

盐生植物盐芥高效率嫁接体系的构建

游美红, 李燕, 蔡宝珊, 刘书林, 谭倩, 孙伟* (山东师范大学生命科学学院逆境植物重点实验室, 山东济南 250014)

摘要 [目的]构建盐生植物盐芥高效率嫁接体系。[方法]利用拟南芥下胚轴水平切割的方法进行了盐芥的无菌嫁接。[结果]苗龄是影响嫁接成功与否的关键因素, 萌发7~10 d的幼苗为最佳嫁接苗, 苗龄过小或过大均不利于嫁接, 同时不同的蔗糖浓度及铁盐也对嫁接有一定影响。[结论]盐芥嫁接体系的成功构建为进一步研究盐生植物地上与地下互作及长距离信号传递的耐逆分子机理提供了参考。

关键词 嫁接; 盐芥; 下胚轴

中图分类号 S-03 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)27-0020-03

Construction of an Efficient Grafting System for Halophyte *Eutrema salsuginea*

YOU Mei-hong, LI Yan, CAI Bao-shan, SUN Wei* et al (Key Laboratory of Plant Stress Research, College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan, Shandong 250014)

Abstract [Objective] The aim was to establish an efficient grafting system for halophyte *Eutrema salsuginea*. [Method] The sterile grafting of *Eutrema salsuginea* was realized by using a new method of grafting which used the hypocotyl horizontal cutting method with a two edge razor blade. [Result] The size of the age of seedling was the key factor that affected the success of the graft; the germination 7-10 days of seedlings was the best grafting period, and too small or too large seedlings were not good for grafting. Furthermore, different concentrations of sucrose and molybdate also had certain influence on grafting. [Conclusion] This method will be good for the study of between ground and underground interactions and the molecular mechanism of the long distance signal transmission of halophytes.

Key words Grafting; *Eutrema salsuginea* (*Thellungiella salsuginea*); Hypocotyl

微嫁接是一种在试管内将砧木与接穗进行嫁接的技术, 是植物组织培养与嫁接技术的结合^[1-3]。微嫁接技术已广泛应用于柑橘、苹果、桃、葡萄和龙眼等多种果树的研究与生产中。微嫁接具有其自身特有的优越性^[1,4]: 周期短、费用低、占地少、成活率高; 进行微嫁接后, 生长条件可以人为控制, 提高了有关科学研究的可信度; 不受季节的限制和环境的影响, 可以在实验室常年进行; 有利于进行嫁接亲和力的研究。微嫁接中的草本植物的嫁接不像果树、林木等木本植物的嫁接要求砧木和接穗的形成层要对齐相接。无论草本植物还是木本植物的嫁接, 影响嫁接成活的因素主要取决于砧木与接穗的亲合力。此外, 砧木与接穗的质量同样也是影响嫁接成活的重要因素, 温度、湿度及光照等方面的差异也会影响嫁接的成活率。另外, 不同物种不同时期的嫁接成活率也不同, 即使是同一物种在不同时期, 其嫁接体的成活率也相差很大。

植物的嫁接是研究长距离信号传递、基因转移及地上与地下部分互作分子机理的理想方法之一。关于植物遗传学双子叶植物研究中的模式植物拟南芥的嫁接技术早在20多年以前就有报道^[5-6], 拟南芥这种体型微小的植物体的嫁接难度很大, 各种方法均能实现, 但效率不高, 比如下胚轴的嫁接中, 最早利用下胚轴切割进行拟南芥嫁接的报道中成功率不超过50%^[7]。拟南芥嫁接系统可用于研究物质运输、信号传导、成花诱导、系统抗性、非生物胁迫的应答^[5,7-12]及smRNA调控^[13-14]、信号长距离应答、基因沉默^[15-16]等很多方面。拟南芥合适的嫁接位点是花序轴和下胚轴部位。花序

