

温天旺, 朱宏, 张依霖, 等. 棉花种间杂种 F_1 纤维中关键代谢路径和基因鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2024, 43(6): 191-200.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.06.018

棉花种间杂种 F_1 纤维中关键代谢路径和基因鉴定

温天旺¹, 朱宏¹, 张依霖¹, 范劲松², 范回桥²

1. 江西农业大学农学院/作物生理生态与遗传育种教育部重点实验室, 南昌 330045;
2. 江西省瑞昌市农业技术推广中心, 瑞昌 332200

摘要 为在表型和遗传上揭示远缘杂种 F_1 纤维的杂种优势并解析产量性状杂种优势不明显的原因, 分别对远缘杂种 F_1 与陆地棉亲本发育10 d的纤维组织样品进行混池取样, 利用转录组学解析材料间在遗传转录水平上的差异, 采用生物信息学方法鉴定材料间存在明显差异的代谢路径和关键基因。结果显示, 杂种 F_1 长纤维细胞数量少, 并且种子表面有绿色短绒; 陆地棉亲本和远缘杂种 F_1 纤维转录组数据共鉴定到1 128个上调基因, 678个下调基因; 通过基因富集分析发现, 差异基因主要富集在苯丙烷生物合成及其分支类黄酮生物合成路径; 差异基因的偏亲表达分析显示, 杂种 F_1 纤维等位基因偏向海岛棉表达, 其中杂种 F_1 的类黄酮代谢路径的二氢黄酮醇-3', 5'-羟化酶(F3'5'H)基因只表达海岛棉的等位基因。总体来看, 海岛棉-陆地棉远缘杂种 F_1 纤维产量性状具有负向杂种优势并且具有明显的绿色短绒, 这可能与苯丙烷生物合成和类黄酮生物合成路径所产生的次生代谢物有关。本研究在遗传转录水平挖掘陆地棉-海岛棉远缘杂交 F_1 纤维的杂种优势及其重要的代谢路径和基因, 并建立了表型性状与遗传转录及遗传转录与代谢合成的联系。

关键词 棉花; 杂种优势; 纤维; 转录组; 类黄酮代谢; 二氢黄酮醇-3', 5'-羟化酶(F3'5'H)

中图分类号 S562 **文献标志码** A **文章编号** 1000-2421(2024)06-0191-10

棉花是世界上重要的经济作物之一, 棉纤维是最主要的纺织原材料, 纤维产量和品质是棉花育种家最关注的性状。目前, 陆地棉以纤维高产而占据棉花总产的95%以上; 海岛棉因纤维优质也具有一定的生产面积, 在我国, 海岛棉主要在新疆的南疆部分地区集中种植。将这2个栽培种的优势有效结合起来并应用于生产是广大棉花育种家致力于实现的目标。棉花育种家主要采取2种策略将两者的优异等位基因聚合应用。一种方法是通过经典的种间杂交和连续回交的方式产生遗传渐渗系, 从而将海岛棉优异基因导入到陆地棉中^[1-4], 由于纤维产量和品质性状均属于典型的数量性状, 通过渐渗少数几个遗传片段改良纤维产量和品质的效果不佳; 另一种是直接通过经典种间杂交的方法产生海岛棉-陆地棉杂种 F_1 , 然而该种间杂种优势主要体现在棉株的生物量上, 在纤维产量上的优势并不明显^[5-6]。

解释杂种优势主要有3种经典模型: 显性模型、超显性模型以及上位互作模型^[7]。随着分子生物学和生物技术的快速发展, 研究人员从不同角度解析

了杂种优势, 比如基因组水平、转录组水平、蛋白组水平、代谢组水平等^[8-9]。众多研究证据表明种间特异性基因不平衡的表达在杂种优势中起着重要作用, Shao等^[10]在水稻中鉴定到3 270个对杂种优势有贡献的特异等位基因。最近有学者研究发现生物学通路的表达互补调控拟南芥生物量杂种优势^[11]。Li等^[12]利用转录组、代谢组和表观组学技术解析了马铃薯的杂种优势现象, 研究发现马铃薯在淀粉和糖代谢中表现出显著的显性互补优势, 杂种交将更多的能量投入到初生代谢中从而产生杂种优势, 其中马铃薯杂种花朵的颜色也表现出明显的杂种显性优势, 表明花青素类物质在杂种马铃薯中积累, 因此次生代谢物质的产生和积累也可能是杂种优势的一种表现形式。

棉花纤维的主要成分是纤维素、半纤维素、木质素和果胶等, 因此, 糖代谢是棉花纤维中的第一大代谢路径。棉花纤维中苯丙烷代谢是仅次于糖代谢的第二大代谢路径^[13], 据报道, 苯丙烷代谢路径主要负责棉花纤维木质素、木聚素和类黄酮等次生代谢物

收稿日期: 2024-05-27

基金项目: 江西省科技计划项目(20212BAB215009); 江西省教育厅科技计划项目(GJJ200440)

温天旺, E-mail: wentianwangjxau@163.com

的合成,因此苯丙烷代谢路径与棉花纤维产量及品质密切相关^[14-15]。苯丙烷代谢路径中存在3个关键酶:苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia lyase, PAL)、肉桂酸-4-羟化酶(cinnamic acid 4-hydroxylase, C4H)和4-香豆酸-CoA连接酶(4-coumarate-CoA ligase, 4CL),分别催化生成肉桂酸、对羟基肉桂酸和对香豆酰辅酶A,这些化合物是下游代谢反应的底物^[16]。类黄酮代谢路径也属于苯丙烷代谢路径的主要分支,负责合成黄酮类代谢物,与植物颜色的形成相关,该路径与纤维产量和品质的形成显著相关^[17]。一般栽培棉纤维长而颜色洁白,野生棉纤维短且偏棕色,类黄酮代谢路径被认为是棉花在驯化过程中受到选择的一条主要代谢路径。在野生棉和彩棉中,类黄酮代谢物质含量也相对丰富,从而导致纤维呈现出一定的彩色。类黄酮相关的结构基因往往在彩棉中高表达^[18],彩棉颜色的深浅往往与其产量品质呈现负相关的关系^[19]。Sun等^[20]通过绿棉和白棉的转录组和代谢组数据分析发现,绿棉中苯丙烷代谢路径发挥重要作用,其中4CL基因显著表达,表明该基因可能参与了相关色素的合成。Li等^[21]鉴定到咖啡酸衍生物、木质素和木酚素在绿色棉中富集。

