

文章编号:1000-8551(2019)08-1490-11

# 水分胁迫对葡萄果实白藜芦醇合成相关基因表达的影响

席奔<sup>1</sup> 柳巧禛<sup>1</sup> 吕丹桂<sup>1</sup> 徐伟荣<sup>1</sup> 王振平<sup>1,2</sup> 代红军<sup>1,\*</sup><sup>1</sup>宁夏大学农学院,宁夏 银川 750021;<sup>2</sup>宁夏大学葡萄与葡萄酒教育部工程中心,宁夏 银川 750021)

**摘要:**为探究水分胁迫对葡萄果实白藜芦醇合成的影响,本研究以赤霞珠为试验材料,对其进行不同程度水分胁迫处理,测定葡萄果实白藜芦醇含量及白藜芦醇生物合成相关基因表达量。结果表明,葡萄果实进入转色期,*PAL*、*4CL*、*STS* 基因随白藜芦醇合成而大量表达;不同水分胁迫处理均能增加葡萄果实白藜芦醇含量,同时提高白藜芦醇合成相关基因的表达量,不同水分胁迫处理间存在差异;水分胁迫对果实转色前期和后期 *PAL*、*STS* 基因表达的促进作用最为显著,但水分胁迫显著降低了 *CHS* 基因的表达量。相关性分析表明,白藜芦醇含量与 *PAL*、*STS* 基因的表达量呈显著正相关,表明水分胁迫主要通过诱导 *PAL*、*STS* 基因表达来增加果实白藜芦醇含量。本研究结果为进一步阐明葡萄白藜芦醇合成调控机制奠定了理论基础。

**关键词:**水分胁迫;葡萄;白藜芦醇;基因表达

DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2019.08.1490

葡萄 (*Vitis vinifera* L.) 为葡萄科葡萄属木质藤本植物,是世界范围内重要的经济类果树之一。据联合国粮食及农业组织 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) 统计,2016 年全球葡萄栽培面积达  $7.1 \times 10^6$   $\text{hm}^2$ , 其中我国栽培面积达  $8.4 \times 10^5$   $\text{hm}^2$ , 占全球栽培面积的 11.8%。白藜芦醇 (resveratrol, Res) 是植物次级代谢产生的一种芪类化合物,存在于 100 多种植物中,在葡萄、虎杖 (*Polygonum cuspidatum* Sibe.et Zucc) 等植物中含量较高<sup>[1]</sup>。Res 及其衍生物具有抗血栓、抗氧化、抑制肿瘤等多种有益于人体健康的活性功能<sup>[2-3]</sup>,还具有抵抗植物病原菌的作用<sup>[4-5]</sup>。Res 由苯丙烷类代谢途径合成,参与合成的酶有苯丙氨酸裂解酶 (phenylalanin ammonialyase, PAL)、肉桂酸-4-羟化酶 (cinnamic acid-4-hydroxylase, C4H)、4-香豆酸-CoA 连接酶 (4-coumarate-CoA ligase, 4CL) 和芪合成酶 (stilbene synthase, STS), 其中 STS 是 Res 合成的关键酶 (图 1)。葡萄 *STSs* 基因家族由 48 个基因组成,至少有 32 个基

因有潜在的生物学功能<sup>[6]</sup>。Höll 等<sup>[7]</sup>发现转录因子 *MYB14* 和 *MYB15* 调节葡萄 *STS* 基因的表达,表明 Res 合成受结构基因和调节基因的控制。Wang 等<sup>[8]</sup>研究表明,葡萄 Res 的合成与积累不仅与葡萄基因型有关,还受外界环境的影响。

水分是限制农业生产的主要因素之一<sup>[9]</sup>。大量研究表明水分胁迫会导致植物形态和生理生化发生变化,如阻碍植物地上部分生长、降低植物蒸腾及光合作用、导致渗透化合物和离子的积累等<sup>[10-12]</sup>。Kennedy 等<sup>[13]</sup>研究表明,水分会影响葡萄果实类黄酮物质的积累,进一步影响葡萄与葡萄酒品质。Castellarin 等<sup>[14]</sup>发现水分胁迫能诱导葡萄果实花青素和酚类物质的积累。但目前关于水分胁迫如何影响葡萄 Res 合成与积累的研究尚鲜见报道。

本研究以酿酒葡萄赤霞珠 (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) 为试验材料,对其进行水分胁迫处理,利用高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 法和实时荧光定量 PCR 技术分

收稿日期:2018-05-21 接受日期:2018-09-11

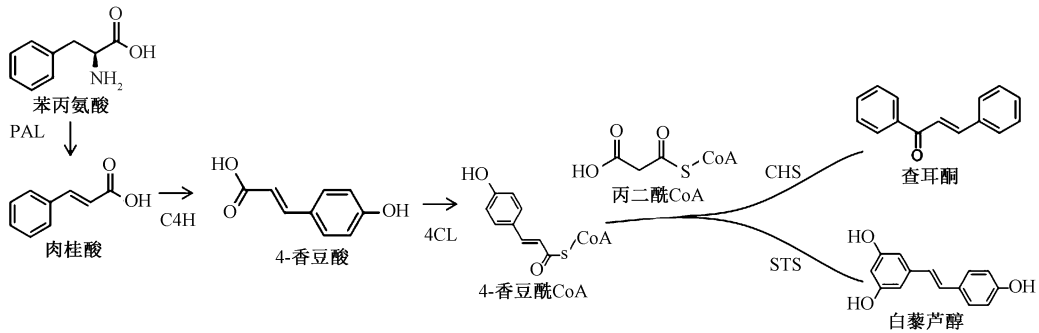
基金项目:国家自然科学基金地区科学基金(31260456),国家葡萄产业体系栽培与生理调控岗位基金(CARS-30-ZP-8)

作者简介:席奔,男,主要从事葡萄栽培生理研究。E-mail:1054914955@qq.com

\* 通讯作者:代红军,女,教授,主要从事葡萄栽培生理研究。E-mail:dai\_hj@nxu.edu.cn

别检测葡萄果实 Res 含量和 Res 合成相关基因的表达量,分析 Res 合成过程中 Res 与相关基因表达量的关

系,探究水分胁迫对葡萄果实 Res 合成的影响,以期为进一步深入研究葡萄 Res 合成调控机制奠定理论基础。



注:CHS:查耳酮合成酶。

Note:CHS:Chalcone synthase.

