

研究报告

Research Report

银杏茎尖无菌接种条件的优化

喻娜* 罗开秀 向丹 赵静

广安职业技术学院, 广安, 638000

* 通讯作者, yuna421@163.com

摘要 本研究以银杏的茎尖为材料,对银杏的消毒条件、培养基蔗糖浓度、激素种类及浓度进行了分析比较,以探索银杏茎尖作为外植体的无菌接种最佳条件,为银杏的快速繁殖及资源保护提供基础。结果显示选择广安地区树龄约 30 年母树当年发出的侧芽带叶茎尖为外植体,70%酒精处理 1.5 min,0.5%新洁尔灭处理 15min 是最佳的灭菌组合。以 MS 为基本培养基,添加激素 0.3 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA,加入 0.3%活性炭,调减蔗糖用量为 0,琼脂 9 g/L,在此条件下培养更能有效地抑制褐化现象,利于银杏茎尖的生长,且长势旺盛。以幼茎尖为外植体建立的无菌体系,为银杏的快速繁殖技术及新品种的培育等研究提供了理论依据。
关键词 银杏, 茎尖, 接种, 条件优化

Optimization of Study on Sterile Inoculation Conditions for the Stem Tips of Ginkgo

Yu Na* Luo Kaixiu Xiang Dan Zhao Jing

Guangan Vocational & Technical College, Guangan, 638000

* Corresponding author, yuna421@163.com

DOI: 10.13271/j.mpb.016.003661

Abstract In this study, stem tips of ginkgo were used as materials to comparatively analyze the disinfection conditions, concentration of sucrose in culture medium, and types and concentrations of hormone, so as to explore the best conditions for sterile inoculation with ginkgo stem tip as explant, and to provide a basis for the rapid propagation and resource conservation of ginkgo. The results showed that the tip of the lateral bud of the seed tree which were 30 years old in Guang'an area was chose as the explant, which was soaked in 70% alcohol for 5 minutes and in 0.5% bromogeramine for 15 minutes. This was the best sterilizing combination. Taking MS as the basic medium, adding hormone 0.3 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA and 0.3% activated carbon, redcing the sucrose dosage to 0, and AGAR 9 g/L. Under this condition, browning phenomenon could be inhibited much effectively, which was conducive to the growth of ginkgo stem tip. The aseptic system with the young stem tip as explant could provide theoretical reference for the rapid propagation technology of ginkgo and the cultivation of new varieties.

Keywords Ginkgo, Young stem tip, Inoculation, Condition optimization

银杏(*Ginkgo biloba* L.)为银杏科、银杏属落叶乔木,是几亿年前出现在地球上最古老的子遗植物,和它同纲的所有其他植物皆已灭绝,作为中国特有的树种,现存活的银杏数量稀少,分布分散,上百岁的老树更不多见,因此银杏又被称为“活化石”。银杏树

的生长慢,寿命长,自然条件下,从栽种到结果至少要二十年,大量结果需等到四十年以后,具有药用,观赏和经济价值(葛永奇, 2003; 郭长禄, 2004)。银杏树还具有净化空气、保持水土、绿化环境、防治虫害、调节气候等作用,是一种具有良好的观赏、绿化和造

基金项目 本研究由四川省教育厅重点项目(18ZA0228)和广安职业技术学院广安科技园共同资助

引用格式 :Yu N., Luo K.X., Xiang D., and Zhao J., 2018, Optimization of sterile inoculation conditions for the stem tips of ginkgo, Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding), 16(11): 3661-3665 (喻娜, 罗开秀, 向丹, 赵静, 2018, 银杏茎尖无菌接种条件的优化, 分子植物育种, 16(11): 3661-3665)

林作用的树种,对中国农林种植结构调整、农区林业的改善具有重要意义(陈平平, 1997, 南京高师学报, (4): 49-55)。现代研究表明银杏叶中的提取物具有改善脑循环、扩张血管、抑制血小板活化因子等药用作用,还可开发成饮料、保健品和化妆品等产品,经济效益颇为可观(汪素娟等, 2013; 杨慧萍和高睿, 2017)。

随着市场对银杏栽培面积需求量增加,人们对银杏的繁殖需求也增大,现目前繁殖方法主要有播种、扦插、嫁接、植物组织培养 4 种,其中传统的播种方法容易发生性状分离,出现品质下降的现象,而扦插和嫁接受季节影响较大,并且繁殖速度相对较慢(朱春林和张彦生, 2005, 新疆农业科技, (6): 29);随着银杏药用价值被挖掘,人们对银杏的品质要求也越来越高,现代分子生物学的发展出现了植物组织培养的方法。对植物进行无性繁殖,植物组织培养既可以打破季节的影响,也可以保持亲本优良性状,通过优化条件加快繁殖速度可以满足不同季节不同品质的需求,在组培过程中植物体细胞无性系变异还可以改良品种和培养新品种(刘福平, 2010)。

