

两品种猕猴桃果实采后淀粉降解特性比较分析

柴吉钊 刘璐 陈景丹 王康 曹士锋 施丽愉 杨震峰 陈伟*

(浙江万里学院生物与环境学院, 浙江 宁波 315100)

摘要:为探究猕猴桃果实采后淀粉降解规律,本试验以红阳(HY)和翠玉(CY)猕猴桃果实为材料,比较分析了不同品种猕猴桃果实采后淀粉含量变化以及淀粉降解相关基因的表达模式。结果表明,猕猴桃采后 25℃ 贮藏过程中, HY 猕猴桃果实硬度迅速下降并伴随出现乙烯跃变, CY 果实硬度缓慢下降但并未出现乙烯释放高峰。2 个品种猕猴桃果实的淀粉含量随贮藏时间的延长显著下降。扫描电镜(SEM)结果显示,随着贮藏时间的延长,2 个品种猕猴桃果实淀粉粒表面的光滑球面均出现不同程度的消化和破碎,说明淀粉存在酶促降解。同时, HY 猕猴桃果实贮藏后期的乙烯释放速率极显著高于 CY 猕猴桃 ($P < 0.001$)。HY 猕猴桃果实外果肉中淀粉含量在贮藏前期(0~2 d)极显著高于 CY 猕猴桃 ($P < 0.01$),但在贮藏后期(8~12 d)极显著低于 CY 猕猴桃 ($P < 0.001$); HY 猕猴桃果实果心中淀粉含量在贮藏前期(2~4 d)与 CY 猕猴桃无显著差异,但在贮藏后期(6~12 d)极显著低于 CY 猕猴桃 ($P < 0.001$)。本研究结果为进一步揭示猕猴桃果实采后淀粉降解机理提供了一定的理论依据。

关键词:不同品种; 猕猴桃; 采后贮藏; 淀粉降解

DOI: 10. 11869/j.issn.100-8551. 2021. 09. 2065

猕猴桃 (*Actinidia chinensis*) 是典型的呼吸跃变型果实,跃变一旦发生,其果肉硬度、颜色、细胞壁、营养物质和芳香物质均会发生明显变化^[1]。商业上猕猴桃主要有中华猕猴桃 (*A. chinensis*) 和美味猕猴桃 (*A. deliciosa*) 2 个品种^[2]。不同品种的猕猴桃之间存在差异^[3],中华猕猴桃包括 Hort 16A、Sanuki Gold、Kohi 等,该品种猕猴桃果肉呈黄色,果实可溶性固形物含量高、有机酸浓度低^[4];而美味猕猴桃 Hayward 果实体积大、果肉呈绿色。两品种猕猴桃中,中华猕猴桃更易产生乙烯^[5],即中华猕猴桃果实的贮藏期和货架期均短于美味猕猴桃^[6]。

猕猴桃果实在成熟过程中碳水化合物含量的增加主要归因于淀粉的累积。而果实是植物贮藏淀粉的重要器官之一,未成熟的香蕉、猕猴桃、苹果等果实中均含有大量淀粉^[7-8]。Richardson 等^[9]将猕猴桃果实成熟发育过程分为细胞分裂期、淀粉积累期和果实成熟期 3 个阶段。果实在细胞分裂期结束后开始积累淀粉,进入成熟期后淀粉开始降解,直至果实完全成熟,

淀粉几乎完全转变为可溶性糖^[9]。王贵禧等^[10]研究发现,采后猕猴桃果实的快速软化主要是由于淀粉酶活性的上升加快了淀粉的降解速度。

淀粉降解由多种酶共同作用完成,起始于淀粉粒表面发生的可逆葡聚糖磷酸化^[11-12]。淀粉粒在葡聚糖水合双激酶 (glucan water dikinase, GWD) 和磷酸化葡聚糖水合双激酶 (phosphoglucan water dikinase, PWD) 的作用下磷酸化^[13],使淀粉粒结构松散,有利于水解酶分解糖链,但水解酶不能隔着磷酸基团降解糖苷键,因此需要去磷酸酶 (phosphoglucan phosphatase) 释放磷酸^[14-15],使水解酶彻底降解糖链,同时形成一个磷酸循环^[16]。拟南芥中存在 2 种去分支酶 (branching enzyme, DBE),包括异淀粉酶 (isoamylase, ISA) 和极限糊精酶 (limit dextrinase, LDA),它们都是支链淀粉彻底降解所必需的酶^[17]。松散淀粉粒在 ISA3 的作用下生成可溶性线性葡聚糖,再在 β -淀粉酶 (β -amylase, BAM) 的催化下水解生成残缺的麦芽三糖和麦芽糖^[14, 17-18],也可以在葡聚糖磷

收稿日期: 2020-05-15 接受日期: 2020-07-14

基金项目: 宁波市自然科学基金项目 (2018A610222)、浙江省重点研发计划项目 (2019C02029)、浙江省教育厅一般科研项目 (Y201942714)

作者简介: 柴吉钊, 女, 主要从事农产品贮藏与加工方面研究。E-mail: 1610904645@qq.com

* 通讯作者: 陈伟, 女, 高级实验师, 主要从事农产品贮藏与加工方面研究。E-mail: vivianchanyee@zwu.edu.cn

酸化酶(α -glucanglucan phospholyase, PHS)和歧化酶(disproportionating enzyme, DPE)作用下进一步形成葡萄糖-1-磷酸和葡萄糖。相比于BAM, α -淀粉酶(α -amylase, AMY)对于暂时的淀粉降解作用并不显著,但AMY3可独立于GWD和PWD,直接作用于非水溶性淀粉粒,可将淀粉内部的 α -1,4共价键进行切割,释放出的分支葡聚糖在ISA3和(或)LDA的作用下通过脱支反应得到线性葡聚糖,使得淀粉粒的降解变得相对简单^[19]。

目前果实淀粉降解相关酶基因的研究只有在番茄、香蕉、猕猴桃等水果中有少量报道^[20],且尚未建立明确的遗传背景。为此,本试验以红阳和翠玉猕猴桃果实为试验材料,探讨不同品种猕猴桃果实成熟软化与淀粉降解的关系,研究其内在的联系,以期对淀粉降解与成熟软化提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料与试剂

猕猴桃果实采自浙江省宁波市东钱湖猕猴桃种植基地,分别摘取形状匀称、大小均一、处于商业成熟(可溶性固形物含量为5.5%~6.0%,硬度为35~40N)且未受病虫害的红阳(HY)和翠玉(CY)2个品种猕猴桃果实,在果实采摘后1h内运至实验室。随机将猕猴桃果实分为3组,每组至少60个,试验重复3次。随后置于恒温恒湿箱(温度25℃,湿度95%)中贮存12d,每2d进行1次取样。果实去皮后,去头去尾,沿头尾方向切开,选用与切面中心对称的果肉,快速放入液氮,待其完全冻结后,快速磨成粉,混合均匀后装入离心管,存放于-80℃超低温冰箱中备用。