图1 白藜芦醇生物合成途径<sup>[15]</sup>

Fig.1 Resveratrol biosynthesis pathway<sup>[15]</sup>

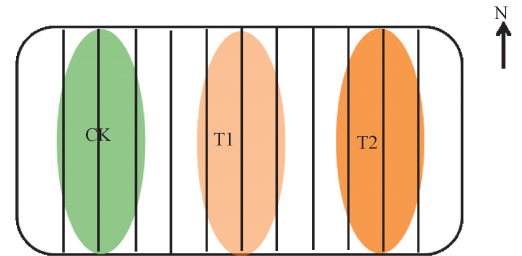
## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为 15 年生赤霞珠,试验在宁夏永宁县(38.28°N,106.24°E)玉泉营葡萄园进行,该地区属中温带干旱气候,土壤类型为淡灰钙土,土质为沙壤土。采用篱架栽培模式,“厂”字形整形,主干上每 10~15 cm 留 1 个结果枝,结果枝上留 1 个穗果,产量约 400 kg·667m<sup>-2</sup>,南北行向,株行距为 0.5 m×3 m,冬季埋土防寒,灌溉方式为滴灌,滴灌流速为 0.6 L·h<sup>-1</sup>。

于葡萄园中部选取长势均一、无病虫害的植株 11 行,每处理设 3 次生物学重复,每重复 30 株,不同处理之间间隔 1 行(图 2)。结合葡萄园田间灌溉情况,并参考文献[16]计算不同处理植株黎明前叶片水势( $\varphi_{\text{predawn}}$ )。试验共设 3 个处理:1)对照(CK)植株黎明前叶片水势在  $-0.20 \text{ Mpa} \geq \varphi_{\text{predawn}} \geq -0.40 \text{ Mpa}$ ;2)处理组 1(T1)植株黎明前叶片水势在  $-0.40 \text{ Mpa} \geq \varphi_{\text{predawn}} \geq -0.60 \text{ Mpa}$ ;3)处理组 2(T2)植株黎明前叶片水势在  $\varphi_{\text{predawn}} \leq -0.60 \text{ Mpa}$ 。2017 年 5 月 25 日为葡萄盛花期(full bloom, E-L23)<sup>[17]</sup>,6 月 20 日绿果期(berry pea size, E-L27)即花后 25 d 开始进行试验处理,并测得植株黎明前叶片水势为  $-0.30 \text{ Mpa}$ ,之后每 5 d 监测 1 次  $\varphi_{\text{predawn}}$ ,根据测定的  $\varphi_{\text{predawn}}$  及试验期间葡萄园日降雨量和日气温(图 3),确定各处理是否灌水及所需灌水量(表 1)。

花后 30 d(30 days after anthesis, 30 DAA)开始采集果实,每 10 d 采样 1 次,采样在测定植株黎明前叶



注:竖线表示每行葡萄树。绿色表示无水分胁迫,黄色表示水分胁迫,颜色越深表示水分胁迫程度越大。

Note: Vertical lines represent the rows of grape trees. Green means no water stress, yellow means water stress. The deeper the color is, the greater the degree of water stress is.

图2 试验设计示意图

Fig.2 Schematic diagram of test design

片水势后进行,在植株东西两侧,随机剪取果粒,一部分用于测定可溶性固形物(total soluble solid, TSS)和可滴定酸(titratable acid, TA)含量,另一部分液氮速冻后,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.2 试验方法

1.2.1 黎明前叶片水势测定 黎明前(5:30-6:00)迅速摘取葡萄枝条中部节位的叶片,用潮湿的纱布包好,装入塑封袋中,带回实验室,用刀片在叶柄末端切出斜面,切割后迅速装入 3005 型植物水分压力室(美国 Soil Moisture Equipment 公司)中,使叶柄末端切口从压力室密封圈中部的小孔露出,固定好,拧紧钢塞,关闭控制阀,此时缓慢转动加压阀,同时用放大镜仔细观察叶柄末端,当叶柄末端出现小水滴的一刹那,立即关闭加压阀,此时读数表盘指针所在位置的数值,

