



# 植物嫁接系统及其在植物生命科学研究中的应用

王幼群

植物生理学与生物化学国家重点实验室, 中国农业大学生物学院, 北京 100193

E-mail: wangyq@cau.edu.cn

2011-06-15 收稿, 2011-09-01 接受

国家自然科学基金资助项目(30870140)

**摘要** 嫁接作为一个特异的研究系统, 被广泛应用于植物生命科学研究各个方面. 本文就嫁接的方法、草本植物嫁接体的发育过程、检测嫁接植株嫁接面发育过程和亲和性的方法以及嫁接在研究物质输导和植物体内信号长距离传递方面的应用作一综述.

**关键词**

嫁接  
物质运输  
信号传递

植物嫁接技术最早起源于我国战国时期, 距今已有两千多年的历史. 在漫长的历史进程中, 植物嫁接技术不断发展完善. 现在, 嫁接技术作为一种常规的无性繁殖手段, 已被广泛应用于果树、蔬菜、花卉等许多生产领域. 它可以提高植株的抗性、改良品质、增加产量, 给农业生产带来巨大的经济效益.

生产意义上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上的过程, 上面的枝或芽称为接穗(scion), 下面带根系的部分称为砧木(stock). 自体嫁接(autograft)的嫁接双方来自同种的同一植株, 同种嫁接(homograft)的嫁接双方来自同种植物的不同植株, 异种嫁接(heterograft)指不同种植株间的嫁接<sup>[1]</sup>. 生产上应用的嫁接组合多是亲和的, 亲和表现在嫁接后嫁接双方可以成活、正常生长直至开花结果<sup>[2]</sup>. 这些组合是人们在长期生产实践中精心选择的结果. 但多数嫁接组合是不亲和性的, 表现在嫁接后嫁接一方或双方的死亡.

嫁接作为一个特异的研究系统已被广泛应用于物质运输、花期调节和信号的长距离传导机制等方面的研究. 本文拟就嫁接的方法、嫁接体的发育过程、嫁接在植物生命科学研究中的应用作一综述.

## 1 嫁接方法

植物常用的嫁接部位为茎, 可以采用平接、劈接、靠接等方法. 最为常用的方法为劈接, 劈接是将

接穗下端切成楔形, 将砧木平切后再切出劈口, 将接穗的楔形下端插入砧木劈口进行嫁接. 在研究嫁接发育过程时常采用平接, 即将接穗和砧木的嫁接面都切成平面, 然后对接. 靠接是将接穗和砧木各削去部分表皮和皮层, 暴露出形成层, 然后将切面进行对接的嫁接. 对于成功的嫁接来说, 接穗和砧木在解剖结构上的精密嵌接是十分重要的. 维管系统和形成层的错位经常导致嫁接的失败或发育的延迟<sup>[3]</sup>.

随着嫁接理论和实践的发展, 为了不同的研究目的, 在传统嫁接方法的基础上, 人们采用了各种其他嫁接方法, 包括愈伤组织嫁接、离体茎段嫁接以及试管苗嫁接等.

为了研究不亲和嫁接的细胞反应, Moore 和 Walker<sup>[4]</sup>将 *Sedum telephoides* 和 *Solanum pennellii* 的愈伤组织在离体条件下嫁接, 发现嫁接引起临近嫁接面处细胞内质网的膨大和细胞壁的明显加厚. 将 *Pyrus communis* 和 *Cydonia oblonga* 的愈伤组织共同进行悬浮培养, 导致 *Cydonia oblonga* 生长量的显著减少<sup>[5]</sup>.

Gebhardt 和 Goldbach<sup>[6]</sup>将樱桃茎尖组织培养获得的具有茎尖的试管苗与具有根系的试管苗在无菌条件下进行显微嫁接, 然后嫁接植株在试管中的液体培养基中生长. 组织学检查证实, 接穗和砧木间建立了维管组织连接. Russo 和 Slack<sup>[7]</sup>采用土豆试管苗嫁接, 建立了筛选和分析抗病毒土豆植株的方法.

植物茎段离体嫁接的方法是由 Parkinson 和 Yeoman<sup>[8]</sup>提出的, 将植物部分茎的切段嫁接在一起, 然后无菌培养在 MS 培养基中. 该方法模拟植物的正常生理状况, 将培养基分成两部分. 与接穗接触的培养基中加入一定浓度的蔗糖、生长素和细胞分裂素, 在与砧木相连的培养基中加入细胞分裂素. 与常规的植物整体嫁接相比, 该方法作为研究系统有很多优点: (1) 没有枝叶和根的影响, 可以更精确地研究嫁接面的发育过程; (2) 可以方便地改变培养基成分和培养条件, 以探讨各种因素对嫁接成活的影响和作用, 从而有助于了解亲和性的本质<sup>[9]</sup>.

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)作为模式植物, 已被广泛应用于植物遗传学、发育生物学和分子生物学研究. 拟南芥嫁接系统可用于研究物质运输、信号传导、成花诱导、系统抗性、非生物胁迫的应答等许多方面<sup>[10,11]</sup>. 拟南芥叶基生, 呈莲座状排列, 合适的嫁接位点是花序轴和下胚轴部位. 花序轴部位的嫁接可以采用劈接和平接的方法<sup>[10,12]</sup>. 平接的方法是在拟南芥抽苔后, 用锋利刀片平切花序轴, 嫁接部位套上硅胶管(内径 0.5 mm, 侧面剖开), 使接穗与砧木紧密接触, 嫁接初期需要采取措施, 保持湿度, 有利于嫁接面早期的发育. Turnbull 等人<sup>[11]</sup>首次建立了拟南芥下胚轴嫁接系统, 采用在培养皿中生长的拟南芥幼苗, 在超净台的体视显微镜下, 将幼苗从下胚轴部位(子叶稍靠下部位)切断, 然后进行自体或同种嫁接.

