

# 外源 GA 对夏黑葡萄果梗代谢的影响

张 坤<sup>1</sup>, 郝 燕<sup>2</sup>

(1. 兰州文理学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃省农业科学院 林果花卉研究所, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:** 利用赤霉素(GA)蘸穗处理葡萄是促进果实膨大的重要途径, 研究葡萄膨大期间, 外源 GA 诱导的葡萄果穗花梗器官代谢生理变化, 可为科学解释 GA 处理后花梗与果实的协同发育机制提供依据。以夏黑葡萄为材料, 在葡萄盛花期(FFS)分别用 15、0 mg/L GA 蘸穗处理果实, 在处理后的第 7 天(FFS15-1、FFS0-1)、第 20 天(FFS15-2、FFS0-2)采样 2 次; 于果实膨大期(FES)在前期的处理基础上再用 25 mg/L GA 进行第 2 次处理, 并于处理后第 7 天采样(FES25), 采用液相色谱-质谱(LC-MS)检测、鉴定、筛选、注释差异代谢物(SDM)和被富集的代谢途径(MPSE)。结果表明, FFS15-1 与 FFS0-1 相比, 出现 54 种差异代谢物, 且上调的 SDMs 有 31 种, 多具有抗氧化活性, 其中, 4-coumaric acid 参与 Phenylpropanoid biosynthesis 途径, 可加剧木质素的积累; 下调的 SDMs 有 23 种, 主要为氨基酸类, 且参与 aminoacyl tRNA biosynthesis 途径, 有利于氮素转运。FFS15-2 与 FFS0-2 相比, 上调的 SDMs 有 42 种, 多与氮素转运、转化有关, 表明该时期葡萄对氮素需求强烈。FES25 与 FFS0-2 相比, 出现 33 种 SDMs, 其中, Indole-3-acrylic acid、Indole-4-carboxaldehyde 显著上调, 主要起生长调节作用, 可能是外源 GA 处理花梗后的核心代谢产物, 直接促进果实膨大和坐果; 而 FES25 与 FFS15-2 相比, 仅产生 9 个 SDM, 表明二者间的代谢特征相似, 但 Trigonelline 和 (15Z)-9, 12, 13-Trihydroxy-15-octadecenoic acid 显著下调, 可缩短细胞周期, 加速花梗细胞分裂促进生长。葡萄开花后期至膨大初期, 用 GA 蘸穗处理后, 果粒迅速膨大, 代谢物 Indole-3-acrylic acid、Indole-4-carboxaldehyde 运输至果实后有助于提高坐果率, 代谢物 Trigonelline 和 (15Z)-9, 12, 13-Trihydroxy-15-octadecenoic acid 显著下调可加速器官发育, 这与此期果实膨大需求相一致。

**关键词:** 葡萄花梗; 外源赤霉素; 差异代谢物; 液相色谱-质谱; 代谢途径; 协同代谢机制; 果实膨大

**中图分类号:** S663.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2481(2024)04-0108-10

## Effect of GA on Metabolism of Summer Black Grape Pedicels

ZHANG Kun<sup>1</sup>, HAO Yan<sup>2</sup>

(1. Lanzhou University of Arts and Sciences, Lanzhou 730000, China;