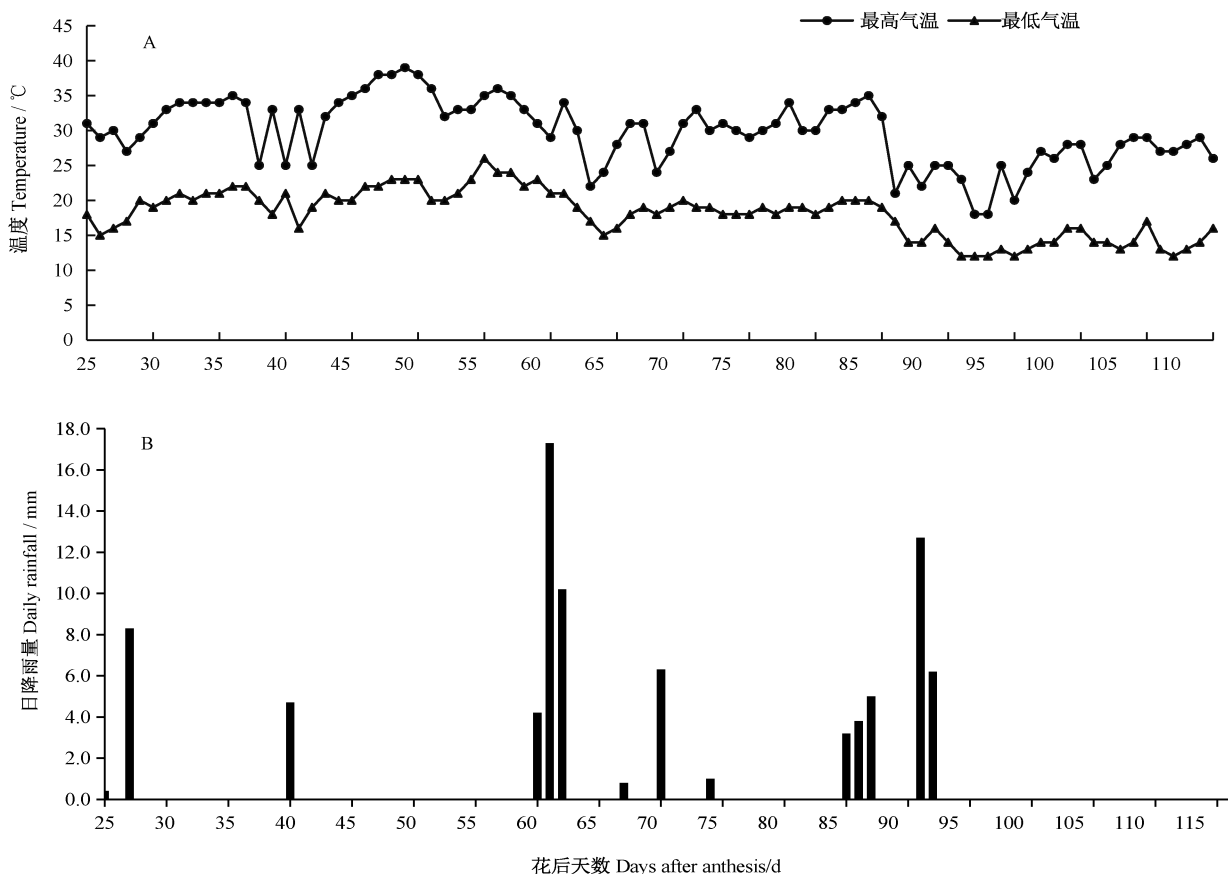


图3 试验期间气温(A)和日降雨量(B)  
Fig.3 Air temperature (A) and daily rainfall (B)

表1 不同处理组灌水时间及灌水量

Table 1 Irrigation time and irrigation quantity of different treatment groups

花后天数 Days after anthesis/d	CK		T1		T2	
	水量 Irrigation water /(L·plant <sup>-1</sup> )	总灌水量 Total irrigation volume /(L·plant <sup>-1</sup> )	水量 Irrigation water /(L·plant <sup>-1</sup> )	总灌水量 Total irrigation volume /(L·plant <sup>-1</sup> )	水量 Irrigation water /(L·plant <sup>-1</sup> )	总灌水量 Total irrigation volume /(L·plant <sup>-1</sup> )
18	3.0		1.50		-	
38	6.6		-		-	
45	7.8		3.60		4.80	
55	8.4		4.60		4.60	
68	2.7	49.80	-	22.90	-	16.44
74	7.5		5.70		3.90	
77	6.0		4.20		2.40	
98	1.8		0.90		-	
105	4.2		2.40		0.78	
108	1.8		-		-	

注：“-”表示没有灌水。  
Note: ‘-’ means no irrigation.

即为叶片水势的绝对值,记录数值。每个处理选取 3 棵植株,每棵植株取 3 片叶子。

1.2.2 百粒重测定 随机取 300 颗果实,利用电子天平(0.000 1 g)称重,重复 3 次,取平均值。

1.2.3 可溶性固形物含量测定 在室温下,随机取果实 100 颗于塑封袋中,手工挤汁,然后取适量果汁用 WYT-32 手持糖量折光仪(福建省泉州光学仪器厂),重复 3 次,取平均值。

1.2.4 可滴定酸含量测定 将 1.2.3 中剩余的果汁转移至离心管中,5 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,取 10 mL 上清液于 100 mL 容量瓶中,蒸馏水定容。取 20 mL 定容后的液体于三角瓶中,用 0.05 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 溶液滴定。果实中可滴定酸含量以酒石酸计。

1.2.5 白藜芦醇测定 参照李晓东等<sup>[18]</sup>的方法。取 1 g 葡萄样品,液氮研磨至粉末状后,用 10 mL 乙酸乙酯浸提,超声提取(80 Hz,30℃)12 min,然后 4℃避光浸提 1 h,10 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min。取上清液,残渣中加入 5 mL 乙酸乙酯重新离心取上清液,合并上清液转移至圆底烧瓶中,40℃旋转蒸干,干燥物用 2 mL 甲醇(色谱纯)溶解,置于 2 mL 离心管,-20℃避光贮存。

高效液相色谱条件:AGILENT1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司);C18 柱子(250 mm×4.6 mm,5 μm);二极管阵列(DAD);检测波长 306 nm;流动相乙腈:水(40:60,v/v),流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>;柱温 30℃;进样量 10 μL。

1.2.6 总 RNA 的提取和实时荧光定量 PCR 总 RNA 提取按照 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 DP441 说明书进行。以总 RNA 为模板,利用 PrimerScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real time) 试剂盒进行反转录与纯化。选取 *EF1*、*Actin* 为内参基因,*PAL*、*4CL*、*CHS*、*STS*、*Myb14*、*Myb15* 基因引物用 Primer 5.0 设计,引物由兰州生工合成部合成(表 2)。RT-qPCR 反应体系为 25 μL:cDNA(100 ng·μL<sup>-1</sup>)1 μL,上游引物和下游引物各 0.5 μL,2×UltraSYBR Mixture 12.5 μL,ddH<sub>2</sub>O 10.5 μL。RT-qPCR 扩增程序:95℃预变性 10 min;94℃变性 10 s,54~56℃退火 30 s,40 个循环;72℃延伸 32 s。每个模板设 3 次生物学重复,取平均值。目的基因相对表达量采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法<sup>[19]</sup>计算。

表 2 RT-qPCR 引物序列  
Table 2 Primer sequences of RT-qPCR

基因名称 Gene name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	
	正向 Forward	反向 Reverse
<i>PAL</i>	AGTCATCCGAGCATCAACTAAA	CCACCATGTAGAGCCTTGTT
<i>4CL</i>	GGAGAAGGTTTCACCGTCATTA	CGTCGGAGTTGATCGAAAC
<i>CHS</i>	GCCAAGGCCATCAAAGAATG	TAGCAGCTTGGTGAGTTGATAG
<i>STS</i>	CAGCAGCCCAAACATTTATTC	GTTCCAATCGCTAATACCAAGTG
<i>Myb14</i>	TCTGAGCCGGATATCAAAC	GGGACGCATCAAGAGAGTGT
<i>Myb15</i>	CAAGAATGAACAGATGGAGGAG	TCTGCCACTGCTGGGAAA
<i>EF1</i>	GTTAAGATGATTCCAACCAAGCCC	TCTCCACGCTCTTGATGACTC
<i>Actin</i>	TCCTTGCTTGCCTCATCTAT	CACCAATCACTCTCTGCTACAA

### 1.3 数据统计与分析

采用 SAS 8.2 进行数据处理与统计分析,Excle 2010 和 SigmaPlot 12.0 进行绘图,通过 SNK 法进行 ANOVO 分析,数据以平均值±标准差(SD)表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 水分胁迫对葡萄果实百粒重、可溶性固形物及可滴定酸的影响

