

综述 Reviews

树木幼年向成年转变的发育调控机制研究进展

赵建国, 崔佳雯, 金飏*

扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏扬州225009

摘要: 树木生长发育过程具有明显的幼年期和成年期, 只有成年期树木才能启动生殖生长, 因此研究树木从幼年期到成年期转变过程中的发育变化规律, 对于阐明树木生殖发育机制和促进树木生殖输出等都具有重要意义。树木由幼年期向成年期转换过程中, 形态特征和超微结构、生理生化指标、转录因子和miRNA调节、DNA甲基化水平以及端粒长短等方面发生了明显变化, 本文综合国内外有关树木阶段发育的相关研究进展, 对树木从幼年向成年转变过程中的发育和调控机制进行综述。

关键词: 树木; 幼年向成年期转化; 形态; 生理; 分子机制

Research Advances of Developmental Changes of Juvenile to Adult Transition in Woody Plants

ZHAO Jian-Guo, CUI Jia-Wen, JIN Biao*

College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China

Abstract: Development of woody plants has distinct two phases, juvenile and adult. Only adult phase can initiate the reproductive production. Thus, analysis the phase changes of juvenile to adult transition can provide insights into the mechanism of reproductive development and output in woody plants. During the juvenile to adult transition, some changes occur in morphological and ultrastructural characteristics, physiological and biochemical properties, transcription factors and miRNA regulatory, DNA methylation level and telomere length. In this review, we summarized recent advances to illustrate the developmental and regulatory mechanisms during the transition of juvenility to adult in woody plants.

Key words: woody plants; juvenile to adult transition; morphology; physiology; molecular mechanisms

高等植物的生命周期要经历3个不同的发展阶段, 胚形成期(embryogenetic stage)、营养阶段(vegetative stage)和生殖阶段(reproductive stage)。其中, 营养阶段是指植物从种子萌发、幼苗生长到生殖前的生长过程, 只有当营养生长到一定时期后, 才能开花、结实而进入生殖阶段, 因此营养生长是生殖生长的物质基础(Jones 1999)。营养阶段进一步可分为幼年期(juvenility)和成年期(adult stage), 幼年期是指植物早期营养生长的阶段, 在此期间, 任何处理都不能诱导开花。幼年期的长短因植物物种而定, 部分草本植物, 如油菜(*Brassica campestris*)、牵牛花(*Pharbitis nil*)和藜(*Chenopodium album*)等幼年期非常短。个别植物没有幼年期, 如花生(*Arachis hypogaea*), 它们在种子阶段就已经具备了花原基(floral primordium)。不同于草本植物,

大部分树木具有相当长的幼年期, 其中桃(*Prunus persica*)和杏(*Prunus armeniaca*)等树幼年期较短, 为3~5年; 而银杏(*Ginkgo biloba*)、油橄榄(*Olea europaea*)和云杉(*Picea asperata*)等的幼年期则较长, 超过15年。树木由幼年期转为成年期会在形态、生理生化、内源激素含量以及分子调控上发生许多变化(郭长花和康向阳2008; Wang等2011), 这些变化可以作为树木阶段发育的特征和标记, 指示发育成熟可以启动生殖生长。由于绝大部分林果树种的经济产出都在生殖阶段, 因此, 研究幼年期到成年期的发育调控机制对缩短树木幼年期、提

收稿 2015-08-03 修定 2015-09-17

资助 江苏省研究生实践创新计划省立省助项目(SJZZ15_0181)和国家自然科学基金(31200145)。

* 通讯作者(E-mail: bjia@yzu.edu.cn; Tel: 0514-87979344)。

早生殖产出以及繁殖育种都具有重要意义(Tanaka等2011)。

由于树木生长周期长、实验材料获取困难以及没有可进行遗传分析的实验体系等原因,制约了树木发育调控机制的深入研究,尤其分子机制研究较少。近年来,随着生理生化新技术、高通量测序技术和功能基因研究技术的迅猛发展,对树木幼年期向成年期转变过程中的发育调控机制有了不少新发现。本文通过对树木幼年期向成年期转化的形态结构变化、生理生化变化以及分子调控机制等方面进行综述,并对目前研究存在的问题和未来研究的方向进行了分析和展望。

1 树木从幼年期向成年期转变过程中的形态和结构变化特征

植物从幼年期向成年期转化时,部分植物叶片的形态结构会发生明显改变,包括叶片面积、叶片形状、叶生物量和叶厚度等。在草本植物的研究中发现,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的幼叶呈圆形且叶边缘圆滑,在叶背面几乎没有毛状物(叶毛)。然而,当生长到成年阶段时,叶片变得狭长、有锯齿并且叶背面有毛状物(Wu等2009)。此外,玉米(*Zea mays*)的幼叶有角质层蜡没有表皮毛,而成年叶片有表皮毛没有角质层蜡(Lawson和Poethig 1995)。研究同样发现在多年生木本植物中叶片也会发生改变,如油橄榄(*O. europaea*)幼年时期叶片要比成年叶片要小和圆,并且枝条上被催化芽的数量要比成年树多(Fernández-Ocaña等2010)。Hudson等(2014)观察到桉树(*Eucalyptus globulus*)幼年期的叶片是水平生长,形状为卵形渐

尖,没有叶柄,具角质层蜡。然而,成年期叶片形态为披针形,垂直生长,有叶柄,无角质层蜡(图1-B)。此外,麻栎(*Quercus acutissima*)、意大利松(*Pinus pinea*)和矛木(*Pseudopanax crassifolius*)幼叶与成年叶的形态也明显不同(图1-A、C、D)。上述研究表明,很多树木幼年期与成年期叶片的形态特征存在阶段发育的特征和标记。

树木在初生生长结束后,茎中维管形成层开始活动,通过分裂分化,向内形成木质部,向外形成韧皮部,从而组成次生维管组织系统(Spicer和Groover 2010)。维管形成层是裸子植物和双子叶植物中普遍存在的一种侧生分生组织,树木的木材就是来自于形成层干细胞不断增殖分化。在幼树向成年树的转化过程中,维管形成层细胞会在超微结构等方面发生明显改变(Yuan 1993; Mellerowicz等1995)。在华北落叶松(*Larix principis-rupprechtii*)中发现,相对于未成熟形成层,较成熟形成层细胞中质体具有明显的基粒片层(grana lamella)结构和丰富的脂粒质体,前质体(proplastid)较少。线粒体数量多,具有更发达的嵴。液泡以次生溶酶体的形式存在。胞间连丝数量多,可以观察到精细的管状结构(Yuan 1995)。此外,通常幼树和成年树在早晚材宽度、木材密度、细胞壁厚度和管胞(导管)厚度等方面也具有明显差异(Rossi等2008; Li等2010, 2011a, b)。比如,幼年树木早材和晚材的年轮宽度比成年树要宽,木材密度以及细胞壁厚度逐渐变大(Rossi等2008; Li等2010, 2011a, b; Carvalho等2013),说明幼树木材的形成速度快,生长量大。微纤丝角(microfibril angle, MFA)是微纤

