

研究报告 Original Papers

珍稀濒危植物金佛山兰的组培快繁

童虹宇¹, 周小雪¹, 李娟¹, 邓洪平¹, 王茜¹, 周启贵¹, 汤绍虎^{1,*}, 张军², 李中娟², 陈玉菡²¹西南大学三峡库区生态环境教育部重点实验室, 生命科学学院, 重庆400715²重庆市药物种植研究所, 重庆408435

摘要: 以金佛山兰子房、柱头等为外植体, 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, 丛芽诱导最佳外植体为子房, 最适培养基为MS+2.0 mg·L⁻¹ ZT+0.2 mg·L⁻¹ NAA; 最佳丛芽继代培养基为MS+1.5 mg·L⁻¹ ZT+0.15 mg·L⁻¹ NAA, 1~4代平均繁殖系数为4.76倍, 丛芽长势良好; 最佳生根培养基为1/2MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA+0.05 mg·L⁻¹ 6-BA, 生根率达100%, 根长为3.95 cm。试管苗移栽到金佛山自然生境, 60 d后的移栽率达60%, 且生长良好。

关键词: 金佛山兰; 组织培养; 快速繁殖

金佛山兰(*Tangtsinia nanchuanica*)属兰科(Orchidaceae)头蕊兰亚族金佛山兰属, 草本。植株高15~35 cm; 根状茎粗短, 具多数粗2.5~4.0 mm的肉质纤维根; 叶4~6枚, 叶片椭圆形、椭圆状披针形或披针形, 纸质, 长6~9 cm, 先端急尖或渐尖; 总状花序长3~6 cm, 顶端具宿存的蕊柱, 退化雄蕊5枚, 一般生于700~2 100 m林下透光处、灌丛边缘和草坡上。金佛山兰由我国植物学家陈心启在重庆市南川金佛山发现和定名, 并认定为我国特有单属单种植物(陈心启1965); 主要分布于重庆市南川区金佛山、四川邻水县华釜山中段和贵州省桐梓境内, 现濒于灭绝, 被载入《国家重点保护野生植物名录》, 并列为国家二级重点保护植物(傅立国1991)。兰科是被子植物大科之一, 约有700属(Atwood 1986)。我国拥有很多原始类群, 金佛山兰是其中之一(陈心启1978, 1979, 1982), 其花形美丽, 跟头蕊兰属的金兰(*Cephalanthera falcata*)十分相似, 但金兰的花冠两侧对称, 具有明显特化的唇瓣。金佛山兰以其近辐射对称的花被、顶生柱头及5枚退化雄蕊等特征, 显现出比兰亚科(Subfam. Orchidoideae)中最原始的头蕊兰属更原始的特征, 它的发现对研究兰亚科的系统发育具有十分重要的意义(中国科学院中国植物志编辑委员会1999)。另外, 它还具有一定的药用价值, 全草入药, 具有清热祛痰的功效(中国药材公司1995)。

兰科植物在我国已有近2 000年的历史(陈心启1988), 繁殖方法主要有种子繁殖、离体快繁等(陈发兴等2002; 卜朝阳等2010; 霍丽丽等2010; 李

婧嫻等2010)。关于金佛山兰的离体繁殖鲜少有报道, 仅见陈晓麟和李铭(2006)诱导愈伤组织的研究。金佛山兰自花授粉, 自然结实率低, 不具有以有性繁殖扩大种群数量的优势, 人工栽培不易存活, 种群数量仍在减少(李铭和陈晓麟2002; 陈晓麟和李铭2006)。本试验以金佛山兰的子房等为外植体, 通过丛芽诱导、继代增殖和生根建立离体繁殖体系, 为扩大金佛山兰的植株数量和实现野外回归提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料及其表面消毒

实验材料为金佛山兰(*Tangtsinia nanchuanica* S. C. Chen)开花植株, 2016年3月采自重庆金佛山国家级自然保护区的北坡海拔约1 320 m林下。

