

不同梅树品种的花芽发育过程及花芽中成花基因和看家基因的表达特性

陈 政, 董天宇, 葛孟清, 王 晨^①

(南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095)

摘要:以梅树(*Prunus mume* Sieb. et Zucc.)早花品种‘粉红朱砂’(‘Fenhong Zhusha’)和‘淡妆宫粉’(‘Danzhuang Gongfen’),中花品种‘淡粉’(‘Dan Fen’)和‘寒红’(‘Han Hong’),以及晚花品种‘南京红’(‘Nanjing Hong’)和‘晚跳枝’(‘Wantiao Zhi’)为研究对象,对花芽发育过程中花芽的纵径和横径、外部形态和纵剖面结构以及鳞片开裂率进行了测量和观察,并采用RT-qPCR技术分析了花芽中成花基因 *pm-FD3*、*pm-AP2* 和 *pm-LFY* 以及看家基因 *S3a*、*homol*、*hsc*、*somX2*、*FRIGIDA-like* 和 *Subunit37e* 的相对表达量变化。观察结果显示:供试6个梅树品种花芽的纵径和横径随花芽发育整体呈增大趋势,在花芽发育早期增长迅速,且早花品种的花芽生长速率最快,晚花品种较慢。6个品种中,品种‘粉红朱砂’花芽鳞片开裂率最大,且在2018年1月16日超过50%,而在2018年1月24日前其余5个品种花芽鳞片开裂率均低于50%;总体上看,花芽鳞片开裂率以早花品种最高,晚花品种最低。根据花芽发育的各项指标,确定品种‘粉红朱砂’、‘淡妆宫粉’、‘淡粉’、‘寒红’、‘南京红’和‘晚跳枝’的开花日期分别为2018年的1月16日、2月11日、2月15日、2月23日、2月28日和3月4日。RT-qPCR分析结果显示:在梅树花芽发育过程中,成花基因和看家基因的表达特性以及相对表达量明显不同。其中,*pm-LFY* 和 *Subunit37e* 基因在6个品种的花芽发育过程中均持续表达,而 *pm-FD* 和 *FRIGIDA-like* 基因仅在中花和晚花品种的花芽发育过程中持续表达,其余基因均间断表达;早花品种的成花基因和看家基因的最高表达日期总体上早于中花和晚花品种,且距开花日期的间隔天数也明显短于晚花品种;此外,有些成花基因与部分看家基因的最高表达日期一致或相近。综合分析结果表明:在梅树花芽发育过程中,其花芽结构和外部形态变化以及成花基因和部分看家基因的高表达特性均与其花期早晚相对应;早花品种“早开花”的特性与部分基因的快速启动有关,对花芽中成花基因和看家基因的相对表达量进行分析有助于梅树花期的预测。

关键词: 梅树; 花期; 花芽发育; 形态特征; 基因表达; 花期预测

中图分类号: Q768; S685.17 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2019)02-0032-10

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2019.02.05

Development progress of flower bud of different cultivars of *Prunus mume* and expression characteristics of flowering and house-keeping genes in flower bud CHEN Zheng, DONG Tianyu, GE Mengqing, WANG Chen^① (College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2019, 28(2): 32-41

Abstract: Taking early-flowering cultivar ‘Fenhong Zhusha’ and ‘Danzhuang Gongfen’, middle-flowering cultivar ‘Dan Fen’ and ‘Han Hong’, and late-flowering cultivar ‘Nanjing Hong’ and ‘Wantiao Zhi’ of *Prunus mume* Sieb. et Zucc. as research objects, their vertical and horizontal diameters, external morphology, longitudinal section structure, and scale cracking ratio of flower bud during their development progress were measured and observed, meanwhile changes in relative expression levels of flowering gene *pm-FD3*, *pm-AP2* and *pm-LFY*, and house-keeping gene *S3a*, *homol*, *hsc*,

收稿日期: 2018-08-13

基金项目: 国家重点研发计划经作专项(2018YFD1000200)

作者简介: 陈 政(1994—),男,江苏连云港人,硕士研究生,主要从事植物遗传育种与基因组学方面的研究。

^①通信作者 E-mail: wangchen@njau.edu.cn

somX2, *FRIGIDA-like* and *Subunit37e* in flower bud were analyzed by using RT-qPCR technology. The observation result shows that vertical and horizontal diameters of flower bud of six cultivars of *P. mume* tested show a tendency to increase with development of flower bud in general, and grow fast in early development stage of flower bud, flower bud growth rate of early-flowering cultivars is the fastest, while that of late-flowering cultivars is slower. Among six cultivars, scale cracking ratio of flower bud of cultivar 'Fenhong Zhusha' is the largest, which exceeds 50% on January 16, 2018, while that of other five cultivars is lower than 50% before January 24, 2018; in general, that of early-flowering cultivars is the highest, while that of late-flowering cultivars is the lowest. According to each development index of flower bud, flowering dates of cultivar 'Fenhong Zhusha', 'Danzhuang Gongfen', 'Dan Fen', 'Han Hong', 'Nanjing Hong' and 'Wantiao Zhi' are January 16, February 11, February 15, February 23, February 28 and March 4 in 2018, respectively. The RT-qPCR analysis result shows that expression characteristics and relative expression levels of flowering and house-keeping genes are evidently different during development progress of flower bud of *P. mume*. In which, *pm-LFY* and *Subunit37e* genes continuously express during development progress of flower bud of six cultivars, while *pm-FD* and *FRIGIDA-like* genes only continuously express during development progress of flower bud of middle- and late-flowering cultivars, and other genes all discontinuously express; the highest expression dates of flowering and house-keeping genes of early-flowering cultivars are earlier than those of middle- and late-flowering cultivars in general, and their interval days to flowering date are evidently shorter than those of late-flowering cultivars; in addition, the highest expression dates of some flowering and house-keeping genes are identical or similar. The comprehensive analysis result shows that structure and external morphology change of flower bud and high expression characteristics of flowering and some house-keeping genes all correspond to the date of flowering period during development progress of flower bud of *P. mume*; "early flowering" characteristics of early-flowering cultivars are associated with fast initiation of some genes, and analysis on relative expression levels of flowering and house-keeping genes in flower bud can help to predict flowering period of *P. mume*.

