



抗性砧木对赤霞珠葡萄叶片白藜芦醇合成过程及含量的影响

翟 晨¹,赵宝龙^{1*},孙军利¹,郁松林¹,
张二震¹,李 格¹,董新平²,章智钧¹

(1 石河子大学 农学院特色果蔬栽培生理与种质资源利用兵团重点实验室,新疆石河子 832000;2 新疆中信国安农业科技开发有限公司,新疆昌吉 832200)

摘要:为了明确不同抗性砧木对赤霞珠葡萄叶片白藜芦醇含量及其合成过程中前体物质和相关代谢酶活性的影响,分析不同抗性砧木与白藜芦醇合成的关系,以获得提高接穗品种赤霞珠葡萄叶片白藜芦醇含量的抗性砧木。该研究选择弗卡(Fercal)、5C、140R、3309M、3309C、SO4、抗砧3号(Kangzhen3)、5BB为砧木与赤霞珠(CS)葡萄进行嫁接,以赤霞珠自根苗为对照(CK),采用高效液相色谱技术,测定成熟葡萄叶片白藜芦醇以及合成白藜芦醇前体物质苯丙氨酸、肉桂酸、香豆酸含量,并对合成白藜芦醇相关代谢酶苯丙氨酸解氨酶(PAL)、肉桂酸-4-羟化酶(C4H)、4-香豆-辅酶A连接酶(4CL)、过氧化物酶(POD)以及多酚氧化酶(PPO)的活性进行测定。结果表明:(1)不同砧木均能提高接穗赤霞珠葡萄叶片白藜芦醇含量11%~46%。(2)在各砧穗组合中,CS/140R嫁接苗叶片的白藜芦醇含量最高达到18.24 μg/g,其合成白藜芦醇前体物质苯丙氨酸和香豆酸含量也最高,分别达到38.61和1.06 μg/g。(3)在各砧穗组合中,白藜芦醇相关代谢酶PAL活性以CS/3309C嫁接苗叶片最高;嫁接苗叶片代谢酶C4H和4CL活性均高于赤霞珠自根苗;POD和PPO活性均以CS/Fercal的接穗赤霞珠叶片最强。研究发现,不同抗性砧木能显著提高赤霞珠葡萄叶片白藜芦醇含量,相关代谢酶C4H活性对葡萄白藜芦醇的合成至关重要,PPO活性与葡萄叶片白藜芦醇合成也密切相关,CS/140R是8个砧穗组合中提高赤霞珠葡萄叶片白藜芦醇含量最具优势的砧穗组合。

关键词:葡萄;砧木;接穗;白藜芦醇;前体物质;代谢酶

中图分类号:Q945.7; Q945.18

文献标志码:A

Effect of Resistant Rootstock on the Process and Content of Resveratrol in Cabernet Sauvignon Grape Leaves

ZHAI Chen¹, ZHAO Baolong^{1*}, SUN Junli¹, YU Songlin¹,
ZHANG Erzhen¹, LI Ge¹, DONG Xinping², ZHANG Zhijun¹

(1 Xinjiang Production and Construction Corps Key Laboratory of Special Fruits and Vegetables Cultivation Physiology and Germplasm Resources Utilization, College of Agriculture, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China; 2 Xinjiang Zhongxinguo Agricultural Science and Technology Development Co., Changji, Xinjiang 832200, China)

Abstract: The objective of this experiment was to compare the concentration of Resveratrol and its precursors and the activity of important metabolic enzymes in Cabernet Sauvignon grape. The relationship was analyzed between the rootstocks and resveratrol synthesis. The results provide a reference for selecting resistant rootstocks with eight different rootstocks suitable for Xinjiang. In this experiment, the eight root-

收稿日期:2017-05-12;修改稿收到日期:2017-08-23

基金项目:国家自然科学基金(31560542)

作者简介:翟 晨(1991—),女,在读硕士研究生,主要从事果树栽培生理及育种研究。E-mail:657613396@qq.com

* 通信作者:赵宝龙,硕士,副教授,主要从事果树栽培生理及育种研究。E-mail:1504201794@qq.com

stock cultivars (Fercal, 5C, 140R, 3309M, 3309C, SO4, Kangzhen3, 5BB) grafted with scions of Cabernet Sauvignon grapes were used as experimental materials. Self-rooted 'Cabernet Sauvignon' plants were used as the control (CK). The content of trans-resveratrol, trans-piceid and phenylalanine, cinnamic acid, and coumaric acid were determined by HPLC technique. The activities of the following enzymes in the phenylalanine pathway of resveratrol production were also determined: peroxidase(POD), polyphenol oxidase(PPO), phenylalanine ammonia lyase (PAL), cinnamic acid-4-hydroxylase(C4H) and 4-coumarate co-enzyme A ligase(4CL). The results showed: (1) resveratrol and piceid concentrations in the Cabernet Sauvignon leaves were 11% to 46% greater in scions with grafted rootstocks than that of self-rooted one. (2) Leaf resveratrol concentrations were the greatest in scions with 140R as the rootstock(18.24 $\mu\text{g/g}$) in the scion combinations of rootstocks. Scions with 140R rootstock had the highest phenylalanine concentration (38.61 $\mu\text{g/g}$) and coumaric acid concentration (1.06 $\mu\text{g/g}$). (3) In the scion combinations of rootstocks CS/3309C had the highest PAL activities. Leaf C4H activities and 4CL activities in scion-rootstocks were greater than that in self-rooted. Leaf POD activity and PPO activity in CS/Fercal were the highest. The conclusions were that these resistant rootstocks could significantly increase the resveratrol concentrations in the leaves of Cabernet Sauvignon grapes. The contents of resveratrol in grapes were significantly associated with the metabolic enzyme C4H and the PPO. CS/140R was the most advantageous combination for increasing resveratrol in Cabernet Sauvignon grape leaves.

