植物资源与环境学报，2022，**31**(2)：39-48
*Journal of Plant Resources and Environment*

# 米槠雄花发育相关的转录组和 MADS-box 家族基因表达特性分析

连　辉[a]，江淑珍[a,b]，熊远芳[a,b]，沈　军[a]，陈世品[a,①]
（福建农林大学：a. 林学院，b. 园林学院 兰科植物保护与利用国家林业和草原局重点实验室，福建 福州 350002）

**摘要**：以米槠〔*Castanopsis carlesii*（Hemsl.）Hayata〕花芽期、半开期和盛花期的雄花为研究材料，利用高通量测序平台构建米槠雄花发育过程的转录组数据库。分别对花芽期与半开期、半开期与盛花期以及花芽期与盛花期进行比较，筛选与雄花发育相关的差异表达 unigenes，并对差异表达 unigenes 进行功能注释。同时对米槠 MADS-box 家族基因进行鉴定，分析其在米槠雄花发育 3 个时期的表达量变化。结果显示：在获得的转录组中，clean reads 数为 628 800 000～643 700 000，高质量总碱基量为 6.29～6.44 Gb，Q30 碱基百分比均不小于 90.67%，GC 含量为45.09%～45.39%。花芽期与半开期、半开期与盛花期以及花芽期与盛花期间分别有 15 086、6 770 和 16 150 个差异表达 unigenes。GO 功能注释结果显示：差异表达 unigenes 主要注释在催化活性、连接和膜等相关的生物过程。KEGG 代谢通路注释结果显示：差异表达 unigenes 主要注释在全局及概要图、碳水化合物代谢、环境适应性和信号转录等相关的代谢通路。说明催化酶在米槠雄花发育过程有重要作用，注释在细胞组分中的差异表达 unigenes 主要与花粉成熟相关，同时雄花发育受碳水化合物代谢和转录因子的调控。表达量分析发现，米槠 type-Ⅱ型 MADS-box 家族基因在雄花发育过程中的表达具有差异性。*SHP* 和 *AG* 基因表达趋势相似，在花芽期表达量较低，半开期和盛花期表达量升高；*AP3* 基因随着雄花发育表达量逐渐升高；2 个 MIKC* 类同源基因主要在半开期表达；3 个 AP1/FUL 类同源基因在雄花发育 3 个时期中均有表达，但表达趋势有差异；*AGL6* 基因在雄花发育 3 个时期表达量均较高；4 个 SEP 类同源基因在雄花发育中表达量较高，其中，*SEP3* 基因表达量最高，在雄花发育 3 个时期的表达量变化不大，其余 3 个 SEP 类同源基因均在盛花期表达量升至最高。综合分析结果表明：在米槠雄花转录组中，多数差异表达 unigenes 的功能与花粉发育和催化酶的作用相关，且参与碳水化合物代谢和转录等代谢通路。MADS-box 家族基因在雄花发育的 3 个时期差异表达，与雄花发育密切相关。

**关键词**：米槠；雄花；转录组；差异表达 unigenes；MADS-box 家族基因

**中图分类号**：Q786；Q946-33；S792.17　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674-7895(2022)02-0039-10
DOI：10.3969/j.issn.1674-7895.2022.02.04

**Analysis on transcriptomes and expression characteristics of MADS-box family genes related to male flower development of *Castanopsis carlesii*** LIAN Hui[a], JIANG Shuzhen[a,b], XIONG Yuanfang[a,b], SHEN Jun[a], CHEN Shipin[a,①] (Fujian Agriculture and Forestry University: a. College of Forestry, b. Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration for Orchid Conservation and Utilization, College of Landscape Architecture, Fuzhou 350002, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2022, **31**(2): 39-48

**Abstract**: Taking male flowers of *Castanopsis carlesii* (Hemsl.) Hayata in flower bud stage, half flowering stage and flowering stage as research materials, the transcriptome database of the development

**收稿日期**：2021-10-09
**基金项目**：福建农林大学优秀研究生学位论文资助经费(1122YS01013)
**作者简介**：连　辉(1996—)，男，福建福州人，硕士研究生，主要从事植物发育生物学方面的研究。
①通信作者 E-mail：fjcsp@126.com
**引用格式**：连　辉，江淑珍，熊远芳，等. 米槠雄花发育相关的转录组和 MADS-box 家族基因表达特性分析[J]. 植物资源与环境学报，2022，31(2)：39-48.

process of male flowers of *C. carlesii* was constructed by using high-throughput sequencing platform. The flower bud stage and half flowering stage, half flowering stage and flowering stage, and flower bud stage and flowering stage were compared, the differentially expressed unigenes related to male flower development were screened, and their functions were annotated. Meanwhile, the MADS-box family genes of *C. carlesii* were identified, and the variations of expression levels of these genes in three stages of male flower development of *C. carlesii* were analyzed. The results show that in the obtained transcriptome, the number of clean reads are 628 800 000-643 700 000, the total amount of clean bases are 6.29-6.44 Gb, the percentages of Q30 base are all no less than 90.67%, and the GC contents are 45.09%-45.39%. There are 15 086, 6 770 and 16 150 differentially expressed unigenes between flower bud stage and half flowering stage, half flowering stage and flowering stage, and flower bud stage and flowering stage, respectively. The GO functional annotation result shows that the differentially expressed unigenes are mainly annotated in the biological processes related to catalytic activity, binding and membrane, etc. The KEGG metabolic pathway annotation result shows that the differentially expressed unigenes are mainly annotated in the metabolic pathways related to global and overview map, carbohydrate metabolism, environmental adaptation and signal transcription, etc. These results suggest that catalytic enzymes play an important role in the development process of male flowers of *C. carlesii*, the differentially expressed unigenes annotated in cell components are mainly related to pollen maturation, and the male flower development of *C. carlesii* is regulated by carbohydrate metabolism and transcription factors. The expression level analysis shows that there are differences in expression of type-Ⅱ MADS-box family genes in the development process of male flowers of *C. carlesii*. The expression trends of *SHP* and *AG* genes are similar, which are relatively low in flower bud stage, and increase in half flowering stage and flowering stage; the expression level of *AP3* gene gradually increases with male flower development; two MIKC* homologous genes are mainly expressed in half flowering stage; three AP1/FUL homologous genes are expressed in three stages of male flower development, but their expression trends are different; the expression levels of *AGL6* gene are all relatively high in three stages of male flower development; the expression levels of four SEP homologous genes are relatively high in male flower development, in which, the expression level of *SEP3* gene is the highest, and the variation of expression level in three stages of male flower development is not evident, while the expression levels of the other three SEP homologous genes all increase to the highest levels in flowering stage. The comprehensive analysis result shows that functions of most differentially expressed unigenes are related to pollen development and catalytic enzymes in the transcriptomes of male flowers of *C. carlesii*, and are involved in metabolic pathways of carbohydrate metabolism and transcription, etc. MADS-box family genes are differentially expressed in three stages of male flower development, which is closely related to male flower development.

