

淹水胁迫下甜瓜幼苗的转录组测序 及生物信息学分析

王亚楠, 姜艳芳, 刘泽发, 党建成, 张红磊, 张紫霞

(湖南人文科技学院 湖南娄底 417000)

摘要: 涝害是全球范围内危害最广、频率最高的自然灾害。葫芦科瓜类作物耐涝性较差, 尤其是甜瓜。甜瓜属一年生草本葫芦科植物, 喜温热气候, 对涝湿环境耐受能力较弱, 是我国重要经济作物。甜瓜种植区域遭受持续多雨或者涝灾的影响, 可能会导致减产甚至绝收。以实验室甜瓜耐涝种间杂交高代种 M13-06-3 为试材, 对其进行淹水胁迫, 并利用转录组测序及实时荧光定量 PCR 对其根系组织进行差异表达基因分析。结果表明, 淹水胁迫后, 耐涝型甜瓜品种 M13-06-3 筛选出 9037 个差异表达基因, 其中 4529 个 DEGs 上调, 4508 个 DEGs 为下调基因。通过实时荧光定量检测发现 *MELO3C003917*、*MELO3C020588*、*MELO3C008314*、*MELO3C025360*、*MELO3C021658* 这 5 个基因定量检测数据与转录组数据的趋势基本一致, 初步推测这 5 个基因为甜瓜耐涝基因。研究结果可为进一步挖掘与甜瓜耐涝相关的基因奠定基础。

关键词: 甜瓜; 淹水胁迫; 实时荧光定量 PCR; RNA 高通量测序技术; 差异表达基因

中图分类号: S652

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2025)06-014-12

Transcriptome sequencing and bioinformatics analysis of melon seedlings under waterlogging stress

WANG Yanan, JIANG Yanfang, LIU Zefa, DANG Jiancheng, ZHANG Honglei, ZHANG Zixia

(Hunan University of Humanities, Science and Technology, Loudi 417000, Hunan, China)

Abstract: Waterlogging is one of the most widespread and frequent natural disasters worldwide. As a cucurbit crop, melon exhibits relatively poor waterlogging tolerance. When melon cultivation areas experience prolonged rainfall or flooding, severe yield losses or even complete crop failure often occur. In this study, a waterlogging tolerant melon high generation M13-06-3, was used as experimental material. Transcriptome sequencing and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) were employed to analyze differentially expressed genes (DEGs) in root tissues. The results revealed that 9037 DEGs were screened in M13-06-3 under waterlogging stress, including 4529 upregulated and 4508 downregulated genes. qRT-PCR validation confirmed that the expression patterns of five genes, *MELO3C003917*, *MELO3C020588*, *MELO3C008314*, *MELO3C025360*, and *MELO3C021658*, were largely consistent with the transcriptome data, suggesting their potential role in melon waterlogging tolerance. These findings provide a foundation for further exploration of waterlogging resistant genes in melon.

Key words: Melon; Waterlogging stress; Real-time fluorescence quantitative PCR; RNA high-throughput sequencing; Differentially expressed gene

葫芦科瓜类作物耐涝性较差, 尤其是甜瓜, 甜瓜属一年生草本葫芦科植物, 喜温热气候, 生长环境偏爱干燥排水良好的土壤, 对涝湿环境耐受能力较弱, 是我国重要经济作物。因此, 甜瓜种植区域遭受持续多雨或者涝灾的影响, 可能会导致减产甚

至绝收。我国栽培甜瓜的重要产区是黄淮平原和长江中下游地区, 该区域受梅雨季节的影响春夏两季雨水过于丰沛, 夏季更是常有暴雨, 土壤中水分过多易形成涝渍危害, 影响当地露地栽培甜瓜的正常种植, 制约甜瓜的产量和品质。淹水胁迫是全球

收稿日期: 2024-11-27; 修回日期: 2025-03-11

基金项目: 湖南省教育厅科研项目(22C0594); 湖南省研究生培养创新实践基地项目(湘教通(2017)451号); 校企合作创新创业教育基地项目(校地合作通(2021)3号)

作者简介: 王亚楠, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为瓜类蔬菜种质资源开发与应用研究。E-mail: 784603339@qq.com

通信作者: 姜艳芳, 女, 讲师, 研究方向为瓜类抗逆资源创新及育种。E-mail: 453518051@qq.com

植物生长中普遍面临的非生物逆境之一,也是影响作物产量和品质的关键因素之一,它通过影响植物的生理和分子机制,对植物的生长发育产生重要影响^[1]。淹水胁迫会导致植物在体内堆积过量活性氧,损伤细胞膜和蛋白质,甚至导致细胞死亡。植物为了维持细胞内的水分平衡,会增加渗透调节物质的积累,如脯氨酸、甜菜碱、可溶性糖和多胺等。

RNA 高通量测序技术(RNA-seq)可以在转录组水平解析基因的表达特点,目前已被广泛应用于功能基因组研究,例如油菜^[2]、栀子^[3]、黄瓜^[4]中,但关于甜瓜耐涝性转录组方面的研究少有报道^[5]。实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术是定量检测基因表达的重要手段之一,已有学者将其应用在了茶树^[6]中来检测其与耐涝相关基因的相对表达量。为探究甜瓜幼苗响应淹水胁迫的分子调控机制,笔者通过对淹水胁迫 9 d 后的甜瓜幼苗(M13-06-3)及未淹水胁迫的甜瓜幼苗(M13-06-3)根系进行转录组测序(transcriptome sequencing),并对获得的转录组测序数据进行生物信息学分析、筛选甜瓜响应淹水胁迫的差异基因,然后对差异基因进行 GO 功能注释、KOG 注释和 KEGG 富集分析,并挑选主要差异表达基因进行实时荧光定量 PCR 验证,以期为研究甜瓜响应涝害机制提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

参与试验的种子材料为湖南人文科技学院园艺教研室瓜类课题组选育的甜瓜耐涝种间杂交高代种 M13-06-3,由薄皮甜瓜与厚皮甜瓜杂交而成,性状更偏向于薄皮甜瓜。

1.2 试验设计

本试验在湖南人文科技学院园艺实验室内进行,2023 年 3 月 15—17 日先挑选出饱满且大小一致的 36 粒甜瓜 M13-06-3 种子进行浸种催芽,随后将其置于大小一致的装有栽培基质土的塑料营养钵中,每盆播种 2 粒种子。待甜瓜幼苗长至 2 叶 1 心后移栽至上口直径为 30 cm、下口直径为 21.5 cm、高为 20.5 cm 的塑料不带漏水孔的圆盆里,每盆 3 株。2023 年 5 月 1 日,甜瓜幼苗普遍长到 3 叶 1 心后,选取生长势大致相同的幼苗来进行淹水处理。淹水处理的高度统一设定为超过植株根部基质表面 3 cm。这样的高度设置能够确保淹水的程度相对一致,从而更好地观察和研究淹

水对甜瓜幼苗的影响。对照组采用正常的浇水方式,在表层土壤没有干的时候不进行浇水操作,在需要浇水的时候,要确保土壤被浇透,使甜瓜幼苗充分吸收水分。

试验共设置了 2 个处理组,即不淹水处理(NW)、淹水处理 9 d(TW)。淹水处理时采取分区管理的方式,每个处理均为 6 盆即 18 株,共计 36 株。每天及时为各处理补充流失的水分,有效保证处理组的淹水高度大致相同,对照组 NW 则进行正常的水分管理。淹水处理后,分别对处理组 NW、TW 的形态、光合特性进行测定和分析,再分别采集其根系组织放入液氮速冻,后转入-80℃超低温冰箱中储存,通过液氮研磨提取根系 RNA 用于转录组学分析,每个指标进行 3 次重复测定,共计 6 个样品。