RNA提取试剂盒、DNaseI,美国Omega Bio-Tek公司;SuperRT cDNA第一链合成试剂盒,江苏康为世纪生物科技有限公司。

1.2 主要仪器与设备

TMS-Touch物性分析仪,美国FTC公司;2014C型气相色谱仪,日本岛津;NanoDro-p2000核酸蛋白分析仪,美国Thermo Fisher Scientific;凝胶成像仪,美国BIO-RAD;JEOL JFC-1600离子溅射仪、JEOL JSM-6460 LV扫描电镜,日本JEOL。

1.3 试验方法

1.3.1 果实硬度 结合质地剖面分析法(texture profile analysis, TPA)通过TMS-Touch物性分析仪对猕猴桃果肉进行硬度测试。测试参数设置如下:测试速度30 mm·min⁻¹,果肉受压变性15%,触发力0.1 N(传

感器量程为25 N时)或1 N(传感器量程为1 000 N时)。试验选用直径为7.5 mm的圆柱形探头。每次随机选取5个果实,沿赤道部位进行2次硬度测定。

1.3.2 乙烯释放速率测定 选择2.5 L的密闭容器作为乙烯释放速率测定专用容器。从贮藏样品中随机选择5个果实放入专用容器中,迅速盖紧盒盖,同时放入原贮藏环境中,2 h以后运用气相色谱仪对容器中的乙烯释放量进行测定,测定过程以标准乙烯气体作为对照,计算桃果实乙烯释放速率,结果以 $\mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ FW表示。本试验选用Rtx-5MS(30 m×0.32 mm×0.25 μm)色谱柱,选用高纯度N₂作为载气,其他相关测定参数为:柱温80℃,检测器(FID)温度270℃,进样口温度230℃,进样量1 mL。

1.3.3 淀粉粒提取及扫描电镜观察 参考聂丹^[21]的方法提取猕猴桃外果肉和果心淀粉。称取液氮研磨后的果肉25 g,放置于100 mL 1 g·mL⁻¹的亚硫酸氢钠溶液中浸泡过夜。次日使用100目标准筛过滤浆液,将过滤所得淀粉悬浊液4 000 r·min⁻¹离心20 min,沉淀即为淀粉沉淀。使用超纯水再次清洗淀粉沉淀,离心(4 000 r·min⁻¹, 20 min)取沉淀,重复3次,获得纯度更高的淀粉沉淀。将所获得的淀粉沉淀倒入氢氧化钠溶液(0.002 g·mL⁻¹)中混匀,静置4 h。静置完成后,离心(4 000 r·min⁻¹, 20 min)取沉淀即为淀粉。将获得的淀粉放入去离子水中继续清洗,离心去沉淀,重复3次,而后将所获得的淀粉放入无水乙醇中继续清洗,直至无色,然后用去离子水清洗沉淀直到无乙醇气味。最后使用200目标准筛过滤悬浊液,离心(4 000 r·min⁻¹, 20 min)弃上清液取沉淀,置于烘箱中,45℃烘干过夜。

金属镀膜:参考萧允艺^[20]的金属镀膜法,即采用特殊装置JEOL JFC-1600离子溅射仪将电阻率小的铂金粉蒸发后覆盖在样品表面。样品表面镀上一层金属膜可以有效抵御电子束的伤害,使二次电子产生率显著增加,所获得的图像质量更佳,同时充电、放电效应也得到有效抑制。

扫描电镜(scanning electron microscopy, SEM)观察:参数为20 kV,真空条件下,放大倍数分别为2 000倍、5 000倍和10 000倍。

1.3.4 淀粉含量测定 参考苗红霞等^[22]的方法。将2 g的果肉样品放入5 mL 80%乙醇中,并用匀浆机混匀,离心(4 000×g, 15 min)取沉淀,接着倒入5 mL去离子水充分清洗,再次离心(4 000×g, 15 min)取沉淀,将沉淀放入5 mL 80% Ca(NO₃)₂溶液中继续溶解,然后通过沸水浴加热溶液10 min,离心(4 000×g, 4 min)

取沉淀,所获取的沉淀通过 80% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液提取 2 次。然后将上清液混合并定容至 20 mL。在 100 μL 0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ I_2 -KI 溶液中加入 2 mL 上清液混匀,测定 600 nm 波长处的吸光度值,重复 3 次。用淀粉标准液制定标准曲线,通过标准曲线计算样品猕猴桃果实的淀粉含量(标准曲线的绘制使用淀粉标准液),淀粉含量结果以 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ FW 表示。

1.3.5 猕猴桃果实 RNA 的提取及 cDNA 的合成 参考邵佳蓉等^[23]的方法,略有调整。两品种猕猴桃果实的总 RNA 提取使用植物 RNA 提取试剂盒,具体过程参照说明书。试验过程中加入 DNaseI 从而排除总 RNA 中可能的微量 DNA 污染,防止对后续 cDNA 合成过程造成影响。使用核酸蛋白分析仪对样品 RNA 浓

度和纯度进行测定。通过凝胶成像仪观察提取 RNA 条带的完整性、大小和清晰度。按照 SuperRT cDNA 第一链合成试剂盒说明书进行 cDNA 合成。

1.3.6 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 检测 本试验模板为从猕猴桃基因组数据库中 (<http://bioinfo.bti.cornell.edu/cgi-bin/kiwi/home.cgi>) 获得的各基因全长序列,相关引物通过 Primer 6 软件设计,引物如表 1 所示。qRT-PCR 利用荧光定量引物进行 3 步法扩增。qRT-PCR 程序:95℃ 预变性 7 min;95℃ 变性 15 s,45℃ 退火 30 s,75℃ 延伸 15 s,39 个循环。内参引物为 *Actin* 基因(引物见表 1,退火温度为 63℃),设置阴性对照。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法对最终的数据进行分析,设置 3 次生物学重复。

表 1 试验所需引物

Table 1 Primers required for the experiment

基因名称 Gene name	GDR/NCBI 登录号 GDR/NCBI accession No.	上游引物(5'-3') Forward primer (5'-3')	下游引物(5'-3') Reverse primer (5'-3')
<i>AcAMY1</i>	Achn227481	GCGAGTTGTGGAGAATGA	TGGATGCTGAAATATAGG
<i>AcAMY3</i>	Achn183691	GGTGGAATCTGAGGAAGTAG	TTCTGTTGGTGGTGGTAAC
<i>AcBAM1</i>	Achn090661	TGGAAGAGATTGACAGAGAC	GAGGACTGGAAGAGTATCAC
<i>AcBAM3</i>	Achn32221	CGGTGACAGAATCCTAGC	TGCCTCGTGTGTAGTATC
<i>AcGWD</i>	Achn73781	ACTTGACGGAGCCTGTT	CAGATTGGACCTGTGAAGATG
<i>AcPWD</i>	Achn217271	GCTGCCTCACTTATCTCAT	TCGCCGTTGCTATTATCC
<i>AcLSF1</i>	Achn389511	AAGGCGAGTGAATCATCTG	CAAGGACAAGGTTACAAGGT
<i>AcLSA3</i>	Achn34891	TCTACTTCCTTCGCTTCTG	GTCACTGCCACTTGTCTT
<i>AcLDA1</i>	Achn118611	TGAATGGTGAGCCTGACA	GGATAGGCTCGTGAAGAA
<i>AcDPE1</i>	Achn358531	CTCTTCTGGTTAGTGGTGT	AAGCCTGCGAATCCTCTA
<i>AcDPE2</i>	Achn289521	TCCTTCTCCGTCAGCAT	GCCTGTTGTATTCTTCTT
<i>AcPHS1</i>	Achn238811	ACCGACCTTGACCTACTTA	ATCCGCTTGACCTGAATG
<i>Actin</i>	Achn107991	ATGCTATCCTCGCTCTTG	GCGATGTATGCTAACTTCTC

