

利用转录组数据挖掘枸杞雄性不育相关基因

范文强¹, 刘雪霞¹, 马小兰¹, 杨 花¹, 朱金忠², 唐建宁³, 岳思君¹, 郑 蕊^{1*}

1. 宁夏大学生命科学学院, 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, 宁夏优势特色作物现代分子育种重点实验室, 宁夏 银川 750021
2. 中宁县杞鑫枸杞苗木专业合作社, 宁夏 中宁 755100
3. 宁夏枸杞产业发展中心, 宁夏 银川 750021

摘要: 目的 探知宁夏枸杞 *Lycium barbarum* 雄性不育发生涉及的相关基因。方法 以雄性不育品种“宁杞 5 号”和正常可育品种“宁杞 1 号”单双核花粉时期花药为材料, 构建 cDNA 文库, Illumina HiSeq2500 高通量平台进行转录组测序。结果 组装得到 14 154 条 Unigenes 序列, 在错误发现率 (false discovery rate, FDR) < 0.05 且差异倍数 (fold change, FC) ≥ 2 的条件下, 获得 3012 个差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs), 其中, 有 2327 个 DEGs 在 NCBI 的非冗余蛋白质数据库 (non-redundant protein database, NR)、基因本体数据库 (gene ontology, GO)、直系同源群集数据库 (clusters of orthologous groups, COG)、基因功能和代谢途径数据库 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)、真核同源群数据库 (euKaryotic orthologous groups, KOG)、去冗余的蛋白序列数据库 (swiss prot protein database, Swiss-Prot) 等数据库中有注释信息。相对于“宁杞 1 号”, 在“宁杞 5 号”中有 1019 个 DEGs 上调, 1993 个 DEGs 下调。GO 分析表明, 1116 个 DEGs 被注释到生物学过程、细胞组分和分子功能中; 此外, 693 个 DEGs 富集到 KEGG 数据库的 50 条代谢通路。结合 PubMed 文献库检索, 筛选到细胞色素 P450 类蛋白 (cytochrome P450 98A3-like, CYP450)、受体蛋白激酶 (receptor-like protein kinase, RPK)、果胶裂解酶 (pectate lyase-like, PLL)、查耳酮合酶 (chalcone synthase, CHS)、花药特异蛋白 (anther-specific protein, ASP) 等 23 个参与雄性不育相关基因, 选取其中 9 个基因进行 qRT-PCR 分析, 结果与转录组测序基因表达趋势一致。结论 为进一步通过转基因技术验证基因功能提供了候选基因, 为解析宁夏枸杞雄性不育发生的分子机制提供了研究基础。

关键词: 宁夏枸杞; 雄性不育; 转录组; 差异表达基因; 单双核花粉时期

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)07-2226-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.07.023

Mining of male sterility-related genes in *Lycium barbarum* using transcriptome data

FAN Wen-qiang¹, LIU Xue-xia¹, MA Xiao-lan¹, YANG Hua¹, ZHU Jin-zhong², TANG Jian-ning³, YUE Si-jun¹, ZHENG Rui¹

1. Key Laboratory of Ministry of Education for Protection and Utilization of Special Biological Resources in Western China, Key Laboratory of Modern Molecular Breeding for Dominant and Special Crops in Ningxia, College of Life Science, Ningxia University, Yinchuan 750021, China
2. Qixin Wolfberry Seedling Professional Cooperatives of Zhongning County, Zhongning 755100, China
3. Wolfberry Industry Development Center, Yinchuan 750021, China

Abstract: Objective To investigate the genes involved in the occurrence of male sterility in *Lycium barbarum*. **Methods** The single Microspore and bi-cellular pollen stage anthers of male sterile variety “Ningqi No.5” and normal fertile variety “Ningqi No.1” were used as materials to construct a cDNA library and sequenced by IlluminaHiSeq2500 high throughput platform transcriptome. **Results** A total of 14 154 Unigenes sequences were assembled. Under the condition of false discovery rate (FDR) < 0.05 and fold change (FC) ≥ 2, there were 3012 differentially expressed genes. Compared with “Ningqi No.1”, 1019 genes were up-regulated and 1993 down-regulated in “Ningqi No.5”. Among them, 2327 genes had annotation information in non-redundant protein database (NR), gene ontology (GO), clusters of

收稿日期: 2022-08-09

基金项目: 宁夏枸杞产业发展中心项目“宁夏枸杞核心种质资源差异性分析及功能基因挖掘”; 宁夏回族自治区重点研发计划重点项目 (2022BBF02010)

作者简介: 范文强, 男, 硕士, 研究方向为植物生物学。E-mail: 1534204028@qq.com

*通信作者: 郑 蕊, 女, 博士, 研究方向为植物生物技术。E-mail: xlzheng@126.com

orthologous groups (COG), Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG), euKaryotic orthologous Group (KOG), swiss prot protein database (Swiss-Prot) and other databases. A total of 1116 differentially expressed genes were annotated into biological processes, cellular components and molecular functions, and 693 differentially expressed genes were enriched into 50 metabolic pathways in KEGG database. Combined with the search of PubMed literature database, 23 genes related to male sterility, such as cytochrome P450 proteins (CYP450), receptor protein kinase (RPK), pectin lyase (PLL), chalcone synthase (CHS) and anther specific protein (ASP) were screened, and 10 of them were selected for RT-qPCR analysis. The results were consistent with the trend of gene expression in transcriptome.

Conclusion The results provide candidate genes for further verification of gene function by transgenic technology, and provide research basis for analyzing the molecular mechanism of male sterility in *L. barbarum*.

