

网络出版时间:2022-07-27 16:27

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2023.02.010

网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20220727.1230.003.html

5-氮杂胞苷对苦瓜果实成熟及转录表达谱的影响

郭金菊,吴廷全,王茹芳,谭德龙,曹海顺,王 瑞,张长远

(广东省农业科学院 设施农业研究所,广东 广州 510640)

[摘 要] 【目的】研究 5-氮杂胞苷(5-azaC)对苦瓜果实成熟和基因表达模式的影响,为解析苦瓜果实成熟的分子调控机制提供理论依据。【方法】以苦瓜(*Momordica charantia* L.)高世代自交系 E12201-e1 为材料,利用 50 mmol/L 5-azaC 处理绿熟期(授粉后 18 d)苦瓜果实,以 ddH₂O 处理为对照,观察处理组(TR)和对照组(CK)果实的表型变化,并利用 RNA-seq 技术比较 TR 和 CK 苦瓜果肉组织中的转录水平差异。【结果】50 mmol/L 5-azaC 处理能明显延迟苦瓜果实成熟。RNA-seq 获得的数据质量较高,可满足后续分析需求。通过筛选共获得 1 773 个差异表达基因(DEGs),其中 1 007 个上调基因,766 个下调基因。GO 和 KEGG 分析结果表明,DEGs 主要富集在细胞组分和分子功能模块,217 个 DEGs 共富集到 93 条代谢通路中,其中 30 个 DEGs 显著富集到光合作用和苯丙烷类生物合成通路。8 个 DEGs 参与细胞壁代谢过程,其中 6 个基因在 5-azaC 处理中下调表达。共获得 681 个差异表达转录因子(TFs),分属于 220 个 TF 家族。12 个 DEGs 的 qRT-PCR 结果与 RNA-seq 结果变化趋势一致。【结论】5-azaC 处理抑制苦瓜果实成熟,并影响果实成熟相关基因的表达模式。

[关键词] 苦瓜;5-氮杂胞苷;转录组测序;果实成熟

[中图分类号] S642.501

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2023)02-0093-09

Effects of 5-azaC on fruit ripening and transcriptome patterns of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) fruit

GUO Jinju, WU Tingquan, WANG Rufang, TAN Delong, CAO Haishun,
WANG Rui, ZHANG Changyuan

(Institute of Facility Agriculture, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640, China)

Abstract: 【Objective】The effects of 5-azacytidine (5-azaC) on fruit ripening and gene expression patterns in bitter gourd were analyzed to provide basis for analyzing molecular regulatory mechanism of bitter gourd fruit ripening. 【Method】The bitter gourd fruit at green mature stage (18 days after pollination) of high-generation inbred line E12201-e1 was used as material. After being treated with 50 mmol/L 5-azaC (TR) and ddH₂O (CK), their phenotypes were observed and transcriptome patterns were compared using RNA-seq technique. 【Result】The fruit ripening of bitter gourd was significantly delayed in 50 mmol/L 5-azaC treatment. RNA-seq obtained high quality data for subsequent analysis. A total of 1 773 differentially expressed genes (DEGs) were identified, including 1 007 up-regulated genes and 766 down-regulated genes. GO and KEGG enrichment analysis showed that DEGs were mainly concentrated in modules of cellular component and molecular function. A total of 217 DEGs were enriched in 93 metabolic pathways, and

[收稿日期] 2022-01-12

[基金项目] 广东省现代农业产业技术体系创新团队项目(2021KJ110);广东省农业科学院院长基金项目(202028);广东省农业科学院创新基金项目(202149);广东省农业科学院学科团队建设项目(202130TD);广东省农业科学院科技创新战略专项资金(高水平农科院建设)一人才项目(R2018QD-037)

[作者简介] 郭金菊(1987—),女,湖北宜城人,助理研究员,博士,主要从事蔬菜遗传育种和分子生物技术研究。

E-mail: gij1987_cool@163.com

[通信作者] 张长远(1970—),男,河南信阳人,研究员,博士,主要从事蔬菜遗传育种研究。E-mail: zcy79130@163.com

30 DEGs from them were significantly enriched in photosynthesis and phenylpropanoid biosynthesis pathways. Eight DEGs were involved in cell wall metabolism, and 6 of them were down-regulated in 5-azaC treatment. A total of 681 differentially expressed transcription factors (TFs) belonging to 220 TF families were obtained. The qRT-PCR results of 12 DEGs were consistent with RNA-seq results. 【Conclusion】 The 5-azaC treatment could inhibit bitter melon fruit ripening and affect gene expression patterns related to fruit ripening.

Key words: bitter melon; 5-azaC; RNA-seq; fruit ripening

苦瓜 (*Momordica charantia* L.) 属于葫芦科 (Cucurbitaceae) 苦瓜属 (*Momordica*), 是一种药膳兼用的蔬菜, 不仅营养丰富, 还含有核糖体失活蛋白、多肽-P、胰蛋白酶抑制剂以及葫芦烷型三萜化合物等生物活性物质, 具有降糖、降脂、抗病毒、抗衰老等多种生物功能, 因此具有较高的经济和社会价值^[1-3]。苦瓜主要以膨大的中后期绿果为食用器官, 果实达到商品成熟后 3~5 d 就会快速变黄、软化甚至腐烂, 严重影响其商品品质和货架期, 从而造成较大的经济损失。苦瓜作为栽培面积最大的岭南特色瓜类蔬菜之一, 其分子生物学研究起步较晚, 人们对苦瓜果实成熟的相关研究主要集中在乙烯生物合成和信号转导方面, 而对 DNA 甲基化调控苦瓜果实成熟的研究尚未见报道。