目前,陆地棉种内杂交在产量上可以表现出一定的杂种优势,中棉所63和杂交棉H318都属于陆地棉种内杂交品种,中棉所63在单株结铃数、铃质量和叶面积载铃量上都要显著高于亲本^[22],H318的杂种优势主要体现在棉铃数、较快的生长速度和干物质积累量方面^[23]。而海岛棉与陆地棉远缘杂种的杂种优势主要表现在生物量上,杂种F₁的种子大小、株高和叶片显著大于亲本的叶片^[24]。理论上利用种间杂交来提高杂种F₁的纤维产量具有可行性,但是在实践中却存在杂种优势不明显并且呈负向效应的现象。为从表型和遗传转录水平鉴定出种间杂种F₁纤维的杂种优势因子并解析产量性状杂种优势不明显的原因,本研究将远缘杂种F₁与陆地棉亲本发育10 d的纤维组织样品分别进行混样测序,转录组测序后进行生物信息学分析,以期鉴定控制海陆杂种F₁纤维产量的关键代谢路径以及关键基因,为棉花遗传改良奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.)新陆中20号

(以下简称LDM)为母本,海岛棉3-79(*G. barbadense* L.)为父本,2020年7月在江西农业大学试验田进行杂交形成F₁。2021年在江西高安原种场棉花试验田进行材料种植和性状考察,本试验采用育苗移栽,等行种植的方式,分别种植母本、父本和F₁,行距1 m,株距0.2 m,亲本和F₁分别种植20株,田间管理采用大田常规管理方式。

1.2 表型调查与统计分析

于2021年10月13日收获亲本和F₁。收回的棉花进行晾晒,晒干后于11月22日进行室内考种,考种项目有单铃籽棉质量、单铃皮棉质量、百粒质量、短绒颜色和衣分。使用Excel软件对材料各类性状的数据进行统计分析。

中亲优势(mid-parent heterosis, H_m)和最优亲本优势(best parent heterosis, H_b)通过杂种F₁的表型与最优亲本表型(F_b)或是双亲(P_1, P_2)的表型平均值(M_v)进行比较计算: $M_v = (P_1 + P_2) / 2$; $H_m = (F_1 - M_v) / M_v$; $H_b = (F_1 - F_b) / F_b$ 。

1.3 转录组数据分析

2021年8月10日分别对陆地棉LDM和F₁材料发育10 d的纤维材料进行取样,每个材料2个重复,每个重复为包含3个单株的混池样品。取样后迅速置于干冰中送往上海美吉生物医药科技公司,样品经过研磨,提取RNA,建立RNA测序文库后,利用HiSeq2000平台进行测序,将获得的原始数据使用fastp软件进行质控获得过滤后数据,通过生物信息学软件Bowtie2将该数据比对到陆地棉参考基因(<https://cottonfgd.org/about/download.html>)。基于所选参考基因组序列,使用StringTie或Cufflinks软件对测序数据进行拼接,并与原有的基因组注释信息进行比较,寻找以前未被注释的转录区,发掘该物种的新转录本和新基因,从而补充和完善基因组注释信息。将基因/转录本与6大数据库(NR, Swiss-Prot, Pfam, EggNOG, GO和KEGG)进行比对,全面获得基因/转录本的注释信息并对各数据库注释情况进行统计。使用软件(RSEM, <http://deweylab.github.io/RSEM/>; Kallisto, <https://pachterlab.github.io/kallisto/>; Salmon, <https://combine-lab.github.io/salmon/>)分别对基因和转录本的表达水平进行定量分析,以便后续分析不同样本间基因/转录本的差异表达情况,并结合序列功能信息揭示基因的调控机制。采用软件Goatools对基因集中的基因进行GO(gene ontology, 基因本体)富集分析,从而获

得该基因集中的基因主要具有哪些GO功能。使用Fisher精确检验,当经过校正的 $P < 0.05$ 时,认为此GO功能存在显著富集情况。采用R脚本对基因集中的基因/转录本进行KEGG通路富集分析,计算原理同GO功能富集分析,当经过校正的 $P < 0.05$ 时,认为此KEGG路径存在显著富集情况。

1.4 等位基因偏亲表达和RT-PCR检测

将转录组原始数据过滤后比对到参考基因组上,利用Bowtie2软件比对到陆地棉参考基因组上^[25],然后利用GATK软件(<https://software.broadinstitute.org/gatk/download/>)获得SNP和Indel变异信息,再利用VCFtools软件提取等位位点信息,只保留变异位点质量大于500并且在F₁材料中的测序深度大于10,在亲本中属于纯合的位点进行等位基因的表达检测。偏亲表达计算公式: $R = (P1 - P2) / (P1 + P2)$,其中,P1表示亲本1的等位位点在F₁中的测序深度,P2表示亲本2的等位位点在F₁中的测序深度,若 $R > 0.33$ 则该基因偏向P1表达,若 $R < -0.33$,则该基因偏向P2表达,此处阈值设置为0.33相当于两亲本间的表达差异大于2倍。

对鉴定到的目标基因,通过CottonFGD(<https://cottonfgd.org>)数据库获得其在陆地棉中的转录本和CDS(coding sequence)序列,利用DNAMAN软件分别将2个基因各自的转录本和CDS序列进行比对,确定2个基因的UTR(un-translated region)序列,利用Primer 5.0软件分别在每个基因的5'UTR和3'UTR设计正向引物和反向引物,其中Ubq7基因为参照(表1)。利用UTR引物分别在陆地棉和海岛棉-陆地棉F₁的纤维材料RNA反转录的cDNA中进行RT-PCR检测。PCR扩增所需的试剂由上海Yeasten公司提供(产品货号:1010ES03)。PCR扩增体系为反应总体积为50 μL的体系:模板cDNA 10 μL,Primer正向1.0 μL(浓度为0.1 μmol/L),Primer反向1.0 μL,2×Hieff®Robust

表1 用于本研究的引物及序列

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences
F3'5H-F	CTTCATATTTGGTCCTTCCG
F3'5H-R	TTGCACATTAGCGTAGTAGTCAT
ANS-F	GCTTCCCATACATACACTGCC
ANS-R	AGTCTCCCATTATTCACAAAA
Ubq7-F	GAAGGCATTCCACCTGACCAAC
Ubq7-R	CTTGACCTTCTTCTTCTGTGCTTG

PCR Master Mix 13.0 μL。PCR反应条件为:94 °C预变性5 min;94 °C变性10 s,55 °C退火20 s,72 °C延伸90 s,35个循环;72 °C再延伸5 min,4 °C保温。PCR产物用1%的琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 表型观测与统计

