



## 植物嫁接愈合分子机制研究进展

谢露露, 崔青青, 董春娟, 尚庆茂\*

中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081

**摘要** 嫁接能显著改良单一品种的产量、品质和抗逆等性状, 已广泛应用于农业生产。促进砧木和接穗在嫁接面的快速愈合有利于提高嫁接效率。目前对嫁接愈合调控机制尚了解不足, 因此短时间内难以进行有效的技术改良。嫁接愈合过程包括先后发生的创伤应激响应、愈伤组织形成、砧穗细胞通讯以及砧穗再生重连等生理事件, 均涉及复杂而交联的激素应答及基因调控模式。近年来, 相关领域的研究成果为综合解析嫁接愈合的调控机制奠定了基础。该文综述了在嫁接愈合过程中发挥核心作用的植物激素及其应答方式, 以及激素依赖或非依赖的基因表达调控模式, 以期为深入揭示嫁接愈合分子机制提供参考。

**关键词** 嫁接, 嫁接愈合, 内源性植物激素, 基因表达调控

谢露露, 崔青青, 董春娟, 尚庆茂 (2020). 植物嫁接愈合分子机制研究进展. 植物学报 55, 634–643.

嫁接是指将一个植株带有芽或枝的接穗(scion)与另一个植株带有根系的砧木(stock)通过机械固定使切割产生的嫁接面(graft interface)紧贴, 培养至砧、穗在嫁接结合部相互愈合, 从而获得嫁接体植株(grafting plant)的技术。优良的嫁接体植株因结合了接穗和砧木各自的优势而具有一种或多种显著的增益效果, 如生物或非生物胁迫抗性增强、产量提高、品质改良、开花或块茎化习性优化以及株型矮化(Goldschmidt, 2014; Wang et al., 2017)。目前, 嫁接技术已作为一种常规手段应用于果树和蔬菜种苗的繁育, 极大地促进了农业生产和农民增收(Lee et al., 2010; Huang et al., 2015)。

砧穗嫁接面能够完全愈合是嫁接成功的关键, 而愈合程度具有很大的不确定性, 受遗传背景、发育阶段和栽培条件等因素的制约(Kawaguchi et al., 2008; Johkan et al., 2009; Vu et al., 2014; 赵渊渊等, 2015)。可通过有针对性地筛选砧穗组合、合理地选择发育阶段及精准地设置环境参数等手段提高嫁接的成功率和愈合速率, 这均需要基础理论作为指导。研究初期以表型和显微结构观测为依据, 将嫁接愈合的进程描述为隔离层的形成和初始粘连(嫁接后0–1天(0–1 days after grafting, DAG))、愈伤组织和胞间

连丝的形成(2–3 DAG)以及砧穗维管束的重连(4–8 DAG) (Moore, 1982, 1984; 卢善发等, 1995; 王幼群, 2011)。随后研究发现, 生理和分子水平的变化与表型变化大致契合(Goldschmidt, 2014; 苗丽等, 2017)。多种植物激素参与了砧穗愈合且作用显著(Nanda and Melnyk, 2018)。然而, 嫁接愈合过程中植物激素发挥作用的时机和方式非常复杂, 亟须归纳和梳理。本文根据嫁接愈合进程依次发生的创伤应激响应(wounding stress responses)、愈伤组织形成(callus formation)、砧穗细胞通讯(cell communication between scion and stock)和砧穗再生重连(regeneration and reunion of scion and stock)四个阶段性的生理学事件, 对已证实或推测参与其中的内源性植物激素及基因表达调控机制进行总结和论述(图1)。

## 1 创伤应激响应

### 1.1 茉莉酸依赖的创伤应激响应

切割造成嫁接面时, 创伤应激响应是首先发生的事件。茉莉酸信号途径是其中较为重要的调控路径。在番茄(*Solanum lycopersicum*)中的研究证实, 创伤发生后的短时间内, 内源性植物激素茉莉酸(jasmonic

收稿日期: 2020-04-09; 接受日期: 2020-06-28

基金项目: 国家自然科学基金(No.31902004)、国家现代农业产业技术体系建设专项资金(No.CARS-25)和现代农业人才支撑计划(2016)

