

康乃馨‘白雪公主’叶片培养植株再生

吕世佳^{1,2}, 张虹^{1,2}, 虎娟^{1,2}, 张芮^{1,2}, 王丽娟^{1,2}, 徐宏波³, 陈任^{1,2*}

(1. 宁夏大学 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏大学 生命科学学院, 宁夏 银川 750021;
3. 宁夏易林环境建设有限公司, 宁夏 银川 750004)

摘要:为建立一套快速、有效的康乃馨白色品种的再生体系,以康乃馨‘白雪公主’的幼叶为外植体,对其愈伤组织和不定芽诱导、不定芽伸长和不定根诱导各阶段所需的植物激素、植物材料的影响进行了探讨。结果表明,当叶片外植体的长度为 5 mm 时,在 TDZ 0.5 mg · L⁻¹、NAA 0.5 mg · L⁻¹ 的 MS 培养基上,愈伤组织和不定芽的诱导效果最为理想;从愈伤组织切下不定芽,移植于单独添加 NAA 为 0.5 mg · L⁻¹ 的培养基能有效地促进不定芽的伸长;不定芽伸长至 3~4 cm 后,在添加 NAA 0.1 mg · L⁻¹ 的培养基上,不定根分化的数量最多;再生植株经移栽和炼苗后生长状态良好。

关键词:康乃馨;植物激素;愈伤组织;不定芽;不定根;再生

中图分类号:S722.37 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2014)06-0114-05

Establishment of a Regeneration System for *Dianthus caryophyllus* Cultivar White Diana from Leaf Explant

LYU Shi-jia^{1,2}, ZHANG Hong^{1,2}, HU Juan^{1,2}, ZHANG Rui^{1,2}, WANG Li-juan^{1,2},
XU Hong-bo³, CHEN Ren^{1,2*}

(1. Key Lab of Ministry of Education for Protection and Utilization of Special Biological Resources in Western China, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China; 2. School of Life Science, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China; 3. Ningxia Yilin Enviroment Construction Co. Ltd., Yinchuan, Ningxia 750004, China)

Abstract: In order to develop a rapid and efficient method for the regeneration of white carnation (*Dianthus caryophyllus*) cultivar, the leaf cuts from White Diana were used as explants, and the effects of plant hormones and materials on the stages of callus and adventitious bud inducement, shoot elongation, adventitious root inducement were determined. The results showed that the most calli and adventitious buds were induced from the leaf explants in the length of 5 mm on the MS basal medium supplied with 0.5 mg · L⁻¹ TDZ combined with 0.5 mg · L⁻¹ NAA. The adventitious buds which had been excised from the residual calli could be facilitatively elongated to shoots by transferring them to the medium with 0.5 mg · L⁻¹ NAA alone. Shoots longer than 3~4 cm cultured on the medium supplied with 0.1 mg · L⁻¹ NAA produced a maximum number of roots per shoot. Regenerated plantlets could be successfully acclimatized and transplanted to pods.

Key words: carnation (*Dianthus caryophyllus*); plant hormone; callus inducement; adventitious bud differentiation; shoot elongation; adventitious root differentiation

康乃馨 (*Dianthus caryophyllus*) 又名香石竹, 为石竹科石竹属多年生宿根草本植物^[1-3]。康乃馨

收稿日期:2014-05-01 修回日期:2014-08-19
基金项目:2013 年度宁夏回族自治区科技支撑计划项目(413-0396)。
作者简介:吕世佳,女,在读硕士,研究方向:代谢植物学。E-mail: lv_shijia@163.com
* 通信作者:陈任,男,教授,博士,研究方向:植物分子生物学与基因工程。E-mail: chenren@nxu.edu.cn