Key words: grape; rootstock; scion; resveratrol; precursor; metabolic enzymes

白藜芦醇(resveratrol, Res)是植物体内天然的多酚类物质,广泛存在于葡萄、松树、虎杖、决明子和花生等植物或果实当中,到目前为止至少已在 21 科植物中被发现,其中葡萄属类植物含量最高^[1]。白藜芦醇多以单体和糖苷(Piceid, 简称 PD)的形式存在,每种形式又有顺式和反式两种结构,在自然界中主要以反式构象存在,即反式白藜芦醇和反式白藜芦醇苷^[2]。它是植物体自身分泌的为了抵御恶劣环境或病原侵害时的一种抗毒素^[3]。另外,它还具有许多医疗保健作用,如抗氧化、抗微生物细菌和抗癌细胞增殖、保护肝脏、抗炎、防治神经性疾病等^[4-6]。研究发现葡萄不同品种间白藜芦醇的含量差异较大,同一品种在不同组织间以及不同生长阶段的含量也存在差异,其中果穗轴和果皮的白藜芦醇含量较高^[7-8],酿酒品种高于鲜食品种^[9],美洲葡萄浆果和叶片中白藜芦醇的含量均高于欧洲葡萄^[10]。早在 1989 年,Doeks 等^[11]就发现抗病与感病葡萄对霜霉病的抗性不同,其中抗性品种最高能产生 5 倍于敏感品种的 Res。Pezet 等^[12]也研究发现抗性葡萄品种感染病菌后产生的白藜芦醇毒性高于敏感葡萄品种。白藜芦醇在植物代谢中作为次生代谢产物^[13],它的合成与苯丙氨酸代谢途径密切相关,苯丙氨酸经过苯丙氨酸解氨酶(PAL)、肉桂酸-4-羟化酶(C4H)、4-香豆酰辅酶 A 连接酶(4CL)的催化,生成 4-香豆酰辅酶 A,4-香豆酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 反应,在白藜芦醇合成酶(RS)的催化下生成白藜芦醇(Res)^[14]。白藜芦醇的代谢合成由多

个酶促反应的调节控制,其中过氧化物酶(POD)和多酚氧化酶(PPO)在逆境中表现的功能与 Res 做为植物抗毒素的目的相同,都是为了逆境中增加抗病和抵抗力,因此,白藜芦醇的代谢研究也多集中在 POD 和 PPO 上^[15]。

新疆现已成为中国优质葡萄原酒的生产基地,但是新疆生态条件各异,存在着一些不利的生态因素对葡萄生产造成损失,降低了葡萄种植户的收益,引入抗性砧木能缓解恶劣生态环境对葡萄生长发育的影响。白藜芦醇含量高低成为评价葡萄及葡萄酒品质的重要指标。目前在不同抗性砧木对葡萄生长发育的影响已经有了大量的研究^[16-18],但在葡萄砧木对葡萄叶片白藜芦醇及其合成过程中前体物质含量影响方面还未见研究报道。因此,本实验选择 8 个抗性砧木嫁接酿酒葡萄品种赤霞珠为材料,并以赤霞珠自根苗为对照进行研究,探讨嫁接在不同砧木上的赤霞珠葡萄叶片白藜芦醇含量的变化,明确不同砧木对赤霞珠葡萄叶片白藜芦醇合成代谢过程中的相关内源物质及其代谢酶活性的变化,进一步分析抗性砧木与白藜芦醇合成的关系,为新疆地区赤霞珠葡萄科学合理选择抗性砧木提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验地及材料培养

试验地点位于新疆石河子农学院试验站(86°06'N, 44°32'E),该地年平均气温 6.5~7.2 °C,一年中的最高气温出现在 7 月,平均气温 25.1~26.1

℃;≥0 ℃的活动积温为4 023~4 118 ℃,≥10 ℃的活动积温为3 570~3 729 ℃;日照时数为2 721~2 818 h;无霜期为168~171 d;年降水量范围为125.0~207.7 mm;年均蒸发量为1514 mm;试验地地势平坦,土壤pH值7.0~8.2,且钙含量丰富。

抗性砧木包括弗卡(Fercal)、5C、140R、3309M、3309C、SO4、抗砧3号(Kangzhen3)和5BB,均来自中国农业科学院郑州果树研究所国家葡萄资源圃。接穗为赤霞珠(Cabernet Sauvignon,简称CS)优系169。组成的砧穗组合分别为CS/Fercal、CS/5C、CS/140R、CS/3309M、CS/3309C、CS/SO4、CS/Kangzhen3、CS/5BB,以赤霞珠自根苗为对照(CK)。2015年初在温室内进行葡萄硬枝嫁接育苗,秋季选取长势一致的一年生硬枝嫁接苗各10株定植于试验地(东西走向),株距0.5 m,栽培管理条件一致。采取生长旺盛期成熟叶片,采后于-80 ℃的冰箱中保存备用。每个处理选取5次重复。

1.2 测定项目及方法

1.2.1 标准曲线的绘制 取反式白藜芦醇、反式白藜芦醇苷、肉桂酸、香豆酸标准样品各10 mg,分别加色谱纯甲醇定容至100 mL容量瓶中;取苯丙氨酸标准样品10 mg,加超纯水定容至100 mL容量瓶中。将5种标准品均配制成100 mg/L标准溶液作为储备液。用岛津LC-2010AHT型高效液相色谱仪,采用SEG ProteCol-P C18柱(4.6 mm×250 mm,5 μm)反向色谱柱。每种均以浓度为1、2、4、8和16 mg/L的标准溶液绘制标准曲线,使用前通过0.45 μm微孔滤膜过滤。结果见表1,反式白藜芦醇及苷和3个前体化合物标准品的溶液浓度和检测响应值呈良好的线性关系,表明此方法灵敏度较高。

