

بررسی الگوی بیان نسبی ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتزی اسید آمینه سیترولین در بافت‌های مختلف گیاه دارویی هندوانه ابوجهل (*Citrullus colocynthis* L.)

Study of relative of expression pattern of key genes in the biosynthetic pathway of amino acid of citrulline in various tissues of medicinal plant of *Citrullus colocynthis*

ندا سواری چبیدی^۱، مریم ذوالفقاری^{۲*} و کریم سرخه^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گیاهان دارویی گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۲- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- استادیار گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

Neda Savari¹, Maryam zolfaghari^{2*} and Karim Sorkheh³

1-Msc student of Medicinal plants, Horticulture Department, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2 - Assistant professor of Horticulture Department, Faculty of Agriculture. Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

3- Assistant professor of plant production and genetics Department, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m.zolfaghari@scu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۶/۲۰)

چکیده

هندوانه ابوجهل یکی از با ارزش‌ترین گیاهان دارویی متعلق به خانواده کدویان است و منبع عالی از ترکیبات شیمیایی نظیر گلوکوزیدها، رزین، املاح واسید آمینه‌های مختلف از جمله سیترولین است. سیترولین یک-آلفا آمینو اسید غیر ضروری بوده که ارتباط زیادی با اسید آمینه آرژنین و اورنتین دارد. این اسید آمینه در چرخه اوره، از اورنتین و کربامویل فسفات در یکی از واکنش‌های این چرخه تولید می‌گردد. از جمله ژن‌های درگیر در سنتز اسید آمینه سیترولین، آرژینیناز، آرژینینوسو کسینات لیاز و نیتریک اکسید سنتاز (NOS) می‌باشند. هدف از این مطالعه، بررسی الگوی بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی اسید آمینه سیترولین در بافت‌های مختلف هندوانه ابوجهل به روش qRT-PCR است، به منظور درک بهتر تنظیم و تجمع سیترولین، بیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز و کاتابولیسم آن در بافت‌های ریشه، ساقه، برگ، پوست و گوشت میوه، بذر نارس و بذر رسیده مورد بررسی قرار گرفت. بررسی آماری میزان بیان ژن‌های دخیل در سنتز سیترولین در گیاه هندوانه ابوجهل بیان متفاوت با اختلاف معنی‌دار در بافت‌های مختلف بود، به طوری که در بافت‌های گوشت و پوست میوه هندوانه ابوجهل به طور معنی داری ($p < 0.01$) بیشتر از بافت‌های ریشه، ساقه، برگ، بذر نارس و بذر رسیده بوده است. به دلیل نقش حائز اهمیت سیترولین و نیز تجمع قابل توجه این اسید آمینه در پوست نسبت به سایر بافت‌های هندوانه ابوجهل، آنالیز بیان نسبی ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز سیترولین، در مقایسه با بافت پوست صورت گرفت که نشان داد ژن‌های ASS، ASL و OTC بیشترین میزان بیان داشته و کمترین بیان مربوط به ژن NOS بود. این مطالعه بر درک تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های تنظیم کننده تجزیه کننده سیترولین متمرکز شده است.

واژه‌های کلیدی

هندوانه ابوجهل

سیترولین

qRT-PCR

مقدمه

هندوانه ابوجهل با نام علمی *Citrullus colocynthis* از خانواده Cucurbitaceae است. منشأ این گیاه مناطق گرمسیری بوده و به صورت وحشی در مناطق گرم و خشک ایران و جهان رشد می‌کند (Grin et al. 2010; Safavi 2011). میوه آن دارای خواص ضد میکروبی و دارای گلیکوزیدهای تلخ، مواد رزینی، پکتین، صمغ، آلفا الاترین-ساپونین، آلکالوئید، و تانن بوده و دانه‌های آن نیز دارای ۵۳ درصد روغن و ۲۳ درصد پروتئین می‌باشند. ترکیبات شیمیایی میوه هندوانه ابوجهل شامل دو نوع گلوکوزید به نام کلوسیتین (Colocinthine) و کوکوریتاسین (Cucurbitacin) می‌باشد. کلوسیتین یک ترکیب بیوشیمیایی است که عمدتاً در تمام قسمت‌های گیاه هندوانه ابوجهل وجود دارد، کوکوریتاسین نیز، یک ماده بیوشیمیایی تلخ بوده که در میوه و ریشه برخی از گیاهان خانواده کدویان وجود دارد که برای حفاظت گیاه در برابر گیاهخواران تولید می‌شود و جنبه دفاعی برای گیاه دارد. این دو ترکیب قسمت عمده مواد مؤثره گیاه را تشکیل می‌دهند (Adam et al. 2001). ریشه این گیاه حاوی آلفاآلاترین، هتیراکوتان و ساپونین است (Bankole et al. 2005). گیاه دارویی هندوانه ابوجهل حاوی چندین اسید آمینه از جمله اسیدآمینه‌های غیرپروتئینی (NPAAs) که اغلب به عنوان ترکیبات ثانویه در نظر گرفته می‌شوند. اسیدآمینه‌های غیر پروتئینی NPAAs به علت اثرهای آللوپاتیک خود نقش‌های مهمی در گیاهان بازی می‌کنند، از این وظایف می‌توان به دخالت در دریافت، جذب و انتقال مواد مغذی، همچنین به عنوان مولکول‌های پیام‌رسان در طول تماس با عوامل پاتوژن یا بیماری زا، گیاه‌خواران و تنش محیطی اشاره کرد (Bell 2003; Huang et al. 2009; Vranova et al. 2011). از دهه‌های گذشته اسیدآمینه‌های غیر پروتئینی (NPAAs) در گیاهان به دلیل حضور در پپتیدها و استفاده در ساختار داروها با فعالیت بیولوژیکی و شرکت در لیگاندهای پپتیدومیمتیک برای افزایش فعالیت دارویی، اهمیت بیشتری یافته‌اند. سیتروлін (Citrulline) یک اسیدآمینه غیر پروتئینی NPAA است که پیش‌ساز اسید آمینه آرژنین (ARG) می‌باشد و نقش مهمی در سنتز نیتریک اکساید، پلی‌آمین‌ها و آلکالوئیدها دارد (Winter et al. 2015). اسیدآمینه سیتروлін ($C_6H_{13}N_3O_3$) به عنوان یک واسطه

سوخت و ساز در چرخه اوره و تشکیل اکسید نیتریک NO نقش دارد و یک رادیکال هیدروکسیل کارآمد است که به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی نیز گزارش شده است (Rimando and Perkins 2010; Davis et al. 2005; Veazie 2005). بیشتر اعضای خانواده Cucurbitaceae دارای میزان بالایی از سیتروлін هستند اما میوه‌های هندوانه *Citrullus lanatus* بالاترین تجمع سیتروлін آزاد را دارا هستند (Rimando and Perkins-Veazie 2005; Davis et al. 2010, 2011; Fish 2014; Jayaprakash and Patil 2016; Akashi et al. 2017). اسید آمینه سیتروлін طی شرایط تنش غیرزیستی در گیاهانی مانند هندوانه و هندوانه ابوجهل (Kawasaki et al. 2000; Akashi et al. 2017)، خربزه (Kusvuran et al. 2013)، گوجه فرنگی (Gong et al. 2010)، برنج (Shaik and Ramakrishna 2012; Borah et al. 2017) و نخود (Garg et al. 2016) تجمع پیدا می‌کند. در تحقیق دیگری گزارش شد که سیتروлін به آنالوگ ساختاری خود آرژنین تبدیل می‌شود، آرژنین یک اسیدآمینه پروتئینوژنیک غنی از نیتروژن بوده و انتظار می‌رود نقش مهمی در متابولیسم نیتروژن داشته باشد (Akashi et al. 2017). همچنین گزارش شده است که سیتروлін به طور مؤثر، DNA و آنزیم‌های متابولیکی را از آسیب‌های اکسیداتیو محافظت می‌کند و این افزایش سطح سیتروлін در پاسخ به تنش خشکی در هندوانه وحشی یک پدیده منحصر به فرد در گیاهان C3 است. (Kawasaki et al. 2000) گزارش دادند که در شرایط کم آبی و آفتاب شدید کویر، پس از پژمرده شدن گیاهان C4، هندوانه ابوجهل که یک گیاه C3 است، به دلیل تجمع سیتروлін سبز باقی می‌ماند (Akashi et al. 2001; Yokota et al. 2002). در مطالعه دیگری الگوی تجمع سیتروлін در میوه‌های هندوانه نابالغ و بالغ مورد بررسی قرار گرفت که در میوه‌های بالغ، بالاترین غلظت سیتروлін در پوست میوه مشاهده شد (Rimando and Perkins-Veazie 2005). اهمیت عملکردی سیتروлін در گیاهان به خوبی مشخص نیست، با این وجود پیشنهاد شده است که سیتروлін ممکن است تأثیر عمده‌ای بر روندهای فیزیولوژیک مانند انتقال نیتروژن و حفظ اسمولاریته در طول تنش‌های غیرزیستی داشته باشد (Joshi and Fernie 2017).

