网络出版时间:2018-02-26 08:48 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2018.06.012
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.s.20180226.0847.024.html

摘叶和挪叶处理对‘赤霞珠’葡萄种子黄烷-3-醇类物质的影响

刘 月[1],何 非[1],李 强[2a],严 静[2b],张 波[3],石 英[1]

(1 中国农业大学 食品科学与营养工程学院,农业部葡萄酒加工重点实验室,北京 100083;
2 中国农业科学院 a 蔬菜花卉研究所,北京 100081;b 郑州果树研究所,河南 郑州 450009;
3 甘肃农业大学 食品科学与工程学院,甘肃省葡萄与葡萄酒工程学重点实验室,甘肃 兰州 730070)

[摘 要] 【目的】研究摘叶和挪叶处理对葡萄种子中黄烷-3-醇类物质的影响,为提高酿酒葡萄品质提供参考依据。【方法】以‘赤霞珠’(*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon)葡萄为供试材料,于果实成熟的不同时期(转色 50%、转色 100%和采收前 2 周)分别进行半摘叶、全摘叶和挪叶处理,研究葡萄种子中黄烷-3-醇含量及组成的变化。【结果】葡萄种子黄烷-3-醇以表儿茶素(EC)和表儿茶素没食子酸酯(ECG)为主要组成单体,儿茶素(C)的含量最低。种子黄烷-3-醇含量从坐果期的 13.7 mg/g 上升至转色开始时的 78.3 mg/g,之后呈下降趋势,至果实采收时黄烷-3-醇的含量为 51.6 mg/g。3 个处理中,仅采收前全摘叶处理显著增加了采收时种子的黄烷-3-醇含量,增幅为 7.6%。在黄烷-3-醇类物质的组成单元中,延伸单元的含量最高,其次为起始单元,游离单体的含量最低,采收时其含量分别为 36.4,14.2 和 1.1 mg/g。摘叶和挪叶处理可显著降低采收时种子黄烷-3-醇的起始单元含量,降幅为 11.2%~38.7%。此外,黄烷-3-醇类物质的平均聚合度(mDP)随葡萄生长发育呈先下降后上升趋势,转色期后逐渐升高,至采收时为 2.9,而没食子酸化程度(*G*)的变化规律不明显,摘叶和挪叶处理可增大采收时种子黄烷-3-醇的 mDP,并保持 *G* 值在 42%左右。【结论】采收前全摘叶处理可显著增加采收时葡萄种子黄烷-3-醇的含量,而采收前半摘叶处理可显著降低 *G* 值,因此采收前半摘叶和全摘叶的栽培措施更有利于改善酿酒葡萄的酿酒品质。

[关键词] 赤霞珠;种子;黄烷-3-醇;摘叶和挪叶

[中图分类号] S663.105^{+}.1 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2018)06-0094-09

Effect of leaf removing and moving on Flavan-3-ols composition in seeds of Cabernet Sauvignon

LIU Yue[1], HE Fei[1], LI Qiang[2a], YAN Jing[2b], ZHANG Bo[3], SHI Ying[1]

(1 *Key Laboratory of Viticulture and Enology, Ministry of Agriculture, College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing* 100083, *China*; 2 a *Vegetable and Flower Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing* 100081, *China*; b *Zhengzhou Fruit Tree Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou, Henan* 450009, *China*; 3 *Gansu Key Laboratory of Viticulture and Enology, College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu* 730070, *China*)

Abstract: 【Objective】The effect of leaf removing and moving on flavan-3-ols composition in grape seeds were examined to provide basis for improvement of grape quality. 【Method】The cultural practices including half leaf removing, leaf removing and leaf moving during ripening (50% véraison, 100% véraison and 2 weeks before harvest) of ‘Cabernet Sauvignon’ were conducted to study the effect of leaf removing

[收稿日期] 2017-03-24
[基金项目] 国家自然科学基金项目(31471723);国家现代农业产业技术体系项目(CARS-29)
[作者简介] 刘 月(1992-),女,湖北孝感人,在读博士,主要从事葡萄酒化学与酿造研究。E-mail:839320887@qq.com
[通信作者] 石 英(1965-),女,陕西西安人,副教授,博士,主要从事食品营养与安全研究。E-mail:shiy@cau.edu.cn

and moving on concentration and composition of flavan-3-ols in grape seeds.【Result】The main components of flavan-3-ols were epicatechin (EC) and epicatechin-3-*O*-gallate (ECG), while the lowest component was catechin (C). The concentration of flavan-3-ols in grape seeds increased from 13.7 mg/g at fruit setting stage to 78.3 mg/g at the beginning of véraison, followed by a decrease trend with 51.6 mg/g at harvest. The leaf removing before harvest treatment increased the content by 7.6%. Extension subunit was the main unit of flavan-3-ols, followed by terminal subunit and monomer, and their concentrations in harvested grape seeds were 36.4, 14.2 and 1.1 mg/g, respectively. Leaf removing and leaf moving significantly decreased terminal subunits concentration by 11.2%－38.7%. Meanwhile, the mean degree of polymerization (mDP) decreased gradually from beginning to véraison, followed by an increase to 2.9 at harvest. The galloylation (*G*) remained unchanged with little fluctuations. Leaf removing and leaf moving increased mDP and maintained *G* at 42%.【Conclusion】Leaf removing and half leaf removing at pre-harvest could significantly increase flavan-3-ols content and decrease *G* value in harvested grape seeds, respectively. Thus, the two cultural practices are beneficial to the improvement of grape quality from the winemaking perspective.

