

# 猕猴桃砧木抗旱性评价及转录组分析

周康宇<sup>1,2</sup>, 何成勇<sup>1#</sup>, 徐子鸿<sup>1</sup>, 王玲利<sup>1</sup>, 赵科<sup>1</sup>, 宋海岩<sup>1</sup>, 刘普<sup>2\*</sup>, 涂美艳<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>四川省四川省农业科学院园艺研究所.农业农村部西南地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 成都 610066; <sup>2</sup>安徽农业大学园艺学院, 合肥 230036)

**摘要:**【目的】为探讨不同猕猴桃砧木在干旱胁迫条件下的生理和分子响应机制,【方法】利用 25% PEG-6000 模拟干旱胁迫对四种猕猴桃材料: 'Bruno'、'XD-GZ-7'、'XD-RZ-1'和'DJY-DE-1'进行处理, 通过植株表型观测和生理指标测定, 进一步利用转录组测序发掘关键差异表达基因。【结果】结果表明, 'Bruno'在干旱胁迫下最早表现出明显的叶片失水和植株萎蔫现象, 旱害指数为 87%, 显著高于其他材料; 而'DJY-DE-1'则表现出较强的抗旱性, 叶片在胁迫后第 8 天出现轻微下垂现象, 旱害指数为 33%, 显著低于其他材料。转录组分析揭示了两个材料在各时期均显示出大量的差异表达基因, GO 富集分析显示这些基因主要涉及细胞过程、代谢过程等生物过程、细胞和细胞膜等细胞组分、以及结合、催化活性等分子功能。KEGG 通路富集分析显示差异基因主要参与信号转导、代谢通路、蛋白质折叠和分类等关键生物过程。利用 WGCNA 分析进一步筛选出了 4 个可能参与根系干旱响应的关键差异表达基因。【结论】本研究通过综合生理和转录组学方法, 深入分析了猕猴桃不同砧木对干旱胁迫的响应机制, 为未来改良作物抗旱性和遗传改良提供了理论基础和实验依据。

**关键词:** 猕猴桃; 干旱胁迫; 生理机制; 转录组

## Analysis of drought resistance of kiwifruit rootstock based on physiology and transcriptome

ZHOU Kangyu<sup>1,2,3</sup>, HE Chengyong<sup>1,2#</sup>, XU Zihong<sup>1,2</sup>, WANG Lingli<sup>1,2</sup>, ZHAO Ke<sup>1,2</sup>, SONG Haiyan<sup>1,2</sup>, LIU Pu<sup>3\*</sup>, TU Meiyan<sup>1,2\*</sup>

(1. Institute of Horticulture, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Horticultural Crop Biology and Germplasm Creation in Southwest China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chengdu 610066, China; 2. Horticulture College, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

**Abstract:** 【Objective】 This study aimed to investigate the physiological and molecular mechanisms of drought tolerance in different kiwifruit materials, with the goal of providing a foundation for future breeding and genetic improvement efforts to enhance drought resistance in kiwifruit. 【Methods】 Four kiwifruit cultivars with varying degrees of drought tolerance were selected: 'Bruno' (*Actinidia deliciosa*), 'XD-GZ-7' (*A. polygama*), 'XD-RZ-1' (*A. eriantha*), and 'DJY-DE-1' (*A. valvata*). These cultivars were chosen based on previous observations of their drought tolerance and represent diverse genotypes from collected germplasm. Drought stress was

收稿日期: 2024.9.13

基金项目: 四川省科技计划项目 (2022YFYZ0003); 四川省“十四五”果树育种攻关 (2021YFYZ0023-01); 国家现代农业产业技术体系四川创新团队 (SCCXTD-2024-4); 国家柑橘产业技术体系猕猴桃成都综合试验站 (CARS-26)

作者简介: 周康宇, 男, 在读硕士研究生。E-mail:1063800248@qq.com。#为共同第一作者

\*通讯作者: Author for correspondence. E-mail:huahelei@126.com; E-mail:puliu@ahau.edu.cn

simulated using 25% PEG-6000, applied at five time points (0, 2, 4, 6, and 8 days). Phenotypic assessments included observations of leaf wilting, plant dehydration, and overall drought response. Physiological parameters such as malondialdehyde (MDA), proline (Pro), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were measured. In addition, transcriptome sequencing of the roots of 'DJY-DE-1' and 'Bruno' at 0, 4, and 8 days was performed to identify differentially expressed genes (DEGs). Then, the Weighted Gene Co-expression Network Analysis (WGCNA) algorithm was employed for module construction. The core steps of this algorithm involve calculating the similarity between genes to construct a gene clustering tree. In the constructed gene clustering tree, each branch represents an independent module. To more precisely delineate these modules, a dynamic tree cutting method was utilized to slice the gene clustering tree. To further quantify the co-expression similarity among the modules, the module eigengenes (MEs) for each module were calculated, and these eigengenes were then used to merge modules that exhibited similarity. Validation of key genes was conducted using quantitative real-time PCR (qRT-PCR). **【Results】** Significant differences in drought responses were observed between the materials. 'Bruno' exhibited early and severe symptoms of drought stress, with noticeable leaf wilting by day 4 (S3), and widespread dehydration by day 8, with a drought index of 87%, the highest among all cultivars. In contrast, 'DJY-DE-1' showed delayed drought symptoms, with minimal wilting and a low drought index of 33%, indicating superior drought tolerance. The intermediate cultivars, 'XD-GZ-7' and 'XD-RZ-1', displayed moderate wilting and dehydration, with drought indices of 67% and 60%, respectively. Physiological measurements supported these observations. 'Bruno' had significantly higher MDA levels under drought stress, indicating greater lipid peroxidation and cellular damage. Conversely, the more drought-tolerant cultivars, especially 'DJY-DE-1', showed elevated levels of proline and higher activities of antioxidant enzymes (SOD and CAT), suggesting better protection against oxidative damage. A fuzzy membership function analysis ranked the cultivars' drought tolerance as follows: DJY-DE-1 > XD-RZ-1 > XD-GZ-7 > Bruno, which was consistent with the phenotypic and physiological data. Transcriptome analysis identified 435,047 transcripts across the three time points, with 102,588, 100,951, and 104,974 DEGs identified at 0, 4, and 8 days, respectively. These DEGs revealed significant expression differences between the drought-tolerant 'DJY-DE-1' and the drought-sensitive 'Bruno'. Validation of eight highly expressed DEGs using qRT-PCR confirmed the accuracy of the transcriptome data. Gene Ontology (GO) analysis showed that the DEGs were enriched in processes related to cellular metabolism, energy, and stress responses. KEGG pathway analysis indicated that these DEGs were involved in key pathways such as signal transduction, carbohydrate metabolism, and protein folding, which are critical for maintaining cellular homeostasis under drought stress. Weighted Gene Co-expression Network Analysis (WGCNA) further identified five key DEGs (TRINITY\_DN11629\_c0\_g1, TRINITY\_DN257031\_c0\_g1, TRINITY\_DN3814\_c0\_g1, TRINITY\_DN9194\_c0\_g1 and TRINITY\_DN16120\_c0\_g1) as potential regulators of drought tolerance, offering valuable targets

for future genetic improvement. 【Conclusion】 This study employed a comprehensive approach, integrating physiological and transcriptomic data, to explore the mechanisms of drought tolerance in kiwifruit. The findings provide important insights into the molecular basis of drought response and pave the way for breeding and genetic strategies to enhance drought resistance in kiwifruit. The identification of key drought-responsive genes highlights potential avenues for improving crop adaptation to changing environmental conditions.