1.3 方法

1.3.1 甜瓜幼苗的生长及光合特性测定 2023 年 5 月 8—9 日分别对甜瓜幼苗的 2 个处理组进行株高、根长、叶面积、鲜质量、干质量、光合参数测定,每个指标进行 3 次重复测定,再取平均值。将取得的数据使用软件 Graphpad Pism9.5、Excel 进行处理和作图,使用 SPSS 进行统计分析。

株高:使用直尺从甜瓜幼苗子叶结点测量至生长点。

叶面积:参照王加蓬等^[7]对甜瓜叶面积的测定方法,即叶面积=叶长×最大叶宽×0.66。

对处理后的甜瓜幼苗用干净的水冲洗根部泥土,洗净后使用纸巾先吸干根部水分,用剪刀将地上、地下部分离,再分别测量地上、地下鲜质量。

光合参数测定使用 iFLYaxin-1161 型便携式光合作用测定仪,测定不同淹水胁迫处理下的长势一致的甜瓜相同部位,选取晴朗天气下 09:00—11:00 对 4 组甜瓜幼苗淹水处理进行光合特性(净光合速率、蒸腾速率、气孔导度、胞间 CO₂ 浓度)比较试验。取样时间分别为各处理组在淹水胁迫 0、9 d 时取样,测定其根系生长指标。

1.3.2 文库构建及测序 本试验委托南京集思慧远生物科技有限公司对 M13-06-3 进行转录组测序。首先用 Trizol 试剂盒分别提取出 M13-06-3 中 2 个处理组的 RNA,依次通过琼脂糖凝胶电泳与凝胶成像、Nanodrop、Agilent 2100 检测其 RNA 的完整性、纯度(OD_{260/280})、浓度、核酸吸收峰、RIN 值、28S/18S、图谱基线、5S 峰等指标,然后通过 PCR 富集构建出 cDNA 文库,用 Qubit 2.0 初步定量、用

Agilent 2100 检测 insert size, insert size 符合预期后用 q-PCR 准确定量(文库有效浓度 $>2\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$),完成库检再经 Agilent 2100 质检合格后,使用 Illumina NovaSeq 6000 对其进行高通量测序。

1.3.3 差异基因的筛选 使用 Illumina NovaSeq 6000 测序平台进行高通量测序,经碱基识别分析得到 Raw Data, 过滤后得高质量 Clean Data ($Q30\geq 90.99\%$, FASTQ 格式存储)。使用软件 HISAT2^[8]以甜瓜基因组为参考进行比对和转录本重构(比对效率 96.01%以上),再用 StringTie^[9]进行基因重建和序列拼接组装。将得到的 Clean Data 与参考基因组比对, 对比对结果和原有注释信息进行分析, 包括文库质量评估等高级分析。用 Blast 将拼接基因与 7 个数据库比对, 以 FPKM 为衡量表达水平的标准。检测差异表达基因时, 用差异表达分析软件 DESeq2 对甜瓜幼苗根部组织样品进行差异筛选。差异倍数是两样品(组)表达量比值, p value 是差异表达显著性, 校正 p 值得到 FDR 值, 控制 FDR 小于一定阈值可降低假阳性率。以 $\text{Log}_2(\text{Fold Change})$ 绝对值 $|\text{Fold Change}|\geq 1$ 且 $\text{FDR}<0.05$ 为标准筛选

出显著差异表达基因。

1.3.4 差异表达基因功能注释和富集分析 对上一步筛选得到的 DEGs 使用 Blast 与 7 个公共数据库 (Swiss-Prot、COG、GO、NR、KEGG、Pfam、KOG) 进行比对, 进行差异表达基因功能注释, 并将其进行 GO、KOG、COG 和 KEGG 富集分析。

1.3.5 差异表达基因的 qRT-PCR 验证 根据转录组测序结果筛选基因, 使用 DANMAN 6.0 软件进行引物的设计(详见表 1), 引物合成在南京集思慧远生物科技有限公司进行。在 CFX Connect (BIO-RAD) 仪器中进行 qRT-PCR, 通过 qRT-PCR 分析可证实 RNA-seq 获得的淹水胁迫响应基因在甜瓜幼苗根中的表达结果。提取甜瓜幼苗 (M13-06-3) 淹水胁迫后 0、9 d 时根系样品的总 RNA。使用前期提取的 M13-06-3 根部浓度、质量良好的总 RNA 进行反转录, 获得 cDNA, 然后进行 Real time PCR 反应。通过分析转录组数据, 从中找到 M13-06-3 根部在淹水胁迫下表达有所上调或下调的序列, 随机选取 13 个基因进行荧光定量分析, 每个样品 3 个生物学重复。

表 1 基因及其引物序列
Table 1 Genes and their primer sequences

基因登录号 Gene accession No.	正向引物 Forward sequence	反向引物 Reverse sequence
Actin7	TGCCGAGAAGTTCTATTCCAGC	CATAGTTGAACCACCACTGAGGAC
MELO3C003917	CGACAAGGGAAGAATGAGCA	GCAAACCTTCTCATCCCTCACAG
MELO3C008314	TGTGGAGGGAGATGGAGAAAC	CTCCTCCCACGACAATAAAGC
MELO3C015312	CCCACAAAGGAGTACAACCCC	TCATCAAAAGGGACAACAGAGC
MELO3C015488	TGGGCTTATCCAGGACTTGC	TTATTGGAACCTTGGGAGCA
MELO3C020588	TTGCCACGTTTCGACCTCTC	CCTCTTTCTCTACGCTCCGCT
MELO3C021306	GAAAAAGCAGTGCCTCCTCC	TCACCATCCAGCCCCAAGA
MELO3C021658	CGTTACCCCTCTTTCCCTCG	CACGGGTTCTTGCTCTCTCAC
MELO3C024315	TTACTCTGACTTTGGATGGGA	TCAGAGCCTTGAGAAACCACC
MELO3C024345	CTGCGTTGTTTGGAAAGGTG	GGAATACGCCTGTCTTTTGCTA
MELO3C025360	AGGACCATCGCCATTTTCTT	GGGGTCCAAATCCAACGAG
MELO3C026754	TCATCCAATACCGTCACAGAGC	AGGTACGATGACGCCAGTT
MELO3C027913	TTGAACCAAACCCAAATGAGTC	TTGGTGGAATGAAGTTGTTGCT

1.4 数据处理

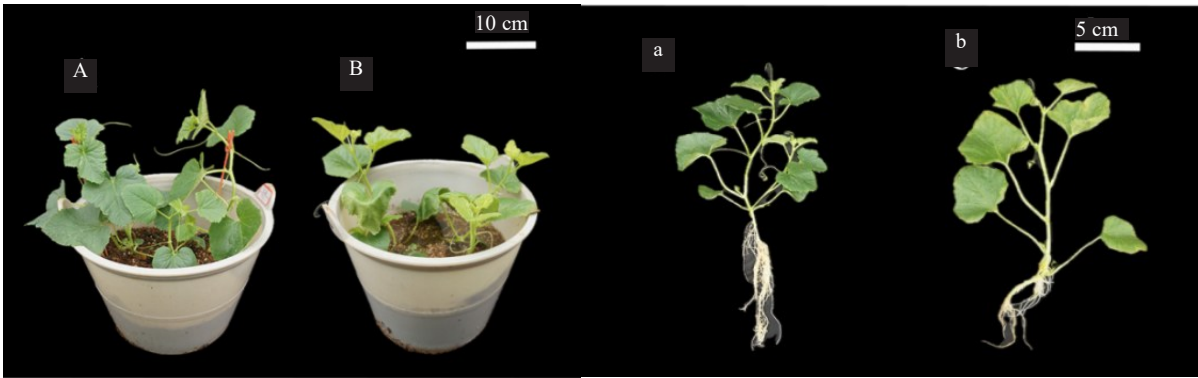
用 Excel 2020 软件计算试验结果和平均值, 用 SPSS 计算标准差并进行差异显著性分析以及方差分析。

