

低温对日光温室砂糖橘成花诱导及生理反应的影响*

付崇毅¹ 刘杰才¹ 崔世茂^{1**} 包妍妍¹ 任杰¹ 郝春燕²

(1. 内蒙古农业大学农学院 呼和浩特 010019; 2. 上海市宝山区蔬菜科学技术推广站 上海 200443)

摘 要 为探索日光温室柑橘花芽进行形态分化的适宜升温时期,以4年生枳砧砂糖橘幼树为试验材料,采用离体培养方法,研究日光温室砂糖橘对低温诱导的成花响应。结果表明:15℃/10℃(昼12h/夜12h)低温处理720h,便能诱导砂糖橘离体茎段腋芽成花,处理960h后砂糖橘离体茎段腋芽成花率呈下降趋势,而萌芽率急剧上升,成花率与萌芽率呈负相关。日光温室砂糖橘秋梢11月初开始形成花芽,整个冬季秋梢成花率呈升高趋势,平均成花率表现为2月>1月>12月。5~20℃低温累计小时数达到1309h后,成花率趋于稳定,达到40.51%。有叶花/无叶花比值与<5℃低温累计小时数呈极显著负相关。砂糖橘成花率与枝条C/N呈正相关,与脯氨酸含量呈极显著正相关。砂糖橘枝条C/N和脯氨酸含量的变化对低温诱导砂糖橘成花表现出一种积极响应。因此,在确定花芽萌发生长升温时间时,枝条C/N和脯氨酸含量变化可以作为判定指标。

关键词 低温 砂糖橘 成花诱导 离体培养 日光温室

中图分类号: S666.2; S628 文献标识码: A 文章编号: 1671-3990(2013)05-0572-08

Flower induction and physiological response of *Citrus reticulata* “Shatangju” to low temperature under solar greenhouse condition

FU Chong-Yi¹, LIU Jie-Cai¹, CUI Shi-Mao¹, BAO Yan-Yan¹, REN Jie¹, HAO Chun-Yan²

(1. College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, China; 2. Baoshan District Vegetable Science and Technology Promotion Station of Shanghai City, Shanghai 200443, China)

Abstract Open-field cultivation has been the main mode of citrus cultivation in China, with major blooming peak in spring and citrus fruits only shipped to markets in October through December. Under protected cultivation, it was possible to force the flowering stage of citrus to an advanced date via temperature control for earlier shipments of fruits to markets. In north China, early autumn low temperatures in solar greenhouses have been used to induce early citrus flower bud differentiation. Induction of flowers by the warming effect with plastic film covers forced sprouting. While the role of the low temperature in flowering has been well documented, flower bud differentiation competence during winter under greenhouse conditions has remained unconfirmed. To determine suitable heating time for citrus flower bud morphological differentiation in solar greenhouse, 4-year-old of “Shatangju” tangerine (*Citrus reticulata* “Shatangju”) seedlings with stock of trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.) were selected. The response of the “Shatangju” tangerine flower to low temperature in solar greenhouse was studied in an *in vitro* culture. The results showed that some axillary buds differentiated into flower buds after treated with low temperature (15℃ at day for 12 h, 10℃ at night for 12 h) for 720 hours. Floral ratio apparently decreased while germination ratio sharply increased after 960 hours under low temperature. Floral ratio was negatively correlated with germination ratio. Under solar greenhouse conditions, autumn shoots of “Shatangju” tangerine were ripe enough to form flower buds in early November. Floral ratio apparently increased during the whole of winter, which showed order of average floral ratio: February > January > December. When accumulated time of low temperature 5~20℃ reached 1309 hours, floral ratio stabilized at 40.51%. A significantly negative correlation was noted between leafy to leafless flower ratio and accumulated hours of <5℃. Under low temperature treatment, C/N ratio was positively correlated with floral ratio while proline content showed a highly significant positive correlation with floral ratio. The response of the change in C/N ratio and proline content of “Shatangju” tangerine was positive to flower induction. In conclusion, change in C/N ratio and shoot proline content were good indicators for heat treatment of citrus to force flower bud germination.

* 教育部博士点基金项目(20101515110005)资助

** 通讯作者: 崔世茂(1961—), 男, 博士, 教授, 主要从事园艺作物抗逆生理和园艺设施及环境调控研究。E-mail: cuishimao@sina.com
付崇毅(1986—), 男, 博士研究生, 主要从事设施园艺及抗逆生理研究。E-mail: fuchongyi@126.com

收稿日期: 2012-11-16 接受日期: 2013-01-05

Key words Low temperature, *Citrus reticulata* “Shatangju”, Flower induction, *In vitro* culture, Solar greenhouse

(Received Nov. 16, 2012; accepted Jan. 5, 2013)

设施栽培不仅能提早或延迟柑橘(*Citrus reticulata* Blanco)果实成熟,通过灌水量和温度的调控还可解决柑橘露地栽培成熟期过于集中的问题,实现柑橘鲜果周年供应^[1-2]。我国柑橘设施栽培发展较晚,现阶段主要以简易覆盖栽培为主,果实成熟期仅能提前40 d左右。北方日光温室栽培柑橘可通过秋末冬初的低温诱导,实现柑橘冬季开花、春季挂果、夏季成熟。但冬季升温时间过早,低温累计小时数不足会影响花芽形成。因此,研究柑橘成花诱导阶段所需的低温累计小时数,对确定冬季温室栽培柑橘的升温时期,调控柑橘果实成熟期具有重要意义。

