DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20240629

葡萄绿枝嫁接愈合过程中内源激素含量 变化及转录组解析

邓嘉漪,魏嘉彦,陈爱赛,何 非,于可济*,王 军*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院葡萄与葡萄酒研究中心•农业农村部葡萄酒加工重点实验室,北京 100083)

摘 要:【目的】研究葡萄绿枝嫁接愈合过程中嫁接接口(接穗和砧木结合部分)激素含量变化,结合转录组学数据分析,明确葡萄绿枝嫁接愈合过程中起关键作用的激素,同时为揭示葡萄嫁接愈合的分子机制提供参考。【方法】以天工 丽人/贝达、天工墨玉/贝达和阳光玫瑰/贝达砧穗组合的嫁接接口为材料,分别在嫁接后1、4、7、10和13 d采集样品,采 用高效液相色谱-三重四级杆串联质谱仪测定嫁接接口生长素(auxin,IAA)、异戊烯基腺嘌呤(isopentenyladenine, IP)、脱落酸(abscisic acid,ABA)和茉莉酸类物质(jasmonates,JAs)的含量。同时对天工丽人/贝达的嫁接接口进行转录组测序。【结果】葡萄绿枝嫁接愈合过程中IAA含量呈上升趋势,而IP、ABA、JAs含量总体呈下降趋势。转录组分析显示 27 个差异表达基因参与植物激素合成和代谢,49 个差异表达基因参与植物激素信号转导。其中 GH3(Vitvi03g00586)、LOX(Vitvi06g00158)、AOS(Vitvi18g00886)、OPCL1(Vitvi18g00124)、ABF(Vitvi12g01667)、TCH4(Vitvi11g01682)的表达量与JA、IP含量呈显著正相关;AHA(Vitvi14g01888)、TIR1(Vitvi07g00248)的表达量与ABA、IP含量呈显著负相关,说明以上基因可能是愈合过程中与内源激素相关的关键基因。【结论】葡萄绿枝嫁接愈合过程中,植物激素的含量变化具有阶段特异性,IAA在嫁接愈合过程中起关键作用,IP、ABA、JAs通过与IAA信号转导相互作用,共同调控绿枝嫁接愈合。

关键词:葡萄;绿枝嫁接;内源激素;转录组;差异表达基因;愈合过程

中图分类号:S663.1 文献标志码:A 文章编号:1009-9980(2025)04-0732-20

Changes of endogenous hormone concentrations and transcriptome analysis during the healing process of greenwood grafting in grape

DENG Jiayi, WEI Jiayan, CHEN Aisai, HE Fei, YU Keji*, WANG Jun*

(Center for Viticulture and Enology, College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University/Key Laboratory of Viticulture and Enology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100083, China)

Abstract: [Objective] To study the changes of hormone concentrations in the graft union during the healing process of greenwood grafting, the experiment was carried out, combined with transcriptomic data analysis, so as to identify the key hormone changes in the healing process of greenwood grafting in grape, and provide references for revealing the molecular mechanism of the healing process. [Methods] The stion combinations of Tiangong Liren/Beta, Tiangong Moyu/Beta and Shine Muscat/Beta were used as materials and were collected at 1, 4, 7, 10 and 13 days after grafting (DAG), respectively. The concentrations of auxin (IAA), isopentenyladenine (IP), abscisic acid (ABA) and jasmonates (JAs) in the graft union were determined by high performance liquid chromatograph-triple quadrupole tandem mass spectrometry (HPLC-QqQ-MS/MS). Simultaniously, transcriptome sequencing was performed on the graft union of Tiangong Liren/Beta. [Results] From the perspective of morphology, Tiangong Moyu/Beta buds burst first, and the bud swelling was observed at 4 DAG. Tiangong Liren/Beta and Shine Muscat/Beta were observed to have swollen buds at 7 DAG. Different stion combinations com-

作者简介:邓嘉漪,女,在读硕士研究生,研究方向为葡萄栽培。E-mail:1227586401@qq.com

收稿日期:2024-12-03 接受日期:2025-01-17

基金项目:现代农业产业技术体系专项资金(CARS-29);宁夏回族自治区重点研发计划重大项目(2024BBF01002-03)

^{*}通信作者 Author for correspondence. E-mail:yukeji@cau.edu.cn;E-mail:jun_wang@cau.edu.cn

pleted the healing process within 13 DAG. From the analysis of plant hormone levels, the concentration of IAA increased, while the concentrations of IP, ABA and JAs decreased during healing. From transcriptome level analysis, the transcriptome data of Tiangong Liren/Beta at different stages were pairwise compared, and 6319 differentially expressed genes were screened. 1 DAG vs 13 DAG had the largest number of differentially expressed genes, with 3846, the second was 1 DAG vs 10 DAG, with 3301 and the third was 1 DAG vs 7 DAG, with 2968. The results showed that the gene transcriptional regulation of 7 DAG, 10 DAG and 13 DAG were significantly changed compared with 1 DAG. The 10 DAG vs 13 DAG comparison combination had the smallest number of differentially expressed genes, indicating that there was little difference in the gene expression pattern between 10 DAG and 13 DAG. 6319 differentially expressed genes were divided into 6 clusters by time series analysis. Cluster 5 contained the most differentially expressed genes, which were significantly enriched in xyloglucan, including xyloglucosvl transferase activity, xyloglucan metabolic process and other pathways, its expression showed a downward trend in the whole healing process, and the trend was obvious at 1-4 DAG. The differentially expressed genes contained in Cluster 3 were enriched in auxin-activated signaling pathway, phloem or xylem histogenesis and other pathways, and their expression levels increased at first week after grafting and were higher at 4-10 DAG. In the process of grapevine greenwood grafting healing, 27 differentially expressed genes were screened to participate in the synthesis and metabolism of plant hormones, and 3, 2, 12 and 10 differentially expressed genes were involved in the synthesis and metabolism of auxin, cytokinin, abscisic acid and jasmonic acid, respectively. In the tryptophan-dependent auxin synthesis pathway, L- tryptophan decarboxylase TDC (Vitvi07g00696) and aldehyde dehydrogenase ALDH (Vitvi04g01402) had the highest expression levels at 7 DAG. Isopentenyltransferase IPT (Vitvi07g00154) was highly expressed at first week after grafting, and then showed a downward trend. The expression of cytokinin dehydrogenase CKX (Vitvi04g00161) decreased significantly at 1-4 DAG and 7-10 DAG by 0.66 and 0.60 times, respectively. The expression level of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase NCED (Vitvi19g01356) was higher at 1-4 DAG and decreased at 4-10 DAG, which was similar to the changing trend of abscisic acid concentration. The expression levels of LOX (Vitvi06g00158), AOS (Vitvi18g00886), OPR (Vitvi18g03162 and Vitvi18g04622) and OPCL1 (Vitvi18g00124) generally decreased at 1-10 DAG, which were consistent with the changing trend of jasmonic acid concentration. 49 differentially expressed genes were selected to participate in plant hormone signal transduction pathway. There were 17 differentially expressed genes involved in auxin signal transduction. They included auxin influx carrier (AUX1), transport inhibitor response protein 1 (TIR1), auxin/indole-3-acetic acid (Aux/IAA), auxin response factor (ARF), acetic acid-amido synthetase (GH3), small auxin-up RNA (SAUR), auxin binding protein 1 (ABP1), plasma membrane H⁺-transporting ATPase (AHA) and mitogen activated protein kinase 3 (TMK3). Two-component response regulators (A-ARR) (Vitvi13g01433 and Vitvi17g00732) involved in cytokinin signal transduction were highly expressed at first week after grafting. There were 8 differentially expressed genes were involved in abscisic acid signal transduction, including abscisic acid receptor PYR/PYL, protein phosphatase 2C (PP2C), sucrose non-fermenting 1related protein kinase 2 (SnRK2) and ABA-responsive element binding factor (ABF). There were 5 differentially expressed genes were involved in jasmonic acid signal transduction, including jasmonic acidamino acid synthetase (JAR1), jasmonate ZIM domain-containing protein (JAZ) and transcription factor MYC2. There were 8 differentially expressed genes were involved in brassinosteroid signal transduction, including brassinosteroid resistant 1/2 (BZR1/2), cyclin D3 (CYCD3) and xyloglucan endotransglucosylase protein (TCH4). There were 3 differentially expressed genes were involved in gibberellin

signal transduction, including gibberellin receptor 1 (GID1) and DELLA protein. There were 3 differentially expressed genes were involved in ethylene signal transduction, including ethylene receptor (ETR), EIN3-binding F-box protein (EBF) and ethylene-responsive transcription factor (ERF). These three differentially expressed genes involved in salicylic acid signal transduction were pathogenesis-related protein 1 (PR1). By WGCNA analysis of transcriptome data, 13 co-expression modules were obtained. The correlation analysis between the module and plant hormone showed that *GH3* (Vitvi03g00586), *LOX* (Vitvi06g00158), *AOS* (Vitvi18g00886), *OPCL1* (Vitvi18g00124), *ABF* (Vitvi12g01667) and *TCH4* (Vitvi11g01682) were positively correlated with the concentrations of JA and IP. *AHA* (Vitvi14g01888) and *TIR1* (Vitvi07g00248) were negatively correlated with the concentrations of ABA and IP. **【**Conclusion**】** The changes of plant hormone concentrations in the process of greenwood grafting healing were stage-specific. IAA played a key role in the process of grafting healing. IP, ABA and JAs regulated the healing process by interacting with IAA signal transduction.