原产于南欧、地中海等地,因其花色娇艳华丽,花香清新淡雅,茎叶翠绿如画,给人以安康、温馨、吉祥的感受而风靡全球,被誉为“母亲节之花”^[1]。目前康乃馨在世界各地广泛栽培,市场需求量很大,是世界四大切花之一(约占整个切花生产的 17%左右),意大利、荷兰、波兰和哥伦比亚的产量位居世界之首^[2]。我国栽培康乃馨已有八、九十年的历史,特别是改革开放以来,随着国民经济的发展和人民生活水平的提高,对鲜切花的需求量不断增加,康乃馨作为主要的切花品种迅速发展起来,在上海、昆明地区的栽培面积已约 700 hm²^[2-3]。我国西北地区康乃馨种植的起步较晚,但随着西部大开发伴随而来的经济发展和消费升级,发展异常迅猛。近年来,银川市大力发展以康乃馨为主的花卉种植基地,康乃馨的种植面积、鲜切花产量大幅增加。

为了满足生产上对品种不断更新及品种多样性的要求,以改变花色为主要方向的花卉育种历来受到了人们普遍的重视,特别是近年来利用分子生物学、植物基因工程等分子育种技术,为定向培育具有特殊颜色的花卉新品系开辟了一条有效的途径。目前康乃馨的栽培品种以红色居多,颜色有纯红、桃红、紫红和镶色等,而白色较少^[4-5]。我国生产上栽培的白色品种主要是‘白雪公主’,对该品种的无性繁殖和组织培养技术的研究还鲜有涉及。近年研究表明,康乃馨白色品种和有色品种一样,具有比较完整的花青素生物合成途径,只是由于少数基因的突变、缺失而不能合成部分酶类,如二氢黄酮醇 4-还原酶或花青素合成酶等,致使花青素生物合成途径中断^[6]。从外部导入其他植物的相关基因,可望利用康乃馨白色品种培育新的花色品系^[6-7]。为此,以‘白雪公主’的幼叶为外植体,通过对植物激素的种类和配比、植物材料大小和处理方式等因素在愈伤组织和不定芽诱导、不定芽伸长和不定根诱导的影响进行详细的探讨,以建立一套快速、有效的康乃馨白色品种‘白雪公主’的再生体系,为康乃馨的花色等特殊性状的分子育种奠定必要的技术基础。

1 材料与 方法

1.1 材料

将康乃馨白色品种‘白雪公主’(White Diana)苗木上的侧芽(约 3~4 cm)切下,用 1%次氯酸钠溶液浸泡、消毒 15 min,无菌水 5 次洗净后,直立扦插于添加 3%蔗糖的 MS(Murashige and Skoog)基本培养基上培养。每隔 1 个月以同样的方法继代 1 次。取连续继代 6 个月以上的无菌苗叶片为材料。

1.2 方法

试验分愈伤组织和不定芽诱导、不定芽伸长和不定根诱导三阶段,均以 MS 为基本培养基,添加 3%的蔗糖和不同浓度配比的植物激素(表 1~表 3)。培养基的 pH 值调至 5.8 后,加入 0.6%的琼脂并加热溶解。各种培养基分别分装于 100 mL 的玻璃三角瓶中,每瓶 30 mL 培养基。分装后,三角瓶口用锡箔纸封口,于 121℃条件下高压灭菌 20 min。

1.2.1 愈伤组织和不定芽诱导 愈伤组织和不定芽诱导选用康乃馨无菌苗顶部的前 4 对叶,切取叶基部 5 mm 和 10 mm 长度的叶片作为外植体。叶片正面朝上平放于 9 种不同的培养基上(表 1),每种培养基(每个三角瓶)上接种 7 个叶片材料,3 次重复。在培养箱中培养 30 d 后,观察愈伤组织和不定芽的生长状态、统计计算平均不定芽分化数。

$$\text{不定芽分化数} = \frac{\text{不定芽个数}}{\text{供试外植体叶片总数}} \quad (1)$$

1.2.2 不定芽伸长 将诱导培养 30 d、生长状态良好的不定芽作为不定芽伸长的材料。材料分为带有愈伤组织的不定芽和去除愈伤组织的不定芽 2 种。将材料分别移植于 3 种不同的不定芽伸长培养基(表 2)中,每种培养基(每个三角瓶)上接种 7 个材料,3 次重复。于相同条件下培养 20 d 后,观察和记录不定芽伸长状况。