一般认为,在热带地区,旱季水分胁迫是诱导柑橘成花的因子^[3]。在亚热带和温带地区,秋季和冬季低温是导致柑橘成花诱导的主要因素^[4-5]。Southwick等^[6]和García-Luís等^[7]证实,从11月初开始,宽皮柑橘的芽在离体培养条件下能被诱导开花,11月之前,离体培养的芽只能形成营养枝。在夏季和秋季初,对宽皮柑橘离体培养的芽进行低温诱导刺激后观察,没有形成花^[8]。研究表明,低温处理持续时间与成花之间表现出一种定量关系,低温处理持续时间越长,成花数越多^[3,6,9]。Inoue等^[10-12]研究证实,15℃处理1.5个月和20℃处理2.5个月后,一年生盆栽温州蜜柑开花,但25℃处理时不能诱导成花。成花诱导期间,*CiFT*基因表现出一种季节性增长,15℃处理会诱导*CiFT*基因的表达,而25℃处理2.5个月后*CiFT*基因在mRNA水平上没有明显变化^[11]。Pillitteri等^[13]研究表明,15℃低温处理2个月,能诱导甜橙的*CsLFY*(mRNA)表达。相关研究报道^[9],低温处理不仅能打破盆栽柑橘芽休眠,还能促进芽的萌发和成花,而离体培养的芽休眠程度浅,低温诱导离体芽成花的效果更显著。García-Luís等^[9]研究证实,(15±1)℃/(10±1)℃(昼/夜)温度处理能诱导温州蜜柑离体芽开花。Tisserat等^[14]研究尤里卡柠檬离体培养条件下,14~20℃温度处理16周后成花率为5%~20%,处理20周后成花率为0~40%。在离体培养条件下,经过诱导处理的离体芽在适宜高温(26℃/25℃)处理下能形成可见花芽^[15]。Davenport^[4]认为25℃/20℃(昼/夜)处理温度是非诱导温度。Nebauer等^[16]也证实,25℃/20℃(昼/夜)处理4个月也不能诱导青柠成花。目前,国内外研究多数集中在不同低温对柑橘成花诱导的影响方面,

取得了一定研究进展。关于日光温室栽培条件下低温累计小时数与柑橘成花关系以及适宜升温及加温时期的研究鲜有报道。本研究以枳砧砂糖橘幼树为试验材料,采用离体培养的方法,通过对不同低温处理时间下砂糖橘离体茎段腋芽成花效应,以及对日光温室条件下秋冬季砂糖橘秋梢成花能力的研究,探索日光温室柑橘通过成花诱导阶段后,花芽进行形态分化的适宜升温及加温时期,为日光温室柑橘花期调控提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验地点及试验材料

供试柑橘品种为4年生枳(*Poncirus trifoliata* Raf.)砧砂糖橘(*Citrus reticulata* “Shatangju”),于2009年2月从湖南省园艺研究所购得,购买时为1年生枳砧苗,当月定植在内蒙古农业大学教学科研基地日光温室中。试验于2011年10月—2012年3月在内蒙古农业大学教学科研基地及内蒙古自治区野生特有蔬菜种质资源与种质创新重点实验室内进行。

用于栽培砂糖橘的日光温室墙体为砖墙夹聚苯板保温墙,跨度7.5 m,高3.5 m,墙体厚度为0.6 m。冬季采用棉帘覆盖保温。10月以前放风口全天敞开,10—11月期间白天放风,晚上密闭放风口,整个冬季不放风。此外,阴天及雨雪天气不放风。采用浙江大学电器设备厂生产的ZDR-20智能数据记录仪测定试验期间露地及日光温室的气温,用于1.2.2节试验中不同时期低温累计小时数的统计。

1.2 试验处理与取样方法

试验 I: 不同低温处理时间下砂糖橘离体茎段腋芽的成花效应

在秋梢完全停止生长(9月23日)后,于2011年10月15日从日光温室取砂糖橘当年生半木质化秋梢置于冰盒中带回实验室。一部分秋梢枝条采用105℃杀酶15 min,再降至80℃恒温烘干粉碎后用于生理指标测定。另一部分秋梢去叶消毒后采用组培方法进行低温处理。消毒的方法为:将枝条放入500 mL量筒中,首先加入70%乙醇浸泡30 s,然后用0.1% HgCl₂浸泡8 min,最后用无菌水冲洗5次。

低温处理方法:消毒后的枝条切成1 cm左右并含1~2个芽的茎段,然后接种在MS+6-BA(1.0 mg·L⁻¹)培养基上,每个三角瓶(150 mL)接种8个茎

段,共接种 60 瓶。接种后在 PGX-250 光照培养箱中培养,温度设置为 $(15\pm 1)^\circ\text{C}/(10\pm 1)^\circ\text{C}$ (昼 12 h/夜 12 h),光照强度约 2 000 lx。在处理第 240 h、480 h、720 h、960 h、1 200 h、1 440 h 分别每次取出 10 瓶茎段,其中 4 瓶茎段用蒸馏水冲洗干净烘干粉碎后用于生理指标的测定,剩余 6 瓶统计茎段萌芽数后移入光照培养箱中培养促使其萌芽。此时光照培养箱温度设置为 $(25\pm 1)^\circ\text{C}/(20\pm 1)^\circ\text{C}$ (昼 16 h/夜 8 h),光照强度约 2 000 lx。培养过程中每 15 d 更换 1 次培养基,并剔除受污染的茎段。20~25 d 后统计成花情况,包括总芽数、有叶花和无叶花数,计算萌芽率和成花率。