陆地棉LDM、海岛棉3-79和杂种F₁的籽棉表型鉴定结果显示,陆地棉LDM具有短绒,长纤维数量比F₁和海岛棉3-79要多;F₁具有明显的绿色短绒表型;而海岛棉3-79属于端毛籽材料(图1)。考种结果显示,杂种F₁在百粒质量上具有显著的中亲优势和3%的优亲优势,在单铃皮棉质量上反而呈现负向中亲优势(-7%)和负向优亲优势(-35%),在衣分上也表现出负向中亲优势(-14%)和负向超亲优势(-18%)(表2)。因此,杂种F₁在纤维产量性状上呈现负向杂种优势,而在纤维短绒的有无及颜色上呈现出杂种显性的特征。

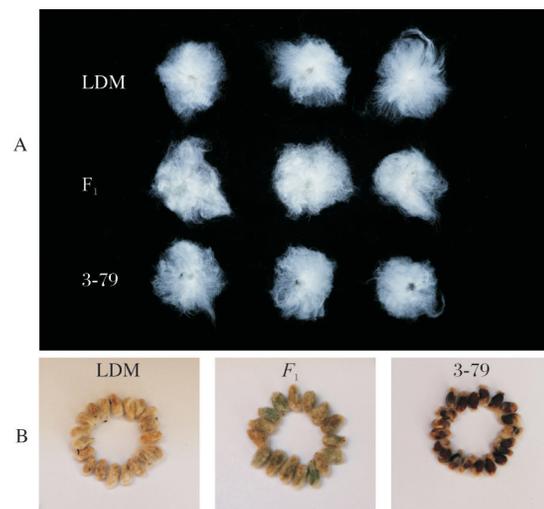


图1 海岛棉3-79、陆地棉LDM和杂种F₁的籽棉表型(A)和短绒表型(B)

Fig.1 The phenotype of seed cotton (A) and fuzz (B) in sea-island cotton 3-79, upland cotton LDM and F₁

2.2 差异基因鉴定

为了比较陆地棉亲本LDM和杂种F₁遗传上的差异,分别取2个材料发育10 d的纤维进行转录组测序。利用比对到参考基因的表达谱数据进行主成分分析发现LDM和F₁的样本间可以明显地区分开,而LDM和F₁的材料内部的2个重复在横坐标上(PC1)的位置差异不大,表明通过混池取样的方法可以保证组内样本间良好的重复性(图2A)。转录组数据经过比较分析,共在LDM和F₁间鉴定到1 806个差异

表2 杂种优势在杂种F₁种子和纤维中的表现
Table 2 The hybrid vigor in the seed and fiber of F₁

材料及杂种优势 Material and hybrid vigor	单铃皮棉质量/g Lint weight per boll	衣分/% Lint percentage	百粒质量/g 100-seeds weight	短绒 Fuzz
3-79	0.75	35.00	12.30	端毛籽 End fuzz seed
LDM	1.36	39.00	8.50	有短绒无色 Colorless fuzz
F ₁	0.88	32.00	12.62	短绒绿色 Green fuzz
中亲杂种优势/% H _m	-17	-14	21	
最优杂种优势/% H _b	-35	-18	3	

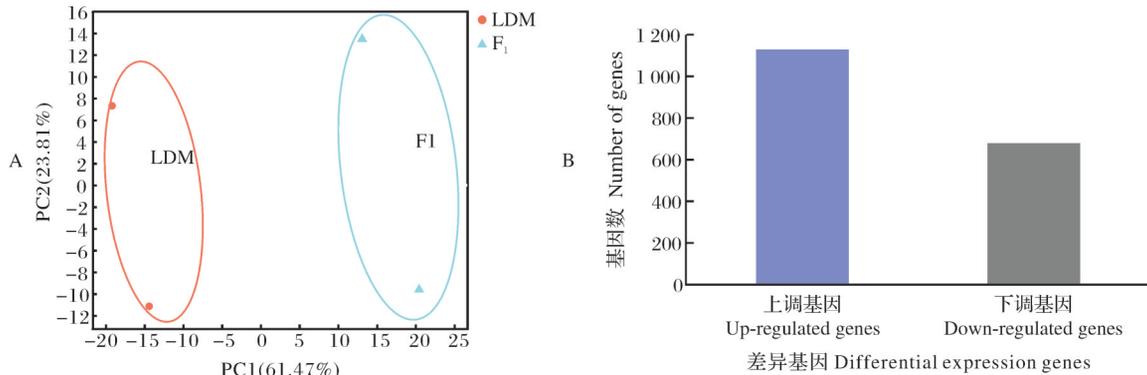


图2 陆地棉LDM与杂种F₁测序样本间的主成分(A)和差异基因分析(B)

Fig.2 The principal component analysis (A) and differential expression genes (B) between upland cotton LDM and F₁

基因 (differential expression genes, DEGs), 其中 1 128 个基因在 F₁ 发育 10 d 的纤维中上调表达, 678 个基因在 F₁ 发育 10 d 的纤维中下调表达 (图 2B)。通过差异基因的基因本体注释发现在分子功能 (molecular function) 中, 有 796 个 DEGs 具有催化活性的功能, 有 777 个 DEGs 具有绑定的功能; 在细胞组分 (cellular component) 中, 692 个基因在细胞部位发挥功能, 557 个基因在细胞膜部位发挥功能;

在生物过程中, 549 个基因参与细胞过程, 488 个基因参与代谢过程 (图 3)。差异基因通过 GO 富集分析鉴定到具有激酶活性的一类基因被显著富集; 富集因子数据表明 D-阿拉伯糖-1, 4-内酯氧化酶活性的一类基因富集最显著, 另外还有转录因子 TFIID 复合体和氧化还原酶活性的一类基因被显著富集; 在富集数量上, 分子功能相关的一类基因富集最多 (图 4)。