2. Institute of Fruit and Floriculture Research, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** Dipping treatment using gibberellic acid(GA) in grape fruits is an important way to promote fruit enlargement. Study on the metabolic physiological changes of pedicel organs induced by exogenous GA during grape expansion can provide a basis for scientific explanation of the collaborative development mechanism of pedicels and fruits after gibberellic acid treatment. In this study, summer black variety(*Vitis vinifera* L×*Vitis labrusca* L) was used as the material. The grapes were treated by dipping with 15 mg/L and 0 mg/L of GA at full flowering stage(FFS), and sampled twice on the 7th days(FFS15-1, FFS0-1) and 20th days(FFS15-2, FFS0-2) after treatment. At the fruit expansion stage(FES), the grapes were treated twice with 25 mg/L of GA on the basis of the previous stage, and then sampled after 7 days(FES25). LC-MS was applied to detect, identify, screen, and note significantly differential metabolites(SDM) and metabolic pathways of significant enrichment(MPSE). The results showed that FFS15-1 exhibited 54 differential metabolites compared to FFS0-1, and there were 31 upregulated SDMs, most of which had antioxidant activity. Among them, 4-coumaric acid participated in the phenylpropanoid biosynthesis pathway, which could exacerbate lignin accumulation. There were 23 downregulated SDMs, mainly amino acids, and they participated in the aminoacyl tRNA biosynthesis pathway, which was beneficial for nitrogen transport; compared to FFS0-2, FFS15-2 upregulated 42 SDMs, mostly related to nitrogen transport and transformation, indicating a strong demand for nitrogen in grapes during this period. Compared with FFS0-2, FES25 had 33 SDMs, significantly up-regulated Indole-3-acrylic acid and Indole-4-carboxaldehyde, which played a role in growth regulation and might be the core metabolic product of exogenous GA treatment on pedicels, directly promoting fruit expansion and fruit setting. Compared with FFS15-2, FES25 only produced 9 SDMs, indicating that the metabolic characteristics between them were similar, and Trigonelline and (15z)-9, 12, 13-trihydroxy-15-octadecenoic acid were significantly down regulated, which could shorten the cell cycle, accelerate division of pedicel cells,

收稿日期: 2023-09-07

基金项目: 兰州文理学院博士基金项目(202205); 国家葡萄产业技术体系兰州综合实验站(CARS-29-23)

作者简介: 张 坤(1980-), 男, 山东高密人, 副教授, 博士, 主要从事乡村农产品创新研究与教学工作。

通信作者: 郝 燕(1973-), 女, 陕西绥德人, 研究员, 主要从事葡萄栽培技术研究工作。

and promote growth. From the late flowering stage to the early stage of grape expansion, after being treated with GA, the fruit rapidly expanded. The transportation of metabolites Indole-3-acrylic acid and Indole-4-carboxylate to the fruit helped to improve fruit setting rate. The significant downregulation of metabolites Trigonelline and (15Z)-9, 12, 13-Trihydroxy-15-octadecenoic acid could accelerate organ development, which was consistent with the demand for fruit expansion during this period.

**Key words:** grape pedicel; exogenous gibberellic acid; differential metabolites; liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS); metabolic pathways; collaborative metabolic mechanism; fruit-expansion

一般多倍体葡萄(如夏黑、巨峰)长势旺、抗性强,有长成大粒葡萄的潜力,但存在结实不良现象<sup>[1]</sup>。葡萄花后的膨大期间用赤霉素(GA)类生长调节剂蘸穗,可促进坐果并获得商品性极佳的大粒葡萄<sup>[2-3]</sup>。蘸穗后 GA 不仅作用于果粒,还作用于花梗等器官,从而改变花梗代谢。葡萄花梗在整个果穗中起支撑和运输功能<sup>[4]</sup>,在葡萄生长和组成中起关键作用<sup>[5]</sup>,能将水、糖、信号等输送到果实。花梗发育可影响葡萄的外观,如花梗短会使果粒紧凑,增加病害风险,适宜的花梗长度可使果粒均匀,有利于着色和综合品质提高,这也是葡萄花前使用 GA 拉穗的原因。目前,关于外源 GA 蘸穗促进坐果与膨大的研究多集中于果粒,极少涉及果梗,探索 GA 蘸穗处理后果粒与果梗的协同代谢机制,有助于提高对葡萄果粒膨大的科学认识。有研究证实,葡萄花梗的直径和果粒大小间存在相关性<sup>[6]</sup>,GA 处理后,花梗的组织结构和生理代谢会根据浆果即将到来的运输和机械要求进行调整<sup>[7]</sup>,如促进维管发育以满足浆果膨大需求<sup>[8]</sup>,但木质素基因生物合成的提前和过度表达,极易在果实成熟期和贮藏期间导致花梗变硬、变脆,导致浆果脱落<sup>[9-10]</sup>。外源 GA 诱导葡萄花梗的代谢物和代谢途径变化,既能反映花梗本身的生长特征,也能反映果实的代谢物需求,有助于解释赤霉素处理后器官间的协同代谢机制。

本研究在果实盛花期和膨大期利用 GA 处理果穗,使用 LC-MS 代谢组研究技术,研究 GA 诱导花梗代谢物和代谢途径变化,为揭示花梗代谢变化对促进浆果膨大的机制提供支持,也为葡萄膨大技术的改进提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验地概况

