

银杏成熟胚乳愈伤组织的诱导研究

徐小勇, 徐媛, 孔芬, 王汝艳

(扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏扬州 225009)

摘要:以银杏成熟胚乳为外植体, 在附加不同激素的培养基上进行愈伤组织的诱导, 筛选出诱导愈伤组织的最佳激素组合培养基, 即 MS+2 mg/L NAA+2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L KT, 获得绿色、紧密的愈伤组织。

关键词: 银杏; 胚乳; 愈伤组织; 诱导

中图分类号: S 664.303.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)11-0102-02

银杏(*Ginkgo biloba* L.)为我国特有的珍贵树种, 也是最古老的子遗植物, 富含黄酮、萜内酯等生物活性物质, 具有预防和治疗心脑血管疾病等功能。近年来, 银杏组织培养、遗传转化、次生代谢生产以及基因克隆等方面都取得一些进展, 但迄今没有建立起完善的再生体系^[1]。良好再生体系的建立首先需要获得胚性强、生长旺盛的愈伤组织。而获得此类愈伤组织的关键是外植体的选择和激素的优化组合。国内外许多学者主要以茎段、胚、叶片等外植体开展了较多的愈伤组织诱导研究^[2-4], 而对胚乳愈伤组织的诱导关注较少。该试验以银杏成熟胚乳为外植体, 在附加不同激素的培养基上进行愈伤组织的诱导, 筛选最适合诱导愈伤组织的培养基, 以期为后期的再生研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试验用品

试验使用的银杏种子来自扬州大学园艺与植保学院的银杏基地, 品种为佛指。种子层积处理完成后熟后用于试验。激素为 6-BA (6-苄基氨基嘌呤)、KT (激动素)、NAA (萘乙酸); 碳源为蔗糖; 培养基为 MS。

1.2 培养基的设计

试验采用 MS 基本培养基附加不同浓度水平的 3 种激素, 即 6-BA (1、2、3 mg/L)、KT (0.5、1、2 mg/L)、NAA (0.5、1、2 mg/L), 采用正交设计如表 1 所示。

1.3 愈伤组织的诱导与继代

取成熟的银杏种子去壳剥皮后, 在超净工作台上用 70% 的酒精浸泡 5~10 min, 再用 2% 的次氯酸钠灭菌 15~30 min, 无菌水冲洗 3 次, 滤纸吸干后切成小块, 去

除胚, 接种在已高压灭菌的 9 种不同激素组合的培养基上。每个培养皿接种 10~15 小块, 进行暗培养, 温度控制在 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。观察愈伤组织诱导情况, 记录愈伤组织的出现时间、颜色、质地以及出愈率(出愈率=诱导愈伤组织的数目/总接种数目)。

表 1 正交设计激素组合

处理号	NAA/ mg · L ⁻¹	BA/ mg · L ⁻¹	KT/ mg · L ⁻¹
1	1	0.5	0.5
2	1	1	1
3	1	2	2
4	2	0.5	1
5	2	1	2
6	2	2	0.5
7	3	0.5	2
8	3	1	0.5
9	3	2	1

将诱导 40 d 后生长出来的致密愈伤组织转移到培养基上(MS+2 mg/L NAA+2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L KT), 置于光下培养。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导结果

共进行了 3 次接种培养, 具体诱导结果见表 2。在接种 18 d 左右, 胚乳切口周围开始长出白色、黄色或绿色的愈伤组织, 继之不断增大。约 30 d 后不再增大, 因此该研究选择接种 40 d 后进行统计出愈率。上述试验数据结合愈伤组织颜色和质地的观察结果见表 3, 同时进行了差异显著性测试。由表 3 结果可知, 出愈率最高的为 6 号处理(28.57%), 与其它处理差异显著, 其对应的激素组合培养基为 MS+2 mg/L NAA+2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L KT; 该组合获得的愈伤组织为绿色、紧密, 可用于进一步再生培养。此外, 1 号处理(MS+1 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L KT)获得的愈伤组织为浅绿色、较紧密, 也适合进一步的培养。

2.2 继代结果

把诱导率高、长势好的愈伤组织进行了继代培养

第一作者简介: 徐小勇(1979), 男, 江西奉新县人, 博士, 讲师, 现主要从事园艺植物遗传育种研究工作。E-mail: xyxu@yzu.edu.cn.

