

银杏组培快繁和体胚发生技术研究进展

陈颖 曹福亮

(南京林业大学森林资源与环境学院)

摘要:银杏因其集药用、食用、观赏、材用于一体备受关注。银杏的组织培养方面研究取得了一定的进展。从不外植体包括胚、茎段、子叶、胚轴、小孢子、配子体等方面概述了银杏组培快繁和体胚发生技术的研究进展及存在问题,提出建立高效、稳定的快繁体系、进一步探索体胚的生根技术是银杏组培今后研究的两个重要方面。

关键词:银杏;组培快繁;体胚发生;研究进展

银杏因在食用、药用、木材和观赏方面的价值而极具发展潜力。银杏传统的育苗方法为实生繁殖、扦插繁殖、嫁接繁殖等。但这些方法的繁殖率低、周期长,远不能满足市场的需求。因此如果想短期内得到大面积栽培的银杏,组织培养是有效可行的方法。至今,国内外对银杏的器官培养、胚培养、细胞培养等方法都做了研究。笔者从银杏的器官发生与体胚发生两个方面综述银杏近年来的研究进展及存在问题,对其发展方向提出建议。

1 银杏的器官发生与植株再生

组培快繁首先遇到的问题是获得大量的芽苗,而芽苗产生是从器官发生开始的,器官发生有两条途径:直接器官发生和间接器官发生。直接器官发生是不经过愈伤组织阶段直接从起始外植体上诱导出芽或根的途径;间接器官发生是从起始外植体先诱导出愈伤组织,从愈伤组织中产生芽或根的方法。

1.1 胚的培养

1.1.1 作为胚发育生理的基础研究

对银杏种子的胚,普遍认为银杏胚存在生理后熟,给银杏的离体培养带来困难。早在1934年,李继侗先生就对银杏的离体胚培养进行了研究,他认为银杏种子的延缓发芽并不是由于胚的未成熟,而是由于胚乳的未成熟,胚乳需要一个后熟过程^[1,2]。利用未成熟胚作外植体,添加蜂皇浆、椰子汁等物质,促进了幼胚的分化和生长,完成胚的后熟作用^[3,4]。胚培养中添加2,4-D、LH和NH₄NO₃均有促进银杏胚完成后熟的作用,且胚成苗率较高,达66%^[5]。对于银杏种胚的休眠原因,Holt^[6]有不同的看法,他认为银杏

种子在从母体脱离后即有发育完好的胚。外层的浆种皮是银杏种子冬季休眠的原因,它的存在显著降低了整体萌发百分率。低温层积虽然提高了整体萌发百分率,但对萌发来说并不是必需的。

1.1.2 作为快繁的原始材料

通过胚培养可直接得到再生植株^[7]。日本的Inoue^[8]将银杏胚离体培养时,培养基中单独附加IAA或IBA可促进未成熟胚的萌发,而成熟胚在无激素培养基上即可萌发。培养基中附加2,4-D或NAA能促使胚在光下产生绿色愈伤组织,但未能使诱导的愈伤组织分化。Camper^[8]将银杏完整的胚在含有2,4-D和NAA的初始培养基上培养5周后,转到仅含有4.5μM 2,4-D培养基上再培养5周后,有根和芽的发生,植株在温室里成活。我们的研究发现不同品种的银杏种胚在不同的培养基上生长存在差异,其中在DCR培养基上不同品种的胚都较适合生长^[9]。

1.1.3 直接作为丛生芽繁殖的外植体

沈敏娟^[10]以银杏的胚、胚轴、子叶等为外植体,研究丛生芽的诱导、抽长与发根。结果发现,将胚培养于MS+BA 1.0 mg/L+CH 300 mg/L+glutamine 1 600 mg/L+CM30%上有多芽体产生,将多芽体切下后培养于不含任何激素的固体培养基中培养,于3个月后褐化死亡;将胚轴培养于WPM+BA 1.0 mg/L+CM30%可获得多芽体;带有原叶体的子叶在MS+KT 1.0 mg/L上可诱导叶片发生,而培养5 d的无菌苗的子叶则可诱导出愈伤组织;诱导形成的多芽体及叶片在不含任何激素的MS液体培养基内伸长效果最佳。罗紫娟^[11]将种子胚剪成2~3段,在White+2,4-D 5.0 mg/L+NH₄Cl 5.34~53.49 mg/L+LH 200~400 mg/L培养基上培养,10~15 d后在胚轴的伤口上形成芽。

