



universidad  
de león



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**

**MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES  
DEL INJERTO EN PLANTAS**

**CELLULAR AND MOLECULAR MECHANISMS OF  
PLANT GRAFTING**

**Autor:** Lara Gallego Acuña

Tutor: María Luz Centeno Martín

**GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**Julio, 2022**

## Índice

1. Introducción .....	1
1.1 El injerto en plantas .....	1
1.2 Aplicaciones e importancia del injerto en la producción agrícola actual .....	2
1.3 Planteamiento y objetivos.....	4
2. Metodología .....	5
3. Formación del injerto. El problema de la incompatibilidad .....	5
4. Bases celulares y moleculares del injerto .....	10
4.1 Respuesta a la herida, adhesión celular y formación de callo .....	11
4.2 Formación y unión del floema.....	19
4.3 Formación y unión del xilema .....	20
5. Intercambio de moléculas y orgánulos entre púa y porta .....	23
6. Conclusiones .....	25
7. Referencias.....	26

## Resumen

El injerto es una técnica agrícola con miles de años de antigüedad. Consiste en cortar la parte aérea de una planta (púa o variedad) y la parte radical de otra (patrón, portainjerto, porta o pie) de la misma o de diferentes especies (homoinjerto y heteroinjerto, respectivamente) y juntarlas para que sus tejidos se unan y crezcan como una única planta. Así, se consiguen nuevas variedades con ventajas adaptativas que, en última instancia, se traducen en un mayor rendimiento. Sin embargo, muchos injertos no son funcionales a pesar de realizarlos en las condiciones ambientales óptimas. Por ello, el objetivo del trabajo ha sido reunir los conocimientos existentes hasta el momento sobre los procesos celulares y moleculares que ocurren en una planta durante un injerto para intentar averiguar qué factores son clave para su éxito. Esto ha permitido concluir que el transporte a corta y larga distancia de moléculas es esencial y, en concreto, que las fitohormonas presentan un papel clave en su regulación. Sin embargo, es necesario seguir investigando el injerto a este nivel para conseguir dilucidar todos los detalles del proceso y poder, así, obtener un mayor rendimiento económico de este tipo de cultivos.

Palabras clave: injerto de plantas, fitohormonas, formación de callo, reconexión vascular, respuesta a la herida.

## Abstract

Grafting is an agricultural technique that is thousands of years old. It consists of cutting the aerial part of one plant (scion or variety) and the root part of another (rootstock) from either the same or different species (homograft and heterograft, respectively) and bringing them together so that their tissues can join and grow as a single plant. This results in new plant varieties with adaptive advantages that ultimately can be translated into higher yields. Nevertheless, many grafts are unfunctional despite being executed under optimal environmental conditions. Hence, the aim of this work has been to gather the knowledge available so far on the cellular and molecular processes that occur in a plant during grafting in order to try to determine which factors are key to its success. This has led to the conclusion that both short and long-distance molecular transport are essential and that, in particular, phytohormones play a key role in its regulation. Nonetheless, it is necessary to keep researching grafting at this level in order to figure out all the details of the grafting process and thus be able to obtain a greater economic return from these types of crops.

Key words: callus formation, phytohormones, plant grafting, vascular reconnection, wound response.

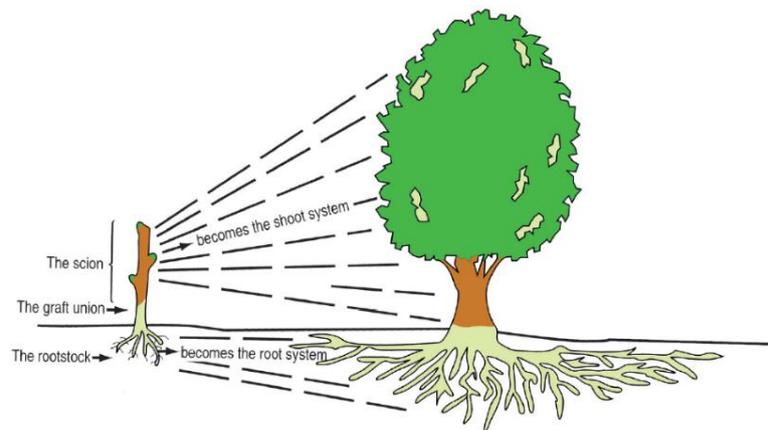
## Abreviaturas

<b>FH</b>	Fitohormona
<b>DAMP</b>	Damage-Associated Molecular Pattern
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species
<b>MAPKS</b>	Mitogen-Activated Protein Kinases
<b>AIA</b>	Ácido indolacético
<b>CK</b>	Citoquinina
<b>PIN</b>	PIN-FORMED
<b>FT</b>	Factor de Transcripción
<b>WIND1</b>	<i>WOUND INDUCED DEDIFFERENTIATION 1</i>
<b>ARF6/8</b>	AUXIN RESPONSE FACTOR 6/8
<b>RAP2.6L</b>	<i>RELATED TO AP2 6L</i>
<b>XTH19/20</b>	<i>XILOGLUCANO ENDOTRANSGLUCOSIDASA/HIDROLASA 19/20</i>
<b>Wt</b>	Wild type
<b>JA</b>	Ácido jasmónico
<b>DAD1</b>	<i>DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE 1</i>
<b>AP2</b>	APETALA2
<b>ERF</b>	ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR
<b>ABA</b>	Ácido abscísico
<b>GA</b>	Giberelina
<b>SL</b>	Estringolactona
<b>AHP6</b>	<i>HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER PROTEIN 6</i>
<b>PXY</b>	PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM
<b>TDR</b>	TRACHEARY ELEMENT DIFFERENTIATION INHIBITOR FACTOR RECEPTOR
<b>WOX4</b>	WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 4
<b>BR</b>	Brasinoesteroide
<b>ATHB7</b>	ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX 7
<b>ARNsi</b>	ARN de silenciamiento
<b>YFP</b>	Yellow Fluorescent Protein
<b>dsRed</b>	Red Fluorescent Protein

# 1. Introducción

## 1.1 El injerto en plantas

El injerto es una técnica agrícola que consiste en cortar dos piezas de plantas vivas de diferentes variedades o especies y juntarlas para que sus tejidos se unan y crezcan como una única planta. Este fenómeno también se da de manera natural, sobre todo en plantas que se injertan consigo mismas o con otras de la misma especie y menos habitualmente entre plantas de especies distintas (Hartmann *et al.*, 2011; Melnyk y Meyerowitz, 2015; Tedesco *et al.*, 2022). El fragmento de la planta que contribuye formando la porción aérea del injerto se denomina **púa o variedad** y es la que proporcionará los frutos, mientras que el que contribuye aportando la porción de la raíz se denomina **patrón, portainjerto, porta o pie (fig. 1)** y servirá para dotar a la planta de diferentes características de interés, como resistencia a condiciones ambientales, enfermedades o plagas (Melnyk y Meyerowitz, 2015; U.S. Department of Agriculture - Specialty Crop Research Initiative Team, no date). A veces, se añade un **interporta o porta intermedio**, procedente de otra especie distinta, entre ambos, si la púa y el porta proceden de especies incompatibles, para controlar la propagación de enfermedades entre ellos, para generar una forma especial en el árbol o para mejorar la capacidad de crecimiento de la planta originada (Hartmann *et al.*, 2011).



**Figura 1.** Partes básicas de un injerto: púa, unión del injerto y porta (*scion*, *graft union* y *rootstock* en inglés, respectivamente) (Hartmann *et al.*, 2011).

Existen dos tipos de injerto:

- **Homoinjerto:** la púa y el porta proceden de la misma especie (intraespecífico).
- **Heteroinjerto:** la púa y el porta proceden de especies diferentes (interespecífico).

Debido a las diferencias genéticas existentes entre especies distantes, hay más probabilidad de encontrarse con un injerto no funcional si se ha practicado un heteroinjerto que un homoinjerto

(Baron *et al.*, 2019). En general, cuanto más distancia filogenética haya entre ambas especies, menos probabilidad de éxito habrá al intentar injertarlas (Melnyk y Meyerowitz, 2015). Esto es debido a su **incompatibilidad**, lo cual se traduce en una falta de unión tisular entre púa y porta. La **compatibilidad** de las especies injertadas, al contrario, está asociada a la capacidad de unión de ambas porciones (Melnyk, 2017; Baron *et al.*, 2019; Tedesco *et al.*, 2022).

Se cree que el origen de esta técnica podría remontarse al s. V a. C., pues existen referencias de la utilización del injerto en la Biblia, textos de la Antigua Grecia y textos históricos de China (Melnyk y Meyerowitz, 2015). Sin embargo, no está claro dónde ni cómo surgió exactamente, pero es probable que el injerto que se produce de forma natural en algunas especies les sirviese de inspiración a las antiguas civilizaciones de Europa y Asia para la creación de esta técnica agrícola (Melnyk y Meyerowitz, 2015; Nawaz *et al.*, 2016).

El primer registro de la aplicación del injerto data del 500 a. C., en China, cuando los granjeros unían diferentes variedades de calabaza para conseguir frutos más grandes. En cambio, no fue hasta 1927 cuando se documentó por primera vez la creación de injertos a partir de dos especies o cultivares distintos para el control de enfermedades y plagas, en Japón, injertando sandía sobre calabaza y consiguiendo la supervivencia de la primera frente a *Fusarium* (Kubota, 2016). En los años posteriores, la agricultura intensiva provocó la aparición de un mayor número de enfermedades procedentes del suelo en los cultivos, por lo que en la década de 1970 se comenzó a investigar esta técnica y a comercializar injertos en China con el objetivo de combatir las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, como *Fusarium* o *Verticillium*, bacterias y nematodos en cucurbitáceas y solanáceas. A partir de entonces y hasta la actualidad, el injerto se convirtió en una práctica habitual en este país (Huang *et al.*, 2015) y se extendió a otros, como Israel, que comenzó a injertar cucurbitáceas en las décadas de 1950 y 1960, Corea y Japón, que empezaron a aplicar la técnica en tomates en las décadas de 1980 y 1990 (Kubota, 2016). El injerto también se extendió por Europa a finales del s. XX (Singh *et al.*, 2017) y llegó a Canadá y EE. UU. a partir de 1990, que a su vez la introdujo en México en los años 2000, convirtiéndose en la técnica que utilizan actualmente para la propagación del tomate (Kubota, 2016).

### 1.2 Aplicaciones e importancia del injerto en la producción agrícola actual

La técnica del injerto se utiliza hoy en día como alternativa al empleo de bromuro de metilo para prevenir y evitar la propagación de fitopatógenos en las cosechas (Kubota, 2016; Singh *et al.*, 2017). Además, tiene otras aplicaciones que aportan importantes beneficios a una gran

variedad de cultivos: desde promover la vigorosidad de la planta, extender el periodo de cosecha y mejorar la calidad de los frutos, hasta proporcionarle ventajas adaptativas, como tolerancia al estrés abiótico (altas o bajas temperaturas, alta osmolaridad, baja disponibilidad de nutrientes e iones y tolerancia a metales pesados o al estrés hídrico), mejorar la eficiencia del uso del agua y la toma de nutrientes, controlar el crecimiento de malas hierbas, etc. (Melnyk y Meyerowitz, 2015; Nawaz *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2017; Williams *et al.*, 2021). En todas estas aplicaciones se pueden utilizar una púa o un porta, según el caso, naturalmente resistente a alguna de las citadas condiciones, o puede generarse un **transinjerto**, es decir, un injerto en el que una de las partes esté modificada genéticamente con el propósito de mejorar la productividad de la planta (Song *et al.*, 2015). Esto, en última instancia, se traduce en una reducción en las pérdidas económicas debidas a malas cosechas y una menor necesidad de la utilización de pesticidas y fertilizantes (Nawaz *et al.*, 2016).

Por otro lado, el injerto también es una técnica muy utilizada en investigación para estudiar, por ejemplo, el transporte a larga distancia a través del floema de moléculas como proteínas, ADN, ARNm, ARNs pequeños, y otras que intervienen en procesos como la regulación morfológica de la planta, su ciclo reproductivo o las interacciones con parásitos y microorganismos (Melnyk y Meyerowitz, 2015; Tsutsui y Notaguchi, 2017; Wang *et al.*, 2017; Baron *et al.*, 2019; Thomas y Frank, 2019; Williams *et al.*, 2021).

Por último, el injerto se aplica actualmente como técnica de propagación vegetativa (multiplicación clonal) en muchos cultivos, desde frutales (manzana, pera, naranja, mango, uva, melocotón, albaricoque, sandía, melón, almendra, nuez pecana, cereza, etc.) y hortícolas (pepino, tomate, pimiento, berenjena, calabaza, etc.) hasta ornamentales (rosa, crisantemo, buganvilla y bonsái) (Nawaz *et al.*, 2016; Baron *et al.*, 2019; Ruan *et al.*, 2020), y tiene cabida en muchas partes del mundo: Asia, Oriente Medio, Europa, el norte de África y América Central (Tsutsui y Notaguchi, 2017).