Key words: *Lycium barbarum* L.; male sterility; transcriptome; differentially expressed genes; single microspore and Bi-cellular pollen stage

宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 为茄科多年生落叶灌木，其成熟的干燥果实枸杞子为我国传统名贵中药材，同时又是国家卫生部公布的药食同源品种之一，在我国已有 2000 多年的用药历史^[1]。现代医学、营养学和药理学研究发现，宁夏枸杞的果实、叶、根中都含有人体所需的多糖、氨基酸、维生素、微量元素等，具有极高的药用价值和营养价值^[2]。

雄性不育 (male sterility, MS) 是植物界存在的普遍现象，是指在有性繁殖过程中雌蕊正常发育，而雄蕊不能正常生长发育和产生有效花粉^[3]。植物雄性不育是一个极其复杂的过程，花药败育形式多样、败育程度各异，在雄蕊分化到成熟花粉粒形成的不同时期均有可能发生，主要表现为雄蕊退化或形态异常、减数分裂异常、小孢子退化、绒毡层功能缺陷、能形成可育的花粉但是花药壁无法正常打开等败育形式^[4-5]。雄性不育现象是植物研究的热点之一，已成为作物育种的主要方向和目标，被广泛用于促进杂交作物的育种过程。在杂交育种中，以雄性不育系为材料控制授粉，在水稻、玉米等作物中已获得高产杂交品种^[6]。由于线粒体和核基因之间的相互作用，MS 表型无法产生功能性花药、花粉或雄配子^[7]。因此，了解花药和花粉发育的微妙而复杂的过程是理解 MS 植物中这一独特现象的先决条件。然而，花药和花粉发育是植物生命周期中的一个关键阶段，它包含一系列相关事件，涉及复杂调控网络中的多种基因^[8]。相关基因的功能障碍可能导致雄性不育^[9]。尽管有许多雄性不育相关基因已被分离，并鉴定其在 MS 中的具体功能，但 MS 发生的调控网络和新基因在很大程度上仍然未知^[10]。

RNA-Seq 以其技术优势，被广泛应用于植物雄性不育相关差异表达基因的识别、SNP 筛选及基因表达量等方面的研究^[11]。尤其是丰度非常低的基因^[12-13]。

关于宁夏枸杞雄性不育转录组及相关基因表达

方面的研究较少。张兴等^[14]通过转录组技术，发现了宁夏枸杞雄性不育品种“宁杞 5 号”成熟花粉时期与雄性不育形成相关的差异表达基因。本研究在前人研究基础上，通过 RNA-Seq 技术分析宁夏枸杞不育品种“宁杞 5 号”与可育品种“宁杞 1 号”单双核时期的花药转录组差异，并对筛选到的雄性不育相关候选基因进行 qRT-PCR 分析。研究结果为枸杞花药发育及雄性不育发生的机制提供研究基础和参考。

1 材料

宁夏枸杞雄性不育品种“宁杞 5 号”与可育品种“宁杞 1 号”，于 2019 年 6 月采摘于宁夏育新公司 (106°6'11.516"E, 38°31'1.808"N) 试验田的 5 龄树，大田栽培管理，生长气候条件相同。由宁夏大学郑蕊博士鉴定为宁夏枸杞 *L. barbarum* L. 的干燥果实。采用对角线取样法，分别采摘“宁杞 5 号”和“宁杞 1 号”枸杞花蕾，参考徐青等^[15]的方法，按照显微镜观察形态结合花蕾纵横经长度确定花药发育时期。于冰上剥取单双核花粉期花药 (图 1)，存于 2 mL 无菌离心管，立即置于液氮中速冻后，存于 -80 °C 备用。样品材料分别设 3 个生物学重复，“宁杞 1 号”3 个样品编号为 T1、T2、T3，“宁杞 5 号”3 个样品编号为 T4、T5、T6。



A-“宁杞 5 号” B-“宁杞 1 号”
A-Ningqi No.5 B-Ningqi No.1

图 1 宁夏枸杞单双核花粉期花药

Fig. 1 Anthers at single microspore and bi-cellular pollen stage of *L. barbarum*

2 方法

2.1 RNA 提取及测序文库构建

将-80℃保存的单双核花粉期花药,于干冰条件下送至北京百迈客生物公司进行 cDNA 文库构建和转录组测序。

2.2 转录组测序及组装

使用 Illumina HiSeq2500 高通量测序平台对 cDNA 文库进行测序,用 Trinity 软件对过滤后的 Clean data 进行序列组装。

2.3 功能注释

使用 BLAST 软件将获得 Unigene 与 NCBI 的非冗余蛋白质数据库(non-redundant protein database, NR)、基因本体数据库(gene ontology, GO)、直源同源群集数据库(clusters of orthologous groups, COG)、基因功能和代谢途径数据库(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)、真核同源群数据库(euKaryotic orthologous groups,

KOG)、去冗余的蛋白序列数据库(Swiss-Prot protein database, Swiss-Prot)等数据库进行序列比对,获取基因的功能信息。

2.4 差异表达基因(DEGs)分析

采用 EBSeq 进行 DEGs 分析,得到 2 个样品之间的差异表达基因集,采用 Benjamini-Hochberg 方法校正显著性 P 值(P -value)。以基因的相对表达量差异倍数(fold change, FC) ≥ 2 , FDR(false discovery rate) < 0.05 作为标准,筛选 DEGs。

2.5 qRT-PCR 分析

以枸杞组成型表达基因 *LbActin* 为内参(GenBank 登陆号: HQ415754.1),选取转录组中识别的 9 个 DEGs,进行实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析,qRT-PCR 引物序列见表 1。每个样品设 3 个生物学重复,采用 TB Green Premix Ex Taq II 试剂盒进行 qRT-PCR 检测, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量。

