

云杉属树种体细胞胚成熟影响因素研究进展

依巴代提·木合旦尔¹, 伊达娅提·木合旦尔²

(1. 新疆师范大学生命科学学院, 新疆乌鲁木齐 830054; 2. 伊宁市第三中学, 新疆伊宁 835000)

摘要 云杉属树种体细胞胚胎发生及植株再生能力受多种因素的影响。体细胞胚萌发困难的一个重要原因就是体细胞胚没有经过一个完整的成熟过程。体细胞胚的成熟受到多方面因素的影响, 包括物理因子、糖类、PEG、基因型、植物生长调节剂、成熟时间和各种离子等因素。综述了云杉属树种体细胞胚成熟影响因素的研究进展, 发现只有云杉属树种体细胞胚真正成熟并同步萌发, 才可以利用云杉属树种体细胞胚进行工厂化育苗。

关键词 云杉属; 体细胞胚; 成熟; 因素

中图分类号 S 718.46 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)18-0011-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.18.004



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Research Progress on Influencing Factors of Somatic Embryo Maturation of *Picea*

Yibadaiti · Muhedaner¹, Yidayati · Muhedaner² (1. College of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi, Xinjiang 830054; 2. Yining No.3 Middle School, Yining, Xinjiang 835000)

Abstract Somatic embryogenesis and plant regeneration ability of *Picea* were affected by many factors. One of the important reasons for the difficulty of somatic embryo germination is that somatic embryo does not go through a complete maturation process. The maturation of somatic embryos is influenced by many factors, including physical factors, sugars, peg, genotypes, plant growth regulators, maturation time, and various ions. Through the factors affecting the maturation of somatic embryos, the real mature and synchronous germination of somatic embryos of *Picea* were described, which could be used to improve the yield and quality of somatic embryos of *Picea* and to carry out industrial seedling raising.

Key words *Picea*; Somatic embryo; Mature; Factors

云杉(*Picea*)属松科较重要的一个属,为裸子植物松科的常绿乔木,云杉属树种全世界约有40种,主要分布在亚洲、北美洲和欧洲。我国云杉属树种资源丰富,有17种9变种,另引种栽培2种^[1-7]。云杉属树种具有适应性强、抗逆性强等特性,广泛用于造林和园林绿化^[1]。另外,云杉属树种在山地森林中分布最广、蓄积量最大,是构成森林生态系统的主体,对维持山地乃至区域生态系统平衡和改善生态环境质量等方面具有举足轻重的作用^[6,8]。云杉属树种的种子繁殖需要4~5年才能获得可移栽的幼苗,生长较慢,自然育种与优良基因型选择效率较低^[7,9],在涵养水源、保持水土、保护山区牧业基地和提供建筑用材等方面有着举足轻重的作用。

体细胞胚的成熟是一个复杂的过程,既受外部因素的影响,又与本身的发育程度有关^[10]。对于成熟体细胞胚的具体形态指标研究较少,多数研究将白色或象牙色不透明体细胞胚作为成熟体细胞胚的外部特征,而对于成熟体细胞胚的大小,由于物种差异没有一个明确的规定^[11]。自1985年Hakman等^[12]首次报道挪威云杉(*Picea abies* Karst)的未成熟合子胚形成体细胞胚胎并再生完整植株以来,不同树种的外植体诱导产生了体细胞胚,云杉属树种组织培养方面的研究取得了较大的进展和丰硕的成果^[1,7,12-15]。云杉属树种天然更新不良和保障成为困惑林业工作者的一大问题^[12-13]。经过近30年努力,国内外有10多种云杉属树种的体细胞胚胎发生。目前,已经有很多植物可以成功地诱导出体细胞胚,但在促进体细胞胚成熟,并将体细胞胚成功地转化为植株的

过程中仍存在很多问题。一些植物的体细胞胚可以顺利地成长到子叶形胚阶段,但萌发率很低,甚至是不萌发或萌发后为畸形苗。自Steward等^[16]和Reinert^[17]发现胡萝卜根细胞离体培养可通过体细胞胚胎发生形成再生植株后,人们在大量的植物组织培养、单细胞悬浮培养、原生质体培养和花粉培养中都观察到了体细胞胚胎发生^[18-20]。1993年,已有210种植物成功地诱导出胚状体^[21]。目前研究多停留在诱导体细胞胚胎发生条件的摸索以及生理生化、组织学的研究方面^[19,22]。体细胞胚胎发生技术在云杉属树种中的应用,为其品种改良和规模化、产业化繁殖提供了基础^[1],笔者综述了云杉属树种体细胞胚胎成熟影响因素的研究进展。

