

# GA<sub>3</sub> 和 PP<sub>333</sub> 对榛子成花的影响及其作用机制

孟晓庆<sup>1</sup>, 侯智霞<sup>1</sup>, 张 兰<sup>2</sup>, 苏淑钗<sup>1</sup>, 朴 蕾<sup>1</sup>, 王培培<sup>1</sup>, 王 冲<sup>1</sup>

(1. 北京林业大学 林学院, 北京 100083; 2. 中国农业科学院 生物技术研究所, 北京 100081)

**摘要:** 利用环剥摘叶处理的方法确定榛子雄花芽生理分化时期, 并分别喷施 GA<sub>3</sub> (100 mg/L) 和 PP<sub>333</sub> (800 mg/L 和 1 g/L), 研究其对榛子雌花、雄花序数量以及成花基因 *LFY* 表达的影响。结果表明, 榛子雄花芽生理分化期为 4 月 22 日至 5 月 28 日。GA<sub>3</sub> 100 mg/L 处理使雄花序数量显著增加, 雌雄比例降低。PP<sub>333</sub> 1 g/L 处理则使雌花数量显著增加, 雌雄比例升高。荧光定量 PCR 结果显示, GA<sub>3</sub> 促进了榛子 *LFY* 基因的表达, PP<sub>333</sub> 抑制了榛子 *LFY* 基因的表达, 推测榛子成花转变与榛子 *LFY* 基因有密切关系。

**关键词:** 榛子; 花芽分化; GA<sub>3</sub>; PP<sub>333</sub>; *LFY* 基因; 实时定量 PCR

**中图分类号:** S664.4 S727.3 **文献标志码** A **文章编号:** 1004-3268(2013)04-0115-04

## Effects of GA<sub>3</sub> and PP<sub>333</sub> on Flowering of Hazelnut and Their Functional Mechanisms

MENG Xiao-qing<sup>1</sup>, HOU Zhi-xia<sup>1</sup>, ZHANG Lan<sup>2</sup>, SU Shu-chai<sup>1</sup>, PIAO Lei<sup>1</sup>,  
WANG Pei-pei<sup>1</sup>, WANG Chong<sup>1</sup>

(1. Forestry College of Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

2. Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** The stage of physiological differentiation of male flower-bud was studied on hazel by using the methods of the band girdle and leaf removal methods. GA<sub>3</sub> (100 mg/L) and PP<sub>333</sub> (800 mg/L and 1 g/L) was sprayed on the leaves of hazel respectively, to research on the amount of hazelnut male, female flowers and the expression of the key gene *LFY* in leaf using the Real-time qPCR method. The results showed that the stage of physiological differentiation of male flower-bud was from April 22th to May 28th. Spraying GA<sub>3</sub> could increase the number of male inflorescence and decrease the ratio of female to male. PP<sub>333</sub> could increase the number of female inflorescence and the ratio of female to male rose. Real-time qPCR results showed that the expression of the key gene *LFY* was promoted by GA<sub>3</sub> and inhibited by PP<sub>333</sub> treatment. From these, a close relation between hazelnut flowering transition and *LFY* gene was conjectured.

**Key words:** hazelnut; flower bud differentiation; GA<sub>3</sub>; PP<sub>333</sub>; *LFY* gene; Real-time qPCR

果树花芽分化是一个复杂的生理生化过程, 对多种果树的研究表明, 果树的花芽分化不仅仅是营养问题, 也与遗传基因有关。喷施植物生长调节剂可以调控作物的花芽分化、提高产量, 在果树生产上应用广泛。赤霉素(GA<sub>3</sub>)是一种促进生长的植物激

素, 与花发育密切相关<sup>[1]</sup>。多效唑(PP<sub>333</sub>)是一种用途广泛的植物生长延缓调节剂, 具有抑制 GA<sub>3</sub> 生物合成的作用<sup>[2]</sup>。不同植物在特定时期外施 GA<sub>3</sub> 和 PP<sub>333</sub> 对成花的影响不同, 同时一些响应 GA<sub>3</sub> 成花调控途径相关基因的表达量也发生变化<sup>[3-5]</sup>。植物

