



一种大豆苗期嫁接方法的建立

付 星, 高 植, 李欣欣, 廖 红

(福建农林大学 资源与环境学院/根系生物学研究中心, 福建 福州 350002)

摘 要:为建立大豆苗期自体嫁接高成苗率的嫁接体系,本研究以 Williams 82 为材料,对不同生长期的幼苗进行嫁接试验,并比较不同时间的避光缓苗处理对嫁接苗成活率的影响。结果表明,利用萌发 4、7 和 10 d 的幼苗,均能进行嫁接试验。其中,生长 4 d 的幼苗结合 3 d 的避光缓苗处理,成活率高达 83%。由于砧木未保留子叶,此生长期的嫁接有利于开展大豆根-冠关系的研究。当砧木保留子叶时,即利用萌发 7 和 10 d 的幼苗进行嫁接并分别避光缓苗处理 3 和 1 d,嫁接苗均能 100% 成活,是一种较优的大豆嫁接体系。本研究不仅丰富和优化了大豆嫁接技术,也为大豆根-冠生理与分子机制的研究提供了技术支撑。

关键词:大豆;嫁接;方法;成活率

Establishment of a Grafting Process at Seedling Stage of Soybean

FU Xing, GAO Zhi, LI Xin-xin, LIAO Hong

(College of Resources and Environment/Root Biology Center, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: In order to establish the grafting system of soybean seedling stage with high survival rate of self-grafting, the soybean variety Williams 82 was used as the material for grafting experiment at different growth stages, and the survival rate of grafting was compared as affected by different darkness treatments for recovering. The results showed that seedlings at 4, 7 and 10 d after germination all can be utilized for grafting. And the survival rate was as high as 83% when the plant grown at 4 d combined with 3 d of darkness. Due to no cotyledons in the rootstock, the grafting process could contribute to study the relationship between roots and shoots in soybean. When the rootstocks with cotyledons, 7 and 10 d seedlings after germination were used for grafting and separately grown under the conditions of 3 and 1 d in darkness for recovering, all grafting plants could be 100% survived, suggested that it was a better system for soybean grafting. This study could not only enrich and optimize soybean grafting technique, but also provide technical support for the research on the physiological and molecular mechanism of the relationship between roots and shoots in soybean.

Keywords: Soybean; Grafting; Process; Survival rate

植物的生长发育是地下部(根)与地上部(冠)之间相互作用、相互影响的复杂过程。了解根、冠之间的营养交换、物质运输和信号转导对改善作物抗逆性及高产、高效的遗传改良等具有重要意义。大豆是典型的生物固氮作物,与非固氮作物相比,大豆根-冠之间存在更为复杂的物质信息交流。嫁接技术的建立为根-冠关系的研究提供了一个简单、可靠且操作性强的方法。嫁接在我国已有近两千年的历史,是十分重要的农业技艺。嫁接技术的应用,不仅在农业生产实践中取得了很好的成效,同时还推动了植物根-冠以及不同器官之间调控机理的研究^[1-5]。在大豆中,嫁接技术的应用主要体现在研究光周期调控开花途径、花叶病毒长距离运输及结瘤固氮的自我调控机制等方面^[6-9],并成功解析了开花促进物质具有移动性且能够促进大豆开花、NARK (Nodule autoregulation receptor kinase)通过地上部-根系之间的长距离信息交流实现对根瘤数目的控制等^[10-12],说明嫁接技术在大豆生理与分子基础研究中均扮演着重要角色。

