

葫芦科作物苦味物质葫芦素的研究进展

李麒, 罗飞, 王成洋, 李良钰, 齐红岩*

沈阳农业大学园艺学院, 设施园艺省部共建教育部重点实验室, 北方园艺设施设计与应用技术国家地方联合工程研究中心(辽宁), 沈阳110866

摘要: 葫芦素是一种广泛分布在葫芦科作物中的葫芦烷型四环三萜类物质, 这种物质不仅能增强作物对虫害的抵御能力, 还具有抗癌、消炎的作用, 但它使葫芦科作物出现苦味。本文综述了葫芦素的结构、分布、合成、转运及调控几方面的研究现状与进展, 并对今后无苦味葫芦科蔬菜育种、葫芦素的工厂化高效合成及葫芦素在植物体内的转运、转化及降解研究进行了展望, 以期为更高效地运用葫芦素、解决生产中的苦味瓜问题提供参考。

关键词: 葫芦素; 苦味; 葫芦科; 合成与调控

葫芦科(Cucurbitaceae)植物种类繁多, 为人类广泛利用, 其中的黄瓜属(*Cucumis*)、西瓜属(*Citrullus*)、南瓜属(*Cucurbita*)、葫芦属(*Lagenaria*)、苦瓜属(*Momordica*)和丝瓜属(*Luffa*)等多种作物均是重要的蔬菜或药用植物。

生产实践中, 葫芦科作物的果实除了产生甘甜、清香或芳香的味道或气味外, 还经常产生令人不悦的苦味, 其苦味源于一种次生代谢物质——葫芦素(cucurbitacin) (Rehm等1957)。葫芦素与逆境有着紧密联系, 可抵御不良环境的侵害。研究指出, 葫芦素能够增强植物对某些害虫的抗性, 也与植物响应机械损伤有关(Tallamy等1997; Balkema-Boomstar等2003; 刘慧等2007; 马超2018)。另外, 葫芦素对人类健康有着重要意义。大量医学研究表明, 葫芦素具有抗癌活性(Chen等2012; Cheng等2019; Saeed等2019)。我国传统中草药甜瓜蒂的药理成分就是葫芦素类物质(唐岚等2012; 陈卫军等2014; 马启武和赵海誉2017)。甜瓜(*Cucumis melo*)中的主要苦味物质葫芦素B已被开发成治疗肝炎、肝癌的良药葫芦素片(周松年和鲁南1987; 陈永献1987)。

因其在植物抵御逆境及人类健康方面的重要意义, 葫芦素引起人们广泛关注。本文从葫芦素的结构及分布、合成、转运与调控等方面进行综述, 为深入研究苦味形成的分子机理奠定基础, 为高效利用葫芦素及培育无苦味优质品种提供参考。

1 葫芦素的结构及在植物中的分布

葫芦素是一类高度氧化的葫芦烷型四环三萜类物质, 其基本结构为[19-(10-9 β)-abeo-10 α -lanost-5-en] (图1), 按照其不同位置含氧官能团的不同, 葫芦素被分为A~T共12种。其中, 某些个别碳位羟基构象不同的葫芦素被归为一类物质, 如葫芦素G和葫芦素H被归为一类, 葫芦素J和葫芦素K被归为一类(Chen等2005; Saboo等2013)。几乎所有的葫芦烷型物质都呈苦味, 但也有例外, 如存在于葫芦科植物罗汉果(*Siraitia grosvenorii*)中的次生代谢物质——罗汉果苷V具有强烈的甜味, 可作为糖尿病患者食品中的甜味剂(Dai等2015; 莫长明2015)。研究指出, 这与葫芦烷型物质的结构有关, 若C-11-OH为 α 构型, 呈甜味, 若C-11-OH为 β 构型或C-11位为羰基, 则呈苦味(林晓琴和杨培全1997)。

葫芦素及其衍生物广泛存在于葫芦科多种植物中。迄今, 已在雪胆属(*Hemsleya*)、南瓜属、黄瓜属、栝楼属(*Trichosanthes*)、佛手瓜属(*Sechium*)、丝瓜属、西瓜属、喷瓜属(*Ecballium*)、苦瓜属、金瓜属(*Gymnopetalum*)、葫芦属、红瓜属(*Coccinia*)、小雀瓜属(*Cyclanthera*)、赤瓟属(*Thladiantha*)等不同作物中检测到了葫芦烷型物质的存在(邱明华等2005)。在这些葫芦科作物的不同组

收稿 2020-01-13 修定 2020-04-22

资助 国家现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-25)。

* 通讯作者(qihongyan@syau.edu.cn, hyqiaaa@126.com)。

织器官中及不同发育时期, 葫芦素种类及含量均有所差异。郭梦鸿等(2015)测定了6种葫芦科药材中葫芦素的含量, 结果显示不同的药材中葫芦素成分不同, 总葫芦素的含量及葫芦素B、葫芦素E的含量均有差异。Shang等(2014)测定了栽培型黄瓜(*Cucumis sativus*)的根、茎、叶、雌花、雄花、果实和蔓中的葫芦素C, 发现茎和叶中的葫芦素C含量显著高于其他部位。孙文等(2014)以栝楼(*Trichosanthes kirilowii*)为试验材料, 测定结果显示不同部位葫芦素B的含量不同。付金玉(2018)以19份甜瓜品系为试验材料, 测定了幼果葫芦素B(苦味物质)的含量和成熟果实的糖度, 发现果实发育第I时期苦味与成熟时期糖度呈极显著正相关, 推测甜瓜果实的苦味物质可能与糖类物质之间存在某种转化关系。刘雯等(2017)的研究结果显示, 不同果龄罗汉果中罗汉果苷IV、罗汉果苷V含量均不同。除葫芦科外, 葫芦素还存在于其他植物中, 如玄参科(Scrophulariaceae)植物假马齿苋(*Bacopa monnieri*, Bhandari等2007)和胡黄连(*Neopicrorhiza scrophulariiflora*, Kim等2006)等。

