

利用猕猴桃雌雄花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/植物种质创新与特色农业重点实验室/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 ('MTH') 猕猴桃变异株的雌花与雄花进行了转录组测序及生物信息学分析。结果表明, 雌花和雄花间共有 337 个差异表达基因, 雌花中有 241 个基因表达量上调, 而表达量下调的基因有 96 个。差异表达基因的 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, 其在雌雄花中的表达水平与转录组数据一致。本研究获得了 'MTH' 猕猴桃变异株雌花与雄花的差异表达基因及功能注释信息, 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

Sex Determination-Related Genes were Identified from the Monoecious Kiwifruit Flowers

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

(¹ College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002; ² Chinese 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; ³ College of Advanced Agricultural Sciences, University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049)

Abstract: In order to explore the molecular mechanism of the variation of kiwifruit from dioecious to monoecious, transcriptome sequencing and bioinformatics analysis on female and male flowers of 'MTH' kiwifruit mutants were carried out. The results 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 female flowers. The 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

收稿日期: 修回日期: 网络出版日期:

URL:

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: qiudl1970@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); 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: Supported by the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (XDA24030404); The Earmarked Fund for CARS(CARS-26); The Key R&D program of Shaanxi Province (2023-ZDLNY-24); Hubei Key Laboratory of Germplasm Innovation and Utilization of Fruit Trees (GSSZ202301)

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 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. In this study, the DEGs and functional annotation information of female and male flowers of 'MTH' kiwifruit mutant were obtained, which provided a theoretical basis for monoecious kiwifruit breeding.

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

猕猴桃是一种营养价值极高的水果，它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，它有助于增强免疫系统、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 种和 21 个变种共 75 个分类单元，73 个分类单元是原产于中国^[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，在我国大面积种植有 40 多年^[4]。我国的猕猴桃品种繁多，满天红（后面简写‘MTH’）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]。有些来自雌雄异株祖先的作物，如葡萄 (*Vitis vinifera* L.)、木瓜 (*Pseudocarya sinensis* (Thouin) C. K. Schneid.) 和草莓 (*Fragaria × ananassa* Duch.) 等，在驯化过程中逐渐转变为雌雄同体。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]。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 而雄性则为 2A + XY^[11]。猕猴桃性别分化的差异主要表现在花器官上，早期通过了解不同性别分化阶段的生理和生化指标变化，以此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]。此前，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别的 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” (*SyGl*) 和“友好男孩” (*FrBy*)，其中 *SyGl* 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]。*SyGl* 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]。除了性别决定基因之外，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。本研究通过分析自然变异的雌雄花同株的‘MTH’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研究参考。

1 材料和方法

1.1 植物材料

在中国科学院武汉植物园种质资源圃中选取自然变异的雌雄花同株的‘MTH’猕猴桃植株（图 1），在盛花期采集同一植株上雌花与雄花各取 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 ‘MTH’猕猴桃变异株雌花与雄花同株

Fig1 ‘MTH’ kiwifruit mutant female flowers and male flowers of the same plant

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），提取‘MTH’雌雄花的总 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 RNA-Seq。

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。

1.4 基因表达水平和差异基因富集分析

利用 HTSeq 对样本的基因表达量进行评估。利用 FPKM 估算的方法评估基因的表达水平^[20]，并采用

DESeq^[21]进行差异基因分析。接着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

选取 7 个与 MTH 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 PrimeScript™ 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 Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒进行, 以中华猕猴桃肌动蛋白基因 (*AcActin*) 为内参基因。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算基因相对表达量, 设置 3 个生物学重复。

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
<i>Ac06484</i>	天冬氨酸蛋白酶	F:TCATATTGCACCCCACTTCG
	Aspartic proteinase PCS1	R:GAGCCGTAGTCCAACCATCG
<i>Ac07664</i>	枯草杆菌蛋白酶样	F:AAGAACAGCATCAATGGCTTCG
	Subtilisin-like protease	R:GCCACACACCATTGTCCAAG
<i>Ac35241</i>	ERF	F:GCCTATTACCGCGTTTCCC
	Ethylene responsive element binding factor 4 (ERF4)	R:AGGTGCTAAATCGGCTACCTT
<i>Ac11873</i>	乙烯合成	F:ATCCGAACAAGATCATAGGAAG
	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase,ACO4	R:CTCGGAGACCCCTTGATCAGC
<i>Ac09980</i>	NAC 转录因子	F:GCACGTCAGCAATCACAACA
	Responsive to desiccation 26,RD26	R:TACCGAATACTGAACGGGTCT
<i>Ac19467</i>	MADS-box	F:CATTAGCAGGATCCGCTCCA
	Agamous MADS-box transcription factor,AG	R:AGGCTGCATCAACTCATACTCA
<i>Ac14904</i>	转录因子	F:GGCCAAGCTACTGATAGTCAC
	CESTA (CES)	R:TAGAACAACTTGCTGCCGAA