گیاهی هندوانه ابوجهل مهم به نظر می‌رسد. این مطالعه بر درک تجمع سیترولین و بخش بندی آن در بافت‌های هندوانه ابوجهل، تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های تنظیم کننده و تجزیه کننده سیترولین متمرکز شده است.

مواد و روش‌ها

در راستای بررسی نمونه بافت‌های هندوانه ابوجهل (*Citrullus colocynthis*) از شهرستان اهواز در استان خوزستان (عرض جغرافیایی ۳۱ درجه و ۱۹ دقیقه شمالی، طول جغرافیایی ۴۸ درجه و ۴۰ دقیقه شرقی)، در ۲ تکرار طی فصل تابستان ۱۳۹۶ جمع آوری گردید و تا زمان استخراج RNA در یخچال $^{\circ}\text{C} - 80$ نگه‌داری شدند.

۵۰-۲۵ میلی گرم از نمونه بافت‌های برگ، ریشه، ساقه، پوست میوه، گوشت میوه، بذر نارس و بذر رسیده گیاه هندوانه ابوجهل برای استخراج RNA توسط ازت مایع پودر گردیدند استخراج RNA کل بافت‌ها با استفاده از کیت Bio basic BS82314 کانادا (www.biobasic.com) و مطابق دستورالعمل شرکت انجام شد. کمیت و کیفیت نمونه‌های RNA از روش‌های اسپکتروفتومتری با استفاده از دستگاه فتومتر مدل ۶۱۳۱ (Eppendorf AG, Germany) بررسی شدند. نمونه‌های RNA جهت حذف DNA ژنومی باقی‌مانده با آنزیم DNase I (Takara, Ltd., Japan) تیمار گردیدند. در مرحله بعد عمل سنتز cDNA طبق دستورالعمل کیت prime script RT reagent (تاکارا، ژاپن) و با استفاده از پرایمرهای Oligo dt و Random انجام شد. با استفاده از نرم افزار آنلاین Primer (<http://primer3.ut.ee>) آغازگرهای مرتبط با هریک از ژن‌های آرژیناز، آرژینوسوکسینات، آرژینوسوکسینات لیاز، نیتریک اکسید سنتتاز، اورنتین کربومیل ترنسفرز در بافت‌های پوست، گوشت میوه، ریشه، ساقه، برگ، بذر نارس و بذر رسیده طراحی شدند و به کمک Primer Blast پایگاه NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) و Baecon (<http://www.premierbiosoft.com>) کیفیت سنجی آغازگرها بررسی گردید. ژن *Actin* اختصاصی هندوانه ابوجهل (GH626171) به عنوان ژن مرجع طراحی شد. لیست آغازگرها در جدول ۱ ارائه شده است.

مراحل سنتز سیترولین در هندوانه ابوجهل در شکل ۱ نشان داده شده است.

در ماتریکس میتوکندری کربامیل فسفات سنتتاز (CPS1) یک یون آمونیوم و یک یون بی‌کربنات را با صرف دو مولکول ATP ترکیب کرده و کربامیل فسفات را تولید می‌نماید. در این واکنش یک ATP بی‌کربنات را فعال کرده و دیگری، کربامیل فسفات را تامین می‌کند. در نهایت دو مولکول ADP و یک Pi آزاد می‌شود. سپس سیترولین از میتوکندری وارد سیتوزول شده و بقیه واکنش‌های چرخه در سیتوزول انجام می‌شوند. در مرحله بعد سیترولین و آسپارات با آنزیم آرژینوسوکسینات سنتتاز کاتالیز و آرژینوسوکسینات تولید می‌گردد. این واکنش نیازمند هیدرولیز یک مولکول ATP به AMP و PPi می‌باشد که معادل هیدرولیز ۲ مولکول ATP است. آرژینوسوکسینات توسط آرژینوسوکسیناز (آرژینوسوکسینات لیاز) به فومارات و آرژنین تبدیل می‌شود. در این واکنش، کربن‌های آسپاراتات در قالب فومارات آزاد می‌شود. فومارات ممکن است وارد میتوکندری شده و در چرخه کربس به اگزالواسات متابولیزه شود (Fereshtian et al. 2017). در ادامه آرژنین به وسیله آرژیناز به اورنتین و اوره تبدیل می‌گردد. نهایتاً اورنتین برای شروع مجدد چرخه، وارد ماتریکس میتوکندری می‌شود (Kusvuran et al. 2013).

گونه‌های جنس توس (*Betula*)، ممرز (*Carpinus*)، توسکا (*Alnus*)، گردو (*Juglans*)، کدو (*Cucurbita*) و جلبک قهوه‌ای (*brown algae*) دارای مقدار قابل توجهی سیترولین در عصاره بافت آوندی خود می‌باشند (Joshi and Fernie. 2017). سیترولین پیش‌ساز آرژنین (ARG) است و به علت این‌که دارای نقش مهمی در سنتز نیتریک اکساید، پلی آمین‌ها و آلکالوئیدها دارد، به صورت گسترده در گیاهان مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین این اسید آمینه در گونه‌های *Cucurbitaceous*، به عنوان حامل اولیه نیتروژن آلی عمل می‌کند (Johnson et al. 2022). پروفایل متابولیک مقایسه‌ای به همراه آنالیز ترانسکریپتومی بافت‌های رویشی تحت شرایط نرمال می‌تواند اطلاعاتی جدید را در ارتباط با عملکرد بیولوژیک و تنظیم سیترولین فراهم کند. بنابراین با توجه به اهمیت این گیاه دارویی، بررسی بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی اسید آمینه سیترولین در بافت‌های مختلف

جدول ۱- آغازگرهای رفت و برگشتی طراحی شده مربوط به ژن‌های مورد مطالعه و ژن اکتین

اندازه محصول (bp)	دمای اتصال	توالی‌های نوکلئوتیدی (3' → 5')	نام آغازگر	نام ژن
۱۸۹	58.4	ATTTGCACCTCCTCGGATCA	CC_006970-F	ARG
	58.4	ACCAGCTTTACAGACTCGCT	CC_006970-R	
۲۲۱	60.5	GACTGCCGAGCTAGACTGAA	CC_022154-F	ASL
	60.5	ACCCATTCTTCTCCCAGACG	CC_022154-R	
۲۳۵	58.4	TCGGCGTCAAGTGTTC AAG	CC_020781-F	OTC
	56.4	TTCTGTGCGTGCATTGCGATT	CC_020781-R	
۱۶۰	58.4	TATCCGTCAATGCCAGGTT	CC_002609-F	ASS
	60.5	GGCTGCGAAAAGGATGGTTC	CC_002609-R	
۲۳۴	60.5	TCTCACTCGAAACCTCCAC	CC_003592-F	NOS
	58.4	AAACCTTCAACGCCTTGTC	CC_003592-R	
۲۱۹	56.4	CAACATACATAGCAGGCACA	ACTIN-F	ACTIN
	60.5	TGACTGAGGCTCCACTCAAC	ACTIN-R	

