

国家一级保护野生植物银缕梅组培快繁体系的建立

张靓靓¹, 汪贤挺², 陈勇³, 朱逸凡¹, 卢新元¹, Zaitseva Svetlana Mikhailovna⁴,
杨海芸^{1*}

¹浙江农林大学, 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 竹业科学与技术教育部重点实验室, 竹子研究院, 杭州 311300; ²安吉小鲵国家级自然保护区管理中心, 安吉 313304; ³灵峰寺林场, 安吉 313304;

⁴俄罗斯国立农业大学, 莫斯科 27550

摘要 银缕梅(*Parrotia subaequalis*)是中国特有的珍稀濒危物种, 属于国家一级重点保护野生植物。为缓解其濒危现状, 以银缕梅带芽茎段作为外植体, 探究不同消毒方式、基本培养基、植物生长调节剂种类与浓度等对侧芽萌发、增殖和不定根生长的影响, 建立了银缕梅组培快繁技术体系。结果表明, 外植体 75%乙醇消毒后置于 0.52% NaClO 中浸泡 5 分钟, 接种成活率为 83.33%; 基本培养基 WPM 上侧芽萌芽率最高, 为 73%; 添加 KT 侧芽萌发率达 91%, 但无丛芽增殖, 而添加 1.0 mg·L⁻¹TDZ 时丛生芽诱导率为 48.63%; 添加 1.5 mg·L⁻¹6-BA 和 0.003 mg·L⁻¹ TDZ 组合缕梅侧芽增殖效果最好, 增殖系数为 4.17, 芽生长状态良好。银缕梅不定根诱导较困难, 高浓度生长素会导致芽苗褐化死亡, 在 1/2MS 基本培养基中添加 0.2 mg·L⁻¹ NAA, 获得最佳生根培养基, 生根率达 60%。该研究建立了银缕梅组培快繁体系, 可有效缓解银缕梅濒危现状, 为科研和生产提供充足的植物材料。

关键词 银缕梅, 濒危保护植物, 组培, 丛生芽, 增殖

银缕梅(*Parrotia subaequalis*)是金缕梅科(*Hamamelidaceae*)银缕梅属(*Parrotia*)落叶小乔木, 被列入《国家重点保护野生植物名录》, 是国务院批准的第一批重点保护野生植物; 在《中国植物红色名录》中被列为 I 级濒危种; 还被国际自然保护联盟(IUCN)列为极度濒危(Critically Endangered, CR)物种。银缕梅是中国特有的珍稀濒危物种, 被称为被子植物的活化石, 其作为第三纪孑遗植物对探讨我国金缕梅科早期起源与分化具有重要科学价值(邓懋彬等, 1997; 胡一民等, 2011)。银缕梅叶片含单宁成分, 具有抗氧化、消炎抗菌等作用(刘明珍等, 2020)。在春秋两季, 其叶片呈现丰富的色彩, 可用作景观树种和盆栽造景(方炎明等, 1997; 刘兴剑和郝日明, 1999; 刘兴剑, 2000)。由于该树种导管分子较长, 横隔数目较多, 是良好的木材用树(方炎明和邓懋彬, 1996), 具有多样的应用价值。

由于银缕梅野生植株对光适应的生态幅度较窄, 幼树生长过程中受到大树遮蔽, 常处于光照不足的境地, 导致野生银缕梅植株自然成活率低(徐惠强等, 2001; 朱汤军等, 2008); 并且由于生殖过程中两性花期不遇、风媒传粉受生长地的地形阻碍等因素, 导致银缕梅花朵 1–3 年才开花一次, 授粉困难、难以结实, 较难获得种子, 人工进行种子的采摘也会对母树造成伤害(郝日明等, 1996; 邓懋彬等, 1997; 刘兴剑等, 2008); 除种子繁殖方式外, 扦插繁殖也是一种方式, 通过多次试验发现, 春季硬枝扦插成活率只有 30%–35%, 秋冬季当年生枝条落叶后扦插成活率 60%–70%, 实生苗扦插经过植物生长调节剂的处理, 生长初期状态良好, 数月后成活率降低, 且野外繁殖后续生长过程中易受病虫害影响(黄绍辉, 2004; 黄绍辉等, 2006; 胡国伟, 2013; 郑学峰和但德军, 2024)。赖辅鑫等以无菌种子为外植体、发芽率为 11.67%, 以茎段为外植体存活率为 46.47%, 10 月份取材效果最佳, 萌芽率为 21.67%, 芽苗有褐化现象(赖辅鑫等, 2022); 阳艳芳以茎段为外植体萌发率为 85.94%, 并进一步利用茎段侧芽诱导愈伤组织, 均未见丛生芽诱导与增殖的研究, 缺乏完善的银缕梅组织培养繁育技术体系。

因此, 本文以银缕梅当年生枝上截取的带芽茎段作为外植体, 研究外植体消毒方法、基本培养基, 植物生长调节剂浓度与种类之间配合, 对侧芽萌发、丛生芽诱导与增殖、生根培养进行系统研究, 旨在有效缓解银缕梅濒危现状, 为科研和生产提供足够的种苗材料。

1 植物材料

本实验材料来自浙江省安吉龙王山野生植株种子繁育的一年生银缕梅(*Parrotia subaequalis*)

