

银杏组织培养研究进展

于震宇, 李艳菊, 郭军战, 代晓龙

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100)

摘要:综述了银杏的器官、胚、组织、细胞培养及遗传转化等领域的研究现状和银杏组织培养中存在的问题以及发展方向。

关键词:银杏;组织培养;研究现状

中图分类号:S792.950.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-7461(2004)03-0072-05

Advances in the Researches of Tissue Culture of *Ginkgo biloba*

YU Zhen-yu, LI Yan-ju, GUO Jun-zhan, DAI Xiao-long

(College of Forestry, NW Sci-Tech Univ. of Agr. and For., Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In this paper, organ culture, embryos culture, cell culture and genetic transformation, present problems existed and development trend in *Ginkgo biloba* were reviewed.

Key words: *Ginkgo biloba*; tissue culture; research state

银杏(*Ginkgo biloba* L.),又名白果,是我国特有、珍贵的经济树种,具有极高的经济价值、科学研究价值和观赏价值。银杏组织培养的研究始于20世纪30年代,1933年,李继侗对银杏进行胚胎培养时发现3 mm大小的胚可正常生长^[1]。此后,美国的Tulecke, Ball, Friedman和Camper等先后对银杏的花粉,幼果胚培养进行了系统研究,取得了一些进展^[2-7]。自20世纪90年代以来,一些国内外学者对银杏的茎段、胚等组织培养以及近年来对细胞悬浮培养进行了广泛的研究,并取得了较大的进步^[8-22]。本文就国内外银杏组织培养的研究现状、存在问题、发展趋势做一综述。

1 器官培养

1.1 茎尖培养

银杏茎尖培养,需从银杏植株的中上部采集长枝,剪除叶片和叶柄,用湿润纱布包置后带回室内,用漂白粉和升汞液灭菌,经无菌水反复冲洗后,从芽上切取长约0.5 cm的茎尖,进行接种。由于银杏树的组织具有明显的部位效应,一般不宜采集向外伸展的横向枝条的芽做材料。银杏茎尖组织诱导愈伤组织和胚茎,一般选用经过改良的White培养基:

White + BA0.5 ~ 1.0 mg/L + NAA0.5 mg/L + NH₄Cl 5.34 mg/L + 白糖4%;生根培养多选用N6培养基: N6 + 2,4 - D3.0 mg/L + BA1.0 mg/L + NAA1.0 mg/L + 白糖3% + 琼脂0.5 g。据试验,在不加2,4 - D而添加NH₄Cl的White培养基上,银杏茎尖组织的芽诱导率为83.1%,有时还能诱导生根。光照和温度对植物的形态建成有着重要的调控作用,银杏茎尖培养时,培养温度以25 ~ 29℃为宜。接种材料可先作一周暗培养,以利于愈伤组织形成,从第8天开始,转移到自然散射光下再培养一周,以促进胚茎的分化^[23]。

1.2 茎段培养

胡惠露等(1997年)以带腋芽的茎段为材料,对银杏茎段愈伤组织的诱导和植株再生效果进行正交实验,筛选出最佳诱导愈伤组织培养基MS + NAA0.5 mg/L + BA0.1 mg/L + KT0.5 mg/L,最佳芽分化培养基为MS + NAA0.1 mg/L + BA1.0 mg/L + KT1.0 mg/L,但未进一步研究根的分化,未得到完整的试管苗^[10]。胡惠露等又研究表明MS + NAA0.5 mg/L + BA0.1 mg/L + 活性炭0.5%配方对茎段分化和植株再生效果很好^[24]。王洪善等用银杏优良无性系的嫩茎为外植体进行离体培养,诱导

产生愈伤组织,经分化诱导,获得丛生芽和不定根,培育出完整的植株^[25]。用无菌苗带腋芽的茎段为外植体,尝试从腋芽途径获得银杏试管苗,研究得知银杏茎段在1/2MS培养基上其腋芽的分化效果较好,多效唑能促进银杏芽的分化,在White+根多壮2#(50%吲·萘粉剂)2.0 mg/L的培养基上分化根,生根率达到90.3%,并形成试管苗^[26]。

