

甜菊自交不亲和及自交亲和无性系自花授粉柱头的荧光显微观察和转录组分析

杨永恒, 张永侠, 张 婷, 徐晓洋, 孙玉明, 王小敏, 佟海英, 原海燕^①

[江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园)江苏省植物资源研究与利用重点实验室, 江苏 南京 210014]

摘要: 为了探究甜菊(*Stevia rebaudiana* Bertoni)自交不亲和的生理和分子机制,以甜菊自交不亲和和无性系‘B4’及自交亲和和无性系‘Z8-42’为研究对象,对2个无性系的自花授粉柱头进行荧光显微观察和转录组分析。荧光显微观察结果显示:‘B4’自花授粉柱头无花粉附着,而‘Z8-42’自花授粉柱头有花粉附着。2个无性系自花授粉柱头转录组整体测序质量较高,共获得43.84 Gb clean data。在组装的51 819个unigene中,表达unigene有49 214个;注释到NR数据库的表达unigene最多(29 523);并且,在NR数据库中,注释到向日葵(*Helianthus annuus* Linn.)同源序列的unigene最多(20 117)。在2个无性系中共筛选到7 560个差异表达unigene;以‘B4’为对照,‘Z8-42’自花授粉柱头中表达量上调的差异表达unigene有3 122个,表达量下调的差异表达unigene有4 438个。GO功能注释和富集分析结果表明:甜菊差异表达unigene的功能包括生物过程、细胞组分和分子功能3个大类47个小类,其中,生物过程大类中富集到信号转导的差异表达unigene最多(225),细胞组分大类中富集到膜部分、膜固有成分和膜组成成分的差异表达unigene非常多(分别为1 700、1 665和1 664),分子功能大类中富集到离子结合的差异表达unigene最多(1 650)。共有1 605个差异表达unigene被注释到KEGG代谢通路的6个大类中,其中,注释到代谢大类的差异表达unigene最多(882),占比为55.0%,分布在10个二级分类的91条代谢通路中。单个代谢通路中,植物-病原体互作通路的差异表达unigene最多(81)。综合上述研究结果,初步判定甜菊自交不亲和和可能发生在柱头与花粉互作的起始阶段,如识别、黏附过程;差异表达unigene引起的柱头细胞信号转导、膜成分、离子结合等功能和结构改变可能是导致供试的2个无性系自交亲和性不同的原因,并且植物-病原体互作通路可能参与柱头和花粉的识别过程,与自交不亲和性密切相关。

关键词: 甜菊; 自交不亲和; 柱头; 差异表达unigene; 荧光显微观察; 转录组分析

中图分类号: Q944.44; Q946-33; S566.9 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2023)04-0025-08
DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2023.04.03

Fluorescence microscopy and transcriptome analysis on self-pollinated stigmas of self-incompatible and self-compatible clones of *Stevia rebaudiana* YANG Yongheng, ZHANG Yongxia, ZHANG Ting, XU Xiaoyang, SUN Yuming, WANG Xiaomin, TONG Haiying, YUAN Haiyan^① [Jiangsu Key Laboratory for the Research and Utilization of Plant Resources, Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences (Nanjing Botanical Garden Mem. Sun Yat-Sen), Nanjing 210014, China], *J. Plant Resour. & Environ.*, 2023, 32(4): 25-32

Abstract: In order to explore the physiological and molecular mechanisms of self-incompatibility of *Stevia rebaudiana* Bertoni, taking self-incompatible clone ‘B4’ and self-compatible clone ‘Z8-42’ of *S. rebaudiana* as research objects, fluorescence microscopy and transcriptome analysis were conducted for self-pollinated stigmas of the two clones. The fluorescence microscopy result shows that there are no

收稿日期: 2023-02-20

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20201243); 江苏省公益类科研院所自主科研项目(JSPKLB202057)

作者简介: 杨永恒(1985—),女,陕西洋县人,博士,助理研究员,主要从事甜菊遗传育种研究。

^①通信作者 E-mail: yuanhaiyan416@163.com

引用格式: 杨永恒, 张永侠, 张 婷, 等. 甜菊自交不亲和及自交亲和无性系自花授粉柱头的荧光显微观察和转录组分析[J]. 植物资源与环境学报, 2023, 32(4): 25-32.

