

芦笋两性花与雄花中发生可变剪接基因的差异分析

黄玲*, 李琼英*, 韦树谷, 赖佳, 代顺冬, 张骞方, 曾华兰, 刘佳, 叶鹏盛**

(四川省农业科学院经济作物育种栽培研究所, 蔬菜种质与品种创新四川省重点实验室, 成都 610300)

摘要: 可变剪接在植物生长发育过程中起着非常重要的作用, 它能使同一个 mRNA 前体生成多种不同的异构体和产生蛋白质多样性。利用 RNA-seq 测序技术分析芦笋两性花蕾与雄花蕾性别分化前期、中期、后期的可变剪接, 从中发掘与两性花及雄花形成密切相关的特有可变剪接。研究结果显示, 在所有试验材料中基因可变剪接均以 3'端可变剪切位点 (3S) 和外显子跳跃 (ES) 类型为主。GO 分析表明, 两性花与雄花在 3 个时期均发生可变剪接的基因主要富集于代谢过程、生物合成以及物质结合相关 GO 条目中。通过 GO 和 KEGG 分析发现, 两性花特有的可变剪接基因主要富集到代谢途径、核糖体蛋白等含氮化合物的生物合成代谢、过氧化物酶体、氧化磷酸化途径等, 其中含氮化合物的生物合成代谢过程和过氧化物酶等抗氧化活性可能与两性花雌蕊的发育相关。雄花蕾特有的可变剪接基因主要富集到代谢途径、次生代谢产物的生物合成和脂肪酸生物合成等脂质代谢过程, 其中脂肪酸生物合成等脂质代谢过程可能与雄花中雌蕊发育有关。

关键词: 芦笋; 两性花; 雄花; 性别分化; 可变剪接

中图分类号: S 644.6

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2019) 08-1503-16

Identification and Difference Analysis of the Alternative Splicing Event in the Hermaphroditic Flowers and Male Flowers of *Asparagus officinalis*

HUANG Ling*, LI Qiongying*, WEI Shugu, LAI Jia, DAI Shundong, ZHANG Qianfang, ZENG Hualan, LIU Jia, and YE Pengsheng**

(Industrial Crops Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences; Vegetable Germplasm Innovation and Variety Improvement Key Laboratory of Sichuan, Chengdu 610300, China)

Abstract: Alternative splicing plays an important role in plant growth and development, which causes the same mRNA precursor for turning into different isoforms and producing protein diversity. To analyze the relationship of alternative splicing of *Asparagus officinalis* L. and the sex differentiation, the alternative splicing occurring in hermaphroditic flower buds and male flower buds were identified using RNA-seq technology. The results showed that a large number of alternative splicing events were identified in hermaphroditic flower buds and male flower buds. The dominated alternative splicing types were the 3'

收稿日期: 2019-05-18; **修回日期:** 2019-07-16

基金项目: 四川省财政创新能力提升工程项目 (2016ZYPZ-007, 2018QNJJ-003)

* 并列第一作者

** 通信作者 Author for correspondence (E-mail: yeps18@163.com)

splice site selection and exon skipping. The GO annotation showed that the shared alternative splicing genes by hermaphroditic flower buds and male flower buds mainly enriched in metabolic processes, biosynthetic process, cellular components and material-associated entries. The results of GO and KEGG analysis showed that the specific alternative splicing genes were significantly enriched in metabolic pathway, nitrogen compound metabolic process, peroxisome and oxidative phosphorylation pathway for hermaphroditic flower buds. The nitrogen compound metabolic process and the activities of antioxidant enzymes were probably related to the development of the asparagus pistil. For male flowers, the specific alternative splicing genes were significantly enriched in metabolic pathways, biosynthesis of secondary metabolites and the lipid metabolic process such as fatty acid biosynthesis. There was a possibility that the lipid metabolic process could lead to the suspension of pistil development in male flowers of asparagus. The results of this study not only provided a theoretical basis for regulating the formation of hermaphroditic flowers, but also for studying deeply the molecular mechanism of sex differentiation and sex determination in *Asparagus officinalis* L.

Keywords: *Asparagus officinalis*; hermaphroditic flower; male flower; sex differentiation; alternative splicing

芦笋 (*Asparagus officinalis* L.) 是典型的雌雄异株植物。一般雌株上只开雌花, 雄株上只开雄花。雄花具有 6 枚健全的雄蕊, 雌蕊发育到一定阶段会发生不完全退化, 但也有极少数雄花的雌蕊不退化, 并能少量结实, 这样的花被称为两性花, 而具有这种花的植株被称为雄性雌型 (XY) 株 (Longo et al., 1996; Mitchell & Diggle, 2005), 简称两性株。

芦笋植株性别不同, 其产量也存在差异。研究者们认为芦笋雄株不结种子而减少了养分的消耗, 因此在相同的生长条件下, 雄株的产量高于雌株 (陈光宇, 2005; Uragami et al., 2016), 为此选育全雄品种已成为全球芦笋育种的重要方向 (周劲松 等, 2010)。芦笋两性株是实现全雄育种的重要资源材料。两性株通过自交或近交 ($XY \times XY \rightarrow 1YY + 2XY + 1XX$), 在其产生的后代群体中存在 1/4 基因型为 YY 的超雄株, 将它作为杂交父本可进行芦笋全雄育种 ($XX \times YY \rightarrow XY$, 后代全部为雄株) (Reamonbuttner & Jung, 2000)。由于两性花的特殊结构, 可以将其作为中间材料用于芦笋花器官发育、性别决定与分化机理的研究。

对于芦笋两性现象的研究主要集中在对两性花的调查和利用方面 (陈光宇 等, 2007; Regalado et al., 2014), 但对其遗传发育的分子机理研究还较少。Ming 等 (2011) 报道芦笋性染色体处于进化的早期阶段, 含有较原始的 X 和 Y 染色体。当性染色体上存在的雄性和雌性控制位点重组受到抑制时, 就会形成发育正常的超雄株和两性株。Harkess 等 (2017) 通过基因组学研究发现, 芦笋的性别是由雄性特异基因 (defective in tapetum development and function 1, *TDF1*) 和雌性抑制基因 (suppressor of female function, *SOFF*) 相互作用, 共同控制性别分化。

也有研究者认为, 芦笋两性株与雄株基因型同为 XY, 但却表现出不一样的雌蕊结构, 可能在两性株体内另外存在着一些性别修饰基因, 它们在某种水平上控制着两性花雌蕊的发育, 影响两性花的形成 (Bracale et al., 1991)。芦笋两性株存在的性别修饰基因主要是促进花柱的伸长和柱头的形成, 这些基因受环境因子的影响。在不同的环境因子下, 花柱的发育程度往往不同 (Galli et al., 1993)。说明两性花发育相关基因的表达容易受环境因子影响。目前参与芦笋两性花形成相关的基因及其表达特点仍不清楚。

可变剪切 (alternative splicing, AS) 是指同一个 mRNA 前体, 通过不同的剪接方式, 产生两个或者更多成熟 mRNA 的转录过程。可变剪接在植物的生长发育过程中发挥重要的调控作用 (Staiger & Brown, 2013; Wang et al., 2016)。Lee 和 Ji (2013) 研究发现开花阻遏因子 *FLOWERING LOCUS M* 通过可变剪接产生一种被称为 FLM- β 的剪接体, 温度的变化会引起这种剪接体表达水平的改变, 从而影响拟南芥开花。在拟南芥开花途径中 *FCA* (flowering time control protein) 基因也通过可变剪接来实现自身的负调控表达, 最终影响开花时间 (Quesada et al., 2014)。刘旦梅等 (2016) 研究发现番茄 *MADS-box* 基因 *Lemads1* 在转录时存在 4 种可变剪接体, 并且它们可能在番茄萼片和果实发育过程中扮演了不同的角色。可变剪接不仅能通过产生不同的蛋白异构体来调节植物的生长发育, 而且有相当一部分转录本由于可变剪接改变了它的可读框, 从而使终止密码子提前产生, 最终进入 NMD (non-sense mediated mRNA decay) 途径降解 (Filichkin et al., 2010)。为了揭示芦笋两性花发育的分子机理,

