

西瓜中苹果酸代谢关键基因 *NADP-ME* 的克隆及功能分析

董 薇¹, 杨从基¹, 许守明¹, 张 洲¹, 吴德峰¹, 李军华²

(1. 河南大学生命科学学院 郑州 450046; 2. 开封市农林科学研究院 河南开封 475004)

摘 要: 有机酸是影响西瓜果实风味品质的关键成分, 解析苹果酸合成代谢的分子机制具有重要意义。通过同源序列比对克隆得到 2 个西瓜 NADP-苹果酸酶基因 *ClaNADP-ME3* 和 *ClaNADP-ME4*, 荧光定量和高效率液相色谱检测发现, *ClaNADP-ME4* 的表达量与西瓜中苹果酸含量变化趋势相反, GFP 融合蛋白亚细胞定位分析表明, *ClaNADP-ME4* 基因分布于细胞质与细胞核中。通过遗传转化超表达 *ClaNADP-ME4* 基因, 进一步验证 *ClaNADP-ME4* 的基因功能, 发现该基因可显著降低西瓜果实中苹果酸含量。综上, *ClaNADP-ME4* 基因具有促进苹果酸代谢的作用, 研究结果为西瓜品质改良的分子育种提供了新靶点。

关键词: 西瓜; 苹果酸; 苹果酸酶; 超表达

中图分类号: S651

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2025)09-040-08

Cloning and functional analysis of *NADP-ME*, a key gene in malic acid metabolism in watermelon

DONG Wei¹, YANG Congji¹, XU Shouming¹, ZHANG Zhou¹, WU Defeng¹, LI Junhua²

(1. College of Life Sciences, Henan University, Zhengzhou 450046, Henan, China; 2. Kaifeng Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Kaifeng 475004, Henan, China)

Abstract: Organic acids in watermelon fruits are critical components influencing flavor quality, and elucidating the molecular mechanism of malic acid synthesis and metabolism is of great significance. Through homologous sequence alignment, two watermelon NADP-malic enzyme genes, designated as *ClaNADP-ME3* and *ClaNADP-ME4*, were cloned. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis revealed that the expression level of *ClaNADP-ME4* was negatively correlated the the malic acid content in watermelon. Subcellular localization analysis using GFP fusion proteins demonstrated that the *ClaNADP-ME4* gene was distributed in both the cytoplasm and nucleus. Genetic transformation and overexpression of the *ClaNADP-ME4* gene further conformed its function, demonstrating that this gene significantly reduced the malic acid content in watermelon fruits. In conclusion, the *NADP-ME4* gene plays a role in promoting malic acid metabolism. These findings provide a new target for molecular breeding aimed at improving watermelon quality.

Key words: Watermelon; Malic acid; NADP-malic enzyme; Overexpression

果实中的 pH 及可溶性固形物、苹果酸和柠檬酸含量都是影响西瓜风味的重要因素^[1]。目前西瓜风味的研究多集中在提高糖含量方面, 通过调控有机酸在西瓜发育过程中的合成代谢对改善西瓜风味及品种改良也具有重要意义。根据果实中所含的主要有机酸种类不同可以大致分为三类: 苹果酸型、柠檬酸型和酒石酸型^[2]。苹果酸酶(malic enzyme, ME)是苹果酸代谢中的关键酶, 能够将苹果

酸氧化脱羧成为丙酮酸和 CO₂, 根据其催化反应所需的辅酶因子不同, 可以将其分为 NADP-ME 和 NAD-ME, NADP-ME 还可以进一步分为光合 NADP-ME 和非光合 NADP-ME^[3]。不同生物体内的苹果酸酶虽然功能有所差异, 但其氨基酸序列具有高度保守性^[4]。ME 参与植物的生长发育及抗逆生长, 在果实发育时期, NADP-ME 能够提供大量 NADPH 用于木质素、丙酮酸及类黄酮的合成^[5]。长

收稿日期: 2025-04-01; 修回日期: 2025-05-23

基金项目: 河南省科技攻关项目(242102111085); 河南大学校级本科教学改革研究与实践项目(HDXJG2022-013); 中原学者工作站项目(234400510004)

作者简介: 董 薇, 女, 副教授, 研究方向为西瓜分子育种。E-mail: dongw@henu.edu.cn

通信作者: 李军华, 男, 副研究员, 研究方向为西瓜育种与栽培技术。E-mail: 15237821866@139.com

期低温导致黑麦的苹果酸含量及 *NADP-ME* 活性升高,当低温胁迫解除后,苹果酸含量和酶活性均下降。*NADP-ME* 不仅作为良好的渗透调节物质调节苹果酸含量,而且还通过调节 *NADP*-苹果酸酶活性来应对低温引起的渗透胁迫^[6]。此外,ME 还可以通过提供碳和 *NADPH* 进行脂肪酸生物合成和有机酸合成,参与膜脂再生,甚至促进果实发育^[7]。笔者通过同源序列比对克隆苹果酸代谢关键基因,采用分子生物学手段对基因功能进行验证,以期达到降低西瓜果实中有机酸含量的目的,创制出一种高糖低酸的新种质,并为分子育种奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料:YV803、V206、V208、P05、P15 为二倍体西瓜自交 8 代以上纯合体。西瓜果肉苹果酸含量与基因表达量检测使用第一组材料以 V206 为母本、V208 为父本杂交的 F_1 代二倍体西瓜(F1203),第二组材料以 P05 为母本、P15 为父本杂交的 F_1 代二倍体西瓜(F1251);YV803 用于遗传转化试验。上述材料均来自河南大学生命科学学院西瓜分子育种课题组。

