

现代果树生物学

李天忠 张志宏 主编

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书共分5篇22章,涵盖果树生长发育、果树营养生物学、果树环境生物学以及现代生物技术和信息技术在果树研究上的应用等内容,较为系统地反映了果树生物学研究的最新进展。全书注重基础理论向实践延伸,重视新的理论和方法的介绍,目的是向读者介绍果树科研动态,使读者能够了解当代果树科学的发展脉络。

本书可以作为大专院校果树学硕士、博士研究生的参考教材,教师及科研人员的参考读物。

图书在版编目(CIP)数据

现代果树生物学 / 李天忠, 张志宏主编. —北京: 科学出版社, 2007
ISBN 978-7-03-020116-4

I. 现… II. ①李…②张… III. 果树—植物生理学 IV. S660.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 171355 号

责任编辑:李秀伟 王 静 彭克里 刘 晶 / 责任校对:李奕莹
责任印制:钱玉芬 / 封面设计:福瑞来书装

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2008年2月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2008年2月第一次印刷 印张:26 1/2

印数:1—2 000 字数:603 000

定价:80.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈双青〉)

《现代果树生物学》编辑委员会

主 编 李天忠 张志宏
副主编 杨洪强 张新忠 马锋旺
编 委 (按姓氏笔画排序)
马锋旺 (西北农林科技大学)
吕德国 (沈阳农业大学)
刘继红 (华中农业大学)
杨洪强 (山东农业大学)
李天忠 (中国农业大学)
张志宏 (沈阳农业大学)
张新忠 (河北省昌黎果树研究所)
高东升 (山东农业大学)
董文轩 (沈阳农业大学)

编写人员 (按姓氏笔画排序)
马锋旺 王 忆 王利军
王 颖 孔 瑾 吕德国
刘月学 刘高峰 刘继红
杨洪强 李天忠 邹养军
张志宏 张新忠 范伟国
秦嗣军 夏 宁 徐小勇
高玉江 高东升 郭函子
曹 慧 梁 东 董文轩
魏绍冲

审 稿 人 邓秀新 (华中农业大学)
韩振海 (中国农业大学)

序

近二十年来,果树科学的基础研究进步很快,相关产业发展也很迅速,科学界、产业界、生产者取得的技术与理论成就日益丰富,需要系统总结;农业现代化、产业国际化、经验系统化发展与技术进步,也亟待先进理论的支撑。本着基础科学与专业学科紧密结合的原则,系统介绍和评述现代果树科学取得的最新研究成果及发展趋势,逐步建立果树的现代理论系统,对教学、科研,以及知识更新与提高十分重要。

该书作者在总结基础科学进步与个人工作成就的基础上,进行了诚实的总结分析,编纂成集,在一定程度上反映了我国果树科学发展水平;对果树科技工作者进行理论创新、技术发明与革新,将会有一定启迪和借鉴作用;对其他相关学科的科技工作者也会有一定参考价值。由于编者工作方向的局限,不足和遗漏之处在所难免,这也为同行们提供了讨论的余地,通过讨论,将使体系更加完善,观点更加明确,对于指导果树科研选题、推动果树科学的进步有重要意义。

中国工程院 院士
山东农业大学 教授



2007年10月1日

前 言

随着科学技术的迅猛发展及分子生物学、生物化学、细胞生物学和植物生理学等生物学科日新月异的变化,通过学科交叉和运用多种手段对果树生命现象进行科学研究的时代已经到来,因此有必要编写一本立足果树生物学研究基础并引入模式植物及信息技术最新研究成果的专著,向果树学科研究生及科研工作者提供果树研究的成果和发展动态,为研究生选题、科研工作者的科研定位和开展研究工作提供参考。

在中国工程院院士、山东农业大学教授束怀瑞先生的倡导下,由中国农业大学、沈阳农业大学、山东农业大学、河北省农林科学院昌黎果树研究所、西北农林科技大学、华中农业大学的9位中青年博士生导师组成编写委员会,组织二十余位教学科研一线的中青年学者,共同编写了本书。

本书共分5篇22章,第1章由张新忠完成,第2章由刘月学(中国农业大学)、李天忠完成,第3章由高东升完成,第4章由李天忠完成,第5章由王颖(沈阳农业大学)、董文轩完成,第6章由李天忠完成,第7章由魏绍冲(山东农业大学)、杨洪强完成,第8章由杨洪强完成,第9章由范伟国(山东农业大学)、李天忠、张志宏完成,第10章由梁东(西北农林科技大学)、马锋旺完成,第11章由曹慧(潍坊学院)完成,第12章由邹养军(西北农林科技大学)、马锋旺、杨洪强完成,第13章由孔瑾(中国农业大学)完成,第14章由王利军(中国科学院植物研究所)、高玉江(吉林省果树研究所)完成,第15章由王忆(中国农业大学)完成,第16章由刘高峰(菏泽学院)、张志宏完成,第17章由秦嗣军(沈阳农业大学)、吕德国完成,第18章由张志宏完成,第19章由郭函子(中国农业科学院作物研究所)、李天忠完成,第20章由刘继红、徐小勇(华中农业大学)完成,第21章由王忆、张志宏完成,第22章由夏宁(中国科学院自动化研究所)完成。

本书涵盖了果树生长发育生物学、果树营养生物学、果树环境生物学及现代生物技术与数字化技术在果树上的应用等内容,全面系统地介绍和阐述了果树生物学的研究进展和发展趋势,并将模式植物最新研究思路引入果树研究领域。全书重视基础理论向实践延伸,从而将果树生物学原理与果树生产中存在的问题有机结合。编者注意处理好创新与继承的关系、知识传授与能力培养的关系、知识先进性与适用性的关系,注重体系和内容的创新,减少常识性内容,增加新颖性的内容和方向性见解,力求做到概念准确、观点明确、具有时代感。本书编写工作历经两年多,为了保证内容的质量,先后在山东农业大学、沈阳农业大学、河北省农林科学院昌黎果树研究所、中国农业大学召开了4次编委会议。

在本书编写过程中,得到了束怀瑞院士的指导,华中农业大学邓秀新教授和中国农业大学韩振海教授进行了审稿,并提出许多宝贵意见和建议,中国科学院植物研究所李绍华研究员也为本书部分章节的修改提出了建设性的意见,在此一并表示感谢。由于编者业务水平和经验有限,书稿一定存在一些缺点与错误,望读者提出宝贵意见。

目 录

序	束怀瑞(i)
前言	编 者(iii)

第一篇 果树发育生物学

第 1 章 果树的个体发育与阶段转变	张新忠(3)
1.1 果树的个体发育阶段	(3)
1.2 阶段转变的生理机制	(5)
1.3 阶段转变的分子机制	(10)
1.4 阶段转变的调控	(13)
1.5 前景与展望	(16)
参考文献	(16)
第 2 章 果树花芽分化	刘月学 李天忠(20)
2.1 果树花芽分化的生理机制	(20)
2.2 成花转变的分子机制	(23)
2.3 果树花芽分化的调控	(35)
2.4 前景与展望	(36)
参考文献	(36)
第 3 章 果树芽休眠	高东升(39)
3.1 果树芽休眠的诱导及其机制	(39)
3.2 果树芽需冷量及其估算模型	(41)
3.3 果树芽休眠的解除及其机制	(43)
3.4 前景与展望	(50)
参考文献	(51)
第 4 章 果树自交不亲和性	李天忠(54)
4.1 植物自交不亲和性概述	(54)
4.2 S-RNase 介导的配子体自交不亲和性分子机制	(56)
4.3 蔷薇科果树自交不亲和性研究与应用	(67)
4.4 前景与展望	(71)
参考文献	(72)
第 5 章 果树无融合生殖	王 颖 董文轩(77)
5.1 无融合生殖的概念、分类和形态标准	(77)
5.2 无孢子配子无融合生殖	(80)
5.3 不定胚生殖性状的表现及遗传研究	(85)

5.4 前景与展望 (87)

参考文献 (87)

第 6 章 果树单性结实 李天忠 (89)

6.1 单性结实的分类 (89)

6.2 单性结实机制 (90)

6.3 单性结实诱导 (94)

6.4 前景与展望 (96)

参考文献 (97)

第 7 章 果实成熟与衰老 魏绍冲 杨洪强 (100)

7.1 果实色泽的形成 (100)

7.2 果实风味的形成 (102)

7.3 果实的软化 (106)

7.4 乙烯与果实成熟衰老 (107)

7.5 果实成熟衰老的调控 (110)

7.6 前景与展望 (112)

参考文献 (113)

第 8 章 果树新根的发生与生长 杨洪强 (115)

8.1 果树根体系的建立 (115)

8.2 果树根系导管的分化与发育 (116)

8.3 激素与果树根系的生长发育 (117)

8.4 根系生长发育的基因调控 (120)

8.5 程序性细胞死亡与果树根系发育 (123)

8.6 根系生长与新梢生长的相关性 (126)

8.7 前景与展望 (128)

参考文献 (128)

第 9 章 果树砧木与接穗的相互作用 范伟国 李天忠 张志宏 (130)

9.1 砧木与接穗的相互作用 (130)

9.2 砧木与接穗相互作用机制 (133)

9.3 前景与展望 (137)

参考文献 (137)

第二篇 果树营养生物学

第 10 章 果树光合作用及同化物转运 梁东 马锋旺 (141)

10.1 果树光合作用的特性 (141)

10.2 影响果树光合作用的因素 (142)

10.3 果树光合同化物分配 (144)

10.4 前景与展望 (153)

参考文献 (153)

第 11 章 矿质营养	曹 慧 (155)
11.1 氮营养	(155)
11.2 磷营养	(161)
11.3 钾营养	(167)
11.4 钙营养	(172)
11.5 铁营养	(178)
参考文献	(186)