بودن یا نبودن از نظر آماری استفاده شد. در نهایت پردازش داده‌ها و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

الگوی بیان ژن آرژیناز

نتایج آنالیز بیان نسبی ژن آرژیناز مورد مطالعه در بافت‌های مختلف گیاه هندوانه ابوجهل با استفاده از qRT-PCR نشان داد که به ترتیب در بافت گوشت و بذر نارس بیشترین و کمترین میزان بیان درمقایسه با بافت پوست هندوانه ابوجهل دارند و بیان به صورت تنظیم مثبت می‌باشد (شکل ۲). با توجه به آزمون آماری t-test، میانگین بیان نسبی ژن آرژیناز در بافت‌های گیاه هندوانه ابوجهل نسبت به پوست میوه این گیاه در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد اما در بافت گوشت اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. در مطالعات انجام شده، مشخص گردید که میوه‌های بالغ هندوانه، بالاترین غلظت سیترونین در پوست را داشته‌اند درحالی که محتوای سیترونین درمیوه نارس ناچیز

جهت بررسی میزان بیان ژن‌های مورد نظر و مقایسه آن‌ها، از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی استفاده شد. واکنش PCR با استفاده از مخلوط واکنش تاکارا حاوی SYBR-Green و آغازگرهای اختصاصی مرتبط با ژن‌ها انجام گردید. برای بررسی اختصاصی بودن پرایمرهای مورد استفاده از نمودار نقطه ذوب در طیف دمای ۹۵ درجه از هم باز شده و به ازای هر سیکل ۰/۳ درجه کم تا به دمای ۶۰ درجه (دمای اتصال پرایمرها) برسد. برای تجزیه و تحلیل نتایج از ژن اکتین به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. نتایج حاصل از qRT-PCR با استفاده از روش $2^{-\Delta C_T}$ آنالیز شدند.

$$2^{-\Delta C_T} = [2^{-(C_{T \text{ Gene studied}} - C_{T \text{ Internal control gene}})]$$

معادله $2^{-\Delta C_T}$ زمانی استفاده می‌شود که تنها هدف تشخیص بیان نسبی هر یک از ژن‌ها و نسبت به ژن کنترل داخلی می‌باشد و نیز آزمایش بدون شاهد انجام شود (Schmittgen and Livak 2008). آزمون t-test بر روی داده‌ها برای تشخیص تفاوت‌ها و معنی‌دار

گزارش شده بود (Akashi et al. 2001; Yokota et al. (2002). بیان ژن آرژیناز در گیاهان تیمار شده با آرژینین توسط Mirzaie et al. (2014) بررسی و مشاهده کردند که بیان ژن در گیاهان تحت تنش بیشتر از گیاهان شاهد بوده است. این امر نشان دهنده نقش این ژن در بیوسنتز پلی‌آمین و یا پرولین و سیترولین در شرایط تنش خشکی می‌باشد. در پژوهشی دیگر با هدف بررسی نقش آرژیناز در حفاظت از گیاه در برابر نماتد در گیاه *Arabidopsis* نشان داده شد که در گیاهان آلوده به نماتد، ژن آرژیناز تنها در ریشه بیان شده و در شاخه‌ها مهار شده بود، ۱۵ روز پس از آلودگی با نماتد، میزان بیان آرژیناز افزایش معنی‌داری داشته است، لیکن به دلیل آسیب دیواره سلولی و یا تغییرات متابولیسم ناشی از حمله نماتد، الگوی بیان ژن آرژیناز را تحت تاثیر قراردادده بود (Rozanska et al. 2013). با تجزیه و تحلیل مولکولی گسترده از ژن‌های کدکننده آرژیناز در گندم نان و سایر گونه‌های آن، سه ژن آرژیناز در گندم نان از قبیل TaARG-2AS، TaARG-2BS و TaARG-2D گزارش شد که میزان بیان بالایی را نشان داد همچنین برای هر دو ژن TaARG-2AS و TaARG-2DS روند مشابهی در مراحل مختلف نمو و پر شدن دانه مشاهده گردید (Maoyun et al. 2017). آرژیناز یکی از ژن‌های کلیدی دخیل در سنتز سیترولین می‌باشد که ابتدا آرژینین تحت اثر آنزیم آرژیناز به اسید آمینه اورنیتین تبدیل می‌گردد، سپس اورنیتین برای شروع مجدد چرخه وارد ماتریکس میتوکندری می‌شود. آنزیم‌های نیتریک اکسید سنتاز، آرژیناز و آرژینین دکربوکسیلاز سه مسیر اصلی متابولیسم آرژینین را کاتالیز می‌کنند. آنزیم نیتریک اکسید سنتاز (NOS) آرژینین را به نیتریک اکسید و سیترولین هیدرولیز می‌کند در حالی که محصولات اصلی مسیرهای وابسته به آرژیناز و آرژینین دکربوکسیلاز ترکیبات پلی‌آمین و پرولین و سیترولین است (Neill et al. 2003).

الگوی بیان ژن نیتریک اکسید سنتاز (NOS)

در بررسی بیان ژن نیتریک اکسید سنتاز در این مطالعه در بذر نارس و رسیده میوه هندوانه ابوجهل بیان بیشتری نسبت به بافت پوست داشته و به صورت تنظیم مثبت می‌باشد (شکل ۳). براساس نتایج آزمون تی تست میانگین بیان نسبی این ژن در

بافت‌های گیاه هندوانه ابوجهل به جز بافت ریشه نسبت به پوست میوه این گیاه در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌داری نشان داد اما بافت ریشه در سطح ۵ درصد معنی‌دار گردید. در مسیر متابولیسم سیترولین و آرژینین، آنزیم نیتریک اکسید سنتاز (NOS) تولید NO و آنزیم آرژینین دکربوکسیلاز تولید پلی‌آمین را از آرژینین کاتالیز می‌کند. در گیاهان، اکسید نیتریک در فرایندهای فیزیولوژیکی و بیولوژیکی متعدد در طول نمو گیاه و پاسخ به تنش نقش دارد. اثرات NO بر تاخیر پیری و افزایش طول عمر برخی از گل‌ها یا میوه‌ها توسط Kumar et al (2012) و نیز Nasibi et al (2010) مورد مطالعه قرار گرفت. در برخی مطالعات دیگر گزارش شده است که نیتریک اکسید موجب کاهش مقدار اتیلن می‌شود و از این طریق عمر مفید برخی از سبزیجات، گل‌ها و میوه‌ها را طولانی‌تر می‌کند (Parra-Lobato and Gomez-Jimenez 2011). کاتابولیسم آرژینین می‌تواند به بازگردش سیترولین از طریق نیتریک اکسید سنتاز (NOS)، که به طور ناقص در گیاهان وجود دارد، منجر شود (Mur et al. 2013). با وجود شناسایی مسیرهای وابسته به NOS، آرژینین و سیترولین در گیاهان به ویژه در تنش‌های زیستی و غیرزیستی شواهد تجربی کمی در این زمینه وجود دارد. به خاطر تجمع بالای سیترولین در گیاهان نظیر هندوانه، به نظر می‌رسد که آنزیم‌های شبه NOS ممکن است به محتوای سیترولین در شرایط ویژه کمک کنند (Corpas et al. 2010; she et al. 2006).

الگوی بیان ژن آرژینو سوکسینات لیاز (ASL)

بیان نسبی ژن آرژینو سوکسینات لیاز در مطالعه حاضر در گوشت میوه بیشترین و در بذر نارس کمتر از بقیه بافت‌ها بوده و به صورت تنظیم مثبت می‌باشد (شکل ۴). نتایج آزمون t-test نشان داد میانگین بیان نسبی این ژن در بافت‌های گیاه هندوانه ابوجهل به جز بافت گوشت میوه در سطح ۵ و ۱ درصد معنی‌دار شدند. آرژینو سوکسینات سنتاز (ASS) و آرژینو سوکسیناز یا آرژینو سوکسینات لیاز (ASL) مسیر بیوسنتیک آرژینین و پلی‌آمین‌ها را تنظیم می‌کنند. آرژینو سوکسینات لیاز ASL که با نام آرژینو سوکسیناز (CC_023055) نیز شناخته می‌شود، نوعی آنزیم است که تجزیه برگشت‌پذیر آرژینو سوکسینات را که به تولید بیوستر آرژینین در تمام موجودات و نیز تولید اوره در موجودات

این باشد که سیترولین در جای دیگری سنتز و به تدریج طی رشد میوه منتقل گردد یا به طور موضعی در پوست و در بافت‌های بین پوست و مغز میوه سنتز شود. بیان اورنیتین کاربامویل ترانسفراز (OTC) که در مرحله نهایی سنتز سیترولین درگیر است، در هر دو نوع بافت گوشت و پوست پایدار و ثابت است.