轴部位的嫁接可以采用劈接和平接的方法^[5-6], Turnbull等^[7]首次建立了拟南芥下胚轴嫁接系统, 采用在培养皿中生长的拟南芥幼苗, 在超净台的体视显微镜下, 将幼苗从下胚轴部位(子叶稍靠下部位)切断, 然后进行自体或同种嫁接。而作为同属于十字花科的盐芥, 与拟南芥有很多相似性状, 其全基因组测序也早已完成, 以盐芥作为耐盐模式植物来研究植物耐盐机理及分子机制也越来越受到科学家的重视, 但有关盐芥嫁接方法的研究鲜见报道。鉴于此, 笔者采用微嫁接技术构建了盐生植物盐芥高效率嫁接体系, 以期为进一步研究盐生植物地上与地下互作及长距离信号传递的耐逆分子机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 中国山东东营生态型盐芥 *Eutrema salsuginea* (*Thellungiella salsuginea*)。

1.2 方法 采用下胚轴水平切割法进行植物微嫁接中的自体嫁接和同种嫁接。

1.2.1 砧木和接穗材料的准备。 将籽粒饱满的盐芥种子用0.5% NaClO 消毒并种在固体培养基(含0.4% Sigma Gelzan™ CM Agar、1% 蔗糖、0.15 mmol/L Fe²⁺的1/2MS培养基)上, 该过程在无菌超净台上操作。4℃层积7d后置于短日照或长日照光照培养箱内竖直培养萌发备用。种子消毒是直接用于0.5% NaClO 消毒6~8 min, 然后用无菌水清洗4~6次。

1.2.2 切割及嫁接。 将萌发后7~10d长势一致的无菌苗盐芥用镊子移至新的固体培养基上, 用双面刀片将盐芥的下胚轴距上端约小于1/2处水平切割, 切开的地上部分为接穗, 切下的地下部分作为砧木备用。并在解剖镜下将二者切口在内径/外径为0.3/1.5 mm的无菌塑料管中对接好, 每个直径9 cm培养皿中可以嫁接7~14株, 嫁接后及时将培养皿封口以保湿。该过程在无菌超净台上操作。用于嫁接的培养基中的蔗糖含量多少也影响着嫁接苗的成活率, 根据筛选

基金项目 山东省良种工程种质资源与创新项目(2014-棉花); 国家级大学生创新项目(201610445114)。

作者简介 游美红(1997—), 女, 山东青岛人, 本科生, 专业: 生物科学。
* 通讯作者, 讲师, 博士, 从事植物耐逆分子生物学研究。

收稿日期 2017-07-21

试验发现培养基的差别不大,而不同浓度的蔗糖对嫁接苗的成活率影响存在较大差异,其中以 1% 蔗糖更有利于嫁接苗的成活,且其他条件不变的情况下污染大大降低。

1.2.3 嫁接体的培养。将嫁接好的盐芥/盐芥复合体置于短日照光照培养箱中竖直培养 10~15 d。

1.2.4 嫁接苗的移栽。将嫁接后培养 10~15 d 的嫁接复合体在解剖镜下观察嫁接接口是否连接好,将嫁接成功的嫁接苗根据试验需要移栽至水培或营养土中继续培养。在该期间嫁接苗接穗下胚轴若有侧根出现,及时剪去。

1.2.5 嫁接条件。上述嫁接方法中,长日照条件为 16 h 光照/8 h 黑暗,光照条件下的温度为 21~23 °C,黑暗条件下的温度为 18~20 °C,光强为 8 000 lx,相对湿度大于 70%。而“1.2.3”和“1.2.4”的短日照条件为 8 h 光照/16 h 黑暗,温度、光强及湿度同长日照条件。

2 结果与分析

2.1 不同发育时期的无菌苗对嫁接效率的影响 作为砧木和接穗的盐芥幼苗,其萌发时间的选择会影响嫁接的成活率

表 1 萌发时间对嫁接苗的影响

Table 1 Effect of seedlings age in grafting success

接穗砧木萌发后天数 Days after germination of scion root stock	嫁接数量 Number of grafting 株	嫁接成功数 Number of successful grafting seedlings//株	成活率 Survival rate %	平均侧根数量 Average number of lateral root//个	后期长势 Growth vigor at late stage
3~5	100	74	74	0.75	瘦弱
7~10	100	96	96	0.08	正常
15+2	100	90	90	0.10	正常