在花序轴抽苔期进行嫁接, 由于花序轴直径相对较粗, 嫁接操作方便. 但拟南芥发育到该时期, 一系列重要的生理事件都已完成. 大部分细胞已经没有分化能力, 在该时期嫁接, 限制了嫁接系统在基础研究中的应用范围. 拟南芥下胚轴嫁接系统由于植株较小, 嫁接难度相对增大, 但成活率较高, 嫁接体适用于研究根系和地上部的物质和信息交换. 不同的研究者应根据不同的研究需要选择合适的嫁接方法. 虽然 Rhee 和 Somerville<sup>[12]</sup>对拟南芥花序轴的平接嫁接进行了初步的组织学观察, 但至今仍缺乏拟南芥嫁接植株的详尽发育过程. 而确定嫁接体接穗和砧木间维管组织何时贯通, 对于确定信号传导和物质运输通过何种途径进行是非常重要的.

## 2 草本植物嫁接植株的发育过程

在草本植物亲和性嫁接组合中, 嫁接体的发育过程大致相同, 主要包括: (1) 隔离层的形成及接穗

与砧木间的初始黏连; (2) 愈伤组织的形成; (3) 连接砧木和接穗间维管束桥的重新连通等<sup>[13,14]</sup>.

### 2.1 隔离层(isolation layer)的形成及接穗与砧木间的初始黏连

嫁接过程中的切割导致隔离层(又称坏死层, necrotic layer)的形成. 电子显微镜观察表明, 隔离层由切割致死细胞的细胞壁残留物构成, 其周围分布着电子致密度高的物质<sup>[15,16]</sup>. 嫁接后 1 d, 接穗和砧木发生初始黏连, 嫁接面两侧细胞中高尔基体数目的增加及其分泌产物和嫁接双方的初始黏连有关<sup>[16]</sup>. 嫁接初期, 隔离层分布在整個嫁接面上, 后来, 随着愈伤组织的形成和分裂, 隔离层首先在维管束区域被突破, 然后逐渐扩展, 使接穗和砧木得以直接接触. 隔离层的消失主要是由于两侧愈伤组织分裂所形成的生长压力和愈伤组织的吸收<sup>[17]</sup>.

### 2.2 愈伤组织的形成

嫁接 2~3 d 后, 嫁接面受伤部位周围的薄壁细胞恢复分裂, 形成愈伤组织. 愈伤组织可由形成层、韧皮部薄壁细胞、木质部薄壁细胞、髓部细胞分裂而形成. 在草本植物中, 愈伤组织细胞首先在维管束和皮层处形成, 在髓部只有少数细胞进行分裂<sup>[14,15,17]</sup>. 嫁接双方愈伤组织细胞的交错生长, 可使接穗和砧木进一步连接在一起. 嫁接面处愈伤维管组织的分化也是在这些愈伤组织细胞中进行的<sup>[16]</sup>.

随着愈伤组织的形成, 在隔离层变薄区域, 接穗和砧木细胞间形成胞间连丝, 这种胞间连丝是在不分裂的细胞壁上次生形成的, 故称为次生胞间连丝. Kollmann 和 Glockmann<sup>[18]</sup>在蚕豆(*Vicia faba*)/向日葵(*Helianthus annuus*)嫁接组合中, 利用蚕豆和向日葵细胞各自的超微结构特征, 准确界定接穗和砧木接触的细胞壁, 证实了接穗和砧木细胞间次生的种间胞间连丝的存在. 既有贯穿细胞壁的连续的次生胞间连丝, 也有中止于细胞壁中部的半胞间连丝形态. 在 *Impatiens walleriana*/*Impatiens olivieri* 嫁接组合中发现, 在嫁接面维管组织区域, 次生胞间连丝多为连续的胞间连丝, 在皮层和髓部, 接穗和砧木细胞间的次生胞间连丝中半胞间连丝的比例较高<sup>[3]</sup>. 次生胞间连丝的形成, 将嫁接双方的细胞连接成一个统一的共质体, 使邻近细胞的物质交流和细胞通讯得以实现, 可能对嫁接体的进一步发育起着重要作用<sup>[18]</sup>.

