

早春栽培的印度南瓜果实淀粉积累相关酶的活力

马 玮¹, 张 蒙¹, 史玉滋¹, 疏 琴¹, 孙廷珍¹,
薄凯亮¹, 王福利², 段 颖¹, 王长林¹

(1. 农业农村部园艺作物生物学与种质创制重点实验室·中国农业科学院蔬菜花卉研究所 北京 100081;
2. 北京市农业技术推广站 北京 100029)

摘 要: 为选育果实淀粉含量高、适于早春日光温室栽培的印度南瓜, 以 Agol、雪 2 父、S8844、无名绿 4 份高代自交系种质为试材, 研究果实发育期间(授粉后 14、21、28、35、42 d)淀粉含量动态变化及其与 AGPase、GBSS、SSS、SBE、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶等酶活力的相关性。结果表明, 果实发育 42 d 后, 高淀粉含量种质 S8844 和无名绿的干物质含量(w, 后同)分别为 26.1%、33.0%, 淀粉含量分别为 85.2%(干质量)、87.1%(干质量)。与淀粉积累有关的 AGPase、GBSS、SBE 等酶活力均高于低淀粉含量的 2 个种质(Agol、雪 2 父)。在进行适于早春日光温室栽培的印度南瓜品种选育时, 可选择果实发育前期的 APGase 和 SBE 酶活力作为高淀粉含量种质的筛选指标之一, 为高品质印度南瓜种质早期筛选鉴定提供一定的参考依据。

关键词: 印度南瓜; 果实淀粉含量; 淀粉合成酶; 淀粉分解酶

中图分类号: S642.1 文献标志码: A 文章编号: 1673-2871(2022)01-024-08

Dynamic changes of fruit starch accumulation-related enzyme activities in early spring cultivated *Cucurbita maxima*

MA Wei¹, ZHANG Meng¹, SHI Yuzi¹, SHU Qin¹, SUN Tingzhen¹, BO Kailiang¹, WANG Fuli², DUAN Ying¹, WANG Changlin¹

(1. Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops of Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 2. Beijing Agricultural Technology Extension Station, Beijing 100029, China)

Abstract: In order to breed *Cucurbita maxima* with high starch content and suitable for greenhouse cultivation in early spring, the dynamic changes of starch accumulation and correlation relationship with the activities of AGPase, GBSS, SSS, SBE, α -amylase, β -amylase were studied in the four inbred lines Agol, Xue2 male, S8844 and Wuminglü. The results showed that after 42 d of fruit development, the dry matter contents of S8844 and Wuminglü were 26.1% and 33.0%, and the starch contents were 85.2% (Dry weight) and 87.1% (Dry weight), respectively. The enzyme activities of AGPase, GBSS and SBE were higher than those of the other two germplasms. The enzyme activities of SBE and AGPase in the early stage of fruit development could be selected as one of the biochemical indexes. The study could provide a theoretical basis for *Cucurbita maxima* breeding in early spring greenhouse.

Key words: *Cucurbita maxima*; Starch content; Starch synthase; Amylase

印度南瓜(*Cucurbita maxima*)原产于南美洲, 是葫芦科南瓜属主要栽培种之一, 在我国广泛栽培。印度南瓜果肉是主要食用部位, 其肉质软糯, 口感甜面, 富含碳水化合物、类胡萝卜素、维生素、

南瓜多糖等多种营养和保健功能成分, 其产业前景日益受到关注^[1-3]。

淀粉是 1,4-糖苷键组成的葡聚糖, 主要分为直链淀粉与支链淀粉两种。淀粉合成在叶绿体或淀

收稿日期: 2021-03-18; 修回日期: 2021-10-27

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0100706); 北京市果类蔬菜产业创新团队项目(BAIC01); 中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ASTIP-IVFCAAS); 中国农业科学院基本科研业务费(IVF-BRF2021007)

作者简介: 马 玮, 女, 在读硕士研究生, 主要研究方向为南瓜遗传育种。E-mail: 15930279531@163.com

通信作者: 段 颖, 女, 助理研究员, 主要研究方向为南瓜遗传育种。E-mail: duanying@caas.cn

王长林, 男, 副研究员, 主要研究方向为南瓜遗传育种。E-mail: wangchanglin@caas.cn

粉体中进行,由一系列酶催化完成,主要涉及五类关键酶,分别为 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶(ADP-glucose pyrophosphorylase, APGase)、颗粒型淀粉合成酶(granule-bound starch synthase, GBSS)、可溶性淀粉合成酶(soluble starch synthase, SSS)、淀粉分支酶(starch branching enzymes, SBE)及淀粉去分支酶(debranching enzymes, DBE)^[4-7]。目前利用基因组或转录组测序,已经分别从美洲南瓜(*Cucurbita pepo*)和中国南瓜(*Cucurbita moschata*)鉴定到 40 多个与淀粉代谢调控相关编码基因^[6-8]。在印度南瓜中的研究表明,淀粉代谢调控相关编码基因的转录模式在高淀粉种质和低淀粉种质中类似,但 *GPT*、*AATP*、*PGM*、*AGPaseL*、*GBSS I*、*SSS III* 和 *SBE I* 等基因表达水平差异显著,推测南瓜果实淀粉积累与淀粉合成前体限速酶 APGase、颗粒型淀粉合成酶关键酶 GBSS、可溶性淀粉合成酶关键酶 SSS 以及淀粉分支酶 SBE 密切相关,而淀粉去分支酶 DBE 的主要作用是将不正确的 α -1,6-糖苷键分支进行水解,其是否参与淀粉降解还有待进一步研究^[9]。利用转录组测序对不同淀粉含量的中国南瓜果实淀粉代谢调控相关基因进行分析,发现 *GBSS*、*SSS* 和 *SBE* 是不同南瓜果实淀粉积累差异的关键基因^[10]。