第三篇 果树环境生物学

第 12 章 果树对水分的吸收与适应	邹养军 马锋旺 杨洪强 (197)
12.1 果树水分的吸收、传导和散失	(197)
12.2 果树水分利用效率及其调节	(202)
12.3 果树干旱胁迫	(206)
12.4 干旱信号的传递	(211)
12.5 水涝对果树的影响	(217)
12.6 合理灌溉理论及节水灌溉	(219)
12.7 前景与展望	(221)
参考文献	(222)
第 13 章 果树耐盐机制	孔 瑾 (226)
13.1 盐胁迫对果树的影响和伤害	(226)
13.2 不同果树种质资源的耐盐性	(228)
13.3 果树耐盐的生理机制和形态特征	(231)
13.4 植物耐盐的分子机制	(232)
13.5 前景与展望	(237)
参考文献	(237)
第 14 章 果树对温度的反应与适应	王利军 高玉江 (240)
14.1 果树对高温的反应与适应	(240)
14.2 果树对低温的反应与适应	(249)
参考文献	(261)
第 15 章 果树对光的适应	王 忆 (266)
15.1 光对果树生长发育的影响	(266)
15.2 光受体	(269)
15.3 强光胁迫	(271)
15.4 弱光胁迫	(274)
15.5 前景与展望	(276)
参考文献	(277)
第 16 章 果树抗病机制与抗病诱导	刘高峰 张志宏 (279)
16.1 植物的抗病机制	(279)

16.2 果树抗病性的诱导 (283)

16.3 前景与展望 (287)

参考文献 (288)

第 17 章 果树根际微域 秦嗣军 吕德国 (290)

17.1 果树根际微域的化学因子 (290)

17.2 果树根际微域土壤酶 (293)

17.3 果树根际微域微生物 (295)

17.4 前景与展望 (299)

参考文献 (299)

第四篇 现代生物技术在果树上的应用

第 18 章 核酸分析技术在果树上的应用 张志宏 (305)

18.1 果树核酸分离技术 (305)

18.2 果树分子标记 (308)

18.3 果树基因克隆 (312)

18.4 果树基因表达分析 (318)

18.5 果树病毒核酸分子检测 (323)

18.6 前景与展望 (326)

参考文献 (326)

第 19 章 蛋白质分析技术在果树上的应用 郭函子 李天忠 (331)

19.1 蛋白质提取 (331)

19.2 蛋白质定量分析 (333)

19.3 蛋白质分离技术 (335)

19.4 蛋白质免疫技术 (342)

19.5 蛋白质与蛋白质相互作用研究技术 (346)

19.6 蛋白质组学研究技术 (348)

19.7 前景与展望 (354)

参考文献 (355)

第 20 章 细胞融合技术在果树上的应用 刘继红 徐小勇 (357)

20.1 果树细胞融合研究概况 (357)

20.2 果树细胞融合诱导方法 (358)

20.3 果树细胞融合方式及类型 (359)

20.4 果树体细胞杂种评价 (361)

20.5 果树体细胞杂种的核质遗传规律 (364)

20.6 细胞融合在果树上的应用 (365)

20.7 前景与展望 (368)

参考文献 (369)

第 21 章 遗传转化技术在果树上的应用	王 忆 张志宏 (371)
21.1 植物遗传转化技术	(371)
21.2 果树遗传转化特点及影响果树遗传转化效率的因素	(372)
21.3 遗传转化在果树育种中的应用	(375)
21.4 遗传转化在研究果树基因功能上的应用	(380)
21.5 前景与展望	(380)
参考文献	(380)

第五篇 数字化技术在果树上的应用

第 22 章 果树数学模型	夏 宁 (387)
22.1 果树模型发展概述	(387)
22.2 果树分枝模拟模型的建立	(395)
22.3 果树分枝模型的可视化技术	(401)
22.4 前景与展望	(405)
参考文献	(406)

第一篇

果树发育生物学

第 1 章 果树的个体发育与阶段转变

果树等多年生木本植物的个体发育周期较长,实生树从播种到自然条件下开花结果需要几年甚至十几年时间,这是提高果树育种工作效率的瓶颈之一。因此,为了提高果树育种工作效率,首先应了解果树实生树的个体发育规律,研究实生树童性、童期和阶段转变的表现、生理机制、分子机制及调控技术等,努力将果树实生树从播种到连续开花结果所需的时间缩到最短。

1.1 果树的个体发育阶段

果树的个体发育与其他多年生木本植物一样,需要经历阶段转变才能具备生殖能力。阶段转变研究早期的权威之一 Hackett(1985)将木本植物的整个发育过程划分为童期(juvenile phase)和成年期(adult phase),两个发育阶段的区分标准是成花。其观点是树体一旦达到成年期,就将是相对稳定的,即可在自然条件下连续开花结果,而不需要施加任何外源诱导措施。其中强调的是“自然条件下”和成花的“连续性”。在这个时期之前,即使通过施加诱导措施而导致早熟花(precocious flowering)也不能认为树体进入了成年期。这给实生树的成年期赋予了准确的界定,但童期的概念尚不十分清楚。

Zimmerman 等(1985)从另一个角度将实生树的童期界定为“不能诱导成花的时期”。因而,实生树在自然条件下不能成花但却能被诱导成花的阶段既不属于童期,也不属于成年期,这一阶段实生树体内发生着由童性(juvenility)到成熟(maturity)转变的生理变化,这个生理过程被称作阶段转变(phase change)。阶段转变是连续的、渐进的,而且是可逆的。国外也有些资料将“阶段转变”写作“phase transition”,但这种表述法容易与物理学中的“相变”混淆。

依据上述观点,Poethig(1990)明确提出将植物的个体发育过程划分为童期、成年营养生长期(adult vegetative phase)和生殖生长期(reproductive phase)。因此,果树等植物的个体发育过程中,实生树表现童性,不具备成花能力的发育阶段称为童期;实生树虽然具备了成花能力,但在自然条件下不能成花,接受某种诱导后可以成花,而且之后即使不再实施这种诱导也能连续成花的发育阶段称为成年营养生长期,国内有时译作转变期;而实生树在自然条件下可以连续开花结果的阶段称为生殖生长期。

1.1.1 童期与童性

处于童期的实生树所具有的特殊的遗传和生理实质称为童性。实生树的童性可以表现在形态、解剖结构、生理生化指标以及基因表达等方面,也有的文献中将童性定义为植物童期所表现出的性状(juvenile trait)。果树学教科书中曾对果树实生树童期叶片、枝条、芽等许多性状与生殖生长期的区别进行了详细的描述,相比于生殖生长期,处于童期

的实生树营养生长旺盛,生根能力强,抗病性抗逆性也强。物种进化的过程中,这种个体发育特性不仅有利于树体对光、水、营养等资源的竞争,而且有利于为更好地繁殖后代创造充分的干物质积累和足够的光合能力。

实生树童期长短受遗传控制,不同树种童期长短相差很大。Hackett(1985)指出,实生树童期长短与该植物最终树冠大小有相关性,一般灌木短,乔木长。同一树种不同杂交组合,甚至同一组合内实生树之间童期长短也有差异。

环境因素对童期的长短有显著影响。苹果实生树从播种到自然成花需要5~8年,如果让苹果实生树在适宜的环境条件即26℃恒温,16 h日照(PPFD 680 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$),气压0.8 kPa中生长,12个月内就能长到可以成花的高度,即120节。由此看来,用时间单位来表示童期的长短显然并不合适,由此提出童程(juvenile span)的概念,即从实生树根颈到其童性消失点的距离。最早用长度单位表示童程,后来研究发现用节位数表示童程比长度单位更确切。

1.1.2 成年营养生长期与阶段转变

关于植物个体发育的研究往往注重童期性状与成年期性状的比较,而较少涉及成年营养生长期。这是因为关于阶段转变的研究的难度相对较大,体现在阶段转变是个渐进的过程,许多植物从童期结束,进入成年营养生长期,直到完成阶段转变进入生殖生长期很少有明显的形态变化。

当植物个体生长到一定的营养体大小时,即使在自然条件下不能成花,通过一些抑制营养生长的物理或化学处理亦可诱导其持续成花,只要这种诱导效果出现,就可以断定这时植物体已经处于或已通过成年营养生长期;反过来,某种理化处理未能诱导植物持续成花却不能由此判断该植物体处于哪个发育阶段,因为不同的促花处理和不同剂量的促花效果不同,所以单纯依据某一促花试验的结果尚不足以确定成年营养生长期开始的临界点;如果在相同条件下获得多种促花试验的数据,再辅以相关指标的数据来分析判断成年营养生长期开始的临界点,所得结果的可靠性会增强。

作者调查的结果显示,2年生‘大久保’桃自然实生树童期结束的临界点是60节,进入生殖生长期的临界点是84节。用同样方法,Zhang等(2006)测得‘金冠’苹果自然实生树成年营养生长期从77节开始,到122节结束。上述试验所得的阶段转变的临界节位可以看作是整个杂种群体的平均值,实际上,群体内不同实生单株之间阶段转变的临界节位并不相同。对于相同组合的实生树,如果在不同的自然条件下生长,其阶段转变的群体平均临界节位也许不会有变化,但其临界高度一定是不同的,而且,不同亲本、不同组合的杂种群体,其阶段转变的平均临界节位更会存在差异。所以,临界高度、临界节位的指标并不具有通用性,只有找到合适的、定性的生理生化指标,才能作为判断阶段转变的标志。

