

湿地松组培再生植株瓶内菌根化及驯化移栽

朱丽华, 程方, 秦莉, 叶建仁

(南京林业大学 森林资源与环境学院 江苏省有害生物入侵预防与控制重点实验室, 江苏 南京 210037)

摘要: 为提高湿地松 *Pinus elliottii* 微繁殖效率, 对湿地松丛生芽发生条件进行了优化, 并对再生植株离体条件下菌根的形成进行了探索。结果表明, 基本培养基、外植体年龄对湿地松带子叶顶芽丛生芽诱导有较大影响。改良 GD (Gresshoff and Doy) 为最佳基本培养基, 苗龄以 18 ~ 25 d 为宜。改良 GD 培养基中加入 0.5 mg·L⁻¹ 活性炭能促进丛生芽的伸长生长。将改良 GD 培养基中大量元素减半并添加 0.05 mg·L⁻¹ α-萘乙酸(NAA)和 1.0 mg·L⁻¹ 吲哚丁酸(IBA)使嫩梢生根率达 80%, 生根的小植株与外生菌根真菌彩色豆马勃 *Pisolithus tinctorius* 在离体条件下形成菌根。菌根的形成提高了再生植株的驯化移栽成活率。再生植株在田间生长正常, 3 a 后平均高度为 80.3 cm。图 2 表 4 参 28

关键词: 森林培育学; 湿地松; 微繁殖; 不定根; 彩色豆马勃; 菌根形成

中图分类号: S723.1

文献标志码: A

文章编号: 1000-5692(2010)03-0398-06

Mycorrhiza formation and acclimatization of tissue cultured *Pinus elliottii*

ZHU Li-hua, CHENG Fang, QIN Li, YE Jian-ren

(Jiangsu Key Laboratory for Prevention and Management of Invasation Species, College of Forest

Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: The condition for axillary bud induction of *Pinus elliottii* has been optimized, and mycorrhizas on the rooted explants has been tested in vitro to improve the efficiency of micropropagation. Axillary bud induction was found to be influenced by the basal medium as well as the age of the seedling from which the explant was taken. Modified Gresshoff and Doy's (GD) medium proved to be superior to others, and the right stage of seedling was 18 – 25 d. The addition of activated charcoal(0.5 mg·L⁻¹) stimulated shoot elongation. Rooting occurred at about 80% on 1/2GD medium supplemented with 0.05 mg·L⁻¹ NAA and 1.0 mg·L⁻¹ IBA. Mycorrhizas were initiated for plantlets with *Pisolithus tinctorius* on an agar medium under fully controlled conditions. Mycorrhizas improved the transfer of the plantlets to ex vitro conditions. After 3 years in the field, the plantlets reached an average of 80.3 cm in height. Their shoot growth appearance was normal. [Ch, 2 fig. 4 tab. 28 ref.]

Key words: silviculture; *Pinus elliottii*; micropropagation; adventitious root; *Pisolithus tinctorius*; mycorrhiza formation

组织培养技术是快速繁殖木本植物, 尤其是繁殖优良树种的理想途径。目前已有近 40 个松属 *Pinus* 树种经器官发生或体细胞胚胎发生获得再生植株^[1], 但真正能应用于大规模商业生产的却只有海岸松 *Pinus pinaster*, 火炬松 *P. taeda* 和辐射松 *P. radiata*^[2-4]。生根困难以及移栽成活率低等因素大大限制了松属树种组织培养技术的发展^[5-7]。在自然界中, 大部分温带及寒带树种和 70% 的热带树种都能形成外生菌根, 很多树种缺少菌根就不能成活或生长很差, 而植物组培繁育整个过程均是在无菌

收稿日期: 2009-10-05; 修回日期: 2010-01-06

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划项目 (2006BAD08A1002)

作者简介: 朱丽华, 博士, 从事森林保护学研究。E-mail: lhzh@njfu.com.cn。通信作者: 叶建仁, 教授, 博士生导师, 从事森林保护学研究。E-mail: jrye@njfu.edu.cn

条件下进行的,由于缺乏菌根真菌的帮助,组培苗生长状况较差,抵抗力较弱,移栽成活率较低^[8]。在组培繁育过程中引入菌根技术有望解决上述技术难题^[7-9]。湿地松 *Pinus elliottii* 是重要的绿化和造林树种。国内外有关湿地松组织培养植株再生的报道较多^[10-13],然而,迄今尚无可用于大规模林业生产的报道。本试验在已有研究基础^[13]上,进一步研究了基本培养基和外植体年龄对湿地松丛生芽诱导的影响,并对组培再生植株的瓶内菌根化进行了初步探讨,对再生植株的田间生长进行了观察。