由图 4 可知,25~70 DAA,CK φ<sub>predawn</sub> 在 -0.19~

-0.48 MPa 范围内;60~65 DAA 的降雨导致  $\varphi_{\text{predawn}}$  上升,同样,85~90 DAA 也出现相似的情况。虽然降雨引起了  $\varphi_{\text{predawn}}$  上升,但在采样时各处理  $\varphi_{\text{predawn}}$  均在试验设定范围内。70~75 DAA 虽有降雨但降雨量较小且降雨恰巧在测定  $\varphi_{\text{predawn}}$  之后,所以  $\varphi_{\text{predawn}}$  呈下降趋势。

各处理均在 2017 年 4 月 24 日葡萄萌芽,5 月 25

日盛花(50%的花帽脱落),6 月 8 日坐果,6 月 13 日(20 DAA)出现幼果,转色(E-L35)时间各处理存在差异,其中 CK 为 7 月 30 日(65 DAA)-8 月 4 日(70 DAA)、T1 为 7 月 23 日(58 DAA)-7 月 29 日(64 DAA)、T2 为 7 月 25 日(60 DAA)-8 月 1 日(67 DAA),各处理均在 9 月 13 日(110 DAA)收获。

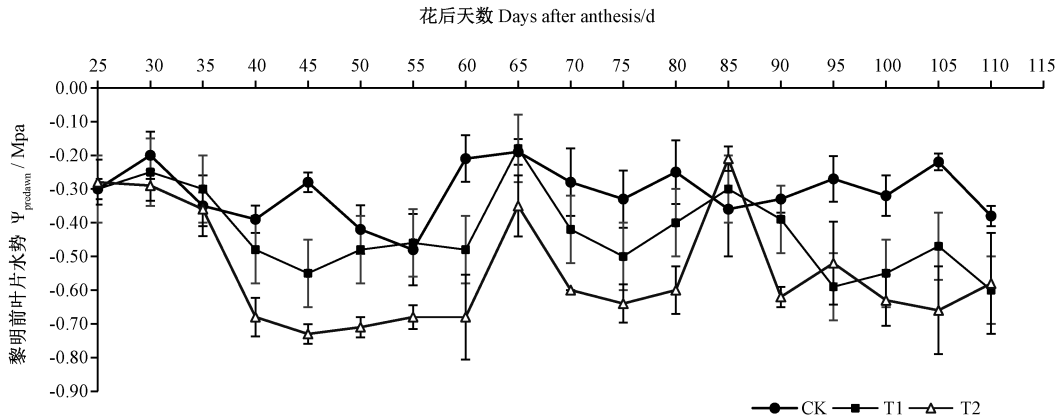


图 4 不同处理黎明前叶片水势

Fig.4 Leaf water potential predawn for different treatments

由图 5-A 可知,随着生育进程的推进,各处理百粒重呈先增加后趋于平稳的变化趋势,其中 CK 不同花后天数百粒重均显著大于 T1、T2(60 DAA 除外),110 DAA 时达到最大,为 115.97 g, T1、T2 分别为 109.34 g, 82.53 g。由图 5-B 可知,随着生育进程的推进,各处理 TSS 含量逐渐增加,其中 60~70 DAA 增速最快。不同处理之间 TSS 含量存在明显差异,转色前 T2 的 TSS 含量均显著高于 CK 和 T1, T1 与 CK 差异均不显著;转色后 T1 的 TSS 含量明显增加且高于 T2,但总体上低于 CK,表明短期的水分胁迫能够提高果实 TSS 含量,但长期的胁迫会降低 TSS 含量。由图 5-C 可知,随着生育进程的推进,各处理 TA 含量呈逐渐降低的趋势,其中转色期 TA 含量下降明显,不同处理间 TA 含量差异明显。T2 的 TA 含量除了在 40 DAA 和 100 DAA 时高于 CK,其余时期均低于 CK,成熟期(110 DAA)CK、T1、T2 的 TA 平均含量分别为 7.36、6.19 和 7.28  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  FW,且 T1 的 TA 含量明显低于 CK 和 T2,表明水分胁迫会降低 TA 含量。

## 2.2 水分胁迫对葡萄果实白藜芦醇含量的影响

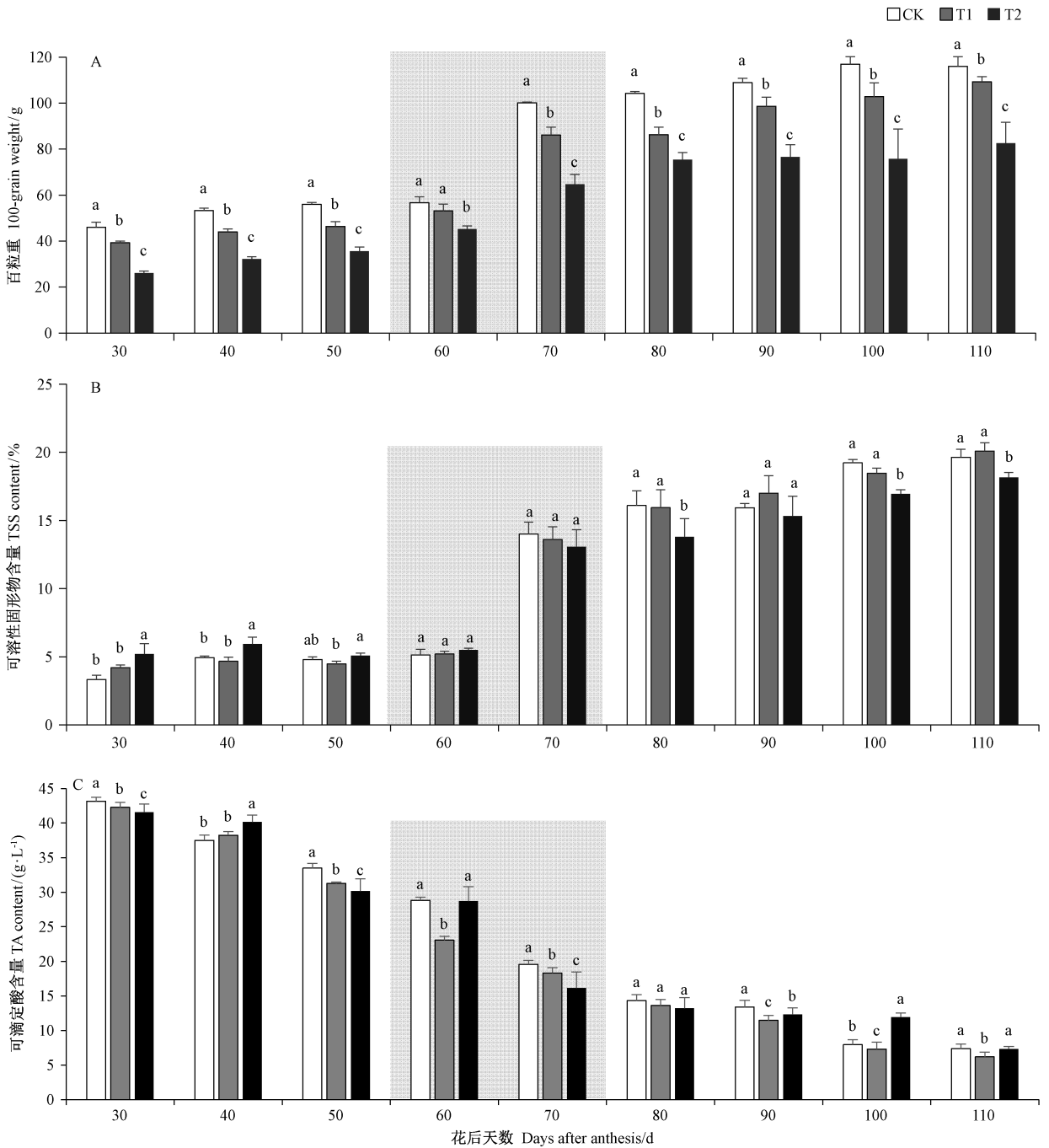
图 6-A 为 Res 标准品溶液的色谱图,其保留时间为 4.705 min;图 6-B 为样品色谱图,表明试验能较好地提取及检测到 Res。以标准样品浓度为横坐