在以胚为外植体诱导银杏不定芽的过程中,胚的

收稿日期:2006-09-01

修回日期:2006-09-08

基金项目:教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目(编号:20050298008)。

作者简介:陈颖(1966-),女,讲师,博士,主要从事生物技术方面的研究。

发育状态是诱导不定芽产生的关键因素。韩国的 P. S. Choi 等^[12]利用不同发育阶段的未成熟胚包括球形胚、心形胚、子叶胚诱导不定芽时发现,心形胚在 MS +BA 1.0 mg/L+ NAA 0.014 mg/L 上培养时,每个心形胚还可诱导出 8 个不定芽,远高于球形胚和子叶胚。但遗憾的是这些芽苗并没有能够生根,完成再生的过程。

以上研究的结果表明,在以不同阶段的胚直接作为增殖的材料时,存在着即使诱导出不定芽,最后也难以生根,难以完成植株再生的问题。

1.2 茎段的培养

1.2.1 定芽或直接再生不定芽的快繁

这种方式是利用原有茎段上的顶芽、腋芽为外植体进行快繁。以定芽作为快繁的外植体,优点在于遗传性状十分稳定,变异频率低,能够保持原有的优良性状,而且通过定芽途径获得的再生植株所需时间短,植株旺盛,移栽易成活,特别适合于优良无性系的快速繁殖。目前,银杏的快繁途径主要还是通过该途径。

Chu M C^[13]将长约 7 cm 的银杏成年雄株的枝条,培养于无激素的 WPM 培养基中,2~3 周后转入泥炭基质中小枝能够生根,这其实就是微扦插育苗。将银杏雌、雄株上当年的幼嫩茎梢,分别接种在改良 White +6-BA 0.5~1.0 mg/L+ NAA 0.5 mg/L+ NH₄Cl 15.34 mg/L 的培养基上,基部出现愈伤组织,节上的腋芽开始生长。30 d 左右培养于 N6+MS 微量元素 + KH₂PO₄ + 2,4-D+BA+NAA 的培养基上部分腋芽基部长出根,形成完整的再生植株^[14]。

罗言云等^[15]以成熟胚离体培养形成的无菌幼苗为外植体,发现茎段在 1/2MS 培养基上其腋芽的分化效果最好。郝岗平等^[16]研究了不同因素对银杏腋芽萌动率的影响,发现在不加激素的改良 MS 培养基上腋芽萌动率和成苗率最高;添加激素后会促进腋芽愈伤化,并且腋芽萌动率和成苗率低于不加激素的改良 MS 培养基,这一研究结果得到许多研究者的证实^[17,18]。而且银杏茎段培养 40 d 左右,腋芽可直接产生丛生芽。产生丛生芽的频率和芽数与培养基有关,丛生芽数可达 3 个。F. Tommasi^[19]的研究结果表明,顶梢和带腋芽的茎段形成嫩梢的能力不同,顶芽有 80% 形成嫩梢,而茎段只有 10% 的抽梢率,新芽的产生属直接产生,因为解剖构造可以看出,新芽的维管束与原外植体相连。

我们的研究也表明,无菌幼苗茎段可以诱导出双芽体,1 个月龄的银杏幼苗最下段(子叶及下胚轴段)在改良 MS+NAA 0.1+6-BA 0.5 培养 1 个月后可见

基部分化出大量的叶丛,继代后叶丛逐渐长出,分化出多个芽丛。雌、雄株的当年生嫩茎可以诱导出双芽体或 3 芽体,不定芽的发生为直接再生^[16]。尽管腋芽萌发不需要激素,但培养基中添加水解酪蛋白(CH)^[16]、多效唑^[20]、稀土^[21]都可促进腋芽的萌发。

