

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2017.30427

公冶祥旭, 朱惠君, 李群, 李琰, 张兴. 除虫菊发状根的诱导及培养条件优化[J]. 植物科学学报, 2017, 35(3): 427-434

Gongye XX, Zhu HJ, Li Q, Li Y, Zhang X. Induction of hairy roots of *Pyrethrum cinerariifolium* Trey. and optimization of culture conditions [J]. *Plant Science Journal*, 2017, 35(3): 427-434

除虫菊发状根的诱导及培养条件优化

公冶祥旭^{1,2}, 朱惠君¹, 李群^{1,2}, 李琰^{1,2*}, 张兴²(1. 西北农林科技大学生命科学学院, 陕西杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学无公害农药研究服务中心/
陕西省生物农药工程技术研究中心, 陕西杨凌 712100)

摘要: 以除虫菊 (*Pyrethrum cinerariifolium* Trey.) 无菌苗为外植体, 研究除虫菊发状根的诱导、培养条件优化, 并对发状根中的除虫菊素进行检测和生物活性测定。结果显示, 乙酰丁香酮能促进除虫菊下胚轴和子叶发状根的诱导, 当乙酰丁香酮浓度为 150 $\mu\text{mol/L}$ 时除虫菊下胚轴和子叶的诱导率为对照的 2.29 倍和 2.66 倍, 预培养 6 d 时, 下胚轴发状根诱导率为对照的 2.25 倍, 发根农杆菌 A4 的诱导率均高于 ATCC15834, 愈伤组织较适合发状根的诱导, 愈伤组织感染后适合在无激素的 MS 培养基上进行发状根诱导, 250 mL 三角瓶中添加 50 mL MS 培养基较适合发状根的生长。对除虫菊发状根进行 PCR 检测发现, 发根农杆菌含有的 Ri T-DNA 的 *rolB* 基因已整合进入发状根基因组中。通过 GCMS 检测发现, 愈伤组织中除虫菊素的 6 种成分均未检测到, 而发状根中检测到瓜菊素 I、茛菊素 I 和茛菊素 II 3 种成分, 发状根对粘虫的拒食作用明显优于愈伤组织。本研究为通过组织培养方式生产除虫菊素奠定了基础。

关键词: 除虫菊; 发根农杆菌; 发状根; 除虫菊素; 培养条件优化

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2017)03-0427-08

Induction of hairy roots of *Pyrethrum cinerariifolium* Trey. and optimization of culture conditions

Gongye Xiang-Xu^{1,2}, Zhu Hui-Jun¹, Li Qun^{1,2}, Li Yan^{1,2*}, Zhang Xing²

(1. College of Life Science, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Research and Development Center of Biorational Pesticide, Northwest A & F University / Shaanxi Province Technology and Engineering Center of Biopesticide, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Inoculation of *Pyrethrum cinerariifolium* Trey. as an explant was carried out to study the induction of the hairy roots, optimization of culture conditions, detection of pyrethrin in the hairy roots, and determination of biological insecticidal activity. Results showed that acetosyringone promoted hairy root induction of the hypocotyls and cotyledons of *P. cinerariifolium*; when the concentration of acetosyringone was 150 $\mu\text{mol/L}$, the inductivities of the hypocotyls and cotyledons were 2.29 and 2.66-fold greater than the contrast control, and after pre-culture for 6 d, the inductivity of the hypocotyls was 2.25-fold greater than the control contrast. The inductivity of A4 was higher than that of ATCC15834. Callus was suitable for inducing hairy roots; after infection, the callus was suitable for inducing hairy roots in the MS medium without hormones, but the addition of 50 mL of MS medium to a 250 mL Erlenmeyer flask was more suitable for the growth of hairy roots. PCR detection showed that the *rolB* gene

收稿日期: 2016-09-08, 退修日期: 2016-10-25。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31272110); 国家高技术研究发展计划(863)项目子课题(2011AA10A202)。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31272110) and National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (2011AA10A202)。

作者简介: 公冶祥旭(1993-), 男, 硕士研究生, 主要从事植物组织培养及次生代谢研究(E-mail: mac00@nwsuaf.edu.cn)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: ly2659@163.com)。

in the Ri T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* was integrated in the genome of the hairy roots. The GCMS detection results showed that the six components of pyrethrin were not detected in the callus, but cinerin I, jasmolin I, and jasmolin II were detected in the hairy roots. The antifeedant effect of the hairy roots on *Mythimna separata* was obviously better than that of the callus. This study lays the foundation for the production of pyrethrins through tissue culture.

