

低糖野生种与高糖栽培种西瓜果实代谢产物组分差异分析

崔霞霞^{1,2,*}, 王亚钦^{2,*}, 任毅², Alisdair R Fernie³, Saleh Alseekh⁴, 何洪巨², 官国义², 张海英², 郭绍贵², 张洁², 许勇^{2,**}

(¹北京农学院植物科学技术学院, 北京 102206; ²北京市农林科学院蔬菜研究中心, 农业部华北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 北京蔬菜种质改良实验室, 北京 100097; ³马克斯·普朗克分子植物生理研究所, 德国波茨坦 14476; ⁴植物系统生物学和生物技术研究中心, 保加利亚普罗夫迪夫 4000)

摘要: 采用高效液相色谱—串联质谱 (UHPLC - MS/MS) 技术对西瓜 5 份具有代表性的材料果实进行代谢产物分析, 在此基础上选取栽培西瓜高糖材料 ‘97103’ 和野生西瓜低糖材料 ‘PI296341’, 利用气相色谱—质谱联用 (GC - MS) 方法对主代谢产物进行定量分析。从成熟果实中定量鉴定出 58 种代谢物, 其中 22 种在 ‘97103’ 和 ‘PI296341’ 间存在显著差异。韧皮部运输的棉籽糖在野生低糖材料果实中大量滞留, 而在栽培高糖材料中极少积累。综合差异代谢物及其代谢途径分析发现, 高糖材料 ‘97103’ 果实在水苏糖、棉籽糖等光合产物卸载途径及蔗糖积累代谢途径上的代谢产物积累较高; 而低糖材料 ‘PI296341’, 则在氨基酸代谢、有机酸代谢途径及 6 - 磷酸葡萄糖等糖代谢途径上产物积累较高。这些发现为野生西瓜进化到栽培种果实品质的代谢产物积累和调控提供了重要依据, 也可为提高西瓜品质提供指导。

关键词: 西瓜; 代谢组学; 光合产物卸载; 蔗糖积累; 糖代谢途径

中图分类号: S 651

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2018) 04-0775-09

Variance Analysis of Metabolite Components Between Low Sugar Wild and High Sugar Cultivated Watermelon Fruits

CUI Xiaxia^{1,2,*}, WANG Yaqin^{2,*}, REN Yi², Alisdair R. Fernie³, Saleh Alseekh⁴, HE Hongju², GONG Guoyi², ZHANG Haiying², GUO Shaogui², ZHANG Jie², and XU Yong^{2,**}

(¹Plant Science and Technology College, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; ²National Engineering Research Center for Vegetables, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (North China), Ministry of Agriculture, Beijing Vegetable Germplasm Improvement Lab, Beijing 100097, China; ³Max-Planck-Institute of Molecular Plant Physiology, Potsdam 14476, Germany; ⁴Center of Plant System Biology and Biotechnology, Plovdiv 4000, Bulgaria)

Abstract: Five representative watermelon accessions were analyzed using UHPLC - MS/MS, and the primary metabolites of the high sugar cultivar ‘97103’ and low sugar wild accession ‘PI296341’ fruits

收稿日期: 2017 - 12 - 26; **修回日期:** 2018 - 04 - 10

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31772328); 北京市科技新星项目 (Z171100001117032); 国家 ‘十三五’ 重点研发项目 (2016YFD0100506); 北京市创新团队项目 (BAIC10-2017)

* 并列第一作者

** 通信作者 Author for correspondence (E-mail: xuyong@nerev.org)

were quantified using Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC - MS) . A total of 58 metabolites were identified, among which 27 compounds were significantly different. Raffinose content was much higher in the wild accession PI296341 than that in the cultivar 97103 fruits, and very few raffinose remained in the cultivar 97103 fruits. Analysis of differential metabolites and metabolic pathways revealed that cultivar 97103 fruits accumulated more metabolites from photosynthate unloading (raffinose and stachyose) and sucrose accumulating pathways, while the metabolites from the metabolism pathways of amino acids and organic acids and glucose-6-phosphate were the majority in PI296341 fruits. These findings provide important insights into the metabolic evolution from wild to cultivated species. The identification of metabolic properties can provide technical guidance for future improvement of watermelon quality.

Keywords: watermelon; metabolomics; photosynthate unloading; sucrose accumulation; sugar metabolism pathway

代谢组学是一个研究生物体整体或组织细胞系统的动态代谢变化学科 (Nicholson et al., 1999; Fiehn et al., 2000; Dixon & Strack, 2003), 研究对象主要是相对分子质量小于 1 000 的内源性小分子 (许国旺 等, 2007)。研究代谢物组成的方法主要有 GC - MS 技术 (Fiehn, 2003)、UPLC-Q-TOF 技术 (赵洪芝, 2012)、DIMS 技术 (McDougall et al., 2008) 等。

在过去的数十年中, 有关西瓜糖代谢的研究主要集中在糖水平变化特征以及与蔗糖合成相关的酶类 (Yativ et al., 2010; Liu et al., 2013)。而水稻 (Lou et al., 2011)、番茄 (Schauer et al., 2006) 等植物已步入代谢组研究时代。

