

基于转录组测序挖掘甜荞 自交不亲和相关功能基因

张建¹, 黄科慧^{1,2}, 刘洋¹, 唐恬¹,
吴银环¹, 王于栋¹, 陶建波¹, 王艺钢¹,
姜澳华¹, 刘佳琦¹, 方小梅¹, 易泽林¹

1. 西南大学 农学与生物科技学院/重庆市荞麦产业创新团队, 重庆 400715;

2. 甘肃省古浪县防沙治沙技术推广中心, 甘肃 古浪 733100

摘要: 普通甜荞属于花柱异长型自交不亲和 1 年生草本作物, 营养价值丰富。为了探明甜荞育性和花型发育的重要功能途径和关键基因, 以自交不亲和普通甜荞乌克兰大粒荞和自交亲和甜荞品种甜自 21 为材料, 分别对盛花期的甜自 21 等柱花, 乌克兰大粒荞长柱花和短柱花雌雄蕊进行转录组测序, 获得 283 170 条平均长度为 1 351 bp, N50 为 2 040 bp 的 Unigenes, 其中有 68 813 条差异表达基因(DEGs)。GO 功能富集分析显示, 自交不亲和甜荞中, 长、短柱花雌雄蕊中的差异基因主要富集在导管形成和导管发育过程中; KEGG 代谢通路分析显示, 自交不亲和甜荞(S-型和 L-型)与自交亲和甜荞(H-型)雌雄蕊中差异基因主要富集在倍半萜和三萜化合物合成途径中; 自交不亲和甜荞长、短柱花雌雄蕊中差异基因(L vs S)主要富集在植物激素信号转导途径中。倍半萜和三萜化合物合成途径共富集到 77 个差异基因, 其中三萜化合物合成途径基因在自交不亲和甜荞中下调表达, 倍半萜化合物合成途径基因以上调表达为主。植物激素信号转导途径中, 与自交亲和型等柱花雌雄蕊比较, 生长素、茉莉酸和赤霉素信号通路中的差异表达基因在自交不亲和型长、短柱花雌雄蕊中均高表达。通过 qRT-PCR 对 15 个自交亲和和性相关差异表达基因进行分析, 结果表明: 其表达趋势与转录组结果一致, *AGL80* 和 *PG* 在短柱花雌雄蕊中高表达, 长柱花雌雄蕊中低表达, 可能与自交不亲和甜荞长、短柱花发育有关。锌指蛋白基因 *CCCH*, 转录因子 *ARF*, *MYC*, *SP11*, *SUI1* 与甜荞育性发育相关。该文比较分析了不同花型甜荞雌雄蕊转录组测序结果, 获得大量 Unigenes 数据及差异表达基因的相关信息, 发现了导管形成与发育对自交不亲和甜荞花柱发育具有重要影响, 明确了萜类化合物、植物激素和转录因子对甜荞育性发育具有重要作用。

关键词: 甜荞; 雌雄蕊; RNA-Seq; 自交亲和性; 花柱发育

中图分类号: S517 **文献标志码:** A

文章编号: 1673-9868(2022)11-0099-15

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



收稿日期: 2021-12-21

基金项目: 重庆市自然科学基金项目(CSTB2022NSCQ-MSX1034); 中央高校基本业务费专项(SWU119070, XDJK2019C038, XDJK2019D022); 重庆市农委荞麦产业技术体系项目(CQCJT2021001)。

作者简介: 张建, 博士, 副教授, 主要从事作物分子育种研究。

通信作者: 易泽林, 副研究员, 硕士研究生导师。

Mining of Common Buckwheat Self-Incompatibility Related Gene Based on RNA-Seq

ZHANG Jian¹, HUANG Kehui^{1,2}, LIU Yang¹, TANG Tian¹,
WU Yinhan¹, WANG Yudong¹, TAO Jianbo¹, WANG Yigang¹,
JIANG Aohua¹, LIU Jiaqi¹, FANG Xiaomei¹, YI Zelin¹

1. College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China;
2. Gulang County Sand Prevention and Control Technology Extension Center of Gansu, Gulang Gansu 733100, China

Abstract: Common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*), a heteromorphic self-incompatible (SI) species, is the annual herbaceous crops with rich nutritional value. The objective of this study is to explore the important functional pathways and key genes regulating fertility and style development of self-incompatible common buckwheat, which has great significance to further study the molecular mechanism of self-incompatibilities in common buckwheat. Ukraine daliqiao (UD) (heterostyly and self-incompatible) and Tianzi 21 (TZ) (homostyled and self-compatible) as materials, RNA-seq were carried out with the samples of pistils and stamens from S-morph flower (S) and L-morph flower (L) of UD, and H-morph flower of TZ (H). A total of 283 170 unigenes with an average length of 1 351 bp and N50 of 2 040 bp were obtained, among which 68 813 differentially expressed genes (DEGs) were identified. GO function enrichment analysis showed that the DEGs in L vs S were significantly enriched in “angiogenesis” and “blood vessel development”. KEGG metabolic pathway analysis showed that DEGs of L vs H and S vs H were significantly enriched in the pathways of sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis. The most of DEGs of L vs S were enriched in the pathway of plant hormone signal transduction. There were 77 DEGs in “sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis”, among which the gene expression of triterpenoid synthesis pathway was down-regulated and the gene expression of sesquiterpenoid synthesis pathway was mainly up-regulated in self-incompatible common buckwheat. In the plant hormone signal transduction pathway, compared with the self-compatible common buckwheat, the DEGs in auxin, JA and GA had high expression in the self-incompatible common buckwheat. Fifteen DEGs related to self-incompatibility were analyzed by qRT-PCR, and the expression trend was consistent with the results of RNA-Seq analysis. The expression levels of *AGL80* and *PG* were high in the pistils and stamens of S-morph flower and low in the pistils and stamens of L-morph flower in UD, which may be related to the style development of self-incompatible common buckwheat. *CCCH* encoding zin finger protein, transcription factors *ARF*, *MYC*, *SP11*, *SUI1* are related to the fertility development of common buckwheat. This study acquired the gene expression profiling data of the pistils and stamens of different flower style in common buckwheat, found that the formation and development of vessel have an important effect on the style development of self-incompatible com-

mon buckwheat, and the terpenoids, certain plant hormones and transcription factor play important roles in fertility development of common buckwheat.

Key words: common buckwheat; pistils and stamens; RNA-seq; self-compatibility; style development

甜荞 *Fagopyrum esculentum* 和苦荞 *Fagopyrum tataricum* 都属于蓼科 Polygonaceae 荞麦属 *Fagopyrum* 的 1 年生草本作物, 起源于中国, 具有生长期短、抗逆性强的特点^[1-3], 富含多种矿质营养元素(铁、钾、锌、硒等)和保健成分(芦丁、槲皮素、不饱和脂肪酸、抗性淀粉、 β -葡聚糖等)^[4-5], 是重要药食兼用作物. 栽培种甜荞花型为异型花(雌雄蕊不等长), 分为 2 种类型, 雌蕊长于雄蕊(长柱花, pin)和雌蕊短于雄蕊(短柱花, thrin)^[6]. 普通栽培种甜荞自花授粉或同类型花植株之间相互授粉不结实, 具有自交不亲和现象^[7]; 同型花雌雄蕊等长, 能够自花授粉结实, 常见于野生种中. 近年来, 国内外多个研究团队利用自交可育野生荞麦 *F. homotropicum*^[8], 通过种间杂交的方式(*F. esculentum* 和 *F. homotropicum*)培育出自交可育甜荞, 即雌雄蕊等长的同型花甜荞^[9-12]. Yasui 等^[13]指出荞麦花的形态是 thrum 和 pin 两种形式, 通过一个具有两个等位基因状态的基因(S 和 s), 控制 thrum(Ss)和 pin(ss)形式. 与其他二态型作物一样, 花的形态和种内不亲和性均由单个 S 位点决定, 且 S-型植株为杂合子(S/s), L-型植株在该位点为纯合隐性(s/s), 未发现 S/S 基因型^[13]. 但随后在中国云南省发现了花柱等长自交亲和野生甜荞. Woo 等^[14]发现自交亲和性受单基因 S^h 控制, 甜荞花型 S 基因的优势关系为 $S > S^h > s$, 自交亲和性等位基因 S^h 保留了异型性不亲和性, 并认为 S^h 等位基因来源于 S 超基因复合体^[15,12]. Yasui 等^[13]在 S-Locus 基因区注释到 32 个预测基因, 并在这 32 个预测基因中发现 2 个与 SI 相关的候选基因, 编码 RING/U-box 超家族蛋白. Mizuno 等^[16]利用 GBS 技术获得甜荞全基因组 SNP 标记, S 等位基因区域内的 SNP 密度和遗传多样性分析表明该区域具有高度多样性. 由于普通甜荞属于自交不亲和的虫媒传粉作物, 花期遇阴雨天气将严重影响结实率, 导致每 667 m² 产量低且十分不稳定(全国平均单产量约为 60 kg/667 m²)^[11], 而通过种间杂交培育的自交可育甜荞, 因携带野生荞麦的特性, 表现出结实率低、产量低、极易落粒, 自交衰退等特点^[11,17]. 因此, 甜荞产量与甜荞育性息息相关, 对甜荞育性及花柱发育的分子机理进行深入研究具有重要意义. 本研究以自交亲和甜自 21 和自交不亲和乌克兰大粒荞为材料, 分别对甜自 21 等柱花、乌克兰大粒荞长柱花和短柱花雌雄蕊进行 RNA-seq, 通过对转录组数据的分析解析甜荞自交不亲和信号传导网络, 挖掘自交不亲和相关基因, 阐明自交不亲和的分子机理, 揭示甜荞育性及花柱发育的分子机制.