基金项目: 银缕梅种质资源遗传进化分析与扩繁技术研究项目

* 通讯作者。E-mail: yhy2006@zafu.edu.cn

(H. T. Cheng) R. M. Hao et H_T. wei)实生苗枝条(图 1A)。

2 培养基成分与培养条件

2.1 外植体消毒

取银缕梅幼树当年生枝条,剪去叶片,并将带芽茎段切成 1.5–2.0 cm 小段,流水冲洗 2 小时后转至超净工作台上备用。先用 75%乙醇消毒 30 秒,无菌水冲洗 3–4 次,再用 0.52% NaClO (次氯酸钠)溶液分别处理 5、10、15、20 和 25 分钟,消毒后用无菌水冲洗 5–6 次,用无菌滤纸吸干水分。将消毒后的带芽茎段接种到 WPM 基本培养基中,每处理 20 皿,重复 3 次。14 天后统计污染率,30 天后统计褐化率及无菌苗成活率,确定最佳消毒方案。

污染率=(污染外植体数/接种外植体总数)×100%;

褐化率=(褐化外植体数/接种外植体总数)×100%;

无菌苗成活率=(成活外植体数/接种外植体总数)×100%。

2.2 茎段侧芽萌发

先将银缕梅外植体带芽茎段消毒,再分别接种到 MS、1/2MS 和 WPM 基本培养基中,不添加任何植物生长调节剂,以筛选侧芽萌发最适基本培养基。以 WPM 为基本培养基,分别单独添加浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0 和 4.0 mg·L⁻¹ KT (Kinetin),浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0 和 4.0 mg·L⁻¹ 6-BA (N-(Phenylmethyl)-9H-purin-6-amine),浓度为 0.001、0.01、0.1、1.0 和 2.0 mg·L⁻¹ TDZ (Tiabendazole)。以不添加任何植物生长调节剂的处理作为对照(CK),探究不同植物生长调节剂对茎段侧芽萌发的影响。每处理 20 皿,重复 3 次。暗培养 3 天后转到光下培养。30 天后统计萌芽率、丛生芽诱导率和平均萌芽数,并记录侧芽生长状况。

萌芽率=(萌发的茎段数/接种茎段总数–污染数)×100%;

丛生芽诱导率=(萌发丛生芽的个数/接种外植体数量)×100%;

平均萌芽数=全部新生芽数量/接种外植体数量。

2.3 丛生芽增殖

以萌发 1 个侧芽的茎段为初始材料进行增殖培养。以 WPM 为基本培养基,分别添加 6-BA (1.5 mg·L⁻¹)和不同浓度 TDZ (0.003、0.004、0.005、0.006、0.007、0.01、0.1 和 1.0 mg·L⁻¹)进行随机组合实验,研究不同组合对银缕梅丛生芽增殖的影响。每处理接种 20 瓶,每瓶 1 个初始材料,重复 3 次。30 天后统计芽增殖系数和平均芽长。

芽增殖系数=(总芽数量–接种芽数量)/接种芽数量;

平均芽长=所有芽长总和/总芽数量。

2.4 生根培养与炼苗移栽

将银缕梅丛生芽中切割高 2 厘米以上的单芽为材料,以 1/2MS 为基本培养基,添加不同浓度 IBA (0、0.2 和 0.4 mg·L⁻¹)和 NAA (0、0.1 和 0.2 mg·L⁻¹)。每处理接种 20 瓶,每瓶 1 个,重复 3 次。30 天后统计生根情况。待苗高 2–3 cm、根长 1.5–2 cm 时进行移栽。移栽时,撕掉封口膜置于驯化室炼苗 2 天,再打开瓶盖炼苗 3 天。炼苗后,用镊子将组培苗从瓶内夹出,洗净根上残留的培养基,移栽到加入 0.1%多菌灵的混合营养土(草炭土:珍珠岩=3:1, v/v)基质中(李孟悦等, 2021)。30 天后统计存活率。

生根率=(生根植株数/接种植株总数)×100%;

存活率=(移栽后成活株数/移栽总数)×100%。

2.5 数据处理与培养条件

利用 Excel 和 SPSS 统计分析软件进行数据整理与分析。采用 Duncan 法进行多组样本间差异显著性分析。培养条件:所有培养基均添加 30 g·L⁻¹ 蔗糖和 0.8%琼脂, pH5.7; 培养温度为(25±2)°C, 光周期为 16 小时光照/8 小时黑暗, 光强为 3 600 μmol·m⁻²·s⁻¹。

3 结果与讨论

3.1 不同 NaClO 处理时间对银缕梅茎段消毒效果的影响

本实验探究了不同 NaClO 处理时间对银缕梅带芽茎段表面灭菌效果的影响。结果表明,外植体在 0.52% NaClO 溶液中,随着浸泡时间的延长,其污染率呈现先波动式上升再降低的趋势,处理 25 分钟时污染率最低,为 5.67%。但随着浸泡时间的延长褐化率逐渐升高,处理 5 分钟时褐化率最低,为 6.67%。经过 30 天生长发育,发现处理 5 分钟的成活率最高,达 83.33%,说明 NaClO 处理时间过长对植株毒害作用较大(表 1)。

