

利用猕猴桃雌雄同株材料发掘性别决定相关基因

吴淋慧^{1,2},董家琦^{2,3},郑浩²,邱栋梁¹,张琼²,钟彩虹²

(¹福建农林大学园艺学院,福州 350002; ²中国科学院武汉植物园/中国科学院植物种质创新与特色农业重点实验室/中国科学院猕猴桃产业技术工程实验室,武汉 430074; ³中国科学院大学现代农业科学学院,北京 100049)

摘要:为探究猕猴桃雌雄异株变异为雌雄同株的分子机制,本研究对满天红猕猴桃雌雄同株变异株的雌花与雄花进行了转录组测序、生物信息学分析及qRT-PCR验证。转录组差异表达基因鉴定结果表明,雌花和雄花间共有337个差异表达基因,雄花中有241个基因表达量上调,有96个基因表达量下调。差异表达基因的GO与KEGG富集结果表明,与雌花相比,雄花中上调的基因主要参与氨基糖和核苷酸糖的代谢以及次生代谢物合成等路径;下调的基因则主要富集在次生代谢物合成、类胡萝卜素合成等途径。通过功能注释分析出30个潜在的性别相关调控基因,其中5个在次生代谢产物合成路径中表达。选取7个差异表达基因进行qRT-PCR验证,其在雌花、雄花中的表达水平与转录组数据一致。本研究结果为猕猴桃雌雄同株材料的创制提供了一定的理论依据。

关键词: 满天红猕猴桃;性别基因;雌雄同株;转录组分析;基因表达

Identification of Sex Determination-Related Genes from the Monoecious Kiwifruit Flowers

WU Linhui^{1,2}, DONG Jiaqi^{2,3}, ZHENG Hao², QIU Dongliang¹, ZHANG Qiong², ZHONG Caihong²

(¹College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002; ²Chinese Academy of Sciences Wuhan Botanical Garden/Chinese Academy of Sciences Key Laboratory of Plant Germplasm Enhancement and Specialty Agriculture/Chinese Academy of Sciences Engineering Laboratory for Kiwifruit Industrial Technology, Wuhan 430074; ³College of Advanced Agricultural Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract: In order to explore the molecular mechanism of the variation of kiwifruit from dioecious to monoecious, transcriptome sequencing, bioinformatics analysis and qRT-PCR verification on female and male flowers of the monoecious mutant of Mantianhong kiwifruit were carried out. The results of transcriptome differential expression gene identification showed that there were 337 differentially expressed genes (DEGs) between female and male flowers, with 241 genes up-regulated and 96 genes down-regulated in male flowers. The GO and KEGG enrichment of DEGs showed that compared with female flowers, the up-regulated genes in male flowers were mainly involved in the metabolism of amino sugars and nucleotide sugars and the synthesis of secondary metabolites. The down-regulated genes were mainly enriched in secondary metabolite synthesis, carotenoid synthesis and other pathways. Through functional annotation analysis, 30 potential gender-related

收稿日期: 2023-12-03 网络出版日期: 2024-02-06

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20231203001>

第一作者研究方向为猕猴桃分子遗传, E-mail: 18259908335@163.com; 董家琦为共同第一作者

通信作者: 邱栋梁, 研究方向为果树及设施园艺植物栽培生理, E-mail: qjudl1970@fafu.edu.cn

钟彩虹, 研究方向为猕猴桃种质资源鉴定、遗传育种及生产技术, E-mail: zhongch@wbpcas.cn

张琼, 研究方向为果树分子育种, E-mail: qiongzhang@wbpcas.cn

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项(A类)(XDA24030404); 国家现代农业产业技术体系(CARS-26); 湖北洪山实验室资助(2021hszd017); 陕西省重点研发计划(2023-ZDLNY-24); 果树种质创新与利用湖北省重点实验室开放课题(GSSZ202301)

Foundation projects: Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (Category A) (XDA24030404); The Earmarked Fund for CARS (CARS-26); Supported by Hubei Hongshan Laboratory (2021hszd017); The Key R&D Program of Shaanxi Province (2023-ZDLNY-24); Hubei Key Laboratory of Germplasm Innovation and Utilization of Fruit Trees (GSSZ202301)

regulatory genes were identified, five of which were expressed in the secondary metabolite synthesis pathway. Seven DEGs were selected for qRT-PCR, and their expression levels in male and female flowers were in accordant with those in transcriptome data. The results of this study provide a theoretical basis for the creation of kiwifruit monoecious materials.

Key words: Mantianhong kiwifruit; sex genes; monoecious; transcriptome analysis; gene expression

猕猴桃(*Actinidia*)是一种营养价值极高的水果,含有多种对健康有益的成分,如维生素E、维生素C、维生素K以及纤维、钾和铁等,具有增强免疫系统、保护心脏健康等多方面的生理功能^[1-2]。猕猴桃属于猕猴桃属(*Actinidia* Lindl.),属内包含54个种和21个变种共75个分类单元,其中73个分类单元原产于中国^[3]。猕猴桃驯化历史很短(约100年),最早商业化种植于新西兰,随后在智利、中国和意大利等其他国家种植,在我国大面积种植了40多年^[4]。我国的猕猴桃品种繁多,满天红猕猴桃是中国科学院武汉植物园培育的优良品种,具有独特而浓郁的香气和酸甜的口感,属于当今少见的既可观赏又可鲜食的新的猕猴桃优良品种^[5]。与其他猕猴桃品种相比,它的花色更为靓丽,为玫瑰红色,花量大,植株树势强旺,果实耐储藏,备受种植户和消费市场的青睐。