Wang<sup>[9]</sup>发现,在 *Vicia faba*/*Helianthus tuberosus* 不亲和嫁接组合中,接穗和砧木之间没有贯通的胞间连丝形成,嫁接双方之间也没有韧皮部的连通。

### 2.3 贯通接穗和砧木的维管束桥的形成

连接接穗和砧木维管束桥的形成是亲和性嫁接发育的关键事件<sup>[2]</sup>。在草本植物的嫁接组合中,嫁接后 3 d 就可以在愈伤组织中观察到管状分子的分化,这些新分化的管状分子形状不规则,一般由嫁接面处的愈伤组织细胞或者维管束周围的薄壁细胞直接分化而来。在分化前,这些细胞一般不进行分裂<sup>[17,19]</sup>。豌豆(*Pisum sativum* L.)根自体嫁接后 4 d,接穗和砧木愈伤组织中分化出管状分子,嫁接后 7 d,可观察到连接接穗和砧木维管束的愈伤木质部桥<sup>[17]</sup>。在蚕豆和假酸浆(*Nicandra physaloides*)的离体茎段自体嫁接中,嫁接后 5 d,也能观察到愈伤木质部桥的形成<sup>[20]</sup>。Monzer 和 Kollmann<sup>[21]</sup>依据 2 种植物导管分子壁加厚的形态不同,确定了 *Lophophora williamsii*/*Trichocereus spachianus* 嫁接组合中嫁接双方愈伤导管分子的连接部位。

嫁接面处的愈伤组织细胞和薄壁细胞在分化为筛分子前,往往要进行一到几次分裂,以形成筛分子和伴胞<sup>[15,20,22]</sup>。豌豆根自体嫁接后 4 d,接穗和砧木愈伤组织中分化出筛分子,嫁接后 8 d,可观察到连接接穗和砧木维管束的愈伤韧皮部桥<sup>[17]</sup>。在 *Cucumis sativus*/*Cucurbita ficifolia* 嫁接组合中,贯穿嫁接面的愈伤韧皮部桥在嫁接后 7 d 内建立,在 *Cucumis sativus*/*Cucurbita ficifolia* 种间嫁接中,接穗和砧木之间的愈伤筛管数目显著低于 *Cucumis* 或 *Cucurbita* 的自体嫁接<sup>[15]</sup>。在离体茎段嫁接系统中,蚕豆或假酸浆自体嫁接后 5 d,假酸浆/番茄(*Lycopersicon esculentum*)种间嫁接后 7 d,可以观察到连接接穗和砧木的愈伤韧皮部桥<sup>[20]</sup>。在蚕豆和向日葵的嫁接中,使用细胞标志,可以对接穗和砧木的筛分子加以区别。蚕豆的筛管中含有 P 型质体,向日葵的筛管中则含有 S 型质体。两种筛管中, P 蛋白的形态也有区别。依据这些细胞标志,可以准确地识别蚕豆和向日葵间的种间筛板<sup>[22]</sup>。

随着愈伤木质部和愈伤韧皮部的进一步分化,在二者之间会分化出形成层<sup>[14,16]</sup>,最终将接穗和砧木间原有的形成层连接起来。在草本植物中,形成层往往在嫁接 2~3 周后形成。嫁接面处形成层的分化十

分重要,它可以分化形成更多的维管组织,以连通接穗和砧木,保证嫁接体双方之间的物质交换能够畅通无阻地进行。嫁接面处形成层的形成常作为嫁接面发育完成的标志<sup>[14,22]</sup>。

对假酸浆和蚕豆两个自体离体嫁接组合的研究表明,离体茎段嫁接的发育过程由下列步骤组成:(1)在接穗和砧木结合处形成隔离层;(2)隔离层两侧的薄壁细胞分裂形成愈伤组织;(3)在愈伤组织的特定区域中,分化产生管状分子和筛分子,其相互连接,贯穿嫁接面,形成木质部和韧皮部桥;(4)在嫁接面管状分子和筛分子之间分化出形成层,其分裂产生更多的连接嫁接双方的维管组织。由此可见,离体茎段嫁接体嫁接面的发育过程和整体嫁接基本一致<sup>[9,20]</sup>。鉴于培养条件的一致性,该方法较整体嫁接更适用于生化和生理研究,从而为嫁接亲和机制的研究开辟了一条新途径。

嫁接的成功与否受遗传、结构、生长特性和生理生化等因素的影响。遗传因素是影响亲和性的重要因素。一般来讲,接穗与砧木分类学上关系越近,嫁接成功率越高,反之,排异现象越强烈。在不亲和性的嫁接组合中,大部分接穗和砧木间没有维管束桥的形成<sup>[23]</sup>。有时虽然可以形成维管束桥,但筛管随后被胼胝质堵塞而丧失功能<sup>[22]</sup>。生理因素可能是嫁接不亲和的重要原因。Gur 等人<sup>[24]</sup>在研究 *Pyrus communis*/*Cydonia oblonga* 嫁接组合时发现,在较高温度下, *Cydonia oblonga* 中产生一种扁氰苷物质,而 *Pyrus communis* 中产生一种 $\beta$ -扁氰苷酶。在嫁接面处, $\beta$ -扁氰苷在 $\beta$ -扁氰苷酶的作用下,分解产生有毒的含氰物,最终导致嫁接体的死亡。

## 3 检测嫁接植株嫁接面发育过程和亲和性的方法

### 3.1 断裂实验法

Roberts 和 Brown<sup>[25]</sup>提出,通过检测嫁接结合部的抗张强度(tensile strength)与嫁接后时间的关系,来研究嫁接面的发育过程和预测嫁接亲和性。抗张强度以断裂重量(breaking weight)表示,即在一测试仪器上,使接穗与砧木结合处断裂所需施加的重量,即断裂重量(g)/单位嫁接面面积(mm<sup>2</sup>)。研究结果表明,在嫁接体形成过程中,嫁接结合部抗张强度的变化可分为 3 个阶段。以亲和的 *Sedum telephoides* 自体嫁

