果 树 学 报 2019,36(7):857-865
Journal of Fruit Science

DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20180432

嫁接对西瓜果实瓜氨酸含量及合成途径关键酶基因表达的影响

李蒙蒙,路绪强,赵胜杰,何 楠,刘文革*

(中国农业科学院郑州果树研究所,郑州 450009)

摘 要:【目的】探讨嫁接前后西瓜果实瓜氨酸含量及其合成途径关键酶表达量的变化,从基因表达水平阐明嫁接影响西瓜果实瓜氨酸含量的机制。**【方法】**以低瓜氨酸品种'SBD黑'为接穗,以'西嫁强生'为砧木,插接法嫁接,'SBD黑'西瓜实生苗为对照。用分光光度法测定果实发育过程中瓜氨酸含量,通过荧光定量分析果实发育过程中瓜氨酸合成途径关键酶基因的表达量变化。**【结果】**嫁接可以增加西瓜果实发育过程中瓜氨酸含量,且在西瓜果实发育38 d时瓜氨酸增加量最大(63%)。在果实发育后期*NAGK*、*GAT*基因表达量在嫁接西瓜与未嫁接西瓜果实中相差较大,嫁接西瓜果实中*Arginase*基因表达量在整个发育过程中始终高于未嫁接西瓜。**【结论】**嫁接西瓜果实中瓜氨酸含量的升高可能是由于瓜氨酸合成上游基因*NAGK*、*GAT*高表达,下游基因*Arginase*低表达共同作用的结果。

关键词:西瓜;嫁接;瓜氨酸;关键酶基因

中图分类号:S651 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-9980(2019)07-0857-09

Effects of grafting on citrulline content and expression of key enzyme genes in watermelon fruits

LI Mengmeng, LU Xuqiang, ZHAO Shengjie, HE Nan, LIU Wenge*

(Zhengzhou Fruit Research Institute, CAAS, Zhengzhou 450009, Henan, China)

Abstract:【Objective**】**In recent years, with the progress of agricultural production conditions and scientific research level as well as the adjustment of agricultural economic policies, watermelon production in China has developed rapidly. Continuous cropping has impeded the agricultural production, resulting in severe soil-borne diseases and thus restricting the sustainable development of cucurbit crops. In practical production, grafting is widely used to solve the above-mentioned problems. Considerable practical experience and researches indicated that watermelon grafting could overcome some continuous cropping obstacles, and grafting onto a suitable rootstock could make watermelon plants grow vigorously, improve the water and fertilizer absorption, enhance resistance to diseases, raise the seedling tolerance to high temperature and salt stress, and increase the yield of watermelon. Previous studies have shown that watermelon fruit is rich in citrulline. On exposure to drought, intensive light and salt stress, citrulline was the primary component (49%) of the amino acids pool, and the citrulline content could accumulate osmotically. It was important to help plants to maintain the osmotic pressure and enhance the ability of stress tolerance. It was suggested that citrulline content could act as a potent scavenger in watermelons by protecting the green tissues from the oxidative stress during drought conditions. Citrulline was identified as the most potent scavenger of hydroxyl radicals than mannitol, proline, and glycine betaine, so some scholars suggested that citrulline can be used as a biomarker to study stress resistance of plants. So far, some studies have shown that grafting can change citrulline contents in watermelon fruits, but

收稿日期:2018-11-21 接受日期:2019-05-06

基金项目:中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ASTIP-2016-ZFRI-07);国家西甜瓜产业技术体系(CARS-25-03);国家自然科学基金(31471893, 31672178)

作者简介:李蒙蒙,女,硕士。研究方向为西瓜遗传育种。Tel:16601151641, E-mail:limm0216@163.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel:0371-65330936, E-mail:lwgwm@163.com

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

the current research is just limited to the determination of citrulline content. There is limited information available about the citrulline synthesis pathway and the mechanism of citrulline accumulation. This study aims to investigate the impact of grafting on citrulline accumulation in developing watermelon fruits and transcriptional regulation of key genes of the citrulline biosynthetic pathway to elucidate the possible mechanism influencing citrulline accumulation in grafted watermelon and make it clear the reason for citrulline accumulation in watermelon fruits by grafting.【Methods】‘SBD black’ characterized by low citrulline content was selected as the scion and grafted to the pumpkin rootstock. Self- rooted ‘SBD black’ served as the control. The flesh samples were taken 10 days after pollination. In order to ensure the consistency of fruit development, three fruits with the same pollination date, shape, size and node position were sampled from each variety. Then the samples were taken every 7 days until the fruit was over ripe (45 days after pollination). The watermelon fruit was cut into two halves and central flesh was used to measure the citrulline contents, and the tissues were immediately frozen in liquid nitrogen and then quickly stored at −80 ℃ untill use. Citrulline was extracted by Methanol-HCl in 55 ℃ waterbath 30 min after watermelon tissues were homogenized, followed by decolorization with active carbon, under the action of a mixture of phosphoric acid and sulfuric acid, boiled 30 min. in the dark for colorreaction by the diacetyl monoxime. The UV-visible spectrophotometric method was used to determine the citrulline content in watermelon fruits indirectly, and all data were repeated three times. The other half of the central flesh of watermelons was extruded with water, wrapped in tin foil and immediately put into liquid nitrogen for quick freezing. Later it was stored in a refrigerator at −80 ℃ for RNA extraction. Then the RNA was eversely transcribed into cDNA. The key genes of citrulline biosynthesis pathway in watermelon fruits were quantified by Roche LightCycler 480 Real Time PCR System.【Results】Compared to ‘SBD black’and ‘Xijiaqiangsheng’ grafted onto pumpkin rootstock could increase citrulline contents in ‘SBD black’ during the development of watermelon fruits, and the citrulline content in ‘SBD black’ grafted watermelon fruit was higher than that of non-grafted ‘SBD black’. The citrulline content of both ‘SBD black’ and grafted ‘SBD black’ reached the maximum at 38 days, and the citrulline content of ‘SBD black’ grafted on pumpkin increased by 63.0% than non-grafted watermelon; Compared the difference in the gene expression related to citrulline biosynthesis between grafted and non-grafted watermelons during fruit development, it was suggested that the expression of NAGK and GAT genes in grafted and non-grafted watermelon fruits differed greatly in the late stage of fruit development, and the expression of both genes in ‘SBD black’- grafted watermelon was lower than that from non- grafted ‘SBD black’, while the expression of ‘SBD black’ Arginase gene in grafted watermelon fruits was higher than that in non-grafted watermelon fruits.【Conclusion】The citrulline content of ‘SBD black’ -grafted watermelon was higher than that with non-grafted ‘SBD black’ one during fruit development. ‘Xijiaqiangsheng’ grafted onto the pumpkin rootstockcan increase the citrulline content in watermelon. The differences in the citrulline content between grafted ‘SBD black’ and non-grafted watermelons was attributed to the high expression of the upstream genes NAGK and GAT as well as the low expression of the downstream genes Arginase in grafted watermelon. The ‘Xijiaqiangsheng’ grafting can regulate the expression of genes involved in the citrulline biosynthesis and ultimately regulate citrulline contents.

