

花生组培苗高效嫁接技术

苗利娟, 韩锁义, 石磊, 房元瑾, 黄冰艳, 董文召, 张俊, 齐飞艳, 孙子淇, 张新友*
(河南省农业科学院经济作物研究所/农业部黄淮海油料作物重点实验室
/河南省油料作物遗传改良重点实验室, 河南 郑州, 450002)

摘要: 为解决花生野生种及转基因组培苗移栽成活率低、田间长势弱等难题, 本研究对花生的嫁接技术进行了优化。以黑籽花生品种豫花 0215 分别在黑暗和光照条件下培养 7d 的实生苗为砧木, 以栽培种、野生种及双二倍体的无菌组培苗为接穗, 采用劈接法, 以花生的下胚轴为嫁接部位进行嫁接。结果表明, 花生砧木的培养方式不同, 嫁接成活率差异显著, 在黑暗条件下培养的砧木下胚轴达到 6cm 以上, 平均嫁接成活率较高, 达到 96% 以上。不同类型接穗嫁接成活率差异很大, 栽培种的嫁接成活率较高, 嫁接到黑暗培养的砧木上成活率达到 100%。采用黑暗培养的豫花 0215 作砧木, 大大提高了嫁接成活率和嫁接效率, 该方法在花生野生种、双二倍体及转基因植株等组培苗的嫁接上获得成功, 克服了野生种及后代材料生根困难及移栽成活率低及组培苗移栽后长势弱等问题, 值得推广。

关键词: 花生; 组培苗; 嫁接; 劈接

中图分类号: S565.2 文献标识码: A 文章编号: 1007-9084(2018)06-0845-06

Efficient grafting technique for regenerated plantlet in peanut

MIAO Li-juan, HAN Suo-yi, SHI Lei, FANG Yuan-jin, HUANG Bing-yan,
DONG Wen-zhao, ZHANG Jun, QI Fei-yan, SUN Zi-qi, ZHANG Xin-you*
(Industrial Crops Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences
/Key Laboratory of Oil Crops in Huanghuaihai Plains, Ministry of Agriculture
/Henan Provincial Key Laboratory for Oil Crops Improvement, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: It is a critical step to transplant regenerated plantlet derived from wild species or genetic transformation after tissue culture in peanut. Low survival rate and weak growth vigor of transplanted seedlings in the field has long been an obstacle. To solve this problem the grafting technology of peanut was applied and optimized in the present study. The seedlings of black-seed variety-Yuhua 0215 cultivated in full dark or full light conditions for 7 days were used as rootstocks. The sterile tissue cultured seedlings of cultivated peanut, wild species, and double diploids materials were used as scions respectively. Using the splicing method, scions were grafted onto the hypocotyls sites of the rootstocks. Our results showed that the survival rate of grafts had significant difference between the two rootstocks. The average survival rate was above 96% in the rootstock that was cultured in full dark condition with the hypocotyls elongated beyond 6cm in length. Moreover, graft survival rate significantly varied among scions of different peanut varieties and different types. The graft survival rate of cultivars was higher than that of wild species, and the survival rate reached 100% when grafted onto rootstocks cultured in full dark condition. The strategy of using Yuhua 0215 cultured in full dark condition as rootstock greatly improved graft survival rate and graft efficiency. The method also successfully overcame the low survival rate, weak vigor and the rooting difficulty of transplants derived from tissue culture of the wild species, double diploid and transgenic plants, thus had great

收稿日期: 2018-05-08

基金项目: 国家高技术研究与发展计划(863 计划)项目(2013AA102602-6); 国家花生产业技术体系(CARS-13); 河南省花生产业技术体系(S202-05); 河南省重大科技专项(16110011100); 河南省农业科学院自主创新专项(2018ZC16)

作者简介: 苗利娟(1981-), 女, 河南滑县人, 助理研究员, 硕士, 主要从事花生组织培养及基因工程研究, E-mail: miao8139@163.com

* 通讯作者: 张新友(1963-), 男, 河南太康人, 研究员, 中国工程院院士, 主要从事花生遗传育种研究, E-mail: haasz@sohu126.com

potential for further application.