标,对应峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得到线性回归方程: $y=108.2x-1.73$ ,  $y$  表示 306 nm 波长处的面积,  $x$  表示 Res 的浓度,相关系数  $R^2=0.9997$ ,表明标准曲线线性良好,能对样品中的白藜芦醇进行定量分析。

白藜芦醇含量在果实转色前含量较低在转色后快速增加,即随着果实逐渐成熟而增加。不同处理对白藜芦醇含量影响存在差异, T1 和 T2 均能增加白藜芦醇含量,其中 T1 效果最佳。60~100 DAA 期间, T1 均极显著高于 CK 和 T2,且在 90 DAA 时达到最大,为 20.41  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  FW,是 CK 的 7.70 倍(表 3)。

## 2.3 水分胁迫对白藜芦醇合成相关基因表达量的影响

由图 7 可知,随着果实进入转色期,白藜芦醇合成相关基因上调表达,果实完全着色后,又开始下调表达。70 DAA 时, T1 和 T2 的 *PAL*、*4CL*、*STS*、*MYB14* 和 *MYB15* 表达量均高于 CK;80 DAA 时, T1 的 *PAL*、*4CL*、*MYB15* 表达量高于 CK,而 *STS*、*MYB14* 低于 CK;90 DAA 与 70 DAA 相似,其中 T1 *PAL*、*STS* 表达量达到最大,且与 CK 差异极显著,分别是 CK 的 2.4 倍和 2.6 倍,而 T2 明显低于 CK;100 DAA 和 110 DAA 时, T1 的 *PAL* 和 *4CL* 表达量也高于 CK,且与 CK 差异显著, *MYB14* 和 *MYB15* 表达量均为 T1 高于 CK, T2 低于 CK, T1 *STS* 表达量则低于 CK。 *CHS* 虽



注:阴影部分表示葡萄果实转色期。不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

Note: The shadow part indicates the ripening of grape berries. Different small letters indicate significant difference at 0.05 level.

图 5 不同处理葡萄果实百粒重、可溶性固形物及可滴定酸含量

Fig.5 Total soluble solids content and 100 grains weight and titratable acid content of grape berries with different treatments

然不直接参与白藜芦醇合成,但与 STS 有共同的作用底物(4-香豆酰 CoA),除 60 DAA,其他时期 T1 和 T2 的 *CHS* 表达量均极显著低于 CK,表明水分胁迫导致 *CHS* 下调表达。

## 2.4 白藜芦醇含量与白藜芦醇合成相关基因表达量的相关性分析

葡萄果实白藜芦醇含量与白藜芦醇合成相关基因表达量的相关性分析结果表明,在果实成熟过程中,白藜芦醇合成与相关基因的表达量具有一定的相关性,

表3 水分胁迫对葡萄果实白藜芦醇含量的影响

Table 3 Effect of water stress on resveratrol content of grape berries

/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ )

处理 Treatment	花后天数 Days after anthesis/d					
	60	70	80	90	100	110
CK	0.25±0.02B	1.82±0.27B	2.47±0.22B	2.65±0.65B	4.38±1.02B	6.26±0.90A
T1	2.88±1.15A	13.46±1.92A	3.44±0.50A	20.41±1.33A	16.28±5.44A	7.56±0.90A
T2	1.09±0.02B	1.11±0.11B	1.71±0.27C	5.69±2.80B	6.21±1.84B	9.36±1.26A

注:同列不同大写字母表示在 0.01 水平差异极显著。

Note: Different capital letters in the same column indicate significant difference at 0.01 level.

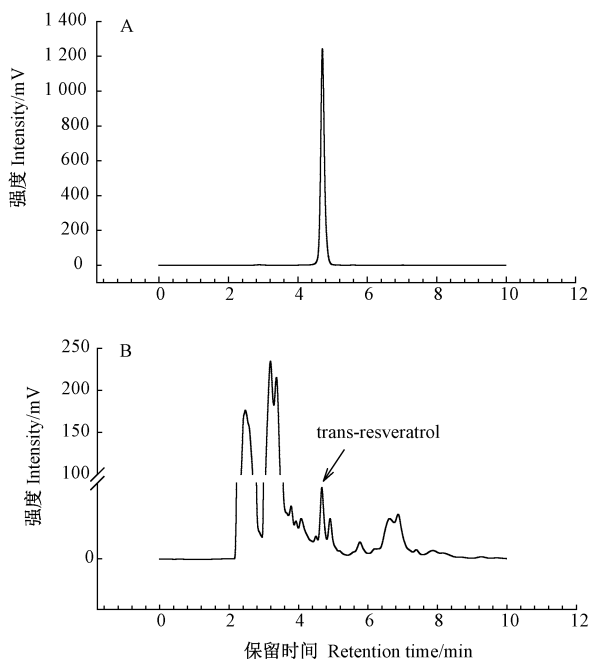


图6 白藜芦醇标准品(A)及试验样品(B)色谱图

Fig.6 The chromatograms of standards of resveratrol (A) and test sample (B)