**Key words:** Kiwifruit, Drought stress, physiological mechanism, Transcriptome

猕猴桃作为一种肉质根类果树，其根系含水量高且分布较浅，导致猕猴桃对于干旱环境尤为敏感，对土壤水分管理的要求也较其他果树更为苛刻。猕猴桃的叶片肥大，还拥有发达的输导组织和气孔，这些特性使得其叶面蒸腾作用强烈，耗水量极大<sup>[1]</sup>，水分亏缺会严重影响猕猴桃的产量和品质。

干旱胁迫下，植物会通过减少水分散失以及提高水分利用率来维持正常生长所需水分。植物通过大量积累脯氨酸、可溶性糖、可溶性蛋白以及无机离子等渗透调节物质降低细胞渗透势，从而降低水势，稳定膜结构和大分子结构表面的水化层，提高水分利用率，从而提高植物在干旱胁迫下的耐受力<sup>[2-4]</sup>。干旱胁迫促使植物体内会产生过量的活性氧自由基，由于活性氧具有极强的氧化性，为了维持植物正常生理代谢，体内有一套减轻和消除活性氧自由基的保护系统。植物保护系统包括酶促清除系统和非酶促清除系统<sup>[5]</sup>。酶促清除系统主要包括过氧化氢酶（CAT）、超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化物酶（POD）、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、抗坏血酸过氧化物酶（APX）等<sup>[6]</sup>，这些抗氧化酶之间相互协调，维持植物体内氧化-抗氧化平衡，从而保障植物正常的生命活动<sup>[7]</sup>。

受干旱胁迫诱导表达的基因，根据其功能特性，可被划分为两大类。第一类是功能蛋白基因，这类基因编码的蛋白质在植物抗旱机制中发挥着直接的防护作用，包括渗透物质合成酶、糖代谢调节基因、抗氧化保护剂基因以及转运蛋白基因等多个方面<sup>[8-9]</sup>。如相较于其他不耐旱的砧木品种，苹果矮化砧木 SH6 在遭受干旱胁迫时，其叶片中的超氧化物歧化酶基因 SOD1、抗坏血酸过氧化物酶基因 APX1、脱氢抗坏血酸还原酶基因 DHAR2 以及过氧化氢酶基因 CAT1 的表达量会显著上调，展现出更强的表达活性<sup>[10]</sup>。第二类基因则主要参与调控干旱胁迫下的基因表达或信号转导过程，主要为转录因子<sup>[11]</sup>。以 ZmCCT 为例，它能够与膜蛋白 ZmFra a 1、泛素连接酶 ZmWIPF2 以及 IAA 家族的转录因子 ZmAux/IAA8 发生相互作用，从而增强 IAA 的合成，并进一步调控下游靶标基因的表达，以此来调节玉米的抗旱性能<sup>[12]</sup>。

本研究以具有不同抗旱能力的猕猴桃种质资源为研究对象，通过综合研究分析各猕猴桃资源在干旱胁迫下的植株表型、旱害指数，评价不同猕猴桃类型的抗旱能力差异；通过测定不同猕猴桃类型干旱胁迫下的叶片丙二醛、过氧化氢含量、过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活性等生理指标，解析抗旱的生理基础；进一步以猕猴桃资源根系为研究对象，通过转录组测

序技术挖掘抗旱基因的。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料

供试材料保存于国家西南特色园艺作物种质资源圃猕猴桃分圃，分别为美味猕猴桃 (*Actinidia deliciosa*) ‘Bruno’，对萼猕猴桃 (*A. valvata*) ‘DJY-DE-1’、葛枣猕猴桃 (*A. polygama*) ‘XD-GZ-7’和软枣猕猴桃 (*A. arguta*) ‘XD-RZ-1’。

### 1.2 模拟干旱处理

对猕猴桃幼苗每天浇灌 600 mL 的 25% PEG-6000 溶液进行模拟干旱胁迫，若底部托盘有渗出液则倒回营养钵中。实验于干旱胁迫后第 0 d、2 d、4 d、6 d、8 d 分别取猕猴桃自上而下第 5-6 片完全叶，用纯净水洗净后将表面残留纯水吸拭干净，立即放置于液氮中，保存于超低温 (-80°C) 冰箱内，后续进行相关指标测定。

### 1.3 旱害指数调查

从干旱胁迫开始，观察猕猴桃砧木叶片变化。评价标准主要参考樊卫国<sup>[13]</sup>等在野生梨耐旱性的旱害分级标准，根据猕猴桃干旱胁迫下的植株形态变化，将旱害分为以下等级：0 级植株正常，无明显差异；1 级植物叶片发生轻度萎蔫；2 级，植株叶片发生中度萎蔫；3 级，植株叶片发生重度萎蔫（植株叶片发生全株萎蔫）；4 级，植株叶片严重萎蔫且约 1/3 叶片干枯；5 级，植株叶片有叶片干枯现象并有伴随脱落。旱害指数= $\Sigma$ （代表级值×株数）/（最高级值×处理总株数）×100%。

### 1.4 生理指标测定

MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸法、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量测定采用过氧化氢-四氯化钛反应方法、Pro 含量测定采用茚三酮-磺基水杨酸法方法、SOD 含量测定采用氮蓝四唑(NBT)法、CAT 含量测定采用双氧水法。

### 1.5 转录组测序

以干旱胁迫第 0、4、8 天的‘DJY-DE-1’和‘Bruno’根系为样本，进行转录组测序，每个处理 3 次生物学重复，共计 18 个样本。转录组测序由上海派森诺生物科技股份有限公司完成。利用无参考基因组进行转录组分析，首先对原始数据进行过滤，将带接头、长度小于 50bp、序列平均质量在 Q20 以下的 Reads 进行去除，对得到的高质量序列进行从头拼接得到转录本序列，对转录本进行聚类，挑选最长的转录本作为 Unigene，最后用 Unigene 进行后续 GO 和 KEGG 分析。采用 DESeq 对基因表达进行差异分析，表达差异倍数  $|\log_2\text{FoldChange}| > 1$ ，显著性  $P\text{-value} < 0.05$  为筛选差异表达基因。

### 1.6 差异表达基因的实时荧光定量 PCR

使用 RNAPrep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取猕猴桃根系 RNA，利用 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR 试剂盒反转录合成 cDNA，使用 HiScript II Q RT SuperMix 进行实时荧光定量 PCR 反应。反应体系为：cDNA 模板 1  $\mu\text{L}$ ，2×HiScript II Q RT

SuperMix 10  $\mu\text{L}$ ，上下游引物（表 1）各 0.5  $\mu\text{L}$ ，ddH<sub>2</sub>O 8  $\mu\text{L}$ ，仪器为荧光 PCR 仪 480，利用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法计算基因的相对表达量。

表 1 实时定量 PCR 反应中各基因的引物序列

Table 1 Primers sequence for quantitative real-time PCR reaction

基因名称	正向引物	反向引物
Gene names	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
<i>AcAld</i>	ACCTGATCACCTCCTCCTCC	TGCGAACCCCTTCTTTGTGT
<i>AcRAP2-4</i>	CCAGCCCACTTCTTACCCAG	GGAGGGACGCTTCTTAGACG
<i>AcEFL</i>	TGGAAAGCGAGAAGGGCAAT	ATGATGGTGAGCTTGCGGAA
<i>AcSus3</i>	TTCCTCCGAGCACACAAACA	ACCCTGTAATTCGGCAGCAA

