

陈满霞,蒋玉蓉,於金生. 小麦春化作用研究进展[J]. 江苏农业科学,2019,47(24):6-12.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.24.002

小麦春化作用研究进展

陈满霞, 蒋玉蓉, 於金生

(浙江农林大学农业与食品科学学院/浙江省农作物品质改良重点实验室,浙江临安 311300)

摘要:小麦是重要的粮食作物,春化作用能够促使小麦加速开花,是小麦发育过程中的一个重要质变过程。春化作用在一定遗传背景下,由多基因控制且受多种因素(如温度、光照等)影响。近年来,人们对小麦的春化作用进行了大量的研究,对小麦春化作用的调控机制及作用方式有了一定的认识,小麦的春化作用主要由 *Vrn-1*、*Vrn-2*、*Vrn-3* 和 *Vrn-4* 等 4 类主效基因调控,它们彼此作用,共同影响着小麦的冬春性。基于前人的研究,本文从小麦春化理论、春化条件及春化特性、春化过程中的生理变化和春化基因等 4 个方面对小麦的春化作用进行概述;此外,总结了小麦春化研究中存在的一些问题,并结合笔者自身试验提出了一些研究思路。

关键词:春化作用;小麦;春化特性;生理变化;春化基因

中图分类号: Q945.41;S512.101

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2019)24-0006-06

小麦(*Triticum aestivum* L.)是主要的粮食作物之一,它提供的热量和蛋白质占到人类营养成分的 20% 以上。小麦在发育前期需要通过适宜的低温处理来促使其加速开花,一般把由低温引起的春化称为低温春化。按照原产地及春化特点的差异,可将小麦种类划分为强冬性、冬性、半冬性和春性 4 种类型^[1-2],不同的类型在春化过程中对温度和光照的需求不同,各种生理和生化代谢也存在一定差异。小麦的春化作用主要由 *Vrn-1*、*Vrn-2*、*Vrn-3* 和 *Vrn-4* 等 4 类基因调控,这 4 类基因位点的显隐性组成调控着小麦的冬性或者春性^[3-6]。

目前人们在分子水平上对小麦春化作用的调控机制及作用方式有了一定的认识,已分离并克隆了春化基因 *Vrn-1*、*Vrn-2* 及 *Vrn-3*,发现了基因 *Vrn-4*^[3-6],并对这些基因位点的等位变异、不同变异类型组合与麦区适应性的关系进行了研究^[7]。但仍有一些问题亟需解决,如对正处于春化过程中的小麦植株细胞内的生理生化过程还未能有较清晰的认识;*Vrn-4* 基因的调控机制及与其他春化基因的互作方式尚需进一步探究。研究分析小麦春化作用的分子机制及响应机制,可为培育高产、优质、高抗的小麦品种提供理论基础,具有极大的现实意义。本文将从春化理论、春化条件及春化特性、春化过程中的生理变化和春化基因等 4 个方面阐述小麦春化研究的现状。

1 小麦春化理论

19 世纪中期,Allen 等在图书中记载了催芽后的麦类作

物种子经低温处理,春播能够抽穗的现象^[8]。20 世纪初期,苏联李森科(Lysenko)提出“春化”一词^[9],即小麦经过人工低温处理后,能够加速抽穗的现象。一些学者认为,春化作用是指小麦必须进行连续的低温处理,才能正常开花,进而完成营养生长向生殖生长的过渡,它是小麦发育过程中一个重要的质变过程^[10]。简而言之,春化就是通过适当的低温处理促进小麦开花,使其具备正常生长的能力。

2 小麦春化条件及春化特性

2.1 春化条件

2.1.1 温度 根据起源和春化特征的不同,可将小麦种类划分为强冬性、冬性、半冬性和春性 4 种类型^[1-2],不同类型在低温环境下对具体温度和时间的需求不同。相对来说,小麦的产地由北到南,植株所需春化温度逐渐升高,所需春化时间变短^[11]。崔继林等在 1953—1954 年对华东地区 104 个小麦品种的春化特征进行了研究,认为将春化温度在 0~3℃(或 2~4℃)、春化时间为 30~40 d 的品种归为冬性小麦,如果春化温度是 10~12℃,则无论春化时间多久都不能使其抽穗;将春化温度在 0~12℃、春化时间不超越 10 d 的归为春性小麦品种^[1]。金善宝认为,春性和过渡性品种对春化温度要求不严格(8~15℃),冬小麦特别是强冬小麦,在生育早期完成春化反应需要比较严格的春化条件^[10]。赵大中等曾报道,在冷处理条件相同的情况下,冬性越强的小麦品种,完成春化反应所需的时间越长^[12];曹广才等在研究中发现,超强冬性小麦品种在未经过低温处理的条件下,植株维持在营养生长阶段,表现为抽穗延迟、无效分蘖变多等,但也能够抽穗开花^[13]。苗果园等研究表明,未经过低温春化的小麦,不管冬性强弱,只要给予植株足够的生长时间,它们最终均能抽穗且灌浆良好^[14]。

由此可见,低温处理是影响小麦穗部发育的重要因素,不同的小麦品种对温度的需求并没有明显的界限,而是一个缓慢的量变积累过程^[10]。在低温诱导条件得不到满足时,春化过程必须经过漫长的温度积累,从而使抽穗期延迟。

收稿日期:2018-09-20

基金项目:浙江省“十三五”重点研发项目(编号:2016C02050-9-9)。

作者简介:陈满霞(1994—),女,山东菏泽人,硕士研究生,研究方向为小麦基因组学研究。E-mail:2802666944@qq.com。

通信作者:於金生,博士,讲师,主要从事植物功能基因组学研究。

E-mail:jinshyu@zafu.edu.cn。

2.1.2 光照 光照是植物生长发育的必要条件,是影响植物开花的重要环境因子,日照长度则关系到植株的花芽分化、抽穗和结实。小麦属于长日照植物,不同的小麦品种对日照时间的响应不同。早在 1935 年,McKinney 等就初次发现了“短日春化”现象,即把未春化的小麦植株在其发育早期置于短日照下,然后放到长日照下,能够加速幼穗分化,也就是说短日照处理可以代替低温春化的需要^[15]。随后有研究表明,某些小麦品种只有在短日照下生长受到抑制时,短日春化才能代替低温春化^[16];一些秋季播种的小麦品种需在短日照下生长,这种特性就是短日春化性^[17]。苗果园等研究表明,一般强冬性小麦品种在一定温度的积累下,会对光照长度表现敏感且具备短日春化性;冬性品种对低温和光长都较敏感,不存在短日春化效应;而有些春性品种对光照长度敏感,但对低温基本没有任何反应^[14]。曹广才等认为,在冬小麦的生育早期以短日照条件为宜^[18],温度与光照虽不可相互替代,但在一定范围内,它们的生态效应具有互相抵偿的作用。