pollens attached to the self-pollinated stigmas of 'B4', while there are pollens attached to the self-pollinated stigmas of 'Z8-42'. The overall transcriptome sequencing quality of self-pollinated stigmas of the two clones is relatively good, and a total of 43.84 Gb clean data are obtained. There are 49 214 expressed unigenes among 51 819 assembled unigenes; the expressed unigenes annotated in NR database are the most (29 523); and in NR database, the unigenes annotated to homologous sequences of *Helianthus annuus* Linn. are the most (20 117). A total of 7 560 differentially expressed unigenes are screened out from the two clones; when taking 'B4' as the control, there are 3 122 differentially expressed unigenes with up-regulated expression and 4 438 differentially expressed unigenes with down-regulated expression in self-pollinated stigmas of 'Z8-42'. The GO functional annotation and enrichment analysis results show that the functions of differentially expressed unigenes of *S. rebaudiana* contain three categories of biological process, cellular component and molecular function and 47 subcategories, in which, differentially expressed unigenes enriched into signal transduction in biological process category are the most (225), a large number of differentially expressed unigenes are enriched into membrane part, intrinsic component of membrane, and integral component of membrane (1 700, 1 665, and 1 664, respectively) in cellular component category, and differentially expressed unigenes enriched into ion binding in molecular function category are the most (1 650). A total of 1 605 differentially expressed unigenes are annotated into six categories of KEGG metabolic pathways, in which, differentially expressed unigenes annotated into metabolism category are the most (882), accounting for 55.0%, and are distributed in 91 metabolic pathways of 10 secondary classifications. In single metabolic pathway, differentially expressed unigenes in plant-pathogen interaction pathway are the most (81). Taken together, it can be preliminarily concluded that self-incompatibility of *S. rebaudiana* may occur at the initial stage of stigma-pollen interaction, such as recognition and adhesion processes; functional and structural variations including stigma cell signal transduction, membrane part, ion binding, etc. caused by differentially expressed unigenes may be the reason of different self-compatibilities of the two test clones, and plant-pathogen interaction pathway may be involved in stigma-pollen recognition process, which is closely associated with self-incompatibility.

Key words: *Stevia rebaudiana* Bertoni; self-incompatibility; stigma; differentially expressed unigene; fluorescence microscopy; transcriptome analysis

甜菊 (*Stevia rebaudiana* Bertoni) 又称甜叶菊, 原产于南美洲, 为菊科 (Asteraceae) 多年生草本植物, 因叶片味甜而得名, 已成为一种新兴的保健型糖料作物^[1-4]。中国是世界上最大的甜菊种植国, 主要在新疆、甘肃、山东、内蒙等地区大规模种植。研究发现, 甜菊具有自交不亲和性^[5], 天然自交结实率极低 (低于 0.4%)^[6], 另外, 虽然甜菊杂交结实率高 (3.0% ~ 74.9%)^[7], 但由于其亲本为杂合体, 杂交后代的株高、叶片大小、花期早晚以及叶片甜菊糖苷组分种类和含量等性状均出现严重的分离现象, 无法满足农业生产对作物品质和农艺性状稳定且一致的要求。因此, 目前 90% 以上的栽培甜菊种苗采用扦插方式繁殖^[8]。然而, 由于甜菊不耐寒, 冬季扦插育苗只能在江苏、安徽等地的设施大棚内进行, 在春季种植时需要将种苗长途运输至北方地区进行人工移栽^[9]。总体来看, 目前甜菊生产存在扦插育苗周期长、机械化程度低、种苗运输成本高且极易传播病虫害等问题。获得性状稳定且一致的甜菊自交系或杂交 F₁ 代种子

是解决上述问题的根本途径。

甜菊普遍具有自交不亲和性, 严重阻碍了甜菊纯合种质培育以及自交系种子或杂交 F₁ 代种子的生产, 制约了甜菊农业规模化、机械化发展。如何克服甜菊的自交不亲和障碍, 培育甜菊纯合亲本是获得性状稳定且一致的甜菊自交系或杂交 F₁ 代种子的关键。目前, 笔者已经筛选到少数甜菊自交亲和和无性系, 如 'Z8' 的自交结实率约 16%^[10], 其自交后代 'Z8-42' 的自交结实率高达 35% (数据为笔者田间统计结果)。为了探究甜菊自交不亲和及自交亲和和种质间差异的产生原因, 克服甜菊自交不亲和障碍以培育更多纯合亲本, 本研究以与 'Z8' 具有相同亲本的自交不亲和和无性系 'B4' 及自交亲和和无性系 'Z8-42' 为研究材料, 对二者分别进行自花授粉, 利用荧光显微镜观察自花授粉柱头差异, 同时对自花授粉柱头进行转录组测序分析, 以期探究甜菊自交不亲和的生理和分子机制, 为克服甜菊的自交不亲和障碍, 加快甜菊纯合种质创制和种子生产等工作提供研究基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试的甜菊自交不亲和无性系‘B4’和自交亲和无性系‘Z8-42’均为江苏省甜菊种质资源库内当年扦插繁殖的植株。于2020年4月将生长状况相近的扦插苗移栽到上口口径15 cm、下口径12 cm、高18 cm的塑料花盆中,栽培基质为V(泥炭):V(珍珠岩)=2:1的混合基质。每个无性系种植3盆,每盆3株。移栽后,置于日光温室内进行培养,室内为自然光,每周浇水1~2次。在同年8月中旬当植株现蕾后将2个无性系植株分别移到不同人工气候箱中单独培养,培养条件均为温度20℃~25℃、光照时间12 h·d⁻¹、光照度10 000 lx。同年9月,当植株进入盛花期时进行自花授粉。

