

影响华柑4号椪柑果实大小的因子研究

刘承浪^{1,2}, 李港秋^{1#}, 李顺心¹, 魏冉冉¹, 路妍¹, 程超³,
唐政³, 刘保艳³, 叶俊丽¹, 柴利军¹, 邓秀新¹, 谢宗周^{1*}

(¹果蔬园艺作物种质创新与利用全国重点实验室·华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070;

²云南省农业科学院热带亚热带经济作物研究所, 云南保山 678000; ³长江勘测规划设计研究有限责任公司, 武汉 430010)

摘要:【目的】探究影响无核椪柑果实大小的关键因子, 为生产优质大果椪柑提供理论依据。【方法】以无核椪柑华柑4号(HG4, 后同)和有核椪柑华柑2号(HG2, 后同)为试材, 通过观察果实生长发育动态、测定植物内源激素含量及分析转录组数据等手段来明确HG4果实发育的影响因子。【结果】与HG2相比, HG4果实偏小且发育迟缓, 发育早期其内源激素IAA、GA₃、Zeatin含量偏低。通过对比HG2和HG4的两个发育时期的果实转录组数据, 鉴定出参与细胞发育等生物过程的173个差异表达基因。其中HG4生长素合成通路上YUC的同源基因(*CmYUC10*、*CmYUC11*)、赤霉素合成通路上GA20ox的同源基因(*CmGA20ox1*、*CmGA20ox5*)和细胞分裂素合成通路上的基因*CmIPT2*表达水平整体相较于HG2更低, 该表达趋势与内源激素含量测定的结果相符。此外, 统计分析表明HG4结果母枝粗度在1.56~3.49 mm, 与果实横径呈正相关; 位于树上部的果实中, 横径>70 mm的大果占比高达40%, 而生长在下部的果实中, 横径>70 mm的大果仅有4%。【结论】HG4果实发育早期激素代谢通路基因低表达影响其内源激素含量, 可能限制了果实细胞分裂和细胞扩张, 同时发现HG4结果母枝粗度和结果高度也是影响其果实大小的重要因素。

关键词: 柑橘, 无核椪柑; 内源激素; 果实发育; 基因表达分析

中图分类号: S666

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2025)04-0721-11

Study on factors affecting fruit development of seedless ponkan cultivar Huagan No. 4

LIU Chenglang^{1, 2}, LI Gangqiu^{1#}, LI Shunxin¹, WEI Ranran¹, LU Yan¹, CHENG Chao³, TANG Zheng³,
LIU Baoyan³, YE Junli¹, CHAI Lijun¹, DENG Xiuxin¹, XIE Zongzhou^{1*}

(¹National Key Laboratory for Germplasm Innovation & Utilization of Horticultural Crops/College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China; ²Institute of Tropical and Subtropical Cash Crops, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Baoshan 678000, Yunnan, China; ³Changjiang Survey, Planning Design and Research Co., Ltd, Wuhan 430010, Hubei, China)

Abstract: 【Objective】Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco.) is one of the main Mandarins cultivars in China. Huagan No. 4 is a new seedless cultivar selected from a bud sport of Jing'an ponkan, with improved fruit quality. However, the cultivar has the problems of low fruiting rate and slow fruit development, limiting its industrial deployment. Therefore, it is important to clarify the key factors affecting the fruit size of seedless ponkan for high-quality production. 【Methods】Huagan No. 4 (HG4) and Huagan No. 2 (HG2) were used as test materials. The paraffin section was used for observing the fruit development, sequencing transcriptome was performed to detect the difference of the gene expression between the two varieties. 【Results】The observation of the equatorial surface of young fruits from 5 to 45 (DAF) revealed that the number of cell layers in the white pericarp of HG4 was more than HG2 on 5 DAF, but consistently less than HG2 from 15 to 45 DAF. The morphology of HG4 and HG2 was also observed

收稿日期: 2024-12-04 接受日期: 2025-01-18

基金项目: 国家现代农业(柑橘)产业技术体系(CARS-26); 长江勘测规划设计研究有限责任公司自主创新项目(CX2021Z52)

作者简介: 刘承浪, 男, 研究实习生, 硕士, 主要从事柑橘种质资源收集与利用研究。E-mail: 448827890@qq.com。#为共同第一作者。

*通信作者 Author for correspondence. E-mail: xiezz@webmail.hzau.edu.cn

during the cell division stage, and the white pericarp cell density of both continued to decrease from 5 to 45 DAF. The cell density of HG4 was consistently larger than HG2 from 15 to 45 DAF, and the significant difference was found on 35 DAF. The fruit transverse longitudinal diameters were measured at 30 day intervals starting on 80 DAF and it were found to be consistently and significantly smaller in HG4 than HG2. The plant endogenous hormone IAA, GA₃ and Zeatin contents in young fruits of HG2 and HG4 showed an overall increase followed by a decrease from 15 days before flowering (DBF) to 45 DAF. The IAA contents of HG4 and HG2 were 117.08 ng·g⁻¹ and 290.21 ng·g⁻¹, respectively, on 45 DAF, the different was significant. The GA₃ content of HG2 peaked at 2.27 ng·g⁻¹ on 25 DAF, while the GA₃ content of HG4 was only 0.90 ng·g⁻¹, with significant differences. The GA₃ and Zeatin contents of HG2 were higher than those of HG4 on 25 and 45 DAF. The differentially expressed genes were screened using the *Citrus clementina* genome with the criteria of *p*-value < 0.05, log₂FoldChange > 1, and were functionally analyzed. Among the 173 differential genes identified, the transcription factors encoding the genes were screened. Three ERF transcription factors (*Ciclev10005820m*, *Ciclev10005863m*, *Ciclev10021265m*), two MADS (*Ciclev10016394m*, *Ciclev10032489m*), one GRF (*Ciclev10025855m*), and an ADAP (*Ciclev10025985m*) were screened by homologous sequence analysis with *Arabidopsis* transcription factors. These seven genes might be involved in the regulation of HG4 fruit development. Meanwhile, the homologous genes of *YUC* related to the auxin synthesis pathway of HG4 (*CmYUC10*, *CmYUC11*), genes of *GA20ox* related to the gibberellin (*CmGA20ox1*, *CmGA20ox5*), and genes of the cytokinin *CmIPT2* were found to have an overall low level of expression in comparison with HG2, which was in accordance with the results of the plant endogenous hormone content measurement. The *CmGA20ox5* was consistent with the relative expression levels of the *GA20ox1* on 25 and 45 DAF. The expressions were significantly lower in HG4 than HG2, suggesting that gibberellin would have a greater possible influence on HG4 fruit development. In addition, the statistical analysis revealed that the average thickness of bearing base shoots with a diameter corresponding to HG4 fruit transverse diameters <65 mm, 65–70 mm, and >70 mm were 2.15 mm, 2.59 mm, and 2.97 mm, respectively. It was found that the thickness was positively correlated with the size of the fruits. The proportion of large fruits with a transverse diameter >70 mm was as great as 40% for fruits sitting on the upper part of the tree, whereas only 4% for lower part. 【Conclusion】 The low expression of hormone metabolic pathway genes affected hormone contents in HG4 fruits during early development period, which might lead to the inherent causes of smaller fruits. The thickness of HG4 bearing base shoots with a diameter and fruiting site would also be a important factor affecting its fruit dimensions.

