

专题介绍 Special Topics

植物嫁接与体内的长距离信号转导

李博, 田晓莉*

中国农业大学作物化学控制研究中心, 农业部作物栽培与耕作学重点开放实验室, 植物生理学与生物化学国家重点实验室, 北京 100193

Plant Grafting Technique and Transduction of Long-Distance Signaling within Plant

LI Bo, TIAN Xiao-Li*

Center of Crop Chemical Control, Key Laboratory of Crop Cultivation and Farming System, State Key Laboratory of National Plant Physiology and Biochemistry, China Agricultural University, Beijing 100193, China

提要: 嫁接技术已广泛用于植物体内长距离信号转导的研究。本文对单接穗单砧木(普通嫁接)、双接穗单砧木(Y型嫁接)、单接穗双砧木(A型嫁接)和中间砧木嫁接技术所揭示的与根瘤产生、块茎形成、主茎伸长、主茎分枝、开花控制、气孔开关和叶片衰老等生理过程有关的长距离信号来源、转导方向和信号特性的研究进展作简要介绍。

关键词: 嫁接; 长距离信号转导

嫁接技术应用于园艺作物生产由来已久,在我国至迟到战国(公元前475~221年)后期即已出现,北魏贾思勰在《齐民要术》中明确描述了靠接法的技术要点,宋朝时期周师厚采用嫁接繁殖具有观赏价值的牡丹,元代更由政府组织编写《农桑摘要》详细介绍嫁接四法,明代的《本草纲目》和清朝的《花镜》等书中介绍了以嫁接方法保持物种优良性状的事例(林于倬等2006)。随着生产实践和科学研究的进步,嫁接技术的使用范围也不断拓展,目前生产中主要用来提高植物的抗逆性(刘勋甲和郑世发1995;于贤昌等1997)、抗病性(翁祖信1997)以及吸收矿质养分和水分的能力(Cohen和Naor 2002),另外还常用来控制植株大小(张晓丽2002)、繁殖无病毒良种(罗正荣等1996)、提高转基因植株的定植效果和保护种质资源(王伟等1999;王彦霞等2007)、实现早产丰产(徐森等1994)以及开展杂交制种(张天真1991;张新等2008)等。

近年来,嫁接技术还广泛用于植物根冠通讯和地上部不同器官间的长距离信号转导研究。一般认为,不同植物种类/品种互相嫁接后,接穗和砧木的发育分别由原来的基因型控制,从而可将植物体内长距离信号物质的转导与砧木和接穗的不同表型相联系。现在,采用嫁接技术研究根瘤和块茎的

形成、主茎的伸长和分枝、开花控制、气孔开关和叶片衰老等生长发育过程的长距离信号转导已取得不同程度的进展,本文对这方面的研究进行简要介绍。

1 嫁接方法

嫁接技术历史悠久,分类复杂多样(张宇和1990)。按嫁接时接穗是否带有自身的根,可分为“靠接”和“切接”两类。“靠接”是在嫁接过程中保留接穗的根系,使其在嫁接愈合期中发挥“护理”作用,至接穗和砧木完全结合后切断,主要用于一般方法不易嫁接成活的植物和一些特殊嫁接方法;“切接”则将接穗切离母株后进行嫁接。按接穗的取材部位划分,嫁接技术分为“枝接”和“芽接”。“枝接”以枝条作为接穗,主要在休眠期进行,常用的方法有切接法(操作简便、成活率高,适用于直径在1 cm以上的砧木),劈接法(适用于较粗砧木或大树高接),皮下接法和腹接法(适用于较粗、皮层较厚的砧木),合接法、舌接法和搭接法等(砧木和接穗粗细大致相仿);“芽接”则只用一个芽作接穗,成苗快,接合牢固。

收稿 2009-02-27 修定 2009-05-20

资助 国家自然科学基金(30571118)。

* 通讯作者(E-mail: xiaolitian@yahoo.com.cn; Tel: 010-62731305)

用于长距离信号转导研究的嫁接技术更多考虑的是信号产生部位和转导途径的多样性。常用的嫁接技术除了传统的单接穗单砧木嫁接(普通嫁接)外,还有双接穗单砧木嫁接(Y型嫁接)、单接穗双砧木嫁接(A型嫁接)和中间砧木嫁接(取植株的一段上胚轴,嫁接到另一株的上胚轴处,将其接穗和砧木分开),其中以普通嫁接法最为常用,Y型嫁接不仅适用于根-冠通讯研究,还可用于分析冠-冠间信号转导,A型嫁接既适用于根-冠长距离信号研究,也可用于根-根通讯研究,中间砧木嫁接则是判断信号物质来源的重要手段(以下如不特别指出,所用嫁接技术均指普通嫁接)。

值得注意的是,砧木木质部汁液的成分及其含量常随嫁接位点的不同而变化(Dodd 2005),这意味着木质部汁液中的信号物质和强度也有可能因此而改变。所以针对特定的研究目的,嫁接位点的确定首先应考虑其对信号转导的影响,其次应兼顾嫁接的易操作性和嫁接苗的成活率,一般在木质化程度过高的部位嫁接成活率较低,而在特别幼嫩的部位嫁接操作难度较大。

2 嫁接与植物一些生理过程中的长距离信号转导和信号物质

2.1 根瘤形成

Lee等(1991)曾将野生型大豆(*Glycine max*)‘Bragg’与耐硝酸盐突变体 *nts382* (根瘤多,地上部和根系较小)互相嫁接,发现突变体作为接穗可促进野生型根瘤数量的增加,而野生型作为接穗则会引起突变体的根瘤数目减少,说明接穗(即地上部)决定着根瘤的生长和活性。此后他们又将另一种大豆突变体 *SS-2* (甲磺酸乙酯诱变筛选)与野生型互相嫁接,得到了相同的结果,从而说明地上部是通过向下转导一种信号来控制根瘤发育的(Lee等1998)。Sheng和Harper(1997)将大豆野生型‘Williams 82’与突变体 *NOD 1-3* (多根瘤型)进行普通嫁接,得到的结果与Lee等(1991, 1998)完全一致。他们还设计了Y型嫁接试验,结果表明2个接穗均为‘Williams 82’时,砧木(无论是‘Williams 82’还是 *NOD 1-3*)的根瘤数量不变,而2个接穗均为 *NOD 1-3* 时,砧木的根瘤数量增加,2个接穗分别为‘Williams 82’和 *NOD 1-3* 时,砧木的根瘤数较2个接穗均为 *NOD 1-3* 的显著减少;Y型嫁接的‘Williams 82’接穗脱叶而 *NOD 1-3* 接穗保持完整时,以‘Williams 82’和 *NOD 1-3* 作为砧木的根瘤数量分别增加35%