Key words: Watermelon; Grafting; Citrulline; Key gene

西瓜(*Citrullus lanatus*)是一种世界性的园艺作物,栽培历史悠久,地域广泛,在多个国家和地区均可广泛种植。据记载我国西瓜种植有1 500多年历史[1]。在我国,除了少数寒温带地区以及高海拔的高寒地区不能露地种植外,南北各地均可广泛栽培[2]。西瓜果实富含番茄红素、瓜氨酸、谷胱甘肽和

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

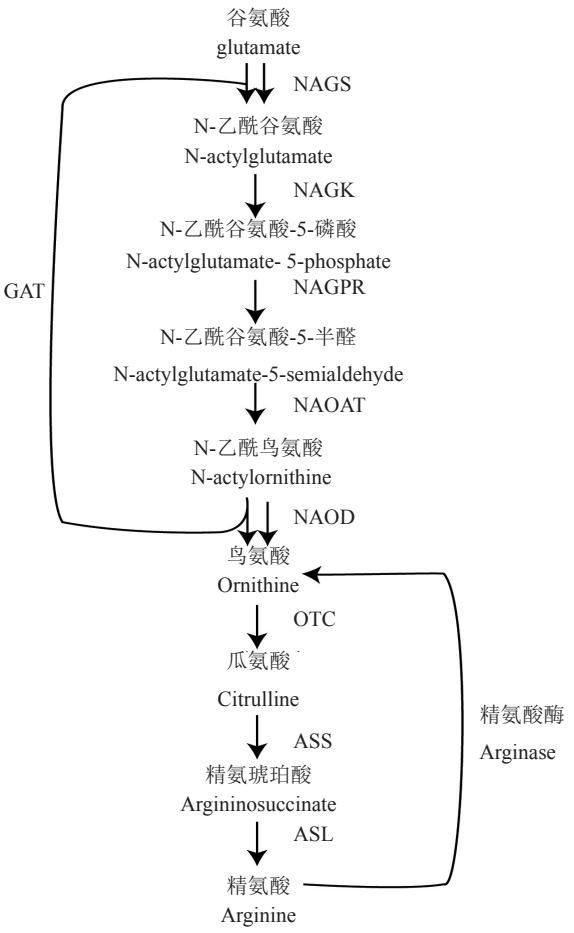
维生素C等营养成分，对人体具有重要的保健功能[3-5]。其中西瓜果实瓜氨酸含量丰富，鲜食即可被人体直接吸收，是人体获取瓜氨酸的重要途径[6]。

西瓜是我国重要的农业经济作物之一，近年来随着我国农业生产条件、科研水平的进步以及农业经济政策的调整，我国西瓜生产发展迅速，西瓜生产的规模化、专业化、设施化发展进程的加快[7]，但轮作周期越来越短，多年重茬导致土壤连作障碍、土传病害发生严重，产量和品质下降，严重制约瓜类作物生产可持续发展[2,8]。生产上，人们广泛使用嫁接的手段来解决上述问题[9-13]。研究表明，西瓜嫁接可克服部分连作障碍，适宜的嫁接砧木可使植株生长健壮，吸水、吸肥能力提高，增强植株抗病能力以及西瓜幼苗对高温胁迫、盐胁迫等逆境的忍受能力，提高西瓜产量[14-17]。

砧木嫁接不仅能够影响西瓜植株抗性，也可影响次生代谢物质的积累。研究表明嫁接对西瓜中番茄红素、类胡萝卜素、维生素K等含量有一定影响[18-20]。Petropoulos等[18]表明嫁接可降低西瓜果实类胡萝卜素、番茄红素、维生素K的含量；和未嫁接西瓜相比，嫁接西瓜果实中番茄红素、维生素K的含量分别降低了40.5%、7.3%，而亚精胺和腐胺含量则降低了24.0%、59% [19]。而其他研究表明嫁接对西瓜果实番茄红素含量的影响具有多样性，随接穗和砧木的不同，嫁接西瓜果实番茄红素含量变化也不同，可能增加、减少或者无明显变化[21-23]。施先锋等[23]以‘优秀砧1号’为砧木，分别对‘极品春玉王’和‘万福来’两个品种嫁接，结果表明嫁接后西瓜果实番茄红素含量均高于自根苗。

瓜氨酸也是西瓜中重要的次生代谢物质之一，虽说瓜氨酸在葫芦科作物中含量丰富，但研究表明西瓜中瓜氨酸含量最高[24]，比黄瓜和南瓜中的瓜氨酸含量高6~9倍[25]。研究发现瓜氨酸能够清除羟基，有较强的抗氧化能力，可有效保护DNA免受伤害，具有抗衰老、提高免疫力的作用，也具有护肤祛斑的功效，可作为女性美容化妆品[26]。研究表明服用瓜氨酸亦能有效缓解疲劳，舒张血管，维护正常的心肺功能，也可以平衡血糖浓度，增强人体的肌肉强度，提高体能[27-28]。而天然产品中分离的*L*-瓜氨酸纯度较好，可有效的治疗男性功能障碍，且无副作用，而倍受消费者青睐[29-30]。

