

# 仁用杏花芽 3 个发育时期数字基因表达谱分析

宋 猜<sup>1</sup>, 乌云塔娜<sup>2,\*</sup>, 李 慧<sup>1</sup>, 许靖诗<sup>3</sup>, 刘汝卿<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>中南林业科技大学经济林培育与保护教育部重点实验室, 长沙 410004; <sup>2</sup>中国林业科学研究院经济林研究开发中心, 郑州 450003; <sup>3</sup>北海市林业技术推广站, 广西北海 536000; <sup>4</sup>怀化市林业调查设计院, 湖南怀化 418000)

**摘 要:** 以仁用杏‘优一’为试材, 运用转录组、数字基因表达谱技术, 研究了仁用杏花芽萌动期前后相关基因的表达规律。结果发现, 仁用杏花芽在花芽萌动期前后进行着各种旺盛的生物合成和代谢活动, 且 4 个开花调控途径(光周期途径、春化途径、自主途径、GA 调控途径)均已启动, 光周期途径在花芽萌动时发挥重要作用, 涉及到了 74 条基因, 其中有 38 条差异基因上调表达, 29 条下调表达; GA 途径在花芽萌动期对花芽的生长发育调控表现为抑制作用, 涉及到了 60 条基因, 其中有 13 条差异基因上调, 9 条差异基因下调; 其他两条途径在花芽萌动前作用, 其中春化途径涉及到了 23 个基因, 其中有 4 条差异基因上调, 15 条差异基因下调; 自主途径涉及到了 24 条基因, 其中有 3 条差异基因上调, 11 条差异基因下调。本研究通过数字基因表达谱分析, 初步了解仁用杏花芽萌动前后的网络途径, 为后期对仁用杏花芽相关开花基因的研究、探明仁用杏早花的分子机理及通过分子育种方法培育仁用杏晚花品种提供坚实的理论依据。

**关键词:** 仁用杏; 花芽; 转录组; 数字基因表达谱; 成花调控途径

**中图分类号:** S 662.9

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2015) 08-1559-10

## The Analysis of Digital Gene Expression About Kernel Apricot Flower Buds at Three Development Stages

SONG Cai<sup>1</sup>, WUYUN Tana<sup>2,\*</sup>, LI Hui<sup>1</sup>, XU Jing-shi<sup>3</sup>, and LIU Ru-qing<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Cultivation and Protection for Non-Wood Forest Trees, Ministry of Education, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China; <sup>2</sup>The Eucommia Engineering Research Center of State Forestry Administration, Zhengzhou 450003, China; <sup>3</sup>Forestry Technology Popularization Station of Beihai City, Beihai, Guangxi 536000, China; <sup>4</sup>Forestry Survey and Design Institute of Huaihua City, Huaihua, Hunan 418000, China)

**Abstract:** Experiment studied the pattern of related gene expression information around the sprouting period with flower buds of kernel apricot (*Armeniaca vulgaris* Lam.) ‘Youyi’, applied the transcriptome and digital gene expression profiling technology. The results found that there were many kinds of exuberant biosynthesis and metabolic activity of kernel apricot flower buds around the sprouting period, and four flowering regulation pathways (photoperiod pathway, verbalization pathway, autonomous pathway and GA-dependent pathway) had already been started, and meantime, photoperiod pathway played a significant role, this process involves 74 genes of which 38 up-regulated expression and 29 down-regulated expression; GA-dependent pathway indicating a inhibiting effect in the sprouting period

收稿日期: 2015 - 06 - 23; 修回日期: 2015 - 08 - 04

基金项目: ‘十二五’国家科技支撑计划项目(2013BAD14B02)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: tanatana@sina.com)

for controlling the development of flower buds, this process involves 38 genes of which 13 up-regulated expression and 9 down-regulated expression. Verbalization pathway and autonomous pathway were effected before the sprouting period. Verbalization pathway has 4 up-regulated expression genes and 15 down-regulated expression genes, autonomous pathway involves 24 genes of which 3 up-regulated expression and 11 down-regulated expression. By analyzing of digital gene expression, we have a preliminary understanding of network way about kernel apricot around the sprouting period, the information could provide theoretical basis for the research of flowering genes involved in kernel apricot blossom, exploring on the molecular mechanism of early blooming and breeding new varieties by molecular method.

**Key words:** kernel apricot; *Armeniaca vulgaris*; flower bud; transcriptome; digital gene expression profiling; flowering regulation pathway

核果类植物由于其在春季开花较早, 容易遇到晚霜的危害, 仁用杏 (*Armeniaca vulgaris* Lam.) 上尤为严重, 若在花期一旦遭到晚霜, 轻者会造成减产, 重者则造成绝收。主产区晚霜危害已成为发展核果类经济树种的限制因子, 严重影响着核果类树种的生产发展 (Johnson-Flanagan et al., 1986; Johnson-Flanagan & Singh, 1987; 王洪春, 1987)。研究仁用杏成花机制和早花机理, 对解决仁用杏晚霜危害问题及培育仁用杏晚花新品种, 提高仁用杏产量具有重要作用。

