

花生离体诱变再生苗的无菌嫁接与移栽

李冠¹, 尹秀波², 崔山³, 乔利仙¹, 隋炯明¹, 姜德锋¹, 王晶珊^{1,*}

¹青岛农业大学生命科学院/山东省高校植物生物技术重点实验室, 山东青岛266109; ²山东省农业技术推广总站, 济南250013; ³青岛谱尼测试有限公司, 山东青岛266101

摘要: 为解决花生(*Arachis hypogaea*)离体诱变再生苗生根难、驯化移栽成活率低等问题, 本文首先研究确立了花生再生苗无菌嫁接及其简单有效的移栽方法, 然后以花生品种‘花育20号’、‘花育22号’、‘花育25号’和‘鲁花11号’胚小叶离体诱变再生苗作为接穗, ‘花育23号’无菌萌发10~13 d的实生苗为砧木进行无菌嫁接和移栽, 结果表明: 沙是适宜的砧木种子无菌萌发培养基; 砧木子叶节以下的下胚轴是适宜的嫁接部位; 嫁接苗直接移栽田间, 不仅操作简单, 节省人力物力, 而且嫁接苗生长快, 成活率高, 4个供试品种的嫁接苗移栽成活率均达到90%以上。田间观察发现, ‘花育20号’中有1株诱变再生嫁接苗当代发生明显变异, 茎枝颜色由绿色突变为紫色, 叶片形状由椭圆形突变为长椭圆形。

关键词: 花生; 离体诱变; 再生苗; 无菌嫁接; 移栽

花生是重要的油料作物和经济作物之一, 优质专用多抗性花生新品种对提高花生产值、增加农民收益有重要意义(唐月异等2014; 邓祖丽颖等2013; 迟晓元等2014)。然而花生遗传基础狭窄, 多样性较差(王允等2015; 董文召等2015), 已经在很大程度上限制了花生杂交育种获得突破性进展(王晶珊等2013)。诱变能够产生自然界不存在的或极为罕见的新性状、新个体(于新玲等2012; 刘进平和郑成木2004; 王鹏等2015b), 而离体诱变和常规诱变育种相比可扩大变异范围, 增加选择机率, 克服突变体嵌合现象(王莉莉等2011), 与离体定向筛选相结合能节省人力、物力、财力, 缩短育种年限(刘进平和郑成木2002; 吴伟刚等2005), 是获得新种质的有效手段(孙光祖等1998; 邓衍明等2014)。但离体诱变技术是否能够成功应用, 关键步骤之一是诱变的再生苗是否能够成功移栽于田间及移栽苗是否能结果, 因为花生再生苗生根率低, 生根的质量差, 即使能生根, 其主根上长出的须根少, 也会造成移栽成活率低(郝世俊等2010)。再生苗嫁接是解决再生苗不易生根的有效手段(姜长阳和邹侠2003; 王伟等1999; 王彦霞等2007), 但花生再生苗嫁接技术研究报道较少(郝世俊等2010; 李长生等2009), 有效的再生苗嫁接技术及移栽方法的确立将为花生离体诱变在生产中的应用提供重要依据。

本课题组在前期研究中确立了花生胚小叶组织培养和离体诱变方法(赵明霞等2011; Zhao等2012), 本论文以已确立的方法为基础对花生组培苗和离体诱变再生苗的无菌嫁接及简单有效的移

栽方法进行研究, 旨在为花生离体诱变技术的广泛利用提供参考。

材料与方法

1 供试品种

组织培养及离体诱变培养材料: 花生(*Arachis hypogaea* L.)品种‘花育20号’、‘花育22号’、‘花育25号’和‘鲁花11号’。‘花育20号’、‘花育22号’和‘花育25号’由山东省花生研究所提供, ‘鲁花11号’由青岛农业大学遗传教研室保存。

砧木材料: 花生品种‘花育23号’, 由山东省花生研究所提供。

2 试验方法

2.1 培养基及培养条件

体细胞胚诱导培养基为MS培养基中添加10 mg·L⁻¹ 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)。诱变培养基是在体细胞胚诱导培养基中添加4 mg·L⁻¹ 平阳霉素(pingyangmycin, PYM)。体细胞胚萌发培养基为MS培养基中添加4 mg·L⁻¹ 6-苄氨基嘌呤(6-benzylaminopurine, BAP)。所有培养基均添加3%蔗糖和0.8%琼脂, pH调至5.8, 培养条件均为(25±1)°C, 13 h·d⁻¹ 54 μmol·m⁻²·s⁻¹光照。

2.2 砧木材料的准备

选择成熟饱满的‘花育23号’干种子先后浸于75%的酒精中1 min和0.1% HgCl₂溶液中20 min进

收稿 2016-08-25 修定 2017-01-18

资助 国家自然科学基金(31471542和31571705)和山东省科技发展计划(2014GNC110002)。

* 通讯作者(E-mail: jswang319@126.com)。

行表面消毒,再用无菌水漂洗4~5次后接种于培养瓶中催芽。催芽培养基质分别采用沙和MS液体培养基(内置脱脂棉)两种处理(均经高压灭菌)。沙中催芽是将种子埋于约2 cm深的沙中,液体培养基中催芽是将种子置于脱脂棉的表面。

2.3 组织培养再生苗的获得

选用‘花育20号’成熟干种子进行表面消毒后,取种子的胚小叶(每个种子8个胚小叶)接种到体细胞胚诱导培养基上诱导体细胞胚的形成。培养4周后将形成体细胞胚的外植体转移到体细胞胚萌发培养基上进行培养,诱导体细胞胚萌发成苗。当小苗长到1.5 cm以上时便可作为接穗进行嫁接及其移栽试验。

