

# 南瓜砧木嫁接对低温下西瓜幼苗耐冷性、 光合作用及抗逆基因表达的影响

鲁军阳 高敏 卫楠楠 程菲 别之龙

华中农业大学园艺林学学院/园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070

**摘要** 为阐明南瓜砧木嫁接诱导西瓜幼苗产生低温抗性的适应机制,研究了南瓜砧木‘青研1号’嫁接对低温10℃/5℃(昼/夜)胁迫下西瓜自交系‘97103’幼苗生长、叶绿素荧光、光合气体交换、卡尔文循环和抗逆相关基因表达的影响。结果表明:低温胁迫下西瓜自嫁接苗PSⅡ最大量子产量( $F_v/F_m$ )等叶绿素荧光参数与常温对照相比显著下降。低温处理5d后,西瓜自嫁接苗和南瓜砧木嫁接苗PSⅡ有效量子产量( $\Phi_{PSⅡ}$ )与常温对照相比分别下降92.9%和59.2%。南瓜砧木嫁接有效延缓了低温引起的PSⅡ损伤,同时促进卡尔文循环关键基因核酮糖-1,5-二磷酸羧化/加氧酶(Rubisco)大亚基基因(*rbcL*)、3-磷酸甘油酸激酶基因(*PGK*)、磷酸核酮糖激酶基因(*PRK*)、果糖1,6-二磷酸激酶基因(*FBPase*)转录水平显著增加,保持低温下较高水平的CO<sub>2</sub>同化速率( $A_{sat}$ )。此外,南瓜砧木嫁接促使低温下西瓜叶片蒸腾速率下降,减缓叶片萎蔫、皱缩,同时诱导谷胱甘肽过氧化物酶(*GPX*)、抗坏血酸过氧化物酶(*tAPX*)、谷胱甘肽还原酶(*GR*)和脱水蛋白(*ERD10*)等9个抗逆相关酶基因上调表达,增强了植株抗氧化能力。低温处理5d后,西瓜自嫁接苗和南瓜砧木嫁接苗冷害指数分别为61.1%和22.2%,全株干质量与对照相比分别下降61.0%和33.2%。南瓜砧木嫁接通过调节蒸腾作用,减少水分散失,促进卡尔文循环关键基因和抗逆相关基因表达,减缓PSⅡ光抑制,减轻膜脂过氧化损伤,增强西瓜对低温的适应能力。

**关键词** 西瓜; 南瓜砧木; 嫁接; 低温胁迫; 光合作用; 叶绿素荧光参数; 抗逆基因

**中图分类号** S 651.604.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)02-0055-10

西瓜(*Citrullus lanatus*)是世界范围内广泛种植的葫芦科西瓜属草本作物,喜温耐热。我国是世界上西瓜栽培面积最大、产量最高的国家,早春设施栽培在西瓜栽培中具有重要地位。西瓜在整个生长发育期不耐低温,10℃以下低温即造成严重冷害<sup>[1-2]</sup>。由于西瓜遗传背景狭窄,目前还没有果实品质优良且生育期耐低温的西瓜品种。因此,低温胁迫已成为限制我国早春设施栽培西瓜高产、优质的重要因素。

嫁接技术广泛应用于园艺生产,是增强作物抗逆性、促进水肥吸收、增加产量、改善果实品质的有效措施<sup>[3-5]</sup>。嫁接在西瓜生产中常用于防止土传病害,促进营养吸收,增强高、低温抗性等<sup>[3,6-7]</sup>。在辣椒<sup>[8]</sup>、茄子<sup>[9]</sup>、番茄<sup>[10]</sup>、黄瓜<sup>[11-13]</sup>以及甜瓜<sup>[14]</sup>上的研究发现,采用适宜的砧木嫁接能有效增强作物低温

抗性,主要表现为降低冷害指数,提高低温胁迫下抗氧化酶系统活性<sup>[8-9]</sup>,减少活性氧积累;提高CO<sub>2</sub>羧化效率<sup>[9,11]</sup>,保持较高的光合水平。嫁接黄瓜的蛋白组学研究发现两大类不同的蛋白分别参与抗逆调节和光合作用<sup>[15]</sup>。徐晓昀等<sup>[16]</sup>报道在嫁接黄瓜中核酮糖-1,5-二磷酸羧化/加氧酶(Rubisco)等卡尔文循环关键酶基因在低温下表达量下降以适应同化力的减少。Xu等<sup>[7]</sup>在嫁接西瓜低温响应转录组中的研究发现,热激蛋白基因(*HSP*)等抗逆相关基因参与低温抗性调节。王红艳等<sup>[17]</sup>发现低温下嫁接甜瓜中超氧化物歧化酶(*SOD*)、过氧化氢酶(*CAT*)等基因表达量显著上调并促进相应酶活性的增加以提高低温抗性。

本研究探讨南瓜砧木嫁接对低温胁迫下西瓜幼苗生长、叶绿素荧光、光合气体交换、抗逆相关基因

收稿日期: 2018-08-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(31501783); 国家西瓜产业技术体系项目(CARS-25); 国家重点研发计划项目(2016YFD0201008)

鲁军阳, 博士研究生, 研究方向: 蔬菜抗逆调控. E-mail: jyly@mail.hzau.edu.cn

通信作者: 程菲, 博士, 副教授, 研究方向: 蔬菜逆境生理与生长发育调控. E-mail: feicheng@mail.hzau.edu.cn

以及卡尔文循环关键基因表达水平的影响,从光合生理及基因表达方面揭示南瓜砧木嫁接提高西瓜低温抗性的作用机制,为嫁接提高作物低温抗性的深入研究提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料及处理

以西瓜自交系 [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai var. *lanatus*] ‘97103’为接穗,‘青研 1 号’南瓜为砧木,构建南瓜砧木嫁接苗 (*Cl/Cl*),并以西瓜 ‘97103’ 自根嫁接苗 (*Cl/Cl*) 作对照。采用顶插接法嫁接,于 28 °C/18 °C (昼/夜)、光周期 12 h/12 h、光强 300  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、湿度 70%~85% 的对照环境下育苗,至接穗长至 4 叶 1 心时进行低温处理。温度设置为 10 °C/5 °C (昼/夜),其他条件同对照环境。低温处理 0、1、3、5 d 测定冷害指数、电解质渗透率、叶绿素荧光和光合气体交换参数并取样,液氮冷冻后保存于 -80 °C 冰箱,待测。每个处理设 4 个重复,每个重复由 6 株西瓜幼苗组成。

