

# 鸡粪及其配施尿素对甜瓜香味物质、酶活性及基因表达的影响

靳亚忠<sup>1</sup>, 陈业雯<sup>1</sup>, 陆森<sup>1</sup>, 张森<sup>1</sup>, 兰慧<sup>1</sup>, 何淑平<sup>1</sup>, 齐红岩<sup>2</sup>

(1. 黑龙江八一农垦大学园艺园林学院, 黑龙江 大庆 163319; 2. 沈阳农业大学园艺学院, 辽宁 沈阳 110866)

**摘要:**为了探讨鸡粪以及鸡粪与尿素配施对薄皮甜瓜果实香气物质合成及关键酶的影响,以薄皮甜瓜“DX108”为试材,以尿素为氮源的处理作为对照(CK),研究等量氮素条件下,鸡粪及其与尿素配施处理对甜瓜果实香气物质以及相关酶活性变化的影响,并分析了乙醇脱氢酶(ADH)和醇酰基转移酶(AAT)基因的表达水平。结果表明:不同处理对薄皮甜瓜香气物质合成、相关酶活性以及关键酶基因表达的影响存在明显差异;尿素处理促进了甜瓜果实中C6和C9醇醛类化合物的合成,而鸡粪以及鸡粪与尿素配施提高了成熟果实中酯类物质含量和种类,尤其是乙酸酯类含量;鸡粪配施尿素处理提高了花后35 d甜瓜果实中非乙酸酯类物质含量,且是尿素处理花后35 d甜瓜果实中非乙酸酯类物质含量的3.1倍,还检测到了尿素处理果实中没有检测到的特征性酯类物质;鸡粪和鸡粪配施尿素处理提高了花后25~30 d果实中LOX酶、氨基转移酶、ADH酶以及AAT酶活性,降低了花后35 d果实中ADH酶活性,抑制了30 d后果实中CmADH1和ADH2的基因表达,而促进了CmAAT1和CmAAT3基因表达。由此可知,鸡粪以及鸡粪与尿素配施有可能是通过调节果实不同发育期香味物质合成途径中关键酶活性的协调变化以及关键酶基因表达,影响了果实香气物质的合成,尤其是酯类物质的合成。

**关键词:**薄皮甜瓜;鸡粪;酶活性;香味物质;基因表达

**中图分类号:**S652 **文献标志码:**A

## Effect of chicken manure and its co-application with urea on aroma substances, aroma-related enzyme activities and gene expression of oriental melon

JIN Yazhong<sup>1</sup>, CHEN Yewen<sup>1</sup>, LU Miao<sup>1</sup>, ZHANG Sen<sup>1</sup>, LAN Hui<sup>1</sup>, HE Shuping<sup>1</sup>, Qi Hongyan<sup>2</sup>

(1. College of Horticulture and Landscape Architecture, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China;

2. College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866, China)

**Abstract:** An experiment was conducted to study the effects of chicken manure and its co-application with urea on aroma components, aroma-related enzyme activities, and gene expression of oriental melon with urea treatment as control under the same amount of nitrogen. The oriental melon cultivar “DX108” was used as experimental material. Aroma compositions and aroma-related enzyme activities in oriental melon fruits were investigated, and the expression levels of related genes from melon fruits under the different treatments, including alcohol dehydrogenase (ADH) and alcohol acyltransferase (AAT), were analyzed. The results showed that there were significant differences in the contents of aromatic compounds and aroma-related enzyme activities, and gene expression of oriental melon fruits. Urea treatment promoted the syntheses of C6 and C9 alcohols and aldehydes in melon fruit, however, the kinds and content of esters were significantly increased by chicken manure and chicken manure co-application with urea treatment, especially acetate esters. Furthermore, the content of non-acetate esters in fruits of chicken manure co-application with urea treatment was 3.1 times higher than that in fruits of urea treatment at day 35 after

收稿日期:2018-12-13

修回日期:2019-01-13

基金项目:现代农业产业技术体系国家西甜瓜产业技术体系(CARS-25);博士科研启动基金(XDB2015-01);黑龙江省自然科学基金项目(C2016039)

作者简介:靳亚忠(1975-),男,黑龙江大庆人,副教授,主要从事木霉菌开发及应用研究、设施蔬菜栽培生理学研究及采后果蔬品质分子生物学研究。E-mail: jyz\_hsp@126.com

anthesis, and some characteristic esters were synthesized in fruits under the co-application treatment and chicken manure treatment, which were not observed in fruits from urea treatment. Both chicken manure and the co-application treatments increased the activities of lipoxygenase (LOX), aminotransferase, ADH, and AAT in fruits from day 25 to 30 during the development stage but reduced the activities of ADH in fruits at day 35 after anthesis. Meanwhile, the expressions of CmADH1 and CmADH2 in fruits with chicken manure and the co-application were suppressed, nevertheless the expressions of CmAAT1 and CmAAT3 were increased after day 30 during the development stage. In summary, either chicken manure or chicken manure co-applied with urea treatments may regulate the coordinated changes of aroma-related enzyme activities and gene expression of the aroma synthesis pathway of fruits at different developmental stages, which further affects the synthesis of fruit aroma substances, especially the synthesis of esters.

**Keywords:** oriental sweet melon; chicken manure; enzyme activities; aroma substance; gene expression

薄皮甜瓜(*Cucumis melo* var. *makuwa* Makino), 一种重要的甜瓜栽培品种类型,其成熟果实香味浓郁、脆甜多汁、口感优良,是一种良好的消暑水果,深受消费者的喜爱。香味物质是衡量甜瓜风味品质的重要指标之一,且果实中香味的浓烈程度受挥发性物质的种类、含量和组成的影响<sup>[1-5]</sup>。甜瓜果实香味物质主要包括酯类、醇类、醛类、酮类、酸以及含硫化合物等<sup>[3,5-6]</sup>。许多研究已表明薄皮甜瓜成熟果实中主要呈香物质是酯类物质,其中乙酸乙酯、乙酸己酯、乙酸正己酯、乙酸-2-甲基-1-丁酯、乙酸苯甲酯、2-甲基丁酸乙酯、异丁酸乙酯、乙酸-2-甲基丙酯等为其果实特征性香气物质<sup>[1-2,4]</sup>。此外,甜瓜品种、果实成熟度、果实部位、嫁接以及外源物质等影响了果实中香气物质的种类、含量及其组分比例,进而导致了香味的差异<sup>[3-4,7-9]</sup>。在番茄<sup>[10-11]</sup>、桃<sup>[12-15]</sup>、蓝莓<sup>[16]</sup>、烤烟<sup>[17]</sup>中的研究也表明外源物质处理、贮藏、栽培措施、光质、施肥等措施促进或抑制了果实或烟草中香气物质的合成。