2.4 离体诱变再生苗的获得

选取‘花育20号’、‘花育22号’、‘花育25号’和‘鲁花11号’成熟饱满的干种子进行表面消毒后,剥取胚小叶接种到诱变培养基上进行诱变培养,同时诱导体细胞胚的形成。

诱变培养2周后,采用石蜡切片法观察体细胞胚的形成情况。培养4周后,将成活的外植体转移到体细胞胚萌发培养基上进行培养,每4周继代培养一次直到体细胞胚萌发长成小苗(苗高1.5 cm以上),便可作为接穗进行嫁接。

2.5 嫁接

嫁接方法采用劈接法(杨瑞2007),砧木实生苗嫁接接口分别采用在子叶节以上的主茎上和子叶节以下的下胚轴两种处理方法。利用无菌催芽约10~13 d苗龄的实生苗作为砧木,从中间纵切,切口深0.7~1 cm。以体细胞胚萌发再生小苗作为接穗,将再生小苗从外植体基部切下,切成“V”字形,切口浅于砧木切口。接穗插于砧木后,用封口膜缠绕包紧,一则使砧木和接穗的形成层紧密接触,二则避免切口失水。将嫁接苗再扦插于培养瓶中,在培养室中闭瓶培养3 d,促使嫁接接口愈合。

2.6 嫁接苗的驯化移栽

嫁接苗在培养室闭瓶培养3 d,打开瓶口约1/10炼苗2 d后进行移栽。移栽采用两种方法,第一种方法是将嫁接苗移栽于盛有经灭菌的育苗基质(草碳土:蛭石=2:1)的塑料杯中,放于驯化室内培养,最初2周保持湿度在80%以上。培养3周后将嫁接苗移栽于青岛农业大学试验田。移栽最初的2

周上午9:00至下午16:00搭遮荫网,防止太阳直晒,2周后撤去遮荫网,按常规田间管理。第二种方法是将经过炼苗2 d的嫁接苗直接移栽于塑料拱棚的土壤中(青岛农业大学试验田)。嫁接苗栽植于土壤后随即浇足水,一则供给嫁接苗根系需水,二则提高塑料拱棚内空气湿度,移栽前期保证空气湿度在80%以上。移栽最初的2周同样上午9:00至下午16:00搭遮荫网,2周后撤去遮荫网,并通风。移栽3周后,撤去临时搭建的塑料拱棚,栽培管理按普通大田管理方法进行。移栽3周后调查嫁接苗移栽成活率,并观察生长发育及开花期。

嫁接苗移栽成活率=最终成活的嫁接苗数/最初移栽的嫁接苗数×100%。

2.7 离体诱变再生苗的嫁接和移栽

离体诱变再生苗的嫁接和移栽以上述试验确立的适宜方法进行,即采用沙作为砧木种子无菌萌发培养基质,嫁接接口在砧木子叶节以下的下胚轴,嫁接苗直接移栽田间。嫁接苗生长发育期间进行田间观察,比较与诱变亲本的异同,判断是否诱变当代发生性状变异。

实验结果

1 不同移栽方法对嫁接苗生长发育和成活率的影响

‘花育20号’种子胚小叶在添加2,4-D的诱导培养基上培养4周后,约75%的外植体形成体细胞胚。当转移到含有BAP的体细胞胚萌发培养基上后,体细胞胚萌发长成小苗,每个外植体可获得7个以上再生小苗。以再生小苗(高1.5 cm以上)为接穗,无菌催芽10~13 d苗龄的‘花育23号’实生苗作为砧木在超净工作台内进行无菌嫁接。嫁接苗在培养室闭瓶培养3 d再开瓶口炼苗2 d后分别直接移栽田间和经驯化室培养3周后移栽田间。将嫁接苗成活率和始花期所需天数等列于表1。由表1可见,直接移栽于试验田的嫁接苗无染菌现象,成活率达到95%,并且由于砧木根系在土壤中伸展空间大,促使地上接穗生长发育快且健壮(图1-A),移栽1个月后开始开花。而移栽于育苗基质在驯化室培养的嫁接苗生长缓慢(图1-B),并且有染菌现象,最终成活率仅为75%,移栽于试验田3周后开始开花,比直接移栽试验田的嫁接苗晚开花近2周。嫁接苗直接移栽田间不仅生长发育快,成活率高,而

表1 不同移栽方法对嫁接苗成活率和生长发育的影响

Table 1 The survival rates and growth of grafted seedlings with different transplanting methods

移栽方法	移栽嫁接苗数	染菌嫁接苗数	成活嫁接苗数	成活率/%	移栽至始花天数/d
直接移栽试验田	40	0	38	95	30
经驯化室培养后移栽试验田	40	6	30	75	42