**Key words**: *Castanopsis carlesii* (Hemsl.) Hayata; male flower; transcriptome; differentially expressed unigenes; MADS-box family gene

在被子植物中,花是重要的生殖器官,也是进化过程中最具多样性的结构[1]。同一个体(雌雄同株)或不同个体(雌雄异株)的单性雄花和雌花可促进异花授粉和基因交流,从而减少近亲繁殖[2]。壳斗科(Fagaceae)含900多种,是重要的经济资源,对森林生态系统的动态平衡有重要作用[3]。单性花是壳斗科植物的主要繁殖策略[4]。在壳斗科植物中,不同属植物有着不同类型花序,如栗属(*Castanea* Mill.)和锥属(*Castanopsis* Spach)植物,前者具有雄性和两性的柔荑花序,后者具有雄性和雌性的花序[4]。在栗属植物中,板栗(*Castanea mollissima* Blume)雌花中有12枚发育不完全的退化雄蕊,具有短的花丝和可见的花药[5]。在锥栗〔*Castanea henryi* (Skan) Rehd. et Wils.〕雌花中也存在退化雄蕊,在雌蕊原基的发育过程中雄蕊原基也发育,随着雌蕊原基的分化完成雄蕊停止发育[6]。而在其他壳斗科种类的研究中,单性花由花分生组织产生,不能同时形成雌性和雄性的性器官原基[4]。因此,在壳斗科植物中,栗属植物由于雄蕊停止生长而形成单性花,而同科其他属种类的单性花不存在雌蕊或雄蕊败育的现象,花发育起始阶段就是单性的。在这些花中,性别决定基因通过控制花分生组织的发生和花器官的形成来调控性别分化[7]。目前,雌雄同株植物的花器官发育已被广泛研究,在大多数情况下,花器官分化主要由MADS-box转录因子控制[8]。

米槠〔*Castanopsis carlesii* (Hemsl.) Hayata〕为壳

斗科锥属植物，广泛分布于中亚热带海拔 1 300 m 以下的山地丘陵，为亚热带常绿阔叶林顶级群落之一[9]。米槠具有 2 种类型花序：雄性柔荑花序在当年生的叶轴上发育，雌花序在枝稍附近发育。目前，在米槠的雄花中尚未发现雌蕊败育的迹象，表明米槠雄花在花发育的起始阶段就是单性的。在壳斗科植物中，花发育起始阶段就是单性的现象较为普遍，如欧洲栓皮栎（*Quercus suber* Linn.）[10]。然而，关于壳斗科植物从起始阶段就是单性的雌、雄花发育机制的研究还不够深入。本文基于转录组测序技术，对米槠雄花的花芽期、半开期和盛花期 3 个时期进行转录组分析，对差异表达 unigenes 进行功能注释。通过系统发育分析，鉴定出米槠 MADS-box 家族基因，并对其在不同发育阶段雄花的表达量进行分析。以期进一步认识 MADS-box 家族基因在米槠雄花发育中的作用，为深入探究壳斗科植物单性花发育的分子机制提供参考。

## 1　材料和方法

### 1.1　材料

供试米槠雄花来自于福建省福州市鼓山风景区（东经 119°23′04″、北纬 26°03′13″，海拔 402 m）米槠野生群落。树种鉴定参照《中国植物志》[11]和《福建植物志》[12]。于 2019 年 3 月至 5 月，持续观察米槠雄花发育时期，分别在米槠雄花的花芽期（花被片和雄蕊均未分化，F1 期）、半开期（花被片和雄蕊分化完成，花被片微微张开，F2 期）及盛花期（花被片张开并开始散粉，F3 期）采集雄花花序，每个时期分别从 3 株植株上采集，即为 3 个生物学重复，共采集 9 个样品。取样后立即用液氮速冻，保存于-80 ℃冰箱中，用于后续转录组测序分析。

### 1.2　方法

1.2.1　*转录组测序与组装*　使用 PureLink™ Plant RNA 试剂盒（美国 Invitrogen 公司）分别提取米槠 3 个时期 9 个样品的总 RNA，再使用 RNase-FreeDNase（美国 Promega 公司）去除 DNA 污染。采用质量体积分数 1.25%琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性，使用 NanoDrop 1000 超微量分光光度计（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）测定总 RNA 的浓度和纯度。使用寡聚体（dT）贴附磁珠对总 RNA 进行纯化，将纯化后的总 RNA 用片段缓冲液破碎成小块，利用随机的六聚体引物反转录产生第 1 链 cDNA，接着合成第 2 链 cDNA。双链 DNA 末端补平，5′端磷酸化，3′端进行接头。使用 PCR 扩增双链 cDNA 片段，用 AMPure XP 磁珠（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）纯化扩增产物，纯化后的双链 PCR 产物经热变性，溶解于 EB 溶液中，经安捷伦 2100 生物分析仪（美国 Agilent 公司）质量控制验证后，溶解于 EB 溶液中的双链 PCR 产物经 95 ℃热变性成单链，经寡核苷酸序列循环，最终得到单链环状 DNA 作为文库。采用第二代测序技术，并基于 Illumina HiSeq 测序平台，对这些文库进行双末端测序。使用 Trinity 软件[13]进行转录组从头组装，为确保 RNA 测序数据的准确性和可靠性，从 raw reads 中剔除低质量、接头污染以及未知碱基 N 含量过高的 reads，仅对剩下的高质量测序数据（clean reads）进行统计分析。