Key words: *Prunus mume* Sieb. et Zucc.; flowering period; development of flower bud; morphology characteristics; gene expression; flowering period prediction

目前对梅树(*Prunus mume* Sieb. et Zucc.)花期预测主要基于开花物候期与气象因子的相关性研究,通过分析其开花物候期的变化规律及其与气象因子的相关性,得出影响梅树花期的关键气象因子^[1];也有研究者通过观察花芽外观形态的动态变化,建立梅树花期需冷量等计算模型^[2-4],作为预测梅树花期的依据。梅树花期预测多采用形态测量法以及建立地区预报模型法等^[5]。

植物表型性状的形成是基因与环境共同作用的结果,但表型性状具有滞后性,针对外界条件的改变,基因表达的响应早于表型性状,因而,在基因水平上及早判断,可提升对植物真实生长状态的预见性和采取措施的目的性^[6-7]。植物从营养生长向生殖生长的转变受基因调控,通过基因启动花发育和开花过程^[8];基因表达信息可以精确反映植物的生长发育以及营养代谢状态^[9]。梅树成花基因 *pm-FD*、*pm-AP2* 和 *pm-LFY* 是梅树花发育的关键基因;其看家基因 *S3a*、*homol*、*hsc*、*somX2*、*FRIGIDA-like* 和 *Subunit37e* 是葡萄(*Vitis vinifera* Linn.)花发育期表达量波动相对

较大的看家基因,通过 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)比对获得^[10]。梅树花芽中成花基因和看家基因的表达状况基本可以反映其花芽的发育情况。基于此,可通过检测梅树开花基因的表达状况预测其花期。

为了验证利用基因表达状况预测梅树花期的可行性,作者以不同花期的6个梅树品种为研究对象,观察花芽发育过程中其外部形态和纵剖面结构的变化,同时采用 RT-qPCR 技术分析了花芽中3个成花基因和6个看家基因的相对表达量变化,探讨成花基因和看家基因相对表达量与开花日期的关系,以期为梅树的花期预测和管理提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

供试6个梅树品种均栽植于南京市紫金山南麓的梅花山景区。该景区面积约102.2 hm²;气候类型属亚热带季风气候,年均降水量1106.5 mm,空气相

对湿度 76%,无霜期 237 d;土壤类型为壤土。

供试 6 个梅树品种为‘粉红朱砂’(‘Fenhong Zhusha’),‘淡妆宫粉’(‘Danzhuang Gongfen’),‘淡粉’(‘Dan Fen’),‘寒红’(‘Han Hong’),‘南京红’(‘Nanjing Hong’)和‘晚跳枝’(‘Wantiao Zhi’),其中,‘粉红朱砂’和‘淡妆宫粉’为早花品种,‘淡粉’和‘寒红’为中花品种,‘南京红’和‘晚跳枝’为晚花品种。每个品种选取株龄 20~30 a 的样树 5 株,共 30 株样树,分别进行挂牌编号。

1.2 方法

1.2.1 采样时间和采样方法 从 2017 年 11 月 20 日开始采样,至 2018 年 1 月 19 日(花芽萌动期)结束,每 4 d 取样 1 次,共取样 16 次,取样日期分别为 2017 年的 11 月 20 日、11 月 24 日、11 月 28 日、12 月 2 日、12 月 6 日、12 月 10 日、12 月 14 日、12 月 18 日、12 月 22 日、12 月 26 日和 12 月 30 日,2018 年的 1 月 3 日、1 月 7 日、1 月 11 日、1 月 15 日和 1 月 19 日。

分别在各样树的南向选择 10 根 1 年生枝条,在上、中、下节位随机采集花芽,每个品种采集 30 枚,用于花芽纵径和横径的测量;其中 10 枚花芽用于外部形态和纵剖面结构观察,其余 20 枚花芽在液氮中冷冻,-80 °C 保存,用于 RNA 提取。

1.2.2 花芽形态观察和测定 用游标卡尺(精度 0.01 mm,北京新诺立华仪器有限公司)分别测量花芽纵径和横径,结果取平均值。

取 5 枚完整花芽,用 DM1000 Leica 体式显微镜(德国 Leica 公司)观察花芽的外部形态,并拍照;另取 5 枚花芽,用解剖刀纵向剖开,同法观察花芽的纵剖面结构,并拍照。

1.2.3 开花情况调查和统计 于 2018 年 1 月 4 日至 1 月 24 日,即从花芽出现小面积鳞片开裂至花芽鳞片完全开裂,对各品种的花芽鳞片开裂和开花情况进行调查,每 4 d 调查 1 次,共调查 6 次,调查日期分别为 2018 年的 1 月 4 日、1 月 8 日、1 月 12 日、1 月 16 日、1 月 20 日和 1 月 24 日。

分别在各样株的南向选择 10 根 1 年生枝条,定株、定时观测和记录枝条上的花芽鳞片开裂总数和花芽总数,同时观测并记录开花数。按照公式“花芽鳞片开裂率=(花芽鳞片开裂总数/花芽总数)×100%”计算花芽鳞片开裂率;以“花蕾露瓣 50%以上且有少许花朵开放”为标准确定可观赏期(花期)^[11]。

1.2.4 总 RNA 提取及 RT-qPCR 反应 将花芽于液氮中研磨,称取 80 μg,采用改良的 CTAB 法^[12]分别提取总 RNA;以总 RNA 为模板,并参考 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 反转录试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]说明书合成 cDNA。

以 cDNA 为模板,用 Primer3 Input (version 0.4.0) 软件分别设计成花基因 *pm-FD*、*pm-AP2* 和 *pm-LFY* 以及看家基因 *S3a*、*homol*、*hsc*、*somX2*、*FRIGIDA-like* 和 *Subunit37e* 的正向引物和反向引物(表 1),并由南京金斯瑞生物科技股份有限公司合成引物。以梅树花芽蛋白延伸因子 *EF-1a* 为内参基因进行 RT-qPCR 反应,扩增体系及程序根据 SYBR® *Premix Ex Taq*™ II 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]说明书完成。PCR 反应体系包括 SYBR® *Premix Ex Taq*™ II 10.0 μL、cDNA 1.0 μL、10.0 mol·L⁻¹ 正向引物和反向引物各 0.4 μL,双蒸水补足至 20.0 μL。

表 1 用于梅树花芽中成花基因和看家基因 RT-qPCR 反应的引物序列

Table 1 Primer sequences used for RT-qPCR reaction of flowering and house-keeping genes in flower bud of *Prunus mume* Sieb. et Zucc.