1 材料与方法

1.1 试验材料

2018 年秋, 自交亲和甜荞品种甜自 21 和贵甜 2 号(来源于贵州师范大学), 自交不亲和甜荞品种乌克兰大粒荞和西荞 2 号分别隔离种植于重庆市北碚区西南大学校内实验基地, 常规田间管理, 待开花初期将乌克兰大粒荞和西荞 2 号长柱花(L-型)植株和短柱花(S-型)植株移栽后隔离种植. 盛花期分别对甜自 21 和贵甜 2 号等柱花, 乌克兰大粒荞和西荞 2 号长柱花和短柱花的花药直径、花冠直径、雄蕊高、花柱高和花柱到花药的距离进行测量并统计分析. 于清晨 7:00~9:00 点, 分别取甜自 21 和贵甜 2 号等柱花, 乌克兰大粒荞和西荞 2 号长柱花和短柱花雌雄蕊, 并进行 3 次生物学重复, 样品经液

氮速冻后 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 用于 RNA 提取.

1.2 RNA 提取及转录组测序

采用博日 Bioflux 的 Biospin 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取各个花型雌雄蕊的总 RNA. 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性, 使用 Agilent Bioanalyzer 2100 System 对 RNA 精确质检. 将检测合格的甜自 21 等柱花(H), 乌克兰大粒荞长柱花(L)和短柱花(S)雌雄蕊总 RNA 送至北京诺禾致源科技股份有限公司测序, 构建 cDNA 文库, 在 Illumina HiSeq 4000 平台上进行测序. 为了保证信息分析的质量, 去除测序得到的原始测序序列(原始数据)里面含有带接头的、低质量的读长后, 得到有效数据, 然后采用 Trinity 软件对有效数据进行拼接, 得到拼接的转录本. 然后利用 Corset 层次聚类软件对转录本进行层次聚类, Corset 层次聚类后得到最长的 Cluster 被确定为 Unigene, 用于后续的分析. 得到的 Unigene 分别与 NCBI(National Center for Biotechnology Information)中的 NR 和 Nt 数据库、KO(KEGG ortholog database)数据库、Swiss-Prot 蛋白质数据库、Pfam 蛋白数据库、GO 数据库、KOG/COG 数据库进行比对, e-value 值设置为小于 $1\text{e-}5$. 然后, 对注释到 GO 数据库中的 Unigene 进行 GO 功能分类, 对注释到 COG/KOG 数据库中的 Unigene 进行 COG/KOG 功能分类分析, 对注释到 KO 数据库中的 Unigene 进行 KEGG 代谢途径分析.

1.3 基因表达数据分析

以 Trinity 拼接得到的转录组作为参考序列, 将每个样品的有效数据在参考序列上做比对, 采用 RSEM 软件, 设置 bowtie2 参数为 mismatch 0, 对 bowtie 的比对结果进行统计, 得到了每个样品比对到每个基因上的读长数目, 并对其进行 FPKM 转换, 进而得到了所有基因的表达水平. 再用 DEGseq 进行差异分析, 筛选阈值为 $q\text{value} < 0.005$ 且 $|\log_2 \text{Fold_change}| > 1$. 然后, 分别对差异表达(上调和下调)基因进行 GO 功能富集分析及 KEGG 代谢途径富集分析.

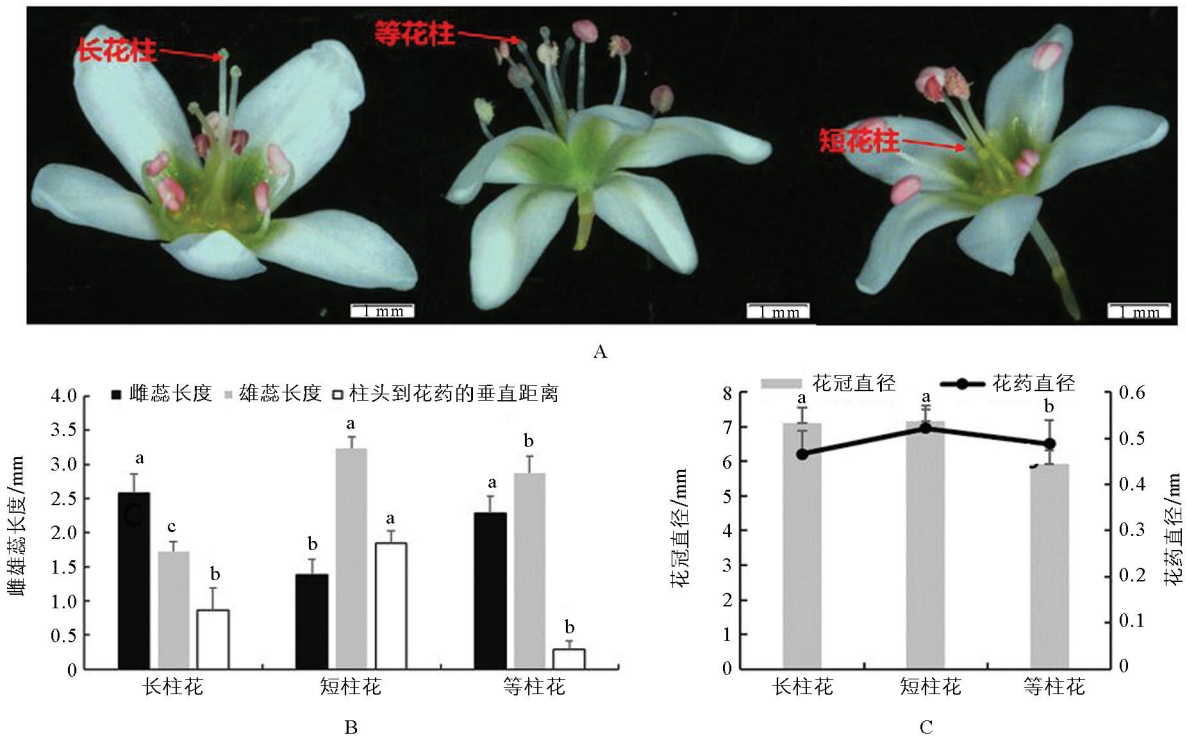
1.4 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析

根据转录组分析结果, 筛选出可能与甜荞育性和花柱发育相关的差异表达基因, 利用 Primer-NCBI 在线设计引物. 同时, 在自交亲和甜自 21 和贵甜 2 号等柱花, 自交不亲和乌克兰大粒荞和西荞 2 号长柱花和短柱花雌雄蕊总 RNA 中, 利用实时荧光定量 PCR 进一步验证差异基因的表达特性. 将 RNA 采用第 1 链 cDNA 合成试剂盒(Invitrogen)反转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板, FeActin 为内参, 采用 TaKaRa(日本)公司的 SYBR © Premix Ex Taq™ II(Tli RNaseH Plus)试剂盒, 在 ABI 7500FAST 荧光定量 PCR 仪(ABI 公司, 美国)进行荧光定量检测. 每个样品设 3 次技术重复, 依照 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算相对表达量.