印度南瓜果肉淀粉组分和含量是重要果实品质性状之一,淀粉含量与果实口感品质密切相关^[11-12]。对印度南瓜研究的结果表明,低淀粉含量品种的果肉质地疏松粗糙,口感生涩,而高淀粉含量品种的果肉质地致密细腻、甜面,其直链淀粉和支链淀粉含量均显著高于低淀粉含量种质^[13]。然而目前在印度南瓜品种选育的实际应用中,通常以口感作为果实品质性状鉴定的手段,容易受到评价者的经验、果实成熟状态等影响,一定程度上影响了鉴定准确性^[12]。

不同栽培方式对南瓜果实淀粉含量存在较为明显的影响^[14-16]。目前,对中国南瓜的研究表明,与露地栽培相比,日光温室栽培模式下的中国南瓜在果实品质和产量等方面均有较大提高,并且采收期明显提前^[16]。在我国北方地区,露地栽培方式生产的南瓜,在生长前期容易受到低温冷害,生长后期容易因高温感染病毒病导致果实畸形,往往对产量造成严重影响。随着人们对印度南瓜消费需求的提升,筛选适宜保护地早春茬口栽培的优质品种越来越受到重视。研究早春日光温室栽培条件下果实淀粉合成及相关酶代谢规律,明确影响果实淀粉

积累的关键生理指标,对于筛选创制南瓜优异种质具有重要意义。笔者在本试验中在早春茬日光温室栽培条件下,利用 Agol、雪 2 父 2 份低淀粉含量种质和 S8844、无名绿 2 份高淀粉含量种质,研究淀粉代谢相关酶活力对果实淀粉积累的影响,以期筛选鉴定适宜早春茬口保护地栽培印度南瓜的优异种质提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验选用 4 份印度南瓜自交系 Agol、雪 2 父、S8844、无名绿,均为中国农业科学院蔬菜花卉研究所南瓜课题组培育 8 代以上的高代自交系。其中,雪 2 父、S8844、无名绿为蔓生种质,单株结瓜数 2~4 个,Agol 为短蔓种质,单株结瓜数 4~6 个。S8844、无名绿果实口感甜面,果肉淀粉含量和可溶性固形物含量高。Agol、雪 2 父果实口感较苦,果肉淀粉和可溶性固形物含量较低。

1.2 试验设计

试验于 2018 年 3—7 月在中国农业科学院蔬菜花卉研究所河北廊坊试验基地进行。2018 年 3 月 15 日选取籽粒光滑饱满的南瓜种子,28 ℃ 生长箱内催芽 2 d 后,播种至 32 孔穴盘育苗,当幼苗长至 2 叶 1 心时,定植于日光温室内,温室长 100 m,高 3.5 m,畦长 6.5 m,行距 1.3 m,株距 0.5 m。光量子通量密度(PFD)为 410 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,最高气温 33.5 ℃,最低气温 8.2 ℃,昼夜平均气温 21.1 ℃,最高湿度 89.5%,最低湿度 19.4%,昼夜平均湿度为 51.77%。5 月 1 日进行人工授粉,雌花经人工授粉后于 14、21、28、35、42 d 对生长一致的果实进行采收,并对相关指标进行测定。按照采收日期,分别将 3 枚果实的去籽果肉切块冻于液氮中,待全部果实采收完毕,进行淀粉代谢相关酶活力检测。

1.3 果实质量和干物质含量测定

南瓜鲜果实质量采用电子天平进行测定。果肉去除果皮和籽粒后,称取 100 g 鲜果肉(m_1),切成薄片,在 65 ℃ 恒温干燥箱内烘干 48 h,取出后进行称质量(m_2),果肉干物质含量测定公式为(m_2/m_1) \times 100%。

1.4 淀粉含量测定

称取约 10.0 g 南瓜烘干果肉,采用研磨仪进行充分研磨,设定参数为 60 Hz,60 s/次,共进行 3 次研磨,获得果肉烘干粉末。南瓜果肉淀粉提取方法参照 Stevenson 等^[17]方法进行提取,称取 2 g 果肉烘干粉末,加入 0.05% NaOH 溶液充分震荡 24 h,

12 000 r·min⁻¹离心 10 min 后加入蒸馏水进行清洗 2 次,沉淀转移至 50 mL 离心管,5000 r·min⁻¹离心 10 min 后弃上清,沉淀加入 9 mL 0.1 mol·L⁻¹ NaCl 和 100 μL 10% 甲苯进行脱脂清洗,加入蒸馏水进行 2 次清洗,再加入无水乙醇进行 2 次清洗后,转移至 Whatman No 4 滤纸上,35 °C 烘干,获得淀粉粗提样品。