2.1.3 其他环境条件 小麦的生长发育还受其他外界环境因素的影响,其春化过程除了要有低温和短日照外,还需要有足够的氧气、适宜的水分以及糖类等不可或缺的营养物质。研究表明,如果发芽的小麦种子经过干燥脱水后,当水分含量低于 40% 时,即使给予足够的氧气和水分,种子也不能通过春化^[19]。小麦的离体胚在有氧气、水分和糖类的前提下,才能发生春化响应^[20-21]。

总之,小麦的春化受许多环境因素的影响,不同环境因子的协同作用影响小麦的春化和开花诱导过程,因此,研究小麦春化时所需的条件,对于小麦正常生长具有重要的意义。

2.2 春化特性

春化是小麦的主要特征之一,是影响小麦区域分布和生态适应性的重要因素^[22],是引种、用种的重要依据,直接影响到小麦的发育过程,如幼穗发育早晚、抽穗期等^[23-24]。春化特性被认为是一种连续的数量性状,主要以小麦花原基的分化及成花进程为基本标记^[25]。不同小麦品种在春化阶段对低温的不同需求使其具有不同的发育特性,通常以叶片数、分蘖数、株高、小穗数等来判断小麦品种的春化特性。

研究表明,春化作用会使小麦的最终叶片数减少^[26-27]。张锦熙等认为,可将小麦开花前划分为 3 个生育阶段,即基本营养生长阶段、可变营养生长阶段和可变生殖生长阶段,其中可变营养生长阶段的长短用该阶段主茎上长出的叶片数表示,它的多少是鉴定小麦品种冬、春性的指标之一,随着小麦品种冬性的增强,在不同播期下这一阶段的叶片数变异幅度会变大^[28]。王士英认为,某些小麦品种在生育早期会因低温春化,导致出叶数减少,从而使主茎的总叶片数相应减少,这是小麦对于生态环境的一种适应方式^[29]。Flood 等认为,随着小麦冬性程度的增加,小穗数一般呈增长趋势^[30],还有学者认为小麦的小穗数可能由其他基因调控^[31]。穗分化进程与叶片生长对温度的响应不同,低温春化效应主要诱导的是小穗原基(二棱)的分化^[28],而叶片数的多少则与积温有一定的关系。

当春化温度适宜时,春化作用能够促进小麦的花芽分化,但目前还没有某种生理标记被普遍用来评判小麦的春化反应过程。探究小麦的春化特性,可为人们在分子水平上认识春

化作用的分子机制、遗传规律提供重要的理论基础。

3 小麦春化过程中的物质变化

通过春化反应过程,小麦生理生化代谢会发生很大的变化,包括碳水化合物及蛋白质代谢、核酸代谢、酶和激素的变化及相关基因的表达等。谭克辉等对小麦春化过程中的生理和生化物质变化作了大量的研究,认为小麦春化是多种代谢过程相互交替的综合过程,至少有 3 个子过程,即糖的氧化、蛋白质代谢和核酸代谢^[32]。这 3 种代谢过程并非完全独立,而是按照一定的先后顺序相互交替进行。

3.1 碳水化合物变化

研究表明,植物的春化作用与茎尖中的碳水化合物代谢具有紧密的联系^[33],其中糖类不仅作为植物细胞代谢中的碳源,用以合成其他含碳物质,还直接参与花器官的发生过程,并在植物开花中起重要作用^[34-36]。糖类对小麦春化反应速度的影响在低温处理的初期(0~14 d)^[37],该时期植物的呼吸速率明显增强,生长点会进行充分的有氧呼吸和代谢^[38]。刘丽杰等认为,低温会使冬小麦胚中的蔗糖含量明显升高,而在同样低温条件下,春小麦中蔗糖的含量变化不大^[39]。研究发现,只有当植株茎尖中的蔗糖、还原糖和可溶性糖等碳水化合物的含量达到一定水平时,生长点方能受低温刺激进行春化,且当它们的含量增加时,春化时间会相应变短^[37,40]。

3.2 蛋白质变化

蛋白质的代谢过程是小麦能否顺利通过低温春化的重要一步^[32]。研究表明,冬小麦经低温处理后,蛋白质合成速度加快^[41],且该现象与花芽分化的特异蛋白表达有关,特异蛋白的表达是基于某些特定基因在转录水平上表达存在差异产生的^[42-43]。此外,这些特异蛋白质仅存在于春化植株中,在脱春化和未春化的植株中不存在^[42],且低温诱导开花与相关 mRNA 的出现具有一定的次序性^[44]。对春化过程中植物蛋白质代谢的进一步研究表明,在低温处理过程中,可溶性蛋白质含量随着叶龄的增大先增加后降低^[45];不同冬小麦品种的可溶性蛋白质含量不同,强冬性品种的含量通常较低^[46]。小麦春化过程中的功能性蛋白质,如过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、酯酶(EST)等可溶性蛋白同工酶,在春化过程中也发生了相应的代谢变化^[47]。杨肇驯等认为,冬小麦在春化过程中,POD 含量在不同时期变化是不均一的,春化中期,POD 的变化较为显著,春化处理 21 d 后,可溶性蛋白的含量迅速增加,逐渐接近未春化处理的春小麦^[48]。

3.3 核酸变化

20 世纪 50 年代,李淑俊等以冬小麦北系 3 号及小红芒 2 个品种为试材,探究了小麦春化反应过程中胚内核酸含量的变化,结果表明,在春化处理期间,随着春化时间的延长,胚中各种核酸含量均增加^[49]。有研究表明,核酸代谢主要在小麦低温处理的中后期进行^[32,50]。此外,Sarhan 等认为,小麦春化后核糖体 RNA 和可溶性 RNA 的含量增加,有利于植株感受低温刺激通过春化,在处理 30~50 d 的过程中,发现了新的 mRNA^[51]。目前,运用 mRNA 差异显示技术及减法杂交等技术,已获得了与春化作用相关的 DNA 序列^[52-54]。赵大中等曾以冬小麦品种燕大 1817 为试材,利用 mRNA 差异显示