接和不亲和的 *Sedum telephioides/Solanum pennellii* 远缘嫁接为例: (1) 嫁接初期 1~3 d, 抗张强度的值及其增长速率较低, 亲和性组合与不亲和性组合每天平均增重 1 g/mm<sup>2</sup>; (2) 抗张强度持续升高, 亲和性自体嫁接的抗张强度在嫁接后 3~11 d 持续增长, 抗张强度增至前一时期的 28 倍, 断裂重量达 56 g/mm<sup>2</sup>. 而非亲和组合在持续 2~5 d 后, 嫁接面的抗张强度即达到最大值, 断裂重量为 12 g/mm<sup>2</sup>; (3) 亲和性组合的抗张强度趋于平稳, 断裂重量与未嫁接的节间相似; 而非亲和组合自第 5 天开始, 抗张强度逐渐下降<sup>[26]</sup>. 抗张强度的变化与嫁接结合部的组织学、细胞学变化是相关的. 因而, 这个方法可以用来检测嫁接体的形成过程和预测嫁接亲和性.

### 3.2 电阻值测定法

Yang 等人<sup>[27]</sup>测定了亲和的番茄自体嫁接与不亲和的嫁接组合苋菜(*Amaranthus tricolor*)/番茄嫁接结合部的电阻值变化. 获得的结果表明, 嫁接结合部电阻的变化与嫁接面的发育过程相关. 嫁接后 2~3 d, 由于隔离层的形成和逐渐加厚, 电阻值持续升高. 在亲和性嫁接组合中, 嫁接后 3~8 d, 随着愈伤组织的产生、隔离层被突破和接穗与砧木细胞间次生胞间连丝的形成, 嫁接结合部的电阻值逐渐下降. 直至接穗和砧木间维管束桥形成后, 电阻值趋于平稳, 并恢复到嫁接前水平. 在非亲和性嫁接组合中, 由于隔离层持续存在, 接穗与砧木细胞间不形成次生胞间连丝, 双方维管束之间也没有维管束桥形成, 结合部电阻值不恢复, 呈现“居高不下”的现象. 通过电阻值的检测, 可以了解嫁接体的形成过程和预测嫁接的亲和性与非亲和性. 这个方法可在同一嫁接植株上连续测定, 因此较断裂法而言, 其优点是不损坏植株.

### 3.3 $L_0$ 值测定法

根的水导性(hydraulic conductance,  $L_0$ )反映了嫁接植株营养和水分的吸收状态,  $L_0$  值的测定也可用于检测嫁接植株的发育过程<sup>[28]</sup>. Fernández-García 等人<sup>[29]</sup>测定了番茄嫁接植株在嫁接后 4, 8, 12, 15 d 的  $L_0$  值.  $L_0$  值在嫁接后 4 d 的值为零, 其后呈直线增加, 在 12~15 d 达到恒定值. 使用组织学方法, 嫁接后 15 d, 在嫁接面处(graft union)观察到连接接穗和砧木的木质部导管.  $L_0$  值数值的变化体现了嫁接植株木质部的发育过程.

## 4 嫁接系统在植物生命科学研究中的应用

### 4.1 利用嫁接体研究植物体内物质运输

连通砧木和接穗的维管束桥的形成是亲和性嫁接组合发育的一个重要标志<sup>[2,15]</sup>. 成功的嫁接组合不仅表现在结构上, 更重要的是, 所产生的维管束桥能否执行生理功能, 进行接穗和砧木间的物质交换. 这种物质交流是双向的, 从接穗到砧木, 或者从砧木到接穗. 在嫁接研究中, 常用同化物和矿物质运输实验来检验嫁接面处维管组织的发育程度和输导功能.

Parkinson 等人<sup>[30]</sup>在离体茎段嫁接中, 用不同直径的氧化铁粒子测定嫁接面处木质部导管的输导功能, 发现在亲和的番茄和假酸浆自体嫁接中, 铁粒子可以随水分自砧木输导到接穗, 但在不亲和的番茄/假酸浆组合中, 在接穗中检测不到铁粒子, 说明嫁接的不亲和性和嫁接面处木质部的输导能力有关.

放射性同位素标记的同化物常用于检验嫁接双方韧皮部的连通情况. De Stigter<sup>[31]</sup>采用 <sup>14</sup>C 标记的 CO<sub>2</sub>, 研究同化物在 *Silene armeria* 自体嫁接中的输导, 发现嫁接后 7 d 起, 同化物可以自嫁接体一方输入另一方, 嫁接后 16 d 达到最高输导速率, 在嫁接体中, 同化物的输导也是受库源关系调节的. Rachow-Brandt 和 Kollmann<sup>[32]</sup>在亲和的番茄/马铃薯嫁接组合中发现, 在嫁接后前 5 d, 嫁接双方之间的韧皮部桥尚未建立, 仅有少量的同化物自接穗经薄壁细胞输入砧木. <sup>14</sup>C 标记的同化物通过韧皮部自接穗向砧木的输导在嫁接后 5~7 d 开始, 随着连接接穗和砧木的愈伤筛管数目的增加, 同化物输导速率随之增加, 说明同化物的转运经由愈伤韧皮部进行. 输导在嫁接后第 9 天达到高峰. 由于薯块作为库的强烈作用, 有超过 80% 的同化物自接穗输入砧木, 而在番茄自体嫁接中只有 60% 的同化物进入砧木. 在不完全亲和的 *Vicia faba/Helianthus annuus* 嫁接组合中, 尽管在接穗和砧木间建立了韧皮部桥, 但同化物从接穗向砧木中输导的量很少, 在嫁接后 11 d 仅有 2% 左右, 而同期在蚕豆和向日葵自体嫁接中则分别达到 40% 和 30%. 该组合同化物的最大转运速率明显低于其他组合. Kollmann 和 Glockmann<sup>[22]</sup>发现, 大量胼胝质堆积在蚕豆和向日葵种间筛板的筛孔中, 筛孔变得狭窄, 这可能在某种程度上与不亲和性有关. 在不亲和嫁接组合中, 同化物自接穗向砧木的输导往往受阻. Wang 和 Kollmann<sup>[20]</sup>用 <sup>14</sup>C 标记的蔗糖, 测定不