南瓜果肉直链淀粉和直链淀粉测定方法参照范明顺等^[18]方法进行并略作修改。称取 25 mg 淀粉粗提样品置于 25 mL 容量瓶中,加入 250 μL 95% 乙醇,1 mol·L⁻¹ NaOH 2.25 mL,30 °C 恒温箱内糊化 24 h,加热至 95 °C 振荡保温 8 min。待淀粉完全溶解后,冷却至室温,定容至 25 mL。将一定浓度的稀释液转移至新的容量瓶中,加入 1 mol·L⁻¹ 乙酸 250 μL,500 μL 碘比色液,定容至 2 mL。采用分光光度法分别于 620 nm 波长下测定直链淀粉含量,于 535 nm 和 730 nm 波长下测定支链淀粉含量。以马铃薯直链淀粉和支链淀粉配制成 1.0 mg·mL⁻¹ 溶液,按照如下体积比例混合配制标准溶液:直链淀粉 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 μL;支链淀粉 4.75、4.5、4.0、3.5、3.0 μL。将标准溶液加入碘比色液,并稀释至 25 mL,在 620 nm、535 nm、730 nm 波长下测定吸光值。直链淀粉和直链淀粉的含量以相关标准

曲线进行计算。直链淀粉标准曲线为: $y=1.482 4x+0.007 7 (R^2=0.995 4)$,支链淀粉标准曲线为: $y=-0.232 5x+0.217 6 (R^2=0.996 5)$ 。

1.5 淀粉相关酶活测定

参照 Nakamura(1989)方法进行并略作修改^[19]。

1.6 数据统计分析方法

采用 Microsoft Excel 2010 进行数据统计,SPSS 23.0 对数据进行单因素方差分析,并运用 Duncan's 检验法进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 印度南瓜果实不同发育时期生长指标

对 Agol、雪 2 父、S8844 和无名绿不同发育时期的单瓜鲜质量和干物质含量进行测定(表 1)。雪 2 父单瓜鲜质量在授粉后 14 d 增长幅度最大,是其他种质的 1.6~1.8 倍。在果实生长中期(28~35 d),Agol 和 S8844、无名绿单瓜鲜质量较发育初期均有较大幅度增长,至果实成熟期(42 d)Agol 和 S8844 的单瓜鲜质量均接近雪 2 父,约为 1.30 kg 和 1.48 kg。无名绿单瓜鲜质量在 4 份种质中最低,至果实成熟期仅为 1.13 kg,约为其他种质的 66%~87%。

对果实干物质含量进行测定,在授粉后 14 d,S8844 干物质含量(w,后同)达到 12.6%,而其他种

表 1 印度南瓜果实不同发育时期单瓜鲜质量和干物质含量

测定指标	品种	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d
单瓜鲜质量/kg	Agol	0.60±0.10 b	0.88±0.13 ab	0.88±0.03 bc	1.10±0.00 b	1.30±0.00 a
	雪 2 父	0.95±0.05 a	1.00±0.00 a	1.13±0.13 a	1.50±0.05 a	1.55±0.10 a
	S8844	0.52±0.06 b	0.73±0.03 b	0.95±0.05 ab	1.35±0.15 ab	1.48±0.03 a
	无名绿	0.55±0.00 b	0.73±0.07 b	0.79±0.01 c	1.15±0.15 b	1.13±0.08 b
w(干物质)/%	Agol	5.1±0.1 c	7.2±0.2 b	8.9±0.1 b	9.4±0.5 c	11.8±0.0 c
	雪 2 父	5.5±0.0 c	6.6±0.2 b	7.8±0.2 b	8.0±0.0 c	8.0±0.1 cd
	S8844	12.6±0.5 a	12.6±0.5 a	15.7±0.2 a	17.1±0.1 b	26.1±0.2 b
	无名绿	8.4±0.2 b	12.3±0.1 a	17.1±0.1 a	22.8±0.7 a	33.0±0.5 a

注:同列数字后不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

质为 5.1%~8.4%。随着果实的发育,无名绿干物质含量迅速增加,与 S8844 较为接近。至果实成熟期(42 d),S8844 和无名绿的干物质含量均显著高于 Agol 和雪 2 父,干物质含量分别为 26.1%和 33.0%,而 Agol 和雪 2 父仅为 11.8%和 8.0%。

2.2 印度南瓜果实不同发育时期淀粉含量

采用紫外分光光度法分别对 Agol、雪 2 父、S8844 和无名绿果实不同发育时期的直链淀粉、支链淀粉和总淀粉含量进行测定(图 1)。4 份种质的总淀粉含量在果实发育过程中总体呈增加趋势,2 份高淀粉含量种质和 2 份低淀粉含量种质在总淀粉含量和支链淀粉含量上差异较大:S8844 和无名

绿的成熟果实总淀粉含量为 85%~88%(干质量,后同),而 Agol 和雪 2 父约为 40%。从积累模式上看,随着果实发育成熟,Agol 和雪 2 父支链淀粉变化趋势一直较为稳定,而 S8844 的支链淀粉在果实生长前期(14~28 d)已经进入快速积累期,无名绿的支链淀粉在果实生长前期积累较不明显,而在后期(35~42 d)增幅最为明显,至授粉后 42 d 时,无名绿支链淀粉含量已经达到 Agol 和雪 2 父的 1.6~1.9 倍。4 份种质果实直链淀粉含量均一直维持较低水平,且在整个果实发育过程中变化趋势不明显,S8844 和无名绿的直链淀粉含量略高于 Agol 和雪 2 父。至果实成熟时,4 份种质果实直链淀粉含量