### 1.2 冷害指数测定

冷害指数参照 Yang 等<sup>[18]</sup> 的方法进行测定,将冷害症状分为 6 级 (0~5 级),冷害指数 =  $\sum(\text{各级株数} \times \text{级数}) / (5 \times \text{总株数}) \times 100\%$ ,每个处理统计 30 株。

### 1.3 电解质渗透率测定

叶片电解质渗透率的测定参照 Hong 等<sup>[19]</sup> 的方法并加以改进。取 0.1 g 新鲜叶片,用去离子水清洗干净,剪成约 1  $\text{cm}^2$  的碎片,加入超纯水 10 mL,室温 25 °C 下 200 r/min 摇晃 2 h,静置,测定溶液的电导率 EL1,随后将样品 100 °C 水浴 15 min,冷却到室温后再次测定溶液的电导率 EL2。电解质渗透率  $\text{EL} = \text{EL1} / \text{EL2} \times 100\%$ 。

### 1.4 MDA 含量测定

MDA 含量的测定参考 Hodges 等<sup>[20]</sup> 的方法。

### 1.5 叶绿素荧光参数测定

叶绿素荧光参数使用 Imaging-PAM 调制荧光成像系统 (IMAG-MAXI; Heinz Walz, Effeltrich, Germany) 进行测定。选取自植株基部第 3 片完全展开的功能叶进行测定。植株暗适应 0.5 h 后,光化光强度和饱和光强度分别设为 280 和 4 000  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。PSII 最大量子产量 ( $F_v/F_m$ )、PSII 有

效量子产量 ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ) 和光化学猝灭 (qP) 参照 Van Kooten 等<sup>[21]</sup> 的方法进行测定和计算。光保护重要指标  $\Phi_{\text{NPQ}}$ 、光损伤重要指标  $\Phi_{\text{NO}}$  参照 Kramer 等<sup>[22]</sup> 的方法进行计算,其中  $\Phi_{\text{PSII}} + \Phi_{\text{NPQ}} + \Phi_{\text{NO}} = 1$ 。

### 1.6 光合气体交换参数测定

用 LI-6400XT 型光合仪 (LI-COR, Lincoln, NE, USA) 测定饱和光强下的  $\text{CO}_2$  同化速率 ( $A_{\text{sat}}$ )、气孔导度 ( $G_s$ )、胞间  $\text{CO}_2$  浓度 ( $C_i$ ) 和蒸腾速率 ( $T_r$ )。选取自植株基部第 3 片完全展开的功能叶进行测定。测定时环境条件如下:测定光源为红蓝光源,温度为 25 °C,光强为 1 000  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , $\text{CO}_2$  含量 400  $\mu\text{L}/\text{L}$ ,叶片温度 (25±1.5) °C,空气湿度 80%~90%。

### 1.7 植株干物质质量测定

低温处理 5 d 后,分别将待测植株地上部和地下部置于 105 °C 烘箱中杀青 30 min,然后 80 °C 烘干至恒质量,精确称质量。

### 1.8 叶片总 RNA 提取及基因表达分析

叶片总 RNA 提取按照 TransZol 试剂 (TransGen, 北京) 说明书进行,提取完成后溶解于无 RNA 的水中。质量合格的 RNA 采用 HisScrip II Q qRT SuperMix 反转录试剂盒 (Vazyme, 南京) 反转录得到 cDNA 作为实时荧光定量 PCR 的模板。

从葫芦科基因组数据库 (<http://cucurbitgenomics.org/search/genome/1>) 选取 9 个抗逆相关基因和 4 个 Calvin 循环关键基因并使用 GenScript 在线设计基因特异性引物 (<https://www.genscript.com/tools/real-time-pcr-tagman-primer-design-tool>) (表 1)。用单峰溶解曲线确认引物的扩增特异性。实时荧光定量 PCR 的反应体系为 10  $\mu\text{L}$ ,条件为 94 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 5 s;55 °C 退火 15 s;72 °C 延伸 5 s;40 个循环。内参基因为 *ClEF1a*、*ClACT* 和 *ClUBCP*<sup>[23]</sup>。基因表达水平参考  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法进行计算<sup>[24]</sup>,热图数值以  $\log_2$  对数表示。

### 1.9 数据处理与分析

试验结果为 4 次重复的平均值 ± 标准误 (mean ± SE)。采用 Microsoft Excel 软件统计数据,SPSS 17.0 软件对数据进行方差分析,运用 Duncan's 新复极差法进行差异显著性 ( $P < 0.05$ ) 检验,用 Origin 7.5 和 HemI 1.0.3 作图。

表1 qRT-PCR 基因特异性引物

Table 1 Gene-specific primers designed for qRT-PCR

| 基因名称<br>Gene name   | 基因 ID<br>Gene ID | 正向引物(5'-3')<br>Forward primer | 反向引物(5'-3')<br>Reverse primer |
|---|------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 抗坏血酸过氧化物酶基因<br><i>CltAPX</i> (thylakoid ascorbate peroxidase)   | Cla013927        | TCCCTTCAGGAGGCATTATC          | CACCAAGGTTGCTGAGTTTG          |
| 脱氢抗坏血酸还原酶基因<br><i>CIDHAR</i> (dehydroascorbate reductase)       | Cla013224        | AATTGCTCGCTTTCTCGTTT          | GTAATGGAAGCTTTGACGCA          |
| 谷胱甘肽 S-转移酶基因<br><i>CIGST</i> (glutathione S-transferase)        | Cla007826        | ATCCTCTGTTGCCTCGTGAT          | CCAACGAAGTTTCTCTTCTGG         |
| 谷胱甘肽过氧化物酶基因<br><i>CIGPX</i> (glutathione peroxidase)            | Cla011457        | TTGAGATTCTTGCAATTTCCG         | GCATTGTTTCCATTCACGTC          |
| 热激蛋白基因<br><i>ClHSP70</i> (heat shock protein gene)              | Cla018221        | GAAGGAGCTTGGAGACAAGG          | CAGCTGCATCACCTCTTGAT          |
| 脱水蛋白基因<br><i>ClERD10</i> (early responsive dehydrin)            | Cla021949        | GCGGAGTACGAGAACAAG            | ACGCCACTCTCTGAACTC            |
| 过氧化氢酶基因<br><i>CICAT</i> (catalase)                              | Cla023448        | TGCCGATACTCAGAGACACC          | TCATGAAACCCTCGTGGTGA          |
| 超氧化物歧化酶基因<br><i>ClSOD</i> (superoxide dismutase)                | Cla012125        | CATCAGAGGCTCCATCCAGT          | GGACCTCCATGGTCCTTCTT          |
| 谷胱甘肽还原酶基因<br><i>CIGR</i> (glutathione reductase)                | Cla021430        | GGTTGACGGTGTACACAAA           | ACAGCGACTCCCTGCATAAT          |
| Rubisco 大亚基基因<br><i>ClrbcL</i> ( <i>rbcL</i> )                  | Cla003384        | AGCCGCGGTATTTATTTTAC          | AAAGTTCCTCCACCGAATTG          |
| 果糖-1,6-二磷酸激酶基因<br><i>ClFBPase</i> (fructose-1,6-bisphosphatase) | Cla018136        | GATGGCGTGTAAACAAATCG          | TTGGAGAACACCTCATTGGA          |
| 3-磷酸甘油酸激酶基因<br><i>ClPGKase</i> (glycerate-3-phosphate kinase)   | Cla013455        | AAGAGGCCATTTGCTGCTAT          | ATTCCACCACCGAGGAGTAG          |
| 磷酸核酮糖激酶基因<br><i>ClPRKase</i> (phosphoribulose kinase)           | Cla008848        | CGACGCATATATCGATCCAC          | TTCCTTCGTTGTCATTTGGA          |

