

朱 璐,李淑顺,闻 婧,等. 鸡爪槭金陵丹枫组培再生体系的建立[J]. 江苏农业科学,2021,49(1):54-58.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.01.010

鸡爪槭金陵丹枫组培再生体系的建立

朱 璐,李淑顺,闻 婧,马秋月,颜坤元,李倩中

(江苏省农业科学院休闲农业研究所,江苏南京 210014)

摘要:鸡爪槭新品种金陵丹枫叶色绚烂,是优质的彩叶树种。以金陵丹枫带芽茎段为外植体,75% 乙醇 40 s + 0.1% 氯化汞 20 min 消毒效果最佳。以 NN69 为基本培养基,筛选获得最适宜的启动培养基为 NN69 + 0.1 mg/L IBA,增殖培养基为 NN69 + 0.4 mg/L KT + 0.1 mg/L IBA,生根培养基为 NN69 + 0.3 mg/L IBA。探讨了金陵丹枫不定芽对羧苄青霉素和潮霉素的敏感性,筛选获得羧苄青霉素的临界值为 300 ~ 400 mg/L,潮霉素的临界值为 2.5 mg/L。

关键词:金陵丹枫;再生体系;羧苄青霉素;潮霉素

中图分类号: S792.350.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)01-0054-05

金陵丹枫是槭树科槭属植物鸡爪槭 (*Acer palmatum*) 的一个园艺品种,由江苏省农业科学院经过多年选育而成^[1]。其叶片掌状 5 ~ 7 裂,叶片边缘具有重锯齿,叶基部近心脏形,新叶为亮红色,观赏期达 100 d 以上。金陵丹枫已获得江苏省林木良种认定证书和植物新品种权证书;可孤植、群植或作为高档盆栽用,具有极高的观赏和应用价值。

在金陵丹枫种苗的生产中,通常采用嫁接的方式,但是嫁接成活率受多种外界因素影响较大,如砧木和接穗的质量,嫁接季节和温度、湿度等,不利于大规模生产^[2]。金陵丹枫扦插不易生根,繁殖较

困难,因此亟待建立金陵丹枫的组培再生体系,解决批量生产的问题。目前,国内虽有少量鸡爪槭品种已建立了组培再生体系,如金陵黄枫、赤枫、日本红枫等^[3-6],但是不同品种的鸡爪槭对不同培养基和植物激素的适应性差异很大,还需要针对不同品种研究其适宜的组培繁殖技术。

本研究以金陵丹枫当年生枝条作为外植体,通过启动培养、增殖培养和生根培养等阶段,筛选最适宜金陵丹枫生长的激素浓度,同时还研究了金陵丹枫不定芽对不同浓度的羧苄青霉素(carbenicillin,简称 Carb)和潮霉素(hygromycin,简称 Hyg)的敏感性,以期为金陵丹枫转基因体系的建立提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

鸡爪槭品种金陵丹枫健康无病害的当年新鲜枝条,采集于江苏省农业科学院槭树良种基地。试验于 2019 年 5 月开始进行,试验地点为江苏省农业科学院休闲农业研究所实验室。

2019,35(4):28-33.

[13] 青 阔,张桂华,王 永,等. 基于 InDel 标记快速检测黄瓜津优 38 种子纯度[J]. 种子,2011,30(6):19-23.

[14] 吴 迷,汪 念,沈 超,等. 基于重测序的陆地棉 InDel 标记开发与评价[J]. 作物学报,2019,45(2):196-203.

[15] 胡陶铸,林 丽,胡继军,等. 利用 InDel 标记构建番茄新品种指纹图谱[J]. 上海交通大学学报(农业科学版),2019,37(2):24-29.

[16] 聂京涛,李晓丹,姚永康,等. 用于黄瓜白粉病抗性鉴定的 InDel

标记[J]. 中国蔬菜,2015,1(9):26-30.

[17] Phetmanyseng X, Xie F, Hernandez J E, et al. Hybrid rice heterosis and genetic diversity of IRRI and Lao rice [J]. Field Crops Research, 2010, 117:18-23.

[18] Jagoz B. The relationship between heterosis and genetics distance based on RAPD and AFLP markers in carrot [J]. Plant Breeding, 2011, 130(5):574-579.

[19] 杨亚桐,董安忆,刘松涛,等. 基于 SSR 分子标记的糯玉米遗传多样性研究[J]. 江苏农业科学,2020,48(2):83-86.