本研究中通过 RNA-seq 测序技术对芦笋雄花与两性花在性别决定前期、中期、后期的花蕾进行转录组测序分析, 比较了雄花、两性花在 3 个不同发育时期共有和特有的可变剪接基因, 为探索芦笋两性花及雄花发育的遗传调控机理提供新的视角, 进而为促进芦笋两性花的形成及全雄品种的培育奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为 3 年生芦笋品种 ‘冠军’, 种植于四川省农业科学院经济作物育种栽培研究所试验基地。选取 2016 年调查结果显示为自交结实的两性株作为研究材料。2017 年春季萌芽, 嫩茎侧枝展开现蕾后, 再结合形态学和解剖学观察 (陈光宇等, 2007), 分别取雄株、两性株发育至性别决定前期、中期、后期的花蕾 [长度分别为 (0.7 ± 0.1) 、 (1.5 ± 0.1) 和 (2.0 ± 0.1) mm], 液氮速冻, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.2 RNA 提取、文库构建和测序

RNA-seq 文库构建及测序均委托深圳华大基因研究院进行。采用植物总 RNA 提取试剂 TRIzol (购于 Invitrogen 公司) 提取芦笋花 (蕾) 总 RNA, 通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳和 Agilent 2100 检测 RNA 的浓度和质量。对质检合格的 RNA 样品, 用带有 Oligo (dT) 的磁珠与芦笋 mRNA 的 polyA 尾进行 A-T 配对, 从而富集 mRNA; 然后反转录合成 cDNA。在反转录酶作用下, 采用六碱基随机引物, 合成第 1 条 cDNA 链。再加入缓冲液、RNase H 和 DNA polymerase I、dNTPs 合成第 2 条 cDNA 链。这时双链 cDNA 结构为粘性末端, 需修复成平末端。随后在 3' 末端加 A 尾并连接测序接头。质检合格的文库用 Hi Seq X10 进行高通量测序。

1.3 数据分析

1.3.1 可变剪接事件鉴定

通过测序平台得到原始数据以后, 首先对这些数据进行质量控制, 去除低质量和污染的序列。然后采用软件 HISAT2 将质控后的高质量数据序列与参考芦笋基因组进行序列比对 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Asparagus+officinalis+L.>)。使用 rMATs 软件对 RNA-seq 的数

据进行可变剪切分析，该软件可分析单样本的可变剪切，也可同时分析样本之间的差异可变剪切，主要分析可变剪切事件的类型：外显子跳跃 (exon skipping, ES)、内含子滞留 (intron retention, IR)、5'端可变剪切位点 (Alternative 5' splice site, 5S)、3'端可变剪切位点 (Alternative 3' splice site, 3S) 和互斥外显子 (Mutually exclusive Exon, MXE)。

1.3.2 发生可变剪接基因的功能注释及富集分析

采用 rMATS 软件分析了雄花与两性花 3 个时期共有和特有的可变剪接，同时分析了同种花在 3 个不同发育时期共有及特有的可变剪接。应用 TermFinder 软件获得包括分子功能、生物学过程和细胞构成等类别内的 GO 注释编号。利用在线工具 (<http://www.omicshare.com/tools/Home/Soft/gogsea>) 对样本共有或特有的可变剪接基因分别进行功能富集分析。并对 P 值进行校正，校正后的 $P \leq 0.05$ 时，则定义该基因集在此 GO 项为显著富集。再将发生可变剪切的 DEGs 注释到 KEGG 数据库 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes)，分析 DEGs 的代谢通路。

2 结果与分析

2.1 测序质量分析

通过分析碱基的组成和质量值分布可以控制原始数据的质量。以芦笋两性花与雄花分化前期、中期和后期的花蕾作为转录组测序样品，建立了芦笋两性花与雄花 3 个时期的转录组数据库，所有样品测序所得原始数据 Q30 值均达到 89% 以上 (表 1)，可见本次测序质量较好。

表 1 芦笋花蕾样品测序数据质量的统计
 Table 1 Statistical analysis of RNA-seq data

样品 Sample	发育时期 Developmental stage	纯净的数据 Clean data	Q20 比例/% Data Q20	Q30 比例/% Data Q30	GC 比例/% GC content
两性花 The hermaphroditic flower	前期 Early stage	41 268 364	95.56	89.43	47.35
	中期 Middle stage	40 476 374	95.42	89.17	46.73
	后期 Late stage	41 391 758	95.79	89.89	47.00
雄花 The male flower	前期 Early stage	41 121 396	95.47	89.33	47.51
	中期 Middle stage	41 124 500	95.50	89.20	46.96
	后期 Late stage	41 502 982	95.88	90.09	46.85

2.2 芦笋雄花、两性花可变剪接事件类型鉴定

通过质控芦笋两性花和雄花转录组数据，得到质量较好的数据。通过 rMATS 软件分析可变剪接 (图 1)，发现芦笋两性花与雄花在发育的 3 个关键时期发生可变剪接的各个类型中以 3'端可变剪切位点 (3S) 和外显子跳跃 (ES) 为主要类型，这两种类型共占总可变剪切数的一半以上，其次是 5'端可变剪切位点 (5S)，数量最少的类型是外显子互斥 (MXE)。

发现可变剪接的基因数量 (图 1) 在两性花性别分化前期最多，在雄花中也是前期多于后两个时期，说明芦笋两性花与雄花基因出现可变剪接事件比较活跃的时期都是在花器官发育早期。

