

宋小飞, 芮伟康, 陶书田. 不同浓度外源钙对梨果实石细胞的影响[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(14): 148–152.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.14.034

不同浓度外源钙对梨果实石细胞的影响

宋小飞, 芮伟康, 陶书田

(南京农业大学园艺学院, 梨工程技术研究中心, 江苏南京 210095)

摘要:以田间多年生砀山酥梨果实及其诱导的愈伤组织为试验材料, 通过施用不同浓度 CaCl_2 (0、0.25%、0.50%、0.75%), 探究抑制石细胞形成的适宜钙浓度。结果表明, 一定浓度的钙离子能够降低肉桂醇脱氢酶的活性, 抑制木质素的合成, 降低石细胞含量, 且以 0.50% CaCl_2 效果最佳。不同种类及配比的激素对愈伤组织的诱导及继代培养效果不同, 筛选出 $\text{MS} + 2.0 \text{ mg/L } 2,4\text{-D} + 0.5 \text{ mg/L } 6\text{-BA} + 0.5 \text{ mg/L NAA}$ 为最适的砀山酥梨果实诱导培养基, $\text{MS} + 2.0 \text{ mg/L } 2,4\text{-D} + 1.0 \text{ mg/L } 6\text{-BA} + 1.0 \text{ mg/L KT}$ 为最适的继代培养基。与田间材料和愈伤组织为研究对象的试验结果显示一致, 由此推测外界因素对钙调控木质素合成的影响较小, 适宜浓度的 CaCl_2 能够显著降低田间梨果实中的石细胞含量, 提高食用品质。

关键词:砀山酥梨; 石细胞; 愈伤组织; 钙; 木质素; 肉桂醇脱氢酶

中图分类号: S661.201 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)14-0148-05

作为我国第三大果树, 梨树在我国具有悠久的栽培历史, 其栽培面积和产量均居世界前列。砀山酥梨 (*Pyrus bretschneideri* Rehd) 原产于我国安徽省宿州市砀山县, 是我国最重要的梨树资源之一^[1], 其丰产性好, 果实品质优良、耐贮性好^[2], 深受广大种植者及消费者的喜爱。但近些年来, 由于品种退化或栽培管理不善等原因, 砀山酥梨果实石细胞含量增多, 果肉变粗, 果肉多渣, 严重影响其风味和品质^[3-4]。以木质素为主要组成成分的石细胞是一种木质化的细胞, 其含量是影响梨果实品质的关键因素之一。通过施用矿质元素可以抑制梨果实木质素合成、减少石细胞含量。王纪忠等研究了施用硼酸、氯化锌等矿质元素对降低梨果实石细胞含量的作用, 并取得了一定的成果^[5-6]。

钙 (Ca) 是细胞壁、细胞膜的重要组成成分, 在维持细胞壁、细胞膜的结构和功能稳定性、减少膜的损伤等方面具有重要作用^[7]。同时, 钙作为细胞功能调节的第 2 信使, 能够参与植物体内各种生理生化反应, 调节植物细胞对各种胁迫信号的转导过程^[8-9]。目前, 关于钙元素促进植物生长及改善果实品质的报道较多^[10-15]。但关于探索适合抑制砀山酥梨果实生长发育过程中石细胞生成的钙浓度却鲜有报道。

梨树作为多年生植物, 在田间试验处理时, 由于多种不确定因素的存在, 试验结果的准确性受到影响, 并且单一影响因素很难控制。而离体愈伤组织为试验研究提供了一个可控的环境, 使任何单一因素的研究成为可能^[16]。为了探究抑制梨果实石细胞形成的适宜钙浓度, 本研究通过对田间砀山酥梨果实及愈伤组织施用不同浓度的氯化钙, 分析木质素含量及

相关酶活性的变化, 以期通过栽培技术抑制石细胞形成和提高果实食用品质提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试肥料为无水 CaCl_2 , 折合含钙量约 36%。MS 培养基 (不加琼脂和蔗糖) 由青岛高科园海博生物技术有限公司生产; 蔗糖由西陇化工股份有限公司生产; 琼脂由北京索莱宝科技有限公司生产。