Se ha demostrado que el cultivo de injertos aumenta el coste de la producción, ya que el precio de los materiales de injerto es mayor que el de las semillas y se requieren más espacio, suministros y mano de obra para llevarlo a cabo. Sin embargo, esto se ve mitigado por los beneficios que aporta el injerto, mayores que los obtenidos de los mismos cultivos no injertados al permitir una mejor productividad de las cosechas (Fundación Hondureña de Investigación Agrícola, 2007; Ozores-hampton *et al.*, 2010; Genova *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2015). Un buen ejemplo de la rentabilidad de la técnica se encuentra en China, país productor de más de la

mitad de sandías y pepinos del mundo, de los cuales el 40 y 30%, respectivamente, son injertados (Huang *et al.*, 2015; Ruan *et al.*, 2020). Obviamente, el injerto resulta más rentable en aquellos países con la mano de obra más barata, como China o India (Singh *et al.*, 2017), donde se sigue haciendo de manera manual en la mayoría de los casos (Huang *et al.*, 2015), mientras que es más caro en países en los que se utiliza una técnica mecanizada, como EE. UU., muchos países de Europa, Corea o Japón (Singh *et al.*, 2017), donde se desarrollaron los primeros robots capaces de generar injertos (Kurata, 1994). Sin embargo, estos avances permiten realizar de 300 a 1200 injertos por hora, frente a 125-150 injertos por hora que puede realizar una persona de forma manual, por lo que la mecanización, a fin de cuentas, también resulta rentable (Ozores-Hampton *et al.*, 2010).

El injerto es tan importante en la producción agrícola actual que algunos cultivos solamente se producen injertados hoy en día (Tedesco *et al.*, 2022). Además, se han llegado a generar nuevos cultivos de los que se obtienen dos tipos de productos comerciales distintos en la misma planta, por ejemplo, injertando púas de tomate y portas de patata (como las marcas comerciales TomTato® o Ketchup 'n' Fries™) se pueden cosechar frutos de tomate y tubérculos de patata. Algo similar sucede con los injertos de berenjena sobre patata (como la marca comercial Egg & Chips®) (Melnik, 2017).

### 1.3 Planteamiento y objetivos

A pesar de la rentabilidad y el amplio abanico de aplicaciones que tiene el injerto, también existen problemas, como el bajo ratio de supervivencia de algunas especies (Guo *et al.*, 2017). Esto puede deberse a la técnica utilizada, pero en la mayor parte de los casos se debe a la incompatibilidad entre las especies injertadas, la cual puede tener un origen genético, fisiológico, en el crecimiento desproporcionado de púa y porta, etc. (Hartmann *et al.*, 2011). Para resolver estos problemas, se hace necesario estudiar las bases celulares y moleculares que rigen el injerto funcional (Williams *et al.*, 2021), pues conocer las claves del éxito del injerto permitiría aprovechar mejor todas las ventajas y opciones que este puede proporcionar a los cultivos y, así, obtener mayores beneficios económicos.

El **objetivo** de este trabajo bibliográfico es, precisamente, recopilar y discutir los resultados de las investigaciones más recientes relativas al estudio de los procesos celulares y moleculares que ocurren durante la formación de un injerto, así como de los factores clave a tener en cuenta para lograr su éxito.

## 2. Metodología

La metodología utilizada para realizar este trabajo ha constado de una búsqueda bibliográfica de seis meses sobre el injerto y su historia, factores de mayor relevancia a la hora de llevarlo a cabo, mecanismos celulares y moleculares implicados en la obtención de injertos funcionales y no funcionales y sobre la base científica más actual en el intercambio de moléculas y orgánulos entre púa y porta, seguido de la redacción del presente documento durante otros cinco meses.

Los buscadores utilizados para la obtención de la información fueron: Google Académico, Pubmed del NCBI y Science Direct. Se hizo una criba por fechas y se dio especial relevancia en la redacción a los artículos publicados entre 2016 y 2022. Las palabras clave principales utilizadas para la búsqueda de información fueron: injerto en plantas, historia del injerto, ventajas e inconvenientes del injerto, aplicaciones del injerto en plantas, fitohormonas en el injerto en plantas, pared celular en el injerto, respuesta a la herida, injertos funcionales y no funcionales e intercambio de moléculas en el injerto en plantas.

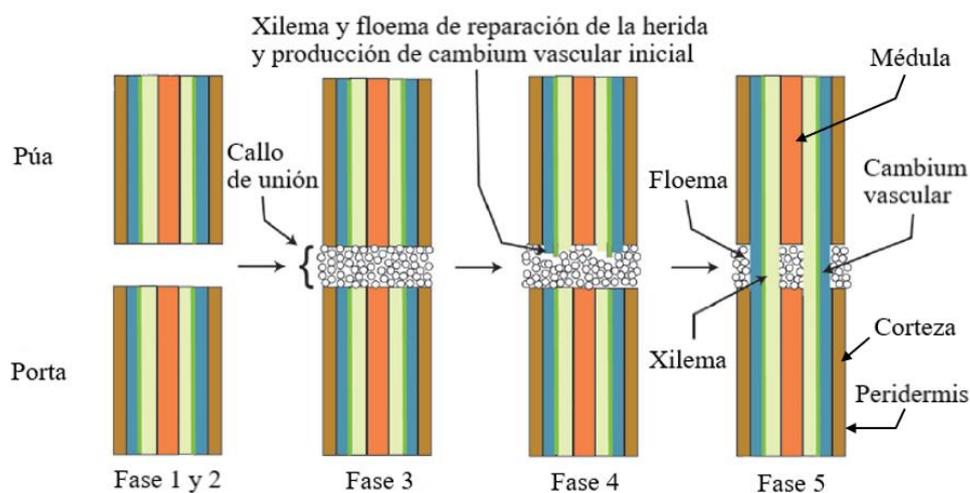
El gestor bibliográfico empleado fue Mendeley y el *software* utilizado para la redacción fue Microsoft Word, de Office 365.

## 3. Formación del injerto. El problema de la incompatibilidad

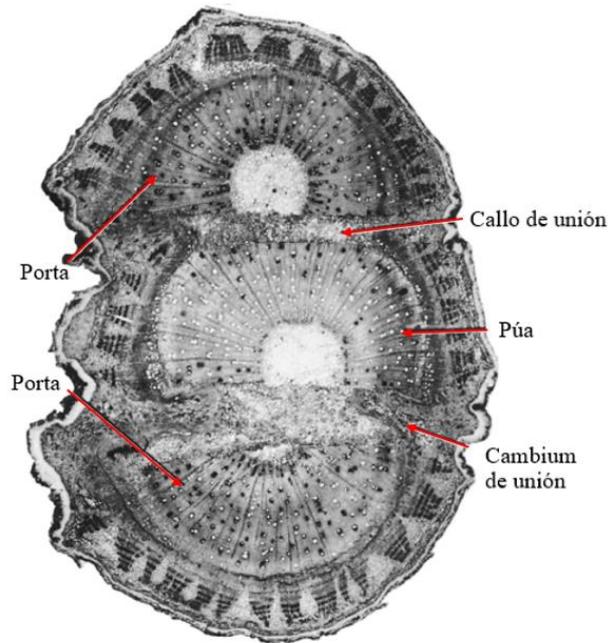
Para crear un injerto, lo primero que se hace es cortar el tallo de las dos plantas elegidas (tres, si se usa un interporta) en condiciones de asepsia y se ponen en contacto por la zona de corte. Se mantienen firmemente unidas con el propósito de que los tejidos se regeneren resultando en una continuidad tisular, dando lugar a una única planta (Hartmann *et al.*, 2011). Para ello, ocurren varios procesos desencadenados como **respuesta a la herida** generada. Primero, se observa una **zona necrótica** alrededor del corte, que suele desaparecer en injertos funcionales (Hartmann *et al.*, 2011; Frey *et al.*, 2020). Después, ocurre una **adhesión temprana**, favorecida por el depósito de algunos componentes de la pared celular (Frey *et al.*, 2020; Frey *et al.*, 2021; Frey *et al.*, 2022). Sin embargo, la principal característica visible cuando se genera un injerto es la formación posterior de un **callo de unión entre púa y porta** (que puede ser de mayor o menor tamaño según la especie) durante los primeros días (**fig. 2 y 3**). El callo de unión es una masa de células indiferenciadas cuyo objetivo es rellenar el hueco que pueda quedar entre los tejidos y servir de unión simplástica entre las dos partes sin conexión vascular para que puedan sobrevivir (Pina *et al.*, 2012; Melnyk, 2017). Además, también tiene como función diferenciarse dando lugar al **cambium de unión** y a los **tejidos vasculares**: el floema y el xilema (Melnyk y Meyerowitz, 2015). La formación del callo se ve favorecida por la presión

mecánica ejercida sobre la zona de corte con una cuerda, cinta adhesiva, una pinza, cera o Parafilm, que sirven tanto para mantener a púa y porta unidos como para orientar las divisiones celulares que darán lugar al callo, entre otras funciones detalladas más adelante (Melnik y Meyerowitz, 2015). En la mayoría de los injertos funcionales se forma callo y en la mayoría de los no funcionales, no se forma, pero esta **no parece ser una etapa imprescindible** para la generación del injerto y la unión vascular, puesto que se han descrito casos de injertos no funcionales con callo e injertos funcionales en los que no se ha formado callo o apenas se aprecia, por lo que podría ser que este fuese un proceso especie-específico (Melnik, 2017; Frey *et al.*, 2020; Frey *et al.*, 2021). Contrariamente, la **adhesión celular** que tiene lugar después de rellenar el hueco entre púa y porta solo suele darse entre especies compatibles, ya que depende del reconocimiento célula-célula (Frey *et al.*, 2021).

El **cambium de unión** generado a partir de las células del callo tiene la función de poner en contacto el cambium vascular de la púa y del porta, un meristemo lateral encargado de regenerar el tejido vascular en las plantas. Una vez ambos se encuentran unidos, será este el principal responsable de la formación de nuevo xilema hacia dentro y nuevo floema hacia fuera (**fig. 2 y 3**). Como se detalla más adelante, solamente se producen injertos funcionales a largo plazo cuando existe una continuidad vascular, por lo que un correcto contacto entre el cambium vascular de ambas porciones del injerto y su unión son esenciales para la supervivencia a largo plazo. Así, se permite la llegada del agua y sales minerales a la púa y de los fotoasimilados al porta, además del transporte a larga distancia de otras moléculas que regulan el metabolismo y desarrollo de las plantas (Hartmann *et al.*, 2011).



**Figura 2.** Fases de la generación de un injerto (Adaptado de Hartmann *et al.*, 2011).



**Figura 3.** Corte transversal a x10 de la zona de unión de un injerto en hendidura (Adaptado de Hartmann *et al.*, 2011).

Como se mencionaba anteriormente, algunos injertos tienen un bajo ratio de supervivencia (Guo *et al.*, 2017). Esto sucede sobre todo en heteroinjertos en los que se intentan unir dos especies con problemas de **incompatibilidad**, generando un injerto no funcional (Melnik y Meyerowitz, 2015). Sin embargo, también se conocen casos de plantas que injertan bien con otras de especies distantes filogenéticamente y no con plantas más próximas. De esto se deducen dos cosas: a) el primer factor que hay que tener en cuenta a la hora de realizar un injerto está representado por las especies que se van a injertar y la compatibilidad que existe entre ellas; b) que la incompatibilidad es un fenómeno de rechazo muy complejo en el que todavía queda mucho por investigar (Melnik, 2017). Para entenderlo, primero se deberá de aclarar lo que se entiende exactamente por compatibilidad e incompatibilidad en el injerto.

La **compatibilidad** en un injerto de plantas se traduce en la capacidad de ambos fragmentos de unirse y desarrollarse juntos como una única planta dado lugar a un injerto funcional. Esto ocurre cuando consiguen generar una unión vascular. Al contrario, dos especies son incompatibles cuando hay una discontinuidad vascular o del cambium por una unión fallida de ambas plantas, dando lugar a un injerto no funcional (Melnik, 2017; Baron *et al.*, 2019; Tedesco *et al.*, 2022). Este último puede identificarse por: rotura de la unión entre púa y porta; unión parcial entre ambas; muerte prematura de la planta; presencia de zonas necróticas; hojas amarillentas, etioladas o defoliación; diferencias significativas en la velocidad de crecimiento o la vigorosidad de la púa y el porta, etc. (Hartmann *et al.*, 2011; Melnik, 2017; Balbi *et al.*,

2019; Irisarri *et al.*, 2019; Frey *et al.*, 2021; He *et al.*, 2022). Cualquiera o varios de estos síntomas pueden apreciarse en cuestión de días, semanas o pocos meses (**incompatibilidad temprana**), o bien pueden aparecer al cabo de muchos meses o años (**incompatibilidad tardía**), como en el caso del roble, que tarda 20 años en manifestar la incompatibilidad, lo que dificulta su diagnóstico (Melnyk, 2017; Baron *et al.*, 2019; Bhat y Rao, 2020).