表 1 qRT-PCR 引物

Table 1 Primers used for real-time quantitative PCR

基因 ID	基因名称	正向引物	反向引物
c13211.graph_c0	<i>CYP450</i>	5'-TGCTGCCTCACATGGCCGGT-3'	5'-TCCCTGGACATGTACGTCTAC-3'
c51964.graph_c0	<i>CHS</i>	5'-ACAGCAGCAATCTCAAGTCA-3'	5'-TATGATGTCAGTGCATATAAG-3'
c73912.graph_c0	<i>PG</i>	5'-ATCGATGGTACACTTGTGGC-3'	5'-GTGAAGTTGCAGGCTGTC-3'
c63703.graph_c0	<i>ASP</i>	5'-GTGACACACATCAAGAGAA-3'	5'-CTGTACACACCTTCTACTGTG-3'
c39039.graph_c0	<i>NAC29-like</i>	5'-CTAGCTAGTTGCTATCACTAAG-3'	5'-TGGTGTCTTGTATGAGAAC-3'
c12782.graph_c0	<i>β-1,3-Glu</i>	5'-CAGTAAGTGGCTAGGAGTTAC-3'	5'-AGCAGTATACTTCAACATCA-3'
c84176.graph_c0	<i>LRR</i>	5'-AGACGACACAATAACATACG-3'	5'-ATGATGTGTTATGTGTCGT-3'
c34073.graph_c0	<i>RPK</i>	5'-CTATACATGAGAAGCAGCA-3'	5'-ATGAATAAGAATTTGTGTCA-3'
c11843.graph_c0	<i>G-3-P</i>	5'-GGTCATTGACAGCGACAAGTT-3'	5'-GTTATAAGCATCATGGGCA-3'
HQ415754.1	<i>Lbactin</i>	5'-GACCTTCAATGTTCCCGCTATG-3'	5'-GCCATCACCAGAGTCCAACAC-3'

3 结果与分析

3.1 转录组质量检测与组装

枸杞‘宁杞 1 号’和‘宁杞 5 号’单双核花粉期花药样品,各设置 3 个生物学重复,共 6 个样本进行转录组测序,经质控筛选,共获得 51.58 Gb 的 Clean reads,且各样本 $Q_{30} \geq 92.11\%$,各样品 GC 含量均大于 43.02%(表 2)。结果表明,所有试验样本测序质量良好,可用于后续研究。

对组装结果进行统计(表 3),共检测到 14 154 条 Unigene, N_{50} 为 1170 bp,组装完整性较高,其中长度区间位于 200~300 bp 的 Unigene 数量最多,为 4726 条。

3.2 DEGs 功能注释

通过对雄性不育品种“宁杞 5 号”和可育品种“宁杞 1 号”单双核花粉期花药转录本进行比较分

表 2 转录组测序数据评估

Table 2 Data evaluation of sample sequencing

样品	测序数量	基数	GC/%	百分含量 $\geq Q_{30}/\%$
T1	29 290 375	8 634 418 326	43.17	92.44
T2	23 477 506	6 921 070 682	43.02	92.87
T3	21 597 616	6 404 336 100	43.51	92.14
T4	33 163 918	9 825 026 630	43.28	92.57
T5	33 508 526	9 953 137 536	43.29	92.11
T6	33 253 964	9 846 662 500	43.10	92.48

析,获得的 DEGs 分别与 NR、GO、COG、KEGG、KOG、Pfam、Swiss-Prot 7 个数据库比对,有 2327 个基因匹配到了注释信息(表 4),其中在 NR 数据库匹配到 2321 个,GO 数据库 1116 个,COG 数据库 668 个,KEGG 数据库 693 个,KOG 数据库 1117 个,Pfam 数据库 1769 个,Swiss-Prot 数据库 1586 个。

表 3 组装结果统计

长度区间/nt	单基因序列数量
200~300	4726
300~500	3766
500~1000	3013
1000~2000	1582
2000 以上	1067
总数/条	14 154
总长度/bp	93 244 314
N50 长度/bp	1170
平均长度/bp	456.58

表 4 差异表达基因注释结果

数据库	DEGs 数量
NR	2321
GO	1116
COG	668
KEGG	693
KOG	1117
Pfam	1769
Swiss-Prot	1586
总计	2327

3.3 DEGs 分析结果

雄性不育品种“宁杞 5 号”与可育品种“宁杞 1 号”单双核花粉期花药转录组比较分析，共检测到 3012 个差异表达基因（图 2）。“宁杞 5 号”相对于“宁杞 1 号”，有 1019 个基因表达上调，1993 个

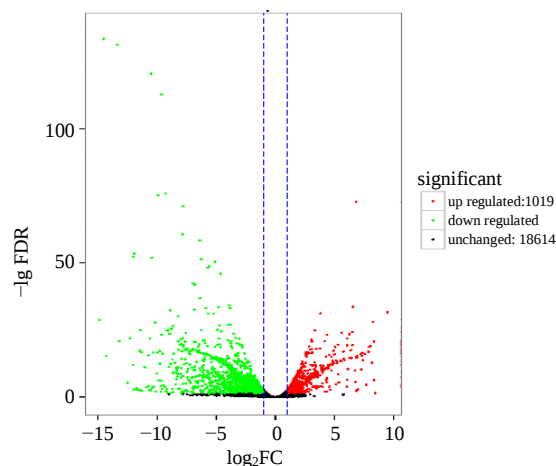


图 2 差异表达基因火山图

Fig. 2 Volcano map of differentially expressed genes

基因表达下调。

3.3.1 GO 功能注释 对 DEGs 进行 GO 功能注释（图 3），有 1116 个 DEGs 被注释到生物学过程（biological process）、细胞组分（cellular component）和分子功能（molecular function）中。其中，在生物学过程的代谢过程（metabolic process）、细胞过程（cellular process）和单生物过程（single-organism process）等二级功能占比较大，分别为 628、548、511 个；细胞组分中注释到的基因数目占比最多的属细胞部分（cell part），有 362 个；分子功能中注释到催化活性（catalytic activity）和蛋

