

茶花凤仙瓶苗开花诱导机理研究

黄志明, 刘登凡

(莆田学院 环境与生命科学系 福建 莆田 351100)

摘要:以茶花凤仙种子为外植体,获得无菌苗并进行增殖、壮苗培养和瓶内开花实验。结果表明:茶花凤仙的种子用1 g/L的氯化汞消毒9 min效果最好,成活率达到90%;采用正交试验设计方法筛选出无菌苗最佳增殖培养基配方为:MS+6-BA 0.6 mg/L+NAA 0.3 mg/L+蔗糖 20 g/L+琼脂 10 g/L,增殖系数可达3.6;对茶花凤仙的壮苗情况来看,PP₃₃₃的最佳质量浓度为0.75 mg/L,采用的壮苗培养基配方为:MS+6-BA 0.6 mg/L+NAA 0.3 mg/L+PP₃₃₃ 0.75 mg/L+蔗糖 20 g/L+琼脂 10 g/L;经过壮苗后的植株在MS(1/3 NH₄NO₃)+6-BA 0.6 mg/L+NAA 0.3 mg/L+PP₃₃₃ 0.75 mg/L培养基上培养,开花率最好,达58%。采用组织培养方法获得无菌苗,并通过芽的增殖与壮苗培养,诱导其在瓶内开花,可为其优良品种的开发利用和快速繁殖提供技术支持。

关键词:茶花凤仙;组织培养;增殖;壮苗培养;瓶苗开花

中图分类号:S681.1 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2012)05-0904-05

Studies on in Vitro Flowering Technology of *Impatiens balsamina*

HUANG Zhi-ming, LIU Deng-fan

(Environment & Life Science Department, Putian University, Putian 351100, China)

Abstract: Seeds of *Impatiens balsamina* were used as explants, seedlings obtained were used for proliferation, strengthening cultivation and in vitro flowering. It was showed that seeds of *Impatiens balsamina* sterilized with 0.1% HgCl₂ for 9 minutes achieved the highest survival rate (90%). The best medium for plantlet proliferation screened out by orthogonal experimental design method was: MS + NAA 0.3 mg/L + 6-BA 0.6 mg/L + sucrose 20 g/L + agar 10 g/L, the multiplication coefficient was up to 3.6. The best PP₃₃₃ concentration was 0.75 mg/L for *Impatiens balsamina* and strengthening cultivation medium was MS + 6-BA 0.6 mg/L + PP₃₃₃ 0.75 mg/L + NAA 0.3 mg/L + sucrose 20 g/L + agar 10 g/L. The modified MS medium (1/3 NH₄NO₃ content) added with 6-BA 0.6 mg/L, NAA 0.3 mg/L and PP₃₃₃ 0.75 mg/L was found to be the best medium for in vitro flowering, with flowering rate up to 58%.

Key words: *Impatiens balsamina*; tissue culture; proliferation; strengthening cultivation; in vitro flowering

茶花凤仙(*Impatiens balsamina* L.)别名“指甲花”,是凤仙花科凤仙花属1年生草本花卉。花瓣左右对称,花色丰富(有白、水红、粉、玫瑰红、大红、洋红、匣紫、紫、雪青等),花头顶生,形如山茶。茶花凤仙原产我国南部、印度和马来西亚,株形多样,花色艳丽,适于花坛、花径、花境、自然丛植等。茶花凤仙不仅是漂亮的室外观赏花卉,还是珍贵的室内盆栽观花观叶植物,深受人们的喜爱。将开花的茶花凤仙瓶苗接种到装有色彩艳丽的果冻状营养液的密封玻璃瓶中,还可开发成旅游商品进入消费市场,丰富试管花卉种类^[1]。

收稿日期:2012-04-26 修回日期:2012-06-10

基金项目:福建省科技厅资助项目(2011N0028)和福建省莆田市科技计划资助项目(2008N11)