Key words: *Citrus*; Seedless ponkan; Endogenous hormones; Fruit development; Gene expression analysis

中国柑橘产业发展迅速,近年来保持世界第一大柑橘生产国和销售国的地位^[1]。椪柑(*Citrus reticulata* Blanco.)作为主要的宽皮柑橘品种,是消费者喜爱的鲜食品种之一。其中,华柑4号是靖安椪柑的无核芽变新品种^[2],与其母本靖安椪柑相比果实品质明显改善。然而华柑4号存在开花量大但坐果率低、果实发育缓慢等问题,在市场上因果实偏小而得不到消费者青睐,其大果比率低直接影响农业生产者的收益,导致果农生产积极性受挫,不利于新品种的推广与产业布局。因此,探明华柑4号果实发

育迟缓的成因,有助于尽早形成良种良法体系。

果实是被子植物的特征性器官,柑橘果实属于柑果,为芸香科植物特有。果皮由子房壁发育而来^[3],分为外果皮(油胞层)、中果皮(白皮层)、内果皮(果肉),其中内果皮膜质分为若干室,向内生出汁囊,是食用的主要部分^[4]。柑橘果实生长呈S型曲线,整个过程分为3个阶段^[5],分别为细胞分裂期、果实膨大期和果实成熟期。在细胞分裂期细胞大量分裂,为果皮生长奠定基础;果实膨大期主要是果肉发育,决定最终果实大小;在果实成熟期果实质量略微

增加,主要是内含物的改变。一般幼果细胞分裂期发生在开花后的一段时期,子房形成后细胞开始膨大,这个过程持续整个果实生长周期^[6]。果实作为柑橘最重要的部位,它的大小通过细胞分裂和细胞膨大共同调控。在黄瓜中,过表达 *CsARF10* 使果实细胞膨大和伸长受到抑制,导致果实畸形^[7]。袁静贤^[8]以幼果期西瓜为材料,发现9个 *ARF* 基因与果实膨大呈正相关,6个 *ARF* 基因与果实细胞分裂呈正相关。此外,研究发现 *MdARF106* 在苹果果实细胞分裂和膨大阶段高表达^[9]。

植物内源激素可以调节果实发育过程,以响应环境和内源信号。在黄瓜生长关键期,果实较长的黄瓜品种生长素含量快速达到峰值^[10],研究证实 *Cs-FUL1A* 能够通过抑制生长素转运来影响细胞分裂和细胞扩张过程,从而调节黄瓜果实长度^[11]。在番茄中,*SIPRE2* 与 *AtPRE1*,都是通过赤霉素调节反应来调控细胞伸长的蛋白,同时发现赤霉素途径的转录因子 *SIGRAS2* 参与了细胞扩张的调节^[12]。在猕猴桃果皮中,细胞分裂素生物合成基因 *IPT* 和 *CYP735A* 表达下调导致扩张蛋白下调,影响果实大小^[13]。前人通过转录组分析两种大小差异显著的葫芦,发现3个与细胞分裂素相关的基因(*CKX1*、*CKX2*、*CKX3*)表现出显著的差异^[14]。笔者在本研究中利用田间数据统计分析、激素含量测定及转录组分析等方法探究影响HG4果实大小的关键因子,为其果实发育的调控机制提供线索,为优质大果的栽培技术改良提供重要的理论支撑。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料为华中农业大学国家柑橘育种中心资源圃的无核椪柑华柑4号和有核椪柑华柑2号。2021年采集开花前15 d和7 d(days before flowering, DBF)的花苞,开花后5、25、45 d(days after flowering, DAF)的幼果,用液氮速冻后放于-80 °C超低温冰箱保存,用于提取植物内源激素。2021年采集5、15、25、35、45 DAF的幼果用FAA固定液固定,用于石蜡切片制备;采集80、110、140、170、200、230 DAF的果实测定果实大小。

1.2 果实大小测定及分级标准

使用数显游标卡尺(精确到0.01 mm)测量果实纵横径,纵径为果实纵向对称轴面的长度,横径为果

实赤道面的长度,果形指数为果实纵径与横径的比值,每个果实3次重复。分级标准按农业部发布的NY/T 589—2002标准执行,对HG4果实横径分为3个区间:<65 mm、65~70 mm、>70 mm。

1.3 石蜡切片制备

石蜡切片制作参考王蓉^[15]的方法并作适当修改,使用番红固绿染液对切片进行染色。切片置入番红染液中染色1~2 h,自来水洗去多余染料,在50%、70%、80%梯度乙醇中各3~8 s进行脱色,于固绿染液中染色30~60 s,无水乙醇三缸脱水,用干净的二甲苯透明5 min,加两滴中性树胶封片。

1.4 植物内源激素提取和测定

参考Pan等^[16]的方法提取植物内源激素,色谱条件:色谱柱为Agilent SB-C18(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm),流动相A泵溶液为0.04%乙酸水溶液,B泵溶液为乙腈,柱温40 °C,进样量10 μL。质谱条件:使用电喷雾离子源,样品质谱信号采集分别采用正、负离子(ESI+、ESI-)扫描模式,质谱参数见表1。

表1 不同植物内源激素质谱参数

Table 1 Mass spectrometry parameters of different plant endogenous hormones

激素种类 Types of hormones	保留时间 Retention time/min	母离子 Parent ions/(m/z)	子离子 Sub ions/(m/z)	离子模式 Ionic mode
IAA	8.6	174	128	负 Negative
GA ₃	7.7	345	239	负 Negative
Zeatin	5.5	220	136	正 Positive

1.5 转录组数据分析

采集25和45 DAF的HG4与HG2幼果,每个样品3次生物学重复,送往诺禾致源公司对样品进行RNA提取及转录组测序。

测序原始数据经过质控和过滤后,使用HISAT2将数据比对到克里曼丁橘(*Citrus clementina*)参考基因组(<http://citrus.hzau.edu.cn/>),使用StringTie软件对转录本进行组装并用TPM定量^[17]。使用R包DESeq2对样本之间的差异基因进行分析,采用 p -value < 0.05, \log_2 FoldChange > 1 为阈值筛选差异表达基因^[18],采用TBtools软件进行差异表达基因GO和KEGG富集分析^[19]。

1.6 数据分析

采用Microsoft Excel(Microsoft Office, 2010)软件对数据进行整理,差异显著性使用SPSS 25软件进行分析,图形绘制使用GraphPad Prism 8软件,原