ژن اورنیتین ترانس کاربامیلاز (Ornithine transcarbamylase) که اورنیتین کاربامویل ترانسفراز و به اختصار OTC هم خوانده می‌شود واکنش بین کاربامویل فسفات و اورنیتین را کاتالیز می‌کند، که حاصل آن تولید سیترولین و فسفات است. این ژن عمل انتقال -اورنیتین بر روی کربامیل فسفات و تولید سیترولین را بر عهده دارد و در همه بافت‌ها حضور دارد. فعالیت برگشت‌پذیر این ژن اجازه تولید اورنیتین و سیترولین را می‌دهد (Levine et al. 2012). ژن‌های OTCase کربامیلاسیون L- اورنیتین را به شکل سیترولین در جلبک‌های ریز، گیاهان و پستانداران کاتالیز می‌کنند؛ در حالی که OTCase کاتابولیک واکنش برگشت تولید اورنیتین از سیترولین را ضمن فسفرولیز در میکروارگانیسم‌های پست‌تر پیش می‌برد (Stalon 1972; Haas et al. 1977). تعداد زیادی OTCs در گیاهانی نظیر *Nishikur*, *Pisum Sativum*, *Phaseolus vulgaris*، *Arabidopsis* و برنج شناسایی شده‌اند که فعالیت‌های آنابولیک آنها در اغلب گونه‌ها تأیید شده است. سمیت القاء شده به علت اورنیتین بالا و عدم تجمع اورنیتین در محیط وقتی که ترکیب سیترولین یا آرژنین وجود دارند، فعالیت آنابولیک OTCase سیترولین را تأیید می‌کند. حضور ایزوژیم‌های OTCase با دو موقعیت سلولی متفاوت با عملکردهای سیتوزولی و میتوکندریایی در سلول‌های سوسپانسیون نیشکر گزارش شده است (Shi et al. 2015). ژنوم هندوانه نیز یک ژن شبه OTC (Cla020781) دارد. ترتیب مورد انتظار توالی پروتئین OTCase هندوانه یک همولوژی بالا و دو دومین متصل شونده P-کربامیل و L-اورنیتین که برای فعالیت این ژن ضروری هستند را نشان داد (McWilliam et al. 2013).

اسید آمینه اورنیتین و سیترولین نقش مهمی در فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند تحمل تنش‌های غیرزیستی، پیش‌ساز پلی‌آمین‌ها، اسمولیت‌های فعال، حامل‌های نیتروژن و احتمالاً به عنوان مولکول‌های پیام رسان بازی می‌کنند. در شرایط خشکی

اورنوتلیک نقش دارد. اسیدآمینه آرژینوسوکسینیک یکی از پیش‌سازهای فومارات در چرخه اسیدسیتریک است. این واکنش توسط آنزیم آرژینوسوکسینات لیاز کاتالیز می‌شود. آرژینوسوکسینات سنتاز (ASS) و آرژینوسوکسیناز یا آرژینوسوکسینات لیاز (ASL) مسیر بیوستیک آرژنین و پلی‌آمین‌ها را تنظیم می‌کنند.

الگوی بیان ژن‌های آرژینو سوکسینات سنتاز (ASS)

بررسی میزان بیان نسبی ژن آرژینوسوکسینات سنتاز در بافت‌های مختلف گیاه دارویی هندوانه ابوجهل در مطالعه حاضر نشان داد که بافت بذر نارس در مقایسه با بافت پوست میوه بیان بیشتری دارد و کمترین بیان در بافت ساقه مشاهده گردید (شکل ۵) با توجه به آزمون آماری t-test، بیان نسبی ژن آرژینوسوکسینات سنتاز در بافت‌های مختلف گیاه هندوانه ابوجهل نسبت به پوست میوه این گیاه مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان داد که بافت ساقه در سطح ۱ درصد و بافت‌های گوشت و بذر رسیده در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهند. ژن آرژینو سوکسینات سنتاز ASS در سنتز آرژینو سوکسینات را از سیترولین و آسپاراتات کاتالیز می‌کند. در راستای تحقیقات پیشین تنظیم کاهشی هماهنگ در هر دو نوع ژن‌های کاتابولیک (ASS, ASL)، حاکی از نقش آنها در حفظ تجمع تدریجی سیترولین در بافت‌های میوه هندوانه است. در تحقیقی الگوی RNA-seq میوه‌های هندوانه در حال رسیدن را مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که در میوه‌های حاوی سیترولین، ممکن است ژن‌های ASS و ASL در مغز میوه به صورت تنظیم منفی کنترل می‌شوند (Guo et al. 2013, 2015).

الگوی بیان ژن اورنیتین ترانس کاربامیلاز (Ornithine transcarbamylase)

در این تحقیق بالاترین میزان بیان نسبی ژن آنزیم OTC در بذر رسیده هندوانه ابوجهل بوده است (شکل ۶). نتایج آزمون تی تست میانگین بیان نسبی ژن اورنیتین ترانس کاربامیلاز در بافت‌های گیاه هندوانه ابوجهل نسبت به پوست میوه این گیاه در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد. بیان اورنیتین کاربامویل ترانسفراز (OTC) که در مرحله نهایی سنتز سیترولین درگیر است و در هر دو نوع بافت گوشت و پوست پایدار و ثابت است. بیان بارز OTC در پوست و تجمع بالای سیترولین می‌تواند به دلیل

تجمع سیترولین، امکان تنظیم کاتابولیسم را فراهم می‌آورد. تحقیقات انجام شده توسط Gong et al (2010); Borah et al (2017); al (2018); Nawaz et al (2018) نشان داد که ژن‌های درگیر در بیوسنتز سیترولین CPS (Cla005591 و Cla022915)، -N-استیل اورنیتین استیل‌گلوآمات سنتاز (Cla014036)، -N-استیل گلوآمات آمینوترانسفراز (Cla015337)، -N-استیل اورنیتین کیناز (Cla022273)، استیل اورنیتین داستیلاز (Cla016179) و (Cla016181)، اورنیتین کرپامیل ترانسفراز/ترانس کرپامیلاز (Cla020781) تنظیم افزایشی داشتند، در حالی که ژن‌های دخیل در کاتابولیسم سیترولین نظیر آمینوسوکسینات سنتاز (Cla019267) و (Cla002609) و -N-استیل اورنیتین گلوآمات استیل ترانسفراز (Cla017879) تنظیم کاهشی را نشان دادند. فعال شدن متابولیسم اورنیتین امکان استفاده از آن را به عنوان بیومارکر در مقاومت در برابر خشکی در کدو بیان نشان می‌دهد. گزارشات Gong et al (2010); Shaik and Ramakrishna (2012); Borah et al (2017) در زمینه بررسی سیترولین القاء شده در برگ‌ها و بافت آوندی گیاه خربزه در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد، نشان دادند که میزان اسید آمینه سیترولین تغییری نداشته درحالی که در هندوانه محتوای سیترولین در میوه به طور صعودی افزایش یافت. تغییرات سیترولین ناشی از شوری و خشکسالی در ۴ ژنوتیپ خربزه مورد بررسی قرار دادند و شاهد تغییر قابل توجه در تجمع سیترولین بودند به طوری که پیشنهاد دادند میزان تجمع سیترولین در پاسخ به تیمارهای داده شده به عنوان یک شاخص بیوشیمیایی در نظر گرفته شود (Kusvuran et al. 2013). در بررسی دیگری تجمع سیترولین ناشی از خشکسالی در بافت‌های رویشی هندوانه تیمارهای تنش با استفاده از اندازه‌گیری‌های فیزیولوژیکی انجام شد. پروفایل اسید آمینه برگ و ساقه در پاسخ به تنش خشکی به ترتیب تا ۳۸ و ۱۶ برابر افزایش محتوای سیترولین را نشان داد. همبستگی بین اسیدهای آمینه نشان دهنده فعال شدن همزمان یک مسیر متابولیک شامل سیترولین، پیش ساز آن (اورنیتین) و محصول کاتابولیک (آرژنین) بود. مطابق با تجمع آن، تجزیه و تحلیل بیان ژن و تعیین توالی RNA فعال شدن ژن‌های مرتبط با بیوسنتز سیترولین (Ornithine carbamoyl-transferase (OTC) و Carbamoyl N-acetylornithine deacetylase (AOD) و