同离体茎段嫁接组合在不同发育时期的同化物输导情况. 在亲和性嫁接组合嫁接后 3 d, 只有很少量的标记蔗糖从接穗运到砧木, 这可能是通过扩散作用经次生胞间连丝运输的. 嫁接后 5~7 d, 由于韧皮部桥的形成, 同化物运输速率明显提高. 在不亲和嫁接组合中, 由于接穗和砧木间没有愈伤韧皮部桥形成, 所以同化物输导速率一直很低, 大部分被阻挡在嫁接面处.

6(5)CF (carboxyfluorescein)是一种常用的筛管输导的示踪剂, 其输导途径和同化物一样是从源到库. 在荧光显微镜下, 6(5)CF 发黄绿色荧光, 容易检测<sup>[33]</sup>. Schöning 和 Kollmann<sup>[34]</sup>采用 CF 输导方法, 探讨了番茄和向日葵自体离体茎段嫁接愈伤韧皮部的输导功能. CF 输导结果证明, CF 的输导在愈伤韧皮部中进行.

Tiedemann 和 Carstens-Behrens<sup>[35]</sup>采集 *Cucumis sativus* (接穗)/*Cucurbita ficifolia* 或 *Cucurbita maxima* (砧木)嫁接后 5~7 周的筛管液, 应用 SDS-PAGE 电泳方法检查筛管液的蛋白质带型, 同其自体嫁接筛管液(对照)的带型相比较, 发现自 *Cucumis* 接穗中采集的筛管液中至少有 4 条蛋白质条带是对照中没有的, 从其分子量上看, 应属于 *Cucurbita* 筛管蛋白类型, 包括 *Cucurbita* PP1 和 PP2 蛋白的亚单位. Golecki 等人<sup>[36]</sup>进一步的研究表明, *Cucumis sativus* 作为接穗, 嫁接到 *Cucurbita* 砧木 9~11 d 后, 至少 9 种筛管蛋白自砧木进入接穗, 说明嫁接后, 嫁接面处的韧皮部重建后, 接穗和砧木筛管内的蛋白质可以交流. 在 *Cucumis sativus* 接穗中检测不到 *Cucurbita* 砧木 PP1 和 PP2 蛋白的 mRNA, 说明转运以蛋白状态进行. 进入 *Cucumis sativus* 接穗的 *Cucurbita maxima* PP1 蛋白定位于外韧皮部的筛分子和伴胞中<sup>[37]</sup>.

## 4.2 利用嫁接体研究植物体内长距离信号传递

利用突变体、转基因植株及野生型植株互为接穗和砧木进行嫁接, 可以有目的地分析某个特定信号的双向长距离传递和作用规律. 嫁接系统是研究植物体内长距离信号传递的理想方法之一.

(i) RNA 通过韧皮部在植物体中的长距离转运. 近年来的研究发现, 某些 RNA 分子作为非细胞自生 (non-cell-autonomous) 的信号分子, 进行胞间或长距离的转运控制相关器官的发育或参与防御反应. 植物的胞间连丝提供了蛋白质或 RNA-蛋白质复合体的

胞间转运通道, 而维管系统特别是特化的韧皮部, 是非细胞自生蛋白质和 RNA-蛋白复合体的长距离转运途径<sup>[38]</sup>. Xoconostle-Cázares 等人<sup>[39]</sup>将 *Cucumis sativus* 嫁接到 *Cucurbita maxima* 上, 采集接穗中的筛管液, 分析其分子组成, 为砧木中 *CmPP16mRNA* 可以通过嫁接面转运至接穗提供了直接证据. Ruiz-Medrano 等人<sup>[40]</sup>利用另一个经典的异种嫁接组合西葫芦 (*Cucurbita maxima*)/黄瓜作为研究系统, 使用原位 RT-PCR 分析技术, 发现 *CmNACP* mRNA 等多种转录产物 (transcripts) 自西葫芦砧木经由韧皮部进入黄瓜接穗的分生组织. *CmNACP* 属于 NAC 基因家族, 此家族的一些成员参与顶端分生组织的发育. 该实验证实, 植物体中的特定 mRNA 向茎顶端转运. Kim 等人<sup>[41]</sup>研究了番茄鼠耳 (mouse ears, *Me*) 突变体, 该突变体是染色体重排导致的 *LeT6* 与 *PEP* 的融合. *PEP-LeT6* 融合的转录产物的过表达导致番茄叶表型的改变. 将正常叶形的茎上端作为接穗嫁接到 *Me* 突变体砧木上, 在接穗上新生的叶发育成鼠耳表型. 通过原位 PCR 技术在接穗茎顶端检测到 *Me* 的转录产物. 该发现证实, 在植物体内起调控作用的 mRNAs (regulatory mRNAs) 可以通过长距离运输控制植物的形态. 马铃薯 (*Solanum tuberosum* subsp. *Andigena*) 的 BEL1-like 转录因子 (transcription factors) *StBEL5* 通过作用于控制生长的靶基因, 参与马铃薯块茎的形成. 嫁接实验表明, *StBEL5* 的转录产物存在于韧皮部细胞中, 能通过嫁接面运输至薯块形成的部位——匍匐茎的顶端<sup>[42]</sup>. 上述研究表明, 特定的 mRNA 分子可以通过韧皮部在植物体内长距离运输, 选择性地转运至特定器官, 调控植物的生长和发育.