1 物理因子对植物体细胞胚成熟的影响

1.1 光照 光照的作用主要体现在光强、光质与光照时间3个方面。邓向阳等^[23]在研究光强对花生体细胞胚发生及再生体系的建立中发现,光下体细胞胚无明显的根端,芽端虽明显变绿,但往往发育不充分,停滞于鱼雷期或更早时期。翁浩等^[24]研究不同因素对金花茶体细胞胚成熟的影响,结果表明,在红光、蓝光、绿光、白光培养条件下,只有白光诱导下体细胞胚成熟,其他光质下体细胞胚极少成熟。另外,光照对植物体细胞胚成熟的影响与培养基中糖的含量有关。当糖浓度较高时,光照对植物体细胞胚的成熟影响不大,而糖浓度较低时,光照可促进植物体细胞胚的早熟萌发。关于光照对体细胞胚成熟的影响较少。赖钟雄等^[25]、王立忱^[26]研究发现,在高糖下,光照对龙眼体细胞胚成熟没有明显的影响;在低糖下,光照可减少胚状体因透明化而引起的死亡,但胚状体早熟萌发。

1.2 通风条件 在植物体细胞胚培养中,不通风,有利于体

作者简介 依巴代提·木合旦尔(1991—),女,新疆伊犁人,硕士研究生,研究方向:资源植物和林木遗传育种。

收稿日期 2019-12-22; **修回日期** 2020-04-16

细胞胚的成熟,且体细胞胚的数量高于通风的情况。Meskaoui等^[27]研究显示密封条件可促进体细胞胚的成熟并限制早熟萌发。在密封微环境中进行黑皮云杉的成熟体细胞胚培养,其数量与正常通风条件下相比增加。

1.3 温度 低温冷冻可促进体细胞胚的成熟,并对体细胞胚的同步化有促进作用^[10]。不同植物品种对温度的影响不同。Bonga^[28]研究发现,-5、-10、-18℃冰冻至少270 d,可促进体细胞胚成熟。对于冷冻促进体细胞胚成熟的方法,研究认为,与某些植物的种子需经低温处理才会发芽类似,此类植物的体细胞胚也可能需要低温处理才能发芽并正常发育,此类模仿种子发芽的处理,其作用可能是通过冷激的方法打开体细胞胚发芽及苗体发育的必要生理代谢机制^[10,26,29]。

2 糖类

糖类作为细胞生长的碳源,不仅为体细胞胚发育提供能量,还可调节渗透压。常用的糖类有蔗糖、麦芽糖、葡萄糖等。齐力旺等^[30]研究发现用麦芽糖代替蔗糖,不但明显提高体细胞胚的成熟频率,而且使体细胞胚发生时间提前7 d;不添加蔗糖,3%麦芽糖+4%PEG 4000时,体细胞胚成熟频率最高。高浓度麦芽糖(6%、9%)可促进黑松体细胞胚成熟及萌发^[31]。低浓度的蔗糖一般不利于体细胞胚的成熟,但赖钟雄等^[32]在龙眼胚性愈伤组织的高频率体细胞胚发生研究中发现,低糖不但可提高体细胞胚的发生频率,而且减少畸形胚的出现。这可能与不同植物种类体细胞胚发育对碳源和渗透压的特殊要求有关^[10,18,20]。培养基中的糖浓度高,可使培养环境的渗透压提高,引起细胞失水,使得体细胞胚出现脱水现象,从而促进植物体细胞胚的成熟。然而,如果培养基中的糖浓度过高,会使得植物体细胞胚出现玻璃化或培育出畸形苗^[33]。张建伟等^[34-35]研究表明,60和90 g/L 2个蔗糖浓度处理下几乎无成熟体细胞胚产生,推测可能是因为渗透压过高,抑制了体细胞胚的产生。10和30 g/L 2个蔗糖浓度处理下获得的体细胞胚数量较多;而30 g/L蔗糖处理下获得体细胞胚健壮,萌发率高。因此,该试验中最佳的蔗糖处理浓度为30 g/L,平均有168个/g。