phosphate synthases (CPS) را تایید کرد (Song et al. 2020). در پژوهشی نتایج بررسی سیترولین در بخش‌های مختلف در هندوانه نشان داد که ممکن است سیترولین در بافت‌های مختلف گیاه سنتز و سپس به میوه‌های هندوانه در حال رسیدن انتقال یابد، اما سطح پایدار سیترولین در میوه‌های رسیده می‌تواند حاصل کاهش کاتابولیسم، افزایش بیوسنتز، انتقال از فاصله دور و تعامل پوست و بافت‌های مغز میوه باشد (Sandlin et al. 2012; Ren et al. 2014). محتوای سیترولین در بافت‌های رویشی (برگ‌ها و ریشه‌ها) در طول رشد پایدار باقی مانده و به طور قابل ملاحظه‌ای با آغاز پیری شروع به کاهش کرده است، به استثنای تجمع وابسته به تنش، تنها مقدار اندکی سیترولین در ارتباط و اتصال با سایر اسیدهای آمینه در بافت‌های رویشی گیاهانی از جمله هندوانه، آرابیدوپسیس و خربزه شناسایی و تشخیص داده شده است (Dasgan et al. 2009; Massange- Sánchez et al. 2016; Xiangfei et al. 2021). براساس مشاهدات، افزایش مستمر در تجمع سیترولین طی رسیدن و رشد میوه به صورت مستقل مورد تایید قرار گرفت (Liu et al. 2010; Guo et al. 2013; Maoyun et al. 2017; Akashi et al. 2017). تغییرات در میزان سیترولین پوست و گوشت تحت تاثیر ژنوتیپ و فاکتورهای محیطی است (Fish 2014). با استفاده از GC-MS میزان محتوای سیترولین موجود در انواع ارقام، گوشت و بافت‌های مختلف هندوانه گزارش گردید؛ محتوای سیترولین برحسب میلی‌گرم برگرم وزن خشک و در میان هندوانه‌های انواع هسته دار، بدون هسته به ترتیب ۱۶،۶ و ۲۰،۳ میلی‌گرم وزن خشک بود. همچنین میزان سیترولین پوست هندوانه در مقایسه با گوشت آن نیز تجمع بیشتری را نشان داده است. این نتایج نشان می‌دهد که پوست هندوانه می‌تواند منبع طبیعی و مهمی برای سیترولین باشد (Rimando and Perkins-Veazie 2005).

تصور بر این است که انتقال دهنده‌های AAP هندوانه می‌توانند یک نقش فعال در انتقال از راه دور و برداشت سیترولین در بافت میوه در حال رسیدن بازی کنند. سیترولین ممکن است در بخش‌های مختلف سنتز شده و به میوه‌های در حال رسیده انتقال یابد. مقادیر نسبتاً محدود سیترولین آزاد در برگ‌ها، ساقه‌ها، ریشه‌ها و عدم تطابق با تجمع افزایشی در بافت‌های مزوکارپ و اگزوکارپ

مفوفتی از بیان ژن‌هایی که در متابولیسم سیتروآین دخیل هستند را نیز نشان می‌دهد (Guo et al. 2013, 2015). بیان بارز OTC پوست و تجمع بالای سیتروآین می‌تواند به دلیل این باشد که سیتروآین در جای دیگری سنتز و به تدریج طی رشد میوه منتقل گردد یا به طور موضعی در پوست و در بافت‌های بین پوست و مغز میوه سنتز شود (Joshi and Fernie. 2017).

نتایج تحقیق نشان داد که نمونه‌های با سطوح سیتروآین و آرژنین بالا مواد جامد محلول پایینی داشته که عمدتاً از قند تشکیل شده‌اند و کمتر شیرین هستند (kim et al. 2020). در بررسی دیگر محتوای سیتروآین با رسیدن میوه افزایش یافت و ۴۵ روز پس از گلدهی در هندوانه پیوندی به بالاترین سطح رسید (Soteriou et al. 2014). در مطالعه دیگری مشاهده شد که محتوای آمینواسیدهای آزاد، عمدتاً آمینواسیدهای غیرپروتئینی، مانند β -آلانین، اسید β -آمینو بوتیریک، اورنیتین و سیتروآین، در معرض تنش خشکی افزایش یافته و به عنوان آنتی اکسیدان عمل می‌کنند (Vranova et al. 2012). اهمیت اسید آمینه سیتروآین توسط Xiangfei et al. (2021) مورد ارزیابی قرار گرفت و گزارش داد که سیتروآین می‌تواند برای ارتقای زیست توده، بازسازی ATP و بازده سوخت‌های زیستی مفید باشد، همچنین مشخص شد که سیتروآین می‌تواند ATP اضافی را فراهم کند و زیست توده و نرخ رشد ویژه را برای *C.carboxidivorans* P7 در هر دو شرایط هتروتروف و اتوتروف افزایش دهد. علاوه بر این، با افزودن سیتروآین نسبت تولید الکل به اسید را ۶۰/۳٪ در شرایط اتوتروف افزایش می‌یابد.

در این پژوهش هدف شناسایی ژن‌های درگیر در متابولیسم اسید آمینه سیتروآین و الگوی بیان ژن‌های کلیدی از جمله ژن آرژیناز، نیتریک اکسید سنتاز، آرژینو سوکسینات لیاز، آرژینو سوکسینات سنتاز و اورنیتین ترانس کاربامیلاز در بافت‌های ریشه، ساقه، برگ، گوشت و پوست میوه، بذر نارس و بذر رسیده با استفاده از تکنیک qRT-PCR بوده است. شدت بیان این ژن‌ها با هم متفاوت و به صورت تنظیم مثبت بوده و در سطح احتمال یک درصد معنی دار شدند، در ژن‌های بررسی شده بیشترین میزان بیان در پوست و گوشت میوه هندوانه ابوجهل مشاهده گردیدند. میزان بیان ژن‌های بررسی شده در بافت‌های رویشی، (ساقه، برگ و ریشه) به شکل

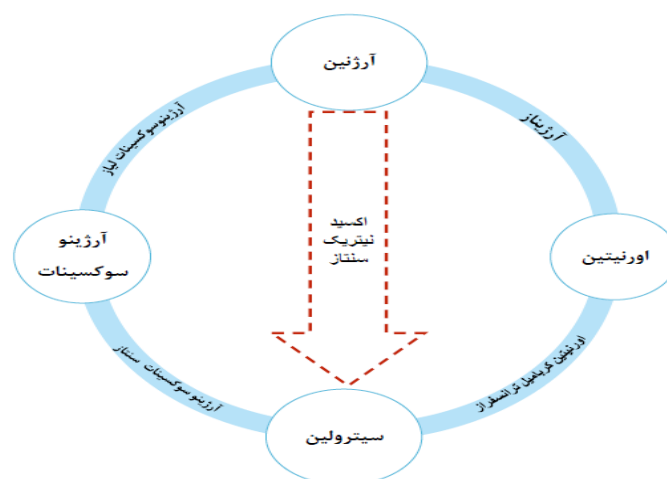
میوه نشان می‌دهد. انتقال سیتروآین در مسافت‌های طولانی طی رشد فعال میوه بعید به نظرمی‌رسد. سطح پایدار سیتروآین در میوه‌های رسیده، حاصل کاهش کاتابولیسم، افزایش بیوسنتز، انتقال از فاصله دور، و تعامل پوست و بافت‌های مغز میوه باشد. سیتروآین ممکن است بر فرآیندهای فیزیولوژیکی اصلی در گیاهان، انتقال سیتروآین و حفظ اسمولاریته سلول‌ها طی تنش‌های زیستی تأثیر داشته باشد.