Key words: *Pyrethrum cinerariifolium* Trey.; *Agrobacterium rhizogenes*; Hairy roots; Pyrethrins; Optimization cultural conditions

除虫菊 (*Pyrethrum cinerariifolium* Trey.) 是菊科的一种多年生草本植物, 其花具有杀虫活性, 种植面积宽广, 市场需求量大, 和鱼藤 (*Derris trifoliata* Lour.)、烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 一起被认为是世界上 3 大植物源杀虫植物之一^[1-3]。除虫菊中具有杀虫活性的成分为除虫菊素, 除虫菊素在空气中和光照条件下不稳定, 会很快失去杀虫活性^[4,5], 在自然界中极易降解、无持效性, 可以减少对环境的污染等优点, 使得除虫菊素成了化学杀虫剂的替代品。由于哺乳动物体内有能将天然除虫菊分解的酶, 因此它在哺乳动物体内不会残留, 对哺乳动物低毒。天然除虫菊素为混合杀虫剂, 由 6 种成分组成, 因而昆虫很难对其产生抗药性, 被人们广泛接受为无公害的环境和协性农药^[6-8]。近年来, 随着人们对无公害有机农产品需求的提高, 生物源农药的用量进一步提升, 天然的除虫菊无法满足市场对除虫菊素的需求, 而除虫菊素主要存在于除虫菊的花中, 在干花中含量仅有 0.6%~1.4%, 使得获得除虫菊素的成本大幅度提高, 导致除虫菊素的传统生产已逐渐赶不上市场的需求^[9-11]。为了提高除虫菊素的产量, 满足市场需要, 通过组织培养等方式生产除虫菊素已成为解决这一问题的方向^[12-15]。由于除虫菊素主要在花中形成, 且见光容易分解等原因, 给生物合成带来了一定的难度。Bretler 等^[16]用除虫菊愈伤组织建立了悬浮细胞系, 虽然该细胞系生长速度较快, 但却不能产生除虫菊素; Chumsri 等^[17]在诱导形成的除虫菊愈伤组织中也检测不到除虫菊素; Barthomeuf 等^[18]研究发现无论除虫菊愈伤组织外植体来源如何, 除虫菊素含量都极低; Fujii 等^[19]和 Zieg 等^[20]在愈伤组织分化形成的芽中发现了除虫菊素的 6 个成分, 但由于大规模的幼芽培养还不具可行性, 所以一直未能进行工业化生产。可见, 一定的器官分化对于通过组织培养方式生产除虫菊素是有希望的。我们通

过组织培养手段从有一定器官分化的除虫菊发状根入手, 经发状根的诱导、培养条件优化、除虫菊素的检测及愈伤组织和发状根对粘虫的拒食活性等实验, 探讨通过组织培养方式生产除虫菊素的可能性。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

利用李琰等^[21]的方法获得除虫菊无菌苗及愈伤组织。愈伤组织连续继代培养 3 代, 稳定后备用。

粘虫 (*Mythimna separata* Walker) 由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心养虫室提供, 挑选生长发育状态一致的健康 3 龄初期幼虫供试。

发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) A4 和 ATCC15834 均由无公害农药研究服务中心提供。

1.2 实验方法

1.2.1 发状根的诱导

发根农杆菌 A4 和 ATCC15834 菌液的制备参照文献[22]的方法进行。

(1) 选取除虫菊无菌苗的根、下胚轴和子叶 3 种外植体, 在 MS 附加 1.0 mg/L 2,4-D 和 0.5 mg/L KT 的培养基上预培养 6 d, 然后分别放在乙酰丁香酮 (AS) 浓度分别为 0、30、60、100、150、200、250 $\mu\text{mol/L}$ 的发根农杆菌菌液中, 每个外植体材料数量不低于 50 个, 每个均侵染 5 min, 吸干菌液后放回原培养基上暗培养 3 d, 用于不同浓度 AS 对除虫菊外植体发状根诱导实验。(2) 选取除虫菊无菌苗的根、下胚轴和子叶 3 种外植体, 在 MS 附加 1.0 mg/L 2,4-D 和 0.5 mg/L KT 的培养基上分别预培养 0、1、3、6、10 d, 然后用 150 $\mu\text{mol/L}$ AS 菌液侵染 5 min, 吸干菌液后放回原培养基上暗培养 3 d, 用于不同预培养时间

对除虫菊外植体发状根诱导实验。(3)选取对数期生长旺盛的愈伤组织分别在 A4 和 ATCC15834 菌液中侵染 10 min, 吸干表面的菌液, 再放回原培养基和 MS 无激素培养基上暗培养 3 d, 用于不同菌株在不同培养基上对除虫菊愈伤组织发状根诱导实验。

待外植体周围有菌斑长出, 从共培养的培养基中取出外植体和愈伤组织, 用无菌水清洗, 吸干水分, 转移到 MS 附加 500 mg/L 头孢噻肟钠培养基上继续暗培养, 每 5 d 转接 1 次, 逐次降低抗生素浓度直至无菌, 将除菌完全、生长快速的发状根转接于无激素的 MS 固体培养基上, 自然光照培养。每 20 d 继代 1 次。外植体在除菌培养基培养 30 d, 计算诱导率。发状根诱导率 = (产生发状根的外植体数/接种的外植体数) × 100%。上述各实验每个处理接种 3 瓶, 每瓶至少接种 10 个外植体。