甜瓜属于喜肥作物,对氮、钾的需求量较多,但是在设施栽培中,一定的氮肥施用范围内,氮肥可以提高甜瓜果实产量,而过量施用氮肥却降低了产量以及可溶性糖分含量、Vc等品质指标<sup>[18]</sup>;此外,潜宗伟等<sup>[19]</sup>研究发现水培营养液中100%氮素用量处理的甜瓜果实中乙酸丁酯、乙酸-2-甲基丙基酯和2-甲基丁酸乙酯等特征性香气物质含量最高,但随着氮素用量的增加,这些特征性酯类物质含量则有所降低。在烟叶中也发现,氮肥过量施用降低了相同节位叶片中特征性香味物质——茄酮和新植二烯的含量<sup>[17,20]</sup>。为了提高生产中的肥料利用以及果实品质,国家实行了减肥减药的战略计划,利用有机肥进行化学氮肥的替代是策略之一。在红富士苹果栽培中,有机肥替代化肥使用,提高了果

实中特征香气物质——乙酸己酯、丁酸己酯、丁酸-2-甲基己酯的含量,并促进了(S)-2-甲基-1-丁醇和(E)-2-己烯醛的合成,提高了苹果风味品质<sup>[21]</sup>;在鸭梨栽培中,施用有机肥提高了果实总糖和总酸含量,也提高了果实中香气物质种类和含量,尤其是特征性香气物质——乙酸己酯、丙酸乙酯、2-甲基丙酸乙酯、2-甲基丁酸乙酯、丁酸乙酯、戊酸乙酯、己酸乙酯、 $\alpha$ -法尼烯的含量,且赋予了果实果香味<sup>[22]</sup>。有机肥改变了桃果实香气物质种类和含量,尤其是提高了特征性香气物质——内脂的种类和含量,降低了C6醇类和醛类物质合成,促进了果实甜香味和果香味的形成<sup>[23-24]</sup>,鸡粪的使用促进了肥城桃果实特征性酯类——乙酸丙酯、甲酸甲酯、乙酸己酯和丙酸甲酯的合成<sup>[24]</sup>。此外,利用有机肥替代化学氮肥提高了烟叶特征性香味物质——新植二烯、法尼基丙酮、茄酮、苯乙醇的含量<sup>[25]</sup>。由此可知,有机肥的使用可以改变果实香气物质的种类、含量以及组分比例,进而影响果实的香味,但是有机肥是如何通过香气物质代谢途径调节其合成,鲜有报道。在甜瓜果实中,许多研究已经表明甜瓜果实香气物质的合成与脂氧合酶(LOX)、氢过氧化物裂解酶(HPL)、乙醇脱氢酶(ADH)、醇酰基转移酶(AAT)、氨基转移酶等酶活性及其基因家族成员相关<sup>[9,26-31]</sup>,但是有机肥如何影响香气物质代谢途径中关键酶活性及酶基因的表达,进而调控香气物质的合成,还未见报道。因此,本试验研究采用基质栽培的方式,以薄皮甜瓜“DX108”为试材,研究鸡粪替代或与尿素配施对甜瓜果实香气物质合成的影响,旨在探讨鸡粪调控甜瓜果实香气物质合成的可能生理机理,为有机肥替代化学氮肥在甜瓜优质绿色栽培中的应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

盆栽试验采用基质栽培的方式进行,基质为草炭:河沙=3:1比例配置的混合基质,每桶装填 10 kg 基质。供试薄皮甜瓜为黑龙江八一农垦大学园艺系甜瓜课题组繁育的“DX108”自交系品种(花后 30~33 d 成熟),采用穴盘进行育苗,当幼苗长出第 4 片真叶时,选取生长大小基本一致、无病虫害的幼苗定植于桶中进行种植,每桶定植 1 株甜瓜幼苗。

供试肥料为常规肥料:尿素(含 N 为 46%)、含磷( $P_2O_5$ ) 46.0% 和含 N 21.2% 的磷酸二铵和含钾( $K_2O$ ) 34.3% 的硫酸钾;试验用鸡粪为商品鸡粪,含全氮 1.46%,含磷( $P_2O_5$ ) 0.74%,含钾( $K_2O$ ) 0.75%,由黑龙江牧康牧业有限公司提供。

### 1.2 试验设计

试验设置为对照(CK)为化学肥料处理(纯 N  $600\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $P_2O_5$   $300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  和  $K_2O$   $300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),该处理中尿素用量为  $10\text{ g}\cdot\text{pot}^{-1}$ 、磷酸二铵用量为  $6.52\text{ g}\cdot\text{pot}^{-1}$ 、硫酸钾用量为  $8.74\text{ g}\cdot\text{pot}^{-1}$ ; A 处理为纯 N  $300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ +鸡粪(纯 N  $300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),其中鸡粪的用量为  $205\text{ g}\cdot\text{pot}^{-1}$ ,尿素的用量为  $5.04\text{ g}\cdot\text{pot}^{-1}$ ,磷酸二铵的用量为  $3.22\text{ g}\cdot\text{pot}^{-1}$ ,硫酸钾的用量为  $4.26\text{ g}\cdot\text{pot}^{-1}$ ; B 处理为鸡粪处理,所用鸡粪的量根据纯 N  $600\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  来计算,其用量为  $410\text{ g}\cdot\text{pot}^{-1}$ ,且鸡粪中含磷( $P_2O_5$ )为  $303\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,含钾( $K_2O$ )为  $308\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,与 CK 处理中肥料的总磷、总钾用量相接近,因此该处理没有额外添加磷酸二铵和硫酸钾。在桶中填混合基质时,CK 处理 50% 的氮、磷、钾肥料以基肥的形式混合到土中,其余的肥料再平均分成 2 份,分别在甜瓜植株伸蔓期和果实坐果后进行追施; A 和 B 处理所用到鸡粪以及磷钾肥,在装填桶时与基质混合均匀,装填入桶中。每个处理 18 桶,3 次重复,每个重复 6 个桶,按照随机区组方法进行排列,放置于黑龙江八一农垦大学园艺园林学院实验基地的塑料大棚中进行栽培,各处理浇水、病虫害防治都按照统一的管理方式进行。甜瓜植株按照单蔓整枝方式进行管理,子蔓结瓜,瓜前留 1 片叶进行摘心。在甜瓜果实在开花当天进行人工授粉,并挂标签进行标记,分别在花后果实生长的第 20、25、30、35 d 进行甜瓜果肉样品采集,样品放置于  $-40^\circ\text{C}$  和  $-80^\circ\text{C}$  冰柜中进行贮藏,用于各项指标的测定。

### 1.3 测定项目与方法

香气物质测定:采用顶空固相微萃取(SPME)

