

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.01.022

刘建军, 龚一富, 王世安, 等. 银杏愈伤组织诱导的多因子正交试验研究[J]. 广西植物, 2014, 34(1):116-119

Liu JJ, Gong YF, Wang SA, et al. Callus induction of *Ginkgo biloba* by orthogonal test[J]. *Guihaia*, 2014, 34(1):116-119

# 银杏愈伤组织诱导的多因子正交试验研究

刘建军<sup>1</sup>, 龚一富<sup>2\*</sup>, 王世安<sup>1</sup>, 赵群芬<sup>2</sup>, 钱丹<sup>3</sup>

(1. 宁波市沁香园农业开发有限公司, 浙江宁波 315800; 2. 宁波大学海洋学院应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江宁波 315211; 3. 宁波市合一农业科技开发有限公司, 浙江宁波 315000)

**摘要:** 采用正交试验设计法, 研究了 NAA、KT、2,4-D、蔗糖浓度和不同外植体类型等因素对银杏愈伤组织诱导的影响。结果表明: 不同外植体类型对银杏愈伤组织诱导率影响最大, KT 和 NAA 其次, 2,4-D 和蔗糖浓度最小。银杏愈伤组织诱导最佳培养基为 MS+NAA 0.5 mg · L<sup>-1</sup>+KT 0.5 mg · L<sup>-1</sup>+蔗糖 40 g · L<sup>-1</sup>, 最佳外植体为茎段, 其愈伤组织诱导率可达 100%。

**关键词:** 银杏; 愈伤组织诱导; 正交试验

**中图分类号:** Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2014)01-0116-04

## Callus induction of *Ginkgo biloba* by orthogonal test

LIU Jian-Jun<sup>1</sup>, GONG Yi-Fu<sup>2\*</sup>, WANG Shi-An<sup>1</sup>, ZHAO Qun-Fen<sup>2</sup>, QIAN Dan<sup>3</sup>

(1. Ningbo Qinxiangyuan Agriculture Development Co. Ltd., Ningbo 315800, China; 2. School of Marine Science, Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Minister of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 3. Ningbo Heyi Agriculture Science and Technology Development Co. Ltd., Ningbo 315000, China)

**Abstract:** Effects of NAA, KT, 2,4-D, sucrose concentration and explants type on the callus induction of *Ginkgo biloba* were investigated by orthogonal test in this paper. The results showed that explants type was the most important factor among the five factors for callus induction of *G. biloba*, followed by KT and NAA concentration, while 2,4-D and sucrose concentration were the weakest. The best medium for callus induction of *G. biloba* was MS+NAA 0.5 mg · L<sup>-1</sup>+KT 0.5 mg · L<sup>-1</sup>+sucrose 40 g · L<sup>-1</sup>, and stem was the best explants. With the stem as explants and with the optimal medium as the culture medium, the highest rate of callus induction in *G. biloba* was up to 100%.

**Key words:** *Ginkgo biloba*; callus induction; orthogonal test

银杏(*Ginkgo biloba*)为银杏科(Ginkgoaceae)银杏属植物, 又名白果树、公孙树, 是当今世界最古老的孑遗植物, 为国家二级保护植物。银杏树具有较高的观赏价值和药用价值。银杏叶片中含有银杏内酯、白果内酯、银杏黄酮、有机酸、多糖、酚类等多种次生代谢产物和生理活性物质(Jacobs *et al.*, 2000; 刘万宏等, 2007; 王飞娟, 2010; 芮海云等, 2008), 可用于治疗和预防肺虚咳嗽、冠心病、心绞痛

和高血脂症等多种疾病, 疗效显著(Bilia, 2002), 银杏植物药的研究和开发已成为国际植物药开发的热点之一。由于银杏是国家保护植物, 资源有限, 银杏内酯等次生代谢产物含量非常低(0.06%), 价格昂贵(银杏内酯价格每公斤 20 万美元)(Van Beek *et al.*, 1991), 所以从天然银杏叶片中提取次生代谢产物远远不能满足市场需求, 开发银杏次生代谢产物优质药源成为十分活跃的领域。

