

DNA 甲基化影响不同倍性西瓜抗旱锻炼相关生理指标的分析

王潇晴^{1,2,3}, 高宇^{1,2,3}, 江雪飞^{1,3*}, 乔飞^{2*}

1. 海南大学热带农林学院/海南省热带园艺作物品质调控重点实验室, 海南儋州 571737; 2. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 海南海口 571101; 3. 海南大学三亚南繁研究院, 海南三亚 572025

摘要: 为了探索 DNA 甲基化对不同倍性西瓜抗旱锻炼的影响, 本研究以不同倍性西瓜悬浮培养细胞为材料, 使用甘露醇 (Mannitol) 模拟干旱胁迫, 经过胁迫、恢复、再胁迫的方法测定细胞生长情况和抗性相关生理指标。同时, 利用 DNA 甲基转移酶抑制剂 5-氮杂胞苷 (5-AzaC) 处理, 探索甲基化对这些生理指标的影响。结果表明, 在干旱条件下, 抗逆锻炼对细胞的生长有显著的保护作用。但是, 5-AzaC 抑制了细胞的质外体碱化, 提升了丙二醛 (MDA) 含量, 使脯氨酸 (Pro) 含量和超氧化物歧化酶 (SOD) 等保护酶活性降低, 加剧了渗透胁迫的损伤, 部分逆转了细胞抗旱锻炼的效果, 且在西瓜二倍体和三倍体细胞中尤其明显。通过主成分分析发现, MDA、Pro 含量和苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、过氧化氢酶 (CAT)、抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 活性指标可以作为西瓜细胞干旱胁迫抗逆锻炼效果的主要评定指标。本研究可为 DNA 甲基化参与西瓜抗性锻炼效果的评价指标筛选和形成机制提供参考。

关键词: 西瓜; 倍性; DNA 甲基化; 干旱胁迫; 生理指标; 抗旱锻炼

中图分类号: S651 文献标志码: A

Effects of DNA Methylation on Physiological Indexes Related to Drought Hardening in Watermelon with Different Ploidy

WANG Xiaoping^{1,2,3}, GAO Yu^{1,2,3}, JIANG Xuefei^{1,3*}, QIAO Fei^{2*}

1. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University / Key Laboratory for Quality Regulation of Tropical Horticultural Crops of Hainan Province, Danzhou, Hainan 571737, China; 2. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Sanya Institute of Breeding and Multiplication, Hainan University, Sanya, Hainan 572025, China

Abstract: In order to explore the effect of DNA methylation on drought hardening of different ploidy watermelon, mannitol was used to mimic drought stress in suspension cultured cells of different ploidy watermelon. The cell growth and resistance related physiological indexes were measured after stress, recovery and re-stress treatments. Meanwhile, the DNA methyltransferase inhibitor 5-azacytidine (5-AzaC) was used to explore whether methylation is involved in resistance regulation. The results showed that 5-AzaC could retard the growth, inhibit the extracellular alkalization, increase the content of malondialdehyde, bring down the content proline and the activity of protective enzymes such as SOD in all types of cells. Moreover, it caused the membrane permeability raising in diploid and triploid cells. Above results suggest that 5-AzaC can aggravate the osmotic stress injury and reverse the effects of drought hardening partially. Principal component analysis revealed that malondialdehyde content, proline content, PAL, CAT and APX activity could be used as the main evaluation indexes for evaluation the effect of drought hardening. This study would provide clues for mining the physiological indexes for evaluate the effects of stress hardening and the mechanism of DNA methylation involved in watermelon resistance regulation.

Keywords: watermelon; ploidy; DNA methylation; drought stress; physiological index; drought hardening

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.04.019

收稿日期 2024-10-02; 接受日期 2024-12-16

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 32260801); 海南省自然科学基金高层次人才项目 (No. 321RC473)。

作者简介 王潇晴 (1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 园艺植物逆境生理与分子生物学。*通信作者 (Corresponding author): 江雪飞 (JIANG Xuefei), E-mail: xuefei.jiang@hainanu.edu.cn; 乔飞 (QIAO Fei), E-mail: fei.qiao@catas.cn。

西瓜 (*Citrullus lanatus*) 是一种非常重要的园艺作物。在世界上, 中国西瓜种植面积最大, 其年产量占世界总产量的 67% 左右^[1-2]。干旱不仅会影响西瓜的光合作用, 抑制细胞有丝分裂, 使细胞膜发生膜质过氧化, 还会影响植物的电导率、渗透调节功能及活性氧代谢等^[3-5]。因此, 生产上经常在苗期利用适度干旱锻炼即“蹲苗”的措施来提高作物的抗旱能力^[6]。

抗逆锻炼是指植物经过短期逆境处理, 植物再次遭遇逆境时表现出更强的抗性, 这种响应也被称为“胁迫记忆”^[4-5]。例如, 干旱锻炼后的小麦遇到二次胁迫时, 与未经过干旱锻炼的小麦相比可以缓解其减产^[7]; 再次遭遇干旱时, 其苗高和鲜质量都相对较高^[8]。并且丙二醛 (MDA) 含量减少、脯氨酸 (Pro) 含量升高, 过氧化物酶 (POD)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 等活性降低, 说明干旱锻炼可以减少活性氧的产生并且提高植物抗旱性^[9-11]。然而, 植物胁迫记忆的产生机制目前仍不清楚。

研究发现, 胁迫记忆的产生过程与 DNA 甲基化修饰紧密相关^[12]。植物在多倍体形成及其后续稳定阶段, 基因结构会经历重构, 基因的表达模式也会发生改变; 在此过程中, 表观遗传修饰 (甲基化等) 对基因功能和结构的变化起到关键作用, 促进了植物的适应性和多样性^[13-15], 而多倍体的产生经常会引起 DNA 甲基化变异^[16]。西瓜多倍体材料丰富, 不同倍性材料 DNA 甲基化研究方面已取得长足进展。例如, 已明确西瓜基因组中 DNA 甲基化水平与倍性之间缺乏关联^[17], 并且观察到三倍体西瓜表现出一种独特的去甲基化模式^[18]; 在逆境条件下, 发现不同倍性材料之间甲基化差异不明显, 但在相同 NaCl 浓度处理下二倍体甲基化率大于四倍体和三倍体^[19]。然而, DNA 甲基化是否参与了西瓜的抗旱锻炼目前尚未见报道。