截取植株的花枝和茎叶枝条, 洗净。在无菌条件下, 先用75%酒精消毒30 s, 无菌水冲洗1次; 后用0.1% HgCl₂消毒8 min, 无菌水冲洗5~6次, 沥干。切取子房、柱头、叶片、茎段、根等为外植体, 待接种。

1.2 丛芽诱导与不定芽继代增殖

丛芽诱导培养基设4种: (1) MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA; (2) MS+2.0 mg·L⁻¹ ZT+0.2 mg·L⁻¹ NAA; (3) MS+0.2 mg·L⁻¹ 6-BA+2.0 mg·L⁻¹

收稿 2018-08-23 修定 2018-11-05

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)。

NAA; (4) MS+0.2 mg·L⁻¹ 6-BA+2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D。将子房、柱头等外植体分别接种、培养, 30 d后统计丛芽诱导率、增殖系数(形成不定芽数/接种外植体数)和生长状况。

分离、切割丛芽, 取大小一致的单个芽(长1~2 cm)接种于含不同浓度ZT (0.5~2.0 mg·L⁻¹)和NAA (0.05~0.20 mg·L⁻¹)的丛芽继代培养基中继代培养, 60 d后统计各代繁殖系数(培养后不定芽总数/接种不定芽数)。每个培养基接种12个不定芽, 3次重复。

1.3 不定芽生根与试管苗移栽

分离、切割丛芽, 取大小一致、长2~3 cm的不定芽, 接种在含不同浓度NAA (0~4.0 mg·L⁻¹)、6-BA (0~0.5 mg·L⁻¹)和IBA (0~2 mg·L⁻¹)的生根培养基中, 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连瓶移出培养箱, 拧松培养瓶盖, 室内放置5 d, 然后逐渐揭盖炼苗2 d。取出试管苗, 洗净根部琼脂, 用5%磷酸钠浸泡根部2 min, 移栽到营养钵中再炼苗1~2周后移栽到田间。其间保持基质(草苔藓:泥炭土=1:3, 常规高压

灭菌)湿润, 每隔4~6 d用“百菌清”喷洒表面。幼苗移栽田间让其自然生长, 60 d后统计成活率并观察生长情况。

1.4 培养条件与数据处理

基本培养基为MS, 生根为1/2MS。培养基含蔗糖30 g·L⁻¹、琼脂6.5 g·L⁻¹, pH 5.8。培养温度为(24±1)°C, 光照强度为20 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 金佛山兰的丛芽诱导

外植体接种的结果表明, 金佛山兰分化能力较弱, 大部分外植体没有明显脱分化和直接再分化。培养30 d, 子房外植体明显膨大, 且保持绿色(图1-B); 柱头略微膨大变黑; 叶片稍有膨大; 茎段略见伸长; 根段和其他外植体无明显变化, 4个不同培养基之间无明显差异。之后除子房外, 其余外植体逐渐变成暗绿色或淡黄色, 直至褐化死

