

文章编号: 1001-1498(2000) 02-0217-05

不同因素对离体培养的银杏幼茎腋芽生长发育的影响

郝岗平¹, 杜希华¹, 尤勇², 侯福林¹, 范志强³, 张慧娟¹

(1. 山东师范大学生物系, 山东济南 250014; 2. 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091;
3. 山东省林业厅种苗站, 山东济南 250014)

关键词: 银杏; 腋芽生长发育; 基本培养基; 激素; 水解酪蛋白和腺嘌呤

中图分类号: S718.43 文献标识码: A

银杏(*Ginkgo biloba* L.) 是世界上保存下来的子遗植物, 在植物界有“活化石”之称。银杏种子富含维生素、矿物质, 可供食用; 叶可提取黄酮类物质, 广泛用于心脑血管疾病的治疗。银杏雌雄异株, 用实生苗或分蘖苗造林, 15~20 a 后开始结种, 种子产量低并有后熟期, 不耐储藏, 且种子价格昂贵, 播种苗雌株比例低, 早期性别难以鉴定, 故以传统的方法繁殖银杏苗木存在一定的困难^[1]。近年来, 组织培养技术用于植物快繁已取得显著成果, 可望成为获得银杏苗木的重要方法之一。关于银杏茎段离体快繁, 仅见罗紫娟^[2]有过初步报道。1994 年以来, 作者研究了不同基本培养基、激素和有机附加物等多种因素对银杏幼嫩茎段快繁的影响, 现将主要结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 试验材料

每年 4~5 月份从山东师大校园内树龄为 40 多年生银杏雌雄株上取当年生的幼嫩枝条。

1.2 材料的表面灭菌

将取回的幼嫩枝梢剪去叶片, 流水冲洗 12 h, 用滤纸吸干, 在 75% 乙醇中浸泡 15 s, 然后用 0.1% 多菌灵灭菌 8 min。用无菌水冲洗 1 次后, 再用 0.1% HgCl_2 灭菌 8~10 min, 无菌水冲洗 4~5 次。在无菌条件下, 切成 0.8~1.0 cm 的带顶芽或腋芽的茎段, 接种到培养基中。

1.3 培养条件

光照强度为 2 000 lx, 光照时间 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$, 温度 25~27 。

1.4 培养基

以 MS、改良 MS(NH_4NO_3 含量减半)、DCR 为基本培养基, 配以 NAA、ZT(玉米素)、水解酪蛋白(CH)、腺嘌呤(Ad)等组成 21 种诱导顶芽和腋芽生长发育的培养基。以生根粉、IBA、NAA 组成 6 种生根培养基。

收稿日期: 1999-03-23

基金项目: 山东省科委基金资助项目(编号: 94031001)

作者简介: 郝岗平(1970-), 男, 山西临县人, 讲师。现在工作单位: 泰山医学院基础部(山东泰安 271000)。

2 结果与分析

2.1 不同基本培养基对银杏茎段腋芽生长发育的影响

采用 3 种基本培养基(MS、改良 MS 和 DCR), 不添加激素和其它附加成分, 探讨大量元素的不同组合对银杏茎段腋芽生长发育的影响。试验结果列于表 1。

表 1 不同基本培养基对银杏茎段腋芽生长发育的影响

培养基编号	基本培养基	接种数/个	愈伤化数/个	愈伤化率/%	腋芽萌动数/个	腋芽萌动率/%	成苗数/个	成苗率/%
1	MS	35	16	45.7	8	22.9	7	20.0
2	DCR	35	16	45.7	9	25.7	6	17.1
3	改良 MS	31	6	19.4	16	51.6	16	51.6

注: 腋芽萌动指腋芽突出 2 小叶; 成苗指腋芽发育到具有 4 片展开叶(下同)。

由表 1 可看出, 在改良 MS 培养基上腋芽萌动率和成苗率最高。可见降低培养基中的 NH_4NO_3 含量有利于银杏茎段腋芽的生长发育。

2.2 激素种类与浓度对银杏茎段腋芽生长发育的影响

在以上对基本培养基选择的基础上, 在培养基中添加 NAA 和 ZT, 比较它们对腋芽生长发育的影响, 结果见表 2~4。

表 2 NAA 与不同基本培养基搭配对银杏茎段腋芽生长发育的影响

培养基编号	成分	接种数/个	愈伤化数/个	愈伤化率/%	腋芽萌动数/个	腋芽萌动率/%	成苗数/个	成苗率/%
4	MS+ NAA 0.1	34	34	100.0	0	0	0	0
5	DCR+ NAA 0.1	33	32	96.7	0	0	0	0
6	改良 MS+ NAA 0.1	28	14	50.0	5	17.9	0	0

