

干旱对葡萄果实发育过程中黄烷醇类多酚积累及 *LAR* 表达的影响

温鹏飞*, 杨运良, 高美英, 牛铁泉, 邢延富, 牛兴艳

(山西农业大学园艺学院, 山西太谷 030801)

摘要: 以酿酒葡萄‘赤霞珠’(*Vitis vinifera* L. ‘Cabernet Sauvignon’)为试材, 采用避雨棚和断根沟措施, 模拟土壤干旱, 探讨了葡萄果实发育过程中干旱对果实中黄烷醇类多酚积累及其合成关键酶隐色花色素还原酶(leucoanthocyanidin reductase, *LAR*)基因表达的影响。结果表明: 土壤干旱导致葡萄单粒质量降低, 纵、横径减小, 促进黄烷醇类多酚积累, 特别是在幼果期, 土壤干旱明显促进黄烷醇类多酚的积累。Real-time PCR、Western blot 结果证实, 土壤干旱促进 *VvLAR1* 和 *VvLAR2* 转录, 诱导果实中 *LAR1*、*LAR2* 新蛋白合成, 进而导致 *LAR* 酶活性增强, 黄烷醇类多酚积累。

关键词: 葡萄; 果实; 土壤干旱; 黄烷醇类多酚; *LAR*

中图分类号: S 663.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 12-2341-11

The Effect of Drought on Flavanols Accumulation and *LAR* Expression During the Development of Grape Berry

WEN Peng-fei*, YANG Yun-liang, GAO Mei-ying, NIU Tie-quan, XING Yan-fu, and NIU Xing-yan
(College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China)

Abstract: In order to understand the effects of soil drought on the accumulation of flavanols and the expression of leucoanthocyanidin reductase (*LAR*), the key enzyme of the flavanols biosynthesis in flavonoid biosynthesis pathway, 5 years old grapevines (*Vitis vinifera* L. ‘Cabernet Sauvignon’) were used as materials, and the soil drought was simulated during grape berry development by the controlling irrigation through the prevent-rain shelter and root-cutting groove. The results showed that the single berry weight, longitudinal and horizontal diameter were decrease, and the growth of grape berry was significantly inhibited by soil drought, which indicated that the prevent-rain shelter and root cutting groove were the effective measures to simulate soil drought. In addition, the accumulation of flavanols in grape berry during its development was induced by soil drought was also observed, especially in the young berry. Real-time PCR and Western blot results showed that the soil drought could induce the expression of *VvLAR1*, *VvLAR2*, the synthesis of *LAR* new protein, and increased the *LAR* enzyme activity, which resulted in the accumulation of flavanols in grape berry.

Key words: grape; berry; soil drought; flavanols; *LAR*

收稿日期: 2012-07-13; **修回日期:** 2012-10-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30800740); 山西省高等学校优秀青年学术带头人资助计划项目 (2009001); 山西省科技产业环境建设项目 (20100510006); 山西农业大学学术带头人及学术骨干培养计划项目

* E-mail: wenpengfei@126.com

多酚类物质 (polyphenol compounds) 是植物苯丙烷类和类黄酮代谢途径产生的一大类次生代谢产物, 不仅参与植物生长发育, 赋予植物抗紫外线、抗病等功能 (Dixon et al., 2005), 而且具有极强的抗氧化性和清除自由基能力 (Skerget et al., 2005), 具有预防冠心病 (Leifert & Abeywardena, 2008)、高血压、高血脂 (Prasain et al., 2010)、糖尿病 (Rodrigo et al., 2011), 抗血栓 (Sano et al., 2005), 抗癌 (Araújo et al., 2011) 等功能, 是葡萄果实和葡萄酒重要的功能成分之一。作为多酚类物质的一个亚类, 黄烷醇类多酚 (Flavanols), 包括黄烷-3-醇及其寡聚体和多聚体 (温鹏飞, 2005), 不仅具有显著的药理学功能 (Hollman & Arita, 2000; Serafini et al., 2003; Schroeter et al., 2010), 而且对葡萄和葡萄酒的诸多感官品质 (Vidal et al., 2002; Zimman et al., 2002; Monagas et al., 2003; 温鹏飞, 2005), 如色泽、澄清度、收敛性、褐变、口感等具有决定性作用 (Cadot et al., 2006)。

葡萄果实中富含各种多酚类物质, 如酚酸、黄酮醇、黄烷醇、花色苷等 (温鹏飞, 2005)。其中, 黄烷醇类多酚 (包括其单体及其寡聚体和多聚体原花色素) 和花色苷是含量最丰富的多酚类物质, 是葡萄果实内在品质重要指标之一, 也是酿造优质葡萄酒的决定因素之一 (Girona et al., 2009)。大量研究证实, 葡萄果实中多酚类物质的生物合成和积累受到环境条件的调控, 如温度 (Mori et al., 2005, 2007; Wen et al., 2008; Crifò et al., 2011)、光照 (Sparvoli et al., 1994; Wang et al., 2010; Wang et al., 2012)、水分 (Kennedy et al., 2002; Castellarin et al., 2007; Girona et al., 2009; Acevedo-Opazo et al., 2010; Ollé et al., 2011; Quiroga et al., 2012) 等。其中, 水分是重要的外部环境条件之一。前人研究证实, 葡萄植株水分状况不仅影响葡萄植株营养生长和产量形成, 而且对果实中多酚类物质含量和组成也具有明显的作用 (Acevedo-Opazo et al., 2010)。调亏灌溉 (regulated deficit irrigation, RDI) 明显促进多酚类物质、可溶性固形物和花色苷的生物合成和积累 (Ojeda et al., 2002), 进而改善葡萄酒的色泽、风味和香味 (Koundouras et al., 2006)。但迄今为止, 有关干旱对葡萄果实黄烷醇类多酚合成和积累的影响鲜见报道, 特别是果实发育过程中持续干旱对黄烷醇类多酚的作用尚未见报道。