1.2.3 不定根诱导 切取已伸长至 3~4 cm、生长状态良好的不定芽作为不定根诱导的材料,直立插入 3 种不同的不定根诱导培养基(表 3)中,每种培养基(每个三角瓶)接种 7 株,3 次重复。于相同条件下培养 35 d,观察不定根的分化情况,统计计算生根率。

$$\text{不定根分化率} / \% = \frac{\text{不定根分化的芽条个数} \times 100}{\text{供试芽条总数}} \quad (2)$$

1.2.4 再生植株的移栽和炼苗 将已生根的再生幼苗用镊子从培养基中轻轻拔出,用毛笔在流水下将根部粘附的培养基洗净后,移栽至盛有土壤基质的花盆中,土壤基质的配比为珍珠岩:营养土=1:1。移栽后用透明的塑料杯罩住幼苗以保持水分。在遮阴下培养 7 d 左右,待再生幼苗完全成活后去掉塑料杯,转移至光照条件下培养。

1.3 培养条件

培养条件均为温度 25℃、有效光量子密度 30 μmol·m⁻²·s⁻¹、每天光照时间 16 h。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织和不定芽的诱导

2.1.1 不同植物激素浓度的影响 叶片外植体在

不同的愈伤组织和不定芽诱导培养基上培养后(图 1A),10 d 左右叶片切口部位开始膨胀,随后生成愈伤组织。20 d 后,在愈伤组织表面上陆续形成芽点,这些芽点逐渐发育成为不定芽(图 1B)。TDZ (*N*-phenyl -*N*'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea)与 NAA 组合对康乃馨白色品种‘白雪公主’叶片的愈伤组织生成和不定芽分化有明显促进作用,TDZ 0.5 mg · L⁻¹、NAA 0.5 mg · L⁻¹时,愈伤组织和不定芽的诱导效果较其它培养基理想,其愈伤组织生长致密、呈淡绿色,平均每外植体的不定芽分化数为 4 ± 0.81。

2.1.2 不同外植体大小的影响 外植体的大小对于愈伤组织的生成和不定芽的分化也有着明显的影响(表 1)。叶片外植体的长度为 5 mm 时,在愈伤组织生长方面和不定芽分化的数量上都明显优于 10 mm。在激素条件相同的情况下,前者生成的愈伤组织较为致密,不定芽分化数较多。但前者形成的不定芽的玻璃化程度略高于后者。

表 1 植物激素浓度和叶片外植体长度对愈伤组织生成和不定芽分化的影响

Table 1 Effects of plant hormone concentration and explant length on the callus generation and the adventitious bud differentiation

| TDZ /(mg · L ⁻¹) | NAA /(mg · L ⁻¹) | 外植体 长度/mm | 愈伤组织 生长状态 | 不定芽分化 (<i>x</i> ± <i>SD</i>) |
|---------------------------------|---------------------------------|--------------|--------------|-----------------------------------|
| 0.2 | 0.2 | 5 | 淡绿色、疏松 | 2.3±0.58 |
| | | 10 | 淡绿色、疏松 | 0.3±0.08 |
| 0.5 | 0.2 | 5 | 淡绿色、致密 | 1.8±0.29 |
| | | 10 | 淡绿色、疏松 | 0.8±0.04 |
| 1.0 | 0.2 | 5 | 淡绿色、致密 | 2.3±0.58 |
| | | 10 | 淡绿色、致密 | 1.2±0.15 |
| 0.2 | 0.5 | 5 | 淡绿色、致密 | 3.3±1.50 |
| | | 10 | 淡绿色、疏松 | 1.6±0.15 |
| 0.5 | 0.5 | 5 | 淡绿色、致密 | 4.0±0.81 |
| | | 10 | 淡绿色、致密 | 2.5±0.50 |
| 1.0 | 0.5 | 5 | 淡绿色、致密 | 3.2±1.75 |
| | | 10 | 淡绿色、疏松 | 1.5±0.53 |
| 0.2 | 1.0 | 5 | 淡绿色、疏松 | 2.6±1.08 |
| | | 10 | 淡绿色、致密 | 2.5±0.50 |
| 0.5 | 1.0 | 5 | 淡绿色、致密 | 1.3±0.16 |
| | | 10 | 淡绿色、疏松 | 1.8±0.81 |
| 1.0 | 1.0 | 5 | 淡绿色、致密 | 2.8±0.58 |
| | | 10 | 淡绿色、疏松 | 2.3±0.58 |