شواهد قابل بررسی در درختان، گونه‌های تیره پروانه آسها و غیر پروانه آسها، و دیاتوم‌های آبی پتانسیل سیتروآین را به عنوان برداشت کننده کارآمد NH_4^+ تنفس نوری یا انتقال دهنده از فاصله دور نیتروژن در گیاهان را نشان می‌دهد (Guo et al 2013, 2017; Zhu et al. 2015). مشاهدات نشان داده است که در طی بلوغ میوه (۲۶ روز پس از گرده‌افشانی) مقدار سیتروآین افزایش قابل ملاحظه داشته؛ درحالی که محتوای سیتروآین در زمان رسیدن میوه (۳۴ روز پس از گرده‌افشانی) دچار کاهش ناگهانی شده است (Guo et al. 2013). مشاهدات مشابهی همچنین توسط چندین گروه مستقل ذکر شده است که هیچ تغییر قابل توجهی در تجمع سیتروآین در طی رشد اولیه میوه ثبت نشده است. اما افزایش مداوم آن در زمان بلوغ میوه مشابه سایر مواد مغذی در هندوانه نظیر لیکوپن، لوتئین یا ساکاروز نسبت به قبل از آن دیده شده است (Liu et al. 2010; Fish.2014; Akashi et al. 2017). با این حال، یک الگوی تجمع دو قطبی نشان دهنده شیب غلظت سیتروآین از پوست خارجی میوه (بافت سبز) به مرکز میوه نشان دهنده نقش احتمالی پوست به عنوان یک محل گذار اثبات می‌کند (Rimando and Perkins-Veazie 2005; Davis et al. 2011).

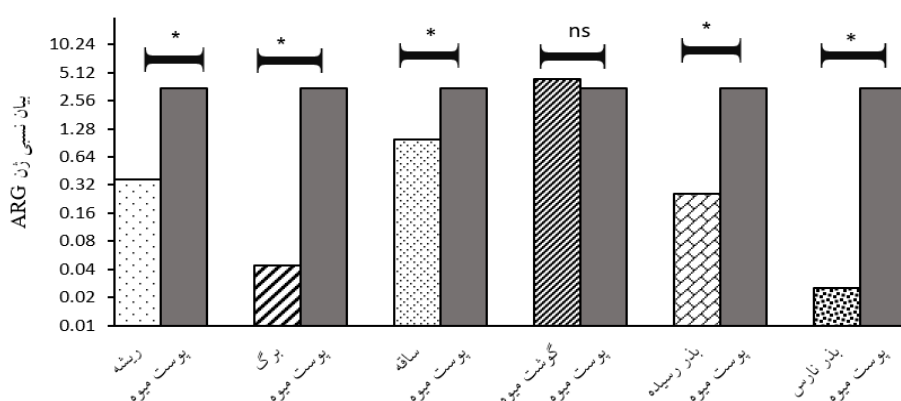
مقدار زیاد سیتروآین در پوست وجود دو آنزیم بیوسنتز N-استیل اورنیتین آمینوترانسفراز (Cla015337) و N-استیل گلوکز آمین سنتاز (Cla014036) را نشان می‌دهد که به عنوان تنظیم کننده رشد میوه در بافت پوست عمل می‌کنند (Guo et al. 2013, 2015; Zhu et al. 2017). اگر چه محل دقیق سنتز و نحوه انتقال سیتروآین در هندوانه به خوبی مشخص نشده است، اما شواهد زیادی وجود سلول‌هایی که از مناطق دور از میوه در این امر دخیل هستند را مشخص می‌کنند. انتقال سیتروآین وجود الگوهای

تنظیم رشد، موقعیت بافت‌های ویژه، تنظیم سنتز، انتقال و ترکیب که نیاز به بررسی بیان ژن‌ها، ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های اصلی و انتقال دهنده‌ها، همچنین تنوع طبیعی در ژن‌های مربوط به متابولیسم دارد. بسیاری از آنزیم‌های دخیل در متابولیسم سیتروکین در گیاهان هنوز به طور کامل شناخته نشده‌اند. از این رو، مدل مطالعات آینده می‌تواند تنظیم یا انتقال سیتروکین از طریق سیستم آوندی را روشن سازد.

قابل توجهی نسبت به بافت میوه کمتر بوده است و تنظیم هماهنگ شده‌ای بین ژن‌های سیتروکین میوه هندوانه ابوجهل وجود دارد که اجازه بیان و تجمع بیش از حد سیتروکین را فراهم می‌آورد. پروفایل آمینواسیدی بافت‌های مختلف هندوانه Charleston Gray در طول رشد و تکامل گیاه انباشت تدریجی سیتروکین تنها در بافت گوشت میوه و پوست آن را تایید کرده است. جنبه‌های زیادی در مورد متابولیسم سیتروکین در گیاهان وجود دارد که هنوز ناشناخته هستند، مانند انتقال سیتروکین از آوندها،

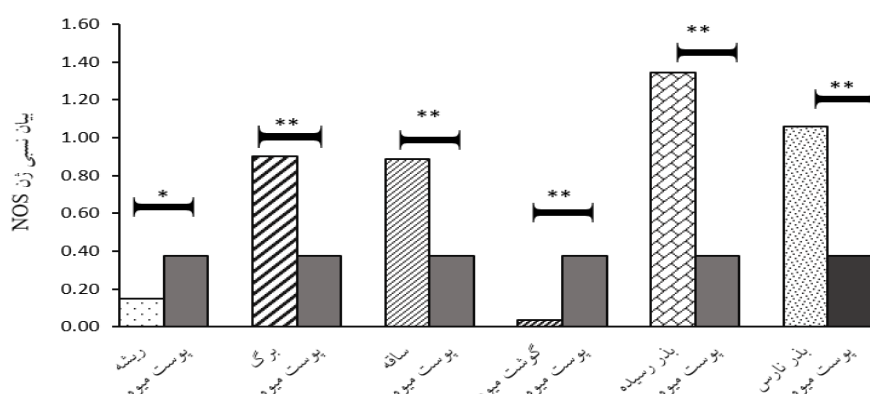


شکل ۱- مسیر بیوسنتز سیتروکین در هندوانه ابوجهل



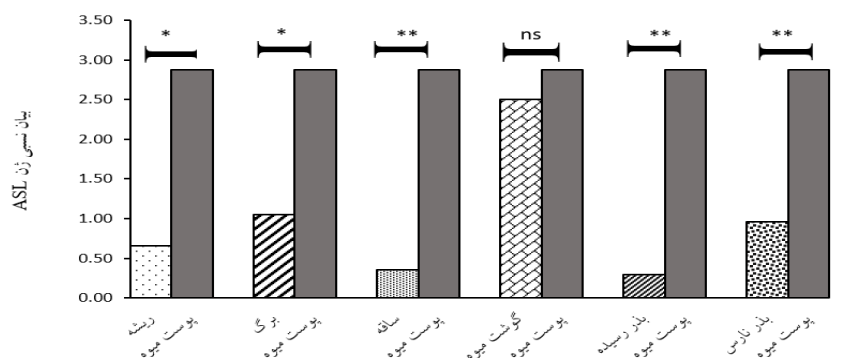
شکل ۲- الگوی میزان بیان ژن آرژیناز برای بافت‌های هندوانه ابوجهل در مقایسه با بافت پوست که با روش $2^{-\Delta C_T}$ محاسبه گردید.

ns و *: به ترتیب تفاوت غیرمعنی‌دار و معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد



