

不同倍性西瓜发育过程中瓜氨酸合成途径主要氨基酸含量变化及相关基因表达分析

陈子昊, 路绪强, 何楠, 杨东东, 朱红菊, 刘文革

(河南省南亚瓜果学国际联合实验室·中国农业科学院郑州果树研究所 郑州 450009)

摘要:以同源二倍体、三倍体和四倍体西瓜伊选为试验材料, 研究 3 种倍性西瓜果实发育过程中瓜氨酸合成途径中谷氨酸、鸟氨酸、瓜氨酸和精氨酸 4 种氨基酸的含量差异以及其合成途径中关键酶基因的表达差异。结果表明, 多倍体西瓜果实中瓜氨酸与鸟氨酸含量均显著高于二倍体, 而多倍体精氨酸含量低于二倍体。在西瓜果实发育 32 d 时, 瓜氨酸与鸟氨酸含量表现为三倍体>四倍体>二倍体, 而谷氨酸与精氨酸含量表现为二倍体>四倍体>三倍体。多倍体与二倍体在果实发育后期(24~32 d) *NAGS*、*NAGK*、*GAT*、*OTC* 基因表达量差异显著, 二倍体中 *ASS1*、*ASS3*、*ARG* 基因表达量在整个果实发育期始终高于多倍体。以上结果表明, 不同倍性西瓜果实中瓜氨酸含量存在差异可能是瓜氨酸合成途径上下游基因的差异表达造成的。研究结果对揭示不同倍性西瓜中瓜氨酸含量差异机制具有重要意义。

关键词:西瓜; 倍性; 瓜氨酸; 基因表达

中图分类号: S651

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2024)06-018-09

Changes of main amino acid contents in citrulline biosynthesis pathway and expression analysis of related genes during fruit development of watermelon with different ploidy

CHEN Zihao, LU Xuqiang, HE Nan, YANG Dongdong, ZHU Hongju, LIU Wenge

(Henan Joint International Research Laboratory of South Asian Fruits and Cucurbits/Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, Henan, China)

Abstract: The content of four amino acids, glutamic acid, ornithine, citrulline and arginine, as well as the expression differences of key enzyme genes in the citrulline synthesis pathway of citrulline, were studied in the diploid, triploid and tetraploid Yixuan watermelon. The results showed that the content of citrulline and ornithine in polyploid watermelon fruits were significantly higher than those in diploid, while the content of arginine in polyploid was lower than that in diploid. At 32 days of fruit development, the content of citrulline and ornithine were triploid > tetraploid > diploid, while the content of glutamic acid and arginine were diploid > tetraploid > triploid. Correspondingly, there were significant differences in the expression of *NAGS*, *NAGK*, *GAT*, *OTC* genes between polyploid and diploid in the late stage of fruit development, and the expression of *ASS1*, *ASS3* and *ARG* genes in diploid was always higher than that of polyploid throughout the developmental period. These results indicated that the differences in citrulline content in different ploidy watermelon fruits were caused by the stable differential expression of upstream and downstream genes of citrulline synthesis pathway. This study is of great significance to reveal the mechanism of citrulline content difference in different ploidy watermelon.

Key words: Watermelon; Ploidy; Citrulline; Gene expression

西瓜(*Citrullus lanatus*)为葫芦科西瓜属的一年生草本植物, 起源于非洲, 是世界上重要的经济水果作物之一^[1-2]。中国是世界上最大的西瓜生产国

和消费国, 有 1500 多年的西瓜种植历史, 西瓜在我国栽培地域广泛且在果蔬生产和供应中占据十分重要的地位^[3-4]。西瓜果实富含可溶性糖、有机酸、

收稿日期: 2024-02-19; 修回日期: 2024-04-15

基金项目: 河南省科技攻关项目(242102110242); 中国农业科学院科技创新工程专项(CAAS-ASTIP-2021-ZFRI); 国家现代农业产业技术体系(CARS-25-03); 河南省重大科技专项(221100110400); 河南省农业良种联合攻关项目(2022010503)

作者简介: 陈子昊, 男, 在读硕士研究生, 研究方向为代谢组学。E-mail: 1297817378@qq.com

通信作者: 刘文革, 男, 研究员, 主要从事西瓜遗传育种研究。E-mail: liuwenge@caas.cn

类胡萝卜素、蛋白质、脂类、纤维素、矿物质、维生素和氨基酸等营养成分^[5-6],是炎热夏季绝佳的多汁水果。西瓜果实中瓜氨酸含量丰富,鲜食即可被人体直接吸收,在人体内可转化为必需氨基酸精氨酸,是人体补充瓜氨酸与精氨酸的最佳选择。在哺乳动物中,瓜氨酸是尿素循环和一氧化氮循环的组成部分,可以调节血液循环^[7],口服瓜氨酸具有预防各种心血管疾病,提高男性的性功能,抗衰老和增强机体免疫力等作用^[8]。

目前,植物中瓜氨酸合成代谢途径及其调控机制研究主要集中在模式植物拟南芥上。Joshi 等^[9]与 Bahri 等^[10]研究表明,植物中瓜氨酸的合成途径主要分为两个过程:一是谷氨酸通过线性途径或循环途径生成鸟氨酸,即谷氨酸在 N-乙酰谷氨酸合成酶(NAGS)催化下生成 N-乙酰谷氨酸,后经 N-乙酰谷氨酸激酶(NAGK)磷酸化生成 N-乙酰谷氨酸-5-磷酸,再与 N-乙酰谷氨酸-5-磷酸还原酶(NAGPR)反应生成 N-乙酰谷氨酸-5-半醛,最后经 N-乙酰鸟氨酸转移酶(NAOAT)生成 N-乙酰鸟氨酸,其中谷氨酸还可通过 N-乙酰鸟氨酸谷氨酸转移酶(GAT)生成鸟氨酸。二是鸟氨酸生成瓜氨酸及鸟氨酸再生,即鸟氨酸在鸟氨酸氨甲酰转移酶(OTC)作用下生成瓜氨酸,后在精氨酸琥珀酸合酶(ASS)催化下生成精氨酸琥珀酸,进一步经精氨酸琥珀酸裂解酶(ASL)催化,生成精氨酸,最后精氨酸在精氨酸酶(ARG)的催化下,参与尿素循环重新生成鸟氨酸^[11]。

