

韩金龙,童晓利,曹荣祥,等. 避雨栽培对梨树开花及成花基因表达的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(24):124-129.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.24.030

避雨栽培对梨树开花及成花基因表达的影响

韩金龙¹,童晓利¹,曹荣祥¹,蒋立奔¹,阚家亮²,李慧²

(1. 江苏丘陵地区南京农业科学研究所,江苏南京 210046;

2. 江苏省农业科学院果树研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室,江苏南京 210014)

摘要:以梨品种苏翠1号和翠冠为试材,露地栽培为对照,记录梨树生长微环境情况、比较梨花器官从花芽萌动期到落花期整个发育过程的形态特征,同时分析成花相关基因表达特点,以期为指导生产提供基础资料。结果显示,避雨栽培能够提高梨园空气温湿度及土壤湿度,改善梨树生长微环境;促进梨成花相关基因 *PbLTY* 和 *PbFT* 转录上调,提早整体物候期,延长开花周期,提高梨成花率、开花率及改善花生长状况。

关键词:梨;避雨栽培;微环境;开花;成花基因

中图分类号: S661.204 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)24-0124-06

梨是我国主栽的三大果树之一,在南北方均有栽植。随着气候变暖,极端天气增多,春季寒潮时有发生,影响梨树成花率和成花质量,严重制约了我国梨产业的发展^[1]。梨树设施栽培可通过改变光照、温湿度等生态因子,促进梨树的物候期提前^[2],减少不良气候因子的影响,从而改善梨果实品质,提早上市。避雨栽培是果树设施栽培中的一种集约化栽培方式^[3],主要是在果园搭建聚乙烯塑料薄膜固定式避雨设施。目前避雨栽培在葡萄^[4]、大樱桃^[5]、芒果^[6]等树种上均有相关研究,研究主要集中在果树病害防控和果实品质提优等方面,对果树成花影响的报道较少。

温度是调节果树物候期最重要的影响因素^[7-9]。研究表

明,花芽萌发的环境变化与成花质量具有密切关系^[10]。果树开花期前1个月对平均温度的变化最为敏感^[9]。而土壤湿度直接决定开花时间和花芽萌发状况^[11-13]。除此之外,物候期也与降水量的多少有一定的相关性^[14-16]。通过改善果树树冠层的温湿度、土壤湿度及光照强度,可影响树体的营养生长和生殖生长。因此,利用避雨栽培设施,改变梨树生长微环境,可影响梨树成花。

果树成花要经过花芽分化期、花芽休眠期和花芽萌发期3个阶段,每个阶段的转变都会受到一系列基因的表达调控,而开花过程也需要相关基因的启动与调节^[17]。*LEAFY(LFY)* 基因和 *FLOWERING LOCUS T(FT)* 基因是模式植物花器官转化的关键基因,对植物成花起着正相关调控作用^[18]。目前,在苹果、桃和葡萄等果树上已分离出成花相关基因,它们在不同花器官中起着调控果树成花的作用^[19-21]。在梨上亦分离出 *LFY* 和 *FT* 的同源基因,但仅局限于花芽分化阶段的研究^[22],对它们在梨树开花过程中的具体表达特点尚不清楚。本研究通过比较露地和避雨2种栽培条件下梨园微环境的差异,分析花芽外观形态特征与相关成花基因的表达特点,明确避雨栽培对梨树成花情况与开花质量的影响,为梨树在南方

收稿日期:2018-09-05

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(16)1031];江苏省自然科学基金(编号:BK20151361)。

作者简介:韩金龙(1989—),男,山西霍州人,硕士,助理研究员,主要从事果树生理栽培与分子生物学研究。E-mail: hjlong24@126.com。

通信作者:李慧,博士,副研究员,主要从事果树逆境生理与分子生物学研究。E-mail: lihui7904@163.com。

[5] Davis A R, Perkins - Veazie P, Sakata Y, et al. Cucurbit grafting [J].

Critical Reviews in Plant Sciences, 2008, 27(1): 50-74.

[6] Lv H F, Cao H S, Nawaz M A, et al. Wheat intercropping enhances the resistance of watermelon to *Fusarium* wilt [J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 696.

[7] Yetisir H, Sarin, Yucel S. Rootstock resistance to *Fusarium* wilt and effect on watermelon fruit yield and quality [J]. Phytoparasitica, 2003, 31(2): 163-169.

[8] 刘慧英,朱祝军,吕国华. 低温胁迫对嫁接西瓜耐冷性和活性氧清除系统的影响[J]. 应用生态学报, 2004, 15(4): 659-662.

[9] Yan Y Y, Wang S S, Wei M, et al. Effect of different rootstocks on the salt stress tolerance in watermelon seedlings [J]. Horticultural plant journal, 2018, 4(6): 239-249.