1.1.3 生殖生长期

判断果树实生树成年营养生长期结束进入生殖生长期的标志是实生树具备了在自然条件下连续成花的能力。育种实践中依据实生树是否成花来准确判断其进入生殖生

长期的临界点并不容易,因为成花受自然条件影响较大,不同地点、不同时间的试验所得成花节位数据的可比性不强。只要实生树在自然条件下能连续成花即可以认为其进入成年期,但如果成花条件不充分,分枝量太小,树势过弱,或者树体营养状况不良等,实生树即使进入成年期也仍不能成花,果树生产中栽培品种的幼树不能开花结果就是很好的例证。因此,在研究实生树阶段转变的试验中应为实生树提供良好的水肥条件,采取合适的栽培技术措施,这也说明了寻找果树实生树进入成年期的临界点对果树育种具有重要意义。

果树实生树进入生殖生长期后,除在形态、解剖结构、生理生化指标上与童期有较大差异之外,还表现生长速度变缓,生根能力渐弱,抗病抗逆性减弱,甚至,茎尖细胞质的pH也随着成年逐渐下降(Albrechtová et al. 2000)。因为阶段转变的渐进性,依据这些相关性状的变化来判断生殖生长期开始的临界点也不易操作,所以多年来,除了严格设计试验研究阶段转变临界点之外,人们还在努力寻找阶段转变的生理生化标记。

1.2 阶段转变的生理机制

植物阶段转变生理机制至今尚不十分清楚,不过人们早就注意到,不同的植物种类所得的研究结果差异较大,有时甚至得到相反的结果。Meilan (1997)在总结前人研究结果时发现,裸子植物与被子植物阶段转变的机制有所不同,被子植物中草本植物和木本植物也有区别。尽管人们认识到了不同物种阶段转变机制的不同,但果树等多年生木本被子植物显然不是研究阶段转变的良好试材。原因之一是果树品种的基因型高度杂合,难以得到遗传背景一致,性状不分离的试材群体;其次是果树作物的生理学研究基础相对薄弱。因此,在果树作物阶段转变研究工作中仍需参考模式植物的研究结果。

在解释植物阶段转变的生理机制时,学术界仍然沿用植物成花的三种假说,分别是成花素假说(florigen/antiflorigen concept)、营养分流假说(nutrient diversion hypothesis)和多因子控制假说(multifactorial control hypothesis)。

依据成花素假说,成花促进因子和成花抑制因子分别是通用的广谱激素,有人认为它们是多组分的,称之为成花素(florigen),由叶合成,在韧皮部中双向运输,到达茎尖后刺激成花基因表达。经典试验是用嫁接诱导光周期敏感型一年生草本植物成花(Zeevaart 1976)。拟南芥Cry2基因的发现和玉米控制成花素合成的idl基因的克隆,有力地支持了成花素假说。但成花素假说至今无法解释根在阶段转变中的作用,因而使其受到质疑,尤其在多年生木本植物上(Bernier et al. 1993);而且虽然学术界为了寻找成花素投入了大量的研究工作,成花素本身到目前仍未被分离出来。

营养分流假说认为任何与阶段转变和成花有关的因子都通过植株内部源库关系的调控来实现。茎尖得到利于成花的良好供应才能成花,一般认为茎尖分生组织中碳水化合物,尤其是蔗糖含量更是成花的条件。施用GA造成植株体内蔗糖主要用于增加节间生长,从而抑制成花;如果改用C3-羟基异构体16,17-二羟GA₃,不增加节间生长,其抑制成花的作用也就没了(King and Ben-Tal 2001)。

随着生理学研究的不断深入,多因子控制假说逐渐得到学术界的认同。该学说认为

多种激素、代谢物、营养等化学物质与阶段转变有关,其中碳水化合物,尤其是蔗糖、内源激素、多胺、矿物质等都很重要(Bernier et al. 1993)。一种或几种 GA 起初始信号作用,淀粉动员和蔗糖含量是关键,通过蔗糖与 CTK、GA 及 ABA,蔗糖与 GA 和 ABA 相互关联,调节碳水化合物代谢的酶活性及碳水化合物的吸收、分配来完成整个过程。在拟南芥、玉米、苹果等植物上已经克隆到上百个与阶段转变或成花有关的基因,对多因子控制学说的支持越来越有力(Lavy and Dean 1998)。

1.2.1 碳水化合物

碳水化合物通过影响成花与阶段转变间接相关。植物接受花诱导后,茎尖分生组织中的蔗糖浓度瞬时激增,刺激细胞有丝分裂。饲喂葡萄糖、果糖或蔗糖都能促进苹属(*Marsilea*)植物成花,但甘露醇不能,说明花诱导中蔗糖的作用不是调节渗透性,而是作为营养物质。研究表明,蔗糖不是成花的诱因,而是助剂,因为有些百合在蔗糖浓度不增加的情况下也能成花。用于成花的蔗糖可能来源于储藏的碳水化合物。在有的试验中当达到光饱和点时,茎尖蔗糖浓度也达到饱和点,成花量也饱和,曾经推测成花的蔗糖是光合作用产生的;又有实验证实在黑暗条件下,植物接受花诱导茎尖中蔗糖浓度也激增,则说明蔗糖来源于茎叶中储藏的碳水化合物。学术界比较公认后者,认为蔗糖激增来源于茎叶中储藏的淀粉,淀粉动员(mobilization)是花诱导早期的重要步骤,拟南芥淀粉动员突变体对花诱导没有反应(Eimert et al. 1995)。究竟是什么酶如此迅速地使淀粉降解,又如此迅速地运抵茎尖呢?目前还没有得到有说服力的试验证据。

桃童期叶片和成年期叶片在光合能力及淀粉、蔗糖、山梨醇含量上都有区别,或许可作为桃实生树童性的标记(Bitonti et al. 2002)。

1.2.2 激素

1. 细胞分裂素

细胞分裂素类对阶段转变和成花有明显的促进作用,欧白芥(*Sinapis alba* L.)接受花诱导后,成花信号迅速由韧皮部下传到根,这个信号很可能是蔗糖,因为接受长日照处理 1 h 内,根中的蔗糖浓度增加。下传信号导致根中成花信号再由木质部上运到茎尖,上运信号应该是细胞分裂素,根中已有的玉米素核糖(zeatin riboside, ZR)和异戊基腺嘌呤核糖(isopentenyladeine riboside, iPR)被激活,通过木质部外运,之后叶也释放异戊基腺嘌呤(isopentenyladeine, iP)运往茎尖,促进阶段转变。上述试验中还发现,早期环剥处理会起到抑制成花的作用,只有植株或树体达到一定阶段才行。转基因拟南芥大量积累细胞分裂素但不成花,说明细胞分裂素的持续、普遍分布无济于事,要求在适当的时间、合适的空间达到一定量才起作用,而且其分布比其剂量效应更重要。但是,比利时、法国和捷克 3 个国家的 9 位科学家联合发表研究报告,用免疫化学方法测得烟草成年营养生长期即将结束时,茎尖分生组织中的游离态 ZT、DHZ 和 iP 含量显著下降(Dewitte et al. 1999)。

茎尖分生组织中有足够的 ZT 和适宜的分布是桃实生树成花的先决条件,桃成年区茎尖较童区茎尖 ZT 含量高,分布广泛,可作为桃实生树童性消失的标记(Bitonti et al. 2002)。叶面喷施 BA 能部分克服 GA 对阶段转变的抑制作用。外源 BA 处理欧亚种葡萄

4 周龄实生苗的茎尖可以导致开花结果,而对照需要 3 ~ 5 年 (Srinivasan and Mullins 1978, 1979)。葡萄实生苗水培的营养液中含有 100 mg L^{-1} 的 CCC 能增加其伤流液中内源 CTK 水平。

随着阶段转变,松树 ZT 增加, iP 减少,可用 iP/ZT 的值作为阶段转变的标记 (Valdes et al. 2002)。内源 CTK 也可作为橡胶 (*Hevea brasiliensis*) 组培苗返童的标记 (Perrin et al. 1996)。

2. 赤霉素

通常认为赤霉素对木本被子植物的阶段转变和成花有抑制作用。洋常春藤 (*Hedera helix* L.) 等阔叶木本 GA 由根产生,运输到茎尖保持童性,童期芽中 GA 含量高于成年期芽,根中 GA 含量高于地上部组织,去掉根或扦插将使洋常春藤 GA 水平下降;随着树体长高,运抵茎尖的 GA 量逐渐减少,对成花的抑制作用减弱,逐渐失去童性 (Frydman and Wareing 1973a, 1973b, 1974; Wareing and Frydman 1976)。对成花起抑制作用的主要是 GA_7 , 对茎加长起主要作用的是 GA_5 , 施用外源 GA 后, GA_5 活性高, GA_4 、 GA_9 与茎加长生长无关 (Xu et al. 1997)。施用外源 GA 能导致洋常春藤成年态生长向童态生长转变 (Rogler and Dahmus 1974)。多效唑、烯效唑等多种生长抑制剂都是通过抑制 GA 生物合成来起到促花的作用 (Fletcher et al. 2000; Hedden and Graebe 1985)。但 GA 对成花和阶段转变的作用因物种而异,与上述结果相反的试验证实,GA 在甜樱桃阶段转变过程中不起作用 (Oliveira and Browning 1993)。GA 甚至是草本植物和裸子植物成花的促进剂 (King and Evans 2003; Meilan 1997)。GA 是拟南芥成花的初级信号,GA 缺陷型基因突变不能成花,而且施用 GA 抑制剂盐酸-2-氯乙基三甲胺 (2-chloroethyltrimethylammonium chloride) 可推迟成花。

3. 生长素

生长素与成花和阶段转变的关系尚不十分清楚,花诱导后生长素水平下降,生长素与细胞分裂素的比值下降。板栗童期枝条内源 IAA 含量高于成年期枝条 (Ballester et al. 1999)。外源 IBA 抑制黑穗醋栗成花,主要是通过调节碳水化合物的源库关系,调动营养和激素向发育器官转移,间接延长童期。

