

UV-C 对葡萄黄烷醇类多酚时空积累、LAR 活性和组织定位的影响

温鹏飞*, 牛兴艳, 邢延富, 牛铁泉, 高美英, 冀铮春, 李昌亨, 杜丽娟

(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, 在果实发育过程中定期对植株进行 UV-C 照射, 分别采用分光光度计法、免疫组织定位等方法, 对黄烷醇类多酚时空积累及其合成关键酶 LAR (leucoanthocyanidin reductase, LAR) 活性和定位进行初步研究。结果表明: UV-C 诱导果皮和果肉中总酚、黄烷醇类多酚、总黄烷-3-醇的积累, LAR 酶活性增强, 且这一诱导作用有明显的照射剂量、器官/组织和发育阶段依赖性。UV-C 照射并不改变 LAR1、LAR2 酶蛋白在葡萄果实中的分布, 但诱导酶蛋白积累, 特别在果皮及果肉维管束中, UV-C 照射导致 LAR1、LAR2 酶蛋白信号明显增强。所有结果表明, UV-C 照射诱导果皮和果肉维管束中 LAR1、LAR2 酶蛋白增加, 诱导 LAR 酶活性增强, 最终导致总黄烷-3-醇和黄烷醇类多酚特异性积累。

关键词: 葡萄; 果实; UV-C; 总黄烷-3-醇; 黄烷醇类多酚; LAR; 组织定位

中图分类号: S 663.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 07-1251-11

The Effect of UV-C Irradiation on Spatial and Temporal Accumulation of Flavanols and the Activity, Tissue Localization of LAR in Grape Berry

WEN Peng-fei*, NIU Xing-yan, XING Yan-fu, NIU Tie-quan, GAO Mei-ying, JI Zheng-chun, LI Chang-heng, and DU Li-juan

(College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China)

Abstract: The 5-year old grapevine (*Vitis vinifera* L. ‘Cabernet Sauvignon’) was subjected to the periodical UV-C irradiation during berry development. The spatial and temporal accumulation of flavanols and the enzyme activity of LAR in the berry were analyzed by spectrophotometer method, and the tissue localization of LAR1 and LAR2 were detected by the immunohistochemical localization. The results indicated that the accumulation of total phenol, flavanols, flavan-3-ols, as well as the LAR enzyme activity in the skin and flesh were induced by UV-C irradiation, which was irradiation dose-, organ/tissue-, and development stage-depend. There were no obvious changes in the tissue localization of LAR1 and LAR2 induced by UV-C, whereas an significant increasing signal was found, especially in the skin and vascular bundle. All the results suggest that UV-C irradiation could induce the accumulation of LAR1 and LAR2

收稿日期: 2013-03-04; **修回日期:** 2013-06-18

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); 山西省科技产业化环境建设项目 (20100510006); 山西农业大学学术带头人及学术骨干培养计划项目 (XG201219)

* E-mail: wenpengfei@126.com

enzyme protein in the skin and vascular bundle, an increasing in LAR activity in the skin during grape berry development, which resulted in the accumulation of total flavan-3-ols and flavanols.

Key words: grape; berries; UV-C; total flavan-3-ols; flavanols; LAR; tissue localization

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、抗真菌、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), 具有防病和保健功能 (Sano et al., 2005; Leifert & Abeywardena, 2008; Prasain et al., 2010; Araùjo et al., 2011; Rodrigo et al., 2011)。作为葡萄果实中含量最丰富的多酚类物质 (Girona et al., 2009), 黄烷醇类多酚不仅具有极显著的药理学功能 (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、风味、澄清度、收敛性、褐变、口感等, 具有决定性作用 (Cadot et al., 2006), 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; Wen et al., 2008; Crifò et al., 2011)、光照 (Sparvoli et al., 1994; Wang et al., 2010a; Wang et al., 2012)、水分 (Kennedy et al., 2002; Castellarin et al., 2007; Ollé et al., 2011) 等。前人的研究证实, 诱导苯丙烷类化合物和黄酮类化合物合成、类黄酮积累是植物抵御紫外光的主要的途径 (Peng et al., 2003)。植物体内积累大量类黄酮类物质能够有效地吸收紫外光进而保护植物免受紫外线伤害 (Christensen et al., 1998; Mol et al., 1998)。González-Aguilar 等 (2007) 的研究表明, 桩果采后经紫外线 C (Ultraviolet C, UV-C) 照射诱导 PAL 活性增加, 可使总酚、总类黄酮含量上升。Koyama 等 (2012) 则发现紫外线特异性诱导黄酮醇类多酚生物合成, 而可见光诱导原花色素合成, 并对其组成具有明显作用。UV-C 照射明显促进 ‘赤霞珠’ 葡萄果实中黄烷醇类多酚及 LAR 蛋白的积累, 且这一积累有发育阶段依赖性 (温鹏飞 等, 2012a)。

隐色花色素还原酶 (Leucoanthocyanidin reductase, LAR, EC 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, EC 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, EC 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 UV-C 照射对葡萄果实 LAR 时空表达及分布的影响尚未见报道。

本试验中以 5 年生酿酒葡萄品种 ‘赤霞珠’ (*Vitis vinifera* L. ‘Cabernet Sauvignon’) 为试材, 在果实发育过程中采用 UV-C 活体照射, 以黄烷 - 3 - 醇生物合成关键酶 LAR 为切入点, 用分光光度计法、免疫组织化学方法阐明葡萄果实发育过程中 UV-C 照射对果实黄烷醇类多酚时空积累及 LAR 表达和定位的影响, 以期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’ 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 m × 2.5 m。