收稿日期: 2013-05-08 修回日期: 2013-07-13

基金项目: 浙江省海洋生物技术产业科技创新团队项目(2012R10029-07); 宁波市农业科技攻关项目(2010C10051); 宁波大学学科项目(XKL11D2099)。

作者简介: 刘建军(1985-), 男, 浙江宁波人, 工程师, 主要从事植物生物技术和植物栽培方面的研究, (E-mail)1183716332@qq.com。

\*通讯作者: 龚一富, 博士, 副教授, 主要从事植物次生代谢工程、植物分子生物学和基因工程的研究, (E-mail)gongyifu@163.com。

银杏细胞大规模培养技术是生产银杏内酯等次生代谢产物的前提。优化银杏愈伤组织诱导和培养条件,可为开展银杏有效成分优良株系的筛选、大规模细胞培养生产、次生代谢产物调控和机理研究等提供基础。目前,银杏愈伤组织诱导研究一般采用单因素对诱导频率的简单比较(孙楠楠等,2011)。罗言云等(2001)研究 MS、B5、6,7-V 和 White 培养基对带腋芽的银杏茎段外植体愈伤组织诱导的影响,表明 MS 培养基有利于愈伤组织诱导和生长。杨林等(2000)研究单一激素种类对银杏叶片、叶柄和茎段愈伤组织诱导的影响,表明激素 NAA 对愈伤组织诱导效果最佳。秦公伟等(2011)等研究表明 NAA 和 6-BA 组合更适合银杏愈伤组织诱导和生长。张君诚(1999)研究表明,外源激素的各种组合对银杏愈伤组织的诱导均明显优于单一激素处理。如何用最少的实验次数筛选对银杏愈伤组织诱导最适宜的激素组合和浓度配比,对建立高效银杏愈伤组织诱导系统和细胞悬浮培养具有重要意义。正交试验是以数理统计为基础的一种理想的优化试验设计方案,通过正交试验可用最少的试验次数,从多个因素中确定影响试验结果的各因素的主次和最优结果。因此,本文采用正交设计方法,研究不同激素种类和浓度、外植体类型和蔗糖浓度对银杏愈伤组织诱导频率的影响,筛选出银杏愈伤组织诱导的最佳诱导外植体和诱导条件,为银杏细胞悬浮培养大量生产有用次生代谢产物提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

银杏叶片、叶柄、茎段等外植体采自宁波大学校园内萌生的银杏幼嫩枝条。白果采自 10 a 树龄的银杏树。

### 1.2 外植体表面消毒方法

将刚采集的银杏叶片、叶柄、茎段、白果等外植体先用自来水冲洗干净,装入广口瓶放在超级工作台上,加入 75% 的酒精表面消毒约 1 min,用无菌水冲洗 2~3 次,转入 10% 次氯酸钠溶液中灭菌约 10 min,用无菌水冲洗 4~5 次。将外植体用无菌吸水纸吸干水分备用。

### 1.3 培养方法与条件

在无菌条件下,将叶片切成 1~2 cm<sup>2</sup> 的小块,叶柄和茎段切成 1~2 cm 的切段,用刀片切开白果,取

出白果内的子叶,将叶片、叶柄、茎段和子叶分别接种到添加不同激素种类和浓度的 MS 固体培养基上,每种培养基共接种 90 个左右外植体,分成 3 个重复处理组,每个处理组接种 30 个左右外植体,每瓶接种 8~9 个外植体。置于温度为(25±1)℃,光照强度为 2 000 lx、12h/12h 的光照培养箱中进行光照培养。及时观察记录银杏外植体愈伤组织诱导的时间、质地、颜色等,20 d 后统计愈伤组织诱导率。

### 1.4 试验设计

银杏愈伤组织诱导培养基筛选采用 5 因素 4 水平正交试验,正交表选用 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>),表头设计见表 1。正交表中 A、B、C、D、E 分别对应于 NAA、KT、2,4-D、外植体和蔗糖浓度 5 个因素。为了选择银杏愈伤组织诱导最适宜的诱导培养基种类和浓度配比,将 A 因素(NAA)对应的 4 个水平设计为 0、0.5、1 和 2 mg·L<sup>-1</sup>,B 因素(KT)对应的 4 个水平设计为 0、0.2、0.5 和 1 mg·L<sup>-1</sup>,C 因素(2,4-D)对应的 4 个水平设计为 0、0.2、0.5 和 1 mg·L<sup>-1</sup>。研究不同外植体对银杏愈伤组织诱导和取材的难易程度不同,将 D 因素对应的外植体分别设计为子叶、叶片、叶柄和茎段,E 因素(蔗糖)对应的 4 个水平设计为 20、30、40 和 50 mg·L<sup>-1</sup>。正交表和 16 种培养基及 5 因素的详细配比见表 2。