基金项目: 扬州大学高层次人才科研启动基金资助项目。

收稿日期: 2009-05-20

但发现愈伤组织生长缓慢 并出现严重的褐变。

表 2 不同激素组合的培养基诱导愈伤组织结果

处理号	不同日期接种数/个			出愈数/个			出愈率/%		
	2月24日	3月3日	4月5日	2月24日	3月3日	4月5日	2月24日	3月3日	4月5日
1	16	28	49	4	7	11	0.25	25.0	22.4
2	15	13	41	1	1	4	6.7	7.7	9.8
3	49	15	38	11	3	9	22.4	20.0	23.7
4	36	14	61	10	3	10	27.8	21.4	16.4
5	16	14	69	1	1	13	6.3	7.1	18.8
6	46	13	60	14	4	16	30.4	30.8	26.7
7	35	16	43	6	2	8	17.1	12.5	18.6
8	30	31	56	3	2	5	100	6.5	8.9
9	32	28	49	6	4	5	18.8	14.3	10.2

表 3 不同激素组合的培养基诱导愈伤组织结果

处理号	接种总数/个	总出愈块数/个	出愈率/%	显著性		颜色	质地
				$\alpha=0.05$	$\alpha=0.01$		
1	93	22	23.66	b	AB	浅绿色	较紧密
2	69	6	8.70	d	D	白色	较疏松
3	102	23	22.55	b	B	淡黄色	疏松
4	111	23	20.72	b	B	淡黄色	疏松
5	99	15	15.15	d	CD	褐色	疏松
6	119	34	28.57	a	A	绿色	紧密
7	94	16	17.02	c	C	浅绿色	较疏松
8	117	10	8.55	d	D	浅绿色	较紧密
9	109	15	13.76	cd	C	浅绿色	较疏松

3 讨论

在该研究中,开展了银杏成熟胚乳用于诱导愈伤组织的优化试验,结果表明激素的种类和浓度对银杏愈伤

组织诱导有较大差异,在 MS+2 mg/L NAA+2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L KT 的激素组合培养基中出愈率最高,且愈伤组织的质地最好,有利于进一步的再生培养。陈发兴和赖钟雄也开展过银杏成熟胚乳愈伤组织诱导研究,但诱导率仅为 12%,获得的愈伤组织结构较疏松,白色,生长缓慢^[5]。值得注意的是,在他们的试验中激素 KT 未被使用。此外,在研究中银杏胚乳在最佳诱导培养基不适合继代保存,褐变严重 可能与银杏组织富含多酚化合物有关^[6]。在今后的研究中,将考虑添加一些抗氧化剂于培养基中,如 PVP(聚乙烯吡咯烷酮)、MES(对氧氮乙环乙烷磺酸)、Vc(维生素 C)、AC(活性炭)等。

参考文献

[1] 郭长禄,陈力耕,胡西琴,等.银杏组织培养及其利用研究进展[J].果树学报,2003,20(5):399-403.
[2] 徐刚标,何方,陈良昌.银杏愈伤组织诱导与继代培养的研究[J].中南林业学院学报,1999,19(3):32-36.
[3] 江静,尚富德.银杏愈伤组织的诱导与激素优化组合研究[J].河南大学学报(自然科学版),2000,30(3):51-54.
[4] 杨林.银杏愈伤组织的形成及其中黄酮类化合物的产生[J].天然产物研究与开发,2001,13(3):48-51.
[5] 陈发兴,赖钟雄.银杏愈伤组织细胞生长及其黄酮苷含量[J].福建农林大学学报(自然科学版),2004,33(4):456-458.
[6] 王义强,蒋舜村,石明旺,等.不同抗氧化剂对银杏愈伤组织褐变影响的研究[J].经济林研究,2003,21(4):21-23.

Callus Induction from Mature Endosperm of *Ginkgo biloba* L.

XU Xiao-yong, XU Yuan, KONG Fen, WANG Ru-yan

(School of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

Abstract: The mature endosperm of *Ginkgo* was used for inducing callus with additional different hormone combinations. The result showed that the optimum hormone combination was MS+NAA 2 mg/L+BA 2 mg/L+KT 0.5 mg/L. And green compact callus was regenerated.

Key words: *Ginkgo biloba* L.; Callus; Inducing; Hormone combination

什么是有机化妆品

“有机化妆品”的概念是从有机农业延伸而来,前提要求其产品所含的植物成分必须源自“有机植物”,即在未受过任何有毒物质、转基因成分和重金属污染的环境下,不用化学合成肥料、农药、杀虫剂,抗生素及生长调节剂种植所得的农作物,而在后续产品加工中,不添加任何人工香料、色素及石油化学产品等成分,所添加的

防腐剂及表面活性剂都须受到严格限制,而且制造过程中不能使用动物实验及利用放射线杀菌。此外,是否提供给消费者全成分标示及正确信息、所含成分的生物可分解性与否、包装的环保回收问题,还有厂商的社会公益及责任都是在被规范的范围里。