表4 不同处理下白藜芦醇含量与白藜芦醇合成相关基因表达量的相关性分析

Table 4 Correlation analysis of transcription level of resveratrol biosynthesis related genes and resveratrol content

	<i>PAL</i>	<i>4CL</i>	<i>STS</i>	<i>CHS</i>	<i>MYB14</i>	<i>MYB15</i>
CK	0.240	0.415	0.823 *	0.671	0.589	0.335
T1	0.667	0.331	0.700	0.446	0.153	-0.033
T2	0.788 *	0.626	0.852 *	0.706	0.387	-0.440

注: \* 表示在 0.05 水平显著相关。

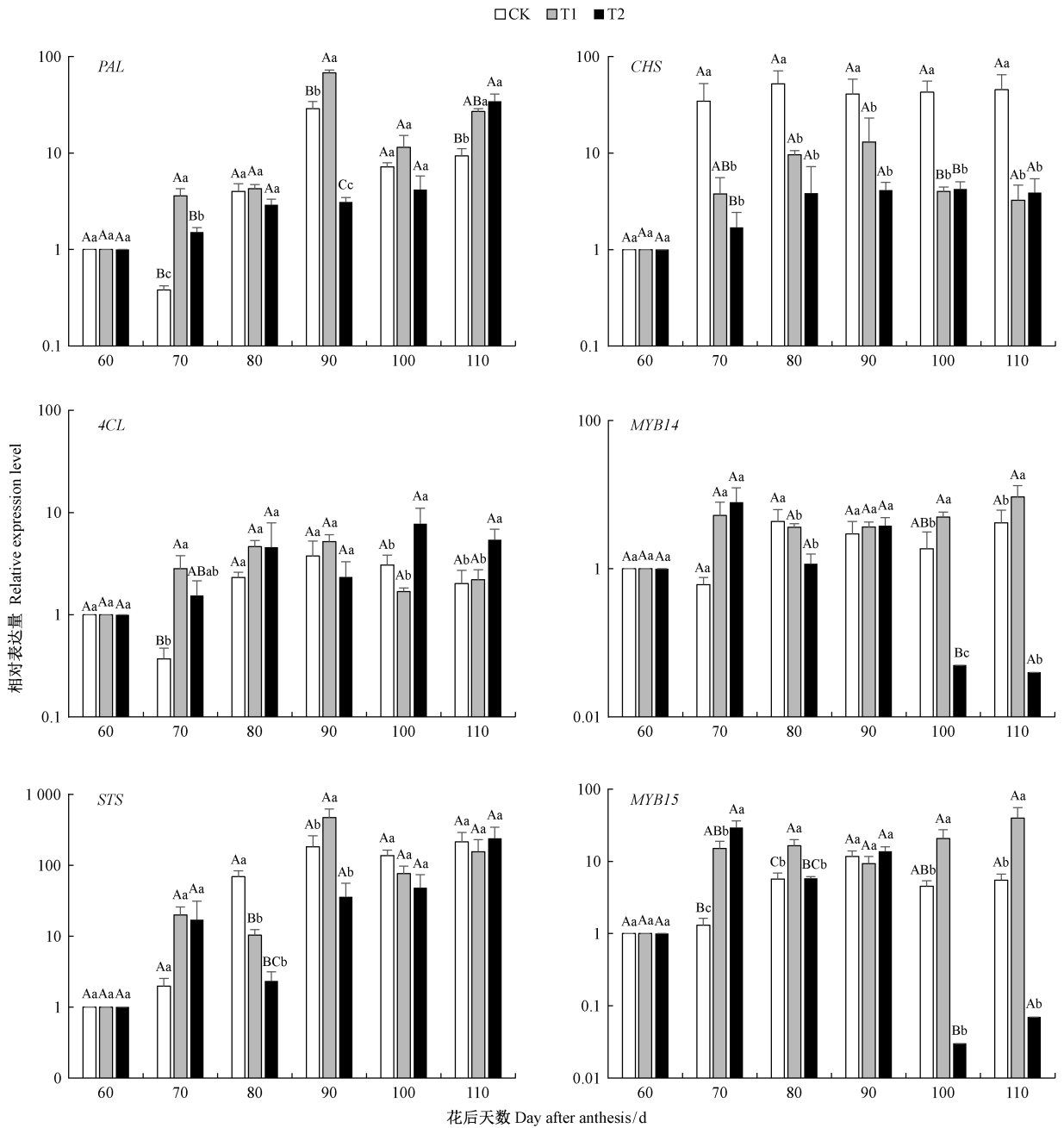
Note: \* indicates significant correlation at 0.05 level.

CK 的 *STS* 基因表达量与白藜芦醇含量呈显著正相关, 相关系数为 0.823 ( $P = 0.0442 < 0.05$ )。T2 的

*PAL*、*STS* 基因表达量与白藜芦醇含量呈显著正相关, 相关系数分别为 0.788 ( $P = 0.0424 < 0.05$ )、0.852 ( $P = 0.0312 < 0.05$ ) (表 4)。表明水分胁迫提高了相关基因的表达量。

### 3 讨论

白藜芦醇是植物产生的一种抗毒素, 受病原体感染<sup>[20]</sup>、紫外线辐射<sup>[21]</sup>、机械损伤<sup>[22]</sup>等生物或非生物胁迫诱导产生。Vezzulli 等<sup>[23]</sup>研究表明, 巴贝拉葡萄 (*V. vinifera* cv. Barbera) 果实在水分胁迫下芪类化合物积累量未增加。这与本试验结果不一致, 可能是因为不同品种葡萄中白藜芦醇的分布和对生物或非生物胁迫响应存在差异<sup>[24]</sup>。Castellarin 等<sup>[14]</sup>研究表明, 水分胁迫会导致 *PAL* 基因表达量增加并诱导类黄酮物质的积累。本研究也发现, 水分胁迫使 *PAL* 基因表达量显著增加且 *PAL* 基因表达量与白藜芦醇含量呈显著正相关, 表明水分胁迫可通过诱导 *PAL* 基因进一步增加白藜芦醇积累量。*STS* 是白藜芦醇合成的关键酶。Höll 等<sup>[7]</sup>证明了 *MYB14* 和 *MYB15* 能够调控葡萄 *STS* 基因表达。本试验中水分胁迫导致葡萄果实转色前期和成熟期 *STS* 基因表达量增加, 且 T2 的 *MYB14*、*MYB15* 与 *STS* 基因表达量的变化趋势相似, 但相关性分析表明 *MYB15* 表达量与白藜芦醇含量呈负相关, 推测 *MYB14* 可能响应水分胁迫参与调控 *STS* 基因表达。王琴飞<sup>[25]</sup>研究认为, *CHS* 虽然不直接参与白藜芦醇合成, 但与 *STS* 有共同的作用底物。在自然条件下苯丙氨酸代谢途径通过 *CHS* 酶合成花色素和其他酚类物质, 而当植物遭遇逆境胁迫时, 会激活 *STS* 基因进入二苯乙烯途径合成白藜芦醇。本试验中水分胁迫使葡萄果实 *CHS* 基因表达量显著下降, 而 *STS* 基因表达量显著增加, 进一步诱导白藜芦醇含量增加提高了植株的抗逆性。



