

中国榛属植物资源培育与利用研究(Ⅱ)

——形态发育、生理和分子生物学研究*

王贵禧

(中国林业科学研究院林业研究所,国家林业局林木培育实验室,国家林业局榛子工程技术研究中心,北京 100091)

摘要:榛树是雌雄同株异花植物,在北京地区雌雄花序于当年6月开始形态分化,翌年3月开花。坚果发育则从5月下旬开始至8月上旬成熟。纬度越高,物候越晚。榛属植物光合作用的光饱和点较低,双峰型峰值也远离中午强光时段,表明其适应林荫、弱光条件。盐碱、低温、干旱等胁迫条件下榛树生长受到影响,各项生理指标发生改变,光合能力下降。榛树不同器官具有异熟现象,雄花序、雌花芽和叶芽的需冷量分别为336~1 176、504~1 344、672~1 512 h,需热量分别为687.0~998.5、998.5~3 496.1、2 546.5~4 180.3 GDH^{°C}。枝条冬春季失水是导致抽条发生的直接原因,抗抽条品种枝条的导管密度、导管总面积、导管/木质部、射线条数及其横截面积、导管细胞平均长度及平均直径等高而皮孔宽度小。对抗低温、抗抽条、抗盐碱、花芽分化、自交不亲和等主要性状基因进行了克隆、表达与功能初步研究,为分子辅助育种奠定了基础。系统研究了榛属植物花粉特性、柱头可授性、授粉受精过程及子房和胚珠的败育等问题,为提高授粉效果、预防空壳等提供指导。

关键词:榛;形态发育;生理学;生殖生物学;分子生物学

中图分类号:S727.3

文献标识码:A

文章编号:1001-1498(2018)01-0113-09

Progress in Cultivation and Utilization of *Corylus* L. Resources in China (Ⅱ)

——Morphological Development, Physiology and Molecular Biology

WANG Gui-xi

(Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry; Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration; Hazelnut Engineering and Technical Research Center, State Forestry Administration, Beijing 100091, China)

Abstract: *Corylus* trees are monoecious and unisexual plants. The male inflorescences and female buds begin to differentiate in June of the current year and blossom in March next year. The infructescence begin to develop in May and the nut mature in early August in Beijing region. The higher the latitude is, the later the phenophase comes. The light saturation point of photosynthesis of hazel plants is relatively low, and the bimodal peaks are also far away from noon light time, indicating that hazel plant adapts to the shade and weak light conditions. The saline-alkali, low temperature, drought and other stresses conditions may have adverse effect on hazel growth, lead to abnormal physiological indicators, and decrease the photosynthetic capacity. Hazel trees have dichogamous characteristics, different organs have different maturity stage. The required cooling capacity of male inflorescences, female flower buds and leaf buds are 336 - 1 176 h, 504 - 1 344 h, 672 - 1 512 h, the required calories are 687.0 - 998.5 GDH

收稿日期:2017-11-29

基金项目:中央级科研院所基本科研业务费资金项目:“川榛种质资源评价及育种群体的核心种质构建”及“榛子提质增效关键技术研究”(CAFYBB2017ZA004-9)

作者简介:王贵禧(1962—),男,研究员,主要从事经济林资源培育与利用研究。E-mail:wanggx0114@126.com

* 致谢:马庆华,赵天田,陈新,宗建伟,王陆军等提出修稿意见,刘剑锋、季兰等提供部分论文资料。

℃, 998.5 – 3 496.1 GDH °C, and 2 546.5 – 4 180.3 GDH °C. Water loss in late winter and early spring is the direct cause of shoot shriveling. The shriveling resistance varieties have high value of the vessel density, total vessel area, vessel/xylem ratio, number of xylem rays and their cross-sectional area, average length of vessel cells and average diameter, and low value of the pore width. The regulatory genes which involve traits such as cold resistance, shoot shriveling resistance, saline-alkali tolerance, inflorescences differentiation and self incompatibility are cloned. The expression and the functions of regulatory genes are analyzed in order to lay a foundation for molecular-assisted selection breeding. The pollen characteristics, stigma receptivity, pollination and fertilization process and the abortion of ovary and ovule were systematically studied in order to provide guidance for improving the pollination effect and preventing blank shell problems.

Keywords: *Corylus*; morphological development; physiology; reproductive biology; molecular biology

1 榛形态发育

1.1 主要物候期及坚果发育过程

榛的物候期受地区、品种及年份等因素影响较大。在北京地区,平欧杂种榛一般3月上中旬开花,雄花序先松软、伸长,花期持续10~15 d,雌花开放时间比雄花晚且短2~5 d。4月上中旬发芽,5月上中旬幼果开始出现,6月上中旬雄花序开始出现,8月上旬坚果成熟,10月底至11月上旬落叶。据王文波^[1]观测,在黑龙江尚志市帽儿山一带,平榛雄花序自4月15日开始变松软,至4月30日拉长至最大,5月2日雌花初开,6日前后开始授粉,至15日左右授粉结束。可见,黑龙江地区的平榛比北京地区的平欧杂种榛的开花物候期晚40 d左右。孙振良等^[2]研究了位于吉林省吉林市的3个榛种的开花、展叶物候与气温的关系,认为欧洲榛与平榛萌发所需的临界温度为4.7℃,而平欧杂种榛的临界温度为3.8℃,欧洲榛、平榛、平欧杂种榛萌发的活动积温分别为42.3、46.1、27.5℃;欧洲榛、平榛和平欧杂种榛展叶所需临界温度分别是15.0、16.3、10.0℃,展叶所需活动积温分别为122.5、117.7、197.1℃。平榛在该地区的初始展叶期为4月下旬,5月初为展叶盛期,其发芽、展叶的临界温度都比平欧杂种榛的高。