技术提取不同处理薄皮甜瓜果实香气成分,经气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)进行测定分析,参照齐红岩等采用的检测方法进行测定<sup>[9]</sup>。

香气物质合成关键酶活性测定:LOX 酶活性、氨基转移酶、ADH 酶以及 AAT 酶活性参照李岩的方法进行测定<sup>[7]</sup>。

实时荧光定量基因表达分析:果实组织总 RNA 的提取按照 ultrapure RNA Kit(北京康为世纪生物科技有限公司,北京)试剂盒中提供的操作方法进行。获得的 RNA 用 RNase-free 无菌水  $30\mu\text{L}$  进行溶解,并用 DNase I (Promega, Madison, WI, USA) 在  $37^\circ\text{C}$  下处理 50 min,去除基因组 DNA 污染,并进行重新沉淀和浓缩。qRT-PCR 采用反应体系为  $20\mu\text{L}$ ,采用的试剂盒为 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) (Cat.FP205,天根,北京,中国),并使用 ABI PRISM7500 荧光定量 PCR 仪进行测定。qRT-PCR 的反应条件如下: $50^\circ\text{C}$ , 2 min; $95^\circ\text{C}$ , 10 min; $95^\circ\text{C}$ , 45 个循环,15 s; $60^\circ\text{C}$ , 1 min;每个样品的 qRT-PCR 都进行 3 次重复,cDNA 来自 3 个生物学重复的样品。试验中以 18SrRNA DNA (148 bp) 作为内参基因,ADH 基因和 AAT 基因家族成员表达引物见表 1,样品 Ct 值是由扩增曲线计算获得的。

### 1.4 数据处理与统计分析

采用 Excel 2010 和 SPSS.19 软件对数据进行处理和统计分析,采用 Duncan 新复极差法进行显著性分析,Origin 8.0 软件进行绘图。

表 1 实时荧光定量基因表达分析的引物序列  
Table 1 Sequence of primers used for gene expression analysis by real-time quantitative PCR

基因 Gene	引物 Primer	序列 Sequence (5-3)
CmADH1	CmADH1-F	CTAATGAAGTCCGATTGAAG
	CmADH1-R	ATGATCTCTGGTGAAG
CmADH2	CmADH2-F	GCCATTGTTGATCACTCA
	CmADH2-R	CATTTCGAGTCACTTGTA
CmAAT1	CmAAT1-F	CCACAGGGGCCAGAATTACA
	CmAAT1-R	TGGAGGAGGCAAGCATAGACTT
CmAAT2	CmAAT2-F	CTATAATTTGGAGGTTGGAATTATC
	CmAAT2-R	AACATTTGCCCTAAATCTTTCCAT
CmAAT3	CmAAT3-F	CGCTTGATGACATGGCACAT
	CmAAT3-R	GGCCTTACGGATAGCAGAGATC
18srRNA	18srRNA-F	AAACGGCTACCACATCCA
	18srRNA-R	CACCAGACTTGCCCTCCA

注:各基因在 GenBank 中的登录号为 CmADH1 (ABC02081), CmADH2 (ABC02082), CmAAT1 (CAA94432), CmAAT2 (AAL77060) 和 CmAAT3 (AAW51125)。

Note: The GenBank ID: CmADH1 (ABC02081), CmADH2 (ABC02082), CmAAT1 (CAA94432), CmAAT2 (AAL77060), CmAAT3 (AAW51125).

## 2 结果与分析

### 2.1 不同施肥处理对薄皮甜瓜果实香气物质种类及含量的影响

由表2可以看出,薄皮甜瓜果实中香气物质主要由醇类、醛类、酯类、酸类物质组成,且随着果实的发育这些香气物质种类以及总含量发生变化,不同施肥处理的果实之间存在显著差异( $P<0.05$ )。尿素单独处理(CK)果实中,随着果实发育,醇类、醛类、酯类、酸类物质种类逐渐增多;鸡粪+尿素(A)和鸡粪(B)处理的果实中酯类物质种类逐渐增多,而醇类、醛类种类减少。对于这些香气物质总含量而言,在各个时期尿素(CK)处理的甜瓜果实中香气物质主要以醇类和醛类物质为主,酯类物质次之,尤其是C6+C9醇类和醛类物质含量明显高于鸡粪+尿素以及单独鸡粪处理(图1);而鸡粪+尿素(A)和鸡粪(B)处理的果实中香气物质则以酯类物质为主,醇类和醛类次之,尤其是乙酸酯类物质含量显著高于CK(图1)。此外,在尿素(CK)单独处理的甜瓜果实中酯类物质总含量随着果实发育呈现先升高而后降低的现象,而其它两个处理果实中酯类物质总含量则呈现逐渐升高的趋势,且在果实成熟的后期(30 d和35 d),鸡粪+尿素(A)处理的果实中酯类物质总量明显高于鸡粪(B)处理的果实中酯类总含量( $P<0.05$ )。

表2 不同施肥处理对薄皮甜瓜果实中香气物质种类和含量的影响

Table 2 Effects of different fertilization treatments on aroma compounds and contents in oriental melon fruits

香气物质 Aroma compound	花后天数 Days after anthesis/d	CK		A		B	
		种类 Kind	含量 Content/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	种类 Kind	含量 Content/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	种类 Kind	含量 Content/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$
酯类 Esters	20	5b	26.68c	9a	73.20a	9a	46.66b
	25	7c	131.83c	12a	182.32a	11b	150.64b
	30	14c	312.79b	17a	429.29a	15b	309.79b
	35	11c	291.84c	22a	890.77a	17b	546.17b
醇类 Alcohols	20	10a	99.97a	8c	30.04b	9b	40.6b
	25	10a	118.33a	8c	50.07c	9b	70.14b
	30	14a	154.49a	4b	32.66c	4b	59.26b
	35	14a	150.84a	4b	27.22c	4b	35.16b
醛类 Aldehydes	20	5a	149.85a	4b	67.36b	5a	69.04b
	25	5a	149.68a	5a	84.83b	5a	75.43c
	30	6a	102.76a	5b	67.06c	5b	80.91b
酸类 Acids	35	6a	99.13a	4b	59.31b	4b	47.70c
	20	2a	1.66a	0b	0b	0b	0b
	25	5a	47.30a	2b	23.32b	1c	18.15b
	30	9a	165.32a	1c	82.28b	2b	89.17b
其他类 Others	35	8a	129.15a	1c	12.95c	2b	64.58b
	20	1a	2.09a	0b	0b	0b	0b
	25	3a	12.21a	0c	0c	1b	4.23b
	30	4a	17.59b	3a	12.29c	2b	34.70a
	35	2c	4.83c	3b	10.04b	4a	31.74a

注:表中不同小写字母表示同一时期不同处理间 Duncan's 新复极差测验达5%显著水平。

Note: Different lowercase letters represent different treatments at the same stage are significantly different at  $\alpha=0.05$ .

