

冯 娇, 侯旭东, 董礼花, 等. GA_3 与 CPPU 对葡萄果锈相关物质合成及基因表达的影响[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(3): 642-650.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.03.024

GA_3 与 CPPU 对葡萄果锈相关物质合成及基因表达的影响

冯 娇¹, 侯旭东¹, 董礼花², 陶建敏¹

(1. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095; 2. 灌南县蔬菜办公室, 江苏 灌南 223500)

摘要: 为探究葡萄的防锈措施, 本研究以阳光玫瑰葡萄为试验材料, 于花后 14 d, 用 25 mg/L 的 GA_3 分别和 0 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、15 mg/L 的 CPPU 组合处理果穗, 以清水处理为对照(CK)。待果实进入转色期后分别采集不同成熟阶段的葡萄果实, 通过实时荧光定量 PCR 测定与果锈生成相关的苯丙氨酸解氨酶(PAL)基因和白藜芦醇合酶(RS)基因的表达水平, 测定葡萄果皮果锈发生率、果皮中次生代谢物含量等指标。结果表明, 果实成熟过程中, 与对照相比, GA_3 +CPPU 处理后, PAL 和 RS 基因表达水平降低, PAL 基因表达峰值、RS 基因表达水平均与 CPPU 处理浓度呈负相关。与对照相比, GA_3 +CPPU 处理显著降低了果皮中白藜芦醇、总酚和木质素含量, 咖啡酸、香豆酸、丁香酸等酚酸含量随 CPPU 浓度增加显著下降, 儿茶素和没食子酸含量随 CPPU 处理浓度增大先升后降。 GA_3 +CPPU 处理的葡萄果皮果锈发生率明显降低。与 GA_3 +5 mg/L CPPU 处理的葡萄果实相比, GA_3 +10 mg/L CPPU 和 GA_3 +15 mg/L CPPU 处理的葡萄果实成熟期推迟, 风味下降, 商品性显著降低。因此, 生产实践上用 GA_3 +CPPU 处理阳光玫瑰葡萄果穗的适宜质量浓度为 25 mg/L GA_3 +5 mg/L CPPU。

关键词: 阳光玫瑰; 果锈; GA_3 +CPPU 处理; 基因表达; 次生代谢物

中图分类号: S663.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2018)03-0642-09

Effects of GA_3 and CPPU on the synthesis of related substances and gene expression of berry russet of grapes

FENG Jiao¹, HOU Xu-dong¹, DONG Li-hua², TAO Jian-min¹

(1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Vegetable Office of Guannan County, Guannan 223500, China)

Abstract: In order to explore the russet prevention measures of grapes, table grape cultivar Shine Muscat was used as material. On the 14th day after anthesis, grape fruit clusters were treated with 25 mg/L GA_3 (Gibberellin A₃) + 0 mg/L CPPU (forchlorfenuron), 25 mg/L GA_3 + 5 mg/L CPPU, 25 mg/L GA_3 + 10 mg/L CPPU and 25 mg/L GA_3 + 15 mg/L CPPU, respectively, and treated with water as control(CK).

After the fruit entered veraison, grape fruits in different stages of maturity were collected separately. The expression levels of phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene related to the formation of fruit russet and resveratrol synthase (RS) gene were measured by real-time fluorescence quantitative PCR. The fruit skin russet level and secondary metabolites content in grape peel were determined. The results show that, compared with the control, the gene ex-

收稿日期: 2017-09-26

基金项目: 国家现代农业葡萄产业技术体系项目(CARS-29); 国家“948”重点项目(2016-X19); 江苏省农业三三工程项目[SXGC(2017)274、SXGC(2016)001]; 江苏省农业重大新品种创制项目(PZCZ201723)

作者简介: 冯 娇(1992-), 女, 山西运城人, 硕士, 助理农艺师, 主要从事果树生理与分子技术研究。(E-mail)478710492@qq.com

通讯作者: 陶建敏, (E-mail)taojianmin@njau.edu.cn

pression level of *PAL* and *RS* after CPPU treatment were decreased during the process of fruit ripening. The expression peak value of *PAL* gene and the expression level of *RS* gene negatively correlated with the concentration of CPPU treatment. To compared with those in control, the contents of total phenol, resveratrol and lignin in pericarp of berries were significantly decreased in the treatment of GA₃ and CPPU. With the increase of CPPU concentration, the content of phenolic acids such as caffeic acid, fenugreek acid and clove acid decreased significantly however, the content of catechin and gallic acid increased first and then decreased. The incidence of berry russet was reduced significantly under the treatment of GA₃ and CPPU. Compared with that of the grape berries treated with GA₃ and 5 mg/L CPPU, the maturity of the grape berries treated with GA₃ and 10 mg/L CPPU or 15 mg/L CPPU was delayed, the flavor was decreased and the marketability was decreased significantly. Therefore, the optimum treatment was 25 mg/L GA₃ combined with 5 mg/L CPPU.

