



# 生长素酰胺水解酶基因在西瓜果实发育过程中的表达

高 婧<sup>1</sup>, 田守蔚<sup>2</sup>, 张 洁<sup>2</sup>, 王艳萍<sup>2</sup>, 孙宏贺<sup>2</sup>, 张海英<sup>2</sup>, 许 勇<sup>2</sup>

(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/蔬菜种质改良北京重点实验室, 北京 100097)

**摘要:**生长素在植物果实发育与成熟过程中发挥重要作用,但生长素调控西瓜果实发育与成熟的分子机制尚不十分清楚。以含糖量低的野生西瓜 PI296341-FR 与含糖量高的栽培西瓜 97103 为试验材料,测定并比较了栽培与野生西瓜果实发育不同时期果实完整组织游离态 IAA 的含量。结果表明:果实游离态 IAA 的含量随西瓜果实发育而上升,在授粉后 18 d 达到峰值,后期逐步下降。含糖量高的栽培西瓜果实游离态 IAA 的含量在果实发育的各个阶段,均显著高于含糖量低的野生西瓜,说明果实游离态 IAA 的积累可能与果实成熟及含糖量积累相关。已有研究表明生长素酰胺水解酶(IAA-Leucine Resistant1-like Hydrolase, ILR1-like hydrolase, ILL)通过催化结合态生长素释放游离态生长素,是游离态生长素积累的限速酶。在西瓜全基因组上对 ILL 基因家族进行了系统进化树分析,通过 qRT-PCR 检测了西瓜各个组织的表达情况,发现西瓜果肉中只有 4 个 ILL 基因表达,并且栽培西瓜果肉中这 4 个基因的表达量均显著高于野生西瓜,其中, *Clal017661* 在栽培西瓜果肉中的表达量最高,且与果实游离态 IAA 的含量变化趋势正相关,推测该基因对栽培西瓜游离态 IAA 的积累起关键作用,进而调控了西瓜果实的发育与成熟的进化。

**关键词:**生长素;西瓜;游离;IAA;生长素酰胺水解酶

肉质果实的发育与成熟是复杂而高度协调的过程,依赖于多个植物生长激素的协调作用<sup>[1]</sup>,其中生长素在果实发育的过程中起到了不可替代的作用。生长素不仅对果实坐果起重要作用<sup>[2]</sup>,还能通过调控细胞分裂和细胞扩增,决定果实最终大小<sup>[3]</sup>。在一些水果作物中,生长素含量的下降被认为是果实启动成熟的先决条件<sup>[4]</sup>。外施生长素可以干扰许多作物的果实成熟过程<sup>[5]</sup>。

植物生长素的主要天然活性形式是吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA),通过植物自身的色氨酸依赖途径及色氨酸非依赖途径合成<sup>[6]</sup>。合成有活性的游离态 IAA 可以通过酯键与糖结合,或通过酰胺键与氨基酸或肽结合,成为非活性的结合态 IAA,植物体 95% 的生长素以结合态形式存在<sup>[7-8]</sup>。IAA 以结合态形式存储、运输,其后在生长素酰胺水解酶(IAA-Leucine Resistant1-like

Hydrolase, ILR1-like hydrolase, ILL)作用下水解产生游离态 IAA,在不同发育过程中提供具有生物活性的生长素<sup>[9]</sup>。

拟南芥的 ILL 蛋白家族有 7 个成员,其中 *AtIAR3* 的主要底物是 IAA-Ala,参与调控了拟南芥对干旱胁迫的响应<sup>[10-11]</sup>。*AtILR1*、*AtIAR3* 及 *AtILL2* 基因,通过调控游离态 IAA 的含量进而参与调节了光照条件下下胚轴的延伸及侧根的发生、根毛的延伸<sup>[12-13]</sup>。芜菁受到根肿菌侵染,肉质根中的 IAA 含量增加可能与 *BrIAR3* 和 *BrILL6* 的表达量变化相关<sup>[14]</sup>;*MtIAR33* 和 *MtIAR34* 调控了蒺藜苜蓿根部受真菌侵染时 IAA 含量的增加<sup>[15]</sup>。桃 ILL 家族的 *PpILR1* 基因在桃果实成熟过程表达量上调了 9 倍,可能通过催化生长素氨基酸结合态水解的形式参与了溶质型桃果实成熟阶段的生长素的跃变过程,进而调控桃果实发育过程<sup>[16]</sup>。因此,ILL 蛋白通过调控游离态 IAA 的释放调控了植物的众多发育过程。