始图片处理使用 Adobe Photoshop CC 2019 软件。

2 结果与分析

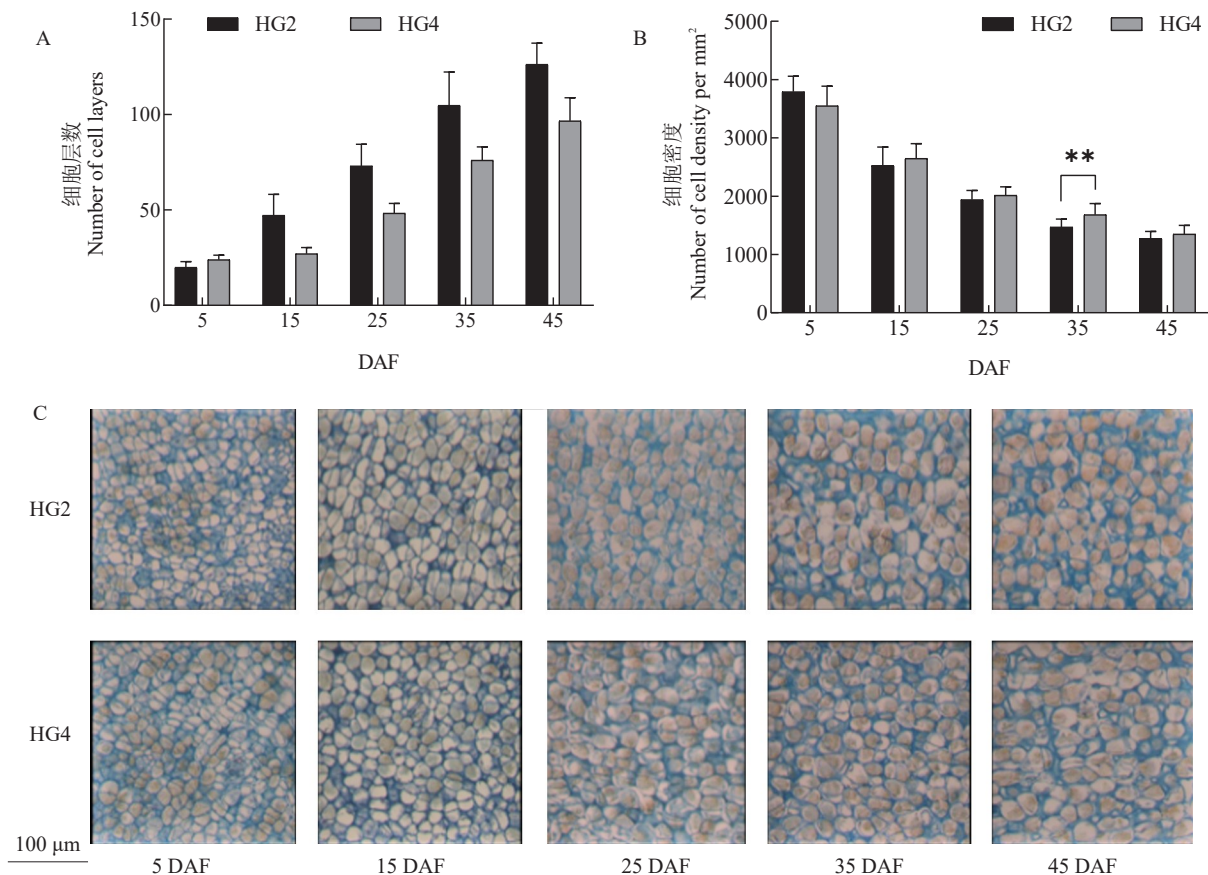
2.1 HG4与HG2果实生长发育动态

为初步了解HG4和HG2的果实发育动态(图1),在5~45 DAF 观察幼果赤道面发现5 DAF 时HG4白皮层的细胞层数大于HG2,但在15~45 DAF 时HG4白皮层的细胞层数始终小于HG2。同时观察HG4和HG2细胞分裂期的白皮层细胞形态,5~45 DAF 二者的白皮层细胞密度持续减小;15~45 DAF HG4白皮层细胞密度始终大于HG2;35 DAF 时,HG4白皮层细胞密度($1682 \text{个} \cdot \text{mm}^{-2}$)显著大于HG2($1468 \text{个} \cdot \text{mm}^{-2}$)(图1-B)。此外,如图2所示,从80 DAF 开始,每隔30 d 测量果实横纵径,发现HG4的果实横纵径始终显著小于HG2。80 DAF 测量

HG4的横纵径分别为26.41、24.97 mm,HG2横纵径分别为31.30、30.50 mm。230 DAF 果实成熟时HG4的横纵径分别为55.35、45.41 mm,HG2的横纵径分别为67.79、55.74 mm。HG4和HG2的果形指数分别从0.945、0.975变为0.822、0.823。

2.2 HG4与HG2植物内源激素含量分析

为探究植物内源激素含量对HG4果实发育的影响,测定HG4和HG2在15 DBF至45 DAF 的幼果植物内源激素含量(图3)。结果显示,HG2与HG4在15 DBF至45 DAF 的幼果内源激素IAA、 GA_3 和Zeratin 含量整体呈先上升后下降趋势。其中,在45 DAF 时HG2生长素含量(w)为 $290.21 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 显著高于HG4的 $117.08 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 。在25 DAF 时HG2的 GA_3 含量达到峰值($2.27 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$),而HG4的 GA_3 含量仅为 $0.90 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$,两者差异显著。在25 DAF 和45 DAF,

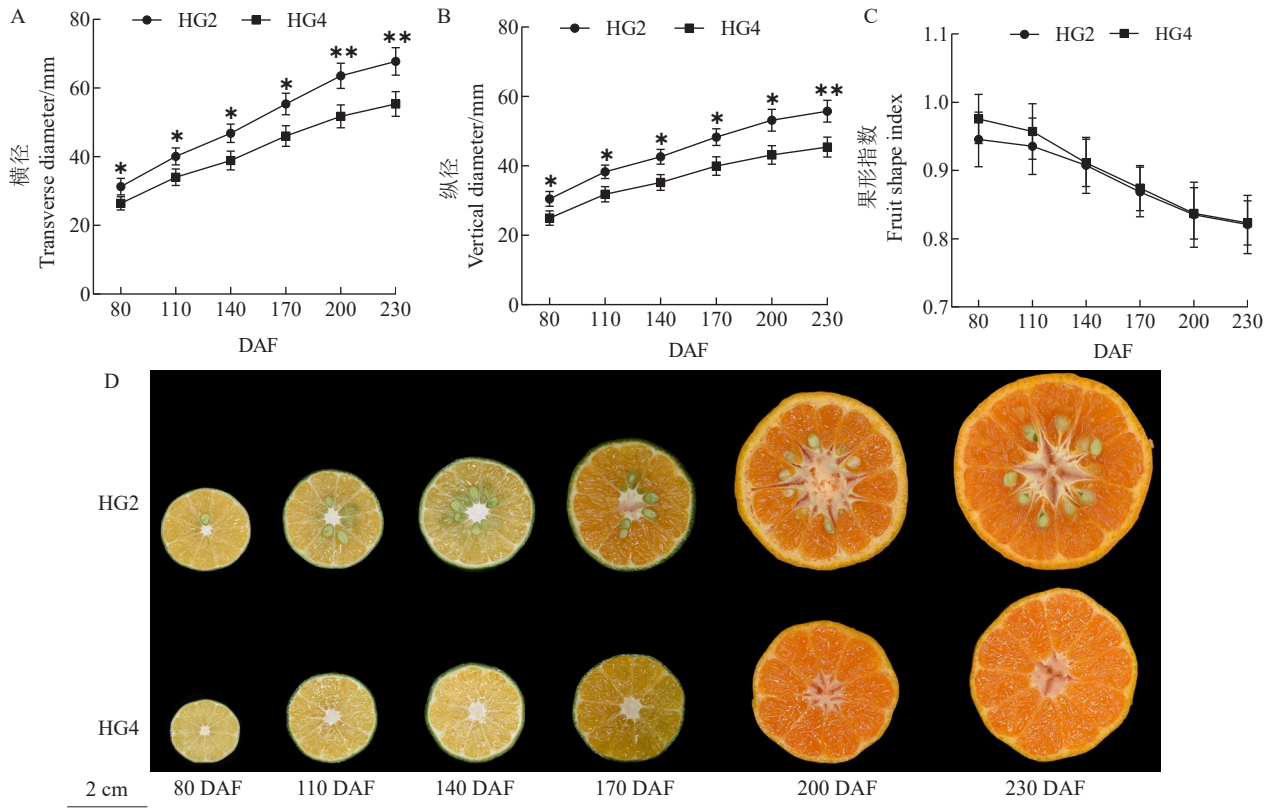


A. 细胞层数,数值为平均值±标准差($n=9$);B. 细胞密度,数值为平均值±标准差($n=65$);C. 白皮层细胞形态。通过 t 检验分析,*表示 $p<0.05$ 水平的显著差异,**表示 $p<0.01$ 水平的显著差异。下同。

A. Number of cell layers, values shown are the mean \pm SD ($n=9$); B. Number of cell density, values shown are the mean \pm SD ($n=65$); C. Cell morphology of the white pericarp. Asterisks indicate significant differences relative to the control by t-test (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$). The same below.