雌雄异株在有花植物中很少见(6%),但在作物中占比较高(20%),如椰枣(*Phoenix dactylifera* L.)、芦笋(*Phoenix dactylifera* L.)、柿子(*Diospyros kaki* Thunb.)等作物^[6]。有些作物的祖先是雌雄异株,如葡萄(*Vitis vinifera* L.)、木瓜(*Pseudocarya sinensis* (Thouin) C. K. Schneid.)和草莓(*Fragaria × ananassa* Duch.)等,但在驯化过程中逐渐转变为雌雄同株。猕猴桃属植物表现出功能上的雌雄异株特性,其中雌株尽管具备完整的两性花器官,但花朵的雄蕊败育无法产生具有活力的花粉;雄株中花朵雌蕊败育,故不形成胚珠^[7-8]。猕猴桃是一种以果实为主要收益的经济作物,因此雌株在生产上的价值远高于雄株。在猕猴桃杂交后代中常出现雄性多于雌性的现象,不结实的雄株会浪费育种资源,降低经济效益^[9-10]。在雌雄异株猕猴桃的生长过程中,会面临雌雄株花期不遇等问题,严重影响果实产量。此外,人工授粉过程中,雄株花粉带病也易引起溃疡病的传播。额外配置雄株不仅增加了种植生产成本,还增大了猕猴桃果园的管理难度。因此,研究猕猴桃性别调控的分子机理是解决猕猴桃生产困境的有效手段。通常认为猕猴桃的性别是

“XY模型”,即雌性植株染色体为2A+XX,而雄性为2A+XY^[11]。猕猴桃性别分化的差异主要表现在花器官上,早期通过不同性别分化阶段的生理和生化指标变化来深入探究猕猴桃的性别遗传机制及性别鉴定。近年,研究者开始采用分子生物学手段,专注于DNA分子水平上探索雌性和雄性植株间的遗传差异^[12]。有研究通过定位猕猴桃性别决定区间,开发了可用于鉴定中华猕猴桃和山梨猕猴桃雌雄性的SSR分子标记^[13]。近期有研究报道雄性猕猴桃基因组存在两个调控性别的基因“害羞女孩”(SyGI)和“友好男孩”(FrBy),其中SyGI能够抑制心皮发育而FrBy促进雄蕊的发育,二者的共同作用决定了花的性别^[14]。SyGI在雌蕊中的高表达,会抑制心皮发育;FrBy仅在雄蕊的早期的绒毡层细胞中表达,其可能通过细胞程序性死亡促进雄花绒毡层降解^[11,15]。除了性别决定基因外,开花诱导基因及解毒和应激相关基因的差异表达对花性别分化也具有重要作用^[16]。此外,植物激素在性别分化中起了关键作用,如乙烯和生长素均会促进雌花的分化^[17]。并有研究显示NAC转录因子与MADS-box基因会影响花分生组织的选择性表达,诱导产生不同性别的花^[18-19]。

目前已报道了猕猴桃性别决定的重要区间和关键基因,然而关于猕猴桃雌雄花同株的分子机理研究较少。本研究分析自然变异的雌雄花同株的满天红猕猴桃转录组数据,探究不同性别花器官中基因表达差异,筛选与性别调控相关的候选基因,为培育猕猴桃雌雄异株的新种质提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

在中国科学院武汉植物园种质资源圃中选取1株自然变异的雌雄花同株的满天红猕猴桃植株(图1),在盛花期采集同一植株上雌花与雄花各30朵,设置3个生物学重复。将花朵经液氮速冻后置于-80℃冰箱,用于转录组测序。



图1 满天红猕猴桃变异株雌花与雄花同株

Fig.1 Female and male flowers on the same plant of Mantiangong kiwifruit mutant

1.2 RNA 样品检测、cDNA 文库构建和转录组测序

使用 MaGen 植物总 RNA 小提试剂盒 (R4151-02), 雌花与雄花各 10 朵为一个重复, 分别提取满天红雌雄花 3 个重复的总 RNA, 使用 Nanodrop 分光光度计评估 RNA 纯度, 并用 Qubit 测量 RNA 浓度及 Agilent 2100 分析 RNA 的完整性。将质量检测合格的总 RNA 送于北京诺禾致源生物信息科技有限公司进行 cDNA 文库构建及转录组测序。

1.3 测序数据的分析

将测序得到的原始序列进行过滤, 去除含有接头的、不明碱基含量超过 10% 以及低质量的读段, 得到 clean data。将得到的 clean data 使用 TopHat2

软件比对到“Hongyang”猕猴桃参考基因组序列上 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 登录号为 PRJNA549770)。

1.4 基因表达水平和差异基因富集分析

利用 HTSeq 软件计算每个样本中所有基因的表达量, 使用 FPKM (Fragments Per Kilobase of exon model per Million mapped fragments) 对每个基因的表达量进行量化^[20]。采用 DESeq^[21] 进行差异基因分析, 对差异基因进行筛选, 阈值设定为: $|\log_2(\text{FoldChange})| > 1$ 且 $q\text{value} < 0.005$, 采用 GOseq 进行 GO 富集分析^[22], KOBAS (2.0) 进行 Pathway 富集分析。DEGs、GO 富集分析图以及 KEGG 富集分析均使用微生信 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 作图。

1.5 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析

通过对基因功能注释分析, 选取 7 个与满天红变异株性别转换相关的差异表达基因, 用 Oligo 7 软件设计特异引物 (表 1)。使用 Magen 植物总 RNA 小提试剂盒提取猕猴桃雌雄花总 RNA, 用 TaKaRa PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒合成 cDNA, 使用 QuantStudio 6 Flex 进行扩增, 反应体系和程序参照 TaKaRa TB Green[®] Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒说明书进行, 以中华猕猴桃肌动蛋白基因 (*AcActin*) 为内参基因。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因相对表达量, 设置 3 次生物学重复。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物

Table 1 Primers used for qRT-PCR

基因编号 Gene ID	注释 Annotated	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
Ac06484	天冬氨酸蛋白酶(PCS1)	F:TCATATTGCACCCCACTTCG R:GAGCCGTAGTCCAACCATCG
Ac07664	枯草杆菌蛋白酶样	F:AAGAACAGCATCAATGGCTTCG R:GCCACACACCATTGTCCAAG
Ac35241	乙烯响应元件结合因子4 (ERF4)	F:GCCTATTACCGCCGTTTCCC R:AGGTCGTAAATCGGCTACCTT
Ac11873	乙烯合成(ACO4)	F:ATCCGAACAAGATCATAGGAAG R:CTCGGAGACCCTTGATCAGC
Ac09980	NAC 转录因子(RD26)	F:GCACGTCAGCAATCACAACA R:TACCGAATACTGAACGGGTCT
Ac19467	MADS-box (AG)	F:CATTAGCAGGATCCGCTCCA R:AGGCTGCATCAACTCATACTCA
Ac14904	转录因子(CES)	F:GGCCAAGCTACTGATAGTCAC R:TAGAACAAACTTGCTGCCGAA
<i>AcActin</i>		F:TGAGAGATTCCGTTGCCAGAAGT R: TTCCTTACTCATGCGGTCTGCGAT