1.2.2　*转录组差异表达 unigenes 注释*　采用 FPKM 值表示转录组差异表达 unigenes 的表达丰度。采用 Benjamini-Hochberg 校正法对原有假设检验得到的 *P* 值进行校正，最终采用 FDR（错误发现率）作为差异表达 unigenes 筛选的关键指标。利用 DESeq 软件，以 FDR<0.05、FC（差异倍数）≥2 作为差异表达 unigenes 的筛选标准，差异表达 unigenes 的功能注释信息通过 KEGG 数据库（http://www.genome.jp/kegg/）和 GO 数据库（http://www.geneontology.org/）获得。使用 BLAST 软件将差异表达 unigenes 序列与 GO 数据库比对，进行注释，在获得每个差异表达 unigene 的 GO 注释后，使用 WEGO 软件（http://wego.genomics.org.cn/cgi-bin/wego/index.pl）对所有差异表达 unigenes 进行 GO 功能分类统计，通过 KEGG 数据库的注释信息得到基因的 path-way 注释。

1.2.3　*MADS-box 家族基因鉴定与表达量分析*　在 TAIR 在线数据库（https://www.arabidopsis.org/index.jsp）下载拟南芥〔*Arabidopsis thaliana*（Linn.）Heynh.〕MADS-box 家族蛋白序列。以拟南芥 MADS-box 家庭蛋白序列作为索引在米槠基因组中进行本地 BLASTp 检索。将获得的候选序列提交到 NCBI-CDD 网站（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd）和 HMMER 网站（https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmsearch），根据 Pfam（PF00319）在米槠基因组数据库中筛选出具有完整保守结构域的成员作为米槠 MADS-box 家族基因。由于米槠 type-Ⅰ型 MADS-box 家族基因在花发育过程中几乎不表

达,且该家族基因在花发育过程中调控作用的研究较少,因此,未开展该家族基因的系统进化树及表达量分析。采用 MEGA 7.0 软件对米槠和拟南芥的 type-Ⅱ型 MADS-box 家族基因的蛋白序列进行多序列比对后,采用邻接法(neighbor-joining method)构建系统进化树,对建成的系统进化树进行自展法系数(bootstrap)校正,设置 1 000 次重复检验,最后优化进化树。从转录组数据中获取米槠雄花 3 个时期 MADS-box 家族基因的表达丰度值(FPKM),通过 $\log_2$(FPKM+1)计算表达量,并使用 TBtools 软件中的 HeatMap 程序绘制基因表达量热图。

## 2 结果和分析

### 2.1 测序质量分析和差异表达 unigenes 筛选

2.1.1 测序质量分析 测序结果(表 1)显示:米槠雄花 3 个时期样品的 clean reads 为 628 800 000~643 700 000,高质量总碱基量为 6.29~6.44 Gb,Q30 碱基百分比均不小于 90.67%,GC 含量为 45.09%~45.39%。

2.1.2 差异表达 unigenes 筛选 对花芽期、半开期和盛花期 3 个时期米槠雄花的转录组结果进行比对分析,结果(表 2)显示:花芽期与半开期间有 15 086 个差异表达 unigenes,其中,与花芽期相比,半开期表达量上调的 unigenes 有 5 283 个,表达量下调的 unigenes 有 9 803 个。半开期与盛花期间有 6 770 个差异表达 unigenes,其中,与半开期相比,盛花期表达量上调的 unigenes 有 3 536 个,表达量下调的 unigenes 有 3 234 个。花芽期与盛花期间有 16 150 个差异表达 unigenes,其中,与花芽期相比,盛花期表达量上调的 unigenes 有 6 588 个,表达量下调的 unigenes 有 9 562 个。

**表 1 米槠雄花转录组数据统计**
**Table 1 Transcriptome statistics of male flowers of *Castanopsis carlesii* (Hemsl.) Hayata**

| 时期[1)] Stage[1)] | Clean reads 数 Number of clean reads | 高质量总碱基量/Gb Total amount of clean bases | Q30 碱基百分比/% Percentage of Q30 base | GC 含量/% GC content |
|---|---|---|---|---|
| F1 | 628 800 000 | 6.29 | 91.23 | 45.09 |
| F2 | 643 700 000 | 6.44 | 90.71 | 45.39 |
| F3 | 631 100 000 | 6.31 | 90.67 | 45.18 |

[1)] F1:花芽期 Flower bud stage;F2:半开期 Half flowering stage;F3:盛花期 Flowering stage.