La incompatibilidad genética o fisiológica entre especies que conduce al injerto no funcional puede estar causada porque una de ellas produce una **sustancia perjudicial para la otra**. Por ejemplo, se sabe que el membrillero no puede injertarse con la mayoría de cultivares de peras, porque produce un metabolito que es convertido en cianuro al llegar al cultivar de pera, lo que mata a los tejidos de alrededor de la unión, con la consecuente falta de funcionalidad en el injerto (Melnyk y Meyerowitz, 2015). Otras causas de incompatibilidad entre especies pueden ser la dificultad para el reconocimiento célula-célula entre púa y porta o que ambas muestren respuestas al estrés desbalanceadas (Frey *et al.*, 2021). Todo esto pone en evidencia de nuevo que para evitar la incompatibilidad es necesario utilizar, preferiblemente, plantas con poca distancia filogenética.

Sin embargo, también puede darse un injerto no funcional debido a que una de las plantas esté infectada por un **virus latente**, **insectos** o **fitoplasmas inducibles por injerto**, que viajan de una planta resistente y asintomática a una planta susceptible tras formarse el injerto (Baron *et al.*, 2019; Bhat y Rao, 2020).

Para superar las citadas causas de incompatibilidad y conseguir la funcionalidad del injerto, se han desarrollado algunos procedimientos. Uno de ellos consiste en añadir un **interporta** entre ambas especies (Agus y Eka, 2017; Shaltiel-Harpaz *et al.*, 2018). En el ejemplo del membrillero y el peral, se utiliza como interporta una variedad de pera compatible con el membrillero, con lo que se entiende que el metabolito, capaz solamente de viajar cortas distancias, no llega nunca al cultivar de pera susceptible, permitiendo la generación de un injerto funcional (Melnyk y Meyerowitz, 2015). Pero esta técnica no funciona siempre debido, probablemente, a que la sustancia que provoca incompatibilidad podría viajar largas distancias a través del interporta (Hartmann *et al.*, 2011).

Aparte de la compatibilidad, hay otros factores que condicionan la unión de las especies a injertar y la supervivencia del injerto, como son: a) la edad del cultivar a injertar; b) las condiciones ambientales en las que se realiza el injerto (temperatura, humedad y momento del

año) y c) la técnica aplicada para cortar y unir las porciones de las plantas que participarán en el mismo.

En relación a la edad, existen evidencias de que si se injertan **plantas jóvenes**, habrá una mayor tasa de éxito, probablemente por tener una mayor capacidad de división y diferenciación celular y por poseer menores niveles de toxinas y metabolitos secundarios (Melnik y Meyerowitz, 2015; Nguyen y Yen, 2018).

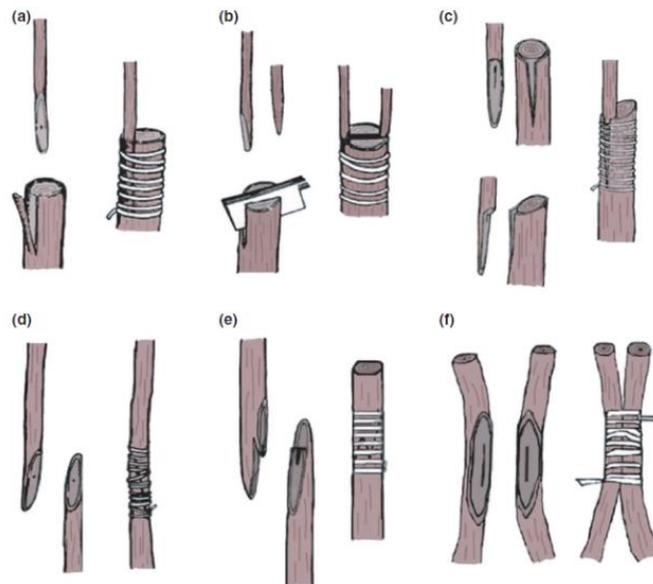
En general, las **temperaturas** demasiado altas o demasiado bajas pueden provocar la formación de poco callo de unión entre ambas plantas o retraso en su formación (Hartmann *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2016), así como más daño celular causado por una mayor abundancia de especies reactivas de oxígeno de la que cabría esperar y, como consecuencia de esto, mayor expresión de enzimas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa y ascorbato peroxidasa) (Muneer *et al.*, 2016).

La **humedad** debe de ser elevada, puesto que la pared de las células del cambium vascular y del parénquima son finas y carecen de resistencia a la plasmólisis celular que podría causar la deshidratación (Hartmann *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2020). Además, el agua favorece la división y la elongación celular necesarias para la formación del callo de unión, que, a su vez, será el que permitirá el paso de agua del porta a la púa en los primeros estadios del proceso de unión de ambas plantas (Sharma y Zheng, 2019). Por ello, esta unión púa-porta se suele mantener físicamente mediante la incorporación de algún material que permita retener la humedad natural de la planta como cera o Parafilm (Rahemi *et al.*, 2016; Bhat y Rao, 2020) o, incluso, se pueden aplicar tratamientos que cierren los estomas de las plantas antes de injertarlas para evitar que pierdan agua por transpiración (Dabirian y Miles, 2017).

El **momento del año** más adecuado para realizar el injerto, al menos en climas templados, suele ser el final de la primavera, pues cuando las temperaturas son cálidas se favorece la vascularización debido a una mayor actividad del cambium vascular y, por lo tanto, el transporte de hormonas implicadas en el proceso. De la misma forma, las condiciones de humedad suelen ser las óptimas en esta época del año (Hartmann *et al.*, 2011; Gotur *et al.*, 2017; Serivichyaswat *et al.*, 2022), aunque para ciertos cultivos puede ser más adecuada otra época diferente (Chouksey *et al.*, 2016).

Por último, existen numerosas **técnicas de injerto** (en la **figura 4** se muestran algunos ejemplos) y no todas son ideales para cualquier tipo de cultivo (**tabla 1**) (Melnik y Meyerowitz, 2015; Rasool *et al.*, 2020), de modo que casi se podría decir que hay un técnica concreta para

cada injerto. En cualquier caso, la metodología utilizada debe de garantizar un contacto adecuado entre el cambium vascular de la púa y el porta para que el injerto salga adelante.



**Figura 4.** Algunos ejemplos de las técnicas de injerto más populares. A. Injerto con corte en la corteza. B. Injerto en hendidura. C. Injerto de corona. D. Injerto por empalme. E. Injerto en lengüeta. F. Injerto por aproximación (Wang *et al.*, 2017).

**Tabla 1.** Ejemplos de las técnicas de injerto con mejores resultados para diferentes cultivos (Adaptado de Maurya *et al.*, 2019).

Púa	Porta	Métodos
Berenjena	<i>Solanum torvum</i> , <i>S. sissymbriifolium</i> , <i>Solanum khasianum</i>	Método en hendidura y lengüeta. Método en hendidura. Método en lengüeta y en hendidura.
Tomate	<i>L. pimpinellifolium</i> , <i>S. nigrum</i>	Solo método en hendidura. Método en lengüeta y en hendidura.
Pepino	<i>C. moschata</i> , <i>Cucurbita maxima</i>	Método de inserción de agujeros y en lengüeta. Método en lengüeta
Sandía	<i>Benincasa hispida</i> , <i>C. moschata</i> , <i>C. melo</i> , <i>C. moschata</i> x <i>C. máxima</i> , <i>Lagenaria siceraria</i>	Método de inserción de agujeros y en hendidura. Método de inserción de agujeros y en hendidura. Método en hendidura. Método de inserción por agujeros. Injerto por empalme.
Calabaza amarga	<i>C. moschata</i> <i>Lagenaria siceraria</i>	Método de inserción por agujeros y en lengüeta. Método de inserción por agujeros.

De todos los factores mencionados que condicionan la ratio de supervivencia de los injertos (sobre todo de los heteroinjertos) el menos estudiado y conocido es el de la incompatibilidad que existe entre ciertas especies. Por ello, es necesario averiguar qué ocurre en las plantas a nivel celular y molecular mientras se están injertando y comparar las diferencias existentes a estos niveles entre un injerto funcional y uno no funcional (Melnik, 2017; Baron *et al.*, 2019).

#### 4. Bases celulares y moleculares del injerto

Tal y como se he indicado en el apartado anterior, los pasos clave que tienen que acontecer para la generación de un injerto funcional son: respuesta a la herida, adhesión celular, formación de callo, unión de los tejidos, diferenciación celular para generar nuevo tejido vascular y, por



**Tabla 2.** Consecuencias de la liberación de ATP, NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, oligogalacturónidos, celobiosa, celodextrina y xiloglucano al practicar el corte en el tallo, siendo MAPKs = proteínas quinasa activadas por mitógenos, PAL = fenilalanina amonio-liasa, ROS = especies reactivas de oxígeno y STS = estilbeno sintasa.

<b>NAD<sup>+</sup> y NADP<sup>+</sup></b>	Estrés oxidativo.
<b>ATP</b>	Despolarización de las membranas, entrada de Ca <sup>++</sup> y formación de ROS.
<b>Oligogalacturónidos</b>	Liberación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y NO, estrés oxidativo, activación de MAPKs, de STS y PAL y depósito de calosa.
<b>Celobiosa</b>	Activación de MAPKs y entrada de Ca <sup>++</sup> .
<b>Celodextrinas</b>	Producción de ROS.
<b>Xiloglucano</b>	Activación de MAPKs, la STS, la PAL, división celular y producción de ROS.

Al liberarse estos fragmentos de la pared celular, se induce una reestructuración de la misma (Melnyk, 2017). Uno de los primeros cambios detectados en la composición de la pared de las células colindantes es un **depósito de pectinas**, formando una especie de gel que permite la adhesión temprana de ambas porciones del injerto (Melnyk y Meyerowitz, 2015; Melnyk, 2017; Frey *et al.*, 2020; Frey *et al.*, 2022) y que suele permanecer en los injertos funcionales. Esto genera un notable engrosamiento de las paredes a los 10 días tras el injerto que suele disminuir posteriormente, tras la unión de ambas porciones (Frey *et al.*, 2020), permitiendo la formación de **plasmodesmos**, que unen las células de púa y porta vía simplasto (Pina *et al.*, 2012; Melnyk y Meyerowitz, 2015; Melnyk, 2017).

Además, se **activan y sobreexpresan algunas enzimas** del cambium y la médula cercanos al corte, que están relacionadas con el mantenimiento, construcción y degradación de la pared de las células, como xiloglucano endotransglucosilasas/hidrolasas,  $\beta$ -1,4-glucanasas,  $\beta$ -1,3-glucanasas y expansinas. Como consecuencia de la mayor actividad enzimática, se produce un aumento en el depósito de algunos componentes de la pared celular (homogalacturonano y xiloglucano) en púa y porta inmediatamente después de formarse un injerto, y de otros solo en la púa (arabinano y arabinogalactano) (Frey *et al.*, 2022). Así pues, el objetivo parece ser la reconstrucción y reestructuración de la pared celular en la zona de corte. De hecho, se ha comprobado que sin esta sobreexpresión, el injerto no es funcional (Melnyk y Meyerowitz, 2015; Melnyk, 2017; Kurotani *et al.*, 2020; Notaguchi *et al.*, 2020).

Después de unos días de la realización del corte, se suele apreciar una **zona necrótica** alrededor del mismo que desaparece al formarse el callo en los injertos funcionales (Frey *et al.*, 2020).