\* 通讯作者。E-mail: shanglab211@126.com

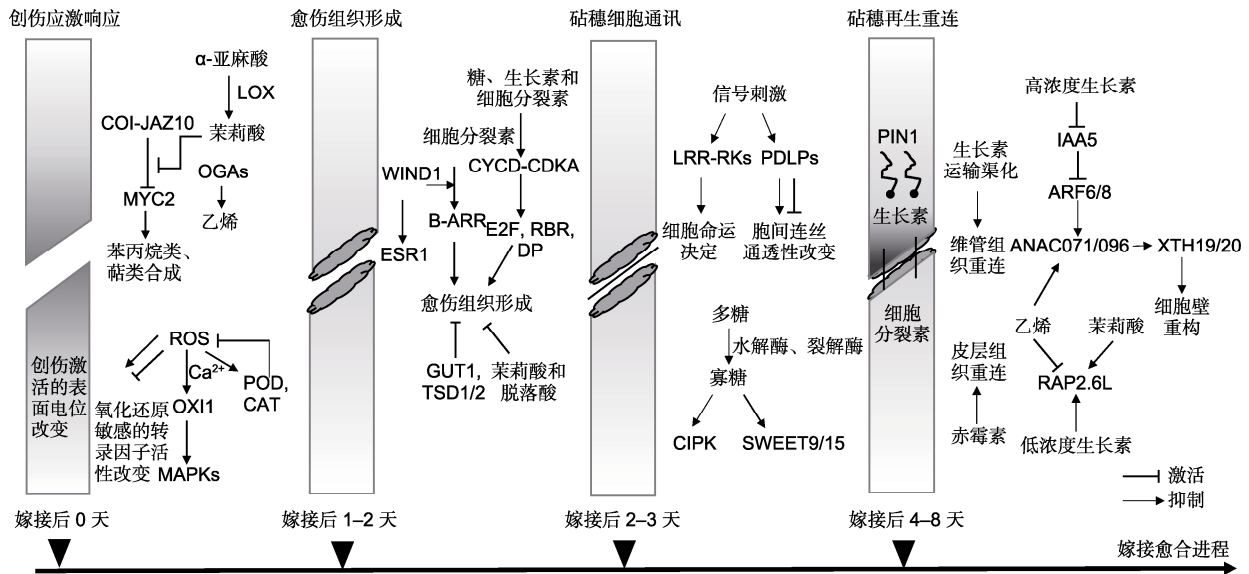


图1 嫁接愈合4个生理学事件中的植物激素应答和基因表达调控

LOX: 脂肪氧化酶; ROS: 活性氧; POD: 过氧化物酶; CAT: 过氧化氢酶

Figure 1 Phytohormone responses and gene expression regulations in the four physiological events during graft healing process

LOX: Lipoxxygenase; ROS: Reactive oxygen species; POD: Peroxidase; CAT: Catalase

acid, JA)及其活性衍生物, 如茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)、茉莉酸-异亮氨酸复合物(jasmonoyl-isoleucine, JA-Ile)以及顺式茉莉酸(*cis*-jasmonate, CJ)被迅速合成(Howe, 2010)。茉莉酸类激素(JAs)在创伤局部大量积累, 激活一系列防御反应, 且经维管系统运输至其它部位, 运输期间伴随着JAs在维管细胞内的二次合成(Ruan et al., 2019)。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中的研究表明, JAs在创伤部位的积累和扩散发生在数秒或数分钟内(Glauser et al., 2008, 2009)。此外, 还发现JAZ10 (*jasmonate ZIM-domain 10*)所指示的茉莉酸诱导信号响应与创伤激活的表面电位改变(wound-activated surface potential changes, WASPs)在空间上的扩散完全一致。细胞膜定位的类谷氨酸盐受体(glutamate receptor-like, GLR)蛋白参与维持WASPs, 进而影响茉莉酸信号转导(Mousavi et al., 2013)。

COI1-JAZ复合体是JAs的高亲和受体(Sheard et al., 2010)。COI1 (coronatine insensitive 1)是具有F-box结构域的E3泛素化连接酶; JAZ蛋白通过JAs结构域与COI1结合, 通过ZIM结构域与下游bHLH类转录因子MYC2结合。感知JAs信号后, JAZ解除对

MYC2的抑制, 后者结合在JAs诱导基因的启动子区, 激活其转录(Sheard et al., 2010)。JA/MeJA能够诱导苯丙素(phenylpropanoids)、生物碱(alkaloids)和萜类(terpenoids)等次生代谢物的合成(Howe, 2010)。

## 1.2 其它创伤应激响应

除茉莉酸信号途径以外, 还存在其它创伤应激响应机制。使用*coi1/jaz*突变体筛选出多种参与创伤响应的非JAs依赖的效应物, 包括乙烯(ethylene, ETH)、脱落酸(abscisic acid, ABA)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)、寡聚半乳糖醛酸(oligogalacturonides, OGAs)、一氧化氮(nitric oxide, NO)和脂肪酸氨基酸复合物(fatty acid-amino acid conjugates, FACs)等(Schillmiller and Howe, 2005)。其中, OGAs可诱导ETH的合成, ETH又能够抑制JAs响应基因的表达(Rojo et al., 1999)。此外, 水杨酸(salicylic acid, SA)是JAs的拮抗激素, 外施SA能够抑制JAs的信号响应, 且具有明显的时效性, 抑制过程伴随谷氧还蛋白(gluataredoxin) GRX480的显著上调, 被认为与氧化还原反应密切相关(Koornneef et al., 2008)。

活性氧(包括超氧阴离子自由基( $O_2^-$ )和过氧化氢

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 在创伤后1小时内开始积累(Orozco-Cardenas and Ryan, 1999)。ROS可作为第二信使参与调控诸多生物学过程, 如细胞程序性死亡、细胞周期、生物或非生物胁迫和胚发生(Elhiti and Stasolla, 2015)。ROS通过其受体改变Ca<sup>2+</sup>流, 促进丝/苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine protein kinase) OXI1 (oxidative-signal inducible 1)的表达, 后者是介导重要级联信号转导通路的促分裂素原活化蛋白激酶(mitogen-activated-protein kinases, MAPKs)的直接诱导因子(Mittler et al., 2004)。此外, 由ROS引起的氧化还原电位改变常与双组分信号系统(two-component signaling system, TCS)整合, 改变一些氧化还原态敏感的转录因子活性(Elhiti and Stasolla, 2015)。研究表明, 番茄嫁接若干天后, 其过氧化物酶(peroxidase, POD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)在切口附近积累(Fernández-García et al., 2004)。甜椒(*Capsicum annuum*)嫁接过程中外施抗坏血酸(ascorbic acid, AA)对嫁接体形成具有促进作用(Johkan et al., 2008)。此外, 番茄嫁接与不嫁接茎段对比显示, ROS清除相关途径基因在嫁接愈合发生时表达量更高(Xie et al., 2019), 表明ROS先升高再降低的调控机制与嫁接愈合密切相关。

