

文章编号:1001—7380(2022)02—0043—09

银杏组织培养方案优化研究进展

吴奇翰

(福建师范大学附属中学,福建 福州 350007)

摘要:构建银杏的植物组织培养技术体系的目的主要有2个,即通过外植体诱导分化愈伤组织,再脱分化,产生不定芽,最终形成完整植株;对愈伤组织进行继代培养和细胞悬浮培养,以提取次生代谢产物。但培养物面临严重的污染和褐化问题,愈伤组织诱导和分化成功率较低,且次生代谢物含量低于天然叶片平均水平,不利于进一步工业化提取应用。该文从外植体类型、取材和保存方法,消毒剂种类、浓度与使用时间,培养基配方、有益化合物添加,外环境条件筛选、pH与温度控制等方面综述了国内外学者对方案作出的优化。针对污染和褐化2大问题,比较各环节的改进做法,讨论为提高成功率和次生代谢物产量进行的改良设计,并为进一步研究提出适宜方案,指出今后的改进方向和研究重点。

关键词:银杏;组织培养;愈伤组织;外植体;消毒剂;培养基;防褐化

中图分类号:Q943.1;Q944.6;S792.95 **文献标志码:**A **doi:**10.3969/j.issn.1001-7380.2022.02.009

Advance in optimization of the tissue culture formula of *Ginkgo biloba* L.

Wu Qihan

(The Affiliated School of Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China)

Abstract:For *Ginkgo biloba* tissue culture technology, scholars have succeeded in inducing explants to differentiate into callus, and further either differentiate into adventitious buds or roots, finally forming plants, or subculturing to extract secondary metabolites. However, in addition to the low success rate, there also encounter contamination and browning problems. The content of secondary metabolites is lower than the average level of natural leaves, which is not conducive to further industrial extraction applications. This article reviewed the optimization of the scheme by domestic and foreign scholars from the aspects of explant type, collection and preservation method, concentration and use time of disinfectant, medium formulation, addition of beneficial compounds, screening of external environmental conditions, pH and temperature control. For the two problems, the improvement methods were compared. We improved designs by different scholars to increase the success rate and secondary metabolite production were discussed. Finally further research highlights also proposed.

Key words: *Ginkgo biloba* L.; Tissue culture; Callus; Explant; Disinfectant; Culture medium; Anti-browning

银杏(*Ginkgo biloba* L.)具有较高观赏、食用等价值,其在生长过程中会产生多种特有的次生代谢化合物,如银杏黄酮(可预防口腔溃疡复发^[1]、抑制肺癌细胞活性^[2])、银杏内酯(可治疗血管性痴呆和调节血脂^[3])等。但上述次生代谢物一般从叶片中取得,随着对其利用价值的研究和开发,传统栽植方法周期长、成本高、受环境影响大的弊端逐渐显现,无法很好满足市场需求。利用组织培养技术,可直接从愈伤组织中生产有益次生代谢物,实现次生代谢物的工业化生产^[4];还可快速、规模化繁育

银杏植株,具有一定研究意义与应用前景。

但银杏的组织培养面临许多难点,如:植株生长速度较慢,组织细胞分裂活力较弱,外植体诱导分化难度大;受真菌和细菌感染,污染较严重,对取材和消毒环节要求严格;代谢途径复杂,富含酚类物质,培养过程中易氧化生成醌,醌在培养基中扩散,影响组织代谢,进而导致褐化,故对培养条件十分敏感。

目前,国内外学者已将不同外植体材料诱导脱分化形成愈伤组织,并进一步诱导其分化出不定

收稿日期:2022-02-06;修回日期:2022-02-26

作者简介:吴奇翰(2006—),男,福建福安人,现就读于福建师大附中“润德”创新人才培养实验班。目前研究方向:木本植物组织培养优化。

芽、不定根,最终形成植株;或对愈伤组织进行继代扩大培养、细胞悬浮培养,提取次生代谢物。但目前仍面临严重的污染和褐化问题;且次生代谢物含量低于天然叶片水平^[5-6],不利于工业化生产应用。为提高成功率、提升产量的优化探究正不断进行。

本文以步骤为序,综述了现有研究在组织培养各环节中提出的改进方案,归纳了外植体的最佳取材时间、部位与其保存方法,探讨了消毒剂的种类、浓度和使用时间,提出了培养基 pH、温度的适宜条件,整理了不同学者的培养基配方和提出的一些益于培养的化合物添加,以供进一步研究参考。同时,本文比较分析了不同学者对污染和褐化 2 个问题进行改良设计中的不同观点,初步讨论了相关原理,提出了较为适宜的培养方案,并指出了今后的研究重点和方向。

1 外植体取材与保存环节的优化

目前,研究主要以胚(包括幼胚、成熟胚、胚乳、子叶)和茎(包括茎段和茎尖)2 种外植体为材料,叶片作为外植体材料成功率较低^[7-8],叶柄诱导愈伤组织难度较大^[9]。

胚外植体在不同时期都具有较高诱导潜能^[10],而 3 月下旬至 5 月中旬抽出的当年生枝条具有最高的诱变潜力^[11-13];茎段外植体茎尖和下段部分的诱导率较低,而上段、中段诱导效果较好,具有一定的位置效应^[14];10 a 以下的银杏植株作为材料来源,细胞分裂较旺盛,诱导难度较低。另外,若把形成愈伤组织作为试验目的,母株年龄对诱导率的影响较不显著;但若把获取次生代谢物作为目的,则应该选择 2—6 年生的幼龄银杏植株作为外植体来源^[15]。

胚外植体在采集后不经腐熟直接去除外种皮,用自来水冲洗干净后,可放入冰箱中 2—4 ℃ 储存^[16-17];也可将其与沙子混合后埋入土中沙藏^[11],还可用 KMnO_4 消毒后常温贮存^[10]。其中,低温保存是目前较为主流的保存方法。对于茎段外植体,可用抗氧化剂溶液[含 150 mg/L CA(枸橼酸)和 100 mg/L Vc(抗坏血酸)]保存^[18],也有研究用 16 h 的 4 ℃ 低温保存^[19]。上述处理有利于杀灭部分外植体所带杂菌以减轻污染,但同样面临组织活力降低的问题。目前绝大研究采用随采随用的方式,以减少在保存过程中造成污染的可能,同时避免活力降低。