目前主要从栽培措施、化学技术等方面研究仁用杏抗寒机理 (魏安智, 2006; 景淼和翟明善, 2008; 郝彦萍, 2011)。植物开花是由自身遗传因素与外界环境因素共同调控, 是开花基因在时间和空间上顺序表达的结果 (曾群 等, 2006), 所以要从分子水平上了解仁用杏早花机制, 需要侧重了解成花途径相关开花基因的表达模式, 目前最有效的方法是通过新一代测序技术对仁用杏花芽发育过程的转录组进行高通量测序 (Mortazavi et al., 2008)。仁用杏花芽萌动早, 初花期前约 1 个月, 是芽到花转变的重要时期, 与花期有直接关系。本研究中利用新一代高通量测序技术对仁用杏开花前一个月的花芽进行数字基因表达谱分析, 获得大量仁用杏花芽开花相关差异基因及生物学通路, 为后期对仁用杏花芽相关开花基因、探明仁用杏早花的分子机理及通过分子育种方法培育仁用杏晚花品种提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

仁用杏主栽品种 ‘优一’ 种植于内蒙赤峰市喀喇沁旗锦山镇, 通过物候期观察, 样品采集时间选择花芽萌动前后, 分别为 2014 年 3 月 17 日 (花芽生态休眠期)、4 月 2 日 (花芽萌动期) 和 4 月 14 日 (花芽露红期)。

### 1.2 总 RNA 提取、纯化、文库构建和测序数据分析

总 RNA 提取、纯化和文库构建委托诺禾致源公司完成。采用 RSEM (Li & Dewey, 2011) 软件, 分析基因的表达水平。从转录组中找出开花相关的基因, 并采用 DESeq 方法 (Anders & Huber, 2010) 筛选出 3 个发育时期的差异表达基因, 比较他们在 3 个时期的表达情况, 进行 GO 功能显著性富集分析, pathway 显著性富集分析; 对成花途径关键基因进行表达模式分析。

2 结果与分析

2.1 花芽萌动前后 3 个时期基因表达差异分析

采用 DESeq 方法筛选出仁用杏花芽萌动前后 3 个时期差异表达基因。花芽生态休眠期、萌动期和露红期 3 个时期文库基因表达互相比对发现, 随着时间的推移, 上调差异基因数量逐渐上升。花芽萌动期—生态休眠期上调基因数为 3 176 条, 下调基因数为 2 844 条, 涉及通路数为 171 条; 花芽露红期—生态休眠期上调基因数为 6 503 条, 下调基因数为 4 638 条, 涉及通路数为 174 条; 花芽露红期-萌动期上调基因数为 5 236 条, 下调基因数为 3 429 条, 涉及通路数为 150 条 (表 1)。说明随着花芽的发育, 越来越多的 *unigene* 基因被启动, 但是花芽露红期与花芽萌动期的差异基因数少于花芽露红期与花芽生态休眠期的差异基因数, 说明有些基因启动后有沉默, 是特定时期特异性表达的基因。

表 1 仁用杏花芽 3 个发育阶段差异表达基因统计

Table 1 Quantifiable statistics of differential expression gene in three kernel apricot bud developmental stages

文库比较 Library comparison	差异基因数 Differential expression gene number	上调基因数 Up-regulated gene number	下调基因数 Down-regulated gene number	涉及的通路数 Related pathway number
萌动期—生态休眠期 Sprouting period – ecological dormant	6 020	3 176	2 844	171
露红期—生态休眠期 Preliminary blooming stage – ecological dormant	11 141	6 503	4 638	174
露红期—萌动期 Preliminary blooming stage – sprouting period	8 665	5 236	3 429	150

2.2 花芽 3 个发育时期差异表达基因通路 (Pathway) 显著性富集分析

对仁用杏花芽 3 个发育时期差异基因进行通路 (Pathway) 显著性富集分析, 以  $Qvalue \leq 0.05$  为标准来定义差异表达基因显著性富集的信号转导途径和生化代谢途径。

分析结果显示, 花芽萌动期—生态休眠期的差异表达基因涉及的通路主要集中在核糖体 (Ribosome)、光合作用 (Photosynthesis)、光合作用—天线 (Photosynthesis – antenna proteins)、DNA 复制 (DNA replication)、错误修复 (Mismatch repair) 等, 其中核糖体、DNA 复制、错误修复为下调差异基因富集的通路, 核糖体是进行蛋白质合成的重要胞器, 在快速增殖、分泌功能旺盛的细胞中尤其多 (Ban et al., 2000; Schlutzen et al., 2000; Wimberly et al., 2000), 说明该时期的生理变化主要是蛋白合成和表达, DNA 复制、细胞分裂、相关基因翻译表达水平已达到一定高度, 但活跃程度在逐渐减弱; 光合作用、光合作用—天线蛋白为上调差异基因富集的通路, 光合作用能够促进植物成熟、开花, 该时期光合作用增强, 其相关基因启动、表达, 对开花起着正调控作用。

花芽露红期—萌动期的差异表达基因涉及的通路主要集中在氧化磷酸化 (Oxidative phosphorylation)、乙醛酸和二羧酸代谢 (Glyoxylate and dicarboxylate metabolism)、戊糖和葡萄糖醛酸酯互变 (Pentose and glucuronate interconversions)、柠檬酸循环 (Citrate cycle)、碳代谢 (Carbon metabolism) 等, 其中除碳代谢属于下调差异基因富集的 pathway 外, 其它通路均为上调差异基因富集的通路。氧化磷酸化是指在有机物氧化中伴随着 ATP 的生成, 构成呼吸链 (Damesin, 2003; 郭成才, 1957); 乙醛酸和二羧酸代谢、柠檬酸循环, 都是重要的呼吸代谢途径; 戊糖和葡萄糖醛酸酯互变属于非氧化糖代谢; 碳代谢主要包括了光合固定代谢、碳水化合物运输转化代谢以及碳水化