Key words: Cabernet Sauvignon; seeds; flavan-3-ols; leaf removing and moving

黄烷-3-醇类物质是由植物体内类黄酮代谢途径产生的一类多酚物质，广泛存在于植物的根、茎、叶片、果实和种子等组织中[1]，不仅参与植物的生长，而且也对抵抗病原微生物侵染[2]、防护诱变损伤具有十分重要的作用[3]。此外，黄烷-3-醇类物质的酚羟基结构对活性氧等自由基有很强的清除能力，通过与自由基结合，可减少或阻止组织中氧化反应的进行，从而起到抗氧化作用[4]。在酿酒葡萄中，黄烷-3-醇类物质是一类重要的生物活性物质，主要存在于葡萄的种子、果皮和果梗中，其中以种子中含量最高[5]，并伴随着酿酒过程的浸渍及发酵工艺逐步进入到葡萄酒中，赋予葡萄酒色泽、口感、风味和澄清度等感官特征。在陈酿阶段，其通过与花色苷等物质之间的相互作用，对葡萄酒体的稳定性也具有十分积极的效果。

随着果实的成熟及葡萄生长环境的变化，黄烷-3-醇类物质的组成和含量会有所不同。随着成熟度的增加，黄烷-3-醇类物质的聚合体（原花色素）含量及聚合度也逐渐增加[6]。研究表明，不同葡萄品种之间黄烷-3-醇类物质的含量及类型差异很大，相同品种葡萄中该类物质的构成及含量也会受地域、栽培条件、气候条件等多种因素的影响，其中光照、温度、水分等环境因素以及外源植物激素对黄烷-3-醇的合成有十分明显的影响[7-11]。通过在葡萄结果部位附近进行摘叶和挪叶处理，可以改善结果带的空气流动，防止病害的发生[12]，同时还可以改变果实的曝光量及温度[13]。目前，关于摘叶和挪叶处理对酿酒葡萄品质影响的研究，主要集中在产量、果穗紧密度、总糖和总酸等基本理化指标和颜色风味等感官方面[14-17]，较少涉及果皮中花色苷和黄烷醇类物质的分析[18-19]，而对种子中黄烷-3-醇类物质的影响尚未见文献报道。因此，通过对果实发育不同时期的葡萄进行摘叶和挪叶处理，改变葡萄果实发育过程中的曝光量和温度，研究成熟过程中葡萄种子中黄烷-3-醇类物质的变化模式，对于研究黄烷-3-醇类物质的积累及提高酿酒葡萄的品质具有重要意义。

新疆玛纳斯地区位于天山北麓经济带核心位置，当地气候条件非常适宜酿酒葡萄的生长，是我国葡萄酒的主要产区之一。本研究以当地主要栽培的‘赤霞珠’（*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon）葡萄为试材，在不同发育期葡萄的结果带附近分别进行摘叶和挪叶处理，研究摘叶和挪叶处理对葡萄种子黄烷-3-醇类物质组成及含量的影响，以期为揭示光照与葡萄品质形成的本质关系提供理论依据，并为实际生产中通过栽培措施改良葡萄品质的研究提供参考。

1　材料与方法

1.1　试验材料

试验于 2011 年在新疆昌吉州玛纳斯县进行，试验地位于北纬 44°18′，东经 86°12′，海拔 470 m；属于半干旱气候，平均气温 8.2 ℃，最高平均气温 13.6 ℃，最低平均气温 3.4 ℃，日照 2 899 h，降雨量 217.8 mm，其中 8－9 月日照时数为 2 173.7 h。试验地土壤类型为砂壤土，弱碱性（不同深度土壤 pH 为 7.2－7.5）。

供试葡萄品种为‘赤霞珠’，2000 年定植，株行距 1.0 m×2.5 m，为倾斜单龙干水平向上的整形方

式,简称改良VSP(M-VSP),南北行向,施肥和病虫害管理按照行业标准(GB 12696－1990, GB/T 25393－2010)进行。葡萄于06-01进入盛花期,花期持续约1周,花后60 d(07-30)开始转色,转色期持续约3周。试验设2个因素,分别为处理时期和处理方式,处理时期分3个水平,分别为08-09(转色50%,记为"V")、08-24(转色100%,记为"AV")、09-08(采收前2周,记为"PH");处理方式分3个水平,分别为摘除新稍基部以上1,3,5节位上的叶片(半摘叶,记为"HLR")、摘除新稍基部以上1－6节上的叶片(全摘叶,记为"LR")和移开新稍基部以上1－6节上的叶片(挪叶,记为"LM")。

试验共有9个处理,分别记为HLR-V(表示50%转色期半摘叶,余类推)、HLR-AV、HLR-PH、LR-V、LR-AV、LR-PH、LM-V、LM-AV和LM-PH,以常规栽培处理为对照(CK)。采用随机区组设计,每种处理均有3个重复,每个重复15株葡萄树。分别在葡萄花后31 d(07-01)、45 d(07-15)、60 d(07-30)、69 d(08-09)、73 d(08-13)、84 d(08-24)、98 d(09-08)、114 d(09-24)采样,直至果实成熟采收。果实采摘后立即置于－80 ℃冰箱中保存待测。

1.2 试 剂

试剂儿茶素((＋)-Catechin, C)、表儿茶素((－)-Epicatechin,EC)、表棓儿茶素(Epigallocatechin,EGC)和表儿茶素没食子酸酯(Epicatechin-3-*O*-gallate,ECG),纯度＞98%,购于美国Sigma公司;乙腈、甲醇、醋酸,均为色谱纯,来自美国Fisher公司;甲醇、丙酮、盐酸、间苯三酚和抗坏血酸等均为国产分析纯试剂,来自蓝弋化工。

1.3 试验方法

1.3.1 样品处理 黄烷-3-醇的提取参照Liang等[20]的方法。随机选出一定数目的葡萄果实,手工分离葡萄种子,将种子置于液氮中研磨至粉末状,用真空冷冻干燥机冻干并于－40 ℃保存待用。(1)游离体黄烷-3-醇的提取。称取0.1 g葡萄籽干粉,加入1 mL体积分数70%丙酮(含0.005 g Vc),10 000 r/min离心15 min,收集上清液,共提3次,合并上清液并摇匀。取400 μL上清液用N_2吹干后,用200 μL含体积分数1% HCl酸化的甲醇溶解,再加入200 μL乙酸钠(200 mmol/L)中和后,0.22 μm滤膜过滤上样。(2)聚合体黄烷-3-醇的裂解和提取。称取0.1 g葡萄籽干粉,加入1 mL间苯三酚缓冲液(含0.3 mol/L HCL,50 g/L的间苯三酚和0.005 g抗坏血酸),50 ℃下静置20 min,加1 mL乙酸钠(200 mmol/L)终止反应,10 000 r/min离心15 min,收集取上清液,共提3次,合并上清液摇匀后,0.22 μm滤膜过滤上样。