作者简介:黄志明(1952—)男,副教授,主要从事植物组织培养研究, E-mail: hzm2233@163.com。

在研究植物自然开花的基础上,人们也作了一些关于瓶苗开花的实验和研究^[1-3]。瓶苗开花是指用组织培养的方法,使植物的开花过程在培养容器中完成^[1]。瓶内开花可以不受季节限制地周年诱导,不仅可以达到快繁的目的,还缩短了开花时间,降低了栽培设施的投入和生产管理费用,是园林花卉资源开发利用一条新途径。孙宁等^[4]通过离子注入技术处理红花茶花凤仙种子,发现经处理的种子不仅萌发率和平均株高高于对照,而且低能磷离子注入能够诱导凤仙组培苗试管内开花,且处理剂量为 $1 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ 时成花率最高,推测其可能是离子注入使DNA发生了改变,影响了成花基因的结构或基因的表达调控。

高等植物的开花诱导过程受自身遗传因子和外界环境因素两方面决定,是开花基因在时间和空间上顺序表达的结果^[5]。磷离子注入虽然能够诱导凤仙组培苗试管内开花,却使处理植株叶片畸形率增加,并使处理试管苗分化率和生根率降低^[4]。那么,能否在不改变茶花凤仙自身遗传物质基础上,研究其试管开花的规律性呢?本研究以茶花凤仙为材料,在不改变植物遗传变异的基础上,采用离体培养技术探讨了灭菌处理方法和培养基成分等外界环境因素对茶花凤仙种子萌发、瓶苗增殖和壮苗生根及开花的影响,以期建立稳定的试管开花体系,为植物开花机理研究提供良好的试验平台,并为该花卉资源的开发利用提供技术支持和理论参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

茶花凤仙种子由北京市芳萱苑种子有限公司提供。

1.2 试验方法

1.2.1 种子消毒灭菌 茶花凤仙种子在超净工作台上用体积分数为75%酒精浸泡10s,再用质量分数为0.1%升汞消毒不同时间,无菌水清洗3次,接种到MS基本培养基并放置于培养室。培养室条件为:温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光照时间12h/d,光照强度为2000lx。每L培养基添加20g蔗糖和10g琼脂。15d后统计污染率和发芽率。每处理接种40粒种子,2次重复。

1.2.2 继代增殖 当无菌苗长到2cm以上时,取其中1cm芽段接种到以正交设计方案配制、附加不同质量浓度6-BA和NAA的MS基本培养基上进行继代增殖。培养25d后统计无菌苗增殖系数和植株平均高度。各处理接种30个外植体,2次重复。

1.2.3 壮苗培养 在继代增殖3次后,再用MS培养基附加不同浓度的 PP_{333} 进行壮苗培养,30d后观察植株生长情况并测量株高。各处理组合接种30个外植体,2次重复。

1.2.4 开花诱导 当无菌苗茎粗达到0.5cm以上时,切去根部并分别接种到4种不同的基本培养基上进行开花实验,培养30d后统计开花率。各处理组合接种24株,2次重复。

1.3 数据处理

采用Microsoft Excel 2003和DPS统计分析程序进行试验数据分析。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌时间对茶花凤仙种子萌发的影响

设计5种不同的消毒时间,对茶花凤仙种子进行灭菌和萌芽效果研究(表1)。结果表明:灭菌时间越短,污染率越高;随着灭菌时间的延长,种子污染率降低,但死亡率升高。显著性测验表明,灭菌时间在8~10min的种子平均萌发率明显比6~7min的高,且差异达到极显著水平。结合不同消毒时间对种子死亡率和平均污染率的影响,结果表明茶花凤仙种子的最佳消毒时间为9min,萌发率可达90%。

2.2 不同浓度的6-BA和NAA对茶花凤仙增殖的影响

将茶花凤仙无菌苗切成带顶芽的长度在1.0cm左右的茎段,接种在添加不同质量浓度NAA和6-BA的MS培养基中培养,30d后统计增殖系数(表2)。

从表2的极差r值来看,不同BA质量浓度是影响茶花凤仙增殖的主要因子,其次是NAA质量浓度。BA和NAA的交互作用不明显,因此将这3列作为误差列进行新复极差测验。结果表明,每L培养基中加入0.4~0.6mg的BA对茶花凤仙的增殖效果较好,平均增殖倍数在2.8以上,BA质量浓度太