综上所述,在选择外植体时,应选择细胞生长分裂旺盛的部位,其分化潜能更强,诱导难度更低。

同时外植体不能太嫩,也不能木质化程度太高。太嫩的组织细胞虽细胞分裂较旺盛,但在消毒时药品渗透也较快,在后续的漂洗操作中不易清除,细胞易失活甚至破裂,造成的褐变现象较严重;而木质化程度较高的部位细胞分化困难,同时对外源生长调节剂和营养物质的吸收不利,也会降低组织培养的效能。同时,从外植体种类上来看,胚外植体与茎外植体在诱导愈伤组织的成功率和形成效果等方面均优于叶外植体。由于不必在特定时段随采随用,且种皮的保护使得消毒较易取得良好效果,胚外植体是最好的外植体选择。

2 消毒与接种环节的优化

茎段和叶片外植体采集后应在洗衣粉中浸泡 30—60 min^[15, 20],后转用自来水清洗 5 min,蒸馏水漂洗 2—5 次,每次 1—2 min;也有研究指出可省略洗衣粉浸泡的步骤,并相应延长自来水清洗时间到 30 min^[15],而后应立即进行消毒,以最大程度减轻和避免污染。胚外植体保存后,先去除骨质外种皮,再经消毒进入培养。在研究中,消毒剂的种类、浓度和使用时间对污染率和褐化率均有直接且重要的影响。有研究采用 70% 乙醇 30 s 结合 0.1% 升汞(氯化汞)溶液 8—10 min 消毒^[7-8],也有研究将消毒的时间加倍处理(60 s 乙醇,20 min 氯化汞)^[15]。其中,乙醇消毒时间的影响不显著,而升汞消毒时间则有显著影响:时间过长,高毒性的汞离子不易清除完全,易导致褐化甚至死亡;时间太短,则面临灭菌不完全,污染率高的问题。对于茎段外植体^[11]和胚外植体^[21],升汞最佳使用时间为 6 min;而对于叶片外植体适宜消毒时间为 2—4 min^[22, 15]。

由于升汞的高毒性不利于试验安全操作,近年来已报道了其他消毒剂的研究与探索。目前应用较为广泛的消毒剂主要有新洁尔灭、双氧水和漂白粉溶液等,也有使用 1.0 mg/L 链霉素溶液进行消毒的报道^[23]。用 70% 酒精初步消毒 90 s 后,转用 0.5% 新洁尔灭处理 15 min 可以取得良好效果,但同样的是新洁尔灭浓度不宜过高,时间不宜过长,以免组织褐化;用 12% 双氧水处理银杏幼茎外植体 8—10 min 也可以取得良好效果^[24]。

对于较易消毒的胚外植体,有使用 10% 漂白粉溶液消毒 15 min 的报道^[10, 25-27],也有用漂白粉溶液结合短时酒精消毒的案例,如 70% 酒精消毒 1 min 后转用 2%^[28]或 3%^[29]漂白粉溶液消毒 15 min。但

对于较难消毒的外植体,大多需要将其与其他消毒剂结合使用,如初步消毒后转用升汞 5 min^[30]处理;也可提高溶液浓度并延长使用时间,如姜蓓等应用 17% 溶液消毒 20 min^[31];Bekhit 等应用 25% 溶液消毒 20 min^[32];也有研究加入 1—2 滴吐温 20^[33]或吐温 80^[34]以增强消毒效果。

综上所述,消毒剂的浓度越高,使用时间越长,对组织的作用越充分,感染率越低;但同时漂洗清除完全的难度也越大,残留的有害物质越多,褐化现象越易发生。目前研究广泛认可的最佳消毒剂的使用方案为 0.1% 升汞溶液消毒 8 min。实际试验中,应根据外植体种类、微生物感染程度、消毒剂浸润的难易程度,选择合适的消毒浓度和消毒时间。通常情况下,较幼嫩的外植体对消毒剂的耐受性较弱,同时带有的微生物也较少,故使用时间也可相应缩短。应用其他消毒剂可提高试验安全性,故是目前和未来优化探究的方向之一。目前,漂白粉的消毒效果较为有限,但与其他方法结合使用或也可在提高安全性、降低成本的同时得到较好的效果。

消毒剂消毒后,应用无菌水漂洗外植体 3—5 次^[5],以减少消毒剂对组织的毒害,后立即接种到培养基上。根据褐化成因,应尽量减少外植体与培

养基的接触面积,以减缓有害物质扩散。叶片外植体接种时应注意切口平齐,大小适中。其与培养基接触面积相对较大,可能是褐化率较高的原因之一;茎段接种时应将其剪成小段,竖直接种在培养基上。有研究指出,剪切后的外植体长度越长,褐化率越低^[20]。综合考虑褐化率和外植体材料的利用率,剪切后外植体的最佳长度为 2 cm 左右。

3 培养基配方的优化

目前,银杏组织培养主要目的有二,一是形成完整植株,二是提取次生代谢物。但不论目的如何,多数研究都需先诱导外植体形成愈伤组织。愈伤组织形成后,可以在诱导分化培养基上诱导出不定芽、不定根,形成试管苗,后续通过炼苗等获得完整植株;或对其进行继代扩大培养,将其转入到细胞悬浮培养基中,进一步扩大培养,以提取有益次生代谢物。由于细胞生长和次生代谢物的积累并不成平行关系,应分别考虑。

