

文章编号:1674-7054(2011)03-0250-06

低温对葡萄果实莽草酸途径入口酶及后分支酸途径关键酶基因表达的影响

李小溪, 问亚琴, 李春兰, 潘秋红

(中国农业大学 食品科学与营养学院/葡萄与葡萄酒研究中心, 北京 100083)

摘要: 以花后 3、7、11 周的“赤霞珠”(*Vitis vinifera* L. Cabernet Sauvignon) 葡萄果实为试材, 应用荧光实时定量 PCR 技术, 研究持续低温处理和变温处理对莽草酸途径入口酶 3-脱氧-D-阿拉伯糖型-庚酮糖酸-7-磷酸合成酶(DAHPS) 基因(*VvDAHPS-1*、*VvDAHPS-2* 和 *VvDAHPS-3*) 和后分支酸途径 2 个关键酶基因邻氨基苯甲酸合成酶(AS) 以及分支酸变位酶(CM) 基因(*VvAS*、*VvCM-1* 和 *VvCM-2*) 表达的影响。结果表明, 持续低温和变温处理对这些基因表达的影响有发育阶段的依赖性, 2 种温度处理均可显著地提高花后 3 周果实中 3 个 *VvDAHPS* 同源基因和 *VvCM-1* 的表达丰度, 且 *VvDAHPS-1* 和 *VvDAHPS-2* 受诱导的效应明显强于 *VvDAHPS-3* 和 *VvCM-1*。随着果实发育, 这些促进效应均明显减弱; 2 种温度处理对 *VvCM-2* 和 *VvAS* 表达的影响较小; 这些基因对温度的响应也呈现处理时间的依赖性。笔者认为, 一定低温有助于促进发育早期的葡萄果实中的碳源流向莽草酸途径合成更多的次生代谢物。

关键词: 莽草酸途径; 低温处理; 变温处理; 基因表达; 葡萄果实

中图分类号: S 663.1

文献标志码: A

莽草酸途径(shikimate pathway) 是连接植物和微生物糖代谢和次生代谢的主要桥梁。糖酵解途径产生的磷酸烯醇式丙酮酸(PEP) 和戊糖磷酸途径产生的赤藓糖-4-磷酸(E4P) 在 3-脱氧-D-阿拉伯糖型-庚酮糖酸-7-磷酸合成酶(3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase, DAHPS) 的作用下, 进入莽草酸途径, 经过 7 个步骤反应形成分支酸(chorismate)。分支酸是莽草酸途径的重要枢纽物质, 其后去向有 2 个分支: 一个在邻氨基苯甲酸合成酶(Anthranilate synthetase, AS) 作用下走向色氨酸(Trp) 合成途径, 另一个在分支酸变位酶(Chorismatase, CM) 作用下走向苯丙氨酸(Phe) 和酪氨酸(Tyr) 合成途径, 这 2 个分支途径也称后分支酸途径(图 1)。据估计, 绿色植物固定的碳源约有 20% 经莽草酸途径, 最终形成芳香族氨基酸、维生素、木质素、酚类物质和芳香族香气物质等^[1-2]。这些物质有的可以作为信号分子(如水杨酸) 参与植物发育的调节^[3], 有的赋予植

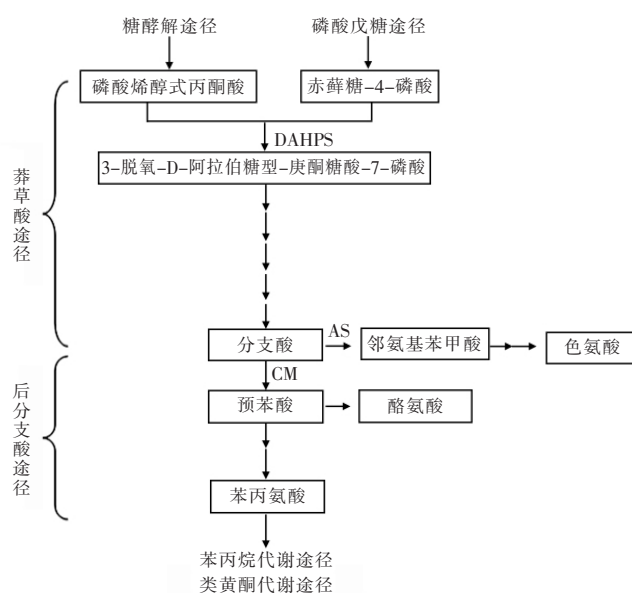


图 1 植物莽草酸途径和后分支酸途径示意图

收稿日期: 2011-07-26

基金项目: 国家自然科学基金资助课题(30771490)

