

水杨酸对“赤霞珠”葡萄中白藜芦醇诱导合成的影响

高彩琴, 范永, 代红军, 王振平

(宁夏大学 葡萄与葡萄酒教育部工程研究中心, 宁夏 银川 750021)

摘要:以“赤霞珠”酿酒葡萄为试材,系统研究了葡萄果实生长发育过程中白藜芦醇(Res)的变化规律,同时探讨了水杨酸的喷施对葡萄果皮及叶片中白藜芦醇合成的诱导作用及与苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性间的关系,以研究不同浓度水杨酸(SA)对酿酒葡萄白藜芦醇诱导合成的影响。结果表明:水杨酸对葡萄白藜芦醇具有显著的诱导效果,在葡萄幼果期诱导率较高,但诱导时间较短暂;而且不同水杨酸浓度对葡萄果皮中白藜芦醇含量和苯丙氨酸解氨酶活性呈正相关,其中4 mM的水杨酸对葡萄白藜芦醇的诱导效果最佳。

关键词:“赤霞珠”葡萄;白藜芦醇(Res);诱导;苯丙氨酸解氨酶(PAL);水杨酸

中图分类号:S 663.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)06-0020-04

白藜芦醇(简称 Res)化学名称为 3,4,5-三羟基二苯乙烯(3,4,5-trihydroxystilbene),是含有芪类结构的非黄酮类多酚化合物。该物质最初是作为葡萄属植物的抗逆物质-植物抗毒素(Phytoalexin)而被发现的,它的产生与葡萄植株受真菌的侵染或非生物刺激(如紫外辐射、臭氧处理、植物生长调节剂、机械损伤等)有关^[1]。它在自然界主要有顺式、反式白藜芦醇及顺式、反式白藜芦醇苷 4 种存在形式,植物中白藜芦醇通常以稳定的反式糖苷形式存在^[2]。目前白藜芦醇已经在 21 科 31 属 72 种植物中被发现,如葡萄科的葡萄属、蛇葡萄属,豆科的落花生属、决明属,蓼科的蓼属等^[3],然而就其含量而言,葡萄属最高。葡萄是世界上普遍栽培和产量较高的水果之一,我国东起沿海浙江平原,西至新疆盆地,北起严寒的黑龙江,南至亚热带的广西,都盛产野生或栽培的各种葡萄,年产量达 100 多万 t,为我国白藜芦醇保健产品的开发提供了充足的原料。但是白藜芦醇在植物中的含量极低,不经诱导几乎很少能提取到白藜芦醇,因此,开发富含白藜芦醇的葡萄已成为制约此领域研究的瓶颈。

现以酿酒葡萄品种“赤霞珠”(Vitis vinifera L. Cabernet Sauvignon)为试材,系统研究了葡萄生长发育过程中葡萄果皮及叶片中白藜芦醇的变化规律,并且探

讨了水杨酸喷施对葡萄白藜芦醇的诱导情况,以期为开发富含白藜芦醇的葡萄提供试验依据,并为今后白藜芦醇保健品的研发打下一定的基础,同时也为开发富含白藜芦醇的优质保健葡萄酒提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为定植于 2002 年的“赤霞珠”(Vitis vinifera L. Cabernet Sauvignon),采用单臂篱架整形方式,东西行栽植,株距 0.5 m,行距 3.0 m,肥力中等,中短梢修剪的普通管理方式。