移栽至始花天数指嫁接苗从培养瓶中移出到初见开花的天数。

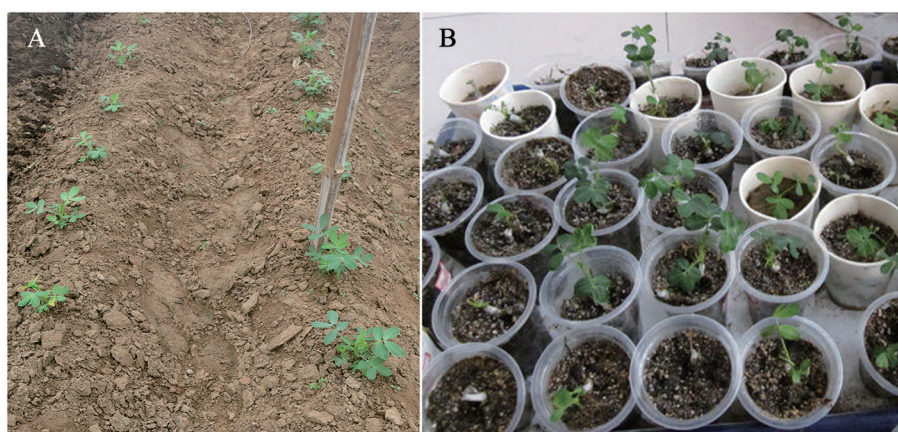


图1 两种不同移栽方法的嫁接苗

Fig. 1 Grafted seedlings with two different transplanting methods

A: 直接移栽土壤3周的嫁接苗; B: 移栽于育苗基质在驯化室培养3周的嫁接苗。

且减少一次移栽, 简化了操作程序, 不需要经过驯化室驯化的过程, 节省空间和人力、物力、财力。因此确定嫁接苗直接移栽田间为适宜的移栽方法。

2 砧木种子催芽培养基对嫁接苗成活率的影响

‘花育23号’种子经表面消毒后分别接种于经高压灭菌盛有沙和液体培养基(脱脂棉作为支撑)的培养瓶中, 2 d后种子开始露白, 约10~13 d下胚轴已伸长到1.5 cm以上, 可作为砧木进行嫁接。种子在沙中催芽类似自然环境, 下胚轴伸长快, 根系健壮, 很容易从沙中提出(图2-A和B)。而在脱脂棉作支撑的液体培养基中, 须根缠绕在脱脂棉上, 不仅操作费工费时, 而且很容易伤根(图2-C和D)。以‘花育20号’胚小叶培养再生小苗为接穗进行无菌嫁接, 砧木嫁接接口在子叶节以下的下胚轴。嫁接苗在培养室培养3 d, 再开瓶口炼苗2 d后直接移栽于塑料拱棚的土壤中。移栽3周后调查嫁接苗移栽成活率见表2, 以沙作为砧木培养基质时, 由于砧木根系未受损伤, 嫁接苗移栽成活率达到97.5%, 并且嫁接苗生长旺盛。而以脱脂棉作支撑的液体

培养基进行砧木培养时, 从脱脂棉中剥离须根时容易伤根, 从而影响嫁接苗的成活, 嫁接苗移栽成活率仅为77.5%。因此确定沙是砧木种子催芽适宜的培养基质。

3 砧木嫁接部位对嫁接苗结果的影响

砧木嫁接部位分别采用在实生苗子叶节以上的主茎上和子叶节以下的下胚轴两种处理方法。利用沙中无菌催芽10~13 d苗龄的‘花育23号’实生苗作为砧木, ‘花育20号’胚小叶培养再生小苗为接穗进行无菌嫁接。嫁接苗在培养室培养3 d, 再开瓶口炼苗2 d后直接移栽于塑料拱棚的土壤中。嫁接接口在主茎上的嫁接苗, 由于砧木上第一对侧枝原基萌发生长(图3-A), 收获期观察接穗和砧木均有结果(图3-B)。而嫁接接口在下胚轴的嫁接苗, 由于砧木不存在侧芽原基, 即砧木上无侧芽生长(图3-C), 最终整个植株全部由接穗结果(图3-D)。从两种处理方法接穗结果粒数统计结果(表3)可以看出, 嫁接接口在下胚轴的嫁接苗, 由于根系吸收的营养全部供给接穗, 且无空间竞争, 单株接穗结果粒数(25~52粒)明显多于嫁接接口在主茎上接穗的结果



图2 沙中催芽(A和B)和液体培养基中催芽(C和D)的砧木种子实生苗
Fig.2 The germinated seedlings in sand (A and B) and in fluid medium (C and D)

表2 砧木种子催芽培养基质对嫁接苗成活率的影响
Table 2 The survival rates of grafted seedlings in different seed germination media

培养基质	移栽嫁接苗数	成活嫁接苗数	成活率/%
沙	40	39	97.5
液体培养基	40	31	77.5

粒数(2~22粒), 并且与主茎相比, 下胚轴较粗(图2-B), 紧实度强, 嫁接操作时简单容易, 因此确定砧木嫁接接口在子叶节以下的下胚轴为适宜嫁接位置。

4 花生离体诱变体细胞胚的形成及其萌发成苗

‘花育20号’、‘花育22号’、‘花育25号’和‘鲁花11号’胚小叶在添加PYM和2,4-D的诱变和体细胞胚诱导培养基上培养一周后由乳白色变黄色, 并且小叶逐渐伸展长大。培养2周后取外植体制作石蜡切片, 显微镜下观察发现已从外植体上直

接形成体细胞胚(图4-A), 而未经过愈伤组织的过程。但随着诱变培养时间的延长, 由于PYM引起的生理损伤作用, 部分外植体逐渐褐化, 4周后观察仅有一半左右的外植体存活(图4-B)。将存活的外植体转移到添加BAP的体细胞胚萌发培养基上后, 部分体细胞胚萌发(图4-C), 经过继代培养进一步发育长成小苗(图4-D)。当小苗长到1.5 cm高时便可作为接穗进行嫁接。