1.2 方法

1.2.1 自花授粉方法 在授粉日上午10:00对2个无性系的所有植株进行自花授粉。具体方法为用毛笔刷取成熟花粉,涂抹在同一植株的所有成熟柱头上。

1.2.2 荧光显微观察 参照舒世珍等^[11]的方法在授粉6 h后将2个无性系自花授粉柱头分别放入FAA固定液(购自武汉赛维尔生物科技有限公司)中过夜,每个无性系至少选取90个柱头。采用苯胺蓝染色法^[12]制片,即先将固定好的柱头用自来水冲洗3~4次,然后置于浓度2 mol·L⁻¹的NaOH溶液中60℃水浴软化5 min,接着用蒸馏水冲洗软化的柱头3次,最后将柱头转入水溶性苯胺蓝溶液(含1 g·L⁻¹苯胺蓝和0.1 g·L⁻¹磷酸二氢钾)中染色20 min。用解剖针将染色柱头挑到载玻片上,使用Leica DM4000荧光显微镜(德国Leica公司)观察并拍照,每个无性系观察10个完整的柱头。

1.2.3 转录组测序分析

1.2.3.1 总RNA提取及文库构建 每个无性系采集3份自花授粉柱头,每份约200 mg,立即放入液氮中速冻,再置于-80℃冰箱中保存。用干冰将样品寄送至上海美吉生物医药科技有限公司进行RNA提取和转录组测序。采用Plant RNA Purification Reagent试剂盒(美国Invitrogen公司)提取自花授粉柱头的总RNA,利用NanoDrop 2000超微量分光光度计(美国Thermo Scientific公司)检测总RNA的浓度和纯度,采用质量体积分数1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测总

RNA的完整性,并利用Agilent 2100生物分析仪(美国Agilent公司)测定总RNA的完整值(RIN)。按照Illumina[®] TruSeq[®] RNA Sample Preparation Kit(美国Illumina公司)中的方法构建文库。

1.2.3.2 测序及数据分析 选择质量合格的文库,采用Illumina NovaSeq 6000测序仪(美国Illumina公司)进行测序。使用在线软件Fastp(<https://github.com/OpenGene/fastp>)对原始测序数据进行质控分析,使用在线软件Trinity(<https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/wiki>)对转录组序列进行组装,使用在线软件TransRate(<http://hibberdlab.com/transrate/>)和CD-HIT(<http://weizhongli-lab.org/cd-hit/>)对组装好的unigene进行过滤、优化和去冗余,使用在线软件BUSCO(<http://busco.ezlab.org>)进行组装质量评估。将转录组测序获得的所有unigene与NR、Swiss-Prot、Pfam、eggNOG、GO和KEGG数据库进行比对和功能注释。使用在线软件RSEM(<http://deweylab.github.io/RSEM/>)分析unigene的表达水平,使用在线软件DESeq2(<http://bioconductor.org/packages/stats/bioc/DESeq2/>)进行unigene差异表达分析,利用美吉云平台对差异表达unigene进行GO和KEGG分类及富集分析。

2 结果和分析

2.1 荧光显微观察

荧光显微观察结果(图1)显示:自交不亲和无性系‘B4’的自花授粉柱头无花粉附着,而自交亲和无性系‘Z8-42’的自花授粉柱头有花粉附着。

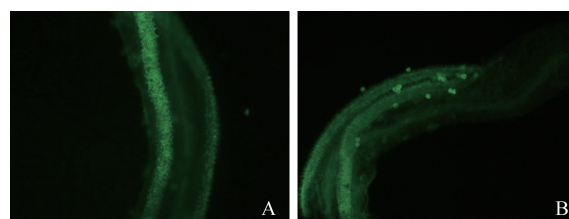


图1 甜菊自交不亲和无性系‘B4’(A)及自交亲和无性系‘Z8-42’(B)自花授粉柱头的荧光显微观察

Fig. 1 Fluorescence microscopy of self-pollinated stigmas of self-incompatible clone ‘B4’ (A) and self-compatible clone ‘Z8-42’ (B) of *Stevia rebaudiana* Bertoni

2.2 转录组测序分析

2.2.1 转录组测序质量和组装结果分析 甜菊自交

不亲和无性系‘B4’及自交亲和无性系‘Z8-42’自花授粉柱头的转录组测序分析结果表明:共测序获得43.84 Gb clean data,各样品的 clean data 为 6.61 ~ 8.15 Gb, Q30 为 94.7% ~ 95.3%, GC 含量为 44.9% ~ 46.4%,表明转录组的整体测序质量较高,获得的测序结果可用于后续生物信息学分析。

将所有样本的 clean data 从头组装,得到 51 819 个 unigene,这些 unigene 的 N50 平均值为 1 772 bp。并且,所有样品的比对率均大于 80%,表明本研究获得的 unigene 测序和组装质量高,可满足后续分析需要。

2.2.2 unigene 功能注释分析 在全部 unigene 中,表达 unigene 有 49 214 个。将全部 unigene 和表达 unigene 分别在 NR、Swiss-Prot、Pfam、eggNOG、GO 和 KEGG 数据库中进行比对。结果显示:共注释到 30 722 个 unigene,占 unigene 总数的 59.3%,其中,注释到 NR 数据库的 unigene 最多,有 30 163 个,占 unigene 总数的 58.2%;注释到 KEGG 数据库的 unigene 最少,有 12 449 个,占 unigene 总数的 24.0%。共注释到 30 055 个表达 unigene,占表达 unigene 总数的 61.1%,其中,注释到 NR 数据库的表达 unigene 同样最多,有 29 523 个,占表达 unigene 总数的 60.0%;注释到 KEGG 数据库的表达 unigene 同样最少,有 12 219 个,占表达 unigene 总数的 24.8%。