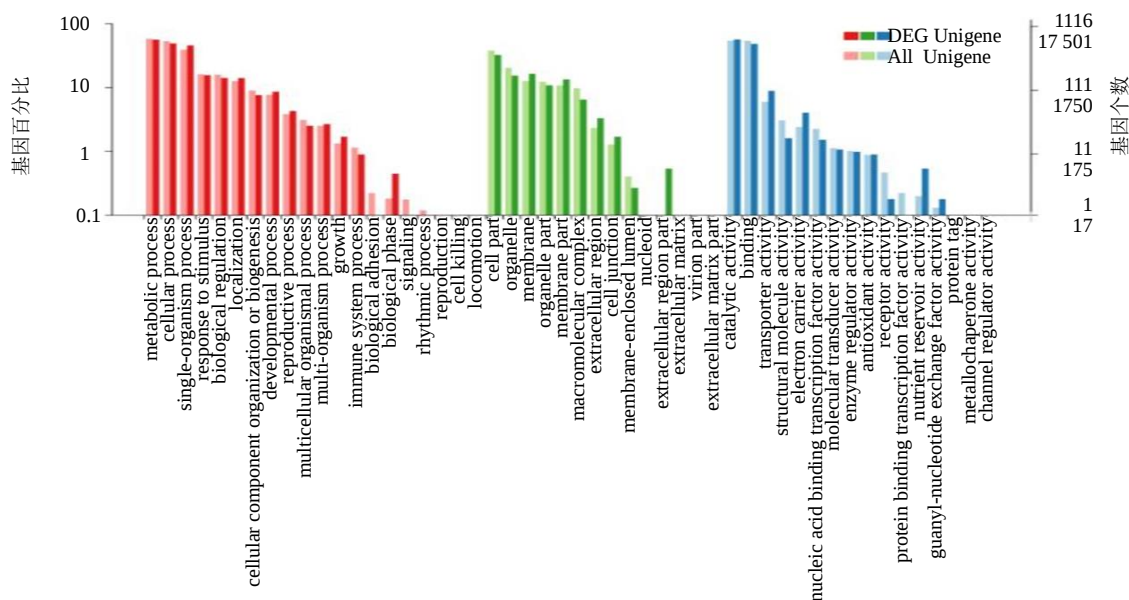


图 3 差异表达基因 GO 功能注释

Fig. 3 Gene ontology functional annotations of differentially expressed genes

白结合 (binding) 功能的比例较高, 分别为 632 个和 539 个。

3.3.2 COG 功能注释 DEGs 中, 有 668 个在 COG 数据库匹配到注释信息 (图 4), 分别参与其中的 22 条代谢途径, 属于常规功能预测 (general function prediction only) 的基因数目最多, 有 198 个。在复制、重组和修复 (reproduction、reorganization and repair)、碳水化合物运输与代谢 (carbohydrate

transport and metabolism)、信号转导机制 (signal transduction mechanisms) 和转录 (transcription) 等过程注释的基因数分别为 96、91、80 和 83 个。未检测到参与细胞运动、细胞外结构以及细胞核结构相关的差异表达基因。

3.3.3 KEGG 功能注释 差异表达基因在 KEGG 数据库中有 693 个基因匹配到注释信息, 参与 5 大类代谢途径中的 50 条代谢通路 (图 5)。其中

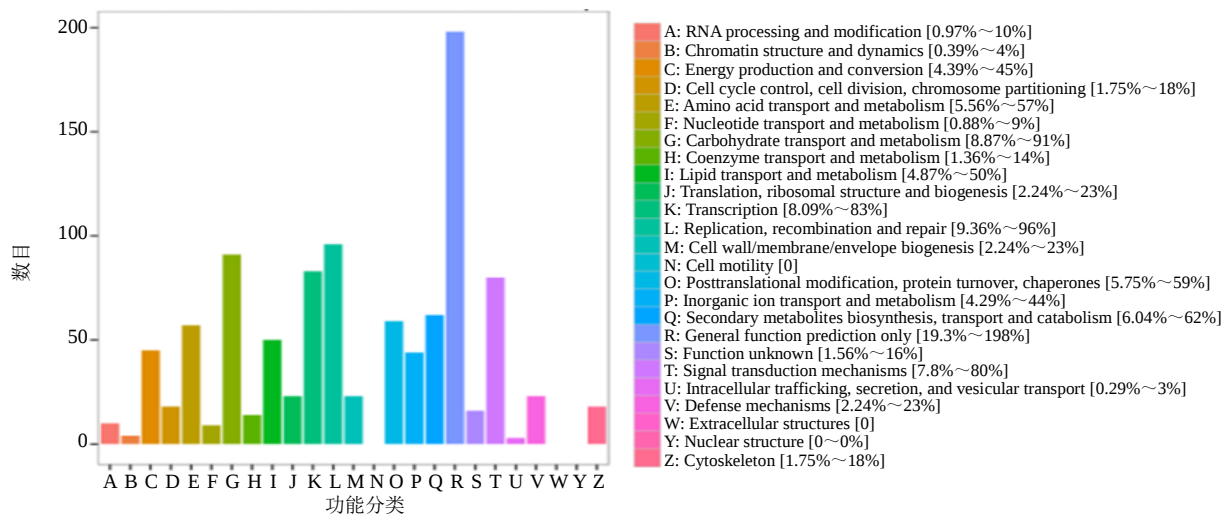


图 4 差异表达基因 COG 注释分类

Fig. 4 Clusters of orthologous groups functional annotations of differentially expressed genes