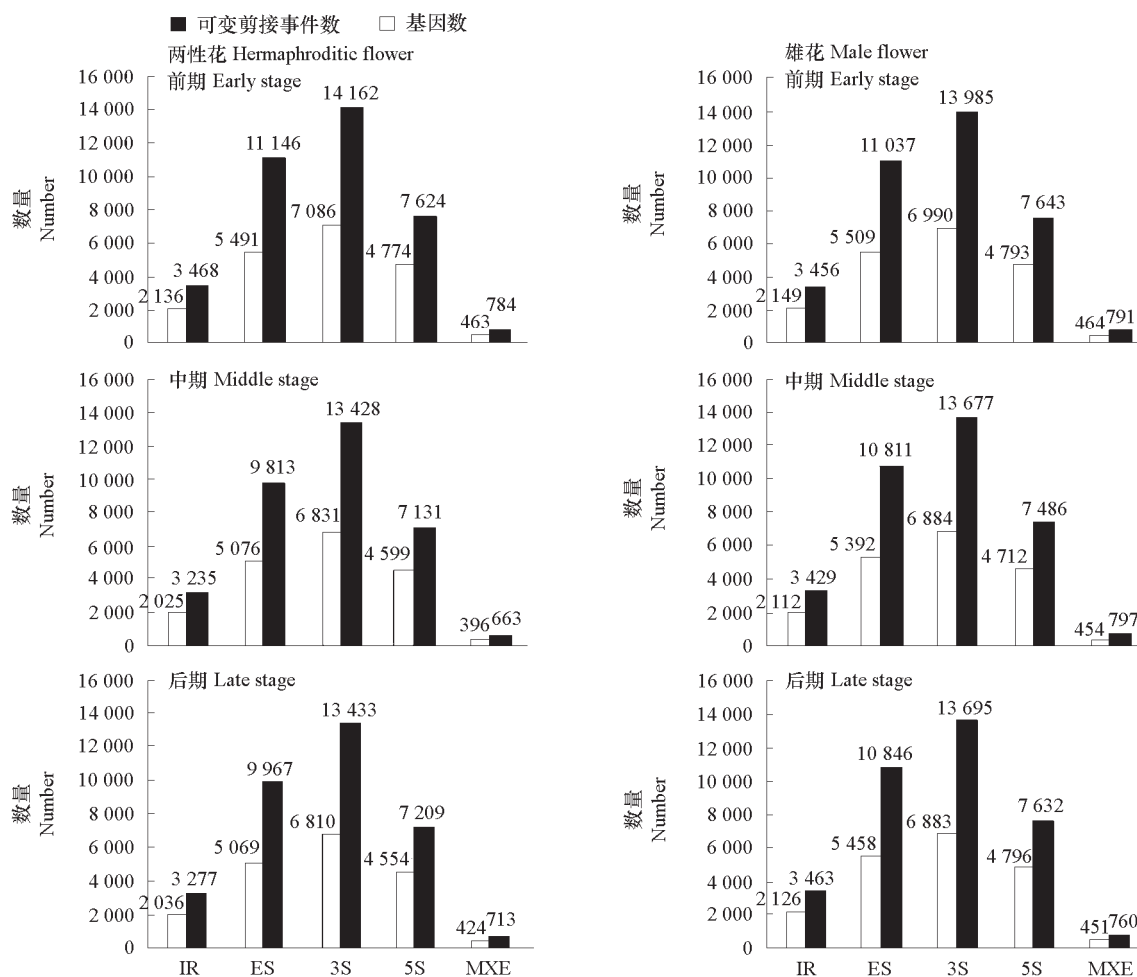


图1 芦笋两性花与雄花前期、中期和后期鉴定出的可变剪接事件

3S: 3'端可变剪切位点; ES: 外显子跳跃; IR: 内含子滞留; 5S: 5'端可变剪切位点; MXE: 外显子互斥。

Fig. 1 Alternative splicing events in the early, middle and late stages of hermaphroditic flowers and male flowers

3S: Alternative 3' splice site; ES: Exon skipping; IR: Intron retention; 5S: Alternative 5' splice site; MXE: Mutually exclusive exon.

2.3 芦笋两性花、雄花特有与共有可变剪接基因数量分析

通过分析芦笋两性花、雄花发育前期、中期和后期花蕾中可变剪接事件的共有性和特异性 (图2) 发现, 这两种花在其不同发育时期发生的可变剪接事件的总数存在差异, 并且不同时期各类型可变剪接的基因数不完全相同。

在两性花中, 3个发育时期均发生了可变剪接事件的基因有8583个, 占发生可变剪接基因总数(12846个)的66.81%。前期和中期、中期和后期、前期和后期共有的基因数分别为696、570和687个; 前期、中期和后期特有的基因数分别为876、715和719个, 以前期特有可变剪接基因数量最多, 说明芦笋两性花发育过程中可变剪接事件主要发生在性别分化早期, 这些基因很可能与两性花性别分化有关。

在雄花的3个发育时期均发生了可变剪接事件的基因有8701个, 占发生可变剪接基因总数

12 929 个的 67.30%。前期和中期、中期和后期及前期和后期共有的基因数分别为 669、644、668 个；前期、中期、后期特有的基因数分别为 752、709 和 766 个，以前期与后期特有可变剪接基因数量较多。在前期出现较多的特有可变剪接基因可能与雄花性别决定有关，而在后期特有可变剪接基因数量较多可能与后期启动雌蕊退化有关。

在芦笋两性花与雄花发育的 3 个时期中都发生可变剪接事件的基因有 7 651 个，占整个可变剪接基因的 79.41%。两性花中特有的基因数量为 932 个，雄花中特有的基因数量为 1 050 个，分别占 9.67%和 10.92%。

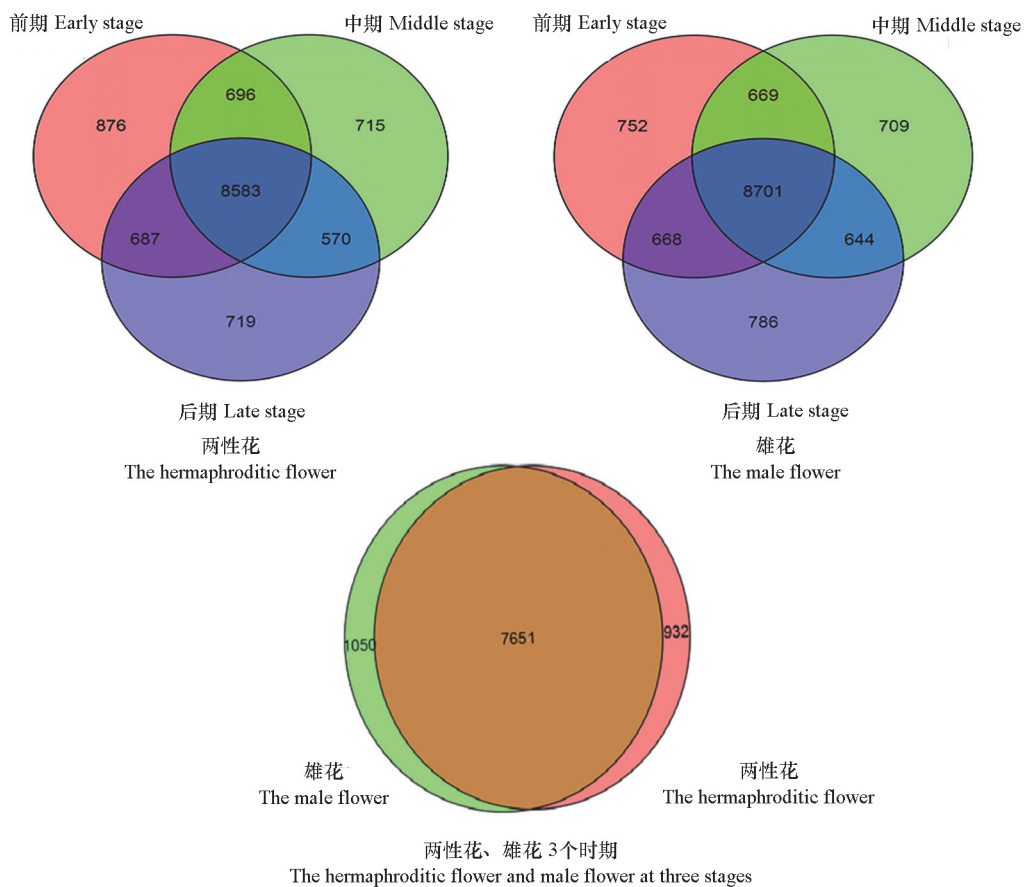


图 2 芦笋雄花、两性花中共有与特有的可变剪接基因数

Fig. 2 The number of common or specific alternative splicing genes between hermaphroditic flower buds and male flower buds

2.4 芦笋两性花与雄花共有的可变剪接基因 GO 注释与 KEGG 功能富集分析

2.4.1 GO 注释

对芦笋两性花与雄花 3 个时期中共有可变剪接基因（7 651 个）进行 GO 功能富集分析，主要涉及 GO 功能分类体系中的生物学过程、细胞组分、分子功能。其中显著富集在生物学过程的有 380 项、细胞组分为 234 项、分子功能有 99 项。选择显著富集基因最多的前 50 个条目作图（图 3）。