1.2 培养条件

培养基为 NN69,购于北京酷来搏科技有限公司,添加蔗糖 20 g/L,琼脂 5 g/L,调整 pH 值至 5.7。其他试剂均购于北京索莱宝科技有限公司。本试验光照强度为 100 μmol/(m²·s),光周期为 16 h—8 h(光照—黑暗),温度为(25±2)℃。

1.3 试验方法

1.3.1 外植体消毒 将采集到的金陵丹枫当年生新鲜枝条剪去叶片,切取约 3 cm 的带芽茎段,用洗涤剂清洗,自来水流水冲洗 1 h。使用 75% 乙醇和 0.1% 氯化汞组合消毒不同时间,同时添加 0.2% Tween-20,消毒完毕后使用无菌水漂洗 3 次,在无菌滤纸上晾干表面水分后,接种到 NN69 培养基中,每瓶接种 3 个外植体,每个处理重复 3 次。随时观察其污染率,防止交叉感染,筛选最佳外植体消毒时间。

1.3.2 启动培养 将上述获得的无菌外植体分别接种到含有不同生长素(IAA、IBA、NAA、6-BA 和 TDZ)不同浓度配比的 NN69 培养基中(表 2),培养 45 d 后,统计腋芽诱导率,观察腋芽萌动及后续生长状况。每个处理重复 3 次,筛选最佳启动培养基。

1.3.3 增殖培养 将生长状况良好、长约 1 cm 的腋芽剪下,放入含有不同浓度的细胞分裂素(6-BA 和 KT)和生长素(IBA 和 NAA)配比的 NN69 培养基中,培养 45 d 后统计平均增殖系数。每个处理重复 3 次,筛选最佳增殖培养基。

1.3.4 生根培养 将经过增殖培养获得的约 1 cm 丛生芽分别剪下,转移到含有不同浓度生长素 IAA(0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/L)、IBA(0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/L)和 NAA(0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/L)配比的 NN69 培养基中,培养 30 d 后统计生根数及平均根长。每个处理重复 3 次,筛选获得最佳生根培养基。

1.3.5 羧苄青霉素(Carb)抗性试验 选取增殖培养基上获得的生长状况良好的健壮不定芽接种到含有不同浓度 Carb(0、100、200、300、400、500、600、700 mg/L)的增殖培养基中,培养 45 d 后统计不定芽的诱导率及平均增殖系数,同时观察不定芽的成活率及生长状况。每个处理重复 3 次,每个处理 50 个芽。

1.3.6 潮霉素(Hyg)抗性试验 选取增殖培养基上获得的生长状况良好的健壮不定芽接种到含有不同浓度 Hyg(0、2.5、5.0、7.5、10、12.5、15.0、

17.5 mg/L)的增殖培养基中,培养 45 d 后统计不定芽的增值率及增值系数,同时观察不定芽的成活率及生长状况。每个处理重复 3 次,每个处理 50 个芽。

1.4 数据分析

试验数据采用 Excel 2016 和 SPSS 19.0 进行统计整理及分析,差异显著性采用 ANOVA 分析,Duncan's 检验($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 不同消毒处理对外植体的影响

将田间采集的外植体茎段用不同的消毒时间进行处理(表 1)。金陵丹枫外植体使用 75% 乙醇消毒 40 s 和 0.1% 氯化汞消毒 20 min 的组合处理时,既能保证金陵丹枫外植体具有较低的污染率(17.6%),又能保持较高的腋芽萌发率(90.3%)。因此,选用该处理对金陵丹枫外植体消毒效果最佳。

表 1 不同消毒处理对外植体的影响			
处理		污染率	萌发率
75% 乙醇(s)	0.1% 氯化汞(min)	(%)	(%)
20	10	29.8±2.1c	91.6±2.5a
40	20	17.6±3.3b	90.3±2.9a
60	30	10.1±2.7a	76.7±1.1b

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。表 2 至表 6 同。

2.2 不同激素配比对外植体启动培养的影响

将无菌外植体接种到不同激素配比的 NN69 培养基中,接种约 10 d 后腋芽开始萌动,同时茎基部开始形成愈伤组织。接种 45 d 后统计腋芽诱导率(表 2),在 NN69 培养基中添加单种激素对金陵丹枫外植体启动培养的影响显著优于同时添加多种激素。其中添加 IBA 浓度为 0.1 mg/L 时,腋芽诱导率最高,为(90.6±3.1)%,腋芽生长快且长势健壮。最终选择该培养基为金陵丹枫最佳培养基。