本研究于 2017 年在江苏省高邮市夏集镇梨果园进行, 选用健康优良、长势旺盛、管理水平一致的 50 年生砀山酥梨果树为试验材料。愈伤组织诱导材料为砀山酥梨盛花后 21 ~ 35 d 无任何处理的果实, 从田间采集放置冰盒中, 当天运回实验室置于 4 ℃ 冰箱中保存。田间试验设 4 个处理组, 分别含 CaCl_2 量为 0 (CK)、0.25%、0.50%、0.75%。每个处理重复 3 次, 单株小区, 完全随机区组排列。在梨生长发育期间喷施叶面 3 次, 分别是在盛花期、坐果期和生理落果期后 2 周。每次喷施量以叶面滴水为度, 其他管理措施同常规管理方法。采样从第 2 次喷施钙肥之后开始, 定期采样至果实成熟, 每次随机采 20 ~ 30 个 (幼果期适当多采), 所采梨果实及时放入带有冰袋的采样盒中, 当天带回实验室。除部分果实直接用于生理指标的测定外, 其余果实去皮后将果肉切碎混合均匀, 经液氮速冻后贮存于 -80 ℃ 冰箱保存, 用于后续试验。

1.2 试验方法

1.2.1 砀山酥梨果实愈伤组织试验体系的建立 将采回的幼果置于流水中冲洗 10 min。在超净工作台内, 先用 75% 乙醇处理幼果 1 min, 然后用无菌水洗 3 遍, 再用 8.5% 次氯酸钠处理 9 min, 最后用无菌水洗 4 遍。使用镊子和手术刀去皮, 切成薄片, 置于诱导培养基上培养 (表 1)。将诱导出的愈伤组织转接到添加不同激素种类及配比的继代培养基 (表 2) 上, 每 5 d 测定愈伤组织生长量, 测定公式为愈伤组织生长量 (g) = 当天测定时愈伤组织鲜质量 - 接种时愈伤组织鲜质

收稿日期: 2018-04-26

基金项目: 新疆生产建设兵团南疆重点产业创新发展支撑计划 (编号: 2017DB006)。

作者简介: 宋小飞 (1992—), 男, 山东威海人, 硕士研究生, 主要从事果树生理与分子生物学研究。E-mail: 1608299022@qq.com。

通信作者: 陶书田, 博士, 副教授, 主要从事果树生理与分子生物学研究。E-mail: taost@njau.edu.cn。

量。多次继代后筛选出生长一致、活力旺盛的愈伤组织作为试验材料,分别培养在含有不同 CaCl_2 浓度[0(CK)、0.25%、0.5%、0.75%]的培养基上。

本试验所用的基本培养基为 MS 培养基,琼脂 0.75%,蔗糖 3%,pH 值 5.75~5.80,培养基装瓶后在 121 ℃ 下高温灭菌 20 min,于(25±1) ℃ 条件下培养。

表 1 愈伤组织诱导培养基

编号	2,4-D (mg/L)	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)
1	3.0	2.0	—
2	3.0	1.0	—
3	2.5	1.0	—
4	2.0	1.0	—
5	2.0	0.5	—
6	2.0	1.0	1.0
7	2.0	1.0	0.5
8	2.0	0.5	0.5

注:2,4-D 为 2,4-二氯苯氧乙酸;6-BA 为 6-苄氨基腺嘌呤;NAA 为萘乙酸。

表 2 愈伤组织继代培养基

编号	2,4-D (mg/L)	6-BA (mg/L)	KT (mg/L)	NAA (mg/L)
1	2	1	1	—
2	2	1	—	1
3	—	1	1	2

注:KT 表示激动素。

1.2.2 愈伤组织钙含量的测定 采用微波消解仪(Ethos T, Milestone 公司,意大利)结合电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP, Optima 2100DV, Perkin Elmer 公司,美国)测定继代培养 10 d 的愈伤组织中的钙含量。称取烘干的愈伤组织 0.1 g,放在消煮管中,在消煮管的外管中加入超纯水 8 mL,再向消煮管中加入硝酸 2 mL,在 110 ℃ 环境下消煮 10 min 之后,依次升温至 130 ℃ 和 150 ℃,消煮 10 min,最后于 280 ℃ 环境下消煮 1 h。将液体在 50 mL 容量瓶中定容,采用电感耦合等离子体发射光谱仪测定。