2 结果与分析

2.1 转录组差异表达基因的鉴定

对猕猴桃雌花与雄花样品进行转录组测序,分别获得 58008756 条和 62485268 条原始序列数,去除杂质、低质量读数和模糊读数后各得到 55823704 条和 59684578 条净序列数,雌花、雄花序列的 Q20 > 94.5%, Q30 > 90%, GC 含量均高于 46%,与参考基因组比对率超过 74%,其中平均大约 72.39% 比

对到基因组的唯一序列(表 2)。结果表明转录组测序结果可靠性和精准性较好,可用于后续的分析。为了探究变异株满天红中雌雄花的差异基因,本研究对转录组测序结果进行表达量分析。以 $\log_{10}(\text{FPKM} + 1)$ 值对基因表达数据进行聚类分析,表达量高的基因用红色表示,而表达量低的基因用蓝色表示。结果表明在满天红变异体的雌花与雄花之间,存在 337 个差异表达基因。与雌花相比,雄花中有 241 个基因的表达量上调,96 个基因的表达量下调(图 2)。

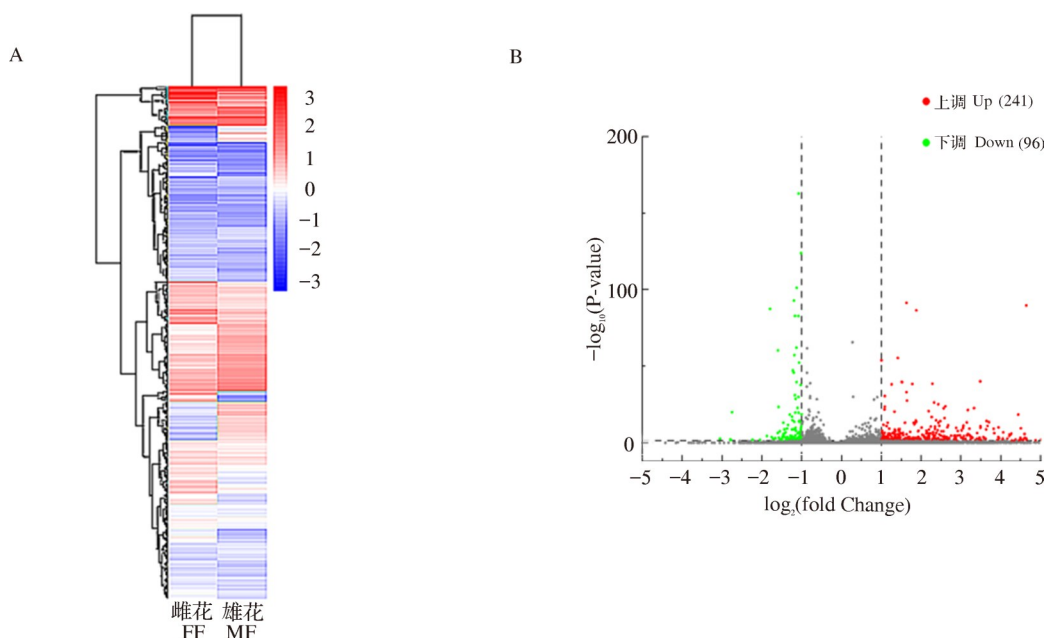
表 2 满天红猕猴桃变异株雌花与雄花序列分析和 RNA-Seq 数据汇总

Table 2 Sequence analysis and RNA-Seq data summary of female and male flowers of 'MTH' kiwifruit mutant

样本 Sample	原始序列数 Raw reads	净序列数 Clean reads	GC 含量 (%) GC content	对比参考 基因组序列 Mapped reads	比对到唯一 序列占比(%) Unique mapped reads	比对到多个 序列占比(%) Multi mapped reads	Q20 (%)	Q30 (%)
满天红雌花 MTH-FF	58008756	55823704	46.09	41799841 (74.88%)	72.36	2.52	95.10	90.49
满天红雄花 MTH-MF	62485268	59684578	46.01	44711812 (74.91%)	72.41	2.50	94.97	90.25

括号内数据:对比参考基因组序列/净序列数 $\times 100\%$

MTH-FF: Mantianhong female flower; MTH-MF: Mantianhong male flower; Bracketed data: Mapped reads/Clean reads $\times 100\%$



灰色圆点表示表达量无显著差异的基因

Grey dots represent genes with no significant difference in expression levels

图 2 满天红猕猴桃变异株雌花与雄花整体差异基因聚类图(A)和差异基因表达情况(B)

Fig. 2 Differential gene class diagram (A) and differential gene expression (B) of female flowers and male flowers of Mantianhong kiwifruit mutant

