

濒危植物四药门花的组培快繁

周玉洁^{1,2}, 韦雪芬¹, 申长青^{1,3}, 李焜钊¹, 孙朝辉¹, 黄久香^{1,*}

¹华南农业大学林学与风景园林学院, 华南农业大学中国南方石灰岩植物研究中心, 广州510642

²广州市住宅建筑设计院有限公司, 广州510642

³广东省乳源瑶族自治县林业局, 广东韶关512700

摘要: 以濒危植物四药门花茎段为外植体, 研究了四药门花组培快繁体系, 为四药门花的繁殖保护提供了科学依据。结果表明: (1)茎段外植体使用0.1% HgCl₂灭菌、灭菌时间10 min时, 成功率最高(90.59%)。 (2)茎段外植体叶腋芽诱导以MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+IBA 0.2 mg·L⁻¹为最佳的诱导培养基。 (3)最佳的增殖培养基为1/4MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+KT 2.0 mg·L⁻¹+IBA 0.2 mg·L⁻¹+AC 0.3 g·L⁻¹。 (4)最佳生根培养基为WPM+IBA 1.0 mg·L⁻¹。 (5)组培苗最佳的移栽基质为进口泥炭土, 30 d时存活率(100%)、苗高(6.24 cm)与冠幅(29.29 cm²)均为最大。

关键词: 四药门花; 濒危植物; 组织培养; 快速繁殖; 资源保护

四药门花 [*Loropetalum subcordatum* (Benth.) Oliv.] 属金缕梅科 (Hamamelidaceae) 檫木属 (*Loropetalum* R. Br.) 的常绿灌木或小乔木, 为中国特有的残遗植物 (张宏达2000)。该种野外植株数量极为稀少、分布区域狭窄、适应性较差, 自然更新困难, 被世界自然保护联盟 (International Union For Conservation of Nature, IUCN) 列为稀有植物, 也是我国II级稀有濒危植物、国家重点保护野生植物 (于永福1999)。该种目前已知现存的自然居群仅剩4个, 分别在香港、广西龙州、贵州茂兰和广东中山五桂山, 分布范围仍在缩小、种群数量不断下降 (陈晓熹等2016); 而且四药门花种子繁殖困难, 野外极少实生苗, 可见四药门花的繁殖保护已迫在眉睫。四药门花的扦插繁殖已有研究 (何妙坤等2013), 但大规模的扦插繁殖对野外种群破坏较大, 且不能在短期内获得大量苗木。组织培养可以克服常规无性繁殖速度慢、繁殖率低等缺点。近年来, 对四药门花的组培技术研究只处于初级探索阶段 (孙红梅等2015), 还未见完整的四药门花组培快繁体系的报道。本研究对四药门花进行了完整的组培快繁体系研究, 以期对四药门花的资源保护和繁殖利用提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为四药门花 [*Loropetalum subcordatum* (Benth.) Oliv.] 扦插苗的当年萌生茎段。四药门花

的插穗来自于广东中山五桂山, 选取树姿优美、生长健壮、无病虫害的植株采摘其当年生木质化枝条, 并于华南农业大学树木园扦插, 扦插的土壤与插穗均使用低浓度的多菌灵灭菌和适宜浓度的生根剂处理, 待到扦插苗生根成活后长出新梢时, 剪取新梢茎段作为组培外植体材料。

1.2 外植体灭菌与叶腋芽诱导培养基筛选

将外植体茎段剪切成10 cm左右长, 剪去叶片, 保留叶柄, 用软毛刷蘸洗洁净水轻轻刷洗枝条, 用自来水冲洗干净后置于超净工作台上。将茎段剪切成长2.0 cm左右, 含1~2个叶腋隐芽的茎尖和茎段, 用0.1%的 HgCl₂溶液分别灭菌5、8、10、12、15 min, 期间不断摇动, 用无菌水冲洗5~6次, 将茎段接种于叶腋芽诱导培养基中, 每瓶接种1个茎段, 每个处理接种60个茎段。叶腋芽诱导培养基选择MS为基本培养基, 植物生长调节剂选择6-苄氨基腺嘌呤 (6-BA) 1.0 mg·L⁻¹附加萘乙酸 (NAA) 0.05 mg·L⁻¹或吲哚丁酸 (IBA) 0.2 mg·L⁻¹, 以MS不附加任何植物生长调节剂为对照。35 d后统计污染率、褐化率、成功率、萌芽率和芽长。

污染率 (%) = 污染的外植体数 / 外植体的总数 × 100;