## 2 结果与分析

### 2.1 南瓜砧木嫁接对西瓜幼苗冷害症状的影响

为了反映嫁接苗对低温胁迫的响应情况,按时间顺序依次统计冷害指数。如图1所示,随着低

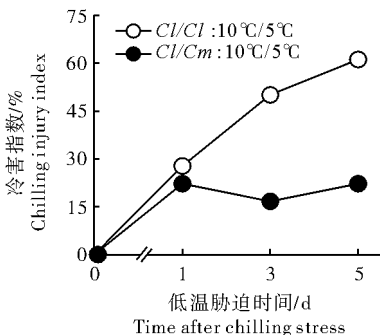


图1 南瓜砧木嫁接对低温胁迫下西瓜幼苗冷害指数的影响

Fig.1 Effects of pumpkin rootstock grafting on the chilling injury index of watermelon seedlings under chilling stress

温胁迫的持续,西瓜幼苗冷害指数不断增加。南瓜砧木嫁接苗在低温处理1 d时冷害指数为22.2%,并在随后的5 d内基本保持不变。而西瓜自嫁接冷害指数持续增加,并在低温处理5 d时达到61.1%,与南瓜砧木嫁接苗相比增加了1.8倍。

### 2.2 南瓜砧木嫁接对低温下西瓜幼苗干物质积累的影响

低温处理5 d时,西瓜自嫁接大部分叶片萎蔫死亡;而南瓜砧木嫁接苗只有少数叶片的边缘有略微的褶皱萎缩(图2)。由表2可知,南瓜砧木嫁接后显著提高了根冠比;常温下南瓜砧木嫁接苗地上部干质量略高于西瓜自嫁接。低温处理5 d后,西瓜自嫁接地上部干质量、地下部干质量和全株干质量与常温对照相比分别下降了61.3%、50.8%和61.0%;而南瓜砧木嫁接苗在低温处理5 d后地上部干质量、地下部干质量和全株干质量与常温对照

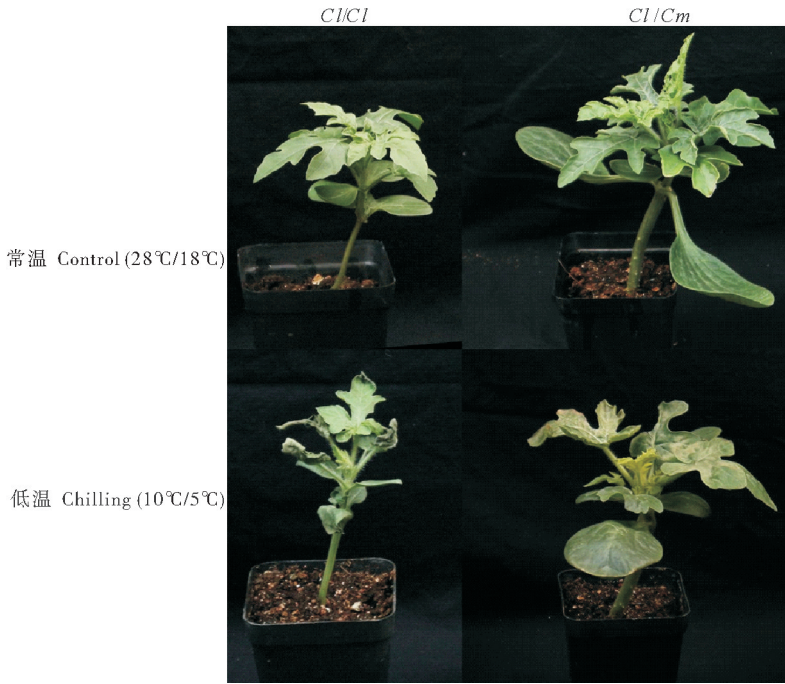


图 2 南瓜砧木嫁接对低温胁迫下西瓜幼苗冷害表型的影响

Fig.2 Effects of pumpkin rootstock grafting on the chilling injury phenotypes of watermelon seedlings under chilling stress

表 2 南瓜砧木嫁接对低温胁迫下西瓜幼苗干物质积累的影响

Table 2 Effects of pumpkin rootstock grafting on dry mass accumulation of watermelon seedlings under chilling stress

| 嫁接组合<br>Grafting combination | 温度处理<br>Treatment        | 单株地上部干质量/g<br>Shoot dry mass<br>per plant | 单株地下部干质量/g<br>Root dry mass<br>per plant | 全株干质量/g<br>Total dry mass<br>per plant | 根冠比<br>Root-shoot<br>ratio |
|------------------------------|--------------------------|---|--|--|----------------------------|
| 西瓜自嫁接<br>(CI/CI)             | 常温 Control (28 °C/18 °C) | 0.716±0.009a                              | 0.122±0.010c                             | 0.838±0.011b                           | 0.170±0.015b               |
|                              | 低温 Chilling (10 °C/5 °C) | 0.277±0.048c                              | 0.060±0.009c                             | 0.327±0.052c                           | 0.190±0.016b               |
| 南瓜砧木嫁接苗<br>(CI/Cm)           | 常温 Control (28 °C/18 °C) | 0.737±0.082a                              | 0.671±0.046a                             | 1.408±0.126a                           | 0.922±0.059a               |
|                              | 低温 Chilling (10 °C/5 °C) | 0.479±0.082b                              | 0.461±0.067b                             | 0.940±0.113b                           | 1.030±0.237a               |