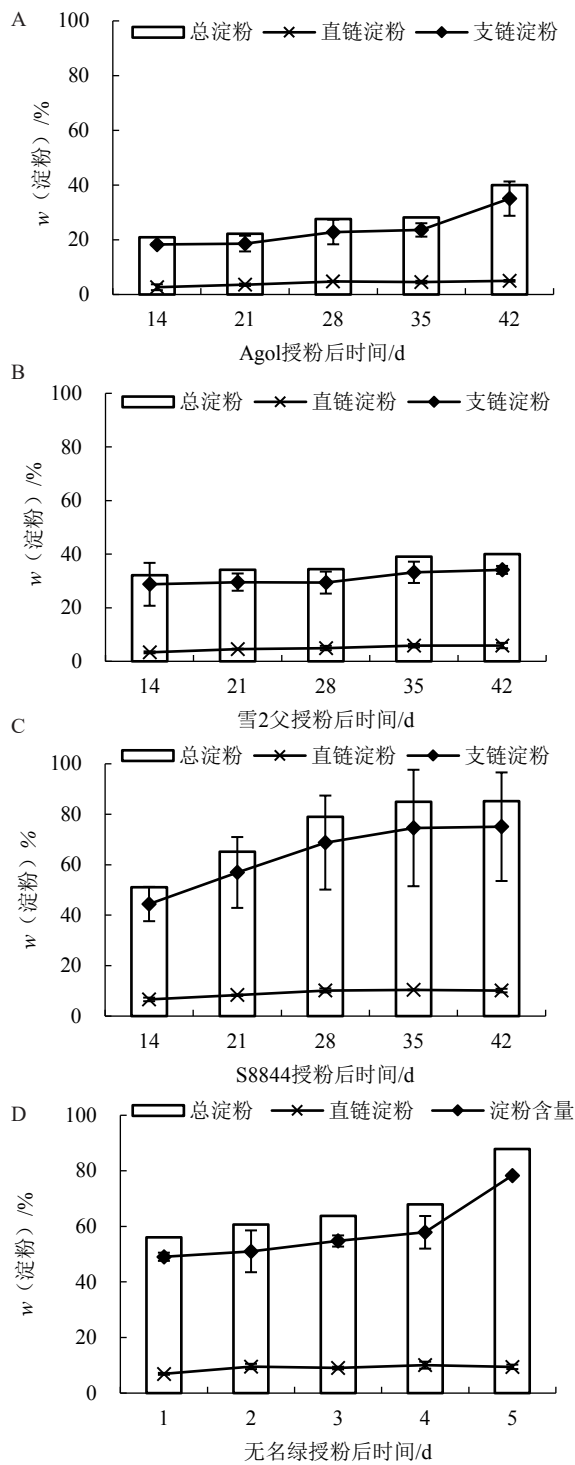


图1 4种印度南瓜果实不同发育时期直链淀粉、支链淀粉和总淀粉含量

分别占总淀粉含量的12.4%、14.7%、11.9%、10.8%。

2.3 印度南瓜果实不同发育时期淀粉合成酶活力

为明确印度南瓜果实发育过程中淀粉积累相关酶的酶活力变化趋势,对4份种质在不同发育阶段的ADP焦磷酸化酶(AGPase)、可溶性淀粉合酶(SSS)、颗粒结合型淀粉合酶(GBSS)和淀粉分支酶

(SBE)进行酶活力测定。如图2-A,AGPase酶活力测定结果显示,2个低淀粉种质Agol和雪2父的AGPase酶活力在整个果实发育时期都较低,且随果实发育进一步降低;2个高淀粉种质S8844和无名绿的AGPase酶活力在果实发育中期(28 d)开始增加,至果实发育后期(35 d)达到峰值,随后逐渐降低(图2-A)。