1.2.2 发状根的 PCR 鉴定

以 *rolB* 基因为检测目标, 上、下游引物分别为 5'-GAA GGT GCA AGC TAC CTC TC-3' 和 5'-GCT CTT GCA GTG CTA GAT TT-3'^[23]。分别提取除虫菊下胚轴、子叶和愈伤组织诱导的发状根以及 Ri 质粒、未转化植株根系的 DNA 为模板, 进行 PCR 检测。扩增条件为: 94℃预变性 3 min, 94℃变性 1 min, 53.5℃退火 1 min, 72℃延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72℃延伸 6 min。PCR 反应结束后, 电泳分离, 于紫外灯下观察结果并照相。

1.2.3 发状根培养条件的优化

不同培养基对除虫菊发状根生长的影响实验分别选取 MS、B5、6,7-V、WPM、White 共 5 种培养基; 不同装液量对除虫菊发状根生长的影响实验分别设置 30、50、70、100、120 mL 共 5 个处理; 选用 250 mL 三角瓶每瓶装液 50 mL (除不同装液量实验), 选用 MS 培养基 (除不同培养基实验), 每瓶接种 5 g 新鲜发状根, pH 值为 5.8, 培养室温度为 (25 ± 1)℃, 摇床转速 80 r/min, 每个处理至少重复 3 次。黑暗培养 30 d 后收获发状根, 每次收获时将摇瓶中发状根倒入布氏漏斗中减压抽滤, 用适量去离子水洗去残留培养基, 于 50℃烘箱干燥至恒重, 计算发状根增长量。发状根增长量计算公式为: 增长量 = 收获

量/瓶 - 接种量/瓶。

1.2.4 发状根提取物中除虫菊素含量检测

将烘干至恒重的除虫菊发状根研磨, 过 200 目筛, 称取 0.2 g, 加入丙酮 8 mL 超声波震荡 30 min, 9000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 重复 3 次, 合并 3 次提取液减压浓缩得浸膏并用丙酮定容, 置 4℃冰箱备用。

采用 TRACE GC ULTRA-POLARISQ 型气质联用仪测定除虫菊素的含量, 除虫菊素标准品 (产品批号: 160-25971) 由日本 Wako 公司提供。操作条件为:

(1)GC 条件: 80℃保持 1 min, 5℃/min 梯度上升至 230℃, 保持 7 min, 5℃/min 梯度上升至 280℃, 保持 8 min。进样口温度: 250℃; 载气 (高纯氮) 流量 1.6 mL/min; 分流比 50:1。色谱柱: DB-1 (30 m × 0.32 mm × 0.25 mm) 弹性毛细管石英柱。

(2)MS 条件: EI 源; 源温 200℃; 电子能量 70 eV; 传输线温度 250℃; 发射电流 300 μA; 电子倍增器电压 350 V; 扫描范围 50 ~ 550 m/z; 扫描时间 0.45 s; 扫描间隔 0.05 s。

1.2.5 愈伤组织和发状根的拒食活性测定

除虫菊愈伤组织和发状根对粘虫的拒食作用采用小叶碟添加法^[24,25], 提取物用丙酮稀释成 10、25、50、100 mg/mL 的溶液, 以丙酮为对照, 连续饲喂 72 h, 重复 3 次, 每个重复饲喂 20 头试虫。实验结果用 Visual Basic 6.0 程序求出拒食中质量浓度 AFC₅₀ 和拒食毒力曲线^[26]。

2 结果与分析

2.1 除虫菊发状根的诱导

2.1.1 不同浓度乙酰丁香酮 (AS) 对除虫菊外植体发状根诱导的影响

不同浓度 AS 对除虫菊发状根的诱导影响较大, 根在不添加 AS 时其发状根诱导率达到 100%, 随着 AS 浓度的增大诱导率逐渐下降 (图 1)。而适当浓度的 AS 能明显促进下胚轴和子叶发状根的诱导, 随着 AS 浓度的增大诱导率明显升高, 当 AS 浓度为 150 μmol/L 时下胚轴和子叶的诱导率最高, 为对照的 2.29 和 2.66 倍, 之后随着浓度的继续升高诱导率逐渐下降。

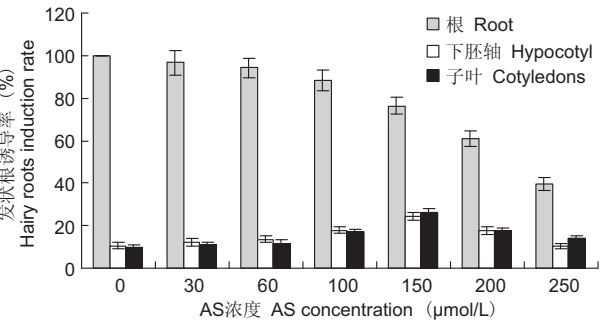


图 1 不同浓度乙酰丁香酮对不同外植体发状根诱导的影响
Fig. 1 Effects of different concentrations of acetosyringone and explants on hairy root induction

