

杨树性别决定基因对杨树叶片叶绿素含量的影响及相关差异表达基因分析

陆静¹ 尹佟明^{1*}

(1. 南京林业大学 南京市 210037)

摘要:【目的】在植物界中,雌雄异株植物除了生殖器官表现出的二态性,在一些非生殖器官上也会观察到明显的次生性别二态性。这种次生性别二态性在植物的生长发育、形态特征和代谢物质积累等方面都可能产生重要的影响,尤其在种群水平上。本研究旨在通过在分子水平上调控杨树性别决定基因的表达,探究植物性别决定基因是否对植物非生殖器官的次生性别二态性产生影响。【方法】通过在杨树雄株无性系“84K”(*Populus. Alba* × *P. tremula var. glandulosa*) 中过表达和在杨树雌株无性系“南林 895”(*P. deltooides* × *P. euramericana*) 中敲除杨树性别决定基因,对抗性植株进行分子检测之后,分别获得杨树性别决定基因的过表达株系和基因敲除系。对获得的阳性转基因株系进行了表型观察和相关指标测定,并对过表达植株开展了基因差异表达分析。【结果】本研究共获得了 91 个“南林 895”过表达株系和 139 个“84K”基因敲除系。在过表达株系中,普遍观察到了植株叶片黄化的现象。对叶色差异显著株系的叶绿素 a、b、(a+b) 的含量测定显示,过表达株系叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素 (a+b) 的含量显著低于野生型,其中叶绿素 b 含量下降最为显著。相比之下,基因编辑植株没有出现黄化的现象,其叶色与野生型没有差异。对过表达株系开展的基因差异表达分析结果显示,过表达系与野生型植株叶片共有 899 个差异表达基因。将这 899 个差异表达基因进行了 GO 分类与 KEGG 通路分析显示,类黄酮生物合成途径显著富集,也是差异表达基因数量最多的通路。【结论】杨树性别决定基因过表达可能影响了类黄酮生物合成途径基因的表达,从而影响了过表达株系叶片叶绿素含量,最终导致叶片黄化现象。这一发现对植物性别决定基因影响植物非生殖器官的次生性别二态性提供了直接证据。同时,这项研究也为植物育种和遗传改良提供了新的思路 and 理论基础。

关键词: 雌雄异株植物; 性别决定基因; 次生性别二态性; 叶绿素含量; 差异表达基因

Effects of poplar sex-determining gene on chlorophyll contents of poplar leaves and analysis of the relevant differentially expressed genes

Abstract: 【Objective】 Except for the dimorphism in the reproduction organs, dioecious plants exhibited secondary sexual dimorphism in some non-reproductive characteristics. This secondary sexual dimorphism can have significant impacts on plant growth, development, morphological traits, and accumulation of metabolic substances, particularly at the population level. This study aims to investigate whether plant sex-determining gene affects the secondary sexual characteristics by manipulating the expression of poplar sex determining gene at molecular level. 【Method】 To established the over-expression and knockout lines of the poplar sex determining gene, we over-expressed the poplar sex determining gene in a male poplar “84K” (*Populus. Alba* × *P. tremula var. glandulosa*) and edited the poplar sex determining gene in a female poplar “Nanlin 895” (*P. deltooides* × *P. euramericana*). For the positive transgenic lines, we observed the phenotypic changes and measured the relevant physiological parameters. Subsequently, we analyzed the relevant differentially expressed genes (DEGs) in over-expression lines. 【Result】 In this study, a total of 139 over-expression and 91 knockout lines were obtained. For the over-expression lines, an obvious phenotypic change of leaf yellowing was observed. Measurement of the chlorophyll a, b, and (a+b) contents showed that all these parameter were significantly lower in the over-expression than in the knockout lines, with chlorophyll b decreased the most. By contrast, no leaf yellowing was observed with the knockout lines, which exhibited the similar leaves color as that of the wild type plants. Analyzing the DEGs in the over-expression lines against the wild type plants revealed a total of 899 DEGs, and the most abundant DEGs were found to involve in the flavonoid biosynthesis pathway base on GO clustering and KEGG mapping. 【Conclusion】 The poplar sex determining gene negatively affected chlorophyll contents, which might occur

基金项目: 十四五国家重点研发计划项目(2021YFD2200202); 国家自然科学基金项目(32071795)

* 尹佟明为通讯作者

through its effect on the expression of genes relevant to the flavonoid biosynthesis pathway, leading to leaf yellowing. The findings of this study provided direct evidence that plant sex determining gene affected the secondary sexual dimorphism of the non-reproductive characteristics. Moreover, this study provides new insights and theoretical foundations for plant breeding and genetic improvement.

Key words: dioecious plant; sex determining gene; secondary sexual dimorphism, chlorophyll content; differentially expressed gene.

由于植物大部分是雌雄同株，与动物相比，性别二态性在植物中较为罕见 (Barrett and Hough, 2012)。性别二态性在植物的繁殖和进化中发挥着重要作用，导致同一物种的雄性和雌性个体在主要性征（生殖器官）或次要性征（非生殖器官）方面存在差异 (Sakai and Weller, 1999)。对雌雄异株植物性别二态性的研究是植物研究的一个热点问题。植物通过性别二态性的进化，能够更好地适应环境变化，并增加繁殖的多样性和适应性。植物的性别二态性在繁殖特征中比在营养特征更为常见。例如，宽叶慈姑 (*Sagittaria latifolia*) 雌雄花朵大小、蒿柳 (*Salix viminalis*) 雌雄花型、黄化木百合 (*Leucadendron xanthoconus*) 和香脂杨 (*Populus balsamifera*) 雌雄花色等存在差异 (Barrett and Hough, 2012; Darolti et al., 2018; Hemborg and Bond, 2005)。然而，对于营养特征是否存在性别二态性，目前尚无一致的观点。一些研究学者认为，雌雄异株植物的营养特征存在性别二态性。例如，木百合 (*Leucodendron* spp.) 雌雄株在叶片和分枝结构上存在差异，白麦瓶草 (*Silene latifolia*) 和康定柳 (*S. paraplesia*) 雌雄株在形态和生理特征也存在差异 (Midgley, 2010; Welsford et al., 2016; Steven et al., 2007; Liao et al., 2019)。除了遗传因素外，生长、形态、生理、物候、生活史和资源分配方面的性二型性可能还受到各种环境胁迫的影响 (Barrett and Hough, 2012; Forrest, 2014; Juvany and Munné-Bosch, 2015; Tonnabel et al., 2017; Zemp et al., 2015; Hultine et al., 2018)。另一些研究学者认为，雌雄异株植物的营养特征不存在性别二态性。例如，欧洲山杨 (*P. tremula*)、毛果杨 (*P. trichocarpa*) 和香脂杨雌雄株在形态或生理方面并未发现差异 (Robinson et al., 2014; McKown et al., 2017)。不同研究中观察到的差异可能归因于所研究植物的性质、不同的发育阶段或基因型的选择。此外，结果还受实验设计、胁迫条件和样本量的影响 (McKown et al., 2017)。因此，需要进一步的研究来探索其他植物种类在形态和生理上的性别二态性，以更好地理解营养特征是否存在性别二态性的现象。这将有助于揭示植物繁殖和进化中性别二态性的机制和意义。

