

我国特有珍稀濒危植物崖柏的离体快繁

周小雪^{1,2,3}, 邓洪平^{1,2,3}, 汤绍虎^{1,2,3,*}

¹三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆400715

²植物资源保护与种质创新重庆市重点实验室, 重庆400715

³西南大学生命科学学院, 重庆400715

摘要: 以崖柏(*Thuja sutchuenensis*)茎尖为外植体, 通过丛芽诱导、继代增殖和生根建立离体繁殖体系。结果表明, 先用体积分数为75%乙醇漂洗1 min, 再用质量分数为0.15%氯化汞消毒16 min, 表面消毒效果最好, 无菌外植体获得率为55.56%; 丛芽诱导最适培养基为1/2SH+2.0 mg·L⁻¹ Trans-ZT, 丛芽诱导率达100%; 最佳丛芽继代增殖培养基为1/2SH+2.0 mg·L⁻¹ Trans-ZT+0.2 mg·L⁻¹ NAA, 1~4代平均繁殖系数为12.40 (倍), 丛芽长势旺盛; 不定芽用100 mg·L⁻¹ IBA速蘸基部10 s后转入DCR基本培养基培养, 针叶型不定芽的生根率为76.67%, 最长不定根达13.5 cm。

关键词: 崖柏; 组织培养; 快速繁殖

崖柏(*Thuja sutchuenensis*)为柏科(Cupressaceae)崖柏属(*Thuja*)常绿乔木, 是我国特有珍稀濒危裸子植物和孑遗植物(汪松等2004)。崖柏于1892年4月被首次发现, 而后“绝迹”了100多年。1999年被重新发现后, 世界自然保护联盟(IUCN)于2003年将其评定为极度濒危物种。崖柏起源久远, 是研究裸子植物系统发育、古地理、古植物区系等的良好素材(王祥福等2007); 崖柏含有多种精油成分(吴章文等2010; 倪妍妍等2018), 其中最主要的萜类化合物具有较好的抑菌效果, 能帮助人体清热解毒、消肿消炎, 在一定程度上对治疗咳嗽、哮喘、高血压、冠心病等疾病也有功效(王亚琦2016; 周洁2016); 崖柏树根、树干的外形各异, 且树根纹理细腻、树干的木纹更是复杂多变, 是极好的根雕材料, 具有极高的艺术价值。总之, 被誉为“植物中的大熊猫”的崖柏用途广阔, 不仅具有重要的研究价值, 还蕴藏着巨大的开发潜力。

崖柏分布在我国重庆市城口县和开县海拔700~2 200 m的石灰岩山地(郭泉水等2015), 野生种群主要集中在重庆市大巴山国家级自然保护区(王鑫2017)。对崖柏野生种群调查研究发现, 种群年龄结构出现严重不连续现象, 幼苗幼树级个体数量不足且存活率较低, 数量有限, 生存状况严峻, 使种群的延续生长难以达到持续, 总体上崖柏种群处于极度衰退状态(刘建锋等2004), 亟待进行拯救繁育。种子繁殖试验表明, 崖柏的结实量极低, 种子数量严重缺乏, 并且大小年现象严重, 败育现

象严重, 且发芽率极低(朱莉等2014), 不具备通过种子大量繁殖的基本条件。扦插繁殖也因存在插穗资源有限、年龄效应、位置效应等诸多问题导致实验结果不理想, 生根率极低(金江群等2013)。所以, 对于有性繁殖困难, 繁殖材料极度缺乏的珍稀濒危树种而言, 植物组织培养可以克服这些问题, 成为其种群扩繁的重要途径。本文以崖柏为实验材料, 采用组织培养技术与方法, 以崖柏幼树茎尖为外植体, 通过丛芽诱导、继代增殖和生根建立离体快繁体系, 以期为崖柏种群扩繁提供可借鉴的繁殖技术, 为该树种的拯救繁育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料及其表面消毒

