

葡萄‘霞多丽’果实中黄烷-3-醇合成酶活性及其相关基因表达

沙晓蓉, 张 萍, 王云霞, 卜虎柏, 马 莹, 靳 磊*

(宁夏大学 农学院, 银川 750000)

摘 要: 为探究酿酒葡萄果实中黄烷-3-醇积累规律与合成相关酶、关键基因表达的关系, 该研究以贺兰山东麓主栽酿酒白葡萄品种‘霞多丽’为材料, 采用比色法、高效液相色谱(HPLC)和荧光定量 PCR 技术, 分析葡萄果实发育过程中黄烷-3-醇单体物质的积累规律及其生物合成过程中相关酶活性、相关基因表达模式的变化。结果表明: (1) 在‘霞多丽’果实整个发育期, 黄烷-3-醇主要单体物质没食子儿茶素(GC)、表儿茶素没食子酸酯(ECG)含量远高于儿茶素(CAT)、表儿茶素(EC)含量, 且 ECG、EC 含量均随果实发育期进程呈先升后降变化趋势, 并于花后 50 d(7 月 13 日)达最大值, 分别为 47.69 和 42.73 mg/g, 而 GC、CAT 的含量则呈先降低后升高, 后随果实成熟逐渐降低的变化趋势。(2) 葡萄果实中黄烷-3-醇生物合成相关酶 PAL 和 ANS 活性随果实发育期进程呈先升高后降低的变化趋势, F3H、F3'H、CHI 活性均在花后 20 d(6 月 13)出现峰值, 而后活性迅速降低, 而 DFR 活性呈先升高后降低, 并于花后 50 d(7 月 13)再次升高, 后随果实成熟逐渐降低。(3) 黄烷-3-醇生物合成相关结构基因 PAL、ANS 的表达水平随果实发育期进程呈先上调后下调的趋势, 与 ECG、EC 含量变化趋势一致, F3'H、F3H、CHI 的表达水平却呈先下调后上调的趋势, DFR 的表达水平先上调而后下调, 并随果实成熟再次上调。(4) 相关性分析表明, F3H、F3'H 和 ANS 酶活性与 GC 含量呈显著正相关关系; F3H、F3'H 基因表达与 GC、CAT 的含量呈正相关关系, ANS、PAL 基因表达与 ECG、GC 的含量呈正相关关系。研究发现, 黄烷-3-醇生物合成相关酶和相关基因表达影响了葡萄果实中黄烷-3-醇类化合物含量的积累, 从而进一步影响葡萄酒的感官品质。

关键词: 霞多丽; 合成酶活性; 黄烷-3-醇; qRT-PCR; 基因表达

中图分类号: Q945.6⁺; Q789

文献标志码: A

Flavane-3-Alcohol Synthase Activity and Related Gene Expression in Grape ‘Chardonnay’ Fruit

SHA Xiaorong, ZHANG Ping, WANG Yunxia, BO Hubai, MA Ying, JIN Lei*

(Agricultural College of Ningxia University, Yinchuan 750000, China)

Abstract: In order to explore the relationship between the accumulation of flavane-3-ol and the expression of synthesis-related enzymes and key genes in wine grape fruit, this study analyzed the white grape variety Chardonnay grown in Donglu of Helan Mountain with colorimetric method, high performance liquid chromatography (HPLC) and fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR). The accumulation rule of flavane-3-ol monomer and the changes of related enzyme activities and related gene expression patterns during biosynthesis of grape fruit were studied. The results showed that: (1) during the whole fruit development peri-

收稿日期: 2021-09-08; 修改稿收到日期: 2022-01-13

基金项目: 宁夏自然科学基金(2020AAC03087)

作者简介: 沙晓蓉(1994—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事酿酒葡萄果实发育生理变化及其品质的研究。E-mail: sxr1976694126@163.com

* 通信作者: 靳 磊, 博士, 副教授, 主要从事园艺植物次生代谢物及其品质的研究。E-mail: Jinleixu@163.com

od, the contents of gallic catechin (GC) and epicatechin gallate (ECG) of flavane-3-ol were much higher than those of catechin (CAT) and epicatechin (EC). The contents of ECG and EC increased at first and then decreased with the development of fruit, and reached the maximum at 50 days after anthesis, which were 47.69 mg/g and 42.73 mg/g, respectively, while the contents of GC and CAT decreased at first and then increased, and then decreased gradually with fruit ripening. (2) The activities of flavane-3-alcohol biosynthesis related enzymes PAL and ANS in grape fruits increased at first and then decreased with the development of fruit. The activities of F3H, F3'H and CHI peaked at 20 days after anthesis (June 13), and then decreased rapidly, while the activity of DFR increased at first and then decreased, increased again at 50 days after anthesis, and then decreased gradually with fruit ripening. (3) The expression of structural genes *PAL* and *ANS* related to flavane-3-ol biosynthesis was up-regulated at first and then down-regulated with the development of fruit, which was consistent with the change trend of ECG and EC contents, while the expression of *F3H*, *F3'H* and *CHI* was down-regulated at first and then up-regulated. The expression of *DFR* was up-regulated at first, then down-regulated, and then up-regulated again with fruit ripening. (4) Correlation analysis showed that the activities of F3H, F3'H and ANS were positively correlated with the content of GC. The expression of *F3H* and *F3'H* genes was positively correlated with the contents of GC and CAT, and the expression of *ANS* and *PAL* genes was positively correlated with the contents of ECG and GC. It was found that the synthase and gene expression related to flavane-3-ol biosynthesis affected the accumulation of flavane-3-ol compounds in grape fruit, which further affected the sensory quality of grape wine.