1 材料和方法

1.1 供试湿地松种子、彩色豆马勃及其处理

选取优良的湿地松成熟种子,经 4℃低温处理 3~4 周,参照朱丽华等^[13]关于湿地松组织培养及植株再生的方法将其培养成无菌苗。将无菌苗从子叶着生部位下 5~8 mm 处将根切除,以上部分作为外植体备用。试验用的外生菌根真菌为彩色豆马勃 *Pisolithus tinctorius* Pt₂,该菌株由杨小明采自云南^[14]。使用前培养于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基上。

1.2 湿地松丛生芽的诱导及伸长

以 MS(Murashige and Skoog), 1/2MS, DCR(Douglas-fir cotyledon revised medium)和改良 GD(Gresshoff and Doy)为基本培养基,附加 4.0 mg·L⁻¹ 6-BA(6-苄氨基嘌呤)和 0.1 mg·L⁻¹ NAA(α-萘乙酸),测定不同基本培养基对丛生芽诱导的影响;在此基础上,以筛选得到的最佳培养基(改良 GD + 4.0 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.1 mg·L⁻¹ NAA)为诱导培养基培养 14~35 d 的无菌苗为外植体,测定外植体年龄对丛生芽诱导的影响,接种 4 周后统计丛生芽诱导率。将诱导产生的丛生芽连同原始外植体转移至改良 GD + 0.5 mg·L⁻¹ 活性炭培养基上,以促进丛生芽的伸长^[13]。所有培养基均添加蔗糖 30.0 mg·L⁻¹,琼脂 6 g·L⁻¹, pH 5.80 ± 0.01, 121℃高温, 0.105 MPa 高压灭菌 18 min。培养温度为 (24 ± 1)℃,光照强度为 2 000 lx,光照 16 h·d⁻¹。

1.3 不定根诱导及再生植株菌根的形成

将长 1.0~1.5 cm 的丛生芽单个切下,接种到 1/2 改良 GD + 0.05 mg·L⁻¹ NAA + 1.0 mg·L⁻¹ IBA(吲哚丁酸)培养基上进行不定根诱导^[15]。在诱导不定根的同时或不定根形成后接入直径 0.5 cm 的菌块 3~4 块,于 1, 2, 3 个月后观察菌根形成情况,未接种菌根真菌的处理为对照。培养条件同 1.2。

1.4 再生植株的驯化移栽及田间移植

生根植株在无植物生长调节物质的 1/2 改良 GD 培养基中单独培养或与彩色豆马勃共培养 3 个月后,逐渐打开棉花塞炼苗 5~7 d。将小苗从瓶中取出,用水洗去根部残留的琼脂培养基,移栽于装有河沙与蛭石(2:1)混合基质的塑料杯内。将塑料杯转移至植物生长室中,喷水 1 次·d⁻¹,2 个月后统计成活率。将成活植株转移至温室中,4 个月后移栽至圃地。于每年生长季结束后对其高生长进行测定。

2 结果与分析

2.1 湿地松丛生芽的诱导

2.1.1 基本培养基对湿地松丛生芽诱导的影响
外植体分别接种到添加 4.0 mg·L⁻¹ 6-BA 及 0.1 mg·L⁻¹ NAA 的 MS, 1/2MS, 改良 GD 和 DCR 培养基中,4 周后统计结果(表 1)表明,在草本植物组织培养中广泛使用的 MS 培养基不仅对湿地松丛生芽诱导效果不佳,且外植体生长较瘦弱,针叶黄化;1/2 MS、改良 GD 和 DCR 等 3 种培养基对湿地松丛生芽诱导的影响差异不明显,但外植体及丛生芽在改良 GD 培养基上生长状态较好,在 DCR 和 1/2 MS 培养基上生长相对

表 1 基本培养基对湿地松丛生芽诱导的影响

Table 1 Effect of different basal medium on axillary buds induction of slash pine

