

植物嫁接体接口愈合机制的研究进展

苗丽, 李衍素, 范兴强, 贺超兴, 于贤昌*

中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京100081

摘要: 嫁接效率的提高依赖于嫁接体接口的愈合速率, 接口愈合涉及创伤反应、生理生化过程、细胞和组织分化、砧木和接穗间信号交流和维管束重建过程。明确愈合过程的机制, 不仅对维管系统发育研究具有重要的理论参考价值, 而且对嫁接苗生产具有一定技术指导意义。本文简要概述了嫁接体接口的解剖结构、愈合过程、影响嫁接体接口愈合的因素, 着重讨论了接口愈合的生理生化特征及相关的分子机制, 并展望了将来嫁接接口愈合的研究方向。

关键词: 嫁接; 愈合过程; 愈合机制

传统意义的嫁接是指有目的地将一株植物的芽或枝等器官接到另一株带有根系的植株的适当位置上, 使两者接合成一个新植物体的技术(Moore 1982), 其中芽或枝部分称为接穗, 带根系部分称为砧木。现代意义的嫁接是指同一植物或不同植物的细胞、组织或器官结合在一起, 并促使其生长发育成为整体或完整植株的技术(周艳等2013)。生产中, 嫁接技术已广泛地应用于良种的保存和快速繁育(Bletsos等2003), 在提高植物的产量、抗逆性、改变植物的开花结果习性及其改良果实品质等方面具有重要的应用价值(Colla等2006; 李涛和于贤昌2007; Venema等2008; Vitale等2014)。嫁接接口融合过程涉及到接穗和砧木之间的通讯、细胞分裂及分化、组织模式的重建、组织器官的形成等一系列的事件, 成为植物学和生命科学的研究热点。本文简要概述了嫁接体接口的解剖结构、愈合过程、以及对嫁接体接口愈合的影响因素, 着重讨论了接口愈合的生理生化特征及相关的分子机制, 以期为其进一步的研究和应用提供有价值的理论信息。

1 嫁接接口的解剖结构研究及方法

在嫁接的早期研究中, 研究者多集中在接口处细胞学和组织学的变化, 运用光镜、电镜和激光共聚焦显微镜来进行平面观察, 阐释嫁接愈合过程中的细胞的识别和交流、细胞周期的起始、细胞增殖和细胞分化及胞间连丝的形成等(Ermel等1997; Estradaluna等2002; Kollmann和Glockmann 1991; Pina 2009)。运用电子显微镜观察北美云杉嫁接接口的细胞发育, 揭示了嫁接界面细胞的恢复和再生过程(Weatherhead和Barnett 1986)。Pina和Errea (2005)采用荧光示踪技术在激光共聚焦显

微镜下对砧穗愈合的组织进行染料耦合分析, 得出砧穗愈伤组织细胞胞间连丝的不充分耦合是造成杏、李嫁接局部不亲和的原因之一, 但扫描电镜下清楚的观察到在亲和及不亲和朝鲜蓟嫁接砧穗间出现类似胞间连丝的管状突起、横桥及愈伤组织, 这表明嫁接初期的砧穗黏连和愈伤组织分化并不是嫁接亲和性的决定性因素(Trinchera等2013)。随着成像技术的发展, 实现了对嫁接体接口的空间结构的观察。Leszczyński等(2000)运用核磁共振成像技术(nuclear magnetic resonance, NMR)对针叶类植物的嫁接接口进行2D的空间展示, 接口处外层木质部及韧皮部/形成层处含水量最高, 韧皮部/形成层细胞活性较强, 在砧穗相连皮层薄壁组织出现薄薄的形成层组织。磁共振成像技术(magnetic resonance imaging technique, MRI)也被应用于分析葡萄嫁接体的一般特性和内部的亲和状态, 嫁接接口周边异常的膨大阻碍砧穗维管束的连接, 并且该技术可能会成为快速检测葡萄嫁接连接程度及亲和性的有效工具(Bahar等2010)。采用X线断层成像技术对葡萄嫁接苗接口进行3D结构对比, 发现亲和性高的砧穗嫁接组织中有较多连接好的木质部和韧皮部, 并且结构规整, 而亲和性较差的组合中结构混乱, 并且砧穗之间并没有完全连接(Milien等2012)。

荧光染料、荧光蛋白(green fluorescent pro-

收稿 2016-10-14 修定 2016-12-23

资助 国家自然科学基金项目(31101583、31272212)、现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-25-C-01)、中国农业科学院科技创新工程项目(CAAS-ASTIP-IVFCAAS)和农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目。

* 通讯作者(E-mail: xcyu1962@163.com)。

tein, GFP)基因标记等途径也被应用于对嫁接体维管束运输功能的研究, Schöning和Kollmann (1997)通过 ^{14}C -蔗糖标记和5(6)-羧基荧光素(CF)标记研究了亲和的番茄/茄子嫁接体和不亲和的蚕豆/向日葵嫁接体的筛管转运功能, 发现在亲和嫁接体中重连筛管的数量与蔗糖和CF的运输量成正比, 在不亲和嫁接体中这种结构和功能并没有一致性。利用荧光漂白后恢复技术(fluorescence redistribution after photobleaching, FRAP), 发现樱桃嫁接苗前期其接口处组织间是以胞间连丝相连, 并且愈伤组织要比皮层组织间的联系更紧密(Pina等2012)。但通过根部酸性品红染色发现, 拟南芥自嫁接中的染色情况比组织学观察到的结果比例要小(Flaishman等2008), 这可能是由于嫁接诱导的创伤反应, 产生的维管束限制了染料的运输(Indig和Aloni 1989)。将转入YFP的拟南芥与转入GFP的拟南芥进行嫁接时, 可以清楚的观察到嫁接后24 h内表皮细胞在接口表面的扩展, 观察*pCASPI::N-LS-GFP*自根嫁接植株中*CASPI* (casparian strip formation in the endodermis)的表达, 发现该基因在嫁接接口上部的表达要比接口下部的表达晚1~2 d, 表明了砧木和接穗在嫁接接口细胞分化的不对称性(Melnyk等2015)。越来越多的成像技术, 染料和标记基因用于嫁接接口愈合过程研究, 这为研究接口愈合复杂的生物学过程和分子机制奠定了基础。

2 嫁接体愈合过程的研究

通过早期对嫁接的形态学研究发现, 尽管嫁接体成活所需时间因植物种类、年龄、嫁接部位及嫁接方法而异, 但是愈合过程基本相同。主要分为三个时期: (1)接穗和砧木间的初始黏连及隔离层的形成; (2)愈伤组织的形成; (3)接穗和砧木间维管束桥的重新连接(Moore 1983), 具体愈合过程又因嫁接的亲合性而异。

2.1 亲和嫁接体愈合过程的研究

亲和嫁接是指砧木和接穗可以完全或部分愈合成活为共生体, 并能长期生长和结实。其接口的愈合过程相似, 嫁接初期, 因切割创伤而导致的隔离层覆盖整个嫁接面, 该隔离层是由受损细胞的细胞壁残留物及电子密度高的致密物质构成, 其主要作用是密封伤口、防止有机物和离子等大

