

不同恢复型大豆细胞质雄性不育 杂种 F_1 的转录组分析

白志元^{1,2}, 杨玉花¹, 张瑞军¹

(¹ 山西农业大学农业基因资源研究中心 / 农业农村部黄土高原作物基因资源与种质创制重点实验室, 太原 030031;

² 南京农业大学农学院 / 国家大豆改良中心, 南京 210095)

摘要: 恢复系的恢复能力在三系杂种 F_1 的育性稳定中发挥着重要的作用。本研究以相同不育系为母本和不同恢复能力的强、弱恢复系为父本配制的 2 个大豆细胞质雄性不育杂种 F_1 为研究对象, 在开花期对其不同大小的混合花芽进行转录组测序。经比较分析, 共筛选出 2060 个差异表达基因 (DEGs, differentially expressed genes), 其中相对以强恢复系为父本配制的杂种 F_1 , 在弱恢复系为父本配制的杂种 F_1 中 1446 个差异表达基因下调表达, 614 个差异表达基因上调表达。qRT-PCR 分析验证 RNA-Seq 结果是可靠的。对差异表达基因进行生物信息学分析, GO 富集分析表明细胞外围、果胶酯酶抑制剂活性、果胶酯酶活性、细胞壁和外部封装结构等功能为主要的差异生物学功能; KEGG 通路富集分析表明戊糖葡萄糖醛酸相互转化、植物病原相互作用和糖酵解 / 糖异生等通路为主要的差异代谢通路。根据差异转录学分析结果结合相关文献报道, 推测大豆细胞质雄性不育杂种 F_1 的育性稳定性与花粉细胞壁发育、碳水化合物代谢和植物病原相互作用等相关基因有关, 当环境条件变化导致其功能平衡打破时, 将会出现不育及育性发生转变。本研究为从育性稳定性方面了解大豆细胞质雄性不育及育性恢复的分子机理提供了有价值的信息。

关键词: 大豆; 细胞质雄性不育; 育性稳定; 转录组测序

Transcriptomic Analysis of Soybean Cytoplasmic Male Sterile F_1 Hybrids from Pollination with Different Restorer Types

BAI Zhi-yuan^{1,2}, YANG Yu-hua¹, ZHANG Rui-jun¹

(¹ Center for Agricultural Genetic Resources Research, Shanxi Agricultural University / Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement on Loess Plateau of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Taiyuan 030031;

² College of Agriculture, Nanjing Agricultural University / National Center for Soybean Improvement, Nanjing 210095)

Abstract: The restoring ability of restorer lines plays an important role in the fertility stability of three line F_1 hybrids. In this study, two soybean cytoplasmic male sterile F_1 hybrids, which were produced with the same male sterile line pollinated by restorer lines showing strong and weak different restoring ability, respectively, were used. The transcriptome sequencing of mixed flower buds of different sizes was carried out at the flowering stage. Through comparative analysis, according to “p-value < 0.05 and | log₂ foldchange | > 1” as the threshold in F_1 hybrid (weak restorer) if compared to that in F_1 hybrid (strong restorer), 2060 differentially expressed genes (DEGs) were identified including 1446 and 614 DEGs were down-regulated and up-regulated, respectively. The transcripts of several genes using quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis were coincident with

收稿日期: 2022-05-10 修回日期: 2022-06-21 网络出版日期: 2022-07-08

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220510001>

第一作者研究方向为大豆杂种优势基础与应用研究, E-mail: bzy923@163.com

通信作者: 张瑞军, 研究方向为大豆杂种优势基础与应用研究, E-mail: zrz013835@163.com

基金项目: 山西省面上青年基金 (201901D211565); 山西省农业科学院优秀青年基金 (YCX2020YQ58); 山西农业大学生物育种工程项目 (YZGC147); 山西省高等学校科技创新项目 (2021L091)

Foundation projects: Shanxi Provincial General Youth Fund (201901D211565); Shanxi Academy of Agricultural Sciences Excellent Youth Fund (YCX2020YQ58); Shanxi Agricultural University Biological Breeding Engineering Project (YZGC147); Shanxi Provincial Science and Technology Innovation Project of Colleges and Universities (2021L091)

the results of RNA sequencing (RNA-Seq). The significance enrichment analysis of gene ontology (GO) showed that the main differential biological functions were cell periphery, pectinesterase inhibitor activity, pectinesterase activity, cell wall and external packaging structure. The enrichment analysis of kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway showed that the main differential metabolic pathways were pentose and glucuronate interconversions, plant pathogen interaction and glycolysis / gluconeogenesis. According to the results of differential transcriptional genes analysis and literature reports, it is speculated that the fertility stability of soybean cytoplasmic male sterile F_1 hybrid was related to the genes involved in pollen cell wall development, carbohydrate metabolism and plant pathogen interaction. When the functional balance was challenged due to the changes of environmental conditions, the sterility and fertility would be switched. Collectively, this study provided valuable information for understanding the molecular mechanism of cytoplasmic male sterility and fertility restoration in soybean from the aspect of fertility stability.