2. 1. 2 不同预培养时间对除虫菊发状根诱导的影响

于农杆菌侵染外植体之前对不同外植体进行预培养时发现，不同预培养时间对除虫菊发状根诱导的影响差异较大(图 2)，根未经过预培养时其发状根诱导率达到 100%，随着预培养时间的延长发状根诱导率逐渐下降。而适当的预培养时间能明显促进下胚轴和子叶发状根的诱导，随着预培养时间的延长，诱导率明显升高，当预培养 6 d 时，除虫菊下胚轴的发状根诱导率最高，为对照的 2.25 倍；子叶发状根没有做预培养处理和做了预培养 6 d 的诱导率差异不显著，但在预培养 10 d 时显著下降。根、下胚轴和子叶在预培养 10 d 时，伤口均有不同程度的愈伤组织形成，显著抑制了发状根的诱导。

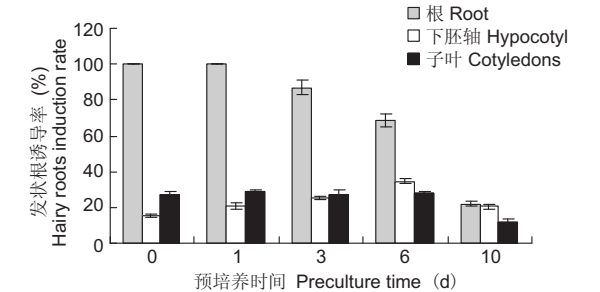


图 2 预培养时间对不同外植体发状根诱导的影响
Fig. 2 Effects of preculture time and explants on hairy root induction

2. 1. 3 不同菌株在不同培养基上对除虫菊愈伤组织进行发状根的诱导

发根农杆菌 A4 和 ATCC15834 在 MS、MS + 150 μmol/L AS、MS + 1.0 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L KT 三种培养基上对除虫菊愈伤组织进行侵染时发现，A4 的诱导率均高于 ATCC15834(图 3)，2

种农杆菌在侵染时是否添加 AS 其发状根诱导率差异均不明显，而在侵染后放回原培养基(培养基中添加 1.0 mg/L 2,4-D 和 0.5 mg/L KT)进行共培养时愈伤组织继续膨大，在诱导 25 d 以后，仅少数愈伤组织上有零星发状根长出，诱导率明显下降，而在无添加植物生长调节剂的培养基上愈伤组织体积不再增大，20 d 后白色、簇状发状根开始慢慢形成，每块愈伤组织上发状根的数量也明显增多，这可能是植物生长调节剂促进了愈伤组织的生长，而抑制了发状根的形成。

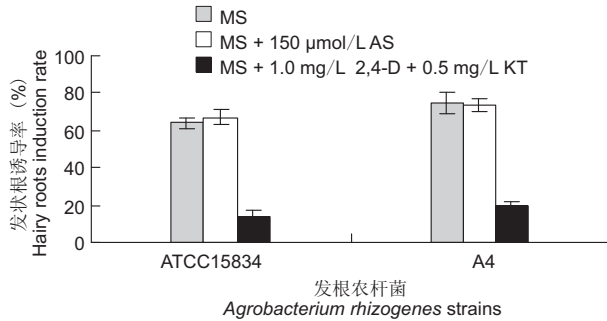


图 3 不同菌株在不同培养基上对愈伤组织发状根的诱导
Fig. 3 Effects of different *Agrobacterium rhizogenes* strains and media on hairy root induction

2. 2 除虫菊发状根的鉴定

从下胚轴、子叶发状根和愈伤组织诱导的发状根总 DNA 中扩增到期望的 423 bp 左右的特异性片段，该片段与作为阳性对照 Ri 质粒 DNA 中扩增出的特异性片段大小一致，而从未转化根系(正常根)提取的总 DNA 中扩增不到此片段(图 4)。这说明发根农杆菌含有的 Ri T-DNA 的 *rolB* 基因已整合进入除虫菊发状根基因组中。

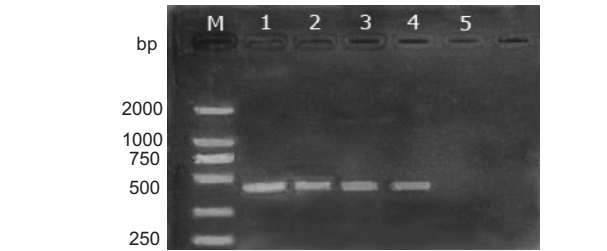


图 4 除虫菊发状根中 *rolB* 基因的 PCR 检测
Fig. 4 PCR detection of the *rolB* gene fragment in hairy roots of *Pyrethrum cinerariifolium*

2.3 除虫菊发状根培养条件的优化

2.3.1 不同培养基对发状根生长的影响

不同培养基对除虫菊发状根生长情况差异较大(图 5)，MS 培养基培养的发状根呈奶白色、粗壮，根长在 1.2 ~ 1.7 cm，增长量也最大。B5 培养基培养的发状根呈淡黄色，发根长度和增长量仅次于 MS 培养基。White 和 WPM 培养基上生长的发状根呈黄色，根长度在 0.5 ~ 1.0 cm，生长至 20 d 左右就停止生长并逐渐褐变。6,7-V 培养基接种的发状根随着培养时间的延长逐渐变短并愈伤化，形成愈伤后生长速度明显变慢，增长量只有 MS 的 33%。