2 结果与分析

2.1 淹水胁迫后甜瓜幼苗的生长特性

通过对甜瓜幼苗进行不同程度淹水处理研究

发现(图 1、表 2), 未进行淹水处理的 NW 组叶片呈深绿色, 根系茂密, 长势较好, 而经淹水处理 9 d 的 TW 组叶片呈黄绿色, 长势差且萎蔫多, 根系不定根丛生, 可见淹水胁迫会明显抑制叶片的生长发育、光合作用以及叶绿素的合成。经淹水处理后, 甜瓜幼苗 2 个处理组的株高、根长、地上鲜质量、地下鲜质量均受到不同程度影响。与对照组 NW 相比, TW 的株高没有受到显著影响, 但根长、地上鲜



注:A、a 分别为处理组 NW 的叶片、根系;B、b 分别为处理组 TW 的叶片、根系。
Note: A and a are the plots of leaves and root system of NW of treatment group respectively; B and b are the plots of leaf and root system of TW of treatment group, respectively.

图 1 淹水胁迫的甜瓜幼苗
Fig. 1 Waterlogging stress-induced cucumber seedlings

表 2 淹水胁迫对甜瓜生长的影响
Table 2 Effects of flooding stress on melon growth

处理 Treatment	株高(地上) Plant height (ground)/cm	根长 Root length/cm	地下鲜质量 Fresh mass of underground/g	地上鲜质量 Fresh mass of aboveground/g	地下干质量 Dry mass of underground/g	地上干质量 Dry mass of aboveground/g	叶面积 Leaf area/ cm ²
NW	25.34±1.38 a	26.45±1.20 a	3.31±0.30 a	16.7±2.00 a	0.29±0.02 a	1.72±0.10 a	42.00±2.13 a
TW	25.15±4.28 a	14.35±1.20 b	1.76±0.17 b	11.93±0.17 b	0.11±0.04 b	1.15±0.12 b	25.73±2.28 b

注:同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。下同。
Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level. The same below.

质量、地下鲜质量均呈下降趋势。NW、TW 的根长分别为 26.45、14.35 cm,同对照组相比,TW 组的根长下降 54.3%,可见淹水胁迫对甜瓜幼苗根长的影响较大,会在一定程度上抑制甜瓜幼苗根系的生长和发育。

2.2 淹水胁迫后甜瓜幼苗的光合特性

经方差分析(表 3),甜瓜幼苗的 2 个处理组(NW、TW)在不同淹水处理下均有显著性差异。在净光合速率方面,NW 远高于 TW,结合表 2、图 1 发现,淹水胁迫严重影响甜瓜的生长发育以及光合作用;在气孔导度方面,NW 与 TW 差异显著,TW 的气孔导度远高于 NW;在胞间 CO₂ 浓度、蒸腾速率方面,TW 都远高于 NW,且有显著性差异。

2.3 淹水胁迫后甜瓜幼苗的转录组测序

对 M13-06-3 根部的 3 个对照组样品(NW1、

NW2、NW3)和 3 个处理组样品(TW1、TW2、TW3)共 6 个样品进行高通量测序,共获得有效数据 43.11Gb,所有样品的 Clean Data 都在 6.58 Gb 以上,平均 GC 含量为 43.25%,且 Q30 碱基百分比在 90.99%~92.45%(表 4),数据表明测序结果较为准确。受淹水胁迫处理的 TW 根部筛选出的差异表达基因共有 9037 个,其中包含 4529 个差异表达基因显著上调,4508 个差异表达基因显著下调(图 2)。将得到的基因组数据比对到甜瓜参考基因组上,获得各个样本的基因组比对情况,比率为 96.01%~97.25%(表 5)。

2.4 表达基因功能注释

将 M13-06-3 中通过筛选得到的差异表达基因(DEGs)使用 Blast 与 7 个公共数据库,包括

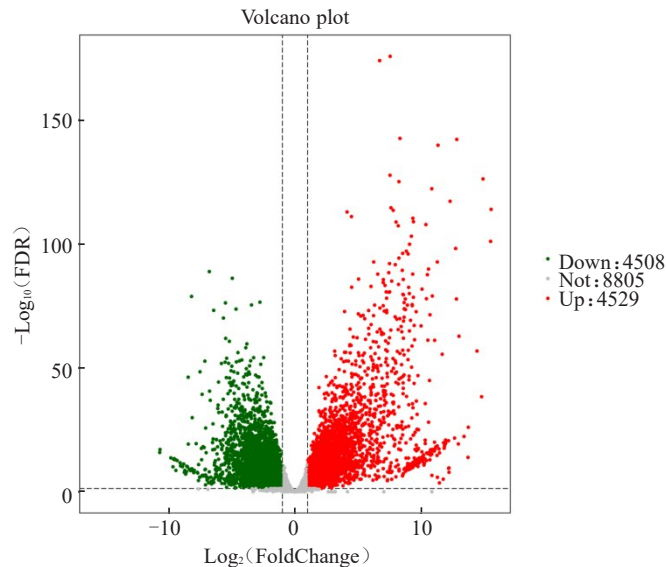
表 3 淹水处理对甜瓜光合特性的影响
Table 3 Effects of flooding treatment on the photosynthetic characteristics of melon

处理 Treatment	净光合速率 $P_n/(\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1})$	气孔导度 $G_s/(\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1})$	胞间 CO ₂ 浓度 $C_i/(\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1})$	蒸腾速率 $T_r/(\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1})$
NW	7.86±1.81 a	0.14±0.06 b	266.35±15.09 b	2.05±0.56 b
TW	4.20±0.89 b	0.32±0.15 a	350.61±21.88 a	5.08±1.22 a

表 4 基因及其序列质量
Table 4 Genes and the sequences quality

样品名称 Sample	总序列数 ReadSum	总碱基数 BaseSum	GC/%	N/%	Q20/%	Cycle Q20/%	Q30/%
NW1	27 245 859	8 173 757 700	43.45	0.00	97.16	100.00	92.36
NW2	26 962 763	8 088 828 900	43.58	0.00	97.23	100.00	92.45
NW3	25 725 332	7 717 599 600	43.47	0.00	96.52	100.00	90.99
TW1	23 555 869	7 066 760 700	42.62	0.00	96.83	100.00	91.80
TW2	24 807 626	7 442 287 800	42.76	0.00	96.83	100.00	91.67
TW3	25 981 432	7 794 429 600	43.63	0.00	96.92	100.00	91.88

注:GC(%). Clean Data GC 含量;N(%). Clean Data 中 N 碱基含量;Q20(%). Clean Data 质量值大于或等于 20 的碱基所占的百分比;Q30(%). Clean Data 质量值大于或等于 30 的碱基所占的百分比。
Note: GC (%). Clean Data GC content; N (%). N bases in Clean Data; Q20 (%). Percentage of bases with Clean Data mass value greater than or equal to 20; Q30 (%). Percentage of bases with Clean Data mass value greater than or equal to 30.



注:横坐标表示某一个基因在两样品中表达量差异倍数的对数值;纵坐标表示 FDR 的负对数值。图中绿色的点代表显著下调的基因,红色的点代表显著上调的基因,黑色的点代表表达差异不显著的基因。Down:上调的差异表达基因;Not:未比对上的基因;Up:下调的差异表达基因。
Note: The horizontal coordinate represents the log value of the expression difference of a gene in the two samples; the ordinate represents the negative log value of the FDR. The green dots in the figure represent significantly downregulated genes, red dots represent significantly up-regulated genes, and black dots represent genes with insignificant differences in expression. Down: differentially expressed up-regulated genes; Not: genes not aligned; Up: downregulated differentially expressed genes.