[10] Yetisir H, Caliskan M E, Soyulu S, et al. Some physiological and growth responses of watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.)

Matsum. and Nakai] grafted onto *Lagenaria siceraria* to flooding [J]. Environmental and Experimental Botany, 2006, 58 (1/2/3): 1-8.

[11] Colla G, Roupheal Y, Cardarelli M A, et al. The effectiveness of grafting to improve alkalinity tolerance in watermelon [J]. Environmental and Experimental Botany, 2010, 68(3): 283-291.

[12] Pulgar G, Villora G, Moreno D A, et al. Improving the mineral nutrition in grafted watermelon plants: nitrogen metabolism [J]. Biologia Plantarum, 2000, 43(4): 607-609.

[13] 张莉,孟祥祥,刘娜,等. 低磷胁迫下嫁接对西瓜生长早期磷素吸收和利用的影响[J]. 果树学报, 2012, 29(1): 120-124.

[14] Huang Y, Li J, Hua B, et al. Grafting onto different rootstocks as a means to improve watermelon tolerance to low potassium stress [J]. Scientia Horticulturae, 2013, 149: 80-85.

地区避雨栽培模式的推广提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料处理

试验在江苏徐淮地区徐州农业科学研究所果园基地进行,供试材料为以杜梨为砧木,生长健壮、生长势基本一致的5年生苏翠1号和翠冠梨品种,株行距3 m×5 m,采用纺锤形树形。试验分2个处理:(1)果园露地栽培梨树;(2)果园避雨栽培梨树(避雨设施高6 m,只在下雨天进行避雨)。从花芽萌动期到谢花期每周采样2次,每次每个品种每种处理随机采集20个花芽,12个用于花芽外观形态特征观察,8个立即用液氮处理保存,用于花芽相关成花基因表达分析。

1.2 试验方法

1.2.1 果园生态因子记录 从2017年3月初(花芽萌动期)开始至2017年4月中下旬(落花期),用空气温湿度自动记录仪和土壤湿度记录仪分别记录果园露地与避雨设施下空气温湿度(树冠层)和土壤湿度变化,每隔2 h记录1次,分析空

气日平均温湿度、平均土壤湿度及其日变化规律。

1.2.2 梨成花率统计 从花芽萌动开始,每种栽培模式下每个梨品种在相同的方位随机选取新梢10枝,固定标记编号,分别统计成花率和开花率,计算公式如下:

$$\text{成花率} = \frac{\sum(\text{花芽数}/\text{总芽数})}{\text{重复数}} \times 100\%;$$

$$\text{开花率} = \frac{\sum(\text{开花数}/\text{花芽数})}{\text{重复数}} \times 100\%。$$

1.2.3 花芽外观形态特征观察 每周选取周一和周四2天观察比较不同栽培模式下,花芽萌发阶段的梨花芽外观形态特征。

1.2.4 成花基因(*LFY*、*FT*)的表达分析 采用改良的CTAB法提取梨花芽的总RNA,用1%琼脂糖胶检测RNA质量,并利用核酸分析仪NanoDrop(Thermo)检测浓度,于-70℃保存备用。以1 μL总RNA为模版,参照AceQ qPCR SYBR Green Master Mix(南京诺唯赞生物科技有限公司)说明书,反转录合成cDNA,并以*qPCact*基因^[23]为内参基因,进行荧光定量PCR检测目的基因^[22]的表达水平(引物序列见表1)。qPCR反应进行3次技术重复,定量结果采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行分析。

表1 荧光定量PCR所用引物

基因	引物序列	目的片段大小 (bp)
<i>PbLFY1</i>	F:5'-AGGGAGCACCCGTTTCATCGT-3'; R:5'-GCCGCATCTTTGCGCTGTGTTG-3'	226
<i>PbFT</i>	F:5'-AGCCCAAGTGACCCCAACCT-3'; R:5'-CGGCGAAGTCTCTGGTATTGAAG-3'	220
<i>qPCact</i>	F:5'-CTCCAGGGCTGTGTTTCCTA-3'; R:5'-CTCCATGTCATCCAGTTGCT-3'	170

1.2.5 数据分析 采用Microsoft Excel 2016软件进行数据处理和图表绘制,SPSS软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同栽培模式下温湿度变化