3.1 诱导愈伤组织培养基

目前对于银杏愈伤组织诱导的研究已较为完善,部分配方整理如表 1。

表 1 诱导愈伤组织培养基配方

配方编号	外植体	基本培养基	植物生长调节剂	其他化合物添加
1 ^[35]	腋芽	MS	3.0 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA	
2 ^[36]	茎段	MS	0.5 mg/L 6-BA	2.0 g/L AC(活性炭)
3 ^[9]	茎段	MS	0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L KT	
4 ^[12]	茎段	MS	2.0 mg/L NAA + 0.1 mg/L 6-BA	
5 ^[37]	茎段	MS	0.3 mg/L NAA + 0.5 mg/L 6-BA	
6 ^[15]	叶片	MS	2.0—3.0 mg/L NAA + 1.0—2.0 mg/L 6-BA	
7 ^[38]	叶片	MS	1.0 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA	
8 ^[39]	叶片	MS	3.0 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA	
9 ^[8]	叶片	MS	2.0 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA	
10 ^[40]	叶片	MS	1 mg/L NAA + 2 mg/L KT	
11 ^[41]	叶片	MS	2 mg/L NAA + 0.1 mg/L KT	
12 ^[42]	叶片	MS	3.0 mg/L NAA + 2.0 mg/L 6-BA	
13 ^[43]	叶片	MS	1 mg/L NAA + 0.005 mg/L 6-BA(或 KT)	
14 ^[44]	叶片	MS	3.0 mg/L NAA + 3.0 mg/L 6-BA	10 mg/L Vc
15 ^[5]	叶片	MS	1.0 mg/L NAA + 2.0 mg/L 6-BA	50—100 mg/L 壳聚糖
16 ^[45]	叶片	MS	1.0 mg/L 6-BA + 0.4 mg/L KT + 1.0 mg/L 2,4-D	
17 ^[7]	叶片	MS	1.0 mg/L NAA + 0.3 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L KT + 2.0 mg/L 2,4-D	
18 ^[38]	叶片	N6	3.0 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA	
19 ^[22]	叶片	N6	3.0 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA	
20 ^[46]	子叶	MS	2.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L 6-BA	
21 ^[25]	子叶	MS	1.0 mg/L 2,4-D + 1.5 mg/L KT	
22 ^[34]	胚	MS	2 mg/L NAA + 3 mg/L KT	
23 ^[10]	胚	MS	1.0 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA	
24 ^[47]	胚	MS	1.5 mg/L NAA + 2.0 mg/L 6-BA	
25 ^[48]	胚	MS	3 mg/L NAA + 5 mg/L KT	
26 ^[23]	胚	MS	0.3—0.5 mg/L 6-BA	2 g/L AC
27 ^[26]	胚	DCR	0.5 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L 2,4-D	
28 ^[16]	胚	DCR	1.0 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA	1 mg/L AgNO ₃
29 ^[49]	叶、胚等	MS	0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L 2,4-D	

注:培养基中默认添加蔗糖(2%—4%)和琼脂(6—8 g/L)。

基本培养基作为大量元素和微量元素的提供者,是影响分化率和次生代谢物产量的最显著因素^[10, 50]。木本植物组织培养所常用的低盐 DCR 培养基并不有利于银杏愈伤组织的诱导^[10, 12], B5, N6, White 培养基也均不是银杏组织培养的较好选择^[15]。大多数研究认为, MS 培养基可以良好地诱导愈伤组织。也有不少研究指出改良 MS 培养基(1/2 MS 和 1/4 MS)对愈伤组织的诱导更加有益,但由于效果差异不大,研究仍将 MS 培养基作为基本培养基的主要选择。

对培养基中大量元素的研究发现, 550 mg/L NH_4NO_3 , 56 mg/L KH_2PO_4 , 496 mg/L MgSO_4 , 292 mg/L CaCl_2 是有利于愈伤组织生长的最佳含量^[40]; 早期研究发现添加少量的还原氮即可显著促进愈伤组织再分化^[51], 在此基础上添加适当含量的 NH_4Cl 也可以取得较好效果^[52]; 另一面也有研究指出在减少 50% NO_3^- 含量培养基上诱导的愈伤组织生长状况不佳且次生代谢物产量低^[53]。

综合上述研究, 较高 N, K 元素含量, 特别是高铵态氮、硝态氮含量的基本培养基对于银杏愈伤组织的诱导有利, 说明银杏需要较多的大量元素以满足原生代谢产物的生成, 促进形成愈伤组织。

对于微量元素, 陈雷等指出 1.250 mg/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 24.800 mg/L H_3BO_3 , 22.300 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.500 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.125 mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 是诱导愈伤组织的最佳含量。含量过低, 不利于愈伤组织生长, 而在一定程度上提高含量, 可抑制组织褐变, 且对无机盐总含量和渗透压影响不大^[47], 但含量过高, 对组织也有一定毒害作用。

也有对琼脂(默认质量浓度 7 g/L)进行改进的研究。一些试验表明, 在默认的琼脂浓度下, 培养基固化不足, 不利于外植体保持竖直, 其最终与培养基的接触面积增大, 更易褐化和污染; 将琼脂含量增加 1—2 g/L 可在较少影响物质吸收的前提下减少褐化发生, 更利于接种和幼苗的生长^[20]。

对于糖类添加量, 一方面有研究发现不添加蔗糖可同时减少褐化与污染^[20]。但另一方面, 也有研究指出增加蔗糖含量到 4%^[9] 或 5%^[54] 更有利于培养, 并认为高糖造成的较高渗透压可减少褐化、促

进愈伤组织发育^[21]。关于糖类物质对银杏组织培养的影响还需进一步实验证明和在理论上支持。

试验已证明, 未添加植物生长调节剂的培养基不能诱导形成愈伤组织^[36]。这说明外植体自身生理状况和内源激素无法支持愈伤组织形成, 需要外源激素的适当添加。对于细胞分裂素, NAA(1-萘乙酸)为较好选择, 常用的 2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸)并不能较好适用于银杏, 反对愈伤组织诱导有一定抑制作用^[53]。相较而言, NAA 诱导出的愈伤组织虽在前期生长较慢, 但后期褐化率低^[54], 生长活力充足^[50]; 对于生长素, 6-BA, KT(6-呋喃氨基嘌呤)与 NAA 相结合使用是较好选择, ZT(玉米素)^[55] 和 IBA^[15] 的诱导效果不佳。综合考虑, 目前研究多使用 NAA 和 KT 组合诱导愈伤组织。也有研究指出, NAA 与 6-BA 组合可使愈伤组织生长得更良好且后期更少出现褐化^[20], 并认为这与 KT 生理活性过低导致后期细胞分裂素不足有一定关系^[8]。总体而言, 由于银杏天然植株生长速度较慢, 外植体对具有较高活性(如 2,4-D)或较高浓度的植物激素均不能良好适应, 导致代谢途径紊乱, 褐化率提高, 次生代谢物合成减少。为此, 绝大多数研究使用浓度较低、生理活性较低的植物激素组合进行培养。