共设 3 个处理: 不进行紫外照射 (对照); 每次照射 5 min 和每次照射 10 min。照射处理时在距离植株 1 m 处设置紫外灯组, 直接照射植株。紫外灯组由 3 支 40 W 紫外灯管 (254 nm, ZSZ 型石英紫外线杀菌灯, 天津广泽特种光源有限公司) 组成, 总辐射强度 $95 \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$ (ZQJ - 紫外辐射照度计测定)。葡萄盛花后 15 d 进行第 1 次紫外照射, 以后每 10 d 照射 1 次。分别于花后 20 d (幼果期)、50 d (膨大期)、70 d (转色期)、90 d (第 2 次膨大期)、110 d (成熟期) 取样。随机选取 3 株, 分别在每株果穗分布区的上、中、下部采集果穗各 1 穗, 共 27 穗, 去除带机械伤害、病虫害及发育异常果粒, 置于冰盒中, 迅速带回实验室。一部分迅速进行固定, 用于 LAR1、LAR2 组织定位研究; 一部分手工分离果皮、果肉, -80°C 保存备用。

1.2 测定方法

1.2.1 总酚、黄烷醇类多酚、总黄烷-3-醇、原花色素含量的测定

总酚含量采用 Folin-Ciocalteu 法测定 (温鹏飞等, 2011)。黄烷醇类多酚含量采用香草醛—盐酸法测定 (Waterhouse et al., 2000)。总黄烷-3-醇含量参照 Ivanova 等 (2011) 方法, 采用 DMACA 法测定。原花色素含量参照温鹏飞等 (2011) 方法测定。

1.2.2 LAR 活性测定

LAR 活性测定参照温鹏飞等 (2012a, 2012b) 方法, 略作修改。样品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 7.7)、 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二氢槲皮素 (dihydroquercetin)、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NADPH, 37°C 下水浴 1 h。然后加入 2 mL 8% 盐酸—甲醇溶液, 2 mL 6% 香草醛—甲醇溶液, 37°C 下水浴 1 h, UV-2450 分光光度计 500 nm 处测定吸光值。粗酶液蛋白含量采用 Bradford 法测定 (Bradford, 1976), 以牛血清蛋白 (BSA) 为标准。LAR 酶活性表示为儿茶素 $\text{mg} \cdot \text{h}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$ 。

1.2.3 LAR 免疫组织定位

LAR 免疫组织定位参照 Wang 等 (2010b)、Hou 和 Huang (2005) 方法, 稍做修改。用双面刀片迅速切取约 0.5 mm 厚的果实薄片, 投入 4% 多聚甲醛和 2.5% 戊二醛的固定液中固定过夜, 系列乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋。包埋块切成 8 μm 厚的切片, 贴于涂有多聚赖氨酸的载玻片上。二甲苯脱蜡, 系列乙醇溶液复水。PBS (pH 7.0) 浸洗 10 min, 封闭液 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS, 0.1% Tween-20, 1.5% 甘氨酸, 5% BSA) 封闭 45 min, 调节液 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS, 0.1% Tween-20, 0.8% BSA, 0.88% NaCl) 浸洗过渡 10 min, PB ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS, 0.8% BSA) 漂洗 10 min; 加入 100 μL 1:50 (体积比) LAR1 或 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), PBS 湿盒中 4°C 过夜。高盐液 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS, 0.1% Tween-20, 0.1% BSA, 2.9% NaCl) 浸洗, 调节液浸洗各 10 min, PBS 冲洗, 加入 100 μL 用 PBS 稀释为 1:100 的碱性磷酸酶标记的羊抗兔酶标二抗 (Promega, USA), 黑暗下室温反应 5~6 h, 调节液浸洗, PBS 冲洗, 双蒸水浸洗各 10 min, 加入 150 μL Western Blue 显色液, 室温反应 15~20 min, 双蒸水漂洗 10 min 终止反应。系列乙醇溶液脱水, 二甲苯过渡后封片。切片干燥后, 用 OLYMPUS BX51 型显微镜观察并采集照片。为了检验化学免疫定位结果的特异性和可靠性, 设置 2 种不同的对照: (1) 省略 LAR1、LAR2 抗体; (2) 省略碱性磷酸酶标记的羊抗兔酶标二抗。

1.3 数据分析

数据用 SAS 8.0、EXCEL 2003 分析, EXCEL 2003 绘图。定位图片用 Photoshop 7.0 分析、标注。

2 结果与分析

2.1 UV-C 照射对葡萄果实发育过程中总酚时空积累的影响

葡萄果实发育过程中总酚的积累表现出明显的规律性, 且定期 UV-C 照射并未改变总酚的积累规律 (图 1)。在整个果实发育期, 果皮中总酚含量均显著高于果肉。这表明, 葡萄果实发育过程中总酚的积累具有明显的器官/组织特异性。此外, 随葡萄果实发育, 果皮中总酚含量在幼果期 (花后 20 d) 最高, 随后下降, 转色 (花后 70 d) 后含量略有增加 (图 1, A); 而果肉中总酚含量则在幼果期最高, 随果实发育而表现为持续下降 (图 1, B)。这表明, 葡萄果实发育过程中果皮和果肉中总酚的积累也具有发育阶段依赖性。

特别值得一提的是, 虽然 UV-C 照射并未改变葡萄果实发育过程中总酚的时空积累模式, 但明显诱导其积累 (图 1)。特别是在幼果期, UV-C 照射明显诱导果皮和果肉中总酚积累。此外, UV-C 照射 5 min 和 10 min 对果皮和果肉中总酚积累的促进作用因果实发育期不同而不同; 且在同一发育期, 对总酚积累的促进作用也不尽相同 (图 1)。这表明, UV-C 照射诱导总酚积累具有照射剂量依赖性和发育阶段依赖性。