1.2.3 木质素含量的测定 准确称取 0.01 g 果肉(愈伤组织)粉末样品,用 95% 无水乙醇充分研磨,并定容至 5 mL,10 000 g 下离心弃上清液,先用 95% 乙醇清洗沉淀 3 次,再用乙醇:正己烷=1:2(体积分数)溶液冲洗 3 次,烘干。加入 2 mL 25% 溴乙酞醋酸溶液,于 70 ℃ 保温 30 min,加入 0.9 mL 2 mol/L 的 NaOH 溶液终止反应,另加 5 mL 乙酸和 0.1 mL 7.5 mol/L 的氯化羟胺,用乙酸定容至 10 mL,利用多功能酶标仪(Bio-Tex Cytation 3 公司,意大利)于 280 nm 处测定吸光值,并通过木质素标准品(Sigma-Aldrich 公司,美国)曲线查得木质素含量^[17]。

1.2.4 石细胞含量的测定 石细胞含量的测定参照 Syros 等人的方法^[17],并稍加改动,具体操作步骤如下:取大小均匀一致的 3 个果实(幼果适当增加),去掉果皮,取食用部分,按四分法取样,准确称取 100 g,置于-20 ℃ 低温冰箱冷冻 24 h。样品取出置于室温自动解冻后,加入 200 mL 蒸馏水,并用组织捣碎机(1 000~1 500 r/min)连续捣碎 3 min。将匀浆转移到 1 000 mL 的烧杯中,加入 700 mL 蒸馏水,用玻璃棒不断搅拌

1 min,静置 3 min,使石细胞充分沉降在底层。倒出上层悬浮液,将沉淀物悬浮于 0.5 mol/L 盐酸中 30 min,弃去漂浮物,用蒸馏水反复漂洗 5~6 次,将前几次漂浮倾出的悬浮液收集并漂洗。收集所得的石细胞用粗滤纸过滤,分离得到纯净的石细胞,烘干至恒质量,称量,重复 3 次,取平均值。

1.2.5 石细胞组织定位 石细胞的组织定位采用徒手切片法,将梨果实沿横切面切开,然后迅速滴加 35% 浓盐酸在横切面上,约 2 min 后滴加 1% 间苯三酚显色 30 s^[18]。

1.2.6 肉桂醇脱氢酶的提取与活性测定 将 Goffner 等人的方法优化后进行酶液的提取与酶活性的测定^[19]。具体操作如下:取少量冷冻样品,用液氮充分研磨至粉末状,取 0.4 g 研磨粉末,加入适量磷酸缓冲液(0.1 mmol/L, pH 值 6.25,含 15 mmol/L 巯基乙醇、2% 聚己二醇、1% 聚乙烯吡咯烷酮、20 mmol/L 氧化型辅酶 II),涡旋 5 min,于 4 ℃ 条件下 18 000 g 离心 15 min,上清液全部转入刻度试管,记录其准确体积后进行活性测定。

1 mL 酶反应体系包括 800 μL 反应液(含 10 mmol/L 氧化型辅酶 II、5 mmol/L 反式肉桂酸),200 μL 粗酶液,以 800 μL 反应液加 200 μL 磷酸缓冲液为对照。将反应液混匀后放入 37 ℃ 恒温水浴,30 min 时立即加入 0.5 mL 1 mol/L HCl 终止反应。之后 4 ℃ 条件下 5 000 g 离心 5 min 以除去变性蛋白,于 340 nm 处测定上清液的吸光度。酶活性以 1 min 吸光度增加 0.001 为 1 个酶活性单位。

1.3 数据分析

运用 Excel 进行数据整理,SPSS 20.0 进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 梨果实愈伤组织的诱导与继代培养

将灭菌后的梨果实切成小块,接种到含有不同种类及配比的培养基上进行诱导,不同种类诱导培养基的诱导率见表 3。8 号培养基(MS+2.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA)诱导率最高,达 95%,是最适的砀山酥梨果实愈伤组织诱导的培养基。