2.1.1 空气温度变化规律 由图1可以看出,避雨栽培对梨园温度变化影响较小。自花芽萌动期到谢花期,随着时间的

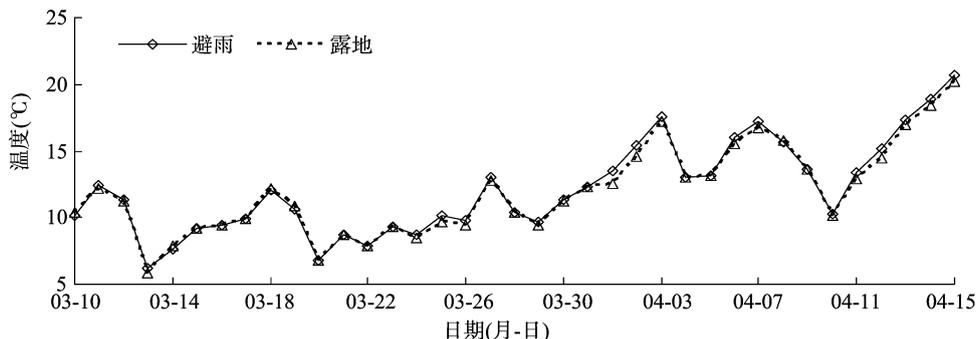


图1 避雨栽培对日空气平均温度的影响

2.1.2 空气湿度规律 由图3可知,从花芽萌动到谢花阶段,避雨和露地条件下空气湿度变化趋势完全一致,且避雨条件较露地条件日空气相对湿度相差2.0%~8.8%(平均高5.1%)。图4显示,避雨和露地条件下,空气相对湿度呈现中午低、早晚高的现象,其中最高出现在06:00,最低出现在14:00。一天中避雨条件较露地条件空气相对湿度相差1.9%~10.2%(平均高5.3%),其中在10:00相差最大,在18:00相差最小。

2.1.3 土壤湿度规律 避雨和露地条件下,土壤相对湿度变

推移,2种模式下空气温度整体的变化趋势表现一致,气温不断升高,且避雨条件气温较露地条件平均高0.19℃。图2显示,避雨和露地条件下气温日变化都表现为06:00“低—高一低”的变化趋势,一天中气温最高出现在14:00,最低出现在06:00;从夜间00:00到14:00,避雨条件气温较露地条件平均高0.19℃,其中10:00的气温相差最大(避雨条件较露地条件高0.74℃),但差异不明显。

化如图5所示,从花芽萌动期到谢花期,避雨和露地条件下的土壤相对湿度出现相同趋势的波动,避雨条件较露地条件土壤相对湿度平均高3.7%,但两者之间的差距在逐渐减小。图6显示,一天内避雨条件下的土壤相对湿度变化较为平缓,相差最大仅为0.7%,露地条件下的土壤相对湿度总体变化呈先升高后降低的趋势,相对湿度最大出现在14:00,最小出现在04:00,两者相差2.6%。