多倍化是高等植物基因组进化的显著特征之一^[12],如水稻、玉米、大豆和甘蓝等多数高等植物都保留有古多倍体的痕迹。基因组加倍会对多倍体植物的形态、活力和生理产生多层次影响^[13],通常伴随着细胞体积增大和代谢物质含量的显著变化^[14],二倍体蓝莓的花色苷和黄烷醇含量高于其同源六倍体或四倍体^[15];拟南芥的倍性水平与茎组织中的木质素和纤维素含量呈负相关,与基质多糖含量呈正相关^[16];同源四倍体木薯中果糖含量显著高于其二倍体^[17];同源四倍体椪柑果实总酸、抗坏血酸和总酚类化合物含量均高于二倍体^[18]。三倍体无籽西瓜是人工诱导多倍体优势利用最成功的作物之一,具有二倍体亲本所没有的少籽(或无籽)、丰产、耐贮藏、抗性强、高糖等优良性状^[19-20]。前人研究表明,多倍体西瓜果实中瓜氨酸、可溶性固形物、番茄红素和维生素 C 含量显著高于其同源二倍体^[21-23],但不同倍性西瓜中瓜氨酸通路的几种主要游离氨基酸含量差异情况以及造成不同倍性西瓜果实中瓜

氨酸等主要氨基酸差异积累的调控机制还不清楚。笔者以同源二倍体、三倍体和四倍体西瓜伊选为试验材料,研究不同倍性西瓜果实中瓜氨酸合成途径的几种主要游离氨基酸含量及相关基因的表达,以期揭示不同倍性西瓜果实中瓜氨酸含量差异机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

笔者选用来源于中国农业科学院郑州果树研究所多倍体西瓜育种课题组同基因型不同倍性的二倍体、三倍体和四倍体西瓜伊选为试验材料。伊选是我国 8424 类型西瓜的育种亲本,具有普遍性和代表性,果实圆球形,果皮浅绿色有深绿网,果肉呈粉红色,平均单果质量 3.5 kg,早熟、易坐果、四倍体种子数量多,适宜开展大规模试验。

1.2 田间试验设计

四倍体伊选于 2008 年经 0.1%秋水仙素诱变二倍体伊选得到,伊选三倍体是由其同源二倍体和四倍体杂交得到。二倍体、三倍体和四倍体西瓜伊选于 2022 年 3 月在海南省三亚市试验基地露地栽培,采用完全随机区组设计(共 9 个小区,每个小区种植 20 株),株距 0.5 m,行距 2.0 m,双蔓整枝,每株留单瓜,田间管理一致;5 月下旬开始授粉,雌、雄花均于开花前一天盖帽,次日自交授粉,挂牌标记授粉时间。分别在授粉后 10、18、26 和 32 d 取长势良好、均匀一致的 3 个果实,纵切后均匀取剖面西瓜果柄侧、果脐侧、阴面侧、阳面侧及中心 5 个区域果肉(图 1),切碎混匀后分装 3 管,液氮速冻后转移至 -80 °C 冰箱保存。

1.3 方法

1.3.1 西瓜果肉氨基酸含量测定 参考杨东东等^[11]的测定方法,采用岛津高效液相色谱仪(型号:LC-20AD)测定西瓜果肉中 L-谷氨酸(L-Glu)、L-鸟氨酸(L-Orn)、L-瓜氨酸(L-Cit)和 L-精氨酸(L-Arg) 4 种游离氨基酸含量。色谱条件—荧光检测器 A Ex: 250 nm, Em: 395 nm;色谱柱: C18(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。

从 3 管冷冻样品中取出适量置于冷冻干燥机冻干处理。测定前将 3 管冻干果肉样品研磨成细粉状,每管分别称取 1.00 g,用 100 mL 的沸水冲泡,随后 95 °C 水浴 10 min,期间晃动混匀 5 次,水浴结束后分别使用 0.22 μm 水相滤膜进行抽滤,冷却至室温后每份提取液分别定容至 125 mL 并置

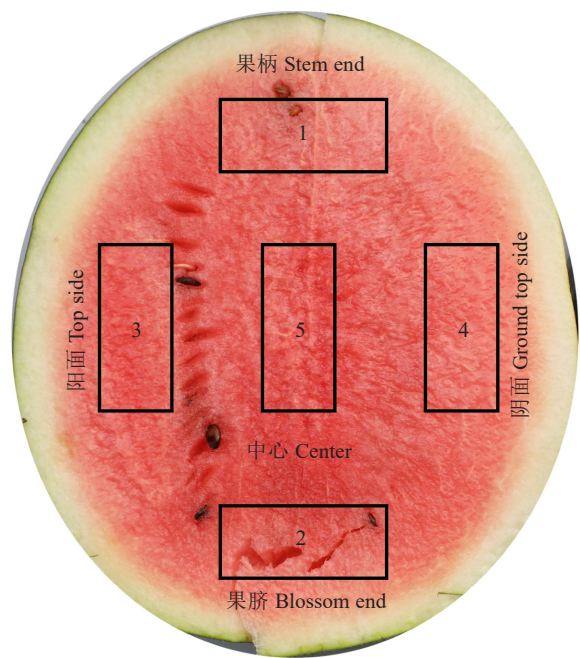


图 1 西瓜果实五点取样法

Fig. 1 Five point sampling method of watermelon fruit

于-20℃保存待测。每份提取液各测定1次,取3次结果平均值作为所测定的游离氨基酸含量。4种游离氨基酸回归方程为L-谷氨酸: $y=33\,636\,600x-243\,691$,相关系数 $R^2=0.999\,9$;L-鸟氨酸: $y=51\,427\,200x+14\,581$,相关系数 $R^2=0.999\,7$;L-瓜氨酸: $y=99\,537\,800x+3\,423.84$,相关系数 $R^2=0.999\,5$;L-精氨酸: $y=56\,254\,200x+8\,282\,500$,相关系数 $R^2=0.998\,9$ 。 y 为液相色谱峰面积, x 为目的游离氨基酸质量分数($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。