和62%, *NOD 1-3* 脱叶而‘Williams 82’保持完整时,以‘Williams 82’和 *NOD 1-3* 作为砧木的根瘤数量分别减少39%和14%。这一Y型嫁接试验的结果为地上部决定根瘤发育的看法提供了新的证据,并提示地上部可发出刺激物和抑制物2种信号调控豆类植物根瘤的形成,其中叶片是产生信号的关键部位。

激素类物质是影响根瘤形成的因素之一,已知低浓度的吲哚-3-乙酸(IAA)和细胞分裂素(CTK)均能促进根系生长和根瘤形成(Ferguson和Mathesius 2003; Lorteau等2001)。有人对豌豆(*Pisum sativum*)多个突变体的根系及根瘤表型进行了分类,发现赤霉素(GAs)或油菜素内酯(BRs)缺失的突变体根瘤数目比野生型明显减少(Lorteau等2001)。向GAs缺失的豌豆突变体根系施以一定浓度的GA₃后,其根瘤数目可恢复至野生型植株的水平(Ferguson和Mathesius 2003),这暗示GAs可能直接参与根瘤形成和发育的调控。Lorteau等(2001)将豌豆的GAs缺失突变体 *lh-2* (少根瘤)与其野生型LH互相嫁接后,LH无论是作为接穗还是砧木,嫁接植株的根瘤数目均比 *lh-2* 自身嫁接的有显著提高,表明GAs是促进豌豆根瘤形成和发育的直接信号,同时也证明该信号既可通过地上部产生向下传递,也可直接在根中产生并调控根瘤的形成和发育,这与大豆中的研究结果(Lee等1991, 1998; Sheng和Harper 1997)不同。Lorteau等(2001)还将豌豆的BRs缺失突变体 *lkb* (少根瘤)与其野生型LKB互相嫁接,发现以突变体 *lkb* 为接穗时,其砧木的根瘤数目均少于以野生型LKB为接穗的嫁接组合,即地上部控制着根瘤的数目,这与大豆中的研究结果(Lee等1991, 1998; Sheng和Harper 1997)一致。由于已有的研究证明BRs不可通过嫁接转导(Symons和Reid 2004),因此BRs也不会是调控根瘤形成和发育的直接信号,而很可能是通过影响地上部的某些生理生化反应来间接调控根瘤形成和发育的。Lorteau等(2001)采用不同突变体的结果存有差异,暗示调控豌豆根瘤发育的基因、信号及其转导途径具有多样性。

2.2 块茎形成

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)是短日照植物,一般情况下叶片内光敏色素接受到光周期信号后,将其向下转导调控块茎的形成(Smith和Whitelam 1990)。

早在上个世纪50年代, Gregory (1956)和

Chapman (1958)就分别将经过短日照处理的马铃薯作为接穗嫁接到经长日照处理的砧木上,发现即使将嫁接植株放置于非诱导的长日照条件下,砧木也会形成块茎。他们据此认为,叶片响应光周期的刺激后产生某种可以通过嫁接传递的诱导信号,继而运输到地下匍匐茎顶端诱导块茎的形成。此后,Chailakhyan等(1981)成功将几个烟草品种(分别需要不同的光周期诱导开花)嫁接到马铃薯(*spp. andigena*)砧木上,发现已通过开花诱导的烟草接穗,无论其是长日、短日或中间型,均可诱导马铃薯砧木形成块茎,而未通过开花诱导的烟草接穗则无此作用。这一结果表明,烟草中的开花刺激物与马铃薯块茎形成的刺激物相似或完全一样,这些刺激物在长日、短日和日中性品种中是相同的。

迄今,这种由叶片产生的可转导的刺激物的化学性质还不清楚,但植物激素可能是其中的一类。据报道,长日照对马铃薯块茎形成的抑制与赤霉素有关(Xu等1998)。另外,马铃薯(*spp. andigena*)矮化突变体体内的GAs合成途径部分受阻,相应地该突变体无论在长日照还是在短日照条件下均可形成块茎(van den Berg等1995)。可见,低水平的GAs

是块茎形成所必需的(Ewing和Struik1992),也就是说GAs可能是负调控马铃薯块茎形成的信号物质之一。这些结果说明用植物激素突变体开展嫁接试验有助于揭示块茎形成过程中的激素信号调控机制,但马铃薯的激素突变体材料十分稀少,因此Peres等(2005)将番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.) (与马铃薯同属茄科)的各种植物激素突变体 *gib-1* (GAs缺失)、*dwarf* (BRs缺失)、*dgt* (IAA不敏感)、*not* [脱落酸(ABA)缺失]和*pro* (GAs高度敏感)嫁接到马铃薯品种‘Monalisa’的砧木上(嫁接位点在上胚轴处),发现马铃薯自身嫁接时块茎的数目和干物质重最高,而番茄的各种突变体嫁接到马铃薯上其光合产物主要分配给地上部,这对块茎形成不利(图1)。但是各突变体诱导块茎形成的能力仍然存在差异,其中*dwarf* (BRs缺失)和*gib-1* (GAs缺失)突变体作为接穗与马铃薯自身嫁接的结果最为接近,这表明GAs是负调控马铃薯块茎形成的信号物质,而BRs可能是调控马铃薯块茎形成的另一种信号物质。由于其他突变体作为接穗后产生的块茎数目及干物质重与马铃薯自身嫁接的相去甚远,因此无法判断与其相应的植物激素的作用。