悬浮培养细胞具有生长一致、周期稳定、受环境影响小等优点, 在细胞水平研究抗性形成机制方面有着独特的优势^[20]。因此, 本研究以不同倍性西瓜悬浮细胞为材料, 通过测定 DNA 甲基化对细胞生长量、电导率、质外体碱、MDA、Pro 含量和 SOD、POD 活性等生理指标的变化, 初步了解不同倍性西瓜抗旱锻炼抗性形成机制, 为西瓜抗旱生理研究和栽培提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

利用西瓜叶片诱导愈伤组织, 培育并筛选出一致性、分散性较好的二倍体 (2n)、三倍体 (3n) 和四倍体 (4n) 西瓜悬浮细胞作为试验材料。该材料目前保存于中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所。悬浮细胞使用恒温摇床 150 r/min, 25 °C, 黑暗条件下进行培养, 培养基配方与文献 [21] 相同, 初始接种量为 5 mL, 继代周期为 10 d。

1.2 方法

1.2.1 试验处理 使用甘露醇 (Mannitol) 模拟干旱胁迫, 参考 ZHU 等^[22]的方法设定浓度 (100 mmol/L); 使用 DNA 甲基化酶抑制剂 5-氮杂胞苷 (5-AzaC) 调节基因组 DNA 甲基化水平, 参考 ZHU 等^[20]的方法设定浓度 (100 μmol/L)。每个倍性细胞系设计 4 个试验处理: (1) CK (对照); (2) S (胁迫处理); (3) S-R (胁迫处理+恢复); (4) A (胁迫处理+甲基化) (图 1)。

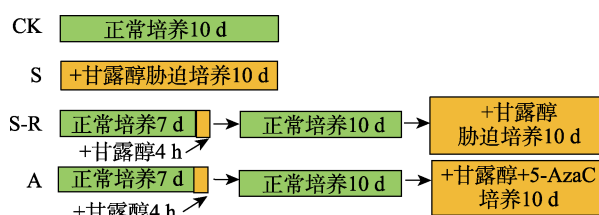


图 1 试验处理方案

Fig. 1 Schematic diagram of treatments

处理后的细胞于平台期 (10 d) 连同培养基倒入真空抽滤装置, 抽干培养液, 称取 0.10 g 细胞于 2 mL 离心管中液氮速冻, 然后存放于 -80 °C 超低温冰箱待用。

1.2.2 悬浮细胞生长量及鲜质量的测定 使用细胞压积法 (packed cell volume, PCV) 测定悬浮细胞的生长量^[22]。在平台期将悬浮细胞连同培养基倒入 50 mL 量筒中密封, 静置过夜, 记录悬浮培养体系总体积 (V_T) 以及细胞沉淀体积 (V_C), 计算出细胞的总体积变化: $\Delta PCV = V_C / V_T$ 。在平台期将细胞和培养基一同倒入真空抽滤装置, 将悬浮细胞抽至微干, 使用万分之一天平进行称重, 记录细胞鲜质量。

1.2.3 悬浮培养细胞培养液 pH (质外体碱化) 的测定 在细胞快速生长期 (7 d), 无菌条件下吸取 2 mL 细胞于 5 mL 离心管中, 放入摇床中 150 r/min, 25 °C 培养 30~60 min 后加入适量蒸馏

水,再次稳定 30 min 后倒入小烧杯^[22]。进行以下 3 个处理:(1) Mannitol 处理 (100 mmol/L Mannitol);(2) CK 处理 (等体积超纯水);(3) Mannitol+5-AzaC 处理 (100 mmol/L Mannitol+100 μ mol/L 5-AzaC);以上 3 个处理 30 min,分别使用 pH 计 (Mettler toledo, pH 12) 测定 pH 的相对变化量 (Δ pH)。

1.2.4 培养液电导率的测定 在细胞指数生长期 (7 d),无菌环境下吸取 5 mL 细胞于 10 mL 离心管中,将其放入 150 r/min, 25 $^{\circ}$ C 摇床培养 30~60 min 后加入适量蒸馏水,继续稳定 30 min 后,进行以下 3 个处理:(1) Mannitol 处理 (100 mmol/L Mannitol);(2) CK 处理 (等体积超纯水);(3) Mannitol+5-AzaC 处理 (100 mmol/L Mannitol+100 μ mol/L 5-AzaC)。以上 3 个处理 10 min,分别立即测其电导率。

1.2.5 丙二醛含量和脯氨酸含量测定 参考郑子凡等^[23]的方法,使用试剂盒 (苏州科铭生物技术有限公司) 分光光度法测定丙二醛 (MDA) 含量;磺基水杨酸法测定脯氨酸 (Pro) 含量。

1.2.6 抗氧化酶活性测定 参考郑子凡等^[23]的方法,使用试剂盒 (苏州科铭生物技术有限公司) 愈创木酚法测定过氧化物酶 (POD) 活性;采用氮蓝四唑 (NBT) 法测定超氧化物歧化酶 (SOD) 活性;采用生化法测定抗坏血酸过氧化物酶

(APX) 活性;采用紫外分光光度计测定谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、过氧化氢酶 (CAT)、苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性。

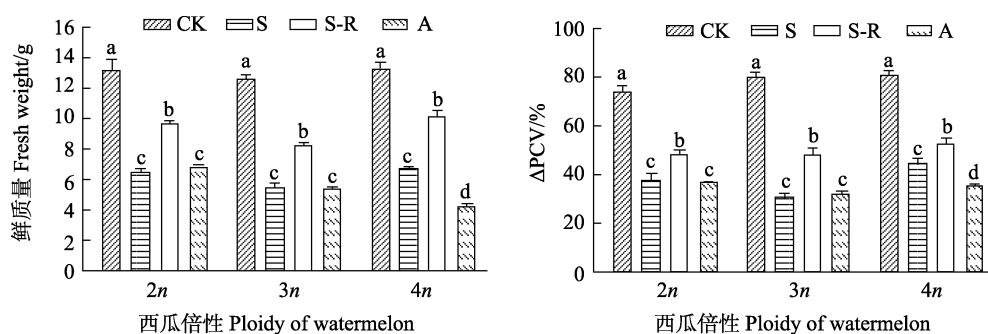
1.3 数据处理

每个处理 3 个生物学重复。使用 Excel 软件整理数据,采用统计分析软件 DPS 15.10 的 Duncan 法进行差异显著性分析。用 Graphpad Prism 8 作图。使用隶属函数法^[24]观察 DNA 甲基化对细胞影响并进行综合评价。当测定指标的变化率与抗旱性呈正相关,则 $X_u=(X-X_{\min})/(X_{\max}-X_{\min})$;当测定指标的变化率与抗旱性呈负相关,则 $X_u=1-(X-X_{\min})/(X_{\max}-X_{\min})$ 。式中, X_u 表示不同倍性西瓜悬浮细胞某一测定指标的变化率, $X_{\min}$ 表示该指标中的最小值, $X_{\max}$ 表示最大值。