通过组织培养进行银杏分子育种具有重要的理论和现实意义。近年来,植物组织培养作为一种现代生物技术的重要研究手段取得了可喜的进步,裸子植物的组织培养不容易成功,银杏的尤其困难。虽然目前银杏组织培养研究有很多,但是成功的例子还很少(张明文, 2003)。在银杏的组培过程中,大多选择成熟的胚诱导无菌苗,然后以无菌苗的胚轴或子叶为外植体,或者以银杏的腋芽为外植体研究银杏芽的萌发、增殖和生根(胡燕梅等, 2010)。从文献上看几乎没有采用幼茎尖为外植体来研究银杏的快繁。在

银杏组培的过程中常常出现很多问题,比如,由于银杏属木本植物,褐化问题比较严重,愈伤诱导率低;种子较大,容易污染等(陈颖和曹福亮, 2006, 林业科技开发, (6): 10-14; 盛丽莉等, 2012)。由此看出通过组织培养让银杏再生来提高繁殖速度的途径很难实现,因此通过对幼茎尖进行诱导培养来促进银杏的繁殖。

1 结果与分析

1.1 不同灭菌条件对银杏幼茎尖消毒效果的影响

不同浓度的新洁尔灭处理不同的时间对银杏茎尖的影响不同(表 1), 1%新洁尔灭处理比 0.5%的新洁尔灭处理更容易褐化,褐化的材料更容易污染;随着新洁尔灭处理的时间的延长,外植体的褐化率升高,污染率下降;在接种后的第十天观察发现 1%新洁尔灭处理 20 min, 0.5%的新洁尔灭处理 15 min, 20 min, 25 min 外植体都没有污染,但随着培养时间的延长,外植体存在严重的褐化现象。综合考虑褐化率和污染率,银杏幼茎尖作为外植体的消毒时间以 0.5%的新洁尔灭处理 15 min 为好。

1.2 不同生长激素及活性炭组合对幼茎尖生长的影响

不同浓度的 NAA 和 6-BA 组合对银杏幼茎尖生长的影响不同,不同浓度的活性炭对褐化现象有抑制作用(表 2),随着 NAA 浓度的升高,幼苗长势越好、越高、越壮, 0.1 mg/L NAA 处理的生长高度在 0.3~0.7 cm, 大多数 \leq 0.5 cm, 0.2 mg/L NAA 处理的生长高度在 0.2~0.9 cm 之间,其中大多数在 0.6~0.9 cm 之间, 0.3 mg/L NAA 处理的生长高度在 0.4~1.5 cm 之

表 1 不同灭菌条件对银杏幼茎尖消毒效果的影响

Table 1 Effects of different sterilization conditions on the sterilization of young stem tips of ginkgo

处理 Treatment	70%酒精 处理时间(min) 70% of the alcohol disinfection time (min)	新洁尔 灭浓度(%) The concentration of bromo geramine (%)	新洁尔灭 处理时间(min) Bromo geramine processing time (min)	第十天的观察结果 The observation of tenth day		第三十天的观察结果 The observation of the thirtieth day	
				褐化率(%) Browning rate (%)	污染率(%) Pollution rate (%)	褐化率(%) Browning rate (%)	污染率(%) Pollution rate (%)
1	1.5	1.0	8	10.00	21.00	100.00	70.00
2	1.5	1.0	10	26.67	7.10	100.00	79.00
3	1.5	1.0	15	46.67	4.40	100.00	75.00
4	1.5	1.0	20	100.00	0.00	100.00	0.00
5	1.5	0.5	8	0.00	25.33	0.00	100.00
6	1.5	0.5	10	0.00	10.00	26.67	33.33
7	1.5	0.5	15	16.67	0.00	28.00	3.33
8	1.5	0.5	20	33.33	0.00	100.00	0.00
9	1.5	0.5	25	39.32	0.00	100.00	0.00

表 2 不同生长激素及活性炭组合对幼茎尖生长的影响

Table 2 Effects of different plant growth hormone and activated carbon combinations on the growth of young stem tips