2 葫芦素的合成、调控与转运

2.1 葫芦科作物葫芦素骨架的合成

植物通过甲羟戊酸(mevalonate, MVA)途径和脱氧木酮糖-5-磷酸(deoxyxylulose-5-phosphate, DXP)途径合成萜类物质。葫芦素属于四环三萜类化合物, 通过MVA途径合成三萜类化合物前体, 即以乙酰辅酶A (acetyl-CoA, AC)为最初底物, 经过多步酶促反应, 形成MVA, 再经过一系列酶的催化生成萜

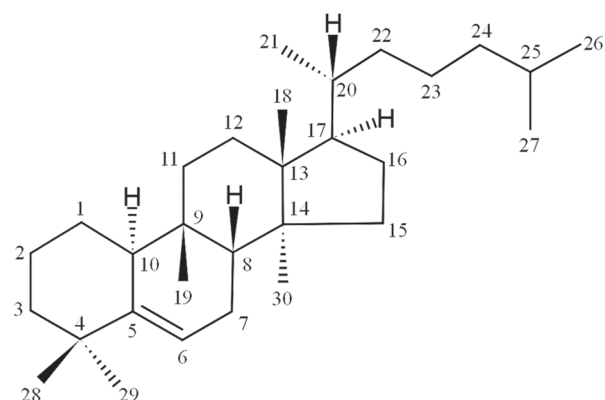


图1 葫芦烷型三萜化合物基本结构

Fig.1 The basic structure of cucurbitane skeleton

类通用前体异戊二烯焦磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)和二甲烯丙基焦磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP), 接着2分子IPP和1分子DMAPP在法尼基二磷酸合酶(farnesyl diphosphate synthase, FPS)的催化下合成三萜化合物直接前体法尼基焦磷酸(farnesyl pyrophosphate, FPP) (梁宗锁等2017; 陈瑶等2018)。FPP在鲨烯合酶(squalene synthase, SQS)和鲨烯环酶(squalene epoxidase, SQE)的催化作用下, 形成2,3-氧化角鲨烯(2,3-oxidosqualene) (孙丽超等2017; 程术等2019), 继后经氧化鲨烯环化酶(oxidosqualene cyclase, OSC)家族催化发生环化形成各种三萜化合物的基本骨架(图2)。

葫芦烷型三萜化合物的基本骨架是葫芦二烯醇(cucurbitadienol), 它由葫芦二烯醇合酶催化形成。该酶属于OSC家族的一员, 首先在西葫芦中被发现(Shibuya等2004)。迄今, 葫芦科作物中已有一些OSC家族基因被克隆并验证了功能, 如表1所示。

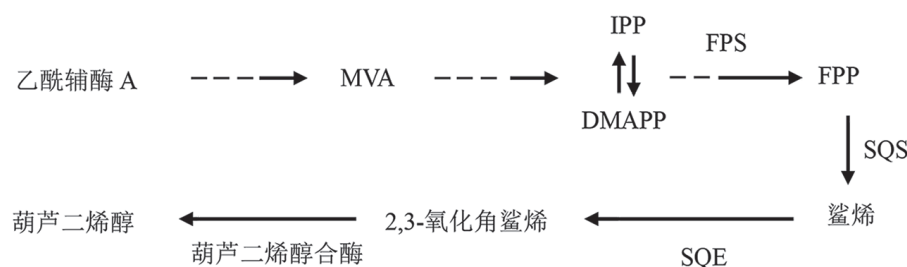


图2 葫芦二烯醇的合成

Fig.2 Synthesis of cucurbitadienol

MVA: mevalonate, 甲羟戊酸; IPP: isopentenyl diphosphate, 异戊二烯焦磷酸; DMAPP: dimethylallyl diphosphate, 二甲烯丙基焦磷酸; FPS: farnesyl diphosphate synthase, 法尼基二磷酸合酶; FPP: farnesyl pyrophosphate, 法尼基焦磷酸; SQS: squalene synthase, 鲨烯合酶; SQE: squalene epoxidase, 鲨烯环酶。虚线表示多步反应。

表1 目前葫芦科作物中已克隆的OSC家族基因
Table 1 The identified OSC genes in Cucurbitaceae crops

物种	OSC家族基因	酶	直接产物	参考文献
丝瓜(<i>Luffa cylindrica</i>)	<i>LcIMS1</i>	葫芦二烯醇合酶	泄根醇酸	Hayashi等2001
西葫芦(<i>Cucurbita pepo</i>)	<i>CpCPX</i> 、 <i>CpCPQ</i> 、 <i>CpCPR</i>	<i>CpCPX</i> 与 <i>CpCPQ</i> 分别编码环阿屯醇合酶和葫芦二烯醇合酶	环阿屯醇 葫芦二烯醇	Shibuya等2004
黄瓜(<i>Cucumis sativus</i>)	<i>CsBi</i>	葫芦二烯醇合酶	葫芦二烯醇	马永硕2013
甜瓜(<i>Cucumis melo</i>)	<i>CmBi</i>	葫芦二烯醇合酶	葫芦二烯醇	Zhou等2016
西瓜(<i>Citrullus lanatus</i> ; <i>Citrullus colocynthis</i>)	<i>CcCDS1</i> 、 <i>CcCDS2</i> 、 <i>ClCDS1</i>	<i>CcCDS2</i> 编码葫芦二烯醇合酶	葫芦二烯醇	Davidovich-Rikanati等2014
罗汉果(<i>Siraitia grosvenorii</i>)	<i>SgCbQ</i>	葫芦二烯醇合酶	葫芦二烯醇	Dai等2015

