

# 不同发育阶段银杏胚的组织培养研究

秦小舒, 逯岩, 郁万文, 曹福亮

(南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

**摘要:**以低温贮藏银杏胚为试材,研究不同取材时期银杏胚的生长长度变化、愈伤组织诱导和分化能力。结果表明:早期取材且低温保存,能减缓胚的生长和发育速度;不同时期胚均能较好的诱导愈伤组织,以10月10日取材在MS培养基上诱导率最高;愈伤组织有一定的分化能力,早期(10月3日至11月16日)取材能诱导出胚性愈伤和不定芽,晚期(11月16日以后)取材能诱导出不定芽和不定根,诱导频率较低。

**关键词:**银杏胚;不同时期;愈伤组织

**中图分类号:**S 666.903.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)23-0087-04

银杏(*Ginkgo biloba* L.)是重要的多功能树种<sup>[1]</sup>,组织培养可以实现其优良品种的快速繁殖,银杏的快繁,以茎段诱导不定芽为主<sup>[2]</sup>,多为单芽和叶丛(银杏的长短枝现象),少为双芽,偶尔出现三芽体,繁殖系数较低。通过愈伤组织进行快繁时,除银杏胚愈伤组织能诱导出不定芽外,其它器官难以分化。在银杏胚的研究方面,关于胚的成苗<sup>[3-4]</sup>和成熟胚愈伤组织<sup>[5]</sup>的诱导报道较多,而同时研究不同生长时期的胚的愈伤组织诱导及分化的研究尚鲜见报道,现将针对这方面进行初步探讨,以期后续研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料分2次采集于江苏泰州同一母树,第1批于2013年9月28日采集,外种皮不经腐熟直接去掉,流水洗净晾干后贮藏于4℃保存备用。第2批于2012年12月采集自然成熟种子,KMnO<sub>4</sub>消毒后常温贮藏。定期翻动并喷湿种子。

### 1.2 试验方法

1.2.1 胚长统计 从2013年10月至2014年4月不定期取4℃保存的种子测量胚长,每次150~200粒,去除无胚种子,计算平均胚长。

1.2.2 不同取材时期和培养基对银杏胚愈伤组织诱导的影响 于2013年10月3日、10月10日、10月25日、

11月16日、2014年1月2日、1月15日分别取低温贮藏银杏胚和2013年7月3日自然成熟胚为外植体,采用MS、MS改良(NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>减半)、DCR、N<sub>6</sub>、WPM 5种培养基,分别添加激素为NAA(0~1 mg/L)、2,4-D(0~4 mg/L)、6-BA(0~2 mg/L)、TDZ(0~0.1 mg/L)。其中,7月3日自然成熟胚的组织培养采用正交实验,试验因素及水平见表1。针对不同时期外植体采取不同的培养基和激素处理。每个处理10瓶,7月胚每瓶接种4个,其余每瓶7个(下同)。对6个时期胚在培养基MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L和DCR+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L上的愈伤组织诱导能力进行多重比较。

表1 7月3日胚愈伤组织培养正交实验表

Table 1 Orthogonal design of callus induction on July 3rd

水平 Level	因素 Factors				
	培养基 Medium	TDZ /(mg·L <sup>-1</sup> )	NAA /(mg·L <sup>-1</sup> )	6-BA /(mg·L <sup>-1</sup> )	暗处理 Dark treatment/d
1	MS	0	0	0	0
2	DCR	0.01	0.1	0.5	9
3	N <sub>6</sub>	0.05	0.5	1.0	18
4	WPM	0.10	1.0	2.0	27

### 1.2.3 不同糖源对10月25日胚愈伤组织诱导的影响

以MS+NAA 1.0 mg/L+6-BA 2.0 mg/L为基本培养基,附加不同糖源及其组合,每个处理总糖源30 g/L。分别为蔗糖30 g/L、葡萄糖30 g/L、麦芽糖30 g/L,蔗糖15 g/L+葡萄糖15 g/L,蔗糖15 g/L+麦芽糖15 g/L,麦芽糖15 g/L+葡萄糖15 g/L,蔗糖10 g/L+葡萄糖10 g/L+麦芽糖10 g/L。