Key words: Grape; Greenwood grafting; Endogenous hormone; Transcriptome; Differentially expressed gene; Healing process

葡萄绿枝嫁接是在葡萄新梢处于半木质化时进 行嫁接的方法,是目前葡萄苗木生产中常用的繁殖 方式之一[1]。抗性砧木嫁接苗可以增强葡萄植株适 应环境的能力,提高葡萄栽培的经济效益四。嫁接 愈合是嫁接苗生产的关键环节。在组织学水平上, 愈合过程需要经历4个阶段:(1)在切口处发生组织 粘连;(2)在切面上形成愈伤组织;(3)愈伤组织细胞 快速分裂并分化;(4)维管组织重建¹³。Melnyk等^[4] 研究认为,愈合过程中韧皮部连接和木质部连接是 暂时分离的,拟南芥在嫁接后1d发生组织粘连,韧 皮部重连发生在嫁接后3~4d,木质部重连发生在嫁 接后 6~7 d, 完成愈合过程需要 8~10 d。Duan 等^[5]研 究发现,温室番茄嫁接苗在嫁接后2d发生组织粘 连,但在连接处仍有间隙,嫁接后3d细胞不断分裂 填补间隙,嫁接后4~5d维管束不断分化并重新连 接,嫁接后7d木质部和韧皮部基本完成重连。Xu 等闷研究发现,同源嫁接西瓜幼苗的韧皮部和木质 部重连不能及时分离,在嫁接后12~13 d完成维管 组织的重连。Cookson等^[7]通过对葡萄越冬枝条进 行机械嫁接,分析嫁接后3d和28d的砧木和嫁接接 口的转录组,发现随着时间的推移,与细胞壁合成、 韧皮部和木质部发育相关的基因上调表达。

植物内源激素在嫁接愈合过程中起着至关重要的作用。生长素(auxin,IAA)是影响嫁接的关键激素,对细胞分裂和维管组织的生长发育具有调控作用。生长素介导的信号转导途径需要生长素受体ABP1(auxin-binding protein 1)和TIR1(transport in-

hibitor response protein 1)、生长素早期响应基因 Aux/IAA (auxin/indole-3-acetic acid), GH3 (gretchen hagen 3)和 SAUR(small auxin-up RNA)、生长素响 应因子ARF(auxin response factor)等共同协作^[8-9]。 有研究发现,应用少量生长素可促进韧皮部分化,而 大量生长素则可以诱导韧皮部和木质部形成¹⁰¹。植 物体内具有活性的细胞分裂素(cytokinin,CTK)以 异戊烯基腺嘌呤(isopentenyladenine, IP)、反式玉米 素(*trans*-zeatin,*t*Z)、二氢玉米素(dihydrozeatin,DZ) 形式存在。Kawaguchi等^[11]分别研究接穗和砧木切 口部位植物激素的变化,结果表明IP型细胞分裂素 的浓度最高,且远高于DZ型。对温室番茄嫁接苗 的研究发现 IP 可能与维管束重构有关⁶¹。脱落酸 (abscisic acid, ABA)不仅在响应生物和非生物胁迫 中发挥重要作用,还在植物发育过程中发挥作 用^[12]。脱落酸信号转导的核心成分由脱落酸受体 PYR/PYL(pyrabactin resistance/PYR1-like)、蛋白磷 酸酶 PP2C(protein phosphatase 2C)、蔗糖非酵解型 蛋白激酶 SnRK2 (sucrose non-fermenting 1-related protein kinase 2)以及脱落酸响应元件结合因子 ABF (ABA responsive element binding factor)组成^[13]。 Ikeuchi等^[14]对拟南芥愈伤组织的形成进行植物激素 定量分析,发现脱落酸会抑制愈伤组织细胞的增 殖。茉莉酸(jasmonic acid, JA)及其衍生物茉莉酸-异亮氨酸(jasmonic acid-isoleucine, JA-Ile)、茉莉酸 甲酯(methyl jasmonate, MeJA)与抗性相关,在逆境 (包括创伤)应答过程中激活,也参与植物生长发育

调节^[15]。茉莉酸类激素主要参与切割后的创伤应激 响应^[16]。茉莉酸缺乏突变体 aos、茉莉酸不敏感突变 体 coil 以及外源茉莉酸处理的拟南芥中,维管组织 细胞的增殖方式相似,表明在愈合过程中茉莉酸不 是细胞增殖过程所必需的^[17]。

目前葡萄绿枝嫁接愈合过程所涉及的激素相关 调控机制的研究较少,理解其调控机制是科学选择 接穗和砧木的基础。笔者在本研究中以天工丽人/ 贝达、天工墨玉/贝达和阳光玫瑰/贝达砧穗组合的 嫁接接口为材料,分别在嫁接后1、4、7、10和13d采 集样品并进行激素含量的测定,同时对天工丽人/贝 达的嫁接接口进行转录组测序,旨在揭示葡萄绿枝 嫁接愈合过程中植物激素及相关基因的变化,为葡 萄绿枝嫁接愈合的生物学机制研究奠定基础,同时 为揭示葡萄嫁接愈合的分子机制提供参考。

1 材料和方法

1.1 植物材料

2023年6月26日在北京大兴喜山葡萄合作社

(39°38′46″S,116°41′43″E)进行葡萄绿枝嫁接。苗 圃为露天苗圃,南北行向,平垄种植,垄长15m,相 邻两垄之间的距离60 cm。以当年贝达(Vitis riparia × V. labrusca)硬枝扦插苗为砧木,以天工丽人(V. labrusca × V. vinifera)、天工墨玉(V. labrusca × V. vinifera)和阳光玫瑰(V. labrusca × V. vinifera)为接穗 进行绿枝嫁接。嫁接方法为劈接,嫁接操作由熟练 技术工人完成。嫁接完成后当天漫灌至土壤完全湿 润,嫁接后5~7 d(days after grafting,DAG)补水并施 肥,10 DAG开始正常育苗管理。

分别在嫁接后1、4、7、10和13d采集样品,每个时间点随机选取5个样品作为1次重复,每个砧穗组合3次重复。从嫁接后1d(6月27日)开始观察接穗芽的形态学变化。用修枝剪采集嫁接接口(长2.5~3.0 cm)(图1),液氮速冻后转移至-80℃冰箱保存,用于激素测定及RNA提取。

1.2 不同砧穗组合嫁接接口激素含量测定

嫁接接口激素含量的测定参照 Yao 等¹¹⁸的方法 并略作修改,将样品用球磨仪研磨成粉,每个重复



图 1 嫁接接口 Fig. 1 The photo of a graft union

准确称量 0.5 g 植物粉末,装入 5 mL 离心管,加入 2.5 mL 冰冷的 50%乙腈水溶液和 10 μ L 0.1 μ g·mL⁻¹ 内标。冰浴避光超声 15 min,4 °C、10 000 r·min⁻¹离 心 5 min,收集上清液至 10 mL 离心管,残渣重复提 取 1 次,合并上清液。

将收集到的上清液(约5 mL)经Fotector Plus 高 通量全自动固相萃取仪(Fotector-08HT, 睿科集团股 份有限公司, 厦门, 中国)富集到HLB固相萃取小柱 (0.05 mL·mg⁻¹, 天津博纳艾杰尔科技公司)中, 用3 mL 洗脱液(含有2.5%甲醇和0.5%甲酸的二氯甲烷)手 动洗脱。收集的洗脱液用氮气吹干, 用200 μL 甲醇 复溶, 混匀, 然后用0.22 μm 有机尼龙过滤膜过滤, 用高效液相色谱-三重四级杆串联质谱仪(12906470, Agilent, USA) 测定激素含量。

参考 Yao 等^[18]植物激素的质谱参数进行定性分析,采用外标法进行定量分析。计算植物激素含量 $C_1 = CV/M$ 。其中 C 为代入标线测得的检测质量浓 度(ng·mL⁻¹); V 为上机检测样品的体积(mL); M 为 样品取样质量(g)。

1.3 天工丽人/贝达嫁接接口 RNA 提取和转录组 测序

按照植物总RNA提取试剂盒(DP441,天根生 化科技有限公司,北京,中国)说明书提取天工丽人/ 贝达嫁接接口总RNA,并送至百迈客生物科技有限 公司(北京)进行转录组测序。使用NanoDrop 2000 分光光度计(Thermo Scientific,美国)和Agient2100/ LabChip GX(PerkinElmer,美国)检测 RNA 纯度、浓度以及完整性。样品检测合格后,构建 cDNA 文库并进行质量检测,合格后使用 Illumina NovaSeq6000测序平台进行 PE150模式测序。对测序得到的原始数据(Raw Data)进行过滤,将获得的高质量序列(Clean Data)与参考基因组(PN40024.v4.57)进行序列比对。利用 StringTie 进行组装,重构转录组用于后续分析。采用每千个碱基的转录每百万映射读取的片段(fragments per kilobase of transcript per million fragments mapped,FPKM)作为衡量基因表达水平的指标。 **1.4 差异表达基因的筛选和分析**

不同样本中表达水平存在显著差异的基因称为 差 异 表 达 基 因 (differentially expressed gene, DEG)。使用 DESeq2 软件进行差异分析,以 FP-KM>1、|log₂Fold Change|≥1、FDR<0.01为标准,对 嫁接后1、4、7、10和13 d这5个时期的样品进行两两 比较,筛选差异表达基因。利用百迈克云平台BM-KCloud(https://www.biocloud.net)对筛选得到的差 异表达基因进行基因功能注释和功能富集。重点关 注参与植物激素合成和代谢、植物激素信号转导途 径上的差异表达基因。

