 年代开始, 国内外学者对该病的研究主要集中于侵染过程、发病规律、病原菌鉴定及田间化学防治等方面<sup>[1-4]</sup>, 但在枸杞抗病育种研究方面, 尚处于起步阶段。究其原因, 主要是枸杞长期采用单株选优的方法进行品种选育, 造成遗传高度杂合, 缺乏对亲本遗传背景的了解, 而且环境因素、生长时期对表观抗病性又具有极大影响, 因此采用传统的育种方法进行枸杞抗病育种研究, 存在育种周期长、效率低等问题, 造成目前生产上缺乏抗病性强且农艺性状优良的主栽品种。自 20 世纪 80 年代初, 植物生物技术, 特别是植物体细胞诱导无性系变异育种技术迅速发展, 已经成为实用化的育种方法, 其中, 利用植物病原菌产生的致病毒素作为选择剂, 在体外定向筛选具有抗性的细胞突变体, 是该领域发展和应用比较成熟的技术体系。该体系的成功运用, 关键需明确合适的筛选方法和

毒素筛选压力。因此, 该试验旨在对枸杞炭疽病菌粗毒素滤液对枸杞愈伤组织生长及分化的毒害作用进行研究, 以期获得确定、稳定的枸杞抗炭疽病体细胞无性系突变体奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. 由宁夏农林科学院国家枸杞工程技术研究中心采集炭疽病株, 由西北农林科技大学植保学院分离和鉴定。

1.1.2 供试品种 供试枸杞品种为宁夏枸杞 (*Lycium barbarum* L.) 优良主栽品种“宁杞 1 号”(cv. ‘Ningqi No. 1’)。

1.1.3 培养基 病原菌培养基的配制: 马铃薯蔗糖琼脂培养基 (简称 PDA): 20% 马铃薯浸出液 1 000 mL, 加蔗糖 20 g, 琼脂 18 g。病原菌产毒 Czapek-Dox 培养液:  $\text{NaNO}_3$  0.2%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1%,  $\text{KCl}$  0.05%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001%, 蔗糖 3%, pH 6~7。枸杞组织培养培养基: 无菌苗培养与扩繁培养基 MS 1: MS+6-BA 0.2 mg/L + NAA 0.01 mg/L + 琼脂粉 4.5 g/L, 在灭菌前用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 调节 pH 6.8 左右, 分装后立即灭菌。愈伤组织诱导培养基 MS 2: MS+NAA 1 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L + 琼脂粉 4.5 g/L, 在灭菌前用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 调节 pH 6.8 左右, 分装后立即灭菌, 用于枸杞叶片或茎段愈伤组织的诱导。愈伤组织继代培养基 MS 3: MS+NAA 0.5 mg/L + 6-BA 0.1 mg/L + 琼脂粉 4.5 g/L, 在灭菌前用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 调节 pH 6.8 左右, 分装后立即灭菌, 用于枸杞愈伤组织的继代培养。

**第一作者简介:**曲玲(1972-), 女, 宁夏银川人, 硕士, 副研究员, 现主要从事枸杞抗病性和枸杞生物技术抗病育种研究工作。

**责任作者:**曹有龙(1963-), 男, 宁夏中宁人, 博士, 研究员, 硕士生导师, 宁夏回族自治区枸杞种质创新与遗传改良创新团队首席专家, 现主要从事枸杞生物技术研究工作。E-mail: youlongc@hotmail.com.

**基金项目:**宁夏回族自治区自然科学基金资助项目(NZ0964, NZ12251)。

**收稿日期:**2012-08-27

芽分化培养基 MS 4:MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.01 mg/L+琼脂粉 4.5 g/L,在灭菌前用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 调节 pH 6.8 左右,分装后立即灭菌。生根培养基 MS 5:1/2MS+IAA 或 NAA 0.1 mg/L+蔗糖 1.5%+琼脂粉 4.5 g/L,在灭菌前用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 调节 pH 6.8 左右,分装后立即灭菌,用于无根苗的生根培养。