1.3.2 RNA 提取与 cDNA 合成 RNA 样品与 1.3.1 的取样时间和取样方法一致。西瓜果肉 RNA 提取参照北京普乐海生物科技有限公司的多糖多酚植物复杂植物 RNA 快速提取试剂盒步骤进行。

采用微量分光光度计测定 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。按照北京普乐海生物科技有限公司的 Focus on the molecular biology EasyScript RT Kit(+gDNA Eraser)反转录试剂盒说明书合成 cDNA。

1.3.3 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^[25]。西瓜瓜氨酸合成途径关键酶基因名称、引物序列见表 2,引物由北京普乐海生物科技有限公司合成。

1.4 数据处理

采用 Microsoft Excel 2021 和 Origin 2021 进行数据处理和作图,采用 SPSS 22.0 进行差异显著性分析。

2 结果与分析

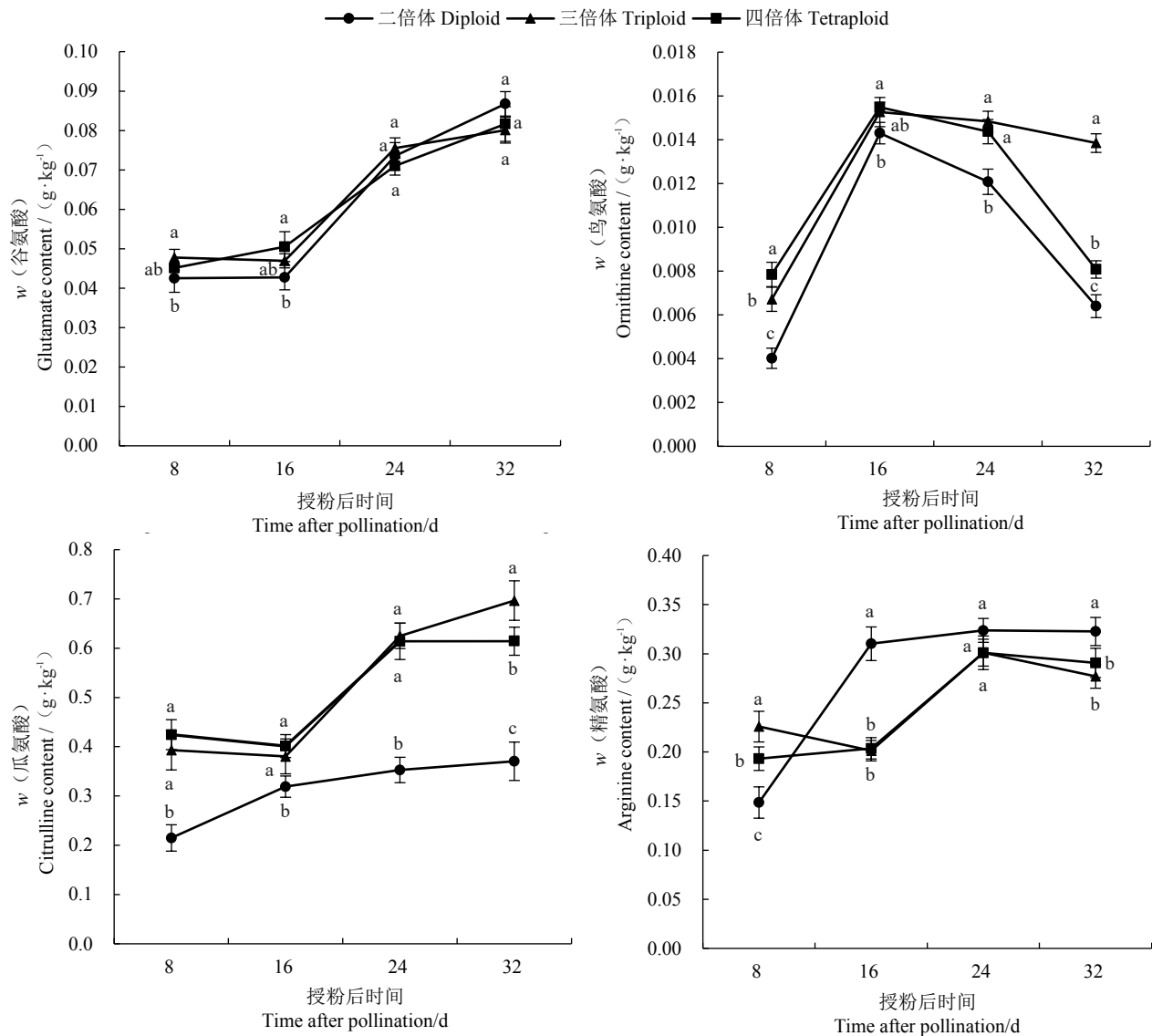
2.1 不同倍性西瓜果实不同发育时期瓜氨酸合成通路中 4 种主要氨基酸含量变化

在不同发育时期,不同倍性西瓜果实中谷氨酸、鸟氨酸、瓜氨酸和精氨酸的含量和积累模式均存在着规律性变化(图 2)。

在果实发育期间,授粉后 8~16 d 多倍体谷氨酸含量高于二倍体,授粉后 32 d 多倍体低于二倍体,但差异不显著。各倍性材料中谷氨酸在授粉后 8~16 d 积累缓慢,16~24 d 迅速积累,32 d 趋于平缓。其中授粉后 8 d 时,三倍体谷氨酸含量(w ,后同)最高($0.047\,7\,\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$),二倍体谷氨酸含量最低($0.042\,5\,\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$),二者呈