Key words: Chardonnay; synthase activity; flave-3-ols; qRT-PCR; gene expression

酿酒葡萄是宁夏回族自治区的优势特色产业，宁夏贺兰山东麓作为中国葡萄酒“地理标志产品产地”之一，因其独特的气候、土壤条件，被业内公认为是世界酿酒葡萄栽培的“黄金”地带^[1]。‘霞多丽’ (Chardonnay)是贺兰山东麓主栽酿酒葡萄品种之一，其果实品质受到温度、光照、水分、海拔高度和土壤养分等环境因素的影响^[2]。果实成熟度、糖、酸、香气及多酚是评价酿酒葡萄果实品质的主要指标^[3]，葡萄酒“七分原料，三分酿”，葡萄品质是酿造优质葡萄酒的根基。黄烷-3-醇作为果实中含量最丰富的多酚类物质之一，是决定葡萄酒品质的一个重要因子，对葡萄酒涩、苦味的优劣和强弱，以及对葡萄酒的诸多感官品质^[4]，如色泽、风味、澄清度、收敛性、褐变及贮藏寿命和稳定性都具有决定性作用^[5-6]。同时，黄烷-3-醇能够被人体快速吸收，有一定的药理学作用和保健功能，如抗氧化性和清除自由基的活性^[7-8]，抑制动脉硬化和保护心血管^[9-10]，皮肤保健美容等作用，是葡萄果实和葡萄酒中非常重要的功能性成分^[11-13]。因此，研究酿酒葡萄中酚类物质对葡萄酒的酿造具有指导意义。

目前，国内外学者对酿酒葡萄中酚类物质的研究比较广泛，但是对与葡萄酒苦涩感相关的黄烷-3-醇类单体的定性定量研究较少。葡萄的成熟条件不同，葡萄中酚类物质的含量及类别也不相同，葡萄的适时采收将直接影响葡萄的质量，进而影响葡萄酒

的品质，通过酚类物质的研究则可以对葡萄成熟度做出更加准确的判断。前人^[14-15]采用高效液相色谱法对葡萄果实中的黄烷-3-醇单体含量进行了测定，结果发现葡萄果实含有儿茶素[(-)-catechin, CAT]、表儿茶素[(-)-epicatechin, EC]和表儿茶素没食子酸酯[(-)-epicatechin gallate, ECG] 3种单体。邓波^[16]以‘赤霞珠’和‘蛇龙珠’葡萄品质为试材，研究不同品种葡萄部位中黄烷-3-醇类化合物单体CAT、EC、ECG含量的差异，结果表明不同品种葡萄部位中黄烷-3-醇类化合物单体的含量有明显差异，‘赤霞珠’葡萄果皮和果梗中的CAT含量高于‘蛇龙珠’。李小龙^[17]研究表明，在葡萄果实发育过程中，‘赤霞珠’种子内酚类物质总量总体呈下降趋势，在幼果期其含量下降较为缓慢，果实成熟后期下降速率减缓并趋于稳定。黄烷-3-醇类物质是类黄酮代谢途径的产物^[18-19]，其生物合成是一个复杂的过程，由多个基因表达及相关酶综合调控。秦晨亮^[20]研究了赤霞珠果实不同发育阶段果皮中酚类物质与其相关酶活性之间的关系，发现赤霞珠葡萄果皮PAL活性在生长发育过程中呈双峰型变化趋势，分别在花后35和80 d达到高峰。*CHI*基因表达水平随着果实的发育而逐渐下降^[21]。但前人对于葡萄果实中黄烷-3-醇类单体的研究主要集中在干红葡萄上，而对白葡萄的研究报道较少。特别是白葡萄中黄烷-3-醇生物合成和积累与其合成相关

酶及相关基因表达的关系鲜见报道。因此,研究白葡萄品种果实中黄烷-3-醇单体及含量的变化规律,探讨其生物合成途径及相关酶活性变化、相关结构基因的表达,对于‘霞多丽’等白葡萄品种资源开发及利用具有重要意义。

本研究应用 HPLC 技术,通过对白葡萄品种‘霞多丽’果实中酚类物质的定性定量分析来探讨其在浆果发育过程中的变化规律和合成相关酶活性变化,同时利用 qRT-PCR 技术对果实发育过程中黄烷-3-醇生物合成相关结构基因进行定量分析,探讨黄烷-3-醇含量变化与其生物合成相关酶及相关基因的关系,对阐明酿酒葡萄次生代谢产物生物合成过程具有重要意义,同时也为优质酿酒葡萄品种的培育提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

宁夏贺兰山东麓地区白葡萄品种‘霞多丽’果实采自银川市美御酒业有限公司葡萄种植基地。葡萄树常规水肥管理,冬天埋土防寒,避免冻伤,用宽行密株的栽培方式,株行距为 0.5 m×3.0 m,单壁篱架栽培,每隔 10~15 cm 留 1 个结果枝,每个结果枝留 1 穗果。选取长势一致的‘霞多丽’葡萄优良植株 60 株,花后 20 d(2020 年 6 月 13 日)开始采样,每 10 d 采样 1 次,共采样 8 次。每次随机选取 3 株,于植株东、西两侧分别采集果穗各 1 穗,共 6 穗。果穗采集后,去除机械伤害、病虫害及发育异常果粒,装入冰盒,迅速带回实验室用液氮速冻后置于-80 ℃冰箱中保存备用。

1.2 仪器与设备

Aglient 1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);Light Cycler 4801I 型荧光定量 PCR 仪(Roche,Swiss);Christ Alpha 1-4 LSC plus 冷冻干燥机(德国 Christ 公司);FRQ-1006 单槽超声波清洗机(杭州法兰特超声波科技有限公司);KH19A

离心机(湖南凯达科学仪器有限公司)。

1.3 葡萄果实中黄烷-3-醇单体含量测定

1.3.1 葡萄果实中黄烷-3-醇的提取 将葡萄样品用液氮研磨,冷冻干燥,干燥后的粉末于-40 ℃冰箱中保存待用。称取葡萄果实干粉 1.0 g 置于 15 mL 离心管中,加入 10 mL 70% 甲醇(HPLC),摇匀,遮光超声 45 min(80 Hz)后离心 15 min(4 ℃),取上清液经 0.25 mm 滤膜过滤后上样待检。

1.3.2 黄烷-3-醇单体 HPLC 分析条件 色谱柱采用 Zorbax Eclipse SB-C18 (250 mm×4.6 mm,5 μm 粒度色谱柱);检测波长为 280 nm,柱温 40 ℃,进样量 10 μL,流速 0.5 mL/min。梯度洗脱:流动相 A 为 0.4% 甲酸水溶液,流动相 B 为乙腈(HPLC)。洗脱程序:0~10 min,B 1%~10%;10~20 min,B 10%~20%;20~32 min,B 20%~35%;32~35 min,B 35%~100%;35~37 min,B 10%。