隐色花色素还原酶 (leucoanthocyanidin reductase, LAR, E. C. 1.17.1.3) 专一性催化 2R, 3S, 4S - 黄烷-3,4-二醇还原成 2R,3S - 黄烷-3-醇 (Maugé et al., 2010), 是葡萄果实黄烷醇类多酚生物合成的关键调控酶之一。现已证实, LAR 与花色素还原酶 (anthocyanidin reductase, ANR, E.C.1.3.1.77) 共同启动葡萄果实黄烷醇类多酚的生物合成 (Bogs et al., 2005)。马春雷等 (2010) 研究发现, 茶树总儿茶素含量与 LAR 及二氢黄酮醇还原酶 (dihydroflavonol 4-reductase, DFR, E.C.1.1.1.219) 表达量具有一定相关性。因而, LAR 表达直接影响黄烷醇类多酚的生物合成。目前有关干旱对葡萄 LAR 表达的影响尚未见报道。

为了明确土壤干旱对葡萄果实黄烷醇类多酚积累的作用, 本研究中以 5 年生酿酒葡萄品种 ‘赤霞珠’ (*Vitis vinifera* L. ‘Cabernet Sauvignon’) 为试材, 采用避雨棚防止降雨和断根沟防止土壤水分横向移动, 并通过控制灌溉, 模拟土壤干旱, 以黄烷醇类多酚生物合成关键酶 LAR 基因为切入点, 分别采用分光光度计法、Western blot、Real-time PCR 法从底物、酶活性、翻译和转录水平阐明土壤干旱对 LAR 表达及黄烷醇类多酚积累的作用, 为采用田间管理措施改善葡萄果实品质, 乃至葡萄酒品质提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料及处理

酿酒葡萄 ‘赤霞珠’ (*Vitis vinifera* L. ‘Cabernet Sauvignon’) 种植于山西农业大学园艺学院园艺

站内。2007 年定植(自根苗), 篱架, 南北行向, 株行距 $1.0\text{ m} \times 2.5\text{ m}$ 。

试验中共设置 3 个处理。(1) 土壤干旱处理(土壤相对含水量 soil relative water content, SRWC 60%): 采用塑料膜避雨设施和断根沟限根措施(于 2011 年葡萄萌芽前完成, 其中避雨设施用于阻断降水, 断根沟用于阻断土壤水分横向移动), 并同时控制灌溉水量, 保持土壤相对含水量在田间最大持水量的 $60\% \pm 5\%$ (单长卷和梁宗锁, 2007); (2) 对照 1 (SRWC 85%): 不进行灌溉控制, 保持土壤相对含水量为田间最大持水量的 $85\% \pm 5\%$; (3) 对照 2 (SRWC 85% + 遮荫): 采用塑料膜避雨设施, 但不控制灌溉, 保持土壤相对含水量为田间最大持水量的 $85\% \pm 5\%$ 。土壤含水量控制采用差额补水法进行。每次采样前 5 d, 采用环刀法测定土壤含水量, 然后计算所需灌溉水量。

葡萄盛花后 20 d 开始采样, 每 10 d 采样 1 次, 共采样 10 次。采样时, 随机选取 3 株植株, 于植株东、西两侧分别在上、中、下部随机选择长势基本一致果穗各 1 穗, 共 18 穗。果穗采集后, 去除带机械伤害、病虫害及发育异常果粒, 然后置于冰盒中, 迅速带回实验室。

1.2 测定方法

1.2.1 葡萄果实单粒质量、纵径、横径测定

随机取葡萄果粒 50 粒, 分成 5 组, 每组 10 粒。分别采用电子分析天平和游标卡尺测定单粒质量和果粒纵、横径。

1.2.2 黄烷醇类多酚的测定

黄烷醇类多酚含量参照 Waterhouse (2000) 方法, 采用香草醛—盐酸法测定。葡萄果实去籽后, 液氮保护下研磨成粉状。准确称取 1.0 g, 加入 5 mL 70%丙酮(含维生素 C $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 暗提取 6 h, 期间不断混匀; $8\,500 \times g$ 离心 10 min, 收集上清液; 沉淀用 5 mL 70%丙酮(含维生素 C $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 重复提取 1 次, 合并上清液, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待测。

准确吸取提取液 400 μL , 分别加入 2.0 mL 8%盐酸甲醇和 2.0 mL 6%香草醛甲醇, 避光 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 后, 在 UV-2450 分光光度计 500 nm 波长下测定吸光值。根据标准曲线计算黄烷醇类多酚含量, 以 Catechin $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ 表示。

1.2.3 LAR 活性测定

LAR 酶活性测定参照仓国营 (2011) 方法, 略作修改。葡萄果实去籽后, 液氮保护下迅速研磨成粉状, 准确称取 1.0 g, 加入 2 mL 硼酸缓冲液(pH 8.8, 内含 $5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 维生素 C, 0.15% PVP, $14\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ β -巯基乙醇), 涡旋震荡混匀。 $15\,000 \times g$ 离心 15 min, 上清液即为 LAR 粗酶液。取 LAR 粗酶提取液 0.5 mL, 分别加入 0.5 mL $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)、 $1\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二氢槲皮素(dihydroquercetin)、 $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NADPH, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下水浴 1 h。然后加入 2 mL 8%盐酸—甲醇溶液, 2 mL 香草醛甲醇溶液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下水浴 1 h, UV-2450 分光光度计测定 500 nm 处吸光值。粗酶液蛋白含量采用 Bradford 法(1976)测定, 以牛血清蛋白(BSA)为标准。LAR 酶活性表示为 Catechin $\text{mg} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}\text{pro}$ 。

1.2.4 Western Blot 分析

葡萄果实总蛋白提取参照 Wen 等 (2008) 方法, 稍做修改。葡萄果实去籽后, 液氮保护下研磨成粉状, 准确称取 1.0 g, 加入 0.5 mL 蛋白提取缓冲液 [$200\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.0), 4% SDS, 2% PVP, $5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 维生素 C, $5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Leupeptine, $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMSF], $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 提取 2 h, $12\,000 \times g$ 离心 15 min, 上清液即为总蛋白提取液。蛋白提取液经 Bradford 法(1976)定量后, 采用 SDS-PAGE 电泳分离, BIO-RAD 电转印系统转膜(NC 膜), 然后分别用葡萄 LAR1、LAR2 多克隆抗体(中国农业大学食品科学与营养工程学院潘秋红教授惠赠)和碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG (二抗) 杂交, TBST、TBS 清洗后, NBT/BCIP 显色。