基本培养基	丛生芽诱导率/%				外植体长势
	重复 1	重复 2	重复 3	平均	
MS	45	40	50	45.0 ± 3.3 a	瘦弱,针叶黄化
1/2 MS	80	80	80	80.0 ± 1.5 b	瘦弱,针叶嫩绿
DCR	85	90	80	85.0 ± 2.9 b	瘦弱,针叶嫩绿
改良 GD	85	80	90	85.0 ± 2.9 b	健壮,针叶嫩绿

说明:同列不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

较瘦弱。综合考虑,改良 GD 为湿地松丛生芽诱导的最佳基本培养基。

2.1.2 外植体年龄对湿地松丛生芽诱导的影响
切取 14 ~ 35 d 生无菌苗带子叶顶芽接种在诱导培养基上,4 周后统计结果(表 2)表明,低于 16 d 或高于 30 d 的无菌苗外植体诱导分化率低于 70%,18 ~ 25 d 无菌苗外植体丛生芽分化率达 85%以上,但外植体年龄对丛生芽诱导的影响并未达到显著差异水平(表 3)。从外观上看,16 d 及以下苗龄的无菌苗由于太幼嫩,玻璃化程度较重,呈肿胀透明状,因而很难继续用作继代培养的材料;30 d 以上苗龄的无菌苗木质化程度较高,且顶梢已经伸长,所诱导产生的丛生芽较少;18 ~ 25 d 无菌苗外植体上诱导产生的丛生芽不仅数量较多且生长旺盛。因此,18 ~ 25 d 生无菌苗为较适合外植体。

2.2 湿地松不定根发生和菌根的形成

诱导产生的丛生芽接种至改良 GD + 0.05 mg·L⁻¹ 活性炭培养基上后迅速伸长,长达 1.0 ~ 1.5 cm 时,将丛生芽单个切下,接种到 1/2 改良 GD + 0.05 mg·L⁻¹NAA + 1.0 mg·L⁻¹IBA 生根培养基中。4 周后,约 80 %左右的嫩梢基部有 1 ~ 2 条长 2 ~ 4 mm 的不定根形成。而在生根培养基中接入嫩梢的同时接种菌根真菌,菌丝生长较快并密布在培养基表面及小植株周围,一直到培养后期均没有观察到不定根形成(图 1-1)。不定根形成后,转至无激素的 1/2 改良 GD 培养基中,同时接入彩色豆马勃菌块。结果发现,菌根真菌菌丝大部分长在琼脂培养基表面,与不定根接触的机会不多,因此在接种 1 ~ 2 个月后没有观察到菌根产生;随着培养时间的延长,琼脂培养基渐渐失水收缩,菌丝沿着三角瓶壁生长,并疏松地覆盖在暴露于空气中的不定根上,接种 3 个月后发现与菌根真菌接触的不定根上形成顶端膨大的二叉分枝状短根(图 1-2),表明不定根与菌根真菌已结合形成菌

表 2 不同龄期的外植体对湿地松丛生芽诱导的影响

Table 2 Influence of explant in different age on frequency of axillary buds induction of *Pinus elliottii*

苗龄/d	接种外植体/个数	有芽外植/个体数	诱导率/%	玻璃化现象
14	76	40	52.6	++
16	43	32	74.4	+
18	54	47	87.3	-
20	24	20	88.8	-
25	24	22	91.7	-
30	20	14	70.0	-
35	20	14	70.0	-

说明: ++表示玻璃化率严重, +表示玻璃化程度较轻, -表示无玻璃化。

表 3 苗龄对湿地松丛生芽诱导方差分析

Table 3 ANOVA of seedling age on frequency of axillary buds induction of *Pinus elliottii*

变因	自由度	平方和	均方	F 值	显著性
组间	6	1 961.683	326.947	0.367	0.888
组内	14	12 475.63	891.116		
总体	20	14 437.31			

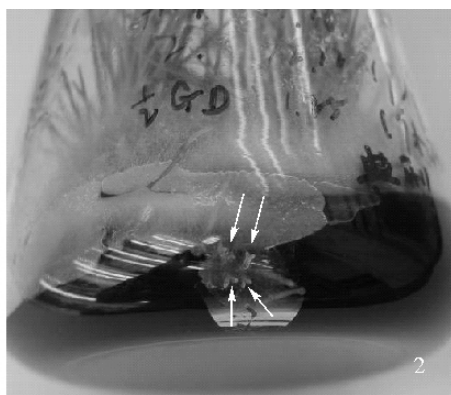


图 1 湿地松组织培养再生植株瓶内菌根化(1. 不定根诱导的同时接种彩色豆马勃; 2. 不定根形成后接种彩色豆马勃;箭头示二叉分枝)