图 2 差异表达火山图
Fig. 2 Difference expression volcano plot

表 5 各样品比对效率
Table 5 The alignment efficiency of each sample

比对情况 Comparison situation	样品名称 Sample					
	NW1	NW2	NW3	TW1	TW2	TW3
未比对上的 Not aligned	1 497 685 (2.75%)	1 481 509 (2.75%)	1 721 143 (3.35%)	1 882 063 (3.99%)	1 770 243 (3.57%)	1 717 327 (3.30%)
比对上的 Reads aligned	52 994 033 (97.25%)	52 444 017 (97.25%)	49 729 521 (96.65%)	45 229 675 (96.01%)	47 845 009 (96.43%)	50 245 537 (96.70%)

Swiss-Prot、GO、KEGG、COG、KOG、Pfam、NR 进行
比对,并进行功能注释。结果显示(表 6、图 3),通
过高通量转录组测序共注释差异表达基因(DEGs)
8904 个。其中,注释到 Swiss-Prot 数据库的有 7031

表 6 NW vs TW 差异表达基因在不同数据库注释到的数目

差异表达基因库名称 DEG library name	数目 Number
Total DEGs	8904
Swiss-Prot	7031
GO	6543
KEGG	3455
COG	2814
KOG	4195
Pfam	7223
NR	8895

个,占比 78.96%;注释到 GO 数据库的有 6543 个,占比 73.48%;注释到 KEGG 数据库的有 3455 个,占比 38.80%;注释到 COG 数据库的有 2814 个,占比 31.60%;注释到 KOG 数据库的有 4195 个,占比 47.11%;注释到 Pfam 数据库的有 7223 个,占比 81.12%;注释到 NR 数据库的有 8895 个,占比 99.89%。

2.5 差异表达基因的 GO 富集分析

差异表达基因主要富集在细胞组分 (cellular

component)、分子功能 (molecular function)、生物学过程 (biological process) 这 3 个主要 GO 类别下。如图 3 所示,淹水胁迫后甜瓜幼苗 (M13-06-3) 的差异表达基因富集到细胞组分 (CC) 类别下最多的是细胞 (cell) 和细胞部分 (cell part),分别富集了 2846 个和 2842 个 DEGs;淹水胁迫后甜瓜幼苗 (M13-06-3) 的差异表达基因富集到分子功能 (MF) 类别下最多的是结合功能 (binding) 和催化活性 (catalytic activity),分别富集了 1861 个和 1820 个 DEGs;淹水胁迫后甜瓜幼苗 (M13-06-3) 的差异表达基因富集到生物学过程 (BP) 类别下最多的是细胞过程 (cellular process) 和代谢过程 (metabolic process),分别富集了 2328 个和 2217 个 DEGs。

2.6 差异表达基因 KEGG 通路注释与分析

2.6.1 KEGG 注释和 KEGG 富集分析 进一步了解甜瓜幼苗 (M13-06-3) 受淹水胁迫后的差异表达基因所参与的代谢途径,将 M13-06-3 淹水胁迫后的 DEGs 同 KEGG 数据库比对,发现有 3455 个 DEGs 在 KEGG 数据库中被注释,得到 KEEG 功能注释分类图 (图 4)。结果表明, M13-06-3 中的 3455 个

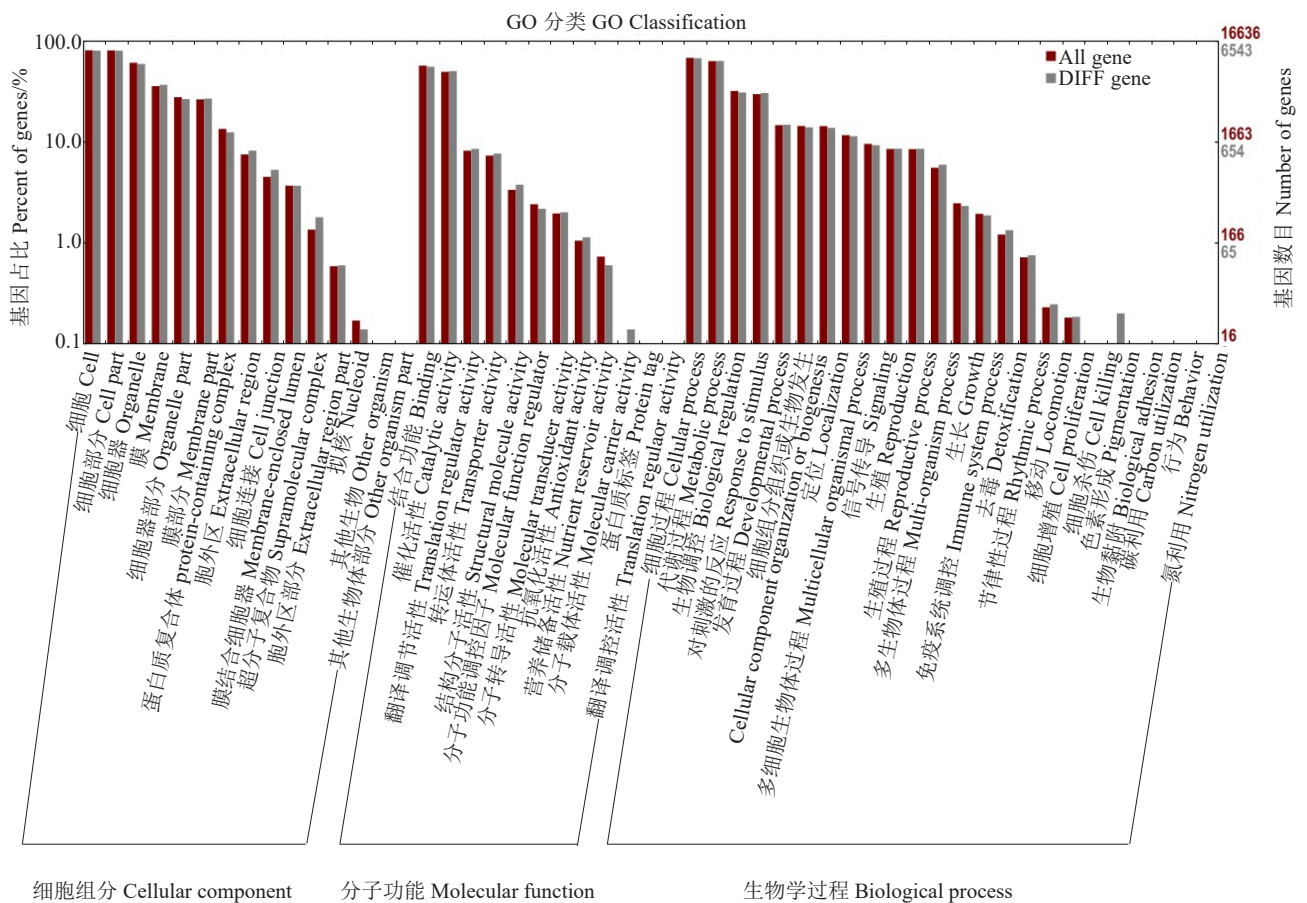


图 3 差异表达基因 GO 注释分类统计图

Fig. 3 Statistical plots of GO annotation classification of differentially expressed genes