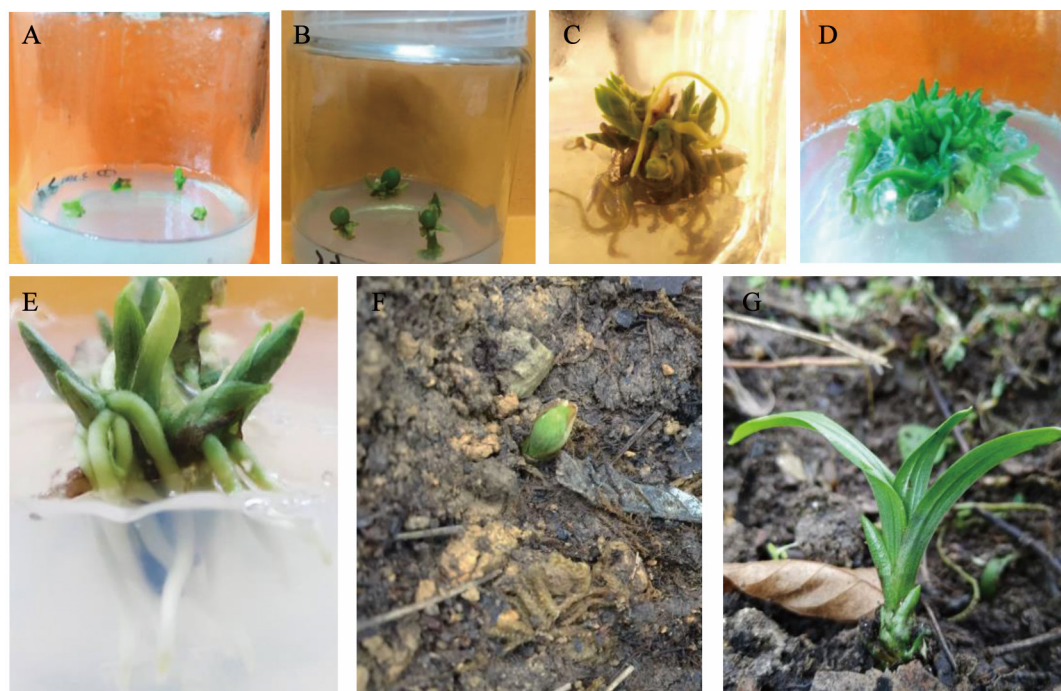


图1 金佛山兰的组织培养和快速繁殖

Fig.1 Tissue culture and rapid propagation of *T. nanchuanica*

A: 刚接种的子房; B: 培养30 d后的子房; C: 诱导出的丛芽; D: 继代增殖的丛芽; E: 不定芽生根; F: 移栽田间的试管苗; G: 在田间生长5个月的幼苗。

亡。培养6个月后, 子房在培养基MS+2.0 mg·L⁻¹ ZT+0.2 mg·L⁻¹ NAA中开始产生不定芽, 并很快形成丛芽。出芽率为33.3%, 增殖系数为2.33, 芽簇生, 长势良好(图1-C)。在其他3个丛芽诱导培养基中子房逐渐变黑死亡。因此, 本试验中诱导丛芽的最佳外植体为子房, 最佳培养基为MS+2.0 mg·L⁻¹ ZT+0.2 mg·L⁻¹ NAA。

2.2 金佛山兰的不定芽继代增殖

在不同继代培养基中, 随着继代次数的增加, 不定芽的繁殖系数逐渐降低(表1)。在连续4代的继代培养中, B₆培养基不定芽增殖效果最好(图1-D), 1~4代平均繁殖系数最高(4.76); B₁₀培养基次之(4.68), 二者之间没有显著差异, 但二者均与其他培养基之间存在显著差异($P<0.05$)。与B₁₀培养基相比, 在B₆培养基中, 不定芽生长状态更好。因此, 综合看来, 金佛山兰不定芽继代的最佳培养基为B₆培养基, 即MS+1.5 mg·L⁻¹ ZT+0.15 mg·L⁻¹ NAA。

2.3 金佛山兰的不定芽生根

在不同生根培养基中, 不定芽最快7 d, 最迟20 d开始产生不定根, 之后根尖逐渐伸长, 60 d后形成较庞大根系(图1-E), 但其生根率、不定根数量和长度等存在差异。R₂、R₉、R₁₀和R₁₆培养基生根率均达100%, 而R₂、R₉的不定根数量和长度显著低

于其他培养基。不定根数量以R₈培养基最多(25.9条), 且与其他培养基均存在显著差异, 但其生根率较低, 不定根较短; 不定根长度以R₁₀培养基最长(3.95 cm), 仅与R₁₃(3.49 cm)和R₁₆(3.61 cm)培养基差异不显著, 且根系较发达, 生长状态更好(表2)。因此, 金佛山兰不定芽的最佳生根培养基为R₁₀培养基, 即1/2MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA+0.05 mg·L⁻¹ 6-BA。

