

# 金雀异黄素和环鸟苷酸调控离体葡萄果实花青苷积累

朱云娜<sup>1,2</sup>, 王中华<sup>1,3</sup>, 张治平<sup>1</sup>, 汪良驹<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>南京农业大学园艺学院, 南京 210095; <sup>2</sup>运城职业技术学院有机食品科技学院, 山西运城 044000; <sup>3</sup>江苏省农业科学院园艺研究所, 南京 210014)

**摘要:** 以离体‘巨峰’葡萄为材料, 观察到金雀异黄素 (GNT) 对果皮花青苷积累的促进效应, 而且证明 GNT 的诱导过程 (约 10~12 h) 不需要光照, 但其后的花青苷积累却依赖于光照。如果在 GNT 预处理后 6 h 内用环鸟苷酸 (cGMP) 处理, 可以明显抑制 GNT 的促进效应, 但在 GNT 预处理后 12 h 再用 cGMP 处理, 则抑制效应消失。半定量 RT-PCR 检测表明, 光和 GNT 诱导葡萄果皮花青苷合成相关基因 *PAL*、*CHS* 和 *UFGT* 表达量上调, 而对 *LDOX* 表达量无明显影响; cGMP 处理抑制了 GNT 诱导的 *PAL* 和 *CHS* 等基因表达的促进作用, 说明 GNT 和 cGMP 相互拮抗, 共同调控葡萄果皮花青苷积累。

**关键词:** 葡萄; 花青苷; 金雀异黄素; 环鸟苷酸 (cGMP); 基因; 表达

**中图分类号:** S 663.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2010) 04-0517-08

## Regulation of Anthocyanin Accumulation in Grapes *in Vitro* by Genistein and cGMP

ZHU Yun-na<sup>1,2</sup>, WANG Zhong-hua<sup>1,3</sup>, ZHANG Zhi-ping<sup>1</sup>, and WANG Liang-ju<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; <sup>2</sup>Organic Food College of Science and Technology, Yuncheng Professional Technology College, Yuncheng, Shanxi 044000, China; <sup>3</sup>Institute of Horticulture, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** It was found in previous paper that the anthocyanin accumulation in peach fruit skin was promoted by genistein (GNT) but inhibited by cGMP, which is quite different from the prevailing hypotheses in this field. In this study, we once again observed that GNT promoted anthocyanin accumulation in grape berry skin *in vitro*. The anthocyanin accumulation induced by GNT was dependent on light exposure. However, a dark period about 10 - 12 h was necessary during GNT induction. This may suggest that light is unnecessary for the direct physiological responses for berries to GNT treatment, but necessary for anthocyanin accumulation. Furthermore, it was found that if the berries were treated with cGMP at once following GNT pretreatment, the GNT-induced anthocyanin accumulation was significantly inhibited. However, if cGMP treatment was conducted 12 h after GNT pretreatment, the inhibition of cGMP was no longer observed, suggesting that the GNT-induced physiological responses might be completed in 12 h. Detection by semi-quantitative RT-PCR showed the expression of the genes including

收稿日期: 2009 - 10 - 09; 修回日期: 2010 - 02 - 23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30471181)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: wlj@njau.edu.cn)

*PAL*, *CHS* and *UFGT*, which are related with anthocyanin biosynthesis, were up-regulated by light exposure and GNT treatment in grape skin, while *LDOX* seemed no response to these two factors. Treatment with cGMP inhibited RNA accumulation of *PAL* and *CHS* induced by GNT, suggesting that GNT and cGMP be of antagonism in regulation of anthocyanin accumulation in grape skins.

**Key words:** grape; anthocyanin; genistein; cGMP; gene; expression

果皮色泽是果实的重要品质,也是衡量果品商品价值的重要因素。如何改善果品外观品质,尤其是促进红色果实着色一直是国内外果树工作者普遍关心的问题。近年来,作者在研究 5-氨基乙酰丙酸(ALA)促进富士苹果着色效应(汪良驹等,2004)时,观察到金雀异黄素(Genistein, GNT)能更快地促进果皮花青苷积累(王中华等,2006)。在田间条件下, GNT 促进桃(朱云娜等,2007a)和蟠桃(朱云娜等,2007b)果实着色。GNT 是一种酪氨酸蛋白激酶抑制剂,常被用于细胞 G 蛋白信号转导研究(Bowler & Chua, 1994; Bowler et al., 1994; 周君莉等,1998),因而, GNT 促进果实花青苷合成可能与 G 蛋白信号有关。作者用外源 cGMP 处理油桃,发现它能抑制 GNT 对桃果实花青苷积累的促进效应(朱云娜等,2007a)。但是前人利用番茄研究认为,植物花青苷积累受到 cGMP 促进(Neuhaus et al., 1993; Bowler & Chua, 1994; Bowler et al., 1994)。显然, GNT 和 cGMP 对果实花青苷合成的调节效应有待进一步澄清。本研究中以‘巨峰’葡萄为材料,在系统观察 GNT 和 cGMP 对葡萄果皮花青苷积累效应的基础上,用半定量 RT-PCR 技术研究了 GNT 和 cGMP 对花青苷合成相关基因 *PAL*、*CHS*、*LDOX* 和 *UFGT* 表达的影响,以期阐明 GNT 调控果皮花青苷含量积累的机理提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料及其处理