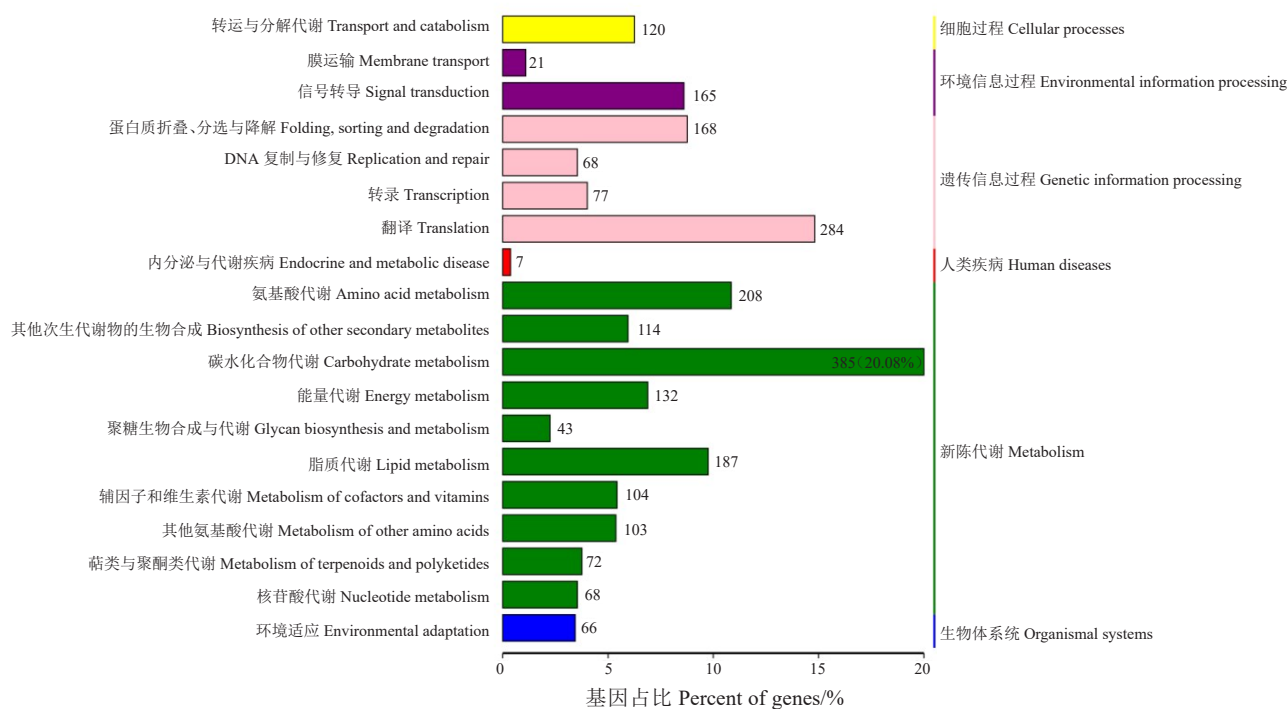


图4 淹水胁迫下根系差异表达基因(部分)的KEGG分类图

Fig. 4 KEGG classification plot of differentially expressed genes (partial) in roots under flooding stress

DEGs 被分别注释到细胞过程 (cellular processes)、环境信息过程 (environmental information processing)、遗传信息过程 (genetic information processing)、人类疾病 (human diseases)、新陈代谢 (metabolism) 和生物体系统 (organismal systems) 这 6 个 KEGG 一级代谢通路中。其中, 6 个 KEGG 一级代谢通路中又下分为 19 个二级通路, 这 19 个二级通路中 DEGs 注释最多的是二级通路新陈代谢 (Metabolism) 下的二级通路碳水化合物代谢 (carbohydrate metabolism), 注释了 385 个 DEGs; 其次是一级代谢通路遗传信息过程 (genetic information processing) 下的二级通路翻译 (translation), 注释了 284 个 DEGs。

进一步与 KEGG 数据库进行比对分析甜瓜幼苗淹水胁迫后可能参与的路径, 共有 2903 条差异表达基因富集到 KEGG pathway 中, 共涉及了 128 个代谢通路。结果显示 (图 5), KEGG pathway 中有 176 个 DEGs 在核糖体 (ribosome) 通路上富集, 有 83 个 DEGs 在苯丙烷类生物合成 (phenylpropanoid biosynthesis) 通路上富集, 有 77 个 DEGs 在淀粉和蔗糖代谢 (starch and sucrose metabolism) 通路上富集, 有 72 个 DEGs 在糖酵解/糖异生 (glycolysis / gluconeogenesis) 通路上富集, 有 72 个 DEGs 在

MAPK 植物信号 (MAPK signaling pathway-plant) 通路上富集, 有 69 个 DEGs 在氨基糖和核苷酸糖的代谢 (amino sugar and nucleotide sugar metabolism) 通路上富集。

2.6.2 对淹水胁迫响应的候选基因进行筛选 为进一步筛选甜瓜幼苗淹水胁迫后响应的相关基因, 将通过筛选得到的差异表达基因 (DEGs) 与 NR、COG、KOG、Swiss-Prot、Pfam、KEGG、GO 等 7 个数据库进行比对注释。当植物受到淹水胁迫时, 体内会启动一系列复杂的信号传导过程, 以调控抗性相关基因的表达并发挥其功能, 从而最大程度地适应胁迫环境, 其中转录因子作为转录起始的关键调节器起着至关重要的作用。通过调控转录因子的表达和活性, 植物能够启动特定的生物化学途径和基因表达网络, 以增强对淹水胁迫的抵抗能力。结合前人研究成果, 发现与淹水胁迫相关的转录因子有 ERF、WRKY、MYB、NAC、bZIP2 等 [10-12]。再结合 GO、KEEG、KOG 等数据库注释的差异表达基因数据以及 FPKM 数据, 推测 MELO3C003917、MELO3C020588、MELO3C008314、MELO3C025360、MELO3C021658 这 5 个基因可能响应甜瓜幼苗淹水胁迫。