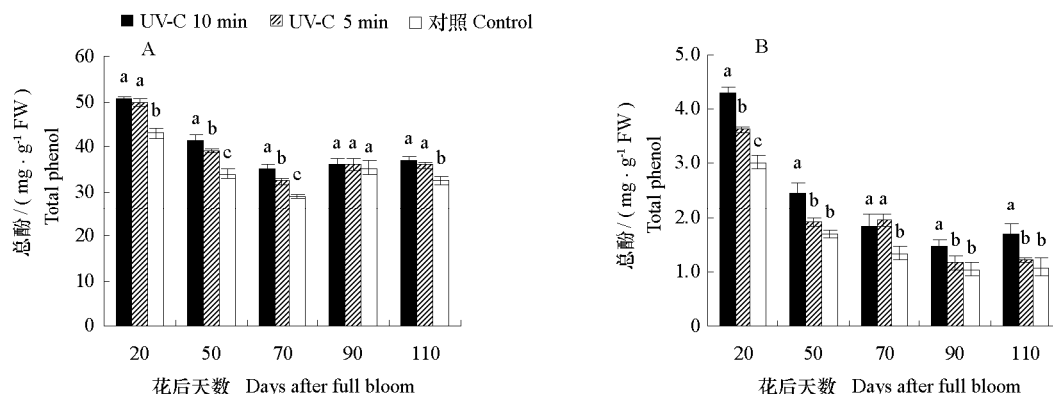


图 1 UV-C 照射对葡萄果实发育过程中果皮 (A) 和果肉 (B) 中总酚含量的影响

Fig. 1 Effects of UV-C irradiation on the content of total phenols in the skin (A) and flesh (B) during grape berry development

2.2 UV-C 照射对葡萄果实发育过程中黄烷醇类多酚时空积累的影响

葡萄果实发育过程中黄烷醇类多酚的时空积累也具有明显发育阶段和器官依赖性 (图 2)。在整个果实发育过程中, 果皮中黄烷醇类多酚含量显著高于果肉。这表明, 黄烷醇类多酚主要在葡萄果皮中积累, 而果肉积累较少。在果皮中, 黄烷醇类多酚在幼果期 (花后 20 d) 含量较高, 随果实膨大、转色而逐渐下降, 转色 (花后 70 d) 后, 含量明显上升; 至成熟期 (花后 110 d) 略有下降 (图 2, A)。果肉中黄烷醇类多酚则随果实发育表现为持续下降 (图 2, B)。果实发育过程中, 果皮、果肉黄烷醇类多酚积累规律不同可能与果皮转色后大量积累花色苷有关 (温鹏飞 等, 2012a)。

UV-C 照射能够诱导果皮和果肉中黄烷醇类多酚积累。首先, 纵观葡萄果实整个发育期, UV-C 照射 10 min 的诱导作用在绝大部分发育时间强于 UV-C 照射 5 min; 其次, UV-C 照射对果皮中黄烷醇类多酚积累的作用明显强于果肉; 第三, UV-C 照射在果实不同发育阶段对黄烷醇类多酚积累的诱导作用也不尽相同, 如在果皮中, 幼果期 (花后 20 d)、膨大期 (花后 50 d) 和成熟期 (花后 110 d) 的诱导作用明显强于转色期 (花后 70 d)。这表明, UV-C 诱导的葡萄果实黄烷醇类多酚积累具有明显的照射剂量、器官和发育阶段依赖性。

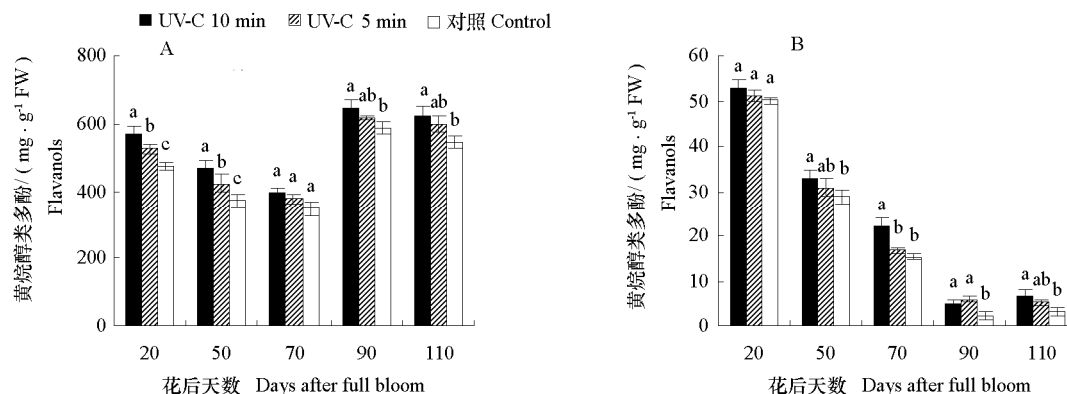


图 2 UV-C 照射对葡萄果实发育过程中果皮 (A) 和果肉 (B) 中黄烷醇类多酚含量的影响

Fig. 2 Effects of UV-C irradiation on the content of flavanols in the skin (A) and flesh (B) during grape berry development