技术,设置不同的春化处理来检测胚芽内 mRNA 的变化,发现并克隆了 1 个春化特异表达基因,该基因仅在春化 20 d 这一关键期表达,而在未春化、春化 4 d、脱春化期不表达^[12]。

小麦春化反应中的各个代谢过程相互交替且反应复杂,目前,对于正处于春化过程中的植株细胞内的各个生理生化代谢过程还未能有较清晰的认识。对小麦春化过程中的各种物质变化进行分析,可为认识春化作用提供资料和信息,为理解低温诱导开花提供切入点,同时在分子水平上,为春化基因的克隆奠定基础。

4 小麦春化基因

目前,小麦的春化作用主要由 4 类基因调控,分别是 *Vrn-1*、*Vrn-2*、*Vrn-3* 和 *Vrn-4*,其中 *Vrn-1*、*Vrn-3* 和 *Vrn-4* 使小麦表现为春性生长习性,而 *Vrn-2* 能够抑制开花,使小麦表现为冬性生长习性^[3-6]。*Vrn-1* 基因包括 3 个直系同源基因:*Vrn-A1*、*Vrn-B1* 和 *Vrn-D1*,分别位于 5A、5B 和 5D 染色体上,与 *Vrn-B1* 和 *Vrn-D1* 相比,*Vrn-A1* 对春化作用表现最不敏感^[55-57]。*Vrn-2* 基因包含 *Vrn-A2*、*Vrn-B2* 和 *Vrn-D2* 3 个基因位点,它们分别被定位在 5A、4B 和 4D 染色体上^[5]。*Vrn-3* 基因位于染色体 7A、7B、7D 上,由 *Vrn-A3*、*Vrn-B3*、*Vrn-D3* 组成^[6,58]。*Vrn-4* 基因被定位在六倍体春小麦的 5D 染色体上,被命名为 *Vrn-D4*^[3,59-60]。这些基因位点之间互相作用,共同影响小麦的春化特性。

4.1 *Vrn-1* 基因

Vrn-1 基因,也称为 *TaVRT-1*,在低温诱导下促进小麦开花,它可以编码与拟南芥 *API/FRUITFULL* 家族同源的 MADS-box 转录因子^[61-62],一系列 MADS-box 调节分生组织的特异性^[63],控制顶端分生组织从营养生长向生殖生长转变^[4,61,64]。六倍体小麦包含 A、B、D 3 个染色体组,各染色体组中 *Vrn-1* 基因的表达量有所差异,*Vrn-A1* 基因对 *Vrn-B1* 和 *Vrn-D1* 具有上位性效应^[56]。*Vrn-1* 基因的显性等位性主要表现为该基因启动子区碱基的插入、缺失或突变^[4,65];在二倍体小麦中,*Vrn-1* 基因的缺失能够使植株长久不开花^[66]。

普通小麦 *Vrn-1* 基因的等位变异类型较多,目前已在 *Vrn-A1* 位点发现了 *Vrn-A1a*、*Vrn-A1b* 及 *Vrn-A1c* 等多种显性等位基因变异类型,它们使小麦的生长习性表现为春性,*Vrn-A1a*、*Vrn-A1b* 是启动子区域的变异类型,而 *Vrn-A1c* 为第一内含子的变异类型^[4,56-67]。*Vrn-A1a* 由于发生了折叠回文结构元件的插入和启动子序列的复制,在启动子区域有 131 bp 与 43 bp 或 222 bp 的碱基插入^[7,64]。*Vrn-A1b* 的突变是由于在 Maquis 等品种的启动子区域,具有多个单核苷酸多态位点(SNP),以及在启动子的 5'端非翻译区(5' UTR)区缺失了 20 bp 的碱基^[4,64]。*Vrn-A1c* 表现为显性,它的基因序列与野生型隐性等位基因 *vrn-A1* 一致,但在 *vrn-A1* 第一内含子区有一个 5 504 bp 碱基片段的缺失^[56]。*Vrn-B1* 包括 *Vrn-B1* 和 *vrn-B1* 2 种等位基因位点的变异,与隐性等位基因 *vrn-B1* 相比,*Vrn-B1* 可以使小麦的生长习性表现为春性,其原因是在第一内含子区域缺失了 1 个 6 850 bp 的碱基片段^[7,56-57,68]。*Vrn-D1* 基因位点的等位变异是由于内含子的大片段缺失,包括 *Vrn-D1* 和 *vrn-D1* 2 种类型,隐性基

因 *vrn-D1* 的第一内含子缺失了 4 235 bp 的碱基片段^[56-57]。

在不同国家和地区的小麦种植区,*Vrn-1* 基因的等位基因变异类型不同,出现的基因频率也有所差别^[69]。Goncharov 等对世界各国小麦品种的研究发现,*Vrn-A1* 在西伯利亚和欧洲小麦品种中出现的频率较高,*Vrn-D1* 在亚洲品种中出现的频率较高,而在中国和印度地区特定的品种内出现频率较高的为显性基因 *Vrn-B3*^[70]。姜莹等认为,在我国小麦十大生态栽培区,*Vrn-D1* 均表现为显性,而 *Vrn-Ala* 和 *Vrn-B1* 在冬小麦区没有分布^[71]。Zhang 等对我国的小麦品种进行研究发现,冬麦区的春性品种主要携带 *Vrn-D1* 基因,而所有春小麦区的春性早熟品种主要携带 *Vrn-A1a* 基因,且春化位点显性频率的顺序依次为 *Vrn-D1*、*Vrn-A1*、*Vrn-B1*、*Vrn-B3*^[7]。刘兴舟对山东地区的小麦品种进行研究表明,该地区的春化基因 *vrnA1*、*vrnB1* 和 *vrnD1* 均为隐性基因,决定了该地区冬小麦种植的主导地位^[72]。此外,有研究发现,未进行春化时,冬小麦隐性基因 *vrn-1* 的表达量较低,春小麦显性基因 *Vrn-1* 的表达量最高;经过春化后,冬小麦隐性基因 *vrn-1* 的表达量明显有所增加^[73]。由此可知,春小麦的 *Vrn-1* 基因无需春化就能表达,而冬小麦的 *vrn-1* 基因需要经过低温刺激才得以表达。

