

甜瓜 α -葡萄糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶基因家族鉴定及表达模式分析

梁语珊^{1#}, 张赵杨^{1#}, 岳婷茹¹, 张利超², 杜清洁¹, 王吉庆¹, 肖怀娟¹, 李猛^{1*}

1 河南农业大学 园艺学院, 河南 郑州 450046

2 承德市中药材绿色生态种植技术服务中心, 河北 承德 067000

梁语珊, 张赵杨, 岳婷茹, 张利超, 杜清洁, 王吉庆, 肖怀娟, 李猛. 甜瓜 α -葡萄糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶基因家族鉴定及表达模式分析[J]. 生物工程学报, 2025, 41(2): 791-808.

LIANG Yushan, ZHANG Zhaoyang, YUE Tingru, ZHANG Lichao, DU Qingjie, WANG Jiqing, XIAO Huaijuan, LI Meng. Identification and expression pattern analysis of α -glucosidase and β -glucosidase gene family members in melon[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(2): 791-808.

摘要: 葡萄糖苷酶是生物体糖代谢途径中不可或缺的一类酶。为探讨 α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase, AGLU)和 β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase, BGLU)的生物学功能及表达模式, 对甜瓜基因组中的 2 个基因家族进行鉴定, 对 2 个家族成员的数量、染色体位置、基因结构、亚细胞定位、蛋白保守基序、系统进化等进行分析, 基于启动子顺式作用元件分析和蛋白互作预测模型对其功能进行了初步预测, 并用实时荧光定量聚合酶链式反应(real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR)技术对各成员的基因表达进行分析。结果表明, 甜瓜中 α -葡萄糖苷酶家族共有 5 个成员, 分布于 5 条染色体上, 全部成员均定位于细胞外基质, 氨基酸长度为 899–1 060 aa。甜瓜中 β -葡萄糖苷酶家族共有 18 个成员, 分布于 8 条染色体上, 全部定位于细胞膜或细胞质中, 氨基酸长度为 151–576 aa。qRT-PCR 结果表明, 低温下约 1/2 基因表达受到抑制, 其中 *CmAGLU5* 和 *CmBGLU7* 可能是 2 个家族中响应低温的关键基因。AGLU 和 BGLU 家族基因受脱落酸(abscisic acid, ABA)、高盐和干旱胁迫诱导上调表达, 其中 AGLU 家族中的 *CmAGLU3* 是响应 ABA 和高盐胁迫的关键基因, *CmAGLU4* 是响应干旱胁迫的关键基因; BGLU 家族中 *CmBGLU18* 是响应 ABA 的关键基因, *CmBGLU6* 是响应高盐和干旱胁迫的关键基因。

关键词: 甜瓜; α -葡萄糖苷酶; β -葡萄糖苷酶; 非生物胁迫; 表达模式

资助项目: 国家自然科学基金(32202578); 中国博士后科学基金(2022M711063); 河南省大宗蔬菜产业技术体系岗位专家项目(HARS-22-07-G4)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32202578), the China Postdoctoral Science Foundation (2022M711063), and the Henan Province Bulk Vegetable Industry Technology System Post Expert Project (HARS-22-07-G4).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: limengscience@163.com

Received: 2024-07-30; Accepted: 2024-10-12; Published online: 2024-10-14

Identification and expression pattern analysis of α -glucosidase and β -glucosidase gene family members in melon

LIANG Yushan^{1#}, ZHANG Zhaoyang^{1#}, YUE Tingru¹, ZHANG Lichao², DU Qingjie¹, WANG Jiqing¹, XIAO Huaijuan¹, LI Meng^{1*}

1 College of Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, Henan, China

2 Technology Service Center on Ecological Planting of Chinese Herbal Medicine in Chengde, Chengde 067000, Hebei, China

Abstract: Glucosidases are an indispensable class of enzymes in the sugar metabolism of organisms. To investigate the biological functions and expression patterns of α -glucosidases (AGLUs) and β -glucosidases (BGLUs), we identified the two family members in the genome of melon (*Cucumis melo*). The number, location on chromosomes, gene structure, subcellular localization, conserved motifs, and phylogenetic relationship of the two family members were analyzed. Based on the *cis*-acting elements in the promoter region and protein interaction models, their functions were preliminarily predicted. Furthermore, the gene expression of the two family members was determined by qRT-PCR. The results showed that the melon genome contained five AGLU family members on five chromosomes, and all of the five members were located in the extracellular matrix, with the amino acid sequence lengths ranging from 899 aa to 1 060 aa. The melon genome carried 18 BGLU family members on 8 chromosomes, and all the members were located in the cell membrane or cytoplasm, with the amino acid lengths ranging from 151 aa to 576 aa. The qRT-PCR results showed that the expression of about 50% of the genes was down-regulated upon cold stress. *CmAGLU5* and *CmBGLU7* may be key members of the two families, respectively, in response to cold stress. The expression of all members of the two families was up-regulated under abscisic acid (ABA), high salt, and drought stress. In the AGLU family, *CmAGLU3* was the key gene in response to ABA and high salt stress, while *CmAGLU4* was the key gene in response to drought stress. In the BGLU family, *CmBGLU18* was the key gene in response to ABA, while *CmBGLU6* was the key gene in response to high salt and drought stress.

Keywords: melon; α -glucosidase; β -glucosidase; abiotic stress; expression pattern

α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase, AGLU)是一种淀粉水解酶,主要在细胞外起作用,直接参与淀粉及糖原的代谢途径,主要水解二糖、低聚糖等,能以蔗糖和多聚糖为底物^[1]; β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase, BGLU)存在于自然界大多数植物中,于1837年首次在苦杏仁中发现,主要参与纤维素的代谢以及多种生理生化途径,并且能够参与到植物的新陈代谢中,调节植物

的生长发育^[2]。 α -葡萄糖苷酶在微生物中的研究较多,主要集中在 α -葡萄糖苷酶制备研究、酶的氨基酸序列和结构、催化机理研究和酶的应用开发等^[3]。国内对于 α -葡萄糖苷酶的研究大多数都是针对 α -葡萄糖苷酶抑制剂展开,而关于植物中的 α -葡萄糖苷酶的基因家族及功能的研究较少,目前在植物领域尚未见 α -葡萄糖苷酶基因家族的报道。关于 β -葡萄糖苷酶的研究

主要涉及香气前体转化和生成香气物质等^[4-5], 研究人员先后从黑樱桃^[6]、水稻^[7]、大豆^[8]、木薯^[9]中进行了分离纯化并确定了其功能。目前, 已在拟南芥^[10]、水稻^[11]、陆地棉^[12]、茶树^[13]、白芷^[14]、大豆^[15]中鉴定了 β -葡萄糖苷酶基因家族, 分别有 48、40、53、29、45、42 个成员。在许多植物中, BGLU 家族基因参与细胞壁木质化、酶活性的调控、信号的传导以及激素的活化等生理过程^[16-17]。在茶树中, 大多数 BGLU 基因都响应干旱、茉莉酸甲酯、盐和冷胁迫; 在模式作物中^[18], 拟南芥 19 个 BGLU 成员响应低温, 而水稻 BGLU 家族成员中只有 *BGLU23* 在低温下上调表达; 干旱处理时, 拟南芥 BGLU 家族 12 个成员受干旱胁迫诱导, 而水稻中仅 *BGLU2*、*BGLU6*、*BGLU16*、*BGLU18* 和 *BGLU26* 在干旱胁迫下表达量上调; 在盐处理时, 拟南芥 BGLU 家族成员中 16 个成员上调表达, 而水稻 BGLU 家族大部分基因不能被诱导表达甚至不表达。整体上关于 2 个家族的研究还较少, 在甜瓜中尚未见 2 个家族成员的鉴定及表达分析的报道。

甜瓜(*Cucumis melo*)为葫芦科黄瓜属植物, 是我国传统的夏令水果, 种植面积和产量均为世界第一, 在园艺产业中有着重要的地位^[19]。2012 年甜瓜基因组数据库公布, 为解析甜瓜基因家族提供了基础。本研究在甜瓜基因组中鉴定出 5 个 AGLU 基因家族成员和 18 个 BGLU 基因家族成员, 分析了这 2 个家族成员的基本性质、系统进化关系、基因结构以及启动子上的作用元件等, 进一步利用 qRT-PCR 分析了 2 个家族成员在非生物胁迫中的响应, 以期为进一步解析甜瓜 AGLU 和 BGLU 基因的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以甜瓜品种‘L5283’为实验材料, 挑选颗粒

饱满、大小一致的种子进行温汤浸种和催芽。露白后, 播种于 50 孔穴盘中, 选用草炭: 蛭石: 珍珠岩=3:1:1 的基质栽培, 正常管理。在一叶一心期分苗, 移栽至 7 cm×7 cm 的营养钵中, 置于光照培养箱中培养, 温度为 28 °C/18 °C (12 h/12 h)、相对湿度为 70%、光强度为 30 000 lx。在三叶一心时期进行胁迫处理, 低温处理为 15 °C/6 °C (昼/夜)、盐胁迫处理为 NaCl 300 mmol/L、干旱处理为 15% (W/W) 的 PEG6000、脱落酸 (abscisic acid, ABA) 处理为 ABA 100 μ mol/L, 分别在处理的 0、6、12、24 h 取从下往上数第 3 片功能叶, 迅速置于液氮中, 于 -80 °C 冰箱保存, 用于总 RNA 的提取和 qRT-PCR 表达分析。

1.2 方法

1.2.1 甜瓜 AGLU 和 BGLU 基因家族成员的鉴定

在甜瓜数据库 (<http://cucurbitgenomics.org/>) 中以关键词“ α -glucosidase”“ β -glucosidase”检索, 同时以拟南芥已知的 AGLU 和 BGLU 成员的蛋白序列进行 BLASTP, Num Descriptions 设为 5, Num Alignments 设为 5, e-value 值为 $1e^{-2}$, 合并获得 2 个家族的候选成员; 进一步再利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 和 MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 网站分析 2 个家族候选成员的保守结构域 (PF01055 和 PF00232), 删除不含保守结构域的成员, 并以各成员在染色体上的位置进行命名^[20]。利用 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 对家族成员的氨基酸序列长度、蛋白质相对分子质量、等电点、稳定性、亲水性和脂肪系数等进行分析。利用 PRABI (<https://npsa-prabi.ibcp.fr/>) 网站进行二级结构预测; 用 Euk-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi-2/>) 和 TMHMM (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 分别预测亚细胞定位和跨膜结构域。

1.2.2 甜瓜 AGLU 和 BGLU 家族基因的染色体定位

在甜瓜基因数据库中下载 CM3.6.1 版本的全基因组注释文件(general feature format 3, GFF3), 用 TBtools 软件选择 Gene Location Visualize from GTF/GFF, 输入全基因组文件和鉴定出的甜瓜 AGLU 和 BGLU 家族成员序列号(identity document, ID), 进行染色体定位可视化。