2.3 UV-C 照射对葡萄果实发育过程中总黄烷-3-醇和原花色素时空积累的影响

葡萄果实中, 黄烷醇类多酚既包括其单体, 即黄烷-3-醇 (如儿茶素、表儿茶素等), 也包括其寡聚体和多聚体, 即原花色素或缩合单宁 (Cadot et al., 2006; Ollé et al., 2011)。因此, 黄烷醇类多酚的含量既取决于黄烷-3-醇单体含量, 也取决于其聚合体含量。

UV-C 照射对葡萄果实发育过程中总黄烷-3-醇积累的作用如图 3 所示。类似于黄烷醇类多酚, 葡萄果实发育过程中总黄烷-3-醇的积累具有明显的发育阶段和器官依赖性。在果实发育的任何阶段, 果皮中总黄烷-3-醇含量明显高于果肉。这表明, 总黄烷-3-醇特异性地在果皮中积累。在整个果实发育进程, 总黄烷-3-醇在果皮和果肉中均表现为幼果期 (花后 20 d) 含量较高, 随果实发育而持续下降, 成熟期 (花后 110 d) 含量最低 (图 3)。

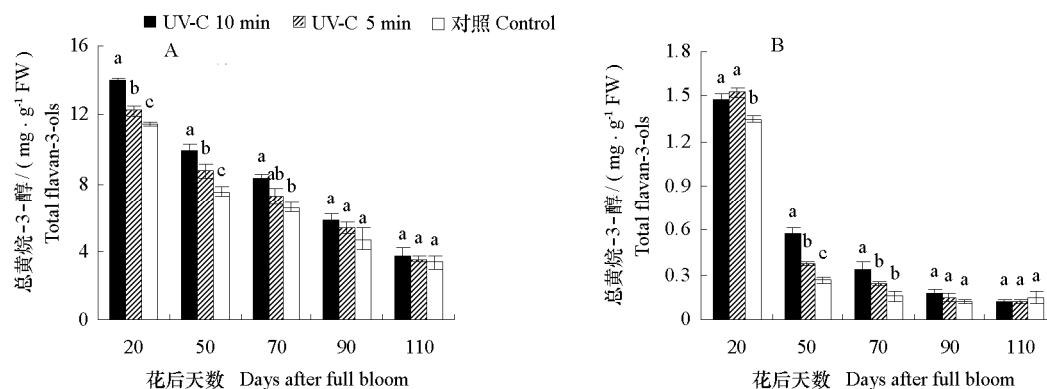


图 3 UV-C 照射对葡萄果实发育过程中果皮 (A) 和果肉 (B) 中总黄烷-3-醇含量的影响

Fig. 3 Effects of UV-C irradiation on the content of total flavan-3-ols in the skin (A) and flesh (B) during grape berry development

UV-C 照射对总黄烷-3-醇积累的诱导作用因果实发育期不同而不同。在转色 (花后 70 d) 前, UV-C 照射明显促进总黄烷-3-醇在果皮 (图 3, A) 和果肉 (图 3, B) 中积累, 而转色后, 这一诱导作用明显减弱。这表明, UV-C 诱导的总黄烷-3-醇具有明显的果实发育阶段依赖性。从图 4 中可以得知, UV-C 照射明显抑制果皮和果肉中原花色素的积累 (果肉, 花后 20 d 和 50 d 例外)。

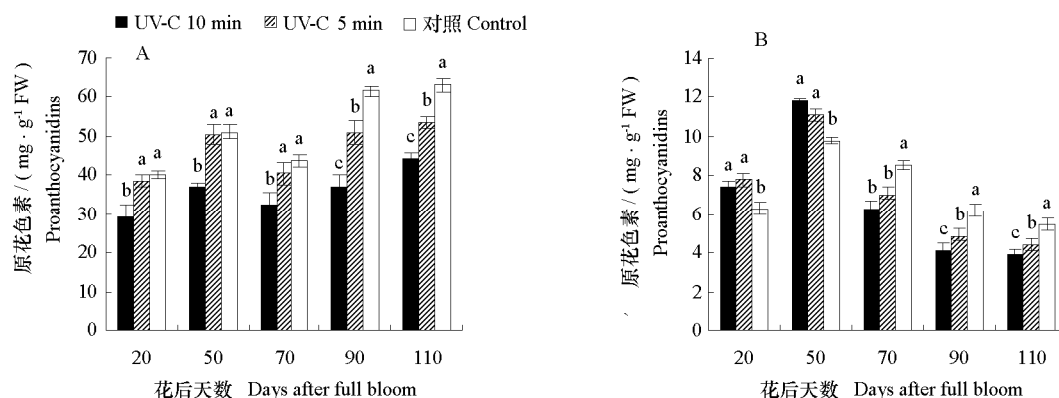


图 4 UV-C 照射对葡萄果实发育过程中果皮 (A) 和果肉 (B) 中原花色苷含量的影响

Fig. 4 Effects of UV-C irradiation on the content of proanthocyanidins in the skin (A) and flesh (B) during grape berry development

2.4 UV-C 照射对葡萄果实中 LAR 酶活性的影响

葡萄果实发育过程中, LAR 酶活性变化表现出明显的发育阶段依赖性 (图 5)。转色 (花后 70 d) 前, 果皮和果肉中 LAR 酶活性均表现为随果实发育而持续降低; 转色后, 果皮中 LAR 酶活性稍有回升 (图 5, A), 而果肉仍持续下降, 至成熟期略有回升。这可能是由于花色苷和黄烷-3-醇生物合成共享同一底物隐色花色苷 (Wang et al., 2010b) 所致。本试验中, 葡萄果实转色在花后 60~70 d 之间完成 (Wang et al., 2010b; 温鹏飞等, 2012a)。转色期, 由于 LAR 酶催化的黄烷-3-醇生物合成与花色苷合成酶 (Anthocyanidin synthase, ANS)、花色苷还原酶 (Anthocyanidin reductase, ANR) 催化的花色苷合成共享同一底物, 因而 LAR 酶活性下降; 而转色后, 参与花色苷合成的 ANS 表达量降低 (Wang et al., 2010b), ANR 活性明显下降 (Koyama et al., 2012), 导致 LAR 酶活性升高。而在果肉中, 由于不存在花色苷积累, 因而 LAR 酶活性不存在这一回升现象。