4. 脱落酸

通常认为脱落酸对阶段转变和成花有抑制作用。洋常春藤童期叶 ABA 含量是成年叶的 5 倍 (Hillman et al. 1974)。

以上研究结果说明植物阶段转变是个相当复杂的生理过程,多种生理生化指标随之发生质或量的变化。但多数有关研究无论选用何种材料类型和何种研究方法,基本上都是通过对比童期材料与成年期材料之间生理生化指标进行比较,分析童期与成年期之间的生理差异。如果能了解植物从童期进入成年营养生长期,再进入生殖生长期的整个过程中究竟发生了怎样的生理变化,对于认识植物阶段转变的生理机制将会更加有利。

作者研究发现,苹果杂种实生树(‘红玉’×‘金冠’)成年营养生长期的韧皮部中 ZT、

iP 含量都很高,是童期和生殖生长期含量的 2 倍以上,但成年营养生长期实生树叶片中 DHZR 含量却明显低于童期和生殖生长期。‘巨峰’葡萄自然实生树韧皮部中 ZT、ZR、DHZR 和 GA 含量随节位升高的动态曲线分别在 16 和 21 节出现明显拐点。‘大久保’桃自然实生树叶片、芽、韧皮部中内源激素随节位升高的动态变化显示,处于童期的三种组织中的 ABA 含量最高,进入成年营养生长期后 ABA 含量下降;成年营养生长期的 ZT、iP、GA 含量显著高于童期和生殖生长期;GA 含量在生殖生长期达到最低值。

1.2.3 多胺

高等植物阶段转变和成花过程中内源多胺含量发生变化。花诱导后欧白芥叶片向韧皮部输出腐胺,用药剂抑制腐胺合成可以抑制成花。葡萄组培苗内源腐胺含量及腐胺/(精胺 + 亚精胺)的值都可以作为外植体童性或组培苗返童的标记。验证性试验也证明,随着实生苗童性减弱,腐胺含量升高(Heloir et al. 1998)。作者发现,‘巨峰’葡萄自然实生树 21 节后,腐胺和亚精胺含量都明显升高。秋子梨和白梨的杂种(*Pyrus ussuriensis* Maxim. × *P. bretschneideri* Rehd.)实生树韧皮部、叶片中腐胺含量(图 1-1)及腐胺/(精胺 + 亚精胺)的值(图 1-2)都在 90 节之后增加到较高水平。在板栗组培苗中也发现类似结果。

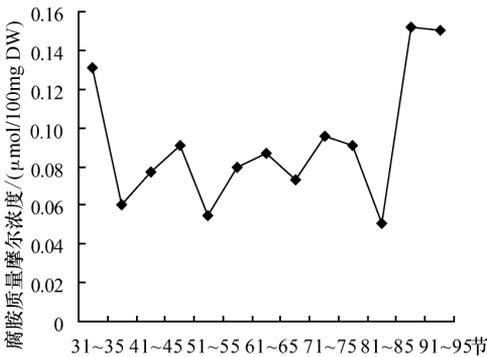


图 1-1 梨实生树韧皮部腐胺含量的动态变化

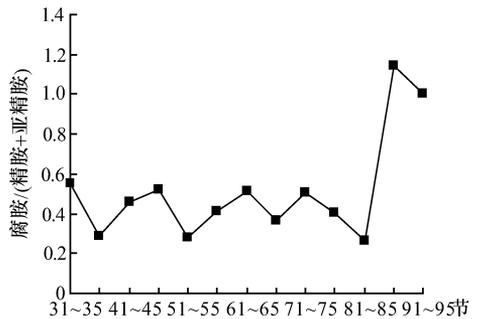


图 1-2 梨实生树腐胺/(精胺 + 亚精胺)值的动态变化

1.2.4 多酚

欧洲板栗组培苗中缩合丹宁的含量可作为童期或返童(rejuvenation)的生化标记(Fernandez-Lorenzo et al. 1999)。类黄酮(flavonoid)是火棘(*Pyracantha coccinea*)阶段转变的定性标记,在营养生长阶段这类次生代谢物质逐渐出现在地上部分,只有进入生殖生长阶段,才能在根中检测到它们(Fico et al. 2000)。花青苷消失是洋常春藤进入成年期的标记(Murray and Hackett 1991)。不同酚类物质含量的比值与杂种核桃(*Juglans nigra* × *J. regia*)返童显著相关(Jay-Allemand et al. 1988)。

‘巨峰’葡萄自然实生树生长到 21 节进入生殖生长期,只有在生殖生长期的韧皮部中才能检测到绿原酸(图 1-3),芽中才能检测到对羟基苯甲酸(图 1-4),这两种酚酸可以作为葡萄进入生殖生长期的定性标记(Zhang et al. 2005)。

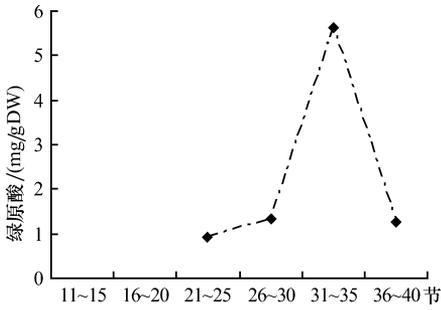


图 1-3 葡萄实生树韧皮部绿原酸含量的动态变化
(Zhang et al. 2005)

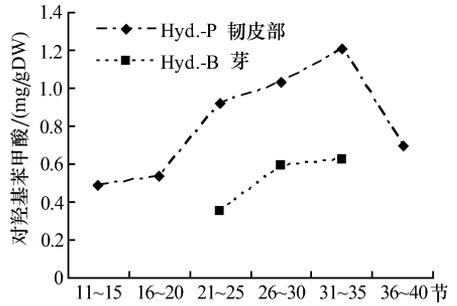


图 1-4 葡萄实生树对羟基苯甲酸含量的动态变化
(Zhang et al. 2005)

Zhang 等(2006)研究发现,苹果‘红玉’×‘金冠’2年生杂种实生树处于童期的定性标记是叶片中检测不到槲皮素,芽中检测不到根皮苷,叶片和韧皮部中能检测到咖啡酸。进入生殖生长期后的韧皮部中检测不到杨梅苷,叶片中也不再含有咖啡酸,是苹果实生树生殖生长期的定性标记;而实生树童性消失进入成年营养生长期时,韧皮部中检测不到咖啡酸,芽中出现根皮苷,叶片中能检测到丰富的槲皮素(图 1-5 ~ 图 1-8)。

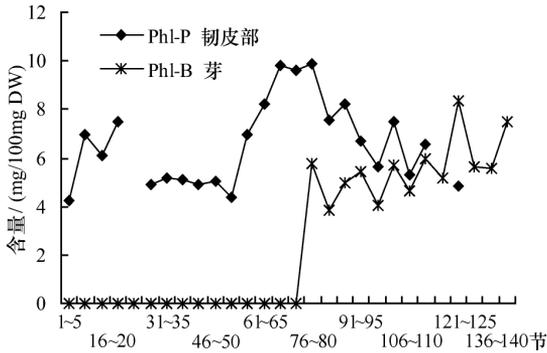


图 1-5 苹果实生树根皮苷含量的动态变化
(Zhang et al. 2006)

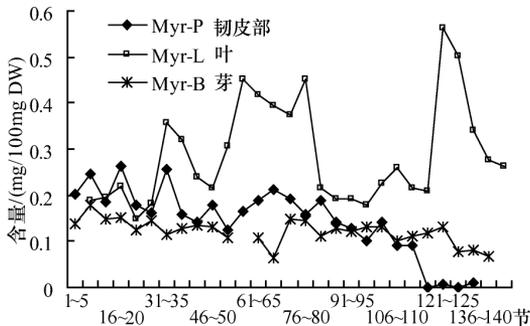


图 1-6 苹果实生树杨梅苷含量的动态变化
(Zhang et al. 2006)

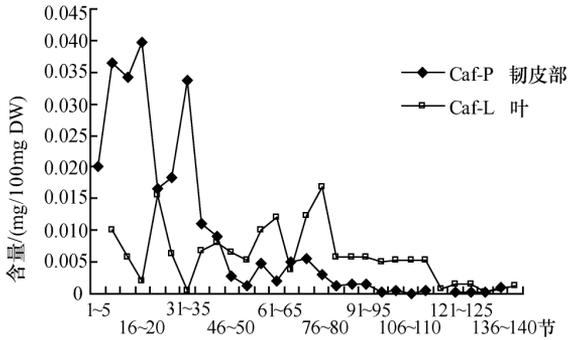


图 1-7 苹果实生树咖啡酸含量的动态变化 (Zhang et al. 2006)

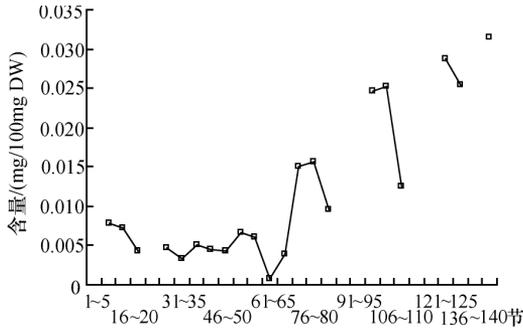


图 1-8 苹果实生树槲皮素含量的动态变化 (Zhang et al. 2006)

1.3 阶段转变的分子机制

大多数多年生木本被子植物童期和生殖生长期存在许多性状差异,称为异型性(heteroblasty),而有些则不表现明显的性状差异。无论植株是否表现出形态性状的差异,其阶段转变过程中所发生的一切生理变化都是受遗传控制的。为了进一步理解童性和阶段转变的分子机制,从20世纪80年代开始,人们分别从蛋白质、RNA、DNA和基因四个角度进行了大量的研究工作,取得了明显进展。