Key words: Shine Muscat; fruit russet; the treatment of GA₃ and CPPU; gene expression; secondary metabolites

阳光玫瑰 (*Vitis labruscana* Bailey×*V. vinifera* L. Shine Muscat) 是二倍体鲜食葡萄品种^[1], 引自于日本, 因其果粒较大, 且品质优良, 受到大量葡萄生产者和消费者的欢迎。但中国大多数地区栽培的阳光玫瑰成熟时浆果表面却出现微小的红褐色斑点, 称为果锈, 影响果面光洁度, 降低了葡萄的市场价值, 严重影响经济效益。果锈是一层褐色的木栓化次生保护组织, 形状为条状或不规则锈斑, 主要在果皮表面发生^[2-4]。砂梨和苹果上的果锈是由生长应力和外在因素导致微观裂隙, 随后通过外表皮细胞的细胞壁内侧木栓质的积累形成高塑性的外周膜引起的果皮生理性紊乱^[5]。

果锈是果实成熟期的一种生理紊乱现象。花期多雨、低温、高湿、植株营养失调、病虫害、用药不当、机械损伤、果园通风不良等都是诱发果锈生成的外界环境因素^[6]。Suehiro^[7]等推测白藜芦醇等酚类化合物、*PPO* 等多酚氧化酶基因与葡萄果锈生成相关; 研究结果表明, 咖啡酸-*O*-甲基转移酶基因 (*COMT*) 和肉桂酸-4-羟化酶 (*C4H* 酶) 基因等木栓质合成基因的表达加强, 外表皮细胞的细胞壁内侧木栓质的积累, 形成果锈^[8-10]。从果锈的形成途径来看, 果锈的重要组分木栓层的形成与木质素合成有关^[5,11], 木质素的合成, 促进木栓形成层出现, 从而在一定程度上促进锈斑的形成^[12]。

GA₃ (赤霉素) 和 CPPU (氯吡脞) 作为植物生长调节剂在葡萄的生产栽培中已有广泛应用。GA₃ 和 CPPU 的使用显著抑制果锈的生成, 提高葡萄的果实品质^[13-14]。目前已有研究表明, 外源 GA₃ 可防止苹果果锈形成^[15], 适当浓度的外源绿原酸处理可显著降低金冠苹果果锈指数^[16], 套袋也可以在一定程度上控制苹果、梨、葡萄果实表面果锈的生成, 降低果锈发生程度, 提高果面光洁

度^[17]。冯娇等从转录组测序角度, 初步探究了 GA₃ 和 CPPU 抑制葡萄果锈生成的机理^[3], 本研究结合之前的测序结果以及相关文献, 同样以 GA₃ 和不同浓度的 CPPU 组合处理阳光玫瑰葡萄果穗, 通过体视显微镜观察同一成熟时期不同处理的葡萄果皮特征, 从果锈生成相关酚类物质和木质素含量等生理方面及相关基因表达等角度阐述 GA₃ 和 CPPU 对果锈生成的影响, 探究该品种的防锈技术, 旨在为新型品种阳光玫瑰的标准化生产栽培提供理论依据和技术指导。

1 材料和方法

1.1 材料

试验于 2016 年 5–10 月在南京农业大学汤山葡萄实验基地进行。供试品种为 7 年生阳光玫瑰葡萄, 采用平棚架避雨栽培, 株行距为 3.0 m×6.0 m, “H”型树形, 土、肥、水管理及病虫害防治同常规。

1.2 方法

1.2.1 田间处理与样品采集 选取树体生长势基本一致的阳光玫瑰葡萄树, 处理前将花穗修剪至距离穗尖约 6 cm 的位置。于花后 2 周分别用 25 mg/L GA₃ (处理 I), 25 mg/L GA₃ + 5 mg/L CPPU (处理 II), 25 mg/L GA₃ + 10 mg/L CPPU (处理 III), 25 mg/L GA₃ + 15 mg/L CPPU (处理 IV) 浸蘸花穗 5~10 s。处理前集中疏果, 每穗大小及遮阴情况保持一致。“H”型树形的每一个主蔓作为一个处理, 4 个处理随机分布于 6 棵树, 每个处理 3 个主蔓, 余下主蔓用清水处理作为对照 (CK)。

果实进入转色期 (7 月 31 日) 开始, 每隔 7 d 取 1 次样品, 从每个处理果穗的上、中、下部随机取 50 粒大小均匀、成熟度一致的果实, 用冰袋带回实验室, 剥离果皮, 液氮速冻, -70 °C 冷冻保存, 用于荧光

定量 PCR 试验;待果实完全成熟时(9 月 18 日),采集 5 个处理的葡萄果实,通过体视显微镜观察果锈发生情况,取果皮置于 -70°C 冰箱中保存,用于测定白藜芦醇、香豆酸、丁香酸等酚类物质及木质素含量等。

1.2.2 试剂与仪器 赤霉素(上海同瑞生物科技有限公司产品),CPPU(四川省兰月科技有限公司产品), Na_2CO_3 、冰乙酸、溴乙酰、高氯酸、Folin-Ciocalteu 试剂、甲醇分析纯、乙酸乙酯、盐酸、抗坏血酸、甲醇(色谱纯)、乙醇、没食子酸、香豆酸、咖啡酸、阿魏酸、儿茶素、丁香酸和白藜芦醇标品均购自上海源叶生物公司,体视显微镜(LEICA S8AP0),酶标仪(德国 TECAN 公司产品),SB-5200DT 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司产品),超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司产品)等。

1.2.3 果锈指数统计 参照张勃等^[12]的方法,从 7 月 31 日起,对 CK 和各处理果实分别进行分级和锈斑率统计。根据果锈程度将果实分级:无锈果为 0 级,果锈面积 $<5\%$ 为 1 级,果锈面积 $6\%\sim 15\%$ 为 2 级,果锈面积 $16\%\sim 25\%$ 为 3 级,果锈面积 $>25\%$ 为 4 级。

果锈指数 $= (0\text{级}\times a + 1\text{级}\times b + 2\text{级}\times c + 3\text{级}\times d + 4\text{级}\times e) \times 100 / (4\text{级}\times n)$ 。其中 a 、 b 、 c 、 d 、 e 分别为 0~4 级果的统计数, n 为样本总数。

1.2.4 体视显微镜观察 利用体视显微镜(放大 25 倍)观察同一成熟时期(9 月 18 日)CK 和 4 种不同处理阳光玫瑰葡萄果实的果皮特征,并拍照记录果皮果锈的发生情况。