试验地位于兰州市红古区,国家葡萄产业技术体系兰州综合试验站种植基地。当地海拔 1 700 m,年均气温 9.1 ℃,降水量 450 mm,日照时数 2 700 h,无霜期 160 d。

### 1.2 试验方法

试材为 5 年生夏黑葡萄,促早栽培,砧木 5BB。

株距 1.2 m,行距 2 m,独龙蔓树形,V 型叶幕。每处理 10 棵树,重复 3 次,所有处理的负载量一致,每棵树留 10 穗葡萄,并统一于花前 4 月 17 日整穗,留穗尖 5 cm。2 次使用 GA 蘸穗处理果穗,GA 用量为生产中比较成熟的使用浓度,其中,4 月 26 日盛花期(Full flowering stage, FFS),设置 0 mg/L (FFS 0) 和 15 mg/L (FFS 15) 2 个赤霉素处理,其作用是拉长果穗和促进坐果,每个处理 5 个果穗,3 次重复;5 月 12 日果实膨大期(Fruit expansion stage, FES),以上 2 个处理均使用 25 mg/L 赤霉素处理 1 次,促进果实膨大。每个处理 5 个果穗,3 次重复。其他管理措施一致。

### 1.3 测定项目及方法

每处理随机摘取不同果穗的 40 粒葡萄,迅速剪下其花梗,加液氮利用研钵研磨后,置于液氮中保存待测。其中,5 月 1 日第一次采样,编号为 FFS 0-1 和 FFS 15-1;5 月 20 日再次采样,编号为 FFS 0-2 和 FFS 15-2。果实膨大期处理过的 5 月 20 日采样记为 FES 25。

1.3.1 仪器 使用高分辨 Q-Exactive HF 质谱仪分析代谢组变化,其主要原理是利用液相色谱柱将代谢产物分离出来,再将这些分离后的代谢产物通过电离源转化为离子,最后在质谱仪中进行精确的质谱分析<sup>[11]</sup>。

1.3.2 代谢物定性 对检测出的代谢物特征,使用 Compound Discoverer 3.1 软件进行保留时间矫正、峰识别、峰提取、峰积分、峰对齐等工作,同时利用 Thermo mzCloud 在线数据库、Thermo mzValut 本地数据库、ChemSpider 数据库等进行物质鉴定。

1.3.3 主成分分析(PCA) PCA 分析前,先对 QC 样本 TIC 总离子流图进行重叠,然后对进行差异比较的分组样品进行主成分分析。

1.3.4 差异分组的正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA) 采用 OPLS-DA 分析代谢物的组间差异与试验组的相关程度信息。利用 SIMCA 软件进行 OPLS-DA 模型评估。

1.3.5 差异代谢物筛选 首先,对样本进行 *t*-Test 假设检验,选取  $P < 0.05$  的代谢物,确保选出的代

代谢物在统计学上具有显著性差异。计算代谢物的 Fold Change, 初步筛选可能具有生物学意义的代谢物。 $|\log_2(\text{Fold Change})| \geq 1$ , 表明这些代谢物在 2 组样本间有着至少 2 倍的变化幅度。在 OPLS-DA 模型中, 通常认为  $VIP > 1$  的代谢物在区分不同类别样本中起着重要作用。

本研究最终筛选条件为  $|\log_2(\text{Fold Change})| \geq 1$ ,  $P < 0.05$  及  $VIP > 1$ , 所选代谢物不仅在表达量上具有显著差异, 而且在统计学上具有显著性, 同时对样本分类具有高度影响能力和解释能力。

1.3.6 差异代谢物 KEGG 功能注释及富集分析 利

用 MetaboAnalystR 进行 KEGG 通路富集。

2 结果与分析

2.1 统计分析

2.1.1 QC 总样本 PCA 得分图 QC 样本 PCA 能反映样本间总体代谢差异。由图 1 可知, QC 总样本均聚集在一起, 表明样本数据可靠。FES 25 和 FFS 15-2 处理间有部分重叠, 表明 2 个处理总样本间的代谢物差异小, 其他处理样本间均被某主成分清晰分离, 且 2 个主成分得分在 0.7 左右, 表明它们间的代谢存在明显差异。