图1 HG4和HG2白皮层细胞学观察

Fig. 1 Cytological observation in the white pericarp of HG4 and HG2

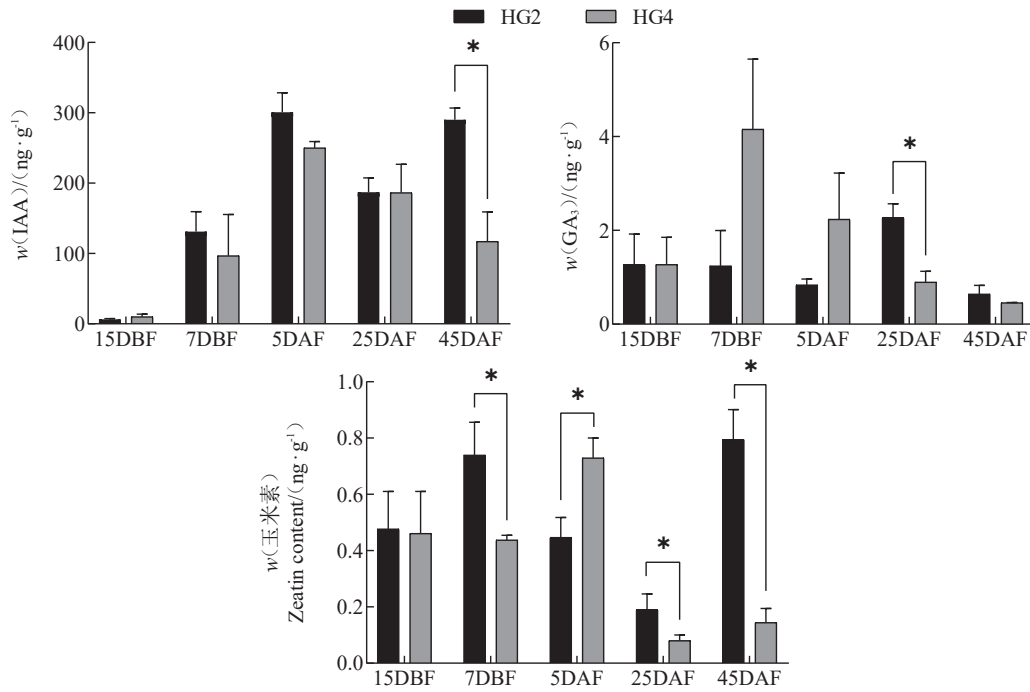


A. 横径;B. 纵径;C. 果形指数;D. 果实发育。数值为平均值±标准差(n=30)。

A. Transverse diameter; B. Vertical diameter; C. Fruit shape index; D. Fruit development. Values shown are the mean ± SD (n = 30).

图2 HG4和HG2果实发育动态

Fig. 2 Dynamics of HG4 and HG2 fruit development



数值为平均值±标准差(n=3)。

Values shown are the mean ± SD (n = 3).

图3 HG4和HG2不同时期的植物激素含量

Fig. 3 Phytohormone content at different stages of HG4 and HG2

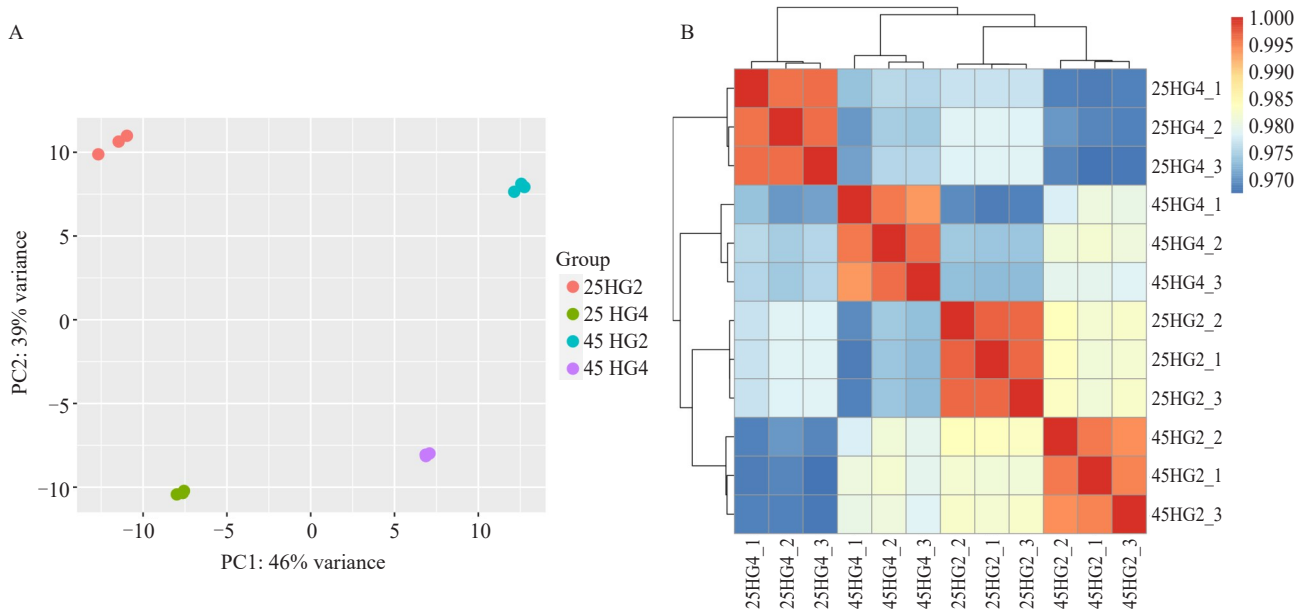
HG2的GA₃和Zeatin激素含量均高于HG4。

2.3 转录组分析鉴定HG4与HG2细胞分裂期差异表达基因

通过测定HG4和HG2幼果植物内源激素含量发现,HG4的幼果内源激素含量在25 DAF和45 DAF均低于HG2。因此,为进一步探究HG4果实大小发育的影响因子,对25 DAF和45 DAF两个时期的HG4和

HG2幼果进行转录组测序,并对其进行功能分析。

2.3.1 差异表达基因鉴定 对25 DAF和45 DAF的HG4和HG2幼果的转录组数据进行主成分分析和样品相关性分析,结果表明样品的重复性较好(图4)。HG4和HG2在25 DAF的转录组比较共鉴定到829个差异表达基因,其中434个上调表达,395个下调表达;45 DAF的转录组比较共鉴定到480个差异表达



25HG2、25HG4、45HG2、45HG4 代表花后 25 d 和 45 d 的 HG2 和 HG4 进行转录组测序的果实样品, $n=3$ 。下同。

25HG2, 25HG4, 45HG2 and 45HG4 represent the fruit samples of HG2 and HG4 with transcriptome sequencing on 25 and 45 days after flowering, $n=3$. The same below.

图4 HG4和HG2样品重复性(A)与相关性分析(B)

Fig. 4 Analysis of sample repeatability (A) and correlation (B) in HG4 and HG2

基因,其中318个上调表达,162个下调表达(表2)。两组材料25 DAF和45 DAF转录组均差异表达的基因共173个(图5-A)。为了鉴定参与果实大小发育的调控因子,在该173个差异基因中,预测了其中具有编码转录因子能力的差异基因。通过对比拟南芥(*Arabidopsis*)同源基因,鉴定到了3个ERF转录因子(*Ciclev10005820m*、*Ciclev10005863m*、*Ciclev10021265m*), 2个MADS转录因子(*Ciclev10016394m*、*Ciclev10032489m*), 1个GRF

转录因子 *Ciclev10025855m* 和 1个ADAP转录因子 *Ciclev10025985m*(图5-B)。这7个候选转录因子可能参与HG4果实大小的调控。

2.3.2 差异表达基因GO注释和KEGG通路富集分析 为了进一步了解HG4和HG2幼果不同发育时期差异基因的生物功能,对25 DAF和45 DAF幼果转录组均差异表达的173个差异表达基因进行GO注释分析,鉴定到的差异表达基因主要参与细胞葡聚糖代谢、细胞发育、碳水化合物代谢、生殖系统发育等多种

表2 HG4和HG2不同发育时期差异表达基因数

Table 2 Number of DEGs in HG4 and HG2 at different developmental stages

花后时间 Time after anthesis/d	差异表达基因数 Number of DEGs	上调表达基因数 Number of up-regulated genes	下调表达基因数 Number of down-regulated genes
25	829	434	395
45	480	318	162