图2-B显示GBSS酶活力测定结果。在4份种

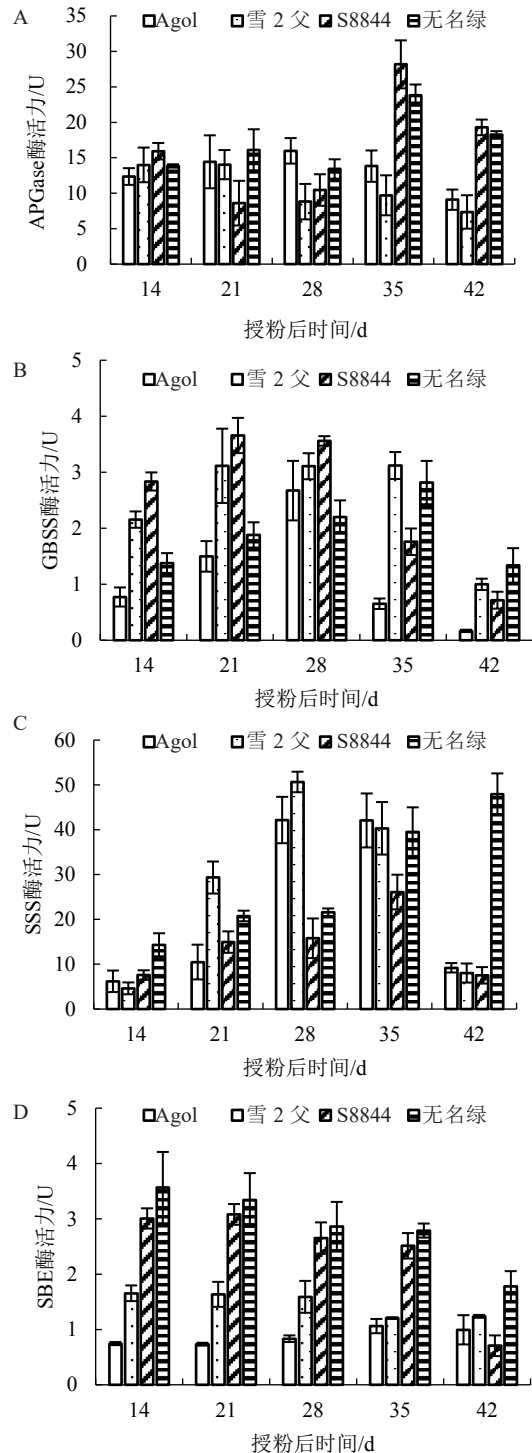


图2 印度南瓜果实不同发育时期淀粉合成相关酶活力

质的果实发育过程中。GBSS 酶活力均表现为先上升再下降的趋势。其中,雪 2 父和 S8844 的 GBSS 酶活力在果实发育早期较高,为 Agol 和无名绿的 1.6~4.0 倍。而在果实发育后期,雪 2 父和无名绿的 GBSS 酶活力仍维持较高水平,随后至果实成熟时,4 份种质的酶活力均降至最低水平(图 2-B)。

图 2-C 显示 SSS 酶活力测定结果。在 4 份种质的果实发育早期,SSS 酶活力均处于上升趋势。在 2 份低淀粉种质 Agol 和雪 2 父中,SSS 酶活力峰值出现于授粉后 28 d,而高淀粉种质 S8844 的 SSS 酶活力峰值出现于 35 d,无名绿的 SSS 酶活力峰值则在果实成熟时出现。在果实发育后期(35~42 d),Agol、雪 2 父和 S8844 的酶活力明显降低,而无名绿仍维持较高水平。至果实成熟时,无名绿 SSS 酶活力是其他 3 份种质的 5.2~6.4 倍(图 2-C)。

对不同发育阶段的果实 SBE 酶活力进行测定,发现无名绿、S8844 明显高于雪 2 父、Agol,且随着果实的成熟,SBE 酶活力在 2 份高淀粉含量种质中呈逐渐降低趋势,而 SBE 酶活力在 2 个低淀粉含量种质中则一直维持较低水平(图 2-D)。

2.4 印度南瓜果实不同发育时期淀粉分解酶活力

对印度南瓜果实不同发育时期淀粉分解途径相关 α -淀粉酶、 β -淀粉酶和总淀粉酶活力进行测定。 α -淀粉酶活力测定结果显示,雪 2 父在整个果实发育时期的酶活力一直较高,而其他 3 份种质的酶活力随果实发育成熟而逐渐降低(图 3-A); β -淀粉酶活力测定结果显示,Agol 和雪 2 父的酶活力高于 S8844 和无名绿。总淀粉酶活力随果实发育的变化趋势,与 β -淀粉酶活力的变化趋势较为接近(图 3-B)。

2.5 印度南瓜果实不同发育时期淀粉含量与酶活力相关性分析

为明确日光温室栽培条件下印度南瓜果实淀粉

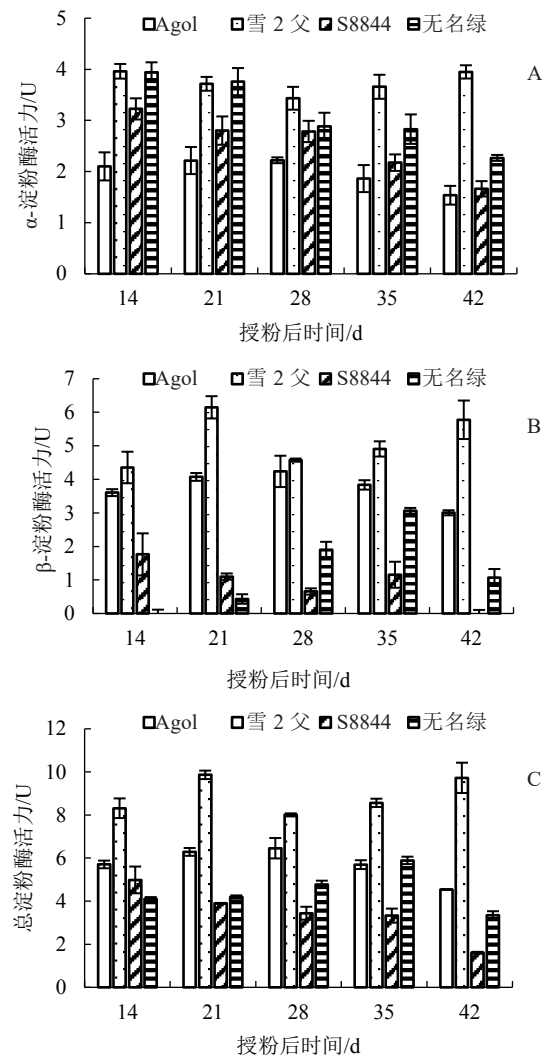


图 3 印度南瓜果实不同发育时期淀粉分解相关酶活力变化粉积累的重要影响因子及作用,对不同发育时期果实直链淀粉含量、支链淀粉含量与淀粉合成分解途径相关酶的酶活力进行相关性分析(表 2)。结果显示,淀粉合成相关酶中,AGPase 酶活力在果实生长期(35~42 d)与直链淀粉和支链淀粉含量相关系数较高,分别达到 0.916、0.929、0.966 和 0.988;