1.2 试验方法

水杨酸诱导室外试验于 2012 年 6~10 月在宁夏玉泉营农场葡萄基地进行,室内测定试验在宁夏大学葡萄与葡萄酒教育部工程研究中心生理栽培实验室完成。宁夏玉泉营农场葡萄基地位于贺兰山东麓冲积扇与黄河冲积平原之间,土地面积广阔,地形相对平坦,西有贺兰山天然屏障抵御寒流,东有引黄灌渠横穿而过,可满足葡萄各个生长时期的水分需要^[4-5]。在葡萄生长的幼果期(2012 年 7 月 13 日),选 90 株长势相同、无病害的 11 年生“赤霞珠”葡萄植株进行标记,配制浓度分别为 2、4、6、8、10 mmol/L 的水杨酸溶液,对葡萄叶面及果穗均匀喷施,在葡萄成熟期(2012 年 8 月 24 日)进行 2 次喷施。每个处理选 15 株葡萄,5 株为 1 个小区,设置 3 次重复,随机区组设计。以喷施蒸馏水为对照。每 2 周采样 1 次,每次采样时,从各处理植株的上、中、下 3 个部位的 5~6 个果穗上采取大小均一的果实和完好的叶片,经液氮速冻后放入 -80℃ 低温冰箱保存。

1.3 项目测定

白藜芦醇的提取测定参照曹庸等^[6]的方法,略有改

第一作者简介:高彩琴(1986-),女,硕士研究生,研究方向为葡萄栽培与生理。E-mail:812706983@qq.com.

责任作者:王振平(1965-),男,教授,现主要从事葡萄栽培及葡萄酒酿造等研究工作。E-mail:wangzhp@nxu.edu.cn.

基金项目:国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS-30-zP-8);国家自然科学基金资助项目(31260456)。

收稿日期:2013-12-11

动,取样重复3次;苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的测定参照薛应龙^[7]的方法,略有改动,取样重复3次。

1.4 数据分析

试验数据采用 SAS 8.2 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 葡萄生长发育过程中果皮和叶片中的白藜芦醇的变化规律

由图1可以看出,在“赤霞珠”葡萄生长发育过程中果皮中 Res 含量呈先增后减的双峰变化趋势;在坐果33 d之前几乎没有 Res 产生,坐果47 d后,葡萄进入了糖分快速积累阶段,同时伴随着果实转色,此时,果皮中 Res 含量迅速升高,在花后61 d, Res 含量达到最高峰,为54.2 $\mu\text{g/g}$,随着葡萄发育进入成熟阶段, Res 含量逐渐下降;在盛花后94 d果皮中 Res 含量降到最低为36.21 $\mu\text{g/g}$,随之葡萄果皮中 Res 含量又有所升高,到采收期9月23日,葡萄果皮中 Res 的含量为44.36 $\mu\text{g/g}$ 。究其原因,在葡萄进入成熟期,9月12日以后,宁夏地区普遍迎来一次大范围的降雨过程,葡萄由于受到雨水逆境的胁迫,导致葡萄果皮中 Res 含量有所升高。

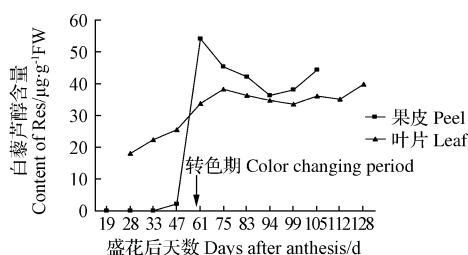


图1 葡萄果实生长发育过程中果皮和叶片中白藜芦醇含量的变化

Fig. 1 Changes of Res contents in peel and leaves during the growth and development of grape

由图1还可以看出,在“赤霞珠”葡萄生长发育过程中,叶片中 Res 含量均低于果皮。从7月8日(花后28 d)开始,随着葡萄叶片的成熟,叶片中 Res 含量逐渐升高,到盛花后75 d,葡萄叶片中 Res 含量达到最高值,为38.25 $\mu\text{g/g}$ 。随着葡萄叶片的老化,叶片中 Res 含量略有降低,但降幅不大,到9月23日葡萄采收期,叶片中 Res 含量为36.02 $\mu\text{g/g}$ 。到10月16日(花后128 d)葡萄冬季修剪时,叶片中 Res 含量有所升高。说明白藜芦醇在葡萄叶片中也呈双峰变化趋势。但到葡萄修剪时,葡萄叶片已大面积干枯,造成称量不准确,看似 Res 含量有所升高,实际上 Res 含量在逐渐降低。经相关性分析后得出,葡萄生长发育过程中果皮和叶片中白藜芦醇含量变化呈极显著正相关(相关系数 $R=0.92389$, $P=0.0004<0.01$)。