表 1 引物名称和序列
Table 1 Primer name and sequence

基因名称 Gene name	正向引物(5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse primer (5'-3')
N-acetyl Glu synthase(<i>NAGS</i>)	GTGAGCGGAATAGCCATAT	CTCCTCCAATAGTGCCATC
N-acetylglutamate kinase(<i>NAGK</i>)	CTCAATCCATCCGCATCC	AATCAACTACAGCCTCCATT
Glutamate N-acetyltransferase(<i>GAT</i>)	GACGACCGACCTTGTTAG	CCACCGCATCTGTTGTTA
Ornithine carbamoyl transferase(<i>OTC</i>)	CCTGACGGATTACAACCAT	TGATGCCAACAAACAACCA
Argininosuccinate synthase(<i>ASS1</i>)	TTACAGTGGTGCTTAGAC	CTCTTCCTTCAAGTCCTTCA
Argininosuccinate synthase(<i>ASS2</i>)	ATGGTGGATGTTGCGAAT	CTTGGTGACTGGAATAGGT
Argininosuccinate synthase(<i>ASS3</i>)	AGATAACCGCAACAACCA	GCCGTAGAGATGAATGAATC
Argininosuccinate lyase(<i>ASL1</i>)	TGCCAGAGTCATAGGAGA	CTTCTTCACGAGGTAATCAG
Argininosuccinate lyase(<i>ASL2</i>)	TTGCGATGGTAGACTTGG	TGCTAAGAGAAGATGCTGAA
Arginase(<i>ARG</i>)	GCATCTCTAACACTCATTCG	GGACATCACCAACATCAGT



注:不同小写字母表示不同倍性西瓜在同一时间差异显著($p < 0.05$)。下同。

Note: Different small letters indicate significant difference among different ploidy watermelon at the same time ($p < 0.05$). The same below.

图2 西瓜果实发育过程中瓜氨酸合成途径主要4种游离氨基酸含量的变化

Fig. 2 Change of four amino acids content in citrulline synthesis pathway during fruit development of watermelon

显著差异;在授粉后16 d时,三倍体与四倍体谷氨酸含量均高于二倍体;在授粉后24 d时,3个倍性西瓜谷氨酸含量均迅速积累,倍性间无显著差异,表现为三倍体>二倍体>四倍体;在授粉后32 d时,三倍体与四倍体谷氨酸含量增长减缓,二倍体增长速率变化较小,倍性间谷氨酸含量也无显著差异,表现为二倍体($0.0868 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)>四倍体($0.0817 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)>三倍体($0.0801 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。

在果实发育期间,多倍体中鸟氨酸的含量均高于二倍体。在授粉后8~16 d时,3个倍性西瓜中鸟氨酸含量同时迅速积累,授粉后16 d后同时开始下降。其中授粉后8 d时,鸟氨酸含量多倍体显著高于二倍

体,表现为四倍体>三倍体>二倍体;在授粉后16 d时,三倍体与四倍体鸟氨酸含量相近且均高于二倍体;在授粉后24 d时,3个倍性材料中鸟氨酸含量均开始下降,多倍体鸟氨酸含量显著高于二倍体,表现为三倍体($0.0148 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)>四倍体($0.0144 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)>二倍体($0.0121 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$);在授粉后32 d时,3个倍性材料中鸟氨酸含量均下降或迅速下降,多倍体鸟氨酸含量均显著高于二倍体,且三倍体显著高于四倍体。

在整个西瓜果实发育期,多倍体西瓜瓜氨酸含量均显著高于二倍体,其中三倍体与四倍体瓜氨酸积累速度基本一致。在授粉后8、16与24 d时,四倍体与三倍体瓜氨酸含量无显著差异;在授粉后

32 d 时,各倍性西瓜果实瓜氨酸含量增长均趋于平缓,多倍体瓜氨酸含量均显著高于二倍体,且三倍体显著高于四倍体。

不同倍性西瓜果实中的精氨酸含量在整个发育期增长趋势不一致,三倍体呈先降低后升高再降低的变化趋势,二倍体和四倍体呈先升高后趋于平缓降低的趋势。在授粉后 8 d 时,多倍体精氨酸含量均显著高于二倍体,且三倍体显著高于四倍体;在授粉后 16 d 时,二倍体精氨酸含量迅速增加,显著高于多倍体;在授粉后 16~24 d 时,多倍体精氨酸含量迅速积累,二倍体积累趋于平缓,授粉后 24 d 精氨酸含量仍表现为二倍体高于多倍体,但差异不显著;在授粉后 32 d 时,各倍性精氨酸含量均开始下降,二倍体精氨酸含量显著高于多倍体。

2.2 不同倍性西瓜果实发育过程中瓜氨酸代谢通路关键酶基因表达量差异分析

为了进一步探究不同倍性西瓜瓜氨酸代谢通路中 4 种主要游离氨基酸差异积累的调控机制,笔者对三种倍性西瓜在不同发育时期的瓜氨酸代谢通路中重要酶基因(*NAGS*、*NAGK*、*GAT*、*OTC*、*ASS*、*ASL*、*ARG*)进行了差异表达分析(图 3)。

N-乙酰谷氨酸是瓜氨酸合成途径第一个产物,由谷氨酸在 *NAGS* 的催化下与乙酰辅酶 A 结合生成;*N*-乙酰谷氨酸在 *NAGK* 催化下生成 *N*-乙酰谷氨酸-5-磷酸,是瓜氨酸合成途径的第二步。多倍体与二倍体西瓜果实发育过程中 *NAGS*、*NAGK* 相对表达量变化一致,在果实发育期间均呈先升高后降低的变化趋势。整个果实发育期间,多倍体 *NAGS*、*NAGK* 相对表达量均显著高于二倍体,其中授粉后 32 d 三倍体的相对表达量显著高于四倍体。