代谢组研究可系统性揭示西瓜果实代谢物组分特征, 并揭示不同类型材料中糖分、氨基酸和有机酸等营养物质的代谢模式, 因此开展西瓜果实代谢组研究具有重要的科学意义。Lucksanaporn 等 (2008) 建立了基于 NMR 技术的西瓜果实代谢组分析方法, 获得了包括糖类、氨基酸和有机酸在内的 11 个主要代谢物。Hu 等 (2016) 测定了西瓜、黄瓜和南瓜的顶端茎、中部茎和根茎结合处的筛管伤流液的代谢物组成和蛋白质, 用主成分分析揭示了 3 个物种既存在相同的代谢物, 又各自存在独特的代谢物积累方向, 这 3 个物种的植株茎韧皮部伤流液中, 均能大量检测到蔗糖、水苏糖、棉籽糖和毛蕊花糖, 而西瓜韧皮部伤流液含有高浓度的 6 - 磷酸葡萄糖盐类、 α - 酮戊二酸、阿拉伯糖酸、酒石酸盐、甘油酸盐、肌糖半乳糖苷、葡萄糖酸盐、山梨醇糖、木糖和木糖醇、氨基乙二酸、还原性谷胱甘肽和莽草酸等, 这些西瓜韧皮部高量运输的物质, 可能为西瓜果实糖分代谢提供蔗糖合成的原料及中间物。已有的研究表明, 大多数植物均以蔗糖为主要运输同化物, 而包括葫芦科在内的 5% 的植物是以棉籽糖系列家族三糖或者四糖等寡糖作为同化物运输的主要形式 (Hendrix, 1968)。

本研究中比较分析西瓜属中的药西瓜种 (*Citrullus colocynthis*)、阿马鲁西瓜种 (*C. amarus*)、黏籽西瓜亚种 (*C. lanatus* ssp. *mucosospermus*) 和西瓜种 (*C. lanatus*) 的 5 个代表性西瓜果实代谢组的差异。通过分析其代谢产物的差异, 明确栽培西瓜与野生西瓜的光合产物卸载与糖积累的代谢物组成与途径, 为野生西瓜进化到栽培西瓜果实品质的代谢变化规律和调控研究提供依据, 为改良西瓜品质提供指导。

1 材料与amp;方法

1.1 植物材料和试剂

本试验选取 5 份代表性西瓜材料, 包括 ‘PI386019’ (药西瓜种 *Citrullus colocynthis*, 果实低糖)、 ‘PI296341’ (阿马鲁西瓜种 *C. amarus*, 果实低糖)、 ‘PI595203’ (黏籽西瓜亚种 *C. lanatus* ssp. *mucosospermus*, 果实低糖)、 ‘PI482271’ (西瓜种 *C. lanatus*, 果实高糖) 和 ‘97103’ (西瓜种 *C. lanatus*, 果实高糖), 以上 5 份材料分类依据来自林德佩 (2015) 的报道。 ‘97103’ 来自北京市农林科学院蔬菜研究中心, 其他材料均引种于美国种质资源库。

将 5 个材料播种于北京市农林科学院蔬菜研究中心延庆基地同一地块。2015 年 6 月授粉后单瓜分别标注授粉日期, 34 d 后取同一天授粉的果实, 每个材料重复 4 次取样。将新鲜果实样品在液氮中冷冻并储存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, 待进一步分析。3 份低糖材料生长周果实生育期较长, 需要授粉后约 42 d 方能达到高糖材料 ‘97103’ 和 ‘PI482271’ 授粉 34 d 的成熟度, 但考虑到授粉后 34 d 果实表型、转录组基因表达等与 42 d 无明显差异 (Guo et al., 2015), 因此采取统一授粉 34 d 的果实取样。

果柄韧皮部汁液收集方法: 果柄用刀片切割后, 等待 1 min, 待果柄伤流液呈水滴状, 用 200 μL 吸头收集伤流液于 2 mL 管中, 放置冰上, 并于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

色谱纯乙腈和甲醇来自 Honeywell (NJ, USA), 色谱纯甲酸来自 J.T.Baker (PA, USA), 使用 Milli-Q 纯化系统 (Millipore, MA, USA) 制备超纯水。

1.2 西瓜果实代谢物的 UHPLC - MS/MS 定性分析

1.2.1 代谢物提取

将冷冻样品在液氮中研磨成细粉。取 200 mg 粉末, 加入甲醇 1 mL (含有 0.1% 甲酸, 体积比, 下同) 萃取粉末样品。将提取混合物涡旋混匀并在室温下超声处理 30 min, 以 $5\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min。取上清液, 通过 $0.22\ \mu\text{m}$ 聚偏二氟乙烯 (PVDF) 滤膜过滤, 待 UHPLC - MS/MS 分析。

