

嫁接对网纹甜瓜果实乙烯生物合成及*CmACO1*基因表达的影响

许传强, 齐红岩*, 邓传羽

沈阳农业大学园艺学院, 设施园艺省部共建教育部重点实验室, 辽宁省设施园艺重点实验室, 沈阳110866

摘要: 以“新汉城翠蜜”网纹甜瓜为接穗, 以“圣砧一号”南瓜为砧木进行嫁接, 研究嫁接对日光温室网纹甜瓜果实乙烯生物合成及*CmACO1*基因转录水平表达的影响。结果表明: 嫁接明显降低了网纹甜瓜果实ACC含量及乙烯释放量, 在乙烯释放高峰时, 嫁接的网纹甜瓜果实乙烯释放量比自根的降低了12.6%; 嫁接降低了果实中ACC合成酶和ACC氧化酶活性, 其最大值分别比自根网纹甜瓜降低了9.0%和6.8%; 嫁接抑制了*CmACO1*的表达, 其相对表达量最大值比自根网纹甜瓜降低了39.0%; 嫁接网纹甜瓜果实中乙烯释放高峰、ACC合成酶和ACC氧化酶活性峰值及*CmACO1*相对表达量峰值出现的时间均比自根的延迟了3 d。

关键词: 嫁接; 网纹甜瓜; 乙烯; ACC; ACC合成酶; ACC氧化酶; *CmACO1*

Effects of Grafting on Ethylene Biosynthesis and Expression of *CmACO1* Gene in Muskmelon (*Cucumis melo* L.) Fruits

XU Chuan-Qiang, QI Hong-Yan*, DENG Chuan-Yu

Key Laboratory of Protected Horticulture, Ministry of Education, Key Laboratory of Protected Horticulture of Liaoning Province, College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China

Abstract: In this study, taking ‘New Seoul Chui Honey’ muskmelon (*Cucumis melo*) as the scion, ‘Sheng Zhen No.1’ pumpkin as rootstock, we studied the effects of grafting on the ethylene biosynthesis and *CmACO1* gene expression of transcription in muskmelon fruits growing in the solar greenhouse. The results showed that grafting distinctly reduced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) content and ethylene production. At the peak of ethylene production, ethylene production in the grafted muskmelon fruits was 12.6% lower than that in the own-root muskmelon fruits. Grafting also decreased the activities of ACC synthase and ACC oxidase, and the maximum value dropped by 9.0% and 6.8% respectively. Furthermore, grafting inhibited the *CmACO1* gene expression and the maximum value of relative expression level dropped by 39.0%. The peaks of ethylene production, ACC synthase and ACC oxidase activities and the *CmACO1* relative expression level in the grafted muskmelon fruits were delayed 3 d than those in the own-root muskmelon fruits.

Key words: graft; muskmelon (*Cucumis melo*); ethylene; ACC; ACC synthase; ACC oxidase; *CmACO1*

目前, 甜瓜嫁接栽培已成为设施甜瓜生产中克服土传病害、防止连作障碍的有效方法之一。已有较多研究报道表明, 设施甜瓜嫁接栽培在获得高产、抗病的同时, 也产生含糖量和芳香物质等品质下降及果实成熟延迟等问题(齐红岩等2010, 2006; 许传强等2006, 2005; 王喜庆2002)。研究还表明, 甜瓜果实的成熟与其乙烯的释放密切相关, 乙烯含量的急剧增加是果实正常成熟必不可少的因素, 如果乙烯的合成受到抑制, 果实的成熟过程便会减慢甚至无法正常成熟(Ayub等1996; Theologis等1993; Picton等1993; Oeller等1991)。可见, 嫁接甜瓜果实成熟的延迟与乙烯合成的变化具有密切相关性。但有关嫁接影响甜瓜乙烯生物

合成的研究尚未见报道。因此, 本试验以网纹甜瓜为试材, 从乙烯生物合成途径入手, 探讨嫁接影响网纹甜瓜果实乙烯生物合成的生理机制, 以期为进一步调控嫁接网纹甜瓜果实品质及其成熟提供理论基础。