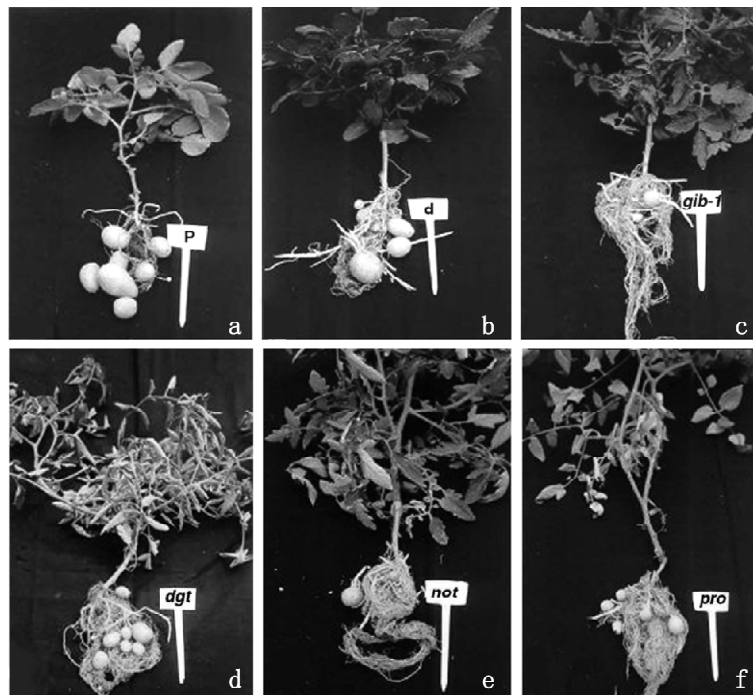


图1 番茄各种突变体嫁接到马铃薯品种‘Monalisa’的砧木上对其块茎形成的影响(Peres等2005)。

a: 马铃薯自身嫁接; b-f: 接穗依次为番茄突变体 *dwarf* (BRs缺失)、*gib-1* (GAs缺失)、*dgt* (IAA不敏感)、*not* [脱落酸(ABA)缺失]和*pro* (GAs高度敏感)。

2.3 主茎伸长 众所周知, GAs能促进叶片伸展和主茎伸长(Reid等1983), 它在植物体内的运输没有极性, 可以通过木质部向上运输也可以由韧皮部向下转导(Jackson 1993)。豌豆 *na* 突变体的 GAs 生物合成在早期环节(从内根 - 贝壳杉烯酸转化为 GA_{12} 醛)受阻(Ingram 和 Reid 1987), 而 *le* 突变体 GA 生物合成的最后步骤(从无活性的 GA_{20} 转化为有活性的 GA_1) 受到破坏(Ingram 等 1984)。Proebsting 等 (1992) 将豌豆突变体 *na* 嫁接到野生型(*Na*) 砧木上后, 发现 *nana* 接穗的节间长度和 GA_1 浓度均恢复正常。然而, 突变体 *le* 嫁接到野生型(*Le*) 砧木上后其主茎不能恢复生长(Reid 等 1983)。究其原因, 可能是 GA_1 在豌豆植株中自下而上的移动性很差, 而它的直接前体 GA_{20} 才是 GAs 运输的主要成员(Proebsting 等 1992), 这样突变体 *le* 嫁接到野生型(*Le*) 砧木上时, 既得不到野生型砧木向上提供的足够的 GA_1 , 自身也无法将 GA_{20} 转化为 GA_1 , 因此其茎节的伸长生长得不到恢复。最近, Dalmadi 等 (2008) 在苜蓿(*Medicago sativa*) 中鉴定出一个与矮化有关的基因——*MsDWF1*, 此基因与豌豆的 *Le* 基因同源, 编码 GAs 生物合成过程中的 3- β - 羟基化酶, 催化 GA_{20} 转化为 GA_1 。与豌豆 *le* 突变体相同, 苜蓿矮化突变体(*MsDwf1*) 的表型也不能被野生型砧木所恢复。

2.4 主茎分枝 激素调控的观点认为, 植物的分枝受主茎合成的 IAA 与根系产生的 CTK 之间的比例调控(Sachs 和 Thimann 1967)。然而, 许多用与 CTK 或 IAA 相关的转基因材料的实验证明, CTK/IAA 并不是调控分枝的唯一因素(Romano 等 1991; Medford 等 1989)。

突变体和嫁接技术已成为研究主茎分枝机制的主要手段, 已有的研究表明, 不同植物种类的分枝信号及其转导途径可能不同, 而且同一种类的植物中也可能存在多种分枝信号及其转导途径。人们从番茄、豌豆和拟南芥中已筛选出大量的分枝突变体(Leyser 等 1993; Napoli 1996; Beveridge 等 1996)。番茄多分枝突变体(*bu*、*ls* 和 *to-2*) 与野生型互相嫁接的试验表明, 根系不是控制分枝发育的关键部位, 但其对已发育的分枝具有促进生长的作用(Schmitz 和 Theres 1999)。Napoli (1996) 将矮牵牛野生型的一段上胚轴作为中间砧木嫁接到多分枝突变体 *dad1* 的接穗和砧木中间, 发现突变体的多分

枝表型可完全恢复, 表明上胚轴可能会产生负调控分枝发育的信号, 或促使诱导分枝发育的信号钝化。*Rms* 基因是豌豆中功能专一的抑制分枝基因(Arumingtyas 等 1992), 其隐性突变体均为多分枝表型。已有的研究表明, *Rms* 系列基因的作用位点不同, 如 *rms-1*、*rms-2* 和 *rms-5* 突变体嫁接到野生型砧木上时, 其多分枝特性被抑制, 而它们作为砧木时, 野生型接穗的表型没有变化, 说明 *Rms-1*、*Rms-2* 和 *Rms-5* 基因在地上部和根系均起作用(Beveridge 等 1994, 1997a; Beveridge 2000); 突变体 *rms-3* 和 *rms-4* 嫁接到野生型砧木上, 其接穗维持原有的多分枝特性, 而以突变体为砧木时, 野生型接穗的分枝不受影响, 说明 *Rms-3* 和 *Rms-4* 基因仅在地上部起作用(Beveridge 和 Murfer 1996; Beveridge 等 1997a)。由此可知, 豌豆有多个基因参与分枝控制, 而且这些基因表达所产生的分枝信号及其转导途径可能是多样的。

豌豆多分枝突变体 *rms-3* 和 *rms-4* 木质部汁液中的玉米素核苷(ZR, 一种CTK) 含量均仅为野生型的 1/40 (Beveridge 等 1994, 1997a)。将 *rms-4* 与野生型植株互相嫁接, 与二者作为接穗均维持其原有的分枝特性(突变体多分枝, 野生型的不分枝) 一致的是, 野生型的作为接穗可促使 *rms-4* 根系产生的 ZR 水平升高至野生型自身嫁接的水平, *rms-4* 作为接穗则可促使野生型砧木的 ZR 含量降低到突变体自身嫁接的水平; *rms-3* 与野生型互相嫁接的结果与之相似(Beveridge 等 1997a)。这些结果一方面表明, 仅在豌豆地上部起作用的 *Rms-3* 和 *Rms-4* 基因控制着木质部汁液中 CTK 的水平, 另一方面则说明突变体的分枝数增加似乎与低浓度 CTK 有关。已有实验证明, 外施 CTK 能促进植物分枝(Wickson 和 Thimann 1958), 而且过量生成 CTK 的转基因植物也表现出多分枝的特性(Medford 等 1989), 因此木质部汁液中的 CTK 可能不是调控豌豆分枝的直接信号物质, 其浓度的高低可能是地上部在 *Rms-3* 和 *Rms-4* 基因的作用下向下传递某种信号调控根系 CTK 合成能力的结果(Beveridge 等 1997b)。