1.3.2 HPLC-MS条件 Agilent 1100系列LC/MSD Trap-VL液相色谱-离子阱质谱联用仪,美国AgilentTechnologies公司。选择反相色谱条件,ZORBAXSB-C18(5 μm,250 mm×4.6 mm)色谱柱,流动相A为体积分数0.2%乙酸水溶液,B为乙腈-体积分数0.2%乙酸水溶液(V(乙腈)∶V(体积分数0.2%乙酸)＝4∶1);洗脱程序:0～20 min,10.0% B;20～40 min,10.0%～20.0% B;40～50 min,20.0%～33.0% B;50～55 min,33.0%～40.0% B;55～58 min,40%～100% B;58～63 min,100% B;63～64 min,100%～10.0% B;64～70 min,10% B。流速为1 mL/min;柱温:25 ℃,检测波长280 nm,进样量10 μL。质谱采用电喷雾离子源(ESI),负离子模式,离子扫描范围100～2 200 m/z,雾化气压力0.24 MPa;干燥气流速10 L/min,干燥气温度350 ℃,碰撞电压1.00 V。

1.3.3 样品的定性和定量 黄烷-3-醇的定性按照质谱信息和标样保留时间进行,采用外标法进行定量分析。原花色素经酸催化发生裂解反应形成延伸单元和起始单元,延伸单元为与间苯三酚结合的黄烷-3-醇复合物,起始单元为其中游离的黄烷-3-醇单体减去丙酮提取所检测到的游离单体。样品重复测定2次,试验结果以每克干种子中所含的各单元的质量表示,单位为mg/g。样品的没食子酸化程度(G)和平均聚合度(mDP)的计算公式如下:

$$G=\frac{\text{ECG 含量}}{\text{总黄烷-3-醇含量}}\times 100\%;$$

$$\text{mDP}=\frac{\text{延伸单元物质的量}+\text{起始单元物质的量}}{\text{起始单元物质的量}}。$$

1.4 数据处理

采用IBM SPASS Statistics 20软件进行数据统计与分析,采用单因素方差分析进行差异显著性($P<0.05$)检验,采用Origin 8.1软件绘图。

2 结果与分析

2.1 摘叶和挪叶处理对葡萄种子黄烷-3-醇类物质含量变化的影响

图1显示,在'赤霞珠'葡萄生长发育过程中,种子黄烷-3-醇的含量自花后31 d开始逐渐升高,在果实转色初期(花后60 d)达到峰值(78.3 mg/g),之后逐渐下降,虽在成熟阶段其含量有所回升,但一直

维持在相对稳定的水平（50 mg/g 左右），同转色开始时相比，降幅为 36.1%。这一变化趋势与前人的研究结果[21-23]相似。‘赤霞珠’种子中共检测到 3 种黄烷-3-醇单体，分别为 C、EC 和 ECG，也与前人的研究结果[24]一致。‘赤霞珠’种子黄烷-3-醇单体主要以 EC 和 ECG 为主，占黄烷-3-醇总量的 75%以上。EC 和 ECG 在转色初期（花后 60 d）达到峰值，含量分别为 30.7 和 34.2 mg/g，之后含量有所降低，至采收时分别下降了 18.9%和 35.4%。相比 EC 和 ECG，C 的含量较低，仅占总含量的 8.9%～22.6%。C 在花后 69 d 时含量达到最高，之后开始下降，并逐渐稳定在 4.6 mg/g 左右。

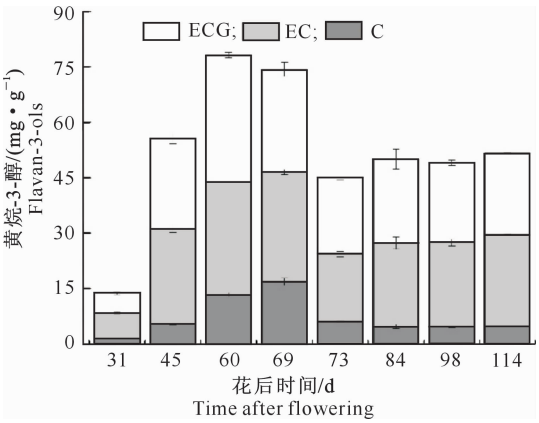
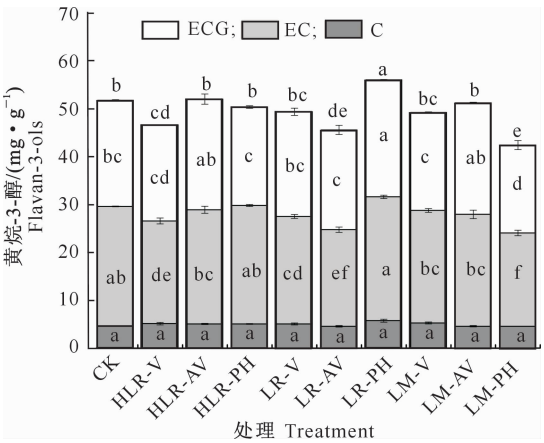


图 1　葡萄成熟过程中种子黄烷-3-醇类物质的变化

Fig. 1　Change of flavan-3-ols in seeds during grape ripening

图 2 所示为‘赤霞珠’葡萄采收时不同时期摘叶和挪叶处理对种子黄烷-3-醇含量的影响。



柱上标不同字母表示不同处理间差异显著。图 4 同

Different letters indicate significant difference at $P<0.05$. The same for Fig. 4