材料与方法

1 试验材料

以网纹甜瓜(*Cucumis melo* L.)品种“新汉城翠

收稿 2011-11-23 修定 2012-02-29
资助 教育部高校博士点专项科研基金课题(20102103120
沈阳农业大学青年基金项目(20070205)。

* 通讯作者(E-mail: hyqiaaa@126.com; Tel: 024-88487

蜜”为接穗,以“圣砧一号”南瓜为砧木进行嫁接处理;以接穗自根苗为对照。基质育苗,基质组成为草碳:蛭石=2:1。将相同苗龄的嫁接苗和自根苗定植于沈阳农业大学园艺学院蔬菜基地节能型日光温室,随机区组设计,3次重复。高畦栽培,畦面宽0.9 m,畦底宽1.4 m,畦高20 cm,双行定植,株距40 cm,7 m×100 m定植约2 000株。采用黑色地膜覆盖,滴灌。单干整枝,吊蔓栽培,每株12~15节之间留结瓜子蔓,采用人工授粉,单株留瓜1个,其他栽培管理与生产相同。自开花授粉后35、38、41、44、47 d及完熟时分别取网纹甜瓜果实中的果肉,液氮速冻,超低温冰箱-80 °C保存,以备测定。3次重复。

2 乙烯释放量的测定

参考刘愚等(1979)的方法并加以改进。从果实的赤道部位取果肉,切成1 mm小段,充分混匀后,取样30 g放入特制的小瓶中(小瓶体积经精确测量),密封2 h后,抽取250 μL气体,用GC-3800气相色谱仪(Varian公司)进行分析。3次重复。分析条件:CP8567色谱柱, FID检测器,不分馏进样。柱温为60 °C,进样口温度为200 °C,检测器温度为250 °C。载气为氮气,柱流量4 mL·min⁻¹。乙烯释放量(nL·g⁻¹·h⁻¹)=(V-V₀)×C/W×t。公式中, V-V₀为容器体积与样品体积的差值(mL), C为从标准曲线上查得的乙烯浓度(μL·L⁻¹), W为样品鲜重(g), t为密闭时间(h)。

3 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)含量的测定

取中果肉2 g,用10 mL乙醇(95%)充分均匀并完全转入离心管,5 000×g离心10 min,将上清液完全转到刻度管中,记录ACC样品体积。取0.8 mL ACC样品,加0.1 mL HgCl₂ (25 mmol·L⁻¹),盖上橡皮塞后在冰水浴中冷却,用微量注射器同时向试管中注入67 μL预冷的5% NaCl和33 μL预冷的饱和NaOH,强烈振荡,静置2 min。用移液管测量试管的体积,从试管内抽取1 mL气体用于气相色谱测定乙烯含量。根据乙烯的产出量计算ACC的含量。3次重复。

4 ACC合酶活性的测定

取中果肉2 g,加入10 mL缓冲液A (400 mmol·L⁻¹磷酸钾缓冲液, pH 8.5, 含1 mmol·L⁻¹ EDTA、0.5% 巯基乙醇、10 μmol·L⁻¹吡哆醛磷酸)研磨均匀,4层纱布过滤(过滤用的纱布预先用缓冲液A饱和);4 °C

匀浆后过滤,4 °C下12 000×g离心20 min;弃去上清,沉淀重新溶于1 mL缓冲液B (400 mmol·L⁻¹磷酸钾缓冲液, pH 8.5, 含1 mmol·L⁻¹ EDTA、1 mmol·L⁻¹巯基乙醇、10 μmol·L⁻¹吡哆醛磷酸、0.1% TritonX-100),4 °C下10 000×g离心10 min,上清液即为酶分析液。取0.2 mL酶液,加到0.8 mL反应缓冲液(50 μmol·L⁻¹ SAM、10 μmol·L⁻¹吡哆醛磷酸液、50 mmol·L⁻¹ Hepes-KOH, pH 8.5)中,密封后置于32 °C水浴中1 h;注入0.1 mL HgCl₂ (50 mmol·L⁻¹)终止反应,冰浴5 min,同时注入0.1 mL混合液(5% NaClO与饱和NaOH溶液体积比为2:1),震荡10 s,冰上冷却2 min;抽取1 mL气体,用于气相色谱测定乙烯含量。以每克果实每小时产生1 nmol的ACC量为1个酶活性单位(U)。3次重复。