1.2.4 谷氨酰胺(Gln)和水解酪蛋白(CH)对11月16日胚愈伤组织诱导的影响 以1/2 MS+1/2 DCR+NAA 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L为基本培养基,附加浓度分别为0、250、500、1 000 mg/L的Gln和500、

**第一作者简介:**秦小舒(1990-),女,硕士研究生,研究方向为经济树种的定向培育与加工利用。E-mail:qinxiaoshu@163.com.

**责任作者:**曹福亮(1957-),男,博士,教授,博士生导师,现主要从事经济林等研究工作。E-mail:fuliangcaonjfu@163.com.

**基金项目:**江苏省自然科学基金资助项目(BK2010019);国家自然科学基金资助项目(31170627)。

**收稿日期:**2014-07-10

1 000 mg/L 的 CH。

### 1.3 消毒及培养

高压锅常规灭菌方法。接种时,剥去骨质中种皮后,用 70%乙醇 1 min,10%次氯酸钠 15 min 进行消毒。无特殊说明,培养基中附加 6 mg/L 琼脂、30 mg/L 蔗糖。培养温度(25±2)℃,光照强度约 40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,光照时间 14 h/d。

### 1.4 数据分析

采用 SPSS 20.0 和 Excel 2003 软件进行数据处理及分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 早期采种与低温贮藏对银杏胚胚长变化的影响

江苏泰兴每年 9 月底,银杏胚发育尚不完全且不同步,发育历程处于胚长小于 1 mm 的球形胚至胚长约为 3.5 mm 的早期子叶胚之间,多为胚长 2 mm 左右的半透明胚体。低温贮藏延缓了银杏胚的发育历程,主要表现在胚长的增长上。从图 1 可以看出,从 2013 年 10 月至 2014 年 4 月底,银杏胚胚长增长可分为 4 个阶段。10 月 3—10 日,胚长增长较快,7 d 增幅达 0.33 mm。10 月 10—28 日,胚长增长基本进入停滞时期,18 d 增长 0.04 mm。从 10 月 28 日至 11 月 22 日,胚长又迅速增加了 0.82 mm。此后至 2014 年 4 月,胚长呈缓慢增加趋势,直到 4 月 27 日达 3.82 mm。而同时期搜集的自然成熟胚在 1 月已基本发育成熟,且平均胚长已达到 8.98 mm,远高于同时期低温贮藏胚。在 4 月剥取的低温贮藏种子中,胚的发育仍不同步,包括针尖大小的球形胚至成熟胚的各个阶段,多为 3.5 mm 左右的子叶胚,同时发现低温贮藏胚在胚长减慢生长的同时却在不断的分化成熟,2 mm 的胚就分化出明显的子叶,而自然成熟过程中 2 mm 胚还停留在心形胚鱼雷胚阶段。长期的低温贮藏导致种子干枯,霉变,胚根发褐,生活力下降,建议早期采种的低温贮藏不超过翌年 1 月。

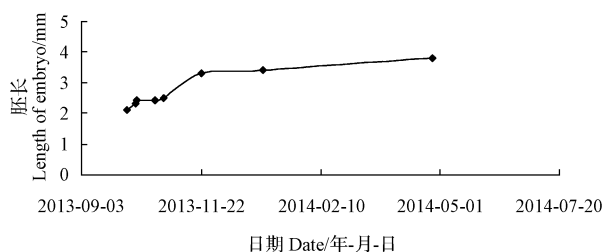


图 1 胚长变化图

Fig. 1 Change of embryo length

### 2.2 不同取材时期和培养基对银杏胚愈伤组织诱导及分化的影响

银杏各个取材时期的胚在接种时呈白色,接种后 3 d 胚体膨大子叶转为黄绿色,7~10 d 表皮开始愈伤,

从胚轴或子叶基部开始愈伤。各时期的胚均能较好的诱导愈伤组织。银杏胚诱导出的愈伤组织主要呈 4 种状态:淡黄色夹杂白色半透明愈伤组织,细腻;翠绿疏松愈伤组织;淡绿愈伤表皮有深绿点状物;淡绿愈伤表皮多透明丝状物,这 4 种愈伤组织状态存在于各个不同取材时期的胚愈伤组织中。