将培养 25 d 的初代愈伤组织接种到不同类型的继代培养基上培养,细胞不断分裂增殖,愈伤组织不断增大(图 1)。在所设定的 3 种类型培养上,愈伤组织均有所增大,且各培养基中愈伤组织增殖率差异明显。培养至 30 d 时 1 号培养基(MS+2.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L KT)上愈伤组织质量增加最大,增加了 1.59 g,而 2 号和 3 号培养基仅分别增加了 1.15、1.01 g。此外,2 号和 3 号培养基中的愈伤组织在 25 d 就进入缓慢生长期,而 1 号培养基中的愈伤组织在 30 d 才进入缓慢生长期。综上所述,1 号培养基愈伤组织增殖量大,继代周期长,是砀山酥梨最适的继代培养基,本试验材料选择在 1 号培养基上连续继代多次后形成的乳白色、活力旺盛、生长速度快的愈伤组织。

2.2 不同浓度钙处理下愈伤组织钙含量的变化

利用连续继代多次的愈伤组织作为材料,测定不同浓度钙处理下,继代培养 10 d 的愈伤组织中的钙含量,结果如图 2 所示。4 组处理的愈伤组织钙含量存在显著差异,愈伤组织中的钙含量与培养基中的钙离子浓度呈正相关关系。CK 中的钙含量为 5.95 mg/L,而含有 0.75% CaCl_2 培养基中的愈

表 3 不同培养基对砀山酥梨幼果果肉愈伤组织诱导比较

培养基编号	果实愈伤组织诱导率 (%)
1	58
2	81
3	88
4	72
5	76
6	87
7	91
8	95

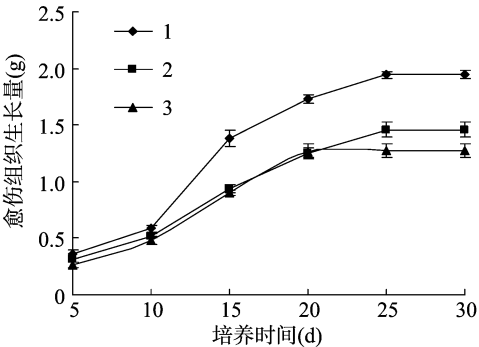
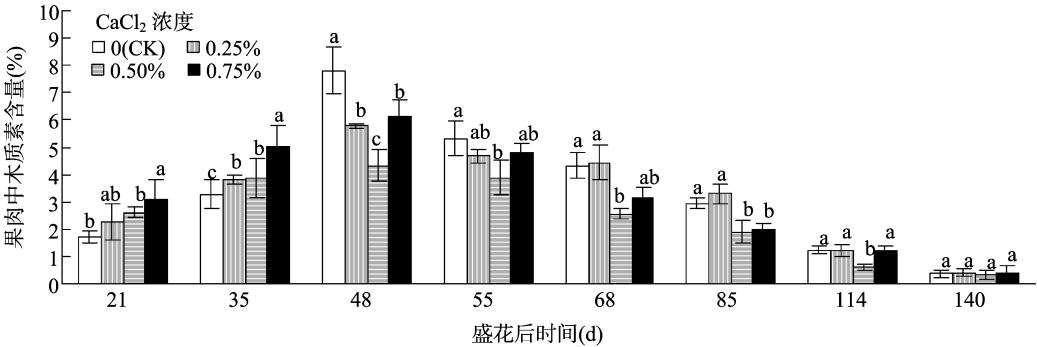


图1 愈伤组织继代培养筛选



柱上同一时期不同小写字母表示各处理在 5% 水平上差异显著, 图 4、图 5、图 7、图 8 同

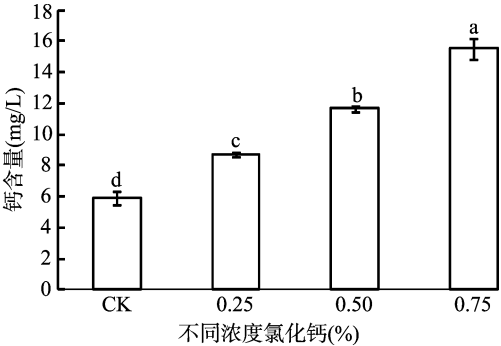
图3 不同浓度钙肥对砀山酥梨果实发育过程果肉中木质素含量变化的影响

不同浓度 CaCl_2 对果肉中木质素的形成影响不同。盛花后 48 d, 3 种不同浓度 CaCl_2 处理的果肉中木质素含量均显著低于 CK, 0.50% CaCl_2 处理的果肉中木质素含量为 CK 的 55.64%。