合物的积累代谢等,在植物生长发育、代谢活动中具有重要作用(江苏农学院,1984)。以上数据说明花芽露红期比花芽萌动期呼吸代谢和非氧化糖代谢增强,但是光合作用、碳水化合物代谢等减弱。

花芽露红期—生态休眠期的差异表达基因涉及的通路主要集中在氧化磷酸化(Oxidative phosphorylation)、脂肪酸代谢(Fatty acid metabolism)、柠檬酸循环(Citrate cycle)、碳代谢(Carbon metabolism)、DNA复制(DNA replication)等,其中除了DNA复制为下调差异基因富集的通路外,其它通路均为上调差异基因富集的通路。植物体内的脂肪酸代谢是维系其生命活动的基本代谢之一,说明该时期代谢活动主要集中于呼吸代谢、脂肪酸代谢、光合作用、碳水化合物代谢、DNA复制、细胞分裂,维持花芽发育的基本生命活动,除了DNA复制、细胞分裂活跃度在减弱外,其余作用力度逐渐增强。

从以上3组各通路的富集结果可以看出,仁用杏花芽在开花前一个月进行着各种旺盛的生物合成和代谢活动,为后期发育积累能量与物质。

## 2.3 成花途径相关基因分析

从仁用杏3个不同时期花芽转录组数据中挖掘出了126个与开花相关的基因。其中属光周期途径相关基因如下:光受体相关基因的有光敏色素基因 *PHYA*、*PHYB*,隐花色素基因 *CRY1*、*CRY2*,节律钟输入基因 *FKF1*、*SPA1*、*ZTL*、*COP2*等,生物节律钟基因 *TOC1*、*ELF3*、*ELF4*、*LHY*等,节律钟输出基因 *GI*以及节律钟下游基因 *CO*、*FT*;春化途径相关基因有 *FLC*、*VIN3*、*VRN1*、*VRN2*等;自主途径相关基因有 *LD*、*FCA*、*SDG*等;赤霉素途径相关基因有 *GA4*、*RGL1*、*LFY*等。除此之外,还从转录组数据中获得与 *FRI* 依赖途径相关的调控基因有 *FES1*、*FRI*;与年龄调节相关的调节基因 *SPL*;温度调控相关基因 *HOS1*;花器官发育基因 *AP1*、*AP2*、*LUG*等。

### 2.3.1 花芽光周期调控途径关键基因表达模式分析

根据拟南芥开花的光周期途径,光受体感受光信号后,将光信号传递给生物节律钟系统,随后产生节律信号且此信号传递给节律钟输出基因,节律输出基因调控节律钟下游开花时间基因的表达(韩玉珍等,1998)。仁用杏花芽3个时期的转录组数据中发现共有74条 *unigene*,即44个开花基因(其中有基因不止一条 *unigene* 序列)可归类于光周期调控途径,其中有67条差异基因,38条差异基因上调表达,29条差异基因下调表达。从转录组中确定了光周期调控途径最关键的几个基因,并对3个不同发育时期的表达量进行了比较,基因表达量为数据,采用DESeq进行基因差异表达分析,筛选阈值为  $\text{padj} < 0.05$ (表2)。

对表2数据结果分析得出,光周期途径中,光敏色素基因 *PHYA*,花芽萌动期—生态休眠期无差异表达,花芽露红期表达量高于萌动期和生态休眠期;*PHYB* 3个时期无差异表达。隐花色素 *CRY1*,花芽萌动期和露红期表达量高于生态休眠期;*CRY2* 在3个时期无差异表达;节律钟基因 *TOC1* 3个时期均上调表达;节律钟基因 *ELF3* 有两个同源基因, *comp34177\_c1* 无差异表达, *comp34873\_c0* 花芽萌动期—生态休眠期无差异表达,花芽露红期—萌动期与花芽露红期—生态休眠期均上调表达;节律钟基因 *LHY* 有两个同源基因,表达量变化一致,均是花芽萌动期—生态休眠期无差异表达、花芽露红期比萌动期及生态休眠期都上调表达;节律钟输出基因 *GI*,花芽萌动期—生态休眠期上调表达,花芽露红期—萌动期无差异表达但表达量高于花芽生态休眠期。7条节律钟下游基因 *CO*,其中 *Col11* 3个发育时期的表达模式均上调, *Col9* 3个时期均下调, *Col2* 仅在花芽萌动期—生态休眠期上调表达,之后无差异表达, *Col13* 花芽萌动期—生态休眠期无差异表达,花芽露红期比生态休眠期与萌动期均上调表达; *Col4* 花芽萌动期—生态休眠期无差异表达,花芽露红期比生态休眠期与花芽萌动期均下调表达; *Col6* 与 *Col5* 表达模式一样,花芽露红期—萌动期无差异表达,花芽萌动期

及花芽露红期比生态休眠期均下调表达。

表 2 仁用杏花芽光周期调控途径关键基因表达模式  
Table 2 Key gene expression model of kernel apricot bud in the photoperiod pathway