果实发育与成熟过程与游离态 IAA 的含量息息相关。西瓜作为非呼吸跃变型果实发育研究的理想模式作物,生长素对其果实发育与成熟过

收稿日期:2018-01-10

基金项目:北京学者资助项目(BSP026);国家西瓜产业技术体系资助项目(CARS-25);北京西瓜瓜创新团队资助项目(BAIC10-2017)。

第一作者简介:高婧(1990-),女,在读硕士,从事蔬菜育种与生物技术研究。E-mail:1192039757@qq.com。

通讯作者:许勇(1965-),男,博士,研究员,从事蔬菜育种研究。E-mail:xuyong@nrcv.org。

程的研究尚在起步阶段,生长素在西瓜果实发育过程的含量变化尚未有研究报道,关于生长素酰胺水解酶对此过程的调控作用尚不清楚。本研究首次报道了含糖量低的野生型西瓜与含糖量高的栽培型西瓜果实发育过程中的生长素含量变化差异;利用生物信息学分析方法,鉴定并分析西瓜全基因组 ILL 家族成员的基本特征;通过 qRT-PCR 检测了西瓜 *ILL* 基因在野生型及栽培型西瓜果实发育过程的表达差异,为 *ILL* 基因家族成员的功能解析奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以野生型种质“PI296341-FR”( *C. lanatus* var. *citroides*)与早熟栽培西瓜自交系 97103( *C. lanatus* subsp. *vulgaris*)为供试材料。野生材料由课题组从美国引进并保存,授粉后约 50 d 种子成熟,但果实可溶性糖含量极低,无甜味,瓢色白且硬;早熟栽培种西瓜由本课题组选育并保存,授粉后约 30 d 成熟,成熟果实含糖量高,中心瓢甜,可溶性固形物 11% 左右,瓢色红,肉质脆酥。早熟栽培西瓜果实发育过程有 4 个关键期:1. 未成熟白瓢期(授粉后 10 d, DAP); 2. 白粉瓢期(18 DAP); 3. 红瓢期(26 DAP); 4. 过熟期(34 DAP)<sup>[16]</sup>。以此作为取样时间点。

### 1.2 方法

1.2.1 果实整组织游离态 IAA 含量的测定 游离态 IAA 的含量测定在中国农业大学生物科学院质谱(MS)实验室进行。分别采集“PI296341-FR”、97103 授粉后 10、18、26、34、42 及 50 d 的西瓜果实各部位样品。采集的样品在液氮中冷冻后,储存在 -80 ℃ 冰箱。测定时将样品粉碎成细粉,取 0.1 g 样品置于 1.5 mL 离心管,加入 500  $\mu$ L 提取液(异丙醇:水:盐酸=2:1:0.002, v/v/v)和 50  $\mu$ L 内标(100  $\mu$ g $\cdot$ L<sup>-1</sup>)溶液,涡旋振荡 10 s,在 4 ℃、300 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 条件下振荡 30 min,加入 1 mL 萃取液(氯仿溶液),涡旋振荡 10 s,在 4 ℃、300 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 条件下振荡 30 min,相同温度下 14 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 离心 5 min,两相形成,转移下层液体 1.2 mL,室温下氮气吹干,用 0.1 mL 甲醇溶液复溶,14 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 离心 5 min 后,取上清液装入进样小瓶,上机待测。所用液相色谱仪为 Waters Acquity UPLC I-Class (Waters Corporation, 34 Maple Street Milford, MA, 01757 USA),使用色谱柱 Poroshell EC-120(3.0 mm $\times$

100 mm, 3  $\mu$ m; Agilent, Santa Clara, CA)进行色谱分离,采用以下溶剂梯度分离 IAA(A 相:水含 0.05% 乙酸;B 相:乙腈含 0.05% 乙酸):0 min, 10% B; 6.25 min, 40% B; 7.5 min, 90% B; 10.5 min, 90% B; 10.6 min, 10% B; 13.5 min, 10% B; 流速为 0.3 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>,上样量为 5  $\mu$ L。使用高分辨质谱仪 Thermo Q-Exactive high resolution mass spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)进行质谱分析,参数设置如下:Ion Source: HESI, Spray Voltage(-): 3000, Capillary Temperature: 320, Sheath Gas: 30, Aux Gas: 10, Spare Gas: 5, Probe Heater Temp.: 350, S-Lens RF Level: 55, 保留时间和 IAA 的质谱信息取决于标准品。每个样本重复 3 次。