注: NAA 0.1 表示 NAA 质量浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 下同。

从表 2 可看出, 培养基中加入 NAA, 促进腋芽愈伤化, 抑制其萌动成苗。在 3 种基本培养基中, 改良 MS 基本培养基与 NAA 搭配对腋芽的这种抑制作用较小。

表 3 比较了改良 MS 基本培养基与不同浓度 NAA 搭配对银杏茎段腋芽生长发育的影响。可以看出, 随着 NAA 浓度的下降, 愈伤化率也下降, 而腋芽萌动率和成苗率逐渐上升, 但仍低于无 NAA 的改良 MS 培养基。

表 3 不同浓度 NAA 与改良 MS 基本培养基搭配对银杏茎段腋芽生长发育的影响

培养基编号	成分	接种数/个	愈伤化数/个	愈伤化率/%	腋芽萌动数/个	腋芽萌动率/%	成苗数/个	成苗率/%
3	改良 MS	24	12	50.0	12	50.0	10	41.6
6	改良 MS+ NAA 0.1	27	22	81.5	4	14.8	0	0
7	改良 MS+ NAA 0.05	29	22	75.9	6	20.7	3	10.3
8	改良 MS+ NAA 0.01	30	18	60.0	12	40.0	8	26.7

注: NAA 0.05、NAA 0.1 分别表示 NAA 质量浓度为 0.05 、 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 下同。

表 4 表示的是在改良 MS 基本培养基中, 添加 NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与不同浓度的 ZT 组合对银杏茎段腋芽生长发育的影响。

表 4 NAA 和不同浓度的 ZT 组合对银杏茎段腋芽生长发育的影响

培养基编号	成 分	接种数/个	愈伤化数/个	愈伤化率/%	腋芽萌动数/个	腋芽萌动率/%	成苗数/个	成苗率/%
9	NAA 0.1+ ZT 0.01	28	16	57.1	12	42.9	9	32.1
10	NAA 0.1+ ZT 0.05	30	22	73.3	8	26.7	5	16.7
11	NAA 0.1+ ZT 0.1	32	24	75.0	8	25.0	4	12.5
12	NAA 0.1+ ZT 0.5	30	24	80.0	6	20.0	0	0

注: ZT 0.01、ZT 0.05、ZT 0.1、ZT 0.5 分别表示 ZT 质量浓度分别为 0.01、0.05、0.1、0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

从表 4 可以看出, 随着 NAA/ZT 比值的升高, 腋芽萌动率和成苗率逐渐提高。当 NAA/ZT = 10 时, 腋芽萌动率和成苗率达到最大, 分别为 42.9% 和 32.1%, 但仍低于不加激素的改良 MS 培养基的腋芽萌动率和成苗率(见表 1、3)。可见外源细胞分裂素也有促进腋芽愈伤化, 抑制腋芽正常发育的作用, 且细胞分裂素浓度越高, 抑制作用越明显。同时也可看出, 与单独使用 NAA 相比, NAA 与低浓度的 ZT 组合, 可使银杏腋芽成苗率提高, 但低浓度的 NAA 与低浓度的 ZT 组合能否大幅度提高银杏腋芽的成苗率尚有待进一步研究。

2.3 附加 CH 和腺嘌呤对银杏茎段腋芽生长发育的影响

在 MS、改良 MS 和 DCR 基本培养基中附加 CH $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和不同浓度的腺嘌呤(分别为 1、5、10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 探讨有机附加物对银杏茎段腋芽生长发育的影响(表 5、6)。

表 5 附加 CH 对银杏茎段腋芽生长发育的影响

培养基编号	成 分	接种数/个	愈伤化数/个	愈伤化率/%	腋芽萌动数/个	腋芽萌动率/%	成苗数/个	成苗率/%
1	MS	27	13	48.1	6	22.2	6	22.2
2	DCR	30	14	46.7	8	26.7	6	20.0
3	改良 MS	27	5	18.5	14	51.8	12	44.4
13	MS+ CH 500	27	9	33.3	8	29.6	8	29.6
14	DCR+ CH 500	30	5	16.7	11	36.7	9	30.0
15	改良 MS+ CH 500	27	5	18.7	24	88.9	24	88.9
16	MS+ NAA 0.1+ CH 500	30	19	63.3	4	13.3	1	3.3
17	DCR+ NAA 0.1+ CH 500	27	13	48.1	6	22.2	1	3.7
18	改良 MS+ NAA 0.1+ CH 500	30	19	63.3	6	20.0	4	13.3