2.2 葫芦科作物葫芦素骨架形成后的修饰

分布在葫芦科植物中的葫芦素种类繁多, 结构各异, 这是因为葫芦烷型三萜化合物基本骨架形成后, 多种修饰酶修饰不同的位点, 最终生成各种葫芦烷型三萜化合物。这些修饰酶包括氧化还原酶、酰基转移酶等(李军玲等2009; Osbourn 2010)。其中细胞色素P450氧化酶(cytochrome P450, CYP-450)家族作为常见的氧化还原酶能够形成羟基、羧基、醛基、酮基和环氧基团等多种修饰(Hamberger和Bak 2013)。21世纪初, 研究者们针对葫芦科作物苦味性状进行了大量关于分子标记的开发、基因定位的工作, 对挖掘葫芦素合成的关键基因起了重要作用(顾兴芳等2006; 李曼等2010; 张圣平等2011; 李宗扬等2015)。直到2014年, Shang等(2014)通过转录组、基因组、代谢组和变异组多组学结合的方法解析了黄瓜中葫芦素C的合成过程, 结果表明黄瓜中葫芦素C的合成基因在染色体上成簇存在, 包括1个OSC、8个细胞色素P450基因及1个酰基转移酶(acyltransferase, ACT)基因, 该基因簇在黄瓜叶和果实中表达模式一致。该研究通过共表达、共调控等验证了其中四步基因的功能。第一步, *CsBi*编码葫芦二烯醇合酶, 该酶催化底物2,3-氧化角鲨烯形成葫芦烷型三萜化合物骨架葫芦二烯醇; 第二步, *Cs540*编码的酶使葫芦二烯醇的C-19位发生氧化反应形成19-羟基葫芦二烯醇; 第三步, 19-羟基葫芦二烯醇在*Cs160*编码的酶催化下其C-25被-OH取代形成19,25-二羟基葫芦二烯醇; *CsACT*编码乙酰基转移酶, 负责最后一步催化形成终产物葫芦素C。在Zhou等(2016)的研究

中, *Cs890*的功能也被验证, 该基因可编码催化C-11位羧化和C-20位羟基化的酶。这与其他植物中某些次生代谢物质的合成类似, 即多个非同源基因在染色体上相邻, 其中一个关键酶基因合成前期骨架, 其他酶基因进行多次后期修饰, 形成最终次生代谢物质(Osbourn 2010)。例如拟南芥thalianol和marneral三萜合成基因簇(Field和Osbourn 2008; Field等2011)、马铃薯 α -茄碱和 α -卡茄碱合成基因簇(Itkin等2013)以及水稻phytocassanes A~E二萜合成基因簇(Okada等2007; Wang等2012)。

黄瓜、甜瓜和西瓜均属于葫芦科植物, 从共同的祖先进化而来, 有着相同的驯化历史。Zhou等(2016)利用比较基因组学方法鉴定了甜瓜中葫芦素B合成基因簇(1个OSC、6个P450及1个ACT)和西瓜中葫芦素E合成基因簇(1个OSC、7个P450及1个ACT)。这两个基因簇在根和果实中表达模式一致。该研究进一步验证了其中四步基因的功能, 其中*CmBi*和*ClBi*编码葫芦二烯醇合酶, 催化第一步反应生成葫芦二烯醇, 与黄瓜类似; 第二步, *Cm890*、*Cl890A*和*Cl890B*均编码催化葫芦二烯醇C-11位形成11-羟基葫芦二烯醇的酶, 其可连续催化多步反应, 进一步形成11-羧基-20 β -羟基葫芦二烯醇; 第三步, *Cm180*和*Cl180*编码的氧化酶催化形成11-羧基-2 β ,20 β -二羟基葫芦二烯醇; 最后, *CmACT*和*ClACT*编码乙酰基转移酶, 甜瓜中葫芦素D经过酰基化生成终产物葫芦素B; 西瓜中葫芦素I经过酰基化生成终产物葫芦素E。

Zhou等(2016)深入对葫芦素B、C、E进行了趋同和差异进化分析, 发现黄瓜中*Cs540*基因编码

的酶催化产生19-羟基葫芦二烯醇,但甜瓜和西瓜的线性区域缺失;甜瓜中*Cm180*和西瓜中*Cl180*在组织中高表达,而在黄瓜中不表达;这都是造成三种葫芦素结构位点差异的原因(图3)。

2.3 葫芦科作物葫芦素的糖基化

在苦瓜(崔俊杰等2015)、甜瓜(唐岚等2012)、药西瓜(*Citrullus colocynthis*, 毛艳等2014)等多种葫芦科作物上的研究表明,葫芦烷型三萜化合物在植物体内以糖苷和苷元两种形式存在。由苷元形式转变为糖苷形式是由糖基转移酶催化的(Coutinho等2003)。在罗汉果(Dai等2015)和黄瓜(Zhong等2017)中,均发现了葫芦素被糖基化修饰的过程。Zhong等(2017)利用代谢组学和转录组学相结合的方法,挖掘到了参与黄瓜中葫芦素C糖基化修饰的特异糖基转移酶UGT73AM3。该研究发现,随着植株的生长发育,叶片中的葫芦素C含量越来越少,向细胞毒性更低的葫芦素C 3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷转变。这可能是植物在长期进化过程中形成的生存策略:种子未熟时,植株体内含有大量高毒性的葫芦素C,避免食草动物的啃食;种子成熟后,葫芦素C转变为低毒性的糖苷形式,同时,果实中储存了大量的糖等营养物质、散发出香气物质,吸引动物食用,帮助植物进行种子的传播(Zhong等2017)。在罗汉果中,存在一类具有强烈甜味的葫芦烷型三萜化合物——罗汉果苷,可作为糖尿病患者专用食品中的甜味剂,就是经过多个不同的葡萄糖基转移酶对其前体进行修饰形成的(Dai等2015; 莫长明2015)。薄皮甜瓜中研究表明,随着果实的发育,葫芦素含量逐渐下降(Hua等2019),但其去向还未明确,我们推测葫芦素被分解,或被糖基化,或被转运出果实。