在分析注释到 NR 数据库的 unigene 同源序列时发现,E 值极低 ($0 < E < 1 \times 10^{-30}$) 的 unigene 有 24 093 个,占注释 unigene 总数的 79.9%,表明注释到的 unigene 与 NR 数据库的同源序列具有高度相似性。在 NR 数据库中将注释 unigene 与其他植物转录组注释的 unigene 进行同源序列匹配,结果显示:与向日葵 (*Helianthus annuus* Linn.) 同源的 unigene 最多,有 20 117 个,占注释 unigene 总数的 66.7%,表明甜菊与向日葵 unigene 的序列同源性最高;与朝鲜蓟 (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* Linn.)、莴苣 (*Lactuca sativa* Linn.) 和黄花蒿 (*Artemisia annua* Linn.) 同源的 unigene 也较多,分别有 3 373、2 800 和 1 661 个,各占注释 unigene 总数的 11.2%、9.3% 和 5.5%。

2.2.3 差异表达 unigene 分析

2.2.3.1 表达量分析 筛选阈值为 $|\log_2 FC| > 1$ 且 $P\text{-adjust} < 0.05$ 时,共获得 7 560 个差异表达 unigene。以自交不亲和无性系‘B4’自花授粉柱头中 unigene 的表达量为对照,自交亲和无性系‘Z8-42’自花授粉

柱头中表达量上调的 unigene 有 3 122 个,表达量下调的 unigene 有 4 438 个,分别占差异表达 unigene 总数的 41.2% 和 58.7%。

2.2.3.2 GO 功能注释和富集分析 差异表达 unigene GO 功能注释结果表明:共注释到 4 171 个差异表达 unigene,这些差异表达 unigene 的功能包括生物过程、细胞组分和分子功能 3 个大类,并可细分为 47 个小类。注释为生物过程的差异表达 unigene 共有 3 514 个,其中注释为细胞过程和代谢过程的差异表达 unigene 较多,分别有 1 224 和 958 个;注释为细胞组分的差异表达 unigene 共有 4 532 个,其中注释为膜部分和细胞部分的差异表达 unigene 较多,分别有 1 700 和 1 150 个;注释为分子功能的差异表达 unigene 共有 5 027 个,其中注释为结合和催化活性的差异表达 unigene 较多,分别有 2 303 和 2 138 个。

从差异表达 unigene GO 富集分析结果中富集显著性水平排名前 20 ($P\text{-adjust} < 0.5$) 的统计结果(表 1)看,在生物过程大类中,富集到信号转导的差异表达 unigene 最多(225),富集到 DNA 整合的差异表达 unigene 较多(212),占比分别为 5.4% 和 5.1%;在细胞组分大类中,富集到膜部分、膜固有成分和膜组成成分的差异表达 unigene 非常多,分别有 1 700、1 665 和 1 664 个,明显多于富集到其他细胞组分的差异表达 unigene,占比分别为 40.8%、39.9% 和 39.9%;在分子功能大类中,富集到离子结合的差异表达 unigene 最多(1 650),占比为 39.6%,富集到腺苷核糖核苷酸结合和腺苷核糖核苷酸结合的差异表达 unigene 较多(均为 887 个,占比均为 21.3%),富集到其他分子功能的差异表达 unigene 均在 100 个以上。

2.2.3.3 KEGG 代谢通路和富集分析 甜菊自交不亲和无性系‘B4’及自交亲和无性系‘Z8-42’自花授粉柱头转录组中共有 1 605 个差异表达 unigene 被注释到 KEGG 代谢通路中。KEGG 代谢通路分析结果表明:这些差异表达 unigene 注释到代谢、遗传信息处理、生物系统、细胞过程、环境信息处理和人类疾病 6 个大类中,每个大类的差异表达 unigene 分别有 882、258、137、118、117 和 93 个。注释到代谢大类的差异表达 unigene 最多,占比为 55.0%,分别注释到代谢大类的 10 个二级分类的 91 条代谢通路中。值得注意的是,差异表达 unigene 最多的单个代谢通路是生物系统大类的环境适应二级分类中的植物-病原体互作通路,共 81 个差异表达 unigene。

表 1 甜菊自交不亲和及自交亲和无性系自花授粉柱头差异表达 unigene 的 GO 富集结果

Table 1 GO enrichment result of differentially expressed unigenes of self-pollinated stigmas of self-incompatibility and self-compatibility clones of *Stevia rebaudiana* Bertoni

