

紫外光对‘北陆’越橘转色果花青苷积累、关键酶活性及其基因表达的影响

杨俊枫, 史文君, 杨 乐, 官中志, 李彬彬, 侯智霞*

(北京林业大学省部共建森林培育与保护教育部重点实验室, 蓝莓研究与发展中心, 北京 100083)

摘 要: 以3年生‘北陆’越橘为试材, 对发育过程中果实花青苷含量及合成酶活性变化进行研究, 并进一步利用3种紫外光(UV-A、UV-B、UV-C)分别照射转色期越橘果实, 测定了果实中花青苷等酚类物质的含量、生物合成酶活性及其基因表达, 从底物、酶活性、基因转录水平阐明了不同紫外光对花青苷生物合成途径的影响。3种紫外光都明显诱导了果实花青苷的积累, 特别是UV-C照射后果实花青苷含量提高了2.36倍。UV照射显著诱导果实PAL、UFGT酶活性升高, *VcPAL*、*VcUFGT*转录增强, 但同时也抑制了DFR酶活性及基因表达, 其中PAL、UFGT酶活性与花青苷的积累极显著正相关($r = 0.807^{**}$, $r = 0.894^{**}$), 而DFR酶则相反($r = -0.854^{**}$)。结果表明, UV照射能诱导丙苯氨酸途径中响应紫外处理的一些关键基因的转录激活(如*VcPAL*, *VcUFGT*)或抑制(如*VcDFR*), 并影响相应酶活性的变化, 促使花青苷等酚类物质的积累。

关键词: 越橘; 转色期果实; 紫外光; 花青苷; 酚类物质; 酶活性; 基因表达

中图分类号: S 663

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2016) 04-0663-11

Effects of UV Irradiation on Accumulation of Anthocyanins and the Activity, Expression of Key Enzyme in Veraison ‘Northland’ Blueberry

YANG Jun-feng, SHI Wen-jun, YANG Le, GONG Zhong-zhi, LI Bin-bin, and HOU Zhi-xia*

(Key Laboratory for Silviculture and Conservation Attached to China Ministry of Education, Blueberry Research and Development Center, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: This experiment was based on the changes between the content of anthocyanins and the activities of biosynthetic enzymes in blueberry during the development, which aimed at further testing accumulations of anthocyanins and other phenolic compounds in blueberry and the enzyme activities, transcriptional level of anthocyanin biosynthetic gene under the environmental stimulus of UV-A, UV-B, UV-C with the veraison fruit of 3-year old blueberry ‘Northland’. The results indicated that three types of UV irradiation both significantly induced the accumulation of anthocyanins in blueberry, especially UV-C, increased by 236% after irradiation. In addition, the activities of PAL, UFGT and the expression of *VcPAL*, *VcUFGT* mRNA were induced by UV irradiation, but the enzyme activity, transcriptional level of *VcDFR* were suppressed. Among them, PAL, UFGT enzyme activities were significantly positively

收稿日期: 2016-01-13; 修回日期: 2016-04-14

基金项目: 中央高校基本科研业务专项资金项目(YX2013-12)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: hzx2004@163.com)

correlated with the accumulation of anthocyanin ($r = 0.807^{**}$, $r = 0.894^{**}$), while DFR was the opposite ($r = -0.854^{**}$). The results suggest that UV irradiation can induced some key genes, which responded to UV treatment, transcriptional enhancement (such as *VcPAL*, *VcUFGT*) or inhibition (such as *VcDFR*), and affected the changes of the corresponding enzyme activities, which resulted in the accumulation of anthocyanin and other phenolic compounds.

Key words: blueberry; anthocyanin; UV; veraison fruit; phenolic compound; enzyme activity; gene expression

越橘 (*Vaccinium* spp.) 又名蓝莓, 果实富含对健康有益的酚类化合物, 尤其是花青苷 (Ronald et al., 2001), 能清除氧化性物质 (Wang & Jiao, 2000)。相关研究证明, 苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、查尔酮异构酶 (CHI)、二氢黄酮醇还原酶 (DFR) 和类黄酮糖基转移酶 (UFGT) 与花青苷的合成密切相关 (Murray & Hackett, 1991; Lister & Lancaster, 1996), 但不同酶在不同植物花青苷合成过程中的作用研究报道不尽一致。冯守千等 (2008) 在红色砂梨中发现 PAL 不是花青苷合成的关键酶, CHI 与着色期砂梨花青苷含量关系密切。而刘金等 (2012) 认为高活性的 PAL 和 CHI 与早熟苹果早期花青苷的合成有关, 而且为成熟期花青苷的合成准备了充足的前体物质。刘晓静等 (2009) 对苹果的研究发现, 红色芽变花青苷合成能力的增强主要是由于其果皮中 CHI 和 DFR 活性的提高, 而与 PAL 和 UFGT 关系不大。王慧聪等 (2004) 在荔枝中的研究表明这 4 种酶中只有 UFGT 活性与花青苷合成密切相关。由于果实中花青苷的积累主要从着色期开始, 所以现在对花青苷合成相关酶的研究多集中于果实着色过程。在多种植物中, 一定的光照和不同类型的紫外光 (UV) 能够增加类黄酮物质的含量, 影响类黄酮物质的组成 (Li et al., 2009; 温鹏飞 等, 2012)。花青苷是一种紫外吸收物质, 增加 UV 照射能够诱导花青苷的生成 (Jia & Wang, 2010; Zhang et al., 2012)。UV 照射苦荞 [*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.] 后, 矢车菊素-3-O-芸香糖苷占总花青苷中的比例有所升高, 说明这种花青苷单体很可能具有抵御紫外辐射的作用 (Eguchi & Sato, 2009)。在 '杜克' 越橘中 (Chau et al., 2014), UV-B 和 UV-C 照射都能显著诱导果实中花青苷的积累。另外有研究表明, 着色期是 UV 诱导葡萄果实花青苷积累的重要时期 (Zhang et al., 2013b)。而在梨中的研究则证实果实商业成熟期 10 d 前是 UV 诱导花青苷以及其他品质特征最适宜的时期 (Zhang et al., 2013a)。目前, 大多数 UV 在越橘上的研究主要集中在成熟果实抗氧化能力与酚类物质含量的诱导提高 (Wang et al., 2009; Eichholz et al., 2011; 杨乐 等, 2015a), 而 UV 照射对越橘果实中花青苷积累及相关酶活性变化的研究尚未见报道, 更未涉及相关基因转录水平的研究。