收稿日期: 2012-12-23

基金项目: 博士后特别资助基金项目(200902052); 国家林业局重点项目(2011-03)

作者简介: 孟晓庆(1986-), 女, 山西忻州人, 在读硕士研究生, 研究方向: 经济林。E-mail: xiaolaoshuwp@163.com

\* 通讯作者: 侯智霞(1973-), 女, 河北鹿泉人, 副教授, 主要从事果树花果发育及品质调控研究。E-mail: hzx2004@163.com

成花基因 *LFY* 是花分生组织特性基因, 在成花调控网络结构中处于比较关键的位置, 是营养生长向生殖生长转变所必需的<sup>[6]</sup>, 其表达受到有生物活性的  $GA_3$  的调节<sup>[7]</sup>。拟南芥 *lfy* 突变体植株不能顺利进行成花转变<sup>[8]</sup>。过表达 *LFY* 表现出早花、花器官变化等生理现象<sup>[9-11]</sup>。

榛子 (*Corylus heterophylla* F.) 属于榛科 (Corylaceae) 榛属 (*Corylus* L.) 树种, 是珍贵的木本粮油资源, 榛仁营养丰富, 含脂肪 57.1%~62.1%、蛋白质 16.2%~21.12%、碳水化合物 6.5%~9.3%, 还含有维生素 C、E、B1 和多种矿物质<sup>[12-14]</sup>。榛子雌雄同株异花, 雌雄比例非常低, 严重影响其经济价值。目前国内有关榛子成花机制的研究报道很少, 鉴于此, 以杂交榛为研究对象, 通过环剥摘叶、喷施  $GA_3$  和  $PP_{333}$  措施, 应用田间统计以及荧光定量的手段, 研究榛子雄花芽生理分化时期、 $GA_3$  和  $PP_{333}$  对成花的影响以及对 *LFY* 基因的表达调节, 以期揭示  $GA_3$  影响榛子成花的内在机制和外生条件, 为调控榛子成花提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验地点和材料

试验于 2010—2012 年在北京市昌平区西郊鹫峰林场实验基地 (北纬 39°56', 东经 116°28') 进行。供试材料为生长发育正常、无病虫害的 6 年生杂交榛达维 (育种代号为 84-254)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 榛子雄花芽生理分化期确定 采用环剥摘叶法<sup>[15-16]</sup>。每次选取一个 4 年生骨干枝进行环剥 (剥口离地面约 20 cm, 环剥的宽度 0.2~0.5 cm), 在骨干枝上随机选 12 个枝条 (粗度在 2~3 cm), 分成 3 个区组, 4 个枝为一个区组, 随机区组排列, 每区组中选 2 个枝进行摘叶处理, 剩余 2 个枝不摘叶作为对照, 将摘叶处理的所有枝条基部的叶片摘除, 只留枝条顶部 1 个大叶, 每隔约 7 d 处理一次, 共 8 次 (2011 年 4 月 28 日至 2011 年 6 月 26 日), 枝条均进行挂牌编号并进行定期检查记录。9 月初调查统计成花情况 (雄花序数占处理芽总数的百分比)。榛子雄花芽生理分化始期为摘叶组开始有雄花序形成的日期, 在此时期摘叶处理已经不能够抑制小部分雄花芽成花转变; 摘叶组雄花序形成百分率变化不显著的时期为雄花芽生理分化结束期<sup>[16]</sup>。

1.2.2  $GA_3$  和  $PP_{333}$  处理对榛子雌花和雄花序数量的影响 2010 年 5 月 1 日和 8 日分别喷施 800 mg/L  $PP_{333}$  (四川国光农化有限公司生产) 和 100

mg/L  $GA_3$  (上海同瑞生物科技有限公司生产), 以清水为空白对照, 喷施至整株叶片滴水为止。在 2011 年 4 月 18 日、4 月 22 日分别喷施 100 mg/L  $GA_3$  和 1 g/L  $PP_{333}$ 。单株小区处理, 重复 3 次, 随机区组排列。翌年 3 月 30 日统计榛子雌雄花的数量。统计时每个处理随机选取 3 棵长势相同的杂交榛, 每个处理共选取 100 个 1 年生小枝, 统计每个枝条的长度, 枝上雌花、雄花序个数。利用 Excel、SPSS 18.0 软件进行统计和分析。