处理 Treatment	NAA (mg/L)	6-BA (mg/L)	AC (%)	生长高度(cm) Growth height (cm)	生长情况 Growth status
1	0.10	1.50	0.30	0.30	弱, 褐化严重 Weak, brown serious
2	0.20	1.00	0.30	0.70	较壮, 轻度发黄 Relatively strong, mild yellow
3	0.20	1.00	0.30	0.80	较壮, 轻度褐化 Relatively strong, slightly brown
4	0.30	1.00	0.50	0.60	弱, 轻度褐化 Weak, slight browning
5	0.10	0.50	0.30	0.70	较壮, 轻度发黄 Relatively strong, mild yellow
6	0.10	1.00	0.10	0.50	弱, 轻度褐化 Weak, slight browning
7	0.20	1.00	0.30	0.90	较壮, 轻度褐化 Relatively strong, slightly brown
8	0.20	0.50	0.50	0.80	较壮, 轻度褐化 Relatively strong, slightly brown
9	0.20	1.00	0.30	0.80	较壮, 轻度褐化 Relatively strong, slightly brown
10	0.10	1.00	0.50	0.30	弱, 发黄 Weak, yellow
11	0.30	0.50	0.30	1.50	壮, 无褐化 Strong, without browning
12	0.20	1.50	0.10	0.30	弱, 发黄 Weak, yellow
13	0.20	1.00	0.30	0.60	弱, 轻度褐化 Weak, slight browning
14	0.30	1.50	0.30	0.80	较壮, 轻度褐化 Relatively strong, slightly brown
15	0.20	1.50	0.50	0.70	较壮, 轻度发黄 Relatively strong, mild yellow
16	0.20	0.50	0.10	0.20	弱 Weak
17	0.30	1.00	0.10	0.40	弱 Weak

间,其中大多数在 0.9~1.5 cm 之间,随着 6-BA 的浓度升高,幼苗的长势越弱,越黄,越容易褐化。0.5 mg/L 6-BA 在处理的生长高度在 0.2~1.5 cm 之间,其中大多数介于 0.7~1.5 cm 之间,1.0 mg/L 6-BA 在处理的生长高度在 0.4~0.9 cm,其中大多数介于 0.7~0.9 cm,1.5 mg/L 6-BA 在处理的生长高度在 0.3 cm 左右。随着活性炭浓度的增加,幼苗的褐化现象也得到有效地抑制。因此,较高浓度的 NAA 和较低浓度的 6-BA

更有利于银杏幼茎尖的生长,因此选择 MS+0.3 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA+0.3% AC 作为银杏幼茎尖继代增殖的培养基(图 1),在这种条件下培养的幼苗普遍生长较好,褐化率和污染率都较低。

1.3 蔗糖和琼脂用量对幼茎尖生长的影响

蔗糖是培养基中提供生命活动必不可少的能源物质,也是主要的碳源物质,同时还具有调节渗透压

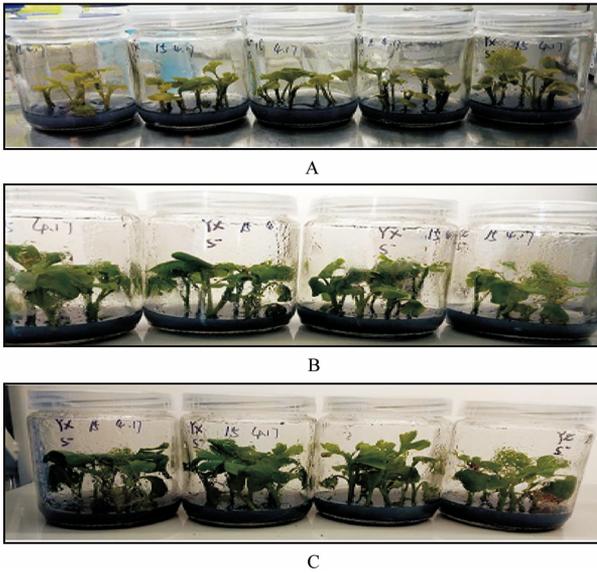


图 1 银杏幼茎尖无菌苗的生长情况

注: A: 接种第一天; B: 接种第八天; C: 接种第 25 天

Figure 1 Growth of sterile seedlings of young stem tips

Note: A: The first day of inoculation; B: The eighth day of inoculation; C: The twenty-fifth day of inoculation