2.2 不同栽培模式下梨成花状况比较

2.2.1 梨成花率和开花率比较 由表2得知,避雨条件和露

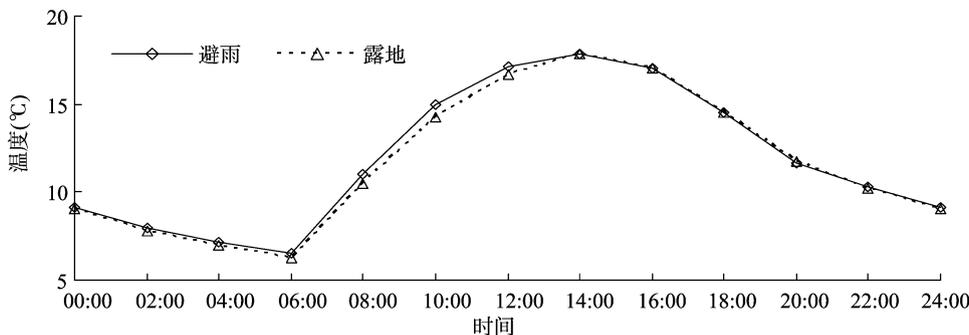


图2 避雨栽培对空气平均温度日变化的影响

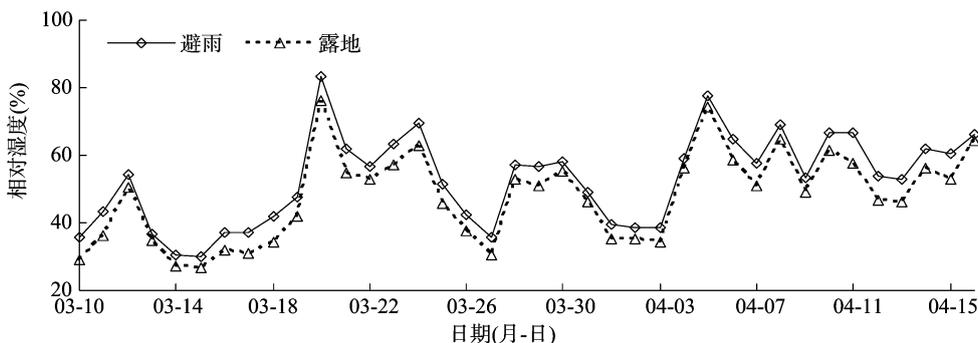


图3 避雨栽培对日空气平均湿度的影响

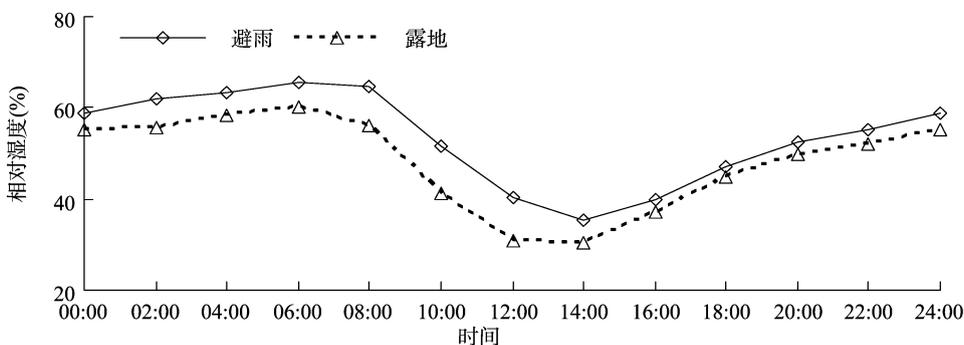


图4 避雨栽培对空气平均湿度日变化的影响

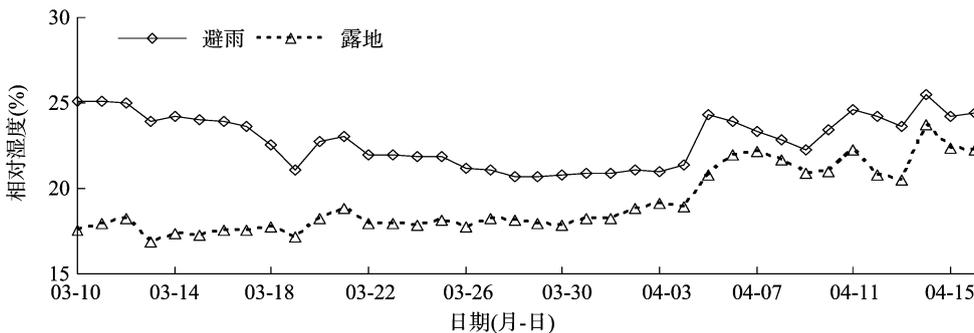


图5 避雨栽培对日土壤平均湿度的影响

地条件对梨树形成总芽数的影响不明显,但是对花芽的形成(成花率)及开花质量存在差异性影响。避雨条件下,苏翠1号和翠冠的成花率分别达到了78.3%和54.9%,较露地条件提高了5.6个百分点和7.4个百分点;在开花率方面,避雨条件也较露地条件分别提高了17.6个百分点和4.5个百分点。这表明避雨栽培对梨树新梢总芽数的形成无明显影响,但能有效提高梨树的花芽形成率及开花率。

2.2.2 花芽萌发外观形态特征比较 由图7可知,在相同的栽培条件下,苏翠1号物候期较翠冠提前,苏翠1号花芽发育较翠冠花芽早,但2种梨花芽形态外观差异逐渐减小,且开花期一致。在不同栽培模式下,同一品种梨花芽的萌发过程存在差异,即避雨栽培较露地栽培的梨物候期提前;避雨栽培梨花芽花序分离期较早且花柄伸长较快;从3月23日到3月30日,避雨栽培的梨花柄明显较露地栽培的长且分离角度大,整

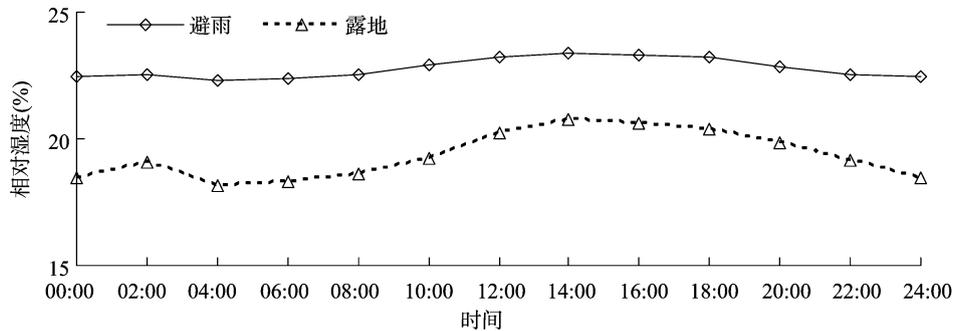


图6 避雨栽培对土壤平均湿度日变化的影响

表2 2种梨在不同栽培模式下开花率调查

品种	栽培模式	总芽数 (个)	花芽数 (个)	开花数 (朵)	成花率 (%)	开花率 (%)
苏翠1号	避雨	221	173	150	78.9	86.7
	露地	221	162	112	73.3	69.1
翠冠	避雨	144	79	72	54.9	91.1
	露地	141	67	58	47.5	86.6