2.4 葫芦素潜在的调控机制及转运机制

在黄瓜中, *CsB1*和*CsBt*均属于bHLH型(basic helix-loop-helix)转录因子,分别调控叶片和果实中葫芦素C生物合成。*CsBt*启动子SV-2195和SNP-1601两个突变是驯化后黄瓜果实无苦味的重要原因。基于葫芦素生物合成保守的事实, Zhou等(2016)利用共线性分析鉴定出*CmBr* (*ClBr*)和*CmBt* (*ClBt*)分别是调控甜瓜(西瓜)根和果实中葫芦素合成的转录因子。甜瓜中*CmBt*没有发现编码差异,但其表达在栽培种中显著降低,表明突变可能发生在启动子区,与黄瓜*CsBt*启动子区的突变相似。而西瓜中*ClBt*第2外显子上单碱基的突变导致翻译蛋白缩短,揭示了栽培西瓜中无苦味物质产生的机理。

次生代谢物质在植物体内并不是静止的,而是随着相应的生理需要在细胞内、细胞间甚至不同的器官间被转运(谢小东等2011)。目前,葫芦素转运只在黄瓜中有报道。黄瓜利用葫芦素C抵御害虫,但为了防止葫芦素C较高的细胞毒性对植株本身造成伤害,植物在进化过程中形成了一套解毒机制。马永硕(2017)把基因组数据与传统的生物学分析方法结合起来,挖掘到了负责葫芦素C跨膜转运的蛋白,该蛋白属于腺苷三磷酸结合盒蛋白(ATP-binding cassette transporter, ABC transporter)家族,因此将其命名为*CsABC1*。其定位于液泡膜,能够将葫芦素C由细胞质转运至液泡中,避免植物自身细胞受到葫芦素C的毒害。该研究结果显示, *CsB1*和*CsBt*不仅能激活*CsBi*的表达,也能结合到*CsABC1*的启动子上,激活其表达。除此之外,还未见其他种类葫芦素,如葫芦素B和葫芦素E等的转运途径的相关报道。

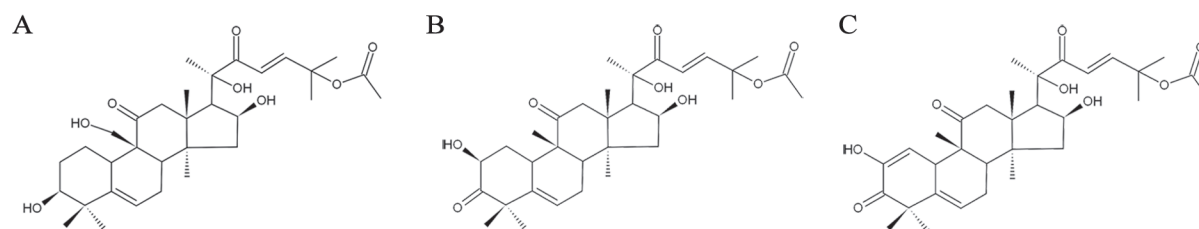


图3 葫芦素C (A)、葫芦素B (B)和葫芦素E (C)的结构

Fig.3 Structure of cucurbitacin C (A), cucurbitacin B (B) and cucurbitacin E (C)

本图根据Zhou等(2016)一文改画。

2.5 环境因素对葫芦素积累的调控

葫芦科作物的苦味与遗传因素和不良的环境条件均有关系, 其中, 遗传因素是主导因素。在甜瓜幼果(马德伟等1996)、黄瓜(Walters和Wehner 1998)、西瓜(Guner和Wehner 2003)、丝瓜(宋波2008)、甜瓜茎蔓(张慧林等2008)、甜瓜成熟果实(刘建萍等2012)等葫芦科蔬菜上均有苦味遗传相关研究报道, 在这些作物上, 苦味性状均为显性性状。

除遗传因素外, 环境条件的变化也对作物葫芦素的含量有较大影响, 黄浅等(2011)综述了导致葫芦科作物产生苦味的环境因子, 包括弱光、低温、高温、干旱、涝害、植物生长调节剂及肥料施用不当等。王鹤冰等(2018)研究了不同氮肥施用量下黄瓜叶片、卷须、果实的苦味程度, 发现氮肥过多或过少都会造成黄瓜的苦味程度升高。易建群(2017)以不苦型和苦味型两种黄瓜为试验材料, 在开花期进行不同的水分处理, 结果表明苦味型黄瓜中葫芦素含量随着水分亏缺程度的上升而提高, 而不苦型黄瓜在不同的水分供应下均无葫芦素产生。Zhang等(2019)研究了嫁接对薄皮甜瓜代谢物变化的影响, 结果表明, 所有以南瓜为砧木的植株均产生苦果, 而以甜瓜为砧木的植株和自根苗均不产生苦果, 嫁接于南瓜砧木上的植株中有17种代谢物发生了变化, 其中, 葫芦素O、葫芦素S及葫芦素C的含量显著增加。另外, 葫芦科作物中葫芦素含量与虫害也有关系, 如孙兴华等(2014)的研究结果显示黄瓜叶片中葫芦素B在美洲斑潜蝇为害下含量升高。Balkema-Boomstra等(2003)发现黄瓜中葫芦素C的含量越高, 红蜘蛛的存活率越低, 植株葫芦素C含量与其对红蜘蛛的抗性呈显著正相关。Dube等(2018)研究了纯度为98%的葫芦素A、葫芦素B及两种含有葫芦素的黄瓜粗提物对线虫的毒性, 结果表明黄瓜粗提物对线虫的防治效果优于高纯度的葫芦素A、葫芦素B。

3 展望

关于葫芦素的研究开始于20世纪, 但人们对于葫芦科蔬菜苦味的驯化和应用很早就开始了。野生的黄瓜果实苦味极端强烈, 在印度一直被当做泻药使用(Dwivedi等2010), 我国明代医药学家