1.5 共表达网络构建与分析

使用 TBtools WGCNA shiny 插件,对天工丽人/ 贝达嫁接后1、4、7、10和13 d的转录组数据进行基 因共表达网络分析(weighted gene co-expression network analysis, WGCNA)。过滤掉90%以上 FP-KM<10的基因,过滤后的基因根据表达量进行层 次聚类,未发现离群样本。以无尺度拓扑拟合指数 *R*²≥0.83,最优软阈值 power=28,构建更符合无尺度 拓扑结构的网络。采用动态剪切树法构建基因聚类 树,最小模块数为30,相似模块合并参数为0.25。绘制基因共表达模块与天工丽人/贝达植物激素含量的相关性热图。以皮尔逊相关系数(|r|≥0.8)和显著性p值(p<0.05)的大小为筛选条件,寻找关键基因模块,并进一步筛选葡萄绿枝嫁接愈合过程中与内源激素相关的关键基因。

1.6 qRT-PCR验证

对 8 个关键基因进行实时荧光定量(qRT-PCR)。使用 HiScript II Q Select RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)试剂盒(R233,南京诺唯赞生 物科技股份有限公司,中国)将 RNA 反转录为 cD-NA,具体步骤参照说明书。利用 NCBI 官网的 Primer-BLAST 工具(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/ primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)设计 特异性引物,以 *VviUBQ* 为内参基因,引物具体信息 见表1。使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒(Q711,南京诺唯赞生物科技股份有限公 司,中国)在 CFX384 Touch 实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad,美国)上进行 qRT-PCR,反应体系和程序 参照试剂盒说明书。设置3次生物学与3次技术重 复,根据2^{-AACt}方法计算基因相对表达量。

1.7 数据处理与分析

Excel 2003 软件用于数据整理, SPSS 26.0 软件 用于方差分析和邓肯检验(*p*<0.05), Origin 2018、R 4.4.1和Cytoscape 3.8.0软件用于数据分析并作图。

2 结果与分析

2.1 不同砧穗组合接穗芽物候期观测

图2为天工墨玉/贝达绿枝嫁接愈合过程中接穗 芽的形态变化,根据接穗芽的形态变化,大致可以分

基因名称 Gene name	正向引物(5'-3') Forward primers (5'-3')	反向引物(3'-5') Reverse primers (3'-5')
GH3	TTCTGAATTCCTCACCAGCTCT	CCTTTGTCCAACCCAGGCA
LOX	CAGAGGTTGACCCCAAGACG	TCTGAACAAGAACCGCACCA
AOS	AAGCGAACTCGCAGCAAAAG	GGCCTAGAGTGAGGATGGGA
OPCL1	CATAGCAAAACAGGTGGCTCC	CCAAATCCATGACGCCCAAG
ABF	TTGAGCTAGAGTCGCTGGTG	CAGGTTCTCCATCAACTGCTTAT
TCH4	CCCCAGCGGATTATCTTCTCT	GTAGGAGGCAGTGAAGGGTG
AHA	CAGTCTGAATTGGTTGAGCCC	CTCTCATTAGCAGCCTCCGT
TIR1	CATGGCTATGGCTTACCCGA	TCCAGCTCTCTCAGATTCCTGC
VviUBQ	GTGGTATTATTGAGCCATCCTT	AACCTCCAATCCAGTCATCTAC

表 1 qRT-PCR 引物序列 Table 1 qRT-PCR primer sequences

为静止期、芽膨大期、萌芽期、叶片显现期和展叶期 5个时期。静止期芽的形态没有明显变化,然后是 芽膨大期和萌芽期,之后是叶片显现期和展叶期,叶 片完全展开意味着嫁接成活。

不同砧穗组合接穗芽物候期变化见表2。天工 墨玉/贝达最先萌芽,在4DAG观察到芽膨大,而天 工丽人/贝达和阳光玫瑰/贝达萌芽相对较晚,在7 DAG观察到芽膨大。3个砧穗组合在13 DAG均至 少有一枚叶的叶身完全展开。通常认为接穗芽的第 一枚真叶完全展开,说明嫁接操作成功,接穗与砧木 之间已经愈合,接穗开始从砧木吸收养分和水分。 在13 DAG统计不同砧穗组合的嫁接成活率,天工 丽人/贝达为94.00%、天工墨玉/贝达为94.81%、阳光 玫瑰/贝达为96.84%。



展叶期 First leaf full expanded stage

图 2 天工墨玉/贝达接穗芽的形态变化

First leaf visible stage

Bud burst stage

Fig. 2 Morphological changes of scion bud in the graft combination of Tiangong Moyu/Beta

表2 不	同砧穗组合接穗芽的发育日期
------	---------------

物候期 Phenological period	天工丽人/贝达 Tiangong Liren/Beta	天工墨玉/贝达 Tiangong Moyu/Beta	阳光玫瑰/贝达 Shine Muscat/Beta
芽膨大期 Bud swell stage	7 DAG	4 DAG	7 DAG
萌芽期 Bud burst stage	-	7 DAG	-
叶片显现期 First leaf visible stage	10 DAG	10 DAG	10 DAG
展叶期 First leaf full expanded stage	13 DAG	13 DAG	13 DAG

Dovelonment	dates of	coion hud	in the	different	nootstool, saion	annhinations
Development	uates of	SCIOII DUU	III LIIE	unierent	. FOOLSLOCK-SCIOI	COMDINATIONS

注:"-"表示介于两个采样时间点之间的某个时间。

Table 2

Quiescent stage

Note: "-" represents a specific time between two sampling time points.

Bud swell stage

2.2 不同砧穗组合嫁接接口内源激素含量的动态 变化

比较天工丽人/贝达、天工墨玉/贝达和阳光玫瑰/ 贝达砧穗组合嫁接接口在嫁接后不同时间的激素含 量变化。由图3-A~C可知,IAA含量在嫁接愈合过 程中整体呈上升趋势。天工墨玉/贝达IAA含量在 10 DAG达到最高值,而天工丽人/贝达和阳光玫瑰/ 贝达IAA含量在13 DAG达到最高值。天工丽人/贝 达IAA含量在嫁接后第2周呈上升趋势,且13 DAG 的IAA含量显著高于7 DAG。与天工丽人/贝达不 同,天工墨玉/贝达和阳光玫瑰/贝达的IAA含量在 嫁接后第1周显著上升。图3-D~F显示,不同砧穗 组合嫁接接口的IP含量随嫁接后时间的增加总体 呈下降趋势。天工丽人/贝达IP含量在嫁接后第1 周下降13.26%,在嫁接后第2周变化幅度极小。天 工墨玉/贝达和阳光玫瑰/贝达IP含量在7~10 DAG下 降幅度最大,分别下降了18.19%、25.23%。图3-G~I 显示,ABA含量在愈合前期保持较高水平,愈合后期 呈下降趋势。天工丽人/贝达ABA含量在1~4 DAG 无明显变化,在4~7 DAG显著下降,下降约 37.55%。天工墨玉/贝达和阳光玫瑰/贝达ABA含量 在嫁接后第1周无明显变化,嫁接后第2周下降幅度



A~C. 天工丽人/贝达、天工墨玉/贝达和阳光玫瑰/贝达生长素含量的变化:D~F. 天工丽人/贝达、天工墨玉/贝达和阳光玫瑰/贝达异戊烯基腺 嘌呤含量的变化:G~I. 天工丽人/贝达、天工墨玉/贝达和阳光玫瑰/贝达脱落酸含量的变化。不同小写字母表示不同时期激素含量差异显著 (*p*<0.05)。下同。

A-C. The changes of IAA concentration in Tiangong Liren/Beta, Tiangong Moyu/Beta and Shine Muscat/Beta; D-F. The changes of IP concentration in Tiangong Liren/Beta, Tiangong Moyu/Beta and Shine Muscat/Beta; G-I. The changes of ABA concentration in Tiangong Liren/Beta, Tiangong Moyu/Beta and Shine Muscat/Beta; G-I. The changes of ABA concentration in Tiangong Liren/Beta, Tiangong Moyu/Beta and Shine Muscat/Beta; G-I. The changes of ABA concentration in Tiangong Liren/Beta, Tiangong Moyu/Beta and Shine Muscat/Beta; G-I. The changes of ABA concentration in Tiangong Liren/Beta, Tiangong Moyu/Beta and Shine Muscat/Beta; G-I. The changes of ABA concentration in Tiangong Liren/Beta, Tiangong Moyu/Beta and Shine Muscat/Beta; G-I. The changes of ABA concentration in Tiangong Liren/Beta, Tiangong Moyu/Beta and Shine Muscat/Beta; G-I. The changes of ABA concentration in Tiangong Liren/Beta, Tiangong Moyu/Beta and Shine Muscat/Beta; G-I. The changes of ABA concentration in Tiangong Liren/Beta, Tiangong Moyu/Beta and Shine Muscat/Beta; G-I. The changes of ABA concentrations at different stages (p < 0.05). The same below.