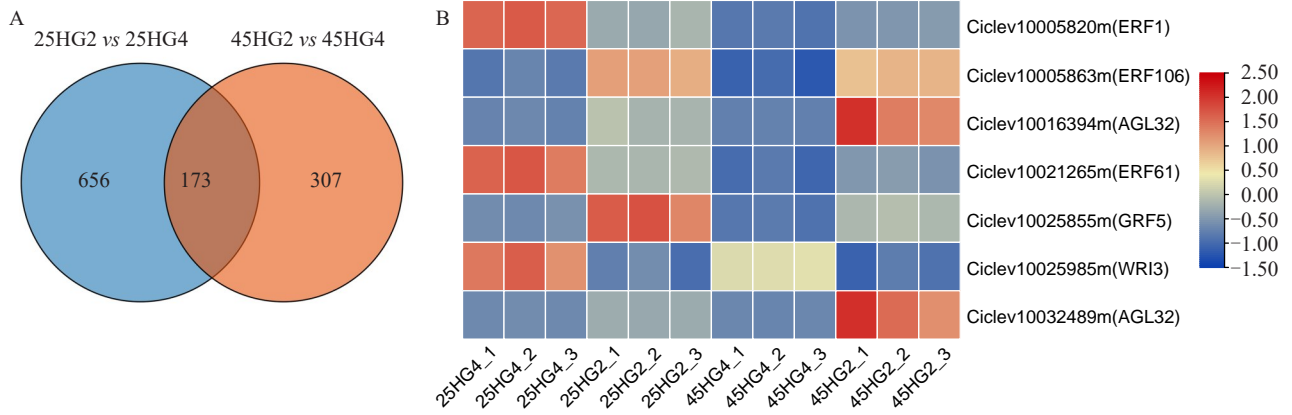


图5 HG4 和 HG2 不同发育时期差异表达基因筛选 (A) 及鉴定 (B)

Fig. 5 Screen (A) and identification (B) of DEGs in HG4 and HG2 at different developmental stages

生物学过程,这些差异表达基因主要集中在细胞壁、细胞外周、外部封装结构等部位上发挥作用,分子功能主要包括单加氧酶活性、氧化还原酶活性等(图6-A)。进一步将25 DAF和45 DAF差异表达的173个基因进行KEGG通路富集分析,结果表明差异表达基因富集到植物激素信号转导、细胞色素P450、类

脂代谢、苯丙素生物合成、氨基酸代谢等多个代谢路径上(图6-B)。

2.3.3 HG4 与 HG2 内源激素代谢通路相关基因表达分析 通过转录组数据分析植物内源激素合成通路上5个基因的差异表达来探究植物内源激素对果实膨大的影响,如图7所示,包括生长素合成通路上

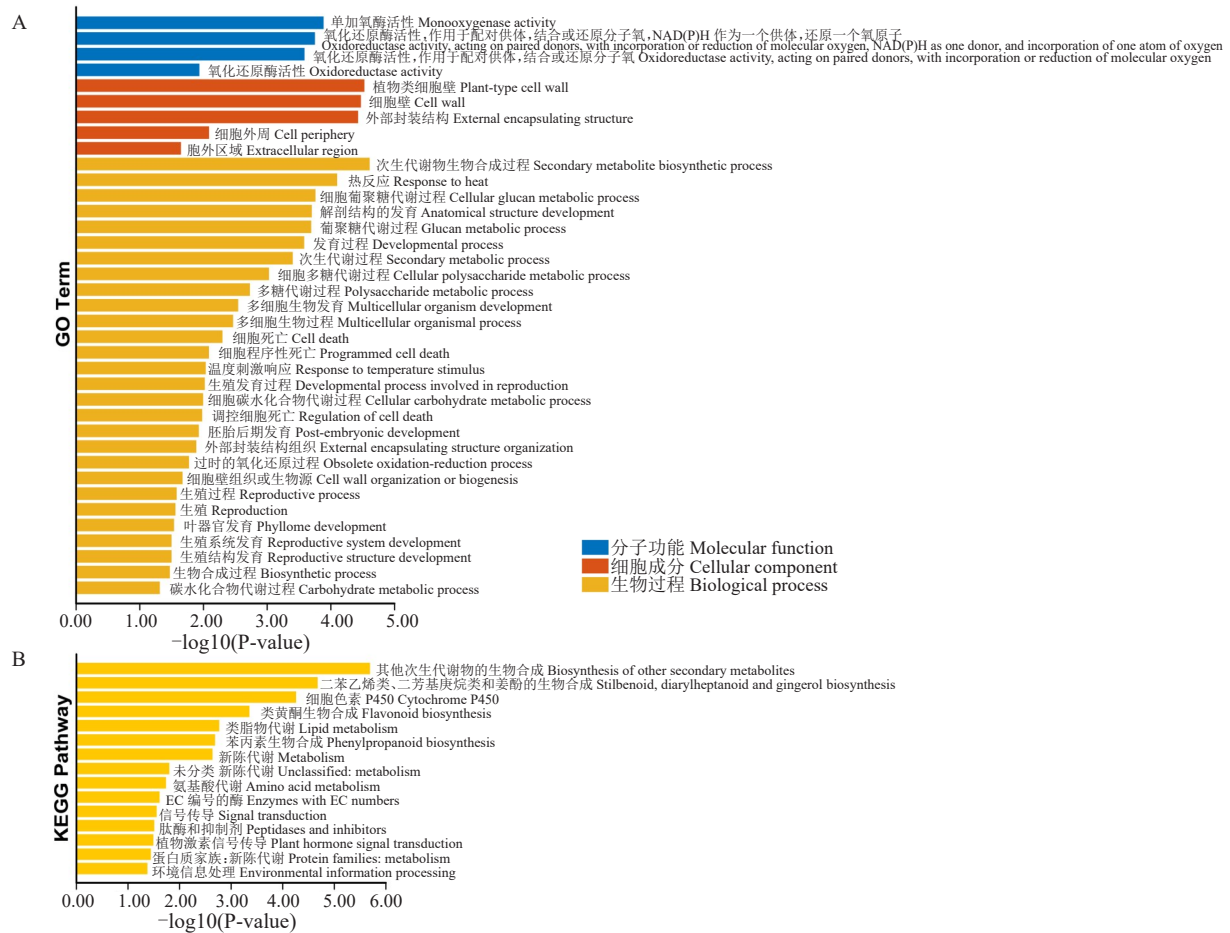


图6 HG4 和 HG2 不同发育时期差异表达基因 GO (A)、KEGG (B) 分析

Fig. 6 GO (A) and KEGG (B) analysis of DEGs in HG4 and HG2 at different stages of development