量外渗, 保护其余活细胞的生理活性(Moore和Dan 1981; Tiedemann 1989), 在两侧的隔离层细胞中常出现大量的高尔基体, 分泌果胶, 碳水化合物和蛋白质以促进砧穗间初始黏连; 随后隔离层两侧细胞间形成类似胞间连丝的细胞壁间突起, 表面覆盖一层脂质和蜡质物质, 通过这种结构的连接满足砧穗间少量水分养料及分子信号的交流, 之后形成的横桥(horizontal bridge, HB)结构加强了联系(Trinchera等2013); 邻近隔离层的薄壁细胞恢复分裂, 特别是靠近接穗部分, 形成愈伤组织, 在木本植物中, 愈伤组织可以由髓区、木射线、形成层和皮层细胞脱分化形成, 在愈伤组织间形成较多的胞间连丝进一步加强接口处砧穗细胞间的连接(Pina等2012)。新形成的愈伤组织细胞虽然进行轴向伸长, 但相对其他原有的薄壁细胞仍较小(Flaishman等2008), 随着愈伤组织的扩增, 既对隔离层形成生长压力, 而且可以吸收隔离层的坏死细胞成分, 导致隔离层的消失, 接穗和砧木中的愈伤组织交错相连, 加固砧穗的连接(Stoddard和McCully 1979)。愈伤组织继而通过增殖和再分化成新的维管束组织, Yin等(2012)发现拟南芥嫁接3 d后, 嫁接界面进行了大量的维管束组织的分化, 并恢复了木质部和韧皮部的功能性连接; 但Melnyk等(2015)在拟南芥接口愈合过程中发现先完成韧皮部的重连, 在嫁接后7 d才完成木质部重连, 其中原因可能是少部分砧穗木质部进行了线性对接, 故在3 d时可以进行木质部的运输, 但随着愈伤组织的扩展这种线性对接受到阻碍, 而真正新分化木质部重接是在嫁接7 d时发生。砧木接穗间维管束组织的重新连接, 标志着嫁接面愈合的完成。

2.2 非亲和嫁接体愈合过程的研究

与亲和性嫁接相反, 非亲和性嫁接因外界环境因素、病原微生物及遗传特性的不同, 造成砧木和接穗不能愈合为成活的共生体, 或愈合为有对生长发育有轻度干扰的共生体, 故非亲和嫁接可以看做是在亲和嫁接的愈合过程中某一环节受到阻碍所致。嫁接体接口缺少愈伤组织可造成嫁接的失败(Weatherhead 1986), 但是大部分研究表明, 愈伤组织仅是切割诱导的创伤反应, 其增殖过程在亲和性和非亲和性嫁接中都有发生(Pina等2012), 不同的是愈伤组织细胞排列和纤维素、脂

质及酚类物质含量各异(Pilar等2001)。通过特定的细胞标记物发现不亲和嫁接体接口表面有半胞间连丝的形成(Kollmann和Glockmann 1985)。Pina和Errea (2005)发现砧穗愈伤组织间胞间连丝的不充分耦合性是造成杏、李嫁接不亲和的主要原因,并且在非亲和性嫁接中延迟了愈伤组织分化形成层。目前大多数研究者认为嫁接成功的关键步骤是功能性维管束组织的重连,不亲和嫁接是由较少部分的维管束组织连接,韧皮部退化或接口上下积累较多酚类物质造成的(Milien等2012; Usenik等2006),在荔枝的不亲和性嫁接苗接口处除了较少维管束桥连接外,还存在着部分隔离层和异常维管束复合物(Chen等2016)。Flaishman等(2008)的研究表明,虽然非亲和拟南芥/番茄嫁接体中坏死层限制了砧穗维管束组织的重连,但拟南芥仍然能够开花结籽,这表明砧穗间存在除了维管束以外的连接通道,如薄壁细胞。此外,即使非亲和嫁接体中存在新维管束组织的形成,但由于其大量的愈伤组织可对分化的韧皮部和木质部形成机械的阻碍,导致物质运输的不连续性,表现为多年生长的不亲和(Hartmann和Kester 1997)。对非亲和嫁接接口的研究已经不仅仅局限于其解剖结构的观察,也已扩展到生理代谢领域。在判断葡萄嫁接苗亲和性时,其接口处酸性磷酸酶和总蛋白含量的分析是必要的,而过氧化物酶和酯酶系统活性变化多样(Gökbayrak等2007),Chen等(2016)研究表明嫁接接口处抗氧化酶系统包括超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)和多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)被激活有利于嫁接接口的愈合。也有研究表明因非亲和嫁接苗生理代谢活性下降或砧穗间重连维管束的受阻而造成接口处多酚类物质和糖类物质的积累,其中糖类物质可能是分子信号,但其内在的机制尚不清楚(Hudina等2014; Kang等2016)。

3 影响嫁接接口愈合的因素

对嫁接体接口愈合过程的影响因素来自三个方面:嫁接方法、品种和外部环境。

植物嫁接部位包括愈伤组织、芽和茎部,茎部嫁接最为常用。目前用于科学研究的茎部嫁接方法主要有劈接法、平接法和靠接法等,其中劈

接法应用较广泛。劈接是将接穗茎部切成楔形,砧木切出平口后再纵向切出与接穗想贴合的切口,将接穗插入砧木切口即可,这种方法易于操作,砧穗间结合面较大,且组织间错位几率小易于成活,故在木本和草本植物嫁接中得到广泛应用。平接法是将接穗和砧木切出平面后将二者对接即可,这种方法对于较小的植物不易操作,并且因砧穗间结合面积较小使组织出现错位几率较大,故接口愈合发育延迟或者愈合失败(Flaishman等2008),但对于研究愈合发育过程,此种方法较为合适。靠接法是将接穗和砧木切出舌形相互套接在一起,虽然该法操作相对麻烦,但砧穗间接触面积大,且砧穗各自保持自身完整植株,故接口愈合较为迅速,且成活率高,在木本植物和瓜类蔬菜中应用较多,因其涉及砧穗间交流的因素较多,在科学研究中应用较少。此外,试管苗嫁接也得到了发展,试管苗嫁接也称微嫁接,因其生长周期短、占地少、生长环境高度可控性及接口愈合速度较快,成为嫁接基础研究的可靠手段,一般适用于拟南芥、烟草、番茄等可进行苗期嫁接的草本植物(Melnyk等2015; Yin等2012)。

因砧木和接穗同属不同品种,或同一科不同属,或不同科而产生亲和性不同的嫁接体,接口愈合过程因此而异。将同一品种接穗嫁接到不同品种的荔枝砧木上,在亲和性较好的嫁接苗结合部位有新的维管束形成并且相互连接较紧密,而在不亲和的嫁接苗砧穗结合处发现仍然有坏死层和不规则维管束化合物,较少的维管束桥相连接(Chen等2016)。接口处形成层凹陷和不连续的维管束是不亲和的梨树/温桫嫁接苗的主要特征,此外,接口处的抗氧化系统也表现出较低活性,由此推测梨树/温桫嫁接不亲和可能是由于接口处产生了过多活性氧(reactive oxygen species, ROS)而清除系统效率过低(Irisarri等2015)。不同科之间的嫁接相对困难,拟南芥作为嫁接的模式植物,多采用花茎嫁接,可以与烟草成功嫁接。并且烟草可以和部分木兰类、双子叶和单子叶植物进行嫁接,不过对接口解剖结构分析并没有发现维管束的重连,但薄壁细胞进行了大量的增殖,木质部和韧皮部组织不规则的发育,使得木质部偶然性的重连,虽然没有发现韧皮部重接,嫁接接口边缘处形成

大量的胞间连丝,这就实现了砧穗间共质体和质外体的交流(Notaguchi 2016)。此外,砧木和接穗本身的生理年龄对于接口愈合速度和质量产生一定影响,同一接穗嫁接在1、2、3个月的麻风树砧木,其成活率分别是66.7%、89.5%和93.8%,这与砧穗接口处茎部直径相关(Cholid等2014)。