的作用(王蒂, 2010)。培养基中蔗糖含量的多少会影响银杏茎尖的长势(表 3) 随着蔗糖浓度的升高, 银杏幼茎尖的生长越越弱, 褐化现象越严重。培养基中蔗糖含量在 30 g/L 时, 接种后几个小时就褐化, 把蔗糖减少到 15 g/L 时, 幼苗生长较弱, 接种后几小时发黄, 培养 20 d 后逐渐褐化, 并更易污染, 把培养基中的糖去除, 幼苗基本无褐化现象, 并且有明显的生长趋势, 可见无糖培养基可以减少褐化现象。可能是由于在组织培养过程中去除糖, 提高组培苗的光合作用, 组培苗由异氧型变为了自养型, 增强了光合作用, 减少褐化, 同时使污染率大大降低, 组培苗的成活率得到提高(肖远志等, 2013)。因此无糖培养基最适合银杏幼茎尖的培养。

琼脂是由海藻中提取的多糖体, 在植物组织培养基中主要充当凝固剂的作用, 其含量可能影响植物对培养基的水分和营养成分的吸收, 随着琼脂浓度的含量越高, 银杏幼茎尖的生长越壮, 褐化现象减少(表 4)。琼脂含量为 7 g/L、8 g/L 时, 培养基较软, 幼苗接种后易倒在培养基上, 由于接触面积大, 更容易褐化和污染, 含量 9 g/L 时有利于幼苗的接种, 及对营养的吸收, 不容易褐化。因此在接种银杏幼茎尖时以琼脂浓度 10 g/L 时为佳。

2 讨论

由于每株银杏幼茎尖个体差异大, 银杏幼茎尖

表 3 蔗糖浓度对银杏幼茎尖生长的影响

Table 3 Effects of different sucrose concentrations on the growth of ginkgo young stem tips

处理 Treatment	蔗糖浓度(g/L) Sucrose concentration (g/L)	生长情况 Growth status
1	0	苗壮, 褐化现象较少 Strong, fewer browning phenomena
2	15	苗弱, 发黄, 培养 20 d 后褐化严重 Weak, yellow, the browning is serious after 20 days
3	30	接种当天褐化, 褐化严重, 生长弱 Brown on the day of vaccination, brown serious, weak

表 4 琼脂浓度对银杏幼茎尖生长的影响

Table 4 The effect of agar concentration on the growth of ginkgo young stem tips

处理 Treatment	琼脂浓度(g/L) Agar concentration (g/L)	生长情况 Growth status
1	7	苗弱, 发黄 Weak, yellow serious
2	8	苗弱, 发黄 Weak, yellow
3	9	苗壮, 褐化现象较少 Strong, fewer browning phenomena

作为外植体的培养消毒比较困难, 通过诱导银杏幼茎尖的培养来活动组培苗, 可以规模化快速繁殖银杏种苗。本试验从灭菌条件、外源激素的种类和浓度、蔗糖浓度、琼脂浓度等多方面出发, 对银杏幼茎尖的组培条件进行了研究, 发现其污染率和褐化率都受到了影响, 在此基础上优化培养条件, 为后续的继代培养、生根培养、提高繁殖系数等生理研究提供了理论依据。

3 材料与方法

3.1 材料的采集

选择广安地区 3 月下旬到 5 月上旬树龄约 30 年母树当年发出的侧芽茎尖 2~3 cm, 带 2~3 片叶子, 每组接种 3 瓶, 每瓶接种 4~6 株茎尖。

3.2 材料的预处理

将采集的外植体置于洗衣粉水中泡 1 h 左右, 用

流水冲洗 5 min, 然后用自来水泡 4~5 次。

3.3 茎尖的消毒试验

选用 70% 的酒精和 0.5% 新洁尔灭和 1% 新洁尔灭组合处理 8 min、10 min、15 min、20 min、25 min, 统计其污染率和褐化率。

3.4 激素及活性炭浓度的筛选

在以不加蔗糖、琼脂 8 g/L 的 MS 培养基中添加外源激素 NAA 和 6-BA, 设置 NAA 浓度为 0.1 mg/L、0.2 mg/L、0.3 mg/L, 6-BA 0.5 mg/L、1.0 mg/L、1.5 mg/L, 银杏壳活性炭 0.1%、0.3%、0.5%, 统计褐化率及污染率, 观察幼苗的生长情况。

3.5 蔗糖和琼脂用量的筛选

采用单因素实验, 比较 0 g/L、15 g/L、30 g/L 的蔗糖, 7 g/L、8 g/L、9 g/L 的琼脂, 观察幼茎的褐化情况及生长情况。

3.6 数据统计与分析

污染率(%)=污染茎尖数/接种茎尖数×100% ;