高和太低都不利于增殖。每 L 培养基中加入 0.6 mg BA 与含 0.8 mg 和 0.2 mg BA 的培养基相比, 芽增殖倍数间的差异达到极显著水平。NAA 质量浓度以 0.3 mg/L 为佳, 其增殖倍数与 0.15 mg/L 和 0.60 mg/L NAA 相比, 差异达到极显著水平。得到芽增殖的最佳培养基配方为: MS + BA 0.6 mg/L + NAA 0.3 mg/L, 增殖系数可达到 3.6。

表 1 消毒灭菌时间对茶花凤仙种子萌发效果的影响

Tab.1 Effects of sterilization time on seed germination of *Impatiens balsamena*

灭菌时间/min Sterilization time	平均死亡率/% Mortality rate	平均污染率/% Pollution rate	平均萌发率/% Germination rate	显著性测验 Significance test	
				5%	1%
6	0	75	25	c	C
7	0	40	60	b	B
8	10	15	85	a	A
9	5	5	90	a	A
10	20	0	80	a	A

同列不同的大写字母和小写字母分别表示 0.01 和 0.05 水平上差异显著。

Different letters in same column by capital letter and lower case letter mean significant differences at 0.05 and 0.01 levels separately.

表 2 6-BA 和 NAA 对茶花凤仙增殖的影响

Tab.2 Effects of 6-BA and NAA on proliferation of *Impatiens balsamena*

处理号 Treatment	6-BA 浓度	NAA 浓度	6-BA 和	6-BA 和	6-BA 和	增殖倍数 Multiple of proliferation
	Concentrations of 6-BA	Concentrations of NAA	NAA 交互作用 Interaction of 6-BA and NAA	NAA 交互作用 Interaction of 6-BA and NAA	NAA 交互作用 Interaction of 6-BA and NAA	
1	0.2	0.15	1	1	1	1.75
2	0.2	0.30	2	2	2	2.8
3	0.2	0.45	3	3	3	2.65
4	0.2	0.60	4	4	4	1.9
5	0.4	0.15	2	3	4	2.9
6	0.4	0.30	1	4	3	3.1
7	0.4	0.45	4	1	2	2.75
8	0.4	0.60	3	2	1	2.55
9	0.6	0.15	3	4	2	3.1
10	0.6	0.30	4	3	1	3.6
11	0.6	0.45	1	2	4	3.2
12	0.6	0.60	2	1	3	2.8
13	0.8	0.15	4	2	3	1.8
14	0.8	0.30	3	1	4	3.2
15	0.8	0.45	2	4	1	2.7
16	0.8	0.60	1	3	2	2.25
k_1	2.275 0 B	2.387 5 B	2.575 0	2.625 0	2.650 0	因素主→次
k_2	2.825 0 AB	3.175 0 A	2.800 0	2.587 5	2.725 0	6-BA > NAA
k_3	3.175 0 A	2.825 0 AB	2.875 0	2.850 0	2.587 5	
k_4	2.487 5 B	2.375 0 B	2.512 5	2.700 0	2.800 0	
r	0.900 0	0.800 0	0.362 5	0.262 5	0.212 5	

K 值后面的不同字母表示不同浓度 BA 和 NAA 对凤仙花增殖差异显著性影响。

Different letters in same column mean significant differences of different concentrations of BA and NAA on multiplication coefficient of *Impatiens balsamena* separately.

2.3 不同 PP₃₃₃ 质量浓度对茶花凤仙壮苗培养的影响

以 MS + 6 - BA 0.6 mg/L + NAA 0.3 mg/L + 糖 20 g/L + 琼脂 10 g/L 为基本培养基, 加不同质量浓度的 PP₃₃₃ 对植株的生长状况有较明显的影响, 部分处理间的株高差异达到极显著水平。试验结果(表 3)表明, 较低质量浓度的 PP₃₃₃ 对植株的生长影响不大, 植株细长, 茎秆纤细, 不利于茶花凤仙瓶苗开花实验; 较高质量浓度的 PP₃₃₃ 对植株的生长影响过大, 植株矮壮, 生长缓慢也不利于茶花凤仙瓶苗开花实验。添加 0.75 mg/L PP₃₃₃ 的培养基最佳, 在该培养基上生长的植株, 茎粗壮, 叶片大而厚, 生长速度适中, 这种植株适合于瓶苗的花芽分化和开花(图 1)。