Figure 1 In vitro mycorrhiza formation by *Pisolithus tinctorius* in micropropagated plantlets of *Pinus elliottii*(1. *Pisolithus tinctorius* were inoculated at the root initiation stage;2. *Pisolithus tinctorius* were inoculated after the adventitious root has formed;arrows indicate the dichotomously branched mycorrhizal root)

根,而未接菌的组培苗不定根上偶尔也有侧根产生,但侧根均无二叉分枝。

2.3 湿地松组织培养再生植株的驯化移栽

将再生植株移栽于河沙与蛭石混合基质中。于植物生长室中驯化 2 个月后,接种菌根真菌的再生植株成活率达 85%(26/30),未接菌的植株移栽成活率为 70%(21/30)。相比之下,接种菌根真菌的植株根系较未接菌的植株发达,但两者在高生长上未表现出明显差异(表 4)。

2.4 湿地松组织培养再生植株的田间表现

驯化移栽成活的组培再生植株于温室中生长 4 个月后,移栽至苗圃地中。5 个月后,移栽成活率达 91.5%(43/47)。移栽前所有植株平均苗高 5.1 cm,部分植株高 7.0 cm 左右(图 2-1)。经过 1, 2, 3 等 3 个生长季节后,平均苗高分别增至 12.1, 30.6 和 80.3 cm,苗高增长值逐年提高,差异明显,增幅稳定(表 4)。大部分再生植株在田间生长正常(图 2-2 ~ 4),少部分植株有斜生现象。

表 4 湿地松组织培养再生植株的高生长情况

Table 4 Yearly average heights of micropropagated plantlets of *Pinus elliottii*

年份	平均苗高/cm	苗高年增长值/cm	苗高年增长率/%
2004	5.1	0	0
2005	12.1	7.04 ± 2.75 a	143 ± 47 a
2006	30.6	18.50 ± 5.37 b	157 ± 40 a
2007	80.3	49.67 ± 11.82 c	165 ± 22 a

说明:同列不同小写字母表示在差异显著($P < 0.05$)。



图 2 湿地松组织培养再生植株(1. 在温室驯化 4 个月后; 2. 移栽于野外 1 a 后; 3. 移栽于野外 2 a 后; 4. 移栽于野外 3 a 后)

Figure 2 Micropropagated plantlets of *Pinus elliottii* (1. 4 months growth in greenhouse; 2. 1 year after transferred to field; 3. 2 years after transferred to field; 4. 3 years after transferred to field)

3 结论与讨论

影响植物器官发生的因素很多,基本培养基种类及外植体类型及年龄有着较重要的影响。在松树的器官分化中,最常用的基本培养基有 GD, DCR 和 SH (Schenk and Hildebrandt)等,此外还有 MS 及各种改良 MS 等^[16]。本研究中改良 GD, DCR, 1/2 MS 培养基均适合于湿地松丛生芽诱导,但以改良 GD 培养基为最佳。此外,外植体年龄对丛生芽的发生也有较大影响,以无菌幼苗作为外植体时,18 ~ 25 d 的无菌苗更有利于丛生芽的诱导,类似的现象在西部白松 *Pinus strobes* 子叶,欧洲赤松 *P. sylvestris*, 黑松 *P. thunbergii* 无菌幼苗培养中亦有报道^[17-19]。

由于松属树种生根困难,并且再生植株受移栽所带来的水分、营养及外界环境微生物的影响较大,因此,在生根阶段接种菌根真菌促进生根并形成菌根对组培苗的驯化、移栽及更快地适应外界环境具有重要意义。已有研究结果表明,菌根真菌接种提高了地中海松和欧洲赤松下胚轴切根苗以及欧洲赤松和海岸松组培苗的生根率^[18, 20-23],改善了再生植株对移栽环境的适应性^[18, 23-24]。国内成小飞等^[25]在离体条件下合成了菌根化的马尾松组培小植株,但未作进一步报道。本试验中,在不定根诱导阶段接种彩色豆马勃未能促进组培苗生根,在不定根形成后接种能使之合生成菌根。菌根的形成对驯化移栽有一定的促进作用,但对生长促进作用不明显。其间的差异可能与菌种或菌株及树种不同有关。为了筛选出能与宿主植物形成最佳组合的高效菌根真菌,需对更多的菌根真菌进行接种试验。此外,