5 离体诱变再生苗的嫁接、移栽及其生长发育

以上述试验确立的采用沙作为砧木种子无菌萌发培养基质, 嫁接接口在砧木子叶节以下的下胚轴和嫁接苗直接移栽田间等方法为基础, 对‘花育20号’、‘花育22号’、‘花育25号’和‘鲁花11号’离体诱变再生苗进行无菌嫁接。嫁接苗在培养室闭瓶培养3 d、炼苗2 d(图5-A和B)后直接栽植于塑料拱棚内的土壤中, 移栽最初的2周上午9:00至下午



图3 不同砧木嫁接部位的嫁接苗及其结果情况

Fig.3 Grafted plants and pods from different grafted part

A: 嫁接口在砧木主茎上的嫁接苗(第一对侧枝萌发, 箭头指萌发的侧枝); B: 嫁接口在主茎上的嫁接苗结果(接穗和砧木均结果, 箭头指嫁接口); C: 嫁接口在砧木下胚轴的嫁接苗(箭头指嫁接口); D: 嫁接口在子叶节以下的下胚轴的嫁接苗结果(全部由接穗结果, 箭头指嫁接口)。

表3 不同砧木嫁接部位的嫁接苗结果数

Table 3 The pod numbers of plants from different grafted parts

嫁接口位置	移栽嫁接苗数	接穗结果粒数
主茎	40	2~22
下胚轴	40	25~52

16:00搭遮荫网, 移栽3周后撤掉临时塑料拱棚, 统计嫁接苗成活率(图6), ‘花育20号’、‘花育22号’、‘花育25号’和‘鲁花11号’嫁接苗移栽成活率分别为95.9%、97.0%、90.9%和90.5%, 均达到90%以上。嫁接苗生长发育基本正常(图5-C), 移栽1个月后开始开花(图5-D)。

生长发育期间田间观察发现‘花育20号’嫁接苗

中有一株变异植株, 茎枝粗壮, 颜色突变为紫色, 叶片较长、突变为长椭圆形(图7-B), 而诱变亲本‘花育20号’茎枝为绿色, 叶片为椭圆形(图7-A)。
‘花育22号’、‘花育25号’和‘鲁花11号’嫁接苗中未观察到明显的性状变异。移栽4个月后嫁接苗的荚果成熟(图5-E)。收获后观察4个供试品种的嫁接苗全部结果, 嫁接苗结果率均达到100%。‘花育20号’的变异植株正常结实, 共获得26粒种子。

讨 论

以往报道再生植株的嫁接苗首先移栽于营养基质, 在驯化室或玻璃温室驯化3周左右, 成活后再移栽试验田, 占用驯化室空间, 并且驯化过程需要精心管理(Zhao等2013; Wang等2015a); 由于移

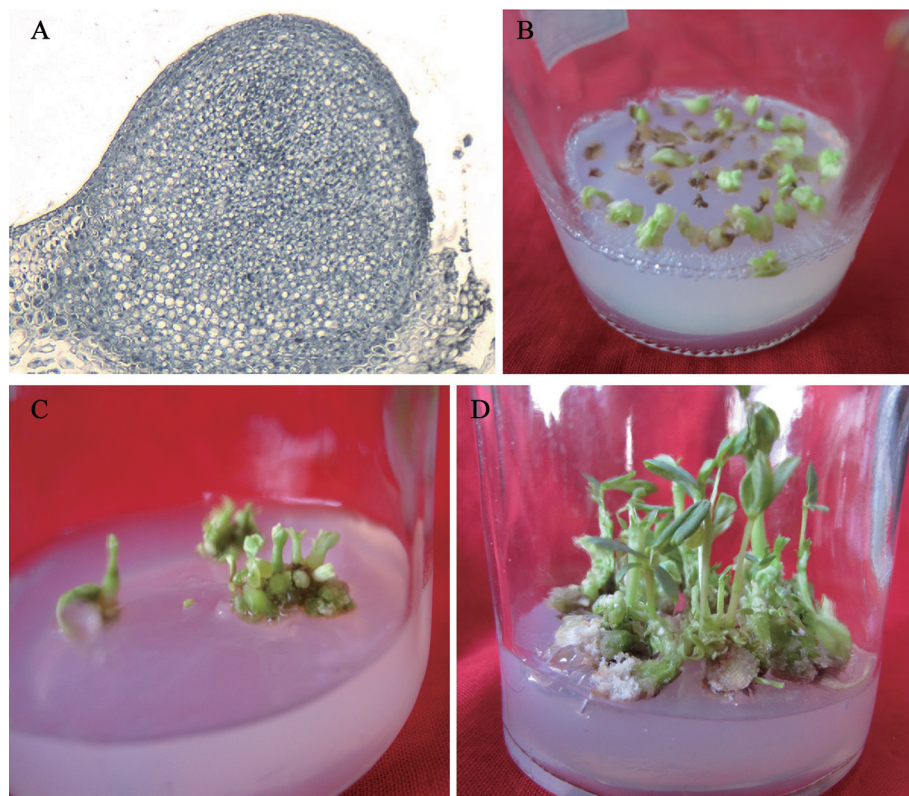


图4 花生离体诱变形成的体细胞胚及其萌发长成的小苗

Fig.4 Somatic embryos and plantlets formed from *in vitro* mutagenesis

A: 在添加 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D和 $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ PYM诱变培养基上培养2周后从外植体上直接形成的球形体细胞胚(石蜡切片); B: 在添加 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D和 $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ PYM诱变培养基上培养4周后的外植体(约一半的外植体褐化); C: 在添加 $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP培养基上萌发的体细胞胚; D: 在添加 $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP培养基上体细胞胚萌发长成的小苗。