培养条件:西瓜果肉苹果酸含量与基因表达量检测使用的试验材料于 2022 年 3 月至 2023 年 7 月在河南大学金明校区科研温室进行定植培养,连续培养 3 个生长周期,每个周期每份材料定植 150 株,行距 2 m,株距 40 cm,每次取 20 个样品。遗传转化材料放置于温度 28 °C、光照 16 h/黑暗 8 h、光照强度为 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、相对湿度大于 70 % 的培养箱中进行培养,营养钵尺寸 15 cm×15 cm。

载体和菌种:DH5 α 感受态、GV3101 感受态、pCambia1300-3flag 载体、pCambia1300-GFP 载体均由河南大学生命科学学院西瓜分子育种课题组保存。

1.2 方法

1.2.1 西瓜 *NADP-ME* 基因的筛选与鉴定 首先在拟南芥网站(<https://www.arabidopsis.org/>)查找拟南芥 *NADP-ME* 蛋白和核酸序列,在葫芦科基因组网站(<http://www.cucurbitgenomics.org/>)西瓜 97103V2 基因组中通过 BLASTp 功能检索西瓜基因组中 ME 蛋白序列。然后在 InterPro 网站(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>)查找西瓜 *NADP-ME* 的保守 PFAM 结构域,利用 TBtools 中的 simple HMM search 工具通过 *NADP-ME* 中的 PFAM 结构域(PF00390 和

PF03949)搜索西瓜基因组中 *NADP-ME* 基因^[8]。然后通过 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)保守域数据库 CDD 和简单模块化架构研究工具 SMART(<https://smart.embl.de/>)对检索到的候选基因进行筛选确认。

1.2.2 系统发育分析 利用系统发育分析工具 MEGA v11^[9]对 ClaNADP-ME 家族成员与拟南芥、番茄、黄瓜、甜瓜、水稻中 ME 进行系统发育树构建,并利用 iTOL(<https://itol.embl.de/>)网站对系统发育树进行美化^[10]。

1.2.3 苹果酸含量测定 参照马丽娜等^[11]的方法提取西瓜果实有机酸组分。准确称取 1 g 西瓜果肉组织,加入液氮研磨成粉末后放入 10 mL 离心管中,加入 5 mL 去离子水,80 °C 水浴 30 min,冷却至室温后用去离子水定容至 10 mL,在 4000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、4 °C 条件下离心 10 min,用注射器收集上清液,再过 0.22 μm 孔径滤膜,将滤液在高效液相色谱仪上检测。

采用高效液相色谱法对苹果酸含量进行测定,使用 Agilent 1220 Infinity II 液相色谱仪,将标样苹果酸准确称取 20 mg,加入 10 mL 纯净水中配置成质量浓度为 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的苹果酸母液,经过 1 倍、2 倍、4 倍、8 倍和 16 倍稀释制成标准样,将标准品使用 0.45 μm 滤膜过滤后,进行 HPLC 测定。流动相 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 溶液, $\text{pH}=2.65$,流速为 0.8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。检测波长为 210 nm。测定的标准品用来绘制标准曲线,测定的样品根据标准曲线用基于面积的外标法计算样品中的苹果酸含量。流动相配制:准确称取 1.360 9 g KH_2PO_4 ,放入 1000 mL 容量瓶中,加入 1000 mL 纯净水,用浓磷酸和 KOH 调节 pH 至 2.65,流动相过 0.45 μm 滤膜,用真空泵进行真空抽滤,然后放入超声仪中在 4 °C 下超声 20 min,除去气体。

1.2.4 *NADP-ME* 基因的克隆 使用金百特多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取西瓜组织的 RNA,称取 100 mg 西瓜果肉组织,放入 2 mL 研磨管中,投入液氮冷冻,放入全自动研磨仪中研磨成粉末,然后按照说明书提取 RNA。使用诺唯赞公司生产的逆转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。从西瓜基因组网站中查询与苹果酸代谢相关酶的基因序列并利用 Primer5 设计引物(表 1)。使用 KOD-NEO-Plus 对基因进行扩增,反应程序为 94 °C,2 min;98 °C,10 s;58 °C,30 s;68 °C,30 s $\cdot\text{kb}^{-1}$,共 35 个循环;68 °C,10 min。扩增产物用 1 % 琼脂糖凝胶电泳进行检验,条带位置正确的 PCR 产物采用

Axygen 胶回收试剂盒回收,回收产物用微量分光光度计检测浓度和质量,储存于-20 ℃用于后续试验。

1.2.5 *ClaNADP-ME4* 的亚细胞定位 首先,选取 GFP 载体上的 *Sal* I 为酶切位点,设计长为 15 bp 的同源臂加上酶切位点,再加上克隆基因的特