## 2 结果与分析

### 2.1 干旱胁迫下猕猴桃植株表型及早害指数分析

利用 25% PEG-6000 模拟干旱胁迫对 4 个猕猴桃材料进行处理，结果表明，‘Bruno’在处理后的第 4 天即出现明显的叶片失水和下垂现象。随着干旱胁迫时间的延长，萎蔫程度逐渐加重，并在第 6 天时植株基部叶片出现干枯，第 8 天时整株叶片均已干枯。‘XD-GZ-7’在干旱胁迫的第 4 天时叶片开始下垂，第 8 天基部叶片边缘出现干枯现象。‘XD-RZ-1’在第 6 天表现出叶片下垂，第 8 天基部叶片开始萎蔫。而‘DJY-DE-1’虽然在第 8 天出现明显下垂，但并未发生叶片萎蔫，其受干旱胁迫的损伤程度低于其他品种（图 1）。

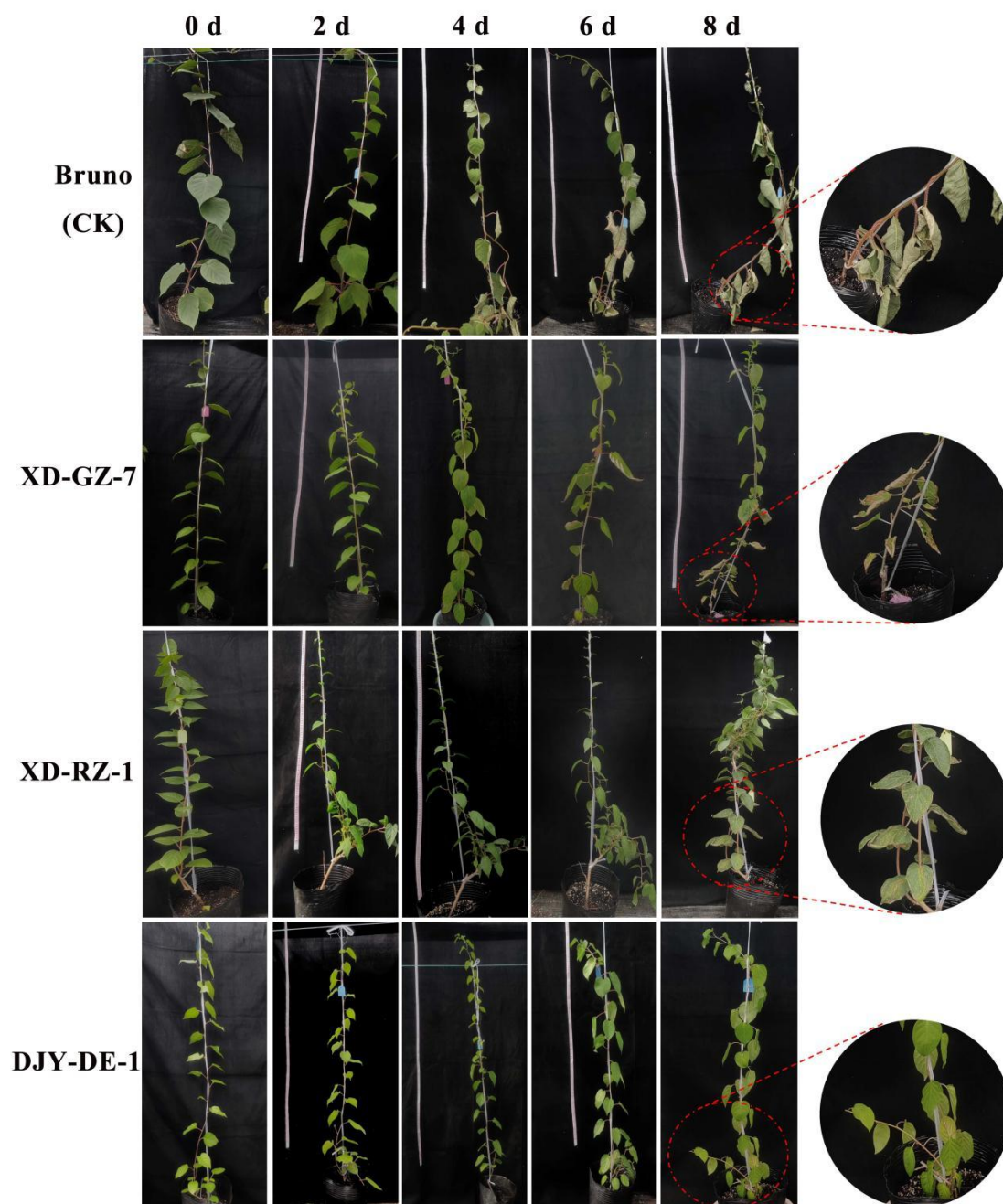


图 1 干旱胁迫下猕猴桃植株表型的变化

对 4 种猕猴桃材料在干旱胁迫下的旱害指数进行统计分析, 结果表明各材料的旱害指数均随胁迫时间的延长持续升高。第 8 天时, 旱害指数从高到低依次为 Bruno(87%)、XD-GZ-7(67%)、XD-RZ-1(60%) 和 DJY-DE-1(33%) (表 2)。

表 2 4 种猕猴桃材料在各时期的旱害指数

Table 2 Drought injury index of four kiwifruit in each period

试验材料	旱害指数 Drought index (%)
------	------------------------

Genotypes	0 d	2 d	4 d	6 d	8 d
Bruno	0%	20%	47%	60%	87%
XD-GZ-7	0%	20%	27%	40%	67%
XD-RZ-1	0%	13%	20%	40%	60%
DJY-DE-1	0%	0%	13%	20%	33%

## 2.2 干旱胁迫下猕猴桃叶片生理指标的变化

随着干旱时间的延长, ‘Bruno’和‘XD-GZ-7’叶片中的MDA含量持续性升高。其中, ‘Bruno’叶片中的MDA在干旱胁迫第4d时相比0d增加了113.79%, 而XD-GZ-7’在干旱胁迫第6d时相比0d增加了74.48%。‘XD-RZ-1’出现先升高后降低再升高的趋势, ‘DJY-DE-1’出现先下降后上升再下降最后上升的趋势, 且变化相对平缓, 最后基本恢复到干旱胁迫前的水平(图2A)。随着干旱的加剧, ‘DJY-DE-1’和‘XD-RZ-1’体内的脯氨酸含量一直呈上升趋势, 其中, ‘DJY-DE-1’干旱胁迫8d相比0d升高了1.68倍, 而‘XD-RZ-1’干旱胁迫8d相比0d升高了2.53倍。‘XD-GZ-7’随着干旱时间的持续, 脯氨酸呈先升高后下降的趋势。‘Bruno’体内的脯氨酸随干旱时间的延长呈先升高后下降的趋势, 并且在干旱胁迫4d达到最高峰, 为对照的2倍。从干旱胁迫4d快速下降, 到干旱胁迫8d时低于干旱处理前(图2B)。

随着干旱胁迫时间的延长, ‘Bruno’叶片H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的含量呈现持续上升趋势; ‘XD-GZ-7’和‘XD-RZ-1’叶片H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的含量先上升后下降再上升; ‘DJY-DE-1’随着干旱时间的延长, 叶片H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的含量相对稳定, 除干旱胁迫2d和4d稍有升高外, 其余时间均无显著变化(图2C)。  
‘Bruno’和‘XD-GZ-7’的叶片SOD酶活性呈先上升后下降趋势, 分别在干旱胁迫4d和6d上升到最大值, 为598 U/g FW和660 U/g FW。‘DJY-DE-1’叶片SOD酶活随干旱时间的延长持续升高, 干旱胁迫8d升高到最大值, 为0d的1.6倍(图2D)。随着干旱的加剧, ‘Bruno’、‘XD-RZ-1’和‘XD-GZ-7’的叶片CAT酶活性均呈先上升后下降趋势, ‘Bruno’和‘XD-RZ-1’在干旱胁迫4d上升到最大值, 分别为27.56 μmol/min/g FW和35.39 μmol/min/g FW; ‘XD-GZ-7’在干旱胁迫6d达到最大值, 为25.11 μmol/min/g FW。而‘DJY-DE-1’CAT活性在整个干旱胁迫下均无显著变化(图2E)。