1.2.3 甜瓜 AGLU 和 BGLU 家族成员系统进化树的构建

以甜瓜 AGLU 蛋白序列在 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行 BLASTP 比对, 直接在 NCBI 数据库中下载序列相似度较高(Ident>50%)的蛋白序列, 包括拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)、小麦(*Triticum aestivum*)、水稻(*Oryza sativa*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)等, 进行系统进化树构建。其中构建 BGLU 家族系统进化树的拟南芥 BGLU 蛋白序列下载自 TAIR 数据库(<https://www.arabidopsis.org/>)。选用 MEGA 6.0 软件的邻接法(neighbor-joining method), 将 bootstrap 设为 1 000, Model/Method 选择 Poisson model, Rates among sites 选择 Uniform rates, 并用 Evolview 在线软件(<http://www.evolgenius.info/evolview/>)进行美化^[21]。

1.2.4 甜瓜 AGLU 和 BGLU 家族蛋白的保守结构域和基因结构分析

从甜瓜基因组数据库中下载 AGLU 和 BGLU 蛋白的氨基酸序列, 利用 MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>)网站分析该家族的保守结构域, 基序参数设置为 10, 其余参数为默认^[22]。利用 GSDS (<http://gsds.gao-lab.org/>)分析 *CmAGLU* 和 *CmBGLU* 基因的内含子和外显子分布情况。

1.2.5 甜瓜 AGLU 和 BGLU 家族基因启动子顺式作用元件预测

从甜瓜基因组数据库下载 AGLU 家族和

BGLU 家族成员基因启动子区(上游 2 000 bp)序列, 提交至 PlantCARE 在线网站(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plant-care/html/>), 对两家族成员启动子区上的顺式作用元件进行预测分析^[23], 使用 Search for CARE 功能, 提交序列为 fasta 格式文件, 其余参数为默认。

1.2.6 甜瓜 AGLU 和 BGLU 蛋白互作预测分析

在甜瓜基因组网站下载 AGLU 和 BGLU 蛋白序列, 在 STRING 网站(<https://cn.string-db.org/>)进行基因蛋白互作分析, 置信度参数设置为 0.4^[24], 物种参数为甜瓜。

1.2.7 RNA 提取及 qRT-PCR 检测

为了明确 AGLU 和 BGLU 家族基因在非生物胁迫下的功能, 分别在低温、ABA、干旱和盐胁迫处理后 0、6、12、24 h 取第 3 片功能叶, 使用 RNA 试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取总 RNA, 使用 PrimeScript™ RT Master Mix 试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司], 按照说明书进行反转录合成 cDNA。模板 cDNA 用 ddH₂O 进行 1:4 稀释, 使用 TOROGreen® qPCR Master Mix 试剂盒(天罗诊断集团)进行 qRT-PCR。利用 DNAMAN 6.0 软件设计引物(表 1), 由河南有康生物科技有限公司合成。PCR 扩增体系(20 μL): 模板 cDNA 1 μL, TOROGreen Express 2×qPCR mix 10 μL, 正向、反向引物(10 μmol/L)各 1 μL, 用 ddH₂O 补至 20 μL。PCR 扩增条件: 95 °C 60 s; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。设置 3 次生物学重复, 以甜瓜 *Actin7* 为内参基因(表 1), 利用 2^{-ΔΔC_t} 法计算基因相对表达量。

1.2.8 数据处理

基因表达数据用 Excel 2021 对数据进行初步整理, 再用 Excel 2021 制作热图进行数据可视化。

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

| Gene | Accession ID | Forward primer (5'→3') | Reverse primer (5'→3') | Product size (bp) |
|-----------------|--------------|--------------------------|------------------------|-------------------|
| <i>CmAGLU1</i> | MELO3C011570 | GAGGCCGTTTATCCTTTCC | CCCATGTTCCCTTGTTATCC | 86 |
| <i>CmAGLU2</i> | MELO3C013786 | CCAAAGGTATGCTGCTACG | CCTAGGTGTTGCGTTTCC | 151 |
| <i>CmAGLU3</i> | MELO3C012241 | GGGTCGTGTGAAGATATGG | CTCCCACCTCCATCTAACC | 106 |
| <i>CmAGLU4</i> | MELO3C023196 | CTTCGATCGTCTACTTGTCC | GTCCTCTCCTTATTCTTAACC | 158 |
| <i>CmAGLU5</i> | MELO3C021782 | GTCCATCCAACCTCCCTATCC | TCACATCGAGATTCACACTACC | 366 |
| <i>CmBGLU1</i> | MELO3C023519 | GCTACAATGGTGGGACGTTT | CCAATTTGCCCTTCTGCTT | 175 |
| <i>CmBGLU2</i> | MELO3C015216 | TGGAGATTCTGAGCATAAACC | ATCCGTATTCAATGTCACTCC | 211 |
| <i>CmBGLU3</i> | MELO3C015214 | CTCGCACATGCTAAGACG | GATGTAGCCTTCTGTCTTCC | 131 |
| <i>CmBGLU4</i> | MELO3C011430 | TCTCTCATGCTACTGTCTCC | GATAACATCGAGCGACATCC | 86 |
| <i>CmBGLU5</i> | MELO3C018247 | AGGGATGGTGTGATGTGAG | CTCAAGTGTCTCCGGTCCA | 117 |
| <i>CmBGLU6</i> | MELO3C018149 | GTCGGATAGGAATAGCATTGG | GCATATAAGGAGGTGTAGTGG | 253 |
| <i>CmBGLU7</i> | MELO3C009789 | AGGAGATTGTGGAAATGAACC | GGAACACACCAATTTGAAGC | 144 |
| <i>CmBGLU8</i> | MELO3C030711 | GGAGACAGAGTGAAGTATTGG | CAGCAGAAGATCGACATGG | 103 |
| <i>CmBGLU9</i> | MELO3C030721 | GCTACTTCTTCATGGCATCC | GGCTCATTCACTGTTGTCC | 183 |
| <i>CmBGLU10</i> | MELO3C009674 | ATGCCTAACAATTGGAGCGT | TAATGACAGGAGGGTTGCCA | 160 |
| <i>CmBGLU11</i> | MELO3C008574 | CCCAATTCATCTTCGGCGT | CCACCGCTACATCACCATTG | 145 |
| <i>CmBGLU12</i> | MELO3C016718 | GGATTCTTGACACCACGGG | ACGATGGGGTGTGGGATA | 140 |
| <i>CmBGLU13</i> | MELO3C017574 | TATGTTCAACCCTACTTGGC | CAGTATGAGCCCGTTTACC | 113 |
| <i>CmBGLU14</i> | MELO3C017964 | GGACCCATAAACCACAAAGG | CAATGCATCACCTATCTCC | 215 |
| <i>CmBGLU15</i> | MELO3C035057 | CTCCGCCAAAGAAACACCAA | AACCAAATCGCCGTCCAAAA | 179 |
| <i>CmBGLU16</i> | MELO3C021253 | GTGGGCTGATGGTTATGG | AAGATTGACGTGGTATTCGG | 83 |
| <i>CmBGLU17</i> | MELO3C002474 | TTCTGGGACTTGACTTGCCT | GGTTTCTTCTTCGTCCGGTG | 191 |
| <i>CmBGLU18</i> | MELO3C002122 | CCAGGTAATGTCACTCTTCC | CCTCCATTGGAAGTTGTCC | 153 |
| <i>CmActin7</i> | - | GTGATGGTGTGAGTCACACTGTTT | ACGACCAGCAAGGTCCAAAC | 83 |

2 结果与分析

2.1 甜瓜 AGLU 和 BGLU 基因家族成员的基本信息

基于关键词检索和保守结构域比对最后获得 5 个 *CmAGLU* 家族成员,命名为 *CmAGLU1*–*CmAGLU5*, 分别位于 3、6、10、11、12 号染色体上(表 2)。鉴定出 18 个 *CmBGLU* 家族成员,命名为 *CmBGLU1*–*CmBGLU18*, 分别位于 1、2、3、4、5、7、11、12 号染色体上(表 2)。

CmAGLU 家族成员蛋白长度为 899 aa (*CmAGLU5*)–1 060 aa (*CmAGLU2*) (表 2); 相对分子量在 100.47 kDa (*CmAGLU5*)–118.23 kDa (*CmAGLU2*)之间; 蛋白多为稳定蛋白, 不稳定指数介于 36.78 (*CmAGLU3*)–40.95 (*CmAGLU2*)之

间, 仅 *CmAGLU2* 的不稳定系数大于 40, 是不稳定蛋白^[24]; 所有成员蛋白总平均亲水性均介于–0.099–0.374 之间, GRAVY<0, 均为亲水蛋白; 脂肪系数差异较小, 在 75.88 (*CmAGLU4*)–87.93 (*CmAGLU5*)之间。

CmBGLU 家族成员蛋白长度在 151 aa (*CmBGLU15*)–576 aa (*CmBGLU1*)之间(表 2), 相对分子量在 17.50 kDa (*CmBGLU15*)–64.16 kDa (*CmBGLU1*)之间, 除 *CmBGLU15* 是不稳定蛋白外, 其余均为稳定蛋白, 不稳定指数介于 19.41 (*CmBGLU3*)–57.82(*CmBGLU15*)之间; 所有成员蛋白总平均亲水性均介于–0.214–0.575 之间, 均为亲水蛋白; 脂肪系数在 68.22 (*CmBGLU13*)–86.35 (*CmAGLU14*)之间。

表 2 甜瓜 AGLU 和 BGLU 基因家族成员的基本信息

Table 2 The basic information of AGLU and BGLU gene family members in melon

| Name | Length (aa) | Molecular weight (kDa) | pI | Instability index | GRAVY | Aliphatic index |
|-----------------|-------------|------------------------|------|-------------------|--------|-----------------|
| <i>CmAGLU1</i> | 932 | 104.35 | 5.97 | 38.93 | -0.231 | 84.69 |
| <i>CmAGLU2</i> | 1 060 | 118.23 | 5.33 | 40.95 | -0.270 | 80.75 |
| <i>CmAGLU3</i> | 930 | 103.27 | 6.55 | 36.78 | -0.153 | 84.70 |
| <i>CmAGLU4</i> | 917 | 104.29 | 5.97 | 37.06 | -0.374 | 75.88 |
| <i>CmAGLU5</i> | 899 | 100.47 | 6.46 | 38.82 | -0.099 | 87.93 |
| <i>CmBGLU1</i> | 576 | 64.16 | 8.91 | 25.84 | -0.355 | 74.91 |
| <i>CmBGLU2</i> | 516 | 59.31 | 5.46 | 27.82 | -0.489 | 76.71 |
| <i>CmBGLU3</i> | 511 | 58.90 | 8.57 | 19.41 | -0.551 | 74.40 |
| <i>CmBGLU4</i> | 507 | 56.99 | 8.35 | 31.33 | -0.218 | 80.79 |
| <i>CmBGLU5</i> | 432 | 49.46 | 6.25 | 32.09 | -0.292 | 78.98 |
| <i>CmBGLU6</i> | 289 | 33.11 | 8.73 | 30.55 | -0.297 | 85.09 |
| <i>CmBGLU7</i> | 487 | 56.18 | 5.11 | 37.30 | -0.462 | 74.46 |
| <i>CmBGLU8</i> | 493 | 56.94 | 4.96 | 36.89 | -0.483 | 74.97 |
| <i>CmBGLU9</i> | 199 | 22.93 | 6.99 | 36.29 | -0.376 | 79.40 |
| <i>CmBGLU10</i> | 505 | 57.19 | 5.72 | 30.49 | -0.249 | 82.24 |
| <i>CmBGLU11</i> | 504 | 57.95 | 5.30 | 32.62 | -0.548 | 74.50 |
| <i>CmBGLU12</i> | 415 | 47.36 | 6.96 | 32.53 | -0.350 | 76.29 |
| <i>CmBGLU13</i> | 506 | 58.30 | 6.61 | 29.34 | -0.447 | 68.22 |
| <i>CmBGLU14</i> | 507 | 57.18 | 5.49 | 31.22 | -0.214 | 86.35 |
| <i>CmBGLU15</i> | 151 | 17.50 | 9.45 | 57.82 | -0.575 | 83.91 |
| <i>CmBGLU16</i> | 538 | 61.58 | 8.13 | 33.53 | -0.328 | 82.12 |
| <i>CmBGLU17</i> | 522 | 59.86 | 5.41 | 39.60 | -0.306 | 75.08 |
| <i>CmBGLU18</i> | 507 | 58.37 | 9.35 | 22.98 | -0.414 | 74.24 |

GRAVY: Grand average of hydropathicity.