1.4 数据分析与统计

试验数据采用 GraphPad Prism 5 软件绘图,结果以平均值 \pm 标准偏差表示。采用非配对 T 检验进行显著性分析,采用 Pearson 进行相关性分析。

2 结果与分析

2.1 猕猴桃果实采后硬度的变化

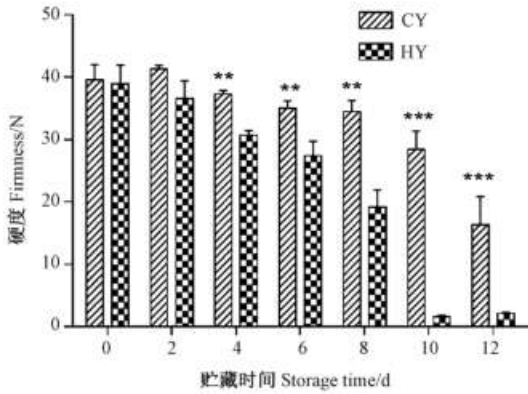
由图 1 可知,果实的硬度是指果肉抗压能力的强弱,可直观地反映出果实的成熟软化。两品种猕猴桃果实在成熟过程中硬度均呈下降趋势,在贮藏后期(4~12 d)CY 猕猴桃果实的硬度极显著高于 HY 果实。

2.2 猕猴桃果实采后乙烯释放速率的变化

由图 2 可知,在果实贮藏过程中,CY 猕猴桃果实的乙烯释放速率保持在较低的水平,基本没有乙烯释放。HY 猕猴桃果实在贮藏前期与 CY 果实无显著性差异,贮藏 10 d 时其乙烯释放量急剧增加,且极显著高于 CY 果实($P<0.001$)。

2.3 猕猴桃果实采后淀粉形态变化

由图 3 可知,在刚采摘的猕猴桃果肉中,淀粉粒表面光滑,在果实成熟软化过程中,两品种猕猴桃果实的淀粉颗粒均有不同程度的消化和破碎,这是淀粉降解的痕迹,且 CY 猕猴桃果实的淀粉降解缓于 HY 果实。



注: *、**、*** 分别表示不同品种之间在 0.05、0.01、0.001 水平上差异显著。下同。

Note: *, **, *** mean significant difference at 0.05, 0.01 and 0.001 level, respectively. The same as following.

图1 猕猴桃果实采后贮藏期间硬度的变化
Fig.1 Changes of firmness in postharvest kiwifruit during storage

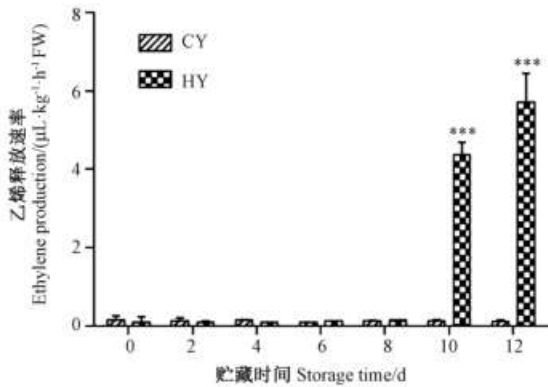


图2 猕猴桃果实采后贮藏期间乙烯释放速率的变化

Fig.2 Changes of ethylene production in postharvest kiwifruit during storage

2.4 猕猴桃果实采后淀粉含量的变化

由图4可知,在猕猴桃果实贮藏期间,其外果肉和果心的淀粉含量均呈下降趋势,HY猕猴桃外果肉中淀粉含量在贮藏前期(0~2 d)极显著高于CY外果肉 ($P < 0.01$),但在贮藏后期(8~12 d)极显著低于CY外果肉 ($P < 0.001$);HY猕猴桃果心中淀粉含量在贮藏2~4 d与CY果实无显著差异,但在贮藏后期(6~12 d)极显著低于CY果心 ($P < 0.001$)。表明HY猕猴桃果实淀粉含量下降速率快于CY猕猴桃果实。

2.5 猕猴桃果实采后淀粉降解酶基因表达变化

由图5可知,在整个猕猴桃果实贮藏期间,猕猴桃外果肉中 *AcGWD*、*AcPWD* 和 *AcLSF1* 的表达量呈下降趋势,且CY猕猴桃外果肉和果心中 *AcGWD* 的相对表

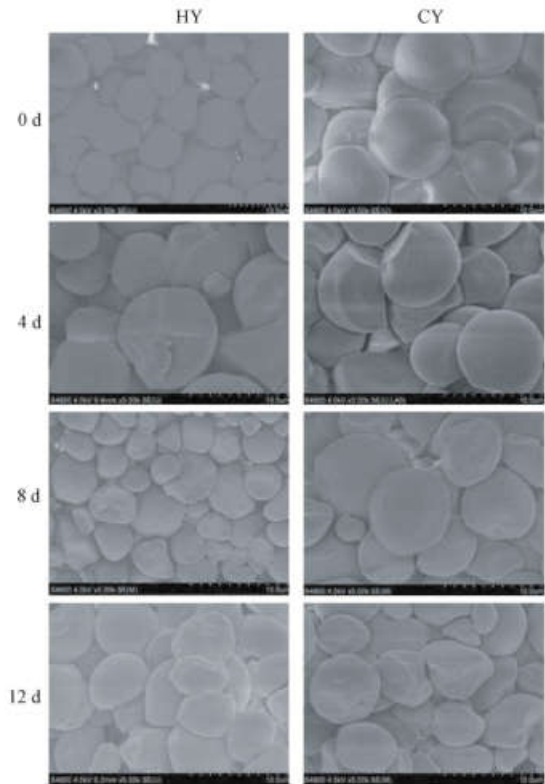


图3 两品种猕猴桃果实贮藏期间淀粉形态 SEM 图
Fig.3 SEM images of starch granules from two kiwifruit species during storage

达量均极显著高于HY猕猴桃 ($P < 0.001$);在 *AcPWD* 表达量下降过程(4~12 d)中,除贮藏10 d时CY猕猴桃外果肉和果心的相对表达量极显著高于HY猕猴桃 ($P < 0.01$),其他贮藏时间两品种猕猴桃无显著差异;贮藏前期 *AcLSF1* 的相对表达量表现为HY猕猴桃外果肉(0~4 d)和果心(0 d)显著或极显著高于CY猕猴桃;0 d时 *AcLSF1* 在HY猕猴桃果心中的表达极显著高于CY猕猴桃 ($P < 0.01$)。两品种猕猴桃果心中 *AcGWD*、*AcPWD* 和 *AcLSF1* 的表达趋势与果肉基本一致。