嫁接技术虽在大豆中早已应用,所采用的嫁接模式也不尽相同^[13-14],然而,在研究大豆光周期相关的开花途径中多以 Y 型或双枝嫁接为主,嫁接材料的砧木或接穗一般为生长至 1~2 片三出复叶的大龄苗^[15-18]。同时,贾贞等^[19]利用 15~30 d 的大豆苗分析了嫁接体中砧木或接穗保留叶片数对接穗生长发育的影响,但此种嫁接由于根系与地上部相互作用时间过长,不适合于大豆根-冠相关生物学的研究。在采用嫁接方法分析大豆根部包括根瘤在内的器官发育与地上部之间的调控关系时,幼苗越小、嫁接时期越早,成苗率及精确性越高。目前,关于大豆幼苗期嫁接体系方法建立方面的研究比较少见。一般而言,嫁接苗龄的选择对接穗成活率及根-冠之间 C/N 平衡、物质转移和信号转导等研究的精准性影响较大。此外,已有研究指出^[16, 20],不同基因型材料之间的嫁接会影响植株开花和种子发育。暗示基因型背景的差异可能会对大豆根-冠之间物质转移和信号转导等产生影响。同时,在分子机理方面,同一遗传背景条件下的嫁

收稿日期:2018-08-18

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(31601814);中国博士后科学基金第九批特别资助项目(2016T90592)。

第一作者简介:付星(1994-),男,硕士,主要从事大豆结瘤机制研究。E-mail: fuxing5417@163.com。

通讯作者:李欣欣(1984-),女,博士,副教授,主要从事大豆生物固氮生理与分子机制的研究。E-mail:lixinxin0476@163.com。

接体系,更能排除基因型差异对试验结果的干扰。基于此,本研究利用不同生长时期的 Williams 82 大豆幼苗进行自体嫁接并结合不同缓苗处理,建立了一种大豆苗期高成苗率的嫁接体系。该体系的建立,可为大豆生产应用及根冠关系的生理与分子机制的研究提供可参考的方法及技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

供试大豆[*Glycine max* (L.) Merr]为 Williams 82。

1.2 试验设计

挑选均一旦饱满的 Williams 82 种子播种在砂与基质土混合的培养花盆中,分别选取萌发 4,7 和 10 d 的大豆进行自体嫁接。嫁接后的大豆幼苗,转移至花盆中,每盆两株,并立即进行缓苗处理。具体操作包括:套袋保湿并分别避光处理 1,2,3 d。期

间每天使用喷壶喷水两次,维持相对湿度 80% 以上。生长一周后,停止喷水并去掉保湿袋。生长至 20 d 时,比较不同萌发天数及缓苗处理条件下的嫁接苗成活率。每种处理 12 个生物学重复,共嫁接 108 株。其中:

嫁接苗成活率(%) = $\frac{\text{嫁接苗成苗数}}{\text{嫁接苗总数}} \times 100$

试验均在步入式人工培养室中完成。其中,大豆生长条件包括:光照强度为 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$;日照时间为 13 h 白天/11 h 黑夜;室内温度为 26℃ 白天/24℃ 黑夜;室内相对湿度为 65%。

1.3 方法

试验采用劈接法(图 1),将大豆砧木茎的上端纵向切成楔形劈口后,将具楔形末端的接穗插入砧木切口,并缠绕 PARAFILM 封口膜进行固定,使其愈合成苗。

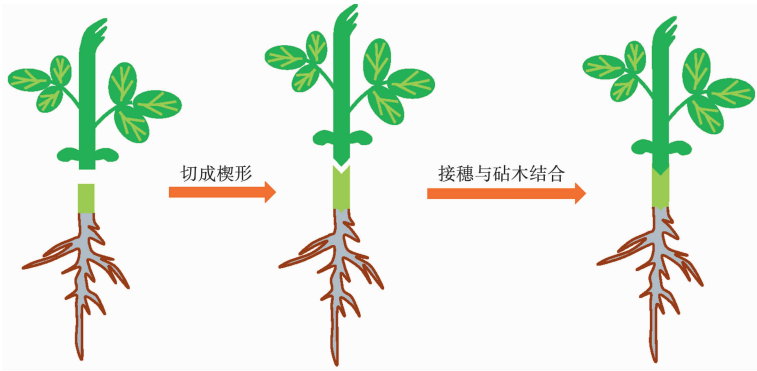
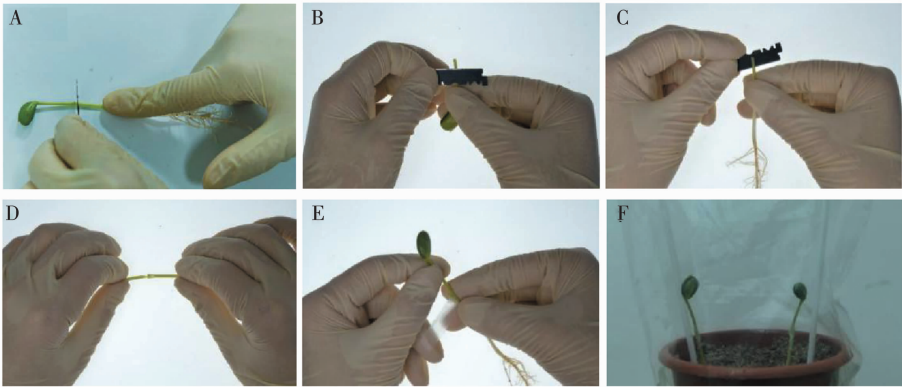