嫁接苗前期的生长管理较为严格,要求适宜的光照、温度、湿度和水分,这些外部环境因素也是影响接口愈合的关键因子。较高的温度抑制生长素信号的专递,延迟愈伤组织形成和分化,在17~23℃范围内番茄嫁接苗成活率随温度升高而增加,而26℃时成活率有所下降(Vu等2014)。茄子嫁接苗置于夜温19~29℃条件下,随温度升高接合部愈伤组织细胞层数增加,但维管束连接及愈合进程减缓,木质部输导能力减弱,愈合质量显著下降(赵渊渊等2015)。光照不仅为植物提供能量,而且能够调节吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)、赤霉素(gibberellins, GA)、脱落酸(abscisic acid, ABA)等植物激素信号,故对嫁接接口愈合起到重要作用。通过蛋白组学分析不同光照下西瓜/南瓜嫁接苗的差异蛋白,发现高光强可以增强离子绑定、转录因子调节、氨基酸代谢及防御反应相关的蛋白从而加强砧穗间的重连(Muneer等2015)。成功的嫁接不仅需要足够的光强,对光质也有一定要求,单一的蓝光或红光造成接穗中水分的失衡,造成萎蔫不利于接口愈合,并且单一光质本身是一种环境胁迫,不利于植物的生长发育(Kang等2016)。高的空气湿度对于嫁接苗前期维持接穗叶片水分平衡是必要的,相对湿度70%~90%范围内,番茄嫁接苗的成活率没有显著变化,但过高湿度会滋生植物病菌不利于接口的愈合,湿度过低会造成叶片的萎蔫(Venema等2008)。嫁接苗前期各个环境因子之间是相辅相成的,共同营造出利于接口愈合和嫁接体生长的环境。

4 嫁接体的生理生化特征

嫁接后,砧木、接穗及其结合部位将发生一些代谢的变化,这些代谢产物会影响嫁接体的成活与否(表1)。故嫁接体接口部位的生理生化特征成为嫁接研究的重要内容。

砧穗间的水分交流始于嫁接面砧穗愈伤组织间出现胞间连丝,新的维管束重连时,砧木吸收的

水分就可以运送到接穗,而且砧穗间重连的程度影响水分的运输能力(Torii等1992)。Turquois和Malone (1996)通过位移传感设备对嫁接番茄的液压进行连续非损伤的测定,发现嫁接部位上下的主液流的功能性连接恢复与接口处木质部桥的出现时间一致。尽管嫁接后番茄水导性(root hydraulic conductance, L_0)显著降低,但测定嫁接面上下 L_0 结果表明,在亲和嫁接体中嫁接面并不是水通道的屏障,这可能是由于砧木本身较低的 L_0 造成的(Fernandez-Garcia等2002, 2004)。在干旱胁迫下,苹果嫁接苗的中间砧嫁接区域导水阻力在植株总体导水阻力中所占的比率有所下降,不同砧木的下降程度不同,其中矮化苗的导水阻力最大,导致地上部分水分供给减少,从而影响树体的生长(张林森等2013)。尽管大量研究通过细胞组织学和观察染料运输的方法来分析嫁接植株中的水压障碍,但这很难区分功能和非功能的维管束系统,一定程度上水压可以调节从砧木通过木质部进入接穗的植物激素和营养成分,这一过程受到嫁接界面愈合程度的影响(Koepke和Dhingra 2013; Martínez-Ballesta等2010)。

砧木吸收的矿质营养对嫁接接口愈合也有一定的作用,其中锌(zinc, Zn)、锰(manganese, Mn)和硼(boron, B)微量元素对黄瓜下胚轴切口愈合是必需的,可能是调节细胞壁及与细胞壁降解相关酶活性,并促进细胞的伸长(Asahina等2006),而在非亲和嫁接中,不连续性的嫁接面使得水分和养料的吸收运输受阻,引起嫁接体的萎蔫,导致接穗的生长过缓(Chen等2016; Davis等2008)。接穗产生的同化产物可以通过共质体途径,也可以通过质外体途径越过嫁接面,嫁接接口愈合初期,砧穗间失去了共质体的联络,造成了同化物在嫁接面的积累,除了大量碳水化合物,还包含生长素、蛋白和RNA,为植物应对创伤反应提供能量,加强砧穗细胞间信号交流,促进接口愈合(Goldschmidt 2014; Yin等2012),通过外源施加植物激素,包括IAA和ZT,可以提高接口处维管束桥形成的速率及数目,加快接口的愈合的速度(Lu和Song 1999; Lu等1996)。研究表明亲和性嫁接中嫁接面对于植物激素的运输并没有造成显著影响,在非亲和嫁接体茎部和根部积累了过量的IAA,导致砧木根部腐烂

(Aloni等2013; Li等2012)。Melnik等(2015)研究发现相比于IAA, 细胞分裂素(cytokinin, CTK)和乙烯(ethylene, ETH)对于拟南芥接口愈合中韧皮部重连的作用是微小的, 这可能是因为嫁接愈合过程复杂, 对植物激素的需求也因组织而异。GA对于促进下胚轴接口组织重连过程中的细胞分化是必需的(Asahina等2002)。砧木接穗间通过植物激素的交流, 共同调节嫁接体的生长发育, 这一过程存在激素间网络互作, 但关于接口愈合过程的激素间互作研究较少(Koepke和Dhingra 2013)。

适量的活性氧含量可以抑制嫁接伤口部位的致病菌的感染, 促进伤口的木质化, 对外部损伤起一个积极的响应, 过量的ROS会对植物细胞造成损伤。相对于非亲和性的黄瓜嫁接苗, 亲和性嫁接的黄瓜茎部含有较高的SOD、POD和抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)活性, 亲和性甜瓜嫁接苗接口处有较高的抗氧化酶活性和较低的活性氧含量(Aloni等2013; Xu等2015)。分析亲和性梨/温柏树的嫁接苗嫁接界面发现, 抗氧化基

因包括*SOD1*、*SOD3*、*APX3*、*APX6*和过氧化氢酶(catalase, CAT)基因(*CAT1*、*CAT3*)的转录水平有所上升, SOD抗氧化酶活性随嫁接天数的增加而提高, 结合ROS特定探针, 线粒体超微结构观察及凋亡过程中的DNA变化, 得出在嫁接界面上过量的ROS含量或是较低的抗氧化酶活性, 可能是造成其不亲和的主要原因(Irisarri等2015)。过氧化物酶在砧穗交流中是必要的, 在嫁接接口部位新分化木质部的木质化过程中发挥很重要的作用(Fernandez-Garcia等2004)。苯丙烷代谢途径产生多酚化合物, 其中木质素、黄酮类化合物参与嫁接接口愈合的复杂过程。苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)在体外愈伤组织中表达量上升, 在非亲和的杏树/李树的嫁接接口处PAL达到较高的转录水平, 并伴随着大量可溶性结合细胞壁的酚类化合物, 但并没有导致木质素的产生(Pina和Errea 2008)。一方面, 酚类化合物在砧穗愈伤组织细胞分生、分化、发育成新组织的过程中发挥着重要的作用(Errea等1994), 另一方面, 多酚

表1 不同物质对嫁接体接口愈合的影响
Table 1 Effect of different substance on graft union healing process