2.2 葡萄生长发育过程中苯丙氨酸解氨酶活性的变化规律

由图2可以看出,葡萄转色前后, PAL 活性均较低,从盛花后19 d开始, PAL 活性逐渐升高,到盛花后61 d葡萄转色期, PAL 活性达到峰值,为37.58 U/g FW,是转色前的4.44倍;随后 PAL 活性迅速下降,在花后75 d,仅2周时间, PAL 活性就降低到15.27 U/g FW。随着葡萄进入成熟阶段, PAL 活性较低,且几乎没有太大变化,一直到葡萄采收期, PAL 活性均维持在10 U/g FW左右。在盛花后61 d,葡萄 PAL 活性达到最高峰,而此时葡萄果皮中白藜芦醇含量也呈现1个最高峰,说明白藜芦醇的合成与 PAL 有关。

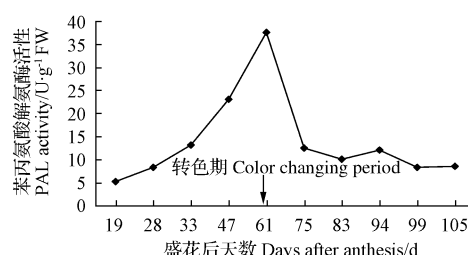


图2 葡萄果实生长发育过程中苯丙氨酸解氨酶活性的变化

Fig. 2 Changes of PAL activity during growth and development of grapes

2.3 不同浓度水杨酸对葡萄果皮和叶片中白藜芦醇含量的影响

白藜芦醇是植物对不良环境适应而产生的一种植物抗毒素。环境的恶化(如真菌感染、紫外线照射、植物生长胁迫剂的作用、机械损伤等)均会刺激白藜芦醇的合成^[8]。

由图3、4可知,“赤霞珠”在不同浓度水杨酸诱导后白藜芦醇含量与对照相比均有所提高。在葡萄生长的幼果期(花后33 d)喷施不同浓度水杨酸2周后,葡萄果皮和叶片中 Res 含量较对照均有所提高。诱导效果最好的是4 mM 水杨酸喷施,在喷施2周后(花后47 d),葡萄果皮中 Res 含量提高了3.15倍,诱导率为215%,葡萄叶片中 Res 含量提高了1.65倍,诱导率为65%。随着葡萄进入转色期,果皮中 Res 含量迅速提高,从葡萄转色后开始, Res 含量逐渐下降,并且诱导率也随之降低。到花后75 d,4 mM 水杨酸对葡萄果皮 Res 的诱导率仅为23.38%,对葡萄叶片 Res 的诱导率也仅为12.18%。

在花后75 d,又用同样浓度的水杨酸对葡萄进行第2次喷施,诱导1周后,葡萄果皮和叶片中 Res 含量均又显著提高。对葡萄果皮 Res 诱导效果最好的仍为4 mM 的水杨酸,使葡萄果皮中 Res 含量提高了36.24 $\mu\text{g/g}$,是对照的1.86倍,诱导率为86.16%。诱导1周后,叶片中