UV-C 照射对果皮、果肉中 LAR 酶的活性具有明显的诱导作用, 且这一作用与果实发育期密切相关。果皮中除成熟期 (花后 110 d) 外, UV-C 照射 10 min 和对照相比均达显著水平, UV-C 照射 5 min 则只在转色期之前 (花后 20~70 d) 显著高于对照。

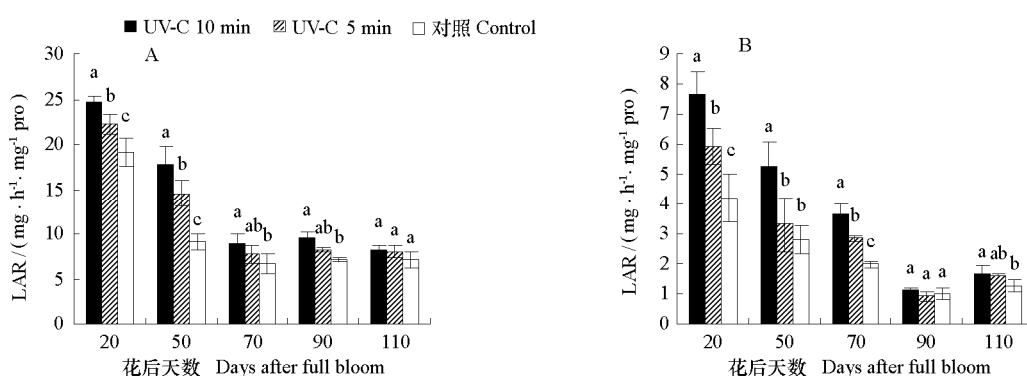


图 5 UV-C 对葡萄果实发育过程中果皮 (A) 和果肉 (B) LAR 酶活性的影响

Fig. 5 Effects of UV-C irradiation on the LAR activity in skin (A) and flesh (B) during the grape berry development

2.5 UV-C 照射对葡萄果实发育过程中 LAR 组织定位的影响

图 6 和图 7 显示葡萄果实发育过程中及 UV-C 照射下 LAR1、LAR2 酶蛋白组织化学定位结果。

蓝绿色信号的有无或强度在图 6 和图 7 中分别代表 LAR1 和 LAR2 酶蛋白的存在与否和酶蛋白数量的多少。在葡萄果实发育过程中, LAR1 和 LAR2 蛋白分布情况相似, 即果皮 (EP) 和果肉 (MP) 中均有蓝绿色信号。此外, 在果肉维管束 (VB) 中也检测到 LAR1 和 LAR2 蛋白分布, 且信号明显强于果肉。这表明, LAR1、LAR2 酶蛋白在果皮和果肉薄壁细胞及维管束中均有分布。前人研究结

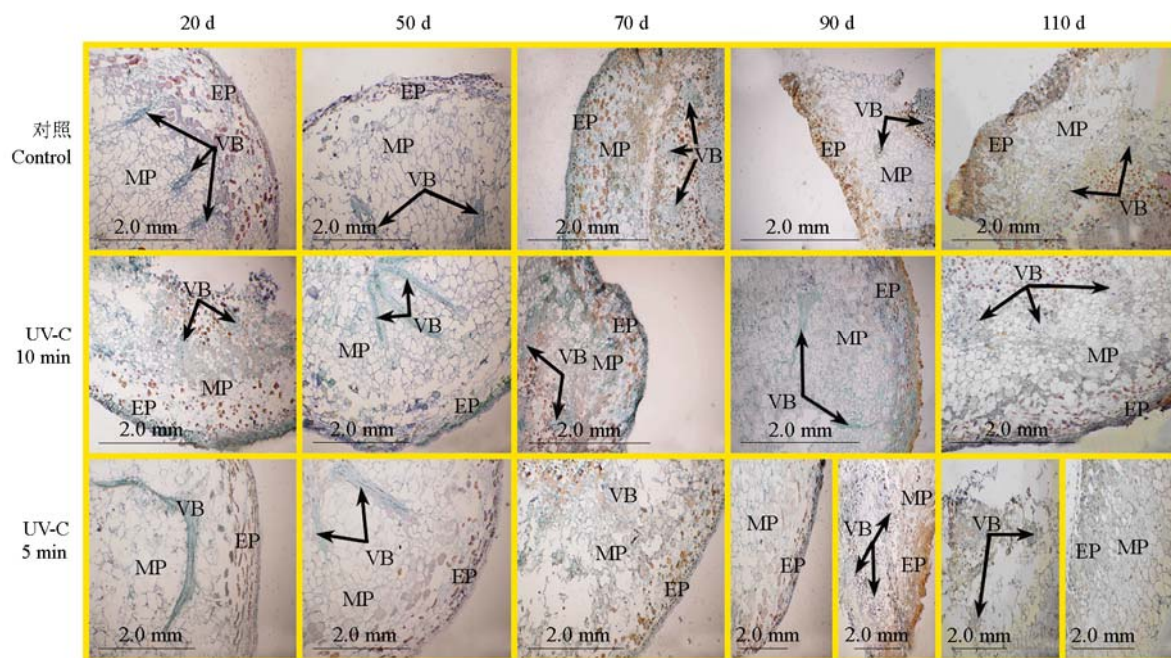


图 6 UV-C 处理对葡萄果实发育过程中 LAR1 组织定位的影响

Fig. 6 Effects of UV-C on the immunohistochemical localization of LAR1 during grape berry development