选用萌发 7~10 d 的略大的盐芥幼苗,其侧根已长出,且细胞分生能力强,能大大提高嫁接成活率及保证嫁接苗后期生长旺盛。由于盐芥在萌发初期生长缓慢,在营养土中萌发后的前 21 d 为其生长缓慢期,21 d 后会迅速生长,在培养皿中其生长缓慢期有所缩短,但仍存在,在萌发 7 d 后会迅速生长,所以用较小苗嫁接一方面不易成活,另一方面很容易导致嫁接后的嫁接苗生长缓慢,侧根较多且长势较差,选用萌

表 2 蔗糖含量对嫁接苗的影响

Table 2 Effect of sucrose content of the medium in grafting success

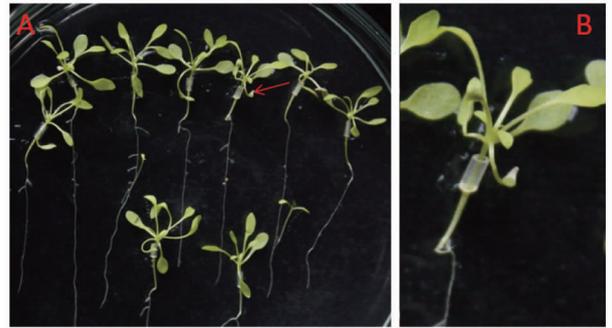
蔗糖浓度 Sucrose concentration %	植株生长状况 Growth condition of plant		培养基受污染程度 Pollution degree of medium
	对叶的影响 Effect on leaf	对根的影响 Effect on root	
0	叶片较小,且黄化	根细小,下胚轴细弱	低
0.5	叶片较小,且黄化	根细小,下胚轴偏细弱	低
1.0	叶片大小、颜色均正常	根及下胚轴生长正常	偏低
2.0	叶片大小、颜色均正常	根及下胚轴生长正常	偏高
3.0	叶片大小、颜色均正常	根及下胚轴生长正常	高

2.3 Fe²⁺ 浓度对嫁接苗的影响 进一步对固体培养基中 Fe²⁺ 浓度进行调整,观察嫁接后嫁接苗的成活率。由表 3 可知,用于嫁接的 Fe²⁺ 的浓度也影响着嫁接苗的成活率,根据筛选发现不同浓度的 Fe²⁺ 对嫁接苗的成活率影响存在差异,其中 0.15 mmol/L 铁盐更有利于嫁接苗的正常生长。

3 结论与讨论

本研究采取的方法为草本植物嫁接中的微嫁接技术,即利用拟南芥下胚轴水平切割的方法进行超净台无菌嫁接。

以及嫁接苗后期的长势。对于砧木苗和接穗苗选择调整为:萌发后 7~10 d 的盐芥无菌苗,嫁接后嫁接苗的成活率以及后期长势最好(表 1)。嫁接成功的嫁接苗如图 1 所示。



注: B 为 A 中箭头所示放大图

Note: B was the enlarge image indicated by an arrow of A

图 1 嫁接成功的盐芥自嫁接苗(盐芥/盐芥)

Fig. 1 The successful grafting seedlings of *Eutrema salsuginea* (Es/Es)

发 7~10 d 的幼苗既利于提高嫁接苗的成活率,还能进一步保证嫁接苗后期生长的旺盛强壮。

2.2 蔗糖浓度对嫁接苗的影响 对固体培养基中蔗糖的浓度进行调整,并观察不同浓度蔗糖对嫁接苗成活率的影响。由表 2 可知,蔗糖的浓度也影响着嫁接苗的成活率,不同浓度的蔗糖对嫁接苗的成活率影响存在较大差异,其中 1.0% 蔗糖有利于嫁接苗的成活且污染最小。

通过比较发现不同时期的盐芥苗影响着嫁接的成活率。这与文献报道一致,Navarro 等^[17]发现用作砧木或接穗的试管苗的苗龄对微嫁接的成活起非常关键的作用。其他科研人员也证明了用作砧木或接穗的苗龄影响嫁接成活率^[18-21]。该研究发现,用萌发后 7~10 d 的无菌盐芥苗做接穗和砧木其嫁接成活率最高,较大与较小苗龄的无菌苗嫁接成活率均较低。该研究同样发现完全借鉴利用拟南芥嫁接的方法,用刚刚萌发 3~5 d 的盐芥嫁接很难成活,即使接合部位能够暂