Key words: peanut; regenerated plantlet; graft; splicing

花生是重要的经济和油料作物。我国是世界上最大的花生生产和消费国,花生对我国的经济发展起着重要的作用^[1]。近几年,我国花生种植面积逐步扩大,花生育种也取得突破性进展,但是目前花生栽培种遗传基础狭窄,抗病抗逆性差,影响了花生产量和品质的进一步提高^[2]。利用转基因及离体诱变技术创造花生新种质是重要的种质创制方法之一,但其依赖于花生组织培养高效再生体系。目前研究者们利用花生不同基因型、不同外植体等建立了高效再生体系^[3-4],但通过转基因和离体诱变等技术得到的花生组培苗根系较弱,移栽成活率不高,严重影响了后续工作的顺利开展。近几年花生远缘杂交技术也逐步完善^[5-7],选用具有抗病耐逆等优良性状的野生种与栽培种杂交,成为选育抗病耐逆优良新品种的重要途径。但远缘杂交多数表现杂交不亲和和杂种败育,需要通过组织培养进行胚拯救,获得杂种 F_1 ,经过染色体加倍处理,之后移栽田间,同样,因为野生种及后代材料组培苗根系弱,有些材料生根困难,导致组培苗移栽成活率极低,移栽后长势较差,严重影响育种工作的顺利进行,再生苗嫁接是解决组培苗移栽成活率低的有效手段^[8]。

嫁接技术在园艺作物繁殖和生产上应用较广泛^[9-11],随着嫁接技术的不断发展,在油菜^[12,13]、棉花^[14,15]和大豆^[16,17]上也得到广泛应用,但在花生上的应用国内外报道较少。有研究表明^[8],以14d的花生实生苗为砧木,转基因组培苗为接穗,采用劈接法和合接法进行嫁接,能大大提高组培苗移栽成活率。另有报道^[18]采用无菌嫁接方法,用12~15d苗龄的无菌实生苗作为砧木,花生组培苗为接穗,在无菌条件下嫁接于上胚轴,但是易出现砧木上结果现象。李冠等^[19]也采用无菌嫁接,用10~13d的实生苗为砧木,以离体诱变的组培苗为接穗,比较了上下胚轴两个嫁接部位的嫁接效果,结果表明下胚轴是最佳嫁接部位,并指出嫁接植株成活后直接移栽田间成活率高。花生目前大多数嫁接部位采用的是上胚轴,移栽田间后砧木上腋芽难以去除。采用下胚轴嫁接存在的问题为,光照培养的砧木下胚轴较短,嫁接时操作不方便,影响嫁接效率。针对花生嫁接存在的问题及不足,本研究采用劈接法,选用黑籽花生品种豫花0215黑暗培养的幼苗为砧木,嫁接部位为下胚轴,以栽培种和野生种及双二倍体的组培苗为接穗,对嫁接成活率及生长情况进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

砧木材料:黑籽花生品种豫花0215。

接穗材料:栽培种:豫花9326、豫花22、远杂9307。野生种:*A. correntina*、*A. macedoi*、PI468366。双二倍体:Am-L。

1.2 方法

1.2.1 嫁接砧木的准备 选用成熟饱满的黑花生豫花0215种子,浸泡过夜催芽,露白后将种子种植于装有高压灭菌蛭石的营养钵中,播种后浇透水,放置于27℃,分别在黑暗和光照(光照时间14h/d)两种条件下培养,当花生幼苗的两片真叶展开(约7d)时,以下胚轴为嫁接部位进行嫁接。

1.2.2 无菌组培苗接穗的准备 以栽培种(豫花9326、豫花22号和远杂9307)、野生种(*A. correntina*、*A. macedoi*、PI468366)和双二倍体Am-L组培苗为接穗,组培苗高度在2.0cm左右进行嫁接。