Key words: soybean; cytoplasmic male sterility; fertility stability; RNA sequencing

杂种优势是生物界普遍存在且十分重要的一种现象,利用杂种优势已成为提升产量、增强抗逆性和改善品质的有效途径之一,并成为提高作物经济效益和社会效益的重要工具^[1-2]。关于大豆的杂种优势,学者们也进行了大量的田间试验,多人、多处、多次研究发现大豆具有杂种优势,利用大豆杂种优势提高产量是确实可行的^[3-5]。目前,中国在大豆杂种优势利用领域处于世界先进水平,吉林省农业科学院、安徽省阜阳市农业科学院、南京农业大学、安徽省农业科学院和山西农业大学(山西省农业科学院)等单位先后实现了杂交大豆生产的三系(不育系、保持系和恢复系)配套体系,越来越多的科研工作者加入到大豆杂种优势的研究与利用^[6]。随着各育种单位杂交大豆育种体系的不断提升,自2002年世界上首个杂交大豆品种通过审定以来,中国已经审定39个杂交大豆品种^[7]。

育性稳定性是大豆杂种优势利用中三系选育的瓶颈问题,杂交种的育性稳定决定了大豆杂交种能否推广应用。张井勇等^[8]和白志元等^[9]研究发现,大豆细胞质雄性不育杂种 F_1 的育性稳定与恢复系恢复能力的强弱相关。大豆细胞质雄性不育育性恢复调控机理是三系法选育的重要遗传学基础。研究发现,作物细胞质雄性不育的机理是复杂的,细胞毒蛋白、能量不足和异常细胞程序性死亡等都与雄性不育机理密切相关^[10-12],可见,传统的方法分析大豆细胞质雄性不育系育性恢复调控和遗传机理是非常有限的。转录组是指特定组织或细胞在特定功能状态下转录的所有RNA的总和,能够提供基因表达、基因调控及氨基酸含量等信息^[13]。转录组学的研究可以筛选和发现调控生物性状的基因,同时推断相应未知基因的功能,并揭示基因在生物学

过程中的分子机理,已广泛应用在雄性不育研究中^[14-15]。大豆细胞质雄性不育也开展了不育系与保持系、不同异交率不育系以及杂种 F_1 与亲本等转录组学相关研究^[16-18],然而,关于不同恢复型大豆细胞质雄性不育杂种 F_1 育性差异转录组分析的研究鲜见报道。

本研究以相同不育系为母本和不同恢复能力的强、弱恢复系为父本配制的2个大豆细胞质雄性不育杂种 F_1 为研究对象,在开花期对其不同大小的混合花芽进行转录组测序分析,比较分析2个大豆细胞质雄性不育杂种 F_1 的差异表达基因和代谢通路,以期为进一步了解大豆细胞质雄性不育育性恢复提供有价值的信息,为三系法选育的育性恢复调控机理及育性稳定提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用山西农业大学农业基因资源研究中心杂交大豆课题组以相同不育系H3A为母本,不同恢复能力的强、弱恢复系配制的2个大豆细胞质雄性不育杂种 F_1 为试验材料,命名为A-CK和B-CK, A-CK代表以弱恢复系SXTH3为父本配制的杂种 F_1 ,育性可育但会受环境影响,育性不稳定; B-CK代表以强恢复系SXTH40为父本配制的杂种 F_1 ,育性可育且不会受环境影响,育性稳定。强恢复系SXTH40和弱恢复系SXTH3的鉴定以及其配制杂种 F_1 的育性稳定性分析在本课题组前期研究已报道^[9]。由于大豆花器官较小,外观上很难界定不同的发育时期,而不同时期的花芽混合可以获得花芽发育的所有遗传信息,因此,本研究以同一时间不同大小的混合花芽作为测序的样品,具体操作为:2020年春,将

A_CK 和 B_CK 种植于山西省晋中市山西农业大学(山西省农业科学院)东阳试验示范基地,于开花期下午分别采集 A_CK 和 B_CK 除第 2 天即将开放之外的不同大小的混合花芽,立即置于液氮中,之后转存在 -80 ℃ 冰箱,待 RNA-Seq 测序,试验设置 3 个生物学重复。收获期的 A_CK 和 B_CK 植株正常结荚及成熟。

1.2 总 RNA 提取、文库构建与测序

采用 TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 法提取 A_CK 和 B_CK 花芽的总 RNA。通过 Oligo (dT) 磁珠富集 mRNA 的方法构建文库,对构建的文库 PCR 扩增进行文库片段富集,文库大小为 300~400 bp,通过 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, 美国) 对文库进行定量,将文库统一稀释到 2 nmol/L,通过碱变性,形成单链文库。构建好的文库采用第二代测序技术,基于 Illumina 测序平台测序,转录组测序委托南京派森诺基因科技有限公司进行。

1.3 转录组测序生物信息学分析

原始下机数据先进行过滤处理,去除低质量 read 和接头,得到高质量序列,之后比对到大豆品种 Williams 82 的参考基因组 Glycine_max.Glycine_max_v2.1.dna.toplevel.fa (http://ftp.ensemblgenomes.org/pub/plants/release-46/fasta/glycine_max/dna)。根据

比对结果,采用 FPKM 方法^[19]计算每个基因的表达量。采用 DESeq 对基因表达进行差异分析,根据表达差异倍数 $|\log_2\text{FoldChange}| > 1$,显著性 $P\text{-value} < 0.05$ 作为阈值来判断基因差异表达的显著性。采用超几何检验确定差异表达基因 (DEGs, differentially expressed genes) 显著富集的 GO 条目和 KEGG 通路,来确定差异表达基因相关的主要生物学功能和主要的代谢通路^[17]。

1.4 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析

随机挑选 7 个差异表达基因采用 qRT-PCR 方法验证 RNA-Seq 检测的差异表达基因的基因表达水平。根据 mRNA 序列设计合成引物 (表 1)。根据 HiScript Q RT SuperMix 提供的 qPCR 试剂盒提供的程序,使用 Oligo (dT) 引物反向转录合成 cDNA。qRT-PCR 体系 10 μL : 5 μL 2 $\times$ SG Green qPCR Mix, 0.2 μL 正向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$), 0.2 μL 反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$), 1 μL cDNA, 3.6 μL nuclease-free ddH₂O。qRT-PCR 反应条件为: 95 ℃ 预变性 3 min; 95 ℃ 10 s, 60 ℃ 退火 30 s, 40 个循环,以 ACTIN (登录号: NM_001358090.1) 为内参,基因的相对表达水平采用 2^{- $\Delta\Delta\text{ct}$} 法定量分析数据。