图 3 嫁接后不同时间嫁接联合体生长素、脱落酸、异戊烯基腺嘌呤含量的变化 Fig. 3 The changes of IAA, ABA, IP concentrations in the graft unions at different DAG

分别为25.32%、32.30%。

当植物受到生物或非生物胁迫时,会引起JAs 含量增高。JA及其衍生物JA-lle、MeJA在1DAG 含量最高(图4),在愈合过程中整体呈下降趋势。 图4-A~C表明,不同砧穗组合嫁接接口的JA含量在 嫁接后第1周显著下降,嫁接后第2周基本不变。 JA-lle是植物中JA的主要活性形式,由图4-D可知, 天工丽人/贝达JA-Ile含量在1~4DAG无明显变化, 之后显著下降,在10DAG最低,之后显著上升。 MeJA是JA的衍生物,由图4-G可知,天工丽人/贝达



A~C. 天工丽人/贝达、天工墨玉/贝达和阳光玫瑰/贝达茉莉酸含量的变化; D~F. 天工丽人/贝达、天工墨玉/贝达和阳光玫瑰/贝达茉莉酸-异亮 氨酸含量的变化; G~I. 天工丽人/贝达、天工墨玉/贝达和阳光玫瑰/贝达茉莉酸甲酯含量的变化。

A-C. The changes of JA concentration in Tiangong Liren/Beta, Tiangong Moyu/Beta and Shine Muscat/Beta; D-F. The changes of JA-Ile concentration in Tiangong Liren/Beta, Tiangong Moyu/Beta and Shine Muscat/Beta; G-I. The changes of MeJA concentration in Tiangong Liren/Beta, Tiangong Moyu/Beta and Shine Muscat/Beta.

图 4 嫁接后不同时间嫁接联合体茉莉酸、茉莉酸-异亮氨酸、茉莉酸甲酯含量的变化 Fig. 4 The changes of JA, JA-Ile, MeJA concentrations in the graft unions at different DAG

MeJA含量无明显变化。在葡萄绿枝嫁接愈合过 程中,天工墨玉/贝达和阳光玫瑰/贝达JA-lle、Me-JA含量变化趋势相似,在嫁接后第1周显著下降, 嫁接后第2周变化幅度较小,呈先上升后下降的趋势(图4-E~F、H~I)。

2.3 转录组测序数据质量分析

对嫁接后1、4、7、10和13d天工丽人/贝达的

嫁接接口进行转录组测序,基于嫁接后不同天数命名 样品(表3)。各样品 Clean reads 数在19.51~21.20 Mb, Q20 均在98%以上,Q30不小于94.86%。各样品的 Reads 与参考基因组的比对效率在90.33%~92.04%。 转录组测序数据比对上参考基因组唯一位置的比例 在87.28%~89.50%。说明转录组数据利用效率高、不 存在污染,可用于后续数据分析。

Table 3 Statistical results of sample sequencing data								
样本 Sample	过滤数据 Clean reads/Mb	过滤碱基 Clean bases/Gb	比对效率 Mapped reads/%	唯一比对效率 Uniq mapped reads/%	Q20/%	Q30/%		
1 DAG-1	20.26	6.06	91.14	88.26	98.29	95.49		
1 DAG-2	20.15	6.03	91.03	88.13	98.17	95.11		
1 DAG-3	20.19	6.04	90.90	88.03	98.23	95.31		
4 DAG-1	20.47	6.13	91.34	88.69	98.19	95.24		
4 DAG-2	20.56	6.16	91.57	88.91	98.21	95.20		
4 DAG-3	20.76	6.22	91.51	88.84	98.17	95.19		
7 DAG-1	20.29	6.07	91.62	89.03	98.40	95.69		
7 DAG-2	21.20	6.35	91.18	88.61	98.06	94.86		
7 DAG-3	20.92	6.26	91.35	88.72	98.21	95.19		
10 DAG-1	20.75	6.21	90.33	87.28	98.28	95.37		
10 DAG-2	20.78	6.22	91.00	87.97	98.32	95.41		
10 DAG-3	20.51	6.14	90.99	87.95	98.28	95.31		
13 DAG-1	20.32	6.08	92.02	89.46	98.26	95.32		
13 DAG-2	20.61	6.17	92.02	89.50	98.42	95.68		
13 DAG-3	19.51	5.84	92.04	89.42	98.56	96.06		

表3 样品测序数据统计结果

为了检验样品选择的可靠性,计算样品转录组 数据的皮尔逊相关系数(图5)。各个时期的3个生 物学重复之间的相关性均大于0.99,呈显著正相关, 表明重复样品间相似度高,重复性好,可以进行下一 步分析。

2.4 差异表达基因筛选

对天工丽人/贝达不同时期嫁接接口的转录本

表达水平进行差异显著性分析,得到10个比较组的 差异表达基因结果(图6),筛选到6319个差异表达 基因。首先是1 DAG vs 13 DAG差异表达基因数量 最多,有3846个,其中1724个基因显著上调,2122个 基因显著下调;其次是1 DAG vs 10 DAG,有 3301 个,其中1439个基因显著上调,1862个基因显著下 调;第三是1 DAG vs 7 DAG,有 2968个,其中 1399



图 5 样品相关性分析 Fig. 5 Correlation analysis of samples



图 6 不同比较组的差异表达基因数量 Fig. 6 The number of differentially expressed genes in different comparisons

个基因显著上调,1569个基因显著下调;表明7 DAG、10 DAG、13 DAG 与1 DAG 相比,嫁接接口 中的基因转录调控发生较大的变化。10 DAG vs 13 DAG比较组差异表达基因数量最少,有861 个,其中317个基因显著上调,544个基因显著下 调。表明10 DAG与13 DAG基因表达模式差异较 小。4 DAG vs 10 DAG比较组有 2417 个差异表达基 因,其中866个基因显著上调,1551个基因显著下 调;4 DAG vs 13 DAG 比较组有 2303 个差异表达基 因,其中697个基因显著上调,1606个基因显著下 调:1 DAG vs 4 DAG 比较组有 1633 个差异表达基 因,其中963个基因显著上调,670个基因显著下调; 7 DAG vs 10 DAG 比较组有 1303 个差异表达基因, 其中714个基因显著上调,589个基因显著下调;4 DAG vs 7 DAG比较组有 1254 个差异表达基因,其 中270个基因显著上调,984个基因显著下调;7 DAG vs 13 DAG比较组有 890 个差异表达基因,其 中284个基因显著上调,606个基因显著下调。

2.5 差异表达基因的聚类分析

为了了解嫁接后不同时期嫁接接口差异表达基因的表达模式,利用 Mfuzz 对 10 个比较组的差异表达基因进行时序表达分析(图7)。结果表明,6319个基因分成6类,最多的一类(Cluster 5)包含了1416个基因,在愈合过程中表达整体呈下降趋势,且在1~4 DAG下降趋势明显。这些基因显著富集在核糖体的结构组成、细胞质翻译、核糖体、木葡聚糖:木葡聚糖葡萄糖基转移酶活性、木葡聚糖代谢过

程等途径中。Cluster 4包含1072个基因,其表达整 体呈上升趋势,在7~10 DAG表达水平基本保持稳 定。这些基因主要富集在叶绿体类囊体膜、叶绿体 基质、叶绿体、叶绿体被膜、质体间质等途径中。 Cluster 3 包含 1063 个基因,其表达水平在嫁接后第 1周呈上升趋势,嫁接后第2周呈先下降后上升趋 势。在4~10 DAG表达水平较高。这些基因主要富 集在叶绿体被膜、生长素激活的信号转导、叶绿体、 果糖-1,6-二磷酸酶 I、韧皮部或木质部组织发生等 途径中。Cluster 6包含980个基因,其表达大体呈下 降趋势,在1~4 DAG表达水平基本保持稳定,在4~ 10 DAG下降趋势较为明显。这些基因主要富集在 DNA结合转录因子活性、转移酶活性,转移氨基酰 基以外的酰基、质膜的锚固成分、谷胱甘肽结合、膜 的锚固成分等途径中。Cluster 2包含973个基因,其 在1~4 DAG的表达呈上升趋势,之后逐渐下降。这 些基因主要富集在 DNA 结合转录因子活性、核小 体、质外体、植物型次生细胞壁的生物发生、木质素 分解代谢过程等途径中。Cluster 1包含815个基因, 其在嫁接后第1周表达水平基本保持稳定,在嫁接后 第2周呈先上升后下降趋势。这些基因主要富集在 未折叠蛋白反应、盐胁迫响应、热休克响应、伴侣辅因 子依赖性蛋白质重折叠、过氧化氢响应等途径中。

2.6 参与植物激素合成和代谢的差异表达基因分析

如图8所示,在葡萄绿枝嫁接愈合过程中,共筛 选到27个差异表达基因参与植物激素合成和代谢,





其中分别有3个、2个、12个和10个差异表达基因参与生长素、细胞分裂素、脱落酸和茉莉酸的合成和代谢。

由图8-A可知,在色氨酸依赖的合成生长素的色 胺途径中,色氨酸脱羧酶基因 *TDC*(Vitvi07g00696) 和醛脱氢酶基因 *ALDH*(Vitvi04g01402)在7 DAG表 达量最高。与色氨酸合成有关的芳香族氨基酸转氨 酶基因 *ISS1*(Vitvi09g00444)表达量在1~10 DAG 呈 下降趋势,之后呈上升趋势。

由图8-B可知,细胞分裂素生物合成限速酶基

因*IPT*(Vitvi07g00154)在嫁接后第1周高表达,之后 呈下降趋势。使细胞分裂素失活的细胞分裂素脱氢 酶基因*CKX*(Vitvi04g00161)表达量在1~4 DAG、7~ 10 DAG显著下降,分别下降了66%、60%。

高等植物主要以间接途径,即类胡萝卜素途径为主合成脱落酸。八氢番茄红素合成酶(PSY)是类 胡萝卜素生物合成第一步的限速酶,其可催化牻牛 儿牻牛儿基焦磷酸(GGPP)转化为八氢番茄红素。 由图 8-C可知,2个 *PSY*(Vitvi04g02011和 Vitvi12g00084)在嫁接后第2周高表达。八氢番茄红素