作者简介: 李小溪(1988-), 女, 山东济南人, 中国农业大学食品科学与营养学院 2010 级食品生物技术专业硕士研究生。

通信作者: 潘秋红(1966-), 女, 副教授, 研究方向: 葡萄风味代谢与调控. E-mail: panqh@cau.edu.cn

物抗逆性,如抗紫外线、抗虫害、抗低温、抗机械损伤、抗离子毒害等^[4-6],有的是构成植物(如中草药)特有品质要素或花果特征香气的主要成分^[7]。由此可见,莽草酸途径是植物体内许多物质代谢的枢纽^[8]。

果实多酚类物质大多数是苯丙烷类代谢的产物,而苯丙烷类化合物又是由苯丙氨酸衍生而来^[9]。酿酒葡萄,尤其是红色酿酒葡萄含有相当丰富的多酚物质,占了其鲜重大约0.3%,在所有水果中含量最高,在葡萄酒酿造过程中,这些酚类物质通过浸渍工艺进入到葡萄酒中,它们不仅决定着葡萄酒酿造的工艺路线,还决定了葡萄酒(特别是红葡萄酒)产品的涩、苦味的优劣和强弱,影响着葡萄酒的色泽、贮藏寿命及生物化学稳定性^[10-11]。此外,大量研究还证实:葡萄多酚具有极强的抗氧化功能,能够有效地清除体内自由基,具有广泛的抗菌、抗病毒、抗癌、抗发炎、抗血栓和心血管保护作用^[12-13]。酚类物质的生物合成代谢是莽草酸途径下游的一个分支,迄今大量的研究只关注葡萄果实中与多酚生物合成紧密相连的苯丙烷代谢途径和类黄酮代谢途径,对其碳供应链上游的莽草酸途径仍未见有报道。

许多研究表明,酚类物质与植物抗性密切相关。植物受到病虫害、机械伤害、低温、高温、紫外辐射等逆境时,体内都会产生大量的多酚物质^[14-16]。Wróblewski等用低温处理河岸葡萄(*Vitis riparia*)幼苗,结果表明,酚类物质对植物的低温胁迫有保护作用。光照、臭氧、微生物等环境因素影响莽草酸途径的相关酶表达量^[9,17],但温度调控莽草酸途径的表达仍未见报道。笔者将探究低温和变温处理对莽草酸途径入口酶DAHPS和后分支酸途径关键酶AS和CM基因表达的影响,旨在为进一步研究葡萄酚类物质合成调控奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 试验材料为2008年6~8月取自河北省怀来县中法葡萄酒庄园的红色葡萄品种“赤霞珠”(*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon)的果实,分别于盛花后3、7、11周采集,采样时间均在上午10:00左右,每个品种每次采集700粒形状完整的、大小基本一致、发育正常的果实,采后用湿纱布包裹,放进泡沫盒中,2 h内送回实验室进行处理。样品经去离子水清洗晾干后,平均分为13份,每份约50粒,盖上干净的湿纱布。低温处理使用控温培养箱,温度设置为10℃,对照为25℃,分别在处理0、1、2、4 h后取出,立即用液氮速冻,贮存于-80℃下待用。变温处理采用人工气候培养箱进行,设定温度程序10℃(12 h)/25℃(12 h)(以下简称10/25℃)和对照25℃(12 h)/25℃(12 h)(以下简称25/25℃),相对湿度控制在60%~70%,分别在0、1、2、4 d后取出,立即用液氮速冻,贮存于-80℃下待用。