GO ID	功能分类 Functional classification		P -adjust ¹⁾	unigene 数量 Number of unigenes	占比/% Proportion
	小类 Subcategory	大类 Category			
GO:0007165	信号转导 Signal transduction	生物过程 Biological process	8.43×10^{-4}	225	5.4
GO:0009765	光合作用, 光捕获 Photosynthesis, light harvesting	生物过程 Biological process	8.43×10^{-4}	16	0.4
GO:0015074	DNA 整合 DNA integration	生物过程 Biological process	8.43×10^{-4}	212	5.1
GO:0000943	逆转录转座子核衣壳 Retrotransposon nucleocapsid	细胞组分 Cellular component	8.43×10^{-4}	169	4.1
GO:0009523	光系统 II Photosystem II	细胞组分 Cellular component	8.43×10^{-4}	21	0.5
GO:0046906	四吡咯结合 Tetrapyrrole binding	分子功能 Molecular function	8.43×10^{-4}	127	3.0
GO:0043531	ADP 结合 ADP binding	分子功能 Molecular function	8.43×10^{-4}	211	5.1
GO:0016705	氧化还原酶活性, 作用于配对供体, 加入或减少分子氧 Oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	分子功能 Molecular function	8.43×10^{-4}	104	2.5
GO:0020037	血红素结合 Heme binding	分子功能 Molecular function	8.43×10^{-4}	110	2.6
GO:0016773	磷酸转移酶活性, 醇基为受体 Phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor	分子功能 Molecular function	8.43×10^{-4}	506	12.1
GO:0004674	蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性 Protein serine/threonine kinase activity	分子功能 Molecular function	8.43×10^{-4}	254	6.1
GO:0004672	蛋白激酶活性 Protein kinase activity	分子功能 Molecular function	8.43×10^{-4}	478	11.5
GO:0016301	激酶活性 Kinase activity	分子功能 Molecular function	8.43×10^{-4}	568	13.6
GO:0044425	膜部分 Membrane part	细胞组分 Cellular component	8.94×10^{-4}	1 700	40.8
GO:0016021	膜组成成分 Integral component of membrane	细胞组分 Cellular component	8.94×10^{-4}	1 664	39.9
GO:0031224	膜固有成分 Intrinsic component of membrane	细胞组分 Cellular component	8.94×10^{-4}	1 665	39.9
GO:0016772	转移酶活性, 转移含磷基团 Transferase activity, transferring phosphorus-containing groups	分子功能 Molecular function	8.94×10^{-4}	730	17.5
GO:0043167	离子结合 Ion binding	分子功能 Molecular function	1.01×10^{-3}	1 650	39.6
GO:0032559	腺苷核糖核苷酸结合 Adenyl ribonucleotide binding	分子功能 Molecular function	1.04×10^{-3}	887	21.3
GO:0030554	腺苷核苷酸结合 Adenyl nucleotide binding	分子功能 Molecular function	1.04×10^{-3}	887	21.3

¹⁾ P -adjust: 矫正后的 P 值 P -value corrected.

从差异表达 unigene KEGG 富集分析结果中富集显著性水平排名前 20 (P -adjust < 0.05) 的统计结果 (表 2) 看, 生物系统大类的环境适应二级分类中的植物-病原体互作通路富集的 unigene 最多 (81), 占比

为 5.0%; 代谢大类的其他次生代谢物生物合成二级分类中的苯丙烷类生物合成通路富集的 unigene 次之 (49), 占比为 3.1%; 其他代谢通路富集的 unigene 均在 40 个以下。

表 2 甜菊自交不亲和及自交亲和无性系自花授粉柱头差异表达 unigene 的 KEGG 富集结果

Table 2 KEGG enrichment result of differentially expressed unigenes of self-pollinated stigmas of self-incompatibility and self-compatibility clones of *Stevia rebaudiana* Bertoni

分类 Category	通路 ID Pathway ID	通路名称 Pathway name	P -adjust ¹⁾	unigene 数量 Number of unigenes	占比/% Proportion
生物系统 Organismal system					
环境适应 Environmental adaptation	map04626	植物-病原体互作 Plant-pathogen interaction	6.24×10^{-7}	81	5.0
代谢 Metabolism					
其他次生代谢物生物合成 Biosynthesis of other secondary metabolites	map00940	苯丙烷类生物合成 Phenylpropanoid biosynthesis	7.55×10^{-6}	49	3.1
能量代谢 Energy metabolism	map00196	光合作用-天线蛋白 Photosynthesis-antenna proteins	7.96×10^{-6}	17	1.1
糖类代谢 Carbohydrate metabolism	map00040	戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化 Pentose and glucuronate interconversions	1.76×10^{-3}	29	1.8
氨基酸代谢 Amino acid metabolism	map00400	苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成 Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	5.81×10^{-2}	17	1.1

续表2 Table 2 (Continued)