表 1 基因 qRT-PCR 验证 RNA-Seq 的分析引物

Table 1 Analysis primers of gene qRT-PCR to verify RNA-seq

引物名称 Primer name	正向引物序列 (5'-3') Forward primer sequence (5'-3')	反向引物序列 (5'-3') Reverse primer sequence (5'-3')	基因注释 Description
ACTIN	CAGAAAGGATCTATATGGCAAC	ATTTTCTTTCTGGTGGAGCTAC	内参基因
GLYMA_02G008300	CAAGCTAGCACTTGTTGCC	GCTCCTCAGACAATGGAGTGG	果胶酯酶
GLYMA_07G225400	AACGTTGGGGTGTGGAACCTT	GACCCTTCACTACGCCACAA	L- 抗坏血酸氧化酶同系物
GLYMA_08G213800	TGGGGATCACTTCTTGTTGC	TCAGTTTCCTGACCTGACGC	含五肽重复序列的 蛋白质 At3g15930
GLYMA_13G064700	ATGTCAGCAGGTTGACACGA	AGACGCAAACCTCATCCTAGCAA	果胶裂解酶
GLYMA_20G103900	GGAAAGAATGCTCTTTTCACTCAC	CCATACCCCTATCAGCATCACA	糖转运蛋白 11
GLYMA_09G274000	GATGATGGATCAGCCACCCC	TGTAGCACCTCTTGTTTCC	WRKY 转录因子 70
GLYMA_17G220100	GTTTTGCAAGCAGGCAAAATGAA	ATTGGATCAACACCTCAACTCGC	含五肽重复序列的 蛋白质 At2g13600

2 结果与分析

2.1 转录组测序和序列比对

利用 Illumina 技术对以相同不育系为母本,以不同恢复能力的强、弱恢复系为父本配制的 2 个

大豆细胞质雄性不育杂种 F₁ 的混合花芽进行了差异转录组学分析。由表 2 可知,从 6 个样品获得 Reads 总数平均为 50200761 条,碱基总数平均为 7530114150 条,过滤读数平均为 46413730 条,过滤碱基数平均为 6962059550 条,过滤数百分比均大于

92.0%, Q20 值均大于 97.5%, Q30 值均大于 94.5%。由表 3 可知, 6 个样品过滤读值与参考基因组比对统计, 总映射百分比均大于 95.5%, 唯一映射百分比均大于 97.5%, 其中, 唯一映射比对到基因区域的 Reads 总数百分比均大于 98.0%, 比对到基因间区的百分比均小于 2.0%, 比对到外显子区域的百分比均大于 97.0%。这些结果说明测序数据质量较好, 满足后续基因功能分析需要。

2.2 差异表达基因的筛选

采用 DESeq 对基因表达进行差异分析, 筛选差异

表达基因条件为: 表达差异倍数 $|\log_2\text{FoldChange}| > 1$, 显著性 $P\text{-value} < 0.05$, 发现不同恢复型的 2 个大豆细胞质雄性不育杂种 F₁ 之间有 2060 个差异表达基因, 其中相对于强恢复系为父本配制的杂种 F₁ (B_{CK}), 弱恢复系为父本配制的杂种 F₁ (A_{CK}) 中存在 1446 个差异表达基因下调表达, 614 个差异表达基因上调表达 (图 1)。结果表明, 以弱恢复系为父本配制的杂种 F₁ 相对以强恢复系为父本配制的杂种 F₁ 下调差异表达基因多。

表 2 数据整理、过滤统计

Table 2 Data sorting, filtering and statistics

样品 Sample	Reads 总数 Total reads	碱基总数 (bp) Total bases	Q20 (%)	Q30 (%)	过滤读数 Clean reads	过滤碱基数 (bp) Clean bases	过滤数百分比 (%) Clean percentage
A _{CK} _1	51196992	7679548800	97.98	94.65	47273686	7091052900	92.33
A _{CK} _2	46737644	7010646600	98.18	94.95	43318284	6497742600	92.68
A _{CK} _3	49420632	7413094800	98.05	94.75	45611544	6841731600	92.29
B _{CK} _1	55550786	8332617900	98.09	94.83	51356458	7703468700	92.44
B _{CK} _2	43599252	6539887800	98.07	94.81	40292122	6043818300	92.41
B _{CK} _3	54699260	8204889000	98.06	94.76	50630288	7594543200	92.56

A_{CK}: 以弱恢复系为父本配制的杂种 F₁; B_{CK}: 以强恢复系为父本配制的杂种 F₁; _1, _2, _3: 3 个生物学重复; 下同
A_{CK}: Hybrid F₁ prepared by weak restorer line as male parent; B_{CK}: Hybrid F₁ prepared by strong restorer line as male parent; _1, _2, _3: 3 biological replicates; The same as below