试验 II:日光温室条件下秋冬季砂糖橘成花能力研究

从 2011 年 10 月 10 日开始,至翌年枝条萌芽时(3 月 8 日),每隔 10 d 从日光温室取砂糖橘当年生半木质化秋梢置于冰盒中带回实验室。其中一部分秋梢的枝条和叶片分开烘干后用于生理指标的测定。另一部分秋梢按试验 I 中的方法消毒接种,每次接种 10 瓶,然后在 PGX-250 光照培养箱中培养促使其萌芽,温度设置为 $(25\pm 1)^\circ\text{C}/(20\pm 1)^\circ\text{C}$ (昼 16 h/夜 8 h),光照强度约 2 000 Lux。20~25 d 后统计成花情况,包括总芽数、有叶花和无叶花数,计算成花率以及有叶花与无叶花的比值。

1.3 测定项目与方法

试验中萌芽率和成花率按以下公式计算:

$$\text{萌芽率} = (\text{萌芽数} / \text{总芽数}) \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{成花率} = \frac{\sum(\text{每瓶花芽数} / \text{每瓶总芽数})}{\text{重复数}} \times 100\% \quad (2)$$

有叶花和无叶花的比值按以下公式计算:

$$\text{有叶花} / \text{无叶花} = \text{有叶花总数} / \text{无叶花总数} \quad (3)$$

硝态氮含量参照李合生^[17]的方法测定;有机氮含量采用凯氏法^[18]测定,浓 $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ 联合消煮后,用全自动凯氏定氮仪直接蒸馏、滴定,有机氮和硝

态氮含量之和为全氮含量;全碳含量采用重铬酸钾-硫酸氧化法^[19]测定;游离脯氨酸含量采用酸性茚三酮比色法^[20]测定。

1.4 数据处理

采用 Excel 2003 进行数据处理和绘图,采用 SAS 9.0、SPSS 17.0 进行方差分析、相关分析和回归分析。

2 结果与分析

2.1 低温处理时间对砂糖橘离体茎段腋芽成花效应的影响

2.1.1 不同低温处理时间下砂糖橘离体茎段腋芽的成花情况

由表 1 可知,15 $^\circ\text{C}/10^\circ\text{C}$ 处理 720 h 后,砂糖橘秋梢离体茎段腋芽便能形成花芽,成花率为 8.89%。处理 960 h 后,离体茎段腋芽成花率最大,达到 12.45%。离体茎段腋芽经低温诱导形成的花芽均为有叶花。处理 720 h 后,在转入 25 $^\circ\text{C}/20^\circ\text{C}$ 适温培养前部分离体茎段腋芽已萌芽。15 $^\circ\text{C}/10^\circ\text{C}$ 处理达到 1 200 h 后,萌芽率明显升高,而成花率表现出下降趋势。

2.1.2 不同低温处理时间下砂糖橘枝条脯氨酸及碳、氮含量变化

由表 2 可知,随低温处理时间的延长,砂糖橘枝条全碳含量先升高后降低。低温处理 720 h 后枝条全碳含量达到最高,处理 960 h 后全碳含量开始显著下降($P<0.05$),而此时萌芽率恰好大幅上升,说明茎段萌发的新芽生长对碳素消耗增多而导致了全碳含量降低。枝条全氮含量呈先下降后上升的趋势,枝条全氮含量在低温处理 720 h 后开始升高,但升高幅度不大。处理 1 200 h 后,成花率开始下降时,全氮含量才出现明显升高($P<0.05$)。这说明低温诱导砂糖橘成花过程中对氮素消耗较多,后期成花率降低,对氮素消耗减少,茎段全氮含量相应升高。低

表 1 低温处理对砂糖橘离体茎段腋芽成花的影响

Table 1 Effect of low temperature treatment on flower formation of axillary buds of "Shatangju" tangerine *in vitro*

低温处理时间 Treatment time of low temperature (h)	总芽数 Total number of buds	适温培养前 Before culture under the optimal temperature		有叶花数 Number of leafy flower	花芽总数 Total number of flower buds	成花率 Floral ratio (%)
		萌芽数 Number of germination	萌芽率 Germination ratio (%)			
240	43	0	0	0	0	0b
480	49	0	0	0	0	0b
720	34	2	5.88	3	3	8.89ab
960	49	9	18.37	5	5	12.45a
1 200	44	18	40.91	3	3	7.80ab
1 440	33	23	69.70	1	1	2.38ab

同列中不同小写字母表示处理间差异达 0.05 显著水平,下同。Different small letters in the same column show significant difference among treatments ($P<0.05$). The same below.

表 2 不同低温处理时间下砂糖橘枝条脯氨酸及碳、氮含量的变化

Table 2 Changes of the content of free proline, total C and N in buds of “Shatangju” tangerine *in vitro* under low temperature treatment

低温处理时间 Treatment time of low temperature (h)	全碳 Total C (g·kg ⁻¹)	全氮 Total N (g·kg ⁻¹)	C/N	脯氨酸 Free proline (mg·g ⁻¹)
0	326.67f	39.57b	8.26f	0.41d
240	374.51c	34.86d	10.74d	0.53c
480	376.51b	23.92f	15.74a	0.52c
720	434.18a	28.15e	15.42b	0.62a
960	359.62d	28.30e	12.71c	0.60b
1 200	341.65e	36.74c	9.30e	0.60ab
1 440	300.96g	40.38a	7.45g	0.51c

温处理过程中随着全碳和全氮含量的变化, C/N 值呈先升后降趋势。枝条脯氨酸含量呈先升后降趋势, 处理 720 h 达到最高, 处理 1 440 h 后, 成花率急剧下降时, 脯氨酸含量开始下降。这说明脯氨酸与砂糖橘成花之间存在密切关系, 可能在花器官形成过程中起到了一定作用^[21-22]。