以转色期巨峰葡萄(*Vitis vinifera* L. ‘Kyoho’)果实为材料,2006年7月下旬采自江苏省农业科学院试验葡萄园。金雀异黄素(GNT)和环鸟苷酸(cGMP)购自于 Sigma-Aldrich 公司。

处理 1: 果实采摘后浸于  $40 \sim 120 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GNT 溶液(含有 0.01% Tween-20,下同)中 5 s,放于黑暗中 12 h,而后转移至光照强度为  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,温度  $(18 \pm 2)^\circ\text{C}$  的光照培养箱中连续光照 120 h。

处理 2: 果实采摘后在  $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GNT 溶液中浸渍 5 s 后,放置于黑暗下 12 h,而后转移至上述光照培养箱中,连续照光(光处理)或用铝箔纸遮光(暗处理)120 h。

处理 3: 果实采摘后在  $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GNT 溶液中浸渍 5 s,而后在黑暗中分别放置 0、2、4、6、8、10 和 12 h,再转移至上述光照培养箱连续照光,并使得每批样品在黑暗和光照下的总时间为 120 h。清水对照果实浸水后连续照光(光对照)或用铝箔纸遮光(暗对照)120 h。

处理 4: 果实采摘后在  $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GNT 溶液中浸渍 5 s,在黑暗中放置 12 h,转移到光照培养箱中,并分为两组,分别进行“暗—光”和“光—暗”处理。其中“暗—光”组继续暗处理 0、12、36、60、84 和 108 h,再照光处理;“光—暗”组先照光 24、48、72 和 96 h,再分别遮光 84、60、36 和 12 h。所有果实(包括光对照和暗对照)在浸果后处理总时间均为 120 h。

处理 5: 果实采摘后在  $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GNT 溶液中浸渍 5 s,保持在黑暗中,并于 0、6 和 12 h 时分别用  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  cGMP 溶液浸渍,而后转移至光照培养箱连续照光(0、36 和 72 h)。

以上各处理均设清水为对照,并在处理结束后,分别取果皮测定花青苷含量,其中处理 5 部分

样品速冻于液氮中, 保存于  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱里, 以备检测与花青苷合成有关的基因表达。

## 1.2 花青苷含量测定

按孙建设等(2000)的方法, 在室温下用 1% HCl - 甲醇溶液提取花青苷, 置暗处 24 h,  $10\,000\times g$  离心 5 min 后, 取上清液用分光光度计测其在 530、620 和 650 nm 下的吸光值, 最终吸光值 =  $\text{OD}_{530} - 0.9\times\text{OD}_{620} - 0.1\times\text{OD}_{650}$ 。花青苷含量按摩尔系数 0.0462 计算, 单位为  $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ 。

## 1.3 果皮总RNA的提取和半定量RT-PCR

改良 CTAB 法(温鹏飞, 2005)提取总 RNA。不同处理间取等量总 RNA, 按照 Fermentas 公司 M-MLV 反转录酶说明书合成第一链 cDNA。根据葡萄已登录序列, 分别设计特异性引物(表 1)。

表 1 PCR 引物合成情况  
Table 1 PCR primers of RT-PCR

基因 Gene	登录号 Accession number	引物序列 Primer sequence (5'-3')	PCR 产物/bp Size of PCR product
<i>ACTIN</i>	AY680701	F: 5'-GATTCTGGTGATGGTGTGAGT-3' R: 5'-GACAATTTC CGTTCAGCAGT-3'	168
<i>PAL</i>	X75967	F: 5'-AGCCATTATGGAGC ACATTC-3' R: 5'-ATGTTCCACCAGAACTTGCC-3'	847
<i>CHS</i>	X75969	F: 5'-AG CTGCCGTTATCATTTGG CG-3' R: 5'-AGTTGATCAGTGACTCAGTG-3'	540
<i>LDOX</i>	AB073018	F: 5'-CTATGAGGGCAAGTGGGTG-3' R: 5'-GAGGTGGGAAGAGTGGTGG-3'	239
<i>UFGT</i>	AB047090	F: 5'-GTGAAGACG AGCTGCTCAATTTC-3' R: 5'-CCGGGAAACCTTTATTTTCATTG-3'	920