1.2.5 *VvLAR1* 和 *VvLAR2* 表达分析

葡萄果实总 RNA 提取参照 Wen 等(2005)方法进行, *VvLAR1* 和 *VvLAR2* 表达分析采用 Real-time PCR 法, 参照 TransScript II Green Two-Step qRT-PCR Super Mix 试剂盒操作说明进行。根据已发表葡萄果实 *LAR1* 和 *LAR2* 序列, 采用 Primer 5.0 设计特异性引物 (表 1)。同时, 为了保证样品一致性, 以葡萄 *Ubiquitin1* 为内参。

Real-time PCR 扩增体系为 25 μ L (模板 cDNA 1 μ L, 上、下游引物各 0.5 μ L, 2 \times TransStartTM Green qPCR SuperMix 12.5 μ L, 50 \times Passive Reference Dye/PCR Enhancer 0.5 μ L)。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, T_m 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环。反应结束后, 分析荧光值变化曲线及融解曲线。每个样品重复 3 次。

表 1 引物序列及 PCR 扩增产物
Table 1 Sequence of primers and PCR amplified products

基因 Gene	引物 Primer	引物序列 (5' - 3') Sequence of primer	PCR 产物/bp PCR products	登录号 Accession No.
<i>VvLAR1</i>	正义 Sense	ACGATGTCCGAACACTGAAC	187	AJ865336
	反义 Anti-sense	TGAACGCCGCTACTACACTC		
<i>VvLAR2</i>	正义 Sense	TCTCGACATACATGATGATGTG	166	AJ865334
	反义 Anti-sense	TGCAGTTTCTTTGATTGAGTTC		
<i>VvUbiquitin1</i>	正义 Sense	GTGGTATTATTGAGCCATCCTT	182	BN000705
	反义 Anti-sense	AACCTCCAATCCAGTTATCTAC		

2 结果与分析

2.1 土壤干旱对葡萄果实生长的影响

土壤干旱 (SRWC 60%) 对葡萄果实生长的影响如图 1 所示。土壤干旱导致葡萄果实单粒质量明显降低, 纵径和横径生长受抑。对葡萄果实单粒质量而言, 除花后 70 d 外, 对照 1 (SRWC 85%) 与对照 2 (SRWC 85% + 遮荫) 在整个果实发育过程中无显著差异, 但与土壤干旱处理存在显著差异 (图 1, A)。这表明, 土壤干旱明显抑制葡萄果粒质量增大。

土壤干旱明显影响葡萄果实纵、横径增长 (图 1, B、C)。与对照 1 (SRWC 85%) 相比较而言, 干旱处理下果实纵径均有所降低 (除花后 30 d 外)。方差分析结果表明, 除花后 30 d 外, 其它各时期差异均达显著水平。这说明, 土壤干旱导致赤霞珠葡萄果实粒纵径生长明显受抑。对照 2 (SRWC 85% + 遮荫) 纵径在果实发育前期低于对照 1 (SRWC 85%), 但随果实发育, 差异逐渐减小, 至成熟期, 两者相差无几 (图 1, B)。转色期 (花后 70 d) 后, 土壤干旱也明显抑制赤霞珠葡萄果粒横径的增长 (图 1, C)。此外, 从图 1 中还可得知, 土壤干旱并未改变葡萄果实生长的模式, 3 个处理单粒质量、纵径和横径增长模式相似。

2.2 土壤干旱对葡萄果实黄烷醇类多酚含量的影响

土壤干旱 (SRWC 60%) 并未改变赤霞珠葡萄果实发育过程中黄烷醇类多酚的积累模式 (图 2), 干旱和对照 1 (SRWC 85%)、对照 2 (SRWC 85% + 遮荫) 均表现为幼果期 (花后 20 d) 黄烷醇类多酚含量最高, 随果实发育而表现为逐渐下降趋势, 果实成熟期 (花后 110 d) 含量最低。此外, 从图 2 中还可得知, 土壤干旱对果实中黄烷醇类多酚积累的作用因果实发育期不同而不同, 具有发育阶段依赖性。在幼果期 (花后 20 d), 土壤干旱明显促进赤霞珠葡萄果实黄烷醇类多酚的积累, 其

含量明显高于对照 1 (SRWC 85%) 和对照 2 (SRWC 85% + 遮荫); 在转色期 (花后 70 d) 和成熟期 (花后 110 d), 各处理之间差异并未达显著水平。