基因名 Gene	Unigene 编号 Code	表达量 FPKM			基因表达模式 Gene expression model		
		A 休眠期 Dormancy	B 萌动期 Sprouting	C 露红期 Preliminary blooming	B - A	C - B	C - A
<i>PHYA</i>	comp32842_c0	29.580	27.530	33.615	-	上调 Up	上调 Up
<i>PHYB</i>	comp33585_c0	19.880	22.140	15.995	-	-	-
<i>CRY1</i>	comp31692_c0	29.315	37.385	35.495	上调 Up	-	上调 Up
<i>CRY2</i>	comp32445_c0	38.420	32.325	32.495	-	-	-
<i>TOC1</i>	comp30414_c0	17.155	29.965	128.190	上调 Up	上调 Up	上调 Up
<i>ELF3</i>	comp34177_c1	17.220	12.365	11.955	-	-	-
	comp34873_c0	7.610	7.935	39.470	-	上调 Up	上调 Up
<i>LHY</i>	comp33218_c0	89.895	107.240	138.900	-	上调 Up	上调 Up
	comp30548_c0	2.905	3.135	48.540	-	上调 Up	上调 Up
<i>GI</i>	comp32422_c0	24.155	33.125	30.985	上调 Up	-	上调 Up
<i>Col2</i>	comp115512_c0	0	2.355	0.230	上调 Up	-	-
<i>Col13</i>	comp26788_c0	5.995	7.335	9.370	-	上调 Up	上调 Up
<i>Col4</i>	comp30001_c1	101.395	114.660	58.070	-	下调 Down	下调 Down
<i>Col6</i>	comp26928_c0	2.900	11.155	7.820	上调 Up	-	上调 Up
<i>Col5</i>	comp33509_c1	81.170	124.560	99.170	上调 Up	-	上调 Up
<i>Col11</i>	comp26555_c0	0.045	1.535	38.055	上调 Up	上调 Up	上调 Up
<i>Col9</i>	comp29611_c0	96.250	59.590	112.650	下调 Down	下调 Down	下调 Down

注：以基因表达量为数据，采用 DESeq 进行基因差异表达分析，筛选阈值为  $\text{padj} < 0.05$ ，“-”表示基因表达水平无显著差异。下同。  
Note: Based on the gene expression level, used DESeq to analyse the differential expression of genes whose screening threshold was  $\text{padj} < 0.05$ , and the ‘-’ represented gene expression level that had no significant differences. The same below.

2.3.2 花芽春化作用途径关键基因表达模式分析

春化作用途径分为两部分，一部分为依赖于 *FLC* 的春化途径，另一部分则不依赖 *FLC* (Michaels & Amasino, 2001)。春化作用起始时表现为响应春化低温，对 *FLC* 的表达起抑制作用，此后 *FLC* 均处于低表达水平。在仁用杏花芽 3 个时期的转录组数据中共找到有 23 条 unigene，即 9 个开花基因（其中有基因不止一条 unigene 序列）可归属于春化作用途径，其中有 19 条差异基因，4 条上调基因和 15 条下调基因。对属于春化作用途径中相对重要的 3 个基因进行了 3 个发育时期的表达模式分析发现(表 3)，3 条同源 unigene 同属于 *VIN3*, comp21722\_c0 3 个时期均无差异表达, comp29479\_c0

表 3 仁用杏花芽春化作用途径关键基因表达模式  
Table 3 Key gene expression model of kernel apricot bud in the vernalization pathway

基因名 Gene	Unigene 编号 Code	表达量 FPKM			基因表达模式 Gene expression model		
		A 休眠期 Dormancy	B 萌动期 Sprouting	C 露红期 Preliminary blooming	B - A	C - B	C - A
<i>VIN3</i>	comp21722_c0	2.340	2.240	1.730	-	-	-
	comp29479_c0	6.785	19.380	26.295	上调 Up	上调 Up	上调 Up
	comp28738_c0	31.520	45.555	12.675	上调 Up	下调 Down	下调 Down
<i>VRN1</i>	comp28286_c0	33.570	27.105	17.990	-	下调 Down	下调 Down
	comp27537_c0	15.895	2.145	0.855	下调 Down	-	下调 Down
	comp23604_c0	7.630	3.495	4.910	下调 Down	-	-
	comp26808_c0	22.545	12.405	12.615	下调 Down	-	下调 Down
	comp32050_c0	3.340	8.270	3.075	上调 Up	下调 Down	-
	comp19034_c0	6.665	0.860	0.740	下调 Down	-	下调 Down
	comp34027_c0	48.415	4.465	1.505	下调 Down	下调 Down	下调 Down
<i>VRN2</i>	comp30391_c0	13.575	4.465	1.505	下调 Down	下调 Down	下调 Down
	comp33008_c0	18.010	12.720	13.090	-	-	-

3 个时期均上调表达, *comp28738\_c0* 花芽萌动期表达量高于生态休眠期, 花芽露红期比萌动期与生态休眠期表大量均下调; *VRN1* 共有 8 条同源基因, *comp34027\_c0*、*comp30391\_c0* 在 3 个时期内持续下调表达, *comp27537\_c0*、*comp26808\_c0*、*comp19034\_c0* 在花芽萌动期与花芽露红期比生态休眠期下调表达, 且花芽露红期与萌动期相比无明显变化, *comp28286\_c0* 为花芽萌动期比生态休眠期无差异表达, 花芽露红期表达量都低于萌动期与生态休眠期, *comp23604\_c0* 花芽萌动期—生态休眠期下调表达, 之后表达无差异, *comp32050\_c0* 花芽萌动期—生态休眠期上调表达, 但花芽露红期—萌动期下调表达且恢复生态休眠期的表达水平; *VRN2* 的 3 个时期无差异表达。