栽操作2次, 耗费大量人力物力财力, 且影响小苗生长(Wang等2015b; Sui等2015); 栽植于基质中的小苗容易染菌, 造成成活率降低。本研究利用‘花育20号’胚小叶组织培养再生小苗作为接穗, ‘花育23号’无菌萌发的种子实生苗作为砧木进行无菌嫁接, 对嫁接苗的移栽方法进行了研究, 结果表明, 嫁接苗直接移栽试验田的土壤中生长快且健壮, 比经驯化室培养3周再移栽试验田的嫁接苗早开花近2周, 成活率高20%, 这可能是由于直接移栽于试验田的嫁接苗砧木根系在土壤中伸展空间大, 根深叶茂, 促使地上部生长发育快且健壮(王鹏等2015a); 并且因为土壤中的微生物处于平衡状态, 有益菌能抑制有害菌的繁衍(何铁柱等2009), 从而提高成活率。直接移栽于试验田不需要经过驯化室驯化的过程, 节省空间, 减少一次移栽, 从而节省人力物力财力。

关于砧木催芽培养基质的选择, 我们前期研究(郝世俊等2010)利用液体培养基中(脱脂棉作为支撑)无菌萌发的种子实生苗作为砧木, 但因其须根缠绕在脱脂棉上, 从培养瓶中取出进行嫁接时很容易伤根, 并且操作费工费时。本研究对砧木催芽培养方法进行了研究, 结果表明, 将作为砧木的花生种子埋于沙中无菌催芽, 根系在沙中伸展无缠绕, 嫁接时很容易从沙中提出, 不仅操作简单, 而且不会伤根, 嫁接苗的移栽成活率(97.5%)明显高于以脱脂棉作为支撑的液体培养基催芽的砧木的嫁接苗成活率(77.5%); 并且沙中催芽的砧木下胚轴伸长快, 可能因为花生种子萌发后, 下胚轴伸长才能将子叶推出地面(禹山林2008)。

我们在前期报道(郝世俊等2010)砧木嫁接接口在子叶节以上的主茎上, 由于砧木带有第一对侧枝原基, 在移栽于田间后需摘除砧木上的侧枝, 否则

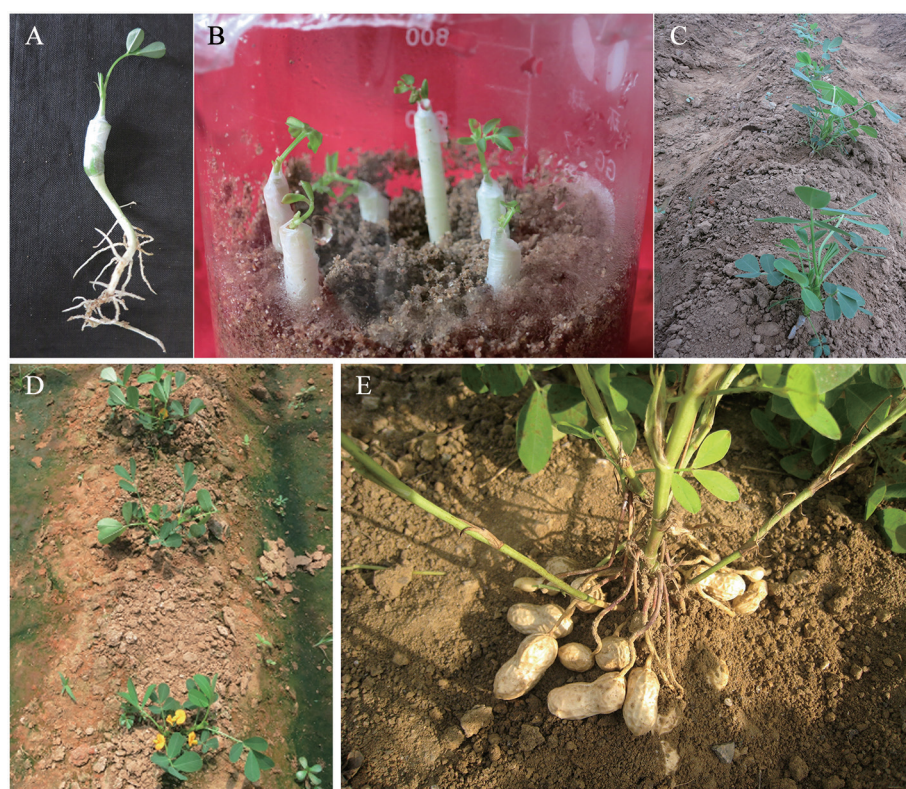


图5 离体诱变再生嫁接苗田间生长及结果

Fig.5 Grafted plants and pods produced from *in vitro* mutagenesis

A和B: ‘花育20号’嫁接苗; C: ‘花育22号’嫁接苗(移栽4周); D: ‘鲁花11号’嫁接苗开花(移栽1个月); E: ‘花育20号’嫁接苗结果。

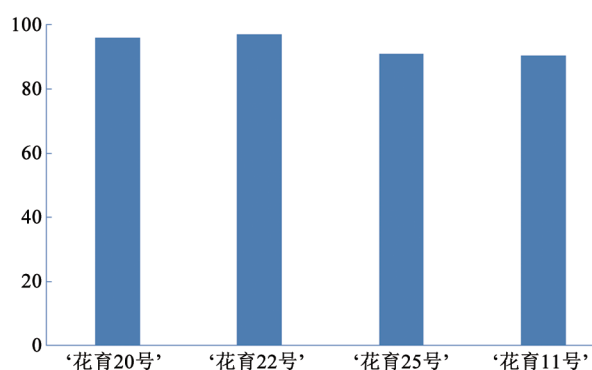


图6 花生离体诱变再生嫁接苗移栽成活率

Fig.6 Survival rates of grafted seedlings regenerated from *in vitro* mutagenesis in peanut