3 PEG

乙二醇(PEG)是一种高分子量的化合物渗透剂,与一些小分子渗透剂如蔗糖和甘露醇相比,其最大特点是本身不能渗透植物细胞壁进入细胞质,因而不会引起质壁分离,使植物组织和细胞处于类似干旱的水分胁迫之中,从而使细胞合成相应的胁迫蛋白质,调节代谢,促使体细胞胚成熟^[36]。研究发现,较高浓度的PEG有明显地促进体细胞胚成熟的作用,用PEG作培养基的渗透剂可明显提高植物体细胞胚的成熟率。这可能是由于PEG可引起水分胁迫,抑制了体细胞内蛋白质的合成,从而调节代谢,促进体细胞胚的发育导致的。美国Weyerhaeuser公司已证明同时使用PEG、ABA和活性炭对改善针叶树体细胞胚成熟和储藏物质的形成十分有效^[37]。Attree等^[36-37]研究发现,没有ABA时,白云杉体细胞胚不能成熟,但附加40 mmol/L PEG和100 mmol/L AgNO₃时,可促进白云杉体细胞胚的成熟^[10,38]。Li等^[38]研究火炬

松体细胞胚成熟中也有类似的发现。PEG发挥功效主要是结合碳因素一起使用,且在依赖于麦芽糖附加时,较高浓度的PEG更能增加体细胞胚成熟的频率^[39]。

4 基因型

基因型是影响植物体细胞胚发生的一个重要因素已被许多学者所认可,基因型也影响植物体细胞胚的成熟。Kintzios等^[40]对甜瓜体细胞胚发生及其植株再生的影响进行研究,结果显示,基因型明显地影响体细胞胚发生率和体细胞胚成熟及植株再生。在14个甜瓜品种中,只有3个品种得到了充分发育的子叶胚。在4个石刁柏品种中,虽然所有的基因型都能再生小苗,但只有1个品种(Rutgers 22)成熟最好,成苗率最高。Mandal等^[41]认为,红花体细胞胚的成熟和萌发受到基因型的影响。李冬梅^[42]对龙眼体细胞胚胎成熟机理的研究,依巴代提·木合旦尔等^[6]对天山云杉体细胞胚的成熟及萌发条件均研究表明,基因型影响植物体细胞胚的成熟。Lelu-Walter等^[43]以海岸松(*Pinus pinaster*)控制授粉的8个基因型未成熟合子胚为外植体,结果发现胚性愈伤组织的诱导能力与基因型关系密切。因此,在开展云杉属树种体细胞胚胎发生研究时,为了获得诱导能力较强的基因型,应扩大优良基因型的筛选力度。

5 ABA

脱落酸(ABA)是调节植物生长发育的一种激素,对植物体细胞胚的发生和发育具有多方面的影响,特别是在体细胞胚发育后期,即体细胞胚的成熟阶段作用非常明显。ABA调节植物体细胞胚发生过程中特异的基因表达,激活有关基因,合成胚胎特异性蛋白及体细胞胚内脂,从而促进体细胞胚的成熟^[6-7,10]。研究发现,ABA可以抑制体细胞胚的过早萌发,促进体细胞胚的成熟并可提高体细胞胚的质量,而在未添加ABA的培养基上,体细胞胚形态不正常,或液泡化,或不分裂^[29,44]。ABA在提高针叶树的体细胞胚胎发生频率及质量中有重要作用。青海云杉的体细胞胚成熟试验表明,同时加入不同浓度的ABA,当ABA含量为30 mg/L时,2个种源1 g胚性组织获得的正常体细胞胚数量最多。青海云杉体细胞胚发育与成熟过程中,当ABA含量为5.28 mg/L时,2个种源1 g胚性组织获得的正常体细胞胚数量最多^[45]。

6 成熟时间

成熟时间对植物体细胞胚的成熟也有很重要的作用。植物细胞胚也如同自然界中的植物一样,不经历一定的时间体细胞胚无法成熟萌发。成熟时间过短,植物体细胞胚成熟不够,无法正常萌发,一般情况下可以生根,但萌芽困难,或者萌芽后叶片无法展开,也有可能发育成玻璃化幼苗。成熟时间适当,植物体细胞胚完全成熟,可以正常萌发出根和叶,后期生长良好。成熟时间过长,萌芽率有所提高,但易使根的生长受到抑制,这可能是由于根原基的分化早于芽原基的分化,体细胞胚在成熟培养基上的时间过长,使得已分化的根原基受到损坏,因此使得根的生长受到破坏。因此,把握好植物体细胞胚的成熟时间对体细胞胚的正常萌发生长也非常重要^[44]。