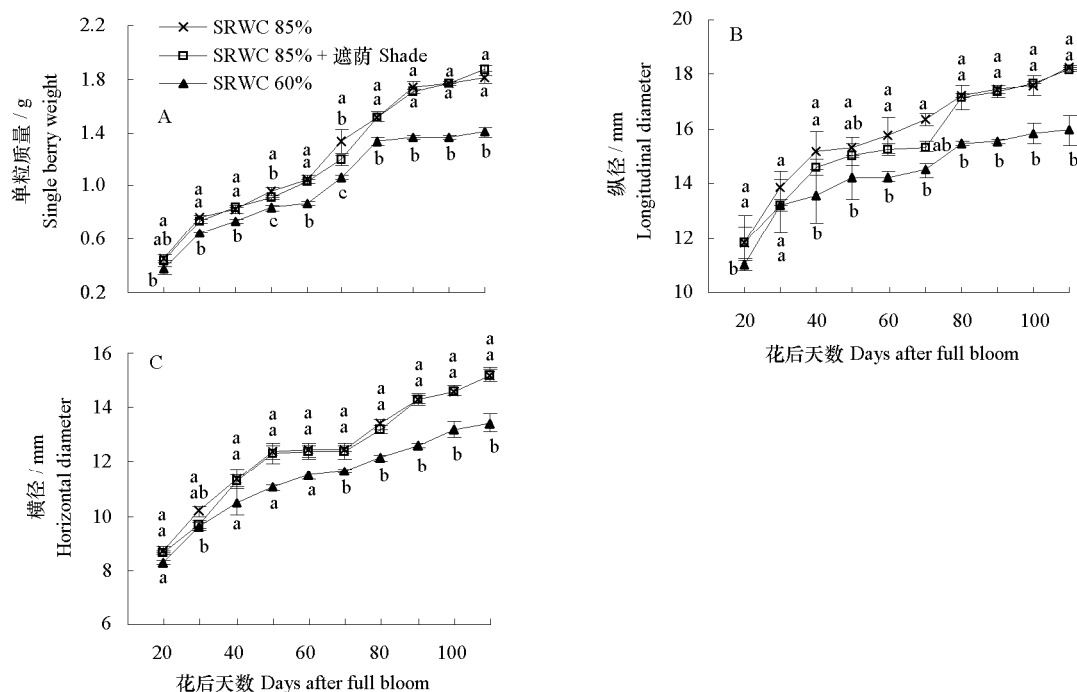


图 1 土壤干旱对葡萄果实单粒质量 (A)、纵径 (B) 和横径 (C) 的影响

Fig. 1 Effect of soil drought on the single berry weight (A), longitudinal diameter (B) and horizontal diameter (C) during grape berry development

值得一提的是, 对照 1 (SRWC 85%) 和对照 2 (SRWC 85% + 遮荫) 土壤水分含量一致, 且果实中黄烷醇类多酚含量无显著差异 (图 2)。这表明, 试验中使用避雨棚阻隔降雨, 虽然会导致棚内光照强度降低, 但由于仅遮盖植株顶部, 侧面并未遮挡, 因而对黄烷醇类多酚积累的影响并不明显。也就是说, 干旱处理下黄烷醇类多酚积累的增加确实是由干旱导致的, 而并非由于避雨棚遮光引发。

2.3 土壤干旱对葡萄果实 LAR 酶活性的影响

葡萄果实中 LAR 酶催化黄烷 - 3, 4 - 二醇还原生成黄烷 - 3 - 醇, 其活性与黄烷醇类多酚积累, 特别是儿茶素的积累密切相关 (Gagné et al., 2009)。葡萄果实发育过程中, 土壤干旱 (SRWC 60%) 对 LAR 酶活性的影响如图 3 所示。可以看出, 处理与对照组 LAR 酶活性变化规律相似, 均表现为幼果期 (花后 20 d) 较高, 随果实发育而呈下降趋势, 至成熟期 (花后 110 d) 最低。这表明, 葡萄果实发育过程中, LAR 酶活性受到严格的发育调控, 具有明显的时序性。

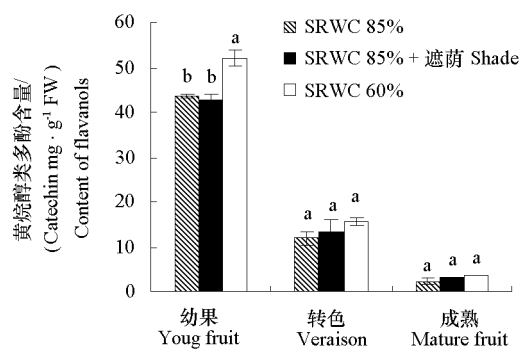


图 2 土壤干旱对葡萄不同发育期果实黄烷醇类多酚含量的影响

Fig. 2 Effect of soil drought on the concentration of flavanols during grape berry development

此外,从图3还可得知,在果实发育的整个时期,土壤干旱(SRWC 60%)均导致葡萄果实LAR酶活性增高。这可能是土壤干旱导致葡萄果实黄烷醇类多酚含量增加的原因之一。而对照2(SRWC 85%+遮荫),虽然未控制灌溉,仅采用避雨棚防雨,在整个果实发育过程中,其活性均低于对照1(SRWC 85%)和干旱处理(SRWC 60%)。

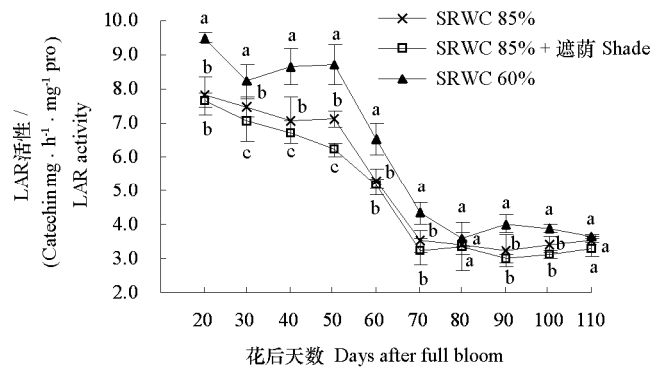


图3 土壤干旱对葡萄果实LAR酶活性的影响

Fig. 3 Effect of soil drought on the LAR activity during grape berry development

2.4 土壤干旱对葡萄果实LAR蛋白的影响

葡萄果实发育过程中,LAR1、LAR2蛋白含量变化如图4、图5所示。干旱处理(SRWC 60%)和对照1(SRWC 85%)、对照2(SRWC 85%+遮荫)处理均检出一条43 kD多肽。就LAR1蛋白含量而言(图4),果实正常发育过程中对照1(SRWC 85%)表现为:花后20 d含量最高,随果实发育而有所下降,花后90 d至花后110 d含量基本稳定。此外,从图4中可以明显看出,土壤干旱明显导致花后20 d至花后50 d LAR1蛋白含量增加。与LAR1蛋白相似,LAR2蛋白含量因果实发育期不同而不同(图5)。