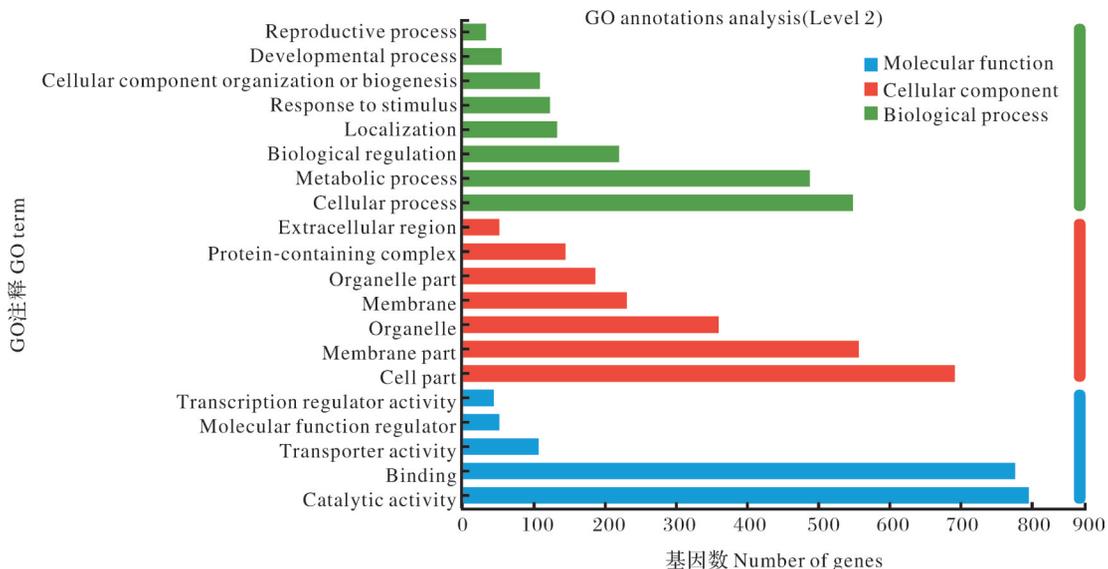


图3 陆地棉LDM与杂种F₁间差异基因的GO注释分析

Fig.3 The gene ontology (GO) annotation of differential expression genes between upland cotton LDM and F₁

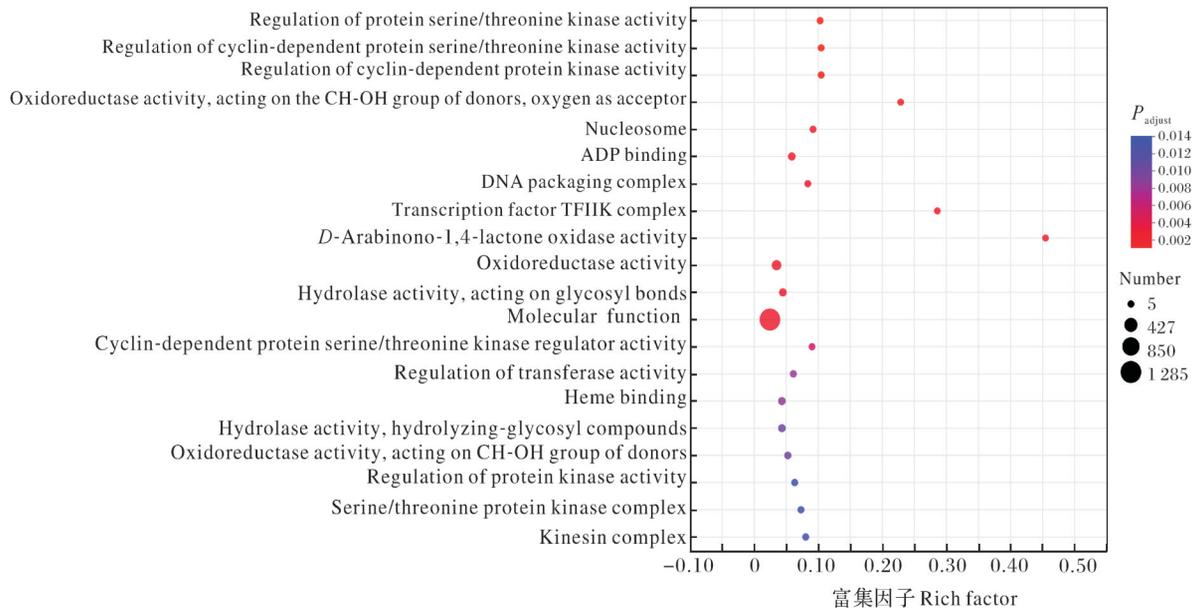


图 4 陆地棉 LDM 与杂种 F₁ 间差异基因的 GO 富集分析

Fig.4 GO enrichment analysis of differential expression genes between upland cotton LDM and F₁

2.3 差异基因的代谢路径富集分析

对 1 806 个 DEGs 进行 KEGG 分析, 鉴定到 6 个 DEGs 被富集到单萜类化合物生物合成代谢路径 (map00902), 30 个 DEGs 被富集到苯丙烷生物合成代谢路径 (map00940), 6 个 DEGs 被富集到其他多糖

降解代谢路径 (map00511), 10 个 DEGs 被富集到类黄酮代谢路径 (map00941), 8 个 DEGs 被富集到倍半萜和三萜类化合物生物合成 (图 5)。从代谢路径富集结果中可以看到苯丙烷代谢和类黄酮代谢所富集的基因数量较多, 并且类黄酮代谢路径属于苯丙烷

