

贵州产灯盏细辛组织培养快速繁殖体系的建立^{*}

张洁, 毛春燕, 刘利利, 曾丽娜, 刘红美^{**}

(贵州医科大学 医药生物技术工程研究中心 & 生物与医学工程重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 贵州医科大学 生物与工程学院 生物技术教研室, 贵州 贵阳 550025)

[摘 要] 目的: 探讨贵州灯盏细辛组织培养快速繁殖体系的建立。方法: 贵州灯盏细辛种子为外植体获得无菌苗后, 以无菌苗的叶片和叶柄作为外植体, 添加不同浓度 6-苄基腺嘌呤(6-BA)、奈乙酸(NAA)于 Murashige & Skoog(MS)培养基中, 筛选出最适愈伤组织诱导和芽分化增殖的培养基; 再采用添加不同浓度的奈乙酸(NAA)和吲哚丁酸(IBA)于 MS 或 1/2 MS 中, 筛选出最适生根培养基。结果: 叶片不适合作为诱导愈伤的外植体, 最适宜叶柄愈伤组织诱导的培养基为 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L NAA; 最适宜不定芽分化增殖的培养基为 MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L NAA, 增殖倍数可达到 12; 最适宜生根的培养基为 1/2MS + 0.5 mg/L NAA + 0.8 mg/L IBA, 生根率可达 100%。结论: 本研究建立了贵州灯盏细辛的组织培养快速繁殖体系, 为规模化生产奠定基础。

[关键词] 组织培养技术; 灯盏细辛; 快速繁殖体系; 激素配比; 愈伤诱导; 分化增殖; 生根

[中图分类号] R282.2 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2020)03-0310-05

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2020.03.012

Establishment of Rapid Propagation System to Culture Herbal
Medicine *Erigeron breviscapus* in Guizhou Province

ZHANG Jie, MAO Chunyan, LIU Lili, ZENG Lina, LIU Hongmei

(Center of Medical Biotechnology Engineering Research & Key Laboratory of Biology and Medical Engineering,
Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; Department of Biotechnology, College of
Biology and Engineering, Guizhou Medical University, Guiyang, 550025, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To establish a rapid propagation system for *Erigeron breviscapus* tissue culture in Guizhou. Methods: The seeds of *E. breviscapus* were cultured to get sterile seedlings. The leaves and petioles of sterile seeding were sliced and added into Murashige & Skoog (MS) medium. 6-benzyladenine(6-BA) and α -naphthalene acetic acid(NAA) at different concentration were added to MS medium to optimize the most suitable medium for callus induction, bud proliferation. In addition, α -naphthalene acetic acid(NAA) and indole-3-butyric acid(IBA) at different concentration of were added to MS or 1/2 MS medium to screen the optimal medium for rooting. Results: The leaves were not suitable as callus-induced explants. The most optimal media were MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L NAA for petiole callus induction, MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L NAA for adventitious bud differentiation (the multiplication factor up to 12), 1/2 MS + 0.5 mg/L NAA + 0.8 mg/L IBA for rooting (the rooting rate up to 100%). Conclusion: This study establishes a rapid tissue culture system for *E. breviscapus* and provides a foundation for large-scale production.

[Key words] tissue culture techniques; *Erigeron breviscapus*; rapid propagation technology; hormone combinations; callus induction; differentiation and proliferation; rooting

^{*}[基金项目] 贵州医科大学医药生物技术工程研究中心(校工程中心 2016002); 贵州省教育厅项目[黔教合 KY 字(2018)088]; 贵州医科大学专创融合课程[校办发(2019)17-5]