1.2 方法

1.2.1 葡萄果实总RNA的提取及cDNA的合成 用本实验室改进CTAB法^[18]提取葡萄果实总RNA,用DNaseI(大连宝生物试剂公司)和EZ-10柱式小量抽提RNA纯化试剂盒(上海生工试剂公司)处理RNA提取液,以除去DNA。经过核酸凝胶电泳检测发现,28S和18SrRNA条带完整,28S条带的亮度约为18S条带的2倍,表明所获得的RNA完整性良好,未发生降解。紫外分光光度法分析显示,每个样品的RNA溶液的 OD_{260}/OD_{280} 和 OD_{260}/OD_{230} 均大于理论上要求的1.8和2.3,表明纯化后的RNA未受蛋白质和多糖的污染,RNA质量较高,能满足后续反转录实验的要求。将得到的RNA用逆转录试剂盒(Promega)合成cDNA。

1.2.2 荧光实时定量PCR扩增 特异引物的设计根据各个基因的cDNA序列设计特异性引物(见表1),*VvUbiquitin*为葡萄果实中的管家基因。在预实验中,分别采用*VvUbiquitin*和*VvActin*作内参,对各低温和变温处理的样品进行转录丰度分析,结果发现,*VvUbiquitin*表达不受温度处理的影响,故选择*VvUbiquitin*作为内参。以花后11周的葡萄果实cDNA为模板,分别对每对引物进行PCR分析,以检测扩增产物是否与理论值相符。图2为扩增片段的琼脂糖凝胶电泳结果,从图2中可知,每对引物均克隆并扩增得到了单一明亮条带的DNA产物,目的基因和内参基因扩增效率基本一致,表现了较高的特异性和可比性。*VvDHAPS-1*, *VvDAHPS-2*, *VvDHAPS-3*, *VvCM-1*, *VvCM-2*, *VvAS*的PCR片段长度分别为188 bp, 118 bp, 154 bp, 217 bp, 132 bp, 117 bp,均与理论值相符,表明目的片段引物设计合理。接着分析每对引物的荧光实时定量PCR融解曲线,结果均获得理想的单一峰型,其融解温度均符合理论期望,进一步证明了这些引物荧光实时定量PCR扩增的特异性。

表 1 莽草酸途径和后分支酸途径关键酶基因荧光实时定量 PCR 分析的特异性引物

基因名称	基因序列号	正向引物	反向引物
<i>VvDAHPS-1</i>	FJ604856	5' TgC TgC Tgg ACT CAC AgT T 3'	5' CAT gAg CAC CAT CCA gTT g 3'
<i>VvDAHPS-2</i>	GU060644	5' CACCgg Agg gTA TgC TTCTA 3'	5' ACC AAg ggC TTC ATC AAC AC 3'
<i>VvDAHPS-3</i>	GU060640	5' TgC TTT ggg TAg gTg AgA g AA 3'	5' ggT TTg TTg CgA ggg TTT Ag 3'
<i>VvCM-1</i>	FJ60485	5' Agg CCg gTA gAT ATg AgA AC 3'	5' TCA CAA gCT gCA gTT AgT CC 3'
<i>VvCM-2</i>	GU060639	5' CTg CCA TCA AAg CAC AAg AC 3'	5' CCA TCC CAT TCA CCA CTA CC 3'
<i>VvAS</i>	GU060638	5' CATCAg Cgg gAA CACTAT CA 3'	5' CAT CTg gAA gCC gTT TTg AC 3'
<i>VvUbiquitin</i>	AY684131	5' GTG GTA TTA TTG AGC CAT CCT T 3'	5' AAC CTC CAA TCC AGT CAT CTA C 3'