2012 年 4 月 28 日开始至 6 月 26 日取叶片, 日期分别为 04-28、05-06、05-13、05-20、05-28、06-06、06-13、06-26, 液氮速冻后备用。

1.2.3 荧光定量 PCR 用改良的 CTAB 法<sup>[17]</sup> 分别提取各时期叶片总 RNA, 反转录按照 TOYOBO First Strand cDNA Synthesis Kit Revertra Ace- $\beta$  (Code No. FSK-100) 说明书进行。以榛子 18S rRNA 为内参, 按照 Thermo 公司 Thermo Scientific DyNAmo colorflash SYBR Green qPCR Kit (F-416) 说明书, 在 Applied Biosystems 7500 Real-time PCR 仪上进行荧光定量 PCR, 采用  $\Delta\Delta CT$  方法分析不同时期和处理 *LFY* 基因的相对表达量。目的基因和内参 PCR 产物长度都为 146 bp。内参基因引物: 18Sfw: 5'-AGACACTCGTGCCTTCTTGCC-3'; 18Srv: 5'-CCGTTGCCGAGAGTCGTTATG-3'。目的基因引物: LFYfw: 5'-GTTTAGGTATGCGAAGAA GGCTG-3'; LFYrv: 5'-CCCA-CATTTTCTCCTCTTTCCTT-3'。引物由上海生物工程技术有限公司合成。

## 2 结果与分析

### 2.1 榛子雄花芽生理分化期的确定

9 月份对各组处理的成花情况进行统计分析, 结果表明 (表 1), 第 1 次 (4 月 28 日) 进行环剥摘叶的芽并非全部都形成叶芽, 已经有 2.2% 的雄花芽度过了花芽生理分化始期, 5 月 6—28 日摘叶处理的芽雄花序形成百分率在 7.9%~23.4%, 从 5 月 28 日到 6 月 26 日摘叶处理的枝条芽雄花序形成百分率在 23.4%~28.5%, 之后摘叶已不能抑制绝大部分花芽的形成, 这说明 4 月 28 日已有小部分花芽度过了花芽分化的临界期, 随着处理时间的推迟雄花序形成百分率逐渐增多, 而 5 月 28 日大部分花芽已度过了花芽分化的临界期即生理分化期, 说明以后雄花序数量基本不再增加。结合前人的研究可以推断, 榛子的大部分雄花芽是在 4 月 22 日和 5 月 28 日之间度过雄花芽生理分化期的, 之后进入形态分化时期。

表 1 环剥摘叶时间对榛子雄花序形成百分率的影响 %

处理	处理时间/(月-日)							
	04-28	05-06	05-13	05-20	05-28	06-06	06-13	06-26
环剥+摘叶	2.2	7.9	10.6	16.9	23.4	27.7	25.3	28.5
环剥+不摘叶	24.9	34.2	32.2	31.75	28.4	33.3	29.3	31.8

注:雄花序形成百分率是雄花序数占处理芽总数的百分比。

2.2 GA<sub>3</sub> 和 PP<sub>333</sub> 对榛子雌雄花数量的影响

2010 年和 2011 年分别对杂交榛子整株喷施 GA<sub>3</sub> 和 PP<sub>333</sub>,统计 1 年生小枝上雌雄花的数量。根据 2010 年的试验结果(表 2),发现 GA<sub>3</sub> 显著促进雄花序分化,降低雌雄分化比例。而外施 PP<sub>333</sub> 虽然使雌花芽增加但是差异不显著。根据 2011 年的试验结果(表 3),外施 GA<sub>3</sub> 使雄花序数量显著增加,PP<sub>333</sub> 显著增加雌花芽的数量,提高雌雄分化比例。GA<sub>3</sub> 和 PP<sub>333</sub> 处理叶芽数量的差异不显著。综合 2 a 结果初步认为:GA<sub>3</sub> 显著促进雄花序分化,降低雌雄分化比例。2 a 中 PP<sub>333</sub> 促进雌花芽的显著性效应不同,可能与施用 PP<sub>333</sub> 的时间、浓度等差异有关。两处理对叶芽数量的影响均不显著。