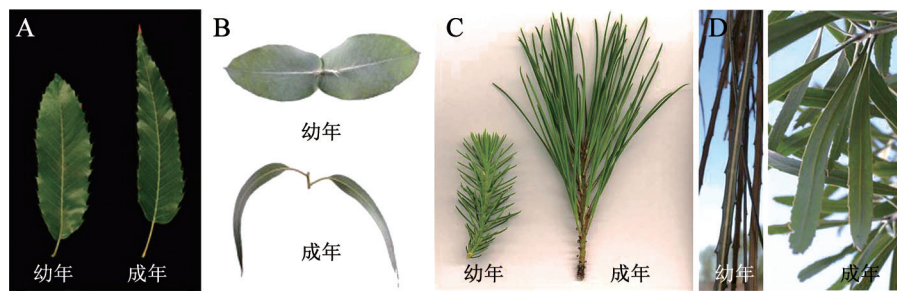


图1 不同树木幼年期与成年期的叶片比较

Fig. 1 The vegetative morphological changes from juvenile to adult in trees

A: 麻栎(*Q. acutissima*) [参考Wang等(2011)文献]; B: 桉树(*E. globulus*) [参考Hudson等(2014)文献]; C: 意大利松(*P. pinea*) ([https://en.wikipedia.org/wiki/Juvenile_\(organism\)#/media/File:Pinus_pinea_foliage.jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/Juvenile_(organism)#/media/File:Pinus_pinea_foliage.jpg)); D: 矛木(*P. crassifolius*) (http://www.canterburynature.org/species/lincoln_essays/lancewood.php)。

丝与细胞主轴之间的交角,其大小对木材性质、纸张和纺织品强度等均有很大影响,是衡量木材性质的指标之一。大量研究已经表明,木材MFA径向变异的一般模式为,在幼龄材区域从内向外明显降低,到成年材区域则趋于稳定(Zobel和van Buijtenen 2012)。MFA与木材硬度呈负相关关系,成年木材组织中的MFA较低,因而具有很强的机械强度(刚度)(Li等2011a)。因此,随着树木从幼年期向成年期的转变,维管形成层细胞的超微结构变得复杂,木材的形成速率逐渐减慢,而木材的机械程度有所增加。

2 树木从幼年期向成年期转变过程中生理化的变化

对于幼年期过长的树木,形态变化会出现滞后性,当观察到开花或角质层蜡出现等形态特征变化时,实际上其生理生化已经发生了很大变化,因此生理生化的标记能更好地解决发育阶段的判断问题(郭长花和康向阳2008)。

2.1 幼年期向成年期转变过程中的激素变化

植物内源激素是植物体内微量但具有重要调节作用的生理活性物质(符继红等2010),在植物的生长、发育和应对生物和非生物因素上起着至关重要的作用,并且随着植物生长不同阶段发生明显变化。目前科学界公认六大类植物内源激素包括生长素(auxin, IAA)、赤霉素(gibberellins, GA)、细胞分裂素(cytokinin, CTK)、脱落酸(abscisic acid, ABA)、乙烯(ethylene, ETH)和油菜素甾醇(brassinosteroid, BR)。其中,生长素(IAA)最早被发现,能够促进胚芽鞘和茎的生长,抑制根的生长和诱导维管细胞分化等。研究表明,植物由营养生长向生殖生长转化后,因生殖生长削弱了幼嫩组织的生长,从而使得植物体内的IAA含量下降,运往根系的IAA减少,也导致根系向地上部输出的IAA数量减少,最终生长速率明显降低(Sorce等2013)。Kijidani等(2014)对不同树龄的日本柳杉(*Cryptomeria japonica*)维管形成层中IAA的研究也发现,幼树维管形成层中IAA的含量明显高于成年树,并且IAA的含量会随着树高的增加而降低。此外,GA也是植物生长阶段转变的关键调节因子(Lavee和Haskal 1993)。对拟南芥和玉米的研究均显示,GA是植物进入成年阶段的促进因子(Schwarz等

2008)。在树木的研究中发现,与成年叶芽相比,辐射松(*Pinus radiata*)幼年期的叶芽中含有较多的GA₇和GA₉以及较少的GA₄(Fernández等2003)。同样,常春藤(*Hedera helix*)幼树组织顶端的芽中GA含量要比成年树的顶芽含量高(Lavee和Haskal 1993)。CTK是一类腺嘌呤衍生物,具有促进细胞分裂、延缓衰老以及诱导芽分化等。Day等(1995)对不同生长时期粗毛野桐(*Mallotus hookerianus*)叶片内部的CTK进行定性定量的差异分析,结果显示幼年期的叶片比成年叶片包含更多更活跃的CTK。ABA主要合成于处在休眠状态和将要脱落的器官,能抑制植物生长、促进休眠和脱落。近年来研究发现ABA与植物树龄也有着密切的关系。对不同树龄古银杏和古槐ABA的含量分析表明,ABA的含量与树龄呈正相关,且ABA在将要脱落的组织中和衰老植物组织中含量较高(张艳洁2009)。上述研究结果表明,与促进生长相关的激素,包括生长素、赤霉素和细胞分裂素随着幼树向成年树转变,含量逐渐下降,而与抑制生长相关的脱落酸则随着树龄的增加而逐渐增加。此外,ETH和BR在植物的幼年向成年转化过程中也起到一定作用(Prins等2010; Schaller 2012)。然而,对不同发育阶段转变的诱导来说,植物激素之间的比值比它们各自的相对含量更重要,更倾向于用激素之间的比值作为树木阶段转变的标记(Munne-Bosch和Lalueza 2007; 郭长花和康向阳2008)。如茶树(*Camellia sinensis*)新梢生长旺盛时IAA/ABA比值较高,且比值越高生长越快,随着新梢展叶数的增加,IAA/ABA比值下降,新梢成年后,激素水平会维持稳定(岳川等2012)。然而,关于激素协同调控树木不同发育阶段的研究仍较少,尤其是树木不同部位器官组织激素的综合分析值得进一步深入研究。