## 1.2 试验方法

1.2.1 枸杞炭疽病原菌粗毒素液的制备 枸杞炭疽病原菌胶胞炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) 菌株移接于 PDA 平板上,于 25℃ 培养 8 d 后,沿菌落边缘打出直径 12 mm 的菌块,接入装有 100 mL Czapek-Dox 培养液的 250 mL 三角瓶中,置于 25℃ 下 100~120 r/min 振荡培养 14 d,培养液经 4 层纱布过滤,定性滤纸重复过滤 1 次,滤液经 4 000 r/min 离心 15 min,重复离心 1 次,取上清液为培养滤液,即粗毒素液。

1.2.2 枸杞无菌苗的获得 选用“宁杞 1 号”优良单株的当年生嫩枝及顶芽,剪去叶片,冲洗干净,放入 70%乙醇溶液中浸泡数秒,再放入 0.1%氯化汞溶液中消毒 8~10 min,用无菌水冲洗 3 次,将嫩茎剪切成一芽一段接种于无菌苗培养和扩繁培养基 MS1 上,半个月左右可萌发多个绿芽,并逐渐抽茎长叶,1 个月左右将高约 2 cm 的芽切割后接于培养基上进行扩繁,待获得足够多的无菌苗后,将其接于生根培养基 MS5 上进行生根培养,可获得叶大、生长健壮的枸杞生根无菌苗,培养温度为 (25±2)℃,日光灯光源,光照强度 3 000 lx,每天光照 10 h。

1.2.3 病原菌粗毒素液对愈伤组织生长的影响 将“宁杞 1 号”枸杞的无菌苗叶片切成 0.5 cm×0.5 cm 的小块,接于愈伤组织诱导培养基 MS2 上,培养 21 d 后将获得的愈伤组织分别转接于含 10%、20%、30%、40%、50%、60%浓度粗毒素液的愈伤组织继代培养基 MS3 上,每瓶接大小均匀的 8 块愈伤组织,每个处理统计 6 瓶,以不加粗毒素液的培养基为对照,培养 21 d 后,用天平称量每个处理的各瓶的愈伤组织鲜重,求出相对生长量,并统计愈伤组织存活率和观察愈伤组织生长状态。培养条件同 1.2.2。愈伤组织鲜重相对生长量 (g/g FW)=(培养后愈伤组织鲜重-原鲜重)/原鲜重。

1.2.4 多步正选择法中不同浓度病原菌粗毒素液对愈伤组织生长的影响 同 1.2.3 的方法,将诱导获得“宁杞 1 号”枸杞叶片愈伤组织,再采用多步正选择法逐级加压筛选。培养基采用愈伤组织继代培养基 MS3,培养基中粗毒素液浓度梯度设为 0、10%、20%、30%、40%、50%、60%,每个浓度统计 6 瓶,每瓶接大小均匀的 8 块愈伤组织,每个梯度下培养 3 周后,选择生长状态较好的愈伤组织再转接于高一梯度的含毒培养基上。观察每个浓度下愈伤组织生长状态,采用 1.2.3 的方法,统计计算愈

伤组织存活率和相对生长量。培养条件同 1.2.2。

1.2.5 病原菌粗毒素液对愈伤组织分化的影响 同 1.2.3 的方法,将诱导获得“宁杞 1 号”枸杞叶片愈伤组织,再分别转接于含 10%、20%、30%、40%、50%浓度粗毒素液的分化培养基 MS4 上,每瓶接大小均匀的 8 块愈伤组织,每个处理统计 5 瓶,以不加粗毒素液的培养基为对照,培养 30 d 后,统计愈伤组织存活率、愈伤组织分化率、每块愈伤组织平均得苗数及观察不定芽的生长状态。培养条件同 1.2.2。愈伤组织存活率%=(成活的愈伤组织块数/接种的愈伤组织块数)×100,愈伤组织分化率%=(分化成苗的愈伤组织块数/接种的愈伤组织块数)×100,每块愈伤组织平均得苗数=分化产生不定芽的数目/接种的愈伤组织块数。