表 2 不同处理对榛子花芽分化的影响(2010 年)

处理	雌花芽/ (个/cm)	雄花序/ (个/cm)	叶芽/ (个/cm)	雌雄比
PP <sub>333</sub> 800 mg/L	0.138 4a	0.188 2a	0.337 6a	0.735 3a
GA <sub>3</sub> 100 mg/L	0.130 5a	0.307 1b	0.295 1a	0.425 0b
清水	0.131 8a	0.204 7a	0.303 5a	0.643 7c

注:同列不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著,下同。

表 3 不同处理对榛子花芽分化的影响(2011 年)

处理	雌花芽/ (个/cm)	雄花序/ (个/cm)	叶芽/ (个/cm)	雌雄比
PP <sub>333</sub> 1 g/L	0.143 6a	0.146 2a	0.437 3a	0.982 216a
GA <sub>3</sub> 100 mg/L	0.105 1b	0.374 0b	0.451 5a	0.281 016b
清水	0.102 1b	0.150 8a	0.418 2a	0.677 056c

2.3 GA<sub>3</sub> 和 PP<sub>333</sub> 对榛子 LFY 基因表达的影响

采用改良的 CTAB 法,分别提取榛子雄花芽分化不同时期叶片总 RNA,电泳结果如图 1 所示,条带清晰,无降解,纯度高,能够满足后续的试验要求。采用荧光定量检测榛子 LFY 的表达变化情况。清水对照的榛子叶片荧光定量结果显示(图 2-CK):LFY 在榛子雄花芽生理分化整个时期都有表达,生理分化初期表达量低,之后表达量升高,5 月 28 日达到最高,形态分化初期表达量降低。GA<sub>3</sub> 和 PP<sub>333</sub> 处理榛子叶片荧光定量结果显示(图 2-GA<sub>3</sub> 和图 2-PP<sub>333</sub>):与对照相比,GA<sub>3</sub> 处理使叶片中 LFY 的表达增加,而 PP<sub>333</sub> 处理抑制了榛子 LFY 的表达。

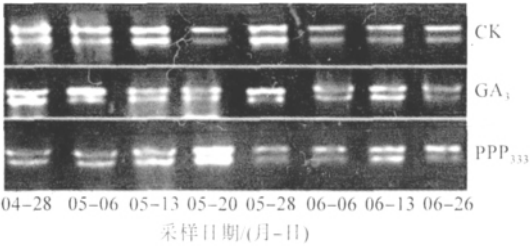


图 1 榛子总 RNA 电泳结果

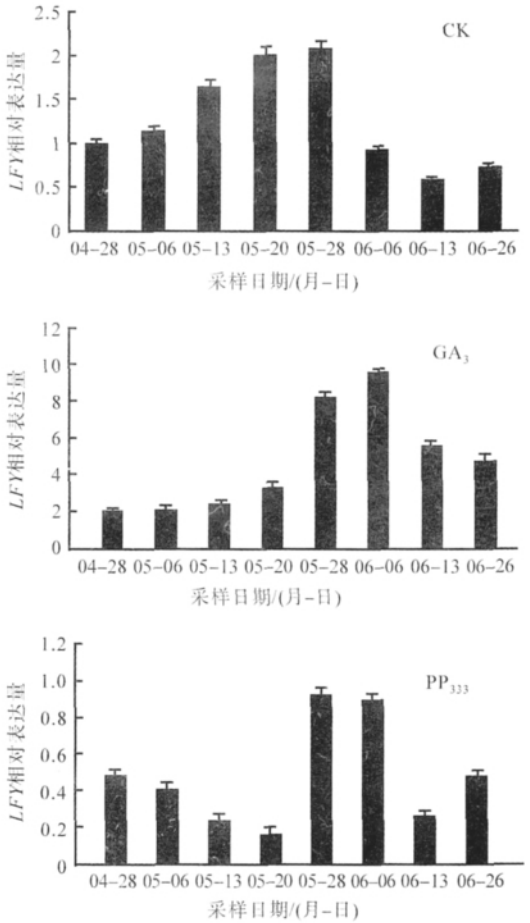


图 2 不同处理对榛子 LFY 相对表达量的影响

3 结论与讨论

成花诱导期是有花植物发育过程中的重要转折时期,同时也是调控植物形成花芽的关键时期。环剥能截留可塑性物质使营养不流入根部或其他枝条而用于花芽的形成,而摘叶可以阻止花芽分化<sup>[15]</sup>。本研究通过环剥摘叶的方法确定了北京地区榛子雄花芽生理分化的时期大致是 4 月 22 日至 5 月 28 日,为生产实践中