En cuanto a los injertos no funcionales, en ellos también sucede la deposición de pectinas que permite la adhesión temprana, lo que explicaría que púa y porta puedan unirse durante las primeras etapas de la formación del injerto (Melnyk, 2017). Sin embargo, se ha observado que las células de varias capas de alrededor de la herida presentan depósitos de suberina, lignina y calosa (de mayor a menor abundancia), que son el resultado de una reacción de **defensa**

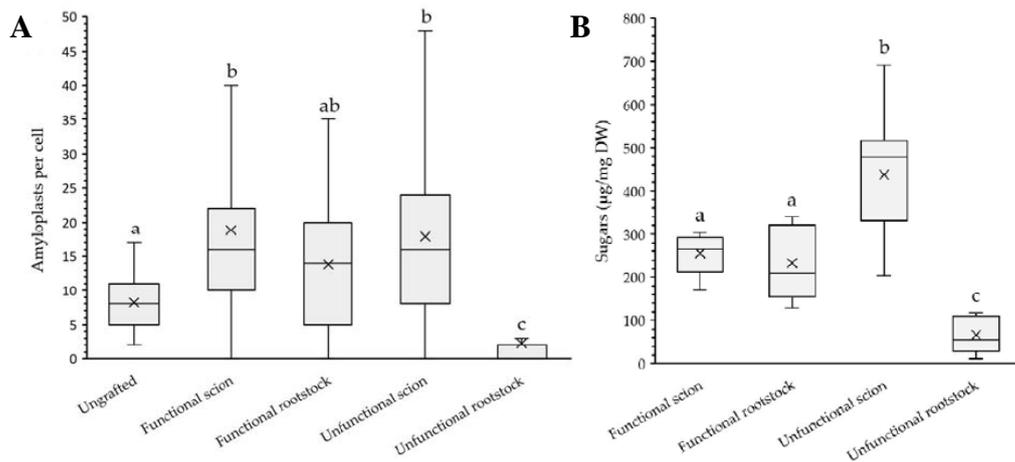
**hipersensitiva** de la pared celular e impiden la adhesión definitiva de las células (**tabla 3**). Esta podría ser la razón de que algunos injertos no sean funcionales (Frey *et al.*, 2021). Otra sería la permanencia de la zona necrótica alrededor del corte, lo que también impide la unión púa-porta y, por tanto, todos los procesos posteriores esenciales para una supervivencia a largo plazo (**tabla 3**) (Frey *et al.*, 2020). La presencia de necrosis que no desaparece con el tiempo es, entonces, un signo de incompatibilidad en el injerto (Notaguchi *et al.*, 2020).

Por lo tanto, parece que las primeras etapas del injerto son inespecíficas, dado que se ha descrito la unión de tejidos vegetales a superficies inertes y que algunas especies incompatibles se adhieren inicialmente (Melnik, 2017). Sin embargo, la fusión de los tejidos sí es específica y depende del reconocimiento célula-célula entre púa y porta (**tabla 3**) (Frey *et al.*, 2021).

**Tabla 3.** Comparación de distintas características fenotípicas entre injertos funcionales y la púa y el porta de injertos no funcionales, siendo [+] = presencia y [-] = ausencia. Valoración relativa y subjetiva (Adaptado de Frey *et al.*, 2021).

	Unión del callo	Grupo de células del callo	Diferenciación vascular	Adhesión	Reconexión vascular	Frecuencia de amiloplastos	Azúcares solubles	Depósitos de defensa en la pared
<b>Innjerto funcional</b>	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	-
<b>Púa no funcional</b>	-	++	++	-/±	-	+++	+++	+++
<b>Porta no funcional</b>	-	+	+	-/±	-	±	±	++

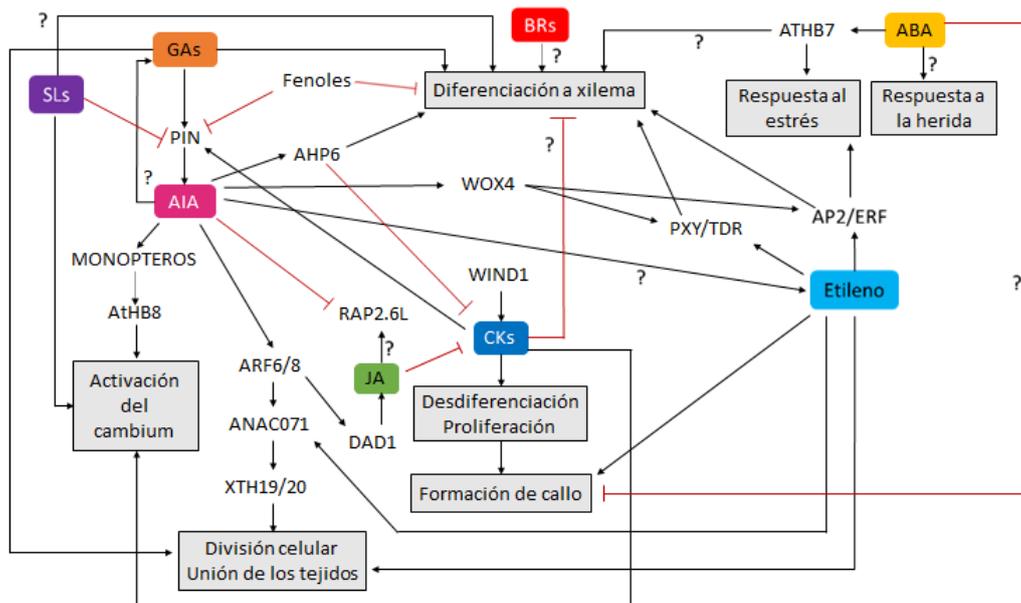
Otra de las consecuencias de practicar un corte en el tallo de una planta es que se interrumpe la comunicación vascular entre sus partes aérea y radical y, por tanto, el transporte de azúcares vía floema. Tras poner en contacto la púa y el porta, durante los primeros estadios del injerto, se ha observado que la púa acumula mayor concentración de **azúcares y amiloplastos** que el porta (**fig. 6**). Una teoría que podría explicar este hecho es que la parte baja de la púa se convierte en un fuerte sumidero debido a la necesidad de un mayor aporte de energía para la regeneración y unión de los tejidos. El contenido en almidón en el porta podría ser, entonces, un marcador de funcionalidad del injerto, dado que, una vez se regenera y se fusiona el tejido vascular en injertos funcionales, aumenta la concentración de azúcares y amiloplastos en el porta, cosa que no ocurre en injertos no funcionales (**tabla 3**) (Frey *et al.*, 2021).



**Figura 6.** A. Diferencias en la distribución de amiloplastos en tejidos no injertados y en la púa y el porta de injertos funcionales y no funcionales. Las letras diferentes indican diferencias significativas con  $p < 0.05$  en el test Kruskal-Wallis. B. Diferencias en el contenido en azúcares solubles entre la púa y el porta de injertos funcionales y no funcionales. Las letras diferentes indican diferencias significativas con  $p < 0.05$  en el test ANOVA (Frey *et al.*, 2021).

B) Las fitohormonas en la respuesta a la herida, la adhesión celular y la formación de callo

Otras moléculas que se activan tras la detección de los DAMPs son las **fitohormonas u hormonas vegetales**. Su papel se manifiesta desde que se practica el corte en ambas plantas. Dependiendo de su concentración, se activan diferentes genes y factores de transcripción (FTs) responsables de inducir los procesos de dediferenciación y proliferación celular que dan lugar al callo entre púa y porta, así como la diferenciación celular posterior para generar los nuevos tejidos vasculares que permitirán la continuidad entre ambas porciones del injerto. Además, una característica destacable de su funcionamiento es que existen interacciones entre ellas (**fig. 7**).



**Figura 7.** Resumen de las interacciones entre fitohormonas, factores de transcripción y proteínas en el injerto conocidas hasta el momento. Esquema elaborado por la autora del TFG.

Las **auxinas**, representadas por el ácido indolacético (**AIA**), y las **citoquininas (CKs)**, un grupo complejo de moléculas, son FHs involucradas en casi todos los procesos del desarrollo de las plantas. Las CKs promueven la división celular, mantienen la identidad de los meristemos y regulan la actividad del cambium vascular (Nanda y Melnyk, 2018). El AIA es responsable de la dominancia apical, participa en la formación de órganos y en el gravitropismo, así como en la diferenciación celular a tejidos vasculares y en la respuesta a la herida (Matsuoka *et al.*, 2016; Nanda y Melnyk, 2018).

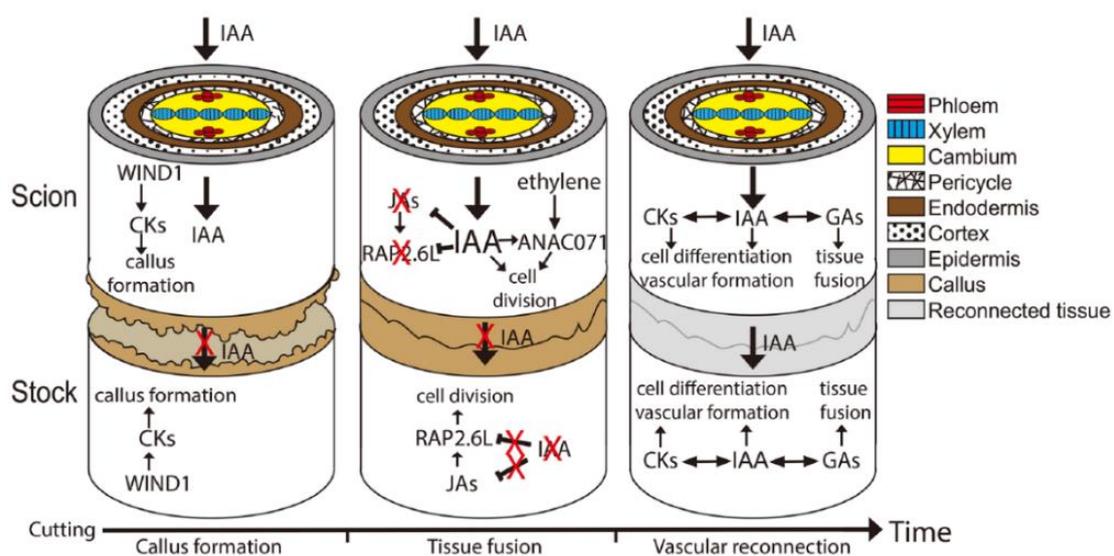
Las CKs se sintetizan mayoritariamente en la raíz de las plantas y de ahí son transportadas en sentido acropétalo hacia las partes aéreas. Por el contrario, el AIA se sintetiza sobre todo en el meristemo apical del tallo y en hojas jóvenes, y se transporta basipétalmente hacia la raíz mediante un transporte activo mediado por las proteínas de membrana de tipo PIN (PIN-FORMED) (**fig. 7 y 8**) (Wang *et al.*, 2014). Esto es lo que sucede en condiciones normales, pero, cuando se practica el corte en el tallo para la formación del injerto, el transporte de ambas FHs se ve impedido físicamente, lo que provoca diferencias en su concentración en púa y porta, al igual que sucedía con los azúcares. La concentración de CKs es mayor en la parte alta del porta y menor en la parte baja de la púa, mientras que el AIA se acumula en la parte baja de la púa y su concentración se va perdiendo con el tiempo en la parte alta del porta. El AIA y las CKs provocan, a través de sus rutas de señalización celular, cambios en la expresión de genes y en la activación de FTs relacionados con la respuesta a la herida y la formación de nuevo tejido vascular. Ya que las respuestas a FHs son dependientes de su concentración, estas serán distintas o se producirán con diferente intensidad en las dos partes del injerto que se ponen en contacto (Melnyk y Meyerowitz, 2015; Melnyk, 2017).

En relación a las CKs, se ha comprobado que la expresión de **WIND1** (*WOUND INDUCED DEDIFFERENTIATION 1*) se activa en ambas porciones del injerto, púa y porta. El FT resultante provoca **desdiferenciación y proliferación celular** al activar la señalización de las **CKs**, generando un **callo** como parte de la respuesta a la herida (**fig. 7 y 8**) (Melnyk, 2017; Nanda and Melnyk, 2018; Frey *et al.*, 2021). Por su lado, la alta concentración de AIA en la parte baja de la púa inhibe la expresión de **RAP2.6L** (*RELATED TO AP2 6L*) y conlleva la activación de los FT **ARF6** y **ARF8** (*AUXIN RESPONSE FACTOR 6/8*), al unirse el AIA a sus represores, lo que permite la expresión de **ANAC071**, mientras que la baja concentración de AIA en la parte alta del porta supone una menor actividad de **ARF6** y **ARF8** y la activación del gen **RAP2.6L** (**fig. 7 y 8**) (Asahina *et al.*, 2011; Pitaksaringkarn *et al.*, 2014; Matsuoka *et al.*, 2016). El resultado es que ANAC071 se acumula en la parte baja de la púa y RAP2.6L en la

parte alta del porta. El primero de estos FT induce la expresión de los genes *XTH19* y *XTH20* (*XILOGLUCANO ENDOTRANSGLUCOSIDASA/HIDROLASA 19/20*) que, como se indicó anteriormente, codifican para enzimas que participan en la relajación de la pared, permitiendo la **división celular de la médula** (para la formación del callo) y la **unión de los tejidos** entre púa y porta (**fig. 7**) (Pitaksaringkarn *et al.*, 2014). De RAP2.6L no se conoce todavía el mecanismo de actuación en el injerto (Melnik, 2017; Nanda y Melnyk, 2018).

Otra consecuencia de la acumulación de AIA en la base de la púa es la formación de **raíces adventicias** en el callo, ya que esta hormona es capaz de inducir su formación. También pueden aparecer en injertos no funcionales. De hecho, su formación no beneficia a la obtención de un injerto funcional (Frey *et al.*, 2020).