^{**}通信作者 E-mail: hmlu@gmc.edu.cn

灯盏细辛[*Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand. - Mazz.]又名灯盏花,菊科飞蓬属,属多年生草本植物,主要分布于云南、贵州和四川等省^[1]。灯盏细辛亦是贵州民间及少数民族地区常用药材^[2],被收载于 2015 年版《中国药典》^[3]、《贵州中药资源》^[4]和《贵州省中药材、民族药质量标准》^[5],具有活血通络止痛、祛风散寒功能,临床上主要用于缺血性心脑血管病的治疗^[6-8],同时还可用于风湿、老年性痴呆、肾衰和糖尿病等疾病的治疗^[9-11],因此药材市场需求量大。由于过度采集挖掘,野生灯盏细辛已逐渐枯竭。植物组织培养技术具有繁殖快、周期短、不受外界因素限制和易管理等优势,是保护野生资源和解决药材供求矛盾的有效措施^[12]。目前,在灯盏细辛组织培养研究方面,学者们对不同外植体诱导效果、愈伤诱导影响因素以及快繁体系建立等方面进行了研究^[13-18],但这些研究报道均为云南产区灯盏细辛,且在培养基和激素配比的种类、浓度都有所差异,贵州产区灯盏细辛组织培养快速繁殖的相关研究还未见报道。贵州省亦是灯盏细辛的重要核心产区之一^[1,19],且灯盏细辛药材的有效药用成分含量高,质量优良^[20-23]。因此,本研究通过对贵州产区的灯盏细辛种子进行无菌播种、获取无菌苗后,采用不同激素配比的培养基对灯盏细辛离体培养过程中愈伤组织诱导、不定芽形成与增殖、壮苗生根移栽等的影响进行了系统研究,以期为贵州优质灯盏细辛种苗的快速繁殖提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 种子 从贵州省六盘水地区野外采集的灯盏细辛种子,由贵州医科大学生物技术教研室刘红美教授鉴定。

1.1.2 主要试剂和仪器 配制 Murashige&Skoog (MS)或 1/2 MS 培养基的化学试剂:琼脂、6-苄基腺嘌呤(6-benzyladenine, 6-BA)、奈乙酸(α-naphthalene acetic acid, NAA)、吲哚丁酸(indole-3-butyric acid, IBA)、甘氨酸、肌醇、烟酸、维生素 B₁、维生素 B₆ 及蔗糖均购于北京索莱宝科技有限公司,硝酸铵、硝酸钾、氯化钙、硫酸锰、磷酸二氢钾、硫酸锌、硼酸、碘化钾、钼酸钠、硫酸铜、氯化钴、乙二胺四乙酸二钠及硫酸亚铁均购于天津市致远化学试剂有限公司;LDZM-60L 立式压力蒸汽灭菌器购自

上海申安医疗器械厂,SW-CJ-1FD 型超净工作台购自苏州安泰空气技术公司。

1.2 方法

1.2.1 培养基及培养条件 以 MS 和 1/2MS 为基本培养基,添加不同浓度的激素(6-BA、NAA、IBA),具体浓度及培养基配方见表 1,所有培养基添加 3% 蔗糖和 0.9% 琼脂,pH 6.0~6.1,高压灭菌条件 121 ℃、25 min。培养条件为(25±2)℃、光照时间 13 h/d,光照强度 1 200 lx。

表 1 培养基编号和配方				
Tab. 1 Medium number and formulations				
培养基 编号	基础培 养基	6-BA/ (mg/L)	NAA/ (mg/L)	IBA/ (mg/L)
A1	MS	1.0	0.1	
A2	MS	1.0	0.1	
A3	MS	1.0	0.1	
A4	MS	2.0	0.2	
A5	MS	2.0	0.2	
A6	MS	2.0	0.2	
A7	MS	3.0	0.3	
A8	MS	3.0	0.3	
A9	MS	3.0	0.3	
B1	MS			
B2	1/2 MS		0.3	0.3
B3	1/2 MS		0.3	0.5
B4	1/2 MS		0.5	0.5
B5	1/2 MS		0.5	0.8

注:空格表示没有加该材料。

1.2.2 初代培养 将灯盏花种子用纱布包裹后扎好口,按常规冲洗干净后灭菌处理;用 75% 乙醇浸泡 0.5 min,无菌水冲洗 2 次,3% 次氯酸钠浸泡 2 min,无菌水冲洗 3 次,3% 次氯酸钠浸泡 3 min,将种子接种到不含激素的 1/2 MS 培养基上进行初代培养以获取无菌苗。