1.2.3 嫁接方法及嫁接部位 嫁接方法为劈接法,嫁接部位为花生下胚轴。切掉用作砧木的花生幼苗子叶及其以上部分,将下胚轴中间纵切成切口,黑暗培养的砧木材料切口深度为0.8~1.0cm;光照培养的砧木切口深度0.5cm左右。将接穗下端削成与砧木的切口对应的V形伤口,V形伤口的两斜面长度为0.5~1.0cm,切口保持平整;将接穗的下端插入砧木的切口中,嫁接苗接口用Parafilm封口膜缠紧,使砧木和接穗紧密结合,有利于伤口愈合。将嫁接苗放于室内,避免阳光直射,并覆盖塑料薄膜;待长出新叶(约7d)去掉薄膜,两周后统计嫁接成活率。

1.2.4 嫁接苗的驯化移栽 在阴天或傍晚将长势良好的嫁接苗移栽大田,移栽完成后浇透水,盖遮阳网遮阴,遮阴期间植株细长,3周左右待移栽苗完全成活后,去掉遮阳网,植株生长恢复正常,移栽成活率达到93%以上。嫁接植株都能正常生长,正常开花结实。

2 结果与分析

2.1 花生砧木的不同培养条件对嫁接成活率的影响

本研究砧木材料分别采用光照和黑暗两种培养条件,光照条件下培养的砧木材料7d后植株较矮,

下胚轴较短(图 1A),而黑暗条件下培养的砧木植株较高,下胚轴达到 6cm 以上(图 1D)。组培苗分别嫁接到两种不同长度的下胚轴上(图 1B、1E),7d 后嫁接苗长出新叶(图 1C、1F)。结果表明(图 2),以黑暗条件下培养材料作砧木,嫁接成活率较高,成活率都在 96% 以上,栽培种组培苗嫁接成活率达到 100%。以光照条件下培养材料作砧木,嫁接成活率普遍偏低,双样本方差分析 P 值为 0.006 (<0.05),

表明黑暗培养和光照培养嫁接成活率差异极显著。由于黑暗培养的花生下胚轴较长,嫁接时便于操作,而光照培养的花生下胚轴较短,下胚轴几乎都在土里,嫁接时不容易将砧木和接穗缠紧,并且砧木和接穗接触面积小,降低了嫁接成活率,也降低了嫁接效率。砧木材料采用黑暗培养可以提高嫁接成活率,并且能大大提高嫁接效率。



注:A:光照培养 7 d 的豫花 0215 砧木;B:光照培养豫花 0215 做砧木的嫁接苗;C:豫花 0215 光照培养的砧木嫁接 7 d 后长出新叶;D:豫花 0215 黑暗培养 7 d 的砧木;E:豫花 0215 黑暗培养砧木的嫁接苗;F:豫花 0215:黑暗培养的砧木嫁接 7 d 后长出新叶

Note:A:Yuhua 0215 as rootstock in light condition for 7 days; B:graft seedling used as rootstock from Yuhua 0215 cultured in light condition; C:new leaves from Yuhua 0215 as rootstock cultured in light condition 7 days after grafting; D:Yuhua 0215 as rootstock in dark condition for 7 days; E:graft seedling used as rootstock from Yuhua 0215 cultured in dark condition; F:new leaves from Yuhua 0215 as rootstock cultured in light condition 7 days after grafting; Fdark