2.1.3 低温累计小时数与砂糖橘成花率、萌芽率间的回归分析以及各指标间的偏相关分析

由图 1 可知, 15 ℃/10 ℃低温处理时间与萌芽率之间表现为非线性回归关系, 相关性极显著且符合 Logistic 曲线模型, R^2 达到了 0.999。15 ℃/10 ℃处理达到 1 047 h 时, 对应的成花率拟合曲线值最大为 11.25%, 此时萌芽率为 25.5%。随处理时间的延长, 成花率呈降低趋势, 而萌芽率急剧上升。

通过偏相关分析可知(如表 3), 砂糖橘离体茎段腋芽的成花率与萌芽率、全氮含量呈负相关, 与脯氨酸、全碳含量及 C/N 呈正相关, 其中与脯氨酸含量的相关性显著。萌芽率与全氮含量呈显著正相关, 与脯氨酸含量、全碳含量及 C/N 呈显著负相关。全碳含量与 C/N 呈显著正相关, 全氮含量与 C/N 呈极显著负相关。因此, 砂糖橘枝条脯氨酸、全碳含量及 C/N 高对成花有利。

表 3 砂糖橘成花率、萌芽率与脯氨酸及碳、氮含量的偏相关分析

Table 3 Analysis of partial correlation between floral ratio, germination ratio and contents of proline, total C and N of “Shatangju” tangerine

	成花率 Floral ratio	萌芽率 Germination ratio	脯氨酸 Free proline	全碳 Total C	全氮 Total N
萌芽率 Germination ratio	-0.721				
脯氨酸 Free proline	0.872*	-0.817*			
全碳 Total C	0.559	-0.858*	0.799		
全氮 Total N	-0.437	0.907*	-0.507	-0.739	
C/N	0.437	-0.910*	0.577	0.857*	-0.972**

*和**分别表示在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平显著相关, 下同。* and ** indicate the significant correlation at 0.05 and 0.01 levels. The same below.

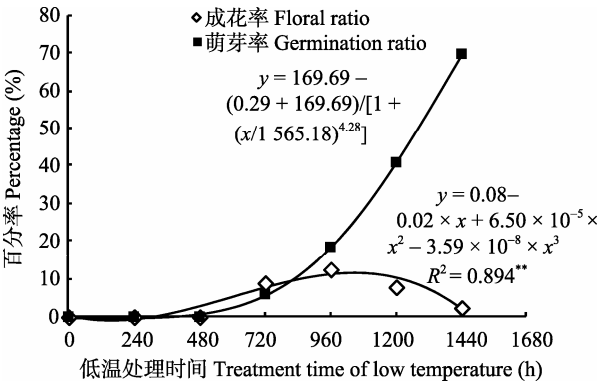


图 1 低温累计小时数与砂糖橘成花率、萌芽率间的回归分析

Fig. 1 Regression analysis between the accumulation hours of low temperature and floral ratio, germination ratio of “Shatangju” tangerine

2.2 日光温室条件下秋冬季砂糖橘成花能力研究

2.2.1 试验期间露地和日光温室的气温变化

由图 2 可知, 9—10 月期间露地日平均气温能维持在 5~15 ℃之间, 进入 11 月后气温急剧下降。10 月温室日平均气温稳定在 15 ℃左右, 11 月初开始下降, 温室日平均气温稳定在 5~10 ℃之间。12 月一次年 2 月是温室气温最低的时期, 日平均气温多维持在 5 ℃左右, 遇到极端寒流天气时日平均温度最低降到-1.72 ℃。2 月底露地和温室气温均开始回升。

2.2.2 低温积累量与砂糖橘成花的关系

如表 4 所示, 露地 9—10 月 5~20 ℃范围内的低温累计小时数达到 1 141 h, 低于 5 ℃的低温累计小时数仅有 49 h。

相关研究^[4,6-7,9-14,23-25]认为, 5~20 ℃的低温均能诱导柑橘成花。由表 5 可知, 11 月 19 日时, 砂糖橘秋梢芽便能形成花芽, 但成花率较低仅为 1.43%, 表明已有少量芽完成了花芽生理分化阶段, 此时 5~20 ℃的低温累计小时数为 790 h。整个冬季砂糖橘秋梢成花率呈升高趋势, 平均成花率表现为 2 月>1 月>12 月, 无叶花数明显增多, 而有叶花/无叶花比值开始降低。2 月开始升温后, 有叶花/无叶花比值降低趋势减缓。

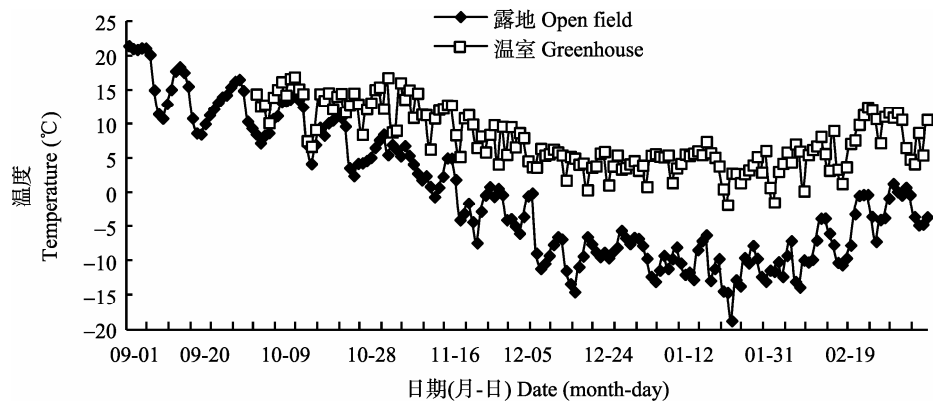


图 2 9 月 1 日—3 月 8 日光温室及露地的日平均温度变化
Fig. 2 Change of daily mean temperature in greenhouse and open field from Sep.1 to Mar. 8