2 结果与分析

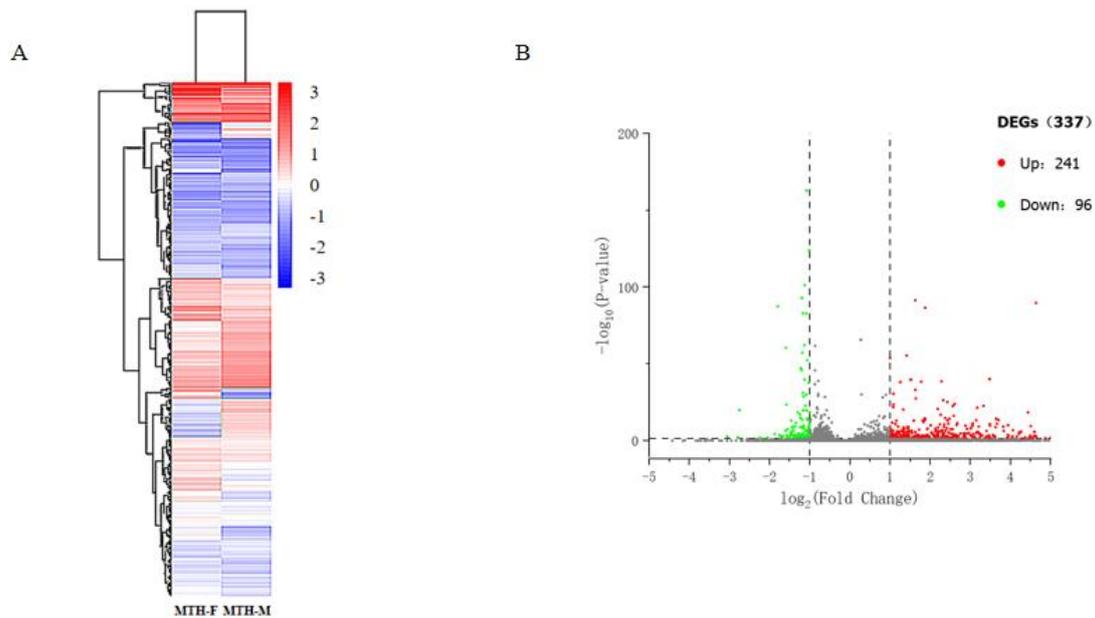
2.1 转录组差异表达基因的鉴定

对猕猴桃雌花与雄花样品进行转录组测序，分别获得 58008756 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 和 59684578 条净序列数，Q20 > 94.5%，Q30 > 90%，GC 含量均高于 46%，与参考基因组比对率超过 74%，其中约 74.9% 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 ‘MTH’ 中雌雄花差异性基因，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。研究结果表明，在 ‘MTH’ 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 个基因的表达量增加，96 个基因的表达量降低（图 2）。

表 2 ‘MTH’ 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 mutants

原始序列数	净序列数	GC 含量 (%)	比对到多个序列占			Q20 (%)	Q30 (%)	
			对比参考基因组序列 Mapped reads	比对到唯一序列占比 Unique mapped reads/%	比 Multi mapped reads/%			
MTH-M	58008756	55823704	46.09	41799841 (74.88%)	74.88%	2.52%	95.1	90.49
MTH-F	62485268	59684578	46.01	44711812 (74.91%)	74.91%	2.50%	94.97	90.25



红色,绿色和灰色圆点分别表示表达量显著升高,显著降低和无显著差异的基因

Red, green and gray dots represent genes with significantly increased expression, significantly decreased expression and no significant difference, respectively.