由图6可知,CY猕猴桃外果肉 *AcISA3* 的相对表达量在贮藏10~12 d时显著高于HY果实 ($P < 0.01$);果心中的 *AcISA3* 表达量在贮藏前期(0~6 d)略有上升,后期(10~12 d)急剧下降。贮藏期间,外果肉中 *AcLDA1* 的相对表达量呈先上升后略下降的趋势,在贮藏前期(2~6 d)HY猕猴桃中的表达量极显著高于CY猕猴桃,在贮藏后期(8~12 d)无显著差异;在果心中, *AcLDA1* 的相对表达量与外果肉存在差异,且在贮藏前期(2~6 d)CY猕猴桃的 *AcLDA1* 相对表达量显著或极显著高于HY猕猴桃。

由图7可知,两品种猕猴桃外果肉中 *AcAMY1* 相

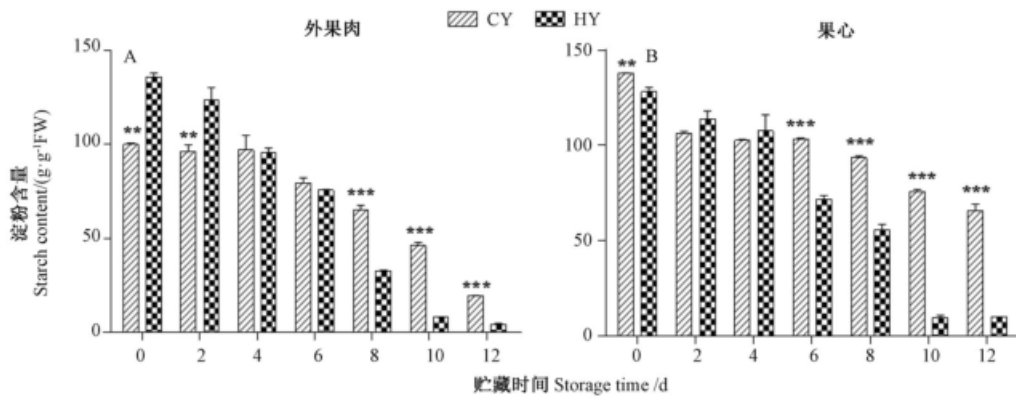


图 4 猕猴桃果实贮藏期间中淀粉含量的变化

Fig.4 Changes of starch content in postharvest kiwifruit during storage

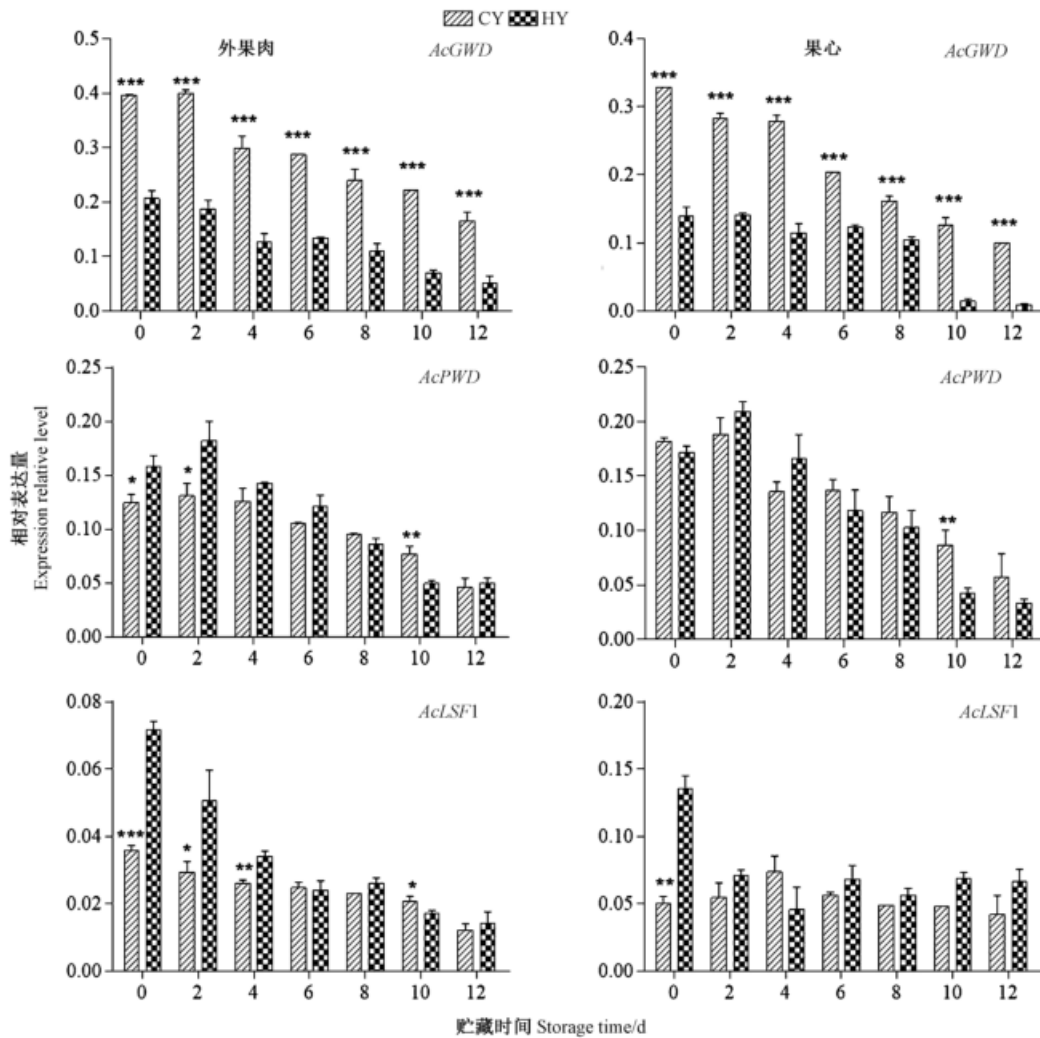


图 5 猕猴桃果实贮藏期间 *AcGWD*、*AcPWD* 和 *AcLSF1* 基因的表达

Fig.5 Expressions of *AcGWD*、*AcPWD* and *AcLSF1* in postharvest kiwifruit during storage

对表达量在贮藏前期呈上升的趋势之后呈波动变化，HY 猕猴桃中 *AcAMY1* 的相对表达量达到峰值早于 CY 猕猴桃；且在果心的变化趋势与外果肉相似，但 CY 猕

猕猴桃在贮藏 4~12 d 过程中果心 *AcAMY1* 的相对表达量极显著高于 HY 猕猴桃。*AcAMY3* 的相对表达量在贮藏 2~8 d 时先急剧下降后又上升，且在不同品种呈

