

# 西瓜果实网条突变体的转录组分析

王志强, 杜慧莹, 李程, 郭松, 田梅, 杨万邦, 于蓉

(宁夏农林科学院园艺研究所, 银川 750002)

**摘要:** 以条纹自交系西瓜(TD)和网条突变体西瓜(WT)为材料, 通过分离群体的条纹性状比例探索西瓜的条性状遗传基础; 以转录组测序及表达差异分析为基础, 探索网条突变体西瓜在不同发育阶段的表达谱变化, 筛选出条纹自交系与网条突变体西瓜之间表达差异显著的基因 57 个, 主要富集于光合作用天线蛋白通路、生物碱生物合成通路、氨基酸代谢通路等 7 种代谢途径; 通过加权基因共表达网络对核心基因的进一步分析, 初步挖掘出部分网条突变体西瓜中有关生物胁迫抗性的基因变化情况, 进一步筛选确定西瓜深绿条纹基因(*CIGS*, watermelon dark-green stripe)、类半胱氨酸蛋白酶抑制剂 5 编码基因、UDP-葡萄糖基转移酶编码基因、类长春碱合成酶编码基因、叶绿素 a-b 结合蛋白编码基因可能是决定西瓜网条果皮性状的核心基因; qRT-PCR 验证结果表明, 条纹自交系西瓜与网条突变体西瓜在基因表达上存在明显差异。本研究为西瓜不同果皮条纹育种提供了新的种质资源, 也为阐明西瓜不同果皮条纹性状形成的分子调控机制提供了一定的理论依据。

**关键词:** 西瓜; 果皮条纹; 转录组; 加权基因共表达网络; 突变体

## Transcriptome Analysis of the Netted Mutant in Watermelon

WANG Zhiqiang, DU Huiying, LI Cheng, GUO Song, TIAN Mei, YANG Wanbang, YU Rong

(Institute of Horticulture, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan 750002)

**Abstract:** In order to explore the genetic basis of netted rind in watermelon, segregated population was constructed by hybridization between the inbred line (TD) that with striped rind and the mutant line (WT) that with netted rind. The segregation patterns in  $F_2$ ,  $BC_1P_1$  and  $BC_1P_2$  populations showed that the striped rind is controlled by a single dominant gene. Transcriptome sequencing and differential expression analysis were conducted for TD and WT rind at different developmental stages. A total of 57 differentially expressed genes (DEGs) were identified between the two genotypes, primarily enriched in seven metabolic pathways, including photosynthesis, alkaloid biosynthesis, and amino acid metabolism. Further exploration of hub genes through weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) revealed those related to biotic stress resistance in the netted mutant. Key genes encoding *CIGS*, cystatin 5, UDP-glucosyltransferase, vinorine synthase, and chlorophyll a-b binding protein were identified as potential determinants of the netted rind. qRT-PCR was applied to validate partial DEGs. This study provides new germplasm resources for watermelon breeding with various rind patterns, and offers a theoretical basis for elucidating the molecular regulatory mechanisms underlying the formation of the rind patterns in watermelon.

**Key words:** watermelon; rind stripe; transcriptome; WGCNA; mutant

西瓜是葫芦科重要的园艺作物, 是世界十大鲜食水果之一。据联合国粮农组织 (<http://www.fao.org>)

统计, 2022 年我国西瓜产量超过 6300 万吨, 是重要的经济作物之一。西瓜经过长期的自然选择

收稿日期: 2023-09-15 网络出版日期: 2024-07-03

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230915001>

第一作者研究方向为西瓜遗传育种, E-mail: wzq2003135@163.com

基金项目: 农业高质量发展和生态保护科技创新示范项目(NGSB-2021-7-02)

**Foundation project:** Scientific and Technological Innovation Demonstration Project for High-quality Agricultural Development and Ecological Protection(NGSB-2021-7-02)

和人工选育,其外形、风味、营养价值各不相同,已形成了多种类型和品种。遗传资源的收集、保存和评价是西瓜遗传学的核心,也是西瓜育种和保护的重要基础。目前,全球已收集了约5000份西瓜种质资源,我国拥有的丰富资源涵盖了西瓜的各种品种和类型<sup>[1-2]</sup>。这些资源为科研工作者提供了宝贵的实物资料,有利于开展西瓜遗传多样性分析和品种改良利用。在此基础上,研究人员通过自然群体或者构建遗传群体,针对西瓜重要性状的遗传结构、群体划分、演化历史和基因定位等方面进行了深入研究。研究结果为西瓜重要性状的分子育种工作提供了理论基础和技术支持<sup>[3-5]</sup>。

作为重要外观性状,西瓜果皮不仅影响着西瓜商品价值,也影响着人们的消费选择。西瓜的果皮种类繁多,根据底色不同可分为黄色、墨绿色、淡绿色、白色等;根据条纹图案,可分为条纹、网条、间歇性条纹、斑点等<sup>[6-7]</sup>。西瓜条纹的不同模式主要是由果皮中色素的积累引起的。不同植物果皮色素的积累,因功能基因和转录因子调控机制不同而异。番茄中 *SIMYB72* 调控复杂的代谢网络和信号级联,在调节番茄果皮叶绿素合成中起着关键作用<sup>[8]</sup>。转录因子 *MdMYB10* 通过调节花青素相关基因的表达,从而决定苹果皮中的红色条纹形成<sup>[9]</sup>。此外, *TAGL1* 甲基化调控番茄皮上叶绿体的发育,并会导致绿色条纹性状的出现<sup>[10]</sup>。

西瓜条纹的遗传基础由一组基因控制,这些基因决定了西瓜果皮的颜色和图案。先前的研究认为3个等位基因(*G*、*gs*和*g*)在*g*位点决定外皮颜色和条纹的遗传,并提出了西瓜条纹的遗传模型:深绿色(*G*)>宽条纹(*g<sup>w</sup>*)>中条纹(*g<sup>m</sup>*)>窄条纹(*g<sup>n</sup>*)>浅绿色(*g*)的显性关系<sup>[11-12]</sup>。此后,独立于单基因模型的多等位基因模型被提出,*S*(前景条纹图案)、*D*(果皮颜色深度)和*DGO*(背景果皮颜色)3个基因被认为是作为独立的位点来决定西瓜的果皮颜色和条纹图案,它们分别位于6号、8号和4号染色体上<sup>[13-14]</sup>。

迄今为止,已有研究对西瓜条纹决定基因进行了遗传定位。通过将具有独特间歇性外皮条纹的WT20与绿色条纹自交系WCZ杂交,发现间歇性条纹由单一显性基因*CIIS*控制,通过单倍型分析将*Cla019202*确定为控制西瓜间歇条纹的*CIIS*候选基因<sup>[15]</sup>。另一项研究利用F<sub>2</sub>和F<sub>3,4</sub>两个分离群体,将西瓜条纹模式的基础基因*CISP*定位于6号染色体上27.43 Mb~29.37 Mb之间的一个611.78 kb区域,

该区域由4个非连续单倍体块和连续重组抑制组成,此外,参与光合作用和叶绿体发育的基因在浅绿色条纹分离群体中下调,而ERF和WRKY等转录因子大多数在浅绿色条纹分离群体中上调<sup>[16-17]</sup>。混合群体分离分析同样被用于深绿色条纹性状的定位,通过深绿色条纹自交系WT2和网状条纹自交系WM204将候选基因定位在西瓜6号染色体上的107 Kb区域内,通过对小范围自然群体进展差异表达分析和遗传多态性分析,最终确定控制西瓜墨绿色条纹的候选基因可能是*ClGS*(*Cla019205*)<sup>[18-19]</sup>。