表 4 露地 9—10 月不同温度范围内累计小时数
Table 4 Accumulated hours of different temperature ranges from Sep. to Oct. in open field h

日期(月-日) Date (month-day)	温度范围 Temperature range		
	<5 ℃	5~20 ℃	>20 ℃
09-01—09-30	30	578	118
10-01—10-31	19	563	17
合计 Total	49	1 141	135

表 5 冬季不同时期日光温室砂糖橘秋梢的成花能力
Table 5 Ability of flower formation of autumn shoots of “Shatangju” tangerine in solar greenhouse under different periods in winter

日期(年-月-日) Date (year-month-day)	累计小时数 Accumulated hours (h)			总芽数 Total bud number	花芽数 Number of flower bud	成花率 Floral ratio (%)	有叶花数 Number of leafy flower	无叶花数 Number of leafless flower	有叶花/无叶花 Leafy flower/ leafless flower
	<5 ℃	5~20 ℃	>20 ℃						
2011-10-10	53	218	134	89	0	0.00e	0	0	—
2011-10-20	95	370	183	85	0	0.00e	0	0	—
2011-10-30	143	508	237	86	0	0.00e	0	0	—
2011-11-09	159	693	276	85	0	0.00e	0	0	—
2011-11-19	256	790	322	93	1	1.43e	1	0	—
2011-11-29	355	904	349	86	5	6.61e	4	1	4.00
2011-12-09	514	957	376	91	18	19.75d	14	4	3.50
2011-12-19	681	1 004	402	93	16	16.76d	12	4	3.00
2011-12-29	848	1 055	424	92	15	16.82d	12	3	4.00
2012-01-08	1 016	1 103	448	93	26	29.41c	18	8	2.25
2012-01-18	1 170	1 154	483	98	36	36.86abc	26	10	2.60
2012-01-28	1 350	1 198	499	88	28	32.76bc	19	9	2.11
2012-02-07	1 515	1 246	526	96	41	42.95a	26	15	1.73
2012-02-17	1 665	1 309	553	92	37	40.69ab	23	14	1.64
2012-02-27	1 748	1 417	602	94	36	38.14abc	23	13	1.77
2012-03-08	1 846	1 529	632	91	40	43.97a	25	15	1.67

2.2.3 日光温室条件下秋冬季节砂糖橘枝梢的脯氨酸及碳、氮含量变化

由表 6 可知,在秋梢停止生长至翌年枝条萌芽期间,枝条和叶片全碳含量波动比较大。随着温室气温的降低,枝条全氮含量先降低,12 月 9 日后开始逐渐升高。叶片全氮含量开始时逐渐升高,12 月 19 日出现急剧下降,此时温室气温进入最低时期(日平

均温度多数在 5 ℃以下),在枝条萌芽前 1 个月随着温室气温的回升又逐渐升高,这说明冬季气温低时砂糖橘对氮素的吸收会减弱,而冬季柑橘吸收的氮素主要贮存在根中,春季气温回升时,根向叶片输送的氮素才开始增多^[26]。砂糖橘秋梢停止生长进入生理分化期后,枝条 C/N 值逐渐上升。在 12 月 19 日,受低温影响,枝条 C/N 值出现第 1 次降低,但仍

表 6 冬季不同时期日光温室砂糖橘秋梢脯氨酸及碳氮含量变化
Table 6 Changes of free proline, total C and N contents of autumn shoots of “Shatangju” tangerine in solar greenhouse in different periods of winter

日期(年-月-日) Date (year-month-day)	枝条 Shoot				叶片 Leaf			
	全碳 Total C (g·kg ⁻¹)	全氮 Total N (g·kg ⁻¹)	C/N	脯氨酸 Free proline (mg·g ⁻¹)	全碳 Total C (g·kg ⁻¹)	全氮 Total N (g·kg ⁻¹)	C/N	脯氨酸 Free praline (mg·g ⁻¹)
2011-10-10	326.00d	32.56k	10.01i	0.49h	368.10k	39.40h	9.34j	0.79i
2011-10-20	342.15g	30.64j	11.17g	0.53g	423.45a	38.96i	10.87d	0.75j
2011-10-30	360.45e	31.67g	11.38ef	0.57f	408.61d	40.19g	10.17f	0.70m
2011-11-09	376.91f	31.05a	12.14d	0.63c	395.10fg	43.33c	9.12k	0.71l
2011-11-19	368.38i	27.79c	13.25b	0.65b	417.35b	42.10e	9.91h	0.68n
2011-11-29	355.80j	27.35h	13.01c	0.62c	353.58l	42.91d	8.24m	0.73k
2011-12-09	341.74l	25.24j	13.54a	0.67a	393.56h	47.98a	8.20m	0.78i
2011-12-19	360.45k	26.41g	13.65a	0.65b	395.40f	45.65b	8.66l	1.21c
2011-12-29	361.93d	32.31f	11.20fg	0.63c	397.76e	36.50k	10.90d	1.11e
2012-01-08	367.15c	34.47d	10.65h	0.61d	368.48k	36.58k	10.07g	1.10e
2012-01-18	345.05g	30.39i	11.36ef	0.67a	396.20f	31.84m	12.44b	1.23b
2012-01-28	344.45g	30.52i	11.29fg	0.67a	385.51j	33.03l	11.67c	1.28a
2012-02-07	365.96h	29.78e	12.29d	0.65b	414.46c	30.79n	13.46a	1.12d
2012-02-17	371.56d	32.25b	11.52e	0.65b	398.23e	38.52j	10.34e	1.09f
2012-02-27	356.31b	35.16h	10.13i	0.61d	394.23i	41.55f	9.49i	1.00g
2012-03-08	322.73a	39.05l	8.26j	0.59e	386.83gh	41.23f	9.38j	0.90h