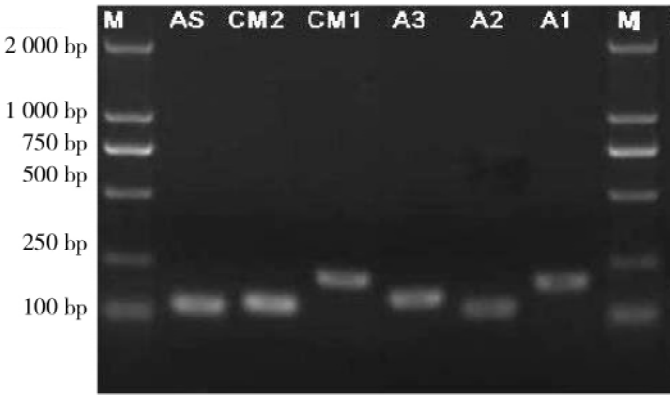


图 2 莽草酸途径和后分支酸途径相关基因 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析

M: DNA 分子质量标准 DL2000; 样品分别为 *VvAS*(AS)、*VvCM-2*(CM2)、*VvCM-1*(CM1)、*VvDAHPS-3*(A3)、*VvDAHPS-2*(A2) 和 *VvDAHPS-1*(A1) 的荧光实时定量 PCR 产物。

1.2.3 荧光实时定量 PCR 分析用 ABI 7300 实时荧光定量 PCR 仪分析转录本丰度 调整 cDNA 用量和循环数,使内标基因与目标基因的表达效率一致,以调整后的 cDNA 模板量进行基因的扩增。PCR 反应体系 10 μL ,其中: 5 μL 的 SYBR $\text{\textcircled{R}}$ Premix Ex *Taq* TM $0.2\ \mu\text{L}$ 的 ROX Reference Dye (50 \times) (大连宝生物试剂公司) 4.5 μL 的 ddH₂O,1/6 μL 的 cDNA,1/3 μL 的正反引物混合液 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。PCR 反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s 60 $^{\circ}\text{C}$ 复性延伸 31 s,循环 40 次。

1.2.4 基因表达相对定量分析计算基因表达相对定量分析 采用文献 [19] 的方法进行分析。先计算目标基因相对于 *VvUbiquitin* 基因的表达量,然后将 25 $^{\circ}\text{C}$ 或 25/25 $^{\circ}\text{C}$ 处理的对照样品的表达量归一化,计算出低温和变温处理样品基因的相对表达量。即以 *VvUbiquitin* 作为内参,将目的基因的 C_T 值标准化, $\Delta C_T = C_{T\text{目标基因}} - C_{T\text{VvUbiquitin}}$,再将温度处理后的样本和对照样本按照 $2 - (\Delta C_{T\text{处理}} - \Delta C_{T\text{对照}})$ 公式进行相对定量分析。每种处理提取 2 份高质量 RNA,每份 RNA 中每个基因各有 2 个重复的 PCR 扩增。实验结果中所呈现的数据为 3 ~ 4 个数值的平均值(将偏差较远的数据舍去),采用 SPSS(Statistical Product and Service Solutions) V12.0 计算标准偏差。

2 结果与讨论

2.1 持续低温处理的影响 如图 3 所示,持续低温处理对“赤霞珠”葡萄果实 *VvDAHPSs*、*VvCMs* 和 *VvAS* 基因表达的诱导效应主要在花后 3 周,其中莽草酸途径入口酶的 3 个同源基因 *VvDAHPS-1*、*VvDAHPS-2* 和 *VvDAHPS-3* 表达量增加最为显著,且呈现随处理时间延长而递增的趋势;在花后 3 周低温处理 4 h 后,其表达量分别为对照的 31、27 和 7 倍;随着果实发育,3 个同源基因的表达受低温促进的效应均明显减弱,对于花后 11 周果实则几乎没有影响。*VvCM* 是催化分支酸进入苯丙氨酸和类黄酮代谢途径的关键酶,*VvAS* 是催化分支酸进入色氨酸代谢途径的关键酶。低温处理可提高发育 3 周果实中 *VvCM-1* 和 *VvAS* 基因的表达丰度,但对 *VvCM-2* 有一定的抑制作用,这说明 2 个同源基因 *VvCM-1* 和 *VvCM-2* 对温度的响应是