1.2.3 叶片和叶柄愈伤组织的诱导 将获得的生长健壮的无菌苗叶片切割成 0.5 cm×0.5 cm,叶柄切成长 1 cm 的小段,分别平放接种到添加不同浓度的 6-BA 和 NAA 的 A1~A9 培养基中;每种培养基接种 5 瓶,每瓶接种 3~5 个外植体,重复 3 次;培养 10 d 后观察愈伤组织的诱导生长情况,用“+”表示出现愈伤组织的体积,“+”越多表示愈伤体积越大。

1.2.4 不定芽的分化与增殖 将愈伤组织诱导分化的丛生芽切成单株接种于添加不同浓度的 6-BA 和 NAA 的 A1-A9 培养基中,接种要求同 1.2.3,培

养 20 d 后对不定芽的分化增殖与生长情况进行观察统计。

1.2.5 生根移栽 将培养后高 1.5 ~ 2.0 cm 的无根小苗转接到添加不同浓度的 NAA 和 IBA 的 B1 ~ B5 培养基中诱导生根,接种要求同 1.2.3,待组织培养苗根系生成、并长至合适长度后后进行炼苗移栽,室内放置 2 d,去封口膜,轻轻洗净苗根部培养基,移栽到高温灭菌后的泥土与珍珠岩 1:1 混合的基质中。

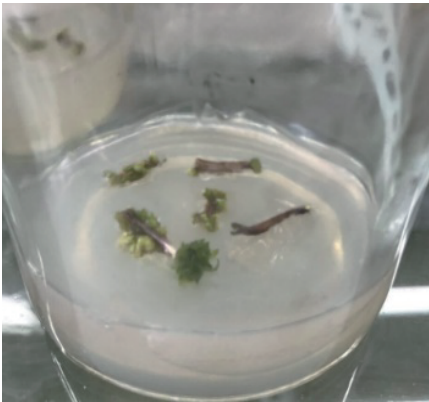
1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 对增殖倍数进行数据分析,结果采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$),数据分析采用单因素方差分析,两两比较采用最小显著性差异法 (least-significant difference, *LSD*), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 初代培养获取无菌苗

采用 2 次 3% 次氯酸钠的灭菌方法对种子进行灭菌,污染率为 10%;接种 6 d 左右,种子开始萌发,萌发率可达 65%。



10 d

2.2 叶柄愈伤组织的诱导与分化

叶柄诱导愈伤组织结果表明 A3 培养基愈伤诱导时间较短,10 ~ 15 d 就出现愈伤组织,20 d 后愈伤组织的体积较大,且新增芽点多,有利于下一步芽的诱导分化,故选择 A3 培养基 (MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L NAA) 为最适宜叶柄愈伤诱导的培养基。见表 2。

表 2 不同培养基对叶柄愈伤组织诱导的影响

Tab.2 Effect of different medium on callus inducement of *E. breviscapus* petiole

培养基	叶柄愈伤组织		
	出现时间/d	愈伤组织体积	后期分化
A1	10 ~ 15	++++	出现 1 ~ 2 个芽点
A2	10 ~ 15	++++	出现 1 ~ 3 个芽点
A3	10 ~ 15	++++	芽点较多,出现 4 ~ 8 个芽点
A4	15 ~ 20	++	未见芽点
A5	15 ~ 20	++	未见芽点
A6	15 ~ 20	++	未见芽点
A7	15 ~ 20	++	未见芽点,出现玻璃化
A8	15 ~ 20	+	未见芽点,出现玻璃化
A9	15 ~ 20	+	未见芽点,出现玻璃化