注: Y 轴为对数刻度表示,不同小写字母表示显著差异 ( $P < 0.05$ ),不同大写字母表示极显著差异 ( $P < 0.01$ )。

Note: The Y axis is logarithmic scale, different small letters mean significant differences at 0.05 level, and different capital letters mean extremely significant differences at 0.01 level.

图 7 水分胁迫对葡萄果实白藜芦醇合成相关基因表达量的影响

Fig.7 Effects of water stress on transcription level of resveratrol biosynthesis related genes in grape berries

殷向静<sup>[26]</sup>对山葡萄 (*Vitis amurensis* Rupr) 转录组进行测序分析发现,白藜芦醇合成受激素、转录因子、STSs 基因及其上下游基因等的调控,进一步分析发现,STSs 基因上游调控区域含有多种顺式作用元件,主要包括光响应元件 ACE、GT1-motif 和 G-box、环境特异性元件 TC-rich repeats (参与干旱胁迫响应)、过程

特异性元件 ABRE (脱落酸响应元件)、CGTCA-motif (茉莉酸甲酯响应元件) 等。Chaves 等<sup>[27]</sup>研究表明,水分胁迫会导致植物芽减少、抑制叶的生长从而改变植物冠层结构,使植物暴露在太阳光下的机率增大。光和热效应会导致一些靶基因的转录调控功能发生变化,如水分胁迫下葡萄黄酮类化合物代谢途径的基因。



因此,推测水分胁迫可以通过 *STSs* 基因上游的光响应元件参与调控白藜芦醇的合成<sup>[28-29]</sup>。但具体是哪种主要的光响应元件参与水分胁迫诱导白藜芦醇的合成还有待进一步研究。此外,水分胁迫也会改变植物内源激素含量,如增加脱落酸、水杨酸含量等<sup>[30-31]</sup>。研究表明外源水杨酸处理可以使 *PAL*、*STS* 基因表达上调,且能增加葡萄细胞白藜芦醇含量<sup>[32]</sup>。脱落酸反应元件结合因子 *VvABF2* 过表达可以明显增加葡萄转基因细胞系白藜芦醇和反式白藜芦醇苷(*trans-piceid*)的积累<sup>[33]</sup>。不同 *STSs* 基因启动子中含有的顺式作用元件的种类和分布不同,对不同激素的响应也有差异,最终导致 *STSs* 基因产生差异的表达模式<sup>[26]</sup>。但 *STSs* 基因中具体哪些成员在水分胁迫诱导白藜芦醇合成中起主导作用尚不清楚。因此,水分胁迫诱导白藜芦醇积累的机制还需进一步研究。

## 4 结论

本研究结果表明,短期的水分胁迫能够提高果实可溶性固形物含量;水分胁迫会降低果实可滴定酸含量,增加果实白藜芦醇含量;水分胁迫对果实转色前期和后期 *PAL*、*STS* 基因表达的促进作用最为显著,但也会显著降低 *CHS* 基因的表达,表明水分胁迫主要通过诱导 *PAL*、*STS* 基因表达从而提高果实白藜芦醇含量。综合来看,黎明前葡萄叶片水势在  $-0.40 \text{ Mpa} \geq \psi_{\text{predawn}} \geq -0.60 \text{ Mpa}$  处理下花后 100 d 采收酿酒葡萄较好,此时果实可溶性固形物含量为 18.50%,可滴定酸含量为  $7.31 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ FW}$ ,白藜芦醇含量为  $16.28 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$ 。本研究为提高富含白藜芦醇的酿酒葡萄原料以及进一步探究葡萄白藜芦醇合成调控机制提供了理论依据。

## 参考文献:

- [1] 李先宽,李赫宇,李帅,宋宁宇,侯晓东,周文华,崔雨禾,马琳. 白藜芦醇研究进展[J]. 中草药,2016,47(14):2568-2578
- [2] Kalantari H, Das D K. Physiological effects of resveratrol [J]. *Biofactors*, 2010, 36(5):401
- [3] Szekeres T, Fritzer-Szekeres M, Saiko P, Jäger W. Resveratrol and resveratrol analogues-structure-activity relationship [J]. *Pharmaceutical Research*, 2010, 27(6):1042-1048
- [4] Jeandet P, Delaunoy B, Conreux A, Donnez D, Nuzzo V, Cordelier S, Clement C, Courot E. Biosynthesis, metabolism, molecular engineering and biological functions of stilbene phytoalexins in plants [J]. *Biofactors*, 2010, 36(5):331
- [5] Timperio A M, D' Alessandro A, Fagioni M, Magro P, Zolla L. Production of the phytoalexins *trans-resveratrol* and *delta-viniferin* in two economy-relevant grape cultivars upon infection with *Botrytis cinerea* in field conditions [J]. *Plant Physiology Biochemistry*, 2012, 50(1):65-71
- [6] Vannozzi A, Dry I B, Fasoli M, Zenoni S, Lucchin M. Genome-wide analysis of the grapevine stilbene synthase multigenic family: genomic organization and expression profiles upon biotic and abiotic stresses [J]. *BMC Plant Biology*, 2012, 12(1):130
- [7] Höll J, Vannozzi A, Czemplin S, D'Onofrio C, Walker A R, Rausch T, Lucchin M, Boss P K, Dry I B, Bogs J. The R2R3-MYB transcription factors *MYB14* and *MYB15* regulate stilbene biosynthesis in *Vitis vinifera* [J]. *Plant Cell*, 2013, 25(10):4135-4149
- [8] Wang W, Tang K, Yang H R, Wen P F, Zhang P, Wang H L, Huang W D. Distribution of resveratrol and stilbene synthase in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) and the effect of UV-C on its accumulation [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, 48(2/3):142
- [9] Chaves M M, Zarrouk O, Francisco R, Costa J M, Santos T, Regalado A P, Rodrigues M L, Lopes C M. Grapevine under deficit irrigation: hints from physiological and molecular data [J]. *Annals of Botany*, 2010, 105(5):661
- [10] Chaves M M, Flexas J, Pinheiro C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell [J]. *Annals of Botany*, 2009, 103(4):551-560
- [11] Cramer G R, Ergä L A, Grimplet J, Tillett R L, Tattersall E A, Bohlman M C, Vincent D, Sonderegger J, Evans J, Osborne C. Water and salinity stress in grapevines: Early and late changes in transcript and metabolite profiles [J]. *Functional and Integrative Genomics*, 2007, 7(2):111-134
- [12] 段素梅,杨安中,黄义德,吴文革,许有尊,陈刚. 干旱胁迫对水稻生长、生理特性和产量的影响 [J]. 核农学报, 2014, 28(6):1124-1132
- [13] Kennedy J A, Matthews M A, Waterhouse A L. Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids [J]. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2002, 3(53):268-274
- [14] Castellarin S D, Matthews M A, Gaspero G D, Gambetta G A. Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries [J]. *Planta*, 2007, 227(1):101-112
- [15] 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(1):77-86
- [16] Bahar E, Carbonneau A, Korkutal I. The effect of extreme water stress on leaf drying limits and possibilities of recovering in three grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars [J]. *African Journal of Agricultural Research*, 2011, 6(5):1151-1160
- [17] Coombe B G. Growth stages of the grapevine: Adoption of a system for identifying grapevine growth stages [J]. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2010, 1(2):104-110
- [18] 李晓东,李绍华,闫树堂. 葡萄白藜芦醇提取和 HPLC 定量测定适宜条件的研究 [J]. 园艺学报, 2006, 33(4):836-838