收稿 2019-01-10 修定 2019-04-28

资助 中山市国有森林资源中心 (广东省林业厅动植物保护处配套资金) (ZX134081)。

* 通讯作者 (jxhuang@scau.edu.cn)。

褐化率(%)=褐化的外植体数/未污染外植体总数 $\times 100$;

灭菌成功率(%)=未污染外植体总数/外植体的总数 $\times 100$;

萌芽率(%)=萌芽数/外植体的总数 $\times 100$ 。

1.3 增殖培养及最佳增殖培养基筛选

将诱导获得的叶腋芽剪切至增殖培养基[WPM+KT 2.0~10.0 mg $\cdot$ L $^{-1}$ +IBA 0.1~0.2 mg $\cdot$ L $^{-1}$ +活性炭(activated carbon, AC) 0.3~0.5 g $\cdot$ L $^{-1}$]中增殖, 大约60 d转接一代, 经过几代增殖后得到一定数量的继代苗。

1.3.1 不同基本培养基对四药门花组培苗增殖的影响

选取继代苗中生长健壮的单芽切成1.0 cm左右长的无顶芽茎段, 接种于MS、1/2MS、1/4MS和WPM四种基本培养基中, 所有培养基均附加 6-BA 2.0 mg $\cdot$ L $^{-1}$ +KT 2.0 mg $\cdot$ L $^{-1}$ +IBA 0.2 mg $\cdot$ L $^{-1}$ +AC 0.3 g $\cdot$ L $^{-1}$, 每瓶接种5个茎段, 每个处理接种30个茎段。60 d后统计芽增殖倍数、芽增殖诱导率、芽长、生根率、根数和根长。

芽增殖倍数=腋芽增殖的芽总数/外植体总数;

芽增殖诱导率(%)=萌芽的外植体数/外植体的总数 $\times 100$;

生根率(%)=生根的外植体数/外植体的总数 $\times 100$ 。

1.3.2 不同植物生长调节剂组合对四药门花组培苗增殖的影响

选取继代苗中生长健壮的单芽切成1.0 cm左右长的无顶芽茎段, 接种于不同植物生长调节剂组合的培养基中, 筛选增殖培养的最佳条件。每瓶接种5个茎段, 每个处理接种30个茎段。以1/4MS为基本培养基, 6-BA (0.5、1.0和2.0 mg $\cdot$ L $^{-1}$)与KT (0、2.0和10.0 mg $\cdot$ L $^{-1}$)为变量植物生长调节剂, 同时附加IBA 0.2 mg $\cdot$ L $^{-1}$ +AC 0.3 g $\cdot$ L $^{-1}$ 。60 d后统计芽增殖倍数、芽增殖诱导率、芽长、生根率、根数和根长。

1.3.3 不同活性炭浓度对四药门花组培苗增殖的影响

选取继代苗中生长健壮的单芽切成1.0 cm左右长的无顶芽茎段, 在培养基1/4MS+6-BA 2.0 mg $\cdot$ L $^{-1}$ +

KT 2.0 mg $\cdot$ L $^{-1}$ +IBA 0.2 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 中添加不同浓度的活性炭(0、0.1、0.3、0.5、1.0 g $\cdot$ L $^{-1}$), 筛选对增殖培养最有效的活性炭浓度。每瓶接种5个茎段, 每个处理接种30个茎段。60 d后统计芽增殖倍数、芽增殖诱导率、芽长、生根率、根数和根长。

1.4 最佳生根培养基筛选

将增殖获得的丛生芽中的健壮不定芽切成1.0 cm左右高的带顶芽的单芽茎段, 接种于不同的生根培养基中进行生根培养, 每瓶接种5个茎段, 每个处理接种30个茎段。选择2个基本培养基WPS、1/2WPS, 分别附加3个IBA浓度梯度0、1.0、2.0 mg $\cdot$ L $^{-1}$, 共6个处理。30 d后统计生根率、生根数、根长、芽长以及生长情况。

以上培养基均附加卡拉胶9 g $\cdot$ L $^{-1}$, 增殖培养基附加蔗糖30 g $\cdot$ L $^{-1}$, 生根培养基附加蔗糖20 g $\cdot$ L $^{-1}$, pH调至5.8~6.0; 高温高压条件下灭菌20 min; 培养条件为温度(25 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C, 光照强度40 μ mol $\cdot$ m $^{-2}$ $\cdot$ s $^{-1}$, 光照时间12 h $\cdot$ d $^{-1}$ 。