表 1 不同 NaClO 处理时间对银缕梅茎段外植体消毒效果的影响
Table 1 Effect of different NaClO treatment time on disinfection effect of stem explants of *Parrotia subaequalis*

Treatments	Disinfection time (min)	Pollution rate (%)	Survival rate (%)	Browning rate (%)	Growth condition
A1	5	10.00±2.00 b	83.33±11.55 a	6.67±2.89 c	Vibrant green emerging leaves with minimal cross-sectional browning
A2	10	6.67±1.15 b	77.78±12.51 ab	15.56±0.96 bc	Slight browning observed at explant cross-sections
A3	15	15.67±1.15 a	55.00±25.00 ab	29.44±13.57 abc	Central green region retained with peripheral browning at explant cross-sections
A4	20	9.00±3.61 b	56.67±27.54 ab	34.44±16.86 ab	Partial explant browning with medium discoloration in culture medium
A5	25	5.67±2.52 b	40.56±13.57 b	53.89±19.46 a	Severe explant necrosis with extensive medium browning

数据为平均值±标准差; 同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。
Data are means±SD; Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$).

3.2 不同基本培养基和植物生长调节剂对银缕梅茎段侧芽萌发的影响

3.2.1 银缕梅茎段侧芽萌发的最适基本培养基筛选

不同基本培养基(MS、1/2MS 和 WPM)对银缕梅茎段侧芽萌发的影响差异显著(表 3)。以 MS 为基本培养基, 其萌芽率较低(58%), 玻璃化程度高, 生长状况不佳; 以 1/2MS 为基本培养基, 其萌芽率较高(71.2%), 但植株较细弱且玻璃化程度较高; 以 WPM 为基本培养基, 萌芽率最高(72%), 生长状态良好, 可作为银缕梅茎段侧芽萌发的最适基本培养基(图 1B)。

表 2 不同基本培养基对银缕梅侧芽萌发的影响
Table 2 Effects of different basic media on lateral bud germination of *Parrotia subaequalis*

Treatments	Number of inoculations	Germination rate (%)	Growth condition
MS	60	58.00±2.00 b	Severe vitrification symptoms observed
1/2MS	60	71.20±7.86 a	Moderate vitrification with thin shoots
WPM	60	72.00±4.00 a	Optimal germination with healthy morphology

数据为平均值±标准差; 同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。
Data are means±SD; Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$).

3.2.2 不同浓度植物生长调节剂单因素处理对银缕梅侧芽生长的影响

实验结果表明, 添加 KT 显著促进银缕梅侧芽萌发, 随着 KT 浓度的增加萌芽率呈现先升高后下降的趋势(表 3)。在添加 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT 的处理中萌芽率最高(91%), 与对照相比提高了 19% ($P<0.05$), 但萌发侧芽仅有 1 个, 并未产生丛生芽; 添加 $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT 与 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT 的处理无显著差异, 其它浓度处理都显著低于这 2 个处理($P<0.05$)。单独添加 $1.5\text{--}2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 对银缕梅侧芽萌发有促进作用, 但是与对照相比无显著差异, 添加 $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 时萌芽率可达 86%; 随着 6-BA 浓度的升高, 平均萌芽数显著高于添加 KT 的处理 ($P<0.05$), $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 处理组平均萌芽数最高, 达 1.17; 添加 6-BA 诱导侧芽的颜色较为翠绿, 且能够产生少量的丛芽, $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 处理组丛生芽诱导率可达 12.82%。单独添加 TDZ 处理组萌芽率并未显著高于对照, 不同浓度之间也无显著差异, 但平均萌芽数和丛生芽诱导率随着 TDZ 浓度的上升呈现先增加再降低的趋势, $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ 处理组最高, 平均萌芽数达 1.72, 丛生芽诱导率最高达 48.63%, 显著高于对照和添加 6-BA 和 KT 的处理, 此时开始出现丛生芽, 但丛生芽有畸形和玻璃化现象。

表 3 不同浓度植物生长调节剂单因素处理对银缕梅侧芽生长的影响

Table 3 The influence of single-factor treatments with different concentrations of plant growth regulators on the growth of lateral buds of *Parrotia subaequalis*