李时珍在《本草纲目》中也记载了甜瓜蒂具有保肝消炎作用(尚轶和黄三文2015)。在人类对葫芦科蔬菜的长期驯化过程中, 其果实苦味逐渐减弱, 但营养体的苦味被保持下来, 既为人们提供了香甜可口的果实, 又使得植株具有一定抵御病虫害的能力, 但由于这种驯化并不完全, 在不良的环境条件下, 葫芦科蔬菜果实经常会表现出令人不悦的苦味, 使得品质下降。这给育种学家们提供了一种独特的思路: 通过调控果实和营养体中苦味合成的“开关”基因 Bt 和 Bl , 培育稳定的营养体苦而果实不苦的品种, 在保证果实品质的同时, 提高作物对逆境的抵抗能力, 减少农药的使用(尚轶和黄三文2015)。

作为一种有着巨大药用价值的次生代谢物质, 葫芦素的工厂化大批量生产尤为重要, 但目前葫芦素的提取、纯化成本还相当高。有研究者提出, 随着生物技术的成熟, 可将葫芦素合成代谢途径导入酵母的基因组中, 在体外高效合成、改良葫芦素, 为未来开发更优良的抗癌药物提供新思路(尚轶和黄三文2015)。

此外, 葫芦素在作物体内的转运与其在作物不同部位的含量有一定关系, 尤其是长距离运输, 但其转运途径并不明确; 另一方面, 不同结构类型葫芦素的细胞毒性、苦味不同, 它们之间可能存在互相转换的关系, 导致不同发育时期葫芦科蔬菜的果实苦味不同(Zhong等2017), 但绝大多数种类葫芦素之间的具体转换过程及调控机制还未知。这两方面的科学问题可能是葫芦素相关研究中下一步的热点问题。

参考文献(References)

- Balkema-Boomstra AG, Zijlstra S, Verstappen FW, et al (2003). Role of cucurbitacin C in resistance to spider mite (*Tetranychus urticae*) in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *J Chem Ecol*, 29 (1): 225–235
- Bhandari P, Kumar N, Singh B, et al (2007). Cucurbitacins from *Bacopa monnieri*. *Phytochemistry*, 68 (9): 1248–1254
- Chen JC, Chiu MH, Nie RL, et al (2005). Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. *Nat Prod Rep*, 22 (3): 386–399
- Chen WJ, Sun Y, Yuan ZK, et al (2014). Isolation and identifi-

- cation of the chemical constituents of *Pedicellus Melo*. J Shenyang Pharm Univ, 31 (5): 351–354 (in Chinese with English abstract) [陈卫军, 孙艳, 苑振宽等(2014). 甜瓜蒂化学成分分离与鉴定. 沈阳药科大学学报, 31 (5): 351–354]
- Chen XP, Bao JL, Guo JJ, et al (2012). Biological activities and potential molecular targets of cucurbitacins: a focus on cancer. *Anti-Cancer Drugs*, 23 (8): 777–787
- Chen Y, Xie QD, Tang YQ, et al (2018). Advances in synthetic metabolic pathways and rate-limiting enzymes of plant terpene. *Mol Plant Breed*, 16 (7): 2371–2379 (in Chinese with English abstract) [陈瑶, 谢琴鼎, 唐亚琴等(2018). 植物萜类合成代谢途径及限速酶的研究进展. 分子植物育种, 16 (7): 2371–2379]
- Chen YX (1987). Cucurbitacin tablet, a new drug for liver cancer and hepatitis. *Chin Trad Herb Drugs*, 18 (10): 21 (in Chinese) [陈永献(1987). 治疗肝炎、肝癌新药葫芦素片. 中草药, 18 (10): 21]
- Cheng AC, Hsu YC, Tsai CC (2019). The effects of cucurbitacin E on GADD45 β -trigger G2/M arrest and JNK-independent pathway in brain cancer cells. *J Cell Mol Med*, 23 (5): 3512–3519
- Cheng S, Deng ZX, Bian GK, et al (2019). Construction of high-efficient terpenoid platform and the application in terpenoid discovery. *Chin Bull Life Sci*, 31 (5): 449–457 (in Chinese with English abstract) [程术, 邓子新, 卞光凯等(2019). 萜类高效合成平台的搭建与萜类产物批量挖掘. 生命科学, 31 (5): 449–457]
- Coutinho PM, Deleury E, Davies GJ, et al (2003). An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J Mol Biol*, 328 (2): 307–317
- Cui JJ, Li B, Cheng JW, et al (2015). Progress on bitter principles and its biosynthesis in bitter gourd. *Acta Horti Sin*, 42 (9): 1707–1718 (in Chinese with English abstract) [崔竣杰, 李波, 程蛟文等(2015). 苦瓜苦味物质及其生物合成研究进展. 园艺学报, 42 (9): 1707–1718]
- Dai LH, Liu C, Zhu YM, et al (2015). Functional characterization of cucurbitadienol synthase and triterpene glycosyltransferase involved in biosynthesis of mogrosides from *Siraitia grosvenorii*. *Plant Cell Physiol*, 56 (6): 1172–1182
- Davidovich-Rikanati R, Shalev L, Baranes N, et al (2014). Recombinant yeast as a functional tool for understanding bitterness and cucurbitacin biosynthesis in watermelon (*Citrullus* spp.). *Yeast*, 32 (1): 103–114
- Dube ZP, Mashela PW, Waele DD (2018). Sensitivity of *Meloidogyne incognita* second-stage juvenile hatch, motility and viability to pure cucurbitacins and cucurbitacin-containing phytonematicides. *S Afr J Plant Soil*, 36 (1): 29–32
- Dwivedi NK, Dhariwal OP, Krishnan SG, et al (2010). Distribution and extent of diversity in *Cucumis* species in the Aravalli ranges of India. *Genet Resour Crop Evol*, 57 (3): 443–452
- Field B, Fiston-Lavier AS, Kemen A, et al (2011). Formation of plant metabolic gene clusters within dynamic chromosomal regions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108 (38): 16116–16121
- Field B, Osbourn AE (2008). Metabolic diversification: independent assembly of operon-like gene clusters in different plants. *Science*, 320 (5875): 543–547
- Fu JY (2018). Cloning, functional analysis and screening of related molecular markers of bitterness-related genes in melon (*Cucumis melo* L.) (dissertation). Tianjin: Tianjin University (in Chinese with English abstract) [付金玉(2018). 甜瓜苦味相关基因的克隆、功能分析及相关分子标记筛选(学位论文). 天津: 天津大学]
- Gu XF, Zhang SQ, Zhang SP (2006). The AFLP markers linked with the bitter fruit gene (*Bt*) in cucumber. *Acta Horti Sin*, 33 (1): 140–142 (in Chinese with English abstract) [顾兴芳, 张素勤, 张圣平(2006). 黄瓜果实苦味 *Bt* 基因AFLP分子标记. 园艺学报, 33 (1): 140–142]
- Guner N, Wehner TC (2003). Gene list for watermelon. *Hort-Science*, 39 (6): 1175–1182
- Guo MH, Sun YQ, Liu Y, et al (2015). Content difference of cucurbitacins in cucurbitaceae plant. *Chin Hosp Pharm J*, 35 (17): 1554–1558 (in Chinese with English abstract) [郭梦鸿, 孙玉琦, 刘影等(2015). 葫芦科植物药材中葫芦素类成分的含量差异. 中国医院药学杂志, 35 (17): 1554–1558]
- Hamberger B, Bak S (2013). Plant P450s as versatile drivers for evolution of species-specific chemical diversity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 368 (1612): 20120426
- Hayashi H, Huang P, Inoue K, et al (2001). Molecular cloning and characterization of isomultiflorenol synthase, a new triterpene synthase from *Luffa cylindrica*, involved in biosynthesis of bryonolic acid. *Eur J Biochem*, 268 (23): 6311–6317
- Hua DP, Fu JY, Liu L, et al (2019). Change in bitterness, accumulation of cucurbitacin B and expression patterns of CuB biosynthesis-related genes in melon during fruit development. *Hortic J*, 88 (2): 253–262
- Huang Q, Qian JK, Wang FZ, et al (2011). Reasons and preventive measures of bitter in cucurbitaceous vegetables. *Bull Agric Sci Technol*, (5): 163–165 (in Chinese) [黄浅, 钱健康, 王凤真等(2011). 瓜类蔬菜苦味产生的原因及防治措施. 农业科技通讯, (5): 163–165]
- Itkin M, Heinig U, Tzfadia O, et al (2013). Biosynthesis of antinutritional alkaloids in solanaceous crops is mediated by clustered genes. *Science*, 341 (6142): 175–179