除了种群水平的研究，我们还可以从分子水平来探究植物在营养发育阶段的性别二态性的表现。植物的性别是通过性别决定基因确定的。如果我们能够通过分子水平调控性别决定基因的表达，进一步研究杨树性别决定基因对生理特征的影响，将有助于揭示植物次生性别二态性受性别调控的分子机制。这样的研究有助于更好地理解营养特征是否存在性别二态性的现象，进而揭示植物繁殖和进化中性别二态性的机制和意义。近年来，在多种雌雄异株植物中已经鉴定出了性别决定基因，例如柿子 (Akagi et al., 2014)、芦笋 (Harkess et al., 2020)、猕猴桃 (Akagi et al., 2018, 2019) 和杨树 (Xue et al., 2020; Müller et al., 2020; Yand et al., 2021) 等。这为我们探索性别决定基因是否对雌雄株营养阶段的性状产生影响提供了前提基础。在先前的研究中，美洲黑杨雄株具有一个 Y 特异基因 *FERR-R*，该基因产生 siRNA 来抑制雌性基因 *FERR* 的表达 (Xue et al., 2020)。我们的研究通过在雄株杨树中过表达和在雌株杨树中敲除性别决定基因，观察到性别决定基因过表达会导致植株叶片黄化现象，通过叶绿素含量测定，证实了杨树性别决定基因过表达会对叶绿素含量这一次生性征产生影响。同时，通过基因差异表达分析，我们进一步探究了相关的代谢调控途径。

1 试验材料

以雄株杨树 84K (*P. alba* × *P. tremula* var. *glandulosa*) 和雌株杨树“南林 895” (*P. deltoides* × *P. euramericana*) 为试验材料。使用 70% 酒精和 4% 次氯酸钠依次对野生型杨树枝条进行消毒，通过组织培养诱导芽发生，获得无菌杨树组培苗。组织培养条件为：16 h 光照/8 h 黑暗的光照周期，200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 光照强度，80%

湿度，23□/15□的昼夜温差。

2 研究方法

2.1 过表达和基因编辑载体的构建

以本实验室保存的 *Pro35S::FERR'*-GFP 载体质粒为模板，使用 Primer Premier 5 设计的引物（表 1），扩增 *FERR* 的 CDS(去除 *FERR-R* 产生 siRNA 抑制雌性特异基因 *FERR* 表达的部位)，经过 *Bam*H1 和 *Kpn*I 双酶切，将目的片段通过同源重组方法连接到植物表达载体 pCAMBIA2301-35Splus 中，测序验证，最终获得过表达载体 *p35S::FERR*（图 1A），转入到 EHA105 农杆菌中，用于 84K 遗传转化。同时，以雌株美洲黑杨（*P. deltoides*）和“南林 895”花蕾为模板，特异引物（表 1）分别扩增 *FERR* 基因组 DNA，并将其亚克隆到 pEASY®-Blunt Zero 测序载体。挑选了 35 个阳性单克隆重组质粒测序、分析 SNP 变异和单倍型。通过在线软件 CRISPR-P 2.0(<http://cbi.hzau.edu.cn/CRISPR2/help.php>)和 CRISPR-GE(<http://skl.scau.edu.cn/>)筛选潜在的 *Cas9* 靶位点，最终挑选三个 sgRNA，通过 Golden Gate 技术将它们插入到 pKSE401 载体的 *Bsa*I 位点之间，测序验证，最终获得基因编辑载体 pKSE401-3gR-*ferr*（图 1B），转入到 EHA105 农杆菌中，用于“南林 895”遗传转化。

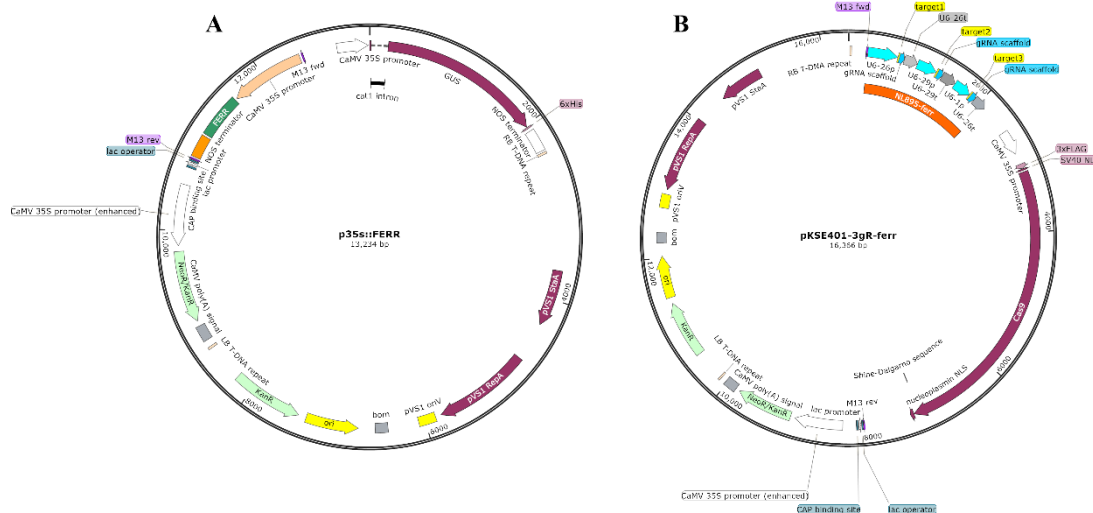


图 1 载体构建示意图

Fig.1 Schematic diagram of vector construction

A. *p35S::FERR* 过表达载体图谱 Vector map of *p35S::FERR* overexpression construct; B. pKSE401-3gR-*ferr* 基因编辑载体图谱 Vector map of pKSE401-3gR-*ferr* gene editing construct.

