

## 柿性器官败育及相关基因的表达

王丽媛<sup>1,2</sup>, 孙鹏<sup>1,2</sup>, 李华威<sup>1,2</sup>, 傅建敏<sup>1,2</sup>, 刁松峰<sup>1,2</sup>, 韩卫娟<sup>1,2</sup>, 索玉静<sup>1,2</sup>, 买旖旎<sup>1,2</sup>

(1. 中国林业科学研究院 经济林研究开发中心, 河南 郑州 450003; 2. 国家林业和草原局 泡桐研究开发中心, 河南 郑州 450003)

**摘要:** 为描述柿 *Diospyros kaki* 性器官败育现象, 以中国林业科学研究院经济林研究开发中心原阳试验基地 10 年生的雌雄同株柿品种‘禅寺丸’‘Zenjimaru’为研究对象, 通过制作石蜡切片结合外部形态变化, 同时利用实时定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)技术对 6 个性别分化相关基因进行表达模式分析, 对柿花芽分化过程中的性器官败育的关键时期及分子调控机制进行了研究。结果表明: 柿雌花中的雄蕊原基和雄花中的雌蕊原基均在 4 月中旬发生败育。此时, 顶端着生雌花的枝条长为 5.0~6.0 cm, 着生雄花的枝条长为 6.0~8.0 cm, 雌花芽长约 1.0 cm, 雄花芽长为 1.0~2.0 cm。除了 4 月 5 日和 4 月 8 日外, *ANT* 和 *LYK3* 基因在其他发育阶段均差异显著( $P<0.05$ )且在雌花芽中的表达量明显高于雄花芽, 而 *AP2* 和 *ABCC10* 基因则是在雄花芽中的表达水平显著高于雌花芽( $P<0.05$ )。在 4 月 5 日和 4 月 14 日(性器官败育关键时期), 基因 *BI-1* 在雌花芽中的表达量分别是雄花芽的 1.5 倍和 2.0 倍, 而在其余阶段, 其表达量分别是雄花芽的 97.5%, 89.2% 和 83.9%, 推测 *BI-1* 作为一种雄性器官细胞凋亡抑制基因, 间接促进柿雄花芽的发育。建议对树体进行正常的修剪、施肥等常规处理的同时, 在 4 月中旬花器官原基败育之前对树体进行相应激素的喷施, 以调控柿花性别, 培育雄性种质。图 3 表 1 参 39

**关键词:** 经济林学; 柿; 性器官败育; 基因表达

中图分类号: S665.2; S718.43 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2019)02-0236-11

## Expression analysis for abortion of sex organs and related-genes in persimmon (*Diospyros kaki*)

WANG Liyuan<sup>1,2</sup>, SUN Peng<sup>1,2</sup>, LI Huawei<sup>1,2</sup>, FU Jianmin<sup>1,2</sup>, DIAO Songfeng<sup>1,2</sup>, HAN Weijuan<sup>1,2</sup>, SUO Yujing<sup>1,2</sup>, MAI Yini<sup>1,2</sup>

(1. Non-Timber Forest Research and Development Center, Chinese Academy of Forestry, Zhengzhou 450003, Henan, China; 2. Paulownia Research Center, National Forestry and Grassland Administration, Zhengzhou 450003, Henan, China)

**Abstract:** The abortion of sex organs in *Diospyros kaki* (persimmon) has not yet been clearly elucidated. To investigate the key period for expression patterns dealing with abortion of sex organs and related-genes in persimmon, paraffin section method and morphology changes, as well as a qRT-PCR analysis of six floral sex differentiation-related genes, were conducted with a 10-year-old monoecious persimmon cultivar ‘Zenjimaru’ in the Yuanyang Practice Base belonging to the Non-timber Forestry Research & Development Center, Chinese Academy of Forestry. Results showed that stamen primordium in female flowers and pistil primordium in male flowers both aborted in mid-April with the female branch 5.0–6.0 cm in length, the male branch 6.0–8.0 cm in length, the female floral bud 1.0 cm in length, and the male floral bud 1.0–2.0 cm in length. In addition, during differentiation, excluding the April 5th and April 8th stages, *ANT* and *LYK3* genes were significantly higher

收稿日期: 2018-03-08; 修回日期: 2018-04-09

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费资助项目(CAFYBB2016QB017, CAFYBB2017ZA005); 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(31500559)

作者简介: 王丽媛, 博士研究生, 从事经济林育种栽培研究。E-mail: 479011096@qq.com。通信作者: 傅建敏, 研究员, 从事经济林育种栽培研究。E-mail: fjm371@163.com

( $P < 0.05$ ) in female floral buds than male; whereas, *AP2* and *ABCC10* genes in male floral buds were significantly higher than female ( $P < 0.05$ ). The *BI-1* level in female floral buds was 1.5 to 2.0 times greater than those in male buds in April 5th and April 14th (the key period for abortion of sex organs), respectively, but it was 97.5%, 89.2%, and 83.9% in the other stages. Thus, the *BI-1* gene may act as an apoptosis-inhibitor and may be indirectly related to development of stamen primordia. Exogenous phytohormones, that regulate the sex of flower buds and cultivate male persimmon germplasm resources, should be considered along with conventional management before abortion of corresponding sexual organs in mid-April. [Ch, 3 fig. 1 tab. 39 ref.]

**Key words:** non-timber forest products; persimmon; abortion of sex organs; gene expression

柿 *Diospyros kaki* 是柿科 Ebenaceae 柿属 *Diospyros* 落叶乔木, 在中国分布范围较广, 是一种重要木本粮食树种。柿果实富含黄酮、多酚和维生素 C 等活性成分, 营养丰富, 具有活血降压、止血凉血等保健功效及药用价值, 可在产品加工、医疗美容等领域发挥重要作用<sup>[1]</sup>。柿开花特性复杂, 大部分品种只开雌花, 少数雌雄同株, 只开雄花的品种十分罕见<sup>[2]</sup>, 雄性资源的严重缺乏限制了柿杂交育种工作的深入开展, 这是造成中国柿产业发展缓慢的关键原因之一<sup>[3-4]</sup>。有研究指出, 在花发育早期存在两性花器官原基, 随着花芽的分化进程, 在雌性或雄性花成熟之前, 对应性器官发生了细胞程序性死亡, 从而导致单性花的产生<sup>[5]</sup>。如玉米 *Zea mays*<sup>[6]</sup>, 芦笋 *Asparagus officinalis*<sup>[7]</sup> 等单性花的产生都是由于两性花器官在花芽分化过程中, 对应性器官的选择性败育导致的。目前, 关于柿花芽分化的研究较少, SOBA-JIMA 等<sup>[8]</sup>对柿‘平核无’‘Hiratanenashi’的雌花分化进程、YONEMORI 等<sup>[9]</sup>对‘花御所’‘Hanagoshō’等雌、雄花芽分化早期的形态学进行了报道。此外, 本课题组对雌雄同株柿‘禅寺丸’‘Zenjimaru’的花芽发育进程进行了组织细胞学研究发现, 在柿花发育早期同时具有雌、雄蕊原基, 随着花芽分化的进行, 到 4 月中旬, 柿雄花中的雌蕊原基有选择性的退化, 雌花中的雄蕊原基也选择性的退化, 最终形成了雌花或雄花等单性花<sup>[10]</sup>。本课题组对 4 月 13 日发育的柿‘禅寺丸’雌、雄花芽进行了 RNA-Seq(转录组测序), 从中筛选出了一些与柿花性别分化相关的关键基因, 可为揭示柿花芽分化, 尤其是对应性器官发生败育现象的分子机制提供一定的参考(此结果尚未发表)。目前, 人们主要从激素测定、胚胎发育、显微观察等角度观察测定柿花芽分化的形成和发育过程<sup>[10-12]</sup>, 而对柿花芽不同分化时期的外部形态特点却没有比较详尽的描述。本研究以雌雄同株柿‘禅寺丸’为试材, 对 4 月中旬(性器官发生败育)前后雌、雄花芽的显微结构与外部形态的相关性进行比较分析, 以建立能够反映内部解剖结构的外部形态指标, 同时利用转录组测序得到的与性别分化相关的关键基因进行实时定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)测定, 以进一步明确柿花芽分化的分子机制, 从而为后期柿花性别的调控、柿雄性资源的培育以及杂交育种工作的深入开展提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验所选材料为 10 年生的雌雄同株柿品种‘禅寺丸’。试验地点位于中国林业科学研究院经济林研究开发中心原阳试验基地(河南省原阳县)( $34^{\circ}55'30''$ ~ $34^{\circ}56'45''$ N,  $113^{\circ}46'24''$ ~ $113^{\circ}47'59''$ E)。选择树势基本一致、无病虫害并且结果正常的健康树体进行试验, 园区进行统一常规管理。