1.2.5 单体酚类物质含量测定 采用反相高效液相色谱法测定阳光玫瑰葡萄果皮中单体酚类物质的含量。分别取 3 g 同一成熟时期(9 月 18 日)CK 和不同处理的阳光玫瑰葡萄果皮,研磨后溶于 25 ml 100%甲醇中,加入 80 mg 抗坏血酸(溶于 15 ml 纯水中),再加入 10 ml 6 mol/L 盐酸,将所有溶液置于 100 ml 锥形瓶中,超声波降解处理 2 min,充氮气排出锥形瓶内的空气,密封后置于 35°C 提取 16 h 后,12 000 r/min、 4°C 离心 20 min,吸取上清液, 40°C 旋转蒸发除去甲醇,用 30 ml 乙酸乙酯溶解后先萃取 1 次,之后再用 20 ml 乙酸乙酯萃取 2 次,合并所有萃取液,在 40°C 条件下旋转蒸发至干再溶于 5 ml 50%甲醇(色谱纯)中,置于 -70°C 条件下避光保存。将经过处理的果皮样品在确定的色谱条件下

进样,根据标准曲线定量。

1.2.6 白藜芦醇含量测定 采用高效液相色谱法测定阳光玫瑰葡萄果皮中白藜芦醇含量。分别称取 1 g 同一成熟时期(9 月 18 日)的 CK 和不同处理的果皮样品,研磨后迅速与 25 ml 80%的乙醇混匀,在 60°C 水浴锅中水浴 30 min, 4°C 8 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液。在液氮中速冻至固态后,放入冷冻干燥器中冻干至粉末状态(避光),溶解在 2 ml 50%的乙醇中,转移至 2 ml 离心管中,离心后吸取上清液,储存于 -70°C 备用。上样前用 1.0 ml 注射器吸取处理好的样品通过 $0.2\ \mu\text{m}$ 的有机系滤膜过滤,使用标准曲线法定量。

1.2.7 总酚含量测定 总酚含量的测定采用 Folin-Ciocalteu 试剂法。分别取同一成熟时期(9 月 18 日)CK 和不同处理的果皮经液氮研磨后,准确称取 2 g 于 50 ml 锥形瓶中,加入 10 ml 甲醇(分析纯,含 2% HCl),在室温、黑暗条件下提取 24 h, 4°C 、12 000 r/min 离心 10 min,吸出上清液。吸取 200 μl 上清液于 5.0 ml 的离心管中,加入 1.0 ml 的 Folin-Ciocalteu 试剂,0.8 ml 7.5%的 Na_2CO_3 溶液,缓慢搅拌反应 30 min 后,用酶标仪在 765 nm 处比色测定吸光度 OD 值。没食子酸作标准品制作标准曲线。

1.2.8 木质素含量测定 样品制备:将同一成熟时期(9 月 18 日)CK 和不同处理的阳光玫瑰葡萄果皮用剪刀剪碎,然后将样品绝对烘干,研成粉末,用电子天平准确称取果皮 0.02 g 各 3 份。将制备好的样品粉末放入 5 ml 试管中,加入 25%的溴乙酰-乙酸溶液(质量比)2.00 ml 和高氯酸 0.08 ml,将管口密封,于 70°C 恒温水浴 30 min,每隔 10 min 振荡试管。取四分之一的反应液,移入已装有 1.0 ml 2 mol/L NaOH 和 2.5 ml 冰乙酸混合液的容量瓶内,振荡充分混匀并用冰乙酸定容至 10.0 ml。以冰乙酸为空白溶液,用酶标仪对样品溶液在波长 260 nm 处进行扫描测定吸光度。

参照 Hatfield 等^[18]的方法, $Lignin = Abs \times liters \times 100\% / W_{\text{sample}}$,Lignin 为木质素含量,Abs 为样品溶液木质素吸光度,Liters 为样品溶液定容体积(ml), W_{sample} 为样品干质量(g)。

1.2.9 实时荧光定量 PCR 用 RNA 试剂盒(Foregene)提取果皮总 RNA,以总 RNA 为模板利用 Takara Prime ScriptTM RT-PCR 试剂盒反转录合成 cDNA,并将合成后的 cDNA 用无菌 ddH₂O(双蒸水)稀释,

浓度稀释至 150 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。实时荧光定量 PCR 以 *VvUbiquitin* 为内参基因(表 1)。实时荧光定量 PCR 20 μl 反应体系为: Takara SYBR Premix *Ex Taq* (TaKaRa) 10.0 μl , 上游引物和下游引物各 0.4 μl , 稀释 10 倍的 cDNA 1.0 μl 和 8.2 μl 去离子水。反应程序如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s, 40 个循环。每个样品做 3 次平行反应, 运用 ABI7300 软件和 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法计算相对表达量。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 The primer sequences used in real-time fluorescence quantitative PCR

基因	引物序列(5'→3')
苯丙氨酸解氨酶(PAL)	F: CCGCTGAAGTGGGAATG
	R: CACCGAGCCGAACAACCG
白藜芦醇合酶(RS)	F: TGGTGCTTATATGGCTCC
	R: CGAGTTTGAATCCGCAC
内参基因(<i>VvUbiquitin</i>)	F: GTGGTATTATTGAGCCATCCTT
	R: AACCTCCAATCCAGTCATCTAC

1.3 统计分析

所有测定重复 3 次, 数据经 Excel 2007 和 SPSS16.0 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 阳光玫瑰不同处理间果锈指数的比较