个形态特征也较露地栽培大。随后避雨栽培梨较露地栽培提前进入开花期,比较梨花形态可知,避雨栽培梨与露地栽培梨落花期(4月13日)无明显差异,避雨栽培使梨开花周期延长。

2.3 成花基因表达情况比较

2.3.1 *PbLFY* 基因的表达分析 由图8可知,在梨花芽萌动到落花过程中,不同栽培模式下 *PbLFY* 基因在不同品种中的表达变化趋势相同。在花芽萌动期到开花前(3月6日到3月30日), *PbLFY* 基因在苏翠1号和翠冠中均呈现表达下调趋势,且 *PbLFY* 基因在苏翠1号中的表达量始终高于翠冠;在花柄伸长及花蕾分离期(3月27日到3月30日)该基因表达量始终维持在较低水平。在开花期(4月6日至4月13日), *PbLFY* 基因在2个品种中表达量均上调,苏翠1号的表达高峰出现在4月10日,翠冠的表达峰值出现在4月13日,2个梨品种在避雨栽培模式下 *PbLFY* 基因表达峰值分别是露地栽培的1.86倍和2.01倍,这表明 *PbLFY* 基因可能参与了花芽早期萌动的进程,不参与梨花器官成熟的调控,且对梨开花过程起正调控作用。

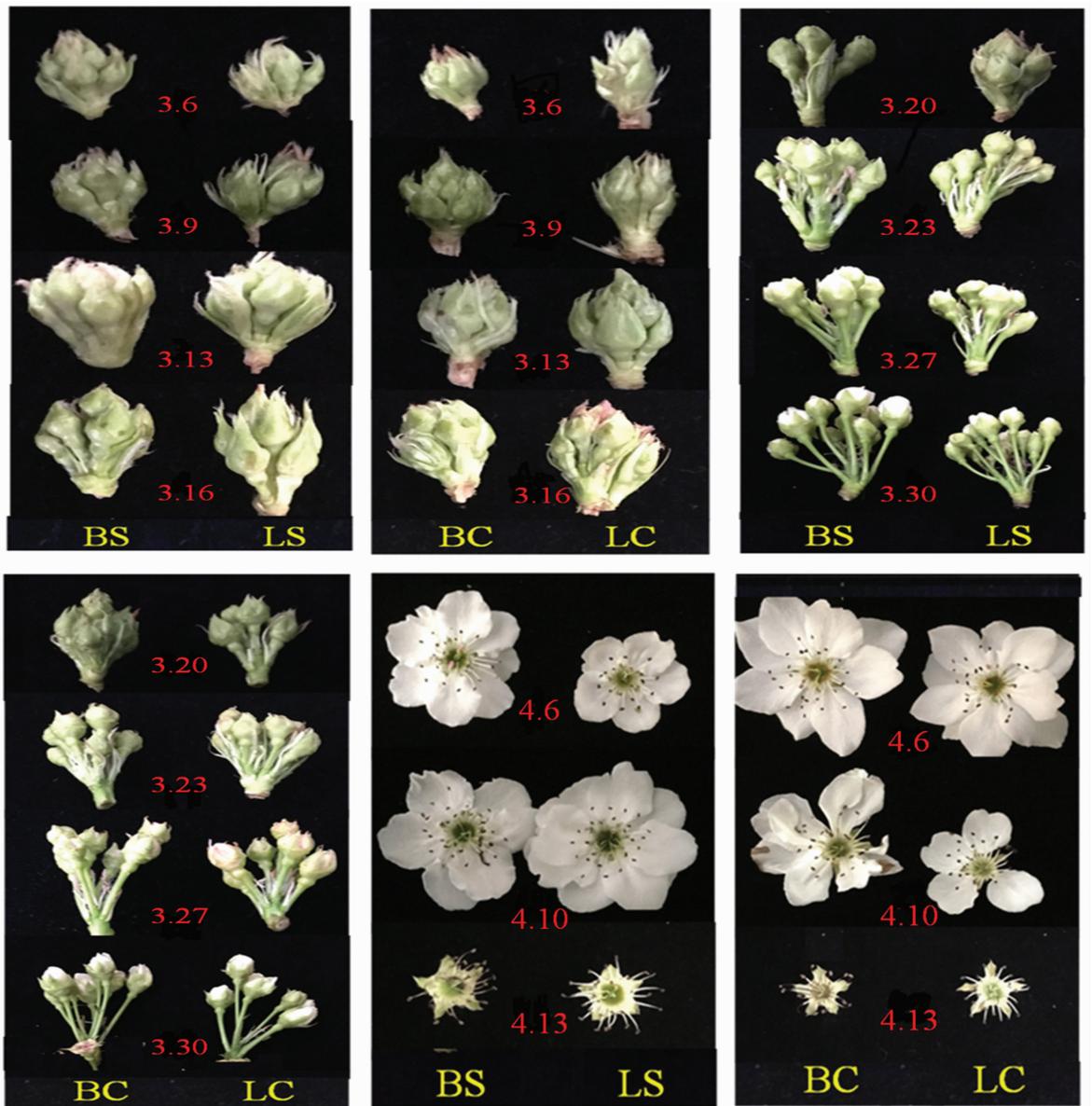
2.3.2 *PbFT* 基因的表达特点 由图9可知, *PbFT* 基因在梨花芽萌动到落花过程中,在不同栽培模式下的表达变化趋势相似,表达量均呈现“升高-降低-升高-降低”的过程,且整个花期物候期, *PbFT* 基因在避雨栽培条件下的表达量始终高于露地栽培。在花芽萌动初期, *PbFT* 基因的表达量维持在一个稳定的水平;在花序即将分离时, *PbFT* 基因的表达量出现第1个表达高峰,此时2个梨品种在避雨栽培模式下的 *PbFT* 基因表达量分别为露地栽培的1.39倍和1.92倍,苏翠1号出现在3月16日,翠冠出现在3月20日,随后其表达短暂下调,在花序分离后期(3月27日), *PbFT* 基因在苏翠1号和翠冠中的表达量同时达到峰值,且避雨栽培模式下的 *PbFT* 基因表达量分别是露地栽培的1.53倍和1.50倍,之后 *PbFT* 基因的表达呈现下调趋势,并维持在较低水平。这表明, *PbFT* 基因可能参与了花芽萌动初期调控,对花序分离及花柄伸长有正相关调控作用;该基因在苏翠1号中的调控启动早