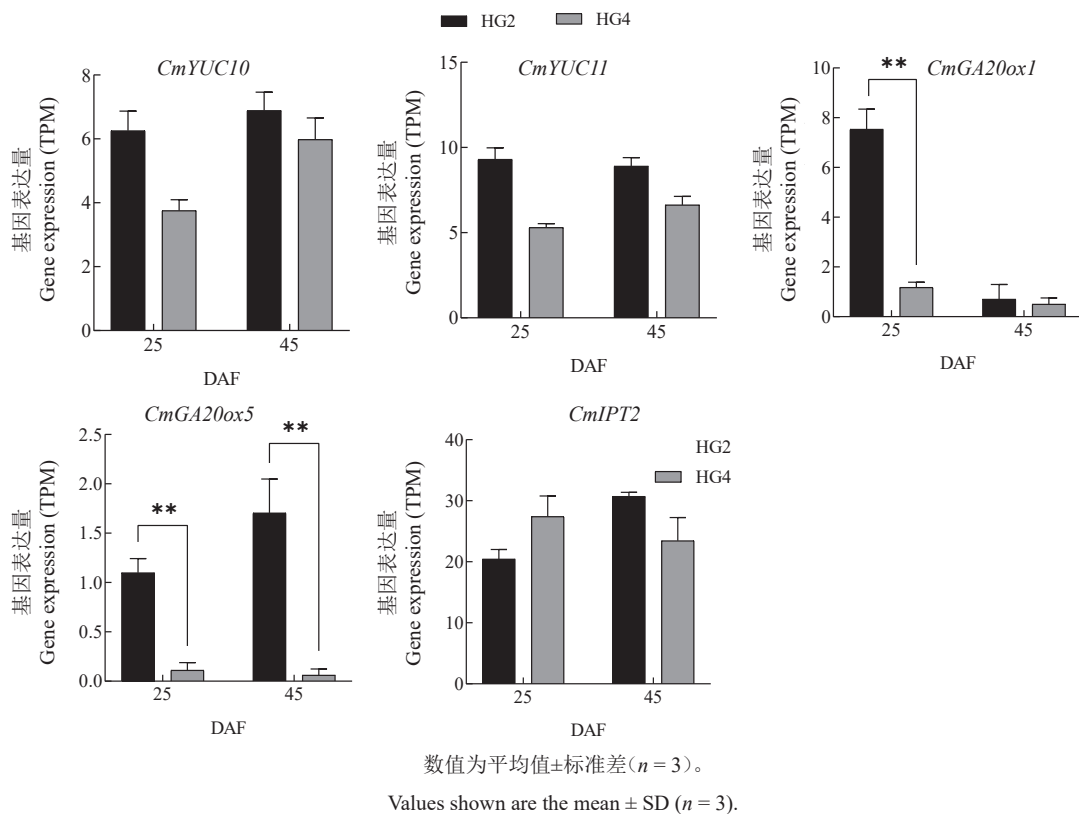


图 7 HG4 和 HG2 内源激素代谢通路相关基因差异表达

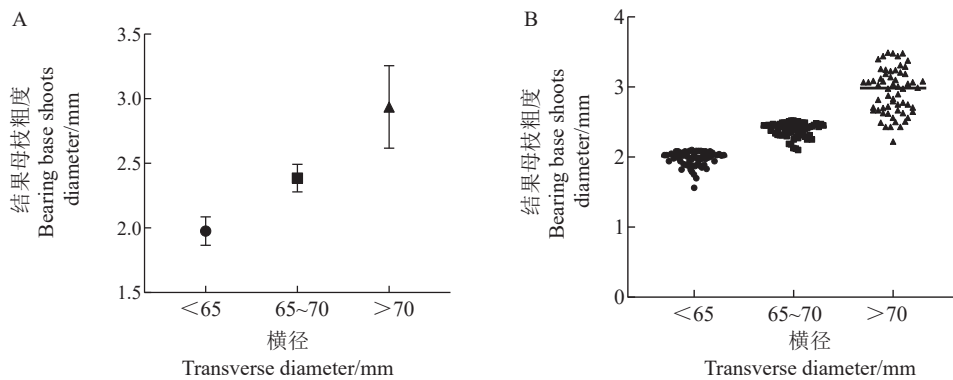
Fig. 7 Expression of genes related to endogenous hormone metabolic pathways of HG4 and HG2

YUC 的同源基因(*CmYUC10*、*CmYUC11*), 赤霉素合成通路上 *GA20ox* 的同源基因(*CmGA20ox1*、*CmGA20ox5*), 细胞分裂素合成通路上的基因(*CmIPT2*)。发现 HG4 生长素、赤霉素和细胞分裂素合成通路上的基因表达水平整体相较于 HG2 偏低, 这与细胞分裂期植物内源激素含量测定的结果相符。在 25 DAF 和 45 DAF 时, HG4 和 HG2 的 *CmGA20ox5* 的表达模式与 *GA20ox1* 的相对表达水

平一致, 并且 HG4 赤霉素合成通路上的基因表达水平显著低于 HG2, 这表明赤霉素含量对 HG4 果实膨大的影响可能更大。

2.4 HG4 结果母枝粗度与果实横径的关系

果实成熟期测量果实横径及对应的结果母枝粗度(图 8), 果实横径 <65 mm、65~70 mm、>70 mm 对应的结果母枝平均粗度分别为 1.98、2.39、2.94 mm; 果实横径 <65 mm 的结果母枝粗度最小值



A. 结果母枝粗度, 所示数值为平均值±标准差(n=60)。

A. Bearing base shoots diameter, values shown are the mean ± SD (n = 60).

图 8 HG4 结果母枝粗度对应的果实横径

Fig. 8 Bearing base shoots diameter corresponds to transverse diameter of HG4

为 1.56 mm,最大值为 2.1 mm,果实横径为 65~70 mm 的结果母枝粗度最小值为 2.1 mm,最大值为 2.52 mm,果实横径 >70 mm 的结果母枝粗度最小值为 2.22 mm,最大值为 3.49 mm。由此得出结论,结果母枝粗度与果实横径呈正相关。

2.5 HG4 结果高度与果实横径的关系

果实成熟期测量不同高度坐果部位的果实横径,同样将横径分为 3 个区间 <65 mm、65~70 mm、>

70 mm。如图 9 所示,上部果实横径占比分别为 20%、40%、40%,中部果实分别为 48%、42%、10%,下部果实分别为 58%、38%、4%;上、中、下部果实的平均横径分别为 69.15、64.53、64.35 mm,上部基本不存在横径 <60 mm 的果实。生长在上部的果实中,横径 >70 mm 的大果占比高达 40%,小果比例只有 20%,而生长在下部的果实中,横径 >70 mm 的大果仅有 4%,小果占比高达 58%。

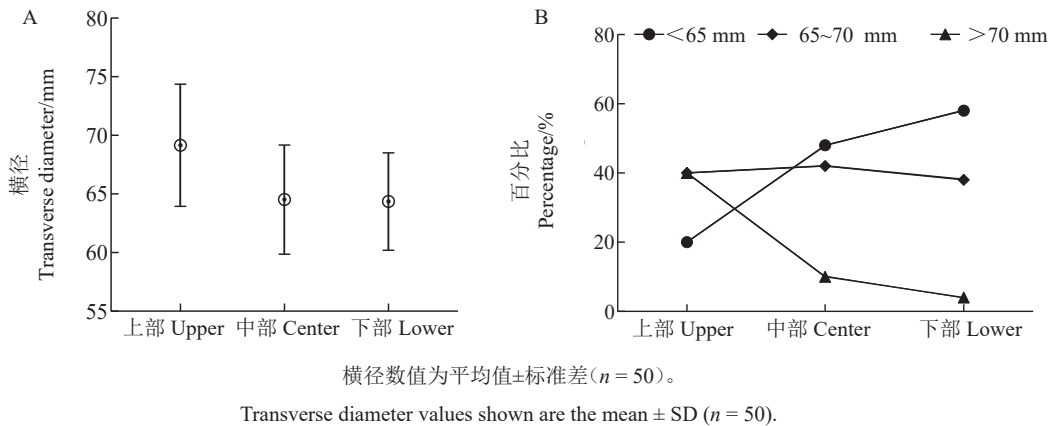


图 9 HG4 不同高度坐果位置对应的果实横径 (A) 及分级占比 (B)

Fig. 9 Corresponding transverse diameter (A) and classification percentage (B) for different height of HG4 fruit set

