

植物嫁接再生机理研究进展

陈晶晶, 李栋梁, 杨倩, 戴小红, 井敏敏, 刘恒*

中国热带农业科学院亚热带作物研究所, 农业农村部热带果树生物学重点实验室, 国家热带果树种质资源圃, 广东湛江524091

摘要: 嫁接(grafting)是一项基于植物再生能力开发的古老的农业技术, 在农业生产中已成为一种重要和有效的植物选育种技术, 然而对于嫁接结合处组织再生的了解才刚刚开始。嫁接再生过程包括伤口愈合、组织融合和维管再连接。近年来以模式植物拟南芥为材料对砧木和接穗愈合再生机理的研究取得了一定进展。本文对嫁接再生过程中再生信号的感知与启动、愈合处细胞的再生、维管束的再生与重新连接、以生长素为代表的植物激素以及糖在植物嫁接再生中的作用、嫁接的特异性等研究进展进行了分析和总结, 以期对嫁接中再生机理的了解提供参考。

关键词: 嫁接; 愈合; 再生; 维管束; 生长素

植物嫁接是指在自然或者人为条件下, 同种(intraspecific)或者异种(heterospecific)植物细胞、组织或器官之间相互作用和影响, 启动植物再生程序, 发育成为完整有机体的生理过程。在农业生产上, 嫁接不但是一种重要的作物种质资源保存和无性繁殖技术, 产生了巨大的经济效益, 同时, 由于可以对砧木和接穗的优良性状进行选择 and 配置, 嫁接已经成为一种重要和有效的植物选育种技术。例如, 在蔬菜生产上嫁接有利于改良品种的农艺性状、提高作物产量、减少病虫害发生以及降低种植成本等(Kyriacou等2017)。在果树生产中, 选择合适的砧木嫁接可以提早果树开花结实时间、增加果实产量, 同时能够有效影响果实的品质、增强抗逆能力、提高营养物质的吸收、转运和利用效率(Prassinis等2009; Nawaz等2016)。在植物信号分子的非细胞自主行为、遗传物质的信息交流及分子的长距离运输, 包括RNA、蛋白质和激素(Wang等2017)等遗传调控的研究中, 嫁接已经成为一种有效的研究手段。包括成花基因*FT* (*flowering locus T*)在内的长距离信号的发现, 都是基于嫁接技术在模式植物中的应用(Covington和Harmer 2007)。拟南芥的子叶(Yoo等2013)、花序茎(Nisar等2012)、芽顶端分生组织(Huang和Yu 2015)、发育的叶片、幼枝/幼根(Turnbull等2002)、成熟枝/成熟根(Rhee和Somerville 1995)等许多组织都适合于嫁接(Melnyk 2017b), 因而在模式植物拟南芥上发展了一系列有效的嫁接技术, 比如拟

南芥花序嫁接(Nisar等2012)、下胚轴套管嫁接(Turnbull等2002; Notaguchi等2009)、无套管斜面嫁接(Yin等2012)、切除子叶嫁接(Marsch-Martínez等2013)以及成熟苗嫁接(Huang等2015)等。

模式植物中嫁接技术的发展使得利用模式植物研究植物嫁接的再生发育生物学机制成为可能。本文将重点综述近年来植物嫁接再生领域的一系列进展, 包括砧木和接穗伤口愈合再生过程中信号的感知启动, 嫁接结合处细胞粘连、附着、分裂、胞间连丝的形成, 维管束的重连和再生, 以及植物激素和糖在嫁接再生中的作用等。

1 接穗和砧木愈合过程中的再生机制

嫁接的核心是接穗和砧木的愈合, 愈合过程中再生程序的启动是嫁接分子调控的关键环节。植物嫁接愈合过程主要包括伤口愈合、组织融合和维管再连接, 具体可以分为损伤诱导程序的启动、细胞破裂带来的细胞碎片的清除、砧木和接穗完整细胞接触、嫁接结合处细胞与细胞间交流网络建立等(Yin等2012; Wang等2017; Melnyk 2017a)。植物具备有效的再生机制来愈合伤口和切口。嫁接最初会引发切割处细胞分泌果胶, 使

收稿 2019-11-27 修定 2020-04-24

资助 中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金(163006-2020001和1630062020016)和农业农村部物种资源保护费项目(125163006000160004)。

* 通讯作者(hengliu@vip.163.com)。

砧木和接穗粘在一起, 部分植物通过产生伤口诱导的被称为愈伤组织的多能细胞, 填补伤口缝隙或封住伤口, 砧木和接穗嫁接组织形成胞间连丝进行连接; 随后韧皮部周围的形成层、皮层、髓细胞和木质部与愈伤组织一起分裂、分化为维管组织, 连接两个嫁接接口(Moore 1983; Moore和Walker 1981; Melnyk等2015), 嫁接结合处韧皮部通常先于木质部连接(Melnyk等2015)。不同植物种类嫁接成功所需要的时间不同。一般果树比蔬菜嫁接愈合所需时间长, 特别是木本科果树, 这可能与园艺植物的细胞结构和生理结构有一定的关系(张晋元等2013)。嫁接的拟南芥下胚轴1~2 d时组织黏连, 3 d后韧皮部连接, 7 d后木质部连接(Melnyk等2018)。在黄瓜嫁接体中, 1~2 d时隔离层、愈伤组织形成, 5~6 d时愈伤组织生长发育, 7~8 d时形成层恢复、输导组织连接, 12 d后愈合部位形成新的维管束(胡艳青等2007)。在嫁接的山核

桃中发现, 9 d后在形成层产生愈伤组织, 随后皮层和韧皮部处也产生愈伤组织, 14 d后愈伤组织对接, 24 d后维管束桥形成, 嫁接体完全愈合(黄坚钦等2001)。在嫁接再生机制的研究中, 细胞识别标记的应用为研究植物组织再生提供了便利。本文整理了涉及植物再生过程, 包括创伤、维管形成及激素响应等相关的分子标记(表1), 细胞识别标记的运用将有助于了解嫁接结合处细胞身份的变化, 从而更好地解析嫁接过程。

1.1 嫁接再生程序的启动

Melnyk等(2018)监测了拟南芥下胚轴嫁接中砧木和接穗全基因组基因表达的变化, 观察到嫁接接口上方和下方的组织迅速形成一种不对称, 使得许多基因在一侧比另一侧表达得更高, 48 h之前尤为明显, 这表明维管束被切割后嫁接切口处的不对称反应可能是嫁接中再生信号启动的开始。Melnyk (2017a)认为这种不对称性是因为接穗和砧

表1 拟南芥嫁接再生过程中涉及的标记基因
Table 1 Marker genes involved in the grafting regeneration of *Arabidopsis thaliana*