**表 2 不同时期间米槠雄花转录组差异表达 unigenes 数**
**Table 2 Number of differentially expressed unigenes in transcriptome of male flower of *Castanopsis carlesii* (Hemsl.) Hayata between different stages**

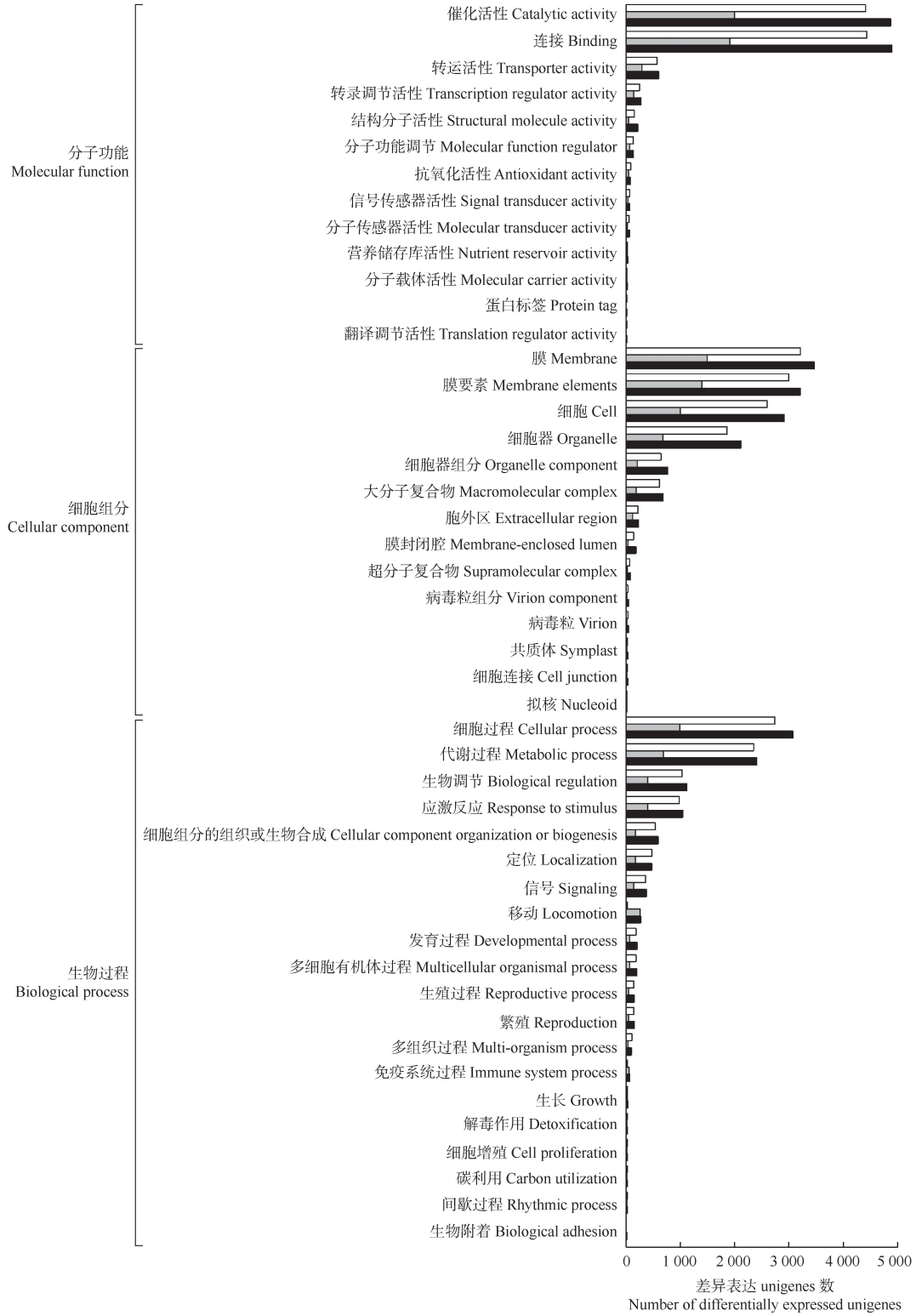
| 时期[1)] Stage[1)] | 差异表达 unigenes 数 Number of differentially expressed unigenes | | |
|---|---|---|---|
| | 表达量上调 Up regulation of expression level | 表达量下调 Down regulation of expression level | 总计 Total |
| F1 vs F2 | 5 283 | 9 803 | 15 086 |
| F2 vs F3 | 3 536 | 3 234 | 6 770 |
| F1 vs F3 | 6 588 | 9 562 | 16 150 |

[1)] F1:花芽期 Flower bud stage;F2:半开期 Half flowering stage;F3:盛花期 Flowering stage.

### 2.2 功能注释分析

2.2.1 GO 功能注释分析 在 GO 数据库对米槠雄花的花芽期与半开期、半开期与盛花期以及花芽期与盛花期 3 组的差异表达 unigenes 进行比对和功能注释,结果见图 1。

由图 1 可以看出:米槠雄花的花芽期与半开期、半开期与盛花期以及花芽期与盛花期 3 组分别有 31 888、13 228 和 35 203 个差异表达 unigenes 注释在分子功能、细胞组分和生物过程 3 大类 47 个亚类中。在分子功能的 13 个亚类中,3 组差异表达 unigenes 主要注释在催化活性和连接 2 个亚类中,其中,注释在催化活性亚类的差异表达 unigenes 分别有 4 411、2 001和 4 876 个;注释在连接亚类的差异表达 unigenes 分别有 4 437、1 911 和4 896个。在细胞组分的 14 个亚类中,3 组差异表达 unigenes 主要注释在膜、膜要素、细胞和细胞器 4 个亚类中,其中,注释在膜亚类的差异表达 unigenes 分别有 3 215、1 493 和 3 464 个;注释在膜要素亚类的差异表达 unigenes 分别有 2 997、1 399 和 3 206 个;注释在细胞亚类的差异表达 unigenes 分别有 2 594、997 和2 915个;注释在细胞器亚类的差异表达 unigenes 分别有 1 862、674 和2 111 个。在生物过程的 20 个亚类中,3 组的差异表达 unigenes 主要注释在细胞过程、代谢过程、生物调节和应激反应 4 个亚类中,其中,注释在细胞过程亚类的差异表达 unigenes 分别有 2 738、983 和 3 071 个;注释在代谢过程亚类的差异表达 unigenes 分别有 2 347、690 和 2 403 个;注释在生物调节亚类的差异表达 unigenes 分别有 1 033、398 和 1 121 个;注释在应激反应亚类的差异表达 unigenes 分别有 981、393 和 1 037 个。




□：花芽期与半开期的差异表达 unigenes 的功能分类 Functional classification of differentially expressed unigenes between flower bud stage and half flowering stage；■：半开期与盛花期的差异表达 unigenes 的功能分类 Functional classification of differentially expressed unigenes between half flowering stage and flowering stage；■：花芽期与盛花期的差异表达 unigenes 的功能分类 Functional classification of differentially expressed unigenes between flower bud stage and flowering stage.