2.2 不定芽生长

2.2.1 不同植物激素浓度的影响 不同激素组合对不定芽伸长生长的影响差异较大(表 2)。在愈伤组织和不定芽诱导培养基上分化的不定芽继续继代于相同的培养基(含 TDZ 0.5 mg · L⁻¹,NAA0.5 mg · L⁻¹)时,虽有部分不定芽伸长,但主要表现为愈伤组织明显增大。当不定芽接种于仅含 NAA0.5 mg · L⁻¹的培养基时,不定芽均伸长,且生长状态良

好(图 1C)。在无激素添加的培养基上,不定芽生长缓慢。

2.2.2 不同不定芽材料的影响 去除愈伤组织的不定芽长势优于带有愈伤组织的不定芽,生长过程中不定芽的基部有部分新芽产生;而带有愈伤组织的不定芽材料的继续生长在一定程度上受到了影响。

表 2 植物激素浓度和不定芽材料对芽条伸长的影响

Table 2 Effects of plant hormone concentration and adventitious buds on the shoot elongation

| TDZ /(mg · L ⁻¹) | NAA /(mg · L ⁻¹) | 材料 处理 | 不定芽 生长状态 |
|---------------------------------|---------------------------------|----------|-----------------------|
| 0 | 0 | 带有愈伤组织的芽 | 不定芽伸长、愈伤组织生长旺盛 |
| | | 无愈伤组织的芽 | 不定芽伸长、出现少量新芽 |
| 0 | 0.5 | 带有愈伤组织的芽 | 不定芽伸长、出现部分新芽、愈伤组织生长旺盛 |
| | | 无愈伤组织的芽 | 不定芽伸长、出现大量新芽 |
| 0.5 | 0.5 | 带有愈伤组织的芽 | 不定芽几乎不伸长、愈伤组织生长旺盛 |
| | | 无愈伤组织的芽 | 少量不定芽伸长、愈伤组织生长旺盛 |

2.3 不定根诱导

在添加 0.1 mg · L⁻¹NAA 诱导培养基上,不定根分化的数量最多(图 1D)。在无激素添加的培养基上,不定芽基部仅有部分较细不定根分化,且再生的植株生长缓慢。在 NAA 为 0.5 mg · L⁻¹时,不定芽生长较快,但不定根的分化较少。采用珍珠岩和营养土配合基质,大部分再生幼苗移栽至花盆后,生长状态良好。

表 3 植物激素浓度对不定根分化的影响

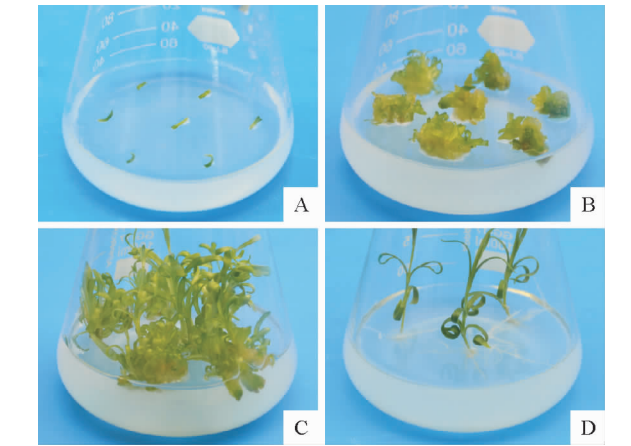
Table 3 Effects of plant hormone concentration on the adventitious root differentiation

| NAA /(mg · L ⁻¹) | 生长状态 | 不定根 分化率/% |
|---------------------------------|------------|--------------|
| 0.0 | 生长慢、根细、数量多 | 45 |
| 0.1 | 生长快、根粗、数量多 | 90 |
| 0.5 | 生长快、根粗、数量少 | 60 |