1.2.2 反式白藜芦醇(Res)和反式白藜芦醇苷(PD)的提取与检测 取1 g葡萄叶片置于研钵中加入液氮研磨,用甲醇定容至10 mL,涡旋,超声浸提20 min,3 000 r/min离心10 min,吸取上清液经0.45 μm滤膜过滤,置于4 ℃冰箱中放置备用。流

动相:乙腈/0.2%磷酸水=45/55;检测波长:306 nm;流速:0.8 mL/min;柱温:25 ℃;进样量:10 μL。洗脱条件:低度洗脱。

1.2.3 苯丙氨酸、肉桂酸和香豆酸的提取与检测

参考Hakkinen等^[19]的方法并稍加修改。称取1 g葡萄叶片研磨后,加入10 mL提取液(80 mg抗坏血酸+70%甲醇+1.2 mol/L HCl),超声波降解处理,离心,取上清液加入石油醚萃取后浓缩至干,再溶于50%甲醇(色谱纯),分装置于-4 ℃保存用于高效液相色谱测定。高效液相色谱测定前样品经0.45 μm微孔滤膜过滤。肉桂酸、香豆酸测定时,流动相为乙腈/0.2%磷酸水=45/55,检测波长分别为306和270 nm;苯丙氨酸测定时,流动相为乙腈/0.2%磷酸水=20/80,检测波长为210 nm。其余条件为:流速:0.8 mL/min;柱温:25 ℃;进样量:10 μL;洗脱条件:低度洗脱。

1.2.4 相关代谢酶活性的测定 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的测定参照Koukol和Conn的方法^[20];肉桂酸-4-羟基化酶(C4H)活性的测定参照Lamb和Rubery的方法^[21];4-香豆酰辅酶A连接酶(4CL)活性测定参照Knoblock和Hahlbrock的方法^[22];过氧化物酶(POD)活性的测定采用愈创木酚法^[23];多酚氧化酶(PPO)活性的测定采用比色法^[23]。

1.4 数据处理

采用Excel 2003和SPSS 17.0软件对数据进行统计分析。采用OriginPro 7.5制作图表。

2 结果与分析

2.1 不同抗性砧木对赤霞珠葡萄叶片白藜芦醇及白藜芦醇苷含量的影响

通过高效液相色谱法测定不同抗性砧木品种的赤霞珠葡萄叶片白藜芦醇及苷提取液,得到色谱图,其中一个样品色谱图(赤霞珠自根苗)如图1所示。其中,在保留时间3.101~3.150 min和4.180~4.189 min各有一个峰值出现,并与反式白藜芦醇(Res)和

表1 反式白藜芦醇、反式白藜芦醇苷及其前体物质苯丙氨酸、肉桂酸、香豆酸的保留时间和回归方程

Table 1 Retention time, regression equations of trans-resveratrol, trans-piceid and phenylalanine, cinnamic acid, coumaric acid

化合物 Compound	保留时间 Retention time/min	标准曲线 Standard curve	决定系数 Correlation coefficient
反式白藜芦醇 Trans-resveratrol	3.136	$y=1\ 000\ 000x+817\ 1$	1
反式白藜芦醇苷 Trans-piceid	4.181	$y=517\ 986x+969.97$	0.999 8
苯丙氨酸 Phenylalanine	5.114	$y=281\ 103x+755.6$	0.999 9
肉桂酸 Cinnamic acid	11.263	$y=995\ 669x+6316.3$	0.999 8
香豆酸 Coumaric acid	5.281	$y=850\ 251x-166.01$	0.986 9

反式白藜芦醇苷(PD)标准样品色谱图的出峰接近,可以认为此处的峰即为反式白藜芦醇苷和反式白藜芦醇。同时,葡萄不同抗性砧木品种砧穗组合叶片Res和PD的峰面积不同,表明它们的Res和PD含量不同(图2)。其中,CS/140R叶片中的白藜芦醇含量最高($18.24 \mu\text{g/g}$),是自根苗的1.5倍,其白藜芦醇苷含量($26.49 \mu\text{g/g}$)是自根苗的1.4倍;不同砧穗组合赤霞珠葡萄叶片白藜芦醇和白藜芦醇苷含量都不同。

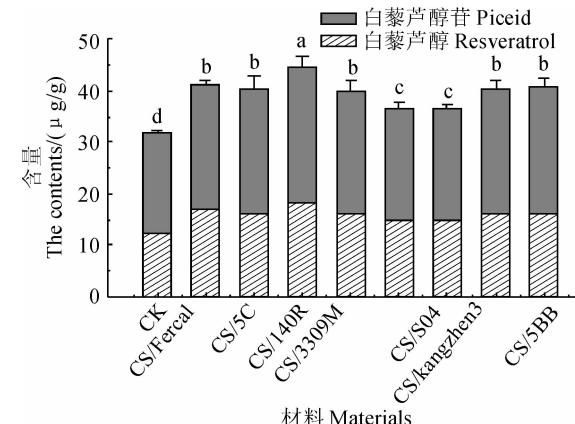
通过比较不同砧木上接穗品种赤霞珠葡萄叶片白藜芦醇和白藜芦醇苷含量发现,其白藜芦醇含量表现为:CS/140R > CS/Fercal > CS/Kangzhen3 > CS/5C > CS/5BB > CS/3309M > CS/3309C > CS/SO4 > CK,白藜芦醇苷含量高低为:CS/140R > CS/5BB > CS/Kangzhen3 > CS/5C > CS/Fercal > CS/3309M > CS/SO4 > CS/3309C > CK。即140R作为砧木能显著提高接穗品种赤霞珠葡萄叶片中的白藜芦醇含量,其白藜芦醇和白藜芦醇苷含量均最高,而赤霞珠自根苗Res和PD含量则最低。说明抗性砧木对葡萄叶片的Res和PD含量有明显影响,且影响程度不同,不同抗性砧木品种均能提高接穗品种赤霞珠葡萄叶片Res和PD含量11%~46%。同时,试验所有检测样品中白藜芦醇苷含量均不同程度地高于白藜芦醇含量,而白藜芦醇含量与白藜芦醇苷含量随砧木品种的变化趋势有相似之处,但不完全相同。