实验所用材料为崖柏(*Thuja sutchuenensis* Franch.)当年生枝条, 2017年10月采自重庆市大巴山自然保护区崖柏保护繁育基地。

剪取枝条茎尖部分(苗端) 5~6 cm, 先用稀释500倍的去油剂刷洗外植体表面, 冲洗干净后, 再用洗衣粉水轻刷外植体表面, 刷洗干净后用流水冲洗1~2 h。

在无菌条件下, 先用体积分数为75%的乙醇

收稿 2019-12-13 修定 2020-01-06

资助 国家林业和草原局“极小种群野生动植物资源拯救项目”(林规发2016-81号)和国家自然科学基金(31370317)。

* 通讯作者(tangsh@swu.edu.cn)。

消毒1 min, 无菌水冲洗3次, 再分别用质量分数为2% NaClO、5% NaClO、0.1% HgCl₂、0.15% HgCl₂消毒不同时间(8、12、16、20 min), 无菌水冲洗5次后, 切割成2~3 cm长的茎尖, 接种于1/2SH基本培养基中。每个处理分别接种12个外植体, 3次重复, 培养15 d后观察、统计外植体污染率和成活率。

1.2 茎尖的丛芽诱导

选取大小长势基本一致的无菌崖柏茎尖(长约2 cm)为外植体, 接种到以下含不同植物生长调节剂的培养基中: 1/2SH+2 mg·L⁻¹玉米素(Trans-ZT)+萘乙酸(NAA) (0、0.5 mg·L⁻¹); 1/2SH+2 mg·L⁻¹6-苄氨基嘌呤(6-BA)+NAA (0、0.5 mg·L⁻¹); 1/2SH+2 mg·L⁻¹细胞分裂素(KT)+NAA (0、0.5 mg·L⁻¹); 1/2SH+2 mg·L⁻¹噻苯隆(TDZ)+NAA (0、0.5 mg·L⁻¹)。每个处理分别接种12个外植体, 3次重复。培养60 d后观察并统计丛芽诱导率(形成不定芽的外植体数/接种外植体数)、繁殖系数和生长状况。

1.3 不定芽的继代增殖

分离、切割丛芽, 取大小一致的不定芽单芽(长2~3 cm), 接种到1/2SH+Trans-ZT (1、2、3、4 mg·L⁻¹)+NAA (0、0.2、0.4、0.6 mg·L⁻¹)培养基中进行继代培养。每个培养基接种12个不定芽, 3次重复。每隔60 d继代一次, 统计各代繁殖系数(培养后不定芽总数/接种不定芽数)及生长状况。

1.4 不定芽的生根与试管苗移栽

分离、切割丛芽, 选取大小基本一致、长势较好、茎长约3 cm的不定芽, 基部分别用100 mg·L⁻¹吲哚-3-丁酸(IBA)、100 mg·L⁻¹ ABT生根粉浸泡5~15 s后转入DCR基本培养基中。每个培养基接种8个不定芽, 3次重复。60 d后统计生根率、不定根数量和根长。

将生根良好的试管苗培养瓶移出培养箱, 拧松瓶盖室内放置2 d, 然后逐渐揭盖炼苗3 d。取出试管苗, 洗净根部琼脂, 用质量分数为5%的磷酸钠浸泡根部2 min, 移栽到营养钵中, 保持基质(蛭石:珍珠岩:丹麦品氏营养土=1:1:1)湿润, 30 d后统计成活率和观察生长情况。

1.5 培养条件与数据处理

基本培养基为1/2SH, 生根培养基为DCR。培养基含蔗糖30 g·L⁻¹、琼脂6.5 g·L⁻¹, pH 6.0。培养

温度为(25±1)°C, 光照强度为30 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光照时间12 h·d⁻¹。实验数据采用SPSS 22.0软件计算均值和进行统计分析, 利用Microsoft Excel对平均数和差异性制表作图。

2 实验结果

2.1 崖柏茎尖的表面消毒

经体积分数为75%的乙醇漂洗1 min, 再用质量分数为2% NaClO、5% NaClO、0.1% HgCl₂、0.15% HgCl₂消毒8~20 min的茎尖, 在1/2SH培养基中培养7 d后, 其污染情况及成活情况见表1。由表可知, 消毒时间相同时, HgCl₂的消毒效果整体上优于NaClO; NaClO溶液消毒的外植体褐化情况随浓度和消毒时间增加而加重。用质量分数为0.15%的HgCl₂消毒16 min时, 外植体的污染率较低(44.44%), 成活率最高(55.56%); 用质量分数为0.15%的HgCl₂消毒20 min时, 其污染率最低(41.67%), 但成活率明显降低(33.33%), 鳞叶出现褐化现象。综合来看, 在本试验中, 表面消毒剂以质量分数为0.15%的HgCl₂较好, 消毒时间以16 min最好。