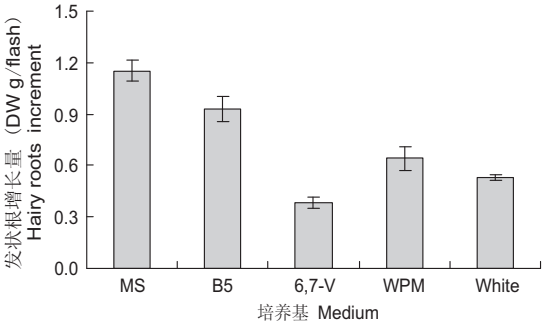


图 5 不同培养基对除虫菊发状根生长的影响
Fig. 5 Effects of different media on hairy root growth of *P. cinerariifolium*

2.3.2 不同装液量对除虫菊发状根生长的影响

除虫菊发状根生长过程中必须有一半左右暴露在培养基外，当发状根完全浸没在培养基中时会很快失去光泽，迅速停止生长。250 mL 三角瓶中不同体积培养基对除虫菊发状根生长的影响差异较大(图 6)，培养基体积在 70 mL 以下时，刚接种的

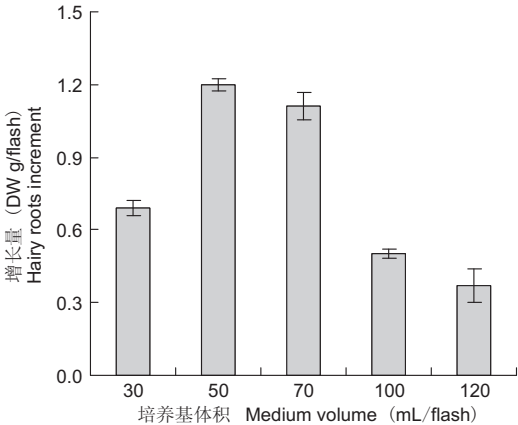


图 6 不同装液量对除虫菊发状根生长的影响
Fig. 6 Effects of different medium volumes on hairy root growth of *P. cinerariifolium*

发状根会有部分暴露在培养基外，随着培养基体积的增加刚接种的发状根被培养基浸没，发状根颜色变深，生长速度缓慢。收获时 50 mL 培养基中发状根增长量最大，为 100 mL 培养基的 2.4 倍；而 30 mL 培养基中的发状根尽管早期生长速度较快，但 20 d 后随着培养基消耗殆尽而停止生长。

2.4 除虫菊愈伤组织及发状根提取物的气质联用分析及生物活性检测

2.4.1 除虫菊发状根提取物气质联用分析

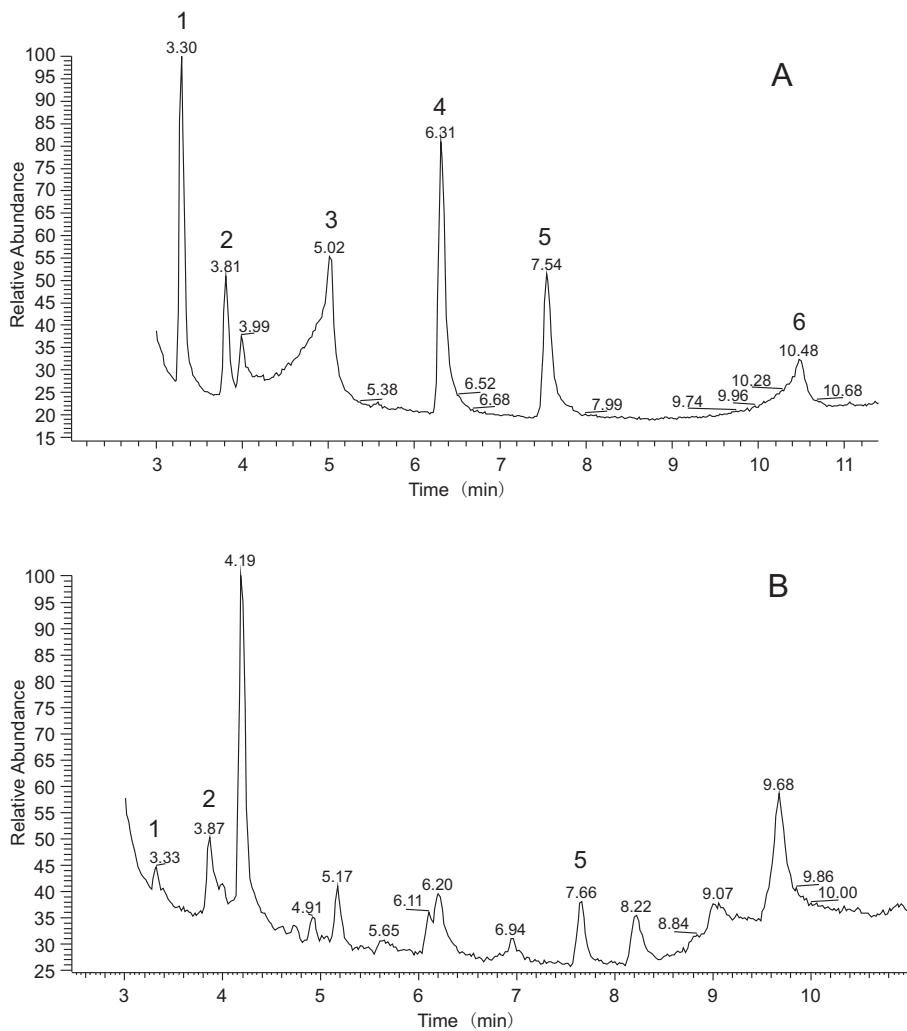
通过除虫菊素标准品和愈伤组织、发状根 GCMS 图谱的离子碎片分子质量库比对，从发状根中检测到瓜菊素 I、茛菊素 I 和茛菊素 II 3 种成分(图 7)，而在愈伤组织图谱中均未检测到除虫菊素的 6 种成分。