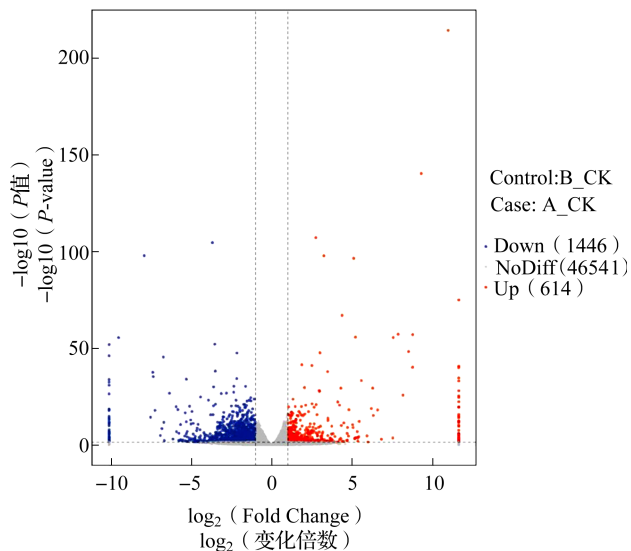
表 3 比对统计

Table 3 Comparison statistics

样品 Sample	总映射 Total_Mapped	唯一映射 Uniquely_Mapped	基因区域映射 Mapped_to_Gene	基因间区映射 Mapped_to_InterGene	外显子区域映射 Mapped_to_Exon
A _{CK} _1	45349845 (95.93)	44350422 (97.80)	43616166 (98.34)	734256 (1.66)	42373256 (97.15)
A _{CK} _2	41632540 (96.11)	40757276 (97.90)	40081237 (98.34)	676039 (1.66)	38949162 (97.18)
A _{CK} _3	43802214 (96.03)	42854974 (97.84)	42156003 (98.37)	698971 (1.63)	40969367 (97.19)
B _{CK} _1	49420533 (96.23)	48376626 (97.89)	47539445 (98.27)	837181 (1.73)	46185419 (97.15)
B _{CK} _2	38668910 (95.97)	37850743 (97.88)	37243682 (98.40)	607061 (1.60)	36295059 (97.45)
B _{CK} _3	48631178 (96.05)	47584995 (97.85)	46844144 (98.44)	740851 (1.56)	45716894 (97.59)

总映射: 过滤读数比对到参考基因组的 reads 总数; 唯一映射: 过滤读数比对到参考基因组唯一位置的 reads 总数; 基因区域映射: 唯一映射比对到基因区域的 reads 总数; 基因间区映射: 唯一映射比对到基因间区的 reads 总数; 外显子区域映射: 唯一映射比对到外显子区域的 reads 总数; 括号内数据含义为其所占百分比 (%)

Total_Mapped: Total reads of clean reads mapped to the reference genome; Uniquely_Mapped: Total reads of clean reads mapped to the reference genome to one position; Mapped_to_Gene: Total reads of uniquely_mapped mapped to gene region; Mapped_to_InterGene: Total reads of uniquely_mapped mapped to intergenic region; Mapped_to_Exon: Total reads of uniquely_mapped mapped to exon region; The data in parentheses mean their percentage (%)



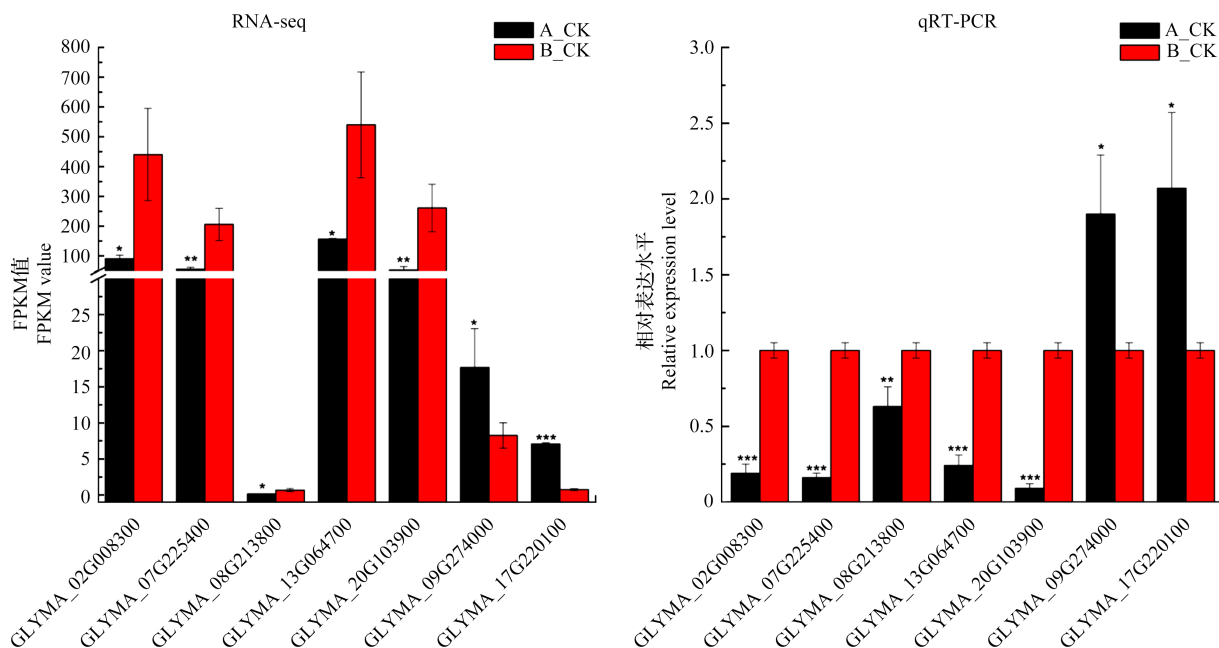
图中竖虚线表示 2 倍表达差异阈值,横虚线表示 P 值=0.05 阈值。

红点表示上调差异表达基因,蓝点表示下调差异表达基因,灰点表示差异表达不显著的基因

The dashed line in the figure was two times the expression difference threshold, the horizontal dotted line was the threshold of P -value=0.05. The red dot indicated the up-regulated DEGs, the blue dot indicated the down-regulated DEGs, and the gray dot indicated the no significant differentially expressed genes

图 1 不同恢复型的 2 个大豆细胞质雄性不育杂种 F₁ 间差异表达基因火山图

Fig.1 Volcano map of differentially expressed genes between two soybean cytoplasmic male sterile hybrids F₁ with different restorer types



*, **, *** 分别表示在 $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$ 水平上差异显著

*, **, *** indicate significant difference at $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$ levels, respectively

图 2 不同恢复型的 2 个大豆细胞质雄性不育杂种 F₁ 选择差异表达基因的 RNA-seq 与 qRT-PCR 分析

Fig.2 RNA-seq and qRT-PCR analysis of selected DEGs from two soybean cytoplasmic male sterile hybrids F₁ with different restorer types