10 月 3 日和 10 日幼胚在培养基 MS、MT、DCR 和激素 6-BA (1、2 mg/L),NAA(0.5、1 mg/L)的组合下进行培养都能较好的诱导愈伤组织。其中,MS 诱导的愈伤组织疏松,愈伤多为黄绿色,继代时分为激素减半与激素不变 2 批处理,结果发现 2 种处理方式差异不明显。愈伤组织出现 2 种变化,一种为致密愈伤,一种为疏松表皮多点状突起愈伤,2 种愈伤在第 3 次继代后褐化严重,且没有分化的迹象。MT 诱导的愈伤组织疏松或水渍状,多为淡黄色愈伤组织表皮镶嵌白色愈伤,继代后愈伤逐渐致密,第 3 次继代后褐化严重,其中 MT+NAA 1.0 mg/L+6-BA 2.0 mg/L 诱导的愈伤组织褐化率较低,且第 40 天在褐化愈伤组织上分化出小芽(图 2-1)。DCR 培养基诱导的愈伤组织翠绿或淡黄疏松,继代后,愈伤转绿且致密,第 3 次继代后褐化率低于 MS 与 MT,且第 40 天在 DCR+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 上分化出芽(图 2-2)。

10 月 25 日幼胚在培养基 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 上的愈伤组织诱导率为 85.71%,在培养基 DCR+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 上的诱导率为 86%。

11 月 16 日胚在培养基 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 上的愈伤组织诱导率为 64%,在培养基 DCR+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 上的诱导率为 52.67%。

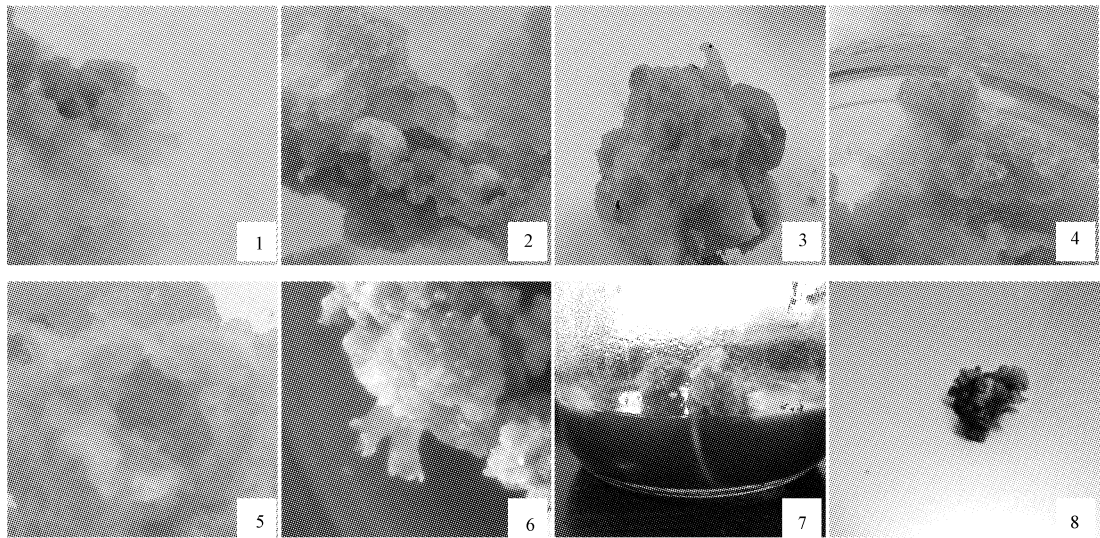
翌年 1 月 2 日胚接种于 1/2MS+1/2DCR+NAA 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+Gln 500 mg/L,15 d 后圈状芽点出现(图 2-3),继代后没能继续分化。