1.2.2 UHPLC - MS/MS 条件

使用 DIONEX Ultimate 3000 UHPLC 系统 (Thermo Scientific, Germering, Germany) 进行液相色谱分离。Hypersil Gold 色谱柱 ($100\ \text{mm}\times 2.1\ \text{mm}$, $1.9\ \mu\text{m}$), 接相同填料保护柱 ($10\ \text{mm}\times 2.1\ \text{mm}$)。流动相为含有 0.05% 甲酸的超纯水 (A 相) 和含有 0.05% 甲酸的乙腈 (B 相), 流速 $300\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 使用具有以下比例 B 相的洗脱液梯度洗脱: $0\sim 2\ \text{min}$, 5%; $2\sim 3.5\ \text{min}$, 5%~20%; $3.5\sim 8\ \text{min}$, 20%~35%; $8\sim 11\ \text{min}$, 35%~100%。进样量为 $3\ \mu\text{L}$, 柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

质谱分析在 Q Exactive Quadrupole-Orbitrap 质谱仪 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) 上进行, 热电喷雾离子源负离子模式, 优化的电离源和 MS 参数: 喷雾电压 3 kV, 鞘气 35 au, 辅助气体 10 au, 毛细管温度 $320\text{ }^{\circ}\text{C}$, 加热器温度 $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。全扫描模式下扫描质量范围 $m/z\ 75\sim 900$, 分辨率为 70 000。

1.2.3 数据处理和多元统计分析

在 UHPLC - MS/MS 采集数据之后, 使用 SIEVE 2.2 软件 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) 对原始数据进行预处理。通过比对化合物测得精确质量数与在线数据库中该化合物理论精确质量数 (质量偏差小于 0.0003%), 结合保留时间、同位素丰度以及二级质谱特征碎片等对化合物进行定性, 参考数据库包括 mzCloud (<https://www.mzcloud.org/>), Chemspider (<http://www.chemspider.com/>), KEGG (<http://www.kegg.jp/>) 和 PlantCyc (<http://www.plantcyc.org/>)。采用 MetaboAnalyst

3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>) (Xia et al., 2015) 对不同亚种间各组分含量的差异显著性进行单因素方差分析 (ANOVA), 显著性水平 $P < 0.05$ 。使用 SIMCA Version 13.0.3 软件 (Umetrics, Umeå, Sweden) 进行主成分分析 (PCA), 以获得亚种之间的代谢物差异的信息。

1.3 西瓜果实代谢物的 GC - MS 相对定量分析

取 25 mg 冷冻干燥样品, 加 1 mL 甲醇提取样品, 70 °C 下提取 15 min, 然后加入 500 μ L 水, 混匀后进行离心, 取上清液 200 μ L 真空干燥, 在残渣中加入 60 μ L 30 mg \cdot mL⁻¹ 甲氧胺盐酸盐吡啶, 在 37 °C 放置 120 min 进行衍生化, 随后加 120 μ L MSTFA (methyl-trimethyl-silyl-trifluoroacetamide) 在 37 °C 下处理 30 min。GC - MS 采用 GC - TOF - MS 系统 (Pegasus HT Leco, USA), 接自动进样器; 载气为高纯氦气, 恒流模式, 流速为 2 mL \cdot s⁻¹; DB-35 (30 m \times 0.32 mm, 0.25 μ m) 色谱柱; 进样口温度 230 °C, 传输管和离子源温度均为 250 °C, 柱温箱升温程序: 初始温度 85 °C, 以 15 °C \cdot min⁻¹ 升至 360 °C; 溶剂延迟 180 s, 质谱扫描范围 m/z 70 ~ 600。使用 Chroma TOF 4.5 (Leco) 和 Tag Finder 4.2 软件 (Schauer et al., 2005; Lisec et al., 2006) 进行数据分析。

用 GC - MS 定量代谢物得到的是相对含量, 即样品中目标化合物峰面积与内标核糖醇 (ribitol) 峰面积之比 (无单位), 反映的是代谢物的丰度。用 Excel 计算比率 (97103 和 PI296341 相对含量的比值), 用 SPSS 软件对栽培种 '97103' 和低糖野生材料 'PI296341' 代谢物含量进行 t 检验。

1.4 西瓜果柄伤流液和果实代谢物含量的离子色谱法测定

称取一定量混合均匀的样品 (西瓜果柄伤流液、果肉粉末) 至 100 mL 容量瓶中, 加 20 mL 温水充分溶解样品, 加水定容至刻度; 将样品进行过滤, 含糖量高的样品进行稀释; 活化净化柱, 依次用 10 mL 甲醇, 15 mL 水活化净化柱 (净化柱型号为 Dionex OnGuard II RP Cartridges, 2.5-cc, Pkg. of 48), 放置 0.5 h; 试样溶液依次通过 0.45 μ m 水相滤膜和净化柱, 弃去前面 3 倍柱体积洗脱液, 收集后面的洗脱液待测。