1.3.3 黄烷-3-醇标准曲线的绘制 将 20 mg 没食子儿茶素(GC)、表儿茶素没食子酸酯(ECG)、儿茶素(CAT)、表儿茶素(EC)标品,加入 2 mL 70% 甲醇配成母液,将母液依次稀释为 100、50、25、10、5 mg/L 的 5 个不同浓度梯度的溶液,把准确配置的不同浓度的标准品混合液在上述色谱条件下分别进样 10 μL,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,建立标准曲线,数据和结果见表 1,所得液相图谱见图 1。从表 2 可知,4 种黄烷-3-醇单体的溶液浓度与峰面积相关系数均在 0.994 3 以上,说明相关性良好,可以满足定量的需要。

1.4 黄烷-3-醇生物合成相关酶活性的测定

苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性测定参照何慕涵等^[22]的方法,以 U·g⁻¹ 表示;查尔酮异构酶(CHI)活性测定参照高娅北等^[23]的方法,结果以 U·g⁻¹ 表示;黄烷酮 3-羟化酶(F3H)、二氢类黄酮还原酶(DFR)活性测定参考刘美玲等^[24]的方法,结果以 μg·g⁻¹·h⁻¹ 表示;类黄酮 3'-羟化酶(F3'H)活性

表 1 4 种黄烷-3-醇的线性方程及相关系数

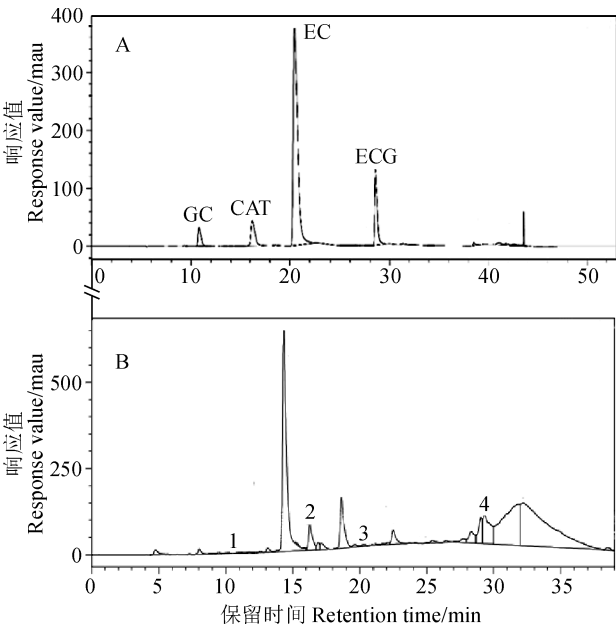
Table 1 Linear equations and correlation coefficients of four flavane-3-ols

化合物 Compound	保留时间 Retention time	线性方程 Linear equation	相关系数(r) Correlation coefficient
没食子儿茶素 Gallic catechin(GC)	10.762	y=4E+07x-103702	0.994 3
表儿茶素没食子酸酯 Epicatechin gallate(ECG)	29.111	y=6E+06x+430958	0.995 8
儿茶素 Catechin(CAT)	16.262	y=2E+06x+97300	0.999 6
表儿茶素 Epicatechin(EC)	20.510	y=5E+06x-73573	0.997 7

测定参考何凤平等^[25]的方法,结果以 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ 表示;花色素苷合成酶(ANS)活性测定参考杜丽娟^[26]的方法,结果以 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ 表示。

1.5 黄烷-3-醇生物合成相关结构基因表达分析

1.5.1 RNA 提取 葡萄果实总 RNA 的提取采用多糖多酚植物专用 RNA 提取试剂盒 Quick RNA



1. 没食子儿茶素(GC);2. 儿茶素(CAT);3. 表儿茶素(EC);
4. 表儿茶素没食子酸酯(ECG)

图 1 4 种黄烷-3-醇单体标准品(A)和样品(B)液相色谱图

1. (-)-gallocatechin(GC); 2. (-)-catechin(CAT);
3. (-)-epicatechin(EC); 4. (-)-epicatechin gallate(ECG)

Fig. 1 Liquid chromatogram of four flavane-3-ol monomers from standard (A) and sample(B)

isolation Kit 进行,具体步骤参见说明书。

1.5.2 cDNA 的合成 按照 Reverse Transcription System Kit 试剂盒说明,建立总体积为 20 μL 的反转录反应体系。首先在 DEPC 处理过的 PCR 管中加入总 RNA 2 μL ,再加入 50 $\mu\text{mol/L}$ Oligo(dT15) 1.5 μL ,变性 10 min 于 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中,立即冰浴 2 min,离心,将液体收集于管底。依次加入 4 μL 15xRT 缓冲液、1 μL RNA 酶抑制剂(Rnasin,20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)、2 μL dNTPs(200 $\mu\text{mol/L}$)、1 μL AMV 反转录酶、8.5 μL DEPC 处理水于冰浴中。混匀后离心,将液体收集于管底,42 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 1 h,99 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min,灭活反转录酶,立即冰浴 5 min,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.5.3 PCR 引物设计 根据 Gene Bank 中苯丙氨酸解氨酶(PAL)、查尔酮异构酶(CHI)、黄烷酮 3-羟化酶(F3H)、二氢类黄酮还原酶(DFR)、花青素合成酶(ANS)、类黄酮 3'-羟化酶(F3'H)基因的全长序列,利用 Primer 5.0 设计 PCR 扩增引物(引物序列见表 2),经北京擎科生物科技有限公司合成。选择 *Actin* 基因作为内参,对试验结果进行标准化处理。

1.6 数据分析

每个测定指标 3 次重复,结果以“平均值 $\pm$ 标准误差”表示,数据处理采用 Excel 2010,利用 SPSS19.0 软件进行方差分析(ANOVA),Duncan 多重比较方法进行差异显著性检验($P<0.05$),目的基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算;用 Pearson 相关性分析法揭示葡萄浆果发育过程中黄烷-3-醇积累代谢与基因表达量的耦合关系;用 Excel 2010 软件进行作图。