- [19] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method [J]. *Nature Protocol*, 2008, 3(6): 1101
- [20] Ahuja I, Kissen R, Bones A M. Phytoalexins in defense against pathogens [J]. *Trends in Plant Science*, 2012, 17(2): 73–90
- [21] Wang J F, Ma L, Xi H F, Wang L J, Li S H. Resveratrol synthesis under natural conditions and after UV-C irradiation in berry skin is associated with berry development stages in Beihong (*V. vinifera* × *V. amurensis*) [J]. *Food Chemistry*, 2015, 168: 430–438
- [22] 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(1): 77–86
- [23] Vezzulli S, Civardi S, Ferrari F, Bavaresco L. Methyl jasmonate treatment as a trigger of resveratrol synthesis in cultivated grapevine [J]. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2007, 58(4): 530–533
- [24] Wang L J, Man X, Liu C, Wang J F, Xi H F, Wu B H, Loescher W, Duan W, Fan P G, Li S H. Resveratrols in grape berry skins and leaves in *Vitis* germplasm [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61642
- [25] 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
- [26] 殷向静. 山葡萄果实转录组分析及白藜芦醇调控机理研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016
- [27] Chaves M M, Santos T P, Souza C R, Ortuño M F, Rodrigues M L, Lopes C M, Maroco J P, Pereira J S. Deficit irrigation in grapevine improves water use efficiency while controlling vigour and production quality [J]. *Annals of Applied Biology*, 2007, 150(2): 237–252
- [28] Castellarin S D, Pfeiffer A, Sivilotti P, Degan M, Peterlunger E, Gaspero G D I. Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit [J]. *Plant Cell and Environment*, 2007, 30(11): 1381–1399
- [29] Fujita A, Gotoyamamoto N, Aramaki I, Hashizume K. Organ-specific transcription of putative flavonol synthase genes of grapevine and effects of plant hormones and shading on flavonol biosynthesis in grape berry skins [J]. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 2006, 70(3): 632–638
- [30] 李保珠, 安国勇, 韩栓. 植物激素 ABA 在水分胁迫下的功能及信号途径 [J]. *植物生理学报*, 2012, 48(1): 11–18
- [31] Niculcea M, López J, Sánchez-Díaz M, Antolin M C. Involvement of berry hormonal content in the response to pre- and post-veraison water deficit in different grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars [J]. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2014, 20(2): 281–291
- [32] Xu A, Zhan J C, Huang W D. Effects of ultraviolet C, methyl jasmonate and salicylic acid, alone or in combination, on stilbene biosynthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon [J]. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 2015, 122(1): 197–211
- [33] Nicolas P, Lecourieux D, Kappel C, Cluzet S, Cramer G, Delrot S, Lecourieux F. The basic leucine zipper transcription factor ABCISIC ACID RESPONSE ELEMENT-BINDING FACTOR2 is an important transcriptional regulator of abscisic acid-dependent grape berry ripening processes [J]. *Plant Physiology*, 2014, 164(1): 365

## Effects of Water Stress on Expression of Genes Related to Resveratrol Biosynthesis in Grape Berries

XI Ben<sup>1</sup> LIU Qiaozhen<sup>1</sup> LYU Dangui<sup>1</sup> XU Weirong<sup>1</sup> WANG Zhenping<sup>1,2</sup> DAI Hongjun<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021;

<sup>2</sup>Ministry of Grape and Wine Engineering Center, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

**Abstract:** To explore the effects of water stress on the synthesis of resveratrol in grape berries, *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon was used as a material to determine the content of resveratrol and gene expression level related to resveratrol biosynthesis under different water stress treatments. The results showed that genes encoding *PAL* (phenylalanin ammonialyase), *4CL* (4-coumarate-CoA ligase) and *STS* (stilbene synthase) were abundantly expressed with the synthesis of resveratrol at veraison. There were differences in the contents of grape resveratrol in response to different levels of water stress, all of which could improve the contents of resveratrol and the transcriptional levels of related genes involved in resveratrol synthesis pathway. Water stress could significantly promote the expressions of *PAL* and *STS* genes in the early and late stages of veraison, but greatly decreased the transcription level of *CHS* (chalcone synthase) gene. Correlation analysis showed that there was a significant positive correlation between resveratrol content and the transcription levels of *PAL* and *STS* genes. Therefore, it could be inferred that water stress could increase the content of resveratrol in grape berries by inducing the expression of *PAL*, *STS* genes. This study lays the foundation for further investigating the regulation mechanism of grape resveratrol synthesis.

**Keywords:** water stress, grape, resveratrol, gene express