由于营养竞争会影响接穗的生长及结荚。并且由于砧木上的侧枝原基的存在,侧枝摘掉后还会再长,所以需经常及时摘除,如此耗费大量的人力和时间。如果砧木和接穗荚果的形状和大小类似,收获时很容易混杂。鉴于此问题,本文研究了砧木嫁

接口位置对嫁接苗结荚的影响。结果表明嫁接接口在子叶节以下的下胚轴,因为没有子叶和子叶节的障碍,且下胚轴较粗,紧实度强,嫁接操作简单易行。此外由于砧木上无侧枝,根系吸收的营养全部输送到接穗上,接穗生长健壮,单株接穗的结果粒数明显多于嫁接接口在主茎上的接穗的结果粒数。

‘花育20号’茎枝绿色,叶片形状为椭圆形,本研究中‘花育20号’嫁接的离体诱变再生苗中有一株茎枝颜色突变为紫色,叶片突变为长椭圆形,收获期观察突变体正常结实,共获得26粒种子。本研究离体诱变是通过胚胎发生途径获得再生植株,因为体细胞胚的形成一般起源于单个细胞,避免了突变体的嵌合现象(赵明霞等2011),因此这些突变排除了嵌合性突变的可能。并且这些突变在诱变当代得到表现,可能为显性突变,而隐性突变需要自交后才能得以表现。本论文4个供试品种嫁接的离体诱变再生苗后代性状变异和分离有待于进一步研究。



图7 ‘花育20号’ (A)及其突变的再生嫁接苗(B)
Fig.7 ‘Huayu 20’ (A) and mutationally grafted plant (B)

本研究结果可为花生离体诱变、遗传转化再生苗的嫁接和移栽提供有效方法。

参考文献

- Chi XY, Chen MN, Pan LJ, Chen N, Wang T, Wang M, Yang Z, Yu SL (2014). Research progress on high-oleic acid peanut breeding. *J Peanut Sci*, 43 (4): 32–38 (in Chinese with English abstract) [迟晓元, 陈明娜, 潘丽娟, 陈娜, 王通, 王冕, 杨珍, 禹山林(2014). 花生高油酸育种研究进展. *花生学报*, 43 (4): 32–38]
- Deng YM, Ye XQ, Jia XP, Liang LJ (2014). The applications of somaclonal variation on germplasm improvement of turfgrasses. *Pratac Sci*, 31 (9): 1696–1706 (in Chinese with English abstract) [邓衍明, 叶晓青, 贾新平, 梁丽建(2014). 体细胞突变技术在草坪草种质创新上的最新应用. *草业科学*, 31 (9): 1696–1706]
- Dengzu L, Song J, Wang Y, Yin D (2013). Progress of development and creating routes of peanut mutants. *Chin Agric Sci Bull*, 29 (21): 12–15 (in Chinese with English abstract) [邓祖丽颖, 宋佳静, 王允, 殷冬梅(2013). 花生突变体创造途径及进展综述. *中国农学通报*, 29 (21): 12–15]
- Dong WZ, Zhang XY, Huang BY, Zhang ZX, Tang FS, Han SY, Xu J, Gao W (2014). Genetic contribution of breeding parents to released peanut varieties in Henan and Shandong Provinces and prospect of related breeding strategy. *J Henan Agric Sci*, 43 (12): 40–45 (in Chinese with English abstract) [董文召, 张新友, 黄冰艳, 张忠信, 汤丰收, 韩锁义, 徐静, 高伟(2014). 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. *河南农业科学*, 43 (12): 40–45]
- Hao SJ, Sui JM, Qiao LX, Wang XJ, Wang JS (2010). Study on grafting technique of regenerated plantlet in peanut. *J Qingdao Agric Univ-Nat Sci*, 27 (2): 110–113 (in Chinese with English abstract) [郝世俊, 隋炯明, 乔利仙, 王晓杰, 王晶珊(2010). 花生组培苗嫁接技术的研究. *青岛农业大学学报(自然科学版)*, 27 (2): 110–113]
- He T, He T, Qiao Y, Lü X, Li Y (2009). The interpretation of greenhouse straw reactor using effect with the idea of adjusting balance of soil microbial. *Bull Agric Sci Tech*, (7): 97–98 (in Chinese) [何铁柱, 何铁锁, 乔艳站, 吕学英, 李玉梅(2009). 用调节土壤微生物平衡的理念诠释温室秸秆反应堆的使用效果. *农业科技通讯*, (7): 97–98]
- Jiang CY, Zhou X (2003). Graft of the test-tube seedlings of apple, cherry, grape and Chinese rose. *Plant Physiol Comm*, 39 (3): 240–241 (in Chinese with English abstract) [姜长阳, 邹侠(2003). 苹果、樱桃、葡萄和月季试管苗的嫁接. *植物生理学通讯*, 39 (3): 240–241]
- Li C, Xia H, Lu J, Li A, Zhao C, Bi Y, Wang X (2009). Graft significantly improves survival rate of transgenic peanut plants. *Chin Agric Sci Bull*, 25 (20): 63–67 (in Chinese with English abstract) [李长生, 夏晗, 卢金东, 李爱芹, 赵传志, 毕玉平, 王兴军(2009). 利用嫁接提高花生离体再生或转基因苗成活率的研究. *中国农学通报*, 25 (20): 63–67]
- Liu J, Zheng C (2004). Induced mutation in connection with *in vitro* culture for crop breeding. *Acta Agric Shanghai*, 20 (1): 19–22 (in Chinese with English abstract) [刘进平, 郑成木(2004). 诱变结合植物组织培养在植物育种中的应用. *上海农业学报*, 20 (1): 19–22]
- Liu JP, Zheng CM (2002). Application of *in vitro* selection and somaclonal variation in improvement of disease resistance. *Hereditas*, 24 (5): 617–630 (in Chinese with English abstract) [刘进平, 郑成木(2002). 体外选择与体细胞无性系变异在抗病育种中的应用. *遗传*, 24 (5): 617–630]
- Sui J, Wang Y, Wang P, Qiao L, Sun S, Hu X, Chen J, Wang J (2015). Generation of peanut drought tolerant plants by pingyangmycin-mediated *in vitro* mutagenesis and hydroxyproline-resistance screening. *PLoS ONE*, 10 (3): e0119240
- Sun G, Tang F, Wang G, Li Z, Zhang Y, Yan W, Sun D, Sun Y (1998). Study of creating a new species of wheat qualitative with radiation mutagenesis and biological technology II. Important properties analysis of new wheat germplasm. *Trit Crops*, 19 (1): 9–10 (in Chinese) [孙光祖, 唐凤兰, 王广金, 李忠杰, 张月学, 阎文义, 孙德全, 孙岩(1998). 辐射诱变与生物技术结合创造小麦新种质的研究II. 小麦新种质重要特性的生化分析. *麦类作物*, 19 (1): 9–10]
- Tang YY, Wang XZ, Wu Q, Yang Z, Song GS, Wang CT (2014). Breeding of ‘Huayu 40’ through EMS mutagenesis. *J Nucl Agric Sci*, 28 (6): 967–969 (in Chinese with English abstract) [唐月异,