近年来发现, 小分子 RNA (small regulatory RNAs) 参与基因调控体系, 在植物中可以分为 MicroRNAs (miRNAs) 和由 21~24 个核苷酸长度的 (siRNA) 两类, 在功能方面参与基因表达的负调控<sup>[43]</sup>. Pant 等人<sup>[44]</sup>发现, 将过表达 miR399 的植株作为接穗嫁接到野生型的砧木上, miR399 可以自茎端移动到根部. 光受体 phytochrome B (PHYB) 和 BEL5 蛋白参与马铃薯块茎形成时的光诱导. miR172 参与这个发育过程. 在块茎形成的短日照诱导条件下, 马铃薯体内 *miR172* 水平高于长日照诱导植株, 促进匍匐茎上块茎的形成. 将 *35S::miR172* 接穗嫁接到野生型砧木 (*35S::miR172/WT*), 块茎的形成时间与 *35S::miR172/35S::miR172* 对照一样, 均较早, 说明 *miR172* 对块茎形成

的促进作用可以通过嫁接进行传递。反之,以野生型为接穗、35S::miR172为砧木的嫁接(WT/35S::miR172)中,其表型类似于WT/WT嫁接对照,揭示miR172在嫁接体砧木部分的超表达对块茎形成的促进作用不显著<sup>[45]</sup>。miRNAs除了参与植物体内大量的生理过程外,研究发现,生物和非生物逆境条件引起大量miRNAs的表达<sup>[46]</sup>。例如,拟南芥在磷缺乏的情况下,诱导miR156, miR399, miR778, miR827和miR2111的表达<sup>[47]</sup>。拟南芥在硫饱和的情况下,miR395在韧皮部内积累。在*hen1-1*突变体中,sRNA的甲基化(methylation)被阻碍,导致几种miRNAs的水平显著减少。Buhtz等人<sup>[48]</sup>将野生型拟南芥作为接穗与*hen1-1*突变体进行嫁接,让嫁接体生长在硫饱和条件下,发现miR395自野生型接穗通过韧皮部转运至*hen1-1*砧木。以*hen1-1*作为接穗、野生型作为砧木,则未能观察到miR395自砧木输入接穗。嫁接实验表明,miR395的转运是有方向性的,其转运方向为从茎端至根部。miR171只能在嫁接体野生型部位检测到,在嫁接体突变体部位则检测不到,说明其不能通过韧皮部转运。

(ii) 信号蛋白在植物体中的长距离转运。高等植物遭受昆虫攻击或食草动物噬食等机械损伤时,引起受伤的系统反应。特定的信号可以自受损部位传递至未受伤部位,引起受伤诱导的蛋白酶抑制剂(proteinase inhibitors, PIs)的表达。这种信号物质是由18个氨基酸组成的多肽,称为系统素(systemin)。系统素来自于其200个氨基酸组成的前体——前系统素(prosystemin)<sup>[49]</sup>。McGurl等人<sup>[50]</sup>发现,在番茄前系统素转基因植株的叶中持续表达蛋白酶抑制剂I和II,而在非转基因植株中,二者只在受伤的情形下表达。将非转基因植株作为接穗,嫁接到表达前系统素的转基因砧木上,引起接穗和砧木的叶中持续表

达蛋白酶抑制剂蛋白,该结果支持在植物伤反应中,系统素作为可移动受伤信号(mobile wound signal)的作用。

在高等植物中,从营养器官到花器官的转换依赖于植物内在和环境信号的共同作用。叶片是接受光周期变化的器官,经过光周期诱导后,发出成花素(florigen)的系统信号,其诱导茎顶端开花。对拟南芥的遗传研究表明,*FLOWERING LOCUS T (FT)*能够诱导长日照(long-day)和短日照(short-day)植物开花<sup>[51]</sup>。*Cucurbita moschata*属于短日照植物。种间嫁接实验表明,有效的开花信号可以从已经开花的*Cucurbita maxima*砧木传递到长日照条件下生长的*C. moschata*接穗中。在收集自*C. maxima*砧木的筛管液中,检测不到*FT*的转录产物,筛管液中却存在着Cm-FTL1和Cm-FTL2蛋白。该实验表明,筛管中的*FT*蛋白(而非*FT* mRNA)跨过嫁接面,进行了长距离转移<sup>[52]</sup>。拟南芥在长日照诱导条件下,*FLOWERING LOCUS (FT)*在子叶和叶表达,作用于茎顶端的靶基因,如*APETALA1 (API)*起始花的形态建成。嫁接实验表明,*FT*蛋白自接穗输入到砧木的茎顶端区域<sup>[53]</sup>。上述实验表明,*FT*蛋白(而非*FT* mRNA)是成花素的必要成分。