淹水胁迫下, 甜瓜幼苗 2 个处理组与光合作用

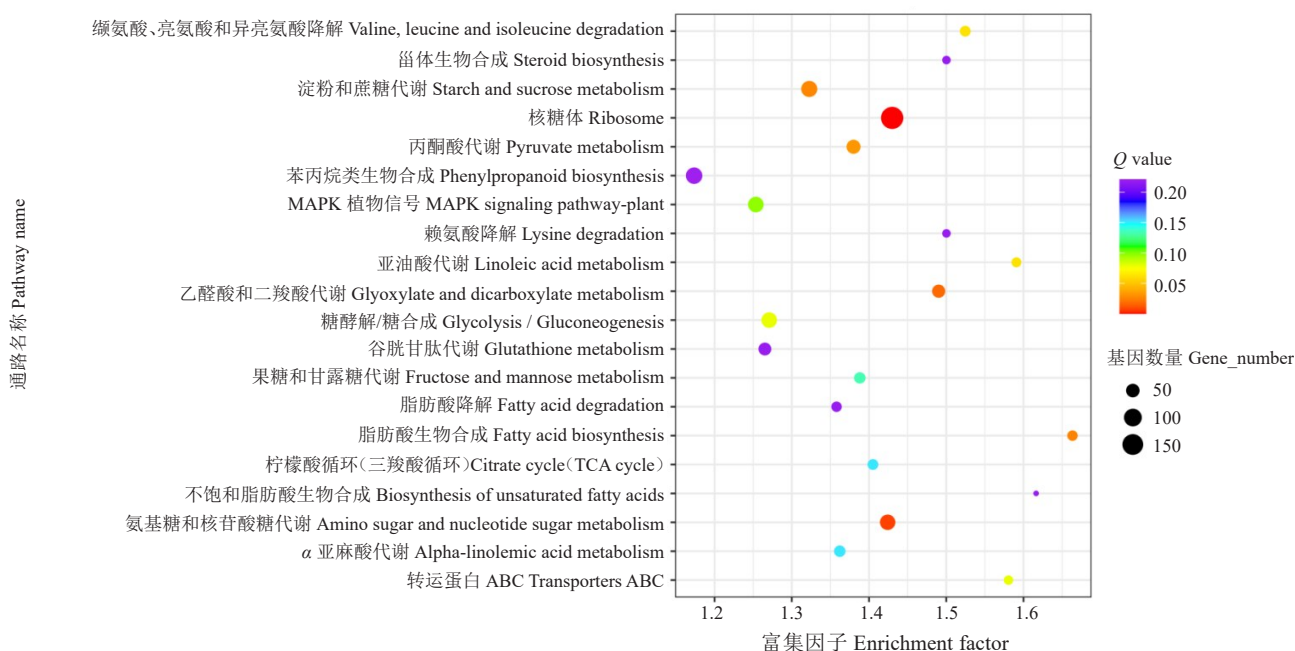


图5 根系差异表达基因的 KEGG 通路富集分析

Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed genes in the root system

相关的蛋白合成会减少,导致光合作用效率下降,甜瓜幼苗的生长指标如株高和生物量的增长会受到抑制。但一些与抗逆相关的蛋白质,如热休克蛋白、病程相关蛋白等可能会增加,这些蛋白质有助于保护细胞免受胁迫,这一点在表7中有所体现。本试验筛选出的5个基因有2个(*MELO3C003917*、*MELO3C021658*)都包含热休克蛋白并参与了内质网加工通路,内质网是细胞中负责蛋白质折叠和修饰的重要细胞器,在应对外界压力和环境变化时,70 kDa 热休克蛋白会参与内质网蛋白的折叠、修复和降解,从而帮助细胞对应激情况,基因 *MELO3C003917*、*MELO3C021658* 描述中都包含了 MreB/Mbl 蛋白和翻译后修饰、蛋白质转换、伴侣蛋白。*MELO3C020588* 的基因结构包含了一种小型热休克蛋白——18.5 kDa 热休克蛋白。*MELO3C008314* 的基因结构中则包含脱落酸受体 PYL4 蛋白并参与了 MAPK 信号通路。结合基因功能描述,发现 18.5 kDa 热休克蛋白、70 kDa 热休克蛋白、MreB/Mbl 蛋白、脱落酸受体 PYL4 蛋白、乳酰基谷胱甘肽裂解酶、内质网加工通路、MAPK 信号通路、氨基酸的转运和代谢通路、碳水化合物的运输和代谢通路在甜瓜对淹水胁迫的反应中起着重要作用。

2.7 qRT-PCR 验证

实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术是定量检

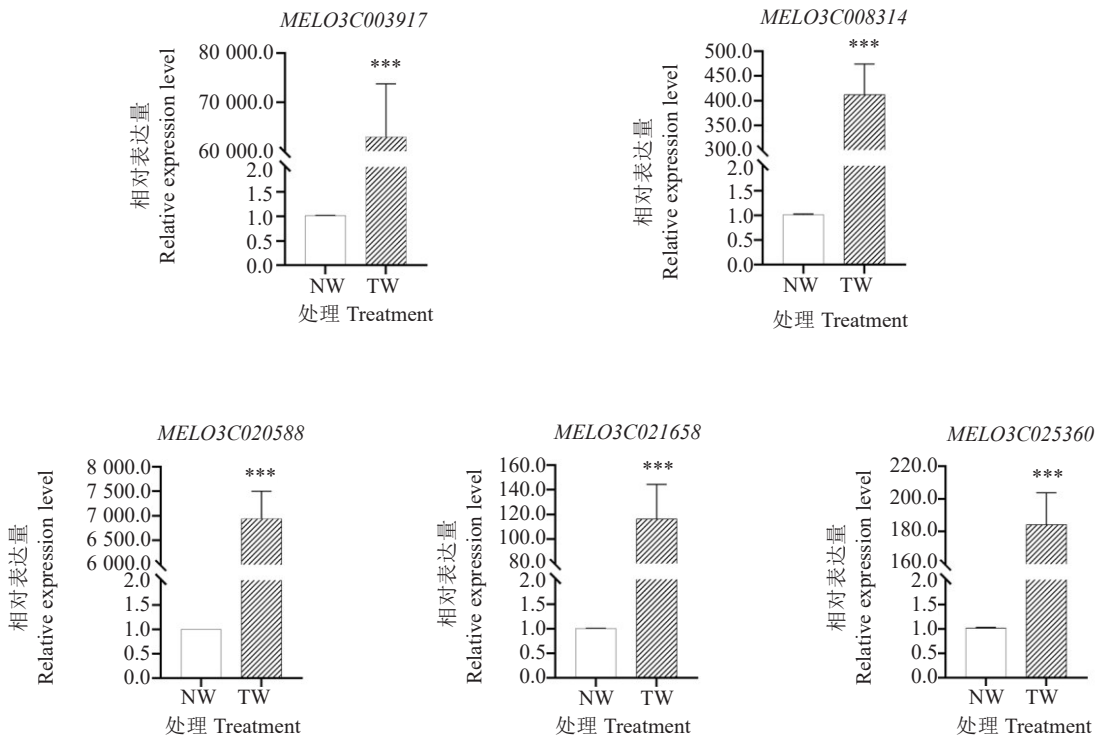
测基因表达的重要手段之一。为验证甜瓜幼苗 M13-06-3 在淹水胁迫下响应的候选基因,挑选了5个候选基因进行实时荧光定量 PCR 验证。通过对淹水胁迫下甜瓜幼苗 M13-06-3 根系样品在 qRT-PCR 测试下的表达趋势和转录组测序结果中的变化趋势分析,发现5个差异表达基因在 qRT-PCR 和转录组测序结果中的变化趋势基本一致,表明转录组分析的结果具有可靠性,也验证了2.6.2中推断的可能响应甜瓜幼苗 M13-06-3 淹水胁迫的基因。*MELO3C003917*、*MELO3C020588*、*MELO3C008314*、*MELO3C025360*、*MELO3C021658* 这5个基因的表达量在2个处理中差异均极显著(图6),初步验证了这5个基因可能是甜瓜耐涝基因。

3 讨论与结论

甜瓜是全球十大水果之一,富含各种维生素、可溶性糖、矿物质等营养元素,受到了各地消费者的喜爱,是中国重要的经济作物。近几年,有学者公开发表了一些甜瓜品种在淹水胁迫下的生理生化影响^[13-15],发现涝害对甜瓜影响较大,且经淹水胁迫后会导致一些植物进化出了形态和结构适应机制,如芽伸长、不定根发育及形成通气组织,这些都有助于植物逃离缺氧环境或改善缺氧器官的氧气供应状况。结合本试验研究数据,从形态上看,过

表 7 差异表达基因描述
Table 7 Description of the differentially expressed genes

序号 Number	基因 Gene	基因描述 Gene description
1	MELO3C003917	翻译后修饰、蛋白质转换、伴侣蛋白;内质网加工通路;热休克 70 kDa 蛋白;MreB/Mbl 蛋白;NAD 特异性谷氨酸脱氢酶 Post-translational modification, protein turnover, chaperone; endoplasmic reticulum processing pathway; heat shock 70 kDa protein; MreB / Mbl protein; NAD-specific glutamate dehydrogenase
2	MELO3C020588	翻译后修饰、蛋白质转换、伴侣蛋白;HSP20 家族蛋白/阿尔法晶体蛋白家族;18.5 kDa I 类热休克蛋白 Post-translational modifications, protein turnover, chaperones; HSP 20 family proteins / alpha crystal protein family; class 18.5 kDaI heat shock proteins
3	MELO3C008314	MAPK 信号通路;聚酮环化酶/脱水酶和脂质转运;脱落酸受体 PYL4;植物激素脱落酸(abscisic acid, ABA) 受体蛋白 MAPK signaling pathway; polyketide cyclase / dehydratase and lipid transport; Absciscic acid receptor PYL4 ; phytohormone abscisic acid (abscisic acid, ABA) receptor protein
4	MELO3C025360	氨基酸的转运和代谢;碳水化合物的运输和代谢;乳酰基谷胱甘肽裂解酶(GST) The transport and metabolism of amino acids; the transport and metabolism of carbohydrates; lactoylglutathione lyase (GST)
5	MELO3C021658	翻译后修饰、蛋白质转换、伴侣蛋白;内质网加工通路;热休克 70 kDa 蛋白 1/2/6/8;MreB/Mbl 蛋白;NAD 特异性谷氨酸脱氢酶 Post-translational modification, protein turnover, chaperone; ER reticulum processing pathway; heat shock 70 kDa protein 1 / 2 / 6 / 8; MreB / Mbl protein; NAD-specific glutamate dehydrogenase



注:**表示在 0.01 水平差异极显著;***表示在 0.001 水平差异极显著。
Note: ** represent significant difference at 0.01 level; *** represent significant difference at 0.001 level.