### 1.2 取样方法

根据李加茹等<sup>[10]</sup>关于‘禅寺丸’性别分化的石蜡切片观察可知, 4 月 17 日是柿花芽分化的第 2 个形态学关键时期, 此时雌、雄花芽从外观上清晰可辨, 并且雌、雄蕊原基已经发生败育。基于此, 我们于 2017 年 4 月初(花芽处于萌动状态)至 2017 年 4 月中下旬(雌、雄蕊原基败育)进行试验材料的采集, 隔 3 d 取样 1 次。具体采集日期为 4 月 5 日(阶段 A), 4 月 8 日(阶段 B), 4 月 11 日(阶段 C), 4 月 14 日(阶段 D)和 4 月 17 日(阶段 E)。从每株树树冠外围中部东、南、西、北 4 个方向各随机抽取生长中庸的当年生枝条(分为开雄花的枝条和开雌花的枝条)各 5 个, 采集每个枝条形态学上端的前 3 个饱满芽(分为雄花芽和雌花芽), 用游标卡尺测量花芽和叶片的长度, 用解剖针剥去芽外面的鳞片并拍照。每份样品采集后分成 2 部分, 一部分投入甲醛冰醋酸乙醇(FAA)固定液中进行固定, 另一部分于-80 ℃保存。

### 1.3 石蜡切片观察

试验材料首先经过一系列梯度的乙醇(体积分数为70%乙醇、85%乙醇、95%乙醇、无水乙醇)进行脱水处理。材料彻底脱水后于二甲苯和无水乙醇配制的混合液以及纯二甲苯中进行透明。透明后的材料在1/2二甲苯+1/2石蜡中于38℃恒温箱中存放36 h后,15 min调高2~3℃进行变温处理,直至温度升为62℃,然后保持在此温度下对样品进行浸蜡处理。之后,对蜡块进行修整,并在切片机上制成纵切片,切片厚度为8~10 μm;将粘贴在载玻片上的蜡带置于烘箱中在38℃的条件下除去残余的黏贴剂,进行常规脱蜡(纯二甲苯和1/2二甲苯+1/2石蜡混合液),不同梯度乙醇复水,用苏木精伊红双重染色后,不同梯度乙醇脱水,1/2二甲苯+1/2石蜡配制的混合液和二甲苯透明,最后用中性树胶进行封片,烘干后在Olympus BX-51型光学显微镜下观察、拍照。

### 1.4 性别分化相关基因 qRT-PCR 分析

采用EZ-10 DNAaway RNA Mini-Preps试剂盒(Sangon)提取不同发育阶段各类型花芽的总核糖核酸(RNA),用Implen P330超微量分光光度计检测RNA的纯度和浓度,利用质量分数为1.0%琼脂糖凝胶电泳法检测总RNA的完整性,样品检测合格后置于-80℃冰箱保存备用。采用TRUEscript 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Kemix)将总RNA反转录成互补脱氧核糖核酸(cDNA)。之后用BIO-RAD CFX 96荧光定量聚合酶链式反应仪对各基因进行qRT-PCR测定。反应体系包括:1.0 μL primer mix(包括5 μmol·L<sup>-1</sup>上游forward引物和下游reverse引物),2.0 μL cDNA,10.0 μL SYBR Premix Ex TaqTM(2×)mix和7.0 μL水。反应条件为:94℃2 min(1个循环);94℃20 s,55~60℃20 s,72℃30 s(40个循环)。

从本课题组已有的转录组数据中选取6个与花芽性别分化相关的关键基因,分别为ANT(*AIN-TEGUMENTA*),LYK3(*LysM containing receptor-like kinase 3*),AP2(*APETALA 2*),ABCC10(*ATP binding cassette subfamily C member 10*),BI-1(*Bax inhibitor 1*)和RBOHB(*Respiratory burst oxidase homolog B*),通过对这些基因在花芽分化不同时期的表达模式进行分析,从而探索关键基因调控柿花芽分化的分子机制。用GAPDH作为内参以校正上样量,所用引物见表1。

表1 性别分化相关基因的引物信息

Table 1 Summary of primers used for floral sex differentiation-related genes in this study

基因名称	引物序列(5'→3')	退火温度/℃	条带大小/bp	基因名称	引物序列(5'→3')	退火温度/℃	条带大小/bp
GAPDH	F: AGCTCTTCCACCTCTCCAGT	56.8	157	ABCC10	F: CCACGCTAACACAGAGCCC	54.8	191
	R: TGCTAGCTGCCACAACCAACT	57.2			R: CAACCGTCCACCAGTCAA	54.6	
ANT	F: TGCCATTATCCGCTCTAC	51.3	121	BI-1	F: TCCTGTCTCTGGCTCT	54.0	188
	R: GACATTCAAGCACCCAAGA	51.9			R: GGCCTGCTTCACATAGTC	53.4	
LYK3	F: CTTCCCTCCGAATCTGTC	51.6	134	RBOHB	F: ATGATTATTGGTGGTTGT	46.9	233
	R: TTCATTCTGGTGGCTCT	52.7			R: CTTGAAAGCTAGAGGAA	47.6	
AP2	F: CGAGTTCCCTCCATTTC	49.9	153				
	R: CATCTATCTGGCTATT	46.3					

### 1.5 数据分析

相对基因表达量的计算采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法,使用SPSS 20.0和Excel 2007等软件对试验数据进行处理,用Origin 6.0软件进行图表绘制等工作。