7 各种离子

高等植物必需营养元素为 N、P、K、Ca、Mg、S、Fe、Mn、Zn、Cu、Mo、B、Cl、C、H、H 和 Ni^[46-47]。因植物对必需营养元素的需要量不同以及同种植物不同阶段的耗量也不同,应针对具体试验目的考虑这些离子的浓度。氮作为各种氨基酸、维生素、蛋白质及核酸的重要组成部分,对体细胞胚发生有一定的影响。培养基中氮主要以铵态氮、硝态氮 2 种形式被利用,张万军等^[48]、韩晓玲等^[49] 研究显示,高氮含量对植物体细胞胚发生发育有重要的促进作用。磷参与细胞呼吸能量储存转化及释放等重要的生命活动,并常以磷酸二氢钾(KH₂PO₄)、磷酸二氢钠(NaH₂PO₄)等盐的形式供给。钾与碳水化合物的合成、转移以及氮因素代谢等有密切的关系,主要由氯化钾(KCl)、硝酸钾(KNO₃)、磷酸二氢钾(KH₂PO₄)等提供^[47,50]。大多数植物体细胞胚发生机制研究主要考虑的都是氮源及一些金属离子。胡忠等^[51]对宁夏枸杞进行研究,结果发现,添加钙离子和硝酸银能有效地促进胚性愈伤组织的生长,形成的体细胞胚数量几乎可达对照的 2 倍^[51]。在未加任何激素时,分别添加碳酸氯(CoCl₂)、氯化镍(NiCl₂)、氯化铜(CuCl₂)、氯化锌(ZnCl₂)、氯化镉(CdCl₂)均可诱导胡萝卜体细胞胚发生以及成熟^[47,52]。

8 结语

影响体细胞胚成熟的重要因素还有很多,而且这些因素并不是单独地起作用,往往各个因素间会互相作用,共同影响体细胞胚的成熟和萌发,因此,深入研究影响体细胞胚成熟的主要因素,找出最适合的云杉属树种体细胞胚成熟培养基种类、植物生长调节剂组合、培养环境、成熟时间等主要因子是成功培养体细胞胚的重要工作。这些研究将为云杉属种质资源的保护提供理论依据,为体细胞胚发生在林业生产上的实际应用作出贡献。因此,应在以后的工作中加强这方面的研究。

参考文献

- [1] 代金玲,锡林呼,白玉娥.云杉属树种体细胞胚发生研究进展[J].世界林业研究,2016,29(5):29-32.
- [2] 王立权.新疆天山云杉群落结构特征研究[D].保定:河北农业大学,2006.
- [3] 唐光楚.新疆的天山云杉[J].新疆农业科学,1989(5):32-33.
- [4] 陈琴,陈代喜,黄开勇,等.杉木与固氮树种混交对其叶片 N 及 NR 和 GS 活性的影响[J].西部林业科学,2017,46(1):85-90.
- [5] 张明刚,陈云龙,戴丽娜,等.石河子东大塘天山云杉种群结构特征研究[J].安徽农学通报,2009,15(7):158-160.
- [6] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会.中国植物志:第 7 卷[M].北京:科学出版社,1978:123-133.
- [7] 依巴代提·木合旦尔,伊丽米努尔,张毓涛,等.天山云杉体细胞胚的成熟及萌发条件[J].林业科学,2019,55(8):176-183.
- [8] 李青梅,高芳,韩皎,等.云杉属树种体胚发生研究进展[J].新农业,2019(15):39-41.
- [9] 范静.天山云杉林地凋落物养分和持水特性的初步研究[D].合肥:安徽农业大学,2013.
- [10] 张丽媛.沙地云杉体细胞胚发生组织细胞学及光学显微结构的研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2008.
- [11] 戎旭旭.华山松胚性组织悬浮培养特性及成熟能力的研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2015.
- [12] 张焕玲.栓皮栎体胚成熟与萌发研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2005.
- [13] HAKMAN I, FOWKE L C, VON ARNOLD S, et al. The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea*