注: + 表示出现愈伤组织的体积,越多表示愈伤体积越大。



20 d

图 1 3 号培养基中不同时间叶柄愈伤组织诱导

Fig.1 The effect of No.3 medium on callus induction

2.3 叶片愈伤组织的诱导与分化

叶片接种于培养基后,早期均出现膨大、卷曲,颜色由深绿变成浅绿;培养至第 15 天时仅 A7 培养基中叶片上出现较小的突起;培养至第 20 天时所有培养基中的叶片均逐渐发黄,A3、A4、A7、A8 及 A9 培养基中出现较为少量的愈伤组织,结构较为致密;随着培养时间延长,愈伤组织增殖均不明显,无芽点出现,愈伤组织和叶片逐渐出现黄化、褐

化。因此,叶片不适合作为外植体。

2.4 不定芽的增殖

将 A3 号培养基中叶柄诱导的带丛生芽的愈伤切成小块或单株接种到 A1 ~ A9 培养基中培养,20 d 后不定芽的增殖结果表明 A6 培养基的增殖倍数相对较高,可达 12 倍,分化出的不定芽多,且无菌苗的生长状况也较好,不定芽较粗壮,叶片大,颜色深绿,无玻璃化现象。故选择 A6 培养基 (MS

+2.0 mg/L 6-BA +0.3 mg/L NAA) 为最佳分化增殖培养基。见表 3、图 2。

表 3 不同培养基对组培苗增殖的影响

Tab.3 The effects on the proliferation of tissue culture seedlings in the different mediums

培养基	芽增殖倍数	无菌苗生长情况
A1	5.0 ± 0.65	苗壮
A2	8.16 ± 0.45 ⁽¹⁾	苗细弱
A3	9.96 ± 0.45 ⁽¹⁾⁽²⁾	苗细,且愈伤化
A4	6.22 ± 0.50 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	苗壮
A5	9.02 ± 0.31 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾	苗壮
A6	12.02 ± 0.39 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾	苗壮
A7	9.84 ± 3.96 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾	苗细弱,玻璃化
A8	13.09 ± 0.39 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾	苗细弱,玻璃化
A9	12.96 ± 0.47 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾	苗细弱,玻璃化

注: ⁽¹⁾与 A1 比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾与 A2 比较, $P < 0.05$; ⁽³⁾与 A3 比较, $P < 0.05$; ⁽⁴⁾与 A4 比较, $P < 0.05$; ⁽⁵⁾与 A5 比较, $P < 0.05$; ⁽⁶⁾与 A6 比较, $P < 0.05$; ⁽⁷⁾与 A7 比较, $P < 0.05$ 。

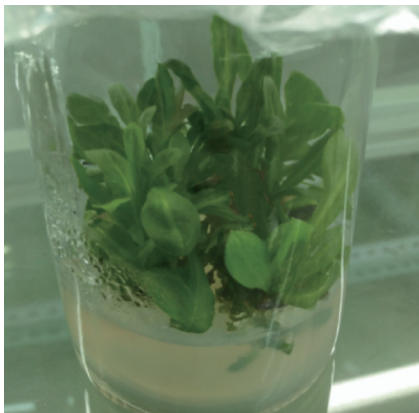


图 2 6 号培养基中增殖的灯盏细辛组培苗

Fig.2 Seedlings of *E. breviscapus* in the sixth medium

2.5 生根培养

将增殖培养 20 d 无根小苗转接到 B1 ~ B5 培养基中,10 d 后观察生根情况。结果表明,灯盏细辛接种在不添加激素的 MS 培养基中时生根率可达 74.44%,但生根数目较少,根较细长;降低培养基无机盐浓度,并添加生长素 0.3 mg/L NAA 和 0.3mg/L IBA 后生根率提高到 89.58%,根生长较为粗壮;当 NAA 浓度增加到 0.5 mg/L 和 IBA 增加至 0.8 mg/L 时,不仅生根率达到至 100%,且生根数目最多,根粗苗壮,故 B5 培养基(MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L NAA)生根效果最佳,为适宜生根的培养基;待灯盏细辛的根生长至 3 cm 左右时,即