2.2 甜瓜 AGLU 家族和 BGLU 家族基因在染色体上的分布情况

甜瓜共有 12 条染色体,为了探究 AGLU 和 BGLU 基因在甜瓜基因组中的分布,依据甜瓜全基因组注释文件和 2 个基因家族成员序列号可以确定其在染色体上的位置(图 1)。由图 1A 可知,甜瓜 AGLU 家族基因分布于 5 条染色体上,*CmAGLU1* 位于 3 号染色体,*CmAGLU2* 位于 6 号染色体,*CmAGLU3* 位于 10 号染色体,*CmAGLU4* 位于 11 号染色体,*CmAGLU5* 位于 12 号染色体;由图 1B 可知,甜瓜 BGLU 基因分布在 8 条染色体上,*CmBGLU1* 位于 1 号染色体,*CmBGLU2* 和 *CmBGLU3* 位于 2 号染色体,

CmBGLU4 位于 3 号染色体,*CmBGLU5*–*CmBGLU10* 位于 4 号染色体,*CmBGLU11* 位于 5 号染色体,*CmBGLU12*–*CmBGLU14* 位于 7 号染色体,*CmBGLU15* 和 *CmBGLU16* 位于 11 号染色体,*CmBGLU17* 和 *CmBGLU18* 位于 12 号染色体。

2.3 甜瓜 AGLU 家族和 BGLU 家族的系统发育分析

在 NCBI 网站下载了拟南芥(5 个)、小麦(5 个)、水稻(5 个)、黄瓜(5 个)和番茄(5 个)的蛋白序列,利用邻接法(neighbor-joining method)对甜瓜 5 个 AGLU 蛋白构建系统进化树,结果如图 2 所示,AGLU 家族进化树分为 I–IV 亚组,

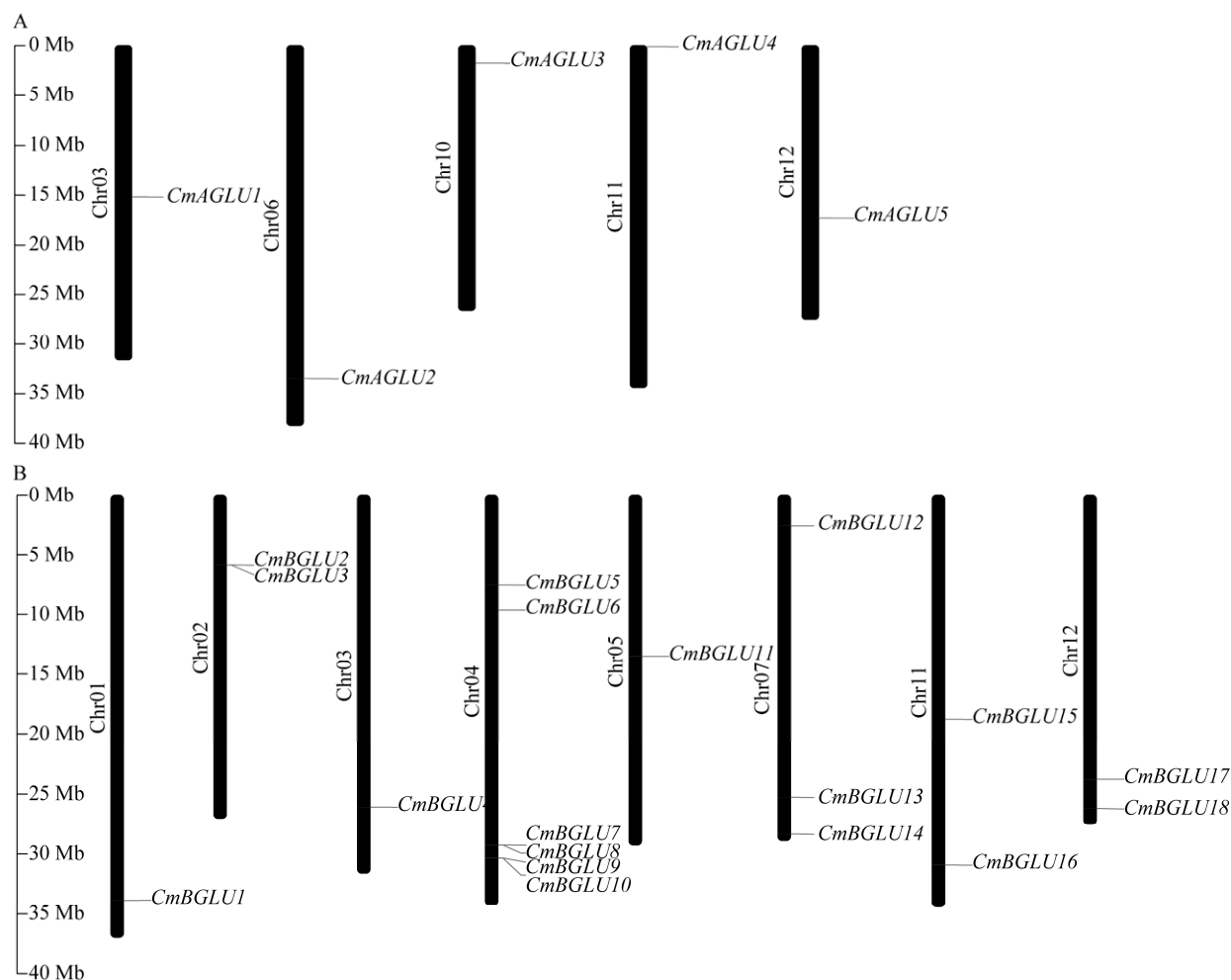


图 1 甜瓜 AGLU 家族(A)和 BGLU 家族(B)成员的染色体定位

Figure 1 Chromosomal location of melon AGLU family (A) and BGLU family (B) members.

CmAGLU2 和 CmAGLU4 属于I亚组, CmAGLU5 属于II亚组, CmAGLU1 和 CmAGLU3 属于IV亚组。甜瓜与黄瓜的亲缘关系最近, 2 个物种成员存在一一对应的关系, CmAGLU1 与 CsAGLU1 同源性为 70.16%, CmAGLU2 与 CsAGLU4 同源性为 79.84%, CmAGLU3 与 CsAGLU3 同源性为 69.45%, CmAGLU4 与 CsAGLU5 同源性为 68.44%, CmAGLU5 与 CsAGLU2 同源性为 65.78%, 提示 AGLU 在甜瓜与黄瓜中的功能可能有一定的相似性。

用筛选出的甜瓜(18 个)和鉴定出的拟南芥 BGLU 家族成员(48 个)的蛋白序列构建进化树

进行系统进化分析(图 2B)。拟南芥 BGLU 家族成员被分为 10 个亚组^[10], 结果显示, CmBGLU9、CmBGLU10 和 CmBGLU14 属于 I 亚组, CmBGLU2、CmBGLU3、CmBGLU11 属于 VII 亚组, CmBGLU4 和 CmBGLU6 属于 VIII 亚组, CmBGLU13 和 CmBGLU18 属于 IX 亚组, CmBGLU5、CmBGLU12 和 CmBGLU17 属于 X 亚组。前期研究中拟南芥 BGLU 家族的第 48 位成员未进行分组^[10], *AtBGLU48(SFR2)* 是一个 β -葡萄糖苷酶类基因, 与拟南芥 BGLU 家族其他成员来源不同, 根据同源关系把 CmBGLU15 和 CmBGLU16 与 *AtBGLU48* 分为一组。