基因 Gene	登录号 Accession number	正向引物序列(5'→3') Sequence of forward primer (5'→3')	反向引物序列(5'→3') Sequence of reverse primer (5'→3')
<i>pm-FD</i>	LOC103332330	AGGCTTTGGCAGAGAACGTA	AGTCCGAAACCCAACCTCTT
<i>pm-AP2</i>	LOC103342180	GGGCTTGTGTTGATACCGAGA	AATGCCCCAAACTCAAATCG
<i>pm-LFY</i>	LOC103338154	GACCTACGAGGCATGGTTGT	TCGCTGCCGTGTAGTATCTG
<i>S3a</i>	LOC103318616	CAGATTGGCAAAACCTTGT	CCTCAGCTTGTGAGTGGTGA
<i>homol</i>	LOC103342159	TGTGAAAAGGGAGGATGAGG	CAGCTCGGCAATTAGAGTC
<i>hsc</i>	LOC103323174	GTCAGTGTCCCGCATACTT	AACATCGAAAAGTCCACCTC
<i>somX2</i>	LOC103328328	GAAGTTAGCGAACCCATGA	CCTGATACCGAAGGATCGAA
<i>FRIGIDA-like</i>	LOC103324196	GAGCTCTCGGACCACTTAC	GTTGTCGTCCACTCTCCAT
<i>Subunit37e</i>	LOC103339635	CAGGACCAGGGACAACAACT	CCTTGTGTTGGTGTATTGTG
<i>EF-1a</i> ¹⁾		CCCTCCGACTACCACTTCAG	GCATCTCAACAGACTTAACTTCAG

¹⁾ 内参基因 Reference gene.

反应程序为:95 ℃ 预变性 60 s;95 ℃ 变性 5 s、60 ℃ 退火 15 s、72 ℃ 延伸 20 s,40 个循环;最后于 72 ℃ 延伸 10 min。每个样品 3 次重复,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各基因的相对表达量^[13]。

1.3 数据统计和分析

采用 EXCEL 2007 和 Origin 2017 软件对数据进行统计和分析。

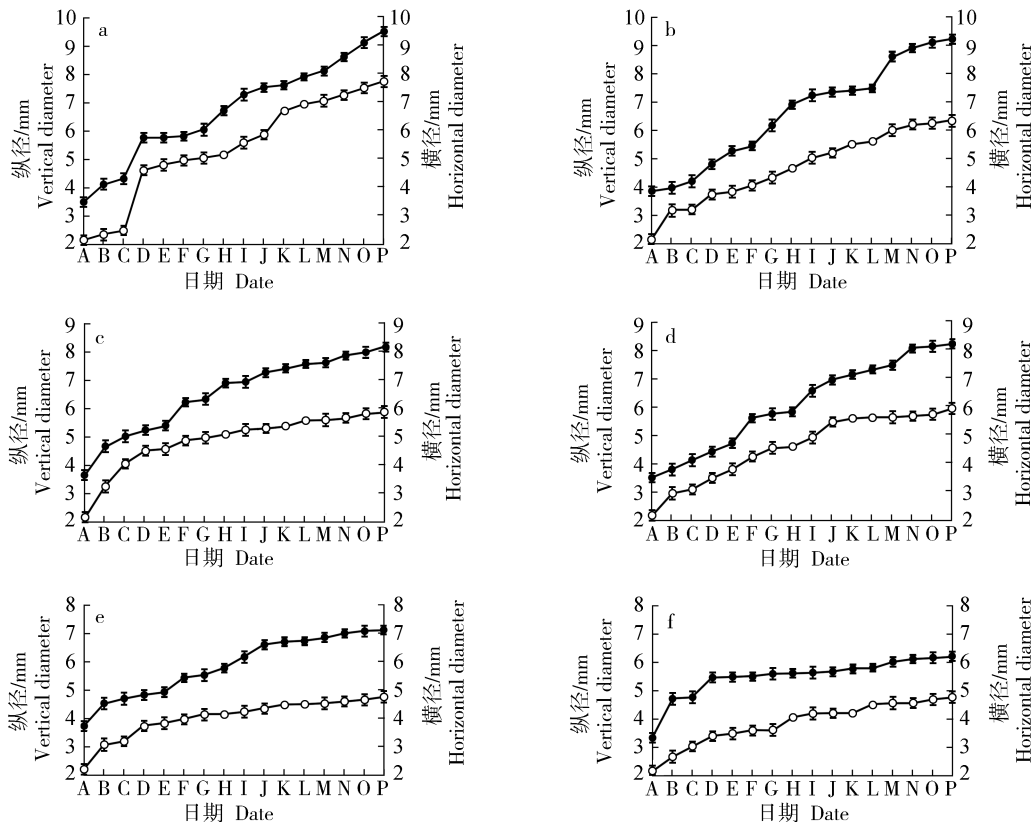
2 结果和分析

2.1 不同梅树品种花芽生长发育的动态变化

不同时期,供试 6 个梅树品种花芽纵径和横径的变化见图 1,花芽外部形态和纵剖面结构的变化分别见图 2 和图 3。

由图 1 可见:在整个花芽发育过程中,供试 6 个梅树品种花芽的纵径和横径总体呈增大趋势;其中,2017 年 11 月 20 日至 12 月 6 日期间花芽的纵径和横径增长速率较快。总体上看,供试 6 个品种中,早花品种的花芽生长速率最快,而晚花品种的花芽生长速率较慢。

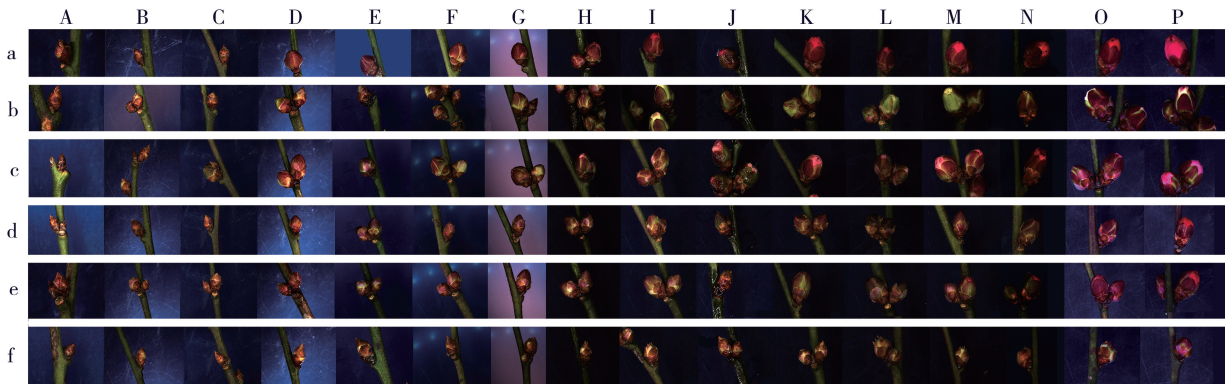
由图 2 和图 3 可见:品种‘粉红朱砂’和‘淡妆宫粉’花芽鳞片开裂时间为 2017 年 12 月 22 日,之后,品种‘粉红朱砂’花芽鳞片开裂程度明显大于品种‘淡妆宫粉’;品种‘淡粉’花芽鳞片开裂时间为 2017 年 12 月 26 日,品种‘南京红’花芽鳞片开裂时间为 2018 年 1 月 7 日,而品种‘寒红’和‘晚跳枝’花芽的鳞片开裂时间均为 2018 年 1 月 15 日。总体上看,早花品种花芽鳞片开裂时间最早。



—●—: 纵径 Vertical diameter; —○—: 横径 Horizontal diameter. A-P. 日期 Date (CCYY-MM-DD): A. 2017-11-20; B. 2017-11-24; C. 2017-11-28; D. 2017-12-02; E. 2017-12-06; F. 2017-12-10; G. 2017-12-14; H. 2017-12-18; I. 2017-12-22; J. 2017-12-26; K. 2017-12-30; L. 2018-01-03; M. 2018-01-07; N. 2018-01-11; O. 2018-01-15; P. 2018-01-19.

a: ‘粉红朱砂’ ‘Fenhong Zhusha’; b: ‘淡妆宫粉’ ‘Danzhuang Gongfen’; c: ‘淡粉’ ‘Dan Fen’; d: ‘寒红’ ‘Han Hong’; e: ‘南京红’ ‘Nanjing Hong’; f: ‘晚跳枝’ ‘Wantiao Zhi’.