1.3.1 DNA 修饰

植物阶段转变过程中,不同发育阶段存在DNA特异,或者存在DNA修饰度和修饰方式的差异。

1. DNA 特异

Huang等(1995)对北美红杉(*Sequoia sempervirens*)线粒体DNA(mtDNA)进行RFLP分析,发现童期及返童枝条mtDNA有4.0 kb和3.6 kb 2个特异性BamH I限制酶切片

段, 成龄枝条中没有。随后, 在该树种未经酶切的 mtDNA 中, 除了发现有 23 kb 的环状 DNA 外, 还发现有 6 个环状质粒结构的小分子 DNA 中, 有 4 个是童期或返童材料特异性的, 分别为 3.2 kb、3.9 kb、4.0 kb 和 4.5 kb, 而且, 这些小分子环状 DNA 具有 38%~56% 的同源性, 叶绿体 DNA 和核 DNA 中均未发现与童性相关的片段 (Huang et al. 2003)。张才喜等 (2000) 也曾报道 14 年生湖北海棠实生树童区叶片基因组 DNA 含有 1 个约 2.1 kb 的特异 DNA RAPD 多态性片段, 成龄区叶片中未扩增出该片段。

2. DNA 甲基化

DNA 甲基化是基因调控的重要途径之一, 不同的 DNA 甲基化度、甲基化分布和甲基化特异位点都影响染色质的结构和基因的表达。Poethig (1990) 在综述植物形态建成时提到 DNA 甲基化与发育阶段的调节有关。

在模式植物上, 通过脱甲基化, 使 DNA 甲基化程度降低, 可导致拟南芥早开花。用脱甲基化剂 5-氮杂胞嘧啶核苷 (5-azacytidine, 5-azac) 处理可以使冬小麦、晚花型拟南芥等春化型草本植物提早开花 (Finnegan et al. 1998)。随着树龄的增长, 辐射松 (*Pinus radiata*) 分生组织中 DNA 甲基化程度逐渐降低, 返童过程中甲基化程度逐渐增强 (Fraga et al. 2002)。旺盛生长、不具备成花能力的板栗组培苗的 DNA 甲基化度为 23%; 而具备成花能力的成龄组织的组培苗仅为 13.7%, 休眠期则表现过度甲基化 (hypermethylation) (Hasbún 2005)。

相反, 3~6 月份营养生长过程中, 桃成年期茎尖分生组织中核 DNA 甲基化度高, 而童期或返童茎尖分生组织中 DNA 甲基化度较低。除了甲基化度的不同, 还检测到了 DNA 甲基化分布的差异, 成年期茎尖分生组织中核 DNA 甲基化呈现弥散型分布, 而童期或返童茎尖分生组织中 DNA 甲基化呈周缘分布 (Bitonti et al. 2002)。

Baurens 等 (2004) 测定了马占相思 (*Acacia mangium*) 的 DNA 甲基化情况, 表现童性的微繁苗的 DNA 甲基化度 (22.04%) 略高于表现成年态的微繁苗 (20.7%), 但利用甲基化敏感扩增多态性技术 (methylation sensitive amplification polymorphism, MSAP), 从所获得的 49 个甲基化位点中分别筛选到 3 个童性特异位点和 3 个成年态特异位点。

1.3.2 基因表达

生殖生长期最可靠的标记就是生殖器官的形成和发育, 阶段转变的开始与结束通常依据植物体在自然条件下或接受诱导后成花的情况来判断。实际上, 虽然成花与阶段转变关系密切, 但二者是两个相对独立的生理过程 (Zimmerman et al. 1985)。以往的研究中在组织、细胞水平上无法区分某因素究竟是对成花产生了影响还是对阶段转变发生了作用, 无法将成花与阶段转变两个生理过程正确区分开来 (Meilan 1997), 而在分子水平上则完全有可能对成花和阶段转变分别进行研究。但是, 即使在模式植物上, 目前已知研究材料和研究方法尚不能做到这一点。因此, 虽然裸子植物与被子植物阶段转变的机制不同, 被子植物中草本植物和木本植物也有区别, 依据基因的保守性和同源性, 以草本模式植物上发现或克隆到的基因作为基础来研究木本被子植物阶段转变, 仍是目前最有效的途径之一。

近年,从几种模式植物上分离克隆了大量的基因,有些与开花有关,有些与阶段转变有关,如花序分生组织特异性基因(*TFL*)同源基因、花分生组织特异基因 *LEAFY* (*LFY*)、*APETALA1* (*API*)同源基因和花器官特异基因(*API*、*AP3*、*DEF*、*AG*)同源基因等。这些基因在拟南芥或烟草中的异位表达显示它们的确能控制生殖生长的转变,同时一些开花调节基因的表达或抑制可以提早开花。

Weigel 等(1992)首先利用 RFLP 技术从拟南芥 *lfy1* 突变体中克隆出了全长 *LFY* 基因,认为是一个花分生组织特异基因,后来又发现它控制着植物开花时间。之后相继在 20 多种植物上克隆到了 *LFY* 同源基因,其中包括苹果 *AFL1*、*AFL2* 和葡萄 *VFL* 基因(Carmona et al. 2002; Wada et al. 2002)。Peña 等(2001)将拟南芥 *LFY* 基因导入柑橘,转基因柑橘当年就开花,且果实发育正常,所结种子无论是珠心胚还是合子胚起源,均可当年播种,翌年春天即可开花结果。

玉米中的 *APETALA2* 同源基因 *glossy15* (*gl15*) 在童期叶片中表达,通过接受 microRNA 172 (*miR172*) 的调节来控制童性。转 *gl15* 基因玉米维持童性,延迟生殖生长。认为 *APETALA2* 同源基因与 *miR172* 之间的平衡是高等植物阶段转变的分子机制(Kerstetter and Poethig 1998; Lauter et al. 2005; Moose and Sisco 1996)。*DALI* 基因在 1~4 年生挪威云杉(*Picea abies*)实生树上不表达,从 5 年生实生树开始表达,之后随树龄增加而增强,认为该基因调节童期向成年期的转变(Carlsbecker et al. 2004)。该文作者承认“成年营养生长期”的存在,但仅指出挪威云杉进入生殖生长期需 20~25 年,并未明确成年营养生长期从何时何处开始,只有当该树种 5 年生树刚好达到成年营养生长期,才能认定 *DALI* 就是阶段转变基因。这些结果对研究果树作物成花和阶段转变的分子机制奠定了基础。

以拟南芥 *LFY3* 的部分为探针对梨、苹果、湖北海棠和柑橘等果树基因组 DNA 进行杂交,显示供试果树基因组中均存 *LFY* 同源基因(陈大明和张上隆 1997),随后他们利用 PCR 技术从柑橘基因组中分离了一条 *LFY* 同源基因 *csLFY*(陈大明等 2001)。在苹果上已分别克隆到了 *LFY* 的同源基因 *AFL1* 和 *AFL2*、*MADS-box* 同源基因 *MdMAD*,以及 *TFL* 的同源基因 *MdTFL* 等(Kotoda et al. 2005; Wada et al. 2002; Yao et al. 1999)。*MdTFL* 基因在苹果的营养器官大量表达而在生殖器官不表达,将其转入拟南芥后延迟开花。将反义 *MdTFL* 基因转入苹果,花期提早至嫁接后 8~15 个月,而正常的植株开花需要 5 年的时间(Kotoda et al. 2003)。如果能够进一步明确开花时植株尚未进入成年营养生长期,则该基因可能与童性有关;如果开花时植株已经进入成年营养生长期,那么该基因只与成花有关。

北美落叶松(*Larix laricina*)童期树的幼嫩针叶中表达了大量的叶绿素结合蛋白 mRNA(Hutchison et al. 1990)。后来在洋常春藤上也发现,叶绿素结合蛋白基因在童期和成年期存在差异表达(Woo et al. 1994)。甜樱桃‘斯坦拉’(Stella)实生树童期茎尖与其扦插树茎尖提取的 mRNA 可以离体表达出差异蛋白质(Besford 1996)。就目前的研究手段,可以筛选果树实生树不同发育阶段的差异 mRNA,构建 cDNA 文库,克隆与童性或阶段转变直接相关的基因。

蛋白质是基因表达的产物。植物阶段转变的过程,必然伴随着蛋白质的定性、定量

变化。因此,童期、成年营养生长期、生殖生长期应该分别存在特异的蛋白质,许多研究结果证明了这一点。在不同的植物中分别发现了童期特异蛋白、成年期特异蛋白,或者不同发育阶段存在蛋白质表达量的差异。

在有些植物的童期组织中能检测到一些特异的低分子质量蛋白质,而生殖生长期的组织中没有。Bon(1988)发现巨杉(*Sequoiadendron giganteum*)童期及返童组织中有一种特异膜蛋白——J16(16 kDa)。Besford等(1996)将甜樱桃栽培品种‘斯坦拉’的自然实生树在严格控制的环境条件下培养,用双向电泳技术研究实生树茎尖低分子质量蛋白质的含量,发现12 kDa、27 kDa和30 kDa蛋白质是实生树的特异性多肽,在相同条件下培养的Stella扦插树则不含这几种蛋白质。将其中的低丰度的12 kDa蛋白质进行氨基酸测序后比较发现,这种蛋白质与高等植物叶绿素合成相关的5-氨基乙酰丙酸脱水酶(5-aminolevulinic acid dehydratase, EC4.2.1.24)的50 kDa亚基有同源性,认为该12 kDa蛋白质是阶段转变的相关蛋白质。草本植物中也发现同样的现象,拟南芥的一个无童期基因突变的营养生长期对亲环素40(Cyclophilin 40)有特殊需要,进入生殖生长期后就不再需要了(Berardini et al. 2001)。