异性引物构成新的引物 (Cla97C08G155260F: 5'- GCTTCTGCAGGGGCCCGGGGTCGAC- 3' , Cla97C08G155260R: 5'- ATCCACTAGTATTTA-AATGTCGACGT-3'),以克隆出的目的片段为模板,使用 KOD-NEO-Plus 进行 PCR 扩增带有同源臂的

表 1 用于基因克隆的引物序列
Table 1 Primer sequence for gene cloning

基因名称 Gene name	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
Cla97C08G155260	ATGCTTTCTTTCTCCGACATCGGTATCTG	TTAAAGGTAGCTACGGTAGCGGGGGCT
Cla97C07G140120	ATGATCTCCTTGAACAGAACCACTTTCCTGAC	CTACCGGTAATTTTGATAGCTAGGACTGTACATACAGC
Cla97C01G017350	ATGGCTACTTCCAATATAACGAACGGCAATG	TTAAAAAATGGGACCAGCAGCAAGGATTTC
Cla97C10G192070	ATGGCGGCAAACGGAAACTCGG	TTAGAAATTTGGTCCAGCTGCCACAATCTC
Cla97C11G220850	ATGGAGAATGAGGGGAAAGATAACGGAGAATT	TTACAAAACGGGACCAGCTGCAAGAATCT

目的片段,回收的目的片段在检测浓度和质量后进行同源重组反应。其次,将转过 GFP 的农杆菌划线摇菌,将 OD 值调整至 0.6 左右,将洋葱剥去外皮然后用无菌水冲洗干净,取第 3~4 层洋葱内表皮,用手术刀将其切成 1 cm² 的正方形,放入侵染液中侵染 20 min,再放入 MS 培养基中,在 28 ℃黑暗条件下 24 h,将洋葱内表皮用无菌水冲洗 3 次后制片,在荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.6 *ClaNADP-ME4* 基因的超表达 首先,选取 OE 载体上的 *Sal* I 为酶切位点,设计长为 15 bp 的同源臂加上酶切位点,再加上克隆基因的特异性引物构成新的引物 (Cla97C08G155260F: 5'- ATGCTTTCTTTCTCCGACATCGGTATCTG- 3' , Cla97C08G155260R: 5'- TAAAGGTAGCTACGG-TAGCGGGGGCT-3'),以克隆出的目的片段为模板,使用 KOD-NEO-Plus 进行 PCR 扩增带有同源臂的目的片段,回收的目的片段在检测浓度和质量后进行同源重组反应。其次,取 100 粒 YV803 西瓜种子进行遗传转化。将种子消毒和 28 ℃暗培养 2 d 后,待子叶由黄变绿时切去子叶边缘部分保留生长点,放入侵染液中侵菌 20 min,用无菌滤纸吸干表面菌液,将其放置在共培养培养基上,在黑暗条件下 28 ℃共培养 3 d,然后依次更换伸长培养基和生根培养基,获得转基因植株。

1.2.7 荧光定量检测 利用 NCBI 网站在线设计 *NADP-ME* 基因的 qRT-PCR 特异性引物 (Cla97C08G155260F: 5'- TCGTTTCGATCCCGCTTT-GAA-3' , Cla97C08G155260R: 5'- CATGGCCTCCA-CAACTTCCT-3'),引物设计使扩增目的片段长度在 100~250 bp,退火温度 Tm 设计在 58~62 ℃,并且跨

外显子。利用诺唯赞 TB Green 试剂盒和罗氏 LightCycler480II 荧光定量 PCR 仪进行检测,反应程序:预变性 95 ℃,30 s;变性 95 ℃,5 s;退火 60 ℃,30 s。循环 40 次,荧光定量数据采用 2^{-ΔΔct} 方法进行计算。

1.3 数据分析

采用 Excel 2021 软件对高效液相色谱检测数据与荧光定量检测数据进行处理和图表绘制,采用 SPSS27.0 软件进行差异显著性分析。

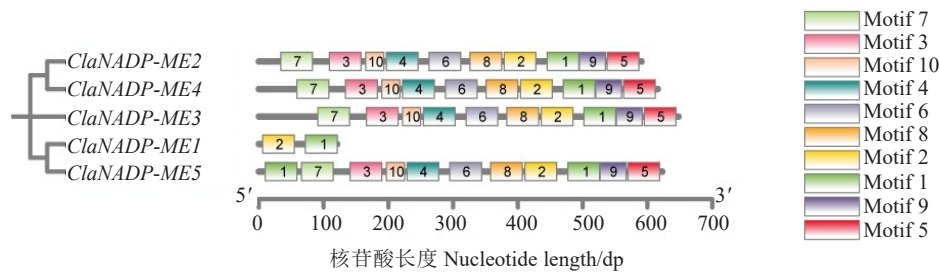
2 结果与分析

2.1 *ClaNADP-ME* 基因家族基因结构分析

利用 TBtools 分析 *ClaNADP-ME* 基因家族的外显子-内含子结构。5 个 *NADP-ME* 基因分布在 5 条不同的染色体上,根据它们在染色体上的顺序分别命名为 *ClaNADP-ME1*~*ClaNADP-ME5* (Cla97C02G033060、Cla97C03G066480、Cla97C07G140120、Cla97C08G155260、Cla97C09G162050),其中 CDS 分布采用保守域数据库(CDD)和简单模块化架构研究工具(SMART)对保守域进行预测。通过 MEME 网站预测了 *ClaNADP-ME* 的保守基序,其中 *ClaNADP-ME1* 中仅包含了 motif 1 和 motif 2, *ClaNADP-ME5* 中则多包含了一个 motif 1,其余成员则都为 10 个保守基序(图 1)。