2.4 金佛山兰的试管苗移栽

60株金佛山兰试管苗, 经炼苗后移栽到营养钵中, 生长2周后移栽到重庆金佛山上(图1-F), 60 d后存活36株, 移栽成活率为60%。幼苗在自然条件下生长5个月后, 个体明显变大, 生长正常(图1-G)。

3 讨论

我国对兰科植物的研究自20世纪20年代以来已取得了很大进展(罗毅波等2003)。金佛山兰作为较原始的属种数量极其稀少, 分布范围也在不断缩小, 繁殖研究迫在眉睫(秦晓丹2014)。然而, 相关进展却十分缓慢, 这也许与兰科植物多有共生菌有关(范黎等1998; 郭顺星和徐锦堂1990; 秦晓丹2014; 魏明等2014)。

金佛山兰人工栽培不易存活。2017年, 我们

表1 植物生长调节剂对金佛山兰的不定芽继代增殖的影响

Table 1 Effects of plant growth regulators on proliferations of adventitious buds of *T. nanchuanica*

培养基编号	ZT浓度/ mg·L ⁻¹	NAA浓度/ 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	2.0	0.20	5.11	4.62	3.18	2.96	3.98±0.04 ^b	好
B ₂	2.0	0.15	5.11	4.63	3.50	2.76	4.01±0.01 ^b	一般
B ₃	2.0	0.10	4.67	4.50	3.80	2.26	3.81±0.32 ^b	好
B ₄	2.0	0.05	4.00	4.11	3.79	2.78	3.68±0.59 ^{bc}	好
B ₅	1.5	0.20	4.67	4.44	3.60	2.79	3.88±0.20 ^b	一般
B ₆	1.5	0.15	4.80	4.67	6.25	3.28	4.76±0.05 ^a	好
B ₇	1.5	0.10	4.17	3.00	3.09	4.65	3.74±0.45 ^b	一般
B ₈	1.5	0.05	2.50	5.00	4.18	3.17	3.72±0.48 ^b	好
B ₉	1.0	0.20	3.25	5.20	2.85	4.34	3.92±0.14 ^b	一般
B ₁₀	1.0	0.15	4.67	6.25	3.44	4.33	4.68±0.03 ^a	较好
B ₁₁	1.0	0.10	3.89	3.69	2.50	3.35	3.37±0.55 ^{bc}	较好
B ₁₂	1.0	0.05	3.57	3.33	4.00	3.00	3.48±0.50 ^{bc}	较好
B ₁₃	0.5	0.20	3.33	3.33	2.29	3.00	3.00±0.01 ^c	一般
B ₁₄	0.5	0.15	3.50	4.00	3.50	3.35	3.60±0.53 ^{bc}	一般
B ₁₅	0.5	0.10	4.86	3.92	2.69	3.72	3.81±0.33 ^b	一般
B ₁₆	0.5	0.05	3.78	4.00	2.00	3.54	3.34±0.57 ^{bc}	较好

同列数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$), 下表同此。

表2 植物生长调节剂对金佛山兰的不定芽生根的影响

Table 2 Effects of plant growth regulators on rooting of adventitious buds of *T. nanchuanica*