表 2 印度南瓜果实不同发育时期淀粉含量与酶活力的相关性分析

授粉后时间/d	淀粉类型	APGase	GBSS	SSS	SBE	α -淀粉酶	β -淀粉酶	总淀粉酶
14	直链	0.692	0.762	0.450	0.979*	0.495	-0.909	-0.712
	支链	0.697	0.749	0.490	0.999**	0.651	-0.868	-0.591
21	直链	-0.228	0.038	0.279	0.989*	0.425	-0.886	-0.742
	支链	-0.458	0.056	0.509	0.974*	0.366	-0.811	-0.686
28	直链	-0.178	-0.970*	0.162	0.923	0.027	-0.989*	-0.929
	支链	-0.295	-0.937	0.283	0.916	0.109	-0.981*	-0.901
35	直链	0.916	-0.698	0.347	0.979*	-0.035	-0.783	-0.591
	支链	0.929	-0.856	0.233	0.905	-0.120	-0.874	-0.690
42	直链	0.966*	0.455	0.552	0.086	-0.295	-0.818	-0.692
	支链	0.988*	0.601	0.534	0.209	-0.405	-0.874	-0.767

注:*代表在 0.05 水平存在显著性差异;**代表在 0.01 水平存在极显著性差异。

GBSS 酶活力在授粉后 28 d 时与淀粉含量呈负相关,相关系数较高,分别达到-0.970 和-0.937;淀粉分支酶 SBE 酶活力与淀粉含量在果实生长前期和中期的相关系数较高,分别达到 0.979、0.999、0.989、0.974。而随着果实的成熟,其相关性降低;SSS 酶活力与淀粉含量的相关性较低。淀粉分解相关酶中, β -淀粉酶在果实发育中期与淀粉含量呈负相关,相关系数为-0.989 和-0.981。

3 讨 论

在中国北方地区利用日光温室栽培为早春茬印度南瓜生长提供适宜的昼夜温度,对高淀粉类型印度南瓜果实淀粉积累、直链淀粉和支链淀粉比例调控及果实品质改良有积极意义。淀粉含量是影响印度南瓜品质和口感的重要因素^[9, 12, 20]。由于果实品质性状形成较为复杂,因此育种中需要了解各因素之间的联系,明确性状调控关键因子,以期对育种材料进行高效筛选。目前,一些研究揭示了南瓜果实品质的遗传调控机制,相关酶及其编码基因的表达模式和功能研究也逐渐深入^[21-22]。本试验在前人工作基础上,进一步探讨了冬春日光温室栽培环境下,不同淀粉含量的印度南瓜果实淀粉积累规律及其与淀粉代谢相关酶活力的相关性,挖掘影响果实淀粉积累的关键因子。

3.1 栽培温度对淀粉合成酶活力的影响

在南瓜属的研究中,Nakkanong 等^[14]利用中国南瓜和印度南瓜及种间杂交种,提出淀粉含量与淀粉合成酶编码基因转录水平之间的关系。在拟南芥、小麦等模式作物的研究中表明,果实淀粉积累相关酶在转录和翻译后水平受到温度、昼夜节律等多种因素影响,其调控机制较为复杂^[23-26]。植物淀粉合成酶具有不同的温度敏感性:小麦种子胚乳细胞 SSS 酶活力适宜温度在 20~25 °C 之间^[23],而水稻种子胚乳 SSS 酶活力在 29~35 °C 时较高,在 22~28 °C 时较低,GBSS 和 SBE 活力则正相反。因此,支链淀粉链的长度和比例受温度影响较大^[25]。目前,昼夜温度对不同淀粉积累类型的印度南瓜淀粉合成酶活力的影响尚不明确,值得进一步深入研究。笔者在本试验中利用 4 份淀粉含量不同的种质,初步研究了北方地区早春茬温室栽培条件下的淀粉含量与淀粉合成酶活力之间的相关性。根据温湿度记录仪数据显示平均昼夜温度为 21.1 °C,在此条件下高淀粉含量种质中与淀粉合成有关的酶活力如 APGase、SBE 均维持较高水平,与低淀粉含

量种质差异明显。在一些田间试验中显示,不同的栽培茬口对同一种印度南瓜果实口感、甜度和淀粉含量存在一定的影响。淀粉酶活力调控机制是否与温度有关,有待进一步研究。

3.2 不同发育时期印度南瓜果实淀粉含量积累和酶活力动态变化趋势

前人研究表明,南瓜果实淀粉含量与干物质、可溶性固形物、可溶性糖和多糖含量呈极显著正相关^[27-28]。本试验中,2 份低淀粉含量种质 Agol、雪 2 父的干物质含量较低,推测可能与同化物合成速率水平较低,并且向果糖、蔗糖或其他碳水化合物等方向转化有关^[29]。2 份高淀粉含量种质的淀粉积累方式也存在较为明显的区别:S8844 在果实整个生长周期中,淀粉合成和积累速率都非常高,而无名绿则在果实特定的发育阶段,淀粉合成和积累速率迅速升高(图 1-C~D)。

植物细胞淀粉主要在叶绿体和淀粉体中进行合成。APGase 将 1-磷酸-葡萄糖和 ATP 转化为淀粉合成底物腺苷-2-磷酸葡萄糖(adenosine diphosphate glucose, ADPG),是淀粉合成途径中的关键限速酶之一^[30]。目前,转录组测序结果显示南瓜属基因组至少有 2 类 ADPG 编码基因,分别命名为 *APGaseS* 和 *APGaseL*,而印度南瓜的 *APGaseL* 基因转录水平与淀粉含量存在显著相关性^[6, 9, 14]。在南瓜中的研究还表明,与中国南瓜蜜本、黄狼南瓜相比,印度南瓜红香栗淀粉含量更高,其 APGase 酶活力也在果实发育时期一直维持较高的水平,说明 APGase 酶活力在果实不同发育时期淀粉积累中的重要作用^[28]。本试验中也检测到高淀粉种质 S8844 和无名绿的 APGase 酶活力随果实发育成熟而进一步升高(图 3-A)。对于拟南芥的研究表明,不同的 APGase 单体可能在果实发育特定时期通过异源多聚体的聚合及构象变化,从而使淀粉与果糖合成效率维持动态平衡^[30]。这为印度南瓜 APGase 酶活力受到转录调控和翻译后的调控机制研究提供了一定的思路。