翌年 1 月 15 日自然成熟胚接种在 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+Gln 500 mg/L,50 d 后分化出愈伤化银杏叶片(图 2-4),接种在 MS 改良+6-BA 5.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+Gln 500 mg/L,50 d 后有芽点的出现(图 2-5)。

翌年 7 月 3 日愈伤组织诱导影响为:培养基>6-BA>NAA>TDZ>暗处理,其最佳组合为 DCR+TDZ 0.05 mg/L+NAA 0.1 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+暗处理 9 d。对褐化的影响为:NAA>培养基>暗处理>TDZ>6-BA。控制褐化的组合为 WPM+TDZ 0.1 mg/L+NAA 1.0 mg/L+6-BA 0 mg/L+暗处理 18 d。针对试验 2 点说明:因正交实验的 16 个处理中,处理 1 为 MS+TDZ 0.00+NAA 0.0+6-BA 0.00+暗

处理 0 d,降低了 MS 的 K 值。但实际情况中是 MS 的诱导率高于 DCR。另外 NAA 对褐化的影响表现为一定浓度范围内随 NAA 浓度的升高,褐化降低。因该试验中所给 NAA 浓度低,使得 NAA 的 K 值较大。其中

WPM+TDZ 0.01 mg/L+NAA 0.5 mg/L 转 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+AC 1 000 mg/L+LH 1 000 mg/L在 55 d 后,出现了双芽(图 2-6)和根(图 2-7)的分化。



注:1. 10 月 10 日胚接种于 MT 培养基(40 d);2. 10 月 10 日胚接种于 DCR 培养基(40 d);3. 10 月 25 日胚初代接种于麦芽糖上(115 d);4. 1 月 2 日胚分化物(15 d);5-6. 翌年 1 月 15 日胚分化物(50 d);7-8. 7 月 3 日成熟胚分化物(15 d)。

Note:1. Embryo from October 10th cultivated on MT medium(40 days);2. Embryo from October 10th cultivated on DCR medium(40 days);3. Embryo from October 25th cultivated on MT medium(115 days);4. Differentiation of embryo from January 2nd (15 days);5-6. Differentiation of embryo from January 15th(50 days);7-8. Differentiation of mature embryo from July 3rd(15 days).

图 2 不同时期胚愈伤分化情况

Fig. 2 Differentiation of embryo callus in different stages

对 6 个时期胚在培养基 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 和 DCR+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 上的愈伤组织诱导能力进行多重比较。由表 2 可知,培养基对愈伤组织诱导率影响较大,MS 培养基的诱导率在总体上高于 DCR 培养基。在各个培养基中,随着时间的推移,低温贮藏胚的愈伤组织诱导率没

表 2 不同取材时期和培养基对银杏胚愈伤组织诱导的影响

Table 2 Influence of developing date and medium on callus induction

取材日期 Date /月-日	诱导率 Callus induction rate/%			
	MS 培养基 MS medium	愈伤度 Level of callus	DCR 培养基 DCR medium	愈伤度 Level of callus
10-03	95.83±6.93 a	3.5	68.33±7.64 cd	2.5
10-10	96.81±3.00 a	3.5	84.33±8.15 ab	3.0
10-25	85.71±7.00 ab	3.0	86.00±7.00 ab	3.0
11-16	64.00±10.52 bc	3.0	52.67±4.62 e	3.0
01-02	89.67±10.02 ab	3.0	62.33±11.15 de	2.5
07-03	97.33±2.31 a	3.5	88.67±4.04 ab	2.5

注:小写字母表示 5% 水平差异显著。诱导率为平均值±标准差。愈伤程度 3.5,3.0,2.5 分别表示胚的愈伤组织面积分别为全愈伤、有 80%~90% 面积愈伤、60%~80% 面积愈伤。

Note:Lowercase letters show significant difference at 0.05 level. Inductivity:mean±standard deviation level of callus 3.5,3.0,2.5 shows embryo callus all of the area,80%~90%,60%~80% of the area.

