

doi:10.13428/j.cnki.fjlk.2023.01.025

铁线莲组织培养研究综述

王超,丁世民,窦京海,李常英,张二海
(潍坊职业学院,山东潍坊262737)

摘要:从外植体选择、外植体表面灭菌、组培途径、生根移栽等4个环节综述铁线莲组织培养研究结果,归纳了外植体类型、基因型、植物生长调节剂种类和配比、培养条件等因素对铁线莲再生的影响。结果表明,基因差异和生长调节剂调控对铁线莲组织培养的影响最为显著;并针对铁线莲组织培养研究中存在的问题提出展望。研究结果可为铁线莲再生体系构建和工厂化育苗提供参考。

关键词:铁线莲;组织培养;研究进展

中图分类号:S339.4⁺1 文献标识码:A 文章编号:1002-7351(2023)01-0142-07

The Research Progress of *Clematis* L. Tissue Culture

WANG Chao, DING Shimin, DOU Jinghai, LI Changying, ZHANG Erhai
(Weifang Vocational Academy, WeiFang 262737, Shandong, China)

Abstract: The article reviews the results of tissue culture research on *Clematis* from four aspects, including explant selection, surface sterilization of explants, culturing route and rooting. And the effects of explant type, genotype, plant growth regulators' type and ratios and culture conditions were summarized. The results show that genetic differences and growth regulator had the most significant effects on *Clematis* tissue culture. Finally, the article presented perspectives on the problems in *Clematis*' tissue culture. The results can be used as a reference for the construction of *Clematis*' regeneration system and industrial seedling culture.

Keywords: *Clematis*; tissue culture; research progress

铁线莲(*Clematis* L.)为毛茛科(Ranunculaceae)植物,据统计约有355种,我国有140余种^[1]。铁线莲具有较高的观赏价值和药用价值^[2],但铁线莲的种子休眠期较长、自然繁殖效率较低^[3],扦插繁殖成活率差异较大^[4],加之国内的铁线莲育种研究相对滞后^[5],极大限制了铁线莲的推广与应用。植物组织培养技术是快速繁殖的有效手段,建立高效的再生体系,对于铁线莲的工厂化育苗和应用推广至关重要。

目前国内外学者已对超过60余种铁线莲进行了组培快繁研究,从初代诱导、继代增殖、生根移栽等多个方面探讨了构建铁线莲再生体系的关键因子。但不同铁线莲种间参数差异较大,且未见有进行数据梳理的综述,因此现有数据相对零散,不便于参考。本研究结合国内外研究进展,对铁线莲组织培养关键环节的影响因素进行综述,以期为铁线莲的再生体系构建提供参考。

1 外植体的选择

外植体是开启组培进程的原材料,理论上植物体的任何部位都能做外植体,但细胞全能性的实现受到遗传信息、生理状态及环境的影响,因此外植体的选择尤为重要。目前多种铁线莲已采用不同类型的外植体进行组织培养研究,如多蓝的茎尖^[6];灵感的腋芽^[7];绿花重瓣铁线莲的不带芽茎段^[8];茱莉亚的茎节^[9];粉香槟的叶片^[10];扬子的叶柄^[11];红花铁线莲的花梗^[12];钝齿铁线莲的胚根根尖^[13]、天台铁线莲的根^[14];辣蓼铁线莲的根芽^[15];西藏甘青铁线莲的种子^[16]等。一般而言,外植体类型会影响组培的效果,像叶片、叶柄等部位进行组培通常需经过愈伤组织阶段,但带芽茎段、顶芽等部位则能通过诱导芽萌发实现完整个体的培育,且该过程不涉及脱分化、再分化,变异率低,繁殖速度快,因此对铁线莲进行组培时外植体的选择多以带芽的茎段、顶芽为主,培养效果较好。