2.3 qRT-PCR 验证

为验证 A CK 和 B CK 的 RNA-Seq 结果,根据基因功能注释,结合相关文献报道,选取可能与大豆细胞质雄性不育杂种 F₁ 育性有关的 7 个差异表达基因(2 个上调基因和 5 个下调基因)进行 qRT-PCR 检测验证,包含 1 个果胶酯酶基因,1 个果胶裂酶基因,1 个抗坏血酸氧化酶基因,1 个糖转运蛋白基因,1 个 WRKY 转录因子基因,2 个含 PPR 蛋白质基因。由图 2 所示,7 个基因的 RNA-seq 结果与 qRT-PCR 结果的表达趋势一致,说明转录组分析是可靠的。

2.4 差异表达基因的 GO 富集分析

利用 topGO^[20] 对不同恢复型的 2 个大豆细胞质雄性不育杂种 F₁ 间差异表达基因进行 GO 富集分析,按照细胞组分、分子功能和生物过程进行 GO 分类,在每个 GO 分类中选择 P -value 最小即富集最显著的前 10 个 GO 条目展示。在细胞组分中,前 5 个 GO 条目分别为细胞外围、细胞壁、外部封装结构、膜和质膜;在分子功能中,前 5 个 GO 条目分别为果胶酯酶抑制剂活性、果胶酯酶活性、活性跨膜转运蛋白活性、离子结合和跨膜转运蛋白活性;在生物过程中,前 5 个 GO 条目分别为细胞壁组织或生物发生、果胶分解代谢过程、细胞壁组织、外部封装结构组织和多糖代谢过程。总体上看,细胞外围、果胶酯酶抑制剂活性、果胶酯酶活性、细胞壁和外部封装结构等功能在不同恢复型大豆细胞质雄性不育杂种 F₁ 中行使着主要的差异生物学功能(图 3)。

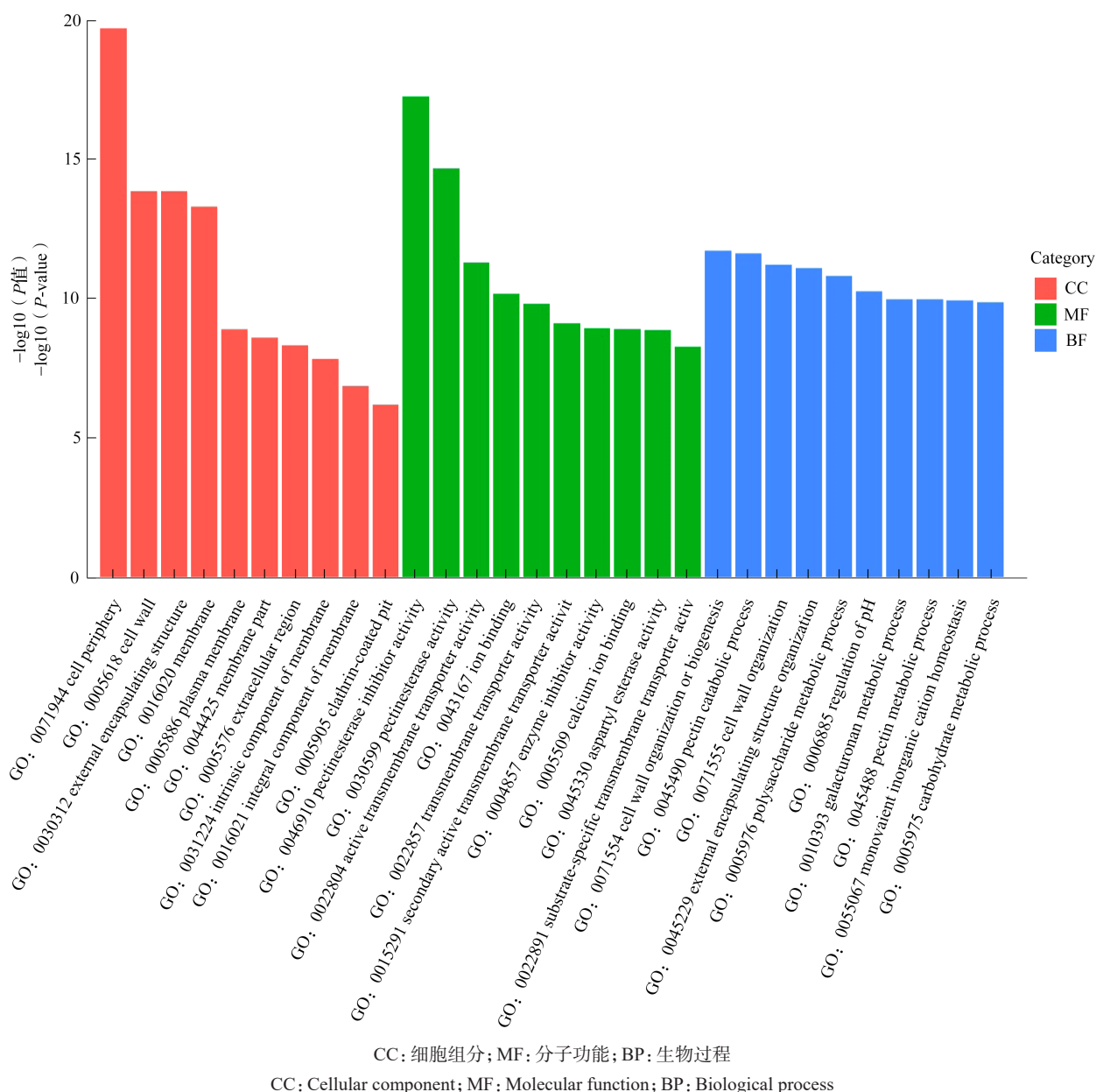


图3 不同恢复型的2个大豆细胞质雄性不育杂种F₁间差异表达基因的GO富集分析

Fig.3 GO enrichment analysis of DEGs between two soybean cytoplasmic male sterile hybrids F₁ with different restorer types