图 1 供试 6 个梅树品种花芽纵径和横径的变化
Fig. 1 Changes in vertical and horizontal diameters of flower bud of six cultivars of *Prunus mume* Sieb. et Zucc. tested

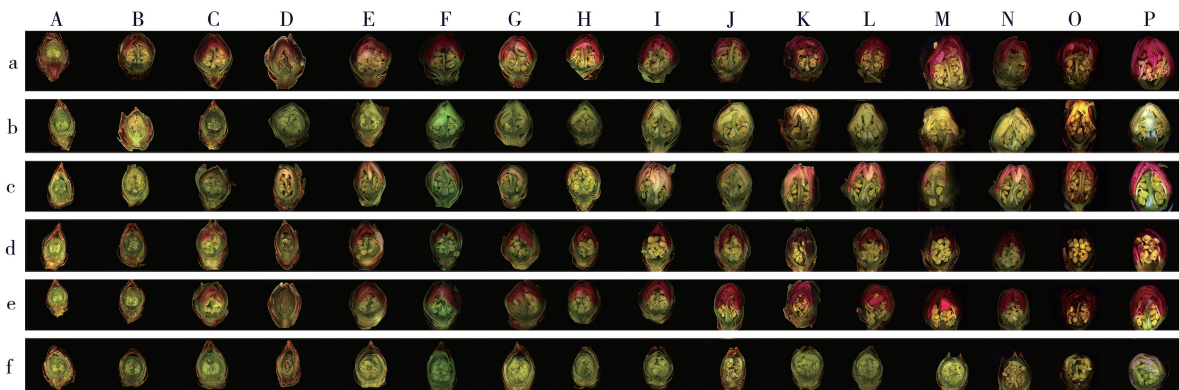


a: '粉红朱砂' 'Fenhong Zhusha'; b: '淡妆宫粉' 'Dan Zhuang Gongfen'; c: '淡粉' 'Dan Fen'; d: '寒红' 'Han Hong'; e: '南京红' 'Nanjing Hong'; f: '晚跳枝' 'Wantiao Zhi'.

A-P. 日期 Date (CCYY-MM-DD): A. 2017-11-20; B. 2017-11-24; C. 2017-11-28; D. 2017-12-02; E. 2017-12-06; F. 2017-12-10; G. 2017-12-14; H. 2017-12-18; I. 2017-12-22; J. 2017-12-26; K. 2017-12-30; L. 2018-01-03; M. 2018-01-07; N. 2018-01-11; O. 2018-01-15; P. 2018-01-19.

图2 供试6个梅树品种花芽外部形态的变化

Fig. 2 Changes in external morphology of flower bud of six cultivars of *Prunus mume* Sieb. et Zucc. tested



a: '粉红朱砂' 'Fenhong Zhusha'; b: '淡妆宫粉' 'Dan Zhuang Gongfen'; c: '淡粉' 'Dan Fen'; d: '寒红' 'Han Hong'; e: '南京红' 'Nanjing Hong'; f: '晚跳枝' 'Wantiao Zhi'.

A-P. 日期 Date (CCYY-MM-DD): A. 2017-11-20; B. 2017-11-24; C. 2017-11-28; D. 2017-12-02; E. 2017-12-06; F. 2017-12-10; G. 2017-12-14; H. 2017-12-18; I. 2017-12-22; J. 2017-12-26; K. 2017-12-30; L. 2018-01-03; M. 2018-01-07; N. 2018-01-11; O. 2018-01-15; P. 2018-01-19.

图3 供试6个梅树品种花芽纵剖面结构的变化

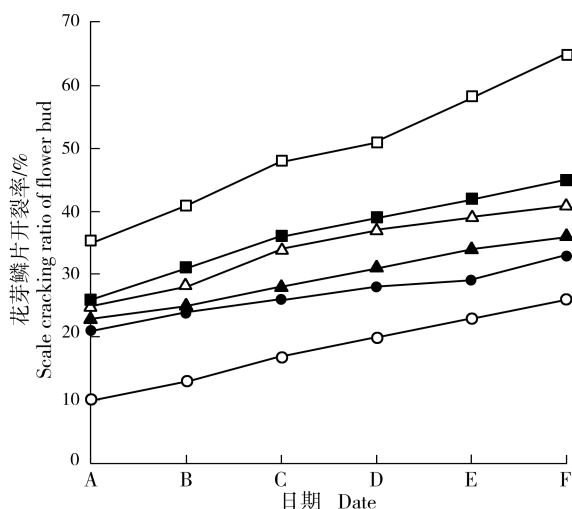
Fig. 3 Changes in structure of longitudinal section of flower bud of six cultivars of *Prunus mume* Sieb. et Zucc. tested

2.2 不同梅树品种开花指标分析

供试6个梅树品种花芽鳞片开裂率的变化见图4。结果显示:品种'粉红朱砂'花芽鳞片开裂率最大,在2018年1月16日即超过50%,此时单株开花数量达到85;之后1月20日和1月24日花芽鳞片开裂率增长速率较快,分别达到58%和65%,单株开花数量也分别增加至175和205,表明该品种在2018年

1月16日进入花期。其余5个品种的花芽鳞片开裂率均明显小于品种'粉红朱砂',且在2018年1月16日至1月24日的20d内花芽鳞片开裂率均未超过50%,单株开花数量也均在10以下,说明这5个品种的花期均晚于品种'粉红朱砂',且均在1月24日以后进入花期。

通过比较分析可见:在供试6个梅树品种中,早



—□—: ‘粉红朱砂’ ‘Fenhong Zhusha’; —■—: ‘淡妆宫粉’ ‘Dan Zhuang Gongfen’; —△—: ‘淡粉’ ‘Dan Fen’; —▲—: ‘寒红’ ‘Han Hong’; —●—: ‘南京红’ ‘Nanjing Hong’; —○—: ‘晚跳枝’ ‘Wantiao Zhi’.