2 结果与分析

2.1 渗透胁迫和 DNA 甲基化对细胞生长的影响

由图 2 可知,处理 S 可以显著降低细胞的鲜质量和总体积,其中,2n、3n、4n 在胁迫处理后的鲜质量为对照的 40%~50%。但经 S-R 处理,细胞的生长可以恢复至对照的 70%。而 2n、3n、4n 处理 A 的鲜质量分别是处理 S-R 的 71.31%、66.35%、41.79%, Δ PCV 也呈现了相同的降低趋势,逆转了抗逆锻炼的效果。说明 DNA 的甲基化参与了抗逆锻炼对细胞生长的保护。



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P<0.05$).

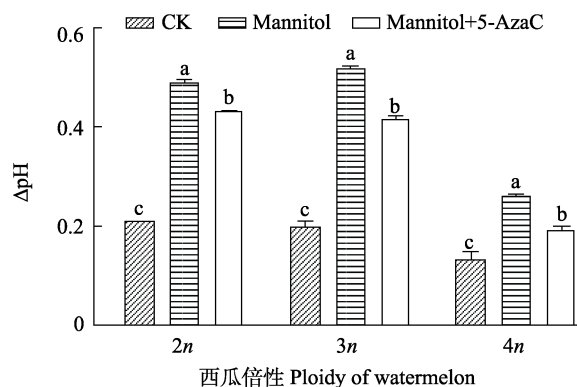
图 2 渗透胁迫和甲基化对西瓜细胞鲜质量、 Δ PCV 的影响

Fig. 2 Effect of osmotic stress and methylation on cell fresh weight and total volume

2.2 渗透胁迫和甲基化对质外体碱化的影响

质外体碱化是植物细胞遭受逆境后的重要保护机制之一^[25]。由图 3 可知,在 2n、3n、4n 中, Mannitol 处理的 Δ pH 均比 CK 提高,而 Mannitol+5-AzaC 处理的 Δ pH 均比 Mannitol 处理降低。表

明渗透胁迫可以使培养液 pH 迅速上升。在 3n 中, Δ pH 变化最为明显, Mannitol 处理比 CK 升高约 0.32。同时, 5-AzaC 可以降低质外体碱化的程度, Mannitol+5-AzaC 处理的 Δ pH 比 Mannitol 处理降低约 0.06~0.10。表明 DNA 的甲基化也参与了质



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P<0.05$).

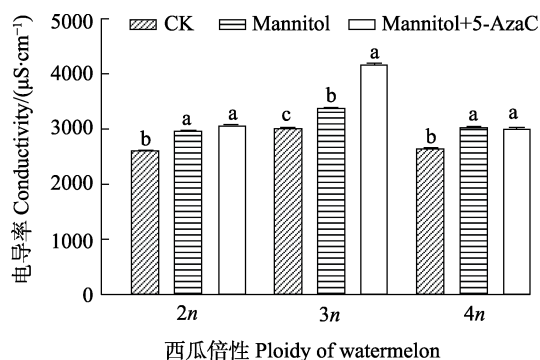
图 3 渗透胁迫和甲基化对质外体碱化的影响

Fig. 3 Effects of osmotic stress and methylation on extracellular alkalization

外体碱化。

2.3 渗透胁迫和甲基化对细胞膜透性影响

当植物遭遇逆境时, 细胞膜结构极易受损, 这种损伤使细胞膜的通透性增加, 细胞内部电解质等成分流失, 细胞电导率上升^[26-27]。因此, 可以通过测量电导率评估细胞膜所遭受的损害程度。由图 4 可知, 在 2n、3n、4n 中, Mannitol 处理的电导率均比 CK 提高。而 Mannitol+5-AzaC 处理 3n 的电导率再次升高, 且与 CK 差异显著, 2n、4n 电导率则基本保持不变。同时, Mannitol+5-AzaC 处理 2n、4n 的电导率小幅度上升, 但与 CK 差异不显著; 而在 3n 中, 电导率比 CK 约上升 800 $\mu\text{S}/\text{cm}$, 差异显著。表明在三倍体中, 抑制 DNA 去甲基化可导致细胞膜受损程度加深。



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P<0.05$).

图 4 渗透胁迫和甲基化对细胞膜透性的影响

Fig. 4 Effects of osmotic stress and methylation on membrane permeability

2.4 DNA 甲基化对细胞丙二醛含量和脯氨酸含量的影响

MDA 是细胞膜磷脂双分子层受损, 引发细胞膜脂质过氧化的重要产物, 可以评估膜脂过氧化的变化^[28]。由图 5 可知, S-R 处理的 MDA 含量显著降低; 而 A 处理 2n、3n、4n 的 MDA 含量均比 S-R 处理显著升高, MDA 含量分别是 S-R 处理的 1.13 倍、1.12 倍、1.31 倍。说明抗逆锻炼可以降低干旱胁迫引起的 MDA 对质膜的伤害, 并且 DNA 的甲基化可能参与了 MDA 的生成调控。但是, 在三倍体和四倍体中, 对照的 MDA 含量较高, 倍性增加造成 MDA 水平升高的问题仍有待探索。