2 结果

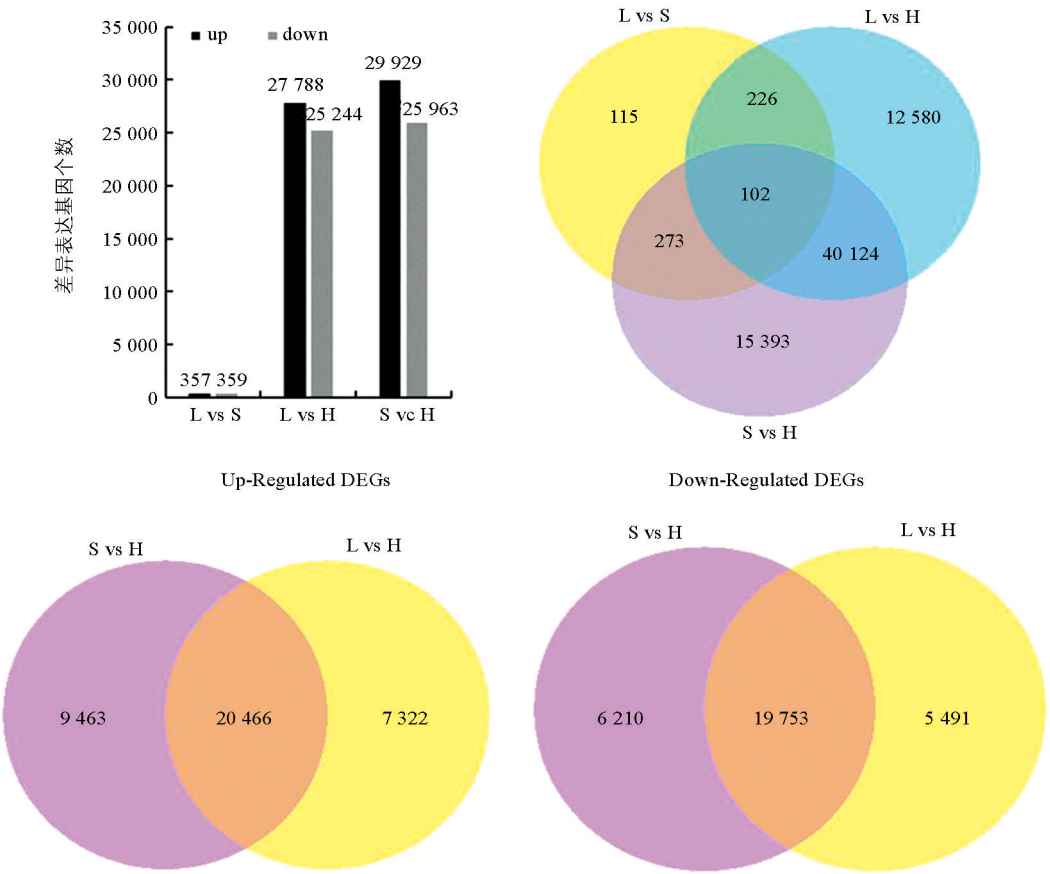
2.1 甜荞花表型分析及性状测量

选取花柱异长型自交不亲和甜荞品种乌克兰大粒荞(UD)和花柱等长型自交亲和甜荞品种甜自 21(TZ)作为实验材料(图 1A). 表型分析结果表明, 不同花柱类型花的花冠直径差异不明显, 短柱花柱头到花药的直径、花药直径、雄蕊高均大于长柱花, 花柱高则是长柱花高于短柱花. 等柱花的花药直径、雄蕊高、花柱高均在长柱花和短柱花之间, 且短柱花柱头到花药的直径最小(图 1). 方差分析结果显示, 除花药直径外, 花冠直径、雄蕊高、花柱高、花柱到花药的直径在长柱花、短柱花和等柱花之间差异均具有统计学意义($p < 5\%$)(图 1).



B 图和 C 图中不同小写字母表示在 $p < 5\%$ 水平差异具有统计学意义。

图 1 甜荞花表型分析及性状测量



L 表示乌克兰大粒荞长柱花, S 表示乌克兰大粒荞短柱花, H 表示甜自 21 等柱花. 下同.

图 2 L vs H 和 S vs H 差异表达基因分析

2.2 RNA-seq 测序及差异基因筛选

甜自 21 等柱花(H), 乌克兰大粒荞长柱花(L)和短柱花(S)雌雄蕊总 RNA 样品经转录组 Illumina HiSeq 4000 测序平台测序后, 9 个测序样品得到的原始数据, 经过严格的质量评估和低质量数据过滤, 使其得到高质量的有效数据, Q30(碱基被测错的概率为 1%)均在 92%以上, GC 含量均在 45%左右(表 1), 说明得到的有效数据质量和准确度较高, 满足后续的数据分析需求。

高质量的有效数据进行拼接后共得到 326 245 个转录本, 平均长度为 1 209 bp, N50 的长度为 1 981 bp. 得到的转录本利用 Corset 软件进行层次聚类, 通过层次聚类后得到 Clusters, 这些 Clusters 中具有最长序列的被确定为 Unigene, 最终得到 283 170 个平均长度为 1 351 bp, N50 为 2 040 bp 的 Unigenes.

通过分析长柱花(L-型)乌克兰大粒荞、短柱花(S-型)乌克兰大粒荞和等柱花(H-型)甜自 21 雌雄蕊中的基因差异表达, 以等柱花雌雄蕊(H-型)作为对照, 在长柱花(L-型)雌雄蕊中上调表达 27 788 个, 下调表达 25 244 个; 在短柱花(S-型)雌雄蕊中上调表达 29 929 个, 下调表达 25 963 个; 长(L-型)、短柱花(S-型)雌雄蕊同时上调基因 20 466 个, 同时下调基因 19 753 个. 通过对长柱花(L-型)乌克兰大粒荞和短柱花(S-型)乌克兰大粒荞雌雄蕊中的基因进行差异表达分析, 共 716 个差异基因, 其中长柱花(L-型)雌雄蕊相对于短柱花(S-型)雌雄蕊上调表达 357 个, 下调表达 359 个(图 2).

表 1 不同花型雌雄蕊转录组测序结果

样品	原始序列	过滤后序列	过滤后碱基数	碱基错误率/%	Q30/%	GC 含量/%
L_1	56420138	55733278	8.36G	0.02	95.02	45.78
L_2	51854578	51235976	7.69G	0.02	94.89	45.83
L_3	54170174	53401442	8.01G	0.03	92.39	45.39
S_1	63152392	61912778	9.29G	0.02	95.03	45.87
S_2	66402272	65372118	9.81G	0.02	94.82	45.68
S_3	59586576	58608248	8.79G	0.03	92.51	45.42
H_1	59225340	58204792	8.73G	0.02	95.04	45.53
H_2	53393352	52412146	7.86G	0.02	95.04	45.67
H_3	56415928	55677058	8.35G	0.03	92.79	45.77

2.3 差异表达基因 GO 功能分析

差异表达基因 GO 富集分析表明, 自交不亲和甜荞雌雄蕊(L-型和 S-型)与自交亲和甜荞雌雄蕊(H-型)相比较(L vs H, S vs H), 差异表达基因特异性富集到氧化还原过程(GO: 0055114, oxidation-reduction process)和氧化还原酶活性(GO: 0016491, oxidoreductase activity; GO: 0016705, oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen)最为显著, 其次在血红素结合(GO: 0020037, heme binding)、铁离子结合(GO: 0005506, iron ion binding)、单个有机体代谢过程(GO: 0044710, single-organism metabolic process)、转移酶活性(GO: 0016758, transferase activity, transferring hexosyl groups)和四吡咯结合(GO: 0046906, tetrapyrrole binding)等均有显著富集(图 3), 表明这些 GO 分类中的差异基因与甜荞亲和性有关. 在自交不亲和甜荞中, 长柱花(L-型)雌雄蕊与短柱花(S-型)雌雄蕊(L vs S)差异表达基因特异性富集到导管形成过程(GO: 0001525, angiogenesis)最为显著, 其次为导管发育(GO: 0001568, blood vessel development)、导管系统开发(GO: 0001944, vasculature development)、导管生成调控(GO: 0045765, regulation of angiogenesis)和导管形态发生(GO: 0048514, blood vessel morphogenesis)(图 3), 表明导管形成相关基因调控甜荞花柱发育。

2.4 差异表达基因 KEGG 通路分析

差异表达基因 KEGG 富集分析表明, 自交不亲和甜荞与自交亲和甜荞雌雄蕊(L vs H, S vs H)差异表达基因均显著富集到倍半萜和三萜生物合成途径(ko00909, Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis), 此外还有花色苷合成途径(ko00942, Anthocyanin biosynthesis), 二萜化合物合成过程(ko00904, Diterpenoid biosynthesis), 角质、软木脂和蜡质合成(ko00073, Cutin, suberine and wax biosynthesis), β -丙氨酸代谢(ko00410, beta-Alanine metabolism), 精氨酸和脯氨酸代谢(ko00330, Arginine and proline metabolism), 半胱氨酸和蛋氨酸代谢(ko00270, Cysteine and methionine metabolism)等(表 2), 表明萜类化合物可能与甜荞亲和性有关. 在

自交不亲和甜荞中, 未检测到长柱花和短柱花雌雄蕊(L vs S)差异基因显著富集到某个代谢途径, 但植物激素信号转导(ko04075, Plant hormone signal transduction)中的差异基因最多.