## 2 结果与分析

### 2.1 柿雌、雄花芽外部形态变化与内部解剖构造之间的对应关系

对柿雌、雄花芽不同分化时期外部形态变化和内部解剖特点进行比较,可以发现两者关系较为密切。随着温度的逐渐升高,树体在3月底开始萌动,顶芽露白并有所膨大,芽体外部包裹的鳞片由休眠期的锈黄色转变为嫩绿色,此时花芽开始进入分化前期。到阶段A,顶芽抽出生长为2.0~4.0 cm的嫩梢,肉眼能看到嫩梢上着生的不同类型的花芽,即能观察到雌花芽1朵单生花序,雄花芽3朵合生花序

的形态变化, 其中, 雌花芽长度小于0.5 cm, 雄花芽长度小于1.0 cm, 幼叶数目不断增加, 颜色由嫩绿色变为黄绿色(图1a, 图2a); 对切片进行显微观察发现, 此时期雌、雄花芽表现一致, 顶端均分化出了花瓣原基、雄蕊原基和心皮原基(图1A, 图2A)。

在阶段B, 由于降雨的原因致使温度有所降低, 柿树发育进程相对较慢, 此时前1年生的枝条上所有的绿芽逐渐开始抽生成新梢, 芽体继续增大, 其中, 顶端嫩梢长至4.0~5.0 cm, 雄花芽长约1.0 cm, 雌花芽长为0.4~0.6 cm, 叶片和花芽颜色仍为黄绿色(图1b, 图2b); 同时, 各花器官原基进一步分化。观察发现, 与雄花芽相比, 雌花芽中的心皮原基发育速度较快, 基部开始膨大(图1B), 而雄花芽中的雄蕊原基发育较雌花芽更加明显, 雄蕊原基内部细胞分裂速度加快, 顶端分生组织间或有幼嫩花药的生成(图2B)。

由于春天温度快速升高, 柿花各时期的分化进程也较快, 在阶段C, 嫩梢生长迅速, 其中, 顶端着生雌花的枝条长为4.0~5.0 cm, 着生雄花的枝条生长相对较快, 长为5.0~6.0 cm, 叶片颜色逐渐加深。此时, 雌花芽长为0.5~1.0 cm, 雄花芽长为1.0~1.5 cm(图1c, 图2c); 随着各原基细胞的分裂分化, 雌花芽内心皮细胞上部逐渐融合形成子房, 分化出花柱和柱头组织, 雄蕊原基分化则相对缓慢, 变化并不明显(图1C), 而雄花芽内心皮细胞也开始融合, 并有类似花柱和柱头组织的结构形成, 雄蕊原基细胞分裂旺盛, 基部缢缩形成花丝, 花药数量逐渐增加, 此时期雌、雄花芽内花柱基部两侧各长出小凸起, 即为蜜腺组织(图2C)。

阶段D顶端着生雌花的枝条长为5.0~6.0 cm, 着生雄花的枝条长为6.0~8.0 cm, 叶片颜色进一步加深。此时, 雌花芽长约1.0 cm, 雄花芽长为1.0~2.0 cm(图1d, 图2d); 石蜡切片观察可知, 雌花芽子房内部已有胚珠的形成, 并产生大孢子母细胞, 雄蕊原基的生长停滞不前, 发生败育(图1D), 而雄花芽内心皮原基生长相对滞缓, 雄蕊原基变化明显, 整体不断伸长和膨大, 其内部的花药数量显著增多, 并有小孢子母细胞的产生(图2D)。

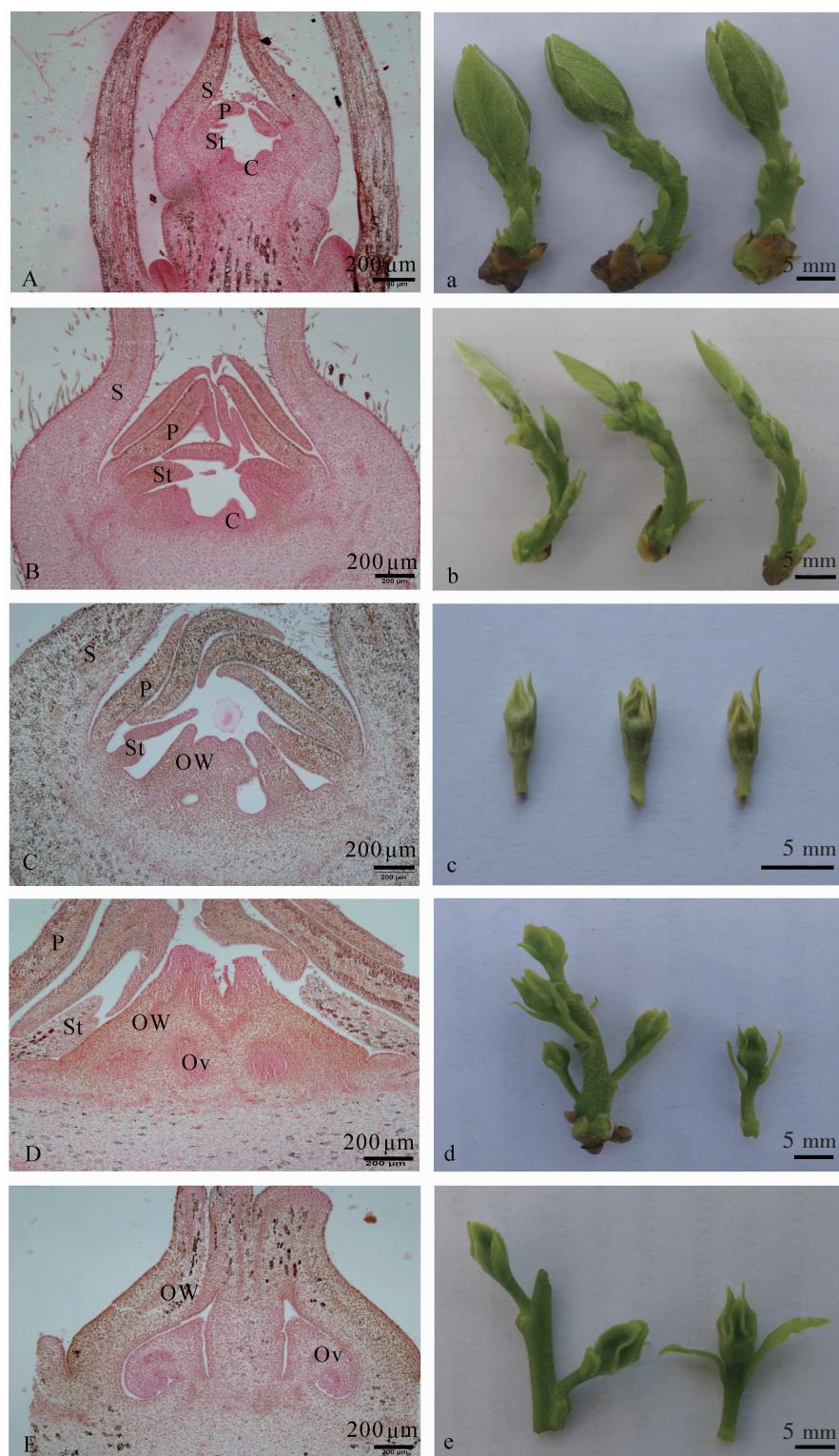
在阶段E, 枝条与花芽迅速伸长生长, 枝条长10.0 cm左右, 雌花芽长为1.0~1.5 cm, 雄花芽长约2.0 cm, 叶片颜色逐渐变为深绿色, 枝条接近木质化(图1e, 图2e); 对不同花芽的内部解剖构造研究发现, 雌花芽内子房形状已初步形成, 大孢子母细胞之后将经过减数分裂形成功能大孢子(图1E), 而雄花芽内心皮原基彻底发生败育, 体积减小, 雄蕊内的小孢子母细胞则开始经过减数分裂, 逐渐形成花粉粒(图2E)。