## 2 愈伤组织形成

### 2.1 愈伤组织形成的诱导

愈伤组织在嫁接面处积累, 填充砧穗之间的空隙, 其中的一些薄壁细胞后续分化为新的维管组织。由于植物组织的再生不需要干细胞龛(stem cell niche)来维持分化, 因而具有更灵活的脱分化(dedifferentiation)和再分化(redifferentiation)能力(Sena et al., 2009)。虽然均能通过诱导产生愈伤组织, 但创伤引起的愈伤组织从生理和分子性质上与植物离体培养所形成的愈伤组织不同。在以适当比例添加生长素(auxin)和细胞分裂素(cytokinins, CTKs)的培养基上诱导产生的愈伤组织中, 分生组织分子标识SCR和WOX5以及根中柱鞘分子标识J0121显著表达(Sugimoto et al., 2010)。然而, 这些分子标识在创伤诱导的愈伤组织中均不表达(Iwase et al., 2011)。AP2/ERF类转录因子WIND1 (wound induced dedifferentiation 1)及其同源蛋白是创伤后组织发育命运的重要调控因子, 其

高丰度表达从创伤后数小时一直持续至愈合完全(Iwase et al., 2011; Melnyk et al., 2015)。此外, AP2/ERF类转录因子ESR1 (enhancer of shoot regeneration 1)能够被WIND1激活, 也在愈伤组织诱导形成中发挥作用(Iwase et al., 2017)。WIND1基因过表达株系表现出对CTKs异常敏感, 通过B类ARR (*Arabidopsis* response regulator)因子介导的信号途径促进细胞的脱分化(Iwase et al., 2011)。CTKs是愈伤组织形成所必需的植物激素。CTKs响应启动子元件连接绿色荧光蛋白报告基因(*pTCSn::GFP*)在去除根的下胚轴外植体上依然能被激活, 说明外植体形成愈伤组织的过程中存在CTKs的从头合成(Ikeuchi et al., 2017)。

愈伤组织的特征是细胞进入快速分裂周期。当受到糖(sucrose)、生长素和细胞分裂素等物质的诱导时, D类细胞周期蛋白(D-type cyclin, CYCD)与A类细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶(A-type cyclin-dependent kinase, CDKA)结合, 形成激活态CYCD-CDKA复合体(den Boer and Murray, 2000), 继而调控下游的3个蛋白E2F (E2 promoter binding factor)、RBR (retinoblastoma-related) 和 DP (dimerization partner), 使细胞进入S期(Inzé and Veylder, 2006)。拟南芥下胚轴中, CDKA在创口附近的表达起始于切割后4天, 可以在维管组织和中柱鞘检测到CDKA启动子活性, 而在内皮层、皮层和表皮中检测不到(Ikeuchi et al., 2017)。在番茄茎中, 愈伤组织在切口上方的维管组织附近形成, 同时在切口上方检测到一些细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶编码基因的活跃转录(Xie et al., 2019)。

### 2.2 愈伤组织形成的抑制

在创伤应激响应中合成量升高的JAs和ABA等植物激素, 在愈伤组织形成中不是必需的。使用JAs或ABA的合成和信号转导突变体进行研究, 发现突变体愈伤组织形成量较野生型轻微但显著增多, 表明JAs和ABA对愈伤组织的形成具有轻微抑制作用(Ikeuchi et al., 2017)。

此外, 还有细胞壁框架产生的物理抑制。细胞壁组分如纤维素(cellulose)、半纤维素(hemicellulose)和果胶(pectin)的有序积累, 是建立和维持细胞分化形态的关键步骤(Ikeuchi et al., 2013)。细胞壁形成缺

陷突变通常会导致愈伤组织异常形成。例如, 参与果胶合成的 *GUT1* (*glucuronyltransferase 1*) 基因突变后, 导致愈伤组织堆积于地上部顶端; 参与纤维素合成的 *TSD1/KOR1/RSW2* 基因突变后, 导致地上和地下部细胞排列混乱; 被推测为编码高尔基体定位的甲基化转移酶基因 *TSD2/QUA2/OSU1* 突变, 导致细胞间不能相互黏连的严重缺陷(Ikeuchi et al., 2013)。因此, 细胞壁组分的正常沉积有助于避免体细胞过分增殖。

### 3 砧穗细胞通讯

#### 3.1 胞间连丝介导的发育决定和免疫应答

胞间连丝(plasmodesmata, PD)由外膜和内膜2层膜结构组成, 分别为质膜和内质网膜的延续, 但理化性质稍有差别(Tilsner et al., 2011)。借助于膜锚定的受体激酶(receptor kinases, RKs)和受体蛋白(receptor proteins, RPs), 胞间连丝能够对胞外环境变化做出响应, 整合质外体(apoplastic)和共质体(symplastic)途径的信号转导, 从而驱动发育决定和免疫应答, 或通透性调控等(Stahl and Faulkner, 2016)。这一机制在砧、穗细胞之间的初始粘连和通讯中扮演重要角色。

在有些发育进程中, 质膜或PD上的RKs和RPs通过非细胞自主性信号途径调控组织形态建成或干细胞分化命运。例如, 通过PD特异性蛋白质组鉴定到的SUB (*strubbelig*)属于非典型的富含亮氨酸重复受体激酶(LRR-RK), 它通过与另一个具有C2结构域的PD锚定蛋白QKY (*quirky*)互作, 将信号传递至下游(Vaddepalli et al., 2014)。PD锚定蛋白ACR4 (*arabidopsis crinkly 4*)以同源复合体或与LRR-RK CLV1 (*clavata 1*)形成异源复合体的形式定位于PD, 小分子多肽可作为配体(ligand)与ACR4和CLV1的胞外结构域结合。结构上同源的配体多肽CLV3和CLE40经证实分别在茎端及根尖分生组织中促进干细胞的分化(Ohyama et al., 2009; Stahl et al., 2009)。当砧穗嫁接面紧贴时, PD及其上锚定的RKs和RPs的存在很可能为砧穗间初始物质交流提供桥梁。由于嫁接面形成的愈伤组织将面临不同的分化命运, 故PD通过不同受体对发育信号进行承接和传递是重要的因素之一。

