

# 火炬松、湿地松、晚松组培繁殖的研究\*

阙国宁 房建军 葛万川 张守英 毛秋娟

**摘要** 本试验以火炬松、湿地松、晚松成熟种子的胚为材料,在附加有细胞分裂素(BAP)的GD改良基本培养基(总盐分含量为0.21%;总含氮量为186 mg/L)经3~4周培养,在胚或子叶及下胚轴上出现膨大肉眼可见的暗绿色愈伤组织及小芽,其分化率达75%~85%。培养基中的细胞分裂素(BAP)浓度对三种松种不定芽的分化具有很大影响,一般以3~5 mg/L为好,在继代培养基中,活性炭对于嫩梢的生长具有良好的效果。当嫩梢长至1.5 cm时,可供生根。在含有0.5 mg/L NAA的生根培养基中经15~20 d培养,即长出白色愈伤组织,然后转至无激素培养基中培养15~20 d后生根。生根的小植株移栽入土壤,其成活率可达80%~95%。

**关键词** 火炬松 湿地松 晚松 组培 繁殖

针叶树种的愈伤组织培养早在30年代就开始,然后直至1950年才有形态再生嫩梢的报道。至于松属(*Pinus*),70年代才开始组织培养繁殖的研究<sup>[1]</sup>,其外植体主要是种胚、子叶、下胚轴等幼态材料。近年来国外对湿地松、火炬松无性系繁殖均有较深入的研究<sup>[2~4]</sup>,然而经组培建立实用的生产体系尚待系统研究。

在我国对松类组培虽然也进行了若干探索,然而尚未取得成功的系统报道。本文在3<sub>a</sub>研究工作的基础上,以我国引种最广泛的火炬松、湿地松、晚松为材料,通过组培培养基的筛选、植物激素种类与浓度以及附加其它成分、生根条件和移栽土壤等系统研究,报道了三种松树的组培繁殖技术,从而为保存松类优良种质资源,快速繁殖优良无性系以及建立松类的复幼繁殖体系,打下了良好基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 植物材料选择与处理

选取优良的火炬松(*P. taeda* L.)、湿地松(*P. elliottii* E.)及晚松(*P. serotina* M.)种子,洗涤后用0.1% KMnO<sub>4</sub> 预消毒处理,浸于清水中3~5 d使其种胚萌动。去种皮的种子经75%酒精表面消毒后置于0.15% HgCl<sub>2</sub> 浸3~4 min,用无菌水洗三次,在无菌条件下取种胚,接种于备制的培养基上。

### 1.2 培养基的选择

按照培养基中的总含盐量、总含氮量以及NH<sub>4</sub><sup>+</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 比值将基本培养基分为三类: M<sub>1</sub> 为高浓度培养基,其盐分含量为0.45%,含氮量为840.86 mg/L, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = 1 : 2; M<sub>2</sub> 为中浓度培养基,其盐分含量为0.21%,总含氮量为186 mg/L, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = 1 : 3; M<sub>3</sub> 为低浓度

1996—05—21 收稿。

阙国宁研究员,房建军,葛万川,张守英,毛秋娟(中国林业科学研究院亚热带林业研究所 浙江富阳 311400)。

\* 本文属国家“八五”攻关项目“国外松短周期工业用材良种选育”课题的一部分。

培养基,其总盐分含量为 0.14%,总含氮量为 77 mg/L,全为硝态氮而无铵态氮。在选择基本培养基的基础上分别添加 0、0.5、1.0、3.0、5.0 mg/L 的 BAP(6-苄基氨基嘌呤),在含最适浓度的基本培养基上分别添加 0、3 g/L 活性炭。所有培养基含糖量为 30 g/L,在高压灭菌前将 pH 值调至 5.6 左右。

### 1.3 培养条件

作为外植体的种胚开始先接种于盛有培养基的试管中,在  $25 \pm 3$  每日光照 12~14 h,光照强度为 2 500~3 000 lx 的环境中。当形成丛生芽后切取单芽或丛生芽培养于 100~250 mL 的三角瓶中,以促进芽的增殖与生长。一般试验每处理 30~50 瓶,接种 25~30 d 后观察其分化情况,40~60 d 后统计嫩梢增殖与生长情况。