图 1 不同培养方式的花生砧木及嫁接

Fig. 1 Peanut stocks and grafted seedlings in different cultivation

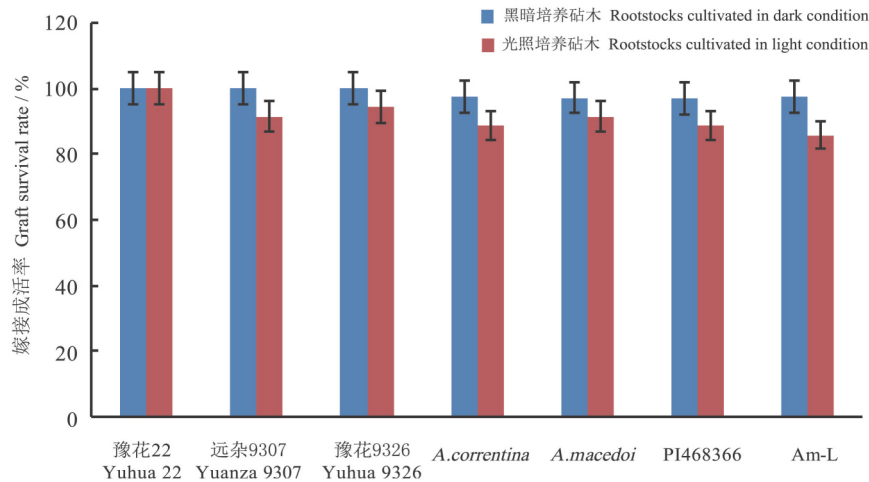


图2 不同培养条件的花生砧木嫁接成活率

Fig. 2 Graft survival rate of scions from different peanut varieties

2.2 不同花生品种接穗对嫁接成活率的影响

采用栽培种和野生种组培苗做嫁接接穗,由图2可看出,3个栽培种组培苗的嫁接成活率较高,在两种砧木上的嫁接成活率平均达95%以上。其中豫花22在两种培养条件的砧木上嫁接成活率均达到100%;在黑暗培养的砧木上,3个栽培种的嫁接成活率都达到100%。而野生种及双二倍体材料嫁接成活率低一些,在两种砧木上嫁接成活率平均为92.9%。在光照条件的砧木上,除*A. macedoi*嫁接成活率为91.4%之外,*A. correntina*, PI468366和Am-L嫁接成活率均偏低,分别为88.6%、88.6%和85.7%。双二倍体Am-L组培苗生长不正常,组培

苗整体偏小,苗较弱,影响嫁接成活率。

2.3 花生嫁接苗的田间生长及结实情况

嫁接成活后的幼苗,趁阴天或傍晚移栽大田,浇透水,遮阳网遮阴(图4A)2周左右,待移栽苗完全成活后,去掉遮阳网,嫁接苗移栽成活率都在93%以上(图3),栽培种移栽成活率普遍高于野生种,100%成活,砧木的培养方式对移栽成活率影响不显著。嫁接植株移栽田间生长正常,正常开花(图4B, 4C),栽培种嫁接苗都能正常结实(图4D),结实量与砧木的培养条件关系不大,野生种PI468366和*A. macedoi*也都能正常结实(图4E, 4F)。

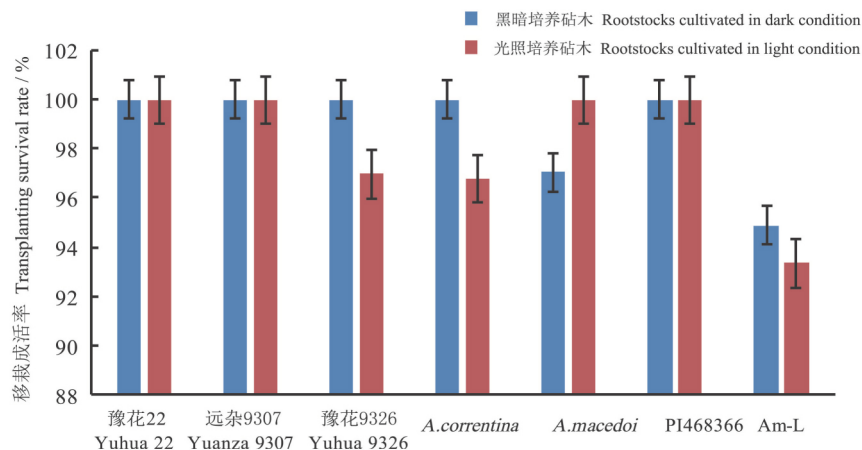


图3 不同花生品种嫁接苗的移栽成活率

Fig. 3 Survival rate of transplanting from different peanut graft seedlings



注: A: 成活的嫁接苗移栽田间遮阳网遮阴; B: 野生种 *A. correntina* 嫁接植株田间开花情况; C: 野生种 *A. macedoi* 嫁接植株的田间开花情况; D: 远杂 9307 嫁接植株的结实情况, 箭头所指是嫁接接口处; E、F: 野生种 *A. macedoi* 嫁接植株的结实情况