据段丽娟^[3]观察,北京地区的平欧杂种榛坚果发育过程大致分为3个阶段:第1阶段,从5月10日(花后50 d)到5月26日(花后66 d)为果实发育初期,子房慢慢膨大,生长速度相对较慢;第2阶段,从5月26日到7月10日(花后110 d)为快速发育期,这阶段果实各指标增长幅度较大;第3阶段,7月10日以后进入果实品质形成期,外部形态指标的生长速度趋向平缓,外壳开始变褐变硬,内部干物质

积累,种仁迅速发育,至8月上旬果实成熟。种仁的发育也呈现“S”型变化曲线,从6月10日(花后80 d)种仁出现到6月25日(花后95 d),坚果纵径和横径都有较大幅度的增长,但这阶段的种仁为“水仁”,6月25日以后种仁进入快速发育阶段,坚果鲜质量快速增加,7月10日(花后110 d)后种仁纵径生长速度趋向平缓,但横径和鲜质量生长较快,直到8月9日(花后140 d)果实成熟。

1.2 雄花序、雌花芽、小孢子的形态发育过程

榛属植物是雌雄同株异花,雄花序为柔荑花序,随着当年新生枝条的生长而形成,一直裸露“悬挂”在树上,越冬后于次年春季开放、散粉。雌花芽为头状花序,也随当年新生枝条的生长而分化形成。董文轩等^[4]以平欧杂种榛‘平欧124号’为试材研究了雌花芽的分化过程,单性雌花芽的形态分化过程可分为花芽分化初期、苞叶原基形成期(顶花序原始体出现期)、花蕾原基形成期、果苞原基形成期、雌蕊原基形成期(包括花柱原基形成期和子房显现期)和花柱伸长期等6个阶段。在沈阳地区,‘平欧124号’的顶花序原始体主要在7月中旬形成,之后逐渐分化出果苞、花柱和子房;最后随着花柱原基的不断伸长,雌花芽形态分化结束,全部过程历时2~3个月;单个花蕾原基上可形成单一花柱或双生花柱。

朱俊义等^[5]在扫描电镜下研究榛雄花序和雌花芽的分化过程,平榛和毛榛在吉林省通化地区的取样时间是6月1日至9月15日,滇榛在云南昆明地区的取样时间是5月1日至9月30日,每隔4 d取样1次。结果显示,平榛和毛榛雌花序的发生时间一般在7月中旬,滇榛一般在6月上旬。榛雌花序由3~5个小聚伞花序螺旋状排列组成,每个小花序原基分化出1枚初级苞片和一团小花序原基分生组织,由小花序原基分生组织分化成2个花原基;每

个花原基分化出2个心皮原基,形成二心皮雌蕊;雌蕊基部有2层花被原基,内层花被原基呈均匀的环状,外层花被发生于花原基近轴面和远轴面,并且近轴面和远轴面的花被不均等分化,外层花被发生早于内层花被。入冬前形成的雌蕊,具2个柱状花柱,内外层花被尚未发育完成,2个二心皮子房呈近直角排列。榛雌花序由芽鳞包被越冬,雌花序芽1~3个单独或与雄花序同时位于叶腋处。柔荑状雄花序由多个小聚伞花序螺旋状排列组成,平榛和毛榛的雄花序发生时间一般在6月下旬,滇榛一般在5月下旬。首先是雄花序原基呈圆柱状伸长生长,外被芽鳞,并逐渐分化出螺旋状排列的球形小花序原基,每个小花序原基分化出1枚初级苞片和一小团花序原基分生组织,由小花序原基分生组织分化出2枚次级苞片和4~6个雄蕊原基,近球形的雄蕊原基纵裂分化成2部分,花丝纵裂至基部,每部分侧面浅纵裂,分化形成四棱形雄蕊原基,每个雄蕊4个药囊;入冬前,形成具4个药囊的雄蕊和2个片状次级苞片。发育成熟的榛雄花序为柔荑状,一般2~4个柔荑状雄花序呈聚合状排列在叶腋处的总花轴上,裸露越冬。

黄义江等^[6]观察了黑龙江庆安县的平榛雌雄花及坐果发育过程,7月下旬为雄花孢原细胞期,8月上旬花粉母细胞开始减数分裂,8月中下旬花粉成熟,成熟花粉越冬,翌年4月中下旬散粉;雌花受粉后于5月上旬至中旬子房开始膨大,8月下旬至9月果实成熟。陈伟等^[7]以6个平欧杂种榛和2个野生平榛种质为试材研究了小孢子的形成过程,认为可分为造孢细胞发育期、小孢子母细胞发育期、减数分裂期、单核花粉粒形成期和成熟花粉粒形成期等5个阶段。造孢细胞在7月下旬左右开始发育,至9月上旬花粉粒达到成熟状态,小孢子形成过程大致需要2个月左右,而且供试平欧杂种榛和野生平榛在小孢子发育各时期的特征没有明显区别。山西农业大学邢晓莹^[8]对平欧杂种榛‘达维’的花粉母细胞染色体的减数分裂过程进行了显微观察,减数分裂活动集中在上午8:30—10:30进行。减数分裂I包括前期I(分为细线期、偶线期、粗线期、双线期和终变期5个时期)、中期I、后期I和末期I,减数分裂II也包括前、中、后和末不同阶段。随着花药的发育,四分体胼胝壁被绒毡层分泌的胼胝质酶溶解后,幼期的单核花粉粒便从四分体中分离出来。单核花粉发育充实后,先进行1次有丝分裂产生2个均等

的核,之后发生1次不均等的胞质分裂,形成小的生殖细胞和大的营养细胞。生殖细胞形成后不久,便逐渐从花粉粒的壁部脱离下来,形状变为圆球形,并游离在营养细胞的细胞质中。到8月中、下旬,花粉粒已接近成熟,其形状近似三角形,颜色略深,具有3个明显的萌发孔。平欧杂种榛‘达维’的花粉母细胞在减数分裂的过程中,22条染色体在终变期完全配对为11个二价体,说明平榛和欧洲榛的亲缘关系近,染色体的同源性好,平欧杂种榛在遗传上相对稳定,可以形成正常可育的雌雄配子。