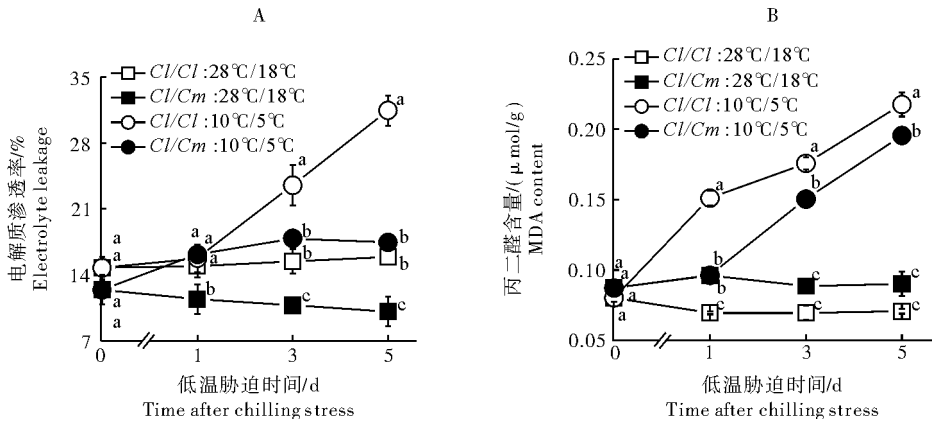
注:不同小写字母表示不同处理间差异显著( $P < 0.05$ )。Note: Different letters indicate the significant differences among various treatments at  $P < 0.05$ .

相比分别下降了35.0%、31.3%和33.2%，显著低于西瓜自嫁接降低水平，有效促进了低温下干物质的积累。

### 2.3 南瓜砧木嫁接对低温下西瓜幼苗电解质渗透率和丙二醛(MDA)含量的影响

为了分析低温对细胞膜完整性的影响，分别测定了电解质渗透率和丙二醛含量。结果如图3A所示，正常温度(28 °C/18 °C)条件下西瓜嫁接苗电解质渗透率基本保持不变，西瓜自嫁接苗电解质渗透率约为15.2%，南瓜砧木嫁接苗电解质渗透率约为11.1%。低温处理诱导电解质渗透率迅速增加，低温

处理5 d时西瓜自嫁接苗电解质渗透率增加至31.5%，比对照增加了1.0倍；南瓜砧木嫁接苗在低温处理5 d时增加至17.4%，比对照增加了0.7倍。同样的，正常温度下，西瓜自嫁接苗和南瓜砧木嫁接苗MDA含量分别约为0.07、0.09  $\mu\text{mol/g}$ ，低温下迅速增加，5 d时，西瓜自嫁接苗MDA含量积累至0.22  $\mu\text{mol/g}$ ，为对照的3.1倍，而此时南瓜砧木嫁接苗的含量为0.20  $\mu\text{mol/g}$ ，为对照的2.2倍(图3B)，显著低于西瓜自嫁接苗。



不同小写字母表示同一时间点不同处理间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下图同。Different letters indicate the significant differences among various treatments at the same time point ( $P < 0.05$ ). The same as follows.

图 3 南瓜砧木嫁接对低温胁迫下西瓜幼苗电解质渗透率(A)和MDA含量(B)的影响

Fig.3 Effects of pumpkin rootstock grafting on the electrolyte leakage(A) and MDA content(B) under chilling stress in watermelon seedlings

### 2.4 南瓜砧木嫁接对低温下西瓜幼苗叶绿素荧光参数的影响

PS II 对低温极其敏感,通过测定叶绿素荧光相关参数可以有效反映冷害发生情况,常通过测定叶绿素荧光 PS II 活性来评价植物低温抗性<sup>[25]</sup>。常温下,PS II 最大量子产量( $F_v/F_m$ )、PS II 有效量子产量( $\Phi_{PSII}$ )、光化学猝灭( $qP$ )和电子传递速率(ETR)在西瓜自嫁接和南瓜砧木嫁接苗中的水平相似,且在 5 d 之内基本保持不变。低温胁迫下,西瓜自嫁接苗  $F_v/F_m$ 、 $\Phi_{PSII}$ 、 $qP$  和 ETR 迅速下降,PS II 损伤逐渐增加。低温处理 5 d 后,西瓜自嫁接苗  $F_v/F_m$ 、 $\Phi_{PSII}$ 、 $qP$  和 ETR 与对照相比分别下降 93.6%、92.9%、100.0%和 92.9%,叶片基本死亡;而以上叶绿素荧光参数在低温处理 5 d 后的南瓜砧木嫁接苗中下降幅度较小,与对照相比分别下降 59.2%、59.2%、45.5%和 59.2%(图 4)。

分析低温处理 5 d 后 PS II 量子产量分配情况发现,常温下  $\Phi_{PSII}$ 、PS II 调节性能量耗散的量子产量( $\Phi_{NPQ}$ )和 PS II 非调节性能量耗散的量子产量( $\Phi_{NO}$ )在西瓜自嫁接和南瓜砧木嫁接苗中的分配比例相似。低温处理 5 d 后,西瓜自嫁接苗  $\Phi_{PSII}$  和  $\Phi_{NPQ}$  与对照相比分别下降 92.9%和 100.0%, $\Phi_{NO}$  增加 280.0%;而南瓜砧木嫁接苗  $\Phi_{PSII}$  和  $\Phi_{NPQ}$  与对照相比分别下降 59.2%和 59.2%, $\Phi_{NO}$  增加 104.1%,PS II 损伤程度显著低于西瓜自嫁接(图 5)。

### 2.5 南瓜砧木嫁接对低温下西瓜幼苗光合气体交换的影响

如图 6 所示,常温下西瓜自嫁接苗和南瓜砧木嫁接苗保持较高水平的光合能力,其饱和和光强下的  $CO_2$  同化速率( $A_{sat}$ )分别约为 8.56 和 9.55  $\mu mol/(m^2 \cdot s)$ ,同时南瓜砧木嫁接苗表现出较强的蒸腾作用。低温下西瓜自嫁接苗  $A_{sat}$ 、气孔导度( $G_s$ ) 86.0%和 81.3%;而南瓜砧木嫁接苗  $A_{sat}$ 、 $G_s$  和  $Tr$  与对照相比分别下降 81.8%、56.6%和 59.3%。低温处理和蒸腾速率( $Tr$ )均迅速下降,低温处理 5 d 后西瓜自嫁接苗  $A_{sat}$ 、 $G_s$  和  $Tr$  与对照相比分别下降 100.2%、诱导西瓜自嫁接苗和南瓜砧木嫁接苗胞间  $CO_2$  浓度( $C_i$ )均显著增加。