图 6 差异表达基因的 qRT-PCR 验证
Fig. 6 qRT-PCR validation of differentially expressed genes

量水分使甜瓜叶片出现萎蔫、发黄等现象^[16],且经淹水胁迫后甜瓜幼苗根系不定根丛生。在光合特性上,对照组 NW 与处理组 TW 的净光合速率、气孔导度、蒸腾速率、细胞间隙 CO₂ 浓度差异显著。结合前人研究,推测甜瓜幼苗受淹水胁迫后不定根的生长促使蒸腾速率和细胞间隙 CO₂ 浓度升高。

可见淹水胁迫在一定程度上影响了甜瓜幼苗的光合特性,但不定根生长等情况表明其对淹水胁迫具备一定适应性,这为后续研究提供了依据和方向。

淹水胁迫是重要逆境胁迫之一,会引发一系列基因的表达变化,特别是与氧气供应、抗氧化反应、离子平衡和逆境适应等相关的基因。这些基因的表达变化会影响幼苗的生理和生化代谢过程,进而影响其对淹水胁迫的适应能力。RNA 高通量测序技术(RNA-seq)可以在转录组水平解析基因的表达特征,目前已被广泛应用于功能基因组研究,但关于甜瓜耐涝性转录组方面的研究报道较少^[5]。笔者对 M13-06-3 根部的 3 个对照组样品(NW1、NW2、NW3)和 3 个处理组样品(TW1、TW2、TW3)进行了转录组测序和生物信息学分析。将通过筛选得到的差异表达基因(DEGs)与 Swiss-Prot、COG、GO、NR、KEGG、Pfam、KOG 这 7 个数据库进行序列比对,各样品的比率为 96.01%~97.25%,并筛选到差异表达基因 9037 个,其中 4529 个 DEGs 上调,4508 个 DEGs 下调。同时,对这些差异基因进行差异比较火山图分析、差异基因聚类热图分析、相关性分析、GO 富集分析、KOG 注释分析、KEGG 代谢通路富集分析以及实时荧光定量验证。

受淹水胁迫后甜瓜幼苗(M13-06-3)的差异表达基因主要富集在细胞组分、分子功能、生物学过程这 3 个主要 GO 类别下。通过 KEGG 代谢通路富集分析发现,差异基因主要参与核糖体、苯丙烷类生物合成、淀粉和蔗糖代谢、糖酵解/糖合成、MAPK 植物信号、氨基糖和核苷酸糖等多种代谢通路。研究表明,淹水胁迫会诱导甜瓜体内多种信号传导途径及代谢过程发生改变,例如激活某些特定的转录因子或调节蛋白,从而促进抗氧化酶活性增强、渗透调节物质积累等有利于提高植物耐受性的反应^[17]。通过转录组测序以及荧光定量检测,结合 GO、KOG、KEGG 分析结果,对响应淹水胁迫的候选基因进行了分析,初步验证了 *MELO3C003917*、*MELO3C020588*、*MELO3C008314*、*MELO3C025360*、*MELO3C021658* 这 5 个基因响应甜瓜幼苗淹水胁迫。从基因结构层面来看,筛选出的这 5 个基因各自包含了与耐涝相关的关键蛋白或参与重要耐涝相关通路的基因,在甜瓜中这些基因所在的基因组区域可能是植物耐涝性状的重要遗传基础,它们的表达调控

以及相互作用共同决定了植物耐涝能力的强弱。*MreB/Mbl* 蛋白调控耐涝基因表达,影响植物耐涝的基础转录水平^[18];热休克蛋白从细胞内稳态维持角度保障细胞在水淹环境下能正常行使功能,为其他调控机制的有效运行提供了细胞层面的基础^[19];而脱落酸(ABA)受体 *PYL4* 蛋白所在的 MAPK 信号通路又与其他激素信号转导等途径相互沟通协作,对植物整体的耐涝生理反应进行精细调控^[20-28];同时,乳酰基谷胱甘肽裂解酶相关的代谢通路参与植物应对胁迫的氧化还原平衡等关键环节,与其他机制协同来减轻水淹造成的伤害,例如拟南芥中的 *AtGSTF2* (*Arabidopsis thaliana* Glutathione S-transferase F2)^[29]、水稻中的 *OsGSTU5* (*Oryza sativa* Glutathione S-transferase U5)^[30]、烟草中的 *NtGSTF1* (*Nicotiana tabacum* Glutathione S-transferase F1)^[31]、玉米中的 *ZmGSTF2* (*Zea mays* Glutathione S-transferase F2)^[32]。有学者研究发现,涝敏感型材料遭遇淹水胁迫后转录和蛋白水平的变化更大^[33];Zhang 等^[34]揭示了甜瓜耐涝过程中发挥重要作用的途径和基因,其中对脱落酸、GO 功能富集、代谢通路以及基因 *MELO3C008314* 的研究结果都与本试验结果一致。

对筛选出的可能响应耐涝的基因功能进一步分析,发现脱落酸受体 *PYL4* 蛋白参与了 MAPK 信号通路且能与其他激素信号转导等途径相互沟通协作,共同调节基因表达、离子通道活性、渗透调节物积累和气孔闭合等机制,对甜瓜的耐涝性产生重要影响;通过参与内质网加工通路,18.5 kDa 热休克蛋白、70 kDa 热休克蛋白等热休克蛋白可以增强植物对淹水胁迫的适应能力,减轻内质网应激,维持蛋白质稳定性和细胞功能,在甜瓜的耐涝适应中发挥重要作用;乳酰基谷胱甘肽裂解酶同氨基酸的转运和代谢、碳水化合物的运输和代谢通路等相关基因在甜瓜的耐涝性中可能发挥重要作用,特别是通过调节与氧化还原平衡、植物抗氧化防御、解毒反应和细胞凋亡等相关的代谢途径;*MreB/Mbl* 蛋白与热休克蛋白之间可能存在直接或间接的相互联系。

MreB/Mbl 蛋白、18.5 kDa 热休克蛋白、70 kDa 热休克蛋白、脱落酸受体 *PYL4* 蛋白、乳酰基谷胱甘肽裂解酶、内质网加工通路、MAPK 信号通路、氨基酸的转运和代谢通路、碳水化合物的运输和代谢通路在甜瓜对淹水胁迫的反应中起着重要作用。通过对甜瓜幼苗(M13-06-3)进行转