热图基于 FPKM 值表示相关基因在嫁接后不同天数的表达量情况。下同。(A)ISS1. 芳香族氨基酸转氨酶; TDC. 色氨酸脱羧酶; ALDH. 醛 脱氢酶; (B)IPT. 异戊烯基转移酶; CKX. 细胞分裂素脱氢酶; (C)PSY. 八氢番茄红素合成酶; PDS. 八氢番茄红素脱氢酶; Z-ISO. ζ-胡萝卜素异 构酶; ZDS. ζ-胡萝卜素脱氢酶; CRTISO. 前番茄红素异构酶; LCYB. 番茄红素 β-环化酶; BCH. β-胡萝卜素羟化酶; VDE. 紫黄质脱环氧化酶; ZEP. 玉米黄质环氧化酶; NCY. 新黄质合成酶; NCED. 9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶; ABA2. 黄氧素脱氢酶; AAO. 脱落醛氧化酶; A8H. 脱 落酸 8'-羟化酶; AOG. 脱落酸 β-葡萄糖基转移酶; (D)PLA2. 磷脂酶 A2; LOX. 脂氧合酶; AOS. 丙二烯氧化物合酶; AOC. 丙二烯氧化物环化 酶; OPR. 12-氧代植二烯酸还原酶; OPCL1. OPC-8:0 辅酶 A 连接酶; ACOX. 脂肪酰辅酶 A 氧化酶; KAT. 3-酮酯酰辅酶 A 硫解酶。

The heatmap depicts the expression of related genes at different days after grafting based on FPKM. The same below. (A) ISS1. Aromatic aminotransferase; TDC. L-tryptophan decarboxylase; ALDH. Aldehyde dehydrogenase; (B) IPT. Isopentenyltransferase; CKX. Cytokinin dehydrogenase; (C) PSY. Phytoene synthase; PDS. Phytoene desaturase; Z-ISO. ζ -carotene isomerase; ZDS. ζ -carotene desaturase; CRTISO. Prolycopene isomerase; LCYB. Lycopene β -cyclase; BCH. β -carotene hydroxylase; VDE. Violaxanthin de-epoxidase; ZEP. Zeaxanthin epoxidase; NCY. Neoxanthin synthase; NCED. 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase; ABA2. Xanthoxin dehydrogenase; AAO. Abscisic-aldehyde oxidase; A8H. Abscisic acid 8'-hydroxylase; AOG. Abscisate β -glucosyltransferase; (D) PLA2. Phospholipase A2; LOX. Lipoxygenase; AOS. Allene oxide synthase; AOC. Allene oxide cyclase; OPR. 12-Oxophytodienoic acid reductase; OPCL1. OPC-8:0 CoA ligase 1; ACOX. Acyl-CoA oxidase; KAT. 3-ketoacyl-CoA thiolase.

图 8 参与植物激素合成和代谢的差异表达基因

Fig. 8 Differentially expressed genes involved in plant hormones synthesis and metabolism

经过一系列反应生成反式番茄红素。反式番茄红 素在番茄红素β-环化酶(LCYB)、β-胡萝卜素羟化 酶(BCH)、玉米黄质环氧化酶(ZEP)、新黄质合成 酶(NSY)等的催化下生成新黄质。新黄质在9-顺 式-环氧类胡萝卜素双加氧酶(NCED)的催化下生 成黄质醛,NCED所催化的新黄质裂解反应为脱 落酸合成途径中的限速反应。NCED(Vitvi19g01356) 在 1~4 DAG 高表达,在 4~10 DAG 呈下降趋势,与脱 落酸含量变化趋势相似。黄质醛经黄氧素脱氢酶 (ABA2)、脱落醛氧化酶(AAO)两步氧化生成脱落 酸。脱落酸主要通过氧化降解和结合失活两条途径 丧失生物活性。3个脱落酸8'-羟化酶基因A8H(Vit-

743

vi02g01269、Vitvi03g00508 和 Vitvi18g00792)表达 量在1~4 DAG呈下降趋势。脱落酸β-葡萄糖基转 移酶基因AOG(Vitvi03g00533)表达量在1~10 DAG 呈下降趋势,之后显著上升。

末莉酸的生物合成从α-亚麻酸开始,经脂氧合酶(LOX)转化为13(S)-氢过氧化亚麻酸(13(S)-HPOT),13(S)-HPOT经丙二烯氧化物合酶(AOS)以及丙二烯氧化物环化酶(AOC)的作用生成12-氧代植物二烯酸(12-OPDA),之后经过12-氧代植二烯酸还原酶(OPR)和一系列β-氧化反应生成茉莉酸。由图 8-D可知,2个LOX(Vitvi01g01562和Vitvi06g00158)、AOS(Vitvi18g00886)、AOC(Vitvi14g01246)、2个OPR(Vitvi18g00886)、AOC(Vitvi18g04622)、OPCL1(Vitvi18g00124)共7个基因的表达量均在1~4DAG显著下降。其中,除LOX(Vitvi01g01562)和AOC(Vitvi14g01246)之外的5个基因的表达量在1~10DAG大致呈下降趋势,与茉莉

酸含量变化趋势一致。

报

2.7 参与植物激素信号转导的差异表达基因分析

如图9所示,在葡萄绿枝嫁接愈合过程中,筛选 到49个差异表达基因参与植物激素信号转导途径 (vvi04075)。这些差异表达基因分布在8类植物激 素中,分别为生长素、细胞分裂素、脱落酸、茉莉酸、 油菜素内酯(brassinosteroid,BR)、赤霉素(gibberellin,GA)、乙烯(ethylene,ET)、水杨酸(salicylic acid, SA),其中以生长素、脱落酸和油菜素内酯等激素包 含的差异表达基因较多,分别为17个、8个和8个, 表明这3类激素在葡萄绿枝嫁接愈合过程中起到重 要的调控作用。

生长素介导的信号转导途径差异表达基因最多,分布在经典的TIR1-Aux/IAA-ARFs信号转导途径以及ABP1-TMKs共同介导的非经典信号转导途径中。由图9-A可知,有14个差异表达基因参与经典生长素信号转导,包括1个生长素内向转运载体



图 9 "植物激素信号转导"途径中的差异表达基因

Fig. 9 Differentially expressed genes in the "Plant hormone signal transduction" pathway

AUXI (auxin influx carrier) $1 \uparrow TIR1 , 5 \uparrow Aux/IAA$, 2 个 ARF、1 个 GH3 和 4 个 SAUR。 AUXI (Vitvi18g00310)在嫁接后第1周高表达,在10DAG表 达量最低。TIR1(Vitvi07g00248)的表达量在嫁接后 第1周呈上升趋势。2个ARF在1~4 DAG表达量较 低,之后呈上升趋势。Aux/IAA、GH3和SAUR是生 长素诱导的早期基因。5个Aux/IAA表达量在1~4 DAG呈上升趋势,其中Aux/IAA(Vitvi11g00394)在 4 DAG表达量最高,之后显著下降,4 DAG的表达 量是7 DAG的2.2倍。GH3(Vitvi03g00586)在1~4 DAG高表达,之后显著下降,4 DAG的表达量是7 DAG的5.3倍。4个 SAUR 表达量在1~4 DAG 均呈 上升趋势。有3个差异表达基因参与非经典生长素 信号转导,包括1个生长素胞外受体ABPI、1个细胞 膜质子泵 ATP 酶基因 AHA (plasma membrane H⁺transporting ATPase)、1个丝裂原活化蛋白激酶基 因 MPK3 (mitogen-activated protein kinase)。 ABP1 (Vitvi07g00196)表达量在 7~10 DAG 显著上升。 AHA(Vitvi14g01888)表达量在嫁接后第1周呈上 升趋势。MPK3(Vitvi06g00356)在1~4 DAG高表 达,之后显著下降,4DAG的表达量是7DAG的2 倍。

参与细胞分裂素信号转导的2个细胞分裂素响 应调节因子*A-ARR*(two-component response regulator)在嫁接后第1周高表达(图9-B)。

有8个差异表达基因参与脱落酸信号转导,包括2个PYR/PYL、4个PP2C、1个SnRK2和1个ABF。如图9-C所示,2个PYR/PYL表达量在嫁接后第1周呈上升趋势,之后呈下降趋势。3个负调控因子PP2C(Vitvi06g00533、Vitvi13g00344和Vitvi11g00270)与正调控因子SnRK2表达量变化趋势相反。SnRK2在1~4DAG表达量呈下降趋势,4~10DAG呈上升趋势,10~13DAG呈下降趋势。转录因子ABF(Vitvi12g01667)与SnRK2在1~4DAG表达量变化趋势。

有 5 个差异表达基因参与茉莉酸信号转导,包括 1 个茉莉酸氨基酸合成酶基因JARI(jasmonic acid-amino acid synthetase)、3 个转录抑制因子JAZ(jasmonate ZIM domain-containing protein)和 1 个 bHLH类转录因子MYC2(myelocytomatosis protein 2)。由图 9-D 可知,JARI表达量在 1~4 DAG 呈下降 趋势,在 4~10 DAG 呈上升趋势。3 个JAZ表达量在 1~4 DAG显著下降。*MYC2*在1~4 DAG高表达,在1~10 DAG呈下降趋势。

有 8 个差异表达基因参与油菜素内酯信号转导,包括 1 个转录因子 BZR1/2(brassinosteroid resistant 1/2)、1 个编码细胞周期蛋白的基因 CYCD3 (cyclin D3-plant)和 6 个木葡聚糖内糖基转移酶基因 TCH4 (xyloglucan endotransglucosylase protein)。由图 9-E可以看出, CYCD3 (Vitvi03g00542)表达量在嫁接后第 1 周呈上升趋势, 7 DAG 的表达量是 1 DAG 的 2.9 倍。除 Vitvi11g01268 之外的 5 个 TCH4 在 1~4 DAG 高表达,在 10~13 DAG 显著下降。