2.4.2 除虫菊愈伤组织及发状根对粘虫幼虫的拒食活性

采用小叶碟添加法测定了除虫菊愈伤组织及发状根对粘虫幼虫的拒食作用，发现愈伤组织及发状根对粘虫幼虫均具有较高的拒食作用(表 1)，试虫在处理 12 h 后就表现出明显的拒食作用，并随着处理时间的延长，拒食活性也逐渐增强，而对发状根的拒食作用明显优于愈伤组织，处理后 12、24、48 h 的 AFC₅₀ 值分别下降 50%、49%和 43%。

3 讨论

早在 20 世纪 70 年代就有关于除虫菊组织培养的研究报道^[27-29]，除虫菊的组织培养研究虽然起步较早，但由于除虫菊素见光容易分解，给生物合成工作带来了一定的困难，因此，通过组织培养手段生产除虫菊素的研究进展极其缓慢。我们在前期的研究中发现，无论以除虫菊的何种外植体，甚至以花为外植体诱导形成的愈伤组织及建立的悬浮细胞系均未检测到除虫菊素。齐静静等^[30]对除虫菊组培苗进行培养时发现，培养至第 4 代时除虫菊素含量就明显开始下降，第 5 代组培苗就表现出植株矮化、枝叶纤细、生长缓慢等退化现象，这给通过组培苗生产除虫菊素带来了一定的困难。因此，我们通过发根农杆菌侵染除虫菊外植体诱导产生发状根，试图通过发状根培养生产除虫菊素。本实验结果表明，通过无菌苗的根、子叶、下胚轴以及愈伤组织均可诱导获得发状根，但无菌苗的根、子叶、下胚轴诱导形成的发状根比较分散、生长缓慢、



1: 瓜菊素 I; 2: 茛菊素 I; 3: 除虫菊素 I; 4: 瓜菊素 II; 5: 茛菊素 II; 6: 除虫菊素 II。
1: Cinerin I; 2: Jasmolin I; 3: Pyrethrin I; 4: Cinerin II; 5: Jasmolin II; 6: Pyrethrin II.

图 7 标准品 (A) 和发状根样品 (B) 的 GCMS 图
Fig. 7 GCMS chromatograms of standard (A) and hairy root samples (B)

表 1 除虫菊愈伤组织及发状根对粘虫幼虫的拒食作用

Table 1 Effect of antifeedant activity of callus and hairy roots of *P. cinerariifolium* on the larvae of *Mythimna separata*

| 供试样品 Test samples | 时间 Time (h) | 回归方程 AFC-P | 拒食中质量浓度 AFC ₅₀ (mg/mL) | 95%置信区间 95% F.L. (mg/mL) | 相关系数 <i>r</i> |
|----------------------|-------------------|------------------------|---|--------------------------------|------------------|
| 愈伤组织 Callus | 12 | $y = 2.0154 + 1.9104x$ | 36.5015 | 1.692 ~ 49.154 | 0.9860 |
| | 24 | $y = 2.3062 + 1.7718x$ | 33.1377 | 1.657 ~ 45.388 | 0.9920 |
| | 48 | $y = 2.2431 + 1.8155x$ | 32.9972 | 1.653 ~ 44.953 | 0.9786 |
| 发状根 Hairy roots | 12 | $y = 2.5829 + 1.9194x$ | 18.1668 | 1.424 ~ 26.565 | 0.9764 |
| | 24 | $y = 2.5561 + 2.0193x$ | 16.2284 | 1.382 ~ 24.085 | 0.9777 |
| | 48 | $y = 2.8679 + 1.8504x$ | 14.1987 | 1.354 ~ 22.601 | 0.9804 |

活力较差，继代培养后不容易成活，而愈伤组织产生的发状根继代培养早期可以和愈伤组织一起培养，生长速度快，很容易成活，通过这种方法诱导的发状根已经在实验室连续培养2年，生长非常稳定。发状根与愈伤组织、悬浮细胞以及芽培养相