培养基编号	NAA浓度/ mg·L ⁻¹	IBA浓度/ mg·L ⁻¹	6-BA浓度/ mg·L ⁻¹	接种不 定/个	生根不定 定芽/个	生根率/%	不定根数/条	根长/cm
R ₁	4.0	0	0	36	35	97.22	15.27±0.64 ^{de}	1.54±0.16 ^d
R ₂	3.0	0	0	36	36	100.00	17.10±0.86 ^{bc}	1.80±0.09 ^d
R ₃	2.0	0	0	36	31	86.11	17.29±3.58 ^{bc}	1.42±0.07 ^{de}
R ₄	1.0	0	0	36	33	91.67	12.71±0.62 ^{def}	2.38±0.07 ^c
R ₅	0.5	0	0	36	29	80.56	12.05±0.92 ^{ef}	2.66±0.37 ^c
R ₆	4.0	0	0.05	36	25	69.44	16.43±0.52 ^{bcd}	0.83±0.02 ^f
R ₇	3.0	0	0.05	36	32	88.89	18.41±2.25 ^{bc}	1.38±0.11 ^{de}
R ₈	2.0	0	0.05	36	34	94.44	25.90±1.15 ^a	1.56±0.10 ^d
R ₉	1.0	0	0.05	36	36	100.00	17.13±0.82 ^{bc}	2.60±0.04 ^c
R ₁₀	0.5	0	0.05	36	36	100.00	16.65±0.57 ^{bcd}	3.95±0.09 ^a
R ₁₁	2.0	0	0.50	36	20	55.56	20.44±1.26 ^b	1.00±0.06 ^{ef}
R ₁₂	0	2.0	0.50	36	16	44.44	10.17±4.48 ^f	3.13±0.95 ^b
R ₁₃	1.0	1.0	0	36	35	97.22	16.87±1.03 ^{bc}	3.49±0.14 ^{ab}
R ₁₄	0.5	1.5	0.10	36	26	72.22	11.66±0.57 ^{ef}	2.45±0.04 ^c
R ₁₅	1.5	0.5	0.50	36	18	50.00	14.60±5.39 ^{ede}	0.97±0.10 ^{ef}
R ₁₆	0.5	0	0.50	36	36	100.00	16.25±0.66 ^{cd}	3.61±0.11 ^a

将1株开花中的金佛山兰植株移栽营养钵中,于室内培养观察,但其果实未能正常发育,未收获到种子。另外,我们将30余株金佛山兰试管苗移栽到校内我院实验基地,60 d后全部死亡。这可能是金佛山兰离开自然生境后无其共生菌提供特殊养分所致(陈心启和吉占和1998; Koopowitz 2001)。本试验建立的组培快繁和自然生境移栽技术,为扩大金佛山兰的植株数量和实现野外回归提供了新途径。

金佛山兰的离体繁殖研究有待深入开展。在本试验中,仅子房外植体诱导出了不定芽,茎段、叶片等仅有膨大而后褐化死亡。本试验以子房为外植体建立的离体繁殖体系,其丛芽诱导率(33.33%)还较低,丛芽继代繁殖系数(前4代平均4.73)还不高,因而丛芽诱导和继代培养基还需要进一步筛选,不定芽生根条件还需优化。增殖系数随继代次数降低,这可能与ZT等在植物体内积累有关。在生根过程中发现,生长旺盛的不定芽容易生根。此外,金佛山兰茎、叶等外植体的脱分化和再分化研究需要抓紧进行,以增加外植体来源和加快金佛山兰的人工繁殖,从而促进金佛山兰的野外回归和种群保护。

参考文献(References)

Atwood JT (1986). The size of the orchidaceae and the sys-

tematic distribution of epiphytic orchids. *Selbyana*, 9 (1): 171–186

Bu CY, He JZ, Bi ZQ, et al (2010). Asepsis sowing and in vitro propagation of *Cymbidium serratum* (Schltr) Y. S. Wu et S. C. Chen. *Plant Physiol J*, 46 (12): 1259–1260 (in Chinese with English abstract) [卜朝阳, 何荆洲, 闭志强等(2010). 豆瓣兰的无菌播种与快速繁殖. *植物生理学报*, 46 (12): 1259–1260]