尽管已经有研究对西瓜条纹决定基因进行了定位,但西瓜条纹形成的分子机制及其相关基因表达谱变化仍不清晰。本研究利用条纹自交系和网条突变体西瓜,通过杂交群体性状分离比调查和转录组测序对西瓜条纹形成机制的进行探索,以期对西瓜的育种和改良提供理论依据和技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为条纹自交系(TD)和网条突变体(WT)的西瓜果实,网条突变体(变异株)WT是从条纹自交系(原亲本)TD的扩繁田中发现,经多代鉴定,该突变体除表型存在差异外,抗病性同时变差。杂交群体构建如下:利用网条突变体(WT)做母本,即为P<sub>1</sub>,用原始自交系条纹亲本(TD)做父本,即为P<sub>2</sub>,杂交得到F<sub>1</sub>,利用F<sub>1</sub>与P<sub>1</sub>杂交,创制BC<sub>1</sub>P<sub>1</sub>,利用F<sub>1</sub>与P<sub>2</sub>杂交,创制BC<sub>1</sub>P<sub>2</sub>。试验材料于2022年5月在宁夏农林科学院园林场试验基地种植,变异株WT和原亲本TD分别各播种20株,播种行距2 m、株距35 m,进行常规田间管理。于2022年6月,采集果皮样品。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 RNA提取和cDNA文库的构建和测序** 分别采集网条突变体WT和条纹自交系TD雌花开放后10 d、20 d和30 d的西瓜果实的果皮,使用锋利小刀从果实最大横径处,沿条纹或网纹纹路切割果皮样品(长宽均3 cm,深0.5 cm)后立即在液氮中冷冻。突变体样品编号为WT(雌花开放后10 d、20 d和30 d分别为WT1、WT2、WT3),原始自交系编号为TD(雌花开放后10 d、20 d和30 d分别为TD1、TD2、TD3)。每个样品设置3次生物学重复,分别以-1、-2和-3表示。RNA提取、cDNA文库构建和测序由北京百迈客生物科技有限公司

完成。

**1.2.2 转录组测序与参考基因组比对** 对测序产生的高质量 Clean Reads, 使用 HISAT2<sup>[20]</sup> 软件将 Clean reads 与参考基因组 (*Citrullus lanatus*.97103\_v2.genome.fa) 进行比对, 从而获取参考基因组上 Reads 的定位信息。然后利用 StringTie<sup>[21]</sup> 为比对的 Reads 进行组装, 重构转录组用于后续分析。

**1.2.3 基因表达量和差异表达基因分析** 转录本或基因表达水平的衡量标准以 FPKM 的标准化为标准。差异表达分析采用 DeSeq2, 存在生物重复的差分组分。筛选标准采用  $FC \geq 1.5$  且  $FDR \leq 0.05$ 。其中差异倍数 (FC, fold change) 表示的是条纹自交系 TD 与网条突变体 WT 的表达量之比, 而错误发现率 (FDR, false discovery rate) 为对差异显著性  $P$  值进行修正后得出。

**1.2.4 数据分析及可视化** 基因功能注释和富集通过 Clusterprofile 包完成<sup>[22]</sup>, 富集背景基因集根据西瓜参考基因组注释进行构建。加权基因共表达网络通过 R 包 WGCNA 完成<sup>[23]</sup>, WGCNA 软阈值设置为 11, 最小模块基因数设置为 30, 通过自己编写的 Python 脚本完成数据处理和提取, 主要包括对所有样品中平均表达量小于 1 或缺失率大于 50% 的基因进行过滤。R 语言用于结果和图表的可视化。共表达网络通过 Cytoscape 软件构建并绘制<sup>[24]</sup>, 表达量热图通过 TBtools 绘制<sup>[25]</sup>, 实时荧光定量 PCR 和转录组表达量的柱状图和散点图通过 Prism8 绘制, 并进行相应方差分析<sup>[26]</sup>, 线性回归采用 prism8 的简单线性回归分析。

**1.2.5 实时荧光定量 PCR** 对转录组同批次样品进行 qRT-PCR。首先利用超微量核酸蛋白测定仪 (SCANDROP100) 检测出 RNA 的 OD 值, 检测合格的 RNA 采用 AIDLAB 公司反转录试剂盒合成 cDNA,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。用于 qRT-PCR 的基因及内参 *Actin* 基因的引物见表 1。qRT-PCR 程序及系统设定为:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;  $96^{\circ}\text{C}$  变性 10 s,  $60^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 共 39 次循环;  $60^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,  $95^{\circ}\text{C}$  终延伸 5 min。相对表达量采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算。得到所有基因相对表达量后, 将 TD1 表达量设置为 1, 对其他所有样品表达量进行标准化并进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 突变体网条性状的遗传分析

收集原始自交系 TD 和突变体 WT 进行杂交 (图 1),  $F_1$  自交, 同时创制  $BC_1P_1$ 、 $BC_1P_2$  和  $F_2$  世代。

田间表型性状统计结果显示,  $F_1$  所有西瓜果实性状均表现为条纹,  $F_2$  西瓜果实性状呈分离状态。其中条纹性状 252 株, 网条性状 70 株, 经卡方检测, 符合 3:1 的孟德尔分离比例 ( $\chi^2=1.826 < \chi_{0.05}^2=3.841$ );  $BC_1P_1$  群体中条纹性状西瓜 165 株, 网条性状西瓜 136 株, 分离比例符合 1:1 的理论比 ( $\chi^2=2.79 < \chi_{0.05}^2=3.841$ ),  $BC_1P_2$  西瓜单株果实均表现为条纹。遗传规律分析表明, 西瓜果实条纹性状和网条性状是质量性状, 其遗传受一对显性基因控制, 且条纹对网条为显性。

表 1 本研究中引物信息

Table 1 Primer information in this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') primer sequence (5-3')	退火温度 ( $^{\circ}\text{C}$ ) TM
Actin-F	GTCACACCCTGGGAATTG	60
Actin-R	CGCCAATAAGACCACCAA	
Cla97C06G126770-F	TTCCAGTTACGGTTCACAGA	60
Cla97C06G126770-R	TGATAAGCACGGACAGACT	
Cla97C06G127330-F	CGTACAAGAATGTGGTGGTT	60
Cla97C06G127330-R	TCAGAATCTCGTTGGAAGGA	
Cla97C06G122150-F	AGTCTCCACTAACCTCCAA	60
Cla97C06G122150-R	TTCATTCACTACGCCAAA	
Cla97C11G213310-F	TAGAGGATTGGGAGGGAAAT	60
Cla97C11G213310-R	CACCCGAAATCGTTCTCATA	
CA97C08G154390-F	GCGGAAGCATTGGATTG	60
CA97C08G154390-R	TTCGGTGACAGGCAATAG	



图 1 网条突变体 WT (左) 和条纹自交系 TD (右) 西瓜对比

Fig 1 Comparison between netted mutant watermelon WT (left) and striped inbred line watermelon TD (right)

## 2.2 转录组数据的比对和分析

本研究分别针对条纹自交系 TD 及网条突变体 WT 不同发育时期的果实构建了 18 个 cDNA 文库。原始测序数据经过质量控制后,共获得 141.46 Gb 的 Clean data,各样品 Clean data 均达到 5.89 Gb 及以上,Q30 碱基百分比在 93.69% 及以上。分别将各样品的 Clean reads 与指定的参考基因组进行序列比对,比对效率为 92.19%~96.29%。