2.2 幼年期向成年期转变过程中的光合性能及抗逆性研究

光合作用是植物界最基本的物质和能量代谢,树木通过光合作用利用无机物生产有机物并且贮存能量。研究发现许多树种光合作用和气孔导度会随着生长发育不同阶段而改变。常春藤同一植株上成年叶片的光合作用和气孔导度比幼年叶片高出50%(Bauer和Bauer 1980)。这是因为幼年

期的叶片叶绿素含量较低(Woodall等1998; Choinski Jr等2003; Hughes等2007), 叶绿体不发达, 气孔数有限并且胞间二氧化碳浓度较低(Woodall等1998; Choinski等2003; Hughes等2007)。不同的是, 相思木(*Acacia koa*)幼年叶片的水分利用率低于成年叶片, 但是光合作用速率在幼年向成年期转变时没有明显变化(Hansen和Steig 1993)。橄榄树(*Canarium album*)叶片在成年阶段有较低的光合速率和气孔导度, 并且叶片内细胞体积变小(Basheer-Salimia 2007)。上述研究并没有表现出完全的一致性, 这可能与不同树木遗传差异以及所处环境条件密切相关。

树木的幼年期不具备生殖发育能力, 易受到逆境的影响, 而到了成年阶段, 树木抗逆境能力增强, 有助于保护树体正常的营养和生殖生长。在对抗干旱胁迫时, 树木幼年期与成年期所采取自身防御措施也有所不同, 如北美红栎(*Quercus rubra*)幼年树能通过白天过早关闭气孔来抵御干旱, 成年的树木则通过根系到达更深处获取丰富水分并且调整水分利用效率来应对干旱环境。此外, 成年树木有更多的生物量(biomass)分配到贮藏组织, 因此能提高储水量来应对干旱(Holbrook和Putz 1996)。在应对盐碱胁迫时, 处于不同发育阶段的树木抗盐碱能力也不同。研究表明, 成年树木要比幼年时期树木的抗盐碱能力强, 原因可能是成年树体内含有大量的脯氨酸, 脯氨酸是渗透保护物质, 能保护细胞受盐胁迫导致的细胞脱水, 从而减轻对植物造成的伤害(Katerji等2003)。此外, 抗低温或高温胁迫能力会因不同树种或同一树种不同发育阶段有所不同。如冬青栎(*Quercus ilex*)和矛木(*P. crassifolius*)幼年树比成年树更易受冻害(Darrow 2001; Andergassen和Bauer 2002)。这些结果表明树木在不同发育阶段抗逆性会有所不同, 相比于幼年时期的树木, 部分成年树的抗逆性明显较强。

3 幼年期向成年期转变过程中分子机制研究

高通量测序技术的广泛应用, 加速了植物全基因组研究进程, 最近几年不断有新的木本植物全基因组测序完成。然而对于无参考基因组的物种而言, 可进行*de novo*转录组测序研究, 即对所得测序reads进行从头组装, 进而可以获得该物种

的unigene数据库(岳桂东等2012)。相比于草本植物和模式植物, 树木通常有着更大的基因组和较长的生长发育周期, 这给树木的分子研究带来一定困难。但由于树木重要的经济用途和生态价值, 近几年在树木生长发育分子研究方面仍取得了不少进展。

3.1 幼年期向成年期转变过程中的转录调控

转录组是指在某一特定阶段, 由细胞转录出来的所有RNA的总和, 包括 mRNA和非编码RNA(non-coding RNA) (Wang等2009; Costa等2010)。转录组是连接基因组遗传信息与生物功能的蛋白质组的纽带, 转录水平的调控是基因表达调控的重要方式。其很大程度上反映的是特定条件下活跃表达的基因, 从而能有效的推断相应未知基因的功能, 揭示特定调节基因的作用机制, 在植物的幼年期向成年期转换过程研究中也发现和验证了许多功能基因。

转录因子(transcription factor), 又叫反式作用因子, 是指在真核生物中能结合到启动子区域, 通过激活或抑制靶基因转录, 从而对靶基因进行表达调控的DNA结合蛋白。转录因子根据DNA结合域的不同可分成不同的转录因子家族, 如bZIP、WRKY、MADS、AP2/EREBP、ARF (AUXIN RESPONSE FACTOR)、NAC、SPL (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE)等(Zhang等2011)。其中, SPL、MADS-box类和AP2 (APETALA2)主要与植物发育阶段转变相关。SPL家族中*AtSPL3*、*AtSPL4*、*AtSPL5*、*AtSPL9*或*AtSPL10*过表达均可促进拟南芥叶表皮毛的形成, 从而使植株过早表现出成年期的特征; 相反, 抑制SPL表达则会推迟营养阶段的转变(Wu和Poethig 2006; Wu等2009)。此外, SPL还参与了树木从幼年期向成年期转变的调控, 桉树的研究中发现, 与拟南芥*AtSPL3*和*AtSPL9*基因高度同源的*EglSPL3*和*EglSPL9*基因在成年叶片中表达量要明显高于幼年叶, 类似现象在加拿大杨(*Populus × canadensis*)中也有报道(Wang等2011)。MADS-box家族中, 过表达*DAL1*可以缩短植物营养生长时期, 并诱导开花(Carlsbecker等2004), 这在木本植物中也得到验证, 如挪威云杉(*Picea abies*)幼年期前期没有*DAL1*表达, 而幼年期中期*DAL1*开始表达, 并且随着向成年

阶段转变表达量逐渐增加(Carlsbecker等2004); 猕猴桃(*Actinidia deliciosa*)中9个MADS-box基因涉及调控花发育以及花期, 在转基因到拟南芥中, 35S::FUL-like转基因植株与对照组相比, 幼年期缩短且诱导提早开花(Varkonyi-Gasic等2011)。在甜橙(*Citrus sinensis*)和苹果(*Malus domestica*)中也有类似报道(Van der Linden等2002; Castillo等2013)。AP2家族中TOE1 (TARGET OF EAT1)、TOE2和TOE3等成员的表达高低也会影响花期时间(表1)。此外, SPL、MADS和AP2常共同作用于发育阶段转换, 如García-López等(2014)将油橄榄(*Olea europaea*)的数据与模式植物拟南芥进行同源比对后发现, 油橄榄中unigene_5004 (AP2-like转录因子家族基因)、unigene_30294 (MADS-box转录因子家族基因)和unigene_34815 (SPL转录因子家族基因)在幼年期向成年期转化过程中均发生明显变化。然而对于树木中这些转录因子的研究还需要进一步进行功能验证(表1)。