比，更易进行工业化生产，发状根诱导、培养的成功为通过组织培养方式生产除虫菊素奠定了基础。通过 GCMS 检测发现，在未检测到除虫菊素的愈伤组织诱导形成的发状根中检测到了瓜菊素 I、茛菊素 I 和茛菊素 II 3 种成分，且经过多次继代

培养后发状根生长速度和除虫菊素含量均较稳定, 但含量较低。可见, 要想通过除虫菊发状根培养实现工厂化生产除虫菊素, 还需在提高含量方面作进一步研究。

参考文献:

- [1] Chen ZM, Wang YH. Chromatographic methods for the determination of pyrethrin and pyrethroid pesticide residues in crops, foods and environmental samples[J]. *J Chromatogr A*, 1996, 754(1/2): 367–395.
- [2] Hitmi A, Bartomeuf C, Sallanon H. Cryopreservation of *Chrysanthemum cinerariaefolium* shoot tips. effects of pre-treatment conditions and retention of biosynthetic capacity. cryoletters[J]. *Cryo-Letters*, 1999, 20(20): 109–120.
- [3] 程喧生, 赵平, 于涌. 天然除虫菊[J]. 农药, 2005, 44(9): 391–394.
Cheng XS, Zhao P, Yu Y. Natural insecticidal pyrethrum [J]. *Chinese Journal of Pesticides*, 2005, 44(9): 391–394.
- [4] 刘雨晴, 赵天增, 董建军, 王伟, 陈荣峰. 天然除虫菊的研究及开发应用[J]. 河南科学, 2013(8): 1151–1155.
Liu YQ, Zhao TZ, Dong JJ, Wang W, Chen RF. Research and development of natural insecticidal pyrethrins [J]. *Henan Science*, 2013(8): 1151–1155.
- [5] 田梦, 陈凯歌, 曾鑫年, 夏李红. 光照对除虫菊素触杀毒力的影响[J]. 环境昆虫学报, 2011, 33(2): 180–184.
Tian M, Chen KG, Zeng XN, Xia LH. Influence of light exposure on the contact toxicity of prethyrins[J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2011, 33(2): 180–184.
- [6] 贝纳新, 高萍, 石承民, 田秀玲, 金亮. 植物源杀虫剂研究进展[J]. 沈阳农业大学学报, 2002, 33(4): 309–314.
Bei NX, Gao P, Shi CM, Tian XL, Jin L. Research advance in botanical insecticides [J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2002, 33(4): 309–314.
- [7] Hitmi A, Coudret A, Barthomeuf C. The production of pyrethrins by plant cell and tissue cultures of *Chrysanthemum cinerariaefolium* and *Tagetes* species [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2000, 35(5): 317–337.
- [8] Shafer TJ, Meyer DA, Crofton KM. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs[J]. *Environ Health Perspect*, 2005, 113(2): 123–136.
- [9] 李杰, 王彩云. 除虫菊主要农艺性状的相关及通径分析[J]. 云南农业大学学报: 自然科学版, 2013, 28(1): 44–51.
Li J, Wang CY. Correlation and path coefficient analysis on main agronomic traits of *Pyrethrum* [*Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch. Bip.][J]. *Journal of Yunnan Agricultural University: Natural Science Edition*, 2013, 28(1): 44–51.
- [10] 王平华, 李顺林, 谢庆华, 吴文伟, 张丽芳, 辜建平. 高含量除虫菊素品种——云除1号的研究[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2004, 26(5): 594–596, 61.
Wang PH, Li SL, Xie QH, Wu WW, Zhang LF, Gu JP. The research of myzus persicae sulzer a high pyrethrin content *Pyrethrum cinerariaefolium* Trev. Strain [J]. *Journal of Southwest Agricultural University: Natural Science Edition*, 2004, 26(5): 594–596, 61.
- [11] 俞宏渊, 曾令杰, 陈宗莲. 除虫菊开花特性与适宜采摘期[J]. 云南植物研究, 2000, 22(2): 181–186.
Yu HY, Zeng LJ, Chen ZL. Studies on the flowering characteristics and harvest time of *Pyrethrum cinerariifolium* [J]. *Acta Botanica Yunnanica*, 2000, 22(2): 181–186.
- [12] 李群, 温鹏飞, 雷嘉敏, 崔蕾, 李琰, 张兴. 培养基及培养条件对除虫菊细胞生长的影响[J]. 西北农业学报, 2014, 23(11): 157–162.
Li Q, Wen PF, Lei JM, Cui L, Li Y, Zhang X. Effects of basic media and culture conditions on cell growth of *Pyrethrum cinerariifolium* [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2014, 23(11): 157–162.
- [13] Banani D, Anania A. Effect of plant growth regulators on in vitro propagation of *Tagetes erecta* Linn: Review[J]. *Ind J Basic Appli Medical Res*, 2014, 3(4): 15–23.
- [14] Hitmi A, Sallanon H, Barthomeuf C. Cryopreservation of *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. cells and its impact on their pyrethrin biosynthesis ability[J]. *Plant Cell Rep*, 1997, 17(1): 60–64.
- [15] Laxman NS. In-vitro production of pyrethrins from ray florets of *Tagetes erecta* L. [J]. *World J Pharm Pharm Sci*, 2015, 4(7): 1983–1993.
- [16] Bretler H, Tramper J. Cell Suspensions of Compositae as a Source of Natural Biocides[M]. Robert R eds. Busy in Biotechnology: Proceedings of a Symposium, May 29. The Netherlands, 1985.
- [17] Chumsri P, Staba EJ. Pyrethrins: content and larvicidal activity of *Chrysanthemum* plants and tissue cultures[J]. *Acad Pharm Sci Abstr*, 1975, 5: 169–172.
- [18] Barthomeuf C, Adnane H, Philippe V, Alain C. Identification and assay of pyrethrins in *Chrysanthemum cinerariaefolium* calli[J]. *Biotechnol Tech*, 1996, 10(9): 639–642.
- [19] Fujii Y, Shimizu K. Regeneration of plants from achenes and petals of *Chrysanthemum coccineum*[J]. *Plant Cell Rep*, 1990, 8(10): 625–627.
- [20] Zieg RG, Zito SW, Staba EJ. Selection of high pyrethrin producing tissue cultures[J]. *Planta Medica*, 1983, 48(2): 88–91.
- [21] 李琰, 冯俊涛, 易晓华, 马泽旭, 郭小虎, 张兴. 除虫菊愈伤组织诱导研究[J]. 西北农业学报, 2007, 16(6): 217–221.
Li Y, Feng JT, Yi XH, Ma ZX, Guo XH, Zhang X. Study