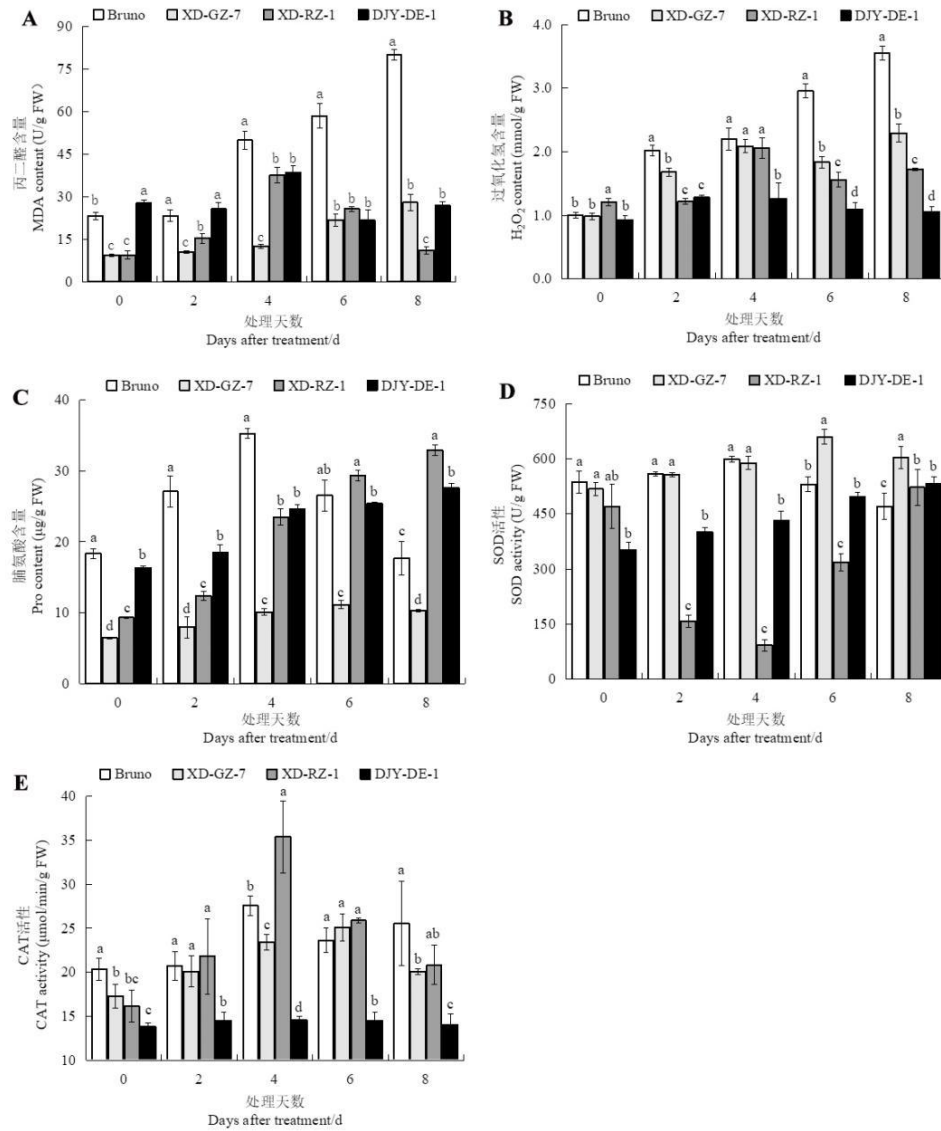


图 2 干旱胁迫下猕猴桃生理指标的变化

注：柱形图中同一时期不同的小写字母代表不同处理之间具有显著性差异 ( $p < 0.05$ )

### Fig.2 Changes in physiological indicators of different kiwifruit under drought stress

Note: Different lowercase letters in the bar graph for the same period represent significant differences between treatments ( $p < 0.05$ ).

### 2.3 转录组数据质量分析

本研究选取了最耐受干旱和干旱敏感的‘DJY-DE-1’和‘Bruno’在干旱处理不同时期的根系进行转录组测序分析，旨在从分子水平探究猕猴桃抗旱的机理。将转录组测序得到的图像文件转化生成 FASTQ 的原始数据 (Raw Data)，对每个样品的原始数据分别进行统计，文库的 Q20 值在 99.2%以上，Q30 值在 97.6%以上 (表 3)，说明测序质量可靠，可进行下一步分析。



表 3 转录组数据质量评估

Table 3 Quality evaluation of offline data

Sample	Reads No.	Bases (bp)	Q30 (bp)	Q20 (%)	Q30 (%)
BruS1_1	44341962	6651294300	6502425726	99.22	97.76
BruS1_2	59123456	8868518400	8689403518	99.3	97.98
BruS1_3	49468096	7420214400	7268934221	99.28	97.96
BruS3_1	59189538	8878430700	8686591373	99.25	97.84
BruS3_2	51325616	7698842400	7536688151	99.26	97.89
BruS3_3	55372102	8305815300	8131526569	99.27	97.9
BruS5_1	40122892	6018433800	5886023577	99.23	97.8
BruS5_2	52531182	7879677300	7725561346	99.31	98.04
BruS5_3	43078966	6461844900	6333084064	99.29	98.01
C_1S1_1	36395324	5459298600	5326215051	99.17	97.56
C_1S1_2	42874640	6431196000	6271306187	99.14	97.51
C_1S1_3	51263944	7689591600	7509944473	99.2	97.66
C_1S3_1	49236038	7385405700	7223293338	99.26	97.8
C_1S3_2	48394024	7259103600	7097085088	99.23	97.77
C_1S3_3	47742362	7161354300	6999422932	99.23	97.74
C_1S5_1	36183344	5427501600	5307319143	99.23	97.79
C_1S5_2	43566458	6534968700	6382416226	99.19	97.67

注：Bru 表示 Bruno，C\_1 表示 DJY-DE-1，S1、S3、S5 分别表示干旱胁迫第 0、4、8 天，三次重复。

#### 2.4 差异表达基因筛选

在进行差异基因表达分析之前，利用皮尔逊相关系数对样品间基因表达水平的相关性进行分析，如图 3A 所示，本研究样品的相关系数均为 1，说明样品间具有极强相关性。将得到的 Clean reads 利用 Trinity 进行从头组装，总共获得 435047 个转录本。根据转录组数据分析筛选出两种猕猴桃砧木品种的干旱响应差异表达基因如图 3-14 所示，两种猕猴桃砧木品种在 S1 时期差异表达基因共有 102588 个，其中，下调表达基因 50895 个，上调表达基因 51693 个；在 S3 时期差异表达基因共有 100951 个，其中，下调表达基因 49058 个，上调表达基因 51893 个；在 S5 时期差异表达基因共有 104974 个，其中，下调表达基因 57385 个，上调表达基因 47589 个（图 3B）。