于翠冠。

3 讨论

避雨栽培通过搭建聚乙烯篷布来改善梨树生长微环境,既可以为梨树生长提供一个相对稳定的环境,也可防御春季寒潮造成的经济损失,避免外界不利环境因子带来的影响。开花是一个复杂的形态建成过程,是外界环境和内部因子共同协同作用的结果^[24]。本研究发现,避雨条件可以改善果园微环境,日平均温度较露地条件高0.2℃左右,日空气平均湿度较露地条件高5.1%,日土壤平均湿度较露地条件高3.7%,这与李延菊等对大樱桃避雨栽培的研究结果^[5]相似,即避雨栽培模式能够提高空气温湿度及土壤湿度。而在梨树开花前,空气温湿度的提高有利于延长花粉寿命,促进花粉萌发、花粉管生长,进而提高果实的座果率^[25]。因此,梨树开花质量对提高果园经济效益起着至关重要的作用。比较2种模式下苏翠1号和翠冠梨的成花率和开花率后发现,避雨栽培能够有效提高它们的成花率(分别提高5.6个百分点和7.4个百分点)和开花率(分别提高为17.6个百分点和4.5个百分点)。这表明避雨栽培可通过改善果园微环境,从而提高梨树的成花率和开花率。

观察梨花芽萌动始的整个开花过程后发现,避雨栽培能够促进梨花期物候期提前^[1],延长开花周期^[2],这可能与避雨栽培可改善果园微环境有直接关系。梨园微环境的改变有效诱导了梨成花相关基因 *PbLFY* 和 *PbFT* 的表达。研究表明, *PbLFY* 和 *PbFT* 基因都表现促进成花的作用,只是促进成花的时期有所不同^[22]。本研究发现,梨相关成花基因 *PbLFY* 在梨开花前(3月30日前),在不同栽培条件下的梨花芽中的表达量均呈逐渐降低趋势;在梨花期(4月6日至4月13日), *PbLFY* 基因表达上调,其中在苏翠1号中表达量呈先上调后下调的趋势,在翠冠中表达量则呈现持续上调,且在此期间避雨条件下表达量均明显增加。这表明,避雨条件能明显提高梨相关成花基因 *PbLFY* 在开花期间的表达量,这可能是避雨条件能够延长梨开花周期的原因^[26]。梨相关成花基因