A-F. 日期 Date (CCYY-MM-DD): A. 2018-01-04; B. 2018-01-08; C. 2018-01-12; D. 2018-01-16; E. 2018-01-20; F. 2018-01-24.

图 4 供试 6 个梅树品种花芽鳞片开裂率的变化
Fig. 4 Changes in scale cracking ratio of flower bud of six cultivars of *Prunus mume* Sieb. et Zucc. tested

花品种花芽鳞片开裂率总体上最高,而晚花品种花芽鳞片开裂率总体上最低,表明梅树花芽鳞片开裂率与该品种的花期早晚特性相对应。

2.3 不同梅树品种花芽中成花基因和看家基因的表达差异

2.3.1 成花基因的表达差异 在花芽发育过程中供试 6 个梅树品种花芽中成花基因的相对表达量变化见表 2。结果显示:在不同梅树品种的花芽发育过程中,3 个成花基因的相对表达量呈现不同的变化趋势。

由表 2 可见:从基因的表达过程看,*pm-FD* 基因在品种‘粉红朱砂’和‘淡妆宫粉’花芽发育的多数时期均没有表达(相对表达量为 0.000),但在中花和晚花品种的花芽发育过程中均不同程度表达,仅相对表达量存在差异;*pm-AP2* 基因在 6 个品种的花芽发育过程中均间断表达,特别是在品种‘淡粉’、‘南京红’和‘晚跳枝’花芽发育的多数时期均没有表达;而 *pm-LFY* 基因在 6 个品种的花芽发育过程中均持续表达,但相对表达量存在较大差异。

从相对表达量看,*pm-FD* 基因在品种‘粉红朱砂’、‘淡妆宫粉’、‘淡粉’、‘寒红’、‘南京红’和‘晚跳枝’花芽中的最高表达日期分别为 2017 年的 11 月 24 日、12 月 6 日、12 月 14 日、12 月 14 日、12 月 18 日和 12 月 22 日;*pm-AP2* 基因在上述 6 个品种花芽中的最高表达日期分别为 2017 年的 11 月 28 日、12 月 14 日、12 月 22 日、12 月 18 日、12 月 26 日和 12 月 26 日;*pm-LFY* 基因在上述 6 个品种花芽中的最高表达日期分别为 2017 年的 11 月 20 日、12 月 10 日、11 月

表 2 供试 6 个梅树品种花芽中成花基因的相对表达量变化
Table 2 Changes in relative expression level of flowering gene in flower bud of six cultivars of *Prunus mume* Sieb. et Zucc. tested

品种 ¹⁾ Cultivar ¹⁾	不同日期 ²⁾ <i>pm-FD</i> 基因的相对表达量 Relative expression level of <i>pm-FD</i> gene at different dates ²⁾															
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
a	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
b	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
c	0.007	0.027	0.021	0.002	0.009	0.011	1.000	0.247	0.522	0.003	0.004	0.002	0.005	0.005	0.005	0.003
d	0.010	0.007	0.023	0.018	0.000	0.038	1.000	0.624	0.014	0.004	0.007	0.005	0.006	0.020	0.053	0.002
e	0.001	0.001	0.001	0.005	0.131	0.000	0.000	1.000	0.059	0.004	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.007
f	0.130	0.141	0.255	1.000	0.215	1.350	0.214	0.214	2.106	0.619	0.609	0.271	0.155	0.437	0.036	0.009

品种 ¹⁾ Cultivar ¹⁾	不同日期 ²⁾ <i>pm-AP2</i> 基因的相对表达量 Relative expression level of <i>pm-AP2</i> gene at different dates ²⁾															
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
a	0.000	0.007	1.000	0.000	0.000	0.002	0.001	0.000	0.038	0.007	0.006	0.012	0.000	0.021	0.000	0.000
b	0.000	0.000	0.000	0.000	0.251	0.001	1.000	0.001	0.003	0.012	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001
c	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.012	1.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000
d	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.035	0.095	1.000	0.009	0.205	0.003	0.006	0.020	0.090	0.002	0.019
e	0.000	0.000	0.000	0.000	0.094	0.001	0.000	0.027	0.059	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
f	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.001	1.000	0.027	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

续表2 Table 2 (Continued)

品种 ¹⁾ Cultivar ¹⁾	不同日期 ²⁾ <i>pm-LFY</i> 基因的相对表达量 Relative expression level of <i>pm-LFY</i> gene at different dates ²⁾															
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
a	1.000	0.031	0.283	0.219	0.000	0.003	0.002	0.016	0.006	0.002	0.002	0.005	0.001	0.000	0.001	0.003
b	0.815	0.062	0.411	0.090	0.072	1.000	0.207	0.182	0.071	0.390	0.049	0.250	0.097	0.035	0.059	0.064
c	0.191	1.000	0.350	0.037	0.009	0.018	0.283	0.073	0.011	0.011	0.009	0.031	0.003	0.001	0.001	0.001
d	0.043	0.002	0.003	0.004	0.012	1.000	0.191	0.175	0.160	0.022	0.005	0.010	0.006	0.053	0.019	0.011
e	0.073	0.022	0.014	0.248	0.017	0.053	0.095	0.082	0.074	1.000	0.008	0.004	0.004	0.006	0.002	0.008
f	0.003	0.079	0.039	0.064	0.036	0.032	0.021	0.100	0.169	1.000	0.005	0.021	0.014	0.013	0.013	0.043

¹⁾ a: ‘粉红朱砂’ ‘Fenhong Zhusha’; b: ‘淡妆宫粉’ ‘Danzhuang Gongfen’; c: ‘淡粉’ ‘Dan Fen’; d: ‘寒红’ ‘Han Hong’; e: ‘南京红’ ‘Nanjing Hong’; f: ‘晚跳枝’ ‘Wantiao Zhi’.

²⁾ A-P. 日期 Date (CCYY-MM-DD): A. 2017-11-20; B. 2017-11-24; C. 2017-11-28; D. 2017-12-02; E. 2017-12-06; F. 2017-12-10; G. 2017-12-14; H. 2017-12-18; I. 2017-12-22; J. 2017-12-26; K. 2017-12-30; L. 2018-01-03; M. 2018-01-07; N. 2018-01-11; O. 2018-01-15; P. 2018-01-19.