4.2 *Vrn-2* 基因

目前,关于 *Vrn-2* 基因分子机制的研究很多,*Vrn-2* 基因是一个开花抑制因子,*Vrn-2* 的表达受到低温春化和短日照的影响。Yan 等以二倍体小麦为材料,对 *Vrn-2* 基因进行定位克隆发现,*Vrn-2* 基因编码一个 *ZCCT* 基因,该基因包括 1 个锌指结构域和 1 个 CCT 功能域,*ZCCT-1* 和 *ZCCT-2* 基因串联组成 *ZCCT*,二者的基因序列有 76% 的相似性^[4-5]。在六倍体小麦中,*ZCCT-1* 又包含了 3 种等位变异:*ZCCT-A1*、*ZCCT-B1* 和 *ZCCT-D1*^[36]。Yan 等研究发现,*Vrn-2* 基因 *ZCCT-2* 编码区序列没有差异,但在 CCT 功能区存在突变,使得这一编码区的第 35 个密码子编码的色氨酸取代了精氨酸^[5],取代的原因可能是突变破坏了甲基化位点,从而使 CCT 功能区蛋白质间的相互作用受到一定的影响^[4]。假如第 35 个密码子处的精氨酸/色氨酸发生突变或 *ZCCT-1*/*ZCCT-2* 中的基因缺失,则小麦品种的生长特性均表现为春性,相反时则表现为冬性特性。Szűcs 等认为,二倍体冬小麦品种中至少存在 1 个功能性的 *ZCCT-1* 基因,隐性 *vrn-2* 基因的所有 *ZCCT* 基因都缺失或 CCT 区域的保守氨基酸发生突变,就会使小麦品种表现为春性,进一步证明了 *ZCCT-1* 是 *Vrn-2* 的候选基因^[74]。

Takahashi 等认为,*Vrn-2* 基因与 *Vrn-1* 的上位性互作效应较为明显,二者共同参与一个开花调控途径^[75]。有研究表明,春化处理前,*Vrn-2* 的表达量相对较高,*Vrn-1* 基因则较低^[5,76];在短日照下,*Vrn-1* 的表达量并没有随着 *Vrn-2* 表达量的降低而升高,只有在长日照条件下才出现逐渐上升的趋势^[77]。由此可以说明,短日照条件下可能还有其他的基因抑制了 *Vrn-1* 的表达;长日照条件下,如果 *Vrn-2* 基因缺失,即使没有进行春化,花芽也能分化。

4.3 *Vrn-3* 基因

研究表明,*Vrn-3* 基因与大麦的 *HvFT* 基因、拟南芥的 *FLOWER LOCUS T (FT)* 基因同源,它们完全连锁^[6,78],且 *FT*

基因能够促进植物开花^[79-81]。*Vrn-3* 基因受长日照和低温诱导促进开花,它与 *Vrn-1*、*Vrn-2*、其他春化基因及光周期基因共同参与植株的开花途径^[78]。参照大麦的 *HvFT* 基因序列,Yan 等设计并开发了小麦春化基因 *Vrn-3* 的分子标记,通过对小麦早花品种和晚花品种 *Vrn-3* 基因位点的差异分析发现,*Vrn-B3* 存在 *Vrn-B3* 和 *vrn-B3* 2 种类型的等位变异类型,其编码区序列并没有出现差异,小麦早花和晚花可能是由于在 *vrn3* 起始密码子上游区域约 591 bp 处有 1 个 5 295 bp 碱基的反转录转座子插入^[6],这一差异可能会导致 *Vrn-2* 与 *Vrn-3* 之间的相互作用受阻^[82]。此外,Chen 等在我国地方小麦品种中发现,*Vrn-B3* 基因上存在 2 个新的等位变异类型,分别是 *Vrn-B3b* 和 *Vrn-B3c*,其中 *Vrn-B3b* 在 5'端非翻译区有一个 890 bp 碱基片段的插入,使植株延迟开花,而 *Vrn-B3c* 在 5'端非翻译区除了有一个 5 300 bp 碱基片段的插入外,还有 2 个小片段的缺失,但启动子的活性并没有受到明显的影响^[83]。在拟南芥中,长日照条件下,*FT* 基因在叶片中的表达量升高^[79],随后 *FT* 蛋白转移到茎尖分生组织促进开花^[84]。在小麦中也发现了这种 *FT* 蛋白由叶片转移到茎尖的现象,说明 *Vrn-3* 基因能够促进小麦开花,可能与这一现象有关。研究发现,在小麦中,*FT* 蛋白与转录因子 TaFDL2 结合,共同促进 *Vrn-1* 基因的表达,从而使植株能够正常开花^[85]。*Vrn-3* 基因通过调控 *Vrn-1* 来影响花期^[55],*Vrn-3* 编码的蛋白可与 TaFDL2 转录因子相互作用,而 TaFDL2 与 *Vrn-1* 的启动子区域结合以促进开花^[86]。

4.4 *Vrn-4* 基因

1971 年,Pugsley 发现了春化基因 *Vrn-4*,并在创制基因系 TDD、TDE、TDC 和 TBD 后,创制了近等基因系 TDF^[55]。之后,Yoshida 等将 *Vrn-4* 定位在 5D 染色体短臂上靠近着丝粒区域,距离长臂上已定位到的 *Vrn-D1* 基因至少 50 cM 的距离^[59],且 *Vrn-4* 基因与 *Vrn-A1* 具有较高的序列同源性^[87]。有研究认为,*Vrn-D4* 基因可能位于由 *Vrn-1*、*Vrn-2*、*Vrn-3* 基因组成的反馈调节网络的上游,也可能是其中的组成部分之一^[88]。研究表明,*Vrn-D4* 调控开花的分子机制与 *Vrn-B1*、*Vrn-D1* 类似,但春化效应不如 *Vrn-A1*^[26,89]。若春化时间相对较短,则带有 *Vrn-B1*、*Vrn-D1* 基因的植株花期早于带有纯合 *Vrn-D4* 基因的植株^[59]。有关 *Vrn-D4* 基因的调节机制、等位变异及其作用方式尚需进一步研究。