## 2.3 差异表达基因的统计分析

筛选雌花开放后 10 d、20 d 和 30 d WT 和 TD 之

间的差异表达基因(表 2)。从果实成熟方面来看,雌花开放 10 d 至 20 d 时两种西瓜差异表达基因分别为 8588 和 9368 个,20 d 至 30 d 时差异表达基因数目分别为 6623 和 6132,表明差异表达基因更加集中在西瓜果实发育早期。同一发育时期 WT 与 TD 相比,雌花开放后 10 d 差异表达基因数量最少,共筛选到 584 个,其中 207 个上调,377 个下调;雌花开放后 30 d 的差异表达基因数量最多,共筛选到 1623 个,其中上调基因 1209 个,下调基因 414 个。

表 2 差异表达基因统计表

Table 2 Statistical of DEGs

差异表达基因分组 DEG set	差异表达基因数量 DEG number	上调差异表达基因数量 Up-regulated DEG number	下调差异表达基因数量 Down-regulated DEG number
WT1_vs_TD1	584	207	377
WT2_vs_TD2	713	286	427
WT3_vs_TD3	1623	1209	414
TD1_vs_TD2	8588	3889	4699
TD1_vs_TD3	11797	5355	6442
TD2_vs_TD3	6623	2901	3722
WT1_vs_WT2	9368	4119	5249
WT1_vs_WT3	10931	5072	5859
WT2_vs_WT3	6132	3109	3023

WT1\_vs\_TD1:TD1 相对于 WT1,以此类推

WT1\_vs\_TD1:TD1 compared with WT1,and so on

## 2.4 果实发育期间差异表达基因富集分析

筛选西瓜果实不同发育阶段差异表达基因,韦恩图的结果显示(图 2A),2147 个基因在突变体和野生型材料中均出现差异表达。对这些共有的差异表达基因进行功能注释,COG 结果(图 2B)显示 2147 个基因主要集中在碳水化合物运输和代谢(G: Carbohydrate transport and metabolism)及信号转导机制(T: Signal transduction mechanisms)。在 GO 数据库中(图 2C)差异表达基因主要注释在代谢过程(Metabolic process)、细胞(Cell)和结合(Binding)等条目。对差异表达基因进行 KEGG 富集分析(图 2D),结果显示 2147 个基因主要富集在植

物激素信号转导(Plant hormone signal transduction)、植物病原互作(Plant-pathogen interaction)、MAPK 信号通路(MAPK signaling pathway)等代谢通路中,此外差异表达基因最显著富集在类固醇生物合成(Steroid biosynthesis)中。

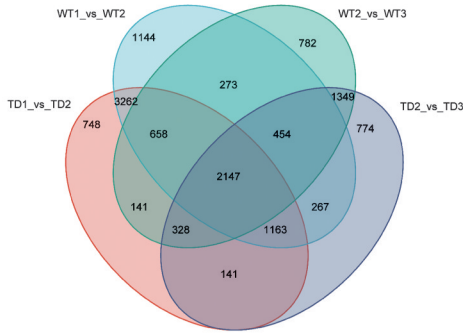
## 2.5 与果实条纹相关差异表达基因注释与富集分析

对 WT1\_vs\_TD1、WT2\_vs\_TD2、WT3\_vs\_TD3 比较组的 57 个共同差异表达基因进行功能注释(图 3A)。由 COG 注释结果可知差异表达基因多集中在次生代谢物生物合成(图 3B),运输和分解代谢(Q: Secondary metabolism biosynthesis, transport and

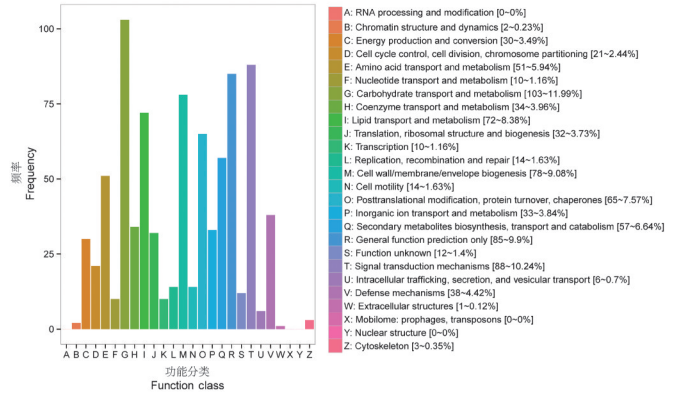
catabolism)、碳水化合物运输与代谢(G: Carbohydrate transport and metabolism)、氨基酸转运与代谢(E: Amino acid transport and metabolism)、脂质转运与代

谢(I: Lipid transport and metabolism)以及翻译后修饰、蛋白质周转、伴侣(O: Posttranslational modification, protein turnover, chaperones)。

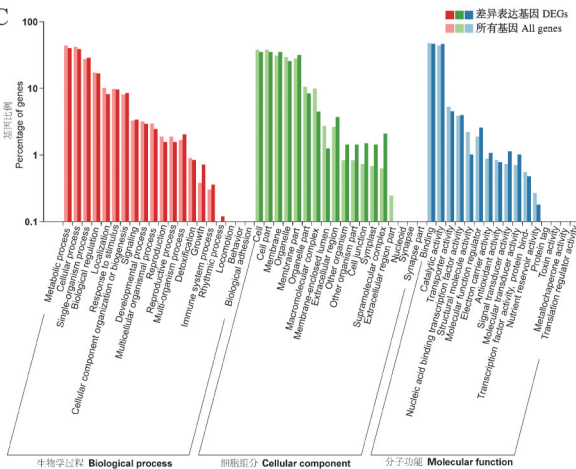
A



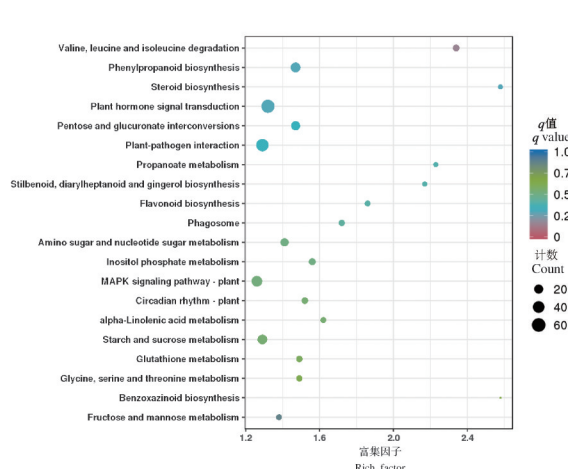
B



C



D



A: 不同发育阶段差异表达基因韦恩图; B: 所有发育阶段均差异表达基因的 COG 注释; C: 所有发育阶段均差异表达基因的 GO 注释; D: 所有发育阶段均差异表达基因的 KEGG 富集

A: Venn diagram of DEGs at different developmental stages; B: COG annotation of all DEGs across developmental stages; C: GO annotation of all DEGs across developmental stages; D: KEGG enrichment analysis of all DEGs across developmental stages

图 2 果实发育相关差异表达基因统计和功能注释

Fig. 2 Statistical analysis and functional annotation of DEGs related to fruit development