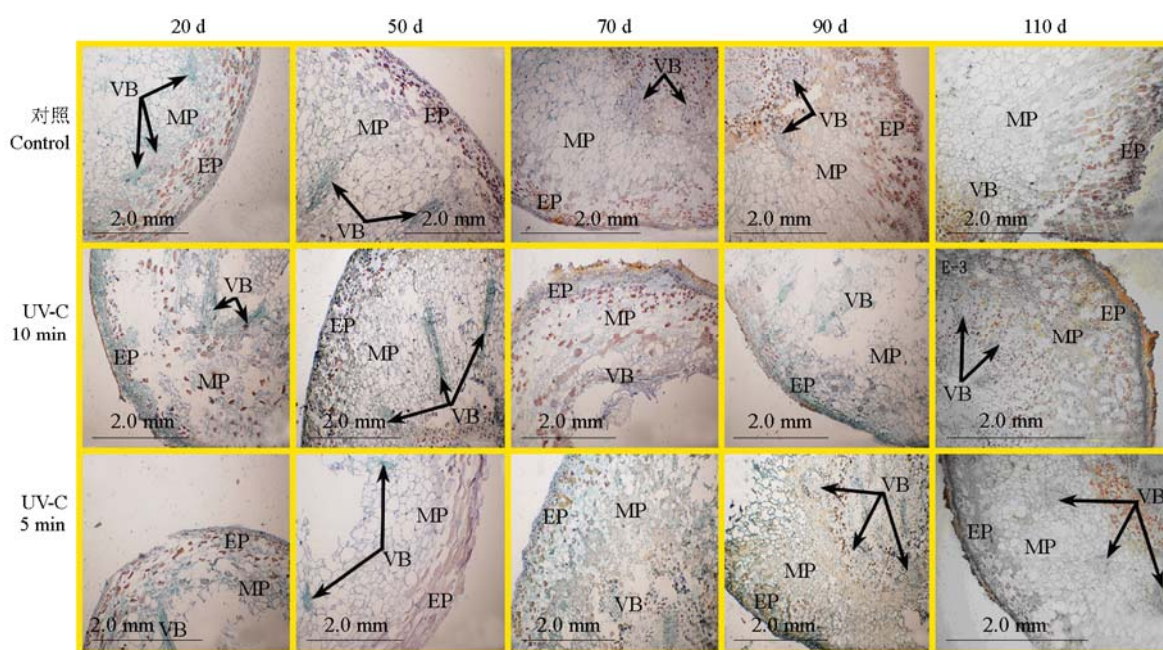


图 7 UV-C 处理对葡萄果实发育过程中 LAR2 组织定位的影响

Fig. 7 Effects of UV-C on the immunohistochemical localization of LAR2 during grape berry development

果表明, 葡萄果实中 ANS 蛋白主要分布于果皮、果肉和维管束 (Wang et al., 2010b); 二氢黄酮醇还原酶 (DFR) 同样也分布在果皮和果肉维管束 (张平, 2010), 本试验结果与之相似。这可能是由于 LAR 和 ANS、DFR 共同协作完成黄烷醇类多酚的合成, 因而具有共同的组织区划所致。

此外, 从图 6 和图 7 中可以明显看出, UV-C 照射导致葡萄果实中 LAR1 和 LAR2 信号强度明显增强, 特别是在果皮和果肉维管束中。这可能是 UV-C 照射诱导总黄烷-3-醇 (图 3) 和黄烷醇类多酚 (图 2) 在果皮和果肉积累的原因之一。

3 讨论

植物体内抗氧化物质合成和积累在植物防御反应中具有重要作用, 是植物响应环境胁迫 (Oh et al., 2009)、提高胁迫耐性的重要措施之一。多酚类物质具有极强的抗氧化能力 (Skerget et al., 2005), 能够有效地清除逆境引发的活性氧迸发 (Rodrigo et al., 2011), 且多酚类物质含量与抗氧化能力呈正相关 (Oh et al., 2009)。因而, 多酚类物质的合成和积累具有明显的逆境保护作用 (Eftekhari et al., 2012)。

前人研究表明, 紫外线能够诱导葡萄 (Pan et al., 2009; Wang et al., 2010a; 温鹏飞 等, 2012a)、苹果 (Ubi et al., 2006)、梨 (Kataoka & Beppu, 2004)、草莓 (Higashio et al., 2005) 等多酚类物质 (特别是类黄酮类物质) 的积累 (Interdonato et al., 2011)。笔者前期研究表明, 植株定期接受 UV-C 照射导致赤霞珠果实中黄烷醇类多酚含量增加, 特别是在幼果期 (花后 20 ~ 60 d), UV-C 明显促进果实中黄烷醇类多酚的积累 (温鹏飞 等, 2012a)。本试验结果表明, UV-C 照射明显促进赤霞珠葡萄果皮和果肉中总酚含量增加 (图 1)。这表明, UV-C 照射分别诱导果皮和果肉中多酚类物质的积累, 导致果实总酚含量增强。此外, 本试验首次证实, UV-C 照射对葡萄果皮和果肉中多酚类物质的诱导作用具有明显的发育阶段依赖性和器官依赖性。