2.2 崖柏茎尖的丛芽诱导

以崖柏茎尖无菌材料为外植体接种到设定的丛芽诱导培养基中进行培养(图1-A和B), 试验结果表明, 不同植物生长调节剂种类和浓度组合显著影响崖柏茎尖丛芽诱导(表2)。B₁、B₂、B₃、B₄培养基的诱导率均达到100%, 且丛芽生长状态较好, KT主要促进茎尖顶端鳞叶伸长生长, 丛芽诱导率低; TDZ导致外植体基部严重褐化, 鳞叶变黄, 且丛芽诱导率最低, 这说明Trans-ZT和6-BA比KT和TDZ更适于崖柏茎尖丛芽诱导; 比较B₁和B₂、B₃和B₄可得, NAA可使外植体基部膨大后产生少量愈伤组织, 但是单独使用Trans-ZT或6-BA比配合NAA使用对丛芽诱导效果更好。丛芽在B₁培养基中繁殖系数最高(11.31), 与次高的B₂培养基无明显差异, 与其他培养基之间存在显著性差异。B₁的丛芽嫩绿(图1-C), 生长状态最好。因此, 崖柏茎尖的丛芽诱导最适培养基为B₁培养基, 即1/2SH+2 mg·L⁻¹ Trans-ZT。

2.3 崖柏茎尖的不定芽继代增殖

在不同继代培养基中, 随着继代次数的增加, 丛芽繁殖系数呈先升高再逐步降低的趋势(表3)。

表1 不同消毒试剂和消毒时间对外植体污染率的影响

Table 1 Effects of disinfectants and times on explants' contamination rates

消毒剂	消毒时间/min	接种数	成活率/%	污染率/%	生长状态
2% NaClO	8	36	11.11	96.67	极大部分真菌污染, 少量褐化
	12	36	22.22	77.78	极大部分真菌污染, 部分褐化
	16	36	27.78	72.22	大部分真菌污染, 大部分褐化
	20	36	36.11	63.89	部分真菌污染, 大部分褐化
5% NaClO	8	36	30.56	77.78	部分真菌污染, 部分褐化
	12	36	27.78	69.44	部分真菌污染, 部分褐化
	16	36	36.11	66.66	部分真菌污染, 大部分褐化
	20	36	16.67	58.33	小部分真菌污染, 大部分褐化
0.1% HgCl ₂	8	36	22.22	72.22	极大部分真菌污染, 无褐化
	12	36	38.89	69.44	大部分真菌污染, 无褐化
	16	36	30.56	61.11	大部分真菌污染, 无褐化
	20	36	41.67	58.33	部分真菌污染, 小部分褐化
0.15% HgCl ₂	8	36	25.00	69.44	大部分真菌污染, 无褐化
	12	36	33.33	66.69	大部分真菌污染, 无褐化
	16	36	55.56	44.44	部分真菌污染, 无褐化
	20	36	33.33	41.67	小部分真菌污染, 部分褐化

基本培养基为1/2SH。消毒剂均为质量分数。

整体来看, 不定芽的长势随继代次数增加有所变弱, 老芽叶片颜色较新发出的嫩芽来说明显变黄, 且部分植株基部膨大后出现褐化现象, 这可能与Trans-ZT以及NAA在不定芽内的积累有关。在继代培养基上连续继代2次以上的丛芽部分分化出针形叶(图1-E和F), 这是崖柏幼化的表现。在1~4代的继代培养中, B₆培养基丛芽的繁殖效果最好, 平均繁殖系数最高, 达12.40倍; 与B₅、B₇培养基(分别为11.83、11.20倍)无显著差异, 但与其他培养基之间差异显著。然而, B₆培养基中的丛芽生长状态最好(图1-D)。综上, B₆培养基(1/2SH+2.0

mg·L⁻¹ Trans-ZT+0.2 mg·L⁻¹ NAA)为崖柏丛芽继代的最佳培养基。

2.4 崖柏不定芽的生根

本实验的结果表明, 只有针叶型不定芽能诱导生根, 鳞叶型不定芽基部膨大后未能诱导出根。针叶型不定芽接种后, 25 d左右开始产生白色不定根, 之后逐渐伸长, 60 d后形成较良好的根系。经不同生长调节剂处理的不定芽随着处理时间不同, 生长状态、不定根数量及长度等存在不同程度差异(表4)。经100 mg·L⁻¹ IBA刺激10 s不定芽的生根率最高达76.67%, 不定根长度也最长(12.65 cm), 不