图2 ‘MTH’猕猴桃变异株雌花与雄花整体 FPKM 层次聚类图 (A), ‘MTH’猕猴桃变异株雌花与雄花基因表达情况 (B)

Fig 2 The overall FPKM hierarchical clustering diagram of female flowers and male flowers of 'MTH' kiwifruit mutant

plants(A),Gene expression of female flowers and male flowers of ‘MTH’ kiwifruit mutant(B)

2.2 差异表达基因的 GO 和 KEGG 富集分析

对变异株‘MTH’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与分子功能这两个本体。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、几丁质降解、氨基糖降解以及含氨基葡萄糖化合物的分解等生物学途径。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、几丁质酶活性、几丁质结合、UDP-葡萄糖苷转移酶活性和纤维素合成酶活性等相关 (图 3A)。在雄花中, 表达下调的基因则主要在单细胞代谢、氧化还原反应、小分子代谢、有机酸合成以及羧酸合成等生物过程。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、氧化还原酶、过渡金属离子结合 (图 3B)。

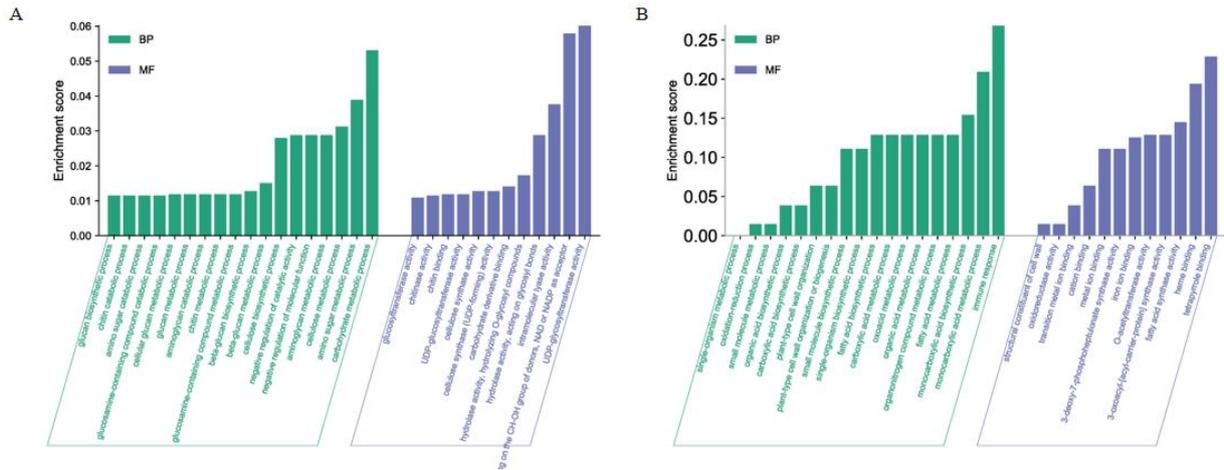


图3 ‘MTH’猕猴桃变异株雌花与雄花的上调基因的 GO 富集 (A), ‘MTH’猕猴桃变异株雌花与雄花下调基因的 GO 富集 (B)

Fig 3 GO enrichment of up-regulated genes in female and male flowers of ‘MTH’ kiwifruit mutant(A),GO enrichment of down-regulated genes in female and male flowers of ‘MTH’ kiwifruit mutant(B)

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。本研究中，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、次级代谢产物的生物合成、苯丙烷类化合物的生物合成途径、二萜类化合物的合成、类黄酮生物合成以及半乳糖的代谢等生物学过程（图 4A）。在富集程度最高的两个途径中，参加氨基糖和核苷酸糖代谢途径中有 6 个上调基因，次生代谢产物的生物合成途径有 22 个上调基因参加。表达量下降的基因主要富集在次生代谢产物的生物合成、类胡萝卜素生物合成、脂肪酸延长、 α -亚油酸代谢等代谢途径（图 4B）。在富集程度最高的次生代谢产物的生物合成途径中，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中，包含有 2 个上调基因。