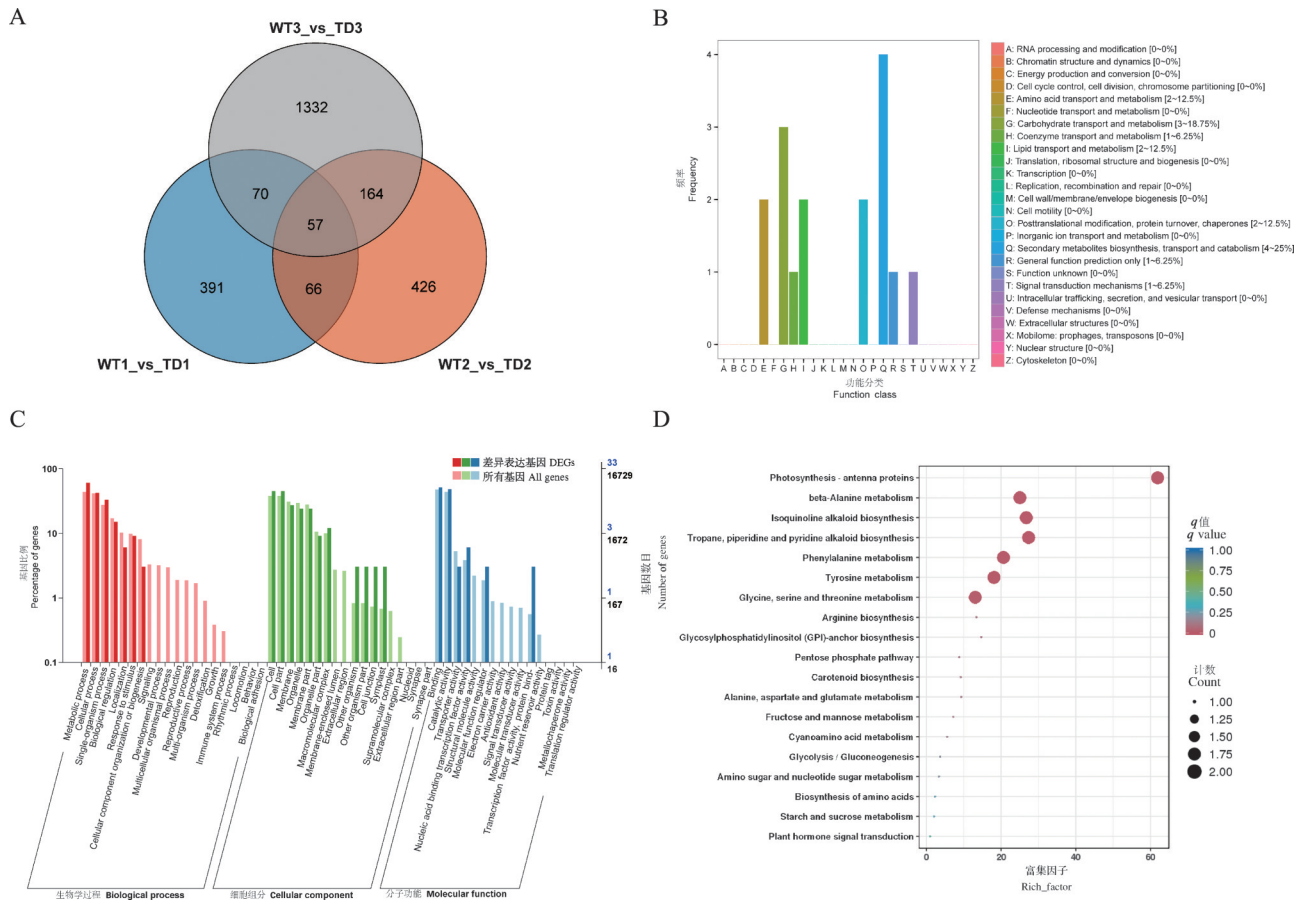
GO 分析结果显示, 差异表达基因富集到 3 类: 生物过程、细胞组分、分子功能(图 3C)。生物过程中差异表达基因富集较为显著的 3 个 GO 条目是细胞过程 (Cellular process)、代谢过程 (Metabolic process) 和单一有机体过程 (Single-organism process); 细胞组分中差异表达基因富集显著的 3 个 GO 条目是细胞、细胞部分 (Cell part) 和膜 (Membrane); 分子功能中差异表达基因富集较为显著的 3 个 GO 条目是结合、催化活性 (Catalytic activity)

和核酸结合转录因子活性 (Nucleic acid binding transcription factor activity)。

差异表达基因进行 KEGG 富集分析后发现(图 3D): 光合作用天线蛋白 (Photosynthesis-antenna proteins)、托品烷、哌啶和吡啶类生物碱生物合成 (Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis)、异喹啉生物碱的生物合成 (Isoquinoline alkaloid biosynthesis)、β-丙氨酸代谢 (beta-Alanine metabolism)、苯丙氨酸代谢 (Phenylalanine metabolism)、酪氨酸代谢 (Tyrosine

metabolism)、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢(Glycine, serine and threonine metabolism)这 7 个通路富集显著。由此可以认为 57 个共同差异表达基因主要富集

在以上 7 个通路,下一步可针对这些通路的基因进行深入挖掘,从而找到调控西瓜果皮条纹和网条性状的功能基因。



A: 不同差异分组差异表达基因韦恩图; B: 差异表达基因的 COG 注释; C: 差异表达基因的 GO 注释; D: 差异表达基因的 KEGG 富集  
A: Venn plots of different subgroups of DEGs; B: COG annotation of DEGs; C: GO annotation of DEGs; D: The KEGG enrichment of DEGs

图 3 果实条纹相关差异表达基因统计和功能注释

Fig. 3 Statistical analysis and functional annotation of DEGs related with stripe