果实成熟是植物特有的生命进程, 是一个复杂而有序的生理生化过程, 其间伴随着色泽、质地、风味、香气等多种内在和外品质的变化, 是外界环境条件、植物激素和转录因子等多种因素共同作用的结果^[4-6]。此外, 许多研究表明, DNA 甲基化是调控果实成熟的重要因子^[7-8]。DNA 甲基化是一种重要且保守的表观遗传学标记, 普遍存在于生物界中, 与基因组的稳定性、发育调控、环境响应等密切相关, 被称为“第五种碱基”^[9-10]。DNA 甲基化是在 DNA 甲基转移酶的催化作用下, 将 S-腺苷甲硫氨酸上的甲基基团转移到胞嘧啶环的 5 位 C 上的酶促反应。在高等植物中, DNA 甲基化可以发生在 CG、CHG 和 CHH (H=A、C 或 T) 3 种不同的序列环境中, 主要受 DNA 甲基转移酶 1 (MET1)、染色质甲基化酶 (CMTs) 和域重排甲基转移酶 (DRMs) 3 种 DNA 甲基转移酶调控^[11]。其中, 对称的 CG 和 CHG 甲基化分别被 MET1 和 CMTs 通过半保留机制维持, 而非对称的 CHH 甲基化被 CMT2、DRM1 和 DRM2 通过 RNA 介导的 DNA 甲基化 (RdDM) 途径维持^[11-13]。DNA 甲基化水平受甲基化和去甲基化过程共同决定。DNA 去甲基化过程是由 DNA 糖基化酶催化完成的, 在拟南芥中 DNA 去甲基化过程

受 DNA 糖基化酶 DME、DML2、DML3 和沉默抑制因子 1 (ROS1) 4 种去甲基化酶催化^[14-15]。研究表明, DNA 甲基化参与调控果实的成熟过程。例如, 番茄的 *cnr* 自然突变体是在 *CNR* 启动子区域发生高度甲基化, 抑制 *CNR* 基因表达, 进而影响番茄果实成熟^[16]。在苹果成熟过程中, 果皮色泽合成关键基因 *MYB10* 启动子区域的甲基化影响基因自身表达, 进而影响果皮颜色^[17-18]。

5-氮杂胞苷 (5-azaC) 是一种 DNA 甲基转移酶抑制剂, 能降低基因组 DNA 甲基化水平, 已被广泛用于基因组 DNA 甲基化调控果实成熟方面的研究。例如, 5-azaC 处理能加速番茄果实成熟, 并能提高成熟标志基因多聚半乳糖醛酸酶基因 (*pg2a*) 和八氢番茄红素合成酶基因 (*PSY1*) 的表达^[19]; Xu 等^[20]和 Huang 等^[8]发现, 5-azaC 能诱导柑橘愈伤组织中类胡萝卜素的降解, 并能抑制柑橘果实成熟。综上所述, DNA 甲基化参与调控果实成熟相关的生物代谢过程。

前期试验发现, 用 50 mmol/L DNA 甲基化抑制剂 5-azaC 处理商品成熟期苦瓜果实后, 苦瓜果实成熟明显延迟。由于 DNA 甲基化是影响基因表达的重要机制, 因此本研究通过转录组测序技术系统分析 5-azaC 处理后苦瓜果肉组织中基因的表达差异, 揭示 DNA 甲基化调控苦瓜果实成熟的分子机制, 以期对苦瓜果实成熟相关基因的挖掘和利用分子育种手段培育耐贮苦瓜新品种奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料及处理

以苦瓜 (*Momordica charantia* L.) 高世代自交系 E12201-e1 为试验材料, 植株定植于广东省农业科学院白云试验基地, 常规管理。待苦瓜果实达到绿熟期 (授粉后 18 d) 时, 选取充分膨大、大小均匀一致、无机械损伤的果实, 用 300 μ L 50 mmol/L 的 5-azaC (过滤灭菌) 进行渗透注射处理 (TR), 每个果实注射 3 个位置, 以 ddH₂O 处理为对照 (CK), 观察并

记录果实表型变化;取伤口附近的果肉组织,速冻于液氮中,并于-80℃冰箱中保存备用。试验设3次重复,每个重复处理5个果实。

1.2 总 RNA 提取与质量检测

使用 TRIzol® Reagent(Invetrogen,USA)提取苦瓜果肉组织总 RNA。利用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性及其是否存在污染,利用 NanoPhotometer® spectrophotometer 检测总 RNA 的纯度,利用 Agilent 2100 bioanalyzer 精确检测 RNA 的完整性。

1.3 cDNA 文库的构建与质检

利用 NEBNext® UltraTM RNA Library Prep Kit(NEB,USA)建库试剂盒构建苦瓜 cDNA 文库,具体操作步骤为:利用 Oligo(dT)磁珠富集带有 polyA 尾的 mRNA,加入 NEB Fragmentation Buffer将 mRNA 随机打断,以片段化的 mRNA 为模板,利用 M-MuLV 逆转录酶合成 cDNA 第一链,然后利用 RNase H 降解 RNA 链,并利用 DNA polymerase I 合成 cDNA 第二链;利用 AMPure XP beads 纯化 cDNA,经过末端修复、加 A 尾并连接测序接头后,用 AMPure XP beads 筛选片段长度在 250~300 bp 的 cDNA,经 PCR 富集获得 cDNA 文库。

文库构建完成后,使用 Qubit2.0 Fluorometer 进行初步定量,稀释文库至 1.5 ng/μL,随后使用 Agilent 2100 bioanalyzer 对文库的插入片段大小进行检测,最后利用 qRT-PCR 方法对文库有效浓度(>2 nmol/L)进行准确定量,以保证文库质量。

库检合格后利用 Illumina HiSeq 平台测序,并产生 150 bp 配对末端读数。

1.4 数据质控

为保证后续分析的质量和可靠性,对原始数据

进行过滤,过滤内容包括去除带接头(adapter)的读长(reads)、去除含 N(即无法确定的碱基信息)的 read 和低质量 reads(Qphred≤20 的碱基数占整个 read 长度 50%以上的 reads),最终获得高质量原始数据过滤后的 reads 数(clean reads),进行后续分析。

1.5 差异基因分析

利用 Hisat2 v2.0.5 将质控得到的 clean reads 比对到苦瓜参考基因组(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_001995035.1)上,获得 reads 在参考基因组上的定位信息;利用 subread 软件中的 featureCounts 工具统计每个基因比对上的 reads 数目,并对其进行 FPKM(fragments per kilobase of transcript per million fragments)转换,分析各基因的表达水平;利用 DESeq2 R package(1.16.1)筛选样品组间的差异表达基因,其中差异基因筛选阈值设为 |log₂(FoldChange)|≥2 且经校正后的 P 值(P_{adj})≤0.01。利用 clusterProfiler R package (3.4.4)对差异表达基因进行 GO 和 KEGG 富集分析,以 P_{adj} ≤0.01 作为显著性富集阈值。