3 讨论

柑橘以果实为主要的收获器官,果实大小关联产量形成,是重要农艺性状之一^[20]。果实膨大由细胞数量的增加和细胞形态的增大决定,这两者体现的是细胞分裂和细胞膨大能力^[21]。在枇杷中,通过 *EjBZRI* 基因间接影响细胞膨大从而调控果实大小^[22]。黄瓜中 *CsHEC1* 可能通过介导细胞数量来促进黄瓜瓜把伸长^[23]。前人以西瓜 97103 为研究对象,发现果实发育中期以细胞膨大为主,细胞面积与数目快速增长,单果质量生长速率在 13 DAF 最高^[8]。笔者在本研究中发现 15~45 DAF 幼果期 HG4 和 HG2 的白皮层细胞层数持续增加且 HG4 白皮层的细胞层数始终小于 HG2; 15~45 DAF 幼果期 HG4 和 HG2 的白皮层细胞密度持续减小且 HG4 白皮层细胞密度始终大于 HG2。此后,80 DAF 时 HG4 的横纵径分别比 HG2 小 15.62% 和 18.13%, 230 DAF 果实成熟时 HG4 的横纵径分别比 HG2 小 18.35% 和 18.53%, 二者的大小差异更为明显。因此, HG4 细胞膨大能力较弱,可能是导致 HG4 果实偏小的直接原因。

果实大小是由多基因控制的数量性状,如

fw2.2、*fw3.2*、*FAS* 和 *WUS* 等^[24], 其中 *fw2.2* 是番茄上第一个被克隆与果实大小相关的基因,其贡献率达 30%,通过控制心皮细胞的数量来调节植物器官中的细胞数量,从而影响番茄果实大小。笔者在本研究中通过对 25 DAF 和 45 DAF 的 HG4 和 HG2 幼果转录组进行分析,在两个材料两个时期均差异表达的基因共 173 个。转录调控是生物生长发育最核心的调控方式之一,转录因子通过结合目标基因启动子调控基因的转录,最终影响生物的性状^[25-26]。在差异基因中鉴定到了 7 个候选转录因子可能参与 HG4 果实大小的调控,为今后的机制研究和栽培措施改进提供了方向。同时,为了进一步了解 HG4 和 HG2 幼果不同发育时期的差异基因的生物學功能,173 个差异表达基因富集到植物激素信号转导、细胞色素 P450、类脂物代谢、苯丙素生物合成、氨基酸代谢等多个代谢路径上。植物内源激素作为一种重要的调节物质,在植物开花、结实、子房发育、成熟、衰老、脱落等生理过程中发挥着重要作用^[27]。本研究结果表明 HG4 与 HG2 的幼果内源激素 IAA、GA₃ 和 Ze-atin 含量整体呈先上升后下降趋势,花后 25 d 和 45 d HG2 幼果内源激素始终高于 HG4。同时,通过转录

组分析发现 HG4 内源激素合成通路上的 *CmYUC10*、*CmYUC11*、*CmGA20ox1*、*CmGA20ox5*、*CmIPT2* 基因表达水平整体相较于 HG2 更低,这与前期测定内源激素含量的结果一致。其中, HG4 赤霉素合成通路上的 *GA20ox* 的同源基因 *CmGA20ox1* 和 *CmGA20ox5* 基因表达水平极显著低于 HG2。因此, 细胞分裂期低含量的赤霉素可能是影响 HG4 幼果发育的主要因素。前人研究发现, 在低温条件下 *CmGA20ox1* 和 *CmLFY* 可能参与低温诱导菊花的开花提前^[28], 然而在拟南芥^[29]和南瓜^[30]中过量表达 *CmGA20ox1*, 则导致开花晚、叶片偏小、植株矮化。

结果母枝粗度对果实大小和品质影响较大。将猕猴桃结果母枝粗度范围划分为 5 个等级, 粗度在 10~12 mm 时果实纵横径和单果质量最大, 粗度在 8~10 mm 时果实内在品质最佳^[31]。苏受婷等^[32]将南丰蜜橘的结果母枝划分为 4 个等级, 粗度在 2.5~3.0 mm 的果实品质最差, 等权情况下粗度 2.5 mm 以下的果实品质最佳, 因纵横径和单果质量的权重高, 加权情况下粗度 3.5 mm 以上的果实最优。HG4 结果母枝粗度在 1.56~3.49 mm, 粗度 \leq 2.00 mm 的果实偏小, 粗度在 2.00~3.00 mm 的果实适中, 粗度 \geq 3.00 mm 的果实偏大, 结果母枝粗度与果实横径成正比例关系, 这与前人结果一致^[32]。同时, 笔者在本研究中通过田间调查统计分析发现, 位于 HG4 树下部的果实偏小, 其中横径 $<$ 65 mm 果实占 58%, 横径 $>$ 70 mm 的大果仅有 4%; 而位于树上部的果实整体偏大, 横径 $>$ 65 mm 的果实占比为 80%, 其中横径 $>$ 70 mm 的大果为 40%。因此, 树上部果实横径偏大(69.15 mm), 下部果实横径偏小(64.35 mm)。这可能与不同冠层的温度、光合产物供给差异有关。

4 结 论

通过田间数据统计分析、激素含量测定及转录组分析等手段发现 HG4 果实发育早期激素代谢通路基因低表达影响其内源激素含量变化, 可能是果实较小的内在原因, 同时发现 HG4 结果母枝粗度和结果高度也是影响其果实大小的重要因素。笔者在本研究中分析了生长素、赤霉素和细胞分裂素的含量及其合成通路相关基因的差异表达对 HG4 果实发育的影响, 但激素之间存在着复杂的相互串扰作用, 信号通路复杂, 未来可结合转录组和代谢组等多组学的手段进一步探究柑橘果实发育机制。

参考文献 References:

- [1] 邓秀新. 柑橘产业发展趋势与桂林柑橘品种结构调整[J]. 南方园艺, 2020, 31(6): 1-4.
DENG Xiuxin. The development trend of citrus industry and the adjustment of citrus variety structure in Guilin[J]. Southern Horticulture, 2020, 31(6): 1-4.
- [2] 吴巨勋, 张雅菁, 伊华林, 谢宗周, 邓秀新. 无核柑橘新品种华柑 4 号的选育[J]. 果树学报, 2022, 39(3): 495-498.
WU Juxun, ZHANG Yajing, YI Hualin, XIE Zongzhou, DENG Xiuxin. Breeding report of a new seedless ponkan cultivar Huang No. 4[J]. Journal of Fruit Science, 2022, 39(3): 495-498.
- [3] STANDER O P J. Fruit split and fruit size studies on citrus[D]. Stellenbosch: Stellenbosch University, 2013.
- [4] SADKA A, SHLIZERMAN L, KAMARA I, BLUMWALD E. Primary metabolism in citrus fruit as affected by its unique structure[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 1167.
- [5] 丁常笑. Zn(NO₃)₂ 与 NAA 影响‘红江橙’果皮解剖结构及陷痕果发生的研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
DING Changxiao. Effect of Zn(NO₃)₂ and NAA on peel anatomical structure and mechanism of creasing in ‘Hongjiangcheng’ orange[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016.
- [6] MU Q, HUANG Z J, CHAKRABARTI M, ILLA-BERENGUER E, LIU X X, WANG Y P, RAMOS A, VAN DER KNAAP E. Fruit weight is controlled by cell size regulator encoding a novel protein that is expressed in maturing tomato fruits[J]. PLoS Genetics, 2017, 13(8): e1006930.
- [7] 郭勤卫. 黄瓜果实发育相关的基因克隆与表达及蛋白组学分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2013.
GUO Qinwei. Cloning and expression of genes and proteomic analysis in cucumber fruit development[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2013.
- [8] 袁静贤. 生长素相关转录因子家族基因在西瓜果实膨大过程中的调控作用分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
YUAN Jingxian. Regulation analysis of auxin-related transcription factor family genes on watermelon fruit expansion[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015.
- [9] DEVOGHALAERE F, DOUCEN T, GUITTON B, KEELING J, PAYNE W, LING T J, ROSS J J, HALLETT I C, GUNASEELAN K, DAYATILAKE G A, DIAK R, BREEN K C, TUSTIN D S, COSTES E, CHAGNÉ D, SCHAFFER R J, DAVID K M. A genomics approach to understanding the role of auxin in apple (*Malus × domestica*) fruit size control[J]. BMC Plant Biology, 2012, 12(1): 7.
- [10] LIU X X, PAN Y P, LIU C, DING Y Y, WANG X, CHENG Z H, MENG H W. Cucumber fruit size and shape variations explored from the aspects of morphology, histology, and endogenous hormones[J]. Plants, 2020, 9(6): 772.
- [11] ZHAO J Y, JIANG L, CHE G, PAN Y P, LI Y Q, HOU Y, ZHAO W S, ZHONG Y T, DING L, YAN S S, SUN C Z, LIU R Y, YAN L Y, WU T, LI X X, WENG Y Q, ZHANG X L. A functional allele of *CsFUL1* regulates fruit length through repressing *CsSUP* and inhibiting auxin transport in cucumber[J]. The Plant Cell, 2019, 31(6): 1289-1307.