图 1 大豆嫁接示意图

Fig. 1 Schematic of soybean grafting process

1.3.1 大豆萌发 4 d 的嫁接流程 如图 2-A 所示,种子萌发第 4 d,子叶尚未分开。为了提高嫁接苗成活率,利用刀片将幼苗茎的两侧修成 0.5 ~ 1.0 cm 长的双面楔形接穗(图 2B),同时在砧木伤口中间垂直向下切 0.5 ~ 1.0 cm 长的伤口(图 2C),接穗

双楔面对准砧木接口并使二者紧密贴合(图 2D),立即用 PARAFILM 封口膜轻轻缠绕伤口固定(图 2E),随后将嫁接苗移入砂与基质土混合的花盆中并罩上有孔的透明袋保湿(图 2F),避光生长且每天早晚各喷一次水。



A: 切割幼苗;B: 楔形接穗;C: 砧木切口;D: 接穗与砧木贴合;E: 伤口固定;F: 嫁接苗移植。下同。

A: Sectioning seedling; B: Wedge-shaping scion; C: Incising root stock; D: Connecting scion and root stock; E: Fixing wound; F: Transplanting grafted seedlings. The same as below.

图 2 大豆萌发第 4 天的嫁接过程

Fig. 2 Grafting process using the 4th day soybean seedlings

1.3.2 大豆萌发 7 或 10 d 的嫁接流程 种子萌发生长至第 7 天或第 10 天时,植株已长出两片真叶。从子叶处分割植株接穗和砧木(图 3A)。其中,含有真叶部分的为接穗,砧木保留子叶。嫁接过程与