PD上的RKs和RPs还可作为模式识别受体(pattern recognition receptors)结合病原衍生配体(pathogen-derived ligand), 如真菌细胞壁的几丁质

(chitin)或细菌的鞭毛蛋白(flagellin), 可激活胞内免疫应答(Stahl and Faulkner, 2016)。例如, PD锚定蛋白FLS2 (*flagellin sensing 2*)和LYM2 (*lysin motif domain-containing glycosylphosphatidylinositol-anchored protein 2*) (Lee, 2015), 在嫁接愈合初期, 嫁接面细胞壁不健全, 病原菌入侵是大概率事件。作为共质体运输的门户, 胞间连丝能够通过外膜和细胞壁之间拐角处填充的胼胝质(callose)来调节自身通透性(permeability)。胼胝质的积累量随环境或发育状况而变化, 与PD的通透性呈负相关(Lee, 2015)。具有胞外DUF26结构域的PD定位受体蛋白(PD-located proteins, PDLPs)是控制胼胝质积累量和PD通透性的上游因子。通常认为, PDLPs接收本地ROS信号, 激活调控通路, 最终使胼胝质积累量增加及PD关闭(Stahl and Faulkner, 2016)。其中, PDL5以SA依赖的方式调控细菌性病原菌免疫应答, SA促进PDL5的转录, 而PDL5的上调又促进SA的积累(Lee et al., 2011)。重要的是, PDL蛋白与嫁接处理相关, PDL1A在嫁接部位高表达(Yin et al., 2012)。

胞间连丝和膜锚定受体一方面需要通过感知嫁接搭档组织或自身组织中的发育信号, 达到加强砧穗交流的目的; 另一方面需要响应创伤应激, 通过免疫应答阻断细胞与外界的联系。在这种情况下, 膜受体(如LRR-RK家族成员)以网络协作的形式对各种胞外信号进行平衡(Smakowska-Luzan et al., 2018)。类似调控机制很可能存在于嫁接愈合的砧穗胞间通讯中。

#### 3.2 寡糖信号途径与胞间通讯

寡糖(oligosaccharides)是细胞的能量来源, 同时也是一类信号分子, 在质膜上有专门的受体蛋白激酶(Chikano et al., 2001)。在嫁接面处, 质膜上的蔗糖转运蛋白SWEET (*sugars will eventually be exported transporters*) 9和15上调表达, 同时CIPK (*calcineurin B-like-interacting protein kinase*)等蛋白激酶受寡糖调节。由于同时上调的还有裂解酶(lyase)和水解酶(hydrolase)等, 因此推测由死亡细胞残留细胞壁分解而来的寡糖类物质可能构成砧穗胞间通讯的一种途径(Yin et al., 2012)。

### 4 砧穗再生重连

砧穗组织重连是嫁接愈合完成的标志性事件, 包括维

管组织和其它组织的重连等。已开发出一些模式化的切割或嫁接系统用于组织重连研究,如拟南芥下胚轴微嫁接(micrograft)或改良后的微嫁接(Turnbull et al., 2002; Yin et al., 2012)、黄瓜(*Cucumis sativus*)或番茄下胚轴和拟南芥花序茎的半切(one-half cut)重连试验(Asahina et al., 2002, 2011)等。这些模式系统为探讨内源性植物激素以及基因调控网络在砧穗再生重连中的作用提供了便利。

#### 4.1 生长素和细胞分裂素在维管组织非对称性重连中的作用

生长素在植物多个发育进程中与维管组织的形成密切相关(Caño-Delgado et al., 2010)。根据生长素的“渠化假说(canalization hypothesis)”,生长素极性运输和由此形成的浓度差异可能为维管束的分化和重连提供空间极性信息(Mazur et al., 2016)。叶脉形成研究揭示了若干以反馈调节形式调控叶片维管束形成的参与因子,包括生长素运输蛋白PIN1 (PINFORMED 1)、生长素信号响应因子MP (MONOPTEROS)和ATHB8等(Wenzel et al., 2007; Donner et al., 2009)。生长素在拟南芥花序茎半切损伤愈合中也会产生渠化效应,由PIN1融合报告基因标识出的生长素运输轨迹先于新维管组织的形成(Mazur et al., 2016)。

由于生长素和细胞分裂素的极性运输,及其运输流被切割所阻断,嫁接面上下组织中的调控模式呈现非对称的特点。借助携带生长素响应元件的DR5启动子和 $\beta$ -葡萄糖苷酸酶( $\beta$ -glucuronidase, GUS)报告基因的转基因拟南芥,观察微嫁接后或非嫁接的GUS染色部位,发现当转基因拟南芥作为接穗,野生型拟南芥作为砧木时,在接穗嫁接面维管束附近部位有明显的染色,1 DAG时开始出现,3 DAG时弥漫至整个嫁接面;而当转基因拟南芥作为砧木时,嫁接面附近在1–3 DAG期间均未观察到明显染色(Yin et al., 2012)。进一步研究发现,维管束韧皮部和木质部的重连在时间上是分离的(Melnyk et al., 2015)。韧皮部重连发生时间是3–4 DAG,而木质部重连发生时间是6–7 DAG。凯氏带合成基因CASP1 (casparian strip membrane domain proteins 1)、指示细胞分裂S期的组蛋白H4编码基因和创伤响应基因WIND1等均呈现出在嫁接面上部表达先于下部的模式。采用生长