1.2.2 可溶性固形物含量的测定 用手持式 ATC-1E 糖度计(ATAGO, Tokyo)测定西瓜果实中心果肉组织的可溶性固形物含量。

1.2.3 西瓜 ILL 家族基因序列检索 利用拟南芥基因组数据库获得 ILL 基因的编码序列,通过检索葫芦科基因组数据库(<http://cucurbitgenomics.org/>)对西瓜蛋白组序列进行比对,选取阈值小于  $e^{-5}$  序列,根据基因注释去除非 ILL 基因后,以此序列集合在西瓜蛋白组序列内再次做 BLASTP 比对检索( $e$ -value =  $1e^{-5}$ ),在匹配序列中筛选非 ILL 序列后列为西瓜 ILL 候选基因序列。

1.2.4 西瓜 ILL 蛋白家族进化与结构分析 从拟南芥基因组数据库中获得拟南芥 ILL 蛋白家族序列( *AtILR1*, AT3G02875; *AtIAR3*, AT1G51760; *AtILL1*, AT5G56650; *AtILL2*, AT5G56660; *AtILL3*, AT5G54140; *AtILL5*, AT1G51780; *AtILL6*, AT1G44350),并从检索获得的转录本序列翻译出西瓜 ILL 蛋白家族序列,用 ClustalX 1.83 进行序列比对(alignment),使用 MEGA 7.0<sup>[17]</sup> 软件构建 ML 系统发育树,做 500 次 bootstrap,其它参数为系统默认值。

1.2.5 西瓜 ILL 基因在不同组织部位的表达分析 RNA 提取试剂盒购自华越洋生物公司;反转录试剂盒为 TURBO DNA-free<sup>TM</sup> Kit,由 Invitrogen 提供;荧光定量 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司;引物由北京天一辉远生物科技有限公司合成。用 RNA 提取试剂盒分别提取,分别取 97103 根、顶端生长点、叶片组织,97103 和 PI296341-FR 授粉后 10、18、26、34、42、50 d 的果肉组织总 RNA。使用 TURBO DNA-free<sup>TM</sup> Kit (Invitrogen) 对各

样品 RNA 进行纯化。以纯化后的 RNA 样品为模板,利用试剂盒 PrimerScript 1st Strand cDNA synthesis kit(Takara)进行反转录,获得 cDNA。反转录得到的 cDNA 稀释 10 倍,用作反应模板。

表 1 荧光定量 PCR 扩增的引物序列

Table 1 Primers used for qRT-PCR amplification

基因登录号 Gene accession No.	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer
Cla011242	GGTCATCTCCAAGCCTGGTCTCAT	CCACCGCCTTGAACTTTGCTATTG
Cla017661	GTGGACATGCTGCAATGCCTCA	ACCCTTTACGAACCCGACAGTGA
Cla018422	CTATTGGGTTTGGCGAGGGAAAGG	CACCACTCCAGTCTTGGCAACAG
Cla010118	CCACGAGAACCCAGAACTTGCTTT	GCTCCCATTCCACCAATTCTCTCAAT
Cla012630	GCTTGTTGGTCACGATGCTCATGT	AGCACCTCCACCTCCTTCTTCAG
Cla013930	TCTTCATCGCCATTACGCCTTC	TCGCAGTTCTGAGACTCCAATCCA
Cla007792(Actin)	CCTACAACCTCAATTATGAAGTGTG	GAAATCCACATCTGCTGGAAGGTG

1.2.6 数据分析 采用 Excel 2010 软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 野生西瓜与栽培西瓜果实整组织游离态 IAA 的含量变化

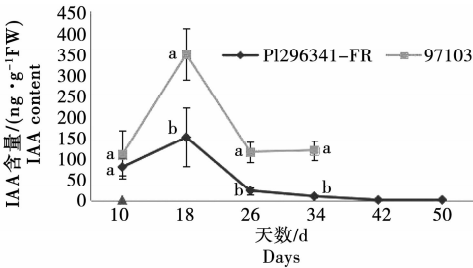
检测“PI296341-FR”、97103 两个品种西瓜果实不同发育时期整组织游离态 IAA 的含量变化,结果显示,二者游离态 IAA 的含量均呈现先升后降趋势,18 d 达到最高值,而后下降。在果实发育后期,野生西瓜游离态 IAA 的含量几乎降为零,而栽培品种仍维持较高含量的游离态 IAA。栽培西瓜在授粉 10 d 后的果实发育的各个阶段游离态 IAA 的含量显著高于野生西瓜(图 1)。栽培品种 97103 可溶性固形物含量在白粉瓢期(18 d)以后迅速积累,一直增加,只在过熟期略有降低,而野生品种 PI296341-FR 可溶性固形物含量一直很低(图 2),不难推测出,栽培西瓜后期较高含量的游离态 IAA 可能对其可溶性固形物的积累起重要的作用。潘磊等<sup>[17]</sup>在桃果实发育中也发现同样现象。