如图 4 所示, 愈伤组织生长过程中木质素含量呈下降趋势, 继代培养至 20 d 时, 0.50% CaCl_2 处理组愈伤组织中木质素含量显著下降。在继代培养 10 d 时, 0.25% CaCl_2 处理的愈伤组织中木质素含量最高, 但与其他处理之间差异不显著。0.50% CaCl_2 处理的愈伤组织中木质素含量始终低于其他处理, 在继代培养周期结束时, 该处理中的木质素含量最低, 仅为对照的 57.8%。

2.4 砀山酥梨果实发育过程中石细胞含量的变化

砀山酥梨果实中石细胞含量的变化趋势与果肉中木质素含量的变化趋势相似, 石细胞含量随着果实不同发育阶段而发生变化(图 5)。CK 中石细胞含量在果实发育初期逐渐增加, 从盛花后 21 d 开始果实内石细胞含量呈上升趋势, 盛花



柱上不同小写字母表示各处理在 5% 水平上差异显著

图2 不同浓度氯化钙处理下愈伤组织钙含量的测定

伤组织钙含量达到 15.51 mg/L, 是对照组的 2 倍多。培养基中过高浓度的钙含量会导致愈伤组织生长受抑制, 含 0.75% CaCl_2 培养基中的愈伤组织在 15 d 时便停止生长, 出现褐化现象并最终死亡。

2.3 木质素含量的变化

砀山酥梨果肉中木质素含量在果实生长发育过程中呈现先上升后下降的趋势(图 3)。CK 中在幼果期, 木质素逐渐积累, 盛花后 48 d 果肉中木质素含量达到最大值 7.8%, 而后果肉中木质素含量逐渐降低, 直至果实成熟时降到最低值。

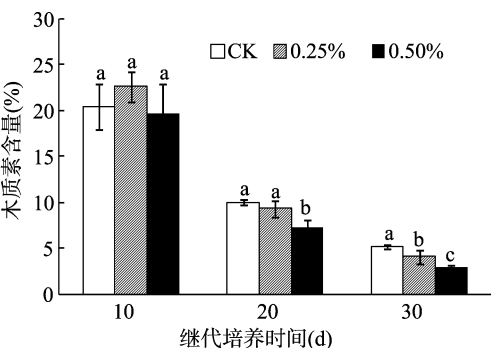


图4 不同浓度钙处理下愈伤组织木质素含量的测定

后 48 d 达到峰值 15.43%; 而后果肉中石细胞含量逐渐减少, 盛花后 85 d 石细胞含量迅速减少, 直到果实成熟时果实中的石细胞含量降到最低。

喷钙处理的果实中的石细胞含量与 CK 的变化趋势相似, 但不同浓度 CaCl_2 在果实发育过程中对石细胞含量影响

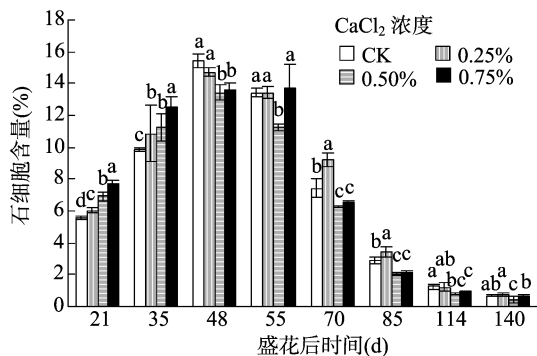


图5 不同浓度钙肥对砀山酥梨果实发育过程石细胞含量变化的影响

不同。在果实发育前期,不同浓度 CaCl_2 处理果实中的石细胞含量都高于 CK。在盛花后 48 d,不同浓度 CaCl_2 处理的果实中石细胞含量也都达到峰值,但比 CK 中石细胞含量少,其中 0.50% CaCl_2 处理显著降低了果实中的石细胞含量,仅为 13.42%。果实成熟时,0.50% CaCl_2 处理的果肉中石细胞含量最少,为 0.46%;而 0.25% CaCl_2 处理石细胞含量最高,为 0.73%。