谷氨酸在 *GAT* 催化下生成鸟氨酸,*GAT* 相对表达量在不同倍性西瓜果实生长发育过程中变化并不一致,二倍体呈先升高后降低的变化趋势,而多倍体呈逐渐降低的变化趋势。从授粉后 8 d 开始,多倍体西瓜果实中 *GAT* 基因相对表达量始终高于二倍体西瓜果实;其中授粉后 24~32 d 多倍体与二倍体呈显著差异。整个果实发育期间,三倍体西瓜果实中 *GAT* 基因相对表达量均最高,其中授粉后 24~32 d 与四倍体呈显著差异。

OTC 催化鸟氨酸与氨甲酰磷酸生成瓜氨酸。*OTC* 相对表达量在授粉后 8 d 表现出二倍体高于多倍体,而授粉后 16~32 d,多倍体 *OTC* 相对表达量高于二倍体。整个果实发育期间,二倍体、三倍体与四倍体果实的 *OTC* 相对表达量呈显著差异,其中

授粉后 24~32 d,三倍体 *OTC* 相对表达量最高。

ASS 催化瓜氨酸生成精氨酸琥珀酸,在西瓜中 *ASS* 是基因家族,3 个基因家族成员分别为 *ASS1*、*ASS2*、*ASS3*。在果实发育过程中,不同倍性西瓜果实中 *ASS1*、*ASS2*、*ASS3* 基因相对表达量表现一致,均随果实发育成熟而降低,*ASS2* 在授粉后 32 d 的相对表达量有所升高,但表达水平较低。多倍体果实中 *ASS2* 基因表达量在授粉后 8 d 显著高于二倍体,其他发育阶段均低于二倍体西瓜;*ASS1* 与 *ASS3* 基因表达量在生长发育过程中多倍体表达量均显著低于二倍体。

ASL 催化精氨酸琥珀酸生成精氨酸,*ASL* 包括 2 个基因家族成员 *ASL1*、*ASL2*。在整个果实发育过程中,多倍体西瓜果实中 *ASL1* 相对表达量仅在授粉后 16 d 高于二倍体,在其他发育阶段均低于二倍体西瓜。*ASL2* 相对表达量在授粉后 8~16 d 多倍体高于二倍体,授粉后 24~32 d 二倍体显著高于多倍体。

ARG 催化精氨酸生成鸟氨酸,重新参与瓜氨酸的合成。多倍体西瓜果实中 *ARG* 相对表达量在整个果实发育期间均显著低于二倍体,除授粉后 16 d,四倍体相对表达量最低,其他果实发育阶段均是三倍体相对表达量最低,其中在授粉后 24~32 d 显著低于四倍体。

2.3 不同倍性西瓜瓜氨酸代谢通路 4 种主要游离氨基酸含量及代谢通路关键酶基因表达联合分析

基于前期研究结果,发现 3 种倍性西瓜瓜氨酸代谢通路中 4 种主要游离氨基酸含量和积累模式差异及代谢通路中关键酶基因之间的表达差异之间存在明显的相关性,所以进一步进行了相关性分析(图 4)。结果表明,谷氨酸含量与控制谷氨酸转化为鸟氨酸的 *NAGS* 相对表达量及精氨酸含量呈显著正相关;与控制谷氨酸转化为鸟氨酸的 *GAT* 相对表达量,控制瓜氨酸转为精氨酸的 *ASS1*、*ASS2*、*ASS3*、*ASL2* 相对表达量呈显著负相关。鸟氨酸含量与控制谷氨酸转化为鸟氨酸的 *NAGK* 相对表达量,控制鸟氨酸转化为瓜氨酸的 *OTC* 相对表达量呈显著正相关;与控制瓜氨酸转换为精氨酸的 *ASL1* 相对表达量,控制精氨酸再生成鸟氨酸的 *ARG* 相对表达量呈显著负相关。瓜氨酸含量与控制谷氨酸转化成鸟氨酸的 *NAGK*、*NAGS* 相对表达量,控制鸟氨酸转化为瓜氨酸的 *OTC* 相对表达量及谷氨酸含量呈显著正相关;与控制瓜氨酸转化成精氨酸的 *ASS1*、*ASS3*、*ASL2* 相对表达量,控制精氨酸再生成鸟氨酸的 *ARG* 相对表达量呈显著负相关。精氨酸