- abies* (Norway Spruce)[J]. Plant science, 1985, 38(1):53-59.
- [14] 李兆慧,潘存德,王强,等.天山云杉(*Picea schrekiana* Fisch et Mey.)凋落物的自毒效应[J].新疆农业科学,2008,45(2):189-198.
- [15] 黄健秋,卫志明.松属树种组织培养和原生质体培养[J].植物学通报,1994,11(1):34-42.
- [16] 李茜.白皮松体细胞胚发生的研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2006.
- [17] STEWARD F C, MAPES M O, MEARS K. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells[J]. Am J Bot, 1958, 45(10):705-708.
- [18] REINERT J. Über die kontrollierte der morphogenese und die induktion von adventivembryonen an gewebeulturen aus karotten[J]. Planta, 1959, 53:318-333.
- [19] 黄学林,李筱菊.高等植物组织离体培养的形态建成及其调控[M].北京:科学出版社,1995:15-50.
- [20] 王进茂,杨敏生,杨文利,等.我国木本植物体细胞胚发生研究进展[J].河北林果研究,2004(3):295-301.
- [21] 王友生.杂三叶和白三叶组织培养再生体系的研究[D].兰州:甘肃农业大学,2006.
- [22] 工傲雪,李景富.植物体细胞胚状体的诱导研究及应用[J].黑龙江农业科学,1999(2):39-41.
- [23] 陈一华.植物体细胞胚发生及体细胞减数分裂研究[D].北京:中国科学院遗传研究所,1997.
- [24] 邓向阳,卫志明.幼胚长度、2,4-D 浓度、光强度等对花生体细胞胚发生的影响及高效再生系统的建立[J].植物生理学报,2000,26(6):525-531.
- [25] 翁浩,赖钟雄.不同因素对金花茶体胚成熟的影响研究[J].园艺与种苗,2013(7):29-34.
- [26] 赖钟雄,潘良镇,陈振光.龙眼体细胞胚的高频率萌发与植株再生[J].福建农业大学学报,1998,27(1):31-36.
- [27] 王立忱.影响植物体细胞胚成熟因素的研究进展[J].防护林科技,2009(1):39-41.
- [28] MESKAOUI A E, TREMBLAY F M. Effects of sealed and vented gaseous microenvironments on the maturation of somatic embryos of black spruce with a special emphasis on ethylene[J]. Plant cell tissue and organ culture, 1999, 56:201-209.
- [29] BONGA J M. The effect of collection date and frozen storage on the formation of embryo-like structures and elongating shoots from explants from mature *Larix decidua* and *L. x eurolepis* [J]. Plant cell, tissue and organ culture, 1997, 51(3):195-200.
- [30] 贺凤美,王力华,刘阳.落叶松体细胞胚发生研究进展[J].辽宁林业科技,2000(6):33-35.
- [31] 齐力旺,韩一凡,韩素英,等.麦芽糖、NAA 及 ABA 对华北落叶松体细胞胚成熟及生根的影响[J].林业科学,2004,40(1):52-57.
- [32] SALAJOVA T, SALAJ J, KORMUTAK A. Initiation of embryogenic tissues and plantlet regeneration from somatic embryos of *Pinus nigra* Am. [J]. Plant science-limerick, 1999, 145(1):33-40.
- [33] 赖钟雄,陈振光.龙眼胚性愈伤组织的高频率体细胞胚发生[J].福建农业大学学报,1997,26(3):271-276.
- [34] 王刚,陈宝刚,刘东升.蔗糖在植物组织培养中的效应[J].林业勘查设计,2007(1):53-55.
- [35] 张建伟,王军辉,李青粉,等.云杉未成熟合子胚诱导体细胞胚发生[J].林业科学,2014,50(4):39-46.
- [36] 张建伟,王军辉,马建伟.粗枝云杉胚性愈伤组织增殖后期的体细胞胚发生方式转变[J].植物生理学报,2014,50(2):197-202.
- [37] ATTREE S M, FOWKE L C. Embryogeny of gymnosperms: Advances in synthetic seed technology of conifers [J]. Plant cell, tissue and culture, 1993, 35:1-35.
- [38] ATTREE S M, POMEROY M K, FOWKE L C. Manipulation of conditions for the culture of somatic embryos of white spruce for improved triacylglycerol biosynthesis and desiccation tolerance [J]. Planta, 1992, 187:395-404.
- [39] LI X, KRASNYANSKI S F, KORBAN S S. Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis and shoot organogenesis in *Rosa* [J]. Journal of plant physiology, 2002, 159(3):313-319.
- [40] BECWAR M R. Conifer somatic embryogenesis and clonal forestry [M] // AHUJA M R, LIBBY W J. Clonal forestry. I. Genetics and biotechnology. Berlin, Germany: Springer, 1993:200-223.
- [41] KINTZIOS S E, TARAVIRA N. Effect of genotype and light intensity on somatic embryogenesis and plant regeneration in melon (*Cucumis melo* L.) [J]. Plant breeding, 2006, 116(4):359-362.