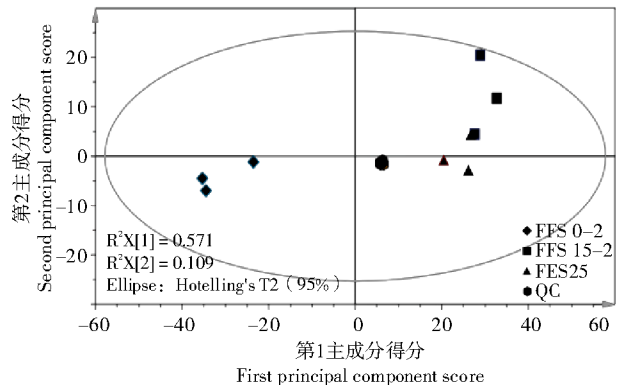
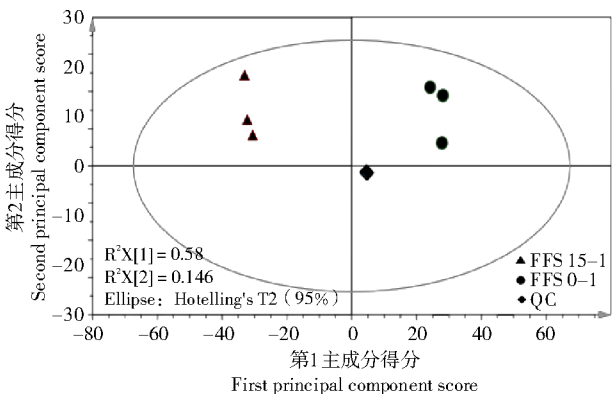


图 1 总样本 PCA 得分  
Fig.1 PCA score of total samples

2.1.2 组内 PCA 由图 2 可知, 在 95% 的置信区间内, 任 2 组样本均被第一主成分明显分开, 不同

处理的 2 个主成分得分均在 0.7 左右, 表明样本间存在明显的代谢差异, 数据可信。

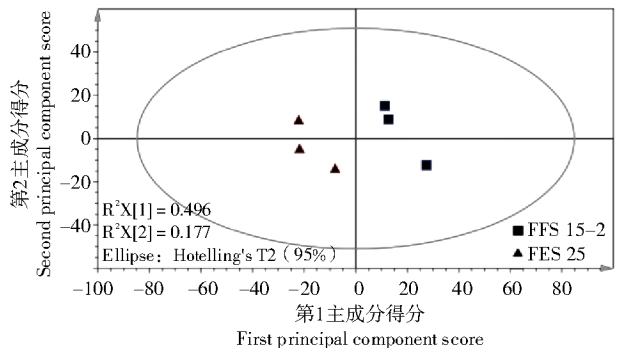
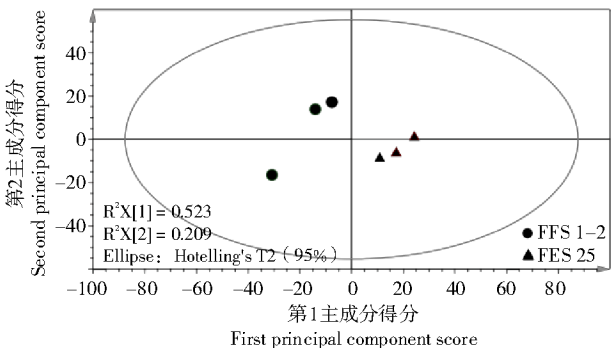
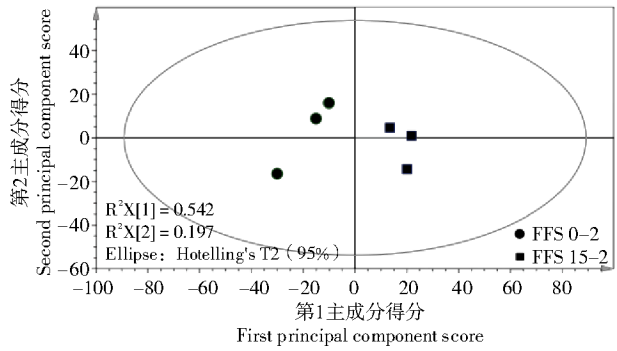
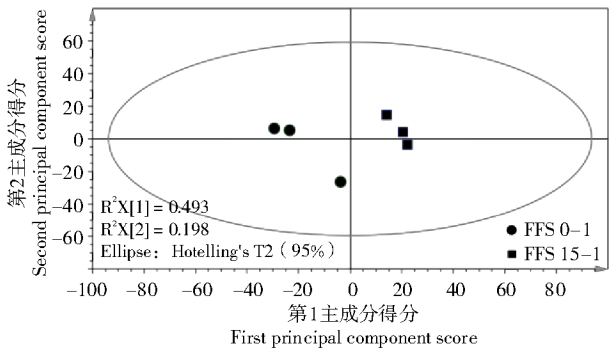