### 2.2 不同施肥处理对薄皮甜瓜果实中主要酯类物质含量的影响

表3中列出的为果实中含量较高和因施肥处理不同而变化强烈的酯类物质,其中包含一些甜瓜果实特征性酯类物质。由表3可知,乙酸乙酯、2-甲基丁酸乙酯、2-甲基丁基乙酸酯是薄皮甜瓜果实中含量较高的酯类物质,随着果实发育,其含量呈现增加趋势,但是鸡粪+尿素(A)处理果实中2-甲基丁基乙酸酯含量先升高而后降低。总体来看,与鸡粪+尿素以及鸡粪单独处理相比较,单独尿素处理(CK)的甜瓜果实中没有检测到2-甲基丁酸甲酯、2-乙基丁酸乙酯、乙酸香叶酯、甘油亚麻酸酯、乙酸异丁酯、异丁酸乙酯、正癸酸正癸酯、水杨酸甲酯;只在花后30 d或35 d的果实中检测到丙酸乙酯、丁酸乙酯、2-甲基乙酸丁酯、异丁酸丁酯、辛酸乙酯、乙酸仲丁酯、乙酸戊酯,且含量较低。鸡粪+尿素和鸡粪处理明显提高了花后30 d或35 d果实中乙酸乙酯、丁酸乙酯、乙酸丁酯、2-甲基乙酸丁酯、2-甲基丁基乙酸酯、乙酸苯甲酯、甘油亚麻酸酯、乙酸异丁酯、异丁酸丁酯、己酸乙酯、癸酸乙酯、乙酸己酯的含量,尤其是鸡粪的施用显著促进了甜瓜特征性香气物质乙酸乙酯、乙酸己酯、丁酸乙酯、乙酸苯甲酯、乙酸异丁酯、己酸乙酯含量的增加。

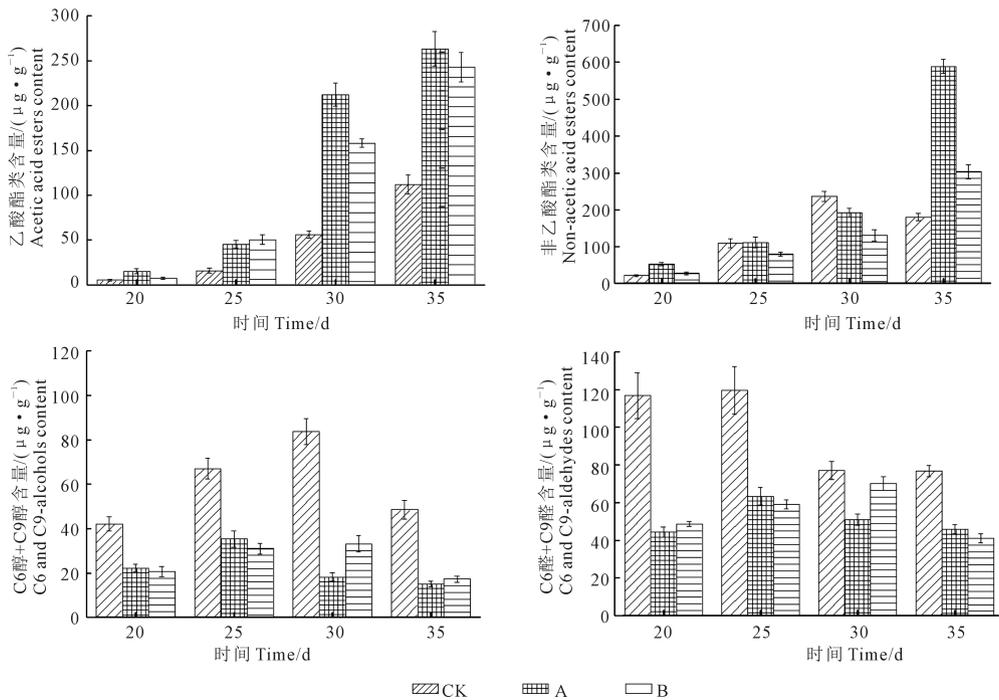


图 1 不同施肥处理对薄皮甜瓜成熟果实中乙酸酯类、非乙酸酯类、C6+C9 醇类和醛类含量的影响

Fig.1 Effects of different fertilization treatments on the contents of acetate esters, non-acetate esters, C6+C9 alcohols and aldehydes in melon ripe fruits

### 2.3 不同施肥处理对薄皮甜瓜果实中香气物质合成相关酶活性的影响

由图 2 可知,花后 20 d 时,各处理之间 LOX 酶活性差异不显著,但在 25 d 之后,鸡粪+尿素(A)和鸡粪(B)处理甜瓜果实中 LOX 酶活性迅速升高,在 30 d 时达到峰值,之后又降低,且显著高于单施尿素处理(CK) ( $P<0.05$ )。鸡粪单独处理果实中氨基转移酶活性始终高于单施尿素处理,在 35 d 的果实中处理之间差异显著 ( $P<0.05$ );而鸡粪(B)与鸡粪+尿素(A)处理之间相比,只在花后 20~30 d 期间和 35 d 果实中氨基转移酶活性呈现差异 ( $P<0.05$ )。此外,单施尿素处理(CK)与鸡粪+尿素(A)处理甜瓜果实中氨基转移酶的活性,仅在花后 35 d 差异显著 ( $P<0.05$ )。

ADH 和 AAT 酶是果实中酯类香气物质合成途径中下游的关键调节酶。由图 2 可知,等氮量条件下,在花后 20 d,单施尿素(CK)处理甜瓜果实中 ADH 酶活性显著高于鸡粪(B)以及鸡粪+尿素(A)处理 ( $P<0.05$ )。随着果实的发育,尿素处理果实中 ADH 酶活性呈现出先降低而后升高的趋势,而鸡粪(B)以及鸡粪+尿素(A)处理果实中 ADH 酶活性逐渐升高,在花后 30 d 时达到峰值,之后降低,且在花后 30 d 时,ADH 酶活性稍高于尿素;但在花后 35 d 时,则显著低于尿素(CK)处理 ( $P<0.05$ )。此外,3 种处理甜瓜果实中 AAT 酶活性,随着果实发育都显示出先升高,在花后 30 d 时达到峰值,之后呈现降

低的趋势。鸡粪(B)、鸡粪+尿素(A)处理果实中 AAT 酶活性在花后 30 d 时显著高于单施尿素(CK)处理 ( $P<0.05$ ),在花后 35 d 时,鸡粪+尿素(A)处理果实 AAT 酶活性明显大于单施尿素(CK)和鸡粪(B)处理,而单施尿素(CK)与单施鸡粪(B)处理之间果实中 AAT 活性无显著差异 ( $P<0.05$ )。