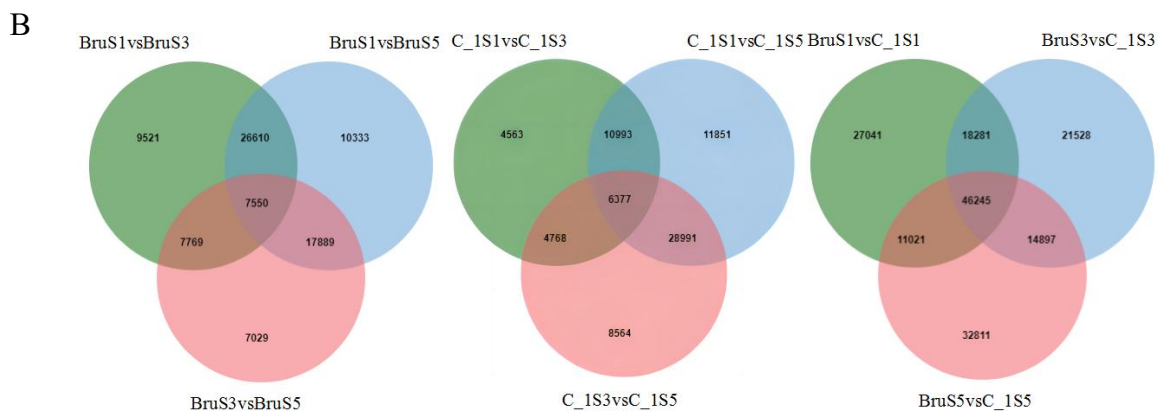
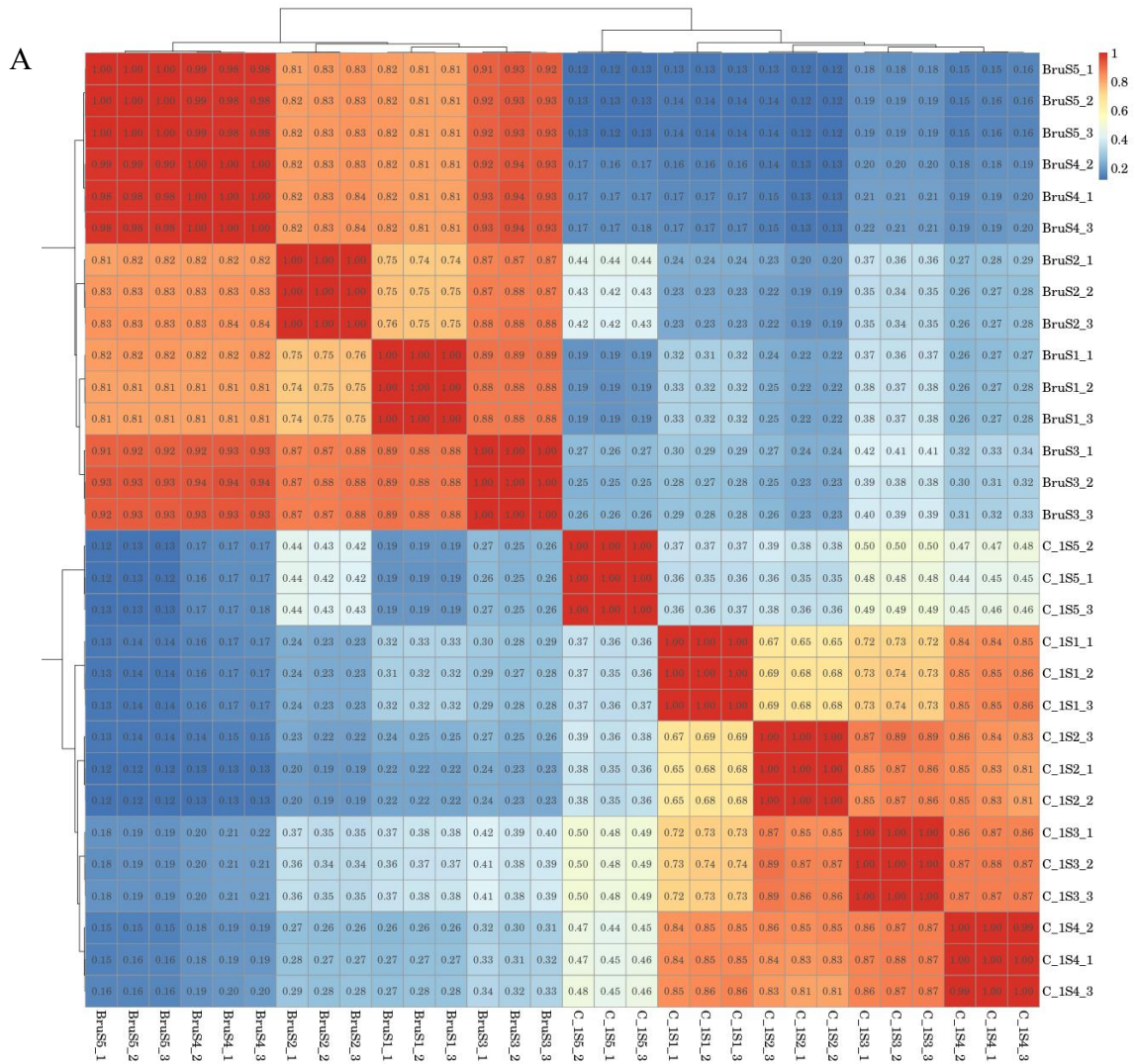


图3 样品相关性检验及差异表达基因分析

Fig. 3 Sample correlation test and differentially expressed genes analysis

### 2.5 差异表达基因的 GO 和 KEGG 分析

针对差异基因进行 GO 功能分类。结果如图 4A 所示，在生物学过程 (biological process)、细胞成分 (cellular component) 和分子功能 (molecular function) 三个 GO 功能分类中，

Unigenes 被划分到 61 个 GO 亚类中，富集在生物过程中‘cellular process’、‘metabolic process’和‘developmental process’的差异基因较多；细胞组分方面‘cell’、‘cell part’和‘membrane’富集到较多的差异基因；分子功能中的‘binding’、‘catalytic activity’和‘transporter activity’部分富集到较多的差异基因。

为进一步揭示差异基因的生物功能，探索干旱胁迫下猕猴桃砧木资源的代谢调控网络，对差异基因进行 KEGG 富集分析，结果如图 4B 所示，富集到较多差异基因的通路为信号转导（Signal transduction）、运输和分解代谢（Transport and catabolism）、糖代谢（Carbohydrate metabolism）、折叠、分类和降解（Folding, sorting and degradation）、氨基酸代谢（Amino acid metabolism）等。