## 2 结果与分析

### 2.1 病原菌粗毒素液对愈伤组织生长的影响

由表 1 可知,枸杞愈伤组织在不含毒素的培养基上,生长迅速,生长状态良好,存活率 100%,鲜重相对生长量为 2.15 g/g FW,而在含毒素的培养基上,随着粗毒素液浓度的逐渐增大,愈伤组织生长速度变慢、存活率降低、逐步褐化。在粗毒素液浓度为 10%时,愈伤组织鲜重相对生长量为 1.93 g/g FW,愈伤组织存活率为 88%,当粗毒素液浓度高于 30%后,愈伤组织相对生长量和存活率均迅速下降,至粗毒素液浓度为 50%时,愈伤组织存活率和相对生长量分别降至 13%和 0.11 g/g FW,浓度为 60%时,愈伤组织全部死亡。可见,枸杞炭疽病原菌粗毒素对枸杞愈伤组织的生长具有一定的抑制作用,致死浓度为 60%,在 10%~50%浓度范围内,愈伤组织均有一定的相对生长量,说明有新的抗性愈伤组织产生,可把浓度 50%作为筛选抗性细胞系的上限浓度。

表 1 不同浓度病原菌粗毒素液对愈伤组织生长的影响

Table 1 Effects of different concentrations of crude toxin on the growth of callus of *Lycium barbarum* L.

粗毒素浓度 /(%) (v/v)	鲜重相对生长量 /g·g <sup>-1</sup> FW	愈伤组织存 活率/%	愈伤组织生长状况
0	2.15	100	愈伤组织淡绿色,松散,生长迅速
10	1.93	88	愈伤组织淡绿色,松散
20	1.81	75	愈伤组织暗黄色,较松散
30	1.45	63	愈伤组织黄白色
40	0.42	25	大部分愈伤组织呈黄褐色,较致密
50	0.11	13	只有个别愈伤组织存活, 其它呈深褐色,死亡
60	0	0	愈伤组织呈黑色,死亡

### 2.2 多步正选择法中不同浓度病原菌粗毒素液对愈伤组织生长的影响

采用多步正选择法,逐级提高粗毒素液浓度对愈伤组织生长的影响见表 2。与表 1 相同,随浓度的增大,愈

伤组织的相对生长量、存活率均呈下降趋势,长势也逐渐衰弱、逐步褐化,生长状态也由松散颗粒状渐渐变得较为致密,直至在高浓度时褐化死亡。但表1与表2相比,经过由低到高的选择压力逐级筛选后,在相同浓度下,愈伤组织的鲜重相对生长量和生长状态均好于未经逐级筛选的愈伤组织,在浓度 $\leq 40\%$ 时,随浓度的逐步增加,这种趋势越发明显,如在 $10\%$ 浓度下,逐级筛选试验中愈伤组织鲜重相对生长量、成活率及长势与表1中基本一致;至 $20\%$ 浓度时,与表1同一浓度下未经筛选相比,愈伤组织鲜重相对生长量和存活率分别增加了 $0.05\text{ g/g FW}$ 和 $4\%$ ,及至 $30\%$ 、 $40\%$ 浓度,增长幅度越来越大,在 $40\%$ 浓度下,2个指标已分别增加了 $0.16\text{ g/g FW}$ 和 $14\%$ 。但在毒素浓度达到 $50\%$ 后,增加幅度降低,推测可能随浓度的增加,毒素对愈伤组织细胞的毒

表2 逐级提高毒素液浓度对枸杞愈伤组织生长的影响

Table 2 Effects of different concentrations of crude toxin on the growth of calli of *Lycium barbarum* L.