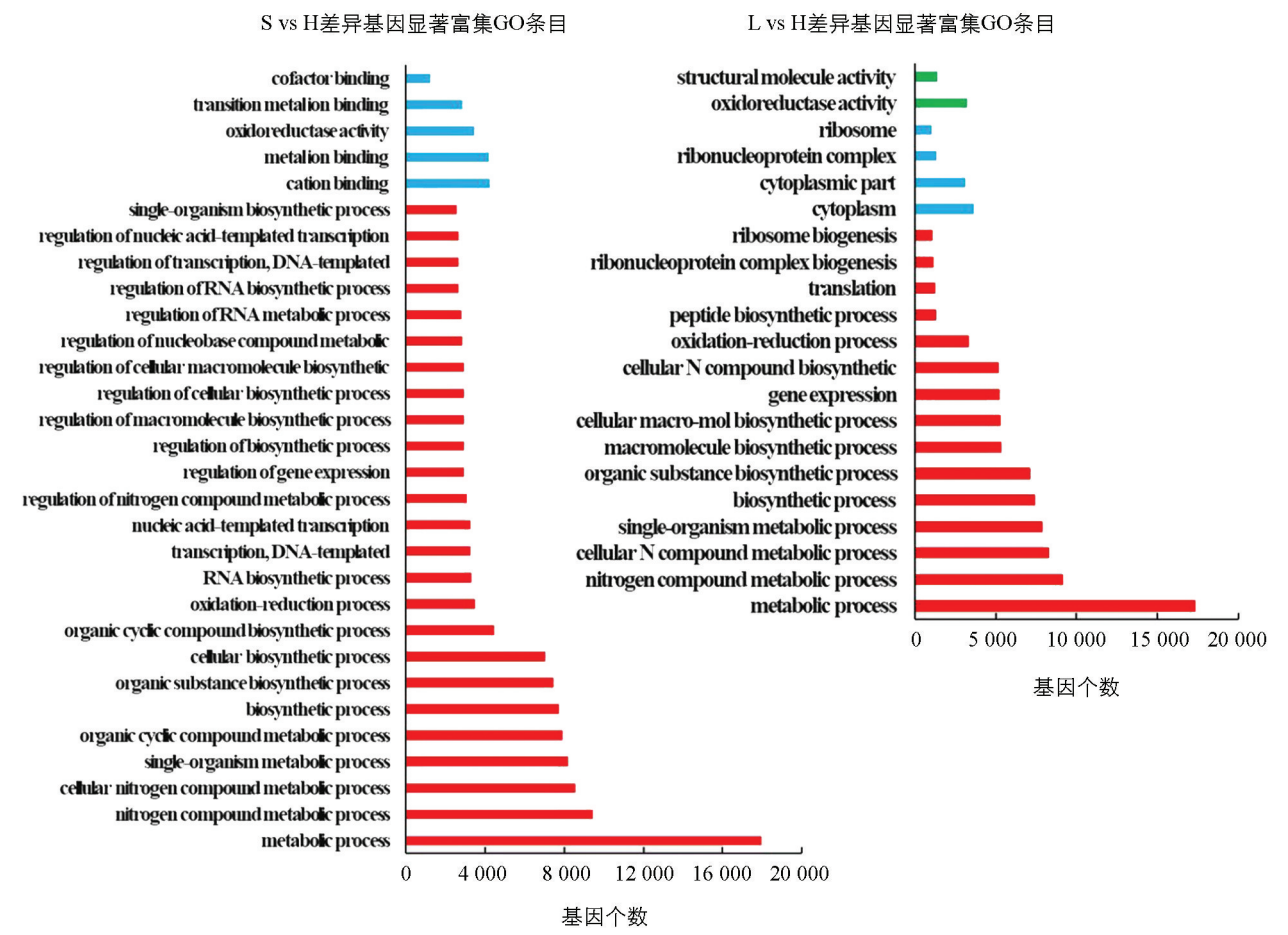


图 3 L vs H, S vs H 和 L vs S 中差异表达基因 GO 分析

表 2 差异表达基因 KEGG 通路分析_top20

条目		节点	DG 数目	总基因数目	p 值	修正后 p 值
L vs H	Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis	ko00909	103	265	1.49E-06	0.000 185 026
	Anthocyanin biosynthesis	ko00942	38	76	6.05E-05	0.003 751 799
	Ribosome	ko03010	665	2 591	0.000 147	0.006 079 685
	beta-Alanine metabolism	ko00410	166	574	0.001 189	0.036 855 917
	Diterpenoid biosynthesis	ko00904	55	155	0.001 965	0.044 372 750
	Cutin, suberine and wax biosynthesis	ko00073	64	190	0.002 504	0.044 372 750
	Arginine and proline metabolism	ko00330	209	761	0.002 505	0.044 372 750
	Tryptophan metabolism	ko00380	98	344	0.014 270	0.221 180 526
	Glycine, serine and threonine metabolism	ko00260	192	737	0.019 200	0.230 627 731
	Phenylalanine metabolism	ko00360	105	378	0.019 818	0.230 627 731
	Limonene and pinene degradation	ko00903	75	258	0.020 459	0.230 627 731
	Cysteine and methionine metabolism	ko00270	237	932	0.023 183	0.239 562 705
	alpha-Linolenic acid metabolism	ko00592	186	723	0.029 347	0.279 923 248
	Other types of O-glycan biosynthesis	ko00514	22	61	0.034 566	0.306 159 299
	Histidine metabolism	ko00340	85	316	0.055 426	0.458 191 199
	Circadian rhythm-plant	ko04712	139	544	0.060 126	0.465 980 375
	C5-Branched dibasic acid metabolism	ko00660	28	92	0.082 679	0.572 725 017
	Steroid biosynthesis	ko00100	95	370	0.095 350	0.572 725 017
	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	ko00400	162	657	0.097 898	0.572 725 017
	Linoleic acid metabolism	ko00591	64	241	0.099 799	0.572725017

续表 2

	条目	节点	DG 数目	总基因数目	<i>p</i> 值	修正后 <i>p</i> 值
S vs H	Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis	ko00909	92	265	0.000 388	0.033 980 646
	Anthocyanin biosynthesis	ko00942	35	76	0.000 642	0.033 980 646
	alpha-Linolenic acid metabolism	ko00592	210	723	0.001 012	0.033 980 646
	Cutin, suberine and wax biosynthesis	ko00073	68	190	0.001 096	0.033 980 646
	Flavonoid biosynthesis	ko00941	91	286	0.003 496	0.086 699 505
	Arginine and proline metabolism	ko00330	203	761	0.021 725	0.283 804 733
	Circadian rhythm-plant	ko04712	149	544	0.023 304	0.283 804 733
	Cysteine and methionine metabolism	ko00270	244	932	0.024 288	0.283 804 733
	Diterpenoid biosynthesis	ko00904	49	155	0.028 043	0.283 804 733
	Plant hormone signal transduction	ko04075	500	2 007	0.028 868	0.283 804 733
	beta-Alanine metabolism	ko00410	155	574	0.029 894	0.283 804 733
	Regulation of autophagy	ko04140	158	588	0.032 232	0.283 804 733
	Stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis	ko00945	55	180	0.033 530	0.283 804 733
	Oxidative phosphorylation	ko00190	295	1 157	0.037 121	0.283 804 733
	Taurine and hypotaurine metabolism	ko00430	33	100	0.041 519	0.283 804 733
	Caffeine metabolism	ko00232	25	71	0.041 532	0.283 804 733
	Sulfur metabolism	ko00920	70	242	0.043 616	0.283 804 733
	Other types of O-glycan biosynthesis	ko00514	22	61	0.044 775	0.283 804 733
	Phenylalanine metabolism	ko00360	104	378	0.045 970	0.283 804 733
	Tyrosine metabolism	ko00350	131	488	0.047 863	0.283 804 733
L vs S	Carotenoid biosynthesis	ko00906	5	385	0.019 206	0.557 989 998
	Caffeine metabolism	ko00232	2	71	0.033 378	0.557 989 998
	One carbon pool by folate	ko00670	3	183	0.037 015	0.557 989 998
	Monoterpenoid biosynthesis	ko00902	2	90	0.050 675	0.557 989 998
	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	ko00630	7	842	0.050 843	0.557 989 998
	Plant hormone signal transduction	ko04075	13	2 007	0.055 964	0.557 989 998
	DNA replication	ko03030	5	536	0.062 567	0.557 989 998
	Phenylalanine metabolism	ko00360	4	378	0.063 977	0.557 989 998
	Circadian rhythm-plant	ko04712	5	544	0.065 735	0.557 989 998
	SNARE interactions in vesicular transport	ko04130	4	383	0.066 427	0.557 989 998
	Regulation of autophagy	ko04140	5	588	0.084 727	0.634 355 072
	RNA degradation	ko03018	8	1 202	0.104 618	0.634 355 072
	Flavonoid biosynthesis	ko00941	3	286	0.104 991	0.634 355 072
	Photosynthesis	ko00195	3	303	0.119 043	0.634 355 072
	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	ko00400	5	657	0.119 639	0.634 355 072
	Photosynthesis-antenna proteins	ko00196	2	155	0.126 108	0.634 355 072
	Tyrosine metabolism	ko00350	4	488	0.128 381	0.634 355 072
	Terpenoid backbone biosynthesis	ko00900	4	501	0.137 319	0.640 822 483
	Stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis	ko00945	2	180	0.159 543	0.697 022 324
	Ubiquitin mediated proteolysis	ko04120	8	1 374	0.176 527	0.697 022 324