1.6 差异转录因子分析

将差异表达基因比对到植物转录因子数据库 PlantTFDB 4.0 (<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/>),阈值设为 $E(1\times10^{-5})$,获得差异表达基因的转录因子分类和数目,并对与果实成熟和衰老相关的转录因子进行热图分析。

1.7 实时荧光定量 PCR

为了验证转录组测序数据的准确性,随机选取上调和下调的差异表达基因各 6 个,根据基因的核酸序列设计荧光定量 PCR 引物,并委托上海生工生物工程股份有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 本研究所用的荧光定量 PCR 引物

Table 1 Primers used for qRT-PCR in this study

基因 ID Gene ID	正向引物(5'→3') Forward primer(5'→3')	反向引物(5'→3') Reverse primer(5'→3')	产物长度/bp Product length
PMcCYPP	ACCTGGAACCAACGGATCT	TCTCGACGGCCTTTACAAC	119
Loc111009598	AAGAAGGCAGAGCGGAAGAC	GCTCGAATCTCCGAAACCCA	113
Loc111011263	TCAAAGATGCTGATGAAGAAGAGC	GGGAGATGTGGGTTCTCTTGG	98
Loc111014782	ACTCGCCGATGCTGTAGTTT	GTCGATATCGTGCTCCGGTT	132
Loc111008985	CACCGGAGGCGAAGACATAA	TTAATCCCCAAGGTGGTGGC	88
Loc111022222	TCTTCAAAACATCTGAGAAATGGG	GCACACCAATTCTCATCGC	94
Loc111022717	CGAGCGAGCTCCTTCTGTTA	GTGGGGAGTGGTCGAGGATA	118
Loc111015318	AGAAACAGAGGAAGACGCCG	CAAACCCTAACTCCGTGCCT	109
Loc111018048	AGGGAAGATGGTGCCAAAGG	GTTGGTTCTGTACTCCGGCA	115
Loc111007889	CCTGGCTAAGGCACAGAACA	CCGCTGCAGTAGTAGTAGC	138
Loc111017569	TGGTGATGGTTCTGGTGAGC	TCAAGTTCAGTCTGTCCAGTCC	108
Loc111005725	AGTGGTTGAGTTCGGCTCAG	GACCGATCGTCTTCCTCACC	106
Loc111006538	TGCTACCTGGTTTCCGGTTC	GATGGAACGGGACGCATCT	89

使用 SV Total RNA Isolation System Kit (Promega, USA) 提取苦瓜果肉组织样品总 RNA, 利用 PrimerScript™ RT Kit (Takara, Japan) 反转录合成 cDNA 第一链, 利用 ABI7500 PCR 仪进行 PCR 扩增。20 μ L 反应体系: TB Green™ Premix Ex Taq II 酶 (Takara, Japan) 10 μ L, 10 μ mol/L 正向引物 (Forward primer) 和反向引物 (Reverse primer) 各 0.8 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 灭菌水 6.4 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 40 个循环。以苦瓜亲环蛋白基因 *McCYP* (NCBI 登录号: HQ171897) 为内参基因, 设 3 次技术重复。

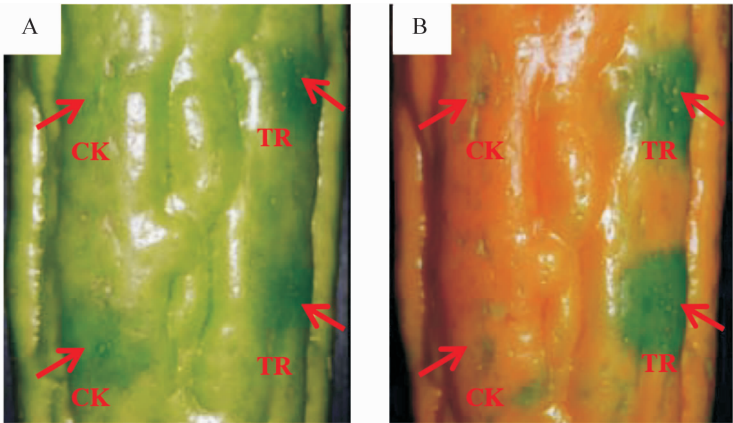
1.8 数据分析

使用 SPSS 统计分析软件对试验数据进行方差分析和显著性分析, 使用 SigmaPlot 10.0 进行数据统计与绘图。

2 结果与分析

2.1 5-azaC 处理对苦瓜果实成熟的影响

观察 5-azaC 处理 (TR) 对苦瓜果实成熟的影响, 结果 (图 1) 表明, 50 mmol/L 5-azaC 处理能显著抑制苦瓜果实转色。



A. 处理当天的苦瓜果实; B. 处理第 3 天的苦瓜果实; TR 为 5-azaC 处理组, CK 为对照组, 红色箭头表示处理位置

A. The bitter gourd on the day of treatment; B. The bitter gourd on the third day of treatment. TR. 5-azaC treatment group; CK. ddH₂O treatment group. Red arrows indicate treated sites

图 1 5-azaC 处理对苦瓜果实成熟的影响

Fig. 1 Effects of 5-azaC treatment on bitter gourd fruit ripening

2.2 5-azaC 处理苦瓜果实中转录组测序数据的质量分析

分别对 5-azaC 和 ddH₂O 处理 3 d 的苦瓜果肉组织进行转录组测序, 共获得 46.94 Gb clean reads, 各样品的 clean bases (clean reads $\times$ 150 bp)

均大于 7 Gb, GC 含量在 45.23% ~ 46.05%, Q20 碱基占总碱基的比例大于 96%, Q30 碱基占总碱基的比例大于 89%, 测序错误率为 3% ($< 6\%$) (表 2), 说明全部样品转录组测序数据质量较高, 满足后续分析需求。

表 2 5-azaC 处理苦瓜果实中转录组测序数据

Table 2 RNA-seq data of bitter gourd fruit treated with 5-azaC

样品 Sample	原始数据 Raw reads	过滤后的数据 Clean reads	过滤后的碱基数/Gb Clean bases	错误率/% Error rate	Q20/%	Q30/%	GC 含量/% GC content
CK-1	53 804 640	53 409 862	8.01	3	96.44	90.59	45.58
CK-2	48 345 802	47 962 296	7.19	3	96.33	90.30	46.02
CK-3	53 311 090	52 884 020	7.93	3	96.49	90.65	45.23
TR-1	48 246 456	47 851 030	7.18	3	96.00	89.67	45.89
TR-2	58 658 196	58 171 314	8.73	3	96.69	91.07	46.05
TR-3	53 100 722	52 699 470	7.90	3	96.28	90.19	45.61