综上所述,在东北地区6月下旬至7月是雌雄花序形态分化的关键时期,此时在栽培上要加强营养,促进雌雄花的分化,8月底花粉发育成熟。

2 榛树生理学研究

2.1 光合生理与水分利用效率研究

刘剑锋等^[9]采用2个平榛种质和3个平欧杂种榛品种进行光合作用研究表明:光饱和点为 $680 \sim 930 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光补偿点为 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光饱和光合速率为 $8 \sim 17 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,表观量子效率为 $0.03 \sim 0.04$,双峰型峰值分别出现在8:00和17:00,表明榛子种质较适应弱光或林荫条件生长,5个种质的光合效率和光饱和点的大小顺序大致为‘平顶黄’、‘达维’、‘平榛1’、‘玉坠’和‘平榛2’,似乎具有欧洲榛遗传基因的平欧杂种榛的光合效率和光饱和点略大于平榛。树冠不同方位叶片其光合特性也有差异,据李六林等^[10]研究,平欧杂种榛树冠南、北面叶片光合速率(P_n)的日变化为双峰曲线,西面叶片为单峰曲线,高峰出现在上午的7:00—8:00,东面叶片光合速率的变化较平稳,无明显的高峰;不同方位叶片的光合速率午间变化主要受非气孔的限制,不同方位叶片的平均光合速率和 CO_2 同化量有一定的差异,南面叶片最高,其次为西、北面叶片,东面叶片最低;‘辽榛7号’和‘辽榛1号’的光饱和点分别约为 $691 \sim 724$ 、 $464 \sim 505 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,其光补偿点分别约为 $10 \sim 26$ 、 $8 \sim 21 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,均比常见的落叶果树低,与刘剑锋等^[9]得出的榛适应于弱光条件的研究结果一致,也与榛树自然分布于林下、林缘地带的实际情况相一致。盐胁迫对平欧杂种榛的光合生理有显著影响,随着胁迫浓度的增加,平欧杂种榛‘辽榛3号’幼苗的盐胁迫症状逐渐加剧,根长及生物量逐渐降低,净光合速率(P_n)、气孔导度(G_s)、蒸腾速率(Tr)、气

孔限制值(L_s)、光合水分利用率(WUE)等光合指标显著下降,呼吸强度显著降低,叶片相对电导率和胞间 CO_2 浓度(C_i)随胁迫浓度的增加逐渐上升,叶绿体膨胀变形,基粒、基质片层结构模糊,类囊体解体^[11]。不同品种(系)进行光合作用的水分利用效率差异较大,宋锋惠等^[12]采用瞬时光合特性与稳定碳同位素技术相结合的方法研究了26个品种(系)的水分利用效率,并由水分利用效率指标得出‘平欧33号’、平欧杂种榛品系85-152、‘辽榛7号’、‘平欧140号’、‘平欧360’、平欧杂种榛品系85-149、‘平顶黄’、‘平欧72号’、‘达维’等品种(系)具有较高的抗旱性能。

2.2 榛耐盐碱机理研究

盐碱胁迫对平欧杂种榛‘辽榛3号’的株高、新梢长度、叶片数、生物量等抑制作用明显,不同种类盐胁迫伤害程度为:NaCl 胁迫 > 混合盐碱胁迫 > Na_2CO_3 胁迫^[11]。随盐碱胁迫浓度的增加,‘辽榛3号’平欧杂种榛的丙二醛含量逐渐上升,可溶性蛋白、可溶性糖含量呈先升后降的变化趋势,脯氨酸显著增加;叶片 ABA 含量显著增加,且低浓度 Na_2CO_3 胁迫下 ABA 积累更快,(GA + IAA + ZR)/ABA 比值显著降低,相关分析表明,该比值与株高、新梢长度、新梢叶片数显著正相关,而与根冠比呈显著负相关;盐胁迫下,‘辽榛3号’平欧杂种榛根系总有机酸积累情况为 Na_2CO_3 胁迫 > 混合盐碱胁迫 > NaCl 胁迫。中性盐 NaCl 胁迫下,叶绿素含量显著下降,光合指标 P_n 、 G_s 、 Tr 、 WUE 、 L_s 、 CUE (表观 CO_2 利用效率)及 LUE (表观光能利用效率)随胁迫浓度的增加逐渐降低,叶片光合能力显著下降。碱性盐 Na_2CO_3 胁迫下,光合能力受影响程度小于中性盐和混合盐胁迫。不同盐种类和年度的伤害差异,与胁迫条件下不同矿质离子在积累、平衡和运输方面存在的差异有关^[13]。利用电阻抗图谱法能有效的反映平欧杂种榛的耐盐碱水平,‘辽榛3号’平欧杂种榛对中性盐 NaCl 的忍耐极限浓度为 $100 \sim 150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,对 Na_2CO_3 的忍耐极限浓度为 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,耐混合盐碱能力介于二者之间^[14]。平榛在盐胁迫处理4h后,MDA含量达到最大值,POD酶活性、可溶性蛋白和脯氨酸含量则在盐处理24h后达到最大值。SOD酶的活性在干旱及盐胁迫处理下的变化趋势不明显^[14]。

2.3 平榛抗逆相关酶生理研究

对生长季节平榛在低温、干旱及盐胁迫下叶片

中的可溶性蛋白、SOD、POD酶活性以及MDA、脯氨酸含量的研究表明:在低温胁迫下,上述指标在处理2h后均有不同程度的上升并达到最大值(除脯氨酸在4h、POD在8h达到最大值外),随后出现整体下降趋势,但SOD的活性略微上升。在干旱胁迫下,可溶性蛋白、POD酶活性、MDA和脯氨酸含量在处理2h后均上升,并达到最大值,脯氨酸在处理24h后达到最大值^[15]。对野生型拟南芥和转平榛WRKY28基因拟南芥株系低温处理12h后,对叶片的相对电导率、可溶性蛋白含量、SOD、CAT、POD酶活性及MDA含量等进行对比分析发现:转基因拟南芥在低温处理12h后的相对电导率、MDA含量增加程度小于野生型拟南芥,MDA含量越多,表明膜脂过氧化损伤程度越严重。转基因株系中的可溶性蛋白含量、SOD酶活性在处理12h后的增加量高于野生型拟南芥。转基因拟南芥中这些生化物质及指标的变化,提高了其在低温胁迫下的抗性^[16]。