素响应启动子元件连接报告基因(*pDR5::GFP*)和细胞分裂素响应启动子元件连接报告基因(*pARR5::GFP*和*pTCSn::GFP*)验证两类植物激素的作用,结果表明,对生长素的响应由接穗起始并随之扩散至嫁接结合部,对细胞分裂素的响应激活由砧木起始并随之扩散至嫁接结合部(Melnyk et al., 2015)。通过突变体筛选得出,生长素响应蛋白ALF4 (aberrant lateral root formation 4)作为承接生长素信号的关键因子,其正常功能在韧皮部重连过程中是必需的(Melnyk et al., 2015)。高通量测序研究表明,生长素应答基因网络在嫁接后的切口上、下组织,以及砧穗分开放置的切口以上组织中被激活,而在砧穗分开放置的切口以下组织中不被激活(Melnyk et al., 2018)。上述结果表明,生长素和细胞分裂素(尤其是生长素)的运输以及信号响应在维管组织重连中的作用显著。

#### 4.2 赤霉素在幼苗期皮层组织重连中的作用

在幼苗期,赤霉素(gibberellin, GA)的生物合成影响皮层的组织重连。当切除黄瓜和番茄幼苗下胚轴直径的一半长度后,皮层的细胞分裂起始于切割后3天,7天后重连。去除子叶后重连被抑制。在地上部尖端施加GA能够逆转抑制作用,而施加GA抑制剂,以及GA缺陷突变体(*gib-1*)呈现与去除子叶类似的表型(Asahina et al., 2002)。此外,去除芽的顶端生长点,或者施用生长素极性运输抑制剂(2,3,5-triiodobenzoic acid, TIBA)并不影响重连,而施用吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)不能弥补去除子叶的重连抑制,研究表明顶端生长点产生的生长素对去除子叶的黄瓜和番茄幼苗组织重连的影响并不大(Asahina et al., 2002)。继而检测幼苗内源性GA,发现具有生物活性的GA<sub>1</sub>/GA<sub>4</sub>及其前体在去除子叶的幼苗中含量降低。推测子叶维持了GA浓度,并且GA在黄瓜和番茄幼苗组织重连中具有重要作用(Asahina et al., 2007)。将拟南芥下胚轴进行全切和嫁接,保留子叶的下胚轴愈合过程伴随GA合成基因(GA20ox1、GA2ox和GA3ox1)的上调,去除子叶或TIBA处理后上调表达被抑制,且赤霉素缺陷突变体*cps*出现维管束正常重连但皮层不能重连的表型,表明皮层组织重连需要GA的生物合成,同时受到源于子叶的生长素的控制(Matsuoka et al., 2016)。对拟南芥花序茎半切处理后3天,细胞分裂主要发生在髓部。去除花序形

态学上端、抑制生长素极性运输以及使用生长素运输突变体(*pin1*), 均会抑制重连过程。而GA缺陷突变体(*ga3ox1/ga3ox2*)能够正常重连。推测在拟南芥花序茎组织重连的过程中, 生长素极性运输的作用显著而GA的作用不显著(Asahina et al., 2011)。

### 4.3 多激素交联作用下的基因调控

转录因子在组织重连过程中作用显著, 其表达受到生长素、JAs和ETH的交联调控。生长素促进转录因子ANAC071 (NAC domain containing protein 71)和ANAC096的表达, 生长素响应因子IAA5 (indole-3-acetic acid inducible 5)、ARF6 (auxin response factor 6)和ARF8居于级联调控的中部, 推测其在嫁接面以上发挥作用(Pitaksaringkarn et al., 2014a; Matsuoka et al., 2016)。AP2/ERF类转录因子的另1个成员RAP2.6L (related to AP2.6L)、JAs和低浓度生长素可促进其表达, 推测其在嫁接面以下发挥作用(Pitaksaringkarn et al., 2014a)。此外, ETH能够促进ANAC071及抑制RAP2.6L的表达(Asahina et al., 2011)。在乙烯不敏感突变体*ein2*中, 细胞分裂仅发生在嫁接面的皮层, 与野生型的髓部不同。当ANAC071和RAP2.6L的表达被抑制后, 重连不能正常进行。虽然这2个转录因子的作用尚不完全明晰, 但它们均受到生长素浓度的影响, 并被创伤应激激素JAs和ETH微调(Asahina et al., 2011)。根据表达模式的相似性和功能验证, 参与细胞壁重构过程的木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶(xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase)编码基因(*XTH19*和*XTH20*)受到ANAC071的直接调控(Pitaksaringkarn et al., 2014b)。

## 5 木本和草本植物嫁接愈合的比较

嫁接技术最早应用于多年生果树、林木和观赏花卉等木本植物, 20世纪初期开始大量应用于茄果类和瓜果类蔬菜等草本植物, 近年来有关嫁接生理的研究大多集中在蔬菜嫁接(Goldschmidt, 2014)。模式植物拟南芥的引入也为嫁接愈合分子机制的研究提供了更多便利(Turnbull et al., 2002)。

从嫁接时间和部位上来看, 草本嫁接采用幼苗期的胚轴或幼嫩茎, 而木本嫁接通常采用越冬后即将打破休眠时期的枝干和发芽枝条(Gautier et al., 2019)。

此外, 愈合期持续时间的长短具有明显差异。例如, 拟南芥和番茄等物种在7–10 DAG就能够完全愈合(Melnyk et al., 2015; Xie et al., 2019); 而葡萄(*Vitis vinifera*)和美洲山核桃(*Carya illinoensis*)等嫁接愈合期则需要数十天(Cookson et al., 2013; Mo et al., 2018)。木本植物嫁接部位的再生能力弱是造成愈合缓慢的可能原因。活跃的维管形成层是木本和草本植物嫁接部位愈合的必要条件。这与大部分双子叶植物、基部被子植物以及裸子植物可以嫁接, 而维管束散生和缺少维管形成层的单子叶植物很难嫁接相互印证(Melnyk and Meyerowitz, 2015)。