图 1 茶花凤仙瓶苗
Fig. 1 Seedlings of *Impatiens balsamina*

表 3 PP₃₃₃ 浓度对茶花凤仙壮苗的影响

Tab. 3 Concentrations of PP₃₃₃ on strengthening cultivation of *Impatiens balsamina*

PP ₃₃₃ 浓度 / (mg · L ⁻¹) Concentrations of PP ₃₃₃	平均高度 / cm Average height	显著性测验		生长状况 Growth status
		5%	1%	
0.25	7.20	a	A	植株茎细长, 茎秆纤细, 叶片小而薄, 生长快
0.50	6.00	ab	AB	植株茎较细长, 叶片较小而薄, 生长较快
0.75	6.60	ab	A	植株茎粗壮, 叶片大而厚, 生长速度适中
1.00	5.40	b	AB	植株茎矮壮, 叶片较小而厚, 生长较慢
1.25	4.00	c	B	植株茎矮小, 叶片小, 生长缓慢

2.4 不同基本培养基对茶花凤仙瓶苗开花的影响

将经过壮苗后的植株转接到表 4 所示的 4 种不同基本培养基中, 各基本培养基均另外添加 6 - BA 0.6 mg/L + NAA 0.3 mg/L + PP₃₃₃ 0.75 mg/L。培养 25 ~ 30 d 后, 部分植株顶芽开始形成花蕾, 并在此后的 15 ~ 20 d 内开花(图 2), 在培养室条件下, 花期在 50 ~ 70 d。试验结果(表 4)表明: 适当减少 MS 基本培养基中 NH₄NO₃ 含量可使开花率有所提高, 当 MS 基本培养基中 NH₄NO₃ 含量降低到原来的 1/3, 瓶苗开花率达到 58%, 分别比含 1NH₄NO₃、1/2NH₄NO₃ 和 1/4NH₄NO₃ 诱导的开花率高 58%、41%、25%, 且基本培养基对茶花凤仙瓶苗开花率的影响差异达到极显著水平。由此可见, 基本培养基是影响开花的主要因子。

表 4 不同培养基对茶花凤仙瓶苗开花率的影响

Tab. 4 Effects of different media on flowering rate of *Impatiens balsamina*

培养基类型 Bbasic media	开花率 / % Flowering rate	显著性测验 Significance test	
		5%	1%
MS	0	d	D
MS(1/2NH ₄ NO ₃)	17	c	C
MS(1/3NH ₄ NO ₃)	58	a	A
MS(1/4NH ₄ NO ₃)	33	b	B

同列不同的大写字母和小写字母分别表示 0.01 和 0.05 水平上差异显著。
Different letters in same column by capital letter and lower case letter mean significant differences at 0.05 and 0.01 levels separately.

3 结论与讨论

茶花凤仙作为凤仙花科重要的花卉品种, 可常年开花, 不仅能作为漂亮的室外观赏花卉, 还是珍贵

的药用植物^[6]和室内盆栽观花观叶植物,市场需求量很大。对茶花凤仙开展离体成花培养技术研究,对指导茶花凤仙生产实践具有重要意义。

(1) 种子的选取和灭菌的彻底性是试验成功的关键。选用饱满健康的茶花凤仙种子为试验材料,研究发现最佳的种子萌发消毒方案为 1 g/L 升汞灭菌 9 min。对试验材料进行表面灭菌时,既要考虑植物材料的耐受能力,也要考虑药剂的消毒效果,不同材料类别、不同药剂种类,甚至不同器官都应区别对待^[7]。

(2) 在组织培养中,生长素主要被用于根的分化以及细胞的分裂和伸长,生长素与一定量的细胞分裂素配合常用于不定芽的诱导;而细胞分裂素的主要作用则是促进细胞分裂和分化,诱导胚状体和不定芽的形成及离体成花调控^[8]。以 MS 为基本培养基,采用正交试验设计方法研究不同浓度的细胞分裂素和生长素及组合对芽增殖的影响,极差分析结果表明 6-BA 是影响茶花凤仙增殖的主要因子,这也与王越和刘燕在大旗瓣凤仙花上的研究中也得到相同的结论^[9]。本试验结果也表明,IBA 和 NAA 均可促进茶花凤仙增殖,并且筛选出最佳的芽增殖培养基配方:MS + 6-BA 0.6 mg/L + NAA 0.3 mg/L + 蔗糖 20 mg/L + 琼脂 10 mg/L。