## 2.2 性别分化相关基因在柿花发育过程中的表达模式分析

柿花花芽分化过程中与性别分化相关基因的表达模式分析见图3。由图3可以看出: 除在阶段C处略有下降外, 基因ANT的表达量在雌花中整体呈现上升的趋势, 并且在阶段E处出现最高值。该阶段的基因表达量是阶段A的1.7倍; 基因ANT在雄花中的表达模式与雌花完全相反, 即除在阶段C处有显著提高(为阶段B的1.5倍)外, 该基因在雄花中整体呈现下降的趋势, 并且在阶段E处出现最低值, 该阶段的基因表达量是阶段A的39.6%。对比ANT基因在雌、雄花中的表达模式发现, 该基因的表达水平除在最初的阶段A无显著差异外, 其他发育阶段均差异显著且在雌花芽中的表达明显高于雄花芽( $P<0.05$ )(图3A)。

柿雌花发育过程中, LYK3和ANT的表达模式基本一致, 均从阶段B明显下降至阶段C后, 急剧上升到阶段E。与ANT相似, 虽然LYK3的表达量在阶段C略有下降, 但该阶段的基因含量仍然较阶段A有所上升。整体来看, 从阶段A到阶段E, 该基因表达量增加了4.4倍。LYK3基因在整个雄花芽的发育过程中出现了2个峰值, 即阶段B和阶段D。虽然在阶段D处有个峰值, 但其值却明显低于阶段B, 甚至是阶段A。由此可知, 基因LYK3在阶段B处表达水平最高, 为阶段A的1.2倍。此外, 雄花芽中LYK3基因的表达水平在前2个发育阶段略高于雌花芽, 其余各发育阶段在雌、雄花芽中的差异变化明显( $P<0.05$ ), 并且在雌花芽中的表达量分别是雄花芽的1.2, 1.5和2.1倍(图3B)。

基因AP2在雌花不同发育过程中, 从阶段A上升到阶段B(表达量是阶段A的2.1倍)后, 其表达量呈直线下降趋势, 并且该基因在阶段E(雌、雄花外部形态特征已完全呈现)的相对表达量略低于阶段A, 是阶段A的92.6%; 基因AP2在雌、雄花芽中的表达模式完全相反, 该基因在雄花芽中的表达量从阶段A缓慢下降到阶段B, 又开始大幅度上升至阶段E, 最终该基因的表达量是阶段A的3.8倍。对比



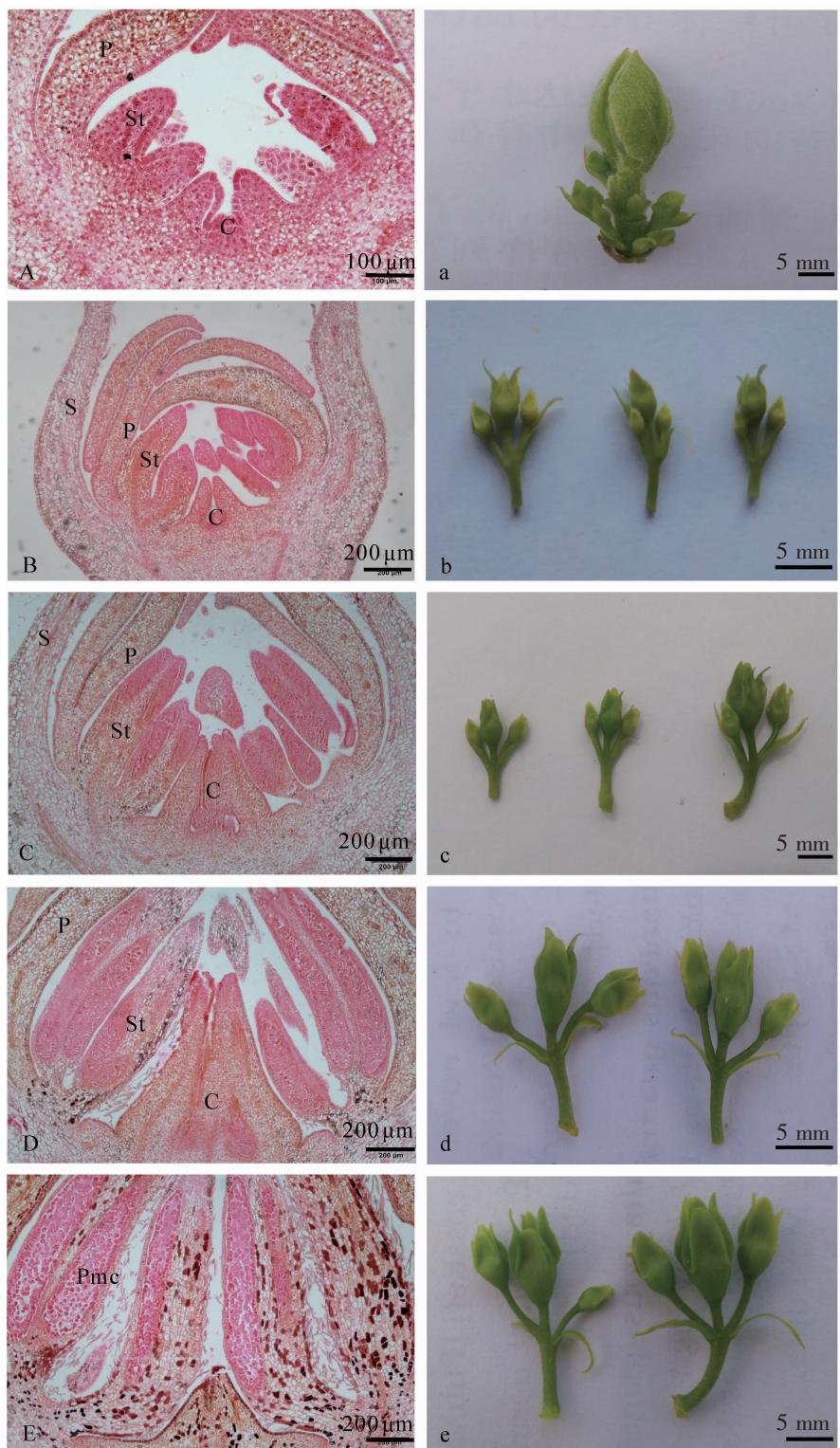
大写字母编号表示柿雌花不同发育时期的石蜡切片观察，小写字母为对应的外部形态；图中C为雌蕊，Ov胚珠，OW子房，P花瓣，S萼片，St雄蕊