粗毒素浓度 /(%)	鲜重相对生长量 / $\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$	愈伤组织存 活率/%	愈伤组织生长状况
0	2.14	100	愈伤组织绿色,松散呈颗粒状,生长迅速
10	1.94	90	愈伤组织淡绿色,松散
20	1.86	79	愈伤组织黄绿色,松散
30	1.59	68	愈伤组织黄色,较松散
40	0.58	39	愈伤组织基本呈黄白色,较松散,稍致密
50	0.14	22	愈伤组织呈淡褐色,较致密
60	0.05	0	愈伤组织呈黑褐色,死亡

表3 枸杞炭疽病原菌粗毒素液对叶片愈伤组织分化的影响

Table 3 Effects of different concentrations of crude toxin on differentiation frequency of leaves calli of *Lycium barbarum* L.

粗毒素浓度 /(%)	愈伤组织 分化率/%	每块愈伤组织平均 得苗/个·块 <sup>-1</sup>	愈伤组织 存活率/%	不定芽生长状态
0(CK)	95.0	5.7	100.0	不定芽健壮,绿色,每块愈伤组织上出现的绿色芽点多且多数可分化成绿芽
10	80.0	1.6	82.5	不定芽较健壮,淡绿色,每块愈伤组织上出现的绿色芽点大多数可分化成绿芽
20	47.5	0.5	75.0	不定芽生长正常,长势较弱,存活愈伤组织上出现的绿色芽点少,可分化成绿芽
30	20.0	0.2	57.5	芽尖萎蔫,或分化苗玻璃化,停止生长,存活愈伤组织上出现的绿色芽点很少,可分化成绿芽
40	7.5	0.1	17.5	芽尖褐化干枯、停止生长,存活愈伤组织上出现的绿色芽点极少
50	0	0	12.5	存活愈伤组织上的极少数芽点不能正常分化,无不定芽产生

注:愈伤组织存活率%=(成活的愈伤组织块数/接种的愈伤组织块数) $\times 100$ ;愈伤组织分化率%=(分化成苗的愈伤组织块数/接种的愈伤组织块数) $\times 100$ ;每块愈伤组织平均得苗数=分化产生不定芽的数目/接种的愈伤组织块数。

Note: Rate of living calli was defined as the number of living calli as the percentage of the number of inoculated calli. Rate of differentiation of calli was defined as the number of regeneration of calli as the percentage of the number of calli planted. Average numbers of shoots per callus were defined as the number of shoots regenerated of per callus planted.

### 3 讨论与结论

自 Scheffer 等<sup>[5]</sup>1972 年报道寄主专化性毒素与病程和抗病性有关,寄主对病原菌的抗性及其毒素耐性之间具有一致性的关系,并利用专化性毒素代替活菌进行抗病品种的选育和抗病性鉴定以来,利用致病毒素来筛选抗病细胞突变体的研究就陆续开展起来。已知至少有 83 种真菌病原和 19 种细菌病原,在侵入寄主细胞时,会分泌致病毒素来破坏寄主细胞,这些病原毒素一般为非酶物质,包括糖苷、萜类、酚类及氨基酸类似物等多种

害作用越来越大,越来越接近其耐受程度,较大程度地降低了细胞对粗毒素的抵抗能力。当毒素浓度达到 $60\%$ 时,与未经逐级筛选相比,愈伤组织虽然有很低的鲜重相对生长量,但最终褐化死亡,因此仍应该把浓度 $50\%$ 作为筛选抗性细胞系的上限浓度。