3 结论与讨论

以康乃馨‘白雪公主’的幼叶为外植体,对植物激素的种类和配比、植物材料大小和处理方式等因素在愈伤组织和不定芽诱导、不定芽伸长和不定根诱导的影响进行了探讨。据前期的预备试验,在愈伤组织和不定芽诱导阶段,叶片外植体在 6-BA 与 2,4-D 或 NAA 组合的培养基中,虽然能够产生愈伤组织,但分化的不定芽数量极少。TDZ 与 NAA

组合对康乃馨白色品种‘白雪公主’叶片的愈伤组织生成和不定芽分化有着明显的促进作用,外植体材料长度为 5 mm 时,愈伤组织和不定芽的生长状态明显优于长度为 10 mm 外植体。TDZ 是一类具有细胞分裂素活性的植物激素^[8-9],其促进愈伤组织生成和不定芽分化的活性比其他细胞分裂素如 6-BA 要高很多^[10]。目前在康乃馨其他品种的顶芽、腋芽、茎节或花瓣的组织培养再生体系中,使用 6-BA 与 NAA 组合较多,说明康乃馨白色品种‘白雪公主’叶片在愈伤组织诱导和不定芽分化具独特性。不定芽分化后,若继续继代于含有 TDZ 的培养基上,反而会影响不定芽的继续生长和伸长。因此,不定芽分化后需要移植于无 TDZ 而 NAA 为 0.5 mg · L⁻¹的培养基上。经伸长后的不定芽在 NAA 0.1 mg · L⁻¹的培养基上,可分化出不定根,形成完整的植株。



注:A:叶片外植体;B:愈伤组织和不定芽诱导;C:不定芽伸长;D:不定根诱导。

图 1 康乃馨‘白雪公主’叶片的再生
Fig. 1 Regeneration process of carnation (*D. caryophyllus*) cultivar White Diana from leaf explant

再生幼苗的移栽和练苗是组织培养育苗的重要环节^[11]。采用珍珠岩和营养土配合,保水性和通气性良好,移栽后用透明塑料杯罩盖幼苗有利于保持水分,减少蒸发,提高了再生幼苗的成活率。

目前康乃馨的组织培养再生体系主要以顶芽、腋芽和茎节为外植体建立起来的^[12-15],这些具有生长点的组织虽然有利于外源基因转化,但因已具有分生组织,部分未经基因转化的分生组织难于在筛选过程中被淘汰,容易继续发育形成假阳性植株^[16-17]。以叶片作为外植体进行基因转化,不仅避免了因含有分生组织而形成假阳性的缺点,其数量上也较顶芽、腋芽和茎节更有优势。在单个植株中,叶片的数量通常是顶芽和侧芽等的几倍甚至十几倍,有利于大量取材。目前,以幼叶作为外植体进行

植物组织培养的相关报道较少,以叶片作为材料进行植物组织培养,可为康乃馨组织培养再生体系的建立提供依据。

康乃馨的栽培品种以红色居多,国内研究多以红色品种‘马斯特’、粉色品种‘粉佳人’和黄色品种‘佳农’等为材料进行组织培养^[4-5]。国外多以 Crowley Sim、Dark Purple、Ember Rose、Orchid Beauty、Red Sim 等为材料^[15,18-20]。以康乃馨白色品种‘白雪公主’的再生体系的建立未见报道。康乃馨白色品种导入外源相关的花青素基因后可望培育出新的花色品系,而且白色品种较其他有色品种所含的色素单纯,改变原有的花色后不易产生颜色混杂,在花色分子育种中适合于作为育种材料而具有特殊的意义^[6-7]。为康乃馨的花色等特殊性状的分子育种奠定必要的技术基础。

参考文献:

[1] 吴中军,夏晶晖,余自力. 观赏园艺学[M]. 成都:电子科技大学出版社, 2004:115-118.

[2] 黄坚,顾其祥,池坚. 香石竹生产技术[M]. 北京:中国农业出版社, 2004:4-5.

[3] 李鹏,朱宏,赵凯,等. 香石竹分子育种研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2008(5):152-154.