表 2 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 2 Primer sequences of real-time fluorescence quantitative PCR

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	产物长度 Product length/bp	基因登录号 Gene accession number
内参基因 <i>Actin</i> Internal reference gene	TCCTTGCCTTGCGTCATCTAT (F) CACCAATCACTCTCCTGCTACAA (R)	125	AB073011
苯丙氨酸解氨酶基因 <i>PAL</i> Phenylalanine ammonia lyase gene	CCGCTGAACTGGGGAATG (F) CACCGAGCCGAACAACCG (R)	914	VIT_8s0040g01710
查尔酮异构酶基因 <i>CHI</i> Chalcone isomerase gene	CAGGCAACTCCATTCTTTTC (F) TTCTCTATCACTGCATTCCC (R)	216	TC51784
花青素合成酶基因 <i>ANS</i> Anthocyanin synthase gene	TCCCCAGCCTGAATTGG (F) ACCCACTTGCCCTCATAGAAAA (R)	789	EF192468.1
黄烷酮 3-羟化酶基因 <i>F3H</i> Flavanone 3-hydroxylase gene	ATGTGGTCAACATCCACAAT (F) TTAGGCCAAAATCTGGTCAA (R)	402	GU585858.1
类黄酮 3'-羟化酶基因 <i>F3'H</i> Flavonoid 3-hydroxylase gene	ATGATGGCCCAAGCCCAACA (F) TTACTTCCCAGAAACTTGGG (R)	564	DQ298196.1
二氢类黄酮还原酶基因 <i>DFR</i> Dihydroflavonoid reductase gene	ATGGAACTTCAGAAACAAAA (F) TCAAATGGTATTCTTCCCGG (R)	502	X75964

2 结果与分析

2.1 ‘霞多丽’果实发育过程中黄烷-3-醇含量的变化

由表3可知,霞多丽葡萄果实在整个发育时期,黄烷-3-醇类化合物 GC、ECG 含量大部分时间远高于 CAT、EC 含量。其中,GC 含量随着果实发育整体呈先升高后下降趋势,在花后 40 d(7 月 3 日)出现峰值(40.02 mg/g),并与其他时期存在显著差异,花后 90 d(8 月 22 日)比峰值时显著减少了 91.85%;ECG 的含量在果实发育初期未检测到,在花后 50 d(7 月 13 日)时出现最高值(47.69 mg/g)并与其他时期差异显著,随后含量持续下降,且至花后 90 d(8 月 22 日)出现最低值,最低值比最高值显著降低了 53.87%;CAT 含量总体呈降-升-降的变化趋势,也在花后 50 d(7 月 13 日)时出现最高峰(18.68 mg/g),并与其他时期相比差异显著;EC 含量的变化总体呈先升后降趋势,同样在花后 50 d(7 月 13 日)达最大值(42.73 mg/g),比花后 40 d(7 月 3 日)增加了 2.19 倍,其最低值出现在花后 20 d(6 月 13 日),仅为 2.69 mg/g。

2.2 ‘霞多丽’果实发育过程中黄烷-3-醇生物合成相关酶活性的变化

黄烷-3-醇生物合成相关酶 PAL、F3H、F3’H、CHI、DFR 和 ANS 活性测定结果(图 2)表明,PAL 和 ANS 活性变化趋势较为一致,均呈先升高后降低的变化趋势,且在花后 30 d(6 月 23 日)出现最大值,并与其他时期存在显著差异;F3H、F3’H、CHI 活性都在花后 20 d(6 月 13 日)出现最大值,而后各酶活性

迅速降低,说明花后 20 d 是‘霞多丽’酶促反应发生的关键时期;DFR 活性先升高后降低,在花后 50 d(7 月 13 日)再次升高,后随果实成熟逐渐降低。另外,各种相关酶活性在 8/2~8/22 期间整体维持在偏低水平,且无显著差异。

2.3 ‘霞多丽’果实发育过程中黄烷-3-醇生物合成相关基因的表达特征

‘霞多丽’葡萄果实中黄烷-3-醇生物合成相关基因的表达分析结果(图 3)显示,在葡萄果实发育过程中,PAL、ANS 基因的表达情况相似,均是在果实生长初期(6/13~6/23)上调,且表现为显著上升趋势,至花后 30 d(6 月 23 日)达到最高值,随后表达水平大幅下降,总体呈下调趋势并维持在较低水平;F3H、CHI 基因表达均呈先下调后上调的趋势,随着果实成熟表达逐渐加强,CHI 基因相对表达量在花后 90 d(8 月 22 日)达到最大值,而 F3H 基因的相对表达量在果实生长初期(6 月 13 日)具有最大值,并远高于其余时期;F3’H 基因的表达水平在果实生长初期快速下调,而后随果实成熟逐渐上调,但仍始终显著低于生长初期的最大值(6 月 13 日);DFR 基因的表达水平随着果实生育期显著先上调,而后大幅度显著下调,随果实成熟再次上调,但仍始终维持在较低水平。

2.4 ‘霞多丽’果实发育过程中黄烷-3-醇含量与生物合成相关酶活性和相关基因表达量的相关性

由表 4 可见,‘霞多丽’葡萄果实中黄烷-3-醇单体 GC 含量与 CHI、DFR 基因相对表达量为负相关,与 F3H、F3’H 基因表达为正相关;ECG 含量与 ANS、PAL 基因表达为正相关,相关系数较小分

表 3 ‘霞多丽’果实发育过程中黄烷-3-醇类化合物的含量变化				
Table 3 Content changes of flavane-3-ols of Chardonnay during fruit development				
时期(月/日) Date(Month/day)	没食子儿茶素(GC) Gallic catechin/(mg/g)	表儿茶素没食子酸酯(ECG) Epicatechin gallate/(mg/g)	儿茶素(CAT) Catechin/(mg/g)	表儿茶素(EC) Epicatechin/(mg/g)
6/13	35.60±1.56b	ND	13.85±0.14b	2.69±0.37d
6/23	32.88±1.07b	ND	4.00±0.78d	3.97±0.38d
7/3	40.02±2.88a	43.90±0.35b	ND	19.52±0.54bc
7/13	19.57±1.20c	47.69±0.24a	18.68±1.13a	42.73±0.83a
7/23	16.56±1.04cd	39.35±0.98c	9.50±0.34c	23.67±1.24b
8/2	14.02±1.01d	34.83±0.35d	9.18±0.26c	3.58±0.15d
8/12	12.90±2.08d	45.26±0.22b	10.07±0.66c	ND
8/22	3.26±0.08e	22.00±0.48e	8.98±0.55c	7.13±0.39cd