基因类别	基因名称	参考文献
原维管束标记基因	<i>TMO</i> 、 <i>PLL1</i>	Gardine等2010; Melnyk等2018
原形成层标记基因	<i>ATHB8</i>	Donner等2009
形成层标记基因	<i>PXY</i> 、 <i>WOX4</i> 、 <i>ANT</i>	Rybel等2016; Melnyk等2018; Schrader等2004
形成层/木质部标记基因	<i>EXP49</i>	Gray-Mitsumune等2004
韧皮部标记基因	<i>NAC020</i> (早期)、 <i>NAC086</i> (中期)、 <i>NEN4</i> (晚期)	Furuta等2014; Kondo等2016; Melnyk等2018
韧皮部伴胞细胞标记基因	<i>AHA3</i>	Dewitt和Sussman 1995
韧皮部筛管元素标记基因	<i>RTM1</i> 、 <i>APL</i>	Chisholm等2001; Bonke等2003
木质部标记基因	<i>VND7</i> 、 <i>IRX3</i> 、 <i>BFN1</i> 、 <i>CESA4</i>	Kondo等2016; Melnyk等2018
初生根干细胞标记基因	<i>WOX5</i>	Sarkar等2007
侧根标记基因	<i>LBD18</i>	Lee等2009, 2012
细胞分裂标记基因	<i>Cyclin B1;1</i> (G2/M期)、 <i>CDKB2;1</i> 、 <i>Histone H4</i> (S期)	Colón-Carmona等1999; Asahina等2011; Melnyk等2018
生长素响应标记基因	<i>DR5</i>	Ulmasov等1997
糖诱导标记基因	<i>ApL3</i> 、 <i>SUC2</i>	Villadsen和Smith 2004
糖抑制标记基因	<i>GDH1</i> 、 <i>DIN6</i> 、 <i>STP1</i>	Cordoba等2015; Melnyk等2018
嫁接特异表达标记基因	<i>HCA2</i> (对称表达)、 <i>ERF6</i> (砧木特异表达)、 <i>RTM2</i> (砧木和接穗差异表达)、 <i>ANAC071</i> (切割部位上方特异表达)、 <i>RAP2.6L</i> (切割部位下方特异表达)	Guo等2009; Asahina等2011; Melnyk等2018
损伤诱导基因	<i>WIND1</i>	Iwase等2011
凯氏带形成标记基因	<i>CASP1</i>	Roppolo等2011; Melnyk等2015
内胚层标记基因	<i>SCR</i> 、 <i>WER</i>	Wysocka-Diller等2000; Lee和Schiefelbein 1999
茎分生组织干细胞标记基因	<i>WUS</i>	Mayer等1998
中柱标记基因	<i>WOL</i> 、 <i>SHR</i>	Efron等2016; Helariutta等2000
胞间连丝定位蛋白基因	<i>PDLP1a</i>	Thomas等2008

木运输动力学发生改变导致的。从物质运输方面分析,维管束中韧皮部主要运输激素、糖、核酸和蛋白质,而木质部主要运输水和溶于水的无机盐。其中生长素、糖等物质从生长的叶片运输到根部(Stitt 1996; Friml和Palme 2002),切断维管组织可能会导致它们在切割部位以上积累,而切割下方因运输阻断,只能消耗原有物质,造成切割上方和下方生长素和糖的不对称分布。嫁接最初的不对称性不仅体现在物质运输上,在细胞分化、分裂和基因表达上也表现不对称(Melnyk等2015)。Melnyk等(2018)从基因水平证实切割后嫁接接口上方和下方的组织中基因表达迅速形成一种不对称,其中糖反应基因的不对称性表现明显,利用染色法也证实了嫁接初期淀粉在嫁接接口处积累,而当维管组织重新连接时,糖积累的不对称性减少。除了糖,生长素在切口处的不对称积累可能诱导切口上方和下方特异基因的表达,Asahina等(2011)发现在剪下的拟南芥花序茎上,切口以上生长素的积累激活*ANAC071* (*NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 71*)表达,而切口以下生长素耗竭激活*RAP2.6L* (*Related to AP2.6L*),抑制*RAP2.6L*或*ANAC071*两者的功能可以抑制伤口愈合,随着切割的愈合,生长素不对称反应降低。以上研究表明,生长素和糖等物质在嫁接切口上方和下方的积累与消耗激活一系列基因表达,从而启动嫁接。

除了嫁接接口处的不对称响应,细胞损伤的感知可能是启动嫁接愈合的另一种机制(Melnyk 2017a)。细胞损伤会改变周围细胞的机械性能(Schopfer 2006),Hamant等(2008)证明在损伤的茎尖分生组织,伤口周围细胞发生消融,微管在附近的分生组织表皮细胞重新定向,以提供机械支持。细胞损伤还会激活激素信号,Heisler等(2010)研究发现在细胞消融过程中生长素输出载体PIN1 (PIN-FORMED1)的定位和微管阵列方向在茎尖分生组织中高度相关,且不依赖彼此,PIN1定位可以改变生长素的转运,从而增强激素反应,促进伤口愈合。PIN1定位和微管阵列定向都可能响应一个共享的上游调节器,该调节器在本质上是生物力学性质的。因此机械和激素信号都可能是嫁接接口处启动再生的关键(Melnyk 2017a)。另外,砧木和

接穗对损伤的感知也存在不对称性,损伤诱导基因*WIND1*在嫁接的拟南芥下胚轴维管束和表皮中上调表达,而在砧木中没有表达(Melnyk等2015b)。

1.2 砧木和接穗的附着和粘附

在嫁接再生过程中,重组在一起的砧木和接穗首先要进行组织粘附,然后开始细胞分裂和分化。早期的附着过程似乎是非特异性的,因为切割的茎会附着在惰性物体上(Moore和Walker 1981)。不亲和嫁接最初也表现出与亲和嫁接相似的附着动力学,但几天后附着减弱,而亲和植物继续增强(Moore 1983)。Melnyk等(2018)将拟南芥茎和根分离0~5 d后再进行嫁接,发现分离并没有加速维管束的重新连接,相反,组织附着后第3天才开始韧皮部的连接;在分离2~3 d后,茎失去嫁接能力;而在分离5 d后,根仍有嫁接能力,表明是否附着在砧木和接穗中反应是不一样的,组织附着是激活嫁接形成所必需的。接穗与砧木的附着促进了维管的形成,使得细胞分化、分裂和基因表达的不对称性逐渐消失,而未成功嫁接茎切面上的细胞扩张和细胞分裂是被抑制的(Melnyk等2015)。

Baron等(2019)认为接穗和砧木之间最初的组织凝聚力由细胞壁物质在伤口处的沉积和随后的聚合产生。嫁接切口处会分泌果胶,研究认为果胶会导致对立组织粘附并加强嫁接植物连接(Jeffrey和Yeoman 1983; Asahina等2002; Pina等2012);大部分植物嫁接切口处会产生伤口诱导的愈伤组织,愈伤组织形成并填补粘附组织之间的空隙,以允许对立组织之间的接触(Aloni等2010);另外切口处的细胞也会扩张增殖,填补嫁接接口处以及由于切割和明显的细胞溶解而形成的缝隙(Melnyk等2015),以上几种反应均能使砧木和接穗附着在一起。

1.3 愈伤组织形成

对大多数植物而言,在对立组织间形成愈伤组织对成功嫁接很重要(Aloni等2010; Melnyk 2017a),但并不是所有嫁接过程都产生愈伤组织,例如嫁接的拟南芥下胚轴产生很少的愈伤组织(Yin等2012)。在嫁接接口处形成愈伤组织是不是嫁接成功或维管连接的绝对要求?在李树嫁接组合中,无论亲和组合还是不亲和组合均出现粘连