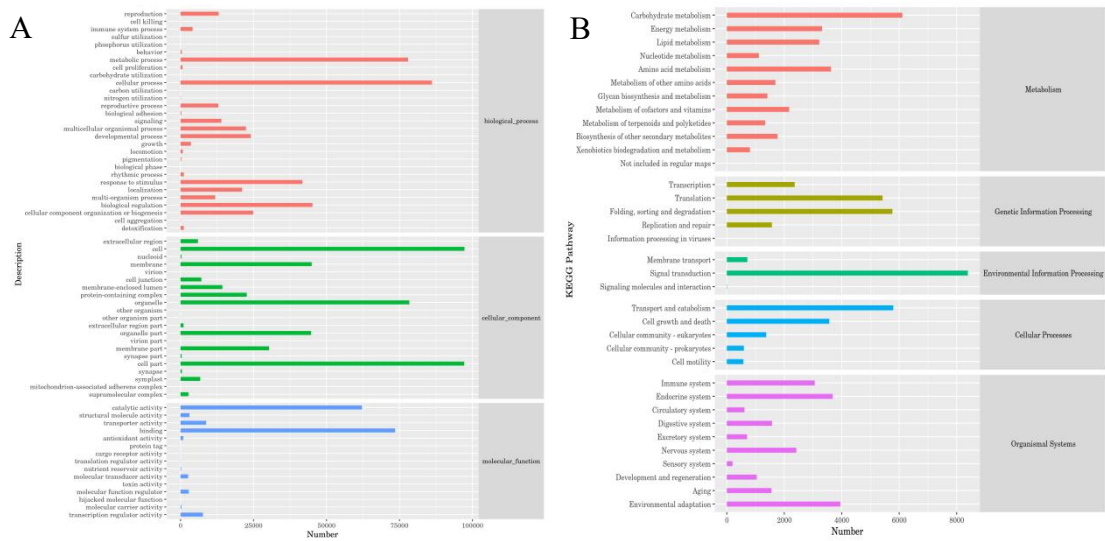


图 4 差异表达基因的 GO 和 KEGG 分析

Fig.4 GO and KEGG analysis of differentially expressed genes

## 2.6 加权基因共表达网络分析

本研究采用加权基因共表达网络分析（WGCNA）算法来进行模块的构建，如图 5 所示，在干旱胁迫的背景下，基于拓扑重叠的不同基因聚类树状图，并结合特定的模块颜色，鉴定出 17 个不同的模块，筛选出与干旱高度相关的两个模块 MEgreenyellow 和 MEpurple，结合 GO 分析最终筛选出 4 个可能参与根系干旱响应差异基因 TRINITY\_DN11629\_c0\_g1（Ethylene-responsive transcription factor RAP2-4 like）、TRINITY\_DN257031\_c0\_g1（Sucrose synthase 3）、TRINITY\_DN3814\_c0\_g1（Protein EARLY FLOWERING like）和 TRINITY\_DN16120\_c0\_g1（Alpha-dioxygenase）。

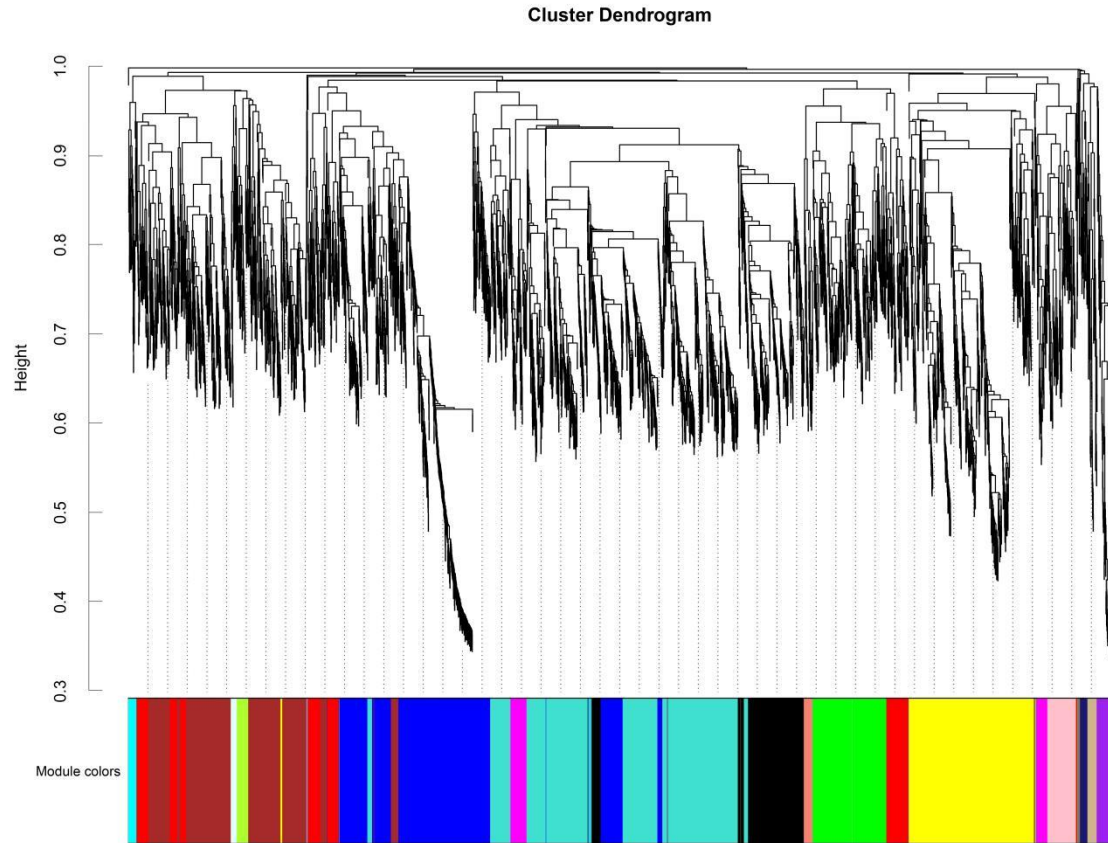


图 5 WGCNA 分析结果

Fig.5 Results of WGCNA analysis

### 2.7 差异表达基因的荧光定量 PCR 分析

转为了进一步验证 RNA-seq 结果，结合 WGCNA 分析，对筛选得到的 4 个基因采用 qRT-PCR 的方法对测序的样品进行了验证。qRT-PCR 结果表明，4 个候选基因的表达量在干旱胁迫后 S3 和 S5 时期均呈升高趋势，与 RNA-seq 结果相吻合，表明 RNA-seq 获得的基因相对表达水平结果可靠。



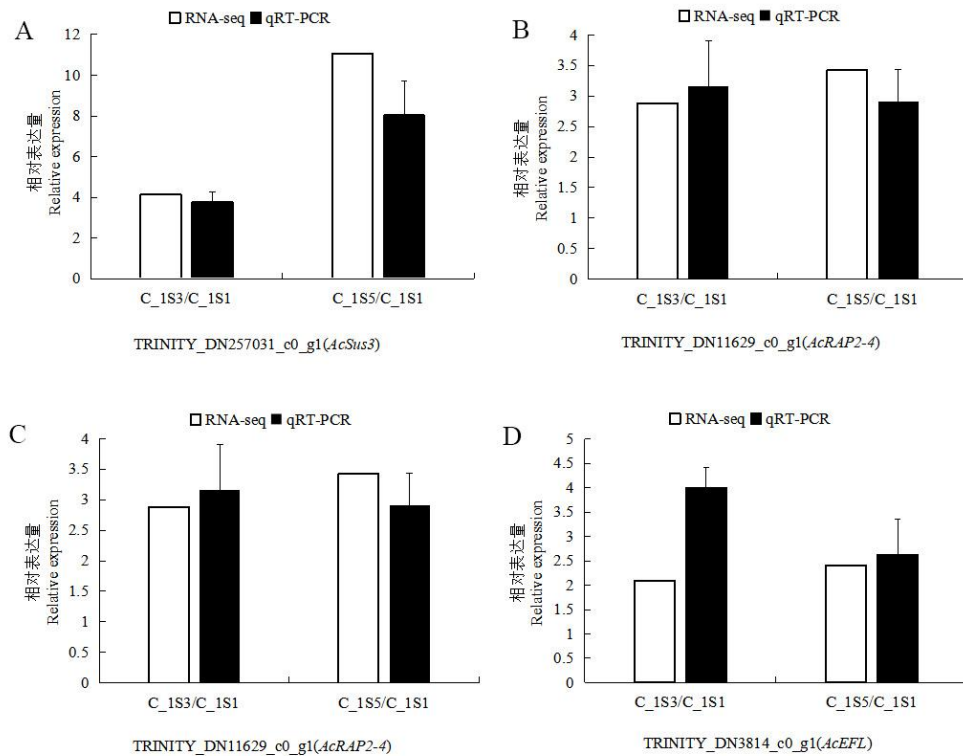


图 6 干旱胁迫下差异表达基因的荧光定量 PCR 分析  
Fig.6 qRT-PCR analysis of differentially expressed genes