注:ND 表示未检测到,不同小写字母表示同一物质不同时期差异显著($P<0.05$),下同

Note: ND means not detected. Different lowercase letters indicate significant differences of the same substance in different periods. The same as below

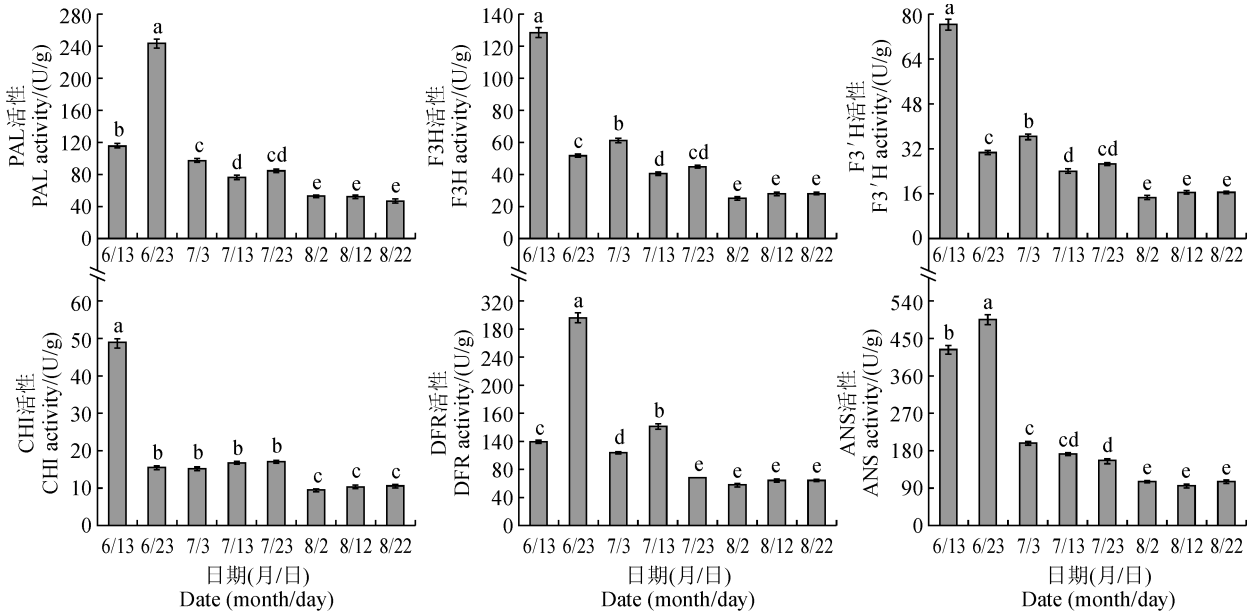


图 2 葡萄果实生长发育过程中黄烷-3-醇生物合成相关酶活性的变化

Fig. 2 Changes in the activities of enzymes related to flavane-3-ol biosynthesis during the growth and development of grape fruit

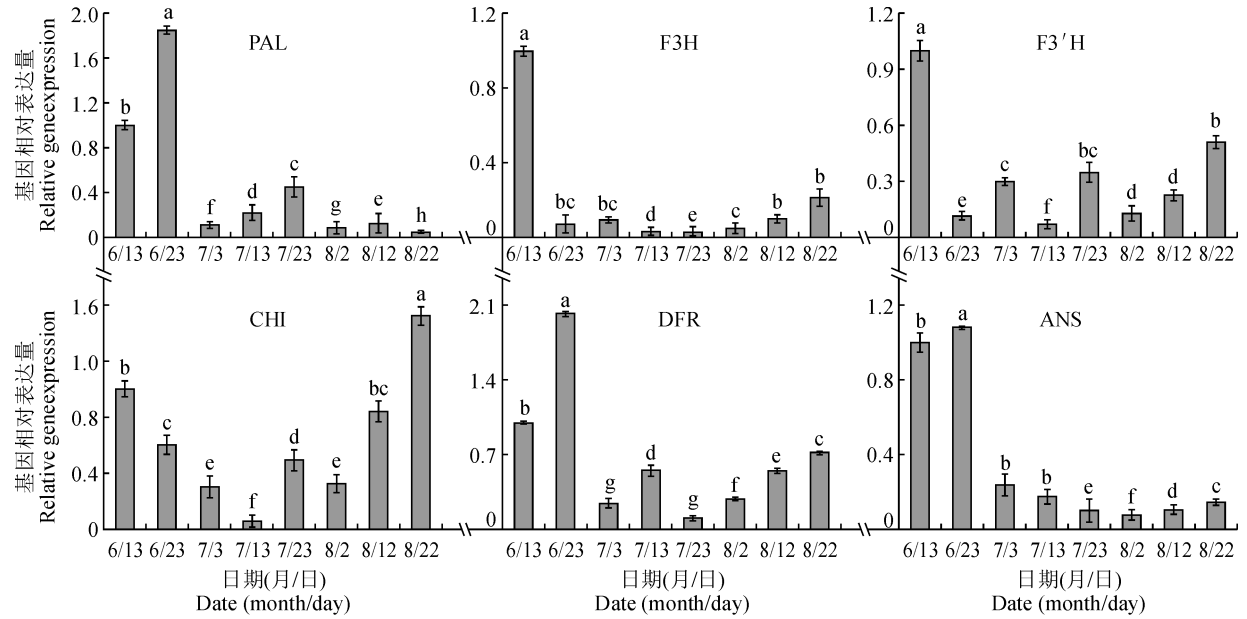


图 3 葡萄果实生长发育过程中黄烷-3-醇生物合成基因相对表达水平的变化

Fig. 3 Relative expression of flavane-3-ols biosynthesis gene in grape fruit during the fruit development