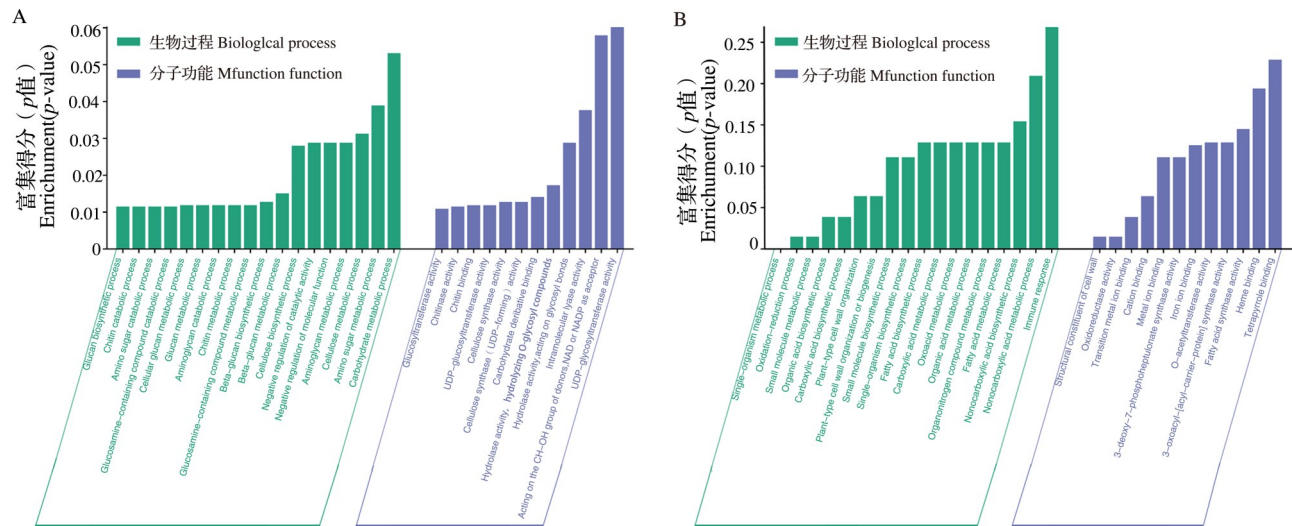
2.2 差异表达基因的GO和KEGG富集分析

对满天红变异株的雄花与雌花的差异基因进行GO富集分析(图3),结果表明差异基因仅富集在生物过程(Biological process)与分子功能(Molecular

function)这两个类别。在生物过程这一功能类别中,与雌花相比,雄花中表达上调的基因主要集中在葡聚糖合成(Glucan biosynthetic process)、几丁质降解(Chitin catabolic process)、氨基糖降解(Amino

sugar catabolic process)以及含氨基葡萄糖化合物的分解(Glucosamine-containing compound catabolic process)等生物学途径。在分子功能方面,上调表达的基因大多与葡萄糖苷转移酶活性(Glucosyltransferase activity)、几丁质酶活性(Chitinase activity)、几丁质结合(Chitin binding)、UDP-葡萄糖苷转移酶活性(UDP-glucosyltransferase activity)和纤维素合成酶活性(Cellulose synthase activity)等相关(图 3A)。在雄花中,表达下调的基因则主要在单细胞代谢(Single-

organism metabolic process)、氧化还原反应(Oxidation-reduction process)、小分子代谢(Small molecule metabolic process)、有机酸合成(Organic acid biosynthetic process)以及羧酸合成(Carboxylic acid biosynthetic process)等生物过程。而在分子功能类别中,表达下调的基因主要富集在细胞壁的结构组成(Structural constituent of cell wall)、氧化还原酶(Oxidoreductase activity)、过渡金属离子结合(Transition metal ion binding)(图 3B)。



A 为上调基因的 GO 富集; B 为下调基因的 GO 富集

A is the GO enrichment of up-regulated genes ; B is GO enrichment of down-regulated genes

图 3 满天红猕猴桃变异株雌花与雄花的差异表达基因的 GO 富集

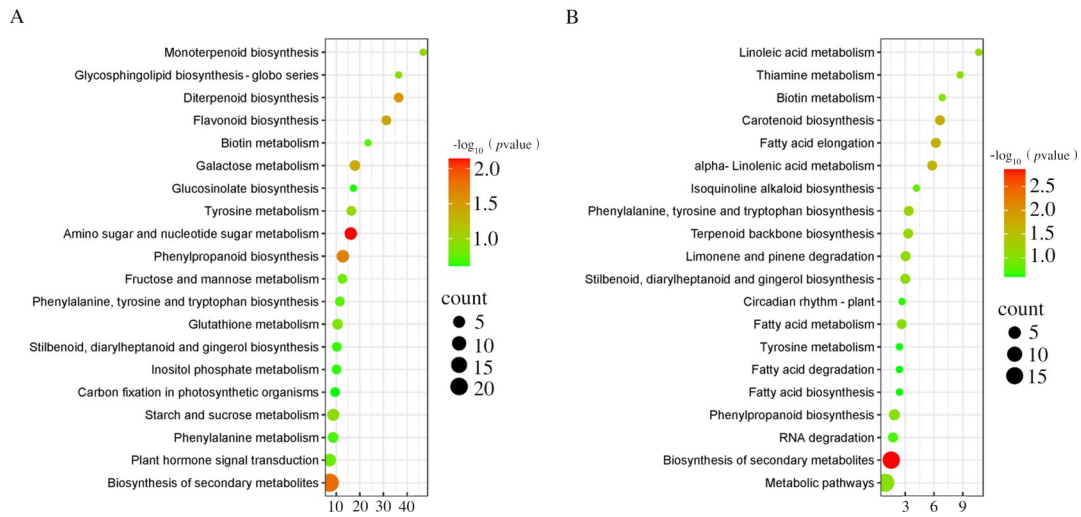
Fig. 3 GO enrichment of differentially expressed genes in female and male flowers of Miantianhong kiwifruit mutant

差异表达基因的KEGG富集分析能够揭示相关代谢途径的变化。与雌花相比,雄花中上调的基因主要参与氨基糖和核苷酸的代谢过程(Amino sugar and nucleotide sugar metabolism)、次级代谢产物的生物合成(Biosynthesis of secondary metabolites)、苯丙烷类化合物的生物合成途径(Phenylpropanoid biosynthesis)、二萜类化合物的合成(Diterpenoid biosynthesis)、类黄酮生物合成(Flavonoid biosynthesis)以及半乳糖的代谢(Galactose metabolism)等生物学过程(图 4A)。在富集程度最高的两个途径中,与雌花相比,雄花参与氨基糖和核苷酸糖代谢途径中有 6 个上调基因,次级代谢产物的生物合成途径有 22 个上调基因。表达量下调的基因主要富集在次级代谢产物的生物合成(Biosynthesis of secondary metabolites)、类胡萝卜素生物合成(Carotenoid biosynthesis)、脂肪酸延长(Fatty acid elongation)、 α -亚油酸代谢(alpha-Linolenic acid metabolism)等代谢途径(图 4B)。在

富集程度最高的次级代谢产物的生物合成途径中,与雌花相比,雄花有 16 个上调基因,在富集程度次高的类胡萝卜素生物合成途径(Carotenoid biosynthesis)中,有 2 个上调基因。