为避免真菌菌丝于琼脂培养基表面旺盛生长而难以与不定根接触的现象,应对瓶内菌根化基质做进一步筛选。

有关松属树种组培再生植株在温室、苗圃或林地生长表现的研究报告较少,只有极少数的树种进入林地测试阶段。对火炬松、海岸松、扭叶松 *Pinus contorta* 等树种的研究结果表明,组培苗与实生苗间存在一定差别^[26-28]。本试验于野外移栽了少量湿地松组培再生植株,总体上看生长较为缓慢,从外观上看大部分植株生长正常,亦有少数植株出现斜生现象。为了进一步研究组培再生植株的田间表现,需对更多植株进行更长期的观测。

参考文献:

- [1] 朱丽华. 湿地松、火炬松和黑松的组培繁殖技术研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2004.
ZHU Lihua. Studies on technology about tissue culture propagation of *Pinus elliottii*, *P. taeda* and *P. thunbergii*[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2004.
- [2] 邢世岩. 松属树种细胞、组织和器官培养名录[J]. 植物生理学通讯, 1990 (1): 75 - 79.
XING Shiyan. A checklist of cell, tissue and organ culture in *Pinus* species[J]. *Plant Physiol Commun*, 1990 (1): 75 - 79.
- [3] HANDLEY L W, BECWAR M R, CHESWICK E E, *et al.* Research and development of commercial tissue culture systems in loblolly pine [J]. *Tappi J*, 1995, **78** (5): 169 - 175.
- [4] MENZIES M I, HOLDEN D G, KLOMP B K. Recent trends in nursery practice in New Zealand [J]. *New For*, 2001, **22**: 3 - 17.
- [5] THORPE T A, HARRY I S, KUMAR P P. Application of micropropagation to forestry[M]// DEBERGH P C, ZIMMERMAN R H. *Micropropagation*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991: 311 - 336.
- [6] MOHAMMED G H, VIDAVER W E. Root production and plantlet development in tissue-cultured conifers [J]. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*, 1988, **14**: 137 - 160.
- [7] NIEMI K, SCAGEL C, HGGMAN H. Application of ectomycorrhizal fungi in vegetative propagation of conifers [J]. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*, 2004, **78**: 83 - 91.
- [8] 王真辉. 菌根真菌在植物组培苗生产技术中的应用[J]. 热带农业科学, 2001, **93** (5): 71 - 78.
WANG Zhenhui. Application of mycorrhizal fungi in plant tissue cultured breeding technique [J]. *Chin J Trop Agric*, 2001, **93** (5): 71 - 78.
- [9] KAPOOR R, SHARMA D, BHATNAGAR A K. Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications [J]. *Sci Hortic*, 2008, **116**: 227 - 239.
- [9] GRELLIER B, LETOUZE R, STRULLU D G. Micropropagation of birch and mycorrhizal formation in vitro[J]. *New Phytol*, 1984, **97**: 591 - 599.
- [10] BRONSON M R, DIXON R K. Cultural factors influencing adventitious shoot and plantlet formation from slash pine cotyledons [J]. *New For*, 1991, **5**: 277 - 288.
- [11] 阙国宁, 房建军, 葛万川, 等. 火炬松、湿地松、晚松组培繁殖的研究[J]. 林业科学研究, 1997, **10** (3): 227 - 232.
QUE Guoning, FANG Jianjun, GE Wanchuan, *et al.* Studies on the tissue cultue of *Pinus taeda*, *P. elliottii* and *P. serotina* [J]. *For Res*, 1997, **10** (3): 227 - 232.
- [12] 唐巍, 欧阳藩, 郭仲琛. 湿地松体细胞胚胎发生和植株再生[J]. 植物资源与环境, 1997, **6** (2): 8 - 11.
TANG Wei, OUYANG Fan, GUO Zhongchen. Plantlet regeneration via somatic embryogenesis in slash pine [J]. *J Plant Resour Environ*, 1997, **6** (2): 8 - 11.
- [13] 朱丽华, 张艺, 吴小芹. 湿地松的组织培养及植株再生[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2004, **28** (6): 47 - 51.
ZHU Lihua, ZHANG Yi, WU Xiaoqin. Tissue culture and plant regeneration of *Pinus elliottii* [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Ed*, 2004, **28** (6): 47 - 51.
- [14] 杨小明. 松树外生菌根菌资源的收集及应用研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2004.
YANG Xiaoming. *The Collection and Application Studies on the Mycorrhiza Fungi of Pinus Tree* [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2004.
- [15] 朱丽华, 吴小芹. 湿地松组培苗生根的影响因子[J]. 东北林业大学学报, 2005, **33** (5): 15 - 18.