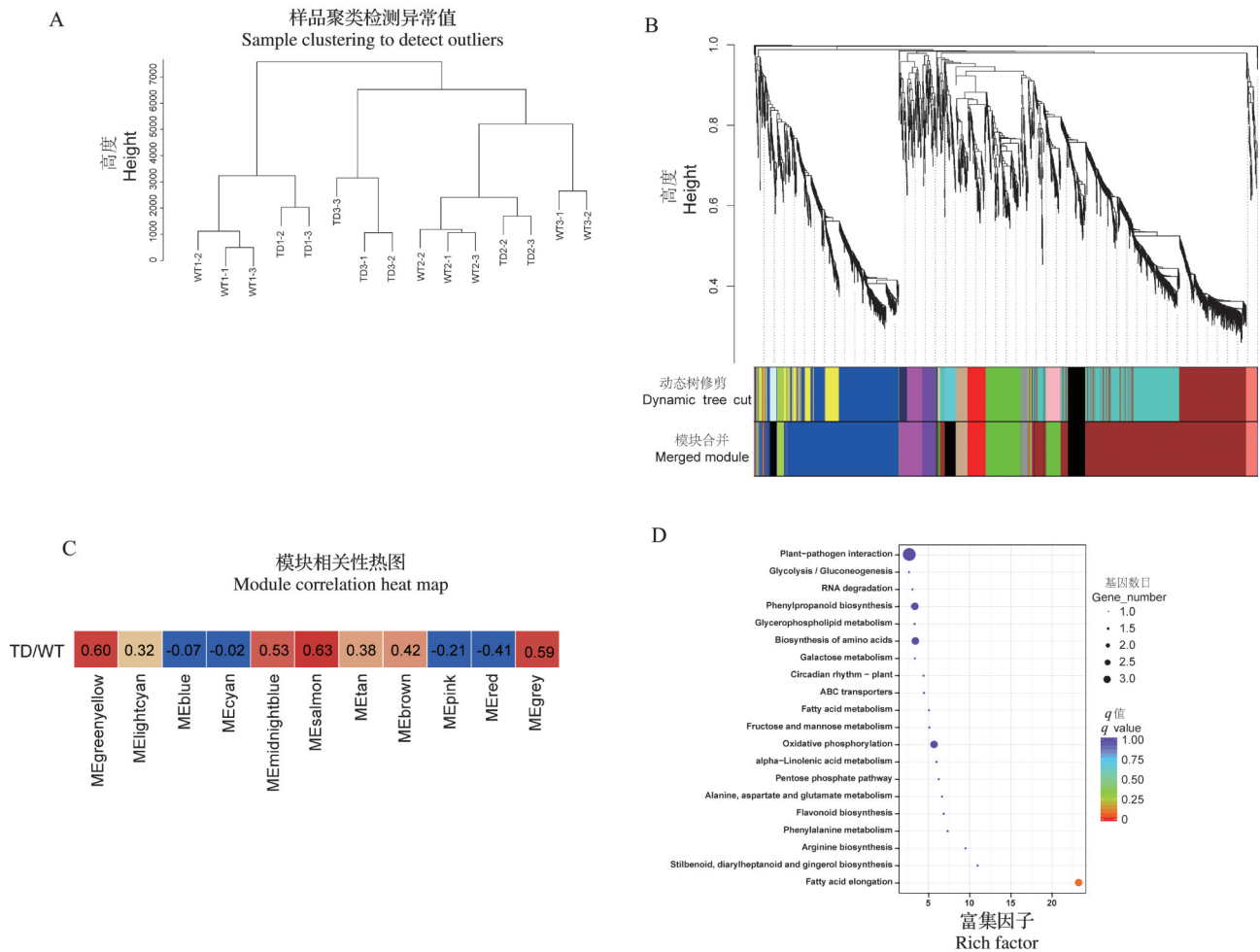
### 2.6 加权基因共表达网络

筛选所有差异表达基因中样品缺失小于 50%, 平均表达量大于 0.5 的基因进行加权基因共表达网络分析 (WGCNA, weighted correlation network analysis), 样品表达聚类树结果显示 TD2-1 和 WT3-3 两个样品出现明显离群, 为了降低基因表达噪声, 后续分析中排除了这两个样品(图 4A)。2384 个基因被划分到 11 个模块中(图 4B), 其中蓝色(blue)模块基因数目最多(894 个), 灰色(grey)模块基因数目最少(3 个)。模块特征基因与样品相关性结果显示, 各模块与 TD/WT 的相关性均不超过 80%, 鲑红(Salmon)模块包含 71 个基因, 与 TD/WT 的相关性最高, 为 0.63(图 4C)。进一步对 Salmon 模块中的基因进行 KEGG 富集分析, 植物-病原互作是 71 个

差异基因最多富集的通路, 显示 TD 与 WT 在抗病能力上存在较大差异(图 4D)。

### 2.7 基因共表达网络和核心基因筛选

为挖掘关键调控基因, 利用加权基因共表达网络分析结果, 从 Salmon 模块中提取富集到植物-病原互作通路和与之共表达的基因, 构建基因共表达网络(图 5A)。只有类受体蛋白激酶(RLK, receptor-like protein kinase)和环核苷酸门控离子通道 1(Cyclic nucleotide-gated ion channel 1)编码基因, 与 13 个基因共表达。基因表达热图结果显示(图 5B), 共表达网络中所有 15 个基因均在 WT2 样品中特异高表达, 这表明 WT 和 TD 之间对病原抗性的差异主要形成在雌花开放 20 d 后, 这 15 个基因是与 WT 抗性变化相关的核心基因。



A: 样品系统分类树, 采用差异表达基因构建进化树; B: 基因表达树和模块确定; C: 模块和性状相关性热图, 相关性采用皮尔逊系数表示; D: Salmon 模块基因的 KEGG 富集

A: Sample phylogenetic classification tree, DEGs were used to construct the evolutionary tree; B: Gene expression tree and module determination; C: Heat map of module and trait correlations, correlations were expressed using Pearson's coefficient; D: KEGG enrichment of salmon module genes

图4 加权基因共表达网络和模块基因功能富集

Fig 4 Weighted gene co-expression network and functional enrichment of modular genes

*CIGS* (*Cla019205*) 被定位为调控西瓜深绿色条纹形成的候选基因<sup>[18]</sup>, 该基因在 WT 和 TD 中存在差异表达, 并被 WGCNA 分配到 Midnight Blue 模块, 提取该模块中与 *CIGS* 基因表达关联度大于 0.8 的基因构建共表达网络(图 5C)。研究表明, 4 个基因与 *CIGS* 存在共表达, 分别为类半胱氨酸蛋白酶抑制剂 5 (Cysteine proteinase inhibitor 5-Like) 编码基因。UDP-葡萄糖基转移酶编码基因 (UDP-glucose glucosyl transferase), 类长春碱合酶编码基因, 叶绿素 a-b 结合蛋白编码基因 (Chlorophyll a-b binding)。其中, UDP-葡萄糖基转移酶和长春碱合酶均参与植物花青素合成<sup>[27]</sup>, 它们与半胱氨酸蛋白酶抑制剂在 WT 各期均有特异高表达, 在 WT2 和 WT3 时均有叶绿素 a-b 结合蛋白编码基因的特异低表达(图 5D)。

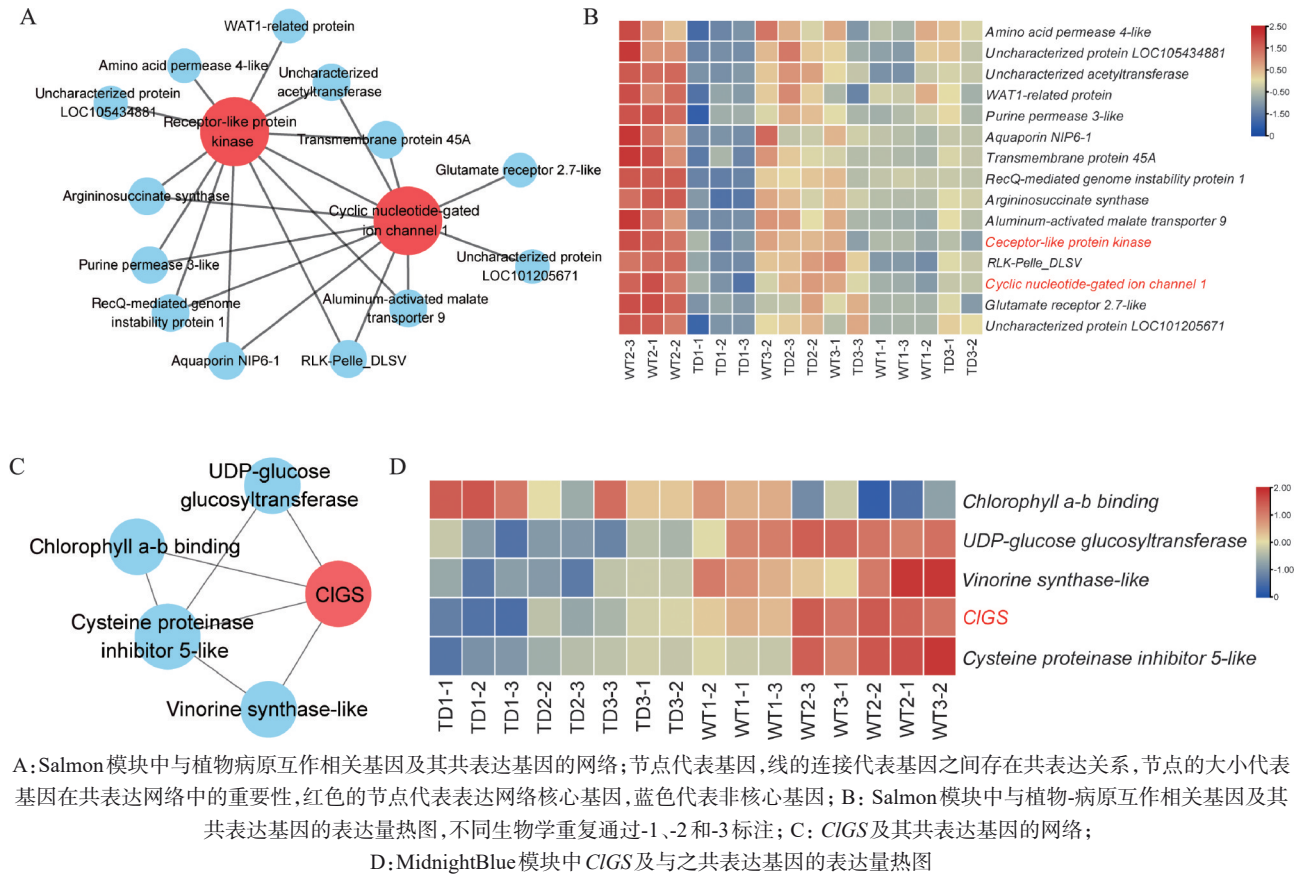
这表明, *CIGS*、UDP-葡萄糖基转移酶、长春碱合酶和类半胱氨酸蛋白酶抑制剂 5 编码基因的表达与 WT 网状形成负相关, 叶绿素 a-b 结合蛋白编码基因与 WT 网状形成正相关。