- [12] 姬雅静,李金焱,张沛宇,马力群,朱鸿亮.番茄果实形状的调控机制研究进展[J].园艺学报,2023,50(9):2015-2030.
JI Yajing, LI Jinyan, ZHANG Peiyu, MA Liqun, ZHU Hongliang. Research progress on the regulatory mechanism of shape formation in tomato fruit[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2023, 50(9): 2015-2030.
- [13] NARDOZZA S, COONEY J, BOLDINGH H L, HEWITT K G, TROWER T, JONES D, THRIMAWITHANA A H, ALLAN A C, RICHARDSON A C. Phytohormone and transcriptomic analysis reveals endogenous cytokinins affect kiwifruit growth under restricted carbon supply[J]. Metabolites, 2020, 10(1):23.
- [14] ZHANG H Y, TAN J, ZHANG M, HUANG S P, CHEN X. Comparative transcriptomic analysis of two bottle gourd accessions differing in fruit size[J]. Genes, 2020, 11(4):359.
- [15] 王蓉.柑橘胞质杂种‘华柚2号’雄性不育的生理特征及 *Cs-miR399a.1* 调控雄性不育的作用机理[D].武汉:华中农业大学,2021.
WANG Rong. Physiological characterization of male sterility in somatic cybrid G1 + HBP and regulatory mechanism of *Cs-miR399a.1* in citrus male sterility[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2021.
- [16] PAN X Q, WELTI R, WANG X M. Quantitative analysis of major plant hormones in crude plant extracts by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Nature Protocols, 2010, 5(6):986-992.
- [17] PERTEA M, KIM D, PERTEA G M, LEEK J T, SALZBERG S L. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown[J]. Nature Protocols, 2016, 11(9):1650-1667.
- [18] LOVE M I, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. Genome Biology, 2014, 15(12):550.
- [19] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, THOMAS H R, FRANK M H, HE Y H, XIA R. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant, 2020, 13(8):1194-1202.
- [20] 彭澳林,郑蓉,舒波,罗纯.园艺植物果实大小调控机制研究进展[J/OL].分子植物育种,2025:1-20.(2025-01-07).<https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20250107.1530.006>.
PENG Aolin, ZHENG Rong, SHU Bo, LUO Chun. Research progress on molecular regulation of fruit size in horticultural plants[J/OL]. China Industrial Economics, 2025: 1-20. (2025-01-07). <https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20250107.1530.006>.
- [21] GAN L J, SONG M Y, WANG X C, YANG N, LI H, LIU X X, LI Y. Cytokinins is involved in regulation of tomato pericarp thickness and fruit size[J]. Horticulture Research, 2022, 9: uhab041.
- [22] SU W B, SHAO Z K, WANG M, GAN X Q, YANG X H, LIN S Q. *EjBZR1* represses fruit enlargement by binding to the *EjCYP90* promoter in loquat[J]. Horticulture Research, 2021, 8(1):152.
- [23] WANG Z Y, ZHOU Z Y, WANG L M, YAN S S, CHENG Z H, LIU X F, HAN L J, CHEN G X, WANG S Y, SONG W Y, CHEN J C, LIU L, SONG X F, YAN L Y, ZHAO J Y, ZHANG X L. The *CsHECI-CsOVATE* module contributes to fruit neck length variation via modulating auxin biosynthesis in cucumber[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2022, 119(39):e2209717119.
- [24] FRARY A, NESBITT T C, GRANDILLO S, KNAAP E, CONG B, LIU J, MELLER J, ELBER R, ALPERT K B, TANKSLEY S D. *fw2.2*: A quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size[J]. Science, 2000, 289(5476):85-88.
- [25] 唐征,陈思雀,徐谦,钟伟杰,刘庆,朱世杨. AP2/ERF 在青花菜苗期响应黑腐病的功能研究[J].园艺学报,2024,51(11):2523-2539.
TANG Zheng, CHEN Sique, XU Qian, ZHONG Weijie, LIU Qing, ZHU Shiyang. Functional study of AP2/ERF in response to black rot at broccoli seedling stage[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2024, 51(11):2523-2539.
- [26] 刘逸婷,王汝鑫,张海梦,井朋伟,史巧芳,赵晓春,余义和.葡萄 *VICKX5* 基因的表达特性及转录调控分析[J/OL].果树学报,2024:1-21.(2024-11-19).<https://doi.org/10.13925/j.cnki.gsxb.20240493>.
LIU Yiting, WANG Ruxin, ZHANG Haimeng, JING Pengwei, SHI Qiaofang, ZHAO Xiaochun, YU Yihe. Expression characteristics and transcriptional regulation analysis of *VICKX5* gene in grape[J/OL]. Journal of Fruit Science, 2024: 1-21. (2024-11-19). <https://doi.org/10.13925/j.cnki.gsxb.20240493>.
- [27] HOU Y M, LI H X, ZHAI L L, XIE X, LI X Y, BIAN S M. Identification and functional characterization of the *Aux/IAA* gene *VcIAA27* in blueberry[J]. Plant Signaling & Behavior, 2020, 15(1):1700327.
- [28] LYU J, AIWAILI P, GU Z Y, XU Y J, ZHANG Y H, WANG Z L, HUANG H F, ZENG R H, MA C, GAO J P, ZHAO X, HONG B. Chrysanthemum MAF2 regulates flowering by repressing gibberellin biosynthesis in response to low temperature[J]. The Plant Journal, 2022, 112(5):1159-1175.
- [29] RADI A, LANGE T, NIKI T, KOSHIOKA M, LANGE M J P. Ectopic expression of pumpkin gibberellin oxidases alters gibberellin biosynthesis and development of transgenic *Arabidopsis* plants[J]. Plant Physiology, 2006, 140(2):528-536.
- [30] CURTIS I S, WARD D A, THOMAS S G, PHILLIPS A L, DAV- EY M R, POWER J B, LOWE K C, CROKER S J, LEWIS M J, MAGNESS S L, HEDDEN P. Induction of dwarfism in transgenic *Solanum dulcamara* by over-expression of a gibberellin 20-oxidase cDNA from pumpkin[J]. The Plant Journal, 2000, 23(3):329-338.
- [31] 易淑瑶,刘青,贾东峰,李亦淇,黄春辉,钟敏,廖光联,徐小彪.不同结果母枝粗度对‘东红’猕猴桃果实品质的影响[J].中国南方果树,2020,49(4):122-126.
YI Shuyao, LIU Qing, JIA Dongfeng, LI Yiqi, HUANG Chunhui, ZHONG Min, LIAO Guanglian, XU Xiaobiao. Influence of bearing base shoots with a diameter on fruit quality of ‘Donghong’ kiwifruit[J]. South China Fruits, 2020, 49(4): 122-126.
- [32] 苏受婷,魏清江,宁少君,廖晓娜,马张正,辜青青.结果母枝粗度对南丰蜜橘果实品质的影响[J].江西农业大学学报,2018,40(5):932-940.
SU Shouting, WEI Qingjiang, NING Shaojun, LIAO Xiaona, MA Zhangzheng, GU Qingqing. Effects of bearing base shoot diameter on fruit quality of Nanfeng tangerine[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2018, 40(5):932-940.