直链淀粉的形成主要受 GBSS 催化调控,通过 α -1,4 糖苷键将 ADPG 连接到糖链的非还原性末端^[31],南瓜属栽培种基因组中至少存在 4 个 GBSS 家族基因。目前,在中国南瓜、印度南瓜中已经鉴定出多个 GBSS 亚基的编码基因,并发现其中一些 GBSS 基因的转录水平与淀粉含量密切相关。小麦种子直链淀粉/支链淀粉比例较高,基因组中存在多个 GBSS 编码基因,且 mRNA 存在多种可变剪接,

共同调控 GBSS 酶活力^[32]。本试验中, GBSS 酶活力与果实淀粉含量之间的相关性较低, 仅在果实生长中期(28 d)呈负相关性(图 2-B), 推测这是由于印度南瓜果实直链淀粉占果实总淀粉含量比例较小, 其酶活力对总淀粉含量的影响并不显著。

支链淀粉形成主要受 SSS、SBE 等酶催化调控。SSS 通过 α -1,4 糖苷键将 ADPG 连接到糖链上形成可溶性淀粉, SBE 催化 α -1,6 葡萄糖苷加入到葡萄糖链的分支端以延伸支链淀粉链。植物中至少存在 4 种不同的 SSS 和 2 种 SBE^[14,33]。目前, 在南瓜属中至少鉴定到 2 个 SSS 和 3 个 SBE^[6,8]。已有研究报道中国南方地区日光温室栽培的印度南瓜果实淀粉含量与 SSS 和 SBE 基因转录水平的相关性较低^[14], 本试验显示 SBE 酶活力与淀粉含量相关性较高, 推测 SBE 基因在转录后和翻译后受到了一定的调控和修饰, 使其结构和功能发生改变, 从而影响果实淀粉合成速率。这种翻译后的修饰作用很可能受到种质自身遗传特性及环境因子的共同影响。

淀粉分解过程主要由 α -淀粉酶、 β -淀粉酶和淀粉磷酸化酶催化。其中 α -淀粉酶主要负责水解 α -1,4 糖苷键, 而 β -淀粉酶主要水解 α -1,6 糖苷键。研究表明印度南瓜果实淀粉含量快速增长期淀粉酶活力较低, 而在果实成熟期和采后贮藏期淀粉酶活力迅速提升^[34]。本试验中, β -淀粉酶和总淀粉酶活力在高淀粉种质中较低, 而在低淀粉种质中较高, 明确了淀粉水解酶在淀粉积累中的作用。

4 结 论

印度南瓜果实淀粉含量由淀粉合成、贮藏与分解代谢的动态平衡共同决定, 其调控机制受到栽培环境影响较大。本研究结果表明早春茬日光温室中栽培的印度南瓜, 果实淀粉含量在幼果期与 SBE 酶活力呈正相关, 在果实发育中后期与 AGPase 酶活力呈正相关, 与 β -淀粉酶和总淀粉酶活力呈负相关。在进行高淀粉含量印度南瓜种质的筛选时, 可将幼果期果实 SBE 酶活力值作为果实淀粉积累潜力的参考生化指标之一。后续研究可以继续关注印度南瓜雌花花冠和子房 SBE 酶活力与成熟果实淀粉含量之间的相关性, 以期进一步加快苗期筛选进程, 减轻育种工作量。此外, 昼夜温度及昼夜节律对不同品种印度南瓜果实淀粉含量及酶活力调控机制也值得进一步研究。本试验为高品质印度南瓜种质的早期筛选提供一定的参考依据。