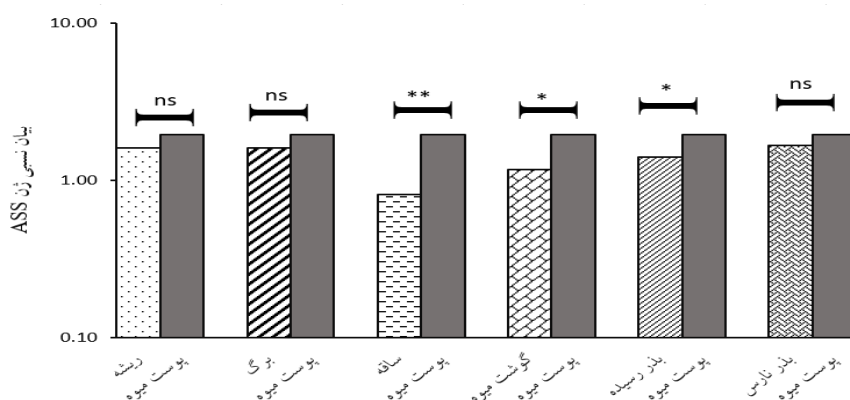
شکل ۳- الگوی میزان بیان ژن NOS در بافت‌های مختلف هندوانه ابوجهل در مقایسه با بافت پوست و با روش $2^{-\Delta C_T}$ محاسبه گردید.

ns و * و ** به ترتیب تفاوت غیرمعنی دار و معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد



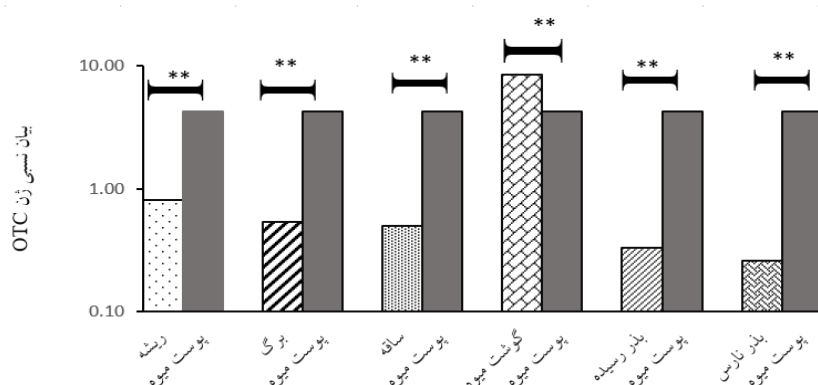
شکل ۴- الگوی بیان ژن ASL در بافت‌های مختلف هندوانه ابوجهل در مقایسه با بافت پوست که با روش $2^{-\Delta C_T}$ محاسبه گردید.

ns و * و ** به ترتیب تفاوت غیرمعنی دار و معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد



شکل ۵- الگوی بیان ژن ASS در بافت‌های مختلف هندوانه ابوجهل در مقایسه با بافت پوست و با روش $2^{-\Delta C_T}$ محاسبه گردید.

ns و * و ** به ترتیب تفاوت غیرمعنی دار و معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد



شکل ۶- الگوی بیان ژن اورنیتین ترانس کاربامیلاز (OTC) در بافت‌های مختلف هندوانه ابوجهل در مقایسه با بافت پوست که با روش $2^{-\Delta C_T}$ محاسبه گردید.

ns و * و ** به ترتیب تفاوت غیرمعنی دار و معنی داری در سطح احتمال 5 درصد و 1 درصد

منابع

Adam S, Al-Yahya M& Al-Farhan A H (2001) Response of Najdi sheep to oral administration of Citrullus colocynthis fruits, Nerium oleander leaves or their mixture. Small Rumin Research, 40:239-244.

Akashi K, Miyake C, Yokota A (2001) Citrulline, a novel compatible solute in drought-tolerant wild watermelon leaves, is an efficient hydroxyl radical scavenger. Federation of European Biochemical Societies letters 508:438-442.

Akashi K, Mifune Y, Morita K, Ishitsuka S, Tsujimoto H, Ishihara T (2017) Spatial accumulation pattern of Citrulline and other nutrients in immature and mature watermelon fruits. Journal of the Science of Food and Agriculture. 97:479-487.

Assefa A D, Hur OS, Ro NY, Lee JE, Hwang AJ, Kim BS, Rhee JH, Yi JY, Kim JH, Lee HS, Sung JS, Kim MK, Noh JJ (2020) Fruit Morphology, Citrulline, and Arginine Levels in Diverse Watermelon (Citrullus lanatus) Germplasm Collections. Plants (Basel). 19:1054.

Bankole S A, Osho A, Joda A O, Enikuomehin O A(2005) Effect of drying method on the quality and storability of 'egusi'melon seeds (Colocynthis citrullus L.)," African Journal of Biotechnology 4:799-803.

Bell E A (2003) Non-protein amino acids of plants: significance in medicine, nutrition, and agriculture. J. Agric. Food Chem. 51:2854-2865.

Borah P, Sharma E. Kaur A, Chandel G, Mohapatra T, Kapoor S, Khurana J. P (2017). Analysis of drought-responsive signaling network in two contrasting rice cultivars using transcriptome-based approach. Sci. Rep. 7, 42131.

Corpas F. J, Barroso J. B, Carreras A, Valderrama R, Palma J.M, Leon A. M, San-dalio L. M. del Rio L.A. (2006) Constitutive argininedependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. Planta 224:246-254.

Dasgan H Y, Kusvuran S, Abak K, Leport L, Larher F, Bouchereau A (2009) The relationship between citrulline accumulation and salt tolerance during the vegetative growth of melon (*Cucumis melo* L.). Plant Soil Environ. 55:51-57.

Davis A R, Fish W , Levi A, King S, Wehner T, Perkins-Veazie P(2010) l-Citrulline levels in watermelon cultivars from three locations. Cucurbit Genet Coop Rep 33:36-39.

Davis A R, Webber CL III, Fish WW, Wehner TC, King S, Perkins- Veazie, P (2011) l-Citrulline levels in watermelon cultigens tested in two environments. Hort Science 46:1572-1575.

Fereshtian M, Soltani F , Kashi A, Babalar M (2017) Evaluation of genetic diversity of some Citrullus colocynthis accessions based on morphological and phytochemical traits, Iranian Journal of Horticultural Sciences, 48:293-303 (In Farsi).

Fish WW (2014). The expression of Citrulline and other members of the Arginine metabolic family in developing watermelon fruit. Int J Agric Innov Res (International Journal, Agriculture, Innovations, Research) 2:665-672.

Gong P, Zhang J, Li H, Yang C, Zhang C, Zhang X Khurram Z Zhang, Y Wang, T Fei, Z Ye, Z (2010) Transcriptional profiles of drought-responsive genes in modulating transcription signal transduction, and biochemical pathways in tomato. Journal of Experimental Botany. 61:3563-3575.

Grin A, Matsum, L. and Nakai, O. (2010). Taxon Citrullus lanatus (Thunb) Taxonomy for plants. Germplasm Resources Information Network. Agricultural Research Service, Beltsville Area. http://www.arsgringovbin/npgs/html/tax_search.pl

Guo, Sun H., Zhang H, Liu J, Ren Y, Gong G et al (2015) Comparative transcriptome analysis of cultivated and wild watermelon during fruit development. PLoS One 10:e0130267.