表 1 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>)正交试验表头设计表

Table 1 Design form of orthogonal test L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>)array

水平 Level	A (mg·L <sup>-1</sup> ) NAA	B (mg·L <sup>-1</sup> ) KT	C (mg·L <sup>-1</sup> ) 2,4-D	D 外植体 Explant	E (g·L <sup>-1</sup> ) 蔗糖 Sucrose
1	0.0	0.0	0.0	子叶	20
2	0.5	0.2	0.2	叶片	30
3	1.0	0.5	0.5	叶柄	40
4	2.0	1.0	1.0	茎段	50

### 1.5 数据处理

采用 Excel 软件对数据进行整理、计算,用平均数代表各处理整体水平,采用 SPSS 统计软件的 One-way ANOVA 分析各参数的差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 银杏外植体愈伤组织诱导

将银杏叶片、叶柄、茎段和子叶分别接种到 16 种愈伤组织诱导培养基上,观察愈伤组织诱导的时间、质地、颜色等,表 2 结果表明:外植体接种 2 d 后外植体切口处膨大,4 d 后组织块明显增厚,6 d 后外植体切口处出现肉眼可见的愈伤组织,最迟在

表 2 银杏愈伤组织诱导正交试验结果

Table 2 Result of callus induction of *G. biloba* in the orthogonal test

编号 No.	A NAA	B KT	C 2,4-D	D 外植体 Explant	E 蔗糖 Sucrose	出愈天数 Days of callus induced	颜色 Color	质地 Density	出愈率(%) Rate of callus
1	1	1	1	1	1	7	黄绿	致密	83.3
2	1	2	2	2	2	9	黄绿	致密	3.3
3	1	3	3	3	3	14	浅黄	致密	3.3
4	1	4	4	4	4	8	浅黄	致密	70.0
5	2	1	2	3	4	12	白色	疏松	10.0
6	2	2	1	4	3	9	黄色	致密	96.6
7	2	3	4	1	2	6	浅黄	疏松	86.7
8	2	4	3	2	1	7	黄绿	致密	33.3
9	3	1	3	4	2	10	白色	疏松	76.7
10	3	2	4	3	1	13	黄绿	致密	6.7
11	3	3	1	2	4	6	白色	疏松	60.0
12	3	4	2	1	3	8	浅黄	疏松	83.3
13	4	1	4	2	3	7	浅黄	疏松	43.3
14	4	2	3	1	4	6	白色	疏松	73.3
15	4	3	2	4	1	8	浅黄	疏松	100.0
16	4	4	1	3	2	15	浅黄	致密	6.7

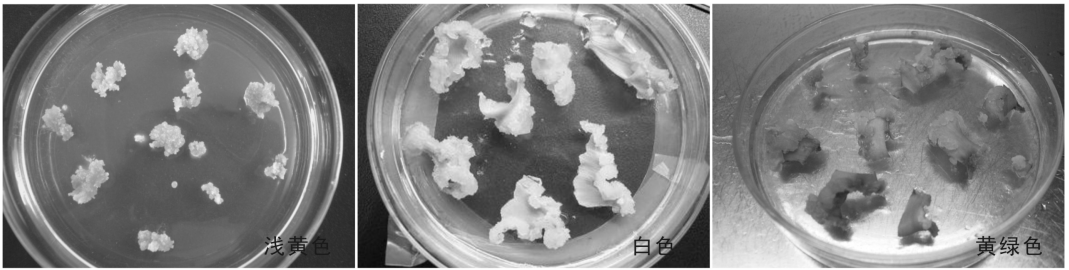


图 1 银杏不同外植体愈伤组织诱导

Fig. 1 Callus induction from various explants of *G. biloba*

15 d 左右长出愈伤组织,所有培养基上均未出现细菌和真菌污染,无菌率为 100%。诱导的愈伤组织的颜色多样,有黄绿色、浅黄色、白色等不同颜色的愈伤组织,有的愈伤组织质地致密,有的愈伤组织质地疏松(图 1)。