传统的观点认为, 高浓度的 IAA 抑制分枝, 低浓度的 IAA 促进侧枝发育(Sachs 和 Thimann 1967), 但 Prasad 等(1993) 认为, 较低水平的 IAA 与侧芽生长不存在必然的联系, 豌豆系列多分枝突变体的结果已证明了这一点。例如, *rms-1*、*rms-2*、*rms-3*

和 *rms-4* 均不缺少 IAA, 且前 3 个突变体的 IAA 含量甚至显著高于野生型(Beveridge 等 1994, 1996, 1997b)。Beveridge 等(1994)曾假设, 突变体主茎 IAA 含量的升高可能是对分枝数增加的反应, 但 *rms-2* 与野生型的嫁接试验否定了这一假设, 如 *rms-2* 嫁接到野生型砧木上时, 分枝数较其自身嫁接显著减少, 但 IAA 的浓度仍然高于野生型(Beveridge 等 1994)。

豌豆 *rms-1* 多分枝突变体的 CTK 浓度较低而 IAA 的浓度较高, 与高浓度 CTK 和 / 或低浓度 IAA 促进分枝的传统观点完全相反。因此, Beveridge 等(1997b)推测, *Rms-1* 基因控制某种新型的可通过嫁接转导的信号(非 CTK 和 IAA)来调控豌豆的分枝。在此基础上, Foo 等(2001)采用中间砧木嫁接和 Y 型嫁接技术进一步研究这一信号的特点。他们的结果显示: 在 Y 型嫁接试验中, 将 *rms-1* 和 WT 共同嫁接到 WT 砧木上, 二者均不产生分枝, 而嫁接到 *rms-1* 砧木上时, 突变体和野生型接穗分别维持自身多分枝和不分枝的表型, 由于砧木和接穗都含有部分上胚轴, 因此该信号可能在上胚轴处产生, 而在地上部只能向顶运输但不能在不同接穗间进行横向传递; 在中间砧木嫁接试验中, 长度仅 5~10 mm 的野生型上胚轴可促使 *rms-1*/WT/*rms-1*(接穗/中间砧木 / 砧木)嫁接组合的表型恢复到野生型不分枝的状态, 在 *rms-1*/*rms-1*/WT 组合中, 尽管存在连续的突变体接穗 - 中间砧木系统, 其多分枝表型同样受野生型砧木(含部分上胚轴)抑制, 这进一步为上胚轴可能是信号产生部位提供了证据。由于在根茎交界处(砧木不含上胚轴)嫁接的成活率太低, 因此 Foo 等(2001)无法证明根系是否也可产生分枝信号。

拟南芥的生命周期短、突变体较多, 是研究基因功能和信号转导的模式作物, 但其植株过于细小, 嫁接操作难度很大。Rhee 等(1995)和 Tsukaya 等(1993)曾成功嫁接苗龄 30 d 的拟南芥植株用于研究开花, 但由于实验时的主茎已经产生分枝, 因此不适用于分枝机制的研究。Turnbull 等(2002)在显微镜下将拟南芥幼苗于下胚轴处进行普通嫁接和 Y 型嫁接后发现, 在普通嫁接试验中, 以野生型作为砧木能抑制多分枝突变体 *max1* 的多分枝特性; 在 Y 型嫁接试验中, 以突变体 *max1* 作为砧木时, *max1* 和野生型接穗均维持自身原有的分枝特性, 而以野生型植株为砧木时, 接穗 *max1* 的分枝则受抑制。

拟南芥中的这些结果与豌豆中以突变体 *rms-1* 为材料进行研究的结果(Beveridge 2000; Beveridge 等 2000; Foo 等 2001)一致, 从而验证了植物的分枝信号可以从上胚轴以下向地上部传送, 但不能在不同接穗间横向运输。此后用拟南芥系列多分枝突变体 *max1*、*max2*、*max3* 和 *max4* 进行的双突变和互相嫁接的试验表明, MAX1、MAX3 和 MAX4 对这种分枝信号(可能是一种新的激素类物质)的产生是必需的, 而 MAX2 在该信号的感知过程中起作用(Booker 等 2005)。

2.5 开花诱导 从营养生长到生殖生长的转变是植株发育的关键时期之一。一般认为, 叶片感知光周期的变化并产生信号, 信号通过韧皮部运输至茎尖的分生组织促进植物开花(Zeevaart 1976)。迄今已发现 2 种从叶片向主茎传递的长距离信号, 分别为开花促进物和开花抑制物(Beveridge 和 Murfet 1996)。Murfet 和 Reid (1993)从豌豆中鉴定出 12 个与开花相关的基因, 其中 *Sn*、*Dne* 和 *Ppd* 基因与光周期的诱导相关, 开花抑制物就是这 3 个基因互作的产物。有关开花促进物的调控基因及信号特性尚不明确, 甚至有的人对开花促进物质是否存在还持怀疑态度(Colasanti 和 Sundaresan 2000)。

豌豆不同基因型的光周期特点和开花时间均存在差异。K218 (*dne*)和 L59 (*sn*)品系为日中性类型, 开花早; L151 则具有长日照习性, 开花晚(Beveridge 和 Murfet 1996)。L151 品系的开花特点与 *Gi* 基因有关, 该基因也是豌豆中 12 个与开花相关的基因之一, 其隐性突变体 *gigas* (L158)对长日照和春化作用更为敏感, 在各种条件下的开花时间均比野生型 L151 延迟(Beveridge 和 Murfet 1996)。已有的研究表明, 豌豆带有子叶的砧木既可合成开花抑制物(Murfet 和 Reid 1973; King 和 Murfet 1985), 也可通过嫁接向上传递开花促进物(Murfet 1971)。Beveridge 和 Murfet (1996)将 K218 分别嫁接到 L151 和 L158 砧木上(嫁接位点在上胚轴处, 砧木保留子叶), 结果其开花时间推迟, 但不同砧木之间并无差异, 说明突变体 *gigas* (L158)合成开花抑制物的能力与其野生型是相似的。他们还将 L151 和 L158 于上胚轴处分别嫁接到 L59 的砧木上(保留子叶), 结果二者的开花时间均明显提前, 且开花时间相同, 这表明突变体 *gigas* 对来自 L59 砧木的开花促进物的响应与其野生型(L151)也无差异。因此, L158 的