2.2 杨树遗传转化和转基因株系鉴定

选择生长 20 d 的健康且完全无菌的野生型杨树组培苗作为试验材料，过表达载体转化雄株 84K，基因编辑载体转化雌株“南林 895”。对于雄株，使用含有 15 mg L⁻¹ 卡那霉素 (kana) 的 1/2 Murashige 和 Skoog 培养基进行筛选。而对于雌株，则使用含有 50 mg L⁻¹ 的卡那霉素的相同培养基进行筛选。农杆菌侵染切好的植物叶片和叶柄 10-15 min，然后在黑暗中共培养三天，无菌水冲洗多次，并用吸水纸吸除表面水分，将其置于组织培养箱中培养。待新芽长到约 1 cm，将其转移到生根培养基上。在此阶段，提取叶片的 DNA/RNA，使用特定引物（表 1）鉴定过表达株系，扩增的 PCR 产物经过 Sanger 测序，qRT-PCR 定量 *FERR* 的表达水平；使用特定引物（表 1）扩增目标编辑位点，产物用于 Sanger 测序和 Illumina 测序。当植株高度达到 6 cm 时，将其单独移植到由营养土、黄土和有机物按 3:3:1 的比例混合而成的盆中，置于生长室中炼苗两个月。最后，将植物转移到南京林业大学生物技术楼（118°82'13"N，32°08'26"E）的露天阳台上进一步

步的培养。

表 1 本研究使用的引物及序列
Tab. 1 Primers used in this study

用途 Applicaiton	前引物序列(5'-3') Forward primer sequence (5'-3')	后引物序列(5'-3') Reverse primer sequence (5'-3')
扩增 <i>FERR</i> cDNA Amplificati on of <i>FERR</i> cDNA <i>p35S::FER</i> <i>R</i> 载体构建 Constructio n of <i>p35S::FERR</i> vector	TTATGCATGTTTCGTCTTCTCCTG	ATGGCCAGCTCTTCTTCTTC
扩增 <i>FERR</i> gDNA Amplificati on of <i>FERR</i> genomic DNA	GACTCTAGAGGATCCATGGCCAGCTCTTCTTC TTCC	GGAAATTCGAGCTCGGTACCTTATGCATGTTTCGTCTTCTCC TGCAA
扩增卡纳 基因 Amplificati on of the kanamycin gene	CTGAAGCGGGAAGGGACT	ATACCGTAAAGCACGAGGAAG
qRT-PCR 内参定量 Reference gene qRT-PCR	GTTGATTTTTGCTGGAAGC	GATCTTGGCCTTCACGTTGT
qRT- PCR <i>FERR</i> 定量 <i>FERR</i> gene qRT-PCR	AAACGGAAAGAGAGCATTGGA	TCATAACCTGTCATTCTGGCA
扩增靶位 点 1 和 2 Amplificati on of target sites 1 and 2	ACCACAGCAGAAAACGG	AAGGACTCCCAAAAAAT
扩增靶位 点 3 Amplificati on of target sites	GAATGTCCAGTAATTAAGAGAGCATCG	GAATGTCCAGTAATTAAGAGAGCATCG

3

扩增靶位

点 1、2 和 3

Amplificati

GTGGCAGAAGGTTAGACT

TGAAATTGCTGAGCAGGT

on of target sites

1, 2, and 3

2.3 叶绿素含量测定

将新鲜植物的第五片叶洗净、擦干并剪碎，取 0.2 g 样品，用液氮研磨成粉末，加入 2 mL 的 95%乙醇，研磨成匀浆，再加入 5 mL 的 95%乙醇，继续研磨直到组织变白为止。过滤到 25 mL 棕色容量瓶中，用少量乙醇清洗研钵、研棒及残渣，并将所有清洗液连同残渣一起过滤到容量瓶中。用滴管吸取乙醇，将滤纸上的叶绿体色素全部冲入容量瓶中，直至滤纸和残渣中无绿色为止。最后用 95%的乙醇定容至 25 mL，充分摇匀。每个样品重复 3 次。将叶绿体色素提取液倒入光径 1 cm 的比色皿中。以 95%乙醇为空白，利用酶标仪测得溶液在波长 665 nm、649 nm 和 470 nm 下的吸光度。根据 Arnon (1949) 描述的方法计算叶绿素含量。

2.4 转录组测序及分析

选取 *FERR* 表达量高的三个过表达株系的叶片进行转录组测序，野生型作为对照，每个样品三个生物学重复。根据植物组织 RNA 快速提取试剂盒（中国北京天根生物技术有限公司）说明书提取叶片总 RNA，使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量，使用 Nanodrop 紫外分光光度计测量 RNA 浓度，使用 Agilent 2100 精确检测 RNA 的完整性。检测合格后建库并进行双端测序。对原始数据进行过滤，去除接头序列及低质量 reads，获得 clean reads。同时，从 https://figshare.com/articles/dataset/84K_genome_zip/12369209 网站下载 84K 参考基因组和注释文件。利用 HISAT2 (v2.1.0) 软件 (Kim et al., 2015) 将 clean reads 比对到参考基因组。使用 FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million fragments mapped) (Pachter et al., 2010) 定量 RNA-seq 的基因表达值。使用 DESeq R Bioconductor 软件包 ($FC \geq 1$ 且 $FDR < 0.05$) (Anders and Huber, 2010) 进行 DEGs 分析。使用六大数据库 NR (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>), GO (<http://www.geneontology.org>), KEGG (<http://www.kegg.jp>), COG/KOG (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>), Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) 和 Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) 进行基因功能注释。使用 GOseq R 软件包 (Young et al., 2010) 对 DEGs 进行 GO 富集分析。使用 KOBAS 软件 (Bu et al., 2021) 分析 KEGG 富集通路。使用 Bardou 等 (Bardou et al., 2014) 描述的方法绘制了 Venn 图。