### 2.3.3 花芽自主途径关键基因表达模式分析

自主途径与光周期及春化作用途径不一样, 其受环境信号调控的机制尚未弄清楚 (Quesada et al., 2003)。目前, 发现有 7 个基因, *FCA*、*FY*、*FPA*、*LD*、*FVE*、*FLK* 和 *FLD* 已被确定属于该途径, 他们彼此之间互不调控基因的表达且不会产生级联放大效益, 以平行的方式对开花起作用 (徐雷等, 2011)。在仁用杏花芽 3 个时期的转录组数据中共找到有 24 条 *unigene*, 即 16 个开花基因 (其中有基因不止一条 *unigene* 序列) 可归属于自主途径, 其中共有 14 个差异表达基因, 3 个差异基因表达量上调, 11 个表达量下调。对 16 条开花基因中相对重要的 5 条基因进行了 3 个发育时期的表达量比较分析 (表 4), 通过比较表达量, 发现 *FCA* 有两条同源基因, *comp30969\_c0* 表达无差异, *comp28908\_c0* 3 个时期表达量逐渐下降; *FPA*、*FLD* 3 个时期无差异表达; *ESD4* 发现两条同源的 *unigene*, *comp31695\_c0* 在 3 个发育时期表达水平无显著差异, *comp11027\_c0* 花芽萌动期和花芽露红期比生态休眠期下调表达, 但花芽露红期—萌动期无差异表达。

**表 4 仁用杏花芽自主途径关键基因表达模式**  
**Table 4 Key gene expression model of kernel apricot bud in the autonomous pathway**

基因名 Gene	Unigene 编号 Code	表达量 FPKM			基因表达模式 Gene expression model		
		A 休眠期 Dormancy	B 萌动期 Sprouting	C 露红期 Preliminary blooming	B - A	C - B	C - A
<i>FCA</i>	<i>comp30969_c0</i>	30.290	30.020	27.135	-	-	-
	<i>comp28908_c0</i>	97.395	20.385	10.245	下调 Down	下调 Down	下调 Down
<i>LD</i>	<i>comp34365_c0</i>	16.825	19.590	10.080	-	下调 Down	-
	<i>comp28190_c0</i>	13.585	12.935	9.455	-	-	-
<i>FPA</i>	<i>comp29254_c0</i>	10.645	7.475	8.495	-	-	-
	<i>comp34303_c0</i>	14.575	14.125	9.950	-	-	-
<i>FLD</i>	<i>comp32573_c0</i>	12.775	10.060	8.120	-	-	-
	<i>comp31695_c0</i>	24.875	21.025	15.085	-	-	-
<i>ESD4</i>	<i>comp11027_c0</i>	48.725	46.370	47.925	下调 Down	-	下调 Down

### 2.3.4 花芽 GA 调控途径关键基因表达模式分析

GA 能够调控生长发育, 也是非诱导性条件下开花所必需的。 *GAI*、*RG*、*RGL1* 是 GA 信号传导途径中的基因, 它们在 GA 缺乏时会抑制 GA 信号途径, 而若存在活性 GA 则能解除它们对 GA 信号途径的负调控作用 (张素芝和左建儒, 2006)。在仁用杏花芽 3 个时期的转录组数据中共找到有 60 条 *unigene*, 即 13 个开花基因 (其中有基因不止一条 *unigene* 序列) 可归属于自主途径, 其中只有 22 条差异表达基因, 13 条基因上调表达, 9 个基因下调表达。对属于自主途径关键的 5 条基因进行了 3 个发育时期的表达量比较分析 (表 5), 通过比较表达量, 发现 *RGL1* 基因花芽萌动期—生态休眠期无差异表达, 花芽露红期比萌动期和生态休眠期表达量高; *GAI* 有 3 条同源基因, *comp174594\_c0* 在 3 个时期内无差异表达, *comp25987\_c0* 3 个时期表达量持续增加, *comp32226\_c0*

花芽萌动期比生态休眠期表达量上调, 花芽露红期和萌动期表达水平无显著差异; *SLY1* 也有两条同源基因, 两条花芽萌动期比生态休眠期均无差异表达, *comp23702\_c0* 花芽露红期比萌动期与生态休眠期上调表达, *comp12232\_c0* 下调表达。

表 5 仁用杏花芽 GA 调控途径关键基因表达模式  
Table 5 Key gene expression model of kernel apricot bud in the GA regulation pathway

基因名 Gene	Unigene 编号 Code	表达量 FPKM			基因表达模式 Gene expression model		
		A 休眠期 Dormancy	B 萌动期 Sprouting	C 露红期 Preliminary blooming	B - A	C - B	C - A
<i>RGL1</i>	<i>comp47073_c0</i>	0.150	1.215	17.415	-	上调 Up	上调 Up
<i>GAI</i>	<i>comp174594_c0</i>	0	0.775	1.130	-	-	-
	<i>comp25987_c0</i>	27.345	48.740	84.945	上调 Up	上调 Up	上调 Up
	<i>comp32226_c0</i>	37.185	59.975	59.655	上调 Up	-	上调 Up
<i>SLY1</i>	<i>comp12232_c0</i>	102.565	77.660	50.455	-	下调 Down	下调 Down
	<i>comp23702_c0</i>	37.680	35.905	41.980	-	上调 Up	上调 Up