En oposición al transporte basipétalo del AIA en la púa, se ha demostrado que también existe una circulación de la auxina del porta a la púa cuando se forma un injerto. En un experimento reciente, se unieron púas wt con portas que sobreexpresaban un gen relacionado con la síntesis de AIA y los resultados mostraron un incremento de los niveles de la FH y de la expresión de genes inducibles por AIA en la púa, en comparación con un injerto wt/wt. Además, se comprobó que a mayor concentración de AIA en el porta, más rápido se formaba el callo y más rápido era el proceso de cura de la herida, aumentando las probabilidades de éxito en el injerto. Por lo tanto, la conclusión fue que la creación de injertos que contengan un porta modificado genéticamente para sobreexpresar genes que intervienen en la síntesis de AIA podría ser una estrategia para mejorar su tasa de éxito (Zhai *et al.*, 2021).



**Figura 8.** Papel de las fitohormonas durante la formación de callo, fusión de los tejidos y reconexión vascular en el injerto en plantas, siendo IAA = AIA (Nanda y Melnyk, 2018).

El **ácido jasmónico (JA)** es una FH lipídica con funciones en la respuesta al estrés biótico y abiótico, el desarrollo de la raíz y la formación de tricomas. También parece estar relacionada con el desarrollo vascular, como se detallará más adelante (Nanda y Melnyk, 2018). En cuanto a su papel en la respuesta a la herida realizada en el injerto, de nuevo se observa una distribución desigual del JA entre púa y porta, pues hay más concentración de esta hormona en la parte alta del porta que en la parte baja de la púa, y cambios diferentes en la expresión génica inducida por la FH en ambas porciones. Se ha demostrado que **RAP2.6L** se activa en el porta cuando se practica el corte y cuando se aplica JA, por lo que se deduce que su expresión podría ser activada por este (Asahina *et al.*, 2011). También existe una relación entre el AIA y el JA, de modo que **ARF6** y **ARF8**, activados por el AIA, inducen la expresión de **DADI** (*DEFECTIVE IN ANTHHER DEHISCENCE 1*), que codifica para una enzima involucrada en la síntesis de JA. A pesar de que la concentración de AIA es baja en el porta, debido a la interrupción su transporte basipétalo, es suficiente para activar **DADI** y, por tanto, **RAP2.6L** por el JA. Los niveles de AIA en el porta no parecen, en cambio, ser suficientes para inhibir la expresión de **RAP2.6L** (**fig. 7 y 8**) (Pitaksaringkarn *et al.*, 2014). Sin embargo, hay estudios realizados con plantas mutantes en la síntesis o transporte de JA que demuestran tener una formación de callo mayor que los controles, por lo que esta FH podría estar involucrada en su inhibición. También existen casos en los que se forma un injerto funcional cuando la planta es deficiente en JA (Nanda y Melnyk, 2018). Por tanto, el papel de esta FH en el injerto todavía no está suficientemente claro.

Si el injerto es funcional, púa y porta terminarán uniéndose y teniendo una continuidad vascular, lo que provocará que la concentración de CKs, AIA y JA se vaya igualando, cambiando así el patrón de expresión génica de respuesta a la herida y, por tanto, restableciéndose el fenotipo normal (**fig. 8**) (Melnyk, 2017).

El **etileno** es una FH en forma de gas involucrada en la iniciación de la raíz, la maduración de los frutos, la senescencia, la respuesta al estrés biótico y abiótico y el crecimiento secundario (Gu *et al.*, 2017; Nanda y Melnyk, 2018). Además, la inhibición de la síntesis de etileno en el injerto reduce la formación de callo y la unión de los tejidos, lo que pone de manifiesto su importante papel en estos procesos. De hecho, se ha demostrado que la expresión de genes de síntesis y respuesta al etileno aumentan en la púa y en el porta de las 0 a las 24 h tras formarse el injerto y que disminuyen de las 24 a las 96 h (Zhai *et al.*, 2021). También se sabe que el etileno activa la expresión de los FTs **AP2** (APETALA2) y **ERF** (ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR) en respuesta al estrés y a procesos del desarrollo que se inician tras realizar un corte (**fig. 7**) (Gu *et al.*, 2017; Nanda y Melnyk, 2018). Además, se ha observado que cuando se forma

la herida al cortar el tallo de ambas plantas, el etileno promueve la expresión de *ANAC071*, que, como ya se indicó, también es inducido por AIA, promoviendo la división celular. Así pues, **AIA y etileno podrían tener un acción conjunta** en la formación de callo en el injerto (**fig. 7 y 8**) (Asahina *et al.*, 2011; Nanda y Melnyk, 2018). La interacción entre ambas FHs se daría también a nivel de metabolismo, pues se ha comprobado que, si se sobreexpresan los genes de síntesis de AIA, se incrementa la concentración de etileno (Nanda y Melnyk, 2018). Esto lleva a pensar que el AIA podría ser responsable de la inducción de las síntesis de etileno como respuesta a la herida (**fig. 7**). Sin embargo, esto todavía no está comprobado.

A pesar de que las FHs más estudiadas involucradas en estas primeras fases en la formación de un injerto son las CKs, el AIA, el JA y el etileno, también hay algo de bibliografía que relaciona otro tipo de FHs con la respuesta a la herida y la formación de callo.

Existen indicios de que el **ácido abscísico (ABA)**, FH que regula las respuestas de las plantas a la sequía y tiene numerosos e importantes papeles en el desarrollo de las semillas (Takahashi *et al.*, 2018), también podría estar implicada en la diferenciación del xilema (detallado más adelante) y en la respuesta a la herida en el injerto. En relación con esto último, se ha detectado una acumulación de ABA y un aumento en la expresión de genes de respuesta a la herida en la zona de corte, lo que podría indicar que la FH tiene un efecto promotor del injerto. Sin embargo, un reciente estudio demuestra que la formación de callo es más eficiente en el injerto cuando hay bajo transporte de ABA (**fig. 7**). Una posible explicación para la acumulación de esta FH en la zona de corte podría ser que se tratase de una respuesta a la desecación producida en los tejidos dañados (**fig. 7**) (Nanda y Melnyk, 2018).

Las **giberelinas (GAs)** son FHs involucradas en la regulación del crecimiento de las plantas y que participan en la expansión, diferenciación y proliferación celular (Matsuoka *et al.*, 2016), así como en la formación de xilema a partir del cambium (descrito más adelante). Se ha comprobado que, inhibiendo la síntesis o señalización de GAs, la púa y el porta no se unen, por lo que parecen ser esenciales para la expansión y el sellado de ambas porciones del injerto (**fig. 7 y 8**) (Nanda y Melnyk, 2018). En cuanto a su relación con otras hormonas, existe evidencia de que los bajos niveles de GAs se recuperan a su estado normal con la aplicación de AIA, por lo que parece que esta podría inducir la síntesis o acumulación de GAs (Matsuoka *et al.*, 2016). Además, las GAs promoverían el transporte de AIA al regular el recambio de las proteínas PIN (**fig. 7**) (Nanda y Melnyk, 2018).

#### 4.2 Formación y unión del floema

Como ya se comentó, parece que la formación de callo no es una clave para la obtención de un injerto funcional en el 100% de los casos. Sin embargo, la unión vascular de ambas plantas sí es imprescindible para la **supervivencia del injerto a largo plazo** (Melnyk, 2017). En algunos casos concretos, se genera un injerto funcional sin unión vascular, pero no es lo más común y es probable que no sean funcionales a largo plazo, ya que es necesario un intercambio eficiente de nutrientes, de hormonas y otras moléculas entre todos los tejidos para la supervivencia de las plantas (Melnyk, 2017; Frey *et al.*, 2020; Frey *et al.*, 2021).

La diferenciación y conexión del floema se produce de 3 a 4 días después de la generación del injerto, correlacionándose con un aumento de la respuesta a **AIA** y a las **CKs** (Melnyk, 2017; Frey *et al.*, 2021). Al bloquear los receptores de CKs se reduce la actividad del cambium (Nanda y Melnyk, 2018), por lo que se deduce que su percepción en estas células es esencial para la formación de nuevo floema. Por otro lado, los niveles de AIA necesarios para la diferenciación del floema dependen de la especie, pero, en la mayoría de los casos, una baja concentración de AIA es suficiente (**fig. 7 y 8**) (Nanda y Melnyk, 2018). Su transporte basipétalo activa **MONOPTEROS**, que, a su vez, activa **AtHB8**, un marcador de la actividad del cambium. Se cree que su expresión supone que dichas células indiferenciadas adquieran como destino el tejido vascular (**fig. 7**) (Melnyk, 2017; Nanda y Melnyk, 2018). Además, se ha comprobado que las **temperaturas elevadas** promueven la regeneración del tejido vascular en el injerto, al impulsar el transporte de AIA. En cambio, no parece tener un efecto potenciador de la adhesión y formación del callo (Serivichyaswat *et al.*, 2022), por lo que un tratamiento con altas temperaturas podría ser utilizado a partir del día 3 para potenciar la unión vascular.

Actualmente, las hormonas más estudiadas en la regeneración del floema en el injerto son el AIA y las CKs. Sin embargo, también existe algo de bibliografía sobre el papel de otro tipo de FHs y de los azúcares en esta etapa del injerto.

Las **estringolactonas (SLs)** son FHs derivadas de los carotenoides que regulan el desarrollo de la planta y la actividad del cambium. Se ha demostrado su capacidad de inhibir la expresión y acumulación de los transportadores PIN sin afectar al cambium (**fig. 7**), por lo que se deduce son capaces de inducir su actividad de forma independiente al AIA. Sin embargo, existen casos en los que se genera un injerto funcional con plantas deficientes en SLs, por lo que puede que no sean esenciales en esta técnica (Nanda y Melnyk, 2018) e, incluso, podrían tener un efecto negativo, al inhibir el transporte de AIA, la principal reguladora de todas las etapas del injerto,

aunque, para confirmar esta teoría, sería necesario seguir investigando su papel en esta técnica agrícola.

Por otro lado, se ha demostrado que los **azúcares** promueven la regeneración del tejido vascular al aplicarse junto con AIA. Sin embargo, no se forma nuevo tejido vascular solamente añadiendo esta FH y azúcar a células indiferenciadas, por lo que las otras hormonas implicadas en este proceso deben de ser esenciales en esta etapa (Melnyk, 2017; Frey *et al.*, 2021).

#### 4.3 Formación y unión del xilema

Existen pruebas de que el nuevo xilema se puede formar **a partir de la vasculatura ya existente**, por **diferenciación de las células del callo y transdiferenciación del parénquima a células xilemáticas**, ya que se han detectado masas de células indiferenciadas en tejido vascular preexistente y en el parénquima medular y cortical cerca de la zona de la herida. Sin embargo, la transdiferenciación en el injerto no se ha estudiado todavía en profundidad. Lo más común es que se forme a partir de vasculatura preexistente (Frey *et al.*, 2020; Frey *et al.*, 2021).

La conexión del xilema se produce de 6 a 8 días después de la creación del injerto. Se ha demostrado que el **AIA** es imprescindible para este proceso, pues si se cortan las hojas no se une el xilema, pero sí si se aplica AIA en la zona donde se encontraban las hojas previamente (Asahina *et al.*, 2011; Matsuoka *et al.*, 2016; Melnyk, 2017). Los niveles de esta FH necesarios para la inducción de la diferenciación a células del xilema también depende de la especie, pero, en general, serán necesarias concentraciones altas de AIA (**fig. 7 y 8**) (Melnyk, 2017; Nanda y Melnyk, 2018). Además, hay pruebas de que las **CKs** favorecen el transporte de AIA y, por tanto, la formación de nuevo tejido vascular, al regular la distribución de las proteínas PIN en los nuevos tejidos vasculares en formación. Sin embargo, el AIA induce la expresión de **AHP6** (*HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER PROTEIN 6*), que provoca la diferenciación celular a xilema, pero cuya proteína codificante es un inhibidor de la señalización de las CKs (**fig. 7**) (Schaller *et al.*, 2015). Se ha comprobado que evitando la síntesis de CKs se forma más xilema y que utilizando un tratamiento de CKs se forma menos, lo que lleva a pensar que el papel de estas FHs en esta etapa del injerto es contrario al del AIA (**fig. 7**) (Nanda y Melnyk, 2018). Quizás, por ello, se inhibe su expresión tras inducir el transporte de AIA, el principal responsable de la formación de nuevo tejido vascular.