由于培养周期长和技术原因, 木本嫁接的调控机制难以采用以草本植物为材料的类似方法进行探究。可通过转录组分析获得的嫁接特异性富集路径对草本和木本愈合过程进行比较。对于拟南芥、番茄、葡萄和美洲山核桃等不同物种, 嫁接后呈现出差异表达的基因参与相似的路径, 包括茉莉酸合成、ROS消解、类黄酮代谢、细胞壁重构、细胞周期、膜锚定受体介导的细胞通讯、生长素运输和响应及维管组织分化(Yin et al., 2012; Cookson et al., 2013; Melnyk et al., 2015; Mo et al., 2018; Xie et al., 2019)。由此推测, 木本和草本嫁接的愈合过程本质上一致, 通过草本嫁接体系研究得出的调控模式在很大程度上也适用于木本嫁接。

## 6 问题和展望

前人的研究在一定程度上揭示了内源性植物激素和基因表达调控在嫁接愈合中的作用机制。与嫁接愈合形态变化相对应的生理学事件具有特征性的激素应答和基因表达模式。在整个嫁接愈合进程中, 激素含量的变化、基因调控网络的转换以及组织间信号的交叠使愈合机制的解析更加复杂。目前仍存在以下问题: 首先, 物种特异性和共有性植物激素的种类和作用模式还有待进一步澄清; 其次, 模式物种中构成基因调控网络的成员和表达模式需要进一步揭示; 最后, 在嫁接应用最多的茄果类和瓜果类蔬菜中, 未能对模式物种中的研究成果及时加以利用。

针对以上问题, 今后可从以下几个方面进行深入研究。(1) 选择不同类群的物种, 通过检测内源性植物激素的种类和含量, 以及施加外源或内源激素抑制

剂的方式, 确定各类植物激素的作用; (2) 在目前已揭示的基因调控网络的基础上, 利用组学分析推测嫁接愈合过程中各层面的调控机制; (3) 选择嫁接应用价值大的作物, 如茄果类或瓜果类蔬菜, 对模式物种中的分子机制进行验证或扩展, 并与生产实践相结合。期待在不久的将来, 研究者对嫁接愈合机制的深入理解能够为精准调控嫁接愈合提供依据, 从而充分发挥嫁接技术的增益潜力。

## 参考文献

- 卢善发, 邵小明, 杨世杰 (1995). 嫁接植株形成过程中接合部组织学和生长素含量的变化. *植物学通报* **12**, 38–41.
- 苗丽, 李衍素, 范兴强, 贺超兴, 于贤昌 (2017). 植物嫁接体接口愈合机制的研究进展. *植物生理学报* **53**, 17–28.
- 王幼群 (2011). 植物嫁接系统及其在植物生命科学研究中的应用. *科学通报* **56**, 2478–2485.
- 赵渊渊, 董春娟, 赵建忠, 尚庆茂 (2015). 夜温对辣椒套管嫁接苗砧穗愈合的影响. *中国农业大学学报* **20**(5), 164–170.
- Asahina M, Azuma K, Pitaksaringkarn W, Yamazaki T, Mitsuda N, Ohme-Takagi M, Yamaguchi S, Kamiya Y, Okada K, Nishimura T, Koshiba T, Yokota T, Kamada H, Satoh S (2011). Spatially selective hormonal control of RAP2.6L and ANAC071 transcription factors involved in tissue reunion in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 16128–16132.
- Asahina M, Iwai H, Kikuchi A, Yamaguchi S, Kamiya Y, Kamada H, Satoh S (2002). Gibberellin produced in the cotyledon is required for cell division during tissue reunion in the cortex of cut cucumber and tomato hypocotyls. *Plant Physiol* **129**, 201–210.
- Asahina M, Yamauchi Y, Hanada A, Kamiya Y, Kamada H, Satoh S, Yamaguchi S (2007). Effects of the removal of cotyledons on endogenous gibberellin levels in hypocotyls of young cucumber and tomato seedlings. *Plant Biotechnol* **24**, 99–106.
- Caño-Delgado A, Lee JY, Demura T (2010). Regulatory mechanisms for specification and patterning of plant vascular tissues. *Annu Rev Cell Dev Biol* **26**, 605–637.
- Chikano H, Ogawa M, Ikeda Y, Koizumi N, Kusano T, Sano H (2001). Two novel genes encoding SNF1-related protein kinases from *Arabidopsis thaliana*: differential accumulation of AtSR1 and AtSR2 transcripts in response to cytokinins and sugars, and phosphorylation of sucrose synthase by AtSR2. *Mol Gen Genet* **264**, 674–681.
- Cookson SJ, Moreno MJC, Hevin C, Mendome LZN, Delrot S, Trossat-Magnin C, Ollat N (2013). Graft union formation in grapevine induces transcriptional changes related to cell wall modification, wounding, hormone signaling, and secondary metabolism. *J Exp Bot* **64**, 2997–3008.
- den Boer BGW, Murray JAH (2000). Triggering the cell cycle in plants. *Trends Cell Biol* **10**, 245–250.
- Donner TJ, Sherr I, Scarpella E (2009). Regulation of pre-procambial cell state acquisition by auxin signaling in *Arabidopsis* leaves. *Development* **136**, 3235–3246.
- Elhiti M, Stasolla C (2015). ROS signaling in plant embryogenesis. In: Gupta KJ, Igamberdiev AU, eds. *Reactive Oxygen and Nitrogen Species Signaling and Communication in Plants*. Cham: Springer. pp. 197–214.
- Fernández-García N, Carvajal M, Olmos E (2004). Graft union formation in tomato plants: peroxidase and catalase involvement. *Ann Bot* **93**, 53–60.
- Gautier AT, Chambaud C, Brocard L, Ollat N, Gambetta GA, Delrot S, Cookson SJ (2019). Merging genotypes: graft union formation and scion-rootstock interactions. *J Exp Bot* **70**, 747–755.
- Glauser G, Dubugnon L, Mousavi SAR, Rudaz S, Wolfender JL, Farmer EE (2009). Velocity estimates for signal propagation leading to systemic jasmonic acid accumulation in wounded *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **284**, 34506–34513.
- Glauser G, Grata E, Dubugnon L, Rudaz S, Farmer EE, Wolfender JL (2008). Spatial and temporal dynamics of jasmonate synthesis and accumulation in *Arabidopsis* in response to wounding. *J Biol Chem* **283**, 16400–16407.
- Goldschmidt EE (2014). Plant grafting: new mechanisms, evolutionary implications. *Front Plant Sci* **5**, 727.
- Howe GA (2010). The roles of hormones in defense against insects and disease. *Plant hormones*. New York: Springer.
- Huang Y, Kong QS, Chen F, Bie ZL (2015). The history, current status and future prospects of vegetable grafting in China. *Acta Hort* **1086**, 31–39.
- Ikeuchi M, Iwase A, Rymen B, Lambolez A, Kojima M, Takebayashi Y, Heyman J, Watanabe S, Seo M, De Veylder L, Sakakibara H, Sugimoto K (2017). Wounding triggers callus formation via dynamic hormonal and transcriptional changes. *Plant Physiol* **175**, 1158–1174.
- Ikeuchi M, Sugimoto K, Iwase A (2013). Plant callus: mechanisms of induction and repression. *Plant Cell* **25**, 3159–3173.
- Inzé D, De Veylder L (2006). Cell cycle regulation in plant