2.5 果实石细胞分布观察

木质素与间苯三酚-盐酸试剂反应呈红色,该反应是以木质素中的松柏醇结构为基础而产生的^[20]。图 6-A 显示的是幼果期石细胞染色情况,CK 与 0.25% 和 0.75% CaCl_2 处理在显色上差异不明显,而在 0.50% CaCl_2 处理中,可以明显看出石细胞染色较少,说明 0.5% CaCl_2 处理在幼果期明显减少了石细胞的形成。图 6-B 显示的是成熟果期石细胞染色情况,0.50% 和 0.75% CaCl_2 处理的梨中被染成红色的细胞明显少于 CK 和 0.25% CaCl_2 处理,且 0.25% CaCl_2 处理与 CK 中被染色细胞数量差异不明显。这说明 0.5% 和 0.75% CaCl_2 处理减少了成熟果中石细胞的含量和密度,并且 0.5% CaCl_2 处理的效果更显著。

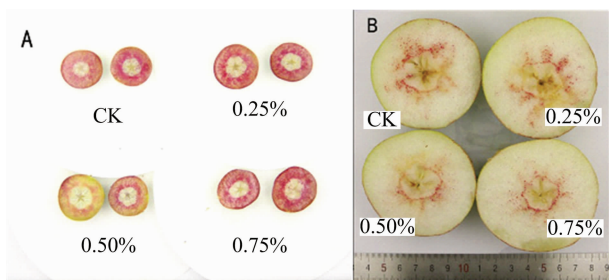


图6 砀山酥梨不同发育时期果实石细胞染色观察

2.6 肉桂醇脱氢酶活性的变化

由图 7 可知,肉桂醇脱氢酶(CAD)活性随着砀山酥梨果实发育先逐渐降低,后于盛花后 70 d 和 85 d 稍有提高,最后在果实成熟期活性降到最低。在果实发育初期,CAD 活性较高,随后快速下降。0.75% CaCl_2 处理在幼果期提高了 CAD 活性,与 CK 相比,盛花后 48 d 3 种浓度 CaCl_2 处理均降低了 CAD 活性,0.50% CaCl_2 处理抑制效果最显著。果实成熟期,0.50% CaCl_2 处理的 CAD 活性最高,是对照的 4.76 倍。

与田间果实中 CAD 活性变化趋势相似,CAD 活性在继代培养的愈伤组织中一直下降(图 8),不同浓度 CaCl_2 均能显著抑制愈伤组织中的 CAD 活性。在继代培养过程中,与其