PCR 扩增采用 20  $\mu\text{L}$  反应体系, 分别加入等量 cDNA 模板 1.5  $\mu\text{L}$ ,  $10\times$  Reaction buffer 2  $\mu\text{L}$ , 2.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$  1.2  $\mu\text{L}$ , 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTP 0.3  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  上下游引物各 0.3  $\mu\text{L}$ , 1 U *Taq* DNA 聚合酶,  $\text{ddH}_2\text{O}$  补充至 20  $\mu\text{L}$ 。反应程序:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min,  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $50.5$  或  $54.1\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,  $n$  个循环,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。其中,  $n$  代表循环次数 (*PAL*: 35; *UFGT*: 35; *CHS*: 30; *LDOX*: 33; *ACTIN*: 33)。目的基因退火温度为  $54.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 管家基因退火温度为  $50.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。扩增完成后, 取 10  $\mu\text{L}$  PCR 产物, 加 2  $\mu\text{L}$  上样缓冲液, 混匀后点样, 1.2% 琼脂糖/TAE 电泳, EB 染色后, 用凝胶成像分析系统成像, 比较 PCR 产物产量。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度 GNT 处理对葡萄果皮花青苷积累的影响

由图 1, A 可知,  $40\sim 120\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  GNT 处理‘巨峰’葡萄果实, 均可明显促进果皮花青苷积累。 $80\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  GNT 处理与  $120\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  GNT 处理效应相同, 表明  $80\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  GNT 是促进葡萄花青苷积累的适宜浓度。

图 1, B 和 C 显示, GNT 对葡萄果皮花青苷积累的促进效应依赖于光照。黑暗下, 即使用  $80\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  GNT 处理, 果皮花青苷含量与暗培养中对照的基本相同。因而, 用 GNT 诱导果实花青苷积累只有在光照条件下才能发挥作用。

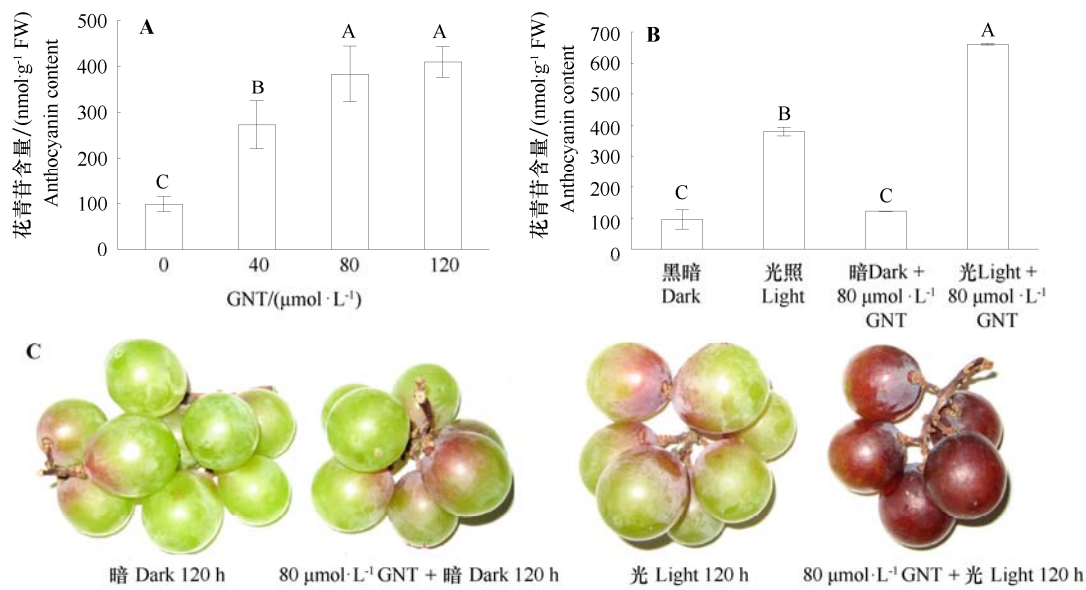


图 1 GNT 处理对葡萄果皮花青苷合成的促进效应及其对光的依赖性

差异显著水平  $P = 0.01$ 。

Fig. 1 The promotive effect of GNT on anthocyanin content of skins of grapes and its dependence upon light exposure

Difference significant at  $P = 0.01$ .