图 2　摘叶和挪叶处理对采收时葡萄种子黄烷-3-醇类物质的影响

Fig. 2　Influence of leaf removing and moving on concentration of flavan-3-ols in grape seeds at harvest

由图 2 可知，与对照相比，仅 LR-PH 显著增加了黄烷-3-醇的含量，增幅为 7.7%；而 HLR-V、LR-AV 及 LM-PH 的黄烷-3-醇含量均显著低于对照，其中 LM-PH 的含量最低（42.3 mg/g），较对照降低 18%；其他处理的黄烷-3-醇含量与对照相比无显著差异（$P<0.05$）。对黄烷-3-醇单体而言，HLR-AV、LM-AV 和 LR-PH 处理的 ECG 含量均高于对照，其中 LR-PH 处理的 ECG 含量显著高于对照，增幅为9.5%；其余处理组的 ECG 含量均低于对照，其中 LM-PH 处理的 ECG 含量显著低于对照，降幅为 17.1%。对 EC 含量而言，HLR-V、LR-V、LR-AV 及 LM-PH 处理均显著低于对照，而其他处理的 EC 含量与对照均无显著差异（$P<0.05$）。各处理的 C 含量均较低，且在所有处理之间均无显著差异。

2.2　摘叶和挪叶处理对葡萄种子黄烷-3-醇类物质组成单元的影响

黄烷-3-醇的总含量包括延伸单元、起始单元和游离单体，图 3 显示了延伸单元、起始单元和游离单体含量随果实发育的变化情况。延伸单元是黄烷-3-醇的主要组成单元，由图 3-A 可知，在花后 60 d 其含量上升到最高（38.2 mg/g），之后略有下降，转色结束后又呈略微升高的趋势，至采收时，与花后 60 d 相比仅下降 4.7%。图 3-B 表明，起始单元含量在花后 69 d 上升至最高（24.8 mg/g），之后持续下降，至采收时降幅达 42.9%。由图 3-C 可以看出，黄烷-3-醇中的游离单体与起始单元相似，也在花后 69 d 上升至最高（21.3 mg/g），花后 73 d 出现急剧下降，降幅 89.2%，之后含量维持在 1 mg/g 左右。

表 1 显示了延伸单元、起始单元和游离单体中各组成单体，即 EC、C、EGG 所占比例的变化情况。延伸单元中 EC 为主要单体，其所占比例随葡萄的生长成熟呈逐渐下降趋势，从花后 31 d 的 82.26%下降为花后 114 d 的 57.22%；ECG 所占比例居次，总体呈升高趋势，至花后 73 d，其比例上升至最高（47.85%），之后保持平稳；C 的比例最低，随葡萄的生长呈先上升后下降趋势，基本保持在 10%以下。与延伸单元不同，起始单元中 ECG 为主要单体，其比例随葡萄的生长成熟先下降后趋于平稳，从花后 31 d 的 76.95%下降为花后 114 d 的 47.16%；EC 的比例呈逐渐增加趋势，而 C 的比例基本一直保持稳定的状态，至采收时，EC 和 C 的比例分别为 27.11%和 25.73%。对于游离单体而言，3 种单体的比例随着葡萄的生长成熟呈波动状态，EC 的比例最低，基本上低于 30%，C 的比例为 20%～40%，而 ECG 的比例为 30%～60%，波动变化趋势明显。

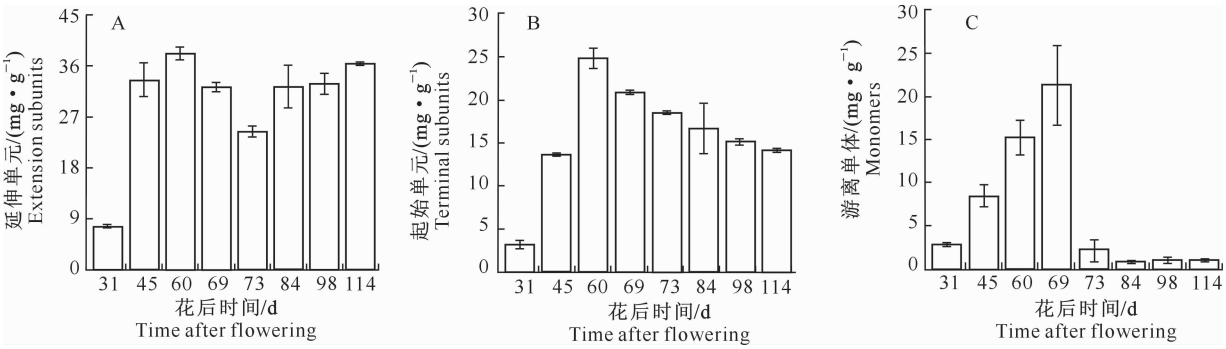


图3 葡萄成熟过程中种子黄烷-3-醇类物质组成单元的变化

Fig. 3 Change of concentrations of flavan-3-ols units in seeds during grape ripening

表1 葡萄成熟过程中种子黄烷-3-醇类物质组成单元中单体比例的变化

Table 1 Change of monomers ratios of flavan-3-ol units in seeds during grape ripening %

黄烷-3-醇单元 Flavan-3-ol units	单体组成 Monomers composition	花后时间/d Time after flowering							
		31	45	60	69	73	84	98	114
延伸单元 Extension subunits	C	1.35	1.84	5.39	9.01	0.56	0.70	1.19	1.60
	EC	82.26	72.70	66.56	66.76	51.59	56.69	56.75	57.22
	ECG	16.39	25.46	28.05	24.23	47.85	42.61	42.06	41.17
起始单元 Terminal subunits	C	22.75	19.25	23.89	26.92	26.59	25.06	25.66	25.73
	EC	0.30	0.35	7.24	10.52	27.35	24.79	25.92	27.11
	ECG	76.95	80.40	68.88	62.56	46.06	50.16	48.42	47.16
游离单体 Monomers	C	24.78	26.07	35.38	39.00	40.39	33.82	32.68	33.07
	EC	20.87	15.27	22.86	28.31	23.37	14.38	21.97	27.79
	ECG	54.36	58.65	41.76	32.69	36.25	51.80	45.35	39.14