LI P, ZHU H, ZHAO K, *et al.* Progress of molecular breeding in carnation [J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2008 (5): 152-154. (in Chinese)

[4] 张黎,齐霞. 不同品种康乃馨引种栽培试验[J]. 农业科学研究, 2007,28(2):43-46.

ZHANG L, QI X. Introduction and cultivation experiment of different varieties of *Dianthus caryophyllus* [J]. Journal of Agricultural Sciences, 2007, 28(2): 43-46. (in Chinese)

[5] 孙骏威,杨长福,李素芳,等. 不同激素组合对康乃馨组织培养的影响[J]. 中国计量学院学报, 2007,18(4):340-342.

SUN J W, YANG C F, LI S F, *et al.* Effect of different hormone combinations on tissue culture in *Dianthus carophyllus* [J]. Journal of China Jiliang University, 2007, 18(4): 340-342. (in Chinese)

[6] TANAKA Y. Flower colour and cytochromes P450[J]. Phytochemistry Reviews, 2006,5(2/3): 283-291.

[7] TANAKA Y, BRUGLIERA F, CHANDLER S. Recent progress of flower colour modification by biotechnology [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2009, 10 (12): 5350-5369.

[8] 谭黎霞,田强强,王敦,等. 海棠花离体繁殖技术研究[J]. 西北林学院学报, 2012,27(2):93-97.

TAN L X, TIAN Q Q, WANG D, *et al.* Micropropagation of *Malus spectabilis* in vitro [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2012, 27(2): 93-97. (in Chinese)

[9] 魏海霞,刘德玺,王霞,等. 2 苹果品种叶片胚状体再生体系的建立[J]. 西北林学院学报, 2014,29(1):84-88.

WEI H X, LIU D X, WANG X, *et al.* Establishment of re-

generation system embryoid from the leaves of two apple varieties [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2014, 29 (1): 84-88. (in Chinese)

[10] 秦静远. TDZ 在植物组织培养中的应用[J]. 杨凌职业技术学院学报, 2005, 4(2): 19-22.

QIN J Y. The use of TDZ in plant tissue culture [J]. Journal of Yangling Vocational & Technical College, 2005, 4(2): 19-22. (in Chinese)

[11] 王岳英. 树莓组织培养生根炼苗技术[J]. 东北林业大学学报, 2010, 38(6): 121-122.

WANG Y Y. Rooting and hardening-seedling techniques for tissue culture of raspberry [J]. Journal of Northeast Forestry University, 2010, 38(6): 121-122. (in Chinese)

[12] 岳玉莲. 康乃馨的组织培养及快速繁殖研究[J]. 大连民族学院学报, 2004, 6(5): 56-65.

YUE Y L. Tissue culture and rapid propagation of *Dianthus caryophyllus* [J]. Journal of Dalian Nationalities University, 2004, 6(5): 56-65. (in Chinese)

[13] 丁小维, 梁雪妮, 桂敏, 等. 不同激素配比对康乃馨芽增殖及玻璃化的影响[J]. 中国农学通报, 2006, 22(4): 269-271.

DING X W, LIANG X N, GUI M, *et al.* Effect of hormones combination on the multiplication and vitrification of shoot culture for Carnation [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2006, 22(4): 269-271. (in Chinese)

[14] MILLER R M, KAUL V, HUTCHINSON J F, *et al.* Adventitious shoot regeneration in carnation (*Dianthus caryo-*

phyllus) from axillary bud explants [J]. Annals of Botany, 1991, 67(1): 35-42.

[15] NUGENT G, WARDLEY-RICHARDSON T, LU C Y. Plant regeneration from stem and petal of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) [J]. Plant Cell Reports, 1991, 10 (9): 477-480.

[16] CURTIS I S, POWER J B, HEDDEN P, *et al.* Transformation and characterization of transgenic plants of *Solanum dulcamara* L.-Incidence of transgene silencing [J]. Annals of Botany, 2000, 86(1): 63-71.

[17] RAHMAN R A, EL-DIN E W H, EL-SAID A G A, *et al.* Agrobacterium-mediated transformation of *Datura metel* (L.) and tropane alkaloids determination [J]. Research Journal of Cell and Molecular Biology, 2008, 2(2): 62-66.