本试验中以 '北陆' 越橘为试材, 以 4 种花青苷合成关键酶 (PAL、CHI、DFR、UFGT) 为切入点, 用高效液相色谱法、分光光度计法、荧光定量 PCR 法检测了越橘果实发育过程中和紫外处理转色期果实中花青苷的积累、相关酶活性及其基因表达的情况, 旨在揭示越橘果实中花青苷的合成规律以及 3 种紫外光处理诱导花青苷等酚类物质积累的不同调控机制, 同时为生产实践中利用紫外光处理增加植物花青苷的含量提供一定的理论基础。

1 材料与方 法

1.1 试材及处理

3 年生半高丛 '北陆' 越橘定植于北京凤凰岭越橘基地。试验于 2015 年 5—6 月进行, 分别于

盛花期后 20、30、40、50、60 和 70 d 随机采摘大小均一生长状态良好的不同发育时期（幼果期、青果期、初转色期、转色期、紫果期、成熟期）的果实各 300 g（图 1），用于总酚、类黄酮和花青苷含量及相关酶活性的测定。

采摘 1 000 g 盛花后 50 d（转色期）的果实进行紫外处理。试验共设 4 个处理：不进行紫外照射（对照），UV-A（365 nm）、UV-B（305 nm）和 UV-C（254 nm）均照射 10 min。3 种紫外灯均使用 40 W 的灯管（北京电光源研究所），总辐射强度为 $2.76 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2}$ 。果实一字排列于聚丙烯托盘内。紫外灯管距果实 30 cm 处照射，且每隔 1 min 翻一面。处理后避光贮存于人工气候箱（23 °C，RH 95%），24 h 后取样。上述样品经液氮研磨速冻，-80 °C 保存备用。以上每组处理均重复 3 次，各 100 个果实，约 80 g。

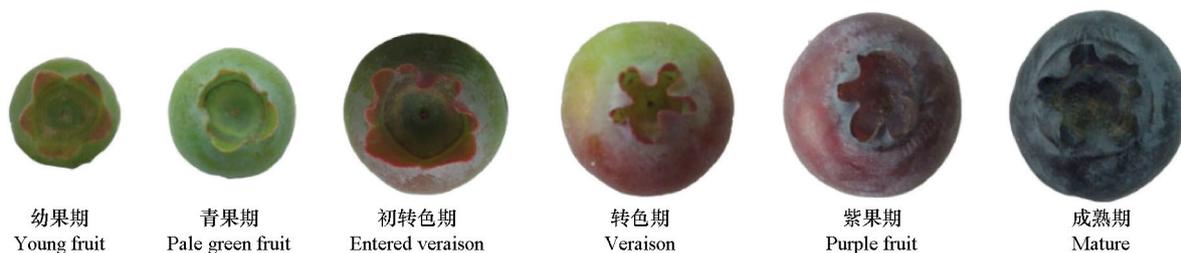


图 1 不同发育时期越橘果实
Fig. 1 Blueberry fruits at different maturity stages

1.2 总酚、类黄酮、花青苷含量测定

总酚和类黄酮的提取参照杨乐等（2015a）的方法。花青苷的提取和检测参照林西（2013）的 HPLC 方法略作改动，取 1 g 冷冻粉末加入 10 mL 60% 的甲醇水（pH 2.5）中，80 °C 水浴提取 40 min，然后 $13\ 000 \times g$ 离心 15 min，收集上清液待测。采用安捷伦 1260 仪器测定，Zorbax SB C-18 柱（250 mm \times 4.6 mm），检测波长为 520 nm，样品注入体积为 25 μL ，柱温 35 °C，流速为 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。液相色谱流动相 A：5% 甲酸水（体积比），流动相 B：乙腈。洗脱程序：0 min，10% B；10 min，20% B；15 min，20% B；25 min，50% B；30 min，60% B。以矢车菊素-3-O-葡萄糖苷（sigma）为标准品测定花青苷的含量。

1.3 花青苷合成相关酶活性测定

PAL 和 CHI 酶液的提取和测定参照杨乐等（2015a）的方法：取 0.5 g 冷冻粉末，加入 5 mL 磷酸缓冲液 [$0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.0)， $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗坏血酸钠， $0.018 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \beta$ -巯基乙醇]，4 °C 下 $12\ 000 \times g$ 离心 30 min，上清液即为酶粗提液。DFR 和 UFGT 酶液的提取参照 Murray 和 Hackett（1991）的方法，取 1 g 冷冻粉末，加入 6 mL 提取缓冲液（ $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 8.8 的硼酸缓冲液，含 $0.005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \beta$ -巯基乙醇， $0.001 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA， $0.001 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT 及 10% PVPP）提取，4 °C 下 $12\ 000 \times g$ 离心 30 min，上清液用于 DFR 和 UFGT 的活性测定。DFR 活性的测定参照 Stafford 和 Lester（1982）等的方法，UFGT 活性的测定参照 Lister 和 Lancaster（1996）的方法。

1.4 实时定量 RT-PCR

按照 RNA 提取试剂盒（华越洋，北京）说明书提取越橘总 RNA，通过琼脂糖凝胶电泳检测其完整性，并用 Thermo Scientific（ND-2000）检测 RNA 浓度和纯度，选择 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值在 1.8 ~ 2.0

之间的RNA。利用Primescript RT Reagent Kit (TaKaRa, 大连)进行反转录,稀释20倍,保存于-20℃备用。用软件primer 5.0设计引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表1)。荧光定量PCR仪器为StepOnePlus Real Time system (Applied Biosystem)。反应体系和程序按照SYBR PrimeScript™ RT-PCR Kit (TaKaRa, 大连)试剂盒进行。PCR扩增程序为95℃预变性30s;95℃5s,60℃30s,95℃15s,40个循环;最后95℃变性15s,退火至60℃后保温1min,检测其荧光值,绘制熔解曲线。试验以*VcGAPDH* (Zifkin et al., 2012)为内参基因,重复4次,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算出基因的相对表达量。