图1 柿‘禅寺丸’雌花不同发育时期的内部解剖及外部形态比较

Figure 1 Comparation between external morphological changes and internal anatomy structure of ‘Zenjimaru’ on female flower differentiation

*AP2* 基因在雌、雄花中的表达模式发现，除了阶段 B 雌花中的表达量显著高于雄花( $P<0.05$ )(是雄花中的 2.3 倍)外，各发育阶段雄花芽中的表达水平总是高于雌花芽，且在阶段 E 处差异最大，该阶段内雄花芽的表达量是雌花芽的 6.5 倍(图 3C)。

基因 *ABCC10* 在雌花发育前期表达直线上升，到阶段 D 处达到最高点(是阶段 A 的 1.5 倍)后，又显



大写字母编号表示柿雄花不同发育时期的石蜡切片观察, 小写字母为对应的外部形态; 图中C为雌蕊, Ov胚珠, P花瓣, Pmc花粉母细胞, S萼片, St雄蕊

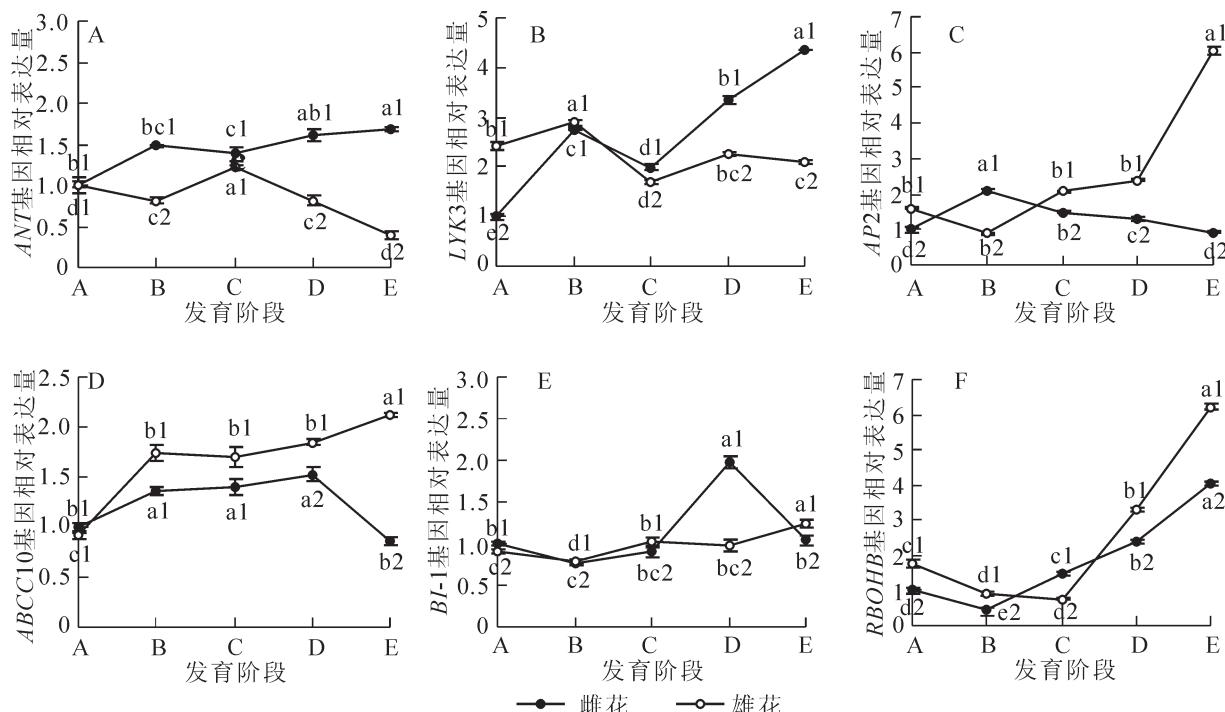
图 2 柿 ‘禅寺丸’ 雄花不同发育时期的内部解剖及外部形态比较

Figure 2 Comparation between external morphological changes and internal anatomy structure of ‘Zenjimaru’ on male flower differentiation

著下降到阶段 E。与阶段 A 相比, *ABCC10* 的表达量在阶段 E 处降低了 13.6%; *ABCC10* 在雄花发育过程中的表达模式整体呈上升趋势, 到阶段 E 时, 该基因是阶段 A 的 2.3 倍。此外, 雌、雄花芽中的 *ABCC10* 基因在阶段 A 处的差异不显著, 而其余阶段在雄花芽中的表达量总是显著高于雌花芽 ( $P < 0.05$ ), 分别是雌花芽的 1.3, 1.2, 1.2 和 2.5 倍(图 3D)。

柿雌花发育过程中,基因 *BI-1* 的表达量从阶段 A 缓慢下降到阶段 B 后,又开始小幅上升至阶段 D,最后下降到与阶段 A 表达量基本持平的阶段 E(为阶段 A 的 1.0 倍)。总体来看,整个雌花性别分化的过程中,该基因在阶段 D 的表达量最高,与阶段 A 相比,提高了 98.1%;在雄花中, *BI-1* 基因的表达水平总体呈上升趋势,与阶段 A 相比,其余各阶段的基因相对表达量基本处在 0.9~1.4 的水平,其中以阶段 B 的表达量最低,阶段 E 的表达量最高。此外,从图 3 中我们可以看出:在阶段 A 和阶段 D 处, *BI-1* 基因在雌花芽中的表达量分别是雄花芽的 1.5 倍和 2.0 倍,而在阶段 B,阶段 C 和阶段 E 处, *BI-1* 基因在雌花芽中的表达量分别是雄花芽的 97.5%, 89.2% 和 83.9%(图 3E)。

*RBOHB* 在雌、雄花芽整个发育过程中的表达模式基本相同,均为先下降后上升的状态。该基因分别在雌、雄花芽中的阶段 B 和阶段 C 处表达量最低,分别为阶段 A 的 43.8% 和 52.5%。之后,随着花器官的建成, *RBOHB* 的表达呈现出整体的上升趋势,到阶段 E 处其值达到最大,分别为阶段 A 的 4.1 倍和 6.2 倍。整体来看,除在阶段 C 处雌花芽的表达量是雄花芽的 2.0 倍外,其余各阶段均为雄花芽高于雌花芽(图 3F)。



发育阶段 A 指 4 月 5 日, B 指 4 月 8 日, C 指 4 月 11 日, D 指 4 月 14 日, E 指 4 月 17 日; 不同字母表示雌花或雄花在不同发育阶段存在显著差异( $P < 0.05$ ), 不同数字表示同一发育阶段雌花雄花之间存在显著差异( $P < 0.05$ )

图 3 柿‘禅寺丸’花芽分化过程中与性别分化相关基因的表达模式分析

Figure 3 qRT-PCR analyses for expression levels of sex differentiation-related genes in floral buds of ‘Zenjimaru’ during different developmental stages