分类 Category	通路 ID Pathway ID	通路名称 Pathway name	P -adjust ¹⁾	unigene 数量 Number of unigenes	占比/% Proportion
脂代谢 Lipid metabolism	map00071	脂肪酸降解 Fatty acid degradation	7.30×10^{-2}	17	1.1
其他氨基酸代谢 Metabolism of other amino acids	map00460	氰基氨基酸代谢 Cyanoamino acid metabolism	1.03×10^{-1}	15	0.9
糖类代谢 Carbohydrate metabolism	map00052	半乳糖代谢 Galactose metabolism	1.86×10^{-1}	18	1.1
能量代谢 Energy metabolism	map00910	氮代谢 Nitrogen metabolism	1.88×10^{-1}	12	0.7
辅助因子和维生素代谢 Metabolism of cofactors and vitamins	map00740	核黄素的新陈代谢 Riboflavin metabolism	1.98×10^{-1}	7	0.4
脂代谢 Lipid metabolism	map00592	α -亚麻酸代谢 α -linolenic acid metabolism	2.21×10^{-1}	16	1.1
萜类和聚酮类代谢 Metabolism of terpenoids and polyketides	map00909	倍半萜类和三萜类生物合成 Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis	2.45×10^{-1}	11	0.7
其他次生代谢物生物合成 Biosynthesis of other secondary metabolites	map00941	类黄酮生物合成 Flavonoid biosynthesis	2.97×10^{-1}	12	0.7
能量代谢 Energy metabolism	map00195	光合作用 Photosynthesis	3.00×10^{-1}	22	1.4
氨基酸代谢 Amino acid metabolism	map00380	色氨酸代谢 Tryptophan metabolism	3.05×10^{-1}	14	0.9
脂代谢 Lipid metabolism	map00073	角质、木栓质和蜡质的生物合成 Cutin, suberine and wax biosynthesis	3.15×10^{-1}	9	0.6
糖类代谢 Carbohydrate metabolism	map00500	淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism	3.68×10^{-1}	33	2.1
聚糖的生物合成和代谢 Glycan biosynthesis and metabolism	map00603	鞘糖脂生物合成-球蛋白和异球蛋白系列 Glycosphingolipid biosynthesis-globo and isoglobo series	3.71×10^{-1}	4	0.2
氨基酸代谢 Amino acid metabolism	map00350	酪氨酸代谢 Tyrosine metabolism	3.76×10^{-1}	14	0.9
脂代谢 Lipid metabolism	map01040	不饱和脂肪酸生物合成 Biosynthesis of unsaturated fatty acids	4.18×10^{-1}	9	0.6

¹⁾ P -adjust: 矫正后的 P 值 P -value corrected.

3 讨论和结论

通常情况下,植物的成熟花粉在散落到柱头上后需要经过附着、吸水、萌发及花粉管伸长等一系列生理过程才能完成受精,任何一个环节发生障碍都不能成功受精。并且,自交不亲和是植物防止自交退化、保持遗传多样性的一种常见的生殖隔离现象^[13-14],目前关于自交不亲和的研究主要集中在十字花科 (*Brassicaceae*)^[15]、茄科 (*Solanaceae*)^[16]、蔷薇科 (*Rosaceae*)^[17-18] 和罂粟科 (*Papaveraceae*)^[19-20] 等植物上。根据遗传方式,植物自交不亲和可分为配子体自交不亲和 (gametophytic self-incompatibility) 和孢子体自交不亲和 (sporophytic self-incompatibility) 2 种类型^[21]。孢子体自交不亲和多见于十字花科、菊科、旋花科 (*Convolvulaceae*) 等植物,目前以十字花科芸薹属 (*Brassica* Linn.) 植物相关研究最多,该属植物的雌蕊和花粉的 S 基因相互作用,导致自花授粉柱头上的花粉粒萌发失败,致使植物自交不亲和^[22-23]。菊科植物普遍存在自交不亲和现象,但关于其自交不亲和的机制却知之甚少。Allen 等^[24-25] 研究表明:菊科千

里光属 (*Senecio* Linn.) 植物的柱头结构与研究较多的十字花科芸薹属植物明显不同,前者属于半干半湿性柱头,后者属于干性柱头,但菊科千里光属植物自交不亲和的分子机制尚不清晰。研究表明:菊花 (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) 的自交不亲和反应部位在雌蕊柱头上,表现为花粉粒黏附少、萌发率低及诱导胼胝质生成,花粉管在柱头上出现各种异常现象很难进入花柱,并且菊花的自交不亲和障碍并不完全,自交结实率为 0%~8%,属于不完全自交不亲和^[26-27]。还有研究发现,菊花的减数分裂过程和花粉育性与自交结实率没有必然联系,少数菊花材料自交结实很可能是 S 基因发生突变或表达差异造成的^[28-29], *CmSRK1* 和 *CmPCP1* 可能分别是菊花雌蕊和花粉的 S 基因,根据这 2 个基因可确定菊花属于孢子体自交不亲和型^[30]。

本研究选择与自交亲和无性系 'Z8' 具有相同亲本但自交不亲和的无性系 'B4' 为对照,将其与 'Z8-42' 进行杂交,结果显示以 'B4' 为母本、'Z8-42' 为父本的结实率为 58%,以 'Z8-42' 为母本、'B4' 为父本的结实率为 60%,表明这 2 个无性系柱头和花粉的功能正常。荧光显微观察结果显示:'B4' 的自花授