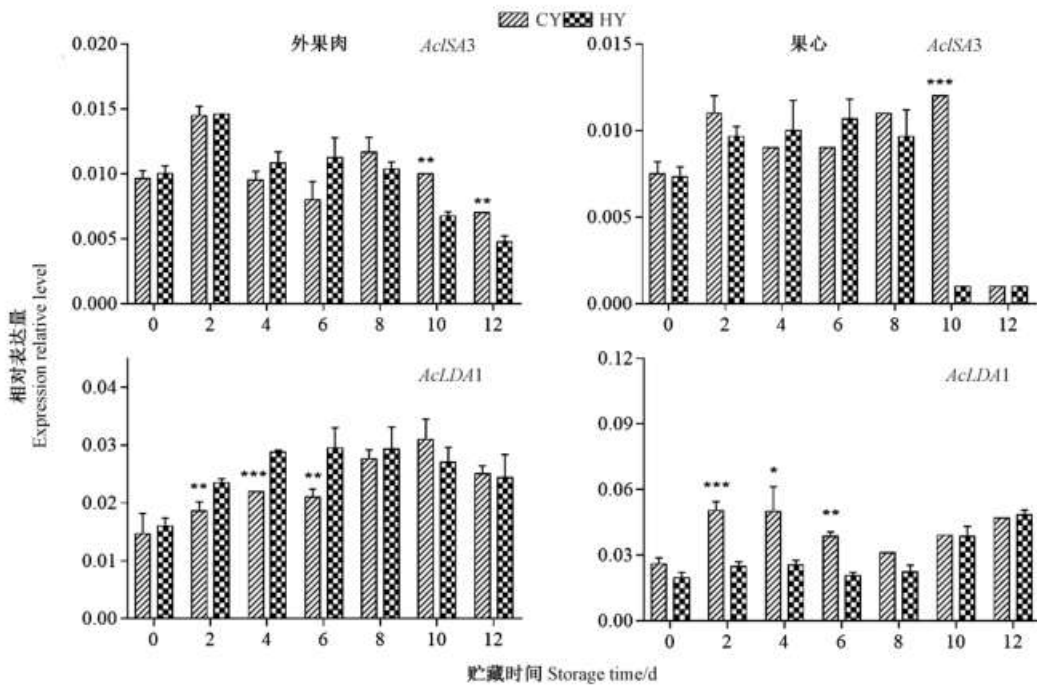


图 6 猕猴桃果实贮藏期间 *AcISA3* 和 *AcLDA1* 基因的表达
 Fig.6 Expressions of *AcISA3* and *AcLDA1* in postharvest kiwifruit during storage

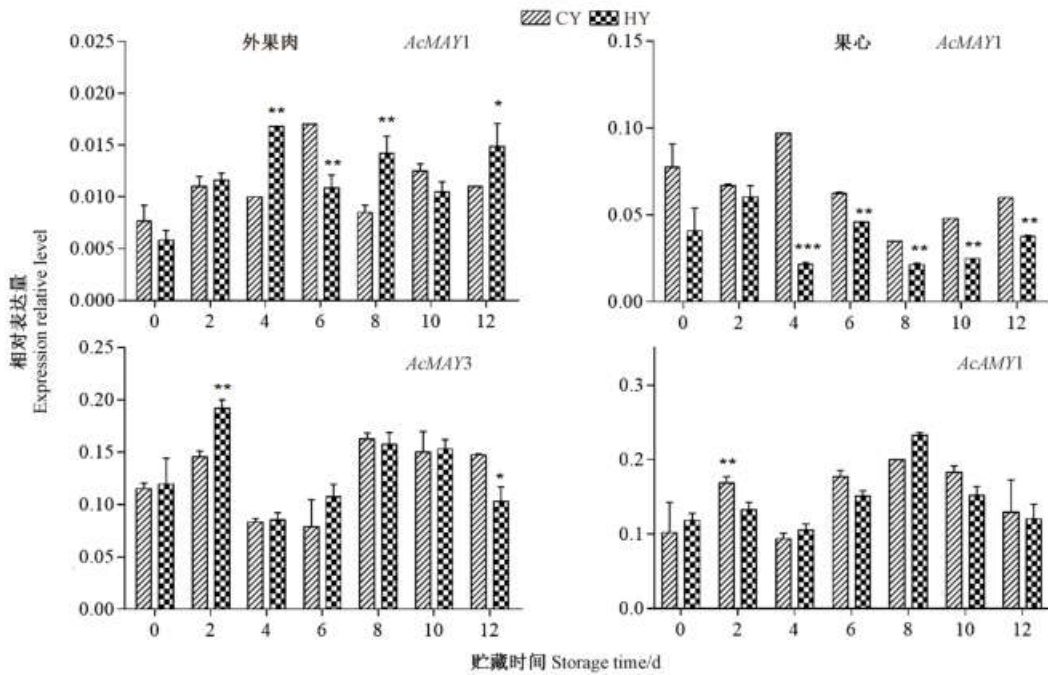
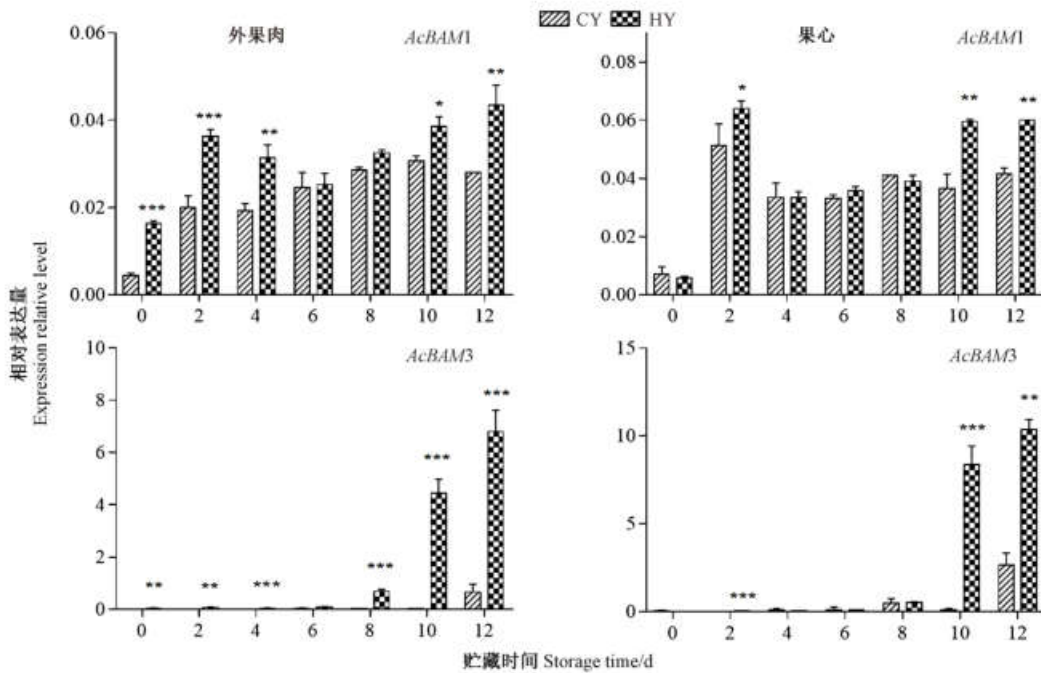


图 7 猕猴桃果实贮藏期间中 *AcAMyS* 基因的表达
 Fig.7 Expressions of *AcAMyS* in postharvest kiwifruit during storage

相同趋势。

由图 8 可知,猕猴桃外果肉与果心中 *AcBAM1* 的相对表达量在贮藏 0~2 d 时迅速增加,贮藏后期(6~12 d)缓慢上升,且贮藏 10~12 d 时 HY 猕猴桃外果肉和果心的相对表达量显著或极显著高于 CY 猕猴桃。