1.5 移栽

将生根良好的组培苗移出培养室至温室, 选择苗高3.0 cm以上且根系发达、茎叶健壮的生根苗从培养瓶中取出, 洗净在根系上附着的培养基, 移栽到装有适宜湿度基质的穴盘中, 盖上透明塑料穴盘盖保湿, 每10 d左右根据基质湿度进行喷水管理。移栽基质选用进口泥炭土(丹麦品氏0~6 mm规格)、进口泥炭土:黄心土=1:2、进口泥炭土:黄心土:河沙=1:2:1三种配比, 30 d后统计存活率、苗高、冠幅与生长情况。移栽温室的温度保持在(25 $\pm$ 4) $^{\circ}$ C, 空气相对湿度保持在70%以上。

2 实验结果

2.1 灭菌时间对四药门花外植体灭菌效果的影响

经过筛选(表1), 不同处理时间对四药门花茎段外植体的污染率、褐化率均产生了影响, 表明了灭菌时间对四药门花外植体诱导具有重要的作用。随着0.1% HgCl $_2$ 灭菌时间的增加, 从污染率看, 呈逐渐下降的趋势, 灭菌 15 min的污染率最低; 从褐化率看, 呈逐渐上升的趋势, 灭菌5 min的褐化率最低; 从成功率看, 先增加后降低, 灭菌成功率最高的为10 min, 达到90.59%。

表1 0.1% HgCl₂处理时间对四药门花外植体灭菌效果的影响

Table 1 Effect of 0.1% HgCl₂ treatment time on sterilization of explants of *L. subcordatum*

处理时间/min	污染率/%	褐化率/%	灭菌成功率/%
5	10.26±0.71 ^a	4.26±0.40 ^d	85.48±1.09 ^{bc}
8	8.69±0.56 ^b	4.82±0.56 ^d	86.49±4.44 ^{abc}
10	4.12±0.37 ^c	5.29±0.34 ^{cd}	90.59±2.99 ^a
12	3.25±0.08 ^{cd}	12.75±1.38 ^{ab}	84.00±3.60 ^{bc}
15	2.55±0.42 ^d	14.73±1.08 ^a	82.72±2.38 ^c

表格中同一指标不同处理数据的小写字母表示在 $P<0.05$ 水平上差异显著,下同。

2.2 不同植物生长调节剂组合对四药门花外植体叶腋芽诱导的影响

经过筛选(表2), 3个处理对外植体的萌发率和芽长有不同程度的影响。萌发率和芽长均显示处理组3为最佳植物生长调节剂组合, 即在MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+IBA 0.2 mg·L⁻¹培养基中其芽较长, 植株生长健壮, 叶片舒展、大而绿(图1-A)。

2.3 四药门花增殖培养条件的筛选

2.3.1 基本培养基的影响

经过筛选(表3), MS培养基比WPM培养基增殖倍数高, 但芽苗细弱, 有轻微玻璃化现象, 芽长较短, 叶片小(图1-B)。1/2MS培养基芽的增殖倍数较MS培养基显著提高, 但芽苗仍细弱, 叶小。1/4MS培养基的增殖倍数有所降低, 但芽长增加, 芽苗中等粗壮, 叶片中等大小, 叶色浓绿(图1-C)。WPM培养基的芽增殖倍数最小, 芽增殖诱导率最低, 但芽苗粗壮, 芽长最大, 叶片大而厚, 叶色浓绿, 生长的苗健壮(图1-D)。综上所述, 增殖培养时, 为快速获得数量较多又质量较好的丛生芽, 用1/4MS作为基本培养基是最佳选择; 如果需要比较健壮的不定芽时, 可以选择用WPM为基本培养基。四药门花极易生根, 在增殖培养基中生根也较为明显, 生根率达到了14.29%~98.67%, 但根数较少, 根长较短。

表2 不同植物生长调节剂组合对四药门花外植体叶腋芽诱导的影响

Table 2 Effect of different plant growth regulator combinations on the induction of axillary buds in explants of *L. subcordatum*

编号	植物生长调节剂种类及浓度			萌发率/%	芽长/cm
	6-BA/mg·L ⁻¹	NAA/mg·L ⁻¹	IBA/mg·L ⁻¹		
1	0	0	0	81.00±1.14 ^c	2.50±0.21 ^a
2	1.0	0.05	0	87.83±1.95 ^b	2.07±0.07 ^b
3	1.0	0	0.2	94.66±2.58 ^a	2.58±0.11 ^a