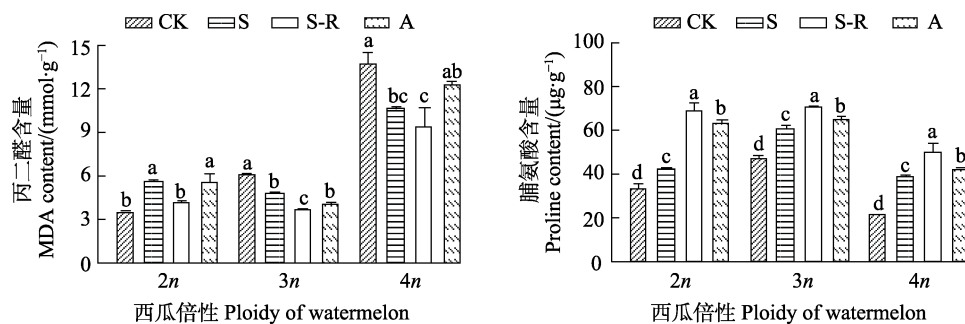
植物遭遇干旱胁迫时可以通过调节渗透调节物质增强植物的抗旱性^[29]。S 处理的 Pro 含量升高 13~22 $\mu\text{g}/\text{g}$; 2n 的 Pro 含量升高约 30 $\mu\text{g}/\text{g}$, 3n、4n 的 Pro 含量升高约 11 $\mu\text{g}/\text{g}$; 而复合使用 5-AzaC 后降低 5~15 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。在 2n、3n、4n 中, S 处理的 Pro 含量均升高, 而 A、S-R 处理的 Pro 含量的上升趋势均受到抑制。说明抑制 DNA 甲基化降低了抗旱锻炼的效果, 表明 DNA 甲基化参与了细胞的渗透调节过程。

2.5 DNA 甲基化对几种抗氧化酶活性的影响

植物遭遇干旱胁迫时, 可以通过调节抗氧化酶 POD、SOD、APX、GSH-Px、CAT、PAL 等的活性来减轻干旱胁迫带来的伤害^[8-11]。由图 6 可知, 在 2n、3n、4n 中, S 处理的几种抗氧化酶活性均显著提高, 而 S-R 处理均有所下降且差异显著。说明抗逆锻炼可以显著降低过氧化物的产生。而 A 处理的抗氧化酶活性在不同倍性细胞上的变化趋势不同。如 SOD、APX、CAT、PAL 活性在不同倍性细胞中, A 处理的变化趋势均显著逆转。而 POD、GSH-Px 活性在不同倍性细胞中的变化趋势无明显规律。说明去甲基化/甲基化均有可能参与了细胞清除过氧化物的过程, 但对不同保护酶的作用不尽相同。

2.6 DNA 甲基化对细胞影响的综合性评价

对以上生理指标的相关性分析发现, 很多指标间存在极显著相关性 (表 1), 为了更有效地探讨众多生理指标间的相关性和重要性, 使用主成分分析^[24]进行进一步综合评价 (表 2)。在干旱胁迫抗逆锻炼下, MDA、Pro 含量及 PAL、CAT、APX 活性可以作为评价 DNA 甲基化影响细胞生

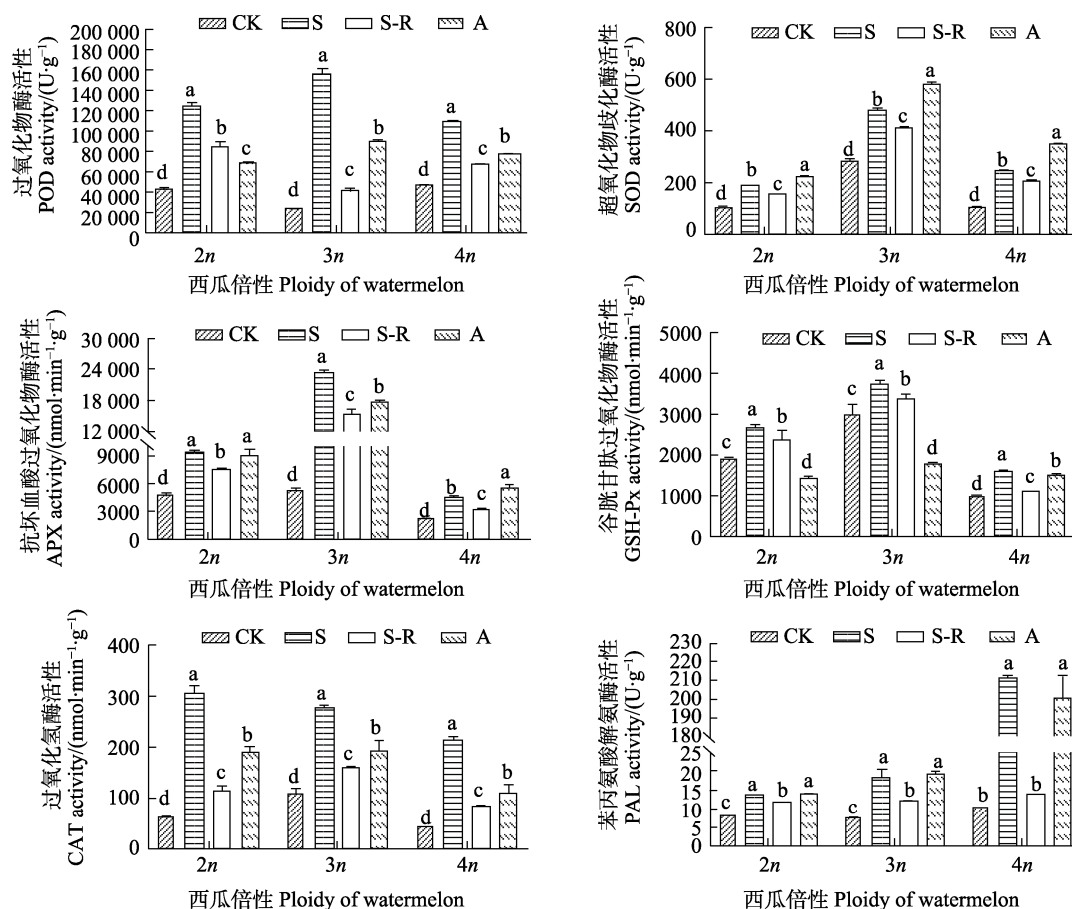


不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$).

图 5 DNA 甲基化对丙二醛含量和脯氨酸含量的影响

Fig. 5 Influence of DNA methylation on MDA content and proline content



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$).