1.2.2 愈伤组织再生芽(间接再生途径)的快繁

银杏茎段极易诱导愈伤组织,但愈伤组织分化丛生芽的频率很低,愈伤化程度高,丛生苗的伸长也较困难。孙满芝^[22]用银杏的幼嫩茎段在 N6+BA 1.0 mg/L+ NAA 0.1 mg/L 上分化出小苗。王洪善^[23]用带有腋芽的幼嫩茎段诱导愈伤组织后将其继代在 N6+BA 0.8~1.0 mg/L+ NAA 0.8~1.0 mg/L 上培养,愈伤组织移植 13 d 后,开始出现不定芽的分化,逐渐增殖,产生丛生芽,并得到伸长苗。胡惠露等^[24,25]利用银杏多年生植株上当年抽生幼嫩带芽茎段为外植体,利用正交设计筛选出了银杏最佳的培养条件是:最佳培养基为 MS+活性炭 0.5%+6-BA 1.0 mg/L+ NAA 0.1 mg/L,最佳取样时间为 4 月中、下旬。但并没有说明继代后的生长情况,也没有形成完整的植株。从以上报道可以看出,通过愈伤组织途径快繁对银杏来说比较困难,尽管报道中指出分化的芽数多达 8 个,甚至报道有 20 个,但都很难重复,目前分化系数还特别低。

1.3 叶片和根段外植体不定芽的发生

到目前为止,利用叶片或根段为外植体易诱导出愈伤组织,但不定芽的诱导相当困难,至今还没有这方面的报道。我们的研究发现,1 个月龄的银杏成熟胚培养的幼苗叶片,在 MS+NAA 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L 上培养 1 个月后,发现有叶片直接生根的现象,但无不定芽的产生^[18]。

1.4 无菌苗的生根

银杏无菌芽苗的生根率仍然很低,结果也不尽相同。郝岗平等^[16]报道诱导的芽苗添加生长素后生根率只有 33.3%。孙满芝^[22]与王洪善等^[23]报道银杏芽苗缺乏分裂素不生根,而生长素配合低浓度 6-BA 生根率达 66.7%,生根时间为 30 d。罗言云等^[20]报道芽苗生根率为 90.3%,但生根时间为 40~50 d。罗紫娟^[14]将诱导的芽苗转移到附加 0.05% 活性炭的培养基上,6~10 d 生根,形成完整植株。我们利用茎段诱导的芽苗作外植体研究了稀土对银杏不同品种芽苗不定根发生的影响,发现 0.5~5.0 mg/L 的稀土能显著促进芽苗不定根的发生,最高生根率达 66.7%,生根时间可提前至 20 d^[21]。

专论综述

2 银杏的体细胞胚发生及植株再生

自 Reinert 和 Steward 在 1958 年首次在胡萝卜细胞悬浮培养中成功地诱导出了体细胞胚(胚状体),并发育成完整的植株以来,植物体胚发生的研究取得了飞快的发展,全世界有 1 000 多种高等植物进行离体培养,大多数可通过体胚发生获得再生植株。通过体胚发生途径形成再生植株证明是一种普遍的现象,许多学者认为该发生途径是植物体细胞在离体培养下一个基本的发育途径。现已有几百种植物诱导出体细胞胚,有的已作为人工种子应用于生产中^[26,27]。银杏的体胚发生研究同其他的植物相比,较为缓慢,但也取得了一定的进展。

2.1 以配子体或未成熟胚为外植体

未成熟胚是诱导体胚发生的最好的材料,银杏也是如此。Yates W. R^[28]从成熟种子中剥出胚在培养基 MS+K 5.0 mg/L+NAA 2.0 mg/L 上培养,几乎每个胚均能发生愈伤组织,并且愈伤组织最先发生于子叶基部。在培养 4~6 周后,比较松散易碎的愈伤组织表面遍布墨绿色圆球状物,这可能是不同发育阶段的胚状体,其中最成熟的胚具有原始的子叶。利用早期的原叶体在改良的 MT+NAA 1.0~5.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 或在不加激素的 BN 培养基上可直接由单倍雌配子体培养出多个心形胚,形成频率为在改良的 MT 培养基上是 0.7%~1.9%,在 BN 上是 2.0%,形成的胚数为 50~470 个/mL,但是胚生长很慢,不能转到固体培养基中继续培养。若用处于单核发育阶段的小孢子在 BN+IAA 11.4 μM+KT 0.93 μM 培养 4~5 个月可培育出多个雄性胚,最高频率为 23.3%,平均为 21.5%,这些胚转到不加激素的固体培养基上能够继续发育^[29,30]。Fontamel A^[31]利用雌配子体诱导出胚,但这样培养出来的胚不能完全发育以形成