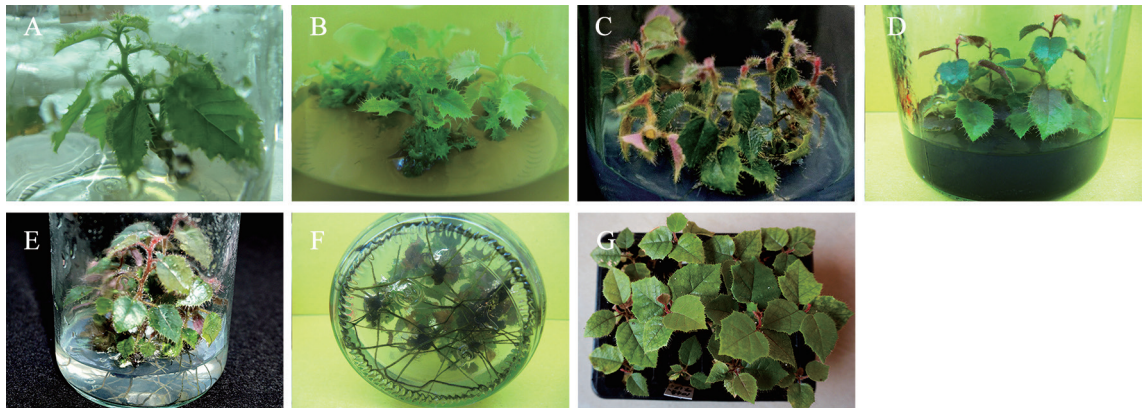


图1 四药门花的组培快繁

Fig.1 Tissue culture and rapid propagation of *L. subcordatum*

A: 四药门花茎段外植体叶腋芽诱导培养; B: 四药门花在MS培养基中的增殖情况; C: 四药门花在1/4MS培养基中增殖情况; D: 四药门花在WPM培养基中增殖情况; E: 四药门花最佳生根培养; F: 四药门花根的生长状态; G: 四药门花在进口泥炭土中的移栽生长情况。

表3 不同基本培养基对四药门花组培苗增殖效果的影响

Table 3 Effect of different basic medium on the proliferation of seedlings of *L. subcordatum*

基本培养基	芽增殖倍数	芽增殖诱导率/%	芽长/cm	生根率/%	平均根数/条	平均根长/cm
MS	2.58±0.13 ^c	80.72±6.27 ^b	1.64±0.04 ^d	14.29±1.47 ^d	0.16±0.05 ^c	0.17±0.05 ^d
1/2MS	3.81±0.18 ^a	100.00±0.00 ^a	1.80±0.04 ^c	44.29±2.25 ^c	1.85±0.16 ^b	0.56±0.09 ^e
1/4MS	3.00±0.17 ^b	100.00±0.00 ^a	2.44±0.05 ^b	89.58±6.32 ^b	2.24±0.17 ^b	1.11±0.05 ^b
WPM	1.92±0.09 ^d	69.33±5.16 ^c	2.77±0.06 ^a	98.67±1.66 ^a	4.07±0.25 ^a	1.58±0.07 ^a

2.3.2 不同植物生长调节剂组合的影响

植物生长调节剂组合筛选试验结果表明(表4), 附加6-BA浓度由0.5 mg·L⁻¹增加到1.0 mg·L⁻¹时, 芽增殖倍数有显著增加, 6-BA浓度继续提高到2.0 mg·L⁻¹时, 芽增殖倍数无显著差异。试验中发现6-BA与KT协同作用, 苗木生长较粗壮, 叶较大, 但附加KT的浓度对苗木生长差异不大。综合分析, 增殖培养基最佳组合是1/4MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+KT 2.0 mg·L⁻¹+IBA 0.2 mg·L⁻¹+AC 0.3 g·L⁻¹。在增殖培养基试验中, 四药门花也会有75.47%~94.64%的生根率。

2.3.3 不同浓度活性炭的影响

经过筛选(表5), 添加低浓度的活性炭(0.1和

0.3 g·L⁻¹)的处理, 芽增殖倍数和芽长较高。不添加活性炭, 苗木茎较细弱, 基部愈伤大; 而添加活性炭后, 苗木茎较粗壮, 愈伤小或无; 但活性炭浓度过高也会抑制芽的诱导, 降低诱导率。活性炭试验中四药门花也有生根, 随着活性炭浓度的增加, 生根率、根数和根长均先升高后降低, 说明活性炭浓度高于0.5 g·L⁻¹后抑制了根的发生。