表2 植物生长调节剂对丛芽诱导的影响

Table 2 Effects of plant growth regulators on induced cluster buds

培养基号	植物生长调节剂	接种茎尖数	丛芽诱导/%	繁殖系数/倍	生长状态
B ₁	2.0 Trans-ZT	12	100	11.31±1.21 ^a	很好, 芽嫩绿
B ₂	2.0 Trans-ZT+0.5 NAA	12	100	10.50±0.87 ^a	好, 少量愈伤
B ₃	2.0 6-BA	12	100	8.47±1.04 ^b	好, 芽浅绿
B ₄	2.0 6-BA+0.5 NAA	12	100	7.81±0.27 ^b	好, 少量愈伤
B ₅	2.0 KT	12	25.00	2.97±0.59 ^c	一般, 芽伸长
B ₆	2.0 KT+0.5 NAA	12	33.33	2.63±1.49 ^c	一般, 芽伸长
B ₇	0.5 TDZ	12	16.67	3.33±0.92 ^c	差, 基部褐化
B ₈	0.5 TDZ+0.5 NAA	12	25.00	2.43±0.14 ^c	差, 基部褐化

植物生长调节剂浓度单位均为mg·L⁻¹。不同小写字母表示不同处理间差异显著(P<0.05), 下同。

表3 Trans-ZT和NAA对丛芽继代的影响

Table 3 Effects of Trans-ZT and NAA on the subculture of cluster buds

培养基号	Trans-ZT/mg·L ⁻¹	NAA/mg·L ⁻¹	各代繁殖系数/倍				平均繁殖系数/倍	生长状态
			1	2	3	4		
B ₁	1.5	0	7.17	8.90	8.53	5.66	7.57±1.47 ^{efg}	一般
B ₂	1.5	0.2	7.83	10.38	9.70	6.57	8.62±1.74 ^{def}	较好
B ₃	1.5	0.4	7.74	8.26	9.13	6.20	7.83±1.23 ^{efg}	一般
B ₄	1.5	0.6	5.27	7.83	8.83	5.96	6.97±1.64 ^{bc}	一般
B ₅	2.0	0	10.67	14.33	12.27	10.03	11.83±1.92 ^{ab}	较好
B ₆	2.0	0.2	11.03	14.80	13.07	10.70	12.40±1.91 ^a	好
B ₇	2.0	0.4	9.90	12.37	12.27	10.27	11.20±1.29 ^{abc}	一般
B ₈	2.0	0.6	9.07	11.57	10.37	9.13	10.03±1.18 ^{bcd}	一般
B ₉	2.5	0	8.17	9.13	9.07	8.17	8.63±0.54 ^{def}	一般
B ₁₀	2.5	0.2	8.90	10.70	8.97	8.57	9.29±0.96 ^{cde}	好
B ₁₁	2.5	0.4	7.67	9.47	8.53	7.33	8.25±0.95 ^{defg}	较好
B ₁₂	2.5	0.6	7.74	9.26	8.43	7.10	8.13±0.93 ^{defg}	一般
B ₁₃	3.0	0	6.60	8.53	7.26	6.60	7.24±0.91 ^{efg}	一般
B ₁₄	3.0	0.2	7.23	8.83	8.20	7.17	7.85±0.80 ^{efg}	一般
B ₁₅	3.0	0.4	6.43	8.31	8.03	5.90	7.17±1.19 ^{fg}	一般
B ₁₆	3.0	0.6	5.66	7.74	6.63	5.43	6.37±1.05 ^g	较差

定芽生长状态较好, 抽生出新叶(图1-G), 叶嫩绿, 与其他培养基差异显著; 100 mg·L⁻¹ ABT生根粉处理10 s后不定芽生根数量最多(5.60条), 但生根率不高, 不定根较短且基部和不定根呈褐色。因此, 100 mg·L⁻¹ IBA速蘸崖柏不定芽基部10 s后接入

