

银杏胚的培养及不定芽的产生

陈颖, 徐彩平, 盛丽莉, 李淑娴, 曹福亮*

(南京林业大学森林资源与环境学院, 南京 210037)

摘要: 通过对银杏未成熟胚和近成熟胚的培养, 研究其不定芽的发生情况。结果表明: (1) 银杏的种胚存在生理后熟现象, 10月上旬, 胚未成熟, 在360个种核中, 小子叶胚数(1.0~3.0 mm)为26.1%, 大子叶胚(3.0~5.0 mm)的种子数占总种核数的42.2%, 种核的出胚率为71.1%; (2) 大子叶胚和小子叶胚接种在不同的培养基上后, 发现大子叶胚膨大, 子叶伸长膨大, 胚愈伤化程度小。而小子叶胚全部愈伤化, 继续培养出现芽点, 频率在35.0%以上; (3) 大子叶胚继代在改良MS+0.2 mg·L⁻¹ IAA+0.75 mg·L⁻¹ KT培养基后, 发现子叶远基端有不定芽的产生, 最高频率达20.0%; (4) 近成熟胚在改良MS+NAA0.01 mg·L⁻¹+6-BA1.0 mg·L⁻¹培养基上, 胚芽出芽率最高达42.5%, 继续培养后发现丛芽点的出现, 再继续生长20 d后出现许多芽丛, 芽数达3个, 频率在30.0%以上。

关键词: 银杏; 未成熟胚; 近成熟胚; 不定芽

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)05-0679-05

Adventitious buds formation from immature or near mature embryo cultures of *Ginkgo biloba*

CHEN Ying, XU Cai-Ping, SHENG Li-Li, LI Shu-Xian, CAO Fu-Liang*

(College of Forest Resource and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: The formation of adventitious buds of *Ginkgo* were studied by using near mature and immature embryos cultures. The results were as followed: (1) *Ginkgo* embryo had characteristic of physiological after-ripening. The rate of small cotyledon embryos(1.0-3.0 mm) was 26.1%, the rate of large cotyledon embryos(3.0-5.0 mm) was 42.2% and the total rate of the seed with embryo was 71.1% in October; (2) The cotyledons from large cotyledon embryos became swollen and few callus was produced after cultured on different induction mediums, but the small cotyledon embryos of all could induced callus and the green spots were initiated on the surface of callus after subculuring two times; (3) The adventitious buds formed from cotyledon of large cotyledon embryos after subcultured on modified MS medium with 0.2 mg·L⁻¹ IAA and 0.75 mg·L⁻¹ KT. The highest emergence of adventitious buds was 20.0%; (4) The highest frequency of embryo bud germination of near mature embryos (42.5%) and the highest number of bundle buds per explant(3.0) were obtained on modified MS medium with 0.01 mg·L⁻¹ NAA and 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA.

Key words: *Ginkgo biloba*; immature embryo; near mature embryo; adventitious buds

在银杏的组织培养中, 国内外学者先后在未成熟胚、成熟胚、子叶、茎段的分化有了一定的研究(Choi等, 2003, Tommasi等, 2004; Camper等,

1997; 郭长禄, 2004, 2005; 陈颖等, 2006)。但仍然存在分化难、分化数少、体系不稳定的问题。我们已通过对无菌苗茎段部位的分别培养, 建立了一个稳定

收稿日期: 2010-10-13 修回日期: 2011-03-16

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2006BAD18B0301); 江苏省普通高校自然科学研究计划(07KJB220048); 江苏省高校优势学科建设工程资助项目[Supported by the National Science and Technology Research and Development Program of China(2006BAD18B0301); Scientific Research Fund of Jiangsu Common Institutions of Higher Education(07KJB220048); Priority Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions]

作者简介: 陈颖(1966-), 女, 副教授, 主要从事抗性生理和生物技术研究, (E-mail) chynjfu@163.com.