从 7 月 31 日开始, 统计不同处理果面的果锈情况, 并计算果锈指数。7 月 31 日至 8 月 14 日 CK 和不同处理果面都没有果锈发生。从 8 月 16 日起, 极少数 CK 果面开始出现少量锈斑, 随着葡萄果实成熟, 出现果锈的葡萄变多, 锈斑面积增大, 果锈指数急剧增长, 直至 9 月中旬 CK 的果锈指数趋于稳定。处理 I 自 8 月 25 日起果面出现少量锈斑, 伴随成熟, 果锈指数呈上升趋势。处理 II 自 8 月 31 日起少量果实果面出现极少锈斑, 不同于 CK 和处理 I, 处理 II 的葡萄果实锈斑面积小, 出现果锈的葡萄少, 果锈指数上升趋势相对小。处理 III 和处理 IV 的阳光玫瑰直至 9 月中旬开始成熟时才有极少量果实果面出现果锈, 果锈指数很低, 几乎可以忽略不计(图 1)。

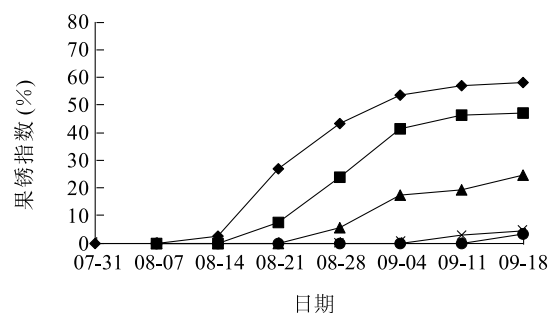


图 1 阳光玫瑰不同处理间果锈指数变化动态
Fig.1 The dynamic change of fruit russet index of Shine Muscat under different treatments

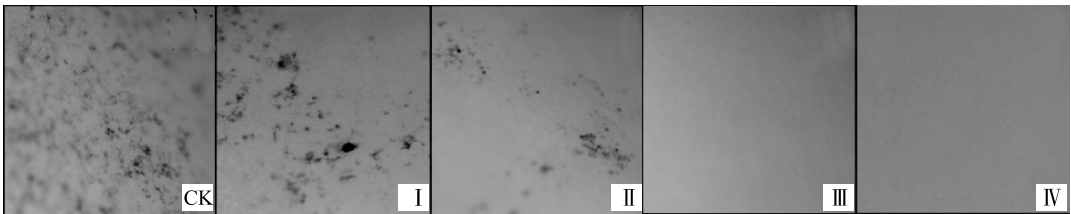
2.2 同一成熟时期不同处理阳光玫瑰葡萄果皮特征差异

图 2 显示, 同一成熟时期不同处理的阳光玫瑰果皮表面存在显著差异。CK、处理 I 和处理 II 的葡萄果皮均有果锈出现, 且果锈依次减少, 处理 III 和处理 IV 的葡萄果皮几乎看不到果锈。从果皮颜色来看, CK、处理 I、处理 II、处理 III 和处理 IV 的葡萄果皮颜色从黄色逐渐到黄绿色。

2.3 GA₃与不同浓度的 CPPU 处理对阳光玫瑰葡萄果锈相关基因表达的影响

由图 3 可知, 阳光玫瑰葡萄果实发育过程中, 从 8 月 21 日开始, 对照果实 PAL 基因的表达水平急剧上升, 此时 CK 果实表面开始出现果锈, 在果实成熟时 PAL 基因的表达达到最大峰值, 之后由于过于成熟, 表达水平相对下降; 处理 I 和处理 II PAL 基因在 8 月 28 日表达水平急剧上升, 此时处理 I 果实表面已出现锈斑, 处理 II 果实表面开始出现锈斑, 且与 CK 果实相比, 处于同一成熟时期时, 与对照相比, PAL 基因表达量相对降低; 处理 III 和处理 IV 在果实成熟过程中, 基因表达水平呈缓慢上升趋势, 至果实成熟时表达量变化幅度不大, 这与成熟时期处理 III 和处理 IV 葡萄果实表面也未出现果锈有关。

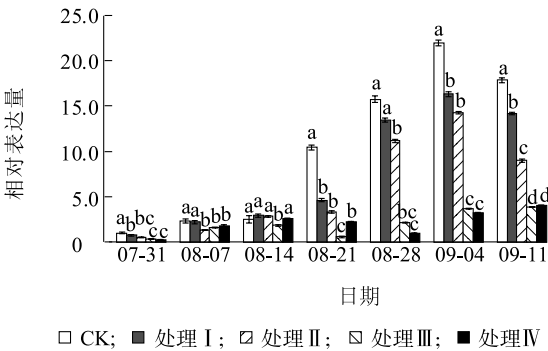
图 4 显示, 阳光玫瑰葡萄果实成熟过程中, 白藜芦醇合成酶(RS)基因的表达量缓慢上升, CK 果实成熟期表达水平最高。与对照相比, 处理 I 的葡萄果实 RS 基因的表达水平相对降低, 在 8 月 14 日、8 月 28 日和 9 月 4 日之间差异显著, 其余时期差异不显著;



CK、处理 I、处理 II、处理 III、处理 IV 见图 1 注。
图 2 同一成熟时期不同处理阳光玫瑰葡萄在体视显微镜下果皮特征差异

Fig.2 Differences in peel characteristics of Shine Muscat grapes with different treatments at the same maturity stage under stereo-microscope

相比于对照,处理II表达水平下降,差异显著;相比于对照,处理III和处理IV表达水平大幅下降,差异极显著。表明,RS 基因的表达趋势与果实成熟进程相一致。



CK、处理 I、处理 II、处理 III、处理 IV 见图 1 注。
图 3 果实成熟过程中 PAL 基因的表达水平变化

Fig.3 Changes of expression level of PAL gene during fruit maturation

2.4 同一成熟时期不同处理阳光玫瑰葡萄果皮单
体酚类物质含量差异

反相超高效液相色谱结果(表 2)显示,香豆酸、
丁香酸和阿魏酸整体含量较高,变化幅度相对较大;