对于培养基中其他物质的添加, 有研究称 500 mg/L Gln(谷氨酰胺)^[10] 有助于增加诱导成功率; 100 mg/L 壳聚糖有利于愈伤组织的分化, 但需要光照条件的配合才有显著差异^[5]。同时, AgNO_3 可以作为乙烯抑制剂, 影响内源激素的合成以增加诱导率, 但若浓度过高, Ag^+ 竞争性结合叶绿素分子^[17], 也可能导致愈伤组织重金属中毒。故 AgNO_3 使用时的最佳浓度为 1 mg/L^[16]。

3.2 诱导分化培养基

对于银杏的组织培养, 目前器官发生途径有 2 种。一种是间接器官发生, 即先诱导出愈伤组织, 再诱导形成不定芽、不定根, 多见于子叶外植体、胚乳外植体和叶片外植体; 另一种是直接器官发生, 即不经过愈伤组织直接形成器官, 多见于胚外植体和茎段外植体(带腋芽)。在多数研究中, 外植体诱导出愈伤组织后不需转移培养基, 继续培养即可诱导其产生不定芽和不定根, 针对分化的培养基配方优化与改进较少。部分培养基配方整理如表 2。

表 2 诱导分化培养基配方

配方编号	外植体	基本培养基	植物生长调节剂	其他化合物添加
1 ^[55]	子叶	MS	1.0 mg/L NAA + 2.0 mg/L KT	3% 胚乳提取液
2 ^[55]	叶片	MS	1.0 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA	
3 ^[55]	花粉	MS	1.0 mg/L NAA + 0.5 mg/L KT	
4 ^[31]	胚	WPM	无	
5 ^[55]	茎段	MS	1.0 mg/L NAA + 0.5 mg/L 6-BA	5 g/L AC
6 ^[13]	茎段	MS	1.7 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L IBA	
7 ^[30]	茎段	MS	0.1 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA	
8 ^[36]	茎段	1/2 MS	0.2 mg/L NAA + 0.8 — 1.0 mg/L IBA	

注:培养基中默认添加蔗糖(2%—3%)和琼脂(6—8 g/L)。

3.3 继代培养培养基

对诱导出的愈伤组织进行继代培养,有利于扩
充试验材料,也有利于产生更多的次生代谢物,为

工业化提取应用建立条件。部分继代培养的培养
基配方整理如表 3。

表 3 继代培养培养基配方

配方编号	外植体	基本培养基	植物生长调节剂	其他化合物添加
1 ^[48]	胚	MS	3 mg/L NAA + 2 mg/L KT	2 g/L AC
2 ^[23]	胚	MS	1.0—2.0 mg/L NAA + 0.5 mg/L 6-BA	
3 ^[56]	胚	MS	1.5 mg/L KT + 1.0 mg/L 2,4-D	
4 ^[26]	胚	DCR	0.3 mg/L 6-BA + 2.0 mg/L 2,4-D	
5 ^[45]	叶片	MS	1.5 mg/L NAA + 2.0 mg/L 6-BA + 0.4 mg/L KT + 2.0 mg/L 2,4-D	
6 ^[15]	叶片	MS	2.0—3.0 mg/L NAA + 1.0—2.0 mg/L 6-BA	
7 ^[57]	叶片	MS	2.0 mg/L NAA + 0.5 mg/L 6-BA	
8 ^[39]	叶片	MS	3.0 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA	
9 ^[36]	茎段	MS	0.5 mg/L NAA + 0.8—1.0 mg/L 6-BA	

注:培养基中默认添加蔗糖(2%—3%)和琼脂(6—8 g/L)。

有不少研究针对继代培养的培养基做出了改
进,如提出葡萄糖的利用虽较蔗糖不利于诱导,但
后期黄酮产量较高^[53];0.002%的 10 nm 直径磁
铁纳米颗粒可以在提高抗氧化水平的同时增加次
生代谢物产量^[33];0.5 mmol/L 硝酸铈有利于增加
黄酮和内酯的产量;水杨酸(SA)可促进次生代谢物
的产生和释放^[29]。

3.4 细胞悬浮培养培养基

针对提取次生代谢物的研究可在多次继代后
将生长良好的愈伤组织剪碎,按30—40 g/L^[57]接种
在液体培养基中。培养液的体积为摇瓶的 1/3—
1/2,在旋转式摇床上以 110—120 r/min^[57-58]速度悬
浮培养,在 20 d 时收获细胞^[15]。部分配方整理如
表 4。

表 4 细胞悬浮培养培养基配方

配方编号	外植体	基本培养基	植物生长调节剂	其他化合物添加
1 ^[59]	叶片	B5	0.5—1.0 mg/L NAA + 0.2—0.5 mg/L 6-BA	30 g/L 蔗糖+ 15 g/L 葡萄糖
2 ^[57]	叶片	MS	2.0 mg/L NAA + 0.015 mg/L 6-BA	
3 ^[38]	叶片	MS	1.5 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA	
4 ^[48]	胚	MS	3 mg/L NAA + 2 mg/L KT	30 g/L 蔗糖
5 ^[60]	胚	MS	3 mg/L NAA + 2 mg/L KT	
6 ^[60]	茎段	N6	1.0 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA + 3.0 mg/L 2,4-D	

与愈伤组织相比,悬浮培养的细胞由于与培养
基的结合更加充分,对营养物质的吸收更加容易,
但也对环境更为敏感,培养基中成分的差异往往会
产生很大的影响。同时,在固体培养基中适宜的激
素浓度配比不一定适于液体悬浮培养。不过,也有
研究直接将愈伤组织培养基配方去除琼脂后作为

细胞悬浮培养基^[38]。

研究指出,MS 和 B5 培养基为基本培养基对银
杏细胞进行液体悬浮培养较佳。若以生产黄酮为
主 B5 培养基较佳,若以生产内酯为主则 MS 培养基
较佳^[16]。同时,去除培养基中的氮源,虽然不利于
细胞生长,但有利于提高次生代谢物产量^[57]。而对

于碳源,蔗糖最适于次生代谢物的积累,葡萄糖则最适于细胞的生长。在一定范围内适当调高蔗糖浓度有利于组织培养,但过高的蔗糖易影响渗透压,降低组织培养效能^[38]。30 g/L 蔗糖与 15 g/L 的葡萄糖混合添加是最佳的碳源配方^[16]。