和愈伤组织增生(Pina等2012), 不同的是不亲和的组合中愈伤组织分化为形成层的时间延迟。*WIND1* (*WOUND INDUCED DEDIFFERENTIATION 1*)是损伤诱导基因, 其促进细胞脱分化、分裂, 有助于形成创伤性愈伤组织(Iwase等2011), 然而抑制*WIND1*表达降低了形成创伤性愈伤组织的能力, 但对拟南芥韧皮部连接没有影响(Melnyk等2015)。以上证据说明嫁接接口处形成愈伤组织可能不是嫁接成功或维管连接的绝对要求, 暗示愈伤组织的重要性可能是特异性的, 其是嫁接成功的原因还是结果尚不清楚(Melnyk 2017a)。植物组织在受伤、被病原菌侵染以及愈伤诱导培养基诱导下均可产生愈伤组织。在愈伤诱导培养基上形成的愈伤组织发育程序类似于侧根发育程序(Sugimoto等2010), 伤口诱导的愈伤组织似乎与根的形成无关(Iwase等2011), 而在嫁接接口处产生愈伤组织的细胞类型尚不清楚, 可能与伤口诱导的愈伤组织最为相似, 但需要进行转录分析才能确定(Melnyk 2017a)。

1.4 细胞的分裂和分化

细胞分裂对愈合很重要, 例如去除黄瓜子叶抑制细胞分裂可以阻止伤口愈合(Asahina等2002)。*WIND1*基因存在可以促进伤口愈合(Melnyk等2015), Iwase等(2011)研究表明细胞分裂素突变体可以阻断*WIND1*过表达的作用, 而细胞分裂素的加入增强了*WIND1*过表达表型, 促进切割和嫁接过程的细胞分裂。在嫁接后2~3 d内的拟南芥下胚轴中, 嫁接接点周围的维管组织开始细胞分裂(Yin等2012; Melnyk等2015)。在拟南芥切割的花序茎中, 细胞周期蛋白基因*Cyclin B1;1*在切割后3 d时明显上调, 损伤区附近的髓细胞和皮层细胞均开始分裂(Asahina等2011)。在嫁接过程中, 细胞分裂在接穗和砧木中表现出不对称性。细胞分裂相关标记基因, 如*Cyclin B1;2*和*Histone H4* (细胞分裂S期标记基因)在接穗中12 h后被激活, 而在砧木中24 h后被激活; 原位杂交显示*Histone H4*在嫁接后前2 d内接穗中的表达高于砧木, 在第3天两者中的表达水平相似(Melnyk等2015)。

在嫁接接口处, 包括形成层和韧皮部在内的维管形成基因较早被激活, 随后是细胞分裂基因被激活, 表明细胞分化的开始早于细胞分裂(Mel-

nyk等2018)。切割损伤会导致切口附近的细胞近端身份逐渐丧失, 随后获得新的细胞身份(Efroni等2016)。拟南芥切割6~12 h后, 内胚层标记基因*SCR* (*SCARECROW*)和中柱细胞标记基因*WOL* (*Wooden Leg*)在切口处表达消失, 而在30 h后又重新开始表达, 48 h后恢复正常表达(Efroni等2016)。在嫁接过程中, 细胞分化在接穗和砧木中也表现出不对称性, 在嫁接结合处上方, 可观察到内胚层细胞的分裂, 且与内皮层凯氏带形成标记基因*CASP1* (*Casparian strip membrane domain protein 1*)的表达时间一致, 而在结合处下方没有观察到内胚层的分裂, *CASP1*的表达比在结合处上方晚1~2 d (Melnyk等2015)。

1.5 胞间连丝形成

在嫁接植物愈合过程中, 植物体相邻细胞间的果胶层沉积在相对组织间变薄并产生大量的次级胞间连丝(Kollmann和Glockmann 1985, 1991)。嫁接部位的微阵列数据显示, 胞间连丝定位蛋白基因*PDLPIa* (*plasmodesmata-located protein 1a*)的表达水平升高, *PDLPIa*蛋白定位于胞间连丝并参与胞间连丝转运(Thomas等2008; Yin等2012)。在排列整齐的维管组织连接处, 发现连续的和连接的胞间连丝, 而在皮层和排列不整齐的组织中, 形成不连续的和间断的胞间连丝(Kollmann等1985)。Pina等(2012)对通过胞间连丝的细胞间通讯进行量化发现, 嫁接2周后, 在嫁接亲和组合的嫁接接口处胞间连丝的连接明显多于不亲和组合, 认为胞间连丝在嫁接植物生长的最初阶段(维管系统重连之前)可能是诊断木本植物未来相容性反应的关键。另外胞间连丝可以在不相关物种的嫁接植物间形成(Kollmann和Glockmann 1985), 以上结果表明胞间连丝可能对促进嫁接愈合具有重要意义(Jeffree和Yeoman 1983)。

1.6 维管束的再生和重新连接

维管束的重新连接是嫁接植物发育的核心事件, 是嫁接成功的标志之一(Melnyk等2015; Melnyk 2017a)。在一些特殊情况下, 远亲种之间的嫁接, 如拟南芥和番茄, 尽管缺乏维管连接, 嫁接到番茄砧木上的拟南芥接穗仍能开花并产生种子(Flaishman等2008), 但由于组织间的营养和激素转

移效率低下, 这些嫁接能否长期稳定还值得怀疑(Melnyk 2017a)。大多数单子叶植物没有维管形成层, 这可能是嫁接失败的原因之一(Melnyk和Meyerowitz 2015)。这进一步表明, 维管束分化是嫁接成功的先决条件(Wang等2017)。维管的连接包括韧皮部的连接和木质部的连接, 针对其重新连接的检测方法, 一种是染料法, 一种是分子标记法。水溶性染料CFDA (carboxyfluorescein diacetate)被用来检测韧皮部和木质部重连, CFDA应用在子叶上可以检测韧皮部连接, 而应用在根部可以检测木质部的连通性(Melnyk 2017b; Melnyk等2015; Botha等2008; Oparka等1994); 另外酸性品红也被用来检测嫁接植物木质部是否连接成功(Yin等2012); Melnyk等(2015)利用染料法和分子标记法验证了拟南芥嫁接后3~4 d形成韧皮部, 5 d左右根系生长, 6~8 d形成木质部。另外对嫁接接口处或伤口处进行切片, 以观察木质部元素的分化及其在伤口部位的连通性, 也是常用的研究维管束重连的方法(Melnyk 2017b)。Melnyk等(2018)研究发现许多形成层、韧皮部和原形成层发育的标记基因在嫁接后6 h内被激活, 原形成层标记基因表达高峰早于形成层标记基因, 而大部分韧皮部标记基因的表达在72 h达到高峰; 嫁接120 h后, 木质部发育标记基因在砧木和接穗中被激活。

研究者对嫁接连接处维管发育的进一步细节的了解还比较少, 但对切断茎中的维管束系统的研究取得了一定进展。在切下的百日菊茎中, 木质部特异标记物*TED3* (*tracheary element differentiation*)和韧皮部特异标记物*ZeHB3* (*Zinnia elegans homeobox gene 3*)的表达在切割48 h内激活, 切割部位上方比下方更强烈, 形成层活性在切割上方也更强, 形成层及周围薄壁细胞分化为韧皮部和木质部前体细胞(Nishitani等2002)。在百日菊茎和豌豆根中, 薄壁细胞向木质部的分化不需要细胞分裂, 而向韧皮部的分化依赖于1~3个细胞的分裂(Schulz 1986; Nishitani等2002)。因此, 在切割的茎中, 多种细胞类型通过分裂和分化参与愈合伤口。