24日、12月10日、12月26日和12月26日。除早花品种‘粉红朱砂’外,其余5个品种的 *pm-FD*、*pm-AP2* 和 *pm-LFY* 基因的最高表达日期多出现在12月中下旬。总体上看,3个成花基因最高表达日期与其花期的早晚基本对应。

2.3.2 看家基因的表达差异 在花芽发育过程中供试6个梅树品种花芽中看家基因的相对表达量变化

见表3。结果显示:在不同梅树品种的花芽发育过程中,与成花基因类似,6个看家基因的相对表达量也呈现不同的变化趋势。

由表3可见:从基因的表达过程看,*S3a* 基因在品种‘粉红朱砂’、‘南京红’和‘晚跳枝’的花芽发育过程中均持续表达,而在其余3个品种的花芽发育过程中则间断表达;*homol* 基因在6个品种的花芽发育

表3 供试6个梅树品种花芽中看家基因的相对表达量变化

Table 3 Changes in relative expression level of house-keeping gene in flower bud of six cultivars of *Prunus mume* Sieb. et Zucc. tested

品种 ¹⁾ Cultivar ¹⁾	不同日期 ²⁾ <i>S3a</i> 基因的相对表达量 Relative expression level of <i>S3a</i> gene at different dates ²⁾															
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
a	0.004	1.000	0.014	0.006	0.007	0.111	0.010	0.168	0.010	0.007	0.015	0.005	0.004	0.011	0.002	0.004
b	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.103	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
c	0.000	0.001	0.001	0.000	0.003	0.024	0.106	0.947	0.025	1.000	0.002	0.002	0.003	0.001	0.000	0.001
d	0.000	0.000	0.001	0.001	0.003	0.026	0.112	1.000	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.001	0.000
e	0.001	0.001	0.001	0.005	1.000	0.005	0.000	0.009	0.013	0.003	0.003	0.002	0.004	0.009	0.001	0.002
f	0.032	0.043	0.046	0.217	0.190	0.182	0.191	0.072	0.228	0.144	0.156	0.153	1.000	0.439	0.007	0.013

品种 ¹⁾ Cultivar ¹⁾	不同日期 ²⁾ <i>homol</i> 基因的相对表达量 Relative expression level of <i>homol</i> gene at different dates ²⁾															
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
a	0.000	1.000	0.001	0.001	0.000	0.000	0.008	0.058	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.000	0.001
b	0.000	0.000	0.005	0.000	139.338	0.034	1.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.003	0.004
c	0.001	0.001	0.002	0.000	0.000	0.016	1.000	0.002	0.020	0.007	0.003	0.000	0.001	0.001	0.001	0.003
d	0.002	0.002	0.004	0.000	0.003	0.033	1.000	0.004	0.001	0.002	0.003	0.001	0.001	0.007	0.006	0.001
e	0.001	0.001	0.001	0.008	0.001	0.000	0.000	1.000	0.001	0.002	0.003	0.001	0.004	0.006	0.002	0.007
f	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.001	1.000	0.027	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

品种 ¹⁾ Cultivar ¹⁾	不同日期 ²⁾ <i>hsc</i> 基因的相对表达量 Relative expression level of <i>hsc</i> gene at different dates ²⁾															
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
a	0.184	0.037	0.051	1.000	0.010	0.004	0.002	0.309	0.212	0.123	0.292	0.093	0.330	0.594	0.275	0.543
b	0.000	0.000	0.000	0.000	0.004	0.001	0.098	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
c	0.001	0.000	1.000	0.000	0.000	0.001	0.006	0.003	0.005	0.001	0.000	0.001	0.003	0.002	0.001	0.001
d	0.047	0.062	0.018	0.059	0.026	1.137	1.000	0.446	0.336	0.132	0.143	0.189	0.194	0.366	0.191	0.201
e	0.000	0.002	0.001	0.001	0.513	0.000	0.000	0.004	0.008	0.004	0.006	0.003	0.001	0.006	0.005	1.000
f	0.013	0.135	0.068	0.080	0.025	0.001	0.789	0.252	0.985	0.431	0.011	0.090	1.000	0.345	0.154	0.108

续表3 Table 3 (Continued)

品种 ¹⁾ Cultivar ¹⁾	不同日期 ²⁾ <i>somX2</i> 基因的相对表达量 Relative expression level of <i>somX2</i> gene at different dates ²⁾															
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
a	0.001	1.000	0.002	0.001	0.001	0.003	0.001	0.007	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001	0.003	0.000	0.001
b	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.074	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
c	0.000	0.000	0.001	0.000	0.002	0.005	0.037	0.006	1.000	0.007	0.004	0.003	0.002	0.001	0.001	0.001
d	0.007	0.012	0.017	0.013	0.051	0.130	1.000	0.148	0.094	0.020	0.016	0.021	0.015	0.053	0.019	0.011
e	0.001	0.000	0.000	0.001	0.001	0.000	0.000	0.001	1.000	0.005	0.002	0.001	0.002	0.002	0.001	0.001
f	0.212	0.153	0.145	0.353	0.455	0.182	0.299	1.321	1.104	1.104	1.015	0.434	0.740	1.282	0.051	0.045

品种 ¹⁾ Cultivar ¹⁾	不同日期 ²⁾ <i>FRIGIDA-like</i> 基因的相对表达量 Relative expression level of <i>FRIGIDA-like</i> gene at different dates ²⁾															
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
a	0.000	1.000	0.000	0.121	0.365	0.004	0.005	1.114	0.000	0.000	0.077	0.002	0.002	0.001	0.000	0.000
b	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.133	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
c	0.009	0.001	0.024	0.008	0.009	0.696	0.951	0.739	48.230	0.053	0.028	0.628	0.139	0.107	0.044	0.065
d	0.022	0.018	0.009	0.017	0.006	0.703	1.000	0.753	0.112	0.065	0.046	0.082	0.228	0.140	0.038	0.025
e	0.001	0.002	0.001	0.004	0.000	0.021	0.000	0.003	1.000	0.066	0.004	0.001	0.010	0.020	0.008	0.024
f	0.024	0.049	0.024	0.072	0.048	1.000	0.093	0.488	0.014	0.090	0.047	0.017	0.194	0.623	0.007	0.030

品种 ¹⁾ Cultivar ¹⁾	不同日期 ²⁾ <i>Subunit37e</i> 基因的相对表达量 Relative expression level of <i>Subunit37e</i> gene at different dates ²⁾															
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
a	0.143	0.027	0.050	0.376	0.121	0.365	0.054	0.040	0.114	0.077	1.000	0.055	0.570	0.246	0.133	0.192
b	0.010	0.452	1.000	0.986	2.188	0.349	0.809	0.115	0.865	0.366	0.761	0.348	2.361	1.230	0.000	4.614
c	0.000	0.003	0.005	0.001	0.003	0.012	0.010	0.004	1.000	0.043	0.021	0.014	0.029	0.078	0.015	0.046
d	0.158	0.040	0.048	0.045	0.086	0.077	1.000	0.029	0.107	0.122	0.078	0.085	0.300	0.007	0.006	0.001
e	0.253	0.091	0.130	0.022	1.088	0.369	0.035	0.014	0.038	0.054	0.159	0.101	0.536	0.425	0.325	0.087
f	0.129	0.123	0.110	0.010	1.000	0.133	0.387	0.007	0.070	0.083	0.128	0.049	0.250	0.427	0.527	0.437

¹⁾ a: ‘粉红朱砂’ ‘Fenhong Zhusha’; b: ‘淡妆宫粉’ ‘Dan Zhuang Gongfen’; c: ‘淡粉’ ‘Dan Fen’; d: ‘寒红’ ‘Han Hong’; e: ‘南京红’ ‘Nanjing Hong’; f: ‘晚跳枝’ ‘Wantiao Zhi’.