2.3.5 花芽开花诱导途径整合因子表达模式分析

开花诱导途径共有 5 个整合因子, 分别为 *FT*、*LFY*、*SOC1*、*SVP* 和 *FLC*, 整合相应开花诱导途径而诱导开花。*FLC* 是抑制开花的关键基因; *FT* 可能与 *LFY* 共同发挥作用, 且 *LFY* 需 *FT* 存在才能发挥作用; *SOC1* 直接参与了光周期途径中 *FT* 基因及春化途径 *FLC* 基因的染色质互作, 从而促进开花; *SVP* 抑制 *SOC1* 的表达, 从而抑制开花, 确定和控制开花时间。在仁用杏花芽 3 个时期的转录组数据中共找到有 11 条 unigene 属于开花诱导途径中的整合因子, 且所有 unigene 均有差异表达, 其中有 3 条差异基因上调表达, 7 条差异基因下调表达。比较 5 条整合因子 3 个发育时期的表达量 (表 6), 发现 *FT* 有 3 条同源 unigene, *comp29712\_c2*、*comp27591\_c0* 花芽萌动期与露红期比生态休眠期表达量下调, 花芽露红期—萌动期上调表达, *comp124894\_c0* 3 个时期表达量变化不显著。*LFY* 有 1 条 unigene, 花芽萌动期—生态休眠期上调表达, 之后表达量下调, 且花芽露红期表达量低于生态休眠期; 发现有 4 条 *SOC1* 的同源 unigene, *comp118835\_c0*、*comp195712\_c0*、*comp95858\_c0* 它们均无差异表达, *comp35193\_c1* 花芽萌动期—生态休眠期表达量上调, 花芽露红期—萌动期表达量下调, 且恢复到生态休眠期水平; 两条 *SVP* 同源基因, *comp33589\_c0* 花芽萌动期与露红期比生态休眠期表达下调但花芽露红期—萌动期无差异表达, *comp29599\_c0* 3 个时期均下调表达; *FLC* 基因 3 个时期均下调表达。

表 6 仁用杏花芽开花诱导途径整合因子表达模式  
Table 6 The integrated factor expression model of kernel apricot bud in the flowering inductin pathway

基因名 Gene	Unigene 编号 Code	表达量 FPKM			基因表达模式 Gene expression model		
		A 休眠期 Dormancy	B 萌动期 Sprouting	C 露红期 Preliminary looming	B - A	C - B	C - A
<i>FT</i>	<i>comp29712_c2</i>	48.950	11.455	17.635	下调 Down	上调 Up	下调 Down
	<i>comp124894_c0</i>	2.635	0	0.740	-	-	-
	<i>comp27591_c0</i>	41.780	10.335	23.570	下调 Down	上调 Up	下调 Down
<i>LFY</i>	<i>comp21031_c0</i>	22.030	60.550	7.725	上调 Up	下调 Down	下调 Down
<i>SOC1</i>	<i>comp35193_c1</i>	23.835	50.105	25.505	上调 Up	下调 Down	-
	<i>comp118835_c0</i>	0.670	4.250	0.310	-	-	-
	<i>comp195712_c0</i>	0.435	1.090	0.305	-	-	-
	<i>comp95858_c0</i>	0.210	1.330	0.580	-	-	-
<i>SVP</i>	<i>comp33589_c0</i>	41.370	20.455	11.590	下调 Down	-	下调 Down
	<i>comp29599_c0</i>	17.370	7.440	1.095	下调 Down	下调 Down	下调 Down
<i>FLC</i>	<i>comp23166_c0</i>	58.540	35.325	11.065	下调 Down	下调 Down	下调 Down

### 3 讨论

本研究中进行高通量测序的样品为花芽萌动前后的仁用杏花芽,是花发育的重要时期。基于转录组、数字基因表达谱数据和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 对开花分子机制的研究,发现有 13 856 条差异表达基因,从转录组数据中共挖掘出了 126 个与开花相关的基因,其中自主途径 16 个,春化途径 16 个,光周期途径 47 个,GA 途径 13 个,整合因子 5 个,花器官发育基因 17 个,年龄途径基因 7 个,影响 *FLC* 表达的基因 (开花诱导途径外) 16 个,包括 *PAF1* 复合体、*SWR1* 复合体、*FRI* 复合体,从而可见,仁用杏的开花调控途径非常复杂。通过筛选差异基因及对差异基因 pathway 显著性富集分析、开花诱导途径中关键基因的表达模式分析,从差异基因富集结果可以看出,仁用杏花芽在花芽萌动前后进行着各种旺盛的生物合成和代谢活动,为后期发育积累能量与物质,发现试验阶段仁用杏的 4 个开花诱导途径均已启动。

光周期途径响应光诱导而促使植物开花 (Yanovsky & Kay, 2002; 孙昌辉 等, 2007)。在光周期途径中,有两类与开花有关的光受体基因,一类是吸收红光和远红光的光敏色素 PHYs (A、B、C、D、E) (Simpson & Deao, 2002); 一类是吸收蓝光和紫外光的隐花色素基因 *CRY1*、*CRY2* (Cashmore & Jarillo, 1999; Lin, 2002)。仁用杏中发现了 *PHYA*、*CRY2*、*CRY1*, 它们均为光周期中促进开花的基因,其中 *CRY2* 不是差异表达基因,可能对开花影响很小, *PHYA* 与 *CRY1* 在 4 月 2 日出现拐点, *PHYA* 先无差异变化之后上调, *CRY1* 先上调之后无差异变化,可能受蓝/红光光质的影响, *CRY1* 比 *PHYA* 先对开花起作用。 *ELF3* 为光周期中节律钟输入基因, *TOC1*、*LHY* 属于节律钟基因,均在 4 月 2 日后表达量急剧上升,这 3 个基因在 4 月 2 日后开花启动起正调控作用。 *GI* 为节律钟输出基因,促进开花。 *COL* 基因家族,生物节律钟下游基因,其中 *Col5* 能促进开花, *GI*、*Col5* 均出现先上调后无差异表达,于 4 月 2 日达到最大值,对开花启动起促进作用; *Col9* 具延迟开花的作用,它的表达量急剧下降,在 3 月 17 日起抑制开花影响力急剧减弱。从以上几个节律钟基因的表达量变化规律可以看出,仁用杏光周期调控途径在花芽萌动时,对开花调控作用显著,且有自己独特的调控模式, *GI*、*CO* 比 *ELF3* 和 *TOC1*、*LHY* 提前表达,其具体的作用机制还有待进一步研究。