### 3 讨论

目前,人们主要通过制作石蜡切片后,利用光学显微镜观察植物花芽分化过程中各个发育阶段的特征从而确定形态分化的关键时期<sup>[13]</sup>。然而,植物的花芽分化受到试验地的立地条件、温度等气候因素、品种自身遗传性能、果树生长中普遍存在的大小年现象以及树体生长发育过程中营养物质的积累等影响<sup>[14~16]</sup>,致使不同研究中花芽分化关键时期的确定有所差异。此外,果农在果园进行栽培管理的过程中,如果只是通过显微观察花芽分化的内部解剖特点,则往往缺少相应的技术及设备条件,从而不能准确地确定花芽分化进程的具体时期,进一步阻碍了柿产业的发展。本研究针对以上问题,通过制作石蜡切片观察柿花芽分化进程中内部解剖特点的同时,测量观察不同分化时期柿花芽外部的形态变化,以建立柿花芽的外部形态特征与内部解剖特点之间的对应关系,根据外部形态指标来判断柿花芽的分化程

度, 有利于生产实践中在花器官败育之前, 采取人为手段调控柿花性别, 具有一定的科学性和实用性。

已有研究表明: 植物单性花的形成与对应性器官的败育有关, 例如, 在石榴 *Punica granatum*<sup>[17]</sup>, 玉米<sup>[18]</sup>, 文冠果 *Xanthoceras sorbifolium*<sup>[19]</sup>等植物中均发现了雌蕊败育现象, 在白花蝇子草 *Silene pratensis*<sup>[20]</sup>, 中华猕猴桃 *Actinidia chinensis*<sup>[21]</sup>中发现了雄蕊败育现象。此外, 山葡萄 *Vitis amurensis* 雄花中的雌蕊败育与珠心组织细胞程序性死亡有关<sup>[22]</sup>, 白花山碧桃 *Prunus davidiana* ‘Albo-plena’ 雄花中的雌蕊败育发生在子房室形成后, 与胚珠退化有关<sup>[23]</sup>, 黄瓜 *Cucumis sativus* 在发育成雌花和雄花的过程中, 对应性器官原基的败育发生在大孢子母细胞时期和小孢子母细胞时期<sup>[24]</sup>。在柿花芽分化早期, ‘禅寺丸’ 雌、雄花芽内对应的雄蕊原基和雌蕊原基发育正常, 在阶段 D, 即大、小孢子发生期, 雌花芽产生大孢子母细胞, 对应的雄蕊原基生长停滞不前, 发生败育, 而雄花芽内有小孢子母细胞的产生, 对应的雌蕊原基生长相对缓慢。到阶段 E 时, 雌蕊原基和雄蕊原基彻底败育, 发生退化。此外, 对柿雌、雄花芽的外部形态观察发现, 在大、小孢子发生期, 顶端着生雌花的枝条长为 5.0~6.0 cm, 着生雄花的枝条长为 6.0~8.0 cm, 雌花芽长约 1.0 cm, 雄花芽长为 1.0~2.0 cm。因此, 在生产实践中, 果农可通过观察花芽的外部生长发育情况, 在大、小孢子发生期, 即雌、雄花原基发生败育之前, 采取相应措施人为调控柿树的花芽分化, 有目的地诱导雄花的产生, 从而培育优良雄性种质资源。

*ANT* 是一种类 *AP2* 乙烯响应转录因子, 它在生殖器官发育过程中占据着重要地位。该基因的强突变体能够使雌配子体缺失, 而弱突变体虽然能产生雌配子体, 但该配子体无活力<sup>[25]</sup>。WILSON 等<sup>[26]</sup>发现, *ANT* 基因在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 心皮发育过程中的相关植物激素运输方面起到重要作用。*LYK3* 是一种 LysM 类受体蛋白激酶, 在植物的生长发育和抗病抗逆等方面具有非常重要的作用<sup>[27]</sup>。一般在逆境条件下, 植物体内的脱落酸(ABA)含量增加, 而拟南芥中 *AtLYK3* 基因的表达受到ABA 的正调控<sup>[28]</sup>, 这表明 *LYK3* 可能是一种胁迫诱导基因。对雌、雄花芽中不同阶段性别相关基因的表达模式进行分析发现, *ANT* 基因与 *LYK3* 基因具有相同的功能, 即均与雌性花器官的产生关系密切。

*AP2* 基因属于植物花器官发育的分子机制 ABCDE 模型中的 A 类功能基因, 其在植物萼片和花瓣形成过程中起着重要的调控作用<sup>[29~30]</sup>。对拟南芥突变体的研究表明, 弱 *AP2* 突变体可使花瓣转化成雄蕊的结构<sup>[31~32]</sup>。*ABCC* 蛋白家族是 ABC 转运蛋白超级家族中的一个亚家族, 其在植物生长发育中发挥重要作用, 该基因家族成员的主要功能是参与重金属的转运过程以及色素在液泡中的积累过程等<sup>[33~34]</sup>。本研究结果表明, *AP2* 基因和 *ABCC10* 基因在雄花芽中一直保持较高的表达水平, 表明该基因可能促进雄性花器官的发育。

作为一种细胞凋亡抑制因子, *BI-1* 基因广泛存在于动物、植物以及微生物中, 其在细胞程序性死亡信号转导下游发挥作用<sup>[35]</sup>。西红柿 *Lycopersicon esculentum* 感染黄瓜花叶病病毒(CMV)以及大麦 *Hordeum vulgare* 感染白粉霉菌所致的细胞程序性死亡与感染部位的 *BI-1* 基因的高表达密切相关, 表明该基因很可能对植物细胞死亡起抑制作用<sup>[36~37]</sup>。*BI-1* 基因在雄花芽发育的整个阶段呈直线上升状态, 表明该基因的积累有利于雄花芽的产生。此外, 雌花芽中的 *BI-1* 基因仅仅在性器官败育关键时期(阶段 D)的表达量最高, 而其余阶段间该基因的表达基本一致。可以看出: 该基因与雄性器官的细胞程序性死亡密切相关。结合 *BI-1* 基因在雌、雄花器官中的表达模式及其解剖结果, 推测该基因作为一种雄性器官细胞凋亡抑制基因, 间接促进柿雄花芽的发育。然而, 关于 *BI-1* 基因抑制凋亡的作用机制还不是很清楚, 因此, 在以后的研究中可利用转基因等分子生物学手段, 着重于该基因在植物细胞程序性死亡, 尤其是花芽分化过程中的作用进行深一步的探讨。

*RBOHB* 是一种呼吸爆发氧化酶(NADPH 氧化酶)基因, 这种酶又是活性氧(ROS)的主要来源之一, 而 ROS 可引起细胞凋亡<sup>[38]</sup>。有报道指出, 水稻中的 *RBOHB* 基因主要在绒毡层和小孢子中表达, 通过产生 ROS 使生物体内出现细胞程序性死亡现象, 进而影响花药的发育<sup>[39]</sup>。整个花芽发育过程中, 除在阶段 B 和阶段 C 处略有下降外, 花发育后期 *RBOHB* 表达量快速上升。此外, 根据本研究解剖学观察结果, 雌花芽在阶段 E 处子房形状已初步形成, 而雄花芽内心皮原基彻底发生败育, 推测该基因诱导的细胞程序性死亡主要发生在花发育后期雌花芽雄蕊的败育和雄花芽雌蕊的败育, 具体仍需进一步的试验验证。