植株。Laurain D^[32]利用银杏未成熟的合子胚在 MT+6-BA 10 μM 或 MT/2+6-BA 10 μM 培养基上,将处于球形、鱼雷型或早期的子叶型的合子胚诱导出胚性愈伤组织,最后形成子叶胚,最高能诱导出 9.6 个胚/外植体,诱导频率为 90%~95%。其形成的胚状体可以发育到子叶后期阶段,但这些体胚最终并没有发育成完整的植株。直到 2005 年郭长禄等^[33,34]利用大于 3 mm 的幼胚,诱导出了胚状体,其中在 MK+BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 培养基上胚状体诱导率最高,达到 53.6%,最多的一块愈伤组织形成多达 38 个胚状体。最可喜的是这些体胚能够发育成苗,完成植株的再生过程。另外他还利用未成熟胚的胚轴、子叶为外植体也诱导出了胚状体,最高诱导频率是由胚轴诱导出来的,可达 45.28%,并且完成植株再生的过程。

2.2 其他外植体

除幼胚作外植体诱导体胚发生之外,人们也不断地采用其他的器官作外植体。吴元立等^[35]利用成熟胚观察到了处于心型胚的早期胚状体。郝岗平等^[36]试图利用茎段作外植体诱导银杏的体胚,但只观察到了三细胞和四细胞的原胚出现,在 MS+NAA 2.0 mg/L+BA 0.1 mg/L 培养基上观察到了球形胚。这些研究只是观察到体胚发生前期的过程,并没有诱导出真正的体胚,看来银杏的体胚发生未成熟胚是最好的外植体。

3 银杏组培和体胚发生中使用的培养基和激素

培养基和添加的激素种类、浓度是器官发生和体胚发生研究中的两个最关键的因素。银杏的快繁研究中所用的基本培养基大多是:MS、各种改良的 MS(如 MK、大量元素减半、1/2 MS)、MT、BN、DCR、WPM、N6、White 等,使用率最高的为 MS 或稍加改动的 MS、DCR、MT(表 1)。

表 1 银杏快繁和体胚发生中所采用培养基及激素

| 外植体 | 基本培养基 | 生长调节剂 | | 分化方式 | 文献 |
|----------|----------|------------------------|-------------------------|-------|---------|
| | | NAA/mg·L ⁻¹ | 6-BA/mg·L ⁻¹ | | |
| 未成熟胚 | MS | 0.01 | 1.0 | 直接不定芽 | [13] |
| 胚、胚轴、子叶 | MS | - | 1.0 | 直接不定芽 | [10] |
| 胚 | White | 5.0(2,4-D) | - | 直接不定芽 | [11] |
| 雌雄茎段 | 改良 White | 0.5 | 0.5~1.0 | 腋芽萌发 | [14] |
| 茎段 | MS | 5.7 μM(IAA) | 4.6 μM(KT) | 腋芽、顶芽 | [19] |
| 茎段 | N6 | 0.1 | 1.0 | 间接不定芽 | [22] |
| 茎段 | N6 | 0.8~1.0 | 0.8~1.0 | 间接不定芽 | [23] |
| 茎段 | MS | 0.1 | 1.0 | 间接不定芽 | [24,25] |
| 成熟胚 | MS | 2.0 | 5.0 | 体细胞胚 | [28] |
| 雌配子体 | MT | 1.0~5.0 | 1.0 | 体细胞胚 | [29] |
| 小孢子 | MT | 11.4 μM(IAA) | 0.93 μM(KT) | 体细胞胚 | [30] |
| 未成熟合子胚 | MT/MT/2 | - | 10 | 体细胞胚 | [32] |
| 未成熟胚 | MK | 1.0 | 1.0 | 体细胞胚 | [33] |
| 未成熟胚轴、子叶 | MK | 1.0~1.5mg/L | 1.0 mg/L | 体细胞胚 | [34] |