时愈合,后期生长缓慢,大部分最终不易成活,效率很低。而用萌发 7 d 后的幼苗嫁接成活率能达到 96% 以上,而且很少出现侧生根,嫁接不成功的为 4%,主要原因是嫁接时虽然对接成功,但嫁接完封血后,接穗的叶子由萎蔫到恢复自然状态时导致接穗与砧木错位,只要不错位,能达到 100% 的成功率。

表 3 Fe²⁺ 含量对嫁接苗的影响

Table 3 Effect of Fe²⁺ concentration of the medium on grafting success

Fe ²⁺ 浓度 Fe ²⁺ concentration//mmol/L	植株生长状况 Growth condition of plant
0.05	植株瘦小,叶片小且失绿严重
0.10	植株瘦弱,叶片较小且有失绿现象
0.15	植株生长正常,叶片大小颜色均正常
0.20	植株生长基本正常,叶片较绿
0.30	植株生长略受抑制,叶片较绿但较小

在柑橘的微嫁接过程中^[17]发现培养基中蔗糖浓度对微嫁接的成活起非常关键的作用,培养基中的蔗糖浓度为 7.5% 时,微嫁接成活率最高为 90%;而蔗糖浓度为 2.5% 时,成活率仅为 55%。该研究发现蔗糖含量的多少也会影响嫁接的效率,当蔗糖浓度为 1.0% 时效果较好,因为是无菌嫁接,而且操作过程时间较长,易污染,蔗糖浓度太高,污染程度增大,反而降低了嫁接苗的成活率。

该研究还发现普通的 1/2MS 培养基中盐芥幼苗的叶子发黄,当适当增加 Fe²⁺ 的浓度后,幼苗叶子会变正常,并且 0.15 mmol/L 铁盐更有利于盐芥幼苗及嫁接苗的正常生长。

综上所述,在几个影响因素中,起决定作用的是盐芥无菌苗的苗龄,若选择太小的幼苗做接穗和砧木,因为盐芥自身发育的特点,该时期植株生长缓慢,导致嫁接苗生长缓慢,侧根多而不易成活,即使成活,后期长势也弱。而太大的苗子不易切割,分生组织没有幼苗活跃,嫁接效率下降。萌发后 7~10 d 的无菌苗是最佳嫁接苗,易切割,易成活,嫁接效率最高。

盐芥作为一种极度耐盐、干旱、低温、高热等非生物胁迫的盐生植物的模式植物^[22-23],在过去的十多年间被广泛应用于非生物胁迫的生理生化及分子生物学方面的研究,其嫁接体系的成功构建将为研究植物体中水平基因转移、信号转导、非生物胁迫等生理生化特别是植物耐盐分子机理方面提供参考。

参考文献

- [1] JONARD R, HUGARD J, CACHEIX J J, et al. *In vitro* micrografting and its applications to fruit science[J]. *Sci Hortic*, 1983, 20(2): 147-159.
- [2] ESTRADA-LUNA A A, LÓEZ-PERALTA C, CÁDENAS-SORIANO E. *In vitro* micrografting and the histology of graft union formation of selected species of prickly pear cactus (*Opuntia* spp.) [J]. *Sci Hortic*, 2002, 92(3/

4): 317-327.