2.2 不同抗性砧木对赤霞珠葡萄叶片合成白藜芦醇前体物质苯丙氨酸、肉桂酸以及香豆酸含量的影响

通过高效液相色谱法对不同抗性砧木的接穗品

种赤霞珠葡萄叶片的白藜芦醇的前体物质苯丙氨酸、肉桂酸以及香豆酸的含量进行测定分析,同样在3个标准品色谱图出峰时间5.114、11.263和5.281 min附近找到了3个物质的出峰点,绘制成图(图3)。

首先,不同抗性砧木上赤霞珠葡萄叶片苯丙氨酸含量差异显著(3,A)。其中,CS/140R叶片苯丙氨酸含量最高($38.61 \mu\text{g/g}$),其与CS/5BB叶片苯丙氨酸的含量无明显差异,CS/140R比自根苗(CK)显著高出160%;CS/Fercal组合叶片苯丙氨酸含量最低,它与赤霞珠自根苗(CK)无显著差异。不同砧穗组合叶片的苯丙氨酸含量表现为:CS/140R



CK. 自根苗; 小写字母表示材料间差异显著($P \leq 0.05$); 下同

图2 不同抗性砧木及自根苗的赤霞珠葡萄叶片白藜芦醇和白藜芦醇苷含量

CK. Self-rooted 'Cabernet Sauvignon' plants; The different letters mean significant differences among materials at 0.05 level; The same as below

Fig. 2 The contents of resveratrol and piceid in leaves of different resistance rootstocks and self-rooted individual of Cabernet Sauvignon grape

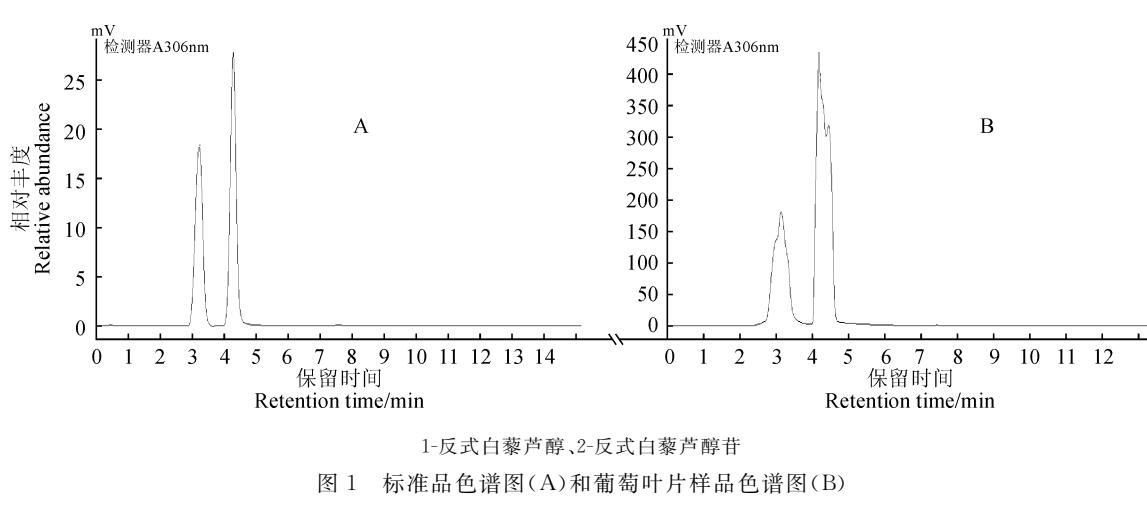


图1 标准品色谱图(A)和葡萄叶片样品色谱图(B)

1-反式白藜芦醇、2-反式白藜芦醇苷

Fig. 1 Sample standard chromatogram (A) and chromatogram (B) of resveratrol in leaves of grape

$> \text{CS/5BB} > \text{CS/5C} > \text{CS/SO4} > \text{CS/3309M} > \text{CS/Kangzhen3} > \text{CS/3309C} > \text{CK} > \text{CS/Fercal}$ 。

其次,赤霞珠叶片肉桂酸含量以嫁接在 3309M 砧木上的接穗最高($0.32 \mu\text{g/g}$),是赤霞珠自根苗(CK)的 2 倍,比肉桂酸含量最低的砧穗组合 CS/140R 高出 132%;砧穗组合 CS/Fercal、CS/140R、CS/SO4 叶片肉桂酸含量与 CK 无显著差异(图 3, B),即以弗卡(Fercal)作砧木的赤霞珠叶片肉桂酸含量比 CK 高,并且高于组合 CS/SO4 和 CS/140R。

再次,叶片香豆酸含量以砧穗组合 CS/140R 最高($1.06 \mu\text{g/g}$),组合 CS/Fercal 含量最低;CS/140R 显著高于 CK 和 CS/Fercal,其叶片香豆酸含量分别是 CK 和组合 CS/Fercal 的 1.8 倍和 2.5 倍;砧穗组合 CS/140R 与 CS/5C、CS/3309C、CS/