图 6 DNA 甲基化对抗氧化酶活性的影响

Fig. 6 Influence of DNA methylation on activities of antioxidant

长的主要指标, SOD、POD 活性和 pH 作为二级指标。通过计算细胞在 5-AzaC 处理后的隶属函数值发现, 三倍体受甲基化的影响最大 (平均隶属函数值 0.700); 二倍体次之 (平均隶属函数值 0.433), 四倍体受甲基化的影响最小 (平均隶属函数值 0.365)。

3 讨论

不同植物在干旱胁迫下会表现出不同的内部适应性机制, 即便是同一物种的不同品种, 在遭遇相同或不同的胁迫时, 也可能呈现出不同的应对策略与生理响应模式^[30]。在拟南芥^[31]和番茄^[32]中均发现, 遭遇干旱胁迫之后植物表现出更好的

表 1 干旱锻炼和 DNA 甲基化处理不同倍性西瓜悬浮细胞生理生化指标相关性分析
Tab. 1 Correlation analysis of physiological and biochemical indexes of watermelon suspension cells with different ploidy under drought hardening and DNA methylation

指标 Index	鲜质量 Fresh weight	ΔPCV	pH	电导率 Conductivity	MDA	Pro	POD	SOD	APX	GPX	CAT
ΔPCV	0.953**										
pH	0.003	0.020									
电导率	0.119	0.106	0.263**								
MDA	0.044	0.201	-0.195	0.435**							
Pro	-0.433**	-0.566**	0.254	-0.337*	-0.664**						
POD	-0.698**	-0.742**	-0.037	-0.103	-0.077	0.180					
SOD	-0.651**	-0.590**	0.126	-0.626**	-0.285	0.570**	0.330*				
APX	-0.561**	-0.612**	0.154	-0.661**	-0.583**	0.654**	0.538**	0.811**			
GSH-Px	-0.152	-0.158	0.187	-0.552**	-0.629**	0.475**	0.255	0.416*	0.670**		
CAT	-0.714**	-0.725**	0.138	-0.244	-0.340*	0.350*	0.800**	0.449**	0.645**	0.496**	
PAL	-0.473**	-0.292	-0.142	0.258	0.569**	-0.274	0.226	0.090	-0.254	-0.293	0.071

注：*，**分别表示在 0.05、0.01 水平（双尾）显著相关或极显著相关。
Note: *, ** indicates significant correlation or extremely significant correlation at the 0.05, 0.01 level (2-tailed).

表 2 干旱锻炼和 DNA 甲基化处理不同倍性西瓜悬浮细胞主成分分析值及贡献率

Tab. 2 Principal component analysis was used to assess contribution rate of suspended cells derived from watermelon with varying ploidy under drought hardening and DNA methylation

指标 Index	主成分 1 Principal component 1	主成分 2 Principal component 2
MDA	-0.984	0.127
Pro	0.973	-0.198
PAL	-0.947	0.307
CAT	0.928	-0.220
APX	0.886	0.459
POD	0.437	0.892
SOD	0.452	0.880
pH	-0.481	0.823
GSH-Px	0.594	0.799
ΔPCV	-0.532	-0.780
鲜质量	0.637	-0.755
电导率	-0.537	0.734
特征值	6.415	5.010
方差贡献率/%	53.462	41.754
累积方差贡献率/%	53.462	95.216

生长状况，盐和碱性胁迫诱导了水稻 DNA 甲基化的跨代改变^[33]，HERMAN 等^[34]研究也发现桃叶蓼存在抗性跨代遗传的现象。本研究通过干旱预处理细胞后，将其进行正常恢复培养，约经过 2 次细胞分裂之后再次干旱胁迫，发现细胞比直接胁迫生长更好，说明通过抗旱锻炼后细胞可能具有更强的抗旱性，由此推测西瓜细胞也可能存

在跨代遗传的现象。复合使用 5-AzaC 处理后，抗旱锻炼的效果被抑制，说明 DNA 去甲基化过程和抗性调节相关，并且甲基化可能是胁迫记忆形成的重要机制之一。

在干旱胁迫下，还可以通过测定细胞外 pH 和电导率判断干旱对番茄细胞生长环境的影响^[35]。铝胁迫复合使用 5-AzaC 处理后，还可引起质外体碱化现象，造成细胞生长环境改变，使生长受到抑制，并对细胞膜系统造成了伤害^[26-27]。XU 等^[36]研究发现四倍体相比于二倍体和三倍体具有更大的基因组，基因表达水平保留更完整、维持相对较低的甲基化水平。此外，甲基化相关酶和调控因子的表达水平等差异也可能影响细胞对甲基化抑制剂的敏感性^[37]。本研究发现，四倍体西瓜悬浮细胞使用甘露醇处理后略高于甘露醇和 5-AzaC 共处理的电导率。由此推测四倍体西瓜基因组较大，所以受到的影响较小，本研究通过对不同倍性细胞进行综合评价，结果也表明四倍体受到甲基化的影响较小。

此外，渗透调节物质也会影响悬浮细胞的生长^[29]，且在不同的倍性中具有不同的表现。董民会^[38]发现多倍体猕猴桃比二倍体染色体数量较多引起的基因剂量效应减缓了 MDA 的形成。使用秋水仙碱诱导猕猴桃发现，盐胁迫 10 d 时的 MDA 含量低于胁迫 5 d 的 MDA 含量^[38]。本研究发现，三倍体和四倍体渗透胁迫 10 d 时 MDA 含量则低于对照，由此推测可能长时间胁迫导致细

胞启动防御机制,增加了其适应能力,导致其 MDA 含量低于对照。而该现象并没有发生在二倍体中,说明胁迫诱导产生的 MDA 可能和基因剂量负相关。复合使用 5-AzaC 处理细胞后与抗旱锻炼后相比,MDA 含量显著上升,发生膜脂过氧化,细胞膜受损程度加深,表明 5-AzaC 抑制了抗旱锻炼的效果,影响细胞的生长。