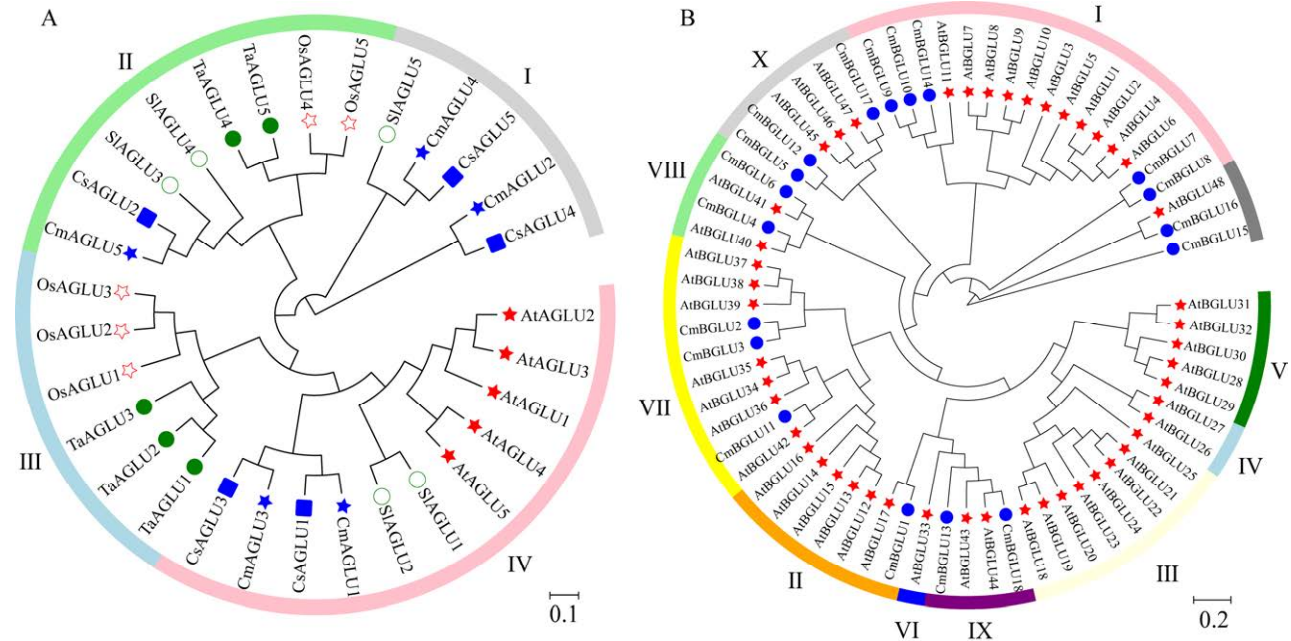


图2 甜瓜与其他物种 AGLU 家族(A)和 BGLU 家族(B)的系统进化树

Figure 2 Phylogenetic tree of AGLU family (A) and BGLU family (B) of melon and other plants. AGLU: Melon (*Cucumis melo*): CmAGLU1 (MELO3C011570); CmAGLU2 (MELO3C013786); CmAGLU3 (MELO3C012241); CmAGLU4 (MELO3C023196); CmAGLU5 (MELO3C021782); Cucumber (*Cucumis sativus*): CsAGLU1 (XP_004140858); CsAGLU2 (XP_011660330); CsAGLU3 (XP_011655772); CsAGLU4 (XP_011650305); CsAGLU5 (XP_004147325); Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*): AtAGLU1 (OAP18359); AtAGLU2 (NP_177023); AtAGLU3 (AAD05539); AtAGLU4 (CAD5324970); AtAGLU5 (CAA0384626); Rice (*Oryza sativa*): OsAGLU1 (XP_015622373); OsAGLU2 (BAA99366); OsAGLU3 (EEE53808); OsAGLU4 (XP_025881777); OsAGLU5 (KAF2928066); Wheat (*Triticum aestivum*): TaAGLU1 (XP_044354987); TaAGLU2 (XP_044338437); TaAGLU3 (XP_044346869); TaAGLU4 (XP_044424558); TaAGLU5 (XP_044439123); Tomato (*Solanum lycopersicum*): SIAGLU1 (XP_004236960); SIAGLU2 (XP_004238937); SIAGLU3 (XP_004236811); SIAGLU4 (XP_004233180); SIAGLU5 (NP_001234030). BGLU: Melon (*Cucumis melo*): CmBGLU1 (MELO3C023519); CmBGLU2 (MELO3C015216); CmBGLU3 (MELO3C015214); CmBGLU4 (MELO3C011430); CmBGLU5 (MELO3C018247); CmBGLU6 (MELO3C018149); CmBGLU7 (MELO3C009789); CmBGLU8 (MELO3C030711); CmBGLU9 (MELO3C030721); CmBGLU10 (MELO3C009674); CmBGLU11 (MELO3C008574); CmBGLU12 (MELO3C016718); CmBGLU13 (MELO3C017574); CmBGLU14 (MELO3C017964); CmBGLU15 (MELO3C035057); CmBGLU16 (MELO3C021253); CmBGLU17 (MELO3C002474); CmBGLU18 (MELO3C002122); Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*): AtBGLU1 (AT1G45191); AtBGLU2 (AT5G16580); AtBGLU3 (AT4G22100); AtBGLU4 (AT1G60090); AtBGLU5 (AT1G60260); AtBGLU6 (AT1G60270); AtBGLU7 (AT3G62740); AtBGLU8 (AT3G62750); AtBGLU9 (AT4G27820); AtBGLU10 (AT4G27830); AtBGLU11 (AT1G02850); AtBGLU12 (AT5G42260); AtBGLU13 (AT5G44640); AtBGLU14 (AT2G25630); AtBGLU15 (AT2G44450); AtBGLU16 (AT3G60130); AtBGLU17 (AT2G44480); AtBGLU18 (AT1G52400); AtBGLU19 (AT3G21370); AtBGLU20 (AT1G75940); AtBGLU21 (AT1G66270); AtBGLU22 (AT1G66280); AtBGLU23 (AT3G09260); AtBGLU24 (AT5G28510); AtBGLU25 (AT3G03640); AtBGLU26 (AT2G44490); AtBGLU27 (AT3G60120); AtBGLU28 (AT2G44460); AtBGLU29 (AT2G44470); AtBGLU30 (AT3G60140); AtBGLU31 (AT5G24540); AtBGLU32 (AT5G24550); AtBGLU33 (AT2G32860); AtBGLU34 (AT1G47600); AtBGLU35 (AT1G51470); AtBGLU36 (AT1G51490); AtBGLU37 (AT5G25980); AtBGLU38 (AT5G26000); AtBGLU39 (AT5G48375); AtBGLU40 (AT1G26560); AtBGLU41 (AT5G54570); AtBGLU42 (AT5G36890); AtBGLU43 (AT3G18070); AtBGLU44 (AT3G18080); AtBGLU45 (AT1G61810); AtBGLU46 (AT1G61820); AtBGLU47 (AT4G21760); AtBGLU48 (AT3G06510).

2.4 甜瓜 AGLU 家族和 BGLU 家族的基因结构和蛋白保守基序分析

在甜瓜 AGLU 家族中, *CmAGLU1* 和 *CmAGLU3* 有 3 个外显子, *CmAGLU4* 和 *CmAGLU5* 有 6 个外显子, *CmAGLU2* 的外显子在 CmAGLU 家族中最多, 有 23 个, 每个成员在 5'端和 3'端均有一个非翻译区 (untranslated region, UTR), 但是长度和位置分布不一致(图 3A)。在甜瓜 BGLU 家族中, *CmBGLU9* 有 5 个外显子, *CmBGLU6* 和 *CmBGLU15* 有 7 个外显子, *CmBGLU16* 有 9 个外显子, *CmBGLU5* 和 *CmBGLU12* 有 10 个外显子, *CmBGLU13* 和 *CmBGLU18* 有 11 个外显子, *CmBGLU17* 有 12 个外显子, *CmBGLU2*、*CmBGLU3*、*CmBGLU4*、*CmBGLU10*、*CmBGLU11* 和 *CmBGLU14* 都有

13 个外显子, *CmBGLU7* 和 *CmBGLU8* 有 14 个外显子, *CmBGLU1* 外显子最多(15 个); 所有 CmBGLU 成员都有 UTR, 除 *CmBGLU1* 以外, 其他成员的 UTR 都在 2 个及 2 个以上(包括 5'端和 3'端), 最多 6 个(*CmBGLU6*), 每个成员的 UTR 长度和位置分布不同(图 3B), 研究表明, UTR 区的数量、位置、长度等均可能影响基因的表达^[25-26], 该预测结果可为后续研究基因的表达情况提供参考。

用 MEME 网站分析甜瓜 AGLU 家族和 BGLU 家族的蛋白保守基序, 在甜瓜 AGLU 家族中(图 4A), *CmAGLU1* 和 *CmAGLU3* 都具有 10 个 motif, *CmAGLU5* 缺少 motif 6, *CmAGLU4* 缺少 motif 6 和 motif 7, *CmAGLU2* 缺少 motif 6、motif 7 和 motif 10, 其中 motif 2 和 motif 6 包

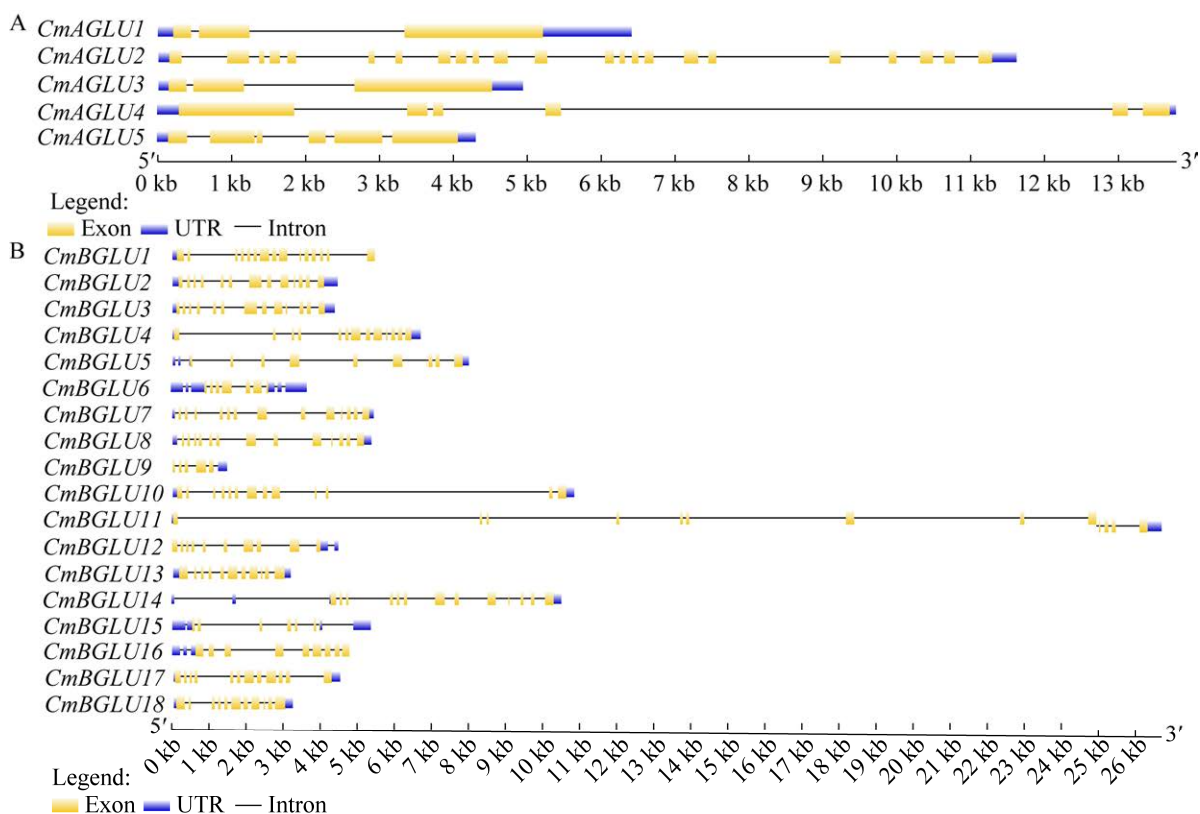


图 3 甜瓜 AGLU 家族(A)和 BGLU 家族(B)基因的结构特征

Figure 3 Gene structure of the AGLU family (A) and BGLU family (B) in melon.