### 3 讨论

植物应对干旱胁迫是个动态的过程，受损情况取决于干旱胁迫的持续时长<sup>[13]</sup>，为了适应干旱胁迫，植物发生生理生化的变化。在干旱胁迫下，植物细胞膜脂过氧化加剧，对细胞结构造成破坏，过氧化氢（ $H_2O_2$ ）和丙二醛（MDA）是膜脂过氧化作用的重要产物，反应细胞膜受伤害程度。大量研究表明，干旱胁迫前  $H_2O_2$  和 MDA 在植物体内含量较低<sup>[14]</sup>。本试验中，在干旱胁迫下不同种质猕猴桃呈现出不同的变化趋势，与耐旱性呈正相关。随着干旱胁迫的加剧，干旱敏感的品种  $H_2O_2$  和 MDA 含量持续升高，意味着细胞膜透性一直在增强，抗旱性强的品种叶片中  $H_2O_2$  和 MDA 含量在后期逐渐下降，可能是自由基清除系统发挥了作用。本研究中对干旱越敏感的品种，有害物质的含量越高于干旱处理前，抗性越强的品种，有害物质的含量越接近于干旱处理前，这与魏桦<sup>[14]</sup>的研究结果一致。

在受到干旱胁迫时，植物会通过渗透调节，降低渗透势，从而适应干旱环境<sup>[15]</sup>。脯氨酸（Pro）含量的增加可以降低植物的脱水能力，保持植物体内水分平衡，提高植物抗旱性<sup>[16]</sup>。本研究中，干旱敏感的猕猴桃的 Pro 含量先升高后降低，抗性强的猕猴桃 Pro 含量持续升高，这表明干旱胁迫会抑制干旱敏感的品种，降低植物的耐旱性。这与胡晓健<sup>[17]</sup>等人在马尾松幼苗中的研究一致，汪娅琴<sup>[18]</sup>等人也在蓝莓上证实了这一观点。

植物除了会通过渗透调节物质来响应干旱胁迫，还会调动酶促保护系统相互协作，共同清除自由基，SOD 通过将  $H_2O_2$  分解为  $O^{\cdot-}$  从而防御自由基对细胞产生破坏，产生的  $O^{\cdot-}$  再由 CAT 进一步消除<sup>[14]</sup>。本研究中大部分猕猴桃种质资源 SOD 呈现先上升后下降的趋势，说明在 SOD 和 CAT 在前中期的干旱胁迫中起作用，激活了抗旱性保护机制，酶活性增加，协同清理自由基，在接受外界环境变化刺激以后，用以抵御外界逆境环境变化<sup>[19]</sup>。在后期，干旱敏感的猕猴桃砧木 SOD 和 CAT 活性下降，说明随着干旱胁迫时间的延长，活性氧等有害物质持续积累，超出了植物三大保护酶的清除能力，植物体内环境平衡破坏，酶活性降低。

本研究鉴定到的 Ethylene-responsive transcription factor RAP2-4 like 属于 AP2/ERF 转录因子家族，为植物所特有。AP2/ERF 转录因子 AP2 结构域能够识别干旱 (DRE/CRT) 和冷诱导 (A/GCCGAC) 响应元件，对植物抵抗干旱和低温等非生物胁迫至关重要<sup>[20-21]</sup>。在拟南芥中，RAP2.4 被证实能够通过激活叶片表皮蜡质的生物合成途径提高植株对干旱胁迫的耐受性<sup>[22]</sup>。与拟南芥 RAP2.4 序列同源性最高的 *M. truncatula* WXP1 在转基因苜蓿中同样表现出更强的耐旱性<sup>[23]</sup>。蔗糖合酶 3 (sucrose synthase 3) 广泛参与植物对干旱胁迫响应的过程，Lu 等人的研究表明，高粱在 10% PEG 6000 模拟干旱处理时，其 *SbSusy3* 基因的表达量在最初的 12 小时内持续上升<sup>[24]</sup>。同样地，大麦的 *HvSus3* 基因在干旱胁迫的第 10 天与对照相比，表达量上调了约 4 倍<sup>[25]</sup>。此外，Chen 等人的研究揭示，在干旱胁迫条件下，黄瓜的 *CsSus3* 基因表达上调，不仅增强了蔗糖合酶的活性，还促进了己糖的积累。这一过程可能通过加速植物生长和清除活性氧 (ROS) 来增强黄瓜的抗旱能力<sup>[26]</sup>。植物 Alpha-dioxygenase 可用于产生脂质衍生分子，从而保护植物组织免受氧化应激和细胞死亡<sup>[27]</sup>，而 EARLY FLOWERING like 主要参与植物的开花过程<sup>[28]</sup>，本研究为上述基因在抗旱中的功能提供了新的视角。

## 4 结论

4 份材料中，对萼猕猴桃 (*A. valvata*) ‘DJY-DE-1’ 抗旱能力最强，TRINITY\_DN11629\_c0\_g1 (Ethylene-responsive transcription factor RAP2-4 like)、TRINITY\_DN257031\_c0\_g1 (Sucrose synthase 3)、TRINITY\_DN3814\_c0\_g1 (Protein EARLY FLOWERING like) 和 TRINITY\_DN16120\_c0\_g1 (Alpha-dioxygenase) 参与其抗旱过程。

### 参考文献 References:

- [1] 何科佳, 王中炎, 王仁才. 高温干旱强光对猕猴桃生长发育的影响及其生理基础[J]. 湖南农业科学, 2005, (03): 42-44.  
HE Kejia, WANG Zhongyan, WANG Rencai. Effects of high temperature, drought and strong light on growth and development of kiwifruit and its physiological basis[J]. Hunan Agricultural Science, 2005, (03): 42-44.
- [2] 冯瑛. 樱桃砧木抗旱性评价及应对干旱胁迫响应的生理和分子机制[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2019.  
FENG Ying. Evaluation of drought resistance of cherry rootstock and physiological and molecular mechanisms of response to drought stress[D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2019