几千年来,嫁接技术为农业生产作出了重要贡献。作为一个独特的研究系统,嫁接技术已被广泛应用于植物生命科学研究之中,解决了诸如物质运输、信号传递方面的一些基本理论问题。一些新的理论问题的解决,需要今后选择适宜的突变体或转基因植株,建立不同的嫁接组合。但就嫁接技术本身而言,尚有亟待解决的问题:其一,如何克服嫁接的不亲和性,使嫁接技术在农业方面得到更广泛的应用;其二,单子叶植物很难进行嫁接,随着单子叶植物越来越多地作为模式植物,难以采用单子叶植物嫁接作为研究系统。

**致谢** 谨以此文深切怀念娄成后先生。本人于1992~1994年间在娄成后先生实验室从事博士后研究工作。先生高尚的品德、对科学深邃的理解给我留下了深刻的印象。先哲已逝,但先生的风范永驻人间。

## 参考文献

- 1 Yeoman M M, Brown R. Implications of the formation of the graft union for organisation in the intact plant. *Ann Bot*, 1976, 40: 1265-1276
- 2 Yeoman M M, Kilpatrick D C, Miedzybrodzka M B, et al. Cellular interactions during graft formation in plants: A recognition phenomenon? *Symp Soc Exp Biol*, 1978, 32: 139-160

- 3 Kollmann R, Yang S, Glockmann R. Studies on graft unions II. Continuous and half plasmodesmata in different regions of the graft interface. *Protoplasma*, 1985, 126: 19–29
- 4 Moore R, Walker D B. Studies of vegetative compatibility-incompatibility in higher plants. VI. Grafting of *Sedum* and *Solanum* callus tissue *in vitro*. *Protoplasma*, 1983, 115: 114–121
- 5 Moore R. Graft incompatibility between pear and quince: The influence of metabolites of *Cydonia oblonga* on suspension cultures of *Pyrus communis*. *Amer J Bot*, 1986, 73: 1–4
- 6 Gebhardt K, Goldbach H. Establishment, graft union characteristics and growth of *Prunus* micrografts. *Physiol Plant*, 1988, 72: 153–159
- 7 Russo P, Slack S A. Tissue culture methods for the screening and analysis of putative virus-resistant transgenic potato plants. *Phytopathology*, 1998, 88: 437–441
- 8 Parkinson M, Yeoman M M. Graft formation in cultured, explanted internodes. *New Phytol*, 1982, 91: 711–719
- 9 Wang Y Q. Histologische, Cytologische und Transport-physiologische Untersuchungen an *In-vitro*-Pflanzungen Unterschiedlicher Kompatibilität. Aachen: Shaker Press, 1992
- 10 Tsukaya N, Natio S, Rédei G P, et al. A new class of mutations in *Arabidopsis thaliana*, *acaulis1*, affecting the development of both inflorescences and leaves. *Development*, 1993, 118: 751–764
- 11 Turnbull C G N, Booker J P, Leyser H M O. Micrografting techniques for testing long-distance signaling in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2002, 32: 255–262
- 12 Rhee S Y, Somerville C R. Flat-surface grafting in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol Rep*, 1995, 13: 118–123
- 13 Moore R. Physiological aspects of graft formation. In: Moore R, ed. *Vegetative Compatibility Responses in Plants*. Waco, TX: Baylor University Press, 1983. 89–105
- 14 McCully M E. Structural aspects of graft development. In: Moore R, ed. *Vegetative Compatibility Responses in Plants*. Waco, TX: Baylor University Press, 1983. 71–78
- 15 Tiedemann R. Graft union development and symplastic phloem contact in the heterograft *Cucumis sativus* on *Cucurbita ficifolia*. *J Plant Physiol*, 1989, 134: 427–440
- 16 Moore R, Walker D B. Studies of vegetative compatibility-incompatibility in higher plants. I. A structural study of a compatible autograft in *Sedum telephoides* (Crassulaceae). *Am J Bot*, 1981, 68: 820–830
- 17 Stoddard F L, McCully M E. Histology of the development of the graft union in pea roots. *Can J Bot*, 1979, 57: 1486–1501
- 18 Kollmann R, Glockmann C. Studies on graft unions. I. Plasmodesmata between cells of plants belonging to different unrelated taxa. *Protoplasma*, 1985, 124: 224–235
- 19 Jeffree C E, Yeoman M M. Development of intercellular connection between opposing cells in a graft union. *New Phytol*, 1983, 93: 491–509
- 20 Wang Y, Kollmann R. Vascular differentiation in the graft union of *in-vitro* grafts with different compatibility—Structural and functional aspects. *J Plant Physiol*, 1996, 147: 521–533
- 21 Monzer J, Kollmann R. Vascular connections in the heterograft *Lophophora williamsii* Coult. on *Trichocereus spachianus* Rice. *J Plant Physiol*, 1986, 123: 359–372
- 22 Kollmann R, Glockmann C. Sieve elements of graft unions. In: Behnke H D, Sjolund R D, eds. *Sieve Elements. Comparative Structure, Induction and Development*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Press, 1990. 219–237
- 23 Deloire A, Héban C. Peroxidase activity and lignification at the interface between stock and scion of compatible and incompatible grafts of *Capsicum* on *Lycopersicum*. *Ann Bot*, 1982, 49: 887–891
- 24 Gur A, Samish R M, Lifshitz E. The role of the cyanogenic glycoside of the quince in the incompatibility between pear cultivars and quince rootstocks. *Hort Res*, 1968, 8: 113–134
- 25 Roberts J R, Brown R. The development of the graft union. *J Exp Bot*, 1961, 12: 294–302
- 26 Moore R. Studies of vegetative compatibility-incompatibility in higher plants. IV. The development of tensile strength in a compatible and incompatible graft. *Am J Bot*, 1983, 70: 226–231
- 27 Yang S, Xiang G, Zhang S, et al. Electrical resistance as a measure of graft union. *J Plant Physiol*, 1992, 141: 98–104
- 28 Turquois N, Malone M. Non-destructive assessment of developing hydraulic connections in the graft union of tomato. *J Exp Bot*, 1996, 47: 701–707
- 29 Fernández-García N, Carvajal M, Olmos E. Graft union formation in tomato plants: Peroxidase and catalase involvement. *Ann Bot*, 2004, 93: 53–60
- 30 Parkinson M, Jeffree C E, Yeoman M M. Incompatibility in cultured explantgrafts between members of the Solanaceae. *New Phytol*, 1987, 107: 489–498
- 31 De Stigter H C M. Parallelism between the transport of <sup>14</sup>C-photosynthates and the flowering response in grafted *Silene armeria* L. *Z Pflanzenphysiol*, 1966, 55: 11–19