除了转录因子以外, 还有一些基因在植物发育阶段中起到重要调控作用。Asai等(2002)在水稻研究中发现与发育阶段相关的突变体MORII, MORII缺失的突变体能长时间的维持幼年期。2011年Tanaka等发现PPS (peter pan syndrome)中2个等位基因的突变体pps-1和pps-2表现出水稻在幼年期显著增长, 证明了PPS基因参与幼年期向成年期转化的调控。此外, Flowering Locus T (FT)家族基因在植物由营养阶段向生殖阶段转换过程中起

着非常重要的作用。杨树作为全基因组信息公开的木本模式植物, 在此领域研究较多, 其中发现FLOWERING LOCUS T1 (FT1)和FT2在植株由幼年期向成年期转换过程中起非常重要的作用, 能够控制诱导植株提早开花。Boehlenius等(2006)在毛果杨(*P. trichocarpa*)中首先分离出与拟南芥FT同源基因, 命名为PtFT1, 并能在转基因拟南芥和欧美山杨(*P. tremula* × *P. tremuloides*)中诱导提前开花。Hsu等(2006)在美洲黑杨(*P. deltoides*)发现另一个PdFT2基因, Pro35S::PdFT2转基因幼年杨树717-1B4 (*P. alba* × *P. tremula*)可以大大缩短幼年期, 使其植株提前诱导开花。之后, 小叶杨(*Populus simonii*)的2个直系同源基因PsFT1和PsFT2也被验证能缩短植株幼年期使其诱导提前开花(Shen等2012)。另外APETALA1 (API)和TERMINAL FLOWER1 (TFL1)在杨树中也被报道与调控花期相关, 并且FT、API和TFL1之间有着密切的关系(Flachowsky等2009; Brunner等2011)。然而, 由于多年生木本植物的遗传体系构建较为困难, 周期长等特点, 目前通过遗传学手段验证基因参与树木幼年期向成年期转化的研究尚不够深入, 这也是今后值得研究的重点。

3.2 关键miRNA以及它们的靶基因在幼年树向成年树转变过程中的调控研究

microRNA (miRNA)是一类非编码的RNA, 在植物生长发育中发挥着重要作用, 是基因表达调控的一种重要手段。植物中的第一个miRNA于

表1 miRNA156和miRNA172在幼年期和成年期植物中的功能研究

Table 1 The functional study of miRNA156 and miRNA172 in juvenile and adult stage of plants

miRNA	靶基因	物种	靶基因功能	参考文献
miR156	SPL3、SPL4、SPL5、SPL9、SPL10和SPL15	拟南芥(<i>A. thaliana</i>)	推动幼年期向成年期转换以及促进开花	Wu和Poethig 2006; Wang等2009; Wu等2009; Teotia和Tang 2015
	OsSPL	水稻(<i>Oryza sativa</i>)	缩短幼年期	Xie等2006
	PcSPL3和PcSPL9 SPL	加拿大杨(<i>Populus × canadensis</i>) 相思树(<i>Acacia confusa</i>)、桉树(<i>E. globulus</i>)、常春藤(<i>H. helix</i>)和麻栎(<i>Q. acutissima</i>)	推动幼年期向成年期转换	Wang等2011
miR172	TOE1,2,3、SMZ和SNZ	拟南芥(<i>A. thaliana</i>)	未在目标植物中验证 负调控诱导开花	Wang等2011 Aukerman和Sakai 2003; Jung等2007; Mathieu等2009; Yant等2010
	GLOSSY15和ZmTOE1	玉米(<i>Zea mays</i>)	抑制开花	Lauter等2005; Salvi等2007
	AP2-like	油橄榄(<i>Olea europaea</i>)	未在目标植物中验证	García-López等2014

2002年首先在拟南芥中发现(Park等2002)。在此基础上, miRNA的研究很快受到广泛的重视, 其中对于植物幼年期向成年期转换中miRNA动态变化研究也受到关注。

与年龄相关的miRNA研究最早是在线虫(*Caenorhabditis elegans*)中发现, miRNA——let-7和lin-4被证明参与控制线虫从幼年期向成年期的转换(Moss 2007; Wu等2009)。近几年在植物中也同样发现2个与年龄发育途径相关的miRNA156和miRNA172(Wang等2011; 虞莎和王佳伟2014)。

miRNA156作为年龄的标尺, 是连接“年龄”与植物生长发育的重要中介分子(Wang等2009; Yu等2013; 虞莎和王佳伟2014)。在拟南芥和玉米中过表达miRNA156/157能够延长幼年期(Wu和Poethig 2006; Chuck等2007; Fornara等2009)。并且发现, miRNA156/157是通过靶mRNA切割和翻译抑制来调控SPL的表达(图2), 从而在参与调控植株幼年期向成年期转化中起着重要作用。近期研究发现植物体内的糖分子是miRNA156上游调控分子, 通过糖处理可以快速降低拟南芥体内miRNA156含量(Yu等2013; Yang等2013; 虞莎和王佳伟2014)。此外, 与植物年龄相关的另一个miRNA172能抑制AP2家族中的6个成员(表1)(Aukerman和Sakai 2003; Lauter等2005; Mathieu等2009)。miRNA172与miRNA156通常表现出一种互补模式, 即随着植物年龄的递增, miRNA156减少而miRNA172增加, 并且与幼年期向成年期转换存在相关性(图2)(Wu等2009)。在加拿大杨(*P. canadensis*)中过表达miRNA156能减少靶基因SPL和miRNA172的表达, 从而延长幼年期(Wang等2011)。与此同时, Wang等(2011)对相思树(*Acacia confusa*)、*Acacia colei*、桉树、常春藤和麻栎5种树木幼年叶和成年叶片RNA进行Northern blot杂交, 发现miRNA156/157在幼年期表达量高于成年叶, 而miRNA172在成年叶