2 植物激素在嫁接再生中的作用

目前研究认为植物激素在植物伤口愈合和维

管束形成中起着重要作用, 因为嫁接过程包含伤口愈合和维管束形成, 因此激素在嫁接中也起着重要作用, 事实证明植物激素特别是生长素(auxin)在嫁接中起着非常重要的作用(Melnyk 2017a)。除了独脚金内酯(strigolactones, SL)和油菜素内酯(brassinosteroids, BR)在伤口愈合中的作用尚未可知, 其他植物激素如生长素、细胞分裂素(cytokinins, CK)、乙烯(ethylene, Eth)、茉莉酸(jasmonic acid, JA)、赤霉素(gibberellin, GA)和脱落酸(abscisic acid, ABA)均被证明在伤口愈合中起着一定的作用(Nanda和Melnyk 2018)。除水杨酸(salicylic acid, SA)外几乎所有已知的植物激素都参与调控植物生长过程中维管组织的发育和分化, 其中生长素似乎是维管细胞分化的主要调控因子, 而其他激素的作用模式通常是与生长素相互作用, 微调生长素生物合成、运输和/或信号通路等过程(Nanda和Melnyk 2018)。虽然各个激素在伤口愈合和维管束形成过程中起着一定作用, 但目前研究证实生长素在嫁接中起着最为重要的作用, 部分其他激素在嫁接中的作用似乎没那么重要, 还有部分激素的作用尚未阐明。

2.1 生长素在伤口愈合和维管束形成中的作用

生长素在决定再生组织和器官的细胞命运方面起着关键作用(Ikeuchi等2019), 其不仅参与了创伤反应, 在维管形成中也起着重要作用。对未分化的组织施加外源生长素时, 会促进维管束的形成(Aloni 1980), 在特定组织和细胞生长素水平调节控制维管细胞的命运(Aloni 1980; Romano等1991)。切割拟南芥茎上部 and 下部, 由于生长素转运受阻, 导致生长素不对称积累, 这种不对称在组织重组过程中起着重要的信号传递作用, 生长素浓度水平的改变可以激活或抑制分别在切割部位的上部和下部表达的、促进髓细胞分裂的*ANAC071*和*RAP2.L*基因(Asahina等2011)。抑制生长素响应因子ARF6 (AUXIN RESPONSE FACTOR 6)和ARF8 (AUXIN RESPONSE FACTOR 8)的活性会抑制细胞分裂和切口的愈合(Pitaksaringkar等2014), 其机理是ARF6和ARF8促进切口上方*ANAC071*的表达, 而抑制*RAP2.6L*的表达, 其中*ANAC071*直接调控可以促进髓细胞增殖的*XTH19* (*Xyloglucan*

Endotransglucosylases/Hydrolase 19)和*XTH20* (Asahina等2011; Pitaksaringkarn等2014)。生长素的输送和积累被认为是维管分化的早期事件之一 (Donner等2009; Wenzel等2007)。Mazur等(2016)利用生长素响应标记*DR5*、生长素转运蛋白*PIN1*和维管束识别标记*ATHB8* [*homeodomain-leucine zipper (HD-Zip) III gene*], 研究拟南芥茎受伤后维管再生的过程, 发现生长素在创面及创面周围的反应增强, 导致了最初均质组织中生长素转运标记通道的形成, 而*PIN1*位置的改变实现了组织复极化和新生极性的建立, 最终在伤口周围形成新的维管束。研究认为生长素是通过激活转录因子基因*MP* (*MONOPTEROS*)起作用, *MP*直接激活*ATHB8*的表达 (Wenzel等2007; Donner等2009), 而*AtHB8*是原形成层活动的标记基因; 一旦*AtHB8*表达被激活, 细胞的命运就被固定为维管组织。

2.2 生长素在嫁接再生中的作用

目前研究发现生长素是嫁接中最重要的也是研究最多的激素。在嫁接植物的接合处, 生长素和细胞分裂素的反应增强, 这种反应是维管组织特有的 (Yin等2012; Wang等2014; Melnyk等2015)。生长素应答的升高与韧皮部连接的时间对应, 而细胞分裂素应答的升高与木质部连接的时间对应 (Melnyk等2015)。生长素对维管组织的分化很重要, 而细胞分裂素促进形成层的分裂和增殖 (Matsumoto-Kitano等2008; Leyser 2011)。利用生长素响应基因启动子*DR5*和细胞分裂素响应启动子*ARR5*和*TCSn*, 检测到生长素在嫁接结合处上方和下方的中柱鞘细胞中响应, 细胞分裂素在嫁接结合处上方和下方的中柱鞘细胞和维管形成层中响应; 生长素在砧木上的反应是嫁接特异的, 而细胞分裂素在接穗上的反应也是嫁接特异的 (Melnyk等2015)。

在拟南芥中, 当去除子叶或用生长素转运抑制剂处理子叶时, 下胚轴嫁接重组受到抑制 (Matsuoka等2016)。用生长素或其抑制剂NPA (*N*-1-naphthylphthalamic acid)处理拟南芥生长素特异响应植株*DR5:GUS*嫁接材料时, 嫁接材料的重组被促进或被抑制 (Wang等2014), 表明生长素促进维管系统的发育, 并且其分布对嫁接体发育意义重大。Mel-

nyk等(2015)通过用多种激素(包括生长素、细胞分裂素和乙烯)通路突变体进行嫁接实验, 发现只有4种生长素信号通路产生突变的基因型, 导致韧皮部连接明显延迟, 其中包括*axr1* (*auxin resistant 1*)、*iaa18* (*indole-3-acetic acid inducible 18*)、*alf4* (*aberrant lateral root formation 4*)和*tir1/afb2/afb3* (*transport inhibitor response 1/auxin signaling f-box2/auxin signaling f-box3*)三重突变体。*ALF4*作用于生长素的下游, 调节木质部极周细胞分裂和侧根的形成 (Celenza等1995; DiDonato等2004), 被认为是嫁接形成的重要基因之一; *ALF4*对生长素的感知很重要 (Celenza等1995; DiDonato等2004)。在砧木和接穗中, *ALF4*和*AXR1*的表达是不对称的, 它们只在嫁接点以下的嫁接中起重要作用, 这表明砧木对生长素的反应更强, 从而能够有效地感知茎来源的生长素, 促进重新连接 (Melnyk等2015)。一种观点是, 生长素通过质外体从一个细胞运输到另一个细胞, 嫁接导致生长素运输中断, 当砧木和接穗组织粘连时, 生长素运输可以不受维管连接的影响, *ALF4*或*AXR1*可能通过促进生长素反应和嫁接接口处以下的维管再生发挥作用, 这在不完全附着、细胞损伤或运输效率低下时尤为重要 (Melnyk等2018)。除了*ALF4*和*AXR1*只在嫁接点以下的嫁接中作用, 实际上接穗和砧木中生长素的反应在很大程度上是对称的, 研究显示嫁接后12 h生长素反应基本对称 (Melnyk等2018), 例如生长素诱导的*DR5*、*IAA5*和*ANAC071*基因在嫁接后1~3 d内分别在砧木和接穗中被激活 (Melnyk等2015; Yin等2012; Pitaksaringkarn等2014)。所有高等植物都能将生长素从茎转移到根, 但并非所有植物都能成功嫁接, 因此对生长素的响应而不是生长素运输本身可能是嫁接能力的决定因素 (Melnyk等2018)。