因素	物质	嫁接组合	对接口愈合的作用	参考文献
水压	水	番茄/番茄; 苹果/海棠/苹果; 多年生植物(橄榄树、桃树、猕猴桃)	测定嫁接接口区域的导水阻力, 判断接口维管束组织重连情况; 调节进入接穗的植物激素和营养成分	Fernandez-Garcia等2004; Koepke和Dhingra 2013; 张林森等2013
矿质元素	Zn、Mn、B	黄瓜/黄瓜	调节细胞壁及细胞壁降解相关酶的功能; 促进接口处细胞伸长	Asahina等2006
碳水化合物	蔗糖、纤维素、果胶、淀粉	拟南芥/拟南芥; 甜樱桃/甜樱桃; 朝鲜蓟/朝鲜蓟	促进伤口的初始黏连; 为伤口愈合提供能量; 作为信号物质启动砧穗间细胞交流	Olmstead等2010; Trinchera等2013; Yin等2012
植物激素	IAA、CTK、ABA、GA、ETH、茉莉酸	葡萄/葡萄; 拟南芥/拟南芥; 甜瓜/南瓜	启动维管束组织分化和发育; 影响维管束组织的木质化; 作为信号促进砧穗间交流; 激活活性氧, 产生氧化胁迫	Aloni等2013; Cookson等2013; Melnyk等2015
酚类化合物	间苯三酚、儿茶酚、对香豆酸、熊果苷、花青素、黄酮醇、绿原酸、木质素	甜樱桃/甜樱桃; 梨树/温桉树; 杏树/杏树; 梨树/梨树	抑制过氧化物酶、IAA合成及运输, 进而影响维管束分化; 砧穗间细胞新陈代谢机能障碍; 导致嫁接不亲和	Feucht和Treutter1995; Hudina等2014; Musacchi等2000; Usenik等2006
活性氧	O ₂ ^{·-} 、H ₂ O ₂ 、·OH	西瓜/南瓜	抑制嫁接部位致病菌感染; 过量会损伤植物细胞	Xu等2015
抗氧化系统	SOD、POD、APX、CAT	番茄/番茄; 西瓜/南瓜; 梨树/温桉树	清除接口处过量ROS; 促进木质素合成	Aloni等2013; Fernandez-Garcia等2004; Irisarri等2015
苯丙烷代谢相关酶	PAL、PPO	杏树/樱桃树; 枇杷/枇杷	促进嫁接接口处坏死层的形成; 砧穗愈伤组织细胞分生、分化, 发育过程中发挥重要作用	Errea等1994; López-Gómez等2007

化合物可以与植物激素互作,影响IAA的合成及运输,间接促进嫁接体发育过程中形成层发育,诱导新木质部和韧皮部的分化及木质化过程(Koepke和Dhingra 2013);而过高的多酚化合物会损伤接口的愈合,限制愈伤组织的分裂和分化及新维管束的形成(Feucht等1988)。PPO通过氧化酚类化合物产生黑色和棕色物质,提高嫁接接口处坏死层的形成,故在嫁接初期PPO活性较高(López-Gómez等2007)。细胞色素氧化酶活性高低在一定程度上反映了呼吸供能的情况,在不亲和性的莧菜/番茄嫁接组合中,发现隔离层的加厚消失,两侧愈伤组织细胞层数明显增多,而细胞色素氧化酶活性一直保持在较高水平,表明了愈伤组织分解和吸收隔离层过程中消耗了大量的能量(张蜀秋等1990)。植物嫁接接口愈合过程十分复杂,其涉及多种生理生化代谢,用传统方法分析代谢间的互作相对困难,因此,随着代谢组学技术的发展,使得揭示代谢互作成为可能,有利于阐明接口愈合生理生化机制。

5 嫁接接口愈合的分子机制的研究

作为古老的农艺技术,嫁接已经日渐成熟并得到了广泛的应用,并在园艺作物中形成了产业化,但是对于嫁接的早期阶段及接穗和砧木识别的具体分子机制目前尚不清楚。在分子水平上的嫁接研究主要集中在组学数据分析和信号转导两方面。

5.1 对嫁接接口愈合的组学水平分析

创伤信号转导途径包含各种化合物和生理因素,多种信号的交流会导致对机械损伤不同的响应模式(Che等2006)。在嫁接结合部愈合过程中首当其冲的是创伤诱导信号,这不同于单独的创伤诱导。据推测,嫁接结合部位的形成在分子水平上可能涉及基因表达、蛋白转换及代谢的重新调整。通过AFPL (amplified fragment length polymorphism analysis)技术,发现嫁接后0、3、7、14 d的山核桃接合部位中与生长素、细胞周期、信号转导、核酸代谢和蛋白质代谢等相关的19个基因出现显著的差异性表达,这表明嫁接过程是一个较复杂的新陈代谢过程(Zheng等2010)。对拟南芥的下胚轴嫁接苗表达谱分析发现,嫁接后1 d接穗和砧木细胞之间正在进行细胞间的信号传递,并伴随着细胞生长被抑制以及接口部位的细胞对损伤

造成的细胞碎片进行清理的过程,而这些过程均是由损伤诱导的一套基因程序来调控的(Yin等2012)。在异源嫁接中,砧木和接穗间的交流也得到了研究,早在1930年代, Kostoff (1930)发现异源嫁接砧穗间可以进行交流并诱导免疫应答,接口表面的细胞突起也表明砧穗间的交流。Cookson等(2014)分析葡萄品种间的嫁接接口的微阵列发现,在嫁接后的1个月内,异源嫁接上调接口处的氧化胁迫响应和Pr蛋白,随后植物胁迫响应的其他基因也得到上调,这表明嫁接接口表面的细胞能够察觉到异源的嫁接对象,从而诱导免疫应答响应。而对其进一步的转录组分析,鉴定到3 000个基因的mRNA可以在接穗和砧木中交换,这些基因参与基本的细胞合成、分解和代谢活动,以及胁迫和信号转导响应。相比于幼嫩的嫁接体,成熟的嫁接体中具有更少的可转运mRNA,这些mRNA能够在接穗和砧木间可以进行定向和双向移动,并且这些基因的转运速率相对较慢,砧穗的基因型、嫁接组合及嫁接环境都能影响mRNA的移动方向、数量和种类(Yang等2015),但并不是所有基因的功能都能够依赖可移动的转录本,故这些砧穗间移动的基因功能需进一步的验证(Notaguchi等2014)。而对不同光照强度下的西瓜嫁接接合部的蛋白组学分析,发现鉴定的差异性蛋白主要参与离子结合、氨基酸代谢、转录调控及防御反应,而这些蛋白的增加,使得嫁接苗在相对较高的光强下砧木和接穗之间维管束的连接更加紧密,其中参与氨基酸合成等关键酶的积累在维管束重连中起到重要作用(Muneer等2015)。故利用各种技术和手段在组学水平上探索不同物种间的基因调节网络信号将是嫁接的研究方向,具体的分子机制还有待进一步研究。

5.2 嫁接体信号转导的研究

5.2.1 嫁接接口愈合信号机制

大量研究表明,韧皮部长距离运输的植物激素、蛋白和RNA在器官间的信号传递中起重要作用,在嫁接接合部通过砧穗间少量的信号蛋白和RNAs的移动交流来改变嫁接体的生长(Kim和Sinha 2001; Mallory等2003)。在梨树/温柏树嫁接中,温柏树根部产生的野黑糖苷进入接穗中,被糖苷酶水解产生氰化物,毒害嫁接接口组织使得细胞坏死,导致嫁接不亲和(Gur和Blum 1968)。不同