2.2 *ClaNADP-ME* 基因家族系统发育树构建

为了探究 *ClaNADP-ME* 与其他物种的系统发育关系,构建西瓜与拟南芥、黄瓜、水稻、甜瓜、番茄中 *NADP-ME* 系统发育树,发现可以将所选物种中的 *NADP-ME* 分为 3 组, *ClaNADP-ME* 分别分布在 3 个组中, *ClaNADP-ME* 与甜瓜、黄瓜和番茄的关系

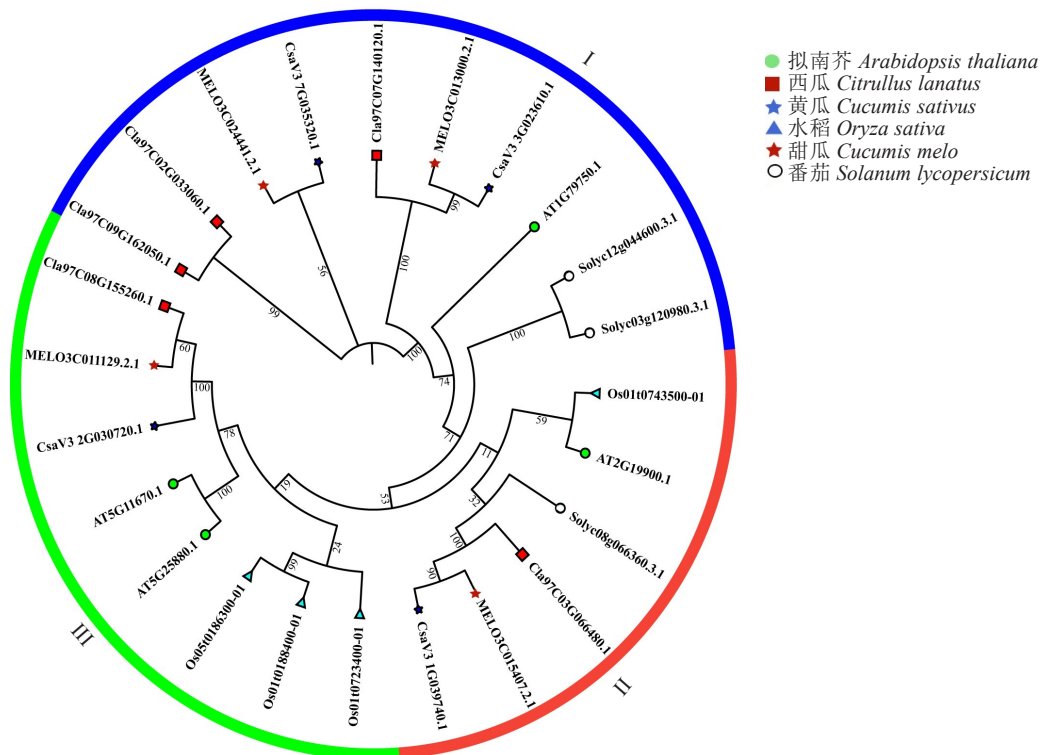
图1 *ClaNADP-ME* 的保守结构域预测Fig. 1 Conservative domain prediction of *ClaNADP-ME*

较近,与水稻、玉米的关系较远。*ClaNADP-ME1* (Cla97C02G033060) 与 *ClaNADP-ME5* (Cla97C09G162050) 同源性最高, *ClaNADP-ME3* (Cla97C07G140120) 与甜瓜 MELO3C013000.2.1 同源性最高,并且这 3 个基因分布在同一组。*ClaNADP-ME2* (Cla97C03G066480) 与甜瓜 MELO3C015407.2.1 同源性最高, *ClaNADP-ME4* (Cla97C08G155260) 与甜瓜 MELO3C011129.2.1 同源性最高(图 2)。

2.3 西瓜果肉苹果酸含量与 *NADP-ME* 基因表达量分析

为了探究西瓜果实中苹果酸在发育过程中的变化与 *NADP-ME* 表达水平的关系,克隆了 *ClaNADP-ME3* (1947 bp) 和 *ClaNADP-ME4* (1851 bp) 2 个基因,未克隆获得预测的其他 3 个基因,可能是