2.5 差异表达基因的KEGG富集分析

通过对不同恢复型的2个大豆细胞质雄性不育杂种F₁间差异表达基因进行KEGG富集分析,由表4所示,以 P -value<0.05为筛选条件,显著富集通路有11个。以FDR值(P 值矫正值)<0.05为筛选条件,显著富集通路仅有3个,分别为戊糖葡萄糖醛酸相互转化、植物病原相互作用和糖酵解/糖异生。结果表明,戊糖葡萄糖醛酸相互转化、植物病原相互作用和糖酵解/糖异生等通路在不同恢复型大豆细胞质雄性不育杂种F₁中为主要的差异代谢通路。戊糖葡萄糖醛酸相互转化和糖酵解/糖异生属于碳水化合物代谢,植物病原相互作用属于环境适

应。与碳水化合物代谢相关的戊糖葡萄糖醛酸相互转化通路有27个差异表达基因,糖酵解/糖异生有19个差异表达基因,与以强恢复系为父本配制的杂种F₁相比,在以弱恢复系为父本配制的杂种F₁仅有4个差异表达基因上调表达,下调表达基因占到91.3%。与环境适应相关的植物病原相互作用有25个差异表达基因,3个差异表达基因上调表达,分别编码抗病蛋白、钙和钙/钙调素依赖性丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶、热休克蛋白83,其中编码抗病蛋白GLYMA_18G083900基因的变化倍数最大, P -value值最小,编码热休克蛋白83GLYMA_09G131500基因的 P -value值次之(表5)。

表 4 不同恢复型的 2 个大豆细胞质雄性不育杂种 F₁ 间差异表达基因的 KEGG 富集分析
Table 4 KEGG enrichment analysis of DEGs between two soybean cytoplasmic male sterile hybrids F₁ with different restorer types

通路 ID Pathway ID	通路名称 Pathway	上一级通路 Upper level pathway	上调差异表达基因数目 Number of up-regulated DEGs	下调差异表达基因数目 Number of down-regulated DEGs	P 值 P-value	P 值矫正值 FDR
gmx00040	戊糖和葡萄糖醛酸相互转化	碳水化合物代谢	1	26	0.0000	0.0000
gmx04626	植物病原相互作用	环境适应	3	22	0.0000	0.0000
gmx00010	糖酵解 / 糖异生	碳水化合物代谢	3	16	0.0000	0.0004
gmx00561	甘油酯代谢	脂质代谢	0	11	0.0039	0.0716
gmx00710	光合生物中的碳固定	能量代谢	1	7	0.0042	0.0716
gmx00910	氮代谢	能量代谢	2	3	0.0132	0.1875
gmx00564	甘油磷脂代谢	脂质代谢	1	10	0.0175	0.1925
gmx00940	苯丙酸生物合成	其他次生代谢物的生物合成	7	8	0.0181	0.1925
gmx00500	淀粉和蔗糖代谢	碳水化合物代谢	1	13	0.0234	0.2205
gmx00520	氨基糖和核苷酸糖代谢	碳水化合物代谢	0	12	0.0291	0.2477
gmx00966	硫苷生物合成	其他次生代谢物的生物合成	2	0	0.0322	0.2490

表 5 植物病原相互作用通路上调差异表达基因分析
Table 5 Analysis of up-regulated differentially expressed genes in plant pathogen interaction pathway

基因号 Gene ID	基因注释 Gene annotation	log ₂ 变化倍数 log ₂ FoldChange	P 值 P-value
GLYMA_09G131500	热休克蛋白 83	1.090297491	6.29427E-06
GLYMA_08G227200	钙和钙 / 钙调素依赖性丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶	1.536231624	0.008423708
GLYMA_18G083900	抗病蛋白	4.314225136	1.03592E-10

3 讨论

育性稳定性是大豆杂种优势利用的关键问题。王曙明等^[21]通过研究大豆细胞质雄性不育三系杂交大豆的杂种优势,发现不同杂交组合的育性存在显著差异。张井勇等^[8]将三系杂交大豆恢复系分为强恢复,恢复和弱恢复 3 类。本课题组前期通过苗期短光照研究三系杂交大豆及亲本育性的影响^[9],发现大豆细胞质雄性不育杂种 F₁ 的育性稳定与恢复系恢复能力的强弱相关,强恢复系在杂交大豆的育性稳定中发挥着关键的作用,指出大多数细胞质雄性不育杂种 F₁ 的部分花粉生活力弱,当环境条件变化时,杂交种的结荚数及育性发生变换,实质是恢复系的恢复力不够强,从遗传角度分析,推测这一现象实际上是恢复系的恢复基因不能彻底抑制不育系的不育基因所致。本研究对不同恢复型的 2 个

大豆细胞质雄性不育杂种 F₁ 的转录组分析,发现相对以强恢复系为父本配制的杂种 F₁,以弱恢复系为父本配制的杂种 F₁ 下调差异表达基因多。

花粉壁是成熟雄配子体表面的一层致密物质,在授粉过程中起着保护花粉、抵抗外界物质入侵和识别雌配子体的作用。花粉粒中花粉细胞壁的正常发育是作物有性生殖的保证,大多数雄性不育性状与细胞壁发育异常有关^[22]。果胶代谢在花粉发育中起重要作用,在花粉发育过程中抑制果胶代谢将会导致花粉发育延迟、部分雄性不育和降低结实率^[23-24]。本研究对不同恢复型的 2 个大豆细胞质雄性不育杂种 F₁ 间差异表达基因进行 GO 富集,结果表明细胞外围、果胶酯酶抑制剂活性、果胶酯酶活性、细胞壁和外部封装结构等功能为主要的差异生物学功能,这些功能均与花粉壁发育相关。表明与花粉细胞壁发育相关的基因异常表达可能是导致以