#### 2.3 病原菌粗毒素液对枸杞叶片愈伤组织分化的影响

由表3可知,粗毒素液对愈伤组织的分化有一定的抑制作用,随着粗毒素液浓度的增大,愈伤组织的存活率、分化率、每块愈伤分化绿芽点数、分化苗数均降低,不定芽的生长状态也改变。当毒素浓度为 $10\%$ 时,愈伤组织的分化率和存活率分别为 $80.0\%$ 、 $82.5\%$ ,每块愈伤组织的得苗数为1.6个,比毒素浓度为 $0\%$ 时显著降低;当浓度为 $40\%$ 时,愈伤组织的分化率和存活率已分别降为 $7.5\%$ 、 $17.5\%$ ,每块愈伤组织的得苗数已降为0.1个;浓度为 $50\%$ 时,虽有部分愈伤组织存活,但不定芽已不能正常形成。从不定芽的生长状态来看,当粗毒素液浓度为 $10\%$ 时,不定芽长势较健壮;当浓度为 $20\%$ 时,不定芽可以正常生长,但长势已较弱,每块愈伤组织上出现的绿色芽点较对照明显减少;当粗毒素浓度大于 $20\%$ 时,不定芽已开始不能正常生长,芽尖萎蔫,停止生长,直至干枯、死亡。同对愈伤组织生长的影响相比,粗毒素对不定芽分化的抑制作用更强,为了使不定芽正常生长,抗性愈伤组织变异系分化培养基中的粗毒素液含量应为 $20\%$ 。

化学物质<sup>[6]</sup>。随着组织培养、细胞培养和原生质体培养技术的日臻发展,目前利用病原菌毒素筛选抗病细胞突变体已在多种植物上获得成功,如:烟草(抗野火病)<sup>[7]</sup>、甘蔗(抗眼斑病)<sup>[8]</sup>、小麦(抗根腐病、赤霉病)<sup>[9-11]</sup>、棉花(抗黄萎病)<sup>[12]</sup>、水仙(抗叶大褐斑病)<sup>[13]</sup>、甜菜(抗褐斑病)<sup>[14]</sup>。在利用病原菌毒素作为选择剂时,前提条件是毒素是否含有致病因子,能否对愈伤组织的生长和分化有影响,而且需要确定合适的毒素筛选压力以及筛选方法,这样才能保证利用毒素筛选出的抗病突变体再生植株具有抗病性。目前利用病原菌毒素筛选植物抗病突

变体主要采用正选择法,包括一步筛选法和多步筛选法,一步筛选法是指所用的选择压足以一次性地消灭感病的对毒素敏感的细胞,留下抗毒素的细胞;多步选择法则采用分2~3次由低及高的选择压力来逐渐消灭正常型细胞。王敬驹<sup>[16]</sup>认为,一步筛选法有利于筛选单基因突变的细胞,而对于遗传背景不详且可能多基因的突变,用多步选择法可能更适用,因为有利于增加特定基因的拷贝数量,使那些稀少的变异不被丢失。枸杞是常异花授粉植物,长期采用单株选优的方法进行品种选育,造成遗传高度杂合,缺乏对亲本遗传背景的了解,因此采用多步选择系统较为合适。

该研究表明,在含不同浓度枸杞炭疽病菌培养滤液的培养基上,枸杞叶片愈伤组织存活率、相对生长量和分化率均随毒素浓度的增大而下降,愈伤组织的生长状态由淡绿色松散生长迅速,变为黄白色,直至变为黑色死亡;不定芽长势也由较为健壮,过渡到不能正常生长,芽尖萎蔫,停止生长,直至干枯、死亡,说明了枸杞炭疽病菌粗毒素具有较强的生物活性,含有致病因子,可以代替病原菌作为离体筛选枸杞抗炭疽病细胞突变体的选择剂。多步正选择法与一步正选择法相比,经过由低到高的选择压力逐级筛选后,在相同浓度下,愈伤组织的鲜重相对生长量和生长状态均好于一步选择法筛选的愈伤组织,但多步选择法不利的一面是容易使一些正常型细胞产生生理适应性,从而混存于突变细胞中,可以反复采用加压与去压交替的方法加以汰除,抗性细胞系筛选的上限浓度可定为浓度50%,抗性细胞变异系分化培养基中的粗毒素液含量可定为20%。此外,在试验中观察到由于愈伤组织呈堆积状,造成各细胞接触毒素不均一,造成未经选择或接触低浓度毒素的敏感细胞生长,因此,可采用逐级破碎扩增的方法,使尽可能多的愈