片中表达量较高。这些研究表明不论在草本植物还是木本植物中miRNA156和miRNA172表达水平呈相似趋势, 即在由幼年期向成年期转换过程中, miRNA156呈现递减趋势, 而miRNA172则递增增长(图2)。

3.3 DNA甲基化和端粒在幼年期向成年期转变过程中的作用

DNA甲基化(DNA methylation)在植物基因组防御、调控基因表达以及控制植物的生长和发育中起重要作用(Chan等2005; Xiao等2006)。植物DNA甲基化的发生和维持主要依赖于4种在结构和功能上不同的胞嘧啶甲基转移酶, 包括甲基转移酶1(MET1)、染色质甲基化酶(CMT)、重新甲基化酶(DRM)和DNA甲基转移酶2(DNMT2)家族的同系物。其中MET1对植物花期调控、形态特征等有明显影响(Finnegan等2000), 研究发现过表达*met1*突变体植物会发生脱甲基现象, 从而延迟植物开花时间(Kankel等2003)。此外, 不同植物的DNA甲基化水平不同(Wagner和Capesius 1981), 同一植物中不同组织器官的甲基化程度也不同(Zlucova等2001)。尤其, DNA甲基化水平在植物由幼年期向成年期转变过程中会发生明显变化(Fraga等2002a; Baurens等2004)。研究发现, 拟南芥幼叶DNA甲基化水平要比成年叶片低(Finnegan等1998)。同样, 随着辐射松由营养生长向生殖生长转变过程中, 基因组水平上DNA甲基化水平由30%~35%增加到60%, 而在复幼过程中DNA甲基化水平又由60%降低到40%左右(Fraga等2002b)。然而, 也有研究报告一些植物幼年苗DNA甲基化水平反而高于成年叶片(Zlucova等2001)。这些研究表明植物生长发育过程中甲基化水平会发生改变, 但不同植物甲基化改变的趋势不同, 说明DNA甲基化与植株不同的发育时期存在一定联系但并非一定呈正相关。

端粒(telomere)被认为是细胞寿命“有丝分裂

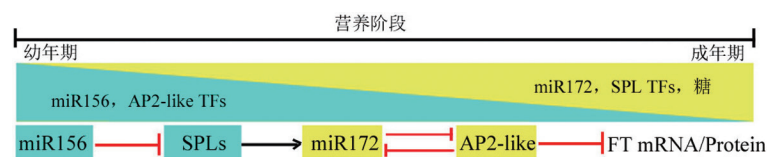


图2 植物幼年期向成年期转换miRNA156与miRNA172相互关系

Fig.2 The mutual relation of miRNA156 and miRNA172 in the juvenile to adult transition in plants

根据Wu等(2009)、Teotia和Tang(2015)文献修改。

钟”(Harley等1990), 由于细胞DNA复制时的方向必须从5'到3'方向, DNA每次复制端粒就缩短一小段(Aronen等2009), 当端粒缩短到一定长度时就引起细胞衰亡, 所以端粒长度反映细胞复制史及复制潜能。端粒酶(telomerase)属逆转录酶, 被认为与延缓衰老相关, 其功能是以自身RNA为模板, 通过其逆转录酶活性, 复制并添加端粒DNA序列到染色体末端, 从而修复延长染色体端粒DNA长度(Zhang等2006)。端粒、端粒酶与年龄之间的关系多见于动物研究, 在植物研究有少量报道。Killan等(1995)在大麦上研究发现, 成年叶端粒长度较幼胚短, 成年叶端粒长度由幼胚中的80 kb缩减到30 kb, 同样在大麦花序发育中端粒也表现为缩短(刘頔等2010; 张徐俞等2014)。植物在发育过程中, 端粒酶活性在幼胚最高, 随着胚的发育成长, 端粒酶活性逐渐下降(Fitzgerld等1996)。不同的是, 在番茄(*Solanum lycopersicum*)、女娄菜(*Melandrium album*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)和拟南芥中, 不同生长发育阶段的植物端粒长度却没有发现明显差异(Zentgraf等2000; 刘頔等2010)。目前, 对于树木年龄与端粒酶关系研究也有一些报道。对不同树龄狐尾松(*Pinus longaeva*)针叶的端粒酶活性测定, 发现树龄长较树龄短的端粒酶活性高, 在楸树(*Catalpa bungei*)和国槐(*Sophora japonica*)的叶片中也得到证实(张徐俞等2014)。然而, 也有一些相反的报道, 对银杏(*Ginkgo biloba*)研究发现, 端粒长度随树龄的增加而增加, 而端粒酶活性则随树龄(10~700年)的增加而呈下降的趋势(Liu等2007; Song等2011; 张徐俞等2014)。端粒长度随着细胞多次分裂和老化而变短, 端粒酶活性在胚胎干细胞中活性强, 这些规律在人类细胞中已经得到大量验证(Nakamura等2002)。而对于植物而言, 上述研究结果并没有表现出完全的一致性, 端粒和端粒酶与树木发育年龄的关系还需进一步研究。

4 总结与展望

树木从幼年向成年转变过程中发育调控机制一直是树木研究的热点之一。而在完成这一营养阶段过程中, 不同发育阶段的树木在营养器官的形态结构和超微结构、生理生化性能、转录因子及miRNA调控机制以及DNA甲基化水平和端粒长短等方面存在差异, 这些差异可以作为树木发育

阶段的特征标记应用于生产中(Munne-Bosch和Lalueza 2007)。大部分研究树木幼年期向成年期转变都集中于前后的差异比较, 仅通过单一的指标作为判定的标准。但树木发育会受许多内外因素影响, 应结合各因素的相互作用进行综合分析, 才能更好地解释树木发育的调控机制。

对于模式植物由幼年期向成年期转化过程中形态特征、生理生化性能变化, 尤其在分子生物学的深入, 如拟南芥中调控幼年期发育的相关基因被分离克隆, 其转基因植株可以大大缩短或延长幼年期, 提前进入成年期促使开花结果或延长幼年期。而树木的研究还很缓慢, 这不仅是由于树木幼年期过长, 而且绝大部分树木缺乏参考基因组信息, 许多调控机理无法进行深入研究。目前, 在一些树木也克隆出相关基因, 如猕猴桃中*FUL-like*基因(Varkonyi-Gasic等2011), 在转化到拟南芥中确实可以大大缩短幼年期, 然而进一步转化到目标植株中研究技术还很薄弱。这些基因在树木发育阶段转变过程中是否发挥主导作用, 以及怎样通过关键基因来调控树木的发育生长, 还需进一步深入研究。因此, 今后应继续加强转录组、小RNA、DNA甲基化以及端粒/端粒酶在树木幼年期向成年期转化过程中的功能研究, 以深入揭示树木幼年向成年转化发育的调控机制。