- 王秀贞, 吴琪, 杨珍, 宋国生, 王传堂(2014). EMS诱变选育花生新品种—花育40号. 核农学报, 28 (6): 967-969]
- Wang JS, Qiao LX, Zhao LS, Wang P, Guo BT, Liu LX, Sui JM (2015a). Performance of peanut mutants and their offspring generated from mixed high-energy particle field radiation and tissue culture. Genet Mol Res, 14 (3): 10837-10848
- Wang JS, Sui JM, Xie YD, Guo HJ, Qiao LX, Zhao LL, Yu SL, Liu LX (2015b). Generation of peanut mutants by fast neutron irradiation combined with *in vitro* culture. J Radiat Res, 56 (3): 437-445
- Wang JS, Zhao MX, Qiao LX, Sui JM, Kong FQ, Wang X, Liu LX (2013). Effects of fast neutron irradiation on plant regeneration in embryonic leaflet culture of peanut (*Arachis hypogaea* L.). Chin J Oil Crop Sci, 35 (2): 148-152 (in Chinese with English abstract) [王晶珊, 赵明霞, 乔利仙, 隋炯明, 孔福全, 王潇, 刘录祥(2013). 快中子辐照对花生种子胚小叶植株再生的影响. 中国油料作物学报, 35 (2): 148-152]
- Wang LL, Zhao MX, Qiao LX, Wang JS, Sui JM, Liu LX (2011). Effect of neutron irradiation on somatic embryogenesis from embryonic leaflets of peanut (*Arachis hypogaea* L.). J Nucl Agric Sci, 25 (4): 652-656 (in Chinese with English abstract) [王莉莉, 赵明霞, 乔利仙, 王晶珊, 隋炯明, 刘录祥(2011). 快中子辐照对花生胚小叶体细胞胚胎发生的影响. 核农学报, 25 (4): 652-656]
- Wang P, Ji RR, Kong XY, Sui JM, Qiao LX, Guo BT, Sun SM, Wang JS (2015a). Production, acclimatization and transplantation of virus-free plantlets of sweet potato. Plant Physiol J, 51 (4): 455-458 (in Chinese with English abstract) [王鹏, 纪瑞瑞, 孔祥远, 隋炯明, 乔利仙, 郭宝太, 孙世孟, 王晶珊(2015a). 高效甘薯脱毒苗生产及驯化移栽. 植物生理学报, 51 (4): 455-458]
- Wang P, Liu LX, Ji RR, Sui JM, Qiao LX, Guo BT, Kong XY, Wang JS (2015b). Effects of ^{60}Co - γ irradiation on variation of agronomic characters of *Ipomoea batatas*. Plant Physiol J, 51 (7): 1167-1172 (in Chinese with English abstract) [王鹏, 刘录祥, 纪瑞瑞, 隋炯明, 乔利仙, 郭宝太, 孔祥远, 王晶珊(2015b). ^{60}Co - γ 射线辐照对甘薯农艺性状变异的影响. 植物生理学报, 51 (7): 1167-1172]
- Wang W, Chen WX, Zhu Z, Xu HL, Gao YF, Wu Q, Zhu Y, Guo ZC, Li XH (1999). Studies on highly efficient planting of transgenic cotton. Acta Bot Sin, 41 (10): 1072-1075 (in Chinese with English abstract) [王伟, 陈宛新, 朱祯, 徐鸿林, 高越峰, 吴茜, 朱玉, 郭仲琛, 李向辉(1999). 转基因棉花高效定植方法的研究. 植物学报, 41 (10): 1072-1075]
- Wang Y, Zhang XG, Li HM, Song JJ, Cui DQ, Yin DM (2015). Agronomic traits and quality analysis of peanut EMS mutation progeny. J Plant Genet Resour, 16 (4): 914-919 (in Chinese with English abstract) [王允, 张幸果, 李贺敏, 宋佳静, 崔党群, 殷冬梅(2015). 花生EMS诱变后代的农艺性状与品质分析. 植物遗传资源学报, 16 (4): 914-919]
- Wang YX, Wang SF, Ma ZY, Zhang GY, Zhao JF (2007). A new high-efficient cotton graft technique and application. Sci Agric Sin, 40 (2): 264-270 (in Chinese with English abstract) [王彦霞, 王省芬, 马峙英, 张桂寅, 赵家发(2007). 棉花高效嫁接新方法及其应用. 中国农业科学, 40 (2): 264-270]
- Wu W, Liu G, Yang X (2005). Applications of the mutation in connection with *in vitro* culture for plant breeding. Chin Agric Sci Bull, 21 (11): 197-201 (in Chinese with English abstract) [吴伟刚, 刘桂茹, 杨学举(2005). 诱变与组织培养相结合在植物育种中的应用. 中国农学通报, 21 (11): 197-201]
- Yang R (2007). Selections stock-scion combination and studies on graft affinity in early stage of different combination of rootstocks and scions of grape (Master's thesis). Lanzhou: Gansu Agricultural University (in Chinese with English abstract) [杨瑞(2007). 葡萄砧穗组合筛选及嫁接早期亲和力和研究(硕士论文). 兰州: 甘肃农业大学]
- Yu S (2008). Chinese Peanut Varieties and Their Genealogy. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers (in Chinese) [禹山林(2008). 中国花生品种及其系谱. 上海: 上海科技出版社]
- Yu XL, Liu LX, Qiao LX, Sui JM, Guo BT, Xu LJ, Wang JS (2012). Effects of mixed high energy particle field on embryonic leaflet culture and plant regeneration of peanut. J Nucl Agric Sci, 26 (3): 433-438 (in Chinese with English abstract) [于新玲, 刘录祥, 乔利仙, 隋炯明, 郭宝太, 徐丽娟, 王晶珊(2012). 高能混合粒子场辐照对花生胚小叶组织培养及植株再生的影响. 核农学报, 26 (3): 433-438]
- Zhao M, Qiao L, Sui J, Tan L, Wang J (2012). An efficient regeneration system for peanut: somatic embryogenesis from embryonic leaflets. J Food Agric Environ, 10 (2): 527-531
- Zhao MX, Sun HY, Ji RR, Hu XH, Sui JM, Qiao LX, Chen J, Wang JS (2013). *In vitro* mutagenesis and directed screening for salt-tolerant mutants in peanut. Euphytica, 193: 89-99
- Zhao MX, Wang XJ, Qiao LX, Sui JM, Guo BT, Wang JS (2011). Effect of pingyangcin on somatic embryogenesis in embryonic leaflet culture of peanut. J Nucl Agric Sci, 25 (2): 242-246 (in Chinese with English abstract) [赵明霞, 王晓杰, 乔利仙, 隋炯明, 郭宝太, 王晶珊(2011). 平阳霉素对花生体细胞胚胎发生的影响. 核农学报, 25 (2): 242-246]