## 2.8 qRT-PCR 分析验证

对核心基因表达及转录组结果进行验证, 从共表达网络中挑选了 5 个基因进行实时荧光定量 PCR (图 6), 结果表明 *Cla97C06G126770* (*CIGS*) 基因在 WT 网条西瓜样品中全部高表达, 与预期一致; *Cla97C06G127330* (类长春碱合酶) 表达量随着西瓜的发育进程呈现上调, 但在 WT 和 TD 之间无明显差异; *Cla97C06G122150* (谷氨酸受体 2.7-like, *GLR2.7*) 在 WT 样品全发育时期表达量更高; *Cla97C11G213310* (未表征的乙酰化转移酶, *UAT*)

在WT3样品中表达量明显高于TD样品; *Cla97C08 G154390* (嘌呤渗透酶3, *PUP3*)的表达量在TD成熟后期下降,而WT中维持相对稳定的表达。*GLR2.7*, *UAT*和*PUP3*在网纹状突变体中的高表达很可能增强了其抗病能力,使其具有比条纹状自交

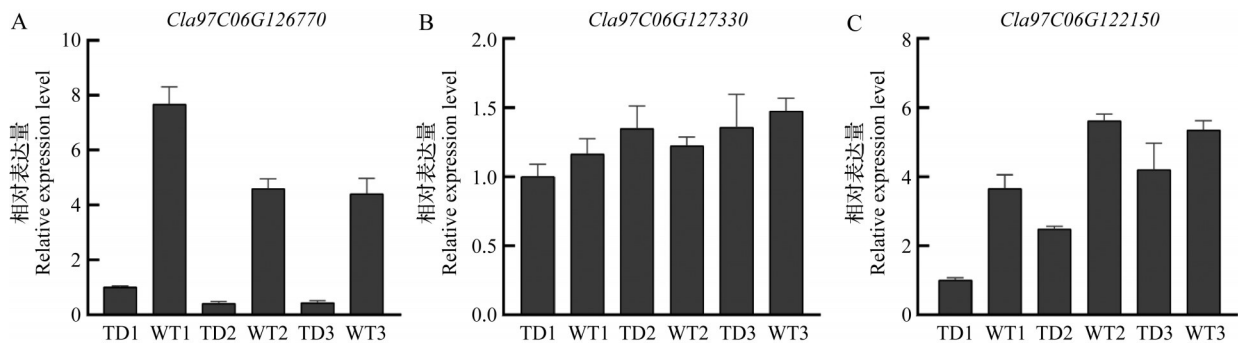
系响应生物病原侵染的优势。实时荧光定量和转录组结果的线性回归分析显示(图6F),两组表达量数据显示出强线性相关关系,  $R^2$ 达到72%,表明转录组结果良好,可信度高。



A: Network of genes related to interaction with plant-pathogens and their co-expression genes in salmon module; Nodes represent genes, the connections of lines represent the existence of co-expression relationships between genes, and the size of nodes represents the importance of genes in the co-expression network, the red nodes represent the core genes of the expression network, and the blue nodes represent the non-core genes; B: Expression calorimetric map of genes related to interaction with plant pathogens and their co-expressed genes in salmon module, different biology is repeatedly labeled by -1, -2, and -3; C: Network of *CIGS* and its co-expressed genes; D: Expression calorimetric map of *CIGS* and its co-expressed genes in MidnightBlue module

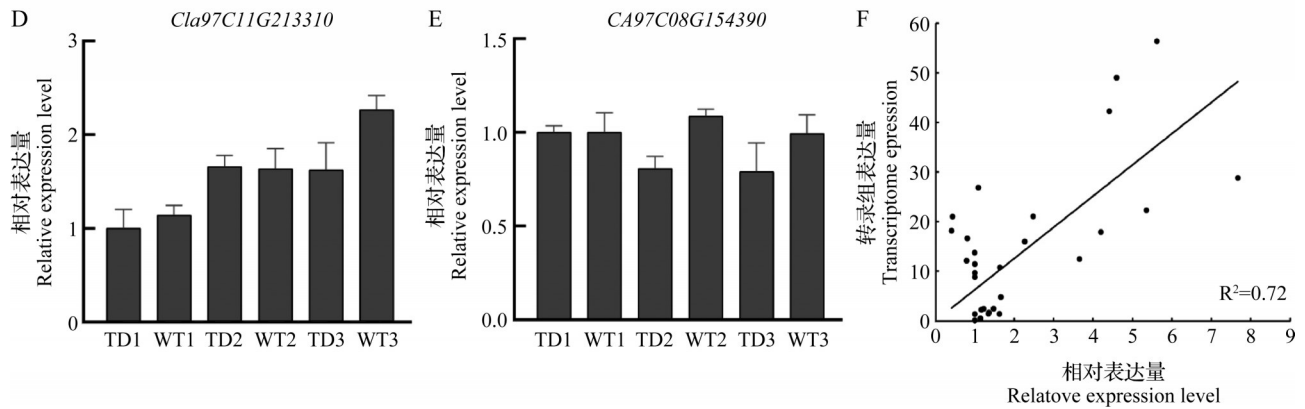
图5 基因共表达网络构建和表达量热图

Fig. 5 Gene co-expression network construction and expression heat map



(图6)





A~E: 5个候选基因在不同样品中的相对表达量; G: 转录组与实时荧光定量间一般线性回归分析

A-E: Relative expression of 5 candidate genes in different samples; G: General linear regression analysis between transcriptome and real-time fluorescence quantification

图6 实时荧光定量及相关性分析

Fig. 6 Real-time fluorescence quantification and correlation analysis

### 3 讨论

西瓜作为一种重要的园艺作物,在农业和食品产业中扮演重要角色,对西瓜生长特征和园艺性状的研究具有重要的理论和实际价值。本研究利用网条突变体材料探索了西瓜果皮条纹形成的遗传机理和分子机制,以期更全面地解释和理解这一复杂过程。