银杏组织培养时,常会发生外植体褐变,罗言云等报道银杏茎段在1/2MS培养基内加入活性炭(AC)0.5 g/L可有效防止褐变^[26]。

2 胚培养

植物的体细胞胚胎发生是指双或单倍体的体细胞在特定条件下,未经性细胞融合,而通过类似于合子胚胎发生的途径,发育出新个体的形态发生过程。体胚发生对植物发育过程中的分子、细胞水平和植物整体水平的研究起着桥梁作用。

2.1 外植体

外植体的来源及其所处的发育阶段是影响体胚发生的重要因子。一般来说,子叶、胚珠、叶片、胚及幼胚、幼胚轴、幼花序轴都是较合适的外植体。当用幼胚或成熟胚诱导体胚发生时,胚接种时位置取向极为重要,胚芽及胚根轴必须接触培养基而使盾片向上。银杏幼胚培养时,除去银杏骨质中种皮后,将种仁(实际是胚乳)用70%的酒精消毒2~3 min,再放入0.1%升汞水溶液中抽气减压灭菌20 min,然后用无菌水漂洗干净,在无菌条件下挑出种胚,将胚整体或切成几段并用灭菌滤纸吸干水分后,分别接种在培养基上。

2.2 培养基

幼胚培养的培养基,以N6和MS为基本培养基,常用的3种芽胚培养基的组成是:N6+KT1.0 mg/L+NAA1.0 mg/L+白糖3%+琼脂0.5%;MS+BA3.0 mg/L+NAA0.5 mg/L+白糖3%+琼脂0.58%;MS+2,4-D2.0 mg/L+LH300 mg/L+白糖3%+琼脂0.5%。生根培养基为:White+2,4-D2.0 mg/L+NH₄Cl5.34 mg/L+LH300 mg/L+白糖+4%活性炭0.05%+琼脂0.5%。把有芽的胚培养块转入此培养基上6~10 d后,就能从芽上长出根,形成完整的小植株。银杏成熟胚培养最常用的培养基是White培养基。银杏胚在White,WS培养基上,胚萌芽率可达100%,在WS培养基上,胚生长状况较好^[27]。诱导胚萌发生长素一般用2,4-D。低浓度生长素有利于银杏胚萌发、抽梢生长,高浓度生长

素易诱导产生愈伤组织。在WS培养基上,2,4-D 1.0 mg/L与活性炭(0.2%)同时加入,有利于胚萌发成正常苗,且促进根系生长。低浓度的无机盐培养基有利于银杏胚根萌发生长,而高浓度的无机盐培养基抑制胚根萌发生长。

2.3 培养条件

温度一般采用25±2℃,光照选用40W日光灯,每天光照10 h,夜间保持黑暗。培养容器的种类、规格与银杏胚萌发、生长有很大关系。一般容器体积越大,盛装的培养基量越多,胚萌发生长越好。研究表明,三角瓶中培养基量越多,保湿效果越好,有利于试管苗生长,而在试管中培养则胚萌发生长不正常^[27]。银杏种子贮存方式对胚培养也有影响。室温贮存的胚易抽梢,低温贮存种子的胚很难抽梢。

3 愈伤组织和细胞培养

植物组织和细胞培养是指用无菌培养方法在人工制备的培养基上培养植物的一个离体部分、组织或细胞。其中,愈伤组织和细胞培养在基因工程及利用细胞生产次生代谢产物中,占据重要地位。1991年加拿大的Carrier等人首次肯定了组织培养物中银杏内酯的存在^[15];陈学森等对继代半年以上的银杏叶片中愈伤组织的检测证明愈伤组织中同样存在黄酮^[16]。近年对银杏通过组织培养,生产次生代谢物的研究很多^[11-13]。通常建立药用植物次生代谢物培养体系有三步:(1)从植物体各部分诱导愈伤组织无性系;(2)建立无性系生长特性;(3)筛选出生长快、次生代谢物产生能力强的无性系并确定基本培养条件。