在另一些植物生殖生长期的组织中可以检测到特异的低分子质量蛋白质。Amo-Marco等(1993)用80年生欧洲板栗(*Castanea sativa* Mill.)实生树树冠枝条代表生殖生长期组织,用基部萌蘖代表童期组织,分别建立组织培养无性系,采用SDS-PAGE分析试管苗低分子质量蛋白质含量,未发现生殖生长期组织和童期组织的膜蛋白存在差异,但是细胞液蛋白质和一些细胞器或质膜蛋白存在明显差异。生殖生长期试管苗中发现43.6 kDa、38.0 kDa、18 kDa和16.5 kDa几条特异蛋白质谱带。

还有些植物的童期和生殖生长期组织中虽然未检测到定性的差异蛋白质,但多种低分子质量蛋白质存在表达量的差异(Atherton et al. 1998;Huang et al. 2003)。橄榄实生树童期叶片和韧皮部中29 kDa蛋白质表达量大,而35 kDa蛋白质在生殖生长期的叶片和韧皮部中大量表达,不同基因型和组合间稳定,还有些差异是品种特异性的,如童期和生殖生长期组织中63 kDa蛋白质存在差异。认为29 kDa蛋白质与童性有关(Garcia 2000)。甜樱桃实生树28 kDa蛋白质在童期茎尖中的表达量高于成年母本树的扦插苗(Hand et al. 1996)。

1.4 阶段转变的调控

对于果树等以花、果实或种子为产品的木本植物,人们常常希望树体迅速通过童期,尽快进入生殖生长期;而对于林木等以营养器官为产品的植物,或者虽然以生殖器官为产品,但为了获得较高的抗性、旺盛的营养生长和较强的生根能力,保持和恢复童性则往往成为人们追求的目标。例如,用材林树种童期木材产量较高;许多果树童期材料的组培生根能力较强;橡胶童期树的产胶量较成年期树高。因此,对于不同的植物或者同种植物不同研究目的,需要对阶段转变分别进行正向、逆向两个方向的调控。

1.4.1 阶段转变的正向调控

为提高果树育种效率,将实生树从播种到自然条件下连续开花结果所需的时间缩到

最短一直是果树育种工作者追求的目标。促进实生树提早开花结果包括两方面的技术措施:缩短实生树童期和缩短成年营养生长期,但是,这两方面的技术措施在原理上是完全相反的。

1. 缩短童期

为实生树提供最适宜营养生长的环境条件,使实生树获得最快的营养生长速度,是缩短实生树童期的最有效技术措施。新西兰人工环境实验室自1993年开始研究通过给予适宜环境条件缩短苹果实生树的童期。如果让苹果实生苗在30℃恒温条件下生长,平均每天可以伸长1节;如果冬春季节在26℃恒温,16 h日长条件下,加上Cimectacarb抑制节间生长,苹果实生苗3~4个月就能长到100节,移入田间后再长20节可以进行促花处理。这项技术已在柑橘上成功了,可在播种后12个月内开花。但育种实践中这样的环境控制设施不易满足,而且植株大了以后移动也不便操作,后来又试验了把种子播种到别的有适宜气候条件的地方,18个月后将顶端接穗采回扦插的方法。

河北省昌黎果树所连续多年应用了一套缩短实生树童期的杂种实生树培育技术,效果很好。2月上旬将大批通过休眠的苹果、梨、桃、葡萄、板栗和甜樱桃等杂交种子在26℃人工气候箱中催芽,之后在光温湿全自控温室中将杂交种子播种于直径内6 cm的营养钵中,如果不加地热线,一般3~7天可出全苗。设定昼夜温度25/15℃,相对湿度80%~90%,4周后桃实生苗可生长到10~15 cm,苹果、梨、葡萄、板栗、甜樱桃等实生苗可生长到5~10 cm。这时将实生苗从6 cm营养钵转移到9 cm营养钵中,到5月上旬桃实生苗可生长到30~40 cm高,树种实生苗可达15~20 cm高,可以将实生苗带土坨直接定植于杂种初选圃。正常肥水管理,桃实生树当年可生长到100~150 cm,树种均可生长到80~100 cm。桃、葡萄、板栗实生树到播种次年可以接受促花措施大量成花,苹果、梨实生树第三年可以实施促花。

2. 缩短成年营养生长期和促花

缩短成年营养生长期是指通过采取有效措施降低实生树成花节位。目前还没有专用的降低果树实生树成花节位的方法,实践中一般采用与促花有关的技术措施,包括低温、生长调节剂、嫁接、扦插、环剥、环割、绞缢、限根、断根等。这方面的研究报道很多,许多促花的技术可以显著提高果树实生树成花率,但并非所有促花措施都能有效地降低实生树的成花节位。

1) 温度

低温对缩短童期和花诱导有明显作用,经过5~10周足以诱导休眠的温度(15℃),7月龄柚子(*Citrus paradisi*)开了花。桃、橄榄、甜橙、荔枝也有同样效果。

2) 植物生长调节剂

植物生长调节剂研究最多,不同植物种类效果不一。昌黎果树所研究了BA、KT30、CCC、ZT、乙烯利、多效唑、烯效唑、亚精胺8种生长调节剂对降低苹果、梨、桃、葡萄、板栗等杂种实生树成花节位的效果。2003~2004年,在‘大久保’桃2年生自然实生树上进行的70个试验处理中有5个试验处理对诱导实生树增加成花量有显著效果,有8个处理有

明显降低桃实生树始花节位的作用。既显著降低成花节位又显著提高成花率的处理仅有2个,分别是7月5日和10日整株喷施2次 2000 mg L^{-1} 多效唑和7月5日整株喷施1次 125 mg L^{-1} 烯效唑,桃实生树平均最低成花节位由84节降低到60~62节。几年来7月初喷施1次 125 mg L^{-1} 烯效唑已经作为常规技术应用于该项目组桃育种实践中。

用同样的研究方法,Zhang等(2006)试验了6种生长调节剂23个处理组合对降低‘金冠’苹果3年生自然实生树成花节位的效果。结果既显著提高了成花率,又显著降低成花节位的处理为6月20日和7月1日分别整株喷施2次 50 mg kg^{-1} BA加 1000 mg kg^{-1} 乙烯利,实生树平均最低成花节位由122节降低到77节。

3) 营养物质

在营养条件好的环境中,尤其微量元素供应充足时,实生树生长快,童期短。氮的供应以 NH_4^+ 为主,单纯 NO_3^- 不好。

4) 栽培措施

嫁接:从实生树采条,高接在成龄树或矮化砧木上不改变童性,但成花提早,连续反复嫁接效果更好。

扦插:黑穗醋栗实生苗上采条扦插就不必再长到相应高度即可开花。

维管限制:落叶松树直立生长要5~10年才能结果,而维管限制令其水平生长3年半即可开花。维管限制如环切、环剥、环缢等措施只有当实生树有一定高度时才有效,但具体那个树种多高为宜并无试验数据。限根、根剪和断根利于白杨树实生树开花。育种实践中,苹果、梨、板栗的4~5年生杂种实生树采用环剥、拉枝、施用生长抑制剂等措施能够成花。

5) 转基因

近年研究报道,许多植物的转基因植株可提早成花,这为缩短果树作物的育种周期提出了一条很有希望的途径。用目前克隆到的许多与阶段转变相关的基因构建转基因工程植株,再以工程植株作亲本可以使杂交后代实生树提早成花。但在阶段转变的生理机制尚不完全清楚的前提下,利用转基因手段来缩短实生树开花结果的时间在果树育种实践中应用的可行性尚待深入研究。

1.4.2 阶段转变的逆向调控

阶段转变的逆向调控主要是返童。返童是指通过自然或人工措施使处于生殖生长阶段的植物个体、器官、组织或细胞恢复童性的过程。有些文献将返童译作“复幼”、“返幼”,是与将童期译作“幼龄期”相对应的。使植物返童的方法有很多,最简单的办法有将实生树平茬、诱发根蘖,以及诱发树体基部产生萌蘖等。在果树生产中,要找到某品种的实生母株一般不容易,要获得返童材料必须采取其他有效措施。

最经典的实验是1954年Doorenbos通过嫁接首次使洋常春藤返童。板栗成年树上的枝条反复往童期砧木上嫁接可以使成龄枝条返童,嫁接4次后可组培生根(Giannelli and Giannini 2000)。同样原理,将北美红杉成龄组培苗反复微嫁接于童性组培砧木上,每嫁接1代童性增强一些,经过4代微嫁接,微茎段即可出现童性性状,并具备生根能力,而且其生根能力可以保持3年之久(Huang et al. 1992)。即使不进行微嫁接,试管苗

经过连续多次茎段继代培养也可以获得返童材料,尤其应用含有高浓度细胞分裂素的培养基效果更好。不管经过愈伤组织途径还是胚状体途径,植物的再生植株往往已经返童。另外,通过赤霉素和细胞分裂素等处理也能获得返童的效果。

有些时候返童是生产者不希望,如经过反复继代培养进行快速繁殖的果树组培苗直接用于生产时,会使树体开花结果期延迟。所以生产中应尽量避免应用高代组培苗。

1.5 前景与展望

许多果树作物都是多年生木本植物,其阶段转变的生理和分子机制与草本模式植物可能不同,所以,要深入研究果树作物阶段转变的机制,虽然需要参考草本模式植物的研究结果,但又不能完全依赖模式植物的研究思路,更宜建立适合木本果树作物的研究方法。

当前,成花依然是木本果树作物阶段转变的最可靠的形态标记,虽然学术界仍然认为植物阶段转变与成花是密切相关的两个独立的生理过程,但在组织和细胞水平上并不能将这两个生理过程区分开来进行研究。在今后的研究工作中,对成年营养生长期应给予高度重视。首先,阶段转变正向调控的措施中,缩短童期的措施多数是有益于营养生长的,而缩短成年营养生长期的措施一般要抑制营养生长,所以研究成年营养生长期对准确判断果树实生树的发育阶段,采取合理技术措施十分关键。其次,可以将成年营养生长期起始点的含义理解为童性与非童性的转折点,成年营养生长期结束点可以理解为成花与非成花的转折点,如果能够利用生理标记确定成年营养生长期起始与结束的临界点,则有希望排除成花基因的干扰,分别从蛋白质、mRNA 和 DNA 三个方面单纯研究阶段转变基因的表达与调控,从而揭示果树作物阶段转变的分子机制。