杂交榛成花调控提供参考。

GA<sub>3</sub> 是影响植物成花的外部因素之一,也是人工调控植物成花的有效手段。目前在果树上相关研究有很多:比如在苹果的研究中发现 GA<sub>3</sub> 有抑花作用,PP<sub>333</sub> 促进花芽分化<sup>[18-21]</sup>;低质量浓度的 GA<sub>3</sub> (30 mg/L 和 50 mg/L)促进银杏雌株花芽分化,PP<sub>333</sub> (100 mg/L 和 1 g/L)具有促花作用<sup>[22]</sup>,与对核桃、野生榛子、荔枝的研究结果一致<sup>[23-25]</sup>。对大多数木本植物的研究得出 GA<sub>3</sub> 抑花,PP<sub>333</sub> 促花,而板栗的研究结果则相反。榛子为雌雄同株异花植物,成花特性较为特殊,本研究结果表明,在杂交榛达维上施用 100 mg/L GA<sub>3</sub> 显著提高其 1 年生小枝上雄花序的数量,降低雌雄分化比例。PP<sub>333</sub> 使雌花芽的数量增加,雌雄分化比例升高,1 g/L PP<sub>333</sub> 作用效果更加显著。这与王文波在野生榛子上的研究结果一致<sup>[24]</sup>。短日条件下 GA<sub>3</sub> 可通过调节拟南芥 *LFY* 基因的表达来调控开花。外源供给 GA<sub>3</sub> 可促进 *LFY* 基因的表达<sup>[7]</sup>;在对剑麻的研究中发现 GA<sub>3</sub> 处理后成花相关基因 *LFO/LFY* 的表达量增加<sup>[26]</sup>。然而也有相反的结论:GA<sub>3</sub> 处理显著抑制了桃、早食枳等的成花诱导和进一步的正常分化,抑制了成花关键基因 *LFY* 的正常表达<sup>[27-28]</sup>。本研究通过对杂交榛叶面喷施 GA<sub>3</sub> 和 PP<sub>333</sub>,研究雄花芽生理分化叶片中成花关键基因 *LFY* 的表达变化情况,结果表明,GA<sub>3</sub> 促进了叶片中成花转变关键基因 *LFY* 的表达,PP<sub>333</sub> 处理则相反。推断榛子成花转变可能与 *LFY* 基因有关,且 *LFY* 的表达诱导杂交榛雄花芽的发育,与对拟南芥、剑麻等的研究结果一致<sup>[7,26]</sup>。总之,GA<sub>3</sub> 和 PP<sub>333</sub> 对植物成花的作用可通过调控某些成花基因的表达而发挥作用。在不同植物中出现研究结果不一致,可能是由于植物自身遗传特性、用药的浓度和时间等差异,以及外施生长调节物质可能通过提高或削弱树势来影响成花的数量以及基因的表达水平。