所有试验数据用SPSS 20.0分析,采用邓肯氏法比较各处理间的差异显著性,用皮尔森相关系数法分析各指标间相关性。

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

基因 Gene	正向引物/反向引物 (5'-3') Forward primer/reverse primer	扩增子长度/bp Amplicon length	参考文献 Reference
<i>VcPAL</i>	AGTGCACGTACCCACTTATG/ TCTCGCGCTCTCAACTTCTTT	165	
<i>VcCHI</i>	AGTGAAGGGTAAATCAGGAAAGG/ TTATCATCCGACGCCAATCG	129	
<i>VcDFR</i>	CACTGAGTTTAAGGGGATCCTAAGG/ CCCTTCTCCCTACAAGTGCAATGG	138	Zifkin et al., 2012
<i>VcUFGT</i>	AGTTTGCTTTGAAGGCTGTTG/ ATGTGCTGGTGTGCATTG	147	Zifkin et al., 2012
<i>VcGAPDH</i>	GGTTATCAATGATAGTTTGGCA/ CAGTCCTTGCTTGATGGAC	102	Zifkin et al., 2012

2 结果与分析

2.1 ‘北陆’越橘果实发育过程中花青苷积累、关键酶活性的变化

2.1.1 花青苷、总酚、类黄酮含量

随着果实成熟,花青苷含量呈上升趋势。在果实转色(花后40d)之前花青苷含量一直很低,随着果实开始转色,含量逐渐升高,成熟期(花后70d)时达到 $3.437 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$,是紫果期(花后60d)的4倍(图2)。由此可见,‘北陆’花青苷积累的主要阶段在果实发育后期。

如图2所示,‘北陆’果实生长发育过程中,总酚和类黄酮主要在果实发育前期积累。总酚含量随果实的生长发育先下降后有所上升,进入转色期(花后50d)总酚含量下降至最低,仅为初期的47.70%,之后有所上升。类黄酮含量随果实的生长发育呈下降趋势。果实发育初期类黄酮的含量缓慢下降,30~40d内含量急剧下降,进入转色期后下降较为平缓。

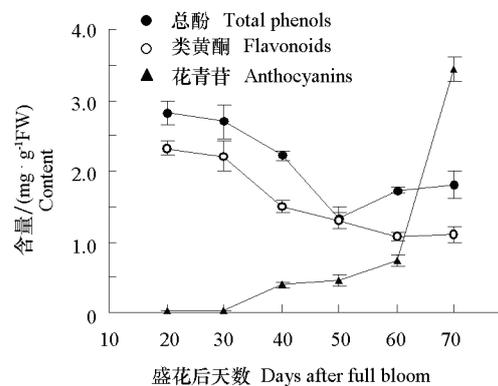


图2 ‘北陆’越橘果实发育过程中总酚、类黄酮和花青苷含量的积累

Fig. 2 Total phenolic, flavonoids, anthocyanin accumulation during ‘Northland’ blueberry fruit development

2.1.2 花青苷合成相关酶活性

由图 3 可以得知, PAL、CHI 酶活性(上游合成酶)与 DFR、UFGT 酶活性(下游合成酶)的变化规律相反: PAL、CHI 在果实发育前期活性高, 后期相对较低; 而 DFR、UFGT 酶活性在果实发育后期较高, 前期较低。

PAL 活性随果实的生长发育基本呈下降趋势, 转色前(花后 20~40 d) PAL 酶活性下降较为迅速。CHI 活性随果实的生长发育呈先下降后上升的趋势, 转色前(花后 20~40 d)果实内 CHI 酶活性下降迅速, 果实进入转色后 CHI 酶活性缓慢增加。DFR 酶活性随果实的生长发育呈先降后升趋势, 在转色期(花后 40 d)之前, 活性下降了 82.52%, 随着果实开始转色, DFR 酶活性急剧上升, 果实成熟期比幼果期升高了近 2 倍。而 UFGT 酶活性随着果实生长发育逐渐上升, 花后 60~70 d UFGT 酶活性急剧上升, 果实成熟期比幼果期增加了近 35 倍。

2.1.3 花青苷、总酚、类黄酮含量与 PAL、CHI、DFR、UFGT 酶活性的相关性分析

结果(表 2)表明, 果实自然发育过程中, 苯丙氨酸途径上游合成酶(PAL、CHI)与总酚合成呈正显著相关, 与花青苷合成呈负相关; 而下游合成酶(DFR、UFGT)则与花青苷合成呈正显著相关, 与总酚类黄酮合成呈负相关。由此说明, DFR 和 UFGT 在自然状态下对花青苷的合成起到关键作用。

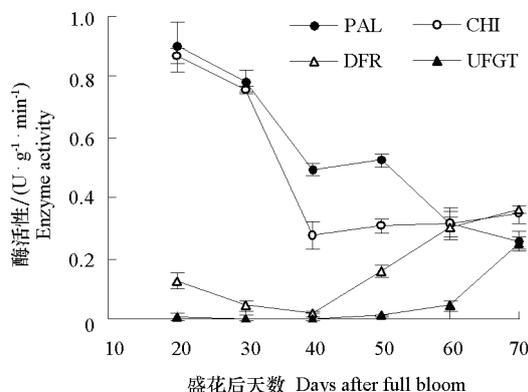


图 3 ‘北陆’越橘果实中 PAL、CHI、DFR 和 UFGT 酶活性的变化

Fig. 3 Enzyme activities change of PAL, CHI, DFR and UFGT in ‘Northland’ blueberry

表 2 花青苷等酚类物质含量与酶活性的相关性分析
 Table 2 Correlation of anthocyanin and other phenolic compound content with enzyme activity in blueberry

酶 Enzyme	总酚 Total phenolic	类黄酮 Flavonoid	花青苷 Anthocyanin
PAL	0.600*	0.886**	-0.943**
CHI	0.657*	0.486	-0.429
DFR	-0.543	-0.714**	0.771**
UFGT	-0.600*	-0.771**	0.829**

注: *为 0.05 显著水平, **为 0.01 极显著水平。

Note: * indicate significance at the 5% level, ** indicate significance at the 1% level.