## 4 结论

本研究将柿雌、雄花芽分化过程中花芽的外部形态特征和内部解剖构造进行比较分析, 外部形态(花芽、叶片和枝条等的变化)可以间接反映其内部结构的变化, 通过建立能够反映内部显微变化的外部形态指标来判断柿雌、雄花芽的分化时期, 具有一定的科学性和实用性。柿花器官在大、小孢子发生期已经发生败育, 此时顶端着生雌花的枝条长为5.0~6.0 cm, 着生雄花的枝条长为6.0~8.0 cm, 雌花芽长约1.0 cm, 雄花芽长为1.0~2.0 cm, 可根据柿花外部形态等指标在花器官败育之前人为调控柿花的性别。性别分化相关基因的表达模式分析中, 高表达量的 $ANT$ 和 $LYK3$ 基因对雌花的分化具有一定的促进作用, 高表达量的 $AP2$ 和 $ABCC10$ 基因有利于雄花的分化。此外, 我们推测 $BI-1$ 基因作为一种雄性器官细胞凋亡抑制基因, 间接促进柿雄花芽的发育。因此, 建议对树体进行正常的修剪、施肥等常规处理的同时, 在4月中旬花器官原基发生败育之前对树体进行相应激素的喷施, 以调控柿花性别、培育雄性种质。

## 5 参考文献

- [1] 王勇, 邓雷, 小岛纪德. 天然高分子柿单宁的研究与应用[J]. 材料导报, 2008, **22**(8): 83~86, 98.  
WANG Yong, DENG Lei, KOJIMA T. Study and application of natural mcmolecule persimmon tannin [J]. *Mater Rev*, 2008, **22**(8): 83~86, 98.
- [2] 李高潮, 王仁梓, 杨勇. 柿种植植物雄性种质资源[J]. 果树科学, 1996, **13**(3): 199~200.  
LI Gaochao, WANG Renzi, YANG Yong. Male germplasm resources in *Diospyros kaki* [J]. *J Fruit Sci*, 1996, **13**(3): 199~200.
- [3] 扈惠灵. ‘磨盘柿’杂种败育的细胞学机制及胚挽救技术体系的建立[D]. 北京: 中国农业大学, 2006.  
HU Huiling. *Embryos Rescue Before Their Aborting in Earlier Stage in Parthenocarpic ‘Mopanshi’ Persimmon by an Ovule Culture Procedure* [D]. Beijing: China Agricultural University, 2006.
- [4] 傅建敏, 孙鹏, 韩卫娟, 等. 柿雄性种质资源图志[M]. 北京: 中国林业出版社, 2017: 4.
- [5] 苏立娟, 靳颖, 吕琳, 等. 植物有性生殖过程中的细胞程序性死亡[J]. 首都师范大学学报(自然科学版), 2005, **26**(2): 69~76, 84.  
SU Lijuan, JIN Ying, LÜ Lin, et al. Programmed cell death during sexual reproduction in plants [J]. *J Capital Norm Univ Nat Sci Ed*, 2005, **26**(2): 69~76, 84.
- [6] 杨同文, 李潮海. 玉米性别决定的激素调控[J]. 植物学报, 2012, **47**(1): 65~73.  
YANG Tongwen, LI Chaohai. Hormone regulation of sex determination in maize [J]. *Chin Bull Bot*, 2012, **47**(1): 65~73.
- [7] 周劲松, 汤泳萍, 盛文涛, 等. 芦笋性别决定与性别分化研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2010, **11**(5): 600~604.  
ZHOU Jinsong, TANG Yongping, SHENG Wentao, et al. Progress in research on sex determination and differentiation in *Asparagus officinalis* L. [J]. *J Plant Genetic Resour*, 2010, **11**(5): 600~604.
- [8] 傍島善次, 石田雅士, 稲葉昭次, 他. カキの発芽期以降における花器の発育について[J]. 京都府立大學學術報告: 農學, 1974, **26**: 15~20.  
SOBAJIMA Y, ISHIDA M, INABA A, et al. Studies on the development of floral organ in Japanese persimmon (cv. Hiratanenashi) after sprouting (Agriculture) [J]. *Sci Rep Kyoto Prefe Univ Agric*, 1974, **26**: 15~20.
- [9] YONEMORI K, SUGIURA A, TANAKA K, et al. Floral ontogeny and sex determination in monoecious-type persimmons [J]. *J Am Soc Hortic Sci*, 1993, **118**(2): 293~297.
- [10] 李加茹, 孙鹏, 韩卫娟, 等. 不完全甜柿‘禅寺丸’花性别分化形态学关键时期的研究[J]. 园艺学报, 2016, **43**(3): 451~461.  
LI Jiaru, SUN Peng, HAN Weijuan, et al. Morphological key period study on floral sex differentiation in pollination-constant and non-astringent persimmon ‘Zenjimaru’ [J]. *Acta Hortic Sin*, 2016, **43**(3): 451~461.
- [11] 钟云, 刘勇, 蒋依辉, 等. 柿胚胎发生发育的研究[J]. 园艺学报, 2004, **31**(3): 353~356.  
ZHONG Yun, LIU Yong, JIANG Nonghui, et al. Studies on the embryogenesis of persimmon [J]. *Acta Hortic Sin*,

2004, **31**(3): 353 – 356.

[12] SUN Peng, LI Jiaru, DU Gaigai, et al. Endogenous phytohormone profiles in male and female floral buds of the persimmons (*Diospyros kaki* Thunb.) during development [J]. *Sci Hortic*, 2017, **218**: 213 – 221.

[13] 秦俊芬, 葛宇, 屈淑平, 等. 南瓜花芽分化解剖结构的研究[J]. 东北农业大学学报, 2011, **42**(10): 66 – 69. QIN Junfen, GE Yu, QU Shuping, et al. Anatomy of flower bud differentiation in pumpkin [J]. *J Northeast Agric Univ*, **42**(10): 66 – 69.

[14] 钱桦, 刘燕, 郑勇平, 等. 施用 6-BA 对春石斛花芽分化及内源激素的影响[J]. 北京林业大学学报, 2009, **31**(6): 27 – 31. QIAN Hua, LIU Yan, ZHENG Yongping, et al. Effects of applying 6-BA on the nobile-type dendrobium flower bud differentiation and changes of hormones [J]. *J Beijing For Univ*, 2009, **31**(6): 27 – 31.

[15] 朱伶俐, 周兰英. 光周期对‘泰山-橙黄’万寿菊花芽分化和开花的影响[J]. 东北林业大学学报, 2017, **45**(4): 33 – 35, 39. ZHU Lingli, ZHOU Lanying. Effect of photoperiod on *Tagetes erecta* ‘Mount Tai Orange’ floral bud differentiation and flowering [J]. *J Northeast For Univ*, 2017, **45**(4): 33 – 35, 39.

[16] 魏永赞, 董晨, 王弋, 等. 荔枝花芽分化与花性别分化研究进展[J]. 广东农业科学, 2017, **44**(7): 34 – 40. WEI Yongzan, DONG Chen, WANG Yi, et al. Advances in floral bud differentiation and floral sex determination in litchi [J]. *Guangdong Agric Sci*, 2017, **44**(7): 34 – 40.