2.5 数据处理

利用 SPSS 26 (IBM Corp., United States) 和 Excel 2016 软件进行数据处理及分析。叶绿素含量进行了 *t* 检验。

3 结果与分析

3.1 转基因杨树的建立

通过一系列分子检测，最终获得了 139 个过表达系和 91 个敲除系。以 *Ubiquitin* 基因为内参，qRT-PCR 结果显示 *FERR* 表达大于 2 的有三个过表达株系，分别为 OE16、OE22 和 OE28 系 (图 2A)。以野生型为对照，二代结合一代测序对 3 个靶点进行检测，结果显示，存在大片段缺失的敲除系 (图 2B)。以 DR3、DR18 和 DR21 系为例，DR3 系在第 3 个 sgRNA 靶位点存在 4 个 Indel，为纯合突变，DR18 系在第 1 个 sgRNA 靶位点存在 4 个 Indel，也为纯合突变，而 DR21 系在每个 sgRNA 靶位点均存在缺失，共计 33 个 Indel，此外，在第 1 个 sgRNA 靶位点多出了 1 个“T”碱基，而另一个等位基因与野生型相似，为杂合突变 (图 2B)。

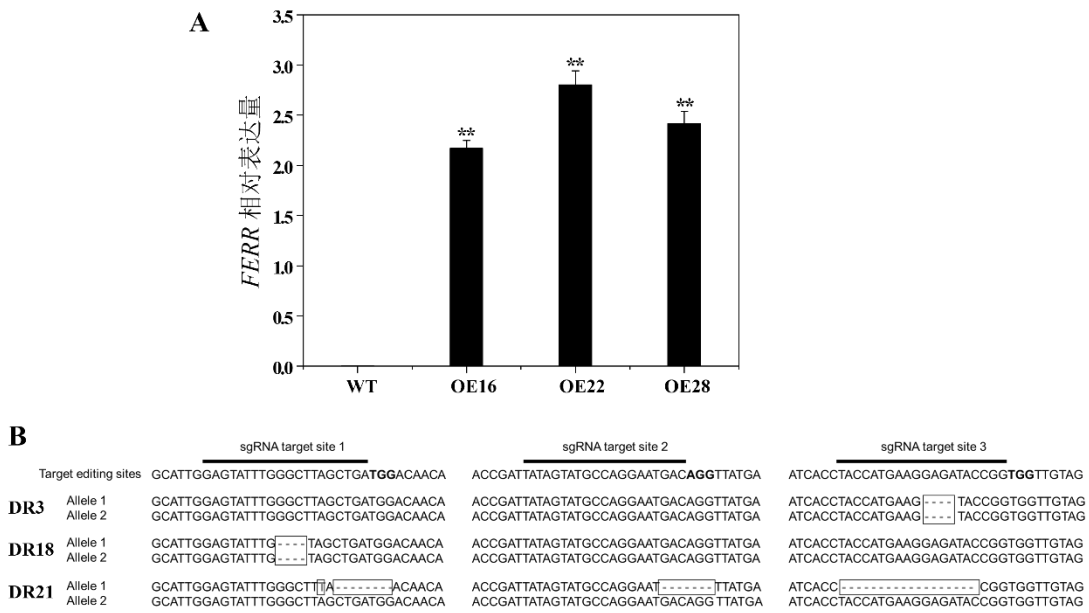


图 2 转基因植株检测

Fig.2 Detection of transgenic plants

A. 野生型和过表达系中 *FERR* 的相对表达量 The relative expression levels of *FERR* in the wild-type and overexpressing lines * *. 过表达系中的 *FERR* 表达量与野生型相比存在极显著差异 ($P < 0.01$)。* * referred a extremely significant difference in relative expression levels of *FERR* between wild-type and overexpressing lines; B.野生型和敲除系中等位基因编辑情况 Gene editing of alleles in the wild-type and knockout lines.“-”表示碱基缺失。“-”represent deletion.

3.2 杨树性别决定基因降低叶片叶绿素含量

通过观察杨树苗期外形生长情况，我们发现相比较于野生型而言，过表达 *FERR* 植株叶色均发黄严重（图 3A），而基因编辑 *ferr* 叶片始终保持和野生型一样的绿色（图 3B）。叶片黄化常与叶绿素含量密切相关。此外，叶绿素是光合作用的关键组分，它们能够吸收光能并将其转化为化学能，为植物的生长和发育提供能量和有机物质。为此，测量了 27 个过表达系和 9 个野生型叶片的叶绿素含量，结果显示，过表达系叶片中叶绿素 a 含量均值为 0.85，是野生型均值 1.22 的 0.70 倍，差异极显著 ($p < 0.01$)（表 2），过表达系叶片中叶绿素 b 含量均值为 0.27，是野生型均值 0.4 的 0.68 倍，差异极显著 ($p < 0.01$)（表 2），过表达系叶片中总叶绿素 (a+b) 含量均值为 1.12，是野生型均值 1.63 的 0.69 倍，差异极显著 ($p < 0.01$)（表 2），其中叶绿素 b 含量差异最显著。表明杨树性别决定基因 *FERR* 的过表达显著降低了植株叶绿素的含量，也再次证实了叶绿素含量与叶片黄化成负相关。