2.4 平欧杂种榛需冷量、需热量生理研究

榛树植物不同基因型的物候期差异明显,同种基因型的不同器官也具有异熟性,尤其是榛属植物的雄花序和雌花芽的异熟性更加明显,这些现象可能与需冷量和需热量有关。马庆华等^[17]以16个平欧杂种榛主栽品种的1年生枝条为试材,以野生平榛1年生枝条为对照,通过水培观察的方法,对平欧杂种榛的雌、雄花序和叶芽进行了需冷量和需热量研究,结果表明:平欧杂种榛不同器官的需冷量由低到高依次为雄花序336~1176h,雌花芽504~1344h,叶芽672~1512h;需热量由低到高依次为雄花序687.0~998.5GDH $^{\circ}C$,雌花芽998.5~3496.1GDH $^{\circ}C$,叶芽2546.5~4180.3GDH $^{\circ}C$;不同品种、器官在刚满足最低蓄冷要求时需热量最高,随着蓄冷时间的延长,需热量逐渐减少。在低纬度温暖地区引种,需要满足品种的最低需冷量要求,在冬季有效低温累积时数达到或超过品种需冷量的地区方可引种。在高纬度寒冷地区引种要充分考虑品种的需热量,田间观察发现,最低需热量与物候期密切相关,品种的需热量影响主栽品种的选择和选配。上述研究丰富了榛属植物开花和休眠解除方面的数据,可为平欧杂种榛的引种和栽培提供参考。

从物候期看,春季雄花序开放时间一般早于雌花2~5d,而且在雄花序形成当年如遇晚秋~初冬期间气温高,柔荑花序即有变松软、拉长现象,似要开放;榛雌雄花都是先叶开放,在北京地区,开花和

发芽的间隔时间1个月左右。这些现象印证了雄花序比雌花芽的需冷量低,雌雄花的需冷量比叶芽低这一研究结果。目前,平欧杂种榛适宜栽植范围划定在淮河以北地区,但在这个大范围内,不同品种优势适生区也有差异,有些品种抗寒能力差只适宜在南部区域种植,不同品种需冷量、需热量的研究结果可作为其适宜栽培区选择的参考依据。

2.5 平欧杂种榛抽条机理

抽条发生的直接原因是枝条失水造成的,不同品种(系)发生抽条的枝条的临界含水量不同,但平欧杂种榛多数品种(系)枝条的含水量降低至35%~30%时就会发生抽条。各地枝条失水的关键时期不一致,北京地区平欧杂种榛的枝条失水集中在2月上旬到下旬,枝条含水量在2月下旬降到最低^[18]。薛俊宏^[19]研究了7个平欧杂种榛品种(系)的抽条与水分含量的关系,越冬期间抗抽条能力强的,如品种(系)‘平欧7号’、‘平欧73号’、‘达维’表现出良好的抗失水性能,在整个越冬期,1年生枝的含水量为41.54%~47.55%,而不抗抽条品系(‘辽榛2号’、‘魁香’、‘平欧360号’、‘平欧402号’)的含水量为26.36%~42.46%,7个品种(系)枝条的含水量与抽条指数的相关系数为 $r = -0.9929$ 。抗抽条品种(系)枝条的脯氨酸含量也显著高于不抗抽条的品种(系)。

虽然抽条与枝条的含水量紧密相关,但抗抽条能力的强弱不完全取决于临界含水量的高低。赵爽等^[20]研究表明,土壤含水量也会影响抽条,抽条与1、2月份地下30 cm土壤的含水量及12月至次年3月期间4个月的地下30 cm土壤含水量的总和呈显著负相关,因此,入冬前采用当地富有的食用菌基质废渣覆盖等措施可有效提高土壤的含水量和地温,从而显著提高平欧杂种榛的越冬能力。抗抽条能力还与枝条的结构有关,抗抽条的品种在生长季枝条的导水能力强,而在休眠季蒸发能力弱。薛俊宏^[19]研究表明,抗抽条品种(系)枝条的导管密度、导管总面积、导管/木质部、射线数及其横截面积、导管细胞平均长度及平均直径等显著高于不抗抽条品系,而抗抽条品种(系)枝条的皮孔宽度显著低于不抗抽条品系;抗抽条品种(系)的叶片厚度、叶脉突起度、栅海比、栅栏组织紧密度、叶柄厚度和维管束厚度均显著高于不抗抽条品系。因此,生长季枝条和叶柄输送水分性能强,越冬期间树体持续保持较高的含水量,枝条皮孔面积小,枝条导管密度大、导

管总面积大、射线数多,这些结构特征是抗抽条品种(系)的重要机制。枝条和叶片的这些结构表现,可作为抗抽条能力早期选择的一项指标。

3 榛部分基因克隆与表达分析

3.1 平榛抗寒基因克隆与表达分析

Chen等^[21]和陈新等^[22]从平榛花芽转录组文库中筛选得到2个CBF基因*CBF1*和*CBF2*,*CBF1*的最大表达量出现在寒冬时期,*CBF2*最大表达量出现在冷适应时期,推测二者分别主要参与平榛的抗冻和抗冷,共同调节完成平榛的越冬过程;*CBF1*和*CBF2*分别在4℃处理8、4 h时转录本累积量最大;空间表达结果表明,*CBF1*主要在雄花序中表达,*CBF2*主要在花芽中表达。陈新等^[23]通过RACE技术获得2个脱水素*DHN*基因的全长序列,*DHN1*属于K₂S类型,*DHN2*属于Y₄SK₂类型,4℃冷激处理后,*ChDHN2*基因呈逐渐上调表达的趋势,处理24 h时达到最大表达量,在雄花序和雌花芽部位的表达比树皮的高,研究表明,*DHN2*在烟草中异源表达提高了植物的抗寒性。