收稿日期:2021-12-10;修回日期:2022-08-10

第一作者:王超(1991—),女,潍坊职业学院助教,从事优良植物品种组培快繁技术研究。E-mail:vera1759630756@163.com。

另外,取材时间对外植体的萌发率和污染率有较明显的影响(表1)。一方面,外植体表面灭菌时间相同,春季取材的外植体污染率低,萌发率高。如,褐毛铁线莲,同样用0.1% HgCl₂对外植体表面灭菌5 min,4月的带芽茎段污染率仅为8%,芽萌发率高于50%;而9月的外植体污染率高达26%,芽体几乎未萌发^[17]。毛蕊铁线莲的节间和叶片随季节延后污染率增加,萌发率降低^[18],与带芽茎段的表现一致。此外,吴荣^[19]认为取材季节直接影响外植体的诱导效果,在一定程度上是能否诱导成功的关键。另一方面,春季不同时间的外植体最适灭菌时间不同。如卡西斯铁线莲4月茎段的最适灭菌时间为4 min、污染率为15%、萌发率为74%,与3月相比,灭菌时间长1 min、污染率高2%、萌发率低3%^[20]。因此在同季节取材也需要注意取材时间的影响。综合来看,外植体采集的最适时间为春季的3—4月,这可能因为铁线莲经过休眠储存了大量的营养物质,春季新生外植体内源激素丰富、活性物质多,整体生理状态较好,且受环境污染较少,容易经表面灭菌处理。但要注意的是不同品种的铁线莲生长习性不同,因此在春季的取材时间略有差异。

表1 外植体取材时间

品种	取材部位	取材月份	灭菌时间/min	污染率/%	萌发率/%
褐毛 ^[17]	带芽茎段	4	5	8.00	56.00
		9	5	26.00	6.00
毛蕊 ^[18]	带芽茎段	3	5	15.00	81.67
		6	5	53.52	41.11
		9	5	82.39	12.67
	节间	3	5	22.03	66.67
		6	5	53.33	35.00
		9	5	62.22	24.23
	叶片	3	5	13.33	75.00
		6	5	52.73	32.58
		9	5	60.87	28.20
卡西斯 ^[20]	带芽茎段	3	3	13.00	77.00
		4	4	15.00	74.00

2 外植体表面灭菌

无菌体系是组培的开端,外植体表面灭菌能有效降低污染率。灭菌的原则是在外植体受损害最少的基础上杀死全部杂菌,因此灭菌剂和灭菌时间的选择至关重要。

常用的灭菌剂有70%酒精、NaClO、HgCl₂等,灭菌剂组合使用效果更佳。70%酒精浸润性好可促进其它试剂的渗透,在表面灭菌时多用其预处理10~30 s,再结合其它灭菌剂。其它灭菌剂为表面灭菌的关键。铁线莲表面灭菌多采用HgCl₂,其杀菌效果最佳但毒性大难清除,不仅会对植物造成二次损伤还会污染环境。

外植体表面灭菌时间越长灭菌效果越好,但存活率降低,不同外植体的最适灭菌时间存在差异(表2)。同种铁线莲不同类型外植体间有差异,如扬子铁线莲茎段及叶柄以0.1% HgCl₂灭菌5 min效果最好,叶片灭菌3 min效果最佳^[11];同类型外植体不同品种间有差异,以茎段为外植体,0.1% HgCl₂为灭菌剂,相对比尔麦肯齐,短柱铁线莲的灭菌时间短且灭菌效果好,

表2 铁线莲外植体灭菌

名称	外植体	灭菌剂	最适时间/min	污染率/%
短柱铁线莲 ^[21]	茎段	0.1% HgCl ₂	5	4.5
比尔麦肯齐 ^[22]	茎段	0.1% HgCl ₂	12	21.2
波兰精神 ^[3]	茎段	0.1% HgCl ₂	6	15.0
蓝天使 ^[23]	茎段	1% NaClO	7	14.44
朱卡 ^[24]	茎段	10% NaClO	12	14.6
里昂城 ^[25]	茎段	0.1% HgCl ₂	6+5	5.56

除品种间差异外可能因为后者取自温室中,取材环境相对干净^[21-22]。因此取材之前可进行植株预培养降低污染率。此外,对于较难灭菌的材料可借鉴魏淑云的二次灭菌法,将里昂城的茎段用 0.1% HgCl₂ 先进行 6 min 灭菌,再进行 5 min 灭菌,与一次灭菌相比,污染率降至 5.56%,褐化率也相对稳定,出芽率也提高了约 6%。二次灭菌法一定程度上可以避免长时间灭菌导致外植体死亡,也有效降低了污染率,但 Hg²⁺ 积累会对外植体造成毒害,用 NaClO 二次灭菌法或可有效避免该问题。