参考文献

- 符继红, 孙晓红, 王吉德, 褚金芳, 闫存玉(2010). 植物激素定量分析方法研究进展. 科学通报, 55 (33): 3163~3176
- 郭长花, 康向阳(2008). 树木发育中的阶段转变研究进展. 生物技术通讯, 19 (5): 784~786
- 刘頔, 宋涵, 李凤兰, 陆海(2010). 植物端粒与端粒酶研究进展. 北京林业大学学报, 32 (5): 163~167
- 虞莎, 王佳伟(2014). miR156介导的高等植物年龄途径研究进展. 科学通报, 59 (15): 1398~1404
- 岳川, 曾建明, 章志芳, 王新超, 曹红利(2012). 茶树中植物激素研究进展. 茶叶科学, 32 (5): 382~392
- 岳桂东, 高强, 罗龙海, 王军一, 许姣卉, 尹焯(2012). 高通量测序技术在动植物研究领域中的应用. 中国科学: 生命科学, 42 (2): 107~124
- 张徐俞, 王瑾瑜, 郑广顺, 张俊琦, 卢存福(2014). 四种树木端粒酶活性与树龄及叶位的相关性. 华北农学报, 29 (12): 197~201
- 张艳洁(2009). 古银杏和古槐衰弱特性的研究[硕士论文]. 北京: 首都师范大学
- Andergassen S, Bauer H (2002). Frost hardiness in the juvenile and adult life phase of ivy (*Hedera helix* L.). Plant Ecol, 161 (2): 207~213

- Aronen T, Pehkonen T, Ryyänänen L (2009). Enhancement of somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Pinus sylvestris*. *Scand J Forest Res*, 24 (5): 372~383
- Asai K, Satoh N, Sasaki H, Satoh H, Nagato Y (2002). A rice heterochronic mutant, *mori1*, is defective in the juvenile-adult phase change. *Development*, 129 (1): 265~273
- Aukerman MJ, Sakai H (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its *APETALA2*-Like target genes. *Plant Cell*, 15 (11): 2730~2741
- Basheer-Salimia R (2007). Juvenility, maturity, rejuvenation in woody plants. *Hebron Univ Res J*, 3 (1): 17~43
- Bauer H, Bauer U (1980). Photosynthesis in leaves of the juvenile and adult phase of ivy (*Hedera helix*). *Physiol Plant*, 49 (4): 366~372
- Baurens FC, Nicolleau J, Legavre T, Verdeil JL, Monteuiis O (2004). Genomic DNA methylation of juvenile and mature *Acacia mangium* micropropagated *in vitro* with reference to leaf morphology as a phase change marker. *Tree Physiol*, 24 (4): 401~407
- Boehlenius H, Huang T, Charbonnel-Campaa L, Brunner AM, Jansson S, Strauss SH, Nilsson O (2006). *CO/FT* regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. *Science*, 312 (5776): 1040~1043
- Brunner A, Sheng X, Edwards J, Fujino T, Wang CT, DiFazio S (2011). Regulation of shoot-system development in *Populus*. *BMC Proceedings*, 25 (Suppl 7): I11
- Carlsbecker A, Tandre K, Johanson U, Englund M, Engstrom P (2004). The MADS-box gene *DALI* is a potential mediator of the juvenile-to-adult transition in Norway spruce (*Picea abies*). *Plant J*, 40 (4): 546~557
- Carvalho A, Paiva J, Louzada J, Lima-Brito J (2013). The transcriptomics of secondary growth and wood formation in conifers. *Mol Biol Int*, 2013
- Castillo MC, Forment J, Gadea J, Carrasco JL, Juarez J, Navarro L, Ancillo G (2013). Identification of transcription factors potentially involved in the juvenile to adult phase transition in *Citrus*. *Ann Bot*, 112 (7): 1371~1381
- Chan SW, Henderson IR, Jacobsen SE (2005). Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Rev Genet*, 6 (5): 351~360
- Choinski Jr JS, Ralph P, Eamus D (2003). Changes in photosynthesis during leaf expansion in *Corymbia gummifera*. *Aust J Bot*, 51 (1): 111~118
- Chuck G, Cigan AM, Saeteurn K, Hake S (2007). The heterochronic maize mutant *Corngrass1* results from overexpression of a tandem microRNA. *Nat Genet*, 39 (4): 544~549
- Costa V, Angelini C, De FI, Ciccodicola A (2010). Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-Seq. *J Biomed Biotechnol*, 2010: 853916
- Darrow HE, Bannister P, Burritt DJ, Jameson PE (2001). The frost resistance of juvenile and adult forms of some heteroblastic New Zealand plants. *New Zeal J Bot*, 39 (2): 355~363
- Day JS, Jameson PS, Gould KS (1995). Cytokinin changes during vegetative metamorphosis in *Elaeocarpus hookerianus*. *Aust J Plant Physiol*, 22 (1): 67~73
- Fernández H, Fraga MF, Bernard P, Revilla MA (2003). Quantification of GA₁, GA₃, GA₄, GA₇, GA₉, and GA₂₀ in vegetative and male cone buds from juvenile and mature trees of *Pinus radiata*. *Plant Growth Regul*, 40 (3): 185~188
- Fernández-Ocaña A, García-López MC, Jiménez-Ruiz J, Saniger L, Macías D, Navarro F, Oya R, Belaj A, de la Rosa R, Corpas FJ et al (2010). Identification of a gene involved in the juvenile-to-adult transition (JAT) in cultivated olive trees. *Tree Genet*, 6 (6): 891~903
- Finnegan EJ, Genger RK, Peacock WJ, Dennis ES (1998). DNA methylation in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49 (1): 223~247
- Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES (2000). DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Curr Opin Genet Dev*, 10 (2): 217~223
- Fitzgerld MS, Mcknight TD, Shippen DE (1996). Characterization and developmental patterns of telomerase expression in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93 (25): 14422~14427
- Flachowsky H, Hanke MV, Peil A, Strauss SH, Fladung M (2009). A review on transgenic approaches to accelerate breeding of woody plants. *Plant Breeding*, 128 (3): 217~226
- Fornara F, Panigrahi KC, Gissot L, Sauerbrunn N, Ruhl M, Jarillo JA, Coupland G (2009). *Arabidopsis* DOF transcription factors act redundantly to reduce *CONSTANS* expression and are essential for a photoperiodic flowering response. *Dev Cell*, 17 (1): 75~86
- Fraga MF, Canal MJ, Rodriguez R (2002a). Phase-change related epigenetic and physiological changes in *Pinus radiata* D. Don. *Planta*, 215 (4): 672~678
- Fraga MF, Rodriguez R, Canal MJ (2002b). Genomic DNA methylation-demethylation during aging and reinvigoration of *Pinus radiata*. *Tree Physiol*, 22 (11): 813~816
- García-López MC, Vidoy I, Jiménez-Ruiz J, Muñoz-Mérida A, Fernández-Ocaña A, Rosa R, Barroso JB, Navarro F, Trelles O, Beuzón CR et al (2014). Genetic changes involved in the juvenile-to-adult transition in the shoot apex of *Olea europaea* L. occur years before the first flowering. *Tree Genetics Genomes*, 10 (3): 585~603
- Hansen DH, Steig E (1993). Comparison of water-use efficiency and internal leaf carbon dioxide concentration in juvenile leaves and phylloides of *Acacia koa* (Leguminosae) from Hawaii, estimated by two methods. *Am J Bot*, 80 (10): 1121~1125
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345: 458~460
- Holbrook NM, Putz FE (1996). Water relations of epiphytic and terrestrially rooted strangler figs in a Venezuelan palm savanna. *Oecologia*, 106 (4): 424~431
- Hsu CY, Liu Y, Luthe DS, Yuceer C (2006). Poplar FT2 shortens the juvenile phase and promotes seasonal flowering. *Plant Cell*, 18 (8): 1846~1861
- Hudson CJ, Freeman JS, Jones RC, Potts BM, Wong MM, Weller JL, Hecht VF, Poethig RS, Vaillancourt RE (2014). Genetic control of heterochrony in *Eucalyptus globulus*. *Genes Genomes Genetics*, 4: 1235~1245
- Hughes MH, Morley CB, Smith WK (2007). Coordination of anthocyanin decline and photosynthetic maturation in juvenile leaves