呈现出规律的变化,其中 MS 培养基表现为 10 月 10 日诱导率最高为 96.81%,其次是 10 月 3 日,翌年 1 月 2 日,10 月 25 日,而 11 月 16 日最低为 64.00%。在 DCR 培养基中,10 月 25 日诱导率最高,其次是 10 月 10 日,10 月 3 日,翌年 1 月 2 日,而 11 月 16 日同样为最低。

2.3 不同糖源对 10 月 25 日胚愈伤组织诱导的影响

将幼胚接种于不同糖源发现,蔗糖愈伤组织诱导率最高,葡萄糖诱导率次之,二者愈伤组织疏松,黄绿色,继代后无分化出现。麦芽糖愈伤组织诱导率极低,只有 23.67%,且愈伤化程度低,体积小。麦芽糖处理中,继代时将糖源改为蔗糖,愈伤组织体积增大,组织致密,表皮光滑多瘤状突起(图 2-8),115 d 后仍然不褐化,石蜡切片发现,愈伤组织形成初生茎。另将 10 月 25 日幼胚接种在 MS 培养基上,添加激素 2,4-D (0.5~4.0 mg/L),NAA(0~1 mg/L),6-BA(1~2 mg/L),结果发现,添加 2,4-D 的愈伤组织质地致密细腻,为黄白色,表皮多点状突起,继代后极易褐化死亡。

2.4 谷氨酰胺(Gln)和水解酪蛋白(CH)对 11 月 16 日胚愈伤组织诱导的影响

不同的有机物处理,胚愈伤组织诱导率不同。其中,Gln 500 mg/L+CH 500 mg/L 愈伤组织诱导率最高



为 90.57%,其次是单独添加 Gln 500 mg/L,诱导率为 78.92%,二者在继代后出现芽点,但没能抽生出较明显的茎段。而不添加有机物的培养基诱导率为 52.56%,最低诱导率为单独添加 CH 1 000 mg/L 达 35.71%,且没有芽点的出现。

### 3 结论与讨论

该试验发现,早期取材且低温保存,能减缓胚的生长和发育速度,但降低了愈伤组织的诱导能力。不同时期取材的胚都有较强的愈伤组织诱导能力,以 10 月 10 日取材在 MS 培养基上诱导率最高。愈伤组织具有一定的分化能力,但因不同时期胚的发育程度不同,以致其愈伤组织具有不同的分化能力。主要表现在早期(10 月 3 日至 11 月 16 日)取材能诱导出胚性愈伤和不定芽,晚期(11 月 16 日以后)取材能诱导出不定芽和不定根。但诱导频率都较低。该研究正交实验发现银杏成熟胚愈伤组织诱导影响为:培养基>6-BA>NAA>TDZ>暗处理,而胡燕梅等<sup>[6]</sup>的正交实验发现的是培养基>NAA>6-BA>(植酸)PA,这可能是选取的因素和水平数不同造成的,但相同的是培养基是影响愈伤组织诱导的最显著因子。

Laurain<sup>[7]</sup>用银杏幼胚诱导出体胚(直接发生方式和愈伤组织分化方式),且能发育至子叶胚时期,但胚较畸形,不能成苗。郭长禄<sup>[8]</sup>用 3 mm 幼胚的胚轴诱导出体胚且发育成苗,Choi 等<sup>[9]</sup>和陈颖等<sup>[10]</sup>用未成熟胚诱导出少量不定芽。而同时将不同阶段胚进行比较的研究较少。裸子植物中,以合子胚为外植体进行的快繁,关于松杉类植物的体胚和不定芽的报道较多<sup>[11]</sup>。其中,体胚的诱导对外植体的发育程度十分敏感,齐力旺<sup>[12]</sup>发现落叶松的球果采集时间只有在 6 月 25 日至 6 月 30 日体胚发生率较高,除这段时间之外,几乎为零。同时对松杉类植物胚的发育阶段研究也较多<sup>[13-14]</sup>,而对银杏胚的发育过程的研究,主要有曹帮华等<sup>[15]</sup>的对银杏成熟过程中胚长的统计和王伏雄等<sup>[16]</sup>对不同发育时期幼胚的萌发