有3个差异表达基因参与赤霉素信号转导,包括1个赤霉素受体基因GID1(gibberellin insensitive dwarf 1)和2个负调控因子DELLA(DELLA protein)。由图9-F可知,GID1(Vitvi07g00217)在1~4DAG高表达,在1~10DAG呈下降趋势。2个DEL-LA表达量在嫁接后第1周呈上升趋势,嫁接后第2周呈先下降后上升趋势。

有 3 个差异表达基因参与乙烯信号转导,包括 1 个乙烯受体基因 *ETR*(ethylene receptor)、1 个编码 Fbox 蛋白的基因 *EBF*(EIN3-binding F-box protein)和 1 个乙烯响应转录因子 *ERF*(ethylene-responsive transcription factor)。由图 9-G可知, *ETR*(Vitvi07g00359)和 *ERF*(Vitvi05g00715)在 1~4 DAG 高 表达,在 4~10 DAG 呈下降趋势。而 *EBF*(Vitvi04g00482)表达量变化趋势相反。

参与水杨酸信号转导的3个差异表达基因均为 病程相关蛋白基因*PRI*(pathogenesis-related protein 1)。由图9-H可知,Vitvi03g00752表达量在1~10 DAG呈上升趋势,之后显著下降。Vitvi03g01650和 Vitvi03g01651表达量在1~4 DAG显著上升,之后呈 下降趋势。

2.8 加权基因共表达网络构建与分析

2.8.1 基因共表达模块构建 为分析转录组数据中的基因表达特征,寻找葡萄绿枝嫁接愈合过程中与内源激素相关的基因模块和共表达基因。将转录组数据中的36966个基因过滤掉90%以上FPKM<10的基因,获得7949个高表达基因进行WGCNA分析。过滤后的基因根据表达量进行层次聚类(图10-A),未发现离群样本。以无尺度拓扑拟合指数*R*²≥ 0.83,最优软阈值 power=28,构建更符合无尺度拓扑

结构的网络。采用动态剪切树法共获得13个共表 达模块(图10-B),各模块中所包含的基因数量差异 明显,其中松石绿(Turquoise)模块中的基因数量最 多,有2400个,棕褐色(Tan)模块中的基因数量最 少,仅有41个(图10-C)。 2.8.2 模块与代谢物的关联分析 将13个基因共 表达模块分别与天工丽人/贝达嫁接接口的IAA、 IP、ABA、JA、JA-Ile、MeJA含量进行相关性分析。 以皮尔逊相关系数(|r|≥0.8)和显著性p值(p<0.01) 的大小为筛选条件。由图11可知,松石绿模块与



A. 样本聚类树; B. 基因共表达模块划分; C. 各模块基因数量。

A. Division of gene co-expression modules; B. Number of genes in each module; C. Number of genes in each module.



JA、IP含量变化呈显著正相关(r = 0.94, $p = 1.6 \times 10^{-7}$; r = 0.85, $p = 6.1 \times 10^{-5}$),黄绿色(Greenyellow)模块与 IAA含量变化呈显著正相关(r = 0.85, $p = 6 \times 10^{-5}$)。 棕色(Brown)模块与ABA、IP含量变化呈显著负相 关(r = -0.82, $p = 1.7 \times 10^{-4}$;r = -0.8, $p = 3.8 \times 10^{-4}$)。红色 (Red)模块与JA-IIe含量变化呈显著负相关(r = -0.81, $p = 2.6 \times 10^{-4}$)。

2.8.3 葡萄绿枝嫁接愈合过程中与内源激素相关的 关键基因 与植物激素含量变化高度相关的松石绿 模块和棕色模块为关键模块。2个模块分别包含前 文(2.6,2.7)所述26个、10个DEGs,根据基因显著性 (gene significance,GS)>|0.75|、模块关系(module membership,MM)>0.89、模块连通性(eigengene connectivity,kME)>0.89过滤。松石绿模块中筛选 到6个DEGs,分别为IAA早期响应基因*GH3*(Vitvi03g00586),JA 合成路径上的LOX(Vitvi06g00158)、AOS(Vitvi18g00886)、OPCL1(Vitvi18g00124),ABA转录因子ABF(Vitvi12g01667)以及与初生细胞壁有关的木葡聚糖内糖基转移酶基因 TCH4(Vitvi11g01682)。棕色模块中筛选到2个IAA 信号转导通路上的DEGs,分别为细胞膜质子泵ATP 酶基因AHA(Vitvi14g01888)和IAA受体基因TIRI (Vitvi07g00248)。利用Cytoscape 3.8.0软件对松石 绿模块筛选到的6个DEGs进行可视化。由图12可 以看出,与JA合成有关的3个DEGs相关性较显 著。IAA早期响应基因GH3(Vitvi03g00586)与 ABA转录因子ABF(Vitvi12g01667)相关性也较显 著,说明ABA和IAA信号转导存在相互作用共同调 控葡萄绿枝嫁接愈合过程。

2.8.4 qRT-PCR 验证 对筛选到的葡萄绿枝嫁接愈

模块-性状相关性 Module-trait relationships							
MEturquoise	-0.49 (0.063)	0.78 (0.00057)	0.85 (0.000061)	0.94 (1.6e-0.7)	0.45 (0.09)	0.61 (0.017)	
MEmagenta	-0.37 (0.17)	0.12 (0.68)	-0.18 (0.52)	-0.31 (0.27)	-0.3 (0.27)	0.092 (0.74)	
MEyellow	-0.47 (0.075)	0.44 (0.1)	0.28 (0.31)	0.31 (0.27)	-0.033 (0.91)	0.55 (0.033)	- 10
MEgreen	-0.44 (0.1)	0.78 (0.00058)	0.44 (0.099)	0.37 (0.18)	0.014 (0.96)	0.49 (0.067)	1.0
MEtan	0.22 (0.44)	0.54 (0.036)	0.089 (0.75)	0.083 (0.77)	-0.27 (0.32)	0.67 (0.0068)	0.5
MEblack	0.35 (0.2)	0.022 (0.94)	0.1 (0.71)	0.33 (0.23)	-0.0096 (0.97)	0.64 (0.011)	
MEpink	-0.085 (0.76)	-0.24 (0.39)	0.23 (0.4)	0.39 (0.15)	0.39 (0.15)	-0.075 (0.79)	0.0
MEgreenyellow	0.85 (0.00006)	-0.48 (0.067)	-0.56 (0.03)	-0.53 (0.043)	-0.32 (0.25)	-0.2 (0.48)	
MEred	0.14 (0.62)	-0.47 (0.079)	-0.32 (0.24)	-0.45 (0.093)	0.039 (0.89)	-0.81 (0.00026)	-0.5
MEpurple	-0.35 (0.2)	-0.31 (0.26)	-0.47 (0.075)	-0.69 (0.0044)	-0.29 (0.3)	-0.56 (0.029)	
MEblue	0.075 (0.79)	-0.42 (0.12)	-0.48 (0.07)	-0.44 (0.1)	-0.38 (0.17)	0.14 (0.63)	-1.0
MEbrown	0.54 (0.04)	-0.82 (0.00017)	-0.8 (0.00038)	-0.76 (0.00096)	-0.44 (0.1)	-0.25 (0.37)	
Megrey	-0.55 (0.034)	-0.3 (0.28)	0.14 (0.63)	0.12 (0.66)	0.4 (0.14)	-0.47 (0.079)	
	IAA	ABA	IP	JA	MeJA	JA-Ile	e)

图 11 基因模块与植物激素含量相关性热图

Fig. 11 Heat map of correlation between gene modules and plant hormone concentrations



红色是 IAA 相关基因,蓝色是 JA 相关基因,紫色是 ABA 相关基因,绿色是 BR 相关基因;连线粗细代表两个基因间连通的权重值 (weight)大小。

Red was IAA related gene, blue was JA related gene, purple was ABA related gene, green was BR related gene; the wire thickness represented the weight value of connectivity between two genes.