### 2.6 南瓜砧木嫁接对低温下西瓜幼苗卡尔文循环关键基因表达的影响

如图 7 所示,常温下西瓜自嫁接苗和南瓜砧木嫁接苗中卡尔文循环关键基因  $rbcl$ 、 $FBPase$ 、 $PGK$  和  $PRK$  表达量相似。低温诱导西瓜自嫁接苗中  $rbcl$  基因表达量下降, $FBPase$  和  $PGK$  基因转录水平略微增加,而  $PRK$  基因转录水平与常温对照相比差异不显著。相比而言,南瓜砧木嫁接诱导低温下  $rbcl$ 、 $FBPase$ 、 $PGK$  和  $PRK$  基因转录水平均显著上调,低温处理 5 d 时与对照相比分别上调 1.3、3.0、6.5 和 138.6 倍。

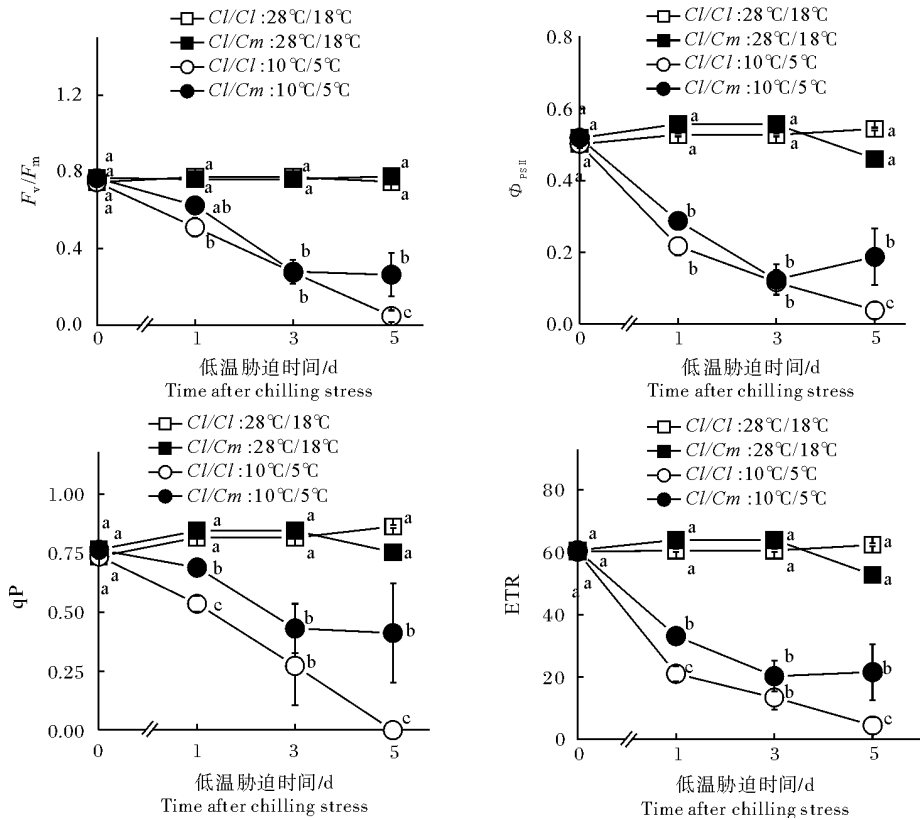


图 4 南瓜砧木嫁接对低温胁迫下西瓜幼苗叶绿素荧光参数的影响

Fig.4 Effects of pumpkin rootstock grafting on the chlorophyll fluorescence parameters under chilling stress in watermelon seedlings

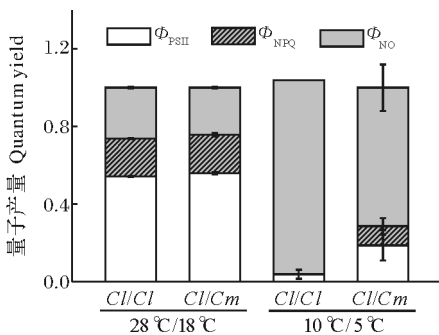


图 5 南瓜砧木嫁接对低温胁迫下西瓜幼苗 PS II 量子产量的影响

Fig.5 Effects of pumpkin rootstock grafting on the quantum yield of PS II under chilling stress in watermelon seedlings

## 2.7 南瓜砧木嫁接对抗逆相关基因表达的影响

为了研究嫁接苗中抗逆相关基因表达对低温的响应,检测了低温处理后 9 个抗逆相关基因转录水平的变化(图 8)。结果表明:西瓜自嫁接苗中抗逆相关基因表达对低温有不同程度的响应,以 *tAPX* 基因诱导表达最为显著,低温处理 3 d 时其表达量上

调 16.9 倍;而 *CAT*、*GPX*、*GST*、*HSP70* 等基因表达水平未发生明显变化。相比而言,低温下南瓜砧木嫁接苗中抗逆基因表达水平普遍显著上调,其中以 *GPX*、*tAPX*、*GR* 和 *ERD10* 基因表达量增加最为显著,低温处理 3 d 时表达量分别上调 292.6、74.0、47.6、59.8 倍。

## 3 讨论

低温胁迫会导致冷害甚至冻害的发生,植物光合作用对低温胁迫极其敏感。本研究表明,正常温度下,西瓜自嫁接苗与南瓜砧木嫁接苗的叶绿素荧光参数没有显著差异。低温诱导西瓜自嫁接苗中  $F_v/F_m$  和  $qP$  显著下降,说明 PS II 活性受到抑制并引起光化学荧光猝灭;同时,低温引起的  $\Phi_{PSII}$  和  $ETR$  的下降说明通过 PS II 的电子传递速率减慢,表明低温处理诱导植物线性电子传递和二氧化碳同化能力下降,进而引起 PS II 反应中心过剩激发能的积累,导致单线态氧和其他活性氧的产生并破坏 PS II 活性,引起 PS II 光抑制<sup>[26-28]</sup>。与西瓜自嫁接苗相比,南