从这些培养基各元素的比例来看,银杏快繁中氮、磷、镁对器官发生和体胚发生起着重要的作用,尤其是氮元素。如在腋芽萌发培养基中,利用 NH_4NO_3 减半的改良 MS 培养基对腋芽的萌发最好^[16,18],或在缺乏硝酸铵的 N6 培养基中能够诱导出不定芽丛^[22,23];在高浓度的 NH_4NO_3 的 MT 培养基中小孢子不能萌发,而把硝酸铵换成谷氨酸盐或用低浓度 NH_4NO_3 的 BN 培养基就可以萌发。利用磷、镁元素减半的 MS (即 MK) 培养基诱导的体胚数目最多^[32,33]。从上述报道的研究结果来看,银杏快繁较易成功的外源激素大多为 6-BA 和 NAA (见表 1),而且它们的比值关系有时候不太符合组培中的激素杠杆理论,即细胞分裂素/生长素比值高有利于不定芽的产生。如在用未成熟胚诱导胚状体时 $\text{BA}/\text{NAA} = 1.0$ ^[33],有的甚至 NAA 的浓度大于 BA 的浓度,如 Laurain D^[29] 在对小孢子进行培养时 IAA 为 $11.4 \mu\text{M}$,而 KT 为 $0.93 \mu\text{M}$, $\text{IAA}/\text{KT} = 12.2$ 。但大多数的研究表明,银杏的外植体快繁所需的激素中细胞分裂素较生长素类更重要一些,如 Laurain D^[30] 将未成熟的合子胚在只含有 6-BA 的 MT/2 或 MT 上诱导出体胚。我们的研究表明,银杏的子叶在只含有 KT 2.0 的 MS 培养基中也有不定芽的发生^[18]。Laurain D^[29] 认为外源生长素对银杏小孢子产生胚来说不是绝对的要求,只是添加生长素可以增加胚形成的数量。而且用 $\text{NAA}/6\text{-BA} > 1$ 以上对未成熟的合子胚进行诱导,以后培养过程中不需添加生长素才有体胚的发生。这些结果说明,内源生长素可能在银杏的不同外植体中含量不同,有的较高,有的较低。

4 问题与展望

从以上的研究结果中可以看出,银杏快繁最易成功的首属茎段外植体,主要靠腋芽或嫩梢繁殖,可以保存母本的优良性状,但分化数少,不定芽数较少,繁殖速度较慢。1 个月龄小苗带有子叶腋芽的茎段具有发生丛生芽的潜力(资料未发表)。不管是器官发生还是体胚发生,要获得大量的不定芽或体胚,达到快速繁殖的目的,最好的外植体就是未成熟胚,特别是小于 3 mm 以下的幼胚培养最易成功。

目前尽管可以诱导出大量的不定芽或体胚,但这些诱导出的不定芽或体胚只发育到初期的阶段,就慢慢地死亡,不能形成真正的再生苗,因此对不定芽或体胚的后期培养条件还需要进一步的摸索,特别是根的诱导是较关键的一步。另外,我们在研究中还发现,银杏实生苗生长具有长短枝现象,在组培过程中,

也发现此现象,有的芽苗很难长高,叶片轮生,继代后不伸长;银杏茎段培养有的外植体多次继代后易出现木质化,茎变硬变黑,难以培养下去;银杏外植体培养过程中愈伤化和褐化较严重;不定芽产生的频率低,这些芽在培养过程只有少部分能够成苗;在培养中出现二次生长现象。