Chen FX, Lin SQ, Wang JF, et al (2002). Advances in the micropropagation and breeding of orchid. *J Fujian Agri For Univ (Nat Sci Ed)*, 31 (4): 476–479 (in Chinese with English abstract) [陈发兴, 林顺权, 王家福等(2002). 兰花繁育技术的研究进展. *福建农林大学学报(自然版)*, 31 (4): 476–479]

Chen SC (1965). A primitive new orchid genus *Tangtsinia* and its meaning in phylogeny. *J Syst Evol*, 10 (3): 193–206 (in Chinese with English abstract) [陈心启(1965). 一个原始的兰科新属进兰属(*Tangtsinia*)及其在系统发育上的意义. *植物分类学报*, 10 (3): 193–206]

Chen SC (1978). *Sinorchis*—a primitive new genus of orchidaceae from China. *J Syst Evol*, 16 (4): 82–85 (in Chinese) [陈心启(1978). 梅兰属——中国兰科的一个原始新属. *植物分类学报*, 16 (4): 82–85]

Chen SC (1979). On *Diplandrorchis*, a very primitive and phylogenetically significant new genus of orchidaceae. *J Syst Evol*, 17 (1): 1–6 (in Chinese with English abstract) [陈心启(1979). 双蕊兰属——一个极其原始和在系统发育上有重要意义的兰科新属. *植物分类学报*, 17 (1): 1–6]

Chen SC (1982). The origin and early differentiation of the orchidaceae. *J Syst Evol*, 20 (1): 1–22 (in Chinese) [陈心

- 启(1982). 关于兰科起源与早期分化的探讨. 植物分类学报, 20 (1): 1-22]
- Chen SC (1988). Study of chinese orchid history from the spring and autumn period to the song dynasty. Plant Sci J, 6 (1): 79-83 (in Chinese) [陈心启(1988). 中国兰史考辨——春秋至宋朝. 植物科学学报, 6 (1): 79-83]
- Chen SC, Tsi ZH (1998). The Orchids Of China. Beijing: Forestry Press (in Chinese) [陈心启, 吉占和(1998). 中国兰花全书. 北京: 中国林业出版社]
- Chen XL, Li M (2006). Studies on induction conditions for callus of *Tangtsinia nanchuanica*. J Chongqing Norm Univ (Nat Sci Ed), 23 (2): 62-63 (in Chinese with English abstract) [陈晓麟, 李铭(2006). 濒危植物金佛山兰愈伤组织诱导条件的研究. 重庆师范大学学报(自然科学版), 23 (2): 62-63]
- China national traditional chinese medicine corporation (1994). Resources of Chinese Traditional Medicine. Beijing: Science Press (in Chinese) [中国药材公司(1994). 中国中药资源志要. 北京: 科学出版社]
- Editorial board of flora of china of the Chinese Academy of Sciences (1999). Flora of China, Vol 19. Beijing: Science Press (in Chinese) [中国科学院中国植物志编辑委员会(1999). 中国植物志19卷. 北京: 科学出版社]
- Fan L, Guo SX, Xu JT (1998). Fungi endophyte from orchid mycorrhizae in China. J Shanxi Univ (Nat Sci Ed), (2): 169-177 (in Chinese with English abstract) [范黎, 郭顺星, 徐锦堂(1998). 我国部分兰科植物菌根的内生真菌种类研究. 山西大学学报(自然科学版), (2): 169-177]
- Fu LK (1991). China Plant Red Data Book. Beijing: Science Press (in Chinese) [傅立国(1991). 中国植物红皮书——稀有濒危植物. 北京: 科学出版社]
- Guo SX, Xu JT (1990). Action and relation of the seed germination of orchidaceae. Bull Bot, 7 (1): 13-17 (in Chinese with English abstract) [郭顺星, 徐锦堂(1990). 真菌在兰科植物种子萌发生长中的作用及相互关系. 植物学报, 7 (1): 13-17]
- Huo LL, Pan HT, Zhang QX (2010). Asepsis sowing and rapid propagation of *Dendrobium pendulum* Roxb. Plant Physiol J, 46 (12): 1269-1270 (in Chinese with English abstract) [霍丽丽, 潘会堂, 张启翔(2010). 肿节石斛的无菌播种和快速繁殖. 植物生理学报, 46 (12): 1269-1270]
- Koopowitz H (2001). Orchids and their Conservation. B T Batsford Ltd, London
- Li M, Chen XL (2002). Observation and comparison of the ecological morphological characteristics of rare and endangered plant *Tangtsinia nanchuanica* and *Cephalanthera falcata*. J Chongqing Coll Edu, 15 (6): 39-41 (in Chinese) [李铭, 陈晓麟(2002). 珍稀濒危植物金佛山兰生态形态特征观察及与金兰的比较. 重庆教育学院学报, 15 (6): 39-41]
- Li JY, Zhang XY, Kong LJ, et al (2010). Asepsis Sowing and in vitro propagation of *Neofinetia richardsiana* Christenson. Plant Physiol J, 46 (12): 1261-1262 (in Chinese with English abstract) [李婧媛, 张小燕, 孔令杰等(2010). 短距风兰的无菌播种和快速繁殖. 植物生理学报, 46 (12): 1261-1262]
- Luo YB, Jia JS, Wang CL (2003). A general review of the conservation status of chinese orchids. Biodiversity Sci, 11 (1): 70-77 (in Chinese with English abstract) [罗毅波, 贾建生, 王春玲(2003). 中国兰科植物保育的现状和展望. 生物多样性, 11 (1): 70-77]
- Qin XD (2014). Study on the diversity of *Tangtsinia nanchuanica*'s endophytic and rhizosphere microorganisms (dissertation). Beijing: Chinese Academy of Forestry (in Chinese with English abstract) [秦晓丹(2014). 金佛山兰内生及根圈微生物多样性(学位论文). 北京: 中国林业科学研究院]
- Wei M, Yang CY, Li AJ, et al (2014). Effects of lanthanum nitrate and orchid mycorrhizal fungi on the growth and active component accumulation in *Dendrobium nobile*. Plant Physiol J, (7): 1059-1064 (in Chinese with English abstract) [魏明, 杨超英, 李爱军等(2014). 硝酸镧和兰科菌根真菌互作对石斛生长和有效成分积累的影响. 植物生理学报, (7): 1059-1064]