3.1 愈伤组织诱导

3.1.1 外植体 银杏愈伤组织最早是利用胚诱导产生的^[28]。诱导银杏愈伤组织的外植体有叶片、幼叶、茎段、根段、子叶、胚、胚乳。徐刚标等报道了银杏愈伤组织诱导率的顺序为:子叶≥胚轴>幼叶>茎段^[11]。另外,银杏茎段的上、中段愈伤组织诱导率高于茎尖和茎段下段^[10]。

3.1.2 培养基 银杏愈伤组织诱导及生长状况与培养基、激素、无机盐含量有关,铵态氮及充足的铁离子供给,对愈伤组织诱导生长有利^[11]。于荣敏等对银杏愈伤组织诱导最适培养基进行了研究,得到叶及叶柄最适培养基为B5;茎的最适培养基为N6;MS培养基对叶、胚、叶柄和茎愈伤组织的诱导都比较适应;根在各种培养基上的诱导效果都不理想^[12]。MT培养基诱导幼叶产生愈伤组织的效果优

于 White 培养基^[14]。MS 和 White 培养基分别适合于胚和胚乳愈伤组织的诱导^[30,31]。生长素是银杏外植体脱分化的必须物质,不同种类生长素对银杏愈伤组织诱导、生长及代谢产物的合成有差异。2,4-D 生理活性强,诱导快,但易使细胞老化。NAA 生理活性弱,NAA 与 BA 或 KT 配合,最适合于诱导幼叶产生愈伤组织,而 2,4-D、KT 和 KT 与 IBA 组合,不能诱导银杏幼叶产生愈伤组织或诱导率很低^[32]。

3.1.3 培养条件 诱导银杏愈伤组织适宜温度在 24℃ 左右,温度过低会使培养物生长停顿,过高会使愈伤组织老化而变褐^[10]。光照时间会影响愈伤组织的结构和生长。在光照培养条件下,愈伤组织结构致密,生长较慢,在暗培养条件下,愈伤组织疏松,生长较快^[26]。

3.2 愈伤组织的继代培养

3.2.1 培养基 姜玲等研究发现 MS 和 B5 培养基对胚愈伤组织形成有相同的促进作用^[34]。徐刚标等又证明 MS 培养基最适宜诱导银杏子叶产生愈伤组织,但最佳诱导培养基不适合继代培养,褐变严重^[11]。生长素种类和浓度会影响愈伤组织形成和代谢产物。陈学森等研究发现在 MT 培养基上,BA 与 NAA 配合,有利于愈伤组织的生长和代谢产物的合成,用 2,4-D 代替 NAA 或用 KT 代替 BA,效果较差^[14]。NAA 和 IBA 与 KT 组合时,NAA 的作用优于 IBA。2,4-D 诱导银杏种子萌发的无菌苗苗根产生愈伤组织最大生长量的适宜浓度为 6 mg/L,诱导产生银杏内酯 B 的适宜浓度为 8 mg/L,而对愈伤组织中银杏内酯 A 的影响不大^[12]。

3.2.2 预防褐变方法 银杏愈伤组织在继代培养过程中,容易发生褐变。姜玲等研究表明,在芽和幼叶愈伤组织的继代培养基中,添加 75 mg/L Na₂SO₃ 可抑制愈伤组织褐变,促进生长^[34]。陈学森等发现 0.1% 的植酸(肌醇六磷酸酯)或 PVP(聚乙烯吡咯烷酮 20%)与 MES(对氧氯乙环乙烷吡咯烷酮 0.5%)可有效控制愈伤组织的褐变,并指出,在采用合适的培养基和激素组合的前提下,才能发挥植酸促进生长、控制褐变的效果^[13,14,16]。在培养基方面,MT 优于 White 培养基,BA 与 NAA 组合的抗褐变的效果优于 2,4-D 与 KT 组合^[17]。徐刚标等的结果表明,在培养基中加入 5.0 mg/L 维生素 C 或 2 000 mg/L PVP 并调整植物生长调节剂种类,可以消除褐变^[11]。