目前，对植物中瓜氨酸代谢途径的研究，主要集中在模式植物拟南芥上[31-33]。近年来一些研究者也开始了对西瓜瓜氨酸合成代谢途径的研究，综合Guo等[34-35]与Vijay等[33]所公布的西瓜瓜氨酸合成代谢途径，以及植物中瓜氨酸合成途径，西瓜中瓜氨酸合成代谢主要途径如图1所示，共分为两个过程，一是谷氨酸通过循环途径或线性途径生成鸟氨酸；二是鸟氨酸生成瓜氨酸以及鸟氨酸的再生。



NAGS. N-乙酰谷氨酸合成酶；NAGK. N-乙酰谷氨酸激酶；NAGPR. N-乙酰谷氨酸-5-磷酸还原酶；NAOAT. N-乙酰鸟氨酸转移酶；GAT. N-乙酰鸟氨酸谷氨酸转移酶；NAOD. N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶；OTC. 鸟氨酸氨甲酰转移酶；ASS. 精氨酸琥珀酸合酶；ASL. 精氨酸琥珀酸裂解酶；ASL。

NAGS. N-acetylglutamate synthase; NAGK. N-acetylglutamate kinase; NAGPR. N-acetylglutamate 5-phosphate reductase; NAOAT. N-acetylornithine transaminase; NAOD. N- acetylornithine deacetylase; GAT. Glutamate N- acetyltransferase; OTC. Ornithine transcarbamoylase; ASS. Argininosuccinate synthase; ASL. Argininosuccinate lyase.

图1　西瓜瓜氨酸合成途径[31-35]

Fig. 1　The pathway of citrulline biosynthesis in plant[31-35]

近些年来，生产上常用的西瓜嫁接砧木为南瓜和葫芦。目前，关于嫁接对西瓜果实瓜氨酸含量的

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

影响有一些研究。关立颖[20]研究表明，南瓜、瓠子以及葫芦嫁接西瓜均能明显降低西瓜果实中瓜氨酸的含量。然而也有研究表明，和自根苗相比，嫁接后西瓜果实在整个发育过程中瓜氨酸含量均升高[21,36]。研究表明南瓜砧木抗病性、抗逆性强，但是嫁接亲和性较差，对西瓜品质有一定的影响；葫芦砧木与西瓜的嫁接亲和力强，但是抗性较弱[37]。

适合西瓜嫁接的南瓜砧木有很多，如‘京欣’系列，‘先锋一号’等，而随着育种工作的开展，许多新的砧木品种不断被选育出来，如郑州果树所选育的南瓜砧木新品种‘西嫁强生’，此砧木耐低温弱光，高抗枯萎病，生长后期耐高温抗早衰，西瓜品质有所改善，产量提高20%以上，在河南、湖南、陕西、山东、云南、湖北等地获得大面积的推广应用，且面积在逐年增加，因此研究南瓜砧木‘西嫁强生’嫁接对西瓜瓜氨酸含量的影响具有一定的理论意义。

笔者以西瓜品种‘SBD黑’为材料，采用生产上西瓜常用的嫁接砧木‘西嫁强生’进行嫁接，测定嫁接对西瓜果实发育过程中瓜氨酸含量的影响，并通过对瓜氨酸合成途径关键酶基因*NAGS*、*NAGK*、*GAT*、*OTC*、*ASS*、*ASL*、*Arginase*表达差异的分析，筛选瓜氨酸合成途径中重要的关键酶基因，明确嫁接西瓜与未嫁接西瓜果实瓜氨酸累积差异的分子机制，为培育高瓜氨酸品种和配套栽培技术提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

本试验所用的‘SBD黑’为黑皮红瓤中晚熟西瓜品种，来自于中国农业科学院郑州果树研究所多倍体西瓜遗传育种课题，根据前期筛选试验发现该品种瓜氨酸含量较低，砧木品种为南瓜砧木‘西嫁强生’，该品种来自于中国农业科学院郑州果树研究所二倍体西瓜遗传育种课题，嫁接方法为插接。

试验材料的田间管理和取样：嫁接和未嫁接的两份材料各定植70株，各试验材料于2016年3月中旬播种于中国农业科学院郑州果树研究所新乡试验基地大棚，育苗移栽，采用顺序设计，行间距1.5 m，株间距0.8 m，地膜覆盖，双蔓整枝，爬地栽培，第2雌花留单瓜，田间栽培管理一致。5月中旬开始授粉，标注授粉日期。从授粉后10 d开始取果肉样品，为保证果实发育一致性，每次取样每个品种每份材料取3个授粉日期相同，形状大小及坐瓜节位相近的果实，参照万学闪等[38]取样方法，将西瓜均分为两半，取其中一半中心果肉，去籽榨汁匀浆，置于−20 ℃超低温冰箱中备用，以测定西瓜瓜氨酸含量。取另一半西瓜中心果肉，用纱布（经过高温高压灭菌）将瓜瓤样品中的水分挤出，锡箔纸包好，立即投入液氮中速冻，然后保存于−80℃冰箱，用于RNA的提取，每个单瓜设为1次重复，共取3个瓜，设置3个生物学重复3次，每隔7 d取1次样，直到果实过熟（授粉后45 d）。

1.2 方法

1.2.1 果肉瓜氨酸含量测定 采用分光光度法测定西瓜果肉瓜氨酸含量[4]。将西瓜匀浆破壁后，称西瓜汁3 g，加入4.5 mL体积比为9∶1的纯甲醇和6 mol·L^{-1}盐酸配成的提取液，55 ℃水浴20 min，1 g活性炭脱色过滤；稀释40倍。取5 mL稀释液于试管中，依次加入2 mL体积比为3∶1的硫酸和磷酸混合液和0.25 mL 30 g·L^{-1}二乙酰一肟，摇匀；避光煮沸30 min，冷却至室温，在波长490 nm处测定吸光度，根据标准曲线方程计算瓜氨酸含量，3次重复并求平均值。