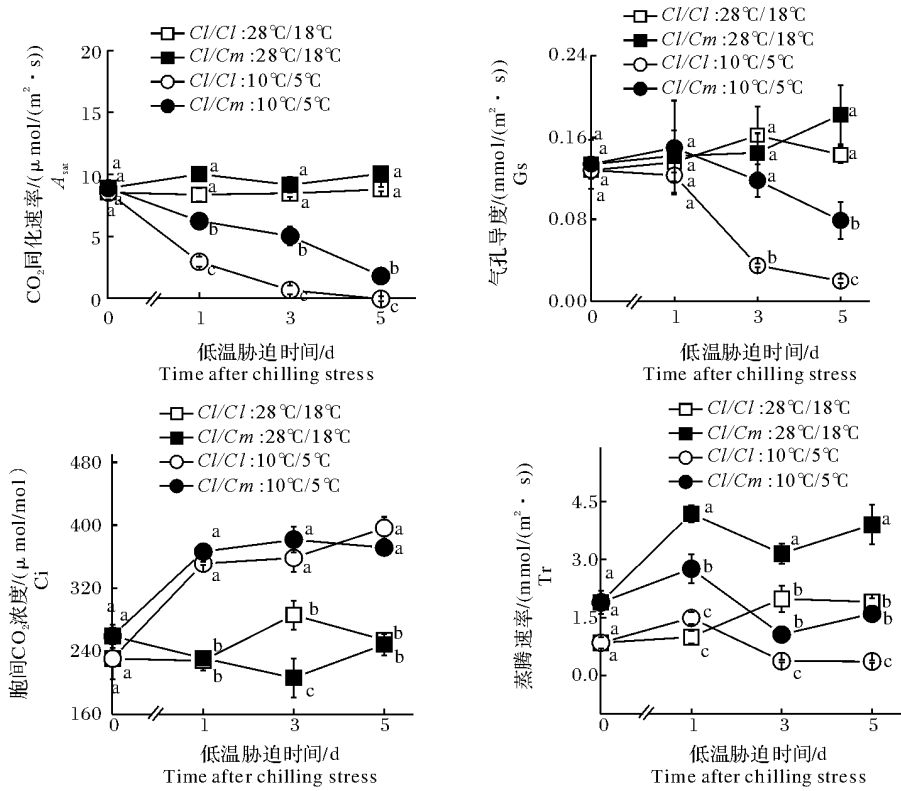


图 6 南瓜砧木嫁接对低温胁迫下西瓜幼苗光合气体交换的影响

Fig.6 Effects of pumpkin rootstock grafting on the photosynthetic gas exchange under chilling stress in watermelon seedlings

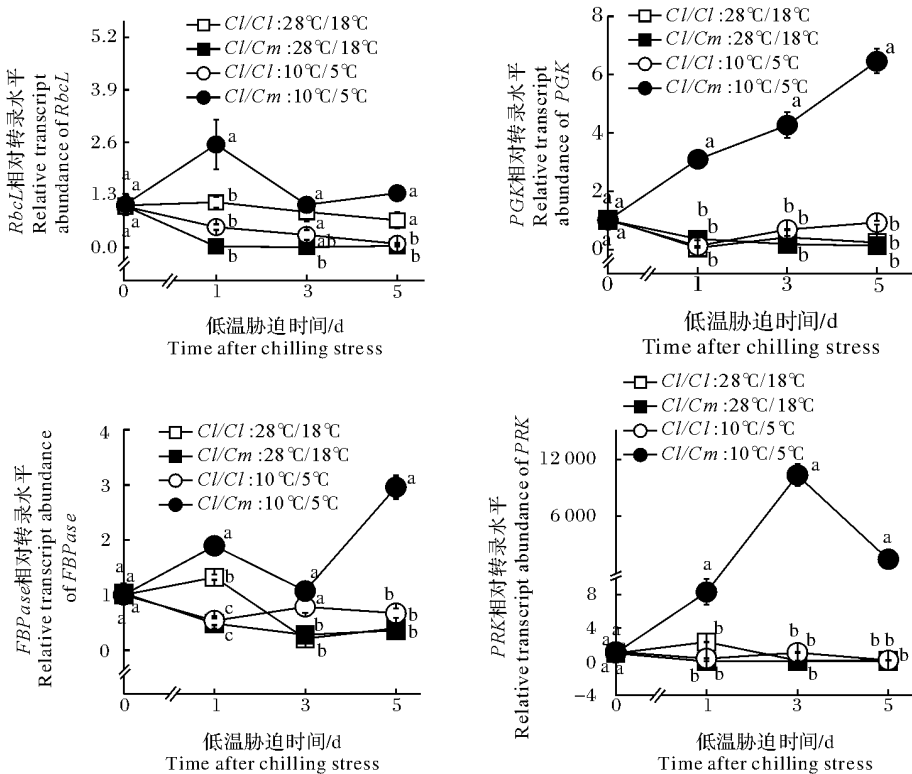


图 7 南瓜砧木嫁接对低温胁迫下西瓜幼苗卡尔文循环关键基因表达水平的影响

Fig.7 Effects of pumpkin rootstock grafting on the expression of key genes involved in Calvin cycle under chilling stress in watermelon seedlings

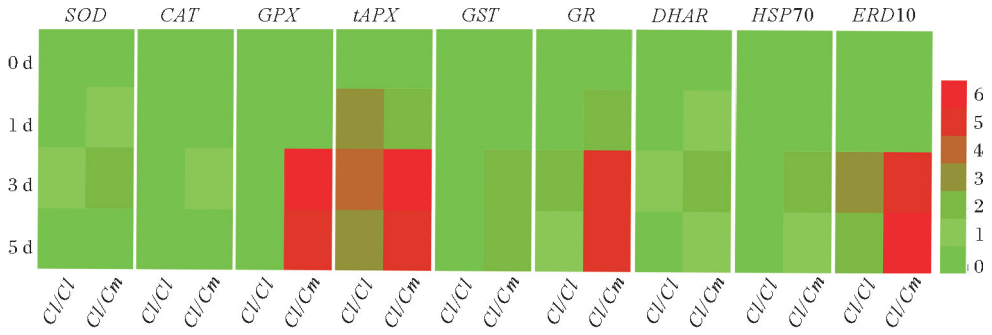


图 8 南瓜砧木嫁接对低温胁迫下西瓜幼苗抗逆相关基因表达的影响

Fig.8 Effects of pumpkin rootstock grafting on the expression of stress-tolerance genes under chilling stress in watermelon seedlings