- development. *Annu Rev Genet* **40**, 77–105.
- Iwase A, Harashima H, Ikeuchi M, Rymen B, Ohnuma M, Komaki S, Morohashi K, Kurata T, Nakata M, Ohme-Takagi M, Grotewold E, Sugimoto K (2017). WIND1 promotes shoot regeneration through transcriptional activation of *ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1* in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **29**, 54–69.
- Iwase A, Mitsuda N, Koyama T, Hiratsu K, Kojima M, Arai T, Inoue Y, Seki M, Sakakibara H, Sugimoto K, Ohme-Takagi M (2011). The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **21**, 508–514.
- Johkan M, Mitukuri K, Yamasaki S, Mori G, Oda M (2009). Causes of defoliation and low survival rate of grafted sweet pepper plants. *Sci Hortic* **119**, 103–107.
- Johkan M, Oda M, Mori G (2008). Ascorbic acid promotes graft-take in sweet pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Sci Hortic* **116**, 343–347.
- Kawaguchi M, Taji A, Backhouse D, Oda M (2008). Anatomy and physiology of graft incompatibility in solanaceous plants. *J Hortic Sci Biotechnol* **83**, 581–588.
- Koornneef A, Leon-Reyes A, Ritsema T, Verhage A, Den Otter FC, Van Loon LC, Pieterse CMJ (2008). Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. *Plant Physiol* **147**, 1358–1368.
- Lee JM, Kubota C, Tsao SJ, Bie Z, Echevarria PH, Morra L, Oda M (2010). Current status of vegetable grafting: diffusion, grafting techniques, automation. *Sci Hortic* **127**, 93–105.
- Lee JY, Wang X, Cui W, Sager R, Modla S, Czymmek K, Zybaliov B, van Wijk K, Zhang C, Lu H, Lakshmanan V (2011). A plasmodesmata-localized protein mediates crosstalk between cell-to-cell communication and innate immunity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**, 3353–3373.
- Lee JY (2015). Plasmodesmata: a signaling hub at the cellular boundary. *Curr Opin Plant Biol* **27**, 133–140.
- Matsuoka K, Sugawara E, Aoki R, Takuma K, Terao-Morita M, Satoh S, Asahina M (2016). Differential cellular control by cotyledon-derived phytohormones involved in graft reunion of *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant Cell Physiol* **57**, 2620–2631.
- Mazur E, Benková E, Friml J (2016). Vascular cambium regeneration and vessel formation in wounded inflorescence stems of *Arabidopsis*. *Sci Rep* **6**, 33754.
- Melnyk CW, Gabel A, Hardcastle TJ, Robinson S, Miyashima S, Grosse I, Meyerowitz EM (2018). Transcriptome dynamics at *Arabidopsis* graft junctions reveal an intertissue recognition mechanism that activates vascular regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* **115**, E2447–E2456.
- Melnyk CW, Meyerowitz EM (2015). Plant grafting. *Curr Biol* **25**, R183–R188.
- Melnyk CW, Schuster C, Leyser O, Meyerowitz EM (2015). A developmental framework for graft formation and vascular reconnection in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* **25**, 1306–1318.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* **9**, 490–498.
- Mo ZH, Feng G, Su WC, Liu ZZ, Peng FR (2018). Transcriptomic analysis provides insights into grafting union development in pecan (*Carya illinoensis*). *Genes* **9**, 71.
- Moore R (1982). Graft formation in *Kalanchoe blossfeldiana*. *J Exp Bot* **33**, 533–540.
- Moore R (1984). Graft formation in *Solanum pennellii* (Solanaceae). *Plant Cell Rep* **3**, 172–175.
- Mousavi SAR, Chauvin A, Pascaud F, Kellenberger S, Farmer EE (2013). *Glutamate receptor-like* genes mediate leaf-to-leaf wound signaling. *Nature* **500**, 422–426.
- Nanda AK, Melnyk CW (2018). The role of plant hormones during grafting. *J Plant Res* **131**, 49–58.
- Ohyama K, Shinohara H, Ogawa-Ohnishi M, Matsubayashi Y (2009). A glycopeptide regulating stem cell fate in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Chem Biol* **5**, 578–580.
- Orozco-Cardenas M, Ryan CA (1999). Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 6553–6557.
- Pitaksaringkarn W, Ishiguro S, Asahina M, Satoh S (2014a). *ARF6* and *ARF8* contribute to tissue reunion in incised *Arabidopsis* inflorescence stems. *Plant Biotechnol* **31**, 49–53.
- Pitaksaringkarn W, Matsuoka K, Asahina M, Miura K, Sage-Ono K, Ono M, Yokoyama R, Nishitani K, Ishii T, Iwai H, Satoh S (2014b). *XTH20* and *XTH19* regulated by ANAC071 under auxin flow are involved in cell proliferation in incised *Arabidopsis* inflorescence stems. *Plant J* **80**, 604–614.
- Rojo E, León J, Sánchez-Serrano JJ (1999). Cross-talk between wound signaling pathways determines local versus systemic gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **20**, 135–142.
- Ruan JJ, Zhou YX, Zhou ML, Yan J, Khurshid M, Weng WF, Cheng JP, Zhang KX (2019). Jasmonic acid signaling pathway in plants. *Int J Mol Sci* **20**, 2479.