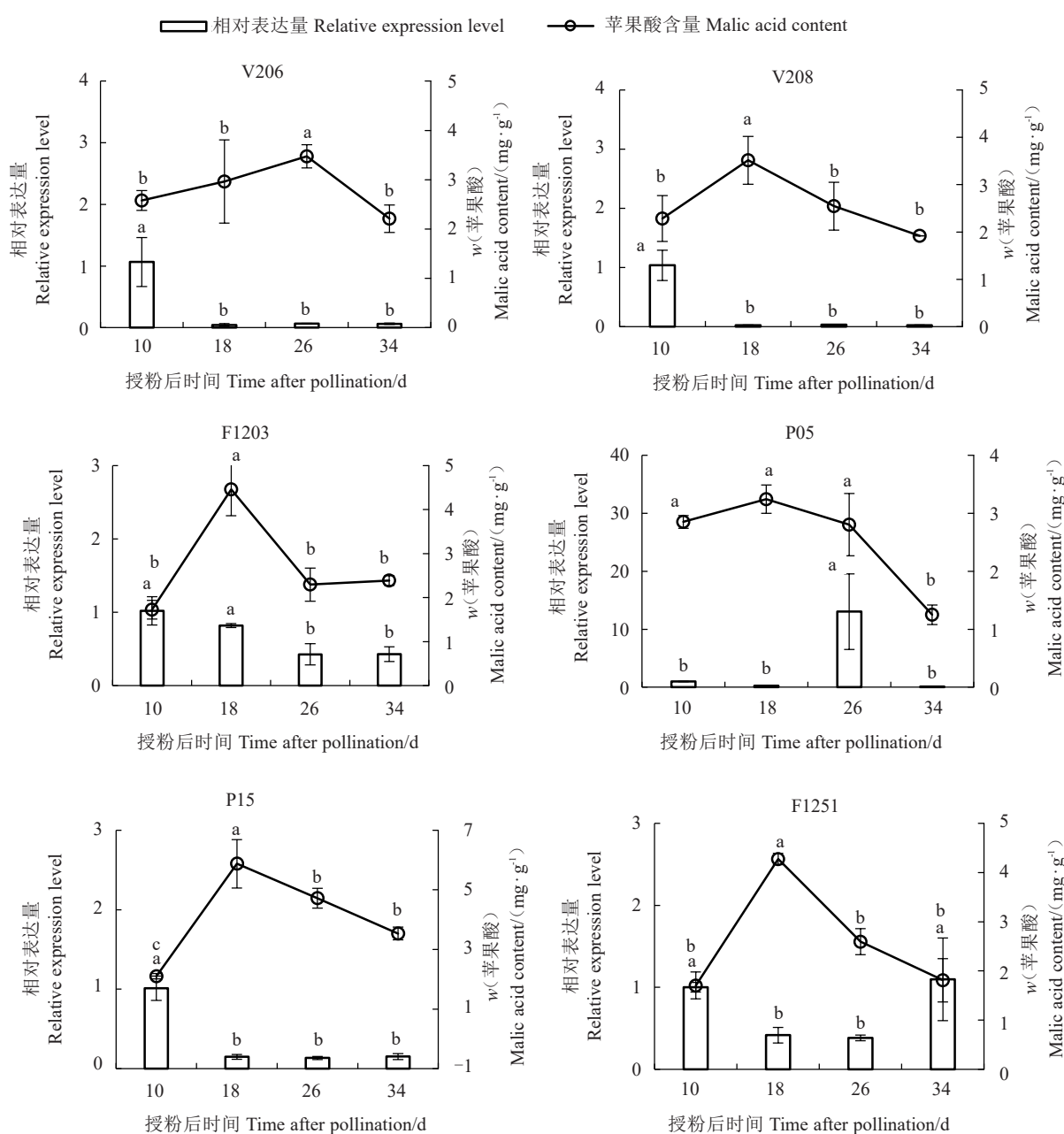
由于不同西瓜基因组存在差异。在所有试验材料的 4 个果实发育时期均未检测到 *ClaNADP-ME3* 基因的表达量。分别在开花授粉后 10、18、26、34 d 时,测定第一组材料母本 V206、父本 V208、杂交 F₁ 子代 F1203 和第二组材料母本 P05、父本 P15、杂交 F₁ 子代 F1251 的西瓜中心果肉中苹果酸含量(图 3)。在母本 V206 中, *ClaNADP-ME4* 的表达量在开花授粉后 10~18 d 时显著下降,在开花授粉后 18~34 d 时没有显著变化,而苹果酸含量在开花授粉后 26 d 时显著高于其他时期;在父本 V208 中, *ClaNADP-ME4* 的表达量在开花授粉后 10~18 d 时显著降低,而苹果酸含量显著升高,在开花授粉后 18~34 d 时表达量变化不显著;在杂交 F₁ 子代 F1203 中, *ClaNADP-ME4* 的表达量在开花授粉后 10~34 d 呈先降低后升高的趋势,而苹果酸含量在开花授粉

图2 *ClaNADP-ME* 基因家族系统发育进化树Fig. 2 Phylogenetic tree of *ClaNADP-ME* gene family

后 10~18 d 时显著升高,在开花授粉后 18~26 d 时显著降低。第一组材料的试验结果表明,在开花授粉后 10~18 d 西瓜果实膨大期,*ClaNADP-ME4* 的表达量与苹果酸含量呈负相关,并且杂交 F_1 子代的 *ClaNADP-ME4* 表达量和苹果酸含量与亲本的变化趋势基本一致。

在母本 P05 中,*ClaNADP-ME4* 的表达量在开花授粉后 10~18 d 时有所下降,在开花授粉后 18~

26 d 时显著上升,而苹果酸含量在开花授粉后 18~34 d 时不断下降;在父本 P15 中,*ClaNADP-ME4* 的表达量在开花授粉后 10~18 d 时显著降低,而苹果酸含量显著升高,在开花授粉后 18~34 d 时表达量无显著变化;在杂交 F_1 子代 F1251 中,*ClaNADP-ME4* 的表达量随果实发育呈先降低后升高的变化趋势,而苹果酸含量呈先升高后降低的变化趋势。第二组材料的试验结果表明,在西瓜果



注:不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

Note: Different small letters indicate significant difference at 0.05 level.