- ZHU Lihua, WU Xiaoqin. Factors affecting root formation of slash pine shoots by tissue culture [J]. *J Northeast For Univ*, 2005, **33** (5): 15 – 18.
- [16] 黄健秋, 卫志明. 松属树种的组织培养和原生质体培养[J]. 植物学通报, 1994, **11** (1): 34 – 42.
- HUANG Jianqiu, WEI Zhiming. Tissue and protoplast culture of *Pinus* species [J]. *Chin Bull Bot*, 1994, **11** (1): 34 – 42.
- [17] WEBB D T, FLINN B S, GEORGIS W. Micropropagation of eastern white pine (*Pinus strobes* L.) [J]. *Can J For Res*, 1988, **18**: 1570 – 1580.
- [18] SUPRIYANTO, ROHR R. In vitro regeneration of plantlets of scots pine (*Pinus sylvestris*) with mycorrhizal roots from subcultured callus initiated from needle adventitious buds [J]. *Can J Bot*, 1993, **72**: 1144 – 1150.
- [19] 朱丽华, 郑丹, 吴小芹. 黑松丛生芽的诱导及植株再生[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2006, **30** (3): 27 – 31.
- ZHU Lihua, ZHENG Dan, WU Xiaoqin. Axillary buds induction and plantlet regeneration of *Pinus thunbergii* [J]. *J Nan-jing For Univ Nat Sci Ed*, 2006, **30** (3): 27 – 31.
- [20] GAY G. Effect of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma hiemale* on adventitious root formation in derooted *Pinus halepensis* shoot hypocotyls [J]. *Can J Bot*, 1990, **68**: 1265 – 1270.
- [21] NIEMI K, VUORINEN T, ERNSTSEN A, *et al.* Ectomycorrhizal fungi and exogenous auxins affect root and mycorrhiza formation on in vitro scots pine hypocotyl cuttings [J]. *Tree Physiol*, 2002, **22**: 1231 – 1239.
- [22] NIEMI K, HÄGGMAN H, SARJALA T. Effects of exogenous diamines on the interaction between ectomycorrhizal fungi and adventitious root formation of scots pine in vitro [J]. *Tree Physiol*, 2002, **22**: 373 – 381.
- [23] NORMAND L, BARTSCHI H, DEBAUD J C, *et al.* Rooting and acclimatization of micropropagated cutting of *Pinus pinaster* and *Pinus sylvestris* are enhanced by ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* [J]. *Physiol Plant*, 1996, **98** (4): 759 – 766.
- [24] NIEMI K, HÄGGMAN H. *Pisolithus tinctorius* promotes germination and forms mycorrhizal structures in scots pine somatic embryos in vitro [J]. *Mycorrhiza*, 2002, **12**: 263 – 267.
- [25] 成小飞, 花小梅, 李文钿. 马尾松离体培养条件下的微繁殖和菌根的形成[J]. 林业科学研究, 1995, **8** (3): 241 – 246.
- CHENG Xiaofei, HUA Xiaomei, LI Wendian. Micropropagation and mycorrhizae formation of *Pinus massoniana* Lamb. in vitro [J]. *For Res*, 1995, **8**: 241 – 246.
- [26] FRAMPTON L J, AMERSON H V, LEACH G N. Tissue culture method affects ex vitro growth and development of loblolly pine [J]. *New For*, 1998, **16** (2): 125 – 138.
- [27] MONTEUUIS O, DUMAS E. Morphological features as indicators of maturity in acclimatized *Pinus pinaster* from different in vitro origins [J]. *Can J For Res*, 1992, **22** (9): 1417 – 1421.
- [28] FLYGH G, GRÖNROOS R, VON ARNOLD S. Induction, rooting, and growth capacity of adventitious shoots of *Pinus contorta* [J]. *Can J For Res*, 1993, **23**: 1907 – 1916.