弱恢复系为父本配制的杂种 F_1 的部分花粉生活力弱的主要原因之一。

碳水化合物代谢是生物体最基本的代谢过程,它可以为花药发育提供能量和碳,是花粉成熟的能量储备。Sun 等^[11]研究发现糖转运蛋白 CsSUT1 的下调抑制了黄瓜花粉萌发并导致雄性不育。Li 等^[16]发现大豆细胞质雄性不育系中 NJCMS1A 的雄性不育性与碳水化合物和能量代谢相关基因的抑制表达有关。Ding 等^[25]以大豆细胞质雄性不育系为基础的 F_1 为材料研究发现糖的减少伴随着雄性不育性的降低。本研究中,不同恢复型的 2 个大豆细胞质雄性不育杂种 F_1 间差异表达基因进行 KEGG 富集分析,以 FDR 值(P 值矫正值) <0.05 为筛选条件,显著富集通路仅有 3 个,其中,戊糖葡萄糖醛酸相互转化和糖酵解/糖异生 2 个通路属于碳水化合物代谢,共有 46 个差异表达基因,与以强恢复系为父本配制的杂种 F_1 相比,在以弱恢复系为父本配制的杂种 F_1 下调表达基因占到 91.3%。表明与碳水化合物代谢相关的基因的下调表达可能是导致以弱恢复系为父本配制的杂种 F_1 的部分花粉生活力弱的主要原因之一。

在作物中,大多数细胞质雄性不育的产生与线粒体基因组的变异、重组和重排紧密相关,产生大量新的嵌合型 ORF,改变转录和翻译产物,从而影响基因的表达及功能缺失,导致作物出现雄性不育^[10]。细胞质雄性不育的机理有多种,细胞毒蛋白可能是引起细胞质雄性不育的原因之一,如油菜 Ogura 胞质中与细胞质雄性不育相关的 ORF138 蛋白^[12],玉米 CMS-T 中与细胞质雄性不育相关的 URF13 蛋白^[26],以及水稻 CMS-WA 中与细胞质雄性不育相关的 WA352 蛋白^[27]都对细胞有毒性。本研究中与环境适应相关的植物病原相互作用通路在不同恢复型大豆细胞质雄性不育杂种 F_1 中为主要的差异代谢通路之一,与以强恢复系为父本配制的杂种 F_1 相比,在以弱恢复系为父本配制的杂种 F_1 中有 3 个上调差异表达基因,其中包括编码抗病蛋白的 GLYMA_18G083900 基因,编码热休克蛋白的 GLYMA_09G131500 基因。植物抗病蛋白能够特异地识别病原微生物分泌的效应蛋白,触发免疫响应以对抗病原微生物的侵扰,热休克蛋白是植物抵御与适应逆境胁迫的重要元素之一,使细胞内的生理生化过程得以平稳运行^[28-29]。上述这些结果推测大豆细胞质雄性不育杂种 F_1 的育性稳定性与花粉细胞壁发育、碳水化合物代谢和植物病原相互作用

等相关基因有关,当环境条件变化导致其功能平衡打破时,将会出现不育及育性发生转变。综上,本研究为从育性稳定性方面了解大豆细胞质雄性不育及育性恢复的分子机理提供了有价值的信息。

参考文献

- [1] Li S Q, Yang D C, Zhu Y G. Characterization and use of male sterility in hybrid rice breeding. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2007, 49 (6): 791-804
- [2] Tester M, Langridge P. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science*, 2010, 327 (5967): 818-822
- [3] 杨加银, 盖钧镒. 黄淮地区大豆重要亲本间产量的杂种优势、配合力及其遗传基础. *作物学报*, 2009, 35 (4): 620-630
Yang J Y, Gai J Y. Heterosis, combining ability and their genetic basis of yield among key parental materials of soybean in huang-huai valleys. *Acta Agronomica Sinica*, 2009, 35 (4): 620-630
- [4] 赵丽梅, 孙寰, 彭宝, 张伟龙, 张井勇. 国内外大豆杂种优势利用研究概况. *吉林农业大学学报*, 2008 (4): 401-406, 414
Zhao L M, Sun H, Peng B, Zhang W L, Zhang J Y. A review of the utilization of heterosis in soybean. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2008 (4): 401-406, 414
- [5] 白志元, 杨玉花, 张瑞军. 大豆杂种优势分析及强优势组合的筛选. *山西农业科学*, 2021, 49 (8): 903-907
Bai Z Y, Yang Y H, Zhang R J. Analysis of soybean heterosis and screening of strong heterosis combination. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2021, 49 (8): 903-907
- [6] 曹芳, 李志刚, 李旭新, 于德彬. 大豆雄性不育及杂种优势利用研究进展. *安徽农业科学*, 2016, 44 (34): 23-25
Cao F, Li Z G, Li X X, Yu D B. Research progress of soybean male-sterility and utilizing heterosis. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2016, 44 (34): 23-25
- [7] 孙妍妍, 赵丽梅, 张伟, 张春宝. 大豆杂种优势利用研究进展. *大豆科技*, 2021 (6): 26-35
Sun Y Y, Zhao L M, Zhang W, Zhang C B. Research progress on utilization of soybean heterosis. *Soybean Science & Technology*, 2021 (6): 26-35
- [8] 张井勇, 孙寰, 赵丽梅, 彭宝, 张伟龙, 李曙光, 赵晓明. 大豆 RN 不育胞质不育与恢复类型的研究. *大豆科学*, 2010, 29 (4): 559-564
Zhang J Y, Sun H, Zhao L M, Peng B, Zhang W L, Li S G, Zhao X M. Classification of male-sterile lines with RN sterile cytoplasm and their restorers. *Soybean Science*, 2010, 29 (4): 559-564
- [9] 白志元, 杨玉花, 张瑞军. 苗期短光照对三系杂交大豆及亲本育性的影响. *中国农业大学学报*, 2021, 26 (9): 11-17
Bai Z Y, Yang Y H, Zhang R J. Effects of short light at seedling stage on fertility of three-line hybrid soybean and its parents. *Journal of China Agricultural University*, 2021, 26 (9): 11-17
- [10] Chen L T, Liu Y G. Male sterility and fertility restoration in crops. *Annual Review of Plant Biology*, 2014, 65: 579-606
- [11] Sun L L, Sui X L, Lucas W J, Li Y X, Feng S, Ma S, Fan J W, Gao L H, Zhang Z X. Down-regulation of the sucrose transporter CsSUT1 causes male sterility by altering carbohydrate supply. *Plant Physiology*, 2019, 180 (2): 986-997