Tissue culture and rapid propagation of rare and endangered *Tangtsinia nanchuanica*

TONG Hong-Yu¹, ZHOU Xiao-Xue¹, LI Juan¹, DENG Hong-Ping¹, WANG Qian^{1,2}, ZHOU Qi-Gui¹, TANG Shao-Hu^{1,*}, ZHANG Jun², LI Zhong-Juan², CHEN Yu-Han²

¹Key Laboratory of Eco-Environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

²Chongqing Institute of Medicinal Plant Cultivation, Chongqing 408435, China

Abstract: *In vitro* propagation system was established by using ovary, stigma, etc. of *Tangtsinia nanchuanica* as explants. The results showed that the optimal explants were ovary, and the optimal medium was MS+2.0 mg·L⁻¹ ZT+0.2 mg·L⁻¹ NAA. The optimal subculture medium was MS+1.5 mg·L⁻¹ ZT+0.15 mg·L⁻¹ NAA. The average reproduction coefficient of 1 to 4 generations was 4.76 times, and the bud grew well. The optimal rooting medium was 1/2MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA+0.05 mg·L⁻¹ 6-BA with rooting rate of 100% and root length of 3.95 cm. Plantlets *in vitro* were then transplanted to the natural habitat of Jinpo Mountain, the survival rate was 60% and plants grew well after 60 days.

Key words: *Tangtsinia nanchuanica*; tissue culture; rapid propagation

Received 2018-08-23 Accepted 2018-11-05

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).