Note: A: survived grafted seedlings planted in field prevented from direct sunlight; B: flowering of grafted plants of wild peanut species *A. correntina* in field; C: flowering of grafted plants of wild peanut *A. macedoi* in field; D: pods of grafted plant of Yuanza 9307 with arrows indicating grafting site; E and F: pods of grafted plant of wild peanut *A. macedoi*

图 4 嫁接苗移栽田间开花及结果情况

Fig. 4 Grafted seedlings in field

3 讨论与结论

目前报道^[8, 18]花生嫁接大多数采用上胚轴嫁接, 嫁接成活后移栽田间, 需要反复去除砧木上的侧枝, 造成人力和物力的浪费, 并且砧木上有结实现象, 会影响接穗的生长和结实量。而本文研究嫁接部位采用下胚轴, 砧木上无侧枝侧芽, 接穗生长旺盛, 嫁接植株砧木上无结实现象。李冠^[19]采用无菌嫁接, 用 10~13d 的实生苗为砧木, 以离体诱变的组培苗为接穗, 比较了上下胚轴两个嫁接部位的嫁接效果, 结果表明下胚轴为最佳嫁接部位。本研究选用黑籽品种豫花 0215 的实生苗做砧木, 砧木采用黑暗条件培养 7d, 下胚轴长度达到 6~8cm 时进行嫁接, 有效避免了普通光照培养的砧木材料下胚轴较短(1~2cm)、嫁接时不好操作的问题, 提高嫁接效率及嫁接成活率。实践表明, 光照培养的砧木下胚轴较短, 每人 1h 只能嫁接十几株, 砧木暗培养下胚轴长度较长, 每人 1h 可嫁接 40 株以上, 工作效率提高一倍多。嫁接部位选用花生下胚轴, 去掉了子叶及以上部分, 移栽田间后省去了去除砧木上侧芽的

麻烦, 营养能够更好的供给接穗。

花生砧木材料种在营养钵里, 免去了繁琐的无菌嫁接苗培养移栽过程, 操作简便, 成活的嫁接苗移栽大田几乎不伤根, 移栽后返苗比较快, 成活率达到 93%~100%, 大大提高了嫁接植株的移栽成活率。嫁接植株移栽田间, 大多数都能正常生长, 开花结果, 而野生种 *A. correntina* 和双二倍体 Am-L 能正常开花, 但不结果。目前研究者指出, 通过嫁接, 接穗后代出现了变异。如绿豆嫁接到凤仙上出现空荚现象, 棉花不同品种嫁接出现不吐絮的现象^[21], 大豆^[22]和绿豆^[23]等通过远缘嫁接可获得变异新种质等。我们之前的研究也表明野生种 *A. correntina* 连续 2 年组培苗移栽田间, 都没有结果, 也可能是环境原因导致, 具体原因还需进一步研究。

花生砧木豫花 0215 采用黑暗培养, 下胚轴达到 6~8cm 时嫁接, 大大提高了嫁接成活率和嫁接效率, 实验步骤简化, 稳定可靠, 易于掌握, 适用于花生野生种材料、双二倍体及转基因植株等组培苗的嫁接, 解决了野生种及后代材料生根困难及移栽成活率低, 以及组培苗移栽后长势较弱等难题, 还省去了生根环节, 缩短了生长周期。

参考文献:

- [1] 董文召,张新友,韩锁义,等. 中国与美国花生生产成本及收益比较分析[J]. 农业科技管理, 2017, 36(5): 57-60.
- [2] 董文召,张新友,黄冰艳,等. 河南、山东育成花生品种的亲本遗传贡献及相关育种策略探讨[J]. 河南农业科学, 2014, 43(12): 40-45.
- [3] 苗利娟,张新友,黄冰艳,等. 河南省育成花生品种的幼叶体细胞胚胎诱导[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(9): 68-70.
- [4] 张月婷,黄家权,晏立英,等. 花生胚小叶高效再生体系的建立[J]. 中国油料作物学报, 2013, 35(4): 389-393.
- [5] 李丽娜,付留洋,秦利,等. 花生栽培种与野生种(*Arachis stenoperma*)种间杂种的创制、鉴定与遗传分析[J]. 中国油料作物学报, 2017, 39(2): 137-144.
- [6] Mallikarjuna N, Deepak R J, Reddy K, et al. Screening new *Arachis* amphidiploids and autotetraploids for resistance to late leaf spot by detached leaf technique[J]. Eur J Plant Pathol, 2012, 132(1): 17-21.
- [7] 李忠,江立庚,唐荣华,等. 花生栽培野杂后代抗病基因类似物的克隆与分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2014, 42(11): 32-38.
- [8] 李长生,夏晗,卢金东,等. 利用嫁接提高花生离体再生或转基因苗成活率的研究[J]. 中国农学通报, 2009, 25(20): 63-67.
- [9] 陶鹏,赵彦婷,李必元,等. 十字花科植物嫁接 mRNA 长距离运输基因 *IAA14* 的鉴定及比较[J]. 分子植物育种, 2016, 14(10): 2574-2581.
- [10] 张红梅,丁明,姜武,等. 不同苗龄接穗西瓜嫁接体愈合的组织细胞学研究[J]. 园艺学报, 2012, 39(3): 493-500.
- [11] 闫海霞,陶大燕,何荆洲,等. 月季和野蔷薇的试管嫁接研究[J]. 西南农业学报, 2017, 30(7): 1636-1641.
- [12] 耿明建,郭丽丽,赵竹青,等. 甘蓝型油菜品种间相互嫁接及其生长发育的影响[J]. 中国油料作物学报, 2009, 31(2): 185-189.
- [13] Filek M, Biesaga-Koscelniak J, Marcinska I, et al. The effects of electric current on flowering of grafted scions of non-vernalized winter rape[J]. Biologia Plantarum, 2003, 46(4): 625-628.
- [14] 王彦霞,王省芬,马峙英,等. 棉花高效嫁接新方法及其应用[J]. 中国农业科学, 2007, 40(2): 264-270.
- [15] Luo J H, Gould J H. In vitro shoot-tip grafting improves recovery of cotton plants from culture[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1999, 57(3): 211-213.
- [16] 曹晓宁,孙石,吴存祥,等. 用于大豆根冠关系研究的嫁接方法[J]. 中国油料作物学报, 2013, 35(5): 579-583.
- [17] Przepiorkowski T, Martin S K S. The effect of grafting on the flowering of near-isogenic lines of soybean[J]. Crop Science, 2003, 43(5): 1760-1763.
- [18] 郝世俊,隋炯明,乔利仙,等. 花生组培苗嫁接技术的研究[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2010, 27(2): 110-113.
- [19] 李冠,尹秀波,崔山,等. 花生离体诱变再生苗的无菌嫁接与移栽[J]. 植物生理学报, 2017, 53(3): 397-406.
- [20] 朱统国,宋传雪,赵长星,等. 不同类型花生嫁接对植株幼苗生长的影响[J]. 农学学报, 2012, 2(10): 5-8.
- [21] 赵智勇. 不同植物嫁接体系的建立及嫁接变异机制的初步研究[D]. 新乡:河南科技学院, 2013.
- [22] 潘相文,孙晓环,张凤芸,等. 大豆远缘嫁接诱变技术的优化[J]. 大豆科学, 2012, 31(2): 237-241.
- [23] Zhang D H, Meng Z H, Xiao W M, et al. Graft induced inheritable variation in mungbean and its application in mungbean breeding[J]. Acta Botanica Sinica, 2002, 44(7): 832-837.

(责任编辑:王丽芳)