2.3 5-azaC 处理苦瓜果实中差异表达基因分析

在 $|\log_2(\text{FoldChange})| \geq 2$ 且 $P_{\text{adj}} \leq 0.01$ 的阈值条件下, 对 5-azaC 处理苦瓜果实中的差异表达基因 (DEGs) 进行筛选, 共筛选到 1 773 个 DEGs, 其中 1 007 个基因上调 (包括 82 个在 5-azaC 处理中特异

表达的基因), 766 个基因下调 (包括 64 个在 ddH₂O 处理中特异表达的基因) (图 2-A, B), 表明 5-azaC 处理影响苦瓜果实中基因的转录水平, 且能诱导更多基因表达。

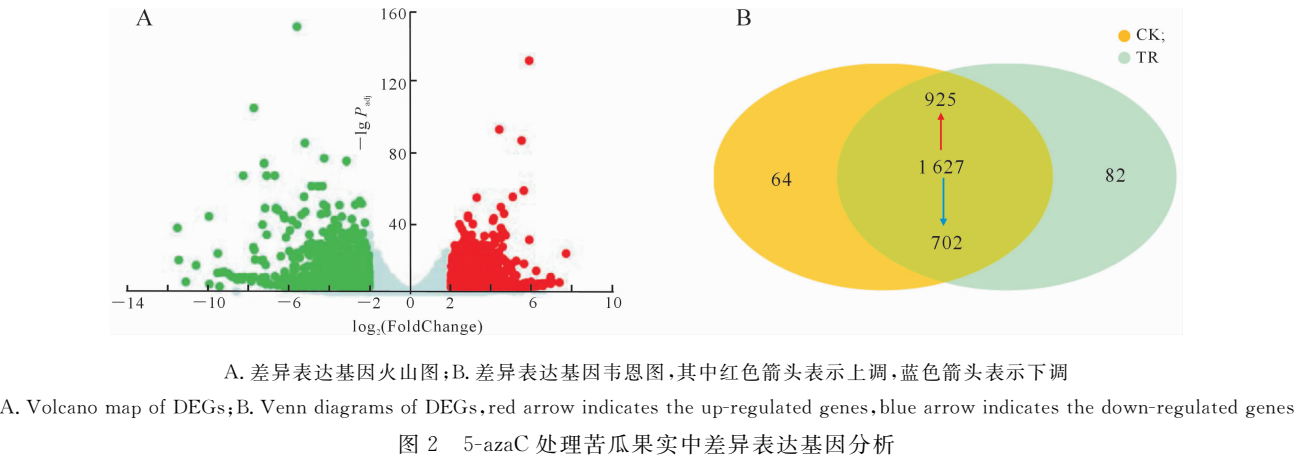


Fig. 2 Analysis of DEGs in bitter gourd fruit treated with 5-azaC

2. 4 5-azaC 处理苦瓜果实中差异表达基因的 GO 和 KEGG 富集分析

2. 4. 1 GO 分析 为了进一步研究 DEGs 的功能,对筛选的 DEGs 进行 GO 分析,根据基因功能将 DEGs 主要分为生物学过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 3 大类,共有 639 个基因注释到 GO 数据库,其中注释到 BP 的有 312 个,

注释到 CC 的有 75 个,注释到 MF 的有 521 个。在 $P_{adj} \leq 0.01$ 的阈值条件下,差异基因主要富集在细胞组分和分子功能 2 大模块,其中类囊体、光合膜和光系统 5 个与光合作用相关的 GO terms 富集在细胞组分模块,肽链内切酶抑制剂活性、肽酶抑制剂活性、肽酶调节活性和肽链内切酶调节活性 4 个 GO terms 富集在分子功能模块(图 3)。