可进行炼苗移栽,成活率可在 85% 以上。见表 4。

表 4 不同培养基对灯盏细辛无菌苗生根的影响

Tab.4 The effects on the rooting of aseptic seedlings in the different mediums

培养基编号	生根率/%	生根情况
B1	74.44	生根数目少,2~4 根,较细
B2	89.58	生根数目少,3~6 根,较粗
B3	95.40	生根数目少,3~6 根,较粗
B4	100.00	生根数目多,4~8 根,较粗
B5	100.00	生根数目多,5~9 根,较粗

3 讨论

为了对保证野外采集种子的灭菌效果,同时增强种子对灭菌剂的耐受性,本研究采用了分开 2 次 2% 次氯酸钠的灭菌方法,灭菌效果较好,污染率低,同时 60% 的种子能够萌发,从而有效建立无菌体系,获取无菌苗。在植物组织培养快繁体系建立的过程中,激素的种类与配比对于愈伤组织诱导、器官分化、增殖、生根起着关键性作用^[24]。在愈伤诱导实验中,本研究中选用了最常用的 6-BA 和 NAA 激素,采用不同的浓度配比,对叶柄进行愈伤诱导,结果表明的细胞分裂素 6-BA 为 1.0 mg/L 时,出现愈伤时间较早,体积也较大,其中又以与 0.3 mg/L 的生长素 NAA 的搭配效果最好,出现的芽点较多,非常有利于后期的分化增殖和植株再生。故筛选出的最适愈伤诱导培养基为 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L NAA。另一方面,不同外植体在植物组织培养中诱导愈伤的反应能力是有差异的^[25]。实验中以灯盏细辛的叶片作为外植体时,愈伤诱导反应不佳,并出现褐化、黄化现象,故在该试验条件下,叶柄比叶片更适合做为诱导愈伤组织的外植体,这与刘成洪等^[16]研究结果一致。

细胞分裂素 6-BA 对不定芽的增殖和分化有着较强的促进作用,但浓度过高时往往会增加再生芽畸形、玻璃化的概率^[26-27]。本实验中 NAA 浓度一定时,随着 6-BA 浓度的升高,芽的增殖倍数明显增高,当 6-BA 升至 3.0 mg/L 时,分化的芽增多,增殖倍数最高可达 13 倍,但苗较细弱、容易出现玻璃化。因此,6-BA 的适宜浓度为 2.0 mg/L。同时,适量的生长素配合 6-BA 使用,不仅能够促进植株的生长也能提高芽的增殖与分化能力^[28]。实验中 6-BA 为 2.0 mg/L 时,搭配 0.3 mg/L 的 NAA,增殖倍数可达到 12 倍,无菌苗生长状态也良

好,故此为分化增殖最适宜的浓度搭配。

生根实验结果表明,灯盏细辛组培苗的生根较为容易,在不添加激素的情况下,生根率就可达 74.44%,只是根数目较少,根不够粗壮,不利于移栽。实验中,采用降低培养基无机盐浓度的 1/2 MS 培养基和添加生长素 NAA 和 IBA,均有利于提高生根率和生根质量。随着 NAA 和 IBA 的浓度升高,都能够使生根率和生根数目随之增高,NAA 浓度为 0.5 mg/L、IBA 为 0.8 mg/L 时,获得最佳生根效果,这与吴毅歆等^[17]采用的激素配比结果一致。生根效果好的组培苗非常有利于提高后期的炼苗移栽的存活率,同时移栽初期也要注意盖塑料薄膜保湿,移栽后成活率在 85% 以上,可用于种植推广。

综上所述,本研究建立了适宜于贵州产区的灯盏细辛的组培快繁体系,从叶柄外植体诱到再生苗移栽大约只需要 50~60 d,和常规人工栽培育苗需要 80~90 d 的周期相比,大大缩短了育苗周期,有利于快速、高效、低成本的为人工栽培提供大量品质优良的种苗,对于发展和推广贵州灯盏细辛中药材的规模化种植具有重要意义。