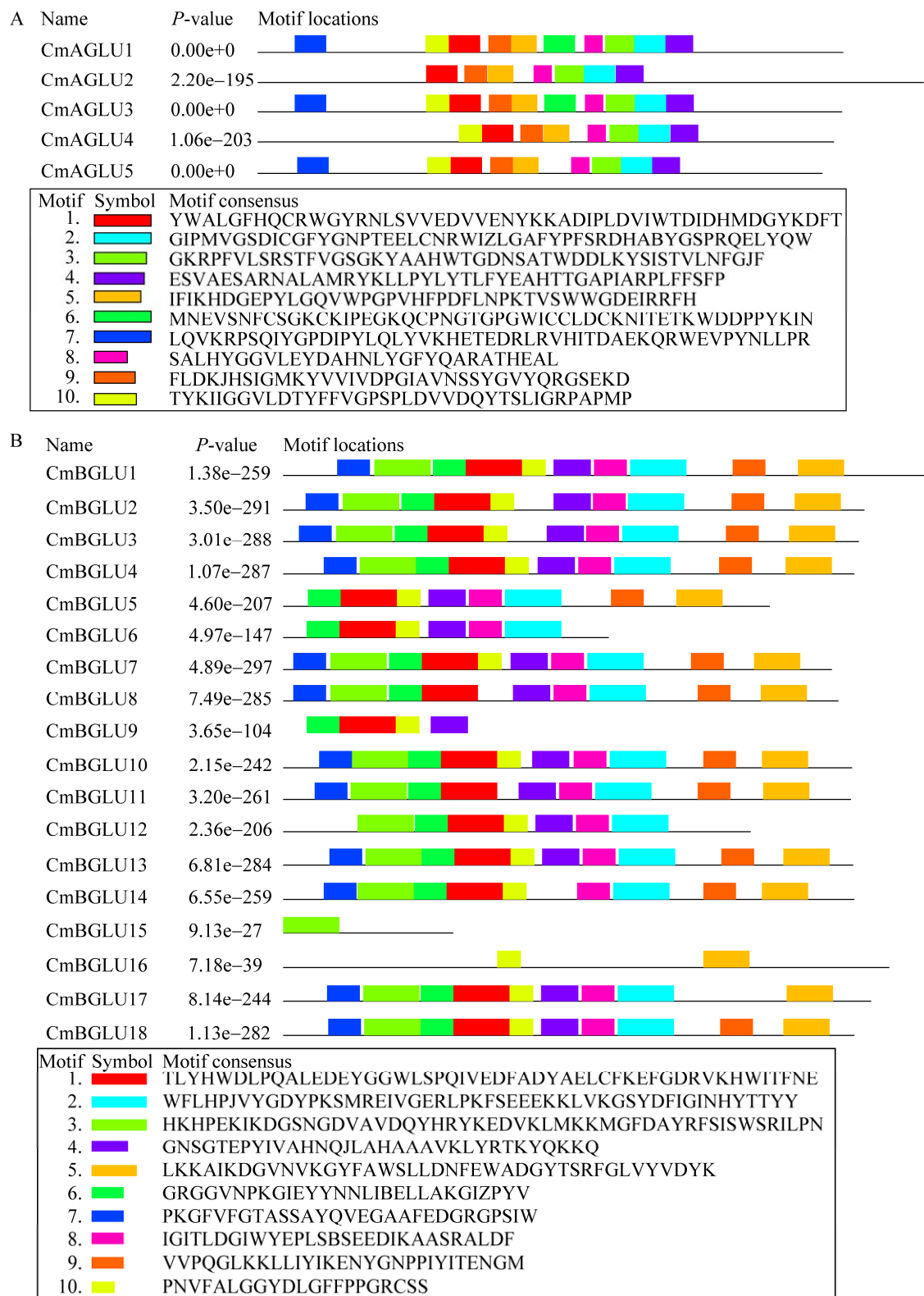


图 4 甜瓜 AGLU 家族(A)和 BGLU 家族(B)的蛋白基序

Figure 4 Protein motifs of the AGLU family (A) and BGLU family (B) in melon.

含了该家族蛋白的功能域。大多数甜瓜 BGLU 基因编码的蛋白都具有 6 个及以上的 motif (图 4B), 其中 motif 1 和 motif 3 包含了该家族蛋白的功能域。而 CmBGLU9、CmBGLU15 和 CmBGLU16 motif 缺失较多, CmBGLU9 只有 motif 1、motif 4、motif 6 和 motif 10, CmBGLU15 只有 motif 3, CmBGLU16 只有 motif 5 和 motif 10, CmBGLU9、CmBGLU15 和 CmBGLU16 这 3 个成员蛋白的保守基序相对其他成员存在较多缺失, 推测可能存在功能上的差异和特殊性。

2.5 甜瓜 AGLU 和 BGLU 基因家族蛋白的二级结构组成、亚细胞定位和跨膜结构域分析

由表 3 可知, CmAGLU 基因家族所有成员蛋白二级结构中, 无规卷曲占比最高 (48.77%–52.47%), β 折叠占比最低 (5.56%–8.30%) (表 3)。CmBGLU 基因家族所有成员蛋白二级结构中, α 螺旋 (32.53%–41.45%) 和无规卷曲占比最高 (34.67%–41.84%), β 折叠占比最低 (5.36%–8.32%)。

表 3 甜瓜 AGLU 和 BGLU 基因家族蛋白的二级结构组成、亚细胞定位和跨膜结构域预测

Table 3 Secondary structure, subcellular localization and transmembrane domain prediction of the AGLU and BGLU gene families in melon

| Name | α -helix (%) | Extended strand (%) | β -sheet (%) | Random coil (%) | Subcellular location | Transmembrane domain |
|----------|---------------------|---------------------|--------------------|-----------------|-----------------------------|----------------------|
| CmAGLU1 | 17.27 | 24.57 | 5.69 | 52.47 | Extracellular matrix | 0 |
| CmAGLU2 | 18.58 | 24.34 | 8.30 | 48.77 | Extracellular matrix | 0 |
| CmAGLU3 | 19.25 | 24.09 | 5.81 | 50.86 | Extracellular matrix | 0 |
| CmAGLU4 | 17.23 | 26.72 | 5.56 | 50.49 | Extracellular matrix | 0 |
| CmAGLU5 | 17.46 | 24.92 | 7.12 | 50.50 | Extracellular matrix | 1 |
| CmBGLU1 | 33.51 | 17.88 | 6.77 | 41.84 | Cell membrane | 1 |
| CmBGLU2 | 34.50 | 18.02 | 6.78 | 40.70 | Cell membrane | 0 |
| CmBGLU3 | 34.44 | 16.63 | 7.24 | 41.68 | Cell membrane | 0 |
| CmBGLU4 | 34.32 | 20.91 | 7.69 | 37.08 | Cell membrane | 1 |
| CmBGLU5 | 39.81 | 14.81 | 6.48 | 38.89 | Cell membrane | 0 |
| CmBGLU6 | 34.95 | 17.65 | 6.23 | 41.18 | Cell membrane | 0 |
| CmBGLU7 | 36.34 | 17.66 | 8.01 | 37.99 | Cell membrane | 0 |
| CmBGLU8 | 35.09 | 19.07 | 5.88 | 39.96 | Cell membrane | 0 |
| CmBGLU9 | 35.68 | 23.12 | 6.53 | 34.67 | Cell membrane | 0 |
| CmBGLU10 | 33.66 | 18.22 | 8.32 | 39.80 | Cell membrane | 1 |
| CmBGLU11 | 36.90 | 15.48 | 6.35 | 41.27 | Cell membrane | 0 |
| CmBGLU12 | 32.53 | 20.24 | 6.02 | 41.20 | Cell membrane | 0 |
| CmBGLU13 | 37.15 | 18.58 | 7.51 | 36.76 | Cell membrane | 0 |
| CmBGLU14 | 38.46 | 15.98 | 6.51 | 39.05 | Cell membrane | 1 |
| CmBGLU15 | 36.42 | 21.19 | 7.28 | 35.10 | Cell membrane, cytoplasm | 0 |
| CmBGLU16 | 41.45 | 13.94 | 5.76 | 38.85 | Cell membrane | 0 |
| CmBGLU17 | 38.31 | 15.71 | 5.36 | 40.61 | Cell membrane | 0 |
| CmBGLU18 | 37.67 | 16.57 | 6.90 | 38.86 | Cell membrane | 0 |

亚细胞定位预测发现,甜瓜 AGLU 家族基因都定位在细胞外基质中,而甜瓜 BGLU 家族基因都定位在细胞膜上,CmBGLU15 同时还定位在细胞质中。在 CmAGLU 家族的成员中,只有 CmAGLU5 有一个跨膜结构域;而在 CmBGLU 家族的成员中,CmBGLU1、CmBGLU4、CmBGLU10、CmBGLU14 各有 1 个跨膜结构域。

2.6 甜瓜 AGLU 家族和 BGLU 家族蛋白互作鉴定

用 STRING 网站进行基因蛋白互作预测分析,由图 5A 可知,甜瓜 AGLU 家族的 5 位成员均与 5 个蛋白互作,分别是 A0A5D3CP83、A0A5A7SJ42、A0A5A7SJG0、A0A5A7T9Y2、A0A5D3BIQ3,其中 A0A5A7T9Y2 和 A0A5D3BIQ3 是葡萄糖苷酶 II 亚基 β 亚型, A0A5D3CP83 是 4- α -葡聚糖转移酶, A0A5A7SJ42 和 A0A5A7SJG0 是 4- α -葡聚糖转移酶 DPE2 亚型, 4- α -葡聚糖转移酶可催化淀粉链的延长,可用于对淀粉进行结构修饰以调整其凝胶特性^[27],提示甜瓜 AGLU 家族成员可能具有催化淀粉链延长的功能。由图 5B 可知,在甜瓜 BGLU 家族中,CmBGLU1

和 CmBGLU8 无互作关系,CmBGLU2、CmBGLU3、CmBGLU9、CmBGLU10、CmBGLU14 都可与 CmBGLU15 形成复合体,而 CmBGLU4、CmBGLU6、CmBGLU12、CmBGLU13、CmBGLU16、CmBGLU17、CmBGLU18 都可与 A0A5D3CDB9、A0A5A7UH07、A0A5A7TMC9、A0A5A7TDF3、A0A5A7TIV3 这 5 个蛋白互作,其中 A0A5D3CDB9 和 A0A5A7TDF3 是内切葡聚糖酶,A0A5A7UH07、A0A5A7TMC9 和 A0A5A7TIV3 是主要细胞外葡聚糖酶,属于葡萄糖水解酶 5 (纤维素酶 A) 家族;内切葡聚糖酶在水解纤维素中发挥作用,以切断纤维分子内部糖苷键的方式将纤维素水解成为还原性寡糖^[28],提示甜瓜 BGLU 家族成员可能在纤维素水解过程中发挥作用。

2.7 甜瓜 AGLU 家族和 BGLU 家族基因启动子功能预测分析

利用 PlantCARE 网站对甜瓜 AGLU 家族和 BGLU 家族基因的启动子进行分析,结果如图 6 所示。甜瓜 AGLU 家族中除了各基因的基本顺式作用元件(如 TATA-box, CAAT-box 等)之外,