别为 0.252、0.338，与 *F3H*、*CHI*、*DFR*、*ANS*、*F3'H* 基因表达为负相关；CAT 含量与 *F3H*、*F3'H* 基因表达为正相关。但是，以上相关关系均未达到显著水平。

同时，GC 含量与生物合成相关酶活性均呈正相关关系，其中 *F3H*、*F3'H* 和 *ANS* 活性与 GC 含量为显著正相关，说明 *F3H*、*F3'H* 和 *ANS* 活性的提高可能对 GC 含量的积累有显著促进作用；EC 含

量与合成相关酶均为负相关关系，ECG 含量与合成相关酶均为正相关关系，而 CAT 含量与 *DFR*、*ANS* 和 *PAL* 酶活性呈负相关关系，与其他合成相关酶活性均呈正相关关系，但 EC、ECG、CAT 含量与生物合成相关酶活性的相关性均达到显著水平。

另外，黄烷-3-醇生物合成相关酶活性与相关基因表达量间，除 *DFR* 活性与 *CHI*、*F3H*、*F3'H* 基因表达量，*PAL* 活性与 *F3'H* 基因表达量为负相关

表 4 黄烷-3-醇含量与合成相关酶活性及相关基因表达量的相关系数

Table 4 Correlation coefficient between the content of flavane-3-ol and the activities of synthesis-related enzymes and the expression of related genes

指标 Index	相关基因表达量 Expression of related genes						相关酶活性 Activity of synthesis-related enzymes					
	F3H	CHI	DFR	ANS	F3'H	PAL	F3H	CHI	DFR	ANS	F3'H	PAL
F3H	0.89**	0.13	0.27	0.71*	0.80*	0.46	1					
CHI	0.93**	0.18	0.23	0.65	0.83*	0.41	0.97**	1				
DFR	−0.01	−0.18	0.89**	0.78*	−0.21	0.88**	0.22	0.14	1			
ANS	0.50	0.04	0.83*	0.98**	0.32	0.94**	0.69	0.62	0.83*	1		
F3'H	0.89**	0.13	0.27	0.71*	0.80*	0.46	1.00**	0.97**	0.22	0.69	1	
PAL	0.08	−0.12	0.85**	0.84**	−0.07	0.95**	0.34	0.23	0.95**	0.90**	0.34	1
GC	0.36	−0.36	−0.33	0.66	0.22	0.54	0.71*	0.54	0.54	0.72*	0.71*	0.64
EC	−0.41	−0.60	−0.43	−0.48	−0.42	−0.38	−0.25	−0.21	−0.10	−0.38	−0.25	−0.27
ECG	−0.73	−0.78	−0.32	0.25	−0.71	0.34	0.46	0.53	0.59	0.50	0.46	0.56
CAT	0.26	−0.32	−0.44	−0.24	0.17	−0.44	0.26	0.36	−0.31	−0.23	0.26	−0.47

注: * 表示相关性在 0.05 水平上是显著的, * * 表示相关性在 0.01 水平上是极显著的

Note: * indicates that the correlation is significant at 0.05 level, and * * indicates that the correlation is extremely significant at 0.01 level

外,其他合成相关酶活性与基因表达量间均为正相关,其中 *CHI* 基因表达量与各合成相关酶活性间相关性较弱,其他基因表达量与黄烷-3-醇生物合成相关酶活性相关性较强,除个别酶外,二者相关性达到显著或是极显著正相关关系。

3 讨 论

黄烷-3-醇是葡萄果实品质评价的一个重要指标,在决定葡萄酒的涩感、色泽及氧化等方面发挥重要作用^[27-30]。本研究通过分析葡萄浆果发育过程中黄烷-3-醇单体含量的积累及相关酶基因的表达特征,为‘霞多丽’葡萄功能成分的综合开发利用提供依据。赵权^[31]研究结果表明,黄烷-3-醇类化合物含量在葡萄果实整个发育过程中呈下降趋势。‘夏黑’葡萄果实中黄烷醇含量在花后 21 ~ 42 d 迅速增加至峰值,之后随果实成熟逐渐下降,幼果期含量显著高于成熟期^[32]。本试验结果表明,在‘霞多丽’葡萄果实发育的不同阶段,其黄烷-3-醇类物质在花后 50 d 之前积累最多,可能是因为这一时期的呼吸作用和新陈代谢强烈,之后检测出的 GC、ECG、CAT、EC 含量均随果实成熟下降,这与 Fujita 等^[33]和 Cadot 等^[34]的研究结果一致。‘赤霞珠’葡萄果实在生长成熟过程中,儿茶素处于先积累,后下降至平稳状态,表儿茶素没食子酸酯具有不稳定性,总体呈下降状态^[6]。本研究中 ECG 在‘霞多丽’葡萄果实发育初期未检测到,可能是因为这一时期 ECG 含

量比较低;CAT 含量随着葡萄的成熟总体呈减少趋势,这与王美丽^[35]的研究结果相似;CAT 等具有较强的抗氧化、抗衰老、抑菌等功能^[36],若考虑葡萄果实的功能作用,在完全成熟前采收是较好的时期。

酚类物质是葡萄中重要的次生代谢物,其生物的合成和积累受到相关基因的调控, PAL、F3H、F3'H、CHI、DFR 和 ANS 是黄烷-3-醇合成的相关酶,大量研究表明其基因参与了葡萄黄烷-3-醇的合成调控。彭东^[37]、王爱华^[38]等研究表明烟叶 PAL 活性随烟叶成熟而增强,成熟后随烟叶衰老而降低,本研究表明,‘霞多丽’果实发育过程中黄烷-3-醇生物合成相关酶 PAL 活性呈先升高后降低的变化趋势,这与前人的研究结果相似;其余合成酶 F3H、F3'H、CHI、DFR 和 ANS 活性均随着葡萄成熟而降低,可能是由于随生育期的延长体内生理代谢活动减弱所引起的。本研究同时发现,随着‘霞多丽’葡萄果实的成熟,酚类物质生物合成相关基因的表达也发生变化,这些基因的表达差异导致黄烷-3-醇积累模式的变化。其中,ANS 基因表达量先上调后下调,后随果实成熟逐渐上调,但仍低于花后 20 d,这与马雅娜^[39]研究结果相似。