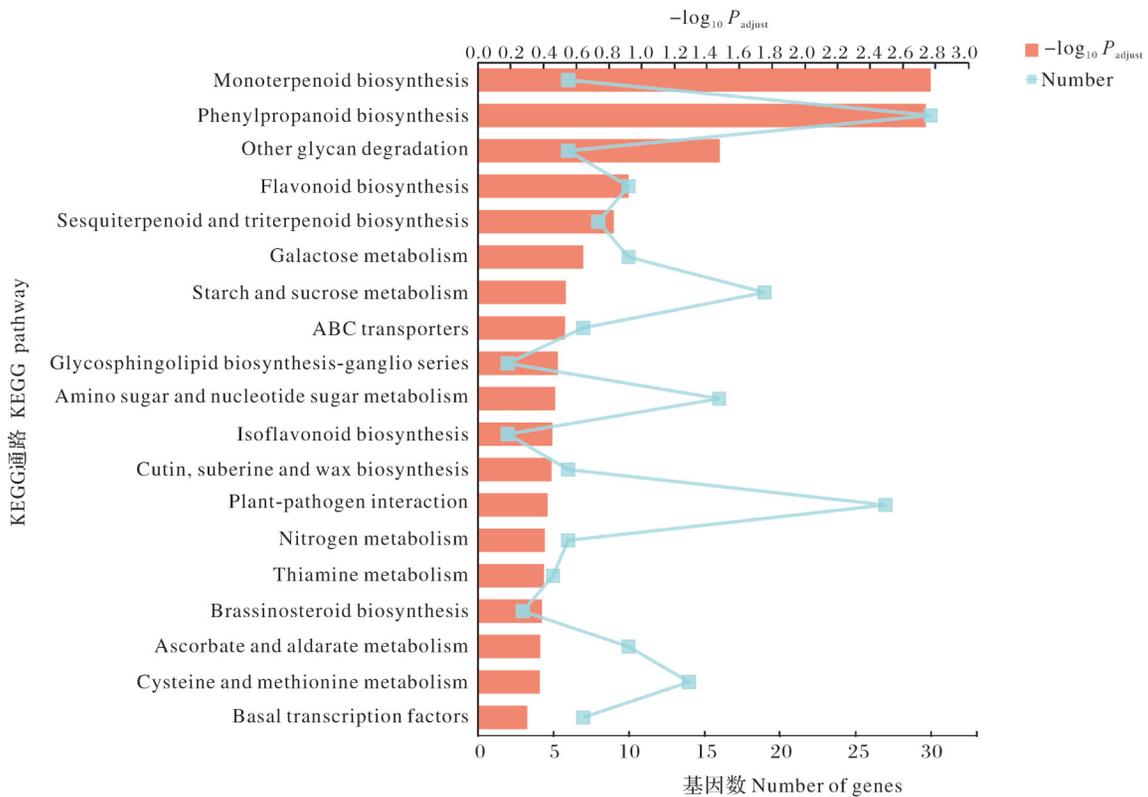


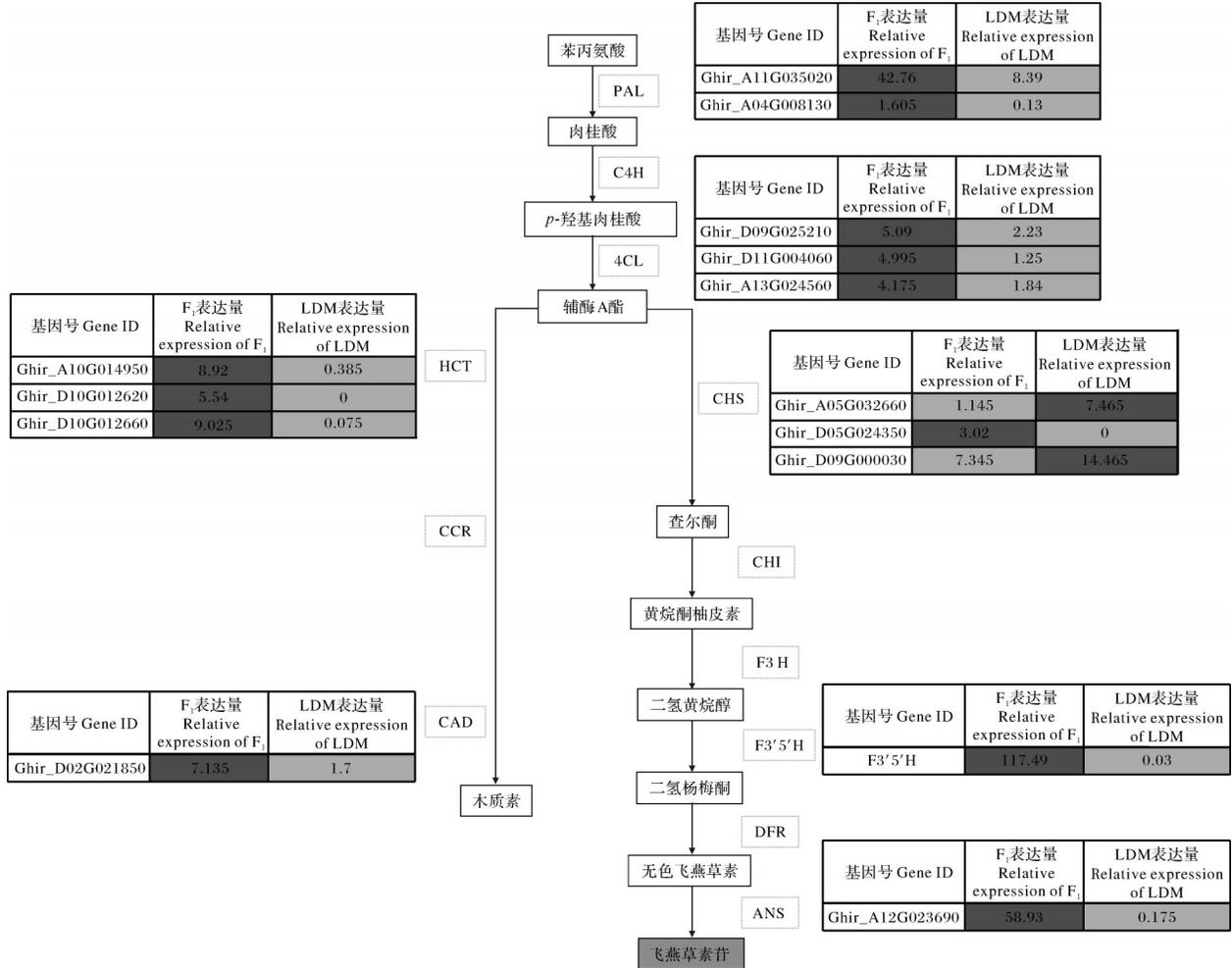
图 5 陆地棉 LDM 与杂种 F₁ 间差异基因的 KEGG 富集分析

Fig.5 The KEGG analysis of differential expression genes between upland cotton LDM and F₁

代谢路径的分支,杂种F₁和陆地棉LDM显著的差异可能来自于这2条代谢路径的差异表达。

进一步分析苯丙烷和类黄酮代谢分支路径结构基因,结果显示,苯丙烷代谢路径的2个PAL和3个4CL主干基因分别在F₁中显著上调表达,合成木质素分支路径的3个HCT基因和2个CAD基因也在F₁中显著上调表达;类黄酮代谢路径分析表明,有1

个CHS基因,1个F3'5'H基因和1个ANS基因分别在F₁中显著上调表达,2个CHS基因在亲本LDM中上调表达(图6)。综合来看,由于CAD基因是木质素合成的关键基因,而F3'5'H基因是飞燕草素合成的关键基因,因此,杂种F₁纤维中的苯丙烷代谢和类黄酮代谢路径的代谢产物可能分别主要流向木质素和花青素中飞燕草素的生物合成。



PAL: 苯丙氨酸解氨酶; C4H: 肉桂酸-4-羟化酶; 4CL: 香豆酸-CoA连接酶; HCT: 羟基肉桂酰转移酶; CCR: 肉桂酰辅酶A还原酶; CAD: 肉桂醇脱氢酶; CHS: 查尔酮合成酶; CHI: 查尔酮异构酶; F3H: 黄酮酮-3β-羟化酶; F3'5'H: 二氢黄酮醇-3', 5'-羟化酶; DFR: 二氢黄酮醇还原酶; ANS: 花青素合成酶。PAL: Phenylalanine ammonia lyase; C4H: Cinnamic acid 4-hydroxylase; 4CL: 4-Coumarate-CoA ligase; HCT: Hydroxycinnamoyl transferase; CCR: Cinnamoyl-CoA reductase; CAD: Cinnamyl-alcohol dhydrogenase; CHS: Chalcone synthase; CHI: Chalcone isomerase; F3H: Flavanone-3β-hydroxylase; F3'5'H: Flavonoid-3', 5'-hydroxylase; DFR: Dihydroflavonol reductase; ANS: Anthocyanin synthase.