2.2 UV-A、UV-B、UV-C 对转色期‘北陆’越橘果实花青苷积累、关键酶活性及其基因表达的影响

2.2.1 果实总酚、类黄酮、花青苷含量

如图 4 所示, 3 种紫外光处理都能显著增加转色期蓝果实中总酚和花青苷的含量 ($P < 0.05$); 除 UV-C 照射外, UV-A 和 UV-B 照射后类黄酮含量都有略微下降。

3 种紫外光对转色期果实中总酚、类黄酮、花青苷的诱导作用都有紫外波长相关性, 大都随着紫外光波长的减少, 诱导效果越明显(除 UV-B 对花青苷), 其中 UV-C 照射诱导转色期果实酚类物质积累最显著, 其总酚、类黄酮和花青苷的含量分别为对照的 1.50、1.33、3.36 倍(图 4)。总体来说, 花青苷在转色果中受到紫外照射后增加幅度相对于总酚、类黄酮增幅大。

2.2.2 果实 PAL、CHI、DFR、UFGT 酶活性

如图 5 所示, 转色期果实中除了 DFR 酶活性在 UV 照射后受到抑制外, PAL、CHI、UFGT 酶活性都受到了明显的促进作用, UFGT 酶活性增加幅度最大, 分别增加了 1.59、1.47、2.24 倍; PAL

增加了 50%左右; CHI 酶活性随着紫外波长的递减, 诱导效果也逐渐下降; DFR 酶活性除了没有受 UV-B 影响外, UV-A 和 UV-C 对其造成了明显的抑制作用 (图 5)。

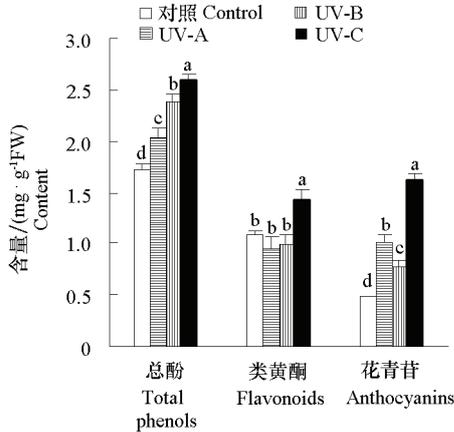


图 4 UV 照射对‘北陆’越橘总酚、类黄酮和花青苷含量的影响

Fig. 4 Effect of UV irradiation on the content of total phenolic, flavonoid and anthocyanin in 'Northland' blueberry
 $P < 0.05$.

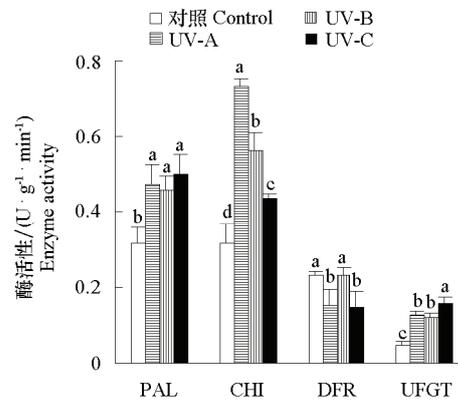


图 5 UV 照射对‘北陆’越橘 PAL、CHI、DFR 和 UFGT 酶活性的影响

Fig. 5 Effect of UV irradiation on the PAL, CHI, DFR and UFGT activities in 'Northland' blueberry
 $P < 0.05$.

2.2.3 果实中 *VcPAL*、*VcCHI*、*VcDFR*、*VcUFGT* 的表达

3 种紫外光不同程度地影响了转色期果实中花青苷合成关键酶基因的表达 (图 6)。UV-A 和 UV-B 处理后, *VcPAL* 的表达起到了明显的上调作用, 而 UV-C 则起抑制作用; *VcCHI* 表达量变化不大, 说明它对紫外照射响应不敏感; *VcDFR* 的表达则是受到了明显的负调控; *VcUFGT* 的表达显著上调。其中, *VcUFGT* 对 3 种紫外光的响应模式与花青苷的响应模式相一致: UV-C > UV-A > UV-B (图 4), 说明 *VcUFGT* 很可能是花青苷途径中响应紫外处理的关键基因。

2.2.4 紫外光处理对果实花青苷含量、酶活性及基因表达相关性的影响

如表 3 所示, 紫外光照射后, 果实中 *VcPAL* 基因表达与 PAL 酶活性相关不显著。但 PAL 酶活性变化与花青苷含量变化呈极显著正相关 ($r = 0.807^{**}$); 而 *VcCHI* 基因表达及酶活性在紫外照射后都与花青苷积累相关不显著。*VcDFR* 和 *VcUFGT* 基因表达与酶活性受到 UV 诱导后的变化趋势一致 ($r = 0.764^{**}$, 0.954^{**}), 且都分别与花青苷含量变化显著相关。也就是说, 紫外光诱导了丙苯氨酸途径中响应紫外处理的一些关键基因的上调 (如 *VcPAL*、*VcUFGT*) 或下调 (如 *VcDFR*), 并影

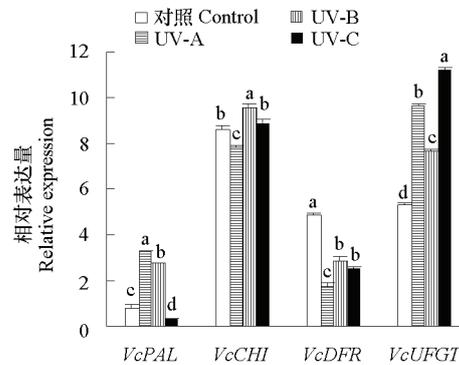


图 6 UV 照射对越橘 *VcPAL*、*VcCHI*、*VcDFR* 和 *VcUFGT* 表达的影响

Fig. 6 Effect of UV irradiation on the *VcPAL*, *VcCHI*, *VcDFR* and *VcUFGT* expression in 'Northland' blueberry
 $P < 0.05$.