2.2 GNT处理后暗期长短对葡萄果皮花青苷积累的效应

表 2 显示,  $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GNT 处理后立即照光或者在暗中保存 2 h 再照光的果皮花青苷含量明显高于对照, 但却低于黑暗中保存更长时间的果实。

整体上看, 随着暗培养时间延长, 果皮花青苷含量逐渐上升, 说明 GNT 诱导的葡萄果皮花青苷积累需要一段时间的暗期哺育, 否则, 不利于花青苷积累。例如, GNT 处理后立即照光 120 h 果皮花青苷含为  $256.07 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ ; 如果先 12 h 暗处理, 再照光 108 h 的果皮花青苷含量为  $425.64 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ , 比前者高 66%。

表 2 GNT 处理后暗期对葡萄果皮花青苷积累的效应

Table 2 Effects of dark duration following GNT treatment on the anthocyanin content of grape skin

GNT/ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	暗期/h Dark time	光期/h Light time	花青苷含量/ ( $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ ) Anthocyanin content
0 (对照 Control)	120	0	$67.33 \pm 1.67 \text{ f}$
0 (对照 Control)	0	120	$178.38 \pm 19.25 \text{ e}$
80	0	120	$256.07 \pm 3.87 \text{ d}$
80	2	118	$232.59 \pm 8.69 \text{ d}$
80	4	116	$299.64 \pm 31.97 \text{ c}$
80	6	114	$368.75 \pm 11.95 \text{ b}$
80	8	112	$368.98 \pm 14.98 \text{ b}$
80	10	110	$392.01 \pm 25.92 \text{ b}$
80	12	108	$425.64 \pm 26.86 \text{ a}$

注: 表中不同小写字母表示不同处理间在  $P < 5\%$  水平上存在显著差异。下同。

Note: The different small letters in the figure present the difference significant at  $P < 5\%$ . The same below.

表 3 GNT 处理后暗—光和光—暗期对葡萄果皮花青苷积累的效应

Table 3 Effects of dark and light duration after GNT treated on the anthocyanin content of grape skin

GNT/ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	暗期/h Dark time	光照/h Light time	再暗期/h Redark time	花青苷含量/ ( $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ ) Anthocyanin content
0 (对照 Control)	120	0	0	$95.75 \pm 31.14 \text{ d}$
0 (对照 Control)	0	120	0	$391.84 \pm 25.10 \text{ b}$
80	12	108	0	$552.04 \pm 126.39 \text{ a}$
80	24	96	0	$362.43 \pm 85.43 \text{ b}$
80	48	72	0	$509.88 \pm 30.59 \text{ ab}$
80	72	48	0	$424.60 \pm 50.77 \text{ b}$
80	96	24	0	$118.29 \pm 2.68 \text{ d}$
80	120	0	0	$148.47 \pm 30.25 \text{ cd}$
80	12	24	84	$210.61 \pm 1.64 \text{ c}$
80	12	48	60	$402.83 \pm 11.67 \text{ b}$
80	12	72	36	$451.27 \pm 9.19 \text{ b}$
80	12	96	12	$574.59 \pm 102.47 \text{ a}$

### 2.3 暗—光处理与光—暗处理对GNT诱导的葡萄果皮花青苷积累的影响

表 3 显示在没有GNT处理的情况下, 暗处理 120 h的果皮花青苷含量最低, 仅为光对照的 25%, 表明光照促进了葡萄果皮花青苷合成。 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GNT处理果实在  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  光照下 108 h 的果皮花青苷含量比未经GNT处理果实照光 120 h的高出 41%。另一方面, GNT处理果实放于黑暗中的果皮花青苷含量与暗处理没有明显差异。GNT处理后, “先光后暗”与“先暗后光”顺序对花青苷积累也没有明显影响。只要GNT处理后先经 12 h暗期, 然后光照时间达到 48 h以上, 所有处理果实花青苷含量均达到 120 h光对照水平, 表明GNT处理大大缩短了葡萄花青苷的积累时间。

### 2.4 cGMP处理对GNT诱导的葡萄果皮花青苷积累的抑制效应

随着光照时间的增加, 葡萄果皮花青苷含量呈明显的上升趋势。未光照时所有处理花青苷含量基本相同。照光 36 h 后, GNT 处理促进了果皮花青苷含量增加, 而 cGMP 抑制了花青苷的积累, 也抑制了 GNT 诱导的花青苷积累。cGMP 这种抑制效应随其在 GNT 处理后再处理的时间延后而减弱。具体表现为, GNT 与 cGMP 同时处理 (G + C0) 的果皮花青苷含量显著低于 GNT 处理; cGMP 在 GNT 处理后 6 h 再处理 (G + C6) 的花青苷含量居中。GNT 处理 12 h 后再用 cGMP 处理 (G + C12), 则果皮花青苷含量与 GNT 处理最为接近, 表明此时的 cGMP 处理抑制效应明显减弱。除此之外, 在光照 72 h 后, GNT 与 cGMP 的拮抗效应更加明显 (图 2)。