录组测序,将通过筛选得到的差异表达基因(DEGs)与 Swiss-Prot、COG、GO、NR、KEGG、Pfam、KOG 等 7 个数据库进行比对分析,并结合荧光定量表达检测对响应淹水胁迫的候选基因进行了分析,结果表明, *MELO3C003917*、*MELO3C020588*、*MELO3C008314*、*MELO3C025360*、*MELO3C021658* 这 5 个基因定量检测数据与转录组测序数据的趋势基本一致,表明转录组测序数据的质量良好,并响应了甜瓜幼苗淹水胁迫,初步推测这 5 个基因为甜瓜耐涝相关基因。

参考文献

- [1] 聂功平,陈敏敏,杨柳燕,等.植物响应淹水胁迫的研究进展[J].中国农学通报,2021,37(18):57-64.
- [2] GUO Y Y, CHEN J, KUANG L H, et al. Effects of waterlogging stress on early seedling development and transcriptomic responses in *Brassica napus*[J]. Molecular Breeding, 2020, 40(9):85.
- [3] FENG Z, WANG D Y, ZHOU Q G, et al. Physiological and transcriptomic analyses of leaves from *Gardenia jasminoides* Ellis under waterlogging stress[J]. Brazilian Journal of Biology, 2022, 84:e263092.
- [4] XU X W, CHEN M Y, JI J, et al. Comparative RNA-seq based transcriptome profiling of waterlogging response in cucumber hypocotyls reveals novel insights into the *de novo* adventitious root primordia initiation[J]. BMC Plant Biology, 2017, 17(1):129.
- [5] GRABHERR M G, HAAS B J, YASSOUR M, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome[J]. Nature Biotechnology, 2011, 29(7):644.
- [6] 徐亚婷.水分胁迫下茶树抗性机理的研究[D].南京:南京农业大学,2016.
- [7] 王加蓬,蔡焕杰,王健,等.温室膜下滴灌甜瓜初花期叶面积动态变化与增长模型研究[J].节水灌溉,2009(1):27-30.
- [8] KIM D, PAGGI J M, PARK C, et al. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype[J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(8):907-915.
- [9] PERTEA M, KIM D, PERTEA G M, et al. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, stringtie and ballgown[J]. Nature Protocols, 2016, 11(9):1650-1667.
- [10] HUANG Y M, LI D F, ZHAO L N, et al. Comparative transcriptome combined with physiological analyses revealed key factors for differential cadmium tolerance in two contrasting hemp (*Cannabis sativa* L.) cultivars[J]. Industrial Crops and Products, 2019, 140:111638.
- [11] WANG L H, DOSSA K, YOU J, et al. High-resolution temporal transcriptome sequencing unravels ERF and WRKY as the master players in the regulatory networks underlying sesame responses to waterlogging and recovery[J]. Genomics, 2021, 113(1):276-290.
- [12] RAINERI J, RIBICHICH K F, CHAN R L. The sunflower transcription factor HaWRKY76 confers drought and flood tolerance to *Arabidopsis thaliana* plants without yield penalty[J]. Plant Cell Reports, 2015, 34(12):2065-2080.
- [13] 刁倩楠,蒋雪君,顾海峰,等.淹水胁迫及恢复对不同品种甜瓜幼苗生长及其生理生化指标的影响[J].上海农业学报,2020,36(1):44-52.
- [14] 王俊良,龙启炎,汪李平,等.淹水胁迫及胁迫解除对甜瓜光合色素和光合特性的影响[J].中国蔬菜,2013(8):50-55.
- [15] 刘达淮,刘诗琴,易鹏程,等.淹水胁迫下外源激素对甜瓜幼苗根系生理特性的影响[J].江苏农业科学,2019,47(9):182-185.
- [16] 陈峰清扬,刘微,唐帅,等.水涝胁迫对辣椒幼苗生长及生理特性的影响[J].分子植物育种,1-11(2023-07-20). <https://knscnki.net/kcms2/detail/46.1068.S.20230720.0916.002.html>.
- [17] WENG J Y, REHMAN A, LI P L, et al. Physiological and transcriptomic analysis reveals the responses and difference to high temperature and humidity stress in two melon genotypes[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(2):734.
- [18] LI C W, SU J S, ZHAO N, et al. CmERF5 - CmRAP2.3 transcriptional cascade positively regulates waterlogging tolerance in *Chrysanthemum morifolium*[J]. Plant Biotechnology Journal, 2022, 21(2):270-282.
- [19] AZHWAR R, PANNEERSELVAM L, SUNDARRAJ K, et al. Heat shock proteins and endoplasmic reticulum stress[M]. Springer Cham:Heat Shock Proteins and Stress, 2018.
- [20] 丁琪,郭文萍,蒋晓玥.小热休克蛋白 OsHSP20 提高水稻的耐旱性[J/OL].分子植物育种,1-8(2024-11-20). <https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20241120.1349.012>.
- [21] 武东辉.甜瓜 *CmPYL4*、*CmPYR1* 基因在果实成熟过程中功能的初步分析[D].呼和浩特:内蒙古大学,2022.
- [22] 董冬,王雪娣,刘同瑞,等.矮牵牛 *PhPYL4* 基因的克隆与表达分析[J].西北农业学报,2019,28(9):1528-1534.
- [23] PIZZIO G A, RODRIGUEZ L, ANTONI R, et al. The PYL4 A194T mutant uncovers a key role of PYR1-LIKE4/PROTEIN PHOSPHATASE 2CA interaction for abscisic acid signaling and plant drought resistance[J]. Plant Physiology, 2013, 163(1):441-455.
- [24] ZHANG M M, ZHANG S Q. Mitogen-activated protein kinase cascades in plant signaling[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2022, 64(2):301-341.
- [25] DANQUAH A, DE ZELICOURT A, COLCOMBET J, et al. The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses[J]. Biotechnology Advances, 2014, 32(1):40-52.
- [26] DIETZ K J, TURKAN I, KRIEGER-LISZKAY A. Redox- and reactive oxygen species-dependent signaling into and out of the photosynthesizing chloroplast[J]. Plant Physiology, 2016, 171(3):1541-1550.
- [27] ZHAO Y, ZHANG Z J, GAO J H, et al. Arabidopsis duodecuple mutant of PYL ABA receptors reveals PYL repression of ABA-Independent SnRK2 Activity[J]. Cell Reports, 2018, 23(11):3340-3351.

- [28] 尹兵兵,潘凌云,付畅,等.逆境下植物 MAPK 级联途径基因的表达调控[J].分子植物育种,2022,20(10):3257-3265.
- [29] SMITH A P, NOURIZADEH S D, PEER W A, et al. *Arabidopsis AtGSTF2* is regulated by ethylene and auxin, and encodes a glutathione S-transferase that interacts with flavonoids[J]. The Plant Journal, 2003, 36(4):433-442.
- [30] TIWARI M, KIDWAI M, DUTTA P, et al. A tau class glutathione-S-transferase (*OsGSTU5*) confers tolerance against arsenic toxicity in rice by accumulating more arsenic in root[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 426: 128100.
- [31] MO Z J, HUANG Y, PU T X A, et al. Genome-wide identification and characterization of Glutathione S-Transferases (GSTs) and their expression profile under abiotic stresses in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)[J]. BMC Genomics, 2023, 24(1):341.
- [32] BITTSÁNSZKY A, GYULAI G, KÖMIVES T. *Arabidopsis thaliana* overexpressing *Zea mays* glutathione S-transferase: modelling an effective phytoremediation[J]. Journal of Biotechnology, 2010, 150:486-486.
- [33] 张焕欣,闫承璞,李国权,等.转录组和蛋白组联合揭示甜瓜响应涝害胁迫的分子机制[J].核农学报,2024,38(4):662-675.
- [34] ZHANG H X, LI G O, YAN C P, et al. Elucidating the molecular responses to waterlogging stress in cucumis melo by comparative transcriptome profiling[J]. Horticulturae, 2022, 8(10):891.