图6 陆地棉和杂种F₁在苯丙烷和类黄酮代谢路径上的差异

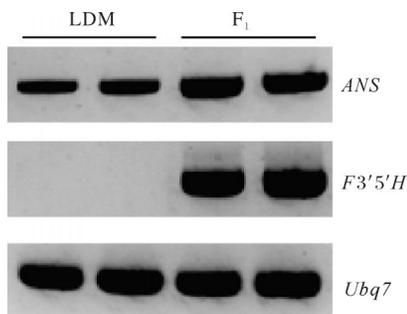
Fig.6 The difference of phenylpropanoid pathway and flavonoid pathway in upland cotton LDM and F₁

2.4 等位基因偏亲表达和关键基因鉴定

经过筛选过滤,在1 806个DEGs中,共鉴定到1 053个DEGs中存在3 833个高质量SNP位点,对获得的每个SNP等位变异的测序深度进行等位基因偏亲表达分析,发现有317个DEGs的等位基因在杂

种F₁中处于相对平衡的表达状态,736个DEGs呈现出偏亲表达的现象,其中有515个基因偏向海岛棉3-79表达,221个基因偏向陆地棉LDM表达。本研究鉴定到苯丙烷代谢路径中的HST、PAL和CAD1基因偏向海岛棉等位位点表达,类黄酮代谢路径的

ANS和F3'5'H偏向海岛棉表达。本研究重点对陆地棉LDM和杂种F₁中的ANS和F3'5'H进行RT-PCR检测,结果表明ANS和F3'5'H在2个材料间表达差异显著,尤其是F3'5'H基因只在杂种F₁中表达,对F₁中扩增得到的产物进行测序,经序列比对表明该基因来自于海岛棉3-79(图7)。



Ubq7为参照基因。Ubq7 as the reference gene.

图7 ANS和F3'5'H基因在LDM和F₁材料间的RT-PCR检测

Fig.7 The RT-PCR test of ANS and F3'5'H in LDM and F₁

3 讨论

3.1 苯丙烷代谢路径影响种间杂种F₁纤维发育

杂种优势是植物中普遍存在的现象,目前为止还没有模型或假说可以完美地解释杂种优势现象^[26]。本研究从表型和遗传转录水平充分挖掘种间杂种F₁纤维中的杂种优势。研究表明虽然杂种F₁在纤维产量上呈现负向杂种优势,但是杂种F₁纤维在苯丙烷和类黄酮代谢路径上优势表达(表2和图5)。分析代谢通路介导的作物农艺性状表型是分析作物杂种优势的有效方法之一^[27],前人研究表明,绿色纤维的表型和苯丙烷代谢路径的主干基因4CL及其代谢呈显著相关^[20-21],因此,本研究中杂种F₁的负向杂种优势和绿色短绒表型极有可能和优势表达的苯丙烷代谢路径有关。

苯丙烷代谢路径是众多次生代谢物质产生的主要代谢路径,其中木质素和类黄酮类物质是最主要的2类代谢物^[28]。Fan等^[29]研究表明CAD基因与木质素合成相关,一般在纤维发育的次生壁形成过程中表达,而木质素的多少和纤维的长度一般呈负相关;C4H是在纤维次生壁加厚时期表达^[30];4CL基因的超表达可以促进木质素沉积^[31]。前人研究表明,黄酮类化合物柚皮素的富集会导致棉花纤维的变短^[32],而彩棉颜色深浅往往与纤维产量和品质呈负

相关^[19]。孙君灵等^[33]通过QTL定位方法,发现棕色纤维基因(Lc₁)在关于纤维强度、长度、细度等的QTL,能够降低纤维强度、长度和细度,这反映了Lc₁基因与纤维品质成负相关。对于棉花来说,纤维细胞发育的速度和数量至关重要,有研究表明陆地棉开花后1d纤维突起的密度比海岛棉多^[34],这可能是导致陆地棉长纤维多而产量有所提升的原因。

本研究发现类黄酮相关基因在杂种F₁中显著上调表达(图6),可能造成了F₁纤维中类黄酮物质的积累而影响纤维的发育,尤其短绒具有肉眼可见的绿色,表明有大量色素的积累,这些色素可能抑制了部分纤维细胞发育为长纤维。

3.2 杂种F₁的种间等位基因的偏亲表达

双亲杂交后产生的杂交种与亲本比较,性状或者基因的表达往往可以呈现出显性或者超显性等表达模式^[35-37],但是对于具体某一等位基因在F₁中的表达不能很直观地呈现出来。转录组测序不仅可以快速检测样本间全基因组的差异基因,同时为研究人员检测杂种F₁等位基因的特异表达提供了便捷的途径。Shao等^[10]、Fu等^[38]曾利用转录组测序鉴定到特异等位基因的表达可能介导了杂种优势形成的机制。本研究对差异基因进行检测发现1 053个差异基因中有736个差异基因是偏亲表达的,并且偏亲表达的差异基因中有515个基因是偏向海岛棉表达,这也可能是造成杂种F₁纤维的表型偏向海岛棉的原因之一,从而导致其产量较低。等位基因的偏亲表达现象在类黄酮代谢路径的结构基因中尤其明显。本研究在类黄酮代谢路径中鉴定到F₁杂种中表达的F3'5'H等位基因来自于海岛棉,该基因是产生飞燕草素的关键基因,也是花卉呈现蓝色的一种主要色素^[39],该基因可以为将来的彩棉基因工程育种提供重要的基因来源。

本研究结果表明,杂种F₁的纤维产量呈负向杂种优势,具有明显的绿色短绒;差异基因富集分析表明苯丙烷代谢路径及其分支类黄酮代谢路径影响了杂种F₁纤维的表现;杂种F₁的等位基因偏向海岛棉等位基因表达,这也可能是杂种F₁纤维产量低的原因;本研究鉴定到的苯丙烷代谢和类黄酮路径结构基因是杂种F₁在次生代谢中具有杂种优势的有力证明,尤其F3'5'H基因可以为将来彩棉遗传改造提供基因来源。