BS—避雨栽培下的苏翠 1 号；LS—露地栽培下的苏翠 1 号；BC—避雨栽培下的翠冠；LC—露地栽培下的翠冠
图 7 梨在不同栽培模式下的开花进程

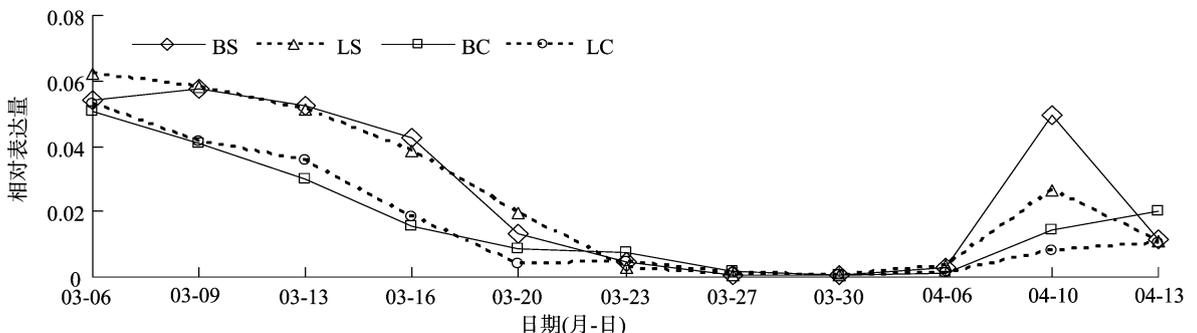


图 8 *PbLFY* 基因在苏翠 1 号和翠冠开花过程中的表达情况

PbFT 在整个花期的表达量会出现 2 个表达高峰,且避雨条件下的表达量均明显高于露地条件,这表明基因 *PbFT* 在梨开花过程中起着正调控作用^[27],也是导致避雨条件下花期物候期提前的原因;基因 *PbFT* 在苏翠 1 号和翠冠中的表达量分

别在 3 月 16 日和 3 月 20 日达到第 1 个小高峰,这与它们进入花蕾分离期的时间相吻合,表明基因 *PbFT* 对梨花芽花蕾分离起正调控作用,与花器官的成熟密切相关^[22]。

综上所述,避雨栽培能够提高梨园空气温湿度和土壤湿

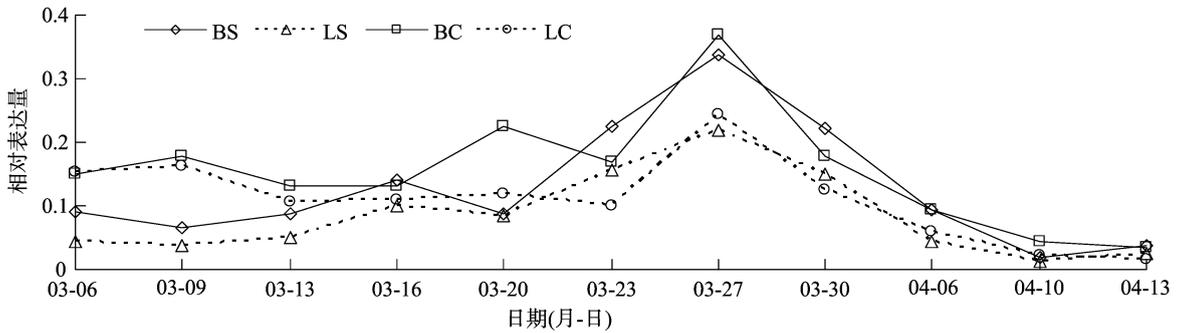


图9 *PbFT*基因在苏翠1号和翠冠开花过程中的表达情况

度,有效改善梨园微环境,促进梨相关成花基因 *PbLFY* 和 *PbFT* 的转录水平上调,促进整体物候期提前,延长开花周期,提高梨成花率、开花率及改善花生长状况。

参考文献:

- [1] 王涛,陈伟立,陈丹霞,等. 翠冠梨大棚栽培光温变化及生长发育规律研究[J]. 安徽农学通报,2007,13(10):78-80.
- [2] 王鑫,王纪忠,赵碧英,等. 梨树大棚栽培棚内外温湿度环境变化规律和物候期研究[J]. 中国农学通报,2012,28(1):201-206.
- [3] 王紫寒,张伟,关利平,等. 避雨栽培对洋香葡萄微环境和果实品质的影响[J]. 中外葡萄与葡萄酒,2015(3):14-17.
- [4] 魏晓峰,鞠延仑,王凯,等. 避雨栽培对“户太八号”葡萄生长及果实发育的影响[J]. 北方园艺,2016(11):9-14.
- [5] 李延菊,孙庆田,张序,等. 避雨栽培对大樱桃园生态因子及生理特性的影响[J]. 果树学报,2014,31(增刊1):90-97.
- [6] 许文天,武红霞,罗纯,等. 避雨栽培对芒果开花结果期生态因子及光合作用的影响[J]. 南方农业学报,2015,46(9):1636-1641.
- [7] Wielgolaski F E. Starting dates and basic temperatures in phenological observations of plants [J]. International Journal of Biometeorology, 1999,42:158-168.
- [8] Chmielewski F M, Müller A, Bruns E. Climate changes and trends in phenology of fruit trees and field crops in Germany, 1961—2000 [J]. Agricultural and Forest Meteorology, 2004, 121(1/2):69-78.
- [9] Lu P, Yu Q, Liu J, et al. Advance of tree-flowering dates in response to urban climate change [J]. Agricultural and Forest Meteorology, 2006, 138(1/2/3/4):120-131.
- [10] Beppu K, Okamoto S, Sugiyama A, et al. Effects of temperature on flower development and fruit set of ‘Satohnishiki’ sweet cherry [J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 1997, 65(4):707-712.
- [11] Struck M. Flowering phenology in the arid winter rainfall region of southern Africa [J]. Bothalia, 1994, 24(1):77-90.
- [12] Keatley M R, Fletcher T D, Hudson I L, et al. Phenological studies in Australia: potential application in historical and future climate analysis [J]. International Journal of Climatology, 2002, 22(14):1769-1780.
- [13] Dreyer L L, Esler K J, Ziztsman J, et al. Flowering phenology of South African Oxalis - possible indicator of climate change? [J]. South African Journal of Botany, 2006, 72:150-156.
- [14] Sparks T H, Carey P D. The responses of species to climate change over two centuries: an analysis of the Marsham phenological record, 1736—1947 [J]. Journal of Ecology, 1995, 83:321-329.
- [15] Penuelas J, Filella I, Zhang X, et al. Complex spatiotemporal phenological shifts as a response to rainfall changes [J]. New Phytologist, 2004, 161(3):837-846.
- [16] Miller-Rushing A J, Primack R B. Global warming and flowering times in Thoreau’s Concord: a community perspective [J]. Ecology, 2008, 89:332-341.
- [17] Wang Z J, Huang J Q, Huang Y J, et al. Cloning and characterization of a homologue of the *Floricaula/Leafy* gene in hickory (*Carya cathayensis* Sarg.) [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2012, 30(3):794-805.
- [18] Boss P K, Bastow R M, Mylne J S, et al. Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting [J]. The Plant Cell, 2004, 16(Suppl):18-31.
- [19] Yamagishi N, Sasaki S, Yamagata K, et al. Promotion of flowering and reduction of a generation time in apple seedlings by ectopical expression of the *Arabidopsis thaliana FT* gene using the *Apple latent spherical virus* vector [J]. Plant Molecular Biology, 2011, 75(1/2):193-204.
- [20] 安丽君,李天红. 桃成花基因 *PpLFY* 的克隆与表达及多克隆抗体制备 [J]. 园艺学报, 2008, 35(11):1573-1580.
- [21] 慕茜,刘更森,孙欣,等. 藤稔葡萄冬季休眠后期花芽发育相关基因表达的分析 [J]. 园艺学报, 2013, 40(5):828-838.
- [22] 王超,张全军,黄小三,等. 金坠梨成花相关基因 *PbLFY*、*PbTFL1* 和 *PbFT* 的克隆及时空表达模式分析 [J]. 南京农业大学学报, 2014, 37(2):26-32.
- [23] 许园园,蔺经,李晓刚,等. 梨 *CBL* 基因家族全基因组序列的鉴定及非生物胁迫下的表达分析 [J]. 中国农业科学, 2015, 48(4):735-747.
- [24] Blazquez M A. Flower development pathways [J]. Cell Science at a Glance, 2000, 113:3547-3548.
- [25] 陈江,张凯丽,张琦. 库尔勒香梨开花物候期对环境因子的响应 [J]. 江苏农业科学, 2016, 44(3):188-191.
- [26] Aheam K P, Johnson H A, Weigel D, et al. *NFL1*, a *Nicotiana tabacum* LEAFY-like gene, controls meristem initiation and floral structure [J]. Plant and Cell Physiology, 2001, 42:1130-1139.
- [27] Hsu C Y, Liu Y, Luthe D S, et al. Poplar *FT2* shortens the juvenile phase and promotes seasonal flowering [J]. The Plant Cell, 2006, 18(8):1846-1861.