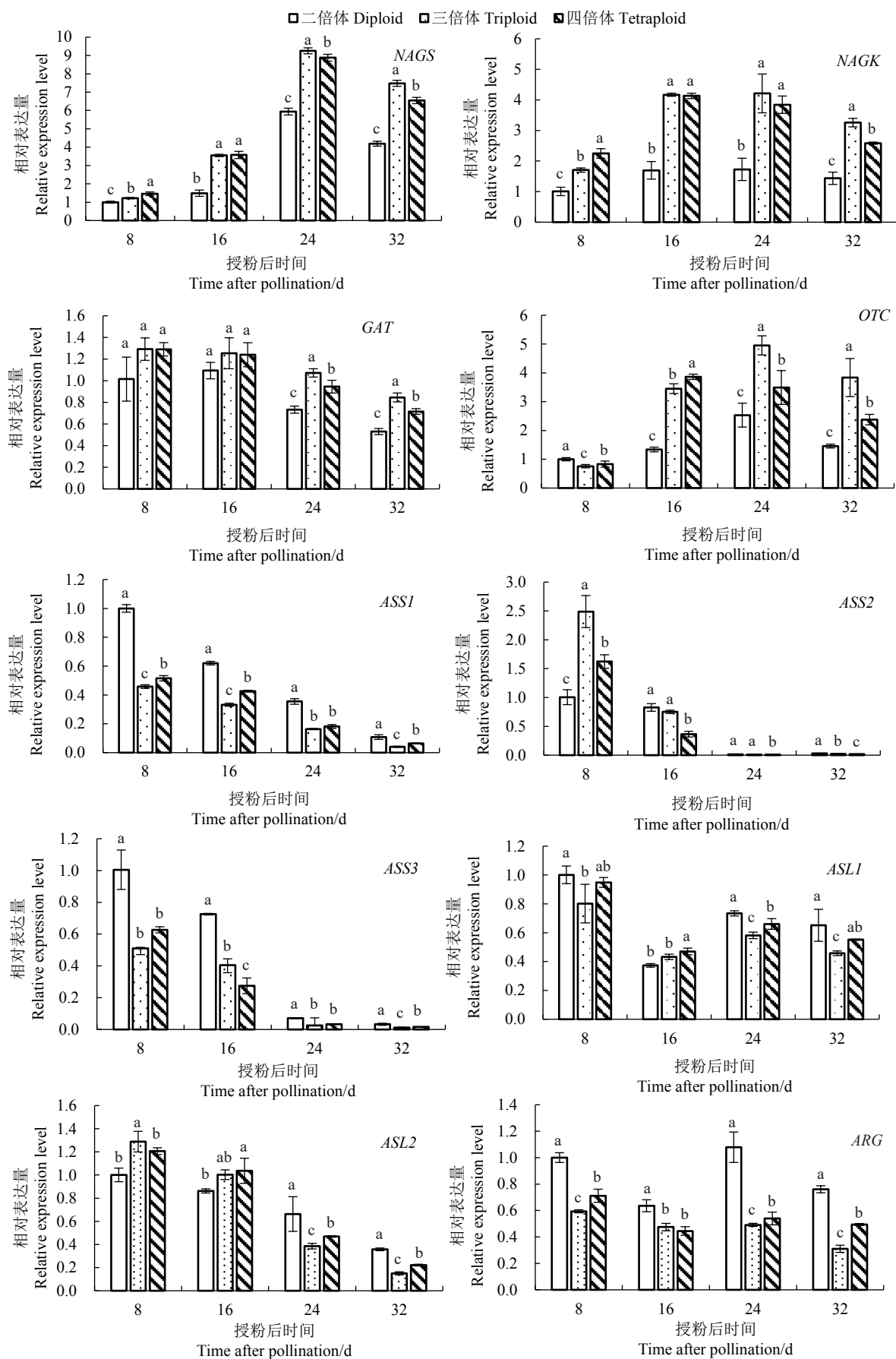


图3 不同倍性果实发育过程中瓜氨酸合成关键酶基因表达量

Fig. 3 Different ploidy on gene expression of key enzymes in citrulline synthesis during fruit development

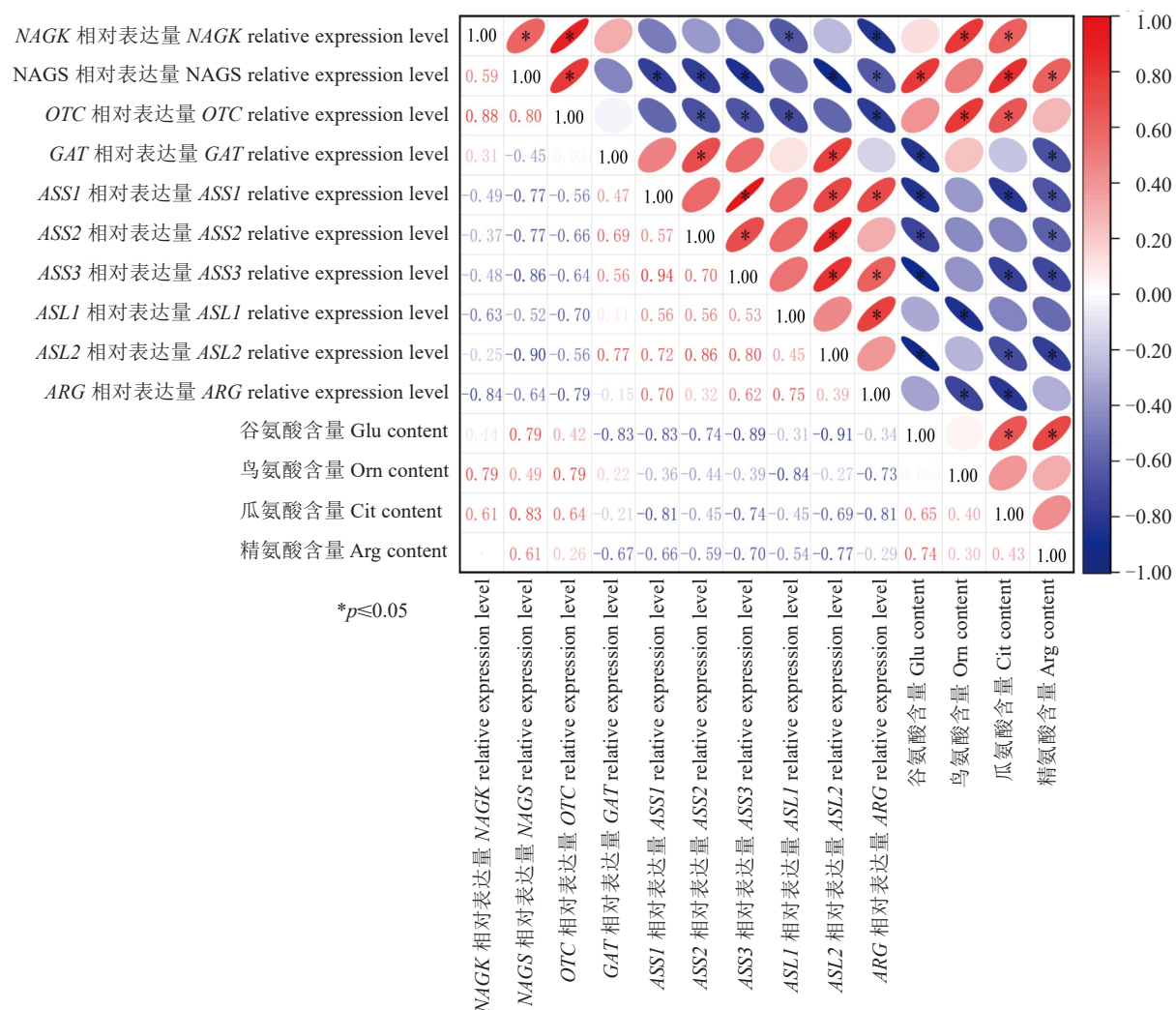


图 4 西瓜果实瓜氨酸合成途径主要 4 种氨基酸含量与关键酶基因表达的相关性分析
Fig. 4 Correlation analysis of four amino acids content in citrulline synthesis pathway and key enzyme genes expression level in watermelon fruit