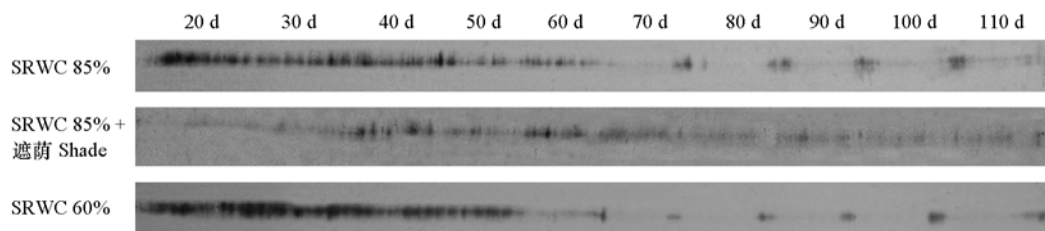


图4 土壤干旱对葡萄果实LAR1蛋白的影响

Fig. 4 Effect of soil drought on the protein amount of LAR1 in grape berry

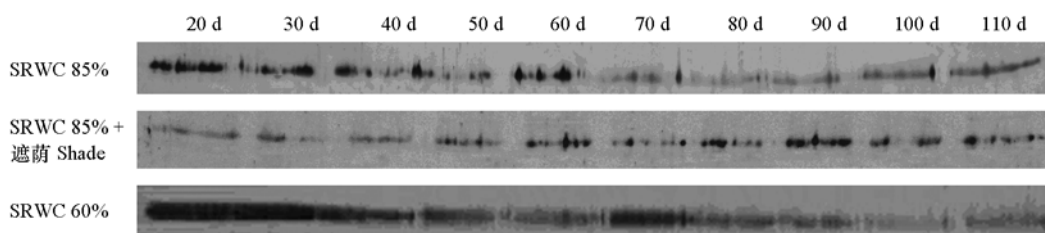


图5 土壤干旱对葡萄果实LAR2蛋白的影响

Fig. 5 Effect of soil drought on the protein amount of LAR2 in grape berry

正常发育过程中, 花后 20 d *LAR2* 蛋白含量最高; 此后随果实发育, 蛋白含量逐步下降; 花后 100 d 至花后 110 d 含量有所升高(图 5, SRWC 85%)。土壤干旱明显导致花后 20 d 至花后 50 d *LAR2* 蛋白含量增加, 这可能是相应时期 *LAR* 酶活性较高的原因之一。

此外, 在花后 20 d 至花后 50 d, 对照 2 (SRWC 85% + 遮荫) 果实中 *LAR1* (图 4)、*LAR2* (图 5) 蛋白含量均低于干旱处理和对照 1 (SRWC 85%), 这可能是相应时期 *LAR* 酶活性较低的原因之一。

2.5 土壤干旱对葡萄果实 *VvLAR1* 和 *VvLAR2* 表达的影响

土壤干旱对葡萄果实 *VvLAR1* 和 *VvLAR2* 表达的影响如图 6 所示。与 *VvLAR2* 相比, *VvLAR1* 在整个果实发育过程表达量较低。果实正常发育过程中, *VvLAR1* 在果实发育前期表达量较低, 而转色后表达量有所上升; *VvLAR2* 在幼果期表达量较高, 而随果实发育表达量持续下降。这表明, 葡萄果实中 *VvLAR1* 和 *VvLAR2* 表达受到明显的发育调控。

土壤干旱明显影响葡萄果实 *VvLAR1* 和 *VvLAR2* 表达(图 6)。就 *VvLAR1* 而言, 葡萄果实发育前期(花后 20 ~ 70 d), 干旱处理和两个对照处理表达水平均较低; 但转色期(花后 70 d)后, 对照 1 (SRWC 85%) 表达量明显上升, 花后 90 d、100 d, 至果实成熟而迅速下降; 土壤干旱下, *VvLAR1* 在花后 100 d 表达也有所增加, 但增幅低于对照 1 (SRWC 85%); 而对照 2 (SRWC 85% + 遮荫) 则表现为明显抑制 *VvLAR1* 表达。

整个果实发育过程中, 多数情况下土壤干旱处理 *VvLAR2* 表达量明显高于两个对照。此外, 避雨棚引发的弱光也导致 *VvLAR2* 表达量有所下降(图 6)。

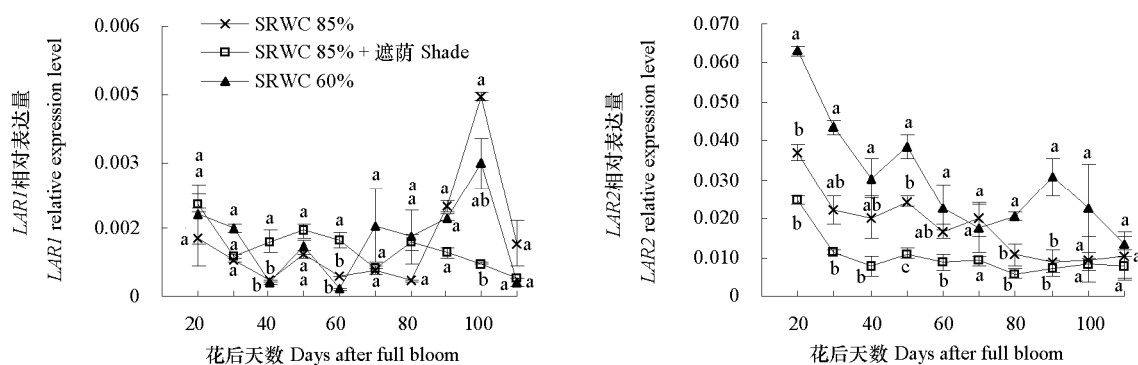


图 6 土壤干旱下葡萄果实 *VvLAR1* 和 *VvLAR2* 表达 Real-time PCR 分析

Fig. 6 Analysis of soil drought on the expression of *VvLAR1* and *VvLAR2* during the grape berry development by Real-time PCR

3 讨论

已有研究表明, 水分胁迫并不改变葡萄果实生长曲线, 但明显抑制葡萄果实的生长, 表现为果实干物质含量减少 (Ollé et al., 2011), 抑制果实细胞分裂和膨大, 导致单粒质量降低 (Girona et al., 2009)。本试验结果与前人 (Girona et al., 2009; Acevedo-Opazo et al., 2010) 的报道一致。这表明, 通过避雨棚和断根沟措施, 分别阻断降水和土壤水分横向移动, 成功地营造了土壤干旱胁迫。此外, 土壤干旱导致葡萄果实皮/肉比增加, 有利于酿造过程(浸渍或发酵)中果皮中花色苷和其它酚类物