第 4 天一致。
种子萌发生长至 10 d 时,为提高嫁接苗的成活率,将接穗截短至约 5~8 cm 长度后再与砧木结合,其余方法步骤与上述过程一致。

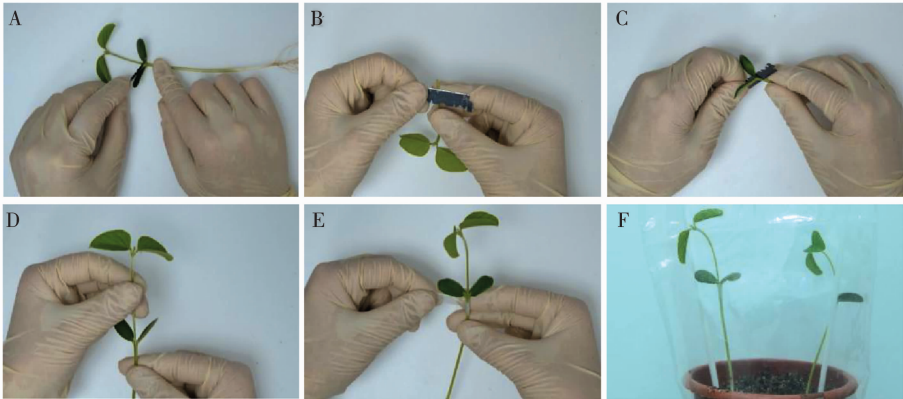


图 3 大豆萌发第 7 天的嫁接过程
Fig. 3 Grafting process using the 7th day soybean seedlings

1.4 数据分析

数据采用 Excel 2013 进行分析计算。

2 结果与分析

2.1 嫁接苗的生长

利用不同萌发时期的大豆进行嫁接。结果如图 4 所示,萌发后 4,7 和 10 d 的大豆根系及地上部虽然呈现出不同的长势,但均能进行嫁接并成功获

得嫁接苗。大豆萌发 4 d 时,由于砧木未保留子叶,所以愈合伤口在下胚轴处。而利用萌发 7 和 10 d 的大豆嫁接,在子叶处形成愈合伤口。将成活的嫁接苗继续培养至嫁接后 10 d 时,即可分辨成活率。成苗后,嫁接苗逐渐形成三出复叶,生长至 20 d 时,成苗后的植株虽长势不同,但均已形成 2~3 个三出复叶。说明,大豆幼苗期无论子叶张开与否,均能进行嫁接试验。



A: 萌发 4 d 的大豆嫁接苗;B: 萌发 7 d 的大豆嫁接苗;C: 萌发 10 d 的大豆嫁接苗。
A: Grafting seedlings at 4 d after germination; B: Grafting seedlings at 7 d after germination;
C: Grafting seedlings at 10 d after germination.

图 4 不同萌发天数的大豆嫁接苗及其生长过程
Fig. 4 Growth process of soybean after grafting at different germination days

2.2 嫁接苗的成活率分析

大豆嫁接苗移植后,进行不同缓苗时间处理的成活率如表 1 所示。利用萌发 4 d 的大豆幼苗进行嫁接,随着缓苗(避光)时间的延长,成活率呈递增趋势,由 66% 增加到 83%;而大豆萌发生长至 10 d 时进行嫁接,嫁接苗的成活率随着缓苗时间的延长而递减,缓苗 1 d 时,嫁接的 12 株苗均能存活,缓苗

2 d 时,成活率为 83%,缓苗 3 d 时,成活率仅为 75%;此外,利用萌发 7 d 的大豆进行嫁接,缓苗时间对成活率影响较小,在 3 种避光处理下,嫁接苗成活率为 83% ~ 100%。表明,在苗期对大豆进行嫁接,萌发天数为 7 d 时,有利于提高嫁接成活率;而利用萌发 10 d 的苗龄进行嫁接,需要配合合理的缓苗时间,亦可增加成苗率。

表 1 大豆嫁接苗的成活率分析
Table 1 Survival rate analysis of grafted soybean plants

萌发天数 Germination days/d	黑暗天数 Dark days/d	成活株数 Survival plants	总嫁接数 Total grafted plants	成活率 Survival rate /%
4	1	8	12	66
	2	9	12	75
	3	10	12	83
	1	11	12	91
7	2	10	12	83
	3	12	12	100
	1	12	12	100
10	2	10	12	83
	3	9	12	75

3 讨 论

利用嫁接技术研究大豆根-冠的信号与物质交流、生物固氮的调控机理时,苗龄越小越有利于提高试验的效率和精度。虽然以往的研究中^[21-22],采用了幼苗通过靠接或插接法获得嫁接苗来解析大豆结瘤的分子机制,由于接穗与砧木的缓苗共生期长达 4 ~ 8 d 不等,大大延长了试验时间。因此,本研究利用不同幼苗期的大豆植株进行嫁接,同时比较不同时间的缓苗处理,尝试建立成苗快,高成活率的大豆嫁接体系,以期为大豆根-冠相关生物学的研究提供技术支撑。

本研究的嫁接方法采用改良的劈接法,主要是将接穗切成 0.5 ~ 1.0 cm 双面楔形。与靠接或插接法的单面楔形相比,双面楔形接穗更有利于与砧木紧密贴合、易于伤口愈合。此外,提高成活率的另一方面是避光缓苗处理,减少蒸腾,且维持 80% 以上的相对湿度 7 d。后期,去掉保湿袋,相对湿度保持在 60% 左右。