5 ACC氧化酶活性的测定

取中果肉1 g,研磨均匀,加入2.0 mL样品提取液[含100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl缓冲液(pH 7.5)、10% (体积分数,下同)甘油、30 mmol·L⁻¹抗坏血酸钠、5% PVP、0.1 mmol·L⁻¹ FeSO₄、5.0 mmol·L⁻¹ DTT],4 °C下12 000×g离心10 min,取0.2 mL上清液注入盛有1.8 mL酶反应液[含100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl缓冲液(pH 7.5)、10%甘油、30 mmol·L⁻¹抗坏血酸钠、30 mmol·L⁻¹ NaHCO₃、1.0 mmol·L⁻¹ ACC、0.1 mmol·L⁻¹ FeSO₄]的玻璃瓶中,30 °C水浴中密闭保温20 min。抽取1 mL气体,用于气相色谱测定乙烯含量。以每克果实每小时产生1 nmol的ACC量为1个酶活性单位(U)。3次重复。

6 甜瓜ACC氧化酶基因(*CmACO1*)转录水平表达的测定

根据GenBank数据库中甜瓜*CmACO1*基因的cDNA已知序列及其特性,利用Primer 5.0软件设计引物,并进行BLAST分析,以确保引物的特异性。引物序列为: F, 5'-TTATCCGCCGTGTCCCA-3'; R, 5'-TCCAGTTGCCATCTTTCAGG-3'。引物委托Invitrogen公司合成。采用实时定量PCR测定*CmACO1*转录水平表达情况。反应体系(20 μL)组成为: 9 μL 2.5×Real Master Mix/20×SYBR solution、2 μL正向引物(2 μmol·L⁻¹)、2 μL反向引物(2 μmol·L⁻¹)、2 μL cDNA模板、5 μL灭菌水。程序为: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 57 °C 30 s, 68 °C 1 min, 40次循环。

荧光采集设在每个循环的第3步,即延伸这一步。循环结束后系统自动检测荧光,绘制融解曲线,具体程序为95 °C变性15 s,退火至60 °C保温1 min,然后每隔100 s上升1 °C,直至95 °C。试验采用 $\Delta\Delta C_T$ 法,以*actin*为内参对照,用ABI 7500 Software v2.0.1进行结果分析,统计不同处理样品中生长素反应基因的相对表达量。每个处理至少提取两个样品RNA,并反转录合成cDNA,每个cDNA进行实时定量PCR,3次重复。

实验结果

1 嫁接对网纹甜瓜果实乙烯释放量的影响

由图1可知,随着果实渐入成熟,嫁接与自根网纹甜瓜果实乙烯释放量均呈现单峰曲线。花后35~41 d,嫁接与自根网纹甜瓜果实乙烯释放量均较小;花后47和44 d,两者的乙烯释放量分别达到峰值,但嫁接处理较自根的降低了12.6%,而且,嫁接的高峰出现比自根的延迟3 d。

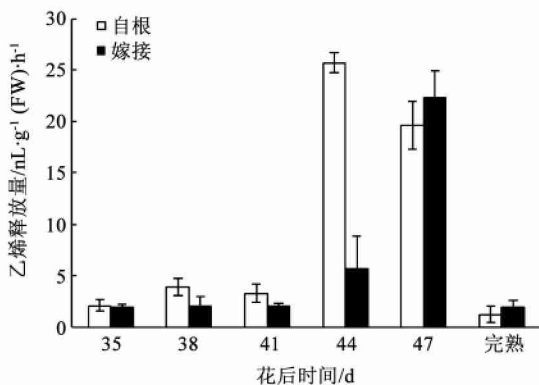


图1 嫁接对网纹甜瓜果实乙烯释放量的影响
Fig.1 Effects of grafting on ethylene production in muskmelon fruits