注: CH 500 表示 CH 的质量浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 下同。

从表 5 的结果可看出, 附加 CH 可使腋芽萌动率和成苗率普遍提高, 尤其是改良 MS+ CH 培养基, 腋芽萌动率和成苗率均达到 88.9%。可见在银杏茎段快繁中, 以改良 MS 作基本培养基附加 CH $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 是较理想的培养基。

表 6 不同浓度的腺嘌呤对银杏茎段腋芽生长发育的影响

培养基编号	成 分	接种数/个	愈伤化数/个	愈伤化率/%	腋芽萌动数/个	腋芽萌动率/%	成苗数/个	成苗率/%
3	改良 MS	26	6	23.1	16	61.5	14	53.8
19	改良 MS+ Ade 1	28	13	46.4	13	46.4	2	7.1
20	改良 MS+ Ade 5	30	28	93.3	2	6.7	0	0
21	改良 MS+ Ade 10	28	20	71.4	8	28.6	0	0

注: Ade 1、Ade 5、Ade 10 分别表示 Ade 质量浓度为 1、5、10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

从表 6 可看出, 附加不同浓度的腺嘌呤后, 腋芽萌动率及成苗率明显低于 3 号培养基。说明腺嘌呤有促进腋芽愈伤化, 抑制腋芽正常生长发育的作用。

2.4 银杏雌雄株茎段腋芽在不同培养基中的生长发育情况比较

在12种培养基中,分别接种银杏雌、雄株茎段,腋芽的生长发育情况比较结果列于表7。

表7 银杏雌雄株茎段腋芽在不同培养基中的生长情况比较

培养基编号	成分	接种数/个		愈伤化数/个		愈伤化率/%		腋芽萌动数/个		腋芽萌动率/%		成苗数/个		成苗率/%	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
1	MS	30	30	16	12	53.3	40.0	12	3	40.0	10.0	8	3	26.7	10.0
2	DCR	28	34	11	18	39.3	75.0	9	6	32.1	17.6	3	4	10.7	11.7
3	改良MS	27	25	7	4	25.9	16.0	11	15	40.7	60.0	11	15	40.7	60.0
4	MS+ NAA 0.1	30	28	30	28	100.0	100.0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	DCR+ NAA 0.1	28	30	28	28	100.0	93.3	0	2	0	6.7	0	0	0	0
6	改良MS+ NAA 0.1	30	31	18	13	60.0	41.9	12	0	40.0	0	0	0	0	0
13	MS+ CH 500	33	30	11	10	33.3	33.3	14	6	42.4	20.0	14	6	42.4	20.0
14	DCR+ CH 500	29	30	16	8	55.2	26.7	9	12	31.0	40.0	9	6	31.0	20.0
15	改良MS+ CH 500	33	28	0	8	0	28.6	29	25	87.9	89.3	29	25	87.9	89.3
16	MS+ NAA 0.1+ CH 500	30	30	22	14	73.3	58.3	2	6	6.7	20.0	0	2	0	6.7
17	DCR+ NAA 0.1+ CH 500	30	28	12	16	40.0	57.1	6	7	20.0	25.0	0	2	0	7.1
18	改良MS+ NAA 0.1+ CH 500	32	30	19	20	59.4	66.7	8	5	25.0	16.7	3	5	9.4	16.7

对银杏雌雄株茎段萌动率,作t检验分析, $t = 0.295$,查表得 $P > 0.05$ 差异不显著;对成苗率进行t检验分析, $t = 0.24$,查表得 $P > 0.05$,差异亦不显著。可见,雌雄性别对银杏腋芽快繁成苗无显著影响。

2.5 银杏无菌苗的增殖与生根

银杏茎段培养40d左右,腋芽产生丛生芽。产生丛生芽的频率和芽数与培养基有关,其中改良MS培养基形成丛生芽的频率最高(达到或超过腋芽成苗总数的1/3),丛生芽数可达3个。所以改良MS培养基也是诱导银杏茎段腋芽形成丛生芽的较好培养基。

将丛生芽分成单芽转入无激素的改良MS培养基或 $MS + 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CH}$ 的培养基中,可再次形成丛生芽。丛生芽生长旺盛,叶片簇生,可连续继代,繁殖系数为3。