Treatments	Number of inoculations	Germination rate (%)	Induction rate of clustered buds (%)	Average number of germination	Growth condition
CK	60	72.00±4.00 bcd	0 d	1.00 c	Plants exhibited tender green coloration with no adventitious bud formation
KT 0.5	60	79.00±3.61 abc	0 d	1.00 c	No adventitious buds; larger leaves with dark green pigmentation
KT 1.0	60	91.00±3.61 a	0 d	1.00 c	No adventitious buds; larger leaves with distinct venation and emerald coloration
KT 1.5	60	84.00±9.65 abc	0 d	1.00 c	No adventitious buds; leaves maintained emerald green pigmentation
KT 2.0	60	71.00±5.29 bcd	0 d	1.00 c	No adventitious buds; greater leaf expansion with dark green coloration
KT 4.0	60	60.00±4.00 d	0 d	1.00 c	No adventitious buds; chlorotic leaves with crinkled morphology and defoliation
BA 0.5	60	68.00±7.94 cd	0 d	1.00 c	Plants showed yellow-green coloration with no adventitious bud formation
BA 1.0	60	71.00±5.57 bcd	7.89±0.84 cd	1.17±0.06 bc	Yellow-green plants with adventitious buds showing hyperhydricity
BA 1.5	60	86.00±5.29 ab	12.82±8.24 cd	1.13±0.14 bc	Adventitious bud formation with emerald green pigmentation
BA 2.0	60	81.00±3.61 abc	9.97±6.51 cd	1.13±0.15 bc	Adventitious buds with smaller leaf size
BA 4.0	60	70.00±13.12 bcd	7.69±4.44 cd	1.12±0.15 bc	Adventitious buds with narrow, fragile leaves and hyperhydricity
TDZ 0.001	60	59.00±3.61 d	12.5±6.25 cd	1.14±0.25 bc	Yellow-green plants with minute adventitious buds at shoot apical meristems
TDZ 0.01	60	74.00±10.44 abcd	21.01±10.87 bcd	1.25±0.22 bc	Dark green plants with adventitious buds and morphological abnormalities
TDZ 0.1	60	73.00±18.00 abcd	37.34±3.74 ab	1.54±0.19 a	Dark green plants with adventitious buds showing vitrification
TDZ 1.0	60	86.67±13.01 ab	48.63±9.37 a	1.72±0.10 a	Emerald green plants with dense adventitious buds, reduced plant size, and leaf tip necrosis
TDZ 2.0	60	86.67±14.03 ab	25.00±13.22 bc	1.26±0.22 b	Emerald green plants with elongated adventitious bud leaves, dwarfism, hyperhydricity, and malformation

数据为平均值±标准差; 同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Data are means±SD; Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$).

3.3 不同浓度 6-BA 和 TDZ 组合对银缕梅丛生芽增殖的影响

实验结果表明, 1.5 mg·L⁻¹ 6-BA 和不同浓度的 TDZ 组合处理对丛生芽增殖效果差异显著 ($P<0.05$) (表 4)。随着 TDZ 浓度的增加, 丛生芽的增殖系数显著降低, TDZ 浓度为 0.003–0.005 mg·L⁻¹ 时显著高于其它处理($P<0.05$), TDZ 为 0.005 mg·L⁻¹ 时, 增殖系数最大(4.5)。在平均芽长方面, 0.006 mg·L⁻¹ TDZ 处理芽长显著大于其它处理, 而其它处理之间

无显著差异。通过观察芽苗生长情况,发现随着 TDZ 浓度的增高,会出现少量黄叶或玻璃化现象,TDZ 浓度为 0.003 mg·L⁻¹ 时,丛生芽生长最好,颜色翠绿。因此,后续继代培养过程中可以选择不同浓度的 TDZ 与 1.5 mg·L⁻¹ 6-BA 组合进行培养(图 1D)。

表 4 不同浓度 6-BA 和 TDZ 组合对银缕梅丛生芽增殖的影响

Treatments		Bud proliferation coefficient	Average of buds length	Growth condition
6-BA (mg·L ⁻¹)	TDZ (mg·L ⁻¹)			
1.5	0.003	4.17±0.75 ab	1.73±0.24 b	Vigorous adventitious bud growth with emerald coloration and shoot elongation
	0.004	4±0.63 ab	1.67±0.23 b	Low adventitious bud induction with chlorosis and rooting occurrence
	0.005	4.5±0.83 a	1.57±0.11 b	Healthy adventitious bud growth accompanied by chlorosis and defoliation
	0.006	3.67±0.51 b	2.47±0.32 a	Optimal shoot elongation with limited adventitious bud formation and chlorosis
	0.007	3.67±0.51 b	1.69±0.15 b	Low bud induction rate with occasional defoliation and plant mortality
	0.01	1.26±0.24 c	1.21±0.39 b	Normal plant morphology with reduced leaf count and dwarfism
	0.1	1.51±0.25 c	1.58±0.72 b	Plant malformation with emerald leaves and pronounced basal adventitious buds

数据为平均值±标准差; 同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。
Data are means±SD; Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$).

3.4 银缕梅单芽生根培养与炼苗移栽

以 1/2MS 为基本培养基,添加不同浓度的 IBA 和 NAA 进行生根培养。培养 30 天,发现随着 IBA 浓度的增加,生根率逐渐降低。在仅添加 0.2 mg·L⁻¹ NAA 的生根培养基中,生根率最高(60%),且基部长出绿色的愈伤组织,不定根呈白色(表 5; 图 1E)。待苗高 2–3 cm、根长 1.5–2 cm 时进行炼苗移栽。移栽时,撕掉封口膜,置于驯化室炼苗 2 天,再打开瓶盖炼苗 3 天。炼苗后用镊子将组培苗从瓶内夹出,洗净根上残留的培养基,然后移栽到加入 0.1%多菌灵的混合营养土(草炭土:珍珠岩=3:1, v/v)基质中,用塑料盒盖住育苗盆使基质保温保湿。30 天后移栽成活率可达 90%以上(图 1F)。

表 5 不同浓度 IBA 和 NAA 对银缕梅生根的影响

Treatments	IBA (mg·L ⁻¹)	NAA (mg·L ⁻¹)	Rooting rate (%)
L0	0	0	50
L1	0.2	0	30
L2	0.4	0	30
L3	0	0.1	10
L4	0	0.2	60
L5	0.2	0.1	10
L6	0.2	0.2	10
L7	0.4	0.1	0
L8	0.4	0.2	0