图3 两组材料在 4 个不同发育时期中心果肉的苹果酸含量和 *ClaNADP-ME4* 基因表达量

Fig. 3 Malic acid content and expression level of *ClaNADP-ME4* gene in the central pulp of two sets of experimental materials at four different development periods

实膨大期, *ClaNADP-ME4* 的表达量与苹果酸含量呈负相关, 并且杂交 F_1 子代 *ClaNADP-ME4* 的表达量和苹果酸含量与低酸亲本(P15)的变化趋势一致。

2.4 *NADP-ME4* 基因的功能分析

2.4.1 *ClaNADP-ME4* 亚细胞定位

为了深入分析

ClaNADP-ME4 基因的功能, 构建了带有目的基因 GFP 的报告载体, 将含有 *35Spro::GFP* 空载体以及 *35Spro::ClaNADP-ME4::GFP* 的 GV3101 农杆菌侵染洋葱内表皮细胞, 在显微镜下观察发现, *ClaNADP-ME4* 在细胞质与细胞核中都有明显的绿色荧光(图 4)。

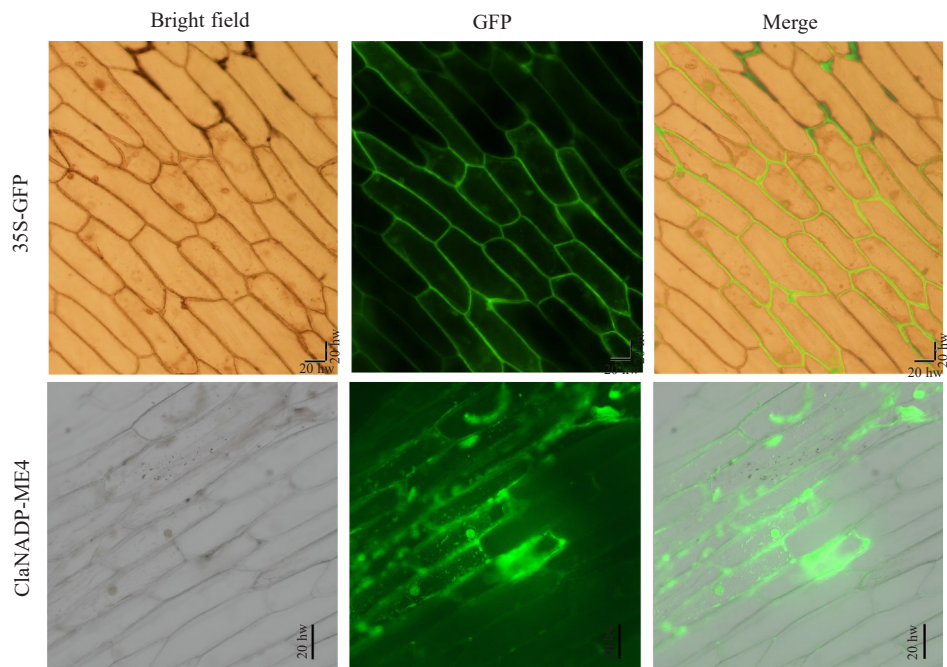


图 4 *ClaNADP-ME4* 在洋葱内表皮细胞中的亚细胞定位

Fig. 4 Subcellular localization of *ClaNADP-ME4* in onion epidermal cells

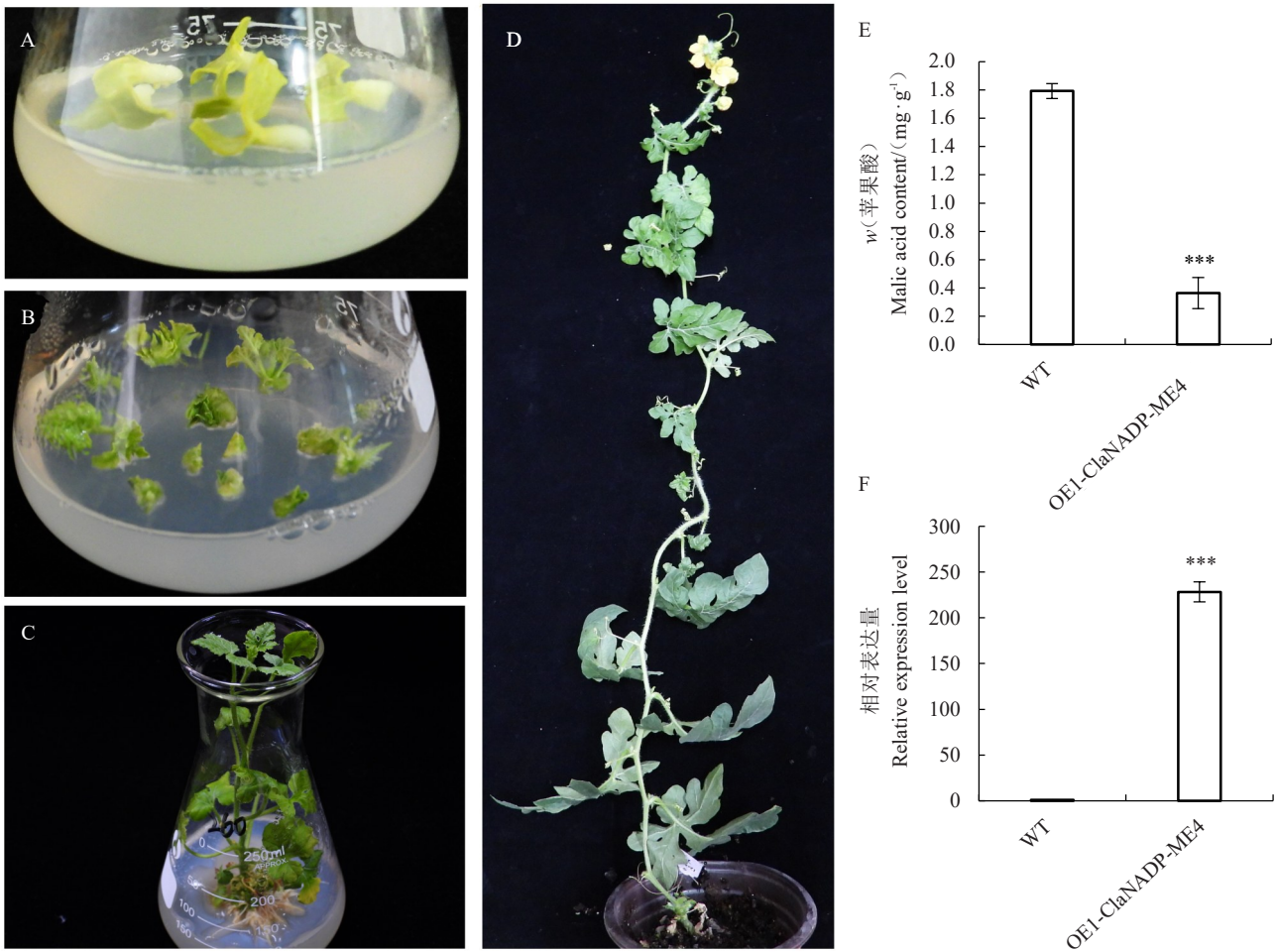
2.4.2 *ClaNADP-ME4* 基因超表达分析 构建 *ClaNADP-ME4* 基因的超表达载体, 利用农杆菌转化的方法, 以保留生长点的西瓜子叶作为外植体, 在子叶由黄变绿时用农杆菌进行侵染(图 5-A), 经过 3 周能够诱导出丛生芽(图 5-B), 在伸长培养基中 4 周能够伸长至 3~4 cm, 转移至生根培养基 6 周后长出多条小根(图 5-C), 半开培养瓶口, 炼苗一周后将其转移至大盆中培养(图 5-D)。通过 PCR 检测和测序, 最终获得了 9 株阳性植株, 进行自交, 通过荧光定量 PCR(图 5-E)和高效液相色谱检测(图 5-F), 结果表明, 转基因植株表达量极显著升高会导致果肉中苹果酸含量极显著降低。