3 铁线莲组织培养途径

铁线莲再生体系构建途径有器官发生和体细胞胚发生 2 种,器官发生途径又分为直接器官发生途径和间接器官发生途径。

3.1 直接器官发生途径

直接器官发生途径通过诱导顶芽、腋芽萌发进而发育成完整个体,该途径变异率低,性状保持较好,是应用较成熟的组培方式。虽然外植体的品种特性、分化状态等因素会影响芽萌发,但外源植物生长调节剂起主导作用,常在培养基中添加 NAA、6-BA 等以打破限制促进芽体萌发。由表 3 可知,不同品种铁线莲对植物生长调节剂诱导的反应不同。诱导培养时褐毛和里昂城最高出芽率均达 93.33%,但诱导培养基中植物生长调节剂配比(6-BA:NAA)相差较大,分别为 20:1 和 10:1;而相同植物生长调节剂配比下里昂城的出芽率比朱卡高出约 21%。而增殖培养效果较差时,也可尝试 3 种植物生长调节剂组合以突破限制,提高增值率。在 NAA、6-BA 的基础上加入 GA₃,朱卡的增殖系数可达 5.52^[24],加入 KT 后褐毛、里昂城其增殖系数可达 2.63、4.07^[17,25]。但第 3 种植物生长调节剂的作用差异较大,成璐^[17]研究表明加入 KT 对东北铁线莲的增殖没有显著提升,所以 3 种植物生长调节剂的配比需要试验确定。此外,植物生长调节剂虽可提升组培效果,但植物生长调节剂浓度过高则会呈现抑制效应,李丽容^[26]指出 6-BA 超过 2.0 mg·L⁻¹ 即抑制芽的分化,同样随 NAA 浓度升高里昂城的出芽率降低^[25],因此植物生长调节剂的使用浓度不能过高。

表 3 铁线莲丛生芽培养

品种	外植体	诱导/增殖培养基	出芽率/%	增殖系数
褐毛铁线莲 ^[17]	带芽茎段	MS + 6-BA 1.0 mg·L ⁻¹ + NAA 0.05 mg·L ⁻¹	93.33	
		MS + 6-BA 2.0 mg·L ⁻¹ + NAA 0.05 mg·L ⁻¹ + KT 1.0 mg·L ⁻¹		2.63
朱卡 ^[24]	带芽茎段	MS + 6-BA 1.0 mg·L ⁻¹ + NAA 0.1 mg·L ⁻¹	72.40	
		MS + 6-BA 1.0 mg·L ⁻¹ + IBA 0.2 mg·L ⁻¹ + GA ₃ 0.2 mg·L ⁻¹		5.52
里昂城 ^[25]	带芽茎段	MS + 6-BA 1.0 mg·L ⁻¹ + NAA 0.1 mg·L ⁻¹	93.33	
		MS + 6-BA 1.0 mg·L ⁻¹ + NAA 0.1 mg·L ⁻¹ + KT 1.0 mg·L ⁻¹		4.07

3.2 间接器官发生途径

间接器官发生途径的关键是形成愈伤组织,愈伤组织的诱导受外植体、植物生长调节剂、培养条件等多种因素的影响。

铁线莲的茎段、叶片、根等均已成功诱导出愈伤组织,但不同类型外植体的出愈率及愈伤组织状态均差异明显(表 4)。茎段的出愈率最高,愈伤组织质量较好;叶片、叶柄等部位出愈率较低,愈伤组织质量差且后续培养易出现褐变等现象。茎段最适合诱导愈伤组织,但其生理状态对

表 4 外植体类型对愈伤组织诱导的影响

品种	外植体类型	出愈率/%	愈伤组织质量
短柱铁线莲 ^[21]	茎段	89.8	乳白色颗粒状
	叶柄	66.2	表面质地坚硬、淡黄色
	叶片	56.3	表面质地坚硬、淡黄色
单叶铁线莲 ^[27]	嫩茎段	76.7	量大
	叶柄	74.0	量少且细胞团小
	叶片	60.0	量小
	老茎段	16.7	细胞团小
天台铁线莲 ^[14]	嫩茎段	90.0	愈伤组织体积最大
	叶柄	66.0	愈伤组织块大
	叶片	46.0	愈伤组织体积小
	老茎段	13.3	愈伤组织体积小
	根	5.6	愈伤组织体积最小