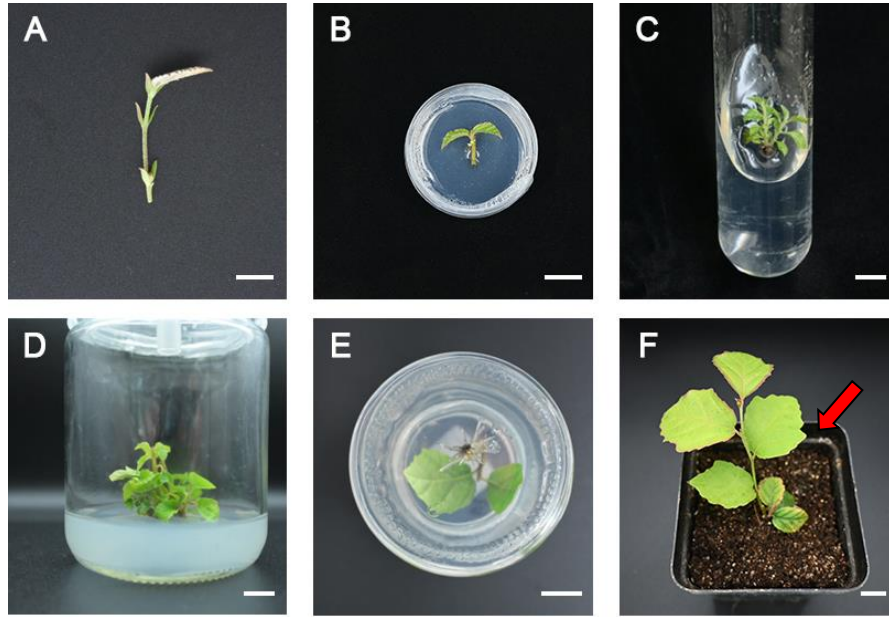


图1 银缕梅茎段离体再生体系的建立

(A) 茎段外植体; (B) 侧芽萌发; (C) 丛生芽诱导; (D) 丛生芽增殖; (E) 不定根诱导; (F) 生根苗移栽。Bars=1 cm
Figure 1 Establishment of in vitro regeneration system of *Parrotia subaequalis* stem segment
 (A) Stem explants; (B) Lateral bud germination; (C) Cluster bud induction; (D) Cluster bud proliferation; (E) Adventitious root induction; (F) Transplanting of rooting plantlets. Bars=1 cm

3.5 讨论

银缕梅作为古老的孑遗植物，在自然条件下其生殖过程中存在不易开花、种子败育率高等障碍(王立超等, 2015)，利用传统的种子繁育和扦插技术难以实现大量快速繁殖。植物组培快繁是目前突破珍稀濒危植物人工培育瓶颈的最有效途径。本研究选取银缕梅离体带芽茎段，通过对外植体消毒、初代培养、增殖培养、生根培养、驯化移栽等进行筛选优化，获得最优培养基和培养技术，侧芽诱导率高达 91%，增殖系数为 4.17，生根率达 60%，移栽驯化后生长良好。本研究建立了银缕梅离体快繁技术体系，对银缕梅的种质资源保护、老树复幼等提供重要的技术支撑。

在组织培养过程中，植物外植体和基本培养基的选取是影响成败的两大关键因素(谢纯刚等, 2023)，常用的外植体有种子、叶片、腋芽、叶柄、花芽及根尖等(李孟悦等, 2021; 张尚文等, 2024)。对于银缕梅组培技术的研究，赖辅鑫(2022)通过种子和茎段进行无菌培养，但诱导率较低，且无生根培养。在外植体选择上，本研究采用一年生实生苗幼嫩茎段，外植体处于幼龄状态，生长活力较高。银缕梅茎段细生绒毛，容易沾染细菌和真菌，NaClO 的浓度和消毒时间至关重要，要平衡好外植体消毒和植株活性两方面。通过前期预实验发现 0.52% NaClO 消毒效果较好，为明确消毒时间与植株存活率之间的关系进行了优化实验，发现处理 5 分钟效果最好，存活率可达 83%。0.52% NaClO 对植株的毒害作用随着消毒时间的延长而增大。基本培养基的种类对带芽茎段的初代培养影响显著，不合适的基本培养基会导致外植体产生褐化、玻璃化现象甚至死亡。银缕梅在 WPM 基本培养基中生长状态最好，植株翠绿，萌芽率达 72%。