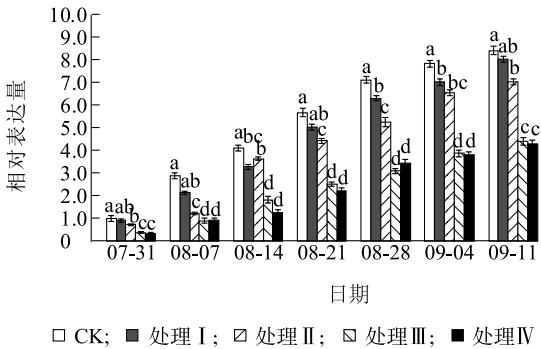
表 2 UPLC 测得的阳光玫瑰葡萄果皮单体酚类物质含量

Table 2 The content of monomeric phenolic compounds in the peel of Shine Muscat grapes by UPLC

处理	单体酚类物质含量 (mg/kg, FW)					
	没食子酸	香豆酸	儿茶素	咖啡酸	丁香酸	阿魏酸
CK	2.27±0.06b	4 241.24±15.83a	0.91±0.13d	0.58±0.01a	597.31±3.65a	297.27±4.26a
处理 I	2.15±0.03b	4 005.26±14.86b	4.08±0.11b	0.37±0.02b	537.74±1.84b	42.72±1.41b
处理 II	2.70±0.07a	3 699.14±7.46c	5.41±0.03a	0.27±0.01c	389.24±0.61c	8.71±0.05c
处理 III	2.07±0.09c	3 312.58±9.03d	3.01±0.32c	0.19±0.01d	370.29±0.24d	6.95±0.16c
处理 IV	2.03±0.10c	2 765.92±10.02e	2.85±0.19c	0.03±0.01e	158.02±0.38e	8.95±0.72c

CK、处理 I、处理 II、处理 III、处理 IV 见图 1 注。

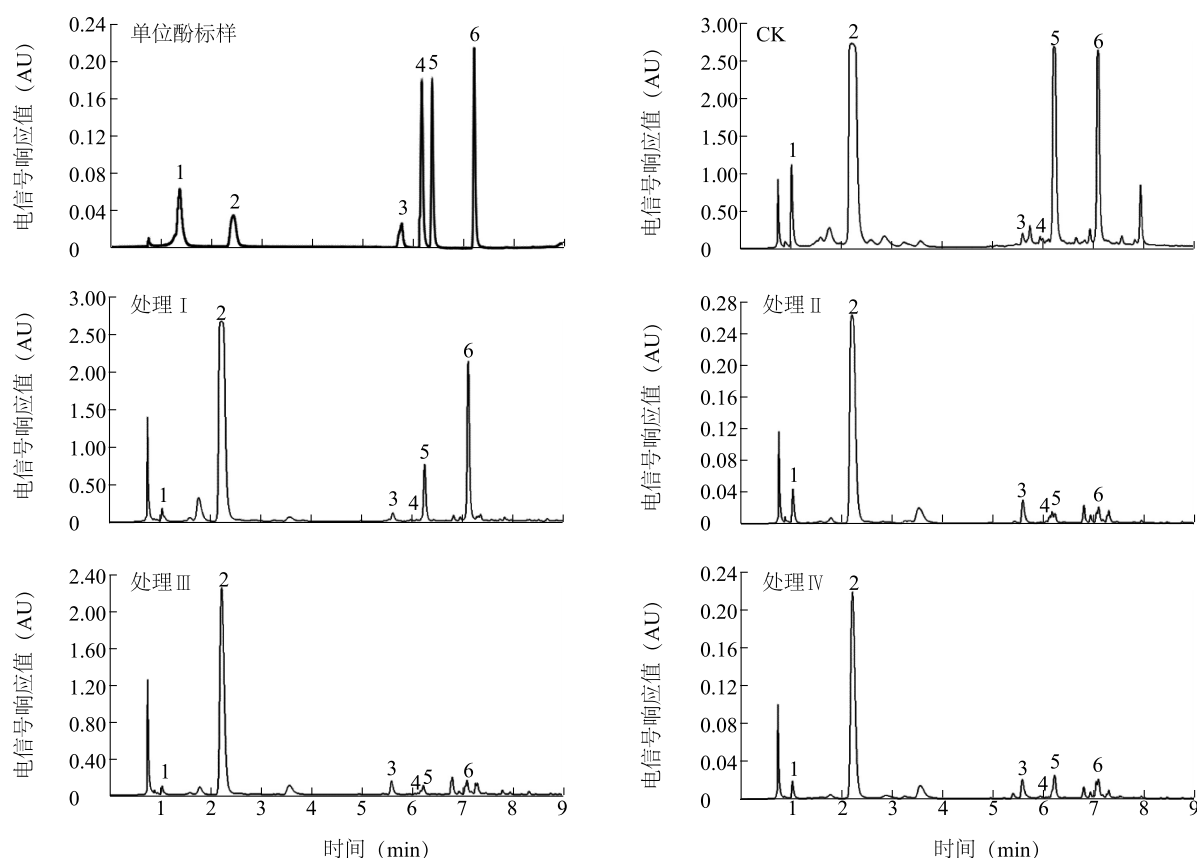
没食子酸、儿茶素含量偏低,咖啡酸含量最低。随着 CPPU 处理浓度增大,香豆酸、咖啡酸、丁香酸含量呈下降趋势,阿魏酸含量先降后升。CK 儿茶素含量最低,处理 I 和处理 II 的儿茶素含量上升,处理 III 和处理 IV 果皮儿茶素含量相对降低,但仍高于 CK。CK 和处理 I 没食子酸含量无显著差异,与处理 II、处理 III 和处理 IV 含量差异显著,呈先增大后降低的趋势。6 种单体酚的标样色谱图及经 5 种不同处理后葡萄果皮中 6 种单体酚含量的色谱图如图 5。