愈伤组织诱导影响较大,单叶铁线莲老茎段出愈率为16.7%^[27],天台铁线莲老茎段出愈率为13.3%^[14],均远低于幼嫩茎段的出愈率。另外茎段的粗细会间接影响愈伤组织的诱导,吴荣^[9]研究表明,茉莉亚的较细嫩茎全部死亡无法诱导愈伤组织,而较粗嫩茎的成活率高达96.3%并且出愈率达64.4%,认为粗嫩茎内营养物质丰富,薄壁细胞多易吸收营养,存活力强。因此,幼嫩粗茎段是诱导铁线莲愈伤组织的最适选择。

铁线莲愈伤组织诱导多以成分丰富且均衡的MS培养基为基础,在基础培养基中添加最适配比的植物生长调节剂是成功诱导愈伤组织的关键,不同品种之间差异明显(表5)。吴荣^[19]研究表明,相同培养基诱导培养7种铁线莲,其中Marie Boisselot出愈率为112.8%,而里昂城仅为26.1%;倪欧碧在第6天时即形成愈伤组织,而其它品种在第10天才逐渐形成。由表5可知,诱导愈伤组织时生长素比例较低且浓度多在0.5 mg·L⁻¹以内,但辣蓼铁线莲根芽诱导愈伤组织却需较高浓度的生长素且占比(生长素/细胞分裂素)提高,一方面这可能是品种间基因型差异的影响,另一方面是培养材料的影响,根芽按生长习性更容易形成芽,因此需要较强的生长素打破成芽趋势诱导出愈伤组织。

此外,研究发现花苞纵切面向下比向上放置诱导愈伤组织效果好^[20],茎段平放优于直立放置^[9];而光照影响愈伤组织的形态,光照较好愈伤组织为绿色致密型,而黑暗条件下为白色疏松型^[25],后者更容易分化出芽。因此诱导培养时可通过调整接种方式和光照条件提高出愈率、提升愈伤组织质量。

表5 铁线莲愈伤组织培养

品种	外植体	最适培养基	出愈率/%
单叶铁线莲 ^[27]	茎段	MS + 6-BA 1.2 mg·L ⁻¹ + NAA 0.35 mg·L ⁻¹	88.6
蓝天使 ^[23]	茎段	MS + 6-BA 2 mg·L ⁻¹ + NAA 0.01 mg·L ⁻¹	78.3
重瓣铁线莲 ^[28]	茎段	MS + 6-BA 1.0 mg·L ⁻¹ + IAA 0.2 mg·L ⁻¹ + 2,4-D 0.8 mg·L ⁻¹	90.0
天台铁线莲 ^[14]	茎段	MS + 6-BA 1.0 mg·L ⁻¹ + NAA 0.3 mg·L ⁻¹	96.7
辣蓼铁线莲 ^[15]	根芽	1/2 MS + ZT 0.3 mg·L ⁻¹ + 2,4-D 2.5 mg·L ⁻¹	95.3
钝齿铁线莲 ^[13]	胚根	MS + 6-BA 2.0 mg·L ⁻¹ + NAA 0.5 mg·L ⁻¹	78.5

3.3 体细胞胚发生途径

体细胞胚发生途径指植物细胞或组织在特定条件下发育成的胚进而发育成植株个体的过程,该途径更为高效且性状稳定、整齐性好^[29]。体细胞胚发生途径分为直接发生型和间接发生型,前者不经过愈伤组织阶段,而后者需由胚性愈伤组织分化出体细胞胚。目前体细胞胚发生的研究较少,已报道的铁线莲品种不足20个,国内仅见湖州和多蓝体细胞胚发生途径研究的相关报道。由表6可知,不同铁线莲品种的体细胞胚诱导能力不同,湖州铁线莲的体细胞胚诱导率仅为10.526%,且未成功发育成完整植株^[30],而多蓝体细胞胚诱导率高达96%,并成功获得再生植株^[31],这可能是基因表达的差异导致。Mitrofanova I. 等^[32]诱导13个铁线莲品种直接体细胞胚胎发生,其中以佛罗里达系和毛叶系的8个品种表现出较好的形态发生能力,其中Nevesta单个外植体可诱导体细胞胚40个;Alpinist等5个品种体细胞胚发生能力差,每个外植体仅能生成1个体细胞胚,这同样验证了基因型的影响显著。因此,建立铁线莲体细胞胚发生体系时需要考虑种间差异。