## 2 结果与讨论

### 2.1 试管苗的诱导、分化和生长

成熟的种胚外植体培养于诱导培养基中,经 7 d 子叶开始展开并开始转为绿色,20~30 d 子叶普遍愈伤组织化,同时在原有的顶芽以及子叶与下胚轴上不同程度地出现肉眼可见的绿色结节,有的已出现原始针叶的小芽(图 1-1),同时在茎尖近乎中心出现由多数密集小芽组成的丛生芽群(图 1-2),分化率达 70%~85%,每个外植体芽数达 5~7 个,最长达 14 个。50~60 d 以后,多数外植体上所分化的芽开始生长,同时在其周围又分化出许多小芽,这时切割这些丛生芽,继代培养于生长培养基中(图 1-3),以促使伸长,再经 2 次继代培养,多数小芽可长成长达 4~7 cm 粗壮的嫩梢(图 1-4),这时可剪切这些长达 1.5 cm 以上的嫩梢条于生根培养基中,经 30~40 d 诱导,长出新根(图 1-5),继而移栽于土壤中,经 4~6 个月培养长成适于自然环境的试管移植苗(图 1-6)。

### 2.2 不同基本培养基对愈伤组织和不定芽诱导效果的比较

基本培养基是植物组培最重要的基质,选择合适培养基对于植物组培成败至关重要。本试验分别选择了不同浓度含盐量以及含氮量的 M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub> 与 M<sub>3</sub> 培养基。由于高浓度盐分的培养基对于供试的松类胚培养均有不同程度的毒害作用,在全部供试的材料中除约 5% 的晚松种胚在培养初期有变绿反应以外,其它全部的种胚均未出现愈伤组织和不定芽,并逐渐死亡,为此不列入表 1 进行统计。从表 1 可知, M<sub>2</sub> 在诱导胚分化方面,略好于 M<sub>3</sub>,但差异不显著。说明就整个外植体而言,在中浓度与低浓度两种基本培养基中,其最初的诱导效应还是比较相似的。然而由于松类胚培养丛生芽的分化主要集中于多片经愈伤组织化的子叶上,通常同一胚上的各片子叶诱导与分化程度也很不一致,为此统计子叶分化率对了解松类组培增殖率以及生产潜力均具有重要意义。M<sub>2</sub> 培养基在子叶分化率上明显高于 M<sub>3</sub>,特别是火炬松其分化率高出 2.7 倍,晚松与湿地松分别高 1.8 倍和 1.5 倍。就三种松树而言,晚松分化率最高,其次分别为

表 1 不同基本培养基对三种松树胚外植体分化的影响

培养基	火炬松			湿地松			晚松		
	调查数 (个)	胚分化率 (%)	子叶分化率 (%)	调查数 (个)	胚分化率 (%)	子叶分化率 (%)	调查数 (个)	胚分化率 (%)	子叶分化率 (%)
M <sub>2</sub>	50	81	77	50	75	60	50	85	78
M <sub>3</sub>	50	66	32	50	70	46	50	80	47