开花时间晚于L151的可能机制在于前者缺少开花促进物,为了验证这个推论,他们又将突变体*gigas*与野生型L151在上胚轴处进行普通嫁接和Y型嫁接,结果在24 h光周期下(8 h日光+16 h弱光,此时突变体一般不开花),野生型的接穗均可正常开花,而突变体的接穗只有在野生型存在的情况下(无论是作为接穗还是作为砧木)才能开花;在9 h短日照条件下,野生型接穗全部正常开花,而突变体的接穗只有在野生型的砧木和接穗同时存在的Y型嫁接组合中才能被诱导开花。这些结果为豌豆突变体*gigas* (L158)缺少开花促进物的看法提供了直接证据,也证明与开花有关的*Gi*基因的作用在于合成开花促进物质或其前体。另外,由于在24 h光周期下的野生型植株(L151)仅作为接穗即可诱导突变体接穗(Y型嫁接)开花,说明*Gi*基因产生的开花促进物质在叶片中合成,并可通过嫁接位点(上胚轴)传递至突变体接穗;但在9 h光周期条件下,只有野生型的砧木和接穗同时存在才能诱导突变体接穗开花(Y型嫁接),表明带有子叶的砧木也可能产生开花促进物质,或通过某种机制促进地上部开花促进物质的产生,或促进开花促进物质由野生型的接穗通过嫁接位点转移至突变体的接穗。

在许多物种中,GA均有促进开花的作用(Pharis和King 1985)。但给上述豌豆突变体L158外施GA₃,并不能促进开花(Beveridge和Murfet 1996),Reid和Murfet (1977)也曾得到相似的结果,因此认为GAs可能不是豌豆开花的促进物质。

拟南芥是兼性长日照植物,长日照条件可加速其开花。*CONSTANS* (简称*CO*)是拟南芥中从光周期感应到成花转变的调节基因,该基因编码某种转录因子促进植株提前开花(Ayre和Turgeon 2004),其突变体*co-1*在长日照条件下开花延迟(Putterill等1995)。*GAS*启动子是从甜瓜中分离出来的、仅在成熟叶片的微脉伴胞中表达的特异启动子(Haritos等2000),因此是研究由叶片产生、并经韧皮部运输的信号物质的有效工具。Ayre和Turgeon (2004)向突变体*co-1*中转入融合基因*GAS:CO*后,结果转基因植株在非诱导的短日照条件下比野生型提早开花,他们进一步将突变体*co-1*比较幼嫩的茎顶端组织嫁接到转*GAS:CO*基因植株的砧木(保留部分成熟叶片)上,结果在10 h的短日照条件下突变体接穗的开花时间比其自身嫁接的提前

24 d,暗示在砧木成熟叶片的微脉伴胞中的*CO*基因产生了开花促进信号,并经过韧皮部长距离转导至突变体茎顶端诱导其提前开花,但该促进物质的化学组成和特性尚不清楚。

2.6 气孔调节 分根试验(Masia等1994)证明,叶片气孔的关闭与叶片的水势无关,而可能是由根系产生的一种化学信号调节的。一些研究表明,该信号物质可能是ABA (Correia和Pereira 1995),因为植物受到干旱胁迫时,根系产生并向上运输大量的ABA以调节气孔的关闭,从而减少蒸腾、降低胁迫带来的伤害。但另一些研究(Jia和Zhang 1997)则得出相反的结论,认为根系产生的ABA水平与叶片气孔行为无关。Fambrini等(1995)和Jones等(1987)用普通嫁接技术分别将ABA缺失的向日葵(*Helianthus annuus*)和番茄突变体与其野生型植株互相嫁接,结果显示,野生型作为接穗嫁接到突变体砧木上时,其气孔导度与野生型自身嫁接的没有差异,说明来源于根系的ABA不是直接的信号物质。Holbrook等(2002)以番茄ABA缺失突变体(*flacca*和*sitiens*)及其野生型植株WT为材料进行相似的嫁接,结果显示,不论砧木为何种基因型,以突变体为接穗的叶片上的气孔导度都是最高的,说明气孔行为受地上部调节,而与根系合成ABA的能力无关。Holbrook等(2002)还设计了A型嫁接分根试验,即将野生型同时嫁接到另一株野生型和ABA缺失突变体的砧木上,成活后对2个砧木轮流进行水分胁迫,结果是在任一砧木遭受干旱胁迫时,接穗的叶片气孔导度与正常浇水的相比均下降20%,亦即叶片气孔开闭与根系产生的ABA没有直接联系。无论砧木能否产生ABA,WT/*sitiens*(接穗/砧木)和WT/WT嫁接组合叶片中的ABA水平在干旱胁迫时都有升高(Holbrook等2002),说明气孔行为可能受叶片自身产生和代谢的ABA能力的影响。

2.7 叶片衰老 植物衰老通常是指叶片衰老,一直是植物生理学的研究热点。虽然人们早已对植物衰老的遗传控制、生理生化和超微结构等进行了大量的研究,但对诱导衰老或参与衰老调控的长距离信号仍然不十分清楚。Ookawa等(1999, 2001, 2005)将易衰老的大豆品种‘Enrei’ (E)和不易衰老的品种‘Tachinagaha’ (T)分别进行自身嫁接和互相嫁接,经过全生育期的观察和测定,发现在成熟早期

以T为砧木的嫁接组合,其衰老速度明显慢于以E为砧木的嫁接组合,而在成熟后期,无论砧木为何种基因型,都是以T为接穗的嫁接植株比以E为接穗的植株衰老缓慢。他们据此认为,根系基因型在成熟早期影响叶片衰老,而地上部是成熟后期调控衰老的主要部位。有报道指出,衰老的快慢与“库”容量的大小有关(Crafs-Brandner和Egli 1987),但E和T的荚果数并没有差异,因此排除了由库容不同导致它们衰老性状不同的可能性,这提示地上部调控衰老的机制还需进一步研究。Ookawa等(2001)还指出,全生育期期间叶片衰老性状的差异可能与伤流液中的CTK和氮素水平相关,但遗憾的是在他们的文章中没有列出数据。