今后的研究应该着重对不定芽或体胚进一步发育或不定根再生方面进行深入探讨;另外若利用成熟胚、茎段这些最易得、最普遍、不受季节限制的外植体建立不定芽或体胚发生的稳定快繁体系,将会为银杏的转基因工程或工厂化育苗提供最有利的基础支持。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Tulecke W R. Haploid tissue culture from the female gametophyte of *Ginkgo biloba*[J]. Nature,1964,302(4):94-95.
- [3] 王伏雄,陈祖铿. 银杏幼胚离体培养的研究(2)[J]. 植物学报,1965,13(3):224-230.
- [4] 李继侗,沈同. The Effect of "Pantothenic Acid" on the growth of the yeast and on the growth of the radical of ginkgo embryo in artificial media. Contributions from the Botanical [J]. Laboratories of National Tsing Hua University, 1934, 8:53-60.
- [5] 陈耀华. 银杏组培育苗试验初报[J]. 北京林业大学学报,1988,10(增刊):106-108.
- [6] Inoue H. Hormonal responses of petioles and embryos in *Ginkgo biloba* cultures[J]. Bulletin of the Tokyo University Forests,1996,96:119-123.
- [7] Campe N D, Coker P S, Wedge D E et al. In vitro culture of ginkgo [J]. In Vitro Plant,1995,33(2):125-127.
- [8] Holt B F, Rothwell G W. Is *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae) really an oviparous plant? [J]. American Journal of Botany,1997,84(6):870-872.
- [9] 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.
- [10] 沈敏娟. 银杏的组织培养[J]. Quarterly Journal of the Experimental forest of National Taiwan University,1994,8(1):127-147.
- [11] 罗紫娟. 银杏组织培养的初步研究[J]. 云南植物研究,1984(1):94-97.
- [12] P. S. Choi, D. Y. Cho, W. Y. Soh. Shoot organogenesis from immature zygotic embryo culture [J]. Biologia plantarum,2003,47(2):309-312.
- [13] Chu M C, Skirvin R M, Jung H. Micropropagation of shoots *Ginkgo biloba* [J]. Hortscience,1987,22(5):1069.
- [14] 罗紫娟. 银杏茎段的组织培养[J]. 杭州师范学院学报,1990(3):60-64.
- [15] 罗言云,贾勇炯,曹有龙. 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.
- [16] 郝岗平,杜希华,尤勇,等. 不同因素对离体培养的银杏幼茎腋芽生长发育的影响[J]. 林业科学研究,2000,13(2):217-221.

应用研究

- [17] 徐承水. 银杏茎段组织培养实验[J]. 中国农学通报, 2000, 16(1): 52-53.
- [18] 陈颖, 曹福亮. 不同银杏外植体器官分化的研究[J]. 东北林业大学学报, 2006, 34(6): 51-53.
- [19] F. Tommasi, F. Scaramuzzi. In vitro propagation of *Ginkgo biloba* by using various bud cultures[J]. *Biolgia plantum*, 2004, 48(2): 297-300.
- [20] 罗言云, 贾勇炯. 银杏茎段的组织培养及其植株再生[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2001, 38(3): 412-416.
- [21] 陈颖, 曹福亮. 稀土对银杏芽苗不定根发生的影响[J]. 南京林业大学学报, 2005, 29(6): 54-56.
- [22] 孙满芝. 组织培养法繁殖银杏苗木试验[J]. 山东林业科技, 1996, 104(3): 4-6.
- [23] 王洪善, 孙满芝. 银杏愈伤组织培养形态建成的研究[J]. 林业科技通讯, 1997, 9: 27-29.
- [24] 胡蕙露, 胡翠玲, 杨枝发. 银杏茎段组织培养正交实验[J]. 安徽农业大学学报, 1997, 24(2): 129-133.
- [25] 胡蕙露, 杨景华, 杨荻荣. 银杏茎段试管培养条件筛选研究[J]. 林业科学, 2002, 38(3): 52-56.
- [26] 沈海龙. 植物组织培养[M]. 中国农业出版社, 2005.
- [27] 陈金慧, 施季森, 诸葛强, 等. 植物体细胞胚胎发生机理的研究进展[J]. 南京林业大学学报, 2003, 27(1): 75-80.
- [28] Yates W F. Induction of embryogenesis in embryo-derived callus of *Ginkgo biloba* L. [J]. *Int Congr Plant Tissue Cell Cult*, 1986(6): 43-46.
- [29] Laurain D, Chenieux J C, Tremouillaux-Guiller J. Direct embryogenesis from female haploid protoplasts of *Ginkgo biloba* L., a medicinal woody species[J]. *Plant Cell Rep*, 1993, 12: 656-660.
- [30] Laurain D, Tremouillaux-Guiller. Embryogenesis from microspores of *Ginkgo biloba* L. [J]. *Plant Cell Rep*, 1993, 12: 501-505.
- [31] Fontamel A, Isabelle S, Vincent p. Regeneration in *Ginkgo biloba* L.: Induction of embryogenesis from megagametophyte according to the development stage[J]. *C R Acad Sci*, 1994, 317(2): 149-155.
- [32] Laurain D, Chenieux J C, Tremouillaux-Guiller J. Production of Ginkgolide and bilobalide in transformed and gametophyte derived cell cultures of *Ginkgo biloba* [J]. *Phytochemistry*, 1997, 46(1): 127-130.
- [33] 郭长禄, 陈力耕, 何新华, 等. 银杏幼胚离体培养再生植株的研究[J]. 园艺学报, 2005, 32(1): 105-107.
- [34] 郭长禄, 陈力耕, 何新华, 等. 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.
- [35] 吴元立, 严学成. 银杏成熟胚培养的细胞组织学观察[J]. 林业科学, 1998, 34(4): 8-12.
- [36] 郝岗平, 杜希华, 史仁玖. 银杏幼嫩茎段培养诱导愈伤组织及其细胞学研究[J]. 西北植物学报, 2003, 23(4): 648-652.