Zhao等^[16]从平榛花芽的转录组库中共筛选得到49条WRKY转录因子的Unigene序列,克隆得到14个WRKY转录因子,其中,13个为全长序列,有5个为WRKY分类中的第I类型,有8个基因为第II类型,*ChWRKY6*的结构最特殊,它属于WRKY家族类型中的第III类型,锌指结构为C₂-HC。以*ChActin*为内参,对平榛7个*ChWRKY*基因在自然越冬条件下花芽中的表达情况进行初步研究,结果表明:在自然条件下,*ChWRKY7*、*ChWRKY6*、*ChWRKY13*在11月表达量最高,*ChWRKY1*、*ChWRKY2*、*ChWRKY28*、*ChWRKY20*则在12月表达量最高;随后*ChWRKY1*、*ChWRKY2*、*ChWRKY28*、*ChWRKY7*表达量随季节的变化逐渐降低,但*ChWRKY20*、*ChWRKY6*、*ChWRKY13*在3月份的表达量略有升高。对平榛*ChWRKY*基因在人工4℃低温及盐、干旱处理下的表达情况进行分析,结果表明:*ChWRKY2*、*ChWRKY28*、*ChWRKY7*、*ChWRKY6*、*ChWRKY13*这5个基因均受4℃低温、盐及干旱的诱导而上升表达,其中,响应低温和干旱处理的时间较早,响应盐胁迫的时间相对较晚。另外,*ChWRKY1*受低温胁迫的诱导,*ChWRKY20*则受盐和干旱的诱导而高表达,受低温胁迫的诱导作用较小。平榛*ChMAPKKK*和*ChMAPKK*基因在干旱、盐及低温胁迫处理后的总体表达趋势与平榛WRKY在相同

处理下的趋势基本一致。WRKY28 的转基因拟南芥株系在 4℃ 处理 12 h 后萎蔫现象明显低于对照。WRKY28 是核定位蛋白,作为转录因子是在细胞核上起作用。

3.2 平欧杂种榛成花基因克隆与调控表达分析

孟晓庆^[24]利用 RACE 法,从平欧杂交榛雄花序中克隆了 *ChaLFY*、*ChaFT*、*ChaAPI*、*ChaSOCl* 的全长 cDNA 序列,在雄花生理分化期(4 月 22 日至 5 月 28 日),混合芽中 *ChaLFY* 的表达量呈上升趋势,*ChaFT*、*ChaSOCl* 和 *ChaAPI* 的表达量逐渐下降;在雄花形态分化期,雄花序中 *ChaLFY*、*ChaFT*、*ChaSOCl* 和 *ChaAPI* 的表达量均呈上升趋势。经比较发现,在平欧杂交榛雄花分化的整个时期内,*ChaSOCl* 基因的表达量最高,其次是 *ChaFT* 和 *ChaLFY*,*ChaAPI* 的表达量最低。*ChaLFY* 的组织表达特性分析表明,不同器官中都检测到了 *ChaLFY*,雄花序和雌花中的表达量较高,而其他营养器官中的表达量很低。外源激素处理可调控成花基因的表达,GA3(100 mg · L⁻¹)处理使雄花序数量显著增加,对雌花数量影响不显著,降低雌雄分化比例;多效唑(1 000 mg · L⁻¹)处理使雌花的数量显著增加,而对雄花序数量影响不显著,提高了雌雄比。实时荧光定量 PCR 结果表明,GA3 促进 *ChaLFY* 和 *ChaAPI* 基因表达,抑制 *ChaFT* 基因表达,对 *ChaSOCl* 基因表达影响不明显;PP333 抑制 *ChaLFY* 基因表达,促进 *ChaFT* 和 *ChaSOCl* 基因表达,对 *ChaAPI* 基因作用不明显。研究构建了 *ChaLFY* 基因的植物表达载体,通过农杆菌介导法转化至烟草叶片中,PCR 检测结果表明,已成功获得转 *ChaLFY* 基因烟草阳性植株,并且收获了转基因烟草种子。

4 榛属植物生殖生物学研究

4.1 榛属植物花粉萌发特性、柱头可授性和种(品种)间亲和性研究

无论是科研还是生产都涉及人工授粉和花粉的保存。翟学杰^[25]研究表明,华榛、欧洲榛‘卡姆’、平欧杂种榛‘辽榛 9 号’和‘平欧 127 号’等的花粉在室温放置 6 d 后萌发率不到 5.0%,而平榛花粉在第 6 天时仍有 13.65% 的萌发率,其保存效果明显好于其它的种。平欧杂种榛花粉在低温(4℃)、干燥(含水量 < 4%)条件存放 10 d 可保持活力,10 d 后活力快速下降^[3]。翟学杰^[25]比较了不同贮藏温度下榛花粉活力的保持情况,在 0 ~ 6℃ 条件下,花粉活力

可以保持 2 个月;-20℃ 条件下,花粉活力可以保持 5 ~ 6 个月;-80℃ 条件下,花粉活力可以保持 1 a 以上,采用液氮冷冻后于 -80℃ 条件下保存可作为榛子花粉长期保存的方式。杂交效果除了与亲和性有关外,花粉的活力和柱头的可授性也直接决定授粉的成败。花粉活力可通过培养基的萌发实验进行检测,段丽娟^[3]研究的固体培养基 10% 蔗糖 + 2% 琼脂培育的花粉萌发率较高;翟学杰等^[26]在培养基配方中添加了硼酸和钙,认为蔗糖、硼酸浓度对花粉萌发影响显著,提出平欧杂种榛花粉适宜的培养基为:蔗糖 150 g · L⁻¹ + 硼酸 100 mg · L⁻¹ + 氯化钙 100 mg · L⁻¹ + 琼脂 10 g · L⁻¹。