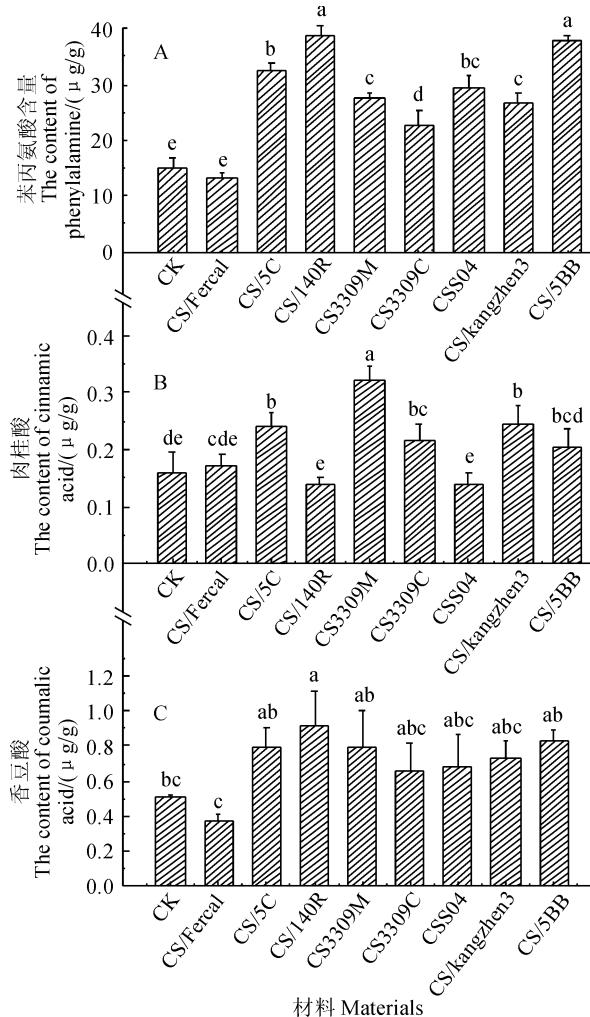


图 3 不同抗性砧木及自根苗的赤霞珠葡萄叶片苯丙氨酸、肉桂酸和香豆酸含量

Fig. 3 The contents of phenylalanine, cinnamic acid and coumaric acid in leaves of different resistance rootstocks and self-rooted individual of Cabernet Sauvignon grape

3309M、CS/Kangzhen3、CS/SO4、CS/5BB 组合均无显著差异(图 3, C)。

本研究发现,不同抗性砧木上接穗赤霞珠叶片合成白藜芦醇的前体物质中,除 SO4 砧木上赤霞珠叶片的香豆酸含量小于 Kangzhen3 砧木上接穗叶片外,其余砧木的赤霞珠叶片香豆酸含量大小排序与苯丙氨酸含量大小顺序相似;各抗性砧木的赤霞珠叶片中肉桂酸、香豆酸和苯丙氨酸的含量明显不同,且苯丙氨酸含量远高于肉桂酸和香豆酸含量。

2.3 不同抗性砧木对赤霞珠葡萄叶片 PAL、C4H 和 4CL 酶活性影响

如表 2 所示,各砧穗组合赤霞珠葡萄叶片代谢酶 PAL、C4H、4CL 活性间均存在显著差异,并表现为 $\text{PAL} < \text{C4H} < 4\text{CL}$,尤其是 PAL 活性远远低于其余 2 种酶。首先,各砧穗组合赤霞珠叶片 PAL 活性以 CS/3309C 最高(3.96 U/g),CS/5BB 最低(1.10 U/g);以 3309C、SO4、Fercal 作砧木的赤霞珠叶片 PAL 活性分别比自根苗高出 74.4%、60.4%、43.6%,其他砧穗组合 PAL 活性则低于自根苗 1.32%~51.10%,但仅砧穗组合 CS/3309C 和 CS/SO4 叶片 PAL 活性与自根苗差异达到显著水平。其次,各抗性砧木上嫁接苗叶片 C4H 活性均显著高于自根苗 16.63%~51.96%,并以砧穗组合 CS/Fercal 最高(32.17 U/g),组合 CS/Kangzhen3 次之,两组合间无显著差异;另外,叶片 C4H 活性在 CS/

表 2 不同抗性砧木及自根苗的赤霞珠葡萄叶片 3 种白藜芦醇相关代谢酶活性

Table 2 The activities of three resveratrol related metabolic enzymes in leaves of different resistance rootstocks and self-rooted individual of Cabernet Sauvignon grape

材料 Material	代谢酶活性 Activity of metabolic enzymes/(U/g)		
	苯丙氨酸 解氨酶 PAL	肉桂酸-4- 羟基化酶 C4H	4-香豆酰辅酶 A 连接酶 4-CL
CK	2.27bc	21.17e	44.05f
CS/Fercal	3.26ab	32.17a	56.18e
CS/5C	1.46c	27.46bcd	63.45c
CS/140R	2.24bc	29.23bc	68.99ab
CS/3309M	1.77c	24.86d	69.89a
CS/3309C	3.96a	27.01cd	60.03d
CS/SO4	3.64a	28.66bc	65.49c
CS/Kangzhen3	1.57c	30.15ab	63.93c
CS/5BB	1.11c	24.69d	66.31bc

注:同一列数据中不同字母表示材料间差异达到 0.05 显著水平

Note: The different letters in a column indicate significant difference among materials at 0.05 level

5C 与 CS/SO4 组合间和 CS/3309M 与 CS/5BB 组合间也差异不显著。再次,各抗性砧木上嫁接苗叶片 4CL 活性也均显著高于自根苗,增幅为 27.54%~58.66%。其中,CS/3309M 叶片 4CL 活性最高,CS/140R 次之,两者间无显著性差异;4CL 活性由大到小顺序依次是 CS/3309M、CS/140R、CS/5BB、CS/SO4、CS/Kangzhen3、CS/5C、CS/3309C、CS/Fercal、CK。以上结果说明不同抗性砧木对接穗赤霞珠叶片酶活性有不同的影响,且各砧穗组合的 2 个代谢酶 C4H 和 4CL 活性均高于自根苗。

2.4 不同抗性砧木对赤霞珠葡萄叶片 POD、PPO 活性的影响

图 4 显示,不同抗性砧木品种的赤霞珠嫁接苗间 POD 和 PPO 活性差别很大,并且弗卡、5C、3309M、SO4、5BB 作砧木的赤霞珠嫁接苗以及自根苗 POD 的活性远高于相应的 PPO 活性,而 140R、3309C、抗砧 3 号作砧木的赤霞珠嫁接苗中 POD 的活性与相应 PPO 活性大小基本一样,说明赤霞珠叶片 POD 与 PPO 的活性之间没有相关性,这可能是由于抗性砧木品种不同所致。其中,在所有砧木嫁接苗之间,叶片 POD 和 PPO 活性均以 CS/Fercal 嫁接苗最强。在 POD 活性方面,CS/Fercal、CS/