瓜氨酸含量（g·kg^{-1}）=（0.096 5 X+0.008 5）×f，R^2=0.998 2。式中，X为490 nm处吸光值；0.096 5为标准曲线斜率；0.008 5为标准曲线截距；f为总稀释倍数。

1.2.2 RNA的提取与cDNA的合成 西瓜果肉RNA提取按照GeneMark多糖多酚植物RNA提取试剂盒（Plant Total RNA Purification KIT）步骤进行。在微量分光光度计上测定RNA的OD值以及浓度；用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性。按照TAKERA公司的PrimeScriptTM reagent Kit with gDNA Eraser（Perfect Real Time）反转录试剂盒来反转录cDNA。

1.2.3 引物设计 根据NCBI数据库中瓜氨酸合成途径相关酶基因的保守序列，筛选西瓜基因组数据库中的同源基因，用Primer Premier 5.0设计引物。其中*ASS*以及*ASL*为基因家族，*ASS*基因家族有3个基因，分别为*ASS1*、*ASS2*、*ASS3*；*ASL*有2个基因，分别为*ASL1*、*ASL2*。试验所用内参基因为*CL-CAC*[39]。西瓜瓜氨酸合成途径关键酶基因名称、基因ID、引物序列均列于表1中，引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表1　实时荧光定量RT-PCR引物表

Table 1　Primers of real-time fluorescence quantitative RT-PCR

基因名称 Gene name	基因ID Gene ID	上游引物 Sense primer	下游引物 Reverse primer	引物量 Primer amount (10 μmol·L^{-1})/μL	退火温度 Annealing temperature/℃
NAGS	Cla014036	GTGAGCGGAATAGCCATAT	CTCCTCCAATAGTGCCATC	1.0	64.2
NAGK	Cla022273	CTCAATCCATCCGCATCC	AATCAACTACAGCCTCCATT	1.0	64.2
GAT	Cla017879	GACGACCGACCTTGTTAG	CCACCGCATCTGTTGTTA	1.0	57.0
OTC	Cla020781	CCTGACGGATTACAACCAT	TGATGCCAACAACAACCA	1.0	64.2
ASS1	Cla002611	TTACAGTGGTGGCTTAGAC	CTCTTCCTTCAAGTCCTTCA	1.0	64.2
ASS2	Cla002609	ATGGTGGATGTTGCGAAT	CTTGGTGACTGGAATAGGT	1.0	57.0
ASS3	Cla019267	AGATAACCGCAACAACCA	GCCGTAGAGATGAATGAATC	1.0	64.2
ASL1	Cla023055	TGCCAGAGTCATAGGAGA	CTTCTTCACGAGGTAATCAG	1.0	63.2
ASL2	Cla022154	TTGCGATGGTAGACTTGG	TGCTAAGAGAAGATGCTGAA	0.7	57.0
Arginase	Cla006970	GCATCTCTAACACTCATTCG	GGACATCACCAACATCAGT	0.7	63.2

1.2.4　荧光定量PCR表达分析　用LightCycler480荧光定量仪进行荧光定量分析，反应体系为cDNA，2.0 μL；2×Master mix，10 μL；上下游引物，0.5~2.0 μL（依据不同基因而定）；补水至20.0 μL。反应程序为95℃预变性5 min，95℃变性10 s，57.0~65.0℃退火10 s，72 ℃延伸20 s，循环45次，每个样品3个重复。

采用Roche LightCycler 480 Real Time PCR System对西瓜果实瓜氨酸合成途径关键酶基因进行荧光定量。每个基因做3次重复，分析方法为$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法[40]。

1.3　数据分析

以未嫁接西瓜品种‘SBD黑’授粉后10 d瓜氨酸合成途径关键酶基因表达为基准，计算不同材料西瓜瓜氨酸合成相关酶基因的相对表达量，用Excel和SPSS 20.0来进行相关数据分析。

2　结果与分析

2.1　‘西嫁强生’南瓜砧木嫁接对西瓜果实发育过程中瓜氨酸含量的影响

由图2可以看出，嫁接西瓜果实在整个果实发育过程中瓜氨酸含量均高于未嫁接西瓜果实，嫁接西瓜在授粉后17~31 d果实瓜氨酸含量迅速增加，期间在24 d后瓜氨酸含量增速更快，31 d时累积速度有所减慢，在38 d含量（*w*，后同）达到最大值为2.34 g·kg^{-1}。而未嫁接西瓜果实发育期呈现出“升高—降低—升高—降低”的趋势，在38 d达到最大1.43 g·kg^{-1}，此时两者瓜氨酸含量比值为1.63。

2.2　‘西嫁强生’南瓜砧木嫁接对西瓜果实发育过程中关键酶基因表达量的影响

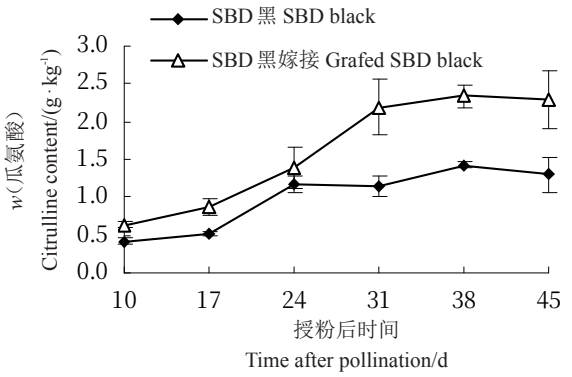


图2　西瓜果实发育过程中瓜氨酸含量的变化

Fig. 2　The change of citrulline content during fruit development of watermelon

如图3所示，嫁接与未嫁接西瓜果实发育过程中*NAGS*相对表达量变化一致，且在嫁接与未嫁接西瓜果实间表达差异不大；在西瓜果实发育前期嫁接对*NAGK*基因的表达影响不大，到发育后期，嫁接明显增加了果实中该基因的表达量。