- [12] Duroc Y, Gaillard C, Hiard S, Defrance M S, Pelletier G, Budar F. Biochemical and functional characterization of *ORF138*, a mitochondrial protein responsible for Ogura cytoplasmic male sterility in Brassiceae. *Biochimie*, 2005, 87 (12): 1089-1100
- [13] Wei W L, Qi X Q, Wang L H, Zhang Y X, Hua W, Li D H, Lv H X, Zhang X R. Characterization of the sesame (*Sesamum indicum* L.) global transcriptome using Illumina paired-end sequencing and development of EST-SSR markers. *BMC Genomics*, 2011, 12: 451
- [14] Liu C, Ma N, Wang P Y, Fu N, Shen H L. Transcriptome sequencing and de novo analysis of a cytoplasmic male sterile line and its near-isogenic restorer line in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *PLoS ONE*, 2013, 8 (6): e65209
- [15] Hu J F, Lan M, Xu X Z, Yang H L, Zhang L Q, Lv F X, Yang H J, Yang D, Li C J, He J M. Transcriptome profiling reveals molecular changes during flower development between male sterile and fertile chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) Lines. *Life*, 2021, 11 (6): 525
- [16] Li J J, Han S H, Ding X L, He T T, Dai J Y, Yang S P, Gai J Y. Comparative transcriptome analysis between the cytoplasmic male sterile line NJCMS1A and its maintainer NJCMS1B in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *PLoS ONE*, 2015, 10: e0126771
- [17] 李蓉, 林春晶, 彭宝, 丁孝羊, 李永宽, 赵国龙, 赵丽梅, 张春宝. 不同异交率大豆细胞质雄性不育系的转录组分析. *中国粮油作物学报*, 2019, 41 (5): 696-704
- Li R, Lin C J, Peng B, Ding X Y, Li Y K, Zhao G L, Zhao L M, Zhang C B. Transcriptomic analysis of soybean cytoplasmic male sterile lines with different outcrossing rate. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2019, 41 (5): 696-704
- [18] Li J J, Yang S P, Gai J Y. Transcriptome comparative analysis between the cytoplasmic male sterile line and fertile line in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Genes & Genomics*, 2017, 39: 1117-1127
- [19] Mortazavi A, Williams B A, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, 2008, 5: 621-628
- [20] Young M D, Wakefield M J, Smyth G K, Oshlack A. Gene ontology analysis for RNA-seq: Accounting for selection bias. *Genome Biology*, 2010, 11 (2): R14
- [21] 王曙明, 孙寰, 赵丽梅, 王跃强, 彭宝, 范旭红, 张宝石. 中国大豆雄性不育和杂种优势利用研究进展与问题分析. *大豆科学*, 2009, 28 (6): 1089-1096, 1102
- Wang S M, Sun H, Zhao L M, Wang Y Q, Peng B, Fan X H, Zhang B S. Progress and problem analysis on soybean male sterility and heterosis exploitation in China. *Soybean Science*, 2009, 28 (6): 1089-1096, 1102
- [22] Zhou Q, Zhu J, Cui Y L, Yang Z N. Ultrastructure analysis reveals sporopollenin deposition and nexine formation at early stage of pollen wall development in *Arabidopsis*. *Science Bulletin*, 2015, 60 (2): 273-276
- [23] Zhang G Y, Feng J, Wu J, Wang X W. BoPMEL1, a pollen specific pectin methylesterase inhibitor, has an essential role in pollen tube growth. *Planta*, 2010, 231: 1323-1334
- [24] Wei B Q, Wang L L, Bosland P W, Zhang G Y, Zhang R. Comparative transcriptional analysis of *Capsicum* flower buds between a sterile flower pool and a restorer flower pool provides insight into the regulation of fertility restoration. *BMC Genomics*, 2019, 20: 837
- [25] Ding X L, Guo Q L, Li Q, Gai J Y, Yang Y P. Comparative transcriptomics analysis and functional study reveal important role of high temperature stress response gene *GmHSFA2* during flower bud development of CMS-based F₁ in soybean. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 600217
- [26] Dewey R E, Timothy D H, Levings C S. A mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in the T cytoplasm of maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1987, 84 (15): 5374-5378
- [27] Luo D P, Xu H, Liu Z L, Guo J X, Li H Y, Chen L T, Fang C, Zhang Q Y, Bai M, Yao N, Wu H, Wu H, Ji C G, Zheng H Q, Chen Y L, Ye S, Li X Y, Zhao X C, Li R Q, Liu Y G. A detrimental mitochondrial-nuclear interaction causes cytoplasmic male sterility in rice. *Nature Genetics*, 2013, 45 (5): 573-577
- [28] 闫佳, 刘雅琼, 侯岁稳. 植物抗病蛋白研究进展. *植物学报*, 2018, 53 (2): 250-263
- Yan J, Liu Y Q, Hou S W. Recent advances in disease resistance proteins in plant immunity. *Chinese Bulletin of Botany*, 2018, 53 (2): 250-263
- [29] 王勇, 任亚峰, 李冬雪, 陈卓. 热休克蛋白与植物病毒组分的互作机制研究进展. *应用与环境生物学报*, 2018, 24 (2): 415-424
- Wang Y, Ren Y F, Li D X, Chen Z. The interaction of heat shock proteins and some components of plant viruses. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2018, 24 (2): 415-424