2 嫁接对网纹甜瓜果实中ACC含量的影响

ACC是乙烯生成的直接前体,通过ACC氧化酶的催化生成乙烯。从图2可以看出,花后35 d到果实完熟期间,嫁接与自根网纹甜瓜果实中ACC含量变化趋势相同,表现出单峰曲线,分别在花后47和44 d达到最大值。花后35~41 d,自根网纹甜瓜果实中ACC含量变化不大,花后41~44 d,ACC含量迅速上升,随后下降,直至完熟。花后35~44 d,嫁接网纹甜瓜果实中ACC含量没有明显变化,仅

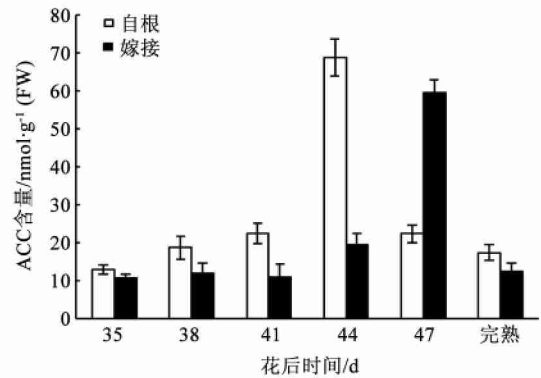


图2 嫁接对网纹甜瓜果实中ACC含量的影响
Fig.2 Effects of grafting on ACC content in muskmelon fruits

在花后44 d时ACC含量略有上升,花后44~47 d,ACC含量迅速上升,随后下降。

3 嫁接对网纹甜瓜果实中ACC合成酶活性的影响

从图3可以看出,嫁接与自根网纹甜瓜果实中ACC合成酶活性变化趋势与其果实中ACC含量的变化趋势基本一致,呈现单峰变化。嫁接与自根网纹甜瓜果实中ACC合成酶活性分别在花后47和44 d达到最大值,但嫁接使ACC合成酶活性降低了9.0%。

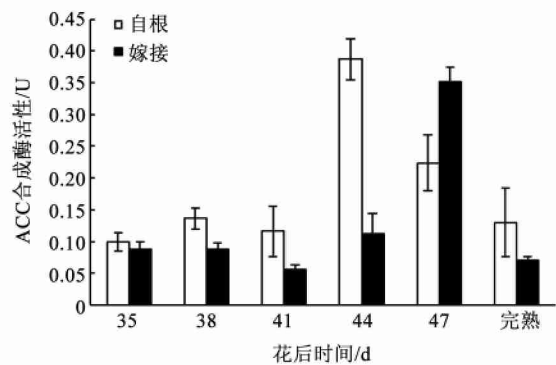


图3 嫁接对网纹甜瓜果实中ACC合成酶活性的影响
Fig.3 Effects of grafting on ACC synthase activity in muskmelon fruits

4 嫁接对网纹甜瓜果实中ACC氧化酶活性的影响

ACC氧化酶是乙烯生物合成的末端酶,催化ACC合成乙烯。从图4可以看出,嫁接与自根网纹甜瓜果实中ACC氧化酶活性变化趋势基本均表现出单峰变化曲线;但在果实发育的不段,两者略有差异,ACC氧化酶活性分别在

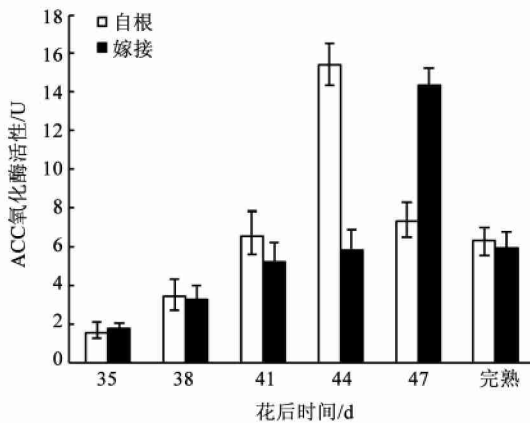


图4 嫁接对网纹甜瓜果实中ACC氧化酶活性的影响
Fig.4 Effects of grafting on ACC oxidase activity in muskmelon fruits