2.2 西瓜生长素酰胺水解酶基因家族的全基因组鉴定与进化树分析

前人的研究结果表明,IAA 以结合态形式存储、运输,生长素酰胺水解酶(IAA-Leucine Resistant1-like Hydrolase, ILR1-like hydrolase, ILL)可以将其水解产生游离态 IAA,是游离态 IAA 积累的限速酶,因此西瓜果实游离态 IAA 积累可能与 ILL 基因有关,有必要进一步在西瓜全基因组上鉴定分析 ILL 基因家族成员。目前在

以西瓜 *Actin* 基因作为内参,利用 LightCycler 480 型荧光定量 PCR 仪(Roche)对基因(引物见表 1)进行定量 PCR 分析。采用比较 C-T 法计算各基因的相对表达量。

以拟南芥上已鉴定出 7 个 *ILL* 基因(*AtILR1*, *AT3G02875*; *AtIAR3*, *AT1G51760*; *AtILL1*, *AT5G56650*; *AtILL2*, *AT5G56660*; *AtILL3*, *AT5G54140*; *AtILL5*, *AT1G51780*; *AtILL6*, *AT1G44350*),通过其编码区在西瓜基因组数据库中进行比对,在西瓜中共得到 6 个 *ILL* 基因(表 2)。



不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著性 ( $P < 0.05$ )。下同。  
Different lowercase letters mean significant difference at 0.05 level. The same below.

图 1 不同类型西瓜果实中游离态 IAA 含量的变化  
Fig. 1 Change of free IAA content in different types of watermelon fruits

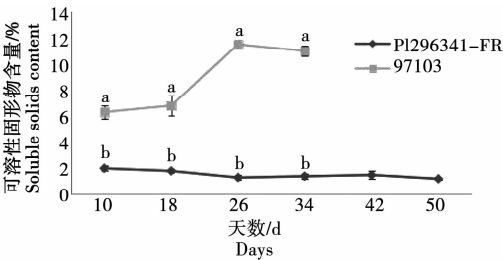


图 2 不同类型西瓜果实中可溶性固形物含量的变化  
Fig. 2 Change of soluble solids content in different types of watermelon fruits

表 2 西瓜基因组中 ILL 基因家族的特征  
Table 2 Characteristics of the ILL genes family in watermelon

基因登录号 Gene accession No.	染色体定位 Chromosome No.	预测的蛋白 Predicted protein			
		氨基酸长度/aa Length	分子量/kD Molecular weight	结构域 Protein domain	二聚化结构域 M20 dimerisation domain
Cla011242	3	443	48.46	Peptidase M20	+
Cla017661	10	762	84.15	Peptidase M20	-
Cla018422	4	484	52.69	Peptidase M20	-
Cla010118	5	389	42.42	Peptidase M20	+
Cla012630	7	445	49.03	Peptidase M20	+
Cla013930	8	502	55.35	Peptidase M20	+

+表示存在此结构域。  
+ means domain exist.

利用进化树分析软件 MEGA7.0 对西瓜的 6 个和拟南芥的 7 个 ILL 蛋白序列 (*AtILR1*, AT3G02875; *AtIAR3*, AT1G51760; *AtILL1*, AT5G56650; *AtILL2*, AT5G56660; *AtILL3*, AT5G54140; *AtILL5*, AT1G51780; *AtILL6*, AT1G44350) 进行进化分析。由图 3 可以看出, 西瓜和拟南芥的 ILL 蛋白主要分为 3 大类, 西瓜中的 *Cla012630*、*Cla011242*、*Cla010118*、*Cla013930* 基因编码的蛋白和拟南芥 AT1G51760 (*AtIAR3*)、AT1G51780 (*AtILL5*)、AT5G56650 (*AtILL1*)、AT5G56660 (*AtILL2*) 和 AT1G44350 (*AtILL6*) 蛋白聚为一类, *Cla017661*、*Cla018422* 编码的蛋白与 AT3G02875 (*AtILR1*) 和 AT5G54140 (*AtILL3*) 聚为一类。其中, *Cla017661* 与 AT3G02875 (*AtILR1*) 亲缘关系较近, 可能具有相似功能。