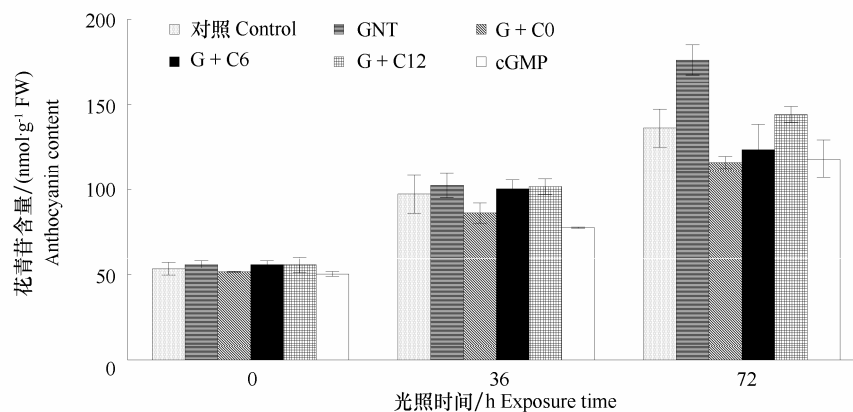


图 2 GNT 和 cGMP 对葡萄果皮花青苷积累的影响

G和C分别表示  $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GNT和  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  cGMP处理, 0、6、12 分别表示GNT处理后 0、6、12 h再用cGMP处理。

横坐标 0、36 和 72 表示照光时间。光照前果实保持在黑暗中 12 h。下同。

Fig. 2 Effects of GNT and cGMP on anthocyanin accumulation of grape skin

G and C represent GNT and cGMP treatment, respectively, while 0, 6 and 12 represent the time when  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  cGMP was applied after  $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GNT treatment. The numbers 0, 36 and 72 in the abscissa represent the time of light exposure, after the fruits were kept at darkness for 12 h. The same below.

### 2.5 GNT和cGMP对葡萄果皮花青苷合成相关基因表达的影响

从图3中可知, 对照果实随着照光时间延长, 葡萄果皮苯丙氨酸解氨酶基因 (PAL)、查尔酮合成酶基因 (CHS) 和UDP葡萄糖 - 类黄酮3 - O - 葡萄糖苷转移酶基因 (UFGT) 表达水平呈先增加后下降趋势。照光前 (0 h) 很难检测到PAL和CHS基因表达; 照光36 h后, 表达量明显上升, 72 h 时PAL表达量又降到很低水平, 而此时CHS和UFGT基因mRNA表达水平也明显低于36 h, 说明这3个基因表达受到光的诱导, 并且在持续的光照条件下存在着一个消长过程。相反, 花白素二氧化酶编码基因 (LDOX) mRNA表达量在试验期间一直保持较高水平, 而且不受光照的影响。

$80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GNT处理明显促进葡萄果实PAL、CHS和UFGT的表达, 其中, PAL和UFGT基因的mRNA水平在照光前就已经明显高于对照, 说明GNT可以在黑暗中诱导这两个基因表达。但是, GNT

处理果实照光前*CHS*表达量很低,照光后迅速升高,表明黑暗中GNT不能诱导*CHS*表达。显然,*PAL*、*UFGT*和*CHS*对GNT处理的响应并不完全相同。在光照下,*PAL*和*CHS* RNA表达量呈现先上升后下降的趋势,但是GNT诱导的*UFGT* mRNA水平却在72 h内保持着持续增加的趋势。

cGMP单独处理效应依基因的不同而不同。对于*PAL*,cGMP处理效应与对照相似,即黑暗中很低,照光36 h后明显上升,72 h后又明显下降,意味着cGMP单独处理对葡萄果皮*PAL* mRNA水平没有效应。对*UFGT*,即使光照0 h,cGMP处理果皮mRNA表达量也已经明显上升,说明黑暗中cGMP也能诱导果皮*UFGT*基因转录;照光36 h后,cGMP处理果皮*UFGT*基因RNA表达量明显提高,但照光72 h时,其表达量又下降,说明cGMP单独处理也没有影响*UFGT*基因表达。但对*CHS*来说,黑暗中cGMP处理不能诱导该基因表达。光照36~72 h后,cGMP处理果皮mRNA水平明显低于对照,说明cGMP单独处理抑制了光照下*CHS*基因表达。