不同的。持续低温处理对花后 7 周和 11 周的果实中这 2 个同源基因的表达几乎没有影响。

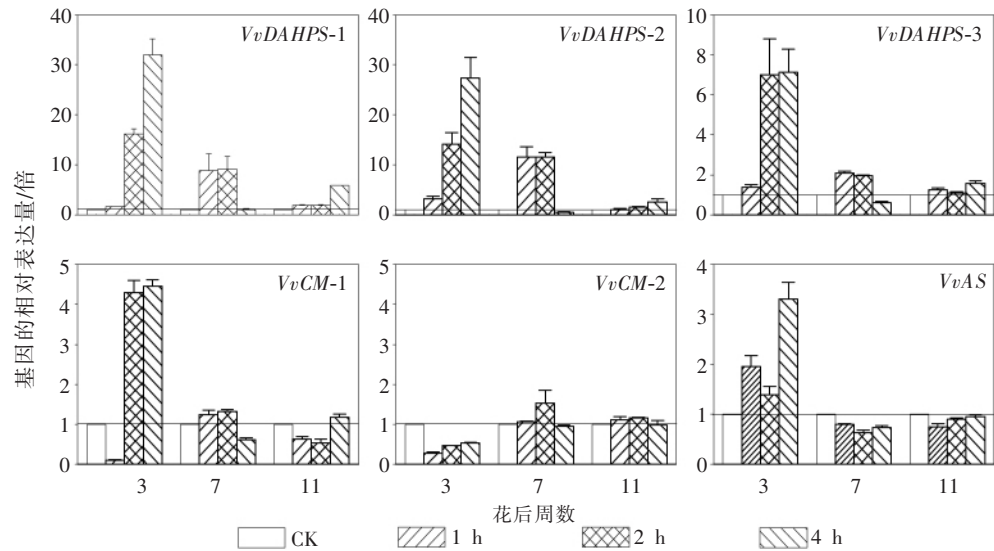


图 3 经持续低温处理不同时间的赤霞珠葡萄果实中莽草酸途径和后分支酸途径基因的转录表达

2.2 变温处理的影响 从图 4 中可以看出,变温处理对“赤霞珠”葡萄果实中莽草酸途径入口酶及后分支酸途径关键酶基因表达的影响也呈现发育阶段的依赖性,对于花后 3 周的果实来说,变温处理可显著地提高 *VvDAHPS* 3 个同源基因和 *VvCM-1* 的表达丰度,随处理时间延长呈现先增加后下降的趋势。*VvDAHPS-1* 和 *VvDAHPS-2* 的表达量增加最为显著,在变温处理 1 d 后,表达量分别为对照的 62.8 和 33.3 倍,而 *VvDAHPS-3* 相对表达量为对照的 2.4 倍,这表明 3 个同源基因对变温处理有不同的响应。随果实发育,这种促进效应明显减弱甚至消失。在后分支酸途径中,只有花后 3 周的果实中 *VvCM-1* 受变温处理的有显著促进作用,但当处理时间为 4 d 时,促进作用转变为抑制作用,表达量显著小于对照值;随着果实发育,变温处理对该基因的影响以抑制表达为主,表达量低于对照。*VvCM-2* 和 *VvAS* 对变温处理几乎没有响应。