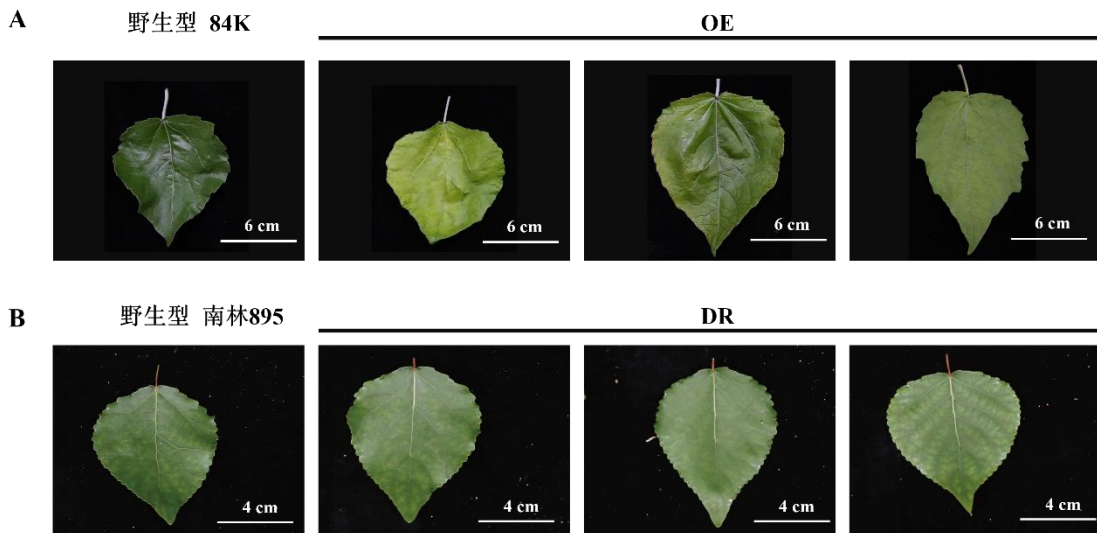


图 3 转基因植株和野生型叶色比较

Fig.3 Comparison of leaf color between transgenic plants and wild-type

A. 野生型和过表达系叶色比较 Comparison of leaf color between wild-type and overexpressing lines. OE 代表过表达系。OE represents the overexpressing lines; B.野生型和敲除系叶色比较 Comparison of leaf color between wild-type and knockout lines. DR 代表敲除系。DR represents the knockout lines.

表 2 过表达 *FERR* 植株和野生型叶片叶绿素含量比较

Tab. 2 Comparison of chlorophyll content between *FERR* overexpressing and wild-type leaves

叶绿素含量 Chlorophyll content (mg·g ⁻¹ FW)	过表达系 Over-expression lines					野生型 Wild type plants					<i>t</i> -test
	数量 <i>n</i>	平均值 Mean	标准差 SD.	范围 Range	变异系数 CV	数量 <i>n</i>	平均值 Mean	标准差 SD.	范围 Range	变异系数 CV	<i>p</i>
叶绿素-a Chlorophyll-a	27	0.85	0.22	0.79-0.88	0.26	9	1.22	0.33	1.17-1.26	0.27	3.555E-12
叶绿素-b Chlorophyll-b	27	0.27	0.01	0.27-0.29	0.02	9	0.41	0.03	0.37-0.46	0.06	2.622E-07
叶绿素-(a+b) Chlorophyll-(a+b)	27	1.12	0.23	1.05-1.17	0.21	9	1.63	0.05	1.62-1.71	0.03	3.019E-10

3. 3 杨树性别决定基因主要参与类黄酮生物合成途径影响叶片叶绿素含量

过表达 *FERR* 导致雄株杨树叶片黄化。为了进一步了解野生型和过表达系之间差异基因所参与的调控通路，我们进行了转录组分析。结果显示，与野生型相比，在 OE16、OE22 和 OE28 系中分别发现了 1,461 个 DEGs、3,064 个 DEGs 和 3,103 个 DEGs（图 4A）。此外，野生型与这三个过表达系之间共有 899 个相同的 DEGs（图 4A）。其中，617 个 DEGs 显著上调，占共同的总 DEGs 的 69%；282 个 DEGs 显著下调，占共同的总 DEGs 的 31%，上调 DEGs 多于下调 DEGs 的数量（图 4B）。