5C、CS/Kangzhen3、CS/5BB 嫁接苗 POD 活性均显著高于自根苗,增幅为 14.30%~94.33%;而 CS/SO4、CS/3309M、CS/3309C、CS/140R 嫁接苗叶片 POD 活性均比自根苗低,降幅为 11.27%~45.37%,且除 CS/SO4 外均达到显著水平,并以 CS/140R 嫁接苗最低。在 PPO 活性方面,CS/Fercal、CS/5C、CS/140R、CS/3309M、CS/3309C、CS/Kangzhen3 嫁接苗叶片 PPO 活性均高于自根苗,增幅为 8.34%~142.54%,且除 CS/5C 和 CS/3309M 组合外均达到显著水平;而 CS/SO4 和 CS/5BB 嫁接苗叶片 PPO 活性均比自根苗低,并以 CS/5BB 嫁接苗最低,但降幅均未达到显著水平。

3 讨 论

3.1 不同抗性砧木对赤霞珠葡萄叶片白藜芦醇及白藜芦醇苷含量的影响

有研究表明,在相同的自然条件下,不同品种的葡萄其合成白藜芦醇的能力差异较大,不同葡萄品种叶片白藜芦醇含量不同^[9,24]。本实验结果表明不同砧木相同接穗品种的葡萄叶片 Res 和 PD 含量也不同,在本实验的 8 个抗性砧木中,砧木 140R 的接穗赤霞珠叶片中白藜芦醇含量最高。白藜芦醇作为植物的一种抗毒素,在植物遇到病害时可以刺激白藜芦醇的合成,当砧木遇到不良环境时,砧木 140R 的接穗赤霞珠叶片可对应产生较多的白藜芦醇,合成能力较强。另外,随着抗性砧木研究的深入,人们发现葡萄砧木不仅能提高接穗植株的抗病虫性、抗寒性、抗旱性、耐盐碱性、耐酸性和耐涝性,也能影响接穗品种的生长发育^[25-26],且发现砧木对地上接穗部分影响是多方面的。对于葡萄等果树砧穗互作生理机制的研究有 2 个基本点,即 2 个或多个遗传体系在激素代谢和营养代谢上的互作^[27],果树砧木的嫁接实际上是对根系的替换,砧木一方面影响接穗的物候期、生长势与结果习性以及果实形态、内在品质等,另一方面影响植株体内的激素、黄酮类和酚类物质等分配与运输;同时,接穗也影响着砧木的根系生长。Li 等^[28]研究发现,根系和叶片中玉米素含量变化与接穗活力有相关性,嫁接于矮化砧上的接穗的叶片、树皮中 ABA 含量明显下降。而在本实验中不同砧木嫁接造成赤霞珠叶片白藜芦醇含量高于自根苗,但具体是砧木抗性品种的差异导致这样的实验结果,还是嫁接过程对植株生长影响变化导致的,还需要进一步的探讨研究。

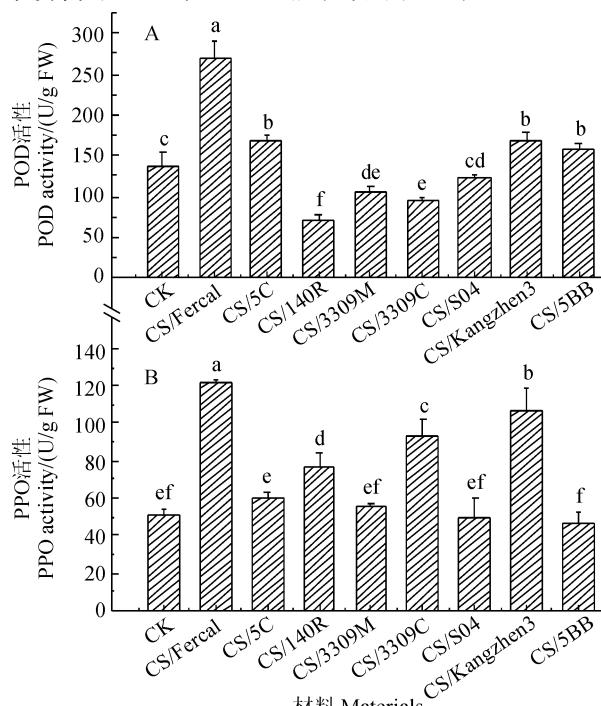


图 4 不同抗性砧木及自根苗的赤霞珠葡萄叶片 POD 和 PPO 活性

Fig. 4 The activities of POD and PPO in leaves of different resistance rootstocks and self-rooted individual of Cabernet Sauvignon grape