- zosphere shape of lentil and maize: Spatial distribution of enzyme activities [J]. Soil biology and biochemistry, 2016, 96: 229–237.
- [25] SPOHN M, CARMINATI A, KUZYAKOV Y. Soil zymography—A novel *in situ* method for mapping distribution of enzyme activity in soil [J]. Soil biology and biochemistry, 2013, 58: 275–280.
- [26] DUAN C J, FANG L C, YANG C L, et al. Reveal the response of enzyme activities to heavy metals through *in situ* zymography [J]. Ecotoxicology and environmental safety, 2018, 156: 106–115.
- [27] SARDANS J, PEÑUELAS J. Drought decreases soil enzyme activity in a Mediterranean *Quercus ilex* L. forest [J]. Soil biology and biochemistry, 2005, 37: 455–461.
- [28] BOWLES T M, ACOSTA-MARTÍNEZ V, CALDERÓN F, et al. Soil enzyme activities, microbial communities, and carbon and nitrogen availability in organic agroecosystems across an intensively-managed agricultural landscape [J]. Soil biology and biochemistry, 2014, 68: 252–262.
- [29] NAHIDAN S, NOURBAKHSH F, MOSADDEGHI M R. Variation of soil microbial biomass C and hydrolytic enzyme activities in a rangeland ecosystem: Are slope aspect and position effective? [J]. Archives of agronomy and soil science, 2015, 61(6): 797–811.
- [30] LIU X M, LI Q, LIANG W J, et al. Distribution of soil enzyme activities and microbial biomass along a latitudinal gradient in farmlands of Songliao Plain, Northeast China [J]. Pedosphere, 2008, 18(4): 431–440.
- [31] ŠTURSOVÁ M, BALDRIAN P. Effects of soil properties and management on the activity of soil organic matter transforming enzymes and the quantification of soil-bound and free activity [J]. Plant and soil, 2011, 338(1/2): 99–110.
- [32] WALLENIUS K, RITA H, MIKKONEN A, et al. Effects of land use on the level, variation and spatial structure of soil enzyme activities and bacterial communities [J]. Soil biology and biochemistry, 2011, 43(7): 1464–1473.
- [33] PANDEY D, AGRAWAL M, BOHRA J S. Assessment of soil quality under different tillage practices during wheat cultivation: Soil enzymes and microbial biomass [J]. Chemistry and ecology, 2015, 31(6): 510–523.
- [34] ROLDAN A, SALINAS-GARCIA J R, ALGUACIL M M, et al. Soil enzyme activities suggest advantages of conservation tillage practices in sorghum cultivation under subtropical conditions [J]. Geoderma, 2005, 129(3/4): 178–185.
- [35] HEMKEMEYER M, CHRISTENSEN B T, MARTENS R, et al. Soil particle size fractions harbour distinct microbial communities and differ in potential for microbial mineralisation of organic pollutants [J]. Soil biology and biochemistry, 2015, 90: 255–265.
- [36] ALLISON S D, CZIMCZIK C I, TRESEDER K K. Microbial activity and soil respiration under nitrogen addition in Alaskan boreal forest [J]. Global change biology, 2008, 14: 1156–1168.
- [37] ANDERSSON M, KJÄLLER A, STRUWE S. Microbial enzyme activities in leaf litter, humus and mineral soil layers of European forests [J]. Soil biology and biochemistry, 2004, 36: 1527–1537.
- [38] PRIETZEL J. Arylsulfatase activities in soils of the Black Forest/Germany: Seasonal variation and effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fertilization [J]. Soil biology and biochemistry, 2001, 33: 1317–1328.
- [39] RIAH W, LAVAL K, LAROCHE-AJZENBERG E, et al. Effects of pesticides on soil enzymes: A review [J]. Environmental chemistry letters, 2014, 12(2): 257–273.
- [40] MA S C, ZHANG H B, MA S T, et al. Effects of mine wastewater irrigation on activities of soil enzymes and physiological properties, heavy metal uptake and grain yield in winter wheat [J]. Ecotoxicology and environmental safety, 2015, 113: 483–490.
- [41] HU X F, JIANG Y, SHU Y, et al. Effects of mining wastewater discharges on heavy metal pollution and soil enzyme activity of the paddy fields [J]. Journal of geochemical exploration, 2014, 147: 139–150.
- [42] XIAN Y, WANG M E, CHEN W P. Quantitative assessment on soil enzyme activities of heavy metal contaminated soils with various soil properties [J]. Chemosphere, 2015, 139: 604–608.
- [43] SUBRAHMANYAM G, SHEN J P, LIU Y R, et al. Effect of long-term industrial waste effluent pollution on soil enzyme activities and bacterial community composition [J]. Environmental monitoring and assessment, 2016, 188(2): 1–13.
- [44] YANG G, DONG F Q, LIU M X, et al. Interactive effect of radioactive and heavy-metal contamination on soil enzyme activity in a former uranium mine [J]. Polish journal of environmental studies, 2018, 27(3): 1–9.
- [45] FANG L C, LIU Y Q, TIAN H X, et al. Proper land use for heavy metal-polluted soil based on enzyme activity analysis around a Pb-Zn mine in Feng County, China [J]. Environmental science and pollution research, 2017, 24: 28152–28164.
- [46] JIA W L, WANG B L, WANG C P, et al. Tourmaline and biochar for the remediation of acid soil polluted with heavy metals [J]. Journal of environmental chemical engineering, 2017, 5(3): 2107–2114.
- [47] TANG J Y, ZHANG L H, ZHANG J C, et al. Physicochemical features, metal availability and enzyme activity in heavy metal-polluted soil remediated by biochar and compost [J/OL]. Science of the total environment, 2020, 701 [2019-12-15]. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134751>.
- [48] ZHAI X Q, LI Z W, HUANG B, et al. Remediation of multiple heavy metal-contaminated soil through the combination of soil washing and *in situ* immobilization [J]. Science of the total environment, 2018, 635: 92–99.
- [49] PAZ-FERREIRO J, TRASAR-CEPEDA C, DEL CARMEN LEIRÓS M, et al. Intra-annual variation in biochemical properties and the biochemical equilibrium of different grassland soils under contrasting management and climate [J]. Biology and fertility of soils, 2011, 47(6): 633–645.