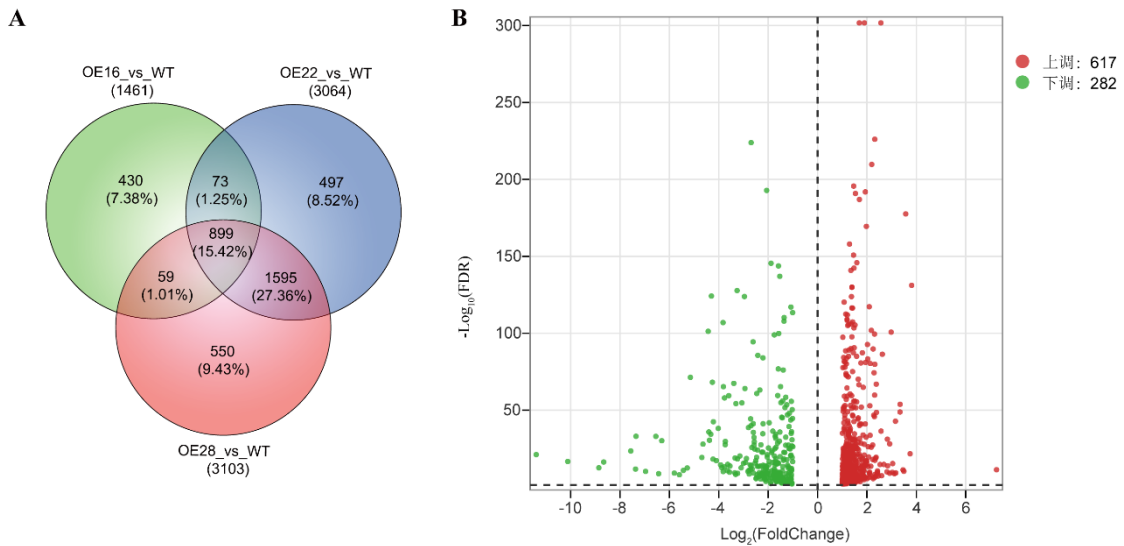


图 4 过表达系和野生型中的 DEGs 分析

Fig.4 DEGs between overexpression lines and the wildtype

A. 差异表达基因韦恩图 Venn diagram of differential gene expression (DEGs); B. 899 个共同的 DEGs 的火山图 Volcano plot of common 899 DEGs

随后，对 899 个共同的 DEGs 进行了 GO 和 KEGG 富集分析。在鉴定的前 20 个 GO 术语中，有 8 个被归类为细胞组分 (CC)，6 个为分子功能 (MF)，6 个为生物过程 (BP)（图 5A）。DEGs 主要富集在细胞核 (GO:0005634)、膜的完整组分 (GO:0016021) 和转录、DNA 模板的过程 (GO:0006351)（图 5A）。KEGG 分析显示，主要在黄酮类生物合成途径 (ko00941) 中显著富集，有 25 个 DEGs，数量最多，其次

富集在有 9 个 DEGs 的类胡萝卜素生物合成途径 (ko00906)、有 7 个 DEGs 的 RNA 聚合酶 (ko03020)、有 9 个 DEGs 的氨基氨基酸代谢途径 (ko00460)、有 7 个 DEGs 的半乳糖代谢途径 (ko00052)、有 7 个 DEGs 的昼夜节律-植物 (ko04712)、有 5 个 DEGs 的泛醌和其他萜类-醌的生物合成途径 (ko00130) 等通路上(图 5B)。表明杨树性别决定基因 *FERR* 的过表达主要影响了植株类黄酮生物合成途径上基因的表达, 进而调控植物叶色。

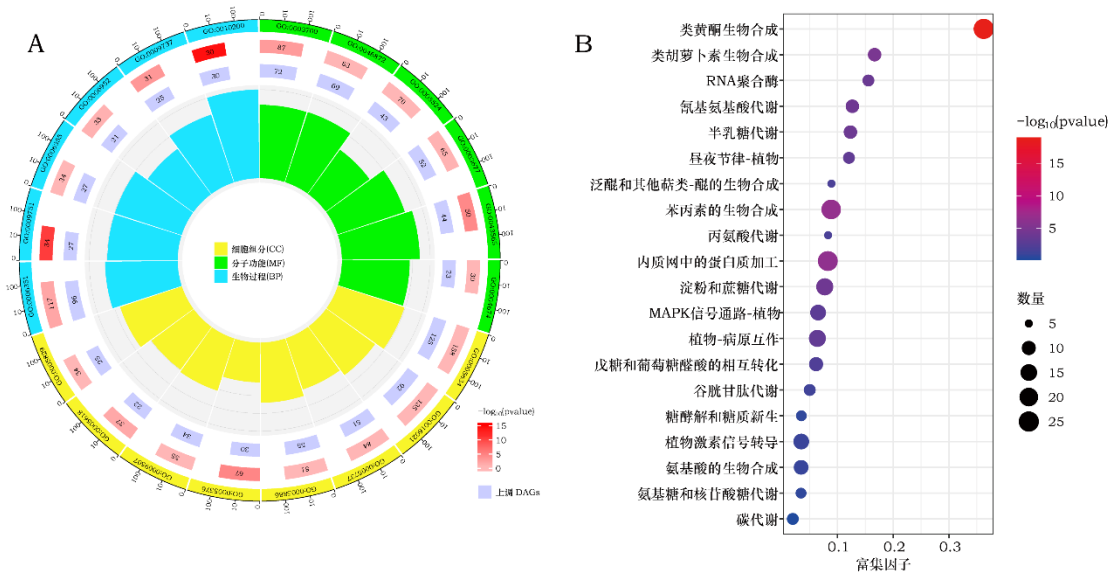


图 5GO 和 KEGG 通路富集分析

Fig. 5 GO and KEGG pathway enrichment analysis

A. 899 个共同的 DEGs 的 GO 分析。GO analysis of 899 common DEGs. 黄色、绿色和蓝色分别代表细胞组分 (CC)、分子功能 (MF) 和生物过程 (BP)。外圈、中圈和内圈分别表示前 20 个 GO 术语、基因背景中的基因数量和 GO 术语的基因富集 P 值, 以及 DEGs 的数量。中央梯形列表显示每个 GO 术语的富集因子。GO analysis of 899 common DEGs. Yellow, green, and blue represent cellular component (CC), molecular function (MF) and biological process (BP), respectively. The outer circle, middle circle, and inner circle represented the top 20 GO terms, the gene numbers in the genome background and the gene enrichment P-value for the GO term, as well as the number of DEGs, respectively. The central ladder-shaped list indicates the enrichment factor for each GO term.; B. 899 个共同的 DEGs 的 KEGG 分析。富集因子表示映射到某一通路的 DEGs 数量与映射到该通路的基因总数之比。基因计数表示映射到某一通路的 DEGs 数量。KEGG analysis of 899 common DEGs. The enrichment factor represents the ratio of the number of DEGs mapped to a pathway to the total number of genes mapped to that pathway. Gene count denotes the number of DEGs mapped to a pathway.