(张新忠)

参 考 文 献

- 陈大明,金勇丰,张上隆. 2001. 柑橘 *LEAFY* 同源基因分离及特性研究. 园艺学报, 28:295~300
- 陈大明,张上隆. 1997. 拟南芥菜 *LEAFY* 基因的分离及果树基因组中存在 *LEAFY* 同源基因的证据. 浙江农业学报, 9: 185~188
- 张才喜,陈大明,李载龙. 2000. 湖北海棠实生树童区与成年区基因 DNA 的 RAPD 研究. 武汉植物学研究, 18: 455~460
- Albrechtová J T P, Walczysko P, Espinel S, et al. 2000. Tree maturation characterized by *in vivo* studies in *Pinus radiata* on, pH patterns at the apex and systemic electrophysiological responses. Plant Physio Biochem, 38: 781~787
- Amo-Marco J B, Vidal N, Vieitez A M, et al. 1993. Polypeptide markers differentiating juvenile and adult tissues in chestnut. J Plant Physiol, 142: 117~119
- Atherton J G, Yen D M, Tucker G A. 1998. Timing of the protein changes during phase transition in *Cineraria*. J Hort Sci Biotech, 73: 35~38
- Ballester A, San-Jos M C, Vidal N, et al. 1999. Anatomical and biochemical events during *in vitro* rooting of microcuttings from juvenile and mature phases of chestnut. Annu Bot, 83: 619~629
- Baurens F C, Nicollet J, Legavre T, et al. 2004. Genomic DNA methylation of juvenile and mature *Acacia mangium* micro-propagated *in vitro* with reference to leaf morphology as a phase change marker. Tree Physiol, 24: 401~407

- Berardini T Z, Bollman K, Sun H, et al. 2001. Regulation of vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* by cyclophilin 40. *Science*, 291: 2405 ~ 2407
- Bernier G, Havelange A, Houssa C, et al. 1993. Physiological signals that induce flowering. *Plant Cell*, 5: 1147 ~ 1155
- Besford R T, Hand P, Peppitt S D, et al. 1996. Phase change in *Prunus avium*: differences between juvenile and mature shoots identified by 2-dimensional protein separation and *in vitro* translation of mRNA. *J Plant Physiol*, 147: 534 ~ 538
- Bitonti M B, Cozza R, Chiappetta A, et al. 2002. Distinct nuclear organization, DNA methylation pattern and cytokinin distribution mark juvenile, juvenile-like and adult vegetative apical meristems in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *J Exp Bot*, 53: 1047 ~ 1054
- Bon M C. 1988. J16, An apex protein associated with juvenility of *Sequoiadendron giganteum*. *Tree Physiol*, 4: 381 ~ 387
- Carlsbecker A, Tandre K, Johanson U, et al. 2004. The *MADS*-box gene *DAL1* is a potential mediator of the juvenile-to-adult transition in Norway spruce (*Picea abies*). *Plant J*, 40: 546 ~ 557
- Carmona M J, Cubas P, Martinez-Zapater J M. 2002. *VFL*, the grapevine *FLORICAULA/LEAFY* ortholog, is expressed in meristematic regions independently of their fate (*Vitis vinifera*). *Plant Physiol*, 130: 68 ~ 77
- Dewitte W, Chiappetta A, Azmi A, et al. 1999. Dynamics of cytokinins in apical shoot meristems of a day-neutral tobacco during floral transition and flower formation. *Plant Physiol*, 119: 111 ~ 121
- Eimert K, Wang S-M, Lue W, et al. 1995. Monogenic recessive mutations causing both late floral initiation and excess starch accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 7: 1703 ~ 1712
- Fernandez-Lorenzo J L, Rigueiro A, Ballester A. 1999. Polyphenols as potential markers to differentiate juvenile and mature chestnut shoot cultures. *Tree Physiol*, 19: 461 ~ 466
- Fico G R, Bilia A, Morelli I I, et al. 2000. Flavonoid distribution in *Pyracantha coccinea* plants at different growth phases. *Biochem Syst Ecol*, 28: 673 ~ 678
- Finnegan E J, Genger R K, Kovac K, et al. 1998. DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 5824 ~ 5829
- Fletcher R A, Gilley A, Sankhla N, et al. 2000. Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. *Hort Rev*, 24: 55 ~ 138
- Fraga M F, Rodriguez R, Canal M J. 2002. Genomic DNA methylation-demethylation during aging and reinvigoration of *Pinus radiata*. *Tree Physiol*, 22: 813 ~ 816
- Frydman V M, Wareing P F. 1973a. Phase change in *Hedera helix* L. I, Gibberellin-like substances in the two growth phases. *J Exp Bot*, 24: 1131 ~ 1138
- Frydman V M, Wareing P F. 1973b. Phase change in *Hedera helix* L. II, The possible role of roots as a source of shoot gibberellin-like substance. *J Exp Bot*, 24: 1139 ~ 1148
- Frydman V M, Wareing P F. 1974. Phase change in *Hedera helix* L. III, The effects of gibberellins, abscisic acid and growth retardants on juvenile and adult ivy. *J Exp Bot*, 25: 420 ~ 429
- Garcia J L, Avidan N, Troncoso A, et al. 2000. Possible juvenile-related proteins in olive tree tissues. *Sci Hort*, 271 ~ 284
- Giovannelli A, Giannini R. 2000. Reinvigoration of mature chestnut (*Castanea sativa*) by repeated graftings and micropropagation. *Tree Physiol*, 20: 1243 ~ 1248
- Hackett W P. 1985. Juvenility, maturation, and rejuvenation in woody plants. *Hort Rev*, 7: 109 ~ 155
- Hand P, Besford R T, Richardson C M, et al. 1996. Antibodies to phase related proteins in juvenile and mature *Prunus avium*. *Plant Growth Regulation*, 20: 25 ~ 29
- Hedden P, Graebe J E. 1985. Inhibition of gibberellin biosynthesis by paclobutrazol in cell-free homogenates of *Cucurbita maxima* endosperm and *Malus pumila* embryos. *J Plant Growth Regulation*, 13: 9 ~ 11
- Heloir M C, Fournioux J C, Barbier M, et al. 1998. Endogenous polyamine concentration in juvenile, adult and micropropagated grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir). *Vitis*, 37: 61 ~ 62
- Hillman I R, Young I, Knight B A. 1974. Abscisic acid in leaves of *Hedera helix* L. *Planta*, 119: 263 ~ 266
- Huang L C, Lin L Y, Chen C M, et al. 1995. Phase reversal in *Sequoia sempervirens* in relation to mtDNA. *Physiol Plant*, 94: 379 ~ 383

- Huang L C, Lius S, Huang B L, et al. 1992. Rejuvenation of *Sequoia sempervirens* by repeated grafting of shoot tips onto juvenile rootstocks *in vitro*, model for phase reversal of trees. *Plant Physiol*, 98: 166 ~ 173
- Huang L C, Chow T Y, Tseng T C, et al. 2003. Association of mitochondrial plasmids with rejuvenation of the coastal redwood, *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. *Bot Bull Acad Sin*, 44: 25 ~ 33
- Huang L C, Pu S Y, Murashige T, et al. 2003. Rejuvenation of *Sequoia sempervirens in vitro*: Phase and age related differences in protein tyrosine phosphorylation. *Biol Plant*, 47: 601 ~ 603
- Hasbún R, Valledor L, Berdasco M, et al. 2005. *In vitro* proliferation and genome DNA methylation in adult chestnuts. *Acta Hort*, 693: 333 ~ 340
- Hutchison K W, Sherman R E, Webber J, et al. 1990. Maturation in larch. II. Effects of age on photosynthesis and gene expression in developing foliage. *Plant Physiol*, 94: 1308 ~ 1351
- Jay-Allemand C, Cornu D, Macheix J J. 1988. Biochemical attributes associated with rejuvenation of walnut tree. *Plant Physiol Biochem*, 26: 139 ~ 144
- Kerstetter R A, Poethig R S. 1998. The specification of leaf identity during shoot development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14: 373 ~ 398
- King R W, Ben-Tal Y. 2001. A florigenic effect of sucrose in *Fuchsia hybrida* is blocked by gibberellin-induced assimilate competition. *Plant Physiol*, 125: 488 ~ 496
- King R W, Evans L T. 2003. Gibberellins and flowering of grasses and cereals: prizing open the lid of the 'florigen' black box. *Annu Rev Plant Biol*, 54: 307 ~ 328
- Kotoda N, Wada M. 2005. *MtFLL1*, a *FLL1*-like gene of apple, retards the transition from the vegetative to reproductive phase in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Sci*, 168: 95 ~ 104
- Kotoda N, Wada M, Masuda T, et al. 2003. The break-through in the reduction of juvenile phase in apple using transgenic approaches. *Acta Hort*, 625: 337 ~ 343
- Lauter N, Kampani A, Carlson S, et al. 2005. Micro RNA172 down-regulates lossy15 to promote vegetative phase change in maize. *Proc Nat Acad Sci USA*, 102: 9412 ~ 9417
- Levy Y Y, Dean C. 1998. The transition to flowering. *Plant Cell*, 10: 1973 ~ 1989
- Meilan R. 1997. Floral induction in woody angiosperms. *New Forests*, 14: 179 ~ 202
- Moose S P, Sisco P H. 1996. *Glossy15*, an *APETALA2*-like gene from maize that regulates leaf epidermal cell identity. *Genes Dev*, 10: 3018 ~ 3027
- Murray J R, Hackett W P. 1991. Dihydroflavonol reductase activity in relation to differential anthocyanin accumulation in juvenile and mature phase *Hedera helix* L. *Plant Physiol*, 97: 343 ~ 351
- Oliveira C M, Browning G. 1993. Studies on the induction of flowering in juvenile *Prunus avium* L. *J Hort Sci*, 68: 731 ~ 739
- Peña L, Martín-Trillo M, Juárez J, et al. 2001. Constitutive expression of *Arabidopsis* *LEAFY* or *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time. *Nature Biotech*, 19: 263 ~ 267
- Perrin Y, Dumas P, Lardet L, et al. 1996. Endogenous cytokinins as biochemical markers of rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) clone rejuvenation. *Plant Cell-Tissue and Organ Culture*, 47: 239 ~ 245
- Poethig R S. 1990. Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. *Science*, 250: 923 ~ 930
- Rogler C E, Dahmus M E. 1974. Gibberellic acid-induced phase change in *Hedera helix* as studied by deoxyribonucleic acid-ribonucleic acid hybridization. *Plant Physiol*, 54: 88 ~ 94
- Srinivasanm C, Mullins M G. 1978. Control of flowering in the grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Physiol*, 61: 127 ~ 130
- Srinivasanm C, Mullins M G. 1979. Flowering in *Vitis*: Conversion of tendrils into inflorescences and bunches of grapes. *Planta*, 145: 187 ~ 192
- Valdés A E, Centeno M L, Espinel S, et al. 2002. Could plant hormones be the basis of maturation indices in *Pinus radiata*. *Plant Physiol. Biochem*, 40: 211 ~ 216
- Wada M, Cao Q F, Kotoda N, et al. 2002. Apple has two orthologues of *FLORICAULA/LEAFY* involved in flowering. *Plant Mol Biol*, 49: 567 ~ 577