- Kim IH, Uchiyama N, Kawahara N, et al (2006). Iridoid glycosides and cucurbitacin glycoside from *Neopicrorhiza scrophulariiflora*. *Phytochemistry*, 67 (24): 2691–2696
- Li JL, Luo XD, Zhao PJ, et al (2009). Post-modification enzymes involved in the biosynthesis of plant terpenoids. *Acta Bot Yunnanica*, 31 (5): 461–468 (in Chinese with English abstract) [李军玲, 罗晓东, 赵沛基等(2009). 植物萜类生物合成中的后修饰酶. *云南植物研究*, 31 (5): 461–468]
- Li M, Gong YQ, Miao H, et al (2010). Fine mapping of the foliage bitterness gene (*Bi*) in *Cucumis sativus*. *Acta Hort Sin*, 37 (7): 1073–1078 (in Chinese with English abstract) [李曼, 龚义勤, 苗晗等(2010). 黄瓜营养体苦味基因*Bi*的定位. *园艺学报*, 37 (7): 1073–1078]
- Li ZY, Qin ZW, Zhou XY, et al (2015). Genetic analysis and molecular mapping of fruit bitterness in cucumber. *Mol Plant Breed*, 13 (7): 1578–1583 (in Chinese with English abstract) [李宗扬, 秦智伟, 周秀艳等(2015). 黄瓜果实苦味性状遗传分析与分子标记. *分子植物育种*, 13 (7): 1578–1583]
- Liang ZS, Fang YM, Yang DF (2017). Biosynthesis, regulation and metabolic engineering of terpenoids in plants. *J Zhejiang Sci-Tech Univ (Nat Sci)*, 37 (2): 255–264 (in Chinese with English abstract) [梁宗锁, 方誉民, 杨东风(2017). 植物萜类化合物生物合成与调控及其代谢工程研究进展. *浙江理工大学学报(自然科学版)*, 37 (2): 255–264]
- Lin XQ, Yang PQ (1997). Progress on the study of cucurbitane-type tetracyclic triterpenoids. *West Chin J Pharm Sci*, 12 (2): 106–109 (in Chinese with English abstract) [林晓琴, 杨培全(1997). 葫芦烷型四环三萜化合物的研究. *华西药理学杂志*, 12 (2): 106–109]
- Liu H, Xu ZF, Huang SS (2007). Comparing on the inducing cucurbitacin B content in cotyledon of squash aroused by *Aulcophora femoralis chinensis* (Coleoptera: Chrysomelidae) and mechanical damage. *Acta Ecol Sin*, 27 (12): 5421–5426 (in Chinese with English abstract) [刘慧, 许再福, 黄寿山(2007). 黄足黄守瓜(*Aulcophora femoralis chinensis*)取食和机械损伤对南瓜子叶中葫芦素B的诱导作用. *生态学报*, 27 (12): 5421–5426]
- Liu JP, Qin ZW, Zhou XY, et al (2012). Inheritance of the main characteristics of F_1 hybrid of wild and cultivated melon. *North Hort*, 13: 16–20 (in Chinese with English abstract) [刘建萍, 秦智伟, 周秀艳等(2012). 野生与栽培甜瓜杂交后代主要性状的遗传规律研究. *北方园艺*, 13: 16–20]
- Liu W, Wang ZH, Yang PQ, et al (2017). The research to different fruit age of mogrosides in distribution and separation. *Shandong Chem Ind*, 46 (12): 12–15, 17 (in Chinese with English abstract) [刘雯, 王志宏, 杨裴庆等(2017). 不同果龄罗汉果中甜苷含量分布研究. *山东化工*, 46 (12): 12–15, 17]
- Ma C (2018). Effects of cucurbitacin B and EGCG on the host biotypes of cotton aphid (dissertation). Wuhan: Huazhong Agricultural University (in Chinese with English abstract) [马超(2018). 葫芦素B与表没食子儿茶素没食子酸酯对棉蚜寄主专化型的影响(学位论文). 武汉: 华中农业大学]
- Ma DW, Sun L, Gao SZ, et al (1996). Study on the genetic pattern of bitter taste in young fruit of melon (*Cucumis melo* L.). *Acta Hort Sin*, 23 (3): 255–258 (in Chinese with English abstract) [马德伟, 孙岚, 高锁柱等(1996). 甜瓜幼果苦味性状遗传的研究. *园艺学报*, 23 (3): 255–258]
- Ma QW, Zhao HY (2017). Structure identification of main tetracyclic triterpenoids and simultaneous determination of cucurbitacin B and D in *Pedicellus Melo*. *Chin J Exp Trad Med Form*, 23 (8): 77–81 (in Chinese with English abstract) [马启武, 赵海誉(2017). 甜瓜蒂中主要四环三萜结构鉴定及葫芦素B, 葫芦素D含量测定. *中国实验方剂学杂志*, 23 (8): 77–81]
- Ma YS (2013). Clone and functional analysis of bitter gene *Bi* in cucumber (dissertation). Nanjing: Nanjing Agricultural University (in Chinese with English abstract) [马永硕(2013). 黄瓜营养体苦味基因*Bi*的克隆及功能解析(学位论文). 南京: 南京农业大学]
- Ma YS (2017). Biosynthesis, regulation, and transportation of bitterness in cucumber (dissertation). Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (in Chinese with English abstract) [马永硕(2017). 黄瓜中苦味素的生物合成、调控及转运机制(学位论文). 北京: 中国农业科学院]
- Mao Y, He JH, Gu ZY, et al (2014). Study on triterpene compounds in *Fructus Colocynthis* by LC-MS/MS. *Chin J Pharm Anal*, 34 (7): 1192–1196 (in Chinese with English abstract) [毛艳, 贺金华, 顾政一等(2014). 药西瓜中三萜类成分的LC-MS/MS分析研究. *药物分析杂志*, 34 (7): 1192–1196]
- Mo CM (2015). Transcriptome study of mogroside metabolic enzyme genes in *Siraitia grosvenorii* and cloning and expression of UDP-glucosyltransferase genes (dissertation). Nanning: Guangxi University (in Chinese with English abstract) [莫长明(2015). 罗汉果苷代谢酶基因转录组研究及葡萄糖基转移酶基因克隆与表达(博士论文). 南宁: 广西大学]
- Okada A, Shimizu T, Okada K, et al (2007). Elicitor induced activation of the methylerythritol phosphate pathway toward phytoalexins biosynthesis in rice. *Plant Mol Biol*, 65 (1–2): 177–187
- Osborn A (2010). Gene clusters for secondary metabolic