金缕梅科不同属种之间对培养基中植物生长调节剂种类和配比要求不同，在诱导过程中常用 6-BA、NAA 及 2,4-D 等植物生长调节剂。张启香等(2005)以金缕梅种子作为外植体，将其接种在 $MS+1.0 \text{ mg} \cdot L^{-1} 6-BA+0.1 \text{ mg} \cdot L^{-1} NAA+0.1 \text{ mg} \cdot L^{-1} 2,4-D$ 培养基上，诱导愈伤组织再分化。裴云霞等(2022)以枫香(*Liquidambar formosana*)带芽茎段作为外植体，将其接种在 $WPM+0.75 \text{ mg} \cdot L^{-1} 6-BA+0.1 \text{ mg} \cdot L^{-1} NAA$ 培养基上，腋芽萌发率可达 100%。戴小英等(2009)以红花荷(*Rhodoleia championii*)茎段作为外植体，接种在 $MS+0.5 \text{ mg} \cdot L^{-1} 6-BA+0.2 \text{ mg} \cdot L^{-1} IAA+0.5 \text{ mg} \cdot L^{-1} AC$ 培养基上，增殖倍数可达 5。刘振湘(2020)以米老排(*Mytilaria laosensis*)腋芽作为外植体，将其接种在 $WPM+1.0 \text{ mg} \cdot L^{-1} 6-BA+0.1 \text{ mg} \cdot L^{-1} NAA$ 培养基中，增殖倍数最高达 3.66，苗高 4.33 cm，生长状态良好。但这些培养基组成用在银缕梅上诱导效果均不佳，因此表明种属间组培快繁培养基成分存在差异。

植物生长调节剂对器官的分化起重要作用(Singh et al., 2016; 康敏等, 2024)。KT 能够

促进细胞分裂和延缓衰老(Yu et al., 2024), 6-BA 能够促进侧芽生长及分化(Liu et al., 2024), TDZ 能够诱导植物细胞分裂并促进芽繁殖再生, 但是其浓度过高容易导致芽畸形且出现玻璃化(Lu et al., 2013)。经过单因素和双因素试验分析, 在丛芽诱导过程中 TDZ 与 6-BA 效果显著, 尤其是 TDZ 需要在较低水平上才能调节外植体侧芽达到较高的启动率, 降低其褐化率以及玻璃化现象。银缕梅丛生芽增殖最适植物生长调节剂组合为 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.003 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ, 附加 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和 0.8% 琼脂, pH5.7, 可以使丛生芽增殖系数达 4.17, 芽长增殖系数为 1.73。银缕梅不定根诱导比较困难, 本实验以 1/2MS 为基本培养基, 探讨了 IBA 和 NAA 协调培养对生根的影响, 结果表明, IBA 对银缕梅生根无促进作用, 随着 IBA 浓度的增加生根率反而降低, 两者配合使用的培养基中植株生根时间长, 根系生长较慢; 仅添加 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的处理生根效果最好, 生根率为 60%。

木本植物在组织培养过程中常出现褐化以及玻璃化等现象, 本研究初期也出现这些问题, 但是通过增加转接次数和间歇性培养使玻璃化植株进行转化, 且保持母株的优良性状。银缕梅组培快繁比较困难, 本研究以实生苗茎段为外植体, 为后续银缕梅老树枝条茎段离体培养打下基础。同时, 银缕梅春秋叶色多变, 不同颜色株系可能繁殖效率存在差异。下一步可考虑建立不同色系银缕梅快繁技术系统及探讨不同地理种源的银缕梅再生能力差异, 以从根本上解决银缕梅濒危的现状, 实现种质资源保护和开发利用。

作者贡献声明

张靓靓: 完成实验、数据分析和论文撰写; 汪贤挺: 提供银缕梅种源和外植体采集等; 陈勇: 银缕梅采集、穗圃种苗养护和移栽驯化; 朱逸凡, 卢新元: 参与组培实验; Zaitseva Svetlana Mikhailovna: 银缕梅组培实验设计; 杨海芸: 实验设计、实施, 数据分析与论文撰写的指导。

参考文献

- 戴小英, 田晓俊, 江香梅 (2009). 红花荷的组织培养与快速繁殖. 植物生理学通讯 **45**, 688.
- 邓懋彬, 金岳杏, 盛国英, 杨其生 (1997). 银缕梅花芽生长和开花习性的观察. 应用与环境生物学报(03), 226–229.
- 方炎明, 邓懋彬 (1996). 银缕梅木材解剖特征及其系统学意义. 植物资源与环境 (02), 50–54.
- 方炎明, 金岳杏, 邓懋彬, 杨其生, 李碧媛 (1997). 银缕梅叶器官的宏观与微观结构及系统意义. 植物资源与环境 (03), 36–42.
- 郝日明, 魏宏图, 刘晚苟 (1996). 银缕梅属花形态及其分类学意义. 植物资源与环境 (01), 38–42.
- 胡国伟 (2013). 银缕梅繁育技术及配方施肥研究. 硕士论文. 杭州: 浙江农林大学. pp. 11–12.
- 胡一民, 方国富, 骆绪美 (2011). 银缕梅的分类学地位、濒危原因与保护对策. 安徽林业科技 **37**(02), 46–48.
- 黄绍辉 (2004). 几种珍稀树种的引种繁育及生态学研究. 硕士论文. 南京: 南京林业大学. pp. 50–53.
- 黄绍辉, 方炎明, 张启香, 方顺请, 王波, 陈花 (2006). 银缕梅扦插繁殖试验. 西南林学院学报 (05), 94–96.
- 康敏, 张美莹, 齐秀双, 佟宁宁, 李旻, 舒庆艳, 刘政安, 吕长平, 彭丽平 (2024). 伊藤杂种‘和谐’组培快繁体系的建立. 植物学报 **59**, 441–451.
- 赖辅鑫 (2022). 濒危植物银缕梅种群恢复的初步研究. 硕士论文. 安庆: 安庆师范大学. pp. 24–46.
- 赖辅鑫, 阮向东, 赵凯, 台昌锐, 阳艳芳, 吴彦 (2022). 珍稀植物银缕梅濒危机理及繁育保护研究. 安庆师范大学学报(自然科学版) **28**(04), 83–88.
- 李孟悦, 刘柳, 刘艳, 张晓曼 (2021). 毛报春(*Primula pubescens*)腋芽再生组织培养体系的建立. 植物学报 **56**, 732–739.
- 刘明珍, 孙国鹏, 戴二宁 (2020). 银缕梅叶片中单宁提取纯化工艺的研究. 化学研究与应用 **32**, 684–688.
- 刘兴剑 (2000). 盆景新树种——小叶银缕梅. 花木盆景(花卉园艺) (04), 29.