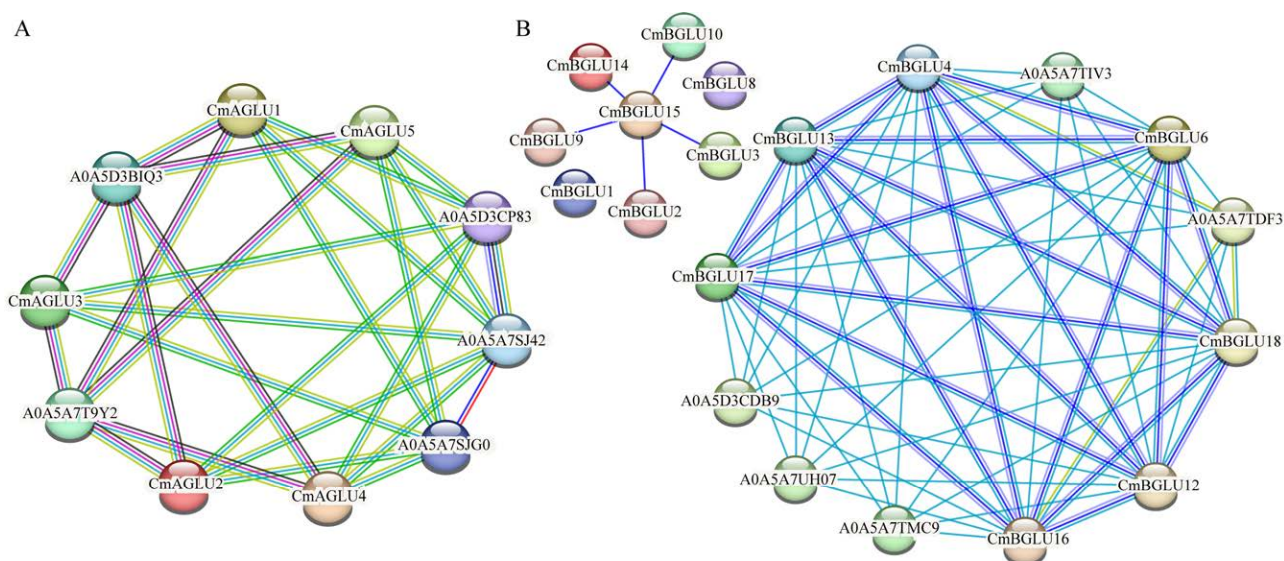


图 5 甜瓜 AGLU 家族(A)和 BGLU 家族(B)蛋白互作网络

Figure 5 Protein-protein interaction network of AGLU family (A) and BGLU family (B) in melon.

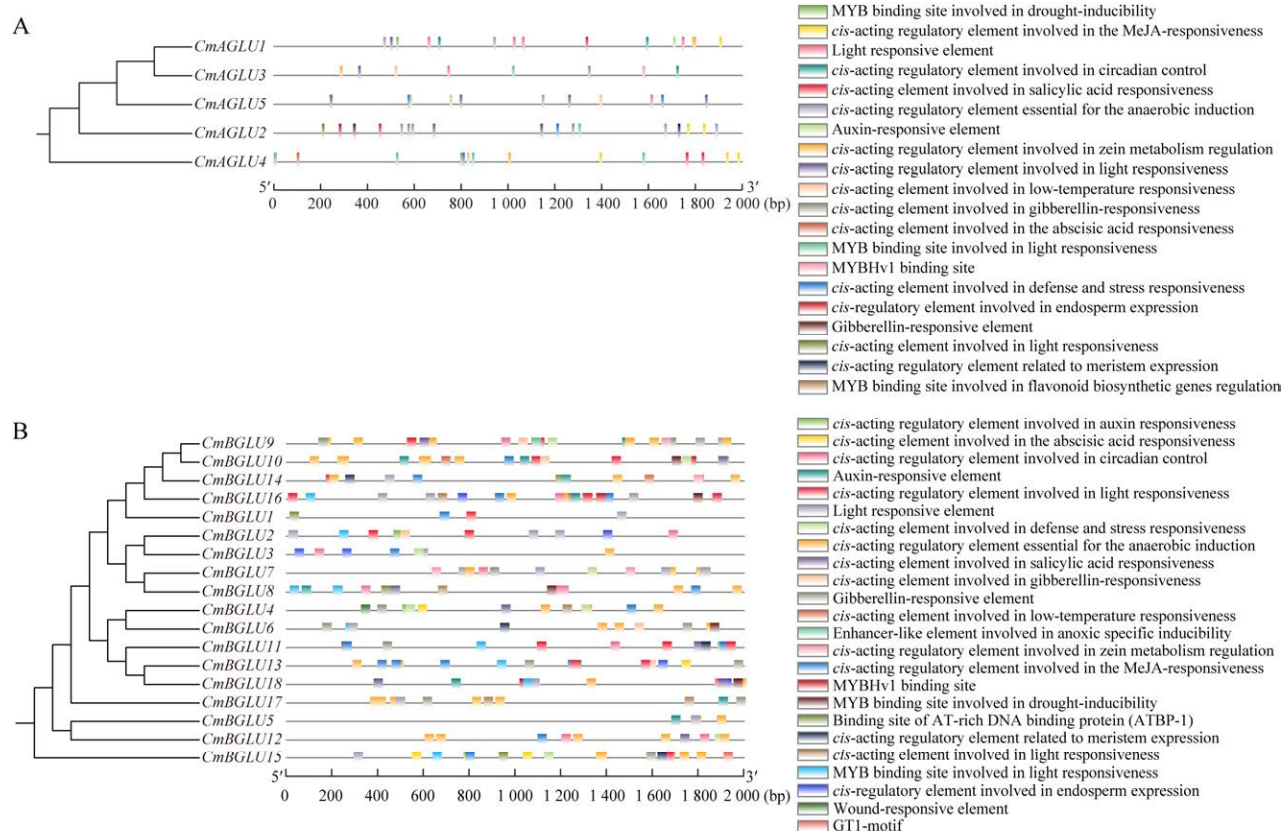


图 6 甜瓜 AGLU 基因家族(A)和 BGLU 家族(B)的启动子顺式作用元件

Figure 6 *Cis*-acting elements of promoters of the AGLU gene family (A) and BGLU family (B) in melon.

共鉴定出 22 种顺式作用元件(图 6A), 分别是与激素响应相关的元件(CGTCA-motif、TGACG-motif、TCA-element、ABRE、P-box、TATC-box)、光响应相关的元件(SP1、GT1-motif、G-box、ACE)、环境胁迫和逆境相关的元件(ARE、TC-rich repeats、LTR)、生长响应相关的元件(circadian、TGA-element、GCN4-motif、CAT-box)、参与蛋白代谢的调节元件(O₂-site)和生物合成调控的 MYB 结合位点(MBS、MRE、MBSI、CCAAT-box)。甜瓜 AGLU 家族中 *CmAGLU2* 顺式作用元件最多(20 个), *CmAGLU3* 顺式作用元件最少(9 个), 大部分成员元件个数在 15 个以上。其中茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)相关的顺式作用调节元件个数最多(12 个); 除了 *CmAGLU1*

和 *CmAGLU5*, 该家族其他成员都具有参与光反应性的 MYB 结合位点, 推测 *CmAGLU1*–*CmAGLU3* 可能受 MYB 转录因子调控。

甜瓜 BGLU 家族中除了各基因的基本顺式作用元件(如 TATA-box, CAAT-box 等)之外, 共鉴定出 24 种顺式作用元件(图 6B), 其中包括环境胁迫相关的元件(ARE、TC-rich repeats、LTR、GC-motif)、激素响应相关的元件(ABRE、CGTCA-motif、TGACG-motif、TATC-box、P-box、TCA-element)、光响应相关的元件(G-box、GT1-motif、ACE)、MYB 和富含蛋白的结合位点(AT-rich element、MRE、MBS、CCAAT-box)、生长响应和组织表达相关的元件 (AuxRR-core, GCN4-motif, circadian,

TGA-element, CAT-box)、机械损伤响应元件(WUN-motif)和参与蛋白代谢的调节元件(O₂-site)。甜瓜 BGLU 家族大部分成员的顺式作用元件数目为 9–24 个, *CmBGLU16* 的元件数目最多(28 个), *CmBGLU5* 的元件数目最少(4 个)。该家族成员含有最多的元件为厌氧诱导必需元件(51 个), 推测该家族成员可能大多数

参与无氧呼吸活动。

2.8 甜瓜 AGLU 家族和 BGLU 家族成员在非生物胁迫下的表达分析

在低温、干旱、ABA 和高盐处理下的不同时间点取甜瓜叶片, 对 AGLU 家族和 BGLU 家族基因的表达进行 qRT-PCR 分析, 结果如图 7 所示。

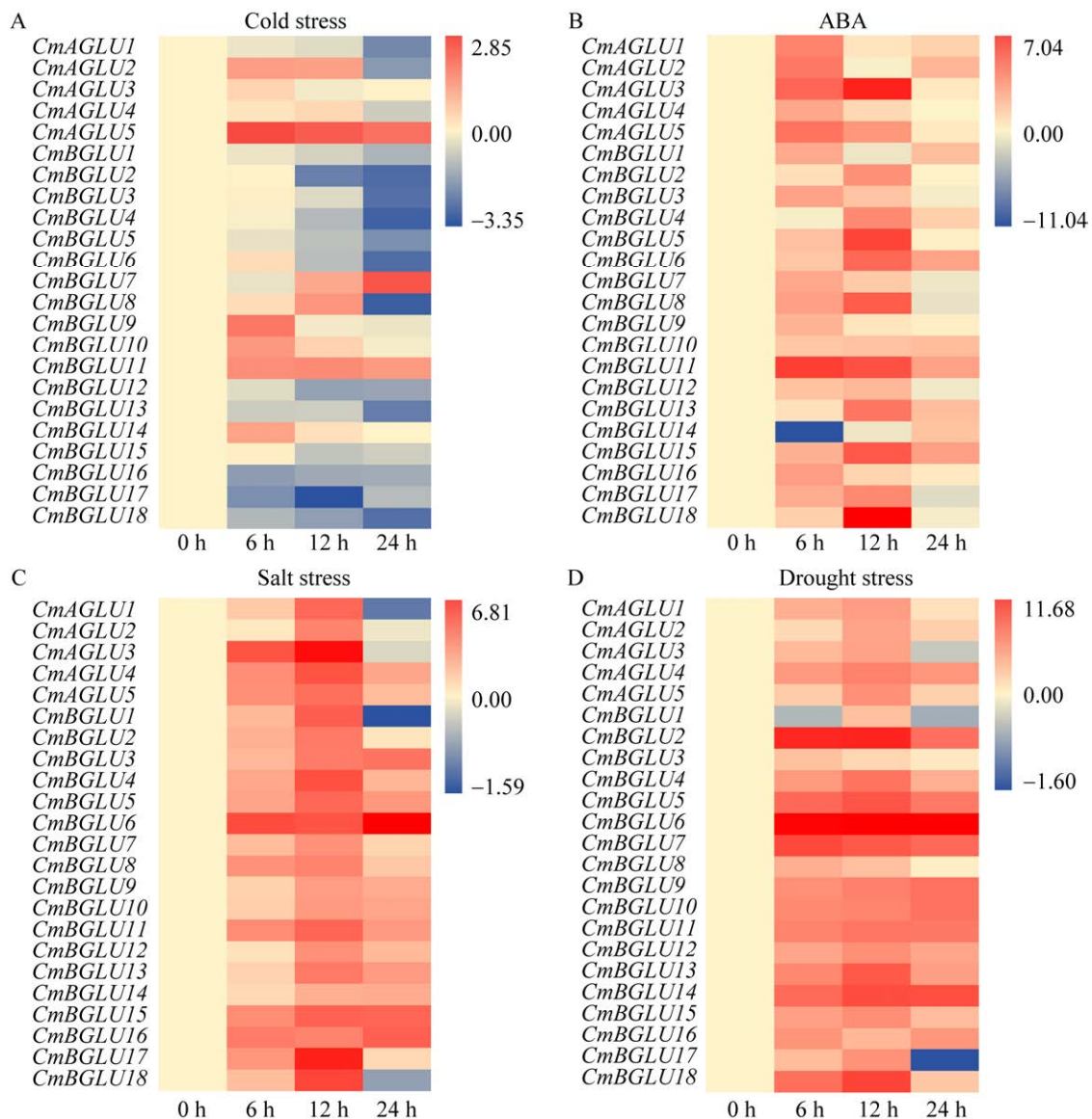


图 7 甜瓜 AGLU 家族和 BGLU 家族基因在低温处理(A)、ABA 处理(B)、高盐处理(C)、干旱处理(D)不同时间的表达模式分析

Figure 7 The expression patterns of AGLU family and BGLU family genes in melon were analyzed at different times of cold treatment (A), ABA treatment (B), salt treatment (C) and drought treatment (D).