贮藏期间,两品种猕猴桃外果肉和果心 *AcBAM3* 的相对表达量呈上升趋势,且与乙烯释放趋势一致,贮藏后期(8~12 d)基因相对表达量急剧增加,且 HY 猕猴桃外果肉 *AcBAM3* 的相对表达量极显著高于 CY 外果肉,两品种猕猴桃果心中 *AcBAM3* 的表达与外果肉结果基

图 8 猕猴桃果实贮藏期间 *AcBAMs* 基因的表达Fig.8 Expressions of *AcBAMs* in postharvest kiwifruit during storage

本一致。

由图 9 可知,在贮藏期间,两品种猕猴桃外果肉中 *AcDPE1* 和 *AcDPE2* 的相对表达量在贮藏 2 d 时上升随后下降,后期又呈上升趋势,且 HY 猕猴桃外果肉表达量均显著或极显著高于 CY 猕猴桃;果心中 *AcDPE1* 和 *AcDPE2* 表达量随贮藏时间总体呈上升趋势,但两品种间均无显著差异 ($P>0.05$)。果心和外果肉中 *AcPHS1* 的相对表达量均随着贮藏时间的延长呈下降趋势,贮藏前期 (2~4 d) HY 猕猴桃外果肉中 *AcPHS1* 的相对表达量极显著高于 CY 猕猴桃,而在贮藏后期 (10~12 d) 极显著低于 CY 外果肉。

3 讨论

已有研究表明,不同品种(或品系)猕猴桃采收期和采后生理变化(尤其是采后果实的呼吸作用、乙烯代谢及果实软化等生理变化)与果实耐贮性和贮藏品质密切相关^[24-26]。本研究发现,随着贮藏时间的延长,两品种猕猴桃果实的硬度及淀粉含量均呈下降趋势,硬度的变化与淀粉含量变化较一致;同时在乙烯发生跃变时,淀粉含量快速下降,HY 猕猴桃果实淀粉含量的下降速率快于 CY 果实,且果心中淀粉含量的下降速率慢于外果肉;HY 果实释放乙烯速率急剧上升时,CY 果实一直保持在低水平。这表明 HY 猕猴桃果实出现呼吸跃变早于 CY 果实。

果实成熟过程中产生大量内源乙烯。内源乙烯对果实多糖水解、香味物质产生、硬度下降等一系列生理变化具有调控作用^[27]。乙烯是果实尤其是跃变型果实成熟衰老进程中的关键因子。乙烯释放量可以反映猕猴桃果实的成熟衰老进程。已有研究报道,在桃果实贮藏期间,当果实硬度快速下降时,果实内源乙烯含量出现跃变高峰^[28]。黄森等^[29]研究发现,柿子内源乙烯与果实硬度呈显著相关。本研究发现,HY 猕猴桃果实硬度迅速下降并伴随乙烯跃变,而 CY 猕猴桃果实硬度缓慢下降未出现乙烯释放高峰。HY 果实中乙烯的释放与硬度呈显著负相关 ($r = -0.898, P < 0.01$)。

成熟前,果实内大量的淀粉是果肉保持硬度的重要因素。淀粉对细胞起支撑作用,可维持组织整体膨压,因此,果实采后成熟软化与淀粉的降解有关。研究发现,在苹果果实发育过程中, β -淀粉酶和 α -淀粉酶活性由低到高,与淀粉含量呈现互为消长的变化,推测它们参与了果实质体中淀粉的降解^[30]。魏建梅等^[31]对香蕉的研究发现,*MAmy*、*Maisa*、*Ma-bmy* 等基因参与采后淀粉降解;也有研究发现, β -淀粉酶活性的明显增强在香蕉果实淀粉降解中起关键作用^[32-33]。本研究发现,在两个品种猕猴桃中,*AcAMY1* 和 *AcAMY3* 表达量在淀粉降解前期增加,表明 *AcAMY1* 和 *AcAMY3* 在淀粉降解前期起作用。Hu 等^[34]研究表明,猕猴桃 *AdBAM3.1/3L/9* 与淀粉降解呈显著正相关,证实该基

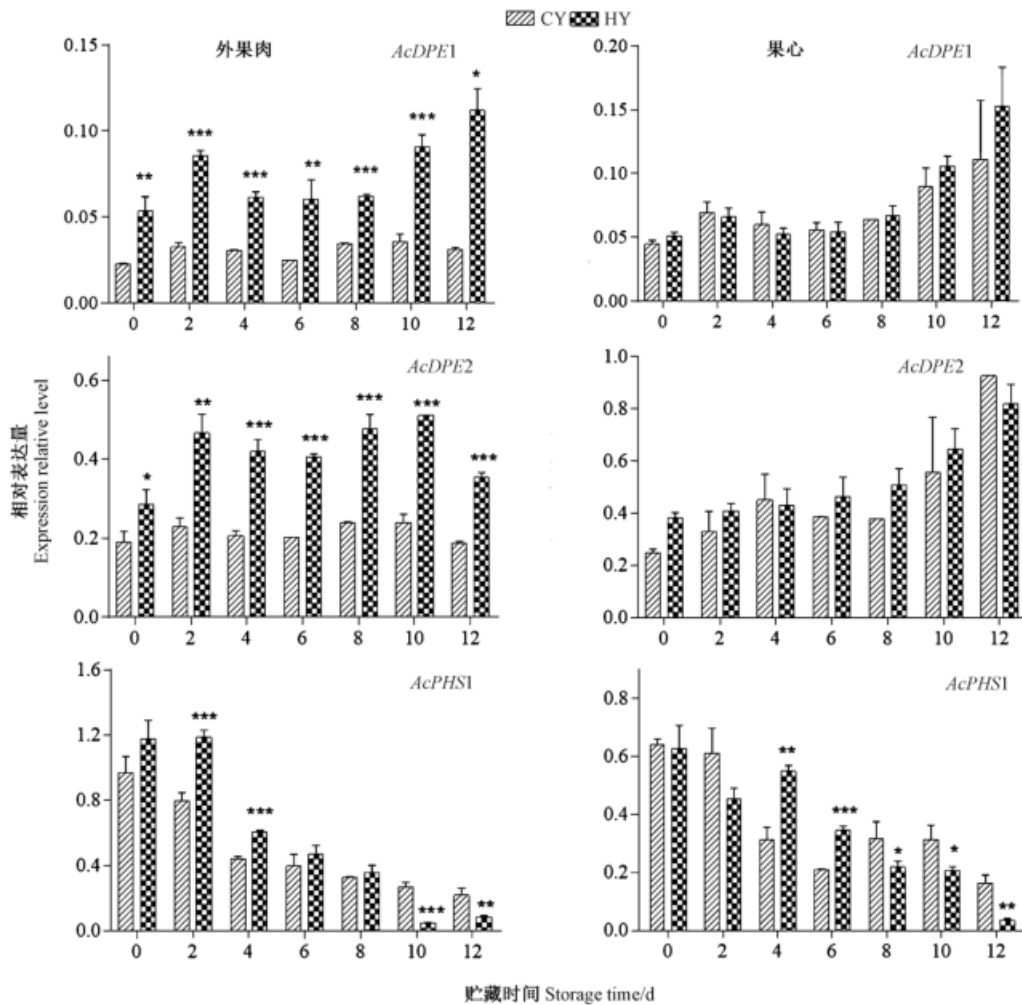


图9 猕猴桃果实贮藏期间 *AcDPEs* 和 *AcPHS1* 基因的表达
Fig.9 Expressions of *AcDPEs* and *AcPHS1* in postharvest kiwifruit during storage