维持在 10 以上。2 月 17 日后, 枝条 C/N 值出现第 2 次降低, 且随温室温度的上升逐渐下降。12 月 19 日后, 叶片全氮含量的降低导致了叶片 C/N 值急剧上升。枝条脯氨酸含量在枝条停止生长后, 随着温室气温的降低而逐渐升高, 11 月 19 日开始形成花芽后不再升高, 且维持在较高含量水平。叶片脯氨酸含量在 12 月前波动不大, 12 月 19 日急剧上升, 此时温室气温开始进入最低温时期, 但枝条脯氨酸含量并没有因气温降低而积累, 反而出现小幅下降。从脯氨酸含量的积累时间上来看, 叶片晚于枝条。

2.2.4 低温与成花率间的回归分析

由图 3 可知, 5~20 ℃低温累计小时数与砂糖橘成花率之间表现为非线性回归关系, 符合 Logistic 曲线模型, 相关性极显著且 R^2 达 0.977。5~20 ℃低温累计小时数达到 904 h 时, 砂糖橘成花率开始明显升高, 1 309 h 后, 对应的成花率拟合曲线趋于稳定, 达到 40.51%。

在分析低温对有叶花/无叶花比值的影响时, 简单的相关系数并不能客观地反映不同范围内温度累计小时数与有叶花/无叶花比值之间的实际关系。因此, 需要进行多元逐步回归分析, 找出作用最显著的温度段低温。将有叶花/无叶花(y)与<5 ℃累计小时数(X_1)、5~20 ℃累计小时数(X_2)、>20 ℃累计小时数(X_3)进行多元线性逐步回归分析, 得到线性回归方程: $y=4.91-0.001\ 9\times X_1$, $R^2=0.814^{**}$ 。有叶花/无叶花比值与<5 ℃累计小时数呈极显著负相关, 说明<5 ℃

的低温积累对砂糖橘成花不利, 累计小时数越大, 有叶花/无叶花比值就越小。

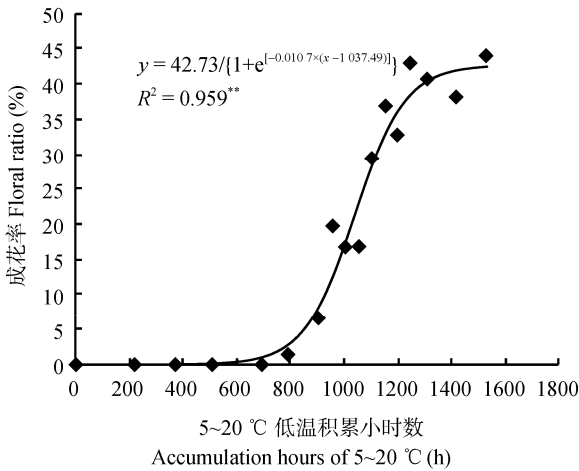


图 3 低温与砂糖橘成花率间的回归关系
Fig. 3 Regression analysis between low temperature and floral ratio of “Shatangju” tangerine

3 讨论与结论

对日光温室栽培的柑橘而言, 采用低温诱导柑橘完成花芽分化后扣膜升温及加温来促使柑橘提早开花, 从而使果实成熟期提前, 其关键是确定柑橘完成花芽分化所需的低温累计小时数。试验 I 结果显示, 15 ℃/10 ℃低温确能诱导砂糖橘离体茎段腋芽成花, 同时也促进了离体茎段腋芽的萌发, 这可能是因为低温诱导柑橘成花的同时也起到了促进枝

条形成的作用^[5,23,27]。在处理后期, 萌芽率急剧上升, 而成花率呈降低趋势, 萌芽率与成花率间呈负相关, 这说明 15 °C/10 °C 下处理时间过长使得芽转向营养生长形成枝条, 不利于花芽分化。有关不同低温对柑橘成花率和萌芽率的影响正在进一步研究中。试验 II 结果显示, 冬季日光温室条件下, 随着低温的不断积累, 砂糖橘秋梢的成花率逐渐升高, 但有叶花/无叶花比值逐渐降低。进一步通过多元线性逐步回归分析, 有叶花/无叶花比值与 <5 °C 累计小时数呈极显著负相关, 这说明有叶花/无叶花比值的下降主要是由于 <5 °C 的低温大量积累造成的, 这与 García-Luís 等^[9]研究报道 <5 °C 温度处理柑橘枝条不会诱导其成花的结果一致。温室条件下, 2 月 17 日 5~20 °C 低温累计小时数达到 1 309 h, 砂糖橘成花率趋于稳定, 达到 40.51%, 但 <5 °C 累计小时数较高, 对有叶花/无叶花比值影响较大。由试验结果可知(表 5), 从 12 月初开始适度加温并对温室温度进行调控, 11 月 29 日—1 月 18 日期间可减少 <5 °C 低温累计小时数 815 h, 5~20 °C 低温累计小时数可达到 1 308 h, 使温室砂糖橘成花率提前 1 个月趋于稳定。