4 讨论

雌雄异株植物不仅在生长、形态、生理、生活史和资源分配等营养特征上存在性别二态性, 还会受到生物和非生物胁迫的影响。例如, 康定柳 (*S. paraplesia*) 雌性个体的株高、生物量积累、叶绿素总含量和净光合速率都高于雄性个体 (Liao et al., 2019); 两周大的大麻 (*Cannabis sativa*) 雄性个体的下胚轴要比雌性个体长 (Campbell et al., 2021); 红皮柳 (*S. purpurea*) 雌性个体株高和分枝角度大于雄株, 而叶重小于雄株 (Gouker et al., 2021); 刺柏 (*Juniperus communis*) 雌株叶片中的碳水化合物、碳氮比和酚类化合物的浓度高于雄株 (Rabska et al., 2020); 相对于雄株, 甜樟属的 *Ocotea tenera* 雌株叶片较大 (Wheelwright et al., 2012); 干旱胁迫会导致美洲黑杨 (*P. deltoides*) 雌雄株的转录和代谢谱发生性别特异性的变化, 从而导致对草食动物的抗性不同 (He et al., 2022); 水分胁迫和氮含量下降的双重压力下, 坡柳 (*S. myrtilleacea*) 雌性个体表现出比雄性个体更好的生长和耐旱能力 (Cai et al., 2022); 盐胁迫下, 一年生山靛 (*Mercurialis annua*) 雌性个体比雄性个体产生更多的新的生殖节点 (Cossard et al., 2019; Zluvova et al., 2015), 盐胁迫还会导致青杨 (*P. cathayana*) 雌性个体相比于雄性个体在生长方面 (茎长、地径、SPAD、平均叶面积、生物量积累) 以及养分 (碳、氮、磷、钾、钙和镁) 积累方面的限制更为显著, 而雄性个体对水分亏缺有更强的适应性, 并从 AMF 形成中获得更多的优势 (Wu et al., 2015; Li, et al., 2020); 调控光竞争环境下, 一年生山靛雄性个体都比雌性个体更小 (Labouche and Pannell, 2016); 升高温度和紫外辐射, 欧洲山杨雌性个体的酚类物质水平高于雄性个体 (Sobuj et al., 2021); 夜间升温, 青杨雄性个体通过扩展根系、积累更多的碳水化合物和调节渗透物质, 表现出比雌性个体对夜间温度具有更强的适应能力 (Liao et al., 220); 在锰

胁迫下, 青杨雄性个体比雌性个体更具耐受性, 以适应锰胁迫 (Zhao et al., 2018); 在镉胁迫下, 青杨的雌性个体对镉积累更为敏感, 遭受更严重的超微结构损伤, 并且在生理活性方面表现出比雄性个体更大程度的下降 (Chen et al., 2016)。

本研究初步揭示了性别决定基因对叶绿素含量的影响和参与的调控通路, 从分子水平证实了植物在营养发育阶段存在性别二态性。然而, 本文仅对叶绿素含量这一生理性状进行了探究, 存在一定的局限性。未来需要进一步研究性别决定基因对其他营养特征是否也存在性别二态性, 如株高、地径、地上部分和地下部分生物量及光合产物分配、净光合速率、分枝数、茎节间数和节间距、叶片形态和大小、碳水化合物浓度等生理指标。同时选择已经鉴定了性别决定基因的其他物种对生长和非生物胁迫响应的能力, 进一步研究植物性别二态性在不同性状和不同层次上的表现, 有助于深入了解植物次生二态性的多效性和复杂性。

5 结论

本研究共获得了 91 个“南林 895”过表达株系和 139 个“84K”基因敲除系。在过表达株系中, 普遍观察到了植株叶片黄化现象。对叶色差异显著株系的叶绿素 a、b、(a+b) 的含量测定显示, 过表达株系叶绿素 a、b、(a+b) 的含量显著低于野生型, 其中叶绿素 b 含量下降最为显著。而基因编辑植株没有出现黄化现象, 其叶色与野生型没有差异。对过表达株系开展的基因差异表达分析结果显示, 过表达与野生型植株叶片有 899 个差异表达基因。差异表达基因 GO 分类与 KEGG 通路分析显示, 类黄酮生物合成途径是差异表达基因数量最多的通路。杨树性别决定基因过表达可能影响了类黄酮生物合成途径基因的表达, 从而影响了过表达株系叶片叶绿素含量, 最终导致叶片黄化现象。这一发现对植物性别决定基因影响植物非生殖器官的次生性别二态性提供了直接证据。同时, 这项研究也为植物育种和遗传改良提供了新的思路和理论基础。

参 考 文 献

- Akagi T, Henry I, Ohtani H, et al. 2018. A Y-encoded suppressor of feminization arose via lineage-specific duplication of a cytokinin response regulator in Kiwifruit. *The Plant Cell*, 30(4):780-795.
- Akagi T, Henry I, Tao R, et al. 2014. Plant genetics. A Y-chromosome-encoded small RNA acts as a sex determinant in persimmons. *Science*, 346(6209): 646-650.
- Akagi T, Pilkington S, Varkonyi-Gasic E, et al. 2019. Two Y-chromosome-encoded genes determine sex in kiwifruit. *Nature Plants*, 5(8): 801-809.
- Anders S, Huber W. 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*, 11(10): R106.
- Arnon D. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in beta vulgaris. *Plant Physiology*, 24(1): 1-15.
- Bardou P, Mariette J, Escudié F, et al. 2014. jvenn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics*, 15(1):293.
- Barrett S, Hough J. 2012. Sexual dimorphism in flowering plants. *Journal of Experimental Botany*, 64(1): 67-82.
- Bu D, Luo H, Huo P, et al. 2021. KOBAS-i: intelligent prioritization and exploratory visualization of biological functions for gene enrichment analysis. *Nucleic Acids Research*, 49(W1): W317-W325.
- Cai, Z., Han, Y., Duan, B, et al. 2022. *Salix myrtilleacea* female cuttings performed better than males under nitrogen deposition on leaves and drought conditions. *Forests*, 13(6): 821.
- Campbell L, Peach K, Wizenberg S. (2021). Dioecious hemp (*Cannabis sativa* L.) plants do not express significant sexually dimorphic morphology in the seedling stage. *Scientific Reports*, 11(1): 16825.
- Chen J, Duan B, Xu G, et al. 2016. Sexual competition affects biomass partitioning, carbon-nutrient balance, Cd allocation and ultrastructure of *Populus cathayana* females and males exposed to Cd stress. *Tree Physiology*, 36(11): 1353-1368.
- Cossard G, Toups M, Pannell J, 2019. Sexual dimorphism and rapid turnover in gene expression in pre-reproductive seedlings of a dioecious herb. *Annals of Botany*, 123(7): 1119-1131.
- Darolti I, Wright A, Pucholt P, et al. 2018. Slow evolution of sex-biased genes in the reproductive tissue of the dioecious plant *Salix viminalis*. *Molecular Ecology*, 27(3): 694-708.
- Forrest J. 2014. Plant size, sexual selection, and the evolution of protandry in dioecious plants. *The American Naturalist*. 184(3): 338-

351.