**图 1　米槠雄花转录组差异表达 unigenes 的 GO 功能分类**

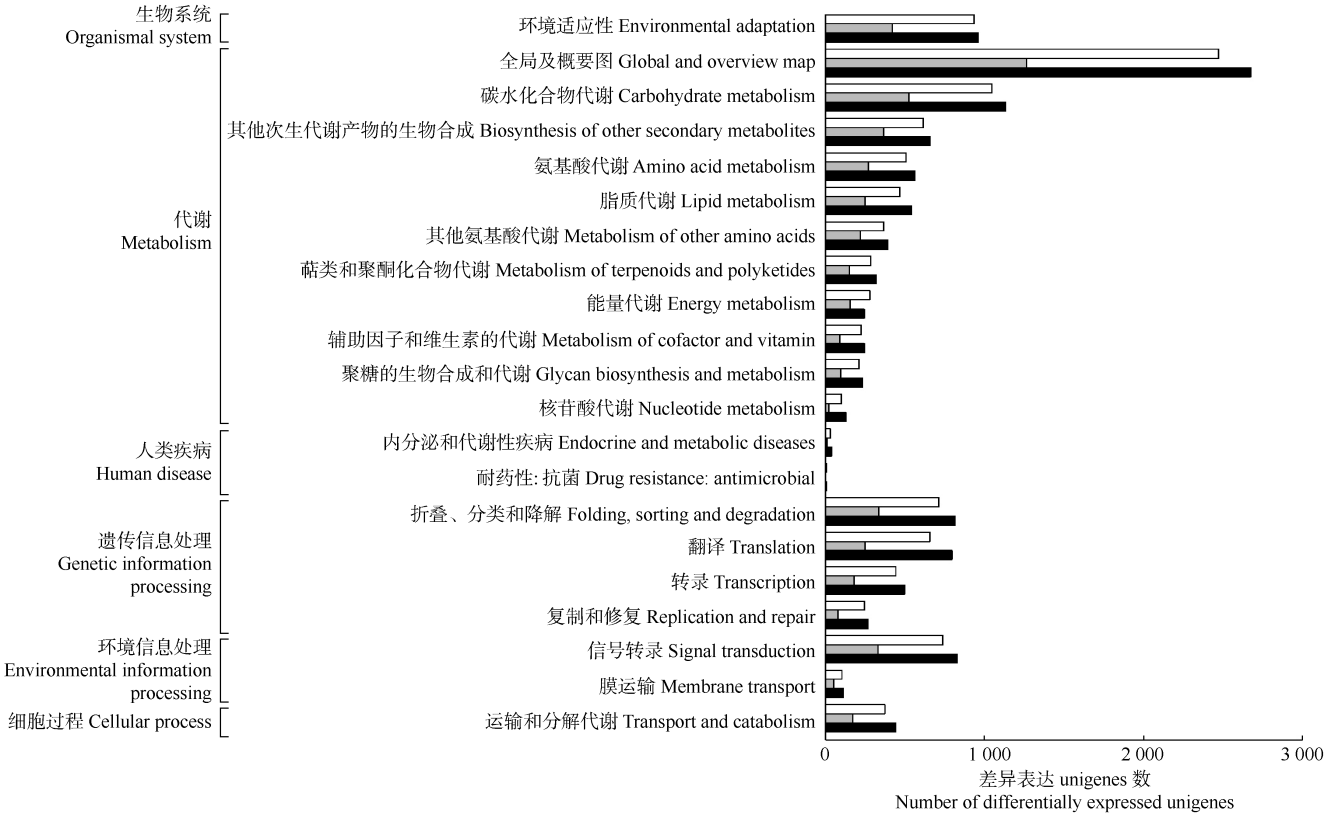
**Fig. 1　GO functional classification of differentially expressed unigenes in transcriptome of male flowers of *Castanopsis carlesii* (Hemsl.) Hayata**

2.2.2 KEGG 代谢通路分析 在 KEGG 数据库中对米槠雄花的花芽期与半开期、半开期与盛花期以及花芽期与盛花期 3 组的差异表达 unigenes 进行比对和功能注释,结果见图 2。

由图 2 可以看出:花芽期与半开期、半开期与盛花期以及花芽期与盛花期 3 组分别有 10 826、5 241 和 11 896 个差异表达 unigenes 注释在 KEGG 代谢通路,共 6 大类 21 亚类,且主要注释在代谢和遗传信息处理 2 大类中。3 组注释在代谢相关通路的差异表达 unigenes 最多,分别有 6 580、3 414 和 7 130 个,包括全局及概要图、碳水化合物代谢、其他次生代谢产物的生物合成、氨基酸代谢和脂质代谢等 11 个亚类,其中,注释在全局及概要图亚类的差异表达 unigenes 最多,分别有 2 473、1 266 和 2 673 个。3 组注释在遗传信息处理相关通路的差异表达 unigenes 分别有 2 060、843 和 2 379 个,包括翻译、转录、复制和修复以及折叠、分类和降解 4 个亚类。3 组注释在环境信息处理相关通路的差异表达 unigenes 分别有 846、384 和 943 个,包括信号转录和膜运输 2 个亚类。在生物系统相关通路中,3 组分别有 846、384 和 943 个差异表达 unigenes 注释在环境适应性亚类中。在细胞过程相关通路中,3 组分别有 372、171 和 443 个差异表达 unigenes 注释在运输和分解代谢亚类中。在人类疾病相关通路中,3 组共有 32、8 和 40 个差异表达 unigenes 注释在内分泌和代谢性疾病以及耐药性:抗菌 2 个亚类中。