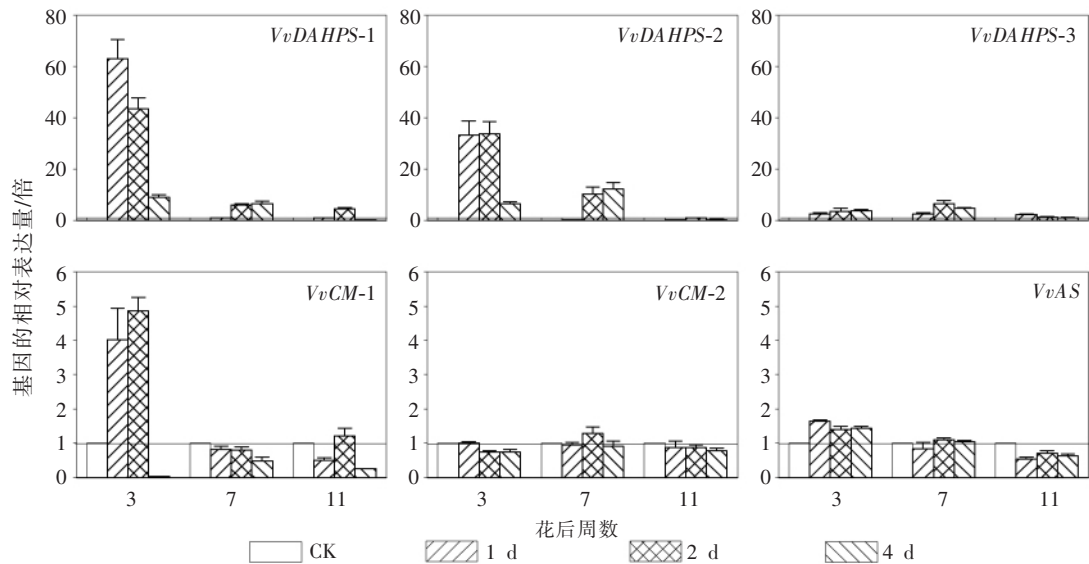


图 4 经变温处理不同时间的赤霞珠葡萄果实中莽草酸途径和后分支酸途径基因的转录表达

实验结果表明,低温对莽草酸途径入口酶和后分支酸途径关键酶基因表达的影响有发育阶段的依赖性,对于红色品种“赤霞珠”来说,低温和变温处理一定时间均可显著地提高莽草酸途径入口酶基因和 *VvCM-1* 的表达丰度,但随着果实发育,这种促进效应明显减弱,这暗示着低温和变温处理可以促进“赤霞

珠”发育早期的果实中光合碳通过莽草酸途径流向次生代谢,合成更多的次生代谢物,但随着果实的转色与成熟,苯丙烷代谢和类黄酮代谢明显增强,酚类物质大量合成^[10],而温度的影响效应不明显。

作为一种逆境因子,低温和变温处理对植物莽草酸途径及后分支酸途径在转录水平上的研究鲜有报道,有关低温/变温对莽草酸途径和后分支酸途径的诱导机理还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] HERMANN K M. The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism [J]. *Plant Physiology*, 1995, 107: 7 – 12.
- [2] HERMANN K M. The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds [J]. *Plant Cell*, 1995(7) : 907 – 919.
- [3] DUMER J, SHAH J, KLESSIG D F. Salicylic acid and disease resistance in plant [J]. *Trends in Plant Science*, 1999(18) : 547 – 575.
- [4] RIPPET P, SCIMEMI C, DUBALD M, et al. Engineering plant shikimate pathway for production of tocotrienol and improving herbicide resistance [J]. *Plant Physiology*, 2004, 134: 92 – 100.
- [5] RVERO R M, RUIZ J M, CARCIA P C, et al. Resisitance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants [J]. *Plant Science*, 2001, 160: 315 – 321.
- [6] OH M, TRICK H N, RAJASHEKAR C B. Secondary metabolism and antioxidants are involved in environmental adaption and stress tolerance in lettuce [J]. *Journal of plant physiology*, 2009, 166: 180 – 191.
- [7] TZIN V, GALILI G. New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants [J]. *Molecular Plant*, 2010(3) : 956 – 972.
- [8] BENTKEY R. The shikimate pathway—a metabolic tree with many branches [J]. *Biochemistry and Molecular Biology*, 1990 (25) : 307 – 384.
- [9] HERMANN K M. The shikimate pathway [J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1999, 50: 473 – 503.
- [10] VIDAL S, FRANCIS L, GUYOT S, et al. The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2003, 83: 564 – 573.
- [11] PELEG H, GACON K, SCHLICH P, et al. Bitterness and astringency of flavan-3-monomers, dimmers and trimmers [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999, 79: 1123 – 1128.
- [12] SKERGET M, KOTNIK P, HADOLIN M, et al. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and antioxidant activities [J]. *Food Chemistry*, 2005, 89: 191 – 198.
- [13] RASMUSSEN S E, FREDERIKEN H, KROGHOLM K S, et al. Dietary proanthocyanidins: occurrence dietary intake, bio-availability, and protection against cardiovascular disease [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2005, 49: 159 – 174.
- [14] PETERS D J, CONSTABEL C P. Molecular analysis of herbivore-induced condensed tannin synthesis: cloning and expression of dihydroflavonol reductase from trembling aspen (*Populus tremuloides*) [J]. *The Plant Journal*, 2002, 32: 701 – 712.
- [15] CHRISTOPHER M E, MIRANDA M, MAJOR I T, et al. Gene expression profiling of systemically wound-induced defenses in hybrid poplar [J]. *Planta*, 2004, 219: 936 – 947.
- [16] BECKMAN G H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2000, 57: 101 – 110.
- [17] DYER W E, HENSTRAND J M, HANDA A K, et al. Wounding induces the first enzyme of the shikimate pathway in Solanaceae [J]. *Proceedings of the National Academy of Science*, 1989, 86: 7370 – 7373.
- [18] HE F, FANG X X, HU M, et al. Preparation and biological application of antibodies against leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase from grape berry [J]. *Vitis*, 2009, 48: 69 – 75.
- [19] KASAI K, KANNO T, AKITA M, et al. Identification of three shikimate kinase genes in rice: characterization of their differential expression during panicle development and of the enzymatic activities of the encoded proteins [J]. *Planta*, 2005, 222: 438 – 447.