4.5 春化基因间的互作

小麦需经过足够时间的低温处理和光照才能开花,各个春化基因位点之间的联系较为复杂,它们协同作用,构成了一个反馈调节网络。春化基因 *Vrn-1*、*Vrn-2*、*Vrn-3* 都存在多种等位基因变异类型,这些等位基因位点显隐性的组成调控着小麦的春性或冬性,而在不同国家或地区的小麦中,等位基因的分布是不同的^[7]。

在普通小麦中,显性基因 *Vrn-1* 的表达时间较早,隐性基因 *vrn-1* 较晚^[76]。在发育前期,显性基因 *Vrn-A1* 的表达会抑制 *Vrn-2* 的表达,而在发育后期,*Vrn-A1* 对 *Vrn-2* 的抑制作用使得 *vrn-B1* 和 *vrn-D1* 得以表达^[57]。Li 等以冬小麦为材料进行研究发现,若植株带有显性基因 *Vrn-3*,那么在 *Vrn-1* 表达量上升的情况下,可以促使小麦提前开花^[85],原因可能是 *Vrn-3* 基因促进 *Vrn-1* 的表达,而 *Vrn-1* 的表

达可间接抑制 *Vrn-2* 的表达。研究表明,在长日照条件下 *Vrn-2* 基因的表达量上升,而短日照抑制了 *Vrn-2* 基因的表达^[76,90]。Distelfeld 等认为,小麦的 *Vrn-3* 基因与其他春化基因及环境因子相互作用,共同调控小麦的花期;在长日照条件下,*Vrn-2* 基因的表达水平上升,*Vrn-3* 受到抑制不表达,从而使得 *Vrn-3* 无法诱导 *Vrn-1* 的表达,进而导致 *Vrn-1* 在叶片及根尖中的表达量非常低,植株停留在营养生长阶段^[91]。进入冬季后,温度降低,日照时间缩短,植物进行春化作用,*Vrn-1* 表达量上调,*Vrn-2* 的表达受到抑制,*Vrn-3* 则开始发挥作用;春季日照时间变长,*Vrn-3* 受光照的刺激,表达量开始升高,进而促进了 *Vrn-1* 的表达,最终促进小麦植株开花^[91-92]。

5 展望

对春化作用的研究有利于揭示小麦发育转变的机制及遗传规律,对小麦的生产具有极为重要的意义。在小麦育种中,只有充分了解小麦品种的春化发育特点、春化模式和反应机制,才能了解小麦春化发育理论与育种的关系,从而提高小麦品种的利用效率、扩大品种的利用范围。目前,在分子水平上,前人已对小麦春化作用的调控机制及作用方式进行了许多研究,并取得了一定的成果,但尚有一些问题亟需解决,如小麦春化过程中的生理生化代谢还需进一步探究,*Vrn-4* 基因的调控机制尚不明确或者还存在其他未发现的春化基因,这些春化基因间的互作关系还缺乏深入研究。

小麦的春化作用是极其复杂的过程,在已有的生理生化基础上,结合生物信息学、基因组学、蛋白质组学、遗传学及计算机模拟等学科知识对其进行研究,将推进对小麦的春化特性、物质代谢及分子机制等的完整认识。此外,传统的小麦杂交育种具有选择效率低、周期长等缺点,而通过构建植物表达载体获得转基因小麦植株,能够快速有效地将小麦春化特性进行特异性遗传改良,同时可为进一步研究春化基因的分子机制、加快育种进程奠定基础,对小麦的引种、育种具有重大的意义。

相信随着多组学的不断发展、春化试验体系的完善以及小麦春化作用研究的不断深入和全面,人们对小麦春化作用的调控机制和分子机制的认识也会更加清晰。

参考文献:

- [1] 崔继林,薛淑伦,钱以丰. 华东区小麦品种春化阶段发育的研究[J]. 植物学报,1955,4(3):245-254.
- [2] 尹 钧,曹卫星. 中外科品种光温互作效应比较研究[J]. 华北农学报,2000,15(2):72-77.
- [3] Goncharov N P. Genetics of growth habit (spring vs winter) in common wheat; confirmation of the existence of dominant gene *Vrn4* [J]. Theoretical and Applied Genetics,2003,107(4):768-772.
- [4] Yan L, Helguera M, Kato K, et al. Allelic variation at the *VRN-1* promoter region in polyploid wheat [J]. Theoretical and Applied Genetics,2004,109(8):1677-1686.
- [5] Yan L L, Loukoianov A, Blechl A, et al. The wheat *VRN2* gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization [J]. Science, 2004,303(5664):1640-1644.
- [6] Yan L, Fu D, Li C, et al. The wheat and barley vernalization gene