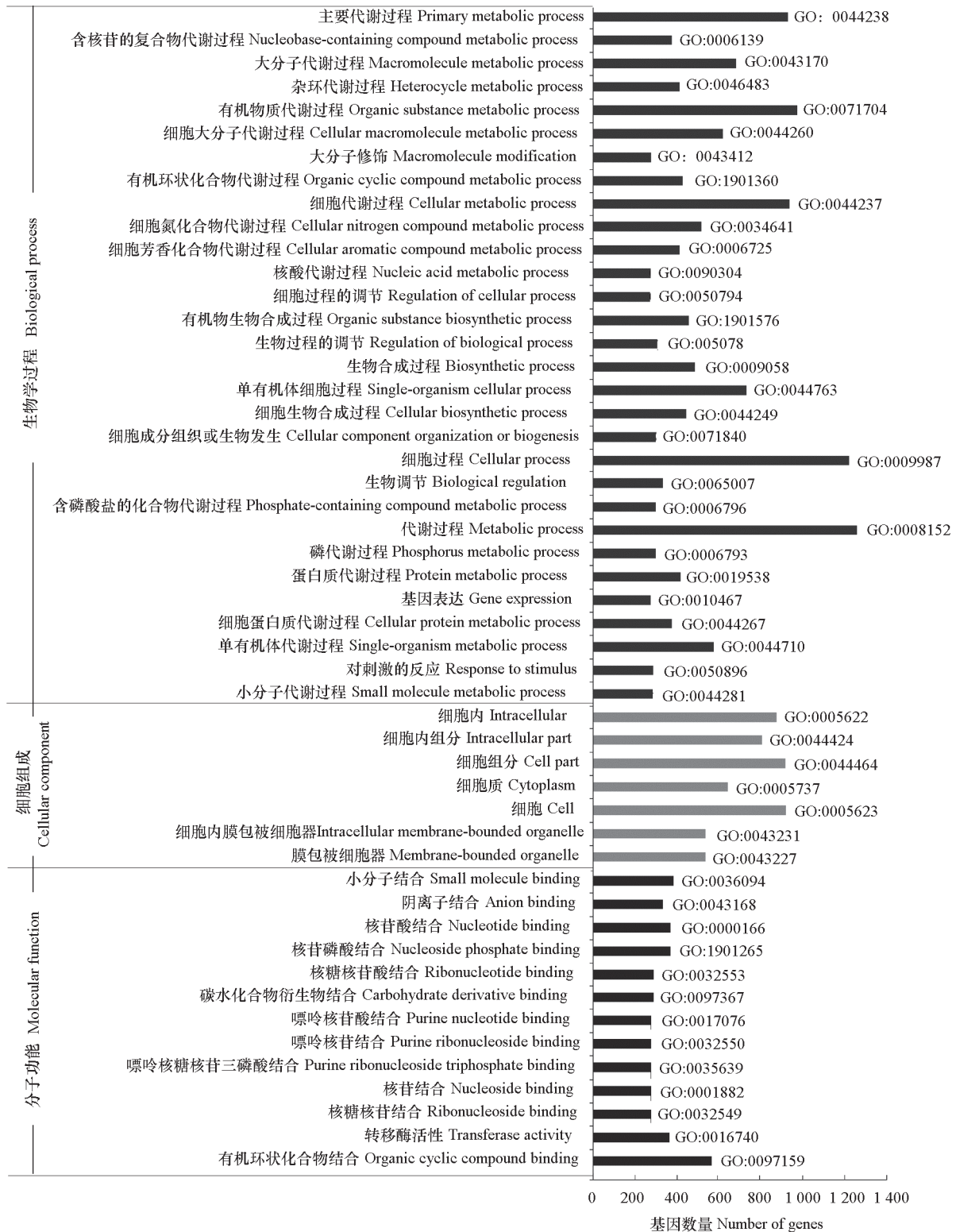


图3 芦笋两性花与雄花共有可变剪接基因显著富集的前50个GO条目

Fig. 3 The top 50 GO enrichment of the shared alternative splicing genes by hermaphroditic flowers and male flowers

在生物学过程中，大多数基因主要富集到了代谢过程（有机物质代谢过程、大分子代谢过程、蛋白质代谢过程等）、细胞过程（细胞代谢过程、细胞生物合成过程）和生物调节相关的 GO 条目中。在细胞组分中，主要以细胞、细胞组分为主。在分子功能中，以物质结合为主，如小分子结合、核糖核苷酸结合、阴离子结合等。

2.4.2 KEGG 功能富集分析

将芦笋两性花与雄花中共有可变剪接基因比对到 KEGG 数据库中，共富集到 131 条代谢通路。以 $P\text{-value} \leq 0.05$ 为标准，筛选共有可变剪接基因显著富集的代谢通路，共 17 条（表 2），结果表明显著富集基因最多的是 RNA 转运，其次是氨基酸的生物合成，还有较多的基因显著富集到碳代谢、泛素介导的蛋白水解、半胱氨酸和蛋氨酸代谢等通路。

表 2 芦笋两性花与雄花中共有可变剪接基因显著富集的通路
Table 2 The significantly enriched KEGG pathway with DEGs common in hermaphroditic and male flowers

通路登录号 Pathway ID	代谢通路注释 Pathway annotation	基因数 Numbers of DEGs	P-value
ko01230	氨基酸的生物合成 Biosynthesis of amino acids	186	0.00420
ko00562	磷酸肌醇代谢 Inositol phosphate metabolism	58	0.00447
ko01210	2-氧羧酸代谢 2-Oxocarboxylic acid metabolism	58	0.00447
ko00970	氨酰 tRNA 生物合成 Aminoacyl-tRNA biosynthesis	68	0.00651
ko00563	糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 锚的生物合成 Glycosylphosphatidylinositol (GPI) -anchor biosynthesis	25	0.00945
ko00280	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解 Valine, leucine and isoleucine degradation	43	0.01531
ko01200	碳代谢 Carbon metabolism	193	0.01664
ko00630	乙醛和二羧酸代谢 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	61	0.01819
ko00072	酮体的合成与降解 Synthesis and degradation of ketone bodies	7	0.01925
ko00071	脂肪酸降解 Fatty acid degradation	28	0.02354
ko04070	磷脂酰肌醇信号系统 Phosphatidylinositol signaling system	52	0.02864
ko04120	泛素介导的蛋白水解 Ubiquitin mediated proteolysis	124	0.03320
ko00650	丁酸盐代谢 Butanoate metabolism	22	0.03371
ko00920	硫代谢 Sulfur metabolism	25	0.04189
ko03013	RNA 转运 RNA transport	344	0.04423
ko00300	赖氨酸生物合成 Lysine biosynthesis	21	0.04535
ko00270	半胱氨酸和蛋氨酸代谢 Cysteine and methionine metabolism	68	0.04560

2.5 芦笋雄花特有可变剪接基因 GO 注释与 KEGG 功能富集分析

2.5.1 GO 注释

芦笋雄花特有可变剪接基因有 1 050 个。对其进行 GO 分析，选择显著富集基因最多的前 50 个条目作图（图 4）。

在生物学过程中，涉及代谢过程的 GO 条目较多，其中包括脂质代谢过程、有机物分解代谢过程、小分子代谢过程和有机酸代谢过程等。细胞组分中主要集中在细胞内组分、细胞器组分、大分子复合物和细胞质基质组分等项。在分子功能中主要以物质结合为主，如 ATP 结合、嘌呤核苷结合、离子结合等。