### 2.4 不同施肥处理对薄皮甜瓜果实中香气物质合成相关酶基因表达的影响

由图 3 可知,甜瓜果实中 CmADH1 和 CmADH2 的表达量随着果实发育呈现出逐渐升高的趋势,且处理之间差异显著 ( $P<0.05$ )。尿素单独处理(CK)促进了花后 30 d 和 35 d 甜瓜果实中 CmADH1 和 CmADH2 的表达,这 2 个基因的表达量显著高于鸡粪(B)和鸡粪+尿素处理(A) ( $P<0.05$ )。鸡粪+尿素(A)处理增加了花后 20 d 和 25 d 果实中 CmADH1 的表达量,而鸡粪(B)处理提高了花后 20 d 和 25 d 果实中的 CmADH2 的表达量 ( $P<0.05$ )。

尿素、鸡粪以及鸡粪+尿素处理对 CmAAT1、CmAAT2 和 CmAAT3 表达的影响也存在差异(图 4)。尿素处理(CK)减弱了 CmAAT2 和 CmAAT3 在果实中的表达,而鸡粪+尿素(A)以及鸡粪(B)处理显著促进了 CmAAT3 基因在花后 20~35 d 果实中的表达,且鸡粪+尿素(A)处理提高了 CmAAT1 和 CmAAT3 在花后 30 d 和 35 d 果实中的表达水平,而且显著高于尿素(CK)和鸡粪(B)单独处理 ( $P<0.05$ )。

表3 不同施肥处理对薄皮甜瓜果实中主要酯类香气物质含量的影响

Table 3 Effects of different fertilization treatments on esters content in oriental melon fruits/( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )

香气物质 Aroma substance	处理 Treatment											
	CK				A				B			
	20 d	25 d	30 d	35 d	20 d	25 d	30 d	35 d	20 d	25 d	30 d	35 d
乙酸乙酯 Ethyl acetate	3.92b	11.24	23.82	59.20	10.12a	20.70	98.10	97.50	nd	12.90	46.10	105.70
丁酸乙酯 Ethyl butyrate	nd	nd	0.55	nd	nd	12.65	16.89	34.78	nd	nd	6.93	12.23
乙酸丁酯 Butyl acetate	0.71	0.75	2.54	4.53	1.36	3.44	11.68	14.88	1.02	2.68	4.77	7.98
2-甲基丁酸乙酯 Ethyl 2-methylbutyrate	15.56	99.74	101.20	106.18	10.76	22.53	45.53	107.70	3.79	10.43	17.57	30.27
2-甲基丁酸丁酯 2-Methylbutyl acetate	nd	nd	2.54	3.77	nd	3.46	5.66	15.23	nd	6.38	11.27	25.67
2-甲基丁基乙酸酯 2-Methylbutyl acetate	5.87	9.66	38.53	48.25	38.63	71.09	38.19	54.46	15.23	40.76	39.91	58.03
2-甲基丁酸甲酯 Methyl 2-methylbutyrate	nd	nd	nd	nd	nd	nd	12.47	29.56	nd	nd	nd	nd
乙酸苯甲酯 Benzyl acetate	0.62	0.75	0.89	0.70	3.65	8.64	16.39	19.55	2.14	5.68	7.66	11.32
2-乙基丁酸乙酯 Ethyl 2-ethylbutanoate	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	10.88
乙酸香叶酯 Geranyl acetate	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	10.99	nd
甘油亚麻酸酯 Glycerin 1- $\gamma$ -linolenate	nd	nd	nd	nd	nd	nd	9.89	5.58	3.01	4.11	8.70	16.53
(甲硫基)乙酸乙酯 (Methylthio)-acetic acid ethylester	nd	6.65	20.87	21.01	nd	12.66	25.06	38.90	6.65	20.87	21.01	nd
乙酸异丁酯 Isobutyl acetate	nd	nd	nd	nd	nd	12.34	25.98	44.16	nd	nd	22.08	30.76
丁酸戊酯 Pentyl butyrate	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	55.97	nd	nd	nd	nd
异丁酸乙酯 Ethyl isobutyrate	nd	nd	nd	nd	nd	nd	7.54	21.25	nd	nd	nd	nd
正癸酸正癸酯 Capric acid dodecylester	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	56.17
己酸乙酯 Ethyl hexanoate	nd	nd	13.94	21.74	2.56	1.53	54.57	48.05	5.58	17.84	32.89	nd
辛酸乙酯 Ethyl caprylate	nd	nd	44.11	nd	nd	nd	nd	65.59	nd	nd	nd	nd
癸酸乙酯 Ethyl caprate	nd	nd	32.09	nd	nd	nd	nd	82.06	nd	nd	nd	82.71
乙酸仲丁酯 DL-sec-Butyl acetate	nd	nd	28.79	23.75	nd	nd	28.90	19.74	nd	8.22	19.09	28.79
乙酸己酯 Hexyl acetate	nd	nd	nd	22.41	nd	nd	29.97	65.28	4.03	20.77	47.29	57.45
水杨酸甲酯 Methyl salicylate	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	13.53	nd

注:nd表示未检测出。

Note: nd stands for not detected.

### 3 讨论

有机肥在果蔬上的施用对果菜品质具有重要的作用,在提高果蔬品质方面的效果已被证实。有机肥可以提高肥城桃果实中可溶性固形物、Vc、固酸比、蔗糖和总糖含量以及桃果实中特征性香气物质含量和种类,赋予了果实果香和甜香味<sup>[23-24]</sup>;在

苹果<sup>[21]</sup>、香蕉<sup>[32]</sup>、鸭梨<sup>[22]</sup>的栽培中也发现,施用有机肥提高了果实中“酯香型”和“果香型”酯类物质含量,同时也增加了酯类物质种类,且鸡粪的施用促进了肥城桃果实中特征性酯类——乙酸乙酯、乙酸丙酯、甲酸甲酯、乙酸己酯和丙酸甲酯的积累<sup>[25]</sup>,这与本文的研究结果相似。本文详细分析了鸡粪、鸡粪+尿素以及尿素处理对薄皮甜瓜香气物质合成