近几年有研究报道了西瓜皮条纹种类的遗传结构为单基因遗传。本研究中 $BC_1P_1$ 和 $BC_1P_2$ 性状分离比符合孟德尔单基因遗传定律,表明西瓜果皮上的条纹和网条性状由一对等位基因控制且条纹对网条是显性的,这与先前不同条纹西瓜品系的杂交实验得出的结论是一致的<sup>[12]</sup>。

本研究利用转录组测序和数据分析,广泛筛选出了在不同发育阶段的网条突变体和条纹自交系西瓜之间的差异表达基因,其中2147个差异基因与果实发育相关,这些基因主要被注释和富集在与信号转导相关的功能或通路中,他们可能协调控制果实发育过程中复杂的信号网络;57个差异基因与果实条纹形成相关,这些基因涉及生物过程、细胞组分和分子功能、光合作用相关、生物碱合成等多个GO条目和KEGG通路。在黄瓜条纹突变体中,光合作用和叶绿素合成基因的表达模式降低引起未成熟的果实显示绿色不规则条纹<sup>[28]</sup>。在绿色条纹番茄中,涉及光合作用、叶绿体发育和叶绿素合成的约90个基因显著上调<sup>[29]</sup>。光合作用能量代谢和光合作用天线蛋白等在其他浅绿色条纹西瓜品系中同样被富集,且在野生型之间存在差异表

达<sup>[30]</sup>,这些结果表明光合相关代谢和叶绿素合成的变化可能是西瓜或果实条纹性状的普遍成因,进一步揭示了决定西瓜条纹的分子机制。

尽管此前有关西瓜条纹遗传定位的研究已经定位了调控西瓜条纹变化的多个候选基因(*CIGS*、*CISP*、*CIIS*等),但条纹形成机制仍不清晰,如西瓜墨绿色条纹性状由西瓜6号染色体上某个未知单基因控制。本研究的表达谱中只鉴定了*CIGS*,该基因在两种西瓜中的表达存在显著差异。在74个自然群体西瓜品系中,*CIGS*第8个外显子上存在一个3 bp插入的个体表现出浅绿色纹路<sup>[18]</sup>。本研究中,*CIGS*在条状纹西瓜不同发育阶段表达量始终较低,且与网纹突变体相比表达量显著下调,这些结果为*CIGS*调控西瓜条纹形成增加了证据。此外,研究构建了包含半胱氨酸蛋白酶抑制剂5编码基因、UDP-葡萄糖基转移酶编码基因、不同时期条纹和网条西瓜加权基因的共表达网络,以及长春碱类合成酶编码基因各一类,随着西瓜果实的发育,表达量增加。这种特异性高表达很可能与西瓜条纹或网条性状的性状耦合,共表达基因通过复杂的交互式网络或信号传导途径共同决定西瓜果皮纹路。

此外,在之前的研究中,西瓜条纹性状的形成本被认为与钙离子在西瓜果皮和果实中的重定位相关<sup>[31]</sup>。本研究中存在15个基因在网条突变体果实发育中期特异高表达,这些基因组成了一个以类受体蛋白激酶编码基因和环核苷酸门控离子通道基因为核心的共表达网络。环核苷酸门控离子通道基因编码植物细胞膜上的一种钙离子通道蛋白,该基因的表达失调可能会引起西瓜果实中钙信号的变

化<sup>[16]</sup>,这一方面与之前的研究中钙信号在不同条纹西瓜中变化的结果一致<sup>[31]</sup>,另一方面钙作为植物体中最重要的信号之一,与植物的抗逆性有很大的关系。共表达网络中存在与疾病抵御相关的基因,类受体蛋白激酶是植物抵御病原胁迫的最重要的蛋白家族成员<sup>[32]</sup>,共表达网络中的类受体蛋白激酶参与到Pto/PRF抗病系统中。环核苷酸门控离子通道1是定位于细胞膜上的通道蛋白,负责与病原感染相关钙信号的感知和传导,是经典的植物免疫相关基因<sup>[33]</sup>。WAT1相关蛋白(WAT1-related protein)是一类植物特异性蛋白质,决定纤维中次级细胞壁的形成并抵御病原入侵<sup>[34]</sup>。谷氨酸受体2.7-like控制植物对病原体的防御、繁殖、气孔开度和光信号的转导<sup>[35]</sup>。WAT1相关蛋白、谷氨酸受体等同样被报道与植物抵御生物胁迫有关<sup>[34-35]</sup>。此外,未表征的乙酰化转移酶(uncharacterized acetyltransferase)、铝激活的苹果酸盐转运体9(Aluminum-activated malate transporter 9)、水分子蛋白NIP6-1(AquaporinNIP6-1)均参与对生物或非生物威胁的反应<sup>[36-38]</sup>。这些结果表明西瓜果实在形成条纹性状时,可能在特定发育阶段,可同时引起病原抗性和钙信号的改变。而这一机制的详细细节尚需更多的研究来阐明。

## 4 结论

本研究以西瓜条纹自交系TD与网条自交系WT为材料,揭示了条纹与网条性状为一对显性基因控制的质量性状,条纹对网条是显性遗传。通过对两种品系不同发育时间的果皮进行转录组测序,筛选出了在不同发育阶段的突变体和自交系之间的差异表达基因。这些基因主要富集于GO条目的生物过程、细胞组分及分子功能,以及KEGG通路中的光合天线蛋白、托品烷、哌啶和吡啶类生物碱的生物合成。通过共表达分析挖掘出与西瓜条纹形成相关的核心基因*CIGS*、类半胱氨酸蛋白酶抑制剂5编码基因、UDP-葡糖糖基转移酶编码基因、类长春碱合成酶编码基因和叶绿素a-b结合蛋白编码基因。此外本研究结果表明西瓜条纹和网条的决定可能伴随着抗病性的变化。本研究探索了西瓜不同类型果实条纹形成的分子机制,为了解西瓜果皮条纹决定提供了遗传学依据,并为改良西瓜品种提供了新的策略和资源。