44~47 d和41~44 d迅速上升, 达到峰值后逐渐下降。在果实发育的整个时期, 嫁接降低了网纹甜瓜果实中ACC氧化酶活性, 活性峰值较自根的降低了6.8%。

5 嫁接对网纹甜瓜果实中*CmACO1*基因表达的影响

从图5可以看出, 嫁接抑制了网纹甜瓜果实中*CmACO1*的表达, 嫁接与自根网纹甜瓜果实中*CmACO1*相对表达量的变化趋势均呈现单峰模式。花后35~44 d, 自根网纹甜瓜果实中*CmACO1*相对表达量逐渐上升, 在花后44 d时达到最大值, 随后下降。花后35~41 d, 嫁接网纹甜瓜果实中*CmACO1*相对表达量变化较小; 花后41~47 d, 迅速

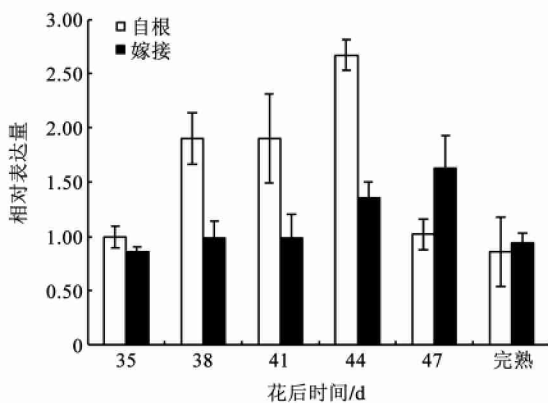


图5 嫁接对网纹甜瓜果实中*CmACO1*表达的影响
Fig.5 Effects of grafting on *CmACO1* gene expression in muskmelon fruits

上升, 在花后47 d时达到最大值, 随后降低。从*CmACO1*相对表达量的峰值来看, 嫁接网纹甜瓜果实中的比自根的降低了39.0%。总体来看, 嫁接与自根网纹甜瓜果实中*CmACO1*的表达趋势与其ACC氧化酶活性变化趋势基本一致。

讨论

网纹甜瓜是一种典型的呼吸跃变型果实, 伴随着乙烯释放高峰的出现, 果实达到成熟, 即可以食用的程度, 同时也标志着果实开始衰老(陈雷和秦智伟1999)。研究表明, 甜瓜果皮的褪绿、果肉的软化、果蒂离层的产生、香气物质和呼吸跃变等都完全或部分依赖于乙烯的生成(Bower等2002; Guis等1997)。本试验中发现, 嫁接与自根网纹甜瓜果实乙烯释放量均表现为单峰曲线, 但嫁接降低了乙烯释放量。在乙烯释放高峰时, 嫁接网纹甜瓜果实乙烯释放量较自根的降低了12.6%。而且, 嫁接网纹甜瓜出现乙烯释放高峰的时间较自根的延迟了3 d。这种成熟期延迟现象与齐红岩等(2010)在嫁接薄皮甜瓜上的研究结果基本一致。

ACC合成酶在调节乙烯生物合成中起关键的作用, 它是催化S-腺苷甲硫氨酸(SAM)向ACC转化的限速酶。ACC在ACC氧化酶催化下生成乙烯, ACC氧化酶是乙烯合成的限速酶(Mathooko 1996; Kende 1993)。ACC氧化酶是一个多基因家族, 目前已发现的甜瓜ACC氧化酶基因家族由*CmACO1*、*CmACO2*和*CmACO3*组成, 但其表达存在器官表达特异性和时空表达特异性, *CmACO1*在果实和受乙烯或伤诱导的叶片中表达量最高, 而*CmACO2*和*CmACO3*只在白化的胚轴和花器官中表达, 在果实中不表达(Lasserre等1996)。本试验中发现, 嫁接不仅降低了ACC含量, 同时还降低了ACC合成酶和ACC氧化酶活性, 并且, 嫁接网纹甜瓜果实中ACC含量、ACC合成酶活性和ACC氧化酶活性高峰也比自根网纹甜瓜延迟3 d, 这与乙烯释放高峰的出现相吻合。另外, 对网纹甜瓜果实中*CmACO1*表达的研究表明, 嫁接抑制了*CmACO1*的表达, 嫁接网纹甜瓜果实中*CmACO1*相对表达量比自根的降低了39.0%, 而且嫁接的*CmACO1*相对表达量峰值出现时间比自根的延迟3 d。可见, 嫁接网纹甜瓜果实中*CmACO1*的表达与ACC