3.2 白藜芦醇与其合成前体代谢物的相关性

为了解葡萄叶片内含物在不同砧木嫁接苗之间的差别,通过分析白藜芦醇合成前体代谢物苯丙氨酸、肉桂酸以及香豆酸的含量发现,140R 作砧木的赤霞珠葡萄叶片苯丙氨酸和香豆酸含量最高,不同砧木的赤霞珠葡萄叶片苯丙氨酸、肉桂酸以及香豆酸含量存在很大差异。对苯丙氨酸和香豆酸进行线性相关分析发现,两种物质相关系数为 0.944 0;在本实验中,对白藜芦醇及白藜芦醇苷含量与其前体代谢物苯丙氨酸、肉桂酸、香豆酸含量的相关系数分别为 0.573 6、0.110 0、0.505 7,且与苯丙氨酸和香豆酸含量达到显著相关,而与肉桂酸相关性没有达到显著水平,表明葡萄叶片白藜芦醇和白藜芦醇苷合成与苯丙氨酸和香豆酸合成的关系更为密切。在白藜芦醇合成过程中,白藜芦醇合成关键酶合酶STS 与花色素合成的关键酶 CHS 竞争同样的底物丙二酰辅酶 A 和 4-香豆酰辅酶 A,分别进入白藜芦醇和花色素两条不同的合成途径。苯丙氨酸通过 CHS 代谢途径产生花色素与其它酚类物质^[29],而逆境条件下会启动 STS 途径,导致植株内白藜芦醇大量合成并积累^[30-31]。在苯丙氨酸代谢中一切含苯丙烷骨架的物质都是由该代谢途径直接或间接生成,咖啡酸、香豆酸、阿魏酸、芥子酸等就是其中的酚酸类产物,这些酚酸在一系列酶的作用下,进一步转化终端产物类黄酮、木质素和植保素^[32]。因此,在肉桂酸催化生成香豆酸过程中有其他酚类物质产生,可能导致白藜芦醇与肉桂酸相关性的降低。

3.3 白藜芦醇与其合成代谢关键酶的相关性

苯丙烷类代谢途径与许多代谢物的合成有关^[32],现已证实 PAL、C4H、4CL 是苯丙烷类代谢途径的 3 个关键酶^[33]。它处于苯丙烷类代谢向形成不同类型产物的转折点,这几个酶的活性在植物生长发育过程中不断地进行变化。已在水稻、小麦、

大麦、玉米、荞麦等植物的种子萌发及幼苗生长过程中发现, PAL、C4H、4CL 的活性均发生变化,并且 3 个酶的活性变化存在着伴随性。一般酶活性最初较低或者没有,上升到一个高峰后随后下降^[34]。在芹菜、大豆细胞悬浮培养物以及马铃薯、甘薯块茎切片中也得到了相似的结果。以果实为试材进行苯丙烷类代谢途径的研究报道甚少,且几乎只集中在 PAL 上。有研究表明 PAL 是酚类物质代谢的限速酶^[35],但也有研究表明烤烟中酚类物质合成并不完全受 PAL 的控制,C4H 酶是参与的肉桂酸向对香豆酸代谢步骤调控的关键点^[36]。本研究发现不同砧穗组合间同一时期这 5 个酶活性大小均有很大差异。我们将反式白藜芦醇和反式白藜芦醇苷含量与 5 个相关酶(PAL、C4H、4CL、POD、PPO)活性进行相关性分析,相关系数分别为 0.041、0.519、0.240、0.073 和 0.412,发现 C4H 和 PPO 活性变化与白藜芦醇合成显著相关。其中 C4H 与白藜芦醇含量呈极显著相关,表明 C4H 对白藜芦醇合成有显著影响。PPO 是酚类代谢和氧化有关的重要酶,PPO 与白藜芦醇含量呈显著相关,说明 PPO 在白藜芦醇的合成中也起了重要作用。

综上所述,本研究中所有赤霞珠嫁接苗叶片白藜芦醇含量均高于自根苗,抗性砧木能显著提高酿酒葡萄叶片白藜芦醇含量,在所有砧木中 140R 嫁接的赤霞珠葡萄叶片白藜芦醇含量最高;通过对葡萄叶片合成白藜芦醇过程中前体代谢物苯丙氨酸、肉桂酸以及香豆酸的研究表明,140R 嫁接的赤霞珠葡萄叶片苯丙氨酸和香豆酸含量最高,3309M 嫁接的赤霞珠葡萄叶片的肉桂酸含量最高;白藜芦醇相关代谢酶试验结果显示,C4H 和 PPO 与葡萄叶片白藜芦醇的合成密切相关;CS/140R 是 8 个砧穗组合中提高赤霞珠葡萄叶片白藜芦醇含量最具优势的砧穗组合。

参考文献:

- [1] 郭景南,刘崇怀,潘兴,等.葡萄属植物白藜芦醇研究进展[J].果树学报,2002,19(3):199-204.
GUO J N, LIU C H, PAN X, et al. Advances in research on resveratrol in *Vitis* spp[J]. *Journal of Fruit Science*, 2002, 19(3):199-204.
- [2] 李洁,熊兴耀,曾建国,等.白藜芦醇的研究进展[J].中国现代中药,2013,15(2):100-108.
LI J, XIONG X Y, ZENG J G, et al. Current situation and progress of resveratrol research[J]. *Modern Chinese Medicine*, 2013, 15(2):100-108.
- [3] 李晓东,何卿,郑先波,等.葡萄白藜芦醇研究进展[J].园艺学报,2011,38(1):171-184.
LI X D, HE Q, ZHENG X B, et al. Advances in resveratrol research of grape[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2011, 38(1):171-184.
- [4] 张兰胜,刘光明.白藜芦醇的研究概述[J].大理学院学报,2007,6(4):72-74.
ZHANG L S, LIU G M. Reviews of research on resveratrol [J]. *Journal of Dali University*, 2007, 16(4):72-74.
- [5] KAWADA N, SERI S. Effects of antioxidants, resveratrol, quercetin, and Nacetyl cysteine on the functions of cultured rat