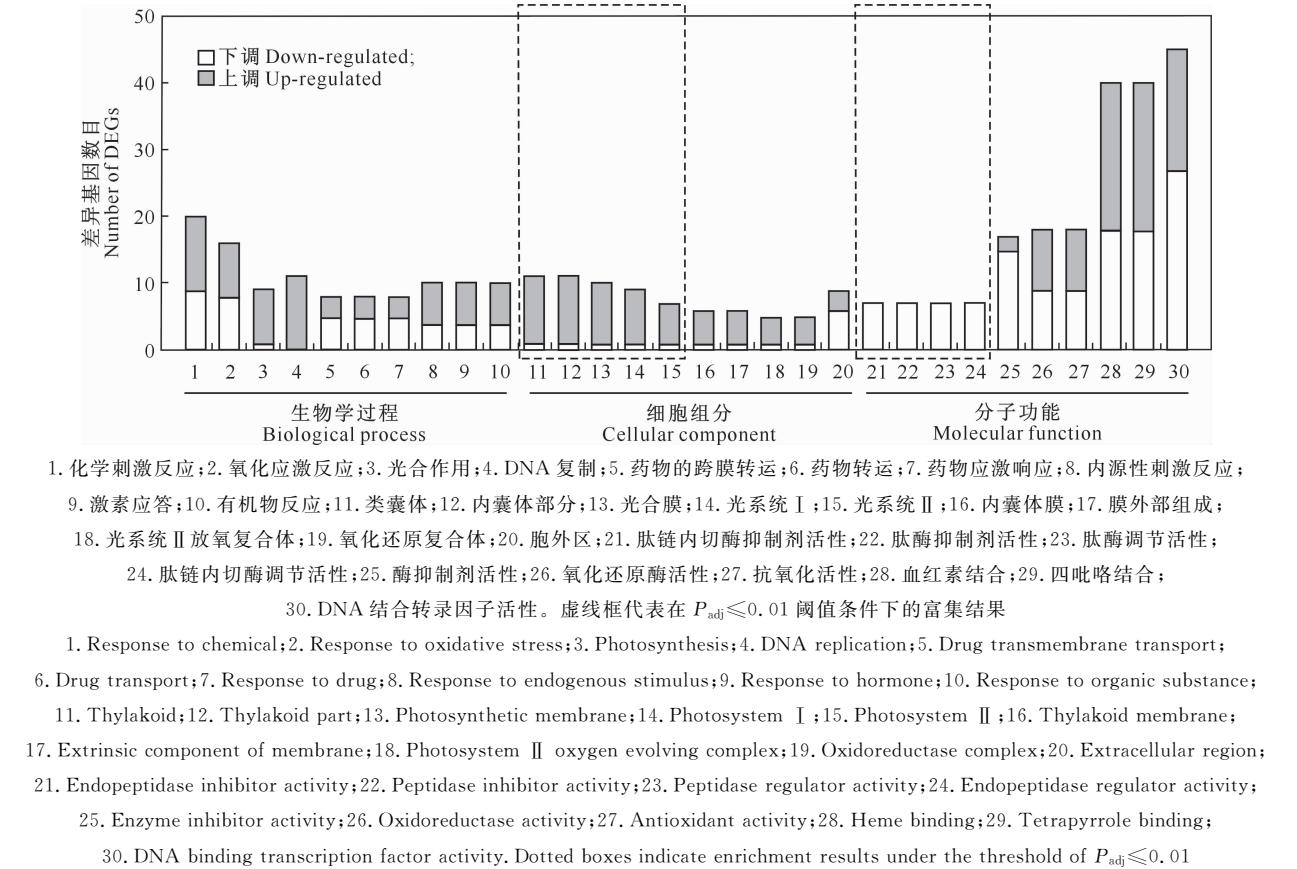


图 3 5-azaC 处理苦瓜果实中差异表达基因的 GO 富集分析(部分)

Fig. 3 GO enrichment analysis of DEGs in bitter melon fruit treated with 5-azaC (portion)

2.4.2 KEGG 分析 对差异表达基因进行 KEGG pathway 分析,共有 217 个(12.2%)差异基因富集到93条代谢通路,在 $P_{\text{adj}}\leq 0.01$ 的阈值条件下,共有 20 个基因富集到苯丙烷类生物合成($P_{\text{adj}}=2.70\times 10^{-3}$)通路,10 个基因富集到光合作用($P_{\text{adj}}=2.70\times 10^{-3}$)通路(表 3)。

表 3 5-azaC 处理苦瓜果实中差异表达基因的 KEGG 富集分析($P_{\text{adj}}\leq 0.01$)

Table 3 KEGG enrichment analysis of DEGs in bitter gourd fruit with 5-azaC treatment ($P_{\text{adj}}\leq 0.01$)

KEGG ID	描述 Description	基因 ID Gene ID	P_{adj}
csv00940	苯丙烷类生物合成 Phenylpropanoid biosynthesis	Loc111009213,Loc111013637,Loc111014955,Loc111017932,Loc111018087,Loc111019137,Loc111019293,Loc111021183,Loc111021185,Loc111021195,Loc111021609,Loc111021691,Loc111022044,Loc111020903,Loc111020774,Loc111020994,Loc111015758,Loc111020167,Loc111008900,Loc111015489	2.70×10^{-3}
csv00195	光合作用 Photosynthesis	Loc111006749,Loc111008042,Loc111009044,Loc111011790,Loc111014193,Loc111021119,Loc111022836,Loc111006691,Loc111009341,Loc111022934	2.70×10^{-3}

2.5 5-azaC 处理苦瓜果实中细胞壁代谢相关差异表达基因的筛选

细胞壁组分的降解是导致果实变软的主要原因之一。细胞壁的降解过程中有多聚半乳糖醛酸酶(PG)、果胶酯酶(PE)、纤维素酶(Cx)和木葡聚糖内糖基转移酶(XET)等多种水解酶参与。本研究通过差异基因的功能分析对细胞壁代谢相关基因进行筛

选,共筛选出 4 个果胶酯酶/果胶酯酶抑制蛋白(pectinesterase/pectinesterase inhibitor, PE/PEI)和 4 个木葡聚糖内糖基转移酶/水解酶(xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase, XTH)编码基因(表 4),其中 75%(6/8)的基因在 5-azaC 处理中下调,表明 5-azaC 处理能抑制苦瓜果肉组织细胞壁的降解。

表 4 5-azaC 处理苦瓜果实中细胞壁代谢相关基因的功能描述

Table 4 Function description of cell wall metabolism related genes in bitter gourd fruit treated with 5-azaC

基因 ID Gene ID	$\log_2$ (FoldChange)	P_{adj}	功能描述 Function description
Loc111007155	2.41	2.24×10^{-10}	木葡聚糖内糖基转移酶/水解酶蛋白 22-like Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 22-like
Loc111007567	-2.16	8.64×10^{-4}	木葡聚糖内糖基转移酶/水解酶蛋白 9-like Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 9-like
Loc111016688	-2.15	1.03×10^{-12}	木葡聚糖内糖基转移酶/水解酶蛋白 2-like Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 2-like
Loc111016694	-2.05	1.09×10^{-7}	木葡聚糖内糖基转移酶/水解酶蛋白 2-like Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 2-like
Loc111009492	-2.24	6.95×10^{-29}	果胶酯酶/果胶酯酶抑制剂 20 Probable pectinesterase/pectinesterase inhibitor 20
Loc111010530	-4.42	2.18×10^{-6}	果胶酯酶 QRT1 Pectinesterase QRT1
Loc111016136	2.29	1.56×10^{-3}	果胶酯酶/果胶酯酶抑制剂 7 Probable pectinesterase/pectinesterase inhibitor 7
Loc111024627	-2.36	6.60×10^{-4}	果胶酯酶/果胶酯酶抑制剂 61 Probable pectinesterase/pectinesterase inhibitor 61