表6 铁线莲体细胞胚培养

品种	途径	体胚诱导培养基	诱导率/%
湖州 ^[30]	间接	1/2 MS + NAA 0.05 mg·L ⁻¹ + ABA 0.03 mg·L ⁻¹	10.53
多蓝 ^[31]	间接	1/2 MS + TDZ 0.2 mg·L ⁻¹ + IBA 0.1 mg·L ⁻¹ + ABA 0.3 mg·L ⁻¹	96.00
Nevesta ^[32]	间接	MS + ZT 1.8 μmol·L ⁻¹	92.00

体细胞胚发生是依赖于植物生长调节剂代谢和信号转导的复杂过程,特别受到生长素、细胞分裂素和脱落酸的影响^[29]。在湖州铁线莲和多蓝铁线莲胚性愈伤组

表7 铁线莲胚性愈伤组织培养

品种	胚性愈伤诱导培养基	胚性愈伤诱导率/%
湖州 ^[30]	1/2 MS + TDZ 0.2 mg·L ⁻¹ + NAA 0.2 mg·L ⁻¹	60
多蓝 ^[31]	1/2 MS + TDZ 1.0 mg·L ⁻¹ + NAA 0.5 mg·L ⁻¹	90

组织诱导中均采用了 TDZ 和 NAA(表 7),诱导率分别为 60% 和 90%,效果均优于 2,4-D 与 6-BA 的组合,因此铁线莲胚性愈伤组织的诱导及继代增殖可选用低浓度 TDZ 和 NAA 作为诱导激素。此外,在体细胞胚诱导培养中脱落酸(ABA)可显著促进体胚的分化与增殖。张启香等^[31]指出 ABA 的浓度对体胚诱导效果影响较大,ABA 0.3 mg·L⁻¹时体胚增殖效果最佳。低浓度 ABA 同样促进湖州铁线莲分化出体细胞胚,但未能促进体细胞胚胎发育^[30]。体细胞胚的发育启动同样受到植物生长调节剂的直接影响,或许取决于细胞分裂素的作用。Mitrofanova I. 等^[32]将球型、心型和鱼雷阶段选择的体细胞胚放置在 6-BA 含量低或不含细胞分裂素的培养基上时,胚状体的发育停止,可以持续 17~21 d 而没有任何生长迹象,而直接体细胞胚诱导时外植体形成胚状体的能力直接取决于 6-BA 浓度。综合来看,体胚诱导培养时可以 TDZ 诱导胚性愈伤组织,以 ABA 促进体胚的分化和增殖,以细胞分裂素的浓度调节体胚发育进程。

此外,植物体细胞胚发生受光照和温度因素的影响。虽植物胚性愈伤组织的形成大多需要黑暗条件,但以光照、黑暗、暗—光 3 种条件培养铁线莲均可诱导体细胞胚,但存在品种间差异。湖州铁线莲在暗培养时胚性愈伤组织诱导率最高,质量较好^[30];而多蓝铁线莲在暗—光条件下胚性愈伤组织诱导率最高。另实验证明光照强度显著影响体细胞胚的形成数量,光强为 3000 lx 时 80% 的外植体能形成体胚,每个外植体能形成 25~30 个体胚,而温度也直接影响体细胞胚的发育,最适温度为 26 ℃^[32]。因此,可通过光周期、光照强度、温度促进铁线莲体细胞胚的诱导。

4 生根移栽

组培苗适应自然环境的关键是生根,生根与培养条件相关,但更受基因的调控,可用生长素诱导生根(表 8)。一般认为矿物质浓度高利于茎叶生长,浓度低利于生根,因此多采用 1/2 MS 等低盐分培养基为基本培养基,但个别品种选用 MS 效果更好,这与品种的个体能力有关。像卡西斯、大河等品种无需植物生长调节剂诱导,通过多次继代培养即可生根^[19];水晶喷泉、朱卡等单一植物生长调节剂就能有效地诱导生根^[24,33];粉红欢喜、Vyvyan Pennell 等相对难生根,需用 2 种生长素诱导生根^[34~35]。个别品种无法实现生根,成璐^[17]采用活性炭和光强等因素诱导褐毛铁线莲和东北铁线莲 2 个野生种生根均未成功。此外生根受季节影响明显,需用低浓度的细胞分裂素与生长素配合使用打破季节的限制^[20]。