Res 含量也有显著提高,但诱导效果最好的水杨酸浓度是 6 mM,使葡萄叶片中 Res 含量提高了 22.38 $\mu\text{g/g}$,是对照的 1.62 倍,诱导率为 61.62%。分析其原因是因为这时葡萄叶片已经逐渐老化,叶片吸收能力比幼果期嫩叶低,因此,要达到较高的诱导效果,需要高浓度的水杨酸。在第 2 次诱导 19 d(盛花后 94 d)后,葡萄果皮中 Res 含量迅速下降,诱导率也在迅速下降,至花后 99 d,果皮中 Res 含量略有上升,再到葡萄采收期,果皮中 Res 含量,诱导效果最好的仍为 4 mM 的水杨酸,诱导率为 26.31%。之后依次为:6 mM 水杨酸,17.7%;8 mM 水杨酸,13.17%;2 mM 水杨酸,11.81%;10 mM 水杨酸,2.89%。在第 2 次诱导(盛花后 94 d)后,葡萄叶片中 Res 含量缓慢下降,诱导率也有降低,但下降幅度比果皮小。

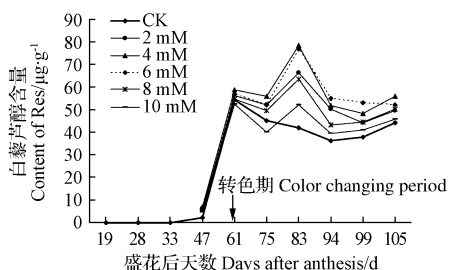


图 3 水杨酸处理后葡萄果皮白藜芦醇含量变化

Fig. 3 Changes of Res contents in peel of grape after

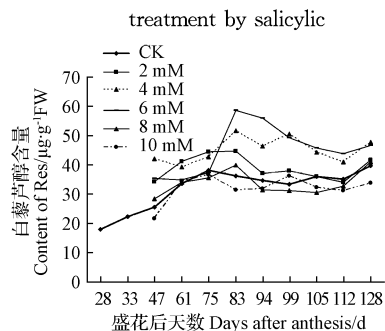


图 4 水杨酸处理后葡萄叶片白藜芦醇含量变化

Fig. 4 Changes of Res contents in leaves of grape after treatment by salicylic acid

2.4 不同浓度水杨酸对葡萄 PAL 活性的影响

如图 5 所示,水杨酸诱导后 PAL 活性的变化和白藜芦醇的变化趋势大体相同,在幼果期和成熟期诱导, PAL 活性均较对照有所提高。4 mM 的水杨酸诱导效果最佳,在幼果期诱导 2 周后,花后 47 d PAL 活性提高了 3.64 U/g FW,诱导率为 15.72%。在葡萄成熟期诱导后, PAL 活性提高了 1.35 U/g FW,诱导率为 11.18%。

2.5 不同浓度水杨酸对葡萄成熟期 Res 和 PAL 活性的影响

由图 6 可知,葡萄成熟期进行不同浓度水杨酸诱导 1 周后,葡萄果皮中 Res 含量诱导组均高于对照,且随着水杨酸浓度的增加,Res 含量先递增后递减。4 mM 水

杨酸对葡萄果皮中 Res 的诱导效果最佳,叶片中 Res 含量随着水杨酸浓度的增加呈先增后减趋势,但 6 mM 的水杨酸对葡萄叶片中 Res 的诱导效果最佳。经诱导后, PAL 活性诱导组均高于对照,且随着水杨酸浓度的增加, PAL 活性先递增,后又递减。用 SAS 8.2 统计分析对葡萄果皮中的 Res 含量、叶片中的 Res 含量和 PAL 活性进行相关分析表明,葡萄果皮的 Res 含量和 PAL 活性呈显著正相关,相关系数 $R=0.85026^*$, $P=0.0364<0.05$ 。而叶片中 Res 含量和 PAL 活性则没有相关性,相关系数 $R=0.76917$; $P=0.0738>0.05$ 。