Effects of Low Temperature on Expression of Genes Encoding Entrance Enzyme of Grape Shikimate Pathway and Key Enzymes of Post Chorimate Pathway

LI Xiao-xi , WEN Ya-qing , LI Chun-lan , PAN Qiu-hong

(Center for Viticulture and Enology , College of Food Science and Nutritional Engineering , China Agricultural University , Beijing 100083 , China)

Abstract: In this report , grape (*Vitisvinifera* L. cv. ‘Cabernet Sauvignon’) berries at 3 , 7 and 11 weeks after full bloom were used as materials , real time PCR were performed , and the effects of treatments with constant low temperature and variable low temperature , respectively , on the expression of the genes encoding 3-Deoxy-D-ara-bino-heptulosonate-7-phosphate synthase (DAHPS) , an entry enzyme of shikimate pathway , and anthranilic acid synthase (AS) and chorismatemutase (CM) , key enzymes of post-chorismate pathway were investigated. The results showed that the effects were developmental stage dependent , the treatments with constant and variable low temperatures , both significantly increased the transcript abundance of three *VvDAHPS* isogenes and *VvCM-1* in 3-week berries; the activation extent of expression of *VvDAHPS-1* and *VvDAHPS-2* was much higher than that of *VvDAHPS-3* and *VvCM-1* , which were greatly reduced accompanying with berry mature; the expression of *VvCM-2* and *VvAS* was slightly affected by two low temperature treatments. Additionally , the response of these tested genes to low-temperature treatments was time dependent. These data suggested that a certain low-temperature will stimulate carbon flow in young grape berries to shikimate pathway , leading to the production of more secondary metabolites.

Key words: shikimate pathway; constant low-temperature treatment; variable low-temperature treatment; gene expression; grape berry

(上接第 249 页)

Effects of Different Packaging Material and Preservation Thickness on Storage Characteristic of Fresh-cut Melon

LIN Shi-sen , CHENG Shan-han , ZHANG Peng

(Key Laboratory of Protection and Development Utilization of Tropical Crop Germplasm Resources , Ministry of Education;
College of Horticulture and Gardening , Hainan University , Haikou 570228 , China)

Abstract: In order to investigate the effects of packaging material and preservation thickness on the storage characteristic of fresh-cut melon , monolayer and nondegradable film , bilayer and nondegradable film , monolayer and degradable film , bilayer and degradable packaging materials were used for the package of fresh-cut melon. The results showed that bilayer film packaging delayed the deterioration , reduced weight loss effectively and maintained the appearance quality better; bilayer and degradable film packaging maintained the high content of VC and activities of POD and SOD. The conclusions were drawn that bilayer and degradable film is a good material used for the storage and preservation of fresh cut melon.

Key words: fresh-cut melon; PE fresh-keeping film; materials and thickness of storage properties