2.5 萜类化合物合成途径基因差异表达分析

在倍半萜和三萜化合物合成途径(ko00909)中共检测到 77 个差异基因, 与自交亲和甜荞雌雄蕊(H-型)相比, 40 个 DEGs 在长柱花雌雄蕊(L-型)和短柱花雌雄蕊(S-型)中同时上调表达, 37 个 DEGs 同时下调表达. 其中, 三萜化合物(Triterpenoid)合成途径基因 *FDFT1*(*farnesyl-diphosphate farnesyltransferase*)和 *SQLE*(*squalene monooxygenase*)以下调表达基因为主. 倍半萜化合物有多个类型, 无环型类倍半萜(Acyclic sesquiterpenoid)合成途径基因 *AFS1*(*alpha-farnesene synthase*)在自交不亲和甜荞长柱花(L)和短柱花(S)雌雄蕊中以下调表达为主; 大根香叶烯(Germacren-type)和蛇麻烯(Humule-type)合成途径相关基因 *SSTLE1*(germacrene C synthase), *GERD*((-)-germacrene D synthase), *TPS1*(valencene/7-epi-alpha-selinene synthase), *HVS*(vetispiradiene synthase), *TPS21*(valencene/7-epi-alpha-selinene synthase)多数为上调表达基因(图 4).

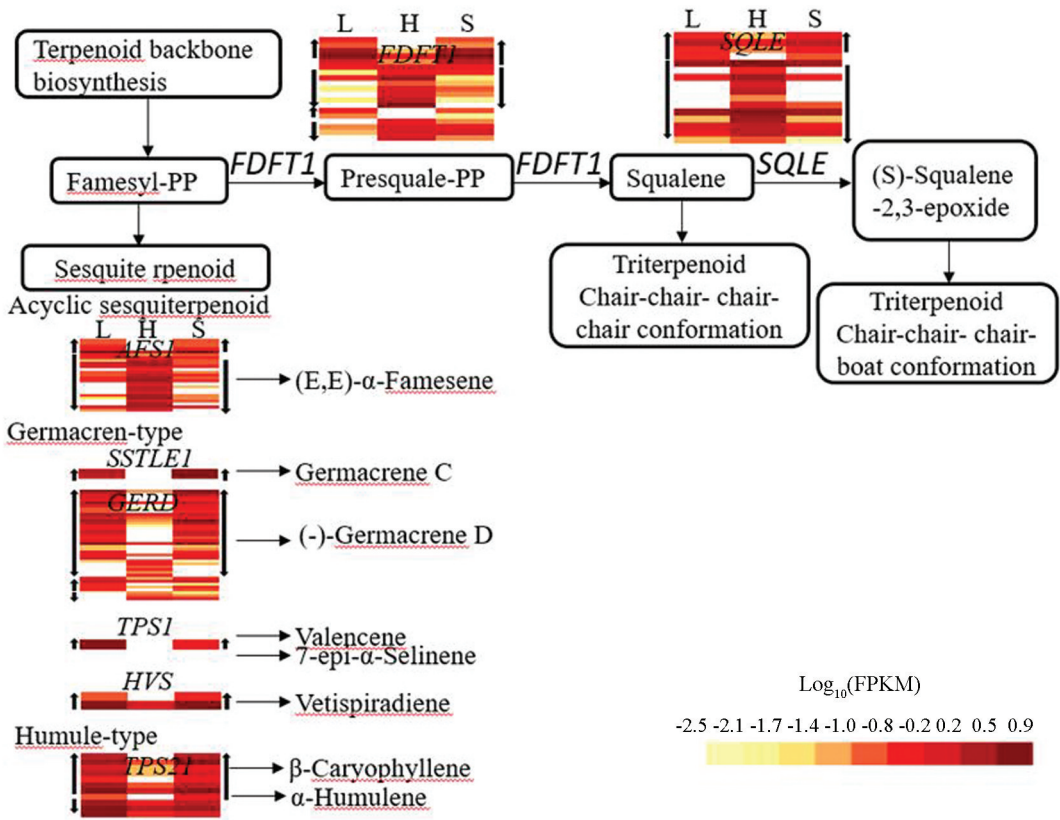


图 4 倍半萜和三萜化合物合成途径差异表达分析

2.6 植物激素相关基因差异表达分析

植物激素信号转导对于激素触发的生化变化非常重要^[16]. 本研究发现, 长柱花雌雄蕊相对于等柱花雌雄蕊上调表达基因在“植物激素信号转导”途径(Ko04075)中显著富集. 而且, 在 Ko04075 途径中发现, 与自交亲和型等柱花雌雄蕊比较, 生长素、茉莉酸和赤霉素信号通路中的差异表达基因在自交不亲和型长、短柱花雌雄蕊中均高表达(图 5). 生长素(AUX/IAA)信号通路中, 相对于等柱花(H)雌雄蕊, *AUX1*, *TIR1*(*transport inhibitor response 1*), *AUX/IAA*, *ARF* 在长柱花(L)和短柱花(S)雌雄蕊中上调表达; 茉莉酸相关信号通路与 α-亚麻酸代谢密切相关, 在茉莉酸信号通路中共发现 13 个基因, 分别为 6 个 *GOI1*, 2 个 *JAR1*(*jasmonic acid-amino synthetase*)和 5 个 *MYC2*; 在赤霉素(GA)信号通路中, 与自交亲和型等柱花雌雄蕊比较, 自交不亲和型长、短柱花雌雄蕊中表达上调的基因为 10 个, 其中 1 个 *GID1*(*gibberellin receptor GID1*), 3 个 *DELLA* 和 6 个 *TF*.