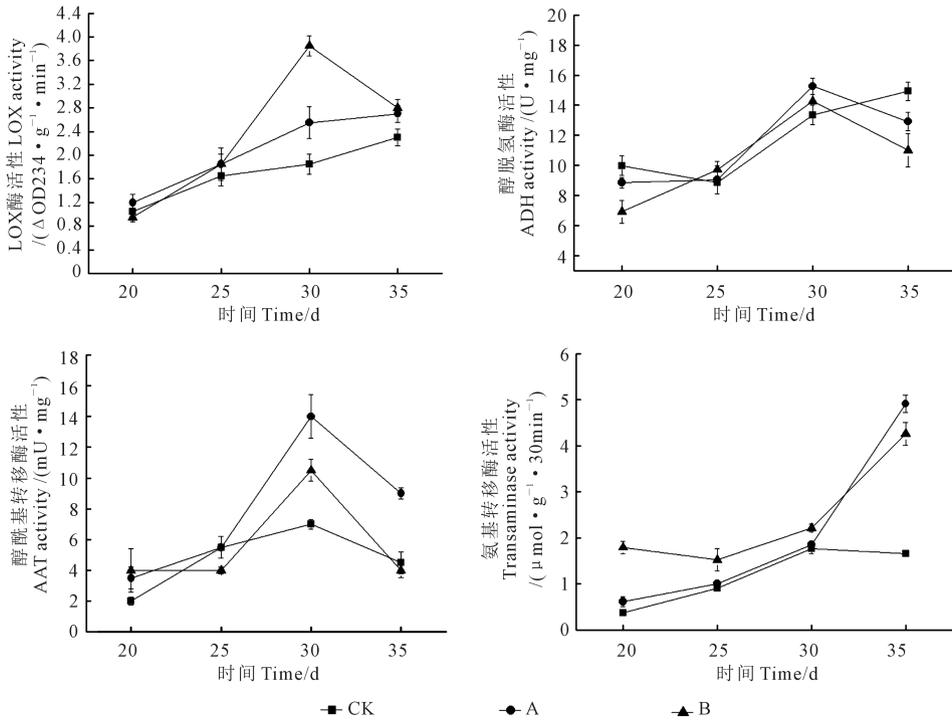


图 2 不同施肥处理对薄皮甜瓜果实香气物质合成关键酶活性的影响

Fig.2 Effects of different fertilization treatments on the activities of enzyme responsible for aromas synthesis in fruits of oriental melon

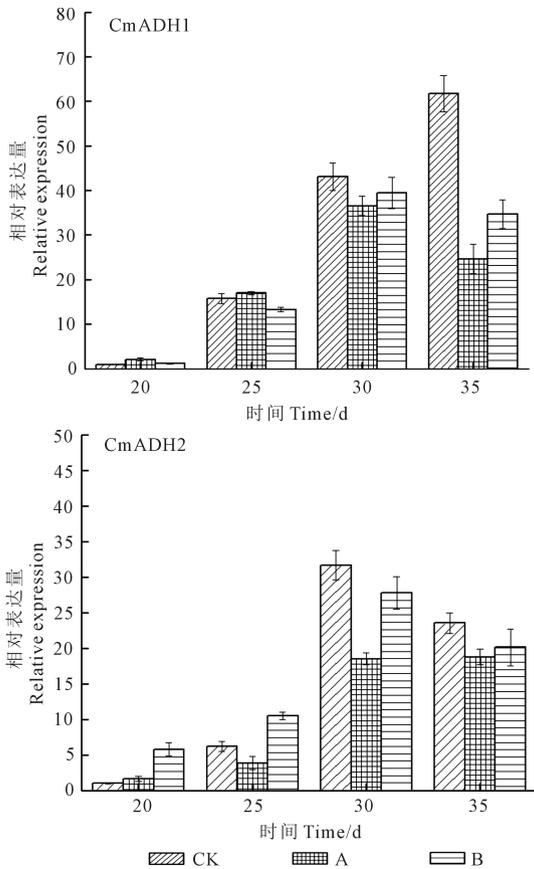


图 3 不同施肥处理对薄皮甜瓜果实中 CmADH1 和 CmADH2 基因表达的影响

Fig.3 Effects of different fertilization treatments on the expressions of CmADH1 and CmADH2 in fruits of oriental melon

的影响,发现鸡粪、鸡粪+尿素处理降低了果实中 C6 和 C9 醇、醛的种类和含量,而促进了“酯香型”物质——丁酸乙酯、乙酸乙酯含量的增加,提高了果香型物质——丙酸乙酯、2-甲基丁酸乙酯、丁酸乙酯、己酸乙酯的含量,赋予了甜瓜果实浓郁的酯香味和果香味;而单独尿素处理果实中 C6 和 C9 醇、醛的种类和含量显著高于鸡粪以及鸡粪+尿素处理,因此果实呈现出了青香味。另外,本研究还发现鸡粪+尿素处理成熟果实中酯类物质的种类和含量高于鸡粪单独处理,同时也发现 2-乙基丁酸乙酯、乙酸香叶酯和水杨酸甲酯只在鸡粪处理果实中测出,而丁酸戊酯和异丁酸乙酯仅在鸡粪+尿素处理的果实中测出,因此这些酯类物质种类和含量的差异导致了果实香味的差异。在烟草中,有机肥的使用也促进了烟叶中特征性香气成分新植二烯、法尼基丙酮、茄酮、苯乙醇的含量,改变了烟草风味<sup>[17]</sup>。由此可知,有机肥——鸡粪的施用主要是通过调节果实中酯类物质,尤其是特征性“酯香型”和“果香型”物质种类和含量而改变薄皮甜瓜果实香味品质的。

已有研究表明,薄皮甜瓜果实中香气物质的合成积累与其合成途径中 LOX 酶、氨基转移酶、ADH 酶、AAT 酶活性以及关键限速酶基因表达相关<sup>[26,28-29,33-34]</sup>。在薄皮甜瓜中,嫁接方式降低了成熟果实中脂氧合酶(LOX)、醇脱氢酶(ADH)和醇酰