*通讯作者: 曹福亮, 博士, 教授, 主要从事经济林、生物技术方面的研究。

的银杏茎段组培快繁体系(陈颖等,2010)。通过定芽(包括顶芽和腋芽)的繁殖可以获得遗传性状稳定的植株,但仍然存在繁殖系数少的困难。为进一步提高银杏不定芽的发生频率和减少偶然性因素,笔者对银杏的成熟胚和未成熟胚愈伤组织诱导和不定芽的分化进行了研究,以期建立高频率的不定芽或体细胞胚再生体系提供有力的技术指导。

1 材料和方法

1.1 种胚来源及分类

种核来源于江苏邳州和盐城(品种:大佛指),种核9月下旬收获后放入4℃冰箱中储藏2周左右。银杏种子具有休眠特性,收获时胚很小或没有,称为胚未发育完全型,在储藏的过程中种胚逐渐长出或长长。种胚在发育过程中出现不同步性,参考Choi等(2003)和郭长禄(2005)法以及胚的长度可将银杏的胚分为5种类型:一类胚长小于1mm以下呈米粒状,子叶和胚芽均未出现,称为圆球胚,第二类在1.0~3.0mm之间,在体视显微镜下可观察到子叶刚开始膨大,称为小子叶胚(图版I:A1);另一类胚长3.0~5.0mm,这一类胚子叶已经出现,但子叶稍部尖削,胚芽部开始膨大,称为大子叶胚(有时有双胚现象,图版I:A2)。这3种类型的胚出现在10月10号之前(南京地区)统称为未成熟胚。11月上旬~12月上旬的胚大都在5.0mm左右,子叶和胚芽都已完整出现,介于成熟胚与未成熟胚之间,称为近成熟胚(子叶有两片,也有3片的,图版I:A3)。次年2月的胚完全成熟称为完全成熟胚(有的胚长可以达到10mm以上,不同品种之间有差异,但大都超过5.0mm以上)(陈颖等,2006)。本研究接种的胚为10月上旬和11月上旬的胚。

1.2 种胚的处理与接种

将银杏种核用5%84消毒液浸泡10min后,剥去骨质中种皮,依次用70%的乙醇浸泡约2min和0.1%的HgCl₂浸泡8~10min,无菌水清洗5次,用无菌的滤纸吸去材料表面的水份,在无菌条件下从胚乳中取出胚,接种在新鲜培养基上。

1.3 胚的培养

将胚接种在MS、改良MS(NH₄NO₃减半)、DCR3种基本培养基,同时附加不同浓度的6-BA、KT、TDZ、2,4-D、CH(水解酪蛋白)进行培养,每瓶4个或5个外植体,每个处理4~10瓶。

1.4 培养基配制、灭菌及培养室条件

在以上培养基中各添加蔗糖30g·L⁻¹、琼脂7.0g·L⁻¹,pH值5.8左右;121℃高压灭菌20min,每25d继代1次。培养室温度为(25±2)℃,光强为30~40μmol·m⁻²·s⁻¹,每天14h光照10h黑暗。

1.5 统计分析

所有数据采用SPSS12.0进行方差分析,Duncan检测方法在0.05水平检测差异显著性,所有百分数在统计分析前均进行反正弦数据转化。

2 结果与分析

2.1 种核出胚率

通过剥取银杏种核中的胚(10月上旬的邳州种胚)发现,在360个种核中有胚的种核总数为256个,无胚的种核数为104个。具大子叶胚的种核数占总种核数的42.2%,具小子叶胚的种核数为26.1%,具圆球胚的种核数为2.8%,该种核批的出胚率为71.1%,无胚率为28.8%。