2.4 基本培养基与植物生长调节剂对四药门花生根效果的影响

四药门花是极易生根树种, 增殖培养时有不同程度的生根, 但生根量较低, 因此有必要探索最佳生根培养基。经过筛选(表6), WPM的处理较1/2WPM的处理, 其株高和叶片大小均较优, 处理2

表4 不同植物生长调节剂组合对四药门花组培苗增殖效果的影响

Table 4 Effect of different plant growth regulator combinations on the proliferation of seedlings of *L. subcordatum*

6-BA/mg·L ⁻¹	KT/mg·L ⁻¹	IBA/mg·L ⁻¹	AC/g·L ⁻¹	芽增殖倍数	芽增殖诱导率/%	芽长/cm	生根率/%	平均根数/条	平均根长/cm
0.5	0	0.2	0.3	1.62±0.07 ^c	82.63±3.82 ^d	3.00±0.07 ^a	78.95±4.34 ^{cde}	2.53±0.20 ^{abc}	1.18±0.09 ^{bc}
0.5	2.0	0.2	0.3	2.96±0.14 ^a	92.86±3.43 ^{bc}	2.55±0.06 ^c	81.71±2.35 ^{bcd}	2.40±0.17 ^{bcd}	0.98±0.08 ^{cd}
0.5	10.0	0.2	0.3	2.47±0.13 ^b	90.91±5.22 ^{bc}	2.86±0.07 ^{ab}	94.64±4.42 ^a	2.82±0.21 ^{ab}	1.29±0.10 ^b
1.0	0	0.2	0.3	2.57±0.09 ^b	96.34±2.07 ^b	2.75±0.06 ^b	85.71±3.53 ^{abc}	2.01±0.14 ^{cd}	1.22±0.08 ^{bc}
1.0	2.0	0.2	0.3	3.00±0.12 ^a	100.00±0.00 ^a	2.78±0.07 ^b	84.85±4.61 ^{abc}	2.79±0.16 ^{ab}	1.82±0.09 ^a
1.0	10.0	0.2	0.3	3.14±0.15 ^a	100.00±0.00 ^a	2.33±0.06 ^{de}	91.55±5.18 ^{ab}	1.87±0.12 ^d	1.00±0.08 ^{bcd}
2.0	0	0.2	0.3	3.00±0.13 ^a	100.00±0.00 ^a	2.17±0.05 ^{de}	75.47±4.27 ^{de}	3.01±0.15 ^a	1.28±0.06 ^b
2.0	2.0	0.2	0.3	3.26±0.17 ^a	100.00±0.00 ^a	2.40±0.05 ^{cd}	77.03±3.22 ^{de}	2.49±0.20 ^{abc}	0.87±0.07 ^d
2.0	10.0	0.2	0.3	3.14±0.14 ^a	100.00±0.00 ^a	2.29±0.05 ^d	89.02±5.60 ^{ab}	2.33±0.14 ^{bcd}	1.10±0.09 ^{bcd}

表5 不同浓度活性炭对四药门花组培苗增殖效果的影响

Table 5 Effect of different concentrations of activated carbon on the proliferation of seedlings of *L. subcordatum*

AC/g·L ⁻¹	芽增殖倍数	芽增殖诱导率/%	平均芽长/cm	生根率/%	平均根数/条	平均根长/cm
0	2.93±0.12 ^c	100.00±0.00 ^a	2.72±0.04 ^c	65.38±5.36 ^c	1.00±0.00 ^d	0.64±0.03 ^d
0.1	3.47±0.16 ^{ab}	100.00±0.00 ^a	3.18±0.03 ^{ab}	90.14±1.24 ^a	2.29±0.22 ^a	1.18±0.08 ^{ab}
0.3	3.60±0.17 ^a	100.00±0.00 ^a	3.58±0.05 ^a	86.51±3.48 ^b	1.57±0.20 ^c	1.20±0.09 ^c
0.5	3.14±0.15 ^b	97.36±1.20 ^{ab}	2.98±0.03 ^b	73.61±4.69 ^{cd}	1.37±0.21 ^{bc}	1.17±0.10 ^{bc}
1.0	3.00±0.12 ^{bc}	95.22±3.57 ^b	2.76±0.03 ^b	67.69±5.94 ^{de}	1.26±0.18 ^{ab}	1.09±0.11 ^a

表6 基本培养基与植物生长调节剂水平对四药门花生根效果的影响

Table 6 Effect of basic medium and plant growth regulator levels on the rooting of *L. subcordatum*