注:胚分化率:分化出芽的胚数/调查胚数×100%;子叶分化率:分化出芽的子叶数/调查子叶数×100%。

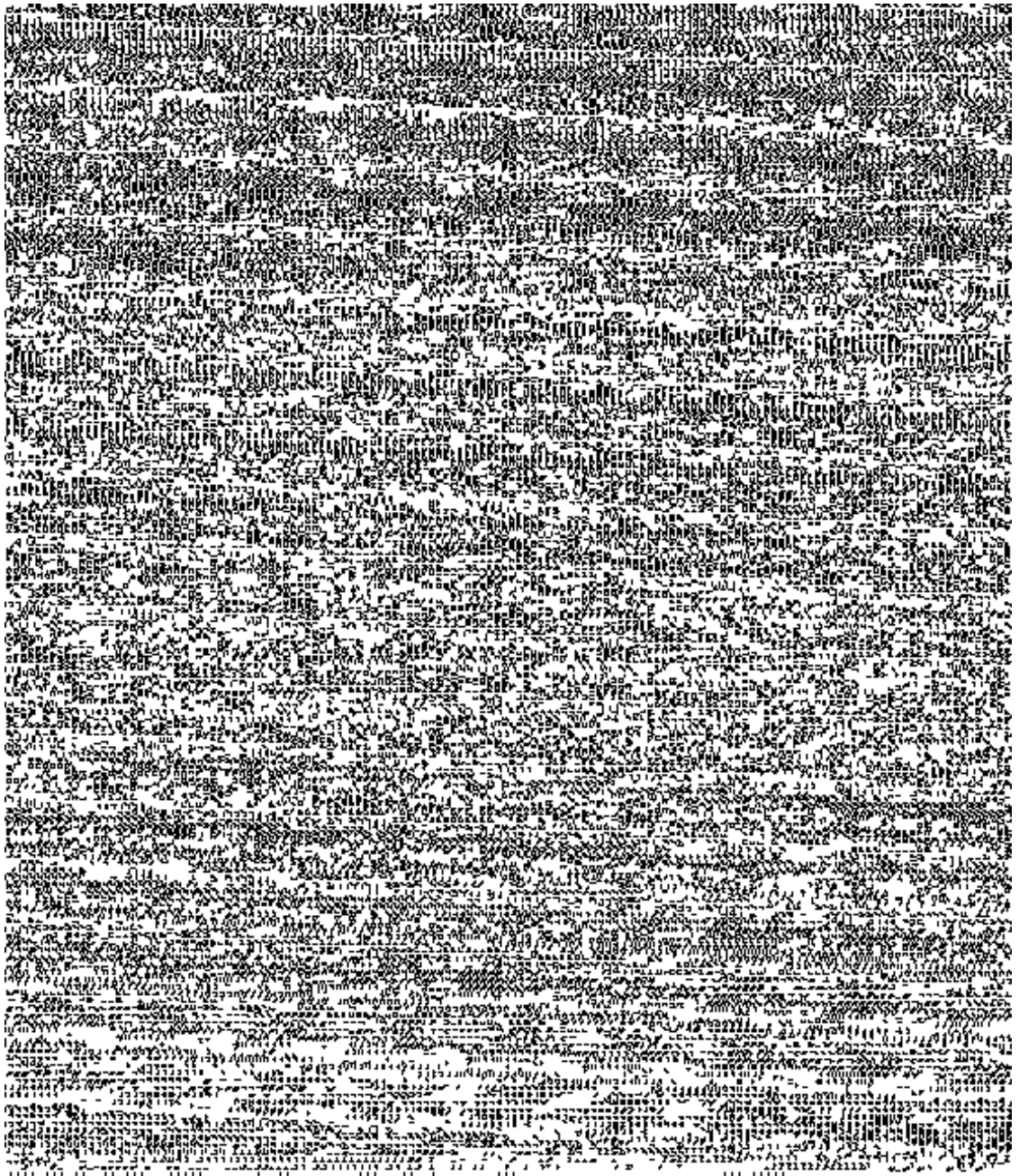


图 1 松类组培苗生长过程

1. 在种胚上出现愈伤组织或小芽(晚松)
2. 愈伤组织上出现丛生芽(湿地松)
3. 分割后的丛生芽(晚松)
4. 生长后的大量丛生芽(火炬松)
5. 生根的试管苗(湿地松)
6. 移栽入土八个月后的幼苗(左:火炬松;右:晚松)

## 火炬松和湿地松。

分析三种基本培养基对松胚原始外植体在诱导不定芽上所产生的差异的原因,一般认为在合适的植物激素条件下培养基的总盐分浓度、总含氮量以及  $\text{NH}_4^+$  与  $\text{NO}_3^-$  的比值对诱导效果起着关键作用。在过往的 10 a 中,许多研究者在松属诸种组培研究的报道中,都应用了低含盐量的培养基,并阐述了降低培养基中的  $\text{NH}_4^+$ ,甚至不含  $\text{NH}_4^+$ ,对于原始外植体的诱导具有促进作用<sup>[2]</sup>。本试验证明了高盐、高氮以及较高  $\text{NH}_4^+$ ,例如目前常用的 MS 培养基对于松属组培是非常不合适的。 $M_2$  培养基在总盐分含量,以及总含氮量方面均比较适中, $\text{NH}_4^+$  与  $\text{NO}_3^-$  的比值虽较低,但也合适; $M_3$  虽也适合于启动培养,但毕竟总含盐量、总含氮量均过低,且不含  $\text{NH}_4^+$ ,这对于外植体分化特别是后期不定芽的形成与生长是不利的。