参考文献

- [1] 孙清芳, 崔崇士, 张耀伟. 南瓜营养品质育种的研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2004, 35(6): 754-758.
- [2] 刘洋, 屈淑平, 崔崇士. 南瓜营养品质与功能成分研究现状与展望[J]. 中国瓜菜, 2006, 19(2): 27-29.
- [3] 刘文君, 黄凤婵, 范爱丽, 等. 南瓜果肉营养成分相关性分析及综合营养品质评价[J]. 江苏农业科学, 2003, 41(8): 150-153.
- [4] ABBAS H M K, HUANG H X, YANG Y F, et al. Characterization of starch in *Cucurbita moschata* germplasm throughout fruit development[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68: 9690-9696.
- [5] ZEEMAN S C, KOSSMANN J, SMITH A M. Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2010, 61: 209-234.
- [6] WYATT L E, STRICKLER S R, MUELLER L A, et al. An acorn squash (*Cucurbita pepo* ssp. *ovifera*) fruit and seed transcriptome as a resource for the study of fruit traits in Cucurbita[J]. Horticulture Research, 2015, 2: 14070.
- [7] 马玮, 史玉滋, 段颖, 等. 南瓜果实淀粉和可溶性固形物研究进展[J]. 中国瓜菜, 2018, 31(11): 1-5.
- [8] 顾焕焕. 基于转录组的南瓜果实发育和品质形成研究[D]. 河北邯郸: 河北工程大学, 2020.
- [9] 王超杰, 王云莉, 徐文龙, 等. 籽用和肉用印度南瓜果实发育过程中淀粉合成途径相关基因的表达分析[J]. 中国蔬菜, 2019(7): 36-42.
- [10] 王安君. 基于 RNA-Seq 的南瓜果实重要品质形成的代谢和分子调控研究[D]. 广州: 暨南大学, 2017.
- [11] HURST P L, CORRIGAN V K, HANNAN P J, et al. Storage roots, compositional analysis, and sensory quality of three cultivars of buttercup squash[J]. New Zealand Journal of Experimental Agriculture, 1995, 23(1): 89-95.
- [12] 尹玲, 王长林, 王迎杰, 等. 南瓜的感官品质、质构及生化分析[J]. 食品科学, 2013, 34(5): 26-30.
- [13] 邢伟, 葛宇, 于杨, 等. 籽用和肉用南瓜品种果实生长发育过程中营养成分的比较分析[J]. 中国蔬菜, 2012(14): 70-75.
- [14] NAKKANONG K, YANG J H, ZHANG M F. Starch accumulation and starch related genes expression in novel inter-specific inbred squash line and their parents during fruit development[J]. Scientia Horticulturae, 2012, 136: 1-8.
- [15] 杨红波, 闵子扬, 成娟, 等. 不同栽培条件对南瓜主要品质影响的研究[C]//中国园艺学会南瓜研究分会籽用南瓜产业发展经验交流会暨学术研讨会论文集, 2015.
- [16] CONTI S, VILLARI G, AMICO E, et al. Effects of production system and transplanting time on yield, quality and antioxidant content of organic winter squash (*Cucurbita moschata* Duch.) [J]. Scientia Horticulturae, 2015, 183: 136-143.
- [17] STEVENSON D G, YOO S H, HURST P L, et al. Structural and physicochemical characteristics of winter squash (*Cucurbita maxima* D.) fruit starches at harvest[J]. Carbohydrate Polymers, 2005, 59(2): 153-163.
- [18] 范明顺, 张崇玉, 张琴, 等. 双波长分光光度法测定高粱中的直

- 链淀粉和支链淀粉[J].中国酿造,2008(21):85-86.
- [19] NAKAMURA Y, YUKI K, PARK S Y, et al. Carbohydrate metabolism in the developing endosperm of rice grains[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1989, 30(6):833-839.
- [20] 杨宏,李跃建,王长林,等. 南瓜口感评价与营养成分的相关性和回归分析[J].中国蔬菜,2016(11):25-32.
- [21] 毛晓微. 印度南瓜主要园艺性状的 QTL 定位[D].河北邯郸:河北工程大学,2016.
- [22] KAŻMIŃSKA K, HALLMANN E, KORZENIEWSKA A, et al. Identification of fruit-associated QTLs in winter squash (*Cucurbita maxima* Duchesne) using recombinant inbred lines[J]. *Genes (Basel)*, 2020, 11(4):419.
- [23] KEELING P L, BACON P J, HOLT D C. Elevated temperature reduces starch deposition in wheat endosperm by reducing the activity of soluble starch synthase[J]. *Planta*, 1993, 191(3):342-348.
- [24] SMITH S M, FULTON D C, CHIA T, et al. Diurnal changes in the transcriptome encoding enzymes of starch metabolism provide evidence for both transcriptional and posttranscriptional regulation of starch metabolism in *Arabidopsis* leaves[J]. *Plant Physiology*, 2004, 136(1):2687-2699.
- [25] JIANG H W, DIAN W M, WU P. Effect of high temperature on fine structure of amylopectin in rice endosperm by reducing the activity of the starch branching enzyme[J]. *Phytochemistry*, 2003, 63(1):53-59.
- [26] KÖLLING K, MATTHIAS T, ANTONIA M, et al. Carbon partitioning in *Arabidopsis thaliana* is a dynamic process controlled by the plants metabolic status and its circadian clock[J]. *Plant, Cell and Environment*, 2015, 38(10):1965-1979.
- [27] 褚盼盼,向长萍. 中国南瓜营养品质的变化规律和相关性[J].中国蔬菜,2007(12):15-19.
- [28] 孙守如,杨子琴,翟庆慧,等. 不同基因型南瓜品种果实发育过程中营养成分的变化[J].河南农业大学学报,2008,42(3):276-279.
- [29] IRVING D E, HURST P L, RAGG J S. Changes in carbohydrates and carbohydrate metabolizing enzymes during the development, maturation, and ripening of buttercup squash (*Cucurbita maxima* D. 'Delica') [J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 1997, 122(3):310-314.
- [30] MIGUEL A B, ALBERTO A I, JACK P. ADP-glucose pyrophosphorylase: a regulatory enzyme for plant starch synthesis[J]. *Photosynthesis Research*, 2004, 79(1):1-24.
- [31] NAKAMURA T, YAMAMORI M, HISASHI H, et al. Production of waxy (amylose-free) wheats[J]. *Molecular and General Genetics*, 1995, 248(3):253-259.
- [32] YAMAMORI M, QUYNH N T. Differential effects of Wx-A1, -B1 and -D1 protein deficiencies on apparent amylose content and starch pasting properties in common wheat[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 100(1):32-38.
- [33] SMITH A M, DENYER K, MARTIN C. The synthesis of the starch granule[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 1997, 48(1):67-87.
- [34] IRVING D E, SHINGLETON G J, HURST P L. Starch degradation in buttercup squash (*Cucurbita maxima*) [J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 1999, 124(6):587-590.