#### 参考文献:

- [1] 潘瑞炽,董愚得. 植物生理学[M]. 北京:高等教育出版社,2004:176-181.
- [2] 张昌杰,尤爱琴,葛天安,等. 多效唑在农作物生产上使用方法[J]. 上海农业科技,2005(4):108.
- [3] King R W, Moritz T, Evans L T, et al. Long-day induction of flowering in *Lolium temulentum* involves sequential increases in specific gibberellins at the shoot apex[J]. Plant Physiology, 2001, 127: 624-632.
- [4] Eriksson S, Bhlénus H, Moritz T, et al. GA4 is the active gibberellin in the regulation of *LEAFY* transcription and *Arabidopsis* floral initiation[J]. The Plant Cell, 2006, 18: 2172-2181.
- [5] Gocal G F W, Sheldon C C, Gubler F, et al. *GAMYB-like* genes, flowering, and gibberellin signaling in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2001, 127: 1682-1693.
- [6] Schultz E A, Haughn G W. *LEAFY* a homeotic gene that regulates in florescence development in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 1991, 3: 771-781.
- [7] Blazquez M, Green R, Nilsson O, et al. Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the *LFY* promoter[J]. Plant Cell, 1998, 10: 791-800.
- [8] Esumi T, Tao R, Yonemori K. Isolation of *LEAFY* and *TERMINAL FLOWER 1* homologues from six fruit tree species in the subfamily maloideae of the Rosaceae[J]. Sex Plant Reprod, 2005, 17: 277-287.
- [9] Weigel D, Nilsson O. A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants[J]. Nature, 1995, 377: 495-500.
- [10] Pena L, Martin-Trillo M, Juarez J, et al. Constitutive expression of *Arabidopsis* *LEAFY* or *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time[J]. Nature Biotechnology, 2001, 19: 263-267.
- [11] 刘月学, 林顺权, 李天忠, 等. 枇杷 *LFY* 同源基因植物表达载体构建及其功能分析[J]. 果树学报, 2008, 25(5): 699-702.
- [12] 梁维坚. 杂交榛子的栽培技术[J]. 北方果树, 2001(5): 26-28.
- [13] 张宇和. 中国果树志[M]. 北京:中国林业出版社, 2005: 1-248.
- [14] 聂洪超, 孙万河, 张玉君, 等. 杂交榛子生产上存在的问题及发展建议[J]. 北方果树, 2010(6): 46-47.
- [15] 许明宪, 黄尚志. 苹果花芽的生理分化和形态分化[J]. 园艺学报, 1962, 1(2): 137-151.
- [16] 张立民. 板栗二次结实调控技术研究[D]. 北京:北京林业大学, 2007.
- [17] Liao Z H, Chen M, Guo L, et al. Rapid isolation of high-quality total RNA from *Taxus* and *Ginkgo*[J]. Reporative Biochemistry & Biotechnology, 2004, 34(3): 209-214.
- [18] 李天红, 黄卫东, 孟昭清. 苹果花芽孕育机理的探讨[J]. 植物生理学报, 1996, 22(3): 251-257.
- [19] 李秉真, 孙庆林, 张建华, 等. 苹果梨花芽分化期内源激素含量的变化[J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(1): 27-29.
- [20] 曹尚银, 汤一卒, 江爱华. GA<sub>3</sub> 和 PP<sub>333</sub> 调控苹果花芽孕育机理的研究[J]. 园艺学报, 2001, 28(4): 339-341.
- [21] 陈清, 周纯, 周学明. 苹果花芽分化的激素调节机理研究及控制技术应用效果[J]. 山西果树, 2006(3): 38-39.
- [22] 王建, 杨毅敏. 生长调节剂处理对银杏结实的影响[J]. 武汉植物学研究, 2001, 19(1): 52-56.
- [23] Kuropka B. Can the yields of walnuts be increased by growth regulators[J]. Erverbsobstbau, 1989, 31(5): 127-129.
- [24] 王文波. 榛子花期物候与开花结实促进技术研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学, 2002.
- [25] 唐志鹏, 蒋晔, 甘霖, 等. 乙烯利和多效唑对鸡嘴荔内源激素和花芽分化的影响[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2006, 32(2): 135-140.
- [26] Harris J C, Song J C, Jameson P E, et al. Autonomous, environmental and exogenous gibberellin regulation of floral development and isolation of a putative partial *FLORICAULA/LEAFY* homologue in *Phormium cookianum*[J]. Plant Growth Regul, 2009, 58: 191-199.
- [27] 安丽君, 金亮, 杨春琴, 等. 外源 GA<sub>3</sub> 对桃的成花效应及其作用机制[J]. 中国农业科学, 2009, 42(2): 605-611.
- [28] 王岩. 早实枳成花相关基因的表达分析及 *PtFLC* 的功能特征[D]. 武汉:华中农业大学, 2010.