植物激素CTK对大多数物种及同一物种的不同器官具有广泛的延缓衰老的作用。传统的观点认为,根系产生的CTK经木质部汁液向上运输来调控地上部衰老(Nooden和Letham 1993)。由于植物叶片也具有合成少量CTK的能力(Singh等1992),因此叶片中CTK的来源也成为衰老调控的研究热点之一。导入*ipt*(CTK合成限速酶)基因的各种植物中,木质部汁液中的CTK含量均大幅度提高,衰老也同时得到明显延缓(Gan和Amasino 1995; McCabe等2001),这些结果为根系是控制衰老的关键部位的观点提供了证据。但Faiss等(1997)将转*ipt*基因番茄与野生型互相嫁接后发现,转基因植株的砧木并不能延缓野生型接穗的衰老,其叶片中的CTK含量与自身嫁接的相比变化也不大;而以转*ipt*基因番茄作为接穗时,不管砧木是哪种基因型,衰老都能得到延缓,表明地上部才是决定衰老的关键部位。Singh等(1992)曾在番茄中采用木质部饲喂外源CTK的技术来研究叶片衰老问题,检测的结果表明,幼叶和老叶中的标记CTK水平并没有差异,但幼嫩叶片具有自身合成CTK的能力,因此他们推测,造成衰老的原因可能是由于叶片合成CTK的能力变化所致,而并非是根系产生的CTK的减少。这也可能是转*ipt*基因的番茄作为接穗时、其叶片衰老得以延缓而与砧木无关(Faiss等1997)的原因。

我国转基因抗虫棉的早衰问题比较突出,严重影响了棉花的产量和纤维品质。Dong等(2008)以2个衰老性状不同的棉花(*Gossypium hirsutum* L.)品种进行自身嫁接和互相嫁接后的结果显示,易衰老品种嫁接到不易衰老品种的砧木上,其倒四叶(功

能叶)和伤流液中的CTK水平均显著高于自身嫁接的,ABA水平则相反,与之相对应的是衰老性状明显延缓;而将不易衰老的品种嫁接到易衰老品种的砧木上后,其叶片和伤流液中的CTK水平比自身嫁接的显著低,ABA水平则明显升高,同时衰老进程加快。他们据此提出棉花根系可能通过调节CTK和ABA的水平来控制地上部的衰老。我们近年来也在棉花中开展了类似的工作,将易衰老的品种‘中棉所41’和不易衰老的品种‘鲁棉研22’进行普通嫁接、Y型嫁接和A型嫁接,苗期的室内营养液培养试验和田间试验的结果均表明地上部是控制棉花衰老的关键部位,且其机制至少有部分与叶片反馈调节根系合成CTK的能力有关(未发表资料)。这些结果与Dong等(2008)的相反,原因可能与采用的棉花品种不同有关。

3 结束语

嫁接技术已应用了数千年,为农业生产和植物生理基础研究做出了很大贡献。就植物体内的长距离信号转导而言,嫁接技术为确定信号的产生部位和转导途径提供了有效的手段。在该领域的未来研究中,一方面是依赖于嫁接技术的进步,如针对难嫁接材料(如拟南芥等植株较小的物种)和难嫁接位点(如木质化程度较高的根茎交界处)进一步开发适用的嫁接技术、提高嫁接成活率,另一方面可通过选择合适的研究材料(如突变体和转有外源基因的植株)进一步了解长距离信号物质的种类和性质。

参考文献

- 林于健,郑甬龙,黄坚钦(2006). 中国古代的嫁接技艺. 浙江林业学报, 23 (3): 342~346
- 刘勋甲,郑世发(1995). 丝瓜作砧木嫁接西瓜的形态学及抗涝性初步研究. 华中农业大学学报, 14 (3): 267~271
- 罗正荣,胡春根,蔡礼鸿(1996). 嫁接及其在植物繁殖和改良中的作用. 植物生理学通讯, 32 (1): 59~63
- 王伟,陈宛新,朱祯,徐鸿林,高越峰,吴茜,朱玉,郭仲琛,李向辉(1999). 转基因棉花高效定植方法的研究. 植物学报, 41(10): 1072~1075
- 王彦霞,王省芬,马峙英,张桂寅,赵家发(2007). 棉花高效嫁接新方法及其应用. 中国农业科学, 40 (2): 264~270
- 翁祖信(1997). 嫁接对茄子黄萎病抗性及早产量的影响. 中国蔬菜, (2): 34~35
- 徐森,王世远,刘佃池(1994). 山楂嫁接苹果试验. 林业科技通讯, (2): 34
- 于贤昌,邢禹贤,马红,魏珉(1997). 黄瓜嫁接苗抗冷特性研究. 园艺学报, 24 (4): 348~352