CK、处理 I、处理 II、处理 III、处理 IV 见图 1 注。

图 4 果实成熟过程中 RS 基因的表达水平变化

Fig.4 Changes of expression level of RS gene during fruit maturation



CK、处理 I、处理 II、处理 III、处理 IV 见图 1 注。1: 没食子酸; 2: 香豆酸; 3: 儿茶素; 4: 咖啡酸; 5: 丁香酸; 6: 阿魏酸。

图 5 标样及不同处理色谱图

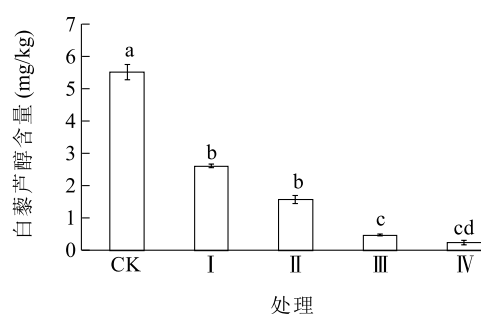
Fig.5 Chromatogram of different treatment and standard sample

2.5 同一成熟时期不同处理阳光玫瑰葡萄果皮白藜芦醇含量差异

超高效液相色谱结果(图 6)显示,同一成熟时期,与 CK 相比,经 GA₃+CPPU 处理的阳光玫瑰葡萄果皮中白藜芦醇含量降低,处理浓度越大,含量越低,且差异显著。处理 III 和处理 IV 之间差异不显著,这与不同处理同一成熟时期成熟度不同有关,成熟度越高,白藜芦醇含量越高。

2.6 同一成熟时期不同处理阳光玫瑰葡萄果皮总酚含量差异

由图 7 可知,同一成熟时期,经过 GA₃+CPPU 处理后的阳光玫瑰葡萄果皮总酚含量下降,与 CK 相比,处理 I 差异不显著,处理 II、处理 III 和处理 IV 差异显著;处理 I、处理 II 和处理 III 之间无显著差异,处理 III 和处理 IV 之间无显著差异。以上结果表明,GA₃+CPPU 抑制阳光玫瑰葡萄果皮中总酚的合成,抑制作用与处理浓度成正相关。



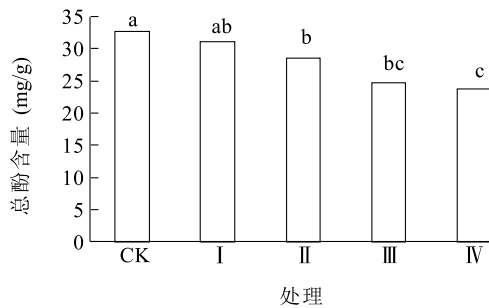
CK、处理 I、处理 II、处理 III、处理 IV 见图 1 注。不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 6 UPLC 测得的不同处理阳光玫瑰葡萄果皮白藜芦醇含量的差异

Fig.6 Difference of resveratrol content in different treatments of the peel of Shine Muscat grapes by UPLC

2.7 同一成熟时期不同处理阳光玫瑰葡萄果皮木质素含量差异

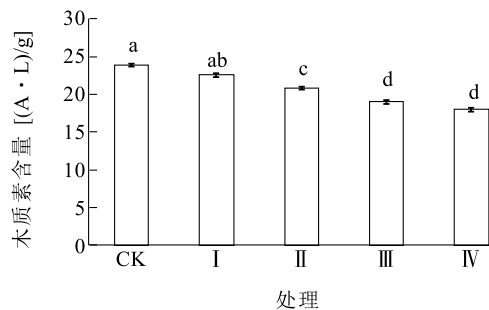
由图 8 可知,同一成熟时期,经 GA₃+CPPU 处



CK、处理 I、处理 II、处理 III、处理 IV 见图 1 注。不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 7 同一成熟时期不同处理阳光玫瑰葡萄果皮总酚含量差异
Fig.7 Difference of total phenolic content in different treatments of the peel of Shine Muscat grapes at the same maturity stage

理后的阳光玫瑰葡萄果皮木质素含量降低。与 CK 相比,处理 I 无显著差异,处理 II、处理 III 和处理 IV 差异显著;处理 III 和处理 IV 之间无显著差异。结果表明,GA₃+CPPU 抑制阳光玫瑰葡萄果皮中木质素的合成,浓度增大,抑制作用越显著,CPPU 浓度达到 10 mg/L 和 15 mg/L 时,抑制作用不再增强。



CK、处理 I、处理 II、处理 III、处理 IV 见图 1 注。不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 8 同一成熟时期不同处理阳光玫瑰葡萄果皮木质素含量差异

Fig.8 Difference of lignin content in different treatments of the peel of Shine Muscat grapes at the same maturity stage

3 讨论

从果锈的发生结果来看,葡萄果实达到一定成熟度时才会出现锈斑,未处理的阳光玫瑰果锈更明显,可能与其成熟度更高有关。这与前人在 CPPU 推迟脱落酸合成高峰且使其峰值变小上的研究结果相一致^[19]。推测 CPPU 推迟了果实的成熟期,促进