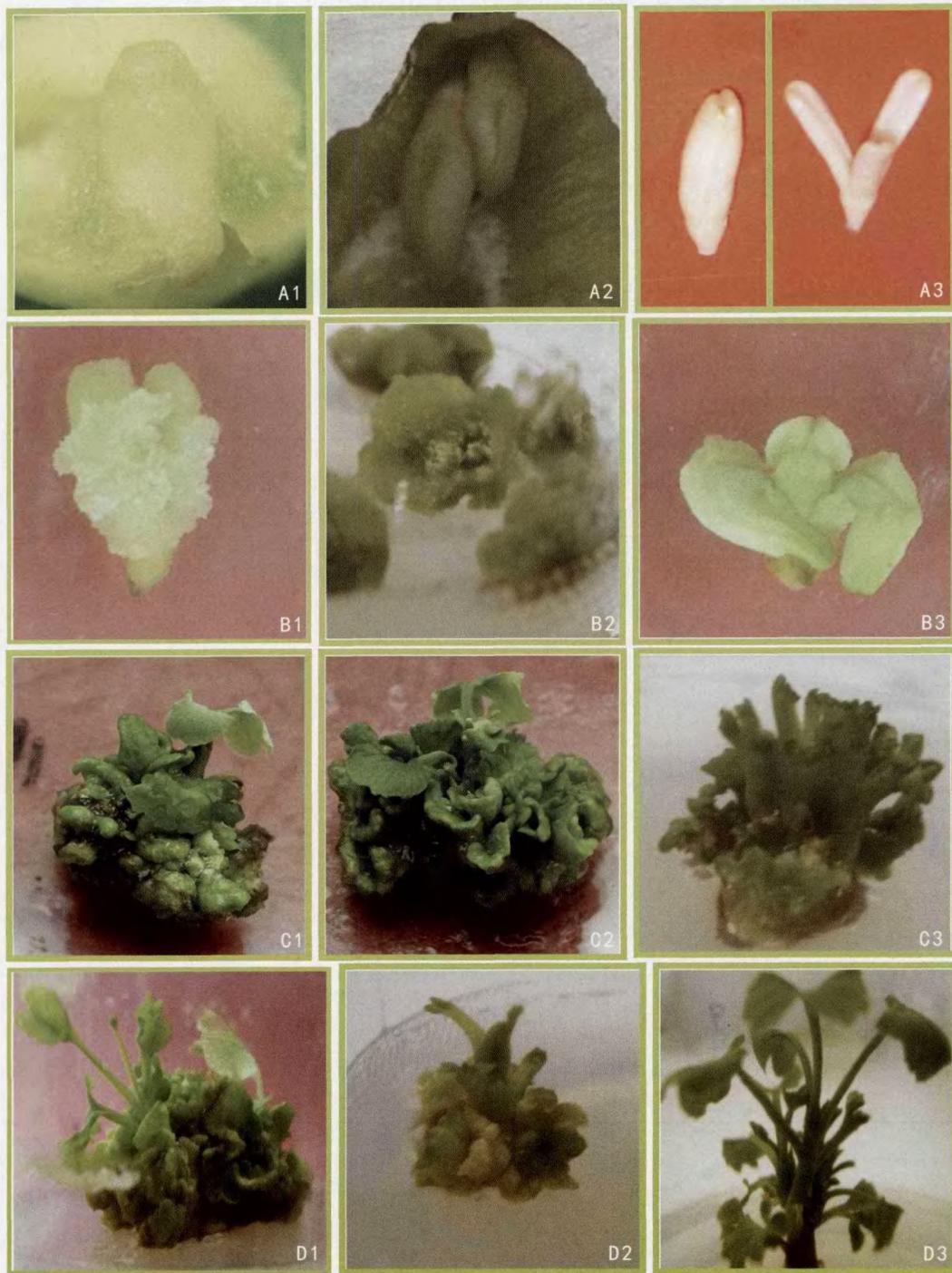
2.2 不同调节剂对未成熟胚愈伤组织诱导的影响

将不同类型的种胚接种在不同的诱导培养基上培养20d时发现,胚诱导的愈伤组织生长状况出现差异,小于1.0mm的圆球胚易褐化,不易成活。小子叶胚(1.0~3.0mm)由于分化程度较低,经培养后极易进入脱分化阶段而产生愈伤组织,诱导率达100%,诱导的愈伤组织呈白色透明状,继代两次后出现多个芽点(图版I:B1-B3),其发生频率在35.0%以上,继续培养后芽点继续生长成完整芽,但最终没有成苗。