脯氨酸具有亲水性,在干旱胁迫下其含量会增加,帮助细胞维持水分,脯氨酸含量越高其抗旱性越强^[39-40]。水稻在干旱胁迫及恢复后其抗旱性会增强^[40]。高鹏飞等^[41]和陈翠红等^[42]也发现脯氨酸含量随胁迫时间的增加而上升。本研究结果表明,在干旱胁迫下脯氨酸含量显著上升,抗旱锻炼后的脯氨酸含量最高,这表明经过预处理后的细胞抗旱性明显增加。复合使用 5-AzaC 后,抗旱锻炼诱导脯氨酸含量上升的效果被显著抑制,印证了 DNA 的去甲基化和抗性相关基因的启动紧密相关^[43]。本研究还发现,利用 5-AzaC 抑制 DNA 甲基化可以逆转抗性锻炼的效果,说明 DNA 甲基化参与了抗逆锻炼抗性的形成。且不同倍性材料之间效果不同,说明不同倍性材料之间 DNA 甲基化水平存在差异。

植物细胞在逆境下会产生大量的活性氧,植物可以通过调节细胞内抗氧化防御系统,维持其正常的生长^[3, 44]。在西瓜^[29]和黄瓜^[44]的研究中发现干旱胁迫会导致抗氧化酶活性增加。此外,在玉米和番茄的研究结果表明低温锻炼可以提高其抗冷性^[45]。莫言玲等^[24]结果表明不同倍性的植物抗氧化酶变化不同。本研究结果表明,在渗透胁迫处理下不同倍性细胞抗氧化酶系统具有相同的变化趋势,POD、SOD、APX、GSH-Px、CAT、PAL 活性与对照相比均显著增加;经过抗旱锻炼后这些酶的活性与胁迫处理相比均有所下降,这可能是经过抗旱锻炼细胞产生活性氧较少,其含量相应降低。本研究在细胞水平测定后发现,抗旱锻炼和 DNA 甲基化共同处理下这些生理指标变化趋势不尽相同,但经过相关性分析和主成分分析后发现部分指标具有显著相关性,并且在指标的重要性上尝试进行了排序,可为抗性锻炼效果的评价体系构建提供参考。

综上所述,本研究结果表明 DNA 甲基化在不同倍性西瓜抗旱锻炼中发挥着重要的调控作用。通过改变与抗旱相关基因的 DNA 甲基化水平,能够影响西瓜的生理生化特性,从而影响其抗旱

能力。这为后期进一步探索 DNA 甲基化相关基因在抗逆锻炼中的具体机制提供科学依据。

参考文献

- [1] 李干琼, 王志丹. 我国西瓜产业发展现状及趋势分析[J]. 中国瓜菜, 2019, 32(12): 79-83.
LI G Q, WANG Z D. Development status and trend analysis of watermelon industry in China[J]. China Cucurbits and Vegetables, 2019, 32(12): 79-83. (in Chinese)
- [2] 任洪雷, 朱筱, 张丰屹, 张必弦, 王家军, 王金生, 吴俊江, 王广金, 邱丽娟. 干旱胁迫的影响及抗旱性研究进展[J/OL]. 分子植物育种, (2024-01-22)[2024-07-21]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=e9e-pYHXmfeFXsHMuZfVaeYk_sBWui1_OBVEwG1_CCQ3jDZ4JmMm_Rt6M6ZP7hKbmGza9In0oZH31BKU2u0apG53M9Yha7sR4TbSjBCGa0cOafj_AACRraibGF31PEljBTGk1uiC-1Cuc61IKRBTb14chv5dK7iMZ5BIL3QslhPOYcGDS3xSB3h5cYf3Vuq&unipatform=NZKPT&language=CHS.
REN H L, ZHU X, ZHANG F Y, ZHANG B X, WANG J J, WANG J S, WU J J, WANG G J, QIU L J. Research progress on effects of drought stress and drought resistance [J/OL]. Molecular Plant Breeding, (2024-01-22)[2024-07-21]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=e9e-pYHXmfeFXsHMuZfVaeYk_sBWui1_OBVEwG1_CCQ3jDZ4JmMm_Rt6M6ZP7hKbmGza9In0oZH31BKU2u0apG53M9Yha7sR4TbSjBCGa0cOafj_AACRraibGF31PEljBTGk1uiC-1Cuc61IKRBTb14chv5dK7iMZ5BIL3QslhPOYcGDS3xSB3h5cYf3Vuq&unipatform=NZKPT&language=CHS. (in Chinese)
- [3] 张化生, 杨永岗, 苏永全, 李晓芳. 干旱胁迫下不同生态型西瓜叶片抗氧化酶活性及产量分析[J]. 干旱地区农业研究, 2017, 35(3): 138-143.
ZHANG H S, YANG Y G, SU Y Q, LI X F. Antioxidant enzymes activities in leaves and yield analysis of different ecological types watermelon under drought stress[J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2017, 35(3): 138-143. (in Chinese)
- [4] SHARMA M, KUMAR P, VERMA V, SHARMA R, BHARGAVA B, IRFAN M. Understanding plant stress memory response for abiotic stress resilience: molecular insights and prospects[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2022, 179: 10-24.
- [5] ZHENG X, CHEN L, XIA H, WEI H, LOU Q, LI M, LI T, LUO L. Transgenerational epimutations induced by multi-generation drought imposition mediate rice plant's adaptation to drought condition[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 39843.
- [6] 王萌萌, 陈忠林, 贾楠, 徐苏男, 张利红. 水分胁迫前的干旱锻炼对小麦光合生理特性的影响[J]. 农业环境科学