编号	基本培养基	IBA/mg·L ⁻¹	生根率/%	平均根数/条	平均根长/cm	平均芽长/cm
1	WPM	0	93.58±2.51 ^b	1.14±0.13 ^c	1.77±0.07 ^c	3.19±0.05 ^c
2	WPM	1.0	100±0.00 ^a	5.97±0.23 ^a	3.14±0.54 ^a	3.79±0.05 ^a
3	WPM	2.0	100±0.00 ^a	6.40±0.39 ^a	2.19±0.09 ^b	3.89±0.05 ^a
4	1/2WPM	0	100±0.00 ^a	2.81±0.20 ^b	2.09±0.05 ^b	3.41±0.04 ^b
5	1/2WPM	1.0	100±0.00 ^a	5.78±0.31 ^a	2.23±0.06 ^b	3.45±0.05 ^b
6	1/2WPM	2.0	100±0.00 ^a	6.70±0.34 ^a	2.24±0.05 ^b	3.43±0.06 ^b

的根长显著高于处理3, 其他结果差异不显著, 故最佳生根培养基选择WPM+IBA 1.0 mg·L⁻¹ (图1-E和F)。

2.5 不同基质对四药门花移栽存活率及生长的影响

经过筛选(表7), 移栽30 d后, 进口泥炭土存活率最高, 且生长最良好(图1-G)。可能由于进口泥炭土透气性较好, 且营养成分含量高, 处理组2土壤透气性可能较处理组1和3差, 导致生长较差。

3 讨论

本研究中, 四药门花外植体采自扦插苗, 所以总体污染率较低。灭菌时间是植物外植体诱导成功与否的关键, 灭菌的时间长短, 不但影响了后期的污染率, 还关系着外植体的褐化率, 常选用的0.1% HgCl₂对植物体的伤害较大, 因此灭菌时间非常关键(张烨然等2016)。在本研究中, 随着升汞灭菌时间的加长, 污染率减少, 但褐化率逐渐升高, 这是由于随灭菌时间延长, 灭菌剂会对植物产生一定的毒害作用(马丽娜等2018), 灭菌的成功率受污染率和褐化率的综合影响, 在本研究中以灭菌10 min为最佳的处理。

MS培养基离子浓度和无机盐较高, 适宜于大多数的木本植物, 常被用于外植体的诱导和增殖培养。四药门花以MS作为基本培养基可以成功诱

导外植体萌芽, 但作为增殖培养基, 诱导效果欠佳, 苗木生长细弱, 芽长较短, 叶片薄而小, 叶色嫩绿(图1-B)。当降低MS中的无机盐的浓度为1/4时, 苗木增殖倍数和苗木生长质量均有提高, 其营养比例更加适合四药门花的增殖(邓桂秀等2011)。WPM培养基对四药门花芽的增壮和生根有较为明显的促进作用, 可能是WPM中含有适量的K₂SO₄对四药门花的生长有利, 增殖培养时可以作为优良的基本培养基。

BA是组织培养中较常使用的细胞分裂素, 能够有效的促进芽的形成, 细胞脱分化到形成分生组织需要细胞分裂素和生长素的共同激发, 并且通常情况下, 高浓度的细胞分裂素和低浓度的生长素更加有益于增殖(臧文静等2015)。本研究中, 外植体诱导时添加6-BA 1.0 mg·L⁻¹附加生长素NAA 0.05 mg·L⁻¹或IBA 0.2 mg·L⁻¹促进了外植体叶腋芽的萌发。增殖培养中添加6-BA 0.5~2.0 mg·L⁻¹, 附加IBA 0.2 mg·L⁻¹对不定芽的诱导和生长有显著的促进作用。

KT对较多的植物增殖效果明显(尹明华等2011)。而本试验中, KT与6-BA同时加入可以起到协同作用, 对增殖结果有较为明显的影响, 但两者适宜比例条件需摸索, 经过筛选, KT与6-BA为2:1时效果达到最佳。

表7 不同基质对四药门花移栽成活率及生长的影响

Table 7 Effect of different substrates on the survival rate and growth of *L. subcordatum*

编号	进口泥炭土	黄心土	河沙	存活率/%	苗高/cm	冠幅/cm ²
1	1	0	0	100.00±0.00 ^a	6.24±0.30 ^a	29.29±7.31 ^a
2	1	2	0	83.33±2.24 ^c	4.54±0.45 ^c	14.95±2.07 ^c
3	1	2	1	91.67±3.23 ^b	5.20±0.21 ^b	19.60±3.96 ^{bc}