*GAT*相对表达量在嫁接与未嫁接西瓜果实发育过程中变化基本一致。授粉后10 d时未嫁接西瓜果实中*GAT*基因相对表达量高于嫁接西瓜果实，之后嫁接西瓜果实中*GAT*基因相对表达量均高于未嫁接西瓜，且越到后期差异越大。

在果实发育过程中，嫁接西瓜果实中*ASS1*、*ASS3*基因相对表达量均高于未嫁接西瓜，且发育前期的差异较大。嫁接与未嫁接西瓜果实中*ASS2*基因相对表达量均随果实的发育呈先降低后上升的趋势，且在整个果实发育过程中未嫁接西瓜果实中*ASS2*基因相对表达量均高于嫁接西瓜。

*ASL*包括两个基因家族成员*ASL1*、*ASL2*，在整

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

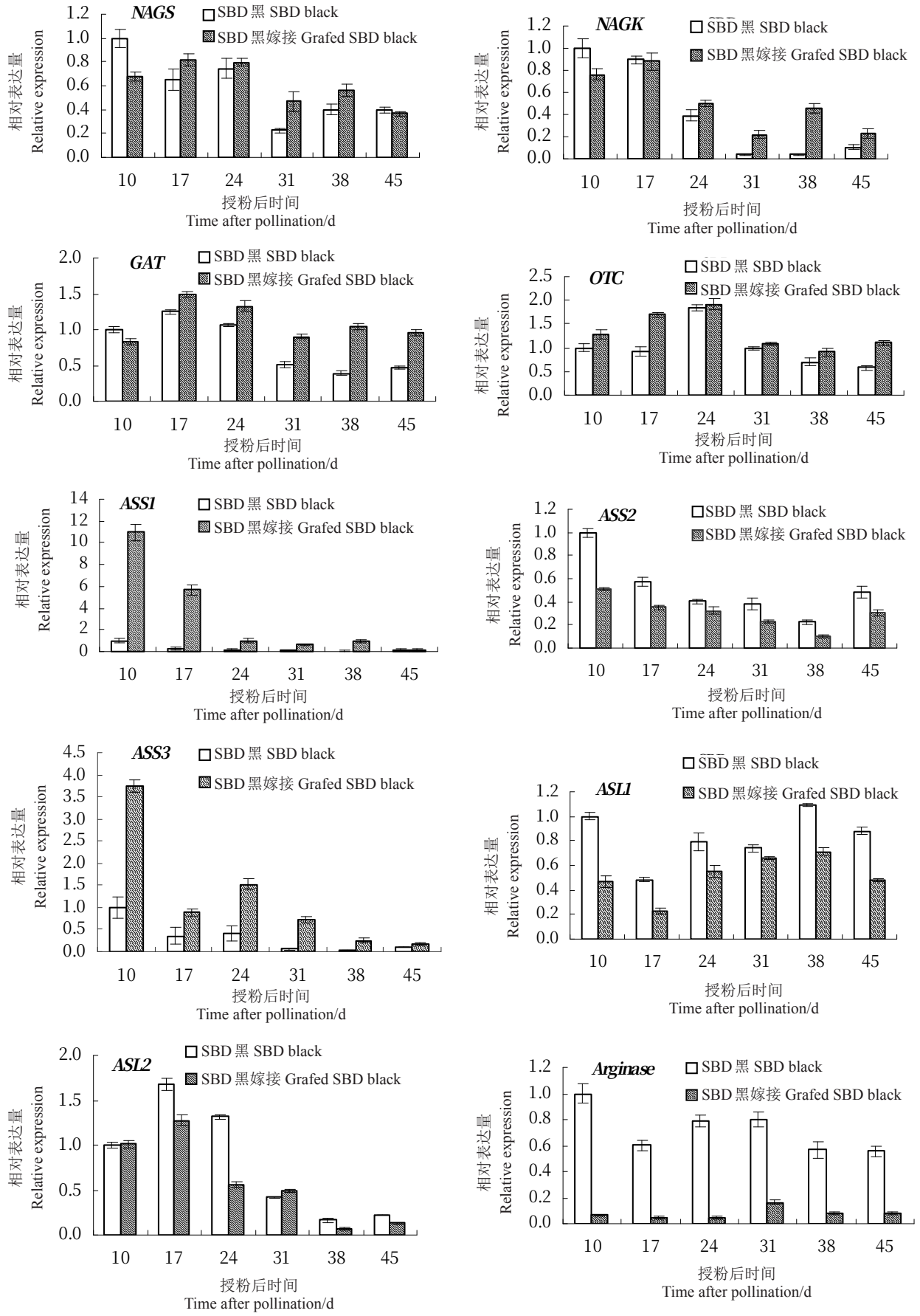


图 3 “西嫁强生”南瓜砧木对“SBD 黑”果实发育过程中瓜氨酸合成关键酶基因表达的影响

Fig. 3 Effects of grafting on gene expression of key enzymes in citrulline synthesis during fruit development of “SBD Black”

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

个果实发育过程中，嫁接西瓜果实中*ASL1*相对表达量均低于未嫁接西瓜。而未嫁接和嫁接西瓜果实中*ASL2*相对表达量呈现出先升高后降低的趋势。嫁接西瓜果实中*Arginase*相对表达量在整个果实发育过程中均低于相应未嫁接西瓜，且差异较大。

3　讨　论

3.1　‘西嫁强生’南瓜砧木嫁接对西瓜果实发育过程中瓜氨酸含量的影响

本研究以低瓜氨酸含量的西瓜品种‘SBD黑’为接穗，以南瓜砧木‘西嫁强生’为砧木进行嫁接，结果发现，嫁接与未嫁接西瓜果实瓜氨酸含量随果实发育均呈‘S’型变化，幼果瓜氨酸含量开始升高，在接近完熟期含量达到最大值，过熟后瓜氨酸含量逐渐降低，呈先增加后降低的趋势。本文的研究结果与万学闪[41]及Soteriou等[21]的结果相一致。