参考文献 References

- [1] ZHANG J F, PERCY R G, MCCARTY J C. Introgression genetics and breeding between upland and Pima cotton: a review [J]. *Euphytica*, 2014, 198(1): 1-12.
- [2] CHEN Y, LIU G D, MA H H, et al. Identification of introgressed alleles conferring high fiber quality derived from *Gossypium barbadense* L. in secondary mapping populations of *G. hirsutum* L. [J/OL]. *Frontiers in plant science*, 2018, 9: 1023 [2024-05-27]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01023>.
- [3] BROWN N, KUMAR P, SINGH R, et al. Evaluation of a chromosome segment from *Gossypium barbadense* harboring the fiber length QTL *qFL-Chr.25* in four diverse upland cotton genetic backgrounds [J]. *Crop science*, 2019, 59(6): 2621-2633.
- [4] ZHU D, LI X M, WANG Z W, et al. Genetic dissection of an allotetraploid interspecific CSSLs guides interspecific genetics and breeding in cotton [J/OL]. *BMC genomics*, 2020, 21(1): 431 [2024-05-27]. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06800-x>.
- [5] 华兴鼎, 周行, 黄骏麒, 等. 海岛棉与陆地棉杂种一代优势利用的研究 [J]. *作物学报*, 1963, 2(1): 1-28. HUA X, ZHOU H, HUANG J, et al. The use of heterosis in the interspecific F₁ hybrids between *G. hirsutum* and *G. barbadense* [J]. *Acta agronomica sinica*, 1963, 2(1): 1-28 (in Chinese with English abstract).
- [6] 菲力申. 陆地棉与海岛棉杂种优势利用研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2008. FEI L S. Studies on heterosis utilisation between upland cotton and island cotton [D]. Nanning: Guangxi University, 2008 (in Chinese with English abstract).
- [7] BIRCHLER J A, YAO H, CHUDALAYANDI S, et al. Heterosis [J]. *The plant cell*, 2010, 22(7): 2105-2112.
- [8] HUANG X H, YANG S H, GONG J Y, et al. Genomic architecture of heterosis for yield traits in rice [J]. *Nature*, 2016, 537(7622): 629-633.
- [9] LIU J, LI M J, ZHANG Q, et al. Exploring the molecular basis of heterosis for plant breeding [J]. *Journal of integrative plant biology*, 2020, 62(3): 287-298.
- [10] SHAO L, XING F, XU C H, et al. Patterns of genome-wide allele-specific expression in hybrid rice and the implications on the genetic basis of heterosis [J]. *PNAS*, 2019, 116(12): 5653-5658.
- [11] LIU W W, HE G M, DENG X W. Biological pathway expression complementation contributes to biomass heterosis in *Ara-bidopsis* [J/OL]. *PNAS*, 2021, 118(16): e2023278118 [2024-05-27]. <https://doi.org/10.1073/pnas.2023278118>.
- [12] LI D W, LU X Y, ZHU Y H, et al. The multi-omics basis of potato heterosis [J]. *Journal of integrative plant biology*, 2022, 64(3): 671-687.
- [13] GOU J Y, WANG L J, CHEN S P, et al. Gene expression and metabolite profiles of cotton fiber during cell elongation and secondary cell wall synthesis [J]. *Cell research*, 2007, 17(5): 422-434.
- [14] AL-GHAZI Y, BOUROT S, ARIOLI T, et al. Transcript profiling during fiber development identifies pathways in secondary metabolism and cell wall structure that may contribute to cotton fiber quality [J]. *Plant & cell physiology*, 2009, 50(7): 1364-1381.
- [15] HAN L B, LI Y B, WANG H Y, et al. The dual functions of WLIM1a in cell elongation and secondary wall formation in developing cotton fibers [J]. *The plant cell*, 2013, 25(11): 4421-4438.
- [16] 尚军, 吴旺泽, 马永贵. 植物苯丙烷代谢途径 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2022, 38(11): 1467-1476. SHANG J, WU W Z, MA Y G. Phenylpropanoid metabolism pathway in plants [J]. *Chinese journal of biochemistry and molecular biology*, 2022, 38(11): 1467-1476 (in Chinese with English abstract).
- [17] 涂礼莉, 谭家福, 郭凯, 等. 类黄酮代谢途径与棉花纤维发育 [J]. *中国科学(生命科学)*, 2014, 44(8): 758-765. TU L L, TAN J F, GUO K, et al. Flavonoid pathway in cotton fiber development [J]. *Scientia sinica (vitae)*, 2014, 44(8): 758-765 (in Chinese with English abstract).
- [18] FENG H J, TIAN X H, LIU Y C, et al. Analysis of flavonoids and the flavonoid structural genes in brown fiber of upland cotton [J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58820 [2024-05-27]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058820>.
- [19] WEN T W, WU M, SHEN C, et al. Linkage and association mapping reveals the genetic basis of brown fibre (*Gossypium hirsutum*) [J]. *Plant biotechnology journal*, 2018, 16(9): 1654-1666.
- [20] SUN S C, XIONG X P, ZHU Q H, et al. Transcriptome sequencing and metabolome analysis reveal genes involved in pigmentation of green-colored cotton fibers [J/OL]. *International journal of molecular sciences*, 2019, 20(19): 4838 [2024-05-27]. <https://doi.org/10.3390/ijms20194838>.
- [21] LI Z H, SU Q, XU M Q, et al. Phenylpropanoid metabolism and pigmentation show divergent patterns between brown color and green color cottons as revealed by metabolic and gene expression analyses [J/OL]. *Journal of cotton research*, 2020, 3(1): 27 [2024-05-27]. <https://doi.org/10.1186/s42397-020-00069-x>.
- [22] 葛勇, 李威, 刘艳改, 等. 中棉所63棉铃对位叶光合生理性能的杂种优势研究 [J]. *棉花学报*, 2016, 28(3): 250-259. GE Y, LI W, LIU Y G, et al. Heterosis studies on photosynthetic and physiological performance of the subtending leaf of cotton boll of CCRI 63 [J]. *Cotton science*, 2016, 28(3): 250-259 (in Chinese with English abstract).