质的浸提。

多酚类物质具有极强的抗氧化性 (Skerget et al., 2005), 能够有效清除逆境引发的活性氧迸发 (Ksouri et al., 2007; Niki, 2010), 从而具有明显的逆境保护作用。因而, 在诸多环境胁迫下, 植物次生代谢增强, 导致多酚类物质积累 (Wang et al., 2012), 如紫外线 (Agati & Tattiini, 2010; Wang et al., 2010)、低温 (Lillo et al., 2008)、高温 (Wen et al., 2008)、水分胁迫 (Castellarin et al., 2007; Girona et al., 2009; Ollé et al., 2011; Sánchez-Rodríguez et al., 2011)、机械伤害 (Campos-Vargas et al., 2005)、病害 (Schnee et al., 2008) 等。

Mencarelli 等 (2010) 发现, 葡萄果实采后失水导致总酚含量暂时增加, 黄酮醇和 *trans*-白藜芦醇含量上升; Bonghi 等 (2012) 证实, 葡萄果实采后缓慢或快速失水均导致果皮中黄烷-3-醇和原花色素 B1、B2 含量下降。本试验结果表明, 土壤干旱导致赤霞珠葡萄果实黄烷醇类多酚含量增加, 特别是在幼果期, 干旱处理明显促进黄烷醇类多酚的积累 (图 2), 这与 Bonghi 等 (2012) 研究结果相矛盾。这可能是由于试材的差异导致的。在本试验中, 土壤干旱发生在葡萄果实生长期, 果实仍通过维管组织与植株相连, 而 Mencarelli 等 (2010) 和 Bonghi 等 (2012) 均采用离体果实。此外, Peterlunger 等 (2005) 证实, 水分胁迫导致‘梅露辄’葡萄果实总酚、花色苷和儿茶素含量明显增加。本试验结果与之一致。

Quiroga 等 (2012) 研究表明, 果实转色后水分胁迫对没食子酸、咖啡酸、儿茶素、槲皮素生物合成没有明显作用。本试验结果表明, 虽然土壤干旱处理未导致成熟期果实黄烷醇类多酚的明显积累, 但含量仍高于两个对照。这既可能是幼果期黄烷醇类多酚大量积累的残留效应, 也可能是转色后至成熟期干旱仍能够促进黄烷醇类多酚微量积累。Ollé等 (2011) 研究表明, 转色前和转色后水分胁迫对葡萄果实原花色素和花色苷积累具有不同作用。因而, 这一差异可能是由于水分胁迫处理时葡萄果实发育期不同所致。也就是说, 水分胁迫对果实中多酚类物质积累的作用因果实发育期不同而不同, 具有发育阶段依赖性。

葡萄果实中, LAR 酶与 ANS 分别催化 2,3-反式、2,3-顺式-黄烷-3-醇合成[主要分别是 (+)-儿茶素和 (-)-表儿茶素] (Gagné et al., 2009), 不仅参与黄烷-3-醇单体的生物合成, 而且为原花色素的生物合成提供底物。因而, LAR 酶活性对葡萄果实中黄烷醇类多酚含量和积累具有决定性作用。Gagné 等 (2009) 以赤霞珠葡萄果皮为试材阐明了果实发育过程中 LAR 酶活变化规律, 本试验中以果实为试材获得与之相似的结果。因而, 葡萄果实发育过程中 LAR 酶活性具有明显的时间特异性, 受到严格的调控。此外, 本试验中还发现, 土壤干旱处理并未改变葡萄果实发育过程中 LAR 酶活性变化规律, 而明显促进其活性增强 (图 3)。

多酚类物质, 可以作为溶质, 通过渗透调节作用而适应缺水环境 (刘松, 2007), 而且水分胁迫会导致植物体内活性氧代谢失调 (Jaleel et al., 2007; Sánchez-Rodríguez et al., 2011), 而多酚类物质还具有极强的自由基清除能力, 能够与酶促系统 (如 SOD、POD、CAT 等) 及非酶促系统 (如谷胱甘肽、抗坏血酸等) 共同参与植物体内活性氧的猝灭 (Ksouri et al., 2007; Niki, 2010; Rodrigo et al., 2011; Sánchez-Rodríguez et al., 2011)。因而, 土壤干旱明显导致葡萄果实 LAR 酶活性升高 (图 3), 可能与水分胁迫能够明显诱导果实多酚类物质积累相关。

Western blot 结果表明, 葡萄果实发育过程中 LAR1、LAR2 蛋白含量变化具有明显的规律, 且这一规律与前人研究结果相同 (何非, 2008)。土壤干旱导致葡萄果实中 LAR1、LAR2 蛋白增加, 特别是在花后 20 d 至 50 d, LAR2 增加更为明显 (图 4, 图 5)。我们前期研究发现, 水杨酸 (salicylic acid, SA) 能够通过诱导苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 蛋白合成而诱导 PAL 酶活性增强 (Wen et al., 2005); 而且, 在高温胁迫下, 蛋白合成抑制剂环己亚胺 (cycloheximide) 能够抑制 SA 诱导的 PAL 活性增加 (Wen et al., 2008)。因而, 本试验中 LAR1、LAR2 蛋白含量增

加可能是土壤干旱诱导 LAR 酶活性增强的主要原因。

葡萄果实发育过程中, *VvLAR1* 和 *VvLAR2* 表达也表现出明显的规律, 这与前人研究结果(何非, 2008)相同。在整个果实发育过程中, *VvLAR2* 表达明显受到土壤干旱的诱导, 而对 *VvLAR1* 的影响则因果实发育期不同而不同(图 6)。我们前期研究表明, SA 能够诱导 PAL mRNA 积累, 进而导致 PAL 蛋白含量增加, PAL 酶活性增强, 多酚类物质积累; 且这一诱导过程能够被转录抑制剂放线菌素 D 所阻断(Wen et al., 2005, 2008)。因而, 土壤干旱诱导的 *VvLAR1* 和 *VvLAR2* 表达可能是 LAR 酶活性增强的主要原因。