春化作用途径感受低温而影响植物开花,且春化作用途径和自主途径主要是通过调控 Flowering Locus C 基因 (*FLC*) 的表达来调控开花时间。春化途径中,从转录组数据中挖掘出了在春化初期表达的 *VIN3*,也发现了小麦春化作用中的 *VRN1* 和 *VRN2*,未发现具有春化稳定作用相关的 *VIN1* 和 *VIN2* 基因,这说明仁用杏春化途径不同于拟南芥和小麦。 *VIN3*、*VRN1*、*VRN2* 均具有促进开花的作用,3 条同源 *VIN3* 基因,其中一条 *VIN3* 无差异表达,可能对开花的作用不是很明显,一条 4 月 2 日前上调,之后下调,还有一条 *VIN3* 表达量一直上调。 *VRN2* 无差异表达,不响应开花,但其表达量不低,可能在 3 月 17 日前已经完成响应; *VRN1* 共 8 条同源基因,其中 6 条 4 月 2 日前表达量下调,4 月 12 日与 4 月 2 日比无差异表达;一条表达量急剧下降,说明该时段,7 条 *VRN1* 对 *FLC* 影响力也逐渐减弱,该基因开始对开花的正调控作用发生在 3 月 17 日前,但是有一条同源基因表达大量变化异于其它 7 条,该条 *unigene* 可能在组装或数据库比对时发生错误。可能在花芽萌动时,温度上升,花芽生态休眠解除,春化途径在这个时期对开花影响不显著。自主途径是除了外界环境因素的诱导可使植物开花以外,植物内部也能调控开花 (李韩炜和朱昀, 2011)。 *FCA*、*FPA*、*FLD* 是 3 条促进开花的自主途径中的基因,但是在采样时段中表现为表达量下降,可能说明自主途径在这段时间对开花启动的促进作用逐渐减弱,可能以上 3 条基因对开花的正调控作用开始时间早于 3 月 17 日。 *ESD4* 促进 *FLC* 表达,即抑制开花,在采样时段中具下调趋势,可能说明该基因在 3 月 17 日—



4 月 12 日对开花的负调控作用也在减弱。所以, 在花芽萌动前后, 自主途径对仁用杏开花的作用不明显, 在花芽萌动前已启动, 即自身控制开花在萌动前已发挥作用。

GA 途径是通过植物体自身生长发育状况以及机体内的内源激素水平进行调控 (He & Amasino, 2005)。RGL1、GAI 两条基因均能抑制 GA 诱导 LFY、SOC1 的表达, RGL1 表现为先无差异表达后上调, 两条 GAI 均有上调趋势, RGL1、GAI 在本试验期间抑制 GA<sub>3</sub> 合成, 因 GA<sub>3</sub> 是花芽生长所必需的, 推测花芽萌动后, 花芽生长完全, GA<sub>3</sub> 在此阶段不发挥作用。SLY1 具有促进花器发育的作用, 在采样时间段内, 表达量下调, 说明基因在这段时间内不能促进开花, 仁用杏在花芽萌动期花器官发育基本完成。

对于整合因子, FT、LFY、SOC1 作用均为促进开花, 但是它们变化趋势有差异, 可能与各途径对整合因子影响力度有关系。FLC、SVP 两个基因, 在试验阶段表达量均下调, 说明在该时段它们对开花启动的抑制作用减弱。以上整合因子具体如何受开花途径的影响、调控还需进一步验证。

仁用杏具有很高的经济、生态和社会价值, 尤其在我国“三北”地区, 但是因其花期早, 易受倒春寒影响而导致减产甚至绝产。本研究中发现光周期关键基因在花芽开始萌动时上调表达显著, 对开花起着重要的调控作用, 若在此时调节光照, 不满足开花的光照需求, 即可推迟开花; GA 途径对花器官发育起着重要作用; 春化途径、自主途径均在花芽萌动前发挥作用, 可通过调控温度和 GA 含量来调节花期。本研究结果在一定程度上解析了仁用杏花芽萌动前后的分子调控模式, 为深入研究仁用杏早花机制奠定了理论基础, 也为调控仁用杏花期及培育仁用杏晚花品种提供了依据。