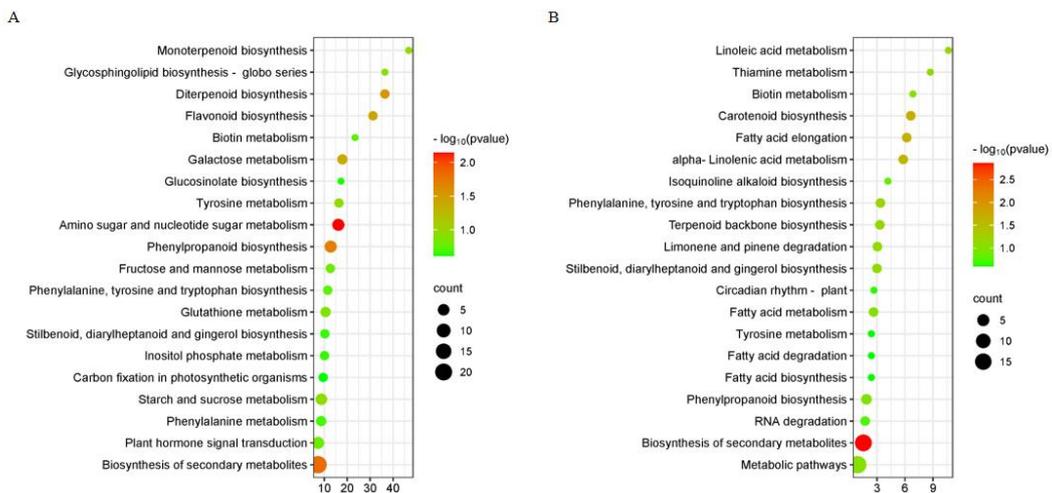


图4 ‘MTH’猕猴桃变异株雌花与雄花上调基因的 KEGG 富集 (A), ‘MTH’猕猴桃变异株雌花与雄花下调基因的 KEGG

富集 (B)

Fig 4 KEGG enrichment of up-regulated genes in female and male flowers of 'MTH' kiwifruit mutant(A),KEGG enrichment of down-regulated genes in female and male flowers of 'MTH' kiwifruit mutant(B)

2.3 'MTH' 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）。我们将这些差异基因分为三类：花发育相关类、转录因子类以及植物激素类。在雌花中，花发育相关的差异表达基因内有 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，有 7 个基因在雌花中上调表达，3 个基因下调表达。值得注意的是，这些差异基因中有 5 个基因(*Ac14888*、*Ac14628*、*Ac14075*、*Ac14734*、*Ac1187*)出现在次生代谢产物的生物合成途径中。

表 3 'MTH' 猕猴桃雄花和雌花中差异表达基因

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

分类	基因名称	表达水平 FPKM		差异倍数的对数 Log2 (Fold Change)	q 值	基因功能
		雌花	雄花			
花发育相关类	<i>Ac07664</i>	11.70	0.00	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	<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>Ac27976</i>	77.94	176.60	-1.35	2.73E-12	GH3
	<i>Ac13890</i>	198.70	359.95	-1.03	6.86E-10	PP2C
	<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

表 3 (续)

分类	基因名称	表达水平 FPKM		差异倍数的对数 Log2 (Fold Change)	q 值	基因功能
		雌花	雄花			
激素相	<i>Ac20399</i>	96.02	30.66	1.48	9.77E-07	IAA 蛋白
关类	<i>Ac10261</i>	508.13	189.53	1.25	8.05E-39	IAA 蛋白
转录因 子类	<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
	<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

为验证猕猴桃与雄花转录组测序数据的准确性和有效性，在花发育、植物激素及转录因子 3 个分类中，选取上调与下调差异表达最明显的基因 (*Ac06484* 和 *Ac07664*, *Ac35241* 和 *Ac11873*, *Ac09980* 和 *Ac14904*)，以及 1 个 MADS-box 基因 (*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* 均在雄花中的相对表达量高于雌花，*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。我们推测这些花发育、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。