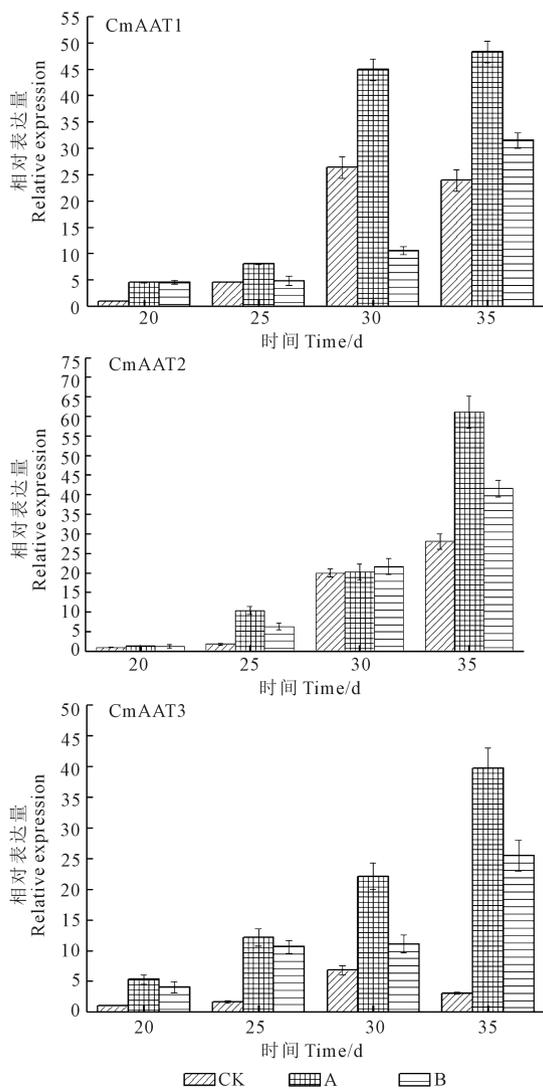


图4 不同施肥处理对薄皮甜瓜果实中 CmAAT1、CmAAT2 和 CmAAT3 基因表达的影响

Fig.4 Effects of different fertilization treatments on the expressions of CmAAT1, CmAAT2 and CmAAT3 in fruit of oriental melon

基转移酶 (AAT) 的活性,还降低了 CmADH1 和 CmADH2 以及 CmAAT1 和 CmAAT2 的转录水平,进而影响了果实中香气物质的种类和含量,尤其是特征性酯类物质种类和含量<sup>[9,35]</sup>。李映晖等<sup>[32]</sup>研究表明,增施鱼粉提高了香蕉和粉蕉果实中醇脱氢酶 (ADH) 和醇酰基转移酶 (AAT) 活性,且与果实挥发性物质总量和种类的增加呈现明显的相关性。在本研究中发现,鸡粪部分替代和全替代化学氮肥条件下,明显提高了花后 30 d 和 35 d 果实中 LOX 酶活性、氨基转移酶活性、AAT 酶活性以及 25~30 d 期间 ADH 酶活性;尿素明显促进了 30 d 后果实中 CmADH1 和 CmADH2 基因的表达水平,而鸡粪以及鸡粪与尿素配施处理促进了 30 d 或 35 d 果实中 CmAAT1、CmAAT2 和 CmAAT3 的表达水平,与果实

中酶活性变化不完全一致,可能果实中还存在其它家族成员参与了果实中相对应酶活性的调节<sup>[26,28]</sup>。同时依据甜瓜果实中香气物质的种类和含量变化,发现尿素处理促进了 CmADH1 和 CmADH2 转录丰度的提高,可能是该处理甜瓜果实 C6 和 C9 醇醛类物质较高的原因之一。因此,鸡粪以及鸡粪与尿素配施可能是通过调节果实发育期间香气物质合成关键酶活性之间的相互协调作用,以及调节关键限速酶基因 CmADH 和 CmAAT 家族成员的转录水平,影响了香气物质的合成,尤其是促进了酯类物质合成的限速酶——AAT 酶活性及 CmAAT 基因家族成员在不同时期的表达,进而调节了酯类物质的合成,提高了果实香味品质。但是,有机肥——鸡粪的施用是如何通过一个调控网络调节香气物质合成的分子机制还不清楚,需进一步进行探讨。

国内外许多研究已经证明,在化学氮肥减量的情况下,有机肥或生物有机肥的施用能够明显促进土壤脲酶、蔗糖酶、多酚氧化酶、中性磷酸酶、蛋白酶等土壤酶活性的提高<sup>[36]</sup>以及土壤有益菌群数量、有效养分、腐殖酸以及有机质含量的增加,提高了土壤肥力和生物活性<sup>[37-39]</sup>,改善了土壤氮的代谢特性,进而改善了果实风味品质<sup>[40]</sup>。但是,有机肥是如何通过调节土壤-植物-微生物的互作进而调节果实品质的机理还不明确。Gaudinier 等<sup>[41]</sup>研究发现氮的吸收、运输、代谢以及提高氮素有效性的分子调控网络中包含有转录因子、氮素和氨基酸代谢途径、碳代谢途径以及激素信号途径中的关键基因、Ca<sup>2+</sup>受体蛋白激酶等,因此,有机肥以及有机肥与化学氮肥的配施可能是通过氮信号、糖信号或激素信号的传递,启动了转录因子对甜瓜植株体内氮素代谢途径关键酶基因的表达调控,从而引发植物体内香气物质代谢网络发生变化,促进了甜瓜果实中香气物质的合成。这种推测还需通过分子生物技术、生物化学等方法进一步验证。

## 4 结论

尿素、鸡粪以及鸡粪+尿素处理对薄皮甜瓜果实香气物质合成的影响不同;尿素的施用显著提高了果实中 C6、C9 醇醛物质含量和种类,而鸡粪、鸡粪+尿素的处理则促进了酯类物质合成和种类的增加,尤其是“酯香型”和“果香型”酯类香气物质的含量,而鸡粪和尿素的配施对成熟果实中乙酸酯类和非乙酸酯类特征性香气物质的影响较大。鸡粪以及鸡粪和尿素配施是通过调节果实香气合成相关酶活性之间相互协调作用,调节了香气物质的合