瓜砧木嫁接苗在低温下保持了相对较高的 PS II 活性( $F_v/F_m$  和  $qP$  较高),提高了电子传递速率( $\Phi_{PSII}$  和 ETR 较高),促进光合电子传递的进行,为光合碳同化提供充足的化学能;并在长期低温胁迫中优势明显,抑制低温引起的光损伤( $\Phi_{NO}$  较低),促进多余光能的及时耗散,减轻了活性氧对光合机构的进一步破坏。光呼吸、梅勒反应(Mehler's reaction)、活性氧清除系统都是光保护的重要组成部分<sup>[28-30]</sup>,南瓜砧木嫁接诱导的光保护机制提高了低温下西瓜幼苗的光合适应能力,表现为南瓜砧木嫁接苗与西瓜自嫁接相比在低温下具有较高的  $CO_2$  同化速率,这与南瓜砧木嫁接后促进低温下卡尔文循环关键基因表达密切相关<sup>[16]</sup>。

低温下西瓜自嫁接叶片萎蔫、失水,而南瓜砧木嫁接苗可通过调节蒸腾作用,减少低温下叶片水分散失。同时,强健的南瓜根系促进水分以及养分向西瓜接穗转运,促进细胞内渗透调节物质积累,调节细胞渗透压,减少离子渗漏<sup>[31]</sup>。抗逆相关基因表达是植物产生低温适应性和抗逆性的关键。与前人在嫁接西瓜<sup>[7]</sup>、黄瓜<sup>[16,31]</sup>、甜瓜<sup>[17]</sup>中的研究结果相似,南瓜砧木嫁接促进低温胁迫下西瓜幼苗 GPX、tAPX、GR 和 ERD10 等抗逆基因的表达,有效减轻细胞膜脂过氧化损伤水平,缓解了低温引起的冷害症状。有研究表明,mRNA、转录因子或过氧化氢( $H_2O_2$ )等长距离移动信号在植物系统获得性适应性中发挥重要作用<sup>[32-34]</sup>,南瓜砧木中的某些长距离运输信号可能在低温下转运至西瓜接穗并调控下游抗逆相关基因表达,通过酶促和非酶促系统共同清除多余的活性氧,减轻细胞膜脂过氧化损伤<sup>[35-38]</sup>,避免活性氧对细胞内蛋白质等生物活性物质的毒性攻

击,维持细胞内正常的生命活动。

综上所述,南瓜砧木嫁接通过调节蒸腾作用,减少水分散失,促进卡尔文循环关键基因和抗逆相关基因表达,减缓 PS II 光抑制,减轻膜脂过氧化损伤,从而增强西瓜对低温的适应能力,并促进低温下西瓜幼苗生长。

## 参 考 文 献

- [1] 许勇,王永健,张峰,等.西瓜幼苗耐低温研究初报[J].华北农学报,1997,12(2):93-96.
- [2] 许勇,张海英,康国斌,等.西瓜野生种质幼苗耐冷性的生理生化特性与遗传研究[J].华北农学报,2000,15(2):67-71.
- [3] LEE J M, KUBOTA C, TSAO S J, et al. Current status of vegetable grafting: diffusion, grafting techniques, automation[J]. Scientia horticulturae, 2010, 127(2): 93-105.
- [4] SCHWARZ D, ROUPHAEL Y, COLLA G, et al. Grafting as a tool to improve tolerance of vegetables to abiotic stresses: thermal stress, water stress and organic pollutants[J]. Scientia horticulturae, 2010, 127(2): 162-171.
- [5] 卮兰春, 陈贵林, 赵丽丽. 西瓜嫁接苗生长发育特性的研究[J]. 中国西瓜甜瓜, 1999(1): 7-10.
- [6] 刘慧英. 嫁接影响西瓜果实品质和幼苗耐冷性的生理机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2003.
- [7] XU J H, ZHANG M, LIU G, et al. Comparative transcriptome profiling of chilling stress responsiveness in grafted watermelon seedlings[J]. Plant physiology and biochemistry, 2016, 109: 561-570.
- [8] 刘倩倩, 马寿宾, 冯希环, 等. 嫁接对高温和低温胁迫下辣椒幼苗快速叶绿素荧光诱导动力学特性的影响[J]. 园艺学报, 2016, 43(5): 885-896.
- [9] GAO Q H, WU Y, JIA S S, et al. Effect of rootstock on the growth, photosynthetic capacity and osmotic adjustment of eggplant seedlings under chilling stress and recovery[J]. Pakistan journal of botany, 2016, 48(2): 461-468.