2.3 不同激素比对芽增殖培养的影响

将无菌外植体在启动培养基上生长的腋芽剪下,放入不同激素浓度配比的 NN69 培养基中培养 45 d 后,统计观察腋芽平均增殖系数(增殖系数=产生的丛生芽数/接种的腋芽数×100%)。统计结果见表 3,金陵丹枫腋芽在不同激素组合的增殖培养基中的平均增殖系数差异显著。6-BA 和 IBA 组合的平均增殖系数为 3.1~3.6,TDZ 和 IBA 组合的平均增殖系数为 2.2~2.9,KT 和 IBA 组合的平

表 2 不同激素配比对外植体启动培养的影响

处理	激素浓度(mg/L)					芽诱导率 (%)
	IAA	IBA	NAA	6-BA	TDZ	
T1	0.1	0	0	0	0	70.1±6.9f
T2	0.2	0	0	0	0	61.3±2.3e
T3	0	0.1	0	0	0	90.6±3.1h
T4	0	0.2	0	0	0	82.2±5.2g
T5	0	0	0.1	0	0	53.9±7.6c
T6	0	0	0.2	0	0	56.2±3.9d
T7	0	0	0	0.4	0	51.7±5.7b
T8	0	0	0	0.5	0	59.8±2.1e
T9	0	0	0	0	0.05	62.6±6.2e
T10	0	0	0	0	0.1	55.2±3.8d
T11	0.1	0	0	0.3	0	46.7±7.1a
T12	0	0.1	0	0.3	0	50.5±5.9b
T13	0	0	0.1	0.3	0	45.2±7.3a

均增殖系数为 6.2~8.3,明显优于其他激素组合。其中在添加 0.4 mg/L KT 和 0.1 mg/L IBA 的 NN69 培养基中腋芽的增殖系数最高,为 8.3,显著高于添加其他激素组合的培养基,且该培养基上生长的丛生芽状态良好,长势健壮,利于进行生根培养。

2.4 不同浓度生长素对生根的影响

将在增殖培养基上产生的丛生芽剪下,分别转移到含有不同生长素浓度的 NN69 培养基中,观察统计不定芽的生根状况。试验结果显示,金陵丹枫不定芽在添加不同生长素的培养基中生根状况差