在低温条件下, 4 个 CmAGLU 和 7 个 CmBGLU 成员响应低温, CmAGLU5 和 CmBGLU7 可能是低温响应的关键基因, 低温处理后分别上调了 2.85 倍和 2.71 倍。在 ABA 处理下, 全部的 CmAGLU 和 CmBGLU 均受诱导, 多数 CmAGLU 在处理 6 h 达到峰值, 表明 CmAGLU 是早期响应 ABA 的基因。其中 CmAGLU3 持续响应 ABA 诱导, 在处理 12 h 达到峰值, 上调了 6.05 倍。在甜瓜 BGLU 家族成员中, CmBGLU1、CmBGLU3、CmBGLU7、CmBGLU9、CmBGLU11、CmBGLU16 均在 ABA 处理 6 h 之后达到峰值; CmBGLU10 和 CmBGLU14 在处理 24 h 达到峰值; 其他 12 个基因均在 ABA 处理后 12 h 达到峰值; 其中 CmBGLU18 对 ABA 响应最为明显, 上调了 7.04 倍, 是 ABA 响应的关键基因。

甜瓜 AGLU 和 BGLU 家族成员均受高盐处理诱导。CmAGLU1–CmAGLU5 均在处理 12 h 后达到峰值, 其中 CmAGLU3 响应最为剧烈, 上调了 6.40 倍。CmBGLU3、CmBGLU6、CmBGLU14、CmBGLU16 在处理 24 h 达到峰值, 其他 14 个基因均在处理 12 h 达到峰值。综合来看, CmBGLU6、CmBGLU17、CmBGLU18 可能是响应高盐胁迫的关键基因, 尤其是 CmBGLU6, 可持续高水平响应, 并在 24 h 达到峰值。

在干旱处理下, 甜瓜 AGLU 和 BGLU 家族成员均响应干旱处理。甜瓜 AGLU 家族成员均在处理后 12 h 达到峰值, 其中 CmAGLU4 表达上调最为明显(5.53 倍)。甜瓜 BGLU 家族成员中, CmBGLU3、CmBGLU7、CmBGLU8、CmBGLU16 在处理 6 h 达到峰值; CmBGLU6、CmBGLU9、CmBGLU10 在处理 24 h 达到峰值, 其他 11 个成员均在处理 12 h 达到峰值; 其中 CmBGLU6 持续高表达, 最高可上调 11.68 倍,

推测其为响应干旱胁迫的关键基因。

3 讨论

甜瓜 AGLU 基因家族中, 鉴定出的 5 位成员蛋白分子量在 100.47–118.23 kDa 之间, 与先前报道的 α -葡萄糖苷酶蛋白分子量相一致, 等电点在 5.33–6.55 之间, 与之前报道的理论等电点值小于 7.00 的结论类似^[29]。甜瓜 AGLU 基因家族中, 激素调控的元件较多, 激素在植物防御反应中发挥着重要的作用^[30], 推测甜瓜 AGLU 基因家族可能在防御反应方面发挥功能; 该家族中茉莉酸甲酯(MeJA)相关的顺式作用元件较多, 这类元件不仅可以对机械损伤和光做出应答, 还可以对茉莉酸类化合物作出应答^[31], 表明 AGLU 家族成员可能在茉莉酸类化合物应答方面有潜在功能; 该家族成员除 CmAGLU4 之外都有参与光响应的顺式作用元件 G-box, G-box 参与植物对光照有无的响应^[32], 并在 UV-B 诱导中发挥重要作用^[33], 提示 AGLU 家族成员参与光响应且受 UV-B 诱导。在 CmAGLU5 中发现了参与低温响应性的顺式作用元件 LTR, 且 CmAGLU5 在低温处理下表达显著上调, 推测 CmAGLU5 对低温的响应可能与该顺式作用元件有关。此外, 主要响应低温的 CmAGLU2 和 CmAGLU5 均在处理 6 h 达到峰值, 与前人在茶树低温处理下的研究结果相一致^[34], 推测 α -葡萄糖苷酶基因可能是在耐冷调控的前期发挥作用; 同样地, CmAGLU3 包含一个参与脱落酸反应的顺式作用元件, 而 CmAGLU3 对 ABA 处理响应最为剧烈, 证明了顺式作用元件预测的准确性。在蛋白互作分析中发现, 甜瓜 AGLU 基因家族中有 2 个互作蛋白 A0A5A7T9Y2 和 A0A5D3BIQ3 都是葡萄糖苷酶 II 亚基 β 亚型, 这 2 个蛋白作为自噬和细胞程序性死亡的分子开关发挥作用^[35], 推测甜瓜 AGLU 家族成员可能在细胞程序性死亡中发挥

作用。

在甜瓜 BGLU 基因家族中, 鉴定出的 18 个家族成员蛋白分子量在 17.50–64.16 kDa 之间, 与前人报道的分子量范围一致^[36]; 11 个 BGLU 家族成员蛋白等电点值小于 7.00, 占比 61.11%, 与前人研究的陆地棉 BGLU 家族成员相似^[12], 推测甜瓜 BGLU 家族成员可能在酸性条件下发挥作用。与之前的研究相比, 甜瓜 BGLU 基因家族成员较少(18 个), 明显少于拟南芥(48 个)、陆地棉(53 个)等作物, 推测是基因复制或者基因表达调控的变化。基因重复是生物进化中的一个重要过程, 通过不等交换、逆转录转座或全基因组重复等途径产生一个与原基因相似的基因或碱基序列, 进而扩充基因家族成员的数量, 以行使不同的功能, 从而增加生物对环境的适应性^[37]。然而, 重复基因也可能进一步受到纯化选择以确保家族基因功能的保守性, 从而使得部分重复基因在进化中被淘汰^[38]。在某些情况下, 一些额外的基因可能不会对生物体的生存和繁殖产生显著影响, 从而在进化过程中被选择压力淘汰, 推测甜瓜 BGLU 家族成员较少可能是因为在进化过程中一些基因受到纯化选择而发生丢失。基因表达调控的变化也可能导致基因家族成员的减少, 在前人研究中, 拟南芥 BGLU 家族虽然有 48 个成员, 但只有 12 个成员受干旱胁迫诱导, 16 个成员在盐处理上调表达^[18], 而本研究甜瓜 BGLU 基因家族 18 个成员全部响应干旱和盐处理, 推测可能是甜瓜 BGLU 家族中某些基因由于表达水平的下降或功能的丧失而在进化过程中逐渐被淘汰。前人报道拟南芥中 *AtBGLU11* 和 *AtBGLU42* 等成员有 13 个外显子^[10], 而系统进化树中与 *AtBGLU11* 同亚族的 *CmBGLU10* 和与 *AtBGLU42* 同亚族的 *CmBGLU11* 的基因也存在 13 个外显子, 说明同一亚族的 BGLU 家族成员在结构与基因功能上具有相似性。*BGLU14* 中有 14 个内含子, 先前

的研究中 BGLU 家族成员内含子数量均未超过 12 个, 在 2004 年拟南芥 BGLU 家族鉴定的研究中也提到内含子的增加相对较为少见, 进化的过程中基因结构变化大多为内含子的减少^[10], 后续可以进一步探究 *BGLU14* 的基因结构。本研究发现, 甜瓜 BGLU 家族只有部分成员参与低温响应, 在 ABA、高盐和干旱处理下, 甜瓜 BGLU 家族基因均有响应, 该研究结果与在拟南芥上的结果相似, 而与水稻上的研究结果有所不同^[18], 提示甜瓜 BGLU 家族在胁迫响应的功能方面可能与同为双子叶植物的拟南芥更相似。此外, 在顺式作用元件分析中发现 *CmBGLU6* 有参与渗透胁迫诱导的 MYB 结合位点, 且 *CmBGLU6* 受干旱和高盐诱导持续高水平表达, 推测该成员对干旱和高盐的响应可能通过 MYB 转录因子调控。

目前, 关于 AGLU 家族和 BGLU 家族鉴定和非生物胁迫方面的报道较少, 本研究报道了 2 个家族的生物信息学特征和功能预测, 初步明确了在多种非生物胁迫下的关键基因, 但基因的功能和具体的调控机制还需要更进一步的研究和验证。

4 结论

本研究在甜瓜基因组中共鉴定出 5 个 AGLU 成员和 18 个 BGLU 成员。两家族成员蛋白结构保守性较高, 提示其功能可能也有一定保守性。低温下约 1/2 基因表达受抑制, 其中 *CmAGLU5* 和 *CmBGLU7* 可能是两家族中响应低温的关键成员。甜瓜 AGLU 和 BGLU 家族成员均响应 ABA、高盐和干旱胁迫, AGLU 家族中 *CmAGLU3* 是响应 ABA 和高盐胁迫的关键基因, *CmAGLU4* 是响应干旱胁迫的关键基因; BGLU 家族中 *CmBGLU18* 是响应 ABA 的关键基因, *CmBGLU6* 是响应高盐和干旱胁迫的关键基因。上述基因可作为后续非生物胁迫机制