图 12 松石绿模块内与植物激素相关的核心基因的基因网络

Fig. 12 Gene network of core genes associated with plant hormones within turquoise module

合过程中与内源激素相关的8个关键基因进行qRT-PCR验证(图13)。结果显示8个基因的相对表达量

变化趋势与转录组测序结果基本一致,说明转录组 数据可靠,用此数据得出的分析结果可信。





3 讨 论

葡萄绿枝嫁接愈合过程与拟南芥相似,接穗与 砧木伤口处密切结合发生组织粘连,结合处周围韧 皮部、木质部薄壁细胞等发生脱分化形成愈伤组 织。愈伤组织细胞不断分裂迅速填充砧穗间隙,部 分愈伤组织细胞分化为维管组织,实现砧穗之间的 连通^[19]。观察接穗芽外观形态可知,不同砧穗组合 接穗芽萌芽时间不同,可能是因为接穗与砧木的亲 和性不同,从而导致愈合进程不同,但不同砧穗组合 在13 DAG接穗芽均至少有1枚叶片完全展开,表明 不同砧穗组合在嫁接后13 d内完成绿枝嫁接愈合过 程,砧穗之间连通,能正常进行水分和养分运输。

笔者在本研究中对天工丽人/贝达的嫁接接口 进行转录组测序,结果表明,愈合过程中的基因表达 存在显著差异。与1DAG相比,7、10和13DAG均 存在大量下调基因,而4DAG下调基因较少,这可 能是愈合前期接穗和砧木切割面上的细胞膨胀,在 嫁接接口处形成薄膜,响应初生细胞壁松弛、次生细 胞壁形成的基因活跃^[4],导致1~4DAG之后的表达 基因出现大量下调。通过时序表达分析将差异表达 基因分成6类,最多的一类基因显著富集在木葡聚 糖:木葡聚糖葡萄糖基转移酶活性、木葡聚糖代谢过 程等途径中,并且在愈合过程中表达整体呈下降的 趋势,也进一步说明葡萄绿枝嫁接愈合前期与细胞 壁的动态变化密切相关。此外,包含基因较多的 Cluster 3 主要富集在叶绿体被膜、生长素激活的信 号转导、叶绿体、果糖-1,6-二磷酸酶 I、韧皮部或木 质部组织发生等途径,表明生长素信号转导途径在 愈合过程中起重要的调控作用。

植物细胞壁在伤口反应、细胞黏附、识别和分化 中具有重要作用^[20]。木葡聚糖是双子叶植物初生细 胞壁中重要的半纤维素^[21]。木葡聚糖内糖基转移酶 (TCH4)功能体现在催化木葡聚糖分子转移、细胞壁 松弛时重新排列聚合物、使细胞扩增修饰初生细胞 壁或使细胞壁部分降解等方面^[22-23]。有研究表明, BR可诱导TCH4活性增强,在植物细胞壁松弛过程 中发挥重要作用^[24]。本研究结果表明参与BR信号 转导的除 Vitvil1g01268 之外的5个*TCH4*在1~4 DAG高表达,在10~13 DAG显著下降,表明愈合前 期*TCH4*可能通过改变细胞壁的结构和性质来调节 细胞的形态和功能。

不同砧穗组合IAA含量变化趋势相似,在愈合 过程中呈上升趋势。在细胞核内, IAA 主要依赖于 经典的TIR1-Aux/IAA-ARFs 信号转导途径实现生 长素信号的传递,调节植物细胞对生长素的慢速响 应^[25]。在本研究中, GH3 (Vitvi03g00586)在1~4 DAG高表达,之后显著下降。GH3能催化IAA腺苷 化或与氨基酸形成复合物,在IAA 失活中起核心作 用^[26]。天工丽人/贝达嫁接接口的IAA含量在愈合 前期较低,愈合后期呈上升趋势。Kawaguchi等^四研 究未嫁接接穗和未嫁接砧木切口部位植物激素的变 化,发现在切割后24、72、120和168h,接穗部位 IAA-Asp浓度呈上升趋势而 IAA 浓度呈下降趋势, 因此推测 IAA 在愈合前期浓度较低与 GH3 通路有 关。生长素胞外受体ABP1在植物界广泛存在,与 TMKs跨膜受体激酶形成生长素共受体来感受并快 速传递胞外生长素信号^[27]。有研究发现,ABP1在维 管组织创伤后再生过程中显著上调表达,且过表达 ABP1可促进再生。同时,ABP1和TMKs是茎在伤 口周围再生维管系统中所必需的[28]。在本研究中, ABP1 (Vitvi07g00196) 在 7 DAG vs 10 DAG 显著上 调,说明在7~10 DAG细胞可能进行维管组织相关 的活动。激活的 TMKs 通过磷酸化方式调控 AHA、 MKK4/5-MPK3/6等一系列下游底物活性[29]。有研 究表明, IAA 可以在数秒内诱导 TMK1 结合 AHA,

激活质子泵的活性,导致大量质子被泵出细胞外,从 而引起细胞壁酸性化和细胞的伸长^[30]。IAA还能通 过TMK1/4-MKK4/5-MPK3/6信号途径,来调控细胞 分裂模式^[31]。在本研究中,*AHA*(Vitvi14g01888)表 达量在嫁接后第1周呈上升趋势,*MPK3*(Vitvi06g00356)在1~4 DAG高表达。说明IAA在1~4 DAG促进细胞不断分裂和增殖,在1~7 DAG促进细 胞伸长。

CTK 通常通过与 IAA 信号通路的互作而发 挥作用^[32]。有研究发现,一些CTK 信号突变体可以 诱导木质部分化,外源CTK 处理也会抑制木质部的 形成^[33]。IP 含量在愈合过程中总体呈下降趋势,与 IAA 水平趋势相反。说明葡萄绿枝嫁接愈合过程中 IP 与 IAA 信号通路存在拮抗作用,IP 可能负调控木 质部的形成。

ABA含量在愈合前期保持较高水平,愈合后期 呈下降趋势。在本研究中,ABA合成关键酶基因 NCED(Vitvi19g01356)和ABA转录因子ABF(Vitvi12g01667)均在1~4 DAG高表达,在4~10 DAG呈 下降趋势,与天工丽人/贝达ABA含量变化趋势相 似。ABA既可以在木质部运输^[34],也可以在韧皮部 运输。ABA早期水平较高可能是受损组织脱水引 起干旱胁迫,导致ABA合成增加,并通过维管组织 运输到嫁接接口处^[11]。ABA含量在愈合后期呈下降 趋势可能与维管束的重连有关。

JAs含量在愈合过程中整体呈下降趋势。JA合成路径上的LOX(Vitvi06g00158)、AOS(Vitvi18g00886)和OPCL1(Vitvi18g00124)的表达量与天工丽人/贝达JA含量变化趋势一致。JA与IAA信号转导相互作用,IAA抑制JA生物合成¹⁵¹。有研究发现,JAs能抑制CTK响应,允许更多木质部形成¹⁵¹。Jang等¹⁶⁰研究发现,JAs与IAA、CTK相互作用通过抑制生长素极性转运载体PIN7.4的表达来调控木质部的形成。JAs在维管形成中的作用及其与IAA、CTK的相互作用有待进一步研究。

4 结 论

葡萄绿枝嫁接愈合过程中植物激素的含量变化 具有阶段特异性。IP、ABA和JAs含量在愈合前期 较高,IAA含量在愈合后期保持较高水平。转录组 数据筛选出27个DEGs参与植物激素合成和代谢, 49个DEGs参与植物激素信号转导。IAA在嫁接愈 合过程中起关键作用,IP、ABA、JAs通过与IAA信 号转导相互作用,共同调控葡萄绿枝嫁接愈合过 程。IP与IAA信号通路存在拮抗作用,IP可能负调 控木质部的形成。JA与IAA信号转导存在相互作 用,IAA抑制JA生物合成。本研究结果为葡萄绿枝 嫁接愈合分子机制研究奠定了基础。

致谢:感谢北京大兴喜山葡萄合作社提供试验 材料,感谢卢浩成、姚雪辰、田萌勃、史宁、李明玉在 仪器分析和论文写作过程中给予的指导!

参考文献 References:

[1] 史祥宾,王海波,黄永,魏华,王小龙,王志强,王宝亮,刘英 君.葡萄叶柄去除绿枝嫁接苗木标准化繁育技术[J].果树实 用技术与信息,2023(12):23-24.

SHI Xiangbin, WANG Haibo, HUANG Yong, WEI Hua, WANG Xiaolong, WANG Zhiqiang, WANG Baoliang, LIU Yingjun. Standard breeding technique of grape leaf removal greenwood grafting seedlings[J]. Applied Technology and Information for Fruit Tree, 2023(12):23-24.

[2] 王海波,史祥宾,黄永,魏华,王小龙,王志强,王宝亮,刘英君.葡萄嫁接苗木标准化繁育技术[J].果树实用技术与信息, 2023(12):21-23.

WANG Haibo, SHI Xiangbin, HUANG Yong, WEI Hua, WANG Xiaolong, WANG Zhiqiang, WANG Baoliang, LIU Yingjun. Standard breeding technique of grape grafted seedlings[J]. Applied Technology and Information for Fruit Tree, 2023(12):21-23.

[3] 杜浩,陈瑶,吴庆贤,刘思彤,靳乐妮,尹增芳.砧/穗间交流的物质及其嫁接愈合效应[J].中国细胞生物学学报,2024,46
 (2):327-335.

DU Hao, CHEN Yao, WU Qingxian, LIU Sitong, JIN Leni, YIN Zengfang. The exchange substance of rootstock and scion and its grafting healing effect[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2024,46(2):327-335.

- [4] MELNYK C W, SCHUSTER C, LEYSER O, MEYEROWITZ E M. A developmental framework for graft formation and vascular reconnection in *Arabidopsis thaliana*[J]. Current Biology, 2015,25(10):1306-1318.
- [5] DUAN Y D, ZHANG F, MENG X M, SHANG Q M. Spatiotemporal dynamics of phytohormones in the tomato graft healing process[J]. Horticultural Plant Journal, 2024, 10(6): 1362-1370.
- [6] XU J N, WEI X Y, XIONG M, ZHANG T, LIU C J, BIE Z L, HUANG Y. A method for simultaneously monitoring phloem and xylem reconnections in grafted watermelon seedlings[J]. Scientia Horticulturae, 2022, 299:111058.
- [7] COOKSON S J, MORENO M J C, HEVIN C, MENDOME L Z N, DELROT S, TROSSAT-MAGNIN C, OLLAT N. Graft union

formation in grapevine induces transcriptional changes related to cell wall modification, wounding, hormone signalling, and secondary metabolism[J]. Journal of Experimental Botany, 2013,64(10):2997-3008.