碳代谢 (carbon metabolism)、氨基酸生物合成 (biosynthesis of amino acids)、淀粉和蔗糖代谢 (starch and sucrose metabolism)、苯丙烷生物合成 (phenylpropanoid biosynthesis)、内质网中的蛋白质加工 (protein processing in endoplasmic reticulum)、植物病原体相互作用 (plant-pathogen interaction) 和植物激素信号转导 (plant hormone signal transduction) 分别富集到 35、31、25、25、22、20 和 20 个基因。

3.4 雄性不育相关 DEGs 筛选

对“宁杞 5 号”和“宁杞 1 号”单双核花粉期花药转录组 DEGs 进行功能注释和代谢途径分析, 同时参考 PubMed 数据库相关文献, 筛选出细胞色素 P450 类蛋白 (cytochrome P450 98A3-like, CYP450)、受体蛋白激酶 (receptor-like protein kinase, RPK)、果胶裂解酶 (pectate lyase-like, PLL)、查耳酮合酶 (chalcone synthase, CHS)、花药特异蛋白 (anther-specific protein, ASP) 等 23 个参与花药发育及雄性不育相关基因 (表 5), 这 23 个基因在雄性不育品种“宁杞 5 号”中均下调表达, 表明

基因表达量的不同会影响植物的生长发育。

3.5 DEGs 的 qRT-PCR 分析

基于差异表达基因的 GO、COG 和 KEGG 分析, 从中挑选了与雄性不育相关性较高的细胞色素 P450 (cytochrome P450 98A3-like, CYP450)、查耳酮合酶 (chalcone synthase, CHS)、聚半乳糖醛酸酶 (polygalacturonase-like, PG)、花药特异蛋白 (anther-specific protein, ASP)、受体蛋白激酶 (receptor-like protein kinase, RPK) 等 9 个差异表达基因, 进行 qRT-PCR 验证。结果表明 qRT-PCR 的表达模式与转录组测序结果基本一致 (图 6)。

4 讨论

转录组学研究可分析遗传背景相同、育性表型存在差异的植物材料, 比较其基因表达量的变化特征, 通过转录组分析, 即使是无参考基因组的物种, 也可以获得在某一状态下基因的表达丰度、剪接方式等信息^[16]。在不同时空条件下, 基因的上、下调表达变化与遗传背景和差异基因的功能密切相关, 因此可通过分析基因表达水平变化的分析, 来预测和研究基因功能的变化^[17]。