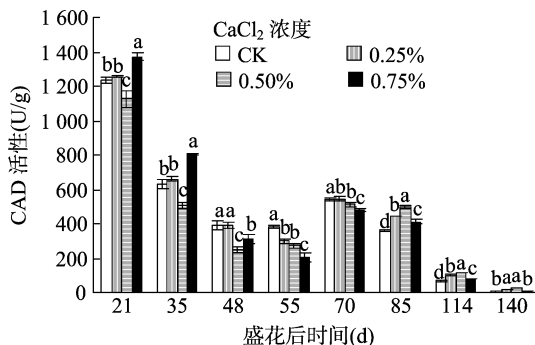


图7 钙对不同发育时期砀山酥梨果实 PME 活性的影响

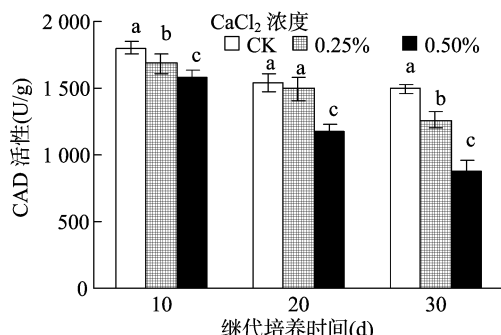


图8 钙对砀山酥梨果实愈伤组织 PME 活性的影响

他处理相比,0.50% CaCl_2 处理的愈伤组织中的 CAD 活性一直最低,且具有显著性差异。

3 结论与讨论

现有研究基本以田间整株植物作为材料来开展抑制梨果实石细胞形成的研究,但田间试验存在许多不确定因素,会影响试验结果的准确性。Wang 等以砀山酥梨为试验材料,研究不同果袋对梨果实石细胞形成的影响发现,果实套袋能够明显减少石细胞含量^[21];而王丹阳研究却发现,套袋显著提高了梨果实中的石细胞含量^[22]。造成这种差异的原因,除了与选用不同的果袋有关,还可能与田间管理操作及当地气候条件等因素有关。本研究针对田间生产过程中钙离子喷施浓度不确定、吸收效果难以控制等现象,利用愈伤组织为试验材料,来验证田间试验的准确性,以减少自然环境变化对梨果实木质素合成的干扰。但由于植物组织培养受外界影响的因素较小,在培养基中施加钙元素不会流失,本研究 0.75% CaCl_2 处理的培养基中,愈伤组织的钙含量过高,并因此出现愈伤组织生长受抑制和褐化严重的现象,因此考虑 0.75% CaCl_2 处理的培养基中愈伤组织不具备作为试验材料的条件。以 0.25% 和 0.50% CaCl_2 处理的培养基中的愈伤组织为研究对象,与田间处理条件相对应,对不同浓度钙影响梨果实石细胞的形成进行分析。

石细胞是一种厚壁组织细胞,由木质素在初生细胞壁上沉积并通过细胞壁次生加厚而形成,由于具有硬化的壁而被称为石细胞。木质素是梨果实石细胞的主要成分,石细胞中的木质素含量高达 29.83%^[20]。本研究发现,田间果实中木质素及石细胞含量在果实发育中期(盛花后 48 d)达到最大值,这一结果与 Ma 等的研究结果^[23-24]一致,说明果实发育中期是石细胞形成的关键时期,此时抑制木质素合成相关酶

的活性,会导致梨果实中石细胞含量减少。0.50% CaCl_2 处理的愈伤组织中的木质素含量,在生长过程中一直最低,而该处理的田间果实中木质素及石细胞含量,从果实发育中期到成熟期始终低于其他处理。果实切片染色观察可用于分析石细胞在果实中的分布情况,结果表明,无论是在幼果期还是在成熟期 0.50% CaCl_2 处理中的石细胞分布密度最小^[18]。结合田间试验和以愈伤组织为材料的试验可以推测,0.50% CaCl_2 能够在梨果实生长发育期间抑制木质素合成,降低果实中的石细胞含量,是田间喷施的适宜钙浓度。

CAD 作为植物次生代谢特别是木质素合成的关键酶,作用于木质素合成反应的最后一步,能通过催化羧基肉桂醛还原为相应的醇类调节木质素单体合成,其活性的高低影响木质素单体的合成。Lu 等在莱阳梨贮藏期间喷施 0.50% CaCl_2 发现,钙处理能够明显降低 CAD 活性,抑制木质素在果肉中的形成,减少贮藏期间果实中的石细胞含量^[25]。本试验结果表明,不同浓度钙处理下,愈伤组织 CAD 活性持续下降,0.50% CaCl_2 处理的田间果实中的 CAD 活性,在石细胞形成的关键时期被显著抑制。而 0.50% CaCl_2 处理的田间果实 CAD 活性在生长发育中后期稍有提高,这可能与自然条件下,激素、机械损伤及真菌等外界因素诱导 CAD 活性发生改变有关^[26]。