瓜氨酸是西瓜果实中重要的次生代谢物质，在整个果实发育过程中，嫁接西瓜果实的瓜氨酸含量均高于未嫁接西瓜。38 d时，嫁接西瓜果实瓜氨酸含量为2.34 g·kg^{-1}，而未嫁接西瓜果实瓜氨酸含量为1.43 g·kg^{-1}，嫁接后瓜氨酸含量增加了63.0%。在Kyriacou等[36]的研究中，和自根苗相比，嫁接西瓜果实瓜氨酸增加12.5%，Soteriou等[21]研究表明嫁接的西瓜果实瓜氨酸含量较自根（未嫁接）西瓜高，而且成熟过程中高瓜氨酸含量持续的时间较长。这些研究结果均表明嫁接可显著增加西瓜果实瓜氨酸含量。

3.2　‘西嫁强生’南瓜砧木嫁接对西瓜果实发育过程中关键酶基因表达的影响

本研究共测定了瓜氨酸合成途径中10个酶基因（*NAGS*、*NAGK*、*GAT*、*OTC*、*ASS1*、*ASS2*、*ASS3*、*ASL1*、*ASL2*、*Arginase*）的相对表达量，其中*GAT*、*OTC* 、*ASS1*、*ASS2*、*ASS3*、*ASL2*基因表达量在果实发育过程中前期较高，后期降低。Page等[42]通过测定杨树组培苗中瓜氨酸合成途径关键酶基因*NAGS*、*NAGK*、*GAT*、*OTC*、*ASS*、*ASL*表达量的变化，发现这些基因表达量随时间的变化表现出先升高后降低的趋势，与本研究的结果相一致，这也说明了在果实发育过程中瓜氨酸合成途径关键酶基因表达量的变化影响了瓜氨酸的积累。Guo等[34]研究表明在西瓜授粉后18~26 d，果实瓜氨酸含量不断增加，此时西瓜果肉*ASS2*、*ASS3*、*ASL2*的相对表达量显著降低，因此推测果实西瓜果实中瓜氨酸累积可能是降低了西瓜中瓜氨酸分解代谢的结果。

通过比较嫁接与未嫁接西瓜果实瓜氨酸合成途径基因表达量差异发现，嫁接西瓜果实中*NAGS*、*NAGK*、*GAT*、*OTC*、*ASS1*、*ASS3*基因相对表达量总体上高于未嫁接西瓜；而*ASS2*、*ASL1*、*ASL2*、*Arginase*基因相对表达量总体上低于未嫁接西瓜。

Wang等[43]通过对干旱条件下草本植物叶片中转录组分析表明，干旱胁迫下其叶片中瓜氨酸合成基因上调。基于最新序列信息和基因注释表明，干旱条件下瓜氨酸含量升高与瓜氨酸上游生物合成基因*NAGS*、*NAGK*、*OTC*的上调，以及下游瓜氨酸分解基因*ASS2*、*ASS3*的下调有关[33]。本文中嫁接后西瓜果实瓜氨酸含量增加与瓜氨酸上游合成基因上调，下游降解基因下调有关，与干旱胁迫后植物体内瓜氨酸以及相关基因表达变化相一致。

在本研究中，果实发育后期，*NAGK*、*GAT*两基因的表达量在嫁接与未嫁接西瓜果实间的差异较大。我们推测*NAGK*、*GAT*在瓜氨酸累积过程中起重要作用，由于这两个基因在西瓜果实发育后期的高表达造成了嫁接后西瓜果实中积累更多的瓜氨酸。

对瓜氨酸合成途径下游的基因*ASS1*、*ASS2*、*ASS3*、*ASL1*、*ASL2*、*Arginase*基因表达分析表明，*ASS1*、*ASS3*基因在嫁接西瓜果实中表达量增加，而*ASS2*则表达量降低，这3个基因中哪个基因在西瓜果实瓜氨酸合成中起重要的作用还有待进一步研究。嫁接西瓜果实*ASL1*、*ASL2*基因相对表达量均低于未嫁接西瓜，但是差异不显著，说明嫁接对西瓜果实中*ASL1*、*ASL2*基因相对表达量影响不大，因此这两个基因可能在西瓜果实瓜氨酸积累过程中起着较小的作用。*Arginase*相对表达量在嫁接西瓜果实中较未嫁接西瓜表达量降低，且差异较大，推测*Arginase*基因可能在西瓜果实瓜氨酸累积过程中起重要作用。

西瓜果实中瓜氨酸除了果实自身生物合成与分解代谢调节外，也可能是由其他组织合成，转运到西瓜果实[33]，未嫁接和嫁接西瓜果实瓜氨酸合成相关基因表达差异具体机制仍需进一步研究。

4　结　论

‘西嫁强生’南瓜砧木嫁接可增加‘SBD黑’西

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

瓜果实瓜氨酸含量。‘西嫁强生’南瓜砧木嫁接西瓜果实瓜氨酸含量的升高可能是瓜氨酸合成途径上游基因*NAGK*、*GAT*高表达，下游基因*Arginase*低表达共同作用的结果。

参考文献 References:

[1] 栾非时 . 西瓜甜瓜育种与生物技术[M]. 北京:科学出版社，2013.
LUAN Feishi. The breeding and biotechnology of watermelon and melon[M]. Beijing: Science Press，2013.

[2] 王坚，蒋有条，林德佩 . 中国西瓜甜瓜[M]. 北京: 中国农业出版社，2000.
WANG Jian，JIANG Youtiao，LIN Depei. China watermelon and melon[M]. Beijing: China Agricultural Press，2000.

[3] 刘文革，何楠，赵胜杰，路绪强 . 我国西瓜品种选育研究进展[J]. 中国瓜菜，2016，29(1): 1-7.
LIU Wenge，HE Nan，ZHAO Shengjie，LU Xuqiang. Advances in watermelon breeding in China[J]. China Cucurbits and Vegetables，2016，29(1):1-7.