Thermo ICS-3000 离子色谱仪, 配电化学检测器; Thermo DIONEX CarboPacTM PA1 柱, 4 mm \times 250 mm; 柱温 30 °C; 流速 1 mL \cdot min⁻¹; 进样体积 25 μ L; 淋洗液为 NaOH 水溶液; 梯度洗脱程序如下: 保留时间分别是 0、15、21、32、32 和 40 min, 各时间对应 NaOH 浓度分别是 20、20、150、150、20 和 20 mmol \cdot L⁻¹。

1.5 α -半乳糖苷酶活性测定

α -半乳糖苷酶活性测定参考 Gao 和 Schaffer (1999) 的报道, 稍作改动。取冷冻的西瓜果实样品各 3 份, 加入 4 倍体积的提取缓冲液 [50 mmol \cdot L⁻¹ HEPES-NaOH (pH 7.5), 2 mmol \cdot L⁻¹ EDTA 和 5 mmol \cdot L⁻¹ DTT] 和少量石英砂冰浴下研磨。18 000 \times g 4 °C 离心 20 min, 取上清液采用对硝基酚法分析 α -半乳糖苷酶活性。

2 结果与分析

2.1 5 个西瓜材料果实的代谢组特征

通过 UHPLC - MS/MS 方法研究 5 个西瓜材料果实代谢物组成特征, 对原始数据进行处理, 并通过主成分分析 (PCA) 获得样品分布的概览。PCA 得分 (图 1) 可明显区分 5 个具有代表性的西瓜果实材料, 两个高糖材料与 3 个低糖材料在 PCA 得分图上沿主成分 2 区分开来: 两个高糖材料

‘97103’和‘PI482271’呈现出相似的代谢物组成特征, 分布于 PCA 得分图的上部, 蔗糖、葡萄糖和果糖二酐等有较高载荷; 低糖材料‘PI296341’、‘PI595203’和‘PI386019’均分布在 PCA 得分图下部, 具有较高含量的苹果酸、泛酸和柠檬酸。3 个低糖材料在沿主成分 1 被区分, ‘PI296341’位于主成分 1 正半轴, ‘PI595203’和‘PI386019’位于主成分 1 负半轴。低糖材料‘PI296341’与其他两个低糖材料相比, 含有较丰富的泛酸、富马酸和苹果酸; 而‘PI595203’和‘PI386019’中柠檬酸、焦谷氨酸和糠酸含量较高。通过对 5 个材料中代谢物组成特征的 PCA 分析可见, 高糖材料与低糖材料中最主要的差异代谢产物为糖类和有机酸。

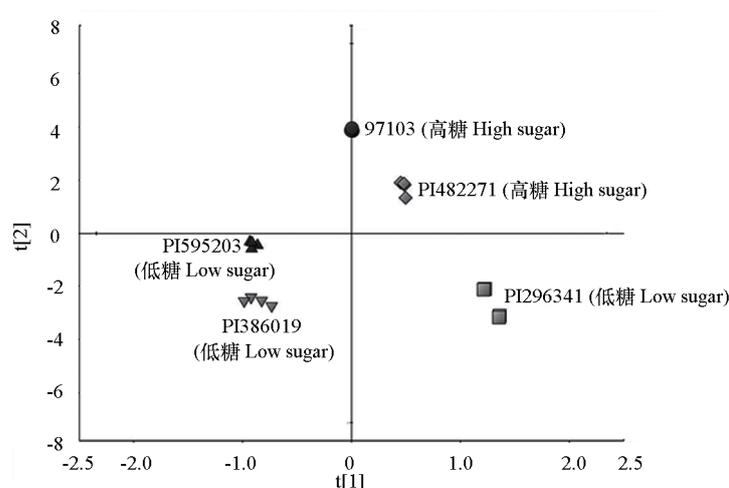


图 1 UHPLC - MS/MS 中 5 个西瓜材料代谢物主成分分析得分图

Fig. 1 The score plot of principal component analysis (PCA) for five watermelon materials for UHPLC - MS/MS

2.2 栽培西瓜‘97103’和野生西瓜‘PI296341’果实代谢组差异

从 5 个材料代谢物组成的 PCA 结果可见, 低糖和高糖材料分别具有类似的代谢产物组成特征。因此进一步选择代表性的低糖材料‘PI296341’和高糖材料‘97103’, 通过 GC - MS 方法定量测定其 58 种代谢物, 包括糖类及其衍生物、氨基酸及其衍生物以及有机酸等的含量。

在 58 种代谢物中, 有 27 种在‘97103’和‘PI296341’中含量存在显著差异 (表 1)。其中 10 种在高糖材料‘97103’果实中的相对含量高于野生低糖材料‘PI296341’的 2 倍以上, 分别为蔗糖、海藻糖、赤藓糖醇、柠檬酸、谷氨酸、苯甲酸、 β -丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸和 5-磷酸腺苷。其他 17 种在野生低糖‘PI296341’中均高于高糖‘97103’的 3 倍以上, 主要包括棉籽糖等三糖、鼠李糖等二糖、6-磷酸葡萄糖等活性糖、甘油酸和丙酮酸等有机酸、亮氨酸和甘氨酸等氨基酸。其中韧皮部运输的棉籽糖在野生低糖材料‘PI296341’存在大量滞留, 其相对含量是高糖材料‘97103’的 5 倍, 由此表明野生低糖材料‘PI296341’对棉籽糖卸载能力较高糖材料 97103 弱。