- VRN3* is an orthologue of FT [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103 (51):19581–19586.
- [7] Zhang X K, Xiao Y G, Zhang Y, et al. Allelic variation at the vernalization genes *Vrn - A1*, *Vrn - B1*, *Vrn - D1*, and *Vrn - B3* in Chinese wheat cultivars and their association with growth habit[J]. Crop Science, 2008, 48(2):458–470.
- [8] Allen R L, Allen L F. New American farm book[M]. New York:O. Judd Company, 1908.
- [9] Lysenko T D. Heredity and its variability[M]. New York:King's Crown Press, 1946.
- [10] 金善宝. 中国小麦品种志(1962—1982)[M]. 北京:农业出版社出版, 1986.
- [11] 曹广才. 强春性小麦品种春化反应[J]. 中国农业气象, 1988, 9 (3):8–11.
- [12] 赵大中, 陈 民, 种 康, 等. 运用差异显示法分离冬小麦春化作用相关 cDNA 克隆[J]. 科学通报, 1998, 43(9):965–968.
- [13] 曹广才, 吴东兵, 姜子英. 冬小麦春播的田间春化条件[J]. 北京农学院学报, 1988, 3(1):1–5.
- [14] 苗果园, 王士英. 温光互作对不同生态类型小麦品种发育效应的研究 I. 品种最长、最短苗穗期及温光敏感性分析[J]. 作物学报, 1993, 19(6):489–496.
- [15] Mckinney H H, Sando W J. Earliness of sexual reproduction in wheat as influenced by temperature and light in relation to growth phases[J]. Journal of Agricultural Research, 1935, 51(7):621–641.
- [16] Koyama K, Hatano H, Nakamura J, et al. Characterization of three *VERNALIZATION INSENSITIVE3 - like (VIL)* homologs in wild wheat, *Aegilops tauschii* Coss [J]. Hereditas, 2012, 149(2):62–71.
- [17] Gott M B. Vernalization of green plants of a winter wheat [J]. Nature, 1957, 180(4588):714–715.
- [18] 曹广才, 李家修, 张成琦, 等. 肥麦春化过程中的短目光周期效应和非春化作用[J]. 山地农业生物学报, 1987, 2(1):1–17.
- [19] 林 坚, 汪晓峰, 景新明, 等. 超干小麦种子抗脂质过氧化的效果[J]. 种子, 2002(2):4–6.
- [20] Michaels S D, Amasino R M. Loss of *FLOWERING LOCUS C* activity eliminates the late – flowering phenotype of *FRIGIDA* and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization[J]. Plant Cell, 2001, 13(4):935–941.
- [21] 殷桂香, 王 瑾, 徐惠君, 等. 几个小麦基因型苗期抗旱性鉴定及相关生理指标分析[J]. 麦类作物学报, 2009, 29(2):319–323.
- [22] 杨宗渠, 尹 钧, 周 冉, 等. 冬前积温和春化处理对不同春化发育特性小麦品种幼穗分化的效应[J]. 核农学报, 2008, 22(4):503–509.
- [23] 谷冬艳. 黄淮麦区小麦春化发育特性与播期效应研究[D]. 石河子:石河子大学, 2007.
- [24] 尹 钧, 杨宗渠, 李金才, 等. 黄淮麦区代表性小麦品种春化发育特性的研究[C]// 中国作物学会全国小麦栽培科学学术研讨会论文集, 2006:7.
- [25] 张艾英. 不同生态区小麦品种春化特性的研究[D]. 晋中:山西农业大学, 2005.
- [26] Berry G J, Salisbury P A, Halloran G M. Expression of vernalization genes in near – isogenic wheat lines; methods of vernalization[J]. Genome, 2011, 21(3):429–434.
- [27] 苗果园, 张云亭, 侯跃生, 等. 小麦品种温光效应与主茎叶数的关系[J]. 作物学报, 1992, 18(5):321–330.
- [28] 张锦熙, 刘锡山, 阎润涛. 小麦冬春品种类型及各生育阶段主茎叶数与穗分化进程变异规律的研究[J]. 中国农业科学, 1986, 19(2):27–35.
- [29] 王士英. 小麦春化进程与植株年龄相关问题的商榷[J]. 作物学报, 1997, 23(6):746–752.
- [30] Flood R G, Halloran G M. Genetics and physiology of vernalization response in wheat [M]. Cambridge:Advances in Agronomy, 1986, 39:87–125.
- [31] Rahman M S, Wilson J H. Determination of spikelet number in wheat. I. Effect of varying photoperiod on ear development [J]. Australian Journal of Agricultural Research, 1977, 28(2):265–274.
- [32] 谭克辉, 王文宏, 何希文, 等. 代谢抑制剂对冬小麦春化过程的影响[J]. 植物学报, 1981, 23(5):371–376.
- [33] 李月芳. 青花菜春化作用与体内碳、氮代谢的关系[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2006.
- [34] Bernier G, Havelange A, Houssa C, et al. Physiological signals that induce flowering[J]. Plant Cell, 1993, 5(10):1147–1155.
- [35] Kinet J M. Environmental, chemical and genetic control of flowering [J]. Horticultural Reviews, 1993, 15:279–334.
- [36] Roldán M, Gómez – Mena C, Ruiz – García L, et al. Effect of darkness and sugar availability to the apex on morphogenesis and flowering time of *Arabidopsis* [J]. Flowering Newsletter, 1997(24):18–24.
- [37] 董秀春. 小麦春化相关基因 *TaVRN2* 和 *NF - Y* 家族基因 *TaNf - YB3* 的分离与功能分析 [D]. 泰安:山东农业大学, 2011.
- [38] 曾 俨. 低温下冬小麦糖积累及代谢关键酶表达的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2011.
- [39] 刘丽杰, 苍 晶, 王军虹, 等. 外源 ABA 对苗期低温下冬小麦蔗糖含量及其关键酶基因表达的影响[J]. 麦类作物学报, 2015, 35(10):1333–1340.
- [40] 张文超. 不同小麦品种春化、光周期基因分子标记检测和抗冻性机制的分析[D]. 开封:河南大学, 2013.
- [41] 任江萍, 潘登魁, 尹 钧. 小麦春化过程中蛋白质变化的研究 [J]. 山西农业大学学报, 1999, 19(4):298–301.
- [42] 逯 斌, 谭克辉, 林 兵, 等. 冬小麦春化过程中低温诱导的与花芽分化相关的 mRNA 和蛋白质的合成[J]. 植物生理学报, 1992, 18(2):113–120.
- [43] 种 康, 雍伟东, 谭克辉. 高等植物春化作用研究进展[J]. 植物学通报, 1999, 16(5):481.
- [44] 王建革, 孙宝启, 黄友志. 小麦抽穗期的遗传控制[J]. 遗传, 2002, 24(2):193–196.
- [45] 郝俊杰. 小麦低温春化可溶性蛋白及冷诱导基因调控区初步分析[D]. 晋中:山西农业大学, 2004.
- [46] 卢太白, 吕金印, 陆和平, 等. 越冬及返青期冬小麦叶片中可溶性蛋白质、氨基酸含量与抗寒性的关系[J]. 西北农业学报, 2009, 18(1):56–59.
- [47] 尹 钧, 任江萍, 潘登奎, 等. 小麦春化发育相关蛋白质同工酶的研究[J]. 麦类作物学报, 2002, 22(1):33–38.
- [48] 杨肇驯, 王文宏, 谭克辉. 冬小麦幼苗春化期间过氧化物酶的变化[J]. 植物生理学报, 1981, 7(4):311–316.