研究和抗性育种的候选基因。本研究为深入探讨甜瓜 AGLU 家族和甜瓜 BGLU 家族的基因功能和作用机制提供了理论基础。

REFERENCES

- [1] CHIBA S. Molecular mechanism in alpha-glucosidase and glucoamylase[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1997, 61(8): 1233-1239.
- [2] HENRISSAT B, DAVIES G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 1997, 7(5): 637-644.
- [3] 胡先望, 杨震, 陈朋, 梁宁, 严晓娟. α -葡萄糖苷酶的研究进展[J]. *甘肃科学学报*, 2011, 23(1): 143-148. HU XW, YANG Z, CHEN P, LIANG N, YAN XJ. Progress in research on α -glucosidases[J]. *Journal of Gansu Sciences*, 2011, 23(1): 143-148 (in Chinese).
- [4] RAWAT R, GULATI A. Seasonal and clonal variations in some major glycosidic bound volatiles in Kangra tea (*Camellia Sinensis* (L.) O. Kuntze)[J]. *European Food Research and Technology*, 2008, 226(6): 1241-1249.
- [5] MORITA K, WAKABAYASHI M, KUBOTA K, KOBAYASHI A, HERATH NL. Aglycone constituents in fresh tea leaves cultivated for green and black tea[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1994, 58(4): 687-690.
- [6] LI CP, SWAIN E, POULTON JE. *Prunus serotina* amygdalin hydrolase and prunasin hydrolase: purification, N-terminal sequencing, and antibody production[J]. *Plant Physiology*, 1992, 100(1): 282-290.
- [7] BONGON JR. Beta-glucosidase from normal and brittle-stem mutant rice cultivars (*Oryza sativa* L.): isolation, purification and characterization[D]. Philippines: College Laguna, 1994.
- [8] MATSUURA M, SASAKI J, MURAO S. Studies on β -glucosidases from soybeans that hydrolyze daidzin and genistin: isolation and characterization of an isozyme[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1995, 59(9): 1623-1627.
- [9] EKSITIKUL T, CHULAVATNATOL M. Characterization of cyanogenic β -glucosidase (Linamarase) from cassava (*Manihot esculenta* Crantz)[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1988, 266(1): 263-269.
- [10] XU ZW, ESCAMILLA-TREVIÑO L, ZENG LH, LALGONDAR M, BEVAN D, WINKEL B, MOHAMED A, CHENG CL, SHIH MC, POULTON J, ESEN A. Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 1[J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 55(3): 343-367.
- [11] OPASSIRI R, POMTHONG B, ONKOKSOONG T, AKIYAMA T, ESEN A, KETUDAT CAIRNS JR. Analysis of rice glycosyl hydrolase family 1 and expression of Os4bglu12 beta-glucosidase[J]. *BMC Plant Biology*, 2006, 6: 33.
- [12] 张曼, 王志城, 刘正文, 王国宁, 王省芬, 张艳. 陆地棉 BGLU 基因家族成员的全基因组鉴定与表达分析[J]. *中国农业科技导报*, 2023, 25(2): 48-59.
- [13] ZHANG M, WANG ZC, LIU ZW, WANG GN, WANG SF, ZHANG Y. Genome-wide identification and expression analysis of BGLU gene family members in upland cotton[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2023, 25(2): 48-59 (in Chinese).
- [13] 姚新转, 陈凌霄, 张宝会, 吕立堂. 茶树 BGLU 基因家族的鉴定和表达模式分析[J]. *种子*, 2022, 41(11): 1-9.
- [14] YAO XZ, CHEN LX, ZHANG BH, LÜ LT. Identification and expression pattern analysis of BGLU gene family in *Camellia sinensis* L.[J]. *Seed*, 2022, 41(11): 1-9 (in Chinese).
- [14] 王雅兰, 周罗静, 张灵迁, 章景, 卞金辉, 高继海. 白芷全基因组测序分析及 BGLU 基因家族分析[J]. *广西植物*, 2024, 44(4): 777-792.
- [15] WANG YL, ZHOU LJ, ZHANG LY, ZHANG J, BIAN JH, GAO JH. Complete genome sequencing and BGLU gene family analysis of *Angelica dahurica*[J]. *Guihaia*, 2024, 44(4): 777-792 (in Chinese).
- [15] 柯丹霞, 刘永辉, 张静静, 陈琼杰. 大豆 BGLU 基因家族全基因组鉴定与表达分析[J]. *信阳师范学院学报(自然科学版)*, 2019, 32(3): 372-378.
- [16] KE DX, LIU YH, ZHANG JJ, CHEN QJ. Genome-wide identification and expression analysis of BGLU family genes in soybean[J]. *Journal of Xinyang Normal University (Natural Science Edition)*, 2019, 32(3): 372-378 (in Chinese).
- [16] KETUDAT CAIRNS JR, MAHONG B, BAIYA S, JEON JS. β -Glucosidases: multitasking, moonlighting or simply misunderstood?[J]. *Plant Science*, 2015, 241: 246-259.
- [17] SAMPEDRO J, VALDIVIA ER, FRAGA P, IGLESIAS N, REVILLA G, ZARRA I. Soluble and membrane-bound β -glucosidases are involved in trimming the xyloglucan backbone[J]. *Plant Physiology*, 2017, 173(2): 1017-1030.
- [18] 苏振峰. GH1 β -葡萄糖苷酶在拟南芥和水稻中的生物信息学及表达模式分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2014.
- [18] SU ZF. Bioinformatics and expression pattern analysis of GH1 β -glucosidase in *Arabidopsis thaliana* and rice[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [19] LI M, ZHAO WL, DU QJ, XIAO HJ, LI JQ, WANG JQ, SHANG FD. Abscisic acid and hydrogen peroxide regulate proline homeostasis in melon seedlings under cold stress by forming a bidirectional closed loop[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2023, 205: 105102.
- [20] WEI SW, GAO LW, ZHANG YD, ZHANG FR, YANG X, HUANG DF. Genome-wide investigation of the NAC transcription factor family in melon (*Cucumis melo* L.) and their expression analysis under salt stress[J]. *Plant Cell Reports*, 2016, 35(9): 1827-1839.
- [21] 刘河, 卢世雄, 梁国平, 毛娟, 陈佰鸿. 苹果 TIPs 亚家族成员鉴定与干旱胁迫响应分析[J]. *西北植物学报*, 2024, 44(7): 1083-1093.
- [21] LIU H, LU SX, LIANG GP, MAO J, CHEN BH. Identification of apple TIPs subfamily members and analysis of drought stress response[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2024, 44(7): 1083-1093 (in Chinese).
- [22] 凡超, 杨杰, 陈蓉, 刘伟, 向旭. 荔枝 HSP70 家族鉴

- 定及其响应非生物胁迫的表达分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(4): 1102-1119.
- FAN C, YANG J, CHEN R, LIU W, XIANG X. Identification of litchi HSP70 family and its expression analysis in response to abiotic stress[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(4): 1102-1119 (in Chinese).
- [23] 席克勇, 田野, 王艳红, 刘奕清, 尹军良, 梁红艳, 朱学栋, 朱永兴. 生姜 IPT 基因家族的鉴定与表达分析[J]. 植物遗传资源学报, 2024, 25(2): 279-293.
- XI KY, TIAN Y, WANG YH, LIU YQ, YIN JL, LIANG HY, ZHU XD, ZHU YX. Identification and expression analysis of IPT gene family in ginger[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2024, 25(2): 279-293 (in Chinese).
- [24] 凡超, 杨杰, 陈蓉, 刘伟, 向旭. 荔枝 VQ 基因家族鉴定及其对非生物胁迫的响应[J]. 西北植物学报, 2024, 44(5): 739-750.
- FAN C, YANG J, CHEN R, LIU W, XIANG X. Identification of Litchi VQ gene family and its response to abiotic stress[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2024, 44(5): 739-750 (in Chinese).
- [25] 杨阳, 付鸿博, 刘媛媛. 苹果 AAP 基因家族的鉴定与分析[J]. 分子植物育种, 2022, 20(18): 5947-5961.
- YANG Y, FU HB, LIU YY. Identification and analysis of the AAP gene family in apple[J]. Molecular Plant Breeding, 2022, 20(18): 5947-5961 (in Chinese).
- [26] SRIVASTAVA AK, LU YM, ZINTA G, LANG ZB, ZHU JK. UTR-dependent control of gene expression in plants[J]. Trends in Plant Science, 2018, 23(3): 248-259.
- [27] CHRISTENSEN SJ, MADSEN MS, ZINCK SS, HEDBERG C, SØRENSEN OB, SVENSSON B, MEYER AS. Enzymatic potato starch modification and structure-function analysis of six diverse GH77 4- α -glucanotransferases[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 224: 105-114.
- [28] ZENG R, HU Q, YIN XY, HUANG H, YAN JB, GONG ZW, YANG ZH. Cloning a novel endo-1,4- β -D-glucanase gene from *Trichoderma virens* and heterologous expression in *E. coli*[J]. AMB Express, 2016, 6(1): 108.
- [29] 岳振峰, 陈小霞, 彭志英. α -葡萄糖苷酶研究现状及进展[J]. 食品与发酵工业, 2000, 26(3): 63-67, 98.
- YUE ZF, CHEN XX, PENG ZY. Research status and progress of α -glucosidase[J]. Food and Fermentation Industries, 2000, 26(3): 63-67, 98 (in Chinese).
- [30] SUGANO S, SUGIMOTO T, TAKATSUJI H, JIANG CJ. Induction of resistance to *Phytophthora sojae* in soyabean (*Glycine max*) by salicylic acid and ethylene[J]. Plant Pathology, 2013, 62(5): 1048-1056.
- [31] 黄诗玮, 马述, 田云, 卢向阳. 植物中响应茉莉素应答的顺式作用元件[J]. 生物技术通报, 2013(4): 8-13.
- HUANG SW, MA S, TIAN Y, LU XY. Cis-acting elements in response to jasmine response in plants[J]. Biotechnology Bulletin, 2013(4): 8-13 (in Chinese).
- [32] 崔国新, 侯杰, 佟玲, 许志茹. 植物基因光反应元件及其结合蛋白[J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(10): 991-1000.
- CUI GX, HOU J, TONG L, XU ZR. Plant gene light response element and its binding protein[J]. Plant Physiology Journal, 2010, 46(10): 991-1000 (in Chinese).
- [33] COMELLI RN, GONZALEZ DH. Identification of regulatory elements involved in expression and induction by sucrose and UV-B light of the *Arabidopsis thaliana* COX5b-2 gene, encoding an isoform of cytochrome c oxidase subunit 5b[J]. Physiologia Plantarum, 2009, 137(3): 213-224.
- [34] 丁菲. 低温胁迫下与茶树糖代谢相关基因的克隆与表达[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2012.
- DING F. Cloning and expression of genes related to sugar metabolism in tea plants under low temperature stress[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2012 (in Chinese).
- [35] CUI J, CHEN B, WANG HJ, HAN Y, CHEN X, ZHANG W. Glucosidase II β -subunit, a novel substrate for caspase-3-like activity in rice, plays as a molecular switch between autophagy and programmed cell death[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 31764.
- [36] 潘利华, 罗建平. β -葡萄糖苷酶的研究及应用进展[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 803-807.
- PAN LH, LUO JP. Research and application progress of β -glucosidase[J]. Food Science, 2006, 27(12): 803-807 (in Chinese).
- [37] 杨巍, 赵丽芬, 杨娟, 李飞, 王天文, 邓英. 黄瓜 AP2/ERF 基因家族全基因组鉴定及表达模式分析[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2024, 39(3): 127-143.
- YANG W, ZHAO LF, YANG J, LI F, WANG TW, DENG Y. Whole genome identification and expression pattern analysis of cucumber AP2/ERF gene family[J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2024, 39(3): 127-143 (in Chinese).
- [38] 谢政文. 禾本科植物 F-box 和 LBD 基因家族的比较和进化分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2015.
- XIE ZW. Comparison and evolutionary analysis of F-box and LBD gene families in Gramineae[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2015 (in Chinese).