李宁等^[27]以过了休眠期的平榛、平欧杂种榛、欧洲榛花枝为试材,在不同湿度(20%、40%、60%)及不同温度(5、10、15℃)下进行水培,研究不同发育条件下花粉的萌发活力,结果表明,温度、湿度、榛种 3 个因素都与花粉活力有关,在 10℃ + 60% 湿度条件下,花粉活力平榛 > 杂种榛 > 欧洲榛。刘剑锋等^[28]报道,平榛与‘达维’经 4℃ 低温保存 50 d 的花粉在各自柱头上的萌发率分别为 47.2% 和 74.3%。自然授粉条件下,平榛与‘达维’在花后 4 d 柱头附着的花粉粒数量最多,分别为 40.6、84.6 粒,柱头长度均以花后第 5 天时最长,此后迅速枯萎变短。霍宏亮等^[29]以川榛为母本研究不同花期、花序形态、授粉方式及温湿度对柱头可授性和花粉管萌发的影响,结果表明,川榛的雌花在露红期已经具有一定的可授性,但花粉附着数较少,柱头上花粉的萌发率也较低;盛花期与末花期的花粉附着能力均较高,以盛花期的花粉萌发率最高;川榛雌花授粉后,在适宜的温湿度条件下花粉管 2 h 后开始萌发,24 h 后伸长到子房,与刘剑锋等的报道一致^[28]。在温室条件下,川榛、平榛、平欧杂种榛‘达维’花粉都在授粉后 12 h 萌发;田间条件下平榛和‘达维’花粉授粉 12 h 后开始萌发,而川榛 16 h 后才开始萌发,说明温湿度对花粉管萌发起始时间有重要影响,但不同榛子种(品种)间的花粉管萌发和生长速度差异不大。

远缘杂交能引入新的遗传资源,有利于杂种优势的利用,丰富物种的优质性状,是培育新品种的主要途径,但由于存在远缘杂交不亲和现象,使杂交成功率非常低^[30]。经典遗传学认为,榛属于孢子体自交不亲和和类型,其自交不亲和性受单一位点的 S 基因控制。近年来,胍胍质荧光反应已经广泛用于花粉和雌蕊相互作用的研究,Mehlenbacher 等^[31]成功

的运用该方法对欧榛的自交和杂交亲和性进行了鉴定。翟学杰等^[32]采用苯胺蓝荧光技术对平榛、毛榛、华榛、欧洲榛和平欧杂种榛等5种榛属植物种间杂交和自交亲和性进行鉴定,并对杂交和自交授粉后花粉与花柱之间的亲和程度和花粉管在花柱中的生长过程进行研究,研究结果认为,榛属植物各种之间杂交亲和性差异较大,平榛与其它几个种正反交亲和性都很好,而华榛×平欧杂种榛正反交都不亲和,其它各种之间杂交存在不同程度的种间单侧不亲和;华榛、欧洲榛、平欧杂种榛是自交不亲和;平欧杂种榛‘辽榛7号’做母本自交与各个种杂交的田间授粉试验结果与荧光检测结果相符,说明荧光技术检测亲和性的方法是可靠性。

4.2 榛属植物自交不亲和及其内参基因筛选

榛属植物种质资源具有自交不亲和性。从种间来看,平榛和川榛都存在同种不同居群的异株之间授粉亲和或单侧亲和的现象。平榛与其他几个种质无论是正交还是反交都表现出了很好的亲和性,滇榛与平榛、滇榛与川榛正交和反交双侧亲和,其余各种质之间单侧亲和或不亲和。平欧杂种榛品种(系)间,除‘82-15’存疑外,其余各品种(系)均为自交不亲和,其中,‘达维’、‘玉坠’、‘辽榛8号’、‘平欧15号’、‘平欧33号’、‘辽榛4号’、‘平欧545号’、‘辽榛3号’、‘平欧48号’、‘辽榛9号’等品种(系)作为母本时杂交亲和性较好;‘平欧48号’、‘平欧545号’、‘辽榛1号’、‘辽榛7号’、‘平欧21号’等品种(系)作父本时,杂交亲和性较好;‘平欧545号’、‘平欧33号’无论做母本还是做父本与其他品种(系)杂交都表现出了良好的亲和性^[33]。

近年来,对平欧杂种榛亲和或不亲和分子机理开展了研究,杨丹等^[34]利用平欧杂种榛不同亲和性授粉、授粉后不同时间的雌蕊转录组测序数据,结合相关文献搜索,共选取了12个候选内参基因;以平欧杂种榛主栽品种‘达维’的盛花期雌蕊、未伸长期雄花序、幼嫩叶片、花粉、1年生枝形成层、嫩茎、根尖、根蘖等8个不同组织器官为研究材料,通过反转录PCR初筛,实时荧光定量PCR检测表达量,并利用geNorm、NormFinder、BestKeeper、Delta Ct程序和RefFinder在线网站评价内参基因的稳定性;研究建立了平欧杂种榛实时荧光定量PCR内参基因的筛选体系:以反转录PCR初筛引物,荧光定量PCR分析引物特性及基因表达,4个程序单独评价引物稳定性,RefFinder综合分析选出最适稳定内参基因,

并选出榛属植物8个不同组织器官中最稳定的2个内参基因*ChaActin*和*Ch18S rRNA*。目前,这方面研究正在进行中。

4.3 榛属植物受精、胚及胚珠败育问题研究

空壳是导致榛子低产的一种常见现象,主要原因是子房和胚珠的败育。Liu等^[35]对榛子子房发育及受精过程做了详细的研究,榛子开花时,子房及胚珠还尚未形成;花后15~20 d,开始分化形成早期子房和胚珠原基;花后40~50 d,珠心分化形成珠被和成熟胚囊,此时花粉管停滞在柱头基部的花粉管腔中,停滞时间26 d左右;之后花粉管继续伸长生长并离开花粉管腔进入子房,最终只有1根花粉管从珠孔附近穿过;花后52~55 d时,花粉管穿过胚囊到达合点完成受精作用。因此,榛子存在延迟受精现象,且受精前阶段花粉管生长属于明显的间歇性生长模式,即从柱头生长到花粉管腔、从花粉管腔生长到子房内部的花柱基部、从子房内部的花柱基部生长至胚囊并完成受精作用。