²⁾ A-P. 日期 Date (CCYY-MM-DD): A. 2017-11-20; B. 2017-11-24; C. 2017-11-28; D. 2017-12-02; E. 2017-12-06; F. 2017-12-10; G. 2017-12-14; H. 2017-12-18; I. 2017-12-22; J. 2017-12-26; K. 2017-12-30; L. 2018-01-03; M. 2018-01-07; N. 2018-01-11; O. 2018-01-15; P. 2018-01-19.

过程中均间断表达,特别是在品种‘晚跳枝’花芽发育的多数时期均没有表达;*hsc*基因在品种‘粉红朱砂’、‘寒红’和‘晚跳枝’的花芽发育过程中均持续表达,但在其余3个品种的花芽发育过程中均间断表达,特别是在品种‘淡妆宫粉’花芽发育的多数时期均无表达;*somX2*基因在品种‘寒红’和‘晚跳枝’的花芽发育过程中均持续表达,但在其余4个品种的花芽发育过程中均间断表达,特别是在品种‘淡妆宫粉’花芽发育的多数时期均无表达;*FRIGIDA-like*基因在中花和晚花品种的花芽发育过程中总体上均持续表达,但在早花品种的花芽发育过程中间断表达,特别是在品种‘淡妆宫粉’花芽发育的多数时期均无表达;*Subunit37e*基因在6个品种的花芽发育过程中基本上均持续表达,但相对表达量均在一定差异。总体上看,除*homol*基因外,其余5个看家基因在品种‘晚跳枝’的花芽发育过程中均可持续表达,且相对

表达量也较高。

从相对表达量看,*S3a*基因在品种‘粉红朱砂’、‘淡妆宫粉’、‘淡粉’、‘寒红’、‘南京红’和‘晚跳枝’花芽中的最高表达日期分别为2017年的11月24日、12月6日、12月26日、12月18日、12月6日和2018年1月7日;*homol*基因在上述6个品种花芽中的最高表达日期分别为2017年的11月24日、12月6日、12月14日、12月14日、12月18日和12月26日;*hsc*基因在上述6个品种花芽中的最高表达日期分别为2017年12月2日、2018年1月19日、2017年的11月28日和12月10日以及2018年的1月19日和1月7日;*somX2*基因在上述6个品种花芽中的最高表达日期分别为2017年的11月24日、12月6日、12月22日、12月14日、12月22日和12月18日;*FRIGIDA-like*基因在上述6个品种花芽中的最高表达日期分别为2017年的12月18日、12月6日、12

月22日、12月14日、12月22日和12月10日;*Subunit37e*基因在上述6个品种花芽中的最高表达日期分别为2017年12月30日和2018年1月19日以及2017年的12月22日、12月14日、12月6日和12月6日。

2.4 不同梅树品种花期与花芽中成花基因和看家基因表达量的关系

从供试6个梅树品种花芽中成花基因和看家基因的最高表达日期到各品种开花日期的间隔天数见表4。

结果显示:各品种花芽中成花基因和看家基因的最高表达日期及开花日期均存在差异,导致间隔天数

差异明显。其中,间隔天数最短的是品种‘粉红朱砂’的看家基因*Subunit37e*,仅17 d;间隔天数最长的是品种‘晚跳枝’的看家基因*Subunit37e*,达到88 d。早花品种的成花基因和看家基因最高表达日期与开花日期的间隔天数平均值分别为58和51 d,中花品种的平均值分别为69和65 d,晚花品种的平均值分别为68和70 d。从成花基因最高表达日期与开花日期的间隔天数看,早花品种短于中花和晚花品种,但中花和晚花品种间差异不大;而从看家基因最高表达日期与开花日期的间隔天数看,早花和中花品种间差异不大,但均明显短于晚花品种。

表4 供试6个梅树品种花芽中成花基因和看家基因的最高表达日期到开花日期的间隔天数

Table 4 Interval days from date of the highest expression level to flowering date of flowering and house-keeping genes in flower bud of six cultivars of *Prunus mume* Sieb. et Zucc. tested

品种 Cultivar	各基因的最高表达日期到开花日期的间隔天数 Interval days from date of the highest expression level to flowering date of each gene									开花日期 Flowering date (CCYY-MM-DD)
	<i>pm-FD</i>	<i>pm-AP2</i>	<i>pm-LFY</i>	<i>S3a</i>	<i>homol</i>	<i>hsc</i>	<i>somX2</i>	<i>FRIGIDA-like</i>	<i>Subunit37e</i>	
粉红朱砂 Fenhong Zhusha	53	49	57	53	53	45	53	29	17	2018-01-16
淡妆宫粉 Danzhuang Gongfen	67	59	63	67	67	23	67	67	67	2018-02-11
淡粉 Dan Fen	63	55	83	51	63	79	55	55	55	2018-02-15
寒红 Han Hong	71	67	75	67	71	75	71	71	71	2018-02-23
南京红 Nanjing Hong	72	64	64	84	72	40	68	68	84	2018-02-28
晚跳枝 Wantiao Zhi	72	68	68	56	68	56	76	84	88	2018-03-04

3 讨论和结论

在梅树的花发育过程中,*pm-FD*基因与*pm-FT*基因相互作用,促进花的转变以及诱导花的发育^[14]; *pm-AP2*基因则对萼片和花瓣的发育有控制作用^[15]; *pm-LFY*基因是成花过程中最早表达的花分生组织特异性基因,其影响效应几乎贯穿花序和花发育的整个过程,在维持花分生组织的正常功能、启动花器官基因的活化以及防止花分生组织逆转等方面具有重要作用^[16]。在供试6个梅树品种的花芽发育过程中,*pm-LFY*基因在各品种的花芽发育过程中均持续表达,仅相对表达量存在一定差异,佐证了该基因对梅树花芽发育的全过程均有控制作用;而*pm-AP2*基因在6个品种的花芽发育过程中均间断表达,说明*pm-AP2*基因仅对梅树花芽发育的部分过程(花萼和花瓣的发育)有控制作用。此外,早花品种(‘粉红朱砂’和‘淡妆宫粉’)的*pm-FD*、*pm-AP2*和*pm-LFY*基因的最高表达日期总体上早于中花品种(‘淡粉’