2.3 其他植物激素在嫁接再生中的作用

除生长素外, 其他植物激素例如CK、Eth、ABA、GA、BR、SA、JA和SL在嫁接中的作用尚未明确, 但它们在伤口愈合和维管束形成中的作用多有涉及, 关于这方面的研究在Nanda和Melnyk (2018)的综述文章中有详细介绍。目前的研究结果显示, 这几种激素在嫁接中并没有起到关键作用, 例如: 在拟南芥和杨树的研究中发现CK的生物

合成和信号突变体均可嫁接成功(Nieminen等2008; Melnyk等2015b); 乙烯信号转导增强突变体(*constitutive triple response 1, ctr1*)或乙烯反应受阻突变体(*ethylene insensitive 2, ein2; ethylene receptor 1, etr1*)的下胚轴可以嫁接成功(Melnyk等2015); 以嫁接为工具研究豌豆植株中BR转运的研究表明, BR生物合成突变体*lkb*嫁接成功(Symons 2004); JA缺陷拟南芥突变体嫁接成功(Gasperini 等2015); 不同植物品种的*sl*缺失突变体嫁接成功(Koltai等2010), 说明SLs对于嫁接成功并不是至关重要的。在嫁接的拟南芥下胚轴中, 抑制GA生物合成或信号转导可以抑制封闭嫁接接口的皮层细胞的扩张, 但不抑制维管组织中的细胞增殖(Matsuoka等2016)。另外ABA在嫁接过程中的作用尚未了解, SA尚未发现涉及维管发育或嫁接。对于这些激素在嫁接中的作用还需要更多的研究阐明。

3 糖在嫁接再生中的作用

糖在植物叶片中产生, 并通过韧皮部运输到根部。研究表明糖促进细胞分裂和细胞扩张(Wang和Ruan 2013), 其在植物生长发育过程中包括维管束形成中起着重要作用(Melnyk等2018), 但是糖在维管形成和伤口愈合中的具体作用机制尚未阐明。糖的添加对愈伤组织诱导维管系统至关重要, 但愈伤组织上形成的维管束不是连续的, 而是分散的结节或管束(Wetmore和Rier 1963; Aloni 1980)。因此, 仅仅在未分化的细胞中添加生长素和糖不足以诱导连续的维管元素, 这表明尽管这些物质很重要, 但还需要其他过程或激素(Melnyk等2018)。

对于糖在嫁接中的作用也尚未很好证实。拟南芥的子叶被移除时, 在嫁接植物培养基中添加糖对于嫁接的成功是重要的(Marsch-Martínez等2013)。Melnyk等(2018)研究表明拟南芥嫁接形成过程中糖相关基因在切口处是不对称表达的, 淀粉在切口上部积累, 但72 h后, 这种不对称在嫁接植株中消失。用糖相关标记基因进行研究发现, 糖诱导基因*ApL3 (ADPGLC-PPase large subunit)* (Villadsen和Smith 2004)在接穗和切割未嫁接接口上部迅速诱导上调表达, 而糖抑制基因*DIN6 (dark-*

induced 6)、*GDH1 (glutamate dehydrogenase 1)*和*STP1 (sugar transporter protein 1)*在砧木和切割未嫁接接口下部也迅速上调表达(Cordoba等2015), 这些结果与接穗的糖积累和砧木的糖消耗一致(Melnyk等2018)。另外转录分析表明代谢活性糖如葡萄糖在嫁接中起作用, 而不是甘露醇等非代谢糖(Melnyk等2018)。

4 嫁接再生与其他再生过程的异同

嫁接同组织培养、扦插和压条等农业技术一样都是基于植物再生能力而开发的。植物再生包括组织修复/再生和新植株的从头再生, 其中根和茎等组织的切除再生或伤口愈合、嫁接等过程属于组织修复/再生; 而非胚性愈伤组织、离体/受伤器官通过不定芽、不定根形成新植株和体细胞脱分化为胚胎细胞发育成新植株分别属于器官从头发生(*de novo organogenesis*)和体细胞从头发生(*somatic embryogenesis*)的再生过程(孙贝贝等2016)。嫁接同其他再生过程一样, 本质上是细胞在受伤或胁迫的环境中命运发生转变的过程, 孙贝贝等(2016)认为伤口或胁迫信号、激素、转录因子和表观遗传途径因子形成有序协作的调控通路, 控制着再生过程。目前以拟南芥为模式植物对于伤口愈合、根的从头发生途径的细胞命运转变分子机制的认识较为清晰(Ahkami等2009; Peret等2009; 孙贝贝等2016; Xu 2017; Zhang等2019); 芽的从头发生途径以及体细胞胚发生的分子机制的研究也取得一定进展(Sarkar等2007; Gordon等2007; Duclecq等2011; Vogel 2015; Feher 2015)。

嫁接涉及两个不同组织的接触和愈合, 其愈合再生的机理更为复杂。虽然嫁接过程包括伤口愈合和维管束的再形成, 但其又不同于单纯的伤口愈合和维管束形成。目前从转录水平和蛋白水平初步了解了植物嫁接的特异性。Yin等(2012)发现数千个基因在嫁接后第1天的拟南芥下胚轴中差异表达, 其中306个基因被认为是嫁接特异性基因。Melnyk等(2018)分析发现拟南芥下胚轴接穗、砧木和切割未嫁接的切口上部, 很多基因都表现相似激活动力学, 切割促进了类似的伤口反应, 但是仍有部分基因只在嫁接组织中表达。另

外在切割后72 h, 嫁接和分离的组织在转录上变得不同, 这表明嫁接和非嫁接的伤口愈合是通过不同的机制进行的, 可能取决于是否存在毗邻组织。在葡萄嫁接后3和28 d的砧木和接穗的转录组研究中发现, 嫁接结合的形成触发了与伤口反应、激素信号和愈伤组织维持相关的基因的差异表达, 嫁接接口处差异调控的基因大部分是针对移嫁接植物结合形成的(Cookson等2013)。通过转录组数据比较, Melnyk等(2018)认为嫁接愈合再生过程与拟南芥花序茎愈合、叶盘培养维管束诱导过程类似, 另外以细胞类型特异方式表达的各种基因也表现出与嫁接形成较高的转录重叠, 包括韧皮部、内胚层和原生木质部, 这些研究为了解嫁接过程与其他发育过程的异同提供了思路(Melnyk等2018)。李跃建等(2009)比较黄瓜嫁接苗和自根苗的蛋白质组学差异, 在嫁接苗叶片新产生了两类蛋白质, 包括能提高抗病抗逆能力的R蛋白和促进萜烯类物质合成的鲨烯合酶, 以及能促进叶绿体合成的辅酶和提高光能利用率的捕光叶绿素 a/b 结合蛋白。Xu等(2006)在黄瓜/南瓜嫁接苗蛋白组学分析中发现, 嫁接愈合良好的组合中涉及光合作用、碳水化合物和能量代谢及蛋白质代谢相关蛋白表达水平高。尽管嫁接中可能存在嫁接特异基因和特异蛋白, 但是对其还缺乏深入研究, 对于嫁接愈合处细胞再生的分子机制尚未明确。另外嫁接过程的特异性还表现在不管什么时候发生切割, 砧木和接穗必须至少附着3 d才能形成韧皮部连接, 可能在分离的顶部或底部表达的RNA不足以驱动嫁接的形成, 而只有通过嫁接参与识别反应的基因才能被激活; 这些基因有助于区分附着的和分离的植物组织。这个识别过程如何被感知, 是否适用于组织再生、组织间通讯或组织融合事件还需进一步研究(Melnyk等2018)。