DCR培养基中为最佳生根方法。

2.5 崖柏的试管苗移栽

20株崖柏生根试管苗经炼苗后移栽到营养钵中, 30 d后存活13株, 成活率达65%, 移栽植株生长良好, 茎伸长长高, 有新鳞叶抽出(图1-H)。

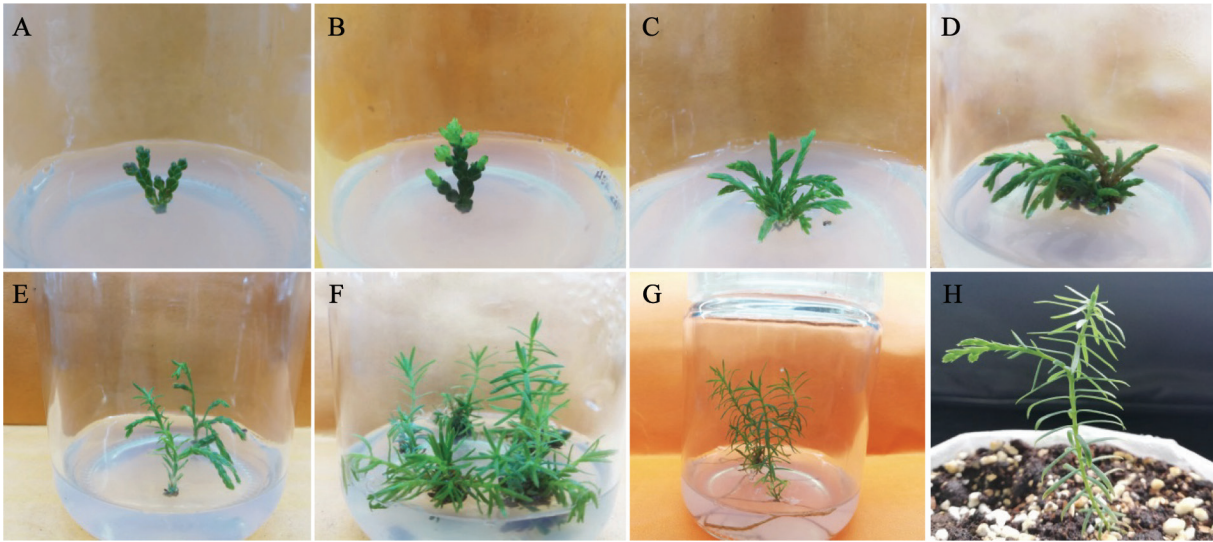


图1 崖柏的组织培养和快速繁殖

Fig.1 Tissue culture and rapid propagation of *Thuja sutchuenensis*

A: 刚接种的茎尖; B: 培养15 d后的茎尖; C: 诱导出的丛芽; D: 继代增殖的丛芽; E: 分化出的针叶型不定芽; F: 继代增殖的针叶型丛芽; G: 不定芽生根; H: 移栽到营养钵中30 d后的试管苗。

表4 植物生长调节剂对不定芽生根的影响

Table 4 Effects of plant growth regulators on rooting of adventitious buds

培养基号	植物生长调节剂	处理时间/s	接种数	生根率/%	根数	根长/cm
R ₁	100 IBA	5	8	63.33	1.40±0.20	7.58±0.11 ^b
R ₂	100 IBA	10	8	76.67	3.25±0.36	12.65±0.94 ^a
R ₃	100 IBA	15	8	53.33	2.20±0.25	5.86±0.35 ^c
R ₄	100 ABT生根粉	5	8	38.54	4.25±0.30	2.61±0.56 ^c
R ₅	100 ABT生根粉	10	8	51.24	5.60±0.86	4.19±0.20 ^d
R ₆	100 ABT生根粉	15	8	43.17	3.60±0.52	3.20±0.29 ^e