2.3 满天红猕猴桃花性别分化差异表达基因

为了筛选猕猴桃雌雄同株性别调控的候选基因,通过差异表达基因的功能注释,发现 30 个可能与性别调控相关的差异表达基因(表 3)。这些差异基因可分为 3 类:花发育相关类、植物激素类以及转录因子类。在雌花中,花发育相关的差异表达基因中有 5 个基因上调表达,5 个基因下调表达;在转录因子类别中,除了 1 个 NAC 转录因子基因(*Ac09980*),其他基因均在雌花中高表达;在植物激素类中,7 个基因上调表达,3 个基因下调表达。这些差异基因中有 5 个基因(*Ac14888*、*Ac14628*、*Ac14075*、*Ac14734*、*Ac11873*)出现在次级代谢产物的生物合成途径中。



A 为上调基因的 KEGG 富集; B 为下调基因的 KEGG 富集

A is the KEGG enrichment of up-regulated genes ; B is KEGG enrichment of down-regulated genes

图4 满天红猕猴桃变异株雌花与雄花差异表达基因的 KEGG 富集

Fig 4 KEGG enrichment of differentially expressed genes in female and male flowers of Mantianhong kiwifruit mutant

表3 满天红猕猴桃雄花和雌花中性别调控差异表达基因

Table 3 Differentially expressed genes of sex regulation in male and female flowers of ' MTH ' kiwifruit

分类 Classification	基因名称 Gene name	表达水平 Expression level		差异倍数的对数 Log2 (Fold change)	q 值 q-value	基因功能 Gene function
		雌花 FF	雄花 MF			
花发育相关类 Flower development related class	<i>Ac07664</i>	11.70	0	5.69	6.41E-06	枯草杆菌蛋白酶样
	<i>Ac13530</i>	5.96	0.22	4.59	6.54E-04	枯草杆菌蛋白酶样
	<i>Ac06826</i>	29.08	1.35	4.26	1.28E-06	GDSL 脂酶
	<i>Ac03740</i>	35.26	2.84	3.46	3.67E-04	FLA 蛋白
	<i>Ac40034</i>	43.06	6.13	2.64	1.82E-04	FLA 蛋白
	<i>Ac06484</i>	37.98	81.05	-1.26	3.61E-04	天冬氨酸蛋白酶
	<i>Ac14888</i>	114.88	242.52	-1.25	2.37E-09	kcs 合酶
	<i>Ac19151</i>	35.26	65.61	-1.06	3.35E-03	BEL1 样蛋白
	<i>Ac21949</i>	3529.18	6366.28	-1.02	1.18E-124	富含脯氨酸蛋白
	<i>Ac14628</i>	90.23	161.01	-1.00	3.87E-09	kcs 合酶
激素相关类 Hormone-related class	<i>Ac35241</i>	26.62	77.89	-1.72	2.53E-03	ERF
	<i>Ac11873</i>	430.43	15.41	4.64	1.93E-90	乙烯合成
	<i>Ac14075</i>	113.45	239.44	-1.25	9.37E-18	DXP 酶
	<i>Ac14734</i>	1523.86	2871.69	-1.08	1.52E-163	NCED 酶
	<i>Ac09777</i>	22.95	2.21	3.21	6.94E-06	SCR 转录因子
	<i>Ac21198</i>	24.54	4.44	2.30	1.54E-03	赤霉素合成
	<i>Ac00695</i>	50.29	9.72	2.20	1.40E-03	TIR1
	<i>Ac39840</i>	25.13	6.92	1.69	2.41E-03	PIN1C
	<i>Ac20399</i>	96.02	30.66	1.48	9.77E-07	IAA 蛋白
	<i>Ac10261</i>	508.13	189.53	1.25	8.05E-39	IAA 蛋白
转录因子类 Transcription factors	<i>Ac09980</i>	100.45	182.08	-1.03	1.02E-04	NAC 转录因子
	<i>Ac19467</i>	76.37	18.03	1.91	1.75E-04	MADS-box
	<i>Ac14904</i>	63.02	4.54	3.63	1.86E-09	转录因子

表3 (续)

分类 Classification	基因名称 Gene name	表达水平 Expression level		差异倍数的对数 Log2 (Fold change)	q 值 q-value	基因功能 Gene function
		雌花 FF	雄花 MF			
	<i>Ac25144</i>	75.36	8.10	3.05	2.07E-10	MYB 转录因子
	<i>Ac05315</i>	75.52	10.54	2.67	3.83E-12	MYB 转录因子
	<i>Ac15025</i>	30.48	4.37	2.64	7.18E-04	转录因子
	<i>Ac38831</i>	224.10	37.11	2.43	7.14E-26	MYB 转录因子
	<i>Ac23565</i>	53.10	9.44	2.32	6.47E-05	同源盒-亮氨酸拉链蛋白样
	<i>Ac05314</i>	63.27	12.28	2.20	5.85E-05	R3-MYB 转录因子
	<i>Ac13145</i>	60.03	12.14	2.14	1.73E-07	MYB 转录因子

2.4 qRT-PCR 验证差异表达基因

为验证猕猴桃雌花与雄花转录组测序数据的准确性和有效性,选取上调与下调差异表达最明显的基因,包括2个花发育相关的蛋白基因(*Ac06484*和*Ac07664*)、2个植物激素相关的基因(*Ac35241*和*Ac11873*)和3个转录因子基因(*Ac09980*、*Ac14904*和*Ac19467*)进行qRT-PCR分析验证(图5)。将所

得的基因相对表达量与转录组数据进行比较,*Ac06484*、*Ac35241*、*Ac09980*在雄花中的相对表达量均高于雌花,*Ac07664*、*Ac11873*、*Ac14904*、*Ac19467*的表达量均为雌花高于雄花,表达量验证结果与转录组数据结果一致。推测这些花发育、转录因子及植物激素相关的差异表达基因可能在猕猴桃性别变异中起着重要作用。