3.3 细胞培养

利用植物细胞培养生产药用成分近年来已成为

开发药用植物资源的重要途径^[35,36]。一般采用经愈伤组织培养到细胞悬浮培养的细胞作“种子”进行细胞大量培养。对银杏细胞培养的主要目的是提高培养细胞的生长速率和银杏内酯、黄酮的含量。Archipoff 等最早利用银杏叶愈伤组织进行细胞悬浮培养,对培养物进行检测得到两种生物碱^[37]。银杏的胚、子叶、根等固体培养时,其产物为银杏内酯 A 和银杏内酯 B,而根愈伤组织细胞悬浮培养产物中,仅含银杏内酯 B^[29-34,37-43],茎段和幼叶悬浮培养物中含黄酮类化合物。银杏悬浮培养物中还含有多糖(ICP-1, ICP-2, ECP-1, ECP-2, ECP-3)^[44]。

3.3.1 外植体 目前,已在叶片、子叶、茎段、胚和胚乳愈伤组织中检测到黄酮^[11]。从众多研究结果得知,不同外植体诱导愈伤组织和产生次生代谢物的能力不同,不同外植体愈伤组织中黄酮含量的排序为:叶 > 茎段 > 子叶^[16],胚 > 胚乳 > 幼叶^[29]。

3.3.2 培养基 Jeon 等研究表明 SH 培养基利于细胞生长,MS 培养基能获得较多的银杏内酯 B^[45]。陈学森等报道了 MT 培养基利于叶愈伤组织形成,但黄酮含量低,White 培养基对愈伤组织培养不利,但有利于黄酮物质的产生和积累^[16]。刘贤旺等研究表明 SH 培养基较 White 等培养基更利于愈伤组织和总黄酮的积累,加入 2,4-D 2 mg/L,6-BA 1 mg/L, NAA 0.5 mg/L 以及 10% 苹果汁,有利于愈伤组织生长,又能促进黄酮的生物合成^[19]。Carrier 等对胚愈伤组织进行悬浮培养表明,MS 培养基附加 1.0 mg/L NAA 和 0.1 mg/L KT,细胞生长速率较快^[46]。Byun 等发现,液体培养基 B5 或 MS 中,增加 NAA 的浓度可促进细胞生长^[47]。KT 与 NAA, NAA 与 6-BA 组合能使细胞干重和黄酮糖苷含量同时提高;但是 NAA 与 ZT 组合或仅添加 GA₃ 可促进细胞干重,而对黄酮糖苷含量无影响^[42]。Camper 等研究发现,2,4-D 与 BA 和 KT 组合诱导产生的愈伤组织中银杏内酯含量高于 NAA 与 BA 和 KT 组合^[33]。

3.3.3 诱导子和前体物质 在继代培养基中加入次生代谢物的前体可以提高次生代谢物的产量。刘贤旺等报道,在 SH 培养基中加入乙酸和苯丙氨酸等前体物质,在光照培养下,能显著提高黄酮产量^[19]。戴均贵等指出,培养基中添加 100 mg/L 异戊二烯及低浓度的牻牛儿醇能提高银杏内酯 B 的产量^[41]。Camper 等报道,在培养基中加入银杏内酯的前体 GGPP(geranylgeranyl pyrophosphate),并加入异戊烯焦磷酸监测培养周期,可取得良好的培养效果^[48]。