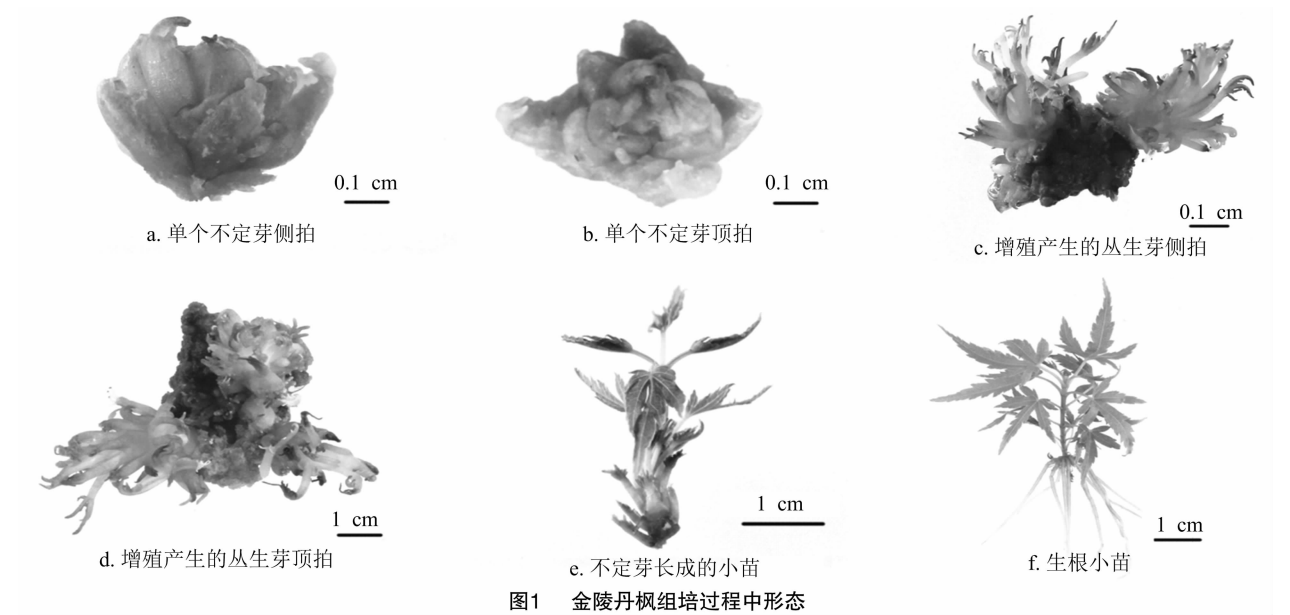
表 3 不同激素比对芽增殖培养的影响

处理	激素浓度(mg/L)				平均增殖系数 (%)
	6-BA	TDZ	KT	IBA	
T1	0.5	0	0	0.1	3.1±0.5b
T2	0.6	0	0	0.1	3.3±0.2c
T3	0.7	0	0	0.1	3.6±0.3d
T4	0.8	0	0	0.1	3.2±0.2c
T5	0	0.2	0	0.1	2.2±0.1a
T6	0	0.4	0	0.1	2.9±0.3b
T7	0	0.6	0	0.1	2.8±0.4b
T8	0	0.8	0	0.1	2.3±0.3a
T9	0	0	0.2	0.1	7.5±0.7h
T10	0	0	0.4	0.1	8.3±0.6g
T11	0	0	0.6	0.1	7.1±0.5f
T12	0	0	0.8	0.1	6.2±0.6e

异显著。在添加 IAA 的培养基上,生根率仅为 55.9%~65.4%,平均根系量仅为 2.5~3.7,平均根长仅为 1.9~2.9 cm。在添加 IBA 的培养基上,生根率显著升高,为 75.9%~95.6%,平均根系量为 4.3~7.1 条,平均根长为 3.0~3.9 cm。在添加 NAA 的培养基上,生根率仅为 67.8%~80.1%,平均根系量仅为 3.1~3.9 条,平均根长仅为 2.3~2.9 cm。不定芽在添加 0.3 mg/L IBA 的培养基上,生根率最高,平均根系量和平均根长最大,小苗长势最好(表 4)。鸡爪槭金陵丹枫丛生芽分化及生根情况见图 1。

表 4 不同浓度生长素对生根的影响

处理	激素浓度(mg/L)			生根率 (%)	平均根系量 (条)	平均根长 (cm)
	IAA	IBA	NAA			
T1	0.1	0	0	55.9±5.7a	2.5±0.5a	1.9±0.3a
T2	0.2	0	0	62.6±4.3b	2.9±0.4b	2.5±0.5c
T3	0.3	0	0	70.3±5.1d	3.7±0.6d	2.9±0.4e
T4	0.4	0	0	65.4±3.9c	3.3±0.5c	2.6±0.3d
T5	0.5	0	0	60.8±4.7b	3.6±0.3d	2.7±0.3d
T6	0	0.1	0	75.9±5.5e	4.5±0.9f	3.1±0.5f
T7	0	0.2	0	83.1±3.9g	6.6±1.2h	3.5±0.2g
T8	0	0.3	0	95.6±5.1i	7.1±1.1i	3.9±0.3h
T9	0	0.4	0	90.3±3.7h	5.9±0.8g	3.3±0.2g
T10	0	0.5	0	85.6±4.1g	4.3±0.8f	3.0±0.4f
T11	0	0	0.1	67.8±4.8c	3.1±0.5c	2.3±0.3b
T12	0	0	0.2	70.3±3.6d	3.5±0.3d	2.7±0.2d
T13	0	0	0.3	77.6±5.2f	3.3±0.3c	2.5±0.2c
T14	0	0	0.4	78.3±4.6f	3.6±0.5d	2.7±0.4d
T15	0	0	0.5	80.1±5.8g	3.9±0.7e	2.9±0.5e



2.5 不同浓度的羧苄青霉素对诱导丛生芽的影响

抗生素 Carb 可以有效抑制农杆菌的生长,同时也会抑制丛生芽的诱导和增殖。随着 Carb 浓度的增高,金陵丹枫丛生芽的诱导率和平均增殖系数显著降低(表 5),表明金陵丹枫丛生芽对 Carb 非常敏感。Carb 浓度为 700 mg/L 时,丛生芽诱导率仅为 45.9%,且丛生芽基本停止增殖。

表 5 不同浓度的羧苄青霉素对诱导丛生芽的影响		
羧苄青霉素浓度 (mg/L)	丛生芽诱导率 (%)	平均增殖系数
0	95.6 ± 3.7g	8.3 ± 0.5h
100	90.9 ± 4.2f	7.1 ± 0.7g
200	87.7 ± 3.5f	6.5 ± 0.4f
300	82.6 ± 3.1e	5.7 ± 0.5e
400	75.2 ± 2.7d	4.6 ± 0.3d
500	70.1 ± 1.6c	4.1 ± 0.2c
600	59.8 ± 5.9b	2.0 ± 0.2b
700	45.9 ± 3.3a	1.5 ± 0.2a