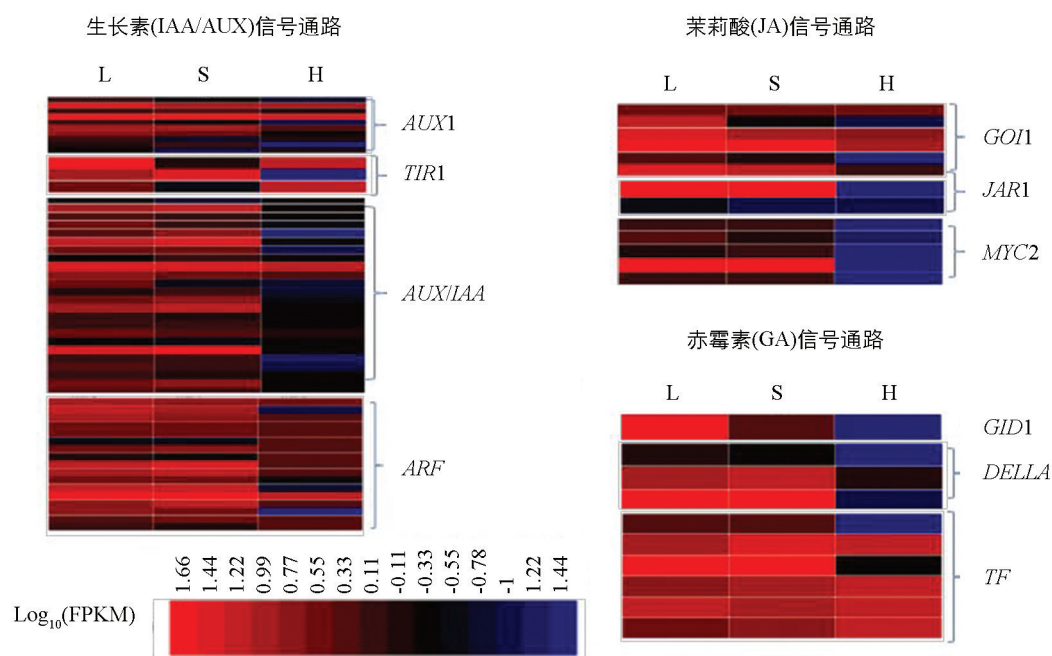


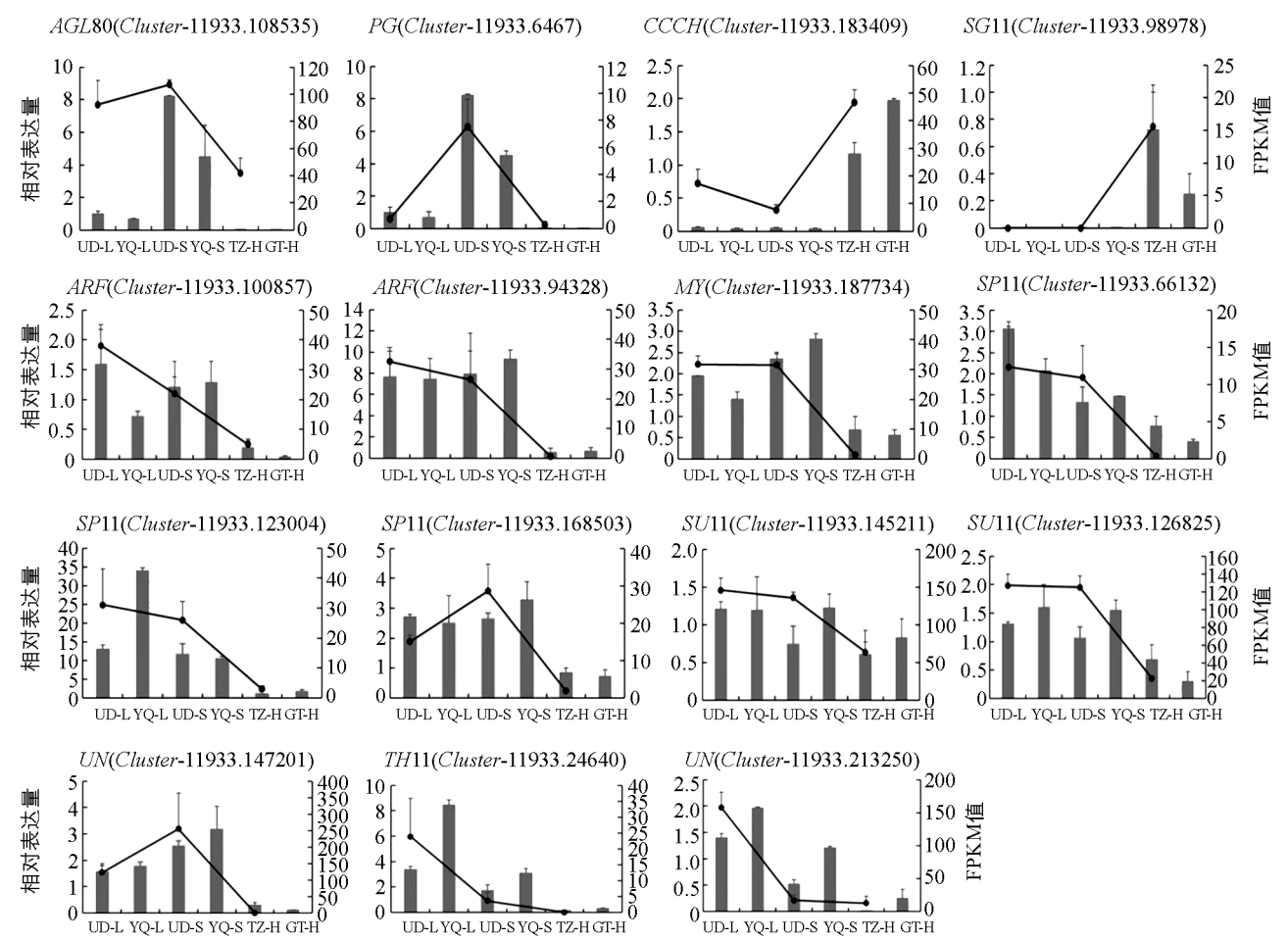
图 5 植物激素信号通路中相关基因差异表达分析

2.7 甜荞花柱异型候选基因的 qRT-PCR 验证

为消除品种特异性影响并验证转录组测序结果的准确性，本研究分别提取自交不亲和的两个甜荞品种乌克兰大粒荞(UD)和西荞 2 号(YQ)L-型雌雄蕊、S-型雌雄蕊和自交亲和的两个甜荞品种甜自 21(TZ)和贵甜 2 号(GT) H-型雌雄蕊总 RNA，利用 qRT-PCR 技术，根据已有参考文献对 MADS-box^[19-20]、MYB^[21]及 U-box 超基因家族^[22]等 16 个差异表达基因进行了 qRT-PCR(表 3)，检测其在不同品种、不同花柱类型中的表达情况，发现与通过转录组测序 FPKM 方法计算读长数得出的表达水平，在不同花柱类型表现出一致的表达趋势，表明了转录组测序结果的准确性(图 6)。

表 3 与甜荞育性和花柱发育相关的差异表达基因 qRT-PCR 引物

基因名称	上游引物	下游引物
AGL80(Cluster-11933.108535)	GGCCCTTCGATTCTCGTAACT	GATTATGATGACCGGCTTTGCC
ARF(Cluster-11933.100857)	TCCCAGTTTGCAGTTCACATG	AGTAAGGCTATTCGGGGTGAC
ARF(Cluster-11933.94328)	CATGTTCGAATCCCCACCTGA	ACCGTGCTGATCCTGAAAGG
CCCH(Cluster-11933.183409)	CCTGGAAGCGCCATAAGGAA	TTGGCTTTTCAGAAGGACAAGT
MYC(Cluster-11933.187734)	CAAAGAGCAGGGCCACCTAAG	GCAAGCCCCTTACCTTCCT
PG(Cluster-11933.6467)	CTGGAACAGGAGCCACGATT	CAACGTCGTTGACTATGGTGCA
SP11(Cluster-11933.123004)	CTCCGCGCTGTTGAATTTGG	GGAATCATACAGGATGAACTGGT
SP11(Cluster-11933.168503)	AAGCACGGAATCTCCGGTAA	AAAAATGGACATGGCAGATGGT
SP11(Cluster-11933.66132)	GGGTGCAAATTATTCTGAAAAGTCA	TCTCGTATGGAGCAATCGGC
SP11(Cluster-11933.98978)	GGAGTGAAGCTTTCGCTCTCT	ACCGGAGATGAAGTTCAAGTG
SUI1(Cluster-11933.145211)	AGGGCTAGGGCGGTTTCAT	AATAGCTGCTACTCGTGGGC
SUI1(Cluster-11933.126825)	AGTTGTGTTCCCCACCTACG	GCCACAACGTATGCGAGTTG
THL(Cluster-11933.24640)	CAGCTAATTTTCGCGGAAGAAACC	ACCTCCAGGACTTCCGATCA
UN(Cluster-11933.147201)	AGTCATTCCGAAAGTTCTTGGGT	TGCTTGATCTACCCTTTGGTG
UN(Cluster-11933.213250)	GCTGGCAGTCATTACGGATG	TATGGCAATAGCCACCAGCAT



UD_L 代表乌克兰大粒荞长柱花; YQ_L 代表西荞 2 号长柱花; UD_S 代表乌克兰大粒荞短柱花; YQ_S 代表西荞 2 号短柱花; TZ_H 代表甜自 21 等柱花; GT_H 代表贵甜 2 号等柱花。

图 6 与甜荞育性和花柱发育相关的差异表达基因 qRT-PCR 验证

此外, MADS-box 转录因子家族 *AGAMOUS-like protein* (*AGL*, *Cluster*-11933.108535)和糖代谢过程中的编码多聚半乳糖醛酸酶基因 (*Polygalacturonases*, *PG*, *Cluster*-11933.6467)在短柱花(S-型)雌雄蕊中高表达,长柱花(L-型)雌雄蕊中低表达,等柱花(H-型)中不表达,表明这两个基因可能与甜荞花柱发育有关. 锌指蛋白基因 *CCCH* (*Cluster*-11933.183409)和 U-box 超基因家族基因 *SP11* (*Cluster*-11933.98978)在自交不亲和性甜荞(S-型和 L-型)雌雄蕊中表达量较低,甚至不表达,但在自交亲和甜荞(H-型)中均高表达. 相反,转录因子 *ARF* (*Cluster*-11933.100857, *Cluster*-11933.100857, *Cluster*-11933.94328), *MYC* (*Cluster*-11933.187734), U-box 超基因家族基因 *SP11* (*Cluster*-11933.123004, *Cluster*-11933.168503, *Cluster*-11933.66132, *Cluster*-11933.98978), 转录抑制子 *SUI1* (*Cluster*-11933.126825)在自交不亲和甜荞雌雄蕊中高表达,在自交亲和甜荞雌雄蕊中低表达,甚至不表达,表明这些基因可能参与调控了甜荞育性.

3 讨论

甜荞营养价值较高,且耐旱耐瘠薄,是高寒山区重要的经济和药食兼用作物. 甜荞的分子研究起步较晚,研究基础较薄弱. 高通量测序技术的出现,为非模式植物基因组学研究带来了更多的新方法和新方案. 基于高通量测序的从头(donovo)转录组分析可在非模式植物中有效地用于新基因的发现和新分子标记的开发. 目前,已有研究对甜荞籽粒^[23-24]、根^[25-26]、根和叶^[27]、花序^[28]、花和子叶^[29]进行了转录组测序,并

挖掘了相关基因,但有关甜芥自交不亲和性及花柱发育相关的基因鲜有报道.本研究分别对盛花期自交亲和甜芥品种甜自 21 等柱花雌雄蕊、自交不亲和甜芥品种乌克兰大粒芥长柱花雌雄蕊和短柱花雌雄蕊进行转录组测序,得到了 283,170 个 Unigenes,其平均长度为 1 351 bp, N50 为 2 040 bp,获得的高质量转录组拼接结果及表达谱数据,将对甜芥育性和花柱发育相关遗传研究提供非常有用的数据资源.