响相应酶活性的变化, 进而调控途径中相关类黄酮产物(如花青苷)的合成(图4~图6)。

表3 花青苷含量与酶活性, 基因表达量的相关性分析
 Table 3 Correlation of anthocyanin content with enzyme activity, gene expression in blueberry

酶及其基因 Enzyme and gene	花青苷 Anthocyanin	<i>VcPAL</i>	<i>VcCHI</i>	<i>VcDFR</i>	<i>VcUFGT</i>
PAL	0.807**	0.293	0.034	-0.936**	0.920**
CHI	0.177	0.878**	-0.374	-0.853**	0.462
DFR	-0.854**	0.025	0.549	0.764**	-0.911**
UFGT	0.894**	0.112	0.081	-0.871**	0.954**
<i>VcPAL</i>	-0.292	1.000	-0.200	-0.523	0
<i>VcCHI</i>	-0.053	-0.200	1.000	0.255	-0.173
<i>VcDFR</i>	-0.661*	-0.523	0.255	1.000	-0.852**
<i>VcUFGT</i>	0.955**	0.000	-0.173	-0.852**	1.000

注: *为 0.05 显著水平, **为 0.01 极显著水平。

Note: * indicate significance at the 5% level, ** indicate significance at the 1% level.

3 讨论

3.1 ‘北陆’越橘果实发育过程中花青苷等酚类物质的积累与相关酶活性之间的关系

‘北陆’花青苷的合成规律和其它越橘品种类似(华星等, 2012; Zifkin et al., 2012), 在果实发育的前期很低, 从转色期开始逐渐积累。而总酚、类黄酮的合成模式则与花青苷相反, 主要在果实发育前期积累。PAL 是花青苷、酚类和类黄酮合成的一种控制酶, 许多报道(宋哲等, 2008; 邓科等, 2011)认为 PAL 是花青苷合成的关键酶; 但在红色砂梨(冯守千等, 2008)和荔枝果皮(王慧聪等, 2004)中的研究则表明果实发育过程中花青苷含量增加的同时 PAL 活性反而下降。本研究结果表明, 越橘果实发育过程中 PAL 活性变化与花青苷积累变化规律相反。然而, PAL 活性与类黄酮和总酚含量的变化呈显著正相关。这说明, PAL 酶催化的反应不仅为花青苷合成提供了前体, 也为其他酚类物质的合成提供了前体。与 PAL 相似, 越橘中 CHI 酶活性也是在果实发育前期较高, 果实花青苷合成的中后期活性较低, 因此 CHI 酶活性与总酚呈显著正相关, 与花青苷相关性不显著。由此表明: CHI 与 PAL 一起参与了越橘中酚类物质的合成, 但与花青苷的合成没有密切联系。

DFR 是催化二氢槲皮素转化为无色花青素的酶, DFR 活性的缺乏是花青苷积累的限制因素(Murray & Hackett, 1991)。王庆菊等(2008)对紫叶稠李叶片中花青苷及其合成相关酶动态的研究认为, 随着 DFR 酶活性的升高, 花青苷的含量增加, DFR 对花青苷的合成可能起到启动作用。本研究也有类似结果, 从转色期开始, 果实中 DFR 酶活性增高, 此时花青苷也随之开始大量积累, 它们之间呈显著正相关, 说明 DFR 可能在转色期启动了花青苷的合成。UFGT 是花青苷合成途径的最后 1 个酶, 它催化不稳定的花青素转变为稳定的花青苷。本研究中, 花青苷在果实发育前期含量很低, 转色后含量逐渐上升并与 UFGT 活性变化相吻合, 进入成熟期后花青苷的含量伴随着 UFGT 活性的急剧上升而大量增加。这说明在自然状态下越橘果实中花青苷的合成与 UFGT 密切相关。这与在苹果(刘金等, 2012)和荔枝(王慧聪等, 2004)上的研究结果相似, 说明 UFGT 是果实发育过程中调控花青苷合成的一个关键酶。

3.2 紫外光处理对转色期‘北陆’越橘果实花青苷含量、酶活性、基因表达的影响

大量研究证实, 紫外光能够诱导葡萄(温鹏飞等, 2012)、苹果(Solovchenko & Schmitz-Eiberger,

2003)、梨 (Zhang et al., 2013a)、草莓 (Severo et al., 2015) 中多酚类物质, 特别是花青苷的积累。杨乐等 (2015b) 发现, 不同发育时期越橘果实在受到 UV-B 照射后花青苷含量都有提升, 特别是在转色期增幅较大。本研究也有类似结果, 3 种 UV 照射都明显地促进了转色期果中花青苷的积累。此外, UV 照射 10 min ($2.76 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2}$) 使越橘果实发生明显的外观改变, 其中 UV-B 和 UV-C 处理后颜色变深。上述结果表明, 本研究所采用的 UV 照射能有效地诱导越橘果实产生积极的响应。