黄烷醇类多酚是葡萄果实中主要的多酚类物质之一 (Girona et al., 2009; Ollé et al., 2011), 在果皮、果肉和种子中均有积累 (Ollé et al., 2011), 且果皮和种子是其主要积累部位 (Cadot et al., 2006)。相较于种子而言, 果皮中黄烷醇类多酚在葡萄酒酿造过程中更易于浸出 (Gagné et al., 2009), 因而对葡萄酒的品质具有决定性作用 (Cadot et al., 2006)。本试验首次发现: UV-C 照射诱导赤霞珠葡萄果皮和果肉中黄烷醇类多酚积累, 且这一诱导作用具有发育阶段和照射剂量依赖性。这与前人研究结果 (Interdonato et al., 2011; 温鹏飞 等, 2012a) 相似。此外, 本试验结果表明, UV-C 照射诱导的黄烷醇类多酚积累还具有器官依赖性。

总黄烷-3-醇, 不仅是黄烷醇类多酚的组成之一, 而且能够参与聚合形成寡聚体、多聚体。因而, 其含量不仅直接影响黄烷醇类多酚含量, 而且对原花色素含量具有一定的作用。本试验首次发现: UV-C 诱导葡萄果皮和果肉中总黄烷-3-醇的积累 (图 4), 却导致原花色素含量降低 (图 5)。这表明, UV-C 诱导的黄烷醇类多酚积累主要是由于总黄烷-3-醇合成、积累所致。此外, 前人研究表明, 紫外线特异性诱导黄酮醇类多酚和黄烷醇类多酚生物合成, 而可见光则诱导原花色素合成, 并对其组成具有明显作用 (Koyama et al., 2012)。因而, UV-C 照射导致原花色素含量的降低既可能由于原花色素参与体内自由基清除而消耗所致, 也可能是 UV-C 抑制合成所致。

Gagné 等 (2009) 研究表明, 赤霞珠葡萄果实发育过程中, 果皮中 LAR 酶活性在幼果期 (花后 24 d) 活性最高, 随后迅速下降; 转色后 (花后 67 d) 活性回升。本试验结果 (图 5, A) 与之相似。此外, 本试验首次发现: UV-C 照射导致果皮、果肉 LAR 酶活性明显升高, 且具有照射剂量依赖性。由于缺乏果肉的相关报道, 无法与前人研究相对比。但前人研究表明, 黄烷醇类多酚一方面可作为紫外线屏蔽物而避免组织受到伤害 (Koyama et al., 2012); 另一方面具有清除自由基的能力, 可参

与猝灭因逆境引发的体内活性氧迸发 (Rodrigo et al., 2011; Koyama et al., 2012)。因而, UV-C 照射导致果皮、果肉 LAR 酶活性增强可能是黄烷醇类多酚, 特别是总黄烷-3-醇积累的主要原因。

采用免疫组织化学定位技术, 本试验首次证实葡萄果实中 LAR1、LAR2 酶蛋白主要分布在果皮、果肉和果肉维管束中。这一结果可能与类黄酮代谢途径中的其它酶, 如 DFR (张平, 2010)、ANS (Wang et al., 2010b) 等, 具有类似的分布。因而, LAR1 和 LAR2 定位与其功能密切相关 (Pan et al., 2009)。此外, 本试验首次证实 UV-C 照射并未改变 LAR1、LAR2 组织定位分布, 但明显导致其信号强度增强 (图 6、图 7), 特别是在果皮和果肉维管束。作者前期研究表明, 干旱 (温鹏飞等, 2012b)、UV-C 照射 (温鹏飞等, 2012a) 下 LAR1 和/或 LAR2 蛋白含量增加是其 LAR 酶活性增强的主要原因。因而, UV-C 照射下 LAR1、LAR2 信号的增强是对应部位 LAR 酶活性增强的主要原因。

综上所述, UV-C 照射导致果皮和果肉中 LAR1、LAR2 酶蛋白总量增加, 从而诱导相应部位 LAR 酶活性增强, 最终导致总黄烷-3-醇和黄烷醇类多酚明显积累, 且这一诱导作用具有照射剂量、器官/组织、发育阶段依赖性。

References

- 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.
- 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.
- Castellarin S D, Matthews M A, Di Gasparo G, Gambetta G A. 2007. Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries. *Planta*, 227: 101 - 112.
- Christensen A B, Gregersen P L, Schröder J, Collinge D B. 1998. A chalcone synthase with an unusual substrate preference is expressed in barley leaves in response to UV light and pathogen attack. *Plant Mol Biol*, 37: 849 - 857.
- González-Aguilar G A, Zavaleta-Gatica R, Tiznado-Hernández M E. 2007. Improving postharvest quality of mango 'Haden' by UV-C treatment. *Postharvest Biology and Technology*, 45: 108 - 116.
- 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*, 476: 1 - 9.
- Dixon R A, Xie D Y, Sharma S B. 2005. Proanthocyanidins-a final frontier in flavonoid research? *New Phytologist*, 165: 9 - 28.
- Eftekhari M, Alizadeh M, Ebrahimi P. 2012. Evaluation of the total phenolics and quercetin content of foliage in mycorrhizal grape (*Vitis vinifera* L.) varieties and effect of postharvest drying on quercetin yield. *Industrial Crops and Products*, 38: 160 - 165.
- 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.
- Higashio H, Hirokane H, Sato F, Toduda S, Uragami A. 2005. Effect of UV irradiation after harvest on the content of flavonoids in vegetables. *Acta Horticulturae Sinica*, 682: 1007 - 1012.
- Hou Z X, Huang W D. 2005. Immunohistochemical localization of IAA and ABP1 in strawberry shoot apices during floral induction. *Planta*, 222: 678 - 687.