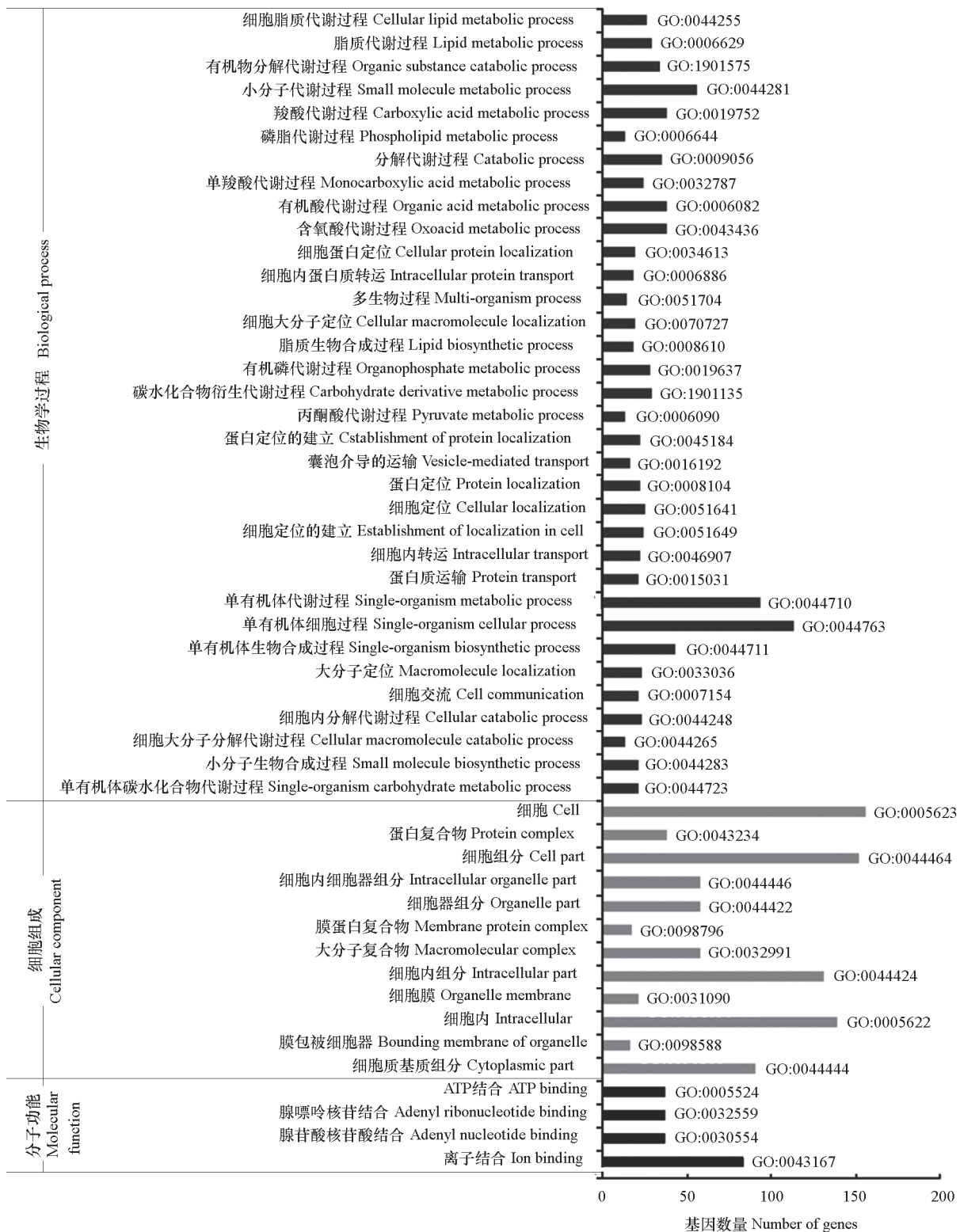


图4 芦笋雄花特有可变剪接基因显著富集的前50个GO条目

Fig. 4 The top 50 GO enrichment of alternative splicing genes specific for the male flowers

2.5.2 KEGG 功能富集分析

为了研究雄花发育的机理，将雄花特有可变剪接基因比对到 KEGG 数据库中，共富集到 123 条代谢通路。以 $P\text{-value} \leq 0.05$ 为标准，筛选特有可变剪接基因显著富集的代谢通路，共 18 条（表 3），结果表明显著富集基因最多的是代谢途径，其次是次生代谢产物的生物合成，还有 3 类代谢与脂质相关，包括甘油磷脂代谢、磷脂酰肌醇信号和脂肪酸生物合成等。

表 3 芦笋雄花特有可变剪接基因显著富集的代谢通路
Table 3 The significantly enriched KEGG pathway with DEGs only in male flowers

通路登录号 Pathway ID	代谢通路注释 Pathway annotation	基因数 Numbers of DEGs	$P\text{-value}$
ko01100	代谢途径 Metabolic pathways	245	4.49E-06
ko01230	氨基酸的生物合成 Biosynthesis of amino acids	37	0.00068
ko01110	次生代谢产物的生物合成 Biosynthesis of secondary metabolites	125	0.00151
ko00053	抗坏血酸和醛酸代谢 Ascorbate and aldarate metabolism	10	0.00846
ko00340	组氨酸代谢 Histidine metabolism	5	0.00866
ko00061	脂肪酸生物合成 Fatty acid biosynthesis	9	0.01229
ko00052	半乳糖代谢 Galactose metabolism	15	0.01371
ko03040	剪接体 Spliceosome	41	0.01542
ko00780	生物素代谢 Biotin metabolism	5	0.01898
ko00900	萜类骨架生物合成 Terpenoid backbone biosynthesis	10	0.02353
ko00100	类固醇生物合成 Steroid biosynthesis	6	0.02716
ko00592	α -亚麻酸代谢 α -Linolenic acid metabolism	8	0.03301
ko00051	果糖和甘露糖代谢 Fructose and mannose metabolism	12	0.03840
ko00010	糖酵解/糖异生 Glycolysis / Gluconeogenesis	18	0.03949
ko00330	精氨酸和脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism	7	0.03995
ko00740	核黄素代谢 Riboflavin metabolism	3	0.04112
ko00564	甘油磷脂代谢 Glycerophospholipid metabolism	14	0.04184
ko04070	磷脂酰肌醇信号 Phosphatidylinositol signaling	10	0.04234

2.6 芦笋两性花特有可变剪接基因 GO 注释与 KEGG 功能富集分析

2.6.1 GO 注释

芦笋两性花特有可变剪接基因有 932 个，对其进行 GO 分析，选择显著富集基因最多的前 50 个条目作图（图 5）。

在生物学过程中，两性花特有可变剪接基因主要富集到了代谢过程中，其中以含氮化合物的生物合成及代谢过程为主，其次还有对应激的反应，特别是氧化应激应答及氧化还原过程。

细胞组分中主要集中在细胞组分、膜及膜组分、大分子复合物和细胞质等相关的 GO 条目中。

在分子功能中以催化活性（结构分子活性、抗氧化活性、过氧化物酶活性、超氧化物歧化酶活性）相关的 GO 条目为主。

2.6.2 KEGG 功能富集分析

为了研究雄花发育的机理，将两性花特有可变剪接基因比对到 KEGG 数据库中，共富集到 115 条代谢通路。以 $P\text{-value} \leq 0.05$ 为标准，筛选 DEGs 显著富集的代谢通路，共 13 条（表 4）。结果表明显著富集基因最多的是代谢途径，其次是核糖体。还有一些氨基酸生物合成代谢途径和过氧化物酶体、氧化磷酸化途径等。