(上接第 13 页)

- [41] MANDAL A K A, GUPTA S D, CHATTERJI A K. Factors affecting somatic embryogenesis from cotyledonary explants of safflower [J]. Biologia plantarum, 2001, 44(4): 503–507.
- [42] 李冬梅. 龙眼体细胞胚胎成熟机理的研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2003.
- [43] LELU-WALTER M A, BERNIER-CARDOU M, KLIMASZEWSKA K. Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis [J]. Plant cell, tissue and organ culture, 2008, 92: 31–45.
- [44] 时亚斌. 植物体细胞胚成熟的影响因素 [J]. 林业勘查设计, 2016(1): 88–89.
- [45] 秦彩云, 李青梅, 王聪慧, 等. 青海云杉愈伤组织增殖与体胚成熟阶段影响因子研究 [J]. 森林工程, 2018, 34(2): 21–25.
- [46] 何念祖, 孟赐福. 植物营养原理 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987: 317–318.
- [47] 木合热皮亚·艾尔肯, 张富春. 诱导植物体细胞胚发生的几个因素研究 [J]. 北方园艺, 2013(3): 194–197.
- [48] 张万军, 王海. 紫花苜蓿愈伤成苗高频再生体系的建立及其影响因子的研究 [J]. 中国农业科学, 2002, 35(12): 1597–1583.
- [49] 韩晓玲, 王冰雪, 林雪, 等. 小冠花高效体细胞胚胎发生与植株再生的研究 [J]. 西北大学学报(自然科学版), 2006, 36(3): 420–423.
- [50] 胡笃敬, 董任瑞, 葛旦. 植物钾营养的理论与实践 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1993: 61–95.
- [51] 胡忠, 徐艳, 高欢欢, 等. 影响宁夏枸杞愈伤组织体细胞胚发生的因素 [J]. 汕头大学学报, 2006, 21(4): 57–63.
- [52] KIYOSUE T, TAKANO K, KAMADA H, et al. Induction of somatic embryogenesis in carrot by heavy metal ions [J]. Can J Bot, 1990, 68: 2301–2303.