- [10] VENEMA J H, DIJK B E, BAX J M, et al. Grafting tomato (*Solanum lycopersicum*) onto the rootstock of a high-altitude accession of *Solanum habrochaites* improves suboptimal-temperature tolerance[J]. Environmental and experimental botany, 2008, 63(1/2/3): 359-367.
- [11] ZHOU Y H, HUANG L F, ZHANG Y L, et al. Chill-induced decrease in capacity of RuBP carboxylation and associated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in cucumber leaves are alleviated by grafting onto figleaf gourd[J]. Annals of botany, 2007, 100(4): 839-848.
- [12] ZHOU Y H, ZHOU J, HUANG L F, et al. Grafting of *Cucumis sativus* onto *Cucurbita ficifolia* leads to improved plant growth, increased light utilization and reduced accumulation of reactive oxygen species in chilled plants[J]. Journal of plant research, 2009, 122(5): 529-540.
- [13] LI H, WANG F, CHEN X J, et al. The sub/supra-optimal temperature-induced inhibition of photosynthesis and oxidative damage in cucumber leaves are alleviated by grafting onto figleaf gourd/luffa rootstocks[J]. Physiologia plantarum, 2014, 152(3): 571-584.
- [14] 和红军. 低温胁迫对甜瓜幼苗生长及生理生化的影响[D]. 石河子: 石河子大学, 2008.
- [15] 李跃进, 梁根云, 刘小俊, 等. 黄瓜嫁接苗和自根苗的蛋白质组学研究[J]. 园艺学报, 2009, 36(8): 1147-1152.
- [16] 徐晓昀. 黄瓜嫁接苗对低温胁迫的生理响应及分子机制研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016.
- [17] 王红艳. 嫁接对甜瓜幼苗耐低温性及光合产物运转的影响[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2018.
- [18] YANG J H, GAO Y, LI Y M, et al. Salicylic acid-induced enhancement of cold tolerance through activation of antioxidative capacity in watermelon[J]. Scientia horticulturae, 2008, 118(3): 200-205.
- [19] HONG S W, LEE U, VIERLING E. *Arabidopsis* hot mutants define multiple functions required for acclimation to high temperatures[J]. Plant physiology, 2003, 132(2): 757-767.
- [20] HODGES D M, DELONG J M, FORNEY C F, et al. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds[J]. Planta, 1999, 207(4): 604-611.
- [21] VAN KOOTEN O, SNEL J F H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology[J]. Photosynthesis research, 1990, 25(3): 147-150.
- [22] KRAMER D M, JOHNSON G, KIIRATS O, et al. New fluorescence parameters for the determination of Q<sub>A</sub> redox state and excitation energy fluxes[J]. Photosynthesis research, 2004, 79(2): 209-218.
- [23] KONG Q S, YUAN J X, GAO L Y, et al. Identification of suitable reference genes for gene expression normalization in qRT-PCR analysis in watermelon[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e90612.
- [24] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [25] MURCHIE E H, LAWSON T. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications[J]. Journal of experimental botany, 2013, 64(13): 3983-3998.
- [26] NIYOGI K K. Safety valves for photosynthesis[J]. Current opinion in plant biology, 2000, 3(6): 455-460.
- [27] HENDRICKSON L, BALL M, OSMOND C B, et al. Assessment of photoprotection mechanisms of grapevines at low temperature[J]. Functional plant biology, 2003, 30: 631-642.
- [28] MURATA N, TAKAHASHI S, NISHIYAMA Y, et al. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress[J]. Biochimica et biophysica acta, 2007, 1767(6): 414-421.
- [29] 王国莉, 郭振飞. 植物低温光抑制及可能的光保护机制研究进展[J]. 广西植物, 2005, 25(4): 375-379.
- [30] 吴正锋, 孙学武, 左绍玲, 等. 荫蔽花生转入自然光照下光合作用的光抑制及光保护机制[J]. 中国油料作物学报, 2017, 39(5): 648-654.
- [31] 高俊杰, 秦爱国, 于贤昌. 低温胁迫下嫁接对黄瓜叶片 SOD 和 CAT 基因表达与活性变化的影响[J]. 应用生态学报, 2009, 20(1): 213-217.
- [32] CHEN X B, YAO Q F, GAO X H, et al. Shoot-to-root mobile transcription factor HY5 coordinates plant carbon and nitrogen acquisition[J]. Current biology, 2016, 26(5): 640-646.
- [33] HAM B K, LUCAS W J. Phloem-mobile RNAs as systemic signaling agents[J]. Annual review of plant biology, 2017, 68: 173-195.
- [34] NIU M L, HUANG Y, SUN S T, et al. Root respiratory burst oxidase homologue-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production confers salt tolerance on a grafted cucumber by controlling Na<sup>+</sup> exclusion and stomatal closure[J]. Journal of experimental botany, 2017, 69(14): 3465-3476.
- [35] SUN S, TIAN Y S, LENG D D, et al. Effects of different rootstocks on chilling-tolerance of grafted watermelon seedlings[J]. Chinese journal of ecology, 2009, 28(8): 1561-1566.
- [36] LI J Y, TIAN H X, LI X G, et al. Higher chilling-tolerance of grafted-cucumber seedling leaves upon exposure to chilling stress[J]. Agricultural sciences in China, 2008, 7(5): 570-576.
- [37] 王喜庆, 齐秀兰, 刘力勇, 等. 低温胁迫对嫁接西瓜幼苗耐冷性和生理生化指标的影响[J]. 北方园艺, 2008(7): 52-55.
- [38] 吕星光, 周梦迪, 李敏. 低温胁迫对甜瓜嫁接苗及自根苗光合及叶绿素荧光特性的影响[J]. 植物生理学报, 2016, 52(3): 334-342.

## Effects of pumpkin rootstock grafting on cold tolerance, photosynthesis and expression of stress-tolerance genes of watermelon seedlings under chilling stress

LU Junyang GAO Min WEI Nannan CHENG Fei BIE Zhilong

Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education/  
College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University,  
Wuhan 430070, China

**Abstract** The effects of pumpkin rootstock ('Qingyan No.1') grafting on growth, chlorophyll fluorescence, photosynthetic gas exchange, expression of Calvin cycle and stress-tolerance genes of watermelon ('97103') seedlings under chilling stress (10 °C/5 °C) were studied to clarify the mechanism of photosynthetic adaptation involved in chilling tolerance in pumpkin rootstock-grafted watermelon seedlings. The results showed that the chlorophyll fluorescence parameter such as maximum quantum yield of PS II ( $F_v/F_m$ ) in self-grafted watermelon decreased significantly under chilling stress in comparison with control. After 5 days of chilling stress, the effective quantum yield of PS II ( $\Phi_{PSII}$ ) in self-grafted watermelon seedlings and pumpkin rootstock-grafted seedlings decreased by 92.9% and 59.2% compared with the control. Pumpkin rootstock grafting effectively delayed the damage of PS II induced by chilling and promoted the expression of key genes including *Rubisco large subunit (rbcL)*, glycerate-3-phosphate kinase (*PGK*), phosphoribulose kinase (*PRK*), and Fructose-1,6-bisphosphatase (*FBPase*) involved in Calvin cycle. A higher  $CO_2$  assimilation rate ( $A_{sat}$ ) in pumpkin rootstock-grafted seedlings under chilling stress was observed, which was attributed to the enhanced expression of 9 stress-tolerance genes including *GPX*, *tAPX*, *GR*, and *ERD10*. After 5 days of chilling treatment, the chilling injury index of self-grafted watermelon seedlings and pumpkin rootstock-grafted seedlings were 61.1% and 22.2%, respectively. The whole plant dry weight was decreased by 61.0% and 33.2%, respectively compared with the control. It is indicated that pumpkin rootstock grafting reduces the water loss by regulating transpiration, up-regulates the expression of key genes involved in Calvin cycle and stress-tolerance, thus alleviates photoinhibition of PS II and reduces the damage of membrane lipid peroxidation to enhance the adaptability of watermelon under chilling stress.

**Keywords** watermelon; pumpkin rootstock; grafting; chilling stress; photosynthesis; chlorophyll fluorescence parameters; stress-tolerance genes

(责任编辑:张志钰)