子叶本是植物的地上部,其内部存储大量养分并产生多种激素或合成大量调控蛋白而参与植物生长发育过程^[23-24]。因此,在考虑植物根-冠关系及研究地下及地上部之间物质交换和信号调控时,接穗和砧木对子叶的取舍十分重要。尤其是开展与生物固氮相关的研究,植株越小,接种根瘤菌时根系更易被侵染而形成根瘤。基于此,本研究利用

萌发 4 d 子叶尚未张开的大豆幼苗进行嫁接,此时,子叶是保留在接穗上的嫁接模式(图 2 和 4A)。由于植株幼小,根冠互作时间较短并且伤口愈合能力较强,大大缩短了试验周期。虽然成活率比砧木保留子叶且生长 7 或 10 d 的嫁接苗低,但配合合理的缓苗时间,例如避光处理 3 d,成活率亦能达到 83%(表 1)。在增加嫁接样本量的条件下,可以满足相关试验需求。

已有研究表明,大豆子叶在接穗上的嫁接模式容易造成植物“头重脚轻”从而影响植株嫁接的成活率^[14, 20]。子叶在砧木的嫁接,能够保持接穗和砧木之间的平衡,有利于嫁接成苗。本研究也发现,砧木保留子叶时,无论利用萌发 7 d 还是 10 d 的幼苗进行嫁接,均有较高的成活率(表 1)。然而,缓苗时间对嫁接成苗影响较大。利用生长 7 d 的幼苗嫁接,缓苗 3 d 处理,12 株嫁接苗均能成活;利用生长 10 d 的幼苗嫁接,缓苗 1 d 处理,嫁接苗能 100% 成活,并随着避光时间的延长,成活率下降(表 1)。由此可见,砧木保留子叶,结合合理的缓苗时间,有利于提高大豆嫁接成苗率。

4 结 论

本研究利用不同苗龄的大豆进行嫁接并结合不同缓苗时间处理,通过比较嫁接苗的成活率,建立了一种大豆苗期高成活率的嫁接方法体系。选择萌发 4 d 的幼苗进行嫁接并结合 3 d 避光缓苗处

理,能提高嫁接成活率,且适用于大豆根-冠关系的研究。在不考虑子叶对根系生长的影响时,砧木保留子叶,利用萌发 7 或 10 d 的幼苗嫁接,分别结合避光缓苗处理 3 和 1 d,嫁接苗均能 100% 成活,本试验构建了一种高成活率的嫁接模式。本研究丰富和优化了大豆嫁接技术,嫁接体系的建立可为大豆根-冠互作、结瘤固氮的生理与分子机理的研究提供可靠且操作性强的方法参考。

参考文献

[1] Moreno B, Jacob C, Rosales M, et al. Yield and quality of grafted watermelon grown in a field naturally infested with fusarium wilt [J]. Hort Technology, 2016, 26 (4): 453-459.

[2] Xu Y, Guo S R, Li H, et al. Resistance of cucumber grafting rootstock pumpkin cultivars to chilling and salinity stresses[J]. Korean Journal of Horticultural Science & Technology, 2017, 35 (2): 220-231.

[3] Chen X, Yao Q, Gao X, et al. Shoot-to-root mobile transcription factor HY5 coordinates plant carbon and nitrogen acquisition[J]. Current Biology, 2016, 26 (5): 640-646.

[4] Ham B K, Lucas W J. Phloem-mobile RNAs as systemic signaling agents[J]. Annual Review of Plant Biology, 2017, 68 (1): 173-195.

[5] Jin S, Jung H S, Chung K S, et al. FLOWERING LOCUS T has higher protein mobility than TWIN SISTER of FT[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66 (20): 6109-6117.

[6] Cober E R, Curtis D F. Both promoters and inhibitors affected flowering time in grafted soybean flowering time isolines[J]. Crop Science, 2003, 43 (3): 886-891.