含量与控制谷氨酸转化为鸟氨酸的 *NAGS* 相对表达量和谷氨酸含量呈显著正相关;与控制谷氨酸转化为鸟氨酸的 *GAT* 相对表达量,控制瓜氨酸转为精氨酸的 *ASS1*、*ASS2*、*ASS3*、*ASL2* 相对表达量呈显著负相关。

3 讨论与结论

园艺作物的生长发育与代谢物质的动态变化息息相关。瓜氨酸是西瓜果实中重要的代谢物质,与代谢通路中谷氨酸、精氨酸和鸟氨酸关系密切^[9]。植物代谢物的含量与其发育时期密切相关,王学征等^[22]研究表明,西瓜果实中番茄红素含量在授粉后 16 d 开始积累,转色期迅速积累,成熟期达到峰值,成熟后开始下降。万学闪等^[23]研究表明,西瓜果实中瓜氨酸含量在幼果期较低,膨大期有所减少,随后大量积累,在接近完熟达到峰值后缓慢下

降。本研究表明,随着果实的发育,瓜氨酸与谷氨酸含量不断升高,在成熟时达到最高值,研究结果与前人并不完全一致,推测可能与品种或栽培环境条件不同有关。然而,精氨酸和鸟氨酸含量则在西瓜完全成熟时降低,这可能是由谷氨酸与鸟氨酸是瓜氨酸合成的底物,而精氨酸是其直接产物造成的。笔者的研究结果也间接证明了西瓜果实中瓜氨酸积累可能受谷氨酸、精氨酸和鸟氨酸的协同影响。

多倍体植物在自然界中普遍存在,是植物引入新物种形成和拓宽生物多样性基础的重要途径之一^[24]。由于基因剂量效应的影响,多倍体植物中一些代谢物质含量相较染色体加倍前会发生显著变化,部分代谢物含量升高或降低^[25]。研究表明,拟南芥茎中半纤维素和果胶含量与倍性水平呈正相关,而木质素和纤维素含量与倍性水平呈负相关^[26]。四倍体柑橘叶片中柠檬酸和果酸含量较二倍体升高,

而苯丙素和萜类化合物含量降低^[27]。笔者的试验结果表明,多倍体西瓜果实的瓜氨酸与鸟氨酸含量在果实发育期间高于二倍体,而二倍体西瓜果实的精氨酸与谷氨酸含量在成熟期高于多倍体,这表明西瓜染色体倍性的变化会导致其部分代谢物质含量的升高或降低。

西瓜果实中瓜氨酸的含量变化受其代谢通路中多种基因的协同调控。前人研究表明,在果实发育过程中瓜氨酸含量呈持续增加趋势,在生理成熟期达到峰值,且参与瓜氨酸合成的 *OTC* 基因在果实发育过程中呈先升高后降低的变化趋势,参与瓜氨酸分解的基因(*ASS1*、*ASS3*、*ASL2*)持续下调表达^[28],与笔者的研究结果基本一致。在植物中,瓜氨酸参与逆境调节,在干旱、盐胁迫等逆境条件下,可积累大量瓜氨酸,通过清除逆境胁迫产生的羟自由基,维持植物相对正常生长^[29-30]。李蒙蒙等^[30]研究表明,嫁接西瓜果实中瓜氨酸含量高于未嫁接西瓜,且成熟时嫁接西瓜瓜氨酸代谢通路上游基因 *NAGS*、*NAGK*、*GAT*、*OTC* 表达量均高于未嫁接西瓜,而下游基因 *ASS2*、*ASS3*、*ASL2* 表达量低于未嫁接西瓜。Song 等^[31]研究表明,干旱胁迫下,西瓜叶片中瓜氨酸含量显著提高,同时 *NAOD*、*NAOAT*、*OTC* 基因表达量显著上调,*ASS1*、*ASS2*、*ASS3*、*ASL2* 基因表达量显著下调。以上研究结果表明西瓜果实中的瓜氨酸含量受其代谢通路上下游基因的调控,在本试验中多倍体西瓜瓜氨酸含量高于二倍体,瓜氨酸合成途径上游基因 *NAGS*、*NAGK*、*GAT*、*OTC* 相较于二倍体表达量较高,而下游基因 *ASS1*、*ASS3*、*ARG* 相较于二倍体表达量较低,与前人研究结果一致。

综上所述,多倍体西瓜果实瓜氨酸含量高于二倍体主要是瓜氨酸合成途径中谷氨酸、精氨酸和鸟氨酸的协同调配,以及上游基因 *NAGS*、*NAGK*、*GAT*、*OTC* 高表达,下游基因 *ASS1*、*ASS3*、*ARG* 低表达共同作用的结果。研究结果对揭示不同倍性西瓜中瓜氨酸含量差异机制具有重要意义。