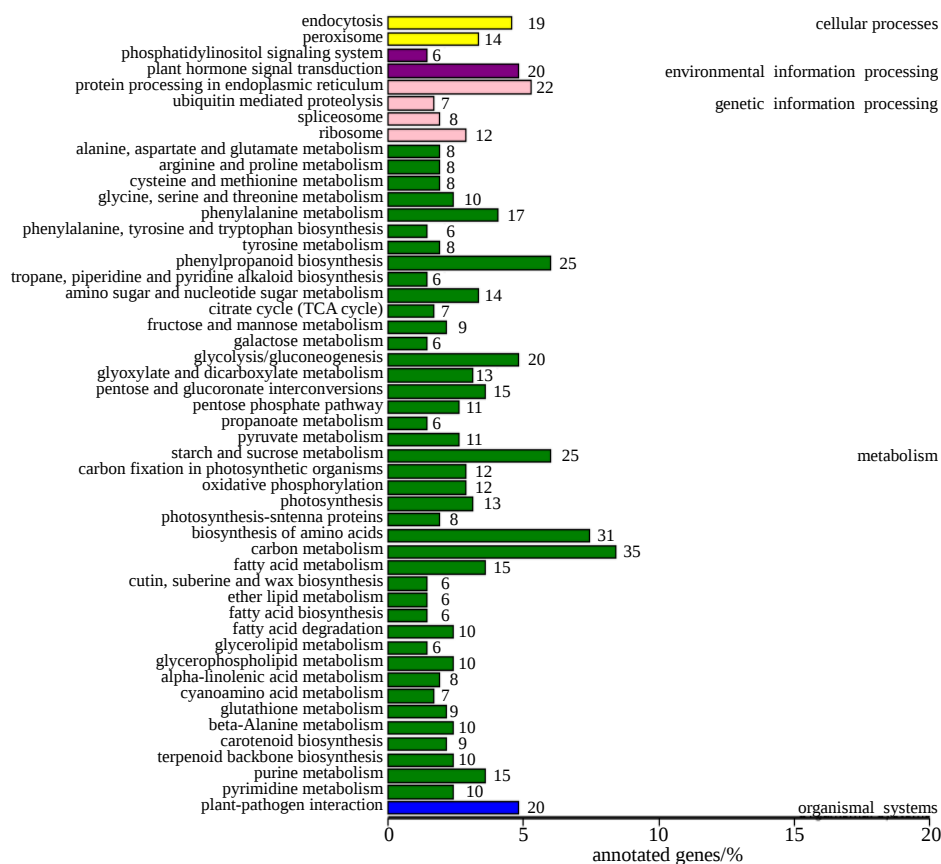


图 5 差异表达基因 KEGG 分类

Fig. 5 KEGG classifications of differentially expressed genes

表 5 雄性不育相关差异表达基因

Table 5 Differential expression genes associated with male sterility

基因 ID	NR 数据库注释	log ₂ FC	相对表达量变化	基因功能
c60080.graph_c0	pectate lyase-like	-11.408 589 480	下调	雄性不育
c63060.graph_c0	glucan endo-1,3-beta-glucosidase	-9.071 718 601	下调	胼胝质降解
c62359.graph_c0	early nodulin-like protein 1	-10.164 000 500	下调	花粉管生长
c75791.graph_c0	beta-galactosidase 5	-9.144 187 935	下调	小孢子发生
c77564.graph_c0	aldehyde dehydrogenase family 2 member C4-like	-6.581 464 312	下调	绒毡层退化
c20229.graph_c0	CLAVATA3/ESR (CLE)-related protein 12-like	-6.558 702 860	下调	花粉外壁形成
c11843.graph_c0	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	-7.575 439 548	下调	花粉发育
c76303.graph_c2	protein HOTHEAD-like	-5.898 262 153	下调	花药角质层发育
c13211.graph_c0	cytochrome P450 98A3-like	-8.452 995 218	下调	雄性不育
c79081.graph_c1	desiccation-related protein PCC13-62-like	-14.528 249 390	下调	花粉发育
c84176.graph_c0	inactive leucine-rich repeat receptor-like	-6.135 964 227	下调	花药发育
c39039.graph_c0	NAC transcription factor 29-like	-6.373 552 105	下调	花药开裂
c76782.graph_c0	GPI-anchored protein LORELEI-like	-11.615 634 120	下调	花粉管生长
c51964.graph_c0	chalcone synthase	-5.270 507 175	下调	花粉败育
c60421.graph_c0	pectinesterase QRT1-like	-6.526 258 227	下调	花粉壁发育
c43864.graph_c0	aquaporin TIP1-3	-6.047 120 656	下调	花粉发育
c74612.graph_c1	probable pectate lyase P59	-9.662 575 192	下调	花粉发育
c12782.graph_c0	β-1,3-glucanase	-9.869 263 656	下调	花粉发育
c73912.graph_c0	polygalacturonase-like	-8.380 392 516	下调	花粉发育中胼胝质降解
c42530.graph_c0	putative DNA-binding protein ESCAROLA-like	-6.127 951 016	下调	花粉发育
c63703.graph_c0	anther-specific protein LAT52-like	-10.278 682 350	下调	花粉管生长
c70271.graph_c0	GDSL-type esterase/lipase	-6.447 040 898	下调	花粉发育
c34073.graph_c0	receptor-like protein kinase ANXUR1	-7.093 384 036	下调	花粉发育

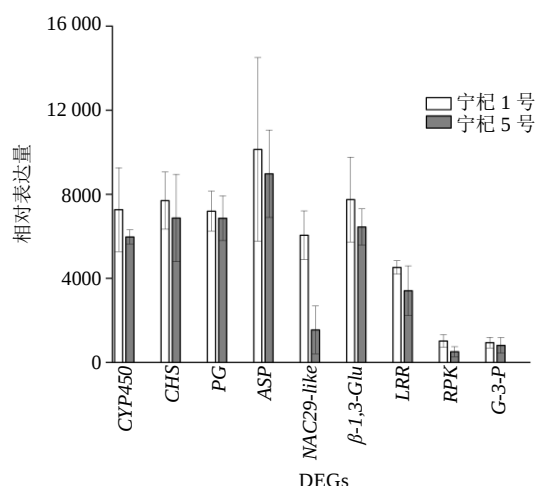


图 6 差异表达基因的 qRT-PCR 分析

Fig. 6 qRT-PCR analysis of differentially expressed genes

本研究利用 Illumina HiSeq2500 高通量测序技术比较宁夏枸杞雄性不育品种“宁杞 5 号”和可育品种“宁杞 1 号”单双核花粉期花药转录组，筛选到 3012 个 DEGs。其中，有 1993 个基因在雄性不育品种“宁杞 5 号”中下调表达，1019 个基因上调表达，与 Qu 等^[18]在油菜细胞核雄性不育系中的研究结果相一致。通过 GO 功能分类、KEGG 代谢途径富集分析及 PubMed 文献检索，识别到 23 个 DEGs 与植物雄性不育相关。结合基因功能的文献报道，选取 9 个 DEGs 通过 qRT-PCR 验证分析，结果与转录组测序保持一致（图 6）。

碳水化合物不仅对维持花药和花粉发育很重要，而且也是影响其发育的信号^[19]。碳水化合物代谢紊乱可导致异常淀粉储存在药室内壁，也可导致绒毡层肥大和小孢子壁形成不良等其他症状，进而导致雄性不育^[20]。淀粉和蔗糖是碳水化合物的重要组成部分，可以为花药发育提供能量。本研究有 25 个 DEGs 富集在淀粉和蔗糖代谢途径中（图 5），这些基因的表达可能会导致淀粉和蔗糖代谢以及能量储备过程的紊乱，从而抑制花粉发育，最终导致雄性不育^[20]。据此推测，碳水化合物的代谢可能会影响宁夏枸杞花药正常发育。此外，植物激素在开花植物的绒毡层和花粉发育中也具有重要作用。先前有研究表明，生长素作为第一种被鉴定的植物激素，在花粉发育中起着关键作用^[21]。赤霉素是绒毡层正常发育所必需的，并影响绒毡层碳水化合物的可用性^[22]。本研究结果有 20 个 DEGs 富集在植物激素信号转导途径中（图 5），这些基因的异常表达，可