- pathways: an emerging theme in plant biology. *Plant Physiol*, 154 (2): 531–535
- Qiu MH, Chen SK, Chen JC, et al (2005). Chemotaxonomy of Cucurbitaceae. *Chin J Appl Environ Biol*, 11 (6): 673–685 (in Chinese with English abstract) [邱明华, 陈书坤, 陈剑超等(2005). 葫芦科化学分类学. 应用与环境生物学报, 11 (6): 673–685]
- Rehm S, Enslin PR, Meeuse ADJ, et al (1957). Bitter principles of the Cucurbitaceae. VII—The diatribution of bitter principles in this plant family. *J Sci Food Agric*, 8 (12): 679–686
- Saboo SS, Thorat PK, Tapadiya GG, et al (2013). Ancient and recent medicinal uses of Cucurbitaceae family. *Int J Ther Appl*, 9: 11–19
- Saeed MEM, Boulos JC, Elhaboub G, et al (2019). Cytotoxicity of cucurbitacin E from *Citrullus colocynthis* against multidrug-resistant cancer cells. *Phytomedicine*, 62: 152945
- Shang Y, Huang SW (2015). Bitterness metabolism in cucumber and synthetic biology. *Chin Bull Life Sci*, 27 (8): 1091–1094 (in Chinese with English abstract) [尚轶, 黄三文(2015). 黄瓜苦味物质的代谢调控与合成生物学. 生命科学, 27 (8): 1091–1094]
- Shang Y, Ma YS, Zhang HM, et al (2014). Biosynthesis, regulation, and domestication of bitterness in cucumber. *Science*, 346 (6213): 1084–1088
- Shibuya M, Adachi S, Ebizuka Y (2004). Cucurbitadienol synthase, the first committed enzyme for cucurbitacin biosynthesis, is a distinct enzyme from cycloartenol synthase for phytosterol biosynthesis. *Tetrahedron*, 60: 6995–7003
- Song B (2008). Study on the genetic characterization of the interspecific hybrid progenies between *Luffa acutangula* (L.) Roxb and *cylindrical* (L.) Roem (dissertation). Nanjing: Nanjing Agricultural University (in Chinese with English abstract) [宋波(2008). 有棱丝瓜与普通丝瓜种间杂种后代的遗传分析(学位论文). 南京: 南京农业大学]
- Sun LC, Li SY, Wang FZ, et al (2017). Research progresses in the synthetic biology of terpenoids. *Biotechnol Bull*, 33 (1): 64–75 (in Chinese with English abstract) [孙丽超, 李淑英, 王凤忠等(2017). 萜类化合物的合成生物学研究进展. 生物技术通报, 33 (1): 64–75]
- Sun W, Chao ZM, Wang C, et al (2014). Determination of cucurbitacin B in some parts of *Trichosanthes kirilowii* by HPLC-UV method. *Chin J Exp Trad Med Form*, 20 (23): 86–88 (in Chinese with English abstract) [孙文, 巢志茂, 王淳等(2014). HPLC-UV对栝楼各部位中葫芦素B的含量测定. 中国实验方剂学杂志, 20 (23): 86–88]
- Sun XH, Zhou XR, Pang BP, et al (2014). Effects of *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard) larval infestation on trypsin and chymotrypsin activity and cucurbitacin B content in cucumber leaves. *Chin J Appl Entomol*, 51 (1): 169–177 (in Chinese with English abstract) [孙兴华, 周晓榕, 庞保平等(2014). 南美斑潜蝇为害对黄瓜叶片中蛋白酶抑制剂活性及葫芦素B含量的影响. 应用昆虫学报, 51 (1): 169–177]
- Tallamy DW, Stull J, Ehresman NP, et al (1997). Cucurbitacins as feeding and oviposition deterrents to insects. *Environ Entomol*, 26 (3): 678–683
- Tang L, Zhao Y, Shan HF, et al (2012). Studies on the separation of cucurbitacins from the fruit base of *Cucumis melo* L. and their antitumor activities. *J Zhejiang Univ Technol*, 40 (4): 388–391, 449 (in Chinese with English abstract) [唐岚, 赵亚, 单海峰等(2012). 甜瓜蒂中葫芦素类成分分离及体外抗癌活性研究. 浙江工业大学学报, 40 (4): 388–391, 449]
- Walters SA, Wehner TC (1998). Independence of the *mj* nematode resistance gene from 17 gene loci in cucumber. *HortScience*, 33 (6): 1050–1052
- Wang HB, Xiong Y, Xiang HF, et al (2018). Study on the relationship between nitrogen fertilizer application and the fruit bitterness in cucumber. *Tianjin Agric Sci*, 24 (12): 36–38, 42 (in Chinese with English abstract) [王鹤冰, 熊艳, 向华丰等(2018). 氮肥施用量与黄瓜苦味出现的关系研究. 天津农业科学, 24 (12): 36–38, 42]
- Wang Q, Hillwig ML, Okada K, et al (2012). Characterization of CYP76M5-8 indicates metabolic plasticity within a plant biosynthetic gene cluster. *J Biol Chem*, 287 (9): 6159–6168
- Xie XD, Cheng TC, Wang GH, et al (2011). ABC and MATE transporters of plant and their roles in membrane transport of secondary metabolites. *Plant Physiol J*, 47 (8): 752–758 (in Chinese with English abstract) [谢小东, 程廷才, 王根洪等(2011). 植物ABC和MATE转运蛋白与次生代谢物跨膜转运. 植物生理学报, 47 (8): 752–758]
- Yi JQ (2017). The effect on physiology and fruit quality and relative expression of gene that control the biosynthetic to cucurbitacin C under different water treatments (dissertation). Hefei: Anhui Agricultural University (in Chinese with English abstract) [易建群(2017). 水分处理对黄瓜生理、品质及苦味相关基因表达的影响(学位论文). 合肥: 安徽农业大学]
- Zhang HL, Wang HL, Zhou ZC, et al (2008). Genetic analysis of bitter traits in stem and vine of melon. *Chin Cucurbits veget*, (4): 28–29 (in Chinese) [张慧林, 王惠林, 周志成等(2008). 甜瓜茎蔓苦味性状的遗传分析. 中国瓜菜, (4): 28–29]
- Zhang SP, Miao H, Cheng ZC, et al (2011). Genetic mapping of the fruit bitterness gene (*Bt*) in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Acta Hort Sin*, 38 (4): 709–716 (in Chinese with English abstract) [张圣平, 苗晗, 程周超等(2011).