Se sabe que el **etileno** promueve el crecimiento secundario al activar la expresión de los FT **AP2**, **ERF** (que también actúan en la respuesta al estrés), **PXY** (PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM) y **TDR** (TRACHEARY ELEMENT DIFFERENTIATION INHIBITOR

FACTOR RECEPTOR). Además, estos también son inducibles por **WOX4** (WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 4), cuya expresión es activada por AIA, otra prueba más que apoya la teoría de que **AIA y etileno presentan una acción conjunta** en el injerto (**fig. 7**) (Nanda y Melnyk, 2018). Estos hallazgos llevan a hipotetizar que, modificando genéticamente las plantas que vayan a formar parte de un injerto para que sobreproduzcan etileno, se podría mejorar la tasa de éxito a largo plazo de este, al potenciar la capacidad de unión vascular. Además, dadas las otras funciones del etileno, su sobreexpresión podría conllevar una respuesta al estrés biótico y abiótico, una iniciación de la raíz y una maduración de los frutos mucho más rápidas, lo cual beneficiaría a la formación de callo y la unión de los tejidos en el injerto, al desarrollo y supervivencia de la planta y a la obtención de frutos maduros en menor tiempo.

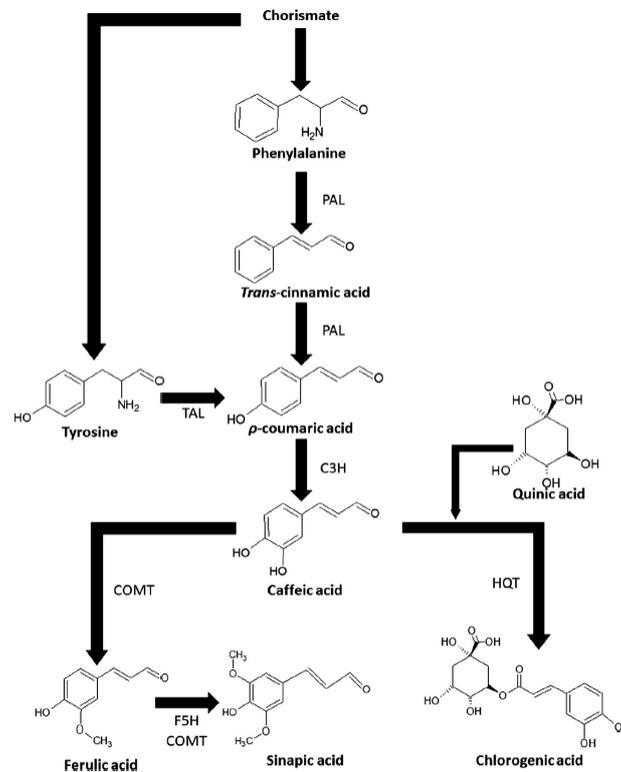
Otras hormonas que podrían estar implicadas en este proceso son los **brasinoesteroides (BRs)**. Sus funciones más estudiadas son la estimulación del crecimiento celular y de la morfogénesis de las plantas. Sin embargo, también presentan un papel muy importante en la formación de xilema, pues la inhibición de su síntesis inhibe la diferenciación de los elementos traqueales (**fig. 7**), aunque su papel en el injerto no está muy investigado todavía (Belkhadir y Jaillais, 2015; Saini *et al.*, 2015; Nanda y Melnyk, 2018).

Como se adelantaba en el apartado de respuesta a la herida, las **GAs** también parecen estar involucradas en la formación de nuevo xilema, pues el tratamiento con estas hormonas induce la formación de más fibras xilemáticas y de mayor tamaño, mientras que la inhibición de su síntesis provoca una menor formación de las mismas (**fig. 7**) (Matsuoka *et al.*, 2016; Nanda y Melnyk, 2018). Por tanto, sería conveniente estudiar en mayor profundidad el papel de estas FHs en el injerto para poder dilucidar más detalles de su mecanismo de acción.

El **JA**, además de las funciones ya conocidas y mejor estudiadas expuestas anteriormente, se ha comprobado que también provoca la formación de xilema, al inhibir la acción de las CK (**fig. 7**), pero todavía no es un proceso que se entienda a la perfección (Nanda y Melnyk, 2018).

Por último, se sabe que el crecimiento secundario provoca la expresión de genes inducibles por **ABA**. Un FT que podría estar implicado en este proceso es **ATHB7** (ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX 7), pues se expresa mientras se está formando nuevo xilema y, además, se sabe que el gen que lo codifica es inducible por ABA como respuesta al estrés por sequía (**fig. 7**). Sin embargo, su papel en el injerto debe ser investigado más a fondo (Nanda y Melnyk, 2018).

En apartados anteriores, se comentaron diferencias entre compuestos que se sintetizan en cantidades distintas en injertos funcionales y no funcionales. Otros componentes cuya concentración es significativamente diferente entre ambos son los **compuestos fenólicos**. Los injertos no funcionales suelen presentar mayores cantidades de estos, como el ácido r-cumárico (Rasool *et al.*, 2020), al haber una mayor expresión de la fenilalanina amonio-liasa (**fig. 9**), la enzima del punto de control de la ruta de síntesis de los ácidos hidroxicinámicos (Irisarri *et al.*, 2016). Estos son liberados de las vacuolas al citoplasma de las células e inhiben la lignificación y, por tanto, la formación de nuevo xilema (**fig. 7**). Además, se ha comprobado que altas concentraciones de estos compuestos en la púa afectan al transporte de AIA (**fig. 7**), lo que también desemboca en un fracaso del injerto debido a una menor inducción de diferenciación celular a tejido vascular. Por ello, el contenido en fenoles y los niveles de expresión de la fenilalanina amonio-liasa pueden ser marcadores importantes para determinar si un injerto será funcional a largo plazo (Rasool *et al.*, 2020). Para intentar mejorar el éxito en el injerto se podrían modificar genéticamente las plantas que van a formar parte de él para que expresen esta enzima en menores cantidades.



**Figura 9.** Ruta de síntesis de los ácidos hidroxicinámicos, donde C3H = cumaril-3-hidroxilasa, COMT = ácido cafeico o-metiltransferasa, F5H = ferúlico 5-hidroxilasa, HQT = hidroxicinamoíl-coenzima A quinato transferasa, PAL = fenilalanina amonio-liasa y TAL = tirosina amonio-liasa (de la Rosa *et al.*, 2019).

## 5. Intercambio de moléculas y orgánulos entre púa y porta

Las **plantas parásitas** son utilizadas para estudiar cómo se unen los tejidos de plantas diferentes y el transporte de moléculas entre ellas. Por lo tanto, son modelos para el estudio del injerto, ya que su haustorio, el órgano capaz de conectar con los haces vasculares de otra planta para obtener sus nutrientes, necesita fusionarse y transportar moléculas entre ambas. Gracias a ellas, se ha comprobado que el ARNm, las proteínas y los virus pueden viajar largas distancias entre plantas diferentes a través de los haces vasculares, bidireccionalmente (Shahid *et al.*, 2018).

Al comprobarlo en injertos, se observó que, efectivamente, algunos **ARNm** viajan largas distancias entre los tejidos de ambas plantas (Spiegelman *et al.*, 2015) y son capaces de generar una proteína en un órgano en el que naturalmente no se detecta (Zhang *et al.*, 2016). Se cree que la razón por la que esto sucede solo con algunos ARNm es la abundancia y vida media de los mismos (Calderwood *et al.*, 2016). Además, se ha comprobado que algunas **proteínas** pueden unirse al ARNm para evitar que sea degradado durante el transporte (Duan *et al.*, 2015; Duan *et al.*, 2016). También existen pruebas de que esto puede potenciar la acción del AIA, consiguiendo así una mejor conexión vascular, por lo que un correcto intercambio genético a larga distancia podría ser una de las claves para obtener un injerto funcional (Wang *et al.*, 2017).

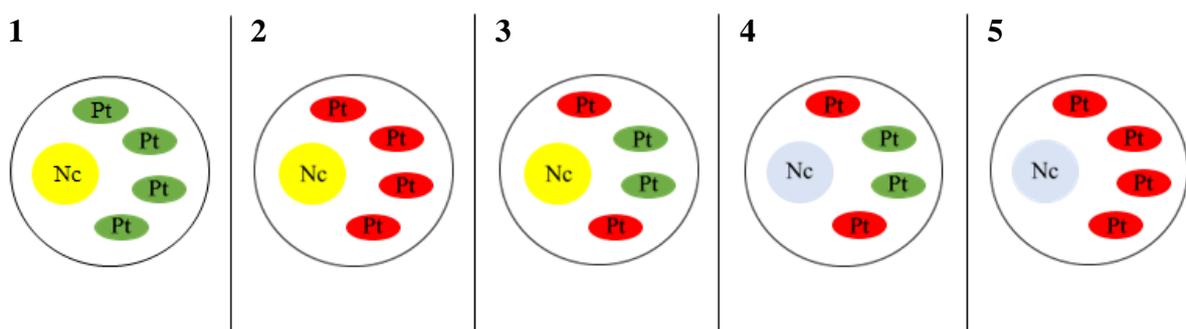
También existe evidencia del transporte de **ARNs pequeños** entre púa y porta, que provocan **cambios epigenéticos** una vez se establece la unión vascular en el injerto, impidiendo la expresión de algunos genes por metilación (Lewsey *et al.*, 2016), así como de **ARNsi**, que silencian la expresión de algunos genes, dado que evitan la traducción de sus transcritos (Hyun *et al.*, 2011; Shahid *et al.*, 2018).

El saber que existe intercambio de estas y otras moléculas, como FHs y FTs (Duan *et al.*, 2015), a larga distancia entre púa y porta ha permitido utilizar el injerto para estudiar el transporte de moléculas involucradas, por ejemplo, en la respuesta al estrés por sequía (Takahashi *et al.*, 2018), a la luz (Spiegelman *et al.*, 2015) y a la disponibilidad de nitrógeno (Landrein *et al.*, 2018).

Además del transporte a larga distancia, también hay pruebas de un **intercambio genético de célula a célula** en la unión púa-porta. Numerosos estudios han demostrado la transferencia de ADN nuclear, mitocondrial y plastídico a través de esta vía en los últimos años (Stegemann y Bock, 2009; Fuentes *et al.*, 2014; Gurdon *et al.*, 2016; Sidorov *et al.*, 2018; Hertle *et al.*, 2021).

La capacidad de intercambiar material entre células vecinas se ha comprobado no solo para material genético, sino también para **orgánulos enteros**. En un reciente estudio, se demostró la

transferencia célula a célula de plastos entre púa y porta a través del callo. Para ello, se injertaron dos líneas de tabaco, una cuyo genoma nuclear se marcó con la proteína fluorescente amarilla (YFP) y otra cuyo genoma plastídico se marcó con la proteína fluorescente roja (dsRed). Se analizaron, entonces, cortes de los callos resultantes de los injertos y se encontraron cinco tipos de células: (1) las que expresaban la YFP en el núcleo y en el citoplasma, (2) las que expresaban la YFP en el núcleo y, además, la dsRed en todos los plastos, (3) las que expresaban la YFP en el núcleo y con algunos plastos wt y otros que expresaban la dsRed, (4) las que no expresaban la YFP, pero con algunos plastos que expresaban la dsRed y otros wt y (5) las que expresaban la dsRed en todos los plastos (**fig. 10**) (Hertle *et al.*, 2021). Ya se conocía que el genoma nuclear puede transferirse de célula a célula mediante el paso del ARNm a través de plasmodesmos (Hyun *et al.*, 2011; Fuentes *et al.*, 2014), sin embargo, el encontrarse el genoma marcado con dsRed contenido en los plastos era indicativo de que había ocurrido una **transferencia de estos orgánulos**. Otro hallazgo que apoya esta teoría es que se observó una reestructuración de la pared celular para la formación de **poros** y, cerca de ellos, se encontraron plastos y mitocondrias de un tamaño más pequeño que estos. Además, se observó que los plastos que se acababan de intercambiar entre dos células presentaban un tamaño menor que el resto y que iban adquiriendo un tamaño normal con el tiempo. Para confirmar este fenómeno, consiguieron visualizar y grabar la transferencia de plastos de célula a célula a tiempo real a través de la unión entre púa y porta, confirmando su teoría (Hertle *et al.*, 2021).



**Figura 10.** Tipos de células encontradas en el callo de las plantas injertadas, siendo Nc amarillo = genoma nuclear marcado con la YFP, Nc azul = genoma nuclear wt, Pt verde = plastos wt y Pt rojo = plastos con el genoma marcado con la dsRed (Adaptado de Hertle *et al.*, 2021).