3 讨论与结论

长期的人工选育导致西瓜的遗传背景狭窄, 利用分子育种的方式创制新品种是有效的解决策略。研究表明, 果实酸度是影响果实口感的重要因素, 因此笔者以苹果酸代谢关键基因 *ClaNADP-ME4* 功能解析为主要目标, 以期达到利用分

子技术降低西瓜中有机酸含量的目的, 为创制出高糖低酸的西瓜新种质开辟新思路。

C4 植物可以根据在维管束鞘细胞中四碳酸的主要脱羧酶分为 NADP-ME、NAD-ME 和 PEPCK 型^[3]。西瓜作为 C4 植物, 目前尚未有其主要脱羧酶相关方面的研究。为了深入探究西瓜中苹果酸代谢分子机制, 克隆获得了 2 个 *NADP-ME* 基因, 分别为 *ClaNADP-ME3* 和 *ClaNADP-ME4*。预测的其他 3 个基因没有成功克隆, 原因可能是不同西瓜种质资源的基因组存在差异。笔者通过生物信息学分析, 发现 *ClaNADP-ME3* 和 *ClaNADP-ME4* 保守结构域保留完整, 初步说明该基因在西瓜中可能具有重要功能。高效液相色谱试验结果表明, 在所选西瓜品种中苹果酸含量存在差异, 但是其变化趋势基本相同, 在果实发育早期积累, 在果实发育后期含量降低, 与梨、桃和火龙果中的有机酸积累模式一致^[12-14]。通过分析不同发育时期的西瓜果实, 发现苹果酸含量升高时, *ClaNADP-ME4* 的表达量降低; 而苹果酸含量降低时, *ClaNADP-ME4* 的表达量显



注:***表示在 0.001 水平差异极显著。A. 预培养外植体;B. 诱导出丛生芽;C. 生根培养;D. 移栽大盆培养 30 d;E. 苹果酸含量;F. 基因表达量。

Note: ***indicate extremely significant difference at 0.01 level. A. Pre cultured explants; B. Inducing clustered buds; C. Rooting cultivation; D. Transplant and cultivate in large pots for 30 days; E. Malic acid content; F. Gene expression level.