- Schilmiller AL, Howe GA** (2005). Systemic signaling in the wound response. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 369–377.
- Sena G, Wang XN, Liu HY, Hofhuis H, Birnbaum KD** (2009). Organ regeneration does not require a functional stem cell niche in plants. *Nature* **457**, 1150–1153.
- Sheard LB, Tan X, Mao HB, Withers J, Ben-Nissan G, Hinds TR, Kobayashi Y, Hsu FF, Sharon M, Browse J, He SY, Rizo J, Howe GA, Zheng N** (2010). Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* **468**, 400–405.
- Smakowska-Luzan E, Mott GA, Parys K, Stegmann M, Howton TC, Layeghifard M, Neuhold J, Lehner A, Kong JX, Grünwald K, Weinberger N, Satbhai SB, Mayer D, Busch W, Madalinski M, Stolt-Bergner P, Provart NJ, Mukhtar MS, Zipfel C, Desveaux D, Guttman DS, Belkhadir Y** (2018). An extracellular network of *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinases. *Nature* **553**, 342–346.
- Stahl Y, Faulkner C** (2016). Receptor complex mediated regulation of symplastic traffic. *Trends Plant Sci* **21**, 450–459.
- Stahl Y, Wink RH, Ingram GC, Simon R** (2009). A signaling module controlling the stem cell niche in *Arabidopsis* root meristems. *Curr Biol* **19**, 909–914.
- Sugimoto K, Jiao YL, Meyerowitz EM** (2010). *Arabidopsis* regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Dev Cell* **18**, 463–471.
- Tilsner J, Amari K, Torrance L** (2011). Plasmodesmata viewed as specialised membrane adhesion sites. *Protoplasma* **248**, 39–60.
- Turnbull CGN, Booker JP, Leyser HMO** (2002). Micro-grafting techniques for testing long-distance signaling in *Arabidopsis*. *Plant J* **32**, 255–262.
- Vaddepalli P, Herrmann A, Fulton L, Oelschner M, Hillmer S, Stratil TF, Fastner A, Hammes UZ, Ott T, Robinson DG, Schneitz K** (2014). The C2-domain protein QUIRKY and the receptor-like kinase STRUBBELIG localize to plasmodesmata and mediate tissue morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **141**, 4139–4148.
- Vu NT, Xu ZH, Kim YS, Kang HM, Kim IS** (2014). Effect of nursery environmental condition and different cultivars on survival rate of grafted tomato seedling. *Acta Hort* **1037**, 765–770.
- Wang J, Jiang LB, Wu RL** (2017). Plant grafting: how genetic exchange promotes vascular reconnection. *New Phytol* **214**, 56–65.
- Wenzel CL, Schuetz M, Yu Q, Mattsson J** (2007). Dynamics of *MONOPTEROS* and *PIN-FORMED1* expression during leaf vein pattern formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **49**, 387–398.
- Xie LL, Dong CJ, Shang QM** (2019). Gene co-expression network analysis reveals pathways associated with graft healing by asymmetric profiling in tomato. *BMC Plant Biol* **19**, 373.
- Yin H, Yan B, Sun J, Jia PF, Zhang ZJ, Yan XS, Chai J, Ren ZZ, Zheng GC, Liu H** (2012). Graft-union development: a delicate process that involves cell-cell communication between scion and stock for local auxin accumulation. *J Exp Bot* **63**, 4219–4232.

## Recent Advances in Molecular Mechanisms of Plant Graft Healing Process

Lulu Xie, Qingqing Cui, Chunjuan Dong, Qingmao Shang<sup>\*</sup>

*Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China*

**Abstract** Grafting can significantly improve target traits such as yield, quality, and resistance of vegetable varieties, and is widely applied in agricultural practice. Prompting graft healing between scion and stock at the graft interface is necessary to improve graft efficiency. Currently the improvement on the technology is hampered by our lack of understanding of regulatory mechanisms of graft healing. The graft healing process involves complicated and cross-linked physiological events, including wounding stress response, callus formation, cell communication between scion and stock, and the regeneration and reunion of scion and stock. Recent research has provided a good foundation for our understanding the molecular mechanisms of graft healing. In this review, we summarize the central roles of phytohormones in each of the physiological events, and the phytohormone-dependent and -independent gene regulatory networks in graft healing, to provide a reference for further studying graft healing-related molecular mechanisms.

**Key words** grafting, graft healing, endogenous plant hormone, gene expression regulation

**Xie LL, Cui QQ, Dong CJ, Shang QM** (2020). Recent advances in molecular mechanisms of plant graft healing process. *Chin Bull Bot* **55**, 634–643.

---

<sup>\*</sup> Author for correspondence. E-mail: shanglab211@126.com

(责任编辑: 朱亚娜)