因可能参与淀粉降解过程。也有研究发现在猕猴桃叶片中稳定过表达 *AdBAM3L* 能有效降低叶片淀粉含量,说明该基因可能是猕猴桃淀粉降解的关键酶基因^[35]。本研究中, *AcBAM1* 和 *AcBAM3* 基因的相对表达量随着淀粉降解在贮藏后期呈上升趋势,且在 HY 猕猴桃外果肉中的表达均比 CY 高,尤其 *AcBAM3* 相对表达量明显增强,说明 *AcBAM1* 和 *AcBAM3* 基因在 HY 猕猴桃果实的淀粉降解过程中发挥了重要作用,且 *AcBAM3* 基因的作用更为关键。已有研究表明, DPE 涉及了淀粉代谢相关酶的磷酸化过程。本研究中, *AcDPE1* 和 *AcDPE2* 在 HY 猕猴桃外果肉中的相对表达量均显著或极显著高于 CY,表明 *AcDPE1* 和 *AcDPE2* 基因是 HY 猕猴桃果实淀粉降解的关键基因。这与陈景丹等^[36]的研究结果一致。Xiao 等^[37]研究发现, *MaPHS* 基因参与了香蕉果实的淀粉降解。PHS 活性主要受该基因表达水平的影响,该酶在淀粉代谢过程中发挥重要作用。本研究结果表明,贮藏前期 HY 果实 *AcPHS1* 基

因表达量总体高于 CY 果实,这可能导致 HY 淀粉降解速度更快。植物中淀粉磷酸化是可逆的,由两种类型的磷酸化酶催化,分别是葡聚糖水合双激酶(添加磷酸基)和磷酸葡聚糖磷酸酶(去除磷酸基),并且这 2 种酶可以促进或维持葡聚糖水解^[38]。本研究还发现随着淀粉降解, *AcGWD*、*AcPWD*、*AcLSF1* 在贮藏期间 2 个品种猕猴桃外果肉和果心中的表达量均呈下降趋势,可能与淀粉含量有关。另外,本试验中 *AcDPE1*、*AcDPE2*、*AcGWD*、*AcPWD* 和 *AcLSF1* 基因的相对表达量随贮藏时间变化的结果,与香蕉^[37]中的结果相反,这可能是不同品种果实淀粉代谢存在差异所导致的。

4 结论

本研究结果表明, HY 猕猴桃果实成熟软化快于 CY 果实。随着贮藏期的延长, HY 猕猴桃果实硬度迅速下降并伴随出现乙烯跃变, CY 果实硬度缓慢下降且

未出现乙烯释放高峰。在两品种猕猴桃中, *AcAMY1* 和 *AcAMY3* 在淀粉降解前期起作用, *AcBAM1*、*AcBAM3*、*AcDPE1* 和 *AcDPE2* 在淀粉降解中可能起重要作用, 尤其是 *AcBAM3* 可能起关键作用。另外, *AcBAM1*、*AcBAM3*、*AcDPE1*、*AcDPE2*、*AcPHS1* 基因相对表达量在 HY 猕猴桃果实中总体均比 CY 果实中高, 这可能导致了 HY 淀粉降解速度更快。贮藏期间两品种猕猴桃果实 *AcGWD*、*AcPWD*、*AcLSF1* 的相对表达量随着淀粉降解呈下降趋势, 可能与淀粉含量有关。

参考文献:

- [1] Burdon J, Pidakala P, Martin P, McAtee P A, Bolding H L, Hall A, Schaffer R J. Postharvest performance of the yellow-fleshed Hort16 Akiwifruit in relation to fruit maturation [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2014, 92: 98-106
- [2] Ampa K, Ikeura H, Saito T, Okawa K, Ohara H, Kondo S. Effects of pre-harvest application of ethephon or abscisic acid on Kohi kiwifruit (*Actinidia chinensis*) ripening on the vine [J]. *Scientia Horticulturae*, 2016, 209: 255-260
- [3] 张安世, 韩臣鹏, 齐秀娟, 张中海. 基于 ISSR 标记的猕猴桃品种遗传多样性分析及指纹图谱构建 [J]. *植物资源与环境学报*, 2017, 26(3): 19-26
- [4] Xu Z C, Hyodo H, Ikoma Y, Yano M, Ogawa K. Relation between ethylene-producing potential and gene expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase in *Actinidia chinensis* and *A. deliciosa* fruits [J]. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 2000, 69(2): 192-194
- [5] Asiache W O, Mworira E G, Mitalo O W, Willis O. Extension of shelf-life by limited duration of propylene and 1-MCP treatments in three kiwifruit cultivars [J]. *The Horticulture Journal*, 2016, 85(1): 76-85
- [6] 胡苗, 李佳颖, 饶景萍. 褪黑素处理对采后猕猴桃果实熟衰老的影响 [J]. *食品科学*, 2018, 39(19): 226-232
- [7] Nardoza S, Bolding H L, Osorio S, Höhne M, Wohlers M, Gleave A P, MacRae E A, Richardson A C, Atkinson R G, Sulpice R, Fernie A R, Clearwater M J. Metabolic analysis of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) berries from extreme genotypes reveals hallmarks for fruit starch metabolism [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(16): 5049-5063
- [8] Li D X, Zhu F. Physicochemical properties of kiwifruit starch [J]. *Food Chemistry*, 2017, 220: 129-136
- [9] Richardson A C, Marsh K B, Bolding H L, Pickering A H, Bulley S M, Frearson N J, Ferguson A R, Thornber S E, Bolitho K M, Machae E A. High growing temperatures reduce fruit carbohydrate and vitamin C in kiwifruit [J]. *Plant, Cell and Environment*, 2004, 27(4): 423-435
- [10] 王贵禧, 韩雅珊. 猕猴桃软化过程中阶段性专一酶活性变化的研究 [J]. *植物学报*, 1995, 37(3): 198-203
- [11] Kötting O, Kossmann J, Zeeman S C. Beyond the Regulation of starch metabolism: The age of enlightenment? [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2010, 13(3): 320-328
- [12] Streb S, Zeeman S C. Starch metabolism in *Arabidopsis* [J]. *The Arabidopsis Book*, 2012, 10: e0160
- [13] 周倩. 基于 RNASeq 解析非结构性糖代谢途径在小桐子幼苗对干旱胁迫响应与适应中的作用 [D]. 昆明: 云南师范大学, 2018: 6-11
- [14] Silver D M, Kötting O, Moorhead G B G. Phosphoglucan phosphatase function sheds light on starch degradation [J]. *Trends in Plant Science*, 2014, 19(7): 471-478
- [15] Kötting O, Santelia D, Edner C, Eicke S, Marthaler T, Gentry M S, Comparot-Moss S, Chen J, Smith A M, Steup M, Ritte G, Zeeman S C. STARCH-EXCESS4 is a laforin-like phosphoglucan phosphatase required for starch degradation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Cell Online*, 2009, 21(1): 334-346
- [16] Meekins D A, Raththagala M, Husodo S, White C J, Guo H F, Kötting O, Vander Kooi C W, Gentry M S. Phosphoglucan-bound structure of starch phosphatase Starch Excess4 reveals the mechanism for C6 specificity [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111(20): 7272-7277
- [17] Fulton D C, Stettler M, Mettler T, Vaughan C K, Li J, Francisco P, Gil M, Reinhold H, Eicke S, Messerli G, Dorken G, Halliday K, Smith A M, Smith S M, Zeeman S C. β -AMYLASE4, a noncatalytic protein required for starch breakdown, acts upstream of three active β -amylases in *Arabidopsis* chloroplasts [J]. *The Plant Cell*, 2008, 20(4): 1040-1058
- [18] Edner C, Li J, Albrecht T, Mahlow S, Hejazi M, Hussain H, Kaplan F, Guy C, Smith S M, Steup M, Ritte G. Glucan, water dikinase activity stimulates breakdown of starch granules by plastidial β -amylases [J]. *Plant Physiology*, 2007, 145(1): 17-28
- [19] Asatsuma S, Sawada C, Itoh K, Okito M, Kitajima A, Mitsui T. Involvement of α -amylase I - I in starch degradation in rice chloroplasts [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2005, 46(6): 858-869
- [20] 蔺允艺. 转录因子 *MaAP2a-1* 和 *MabHLH6* 调控采后香蕉果实淀粉降解的作用及其机制研究 [D]. 广州: 华南农业大学, 2017: 8-10
- [21] 聂丹. 多种淀粉颗粒的扫描电镜下的形态分析 [J]. *安徽农业科学*, 2014, 42(33): 11863-11865
- [22] 苗红霞, 金志强, 刘伟鑫, 张建平, 孙佩光, 徐碧玉. 香蕉果实抗性淀粉含量变化及其与其他类型淀粉相关性分析 [J]. *中国农业科学*, 2013, 46(24): 5180-5187
- [23] 邵佳蓉, 宋春波, 卞坤, 陈伟, 杨震峰. 桃果实 *PpSIZ1* 基因对低温和外源褪黑素处理的响应 [J]. *园艺学报*, 2016, 43(7): 1257-1266
- [24] 王仁才, 谭兴和, 吕长平, 熊兴耀. 猕猴桃不同品系耐贮性与采后生理生化变化 [J]. *湖南农业大学学报*, 2000, 26(1): 46-49
- [25] 谢鸣, 蒋桂华. 猕猴桃采后生理变化及其与耐藏性的关系 [J]. *浙江农业学报*, 1992, 4(3): 124-127
- [26] Manolopoulou H, Papadopoulou P. A study of respiratory and physico-chemical changes of four kiwifruit cultivars during cool-storage [J]. *Food Chemistry*, 1998, 63(4): 529-534
- [27] 黄文俊, 钟彩虹. 猕猴桃果实采后生理研究进展 [J]. *植物科学学报*, 2017, 35(4): 624-630
- [28] 吴彬彬, 饶景萍, 李白云, 赖勤毅, 张海燕. 采收期对猕猴桃果实品质及其耐贮性的影响 [J]. *西北植物学报*, 2008, 28(4): 4788-4792