- [3] MURASHIGE T, BITTERS W P, RANGAN T S, et al. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free citrus clone [J]. *J Hortic Sci*, 1972, 7: 118-119.
- [4] OLLAT N, POIZAT C, LIMA D S A, et al. Quantitative root-stock-scion relationships in grapevine: Investigations by the analysis of reciprocal micrograftings. Book of abstracts of 6th international symposium on grape vine [J]. *Physiology and biotechnology*, 2000, 11(15): 70-71.
- [5] TSUKAYA H, NAITO S, REDEI G P, et al. A new class of mutations in *Arabidopsis thaliana*, *acaulis* 1, affecting the development of both inflorescences and leaves [J]. *Development*, 1993, 118: 751-764.
- [6] RHEE S Y, SOMERVILLE C R. Flat-surface grafting in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant molecular biology reporter*, 1995, 13(2): 118-123.
- [7] TURNBULL C G N, BOOKER J P, LEYSER H M O. Micrografting techniques for testing long-distance signalling in *Arabidopsis* [J]. *The plant journal*, 2002, 32(2): 255-262.
- [8] LIN M K, BELANGER H, LEE Y J, et al. FLOWERING LOCUS T protein may act as the long-distance florigenic signal in the cucurbits [J]. *Plant cell*, 2007, 19(5): 1488-1506.
- [9] CORBESIER L, VINCENT C, JANG S, et al. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis* [J]. *Science*, 2007, 316(5827): 1030-1033.
- [10] AYRE B G, TURGEON R. Graft transmission of a floral stimulant derived from constants [J]. *Plant physiology*, 2004, 135(4): 2271-2278.
- [11] CHEN A, SCHROEDER J I. An improved grafting technique for mature *Arabidopsis* plants demonstrates long-distance shoot-to-root transport of phytochelatins in *Arabidopsis* [J]. *Plant physiology*, 2006, 141(1): 108-120.
- [12] 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*, 2012, 54(1): 119-128.
- [13] BUHTZ A, PIERITZ J, SPRINGER F, et al. Phloem small RNAs, nutrient stress responses, and systemic mobility [J]. *BMC plant biology*, 2010, 10(1): 1-13.
- [14] MOLNAR A, MELNYK C W, BASSETT A, et al. Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells [J]. *Science*, 2010, 328(5980): 872-875.
- [15] LIANG D C, WHITE R G, WATERHOUSE P M. Gene silencing in *Arabidopsis* spreads from the root to the shoot, through a gating barrier, by template-dependent, nonvascular, cell-to-cell movement [J]. *Plant physiology*, 2012, 159(3): 984-1000.
- [16] BROSNAN C A, MITTER N, CHRISTIE M, et al. Nuclear gene silencing directs reception of long-distance mRNA silencing in *Arabidopsis* [J]. *PNAS*, 2007, 104(37): 14741-14746.
- [17] NAVARRO L, ROISTACHER C N, MURASHIGE T. Improvement of shoot tip grafting *in vitro* for virus-free citrus [J]. *Jam Soc Hortic Sci*, 1975, 100: 471-479.
- [18] PALMA B, VOGT G F, NEVILLE P. A combined *in vitro/in vivo* method for improved grafting of *Acacia senegal* (L.) Willd [J]. *J Hortic Sci*, 1996, 71(3): 379-381.
- [19] PALMA B, VOGT G F, NEVILLE P. La microgreffe, une solution pour la multiplication *in vitro* de l'*Acacia senegal* (L.) Willd? [J]. *Annales des sciences forestières*, 1997, 54(2): 203-210.
- [20] 宋瑞琳, 吴如健, 柯冲. 茎尖嫁接脱除柑桔主要病原的研究 [J]. *植物病理学报*, 1999, 29(3): 275-279.
- [21] 李耿光, 胡兰娟, 黄群声, 等. 柑桔茎尖培养的初步研究 [J]. *植物生理学报*, 1978, 4(2): 189-196.
- [22] AMTMANN A, BRESSAN R, BOHNERT H, et al. Learning from evolution: *Thellungiella* generates new knowledge on essential and critical components of abiotic stress tolerance in plants [J]. *Molecular plant*, 2009, 2(1): 3-12.
- [23] WU H J, ZHANG Z H, WANG J Y. Insights into salt tolerance from the genome of *Thellungiella salsuginea* [J]. *PNAS*, 2012, 109(30): 1-6.

(上接第 19 页)

- [8] 张超, 尹礼国, 朱文优, 等. 富硒红发夫酵母补料分批培养研究 [J]. *食品工业科技*, 2011(9): 220-222.
- [9] 陈福生, 杨清华. 不同添加时间和添加量组合对酵母富硒效果的影响 [J]. *中国酿造*, 2004, 23(9): 14-16.

- [10] 贺立东. 分光光度法测定富硒酵母中有机硒的含量 [J]. *食品工业科技*, 2000, 21(5): 67-68.
- [11] 李爱芬, 刘振乾, 徐宁, 等. 微量元素硒载体酵母发酵的研究 [J]. *暨南大学学报(自然科学与医学版)*, 2004, 25(5): 626-631.
- [12] 柴丽红, 苗丹. 安琪活性干酵母的富硒研究 [J]. *食品与机械*, 2005, 21(6): 38-40, 75.