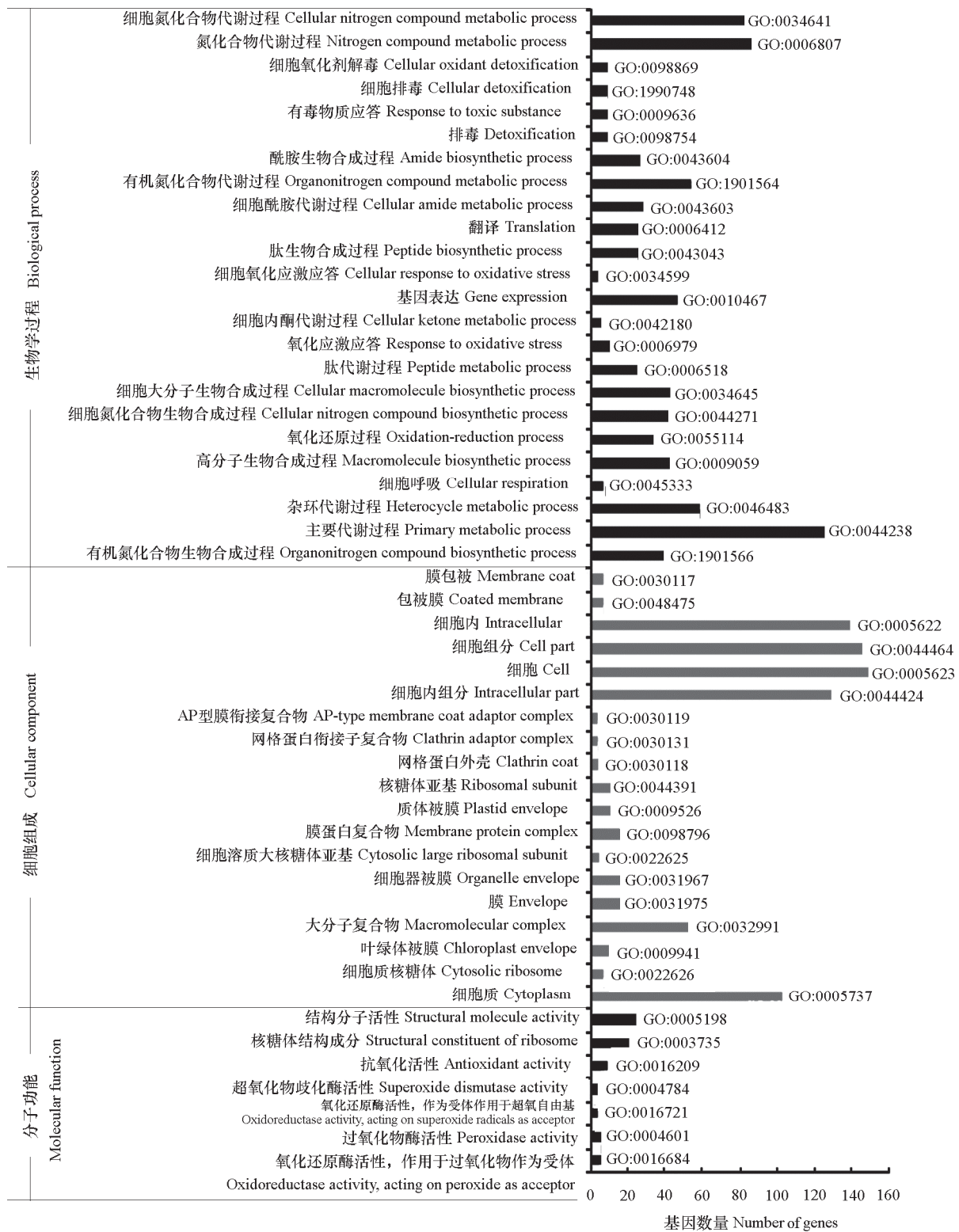


图5 芦笋两性花特有可变剪接基因显著富集的前50个GO条目

Fig. 5 The top 50 GO enrichment of alternative splicing genes specific for the hermaphroditic flowers

表 4 芦笋两性花特有可变剪接基因显著富集的代谢通路

Table 4 The significantly enriched KEGG pathway with DEGs only in the hermaphroditic flowers

通路登录号 Pathway ID	代谢通路注释 Pathway annotation	基因数 Number of DEGs	P-value
ko00520	氨基酸和核苷酸糖代谢 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	27	3.55E-05
ko03010	核糖体 Ribosome	37	0.00E+00
ko00052	半乳糖代谢 Galactose metabolism	17	0.00080
ko04146	过氧化物酶体 Peroxisome	15	0.00130
ko04122	硫中继系统 Sulfur relay system	4	0.00610
ko00960	莨菪烷、哌啶和吡啶生物碱的生物合成 Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis	6	0.00642
ko00250	丙氨酸, 天门冬氨酸和谷氨酸代谢 Alanine, aspartate and glutamate metabolism	10	0.00960
ko03050	蛋白酶体 Proteasome	8	0.01363
ko00290	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成 Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	6	0.01400
ko00061	脂肪酸生物合成 Fatty acid biosynthesis	8	0.01675
ko04145	吞噬体 Phagosome	11	0.02839
ko01100	代谢途径 Metabolic pathways	186	0.04034
ko00190	氧化磷酸化 Oxidative phosphorylation	12	0.05004

3 讨论

可变剪接是植物体内基因表达过程中一种重要的调控机制。通过可变剪接把同一个 mRNA 前体剪接成不同的 mRNA 剪接异构体, 从而增加蛋白质的多样性 (Yu et al., 2016)。已有研究表明, 可变剪接在植物的各个组织器官及发育过程中都起着重要作用 (Thatcher et al., 2016)。在可变剪接调控植物花发育的研究中, 林长发等 (2003) 发现 *LON* 基因的可变剪接只在水稻野败型细胞质雄性不育系 ‘珍汕 97A’ 的成花组织中发生, 在不育系的根、叶和两个可育品系中均未检测到, 推测 *LON* 基因的可变剪接可能与该不育系花粉败育有关。本研究中利用 RNA-seq 测序技术分析芦笋两性花 (XY) 与雄花 (XY) 性别分化前期、中期、后期的可变剪接基因。结果表明, 在两性花与雄花发育的 3 个时期中, 均以前期鉴定出的可变剪接基因数多于后两个时期, 说明可变剪接事件在芦笋两性花与雄花性别分化过程中起着重要作用。3 个时期中两性花与雄花共有的可变剪接基因主要富集于代谢过程、生物合成、细胞组分以及物质结合等相关 GO 条目中。已有研究表明, 代谢过程、生物合成、细胞组分相关的 GO 条目与花发育密切相关 (侍婷, 2014; 刘锴栋 等, 2018)。进一步说明可变剪接在芦笋两性花和雄花的发育过程发挥着非常重要的作用。

本研究中通过 GO 和 KEGG 分析了芦笋两性花特有的可变剪接基因, GO 分析发现其富集到含氮化合物的生物合成代谢过程、细胞组分、大分子复合物、抗氧化活性、过氧化物酶活性等相关的 GO 条目中; KEGG 分析发现, 其显著富集到代谢途径、核糖体、过氧化物酶体、氧化磷酸化途径等。核糖体是细胞内遗传物质翻译, 合成蛋白质的重要场所, 其自身含有 71~89 种核糖体蛋白 (靳聪聪 等, 2018), 是一种重要的含氮物质。因此推测, 含氮化合物的生物合成代谢过程可能与芦笋两性花雌蕊的发育相关。在众多的植物成花理论中, 碳氮比理论认为, 碳氮比控制着花芽的分化 (Grasmanis et al., 1967; 张建铭 等, 1999), 并且碳氮比对植物花性别的分化有较大的影响。肖华山等 (2002) 研究了碳氮比与荔枝雄蕊和雌蕊分化的关系, 发现碳氮比较小有利于雌蕊分化, 反之则有利于雄蕊分化, 即较高含量的氨基酸有利于雌蕊分化。李利红和连艳鲜 (2007) 研究了氨基酸含量与杏花雌蕊发育之间的关系, 结果表明在雌蕊发育较好的品种中, 氨基酸含量高。本研究发现芦笋两性花特有的可变剪接基因富集到含氮化合物生物合成代谢过程的 GO 条目中, 说明可变剪

接可能通过调节这些基因的表达影响芦笋两性花的碳氮比值, 进而在两性花雌蕊的生长和发育过程中发挥作用。这一推论与刘孟等 (2015) 发现高水平含氮化合物多胺与雌性器官发育相关的结果一致。除了碳氮比理论之外, 过氧化物酶也被认为与植物的性别分化有关 (应振土和李曙轩, 1990), 并且过氧化物酶及同工酶被作为一种重要的遗传标记广泛运用于植物性别的鉴定 (马丽媛等, 2013; 焦培培等, 2017)。已有研究发现, 银杏 (温银元等, 2010)、黄连木 (马丽媛等, 2013)、青钱柳 (王子坚, 2013)、黄瓜 (艾辛等, 2000) 等植物不同性别间过氧化物酶同工酶存在差异。芦笋雌雄株体内的过氧化物酶同工酶也存在较大差异 (洪达等, 2008; 李霞等, 2009), 推测芦笋性别差异与过氧化物酶同工酶相关 (范双喜和宋学锋, 1995)。但前人的研究基本都是基于雌雄株的酶谱差异分析, 对过氧化物酶基因的表达及转录组水平的调控情况还未见报道。本研究中利用 RNA-seq 测序技术结合生物信息学手段发现了芦笋两性花中特有的过氧化物酶、超氧化物歧化酶等抗氧化酶基因的可变剪接事件, 说明这些抗氧化酶基因的特有可变剪接可能影响了芦笋两性花中抗氧化酶活性, 最终调控了两性花中雌蕊的发育。

本研究中发现芦笋雄花特有的可变剪接基因富集到脂质代谢过程、有机物分解代谢过程、ATP 结合等相关的 GO 条目中。其中脂质代谢过程可能与芦笋雄花中雌蕊停止发育有关。通过 KEGG 分析发现雄花特有的可变剪接基因富集到脂质代谢相关通路有甘油磷脂代谢、磷脂酰肌醇信号和脂肪酸生物合成等。已有研究发现甘油磷脂、磷脂酰肌醇等脂类物质均与拟南芥花的发育有关 (莫萍丽, 2006; 李晓川, 2011)。侍婷 (2014) 研究发现脂肪酸的代谢与果梅雌蕊发育有着密切关系。刘孟等 (2016) 通过分析芦笋雌花、雄花、雄性两性花的差异表达蛋白发现脂质相关蛋白与芦笋雌性器官发育相关。本研究与上述结果一致。因此推测雄花中特有的脂质代谢基因的可变剪接可能改变了其编码蛋白质的结构与功能, 从而影响了芦笋雄花的发育。