摘叶和挪叶处理对采收时葡萄种子黄烷-3-醇延伸单元、起始单元和游离单体的影响见图4。

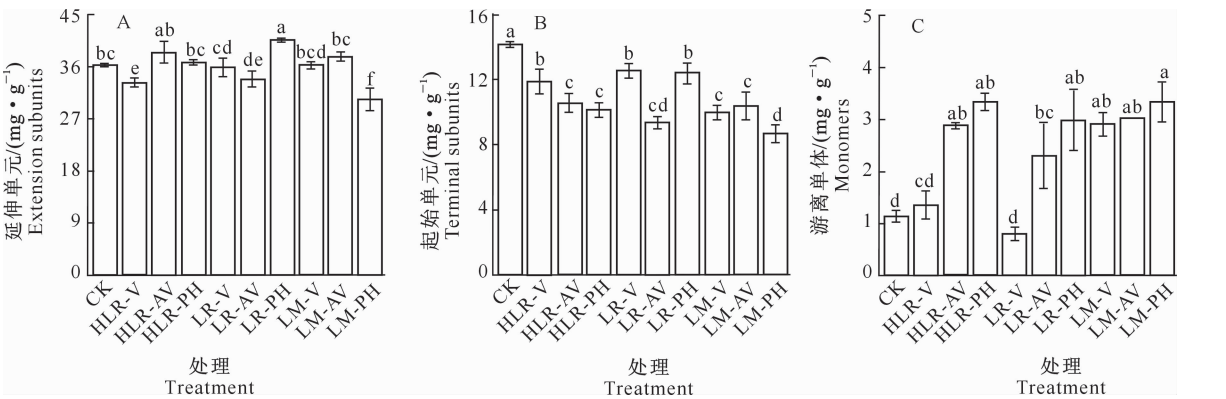


图4 摘叶和挪叶处理对采收时葡萄种子黄烷-3-醇类物质组成单元的影响

Fig. 4 Influence of leaf removing and leaf moving on concentrations of flavan-3-ols units in grape seeds at harvest

由图4-A可知,延伸单元为黄烷-3-醇类物质的主要组成单元,其含量的多少直接影响着黄烷-3-醇总含量的变化。因此,半摘叶、全摘叶和挪叶处理对延伸单元含量的影响与其对黄烷-3-醇总含量的影响表现出相同的规律,在此不再赘述。由图4-B可以看出,不同时期摘叶和挪叶处理对起始单元含量的影响规律表现相同,即均显著地降低了其含量($P<0.05$)。例如,LM-PH处理的起始单元含量最低,较对照组降低38.7%。由图4-C可知,对于游离单体而言,除HLR-V和LR-V处理外,其他处理组游离单体含量均显著高于对照,同时表现出处理时期越晚,其含量越高的变化规律。例如,HLR-PH处理的游离单体含量分别较HLR-V和HLR-AV处理高59.6%和13.8%。

表2显示了摘叶和挪叶处理对采收时葡萄种子黄烷-3-醇延伸单元、起始单元和游离单体中各组成单体所占比例的影响。对延伸单元组成单体而言,两种摘叶处理方式均降低了ECG的比例,并显著地

增加了 C 的比例（$P<0.05$）。例如，LR-PH 处理的 C 和 ECG 比例较对照组分别增加了 67.5%和降低了 9.6%。对延伸单元 EC 比例的影响，则表现为采收前的各处理均使其比例有所增加，而转色结束时各处理的比例又有所降低。对起始单元而言，半摘叶、全摘叶和挪叶处理均显著地降低了其 EC 的比例，但显著增加了 ECG 的比例，其中 LM-PH 处理的影响效果最明显，使 EC 降低了 94.7%，而使 ECG 增加了 36.8%；起始单元 C 的比例仅以 HLR-V、HLR-PH 和 LR-V 处理高于对照。在游离单体的组成中，仅 LR-V 处理能分别显著地增加 ECG 的比例和降低 C 的比例，其他处理组的 ECG 比例均低于对照，而 C 和 EC 的比例均高于对照，其中 EC 的比例均有显著增加。

表 2　摘叶和挪叶处理对采收时葡萄种子黄烷-3-醇类物质组成单元中单体比例的影响

Table 2　Influence of leaf removing and leaf moving on monomers ratios of flavan-3-ols units in grape seeds at harvest

%

黄烷-3-醇单元 Flavan-3-ol units	单体组成 Monomers composition	处理 Treatment									
		CK	HLR-V	HLR-AV	HLR-PH	LR-V	LR-AV	LR-PH	LM-V	LM-AV	LM-PH
延伸单元 Extension subunits	C	1.60 c	4.06 ab	4.69 ab	3.09 bc	4.34 ab	4.81 ab	4.92 a	4.82 ab	3.51 ab	4.04 ab
	EC	57.22 cd	57.38 cd	56.97 cde	61.75 a	56.20 de	55.26 e	57.87 bcd	58.15 bc	56.97 cde	59.20 b
	ECG	41.17 a	38.56 bcd	38.35 bcd	35.16 e	39.45 abc	39.93 ab	37.21 cde	37.04 cde	39.51 abc	36.76 de
起始单元 Terminal subunits	C	25.73 ab	27.79 a	20.39 d	25.76 ab	26.24 ab	22.32 cd	21.90 cd	24.24 bc	20.81 cd	23.95 bc
	EC	27.11 a	15.31 b	7.30 cd	4.81 de	16.27 b	5.49 de	7.24 cd	11.59 bc	5.34 de	1.43 e
	ECG	47.16 d	56.90 c	72.31 a	69.43 ab	57.49 c	72.19 a	70.86 a	64.17 b	73.85 a	74.62a
游离单体 Monomers	C	33.07 c	34.45 bc	38.14 ab	39.13 a	22.71 d	35.80 abc	33.84 bc	37.55 abc	35.88 abc	37.23 abc
	EC	27.79 e	33.50 d	38.54 cd	45.57 ab	25.79 e	41.63 bc	48.16 a	42.35 abc	41.59 bc	42.64 abc
	ECG	39.14 b	32.05 b	23.31 c	15.30 c	51.50 a	22.57 c	18.00 c	20.11 c	22.53 c	20.14 c

注：同一行数据后标不同字母表示不同处理之间具有显著差异（$P<0.05$）。

Notes: Different letters in same row indicate significant difference at $P<0.05$.