En otro estudio, se utilizó una estrategia novedosa y prometedora para demostrar la existencia de un **transporte célula-célula de mitocondrias** en la zona de unión de un injerto. Se utilizaron plantas de *Nicotiana tabacum*, a cuyas células se les había intercambiado su citoplasma por el de células de *N. undulata*, y plantas de *N. sylvestris*. La razón por la que se modificó el citoplasma de las células de *N. tabacum* fue conseguir plantas androestériles de esta especie, ya que la androesterilidad es un carácter de *N. undulata* codificado por el genoma mitocondrial,

que se hereda por vía materna. De este modo, de haber un transporte de las mitocondrias de *N. sylvestris* a *N. tabacum* tras el injerto, se conseguiría recuperar el fenotipo de *N. tabacum* respecto a este carácter. Así, se marcó el ADN nuclear de *N. tabacum* con un gen de resistencia a gentamicina y el ADN plastídico de *N. sylvestris* con un gen de resistencia a espectinomicina y se realizó el injerto con la primera como púa y la segunda como porta. Del callo, se aislaron las células resistentes a ambos antibióticos y se regeneraron plantas completas a partir de ellas. El resultado fue la obtención de una **planta quimérica**, con flores masculinas fértiles y flores masculinas infértiles en diferentes ramas, ya que, tal y como se hipotetizó, el ADN mitocondrial de *N. sylvestris* consiguió revertir la esterilidad masculina. Por último, consiguieron identificar un posible gen responsable de este fenómeno: *ORF293*, cuyo transcrito se acumula en las plantas infértiles, pero no en las plantas fértiles (Gurdon *et al.*, 2016).

Con ello, no solo queda demostrada la capacidad de transferirse horizontalmente proteínas y diferentes tipos de ARNs entre púa y porta, sino también los tres tipos de genomas: el nuclear, el mitocondrial y el plastídico. Esto abre la puerta a cruzar plantas que no son compatibles sexualmente, pero cuyo injerto es funcional, para generar nuevas variedades con características que no se podrían encontrar en la naturaleza (Gurdon *et al.*, 2016).

## 6. Conclusiones

El injerto es una técnica agrícola vigente desde hace miles de años que consiste en unir partes de dos plantas para generar un nuevo individuo que reúne características beneficiosas de una o de ambas. En su éxito influyen la compatibilidad genética y/o fisiológica entre las especies injertadas, la presencia de patógenos o metabolitos producidos por una de las plantas que pueda ser perjudicial para la otra, la edad de la planta, las condiciones ambientales en las que se realice y la técnica utilizada. El estudio de los mecanismos moleculares que subyacen a la formación exitosa de un injerto permite concluir que la herida causada a las partes que se ponen en contacto (púa y porta) puede desencadenar una respuesta hipersensitiva, que implica la síntesis de suberina, lignina, calosa y compuestos fenólicos. La deposición de estos en las zonas de corte evita la unión entre ambas y genera injertos no funcionales. Otra conclusión es que la única etapa imprescindible para la supervivencia de un injerto a largo plazo es la unión vascular.

En cuanto al papel de las FHs en estos procesos, está bastante definido para AIA y las CK actualmente, siendo el AIA el principal agente regulador de todas las fases del injerto. También parece que podría tener una acción conjunta con el etileno y los azúcares. Sin embargo, esto,

junto con la participación del JA, el ABA, las GAs, las SLs y los BRs, así como las interacciones entre diferentes FHs, todavía necesita ser investigado más a fondo.

Por último, existe una clara evidencia del transporte de moléculas a corta y larga distancia entre púa y porta, que parece ser esencial para su funcionalidad también, lo que abre la puerta a futuras aplicaciones e investigaciones para conseguir un aumento del porcentaje de éxito en el injerto y, por tanto, un mayor rendimiento económico.

## 7. Referencias

- Agus, S. y Eka, P. N. (2017) "Interstock effect on the growth of Mandarin cv. Batu 55, Tangerine cv. Pontianak and Lime cv. Nimas propagated by grafting", *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*, 10(70), pp. 239-246. doi:10.18551/rjoas.2017-10.34 INTERSTOCK.
- Asahina, M., Azuma, K., Pitaksaringkarn, W., Yamazaki, T., Mitsuda, N., Ohme-Takagi, M., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Okada, K., Neshimura, T., Koshihara, T., Yokota, T., Kamada, H. y Satoh, S. (2011) "Spatially selective hormonal control of RAP2.6L and ANAC071 transcription factors involved in tissue reunion in Arabidopsis", *PNAS*, 108(38), pp. 16128-16132. doi:10.1073/pnas.1110443108.
- Baron, D., Esteves Amaro, A. C., Pina, A. y Ferreira, G. (2019) "An overview of grafting re-establishment in woody fruit species", *Scientia Horticulturae*, 243(May 2018), pp. 84-91. doi:10.1016/j.scienta.2018.08.012.
- Belkhadir, Y. y Jaillais, Y. (2015) "Tansley review The molecular circuitry of brassinosteroid signaling", *New Phytologist*, 206, pp. 522-540. doi:10.1111/nph.13269.
- Bhat, A. I. y Rao, G. P. (2020) "Transmission Through Grafting and Budding", en *Characterization of Plant Viruses*.
- Calderwood, A., Kopriva, S. y Morris, R. J. (2016) "Transcript Abundance Explains mRNA Mobility Data in Arabidopsis thaliana", *The Plant Cell*, 28, pp. 610-615. doi:10.1105/tpc.15.00956.
- Chouksey, S., Bisen, B. P. y Pandey, S. K. (2016) "Effect of Different Season and Deblading on Wedge Grafting in Guava (Psidium guajava L.) CV. LUCKNOW-49", *International Journal of Agriculture Sciences*, 8(57), pp. 3151-3153.
- Claverie, J., Balacey, S., Lemaître-Guillier, C., Brulé, D., Chiltz, A., Granet, L., Noirot, E., Daire, X., Darblade, B., Héloir, M.-C. y Poinssot, B. (2018) "The Cell Wall-Derived Xyloglucan Is a New DAMP Triggering Plant Immunity in Vitis vinifera and Arabidopsis thaliana Quality Control of the Purified", *Frontiers in Plant Science*, 9. doi:10.3389/fpls.2018.01725.
- Dabirian, S. y Miles, C. A. (2017) "Antitranspirant application increases grafting success of watermelon", *HortTechnology*, 27(4), pp. 494-501. doi:10.21273/HORTTECH03739-17.
- Duan, X., Zhang, W., Huang, J., Hao, L., Wang, S., Wang, A., Meng, D., Zhang, Q., Chen, Q. y Li, T. (2016) "PbWoxT1 mRNA from pear (Pyrus betulaefolia) undergoes long-distance transport assisted by a polypyrimidine tract binding protein", *New Phytologist*, 210, pp. 511-524. doi:10.1111/nph.13793.
- Duan, X., Zhang, W., Huang, J., Zhao, L., Ma, C., Hao, L., Yuan, H., Harada, T. y Li, T. (2015) "KNOTTED1 mRNA undergoes long-distance transport and interacts with movement protein binding protein 2C in pear (Pyrus betulaefolia)", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 121, pp. 109-119. doi:10.1007/s11240-014-0685-z.
- Frey, C., Acebes, J. L., Encina, A. y Álvarez, R. (2020) "Histological Changes Associated with the Graft Union Development in Tomato", *Plants*, 9. doi:10.3390/plants9111479.
- Frey, C., Álvarez, R., Encina, A. y Acebes, J. L. (2021) "Tomato Graft Union Failure Is Associated with Alterations in Tissue Development and the Onset of Cell Wall Defense Responses", *Agronomy*, 11. doi:10.3390/agronomy11061197.
- Frey, C., Manga-Robles, A., Acebes, J. L. y Encina, A. (2022) "The graft framework : Quantitative changes in cell wall matrix polysaccharides throughout the tomato graft union formation", *Carbohydrate Polymers*, 276.

doi:10.1016/j.carbpol.2021.118781.

Fuentes, I., Stegemann, S., Golczyk, H., Karcher, D. y Bock, R. (2014) "Horizontal genome transfer as an asexual path to the formation of new species", *Nature*. Nature Publishing Group, 511, pp. 232-235. doi:10.1038/nature13291.

Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (2007) *Ventajas del uso de plantas injertadas en la producción de berenjena china en Honduras*.

Genova, C., Schreinemachers, P. y Afari-Sefa, V. (2013) *An impact assessment of AVRDC's tomato grafting in Vietnam*. AVRDC - The World Vegetable Center, Shahu, Taiwan. Editado por M. Mecozzi. Shanhua, Taiwan.

Gotur, M., Sharma, D. K., Chawla, S. L., Joshi, C. J. y Navya, K. (2017) "Performance of wedge grafting in guava (*Psidium Guajava* L.) under different growing conditions", *Plant Archives*, 17(2), pp. 1283-1287.

Gu, C., Guo, Z.-H., Hao, P.-P., Wang, G.-M., Jin, Z.-M. y Zhang, S.-L. (2017) "Multiple regulatory roles of AP2/ERF transcription factor in angiosperm", *Botanical Studies*. Springer Berlin Heidelberg, 58(6). doi:10.1186/s40529-016-0159-1.

Guo, Z., Tang, G., Zhou, Y., Shuwu, L., Hou, H., Chen, Z., Chen, J., Hu, C., Wang, F., De Smedt, S. C., Xiong, R. y Huang, C. (2017) "Fabrication of Sustained-release CA-PU Coaxial Electrospun Fiber Membranes for Plant Grafting Application", *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd., 169, pp. 198-205. doi:10.1016/j.carbpol.2017.04.020.

Gurdon, C., Svab, Z., Feng, Y., Kumar, D. y Maliga, P. (2016) "Cell-to-cell movement of mitochondria in plants", *PNAS*, 113, pp. 3395-3400. doi:10.1073/pnas.1518644113.

Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T. y Geneve, R. L. (2011) *Hartmann & Kester's Plant Propagation: Principles and Practices*. 1.<sup>a</sup> ed. Pearson.

He, W., Xie, R., Wang, Y., Chen, Q., Wang, H., Yang, S., Luo, Y., Zhang, Y., Tang, H., Gmitter Jr, F. G. y Wang, X. (2022) "Comparative transcriptomic analysis on compatible/incompatible grafts in Citrus", *Horticulture Research*, 9. doi:10.1093/hr/uhab072.

Hertle, A. P., Haberl, B. y Bock, R. (2021) "Horizontal genome transfer by cell-to-cell travel of whole organelles", *Science Advances*, 7. doi:10.1126/sciadv.abd8215.

Hou, S., Liu, Z., Shen, H. y Wu, D. (2019) "Damage-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity in Plants", *Frontiers in Plant Science*, 10. doi:10.3389/fpls.2019.00646.

Huang, Y., Kong, Q. S., Chen, F. y Bie, Z. L. (2015) "The history, current status and future prospects of vegetable grafting in China", *Acta Horticulturae*, 1086, pp. 31-40. doi:10.17660/actahortic.2015.1086.2.

Hyun, T. K., Uddin, M. N., Rim, Y. y Kim, J.-Y. (2011) "Cell-to-cell trafficking of RNA and RNA silencing through plasmodesmata", *Protoplasma*, 248, pp. 101-116. doi:10.1007/s00709-010-0225-6.

Institute of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences (2015) *Watermelon Grafting Economic Analyses*. Disponible en: <https://programs.ifas.ufl.edu/watermelon-grafting/research/economic-analyses/> (Accedido: 23 de febrero de 2022).

Irisarri, P., Zhebentyayeva, T., Errea, P. y Pina, A. (2016) "Differential expression of phenylalanine ammonia lyase (PAL) genes implies distinct roles in development of graft incompatibility symptoms in Prunus.", *Scientia Horticulturae*. Elsevier B.V., 204, pp. 16-24. doi:10.1016/j.scienta.2016.03.025.

Irisarri, P., Zhebentyayeva, T., Errea, P. y Pina, A. (2019) "Inheritance of self- And graft-incompatibility traits in an F1 apricot progeny", *PLoS ONE*, 14(5), pp. 1-14. doi:10.1371/journal.pone.0216371.

Kubota, C. (2016) "History of vegetable grafting", en Kubota, C., Miles, C., y Zhao, X. (eds.) *Grafting Manual: How to Produce Grafted Vegetable Plants*, pp. 1-5.

Kurata, K. (1994) "Cultivation of grafted vegetables. II. Development of grafting robots in Japan", *HortScience*, 29(4), pp. 240-244. doi:10.21273/hortsci.29.4.240.

Kurotani, K., Wakatake, T., Ichihashi, Y., Okayasu, K., Sawai, Y., Ogawa, S., Cui, S., Suzuki, T., Shirasu, K. y Notaguchi, M. (2020) "Host-parasite tissue adhesion by a secreted type of  $\beta$ -1,4-glucanase in the parasitic plant *Phtheirospermum japonicum*", *Communications Biology*. Springer US, 407. doi:10.1038/s42003-020-01143-5.