综上所述, 通过 RNA-Seq 技术, 初步明确了芦笋两性花、雄花 3 个发育阶段基因的可变剪接情况, 发现芦笋两性花与雄花的发育过程中主要以生物合成与物质代谢过程为主, 而含氮化合物的生物合成代谢与抗氧化酶基因的可变剪接则在芦笋两性花雌蕊发育中起重要作用, 脂质代谢相关基因的可变剪接可能与雄花中雌蕊退化相关。本研究结果为全面揭示芦笋性别分化的调控机制积累了理论依据。

References

- Ai Xin, Zhu Lili, Shu Lihui, Tao Xiaoming, He Guangcun. 2000. Correlation of sex expression and three oxidase isozyme in cucumber plant (*Cucumis sativus* L.). *Plant Science Journal*, 18 (3): 184 - 188. (in Chinese)
- 艾辛, 祝莉莉, 舒理慧, 陶晓明, 何光存. 2000. 黄瓜植株性别表现与 3 种氧化酶同工酶的关系. *植物科学学报*, 18 (3): 184 - 188.
- Bracale M, Caporali E, Galli M, Longo C, Marziani-Longo G, Rossi G, Spada A, Soave C, Falavigna A, Raffaldi F. 1991. Sex determination and differentiation in *Asparagus officinalis* L. *Plant Science*, 80 (1 - 2): 67 - 77.
- Chen Guangyu. 2005. *Asparagus* pollution-free production technology. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- 陈光宇. 2005. 芦笋无公害生产技术. 北京: 中国农业出版社.
- Chen Guangyu, Zhou Jinsong, Tang Yongping, Luo Shaochun, Zhan Fengxi, Yin Fuqiang. 2007. Investigation and preliminary utilization of hermaphroditic plants of asparagus. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 19 (9): 31 - 34. (in Chinese)
- 陈光宇, 周劲松, 汤泳萍, 罗绍春, 占丰溪, 尹富强. 2007. 芦笋两性株调查与初步利用研究. *江西农业学报*, 19 (9): 31 - 34.
- Fan Shuangxi, Song Xuefeng. 1995. Relationship between sex and isozymes of peroxidase in asparagus plants. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 10 (2): 67 - 71. (in Chinese)

- 范双喜, 宋学锋. 1995. 石刁柏性别表现与同工酶的关系. 华北农学报, 10 (2): 67 - 71.
- Filichkin S A, Priest H D, Givan S A, Shen R, Bryant D W, Fox S E, Wong W K, Mockler T C. 2010. Genome-wide mapping of alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. Genome Research, 20 (1): 45 - 58.
- Galli M G, Falavigna A, Raffaldi F, Savini C, Vigo A. 1993. Different kinds of male flowers in the dioecious plant *Asparagus officinalis* L. Sexual Plant Reproduction, 6 (1): 16 - 21.
- Grasmanis V O, Leeper G W. 1967. Ammonium nutrition and flowering of apple trees. Australian Journal of Biological Sciences, 20 (4): 761 - 768.
- Harkess A, Zhou J S, Xu C Y, Bowers J E, Van der Hulst R, Ayyampalayam S, Mercati F, Riccardi P, Mckain M R, Kakrana A, Tang H B, Ray J, Groenendijk J, Arikiti S, Mathioni S M, Nakano M, Shan H, Alexa T R, Kanno A, Zhen Y, Chen H X, Li W Q, Chen Y L, Xu X Y, Zhang Y P, Luo S C, Chen H L, Gao J M, Mao Z C, Pires J C, Luo M Z, Kudrna D, Wing R A, Blake C M, Yi K X, Kong H Z, Lavrijsen P, Sunseri F, Falavigna A, Ye Y, James H, Chen G Y. 2017. The asparagus genome sheds light on the origin and evolution of a young Y chromosome. Nature Communications, 8 (1): 1279.
- Hong Da, Sun Fucong, Ji Yanke, Gao Wujun, Deng Chuanliang, Lu Longdou. 2008. Comparatively analysis on isozyme patterns of *Asparagus officinalis* L. male and female plants. Journal of Henan Normal University (Natural Science), 36 (1): 111 - 114. (in Chinese)
- 洪 达, 孙富从, 姬艳克, 高武军, 邓传良, 卢龙斗. 2008. 芦笋雌雄性别间同工酶酶谱的比较分析. 河南师范大学学报 (自然版), 36 (1): 111 - 114.
- Jiao Peipei, Wang Yanqin, Li Zhijun. 2017. Relationship between sex identification and peroxidase isozymes of *Populus euphratica* Olivier and *Populus pruinosa* Schrenk. Journal of Tarim University, 29 (1): 8 - 14. (in Chinese)
- 焦培培, 王彦芹, 李志军. 2017. 胡杨、灰叶胡杨性别表现与 POD 同工酶的关系研究. 塔里木大学学报, 29 (1): 8 - 14.
- Jin Congcong, Hou Mingyu, Pan Yanyun. 2018. Research progress of ribosomal protein function in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology Journal, 54 (2): 203 - 212. (in Chinese)
- 靳聪聪, 侯名语, 潘延云. 2018. 拟南芥核糖体蛋白生物学功能研究进展. 植物生理学报, 54 (2): 203 - 212.
- Lee J H, Ryu H S, Chung K S, Posé D, Kim S, Schmid M, Ji H A. 2013. Regulation of temperature-responsive flowering by MADS-box transcription factor repressors. Science, 342 (6158): 628 - 632.
- Li Lihong, Lian Yanxian. 2007. Content changes of amino acid in different developmental stages of flower bud in two apricot varieties with different abortion rates. Plant Physiology Communications, 43 (5): 959 - 960. (in Chinese)
- 李利红, 连艳鲜. 2007. 败育率不同的两个杏树品种花芽分化期间的氨基酸含量变化. 植物生理学报, 43 (5): 959 - 960.
- Li Xia, Mu Meng, Li Shuhua, Yang Lin, Pang Shaokun, Liu Ning, Bao Yancun, Li Fang, Li Baohua, Zheng Hongxia. 2009. Comparative study on peroxidase and esterase patterns in male and female plants of *Asparagus officinalis*. Acta Agriculturae Jiangxi, 21 (11): 30 - 32. (in Chinese)
- 李 霞, 牟 萌, 李书华, 杨 林, 逢少堃, 刘 宁, 包艳存, 李 芳, 李保华, 郑红霞. 2009. 雌雄芦笋过氧化物酶及酯酶同工酶的比较研究. 江西农业学报, 21 (11): 30 - 32.
- Li Xiaochuan. 2011. Glycerol-3-phosphste acyltransferase 6 (GPAT6) is important for tapetum development in *Arabidopsis* and plays multiple roles in plant fertility[M. D. Dissertation]. Shanghai: Shanghai Normal University. (in Chinese)
- 李晓川. 2011. 拟南芥甘油 - 3 - 磷酸乙酰转移酶 6 (GPAT6) 对于绒毡层及育性的影响[硕士论文]. 上海: 上海师范大学.
- Lin Changfa, Qian Xiaoyin, Yang Jinshui. 2003. Relationship between alternative splicing of LON gene and cytoplasmic male sterility (CMS) rice// The Seventh Congress and Symposium of the Chinese Society of Genetics: 125. (in Chinese)
- 林长发, 钱晓茵, 杨金水. 2003. 水稻 LON 基因可变剪接和细胞质雄性不育 (CMS) 的相关性研究//中国遗传学会第七次代表大会暨学术讨论会: 125.
- Liu Danmei, Zhang Yanjie, Pei Yanxi. 2016. Characterization of the alternative splicing of *Lemads1* in tomato MADS-box. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 32 (6): 641 - 648. (in Chinese)