## 2.2 影响银杏愈伤组织诱导率的因素分析

正交试验结果表明(表 2),NAA、KT、2,4-D、外植体类型和蔗糖浓度对银杏愈伤组织诱导率均有影响,但仅仅简单比较百分率不能准确确定影响银杏愈伤组织诱导的各因素的主次顺序。

通过直观分析表明(表 3),NAA 浓度从 0 增加到  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,银杏愈伤组织诱导率呈先增加后降低的趋势,当 NAA 浓度为  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,银杏愈伤组织的诱导率最高,为 56.7%。通过比较直观分析表中愈伤组织诱导频率平均值可知,当 KT 浓度为  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、2,4-D 浓度为  $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时银杏愈伤组织的诱导率最高。比较不同外植体对愈伤组

表 3 银杏愈伤组织诱导的直观分析

Table 3 Audio-visual analysis for callus induction rate of *G. biloba*

因素和 Sum of factor	A NAA	B KT	C 2,4-D	D 外植体 Explant	E 蔗糖 Sucrose
K1	159.9	213.3	246.6	326.6	223.3
K2	226.6	179.9	196.6	139.9	173.4
K3	226.7	250.0	186.6	26.7	226.5
K4	223.3	193.3	206.7	343.3	213.3
X1	40.0	53.3	61.7	81.7	55.8
X2	56.8	45.0	49.2	35.0	43.3
X3	56.7	62.5	46.7	6.7	56.6
X4	55.8	48.3	51.7	85.8	53.3
R	16.8	17.5	15.0	79.1	13.3

织诱导率的影响,结果表明茎段外植体诱导愈伤组织率最高,子叶其次,但茎段和子叶诱导愈伤组织频率相差不明显。叶柄难于诱导愈伤组织,其愈伤组织诱导率最低,仅为 6.7%。比较蔗糖浓度对银杏愈伤组织出愈率的影响,结果表明当蔗糖浓度为  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时银杏愈伤组织诱导率最高。方差分析结果

表明(表 4), 外植体类型对银杏愈伤组织诱导率的影响差异极显著, 而 NAA、KT、2, 4-D 和蔗糖浓度对银杏愈伤组织诱导率的影响差异不显著。比较 5 个因素的极差(R)表明, D 因素(外植体)的极差最大(79.1), 其次是 B 因素(KT)和 A 因素(NAA), 影响比较小的是 C 因素(2, 4-D)和 E 因素(蔗糖浓度)。因此, 影响银杏愈伤组织诱导率的主次因素为 D>B>A>C>E。根据各因素平均值(X<sub>i</sub>)的大小可得出最优组合为: A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>D<sub>4</sub>E<sub>3</sub>, 即培养基为 MS + NAA 0.5 mg · L<sup>-1</sup> + KT 0.5 mg · L<sup>-1</sup> + 蔗糖 40 g · L<sup>-1</sup>, 外植体为茎段时, 其愈伤组织诱导频率最高。将茎段外植体接种到愈伤组织最优培养基上, 结果表明最优组合的愈伤组织诱导率为 100%, 更进一步验证了正交试验结果的准确性。

表 4 银杏愈伤组织诱导率方差分析

Table 4 Variance analysis for callus induction rate of *G. biloba*

因素 Factor	偏差平方和 Variance	自由度 Degree of freedom	F 值 F value	F <sub>0.01</sub>
NAA	809.31	3	1.803	9.280
KT	698.62	3	1.556	
2, 4-D	518.66	3	1.155	
外植体 Explant	17471.31	3	38.919 * *	
蔗糖 Sucrose	448.92	3	1.000	
误差 Error	448.92	3		