- of three deciduous tree species. *New Phytol*, 175 (4): 675~85
- Jones CS (1999). An essay on juvenility, phase change, and heteroblasty in seed plants. *Int J Plant Sci*, 160 (S6): S105~S111
- Jung JH, Seo YH, Seo PJ, Reyes JL, Yun J, Chua NH, Park CM (2007). The *GIGANTEA*-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of *CONSTANS* in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19 (9): 2736~2748
- Kankel MW, Ramsey DE, Stokes TL, Flowers SK, Haag JR, Jeddeloh JA, Riddle NC, Verbsky ML, Richards EJ (2003). *Arabidopsis MET1* cytosine methyltransferase mutants. *Genetics*, 163 (3): 1109~1122
- Katerji N, van Hoorn JW, Hamdy A, Mastrorilli M (2003). Salinity effect on crop development and yield, analysis of salt tolerance according to several classification methods. *Agric Water Manage*, 62 (1): 37~66
- Kijidani Y, Ohshiro N, Iwata D, Nagamine M, Nishiyama T, Matsuura J, Koga S (2014). Variation of indole acetic acid (IAA) amounts in cambial-region tissues in 7- and 24-year-old sugi (*Cryptomeria japonica*) trees. *J Wood Sci*, 60 (3): 177~185
- Kilian A, Stiff C, Kleinhofs A (1995). Barley telomeres shorten during differentiation but grow in callus culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92 (21): 9555~9559
- Lauter N, Kampani A, Carlson S, Goebel M, Moose SP (2005). *microRNA172* down-regulates *glossy15* to promote vegetative phase change in maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102 (26): 9412~9417
- Lavee S, Haskal A (1993). Partial fruiting regulation of olive trees (*Olea europaea* L.) with paclobutrazol and gibberellic acid in the orchard. *HortScience*, 71: 83~86
- Lawson EJ, Poethig RS (1995). Shoot development in plants: time for a change. *Trends Genet*, 11 (7): 263~268
- Li X, Wu HX, Southerton SG (2010). Seasonal reorganization of the xylem transcriptome at different tree ages reveals novel insights into wood formation in *Pinus radiata*. *New Phytol*, 187 (3): 764~776
- Li X, Wu HX, Southerton SG (2011a). Transcriptome profiling of wood maturation in *Pinus radiata* identifies differentially expressed genes with implications in juvenile and mature wood variation. *Gene*, 487 (1): 62~71
- Li X, Wu WX, Southerton SG (2011b). Transcriptome profiling of *Pinus radiata* juvenile wood with contrasting stiffness identifies putative candidate genes involved in microfibril orientation and cell wall mechanics. *BMC Genomics*, 12 (10): 491~500
- Liu D, Qiao N, Song H, Hua X, Du J, Lu H, Li F (2007). Comparative analysis of telomeric restriction fragment lengths in different tissues of *Ginkgo biloba* trees of different age. *J Plant Res*, 120 (4): 523~528
- Mathieu J, Yant LJ, Murdter F, Kuttner F, Schmid M (2009). Repression of flowering by the miR172 target SMZ. *PLoS Biol*, 7: e1000148
- Mellerowicz EJ, Riding RT, Greenwood MS (1995). Nuclear and cytoplasmic changes associated with maturation in the vascular cambium of *Larix laricina*. *Tree Physiol*, 15 (7-8): 443~449
- Moss EG (2007). Heterochronic genes and the nature of developmental time. *Curr Biol*, 17 (11): R425~R434
- Munne-Bosch S, Lalueza P (2007). Age-related changes in oxidative stress markers and abscisic acid levels in a drought-tolerant shrub, *Cistus chusii* grown under Mediterranean field conditions. *Planta*, 225 (4): 1039~1049
- Nakamura K, Izumiyama-Shimomura N, Sawabe M, Arai T, Aoyagi Y, Fujiwara M, Tsuchiya E, Kobayashi Y, Kato M, Oshimura M et al (2002). Comparative analysis of telomere lengths and erosion with age in human epidermis and lingual epithelium. *J Invest Dermatol*, 119 (5): 1014~1019
- Park W, Li J, Song R, Messing J, Chen X (2002). CARPEL FACTORY, a dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol*, 12 (17): 1484~1495
- Prins CL, Vieira IJC, Freitas SP (2010). Growth regulators and essential oil production. *Braz J Plant Physiol*, 22 (2): 91~102
- Rossi S, Deslauriers A, Anfodillo T, Carrer M (2008). Age-dependent xylogenesis in timberline conifers. *New Phytol*, 177 (1): 199~208
- Salvi S, Sponza G, Morgante M, Tomes D, Niu X, Fengler KA, Meeley R, Ananiev, EV, Svitashv S, Bruggemann E et al (2007). Conserved noncoding genomic sequences associated with a flowering-time quantitative trait locus in maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 (27): 11376~11381
- Schaller GE (2012). Ethylene and the regulation of plant development. *BMC Biol*, 10 (1): 9
- Schwarz S, Grande AV, Bujdoso N, Saedler H, Huijser P (2008). The microRNA regulated SBP-box genes *SPL9* and *SPL15* control shoot maturation in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 67 (1-2): 183~195
- Shen L, Chen Y, Su X, Zhang S, Pan H, Huang M (2012). Two FT orthologs from *Populus simonii* Carrière induce early flowering in *Arabidopsis* and poplar trees. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 108: 371~379
- Song H, Liu D, Li F, Lu H (2011). Season- and age-associated telomerase activity in *Ginkgo biloba* L. *Mol Biol Rep*, 38 (3): 1799~1805
- Sorce C, Giovannelli A, Sebastiani L, Anfodillo T (2013). Hormonal signals involved in the regulation of cambial activity, xylogenesis and vessel patterning in trees. *Plant Cell Rep*, 32 (6): 885~898
- Spicer R, Groover A (2010). Evolution of development of vascular cambia and secondary growth. *New Phytol*, 186 (3): 577~592
- Tanaka N, Itoh H, Sentoku N, Kojima M, Sakakibara H, Izawa T, Itoh J, Nagato Y (2011). The *COP1* ortholog *PPS* regulates the juvenile-adult and vegetative-reproductive phase changes in rice. *Plant Cell*, 23 (6): 2143~2154
- Teotia S, Tang G (2015). To bloom or not to bloom: role of microRNAs in plant flowering. *Mol Plant*, 8 (3): 359~377
- Van der Linden CG, Vosman B, Smulders MJ (2002). Cloning and characterization of four apple *MADS* box genes isolated from vegetative tissue. *J Exp Bot*, 53 (371): 1025~1036
- Varkonyi-Gasic E, Moss SM, Voogd C, Wu R, Lough RH, Wang YY, Hellens RP (2011). Identification and characterization of flower-