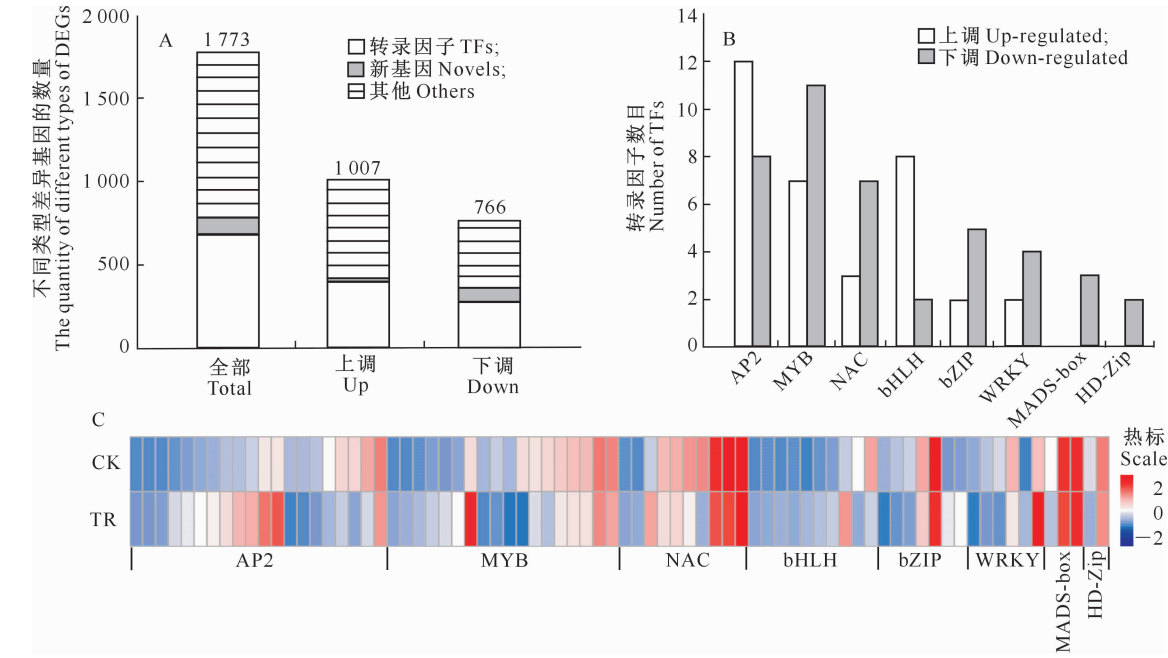
2.6 影响苦瓜果实成熟的相关转录因子分析

转录因子在果实的成熟和衰老过程中发挥着重要作用。利用植物转录因子数据库 PlantTFDB 4.0 进行转录因子预测,共有 681 个基因被预测为转录因子(TFs),分属于 220 个 TF 家族,其中 402 个 TFs 上调,279 个 TFs 下调(图 4-A)。根据功能注释重点分析了 AP2、MYB、NAC、WRKY 和 MADS-box 等果实成熟和衰老相关的转录因子。其中,大多数 AP2(60%)和 bHLH(80%)家族转录因子在 5-azaC 处理果实中表现上调;HD-Zip、MADS-box

及多数 MYB(61%)、NAC(70%)、bZIP(71%)、WRKY(67%)家族转录因子在 5-azaC 处理果实中表现下调(图 4-B,C)。表明 5-azaC 会影响苦瓜果实成熟和衰老相关转录因子的表达水平。

2.7 5-azaC 处理苦瓜果实中差异表达基因的 qRT-PCR 验证

为验证转录组测序结果的可靠性,分别选取 6 个上调和 6 个下调的转录因子进行 qRT-PCR 定量分析,发现其表达量变化与转录组测序结果一致(图 5),表明本研究结果重复性好,测序结果可靠。



A. 不同类型差异表达基因的数量分布;B. 不同转录因子家族中差异表达转录因子数量分析;C. 差异表达转录因子的热图分析
A. Quantity distribution of different types of DEGs;B. Quantitative analysis of differentially expressed TFs in different TF families;
C. The heatmap of differentially expressed TFs

图 4 5-azaC 处理苦瓜果实中差异表达转录因子分析

Fig. 4 Analysis of differentially expressed TFs in bitter melon fruit treated with 5-azaC