### 3 结论与讨论

银杏愈伤组织的形成受到多种因素的影响, 外植体来源、取材时间、培养基类型、激素种类及浓度配比、培养条件、蔗糖浓度等因素均影响银杏愈伤组织的诱导和分化(孙楠楠等, 2011)。如果考虑所有因素进行全面试验研究, 工作量相当大, 而正交试验是一种理想的优化试验设计方案, 通过正交试验, 能够以最少的次数, 从多个因素中找出影响试验结果各因素的主次和最优结果, 克服了培养条件设计上的盲目性, 提高了工作效率和实验数据准确性。

在影响银杏愈伤组织诱导的因素中, 激素种类及浓度配比是影响银杏愈伤组织诱导和生长的主要因素。NAA 是广谱型植物生长调节剂, 生理活性较弱, 有利于诱导愈伤组织。外源激素的各种组合对外植体诱导效果明显优于单种激素处理(张君诚, 1999)。本研究结果表明, NAA 与 KT 组合诱导效果最佳, 诱导银杏愈伤组织最佳培养基组合 NAA 和 KT 浓度均为 0.5 mg · L<sup>-1</sup>, 其愈伤组织诱导率

达 100%。秦公伟等(2011)研究结果表明, 在 NAA 浓度为 2.0 mg · L<sup>-1</sup> 时, KT 系列浓度所诱导的愈伤组织生长状况总体良好, 但后期易出现褐化现象。胡蕙露等(1997)诱导银杏茎段愈伤组织培养基 NAA、KT 和 BA 浓度分别为 0.5、0.5 和 0.1 mg · L<sup>-1</sup>, 其愈伤组织诱导时间为 6 d, 但愈伤组织诱导率仅为 85.7%, 低于本试验结果, 虽与本研究 NAA 与 KT 组合优化浓度一致, 但添加 6-BA 更不利于愈伤组织诱导, 这与杨林(2000)研究中认为 6-BA 对银杏愈伤组织诱导效果最差的结论一致。2, 4-D 生理活性强, 诱导快, 但也易使细胞老化。2, 4-D 常用于诱导植物的胚性愈伤组织, 但本研究所优化的激素最佳组合为 NAA 和 KT, 不添加 2, 4-D 说明 2, 4-D 的添加不利于银杏愈伤组织的诱导, 这与姜玲等(1998)的研究结果一致。

银杏愈伤组织诱导可选用的外植体有叶片、叶柄、茎段、根、子叶、胚、胚乳等, 各外植体诱导愈伤组织的能力不同(孙楠楠等, 2011; 陈颖等, 2011)。本研究结果表明, 茎段外植体诱导愈伤组织率最高, 其次是子叶, 而叶柄难于诱导愈伤组织, 其愈伤组织诱导率最低, 茎段和子叶诱导能力差异不明显。杨林(2011)研究不同激素对银杏叶片、叶柄和茎段外植体愈伤组织诱导率的影响, 结果表明, 在诱导培养基中添加不同浓度的 NAA、6-BA 和 2, 4-D 时, 茎段外植体愈伤组织诱导频率明显比叶柄和叶片外植体高, 说明茎段诱导愈伤组织能力最强, 与本研究结论一致。徐刚标等(1999)研究表明, 银杏愈伤组织诱导能力是子叶>幼叶>茎段, 与本研究不同。各种外植体诱导愈伤组织能力不同可能与其含有的内源激素含量有关(沙波等, 2007)。前人各研究中得出的愈伤组织诱导能力最佳外植体各不相同, 还有能与所有激素种类和浓度不同有关, 外源激素通过调节内源激素含量导致不同外植体的诱导能力表现出差异, 对这方面的研究还值得进一步深入研究。

### 参考文献:

- Bilia AR. 2002. *Ginkgo biloba* [J]. *Fitoterapia*, **73**(3):276-279
- Chen Y(陈颖), Xu CP(徐彩平), Sheng LL(盛丽莉), et al. 2011. Adventitious buds formation from immature or near mature embryo cultures of *Ginkgo biloba* (银杏胚的培养及不定芽的产生). *Guihaia* (广西植物), **31**(5):679-683
- Hu HL(胡蕙露), Hu CL(胡翠玲), Yang ZF(杨枝发). 1997. Studies on callus induction and plant regeneration of stem section of *Ginkgo biloba* (银杏茎段组织培养正交试验) [J]. *J Anhui* (下转第 45 页 Continue on page 45)