于单独的创伤效应, 在黄瓜嫁接后2~10 d从嫁接结合部位鉴定出3种新生特异性蛋白, 而嫁接接口处的细胞形态变化正是由于砧木和接穗间细胞嫁接蛋白的相互识别(Xiao和Yang 1995; Yeoman等1978)。创伤反应还可以诱导植物激素促进接口愈合, 创伤诱导的乙烯和茉莉酸分别通过调节*ANAC071* (*Arabidopsis* NAC domain containing protein 71)和*RAP2.6L* (At5g13330)转录因子的表达来调节生长素响应促进上下界面的愈合(Asahina和Sato 2015)。拟南芥嫁接接口愈合过程中韧皮部重连要先于木质部重连, 这是因为从接穗运下来的IAA, 通过ALF4 (aberrant lateral root formation 4)刺激生长素受体 (transport inhibitor response 1/auxin signaling F-box, TIR/AFBs)和AXR1 (auxin-resistant 1), 进而激活Aux/IAA-ARF (aux/IAA-auxin response factor)响应, 最终使韧皮部重连(Melnyk等2015)。以上研究表明, 生长素不仅能促进在嫁接接口的愈合, 而且能通过激活其他代谢响应, 来影响嫁接体的发育。Asahina等(2002)研究发现, 子叶合成的GA及来自砧木的微量元素对于黄瓜和番茄切开的茎部愈合是必需的, 并且外源GA可以缓解因摘除子叶造成的茎部愈合缓慢现象。尽管嫁接愈合过程阐述较为清晰, 但其具体分子机制尚不明确。

5.2.2 嫁接体中的信号交流

早在20世纪50年代, Michurin (1949)认为基因可在接穗和砧木间移动, 并提出了嫁接杂交的概念, 但因其并不符合孟德尔遗传规律, 故并没有被科学界所接受, 随后的文献报道也并没有证实嫁接中有杂交种出现(Janick和Topoleski 1963; Stubbe 1954), 但也有研究支持嫁接中有物质转换的现象(Frankel 1956)。Ohta (1991)通过组织形态学观察到染色质可以从较老的砧木通过维管束运输到较幼嫩的接穗的顶端原基细胞或花芽中。近年来的研究表明砧穗间通过植物激素和蛋白的交流, 激活相应的生理代谢反应, 促进嫁接体更好的生长。在甜瓜嫁接苗亲和性的研究中发现, 亲和性嫁接苗可以通过接穗产生的生长素激活砧木中乙烯和ROS代谢, 同时激活了抗氧化酶系统将多余的活性氧清除, 保证砧木的正常生长, 而非亲和嫁接中因缺少抗氧化酶系统的活化, 导致砧木生长的受抑, 但这种抑制作用通过外施IAA或乙烯抑制剂,

ABA或抗氧化物质可以得到缓解(Aloni等2013)。Spiegelman等(2015)发现, 野生型番茄接穗中合成的SlCyp1 (*Solanum lycopersicum* cyclophilin 1)亲环蛋白通过韧皮部转运到矮化的*dgt* (*SlCyp1*)突变体砧木中, 通过刺激生长素响应, 恢复次级木质部维管束的发育, 促进根部的生长。通过嫁接技术不仅可以探究嫁接过程砧穗间信号交流, 而且为探究可移动信号提供一种快速可靠的研究系统。

目前韧皮部汁液中可以识别出多种小RNA, 甚至是mRNA (Buhtz等2008; Spiegelman等2013)。Palauqui等(1997)发现烟草嫁接苗中出现的基因沉默的传递, 推测可能存在一些可移动的mRNA, 这种嫁接转移的RNA沉默信号是可以上调与下调的。在阻碍小RNA合成的拟南芥突变体的嫁接苗中发现, 无论是转基因的sRNA还是内源性的sRNA都可以穿过嫁接面转运到突变体中, 并通过DNA甲基化对受体细胞进行可遗传表观修饰(Lewsey等2016; Molnar等2010), 这在茄科植物的嫁接中也得到证实(Wu等2013)。尽管由可移动的sRNAs导致甲基化改变的程度还尚不明确, 但这一发现不仅扩展了研究嫁接愈合的研究范围, 而且还能够为作物育种提供一种新的思路。砧穗间交流的miRNA种类繁多, 并且其功能因种类而异。在异源和同源嫁接的柑橘接穗中大部分的miRNA表达量得到了显著的下降, 其中miRNA156可能与木本植物中童期下降有关, miRNA397可能与砧穗组合对铜和其他微量元素的吸收有关(Tzarfati等2013)。miRNA156已被证实是可以移植转运的信号, 在马铃薯过表达miRNA156可以改变植物结构和减少块茎产量, 改变细胞分裂素和独脚金内酯的水平(Bhogale等2013), 到目前为止证明可以转运的miRNAs依旧很少。对于HGT (水平基因转移)的研究不仅局限于基因, 近年来还扩展到了对基因组的水平转移的研究, 通过构建携带不同抗性基因和不同细胞成分(细胞核和质体)标记基因的烟草转基因系, 并将两者进行嫁接, 通过分析其嫁接结合部位, 发现很多细胞具有两者的抗性和报告基因(Stegemann和Bock 2009), 这表明嫁接可以通过大片段基因甚至是整个质体基因组来进行基因交流, 但这种交流只发生在嫁接结合面的部分细胞。随后其对叶绿体在嫁接区域的流动进行了研究, 在非亲和嫁

接的物种间出现了完整的叶绿体细胞器的流动,而这种置换后的基因组并没有出现基因重组,据推测叶绿体转移可能是通过嫁接面中出现的胞间连丝,或依赖嫁接面上含有的可以去除接穗砧木之间障碍的降解酶,通过细胞质之间的交流完成的(Stegemann等2012),此研究不仅对植物中细胞器捕获研究提供一种可能的机制,而且也推动了对嫁接分子机制的深入研究,同时,嫁接间的交流也扩展到了表观遗传层面。

综上所述,随着测序技术和生物信息学的发展,对嫁接的相关分子机制的研究也上升到了大数据时代,对嫁接愈合过程中的各个时期进行了基因芯片、mRNA测序及miRNA测序,从基因组水平进行剖析,找到了相关的代谢过程,还通过蛋白组学手段寻找相关差异蛋白,尽管各个研究结果因物种而不尽相同,但这为进一步明确嫁接接口的愈合机制提供了有力的参考。嫁接还可作为独特的研究系统进行物质(植物激素、蛋白和RNAs)转运的研究,这其中不仅寻找到了与嫁接接口愈合相关的关键基因和蛋白,例如IAA、ALF4、SICyp1,而且还发现了一些新的迁移sRNA、miRNA,甚至质体基因组,例如叶绿体等。与此同时,还在基因组及表观遗传学上进行深入研究,例如RdDM (RNA-directed DNA methylation)位点的发现,这为异源信号间的交流模式提供了参考。

6 展望

近年来,对嫁接接口愈合的研究不仅仅局限于细胞形态学、解剖学及生理生化机制的研究,而是扩展到了基因组学、转录组学及蛋白组学,明晰了愈合过程中各个时期的组织形态变化,并从中找出涉及的代谢过程,提出了可能的维管束组织重连模型,但具体的分子机制尚不明确,特别是异源嫁接中的信号交流。鉴于此,今后的研究还需从以下4各方面入手:(1)收集多种砧木和接穗资源,为探究亲和性不同嫁接组合分子机制奠定基础。(2)取样部位应该更加精细化,以往研究的取材部位较为宽泛,或是整株的嫁接体,或是砧木和接穗各自不同的器官,这对明确接口愈合机制是不利的。(3)利用异源嫁接材料探究嫁接接口愈合、寻找异源材料间信号传导途径及相关的代谢通路中的关键基因是未来的研究方向。(4)结