- 32 Rachow-Brandt G, Kollmann R. Studies on graft unions IV. Assimilate transport and sieve element restitution in homo- and heterografts. *J Plant Physiol*, 1992, 139: 579–583
- 33 Grignon N, Touraine B, Durand M. 6(5)Carboxyfluorescein as a tracer of phloem sap translocation. *Am J Bot*, 1989, 76: 871–877
- 34 Schöning U, Kollmann R. The function of phloem connections in regenerating *in vitro*-grafts. *Bot Acta*, 1994, 108: 56–62
- 35 Tiedemann R, Carstens-Behrens U. Influence of grafting on the phloem protein patterns in *Cucurbitaceae* I. Additional phloem exudate in *Cucumis sativus* grafted on two *Cucurbita* species. *J Plant Physiol*, 1994, 143: 189–194
- 36 Golecki B, Schulz A, Carstens-Behrens U, et al. Evidence for graft transmission of structural phloem proteins or their precursors in heterografts of *Cucurbitaceae*. *Planta*, 1998, 206: 630–640
- 37 Golecki B, Schulz A, Thompson G A. Translocation of structural P proteins in the phloem. *Plant Cell*, 1999, 11: 127–140
- 38 Yoo B C, Kragler F, Varkonyi-Gasic E, et al. A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell*, 2004, 16: 1979–2000
- 39 Xoconostle-Cázares B, Xiang Y, Ruiz-Medrano R, et al. Plant paralog to viral movement protein potentiates transport of mRNA into the phloem. *Science*, 1999, 283: 94–98
- 40 Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cázares B, Lucas W J. Phloem long-distance transport of CmNACP mRNA: Implications for supracellular regulation in plants. *Development*, 1999, 126: 4405–4419
- 41 Kim M, Caino W, Kessler S, et al. Developmental changes due to long-distance movement of homeobox fusion transcript in tomato. *Science*, 2001, 293: 287–289
- 42 Banerjee A K, Lin T, Hannapel D J. Untranslated regions of a mobile transcript RNA metabolism. *Plant Physiol*, 2009, 151: 1831–1843
- 43 Brodersen P, Voinnet O. The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet*, 2006, 22: 268–280
- 44 Pant B D, Buhtz A, Kehr J, et al. MicroRNA 399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *Plant J*, 2008, 53: 731–738
- 45 Martin A, Adam H, Díaz-Mendoza M, et al. Graft-transmissible induction of potato tuberization by the microRNA *miR172*. *Development*, 2009, 136: 2873–2881
- 46 Sunkar R, Zhu J K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2004, 16: 2001–2019
- 47 Hsieh L C, Lin S I, Shih A C C, et al. Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in *Arabidopsis* by deep sequencing. *Plant Physiol*, 2009, 151: 2120–2132
- 48 Buhtz A, Pieritz J, Springer F, et al. Phloem small RNAs. Nutrient stress responses, and systemic mobility. *BMC Plant Biol*, 2010, 10: 64
- 49 Ryan C A, Pearce G. Systemin: A polypeptide signal for plant defensive genes. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1998, 14: 1–7
- 50 McGurl B, Orozco-Cardenas M, Pearce G, et al. Overexpression of the prosystemin gene in transgenic tomato plants generates a systemic signal that constitutively induces proteinase inhibitor synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 9799–9802
- 51 Mouradov A, Cremer F, Coupland G. Control of flowering time: Interaction pathways as a basis for diversity. *Plant Cell*, 2002, 14: S111–S130
- 52 Lin M K, Belanger H, Lee Y J, et al. Flowering locus T protein may act as the long-distance florigenic signal in the Cucurbits. *Plant Cell*, 2007, 19: 1488–1506
- 53 Noaguchi M, Abe M, Kimura T, et al. Long-distance, graft-transmissible action of *Arabidopsis* FLOWERING LOCUS T protein to promote flowering. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49: 1645–1658