3.3.4 培养条件 培养条件对细胞培养及次生代谢物的积累至关重要。徐利均等报道,银杏悬浮细胞培养基中,添加5 mL/L 蜂蜜可明显促进细胞分裂、生长及黄酮糖苷的累积,并能防止褐变^[18]。悬浮培养的最优pH为5.7,最优碳源为蔗糖30 g/L,温度一般控制在25℃^[12]。众多研究表明,光照利于愈伤组织生长,能促进继代培养和悬浮培养细胞中代谢产物含量^[14,16,49]。陈学森等的研究结果,利用银杏叶愈伤组织进行细胞悬浮培养生产黄酮的适宜条件为:选用MT+BA1.0 mg/L+NAA3.0 mg/L+糖0.5%+PM(PVP2.0%+MES0.05%)培养基,光照培养40~50 d,然后提取有效成分^[13]。

4 基因转化

1997年,Laurain等首次利用发根农杆菌的农杆菌型菌株GFBP2409侵染胚,进行发根培养获得成功^[50]。随后,张伦等利用3个发根农杆菌菌株:R15834,R1000和A4,分别对银杏幼叶、幼芽和幼茎进行转化,除A4外,均能诱导获得了毛状根,通过对毛状根中冠瘿碱的检测,农杆菌Ri质粒的T-DNA片段整合到银杏细胞的基因组中^[39]。通过发根农杆菌进行基因转化,已经得到了表现型证明(细菌葡萄糖醛酸酶基因导入后,感染的细胞被酶底物染成蓝色)和分子证明(用PCR技术),但毛状根培养系统的建立至今尚未成功^[38]。

5 存在问题与展望

银杏为木本裸子植物,在组织培养中,植株再生困难,特别是芽和根分化难度大。近几年的研究结果也为银杏的无性快速繁殖和银杏工厂化育苗提供了依据,但在如何快速获得大量芽方面的研究及其在生产上的应用和推广还需进一步深入。

虽然国内外近年来对银杏愈伤组织的诱导、细胞悬浮培养等方面的研究已很多,但真正用于次生代谢物工业化生产的甚少,其主要原因是离体细胞生长缓慢,次生代谢产物含量太低,同时离体植物组织的生长必须依赖于外源植物激素,因而成本太高,不能用于次生代谢产物的规模化生产。转基因器官培养技术给这一研究带来了希望。该技术以发根培养技术(Hairy-root culture technology)发展最快。发根培养技术是利用发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)感染植物器官、组织或细胞而产生多分枝、生长迅速的发根(Hairy root),进而从发根中提取次生代谢物的培养方法。由于发根具有生长迅速且不需

外源激素、遗传性稳定等特点,所以特别适合工业化生产。因此,银杏的发根培养前景广阔。

参考文献:

- [1] 杨增海. 园艺植物组织培养[M]. 北京: 农业出版社, 1987, 307.
- [2] Tulecke W A. Tissue derived from the pollen *Ginkgo biloba* [J]. Science, 1953, 117: 599-600.
- [3] Tulecjkje W A. The pollen of *Ginkgo biloba* in vitro culture and tissue formation [J]. Amer. J. Bot., 1957, 44: 602-608.
- [4] Ball E. Growth of the embryo of *Ginkgo* under experimental condition I. origin of the first root of the seedling in vitro [J]. Amer. J. Bot., 1957, 44: 602-608.
- [5] Tulecke W A. Haploid tissue culture form the female gametophyte of *Ginkgo biloba* L [J]. Nature, 1964, 302(4): 94-95.
- [6] Friedman W E. Morphogenesis and experimental aspects of growth and development of the male gametophyte of *Ginkgo biloba* in vitro [J]. Amer. J. Bot. 1987, 74: 1816-1830.
- [7] Camper N D, Coker P S, Wedge D E, et al. In vitro culture of ginkgo [J]. In vitro cellular & developmental [J]. Biology Plant, 1997, 33(2): 125-127.
- [8] 罗紫娟. 银杏组织培养的初步研究 [J]. 云南植物研究, 1984, 6(1): 93-97.
- [9] 吴元立, 严学成. 银杏成熟胚培养的细胞组织学观察 [A]. 见: 全国第五次银杏学术研讨会论文集 [C]. 广州: 广东科技出版社, 1997, 345-351.
- [10] 胡惠露, 胡翠玲, 杨枝发. 银杏茎段组织培养正交试验 [J]. 安徽农业大学学报, 1997, 24(2): 129-133.
- [11] 徐刚标, 何方, 陈良昌. 银杏愈伤组织诱导与继代培养的研究 [J]. 中南林学院学报, 1999, 19(3): 32-37.
- [12] 于荣敏, 赵鸿莲, 郑玉果, 等. 银杏愈伤组织培养及其代谢产物银杏内酯的研究 [J]. 生物工程学报, 1999, 15(1): 52-57.
- [13] 陈学森, 张艳敏, 董会. 植酸在银杏组织培养应用的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 1999, 9(2): 24-27.
- [14] 陈学森, 邓秀新, 章文才. 银杏组织培养与黄酮生产的研究, I. 银杏愈伤组织的诱导与褐变调控的研究 [J]. 中国农业科学, 1997, 30(6): 55-60.
- [15] Carrier D J, Chauret N, Mancini M. Detection of ginkgolide A in *Ginkgo Diloba* cell cultures [J]. Plant cell Reports. 1991, 10(5): 256-269.
- [16] 陈学森, 邓秀新, 章文才. 培养基及培养条件对银杏愈伤组织黄酮产量的影响 [J]. 园艺学报, 1997, 24(4): 373-377.
- [17] 张广辉, 陈春秋, 李竟莹, 等. 银杏离体培养生产次生代谢物研究进展 [J]. 北京林业大学学报, 2002, 24(7): 130-134.
- [18] 徐利均, 谢水红, 甘霖, 等. 银杏组培繁殖及黄酮糖苷的产生 [J]. 西南农业大学学报, 2001, 23(4): 368-370.
- [19] 刘贤旺, 谢少贤, 罗光明, 等. 银杏组织培养及其代谢调控的研究 [J]. 江西林业科技, 1998, 6: 3-6.
- [20] 于荣敏, 赵鸿莲, 张辉. 银杏细胞悬浮培养及其银杏内酯产生的研究 [J]. 生物工程学报, 1999, 15(2): 207-210.
- [21] Jiang-ling, Zhang W C. Experimental induction of callus from