2.3 西瓜果实代谢物、酶活及代谢途径的综合分析

通过离子色谱法检测得到, 栽培高糖西瓜‘97103’果柄韧皮部汁液中棉籽糖含量是野生低糖材料‘PI296341’的 3 倍左右, 而果实中棉籽糖被迅速卸载至极低水平, 其含量仅为野生低糖材料‘PI296341’的 1/7 (表 2), 表明栽培高糖材料‘97103’果实对棉籽糖的卸载能力远高于野生低糖‘PI296341’果实对棉籽糖的卸载能力。通过检测野生低糖材料‘PI296341’和栽培高糖西瓜‘97103’

果实中碱性 α -半乳糖苷酶的活性 (表 2), 发现 ‘97103’ 是野生材料 ‘PI296341’ 的 3 倍左右。由此可见, 栽培高糖西瓜 ‘97103’ 中碱性 α -半乳糖苷酶的高活性可能对维管束中运输的棉籽糖水解和卸载起重要作用。

表 1 ‘97103’ 和 ‘PI296341’ 西瓜果实代谢物相对含量
Table 1 Relative content of ‘97103’ and ‘PI296341’ watermelon fruit metabolites

分类 Category	代谢物 Metabolite	97103	PI 296341	比率 Ratio	
糖类 Sugar	蔗糖 Sucrose	23 421.9*	973.7	24.054	
	海藻糖 Trehalose	6.1*	2.6	2.346	
	赤藓糖醇 Erythritol	306.7*	68.1	4.504	
	果糖 Fructose	15 449.5	19 057.2	0.811	
	半乳糖醇 Galactitol	151.1	168.5	0.897	
	1-磷酸肌醇 Inositol-1-phosphate	2.1	3.2	0.656	
	肌醇 Inositol	660.9	810.4	0.816	
	棉籽糖 Raffinose	73.1	405.2*	0.180	
	鼠李糖 Rhamnose	2.3	64.4*	0.036	
	6-磷酸葡萄糖 Glucose-6-phosphate	7.3	39.9*	0.183	
	半乳糖 Galactose	23.5	141.8*	0.166	
	葡萄糖 Glucose	8 002.3	17 137.6	0.467	
	麦芽糖 Maltose	6.4	6.8	0.941	
	木糖 Xylose	5.0	11.5	0.435	
	岩藻糖 Fucose	175.8	164.9	1.066	
	有机酸 Organic acid	柠檬酸 Citric acid	120.4*	34.1	3.531
		甘油酸 Glyceric acid	2.5	186.8*	0.013
丙酮酸 Pyruvic acid		0.5	4.7*	0.106	
马来酸 Maleic acid		13.8	47.7*	0.289	
苏糖酸 Threonic acid		40.3	241.9*	0.167	
苯甲酸 Bbenzoic acid		4.9*	2.0	2.450	
脱氢抗坏血酸 Dehydroascorbic acid		1.7	1.9	0.895	
富马酸 Fumaric acid		109.3	146.4	0.747	
1-4-内酯古洛糖酸 1-4-lacton gulonic acid		9.5	21.1	0.450	
苹果酸 Malic acid		1 400.9	3 648.1	0.384	
烟酸 Nicotinic acid		17.4	15.2	1.145	
焦谷氨酸 Pyroglutamic acid		2 119.1	5 342.5	0.397	
琥珀酸 Succinic acid		7.3	13.9	0.525	
伽玛氨基丁酸 Gaba		23.0	131.6*	0.175	
氨基酸 Amino acid		谷氨酸 Glutamic acid	662.4*	214.4	3.090
		亮氨酸 Leucin	299.0	1 011.3*	0.296
		甘氨酸 Glycine	131.3	618.2*	0.212
	谷氨酰胺 Glutamine	37.5	189.6*	0.198	
	酪氨酸 Tyrosine	3.6	32.5*	0.111	
	丙氨酸 Alanine	413.0	491.4	0.840	
	β 丙氨酸 Beta alanine	25.3*	10.5	2.410	
	精氨酸 Arginine	1 148.3	604.5	1.900	
	天冬氨酸 Aspartic acid	1 233.2	680.3	1.813	
	组氨酸 Histidine	268.2	166.0	1.616	
	异亮氨酸 Isoleucine	1 154.1	1 710.0	0.675	
	赖氨酸 Lysine	37.4	93.4	0.400	
	蛋氨酸 Methionine	228.2*	85.2	2.678	
	天冬酰胺 Asparagine	82.2	157.1	0.523	
	鸟氨酸 Ornithine	927.0	484.4	1.914	
	苯丙氨酸 Phenylalanine	852.6	442.9	1.925	
	其他 Other	4-羟基脯氨酸 Prolin-4-hydroxy	10.8	9.1	1.187
脯氨酸 Proline		589.3	965.3	0.610	
丝氨酸 Serine		625.8	619.6	1.010	
苏氨酸 Threonine		83.3	146.0	0.571	
色氨酸 Tryptophan		926.9*	419.3	2.211	
缬氨酸 valine		679.6	1352.4	0.503	
腐胺 Putrescine		3.8	36.9*	0.103	
尿素 Urea		8.5	527.0*	0.016	
2-磷酸甘油 Glycerol-2-phosphate		0.9	6.4*	0.141	
磷酸 Phosphoric acid		939.4	2 208.1	0.425	
甘油 Glycerol	214.8	175.3	1.225		
L-谷胱甘肽 L-glutathione	69.7	569.6*	0.122		
5-磷酸腺苷 Adenosine-5-monophosphate	0.9*	0.3	3.000		