植物生长调节剂浓度单位均为mg·L⁻¹。

3 讨论

崖柏为中国特有树种,“绝迹”百余年后被重新发现,受到中国政府乃至国际社会的高度重视,我国相继建立了两个国家自然保护区,以期对该物种进行有效保护。崖柏现存种群和个体数量十分有限,拯救繁育工作刻不容缓,而植物组织培养成为其种群扩繁的重要途径。至今,对崖柏的组织培养研究只处于初步探索阶段(金江群2012),还未见完整的崖柏离体快繁体系的报道。本试验以当年生崖柏植株的茎尖为外植体,率先建立了崖柏的离体快繁体系。

试验研究发现,与大多数柏科植物一样,崖柏组织培养的困难之一是较难获得无菌材料,难以起始培养。由于崖柏枝叶为鳞叶状,角质层厚,其缝隙间容易藏匿各类微生物,又有油脂作为屏障,致使表面消毒时化学消毒剂很难彻底杀死鳞叶间的微生物,材料接入培养基后极易污染。所以,本试验在对茎尖材料表面消毒前先用稀释的去油剂清洗其表面油污,再适当延长消毒时间,结果以体积分数为75%的乙醇漂洗1 min,再用质量分数为0.15%的HgCl₂消毒16 min效果较好,但整体污染率还是较高。因此,其表面消毒方法有待进一步优化。

在崖柏丛芽诱导和增殖培养过程中发现,崖柏生长发育极为缓慢,需以60 d为一个继代周期,但整体增殖系数较高,在最佳继代培养基(1/2SH+2.0 mg·L⁻¹ Trans-ZT+0.2 mg·L⁻¹ NAA)中,平均增殖系数可达12.40倍。Trans-ZT作为一种高活性的天然细胞分裂素,广泛应用于植物组织培养,在金佛

山兰(童虹宇等2018)和毛棉杜鹃(赵富群等2017)的组培快繁中,适宜浓度的Trans-ZT能显著提高丛芽的增殖效果。本试验结果也表明,Trans-ZT诱导崖柏丛芽发生和促进丛芽增殖的效果比其他细胞分裂素更好。同时,本实验中还发现,连续不断的继代培养后材料表现出幼化现象,分化出只有在幼苗期才出现的针叶型不定芽,这与柏科植物中金黄球柏(齐力旺等1997)和绒柏(王建华等2006)的组培研究结果相似,叶形变化的发育特征可能与培养基中外源生长调节剂积累有关。幼化的材料枝叶嫩绿,不出现褐化现象,更易诱导分化,生长速度比鳞叶型不定芽快。

生根培养是柏科植物组培的瓶颈(金江群等2012),多种植物虽能获得无菌苗(无根苗),但未能成功诱导生根或生根率极低。金江群(2012)在崖柏组织培养研究中对其进行了5个月的生根培养,但未能成功生根。所以,本试验对崖柏进行生根培养时,突破传统的柏科植物生根培养方式,借鉴成功诱导蓝莓(阳翠等2016)和红阳猕猴桃(周月2013)组培苗生根的方法,以100 mg·L⁻¹ IBA速蘸不定芽基部10 s后接入DCR基本培养基结果成功诱导崖柏针叶型不定芽生根。针叶型不定芽相较鳞叶型不定芽叶片多,木质化程度低,芽更幼嫩,更有利于组培苗生根,这与吴玲利等(2019)对青钱柳的生根培养研究结果相似。鳞叶型不定芽可在下一步试验中尝试进行试管外生根。

本试验经过对崖柏两年多的组织培养研究,突破了崖柏无菌材料难以获得和生根困难两大难题,率先建立了崖柏离体快繁体系,为崖柏的离体繁殖和拯救保护奠定了基础。

参考文献(References)