(3) 多效唑(PP₃₃₃)作为植物生长延缓剂,在植物体内抑制内源激素 GA 的生物合成,对提高植物抗逆性、促进壮苗生根都有重要作用,并已广泛应用于大田和观赏植物^[10]。例如,陈炫等^[11]研究发现叶面喷施多效唑和乙烯利混合剂,能有效抑制妃子笑荔枝抽生冬梢,促进花芽分化,提高成花率;喷施药剂还能提高荔枝树内源 ABA、ZR、ABA/IAA、ABA/GA₃、Z R/IAA、Z R/GA₃ 值,降低 GA₃ 和 IAA 含量,提高可溶性糖、淀粉、全氮含量,增加 C/N 比值,从而提高成花率。近年来人们开始将 PP₃₃₃ 应用于植物组织培养中,用于矮化植株,使叶形指数变小^[12]。对茶花凤仙的壮苗情况来看,最佳的 PP₃₃₃ 质量浓度为 0.75 mg/L,并筛选出茶花凤仙壮苗培养基配方为 MS + 6-BA 0.6 mg/L + NAA 0.3 mg/L + PP₃₃₃ 0.75 mg/L。

(4) 国内外大量研究结果表明,培养基中营养条件特别是氮浓度水平及类型配比在植物试管开花诱导过程中起重要作用,许多研究报道低氮浓度有利于促进植物离体开花,而高浓度氮抑制开花^[13-15]。与此相一致,当 MS 基本培养基中 NH₄NO₃ 含量降低到原来的 1/3,瓶苗开花率可提高 58%。然而,研究发现,进一步降低培养基中氮源,试管苗开花率进一步降低,当 MS 培养基中 NH₄NO₃ 降低到原来的 1/4 时,瓶苗开花率仅有 33%,说氮对茶花凤仙试管苗开花的影响,除与氮含量有关外,可能还与培养基中其他的一些开花诱导信号物质,如蔗糖、细胞分裂素、以及 C/N、硝氮与铵氮比值等有关,从而影响开花^[16-18]。本研究者推测,氮除了可能作为培养基中的 N 源通过改变植物离体开花诱导过程中的 C/N 比而影响植物瓶内开花外,还有可能调控植物内源激素水平或通过 NO₃⁻ 在地上部积累而直接或间接激活或抑制开花相关基因表达,其调控植物瓶内开花诱导的生理机制和作用途径有待进一步研究证实。本研究筛选出茶花凤仙瓶苗最佳开花培养基配方为 MS(1/3NH₄NO₃) + 6-BA 0.6 mg/L + NAA 0.3 mg/L + PP₃₃₃ 0.75 mg/L + 糖 20 g/L + 琼脂 10 g/L,可在不改变遗传物质和植物正常形态的基础上调控植物瓶内开花过程。

参考文献:

- [1] 房立晶,白志川,刘世尧,等. 试管开花生物技术研究概况[J]. 南方农业, 2007, 1(3): 72-74.
- [2] Chang W C, Hsing Y I. In vitro flowering of embryoids derived from mature root callus of ginseng (*Panax ginseng*) [J]. Nature, 1980, 28(4): 160-162.



图 2 茶花凤仙瓶苗开花

Fig. 2 In vitro flowering of *Impatiens balsamina*

(下转第 913 页)

参考文献:

- [1]张青,李隆云,孙年喜.青蒿种子萌发过程中生理生化变化的研究[J].种子,2011,30(3):10-13.
- [2]董青松,马小军,冯世鑫等.黄花蒿种子发芽试验研究[J].中国种业,2008(8):47-48.
- [3]李红莉,徐有明,李隆云等.青蒿种子品质检验及质量标准的研究[J].种子,2008,27(11):1-4.
- [4]刘飞,吴晓丽,李隆云.青蒿种子带菌检测及药剂消毒处理[J].种子,2008,27(1):23-25.
- [5]颜启传.种子检验原理和技术[M].杭州:浙江大学出版社,2001.
- [6]陈敏,杨玉杰,李海云.NaCl胁迫对羽衣甘蓝种子萌发的影响[J].北方园艺,2011(16):17-19.
- [7]吕小红,伏家瑞.聚乙二醇渗透处理提高花生种子活力和抗寒性[J].中山大学学报:自然科学版,1990(29):63-70.
- [8]郑晓鹰,孔祥辉.几种蔬菜种子渗透调控的初步研究[J].中国农业科学,1986(2):36-41.
- [9]燕义唐.PEG引发预防大豆种子吸胀冷害效果[J].植物生理学通讯,1987(4):24-26.
- [10]张文明,郑文寅,任冲等.电导法测定大豆种子活力的初步研究[J].种子,2003(2):34-36.
- [11]刘永庆.PEG高渗处理对番茄种子活力的影响[J].湖南农学院报,1994(2):42-46.
- [12]张万萍,杨民,江燕.H₂O₂浸种对羽衣甘蓝种子萌发及幼苗的影响[J].种子,2008,27(12):98-100.
- [13]李保珠,赵翔,安国勇.赤霉素的研究进展[J].中国农学通报,2011,27(1):1-5.
- [14]董青松,马小军,冯世鑫等.黄花蒿种子发芽试验研究[J].中国种业,2008,8:47-48.
- [15]毕辛华,戴心维.种子学[M].北京:中国农业出版社,2002:62-211.
- [16]刘洪见,黄建,张旭乐等.赤霉素等4种化学物质对几种植物种子萌发的影响[J].浙江农业科学,2010,6:1244-1246.
- [17]郁继华,吕军芬,舒英杰.外源H₂O₂对西瓜幼苗抗冷性的影响[J].中国蔬菜,2004(5):24-25.
- [18]岳华,刘周,李玉珠.不同温度、光照、贮存时间及PEG胁迫对北丝石竹种子萌发的影响[J].江西农业大学学报,2012,34(1):72-76.

(上接第908页)

- [3]周俊辉,杨寅桂,刘义存等.微型月季的试管开花诱导研究[J].江西农业大学学报,2008,30(3):504-508.
- [4]孙宁,张磊,赵新海等.离子注入对凤仙试管苗组织培养和成花的影响[J].华北农学报,2009,24(3):159-161.
- [5]孙昌辉,邓晓建,方军等.高等植物开花诱导研究进展[J].遗传,2007,29(10):1182-1190.
- [6]危建安,谢琪.凤仙花研究进展[J].时珍国医国药,2001,12(2):164,165.
- [7]金铭铭,徐惠风,李艳等.阿特拉津和汞胁迫对波斯菊种子萌发及生长的影响[J].安徽农业科学,2010,38(7):3384-3385,3407.
- [8]沈海龙.植物组织培养[M].北京:中国林业出版社,2005:40-41.
- [9]王越,刘燕.大旗瓣凤仙花的组织培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,2008,44(3):510.
- [10]楚爱香,孔祥生,张要战等.植物生长调节剂在观赏植物上的应用[J].园艺学报,2004,31(3):408-412.
- [11]陈炫,陶忠良,吴志祥等.多效唑+乙烯利对妃子笑荔枝内源激素及碳氮营养的影响[J].江西农业大学学报,2012,34(1):27-33.
- [12]朱道圩,张会丽,王锦等.多效唑对大花高代组培苗生长的效应[J].植物生理学通讯,2006,42(2):232-234.
- [13]Duan J X, Yazawa S. Floral induction and development in *Phalaenopsis* in vitro[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1995, 43: 71-74.
- [14]Kachonpadungkitti Y, Romchatngoeng S, Hasegawa K, et al. Efficient flower induction from cultured buckwheat (*Fagopyrum esculentum* L.) node segments in vitro[J]. Plant Growth Regulation 2001, 35: 37-45.
- [15]Kostenyuk I, Oh B J, So I S. Induction of early flowering in *Cymbidium niveo-marginatum* mak in vitro[J]. Plant Cell Reports, 1999, 19: 1-5.
- [16]Bernier G, Périlleux C. A physiological overview of the genetics of flowering time control[J]. Plant Biotechnology Journal, 2005, 3: 3-16.
- [17]Corbesier L, Coupland G. The quest for florigen: a review of recent progress[J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57: 3395-3403.
- [18]Jackson S D. Plant responses to photoperiod[J]. New Phytologist, 2009, 181: 517-531.