合现代生物生化技术探究愈合过程中的信号传导的互作模式,包括生理代谢互作、植物激素信号互作,这是全面明确接口愈合的重要方面。以上问题若能得到解决,不仅有助于深入认识异源嫁接中的信号交流模式,揭示接口愈合分子机制,而且也利用嫁接研究系统进行物质运输和信号转导的研究提供有价值的信息。此外,从明确的嫁接愈合机制中寻找到的关键的信息和基因,可以用于指导生产实践中的嫁接技术。

参考文献

- Aloni B, Cohen R, Karni L, Aktas H, Edelstein M (2013). Hormonal signaling in rootstock-scion interactions. *Sci Hortic*, 127 (2): 119–126
- Asahina M, Gocho Y, Kamada H, Satoh S (2006). Involvement of inorganic elements in tissue reunion in the hypocotyl cortex of *Cucumis sativus*. *J Plant Res*, 119 (119): 337–342
- 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 (1): 201–210
- Asahina M, Satoh S (2015). Molecular and physiological mechanisms regulating tissue reunion in incised plant tissues. *J Plant Res*, 128 (3): 381–388
- Bahar E, Korkutal I, Carbonneau A, Akcay G (2010). Using magnetic resonance imaging technique (MRI) to investigate graft connection and its relation to reddening discoloration in grape leaves. *J Food Agric Environ*, 8 (3): 293–297
- Bhogale S, Mahajan AS, Natarajan B, Rajabhoj M, Thulasiram HV, Banerjee AK (2013). *MicroRNA156*: a potential graft-transmissible microRNA that modulates plant architecture and tuberization in *Solanum tuberosum* ssp. andigena. *Plant Physiol*, 164 (2): 1011–1027
- Bletsos F, Thanassouloupoulos C, Roupakias D (2003). Effect of grafting on growth, yield, and verticillium wilt of eggplant. *Hortscience*, 38 (2): 183–186
- Buhtz A, Springer F, Chappell L, Baulcombe DC, Kehr J (2008). Identification and characterization of small RNAs from the phloem of *Brassica napus*. *Plant J*, 53 (5): 739–749
- Che P, Lall S, Nettleton D, Howell SH (2006). Gene expression programs during shoot, root, and callus development in *Arabidopsis* tissue culture. *Plant Physiol*, 141 (2): 620–637
- Chen Z, Zhao J, Qin Y, Hu G (2016). Study on the graft compatibility between ‘Jingganghongnuo’ and other litchi cultivars. *Sci Hortic*, 199: 56–62
- Cholid M, Hariyadi, Susanto S, Djumali, Purwoko BS (2014). Effects of grafting time and grafting methods used on scion and rootstock compatibility of physic nut (*Jatropha curcas* L.). *Asian J Agr Res*, 8 (3): 150–163
- Colla G, Roupahel Y, Cardarelli M, Rea E (2006). Effect of salinity on

- yield, fruit quality, leaf gas exchange, and mineral composition of grafted watermelon plants. *Hortscience*, 41 (3): 622–627
- Cookson SJ, Moreno MJC, Hevin C, Mendome LZN, Delrot S, Magnin N, Trossatmagnin C, Ollat N (2014). Heterografting with nonself rootstocks induces genes involved in stress responses at the graft interface when compared with autografted controls. *J Exp Bot*, 65 (9): 2473–2481
- Cookson SJ, Moreno MJC, Hevin C, Mendome LZN, Delrot S, Trossatmagnin C, Ollat N (2013). Graft union formation in grapevine induces transcriptional changes related to cell wall modification, wounding, hormone signalling, and secondary metabolism. *J Exp Bot*, 64 (10): 2997–3008
- Davis AR, Perkins-Veazie P, Sakata Y, López-Galarza S, Maroto JV, Lee S-G, Huh Y-C, Sun Z, Miguel A, King SR (2008). Cucurbit grafting. *Crit Rev Plant Sci*, 27 (1): 50–74
- Ermel FF, Poëssel JL, Fau Robert M, Cateson AM (1997). Early scion/stock junction in compatible and incompatible pear/pear and pear/quince grafts: a histo-cytological study. *Ann Bot*, 79 (5): 505–515
- Errea P, Treutter D, Feucht W (1994). Characterization of flavanol type-polyphenols in apricot cultivar and rootstocks. *Adv Hortic Sci*, 8 (3): 165–169
- Estradaluna AA, Lopezperalta C, Cardenassoriano E (2002). *In vitro* micrografting and the histology of graft union formation of selected species of prickly pear cactus (*Opuntia* spp.). *Sci Hortic*, 92 (3-4): 317–327
- Fernandez-Garcia N, Martinez V, Carvajal M (2004). Effect of salinity on growth, mineral composition, and water relations of grafted tomato plants. *J Plant Nutr*, 167 (5): 616–622
- Fernandez-Garcia N, Martínez V, Cerdá A, Carvajal M (2002). Water and nutrient uptake of grafted tomato plants grown under saline conditions. *J Plant Physiol*, 159 (159): 899–905
- Feucht W, Treutter D (1995). Catechin effects on growth related processes in cultivated calli of *Prunus avium*. *Gartenbauwissenschaft*, 60 (1): 7–11
- Feucht W, Treutter D, Schmid P (1988). Inhibition of growth and xylogenesis and promotion of vacuolation in *Prunus* callus by the flavanone prunin. *Plant Cell Rep*, 7 (3): 189–192
- Flaishman MA, Loginovsky K, Golobowich S, Levyadun S (2008). *Arabidopsis thaliana* as a model system for graft union development in homografts and heterografts. *J Plant Growth Regul*, 27 (3): 231–239
- Frankel R (1956). Graft-induced transmission to progeny of cytoplasmic male sterility in *petunia*. *Science*, 124 (3224): 684–685
- Gökbayrak Z, Söylemezoglu G, Akkurt M, Celik H (2007). Determination of grafting compatibility of grapevine with electrophoretic methods. *Sci Hortic*, 113 (4): 343–352
- Goldschmidt EE (2014). Plant grafting: new mechanisms, evolutionary implications. *Front Plant Sci*, 5 (5): 727
- Gur A, Samish RM, Lifshitz E (1968). The role of the cyanogenic glucoside of the quince in the incompatibility between pear cultivars and quince rootstocks. *Hortic Res*, 8: 113–134
- Hartmann HT, Kester DE, Davies FT, Geneve RL (1997). *Plant Propagation. Principles and Practices*, 6th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 757
- Hudina M, Orazem P, Jakopic J, Stampar F (2014). The phenolic content and its involvement in the graft incompatibility process of various pear rootstocks (*Pyrus communis* L.). *J Plant Physiol*, 171 (5): 76–84
- Indig FE, Aloni R (1989). An experimental method for studying the differentiation of vessel endings. *Ann Bot*, 64 (5): 589–592
- Irisarri P, Binczycki P, Errea P, Martens HJ, Pina A (2015). Oxidative stress associated with rootstock-scion interactions in pear/quince combinations during early stages of graft development. *J Plant Physiol*, 176: 25–35
- Janick J, Topoleski LD (1963). Inheritance of fruit colour in eggplant (*Solanum melongena*). *Proc Amer Soc Hort Sci*, 83: 547–558
- Kang ML, Lim CS, Muneer S, Jeong BR (2016). Functional vascular connections and light quality effects on tomato grafted unions. *Sci Hortic*, 201: 306–317
- Kim M, Sinha N (2001). Developmental changes due to long-distance movement of a homeobox fusion transcript in tomato. *Science*, 293 (5528): 287–289
- Koepke T, Dhingra A (2013). Rootstock scion somatogenetic interactions in perennial composite plants. *Plant Cell Rep*, 32 (9): 1321–1337
- Kollmann R, Glockmann C (1985). Studies on graft unions. I. Plasmodesmata between cells of plants belonging to different unrelated taxa. *Protoplasma*, 124 (3): 224–235
- Kollmann R, Glockmann C (1991). Studies on graft unions. *Protoplasma*, 165 (1-3): 71–85
- Kostoff D (1930). Ontogeny, genetics, and cytology of *Nicotiana* hybrids. *Genetica*, 12 (1): 33–139
- López-Gómez E, Juan MAS, Diaz-Vivancos P, Beneyto JM, García-Legaz MF, Hernández JA (2007). Effect of rootstocks grafting and boron on the antioxidant systems and salinity tolerance of loquat plants (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *Environ Exp Bot*, 160 (2): 151–158
- Leszczyński R, Byczkowski B, Jurga S, Korszun S (2000). NMR microimaging studies of the union between stock and scion. *Appl Magn Reson*, 18 (1): 147–153
- Lewsey MG, Hardcastle TJ, Melnyk CW, Molnar A, Valli A, Urich MA, Nery JR, Baulcombe DC, Ecker JR (2016). Mobile small RNAs regulate genome-wide DNA methylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113 (6): e801–e810
- Li HL, Zhang H, Yu C, Ma L, Wang Y, Zhang XZ, Han ZH (2012). Possible roles of auxin and zeatin for initiating the dwarfing effect of M9 used as apple rootstock or interstock. *Acta Physiol Plant*, 34 (1): 235–244
- Li T, Yu XC (2007). Effect of Cu^{2+} , Zn^{2+} and Mn^{2+} on SOD activity of cucumber leaves extraction after low temperature stress. *Acta Hortic Sin*, 34 (4): 895–900 (in Chinese with English abstract) [李涛, 于贤昌 (2007). Cu^{2+} , Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 对冷胁迫下嫁接黄瓜幼苗叶片提取液SOD活性的影响. *园艺学报*, 34 (4): 895–900]
- Lu S, Song Y (1999). Relation between phytohormone level and vascular bridge differentiation in graft union of explanted internode autografting. *Chin Sci Bull*, 44 (20): 1874–1878
- Lu SF, Tang DT, Song JY, Liu MQ, Yang S (1996). Preliminary stud-