本试验结果表明, 3 种紫外光照射不同程度地诱导了苯丙氨酸途径中一些结构基因的转录表达, 并影响了相应酶活性的变化, 进而促使花青苷等黄酮类物质的积累, 并且这种诱导作用具有结构基因相关性, 紫外光波长相关性。其中, *VcPAL* (除 UV-C 外) 和 *VcUFGT* 在紫外照射后转录水平明显上调, 相应的 PAL 和 UFGT 酶活性也有较大幅度的提升, 并且与花青苷的积累密切相关 ($r = 0.807^{**}$, $r = 0.894^{**}$), 这表明 *VcPAL* 和 *VcUFGT* 很可能是越橘花青苷途径中响应紫外照射的关键基因。其他果实中也有类似结果, UV-C 处理诱导枳果中 PAL 活性增加 (González-Aguilar et al., 2007)。苹果中 UV-B 和低温共同诱导了花青苷合成基因的表达, 尤其是 *pUFGluT*, 最终促使花青苷的合成 (Ubi et al., 2006)。Zhang 等 (2013c) 提出, 成熟葡萄受到 UV 照射后果实中 *VvUFGT* 的表达大量激活, 导致碳源由原花青素合成流向花青苷合成。此外, 本研究中 *VcCHI* 的表达并没有受到紫外光明显的激活或者抑制作用, 而 CHI 的酶活性却受到了较大幅度的提升, 它的活性与花青苷的含量变化不一致, 说明 CHI 不是越橘花青苷合成的关键酶, 它可能参与了苯丙氨酸途径其它酚类物质的诱导合成。而对于 *VcDFR*, 紫外照射后基因表达和相应酶活性都受到了明显的抑制, 并与花青苷合成呈显著负相关, 与自然状态下 DFR 与花青苷的合成呈极显著正相关相反。这可能由于 DFR 催化的花青苷生物合成与 FLS (黄酮醇合成酶) 催化的黄酮醇生物合成共享同一底物 (二氢槲皮素)。转色期, 自然状态下果实主要进行花青苷的合成, 而紫外照射后可能使黄酮醇的合成也受到了诱导, 导致二氢槲皮素流向了黄酮醇合成途径, 因而 DFR 酶活性和基因表达受到了一定程度的抑制。越橘中的研究表明果实中含量最多的酚类物质是黄酮醇, 并且 UV 照射可能诱导了果实中黄酮醇的积累 (Penelope et al., 2008)。Solovchenko 和 Schmitz-Eiberger (2003) 指出苹果中对 UV-B 起保护作用的黄酮类物质主要是黄酮醇, 而不是花青苷。正因为 UV 处理有可能诱导了果实中其他酚类物质的大量积累, 而 PAL 作为这些酚类物质共同合成催化酶, 其活性必然得到显著增强。华星等 (2012) 的研究表明, 只有在缺乏合成花青苷前体的情况下, PAL 酶才是花青苷合成的关键酶。本研究中, UV 处理可能诱导了果实中黄酮醇的合成, 从而使花青苷合成前体二氢槲皮素受到了抑制, 此时 PAL 酶活性变化与花青苷合成呈极显著正相关 ($r = 0.807^{**}$), 这与自然状态下 (合成前体充足) 果实中 PAL 酶与花青苷合成规律相反 ($r = -0.943^{**}$)。以上结果表明, PAL 酶在 UV 照射下可能对花青苷的诱导起到了关键作用。

3 种紫外光对花青苷合成相关酶活性及基因表达的影响各不相同, 但综合作用到越橘果实花青苷等酚类物质的积累, 诱导效果最显著的是 UV-C。而总酚和类黄酮的积累也是随着紫外光波长的递减, 含量递增。前人研究也有类似结果: 在 '杜克' 越橘中, UV-C 和 UV-B 照射对花青苷及总酚的诱导效果显著, 而 UV-A 照射后其含量的变化与对照相似 (Chau et al., 2014)。在葡萄的研究中, 不同紫外光照射对黄烷-3-醇合成基因的诱导, 是随着紫外光波长的递减表达量递增 (Zhang et al., 2013c)。这可能是由于臭氧层对紫外光的吸收, UV-A (全部) 和 UV-B (部分) 能照射到地球表面, 植物已对 UV-A、UV-B 辐射产生了适应, 当给予一定剂量的 UV-A、UV-B 和 UV-C 照射时, 植物对 UV-C 辐射更敏感, 从而触发相应的保护机制, 产生更多花青苷等紫外吸收物质。

本研究中不同的酶及基因对紫外波长有区别性反应, 说明 3 种紫外光增加花青苷合成的代谢机

制并不完全相同。现在普遍认为存在着 3 种光受体, 一是吸收红光/远红光的光敏色素; 二是吸收蓝光和 UV-A 的隐花色素和向光素; 三是最近发现的响应 UV-B 的 UVR 8 受体 (Chen et al., 2004; Wu et al., 2012)。Brown 等 (2005) 发现拟南芥 UVR 8-1 突变体中, UV-B 诱导的 *CHS* 基因表达受到抑制; 而用 UV-A、远红光处理 UVR 8-1 突变体, *CHS* 基因均能够正常表达。齐艳等 (2014) 研究也表明光受体的不同, 可能导致了同一品种甘蓝在 UV-A 和 UV-B 处理后花青素积累效果的不同。Stracke 等 (2010) 指出, UV-B 照射可以通过诱导 UVR 8 受体与 E 3 泛素连接酶 COP 1 结合, 从而促进类黄酮合成的转录因子 *MYB 12* 和 *MYB 111* 基因的转录表达。Maier 等 (2013) 也指出, 光可能通过光受体信号传递调控 *MYB* 转录因子, 进而调控结构基因的表达, 最终影响苹果中花青苷的合成。因此, 在本研究中 3 种紫外光可能通过作用于其各自的光受体, 进而激活 *MYB* 转录因子来调控相应的结构基因 (*VcPAL*、*VcUFGT*) 的表达。另外, 本试验中 UV 照射对 4 种酶活性的诱导程度整体要比其酶基因的表达量高, 这可能是由于 UV 照射后, 越橘果实随着储存时间的延长, 基因的表达量逐渐回到起始水平甚至更低, 而其酶活性由于蛋白质半衰期较长而在相当长时期内维持稳定。

综上, 3 种 UV 照射都能显著诱导越橘中花青苷等酚类物质的合成。这种诱导作用具有结构基因相关性, 紫外光波长相关性。其中 PAL 和 UFGT 在紫外诱导下对花青苷的积累起到了关键作用; UV-C 对花青苷等酚类物质的积累效果最明显。本研究可为生产实践中利用紫外光处理增加植物花青苷的含量提供一定的理论依据。