能力的比较。该研究弥补了不同发育时期胚愈伤组织诱导和分化能力比较的空白。且作者针对 10 月 16 日和 11 月 16 日胚进行硝酸银的处理,发现硝酸银能显著提高愈伤组织的分化能力,如果能对更早发育时期的胚做不同的处理,且针对各发育阶段的胚做相同处理,进行同步比较将更会有说服力,也将会有更大的发现。

### 参考文献

- [1] 曹福亮. 中国银杏[M]. 南京:江苏科学技术出版社,2002:2-9.
- [2] 陈颖,曹福亮. 银杏组培快繁和体胚发生技术研究进展[J]. 林业科技开发,2006,20(6):10-14.
- [3] 罗言云,贾勇炯. 银杏成熟胚的离体培养研究[J]. 四川大学学报(自然科学版),1999,36(3):573-577.
- [4] 陈颖,曹福亮,谢寅峰,等. 5 个银杏优良品种成熟胚离体繁殖培养基的选择研究[J]. 西北植物学报,2004,24(11):2025-2032.
- [5] 温银元,王玉国,康铁梅. 银杏胚愈伤组织的继代培养及其生理特性研究[J]. 山西农业大学学报(自然科学版),2008,28(3):263-266.
- [6] 胡燕梅,张志华,周骏江,等. 正交试验优化银杏胚愈伤组织继代培养及黄酮积累[J]. 北方园艺,2009(12):34-37.
- [7] Lanrain. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Ginkgo biloba*[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1996,44:19-24.
- [8] 郭长禄. 银杏胚轴、子叶诱导胚状体发生及成苗的研究[J]. 林业科学,2005,41(2):178-181.
- [9] Choi P, Cho D, Soh W. Shoot organogenesis from immature zygotic embryo cultures of *Ginkgo biloba*[J]. Biologia Plantarum, 2003,47(2):309-312.
- [10] 陈颖,徐彩平,盛丽莉,等. 银杏胚的培养及不定芽的产生[J]. 广西植物,2011,31(5):679-683.
- [11] 汪小雄,卢龙斗,郝怀庆,等. 松杉类植物体细胞胚发育机理的研究进展[J]. 西北植物学报,2006,26(9):1965-1972.
- [12] 齐力旺. 落叶松胚性愈伤组织诱导培养基中激素的 311-A 最优回归设计筛选[J]. 林业科学研究,2001,14(3):251-257.
- [13] 吴涛,陈少瑜,陈芳,等. 云南松合子胚发育及形态特征[J]. 西北林学院学报,2008(6):91-93.
- [14] 李清清,叶建仁,吴小芹. 黑松合子胚和体细胞胚发育阶段的形态特征比较[J]. 林业科技开发,2012,26(5):21-23.
- [15] 曹帮华,蔡春菊. 银杏种子后熟生理与内源激素变化的研究[J]. 林业科学,2006,42(2):32-37.
- [16] 王伏雄,陈祖铿,李宪章. 银杏幼胚离体培养的研究(1)[J]. 植物学报,1963,11(3):217-223.

## Study on Tissue Culture of *Ginkgo* Embryos from Different Developing Stages

QIN Xiao-shu, LU Yan, YU Wan-wen, CAO Fu-liang

(College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu 210037)

**Abstract:** Taking cryopreservation *Ginkgo* embryos as materials to study embryos changes, callus induction and differentiation during different stages. The results showed that, collecting immature embryo and cryopreservation could slow down the growth and development of embryos; embryo of different stages could derive callus well, materials from October 10th induced the highest rate of callus with MS medium; callus had the ability of differentiation; immature embryo (October 3rd to November 16th) could induce embryonic callus and adventitious buds, later (after November 16th) drawn to induce adventitious buds and adventitious roots. However, the frequency of callus differentiation was low.

**Keywords:** *Ginkgo* embryos; different stage; callus