## 2.3 type-Ⅱ型 MADS-box 家族基因鉴定及表达量分析

利用 MEGA 7.0 对米槠和拟南芥 type-Ⅱ型 MADS-box 蛋白构建系统进化树(图 3)。结果显示:米槠 type-Ⅱ型 MADS-box 家族基因有 53 个成员,可分为 13 类:C/D 类(6 个成员)、ANR1 类(4 个成




□: 花芽期与半开期的差异表达 unigenes 的代谢通路 Metabolic pathway of differentially expressed unigenes between flower bud stage and half flowering stage; ■: 半开期与盛花期的差异表达 unigenes 的代谢通路 Metabolic pathway of differentially expressed unigenes between half flowering stage and flowering stage; ■: 花芽期与盛花期的差异表达 unigenes 的代谢通路 Metabolic pathway of differentially expressed unigenes between flower bud stage and flowering stage.

**图 2 米槠雄花转录组差异表达 unigenes 的 KEGG 代谢通路**

**Fig. 2 KEGG metabolic pathway of differentially expressed unigenes in transcriptome of male flowers of *Castanopsis carlesii* (Hemsl.) Hayata**

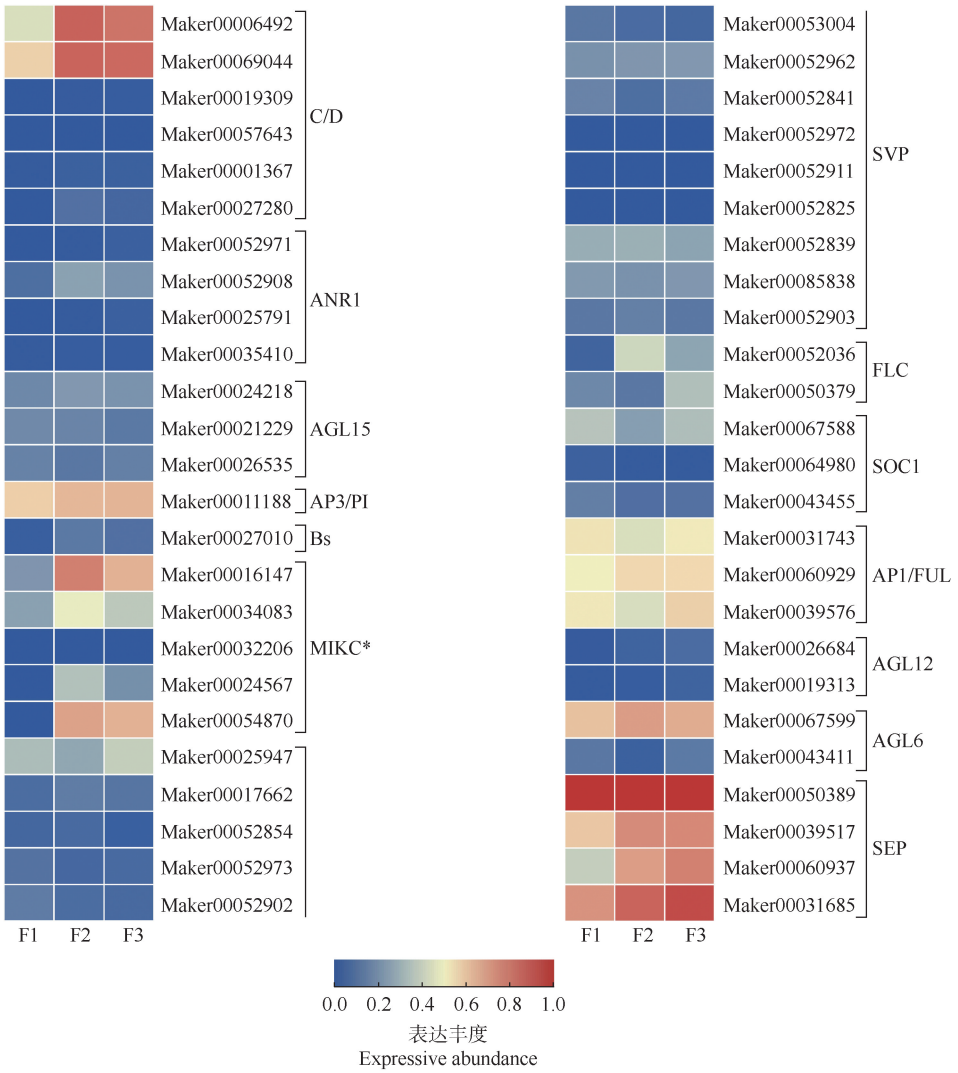
员）、AGL15 类（4 个成员）、AP3/PI 类（1 个成员）、Bs 类（1 个成员）、MIKC* 类（7 个成员）、SVP 类（14 个成员）、FLC 类（2 个成员）、SOC1 类（3 个成员）、AP1/FUL 类（3 个成员）、AGL12 类（2 个成员）、AGL6 类（2 个成员）和 SEP 类（4 个成员）。

基于花芽期、半开期和盛花期 3 个时期米槠雄花的转录组数据对米槠 type-Ⅱ型 MADS-box 家族基因进行表达分析，发现其在雄花不同发育阶段的表达具有差异性。3 个时期米槠雄花 type-Ⅱ型 MADS-box 家族基因的表达量热图（图 4）显示：在 C/D 类同源基因中，*SHP* 基因（Maker00006492）和 *AG* 基因（Maker00069044）表达趋势类似，在花芽期表达量较低，半开期和盛花期表达量升高；其余 4 个 C/D 类同源基因在雄花发育过程中几乎不表达。在 AP3/PI 类同源基因中，*AP3* 基因（Maker00011188）随雄花发育表达量逐渐升高。在 MIKC* 类同源基因中，Maker00016147 和 Maker00054870 在雄花发育过程中表达量较高，其余基因表达量较低或不表达；其中，

▲：米槠 *Castanopsis carlesii*（Hemsl.）Hayata；●：拟南芥 *Arabidopsis thaliana*（Linn.）Heynh.