此外, 遮荫也会明显影响葡萄果实发育过程中 *VvLAR1* 和 *VvLAR2* 基因表达(图 4 ~ 图 6)。Sparvoli 等(1994)研究表明, 光对类黄酮代谢途径中大部分结构基因都具有调控作用, 遮荫抑制 CHS、CHI、F3H、DFR、LDOX 等基因的表达。Jeong 等(2004)研究表明, 遮荫明显抑制 CHS1、CHS2、CHS3、CHI1、CHI2、F3H1、F3H2、DFR、LDOX、UGT 等基因表达, 从而抑制花色苷积累。Hou 等(2010)同样证实, 遮荫导致 CHS、F3H、DFR、ANS mRNA 水平明显降低, 导致花色苷积累受抑。本试验结果表明, 遮荫明显抑制 *VvLAR2* 在整个果实发育期表达。这可能是弱光对类黄酮代谢途径中结构基因具有普遍抑制作用。

综上所述, 土壤干旱明显影响葡萄果实 *VvLAR1* 和 *VvLAR2* 转录, 导致 LAR1、LAR2 蛋白含量有所差异, 进而影响 LAR 酶活性发生明显变化, 最终导致葡萄果实中黄烷醇类多酚含量的差异。

References

- Acevedo-Opazo C, Ortega-Farias S, Fuentes S. 2010. Effects of grapevine (*Vitis vinifera* L.) water status on water consumption, vegetative growth and grape quality: An irrigation scheduling application to achieve regulated deficit irrigation. *Agricultural Water Management*, 97: 956 - 964.
- Agati G, Tattini M. 2010. Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytologist*, 186: 786 - 793.
- Araújo J R, Gonçalves P, Martel F. 2011. Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutrition Research*, 31: 77 - 87.
- Bogs J, Downey M O, Harvey J S, Ashto A R, Tanner G J, Robinson S P. 2005. Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. *Plant Physiology*, 139: 652 - 663.
- Bonghi C, Rizzini F M, Gambuti A, Moio L, Chkaiban L, Tonutti P. 2012. Phenol compound metabolism and gene expression in the skin of wine grape (*Vitis vinifera* L.) berries subjected to partial postharvest dehydration. *Postharvest Biology and Technology*, 67: 102 - 109.
- Bradford M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248 - 254.
- Cadot Y, Castelló M T M, Chevalier M. 2006. Flavan-3-ol compositional changes in grape berries (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Franc) before veraison, using two complementary analytical approaches, HPLC reversed phase and histochemistry. *Analytica Chimica Acta*, 563: 65 - 75.
- Campos-Vargas R, Nonogaki H, Suslow T, Saltveit M E. 2005. Heat shock treatment delay the increase in wound-induced phenylalanine ammonia-lyase activity by altering its expression, not its induction in Romaine lettuce (*Lactuca sativa*) tissue. *Physiologia Plantarum*, 132: 82 - 91.
- Cang Guo-ying. 2011. Study on the accumulation mechanism of flavanols during grape berry development[M. D. Dissertation]. Taigu: Shanxi Agricultural University. (in Chinese)
- 仓国营. 2011. 葡萄果实发育过程中黄烷醇类多酚积累机制的研究[硕士论文]. 太谷: 山西农业大学.
- Castellarin S D, Matthews M A, Di Gasparo G, Gambetta G A. 2007. Water deficits accelerate ripening induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries. *Planta*, 227: 101 - 112.
- Crifò T, Puglisi I, Petrone G, Recupero G R, Lo Piero A R. 2011. Expression analysis in response to low temperature stress in blood oranges: Implication of the flavonoid biosynthetic pathway. *Gene*, doi: 10.1016/j.gene.2011.02.005.
- Dixon R A, Xie D Y, Sharma S B. 2005. Proanthocyanidins-a final frontier in flavonoid research? *New Phytologist*, 165: 9 - 28.
- Gagné S, Lacampagne S, Claisse O, GénY L. 2009. Leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase gene expression and activity in

- flowers, young berries and skins of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet-Sauvignon during development. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 282 – 290.
- Girona J, Marsal J, Mata M, Campo J D, Basile B. 2009. Phenological sensitivity of berry growth and composition of Tempranillo grapevines (*Vitis vinifera* L.) to water stress. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15: 268 – 277.
- He Fei. 2008. Study of the gene expression of leucoanthocyanidin reductase in grape berries[M. D. Dissertation]. Beijing: China Agricultural University. (in Chinese)
- 何 非. 2008. 葡萄果实无色花色素还原酶基因的表达研究[硕士论文]. 北京: 中国农业大学.
- Hollman P C H, Arts L C W. 2000. Flavonols, flavones and flavanols: Nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science and Food Agriculture*, 80: 1081 – 1093.
- Hou F Y, Wang Q M, Dong S X, Li A X, Zhang H Y, Xie B T, Zhang L M. 2010. Accumulation and gene expression of anthocyanin in storage roots of purple-fleshed sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] under weak light conditions. *Agricultural Sciences in China*, 9: 1588 – 1593.
- Jaleel C A, Manivannan P, Sankar B, Kishorekumar A, Gopi R, Somasundaram R, Panneerselvam R. 2007. Induction of drought stress tolerance by detoconazole in *Catharanthus roseus* is mediated by enhanced antioxidant potentials and secondary metabolite accumulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 60: 201 – 206.
- Jeong S T, Goto-Yamamoto N, Kobayashi S, Esaka M. 2004. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Science*, 167: 247 – 252.
- Kennedy J A, Matthews M A, Waterhouse A L. 2002. Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53: 268 – 274.
- Koundouras S, Marinos V, Gkouliti A, Kotseridis Y, Van Leeuwen C. 2006. Influence of vineyard location and vine water status on fruit maturation of non-irrigated cv. Agiorgitiko (*Vitis vinifera* L.). Effects on wine phenolic and aroma components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 5077 – 5086.
- Ksouri R, Megdiche W, Debez A, Falleh H, Grigono C, Abdely C. 2007. Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 244 – 249.
- Leifert W R, Abeywardena M Y. 2008. Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutrition Research*, 28: 729 – 737.
- Lillo C, Lea U, Ruoff P. 2008. Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant Cell Environ*, 31: 587 – 601.
- Liu Song. 2007. Study on plant phenolic compound content and their response to hyperarid extreme environment[Ph. D. Dissertation]. Beijing: Beijing Forestry University. (in Chinese)
- 刘 松. 2007. 极端干旱环境下植物体内多酚类物质含量及其对逆境的响应研究[博士论文]. 北京: 北京林业大学.
- Ma Chun-lei, Qiao Xiao-yan, Chen Liang. 2010. Cloning and expression analysis of leucoanthocyanidin reductase gene of tea plant (*Camellia sinensis*). *Journal of Tea Science*, 30: 27 – 36. (in Chinese)
- 马春雷, 乔小燕, 陈 亮. 2010. 茶树无色花色素还原酶基因克隆及表达分析. *茶叶科学*, 30: 27 – 36.
- Maugé C, Granier T, d'Estaintot BL, Gargouri M, Manigand C, Schmitter J M, Chaudière J, Gallois B. 2010. Crystal structure and catalytic mechanism of leucoanthocyanidin reductase from *Vitis vinifera*. *Journal of Molecular Biology*, 397: 1079 – 1091.
- Mencarelli F, Bellincontro A, Nicoletti I, Cirilli M, Muleo R, Corradini D. 2010. Chemical and biochemical change of healthy phenolic fractions in winegrape by means of postharvest dehydration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 7557 – 7564.
- Monagas M, Gómez-Cordovés C, Bartolome B, Laureano O, Ricardo da Silva J M. 2003. Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 6475 – 6481.
- Mori K, Sugaya S, Gemma H. 2005. Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Scientia Horticulturae*, 105: 319 – 330.
- Mori K, Goto-Yamamoto N, Kitayama M, Hashizume K. 2007. Loss of anthocyanins in red-wine elevated night temperature condition. *Journal of Experimental Botany*, 58: 1935 – 1945.
- Niki E. 2010. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology & Medicine*, 49: 503 – 515.