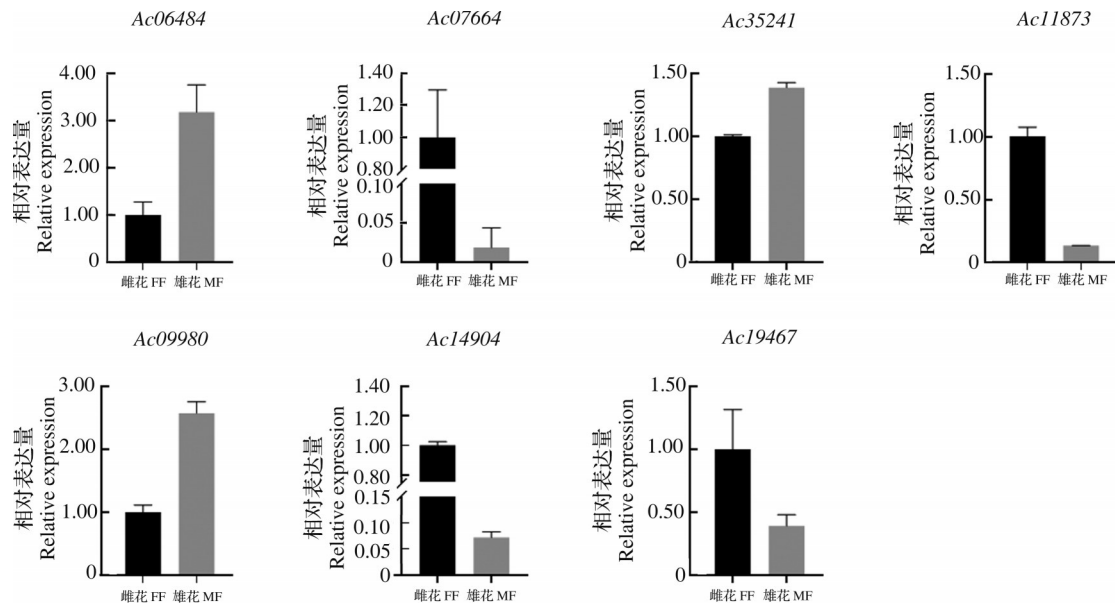


图5 满天红猕猴桃雄花和雌花中差异表达基因的qRT-PCR分析

Fig. 5 qRT-PCR analysis of differentially expressed genes in male and female flowers of Mantianhong

3 讨论

植物性别决定是植物研究的热点问题。目前已经在野生葡萄^[23](*Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*)、柳树^[24](*Salix babylonica* L.)、柿子^[25](*Diospyros kaki* Thunb.)、杨树^[26](*Populus przewalskii* Maxim.)、菠菜^[27](*Spinacia oleracea* L.)等物种中确定了性别决定基因。在猕猴桃中,已经鉴定出两个猕猴桃的性

别决定基因*FrBy*和*SyGI*^[13]。但是目前的研究并不能完全解释猕猴桃属植物中性别变异的现象,因此发掘猕猴桃性别分化和调控相关因子,对解析猕猴桃的性别调控网络十分重要。在雌雄异株植物中,由于性别决定基因的渗漏表达(Leaky sex expression),存在偶发的性别转变现象,如在雌株上开出雄花^[28]。雌株开雄花的竞争优势,首先在于雌株经同株异花授粉自身结实更有保障,其次是稀有

性别的配子有更多的受精机会,在群体中的占比倾向于增加;遗传分析表明即使在有正常雄株存在的情况下,雌株上产生的雄花依然有竞争力,可以使雌花受精^[24]。在葡萄驯化的研究中,关键一步在于从雌雄异株的野生种 *Vitis sylvestris* 转变为雌雄同株的栽培种 *Vitis vinifera*^[23]。雌雄同株的进化是葡萄驯化历史中的一个关键点,由于自花授粉的有效性,使可靠产量大幅度增加。

植物性别相关的遗传因素主要分为两类:性别决定基因和性别分化基因。性别决定基因位于性染色体上,并在雌性和雄性个体或其性器官的发展中扮演着决定性角色。而性别分化基因则表现出在不同组织、器官和个体间的表达差异,并且在雌雄同株植物的花序分生组织中通过选择性的表达模式来决定不同性别花的形成^[29]。在花发育过程中,枯草杆菌蛋白酶(SBT, subtilisin)发挥着重要作用。例如,在拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)中,花药绒毡层产生的凯氏条带完整性因子(CIF, casparian strip integrity factor)肽前体需要花粉分泌的SBT蛋白进行加工才能被定位在中间层的受体激酶 Gassho 识别,进而调控花粉壁正常发育^[30]。有研究表明,天冬氨酸蛋白酶影响花粉和胚珠的发育,并在拟南芥的植物繁殖中发挥重要作用。在拟南芥中,天冬氨酸蛋白酶基因突变体材料的花粉活性显著降低,并且顶端花粉管壁中高度甲基化的半乳糖醛酸和木葡聚糖的丰度显著增加^[31]。NAC 转录因子在植物花器官发育及不同的花发育阶段均扮演着关键的调控角色,它们主要调控花粉的形成、绒毡层的生长、花药的裂开,并参与激素对花药发育的调控^[18]。MADS-box 基因家族中,ABCE 模型中的基因是确定花器官身份的重要调控元件。其中,A类(*AP1*、*AP2*)和E类(*SEP*)基因共同决定了萼片的特性;A类、B类(*AP3*、*PI*)与E类基因共同作用花瓣的形成;B类、C类(*AG*)和E类基因一起影响雄蕊的发育;C类和E类基因则共同决定心皮的特性。同时,还发现A类功能基因抑制C类功能基因的表达^[19]。在拟南芥中,*MADS-box* 基因的B类和C类同源基因功能倾向于高度保守^[32]。因此,*MADS-box* 基因调控雌雄性别分化过程。本研究发现枯草杆菌蛋白酶(*Ac07664*)与天冬氨酸蛋白酶(*Ac06484*)、*MADS-box* 基因(*Ac19467*)与NAC 转录因子(*Ac09980*) 在雌花和雄花中表达差异明显,两者可能参与调控同一猕猴桃植株中雌雄花的发育过程。