榛子子房败育最初约于花后30 d发生,败育的子房直径小于2 mm,胚珠珠被部分分化,而且不能形成成熟胚囊。花后40 d左右,败育子房中的花粉管于花柱基部滞留,胚珠受精受阻。缺乏成熟胚囊和花粉管生长停滞是导致败育的主要原因,子房败育可能与营养供养不足有关,直接原因是未能完成受精^[36]。榛子子房仅在授粉后才开始发育,花粉管生长信号是激发子房发育分化的关键因素。Cheng等^[37]报道,DNA甲基化可能在榛子早期子房发育启动过程中起重要作用,当基因发生去甲基化或甲基化时,基因的表达水平出现了相应的增加或降低。特别重要的是,同一MSAP扩增片段在榛子子房的不同发育阶段出现频繁的甲基化和去甲基化变化,这些变化可能导致特定基因的活化或失活。因此,榛子基因组的表观遗传变化可能是授粉后胚珠与子房发育启动的一种重要机制。

Cheng等^[38]研究揭示了胚珠败育的生理和分子机理。在败育胚珠中,一些重要的限速酶在脱落酸、乙烯和茉莉酸生物合成途径中显著上调表达,包括9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶,ACC合成酶和磷脂酶A1。与发育的胚珠相比,在败育胚珠中的吲哚乙酸(IAA)、赤霉素(GA)、细胞分裂素(CTK)、水杨酸(SA)水平显著降低,而脱落酸(ABA)、乙烯(ETH)、茉莉酸(JA)水平明显偏高。败育胚珠中的一些重要基因在脱落酸、乙烯和茉莉酸生物合成及

信号转导过程中均显著上调表达,包括 ABA 反应元件结合因子(ABF)、ERF1/2 乙烯反应转录因子 1(ERF1/2)和茉莉酸 ZIM 结构域包含蛋白(JAZ)。通过 RNA 测序在榛子发育和败育胚珠之间找到了 1 209 个差异表达的基因,发现的激素信号转导(ko04075)和一些植物激素生物合成途径丰富了通路富集分析。一些关键基因在 ETH、JA 和 ABA 信号转导途径中显著上调表达,包括乙烯应答转录因子 1(ERF1/2)和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 CTR1 在乙烯信号途径、茉莉 ZIM 结构域蛋白质(JAZ)和转录因子依赖 JA 信号途径及 ABA 反应元件结合因子(ABF)在 JA 信号途径。吲哚乙酸的抑制剂、赤霉素、细胞分裂素、水杨酸的合成物和信号物以及脱落酸、乙烯和茉莉酸的生物合成物及其信号物,它们的激活对榛子内的败育胚珠的形成具有重大作用。相对于发育胚珠而言,脱落酸、乙烯和茉莉酸的信号传导,在败育胚珠中要更加活化。q-RT-PCR 反应显示,NCED、ABF、ACS、ERF1/2 和 MYC2 的表达水平与新的实时显示差异表达基因所获得的结果分析一致。IAA、GA、CTK、SA 生物合成和信号通路的抑制,ABA、ETH、JA 生物合成和信号通路的激活可能导致榛子胚珠的败育。

5 问题与展望

从发育学、生理学和分子生物学方面对榛树进行研究还处在起步阶段,目前的研究结果基本明确了雌、雄花序以及小孢子的分化和发育过程,也涉及到了通过植物生长调节剂调控雌、雄花序的分化比例,这对于通过加强营养等科学的栽培措施促进雌雄花序的形成具有理论指导意义,但是关于施肥种类、施肥时期等问题留待以后研究。榛属植物在发育方面存在雌雄异熟现象,在生理上雌雄花序的需冷量也不同,这种现象有点违背物竞天择的进化规律,今后需要从调控雌雄花序发育的基因表达差异方面进行深入研究。榛属植物具有孢子体自交不亲和特性,对于花粉保存、活力检测和柱头可授性等也有了比较细致的研究结果,尤其对于胚和子房的败育问题进行了较深入的研究,但存在的问题包括:在分子水平上揭示控制榛属植物自交不亲和和关键基因的作用机理、花粉在花粉管内生长到进入胚珠形成合子期间有一个较长的“停滞期”的原因、胚珠和子房的败育有哪些调控措施、子房内本来有 2 个胚珠但为什么只有 1 根花粉管从珠孔穿过到达合点完成

受精作用等等,这些问题都等待解答。榛树栽培生理目前仅涉及到光合、抽条、抗寒、抗盐碱等方面的初步研究,水分生理、营养生理等方面还鲜有报道。从栽培角度看,不同榛种、品种之间在光合、抗抽条、抗寒、抗盐碱等方面存在较明显的差异,与之相关的功能基因的解析以及通过分子辅助育种手段培育理想的新品种将是一项长期的、艰巨的任务。

参考文献:

- [1] 王文波. 榛子花期物候与开花结实促进技术研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2002.
- [2] 孙振良, 公建华, 张启昌, 等. 榛子、杂交欧榛、欧榛物候及生长节律的初步研究[J]. 吉林林学院学报, 1999, 15(1): 20-24.
- [3] 段丽娟. 杂交榛开花结实物候期及生理特性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2009.
- [4] 董文轩, 陈伟, 谭茵茵, 等. 平欧杂种榛雌花芽分化过程[J]. 果树学报, 2010, 27(5): 812-814.
- [5] 朱俊义, 张力凡, 沈鹏, 等. 榛属(桦木科)花序及花的形态发生[J]. 植物分类与资源学报, 2014, 36(4): 433-442.
- [6] 黄文江, 王宗清. 榛属花粉形成过程的细胞学观察[J]. 西南师范大学学报, 1989, 14(2): 69-72.
- [7] 陈伟, 董文轩, 周传生, 等. 平欧杂种榛小孢子形成过程的显微观察[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(11): 36-40.
- [8] 邢晓莹. 杂种榛减数分裂观察及雄花序数量的调控研究[D]. 太原: 山西农业大学, 2014.
- [9] 刘剑锋, 程云清, 刘强, 等. 平榛与平欧杂种榛叶片光合特性[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2012, 38(4): 413-420.
- [10] 李六林, 季兰. 杂种榛子不同方位叶片光合作用的日变化[J]. 林业科学, 2006, 42(12): 47-53.
- [11] 张丽. 平欧杂种榛抗盐碱生理机制研究及其耐盐性评价[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2015.
- [12] 宋锋惠, 俞涛, 史彦江, 等. 26 个平欧杂种榛品种(系)水分利用效率研究[J]. 新疆农业科学, 2015, 52(10): 1794-1800.
- [13] 张丽, 贾志国, 马庆华, 等. 盐碱胁迫对平欧杂种榛生长及叶片内源激素含量的影响[J]. 林业科学研究, 2015, 28(3): 394-401.
- [14] 张丽, 贾志国, 马庆华, 等. 盐碱胁迫对平欧杂种榛枝条电阻抗参数及离子含量的影响[J]. 应用生态学报, 2014, 25(11): 3131-3138.
- [15] 赵天田. 平榛 WRKY 转录因子的克隆与功能鉴定[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2012.
- [16] Zhao Tian-tian, Zhang Jin, Liang Li-song, et al. Expression and Functional Analysis of WRKY Transcription Factors in Chinese Wild Hazel, *Corylu shetophylla* Fisch[J]. Plos One, 2015, 10(8): 1-19.
- [17] 马庆华, 罗青红, 艾吉尔·阿不拉, 等. 平欧杂种榛主栽品种需冷量、需热量研究[J]. 林业科学研究, 2016, 29(3): 354-361.

- [18] 李春牛,董凤祥,王贵禧,等.平欧杂交榛抗抽条能力及抽条临界含水量研究[J].林业科学研究,2010,23(3):330-335.
- [19] 薛俊宏.平欧杂种榛优系抗抽条的生理机制[D].太谷:山西农业大学,2015.
- [20] 赵爽,苏淑钗,张兵,等.河北省平泉县平欧杂交榛越冬性研究[J].中南林业大学学报,2015,35(4):33-39.
- [21] Chen Xin, Zhang Jin, Liu Qing-zhong, et al. Transcriptome sequencing and identification of cold tolerance genes in hardy corylus species (*C. heterophylla* Fisch) Floral Buds[J]. Plos One, 2014, 9(9): e108604.
- [22] 陈新,王贵禧,梁丽松,等.平榛冷适应基因 *CBF* 的克隆及时空表达特性分析[J].林业科学,2012,48(1):167-172.
- [23] 陈新,梁丽松,马庆华,等.平榛脱水素基因的克隆与表达分析[J].园艺学报,2013,40(1):32-40.
- [24] 孟晓庆.榛子成花基因的克隆及其表达特性分析[D].北京:北京林业大学,2013.
- [25] 翟学杰.榛子花粉贮藏和亲和性研究[D].长沙:中南林业科技大学,2009.
- [26] 翟学杰,董凤祥,张日清,等.影响杂交榛花粉萌发和花粉管生长的培养基分研究[J].林业科学研究,2009,22(6):753-757.
- [27] 李宁,苏淑钗,靳利军,等.榛子花粉生长适宜温湿度研究[J].中国农学通报,2008,24(3):116-120.
- [28] 刘剑锋,颜瑩,程云清,等.榛子花粉生活力和柱头可授性与结实特征研究[J].北京林业大学学报,2012,34(3):58-63.
- [29] 霍宏亮,张日清,马庆华,等.川榛柱头可授性及花粉管生长特性的研究[J].林业科学研究,2014,27(3):403-409.
- [30] 孟金陵.植物生殖遗传学[M].北京:科学出版社,1995:300-350.
- [31] Mehlenbacher S A, Thompson M M. Dominance relationships among S-alleles in *Corylus avellana* L. [J]. Theoretical & Applied Genetics, 1988,76(5):669-672.
- [32] 翟学杰,董凤祥,张日清,等.5种榛属植物的亲和性分析[J].中南林业科技大学学报,2009,29(4):26-30.
- [33] 霍宏亮.中国榛属植物分布及杂交亲和性研究[D].长沙:中南林业科技大学,2014.
- [34] 杨丹,李清,王贵禧,等.平欧杂种榛实时荧光定量PCR内参基因的筛选与体系建立[J].中国农业科学,2017,50(12):2399-2410.
- [35] Liu Jian-feng, Zhang Hui-di, Cheng Yun-qing, et al. Pistillate flower development and pollen-tube growth mode during the delayed fertilization stage in *Corylus heterophylla* Fisch[J]. Plant Reproduction, 2014, 27(3): 145-152.
- [36] Liu Jian-feng, Zhang Hui-di, Cheng Yun-qing, et al. Comparison of ultrastructure, pollen tube growth pattern and starch content in developing and abortive ovaries during the progamic phase in hazel [J]. Front Plant Sci, 2014, 5(5): 528.
- [37] Cheng Yun-qing, Wang Ju, Liu Jian-feng, et al. Analysis of ovary DNA methylation during delayed fertilization in hazel using the methylation-sensitive amplification polymorphism technique [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2015, 37(11): 231.
- [38] Cheng Yun-qing, Zhao Yi-xin, Liu Jian-feng, et al. Comparison of phytohormone biosynthesis and signal transduction pathways in developing and abortive hazelnut ovules [J]. Plant Growth Regulation, 2017, 81(1): 147-157.

(责任编辑:徐玉秀)