能是造成枸杞雄性不育的原因之一。因此，推测生长素信号可能会影响花粉的正常发育。

值得注意的是，确定了 23 个与雄性不育相关的基因在不育品种“宁杞 5 号”中均下调表达，主要是与胼胝质降解、花粉管生长、绒毡层退化、花粉外壁形成以及花药角质层发育等有关（表 5），推测这些基因的特异表达可能是雄性不育发生的原因。花药角质层和小孢子外壁是雄性配子体和花粉粒的保护屏障^[23]。细胞色素 P450 家族成员 CYP704 B2 是植物雄性配子形成过程中角质层和外壁形成必不可少^[23]。本研究中，CYP450 (c13211.graph_c0) 基因在不育品种“宁杞 5 号”花药转录组水平和 qRT-PCR 分析均下调表达，这与 CYP450 家族基因在棉花^[24]中的表达模式类似。据此推测 CYP450 基因导致雄性不育发生的原因是与花药角质层形成有关。受体样蛋白激酶 2 (RPK2) 是拟南芥花药发育的关键调控因子，RPK2 T-DNA 插入突变体 rpk2-2 破坏了绒毡层降解及绒毡层细胞命运的关键代谢途径，引起花药开裂和花粉成熟缺陷，导致拟南芥雄性不育^[25]。本研究中，RPK (c34073.graph_c0) 基因在不育品种“宁杞 5 号”花药转录组水平和 qRT-PCR 分析均下调表达，由此推测，RPK 基因的低水平表达，可能是引起不育品种“宁杞 5 号”花药绒毡层细胞提前进行程序性死亡而解体，其花粉粒不能正常发育成熟的原因。植物 β-1,3-葡聚糖酶 (β-1,3-glucanase) 参与植物花粉发育过程中胼胝质的降解^[26]。本研究中发现，β-1,3-glucanase (c12782.graph_c0) 基因参与花粉发育且在不育品种“宁杞 5 号”中下调表达，推测 β-1,3-glucanase 基因的低水平表达是导致胼胝质降解的原因之一。Hou 等^[27]从拟南芥中报道了一个早期的结节样蛋白 (ENs) 基因，发现该基因对于花粉管进入胚珠、生长停滞和爆发有重要作用。他们研究发现，EN14 可以和受体样激酶的细胞外结构域发生特异性结合，严格控制花粉管的接收。本研究发现，early nodulin-like protein 1 (c62359.graph_c0) 基因在不育品种“宁杞 5 号”中下调表达，因此我们推测不育的原因是该基因下调表达无法与受体结合，花粉管无法接收花粉导致。果胶裂解酶样 (PLL) 基因已经在各种种植中得到鉴定，Zheng 等^[28]通过人工微 RNA (amiRNA) 对 OsPLL3 和 OsPLL4 的进行敲低，发现这 2 个基因表达降低时，会破坏正常花粉的发育并导致雄性不育。这与本研究 PLL (c60080.graph_

c0) 基因在不育品种“宁杞 5 号”中下调表达结果是一致的。Tsugama 等^[29]研究结果证明 GDSL 型脂肪酶基因 (*GELP*) 可以调节拟南芥中花粉壁的特性发生变化, *GELP77* 缺陷 (*gelp77*) 植物表现出花粉壁发育异常, 这种表型通过引入 *GELP77* 基因组片段而得到恢复。而本研究中发现 *GDSL lipase* (c70271.graph_c0) 基因在不育品种“宁杞 5 号”中下调表达, 表明 *GELP77* 基因的高表达对于拟南芥花粉壁正常发育是不可或缺的。

此外, 本课题组比较分析还发现了一个调控花药开裂的转录因子 NAC transcription factor 29-like (c39039.graph_c0)。NAC 转录因子在前人的研究中已有报导, 由一个涉及广泛生物过程的大基因家族组成^[30], 其中有一些参与花粉发育 (NST1、NST2)^[31]。转录因子可以调节多个相关的下游基因, 这些基因是细胞机制的重要组成部分, 在植物生长发育中起着关键作用^[32]。Mitsuda 等^[33]研究发现, NAC 在拟南芥次生壁增厚过程中起重要作用, 其中, 次生壁增厚促进因子 NST1 和 NST2 的嵌合抑制因子的表达导致花药开裂缺陷, 原因是花药内囊中次生壁增厚的丧失。本研究发现的 NAC 转录因子在不育品种“宁杞 5 号”中下调表达, 推测其低水平表达是导致花药无法正常开裂的原因。