银杏大子叶胚(3.0~5.0mm)由于分化程度较高,进入脱分化时间较迟,一般在愈伤组织形成前胚继续发育,胚芽部膨大、子叶张开,呈黄绿色,整个胚愈伤化不明显。从愈伤组织诱导率来看,高浓度的6-BA(2.5mg·L⁻¹)比KT更易诱导愈伤组织,如1号培养基中大子叶胚的愈伤组织诱导率最高达100%,高浓度的2,4-D也使胚易愈伤化。另外愈伤组织诱导率还与基本培养基有关,改良MS培养基较DCR培养基更容易,后者(6号培养基)诱导率只有60%(表2,P<0.05),但DCR培养基较改良MS培养基更有利于子叶的生长,500mg·L⁻¹CH(水解酪蛋白)对胚愈伤组织的诱导效果不明显。

2.3 不同调节剂对大子叶胚不定芽诱导的影响

上述大子叶胚诱导的愈伤组织继代2次后,在



图版 I A1-A3. 银杏种胚的分类 A1. 银杏的小子叶胚($\times 10$ (9月下旬, 1.0~3.0 mm); A2. 银杏的大子叶胚(10月上旬, 3.0~5.0 mm, 双胚); A3. 银杏的近成熟胚(11月上旬, 5.0 mm左右, 子叶有2片或3片)。B1-B3. 银杏不同种胚愈伤组织的诱导 B1. 小子叶胚愈伤组织的产生; B2. 小子叶胚培养后不定芽点的产生; B3. 近成熟胚的培养(顶芽出现, 子叶膨大)。C1-C3. 外植体叶丛的产生 C1. 圆球状凸起; C2-C3. 丛生状叶。D1-D3. 丛芽的产生 D1. 芽从叶丛中长出; D2. 3个丛芽; D3. 丛芽的伸长。

Plate I A1-A3. Category of *Ginkgo* embryos A1. Small cotyledon embryos (in late September, 1.0~3.0 mm); A2. Large cotyledon embryos (in early October, 3.0~5.0 mm, with two embryos in one seed); A3. Near mature embryos (in early November, 5.0 mm, with two or three cotyledons). B1-B3. Callus induction of *Ginkgo* embryos B1. Callus formation of small cotyledon embryos; B2. Adventitious bud spots from small cotyledon embryos; B3. Culture of near mature embryos (Emerging apical bud, enlarging cotyledon). C1-C3. Formation of leaf clusters C1. Appearance of ground balls from explants; C2-C3. leaf clusters. D1-D3. Formation of shoots from explant D1. Appearance of shoots from leaf clusters; D2. Appearance of three shoots from explants; D3. elongation of shoots.

1~2号培养基上愈伤组织易出现褐化,严重的出现死亡,可能6-BA浓度过高所致,而在3~6号培养基上褐化较轻。将无褐化已愈伤化的胚接种到改良MS+0.2 mg·L⁻¹ IAA+0.75 mg·L⁻¹ KT与改良MS+0.2 mg·L⁻¹ 6-BA+3.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+500 mg·L⁻¹ CH培养基上,发现在其子叶上不定芽的产生,发生频率最高在20%左右(表3),但不定芽继续培养后没有继续生长。

2.4 不同调节剂、不同培养基对近成熟胚不定芽诱导的影响

将银杏的近成熟胚(11月上旬接种,胚长在5 mm左右)接种在改良MS和DCR培养基上附加不同浓度NAA和6-BA培养,10 d后发现胚芽长出并

膨大化(图版I:B3),继续培养20 d后芽体达3~4 cm³,不同培养基和不同品种间成芽率存在显著性差异($P<0.05$),在改良MS+0.01 mg·L⁻¹ NAA