粉柱头无花粉附着,而自交亲和无性系‘Z8-42’自花授粉柱头附有花粉,由此推测‘B4’的自交不亲和障碍可能发生在柱头与花粉互作的起始阶段(如识别、黏附过程),而‘Z8-42’自花授粉后花粉可以在柱头上附着可能是促使其自交亲和的关键。

转录组测序分析结果显示:在NR数据库中将甜菊自花授粉柱头的转录组 unigene 与其他植物转录组注释 unigene 的同源序列进行匹配,甜菊与向日葵 unigene 的序列同源性最高,其次是朝鲜蓟、莴苣和黄花蒿,这可能是因为这4种植物和甜菊都属于菊科,因此在生理和分子水平上相似性较高。后期可参考这4种植物的自交不亲和和机制开展破除甜菊自交不亲和障碍的相关研究。

在转录组分析中,GO富集分析常用来寻找差异表达 unigene 引起的功能变化,KEGG富集分析则用于寻找差异表达 unigene 对不同代谢通路的影响。GO富集分析结果表明:生物过程大类中富集到信号转导功能的差异表达 unigene 最多,细胞组分大类中富集到膜部分、膜固有成分和膜组成成分的差异表达 unigene 非常多,而分子功能大类中富集到离子结合功能的差异表达 unigene 最多,推测这些差异表达 unigene 可引起甜菊柱头细胞信号转导、膜成分、离子结合等功能和结构的变化,从而导致供试2个无性系的自交亲和性不同,具体机制有待后续研究。KEGG富集分析结果表明:生物系统大类的环境适应二级分类中的植物-病原体互作通路富集的差异表达 unigene 最多,这与王海静等^[31]的研究结果相似。已有研究表明:花粉和花柱的识别模式类似细菌侵染引起的生物反应^[32],花柱识别自花或异花花粉的机制与植物体区分伤害和外来病原入侵的机制类似,在自交不亲和识别过程中,当外界花粉进入柱头后,柱头中S核糖核酸酶(S-RNase)表达水平的变化可能是植物体的一种防御信号^[33],且有研究者推测植物自交不亲和由病原防御进化而来^[34]。可见,植物-病原体互作通路在植物自交不亲和过程中起重要作用。

综合上述研究结果,初步判定甜菊自交不亲和障碍可能发生在柱头与花粉互作的起始阶段,如识别、黏附过程;差异表达 unigene 引起的柱头细胞信号转导、膜成分、离子结合等功能和结构改变可能是导致供试2个无性系自交亲和性不同的原因,且植物-病原体互作通路可能参与柱头和花粉的识别过程,与自交不亲和性密切相关,这将是今后研究的重点。

参考文献:

- [1] 陈育如,杨凤平,杨帆,等.甜叶菊及甜菊糖的多效功能与健康应用[J].南京师大学报(自然科学版),2016,39(2):56-60.
- [2] SAMUEL P, AYOUB K T, MAGNUSON B A, et al. Stevia leaf to stevia sweetener: exploring its science, benefits, and future potential[J]. The Journal of Nutrition, 2018, 148: 1186S-1205S.
- [3] PETELIUK V, RYBCHUK L, BAYLIAK M, et al. Natural sweetener *Stevia rebaudiana*: functionalities, health benefits and potential risks[J]. EXCLI Journal, 2021, 20: 1412-1430.
- [4] IATRIDIS N, KOUGIOUMTZI A, VLATAKI K, et al. Anti-cancer properties of *Stevia rebaudiana*; more than a sweetener [J]. Molecules, 2022, 27: 1362.
- [5] 袁袭柳,罗庆云,陈思锐,等.聚药雄蕊植物甜叶菊花部特征与繁育特性初步研究[J].中国糖料,2018,40(3):1-6.
- [6] YADAV A K, SINGH S, DHYANI D, et al. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)] [J]. Canadian Journal of Plant Science, 2011, 91(1): 1-27.
- [7] 杨永恒,黄苏珍,佟海英.甜菊不同杂交组合结实率及其F₁代萌发和生长及对NaCl耐性的比较[J].植物资源与环境学报,2012,21(2):73-78.
- [8] 王晨.2018年中国甜菊栽培总面积约27万亩[J].精细与专用化学品,2019,27(8):14.
- [9] 周群喜,杨秋萍.甜叶菊繁育苗技术[J].种子科技,2012,30(5):40-42.
- [10] 杨永恒,侯孟兰,张永侠,等.甜菊自交胚挽救及其自交S₁代的主要性状分析[J].植物资源与环境学报,2018,27(4):81-89.
- [11] 舒世珍,李钦,陈绍裘,等.中国甜菊栽培及应用技术[M].北京:农业出版社,1994:39.
- [12] 胡适宜.植物胚胎学实验方法(五)检查花粉在柱头上萌发和花粉管在花柱中生长的制片法[J].植物学通报,1994,11(2):58-60.
- [13] 刘素玲,赵国建,吴欣,等.植物自交不亲和和机制研究进展[J].中国农业科技导报,2016,18(4):31-37.
- [14] SILVA N F, GORING D R. Mechanisms of self-incompatibility in flowering plants[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2001, 58: 1988-2007.
- [15] NASRALLAH J B. Self-incompatibility in the Brassicaceae: regulation and mechanism of self-recognition[J]. Current Topics in Developmental Biology, 2019, 131: 435-452.
- [16] WILLIAMS J S, WU L, LI S, et al. Insight into S-RNase-based self-incompatibility in *Petunia*: recent findings and future directions[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 41.
- [17] WANG C L, XU G H, JIANG X T, et al. S-RNase triggers mitochondrial alteration and DNA degradation in the incompatible pollen tube of *Pyrus pyrifolia* *in vitro* [J]. The Plant Journal, 2009, 57: 220-229.
- [18] WU J Y, QU H Y, SHANG Z L, et al. Reciprocal regulation of Ca²⁺-activated outward K⁺ channels of *Pyrus pyrifolia* pollen by