[18] KAKEHI M. Studies on the tissue culture of carnation. V. induction of redifferentiated plants from petal tissue [J]. Bulletin of the Hiroshima Agricultural College, 1979(6): 159-166.

[19] KHARRAZI M, NEMATI H, TEHRANIFAR A, *et al.* In vitro culture of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) focusing on the problem of vitrification [J]. Journal of Biological and Environmental Sciences, 2011, 5(13): 1-6.

[20] NAKANO M, HOSHINO Y, MII M. Adventitious shoot regeneration from cultured petal explant of carnation [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1994, 36(1): 15-19.

(上接第 109 页)

[4] 陈小燕, 吕家珑, 张红, 等. 不同植被覆盖下植物残体分解特性[J]. 干旱地区农业研究, 2008, 26(4): 83-87.

CHEN X Y, LU J L, ZHANG H, *et al.* Residue decomposition in soils under different vegetation types [J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2008, 26(4): 83-87. (in Chinese)

[5] 赵娜, 赵护兵, 鱼昌为, 等. 旱地豆科绿肥腐解及养分释放动态研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2011, 17(5): 1179-1187.

ZHAO N, ZHAO H, YU C W, *et al.* Nutrient releases of leguminous green manures in rainfed lands [J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2011, 17(5): 1179-1187. (in Chinese)

[6] 张夫道, FOKIN A D. 作物秸秆碳在土壤中分解和转化规律的研究[J]. 植物营养与肥料学报, 1994, 1(1): 27-38.

ZHANG F D, FOKIN A D. Decomposition and transformation of ¹⁴C-traced straw in soils [J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 1994, 1(1): 27-38. (in Chinese)

[7] 黄昌勇. 土壤学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.

[8] 陈江华, 刘建利, 李志宏. 中国植烟土壤及烟草养分综合管理[M]. 北京: 科学出版社, 2008.

[9] 李春泉, 巩蕾. 复种箭舌豌豆与玉米秸秆复合青贮育肥肉牛试验[J]. 甘肃畜牧兽医, 2011, 41(4): 19-20.

[10] 姜培坤, 徐秋芳, 周国模, 等. 种植绿肥对板栗林土壤养分和生物学性质的影响[J]. 北京林业大学学报, 2007, 29(3): 120-121.

JIANG P K, XU Q F, ZHOU G M, *et al.* Effects of green manure on soil nutrients and bio-properties of *Castanea mollissima* Blume plantations [J]. Journal of Beijing Forestry U-

niversity, 2007, 29(3): 120-121. (in Chinese)

[11] 张立新, 耿增超, 张朝阳, 等. 渭北旱原红富士苹果园不同水分条件有机肥施用模式研究[J]. 西北林学院学报, 2004, 19 (4): 68-71.

ZHANG L X, GENG Z C, ZHANG C Y, *et al.* On organic fertilizer application pattern in Fuji apple orchard under different water supplies on Weibei Plateau [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2004, 19(4): 68-71. (in Chinese)

[12] 张霞, 丁学利, 周涛. 沙地果园苹果黄叶病防治试验[J]. 西北林学院学报, 2001, 16(2): 40-42.

ZHANG X, DING X L, ZHOU T, *et al.* An experiment on the control of apple chlorosis in the orchard on the sandlot [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2001, 16(2): 40-42. (in Chinese)

[13] 林心雄, 吴顺龄, 车玉琴. 干旱和半湿润地区测定有机物分解速率的尼龙网袋法[J]. 土壤, 1992, 24(6): 315-318.

[14] 宋学贵, 胡庭兴, 鲜骏仁, 等. 川西南常绿阔叶林凋落物分解及养分释放对模拟氮沉降的响应[J]. 应用生态学报, 2007, 18 (10): 2176-2172.

SONG X G, HU T X, XIAN J R, *et al.* Responses of litter decomposition and nutrient release to simulated nitrogen deposition in an evergreen broad-leaved forest in southwestern Sichuan [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2007, 18 (10): 2176-2172. (in Chinese)

[15] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.