- Guo QS, Qin AL, Ma FQ, et al (2015). Research progress on *Thuja sutchuenensis*: a critically endangered species in the world. *World For Res*, 28 (6): 18–22 (in Chinese with English abstract) [郭泉水, 秦爱丽, 马凡强等(2015). 世界极度濒危物种崖柏研究进展. *世界林业研究*, 28 (6): 18–22]
- Jin JQ (2012). The vegetative propagation of *Thuja sutchuenensis* and its physiological response to drying and rewetting (dissertation). Beijing: Chinese Academy of Forestry (in Chinese with English abstract) [金江群(2012). 崖柏无性繁殖及其对于干旱—复水的生理响应研究(学位论文). 北京: 中国林业科学研究院]
- Jin JQ, Guo QS, Zhu L, et al (2013). Study on cutting propagation of *Thuja sutchuenensis*, an endangered species endemic to China. *For Res*, 26 (1): 94–100 (in Chinese with English abstract) [金江群, 郭泉水, 朱莉等(2013). 中国特有濒危植物崖柏扦插繁殖研究. *林业科学研究*, 26 (1): 94–100]
- Jin JQ, Han SY, Guo QS (2012). Research advances and prospect in tissue culture of Cupressaceae. *World For Res*, 25 (2): 34–40 (in Chinese with English abstract) [金江群, 韩素英, 郭泉水(2012). 柏科植物组织培养研究现状与展望. *世界林业研究*, 25 (2): 34–40]
- Liu JF, Xiao WF, Guo ZH, et al (2004). A preliminary study on population structure and dynamics of a rare and endangered plant, *Thuja sutchuenensis* (Cupressaceae). *Acta Agr Univ Jiangxiensis*, 26 (3): 377–380 (in Chinese with English abstract) [刘建锋, 肖文发, 郭志华等(2004). 珍稀濒危植物—崖柏种群结构与动态初步研究. *江西农业大学学报*, 26 (3): 377–380]
- Ni YY, Zhang YT, Liu JF, et al (2018). Comparison of chemical constituents in volatile compounds from leaves of five *Thuja* species. *J Nanjing For Univ (Nat Sci Ed)*, 42 (6): 179–185 (in Chinese with English abstract) [倪妍妍, 张玉婷, 刘建锋等(2018). 崖柏属5种植物叶片挥发油成分分析. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 42 (6): 179–185]
- Qi LW, Han SY, Yang FY, et al (1997). Tissue culture and propagation *in vitro* of *Platycladus orientalis* (L.) France cv. *Semperaurescens*. *Acta Horti Sin*, 24 (1): 76–79 (in Chinese with English abstract) [齐力旺, 韩素英, 杨凤英等(1997). 金黄球柏离体培养及快速繁殖研究. *园艺学报*, 24 (1): 76–79]
- Tong HY, Zhou XX, Li J, et al (2018). Tissue culture and rapid propagation of rare and endangered *Tangsania nanchuanica*. *Plant Physiol J*, 54 (11): 1681–1686 (in Chinese with English abstract) [童虹宇, 周小雪, 李娟等(2018). 珍稀濒危植物金佛山兰的组培快繁. *植物生理学报*, 54 (11): 1681–1686]
- Wang JH, Qi LW, Han SY (2006). Tissue culture and plantlet regeneration of *Chamaecyparis pisifera* cv. 'Squarrosa'. *Plant Physiol Commun*, 42 (1): 76 (in Chinese with English abstract). [王建华, 齐力旺, 韩素英(2006). 绒柏的组织培养和植株再生. *植物生理学通讯*, 42 (1): 76]
- Wang S, Xie Y (2004). *China Species Red List* (Vol. 1). Beijing: Higher Education Press (in Chinese) [汪松, 解焱(2004). *中国物种红色名录(第1卷)*. 北京: 高等教育出版社, 305–306]
- Wang X (2017). Community characteristics and conservation strategies of the *Thuja sutchuenensis* Franch. (dissertation). Chongqing: Southwest University (in Chinese with English abstract) [王鑫(2017). 崖柏群落特征及其保护对策研究(学位论文). 重庆: 西南大学]
- Wang XF, Guo QS, Liu ZY, et al (2007). A composition analysis of seed plant flora in *Thuja sutchuenensis* community. *For Res*, 20 (6): 755–762 (in Chinese with English abstract) [王祥福, 郭泉水, 刘正宇等(2007). 崖柏群落种子植物区系组成分析. *林业科学研究*, 20 (6): 755–762]
- Wang YQ (2016). The research on the extraction technology and active function of *Thuja sutchuenensis* essential oil (dissertation). Changsha: Central South University of Forestry and Technology (in Chinese with English abstract) [王亚琦(2016). 崖柏精油提取及其功能性研究. 长沙: 中南林业科技大学]
- Wu LL, Han H, Zeng YL, et al (2019). Tissue culture and rapid propagation of *Cyclocarya paliurus*. *Plant Physiol J*, 55 (1): 61–68 (in Chinese with English abstract) [吴玲利, 韩航, 曾艳玲等(2019). 青钱柳组织培养及快速繁殖. *植物生理学报*, 55 (1): 61–68]
- Wu ZW, WU CC, Chen YH, et al (2010). Components of phytoncides in 8 Cupressaceae plants and their physiological efficacy analysis. *J Cent South Univ For & Technol*, 30 (10): 1–9 (in Chinese with English abstract) [吴章文, 吴楚材, 陈奕洪等(2010). 8种柏科植物的精气成分及其生理功效分析. *中南林业科技大学学报*, 30 (10): 1–9]
- Yang C, Wang J, Dong SW, et al (2016). The effect of different culture media on the rooting of blueberry shoots *in vitro*. *Plant Physiol J*, 52 (9): 1438–1442 (in Chinese with English abstract) [阳翠, 王军, 董顺文等(2016). 培养基组分对蓝莓组培苗瓶内生根的影响. *植物生理学报*, 52 (9): 1438–1442]
- Zhao FQ, Yin Q, Hong WJ, et al (2017). Tissue culture and rapid propagation of *Rhododendron moulmainense*. *Plant Physiol J*, 53 (9): 1666–1672 (in Chinese with English abstract) [赵富群, 尹茜, 洪文君等(2017). 毛棉杜鹃的组织培养与快速繁殖. *植物生理学报*, 53 (9): 1666–1672]
- Zhou J (2016). The research on antibacterial and microcapsule