和‘寒红’)和晚花品种(‘南京红’和‘晚跳枝’),而晚花品种的*pm-FD*、*pm-AP2*和*pm-LFY*基因的最高表达日期最晚,显示梅树花芽中*pm-FD*、*pm-AP2*和*pm-LFY*基因的表达规律与其花期早晚基本对应。值得注意的是,成花基因*pm-FD*在早花品种花芽发育的多数时期均没有活跃表达,但在中花和晚花品种的花芽发育过程中均持续表达,其原因有待进一步的研究和探索。

张积森等^[17]和王瑛等^[18]的研究结果表明:看家基因是在所有类型细胞中都能表达的一类基因,其产物对维持细胞的基本结构和各种代谢活动是必需的;相较于成花基因,看家基因在植物生长发育过程中的表达更稳定。本研究选择的6个看家基因*S3a*、*homol*、*hsc*、*somX2*、*FRIGIDA-like*和*Subunit37e*在梅树的花芽生长发育过程中多次出现高表达,其中,有些看家基因与成花基因的最高表达日期相近,如品种‘粉红朱砂’、‘淡妆宫粉’、‘淡粉’、‘寒红’和‘南京红’的看家基因*homol*与其成花基因*pm-FD*的最高表达日期一致,因此,研究此类看家基因的最高表达

日期与开花日期的间隔规律,有助于梅树花期的预测。此外,在不同品种梅树花芽发育过程中,各看家基因的表达规律及相对表达量存在明显差异,例如:在6个品种的花芽发育过程中,*homol*基因均间断表达,而*Subunit37e*基因基本上持续表达,*FRIGIDA-like*基因则在中花和晚花品种的花芽中基本上持续表达,但在早花品种中却间断表达,表明在不同品种的花芽发育过程中,有些看家基因的影响效应贯穿于花芽发育的全过程,而有些看家基因的影响效应则在品种间存在差异或与花期特性相关,但这些看家基因在梅树花芽发育过程中的作用靶点以及与开花日期的相关性还需进一步研究。此外,除*homol*基因外,其余5个看家基因在品种‘晚跳枝’的花芽发育过程中均可持续表达,且相对表达量也较高,说明这些看家基因对品种‘晚跳枝’花芽发育的作用较为稳定,但这些看家基因在梅树晚花品种的花芽发育过程中是否有相似的作用规律及其对花期的具体推迟作用,均有待深入研究。

根据花芽纵径和横径的变化规律、花芽外部形态的变化以及花芽鳞片开裂率,确定品种‘粉红朱砂’、‘淡妆宫粉’、‘淡粉’、‘寒红’、‘南京红’和‘晚跳枝’的开花日期分别为2018年的1月16日、2月11日、2月15日、2月23日、2月28日和3月4日,各品种的开花日期与其花期特性相对应。而从各基因的最高表达日期看,早花品种的成花基因*pm-FD*和*pm-AP2*以及看家基因*S3a*、*homol*和*somX2*均最早进入最高表达日期,而且,早花品种的成花基因和看家基因的最高表达日期距开花日期最近;说明早花品种的“早开花”特性与其花芽发育过程中成花基因和看家基因的快速启动有关。因此,对梅树花芽发育过程中成花基因和部分看家基因的表达规律进行分析,对于梅树花期的预测有一定的参考意义。

由于本研究并未进行不同年份间的重复观察和研究,且涉及的梅树品种较少,研究结果具有一定的局限性。而植物的花期除受遗传和生理代谢等内因控制外,还受到气温、水分、光照以及栽培管理措施等多种外因的影响,因而,对不同梅树品种花期与基因表达的相关性还有待深入研究。

致谢:中山陵园管理局孙琴园林高级工程师和李长伟园林工程师等对梅树花期观察提供了帮助,在此表示感谢!

参考文献:

- [1] 贾坤,张黎霞,赵天禄,等.北京地区梅花的花期预报模式初建[J].北京林业大学学报,2010,32(S2):97-100.
- [2] 孙丽君.豫东地区不同梅花品种的开花物候期研究[J].现代农业科技,2017(13):148,150.
- [3] 杨亚会,李庆卫.部分梅花品种的需冷量研究[J].北京林业大学学报,2013,35(S1):47-51.
- [4] 欧锡坤,陈琦玲.应用台湾需冷模式评估本地种梅树的需冷量[J].北京林业大学学报,2003,25(特刊):6-10.
- [5] 廖碧婷,王四化,杜尧东,等.广州地区梅花花期的预报方法[J].广东气象,2016,38(4):55-58.
- [6] 张超博,李傲,崔梦杰,等.干旱胁迫下‘宁玉’草莓生长发育及相关基因表达特点[J].园艺学报,2017,44(12):2351-2360.
- [7] 房经费.DNA技术在农业上的应用[J].农业生物技术学报,2014,22(12):1463-1470.
- [8] 赵奇,王台,魏小弟.AP2基因在高等植物花器官发育中的作用概述[J].热带农业科学,2005,25(3):50-56.
- [9] 张成.利用基因信息预测葡萄需肥规律并评价钾肥喷施效果[D].南京:南京农业大学园艺学院,2016:11-12.
- [10] 崔力文,郑婷,张克坤,等.葡萄*Actin*基因家族的鉴定及进化和表达分析[J].植物资源与环境学报,2017,26(3):1-10.
- [11] 陈翔高,房伟民,汪诗珊,等.梅花开花物候期及加长观赏期的研究[J].北京林业大学学报,1999,21(2):22-26.
- [12] 张彦苹,王晨,于华平,等.适于葡萄不同组织RNA提取方法的筛选[J].西北农业学报,2010,19(11):135-140.
- [13] 唐永凯,贾永义.荧光定量PCR数据处理方法的探讨[J].生物技术,2008,18(3):89-91.
- [14] 叶金英.*FT*、*FD*与*SOC1*对*API*基因表达调控的研究[D].厦门:厦门大学生命科学学院,2009:10.
- [15] 徐宗大,郝瑞杰,杨炜茹,等.梅花*pmAP2*基因的克隆及表达[J].东北林业大学学报,2015,43(5):54-58,67.
- [16] 兰树斌,李建国.植物*LFY*基因的研究进展[J].广西农业生物科学,2007(S):132-137.
- [17] 张积森,李伟,阙友雄,等.斑茅两个看家基因片段的克隆及其在基因芯片中的应用[J].热带亚热带植物学报,2007,15(4):277-283.
- [18] 王瑛,陈亚娟,丁莉萍,等.毛白杨不同组织器官稳定表达看家基因的筛选[J].植物生理学报,2016,52(8):1312-1320.

(责任编辑:郭严冬)