图5 转基因植株苹果酸含量和基因表达量
Fig. 5 Malic acid content and gene expression level in transgenic plants

著升高:初步说明 *ClaNADP-ME4* 基因在果实发育过程中调控苹果酸代谢。未在果实发育过程中检测到 *ClaNADP-ME3* 基因的表达,初步说明该基因可能未参与果实中苹果酸代谢。柠檬酸是甜瓜整个果实发育中的主要有机酸,授粉后,ME 活性与柠檬酸含量呈正相关,并随果实发育含量逐步增加,这表明 ME 可能与果实发育过程中有机酸积累有关^[15]。过表达 *ClaNADP-ME4* 的转基因植株中,*ClaNADP-ME4* 表达量极显著升高,而果实中苹果酸含量极显著下降,与在黄瓜中的试验结论一致,*CsNADP-ME2* 主要存在于外果皮和维管束中,过表达 *CsNADP-ME2* 可以促进果实中可溶性糖和淀粉的积累,而经过 RNAi 干扰 *CsNADP-ME2* 后则会使苹果酸在外果皮中积累,*CsNADP-ME2* 可能通过糖酵解途径反馈调节黄瓜果实中的碳氮平衡代谢^[16]。

研究表明,长期低温会导致黑麦的苹果酸含量和 NADP-ME 活性升高,通过调节 NADP-苹果酸酶活性来应对低温引起的渗透胁迫^[6]。因此,在接下来的研究中,分析 *NADP-ME* 基因在西瓜发育过程中抵御各种逆境胁迫的作用,有助于筛选出优良的抗逆基因。

综上所述,*ClaNADP-ME4* 基因参与西瓜果实中的苹果酸代谢,该基因高表达能够降低苹果酸含量。研究结果为进一步研究果实中有机酸代谢的分子机制提供了理论基础,并为利用分子育种技术创制低酸度的西瓜新种质提供了靶基因。

参考文献

[1] 赵胜杰,高磊,路绪强,等.不同类型西瓜果实糖酸组分含量分析[J].中国瓜菜,2017,30(8):7-11.
[2] MA X C, SHENG L, LI F F, et al. Seasonal drought promotes ci-

- trate accumulation in citrus fruit through the CsABF3-activated *CsANI - CsPH8* pathway[J]. *New Phytologist*, 2024, 242 (3): 1131-1145.
- [3] SUN X, HAN G L, MENG Z, et al. Roles of malic enzymes in plant development and stress responses[J]. *Plant Signaling and Behavior*, 2019, 14(10): e1644596.
- [4] ETIENNE A, GÉNARD M, LOBIT P, et al. What controls fleshy fruit acidity? A review of malate and citrate accumulation in fruit cells[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64 (6): 1451-1469.
- [5] LOMBARDO V A, OSORIO S, BORSANI J, et al. Metabolic profiling during peach fruit development and ripening reveals the metabolic networks that underpin each developmental stage[J]. *Plant Physiology*, 2011, 157(4): 1696-1710.
- [6] CRECELIUS F, STREB P, FEIERABEND J. Malate metabolism and reactions of oxidoreduction in cold-hardened winter rye (*Secale cereale* L.) leaves[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2003, 54(384): 1075-1083.
- [7] UMER M J, BIN SAFDAR L, GEBREMESKEL 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.
- [8] CHEN C J, WU Y, LI J W, et al. TBtools-II: A “one for all, all for one” bioinformatics platform for biological big-data mining[J]. *Molecular Plant*, 2023, 16(11): 1733-1742.
- [9] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [10] LETUNIC I, BORK P. Interactive tree of life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(W1): 293-296.
- [11] 马丽娜, 龚霄, 殷俊伟, 等. 基于 RP-HPLC 法测定水果及其果酒中有机酸含量[J]. *食品工业*, 2018, 39(1): 328-330.
- [12] SONG J X, CAN Y C, LU Z H, et al. PbPH5, an H⁺ P ATPase on the tonoplast, is related to malic acid accumulation in pear fruit[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2022, 21 (6): 1645-1657.
- [13] ZHENG B B, ZHAO L, JIANG X H, et al. Assessment of organic acid accumulation and its related genes in peach[J]. *Food Chemistry*, 2021, 334: 127567.
- [14] 刘瑞玲, 潘旭婕, 吴伟杰, 等. 红肉火龙果采后品质劣变及苹果酸代谢研究[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(5): 300-308.
- [15] ZHANG H, WANG H S, YI H P, et al. Transcriptome profiling of *Cucumis melo* fruit development and ripening[J]. *Horticulture Research*, 2016, 3: 16014.
- [16] SHAN N, ZHANG Y J, GUO Y C, et al. Cucumber malate decarboxylase, CsNADP-ME2, functions in the balance of carbon and amino acid metabolism in fruit[J]. *Horticulture Research*, 2023, 10(12): uhad216.