

# 热胁迫下棉花 CMS-D2 恢复系花粉育性相关环状 RNA 鉴定及功能初步分析

## Identification and preliminary functional analysis of circular RNAs related to pollen fertility of cotton CMS-D2 restorer line under heat stress

王瑞杰, 张梦\*, 陈亮亮, 张学贤, 郭立平, 戚廷香, 唐会妮, 王海林, 乔秀琴, 吴建勇\*, 邢朝柱\*

(中国农业科学院棉花研究所 / 棉花生物育种与综合利用全国重点实验室 / 农业农村部棉花生物学与遗传育种重点实验室, 河南 安阳 455000)

**摘要:**近年来,随着人工杂交制种成本的逐年提升,细胞质雄性不育(cytoplasmic male sterility, CMS)已逐渐成为棉花杂种优势利用领域的研究热点。在棉花 CMS 系中, 哈克尼西棉细胞质雄性不育(CMS-D2)胞质是目前生产上推广种植的棉花“三系”杂交种的主要胞质来源。然而,其恢复系育性容易受夏季持续高温胁迫影响,这严重制约了“三系”杂交种在生产上大规模应用(尤其在夏季温度更高的长江流域棉区)。已有一些研究发现非编码 RNA 参与调控植物对外界热胁迫的响应。作为一种重要的非编码 RNA 类型,环状 RNA(circular RNAs, circRNAs)在基因转录和转录后调控中也发挥着重要作用。然而,关于 circRNAs 在热胁迫下棉花 CMS-D2 恢复系雄性育性稳定性中的调控角色目前仍未见相关报道。本研究选用一套同核异质近等基因恢复系 NH(耐高温)和 SH(以前命名为 ZBR, 高温敏感型),分别种植于黄河流域棉区河南安阳和长江流域棉区江西九江,利用高温胁迫下其成熟花粉构建去核糖体 RNA 测序文库并进行转录组分析。共鉴定到 967 个 circRNAs, 其中 250 个 circRNAs 在高温胁迫下差异表达。随机选取 12 个差异表达 circRNAs (differentially expressed circRNAs, DECs)并设计发散引物和聚合引物,以经 RNase R 酶消化处理后的花粉 cDNA 为模板进行 PCR 扩增和 Sanger 测序,其中有 8 个 DECs 的反向剪接位点得到了验证。利用半定量 PCR 和实时荧光定量 PCR 技术分析 5 个已验证的 DECs 在 2 个材料根、茎、叶和花粉中的表达模式,发现这些 circRNAs 在根、茎、叶中均低表达或不表达,但在花粉中相对高表达,且相比 NH 来说,在 SH 中均显著下调表达。GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析发现 DECs 对应的亲本基因显著富集在一些可能与花粉育性相关的生物学过程如花粉管引导、细胞壁组织、戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化、类固醇生物合成和 N-聚糖生物合成途径等。此外,还构建了高温胁迫下棉花花粉发育相关 DECs 介导的竞争性内源性 RNA(ceRNA)调控网络,共包含 21 个 DECs、8 个 miRNAs 及 22 个潜在 mRNA 靶基因。其中, circRNA346-miR159a-MYB33 和 circRNA484-miR319e-MYB33 这两个 ceRNA 模块可能对热胁迫下 CMS-D2 恢复系花粉育性稳定性调控至关重要。本研究系统分析了棉花花粉中 circRNAs 的丰度、特征、组织表达模式及其潜在功能,并初步构建了热胁迫下 circRNAs 参与调控 CMS-D2 恢复系花粉育性稳定性的 ceRNA 网络,为进一步揭示棉花 CMS-D2 育性恢复机理奠定了基础,同时对生产上解决恢复系花药发育对高温胁迫敏感的育种瓶颈具有重要指导意义。

**关键词:** CMS-D2 恢复系; 花粉育性稳定性; circRNA; 热胁迫; circRNA 介导的 ceRNA 网络

\* 通信作者: 张梦, zhangmeng03@caas.cn; 吴建勇, dr.wujianyong@live.cn; 邢朝柱, chaozhuxing@126.com

基金项目: 中原院士基金(212101510001); 河南省自然科学基金面上项目(232300421168); 河南省自然科学基金青年项目(232300421269)