活性炭是一种无机吸附剂, 吸附能力强, 同时对植物生长有较大的促进效果, 常被应用于组织培养中(赵富群等2017)。四药门花在组织培养过程中会分泌较多褐色的酚类物质, 在增殖培养中添加活性炭之后, 有利于对酚类物质的吸收, 从而促进生长, 愈伤也有所减小, 同时芽的增殖倍数有所升高, 苗的生长较为健壮, 但平均芽长随着添加活性炭浓度的提高先升高再下降, 表明了过高的活性炭对增殖也有一定的抑制效果。主要因为高浓度的活性炭也会吸附培养基中的植物生长调节剂, 导致作用于茎段的植物生长调节剂浓度降低(王丽萍等2008)。

植物生长调节剂能够对植物生根产生促进作用, 会影响植物的营养分配、细胞分裂和伸长, 但是浓度并非越高越好, 仅在一定的范围内对植物才具有促进作用(周亮2015)。IBA能够加速植物细胞中的酶的代谢(姜宗庆等2018), 从而促进植物根系的发生和生长。本研究中, 添加IBA后对四药门花的生根数量和根长有显著的促进作用。四药门花极容易生根, 因此添加低浓度的IBA ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 即可达到较佳的效果。

基本培养基对生根也存在显著影响, MS为基本培养基时, 四药门花生根率只有14.29%, 而在附加同样的植物生长调节剂条件下, 将MS培养基中的大量元素降低为1/4时, 四药门花的生根率达到了89.58%, WPM培养基更加有利于四药门花生根, 同样的植物生长调节剂条件下, 四药门花生根率达到了98.67%, 说明基本培养基中的营养元素不仅可以提供组培苗生长所必须的营养, 对四药门花这种植物还可以促进生根。

参考文献(References)

- Chen XX, Shen CQ, Hong WJ, et al (2016). Distribution of *Loropetalum subcordatum* in Zhongshan Wuguishan, a plant species with extremely small populations. *J Anhui Agric Sci*, 44 (23): 1–3 (in Chinese with English abstract) [陈晓熹, 申长青, 洪文君等(2016). 极小种群植物四药门花在中山五桂山的种群分布. *安徽农业科学*, 44 (23): 1–3]
- Deng GX, Yu H, Song PF, et al (2011). Effect of different basic media on proliferation and growth of clumpy shoot of southern highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* hybrids). *J Plant Resour Environ*, 20 (1): 60–64 (in Chinese with English abstract) [邓桂秀, 於虹, 宋鹏飞等(2011). 不同基本培养基对南方高丛蓝浆果丛生枝增殖及生长的影响. *植物资源与环境学报*, 20 (1): 60–64]
- He MK, Huang JX, Huang CT, et al (2013). Study on the propagation technique of *Loropetalum subcordatum*. *Practical For Technol*, (11): 50–53 (in Chinese) [何妙坤, 黄久香, 黄川腾等(2013). 四药门花扦插繁殖技术研究. *林业实用技术*, (11): 50–53]
- Jiang ZQ, Li CZ, Yu L, et al (2018). Regulating effects of exogenous IBA on stem cutting and activity of related enzymes during rooting of *Carya illinoensis*. *Jiangsu Agric Sci*, 46 (7): 152–154 (in Chinese with English abstract) [姜宗庆, 李成忠, 余乐等(2018). 外源IBA对薄壳山核桃嫩枝扦插及其生根过程中相关酶活性的调控效应. *江苏农业科学*, 46 (7): 152–154]
- Ma LN, He J, Li G (2018). Tissue culture and rapid propagation of *Ziziphora bungeana* Juz. *Plant Physiol J*, 54 (8): 1349–1355 (in Chinese with English abstract) [马丽娜, 何江, 李冠(2018). 新塔花的组织培养与快速繁殖. *植物生理学报*, 54 (8): 1349–1355]
- Sun HM, Chen Y, Liang YX, et al (2015). Preliminary study on tissue culture of endangered plant *L. subcordatum*. *Xiandai Horti*, (4): 12–13 (in Chinese) [孙红梅, 陈彦, 梁银兴等(2015). 濒危植物四药门花的组织培养研究初探. *现代园艺*, (4): 12–13]
- Wang LP, Dong LF, Jia CX, et al (2008). Optimum alternate cycles and concent of activated carbon's in test tube seedling cultivation of Chinese pine. *J Northwest For Univ*, 23 (5): 79–83 (in Chinese with English abstract) [王丽萍, 董丽芬, 贾彩霞等(2008). 油松试管苗培养中活性炭最适交替周期及浓度的研究. *西北林学院学报*, 23 (5): 79–83]
- Yin MH, Nie FQ, Hu WT, et al (2011). Effects of KT and NAA on the proliferation and differentiation of *Dendrobium candidum* protocorm. *Heilongjiang Agric Sci*, (8): 25–26 (in Chinese with English abstract) [尹明华, 聂凤琴, 胡文韬等(2011). NAA和KT对铁皮石斛原球茎增殖与分化的影响. *黑龙江农业科学*, (8): 25–26]
- Yu YF (1999). A milestone in the protection of wild plants in China—National Key Protected Wild Plants List (1st Batch). *Plants*, (5): 3 (in Chinese) [于永福(1999). 中国野生植物保护工作的里程碑——《国家重点保护野生植物名录(第一批)》出台. *植物杂志*, (5): 3]
- Zang WJ, Chen Y, Li Q, et al (2015). Tissue culture differentiation and callus induction of different explant from *Pennisetum americanum* × *P. purpureum*. *Prata Sci*, 32 (9): 1451–1456 (in Chinese with English abstract) [臧文静, 陈莹, 李青等(2015). 杂交狼尾草不同外植体愈伤组织诱导. *草业科学*, 32 (9): 1451–1456]