然而,当cGMP与GNT共同处理时,它们所表现出的生理效应与单独处理效应则不尽相同。就*PAL*而言,cGMP在GNT处理的同时或者在6 h后处理,都可以显著抑制GNT诱导的基因表达,而且这种抑制效应在光照72 h后,仍然清晰可见。然而,在GNT处理12 h后再用cGMP处理,则cGMP不再抑制GNT诱导的基因表达,暗示着cGMP可以抑制黑暗中GNT诱导的*PAL*基因表达,而不能抑制光诱导的*PAL*基因表达。对*UFGT*来说,GNT和cGMP共同处理对黑暗中基因表达没有互作效应;但在照光36 h后,共同处理的RNA转录水平明显低于单独处理。在照光72 h后,这种拮抗效应更加明显。GNT与cGMP对*UFGT*基因表达也存在着一定的拮抗效应。主要表现在照光后72 h的测定结果。GNT与cGMP同时处理的样品或者GNT处理6 h后再用cGMP处理的葡萄果皮*UFGT*基因表达量均低于GNT单独处理,而在12 h后再处理的样品中却没有差异,意味着GNT诱导的能够被cGMP抑制的生理过程大约在12 h内完成。对于*CHS*而言,GNT与cGMP同时处理的果皮RNA表达量在照光36 h时已明显低于GNT单独处理,甚至低于对照,意味着cGMP处理抑制了葡萄果皮*CHS*基因表达。在照光72 h时,cGMP在GNT处理后6 h或12 h再处理的样品中也观察到类似现象,说明cGMP对*CHS*基因表达抑制效应更为重要。

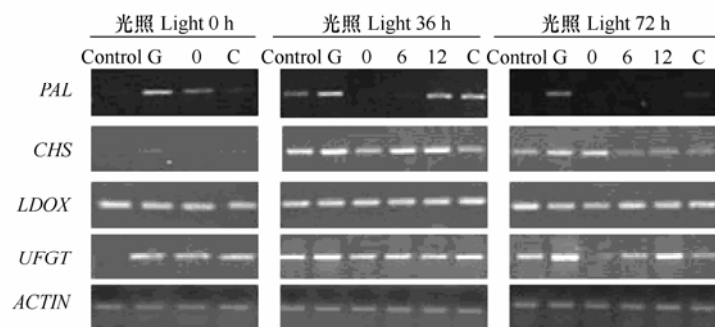


图3 GNT和cGMP对葡萄果皮*PAL*、*CHS*、*LDOX*和*UFGT*等基因表达的影响  
Fig. 3 GNT and cGMP on temporal expression of *PAL*, *CHS*, *LDOX* and *UFGT* in grape skin

### 3 讨论

王中华等(2006)和朱云娜等(2007a, 2007b)报道GNT能迅速促进苹果果实圆片花青苷积累,也能促进桃和油桃果皮花青苷合成。本结果在葡萄果皮花青苷积累上再次验证,并首次观察到其促进效应是一个需光过程。但GNT诱导的直接的生理过程却不需要光,因而,GNT处理后10~12 h的暗处理不仅没有削弱对花青苷积累的促进效应,反而增强了促进效应。导致这一结果可能有两种原因:①GNT是一种光不稳定性物质(崔洪武,2005)。用它处理果实后立即光照,会引起GNT

的分解, 从而降低生理活性。相反, GNT 处理后先置于暗中以利于细胞吸收, 而后再照光, 便可以减少光的破坏作用。②GNT 诱导的生理反应要求在暗中完成, 光照反而不利于诱导过程。本试验结果尚不能分清这两种可能性。不过, 花青苷合成相关酶编码基因的 RT-PCR 结果表明, GNT 可以在黑暗中诱导 *PAL* 和 *UFGT* RNA 表达 (图 3)。因而, GNT 诱导的生理过程至少有一部分是暗中进行的。表 3 结果进一步表明, 只要 GNT 处理的果实先在黑暗中保持 12 h, 则其后无论是先光照还是后光照, 相同光照时间内诱导积累的花青苷量基本相等。48 h 光照能够诱导积累的花青苷含量几乎与对照果实在 120 h 光照时间内的积累量相同。显然, GNT 处理促进了葡萄果皮花青苷积累。

cGMP 单独或者与 GNT 共同处理都能抑制油桃果实花青苷积累, 因而推测 GNT 诱导的花青苷积累可能与细胞 cGMP 信号转导途径有关 (朱云娜 等, 2007a)。然而, 这一推论与当前一些流行理论相悖。Bowler 等 (1994) 曾有报道, 光敏素介导的花青苷合成受到 cGMP 的促进, 而被 GNT 所抑制。周君莉等 (1998) 也提出, 尾穗苋叶片苋红素的合成也受到 cGMP 的促进和 GNT 所抑制。因而, 果实表皮花青苷合成的诱导过程似乎应该是细胞光敏素首先感受光信号, 然后通过 G-蛋白将光信号转化为化学信号, 产生 cGMP, 后者诱导与花青苷合成有关的基因 (如 *CHS*) 表达来控制花青苷合成 (Neuhaus et al., 1997)。孙大业等 (2000) 指出, 植物体内光信号转导途径与动物中有很大的相似性。因而, Bowler 等 (1994b) 的 “G-蛋白理论” 似乎是一种定论。然而, Bridges 等 (2005) 指出, 将外源 cAMP 或 cGMP 注入拟南芥的细胞提取物后并没有增加任何可检测到的蛋白激酶的活性, 表明植物体内可能不存在任何环状核苷酸调节的蛋白激酶。因此, “G-蛋白理论” 仅仅是一种假说, 有关植物花青苷合成调控理论尚有多种争议。例如, 夏春华和蔡世英 (2004) 报道,  $GA_3$  和  $Ca^{2+}$  可以促进安祖花 (*Anthurium andraeanum*) 佛焰苞花青苷合成, 但是,  $GA_3$  却抑制果实花青苷合成 (刘淑娴 等, 1994)。显然, 植物花青苷合成调控机理有待进一步研究。