萜类化合物也称类异戊二烯,是由两个异构的 5 碳骨架(异戊烯基二磷酸(IPP)和二甲基烯丙基二磷酸(DMAPP))组成的最大类别的天然化合物,萜类化合物在自然界中普遍存在,具有各种结构和功能^[30].萜烯通过参与植物的主要代谢,例如植物激素(脱落酸,细胞分裂素,赤霉素和油菜素甾体)、光合色素(叶绿素和类胡萝卜素)、电子载体(质体醌和泛醌)和内膜系统,对植物的生长和发育至关重要^[31-32].当植物开花时,一些低分子量的萜类化合物被释放以吸引昆虫进行授粉^[33].在本研究中,通过对差异基因进行 KEGG 通路分析发现,自交不亲和甜芥与自交亲和甜芥雌雄蕊(L vs H, S vs H)差异表达基因显著富集到倍半萜和三萜生物合成途径,该途径共检测到 79 个差异表达基因,42 个 DEGs 在长柱花(L-型)雌雄蕊和短柱花(S-型)雌雄蕊中同时上调表达,37 个 DEGs 同时下调表达,由此推断萜类化合物可能参与调控了甜芥育性发育.

植物激素信号转导对于激素触发的生化变化非常重要^[18].牵牛花授粉诱导多种植物激素,引起生理和分子变异导致其衰老^[34].植物生长调节剂生长素基本上参与细胞所有发育过程,包括细胞分裂和扩增,对所有植物发育过程都有影响^[35].生长素可能直接或间接参与烟草花蕊识别和花粉管伸长^[36],在可可^[37]、矮牵牛^[38]和欧洲橄榄^[39]等植物的自交不亲和反应中有重要作用.在本研究中,植物激素信号转导途径(Ko04075)中的 *AUX/IAA* 与色氨酸合成密切相关,该途径中与自交亲和甜芥等柱花雌雄蕊相比,*AUX1*,*TIR1*,*AUX/IAA*,*ARF*,*CH3* 和 *SAUR* 等基因在自交不亲和甜芥长柱花雌雄蕊中均上调表达,推测 *AUX/IAA* 相关基因可能参与了甜芥花柱发育.

茉莉酸(JA)在植物发育过程中起着重要的调节作用,如根的生长^[40]、雄蕊的发育^[41]、毛的形成^[42]、开花^[43]、叶片的衰老^[44]和顶端细胞的形成^[45],以及控制对非生物和生物胁迫的不同防御反应.在拟南芥中,JA 诱导 *R2R3 MYB* 转录因子 *MYB21* 以及 *MYB24*^[46],与 bHLH 转录因子第二亚组(*MYC2*,*MYC3*,*MYC4* 和 *MYC5*)^[40]来调节后期雄蕊发育^[47].Shi 等^[48]的研究结果表明,自花授粉梨树花柱中的 JA 浓度增加,而异花授粉花柱中的 JA 浓度显著降低.结合外源 JA 处理,Shi 等^[48]认为 S-RNase 的表达水平降低与 JA 信号级联有关.本研究中 α -亚麻酸代谢途径在茉莉酸信号作用下,*MYC2* 在自交不亲和甜芥长、短柱花雌雄蕊中上调表达,自交亲和甜芥、雌雄蕊中下调表达.结果表明 JA 信号对 *bHLH* 转录因子 *MYC2* 有影响,从而参与调控甜芥自交亲和性.

赤霉素(GA)是植物中许多发育过程必不可少的植物激素,包括种子发芽、茎伸长、叶片膨胀、毛状体发育、花粉成熟和开花诱导^[49].植物中存在的具有生物活性的 GA 较少,主要包括 GA1,GA3,GA4 和 GA7,是碱性二萜类羧酸骨架的衍生物^[50].DELLA 是 GA 反应的关键细胞内阻遏物,抑制种子发芽、生长和几乎所有已知的 GA 依赖性过程,而 GA 则减轻其抑制活性^[49].DELLA 是植物特异性 GRAS 家族中假定的转录调节因子的子集,拟南芥中有 5 个 *DELLA*,它们在抑制 GA 反应中起着独特或重叠的功能^[51-52],其中 *RGA* 和 *GAI* 抑制营养生长和花诱导^[53],*RGA*,*RGL1* 和 *RGL2* 共同调节花的发育^[52].本研究的 Ko04075 途径,在 GA 作用下二萜化合物生物合成通路中,与自交亲和甜芥相比 *TF*,*DELLA* 和 *GID1* 基因在自交不亲和甜芥长、短柱花雌雄蕊中均上调表达.因此,本研究推测赤霉素通过影响萜类化合物的合成,进而参与调控甜芥自交不亲和性.

4 结论

本研究获得了自交不亲和甜芥长、短柱花和自交亲和甜芥等柱花雌雄蕊的基因表达谱数据,共获得

283 170 条 Unigenes, 其中有 68 813 个差异表达基因(DEGs). 自交不亲和甜荞中长、短柱花雌雄蕊中的差异基因主要富集在导管形成和导管发育过程中; 自交不亲和甜荞(S型和 L型)与自交亲和甜荞(H型)雌雄蕊中差异基因主要富集在倍半萜和三萜化合物合成途径中; 自交不亲和甜荞长、短柱花雌雄蕊中差异基因(L vs S)主要富集在植物激素信号转导途径中, 生长素、茉莉酸和赤霉素信号通路中的差异表达基因在自交不亲和型长、短柱花雌雄蕊中均高表达; *ARF*, *MYC*, *MADS* 和 *U-box* 超基因家族中某些基因参与了甜荞育性发育.

参考文献:

[1] 柴岩, 张宗文. 荞麦研究进展: 第十届国际荞麦会议论文集 [M]. 杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2007.

[2] 蔡齐宗, 王佳蕊, 陈庆富, 等. 苦荞全基因组 SSR 位点鉴定及分子标记开发 [J]. 河南农业大学学报, 2022, 56(3): 392-400.

[3] 李春花, 加英多拉, 田娟, 等. 自交可育红花甜荞种质资源创新利用研究 [J]. 南方农业学报, 2021, 52(10): 2751-2757.

[4] KOYAMA M, NAKAMURA C, NAKAMURA K. Changes in Phenols Contents from Buckwheat Sprouts during Growth Stage [J]. Journal of Food Science and Technology, 2013, 50(1): 86-93.

[5] 柴岩, 王鹏科, 冯佰利. 中国小杂粮产业发展指南 [M]. 杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2007.

[6] GARBER R J, QUISENBERRY K S. Self-Fertilization in Buckwheat [J]. J Agric Res, 1927, 34: 185-190.

[7] SŁOMKA A, SYCHTA K, DUBERT F, et al. Embryological Background of Low Seed Set in Distylous Common Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) with Biased Morph Ratios, and Biostimulant-Induced Improvement of it [J]. Crop and Pasture Science, 2017, 68(7): 680-690.

[8] OHNISHI O. Search for the Wild Ancestor of Buckwheat. I. Description of New *Fagopyrum* (Polygonaceae) Species and Their Distribution in China and Himalayan Hills [J]. Fagopyrum, 1998, 15: 18-28.

[9] MATSUI K, TETSUKA T, NISHIO T, et al. Heteromorphic Incompatibility Retained in Self-Compatible Plants Produced by a Cross between Common and Wild Buckwheat [J]. New Phytologist, 2003, 159(3): 701-708.

[10] WANG Y J, SCARTH R, CAMPBELL G C. Inheritance of Seed Shattering in Interspecific Hybrids between *Fagopyrum esculentum* and *F. homotropicum* [J]. Crop Science, 2005, 45(2): 693-697.

[11] 陈庆富. 荞麦生产状况及新类型栽培荞麦育种研究的最新进展 [J]. 贵州师范大学学报(自然科学版), 2018, 36(3): 1-7, 131.

[12] MATSUI K, YASUI Y S. Buckwheat Heteromorphic Self-Incompatibility: Genetics, Genomics and Application to Breeding [J]. Breeding Science, 2020, 70(1): 32-38.

[13] YASUI Y, MORI M, AII J, et al. S-LOCUS EARLY FLOWERING 3 is Exclusively Present in the Genomes of Short-Styled Buckwheat Plants that Exhibit Heteromorphic Self-Incompatibility [J]. PLoS ONE, 2012, 7(2): e31264.

[14] WOO S H, ADACHI T, JONG S K, et al. Inheritance of Self-Compatibility and Flower Morphology in an Inter-Specific Buckwheat Hybrid [J]. Canadian Journal of Plant Science, 1999, 79(4): 483-490.

[15] MATSUI K, NISHIO T, TETSUKA T. Genes Outside the S Supergene Suppress S Functions in Buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) [J]. Annals of Botany, 2004, 94(6): 805-809.

[16] MIZUNO N, YASUI Y S. Gene Flow Signature in the S-Allele Region of Cultivated Buckwheat [J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 125-138.