已有研究表明,石榴在果实发育期间 ANS 基因的表达与花色苷含量呈显著正相关^[40], PAL 基因的表达与烟叶中的类黄酮含量呈显著正相关^[23]。在本研究‘霞多丽’葡萄果实中, F3H、F3'H 和 ANS 活性与 GC 含量达显著正相关水平,表明 F3H、F3'

H 和 ANS 活性对 GC 含量的积累影响较大。ANS、PAL 基因的表达量与其 ECG、GC 含量呈正相关,即黄烷-3-醇含量与结构基因表达量呈正相关关系,说明该基因可能是影响黄烷-3-醇含量的主要结构因子,对 ECG、GC 含量合成的调控作用较强,基因表达量越高,越容易促进黄烷-3-醇类物质的生物合成。另外,F3H 基因表达量与 F3'H 活性,PAL 基因表达量与 DFR、ANS 活性之间也存在极显著正相关关系。因此可根据 F3H、F3'H 和 ANS 活性和 ANS、PAL 基因的表达量高低来判断‘霞多丽’葡萄果实中黄烷-3-醇的合成积累水平。

参考文献:

[1] 李亚军. 地理标志产品保护对贺兰山东麓葡萄酒的发展影响[J]. 企业改革与管理, 2018,(7): 216-217.
LI Y J. The influence of geographical indication product protection on the development of wine at the eastern foot of Helan Mountain [J]. *Enterprise Reform and Management*, 2018, (7): 216-217.

[2] 张立华, 林益明, 叶功富, 等. 环境因素对植物单宁形成的影响[J]. 鲁东大学学报(自然科学版), 2010, 26(4): 366-372.
ZHANG L H, LIN Y M, YE G F, *et al.* Effects of environmental factors on the formation of plant tannins [J]. *Ludong University Journal* (Natural Science Edition), 2010, 26(4): 366-372.

[3] 王丽娜. 宁夏产区酿酒葡萄品质与葡萄酒质量的研究[D]. 陕西杨陵: 西北农林科技大学, 2011.

[4] 温鹏飞, 牛兴艳, 邢延富, 等. 土壤干旱对葡萄果实中黄烷醇类多酚时空积累及隐色花色素还原酶活性、组织定位的影响[J]. 中国农业科学, 2013, 46(14): 2 979-2 989.
WEN P F, NIU X Y, XING Y F, *et al.* Effects of soil drought on spatio-temporal accumulation of flavanols polyphenols, activity of leucoanthocyanidin reductase and tissue localization in grape fruits [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(14): 2 979-2 989.

[5] 温鹏飞, 邢延富, 牛铁泉, 等. 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素还原酶表达的影响[J]. 中国农业科学, 2012, 45(21): 4 428-4 436.
WEN P F, XING Y F, NIU T Q, *et al.* Effects of UV-C on the accumulation of flavanols polyphenols and the expression of leucoanthocyanidin reductase during grape fruit development [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(21): 4 428-4 436.

[6] 牟京霞. 酿酒葡萄成熟过程中黄烷-3-醇类化合物含量变化的研究[D]. 济南: 山东轻工业学院, 2011.

[7] RICARDO D A, SILVA J M, RIGAUD J, *et al.* Procyanidin dimers and trimers from grape seeds [J]. *Phytochemistry*, 1991, 30(4): 1 259-1 264.

综上所述,在‘霞多丽’葡萄果实发育过程中,黄烷-3-醇单体含量随果实成熟逐渐下降,黄烷-3-醇类物质的积累与葡萄果实中其生物合成相关酶活性及相关基因表达有关。F3H、F3'H 和 ANS 活性与‘霞多丽’葡萄果实中 GC 含量为显著正相关;F3H、F3'H 基因可能促进 GC、CAT 的合成,ANS、PAL 基因促进 ECG、GC 的合成,CHI、DFR 基因抑制 GC 的合成。总之,黄烷-3-醇生物合成的相关酶活性和相关基因表达影响了葡萄果实中黄烷-3-醇类化合物含量的积累,从而进一步影响葡萄酒的感官品质。

[8] TEISSEDE P L, FRANKEL E N, WATERHOUSE A L, *et al.* Inhibition of *in vitro* human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1996, 70(1): 55-61.

[9] FRANKEL E, KANNER J, KINSELLA J E. Inhibition in vitro of ox-iation of human low density lipoproteins by phenolic substances in wine[J]. *The Lancet*, 1993, 341(8 843): 1-4.

[10] TEBIB K, BITRI L, BESANCON P, *et al.* Polymeric grape seed tannins prevent plasma cholesterol changes in high-cholesterol-fed rats [J]. *Food Chemistry*, 1994, 49(4): 403-406.

[11] 范明远, 叶 音. 体内自由基清除剂及抗氧化剂—原花青素的研究进展[J]. 中国预防医学杂志, 2001, 2(4): 303-305.
FAN M Y, YE Y. Research progress of free radical scavengers and antioxidants-proanthocyanidins *in vivo* [J]. *Chinese Preventive Medicine*, 2001, 2(4): 303-305.

[12] BAGCHI D, BAGCHI M, STOHS S J. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: Importance in human health and disease prevention[J]. *Toxicology*, 2000, 148(2/3): 187-197.

[13] HUYNH T H, TEE R W. Selective induction of apoptosis in human mammary cancer cells (MCF-7) by pycnogenol[J]. *Anticancer Research*, 2000, 20(4): 2 417-2 420.

[14] KENNEDY J A, TROUP G J, PILBROW J R, *et al.* Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz[J]. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2000, 6(3): 244-254.

[15] IBERN-GOMEZ M, ANDRES-LACUEVA C, LAMUELA-RAVENTOS RM, *et al.* Rapid HPLC analysis of phenolic compounds[J]. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2002, (3): 218-221.

[16] 邓 波. 品种、负荷对酿酒葡萄黄烷-3-醇类化合物影响[D]. 济南: 山东轻工业学院, 2012.

[17] 李小龙. 酿酒葡萄果实生长发育过程中酚类物质变化规律的研究[D]. 陕西杨陵: 西北农林科技大学, 2015.