酶活性的变化趋势具有同步性。嫁接对网纹甜瓜果实ACC氧化酶活性及*CmACO1*表达的抑制作用可能是嫁接网纹甜瓜果实乙烯释放量降低、释放高峰延迟的重要原因之一。至于嫁接导致网纹甜瓜果实中哪些因素的变化,从而抑制ACC氧化酶活性及*CmACO1*表达,还有待于进一步研究。

参考文献

- 陈雷, 秦智伟(1999). 甜瓜采后生理和贮藏保鲜研究进展. 北方园艺, (6): 24~27
- 刘愚, 焦新之, 邱鹏宾, 刘文燕, 徐荣江, 林家桦, 施加尧(1979). 苹果采后生理变化及采后预处理对长期贮藏的影响. 植物生理学报, 5: 151~159
- 齐红岩, 李天来, 刘轶飞, 李丹(2006). 嫁接对薄皮甜瓜光和特性、产量与含糖量的影响. 沈阳农业大学学报, 37 (2): 155~158
- 齐红岩, 邱丽妍, 腾录华, 周春旭(2010). 嫁接对薄皮甜瓜果实成熟期及其相关品质的影响. 中国农学通报, 26 (2): 176~180
- 王喜庆(2002). 嫁接甜瓜防病增产效果初步研究. 中国西瓜甜瓜, (2): 22~23
- 许传强, 李天来, 齐红岩(2006). 嫁接对网纹甜瓜果实发育、糖含量及蔗糖代谢相关酶活性的影响. 园艺学报, 33 (4): 773~778
- 许传强, 李天来, 齐红岩, 王浩(2005). 嫁接对网纹甜瓜生长发育、产量及品质的影响. 中国蔬菜, (6): 12~14
- Ayub R, Guis M, Ben Amor M, Gillot L, Roustan JP, Latche A, Bouzayen M, Pech JC (1996). Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. Nat Biotechnol, 14: 862~866
- Bower J, Holdford P, Latché A, Pech JC (2002). Culture conditions and detachment of the fruit influence the effect of ethylene on the climacteric respiration of the melon. Postharvest Biol Technol, 26: 135~146
- Guis M, Botondi R, Ben Amor M, Ayub R, Bouzayen M, Pech JC, Latche A (1997). Ripening-associated biochemical traits of cantaloupe charentais melons expressing an antisense ACC oxidase transgene. J Amer Soc Hort Sci, 122 (6): 748~751
- Kende H (1993). Ethylene biosynthesis. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 44: 283~307
- Lasserre E, Bouquin T, Hernandez JA, Bull J, Pech JC, Balagué C (1996). Structure and expression of three gene encoding ACC oxidase homologs from melon (*Cucumis melo* L.). Mol Genet, 251: 81~90
- Mathooko FM (1996). Regulation of ethylene biosynthesis in higher plants by carbon dioxide. Postharvest Biol Technol, 7: 1~26
- Oeller PW, Lu MW, Taylor LP, Pike DA, Theologis A (1991). Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. Science, 254: 437~439
- Picton S, Barton SL, Bouzayen M, Hamilton AJ, Grierson D (1993). Altered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene-forming enzyme transgene. Plant J, 3: 469~481
- Theologis A, Oeller PW, Wong LM, Rottmann WH, Dantz DM (1993). Use of a tomato mutant constructed with reverse genetics to study fruit ripening, a complex developmental process. Dev Genet, 14: 282~295