此外, 1×10^{-7} mol/L TDZ(苯基噻二唑基脲)可同时发挥细胞分裂素和生长素的功能,保持悬浮细胞旺盛生长,增加次生代谢物的积累^[48];0.05%的芦荟汁添加有益于次生代谢物的合成^[61];0.10 g/L 的琼脂糖有利于黄酮的累积^[57];5 mL/L 蜂蜜的添加也有利于黄酮的积累;培养第9 d时添加 2×10^{-5} 的茉莉酸甲酯(MJ)有利于提高黄酮产量;但 CH(水解酪蛋白)在细胞悬浮培养中并不能提高效能^[35]。

3.5 对抗褐变的配方优化

由于含有较多的单宁和酚类物质,银杏组织培养全过程中均较易出现褐化问题。针对这一问题,研究已探讨了多种抗褐化剂的应用。王义强提出最佳抗氧化剂为 10 mg/L Vc,其次为 1 g/L PVP(聚乙烯吡咯烷酮)^[44];单超得出 2 g/L AC 有利于外植体状态保持良好^[11],且效果明显较其他抗褐化剂好^[21];胡蕙露等证实 AC 可有效防止褐变,并指出 AC 含量对培养影响达到极显著水平,甚至超过植物生长调节剂^[30],且对于愈伤组织的诱导是必需的^[36]。

CA(柠檬酸),PA(植酸),硫代硫酸钠和 EDTA 二钠有助于抑制 PPO(多酚氧化酶)活性^[62]。Vc 作为维生素,是一种较为安全的抗氧化剂,能够促进醌重新还原为酚类物质,抑制醌的二次聚合反应,同时可使培养环境更趋于碱性,抑制 PPO(多酚氧化酶)的活性以减少褐变^[63];AC 主要是吸附培养基中对组织产生毒害的物质,提供的暗环境也有利于激素(特别是光敏性的 IBA 和 IAA^[64])的结构稳定和生理活性。但由于 AC 对酚类物质和植物激素均具较高亲和性^[65],可能会不加选择地吸附培养基中的营养物质和激素^[66],对组织培养产生不利影响^[67],故应用时需增加激素含量以降低影响;PVP 作为一种吸附剂,虽具有选择性吸附能力,但其吸附有害物质,特别是醌类物质的能力较弱,在应用中效果也较差。

然而,也有不少研究指出无论哪种抗褐化剂对减少褐化的作用均不显著。江静等指出 PVP, Vc, AC 的抗褐变效应并不突出^[22];喻娜等也认为 L-半胱氨酸和腺苷-5'-三磷酸二钠盐并不能产生良好效果^[37]。可能由于 PA 的酸性会使愈伤组织生化反应不协调,且酸性条件下 PPO 酶活性较高,非但未

能达到抑制褐化的功效^[56],反而可能加剧褐化^[25]。

4 外环境条件的优化

按照传统惯例,愈伤组织的分化应在暗条件下进行。但研究发现,光照条件在诱导分化、减少褐化、提升次生代谢物含量方面均优于传统暗条件^[5]。对于愈伤组织的诱导,认为从 2 d 起应在每日 12 h 的 1 000—2 000 lx 光照下培养^[13, 37];或应在每日 16 h 的 2 000—3 000 lx 光照下培养^[31];对于继代培养,应给予每日 12 h^[8]乃至 16 h^[26]的光照;而在进行细胞悬浮培养时,在 3 000 lx 的连续光照下培养,次生代谢物含量最高;在 2 000 lx 光照下培养,细胞增长最快^[15]。这可能是由于光照条件下愈伤组织的代谢更偏向于自养型,在有害物质生成减少的同时促进了叶绿体的分化。有研究指出黄酮含量与叶绿素含量成正相关^[68],生成的叶绿体或为黄酮合成提供结构基础,这一观点还需进一步研究提供证据。

由于 PPO 在 30 ℃ 下活性最大^[69],全过程培养时环境温度都不宜过高,应稳定在 25 ℃ 左右。也有研究认为降低到 20 ℃ 可以大大减少褐化发生^[70];由于 PPO 在 pH 为 5.6 时活性最大^[71],中性、碱性的培养基可以减少褐化^[20]。从此方面考虑,虽然黄酮和内酯产量最大的 pH 可能不同^[15],但在综合考虑下,最佳 pH 仍为 5.8。

此外,在细胞悬浮培养中,用通气较为不良的介质封口,如塑料膜^[15]或玻璃纸^[72],可以提升黄酮和内酯的产量。这或许揭示了不良通气状况可通过缺氧胁迫细胞诱导其产生次生代谢物。但也有研究认为低温预处理和黑暗预处理能够减少褐化^[73]。

5 小结与展望

银杏含有多种药用次生代谢物,对其组织培养技术的探究将有利于更广泛地开发和应用其价值。但该技术面临许多难点,如污染严重、褐化率高、次生代谢物产量低于自然水平等。针对这些问题,国内外学者自上世纪以来不断对方案进行优化改进,总体取得了良好的成效。

据总结优化,可选用带腋芽的茎段或成熟胚作为外植体材料。胚外植体用 4 ℃ 低温保存,茎外植体随采随用。取材后将外植体在洗衣粉溶液中浸泡 20 min,用流水冲洗 40 min,后用蒸馏水漂洗干

净,擦干后进入消毒环节。消毒时注意无菌操作,先用75%乙醇初步消毒45 s,再转用0.1% HgCl₂溶液消毒8 min。消毒后立即接种在培养基上,并注意尽量减少与培养基的接触面积。

在诱导愈伤组织时,应选用NAA与6-BA配合使用,降低蔗糖浓度至20 g/L,适当增加琼脂含量至9 g/L,并适当添加抗褐变试剂(如2 g/L AC)和其他有益化合物。40 d后,若继续培养,则可进一步形成完整植株;若进行扩大培养,则可以在培养基配方中去除琼脂,将愈伤组织剪碎以30 g/L接种到液体培养基中,用透气性较差的介质封口后,在120 r/min的摇床上进行悬浮培养,20 d后收获。在全过程中,应注意控制温度在22℃左右,pH在5.8以上,并给予2 000 lx左右的光照条件。