[17] WETZSTEIN H Y, YI Weiguang, PORTER J A, et al. Flower position and size impact ovule number per flower, fruitset, and fruit size in pomegranate [J]. *J Am Soc Hortic Sci*, 2013, **138**(3): 159 – 166.

[18] DELONG A, CALDERON-URREA A, DELLAPORTA A S L. Sex determination gene *TASSELSEED2* of maize encodes a shortchain alcohol dehydrogenase required for stage-specific floral organ abortion [J]. *Cell*, 1993, **74**(4): 757 – 768.

[19] 张敏, 王頓, 张雷, 等. 文冠果雌雄花发育过程形态结构比较[J]. 电子显微学报, 2012, **31**(2): 154 – 162. ZHANG Min, WANG Di, ZHANG Lei, et al. Female and male flower differentiation in *Xanthoceras sorbifolia* Bunge [J]. *J Chin Electr Microsc Soc*, 2012, **31**(2): 154 – 162.

[20] HARDENACK S, YE De, SAEDLER H, et al. Comparison of MADS-box gene expression in developing male and female flowers of the dioecious plant white campion [J]. *Plant Cell*, 1994, **6**(12): 1775 – 1787.

[21] 杨妙贤, 肖德兴, 梁红, 等. 中华猕猴桃性别分化的细胞形态学观察[J]. 园艺学报, 2011, **38**(2): 257 – 264. YANG Miaoqian, XIAO Dexing, LIANG Hong, et al. Cytomorphological observation on sex differentiation of *Actinidia chinensis* [J]. *Acta Hortic Sin*, 2011, **38**(2): 257 – 264.

[22] CAPORALI E, SPADA A, MARZIANI G, et al. The arrest of development of abortive reproductive organs in the unisexual flower of *Vitis vinifera* ssp. *silvestris* [J]. *Sex Plant Reprod*, 2003, **15**(6): 291 – 300.

[23] 江雪飞, 王力荣, 邹志荣, 等. 白花山碧桃雌蕊败育特性的解剖学研究[J]. 果树学报, 2004, **21**(3): 201 – 203. JIANG Xuefei, WANG Lirong, ZOU Zhirong, et al. Study on the anatomical characteristics of pistil abortion of ‘Baihuashanbitao’, a variety of *Amygdalus davidiana* [J]. *J Fruit Sci*, 2004, **21**(3): 201 – 203.

[24] 陈学好, 陈艳萍, 金银根. 黄瓜性器官败育的细胞学研究[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2003, **24**(2): 68 – 71. CHEN Xuehao, CHEN Yanping, JIN Yinggen. Study on abortion process of sex organs in cucumber flowers at cell level [J]. *J Yangzhou Univ Agric Life Sci Ed*, 2003, **24**(2): 68 – 71.

[25] 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. ZHAO Qi, WANG Tai, WEI Xiaodi. Function of *AP2* gene during floral organs development in higher plant: review [J]. *Chin J Trop Agric*, 2005, **25**(3): 50 – 56.

[26] WILSON S N, AZHAKANANDAM S, FRANKS R G. Polar auxin transport together with *AINTEGUMENTA* and *REVOLUTA* coordinate early *Arabidopsis gynoecium* development [J]. *Dev Biol*, 2010, **346**(2): 181 – 195.

[27] 田丽梅. 番茄 *IMPA/β* 和 *LYK* 家族基因的鉴定、表达模式分析和功能研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016. TIAN Limei. *Genome-Wide Characterization, Expression Patterns and Functional Analysis of the IMPα/β and LYK*

*Gene Families in Tomato* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016.

[28] PAPARELLA C, SAVATIN D V, MARTI L, et al. The *Arabidopsis* LYSIN MOTIF-CONTAINING RECEPTOR-LIKE KINASE3 regulates the cross talk between immunity and abscisic acid responses [J]. *Plant Physiol*, 2014, **165**(1): 262 – 276.

[29] MAES T, van de STEENE N, ZETHOF J, et al. Petunia *Ap2-like* genes and their role in flower and seed development [J]. *Plant Cell*, 2001, **13**(2): 229 – 244.

[30] 吴彦庆, 成梦琳, 赵大球, 等. 芍药分生组织决定基因 *APETALA2*(*AP2*)的克隆及生物信息学分析[J]. 华北农学报, 2017, **32**(3): 58 – 64.

WU Yanqing, CHENG Menglin, ZHAO Daqiu, et al. Cloning and bioinformatics analysis of *APETALA2* (*AP2*) in *Paeonia lactiflora* [J]. *Acta Agric Sin*, 2017, **32**(3): 58 – 64.

[31] IRISH V F. Floral development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol Biochem*, 1998, **36**(1/2): 61 – 68.

[32] 闻可欣, 刘雪梅. *AP2* 功能基因在植物花发育中的重要作用[J]. 生物技术通报, 2010(2): 1 – 7.

WEN Kexin, LIU Xuemei. The important role of *AP2* functional genes in plant floral development [J]. *Biotech Bull*, 2010(2): 1 – 7.

[33] 谢小东. 烟草 ABC 转运蛋白家族鉴定及次生代谢物质转运的功能研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2014.

XIE Xiaodong. *Identification and Functional Characterization of Nicotiana tabacum ABC Transporters Involved in the Transport of Secondary Metabolites* [D]. Chongqing: Chongqing University, 2014.

[34] 邵若玄, 沈忆珂, 周文彬, 等. 植物 ATP 结合盒(ABC)转运蛋白研究进展[J]. 浙江农林大学学报, 2013, **30**(5): 761 – 768.

SHAO Ruoxuan, SHEN Yike, ZHOU Wenbin, et al. Recent advances for plant ATP-binding cassette transporters [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2013, **30**(5): 761 – 768.

[35] 叶小颖. *BI-1* 对紫外光诱发飞廉悬浮细胞凋亡和黄酮合成积累的影响及其信号转导机制研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2009.

YE Xiaoying. *Investigation of Signal Transduction Mechanisms and Effect of BI-1 in UV-induced Programmed Cell Death and Flavonoid Accumulation of Carduus crispus L. Cells* [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2009.

[36] XU Ping, BLANCAFLOR E B, ROOSSINCK M J. In spite of induced multiple defense responses, tomato plants infected with *Cucumber mosaic* virus and D satellite RNA succumb to systemic necrosis [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2003, **16**(6): 467 – 476.

[37] HÜCKELHOVEN R, DECHERT C, KOGEL K H. Overexpression of barley BAX inhibitor 1 induces breakdown of mlo-mediated penetration resistance to *Blumeria graminis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(9): 5555 – 5560.

[38] RECZEK C R, CHANDEL N S. ROS-dependent signal transduction [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2014, **8**: 8 – 13.

[39] 胡丽芳, 刘秋圆, 朱昌兰, 等. 水稻 *OsRbohB* 基因原位杂交载体的构建及其在花药中的表达分析[J]. 广东农业科学, 2014(24): 118 – 121.

HU Lifang, LIU Qiuyuan, ZHU Changlan, et al. Rice *OsRbohB* gene in situ hybridization vector construction and expression analysis at rice anther [J]. *Guangdong Agric Sci*, 2014(24): 118 – 121.