组培苗移栽成活率差异较大,基因表达差异影响明显,Polish Spiri 组培苗即使没有生根移栽后也易存活^[3];钝齿铁线莲、辣蓼铁线莲、单叶铁线莲移栽的成活率均高达 90% 以上^[13,15,27];里昂城和狂想曲移栽存活率在 70% 以上^[25],而 Gipsy Queen 移栽成活率低且易出现突然枯死现象^[20]。此外基质组分也影响移栽成活率,透气性好、保水保肥的基质能促进根系的生长、提高成活率。现有研究表明,珍珠岩、蛭石和腐殖土(4:1:1)培养钝齿铁线莲成活率最高^[13];珍珠岩和蛭石(1:2)培养短柱铁线莲成活率最高^[30];而魏淑云^[25]认为蛭石的保水性不利于铁线莲根系生长,宜采用珍珠岩和草炭土(1:1)。结合各种铁线莲特性,科学配比基质是提高移栽成活率的保障。

5 展望

总而言之,铁线莲组织培养受多方面的影响,其中基因型影响较显著,而植物生长调节剂调控在组织培养的各个环节较为关键,有效的植物生长调节剂配比可突破铁线莲自身局限并提高组培效率,此外外植体类型、采样时间、培养条件等也是保障组培顺利进行的因素。

虽然已探究并建立了多个品种铁线莲再生体系,但依然存在 2 个需解决的问题。一是研究规模较小。

表 8 铁线莲生根培养

品种	生根培养基	生根率/%
朱卡 ^[24]	1/2 MS + IBA 0.3 mg·L ⁻¹	91.70
水晶喷泉 ^[33]	1/2 MS + IBA 0.5 mg·L ⁻¹	82.00
粉红欢喜 ^[34]	1/2 MS + IBA 1.5 mg·L ⁻¹ + IAA 1 mg·L ⁻¹	76.92
Vyvyan Pennell ^[35]	1/2 MS + NAA 1 mg·L ⁻¹ + IBA 0.5 mg·L ⁻¹	50.00
短柱铁线莲 ^[30]	MS + NAA 0.1 mg·L ⁻¹ + IBA 0.5 mg·L ⁻¹	43.30

铁线莲种间差异较大,但受试种多为早花大花系、佛罗里达系的品种,存在数据差异大、参考性低等问题,因此不能广泛的适用于铁线莲品种。二是铁线莲体细胞胚再生途径研究滞后。目前的研究多集中于器官发生途径,仅极个别的铁线莲品种进行了体细胞胚相关研究,但仍存在体胚诱导率低、体胚败育等问题。因此,后续工作应扩大受试品种范围,使各组别的铁线莲均建立可靠、高效的再生体系,为铁线莲工厂化育苗提供保障。同时需深入体细胞胚发生途径的研究,建立成熟的体细胞胚再生体系,为开展遗传转化育种奠定基础,加快我国铁线莲种质资源创新进程。

参考文献:

- [1] 张燕,黎斌,李思锋. 铁线莲属植物分类学及园艺学研究进展[J]. 中国野生植物资源,2010,29(5):6-10.
- [2] 刘庆超,王奎玲,卢婉佩,等. 我国铁线莲属植物资源研究进展[J]. 植物遗传资源报,2014,15(3):483-490,497.
- [3] 宋微,张虎,王磊,等. 铁线莲‘Polish Spirit’组培快繁体系的建立[J]. 分子植物育种,2020,18(1):261-267.
- [4] 杨维雄,常晓勇,尹建华. 我国铁线莲属植物研究进展[J]. 现代农业科技,2020(9):135-137.
- [5] 裴林英,李升科,周杰,等. 中国铁线莲属野生植物资源的园艺价值与应用[J]. 北方园艺,2022(2):120-127.
- [6] 袁佳,胡恒康,方炎明,等. 不同培养条件对铁线莲不定芽增殖及玻璃化的影响[J]. 西北植物学报,2011,31(2):401-406.
- [7] 杨利平,陈乃明,王鹏良,等. 铁线莲‘Inspiration’组培继代培养基的筛选与优化[J]. 江苏农业科学,2020,48(14):83-86.
- [8] 张丽琼,常权记,廖咸康,等. 绿花重瓣铁线莲愈伤组织诱导研究[J]. 北方园艺,2010(20):152-154.
- [9] 吴荣. 铁线莲“茉莉亚”的组织培养研究[J]. 绿色科技,2013(8):139-140.
- [10] 刘洪见,杨艳萍,钱仁卷,等. 铁线莲粉香槟的组培快繁研究初报[J]. 浙江农业科学,2013(5):557-558.
- [11] 赵爽. 两种铁线莲属植物的光合适应性与繁殖技术研究[D]. 杭州:浙江农林大学,2017.
- [12] 倪新,马毓. 红花铁线莲(*Clematis coccinea*)组织培养[J]. 植物学通报,1984(Z1):71-73.
- [13] 吴红,李成忠,张成霞. 钝齿铁线莲根尖组培再生体系的研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学),2017,32(1):120-124.
- [14] 张徐俞,蒋明,陈彤,等. 天台铁线莲愈伤组织诱导研究[J]. 江苏农业科学,2011,39(3):65-66.
- [15] 王玉敏. 辣蓼铁线莲根芽愈伤组织试管苗培养研究[J]. 河南科学,2014,32(3):372-375.
- [16] 泽仁旺姆,尼珍,潘多. 西藏甘青铁线莲的再生植株[J]. 西藏科技,2002(9):61.
- [17] 成璐. 两种铁线莲植物组织培养的初步研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2014.
- [18] 袁迎燕. 毛蕊铁线莲组织培养与植株再生研究[D]. 雅安:四川农业大学,2010.
- [19] 吴荣. 观赏铁线莲离体培养研究[D]. 昆明:西南林业大学,2011.
- [20] 宋微,张虎,王磊,等. 3个铁线莲品种组培快繁体系的建立[J]. 分子植物育种,2021,19(4):1277-1283.
- [21] 盛璐,杨迎杰,季孔庶. 短柱铁线莲愈伤组织培养及褐化抑制[J]. 分子植物育种,2015,13(10):2380-2387.
- [22] 马育珠,李林芳,马玲玲,等. 铁线莲品种*Clematis 'Bill MacKenzie'*愈伤组织的诱导[J]. 北方园艺,2015(24):94-97.
- [23] 黄鑫. 两个品种铁线莲的组织培养及工厂化生产成本控制研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2018.
- [24] 高燕,莫建彬,付艳茹,等. 铁线莲‘朱卡’组织培养技术及再生体系的建立[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2021,45(3):109-116.
- [25] 魏淑云. 两种大花组铁线莲组织培养体系的建立[D]. 上海:上海交通大学,2016.
- [26] 李丽容,金开正. 铁线莲组培快繁技术研究[J]. 安徽农业科学,2016,44(15):138-139.
- [27] 黄余磊,吕枷薪,蒋明,等. 单叶铁线莲(*Clematis henryi*)愈伤组织诱导与植株再生[J]. 浙江农业学报,2011,23(4):731-735.
- [28] 张涛,周琼,张丽琼,等. 重瓣铁线莲愈伤组织诱导研究[J]. 安徽农业科学,2008(22):9402,9542.
- [29] 张蒙,刘敏,李梦倩,等. 大蒜体细胞胚发生过程中内源激素含量及相关基因表达的变化特征[J]. 西北植物学报,2021,41(7):1175-1187.
- [30] 王辉. 三种中国野生铁线莲组织培养研究[D]. 南京:南京林业大学,2012.
- [31] 张启香,胡恒康,方炎明. 铁线莲‘Multi-Blue’体细胞胚诱导和植株再生[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2010,34(6):18-22.

- [32] Mitrofanova I, Ivanova N, Kuzmina T, et al. In vitro Regeneration of Clematis Plants in the Nikita Botanical Garden via Somatic Embryogenesis and Organogenesis[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021(12):311–328.
- [33] 朱宏芬, 施永泰, 倪建刚, 等. 盆栽铁线莲(*Crystal Fountain*)组织培养技术[J]. *浙江农业科学*, 2015, 56(9):1440–1442.
- [34] 杨玲, 潘鹏举, 吴伯志. 两种全缘组铁线莲花卉的组培快繁[J/OL]. 分子植物育种:1–12[2023–01–25]. <http://kns.cnki.net/kams/detail/46.1068.s.20210423.1344.016.html>.
- [35] 陈坤. 两种铁线莲观赏品种组培与扦插繁殖技术研究[D]. 南京:南京林业大学, 2012.