- [8] DHARMASIRI N, DHARMASIRI S, ESTELLE M. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor[J]. Nature, 2005, 435(7041): 441-445.
- [9] ROBERT S, KLEINE- VEHN J, BARBEZ E, SAUER M, PA-CIOREK T, BASTER P, VANNESTE S, ZHANG J, SIMON S, ČOVANOVÁ M, HAYASHI K, DHONUKSHE P, YANG Z B, BEDNAREK S Y, JONES A M, LUSCHNIG C, ANIENTO F, ZAŽÍMALOVÁ E, FRIML J. ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in *Arabidopsis*[J]. Cell, 2010, 143(1):111-121.
- [10] RASOOL A, MANSOOR S, BHAT K M, HASSAN G I, BABA T R, ALYEMENI M N, ALSAHLI A A, EL-SEREHY H A, PA-RAY B A, AHMAD P. Mechanisms underlying graft union formation and rootstock scion interaction in horticultural plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11:590847.
- [11] KAWAGUCHI K, NOTAGUCHI M, OKAYASU K, YU S W, KOJIMA M, TAKEBAYASHI Y, SAKAKIBARA H, OTAGA-KI S, MATSUMOTO S, SHIRATAKE K. Plant hormone profiling of scion and rootstock incision sites and intra- and inter-family graft junctions in *Nicotiana benthamiana*[J]. Plant Signaling & Behavior, 2024, 19(1):2331358.
- [12] VISHWAKARMA K, UPADHYAY N, KUMAR N, YADAV G, SINGH J, MISHRA R K, KUMAR V, VERMA R, UPADHYAY R G, PANDEY M, SHARMA S. Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: A review on current knowledge and future prospects[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8:161.
- [13] CHEN K, LI G J, BRESSAN R A, SONG C P, ZHU J K, ZHAO Y. Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2020, 62(1):25-54.
- [14] IKEUCHI M, IWASE A, RYMEN B, LAMBOLEZ A, KOJIMA M, TAKEBAYASHI Y, HEYMAN J, WATANABE S, SEO M, DE VEYLDER L, SAKAKIBARA H, SUGIMOTO K. Wounding triggers callus formation *via* dynamic hormonal and transcriptional changes[J]. Plant Physiology, 2017, 175(3): 1158-1174.
- [15] NANDA A K, MELNYK C W. The role of plant hormones during grafting[J]. Journal of Plant Research, 2018, 131(1):49-58.
- [16] 谢露露,崔青青,董春娟,尚庆茂.植物嫁接愈合分子机制研究 进展[J].植物学报,2020,55(5):634-643.
 XIE Lulu, CUI Qingqing, DONG Chunjuan, SHANG Qingmao.
 Recent advances in molecular mechanisms of plant graft healing process[J]. Chinese Bulletin of Botany,2020,55(5):634-643.
- [17] MATSUOKA K, YANAGI R, YUMOTO E, YOKOTA T, YA-MANE H, SATOH S, ASAHINA M. RAP2.6L and jasmonic acid-responsive genes are expressed upon *Arabidopsis* hypocotyl grafting but are not needed for cell proliferation related to heal-

ing[J]. Plant Molecular Biology, 2018, 96(6): 531-542.

- [18] YAO X C, XIA N Y, MENG X, DUAN C Q, PAN Q H. A onestep polyphenol removal approach for detection of multiple phytohormones from grape berry[J]. Horticulturae, 2022, 8(6):548.
- [19] 王凤婷,赵福顺,乔凯彬,徐珣,刘金亮.蔬菜嫁接砧穗互作分子机制研究进展[J]. 生物技术通报,2024,40(10):149-159.
 WANG Fengting, ZHAO Fushun, QIAO Kaibin, XU Xun, LIU Jinliang. Progress on the molecular mechanism of scion-root-stock interactions in vegetable grafting[J]. Biotechnology Bulletin,2024,40(10):149-159.
- [20] SALA K, KARCZ J, RYPIEŃ A, KURCZYŃSKA E U. Unmethyl- esterified homogalacturonan and extensins seal *Arabidopsis* graft union[J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1):151.
- [21] 肖银燕,袁伟娜,刘静,孟建,盛奇明,谭烨欢,徐春香.木葡聚 糖及其在植物抗逆过程中的功能研究进展[J].植物学报, 2020,55(6):777-787.

XIAO Yinyan, YUAN Weina, LIU Jing, MENG Jian, SHENG Qiming, TAN Yehuan, XU Chunxiang. Xyloglucan and the advances in its roles in plant tolerance to stresses[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2020, 55(6): 777-787.

- [22] XU W, PURUGGANAN M M, POLISENSKY D H, ANTOSIE-WICZ D M, FRY S C, BRAAM J. *Arabidopsis* TCH₄, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase[J]. The Plant Cell, 1995, 7(10): 1555-1567.
- [23] 杨帅,高尚珠,卢晗,詹亚光,曾凡锁. 植物细胞壁形成及在非 生物胁迫中的作用[J]. 植物生理学报,2023,59(7):1251-1264.
 YANG Shuai,GAO Shangzhu,LU Han,ZHAN Yaguang,ZENG Fansuo. Plant cell wall development and its function in abiotic stress[J]. Plant Physiology Journal,2023,59(7):1251-1264.
- [24] 陈晨,陈虹,倪铭,张子晗,喻方圆.油菜素内酯调控植物生长 发育的研究进展[J]. 林业科学,2022,58(7):144-155.
 CHEN Chen, CHEN Hong, NI Ming, ZHANG Zihan, YU Fangyuan. Research progress of brassinolide in regulating plant growth and development[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2022, 58 (7):144-155.
- [25] YU Z P, ZHANG F, FRIML J, DING Z J. Auxin signaling: Research advances over the past 30 years[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2022, 64(2): 371-392.
- [26] SUGAWARA S, MASHIGUCHI K, TANAKA K, HISHIYAMA S, SAKAI T, HANADA K, KINOSHITA-TSUJIMURA K, YU H, DAI X H, TAKEBAYASHI Y, TAKEDA-KAMIYA N, KAK-IMOTO T, KAWAIDE H, NATSUME M, ESTELLE M, ZHAO Y D, HAYASHI K I, KAMIYA Y, KASAHARA H. Distinct characteristics of indole- 3- acetic acid and phenylacetic acid, two common auxins in plants[J]. Plant & Cell Physiology, 2015, 56(8):1641-1654.

- [27] ZHOU Y W, WANG C Y, YU Y Q, DING Z J, XU T D. Rapid auxin signaling: An ancient and conserved response in plants[J]. The Innovation Life, 2024, 2(2): 100061.
- [28] FRIML J, GALLEI M, GELOVÁ Z, JOHNSON A, MAZUR E, MONZER A, RODRIGUEZ L, ROOSJEN M, VERSTRAETEN I, ŽIVANOVIĆ B D, ZOU M X, FIEDLER L, GIANNINI C, GRONES P, HRTYAN M, KAUFMANN W A, KUHN A, NAR-ASIMHAN M, RANDUCH M, RÝDZA N, TAKAHASHI K, TAN S T, TEPLOVA A, KINOSHITA T, WEIJERS D, RAKUSOVÁ H. ABP1-TMK auxin perception for global phosphorylation and auxin canalization[J]. Nature, 2022, 609(7927): 575-581.
- [29] YU Y Q, TANG W X, LIN W W, LI W, ZHOU X, LI Y, CHEN R, ZHENG R, QIN G C, CAO W H, PÉREZ-HENRÍQUEZ P, HUANG R F, MA J, QIU Q Q, XU Z W, ZOU A L, LIN J C, JI-ANG L W, XU T D, YANG Z B. ABLs and TMKs are co-receptors for extracellular auxin[J]. Cell, 2023, 186(25): 5457-5471.
- [30] LIN W W, ZHOU X, TANG W X, TAKAHASHI K, PAN X, DAI J W, REN H, ZHU X Y, PAN S Q, ZHENG H Y, GRAY W M, XU T D, KINOSHITA T, YANG Z B. TMK-based cell-surface auxin signalling activates cell-wall acidification[J]. Nature, 2021,599(7884):278-282.
- [31] 马军,徐通达.植物非经典生长素信号转导通路解析[J].生物 技术通报,2020,36(7):15-22.
 MA Jun, XU Tongda. Non-canonical auxin signaling pathway in plants[J]. Biotechnology Bulletin,2020,36(7):15-22.
- [32] SCHALLER G E, BISHOPP A, KIEBER J J. The Yin-Yang of hormones: Cytokinin and auxin interactions in plant development[J]. The Plant Cell, 2015, 27(1):44-63.
- [33] MÄHÖNEN A P, HIGUCHI M, TÖRMÄKANGAS K, MIY-AWAKI K, PISCHKE M S, SUSSMAN M R, HELARIUTTA Y, KAKIMOTO T. Cytokinins regulate a bidirectional phosphorelay network in *Arabidopsis*[J]. Current Biology, 2006, 16(11): 1116-1122.
- [34] YANG Q, DENG X J, LIU T, QIAN J Y, ZHANG P H, ZHU E G, WANG J Q, ZHU X X, KUDOYAROVA G, ZHAO J Z, ZHANG K W. Abscisic acid root- to- shoot translocation by transporter AtABCG25 mediates stomatal movements in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2024, 195(1):671-684.
- [35] PITAKSARINGKARN W, ISHIGURO S, ASAHINA M, SA-TOH S. ARF6 and ARF8 contribute to tissue reunion in incised Arabidopsis inflorescence stems[J]. Plant Biotechnology, 2014, 31(1):49-53.
- [36] JANG G, YOON Y, CHOI Y D. Jasmonic acid modulates xylem development by controlling expression of *PIN-FORMED* 7[J]. Plant Signaling & Behavior, 2019, 14(9): 1-4.