[4] 程志强，刘文革，邓云，赵胜杰，阎志红，何楠 . 西瓜果实中 L-瓜酸的提取与测定[J]. 果树学报，2010，27(4): 650-654.
CHENG Zhiqiang，LIU Wenge，DENG Yun，ZHAO Shengjie，YAN Zhihong，HE Nan. Extraction and determination of L-citrulline in watermelon fruits[J]. Journal of Fruit Science，2010，27(4): 650-654.

[5] 万学闪，刘文革，阎志红，赵胜杰，何楠，刘鹏，代军委 . 西瓜果实发育过程中番茄红素，瓜氨酸和 Vc 等功能物质含量的变化[J]. 中国农业科学，2011，44(13): 2738-2747.
WAN Xueshan，LIU Wenge，YAN Zhihong，ZHAO Shengjie，HE Nan，LIU Peng，DAI Junwei. Changes of the contents of functional substances including lycopene，citrulline and ascorbic acid during watermelon fruits development[J]. Scientia Agricultura Sinica，2011，44(13): 2738-2747.

[6] RIMANDO A M，PERKINS-VEAZIE P M. Determination of citrulline in watermelon rind[J]. Journal of Chromatography A，2005，1078(1): 196-200.

[7] 梁莉，李荣富，徐利敏，李杰，陈强，云小鹏 . 日光温室西瓜嫁接砧木筛选试验[J]. 中国瓜菜，2014，27(3): 39-42.
LIANG Li，LIU Rongfu，XU Limin，LI Jie，CHEN Qiang，YUN Xiaopeng. The screening test of grafted rootstock of watermelon in greenhouse[J]. China Cucurbits and Vegetables，2014，27(3): 39-42.

[8] 张晓玲，潘振刚，周晓锋，倪吾钟 . 自毒作用与连作障碍[J]. 土壤通报，2007，38(4): 781-784.
ZHANG Xiaoling，PAN Zhengang，ZHOU Xiaofeng，NI Wuzhong. Continuous cropping obstacle and autotoxicity[J]. Chinese Journal of Soil Science，2007，38(4):781-784.

[9] COLLA G，ROUPHAEL Y，CARDARELLI M，SALERNO A，REA E. The effectiveness of grafting to improve alkalinity tolerance in watermelon[J]. Environmental and Experimental Botany，2010，68(3): 283-291.

[10] CONDURSO C，VERZERA A，DIMA G，TRIPODI G，CRINO P，PARATORE A，ROMANO D. Effects of different rootstocks on aroma volatile compounds and carotenoid content of melon fruits[J]. Scientia Horticulturae，2012，148: 9-16.

[11] FALLIK E，ILIC Z. Grafted vegetables – the influence of rootstock and scion on postharvest quality[J]. Folia Horticulturae，2014，26(2): 79-90.

[12] MIGUEL A，MAROTO J V，BAUTISTA SAN A，BAIXAULI C，CEBOLLA V，PASCUAL B，GUARDIOLA J L. The grafting of triploid watermelon is an advantageous alternative to soil fumigation by methyl bromide for control of Fusarium wilt[J]. Scientia Horticulturae，2004，103(1): 9-17.

[13] ROUPHAEL Y，SCHWARZ D，KRUMBEIN A，COLLA G. Impact of grafting on product quality of fruit vegetables[J]. Scientia Horticulturae，2010，127(2): 172-179.

[14] 高军红，廖华俊 . 嫁接对西瓜果品品质的影响[J]. 中国瓜菜，2006，13(5): 12-14.
GAO Junhong，LIAO Huajun. The effect of grafting on fruit quality of watermelon[J]. China Cucurbits and Vegetables，2006，13(5): 12-14.

[15] 李静，别之龙，曾维寅，蔡炎 . 不同砧木嫁接对西瓜植株生长和果实品质的影响初报[J]. 长江蔬菜，2009 (4): 32-34.
LI Jing，BIE Zhilong，ZENG Weiyin，CAI Yan. Effect of different rootstock grafting on plant growth and fruit quality of watermelon[J]. Journal of Changjiang Vegetables，2009 (4): 32-34.

[16] 张保东，江姣，邱孟超，贾文红 . 不同葫芦嫁接砧木对中果型西瓜品质及产量的影响[J]. 中国瓜菜，2016，29(1): 30-33.
ZHANG Baodong，JIANG Jiao，QIU Mengchao，JIA Wenhong. The effect of different grafted rootstock on quality and yield of medium fruit watermelon[J]. China Cucurbits and Vegetables，2016，29(1): 30-33.

[17] KARACA F，YETİŞİR H，SOLMAZ I，CANDIR E，KURT Ş，SARI N，GÜLER Z. Rootstock potential of Turkish Lagenaria siceraria germplasm for watermelon: plant growth，yield and quality[J]. Turkish Journal of Agriculture and Forestry，2012，36 (2): 167-177.

[18] PETROPOULOS S A，OLYMPIOS C，ROPOKIS A，VLACHOU G，NTATSI G，PARASKEVOPOULOS A，PASSAM H C. Fruit volatiles，quality，and yield of watermelon as affected by grafting[J]. Journal of Agricultural Science and Technology，2014，16(4): 873-885.

[19] PROIETTI S，ROUPHAEL Y，COLLA G，CARDARELLI M，DE AGAZIO M，ZACCHINI M，BATTISTELL A. Fruit quality of mini – watermelon as affected by grafting and irrigation regimes[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture，2008，88(6): 1107-1114.

[20] 关立颖 . 嫁接对西瓜营养成分的影响及番茄红素估测方法初探[D]. 合肥：安徽农业大学，2011.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

GUAN Liying. The effect of grafting on nutrient composition of watermelon and the study of estimating method of lycopene content[D]. Hefei: Anhui Agriculture University，2011.

[21] SOTERIOU G A，KYRIACOU M C，SIOMOS A S，GERASOPOULOS D. Evolution of watermelon fruit physicochemical and phytochemical composition during ripening as affected by grafting[J]. Food Chemistry，2014，165: 282-289.