Grafting and transplanting of regenerated plantlet by *in vitro* mutagenesis in peanut

LI Guan¹, YIN Xiu-Bo², CUI Shan³, QIAO Li-Xian¹, SUI Jiong-Ming¹, JIANG De-Feng¹, WANG Jing-Shan^{1,*}

¹College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University / Key Lab of Plant Biotechnology in Universities of Shandong, Qingdao, Shandong 266109, China; ²The Agricultural Technology Extension Station of Shandong Province, Jinan 250013, China; ³Pony Testing International Group, Qingdao, Shandong 266101, China

Abstract: To solve the problem of root regeneration and low survival rate after transplantation in peanut, a simple and effective grafting *in vitro* and transplantation technique of regenerated plantlets was studied. The grafting was conducted with regenerated plantlets derived from *in vitro* mutagenesis of peanut cultivars ‘Huayu 20’, ‘Huayu 22’, ‘Huayu 25’ and ‘Luhua 11’ as the scions. The rootstocks were obtained from 10- to 13-day-old germinated peanut seedlings of ‘Huayu 23’. The grafted plantlets were cultured under sterile condition for 3 days, hardening-seedling for 2 days and were then transferred to the field, with temporary plastic tunnel for 3 weeks and later in normal field management. The result shows that sand was suitable medium for the germination of rootstock seeds, and hypocotyl of rootstock seedling below the cotyledonary nodes was suitable operating part. The grafted seedlings showed normal and rapid growth after they were transplanted to field, and the survival rates could reach to 90% in 4 tested cultivars. There was a regenerated plant which showed obvious variation from ‘Huayu 20’ mutagenesis, with purple stem and long oval leaves relative to original green stem and oval leaves.

Key words: peanut; *in vitro* mutagenesis; regenerated plantlet; sterile grafting; transplanting

Received 2016-08-25 Accepted 2017-01-18

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 31471542 and 31571705), and Shandong Province Science and Technology Development Plan Project (Grant No. 2014GNC110002).

*Corresponding author (E-mail: jswang319@126.com).