褐化率(%)=褐化茎尖数/接种茎尖数×100%。

作者贡献

喻娜和向丹是本研究的实验设计者和实验研究的执行人; 罗开秀完成数据分析, 论文初稿的写作; 赵静参与实验设计, 试验结果分析; 喻娜是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由四川省教育厅重点项目“以银杏幼茎尖为外植体培养组培苗的研究”(编号 18ZA0228)和广安职业技术学院广安科技园共同资助。

参考文献

- Guo C.L., 2004, Studies on establishment of regeneration system, expression of *LEAFY* gene and genetic transformation in *Ginkgo biloba*, Dissertation for Ph.D., Zhejiang University, Supervisor: Chen L.G., pp.1-5 (郭长禄, 2004, 银杏再生体系建立和 *LEAFY* 基因表达, 转化的研究, 博士学位论文, 浙江大学, 导师: 陈力耕, pp.1-5)
- Ge Y.Q., 2003, Study on the genetic diversity of the relict plant *Ginkgo biloba* L., Thesis for M.S., Zhejiang University, Su

- pervisor: Fu C.X., pp.9 (葛永奇, 2003, 子遗植物银杏遗传多样性研究, 硕士学位论文, 浙江大学, 导师: 傅承新, pp.9)
- Hu Y.M., Xia J.B., Han X.H., and Zhou Q., 2010, Optimization of the ginkgo callus induction and growth, *Zhongguo Nongxue Tongbao* (Chinese Agricultural Science Bulletin), 26(24): 47-51 (胡燕梅, 夏景波, 韩晓红, 周全, 2010, 银杏愈伤组织诱导与生长的优化试验, *中国农学通报*, 26(24): 47-51)
- Liu F.P., 2010, The genetic bases of plant somaclonal variation and the main influence factors, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue* (Genomics and Applied Biology), 29(6): 1142-1151 (刘福平, 2010, 植物体细胞无性系变异的遗传基础及主要影响因素, *基因组学与应用生物学*, 29(6): 1142-1151)
- Sheng L.L., Chen Y., Wang N.Y., Xu C.P., and Cao F.L., 2012, Histological observation of somatic embryogenesis and adventitious buds induction from *Ginkgo biloba* L., different explants *in vitro* culture, *Zhongnan Linye Keji Daxue Xuebao* (Journal of Central South University of Forestry & Technology), 32(4): 153-158 (盛丽莉, 陈颖, 汪南阳, 徐彩平, 曹福亮, 2012, 银杏不同外植体的细胞学观察 - 体胚发生不定芽诱导及不定根的发生过程, *中南林业科技大学学报*, 32(4): 153-158)
- Wang D., 2010, Plant tissue culture, China Agricultural Press, Beijing, China, pp.22 (王蒂, 2010, 植物组织培养, 中国农业出版社, 中国, 北京, pp.22)
- Wang S.J., Kang A., Di L.Q., Zhang S.J., Tian L., Zhou W., Hui F., Shan J.J., Zhao X.L., and Bi X.L., 2003, Progress in pharmacokinetic study on main active ingredients of *Ginkgo biloba* leaf extract, *Zhongcaoyao* (Chinese Traditional and Herbal Drugs), 44(5): 626-631 (汪素娟, 康安, 狄留庆, 张圣洁, 田乐, 周伟, 恽菲, 单进军, 赵晓莉, 毕肖林, 2013, 银杏叶提取物主要活性成分药动学研究进展, *中草药*, 44(5): 626-631)
- Xiao Y.Z., Huang G.L., and Zhang P., 2013, Application of new technology in ornamental plant tissue culture, *Hunan Nongye Kexue* (Journal of Hunan Agricultural Sciences), (15): 20-22 (肖远志, 黄国林, 张平, 2013, 新技术在观赏植物组织培养中的应用, *湖南农业科学*, (15): 20-22)
- Yang H.P., and Gao R., 2017, Progress on medicinal componets and pharmacological effects of *Ginkgo biloba*, *Dongwu Yixue Jinzhan* (Progress in Veterinary Medicine), 38(8): 96-99 (杨慧萍, 高睿, 2017, 银杏药用成分及药理作用研究进展, *动物医学进展*, 38(8): 96-99)
- Zhang M.W., 2003, Establishment of genetic transformation receptor system of *Ginkgo biloba*, Thesis for M.S., Zhejiang University, Supervisor: Chen L.G., pp.5 (张明文, 2003, 建立银杏遗传转化受体系统的研究, 硕士学位论文, 浙江大学, 导师: 陈力耕, pp.5)