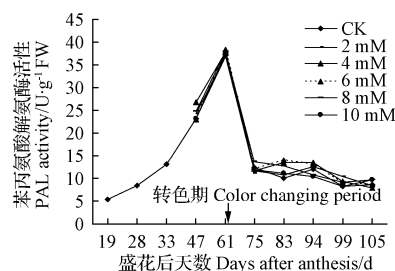


图 5 水杨酸处理后葡萄苯丙氨酸解氨酶活性变化

Fig. 5 Changes of PAL activity in grape after treatment by salicylic acid

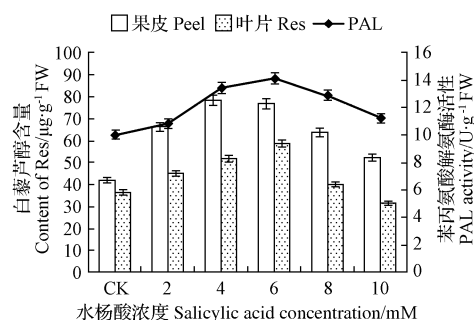


图 6 葡萄成熟期不同水杨酸浓度处理 1 周后葡萄白藜芦醇含量和苯丙氨酸解氨酶活性比较

Fig. 6 Comparison of Res content and PAL activity in grape after treatment by different concentrations of salicylic acid one week during grape maturity

3 讨论与结论

该研究发现,叶片中白藜芦醇含量的变化会出现 2 个高峰,即叶片中白藜芦醇的含量在新梢生长旺盛时期出现了第 1 个高峰,之后逐渐降低,但是在叶片脱落前一段时间,白藜芦醇含量又增加,出现第 2 个峰值。而葡萄生长发育的过程中,果实内白藜芦醇含量仅出现 1 个高峰,这与 Jandet 等^[9]的研究结果一致。Bais 等^[10]研究发现,在花后 1~5 周内葡萄中的白藜芦醇的含量逐渐上升,在花后 10~16 周白藜芦醇的含量呈下降趋势。余兴^[11]研究认为,不同葡萄品种果实的白藜芦醇含量的变化趋势不同,其中“蛇龙珠”葡萄果实的白藜芦醇含量

变化呈双峰形态;“白羽”葡萄的白藜芦醇含量随果实生长而缓慢增加。

随着水杨酸处理浓度的增加,PAL 活性和 Res 含量均呈现先升高后又降低的趋势,经相关性分析,葡萄果皮的 Res 含量和 PAL 活性呈极显著正相关。即在葡萄发育的幼果期,PAL 活性较低,随着葡萄的转色,PAL 活性陡然升高,在葡萄盛花后 61 d 白藜芦醇含量出现 1 个明显的高峰,而此时也正是 PAL 活性最强的时候,说明 PAL 参与了葡萄白藜芦醇的合成。随着葡萄的成熟,白藜芦醇含量在逐渐降低,PAL 活性也呈降低趋势,这种现象可能与果实成熟时白藜芦醇合酶(RS)的基因表达水平、二苯乙烯合成酶(STS)的活性逐渐降低有关^[12],也可能与 PAL 活性的降低有关。

水杨酸能够在葡萄生长的幼果期和成熟期诱导葡萄 Res 的合成,并且幼果期的诱导率远远高于成熟期,但总体来说它的诱导效果较短暂,该研究结果与李晓东等^[13]的研究结果是一致的。对葡萄果皮 Res 诱导效果最好的为 4 mM 的水杨酸,但对葡萄叶片诱导效果最好的水杨酸浓度前期是 4 mM,后期是 6 mM。究其原因,是因为这时葡萄叶片已经逐渐老化,叶面吸收能力比幼果期嫩叶较低,因此,要达到较高的诱导效果,需要高浓度的水杨酸。水杨酸诱导后 PAL 活性的变化和白藜芦醇的变化趋势大体相同,在幼果期和成熟期诱导,PAL 活性较对照均有所提高。经数据分析,在成熟期诱导 1 周后,随水杨酸浓度增加 PAL 活性和白藜芦醇含量变化呈正相关。