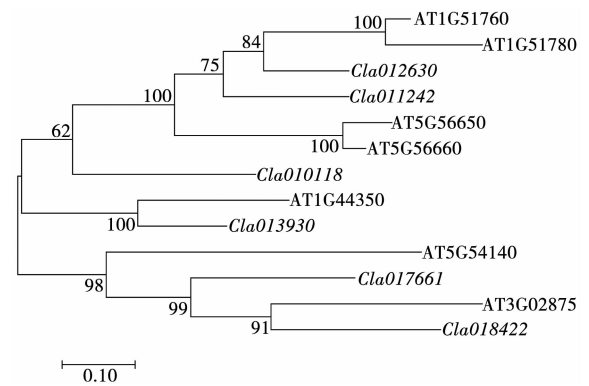


图 3 西瓜和拟南芥 ILL 蛋白家族的系统进化树分析  
Fig. 3 Molecular phylogenetic analysis of ILL proteins from *Citrullus lanatus* and *Arabidopsis thaliana* by Maximum Likelihood method

2.3 西瓜 ILL 基因在不同组织部位的表达分析

分别提取 97103 授粉后 18 d 的根、叶、顶端生长点、果柄及果肉组织, 利用荧光定量 PCR 对候选 6 个 ILL 基因的表达情况进行分析。以 18 d 时 *Cla012630* 在果柄组织的表达量作为 1, 从图 4 中可以看出, *Cla012630* 和 *Cla13930* 在根部的表达量最高, 排在第 3 位的是 *Cla018422* 它的表达量约为 *Cla012630* 的 50%, *Cla011242*、*Cla017661* 和 *Cla010118* 表达量较低。与其它器官相比, 西瓜 *ILL* 基因家族在叶片中的表达量均相对较低。在顶端生长点中, 主要表达 *Cla017661*、*Cla011242* 基因, 其它 *ILL* 基因表达量较低。果柄组织中主要表达 *Cla011242*、*Cla013930* 基因, 其次为 *Cla017661*、*Cla012630* 基因, *Cla018422* 与 *Cla010118* 表达量极低。在果肉组织中, *Cla018422* 和 *Cla010118* 表达量极低, 几乎为 0。 *Cla017661* 表达量最高, 高出排在第二位的 *Cla011242* 将近一倍, *Cla012630* 和 *Cla013930* 表达量约为 *Cla017661* 的 30%。

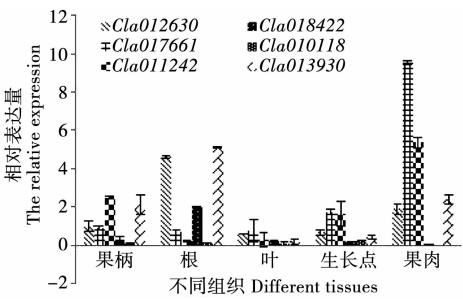


图 4 97103 中 *ILL* 基因在西瓜不同组织的表达情况  
Fig. 4 Expression profile of *ILLs* gene of 97103 in different tissues

## 2.4 ILL 基因在野生及栽培西瓜果实发育过程中的表达差异分析

分别提取 PI296341-FR 授粉后 10、18、26、34、42、50 d 和 97103 授粉后 10、18、26、34 d 的果肉组织总 RNA,对比检测 4 个 *ILL* 基因在野生与栽培西瓜品种果肉中表达差异情况,取相同时期 97103 果皮作对照。以授粉后 10 d 时 *Cla012630* 在果皮组织的表达量作为 1。从图 5 中可以看出,除 *Cla013930* 基因以外,其余 3 个基因在 97103 果肉中的表达均显著高于在 PI296341-FR 果肉及 97103 果皮的表达,并且在

野生果肉与 97103 果皮的表达情况基本相同。其中,*Cla017661*、*Cla011242* 在 97103 果肉表达量变化趋势与果实整组织游离态 IAA 的浓度变化趋势类似,都在授粉后 18 d 达到最高,在授粉后 26 d 降低,又在 34 d 有所上调。这 3 个基因均表现出在含糖量高的组织表达量高,栽培西瓜的果瓢高于野生西瓜的果瓢,栽培西瓜的果皮(含糖量也低)与野生西瓜的果瓢同样表现出较低的表达量。其中 *Cla017661* 表达量最大,推测其在水解结合态生长素中发挥更大的作用。