- Guo S, Zhang J, Sun H, Salse J, Lucas W J, Zhang H et al (2013) The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions. Nat Genet (Nature Genetics publishes the very highest quality research in genetics) 45:51–58.
- Haas D, Holloway B W, Schambeck A, Leisinger T (1977) The genetic organization of arginine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Gen Genet 154:7–22.
- Huang S, Li R, Zhang Z, Li L, Gu X, et al (2009) The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. Nat Genet 41:1275–1281.
- Jayaprakasha, G. K, Patil B S (2016) A metabolomics approach to identify and quantify the phytochemicals in watermelons by quantitative (1) HNMR. Talanta 153:268–277.
- Johnson J. B., Ohri B, Walsh K B. Naiker M (2022) A Simple Isocratic HPLC–UV Method for the Simultaneous Determination of Citrulline and Arginine in Australian Cucurbits and Other Fruits. Food Anal. Methods 15:104–114.
- Joshi V, Fernie A. R (2017) Citrulline metabolism in plants. Amino Acids 49:1543–1559.
- Kawasaki S, Miyake C, Kouchi MT, Yokota A (2000) Responses of wild watermelon to drought stress: accumulation of an Arg homologue and Citrulline in leaves during water deficit. Plant Cell Physiol 41:864–873.
- Kim Y C, Choi D, Cha A, Lee Y.-G, Baek, N.-I, Rimal S, Lee S (2020) Critical enzymes for biosynthesis of cucurbitacin derivatives in watermelon and their biological significance. Communication Biology 3:444.
- Kumar R, Solankey S S & Singh M (2012) Breeding for drought tolerance in vegetables. Vegetable Science, 39:1–15.
- Kusvuran S, Dasgan H Y, Abak K (2013) Citrulline is an important biochemical indicator in tolerance to saline and drought stresses in melon. Sci. World J, 253414.
- Levine A B, Punihaole D, Levine T B (2012) Characterization of the role of nitric oxide and its clinical applications. Cardiology 122:55–68.
- Liu W, Zhao S, Cheng Z, Wan X, Yan Z, King S (2010) Lycopene and Citrulline concentrations in watermelon (*Citrullus lanatus*) fruit with different ploidy and changes during fruit development. In Sun X (Ed) Proc. 4th Intl. Symp on Cucurbits Acta Hort 871:543–550.
- Maoyun she, Xingguo Y, Yueming y, Howit C, Belgard M, Wujun M (2017) Comprehensive molecular analysis of arginase-encoding genes in common wheat and its progenitor species. Scientific reports 7:6641.
- Massange-Sanchez J A, Palmeros-Suarez P A, Espitia-Rangel E, Rodriguez-Arévalo I, Sanchez-Segura L, Martinez-Gallardo N, Alatorre-Cobos F, Tiessen A, Délano-Frier JP (2016) Overexpression of grain amaranth (*A hypochondriacus*) AhERF or AhDOF transcription factors in *Arabidopsis thaliana* increases water deficit- and salt-stress tolerance, respectively, via contrasting stress-amelioration mechanisms. PLoS One 11:e0164280.
- McWilliam H, Li W, Uludag M, Squizzato S, Park Y M, Buso N, Cowley AP, Lopez R (2013) Analysis tool web services from the EMBL-EBI. Nucleic Acids Res 41:W597–W600.
- Mirzaie F, Yaghoobi M M, Manouchehri Kalantari Kh and Nasibi f (2014) Effects of two arginine enantiomers (L and D) pre-treatment on some physiological parameters and the expression of arginase 1 gene in tomato plants under drought Stress'. Iranian Journal of Plant Physiology 4:1005–1013.
- Mur L A. J, Hebelstrup K H, Gupta KJ (2013) Striking a balance: does nitrate uptake and metabolism regulate both NO generation and scavenging? Front Plant Sci 4:288.
- Nasibi F (2011) Effect of different concentrations of sodium nitroprusside (SNP) pretreatment on oxidative damages induced by drought stress in tomato plant. Iranian Journal of Plant Biology 3:63–74 (In Farsi).
- Nawaz M, Chen C, Shireen F, Zheng Z, Sohail H, Afzal M, Ali M, Bie Z, Huang Y (2018) Genome-wide expression profiling of leaves and roots of watermelon in response to low nitrogen. BMC Genomics 19:456.
- Nimmakayala P, Islam-Faridi N, Tomason Y R, Lutz F, Levi A, Reddy UK (2011). *Citrullus* Wild crop relatives: genomic and breeding resources (pp. 59–66).
- Nimmakayala P, Islam-Faridi N, Tomason Y R, Lutz F, Levi A, Reddy U K (2011) *Citrullus* Wild crop relatives: genomic and breeding resources (pp. 59–66).
- Parra-Lobato M C and Gomez-Jimenez M C (2011) Polyamine-induced modulation of genes involved in ethylene biosynthesis and signalling pathways and nitric oxide production during olive mature fruit abscission. Journal of Experimental Botany. 62:4447–4465.
- Ren Y, Mc Gregor C, Zhang Y, Gong G, Zhang H, Guo S, Sun H, Cai W, Zhang J, Xu Y (2014) An integrated genetic map based on four mapping populations and quantitative trait loci associated with economically important traits in watermelon (*Citrullus lanatus*). BMC Plant Biol 14:33.
- Rimando AM, Perkins-Veazie P (2005) Determination of Citrulline in watermelon rind. J Chromatogr (Journal of Chromatography A) 1078:196–200.
- Rozanska E., Labudda M, Dzik J M, Sobczak M (2013) Enzymatic activity and arginase gene expression in *Arabidopsis* plants infected with a cyst-forming nematode. BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology 94(3).
- Safavi S R (2016) A new species of *Scorzonera* L. (Asteraceae) from Natanz Iran. The Iranian Journal of Botany, No. 22 (1): 1–5. Tehran (In Farsi).
- Sandlin KC, Prothro JM, Heesacker AF, Khalilian N, Okashah R, Xiang W, Bachlawa F, Caldwell D, Seymour D, White V, Chan E, Tolla G, White C, Safran D, Graham E, Knapp SJ, McGregor CE (2012) Comparative mapping in watermelon *Citrullus lanatus* (Thunb). Theor Appl Genet 125:1603–1618.
- Shaik R, Ramakrishna W. (2012) Bioinformatic analysis of epigenetic and MicroRNA mediated regulation of drought responsive genes in rice. PLoS One 7:e49331.
- Shi D, Allewell N.M, Tuchman M (2015). From genome to structure and back again: a family portrait of the transcarbamylase. The International Journal of Molecular Science. 16:18836–18864.
- Song Q, Joshi M, DiPiazza J, Joshi V (2020) Functional Relevance of Citrulline in the Vegetative Tissues of

- Watermelon During Abiotic Stresses. *Front Plant Sci.* 5:11-512.
- Soteriou G, Kyriacou M, Siomos A, Gerasopoulos D (2014) Evolution of watermelon fruit physicochemical and phytochemical composition during ripening as affected by grafting. *Food chemistry* 165:282-289.
- Stalon V. (1972). Regulation of the catabolic ornithine carbamoyltransferase of *Pseudomonas fluorescens*. A study of the allosteric interactions. *Eur J Biochem* 29:36-46.
- Schmittgen T. D., Livak K. J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protocols* 3, 1101-1108.
- Vranova E., Coman D., Gruissem W. (2012). Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network. *Mol Plant* .5:318-333.
- Wang L, Cao C, Ma Q, Zeng Q, Wang H, Cheng Z, Zhu G, Qi J, Ma H, Nian H, Wang Y (2014). RNA-seq analyses of multiple meristems of soybean: novel and alternative transcripts, evolutionar and functional implications. *BMC Plant Biology.* 14:169.
- Winter G, Todd C D, Trovato M, Forlani G, Funck D. (2015) Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Front. Plant Sci.* 6:534.
- Xiangfei L., Rumeng H., Teng B, Tolbert O, Xian Z., Meijuan X., Taowei Y., Zhiming R. (2021) Citrulline deim, inase pathway provides ATP and boosts growth of *Clostridium carboxidivorans* P7. *Biotechnology for Biofuels.* 14:1-10.
- Yokota A., Kawasaki S., Iwano M., Nakamura C., Miyake C., Akashi K. (2002) Citrulline and DRIP-1 protein (ArgE homologue) in drought tolerance of wild watermelon. *Ann Bot (Annals of Botany) (Lond.)* 89:825-832.
- Zhu Q., Gao P., Liu S., Zhu Z., Amanullah S., Davis A.R., Luan F. (2017). Comparative transcriptome analysis of two contrasting watermelon genotypes during fruit development and ripening. *BMC Genomics* 18:3.