5 展望

嫁接技术及其应用仍在不断发展。通过砧木育种和自动化技术的进步, 全球已有数十亿株经过嫁接的植物(Lee等2010)。人们对嫁接再生的机制的研究从细胞形态学、解剖学及生理生化机制, 扩展到了基因组学、转录组学及蛋白组学(苗丽等

2017)。利用模式植物拟南芥等材料解析了嫁接愈合再生过程中各个时期的组织形态变化, 筛选了一些差异表达的基因, 初步了解了涉及的代谢过程, 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, 特别是对嫁接亲和和不亲和性的机理还了解不够。

虽然嫁接拟南芥及其近缘种(Flaishman等2008; Melnyk等2015)使得嫁接的机制部分被阐明, 但是作为草本的拟南芥嫁接机制是否和木本植物的嫁接机制相同, 还需要进一步研究。对于园艺中常见的嫁接品种, 如木本植物桃子、李子、葡萄、芒果、荔枝和番荔枝等, 由于缺乏遗传资源以及这些物种的繁殖时间较长, 嫁接研究较难, 解决这个难题需要在研究手段和思路上进行探索。另外在园艺生产中, 植物通常被嫁接到不同的品种或物种上, 而具有相同遗传背景的嫁接植物并不常见, 随之而来的问题是嫁接中的亲和性和不亲和性。因此, 解析异源嫁接材料嫁接愈合再生的机制对于现实中嫁接生产更有指导意义。而对于探索异源材料间嫁接不亲和的机制, 寻找信号转导途径及相关的代谢通路中的关键基因, 可为解决嫁接不亲和提供解决思路。嫁接愈合再生过程中伤口愈合、维管束重连及砧木、接穗间识别等过程中细胞命运转变的分子机制还需进一步阐明。明确嫁接再生的机制不仅对植物再生、激素反应、维管发育和自我/非自我识别等过程提供理论参考, 还可以用于指导生产实践中的嫁接技术。

参考文献 (References)

- Ahkami AH, Lischewski S, Haensch KT, et al (2009). Molecular physiology of adventitious root formation in *Petunia hybrida* cuttings: Involvement of wound response and primary metabolism. *New Phytol*, 181: 613–625
- Aloni B, Cohen R, Karni L, et al (2010). Hormonal signaling in rootstock–scion interactions. *Sci Hortic*, 127 (2): 119–126
- Aloni R (1980). Role of auxin and sucrose in the differentiation of sieve and tracheary elements in plant tissue cultures. *Planta*, 150 (3): 255–263
- Asahina M, Azuma K, Pitaksaringkarn W, et al (2011). Spatially selective hormonal control of *RAP2.6L* and *ANAC071* transcription factors involved in tissue re-union in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108 (38):

- 16128–16132
- Asahina M, Iwai H, Kikuchi A, et al (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
- Baron D, Amaro ACE, Pina A, et al (2019). An overview of grafting re-establishment in woody fruit species. *Sci Hort*, 243: 84–91
- Bonke M, Thitamadee S, Mähönen AP, et al (2003). *APL* regulates vascular tissue identity in *Arabidopsis*. *Nature*, 426: 181–186
- Botha CE, Aoki N, Scofield GN, et al (2008). A xylem sap retrieval pathway in rice leaf blades: evidence of a role for endocytosis? *J Exp Bot*, 59: 2945–2954
- Celenza JL, Grisafi PL, Fink GR (1995). A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev*, 9: 2131–2142
- Chisholm ST, Parra MA, Anderberg RJ, et al (2001). *Arabidopsis RTM1* and *RTM2* genes function in phloem to restrict long-distance movement of tobacco etch virus. *Plant Physiol*, 127: 1667–1675
- Colón-Carmona A, You R, Haimovitch-Gal T, et al (1999). Technical advance: spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J*, 20: 503–508
- Cookson SJ, Moren MJC, Hevin C, et al (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
- Cordoba E, Aceves-Zamudio DL, Hernández-Bernal AF, et al (2015). Sugar regulation of SUGAR TRANSPORTER PROTEIN 1 (*STP1*) expression in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, 66: 147–159
- Covington MF, Harmer SL (2007). The circadian clock regulates auxin signaling and responses in *Arabidopsis*. *PLOS Biol*, 5: e222
- Dewitt ND, Sussman MR (1995). Immunocytological localization of an epitope-tagged plasma membrane proton pump (H^+ -ATPase) in phloem companion cells. *Plant Cell*, 7: 2053–2067
- DiDonato RJ, Arbuckle E, Buker S, et al (2004). *Arabidopsis ALF4* encodes a nuclear-localized protein required for lateral root formation. *Plant J*, 37: 340–353
- Donner TJ, Sherr I, Scarpella E (2009). Regulation of prepro-cambial cell state acquisition by auxin signaling in *Arabidopsis* leaves. *Development*, 136: 3235–3246
- Duclercq J, Sangwan-Norreel B, Catterou M, et al (2011). De novo shoot organogenesis: from art to science. *Trends Plant Sci*, 16: 597–606
- Efroni I, Mello A, Nawy T, et al (2016). Root regeneration triggers an embryo-like sequence guided by hormonal interactions. *Cell*, 165 (7): 1721–1733
- Feher A (2015). Somatic embryogenesis-stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochim Biophys Acta*, 1849: 385–402
- Flaishman MA, Loginovsky K, Golobowich S, et al (2008). *Arabidopsis thaliana* as a model system for graft union development in homografts and heterografts. *J Plant Growth Regul*, 27 (3): 231–239
- Friml J, Palme K (2002). Polar auxin transport-old questions and new concepts? *Plant Mol Biol*, 49 (3–4): 273–284
- Furuta KM, Yadav SR, Lehesranta S, et al (2014). Plant development. *Arabidopsis* NAC45/86 direct sieve element morphogenesis culminating in enucleation. *Science*, 345: 933–937
- Gardiner J, Sherr I, Scarpella E (2010). Expression of *DOF* genes identifies early stages of vascular development in *Arabidopsis* leaves. *Int J Dev Biol*, 54: 1389–1396
- Gasparini D, Chauvin A, Acosta IF, et al (2015). Axial and radial oxylipin transport. *Plant Physiol*, 169: 2244–2254
- Gordon SP, Heisler MG, Reddy GV, et al (2007). Pattern formation during *de novo* assembly of the *Arabidopsis* shoot meristem. *Development*, 134: 3539–3548
- Gray-Mitsumune M, Mellerowicz EJ, Abe H, et al (2004). Expansins abundant in secondary xylem belong to subgroup A of the *alpha-expansin* gene family. *Plant Physiol*, 135: 1552–1564
- Guo Y, Qin G, Gu H, et al (2009). *Dof5.6/HCA2*, a *Dof* transcription factor gene, regulates interfascicular cambium formation and vascular tissue development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21: 3518–3534
- Hamant O, Heisler MG, Jonsson H, et al (2008). Developmental patterning by mechanical signals in *Arabidopsis*. *Science*, 322 (5908): 1650–1655
- Heisler MG, Hamant O, Krupinski P, et al (2010). Alignment between *PIN1* polarity and microtubule orientation in the shoot apical meristem reveals a tight coupling between morphogenesis and auxin transport. *PLOS Biol*, 8 (10): e1000516
- Helariutta Y, Fukaki H, Wysocka-Diller J, et al (2000). The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell*, 101: 555–567
- Hu YQ, Su Y, Han FY, et al (2007). The research of anatomical structures and three activity of antioxidases' change of grafted cucumber seedling. *J Inner Mong Agric Univ (Nat Sci Edi)*, 28 (3): 224–230 (in Chinese with English abstract) [胡艳青, 苏媛, 韩风业等(2007). 嫁接黄瓜在愈合过程中的解剖观察和抗氧化酶活性的变化研究. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 28 (3): 224–230]