**图 3　米槠和拟南芥 type-Ⅱ型 MADS-box 蛋白的系统进化树**

**Fig. 3　Phylogenetic tree of type-Ⅱ MADS-box proteins in *Castanopsis carlesii*（Hemsl.）Hayata and *Arabidopsis thaliana*（Linn.）Heynh.**




F1：花芽期 Flower bud stage；F2：半开期 Half flowering stage；F3：盛花期 Flowering stage.

**图4 米槠雄花 type-Ⅱ型 MADS-box 家族基因的表达量热图**

**Fig. 4 Heatmap of expression level of type-Ⅱ MADS-box family genes in male flowers of *Castanopsis carlesii* (Hemsl.) Hayata**

Maker00016147 在花芽期的表达量较低，在半开期的表达量升至最高，在盛花期的表达量降至半开期的一半；Maker00054870 的表达趋势类似，在半开期的表达量最高，在盛花期的表达量略下降。在 AP1/FUL 类同源基因中，Maker00031743 和 Maker00060929 为 *AP1* 基因，Maker00031743 在花芽期的表达量最高，在半开期的表达量降至最低，在盛花期的表达量较半开期升高；Maker00060929 在花芽期、半开期和盛开期的表达量均较高，且几乎没有变化；*FUL* 基因（Maker00039576）在花芽期和盛花期的表达量较高，但在半开期的表达量却较低。在 AGL6 类同源基因中，*AG6* 基因（Maker00067599）在雄花发育 3 个时期的表达量均较高。在 SEP 类同源基因中，Maker00050389、Maker00039517、Maker00060937 和 Maker00031685 均在雄花发育过程中高表达；其中，*SEP3* 基因（Maker00050389）的表达量最高，且在雄花发育 3 个时期的波动不大；Maker00039517 和 Maker00031685 的表达趋势相似，在花芽期的表达量较高，在半开期和盛花期的表达量逐渐升高；Maker00060937 在花芽期的表达量较低，在半开期和盛花期的表达量逐渐升高。其余 6 类同源基因在米槠雄花发育过程中几乎不表达。

## 3 讨　　论

功能注释结果表明：通过与 GO 数据库比对，花芽期与半开期、半开期与盛花期以及花芽期与盛花期 3 组差异表达 unigenes 注释在分子功能、细胞组分和生物过程的 47 个亚类中。在分子功能中，注释在催化活性和连接亚类的差异表达 unigenes 最多，可见催化酶在米槠雄花发育过程中发挥着重要作用；在细胞组分中，差异表达 unigenes 主要注释在膜、膜要素、细胞和细胞器 4 个亚类中，在雄花发育过程中，花粉粒的成熟伴随着新的细胞膜、细胞壁以及细胞器的生成，推测差异表达 unigenes 与花粉粒的成熟相关。通过 KEGG 数据库比对，3 组差异表达 unigenes 主要注释在代谢和遗传信息处理 2 大类中。注释在代谢相关通路的差异表达 unigenes 最多，主要注释在全局及概要图、碳水化合物代谢和其他次生代谢产物的生物合成 3 个亚类中。相关研究表明：植物成花过程中需要消耗大量的碳水化合物和蛋白质等[14]，因此，注释在代谢相关通路的差异表达 unigenes 对米槠雄花成花有重要作用。此外，KEGG 代谢通路注释结果还显示：注释在遗传信息处理相关通路的转录亚类和环境信息处理相关通路的信号转录亚类的差异表达 unigenes 较多，表明转录因子对米槠雄花的基因表达有重要作用。

相关研究表明：转录因子家族在植物的生殖过程中发挥着重要作用，其中 MADS-box 家族是控制花器官形成的重要转录因子家族[15]。相关研究根据系统发育学和基因结构的特点，将 MADS-box 家族分为 type-Ⅰ型和 type-Ⅱ型[16,17]。通过对米槠雄花的花芽期、半开期和盛花期的基因表达量分析，发现 type-Ⅰ型 MADS-box 家族基因在米槠成花过程中几乎不表达，印证了大多数植物中以 type-Ⅱ型 MADS-box 家族基因为主的推断[18]。通过对米槠 type-Ⅱ型 MADS-box 家族基因进行鉴定及表达量分析，发现其在米槠雄花不同发育阶段的表达具有差异性，其中，鉴定到 AP1/FUL 类同源基因 3 个，*AP1* 基因 2 个，其中 1 个在花芽期和盛花期表达量较高，另外 1 个在 3 个时期的表达量均较高；*FUL* 基因 1 个，在花芽期和盛花期表达量较高。研究发现，*FUL* 基因在花序分生组织中表达，对花分生组织的起始分化有重要作用，可能参与调控开花时间，而 *AP1* 基因在花分生组织和萼片的形成中有重要作用[19]。因此，米槠 *FUL* 基因在花芽期和盛花期表达量较高，推测对米槠雄花花序分化和开花起重要作用，*AP1* 基因在半开期和盛花期高表达，调控花被片的形成。鉴定到 AP3/PI 类同源基因 1 个，为 *AP3* 基因，表达量随着雄花的发育逐渐升高。AP3/PI 类基因通常在花瓣和雄蕊中表达，对控制花瓣和雄蕊的形成有重要作用[19]。因此，在米槠雄花发育过程中，AP3/PI 类同源基因对雄蕊和花被片的发育有重要作用。鉴定到 C/D 类同源基因 6 个，其中米槠 *AG* 基因表达量随着雄花的发育逐渐升高，主要在雄花发育后期表达。在欧洲栗（*Castanea sativa* Mill.）和欧洲栓皮栎的研究中，*AG* 基因主要在雄花发育后期表达，与花粉发育密切相关[4,10]。在米槠雄花发育过程中，*AG* 基因的表达趋势与欧洲栗和欧洲栓皮栎相似，因此，AG 类同源基因可能参与调控米槠的花粉发育。米槠 *SHP* 基因在时间上的表达模式与 *AG* 基因相似，主要在雄花发育后期表达。在欧洲栗和欧洲栓皮栎的研究中，*SHP* 基因在雄花发育后期高表达，同时还在雌花中表达，表明壳斗科的 SHP 类同源基因可能是功能性的 C 类基因[4,10]。而 *STK* 基因主要参与调控胚珠的发育[20]，在米槠雄花发育的 3 个时期均未表达，印证了米槠雄花中不存在雌蕊的结构。鉴定到 SEP 类同源基因 4 个，在米槠雄花发育的 3 个时期有较高表达，表明 SEP 类同源基因在米槠雄花发育过程中起协同作用。