在银杏幼嫩茎段快繁中,顶芽数量虽少于腋芽,但仍可看出不同培养基对顶芽生长成苗的影响不同。实验结果表明,不加激素的MS和DCR两种培养基适于顶芽生长,成苗率可达100%;CH和NAA对顶芽生长无促进作用;且改良MS基本培养基对顶芽生长的促进作用不及MS和DCR两种基本培养基。这可能是由于顶芽和腋芽的生长模式、生理状态等不同造成的。顶芽在生长发育过程中,节间伸长,长成约为4节的枝条,节上腋芽可萌发生成苗。不加激素的MS、改良MS和 $MS + 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CH}$ 的培养基是促进节上腋芽生长的较好培养基。通过切段法将顶芽和腋芽转入新鲜培养基中扩大繁殖,繁殖系数可达4。

在无菌苗的生根试验中,挑选健壮的苗转入生根培养基中诱导生根。结果只有 $MS + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA}$ 的培养基中有根形成,生根率为33.3%。

3 讨论

大量的研究表明,基本培养基的成分和含量对器官分化的影响很大。Flinn^[3]认为高盐的MS培养基对于大多数松属(*Pinus* Linn.)树种的器官分化不利。Perene和Sommer^[4]在湿地

松的培养分化研究中发现, 只有在明显降低 NH_4^+ 和 NO_3^- 的含量中, 才能诱导产生更多的分化芽。在本实验中, 降低 NH_4NO_3 含量的改良 MS 培养基, 无论对促进银杏腋芽生长发育, 还是诱导腋芽形成丛生芽, 都是较好的基本培养基。这与其他学者在松属树种中所得结果一致。

一般说来, 诱导丛生芽时, 外植体需培养在细胞分裂素/生长素比率较高的培养基上^[5-6]。但本实验表明, 细胞分裂素和生长素都抑制银杏茎段腋芽的生长发育, 这可能是由于银杏本身的内源激素较为丰富所致。此外, 提高银杏无菌苗的生根率仍是今后有待解决的难题。

参考文献:

- [1] 邢世岩. 银杏丰产栽培[M]. 济南: 济南出版社, 1993.
- [2] 罗紫娟. 银杏茎段的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 1985, (1): 35~36.
- [3] Flinn B S. In vitro control of caulogenesis by growth regulators and media components in embryonic explants of eastern white pine (*Pinus strobus*) [J]. Can J Bot Plant Physiol, 1986, 64: 1948~1956.
- [4] Perene-Bermudw Z, Sommer H E. Factors affecting adventitious bud induction in *Pinus elliotii* (Engelm.) embryos cultured in vitro [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1987, 11: 25~26.
- [5] Gupta P K, Durzam D. J. Shoot multiplication from mature tree of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) [J]. Plant Cell Reports, 1985, 4: 177~179.
- [6] 颜昌敬. 植物组织培养手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990. 56~82.

Effects of Various Factors on the Growth and Development of Cultured Axillary Buds of *Ginkgo biloba* in vitro

HAO Gang-ping¹, DU Xi-hua¹, YOU Yong², HOU Fu-lin¹,
FAN Zhi-qiang³, ZHANG Hui-juan¹

(1. Department of Biology, Shandong Teachers' University, Jinan 250014, Shandong, China;

2. The Research Institute of Forestry, CAF, Beijing 100091, China;

3. Shandong Forest Seed and Sapling Station, Jinan 250014, Shandong, China)

Abstract: The stem of *Ginkgo biloba* were cultured on MS, modified MS and DCR basal medium, supplemented with various concentration of hormones—NAA, ZT (zeatin) and two types of nurture—CH (casein hydrolysate) and Ade (adenine). The aim was to study the effects of various basal medium, different hormones and nurtures on the growth and development of *Ginkgo biloba* stem. The result showed that the modified MS with CH 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ was the best medium for inducing the development of axillary buds; the medium with NAA, ZT and Ade promoted axillary buds to be callus and inhibited them developing into shoots. The shoot rate was 89.3%. After cultured for 40 days, the clustered buds were emerged from axillary buds. The detached buds from clustered buds were cultured on modified MS basal medium or supplemented with CH 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The shoots grew well, and the reproduction coefficient was 3. The shoots from apical buds were also reproduced, and the reproduction coefficient was 4. The shoots were induced to root on MS+ NAA 0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ medium, and the rooting rate was 33.3%.

Key words: *Ginkgo biloba*; growth and development of axillary buds; basal medium; hormones; CH and Ade