表1 银杏种胚的分类及出胚率
Table 1 Embryo classification and percentage of seeds with embryo in total seeds

总胚数 (个) Total embryos	胚的类型 Types of embryo	胚数 (个) Number of embryos	占总胚 百分率 (%) Percent- age	总出胚 率(%) Total embryo rate
360	大子叶胚(3.0~5.0 mm)	152	42.2	71.1
	小子叶胚(1.0~3.0 mm)	94	26.1	
	球形胚(<1.0 mm)	10	2.8	
	无胚	104	28.8	

表2 不同培养基对银杏幼胚(邳州)愈伤组织诱导的影响(接种20 d,调节剂浓度 mg·L⁻¹)
Table 2 Effect of different regulators on callus induction of *Ginkgo* immature embryos

序号 No.	培养基 Medium	总胚数 (个) Total embryos	大子叶 胚(个) Large cotyledon embryos	小子叶 胚(个) Small cotyledon embryos	大子叶胚愈 伤化情况 Callus of large cotyledon embryos	小子叶胚愈 伤化情况 Callus of small cotyledon embryos	大子叶胚愈 伤化程度 Degree of callus	大子叶胚 愈伤组织 诱导率 Rate of callus(%)
1	改良 MS + 6-BA2.5 + CH500	41	25	16	顶芽膨大,子叶膨大,胚产生愈伤组织,黄绿色,继代后褐化	整个胚愈伤化,黄色透明	****	100a
2	改良 MS + 6-BA2.5 + CH500 + NAA0.2	41	25	16	子叶黄色透明状,部分发硬;胚不愈伤化,继代后褐化	全愈伤化	***	73c
3	改良 MS + KT2.5	41	25	16	子叶、顶芽膨大、翘起,胚芽部膨大。胚愈伤化不明显	全愈伤化	**	65de
4	改良 MS + 6-BA0.2 + 2,4-D2.0 + CH 500	41	25	16	子叶半愈伤化,胚芽部膨大;胚基部愈伤化	愈伤组织表面成螺纹	***	85b
5	改良 MS + 6-BA0.2 + 2,4-D3.0 + CH 500	41	25	16	子叶愈伤化,胚芽部膨大;胚基部愈伤化明显	白色透明全愈伤化	****	100a
6	DCR + 6-BA1.5 + CH500	41	25	16	胚芽部膨大,子叶黄绿色。胚愈伤化不明显	白色透明全愈伤化	**	60e

注:****表示外植体全部愈伤化;***表示外植体3/4愈伤化;**表示外植体1/2部愈伤化;同列内相同字母表示邓肯氏新复极差法检验在0.05水平上差异不显著,下同。小于1.0 mm的胚由于死亡,未计算在内。

表3 大子叶胚继代培养后不定芽的发生(调节剂浓度 mg·L⁻¹)
Table 3 The occurrence of adventitious buds after embryo subculture

原培养基 First culture medium	继代培养基 Subculture medium	接种数 No. of inoculation	总不定芽数(个) Total of adventitious buds	不定芽发生百分率(%) Rate of adventitious buds
改良 MS + KT2.5	改良 MS + 0.2 IAA + 0.75 KT	25	5	20.0a
改良 MS + 6-BA0.2 + 2,4-D2.0 + CH500		25	3	12.0c
DCR + 6-BA1.5 + CH500		25	4	16.0b
改良 MS + 6-BA0.2 + 2,4-D3.0 + CH500	改良 MS + 6-BA0.2 + 3.0 2,4-D + 500CH	25	3	12.0c

+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA 出芽率最高,邳州胚达42.5%,盐城胚达40.0%(表4)。尽管出芽率在改良MS培养基上稍优于DCR,但主要还是不同的调节剂配比和浓度在影响着出芽率,如加TDZ后盐城胚的出芽率达40.0%,芽很健壮。而邳州胚只有10.0%,说