同时,研究也正在讨论一些新的优化方案,如:在消毒环节中升汞溶液效果较好但毒性较大,是否能够用其他消毒剂的结合使用代替升汞溶液消毒,提高操作安全性;培养基中对糖类物质的应用是否有更优方案等。

综合而言,为解决污染问题,应注意试验过程中全程的无菌操作,同时在消毒环节时特别注意消毒剂的使用。而针对褐化问题,现有讨论的主要焦点在于抗褐变试剂的添加使用。据本文总结,抗褐变试剂的使用或许并不能产生决定性影响,若想真正解决褐化问题,应从培养基本身的营养和激素条件,以及培养的温湿度、光照等外环境条件方面着手,使各方面条件符合愈伤组织要求,以使其代谢趋于正常,有害物质生成减缓。另外,也有学者认为银杏各品种之间的差异,即基因水平上的差异,是褐化率的重要影响因子之一^[21]。是否使用抗褐化剂、使用何种抗褐化剂,是当前研究探讨的重点,对本植物组织培养中褐变原理的进一步更加完善的分子生物学分析是未来有助解决褐化问题的探索方向。如果能寻找并培育出特异性吞噬酚类物质的工程菌,将其接种到培养基中,或许可以同时使褐变与污染问题得到较大改善。

同时,在为提高黄酮和内酯产量的研究中,不丰富的氮源、一定范围内的低温、较高的渗透压、较不充足的氧气等条件都有利于银杏次生代谢物的积累,而这些条件都会对组织细胞生长造成一定的胁迫。这可能是因为细胞中,初生代谢与次生代谢具有一定的冲突。当细胞的正常环境较为不适宜时,细胞会产生更多的次生代谢物。在培养过程

中,探索不同胁迫因子的影响,寻找初生代谢与次生代谢的最佳平衡点,是进一步研究的方向。

无糖条件可以在光照条件辅助下诱导愈伤组织分化出叶绿体,使代谢途径更偏向自然条件下的自养型代谢,其有利于减少有害物质的生成,同时也促进次生代谢物的合成。于此同时,无糖条件也减少了异养微生物的生存可能,故可以同时减少褐化率和污染率。因此,应用近几年来兴起的无糖组织培养技术,将光照和二氧化碳作为碳源,促使愈伤组织进行自养型代谢,也是较好的优化方向。

另外,现有优化大多停留在方案和技术层面上,没有深入探究其机理。故在今后的研究中,对银杏组织培养过程中更多的生物化学分析,甚至分子生物学分析,或许可以更好地改进技术、优化方案,进一步提高银杏组织培养的成功率,为进一步研究在长期继代培养中保持次生代谢物合成,实现工业化生产提供良好基础。

致谢 感谢邓秋萍老师、陈璟老师在课题选题阶段提供的支持;感谢常小光老师在初稿写作过程中给予的建议;感谢刘佳晔同学在论文修改过程中给予的帮助。

参考文献:

- [1] 张铁涵,张浩然,李婉亭,等.银杏黄酮降低口腔溃疡复发率的相关免疫学分析[J].中国医学工程,2021,29(9):14-17.
- [2] 靳彩玲,赵树鹏,姬颖华,等.银杏内酯B通过MMP9/STAT3信号通路对肺癌细胞A549增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响[J].中医药信息,2022,39(1):19-23.
- [3] 高宪新.银杏内酯对血管性痴呆患者认知功能及血脂水平的影响[J].中国现代药物应用,2022,16(3):31-33.
- [4] 李永欣,王义强.植物组织培养的应用研究概述[J].江苏林业科技,2005,32(3):44-46.
- [5] ELATEEQ A, SAAD Z, EISSA M, et al. Effect of chitosan and light conditions on the production of callus biomass, total flavonoids and total phenolics in *Ginkgo biloba* L [J]. Al-Azhar Journal of Agricultural Research, 2021,46(1):28-42.
- [6] 王俊焱,董金金,刘伟,等.银杏愈伤组织生长、褐化与黄酮积累研究[J].生物技术通报,2019,35(2):16-22.
- [7] 任鹏斌,王阿姣,李波,等.银杏叶片愈伤组织诱导的激素组合培养条件分析[J].湖北农业科学,2016,55(1):216-219.
- [8] 秦公伟,曹小勇,张静,等.银杏叶片愈伤组织培养及光暗条件对黄酮含量的影响[J].陕西理工学院学报(自然科学版),2011,27(1):71-76.
- [9] 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.
- [10] 秦小舒,逯岩,郁万文,等.不同发育阶段银杏胚的组织培养研究[J].北方园艺,2014(23):87-90.