- Ojeda H, Andary C, Kraeva E, Carbonneau A, Deloire A. 2002. Influence of pre- and postveraison water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* cv. Shiraz. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53: 261 – 267.
- Ollé D, Guiraud J L, Souquet J M, Terrier N, Ageorges A, Cheynier V, Verries C. 2011. Effect of pre- and post-veraison water deficit on proanthocyanidins and anthocyanin accumulation during Shiraz berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17: 90 – 100.
- Peterlunger E, Sivilotti P, Colussi V. 2005. Water stress increased polyphenolic quality in ‘Merlot’ grapes. *ISHS Acta Horticulture*, 689: 293 – 300.
- Prasain J K, Carlson S H, Wyss J M. 2010. Flavonoids and age-related disease: Risk, benefits and critical windows. *Maturitas*, 66: 163 – 171.
- Quiroga A M, Deis L, Cavagnaro J B, Bottini R, Silva M F. 2012. Water stress and abscisic acid exogenous supply produce differential enhancements in the concentration of selected phenolic compounds in Cabernet Sauvignon. *Journal of Berry Research*, 2: 33 – 44.
- Rodrigo R, Miranda A, Vergara L. 2011. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta*, 412: 410 – 424.
- Sánchez-Rodríguez E, Moreno D A, Ferreres F, Rubio-Wilhelmi M M, Ruiz J M. 2011. Differential responses of five cherry tomato varieties to water stress: Changes on phenolic metabolites and related enzymes. *Phytochemistry*, 72: 723 – 729.
- Sano T, Oda E, Yamashita T, Naemura A, Ijiri Y, Yamakoshi J, Yamamoto J. 2005. Anti-thrombotic effect of proanthocyanidins, a purified ingredient of grape seed. *Thrombosis Research*, 115: 115 – 121.
- Schnee S, Viret O, Gindro K. 2008. Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72: 128 – 133.
- Schroeter H, Heiss C, Spencer J P E, Keen C L, Lupton J R, Schmitz H H. 2010. Recommending flavanols and procyanidins for cardiovascular health: Current knowledge and future needs. *Molecular Aspects of Medicine*, 31: 546 – 557.
- Serafini M, Bugianesi R, Maiani G, Valtuena S, De Santis S, Crozier A. 2003. Plasma antioxidants from chocolate. *Nature*, 424: 1013.
- Shan Chang-juan, Liang Zong-suo. 2007. Effects of soil drought on root growth and physiological characteristics of winter wheat seedlings. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 15 (5): 38 – 41. (in Chinese)
- 单长卷, 梁宗锁. 2007. 土壤干旱对冬小麦幼苗根系生长及生理特性的影响. *中国生态农业学报*, 15 (5): 38 – 41.
- Skerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hras A R, Simionic M, Knez Z. 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89: 191 – 198.
- Sparvoli F, Martin A, 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 Molecular Biology*, 24: 743 – 755.
- Vidal S, Cartalade D, Souquet J M, Fulcrand H, Cheynier V. 2002. Changes in proanthocyanidins chain in wine-like model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 2261 – 2266.
- Wang Y S, Gao L P, Shan Y, Liu Y J, Tian Y W, Xia T. 2012. Influence of shade on flavonoid biosynthesis in tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *Scientia Horticulturae*, 141: 7 – 16.
- Wang W, Tang K, Yang H R, Wen P F, Zhang P, Wang H L, Huang W D. 2010. Distribution of resveratrol and stilbene synthase in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) and the effect of UV-C on its accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48: 142 – 152.
- Waterhouse A L, Ignelzi S, Shirley J R. 2000. A comparison of methods for quantifying oligomeric proanthocyanidins from grape seed extracts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51: 383 – 389.
- 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色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.
- Wen P F, Chen J Y, Kong W F, Pan Q H, Wan S B, Huang W D. 2005. Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. *Plant Science*, 169: 928 – 934.
- Wen P F, Chen J Y, Wan S B, Kong W F, Zhang P, Wang W, Zhan J C, Pan Q H, Huang W D. 2008. Salicylic acid activates phenylalanine ammonia-lyase in grape berry in response to high temperature stress. *Plant Growth Regulation*, 55: 1 – 10.
- Zimman A, Joslin W S, Lyon M L, Meier J, Waterhouse A L. 2002. Maceration variables affecting phenolic composition in commercial-scale Cabernet Sauvignon winemaking trials. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53: 93 – 98.