明产地不同也影响银杏胚的出芽率。将上述胚的子叶、根部剪去,胚芽继续在原培养基上培养30 d后,发现胚芽继续膨大,这些胚芽会出现不同的发育状态,有的上面出现许多圆球状凸起,凸起数最高多达9个(图版I:C1)。有的出现许多叶丛,这些叶丛从

生状,长度差别不大,没有主枝之分(图版 I:C2),有的叶丛长度差异明显,有主枝之分(图版 I:C3)。这些叶丛继续培养 20 d 后,叶丛间逐渐变为可辩的

芽丛,有顶芽和侧芽之分,丛芽数可达 3 个(图版 I:D1-D4),其发生频率在 30.0% 以上,将其分割成单芽继续培养,芽不断抽长生长良好。

表 4 不同培养基对近成熟胚芽生长的影响(调节剂浓度 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
Table 4 Effect of different mediums on growth of near mature embryo buds

培养基 Medium	邳州胚 Embryo from Pizhou City			盐城胚 Embryo from Yancheng City		
	接种数(个) No. of inoculation	出芽数(个) No. of germination	出芽率(%) Rate of germination	接种数(个) No. of inoculation	出芽数(个) No. of germination	出芽率(%) Rate of germination
改良 MS+NAA0.1+6-BA0.5	40	15	37.5bc	40	12	30.0c
改良 MS+NAA0.01+6-BA1.0	40	17	42.5a	40	14	35.0b
MS+NAA0.1+6-BA0.5	40	6	15.0d	40	8	20.0d
DCR+IBA0.1+TDZ0.1	40	4	10.0e	40	16	40.0a
DCR+NAA0.1+6-BA0.5	40	14	35.0c	40	12	30.0c
DCR+NAA0.01+6-BA1.0	40	16	40.0ab	40	13	32.5bc

3 结论与讨论

在 10 月上旬,胚未成熟,大子叶胚的种子数占总种子数的 42.1%,小子叶胚数为 26.1%,种子的出胚率为 71.1%;胚接种后,发现大子叶胚胚芽部膨大,子叶伸长膨大,胚愈伤化程度小。而小子叶胚无胚芽长出,整个胚全部愈伤化,继续培养出现芽点,发生频率在 35.0% 以上;大子叶胚继代在改良 MS+0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA+0.75 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT 培养基中,其子叶远基端处有不定芽的产生,最高频率达 20.0%;近成熟胚在改良 MS+0.01 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA+1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 培养基上,胚芽出芽率最高达 42.5%,最多的丛芽数达 3 个,频率在 30.0% 以上。

银杏的种胚存在生理后熟现象(芮海云,2009;曹福亮,2002;曹邦华,2001),但对于未成熟胚和成熟胚的大小和时间并没有明确的划分。Choi 等(2003)根据胚的长度不同将银杏未成熟胚划分为球形胚($<1 \text{ mm}$)、心形胚(1.0~1.5 mm)、鱼雷形(1.5~2.5 mm)、子叶形($>2.5 \text{ mm}$)四种类型。郭长禄(2005)将未成熟胚划分为 $>3.0 \text{ mm}$ 和 $<3.0 \text{ mm}$ 的两种。我们通过数年的银杏胚培养发现,从 9 月份采收到次年的 2 月份是银杏种胚从未成熟到成熟到完全成熟的发育阶段,根据胚的长度和子叶的大小及采收后储藏时间长短可把胚的成熟度划分为圆球胚、小子叶胚、大子叶胚、近成熟胚、成熟胚 5 种,作为对银杏胚发育成熟度类型的补充。