IAA 合成,IAA 可能抑制果锈生成^[11,20],因而果锈减少,具体机理尚待研究。

GA₃ 搭配不同浓度的 CPPU 处理阳光玫瑰葡萄果穗,伴随处理浓度增大成熟期依次推迟,成熟时同一时期 CK 成熟度最高;与对照相比,处理浓度依次增大,白藜芦醇含量和总酚含量依次降低,这与孙建平^[21]的研究结果一致,高成熟阶段的葡萄果实酚类物质生物活性高于低成熟阶段的葡萄果实。香豆酸、丁香酸和阿魏酸 3 种酚酸类物质变化幅度较大,随着 CPPU 浓度增大而下降,与总酚含量变化趋势存在伴随性。咖啡酸、没食子酸和儿茶素含量变化幅度相对较小,CPPU 处理浓度增大,咖啡酸含量降低;CK 果皮的儿茶素含量最低,处理 I 和处理 II 的果皮儿茶素含量上升,处理 III 和处理 IV 的果皮儿茶素含量相对降低,但仍高于 CK;与儿茶素类似,随处理浓度增大,没食子酸含量呈先升高后降低的趋势。这可能是由于 CK 果皮中一部分儿茶素和没食子酸最终转化为木质素,促进木栓形成层出现,进而在一定程度上促进果锈形成,果锈指数升高。

苯丙烷类代谢途径是植物次生物质代谢中的重要途径,与酚酸、类黄酮和白藜芦醇等酚类物质及木质素等许多次生代谢物的合成有关^[12]。在苹果和梨上的研究表明,苯丙烷代谢的次级产物代谢途径参与了果锈形成过程^[22]。苯丙烷代谢途径中,苯丙氨酸在苯丙氨酸解氨酶(PAL)的催化下转化为肉桂酸,肉桂酸羟化酶(C4H)催化肉桂酸转化为香豆酸,香豆酸在 4-香豆酸-CoA 连接酶(4CL)的催化下活化为 4-香豆酰-CoA,结合乙酰-CoA 在白藜芦醇合成酶(RS)的催化下合成白藜芦醇;香豆酸在酶的催化作用下,经咖啡酸、阿魏酸和芥子酸等中间产物,生成香豆醇、松柏醇和芥子醇,依次聚合形成 3 种木质素单体,最终聚合成苯丙烷合成途径的终产物——木质素^[23-24]。木质素是木栓层形成,果实质化的标志^[25]。果锈是一层木栓化次生保护组织^[2],酚类物质、木质素的含量变化与果锈生成密切相关。

PAL 是苯丙烷代谢途径的起始限速酶,它的转录水平直接影响酚类物质和木质素的合成水平^[26]。RS 是二苯乙烯合酶(STS)中的一类,是白藜芦醇等芪类化合物合成途径中特有的酶^[27]。在果实成熟过程中,PAL 基因表达水平总体呈上升趋势,果实成熟后有所下降,RS 基因表达水平持续上调,与果实

成熟进程相一致。果实成熟时期,CK 果实成熟度最高,*PAL* 和 *RS* 基因表达量呈最大值,对应于 CK 果实成熟时期总酚、香豆酸等单体酚、白藜芦醇等酚类物质和木质素含量最高。与 CK 相比,果实成熟时期,处理 I、处理 II、处理 III 和处理 IV 的基因表达水平总体依次呈显著下降的趋势,对应于同一成熟时期处理 I、处理 II、处理 III 和处理 IV 的果实总酚等酚类物质和木质素含量依次下降。同时,各处理葡萄果皮 *PAL* 基因的转录水平变化趋势与其表面果锈的出现时间顺序相一致。以上结果表明,*PAL* 和 *RS* 基因与葡萄果锈出现在一定程度上具有相关性。

从生理生化角度分析,同一成熟时期,CK 葡萄果皮酚类物质含量最多,木质素合成最多,促进木栓形成层出现,从而在一定程度上促进果面锈斑形成^[28];处理 I 和处理 II 的阳光玫瑰葡萄果皮酚类物质和木质素含量依次减少,在一定程度上抑制木栓形成层的发生,但果皮表面仍有不同程度的锈斑生成,CPPU 浓度加大,果锈显著减少;处理 III 和处理 IV 的葡萄酚类物质和木质素含量很低,木栓层活动弱,果实果面几乎无锈斑。综上所述,同一成熟时期,GA₃+CPPU 处理显著降低葡萄果皮中白藜芦醇、香豆酸等酚类物质含量和木质素含量,木栓层活动受到抑制,一定程度上抑制果锈生成,CPPU 浓度为 10 mg/L 和 15 mg/L 时,果面几乎无锈斑。

本试验结果表明,GA₃ 与不同浓度的 CPPU 组合处理阳光玫瑰果穗,能显著减少果皮表面锈斑生成。然而在果皮表面果锈显著减少的前提下,与 5 mg/L CPPU 相比,10 mg/L CPPU 和 15 mg/L CPPU 处理后的葡萄果实成熟期推迟,成熟时风味下降,果实硬度提高,容易出现僵果,商品性显著下降。因此总体来说,使用 25 mg/L GA₃+5 mg/L CPPU 处理的阳光玫瑰葡萄果面洁净,锈斑较少,成熟期适中,显著提高商品价值。因此,GA₃ 与 CPPU 组合浸蘸果穗是生产上解决阳光玫瑰葡萄果锈问题的有效方法,推荐使用 25 mg/L GA₃+5 mg/L CPPU 的处理。

参考文献:

- [1] YAMADA M, YAMANE A, SATO N, et al. New grape cultivar 'Shine Muscat' [J]. Bulletin of the National Institute of Fruit Tree Science, 2008, 7: 21-38.
- [2] OGORO A, ONO T, KAGAMI H, et al. Skin-browning occurred on berries of 'Suihou' grape [J]. Bull Okayama Agri Exp Sta, 2007, 25: 5-10.
- [3] 冯 娇,王 武,侯旭东,等. 基于转录组测序技术探究 GA₃ 和 CPPU 抑制葡萄果锈产生的机理 [J]. 江苏农业学报, 2017, 33 (4): 895-903.
- [4] 聂继云,重雅凤,马智勇,等. 金冠苹果果锈的发生原因及防治 [J]. 北方果树, 2001 (3): 3-4.
- [5] WANG Y Z, DAI M S, CAI D Y, et al. A review for the molecular research of russet/semi-russet of sand pear exocarp and their genetic characters [J]. Scientia Horticulturae, 2016, 210: 138-142.
- [6] 吴 江,程建徽,张月华,等. 黄绿色葡萄品种果皮锈斑问题及防治措施 [J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2006 (6): 41-42.
- [7] SUEHIRO Y, MOCHIDA K, ITAMURA H, et al. Skin browning and expression of *PPO*, *STS*, and *CHS* genes in the grape berries of 'Shine Muscat' [J]. Journal-Japanese Society for Horticultural Science, 2014, 83 (2): 122-132.
- [8] LEGAY S, GUERRIERO G, DELERUELLE A, et al. Apple russetting as seen through the RNA-Seq lens: strong alterations in the exocarp cell wall [J]. Plant Mol Biol, 2015, 88 (1/2): 21-40.
- [9] WANG Y Z, DAI M S, ZHANG S J, et al. Exploring candidate genes for pericarp russet pigmentation of sand pear (*Pyrus pyrifolia*) via RNA-Seq data in two genotypes contra sting for pericarp color [J]. PLoS One, 2014, 9 (1): e83675.
- [10] WANG Y Z, ZHANG S, DAI M S, et al. Pigmentation in sand pear (*Pyrus pyrifolia*) fruit: biochemical characterization, gene discovery and expression analysis with exocarp pigmentation mutant [J]. Plant Mol Biol, 2014, 85: 123-134.
- [11] JEAN-JACQUES M, JEAN-CLAUDE S, ANNIE F, et al. Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wine [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1991, 30 (3): 441-486.
- [12] 张 勃. 套袋对黄冠梨果实锈斑形成和发育的影响 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2004.
- [13] 辛守鹏,刘 帅,余 阳,等. 赤霉素与细胞分裂素对葡萄果实邻近叶光合特性及果实品质的影响 [J]. 应用生态学报, 2015, 26 (7): 1814-1820.
- [14] RETAMALES J, BANGERTH F, COOPER T, et al. Effects of CPPU and GA₃ on fruit quality of 'Sultanina' table grape [J]. Plant Bioregulators in Horticulture, 1995, 394: 149-158.
- [15] BARANDOOZI F N, TALAIE A. The effect of gibberellins on russetting in 'Golden Delicious' apples [J]. Journal of Horticulture and Forestry, 2009, 1 (4): 61-64.
- [16] 李健花,高晶晶,冯新新,等. '金冠' 苹果与其无锈芽变的果皮性状比较和防锈技术研究 [J]. 园艺学报, 2014, 41 (1): 35-43.
- [17] 柯凡君,张绍铃,陶书田,等. 不同果袋对'黄金'和'丰水'梨发育微环境及果实品质的影响 [J]. 南京农业大学学报, 2011, 34 (2): 33-37.
- [18] HATFIELD R D, GRABBER J, RALPH J, et al. Using the acetyl bromide assay to determine lignin concentrations in herbaceous plants: some cautionary notes [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 1999, 47 (2): 628-632.

- [19] 王央杰,李三玉,王向阳. CPPU 对巨峰葡萄果粒肥大和内源激素水平的影响[J]. 园艺学报, 1997,24(1):84-86.
- [20] MOCHIDA K, MAKI S, OHNISHI A, et al. Relationship between skin-browning symptom (called 'kasuri-sho') and mineral nutrient contents in the skin of 'Shine Muscat' grapes[J]. Bull Shimanagi Exp Sta, 2013,41:41-50.
- [21] 孙建平. 不同种葡萄果皮中酚类物质的分离及其生物活性研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2003.
- [22] HENG W, LIU L, WANG M D, et al. Differentially expressed genes related to the formation of russet fruit skin in a mutant of 'Dangshansuli' pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) determined by suppression subtractive hybridization[J]. Euphytica, 2014, 196(2):285-297.
- [23] 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(1):1922-1926.
- [24] VILLALOBOS-GONZALEZ L, PENA-NEIRA A, FREDDY IBAN E Z, et al. Long-term effects of abscisic acid (ABA) on the grape berry phenylpropanoid pathway: Gene expression and metabolite content[J]. Plant Physical and Biochemistry, 2016, (105):213-223.
- [25] 吴锦程,唐朝晖,陈群,等.不同贮藏温度对枇杷果肉木质化及相关酶活性的影响[J].武汉植物学研究,2006,24(3):235-239.
- [26] CHEN J Y, WEN P F, KONG W F, et al. Changes and subcellular localizations of the enzymes involved in phenylpropanoid metabolism during grape berry development[J]. Journal of Plant Physiology, 2006,163:115-127.
- [27] ZHANG E H, GUO X F, MENG Z F, et al. Construction, expression and characterization of *Arabidopsis thaliana* 4CL and *Arachis hypogaea* RS fusion gene 4CL:RS in *Escherichia coli*[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2015,31:1379-1385.
- [28] 陈建中,葛水莲,王有年,等. 桃内果皮木质化与其相关酶的关系[J]. 河南农业科学,2008,37(9):100-103.

(责任编辑:陈海霞)