2.3　摘叶和挪叶处理对葡萄种子黄烷-3-醇类物质 mDP 及 *G* 的影响

对酿酒葡萄黄烷-3-醇类物质进行分析时，mDP 和 *G* 通常作为重要的分析指标，用以反映酒体的收敛性和结构感。一般来说，随着 mDP 的升高，酒体的苦味会减少而涩味有所增强，同时较高的 *G* 则会使葡萄酒口感粗糙[25]。在葡萄果实发育过程中，种子黄烷-3-醇 mDP 及 *G* 的变化规律如图 5 所示。

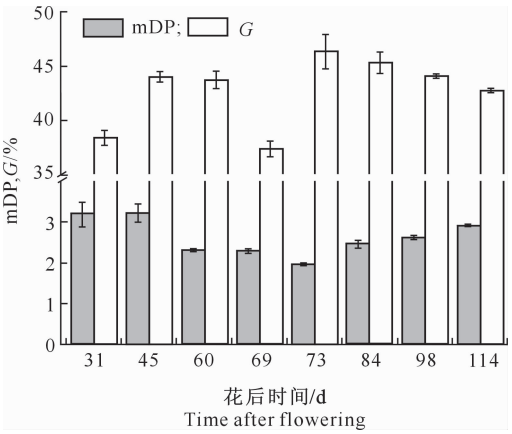
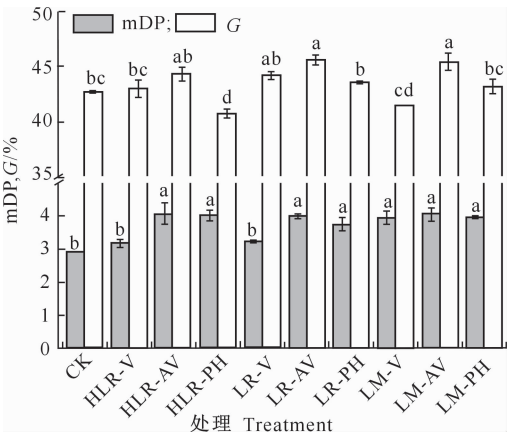


图 5　葡萄成熟过程中种子黄烷-3-醇类物质 mDP 和 *G* 的变化

Fig. 5　Change of flavan-3-ols mDP and *G* in seeds during grape ripening

摘叶和挪叶处理对采收时葡萄种子黄烷-3-醇物质 mDP 和 *G* 的影响如图 6 所示。



相同颜色柱上标不同字母表示处理间差异显著

Different letters on same color bars indicate significant difference at $P<0.05$

图 6　摘叶和挪叶处理对采收时葡萄种子黄烷-3-醇类物质 mDP 和 *G* 的影响

Fig. 6　Influence of leaf removing and leaf moving on mDP and *G* of flavan-3-ols in grape seeds at harvest

图 5 显示，随葡萄的生长发育 mDP 呈现先下降后上升的趋势，至采收时达到 2.9。相比 mDP 的变化，种子 *G* 总体呈波动性变化，在花后 73 d 达到最高值（46.3%），之后又开始缓慢降低，在采收时达到

42.8%。

由图6可见,所有摘叶和挪叶处理的mDP值均高于对照,除HLR-V和LR-V处理外,其他处理的mDP值与对照之间均具有显著差异($P<0.05$),mDP值基本上在3.8左右波动。对于G而言,HLR-PH处理的G值显著低于对照,降幅为4.7%;LR-AV和LM-AV处理的G值均显著高于对照,增幅分别为6.4%和6.0%,其他处理与对照间均无显著差异。

3 讨 论

在'赤霞珠'葡萄果实生长发育过程中,种子黄烷-3-醇类物质含量在转色开始时达到最高,在转色过程中大幅度下降,之后含量变化趋势较为平缓。关于转色后种子黄烷-3-醇类物质含量显著降低的原因:一方面,种子中的黄烷-3-醇类物质在转色后发生了氧化和降解作用[26];另一方面,随着果实的发育,大部分黄烷-3-醇形成聚合体并与细胞壁上的多糖和蛋白结合,种子发育后期氧化后的黄烷醇类物质具有更多的多糖和蛋白质结合位点,增加了黄烷醇类物质和细胞壁的结合力,从而降低了种子中可提取的黄烷-3-醇类物质含量[27-29]。

通过对比摘叶和挪叶处理对采收时葡萄种子黄烷-3-醇含量的影响可以发现,仅采收前全摘叶处理的黄烷-3-醇含量显著高于对照,而其他处理与对照之间无显著差异,甚至显著降低。研究发现,在果实的转色阶段,增加光照和温度(例如转色期摘叶和挪叶处理)有利于此阶段黄烷-3-醇类物质的合成[30],但是超过一定温度(>35 ℃),黄烷-3-醇类物质的合成也将受到抑制[31];然而,在果实的成熟阶段,强光照反而会加快黄烷-3-醇的下降速率[32]。因此,强光照和高温可能导致转色期半摘叶、全摘叶和挪叶处理的黄烷-3-醇含量与对照之间无显著差异,甚至显著降低。此外,摘叶处理可对植物造成机械伤害胁迫,而胁迫能促进次生代谢产物的积累[33];同时,在果实的成熟阶段通过摘叶处理能降低库源比,延缓叶片的衰老[34],保证葡萄果实源的供应,从而增加次生代谢产物黄烷-3-醇类物质的合成。因此,造成了采收前全摘叶处理的黄烷-3-醇含量显著高于采收前挪叶处理。