* $P < 0.05$.

表2 高糖‘97103’和低糖‘PI296341’西瓜棉籽糖、水苏糖、蔗糖含量和碱性 α -半乳糖苷酶活性
 Table 2 The content of raffinose, stachyose, sucrose and the activity of alkaline alpha-galactosidase
 in high sugar ‘97103’ and low sugar ‘PI296341’

测定部位 Measure part	材料 Material	棉籽糖/ (mg · g ⁻¹) Raffinose	水苏糖/ (mg · g ⁻¹) Stachyose	蔗糖/ (mg · g ⁻¹) Sucrose	碱性 α -半乳糖苷酶 活性/(mol · g ⁻¹ FW) Activity of alkaline alpha-galactosidase
果柄伤流液 Phloem sap of fruit pedicel	97103 (高糖 High sugar)	6.63*	10.80*	5.10*	—
	PI296341 (低糖 Low sugar)	2.36	1.28	3.38	—
果实 Fruit	97103 (高糖 High sugar)	0.26	0.21	32.00*	0.60**
	PI296341 (低糖 Low sugar)	1.82*	0.41*	0.25	0.23

* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$.

3 讨论

棉籽糖和水苏糖是栽培西瓜茎部维管运输的主要糖分(Zhang et al., 2010),在野生西瓜(*Citrullus amarus*)‘PI296341’中高含量的棉籽糖通过 α -半乳糖苷酶水解作用卸载。棉籽糖被 α -半乳糖苷酶水解成蔗糖和 α -半乳糖(Carmi et al., 2003),随后蔗糖和 α -半乳糖通过转运蛋白被卸载到果实细胞(Williams et al., 2000)。棉籽糖的水解产物 α -半乳糖(α -galactose)是UDP-葡萄糖(UDP-glucose)的合成底物,UDP-葡萄糖能与果糖在蔗糖磷酸合成酶作用下合成蔗糖。可见,碱性 α -半乳糖苷酶不但直接水解棉籽糖生成蔗糖,还提供了合成蔗糖原料UDP-葡萄糖的合成前体 α -半乳糖。综上,栽培高糖西瓜‘97103’果实蔗糖来源于3个途径方面:(1)韧皮部运输;(2)韧皮部运输的棉籽糖、水苏糖被 α -半乳糖苷酶水解成蔗糖;(3)UDP-葡萄糖和果糖在蔗糖磷酸合成酶作用下合成蔗糖。考虑到高糖西瓜‘97103’和野生低糖‘PI296341’果实蔗糖磷酸合成酶活性差异仅2~3倍(Liu et al., 2013),推测第(1)和(2)途径可能是西瓜果实蔗糖来源的主要途径。

本研究中发现野生低糖‘PI296341’西瓜果实中6-磷酸葡萄糖的相对含量是高糖西瓜‘97103’的5倍。进一步分析6-磷酸葡萄糖的下游代谢途径发现,6-磷酸葡萄糖可作为甘氨酸等氨基酸、腐胺的合成底物(图2)。相应地,甘氨酸、腐胺在低糖‘PI296341’果实中的相对含量是高糖西瓜‘97103’果肉的3~10倍。而高糖西瓜‘97103’果实中海藻糖相对含量是低糖‘PI296341’果实的2.3倍,因此推测6-磷酸葡萄糖在‘97103’果实中流向了海藻糖合成途径。此外发现‘97103’果肉中能积累相当于‘PI296341’4.5倍的赤藓糖醇,而低糖‘PI296341’果实能积累相当于‘97103’约30倍的鼠李糖。由于鼠李糖和赤藓糖醇均是果糖的下游代谢物,因此推测‘97103’和‘PI296341’果肉果糖的代谢途径也存在代谢流向差异。栽培西瓜倾向于合成赤藓糖醇,而野生西瓜则合成较高含量的鼠李糖(图2)。有机酸代谢十分复杂,但由于6-磷酸葡萄糖是磷酸烯醇式丙酮酸(Phosphoenol-pyruvic acid, PEP)和丙酮酸合成的重要前体物(Schauer et al., 2006),本试验结果表明‘PI296341’果实6-磷酸葡萄糖含量是高糖西瓜‘97103’的5倍,相对应的丙酮酸含量在‘PI296341’中为‘97103’的10倍,同时检测到‘PI296341’中丙酮酸下游相关的马来酸等含量为‘97103’含量的3~5倍,而97103中柠檬酸含量是‘PI296341’的3.5倍,由此推测高糖材料‘97103’中丙酮酸可能主要进入了TAC循环进行柠檬酸的积累。