- 黄瓜果实苦味基因 *Bt* 的初步定位. 园艺学报, 38 (4): 709–716]
- Zhang SS, Nie LC, Zhao WS, et al (2019). Metabolomic analysis of the occurrence of bitter fruits on grafted oriental melon plants. PLOS One, 14 (10): e0223707
- Zhong Y, Xue XF, Liu ZQ, et al (2017). Developmentally regulated glucosylation of bitter triterpenoid in cucumber by the UDP-glucosyltransferase UGT73AM3. Mol Plant, 10 (7): 1000–1003
- Zhou SN, Lu N (1987). Cucurbitacin, a new drug for liver cancer, is available. Shandong Pharm Ind, (2): 41 (in Chinese) [周松年, 鲁南(1987). 抗肝癌新药——葫芦素问世. 山东医药工业, (2): 41]
- Zhou Y, Ma YS, Zeng JG, et al (2016). Convergence and divergence of bitterness biosynthesis and regulation in Cucurbitaceae. Nat Plants, 2: 16183

Research status and advance of bitter compounds cucurbitacins in Cucurbitaceae crops

LI Qi, LUO Fei, WANG Chengyang, LI Liangyu, QI Hongyan*

College of Horticulture, Shenyang Agricultural University/Key Laboratory of Protected Horticulture, Ministry of Education/Northern National & Local Joint Engineering Research Center of Horticultural Facilities Design and Application Technology (Liaoning), Shenyang 110866, China

Abstract: Cucurbitacins are a group of cucurbitane-type tetracyclic triterpenoids which widely exist in Cucurbitaceae crops. These compounds can help plants resist pests and have the function of anti-cancer and anti-inflammation to human beings, but they confer bitterness on Cucurbitaceae crops. This paper overviewed the research status on the structure, distribution, biosynthesis, transport and molecular regulation of cucurbitacins. Furthermore, we prospected the breeding of non-bitter Cucurbitaceae vegetables, the efficient industrial synthesis of cucurbitacins and their transfer, conversion and degradation in plants, so as to provide reference on efficient use of cucurbitacins and reducing bitter cucurbits fruit in production.

Key words: cucurbitacin; bitterness; Cucurbitaceae; synthesis and regulation

Received 2020-01-13 Accepted 2020-04-22

This work was supported by the China Modern Agricultural System (CARS-25).

*Corresponding author (qihongyan@syau.edu.cn, hyqiaaa@126.com).