植物激素在植物性别分化中发挥重要的调控作用。Sun 等^[33]研究发现在柿花性别分化过程中,*IAA* 基因很可能具有促进雌花分化的作用。早期的生长素响应 Aux/IAA 基因家族,能够编码蛋白质抑制下游响应基因的表达,并促进雌花的形成^[34]。本研究中 *IAA* 基因在雌雄花中差异表达显著,在雌花中上调表达,因此推测高水平的内源生长素含量可能是猕猴桃雌花发育的基础。此外,乙烯也可参与花发育和性别分化调控的过程。有研究表明,花芽发育初期产生的局部高浓度、长时期的乙烯信号,抑制了两性花芽的雄蕊,促进子房发育,最终导致单性雌花形成^[35]。乙烯响应转录因子(ERFs)在植物发育和激素间的交互作用中扮演着重要的角色。前人研究表明在桑树的雌性样本中表达上调的 *ERF1B*,可能通过调控乙烯信号通路参与性别的决定^[36-37]。本研究中发现 *ERF4* 在雌花中下调表达,而 *ACO4* 上调表达,促进乙烯合成,从而发挥诱导猕猴桃雌性发育、抑制雄性的双重功能。因此,在满天红变异株猕猴桃中差异表达的 *ERF*、*ACO*、*IAA* 等基因可能在猕猴桃性别决定和调控中发挥重要的作用。

本研究中雌株满天红出现变异开出雌雄两种花,通过比较分析同株植物中雌花与雄花的转录组,结合差异表达基因的筛选与鉴定,以及GO富集和KEGG富集分析,结果表明次级代谢的生物合成途径对雌雄花变异起着显著作用。同时,检测到2个花发育相关的蛋白基因、2个植物激素相关的基因和3个转录因子基因可能参与猕猴桃的性别分化。对这些关键基因和转录因子的功能进行深入研究,有助于进一步探究雌雄花变异的分子机制,为猕猴桃雌雄同株新种质的培育提供重要的理论依据。

参考文献

- [1] Yuan X Y, Zheng H, Fan J T, Liu F X, Li J T, Zhong C H, Zhang Q. Comparative study on physicochemical and nutritional qualities of kiwifruit varieties. *Foods*, 2022, 12 (1):108
- [2] Tyagi S, Nanher A H, Sahay S, Kumar V, Bhamini K, Nishad S K, Ahmad M. Kiwifruit: Health benefits and medicinal importance. *Rastriya Krishi*, 2015, 10(2):98-100
- [3] Li X W, Li J Q, Soejarto D. Actinidiaceae. *Flora of China*, 2007, 12:334-360
- [4] 吴玉琼. 新西兰猕猴桃产业发展史研究(1904-2014). 南京: 南京师范大学, 2017
Wu Y Q. Study on the development history of kiwifruit industry in New Zealand (1904-2014). Nanjing: Journal of

- Nanjing Normal University, 2017
- [5] 姜正旺,钟彩虹,黄宏文,王圣梅.观赏与鲜食兼用猕猴桃新品种——‘满天红’//中国园艺学会观赏园艺专业委员会,国家花卉工程技术研究中心.中国观赏园艺研究进展.北京:中国林业出版社,2010:110-111
- Jiang Z W, Zhong C H, Huang H W, Wang S M. A new kiwifruit cultivar ‘Mantianhong’ for both ornamental and fresh fruit purposes.// Ornamental Horticulture Committee of Chinese Society for Horticultural Science, National Engineering Research Center for Floriculture. Advances in Ornamental Horticulture of China. Beijing: China Forestry Publishing House, 2010:110-111
- [6] Renner S S. The relative and absolute frequencies of angiosperm sexual systems: Dioecy, monoecy, gynodioecy, and an updated online database. *American Journal of Botany*, 2014, 101(10):1588-96
- [7] 姚春潮,王跃进,刘旭峰,龙周侠.猕猴桃雄性基因RAPD标记S1032-850的获得及其应用. *农业生物技术学报*, 2005(5):12-16
- Yao C C, Wang Y J, Liu X F, Long Z X. Obtainment and application of RAPD marker S1032-850 linked to male gene in Actinidia. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2005(5):12-16
- [8] McNeilage M A. Sex expression in fruiting male vines of kiwifruit. *Sexual Plant Reproduction*, 1991, 4(4):274-278
- [9] Seal A G, Ferguson A R, Silva H N, Zhang J L. The effect of 2n gametes on sex ratios in Actinidia. *Sexual Plant Reproduction*, 2012, 25(3):197-203
- [10] Khukhunaishvili R G, Dzhokhadze D I. Electrophoretic study of the proteins from Actinidia leaves and sex identification. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2006, 42(1):117-120
- [11] Akagi T, VarkonyiGasic E, Shirasawa Kenta, Catanach A, Henry I M, Mertten D, Datson P, Masuda K, Fujita N, Kuwada E, Ushijima K, Beppu K, Allan A C, Charlesworth D, Kataoka I. Recurrent neo-sex chromosome evolution in kiwifruit. *Nature Plants*, 2023, 9(3):393-402
- [12] 杨妙贤,梁红,贺苏丹.猕猴桃性别分化与鉴定研究进展. *仲恺农业工程学院学报*, 2009, 22(1):57-60
- Yang M X, Liang H, He S D. Research progress in sex differentiation and identification of Actinidia. *Journal of Zhongkai University of Agriculture and Engineering*, 2009, 22(1):57-60
- [13] Zhang Q, Liu C Y, Liu Y F, VanBuren R, Yao X H, Zhong C H, Huang H W. High-density interspecific genetic maps of kiwifruit and the identification of sex-specific markers. *DNA Research*, 2015, 22(5):367-75
- [14] Akagi T, Henry I M, Ohtani H, Morimoto T, Beppu K, Kataoka I, Tao R. A Y-Encoded suppressor of feminization arose via lineage-specific duplication of a cytokinin response regulator in kiwifruit. *The Plant Cell*, 2018, 30(4):780-795
- [15] Akagi T, Pilkington S M, VarkonyiGasic E, Henry I M, Sugano S S, Sonoda M, Firl A, McNeilage M A, Douglas M J, Wang T, Rebstock R, Voogd C, Datson P, Allan A C, Beppu K, Kataoka I, Tao R. Two Y-chromosome-encoded genes determine sex in kiwifruit. *Nature Plants*, 2019, 5(8):801-809
- [16] 韩凯,罗尧幸,焦晓博,闫钊,Naomi Abe-Kanoh,马小河,纪薇.葡萄不同性别花器官发育机制初探. *园艺学报*, 2023, 50(12):2551-2567
- Han K, Luo Y X, Jiao X B, Yan Z, Naomi A K, Ma X H, Ji W. Preliminary study on the mechanism of flower organ development and sex formation in different grapes. *Acta Horticulturae Sinica*, 2023, 50(12):2551-2567
- [17] Pan J, Wen H F, Chen G Q, Lin W Q, Du H, Chen Y, Zhang L Y, Lian H L, Wang G, Cai R, Pan J S. A positive feedback loop mediated by CsERF31 initiates female cucumber flower development. *Plant Physiology*, 2021, 186(2):1088-1100
- [18] 王佳丽,王鹤冰,杨慧勤,胡若琳,魏大勇,汤青林,王志敏. NAC 转录因子在植物花发育中的作用. *生物工程学报*, 2022, 38(8):2687-2699
- Wang J L, Wang H B, Yang H Q, Hu R L, Wei D Y, Tang Q L, Wang Z M. The role of NAC transcription factors in flower development in plants. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(8):2687-2699
- [19] Ruelens P, Zhang Z C, Van Mourik H, Maere S, Kaufmann K, Geuten K. The origin of floral organ identity quartets. *The Plant Cell*, 2017, 29(2):229-242
- [20] Trapnell C, Williams B A, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren M J, Salzberg S L, Wold B J, Pachter L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, 2010, 28(5):511-515
- [21] Anders S, Pyl P T, Huber W. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 2015, 31(2):166-169
- [22] 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
- [23] Badouin H, Velt A, Gindraud F, Flutre T, Dumas V, Vautrin S, Marande W, Corbi J, Sallet E, Ganofsky J, Santoni S, Guyot D, Ricciardelli E, Jepsen K, Käfer J, Berges H, Duchêne E, Picard F, Huguency P, Tavares R, Bacilieri R, Rustenholz C, Marais G A B. The wild grape genome sequence provides insights into the transition from dioecy to hermaphroditism during grape domestication. *Genome Biology*, 2020, 21(1):223
- [24] He L, Jia K H, Zhang R G, Wang Y, Shi T L, Li Z C, Zeng S W, Cai X J, Wagner N D, Hörandl E, Muyle A, Yang K, Charlesworth D, Mao J F. Chromosome-scale assembly of the genome of *Salix dunnii* reveals a male-heterogametic sex determination system on chromosome 7. *Molecular Ecology Resources*, 2021, 21(6):1966-1982
- [25] Akagi T, Henry I M, Kawai T, Comai L, Tao R. Epigenetic