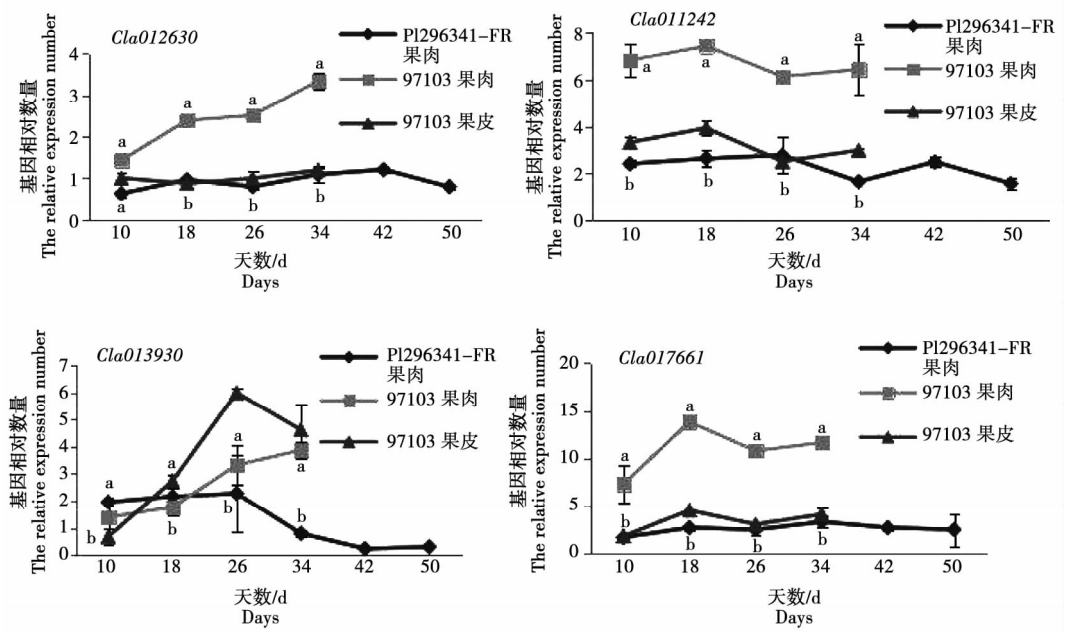


图 5 *ILL* 基因在不同类型西瓜果实中的表达情况  
Fig. 5 Expression profile of *ILLs* gene in different types of watermelon fruits

## 3 结论与讨论

生长素很早就被报道参与果实发育过程,外施生长素会扰乱正常的果实成熟过程<sup>[5]</sup>,此外生长素对果实坐果及果实大小的调控也起到关键作用<sup>[1]</sup>。除此以外,在一些报道中,提出了果实组织中生长素合成或信号传导与糖积累之间的联系<sup>[18-19]</sup>,但生长素如何影响糖代谢进而影响果实品质的机理还不清楚。在烟草细胞中,生长素抑制了淀粉粒的发育,淀粉生物合成主要酶的积累受生长素的影响<sup>[20]</sup>。下调生长素响应因子 *SlARF4* 的表达的转基因番茄,在果实发育早期积累更多的淀粉,后期积累更多的糖<sup>[21]</sup>。

西瓜起源于非洲,西瓜祖先品种 (*C. colocynthis* 或 *C. lanatus* var. *citroides*, 或其它)有着

白而坚硬的果肉、厚厚的果皮、极低的含糖量,味苦,以上性状均有利于在雨季到来之前保护种子,防止种子过早被传播<sup>[22]</sup>。经过人为驯化过程,现代栽培西瓜和野生西瓜祖先品种在外观和成分上有着明显的不同,这些变化的结果就是由不成熟并苦涩的野生西瓜变成了完全成熟并甜的栽培西瓜。目前西瓜驯化过程的关键影响因素的研究还很少,西瓜由不甜的野生品种驯化为可以积累糖分的栽培品种,涉及的关键因子有待于进一步研究。

本研究测量了野生品种“PI296341-FR”、早熟栽培西瓜品种 97103 果实不同发育时期整组织的游离态 IAA 浓度的变化情况,发现不同类型西瓜果实游离态 IAA 的浓度变化有差异。二者游离态 IAA 的含量均呈现先升后降趋势,18 d 达到

最高值,而后下降。这可能与种子发育有关,种子早期形成与发育会合成大量游离态 IAA,成熟后,游离态 IAA 的含量迅速降低<sup>[23]</sup>,导致果实整组织游离态 IAA 的降低。在果实发育中后期,果实整组织的游离态 IAA 主要来源于果肉,野生西瓜游离态 IAA 的含量几乎降为零,而栽培品种仍维持较高含量的游离态 IAA。此时是栽培西瓜果肉中可溶性固形物迅速积累期(决定西瓜含糖量),游离态 IAA 可能是栽培西瓜果肉糖分积累的关键因素。总体上看,栽培西瓜在果实发育的各个阶段游离态 IAA 的含量显著高于野生西瓜,这与栽培西瓜同化物积累的能力显著高于野生型相吻合。