成,另一方面,还从转录水平促进了酯类香气合成关键酶基因的表达量,最终影响了果实的香气成分变化和香味品质。

### 参考文献:

- [1] 齐红岩,刘勇,刘轶飞. 不同薄皮甜瓜品种成熟果实中芳香物质的分析[J].中国瓜菜, 2011,24(6): 1-6.
- [2] 徐晓飞,齐红岩,姜岩岩,等. 不同风味类型甜瓜果实发育过程中风味品质比较[J]. 华北农学报,2012,27(2): 127-132.
- [3] 唐贵敏,于喜艳,赵登超,等. 不同品种厚皮甜瓜果实成熟过程中挥发性物质成分分析[J].中国蔬菜, 2007,(4):7-11.
- [4] 刘圆,齐红岩,王宝驹,等. 不同品种甜瓜果实成熟过程中香气物质动态分析[J]. 华北农学报,2008,23(2):49-54.
- [5] 潜宗伟,唐晓伟,吴震,等. 甜瓜不同品种类型芳香物质和营养品质的比较分析[J]. 中国农学通报, 2009,25(12):165-171.
- [6] Aubert C, Pitrat M. Volatile compounds in the skin and pulp of Queen Anne's pocket melon [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(21):8177-8182.
- [7] 李岩.乙炔在薄皮甜瓜果实香气物质合成中的作用与调控[D]. 沈阳:沈阳农业大学, 2012.
- [8] 苏杭,王琦,李春梅,等. 植物生长调节剂噻苯隆对甜瓜品质的影响[J]. 中国农业科学, 2018,51(16):3095-3105.
- [9] 齐红岩,关小川,李岩,等. 嫁接对薄皮甜瓜果皮和果肉中主要酯类、游离氨基酸及酯类合成相关酶活性的影响[J]. 中国农业科学, 2010,43(9):1895-1903.
- [10] 岳钉伊,张静,赵建涛,等. 增施 CO<sub>2</sub> 与 LED 补光对番茄果实品质及挥发性物质的影响[J]. 食品科学,2018,39(1):124-130.
- [11] 蔡东升,李建明,李惠,等. 营养液供应量对番茄产量、品质和挥发性物质的影响[J].应用生态学报,2018,29(3):921-930.
- [12] 吴磊,柳洪入,陈妙金,等. 避雨栽培对桃果实挥发性物质形成的影响[J]. 园艺学报, 2015, 42(3):535-544.
- [13] 郭东花,白红,石佩,等. 不同时期套袋对“瑞光 19 号”油桃果实挥发性成分及着色的影响[J].食品科学,2016,37(8):242-247.
- [14] 吴大军,陈妙金,孙奇勇,等. 采前避雨栽培影响桃果实采收后贮藏品质[J]. 果树学报,2016,33(1):96-105.
- [15] 林晓娜,朱丽琴,尚鹏鹏,等. 一氧化氮对冷藏过程中‘肥城桃’果实内挥发性物质的影响[J]. 果树学报,2016,33(1):88-95.
- [16] 李江阔,张鹏,陈绍慧,等. 蓝莓贮藏货架期间生理品质与挥发性物质的变化[J]. 食品科学,2014,35(10):246-251.
- [17] 邸慧慧,史宏志,张国显,等. 不同肥力水平对烤烟各部位烟叶中性香气成分含量的影响[J].河南农业大学学报,2010,44(3):255-261.
- [18] 康利允,常高正,高宁宇,等. 不同氮、钾肥施用量对甜瓜产量和营养品质的影响[J]. 果树学报,2018,35(8):997-1005.
- [19] 潜宗伟,陈海丽,刘明池. 不同氮素水平对甜瓜芳香物质和营养品质的影响[J]. 植物营养与肥料学报,2011,17(6):1451-1458.
- [20] 李银科,王正银,杨光宇,等. 不同施氮水平对红花大元烟叶香味物质和感官评吸质量的影响[J]. 植物营养与肥料学报,2017,23(2):539-547.
- [21] 王孝娣,史大川,宋焯,等. 有机栽培红富士苹果芳香成分的 GC-MS 分析[J]. 园艺学报,2005,32(6):27-31.
- [22] 魏树伟,张勇,王宏伟,等. 施有机肥及套袋对鸭梨果实风味品质的影响[J]. 植物营养与肥料学报,2012,18(5):1269-1276.
- [23] 赵亚楠,王钰馨,付喜玲,等. 牛粪肥和贝壳肥对肥城桃内在品质的影响[J].山东农业大学学报(自然科学版),2016,47(1):1-8.
- [24] 罗华,李敏,胡大刚,等. 不同有机肥对肥城桃果实产量及品质的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2012,18(4):955-964.
- [25] 化党领,杨秋云,王镇,等. 施用生物有机肥对烤烟生长及香气物质含量的影响[J]. 中国烟草学报,2011,17(7):62-66.
- [26] Chen H, Qi H Y, Cao S X, et al. The relationship between CmADHs and the diversity of volatile organic compounds of three aroma types of melon (*Cucumis melo*) [J]. Frontiers in physiology, 2016, 7(254):1-18.
- [27] Li Y, Qi H Y, Jin Y Z, et al. Role of ethylene in biosynthetic pathway of related-aroma volatiles derived from amino acids in oriental sweet melons (*Cucumis melo var. makuwa* Makino) [J]. Scientia Horticulturae. 2016, 201(30):24-35.
- [28] Jin Y Z, Lv D Q, Liu W W, et al. Ethanol vapor treatment maintains postharvest storage quality and inhibits internal ethylene biosynthesis during storage of oriental sweet melons [J]. Postharvest Biology and Technology, 2013, 86:372-380.
- [29] Zhang C, Cao S X, Jin Y Z, et al. Melon13-lipoxygenase *CmLOX18* may be involved in C6 volatiles biosynthesis in fruit [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1):1-12.
- [30] Tang Y F, Zhang C, Cao S X, et al. The effect of CmLOXs on the production of volatile organic compounds in four aroma types of melon (*Cucumis melo*) [J]. Plos One, 2015, 10(11):1-18.
- [31] Gouda I, Bar E, Portnoy V, et al. Branched-chain and aromatic amino acid catabolism into aroma volatiles in *Cucumis melo* L. Fruit [J]. Journal of Experimental Botany, 2010, 61(4):1111-1123.
- [32] 李映晖,吕庆芳,李映志,等. 不同肥料对香蕉和粉蕉果实挥发物的影响[J].江苏农业学报,2015,31(1):73-79.
- [33] 解群杰. 甜瓜 CmLOX18 启动子分析及其在高温和香气合成中的作用[D]. 沈阳:沈阳农业大学, 2018.
- [34] 齐红岩,李岩,关小川,等. 两个不同类型薄皮甜瓜品种成熟特性、香气成分及其相关酶活性分析[J].中国农业科学 2011,44(4):771-780.
- [35] 田晓彬,齐红岩,李岩,等. 不同砧木嫁接对薄皮甜瓜成熟期品质、香气合成相关酶活性及基因表达的影响[J]. 中国农业科学, 2012,45(9):1766-1774.
- [36] 李明静,杨丽娟,邹春娇,等. 不同物料组合施用对温室番茄根系活力及土壤生物学特性的影响[J]. 土壤通报,2015,46(4):883-888.
- [37] 王维,吴景贵,李蕴慧,等. 有机物料对不同作物根系土壤腐殖质组成和结构的影响[J]. 水土保持学报,2017,31(2):215-220.
- [38] 姜丽娜,敬岩,符建荣,等. 有机肥提升高产稻田生产力及土壤生物活性作用研究[J].土壤通报,2010,41(4):892-897.
- [39] 汪吉东,张辉,张永春,等. 连续施用不同比例鸡粪氮对水稻土有机质积累及土壤酸化的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2014,20(5):1178-1185.
- [40] 钟书堂,沈宗专,孙逸飞,等. 生物有机肥对连作蕉园香蕉生产和土壤可培养微生物区系的影响[J]. 应用生态学报,2015,26(2):481-489.
- [41] Gaudinier A, Rodriguez-Medina J, Zhang L F, et al. Transcriptional regulation of nitrogen-associated metabolism and growth [J]. Nature, 2018, 563(7730):259-264.