参考文献

- [1] GUO S G, ZHAO S J, SUN H H, et al. Resequencing of 414 cultivated and wild watermelon accessions identifies selection for fruit quality traits[J]. *Nature genetics*, 2019, 51(11): 1616-1623.
- [2] TIAN S W, JIANG L J, GAO Q, et al. Efficient CRISPR/Cas9-based gene knockout in watermelon[J]. *Plant Cell Reports*, 2017, 36(3): 399-406.
- [3] 刘启振,王思明.西瓜的起源及其在全球的传播[J]. *海交史研究*, 2020(4): 30-44.
- [4] 李福,谢露露,刘季扬,等.西瓜果实耐裂性的生理基础及其遗传和环境调控[J]. *中国瓜菜*, 2023, 36(5): 1-7.
- [5] UMER M J, BIN SAFDAR L, GEBRENESKEL H, et al. Identification of key gene networks controlling organic acid and sugar metabolism during watermelon fruit development by integrating metabolic phenotypes and gene expression profiles[J]. *Horticulture Research*, 2020, 7(1): 193.
- [6] 黄小忠,卢阳月,林远至,等.不同瓤色西瓜果肉挥发性物质检测与分析[J]. *中国瓜菜*, 2023, 36(11): 33-39.
- [7] CURIS E, NICOLIS I, MOINARD C, et al. Almost all about citrulline in mammals[J]. *Amino Acids*, 2005, 29(3): 177-205.
- [8] COLLINS J K, WU G Y, PERKINS-VEAZIES P, et al. Watermelon consumption increases plasma arginine concentrations in adults[J]. *Nutrition*, 2007, 23(3): 261-266.
- [9] JOSHI V, FEMIE A R. Citrulline metabolism in plants[J]. *Amino Acids*, 2017, 49(9): 1543-1559.
- [10] BAHRI S, ZERROUK N, AUSSEL C, et al. Citrulline: From metabolism to therapeutic use[J]. *Nutrition*, 2013, 29(3): 479-484.
- [11] 杨东东,朱红菊,赵永,等.蔬菜作物中瓜氨酸代谢调控研究进展[J]. *中国瓜菜*, 2023, 36(2): 1-10.
- [12] 朱红菊,赵胜杰,路绪强,等.二倍体和四倍体西瓜幼苗根系形态差异比较[J]. *中国瓜菜*, 2020, 33(11): 18-21.
- [13] COHEN H, FAIT A, TEL-ZUR N. Morphological, cytological and metabolic consequences of autopolyploidization in *Hylocereus* (Cactaceae) species[J]. *BMC Plant Biology*, 2013, 13(173): 2013.
- [14] LAVANIA U C, SRIVASTAVA S, LAVANIA S, et al. Autopolyploidy differentially influences body size in plants, but facilitates enhanced accumulation of secondary metabolites, causing increased cytosine methylation[J]. *Plant Journal*, 2012, 71(4): 539-549.
- [15] MENGIST M F, GRACE M H, XIONG J, et al. Diversity in metabolites and fruit quality traits in blueberry enables ploidy and species differentiation and establishes a strategy for future genetic studies[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 370.
- [16] CORNEILLIE S, DE STORME N, VAN ACKER R, et al. Polyploidy affects plant growth and alters cell wall composition[J]. *Plant Physiology*, 2019, 179(1): 74-87.
- [17] 陆柳英,阮孟斌,吴正丹,等.蛋白质组学分析染色体加倍对木薯表型及块根形成期代谢产物的影响[J]. *植物生理学报*, 2023(10): 1870-1880.
- [18] TAN F Q, ZHANG M, XIE K D, et al. Polyploidy remodels fruit metabolism by modifying carbon source utilization and metabolic flux in Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco)[J]. *Plant Science*, 2019, 289: 110276.
- [19] 王友平,朱金英,徐光东,等.西瓜多倍体研究应用进展[J]. *长江蔬菜*, 2010(20): 8-12.
- [20] 刘文革,王鸣,阎志红.蔬菜作物多倍体育种研究进展[J]. *长江蔬菜*, 2003(1): 29-33.
- [21] 郑锋,詹园凤,党选民,等.不同倍性小型西瓜果实中番茄红素、瓜氨酸含量比较分析[J]. *热带农业科学*, 2012, 32(2): 68-73.

- [22] 王学征,张雅楠,肖琪,等.西瓜果实发育过程中番茄红素积累变化及相关酶基因表达[J].东北农业大学学报,2016,47(4):40-48.
- [23] 万学闪,刘文革,阎志红,等.西瓜果实发育过程中番茄红素、瓜氨酸和维生素 C 等功能物质含量的变化[J].中国农业科学,2011,44(13):2738-2747.
- [24] VAN HIEU P. Polyploid gene expression and regulation in polysomic polyploids[J]. American Journal of Plant Sciences, 2019, 10(8):1409-1443.
- [25] IANNICELLI J, GUARINIELLO J, TOSSI V E, et al. The “polyploid effect” in the breeding of aromatic and medicinal species[J]. Scientia Horticulturae, 2019, 260:108854.
- [26] CORNEILLIE S, DE STPRME N, VAN ACKER R, et al. Polyploidy affects plant growth and alters cell wall composition[J]. Plant Physiology, 2019, 179(1):74-87.
- [27] TAN F Q, TU H, WANG R, et al. Metabolic adaptation following genome doubling in citrus doubled diploids revealed by non-targeted metabolomics[J]. Metabolomics, 2017, 13(11):143.
- [28] JOSHI V, JOSHI M, SILWAL D, et al. Systematized biosynthesis and catabolism regulate citrulline accumulation in watermelon[J]. Phytochemistry, 2019, 162:129-140.
- [29] AKASHI K, MIYAKE C, YOKOTA A. Citrulline, a novel compatible solute in drought-tolerant wild watermelon leaves, is an efficient hydroxyl radical scavenger[J]. Febs Letters, 2001, 508(3):438-442.
- [30] DASGAN H Y, KUSVURAN S, ABAK K, et al. The relationship between citrulline accumulation and salt tolerance during the vegetative growth of melon (*Cucumis melo* L.) [J]. Plant, Soil and Environment, 2009, 55(2):51-57.
- [31] 李蒙蒙,路绪强,赵胜杰,等.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[J].果树学报,2019,36(7):857-865.
- [32] SONG Q S, JOSHI M, DIPIAZZA J, et al. Functional relevance of citrulline in the vegetative tissues of watermelon during abiotic stresses[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11:512.