IAA 作为重要的植物激素,其含量的变化对植物生长发育有重要的影响。除了从头合成途径,从结合态 IAA 水解释放出有活性的 IAA 也是其重要来源,生长素酰胺水解酶 *ILL* 基因在此过程发挥了重要的作用<sup>[24-25]</sup>。最早在拟南芥发现并鉴定了生长素酰胺水解酶 *ILL* 基因<sup>[26]</sup>,后在许多植物中陆续发现 *ILL* 蛋白通过调控游离态 IAA 的释放调控了植物的众多发育过程。其中,桃 *ILL* 家族的 *PpILR1* 基因在桃果实成熟过程表达量上调了 9 倍,可能通过催化生长素氨基酸结合态水解的形式参与了溶质型桃果实成熟阶段生长素的跃变过程,进而调控桃果实发育过程<sup>[16]</sup>。目前 *ILL* 基因家族的功能研究还十分有限。

本研究从西瓜基因组数据库中鉴定出 6 个 *ILL* 家族成员,编码的氨基酸长度在 389 ~ 762 aa。qRT-PCR 结果显示,西瓜 *ILL* 家族基因中 *Cla017661*、*Cla011242* 及 *Cla012630* 在栽培西瓜果肉中的表达量,明显高于野生西瓜果肉,且在整个果实发育时期保持相对较高水平,这与栽培西瓜果实整组织游离态 IAA 的含量较高相一致。其中,分析发现 *Cla017661* 基因的表达量变化趋势与果实整组织游离态 IAA 的浓度变化趋势一致,推测该基因是调控西瓜果实生长素含量的关键基因。进化树结果显示,*Cla017661* 编码的蛋白与拟南芥 *ILR1* 亲缘关系较近。*ILR1* 主要水解 IAA-Leu 和 IAA-Phe<sup>[11]</sup>,推测 *Cla017661* 主要以 IAA-Leu 和 IAA-Phe 为底物,调节西瓜果实游离态 IAA 的含量,进而参与栽培西瓜可溶性固形物的积累。进一步对果实差异表达的 *ILL* 家族基因的功能开展解析,将会探明生长素调控

西瓜果实成熟及糖分积累的分子机制,本项研究为此奠定了良好工作基础。

### 参考文献:

- [1] Kumar R, Khurana A, Sharma A K. Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruits[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(16): 4561-4575.
- [2] De Jong M, Mariani C, Vriezen W H. The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(5): 1523-1532.
- [3] Devoghalare F, Doucen T, Guitton B, et al. A genomics approach to understanding the role of auxin in apple (*Malus x domestica*) fruit size control[J]. *BMC Plant Biology*, 2012, 12(1): 7.
- [4] Given N K, Venis M A, Gierson D. Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climacteric fruit[J]. *Plant*, 1988, 174(3): 402-406.
- [5] Cohen J D. *In vitro* tomato fruit cultures demonstrate a role for indole-3-acetic acid in regulating fruit ripening[J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 1996, 121(3): 520-524.
- [6] Normanly J, Cohen J D, Fink G R. *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993, 90(21): 10355-10359.
- [7] Campanella JJ, Ludwig-Mueller J, Town C D. Isolation and characterization of mutants of *Arabidopsis thaliana* with increased resistance to growth inhibition by indoleacetic acid-amino acid conjugates [J]. *Plant Physiology*, 1996, 112(2): 735-745.
- [8] Normanly J. Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism[J]. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2010, 2(1): a001594.
- [9] Woodward A W, Bartel B. Auxin: regulation, action, and interaction[J]. *Annals of Botany*, 2005, 95(5): 707-735.
- [10] Kinoshita N, Wang H, Kasahara H, et al. IAA-Ala Resistant3, an evolutionarily conserved target of miR167, mediates *Arabidopsis* root architecture changes during high osmotic stress[J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(9): 3590-3602.
- [11] LeClere S, Tellez R, Rampey R A, et al. Characterization of a family of IAA-amino acid conjugate hydrolases from *Arabidopsis* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(23): 20446-20452.
- [12] Rampey R A, LeClere S, Kowalczyk M, et al. A family of auxin-conjugate hydrolases that contributes to free indole-3-acetic acid levels during *Arabidopsis* germination [J]. *Plant Physiology*, 2004, 135(2): 978-988.
- [13] Strader L C, Culler A H, Cohen J D, et al. Conversion of endogenous indole-3-butyric acid to indole-3-acetic acid drives cell expansion in *Arabidopsis* seedlings [J]. *Plant Physiology*, 2010, 153(4): 1577-1586.
- [14] Schuller A, Ludwig - Müller J. A family of auxin conjugate hydrolases from *Brassica rapa*: characterization and expression during clubroot disease [J]. *New Phytologist*, 2006, 171(1): 145-158.
- [15] Campanella JJ, Smith S M, Leibu D, et al. The auxin conjugate hydrolase family of *Medicago truncatula* and their ex-