- de la Rosa, L. A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J. y Alvarez-Parrilla, E. (2019) "Phenolic Compounds", en Yahia, E. M. (ed.) *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*. Elsevier Inc., pp. 253-272. doi:10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9.
- Landrein, B., Formosa-Jordan, P., Malivert, A., Schuster, C., Melnyk, C. W., Yang, W., Turnbull, C., Meyerowitz, E. M., Locke, J. C. W. y Jönsson, H. (2018) "Nitrate modulates stem cell dynamics in Arabidopsis shoot meristems through cytokinins", *PNAS*, 115, pp. 1382-1387. doi:10.1073/pnas.1718670115.
- Lewsey, M. G., Hardcastle, T. J., Melnyk, C. W., Molnar, A., Valli, A., Urich, M. A., Nery, J. R., Baulcombe, D. C. y Ecker, J. R. (2016) "Mobile small RNAs regulate genome-wide DNA methylation", *PNAS*, 113(6), pp. 801-810. doi:10.1073/pnas.1515072113.
- Matsuoka, K., Sugawara, E., Aoki, R., Takuma, K., Terao-Morita, M., Satoh, S. y Asahina, M. (2016) "Differential Cellular Control by Cotyledon-Derived Phytohormones Involved in Graft Reunion of Arabidopsis Hypocotyls", *Plant and Cell Physiology*, 57(12), pp. 2620-2631. doi:10.1093/pcp/pcw177.
- Maurya, D., Pandey, A. K., Kumar, V., Dubey, S. y Prakash, V. (2019) "Grafting techniques in vegetables crops: A review", *International Journal of Chemical Studies*, 7(2), pp. 1664-1672.
- Melnyk, C. W. (2017) "Plant grafting: insights into tissue regeneration", *Regeneration*, 4(1), pp. 3-14. doi:10.1002/reg2.71.
- Melnyk, C. W. y Meyerowitz, E. M. (2015) "Plant grafting", *Current Biology*. Elsevier, 25(5), pp. R183-R188. doi:10.1016/j.cub.2015.01.029.
- Miller, M. L., Roddy, A. B., Brodersen, C. R., McElrone, A. J. y Johnson, D. M. (2020) "Anatomical and hydraulic responses to desiccation in emergent conifer seedlings", *American Journal of Botany*, 107(8), pp. 1177-1188. doi:10.1002/ajb2.1517.
- Muneer, S., Ko, C. H., Wei, H., Chen, Y. y Jeong, B. R. (2016) "Physiological and proteomic investigations to study the response of tomato graft unions under temperature stress", *PLoS ONE*, 11. doi:10.1371/journal.pone.0157439.
- Nanda, A. K. y Melnyk, C. W. (2018) "The role of plant hormones during grafting", *Journal of Plant Research*. Springer Japan, 131, pp. 49-58. doi:10.1007/s10265-017-0994-5.
- Nawaz, M. A., Imtiaz, M., Kong, Q., Cheng, F., Ahmed, W., Huang, Y. y Bie, Z. (2016) "Grafting: A technique to modify ion accumulation in horticultural crops", *Frontiers in Plant Science*, 7(OCTOBER2016), pp. 1-15. doi:10.3389/fpls.2016.01457.
- Nguyen, V. H. y Yen, C. R. (2018) "Rootstock age and grafting season affect graft success and plant growth of papaya (*Carica papaya* L.) in greenhouse", *Chilean Journal of Agricultural Research*, 78(1), pp. 59-67. doi:10.4067/S0718-58392018000100059.
- Notaguchi, M., Kurotani, K., Sato, Y., Tabata, R., Kawakatsu, Y., Okayasu, K., Sawai, Y., Okada, R., Asahina, M., Ichihashi, Y., Shirasu, K., Suzuki, T., Niwa, M. y Higashiyama, T. (2020) "Cell-cell adhesion in plant grafting is facilitated by b-1,4-glucanases", *Science*, 369, pp. 698-702. doi:10.1126/science.abc3710.
- Ozores-Hampton, M., Zhao, X. y Ortez, M. (2010) *Introducción a la Tecnología de Injertos a la Industria de Tomate en la Florida : Beneficios Potenciales y Retos*.
- Pina, A., Errea, P. y Martens, H. J. (2012) "Graft union formation and cell-to-cell communication via plasmodesmata in compatible and incompatible stem unions of *Prunus* spp.", *Scientia Horticulturae*. Elsevier B.V., 143, pp. 144-150. doi:10.1016/j.scienta.2012.06.017.
- Pitaksaringkarn, W., Ishiguro, S., Asahina, M. y Satoh, S. (2014) "ARF6 and ARF8 contribute to tissue reunion in incised Arabidopsis inflorescence stems", *Plant Biotechnology*, 31, pp. 49-53. doi:10.5511/plantbiotechnology.13.1028b.
- Pitaksaringkarn, W., Matsuoka, K., Asahina, M., Miura, K., Sage-Ono, K., Ono, M., Yokoyama, R., Nishitani, K., Ishii, T., Iwai, H. y Satoh, S. (2014) "XTH20 and XTH19 regulated by ANAC071 under auxin flow are involved in cell proliferation in incised Arabidopsis inflorescence stems", *The Plant Journal*, 80, pp. 604-614. doi:10.1111/tpj.12654.
- Rahemi, A. R., Taghavi, T. y Dale, A. (2016) "A Simple Method to Improve Hazelnut Grafting", *Journal of Nuts*, 7(2), pp. 83-87. doi:10.22034/JON.2016.527093.

- Rasool, A., Mansoor, S., Bhat, K. M., Hassan, G. I., Baba, T. R., Alyemeni, M. N., Alsahli, A. A., El-Serehy, H. A., Paray, B. A. y Ahmad, P. (2020) "Mechanisms Underlying Graft Union Formation and Rootstock Scion Interaction in Horticultural Plants", *Frontiers in Plant Science*, 11. doi:10.3389/fpls.2020.590847.
- Ruan, Y., Wang, T., Guo, S., Ling, N. y Shen, Q. (2020) "Plant Grafting Shapes Complexity and Co-occurrence of Rhizobacterial Assemblages", *Microbial Ecology*. *Microbial Ecology*, 80(3), pp. 643-655. doi:10.1007/s00248-020-01532-7.
- Saini, S., Sharma, I. y Pati, P. K. (2015) "Versatile roles of brassinosteroid in plants in the context of its homeostasis, signaling and crosstalks", *Frontiers in Plant Science*, 6. doi:10.3389/fpls.2015.00950.
- Schaller, G. E., Bishopp, A. y Kieber, J. J. (2015) "The Yin-Yang of Hormones: Cytokinin and Auxin Interactions in Plant Development", *The Plant Cell*, 27, pp. 44-63. doi:10.1105/tpc.114.133595.
- Serivichyaswat, P. T., Bartusch, K., Leso, M., Musseau, C., Iwase, A., Chen, Y., Sugimoto, K., Quint, M. y Melnyk, C. W. (2022) "High temperature perception in leaves promotes vascular regeneration and graft formation in distant tissues", *Development*, 149. doi:10.1242/dev.200079.
- Shahid, S., Kim, G., Johnson, N. R., Wafula, E., Wang, F., Coruh, C., Bernal-Galeano, V., Phifer, T., DePamphilis, C. W., Westwood, J. H. y Axtell, M. J. (2018) "MicroRNAs from the parasitic plant *Cuscuta campestris* target host messenger RNAs", *Nature*. Nature Publishing Group, 553, pp. 82-95. doi:10.1038/nature25027.
- Shaltiel-Harpaz, L., Gerchman, Y., Ibdah, M., Kedoshim, R., Rachmany, D., Hatib, K., Bar-Ya'akov, I., Soroker, V. y Holland, D. (2018) "Grafting on resistant interstocks reduces scion susceptibility to pear psylla, *Cacopsylla bidens*", *Pest Management Science*, 74(3), pp. 617-626. doi:10.1002/ps.4745.
- Sharma, A. y Zheng, B. (2019) "Molecular responses during plant grafting and its regulation by auxins, cytokinins, and gibberellins", *Biomolecules*, 9. doi:10.3390/biom9090397.
- Sidorov, V., Armstrong, C., Ream, T., Ye, X. y Saltarikos, A. (2018) "«Cell grafting»: a new approach for transferring cytoplasmic or nuclear genome between plants", *Plant Cell Reports*. Springer Berlin Heidelberg, 37(8), pp. 1077-1089. doi:10.1007/s00299-018-2292-7.
- Singh, H., Kumar, P., Chaudhari, S. y Edelstein, M. (2017) "Tomato grafting: A global perspective", *HortScience*, 52(10), pp. 1328-1336. doi:10.21273/HORTSCI11996-17.
- Song, G., Walworth, A. E. y Loescher, W. H. (2015) "Grafting of genetically engineered plants", *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 140(3), pp. 203-213. doi:10.21273/jashs.140.3.203.
- Spiegelman, Z., Ham, B.-K., Zhang, Z., Toal, T. W., Brady, S. M., Zheng, Y., Fei, Z., Lucas, W. J. y Wolf, S. (2015) "A tomato phloem-mobile protein regulates the shoot-to-root ratio by mediating the auxin response in distant organs", *The Plant Journal*, 83, pp. 853-863. doi:10.1111/tbj.12932.
- Stegemann, S. y Bock, R. (2009) "Exchange of Genetic Material Between Cells in Plant Tissue Grafts", *Science*, 324, pp. 649-651. doi:10.1126/science.1170397.
- Takahashi, F., Suzuki, T., Osakabe, Y., Betsuyaku, S., Kondo, Y., Dohmae, N., Fukuda, H., Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. (2018) "A small peptide modulates stomatal control via abscisic acid in long-distance signalling", *Nature*. Springer US, 25. doi:10.1038/s41586-018-0009-2.
- Tedesco, S., Feveireiro, P., Kragler, F. y Pina, A. (2022) "Plant grafting and graft incompatibility: A review from the grapevine perspective", *Scientia Horticulturae*. Elsevier B.V., 299. doi:10.1016/j.scienta.2022.111019.
- Thomas, H. R. y Frank, M. H. (2019) "Connecting the pieces: uncovering the molecular basis for long-distance communication through plant grafting", *New Phytologist*, 223(2), pp. 582-589. doi:10.1111/nph.15772.
- Tsutsui, H. y Notaguchi, M. (2017) "The use of grafting to study systemic signaling in plants", *Plant and Cell Physiology*, 58(8), pp. 1291-1301. doi:10.1093/pcp/pcx098.
- U.S. Department of Agriculture - Specialty Crop Research Initiative Team (sin fecha) *Vegetable Grafting Research-Based Information Portal*. Disponible en: <http://www.vegetablegrafting.org/about/about-us/> (Accedido: 21 de febrero de 2022).
- Vega-Muñoz, I., Duran-Flores, D., Fernández-Fernández, Á. D., Heyman, J., Ritter, A. y Stael, S. (2020) "Breaking Bad News: Dynamic Molecular Mechanisms of Wound Response in Plants", *Frontiers in Plant Science*, 11. doi:10.3389/fpls.2020.610445.

- Vieira Balbi, R., Pio, R., da Hora Farias, D., Tadeu de Melo, E., Pereira, M. P. y Pereira, F. J. (2019) "The cell regeneration and connection of grafting between pear and quince trees are defined by the cortex and phloem", *Scientia Horticulturae*. Elsevier, 257. doi:10.1016/j.scienta.2019.108662.
- Wang, J., Jiang, L. y Wu, R. (2017) "Plant grafting: how genetic exchange promotes vascular reconnection", *New Phytologist*, 214, pp. 56-65. doi:10.1111/nph.14383.
- Wang, J., Jin, Z., Yin, H., Yan, B., Ren, Z. Z., Xu, J., Mu, C. J., Zhang, Y., Wang, M. Q. y Liu, H. (2014) "Auxin Redistribution and Shifts in PIN Gene Expression during Arabidopsis Grafting 1", *Russian Journal of Plant Physiology*, 61, pp. 688-696. doi:10.1134/S102144371405015X.
- Williams, B., Ahsan, M. U. y Frank, M. H. (2021) "Getting to the root of grafting-induced traits", *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Ltd, 59. doi:10.1016/j.pbi.2020.101988.
- Yang, X., Hu, X., Zhang, M., Xu, J., Ren, R., Liu, G., Yao, X. y Chen, X. (2016) "Effect of low night temperature on graft union formation in watermelon grafted onto bottle gourd rootstock", *Scientia Horticulturae*. Elsevier B.V., 212, pp. 29-34. doi:10.1016/j.scienta.2016.09.010.
- Zhai, L., Wang, X., Tang, D., Qi, Q., Yer, H., Jiang, X., Han, Z., McAvoy, R., Li, W. y Li, Y. (2021) "Molecular and physiological characterization of the effects of auxin-enriched rootstock on grafting", *Horticulture Research*, 8. doi:10.1038/s41438-021-00509-y.
- Zhang, W., Thieme, C. J., Kollwig, G., Apelt, F., Yang, L., Winter, N., Andresen, N., Walther, D. y Kragler, F. (2016) "tRNA-Related Sequences Trigger Systemic mRNA Transport in Plants", *The Plant Cell*, 28, pp. 1237-1249. doi:10.1105/tpc.15.01056.