### 2.3 细胞分裂素(BAP)浓度对不定芽分化的影响

细胞分裂素(BAP)对于松类组培成功地诱导不定芽并促进不定芽开始生长成嫩梢起着决定作用<sup>[5]</sup>,本试验以  $M_2$  为基本培养基,不同浓度 BAP 对三种松树不定芽诱导效果见表 2。由于在不含 BAP 的培养基中无不定芽分化,只有少数胚能单独形成带根的无菌苗,为此不列入表 2 统计之中。从表 2 的结果可看出三种松树对于 BAP 的适应范围都比较大,一般以较高浓度为宜,特别是火炬松和晚松在 BAP 浓度 3~5 mg/L 之间较为适合,而湿地松在 1~5 mg/L 之间均无明显差异,BAP 浓度在 0.5 mg/L 以下,对于三种松类不定芽的诱导效果均比较差。鉴于各外植体之间在遗传与生理上存在着差异,因此在相同的培养基条件下其反应也很不一致,表现在平均数的变异系数都比较大,一般在 50% 以上,甚至达 75%。许多研究证明了不同种源,不同球果发育期,甚至不同贮存方式对于培养体的诱导效果都有很大的影响,在这方面尚必须通过深入探索,以期获得更为准确的结果。

表 2 不同浓度 BAP 对三种松不定芽(芽数/每外植体)形成的影响

树种	项目	BAP 浓度(mg/L)			
		0.5	1.0	3.0	5.0
火炬松	$\bar{X} \pm S$	1.8 ± 1.0	4.0 ± 3.0	7.3 ± 3.9	7.5 ± 2.9
	CV(%)	58.2	75.0	53.0	30.0
湿地松	$\bar{X} \pm S$	3.2 ± 2.1	5.4 ± 2.6	5.6 ± 2.9	6.1 ± 3.1
	CV(%)	63.7	49.0	51.0	50.8
晚松	$\bar{X} \pm S$	2.7 ± 1.7	3.5 ± 2.2	8.0 ± 2.4	7.2 ± 3.2
	CV(%)	62.9	62.8	29.6	44.4

注:  $\bar{X}$  为平均芽数, S 为标准差, CV 为变异系数。

### 2.4 活性炭对分化与生长的影响

本试验利用含上述最适的  $M_2$  基本培养基,采取加 3 g/L 的活性炭或不加活性炭的组进行比较,经 50 d 培养,其结果列于表 3。从表 3 可以看出培养基中添加活性炭对于诱导不定芽在数量上影响不大,一般尚有下降之趋势。但是,对于不定芽的生长特别是伸长具有明显的效果。Bronson M R 等<sup>[6]</sup>研究了不同浓度活性炭对湿地松不定芽生长与诱导效果,认为活性炭对不定芽的生长具有明显

表 3 活性炭(AC)对于松树继代培养体分化与生长的影响

树种	活性炭含量(g/L)	每外植体平均芽数(个)	嫩梢 2cm (%)	嫩梢 5cm (%)
火炬松	0	6.8	15.7	10.5
	3	3.9	42.3	16.8
湿地松	0	4.5	12.8	3.5
	3	3.2	24.5	8.4
晚松	0	7.5	36.4	15.2
	3	5.6	57.8	28.4

的增益作用。为此在继代培养中为了使不定芽能长成 2 cm 以上可供生根的有效嫩梢, 添加活性炭是非常必要的。从子叶及下胚轴上分化出来的不定芽多数长度都在 2 mm 以下, 如果不选用合适的继代培养基就有可能使这些已分化的不定芽难以继续生长以至于死亡, 为此对于密集生长的不定芽在继代培养时首先以 3~4 小芽为一丛, 将其分割, 然后培养于含有活性炭的培养基中。