- regulation of the sex determination gene MeGi in polyploid persimmon. *The Plant Cell*, 2016, 28(12):2905-2915
- [26] Müller N A, Kersten B, Leite M A P, Mähler N, Bernhardsson C, Bräutigam K, Carracedo L Z, Hoenicka H, Kumar V, Mader M, Pakull B, Robinson K M, Sabatti M, Vettori C, Ingvarsson P K, Cronk Q, Street N R, Fladung M. A single gene underlies the dynamic evolution of poplar sex determination. *Nature Plants*, 2020, 6(6):630-637
- [27] She H H, Liu Z Y, Li S F, Xu Z S, Zhang H L, Cheng F, Wu J, Wang X W, Deng C L, Charlesworth D, Gao W J, Qian W. Evolution of the spinach sex-linked region within a rarely recombining pericentromeric region. *Plant Physiology*, 2023, 193(2):1263-1280
- [28] Cossard G G, Gerchen J F, Li X, Cuenot Y, Pannell J R. The rapid dissolution of dioecy by experimental evolution. *Current Biology*, 2021, 31(6):1277-1283
- [29] Diggle P K, Di Stilio V S, Gschwend A R, Golenberg E M, Moore R C, Russell J R W, Sinclair J P. Multiple developmental processes underlie sex differentiation in angiosperms. *Trends in Genetics*, 2011, 27(9):368-376
- [30] Hou Q C, Wang L L, Qi Y C, Yan T W, Zhang F, Zhao W, Wan X Y. A systematic analysis of the subtilase gene family and expression and subcellular localization investigation of anther-specific members in maize. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2023, 203:108041
- [31] Gao H, Zhang Y H, Wang W H, Zhao K K, Liu C M, Bai L, Li R, Guo Y. Two membrane-anchored aspartic proteases contribute to pollen and ovule development. *Plant Physiology*, 2016, 173(1):219-239
- [32] 孙福辉, 方慧仪, 温小蕙, 张亮生. 马银花 MADS-box 基因家族系统进化与表达分析. *植物学报*, 2023, 58(3):404-416
- Sun F H, Fang H Y, Wen X H, Zhang L S. Phylogenetic and expression analysis of MADS-box gene family in *Rhododendron ovatum*. *Chinese Bulletin of Botany*, 2023, 58(3):404-416
- [33] Sun P, Li J R, Du G G, Han W J, Fu J M, Diao S F, Suo Y J, Zhang Y, Li F D. Endogenous phytohormone profiles in male and female floral buds of the persimmons (*Diospyros kaki Thunb.*) during development. *Scientia Horticulturae*, 2017, 218:213-221
- [34] Takahashi H, Jaffe M J. Further studies of auxin and ACC induced feminization in the cucumber plant using ethylene inhibitors. *Phyton*, 1984, 44(1):81-86
- [35] Li Z, Wang S, Tao Q Y, Pan J S, Si L T, Gong Z H, Cai R. A putative positive feedback regulation mechanism in CsACS2 expression suggests a modified model for sex determination in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(12):4475-4484
- [36] Li N, Meng Z W, Tao M J, Wang Y Y, Zhang Y L, Li S F, Gao W J, Deng C L. Comparative transcriptome analysis of male and female flowers in *Spinacia oleracea* L. *BMC Genomics*, 2020, 21(1):850
- [37] Mohanty J N, Nayak S, Jha S, Joshi R K. Transcriptome profiling of the floral buds and discovery of genes related to sex-differentiation in the dioecious cucurbit *Coccinia grandis* (L.) Voigt. *Gene*, 2017, 626:395-406