- 张天真(1991). 植物核雄性不育系利用途径的研究和探索. 种子, (5): 38~42
- 张晓丽(2002). 嫁接技术与植物改良. 邢台职业技术学院学报, 19 (2): 71
- 张新, 秦志刚, 菲力申, 娄喜艳(2008). 嫁接在植物育种中的应用研究进展. 安徽农业科学, 36 (15): 6289~6291
- 张宇和(1990). 嫁接. 见: 中国大百科全书出版社编辑部编. 中国大百科全书: 农业I. 北京: 中国大百科全书出版社, 453~456
- Arumingtyas EL, Floyd RS, Gregory MJ, Murfet IC (1992). Branching in *Pisum*: inheritance and allelism tests with 17 *ramosus* mutants. *Pisum Genet*, 24: 17~31
- Ayre BG, Turgeon R (2004). Graft transmission of a floral stimulant derived from *CONSTANS*. *Plant Physiol*, 135 (4): 2271~2278
- Beveridge CA (2000). Long-distance signalling and a mutational analysis of branching in pea. *Plant Growth Regul*, 32 (2-3): 193~203
- Beveridge CA, Ross JJ, Murfet IC (1994). Branching mutant *rms-2* in *Pisum sativum*. Grafting studies and endogenous indole-3-acetic acid levels. *Plant Physiol*, 104 (3): 953~959
- Beveridge CA, Ross JJ, Murfet IC (1996). Branching in pea: Action of genes *Rms3* and *Rms4*. *Plant Physiol*, 110 (3): 859~865
- Beveridge CA, Murfet IC (1996). The *gigas* mutant in pea is deficient in the floral stimulus. *Physiol Plant*, 96 (4): 637~645
- Beveridge CA, Murfet IC, Kerhoas L, Sotta B, Miginiac E, Rameau C (1997a). The shoot controls zeatin riboside export from pea roots. Evidence from the branching mutant *rms4*. *Plant J*, 11 (2): 339~345
- Beveridge CA, Symons GM, Murfet IC, Ross JJ, Rameau C (1997b). The *rms1* mutant of pea has elevated indole-3-acetic acid levels and reduced root-sap zeatin riboside content but increased branching controlled by graft-transmissible signal (s). *Plant Physiol*, 115 (3): 1251~1258
- Beveridge CA, Symons GM, Turnbull CG (2000). Auxin inhibition of Decapitation-Induced Branching is Dependent on Graft-Transmissible Signals Regulated by Genes *Rms1* and *Rms2*. *Plant Physiol*, 123 (2): 689~697
- Booker J, Sieberer T, Wright W, Williamson L, Willett B, Stirnberg P, Turnbull C, Srinivasan M, Goddard P, Leyser O (2005). *MAX1* encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of *MAX3/4* to produce a carotenoid-derived branch inhibiting hormone. *Dev Cell*, 8 (3): 443~449
- Chailakhyan MK, Ianina LI, Devedzhian AG, Lotova GN (1981). Photoperiodism and tuber formation in tobacco graftings on the potato. *Doklady Akad Nauk SSSR*, 257 (5): 1276~1280
- Chapman HW (1958). Tuberization in the potato plant. *Physiol Plant*, 11 (2): 215~224
- Cohen S, Naor A (2002). The effect of three rootstocks on water use, canopy conductance and hydraulic parameters of apple trees and predicting canopy from hydraulic conductance. *Plant Cell Environ*, 25 (1): 17~28
- Colasanti J, Sundaresan V (2000). 'Florigen' enters the molecular age: long-distance signals that cause plants to flower. *Trends Biochem Sci*, 25 (5): 236~240
- Correia MJ, Pereira JS (1995). The control of leaf conductance of white lupin by xylem ABA concentration decreases with the severity of water deficits. *J Exp Bot*, 46 (1): 101~110
- Crafs-Brandner SJ, Egli DB (1987). Sink removal and leaf senescence in soybean. *Plant Physiol*, 85 (3): 662~666
- Dalmadi Á, Kaló P, Jakab J, Saskői A, Petrovics T, Deák G, Kiss GB (2008). Dwarf plants of diploid *Medicago sativa* carry a mutation in the gibberellin 3- β -hydroxylase gene. *Plant Cell Rep*, 27 (8): 1271~1279
- Dodd IC (2005). Root-to-shoot signalling: Assessing the roles of 'up' in the up and down world of long-distance signalling *in planta*. *Plant Soil*, 274 (1-2): 251~270
- Dong H, Niu Y, Li W, Zhang D (2008). Effects of cotton rootstock on endogenous cytokinins and abscisic acid in xylem sap and leaves in relation to leaf senescence. *J Exp Bot*, 59 (6): 1295~1304
- Ewing EE, Struik PC (1992). Tuber formation in potato: induction, initiation, and growth. *Hortic Rev*, 14: 89~198
- Fambrini M, Vernieri P, Toncelli ML, Rossi VD, Pugliesi C (1995). Characterization of a wilted sunflower (*Helianthus annuus* L.) mutant: III. Phenotypic interaction in reciprocal grafts from wilted mutant and wild-type plants. *J Exp Bot*, 46 (5): 525~530
- Faiss M, Zalubilová J, Strnad M, Schmülling T (1997). Conditional transgenic expression of the *ipt* gene indicates a function for cytokinins in paracrine signaling in whole tobacco plants. *Plant J*, 12 (2): 401~415
- Ferguson BJ, Mathesius U (2003). Signaling interactions during nodule development. *J Plant Growth Regul*, 22 (1): 47~72
- Foo E, Turnbull CG, Beveridge CA (2001). Long-distance signaling and the control of branching in the *rms1* mutant of pea. *Plant Physiol*, 126 (1): 203~209
- Gan SS, Amasino RM (1995). Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, 270 (5244): 1986~1988
- Gregory LE (1956). Some factors for tuberization in the potato. *Am J Bot*, 43 (4): 281~288
- Haritatos E, Ayre BG, Turgeon R (2000). Identification of phloem involved in assimilate loading in leaves by the activity of the galactinol synthase promoter. *Plant Physiol*, 123 (3): 929~937
- Holbrook NM, Shashidhar VR, James RA, Munns R (2002). Stomatal control in tomato with ABA-deficient roots: response of grafted plants to soil drying. *J Exp Bot*, 53 (373): 1503~1514
- Ingram TJ, Reid JB, Murfet IC, Gaskin P, Willis CL, MacMillan J (1984). Internode length in *Pisum*: the *Le* gene controls the 3 β -hydroxylation of gibberellin A₂₀ to gibberellin A₁. *Planta*, 160 (5): 455~463
- Ingram TJ, Reid JB (1987). Internode length in *Pisum*: gene *na* may block gibberellin synthesis between *ent-7 α -hydroxykaurenoic acid* and gibberellin A₁₂-aldehyde. *Plant Physiol*, 83 (4): 1048~1053
- Jackson MB (1993). Are plant hormones involved in root to shoot communication? *Adv Bot Res*, 19: 103~187
- Jia WS, Zhang JH (1997). Comparison of exportation and metabo-