- technology of *Thuja sutchuenensis* essential oil (dissertation). Changsha: Central South University of Forestry and Technology (in Chinese with English abstract) [周洁 (2016). 崖柏精油抑菌活性与微胶囊化研究(学位论文). 长沙: 中南林业科技大学]
- Zhou Y (2013). Study on establishment of high efficient regeneration system and transformation of an antimicrobial peptide gene *LJAMP2* into Hongyang kiwifruit (dissertation). Chongqing: Southwest University (in Chinese with English abstract) [周月(2013). 红阳猕猴桃高效再生体系的建立及抗病基因*LJAMP2*的导入(学位论文). 重庆: 西南大学]
- Zhu L, Guo QS, Zhu NN, et al (2014). Study on the cones and seeds biological characteristic of a critically endangered species, *Thuja sutchuenensis*, in the world. Seed, 33 (7): 56–59 (in Chinese) [朱莉, 郭泉水, 朱妮妮等(2014). 世界级极危物种——崖柏的球果和种子性状研究. 种子, 33 (7): 56–59]

***In vitro* rapid propagation of endemic, rare and endangered *Thuja sutchuenensis* in China**

ZHOU Xiaoxue^{1,2,3}, DENG Hongping^{1,2,3}, TANG Shaohu^{1,2,3,*}

¹Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Region, Ministry of Education, Chongqing 400715, China

²Chongqing Key Laboratory of Plant Resource Conservation and Germplasm Innovation, Chongqing 400715, China

³School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: *In vitro* rapid propagation system was established by using stem tips of *Thuja sutchuenensis* as explants. The results showed that the best surficial disinfected method was to first rinse 75% ethanol for 1 min, then 0.15% mercury chloride solution for 16 min, and the rate of obtaining sterile explants was 55.56%; the optimal medium for inducing cluster buds was 1/2SH+2.0 mg·L⁻¹ Trans-ZT, with an induction rate of 100%; the optimal subculture medium was 1/2SH+2.0 mg·L⁻¹ Trans-ZT+0.2 mg·L⁻¹ NAA, and the average reproduction coefficient of 1 to 4 generations was 12.40 times, and the buds grow well; the rooting rate of coniferous adventitious buds was 76.67% after it was quickly dipped with 100 mg·L⁻¹ IBA for 10 seconds and then transferred to DCR medium without plant growth regulators, and the longest root length was 13.5 cm.

Key words: *Thuja sutchuenensis*; tissue culture; rapid propagation

Received 2019-12-13 Accepted 2020-01-06

This work was supported by the National Forestry and Grassland Bureau “Minimal Population Wild Animal and Plant Resources Rescue Project” (Forestry Regulation No. 2016-81) and National Natural Science Foundation of China (31370317).

*Corresponding author (tangsh@swu.edu.cn).