- Interdonato R, Rosa M, Nieva C B, González J A, Hilal M, Prado F E. 2011. Effects of low UV-B doses on the accumulation of UV-B absorbing compounds and total phenolics and carbohydrate metabolism in the peel of harvest lemons. *Environmental and Experimental Botany*, 70: 204 – 211.
- Ivanova V, Stefova M, Vojnoski B, Dornyei A, Márk L, Dimovska V, Stafilov T, Kilár F. 2011. Identification of polyphenolic compounds in red and white grape varieties grown in R. Macedonia and changes of their content during ripening. *Food Research International*, 44: 2851 – 2860.
- Kataoka L, Beppu K. 2004. UV irradiation increases development of red skin color and anthocyanins in ‘Hakuho’ peach. *HortScience*, 39: 1234 – 1237.
- 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.
- Koyama K, Ikeda H, Poudel P R, Goto-Yamamoto N. 2012. Light quality affects flavonoid biosynthesis in young berries of Cabernet Sauvignon grape. *Phytochemistry*, 78: 54 – 64.
- Leifert W R, Abeywardena M Y. 2008. Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutrition Research*, 28: 729 – 737.
- 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 B L, 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 and Biology*, 397: 1079 – 1091.
- 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.
- Mol J, Grotewold E, Koes R. 1998. How genes paint flowers and seeds. *Trends Plant Sci*, 3: 212 – 217.
- Mori K, Sugaya S, Gemma H. 2005. Decreased anthocyanins biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Scientia Horticulturae*, 105: 319 – 330.
- Oh M M, Carey E E, Rajashekar C B. 2009. Environmental stresses induce health-promoting phytochemicals in lettuce. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 578 – 583.
- 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 anthocyanins accumulation during Shiraz berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17: 90 – 100.
- Pan Q H, Wang L, Li J M. 2009. Amounts and subcellular localization of stilbene synthase in response of grape berries to UV irradiation. *Plant Science*, 176: 360 – 366.
- Peng R H, Yao Q H, Xiong A S. 2003. Ubiquitin-conjugating enzyme (E2) confers rice UV protection through phenylalanine ammonia-lyase gene promoter unit. *Acta Botanica Sinica*, 45: 1351 – 1358.
- Prasain J K, Carlson S H, Wyss J M. 2010. Flavonoids and age-related disease: Risk, benefits and critical windows. *Maturitas*, 66: 163 – 171.
- Rodrigo R, Miranda A, Vergara L. 2011. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta*, 412: 410 – 424.
- 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.
- 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.
- 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.

- Ubi B E, Honda C, Bessho H, Kondo S, Wada M, Kobayashi S, Moriguchi T. 2006. Expression analysis of anthocyanin biosynthesis genes in apple skin: Effect of UV-B and temperature. *Plant Science*, 170: 571-578.
- 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 H L, Wang W, Zhang P, Pan Q H, Zhan J C, Huang W D. 2010b. Gene transcript accumulation, tissue and subcellular localization of anthocyanidin synthase (ANS) in developing grape berries. *Plant Science*, 179: 103 - 113.
- Wang W, Tang K, Yang H R, Wen P F, Zhang P, Wang H L, Huang W D. 2010a. 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.
- 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.
- 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, 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.
- Wen Peng-fei, Xing Yan-fu, Niu Tie-quan, Gao Mei-ying, Niu Xing-yan. 2012a. Accumulation of flavanols, expression of leucoanthocyanidin reductase induced by UV-C irradiation during grape berry development. *Scientia Agricultura Sinica*, 45: 4428 - 4436. (in Chinese)
- 温鹏飞, 邢延富, 牛铁泉, 高美英, 牛兴艳. 2012a. UV-C 对葡萄果实发育过程中黄烷醇类多酚积累及隐色花色苷还原酶表达的影响. *中国农业科学*, 45: 4428 - 4436.
- Wen Peng-fei, Yang Yun-liang, Gao Mei-ying, Niu Tie-quan, Xing Yan-fu, Niu Xing-yan. 2012b. The effect of soil drought on flavanols accumulation and LAR expression during the development of grape berry. *Acta Horticulturae Sinica*, 39: 2341 - 2351. (in Chinese)
- 温鹏飞, 杨运良, 高美英, 牛铁泉, 邢延富, 牛兴艳. 2012b. 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. *园艺学报*, 39: 2341 - 2351.
- Wen Peng-fei, Zheng Hong-jia, Niu Tie-quan, Gao Mei-ying, Cang Guo-ying, Yang Yun-liang. 2011. Effects of late harvest on the polyphenols concentration in grape berry. *Journal of Shanxi Agricultural University: Natural Science Edition*, 31: 446 - 450. (in Chinese)
- 温鹏飞, 郑宏佳, 牛铁泉, 高美英, 仓国营, 杨运良. 2011. 延迟采收对葡萄果实多酚类物质含量的影响. *山西农业大学学报: 自然科学版*, 31: 446 - 450.
- Zhang Ping. 2010. Antibody preparation, localization of DFR and the effect of both low temperature and SA in grape berry [Ph. D. Dissertation]. Beijing: China Agricultural University. (in Chinese)
- 张 平. 2010. 葡萄果实二氢黄酮醇还原酶抗体制备、定位以及低温、水杨酸的影响 [博士论文]. 北京: 中国农业大学.
- 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.