[17] MATSUI K, YASUI Y S. Genetic and Genomic Research for the Development of an Efficient Breeding System in Heterostylous Self-Incompatible Common Buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2020, 133(5): 1641-1653.

[18] BOWLER C, CHUA N H. Emerging Themes of Plant Signal Transduction [J]. The Plant Cell, 1994, 6(11): 1529-1541.

- [19] FOURQUIN C, FERRÁNDIZ C. Functional Analyses of AGAMOUS Family Members in *Nicotiana Benthamiana* Clarify the Evolution of Early and Late Roles of C-Function Genes in Eudicots [J]. *The Plant Journal*, 2012, 71(6): 990-1001.
- [20] LU S W, ZHANG Y, ZHU K J, et al. The Citrus Transcription Factor CsMADS6 Modulates Carotenoid Metabolism by Directly Regulating Carotenogenic Genes [J]. *Plant Physiology*, 2018, 176(4): 2657-2676.
- [21] USHIJIMA K, NAKANO R, BANDO M, et al. Isolation of the Floral Morph-Related Genes in Heterostylous Flax (*Linum Grandiflorum*): The Genetic Polymorphism and the Transcriptional and Post-Transcriptional Regulations of the S Locus [J]. *The Plant Journal for Cell and Molecular Biology*, 2012, 69(2): 317-331.
- [22] VIERSTRA R D. The Ubiquitin/26S Proteasome Pathway, the Complex last Chapter in the Life of many Plant Proteins [J]. *Trends in Plant Science*, 2003, 8(3): 135-142.
- [23] SHI T X, LI R Y, CHEN Q J, et al. De Novo Sequencing of Seed Transcriptome and Development of Genic-SSR Markers in Common Buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) [J]. *Molecular Breeding*, 2017, 37(12): 1-15.
- [24] FANG X M, ZHANG Y L, ZHANG Y K, et al. De Novo Transcriptome Assembly and Identification of Genes Related to Seed Size in Common Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.) [J]. *Breeding Sci*, 2019, 69(3): 487-497.
- [25] XU J M, FAN W, JIN J F, et al. Transcriptome Analysis of Al-Induced Genes in Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Root Apex: New Insight into Al Toxicity and Resistance Mechanisms in an Al Accumulating Species [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1141.
- [26] 黄娟, 邓娇, 陈庆富. 荞麦根的转录组学分析及黄酮合成基因的鉴定 [J]. *中国农业科技导报*, 2017, 19(2): 9-19.
- [27] YOKOSHO K, YAMAJI N, MA J F. Global Transcriptome Analysis of Al-Induced Genes in an Al-Accumulating Species, Common Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2014, 55(12): 2077-2091.
- [28] LOGACHEVA M D, KASIANOV A S, VINOGRADOV D V, et al. De Novo Sequencing and Characterization of Floral Transcriptome in Two Species of Buckwheat (*Fagopyrum*) [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 30.
- [29] FANG Z W, HOU Z H, WANG S P, et al. Transcriptome Analysis Reveals the Accumulation Mechanism of Anthocyanins in Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Cotyledons and Flowers [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(6): 1493.
- [30] LANGE B M, RUJAN T, MARTIN W, et al. Isoprenoid Biosynthesis: The Evolution of Two Ancient and Distinct Pathways across Genomes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(24): 13172-13177.
- [31] LIU Y, WANG H, YE H C, et al. Advances in the Plant Isoprenoid Biosynthesis Pathway and Its Metabolic Engineering [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2005, 47(7): 769-782.
- [32] TETALI S D. Terpenes and Isoprenoids: a Wealth of Compounds for Global Use [J]. *Planta*, 2019, 249(1): 1-8.
- [33] PICHERSKY E, GERSHENZON J. The Formation and Function of Plant Volatiles: Perfumes for Pollinator Attraction and Defense [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, 5(3): 237-243.
- [34] BRODERICK S R, WIJERATNE S, WIJERATN A J, et al. RNA-Sequencing Reveals Early, Dynamic Transcriptome Changes in the Corollas of Pollinated Petunias [J]. *BMC Plant Biology*, 2014, 14: 307.
- [35] OVERVOORDE P, FUKAKI H, BEECKMAN T. Auxin Control of Root Development [J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2010, 2(6): a001537.
- [36] CHEN D, ZHAO J. Free IAA in Stigmas and Styles during Pollen Germination and Pollen Tube Growth of *Nicotiana Tabacum* [J]. *Physiologia Plantarum*, 2008, 134(1): 202-215.
- [37] HASENSTEIN K H, ZAVADA M S. Auxin Modification of the Incompatibility Response in *Theobroma Cacao* [J]. *Physiologia Plantarum*, 2001, 112(1): 113-118.
- [38] KOVALEVA L, ZAKHAROVA E. Hormonal Status of the Pollen-Pistil System at the Progamic Phase of Fertilization after Compatible and Incompatible Pollination in *Petunia Hybrida* L [J]. *Sexual Plant Reproduction*, 2003, 16(4): 191-196.
- [39] SOLFANELLI C, BARTOLINI S, VITAGLIANO C, et al. Immunolocalization and Quantification of IAA after Self-

- and Free-Pollination in *Olea Europaea* L [J]. *Scientia Horticulturae*, 2006, 110(4): 345-351.
- [40] FERNÁNDEZ-CALVO P, CHINI A, FERNÁNDEZ-BARBERO G, et al. The Arabidopsis BHLH Transcription Factors MYC3 and MYC4 are Targets of JAZ Repressors and Act Additively with MYC2 in the Activation of Jasmonate Responses [J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(2): 701-715.
- [41] PARK J H, HALITSCHKE R, KIM H B, et al. A Knock-out Mutation in Allene Oxide Synthase Results in Male Sterility and Defective Wound Signal Transduction in Arabidopsis Due to a Block in Jasmonic Acid Biosynthesis [J]. *The Plant Journal*, 2002, 31(1): 1-12.
- [42] QI T C, SONG S S, REN Q C, et al. The Jasmonate-ZIM-Domain Proteins Interact with the WD-Repeat/BHLH/MYB Complexes to Regulate Jasmonate-Mediated Anthocyanin Accumulation and Trichome Initiation in Arabidopsis Thaliana [J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(5): 1795-1814.
- [43] YOSHIDA Y, SANO R, WADA T, et al. Jasmonic Acid Control of GLABRA3 Links Inducible Defense and Trichome Patterning in Arabidopsis [J]. *Development*, 2009, 136(6): 1039-1048.
- [44] JIANG Y J, LIANG G, YANG S Z, et al. Arabidopsis WRKY57 Functions as a Node of Convergence for Jasmonic Acid-and Auxin-Mediated Signaling in Jasmonic Acid-Induced Leaf Senescence [J]. *The Plant Cell*, 2014, 26(1): 230-245.
- [45] ZHANG X, ZHU Z Q, AN F Y, et al. Jasmonate-Activated MYC2 Represses ETHYLENE INSENSITIVE3 Activity to Antagonize Ethylene-Promoted Apical Hook Formation in Arabidopsis [J]. *The Plant Cell*, 2014, 26(3): 1105-1117.
- [46] SONG S S, QI T C, HUANG H, et al. The Jasmonate-ZIM Domain Proteins Interact with the R2R3-MYB Transcription Factors MYB21 and MYB24 to Affect Jasmonate-Regulated Stamen Development in Arabidopsis [J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(3): 1000-1013.
- [47] HUANG H, GONG Y L, LIU B, et al. The DELLA Proteins Interact with MYB21 and MYB24 to Regulate Filament Elongation in Arabidopsis [J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 64-72.
- [48] SHI D Q, TANG C, WANG R Z, et al. Transcriptome and Phytohormone Analysis Reveals a Comprehensive Phytohormone and Pathogen Defence Response in Pear Self-/Cross-Pollination [J]. *Plant Cell Reports*, 2017, 36(11): 1785-1799.
- [49] ACHARD P, GENSHIK P. Releasing the Brakes of Plant Growth: How GAs Shutdown DELLA Proteins [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(4): 1085-1092.
- [50] YAMAGUCHI S. Gibberellin Metabolism and Its Regulation [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59: 225-251.
- [51] LEE S, CHENG H, KING K E, et al. Gibberellin Regulates Arabidopsis Seed Germination via RGL2, a GAI/RGA-Like Gene whose Expression is Up-Regulated Following Imbibition [J]. *Genes & Development*, 2002, 16(5): 646-658.
- [52] TYLER L, THOMAS S G, HU J H, et al. DELLA Proteins and Gibberellin-Regulated Seed Germination and Floral Development in Arabidopsis [J]. *Plant Physiology*, 2004, 135(2): 1008-1019.
- [53] DILL A, SUN T P. Synergistic Derepression of Gibberellin Signaling by Removing RGA and GAI Function in Arabidopsis Thaliana [J]. *Genetics*, 2001, 159(2): 777-785.