[7] Heinze P H, Parker M W, Borthwick H A. Floral initiation in Biloxi soybean as influenced by grafting[J]. Botanical Gazette, 1942, 103 (3): 518-530.

[8] 姚贵滨,李文龙,赵永山,等. 嫁接技术在大豆花叶病毒长距离运输机制研究上的应用[J]. 河北农业大学学报, 2010, 33 (6): 74-77. (Yao G B, Li W L, Zhao Y S, et al. The application of graft technique in the soybean for investigation of soybean mosaic virus transporting mechanism[J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2010, 33 (6): 74-77.)

[9] Sheng C, Harper J E. Shoot versus root signal involvement in nodulation and vegetative growth in wild-type and hypernodulation soybean genotypes[J]. Plant Physiology, 1997, 113: 825-831.

[10] 许鑫. 早熟大豆子叶的开花促进效应研究[D]. 北京:中国农业科学院,2017. (Xu X. Study of flowering promoting effect of early-maturing soybean's cotyledons[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences,2017.)

[11] Lim C W, Lee Y W, Hwang C H. Soybean nodule-enhanced CLE peptides in roots act as signals in GmNARK-mediated nodulation

suppression[J]. Plant & Cell Physiology, 2011, 52 (9): 1613-1627.

[12] Reid D E, Ferguson B J, Gresshoff P M. Inoculation-and nitrate-induced CLE peptides of soybean control NARK-dependent nodule formation [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2011, 24 (5): 606-618.

[13] 贾贞,韩天富. 嫁接技术在大豆生理和育种研究中的应用. 大豆科学, 2010, 29 (1): 136-143. (Jia Z, Han T F. Uses of grafting techniques in the studies of physiology and breeding of soybean[J]. Soybean Science, 2010, 29 (1): 136-143.)

[14] 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. (Cao X N, Sun S, Wu C X, et al. Grafting techniques for root-shoot relationship study in soybean[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2013, 35 (5): 579-583.)

[15] Borthwick H A, Parker M W. Photoperiodic perception in Biloxi soybeans[J]. Botanical Gazette, 1938, 100: 374-387.

[16] Shanmugasundaram S, Wang C C, Toung T S. Photoperiodic response of flowering in two-branched soybean plants[J]. Botanical Gazette, 1979, 140 (4): 4141-4147.

[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] Sun H, Jia Z, Cao D, et al. *GmFT2a*, a soybean homolog of *FLOWERING LOCUS T*, is involved in flowering transition and maintenance[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e29238.

[19] 贾贞,吴存祥,王妙,等. 大豆嫁接体系中砧木或接穗保留叶片数对接穗生长发育的影响[J]. 作物学报, 2011, 37 (4): 650-660. (Jia Z, Wu C X, Wang M, et al. Effects of leaf number of stock or scion in graft union on scion growth and development of soybean[J]. Acta Agronomica Sinica, 2011, 37 (4): 650-660.)

[20] Pantalone V R, Rebetzke G J, Burton J W, et al. Soybean PI416937 root system contributes to biomass accumulation in reciprocal grafts[J]. Agronomy Journal, 1999, 91: 840-844.

[21] Cho M J, Harper J E. Root isoflavonoid response to grafting between wild-type and nodulation mutant soybean plants[J]. Plant Physiology, 1991, 96(4): 1277-1782.

[22] Balatti P A, Pueppke S G. Cultivar-specific interactions of soybean with rhizobium *fredii* are regulated by the genotype of the root [J]. Plant Physiology, 1990, 94(4): 1907-1909.

[23] Matsuoka K, Sugawara E, Aoki R, et al. Differential cellular control by cotyledon-derived phytohormones involved in graft reunion of *Arabidopsis* hypocotyls[J]. Plant & Cell Physiology, 2016, 57 (12): 2620-2631.

[24] Yoo S J, Hong S M, Jung H S, et al. The cotyledons produce sufficient FT protein to induce flowering: Evidence from cotyledon micrografting in *Arabidopsis* [J]. Plant & Cell Physiology, 2013, 54 (1): 119-128.