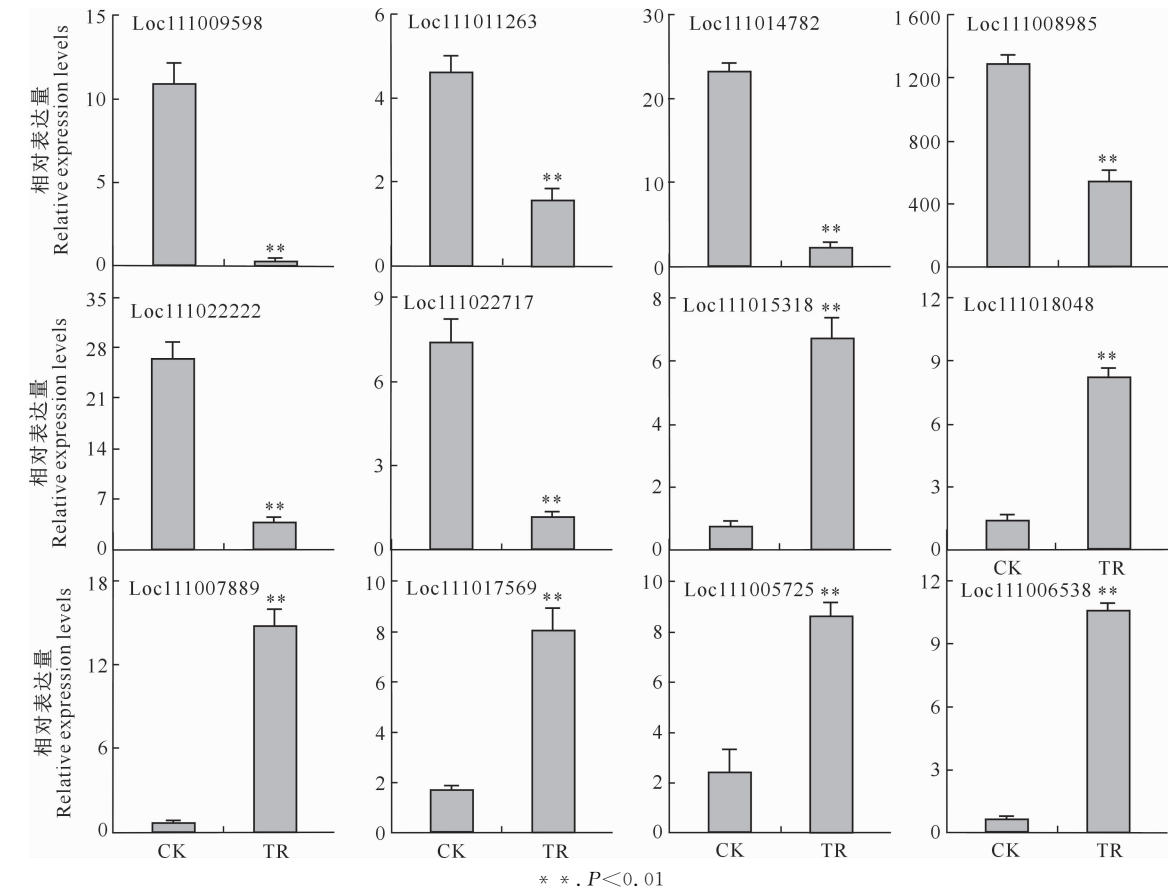


图 5 5-azaC 处理苦瓜果实中 12 个 DEGs 的 qRT-PCR 验证

Fig. 5 qRT-PCR verification for 12 DEGs in bitter melon fruit treated with 5-azaC

3 讨 论

3.1 5-azaC 处理对苦瓜果实成熟的影响

5-azaC 是一种胞嘧啶核苷类似物,能抑制 DNA 甲基转移酶活性,降低全基因组 DNA 甲基化水平,已被广泛用于基因组 DNA 甲基化引起的植物表观遗传研究中^[20]。在非光周期诱导条件下,5-azaC 处理能加速长日照植物高雪轮(*Silene armeria*)和短日照植物紫苏(*Perilla frutescens*)的开花过程^[21]。许多研究表明,5-azaC 处理能显著影响果实全基因组 DNA 甲基化水平,从而影响果实的成熟过程。Huang 等^[8]利用 5-azaC 处理未成熟的柑橘果实,发现其能降低基因组 DNA 甲基化水平,进而抑制柑橘果实的成熟进程,该结果与柑橘果实成熟过程中基因组 DNA 甲基化上升的趋势一致。但在番茄果实成熟过程中,DNA 甲基化水平呈下降趋势,且 5-azaC 处理能显著促进番茄果实成熟^[19]。本研究利用 50 mmol/L 5-azaC 处理绿熟期苦瓜果实,结果发现其能明显延迟苦瓜果实成熟,表明苦瓜果实成熟过程中 DNA 甲基化水平可能与柑橘类似,呈上升趋势。苦瓜作为典型的呼吸跃变型果实,其成熟过程中的表观遗传调控机制、全基因组 DNA 甲基化水平的变化趋势及其与呼吸跃变型果实番茄的异同等诸多问题仍需进一步探究。

果实质地是影响果实品质的重要因素,果实硬度是反映果实硬度的主要指标,细胞壁是决定果实硬度的关键因素。果实的成熟伴随着果实软化,果实软化的主要原因是纤维素、半纤维素和果胶等细胞壁组分的降解。细胞壁的降解由 PG、PE、果胶裂解酶(PEL)、Cx、 β -半乳糖苷酶(β -Gal)、XTH 等 30 多种酶参与完成。本研究中 5-azaC 处理能显著抑制大多数细胞壁降解相关酶编码基因的表达,表明 5-azaC 处理可能抑制苦瓜果肉组织细胞壁的降解。

3.2 5-azaC 处理对苦瓜果实转录表达谱的影响

果实的成熟是一个多基因参与的过程,是大量基因表达和调控的结果^[4,22]。转录组是细胞在特定时期或特定生理条件下所有基因表达后产物的表现,反映了特定情况下基因的表达水平,对从整体水平上研究基因的功能、挖掘优良性状相关基因具有重要作用。RNA-seq 技术具有数据量大、高效、快捷等优点,能为植物基因表达的全面分析提供数据资源。本研究采用 RNA-seq 技术对 TR 和 CK 处理苦瓜果实中的差异表达基因进行了分析,共筛选到 1 773 个 DEGs,其中有 56.8% 的基因上调表达,

表明 5-azaC 处理影响苦瓜果实中基因的转录水平,且能诱导更多基因表达。KEGG 富集分析结果表明,这些差异基因主要参与光合作用和苯丙烷类生物合成通路($P_{\text{adj}} \leq 0.01$)。光合作用是果实生长发育和品质形成的重要基础。随着果实的成熟,果肉组织中的叶绿体转变为有色体,从而丧失光合功能^[23-24]。与此同时,光合作用相关基因的表达水平显著下调^[24-26]。本研究富集到光合作用代谢通路的 10 个基因在 5-azaC 处理下均上调表达,表明 5-azaC 通过影响苦瓜果实的光合作用进而影响其成熟进程。此外,有 20 个差异表达基因富集到苯丙烷类生物合成通路,其中 11 个基因上调表达,9 个基因下调表达。苯丙素代谢可以形成大量的次生代谢产物,如类黄酮、花青素和芳香类物质等^[27],苯丙烷类生物合成相关基因的表达量变化,表明 5-azaC 处理影响了苦瓜果肉组织中的次生代谢。

3.3 苦瓜果实成熟相关转录因子分析

转录因子在果实成熟和衰老的调控过程中发挥着重要作用^[28]。转录因子参与调控果实成熟和衰老最初是在番茄 *rin*^[29]、*nor*^[16] 和 *cnr*^[30] 突变体中发现的,这 3 个突变基因分别属于 MADS-box、NAC 和 SBP 转录因子家族,这些基因的突变几乎抑制了果实成熟的整个进程。近年来,随着生物技术的发展,越来越多与果实成熟和衰老相关的转录因子被分离和鉴定出来。本研究共筛选得到 681 个差异转录因子,占差异表达基因总数的 38.4%。基于前人研究基础^[28],本研究重点分析了 AP2、MADS-box、NAC、MYB 和 WRKY 等调控果实成熟相关的转录因子家族,发现其中 55%(42/76)的转录因子在 5-azaC 处理下下调表达,表明转录因子在调控苦瓜果实成熟相关基因的表达上发挥了重要作用。果实的成熟是多种转录因子协同作用的结果,系统挖掘果实成熟相关转录因子,探明转录因子间的内在关系,挖掘其下游靶向基因,明晰果实成熟的转录调控网络,对丰富果实成熟理论和利用分子手段调控果实成熟具有重要意义。

[参考文献]

- [1] Wang S Z, Li Z L, Yang G L, et al. *Momordica charantia*: a popular health-promoting vegetable with multifunctionality [J]. Food & Function, 2017, 8(5): 1749-1762.
- [2] 程蛟文, 钟建, 程雨柔, 等. 苦瓜种子 EMS 诱变条件分析 [J]. 中国蔬菜, 2019(1): 26-31.
- Cheng J W, Zhong J, Cheng Y R, et al. Analysis of EMS mutagenesis condition for bitter melon (*Momordica charantia* L.)