- Wareing P F, Frydman V M. 1976. General aspects of phase change with special reference to *Hedera helix* L. *Acta Hort*, 56: 57 ~ 68
- Weigel D, Alvarez J, Smyth D R, et al. 1992. *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell*, 69: 843 ~ 859
- Woo H H, Hackett W P, Das A. 1994. Differential expression of a chlorophyll a/b binding protein gene and a praline rich protein gene in juvenile and mature phase English ivy (*Hedera helix*). *Physiol Plant*, 92: 69 ~ 78
- Xu Y L, Gage D A, Zeevaart J A. 1997. Gibberellins and stem growth in *Arabidopsis thaliana*: Effects of photoperiod on expression of the GA_4 and GA_5 loci. *Plant Physiol*, 114: 1471 ~ 1476
- Yao J L, Dong Y H, Kvarnheden A, et al. 1999. Seven *MADS*-box genes in apple are expressed in different parts of the fruit. *J Amer Soci Hort Sci*, 124: 8 ~ 13
- Zeevaart J A D. 1976. Physiology of flower formation. *Annu Rev Plant Physiol*, 27: 321 ~ 348
- Zhang X Z, Li C M, Chang R F, et al. 2005. Changes of polyphenol composition along a cane of a *Vitis vinifera* × *labrusca* seedling. *Vitis*, 44: 101 ~ 102
- Zhang X Z, Zhao Y B, Li C M, et al. 2006. Potential polyphenol markers of phase change in apple (*Malus domestica*). *J Plant Physiol*, in press
- Zimmerman R H, Hackett W P, Pharis R P. 1985. Hormonal aspect of phase-change and precocious flowering. In: Pharis R P, Reid D M ed. *Encyclopedia of Plant Physiology NS*, 11: 79 ~ 115

第 2 章 果树花芽分化

果树生产的基础是开花结实,开花结实的第一步是花芽形成。花芽分化和形成的研究是果树学研究的重要方向,果树的开花研究可以解决果树生产中的许多实际问题,例如大小年结果、提早果树的结果年龄、改善果实的品质等。开花是果树的生长发育由营养阶段向生殖阶段的转折,它是果树生命周期中至关重要的生命现象之一,作为有性生殖的发端或起点,它引起授粉受精和胚胎发生等一系列生殖生理过程,使个体的有性生殖和遗传重组成为可能。果树花芽分化与形成是一个复杂的过程,受环境、内源物质及平衡、基因等调控和影响。

2.1 果树花芽分化的生理机制

植物的开花通常分为三个顺序过程:开花诱导、开花启动和花的分化与发育。花形成前,茎端分生组织或细胞必须做出一个决定:开花或者不开花。叶感受到开花诱导信号,并将之传递给茎端,便是花发育的起始步骤。随后是顶端分生组织诱导,使营养分生组织转化成有性分生组织,然后起始一系列花器官原基形成。

植物感受各种外界环境信号后产生的与成花有关的物质称开花物质,包括促花的成花刺激物和抑花的成花抑制物,主要有“开花素”、碳水化合物、激素及其他物质。人们认为植物在非诱导条件下,体内产生开花抑制物,植物不能开花;在诱导条件下,阻止了开花抑制物的产生,或者使开花抑制物降解,从而使花的发育得以进行。

2.1.1 开花素

1937年,柴拉轩通过嫁接试验提出了“开花素学说”:①光周期反应的感受器官是叶片,叶片在不同光周期条件下产生促抑信息,并且输送到茎尖生长点发生作用;②产生的成花物质可多向、多距离运输;③开花促进物质对不同物种及具有不同光周期特性的植物是相同或相近的;④产生的成花物质是在特定条件下产生而非基础代谢物质,并应具有普遍性。柴拉轩曾认为“开花素”由GA和成花素组成,前者的主要功能是促进茎的生长,后者的主要作用是促进花序(芽)的分化和形成。但由于方法学上的困难,从植物体内分离这类物质的努力都以失败而告终,迄今为止仍未得到令人信服的研究结果。实验证明,去除接穗上的叶片对于促进成花非常重要,因为处于不利于发育的光周期条件下的叶片,会产生抑制花芽分化启动、阻止花发育或促进营养生长的信息,从而使正在开花的植株恢复其营养生长。现在,不少植物生理学家和果树学家认为,环境信号诱导作用可能不是单一的成花素,而是调节了多种内源激素的平衡,或激素的互作。植物生长物质对于果树成花的作用方式是多种多样的,各种生长物质之间往往是互作的。环境信号的刺激引起内源激素关系的变化,导致成花。Bernier(1993)提出了“多因子诱导开花学

说”,以后进一步发展为控制成花的网状系统模型,即成花受多条相应的途径控制,只要一条途径畅通,花芽分化即可启动。

2.1.2 开花物质

影响植物开花的物质多种多样,常见的有六氢吡啶、水杨酸和苯甲酸等,它们能诱导浮萍(*Lemna paucicostata*)开花。弱酸性的化合物,如乳酸、柠檬酸、甲酸、丁酸、对羟基苯甲酸、丙酸、丙酸钠在诱导暗期前处理的牵牛幼苗中都呈现抑制作用,而弱碱、 NH_4Cl 、普鲁卡因和柠檬酸三钠则促进开花。苯丙烷类,如绿原酸、松柏醇葡萄糖苷和香豆酰奎尼酸,也与开花有关。此外,多胺对植物开花也有重要作用,苯胺可与多胺键合而影响开花和生殖发育。

2.1.3 内源激素

已知的五大类激素几乎对植物开花都有一定作用,但最有影响的是细胞分裂素、赤霉素和生长素。

细胞分裂素参与许多植物的成花转变过程,只是在不同植物中的表现不完全一致。内源细胞分裂素的增加可以减弱苹果的营养生长,促进开花,例如,将玉米素通过去掉叶片的叶柄注入苹果短枝后,显著地促进了短枝形成花芽(Badawi et al. 1980)。苹果短枝花芽发端前,外源CTK处理促进花芽分化(Ramirez et al. 2000)。将在细胞分裂素合成过程中的关键酶异戊烯基转移酶(isopentenyl-transferase, IPT)基因转入烟草中,转化烟草叶中脉末端可产生花芽,这些花芽中的细胞分裂素含量远比野生型的花芽中高得多(Estruch et al. 1993)。细胞分裂素的作用可能与叶产生的成花生理信号有关。

赤霉素一般对植物的成花具有促进作用,但对果树及木本植物花的发生具有抑制作用。很早就有人注意到幼嫩苹果的种子对花芽形成的抑制作用。Luckwill(1970)认为种子制造的GA抑制成花,从种子输入短枝的GA使短枝停留于营养生长而导致隔年结果。Hoad(1978)证实了这一观点,并指出苹果和梨的短枝组织若接受多量的由果柄输送来的GA会抑制花芽分化。后续的研究认为GA抑制果树花芽孕育,可能是通过在信号产生位点刺激IAA生物合成来起作用的。

低浓度生长素是花发生所必需的,但是在高浓度时则抑制开花。生长素的研究在果树方面的报道不一,甚至不同的研究得到的结果相反。因此目前生长素对果树花芽分化的影响尚未取得一致的看法。

不同的激素在生长发育过程中共同存在,它们出现的时间和含量有所不同,它们之间的相互作用有协同也有拮抗,当果树体内的激素种类和数量达到一定的比例和条件时就会引起成花。研究者也很早就注意到这一点,并指出任何器官的发育依赖于激素平衡和有效同化产物之间的相互作用。

Luckwill(1974)认为果树中的激素平衡导致了成花基因解除阻遏,使成花基因活化。根据“激素平衡”的概念,在花芽分化前,凡能提高树体细胞分裂素水平或降低树体赤霉素浓度的方法,应能促进成花;反之,则抑制成花。这对果树生产有重要的指导意义,如在适当的时期可采用喷施外源激素来控制果树的成花;并可改善果树大小年的情况,如