2.6 不同浓度的潮霉素对诱导丛生芽的影响

抗生素 Hyg 在遗传转化筛选过程中起着重要作用。Hyg 也会抑制丛生芽的诱导和增殖,甚至会导致丛生芽白化死亡。Hyg 对金陵丹枫丛生芽的生长影响尤为明显。当 Hyg 浓度为 10.0 mg/L 时,丛生芽的诱导率仅为 20.3%,且丛生芽几乎不增殖。当 Hyg 浓度为 12.5 mg/L 时,丛生芽不被诱导,且 20.6% 丛生芽出现白化死亡现象(表 6)。

表 6 不同浓度的潮霉素对诱导丛生芽的影响		
潮霉素浓度 (mg/L)	丛生芽诱导率 (%)	平均增殖系数
0	95.6 ± 3.7e	8.3 ± 0.5e
2.5	80.1 ± 4.1d	3.1 ± 0.3d
5.0	69.9 ± 3.6c	2.6 ± 0.2c
7.5	50.2 ± 3.3b	1.7 ± 0.2b
10.0	20.3 ± 3.5a	1.2 ± 0.2a
12.5	0	20.6% 丛生芽白化死亡
15.0	0	53.4% 丛生芽白化死亡
17.5	0	83.7% 丛生芽白化死亡

3 结论与讨论

组培再生技术具有繁殖速度快、繁殖系数大、繁殖后代整齐一致等优点,被广泛应用于各种植物种苗繁育中。但是由于物种之间的差异,许多木本植物仍面临组培再生困难的问题。本研究以鸡爪槭金陵丹枫为研究对象,建立了组培再生技术体系。以当年生枝条为外植体,75% 乙醇消毒 40 s, 0.1% 氯化汞消毒 20 min,流水冲洗后接种到 NN69 + 0.1 mg/L IBA 的培养基上进行启动培养,诱导腋芽萌发。将萌发的腋芽切下,接种到 NN69 + 0.4 mg/L KT NN69 + 0.1 mg/L IBA 的培养基上进行增殖培养,诱导产生丛生芽。从产生的丛生芽切下的单个不定芽接种到 NN69 + 0.3 mg/L IBA 的培养基上进行生根培养,长成带根小苗后可以移栽到穴盘。通过金陵丹枫不定芽对羧苄青霉素和潮霉素的敏感

性的研究,发现当 Carb 浓度为 700 mg/L 或者 Hyg 浓度为 10 mg/L 时,丛生芽基本停止增殖。

进行组培再生体系的建立第 1 步是要解决外植体的污染问题。由于本试验的外植体取自大田的当年生枝条,附生菌较多,故采用了 75% 乙醇消毒和 0.1% 氯化汞消毒组合消毒的方式,这与前人的研究结果^[3]一致。在组培过程中,常用的基本培养基有 MS^[7]、WPM^[8]、NN69^[9]、B5^[10]、White^[11] 等,不同基本培养基对槭属植物再生体系的建立具有重要影响。鸡爪槭赤枫使用了 MS 培养基作为基本培养基^[4],日本红枫青龙使用了 WPM 培养基^[5],鸡爪槭金陵黄枫使用了 NN69 培养基^[3]。本试验也选择 NN69 作为基本培养基进行培养。植物生长调节剂是组培再生体系建立过程中不可或缺的物质,其种类、浓度和配比等是诱导腋芽生长、腋芽增殖和不定芽生根的关键因子^[12-13]。鸡爪槭赤枫^[4]、复叶槭^[13]、红翅槭^[14]和尖尾槭^[15]均采用了 6-BA 和 IAA 的组合实现了腋芽的增殖。鸡爪槭金陵黄枫利用 TDZ 和 NAA 组合使用时,腋芽增殖系数最高^[3]。日本红枫青龙在 TDZ 和 IBA 组合中增殖最快^[5]。这说明槭属植物对激素种类和浓度的感知具有较大差异,不同基因型的槭属植物需要不同激素浓度和配比。