宁夏枸杞雄性不育单双核花粉时期花药转录组的研究结果, 可为进一步通过转基因技术验证相关差异表达基因功能提供了候选基因资源, 同时也为深入解析宁夏枸杞雄性不育发生的分子机制提供了研究基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 徐常青, 刘赛, 徐荣, 等. 我国枸杞主产区生产现状调研及建议 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(11): 1979-1984.
- [2] Harunobu A. A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji) [J]. *Food Res Int*, 2011, 44(7): 1702-1717.
- [3] 王保明, 陈永忠, 李红波, 等. 植物雄性不育的机制及应用研究进展 [J]. 河南农业科学, 2019, 48(5): 1-9.
- [4] 刘永明, 张玲, 邱涛, 等. 高通量转录组测序技术在植物雄性不育研究中的应用 [J]. 遗传, 2016, 38(8): 677-687.
- [5] Smith A R, Zhao D Z. Sterility caused by floral organ degeneration and abiotic stresses in *Arabidopsis* and cereal grains [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1503.
- [6] Gómez J F, Wilson Z A. A barley PHD finger transcription factor that confers male sterility by affecting tapetal development [J]. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12(6): 765-777.
- [7] Xu H M, Kong X D, Chen F, et al. Transcriptome analysis of *Brassica napus* pod using RNA-Seq and identification of lipid-related candidate genes [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 858.
- [8] Zhou X, Liu Z Y, Ji R Q, et al. Comparative transcript profiling of fertile and sterile flower buds from multiple-allele-inherited male sterility in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) [J]. *Mol Genet Genomics*, 2017, 292(5): 967-990.
- [9] Yang J H, Liu X Y, Xu B C, et al. Identification of miRNAs and their targets using high-throughput sequencing and degradome analysis in cytoplasmic male-sterile and its maintainer fertile lines of *Brassica juncea* [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 9.
- [10] Chen C M, Chen G J, Cao B H, et al. Transcriptional profiling analysis of genic male sterile-fertile *Capsicum annuum* reveal candidate genes for pollen development and maturation by RNA-Seq technology [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2015, 122(2): 465-476.
- [11] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics [J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(1): 57-63.
- [12] Liu C H, Fan C. De novo transcriptome assembly of floral buds of pineapple and identification of differentially expressed genes in response to ethephon induction [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 203.
- [13] 范文强, 刘雪霞, 马小兰, 等. 宁夏枸杞花药转录组分析及花药发育相关基因的筛选 [J]. 中草药, 2022, 53(3): 827-834.
- [14] 张兴, 冯嘉馨, 陈佳, 等. 雄性不育枸杞花药比较转录组分析 [J/OL]. 基因组学与应用生物学, 2022: 1-15. [2022-06-09]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1369.Q.20220607.1818.002.html>.
- [15] 徐青, 秦慧, 张炎, 等. 不育枸杞花药营养物质代谢与花粉败育的关系 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(31): 15566-15569.
- [16] 刘永明, 张玲, 邱涛, 等. 高通量转录组测序技术在植物雄性不育研究中的应用 [J]. 遗传, 2016, 38(8): 677-687.
- [17] 陶兴林, 侯栋, 朱惠霞, 等. 花椰菜温敏雄性不育系 GS-19 花药败育的细胞学及转录组分析 [J]. 中国农业科学, 2017, 50(13): 2538-2552.
- [18] Qu C M, Fu F Y, Liu M, et al. Comparative transcriptome analysis of recessive male sterility (RGMS) in sterile and

- fertile *Brassica napus* lines [J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144118.
- [19] Honma Y, Adhikari P B, Kuwata K, *et al.* High-quality sugar production by osgcs1 rice [J]. *Commun Biol*, 2020, 3(1): 617.
- [20] Mamun E A, Alfred S, Cantrill L C, *et al.* Effects of chilling on male gametophyte development in rice [J]. *Cell Biol Int*, 2006, 30(7): 583-591.
- [21] Salinas-Grenet H, Herrera-Vásquez A, Parra S, *et al.* Modulation of auxin levels in pollen grains affects stamen development and anther dehiscence in *Arabidopsis* [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(9): E2480.
- [22] Plackett A R, Thomas S G, Wilson Z A, *et al.* Gibberellin control of stamen development: A fertile field [J]. *Trends Plant Sci*, 2011, 16(10): 568-578.
- [23] Li H, Pinot F, Sauveplane V, *et al.* Cytochrome P450 family member CYP704B2 catalyzes the ω -hydroxylation of fatty acids and is required for anther cutin biosynthesis and pollen exine formation in rice [J]. *Plant Cell*, 2010, 22(1): 173-190.
- [24] Li Y Q, Qin T F, Wei C Y, *et al.* Using transcriptome analysis to screen for key genes and pathways related to cytoplasmic male sterility in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(20): 5120.
- [25] Cui Y W, Hu C, Zhu Y F, *et al.* ClK receptor kinases determine cell fate specification during early anther development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2018, 30(10): 2383-2401.
- [26] Wan L L, Zha W J, Cheng X Y, *et al.* A rice β -1, 3-glucanase gene Osg1 is required for callose degradation in pollen development [J]. *Planta*, 2011, 233(2): 309-323.
- [27] Hou Y N, Guo X Y, Cyprys P, *et al.* Maternal ENODLs are required for pollen tube reception in *Arabidopsis* [J]. *Curr Biol*, 2016, 26(17): 2343-2350.
- [28] Zheng Y Z, Yan J J, Wang S Z, *et al.* Genome-wide identification of the pectate lyase-like (PLL) gene family and functional analysis of two PLL genes in rice [J]. *Mol Genet Genomics*, 2018, 293(6): 1317-1331.
- [29] Tsugama D, Fujino K, Liu S K, *et al.* A GDSL-type esterase/lipase gene, GELP77, is necessary for pollen dissociation and fertility in *Arabidopsis* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 526(4): 1036-1041.
- [30] Hong Y B, Zhang H J, Huang L, *et al.* Overexpression of a stress-responsive NAC transcription factor gene ONAC022 improves drought and salt tolerance in rice [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 4.
- [31] Nakano Y, Yamaguchi M, Endo H, *et al.* NAC-MYB-based transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis in land plants [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 288.
- [32] Li C, Zhao Z F, Liu Y M, *et al.* Comparative transcriptome analysis of isonuclear-alloplasmic lines unmask key transcription factor genes and metabolic pathways involved in sterility of maize CMS-C [J]. *PeerJ*, 2017, 5: e3408.
- [33] Mitsuda N, Seki M, Shinozaki K *et al.* The NAC transcription factors NST1 and NST2 of *Arabidopsis* regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(11): 2993-3006.

[责任编辑 时圣明]