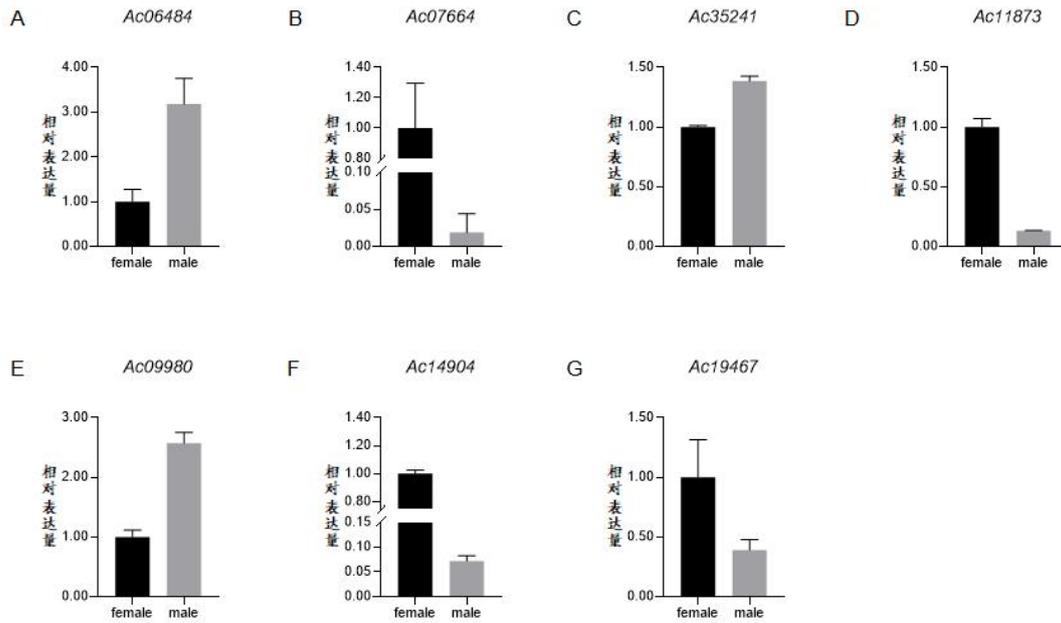


图 5 差异表达基因的 qRT-PCR 分析

注: A: *Ac06484* 的相对表达量; B: *Ac07664* 的相对表达量; C: *Ac35241* 的相对表达量; D: *Ac11873* 的相对表达量; E: *Ac09980* 的相对表达量; F: *Ac14904* 的相对表达量; G: *Ac19467* 的相对表达量

Fig 5 qRT-PCR analysis of differentially expressed genes

Note: A: the relative expression of *Ac06484*; B: the relative expression of *Ac07664*; C: the relative expression of *Ac35241*; D: the relative expression of *Ac11873*; E: relative expression of *Ac09980*; F: The relative expression of *Ac14904*; G: Relative expression of *Ac19467*

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 *SyGl*^[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)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 Casparian Strip Integrity Factor (CIF) 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 (GSO) 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均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，它们主要调控对花粉形成、绒毡层生长、花药裂开以及参与激素调控着花药的发育^[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 功能基因抑制 C 功能基因的表达^[19]。在拟南芥中，MADS-box 基因的 B 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，四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* 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]。此外，乙烯也可参与花发育和性别分化调控和的过程。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]。因此，本研究中发现差异表达的 *ERF*、*ACO*、*IAA* 相关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 ‘MTH’ 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，表明次级代谢的生物合成途径在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、2 个植物激素相关的基因、和 3 个转录因子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):108-108.
- [2] Tyagi S, Nanher A.H., Sahay S, Kumar V, Bhamini K, Nishad S K, Ahmad M. *Kiwifruit: Health benefits and medicinal importance*, 2015.
- [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).南京师范大学, 2017.
- Wu Yuqiong. *Study on the Development History of Kiwifruit Industry in New Zealand (1904-2014)*. *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(2010).中国林业出版社, 2010:110-111.
- Jiang Zhengwang, Zhong Caihong, Huang Hongwen, Wang Shengmei. A New Kiwifruit Cultivar ‘MTH’ for both Ornamental and Fresh Fruit Purposes. *China Flowers & Horticulture*, 2010, (18):36-37.
- [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(05):12-16.
- Yao Chun, Wang Yuejing, Liu Xufeng, Long Zhouxia. Obtainment and Application of RAPD Marker S1032-850 Linked to Male Gene in Actinidia. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2005, (05):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):117-20.
- [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(01):57-60.
- Yang Miaoxian, Liang Hong, He Sudan. Research progress in sex differentiation and identification of Actinidia. *Journal of Zhongkai University of Agriculture and Engineering*, 2009, 22(01):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: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 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, Varkonyi Gasic 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 等. 葡萄不同性别花器官发育机制初探. *园艺学报*, 2023, 1-17.
- Han Kai, Luo Yaoxing, Yan Zhao, Naomi Abe-Kanoh, Ma Xiaohu, Ji Wei. Preliminary Study on the Mechanism of Flower Organ Development and Sex Formation in Different Grapes. *Acta Horticulturae Sinica*, 2023, 1-17.
- [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, 魏大勇等. NAC 转录因子在植物花发育中的作用. *生物工程学报*, 2022, 38(08):2687-2699.
- Wang Jiali, Wang Hebing, Yang Huiqin, Hu Ruolin, Wei Dayong, Tang Qinglin, Wang Zhiming. The role of NAC transcription factors in flower development in plants. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(08):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):511-5.
- [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, Hugueney 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):223-223.
- [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.
- [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.e5.

- [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: PPB*, 2023, 203:108041-108041.
- [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(03):404-416.
Sun F H, Fang H Y, Wen X H, Zhang S L. Phylogenetic and Expression Analysis of MADS-box Gene Family in *Rhododendron ovatum*. *Chinese Bulletin of Botany*, 2023, 58(03):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):81-6.
- [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):4475-84.
- [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):850-850.
- [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.