- 刘兴剑, 郝日明 (1999). 小叶银缕梅. 植物杂志 (04), 6.
- 刘兴剑, 孙起梦, 窦剑 (2008). 珍稀树种银缕梅引种观察. 江苏农业科学 (04), 173–175.
- 刘兴剑, 汤诗杰, 姚淦, 熊玉宁 (2008). 银缕梅开花过程与花形态观察. 江苏农业科学 (06), 165–166.
- 刘振湘 (2020). 米老排组培快繁优化及愈伤诱导研究. 硕士学位论文. 北京: 中国林业科学研究院. pp. 32–40.
- 裴云霞, 曹健, 汪长江, 胡兴宜, 倪天虹, 管兰华, 杜克兵 (2022). 3 株枫香优株组培快繁体系的建立. 湖北民族大学学报(自然科学版) **40**, 367–373.
- 王立超, 石燕, 王金厚, 陆俊, 刘成功, 宋曰钦 (2015). 不同处理对银缕梅种子发芽的影响. 西北林学院学报 **30**(06), 151–155.
- 谢纯刚, 刘哲, 章书声, 胡海涛 (2023). 手指柠檬茎段离体再生体系建立. 植物学报 **58**, 926–934.
- 徐惠强, 郝日明, 姚志刚, 王中磊, 刘兴剑 (2001). 珍稀树种小叶银缕梅和宝华玉兰自然现状及其就地保护研究. 江苏林业科技 (05), 19–21.
- 张启香, 方炎明, 胡恒康, 黄绍辉 (2005). 金缕梅的组织培养. 植物生理学通讯 (05), 88.
- 张尚文, 黄诗宇, 杨天为, 李婷, 张向军, 高曼熔 (2024). 基于正交实验的赤苍藤组培快繁体系建立. 植物学报 **59**, 99–109.
- 郑学峰, 但德军 (2024). 银缕梅扦插育苗技术. 安徽林业科技 **50**(03), 49–51.
- 朱汤军, 岳春雷, 金水虎 (2008). 银缕梅和伴生植物光合生理生态特性比较. 浙江林学院学报 (02), 176–180.
- Lu J, Chen R, Zhang M, Da SJ, Ma G (2013). Plant regeneration via somatic embryogenesis and shoot organogenesis from immature cotyledons of *Camellia nitidissima* Chi. *J Plant Physiol* **170**, 1202–1211.
- Liu C, Deng J, Yan H, Huang H (2024). *In vitro* cluster buds regeneration and control of shoot tip necrosis in tissue cultures of *Trichosanthes cucumerina* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **159**, 24. <https://doi.org/10.1007/s11240-024-02883-6>.
- Singh CK, Raj SR, Jaiswal PS, Patil VR, Punwar BS, Chavda JC, Subhash N (2016). Effect of plant growth regulators on *in vitro* plant regeneration of sandalwood (*Santalum album* L.) via organogenesis. *Agrofor Syst* **90**, 281–288.
- Yu Q, Lin W, Yu X, Qin B, Liang Y, Wei F, Qin S, Wei K (2024). Research on the rapid tissue breeding technology of the endangered plant *Cibotium barometz* (L.) J. Sm. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **158**, 38. <https://doi.org/10.1007/s11240-024-02830-5>.

Establishment of Tissue Culture and Rapid Propagation System of Wild Plant *Parrotia subaequalis* Under National First Class Protection

Liangliang Zhang¹, Xianting Wang², Yong Chen³, Yifan Zhu¹, Xinyuan Lu¹, Zaitseva Svetlana Mikhailovna⁴, Haiyun Yang^{1*}

¹The State Key Laboratory of Subtropical Forest Cultivation, Key Laboratory of Bamboo Science and Technology, Ministry of Education, Bamboo Research Institute, Zhejiang A & F University, Hangzhou 311300, China; ²Anji Hynobius National Nature Reserve Management Center, Anji 313304, China;

³Lingfeng Temple Forest Farm, Anji 313304, China; ⁴National Agricultural Research University of Russia, Moscow 127550, Russia