[22] PERKINS-VEAZIE P，ZHANG X，LU G，HUAN J. Grafting increases lycopene in seedless watermelon[J]. HortScience，2007，42(4): 959.

[23] 施先锋，曾红霞，李煜华，汤谧，张娜，杜念华，任俭，孙玉宏 . 嫁接对西瓜果实发育过程中番茄红素积累的影响[J]. 江苏农业科学，2012，40(4): 169-171.
SHI Xianfeng，ZENG Hongxia，LI Yuhua，TANG Mi，ZHANG Na，DU Nianhua，REN Jian，SUN Yuhong. The effect of grafting on the accumulation of lycopene during the development of watermelon fruit [J]. Jiangsu Agricultural Sciences，2012，40(4): 169-171.

[24] FISH W W，BRUTON B D. The expression of citrulline and other members of the arginine metabolic family in developing watermelon fruit[J]. International Journal of Agriculture Innovations and Research，2014，2(5): 2319-1473.

[25] FISH W W. Process for the production of L-citrulline from watermelon flesh and rind: U.S. Patent 8，173，837[P]. 2012-5-8.

[26] SUREDA A，CÓRDOVA A，FERRER M D，TAULER P，PÉREZ G，TUR J A，PONS A. Effects of L-citrulline oral supplementation on polymorphonuclear neutrophils oxidative burst and nitric oxide production after exercise[J]. Free Radical Research，2009，43(9): 828-835.

[27] 刘娟，路欣欣，孟慧 . 瓜氨酸的药理作用及生产方法的研究进展[J]. 药学实践杂志，2011，29(3): 173-175.
LIU Juan，LU Xinxin，MENG Hui. Progress on pharmacological activities and production methods of citrulline[J]. Journal of Pharmaceutical Practice，2011，29(3):173-175.

[28] WU G，BAZER F W，DAVIS T A，KIM S W，LI P，RHOADS J M，YIN Y. Arginine metabolism and nutrition in growth，health and disease[J]. Amino Acids，2009，37(1): 153-168.

[29] 王晶，赵晶 . 一氧化氮的生物学效应[J]. 中国基层医药，2003，10(12): 1316-1318.
WANG Jing，ZHAO Jing. Biological effects of nitric oxide[J]. Chinese Primary Medicine and Pharmacy，2003，10(12):1316-1318.

[30] 赵力 . 一种从西瓜皮中提取瓜氨酸的方法[P]. 中国专利，100721307，2006-11-29.
ZHAO Li. Method for extracting citrulline from watermelon rind [P]. Chinese Patent，100721307，2006-11-29.

[31] SLOCUM R D. Genes，enzymes and regulation of arginine biosynthesis in plants[J]. Plant Physiology and Biochemistry，2005，43(8): 729-745.

[32] WINTER G，TODD C D，TROVATO M，FORLANI G，FUNCK D. Physiological implications of arginine metabolism in plants [J]. Frontiers in Plant Science，2015，6: 534.

[33] VIJAY J，ALISDAIR R，FERNIE. Citrulline metabolism in plants[J]. Amino Acids，2017(49): 1543-1559.

[34] GUO S G，ZHANG J G，SUN H H，……，XU Y. The draft genome of watermelon (Citrullus lanatus) and resequencing of 20 diverse accessions[J]. Nat Genet，2013，45 (1):51-58.

[35] GUO S G，SUN H H，ZHANG H Y，LIU J G，REN Y，GONG G Y，JIAO C，ZHENG Y，YANG W C，FEI Z J，XU Y. Comparative transcriptome analysis of cultivated and wild watermelon during fruit development[J]. PLoS One，2015，10(6): e0130267.

[36] KYRIACOU M C，SOTERIOU G A，ROUPHAEL Y，SIOMOS A S，GERASOPOULOS D. Configuration of watermelon fruit quality in response to rootstock‐mediated harvest maturity and postharvest storage[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture，2016，96(7):2400-2409.

[37] 杨小振，张显，张宁，刘晓辉. 嫁接砧木对西瓜品质影响的研究进展[J]. 中国瓜菜，2013，26(2):1-5.
YANG Xiaozhen，ZHANG Xian，ZHANG Ning，LIU Xiaohui. Progress of research on effect of rootstocks on quality of grafted watermelon[J]. China Cucurbits and Vegetables，2013，26(2):1-5.

[38] 万学闪，刘文革，阎志红，赵胜杰，何楠，刘鹏，代军委 . 无籽西瓜果实不同部位瓜氨酸含量测定[J]. 中国瓜菜，2010，23(6): 11-14.
WAN Xueshan，LIU Wenge，YAN Zhihong，ZHAO Shengjie，HE Nan，LIU Peng，DAI Junwei. Citrulline contents in different parts of seedless watermelon fruit[J]. China Cucurbits and Vegetables，2010，23(6):11-14.

[39] KONG Q S，YUAN J X，GAO L Y，ZHAO L Q，CHENG F，HUANG Y，BIE Z H. Evaluation of appropriate reference genes for gene expression normalization during watermelon fruit development[J]. PloS One，2015，10(6): e0130865.

[40] LIVAK K J，SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods，2001，25(4): 402-408.

[41] 万学闪 . 西瓜番茄红素，瓜氨酸，Vc 及糖等成分的研究[D]. 北京：中国农业科学院，2009.
WAN Xueshan. Study on Lycopene，Citrulline，Vc and Sugar in Watermelon[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences，2009.

[42] PAGE A F，MINOCHA R，MINOCHA S C. Living with high putrescine: expression of ornithine and arginine biosynthetic pathway genes in high and low putrescine producing poplar cells[J]. Amino Acids，2012，42(1): 295-308.

[43] WANG L，CAO C L，MA Q B，ZENG Q Y，WANG H F，CHENG Z H，ZHU G F，QI J，MA H，NIAN H，WANG Y X. RNA-seq analyses of multiple meristems of soybean: novel and alternative transcripts，evolutionary and functional implications [J]. BMC Plant Biology，2014，14(1): 169.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net