[18] SAITO K, YAMAZAKI M, TANSLEY. Biochemistry and

molecular biology of the late-stage of biosynthesis of anthocyanin: Lessons from *Perilla frutescens* as a model plant[J]. *New Phytologist*, 2002, **155**(1): 9-23.

[19] SPRINGOB K, NAKAJIMA J I, YAMAZAKI M, *et al.* Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins[J]. *Natural Product Reports*, 2003, **20**: 288-303.

[20] 秦晨亮, 丁 玲, 代红军. 赤霞珠葡萄果实发育过程中酚类物质含量与相关酶活性的关系[J]. *浙江农业学报*, 2015, **27**(11): 1 922-1 926.

QIN C L, DING L, DAI H J. Relationship between phenolic content and related enzyme activities during fruit development of Cabernet Sauvignon grape [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2015, **27**(11): 1 922-1 926.

[21] 周 军, 姚泉洪, 彭日荷, 等. 巨峰葡萄查尔酮异构酶基因克隆及表达分析[J]. *西北植物学报*, 2009, **29**(9): 1 723-1 729.

ZHOU J, YAO Q H, PENG R H, *et al.* Cloning and expression analysis of chalcone isomerase gene *CHI* in Kyobo grape by semi-quantity RT-PCR [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2009, **29**(9): 1 723-1 729.

[22] 何慕涵, 苏文华, 张光飞, 等. 不同地区短葶飞蓬总黄酮含量与 PAL 和 4CL 酶活性的比较[J]. *中国农学通报*, 2012, **28**(25): 179-183.

HE M H, SU W H, ZHANG G F, *et al.* Comparison of total flavonoids content and PAL and 4CL enzyme activities of *Erigeron breviscapus* in different regions [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, **28**(25): 179-183.

[23] 高娅北, 李成刚, 陈二龙, 等. 烤烟烟叶类黄酮合成关键酶活性及其调控基因表达分析[J]. *中国烟草学报*, 2019, **25**(1): 86-92.

GAO Y B, LI C G, CHEN E L, *et al.* Analysis of key enzyme activities and expression of regulatory genes in synthesis of flavonoids in flue-cured tobacco [J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2019, **25**(1): 86-92.

[24] 刘美玲, 刘玉冰, 曹 波. 液质联用法测定干旱胁迫下红砂 (*Reaumuria soongorica*) 叶片 F3H、DFR 酶活性[J]. *生态学杂志*, 2012, **31**(8): 2 158-2 162.

LIU M L, LIU Y B, CAO B. The activities of F3H and DFR in leaves of *Reaumuria soongorica* under drought stress were determined by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). *Chinese Journal of Ecology*, 2012, **31**(8): 2 158-2 162.

[25] 何凤平, 潘永贵, 张伟敏. 鲜切荸荠类黄酮 3'-羟化酶分离纯化及其动力学性质[J]. *食品科学*, 2017, **38**(8): 17-23.

HE F P, PAN Y G, ZHANG W M. Isolation, purification and kinetic properties of flavonoid 3-hydroxylase from fresh-cut shepherd [J]. *Food Science*, 2017, **38**(8): 17-23.

[26] 杜丽娟. UV-C 对葡萄果实发育中花色苷积累及 ANS 表达的影响[D]. 山西太谷: 山西农业大学, 2015.

[27] LEE J, KENNEDY J A, DEVLIN C, *et al.* Effect of early seed removal during fermentation on proanthocyanidin extraction in red wine: A commercial production example[J]. *Food Chemistry*, 2008, **107**(3): 1 270-1 273.

[28] KANTZ K, SINGLETON VL. Isolation and determination of polymeric polyphenols in wines using sephadex LH-20[J]. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1991, (42): 309-315.

[29] VIDAL S, CARTALADE D, SOUQUET J M, *et al.* Changes in proanthocyanidins chain in wine-like model solutions[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, **50**(8): 2 261-2 266.

[30] MONAGAS M, GÓMEZ-COROVÉS C, BARTOLOMÉ B, *et al.* Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, **51**(22): 6 475-6 481.

[31] 赵 权. 葡萄酚类物质及其生物合成相关结构基因表达[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2010.

[32] 陈洪强, 夏 惠, 王 进, 等. 葡萄果皮类黄酮含量的变化及其相关基因表达[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2020, **46**(2): 165-170.

CHEN H Q, XIA H, WANG J. *et al.* Changes of flavonoid content and expression of related genes in grape pericarp [J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2020, **46**(2): 165-170.

[33] FUJITA A, SOMA N, YAMAMOTO N G, *et al.* Anthocyanidin reductase gene expression and accumulation of flavan-3-ols in grape berry[J]. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2005, **56**(4): 336-342.

[34] CADOT Y, MIÑANA CASTELLÓ M T, CHEVALIER M. 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[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, **563**(1/2): 65-75.

[35] 王美丽. 葡萄成熟过程与葡萄酒陈酿过程单体酚变化的研究[D]. 陕西杨陵: 西北农林科技大学, 2006.

[36] 毛清黎, 施兆鹏, 李 玲, 等. 茶叶儿茶素保健及药理功能研究新进展[J]. *食品科学*, 2007, **28**(8): 584-589.

MAO Q L, SHI Z P, LI L, *et al.* New progress in health care and pharmacological functions of tea catechins [J]. *Food Science*, 2007, **28**(8): 584-589.

[37] 彭 东, 陈爱国, 梁洪波, 等. 不同种质材料烟草各时期多酚含量和组成差异分析[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. 2012.

[38] 王爱华. 烤烟生长和调制过程中主要多酚类物质代谢动态的研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2005.

[39] 马雅娜. 葡萄果实 MybPA1、MybPA2 克隆及其表达规律研究[D]. 山西太谷: 山西农业大学, 2016.

[40] 招雪晴, 苑兆和. 2 个石榴品种果皮花色苷合成相关基因表达分析[J]. *西北植物学报*, 2018, **38**(5): 823-829.

ZHAO X Q, YUAN Z H. Expression analysis of genes related to anthocyanin synthesis in pericarp of 2 pomegranate varieties [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2018, **38**(5): 823-829.

(编辑: 裴阿卫)