References

- Brown B A, Cloix C, Jiang G H, Kaiserli E, Herzyk P, Kliebenstein D J, Jenkins G I. 2005. A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (50): 18225 - 18230.
- Chau T N, Kim J, Yoo K S, Lim S, Lee E J. 2014. Effect of prestorage UV-A, -B, and -C radiation on fruit quality and anthocyanin of ‘Duke’ blueberries during cold storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (50): 12144 - 12151.
- Chen M, Chory J, Fankhauser C. 2004. Light signal transduction in higher plants. *Annu Rev Genet*, 38: 87 - 117.
- Deng Ke, Kong Wei-fu, Zhan Ji-cheng, Wang Xiu-qing, Huang Wei-dong. 2011. The study on increasing activity of phenylalanine ammonia-lyase and phenols accumulation induced by sugar in peach fruit. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 27 (25): 162 - 167. (in Chinese)
- 邓 科, 孔维府, 战吉成, 王秀芹, 黄卫东. 2011. 糖诱导桃果实园片果实苯丙氨酸解氨酶活性上升和酚类物质积累的研究. *中国农学通报*, 27 (25): 162 - 167.
- Eguchi K, Sato T. 2009. Differences in the ratios of cyanidin-3-*O*-glucoside and cyanidin-3-*O*-rutinocide to total anthocyanin under UV and non-UV conditions in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Garten). *Plant Production Science*, 12 (2): 150 - 155.
- Eichholz I, Keil S, Keller A, Ulrich D, Lothar W K, Rohn S. 2011. UV-B-induced changes of volatile metabolites and phenolic compounds in blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food Chemistry*, 126 (1): 60 - 64.
- Feng Shou-qian, Chen Xue-sen, Zhang Chun-yu, Liu Xiao-jing, Liu Zun-chun, Wang Hai-bo, Wang Yan-ling, Zhou Chao-hua. 2008. A study of the relationship between anthocyanin biosynthesis and related enzymes activity in *Pyrus pyrifolia* ‘Mantianhong’ and its bud sports ‘Aoguan’. *Scientia Agricultura Sinica*, 41 (10): 3184 - 3190. (in Chinese)
- 冯守千, 陈学森, 张春雨, 刘晓静, 刘遵春, 王海波, 王延玲, 周朝华. 2008. 砂梨品种‘满天红’及其芽变品系‘奥冠’花青苷合成与相关酶活性研究. *中国农业科学*, 41 (10): 3184 - 3190.
- 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 (1): 108 - 116.
- Hua Xing, Hou Zhi-xia, Su Shu-chai. 2012. Characteristics of major fruit qualities development in blueberry. *Nonwood Forest Research*, 30 (1): 108 - 113. (in Chinese)
- 华 星, 侯智霞, 苏淑钗. 2012. 蓝莓果实关键品质的形成特性. *经济林研究*, 30 (1): 108 - 113.

- Jia G, Wang M-H. 2010. Ultraviolet A-specific induction of anthocyanin biosynthesis and PAL expression in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Growth Regulation*, 62 (1): 1 - 8.
- Li X D, Wu B H, Wang L J, Zheng X B, Yan S T, Li S H. 2009. Changes in trans-resveratrol and other phenolic compounds in grape skin and seeds under low temperature storage after post-harvest UV-irradiation. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 84 (2): 113 - 118.
- Lin Xi. 2013. Study on the process of blueberry powder and blueberry chemical composition, mainly in anthocyanin [M. D. Dissertation]. Beijing: Beijing Forestry University. (in Chinese)
- 林 西. 2013. 蓝莓果干粉制备工艺和以花青素为主的化学组分研究[硕士论文]. 北京: 北京林业大学.
- Lister C E, Lancaster J E. 1996. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity and its relationship to anthocyanin and flavonoid levels in New Zealand-grown apple cultivars. *Journal of the American Society for Horticulture Science*, 121 (2): 281 - 285.
- Liu Jin, Wei Jing-li, Liu Mei-yan, Song Yang, Feng Shou-qian, Wang Chuan-zeng, Chen Xue-sen. 2012. The relationships between the enzyme activity of anthocyanin biosynthesis, ethylene release and anthocyanin accumulation in fruits of precocious apple cultivars. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (7): 1235 - 1242. (in Chinese)
- 刘 金, 魏景立, 刘美艳, 宋 杨, 冯守千, 王传增, 陈学森. 2012. 早熟苹果花青苷积累与其相关酶活性及乙烯生成之间的关系. *园艺学报*, 39 (7): 1235 - 1242.
- Liu Xiao-jing, Feng Bao-chun, Feng Shou-qian, Wang Hai-bo, Shi Jun, Wang Na, Chen Wei-yi, Chen Xue-sen. 2009. Studies on anthocyanin biosynthesis and activities of related enzymes of 'Ralls' and its bud mutation. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (9): 1249 - 1254. (in Chinese)
- 刘晓静, 冯宝春, 冯守千, 王海波, 石 俊, 王 娜, 陈为一, 陈学森. 2009. '国光' 苹果及其红色芽变花青苷合成与相关酶活性的研究. *园艺学报*, 36 (9): 1249 - 1254.
- Maier A, Schrader A, Kokkelink L, Falke C, Welter B, Iniesto E, Rubio V, Uhrig J F, Hülskamp M, Hoecker U. 2013. Light and the E3 ubiquitin ligase COP1/SPA control the protein stability of the MYB transcription factors PAP1 and PAP2 involved in anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 74 (4): 638 - 651.
- Murray J R, Hackett W P. 1991. Dihydroflavonol reductase activity in relation to differential anthocyanin accumulation in juvenile and mature phase *Hedera helix* L. *Plant Physiology*, 97 (1): 343 - 351.
- Penelope P V, Julie K C, Luke H. 2008. Blueberry fruit response to postharvest application of ultraviolet radiation. *Postharvest Biology and Technology*, 47 (3): 28.
- Qi Yan, Xie Yan-xia, Zheng He, Sun Qian-qian, Li Dian-bo, Wang Jin-fang, Shi Jin, Zhao Bing, Guo Yang-dong. 2014. UV-A and UV-B involved in induction and regulation of anthocyanin biosynthesis in cabbage. *Journal of China Agricultural University*, 19 (2): 86 - 94. (in Chinese)
- 齐 艳, 邢燕霞, 郑 禾, 孙倩倩, 李殿波, 王晋芳, 石 锦, 赵 冰, 郭仰东. 2014. UV-A 和 UV-B 提高甘蓝幼苗花青素含量以及调控基因表达分析. *中国农业大学学报*, 19 (2): 86 - 94.
- Ronald L P, Sheryl A. L, Cao G H, Muccitelli H, Hammerstone J F. 2001. Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 1270 - 1276.
- Severo J, de Oliveira I R, Tiecher A, Chaves F C, Rombaldi C V. 2015. Postharvest UV-C treatment increases bioactive, ester volatile compounds and a putative allergenic protein in strawberry. *LWT-Food Science and Technology*, 64 (2): 685 - 692.
- Solovchenko A, Schmitz-Eiberger M. 2003. Significance of skin flavonoids for UV-B-protection in apple fruits. *Journal of Experimental Botany*, 54 (389): 1977 - 1984.
- Song Zhe, Li Tian-zhong, Xu Gui-xuan. 2008. Studies on the relationship among the anthocyanin sugar and related enzymes activity during the coloring stage of 'Fuji' apple. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 24 (4): 255 - 260. (in Chinese)
- 宋 哲, 李天忠, 徐贵轩. 2008. "富士" 苹果着色期果皮花青苷与果实糖份及相关酶活性变化的关系. *中国农学通报*, 24 (4): 255 - 260.
- Stafford H A, Lester H H. 1982. Enzymic and nonenzymic reduction of (+)-dihydroquercetin to its 3, 4, diol. *Plant Physiology*, 70: 695 - 698.
- Stracke R, Favory J J, Gruber H, Bartelniewoehner L, Bartels S, Binkert M, Funk M, Weisshaar B, Ulm R. 2010. The *Arabidopsis* bZIP transcription factor HY5 regulates expression of the PFG1/MYB12 gene in response to light and ultraviolet-B radiation. *Plant Cell & Environment*, 33 (1): 88 - 103.