- 学报, 2010, 29(10): 1930-1935.
- WANG M M, CHEN Z L, JIA N, XU S N, ZHANG L H. Effects of pretreatment of water stress on photosynthetic characteristics of wheat under water stress[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2010, 29(10): 1930-1935. (in Chinese)
- [7] WANG X, VIGNJEVIC M, JIANG D, JACOBSEN S, WOLLENWEBER B. Improved tolerance to drought stress after anthesis due to priming before anthesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) var. Vinjett[J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(22): 6441-6456.
- [8] 刘义国, 万雪洁, 张艳, 李玲燕, 周宣材, 孙新灵, 郭卫卫, 师长海. 干旱锻炼对小麦幼苗期形态指标的影响[J]. 西北农业学报, 2022, 31(2): 157-163.
- LIU Y G, WAN X J, ZHANG Y, LI L Y, ZHOU X C, SUN X L, GUO W W, SHI C H. Effect of drought priming on morphological indices of wheat seedlings[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2022, 31(2): 157-163. (in Chinese)
- [9] 万雪洁, 张艳, 师长海, 周宣材, 孙新灵, 李松坚, 张守福, 刘义国. 干旱锻炼对小麦幼苗期抗氧化特性的影响[J]. 华北农学报, 2021, 36(增刊 1): 125-129.
- WAN X J, ZHANG Y, SHI C H, ZHOU X C, SUN X L, LI S J, ZHANG S F, LIU Y G. Priming of drought on the antioxidant characteristics of wheat seedlings[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2021, 36(Suppl. 1): 125-129. (in Chinese)
- [10] 谢洒洒, 文如霜, 赵小文, 刘琦, 刘钺, 王梓廷, 张木清. 干旱锻炼对水分胁迫下甘蔗抗逆生理特性的影响[J]. 西北农业学报, 2022, 31(1): 52-62.
- XIE S S, WEN R S, ZHAO X W, LIU Q, LIU Y, WANG Z T, ZHANG M Q. Effects of drought exercise on stress resistance physiological characteristics of sugarcane under water stress[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2022, 31(1): 52-62. (in Chinese)
- [11] ZHANG X X, WANG X L, ZHONG J W, ZHOU Q, WANG X, CAI J, DAI T B, CAO W X, JIANG D. Drought priming induces thermo-tolerance to post-anthesis high-temperature in offspring of winter wheat[J]. Environmental and Experimental Botany, 2016, 127: 26-36.
- [12] YAKOVLEV I A, CARNEROS E, LEE Y K, OLSEN J E, FOSSDAL C G. Transcriptional profiling of epigenetic regulators in somatic embryos during temperature induced formation of an epigenetic memory in Norway spruce[J]. Planta, 2016, 243(5): 1237-1249.
- [13] MASTERSON J. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms[J]. Science, 1994, 264(5157): 421-424.
- [14] COMAI L. Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants[J]. Plant Molecular Biology, 2000, 43(2/3): 387-399.
- [15] XIAO J, SONG C, LIU S, TAO M, HU J, WANG J, LIU W, ZENG M, LIU Y. DNA methylation analysis of allotetraploid hybrids of red crucian carp (*Carassius auratus* red var.) and common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56409.
- [16] 王强. 二倍体与四倍体豇豆形态生理、基因表达谱和 DNA 甲基化差异分析[D]. 南昌: 江西农业大学, 2020.
- WANG Q. Analysis the difference of morphology, gene expression profile and dna methylation on diploid and tetraploid cowpea[D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2020. (in Chinese)
- [17] 聂丽娟, 王子成, 王一帆, 李国申, 何艳霞. 二倍体和同源四倍体西瓜的 DNA 甲基化差异分析[J]. 核农学报, 2009, 23(1): 80-84.
- NIE L J, WANG Z C, WANG Y F, LI G S, HE Y X. Analysis on dna methylation diversity of diploid andtetraploid of watermelon (*Citrullus lanatus*)[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2009, 23(1): 80-84. (in Chinese)
- [18] 王春国, 古瑜, 陈成彬, 焦定量, 薛振毅, 宋文芹. 不同倍性西瓜基因组 DNA 甲基化水平与模式的 MSAP 分析[J]. 分子细胞生物学报, 2009, 42(2): 118-126.
- WANG C G, GU Y, CHEN C B, JIAO D L, XUE Z Y, SONG W Q. Analysis of the level and pattern of genomic dnamethylation in different ploidy watermelons bymsap (*Citrullus lanatus*)[J]. Journal of Molecular Cell Biology, 2009, 42(2): 118-126. (in Chinese)
- [19] 朱红菊. NaCl 胁迫对不同倍性西瓜幼苗影响及 DNA 甲基化分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012.
- ZHU H J. The effects of NaCl stress on different ploidy watermelon seedlings and DNA methylation analysis[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012. (in Chinese)
- [20] ZHU F, LI M, YAN M, QIAO F, JIANG X. Integrated transcriptome analysis and single-base resolution methylomes of watermelon (*Citrullus lanatus*) reveal epigenome modifications in response to osmotic stress[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 769712.
- [21] XU Z, SUN M, JIANG X, SUN H, DANG X, CONG H, QIAO F. Glycinebetaine biosynthesis in response to osmotic stress depends on jasmonate signaling in watermelon suspension cells[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 1469.
- [22] ZHU F, LI M, SUN M, JIANG X, QIAO F. Plant hormone signals regulate trehalose accumulation against osmotic stress in watermelon cells[J]. Protoplasma, 2022, 259(5): 1351-1369.