- [23] DING Y H, ZHANG R, ZHU L F, et al. An enhanced photosynthesis and carbohydrate metabolic capability contributes to heterosis of the cotton (*Gossypium hirsutum*) hybrid 'Huaza Mian H318', as revealed by genome-wide gene expression analysis[J/OL]. *BMC genomics*, 2021, 22(1): 277 [2024-05-27]. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07580-8>.
- [24] LI T Y, WANG F Q, YASIR M, et al. Expression patterns divergence of reciprocal F₁ hybrids between *Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense* reveals overdominance mediating interspecific biomass heterosis[J/OL]. *Frontiers in plant science*, 2022, 13: 892805 [2024-05-27]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.892805>.
- [25] WANG M J, TU L L, YUAN D J, et al. Reference genome sequences of two cultivated allotetraploid cottons, *Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense* [J]. *Nature genetics*, 2019, 51(2): 224-229.
- [26] HOCHHOLDINGER F, BALDAUF J A. Heterosis in plants [J]. *Current biology*, 2018, 28(18): 1089-1092.
- [27] 向丽媛, 徐凯, 苏静, 等. 基于通路分析剖析水稻农艺性状配合力和杂种优势[J]. *作物学报*, 2019, 45(9): 1319-1326. XIANG L Y, XU K, SU J, et al. Genetic dissection of combining ability and heterosis of rice agronomic traits based on pathway analysis[J]. *Acta agronomica sinica*, 2019, 45(9): 1319-1326 (in Chinese with English abstract).
- [28] VOGT T. Phenylpropanoid biosynthesis [J]. *Molecular plant*, 2010, 3(1): 2-20.
- [29] FAN L, SHI W J, HU W R, et al. Molecular and biochemical evidence for phenylpropanoid synthesis and presence of wall-linked phenolics in cotton fibers[J]. *Journal of integrative plant biology*, 2009, 51(7): 626-637.
- [30] NI Z Y, LI B, NEUMANN M P, et al. Isolation and expression analysis of two genes encoding cinnamate 4-hydroxylase from cotton (*Gossypium hirsutum*) [J]. *Journal of integrative agriculture*, 2014, 13(10): 2102-2112.
- [31] 孟颖, 邢蕾蕾, 曹晓红, 等. 小麦 *Ta4CL1* 基因的克隆及其在促进转基因拟南芥生长和木质素沉积中的功能[J]. *作物学报*, 2022, 48(1): 63-75. MENG Y, XING L L, CAO X H, et al. Cloning of *Ta4CL1* and its function in promoting plant growth and lignin deposition in transgenic *Arabidopsis* plants [J]. *Acta agronomica sinica*, 2022, 48(1): 63-75 (in Chinese with English abstract).
- [32] TAN J F, TU L L, DENG F L, et al. A genetic and metabolic analysis revealed that cotton fiber cell development was retarded by flavonoid naringenin[J]. *Plant physiology*, 2013, 162(1): 86-95.
- [33] 孙君灵, 霍曙明, 周忠丽, 等. 棉纤维颜色与品质性状杂种优势关系研究[J]. *棉花学报*, 2010, 22(3): 267-272. SUN J L, HUO S M, ZHOU Z L, et al. Analysis on the relationship between heterosis of quality traits fiber colors[J]. *Cotton science*, 2010, 22(3): 267-272 (in Chinese with English abstract).
- [34] 李成奇, 郭旺珍, 张天真. 棉花4个栽培种纤维初始发育的比较研究[J]. *作物学报*, 2007, 33(8): 1346-1351. LI C Q, GUO W Z, ZHANG T Z. Comparative studies on fiber initiation development of four cultivated cotton species[J]. *Acta agronomica sinica*, 2007, 33(8): 1346-1351 (in Chinese with English abstract).
- [35] ZHU X X, ZHU Y C, AI N J, et al. Gene differential expression at seedling stage in four cotton combinations hybridized by CRI-12 and its pedigree-derived lines[J]. *Acta agronomica sinica*, 2009, 35(9): 1637-1645.
- [36] LI S J, JAYASINGHEGE C P A, GUO J, et al. Comparative transcriptomic analysis of gene expression inheritance patterns associated with cabbage head heterosis[J/OL]. *Plants*, 2021, 10(2): 275 [2024-05-27]. <https://doi.org/10.3390/plants10020275>.
- [37] LIN T Z, ZHOU C, CHEN G M, et al. Heterosis-associated genes confer high yield in super hybrid rice[J]. *Theoretical and applied genetics*, 2020, 133(12): 3287-3297.
- [38] FU J, ZHANG Y L, YAN T Z, et al. Transcriptome profiling of two super hybrid rice provides insights into the genetic basis of heterosis[J/OL]. *BMC plant biology*, 2022, 22(1): 314 [2024-05-27]. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03697-4>.
- [39] SHIMADA Y, OHBAYASHI M, NAKANO-SHIMADA R, et al. Genetic engineering of the anthocyanin biosynthetic pathway with flavonoid-3', 5'-hydroxylase: specific switching of the pathway in petunia [J]. *Plant cell reports*, 2001, 20(5): 456-462.

Identifying key metabolic pathways and genes in fibers of interspecific F₁ hybrids of cotton

WEN Tianwang¹, ZHU Hong¹, ZHANG Yilin¹, FAN Jinsong², FAN Huiqiao²

1. College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University/Key Laboratory of Crop Physiology, Ecology and Genetic Breeding, Ministry of Education, Nanchang 330045, China;
2. Agricultural Technology Extension Center of Ruichang City, Ruichang 332200, China

Abstract Bulk sampling was conducted on the fiber (10 days after anthesis) of interspecific F₁ hybrids and parents of upland cotton to study the heterosis in fibers of interspecific F₁ hybrids in terms of phenotype and genetics and analyze the reasons for the unclear heterosis in traits of yield. Transcriptomics was used to analyze the significant differences in transcription levels between samples. Bioinformatics was used to identify the significant differences in metabolic pathways and key genes between samples. The results showed that the F₁ hybrid had fewer long fiber cells and the surface of the seed was covered by green fuzz. A total of 1 128 upregulated genes and 678 downregulated genes were identified in the transcriptome data of fiber between parents of upland cotton and interspecific F₁ hybrids. The results of analyzing gene enrichment showed that the differential expression genes (DEGs) were mainly enriched in the biosynthesis of phenylpropane and biosynthesis pathways of flavonoid. The results of parental allele-specific expression analysis of DEGs showed that the allele of fiber in interspecific F₁ hybrids tended to be expressed in sea-island cotton, among which the dihydroflavonol-3',5'-hydroxylase (F3'5'H) genes in the metabolic pathway of flavonoid in interspecific F₁ hybrids only expressed the alleles of sea-island cotton. Overall, the traits of fiber yield in the interspecific F₁ hybrids between sea-island cotton and upland cotton had negative heterosis and significant green and short fuzz in the fibers, which may be related to the secondary metabolites produced by the biosynthesis of phenylpropane and flavonoid. It is indicated that the heterosis and key metabolic pathways and genes of fibers in the interspecific F₁ hybrids between upland cotton and sea-island cotton are investigated at the transcription level. The relationship between phenotypic traits and transcription and the relationship between transcription and metabolic synthesis are established.

Keywords cotton; heterosis; fiber; transcriptome; metabolic pathway of flavonoid; dihydroflavonol-3',5'-hydroxylase (F3'5'H)

(责任编辑:张志钰)