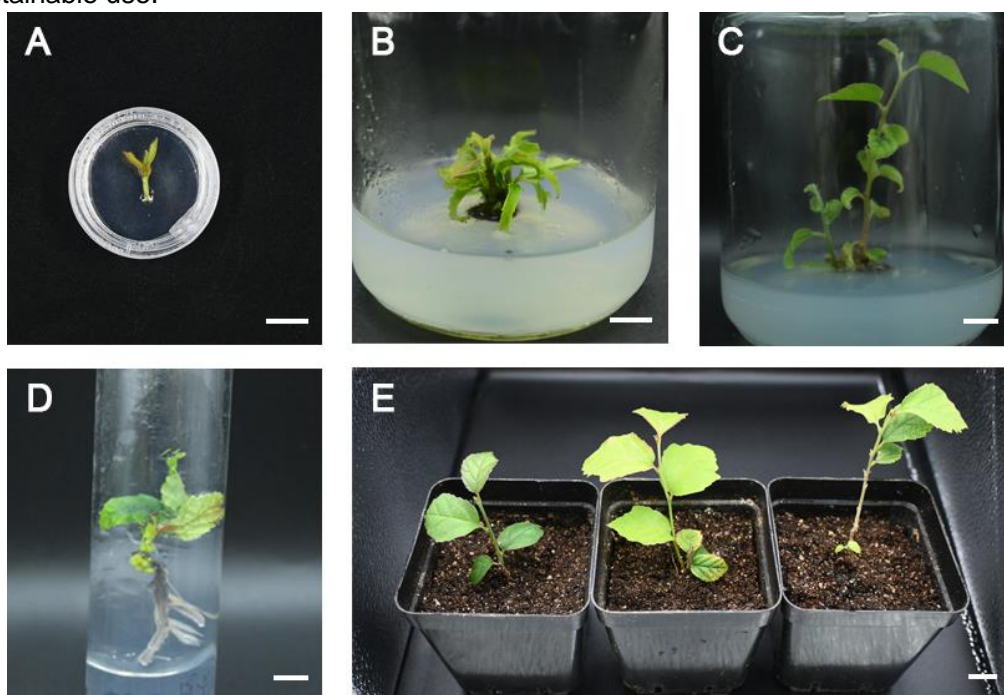
INTRODUCTION: *Parrotia subaequalis*, is a critically endangered wild plant species listed in the National Key Protected Wild Plants List of China and classified as Critically Endangered (CR) by the International Union for Conservation of Nature (IUCN). As a relic species from the Tertiary period, it holds significant scientific value for studying the early origin and differentiation of the *Hamamelidaceae* family in China. Despite its ecological and ornamental importance, *P. subaequalis* faces numerous threats to its survival, including low natural survival rates due to limited light adaptation, difficulties in pollination and seed set,

and challenges in vegetative propagation methods such as cutting and seed sowing. Tissue culture technology offers a promising approach to rapidly propagate this endangered species, overcoming the limitations of traditional propagation methods.

RATIONALE: This study aimed to establish an efficient tissue culture and rapid propagation system for *P. subaequalis* by investigating the effects of different disinfection methods, basic media, and combinations of plant growth regulators (PGRs) on lateral bud germination, proliferation, and adventitious root formation. By optimizing these factors, we sought to increase the survival rate and proliferation coefficient of *P. subaequalis* in vitro, thereby providing a reliable source of plant material for conservation and production purposes.

RESULTS: Disinfection Effects: The optimal disinfection method involved treating the shoot segments with 75% ethanol for 30 seconds followed by 0.52% NaClO for 5 minutes, resulting in an 83.33% survival rate. Lateral Bud Germination: The WPM basic medium showed the highest germination rate (72%) among the tested media (MS, 1/2MS, WPM). The addition of $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT significantly increased the germination rate to 91%, but without inducing multiple shoots. The combination of $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA and $0.003 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ yielded the best proliferation results, with a proliferation coefficient of 4.17. Adventitious Root Formation: Inducing adventitious roots in *P. subaequalis* was challenging, with high concentrations of auxins causing browning and death of shoots. The addition of $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA to 1/2MS medium resulted in a 60% rooting rate. Acclimatization and Transplantation: Rooted plantlets were successfully acclimatized and transplanted into a mixed substrate of peat moss and perlite (3:1, v/v) with a survival rate exceeding 90% after 30 days.

CONCLUSION: This study successfully established a tissue culture and rapid propagation system for *P. subaequalis*, significantly improving its survival rate and proliferation coefficient. The optimized protocols, including the use of WPM medium for lateral bud germination, a combination of $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA and $0.003 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ for proliferation, and $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA for root induction, provide a reliable method for the large-scale propagation of this endangered species. This system not only contributes to the conservation of *P. subaequalis* but also facilitates its utilization in landscaping and timber production. Future research could focus on exploring the regeneration capacity of different color morphs and geographical populations of *P. subaequalis* to further enhance its conservation and sustainable use.



Establishment of in vitro regeneration system of *Parrotia subaequalis* stem segment. (A) Lateral bud germination; (B) Cluster bud induction; (C) The clustered buds elongate and grow; (D) Adventitious root induction; (E) Transplanting of rooting plantlets. Bars=1 cm

Key words *Parrotia subaequalis*, endangered protected plant, tissue culture, cluster buds, proliferation

* Author for correspondence. E-mail: yhy2006@zafu.edu.cn

通讯作者团队简介

杨海芸团队长期从事组织培养快繁技术研究与应用，建立了濒危植物、竹子、珍贵树木、中草药等 100 余种植物组织培养快繁技术体系。发表研究论文 30 余篇。授权国家发明专利 12 项，成果转化 10 余项。