催化葡萄果实花青苷生物合成的酶类及其编码基因均已明确, 其中第一个酶为苯丙氨酸解氨酶 (*PAL*), 此外, 还有查尔酮合成酶 (*CHS*)、花白素二氧化酶 (*LDOX*) 和 UDP 葡萄糖-类黄酮 3-O-葡萄糖苷转移酶 (*UFGT*) 等。最初认为, *PAL* 是花色苷合成的关键酶, 但后来发现, *PAL* 基因在光下和暗中都可以持续稳定转录, 而 *CHS*、*F3H*、*DFR*、*LDOX*、*UFGT* 等在暗中转录水平很低, 照光后才急剧增加, 并出现消长变化, 意味着花色苷合成并不受限于 *PAL*, 而是取决于 *PAL* 后面基因的表达 (Sparvoli et al., 1994)。Boss 等 (1996) 认为 *UFGT* 基因是决定浆果能否着色的关键因素; 葡萄果肉中 *PAL* 和 *UFGT* 基因表达的调节与 *CHS*、*CHI*、*DFR*、*LDOX* 等基因不同, 因而可能受到不同的调控系统的调控 (Kereamy et al., 2002)。本研究中也观察到葡萄果皮 *PAL*、*CHS*、*LDOX* 和 *UFGT* 的表达响应存在着明显差异。首先, *LDOX* 一直保持着较高的表达水平, 是一个非光调节基因, 其表达可能不受特定系统的调控。其次, *PAL*、*CHS* 和 *UFGT* 对 GNT 处理的响应存在明显差异, *PAL* 和 *UFGT* 在 GNT 诱导下可以在黑暗中检测到 RNA 的表达, 而 *CHS* 只能在光照下才能检测到 RNA 的表达, 也就是说, GNT 可以替代光诱导葡萄果皮 *PAL* 和 *UFGT* 基因表达, 但是由于 *CHS* 不能同步表达, 因而, GNT 不能在黑暗中诱导果皮花青苷积累。第三, cGMP 处理明显抑制 GNT 诱导的 *PAL* 和 *CHS* 基因表达。这可能是 cGMP 抑制果皮花青苷积累的重要原因。在离体苹果果实中, GNT 诱导果皮花青苷积累的同时, *PAL* 活性瞬时急剧上升 (王中华 等, 2006)。可见, *PAL*、*CHS* 等基因在花青苷生物合成过程中决非不重要, 至少在 GNT 诱导的离体葡萄花青苷积累过程中表明出强烈调节活性, 暗示着这些基因及其酶类具有重要生理作用。

## References

- Boss P K, Davies C, Robinson S P. 1996. Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiol*, 111: 1059 - 1066.