适宜浓度 CaCl_2 在梨果实发育过程中能够显著减少木质素的合成,并在石细胞形成的关键时期抑制 CAD 活性,降低梨果实中石细胞含量。此外,以砀山酥梨果实愈伤组织为试验材料的结果,进一步验证了田间试验的准确性。综上所述,在实际生产中,外界因素对钙调控木质素合成的影响较小,外源喷施 0.50% CaCl_2 能够明显减少梨果实中石细胞含量。当然,参与木质素合成过程的酶有十多种,不同浓度外源钙对各种酶的综合影响所导致的木质素含量的变化,还亟待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Wei H, Liu L, Wang M D, et al. Differentially expressed genes related to the formation of russet fruit skin in a mutant of ‘Dangshansuli’ pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) determined by suppression subtractive hybridization[J]. Euphytica, 2014, 196(2): 285–297.
- [2] 徐义流. 砀山酥梨[M]. 北京:中国农业出版社, 2009: 1–3.
- [3] 李玲, 蔡永萍, 刘小阳. 梨果实的石细胞[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(5): 629–632.
- [4] 刘小阳, 李玲, 宗梅, 等. 梨果实石细胞含量分布及其对梨品质的影响[J]. 安徽农业大学学报, 2004, 31(1): 104–106.
- [5] 王纪忠, 陶书田, 齐开杰, 等. 喷硼对梨果硼、钙含量及石细胞形成相关酶活性的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2011, 17(5): 1250–1255.
- [6] 李疆, 任莹莹, 吐尔逊·阿依, 等. 氯化锌对库尔勒香梨果实品质的影响[J]. 经济林研究, 2009, 27(2): 16–19.
- [7] Palta J P. Role of Calcium in plant responses to stresses; linking basic research to the solution of practical problems[J]. HortScience, 1996, 31(1): 51–57.
- [8] 朱晓军, 杨劲松, 梁永超, 等. 盐胁迫下钙对水稻幼苗光合作用及相关生理特性的影响[J]. 中国农业科学, 2004, 37(10): 1497–1503.
- [9] 孙大业, 郭艳林, 马力耕. 细胞信号传导[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [10] 王晓佳, 贾永华, 王春良. 不同钙肥处理对金冠苹果品质的影响[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(35): 62–64.
- [11] 陈桂芬. 施钙肥可提高春甜橘产量和品质[J]. 农家顾问, 2014(2): 31.
- [12] 文旭. 不同有机钙肥对库尔勒香梨果实相关品质的影响研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2012.
- [13] Raese J T, Drake S R, Staiff D C. Influence of different Calcium materials and spray timing on mineral composition, yield, fruit quality, and control of fruit disorders of ‘Anjou’ pears[J]. Journal of Plant Nutrition, 1995, 18(4): 823–838.
- [14] 李中勇, 高东升. 喷钙对设施油桃产量和品质的影响[J]. 落叶果树, 2007, 39(3): 25–26.
- [15] 李丙智, 梁俊, 张林森, 等. CA2000 钙宝叶肥在富士苹果树上应用研究[J]. 西北林学院学报, 2001, 16(3): 26–28.
- [16] 赵娟. 梨果实愈伤组织对致病真菌侵染的生理响应机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- [17] Syros T, Yupsanis T, Zafiriadis H, et al. Activity and isoforms of peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus cretica* L. [J]. Journal of Plant Physiology, 2004, 161(1): 69–77.
- [18] Tao S T, Khanizadeh S, Zhang H, et al. Anatomy, ultrastructure and lignin distribution of stone cells in two *Pyrus* species [J]. Plant Science, 2009, 176(3): 413–419.
- [19] Goffner D, Joffroy I, Grima-Pettenati J. purification and characterization of isoforms of cinnamyl alcohol dehydrogenase from eucalyptus, xylem[J]. Planta, 1992, 188(1): 48–53.
- [20] 陶书田. 梨(*Pyrus*)果实石细胞的结构成分分析及相关酶基因的克隆[D]. 南京: 南京农业大学, 2009.
- [21] Wang B, Zhang N, Yan C C, et al. Bagging for the development of stone cell and metabolism of lignin in *Pyrus bretschneideri* ‘Dangshan Suli’ [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2013, 40(3): 531–539.
- [22] 王丹阳. 木质素代谢相关酶在梨石细胞合成中的作用[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
- [23] Ma C, Zhang H P, Li J M, et al. Genome-wide analysis and characterization of molecular evolution of the *HCT* gene family in pear (*Pyrus bretschneideri*) [J]. Plant Systematics and Evolution, 2017, 303(1): 71–90.
- [24] Cao Y P, Han Y H, Meng D D, et al. Structural, evolutionary, and functional analysis of the class III peroxidase gene family in Chinese pear (*Pyrus bretschneideri*) [J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 1874.
- [25] Lu G L, Li Z J, Zhang X F, et al. Expression analysis of lignin-associated genes in hard end pear (*Pyrus pyrifolia* Whangkeumbae) and its response to calcium chloride treatment conditions [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2015, 34(2): 251–262.
- [26] Kim S J, Kim K W, Cho M H, et al. Expression of cinnamyl alcohol dehydrogenases and their putative homologues during *Arabidopsis thaliana* growth and development: lessons for database annotations [J]. Phytochemistry, 2007, 68(14): 1957–1974.