- [49] 李淑俊,殷宏章. 春化过程中小麦胚中核酸含量的变化[J]. 植物生理学通讯,1956(2):1-4.
- [50] 魏松德,侯玉泽. 小麦胚在萌发和春化处理过程中核酸含量和多聚核糖体的形成[J]. 洛阳农专学报,1994,14(4):63-65.
- [51] Sarhan F, Chevrier N. Regulation of RNA synthesis by DNA - dependent RNA polymerases and RNases during cold acclimation in winter and spring wheat[J]. Plant Physiology,1985,78(2):250-255.
- [52] 种 康,谭克辉,黄华樑,等. 冬小麦春化作用相关基因的 cDNA 分子克隆研究[J]. 中国科学(B 辑:化学 生命科学 地学),1994,24(9):964-970.
- [53] 倪中福. 小麦 RAPD 分子标记遗传差异及杂交种与亲本间基因差异表达研究[D]. 北京:中国农业大学,1999.
- [54] 柴建芳,吴志明,赵 和,等. 利用减法 AFLP 有效标记小麦中的外源染色体片段(英文)[J]. 植物学报(英文版),2003,45(4):379-383.
- [55] Pugsley A T. A genetic analysis of the spring - winter habit of growth in wheat[J]. Australian Journal of Agricultural Research,1971,22(1):21-31.
- [56] Fu D L, Szucs P, Yan L L, et al. Large deletions within the first intron in *VRN - 1* are associated with spring growth habit in barley and wheat[J]. Molecular Genetics and Genomics,2005,273(1):54-65.
- [57] Loukoianov A, Yan L L, Blechl A, et al. Regulation of *VRN - 1* vernalization genes in normal and transgenic polyploid wheat[J]. Plant Physiology,2005,138(4):2364-2373.
- [58] Bonnin I, Rousset M, Madur D, et al. FT genome A and D polymorphisms are associated with the variation of earliness components in hexaploid wheat [J]. Theoretical and Applied Genetics,2008,116(3):383-394.
- [59] Yoshida T, Nishida H, Zhu J, et al. *Vrn - D4* is a vernalization gene located on the centromeric region of chromosome 5D in hexaploid wheat[J]. Theoretical and Applied Genetics,2010,120(3):543-552.
- [60] Iwaki K, Nakagawa K, Kuno H, et al. Ecogeographical differentiation in East Asian wheat, revealed from the geographical variation of growth habit and *Vrn* genotype [J]. Euphytica,2000,111(2):137-143.
- [61] Danyluk J, Kane N A, Breton G, et al. *TaVRT - 1*, a putative transcription factor associated with vegetative to reproductive transition in cereals[J]. Plant Physiology,2003,132(4):1849-1860.
- [62] Xiao J, Xu S J, Li C H, et al. O - GlcNAc - mediated interaction between VER2 and TaGRP2 elicits *TaVRN1* mRNA accumulation during vernalization in winter wheat[J]. Nature Communications,2014,5(4572):1-13.
- [63] Preston J C, Kellogg E A. Reconstructing the evolutionary history of paralogous *APETALA1/FRUITFULL - like* genes in grasses (*Poaceae*) [J]. Genetics,2006,174(1):421-437.
- [64] Yan L, Loukoianov A, Tranquilli G, et al. Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2003,100(10):6263-6268.
- [65] Fandrich L, Mallory - Smith C A, Zemetra R S, et al. Vernalization responses of jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica*), wheat, and wheat by jointed goatgrass hybrid plants[J]. Weed Science,2008,56(4):534-542.
- [66] Shitsukawa N, Ikari C, Shimada S, et al. The einkorn wheat (*Triticum monococcum*) mutant, maintained vegetative phase, is caused by a deletion in the *VRN1* gene [J]. Genes & Genetic Systems,2007,82(2):167-170.
- [67] Eagles H A, Cane K, Trevaskis B. Veery wheats carry an allele of *Vrn - A1* that has implications for freezing tolerance in winter wheats [J]. Plant Breeding,2011,130(4):413-418.
- [68] Trevaskis B, Bagnall D J, Ellis M H, et al. MADS box genes control vernalization - induced flowering in cereals[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences,2003,100(22):13099-13104.
- [69] Gotoh T. Genetic studies on growth habit of some important spring wheat cultivars in Japan, with special reference to the identification of the spring genes involved [J]. Japanese Journal of Breeding,1979,29(2):133-145.
- [70] Goncharov N. Genetic resources of wheat related species: the *Vrn* genes controlling growth habit (spring vs. winter) [J]. Euphytica,1998,100(1/2/3):371-376.
- [71] 姜 莹,黄林周,胡银岗. 中国小麦地方品种春化基因的分布及其与冬春性的关系[J]. 中国农业科学,2010,43(13):2619-2632.
- [72] 刘兴舟. *Vrn*、*Ppd - D1* 和 *Lr34/Yr18* 基因在山东小麦品种中的分子检测和分布的研究[D]. 泰安:山农业大学,2009.
- [73] Tranquilli G, Dubcovsky J. Epistatic interaction between vernalization genes *Vrn - Am1* and *Vrn - Am2* in diploid wheat[J]. Journal of Heredity,2000,91(4):304-306.
- [74] Szűcs P, Skinner J S, Karsai I A, et al. Validation of the *VRN - H2/VRN - H1* epistatic model in barley reveals that intron length variation in *VRN - H1* may account for a continuum of vernalization sensitivity[J]. Molecular Genetics and Genomics,2007,277(3):249-261.
- [75] Takahashi Y, Teshima K M, Yokoi S, et al. Variations in Hd1 proteins, Hd3a promoters, and Ehd1 expression levels contribute to diversity of flowering time in cultivated rice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2009,106(11):4555-4560.
- [76] Dubcovsky J, Loukoianov A, Fu D, et al. Effect of photoperiod on the regulation of wheat vernalization genes *VRN1* and *VRN2* [J]. Plant Molecular Biology,2006,60(4):469-480.
- [77] Hilda T B, Jorge E N, Nelly S. Wheat production in stressed environments [M]. Dordrecht: Springer - Verlag New York Inc,2007:659-665.
- [78] Fu D L, Dunbar M, Dubcovsky J. Wheat *VIN3 - like* PHD finger genes are up - regulated by vernalization [J]. Molecular Genetics and Genomics,2007,277(3):301-313.
- [79] Kobayashi Y, Kaya H, Goto K, et al. A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals[J]. Science,1999,286(5446):1960-1962.
- [80] Kardailsky I, Shukla V K, Ahn J H, et al. Activation tagging of the floral inducer FT [J]. Science,1999,286(5446):1962-1965.
- [81] Turck F, Fornara F, Coupland G. Regulation and identity of florigen: *FLOWERING LOCUS T* moves center stage [J]. Annual Review of Plant Biology,2008,59:573-594.
- [82] Stelmakh A F. Growth habit in common wheat (*Triticum aestivum*