- on callus induction of *Pyrethrum cinerariifolium* Trev [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2007, 16 (6): 217–221.
- [22] 吕经娟, 李淑斌, 周宁宁, 蹇洪英, 王其刚, 张颢, 唐开学. ‘光叶蔷薇’器官间接再生体系的建立及 GUS 基因转化的初步研究[J]. *植物科学学报*, 2014, 32(2): 139–147. Lü JJ, Li SB, Zhou NN, Jian HY, Wang QG, Zhang H, Tang KX. Callus induction and plant regeneration of *Rosa wichuraiana* ‘Basye’s thornless’ [J]. *Plant Science Journal*, 2014, 32(2): 139–147.
- [23] Triplett BA, Moss SC, Bland JM, Dowd MK. Induction of hairy root cultures from *Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense* to produce gossypol and related compounds[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2008, 44(6): 508–517.
- [24] 叶火春, 张静, 周颖, 肖建辉, 闫超, 冯岗. 山竹果皮提取物农药活性研究[J]. *热带农业科学*, 2016(2): 64–68. Ye HC, Zhang J, Zhou Y, Xiao JH, Yan C, Feng G. Pesticide activity of the extracts from the pericarp of *Garcinia mangostana* Linn. [J]. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 2016(2): 64–68.
- [25] 冯岗, 张静, 李修伟, 冯俊涛, 张兴. 小果博落回生物碱对几种农业害虫的生物活性[J]. *浙江大学学报: 农业与生命科学版*, 2008, 34(2): 187–192. Feng G, Zhang J, Li XW, Feng JT, Zhang X. Insecticidal activity of alkaloids from *Macleaya microcarpa* against several species of insect pests [J]. *Journal of Zhejiang University: Agriculture and Life Sciences*, 2008, 34(2): 187–192.
- [26] 冯岗, 李广泽, 冯俊涛, 张静, 刘霞, 张兴. Visual Basic 6.0 在农药毒力测定数据处理中的应用[J]. *西北农业学报*, 2005, 14(2): 115–117. Feng G, Li GZ, Feng JT, Zhang J, Liu X, Zhang X. Application of visual basic 6.0 in calculating of toxicity assay [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2005, 14(2): 115–117.
- [27] Cashyap MM, Kueh JH, Mackenzie IA, Pattenden G. *In vitro* synthesis of pyrethrins from tissue cultures of *Tanacetum cinerariifolium* [J]. *Phytochemistry*, 1978, 17(17): 544–545.
- [28] Grewal S, Sharma K. *Pyrethrum* plant (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.) regeneration from shoot tip culture [J]. *Indian J Exp Biol*, 1978, 17(3): 544–545.
- [29] Khanna P, Khanna R. Endogenous free ascorbic acid and effect of exogen ascorbic acid on growth and production of pyrethrins from *in vitro* tissue culture of *Tagetes erecta* L. [J]. *Indian J Exp Biol*, 1976, 14: 630–631.
- [30] 齐静静, 毛静, 胡昊, 李杰, 王彩云. 继代次数对除虫菊生长及其除虫菊酯质量分数的影响[J]. *云南农业大学学报: 自然科学版*, 2014, 29(2): 216–222. Qi JJ, Mao J, Hu H, Li J, Wang CY. The influence of subculture times on the growth and pyrethrins mass fraction of *Tanacetum cinerariifolium* (Trev.) Sch. Bip [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University: Natural Science Edition*, 2014, 29(2): 216–222.

(责任编辑: 张 平)