- Gouker F, Carlson C, Zou J, *et al.* 2021. Sexual dimorphism in the dioecious willow *Salix purpurea*. *American Journal of Botany*, 108(8): 1374-1387.
- Harkess A, Huang K, van der Hulst R, *et al.* 2020. Sex determination by two Y-linked genes in garden asparagus. *The Plant Cell*, 32(6): 1790-1796.
- He F, Wu Z, Zhao Z, *et al.* 2022. Drought stress drives sex-specific differences in plant resistance against herbivores between male and female poplars through changes in transcriptional and metabolic profiles. *The Science of the Total Environment*, 845: 157171.
- Hemborg Å M, Bond W J. 2005. Different rewards in female and male flowers can explain the evolution of sexual dimorphism in plants[J]. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85(1): 97-109.
- Hultine K, Bush S, Ward J, *et al.* 2018. Does sexual dimorphism predispose dioecious riparian trees to sex ratio imbalances under climate change? *Oecologia*, 187: 921-931.
- Juvany M, Munné-Bosch S. 2015. Sex-related differences in stress tolerance in dioecious plants: a critical appraisal in a physiological context. *Journal of Experimental Botany*, 66(20): 6083-6092.
- Kim D, Langmead B, Salzberg S. 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, 12(4): 357-360.
- Labouche A, Pannell J, 2016. A test of the size-constraint hypothesis for a limit to sexual dimorphism in plants. *Oecologia*, 181: 873-884.
- Li Z, Wu N, Liu T, *et al.* 2020. Gender-related responses of dioecious plant *Populus cathayana* to AMF, drought and planting pattern. *Scientific Reports*, 10(1): 1-8.
- Liao J, Cai Z, Song H, *et al.* 2020. Poplar males and willow females exhibit superior adaptation to nocturnal warming than the opposite sex. *Science of the Total Environment*, 717: 137179.
- Liao J, Song H, Tang D, *et al.* 2019. Sexually differential tolerance to water deficiency of *Salix paraplesia*—A female-biased alpine willow. *Ecology and Evolution*, 9(15): 8450-8464.
- McKown A, Klápště J, Guy R, *et al.* 2017. Sexual homomorphism in dioecious trees: extensive tests fail to detect sexual dimorphism in *Populus*†. *Scientific Reports*, 7(1): 1831.
- Midgley J. 2010. Causes of secondary sexual differences in plants- evidence from extreme leaf dimorphism in *Leucadendron* (Proteaceae). *South African Journal of Botany*, 76 (3): 588-592.
- Müller N, Kersten B, LeiteMontalvão A, *et al.* 2020. A single gene underlies the dynamic evolution of poplar sex determination. *Nature Plants*, 6(6): 630–637.
- Pachter L. 2010. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, 28(5): 511-515.
- Rabska M, Pers-Kamczyc E, Żytkowiak R, *et al.* 2020. Sexual dimorphism in the chemical composition of male and female in the dioecious tree, *Juniperus communis* L., growing under different nutritional conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21): 8094.
- Robinson K, Delhomme N, Mähler N, *et al.* 2014. *Populus tremula* (European aspen) shows no evidence of sexual dimorphism. *BMC Plant Biology*, 14, 276.
- Sakai A, Weller S. 1999. Gender and sexual dimorphism in flowering plants: a review of terminology, biogeographic patterns, ecological correlates, and phylogenetic approaches. *Gender and sexual dimorphism in flowering plants*, 1-31.
- Sobuj N, Nissinen K, Virjamo V, *et al.* 2021. Accumulation of phenolics and growth of dioecious *Populus tremula* (L.) seedlings over three growing seasons under elevated temperature and UVB radiation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 165: 114-122.
- Steven J, Delph L, Brodie E. 2007. Sexual dimorphism in the quantitative genetic architecture of floral, leaf, and allocation traits in *Silene latifolia*. *Evolution*, 61 (1): 42-57.
- Tonnabel J, David P, Pannell J. 2017. Sex-specific strategies of resource allocation in response to competition for light in a dioecious plant. *Oecologia*, 185: 675-686.
- Welsford M, Hobbhahn N, Midgley J, *et al.* 2016. Floral trait evolution associated with shifts between insect and wind pollination in the dioecious genus *Leucadendron* (Proteaceae). *Evolution*, 70 (1): 126-139.
- Wheelwright N, Sinclair J, Hochwender C, *et al.* 2012. Leaf size in three generations of a dioecious tropical tree, *Ocotea tenera* (Lauraceae): Sexual dimorphism and changes with age. *American Journal of Botany*, 99(8): 1350-1355.
- Wu N, Li Z, Liu H, *et al.* 2015. Influence of arbuscular mycorrhiza on photosynthesis and water status of *Populus cathayana* Rehder males and females under salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37: 1-14.
- Xue L, Wu H, Chen Y, *et al.* 2020. Evidences for a role of two Y-specific genes in sex determination in *Populus deltoides*. *Nature Communications*, 11(1): 5893.

- Yang W, Wang D, Li Y, *et al.* 2021. A general model to explain repeated turnovers of sex determination in the Salicaceae. *Molecular Biology and Evolution*, 38(3): 968-980.
- Young M, Wakefield M, Smyth G, *et al.* 2010. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biology*, 11(2): R14.
- Zemp N, Tavares R, Widmer A. 2015. Fungal infection induces sex-specific transcriptional changes and alters sexual dimorphism in the dioecious plant *Silene latifolia*. *PLoS Genetics*, 11(10): e1005536.
- Zhao H, Zhang S, Li, J, *et al.* 2018. Effects of NH_4^+ and NO_3^- on sexual dimorphism responses to manganese stress in a dioecious tree species. *Trees*, 32: 473-488.
- Zluvova J, Zak J, Janousek B, *et al.* 2010. Dioecious *Silene latifolia* plants show sexual dimorphism in the vegetative stage. *BMC Plant Biology*, 10(1): 1-5.