- [23] 郑子凡, 于佳乐, 聂虎帅, 刘杰, 魏巍, 王沛捷, 武小娟, 吴娟, 马艳红. 干旱胁迫对 18 个马铃薯品种生理特性的影响[J]. 中国马铃薯, 2023, 37(4): 306-319.
ZHENG Z F, YU J L, NIE H S, LIU J, WEI W, WANG P J, WU X J, WU J, MA Y H. Effects of drought stress on the physiological characteristics of 18 potato varieties[J]. Chinese Potato Journal, 2023, 37(4): 306-319. (in Chinese)
- [24] 莫言玲, 郑俊鸾, 杨瑞平, 刘长命, 顾秀荣, 张显, 魏春华. 不同西瓜基因型对干旱胁迫的生理响应及其抗旱性评价[J]. 应用生态学报, 2016, 27(6): 1942-1952.
MO Y L, ZHENG J X, YANG R P, LIU C M, GU X R, ZHANG X, WEI C H. Physiological responses and tolerance to drought stress of different watermelon genotypes[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2016, 27(6): 1942-1952. (in Chinese)
- [25] QIAO F, CHANG X L, NICK P. The cytoskeleton enhances gene expression in the response to the Harpin elicitor in grapevine[J]. Journal of Experimental Botany, 2010, 61(14): 4021-4031.
- [26] 刘鹏, 应小芳, 徐根娣, 蔡妙珍, 王芳, 罗虹. 铝对大豆质膜透性和 POD、CAT 活性的影响[J]. 浙江师范大学学报(自然科学版), 2005, 28(3): 300-303.
LIU P, YING X F, XU G D, CAI M Z, WANG F, LUO H. Effect of aluminum on the permeability of plasma membrane and activities of CAT and POD of soybean[J]. Journal of Zhejiang Normal University (Natural Sciences), 2005, 28(3): 300-303. (in Chinese)
- [27] 陈志刚, 张红蕊, 周晓红, 张珂. 铝胁迫对黑麦草种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 水土保持研究, 2011, 18(4): 207-210.
CHEN Z G, ZHANG H R, ZHOU X H, ZHANG K. Effect of aluminum stress on seed germination and seedling growth of *Lolium multi florum*[J]. Research of Soil and Water Conservation, 2011, 18(4): 207-210. (in Chinese)
- [28] 孙天国, 张梅娟, 马天意, 翟莹, 李想. 亚精胺对渗透胁迫下甜瓜幼苗膜脂过氧化和抗氧化系统的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2024, 42(1): 177-184.
SUN T G, ZHANG M J, MA T Y, ZHAI Y, LI X. Effects of spermidine on membrane lipid peroxidation and antioxidant system of melon seedling under osmotic stress[J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2024, 42(1): 177-184. (in Chinese)
- [29] 娄丁, 冯江帅, 李想, 薛喜琴, 安科旭, 刘永华. 干旱胁迫对柠条幼苗生长及生理生化特性的影响[J]. 陕西林业科技, 2024, 52(2): 1-8.
LOU D, FENG J S, LI X, XUE X Q, AN K X, LIU Y H. Effect of drought stress on the growth and physiological characteristics of *Caragana korshinskii*[J]. Shaanxi Forest Science and Technology, 2024, 52(2): 1-8. (in Chinese)
- [30] 马村艺, 郝春磊, 张黎. 聚乙二醇模拟干旱胁迫对砧根组培苗生理特性的影响[J]. 分子植物育种, 2023, 21(22): 7524-7530.
MA C Y, HAO C L, ZHANG L. Effects of PEG on physiological characteristics of *Heuchera micrantha* tissue culture seedlings under simulated drought stress[J]. Molecular Plant Breeding, 2023, 21(22): 7524-7530. (in Chinese)
- [31] HERMAN J J, SULTAN S E, HORGAN-KOBELSKI T, RIGGS C. Adaptive transgenerational plasticity in an annual plant: grandparental and parental drought stress enhance performance of seedlings in dry soil[J]. Integrative And Comparative Biology, 2012, 52(1): 77-88.
- [32] TANG K, ZHU X, XIE S, LANG Z, ZHU J K. Transgenerational increases in DNA methylation in *Arabidopsis* plants defective in active DNA demethylation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2024, 121(22): e2320468121.
- [33] FENG Q, YANG C, LIN X, WANG J, LIU B. Salt and alkaline stress induced transgenerational alteration in DNA methylation of rice (*Oryza sativa*)[J]. Australian Journal of Crop Science, 2012, 6(5): 877-883.
- [34] HERMAN J J, SULTAN S E. DNA methylation mediates genetic variation for adaptive transgenerational plasticity[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2016, 283: 20160988.
- [35] GAPILLOUT I, MILAT M L, BLEIN J P. Effects of fusaric acid on cells from tomato cultivars resistant or susceptible to *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici[J]. European Journal of Plant Pathology, 1996, 102: 127-132.
- [36] XU P, XU J, LIU G, CHEN L, SUN X. The allotetraploid origin and asymmetrical genome evolution of the common carp *Cyprinus carpio*[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 4625.
- [37] ZHANG H, LANG Z, ZHU J K. Dynamics and function of DNA methylation in plants[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2018, 19(8): 489-506.
- [38] 董民会. 秋水仙碱诱导三个猕猴桃品种多倍体产生及非生物胁迫初探[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2023.
DONG M H. Preliminary research on colchicine induced polyploidy and abiotic stress in three kiwifruit cultivars[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2023. (in Chinese)
- [39] ZLATEV Z S, LIDON F C, RAMALHO J C, YORDANOV I T. Comparison of resistance to drought of three bean cultivars[J]. Biologia Plantarum, 2006, 50(3): 389-394.
- [40] SALEKDEH G H, SIOPONGCO J, WADE L J, GHAREYAZIE B, BENNETT J. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery[J]. Proteomics,

- 2002, 2(9): 1131-1145.
- [41] 高鹏飞, 张静, 范卫芳, 高冰, 郝宏娟, 吴建慧. 干旱胁迫对光叉委陵菜根系特征、结构和生理特性的影响[J]. 草业学报, 2022, 31(2): 203-212.
- GAO P F, ZHANG J, FAN W F, GAO B, HAO H J, WU J H. Effects of drought stress on root characteristics structure and physiological characteristics of *Potentilla bifurca* var. *glabrata*[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2022, 31(2): 203-212. (in Chinese)
- [42] 陈翠红, 周蕴薇, 李家琦, 杨丰瑞, 白云, 陈丽飞. 干旱胁迫对侧金盏花生理特性的影响[J]. 福建农业学报, 2021, 36(5): 532-541.
- CHEN C H, ZHOU Y W, LI J Q, YANG F R, BAI Y, CHEN L F. Physiology of *Adonis amurensis* as affected by drought[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2021, 36(5): 532-541. (in Chinese)
- [43] TIRNAZ S, BATLEY J. DNA methylation: toward crop disease resistance improvement[J]. Trends in Plant Science, 2019, 24(12): 1137-1150.
- [44] 银珊珊, 周国彦, 顾博文, 武春成, 闫立英, 谢洋. 褪黑素引发对干旱胁迫下黄瓜幼苗生理特性的影响[J]. 中国农学通报, 2022, 38(19): 30-36.
- YIN S S, ZHOU G Y, GU B W, WU C C, YAN L Y, XIE Y. Effects of melatonin priming on physiological characteristics of cucumber seedlings under drought stress[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2022, 38(19): 30-36. (in Chinese)
- [45] 简令成, 卢存福, 李积宏, LI PAUL H. 适宜低温锻炼提高冷敏感植物玉米和番茄的抗冷性及其生理基础[J]. 作物学报, 2005, 31(8): 971-976.
- JIAN L C, LU C F, LI J H, LI PAUL H. Increment of chilling tolerance and its physiological basis in chilling-sensitive cornsprouts and tomato seedlings after cold-hardening at optimum temperatures[J]. Acta Agronomica Sinica, 2005, 31(8): 971-976. (in Chinese)