羧苄青霉素对根癌农杆菌具有很好的抑制作用,但是高浓度的羧苄青霉素会抑制不定芽的生长和增殖,浓度过低又不足以抑制农杆菌生长。在贡菊叶片诱导不定芽的过程中,当羧苄青霉素为 250 mg/L 时,不定芽的诱导不受影响^[16]。蓝莓与树莓在分化阶段羧苄青霉素的临界值为 200 ~ 300 mg/kg^[17]。金陵丹枫不定芽对羧苄青霉素的临界值则为 300 ~ 400 mg/L。在转基因体系建立过程中,潮霉素作为抗性筛选标记具有重要作用。潮霉素浓度过高会导致植物细胞死亡,严重抑制植株生长。不同物种对潮霉素的敏感性差异巨大。巨霸杨对潮霉素临界浓度为 4 ~ 6 mg/L^[18]。甘蔗在愈伤组织形成过程中,潮霉素的筛选浓度为 30 mg/L^[19]。金陵丹枫不定芽对潮霉素较为敏感,潮霉素浓度为 2.5 mg/L 时,已经影响丛生芽的诱导率和增殖系数。

本研究建立了鸡爪槭金陵丹枫组培再生体系,为大量工厂化育苗提供了技术支撑;并且开展了不定芽对羧苄青霉素和潮霉素的抗性试验,筛选出了临界浓度,以期为金陵丹枫遗传转化体系的建立和优化提供参考,同时为进一步目的基因导入和分子

遗传育种改良奠定了基础。

参考文献:

- [1] 闻婧,李淑顺,朱璐,等. 鸡爪槭新品种‘金陵丹枫’[J]. 园艺学报,2019,46(增刊2):2919-2920.
- [2] 吕运舟,黄利斌,何旭东,等. 鸡爪槭园艺品种分类及栽培研究综述[J]. 江苏林业科技,2014,41(5):41-45.
- [3] 李倩中,刘晓宏,李淑顺,等. 鸡爪槭新品种金陵黄枫组培技术初探[J]. 江苏农业科学,2011,39(4):49-50,89.
- [4] 马建华,朱晓菲,何程相,等. 鸡爪槭(*Acer palmatum* Thunb.) 品种‘赤枫’组培再生体系的建立[J]. 中国农业科技导报,2020,22(1):171-178.
- [5] 孙红英,辛全伟,林兴生,等. 日本红枫‘青龙’组织培养与快速繁殖[J]. 中南林业科技大学学报,2019,39(7):44-47.
- [6] 舒婷,高小坤,罗文熠,等. 日本红枫外植体的选择及启动培养初步研究[J]. 安徽林业科技,2017,43(6):26-28,32.
- [7] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures[J]. Physiologia Plantarum, 1962, 15(3):473-497.
- [8] Lloyd G, McCown B. Commercially - feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot - tip culture[J]. Combined Proceedings of International Plant Propagators' Society, 1980,30:421-427.
- [9] Gamborg O L, Miller R A, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells[J]. Experimental Cell Research, 1968, 50(1):151-158.
- [10] Lamport D. Cell suspension cultures of higher plants: isolation and growth energetics[J]. Experimental Cell Research, 1964, 33(1):195-206.
- [11] Hill K, Schaller G E. Enhancing plant regeneration in tissue culture[J]. Plant Signaling & Behavior, 2013, 8(10):212-224.
- [12] Jiménez V M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis[J]. Plant Growth Regulation, 2005, 47(2):91-110.
- [13] 李艳敏,孟月娥,赵秀山,等. 金叶复叶槭组织培养技术研究[J]. 河南农业科学,2008,37(7):98-99.
- [14] 唐丽,钟秋平,刘显梅,等. 红翅槭的组织培养及再生技术[J]. 北方园艺,2010(9):136-138.
- [15] Durkovic J. Regeneration of *Acer caudatifolium* Hayata plantlets from juvenile explants[J]. Plant Cell Reports, 2003, 21(11):1060-1064.
- [16] 徐亚男,任慢蓉,岳圆圆,等. 贡菊再生体系建立及羧苄青霉素浓度筛选[J]. 延边大学农学报,2019,41(3):41-45.
- [17] 张寅玲,黄俊轩,李建科,等. 羧苄青霉素对几种浆果分化及生长的影响研究[J]. 北方园艺,2010(16):135-137.
- [18] 王桂英,刘晓杰,李珊珊,等. 巨霸杨组培再生体系的建立及潮霉素抗性试验[J]. 北方园艺,2015(13):98-102.
- [19] 姚丽,吴才文,曾千春. 甘蔗遗传转化中不同阶段潮霉素抗性筛选[J]. 中国糖料,2010(2):17-19.