白藜芦醇在酿酒葡萄“赤霞珠”生长发育过程中含量不同,其中葡萄果皮中白藜芦醇变化较复杂,呈现双峰形态。转色期含量最高,葡萄采收期白藜芦醇含量有所上升。葡萄叶片中白藜芦醇含量变化比较小,但也呈现双峰形态,且叶片中白藜芦醇含量低于果皮。葡萄果

皮和叶片中白藜芦醇含量在葡萄生长发育过程中呈现极显著正相关。水杨酸对葡萄白藜芦醇具有显著的诱导效果,在葡萄幼果期诱导率较高,但诱导效果较短暂。其中 4 mM 的水杨酸对葡萄白藜芦醇的诱导效果最佳。

参考文献

- [1] 范永,代红军,单守明,等. 外源刺激诱导白藜芦醇合成的研究进展[J]. 中外葡萄与葡萄酒,2009(5):71-74.
- [2] 韩晶晶,刘炜,毕玉平. 白藜芦醇的研究进展[J]. 生物工程学报,2008,24(11):1851-1859.
- [3] 周福成,周艳琴,郭婷婷,等. 白藜芦醇的研究进展[J]. 中国医药导报,2009,8(6):11-13.
- [4] 王静芳,孙权,王振平. 宁夏贺兰山东麓酿酒葡萄发展的肥力制约因素与改良措施[J]. 农业科学研究,2007(1):24-28.
- [5] 李文超,孙盼,王振平. 不同土壤条件对酿酒葡萄生理及果实品质的影响[J]. 果树学报,2012,29(5):837-842.
- [6] 曹庸,于华忠,张敏,等. HPLC 法测定虎杖白藜芦醇的含量及其稳定性研究[J]. 林产化学与工业,2004,24(2):61-64.
- [7] 薛应龙. 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的测定[M]//植物生理学实验手册. 上海:上海科学技术出版社出版,1985:191-192.
- [8] Langcake P, Pryce R J. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury[J]. *Physiological plant pathology*,1976(9):77-86.
- [9] Jandet P, Bessis R, Gautheron B. The production of resveratrol by grape berries in different developmental stages[J]. *American Journal of Enology & Viticulture*,1991,42(1):41-46.
- [10] Bais A J, Murphy P J, Dry I B. The molecular regulation of stilbene phytoalexin biosynthesis in *Vitis vinifera* during grape berry development[J]. *Australian Journal of Plant Physiology*,2000,27(5):425-433.
- [11] 余兴. 葡萄生育期及采后紫外处理后白藜芦醇及其糖苷的变化研究[D]. 合肥:安徽农业大学,2005.
- [12] Versari A, Parpinello G P, Tornielli G B, et al. Stilbene compounds and stilbene synthase expression during ripening, wilting and UV treatment in grape cv. Corvina[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*,2001,49(11):5531-5536.
- [13] 李晓东,郑先波,闫树堂,等. 水杨酸和紫外线对诱导采收葡萄果皮内白藜芦醇合成作用研究[J]. 果树学报,2007,24(1):30-33.

Effect of SA on the Accumulation of Resveratrol in Carbernet-Sauvignon Grape

GAO Cai-qin, FAN Yong, DAI Hong-jun, WANG Zhen-ping

(Grape and Wine Education Department Technology Research Center, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: With the fruits of Carbernet-Sauvignon grape as experimental material, the law of resveratrol change during the grape berry development was systematically investigated. The effect of SA spraying on the changes of resveratrol and foseetyl-aluminium activities in peel and leaves of grape were discussed, in order to explore the effect of different concentration on the accumulation of resveratrol in the wine grape. The results showed that SA had a significant effect on resveratrol induction, especially occurred a high induction rate at young fruit stage, however the induction time was transient. Moreover, SA with different concentrations were positively correlated with the content of resveratrol in grape peel and foseetyl-aluminium activity. The 4 mM SA displayed the best effect on the accumulation of resveratrol in the wine grape.

Key words: Carbernet-Sauvignon grape; resveratrol; induction; foseetyl-aluminium; salicylic acid