## References

- Anders S, Huber W. 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*, 11 (10): R106.
- Ban N, Nissen P, Hansen J, Moore P B, Steitz T A. 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 resolution. *Science*, 289 (5481): 905 - 920.
- Cashmore A R, Jarillo J A. 1999. Cryptochromes: Blue light receptors for plants and animals. *Science*, 284: 760 - 765.
- Damesin C. 2003. Respiration and photosynthesis characteristics of current 2 year stems of *Fagus sylvatica*: From the seasonal pattern to an annual balance. *New Phytologist*, 158: 465 - 475.
- Guo Cheng-cai. 1957. Oxidative phosphorylation. *Progress in Physiology*, 1 (2): 162 - 168. (in Chinese)
- 郭成才. 1957. 氧化磷酸化作用. *生理科学进展*, 1 (2): 162 - 168.
- Han Yu-zhen, Li Rui, Meng Fan-jing. 1998. Regulation of flowering by photoperiod in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Molecular Biology*, 34: 401 - 405. (in Chinese)
- 韩玉珍, 李 睿, 孟繁静. 1998. 拟南芥开花的光周期调节. *植物生理与分子生物学*, 34: 401 - 405.
- Hao Yan-ping. 2011. The research progress of kernel-used apricot flowers cold tolerance and the summary of delaying flowering measures. *Shanxi Fruits*, (1): 43 - 45. (in Chinese)
- 郝彦萍. 2011. 仁用杏花耐寒性研究进展及延迟花期措施总结. *山西果树*, (1): 43 - 45.
- He Y, Amasino R M. 2005. Role of chromatin modification in flowering time control. *Trends Plant Sci*, 10 (1): 30 - 35.
- Jiangsu Agricultural University. 1984. *Plant physiology*. Beijing: Agriculture Press: 121 - 158. (in Chinese)
- 江苏农学院. 1984. *植物生理学*. 北京: 农业出版社: 121 - 158.
- Jing Miao, Qu Ming-pu. 2008. Research progress on the flowering and fruit set of kernel-used apricot. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, (1): 131 - 135. (in Chinese)
- 景 淼, 瞿明普. 2008. 仁用杏开花座果的研究进展. *中国农学通报*, (1): 131 - 135.
- Johnson-Flanagan A M, Barran L R, Singh J. 1986. Chemistry and biology. *Canada J Plant Physiol*, 124: 309 - 319.
- Johnson-Flanagan A M, Singh J. 1987. *Plant cold hardiness*. New York: Alan R. Liss, Inc: 29.

- Li B, Dewey C. 2011. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 12: 323.
- Li Chao-wei, Zhu Yun. 2011. The research progress on flowering mechanisms in plant. *Biology Teaching*, 36 (6): 6 – 7. (in Chinese)
- 李朝伟, 朱 昀. 2011. 植物开花调控机理研究进展. *生物学教学*, 36 (6): 6 – 7.
- Lin C. 2002. Blue light receptors and signal transduction. *Plant Cell*, (S): 207 – 225.
- Michaels S D, Amasino R M. 2001. Loss of FLOWERING LOCUS C activity eliminates the late-flowering phenotype of FRIGIDA and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization. *Plant Cell*, 13 (4): 935 – 941.
- Mortazavi A, Williams B A, McCue K, Schaeffer L, Wold B. 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, 5 (7): 621 – 628.
- Quesada V, Macknight R, Dean C, Simpson G G. 2003. Auto regulation of FCA prem RNA processing controls *Arabidopsis* flowering time. *EMBO J*, 22 (12): 3142 – 3152.
- Schlutzen F, Tocilj A, Zarivach R, Harms J, Gluehmann M, Janell D, Bashan A, Bartels H, Agmon I, Franceschi F, Yonath A. 2000. Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 resolution. *Cell*, 102 (5): 615 – 623.
- Simpson G G, Deao C. 2002. *Arabidopsis*, the Rosetta stone of flowering time? *Science*, 296 (5566): 285 – 289.
- Sun Chang-hui, Deng Xiao-jian, Fang Jun, Chu Cheng-cai. 2007. An overview of flowering transition in higher plants. *Hereditas*, 29 (10): 1182 – 1190. (in Chinese)
- 孙昌辉, 邓晓建, 方 军, 储成才. 2007. 高等植物开花诱导研究进展. *遗传*, 29 (10): 1182 – 1190.
- Wang Hong-chun. 1987. Membrane structure function and osmotic regulation. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers: 99. (in Chinese)
- 王洪春. 1987. 物膜结构功能和渗透调节. 上海: 上海科学技术出版社: 99.
- Wei An-zhi. 2006. Cold resistance mechanism and anti-frost substances selection of *Prunus armeniaca* [Ph. D. Dissertation]. Yangling: Northwest A & F University. (in Chinese)
- 魏安智. 2006. 仁用杏抗寒机理研究与抗寒物质筛选 [博士论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Wimberly B T, Brodersen D E, Clemons W M, Morgan-Warren R J, Carter A P, Vornrhein C, Hartsch T, Ramakrishnan V. 2000. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*, 407 (6802): 327 – 339.
- Xu Lei, Jia Fei-fei, Wang Li-lin. 2011. Progresses on molecular mechanisms of flowering transition in *Arabidopsis*. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 31 (50): 1057 – 1065. (in Chinese)
- 徐 雷, 贾飞飞, 王利琳. 2011. 拟南芥开花诱导途径分子机制研究进展. *西北植物学报*, 31 (50): 1057 – 1065.
- Yanovsky M J, Kay S A. 2002. Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature*, 419: 308 – 312.
- Zeng Qun, Zhao Zhong-hua, Zhao Shu-qing. 2006. The signaling pathways of flowering time regulation in plant. *Hereditas*, 28 (8): 1031 – 1036. (in Chinese)
- 曾 群, 赵仲华, 赵淑清. 2006. 植物开花时间调控的信号途径. *遗传*, 28 (8): 1031 – 1036.
- Zhang Su-zhi, Zuo Jian-ru. 2006. The research progress of *Arabidopsis* flowering time's control. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 33 (4): 301 – 309. (in Chinese)
- 张素芝, 左建儒. 2006. 拟南芥开花时间调控的研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 33 (4): 301 – 309.