- ies on controlling graft union through plant hormones. *Acta Bot Sin*, 38: 307–311 (in Chinese with English abstract) [卢善发, 唐定台, 宋经文, 刘美琴, 杨世杰(1996). 利用植物激素调控嫁接形成的初步研究. *植物学报*, (4): 307–311]
- Mallory AC, Mlotshwa S, Bowman LH, Vance VB (2003). The capacity of transgenic tobacco to send a systemic RNA silencing signal depends on the nature of the inducing transgene locus. *Plant J*, 35 (1): 82–92
- Martínez-Ballesta MC, Alcaraz-López C, Muries B, Mota-Cadenas C, Carvajal M (2010). Physiological aspects of rootstock-scion interactions. *Sci Hortic*, 127 (2): 112–118
- Melnik C, Schuster C, Leyser O, Meyerowitz E (2015). A developmental framework for graft formation and vascular reconnection in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol*, 25 (10): 1306–1318
- Milien M, Renault-Spilmont AS, Cookson SJ, Sarrazin A, Verdeil JL (2012). Visualization of the 3D structure of the graft union of grapevine using X-ray tomography. *Sci Hortic*, 144 (3): 130–140
- Molnar A, Melnik CW, Bassett A, Hardcastle TJ, Dunn R, Baulcombe DC (2010). Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science*, 328 (5980): 872–875
- Moore R (1982). Graft Formation in *Kalanchoe blossfeldiana*. *J Exp Bot*, 33 (3): 533–540
- Moore R (1983). Studies of vegetative compatibility-incompatibility in higher plants. IV. The development of tensile strength in a compatible and an incompatible graft. *Protoplasma*, 115 (2-3): 114–121
- Moore R, Dan BW (1981). Studies of vegetative compatibility-incompatibility in higher plants. I. A structural study of a compatible autograft in sedum telephoides (Crassulaceae). *Am J Bot*, 68 (6): 831–842
- Muneer S, Ko CH, Soundararajan P, Manivnnan A, Park YG, Jeong BR (2015). Proteomic study related to vascular connections in watermelon scions grafted onto bottle-gourd rootstock under different light intensities. *PLoS One*, 10 (3): e0120899
- Musacchi S, Pagliuca G, Kindt M, Piretti MV, Sansavini S (2000). Flavonoids as markers for pear-quince graft incompatibility. *J Appl Bot*, 74 (5): 206–211
- Notaguchi M (2016). Interfamilial grafting using a plant genus *Nicotiana*. <https://pag.confex.com/pag/xxiv/webprogram/Paper18970.html>
- Notaguchi M, Higashiyama T, Suzuki T (2014). Identification of mRNAs that move over long distances using an RNA-Seq analysis of *Arabidopsis/Nicotiana benthamiana* heterografts. *Plant Cell Physiol*, 56 (2): 311–321
- Ohta Y (1991). Graft-transformation, the mechanism for graft-induced genetic changes in higher plants. *Euphytica*, 55 (1): 91–99
- Olmstead MA, Lang NS, Lang GA (2010). Carbohydrate profiles in the graft union of young sweet cherry trees grown on dwarfing and vigorous rootstocks. *Sci Hortic*, 124 (1): 78–82
- Palauqui JC, Elmayan T, Pollien JM, Vaucheret H (1997). Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *Embo J*, 16 (15): 4738–4745
- Pilar E, Lilibeth G, Antonio MJ (2001). Early detection of graft incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca*) using *in vitro* techniques. *Physiol Plant*, 112 (1): 135–141
- Pina A (2009). Cell-to-cell transport through plasmodesmata in tree callus cultures. *Tree Physiol*, 29 (6): 809–818
- Pina A, Errea P (2005). A review of new advances in mechanism of graft compatibility-incompatibility. *Sci Hortic*, 106 (1): 1–11
- Pina A, Errea P (2007). Differential induction of phenylalanine ammonia-lyase gene expression in response to *in vitro* callus unions of *Prunus* spp. *J Plant Physiol*, 165(7): 705–714
- Pina A, Errea P, Martens HJ (2012). Graft union formation and cell-to-cell communication via plasmodesmata in compatible and incompatible stem unions of *Prunus* spp. *Sci Hortic*, 143 (1): 144–150
- Schöning U, Kollmann R (1997). Phloem translocation in regenerating *in vitro*-heterografts of different compatibility. *J Exp Bot*, 48 (2): 289–295
- Spiegelman Z, Golan G, Wolf S (2013). Don't kill the messenger: long-distance trafficking of mRNA molecules. *Plant Sci*, 213: 1–8
- Spiegelman Z, Ham BK, Zhang Z, Toal TW, Brady SM, Zheng Y, Fei Z, Lucas WJ, Wolf S (2015). A tomato phloem-mobile protein regulates the shoot-to-root ratio by mediating the auxin response in distant organs. *Plant J*, 83 (5): 853–863
- Stegemann S, Bock R (2009). Exchange of genetic material between cells in plant tissue grafts. *Science*, 324 (5927): 649–651
- Stegemann S, Keuthe M, Greiner S, Bock R (2012). Horizontal transfer of chloroplast genomes between plant species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109 (7): 2434–2438
- Stoddard FL, McCully ME (1979). Histology of the development of the graft union in pea roots. *Can J Bot*, 57 (2): 1486–1501
- Stubbe H (1954). Über die vegetative hybridisierung von pflanzen. Versuche an tomatenmutanten. *Genet Resour Crop Evolu*, 2 (1): 185–236
- Tiedemann R (1989). Graft union development and symplastic phloem contact in the heterograft *Cucumis sativus* on *Cucurbita ficifolia*. *J Plant Physiol*, 134 (4): 427–440
- Torii T, Kasiwazaki M, Okamoto T, Kitani O (1992). Evaluation of graft-take using a thermal camera. *Acta Hortic*, (319): 631–634
- Trinchera A, Pandozy G, Rinaldi S, Crinò P, Temperini O, Rea E (2013). Graft union formation in artichoke grafting onto wild and cultivated cardoon: an anatomical study. *J Plant Physiol*, 170 (18): 1569–1578
- Turquois N, Malone M (1996). Non-destructive assessment of developing hydraulic connections in the graft union of tomato. *J Exp Bot*, 47 (5): 701–707
- Tzafati R, Ben-Dor S, Sela I, Goldschmidt EE (2013). Graft-induced changes in microRNA expression patterns in *Citrus* leaf petioles. *Open Plant Sci J*, 7 (1): 17–23
- Usenik V, Krška B, Vičan M, Štampar F (2006). Early detection of graft incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca* L.) using phenol analyses. *Sci Hortic*, 109 (4): 332–338
- Venema JH, Dijk BE, Bax JM, Hasselt PRV, Elzenga JTM (2008). Grafting tomato (*Solanum lycopersicum*) onto the rootstock of