- Ubi B E, Honda C, Bessho H, Kondo S, Wada M, Kobayashi S, Moriguchi T. 2006. Expression analysis of anthocyanin biosynthetic genes in apple skin: effect of UV-B and temperature. *Plant Science*, 170 (3): 571 - 578.
- Wang C Y, Chen C T, Wang S Y. 2009. Changes of flavonoid content and antioxidant capacity in blueberries after illumination with UV-C. *Food Chemistry*, 117 (3): 426 - 431.
- Wang Hui-cong, Huang Xu-ming, Hu Gui-bing, Huang Hui-bai. 2004. Studies on the relationship between anthocyanin biosynthesis and related enzymes in litchi pericarp. *Scientia Agricultura Sinica*, 37 (12): 2028 - 2032. (in Chinese)
王慧聪, 黄旭明, 胡桂兵, 黄辉白. 2004. 荔枝果皮花青苷合成与相关酶的关系研究. *中国农业科学*, 37 (12): 2028 - 2032.
- Wang Qing-ju, Li Xiao-lei, Wang Lei, Sun Fan-ya, Shen Xiang. 2008. Dynamic changes of anthocyanin and the relevant biosynthesis enzymes in *Padus virginiana* ‘Schubert’ leaves. *Cientia Silvae Sinicae*, 44 (3): 45 - 49. (in Chinese)
王庆菊, 李晓磊, 王 磊, 孙凡雅, 沈 向. 2008. 紫叶稠李叶片花色苷及其合成相关酶动态. *林业科学*, 44 (3): 45 - 49.
- Wang S Y, Jiao H. 2000. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (11): 5677 - 5684.
- Wen Peng-fei, Xing Yan-fu, Niu Tie-quan, Gao Mei-ying, Niu Xing-yan. 2012. Accumulation of flavanols, expression of leucoanthocyanidin reductase induced by UV-C irradiation during grape berry development. *Scientia Agricultura Sinica*, 45 (21): 4428 - 4436. (in Chinese)
温鹏飞, 邢延富, 牛铁泉, 高美英, 牛兴艳. 2012. 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 (21): 4428 - 4436.
- Wu D, Hu Q, Yan Z, Chen W, Yan C, Huang X, Zhang J, Yang P Y, Deng H T, Shi Y G. 2012. Structural basis of ultraviolet-B perception by UVR8. *Nature*, 484 (7393): 214 - 219.
- Yang Le, Hou Zhi-xia, Yang Jun-feng, Gong Zhong-zhi, Wang Chong, Shi Wen-jun. 2015a. Effect of UV-C treatment on phenolic compounds and relevant enzymes activities of blueberry. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 27 (6): 955 - 960. (in Chinese)
杨 乐, 侯智霞, 杨俊枫, 宫中志, 王 冲, 史文君. 2015a. UV-C 对蓝莓酚类物质及其相关酶活性的影响. *浙江农业学报*, 27 (6): 955 - 960.
- Yang Le, Yang Jun-feng, Hou Zhi-xia, Gong Zhong-zhi, Wang Chong, Shi Wen-jun. 2015b. Effects of UV-B treatment on the major quality of blueberry and related enzyme activities in different developmental stages. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 35 (12): 2477 - 2482. (in Chinese)
杨 乐, 杨俊枫, 侯智霞, 宫中志, 王 冲, 史文君. 2015b. UV-B 对不同发育时期离体蓝莓主要果实品质及相关酶活性的影响. *西北植物学报*, 35 (12): 2477 - 2482.
- Zhang D, Qian M J, Yu B, Teng Y W. 2013a. Effect of fruit maturity on UV-B-induced post-harvest anthocyanin accumulation in red Chinese sand pear. *Acta Physiologiae Plant*, 35 (9): 2857 - 2866.
- Zhang D, Yu B, Bai J H, Qian M, Shu Q, Su J, Teng Y. 2012. Effects of high temperatures on UV-B/visible irradiation induced postharvest anthocyanin accumulation in ‘Yunhongli No. 1’ (*Pyrus pyrifolia* Nakai) pears. *Scientia Horticulturae*, 134 (1): 53 - 59.
- Zhang Z Z, Che X N, Pan Q H, Li X X, Duan C Q. 2013b. Three types of ultraviolet irradiation differentially promote expression of shikimate pathway genes and production of anthocyanins in grape berries. *Plant Physiology and Biochemistry*, 57: 74 - 83.
- Zhang Z Z, Che X N, Pan Q H, Li X X, Duan C Q. 2013c. Transcriptional activation of flavan-3-ols biosynthesis in grape berries by UV irradiation depending on developmental stage. *Plant Science*, 208: 64 - 74.
- Zifkin M, Jin A, Ozga J A, Zaharia L I, Scherthner J P, Gesell A, Abrams S R, Kennedy J A, Constabel C P. 2012. Gene expression and metabolite profiling of developing highbush blueberry fruit indicates transcriptional regulation of flavonoid metabolism and activation of abscisic acid metabolism. *Plant Physiology*, 158 (1): 200 - 224.