戴起伟,易中懿,汪翔,等. 中国甘薯作物的域外引入与科技发展[J]. 江苏农业科学,2019,47(24):12-15.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.24.003

中国甘薯作物的域外引入与科技发展

戴起伟, 易中懿, 汪翔, 秦建军, 陆建珍

(江苏省农业科学院农业经济与发展研究所, 江苏南京 210014)

摘要:16 世纪末,福建南洋侨商将甘薯带回家乡种植成功并迅速广泛推广,成为我国甘薯作物域外引入与传播的主要路径之一。徐光启 1608 年撰著的《甘薯疏》开启了我国甘薯科学的先河,为我国早期甘薯作物成为重要的粮食来源作出了重大贡献。我国现代甘薯科学技术的发展,分为 20 世纪上半叶发展起始阶段、下半叶全面发展阶段、改革开放以来快速发展阶段 3 个主要阶段。《中国甘薯栽培学》等专著的出版对甘薯学科发展起到了重要作用。1949—2018 年,我国发表甘薯专业中文期刊文献 23 592 篇。1999—2018 年,我国产出甘薯学位论文 593 篇。

关键词:甘薯;徐光启;甘薯学科;甘薯科技

中图分类号:S531.022 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)24-0012-04

在我国主要粮食作物中,甘薯与玉米、马铃薯均是 16 世纪中后期引入我国的。其中,甘薯的引入对我国居民食物结构的影响是十分巨大而深远的。据联合国粮食及农业组织统计,中国(含香港、澳门、台湾)2017 年甘薯面积 337.31 万 hm^2 ,总产量 7 203.2 万 t,分别占世界甘薯面积与产量的 38.66% 和 63.84%,为世界甘薯第一大国。我国甘薯作物的普及与产量、品质的不断提高,是历代中国人不断进行甘薯科学研究,推动甘薯科技进步的结果。本文试以此为主题,对甘薯自域外引入 400 多年来在我国的科技发展情况进行阐述。

1 徐光启开启我国甘薯科学的先河

1.1 《甘薯疏》是我国第 1 部甘薯栽培专著

我国甘薯的科学研究最早可溯源到明代著名科学家徐光

启 1608 年所著的《甘薯疏》^[1-2]。据《金薯传习录》记载,1593 年福建长乐县生员陈经伦之父陈振龙从吕宋岛“捐资买种”,将薯藤苗种及传种法则带归闽地,旋即禀献巡抚,批令试种并获成功。后经官方大力倡导推广种植,广为民食,“赖以救饥,其利甚大”^[3]。此为甘薯被引入我国并很快得到传播的主要途径之一。

徐光启 1607 年因私离职回居家乡上海老家。据《甘薯疏》序记载,1608 年,长江以南发大水,麦子稻子都没有收获,他想种点儿什么来救急,同时也为以后的救灾预作打算。有人说福建省、浙江省在灾荒年月种植甘薯获益,门客莆田徐生多次给他送来种子,试着栽种,产量还很高。他很想到处宣传推广,又怕用口来说不能使其家喻户晓,就写了这篇《甘薯疏》作为倡导。徐光启亲自从事甘薯引种栽培,《甘薯疏》便是他自身实践的结果,同时也是对甘薯引种至国内 10 多年来农民栽培经验的总结。

1.2 《甘薯疏》的文献价值

《甘薯疏》是我国第 1 部甘薯专著,称得上是我国甘薯科

收稿日期:2019-07-08

基金项目:国家甘薯产业技术体系专项基金(编号:CARS-10)。

作者简介:戴起伟(1955—),男,江苏扬州人,硕士,研究员,主要从事甘薯产业经济研究。E-mail:dqw00001@126.com。

L. em. Thell.) [J]. Euphytica, 1987, 36(2): 513-519.

[83] Chen F, Zhang F Y, Li H H, et al. Allelic variation and distribution independence of *Puroindoline b - B2* variants and their association with grain texture in wheat [J]. Molecular Breeding, 2013, 32(2): 399-409.

[84] Corbesier L, Vincent C, Jang S, et al. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of Arabidopsis [J]. Science, 2007, 316(5827): 1030-1033.

[85] Li C X, Dubcovsky J. Wheat FT protein regulates *VRN1* transcription through interactions with FDL2 [J]. Plant Journal, 2008, 55(4): 543-554.

[86] 袁秀云,李永春,闫延涛,等. 小麦春化发育的分子调控机理研究进展 [J]. 西北植物学报, 2008, 28(7): 1486-1490.

[87] Kippes N, Debernardi J M, Vasquez - Gross H A, et al. Identification of the *VERNALIZATION 4* gene reveals the origin of spring growth habit in ancient wheats from South Asia [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States

of America, 2015, 112(39): 5401-5410.

[88] Kippes N, Zhu J, Chen A, et al. Fine mapping and epistatic interactions of the vernalization gene *VRN - D4* in hexaploid wheat [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2014, 289(1): 47-62.

[89] Pugsley A T. Additional genes inhibiting winter habit in wheat [J]. Euphytica, 1972, 21(3): 547-552.

[90] Trevaskis B, Hemming M N, Peacock W J, et al. *HeVRN2* responds to daylength, whereas *HeVRN1* is regulated by vernalization and developmental status [J]. Plant Physiology, 2006, 140(4): 1397-1405.

[91] Distelfeld A, Li C, Dubcovsky J. Regulation of flowering in temperate cereals [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2009, 12(2): 178-184.

[92] Pidal B, Yan L, Fu D, et al. The *CArG - box* located upstream from the transcriptional start of wheat vernalization gene *VRN1* is not necessary for the vernalization response [J]. Journal of Heredity, 2009, 100(3): 355-364.