- a high-altitude accession of *Solanum habrochaites* improves suboptimal-temperature tolerance. *Environ Exp Bot*, 63 (1–3): 359–367
- Vitale A, Rocco M, Arena S, Giuffrida F, Cassaniti C, Scaloni A, Lomaglio T, Guarnaccia V, Polizzi G, Marra M (2014). Tomato susceptibility to *Fusarium* crown and root rot: Effect of grafting combination and proteomic analysis of tolerance expression in the rootstock. *Plant Physiol Bioch*, 83 (10): 207–216
- 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 (2): 765–770
- Weatherhead I (1986). Causes of graft failure in Sitka spruce, *Picea sitchensis* (Bong.) Carr. *Acta Oto-Laryngol*, 130 (12): 1329–1334
- Weatherhead I, Barnett JR (1986). Development and structure of unusual xylem elements during graft union formation in *Picea sitchensis* L. *Ann Bot*, 57 (4): 593–598
- Wu R, Wang X, Lin Y, Ma Y, Liu G, Yu X, Zhong S, Liu B (2013). Inter-species grafting caused extensive and heritable alterations of DNA methylation in Solanaceae plants. *PLoS One*, 8 (4): e61995–e61995
- Xiao GS, Yang SJ (1995). Appearance of specific proteins during development of cucumis sativus homograft. *J Agr Biol*, (2): 32–37 (in Chinese with English abstract) [肖桂山, 杨世杰(1995). 黄瓜同种异体嫁接组合形成过程中特异蛋白质的产生. *农业生物技术学报*, (2): 32–37]
- Xu Q, Guo SR, Li H, Du NS, Shu S, Sun J (2015). Physiological aspects of compatibility and incompatibility in grafted cucumber seedlings. *J Am Soc Hortic Sci*, 140 (4): 299–307
- Yang Y, Mao L, Jittayasothorn Y, Kang Y, Jiao C, Fei Z, Zhong GY (2015). Messenger RNA exchange between scions and rootstocks in grafted grapevines. *BMC Plant Biol*, 15 (1): 1–14
- Yeoman MM, Kilpatrick DC, Miedzybrodzka MB, Gould AR (1978). Cellular interactions during graft formation in plants, a recognition phenomenon? *Symp Soc Exp Biol*, 32: 139–160
- Yin H, Bo Y, Jing S, Jia P, Zhang Z, Yan X, Chai J, Ren Z, Zheng G, 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 (11): 4219–4232
- Zhang LS, Xu SR, Zhang YW, Hu JJ, Liu FT, Li XW, Han MY, Ma FW (2013). Hydraulics characteristic of Fuji apple grafted on different dwarf interstocks under drought stress. *Acta Hort*, 40 (11): 2137–2143 (in Chinese with English abstract) [张林森, 胥生荣, 张永旺, 胡景江, 刘富庭, 李雪薇, 韩明玉, 马锋旺 (2013). 干旱胁迫下不同中间砧嫁接苹果苗的导水特性. *园艺学报*, 40 (11): 2137–2143]
- Zhang SQ, Yang SJ, Ma LB (1990). The changes of two enzymes activities during the developmental process of graft unions. *J China Agric Univ*, 5 (2): 149–152 (in Chinese with English abstract) [张蜀秋, 杨世杰, 马龙彪(1990). 嫁接组合形成过程中两种酶活性的动态变化. *中国农业大学学报*, 5 (2): 149–152]
- Zhao YY, Dong CJ, Zhao JZ, Shang QM (2015). Effects of different temperature at night on healing of tube grafted eggplant plug seedlings. *China Veget*, 1 (10): 31–36 (in Chinese with English abstract) [赵渊渊, 董春娟, 赵建忠, 尚庆茂(2015). 不同夜温对茄子套管嫁接苗愈合的影响. *中国蔬菜*, 1 (10): 31–36]
- Zheng BS, Chu HL, Jin SH, Huang YJ, Wang ZJ, Chen M, Huang JQ (2010). cDNA-AFLP analysis of gene expression in hickory (*Carya cathayensis*) during graft process. *Tree Physiol*, 30 (2): 297–303
- Zhou Y, Zhou HY, Zhu L, Huang LH (2013). The latest research on plant in vitro micrografting. *Guizhou Sci*, 31 (2): 84–88 (in Chinese with English abstract) [周艳, 周洪英, 朱立, 黄丽华(2013). 植物微嫁接研究进展. *贵州科学*, 31 (2): 84–88]

Research advances on mechanism of interface healing of plant grafting

MIAO Li, LI Yan-Su, FAN Xing-Qiang, HE Chao-Xing, YU Xian-Chang*

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

Abstract: Grafting efficiency depends on rate of graft union healing. Wounding response, physiological and biological process, cell and organ differentiation, signal communication between scion and rootstock, connection in vascular system are involved in this complicated healing process. If elucidate molecular mechanism of vascular connection clearly, it would be an important theoretical value, and produce a technological guide in grafted seedling production. In this paper, the research advances on anatomic structure, healing process, physiology and biology characteristic and relative molecular mechanism were presented, and looking forward to the research direction of graft union healing, in order to provide references for further in-depth studies of grafting mechanism and associated application.

Key words: grafting; healing process; healing mechanism

Received 2016-10-14 Accepted 2016-12-23

This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31101583, 31272212), Special Fund for China Modern Agriculture Technology Construction System (CARS-25-C-01), the Science and Technology Innovation Program of the Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS-ASTIP-IVFCAAS) and Ministry of Agriculture Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops.

*Corresponding author (E-mail: xcyu1962@163.com).