- heme and carbon monoxide [J]. *New Phytologist*, 2011, 189: 1060-1068.
- [19] THOMAS S G, FRANKLIN-TONG V E. Self-incompatibility triggers programmed cell death in *Papaver* pollen [J]. *Nature*, 2004, 429: 305-309.
- [20] WHEELER M J, DE GRAAFA B H J, HADJIOSIF N, et al. Identification of the pollen self-incompatibility determinant in *Papaver rhoeas* [J]. *Nature*, 2009, 459: 992-995.
- [21] DOUCET J, LEE H K, GORING D R. Pollen acceptance or rejection: a tale of two pathways [J]. *Trends in Plant Science*, 2016, 21(12): 1058-1067.
- [22] TARUTANI Y, SHIBA H, IWANO M, et al. *Trans*-acting small RNA determines dominance relationships in *Brassica* self-incompatibility [J]. *Nature*, 2010, 466: 983-986.
- [23] TAKASHI T, KEITA S, RIE S-I, et al. Evolution of self-compatibility in *Arabidopsis* by a mutation in the male specificity gene [J]. *Nature*, 2010, 464: 1342-1346.
- [24] ALLEN A M, LEXER C, HISCOCK S J. Characterisation of *sunflower-21* (*SF21*) genes expressed in pollen and pistil of *Senecio squalidus* (Asteraceae) and their relationship with other members of the *SF21* gene family [J]. *Sexual Plant Reproduction*, 2010, 23: 173-186.
- [25] ALLEN A M, THOROGOOD C J, HEGARTY M J, et al. Pollen-pistil interactions and self-incompatibility in the Asteraceae: new insights from studies of *Senecio squalidus* (Oxford ragwort) [J]. *Annals of Botany*, 2011, 108: 687-698.
- [26] 李辛雷, 陈发棣. 菊花自交不亲和性和初步研究 [J]. *武汉植物学* 研究, 2007, 25(6): 591-595.
- [27] 谭素娥, 费江松, 房伟民, 等. 22 份菊属植物自交特性及后代性状分析 [J]. *南京农业大学学报*, 2017, 40(3): 400-407.
- [28] 徐雁飞, 陈发棣, 陈素梅, 等. 5 个菊花品种自交结实特性及减数分裂行为与花粉育性研究 [J]. *西北植物学报*, 2009, 29(3): 469-474.
- [29] 徐雁飞, 陈发棣, 滕年军, 等. 菊花品种自交亲和性鉴定及其授粉后花柱内 3 种保护酶活性的变化 [J]. *园艺学报*, 2009, 36(1): 59-64.
- [30] WANG F, XU S, WU Z, et al. Screening and functional analysis of potential *S* genes in *Chrysanthemum morifolium* [J]. *Ornamental Plant Research*, 2021, 1: 6.
- [31] 王海静, 李明媛, 武军凯, 等. ‘鸭梨’及其自交亲和性芽变‘金坠梨’花粉蛋白质组病原防御相关蛋白表达分析 [J]. *河北科技师范学院学报*, 2018, 32(1): 1-8.
- [32] VAN DOORN W G, WOLTERING E J. Physiology and molecular biology of petal senescence [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(3): 453-480.
- [33] LIU B, MORSE D, CAPPADOCIA M. Compatible pollinations in *Solanum chacoense* decrease both S-RNase and S-RNase mRNA [J]. *PLoS ONE*, 2009, 4(6): e5774.
- [34] KAO T-H, MCCUBBIN A G. How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(22): 12059-12065.

(责任编辑: 佟金凤)

公益宣传：全国生态日

“绿水青山就是金山银山”是习近平生态文明思想核心理念。党的十八大以来,我国生态环境保护发生了历史性、转折性、全局性变化,生态文明建设取得举世瞩目的成就:率先提出和实施生态保护红线制度,推动建设世界上最大的国家公园体系,近十年增加的森林面积约占全球增加的森林面积的四分之一……实践证明:绿水青山既是自然财富、生态财富,又是社会财富、经济财富。

为了更好地学习宣传贯彻习近平生态文明思想,提高全民生态环境保护意识,2023年6月28日,十四届全国人大常委会第三次会议决定将8月15日设立为“全国生态日”,倡导简约适度、绿色低碳的生活方式,拒绝奢华和浪费,增强全民生态环境保护的思想自觉和行动自觉,从而推动我国生态文明建设不断取得新成效。