## 2.5 根的诱导与试管苗移栽

选取展叶的粗壮的 2 cm 的嫩梢, 切下并培养于含有 NAA 的 M<sub>2</sub> 培养基中, 经 7~10 d 即形成白色的愈伤组织, 这时应及时转至低含量以至不含生长素的培养基中, 经 10~15 d 培养就可长出 3~5 条白色的根。三种松树平均生根率在 80%~85% 之间。当根条长到 1.0~1.5 cm 时, 就可将试管苗置于自然光下炼苗 3~5 d, 然后取出小苗清洗附在根上的培养基即可移栽。

1994 年对生根的火炬松、晚松试管苗作了少量的移栽试验, 首批于 4 月 29 日移至以黄土为基质的一般扦插床上, 加盖塑料布以保持空气湿度, 在与扦插苗相同的管理条件下, 经 10 d 观察移植苗仍保持新鲜状态, 15 d 后叶片略呈黄色但渐趋老化, 20 d 左右移栽的试管苗又开始转绿, 并出现新梢生长, 首批移植苗成活率达 95% 以上, 但苗木较为纤细。第二批于 5 月 16 日移栽, 结果晚松成活率达 95%, 火炬松达 80%。移植的苗木于 8 月 1 日调查发现已开始增粗, 高度在 18 cm 左右。挖取移栽成活并开始旺盛生长的苗木观察其根系较发达已长成能适应当地土壤条件的正常苗木, 从而完成了松树组培的全过程。至于成年松树无性系的组培繁殖, 以及松树复幼组培生产体系建立等方面生产实用技术有待于进一步研究。

## 参 考 文 献

- 1 Bonga J M, Durzan D J( 阚国宁, 郭达初, 李金田译). 树木组织培养. 北京: 中国林业出版社, 1988.
- 2 Mofit P L, Amerson H. A tissue culture process for the clonal production of loblolly pine plantlets. N. Carolina Afr. Res. Serv. Tsch. Bull., 1982, (271): 14.
- 3 Pérez-Bermúdez P, Sommer H E. Factors affecting adventitious and induction in *Pinus elliottii* Engelm. embryos cultured *in vitro* Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1987, (11): 25~35.
- 4 Franklin C L, Mofit R L, Vuke T M. Stable ploidy levels in long-term callus culture of loblolly pine. Plant Cell Reports, 1989, (3): 101~104.
- 5 Nancy E G, Glorinm D, Perez-Orzco, et al. *In vitro* response of embryos from different provenances of *Pinus caribaea* var. *boudurensis* Morelet. plant cell. Tissue and Organ Culture, 1993, 32(1): 47~53.
- 6 Bronson M R, Dixon R K. Cultural factors influencing adventitious shoot and plantlet formation from slash pine cotyledons. New Forests, 1991, 5(4): 277~288.

## Studies on the Tissue Culture of *Pinus taeda*, *P. elliottii* and *P. serotina*

Que Guoning Fang Jianjun Ge Wanchuan Zhang Shouying Mao Qiujuan

**Abstract** The embryos, of the mature seeds of *P. taeda* L., *P. elliottii* E., *P. serotina* M., were used as experimental material. The explants were placed on modified GD medium (total salt 0.21%, total nitrogen 186 mg/L) supplemented with BAP for 3~4 weeks to induce swollen dark green callus, then the buds were found on embryos, cotyledon and hypocotyl. The rate of differentiation reached 75%~85%, and the concentration of BAP played an important part in the differentiation of adventitious buds of three pines, normally 3~5 mg/L is suitable. They were subcultured to medium containing activated charcoal, which is beneficial to the growth of shoots. When the shoots grown to the length of 1.5 cm, they were planted on the rooting medium with 0.5 mg/L NAA for 15~20 days, and the white callus were visible. At this point they were transferred to the hormone-free medium for 15~20 days to root, when the plantlets were planted in soil, 85%~90% of them have survived.

**Key words** *Pinus taeda* L. *P. elliottii* E. *P. serotina* M. tissue culture propagation

---

Que Guoning, Professor, Fang Jianjun, Ge Wanchuan, Zhang Shouying, Mao Qiujuan (The Research Institute of Subtropical Forestry, CAF Fugang, Zhejiang 311400).