综上所述，在米槠雄花发育过程中，AP1/FUL 类、AP3/PI 类、C/D 类和 SEP 类同源基因有较高的表达，且在不同时期的表达具有差异性，而这些基因在其他物种中已被证实参与调控各个花器官的发育。米槠是雌雄同株的单性花植物，AP3/PI 类和C/D类同源基因对雄蕊和雌蕊的形成有着重要的作用。因此，下一步可重点分析 MADS-box 家族基因分别在米槠雄花和雌花不同花器官中的表达情况，以期阐明这些基因在米槠性别分化和花器官发育中的功能和作用机制。

**参考文献：**

[1] 许自龙，陈益存，高　暝，等. 被子植物性别分化的研究进展[J]. 林业科学，2019，55(8)：157-169.

[2] CHARLESWORTH B，CHARLESWORTH D. A model for the evolution of dioecy and gynodioecy[J]. The American Naturalist，1978，112(988)：975-997.

[3] KREMER A，ABBOTT A G，CARLSON J E，et al. Genomics of

Fagaceae[J]. Tree Genetics and Genomes, 2012, 8: 583-610.

[4] ALHINHO A T, RAMOS M J N, ALVES S, et al. The dynamics of flower development in *Castanea sativa* Mill.[J]. Plants, 2021, 10: 1538.

[5] SHI Z, STÖSSER R. Reproductive biology of Chinese Chestnut (*Castanea mollissima* Blume)[J]. European Journal of Horticultural Science, 2005, 70(2): 96-103.

[6] FAN X M, YUAN D Y, TIAN X M, et al. Comprehensive transcriptome analysis of phytohormone biosynthesis and signaling genes in the flowers of Chinese chinquapin (*Castanea henryi*)[J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 2017, 65(47): 10332-10349.

[7] SOBRAL R, SILVA H G, MORAIS-CECÍLIO L, et al. The quest for molecular regulation underlying unisexual flower development [J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 160.

[8] BECKER A, THEIßEN G. The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2003, 29: 464-489.

[9] LIU B, ZENG Q M, JIANG Y T, et al. The complete chloroplast genome sequence of *Castanopsis carlesii* (Fagaceae) [J]. Mitochondrial DNA Part B, 2019, 4(1): 2076-2077.

[10] SOBRAL R, COSTA M M R. Role of floral organ identity genes in the development of unisexual flowers of *Quercus suber* L.[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 10368.

[11] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第二十二卷[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 66.

[12] 福建省科学技术委员会《福建植物志》编写组. 福建植物志[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1982: 384.

[13] KIM C S, WINN M D, SACHDEVA V, et al. K-mer clustering algorithm using a MapReduce framework: application to the parallelization of the Inchworm module of Trinity [J]. BMC Bioinformatics, 2017, 18: 467.

[14] 彭向永. 雌、雄蒿柳花芽分化机制及性别决定基因挖掘[D]. 北京: 中国林业科学研究院林业研究所, 2017: 74-80.

[15] 朱利利, 杜庆鑫, 何 凤, 等. 杜仲雄花芽2个发育时期转录组分析[J]. 植物研究, 2020, 40(2): 284-292.

[16] ALVAREZ-BUYLLA E R, PELAZ S, LILJEGREN S J, et al. An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97 (10): 5328-5333.

[17] 王 敏, 席 东, 莫正海, 等. 薄壳山核桃 *CiAGL6* 基因的克隆、亚细胞定位及表达[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2020, 44(4): 63-69.

[18] 邱文明, 徐育海, 何秀娟. 板栗雌雄花发育相关的 *MADS-box* 基因发掘与表达分析[J]. 园艺学报, 2016, 43(8): 1593-1604.

[19] PABÓN-MORA N, AMBROSE B A, LITT A. Poppy *APETALA1/FRUITFULL* orthologs control flowering time, branching, perianth identity, and fruit development[J]. Plant Physiology, 2012, 158 (4): 1685-1704.

[20] 王 莹, 穆艳霞, 王 锦. *MADS-box* 基因家族调控植物花器官发育研究进展[J]. 浙江农业学报, 2021, 33(6): 1149-1158.

(责任编辑: 郭严冬)

## 公益宣传: 世界地球日

世界地球日(The World Earth Day)为每年的4月22日,是一个专为世界环境保护而设立的节日,旨在提高民众对于现有环境问题的保护意识,动员民众积极参与环境保护运动,通过绿色低碳生活,改善地球的整体环境,保护人类共同的家园。

1970年4月22日举行了人类有史以来第一次规模宏大的群众性环境保护运动,成为人类历史上的首个"地球日"。现今,世界地球日的庆祝活动已发展至全球近200个国家,每年有超过10亿人参与世界地球日活动,已成为世界上最大的民间环保节日。中国从20世纪90年代起,每年都会在4月22日举办世界地球日活动。今年世界地球日的主题是"珍爱地球,人与自然和谐共生",呼吁人们共同应对生物多样性危机、气候危机、公共健康危机,共筑一个更加美好的世界。