- seed [J]. *China Vegetables*, 2019(1):26-31.
- [3] 郭金菊,罗剑宇,吴海滨,等. 苦瓜新品种绿钻 1 号的选育 [J]. *中国蔬菜*, 2021(11):90-92.
- Guo J J, Luo J N, Wu H B, et al. A new bitter gourd F1 hybrid- 'Lyuzuan No. 1' [J]. *China Vegetables*, 2021(11):90-92.
- [4] Klee H J, Giovannoni J J. Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes [J]. *Annual Review of Genetics*, 2011, 45:41-59.
- [5] Liu M, Pirrello J, Chervin C, et al. Ethylene control of fruit ripening: revisiting the complex network of transcriptional regulation [J]. *Plant Physiology*, 2015, 169(4):2380-2390.
- [6] Giovannoni J, Nguyen C, Ampofo B, et al. The epigenome and transcriptional dynamics of fruit ripening [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2017, 68:61-84.
- [7] Lang Z B, Wang Y H, Tang K, et al. Critical roles of DNA demethylation in the activation of ripening-induced genes and inhibition of ripening-repressed genes in tomato fruit [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(22):E4511-E4519.
- [8] Huang H, Liu R E, Niu Q F, et al. Global increase in DNA methylation during orange fruit development and ripening [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(4):1430-1436.
- [9] Law J A, Jacobsen S E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11(3):204-220.
- [10] Lei M, Zhang H, Julian R, et al. Regulatory link between DNA methylation and active demethylation in *Arabidopsis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(11):3553.
- [11] Chan S W, Henderson I R, Jacobsen S E. Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2005, 6(5):351-360.
- [12] Finnegan E J, Kovac K A. Plant DNA methyltransferases [J]. *Plant Molecular Biology*, 2000, 43(2/3):189-201.
- [13] Matzke M A, Kanno T, Matzke A J M. RNA-directed DNA methylation: the evolution of a complex epigenetic pathway in flowering plants [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2015, 66:243-267.
- [14] Zhu J K. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases [J]. *Annual Review of Genetics*, 2009, 43:143-166.
- [15] Higo H, Tahir M, Takashima K, et al. DDM1 (*Decrease in DNA Methylation*) genes in rice (*Oryza sativa*) [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2012, 287:785-792.
- [16] Manning K, Tör M, Poole M, et al. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening [J]. *Nature Genetics*, 2006, 38(8):948-952.
- [17] Telias A, Lin-Wang K, Stevenson D E, et al. Apple skin patterning is associated with differential expression of MYB10 [J]. *BMC Plant Biology*, 2011, 11:93.
- [18] El-Sharkawy I, Liang D, Xu K. Transcriptome analysis of an apple (*Malus × domestica*) yellow fruit somatic mutation identifies a gene network module highly associated with anthocyanin and epigenetic regulation [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(22):7359-7376.
- [19] Zhong S L, Fei Z J, Chen Y R, et al. Single-base resolution methylomes of tomato fruit development reveal epigenome modifications associated with ripening [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(2):154-159.
- [20] Xu J D, Wang X, Cao H B, et al. Dynamic changes in methylome and transcriptome patterns in response to methyltransferase inhibitor 5-azacytidine treatment in citrus [J]. *DNA Research*, 2017, 24(5):509-522.
- [21] Kondo H, Shiraya T, Wada K C, et al. Induction of flowering by DNA demethylation in *Perilla frutescens* and *Silene armeria*: heritability of 5-azacytidine-induced effects and alteration of the DNA methylation state by photoperiodic conditions [J]. *Plant Science*, 2010, 178(3):321-326.
- [22] Gapper N E, McQuinn R P, Giovannoni J J. Molecular and genetic regulation of fruit ripening [J]. *Plant Molecular Biology*, 2013, 82(6):575-591.
- [23] Bükér M, Schünemann D, Borchert S. Enzymic properties and capacities of developing tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruit plastids [J]. *Journal of Experimental Botany*, 1998, 49(321):681-691.
- [24] Kahlau S, Bock R. Plastid transcriptomics and translaticomics of tomato fruit development and chloroplast-to-chromoplast differentiation: chromoplast gene expression largely serves the production of a single protein [J]. *The Plant Cell*, 2008, 20(4):856-874.
- [25] Carrari F, Baxter C, Usadel B, et al. Integrated analysis of metabolite and transcript levels reveals the metabolic shifts that underlie tomato fruit development and highlight regulatory aspects of metabolic network behavior [J]. *Plant Physiology*, 2006, 142(4):1380-1396.
- [26] Lytovchenko A, Eickmeier I, Pons C, et al. Tomato fruit photosynthesis is seemingly unimportant in primary metabolism and ripening but plays a considerable role in seed development [J]. *Plant Physiology*, 2011, 157(4):1650-1663.
- [27] Vogt T. Phenylpropanoid biosynthesis [J]. *Molecular Plant*, 2010, 3(1):2-20.
- [28] 范中奇, 邝健飞, 陆金旺, 等. 转录因子调控果实成熟和衰老机制研究进展 [J]. *园艺学报*, 2015, 42(9):1649-1663.
- Fan Z Q, Kuang J F, Lu J W, et al. Advances in research of the mechanism of transcription factors involving in regulating fruit ripening and senescence [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2015, 42(9):1649-1663.
- [29] Vrebalov J, Ruezinsky D, Padmanabhan V, et al. A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (rin) locus [J]. *Science*, 2002, 296(5566):343-346.
- [30] Giovannoni J J, Noensie E N, Ruezinsky D M, et al. Molecular genetic analysis of the ripening-inhibitor and non-ripening loci of tomato: a first step in genetic map-based cloning of fruit ripening genes [J]. *Molecular and General Genetics*, 1995, 248(2):195-206.