- Zhang HD (2000). Higher Flora of China: Hamamelidaceae. Qingdao, Shandong: Qingdao Publishing House, 3: 710 (in Chinese) [张宏达(2000). 中国植物志: 金缕梅科. 山东青岛: 青岛出版社, 3: 710]
- Zhang YR, Peng YJ, Ma Q, et al (2016). Rapid propagation system of *Catalpa bungei* and *C. fargesii* Bur. f. *duclouxii*. J North Forestry Univ, 44 (11): 5–9 (in Chinese with English abstract) [张烨然, 彭言劫, 马勤等(2016). 楸树与滇楸组培快繁技术. 东北林业大学学报, 44 (11): 5–9]
- Zhao FQ, Yin Q, Hong WJ, et al (2017). Tissue culture and rapid propagation of *Rhododendron moulmense*. 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 L (2015). Effects of NAA and IBA on the rooting of *Verbena bonariensis*. J North Forestry Univ, 30 (5): 161–164 (in Chinese with English abstract) [周亮(2015). NAA和IBA生根剂对柳叶马鞭草插条生根的影响. 西北林学院学报, 30 (5): 161–164]

Tissue culture and rapid propagation of the endangered plant *Loropetalum subcordatum*

ZHOU Yu-Jie^{1,2}, WEI Xue-Fen¹, SHEN Chang-Qing^{1,3}, LI Kun-Zhao¹, SUN Zhao-Hui¹, HUANG Jiu-Xiang^{1,*}

¹South China Limestone Plants Research Center, College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

²Guangzhou Residential Architectural Design Institute Co., Ltd., Guangzhou 510642, China

³Forestry Bureau of Ruyuan Yao Autonomous County, Guangdong Province, Shaoguan, Guangdong 512700, China

Abstract: To provide a scientific basis for the reproduction and protection of this endangered plant, complete tissue culture and rapid propagation system of *Loropetalum subcordatum* was studied with the young stem segment as explants. There were five main results of this research: (1) Stem explants were sterilized with 0.1% HgCl₂, the best sterilization time was 10 minutes, and the highest success rate was 90.59%. (2) MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+IBA 0.2 mg·L⁻¹ was the best inducing culture. (3) The best proliferation medium was 1/4MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+KT 2.0 mg·L⁻¹+IBA 0.2 mg·L⁻¹+AC 0.3 g·L⁻¹. (4) The best rooting medium was WPM+IBA 1.0 mg·L⁻¹. (5) The best transplanting substrate for tissue culture plantlets was imported peat soil. The survival rate (100%), seedling height (6.24 cm) and crown width (29.29 cm²) were the highest on the 30th day.

Key words: *Loropetalum subcordatum*; endangered plant; tissue culture; rapid propagation; resources conservation

Received 2019-01-10 Accepted 2019-04-28

This work was supported by Zhongshan Forest Resource Center (Supporting Funds of Animal and Plant Protection Department, Guangdong Forestry Department) (ZX134081).

*Corresponding author (jxhuang@scau.edu.cn).