- [3] 周兴元, 曹福亮. 遮荫对假俭草抗氧化酶系统及光合作用的影响[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2006, 30(3): 32-36.
- ZHOU Xingyuan, CAO Fuliang. Effects of shading on antioxidant enzyme system and photosynthesis of pseudofrugals[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science), 2006, 30(3): 32-36.
- [4] 曹潘攀. 蝴蝶花对干旱和遮荫胁迫的生理响应研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2019.
- CAO PanPan. Physiological response of Iris flower to drought and shade stress[D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2019.
- [5] CAGRI G, NUR F A, BUSRA A. Polyamine, 1, 3-diaminopropane, regulates defence responses on growth, gas exchange, PSII photochemistry and antioxidant system in wheat under arsenic toxicity[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2023, 201: 107886.
- [6] 杨秋悦, 罗影子, 杨洋, 阮宝丽, 黄明进. 干旱胁迫对铁皮石斛生理及不同部位活性成分的影响[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(13): 142-149.
- YANG Qiuyue, LUO Shadow, YANG Yang, RUAN Baoli, HUANG Mingjin. Effects of drought stress on physiology and active components of *Dendrobium officinale*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2023, 51(13): 142-149.
- [7] 唐佳莉, 姬新颖, 郑旭, 李敖, 张俊佩. 盐胁迫下东部黑核桃生理生化与营养器官结构的动态响应[J]. 果树学报, 2024, 41(02): 294-313.
- TANG Jiali, JI Xinxin, ZHENG Xu, LI Ao, ZHANG Junpei. Dynamic response of physiology, biochemistry and vegetative organ structure of eastern Black walnut under salt stress[J]. Journal of Fruit Science, 2024, 41(02) : 294-313.
- [8] XIAO BZ, CHEN X, XIANG CB, TANG N, ZHANG QF, XIONG LZ. Evaluation of seven function-known candidate genes for their effects on improving drought resistance of transgenic rice under field conditions[J]. Molecular Plant, 2009, 2(1): 73-83.
- [9] WANG S, LIANG D, LI C, HAO Y, MA F, SHU H. Influence of drought stress on the cellular ultrastructure and antioxidant system in leaves of drought-tolerant and drought-sensitive apple rootstocks[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2012, 51: 81-89.
- [10] 李兴亮, 张军科, 李民吉, 周贝贝, 周佳, 张强, 魏钦平. 不同类型苹果矮化砧木抗旱评价与基因表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2018, 26(03): 401-409.
- LI Xingliang, ZHANG Junke, LI Minji, ZHOU Beibei, ZHOU Jia, ZHANG Qiang, WEI Qiping. Evaluation and gene expression analysis of different apple (*Malus × domestica*) dwarfing stocks on drought resistance[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2018, 26(03): 401-409.
- [11] SAIBO NJ, LOURENÇO T, OLIVEIRA MM. Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. Annals of Botany. 2009, 103(4): 609-623.
- [12] ZHANG Z, QU J, LU M, ZHAO X, XU Y, WANG L, LIU Z, SHI Y, LIU C, LI Y, WANG C, XU M, NAN Z, CAO Q, PAN J, LIU W, LI X, SUN Q, WANG W. The maize transcription factor CCT regulates drought tolerance by interacting with Fra a 1, E3 ligase WIPF2, and auxin response factor Aux/IAA8[J]. Journal of Experimental Botany, 2024, 75(1): 103-122.
- [13] 樊卫国, 李迎春. 部分梨砧木的叶片组织结构与抗旱性的关系[J]. 果树学报, 2008, (01): 17-21.
- FAN Weiguo, LI Yingchun. Relationship between leaf structure and drought resistance of some pear rootstocks[J]. Journal of Fruit Science, 2008, (01): 17-21.
- [14] 魏桦. 不同猕猴桃种质资源抗旱性及抗寒性综合评价[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2021.

WEI Hua. Comprehensive evaluation of drought and cold resistance of different kiwifruit germplasm resources [D]. Xiayang: Northwest A&F University, 2021.

[15] 贾鑫, 孙窗舒, 李光跃, 李国斌, 陈贵林. 干旱胁迫对蒙古黄芪生长和生理生化指标及其黄芪甲苷积累的影响[J]. 西北植物学报, 2018, 38(03): 501-509.

JIA Xin, SUN ChuanShu, LI Guangyue, LI Guobin, Chen Guilin. Effects of drought stress on growth, physiological and biochemical indexes and accumulation of *Astragaloside* in Mongolia[J]. Acta Botanica Sinica, 2018, 38(03): 501-509.

[16] 杨艳, 陈景震, 吉悦娜, 陈韵竹, 李培旺, 叶传财, 李力, 潘雨虹, 夏栗, 李党训. 紫色土干旱胁迫对栀子生长及生理的影响[J]. 湖南林业科技, 2023, 50(05): 28-33.

YANG Yan, CHEN Jingzhen, JI Yuena, CHEN Yunzhu, LI Peiwang, YE Chuancai, LI Li, PAN Yuhong, XIA Li, LI Dangxun. Effects of purple soil drought stress on growth and physiology of *Gardenia gardenia* [J]. Hunan Forestry Science and Technology, 2023, 50(05): 28-33.

[17] 胡晓健, 杨春霞, 谭世才, 谷振军, 唐山, 喻方圆. 干旱胁迫对不同种源马尾松幼苗中脯氨酸及内源激素含量的影响[J]. 南方林业科学, 2020, 48(06): 24-28+53.

HU Xiaojian, YANG Chunxia, TAN Shicai, GU Zhenjun, TANG shan, YU Fangyuan. Effects of drought stress on the contents of proline and endogenous hormone in Masson Pine seedlings of different provenance[J]. Southern Forestry Science, 2020, 48(06): 24-28+53.

[18] 汪娅琴, 郭小兰, 李培培, 王德炉. 4个兔眼蓝莓品种对持续干旱的生理响应及其抗旱性评价[J]. 经济林研究, 2021, 39(03): 186-196.

WANG Yaqin, GUO Xiaolan, LI Peipei, WANG Delu. Physiological response and drought resistance evaluation of 4 rabbit eye blueberry varieties to persistent drought[J]. Economic Forestry Research, 2021, 39(03): 186-196.

[19] 陈钊. PEG模拟干旱胁迫对福建山樱花种子萌发及幼苗生理的影响[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2022. CHEN Chuan. Effects of PEG simulated drought stress on seed germination and seedling physiology of *Prunus campanulata* in Fujian[D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2022.

[20] XIE ZL, NOLAN T, JIANG H, TANG BY, ZHANG MC, LI ZH, YIN YH. The AP2/ERF transcription factor TINY modulates brassinosteroid-regulated plant growth and drought responses in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2019a, 31: 1788-1806.

[21] JIANG W, PAN R, WU C, XU L, ABDELAZIZ ME, OELMULLER R, ZHANG WY. *Piriformospora indica* enhances freezing tolerance and post-thaw recovery in *Arabidopsis* by stimulating the expression of CBF genes[J]. Plant Signaling and Behavior, 2020, 15: 1745472.

[22] YANG SU, KIM H, KIM RJ, KIM J, SUH MC. AP2/DREB transcription factor RAP2.4 activates cuticular wax biosynthesis in *Arabidopsis* leaves under drought[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 895.

[23] ZHANG JY, BROECKLING CD, BLANCAFLOR EB, SLEDGE MK, SUMNER LW, WANG ZY. Overexpression of WXP1, a putative *Medicago truncatula* AP2 domain-containing transcription factor gene, increases cuticular wax accumulation and enhances drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*)[J]. Plant Journal, 2005, 42(5): 689-707

[24] LU Y, HAN S, ZHOU C, CHENG Y, LV Y, ZENG G, ZHANG D, GAO X, HU Y, SHEN X. Molecular identification and expression analysis of five sucrose synthase genes in *Sorghum Bicolor*[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2022, 28(4): 697-707.



- [25] BARRERO-SICILIA C, HERNANDO-AMADO S, GONZÁLEZ-MELENDI P, CARBONERO P. Structure, expression profile and subcellular localisation of four different sucrose synthase genes from barley[J]. *Planta*, 2011, 234(2): 391–403
- [26] CHEN L, ZHENG F, FENG Z, LI Y, MA M, WANG G, ZHAO H. A vacuolar invertase CsVI2 regulates sucrose metabolism and increases drought tolerance in *Cucumis sativus* L[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(1): 176.
- [27] DE LEÓN IP, SANZ A, HAMBERG M, CASTRESANA C. Involvement of the Arabidopsis alpha-DOX1 fatty acid dioxygenase in protection against oxidative stress and cell death[J]. *Plant Journal*, 2002, 29(1): 61-62.
- [28] TIAN M, WU A, ZHANG M, ZHANG J, WEI H, YANG X, MA L, LU J, FU X, WANG H, YU S. Genome-wide identification of the Early Flowering 4 (ELF4) gene family in cotton and silent GhELF4-1 and GhEFL3-6 decreased cotton stress resistance[J]. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12: 686852.