- ing genes in kiwifruit: sequence conservation and role in kiwifruit flower development. *BMC Plant Biol*, 11 (1): 72~86
- Wagner I, Capesius I (1981). Determination of 5-methylcytosine from plant DNA by high-performance liquid chromatography. *Biochim Biophys Acta*, 654 (1): 52~56
- Wang JW, Park MY, Wang LJ, Koo Y, Chen XY, Weigel D, Poethig RS (2011). MiRNA control of vegetative phase change in trees. *PLoS Genet*, 7 (2): 199~212
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, 10 (1): 57~63
- Woodall GS, Dodd IC, Stewart GR (1998). Contrasting leaf development within the genus *Syzygium*. *J Exp Bot*, 49 (318): 79~87
- Wu G, Park MY, Conway SR, Wang JW, Weigel D, Poethig RS (2009). The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell*, 138 (4): 750~759
- Wu G, Poethig RS (2006). Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by *miR156* and its target *SPL3*. *Development*, 133 (18): 3539~3547
- Xiao W, Custard KD, Brown RC, Lemmon BE, Harada JJ, Goldberg RB, Fischer RL (2006). DNA methylation is critical for *Arabidopsis* embryogenesis and seed viability. *Plant Cell*, 18 (4): 805~814
- Xie KB, Wu CQ, Xiong LZ (2006). Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice. *Plant Physiol*, 142: 280~293
- Yang L, Xu M, Koo Y, He J, Poethig RS (2013). Sugar promotes vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* by repressing the expression of *MIR156A* and *MIR156C*. *eLife*, 2: e00260
- Yant L, Mathieu J, Dinh TT, Ott F, Lanz C, Wollmann H, Chen X, Schmid M (2010). Orchestration of the floral transition and floral development in *Arabidopsis* by the bifunctional transcription factor APETALA2. *Plant Cell*, 22 (7): 2156~2170
- Yu S, Cao L, Zhou CM, Zhang TQ, Lian H, Sun Y, Wu J, Huang J, Wang GD, Wang JW (2013). Sugar is an endogenous cue for juvenile-to-adult phase transition in plants. *eLife*, 2: e00269
- Yuan D (1993). Studies on the relationship between the degree of juvenility and cell ultrastructure in prince rupprecht larch (*Larix principis-rupprechtii*) I. Embryo, annual shoots in 3-year old and 12-year old trees. *J Beijing Fores Univ*, 2: 31~40
- Yuan D (1995). Studies on the relationship between the degree of juvenility and cell ultrastructure in *Larix principis-rupprechtii* II. The annual shoots in the upper and lower crown. *J Beijing Fores Univ*, 4: 1~11
- Zentgraf, U, Hinderhofer K, Kolb D (2000). Specific association of a small protein with the telomeric DNA-protein complex during the onset of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 42 (3): 429~438
- Zhang H, Jin J, Tang L, Zhao Y, Gu X, Gao G, Luo J (2011). PlantTFDB 2.0: update and improvement of the comprehensive plant transcription factor database. *Nucleic Acids Res*, 39 (Suppl 1): D1114~D1117
- Zhang L, Tamura K, Shin-ya K, Takahashi H (2006). The telomerase inhibitor telomestatin induces telomere shortening and cell death in *Arabidopsis*. *Biochim Biophys Acta*, 1763 (1): 39~44
- Zluvovala J, Janousek B, Vyskot B (2001). Immunohistochemical study of DNA methylation dynamics during plant development. *J Exp Bot*, 52 (365): 2265~2273
- Zobel BJ, van Buijtenen JP (2012). *Wood Variation: Its Causes and Control*. Berlin: Springer Science & Business Media