在黄烷-3-醇类物质生物合成的途径中,EC和C由共同的前体物无色花色素形成,EC的C3位与没食子酸发生酯化反应后形成ECG。试验结果表明,'赤霞珠'葡萄种子中的EC和G均较高,而C的含量较低,说明无色花色素更多流向了EC合成途径。黄烷-3-醇的mDP从转色到成熟过程中有明显增加,其值基本上在1.5~4.0,这与前人的研究结果[27]具有一致性。不同时期的摘、挪叶处理均可以增加mDP和游离单体的含量,降低起始单元的含量,说明摘、挪叶处理增加了起始单元向游离单体的转化,同时在形成聚合体的过程中,游离单体可能主要参与延伸单元的形成。另一方面,较高的mDP也可能与摘叶和挪叶处理增加了聚合的前体物质(黄烷-3-醇单体)有关,但是有关果实发育过程中聚合体的聚合机制,目前研究认为其与光照强度并无关联[35],具体原因有待进一步研究。此外,摘叶和挪叶处理增加了EC在游离单体中的比例,反而降低了其在起始单元中的比例,说明摘叶和挪叶处理有利于起始单元中的EC更多地向游离单体转化。

摘叶处理对葡萄酒化学组成影响的相关研究已有报道,这些化学成分主要包括葡萄酒中的可溶性固形物、酒石酸、挥发性化合物以及原花色素等[36-37]。本试验仅研究了摘叶和挪叶处理对葡萄种子黄烷-3-醇含量及组分的影响,而未进一步进行酿酒试验研究其变化对葡萄酒口感的影响。因此,后续有必要研究不同处理葡萄种子对终产品葡萄酒口感的贡献,以期为进一步找到适宜的栽培管理措施、改善葡萄酒品质提供理论依据。

4 结 论

试验表明,半摘叶、全摘叶与挪叶等处理类型与转色期、转色结束和采收前等处理时期可不同程度地影响葡萄种子黄烷-3-醇的含量及组成,这主要与果实的曝光量、温度和植物的库源关系有关。综合考虑不同时期摘叶和挪叶处理对黄烷-3-醇含量及mDP、G的影响可以发现,采收前全摘叶处理使葡萄种子黄烷-3-醇的含量显著高于对照组,而G与对照之间无显著差异。采收前半摘叶处理的G显著低于其他处理组,而黄烷-3-醇的含量与对照之间不存在显著差异。对于mDP而言,所有处理均可使其值有所增大。所以,为了提高酿酒葡萄的品质,可以采用采收前半摘叶和全摘叶的栽培措施。

[参考文献]

[1] Saito K, Yamazaki M. 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.

[2] Aron P M, Kennedy J A. Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity [J]. Molecular Nutrition and Food Research,

2008，52(1)：79-104.

[3] Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins [J]. Phytochemistry，1991，30(12)：3875-3883.

[4] Cos P，De Bruyne T，Hermans N，et al. Proanthocyanidins in health care：current and new trends [J]. Current Medicinal Chemistry，2004，11(10)：1345-1359.

[5] Souquet J M，Cheynier V，Brossaud F，et al. Polymeric proanthocyanidins from grape skins [J]. Phytochemistry，1996，43(2)：509-512.

[6] 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，2002，53(4)：268-274.

[7] Koyama K，Ikeda H，Poudel P R，et al. Light quality affects flavonoid biosynthesis in young berries of Cabernet Sauvignon grape [J]. Phytochemistry，2012，78：54-64.

[8] 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)：4428-4436.
Wen P F，Xing Y F，Niu T Q，et al. Accumulation of flavanols，expression of leucoanthocyanidin reductase induced by UV-C irradiation during grape berry development [J]. Scientia Agricultural Sinica，2012，45(21)：4428-4436.

[9] Cohen S D，Tarara J M，Gambetta G A，et al. Impact of diurnal temperature variation on grape berry development，proanthocyanidin accumulation，and the expression of flavonoid pathway genes [J]. Journal of Experimental Botany，2012，63(7)：2655-2665.

[10] Roby G，Harbertson J F，Adams D A，et al. Berry size and vine water deficits as factors in winegrape composition：anthocyanins and tannins [J]. Australian Journal of Grape and Wine Research，2004，10(2)：100-107.

[11] 高　翔，惠竹梅，彭小琴，等. 24-表油菜素内酯对酿酒葡萄原花色素及黄烷醇含量的影响 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版)，2014，42(2)：94-100.
Gao X，Xi Z M，Peng X Q，et al. Effects of 24-epibrassinolide on contents of proanthocyanidins and flavanol accumulation in wine grape [J]. Journal of Northwest A&F University(Natural Science Edition)，2014，42(2)：94-100.

[12] Downey M O，Dokoozlian N K，Krstic M P. Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine：a review of recent research [J]. American Journal of Enology and Viticulture，2006，57(3)：257-268.

[13] Tardaguila J，Toda F M D，Poni S，et al. Impact of early leaf removal on yield and fruit and wine composition of *Vitis vinifera* L. Graciano and Carignan [J]. American Journal of Enology and Viticulture，2010，61(3)：372-381.

[14] Bavaresco L，Gatti M，Pezzutto S，et al. Effect of leaf removal on grape yield，berry composition，and stilbene concentration [J]. American Journal of Enology and Viticulture，2008，59(3)：292-298.

[15] Bogicevic M，Maras V，Mugoša M，et al. The effects of early leaf removal and cluster thinning treatments on berry growth and grape composition in cultivars Vranac and Cabernet Sauvignon [J]. Chemical and Biological Technologies in Agriculture，2015，2(1)：1-13.