伤组织细胞接触到选择培养基,从而减少嵌合体的发生,提高选择效率。

### 参考文献

- [1] 邓放,王子权,朱士云,等.枸杞炭疽病侵染和发生规律的研究[J].吉林农业大学学报,1988,10(2):11-15.
- [2] 张锦秀,李岩涛,杨宝胜,等.枸杞炭疽病病原菌鉴定[J].内蒙古农业科技,1991(2):34.
- [3] 张锦秀,李岩涛,杨宝胜,等.枸杞炭疽病化学防治研究[J].内蒙古农牧学院学报,1993,14(1):31-34.
- [4] Park S K, Kim K C. Histopathology of *Colletotrichum gloeosporioides* on the Susceptible and Resistant Local-varieties of Chinese Matrimony Vine [J]. Korean Journal of Plant Pathology, 1988, 4(3): 226-233.
- [5] Schefer R P, Yoder O C. Host-Specific Toxin and Selective Toxicity. In: Phytotoxins in Plant Disease [M]. London: Academic Press, 1972: 251-272.
- [6] 孙敬,桂耀林.植物细胞工程实验技术[M].北京:科学出版社,1995:127-129.
- [7] Carlson P S. Methionine sulfoximine-resistant mutants of tobacco [J]. Science, 1973, 180: 1366-1317.
- [8] Larkin P J, Scowcraft W R. Somaclonal variation-a novel source of variability from cell culture for plant improvement [J]. Theor April Genet, 1981, 60: 197-214.
- [9] 郭丽娟,姚庆筱,胡启德,等.利用细胞工程技术筛选小麦抗根腐病突变体的研究[J].吉林农业大学学报,1988,10(2):11-15.
- [10] 孙光祖,王广金,陈义纯,等.小麦抗赤霉病突变体的选育及其变异研究[J].核农学报,1995,9(1):1-6.
- [11] 孙光祖,李忠杰,李希臣,等.小麦抗赤霉病突变体的选育及 RAPD 分子验证[J].核农学报,1999,13(4):202-205.
- [12] 姚明镜,张献龙,刘金兰,等.陆地棉黄萎病体细胞抗性突变体的筛选研究[J].棉花学报,1995,7(1):59-64.
- [13] 陈双雄,张永祥,蔡向群.离体筛选中国水仙抗叶大褐斑病突变体初步研究[J].亚热带植物科学,2002,31(1):25-27.
- [14] 马彪彪,张悦琴,吴则东.抗甜菜褐斑病体细胞无性系变异的研究[J].中国糖料,2001(1):1.
- [15] 王敬驹.植物生物技术[M].北京:科学出版社,1987:118-135.

## Effect of the Filtered Solution of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. on the Growth and Differentiation of Callus in *Lycium barbarum* L.

QU Ling<sup>1</sup>, SHI Zhi-gang<sup>1</sup>, JIAO En-ning<sup>1</sup>, LI Yan-long<sup>1</sup>, ZHANG Zong-shan<sup>2</sup>, CAO You-long<sup>1</sup>

(1. National Engineering Research Center of Wolfberry, Ningxia Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Yinchuan, Ningxia 750002; 2. Institute of Plant Protection, Ningxia Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Yinchuan, Ningxia 750002)

**Abstract:** The effect of the filtered solution of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. on the growth and differentiation of calli in *Lycium barbarum* L. were studied. The results indicated that the crude toxin had toxic effect and evidently inhibited the growth and differentiation of calli in *Lycium barbarum* L. *in vitro*. Compared with one-step screening system, the resistance of callus to *Lycium barbarum* L. toxin could be improved by increasing the concentration gradually in multi-step screening system. The toxin concentration of 50% could be considered as the selection pressure of resistant cell line and the concentration of 20% could be regarded as the screen concentration of differentiation of resistant cell line to *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.

**Key words:** *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.; culture filtrate; callus; selection method and pressure; toxic effect