栽培种西瓜和野生种西瓜在基因组序列以及形态和生理特征上表现出明显的差异(Guo et al., 2013),然而在代谢与表型差异方面,特别是在糖积累及其对果实发育和驯化的影响,仍知之甚少。栽培高糖西瓜‘97103’和野生低糖材料‘PI296341’间的代谢组差异主要与3种代谢途径有关,即糖代谢、氨基酸代谢和有机酸代谢。本研究中发现栽培西瓜和野生西瓜之间存在不同的代谢物积累

途径。在野生西瓜果实中，氨基酸代谢、有机酸代谢途径相关物质大量积累，有机酸的积累是西瓜风味形成的重要因素（刘景安，2013），野生低糖材料‘PI296341’中甘油酸、丙酮酸、马来酸、蔗糖酸等有机酸代谢途径可能在西瓜栽培驯化历史中通过人类选择而受到了抑制。在栽培西瓜中存在大量蔗糖代谢途径相关物质。栽培西瓜和野生西瓜之间在糖分积累代谢水平上的进化分离是西瓜适应自然及人为选择的表现，对栽培西瓜的驯化却抑制了有机酸代谢相关途径物质积累，根据本结果，西瓜风味育种选择时可重视有机酸和氨基酸代谢途径的相关基因。

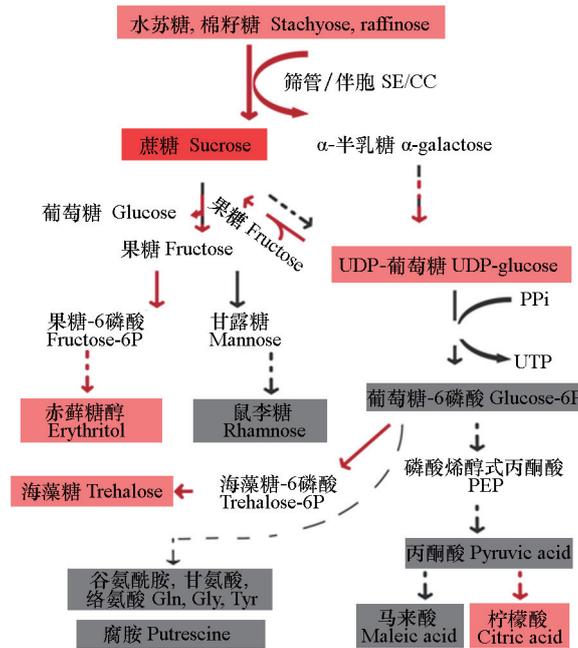


图2 韧皮部运输水苏糖、棉籽糖在栽培西瓜‘97103’和野生西瓜‘PI296341’果实卸载及其代谢网络

红色箭头表示栽培西瓜果实主要代谢途径，灰色箭头代表野生西瓜果实主要代谢途径。

Fig. 2 Metabolic profiles of phloem transported stachyose and raffinose in cultivar ‘97103’ and wild accession ‘PI296341’ watermelon fruits. Red arrows indicate the main metabolic pathway of cultivar watermelon fruits, while the grey arrows show the main metabolic pathway of wild watermelon fruits.

References

Carmi N, Zhang G, Petreikov M, Gao Z, Eyal Y, Granot D, Schaffer AA. 2003. Cloning and functional expression of alkaline alpha-galactosidase from melon fruit: similarity to plant SIP proteins uncovers a novel family of plant glycosyl hydrolases. *Plant Journal*, 33: 97 - 106.

Dixon RA, Strack D. 2003. Phytochemistry meets genome analysis and beyond. *Phytochemistry*, 62: 815 - 816.

Fiehn O. 2003. Metabolic networks of cucurbita maxima phloem. *Phytochemistry*, 62 (6): 875 - 886.

Fiehn O, Kopka J, Dörmann P, Atmann T, Trethewey R N, Willmitzer L. 2000. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature Biotechnology*, 18 (11): 1157 - 1161.

Gao Z, Schaffer AA. 1999. A novel alkaline alpha-galactosidase from melon fruit with a substrate preference for raffinose. *Plant Physiology*, 119: 979 - 988.

Guo S G, Sun H H, Zhang H Y, Liu J, Ren Y, Gong G Y, Jiao C, Zheng Y, Yang W, Fei Z J, Xu Y. 2015. Comparative transcriptome analysis of cultivated and wild watermelon during fruit development. *PLoS ONE*, 10 (6): e0130267.