- [29] 黄森, 张继澍, 张院民. 赤霉素处理对采后柿果实乙烯生物合成的影响 [J]. 中国农学通报, 2006, 22(2) : 88–90
- [30] Ding P, Tee Y K. Application of exogenous ethylene on postharvest quality of dabai (*Canarium odontophyllum* Miq.) fruit [J]. African Journal of Agricultural Research, 2010, 5(24) : 3483–3492
- [31] 魏建梅, 齐秀东, 闫芳教. 采后嘎拉苹果果实糖和淀粉代谢及关键酶基因表达特性 [J]. 北方园艺, 2015 (19) : 126–131
- [32] Gao H, Huang S, Dong T, Yang Q S, Yi G J. Analysis of resistant starch degradation in postharvest ripening of two banana cultivars: Focus on starch structure and amylases [J]. Postharvest Biology and Technology, 2016, 119: 1–8
- [33] Jourda C, Cardí C, Gibert O, Giraldo Toro A, Ricci J, Mbéguié-A-Mbéguié D, Yahiaoui N. Lineage-specific evolutionary histories and regulation of major starch metabolism genes during banana ripening [J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 1778
- [34] Hu X, Kuang S, Zhang A D, Zhang W S, Chen M J, Yin X R, Chen K S. Characterization of starch degradation related genes in postharvest Kiwifruit [J]. Molecular Sciences, 2016, 17(12) : 2112
- [35] Alcaraz M L, Hormaza J I, Rodrigo J. Ovary starch reserves and pistil development in avocado (*Persea americana*) [J]. Physiologia Plantarum, 2010, 140(4) :395–404
- [36] 陈景丹, 许凤, 陈伟, 杨震峰. 猕猴桃果实采后软化期间淀粉降解关键基因表达分析 [J]. 核农学报, 2018, 32(2) : 236–243
- [37] Xiao Y Y, Kuang J F, Qi X N, Ye Y J, Wu Z X, Chen J Y, Lu W J. A comprehensive investigation of starch degradation process and identification of a transcriptional activator MabHLH6 during banana fruit ripening [J]. Plant Biotechnology Journal, 2017, 16(1) : 151–164
- [38] Subasinghe R M, Liu F, Polack U C, Lee E A, Emes M J, Tetlow I J. Multimeric states of starch phosphorylase determine protein-protein interactions with starch biosynthetic enzymes in amyloplasts [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2014, 83: 168–179

Comparative Analysis of Starch Degradation Characteristics of Two Varieties of Kiwifruit After Harvest

CHAI Jichuan LIU Lu CHEN Jingdan WANG Kang CAO Shifeng
SHI Liyu YANG Zhenfeng CHEN Wei*

(College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo, Zhejiang 315100)

Abstract: In order to explore the degradation of starch in postharvest fruit, the change of starch contents and the expression pattern of genes related to starch degradation in postharvest Hongyang and Cuiyu kiwifruits were compared and analyzed. Results showed that the firmness of Hongyang fruit decreased rapidly with the occurrence of ethylene climax, but the firmness of Cuiyu fruit decreased slowly without ethylene release peak. The starch content decreased with the prolongation of storage time. SEM results showed that with the increase of storage time, the smooth surface of the starch was digested and broken to different degrees, indicating the enzymatic degradation of starch occurred in the two varieties of kiwifruit. Meanwhile, it was found that the ethylene production of Hongyang fruit was significantly higher than that of Cuiyu fruit ($P < 0.001$). During storage, the starch content in the outer pericarp of Hongyang fruit was significantly higher than that of Cuiyu fruit in the early storage period (0–2 d) ($P < 0.01$), but significantly lower than that of Cuiyu fruit in the later storage period (8–12 d) ($P < 0.001$); The starch content in the core of Hongyang fruit was not significantly different from that of Cuiyu fruit in the early storage period (2–4 d), but it was significantly lower than that of Cuiyu fruit in the later storage period (6–12 d). These results provide a theoretical basis for further revealing the mechanism of starch degradation in the postharvest of kiwifruit.

Keywords: different varieties, kiwifruit, postharvest storage, starch degradation