本试验结果表明, 当地露地日平均气温从 9 月开始低于 20 °C, 至 10 月底前日平均气温能维持在 5 °C 以上。9—10 月间 5~20 °C 范围内的低温累计小时数可以达到 1 141 h, 由 Logistic 模型可以计算出对应的成花率为 32.12%。此外, 9—10 月露地 <5 °C 的低温累计小时数仅有 49 h, 对有叶花/无叶花比值的影响较小。因此, 北方日光温室柑橘生产上, 在 9 月可以采取不覆盖棚膜的方式, 利用自然低温对柑橘进行成花诱导。10 月初覆盖棚膜, 10—11 月间采取放风降温的方式进一步诱导柑橘成花。11 月覆盖棉帘后逐渐升温, 进入 12 月后应进行加温, 保证温室最低温度 >5 °C, 促使经过成花诱导的芽迅速通过成花启动时期(形态分化时期)发育为可见花芽, 从而可以实现温室柑橘冬季开花, 果实夏季成熟上市的目标。

成花过程是植物生长发育过程中的重要转折时期, 有关成花机理的研究报道很多, 并形成了多种成花诱导假说。传统的碳氮营养学说虽然不能很好地解释植物成花诱导的本质, 但是碳水化合物和含氮化合物是植物开花过程所需的重要营养和能量来源。一般认为碳水化合物(淀粉)不直接影响花芽分化, 而是作为代谢产物合成的底物单独或通过植物激素调控引发柑橘花芽分化^[24]。试验 I 结果显示, 全碳含量与成花率呈正相关, 与萌芽率呈显著负相关, 说明全碳含量高时利于砂糖橘成花。试验 II 结果显

示, 冬季温室条件下, 砂糖橘枝条和叶片的全碳含量波动大, 表现无规律性, 这可能受日光温室每天温度变化的影响较大。氮素是影响果树生长发育的重要元素。研究表明, 柑橘芽体内氮素形态和开花枝条数及成花总数相关^[25]。本试验结果显示, 砂糖橘枝条全氮含量在成花诱导期间逐渐降低, 这与 Nakajima 等^[28]研究结果一致。砂糖橘成花率与枝条 C/N 呈正相关, 温室条件下冬季随成花率升高, 枝条 C/N 值逐渐升高维持较高水平。温室极端低温时期, 枝条 C/N 降低但仍维持在 10 以上, 叶片 C/N 整个冬季只在此时期才出现急剧升高。说明砂糖橘枝条 C/N 与低温诱导成花关系密切, 叶片 C/N 则受温室极端低温影响较大。一般普遍认为脯氨酸的积累是植物对逆境胁迫做出的一种适应性响应, 但有研究发现^[21-22], 脯氨酸在植物开花及花器官发育过程中起着重要作用。本试验结果显示, 低温诱导处理, 离体茎段腋芽脯氨酸含量与成花率呈显著正相关, 与萌芽率呈显著负相关, 冬季砂糖橘枝条脯氨酸含量的积累表现出对成花诱导的响应, 这与 Poerwanto 等^[29]研究结果相似。脯氨酸对成花的影响主要体现在两方面, 一方面可能作为一种维持细胞快速分裂需要的代谢产物^[30-33], 另一方面在分子水平上作为一种反馈信号来调节发育进程如成花转变^[22,34-36]。砂糖橘叶片脯氨酸含量则受气温的影响较大, 温室气温处于最低时期才出现积累, 时间上晚于枝条。说明枝条脯氨酸积累可能是对成花诱导的一种响应, 而叶片脯氨酸积累则是低温胁迫引起的渗透调节。砂糖橘枝条 C/N 和脯氨酸含量变化对低温诱导砂糖橘成花表现出的积极响应, 在确定花芽萌发升温时间时或许可以作为一种很好的判定指标。

本研究综合分析结果表明, 进入 12 月后开始对日光温室进行加温并保证温度 >5 °C, 加温 1 个月左右可使砂糖橘成花率趋于稳定。下一步应就不同低温对柑橘成花率和萌芽率的影响进行深入研究, 以期对日光温室柑橘花芽萌发的升温调控提供精确的理论指导。

参考文献

- [1] Iwagaki I. Cultivation of satsuma mandarin (*Citrus reticulata*) in vinyl-greenhouses in Japan[J]. Japan Agricultural Research Quarterly, 1991, 24(4): 292-299
- [2] Ellchl T. Technology development and popularization of the protected cultivation of citrus in Wakayama Prefecture[J]. Agriculture and Horticulture, 2004, 79(11): 1181-1192
- [3] Chaikiattiyos S, Menzel C M, Rasmussen T S. Floral induction in tropical fruit trees: effects of temperature and water supply[J]. Journal of Horticultural Science, 1994, 69(3): 397-415