- [11] 单超. 不同因素对银杏茎段定芽增殖的影响及增殖过程生理生化分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2019.
- [12] 郝岗平, 杜希华, 史仁玖, 等. 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.
- [13] 赵军. 不同浓度 6-BA 对银杏茎段丛生芽诱导的影响[J]. 种子科技, 2021, 39(20): 13-14.
- [14] 胡蕙露, 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.
- [15] 李春斌. 银杏组织、细胞悬浮培养及银杏黄酮和萜内酯的提取、纯化和检测方法研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2002.
- [16] 秦小舒, 陈颖, 刘新亮, 等. AgNO_3 处理下银杏幼胚愈伤组织的形成和激素变化[J]. 林业科技开发, 2015, 29(1): 35-39.
- [17] 秦小舒, 曹福亮, 逯岩, 等. AgNO_3 对银杏胚愈伤组织诱导及分化的影响[J]. 江西农业大学学报, 2014, 36(5): 958-964.
- [18] EL-BELTAGI H, AHMED O, HEGAZY A. Molecular role of nitric oxide in secondary products production in *Ginkgo biloba* cell suspension culture[J]. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 2015, 43(1): 12-18.
- [19] 梁峙. 银杏外植体组织诱导与培养的研究[D]. 西安: 陕西科技大学食品生物技术, 2002.
- [20] 喻娜. 银杏组织培养中幼茎尖外植体抗褐化培养条件的优化[J]. 分子植物育种, 2020, 18(18): 6135-6142.
- [21] 张明文, 陈力耕. 银杏组织培养中控制褐化的研究[J]. 中国南方果树, 2003(3): 51-52.
- [22] 江静, 尚富德, 李锁平. 银杏愈伤组织的诱导与激素优化组合研究[J]. 河南大学学报(自然科学版), 2000, 30(3): 51-54.
- [23] 李红梅, 王义强. 银杏胚芽组织培养试验初报[J]. 甘肃农业科技, 2008(3): 37-39.
- [24] 喻娜, 罗开秀, 向丹, 等. 银杏茎尖无菌接种条件的优化[J]. 分子植物育种, 2018, 16(11): 3661-3665.
- [25] 张智, 邵菊芳, 滕婷婷, 等. 抗氧化剂对银杏愈伤组织褐变的影响[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(30): 13051-13052.
- [26] 朱红威, 邵菊芳, 李庆, 等. 不同培养条件对银杏愈伤组织生长及黄酮含量的影响[J]. 食品科学, 2007, 28(11): 102-105.
- [27] 朱红威, 邵菊芳, 陶秀祥, 等. 激素对银杏愈伤组织诱导及继代培养的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2008(3): 482-487.
- [28] TOMMASI F, SCARAMUZZI. In vitro propagation of *Ginkgo biloba* by using various bud cultures[J]. Biologia Plantarum, 2004, 48(2): 297-300.
- [29] KANG S, MIN, KIM Y, et al. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of bilobalide and ginkgolides in cell cultures of *Ginkgo biloba*[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 2006, 42(1): 44-49.
- [30] 胡蕙露, 杨景华, 杨荻荣, 等. 银杏茎段试管培养条件筛选研究[J]. 林业科学, 2002, 38(3): 52-56.
- [31] 姜蓓, 贾志超, 徐小勇, 等. 银杏无菌苗培养方法的优化[J]. 种子, 2018, 37(3): 79-82.
- [32] BEKHIT M, GOMAA E, IBRAHIMA I, et al. In vitro studies on *Ginkgo biloba* L. 2-Factors affecting callus production and ginkgolide contents[J]. Journal of Product & Development, 2008, 2(13): 457-474.
- [33] EL-SABER M, DIAB M, HENDAWAY M, et al. Magnetite nanoparticles different sizes effectiveness on growth and secondary metabolites in *Ginkgo biloba* L. callus[J]. Egyptian Journal of Chemistry, 2021(4): 10-15.
- [34] 崔刚, 唐蕾, 王武. 培养基和外源激素对银杏愈伤组织诱导、生长及叶绿素含量的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(2): 117-122.
- [35] 徐利均, 谢永红, 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(4): 368-370.
- [36] 李红梅, 郭红丽, 谢园园, 等. 甘肃徽县银杏茎尖茎段组织培养试验研究[J]. 中国园艺文摘, 2009, 25(5): 18-21.
- [37] 喻娜, 赵有薇, 潘阿旦, 等. 银杏幼茎节无菌接种体系的建立[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(19): 116-119.
- [38] 马云峰. 理化因子对银杏组织培养中黄酮类化合物产生影响的研究[D]. 开封: 河南大学, 2003.
- [39] 秦卫东, 高明侠, 吕兆启. 银杏愈伤组织培养及其黄酮生物合成的初步探讨[J]. 食品科学, 2002(11): 38-41.
- [40] 姜玲, 章文才, 柯云. 几种大量元素对银杏愈伤组织细胞生长及黄酮醇糖苷含量的影响[J]. 园艺学报, 2000, 7(2): 130-132.
- [41] 张威威, 秦公伟, 程水源, 等. 银杏愈伤组织诱导初步研究[J]. 长江大学学报(自然科学版), 2011, 8(1): 237-239.
- [42] 滕毅, 杨海玲, 凌庆枝. 银杏愈伤组织培养及其黄酮的提取与检测[J]. 中国中医药现代远程教育, 2020, 18(11): 106-108.
- [43] 杜希华, 孙秀玲, 郝岗平, 等. 不同外植体和激素对银杏愈伤组织诱导和生长的影响[J]. 山东师范大学学报(自然科学版), 2008, 23(1): 129-133.
- [44] 王义强, 蒋舜村, 石明旺, 等. 不同抗氧化剂对银杏愈伤组织褐变影响的研究[J]. 经济林研究, 2003(4): 21-23.
- [45] 王霞霞, 高平, 李栋, 等. 银杏愈伤组织诱导及其双黄酮含量的测定[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(23): 65-67.
- [46] 温银元, 王玉国, 铁梅. 银杏胚愈伤组织的继代培养及其生理特性研究[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2008, 28(3): 263-266.
- [47] 陈雷, 刘新亮, 王欢利, 等. 微量元素对银杏愈伤组织诱导及生长的影响[J]. 东北林业大学学报, 2013, 41(5): 7-10.
- [48] 沈小钟, 莫小路, 曾庆钱, 等. TDZ 对银杏悬浮细胞生长及次生代谢物的影响[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(11): 48-51.
- [49] 杨林. 银杏愈伤组织的形成及其中黄酮类化合物的产生[J]. 天然产物研究与开发, 2001(3): 48-51.
- [50] 胡燕梅, 张治华, 周骏江, 等. 正交试验优化银杏胚愈伤组织继代培养及黄酮积累[J]. 北方园艺, 2009(12): 34-37.
- [51] BROWN S, WETHERELL D F, DOUGALL D K. The potassium requirement for growth and embryogenesis in a wild carrot suspension culture[J]. Physiologia Plantarum, 1976, 37: 73-79.
- [52] 罗紫娟. 银杏茎段的组织培养[J]. 杭州师范学院学报(自然科学版), 1990(3): 60-65.
- [53] SUKITO A, TACHIBANA S, ITOH K. Callus induction and production of bilobalide and ginkgolides by callus and cell suspension cultures of *Ginkgo biloba* leaves[C]//Forestry & Agriculture sus-