- young *Ginkgo* leaves and buds cultured in vitro in the presence of plant growth regulators[J]. *China-Fruits*, 1998, (2): 30-31;3 ref.
- [22] Shipra-Agarwal, Anil-Kumar, Banerjee-S, et al. Production of bilobalide in cultures of clone GBC-1 of *Ginkgo biloba*. *Journal of medicinal and Aromatic*[J]. *Plant Sciences*. 2001, 22-23; 4A - 1A, 194-196; 11 ref.
- [23] 张云跃, 韩宁林. 银杏生产百事问[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996, 76-78.
- [24] 胡惠露, 杨景华, 杨获荣, 等. 银杏茎段试管培养条件筛选研究[J]. *林业科学*, 2001, 9(2): 163-166.
- [25] 王洪善, 孙满芝, 孔庆访, 等. 银杏愈伤组织培养形态建成的研究[J]. *林业科技开发*, 1997, (5): 36-38.
- [26] 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.
- [27] 徐刚标, 何方, 陈良昌. 银杏种质离体保存的研究[J]. *经济林研究*, 1999, 17(4): 15-18.
- [28] 吴元立. 银杏药用物质的开发利用及其发展设想[J]. *亚热带植物通讯*, 1998, 27(2): 52-55.
- [29] 倪静静, 黄学林. 银杏愈伤组织培养及其黄酮类化合物的测定(简报)[J]. *热带亚热带植物学报*, 2001, 9(2): 163-166.
- [30] 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.
- [31] 吴元立, 严学成. 银杏成熟胚培养的细胞组织学观察[J]. *果树科学*, 1998, 15(4): 327-331.
- [32] 姜玲, 章文才. 几种激素诱导银杏愈伤组织试验[J]. *中国果树*, 1998(2): 30-31.
- [33] Camper N D, Wedge D E, Keese R J, et al. In vitro culture of *Ginkgo*[J]. *In Vitro Plant*, 1997, 33(3): 20-23.
- [34] 姜玲, 章文才. 银杏悬浮细胞系的建立及其黄酮糖苷的产生[J]. *果树科学*, 1999, 16(2): 131-134.
- [35] Stockigt J, Obitz P, Falkenhagen H, et al. Natural products and enzymes from plant cell cultures[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1995, 43: 97-109.
- [36] Mavtiana F. *Plant Cell biotechnology*[M]. Berlin: Springer - Verlag, 1988, 1-14.
- [37] Archipoff G, Linder C, Lobstein G A, et al. Bioconversion of morphine by cell suspension of *Ginkgo biloba* growing in vitro[J]. *Planta Med*, 1986(6): 515.
- [38] 刘叔情, 郑俊华, 果德安, 等. 展望分子生物学技术在银杏研究中的应用[J]. *国外医药植物学分册*, 1999, 14(1): 4-6.
- [39] 张伦, 张熙, 吴建军, 等. 银杏毛状根的诱导和培养[J]. *贵州科学*, 1999, 17(2): 132-134.
- [40] 于荣敏, 马文霞. 银杏细胞培养多糖与银杏叶多糖的研究[J]. *中国生物药物杂志*, 1999, 20(5): 217-220.
- [41] 戴均贵, 朱蔚华. 前体及真菌诱导子对银杏悬浮培养细胞产生银杏内酯 B 的影响[J]. *药学报*, 2000, 35(2): 151-155.
- [42] Carrier D J, Consentino G, Neufeld R, et al. Nutritional and hormonal requirements of *Ginkgo biloba* embryo-derived callus and suspension cell culture[J]. *Plant Cell Reports*, 1990, 8(11): 635-638.
- [43] 姜玲, 章文才. 植物生长调节剂对银杏悬浮细胞生长和黄酮糖苷含量的影响[J]. *湖北农业科学*, 1999(5): 45-47.
- [44] 颜金, 罗保生. 生物技术培养银杏发根中的黄酮分析研究[J]. *分析科学学报*, 2000, 16(4): 320-325.
- [45] Jeon M H, Sung S H, Hun H, et al. Ginkgolide-B production in cultured cells derived from *Ginkgo biloba* L. leaves[J]. *Plant Cell Reports*, 1995, 14(8): 501-504.
- [46] Carrier D J, Archambault J, Vander H R, et al. Formation of terpenoid products in *Ginkgo biloba* L. cultured cells[J]. *Plant Cell Reports*, 1996, 15(12): 888-891.
- [47] Byun S Y, Ryu Y M, Kim D I. Studies on production of flavonol glycosides in cell cultures of *Ginkgo biloba*[J]. *Biochem Eng*, 2001, 19: 246-249.
- [48] Camer N D, Coker P S, Wedge D E, et al. In vitro culture of *Ginkgo biloba*[J]. *In Vitro Plant*, 1997, 33(2): 125-127.
- [49] 房建军, 阙国宁. 银杏愈伤组织生长和黄酮类化合物积累的关系[J]. *林业科学研究*, 1997, 11(2): 124-129.
- [50] Laurain D, Tremouillaux G J, Chenieux J C, et al. Production of ginkgolide and bilobalide in transformed and gametophy ederived cell cultures of *Ginkgo biloba*[J]. *Phytochemistry*, 1997, 46(1): 127-130.