- [4] Davenport T L. Citrus flowering[J]. Horticultural Reviews, 1990, 12(8): 349–408
- [5] Krajewski A J, Rabe E. Citrus flowering: a critical evaluation[J]. Journal of Horticultural Science, 1995, 70(3): 357–374
- [6] Southwick S M, Davenport T L. Characterization of water stress and low temperature effects on flower induction in Citrus[J]. Plant Physiology, 1986, 81(1): 26–29
- [7] García-Luís A, Kanduser M, Guardiola J L. The influence of fruiting on the bud sprouting and flower induction responses to chilling in Citrus[J]. Journal of Horticultural Science, 1995, 70(5): 817–825
- [8] García-Luís A, Kanduser M. Changes in dormancy and sensitivity to vernalization in axillary buds of satsuma mandarin examined *in vitro* during the annual cycle[J]. Annals of Botany, 1995, 76(5): 451–455
- [9] García-Luís A, Kanduser M, Santamarina P, et al. Low temperature influence on flowering in *Citrus*. The separation of inductive and bud dormancy releasing effects[J]. Physiologia Plantarum, 1992, 86(4): 648–682
- [10] Inoue H. Effects of temperature on bud dormancy and flower bud differentiation in Satsuma mandarin[J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 1990, 58(4): 919–926
- [11] Nishikawa F, Endo T, Shimada T, et al. Increased *CiFT* abundance in the stem correlates with floral induction by low temperature in Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.)[J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(14): 3915–3927
- [12] Inoue H. Differentiation and development of flower buds in Satsuma mandarins under different temperature conditions[J]. Journal of the Japan Society for Horticultural Science, 1989, 58(1): 75–82
- [13] Pillitteri L J, Lovatt C J, Walling L L. Isolation and characterization of *LEAFY* and *APETALA1* homologues from *Citrus sinensis* L. Osbek “Washington”[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2004, 129(6): 846–856
- [14] Tisserat B, Galletta P D, Jones D. In vitro flowering from Citrus lemon lateral buds[J]. Journal of Plant Physiology, 1990, 136(1): 56–60
- [15] Iwahori S, García-Luís A, Santamarina P, et al. The influence of ringing on bud development and flowering in Satsuma mandarin[J]. Journal of Experimental Botany, 1990, 41(10): 1341–1346
- [16] Nebauer S G, Avila C, García-Luís A, et al. Seasonal variation in the competence of the buds of three cultivars from different citrus species to flower[J]. Trees-Structure and Function, 2006, 20(4): 507–514
- [17] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 123–124
- Li H S. Principles and techniques of plant physiological biochemical experiment[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000: 123–124
- [18] 赵春江. 数字农业信息标准研究: 作物卷[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 389–393
- Zhao C J. Research on information standards for digital agriculture—Crop[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2004: 389–393
- [19] 田大伦. 杉木林生态系统定位研究方法[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 311–314
- Tian D L. Research methods of location for Chinese fir plantation ecosystem[M]. Beijing: Science Press, 2004: 311–314
- [20] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 161–162
- Zou Q. Precedure of plant physiology experiment[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 161–162
- [21] Chiang H H, Dandekar A M. Regulation of proline accumulation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh during development and in response to desiccation[J]. Plant, Cell and Environment, 1995, 18(11): 1280–1290
- [22] Mattioli R, Marchese D, D’Angeli S, et al. Modulation of intracellular proline levels affects flowering time and inflorescence architecture in *Arabidopsis*[J]. Plant Molecular Biology, 2008, 66(3): 277–288
- [23] Southwick S M, Davenport L. Characterization of water stress and low temperature effects on flower induction in Citrus[J]. Plant Physiology, 1986, 81(1): 26–29
- [24] Sanz A, Monerri C, Gonzáles-Ferrer J, et al. Changes in carbohydrates and mineral elements in Citrus leaves during flowering and fruit set[J]. Physiologia Plantarum, 1987, 69(1): 93–98
- [25] Lovatt C J, Zheng Y, Hake K D. Demonstration of a change in nitrogen metabolism influencing flower initiation in *Citrus*[J]. Israel Journal of Botany, 1988, 37(2/4): 181–188
- [26] Legaz F, Serna M D, Primo-Millo E. Mobilization of the reserve N in citrus[J]. Plant and Soil, 1995, 173(2): 205–210
- [27] García-Luís A, Almela V, Monerri C, et al. Inhibition of flowering *in vivo* by existing fruits and applied growth regulators in *Citrus unshiu*[J]. Physiologia Plantarum, 1986, 66(3): 515–520
- [28] Nakajima Y, Susanto S, Hasegawa K. Effect of winter-chilling treatment on flower bud induction in young Pomelo trees[J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 1992, 61(2): 287–293
- [29] Poerwanto R, Inoue H. Effects of air and soil temperatures in autumn on flower induction and some physiological responses of Satsuma Mandarin[J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 1990, 59(2): 207–214
- [30] Nanjo T, Kobayashi M, Yoshida Y, et al. Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Journal, 1999, 18(2): 185–193
- [31] Munoz F J, Dopico B, Labrador E. A cDNA encoding a proline-rich protein from *Cicer arietinum*. Changes in expression during development and abiotic stress[J]. Physiologia Plantarum, 1988, 102(4): 582–590
- [32] Showalter A M. Structure and function of plant cell wall proteins[J]. Plant Cell, 1993, 5(1): 9–23
- [33] Majewska-Sawka A, Nothnagel E A. The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development[J]. Plant Physiology, 2000, 122(1): 3–9
- [34] Mattioli R, Falasca G, Sabatini S, et al. The proline biosynthetic genes *P5CS1* and *P5CS2* play overlapping roles in *Arabidopsis* flower transition but not in embryo development[J]. Physiologia Plantarum, 2009, 137(1): 72–85
- [35] Székely G, Abrahám E, Cséplő Á, et al. Duplicated *P5CS* genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis[J]. Plant Journal, 2008, 53(1): 11–28
- [36] Jacquemard A, Gadisseur I, Bernier G. Cell division and morphological changes in the shoot apex of *Arabidopsis thaliana* during floral transition[J]. Annals of Botany, 2003, 91(5): 571–576