Guo S G, Zhang J, Sun H H, Salse J, Lucas W J, Zhang H Y, Zheng Y, Mao L, Ren Y, Wang Z, Min J, Guo X, Murat F, Ham B K, Zhang Z, Gao S, Huang M, Xu Y, Zhong S, Bombarely A, Mueller LA, Zhao H, He H, Zhang Y, Huang S, Tan T, Pang E, Lin K,

- Hu Q, Kuang H, Ni P, Wang B, Liu J, Kou Q, Hou W, Zou X, Jiang J, Gong G, Klee K, Schoff H, Huang Y, Hu X, Dong S, Liang D, Wang J, Wu K, Xia Y, Zhao X, Zheng Z, Xing M, Liang X, Huang B, Lv T, Yin Y, Yi H, Li R, Wu M, Levi A, Zhang X, Giovannoni J J, Li Y, Fei Z. 2013. The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions. *Nature Genetics*, 5 (1): 51 - 58.
- Hendrix J E. 1968. Labeling pattern of translocated stachyose in squash. *Plant Physiology*, 43: 1631 - 1636.
- Hu C, Ham B K, El-shabrawi H M, Alexander D, Zhang D, Ryals J, Lucas W J. 2016. Proteomics and metabolomics analyses reveal the cucurbit sieve tube system as a complex metabolic space. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 87 (5): 442 - 454.
- Lin De-pei. 2015. A study of systematics for *Citrullus* Schrad. *Zhongguo Guacai*, 28 (5): 1 - 4. (in Chinese)
- 林德佩. 2015. 西瓜属 (*Citrullus* Schrad.) 的分类系统研究. *中国瓜菜*, 28 (5): 1 - 4.
- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie A R. 2006. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols*, 1: 387 - 396.
- Liu J A. 2013. Analyses of physiological and biochemical mechanism and gene expression profile of fruit quality development in watermelon [Ph. D. Dissertation]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. (in Chinese)
- 刘景安. 2013. 西瓜果实品质形成的生理生化机制与基因表达谱研究[博士论文]. 北京: 中国农业科学院.
- Liu J A, Guo S G, He H J, Zhang H Y, Gong G Y, Ren Y, Xu Y. 2013. Dynamic characteristics of sugar accumulation and related enzyme activities in sweet and non-sweet watermelon fruits. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35: 3213 - 3222.
- Lou Q J, Ma C F, Wen W W, Zhou J, Chen L, Feng F J, Xu X Y, Lu X, Luo L J, Mei H W, Xu G W. 2011. Profiling and association mapping of grain metabolites in a subset of the core collection of chinese rice germ plasm (*Oryza sativa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 9257 - 9264.
- Lucksanaporn T, Osawa M, Eiichiro F. 2008. Quality evaluation and prediction of *Citrullus lanatus* by H-1 NMR-based metabolomics and multivariate analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 5827 - 5835.
- McDougall G, Martinussen I, Stewart D. 2008. Towards fruitful metabolomics: high throughput analyses of polyphenol composition in berries using direct infusion mass spectrometry. *Journal of Chromatography. B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 871 (2): 362 - 369.
- Nicholson J K, Lindon J C, Holmes E. 1999. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, 29 (11): 1181 - 1189.
- Schauer N, Semel Y, Roessner U, Gur A, Balbo I, Carrari F, Pleban T, Perez-melis A, Bruedigam C, Kopka J, Willmitzer L, Zamir D, Fernie A R. 2006. Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement. *Nature Biotechnology*, 24: 447 - 454.
- Schauer N, Steinhäuser D, Strelkov S, Schomburg D, Allison G, Moritz T, Lundgren K, Roessner-Tunali U, Forbes M G, Willmitzer L, Fernie A R, Kopka J. 2005. GC - MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. *FEBS Letters*, 579: 1332 - 1337.
- Williams L E, Lemoine R, Sauer N. 2000. Sugar transporters in higher plants—a diversity of roles and complex regulation. *Trends in Plant Science*, 5: 283 - 290.
- Xia J, Sinelnikov I V, Han B, Wishart D S. 2015. MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Research*, 43: W251 - W257.
- Xu Guo-weng, Lu Xin, Yang Sheng-li. 2007. Recent advances in metabolomics. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*, (6): 701 - 711. (in Chinese)
- 许国旺, 路鑫, 杨胜利. 2007. 代谢组学研究进展. *中国医学科学院学报*, (6): 701 - 711.
- Yatav M, Harary I, Wolf S. 2010. Sucrose accumulation in watermelon fruits: genetic variation and biochemical analysis. *Journal of Plant Physiology*, 167: 589 - 596.
- Zhang B, Tolstikov V, Tumbull C, Hicks L M, Fiehn O. 2010. Divergent metabolome and proteome suggest functional independence of dual phloem transport systems in cucurbits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107: 13532 - 13537.
- Zhao Hong-zhi. 2012. Study of plant metabolomics on *Arabidopsis thaliana* and anti-inflammatory activity on metabolites of *Flos Lonicerae Japonica* [Ph. D. Dissertation]. Tianjin: Nankai University. (in Chinese)
- 赵洪志. 2012. 拟南芥植物代谢组学及金银花代谢产物抗炎活性研究[博士论文]. 天津: 南开大学.