- 刘旦梅, 张彦洁, 裴雁曦. 2016. 番茄 MADS-box 基因 *Lemads1* 的可变剪接与表达模式分析. 中国生物化学与分子生物学报, 32 (6): 641 - 648.
- Liu Kaidong, Mo Yiwei, Feng Shaoxian, Wu Wanyi, Li Haili, Zhong JunDi, Yuan Changchun. 2018. Comparative proteomic analysis in different developmental stages of sugar-apple (*Annona squamosa* L.) flowers. Scientia Agricultura Sinica, 51 (1): 149 - 159. (in Chinese)
- 刘楷栋, 莫亿伟, 冯少娴, 吴婉仪, 黎海利, 钟军弟, 袁长春. 2018. 番荔枝花发育不同阶段的差异蛋白质组分析. 中国农业科学, 51 (1): 149 - 159.
- Liu Meng, Nie Lanchun, Hu Shuming, Wang Shanshan. 2015. Content changes of endogenous hormones and polyamine during development of male and female flowers of asparagus 'Champion'. Acta Horticulturae Sinica, 42 (11): 2278 - 2282. (in Chinese)
- 刘孟, 乜兰春, 胡淑明, 王珊珊. 2015. '冠军' 芦笋雌雄花发育过程中内源激素和多胺含量的变化. 园艺学报, 42 (11): 2278 - 2282.
- Liu Meng, Nie Lanchun, Wang Shanshan, Hu Shuming. 2016. Expression analysis of differential proteins in three kinds of flower buds with sex differentiation of asparagus. Scientia Agricultura Sinica, 49 (21): 4192 - 4202. (in Chinese)
- 刘孟, 乜兰春, 王珊珊, 胡淑明. 2016. 芦笋三种花蕾性别分化相关差异蛋白表达分析. 中国农业科学, 49 (21): 4192 - 4202.
- Longo G P M, Caporali E, Carboni A, Spada A, Falavigna A. 1996. Transition from hermaphroditic to unisexual flowers in male and female plants of asparagus. Acta Horticulturae, (415): 151 - 156.
- Ma Liyuan, Qi Guohui, Li Bao-guo, Guo Suping, Zhang Xue-mei, Shi Lili, Dong Lixin, Liu Xixing. 2013. Content of endogenous phytohormones and isoenzymes of peroxidase in male and female *Pistacia chinensis* plants bunge leaves. Plant Science Journal, 31 (3): 297 - 303. (in Chinese)
- 马丽媛, 齐国辉, 李保国, 郭素萍, 张雪梅, 施丽丽, 董丽欣, 刘喜星. 2013. 黄连木雌、雄株内源植物激素和 POD 同工酶的比较. 植物科学学报, 31 (3): 297 - 303.
- Ming R, Bendahmane A, Renner S S. 2011. Sex chromosomes in land plants. Annual Review of Plant Biology, 62 (1): 485 - 514.
- Mitchell C H, Diggle P K. 2005. The evolution of unisexual flowers: morphological and functional convergence results from diverse developmental transitions. American Journal of Botany, 92 (7): 1068.
- 物科学学报, 31 (3): 297 - 303.
- Mo Liping. 2006. Molecular analysis of two sec14-like phosphatidylinositol transfer proteins specifically expressed in the flower of *Arabidopsis thaliana* [Ph. D. Dissertation]. Xiamen: Xiamen University. (in Chinese)
- 莫萍丽. 2006. 拟南芥两个在花中特异表达的 Sec14-like 磷脂酰肌醇转移蛋白的分子生物学研究 [博士论文]. 厦门: 厦门大学.
- Quesada V, Macknight R, Dean C, Simpson G G. 2014. Autoregulation of FCA pre-mRNA processing controls *Arabidopsis* flowering time. EMBO Journal, 22 (12): 3142 - 3152.
- Reamonbuttner S M, Jung C. 2000. AFLP-derived STS markers for the identification of sex in *Asparagus officinalis* L. Theoretical and Applied Genetics, 100 (3): 432 - 438.
- Regalado J J, Gil J, Castro P, Moreno R, Lopezencina C. 2014. Employment of molecular markers to develop tetraploid "supermale" asparagus from andromonoecious plants of the landrace 'Morado de Huétor'. Spanish Journal of Agricultural Research, 12 (4): 1131 - 1136.
- Shi Ting. 2014. The molecular mechanism of pistil abortion based on 'OMICS' in japanese apricot [Ph. D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Agricultural University. (in Chinese)
- 侍婷. 2014. 基于组学的果梅雌蕊败育分子机理 [博士论文]. 南京: 南京农业大学.
- Staiger D, Brown J W S. 2013. Alternative splicing at the intersection of biological timing, development, and stress responses. Plant Cell, 25 (10): 3640 - 3656.
- Thatcher S R, Danilevskaya O N, Xin M, Beatty M, Zastrowhayes G, Harris C, Allen B V, Habben J, Li B. 2016. Genome-wide analysis of alternative splicing during development and drought stress in maize. Plant physiology, 170 (1): 586.
- Uragami A, Ueno R, Yamasaki A, Matsuo K, Motoki S. 2016. Productive differences between male and female plants in white asparagus production using the rootstock-planting forcing culture technique. Horticulture Journal, 85 (4): 322 - 330.

- Wang Ketao, Jiao Zhicheng, Xu Meng, Wang Yongsheng, Li Ren, Cui Xia, Gu Lianfeng, Zhang Shuaibin. 2016. Landscape and fruit developmental regulation of alternative splicing in tomato by genome-wide analysis. Horticultural Plant Journal, 2 (6): 338 - 350.
- Wang Zijian. 2013. Study on the related factors of sex differentiation of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk [M. D. Dissertation]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University. (in Chinese)
- 王子坚. 2013. 青钱柳性别分化的相关因素研究 [硕士论文]. 南昌: 江西农业大学.
- Wen Yinyuan, Wang Yuguo, Yin Meiqiang, Zhao Juan, Wang Jiping. 2010. Sex identification and regulation of *Ginkgo* plantlets *in vitro* cultured. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 24 (1): 31 - 35. (in Chinese)
- 温银元, 王玉国, 尹美强, 赵娟, 王计平. 2010. 银杏试管苗的雌雄鉴别与调控. 核农学报, 24 (1): 31 - 35.
- Xiao Huashan, Lü Liuxin, Xiao Xiangxi. 2002. Dynamic changes of carbonitride during development of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pistil and stamen. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 8 (1): 26 - 30. (in Chinese)
- 肖华山, 吕柳新, 肖祥希. 2002. 荔枝花雄蕊和雌蕊发育过程中碳氮化合物的动态变化. 应用与环境生物学报, 8 (1): 26 - 30.
- Ying Zhenyu, Li Shuxuan. 1990. Relation of sex expression to ethylene evolution and oxidase activity in *Lagenaria leucantha* and *Cucumis sativus*. Acta Horticulturae Sinica, 17 (1): 51 - 58. (in Chinese)
- 应振土, 李曙轩. 1990. 瓠瓜与黄瓜的性别表现和内源乙烯与氧化酶活性的关系. 园艺学报, 17 (1): 51 - 58.
- Yu H P, Tian C H, Yu Y, Jiao Y L. 2016. Transcriptome survey of the contribution of alternative splicing to proteome diversity in *Arabidopsis thaliana*. Molecular Plant, 9 (5): 749 - 752.
- Zhang Jianming, Tan Feng, Chen Jing. 1999. The change of endogenous hormones and carbohydrate and nitrogen contents during flower bud differentiation in *Gardenia jasminoides* var. *grandiflora*. Journal of Southwest China Normal University (Natural Science), 24 (2): 219 - 224. (in Chinese)
- 张建铭, 谈锋, 陈京. 1999. 大花梔子花芽生理分化期内源激素和碳氮比的动态变化. 西南师范大学学报 (自然科学版), 24 (2): 219 - 224.
- Zhou Jinsong, Tang Yongping, Sheng Wentao, Luo Shaochun, Chen Guangyu. 2010. Progress in research on sex determination and differentiation in *Asparagus officinalis* L. Journal of Plant Genetic Resources, 11 (5): 600 - 604. (in Chinese)
- 周劲松, 汤泳萍, 盛文涛, 罗绍春, 陈光宇. 2010. 芦笋性别决定与性别分化研究进展. 植物遗传资源学报, 11 (5): 600 - 604.