4 参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志,第 74 卷,菊科(一)[M]. 北京:科学出版社,1985:308-309.
- [2] 何顺志,徐文芬,黄敏,等. 贵州中药资源种类与分布的研究[J]. 世界科学技术·中医药现代化,2005,7(2):95-102.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2015 年版一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:147-148.
- [4] 贵州省中药资源普查办公室中药研究所. 贵州中药资源[M]. 北京:中国医药科技出版社,1992:67.
- [5] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药质量标准:2003 版[S]. 贵阳:贵州科技出版社,2003:172.
- [6] GAO J, CHEN G, HE H, et al. Therapeutic effects of breviscapine in cardiovascular diseases; a review [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2017,8:289.
- [7] 李星. 灯盏细辛注射液对缺血性脑卒中患者的临床疗效[J]. 中国老年学杂志,2018,8(38):3850-3851.
- [8] WANG J, ZHANG L, LIU B, et al. Systematic investigation of the *Erigeron breviscapus* mechanism for treating cerebrovascular disease[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2018, 224:429-440.
- [9] ZHANG L, SUN S, LI W, et al. Effect of scutellarin in-

hibits collagen-induced arthritis through TLR4/NF- κ B-mediated inflammation[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2017,16(4):5555-5560.

- [10] HU X, TENG S, HE J, et al. Pharmacological basis for application of scutellarin in Alzheimer's disease: antioxidant and antiapoptosis[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2018,18(5):4289-4296.
- [11] 赵君,支英杰,赵晖,等. 灯盏花素注射剂治疗糖尿病性肾病的有效性和安全性:随机对照试验的系统评价和 Meta 分析[J]. 中国中药杂志,2019,44(4):833-844.
- [12] 宋艳梅,张天锡,王文全,等. 组织培养技术在中药资源保护和开发利用中的应用[J]. 西部中医药,2019,32(2):135-138.
- [13] 黄衡宇,李鹏,党承林. 药用植物灯盏花的组织培养[J]. 广西植物,28(5):685-689.
- [14] 林丽飞,夏瑞娥,刘春,等. 不同因素对短葶飞蓬愈伤组织的影响[J]. 江苏农业科学,2013,41(2):52-54.
- [15] 杨生超,吕红,杨建文,等. 灯盏花组织培养研究[J]. 种子,2006,25(5):24-26.
- [16] 刘成洪,张孟魁,邓华,等. 灯盏花快速繁殖体系的建立[J]. 中草药,2005,36(4):597-599.
- [17] 吴毅歆,谢庆华,桑林,等. 灯盏细辛的组织培养与快速繁殖[J]. 植物学通报,2005,22(1):54-57.
- [18] 董志渊,杨丽英. 灯盏细辛离体叶片再生植株的研究[J]. 中国林副特产,2014,131(4):5-8.
- [19] 杨生超,徐绍松,文国松. 灯盏花种质资源群体表型多样性研究[J]. 西北植物学报,2008,28(8):1573-1579.
- [20] 杨生超,张雪峰,李黎. 灯盏花种质资源灯盏乙素和咖啡酸含量[J]. 中国中药杂志,2009,34(12):239-240.
- [21] 梅艳,冯春,李俊,等. HPLC 同时测定灯盏细辛合剂中 4 种有效成分的含量[J]. 中药材,2013,36(4):665-667.
- [22] 孙佳,郑林,王爱民. 超高效液相色谱法测定贵州产灯盏细辛中的 6 种成分[J]. 中国医药工业杂志,2013,44(7):676-673.
- [23] 侯佳,邹欢,李勇军. 超高效液相色谱-三重四级杆质谱同时测定灯盏细辛中 10 种指标成分的含量[J]. 天然产物研究与开发,2016,28(9):1397-1401,1371.
- [24] 李莉梅,魏丹璇,蔡丹馥,等. 不同植物生长调节剂对铁皮石斛再生的影响[J]. 基因组学与应用生物学,2018,37(5):2080-2089.
- [25] 丛登立,鞠会,张婷婷. 北柴胡高频愈伤诱导优化技术研究[J]. 人参研究,2018(2):12-15.