## 参考文献

[1] Levi A, Jarret R, Kousik S, Patrick Wechter W, Nimmakayala

- P, Reddy U K. Genetic resources of watermelon. *Genetics and genomics of Cucurbitaceae*, 2017(20), 87-110
- [2] 王准,许勇,张海英,范建光,郭绍贵,任毅,宫国义,张洁,翁益群,Angela Davis. 1197份西瓜种质资源遗传多样性和群体结构分析及核心种质构建. *中国瓜菜*, 2019, 32(8): 210  
Wang Z, Xu Y, Zhang H Y, Fan J G, Guo S G, Ren Y, Gong G Y, Zhang J, Weng Y Q, Angela D. Genetic diversity, population structure, and formation of a core collection of 1197 *Citrullus* accessions. *China Cucurbits and Vegetables*, 2019, 32(8): 210
- [3] Jaiswar A, Rai N, Arora D, Malhotra M, Jaiswal S, Iquebal M A. Recent advances in genomics, genetic resources of watermelon. *The Watermelon Genome*, 2023, 131-142
- [4] Wu S, Wang X, Reddy U, Sun H, Bao K, Gao L, Mao L, Patel T, Ortiz C, Abburi V L, Nimmakayala P, Branham S, Wechter P, Massey L, Ling K S, Kousik C, Hammar S A, Tadmor Y, Portnoy V, Gur A, Katzir N, Guner N, Davis A, Hernandez A G, Wright C L, McGregor C, Jarret R, Zhang X, Xu Y, Wehner T C, Grumet R, Levi A, Fei Z. Genome of 'Charleston Gray', the principal American watermelon cultivar, and genetic characterization of 1365 accessions in the U.S. National Plant Germplasm System watermelon collection. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(2): 2246-2258
- [5] Tian S, Ge J, Ai G, Jiang J, Liu Q, Chen X, Liu M, Jianqiang Y, Zhang X, Yuan L. A 2.09 Mb fragment translocation on chromosome 6 causes abnormalities during meiosis and leads to less seed watermelon. *Horticulture Research*, 2021, 8, 1-13
- [6] Guner N, Wehner T C. The genes of watermelon. *Hortscience*, 2004, 39(6): 1175-1182
- [7] Poole C F. Genetics of cultivated cucurbits. *Journal of Heredity*, 1944, 35(4): 122-128
- [8] Mengbo W, Xin X, Xiaowei H, Yudong L, Haohao C, Helen C, Zehao G, Yujin Y, Yingqing L, Bihong F, Zhengguo L, Wei D. *SIMYB72* regulates the metabolism of chlorophylls, carotenoids, and flavonoids in tomato fruit. *Plant Physiology*, 2020, 183(3): 854-868
- [9] Telias A, Linwang K, Stevenson D E, Cooney J M, Hellens R P, Allan A C, Hoover E E, Bradeen J M. Apple skin patterning is associated with differential expression of *MYB10*. *BMC Plant Biology*, 2011, 11: 93
- [10] Vrebalov J, Pan I L, Arroyo A J M, McQuinn R, Chung M, Poole M, Rose J, Seymour G, Grandillo S, Giovannoni J, Irish V F. Fleshy fruit expansion and ripening are regulated by the tomato shatterproof gene *TAGL1*. *The Plant Cell*, 2009, 21(10): 3041-3062
- [11] Weetman L. Inheritance and correlation of shape, size and color in the watermelon. *Citrullus Vulgaris* Schrad, 1937, 20: 224-256
- [12] Wehner T C, Lou L. Qualitative inheritance of external fruit traits in watermelon. *Hortscience*, 2016, 51(5): 487-496
- [13] Yang H B, Park S W, Park Y, Lee G P, Kang S C, Kim Y K.

- Linkage analysis of the three Loci determining rind color and stripe pattern in watermelon. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology*, 2015, 33(4): 559-565
- [14] Park S W, Kim K T, Kang S C, Yang H B. Rapid and practical molecular marker development for rind traits in watermelon. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 2016, 57: 385-391
- [15] Wang Y, Duan S, Kang Q, Liu D, Yang S, Niu H, Zhu H, Sun S, Hu J, Dou J, Yang L. Genetic mapping of a candidate gene *CII5* controlling intermittent stripe rind in watermelon. *Horticulturae*, 2023, 9(2): 263
- [16] Yue Z, Ma R, Cheng D, Yan X, He Y, Wang C, Pan X, Yin L, Zhang X, Wei C. Candidate gene analysis of watermelon stripe pattern locus *CISP* ongoing recombination suppression. *Theoretical and Applied Genetics*, 2021, 134(10): 3263-3277
- [17] Liang X, Gao M, Amanullah S, Guo Y, Xu H, Liu X, Liu J, Gao Y, Yuan C, Wang X, Luan F. Molecular mapping of candidate gene regulating fruit stripe trait in watermelon. *Euphytica*, 2022, 218(12): 174
- [18] Wang D, Zhang M, Xu N, Yang S, Dou J, Liu D, Zhu L, Zhu H, Hu J, Ma C, Yang L, Sun S. Fine mapping a *CIGS* gene controlling dark-green stripe rind in watermelon. *Scientia Horticulturae*, 2022, 291, 110583
- [19] Wang Y, Duan S, Kang Q, Liu D, Yang S, Niu H, Zhu H, Sun S, Hu J, Dou J, Yang L. Genetic mapping of a candidate gene *CII5* controlling intermittent stripe rind in watermelon. *Horticulturae*, 2023, 9(2): 263
- [20] Kim D, Langmead B, Salzberg S L. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, 2015, 12(4): 357-360
- [21] Pertea M, Pertea G M, Antonescu C M, Chang T C, Mendell J T, Salzberg S L. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(3): 290-295
- [22] Wu T, Hu E, Xu S, Chen M, Guo P, Dai Z, Feng T, Zhou L, Tang W, Zhan L, Fu X, Liu S, Bo X, Yu G. ClusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *The Innovation*, 2021, 2(3): 100141
- [23] Langfelder P, Horvath S. WGCNA: An R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9, 559
- [24] Su G, Morris J H, Demchak B, Bader G D. Biological network exploration with Cytoscape 3. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2014, 47, 8(13): 1-24
- [25] Chen C, Chen H, Zhang Y, Thomas H R, Frank M H, He Y, Xia R. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202
- [26] Swift M L. GraphPad Prism, data analysis, and scientific graphing. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 1997, 37: 411-412
- [27] Jaakola L. New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. *Trends in Plant Science*, 2013, 18(9): 477-483
- [28] Song M, Zhang M, Cheng F, Wei Q, Wang J, Davoudi M, Chen J, Lou Q. An irregularly striped rind mutant reveals new insight into the function of *PGI $\beta$*  in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2020, 133: 371-382
- [29] Liu G, Li C, Yu H, Tao P, Yuan L, Ye J, Chen W, Wang Y, Ge P, Zhang J, Zhou G, Zheng W, Ye Z, Zhang Y. *GREEN STRIPE*, encoding methylated tomato *AGAMOUS-LIKE 1*, regulates chloroplast development and Chl synthesis in fruit. *New Phytologist*, 2020, 228(1): 302-317
- [30] Yue Z, Ma R, Cheng D, Yan X, He Y, Wang C, Pan X, Yin L, Zhang X, Wei C. Candidate gene analysis of watermelon stripe pattern locus *CISP* ongoing recombination suppression. *Theoretical and Applied Genetics*, 2021, 134(10): 3263-3277
- [31] Yue Z, Ma R, Cheng D, Yan X, He Y, Wang C, Pan X, Yin L, Zhang X, Wei C. Candidate gene analysis of watermelon stripe pattern locus *CISP* ongoing recombination suppression. *Theoretical and Applied Genetics*, 2021, 134(10): 3263-3277
- [32] Morris E R, Walker J C. Receptor-like protein kinases: The keys to response. *Current Opinion in Plant Biology*, 2003, 6(4): 339-342
- [33] Kaupp U B, Seifert R. Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiological Reviews*, 2002, 82: 769-824
- [34] Scharnhorst V, Van der Eb A J, Jochemsen A G. WT1 proteins: Functions in growth and differentiation. *Gene*, 2001, 273(2): 141-161
- [35] Grenzi M, Bonza M C, Costa A. Signaling by plant glutamate receptor-like channels: What else! *Current Opinion in Plant Biology*, 2022, 68: 102253
- [36] Kumar G, Arya M, Radhika P, Giridhar P. Genome-wide identification, characterization of *Serotonin N-acetyltransferase* and deciphering its importance under development, biotic and abiotic stress in soybean. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 220: 942-953
- [37] Jiang W, Tong T, Chen X, Deng F, Zeng F, Pan R, Zhang W, Chen G, Chen Z H. Molecular response and evolution of plant anion transport systems to abiotic stress. *Plant Molecular Biology*, 2022, 110(4): 397-412
- [38] Ahmed B, Alam M, Aktar N, Hossain M S, Ullah M W, Bashar K K, Kabir S T, Emdad E M, Islam M S. Genome-wide investigation of aquaporin genes in *Corchorus spp* and their role in organ development and abiotic stress tolerance. *Plant Gene*, 2023, 34: 100410