银杏的胚发育和离体培养早就引起了学者们的注意(吴元立,1998)。Laurain 等(1993a,b)通过雌

配子体、未成熟胚培养成功地诱导了胚状体的发生。郭长禄等(2005)发现未成熟胚的下胚轴易产生胚状体,Choi 等(2003)发现未成熟胚的子叶可以产生不定芽,但这些芽并没有继续发育。我们在未成熟胚愈伤组织和子叶远基端也都发现了不定芽的产生,验证了他们的结果。尽管未成熟胚的分化能力最强,但材料受季节和取样时间的限制太大,过早过晚都不易诱导胚状体和不定芽的产生,至今大部分学者诱导出来的不定芽或胚状体只发育到某一阶段,并未完全成苗,这限制了银杏这一古老树种的快繁和基础理论的深入研究。

利用近成熟胚(11 月上旬)的培养,发现胚芽是产生丛生芽的很好材料,在胚外植体上可观察到芽点的出现,由于银杏的芽体是轮生叶形,芽体很大,刚开始出现的芽点或突起很多,似有许多不定芽,如果这些芽点不继续发育,就很难辨认芽丛的个数,很可能把叶丛误认为是大量的芽丛,经过我们数次的试验证明,这些芽点或叶丛能够发育成 3 个正常丛芽,且能够稳定地继代和生长。这一研究结果为建立高频、稳定遗传的银杏再生体系提供了技术指导。

参考文献:

- 曹福亮. 2002. 中国银杏[M]. 南京:江苏科学技术出版社
Camper ND, Coker DE, Wedge DE, et al. 1997. *In vitro* culture of *Ginkgo*[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 33:125-127
Cao BH(曹帮华), Cai CJ(蔡春菊). 2001. Physical research of *Ginkgo* seeds(银杏种子生理研究进展)[J]. *Shandong Agric Sci*(山东农业科学), (1):40-42
Chen Y(陈颖), Cao FL(曹福亮). 2006. Studies on organ differentiation of different explants of *Ginkgo biloba* *in vitro*(不同银(下转第 705 页 Continue on page 705))

(3.81%)、醋酸仲丁酯(3.05%);占挥发油总量的64.18%。另外,在罗汉果的挥发油中尚有16种组分经过计算机检索质谱库及其它标准谱对照无法确定性,有待今后工作中进一步确认。罗汉果风味主要成分为2-甲基-2-丁酸丁酯与已发表的文章一致(黄丽捷等,2009),但是含量明显较高。2-甲基-2-丁酸丁酯具有有强烈的、甜润的水果香气,并有香蕉和菠萝似的香韵,现被广泛用于食用香精、烟草、日用化学品香精中。

冷冻干燥提取低温富集风味成分的方法是一种超低温(-50℃)的分离技术,由于提取温度极低,与水蒸气蒸馏法相比,能最大程度的避免植物挥发油提取过程中化学成分的破坏,反映出植物挥发油的实际组成。随着罗汉果果酒、新鲜罗汉果速冻粉茶等产品的相继面市,如何更好地去除或者利用其香味成分是必须解决的问题,希望本研究能为鲜罗汉果产品风味质量的控制提供理论依据。

参考文献:

- 中华人民共和国卫生部药典委员会. 2005. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社:148
- 竹本常松,在原重信,中岛正,等. 1983. 罗汉果成分研究(I)[M]. 药学杂志(日),103:1-151
- 李锋,李典鹏,蒋水元,等. 2003. 罗汉果栽培与开发利用[M]. 北京:中国林业出版社
- 李锋,蒋水元,李典鹏,等. 2010. 罗汉果栽培与化学成分研究[M]. 南宁:广西科学技术出版社
- Chen QB(陈全斌),Zhu J(朱静),Tan HS(谭洪盛). 2011. Identification of flavone aglycones in *Momordica grosvenorii* flower[J]. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学),39(2):792-794
- Huang LJ(黄丽捷),Su XJ(苏小建),et al. 2009. Analysis of volatile oil components from *Siraitia grosvenorii* and *S. grosvenorii* wine quality(鲜罗汉果挥发性风味成分分析)[J]. *Food Res Develop*(食品研究与开发),30(10):106-109
- Kasai R,Nie Ruiliu,Nashi K,et al. 1989. Sweet cucurbitane glycosides from fruits of *Siraitia siamensis* (chi-zi Luo-han-guo) a Chinese folk medicine[J]. *Agric Biol Chem*,53(12):3374
- Li DP(李典鹏),Chen YY(陈月园),Pan ZH(潘争红),et al. 2004. Study on variation of mogrol glycosides from fruits of *Siraitia grosvenorii* in different growing ages(不同日龄罗汉果甙类变化研究)[J]. *Guihaia*(广西植物),24(6):546-549
- Matsumoto K,Kasai R,Ohtani k,et al. 1990. Minor cucurbitane glycosides from fruits of *Siraitia grosvenorii* (Cucurbitanaceae)[J]. *Chem Pharm Bull*,38(7):2030
- Si JY(斯建勇),Chen DH(陈迪华),Chang Q(常琪),et al. 1996. Isolation and determination of cucurbitane-glycosides from fresh fruits of *Siraitia grosvenorii* (罗汉果中三萜甙的分离和结构测定)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报),38(6):489-494
- Xu WK(徐位坤),Meng LS(孟丽珊),Li ZY(李仲瑶). 1992. Isolation and identification of a bitter constituent from Luo-han-guo, sunripe fruits(罗汉果嫩果中一个苦味成分的分离和鉴定)[J]. *Guihaia*(广西植物),12(2):136-138
- 杏外植体器官分化的研究[J]. *J Northeast Fore Univ*(东北林业大学学报),6(4):4-6
- Chen Y(陈颖),Cao FL(曹福亮),Xu CP(徐彩平),et al. 2010. Studies of stem segments culture *in vitro* of *Ginkgo biloba*(不同部位银杏茎段培养及其位置效应研究)[J]. *J Zhejiang Fore Sci Tech*(浙江林业科技),1(1):28-31
- Choi PS,Cho DY,Soh WY. 2003. Shoot organogenesis from immature zygotic embryo culture[J]. *Biologia Plantarum*,47(2):309-312
- Guo CL(郭长禄),Chen LG(陈力耕),He XH(何新华),et al. 2005. Plant regeneration from immature embryos of *Ginkgo biloba*(银杏幼胚离体培养再生植株的研究)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报),32(1):105-107
- Guo CL(郭长禄),Chen LG(陈力耕),He XH(何新华),et al. 2005. Study on somatic embryogenesis of embryonic axis and cotyledon in *Ginkgo biloba* and plantlet formation(银杏胚轴、子叶诱导胚状体发生及成苗的研究)[J]. *Sci Silv Sin*(林业科学),41(2):178-181
- Laurain D,Jean CC,Tremouillaux GJ. 1993a. Direct embryogenesis from female haploid protoplasts of *Ginkgo biloba*, a medicinal woody species[J]. *Plant Cell Reports*,12:656-660
- Laurain D,Tremouillaux GJ. 1993b. Embryogenesis from microspores of *Ginkgo biloba*[J]. *Plant Cell Reports*,12:501-505
- Rui HY(芮海云),Gu GP(顾龚平). 2009. Study of biological character and storage of *Ginkgo* seeds(银杏种子的生物学特性及储藏)[J]. *Chin Wild Plant Res*(中国野生植物资源),28(5):10-13
- Tommasi F, Scaramuzzi F. 2004. *In vitro* propagation of *Ginkgo biloba* by using various bud cultures[J]. *Biologia Plantarum*,48(2):297-300
- Wu YL(吴元立),Yan XC(严学成). 1998. The mature embryo *Ginkgo biloba*; *in vitro* culture and its cytohistological studies(银杏成熟胚培养的细胞组织学观察)[J]. *Sci Silv Sin*(林业科学),34(4):8-13

(上接第 683 页 Continue from page 683)