(下转第 320 页)

- [12] HONG J ,KANG B ,YEO S, et al. Pathogenesis of coxsackievirus B2 in mice: characterization of clinical isolates of the coxsackievirus B2 from patients with myocarditis and aseptic meningitis in Korea [J]. Journal of Veterinary Science, 2017,18(4):457-464.
- [13] SAIKIA U N ,MISHRA B ,SHARMA M ,et al. Disseminated coxsackievirus B fulminant myocarditis in an immunocompetent adult: a case report [J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2013, 78(1):98-100.
- [14] 龚玲. 轮状病毒性肠炎并发病毒性心肌炎 28 例临床分析[J]. 深圳中西医结合杂志, 2016(5):117-119.
- [15] 朱通球, 刘勇, 张晓桂,等. 动态心电图在小儿病毒性心肌炎中的诊断价值[J]. 实用预防医学, 2012,19(1):102-103.
- [16] 倪荣,李丽丽. 病毒性心肌炎的发病机制和治疗进展[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2016,19(6):936-938.
- [17] 张文宁,王芑,周建光,等. 人 4 型腺病毒拷贝数 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测方法的建立[J]. 生物技术通讯, 2017,28(4):528-533.
- [18] 丛超,郭义山,王东. 病毒性心肌炎发病机制的研究进展[J]. 医学综述, 2017,23(15):2948-2953.
- [19] 刘艳红,李咏梅. 手足口病的实验室诊断[J]. 山东医药, 2012,52(35):100-106.
- [20] JAIANAND K, SARAVANAN N, GUNASEKARAN P, et al. Development of a new method for diagnosis of group B coxsackie genome by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification [J]. Indian Journal of Medical Microbiology, 2011,29(2):110-117.
- [21] JIA R, CHENG J S, HENG C, et al. Microchip capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence combined with one-step duplex reverse-transcription polymerase chain reaction for the rapid detection of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 in throat swab specimens [J]. Journal of Separation Science, 2015, 38(14):2538-2544.
- [22] 代海丽,高铁磊,朱琳,等. 柯萨奇病毒 B3 的 TaqMan 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 中国卫生检验杂志, 2012(1):8-10.
- [23] 段晶晶,刘国华,黄学勇,等. 柯萨奇病毒 B5 巢式 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 郑州大学学报(医学版), 2013(3):58-61.
- [24] 李杰,卢昕,徐嘉良,等. 应用 SYBR Green I 荧光 PCR 方法快速检测溶藻弧菌[J]. 中国预防医学杂志, 2014(3):195-198.
- [25] 丛喆,李兆忠,魏强,等. SYBR Green I 实时荧光定量 RT-PCR 测定猴免疫缺陷病毒 RNA 拷贝数方法的建立[J]. 中国实验动物学报, 2006(4):271-275.
- [26] 李杰,卢昕,徐嘉良,等. 应用 SYBR Green I 荧光 PCR 方法快速检测溶藻弧菌[J]. 中国预防医学杂志, 2014(3):195-198.
- [27] 吕莉琨,杨东靖,李力,等. 手足口病柯萨奇病毒 A2、A4 和 A5 型 SYBR Green I 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 中国病原生物学杂志, 2017(1):21-25.
- [28] 周晓丽,朱国坡,李雪华,等. 实时荧光定量 PCR 技术原理与应用[J]. 中国畜牧兽医, 2010,37(2):87-89.

(2020-01-10 收稿,2020-02-18 修回)

中文编辑: 严 征; 英文编辑: 丁廷森

(上接第 314 页)

- [26] 陶瑜,劳景莉,于旭东,等. 不同激素对五指毛桃离体再生的影响[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2019,53(4):528-533.
- [27] 王丰青,田云鹤,周勋,等. 地黄高效叶片离体再生系统的建立[J]. 中国现代中药, 2013(2):122-126.
- [28] 王毕,邓婕红,王彩霞,等. 长寿花组培快繁技术[J]. 湖北大学学报(自然科学版), 2019,41(5):494-496,560.

(2020-01-07 收稿,2020-02-26 修回)

中文编辑: 严 征; 英文编辑: 张启芳