- pression during the interaction with two symbionts[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2008, 27(1): 26-38.
- [16] Guo S, Sun H, Zhang H, et al. Comparative transcriptome analysis of cultivated and wild watermelon during fruit development[J]. Plos One, 2015, 10(6): e0130267.
- [17] 潘磊, 曾文芳, 牛良, 等. 桃生长素酰胺水解酶基因家族序列特征及其表达分析[J]. 园艺学报, 2015, 42(2): 243-251.
- [18] Pandolfini T, Rotino G L, Camerini S, et al. Optimisation of transgene action at the post-transcriptional level: high quality parthenocarpic fruits in industrial tomatoes[J]. BMC biotechnology, 2002, 2(1): 1-11.
- [19] Wang H, Schauer N, Usadel B, et al. Regulatory features underlying pollination-dependent and-independent tomato fruit set revealed by transcript and primary metabolite profiling[J]. The Plant Cell, 2009, 21(5): 1428-1452.
- [20] Miyazawa Y, Sakai A, Miyagishima S, et al. Auxin and cytokinin have opposite effects on amyloplast development and the expression of starch synthesis genes in cultured bright yellow-2 tobacco cells[J]. Plant Physiology, 1999, 121(2): 461-470.
- [21] Sagar M, Chervin C, Mila I, et al. Sl-ARF4, an auxin response factor involved in the control of sugar metabolism during tomato fruit development[J]. Plant Physiology, 2013, 161: 1362-1374.
- [22] Chomicki G, Renner S S. Watermelon origin solved with molecular phylogenetics including Linnaean material: another example of museomics[J]. New Phytologist, 2015, 205(2): 526-532.
- [23] Tiwari A, Vivian-Smith A, Ljung K, et al. Physiological and morphological changes during early and later stages of fruit growth in *Capsicum annuum*[J]. Physiologia Plantarum, 2013, 147(3): 396-406.
- [24] Korasick D A, Enders T A, Strader L C. Auxin biosynthesis and storage forms[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(9): 2541-2555.
- [25] Ljung K. Auxin metabolism and homeostasis during plant development[J]. Development, 2013, 140(5): 943-950.
- [26] Bartel B, Fink G R. ILR1, an amidohydrolase that releases active indole-3-acetic acid from conjugates[J]. Science, 1995, 268(5218): 1745-1748.

## Expression Analysis of IAA-amino Acid Hydrolases Genes in the Development of Watermelon Fruits

GAO Qiang<sup>1</sup>, TIAN Shou-wei<sup>2</sup>, ZHANG Jie<sup>2</sup>, WANG Yan-ping<sup>2</sup>, SUN Hong-he<sup>2</sup>, ZHANG Hai-ying<sup>2</sup>, XU Yong<sup>2</sup>

(1. College of Plant Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; 2. National Engineering Research Center for Vegetables, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (North China), Beijing Key Laboratory of Vegetable Germplasm Improvement, Beijing 100097, China)

**Abstract:** Auxin plays an important role in the development and maturation of plant fruit, but the molecular mechanism of auxin in regulating the development and maturity of watermelon fruit is still not clear. In this study, the free IAA content of whole fruit tissue was measured and compared between cultivated watermelon 97103 which presents high sugar content and wild watermelon PI296341-FR which presents low sugar content. The results showed that in fruit the content of free IAA increased with the development of watermelon fruit, and reached its peak on the 18 day after pollination, and then gradually decreased in the later period. The free IAA content of the watermelon fruit with high sugar content was significantly higher than that of the wild watermelon with low sugar content at all stages of fruit development, indicating that the IAA accumulation of free fruit was related to fruit maturity and sugar accumulation. Studies have shown that IAA-Leucine Resistant1-like Hydrolase (ILL) which were rate-limiting enzymes in the accumulation of free auxin released free auxin by hydrolyzing IAA-amino acid hydrolases. In this study, we analyzed the phylogenetic tree of the ILL gene family in the whole genome of watermelon, and the gene expression of each tissue in watermelon by qRT-PCR. It was found that only 4 ILL genes were expressed in the flesh of watermelon, and the expression of the four genes in the cultivated watermelon was significantly higher than that of the wild watermelon. Among them, the expression of *Cla017661* in the cultivated watermelon flesh was the highest, and it was positively related to the variation trend of free IAA content in the fruit, suggesting that *Cla017661* was crucial in the accumulation of free IAA in cultivated watermelon and regulated the evolution of development and maturation of watermelon fruit.

**Keywords:** auxin; watermelon; free; IAA; IAA-amino acid hydrolases

(该文作者还有宫国义、周明, 单位同第二作者)