- Huang JQ, Zhang BS, Lu JW, et al (2001). Anatomical observation in graft union of *Carya cathayensis*. J Zhejiang For Coll, 18 (2): 111–114 (in Chinese with English abstract) [黄坚钦, 章滨森, 陆建伟等(2001). 山核桃嫁接愈合过程的解剖学观察. 浙江林学院学报, 18 (2): 111–114]
- Huang NC, Yu TS (2015). A pin-fasten grafting method provides a non-sterile and highly efficient method for grafting *Arabidopsis* at diverse developmental stages. Plant Methods, 11: 38
- Ikeuchi M, David S, Favero DS, et al (2019). Molecular mechanisms of plant regeneration. Ann Rev Plant Biol, 70: 377–406
- Iwase A, Mitsuda N, Koyama T, et al (2011). The *AP2/ERF* transcription factor *WIND1* controls cell dedifferentiation in *Arabidopsis*. Curr Biol, 21 (6): 508–514
- Jeffree CE, Yeoman MM (1983). Development of intercellular connections between opposing cells in a graft union. New Phytol, 93 (4): 491–509
- 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. III. On the mechanism of secondary formation of plasmodesmata at the graft interface. Protoplasma, 165: 71–85
- Kollmann R, Yang S, Glockmann C (1985). Studies on graft unions. II. Continuous and half plasmodesmata in different regions of the graft interface. Protoplasma, 126: 19–29
- Koltai H, LekKala SP, Bhattacharya C, et al (2010). A tomato strigolactone-impaired mutant displays aberrant shoot morphology and plant interactions. J Exp Bot, 61: 1739–1749
- Kondo Y, Nurani AM, Saito C, et al (2016). Vascular cell induction culture system using *Arabidopsis* leaves (VI-SUAL) reveals the sequential differentiation of sieve element-like cells. Plant Cell, 28: 1250–1262
- Kyriacou MC, Youssef R, Giuseppe C, et al (2017). Vegetable grafting: the implications of a growing agronomic imperative for vegetable fruit quality and nutritive value. Front Plant Sci, 8: 741
- Lee HW, Kim MJ, Kim NY, et al (2012). *LBD18* acts as a transcriptional activator that directly binds to the *EXPANSIN14* promoter in promoting lateral root emergence of *Arabidopsis*. Plant J, 73 (2): 212–224
- Lee HW, Kim NY, Lee DJ, et al (2009). *LBD18/ASL20* regulates lateral root formation in combination with *LBD16/ASL18* downstream of *ARF7* and *ARF19* in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 151 (3): 1377–1389
- Lee JM, Kubota C, Tsao SJ, et al (2010). Current status of vegetable grafting: diffusion, grafting techniques, automation. Sci Hortic, 127: 93–105
- Lee MM, Schiefelbein J (1999). WEREWOLF, a *MYB*-related protein in *Arabidopsis*, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning. Cell, 99: 473–483
- Leyser O (2011). Auxin, self-organisation, and the colonial nature of plants. Curr Biol, 21: R331–R337
- Li YJ, Ling GY, Liu XJ, et al (2009). Proteomic study on grafted and non-grafted cucumber (*Cucumis sativus* L.). Acta Hortic Sin, 36 (8): 1147–1152 (in Chinese with English abstract) [李跃建, 梁根云, 刘小俊等(2009). 黄瓜嫁接苗和自根苗的蛋白质组学研究. 园艺学报, 36 (8): 1147–1152]
- Marhavy P, Montesinos JC, Abuzeineh A, et al (2016). Targeted cell elimination reveals an auxin-guided biphasic mode of lateral root initiation. Genes Dev, 30 (4): 471–483
- Marsch-Martínez N, Franken J, Gonzalez-Aguilera KL, et al (2013). An efficient flat-surface collar-free grafting method for *Arabidopsis thaliana* seedlings. Plant Methods, 9: 14
- Matsumoto-Kitano M, Kusumoto T, Tarkowski P, et al (2008). Cytokinins are central regulators of cambial activity. Proc Natl Acad Sci USA, 105: 20027–20031
- Matsuoka K, Sugawara E, Aoki R, et al (2016). Differential cellular control by cotyledon-derived phytohormones involved in graft reunion of *Arabidopsis* hypocotyls. Plant Cell Physiol, 57: 2620–2631
- Mayer KF, Schoof H, Haecker A, et al (1998). Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. Cell, 95: 805–815
- Mazur E, Benkova E, Friml J (2016). Vascular cambium regeneration and vessel formation in wounded in florescence stems of *Arabidopsis*. Sci Rep, 6: 33754
- Melnyk CW (2017a). Plant grafting: insights into tissue regeneration. Regeneration, 4 (1): 3–14
- Melnyk CW (2017b). Grafting with *Arabidopsis thaliana*. In: Kleine-Vehn J, Sauer M (eds). Plant Hormones. Methods in Molecular Biology. Vol 1497. New York, USA: Humana Press, 9–18
- Melnyk CW, Meyerowitz EM (2015). Plant grafting. Curr Biol, 25 (5): R183–R188
- Melnyk CW, Gabel A, Hardcastle TJ, et al (2018). Transcriptome dynamics at *Arabidopsis* graft junctions reveal an intertissue recognition mechanism that activates vascular regeneration. Proc Natl Acad Sci USA, 115 (10): E2447–E2456
- Melnyk CW, Schuster C, Leyser O, et al (2015). A developmental framework for graft formation and vascular reconnection in *Arabidopsis thaliana*. Curr Biol, 25 (10): 1306–1318