- lism of xylem-delivered ABA in maize leaves at different water status and xylem sap pH. *Plant Growth Regul*, 21 (1): 43~49
- Jones HG, Sharp CS, Higgs KH (1987). Growth and water relations of wilted mutants of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *J Exp Bot*, 38 (11): 1848~1856
- King WM, Murfet IC (1985). Flowering in *Pisum*: a sixth locus, *Dne*. *Ann Bot*, 56 (6): 835~846
- Lee SH, Ashley DA, Boerma HR (1991). Regulation of nodule development in supernodulating mutants and wild-type soybean. *Crop Sci*, 31 (3): 688~693
- Lee HS, Kim YW, Park EH (1998). Introduction, development, and characterization of supernodulating soybean mutant. Shoot factor regulation of nodule development in supernodulating soybean mutant. *Korean J Crop Sci*, 43 (1): 28~31
- Leyser HMO, Lincoln CA, Timpte C, Lammer D, Turner J, Estelle M (1993). *Arabidopsis* auxin-resistance gene *AXRL* encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme. *Nature*, 364 (8): 161~164
- Lorteau MA, Ferguson BJ, Guinel FC (2001). Effects of cytokinin on ethylene production and nodulation in pea (*Pisum sativum*) cv. Sparkle. *Physiol Plant*, 112 (3): 421~428
- Masia A, Pitacco A, Braggio L, Giulivo C (1994). Hormonal responses to partial drying of the root system of *Helianthus annuus*. *J Exp Bot*, 45 (1): 69~76
- McCabe MS, Garratt LC, Schepers F, Jordi WJRM, Stoopen GM, Davelaar E, van Rhijn JHA, Power JB, Davey MR (2001). Effects of P_{SAG12}-IPT gene expression on development and senescence in transgenic lettuce. *Plant Physiol*, 127 (2): 505~516
- Medford JI, Horgan R, El-Sawi Z, Klee HJ (1989). Alterations of endogenous cytokinins in transgenic plants using a chimeric isopentenyl transferase gene. *Plant Cell*, 1 (4): 403~413
- Murfet IC (1971). Flowering in *Pisum*: reciprocal grafts between known genotypes. *Aust J Biol Sci*, 24: 1089~1101
- Murfet IC, Reid JB (1973). Flowering in *Pisum*: evidence that gene *Sn* controls a graft-transmissible inhibitor. *Aust J Biol Sci*, 26: 675~677
- Murfet IC, Reid JB (1993). Developmental mutants. In: Casey R, Davies DR (eds). *Biotechnology in Agriculture Series; Peas: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology*. Wallingford: CAB International, 165~216
- Napoli C (1996). Highly branched phenotype of the petunia *dadl-1* mutant is reversed by grafting. *Plant Physiol*, 111 (1): 27~37
- Nooden LD, Letham DS (1993). Cytokinin metabolism and signaling in the soybean plant. *Aust J Plant Physiol*, 20 (5): 639~653
- Ookawa T, Nishiyama M, Takahiro J, Ishihara K, Hirasawa T (1999). Differences in leaf senescence among reciprocally grafted plants of two soybean cultivars, Enrei and Tachinagaha. *Plant Prod Sci*, 2 (1): 51~52
- Ookawa T, Nishiyama M, Takahiro J, Ishihara K, Hirasawa T (2001). Analysis of the factors causing differences in the leaf senescence pattern between two soybean cultivars, Enrei and Tachinagaha: comparison of root length and exudation rate among grafted plants *Plant Prod Sci*, 4 (1): 3~8
- Ookawa T, Tomita N, Hirasawa T (2005). Interaction of scion and stock on leaf senescence of soybean plants grafted at mid-stem during ripening. *Plant Prod Sci*, 8 (1): 32~37
- Peres LEP, Carvalho RF, Zsögön A, Bermúdez-Zambrano OD, Robles WGR, Tavares S (2005). Grafting of tomato mutants onto potato rootstocks: An approach to study leaf-derived signaling on tuberization. *Plant Sci*, 169 (4): 680~688
- Pharis RP, King RW (1985). Gibberellins and reproductive development in seed plants. *Ann Rev Plant Physiol*, 36: 517~568
- Prasad TK, Li X, Abdel-Rahman AM, Hosokawa Z, Cloud NP, LaMotte CE, Cline MG (1993). Does auxin play a role in the release of apical dominance by shoot inversion in *Ipomoea nil*? *Ann Bot*, 71 (3): 223~229
- Proebsting WM, Hedden P, Lewis MJ, Croker SJ, Proebsting LN (1992). Gibberellin concentration and transport in genetic lines of pea. Effects of grafting. *Plant Physiol*, 100 (3): 1354~1360
- Putterill J, Robson F, Lee K, Simon R, Coupland G (1995). The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell*, 80 (6): 847~857
- Reid JB, Murfet IC (1977). Flowering in *Pisum*: the effect of genotype, plant age, photoperiod and number of inductive cycles. *J Exp Bot*, 28 (4): 811~819
- Reid JB, Murfet IC, Potts WC (1983). Internode length in *Pisum*. II. Additional information on the relationship and action of loci *Le*, *La*, *Cry*, *Na* and *Lm*. *J Exp Bot*, 34 (3): 349~364
- 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 (3): 438~446
- Sachs T, Thimann KV (1967). The role of auxins and cytokinins in the release of buds from dominance. *Amer J Bot*, 54 (1): 136~144
- Schmitz G, Theres K (1999). Genetic control of branching in *Arabidopsis* and tomato. *Curr Opin Plant Biol*, 2 (1): 51~55
- Sheng C, Harper JE (1997). Shoot versus root signal involvement in nodulation and vegetative growth in wild-type and hypernodulating soybean genotypes. *Plant Physiol*, 113 (3): 825~831
- Singh S, Letham DS, Palni LMS (1992). Cytokinin biochemistry in relation to leaf senescence. VIII. Translocation, metabolism and biosynthesis of cytokinins in relation to sequential leaf senescence of tobacco. *Physiol Plant*, 86 (3): 398~406
- Smith H, Whitelam GC (1990). Phytochrome, a family of photoreceptors with multiple physiological roles. *Plant Cell Environ*, 13 (7): 695~707
- Symons GM, Reid JB (2004). Brassinosteroids do not undergo long-distance transport in pea. Implications for the regulation of endogenous brassinosteroid levels. *Plant Physiol*, 135 (4):

- 2196~2206
- Tsukaya N, Naito S, Rédei G, Komeda Y (1993). A new class of mutations in *Arabidopsis thaliana*, *acaulis1*, affecting the development of both inflorescences and leaves. *Development*, 118 (3): 751~764
- Turnbull CGN, Booker JP, Leyser HMO (2002). Micrografting techniques for testing long-distance signalling in *Arabidopsis*. *Plant J*, 32 (2): 255~262
- van den Berg JH, Simko I, Davies PJ, Ewing EE, Halinska A (1995). Morphology and [¹⁴C] gibberellin A₁₂ metabolism in wildtype and dwarf *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* grown under long and short photoperiods. *J Plant Physiol*, 146 (4): 467~473
- Wickson M, Thimann KV (1958). The antagonism of auxin and kinetin in apical dominance. *Physiol Plant*, 11 (1): 62~74
- Xu X, van Lammeren AAM, Vermeer E, Vreugdenhil D (1998). The role of gibberellin, abscisic acid and sucrose in the regulation of potato tuber formation *in vitro*. *Plant Physiol*, 117 (2): 575~584
- Zeevaart JAD (1976). Physiology of flower formation. *Annu Rev Plant Physiol*, 27: 321~348