(通讯地址: 210037, 南京市龙蟠路 159 号)

《林业科技开发》投稿指南

《林业科技开发》杂志是由南京林业大学与国家林业局科技司等合办的国家级林业科技期刊, 是国家林业局重点扶持期刊, 以“面向全国、注重开发、推广成果、服务生产”为宗旨, 以创新性、实用性作为选择稿件的最重要依据。该刊已入选“中国科技核心期刊”和“中国农业核心期刊”等, 并已被《中国科技期刊全文数据库》、《中国科技期刊电子版》、《中文科技期刊数据库》、《中国科学引文数据库来源期刊》、《中国学术期刊综合评价数据库》等收录。本刊自 2001 年起, 连续两次被评为江苏省一级期刊。本刊报道内容为: 经济林、用材林、竹林、防护林以及园林植物等的育种、栽培经营及病虫害防治技术; 木、竹加工工艺、人造板制造技术以及林木资源的综合开发利用、园林规划设计等; 各种信息, 如推广项目、专利介绍、成果鉴定及有关开发信息等。设有专家论坛、技术开发、应用研究、风景园林、生产经验、经营管理、科技信息、专利介绍、专题讲座、种苗商情等多项专栏。欢迎广大林业科技工作者踊跃投稿。

1. 来稿要求字迹工整、清晰, 论点明确, 数据可靠, 文句通顺。
2. 稿件力求精练, 3000~5000 字为宜, 并附摘要、关键词、作者简介、基金项目名称及编号(应用研究类论文需附摘要、关键词、及作者单位的英语译文等)。
3. 文内附图请用计算机绘制或描图纸墨线绘制, 线条均匀; 照片要求清晰, 尺寸适当; 表格一律采用三线表, 不留竖线。
4. 稿件应采用国家法定计量单位与符号。文稿中外文字母的文体及大小写、正斜体必须标明。
5. 稿件应按规定格式著录参考文献, 特别是研究类及综述类稿件, 参考文献必须按规定列出, 并在文中注明引用处。
6. 来稿文责自负, 请勿一稿多投。若发现他刊已用的来稿, 一律作废, 已刊出的将不发稿酬。
7. 来稿请写明工作单位、姓名及详细通讯地址和电话。
8. 来稿一般不退, 请自留底稿。投稿后 4 个月内未接到录用通知, 可另投他刊。来稿一经刊登, 本刊将保留专有使用权 1 年。
9. 依照《著作权法》规定, 本刊可以对来稿作文字修改、删节。如作者不允许对文稿作修改, 务请在来稿中注明。作者若不同意其他报刊转载或摘编其作品, 亦请在来稿时声明。
10. 来稿一经刊登, 将按规定支付稿酬, 并赠送本期 2 册。
11. 作者来稿发表后, 文章署名权归作者所有, 其编辑版权属本刊所有。本刊被有关数据库收录并编入《中国学术期刊(光盘版)》, 凡不同意自己论文被收录或入编、入网的作者请在投稿时声明。作者的著作权使用费与本刊稿酬一次性付给, 不再另付。
12. 本刊发表的论文, 凡涉及国家或省(部)级成果奖励者, 请及时提供获奖复印件或单位证明, 本刊将给予适当奖励。
13. 来稿请挂号寄至本刊编辑部, 同时请以电子邮件附件形式发送到本刊, 勿寄个人, 以免耽误。

编辑部地址: 南京市龙蟠路 159 号南京林业大学内 邮政编码: 210037

电话: (025) 85427227, 85427298 传真: (025) 85427298 E-mail: lkkf@vip.163.com http://www.lkkf.cn