[16] Talaveranoa M I，Morenoa D，Rodríguez-Pulidob F J，et al. Effect of early leaf removal on *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo seeds during ripening based on chemical and image analysis [J]. Scientia Horticulturae，2016，209：148-155.

[17] Whiting J. Regulating winegrape sugar accumulation through leaf removal [J]. Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker，2010，555：18-20.

[18] Runze Y，Cook M G，Yacco R S，et al. Effects of leaf removal and applied water on flavonoid accumulation in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Merlot) berry in a hot climate [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2016，64(43)：8118-8127.

[19] Pastore C，Allegro G，Valentini G，et al. Anthocyanin and flavonol composition response to veraison leaf removal on Cabernet Sauvignon，Nero d'Avola，Raboso Piave and Sangiovese *Vitis vinifera* L. cultivars [J]. Scientia Horticulturae，2017，218：147-155.

[20] Liang N N，He F，Pan Q H，et al. Optimization of sample preparation and phloroglucinol analysis of Marselan grape skin proanthocyanidins using HPLC-DAD ESI-MS/MS [J]. South African Journal of Enology and Viticulture，2014，33(1)：122-131.

[21] Kennedy J A，Matthews M A，Waterhouse A L. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening [J]. Phytochemistry，2000，55(1)：77-85.

[22] 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.

[23] Giovanelli G，Brenna O V. Evolution of some phenolic components，carotenoids and chlorophylls during ripening of three Italian grape varieties [J]. European Food Research and Technology，2007，225(1)：145-150.

[24] Haslam E. Practical polyphenolics：from structure to molecular recognition and physiological action [M]. London：Cambridge University Press，1988.

[25] Vivas N，Marie-Francoise N，Vivas De Gaulejac N，et al. Differentiation of proanthocyanidin tannins from seeds，skins and stems of grapes (*Vitis vinifera*) and heartwood of quebracho (*Schinopsis balansae*) by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and thioacidolysis/liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry [J]. Analytica Chimica Acta，2004，513(1)：247-256.

[26] Geny L，Saucier C，Bracco S，et al. Composition and cellular localization of tannins in grape seeds during maturation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2003，51(27)：8051-8054.

[27] Downey M O，Harvey J S，Robinson S P. Analysis of tannins

in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development [J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2003,9(1):15-27.

[28] Riou V, Vernhet A, Doco T, et al. Aggregation of grape seed tannins in model wine: effect of wine polysaccharides [J]. Food Hydrocolloids, 2002,16(1):17-23.

[29] Hanlin R, Hrmova M, Harbertson J, et al. Review: condensed tannin and grape cell wall interactions and their impact on tannin extractability into wine [J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2010,16(1):173-188.

[30] Downey M O, Harvey J S, Robinson S P. The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes [J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2004,10(1): 55-73.

[31] Jones H G. Plants and microclimate: a quantitative approach to environmental plant physiology [M]. London: Cambridge University Press, 2013.

[32] Koyama K, Goto-Yamamoto N. Bunch shading during different developmental stages affects the phenolic biosynthesis in berry skins of 'Cabernet Sauvignon' grapes [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2008,133(6): 743-753.

[33] 黄璐琦,郭兰萍. 环境胁迫下次生代谢产物的积累及道地药材的形成 [J]. 中国中药杂志,2007,32(4):277-281.
Huang L Q, Guo L P. Secondary metabolites accumulating and geoherbs formation under enviromental stress [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2007,32(4):277-281.

[34] 黄升谋,邹应斌. 库源关系对杂交水稻根系及叶片衰老的影响 [J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2002,28(3):192-194.
Huang S M, Zou Y B. Effects of sink source ratio on roots and leaves senescene in hybrid rice [J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Science Edition), 2002,28(3):192-194.

[35] He F, Pan Q H, Shi Y, et al. Biosynthesis and genetic regulation of proanthocyanidins in plants [J]. Molecules, 2008, 13(10):2674-2703.

[36] Kemp B S, Harrison R, Creasy G L. Effect of mechanical leaf removal and its timing on flavan-3-ol composition and concentrations in *Vitis vinifera* L. cv. Pinot Noir wine [J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2011, 17(2): 270-279.

[37] Kozina B, Karoglan M, Herjavec S, et al. Influence of basal leaf removal on the chemical composition of Sauvignon Blanc and riesling wines [J]. Journal of Food, Agriculture and Environment, 2008,6(1):28-33.

(上接第93页)

[40] 刘晶晶,杨 兴,陆扣萍,等. 生物质炭对土壤重金属形态转化及其有效性的影响 [J]. 环境科学学报,2015,35(11):3679-3687.
Liu J J, Yang X, Lu K P, et al. Effect of bamboo and rice straw biochars on the transformation and bioavailability of heavy mental in soil [J]. Journal of Environmental Science, 2015,35(11):3679-3687.

[41] 陈朝阳,陈志厚,吴 平,等. 南平植烟土壤有机质状况及其与土壤养分的关系 [J]. 安徽农业科学,2011,39(19):11547-11550.
Chen C Y, Chen Z H, Wu P, et al. Study on the status of soil organic matter and its relationship with soil nutrient in Nanping tobacco-growing areas [J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 2011,39(19):11547-11550.

[42] 秦 松. 贵州烟区营养环境与烟叶质量的关系 [D]. 重庆:西南大学,2007.
Qin S. Relationship between nutrition environment and tobacco leaf's quality in tobacco-growing regions of Guizhou [D]. Chongqing: Southwest University, 2007.

[43] 仓 龙,朱向东,汪 玉,等. 生物质炭中的污染物含量及其田间施用的环境风险预测 [J]. 农业工程学报,2012,28(15):163-167.
Cang L, Zhu X D, Wang Y, et al. Pollutant contents in biochar and their potential environmental risks for field application [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2012,28(15):163-167.