- tainable Conference 2015, Bali, Indonesia;2016.
- [54] 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.
- [55] 陈颖,曹福亮.不同银杏外植体器官的分化[J].东北林业大学学报,2006,34(6):4-6.
- [56] 邵菊芳,朱红威,于文峰,等.抗氧化剂和吸附剂促进银杏愈伤组织生长及防止褐化作用研究[J].福建林业科技,2009,36(3):117-120.
- [57] 杨林,周吉源.银杏细胞悬浮培养及黄酮的产生[J].中央民族大学学报(自然科学版),2002,11(1):55-58.
- [58] 李春斌,王关林,岳玉莲,等.培养条件对银杏悬浮培养细胞黄酮合成影响研究[J].大连理工大学学报,2003,43(3):287-291.
- [59] 王关林,李春斌,方宏筠.提高银杏悬浮培养细胞内酯合成的研究[J].园艺学报,2002,29(4):321-325.
- [60] 莫小路,黄学林.银杏悬浮培养细胞的生长、分化与萜内酯化化合物的积累[J].生物工程学报,2004,20(3):445-449.
- [61] 都兴范,王关林.芦荟汁对银杏悬浮培养细胞的生长及次生代谢产物合成的影响[J].生物技术,2000,10(3):17-19.
- [62] 崔明月,曲亚男,蒋丽娜,等.抑制剂对多酚氧化酶抑制作用[J].食品工业,2019,40(6):225-229.
- [63] 王馨雨,杨绿竹,王婷,等.植物多酚氧化酶的生理功能、分离纯化及酶促褐变控制的研究进展[J].食品科学,2020,41(9):222-237.
- [64] NISSEN S J, SUTTER E G. Stability of IAA and IBA in nutrient medium to several tissue culture procedures [J]. HortScience, 1990, 25(7): 800-802.
- [65] 刘根林,梁珍海,朱军.活性炭在植物组织培养中的作用概述[J].江苏林业科技,2001,28(5):46-48.
- [66] 王港,杨秀平,李周岐.活性炭对组织培养中几种植物激素的吸附作用[J].林业科技开发,2006,20(6):26-27.
- [67] 孙占育,孙志强,曹斌.活性炭在促进组培苗植物生根中的作用[J].湖南农业科学,2010(7):3-5.
- [68] 莫小路,黄学林,孟辰.银杏悬浮细胞叶绿体的分化与黄酮类产物积累[J].中山大学学报(自然科学版),2003,42(6):94-97.
- [69] 林茜,韩晓华,高营营,等.红豆杉组织培养中的褐化现象及防控策略[J].南方园艺,2015,26(2):45-47.
- [70] LIVADARIU O, RAICIU A, BARBU L. Preliminary research on getting callus in *Ginkgo biloba* L.[J]. Romanian Biotechnological Letters, 2019,24(1):20-29.
- [71] 段勇.抑制山药中多酚氧化酶活性的研究[J].食品工程,2018(4):34-36.
- [72] 刘佳佳,郭勇,郑穗平,等.高产黄酮苷银杏悬浮培养细胞系选育和继代培养稳定性研究[J].生物工程学报,2001,17(1):94-97.
- [73] 张梅,杨燕,盛鹏,等.植物组织培养中褐化现象控制方法分析[J].种子科技,2022,40(3):91-93.
- (上接第23页)
- [20] 鲍士旦.土壤农化分析[M].3版.北京:中国农业出版社,2000.
- [21] 杨喜田,宁国华,董慧英,等.太行山区不同植被群落土壤微生物学特征变化[J].应用生态学报,2006,17(9):1761-1764.
- [22] 郑华,欧阳志云,王效科,等.不同森林恢复类型对土壤微生物群落的影响[J].应用生态学报,2004,15(11):2019-2024.
- [23] 张静,李会琳,王岚,等.土地利用方式改变以及长期施肥处理对酸性土壤微生物群落结构的影响[J].四川环境,2017,36(6):36-44.
- [24] 程智超,杨立宾,隋心,等.黑龙江中央站黑嘴松鸡国家级自然保护区不同森林类型土壤微生物功能多样性分析[J].环境科学研究,2021,34(5):177-1186.
- [25] 邓楚璇,周英,李上官,等.基于高通量测序的土壤微生物群落结构对土地利用方式的响应[J].四川林业科技,2021,42(1):16-24.
- [26] 丁新景,黄雅丽,敬如岩,等.基于高通量测序的黄河三角洲4种人工林土壤细菌结构及多样性研究[J].生态学报,2018,38(16):5857-5864.
- [27] 薛晓敏,王来平,韩雪平,等.不同树盘覆盖对矮砧苹果园土壤微生物群落结构和多样性的影响[J].生态学报,2021,41(4):1528-1536.
- [28] 乔沙沙,周永娜,刘晋仙,等.关帝山针叶林土壤细菌群落结构特征[J].林业科学,2017,53(2):89-99.
- [29] 王峰,陈玉真,吴志丹,等.化肥减施对茶园土壤细菌群落结构及多样性的影响[J].茶叶学报,2020,61(4):160-167.
- [30] 刘爽,王雅,刘兵兵,等.晋西北不同土地管理方式对土壤碳氮、酶活性及微生物的影响[J].生态学报,2019,39(12):4376-4389.
- [31] 刘君,王宁,崔岱宗,等.小兴安岭大亮子河国家森林公园不同生境下土壤细菌多样性和群落结构[J].生物多样性,2019,27(8):911-918.
- [32] 范雅倩,安菁,梁晨.北京市松山国家级自然保护区典型植被群落的土壤微生物群落结构特征[J].北方园艺,2021(1):81-86.
- [33] 周佳,周灵芝,劳承英,等.短期不同耕作方式对水稻根际土壤细菌群落结构多样性的影响[J].南方农业学报,2020,51(10):2401-2411.
- [34] 吕江,赵晖,袁宗浩,等.高速公路边坡植被修复对土壤微生物群落的影响[J].福建农林大学学报(自然科学版),2021,50(3):420-426.
- [35] 焦克,张旭博,徐梦,等.藏东南典型暗针叶林不同土壤剖面深度微生物群落特征研究[J].生态学报,2021,41(12):4864-4875.
- [37] 丁建莉,姜昕,关大伟,等.东北黑土微生物群落对长期施肥及作物的响应[J].中国农业科学,2016,49(22):4408-4418.
- [36] 刘成刚,薛建辉.喀斯特石漠化山地不同类型人工林土壤的基本性质和综合评价[J].植物生态学报,2011,35(10):1050-1060.
- [37] 丁建莉,姜昕,关大伟,等.东北黑土微生物群落对长期施肥及作物的响应[J].中国农业科学,2016,49(22):4408-4418.
- [38] 程亮,王信,郭青云.青藏高原不同生境土壤细菌群落结构特征及其与环境的关系[J].干旱地区农业研究,2019,37(1):18-26.