(上接第 141 页)

- [32] WANG Z, WANG T, ZOU B, et al. Soil C:N:P stoichiometry and nutrient dynamics in *Cunninghamia lanceolata* plantations during different growth stages[J]. *The journal of applied ecology*, 2020, 31(11):45–457.
- [33] 熊华, 于飞, 谷晓平, 等. 梵净山不同森林植被生物量、净生产量、碳储量及空间分布特征[J]. *生态环境学报*, 2021, 30(2):264–273.
- [34] 张煜星, 王雪军. 全国森林蓄积生物量模型建立和碳变化研究[J]. *中国科学:生命科学*, 2021, 51(2):199–214.
- [35] 李智超, 张勇强, 宋立国, 等. 江西大岗山不同林龄杉木人工林土壤碳氮储量[J]. *中南林业科技大学学报*, 2019, 39(10):116–122.
- [36] 兰秀, 杜虎, 宋同清, 等. 广西主要森林植被碳储量及其影响因素[J]. *生态学报*, 2019, 39(6):2043–2053.
- [37] GE X, YANG Z, ZHOU B, et al. Biochar Fertilization Significantly Increases Nutrient Levels in Plants and Soil but Has No Effect on Biomass of *Pinus massoniana* (Lamb.) and *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook Saplings During the First Growing Season[J]. *FORESTS*, 2019, 10(8):1011–1019.
- [38] WU Q, JIANG X, ZHANG C, et al. Accumulation of chemically degraded organic carbon in the soil profile of Chinese fir plantations[J]. *CANADIAN JOURNAL OF SOIL SCIENCE*, 2020, 100(3):245–252.
- [39] ZHANG H, ZHOU G, WANG Y, et al. Thinning and species mixing in Chinese fir monocultures improve carbon sequestration in subtropical China[J]. *European journal of forest research*, 2019, 138(3):433–443.
- [40] 高鑫, 周凡, 付宗营, 等. 不同干燥方法对杉木吸湿及尺寸稳定性的影响[J]. *安徽农业大学学报*, 2020, 47(5):730–737.
- [41] 刘颖, 李贤军, 郝晓峰. 杉木常压过热蒸汽干燥工艺研究[J]. *林产工业*, 2020, 57(11):4–9.
- [42] 张静, 漆楚生, 母军. 热处理温度和时间对杉木质量损失和静曲强度的影响[J]. *北京林业大学学报*, 2020, 42(10):137–144.
- [43] GAO Y, ZHAO L, JIANG J, et al. Water Absorption Properties in Transverse Direction of Heat-Treated Chinese Fir Wood Determined Using TD-NMR[J]. *FORESTS*, 2021, 12(11):879–887.
- [44] LI Y, DENG X, ZHANG Y, et al. Chemical Characteristics of Heartwood and Sapwood of Red-Heart Chinese Fir (*Cunninghamia lanceolata*) [J]. *FOREST PRODUCTS JOURNAL*, 2019, 69(2):103–109.
- [45] 王耕, 常畅, 于小茜, 等. 基于文献计量分析的珊瑚礁研究现状与热点[J]. *生态学报*, 2019, 39(3):1114–1123.
- [46] 陈悦, 陈超美, 刘则渊, 等. CiteSpace 知识图谱的方法论功能[J]. *科学学研究*, 2015, 33(2):242–253.
- [47] 张应语, 封燕. 社会网络分析回顾与研究进展[J]. *科学决策*, 2019(12):61–76.
- [48] 伍国勇, 李浩鑫, 杨丽莎, 等. 基于 CiteSpace 的中国流域生态补偿研究知识图谱分析[J]. *生态经济*, 2021, 37(10):164–172.
- [49] 从杉木栽植的疏密度和繁殖方法上来说说明提高产量问题[J]. *林业科学*, 1955(2):38–43.
- [50] 俞新妥. 杉木和马尾松种子场圃发芽率的初步研究[J]. *林业科学*, 1958(4):67–80.
- [51] 史忠礼. 超声波对几种林木种子发芽的影响[J]. *林业科学*, 1959(5):45–50.
- [52] 高德茂. 实行科学造林育林促进杉木速生丰产[J]. *湖南林业科技*, 1974(4):1–2.
- [53] 高德茂. 坚持科学造林实现杉木速生丰产[J]. *湖南林业科技*, 1974(5):1–2.
- [54] 彭万喜, 吴义强, 张仲凤, 等. 中国的杉木研究现状与发展途径[J]. *世界林业研究*, 2006(5):54–58.