- hepatic stellate cells and kupffer cells[J]. *Hepatology*, 1998, 27: 1 265-1 274.
- [6] MARTINEZ J, MORENO J J. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2000, 59: 865-870.
- [7] 李阿英,王西城,刘丹,等.4个鲜食葡萄品种生长发育过程中各器官白藜芦醇的含量变化[J].果树学报,2014,31(6):1 079-1 085.
- LI A Y, WANG X C, LIU D, et al. The resveratrol content changes in various organs of four table grape cultivars during the grape growth process[J]. *Journal of Fruit Science*, 2014, 31(6):1 079-1 085.
- [8] 李婷,李胜,张青松,等.葡萄不同组织部位白藜芦醇含量的比较[J].甘肃农业大学学报,2009,44(2):64-67.
- LI T, LI S, ZHANG Q S, et al. Comparison of the resveratrol contents in different grape tissues[J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2009, 44(2):64-67.
- [9] 陈雷,韩雅珊.葡萄不同品种和组织中白藜芦醇含量的差异[J].园艺学报,1999,26(2):118-119.
- CHEN L, HAN Y S. Studies on the content of resveratrol in different cultivars and organs of grape[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 1999, 26(2):118-119.
- [10] JEANDET P, BESSIS R, GAUTHERON B. The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages[J]. *Enol. Vitic.*, 1991, 42(1): 41-46.
- [11] DOCKS W, CRCASSY L L. The significance of stilbene phytoalexins in the plasompara viticola pathoilo grapevine interaction [J]. *Physi Molt plant Patho*, 1989, 34(3): 189-202.
- [12] PEIET R, GINDROK, VIRET O, et al. Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2004, 65: 297-303.
- [13] JEANDKT P, BESSIS R, SBAGII M, et al. Production of the phytoalexin resveratrol by grapes as a response to botrytis attack under natural conditions[J]. *Phytopathology*, 1995, 143:135-139.
- [14] 黄卫文,李忠海,黎继烈,等.白藜芦醇的合成研究进展[J].中南林业科技大学学报,2010,(10):72-77.
- HUANG W W, LI Z H, LI J L, et al. Advances in the research of resveratrol synthesis[J]. *Journal of Central South University of Forestry and Technology*, 2010,(10):72-77.
- [15] 王琴飞.赤霞珠葡萄叶片中以白藜芦醇为底物的代谢酶的研究[D].海口:海南大学,2008.
- [16] 张彪.不同砧穗组合对戈壁区酿酒葡萄生长和品质的影响[D].兰州:甘肃农业大学,2014.
- [17] 钟海霞,潘明启,张付春,等.7种砧木对克瑞森无核葡萄生长及产量品质的影响[J].新疆农业科学,2016,53(10):1 786-1 793.
- ZHONG H X, PAN M Q, ZHANG F C. Effects of seven rootstocks on growth, yield and quality of crimson seedless grapes[J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2016, 53(10): 1 786-1 793.
- [18] 李超,白世践,耿新丽,等.不同砧木对‘赤霞珠’葡萄生长发育的影响[J].果树学报,2016,33(10):1 242-1 250.
- LI C, BAI S J, GENG X L, et al. Effects of rootstocks on growth and development of 'Cabernet Sauvignon' grape[J]. *Journal of Fruit Science*, 2016, 33(10):1 242-1 250.
- [19] HAKKINEN S, HEINONEN M, KARENLAMPI S, et al. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries[J]. *Food Research International*, 1999, 32:345-353.
- [20] KOUKOL J, CONN E E. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Herdeum vulgare*[J]. *Journal of Biology and Chemistry*, 1961, 236:2 692-2 698.
- [21] LAMB C J, RUBERY P H. A Spectrophotometric assay for traps-cinnamic acid 4-hydroxylase activity[J]. *Analytical Biochemistry*, 1975, 68: 554-561.
- [22] KNOBLOCK K H, HAHLBROCK K. Isoenzymes of p-coumarate: CoA ligase from cell suspension cultures of *glycine max*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1975, 52(2):311-320.
- [23] 刘萍等.植物生理学实验技术[M].北京:科学出版社.2007.
- [24] 邓建国,姜丰,杨国顺.13个葡萄品种白藜芦醇含量的研究[J].中国果菜,2009,(3):45-46.
- DENG J G, JIANG F, YANG G S. Research on content of resveratrol in 13 species grape[J]. *China Fruit and Vegetable*, 2009, (3): 45-46.
- [25] 周万海.葡萄砧木耐盐性及砧-穗特性研究[D].兰州:甘肃农业大学,2005.
- [26] 李超,白世践,赵荣华,等.葡萄砧木及其应用的研究进展[J].农学学报,2016,6(5):53-59.
- LI C, BAI S J, ZHAO R H, et al. Progresses in research and application of grapevine rootstocks[J]. *Journal of Agriculture*, 2016, 6(5):53-59.
- [27] H T. 哈特曼,D E 凯斯特.植物繁殖原理和技术[M].郑开文,等.译北京:中国林业出版社.1982,364-381.
- [28] LI HONGLI, ZHANG HE, YU CHI, et al. Possible roles of auxin and zeatin for initiating the dwarfing effect of M9 used as apple rootstock or interstock[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2012, 34(1):235-244.
- [29] 刘静,胡莺雷,高音,等.苯丙氨酸代谢途径分子调控的某些方面[M]//林忠平.走向21世纪的植物分子生物学.北京:科学出版社,2000.
- [30] DONNEZ D, JEANDET P, CLEMENT C, et al. Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms[J]. *Trends in Biotechnology*, 2009, 27(12):706-712.
- [31] CHONG J L, POUTARAUD A, HUGUENEY P. Metabolism and roles of stilbenes in plants[J]. *Plant Science*, 2009, 177: 143-155.
- [32] WEISSHAAR B, JENKINS G. I. Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 1998, 1:251-257.
- [33] BRENDA W. S. Evidence for enzyme complexes in the phenyl propanoid and flavonoid pathways[J]. *Physiologia Plantarum*, 1999, 107:142-49.
- [34] ACHNINE L, BLANCAFLOR E B, RASMUSSEN S, et al. Colocalization of l-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis[J]. *Plant Cell*, 2004, 16:3 098-3 109.
- [35] WAHID A, GHAZANFAR A. Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2006, 163:723-730.
- [36] 陈爱国,彭东,陈向东,等.烤烟苯丙烷代谢中相关酶活性和多酚产物的关系研究[C]//山东植物生理学会第七次代表大会暨植物生物学与现代农业研讨会论文集,山东泰安,2012.