- Miao L, Li YS, Fan XQ, et al (2017). Research advances on mechanism of interface healing of plant grafting. *Plant Physiol J*, 53 (1): 17–28 (in Chinese with English abstract) [苗丽, 李衍素, 范兴强等(2017). 植物嫁接体接口愈合机制的研究进展. *植物生理学报*, 53 (1): 17–28]
- Moore R (1983). Studies of vegetative compatibility-incompatibility in higher plants. IV. The development of tensile strength in a compatible and an incompatible graft. *Am J Bot*, 70: 226–231
- Moore R, Walker DB (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: 820–830
- Nanda AK, Melnyk CW (2018). The role of plant hormones during grafting. *J Plant Res*, 131: 49–58
- Nawaz MA, Imtiaz M, Kong Q, et al (2016). Grafting: a technique to modify ion accumulation in horticultural crops. *Front Plant Sci*, 21 (7): 1457
- Nieminen K, Immanen J, Laxell M, et al (2008). Cytokinin signaling regulates cambial development in poplar. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 20032–20037
- Nisar N, Verma S, Pogson B J, et al (2012). Inflorescence stem grafting made easy in *Arabidopsis*. *Plant Methods*, 8 (1): 50
- Nishitani C, Demura T, Fukuda H (2002). Analysis of early processes in wound-induced vascular regeneration using *TED3* and *ZeHB3* as molecular markers. *Plant Cell Physiol*, 43 (1): 79–90
- Notaguchi M, Daimon Y, Abe M, et al (2009). Adaptation of a seedling micro-grafting technique to the study of long-distance signaling in flowering of *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Res*, 122 (2): 201–214
- Nuhse TS (2012). Cell wall integrity signaling and innate immunity in plants. *Front Plant Sci*, 3: 280
- Oparka KJ, Duckett CM, Prior DAM, et al (1994). Real-time imaging of phloem unloading in the root-tip of *Arabidopsis*. *Plant J*, 6: 759–766
- Peret B, Rybel BD, Casimiro I, et al (2009). *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci*, 14: 399–408
- 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: 144–150
- Pitaksaringkarn W, Ishiguro S, Asahina M, et al (2014). *ARF6* and *ARF8* contribute to tissue reunion in incised *Arabidopsis* inflorescence stems. *Plant Biotechnol*, 31: 49–53
- Prassinos C, Ko JH, Lang G, et al (2009). Rootstock-induced dwarfing in cherries is caused by differential cessation of terminal meristem growth and is triggered by rootstock-specific gene regulation. *Tree Physiol*, 29 (7): 927–936
- Rhee SY, Somerville CR (1995). Flat-surface grafting in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol Rep*, 13 (2): 118–123
- Romano CP, Hein MB, Klee HJ (1991). Inactivation of auxin in tobacco transformed with the indoleacetic acid-lysine synthetase gene of *Pseudomonas savastanoi*. *Genes Dev*, 5: 438–446
- Roppolo D, Rybel BD, Tendon VD, et al (2011). A novel protein family mediates Casparian strip formation in the endodermis. *Nature*, 473: 380–383
- Rybel BD, Mähönen AP, Helariutta Y, et al (2016). Plant vascular development: from early specification to differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17: 30–40
- Sarkar AK, Luijten M, Miyashima S, et al (2007). Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature*, 446: 811–814
- Schopfer P (2006). Biomechanics of plant growth. *Am J Bot*, 93 (10): 1415–1425
- Schrader J, Nilsson J, Mellerowicz E, et al (2004). A high-resolution transcript profile across the wood-forming meristem of poplar identifies potential regulators of cambial stem cell identity. *Plant Cell*, 16: 2278–2292
- Schulz A (1986). Wound phloem in transition to bundle phloem in primary roots of *Pisum sativum* L. I. Development of bundle-leaving wound-sieve tubes. *Protoplasma*, 130 (1): 12–26
- Stitt M (1996). Plasmodesmata play an essential role in sucrose export from leaves: a step toward an integration of metabolic biochemistry and cell biology. *Plant Cell*, 8: 565–571
- Sugimoto K, Jiao Y, Meyerowitz EM (2010). *Arabidopsis* regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Dev Cell*, 18 (3): 463–471
- Sun B B, Liu J, Ge Y C, et al (2016). Recent progress on plant regeneration. *Chin Sci Bull*, 61: 3887–3902 (in Chinese with English abstract) [孙贝贝, 刘杰, 葛亚超等(2016). 植物再生的研究进展. *科学通报*, 61: 3887–3902]
- Symons GM (2004). Brassinosteroids do not undergo long-distance transport in pea. Implications for the regulation of endogenous brassinosteroid levels. *Plant Physiol*, 135: 2196–2206
- Thomas CL, Bayer EM, Ritzenhaler C, et al (2008). Specific targeting of a plasmodesmal protein affecting cell-to-cell communication. *PLOS Biol*, 6: e7
- Turnbull CGN, Booker JP, Leyser HMO (2002). Micrografting techniques for testing long-distance signalling in *Arabidopsis*. *Plant J*, 32 (2): 255–262
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, et al (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing nat-

- ural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell*, 9: 1963–1971
- Villadsen D, Smith SM (2004). Identification of more than 200 glucose-responsive *Arabidopsis* genes none of which responds to 3-O-methylglucose or 6-deoxyglucose. *Plant Mol Biol*, 55: 467–477
- Vogel G (2005). How does a single somatic cell become a whole plant. *Science*, 309: 86
- Wang J, Jiang L, Wu R (2017). Plant grafting: how genetic exchange promotes vascular reconnection. *New Phytol*, 214 (1): 56–65
- Wang J, Jin Z, Yin H, et al (2014). Auxin redistribution and shifts in *PIN* gene expression during *Arabidopsis* grafting. *Russ J Plant Physiol*, 61 (5): 688–696
- Wang L, Ruan YL (2013). Regulation of cell division and expansion by sugar and auxin signaling. *Front Plant Sci*, 4: 163
- Wenzel CL, Schuetz M, Yu Q, et al (2007). Dynamics of *MONOPTEROS* and *PIN-FORMED1* expression during leaf vein pattern formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 49: 387–398
- Wetmore RH, Rier JP (1963). Experimental induction of vascular tissues in callus of angiosperms. *Am J Bot*, 50 (5): 418–430
- Wysocka-Diller JW, Helariutta Y, Fukaki H, et al (2000). Molecular analysis of *SCARECROW* function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. *Development*, 127: 595–603
- Xu L (2017). *De novo* root regeneration from leaf explants: wounding, auxin, and cell fate transition. *Curr Opin Plant Biol*, 41: 39–45
- Xu Q, Guo SR, Li L, et al (2016). Proteomics analysis of compatibility and incompatibility in grafted cucumber seedlings. *Plant Physiol Biochem*, 105 (4): 21–28
- Yin H, Yan B, Sun J, et al (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
- Yoo SJ, Hong SM, Jung HS, et al (2013). The cotyledons produce sufficient FT protein to induce flowering: evidence from cotyledon micrografting in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, 54 (1): 119–128
- Zhang GF, Zhao F, Chen LQ, et al (2019). Jasmonate-mediated wound signalling promotes plant regeneration. *Nat Plants*, 5: 491–497

Research progress on regeneration mechanism of plant grafting

CHEN Jingjing, LI Dongliang, YANG Qian, DAI Xiaohong, JING Minmin, LIU Heng*

National Field Genebank for Tropical Fruit, Key Laboratory of Tropical Fruit Biology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, South Subtropical Crop Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Zhanjiang, Guangdong 524091, China

Abstract: Grafting is an ancient agricultural technology which is based on the development of plant regeneration ability. It has become an important and effective plant breeding technology in agricultural production. However, our understanding of tissue regeneration in grafting junction is just beginning and remain limited. Grafting regeneration process includes wound healing, tissue fusion and vascular reconnection. In recent years, the mechanism of rootstock and scion regeneration using model plant *Arabidopsis thaliana* as material has made some progress. In this paper, we analyzed and summarized the progress of research on the perception and initiation of regeneration signals during graft regeneration, regeneration of cells at the healing site, regeneration and reconnection of vascular bundles, the role of plant hormones (e.g. auxin) and sugars in plant graft regeneration, and the specificity of grafting, with a view to providing a reference for understanding the mechanism of regeneration in grafting.

Key words: grafting; healing; regeneration; vascular bundle; auxin

Received 2019-11-27 Accepted 2020-04-24

This work was supported by the Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund for Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences (1630062020001 and 1630062020016), and Species and Varieties Resources Protection Project of Ministry of Agricultural and Rural Affairs (125163006000160004).

*Corresponding author (hengliu@vip.163.com).