- Bowler C, Chua N H. 1994. Emerging themes of plant signal transduction. *Plant Cell*, 6: 1529 - 1541.
- Bowler C, Neuhaus G, Yamagata H, Chua N H. 1994. Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell*, 77: 73 - 81.
- Bridges D, Fraser M E, Moorhead G B G. 2005. Cyclic nucleotide binding proteins in the *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* genomes. *BMC Bioinformatics*, 6: 6.
- Cui Hong-wu. 2005. Study and utilization of soybean isoflavones. Beijing: Science Press: 7 - 91. (in Chinese)
- 崔洪武. 2005. 大豆异黄酮——活性研究与应用. 北京: 科学出版社: 7 - 91.
- Kereamy A E, Chervin C, Souquet J, Moutounet M, Monje M, Nepveu F, Mondies H, Ford C M, Van H R, Roustan J. 2002. Ethanol triggers grape gene expression leading to anthocyanin accumulation during berry ripening. *Plant Sci*, 163: 449 - 454.
- Liu Shu-xian, Jiang Yue-ming, Li Yue-biao, Zhang Dong-lin, Chen Fang. 1994. Effect of GA<sub>3</sub> on colour of plum fruit after harvest. *Acta Horticulturae Sinica*, 21 (4): 320 - 322. (in Chinese)
- 刘淑娴, 蒋跃明, 李月标, 张东林, 陈 芳. 1994. GA<sub>3</sub>对三华李采后色泽的影响. *园艺学报*, 21 (4): 320 - 322.
- Neuhaus G, Bowler C, Hiratsuka K, Yamagata H, Chua N H. 1997. Phytochrome-regulated repression of gene expression requires calcium and cGMP. *EMBO J*, 16: 2554 - 2564.
- Saure M C. 1990. External control of anthocyanin formation in apple. *Sci Hort*, 42: 181 - 218.
- Sparvoli F, Martin C, Scienza A, Gavazzi G, Tonelli C. 1994. Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Mol Biol*, 24: 743 - 755.
- Sun Da-ye, Guo Yan-lin, Ma Li-geng, Cui Su-juan. 2000. Cell signal transduction. Third edition. Beijing: Science Press: 246 - 257. (in Chinese)
- 孙大业, 郭艳林, 马力耕, 崔素娟. 2000. 细胞信号转导. 第3版. 北京: 科学出版社: 246 - 257.
- Sun Jian-she, Ma Bao-kun, Zhang Wen-cai. 2000. The study on the characters of needed light in the coloration of 'Fuji' apple skin. *Acta Horticulturae Sinica*, 27 (3): 213 - 215. (in Chinese)
- 孙建设, 马宝焜, 章文才. 2000. 富士苹果果皮色泽形成的需光特性研究. *园艺学报*, 27 (3): 213 - 215.
- Wang Liang-ju, Wang Zhong-hua, Li Zhi-qiang, Liu Hui, Liu Wei-qin, Chen Zong-yuan, Yan Pu, Sun Dun-qian. 2004. Effect of 5-aminolevulinic acid on enhancing apple fruit coloration. *J Fruit Sci*, 21: 512 - 515. (in Chinese)
- 汪良驹, 王中华, 李志强, 刘 晖, 刘卫琴, 陈宗元, 颜 璞, 孙敦乾. 2004. 5-氨基乙酰丙酸促进苹果果实着色的效应. *果树学报*, 21: 512 - 515.
- Wang Zhong-hua, Tang Guo-hui, Li Zhi-qiang, Wang Liang-ju. 2006. Promotion of 5-aminolevulinic acid and genistein on anthocyanin accumulation in apples. *Acta Horticulturae Sinica*, 33: 1055 - 1058. (in Chinese)
- 王中华, 汤国辉, 李志强, 汪良驹. 2006. 5-氨基乙酰丙酸和金雀异黄素促进苹果果皮花青苷形成的效应. *园艺学报*, 33 (5): 1055 - 1058.
- Wen Peng-fei. 2005. Studies on flavanols in wine and grape berry and expression of genes involved in proanthocyanidins biosynthesis during berry development [Ph D. Dissertation]. Beijing: China Agricultural University. (in Chinese)
- 温鹏飞. 2005. 葡萄与葡萄酒中黄烷醇类多酚和果实原花青苷合成相关酶表达规律的研究 [博士论文]. 北京: 中国农业大学.
- Xia Chun-hua, Cai Shi-ying. 2004. Effects of GA<sub>3</sub>, Ca<sup>2+</sup> on anthocyanin and phenylalanine amonialyase in stem of *Anthurium andraeanum*. *Acta Horticulturae Sinica*, 31 (3): 343 - 346. (in Chinese)
- 夏春华, 蔡世英. 2004. GA<sub>3</sub>和Ca<sup>2+</sup>对安祖花佛焰苞花青苷含量及其花梗PAL活性的影响. *园艺学报*, 31 (3): 343 - 346.
- Zhou Jun-li, Ma Li-geng, Sun Da-ye. 1998. Role of G-proteins and cGMP in phytochrome-mediated amaranthin biosynthesis in *Amaranthus caudatus*. *Science in China: Series C*, 28 (2): 143 - 147. (in Chinese)
- 周君莉, 马力耕, 孙大业. 1998. G-蛋白和cGMP在光敏色素介导的尾穗苋苋红素合成中的作用. *中国科学: C辑*, 28 (2): 143 - 147.
- Zhu Yun-na, Wang Zhong-hua, Zhang Feng-song, Dong Xian-cai, Wang Liang-ju. 2007a. Effect of genistein on promotion of fruit coloration in peaches. *Acta Horticulturae Sinica*, 34: 569 - 574. (in Chinese)
- 朱云娜, 王中华, 张凤颂, 董显才, 汪良驹. 2007a. 金雀异黄素促进桃果实着色的效应. *园艺学报*, 34: 569 - 574.
- Zhu Yun-na, Wang Zhong-hua, Wang Liang-ju. 2007b. Effect of foliar application of genistein on fruit coloration and quality of bagged flat peaches. *J Fruit Sci*, 24: 438 - 443. (in Chinese)
- 朱云娜, 王中华, 汪良驹. 2007b. 叶面喷施金雀异黄素对套袋蟠桃果实着色及品质的影响. *果树学报*, 24: 438 - 443.