图 2 组内 PCA 得分  
Fig.2 PCA score in the group

2.1.3 OPLS-DA 从图3、4可以看出,OPLS-DA模型可以很好地解释处理组间的差异,95%置信区间(Hotelling's T-squared ellipse)内,不同对比组均被明显区分,R值接近1,Q值>0.5,表示模型稳定

可靠。同时随着置换保留度逐渐降低,置换的Y变量比例增大,随机模型的R<sup>2</sup>和Q<sup>2</sup>均逐渐下降,说明原模型不存在过拟合现象,表明所建模型稳定可靠。

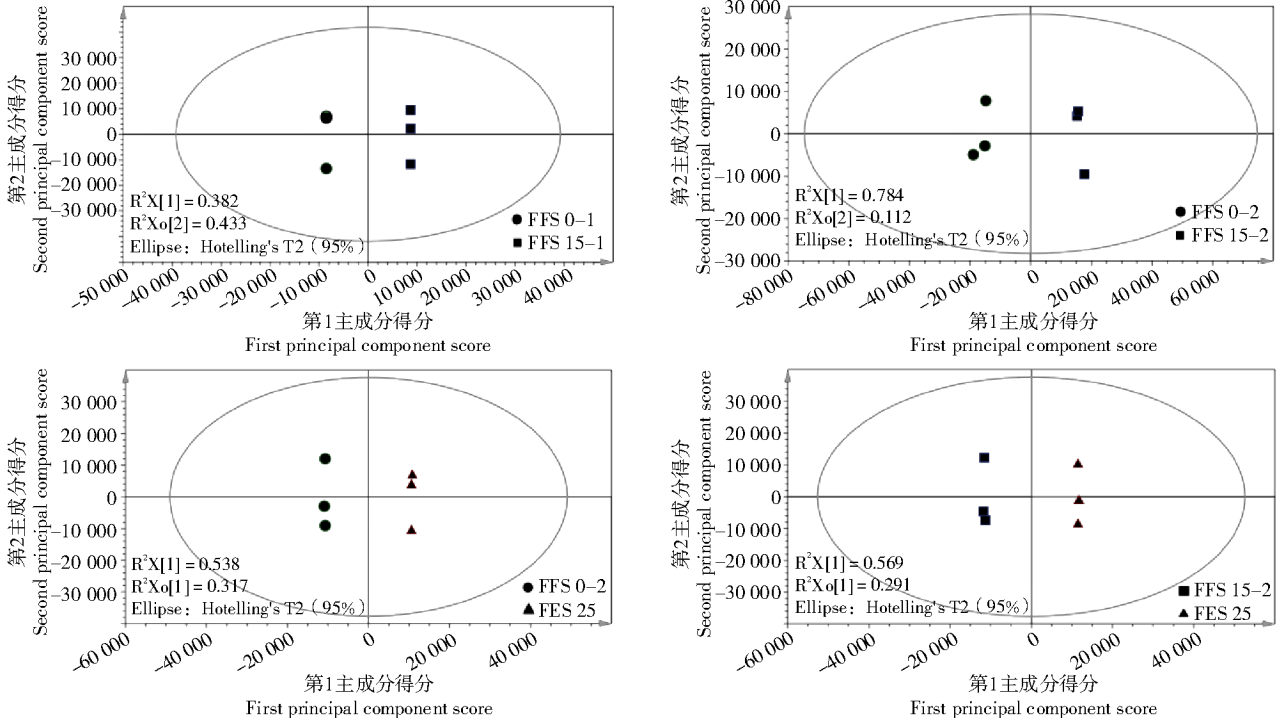
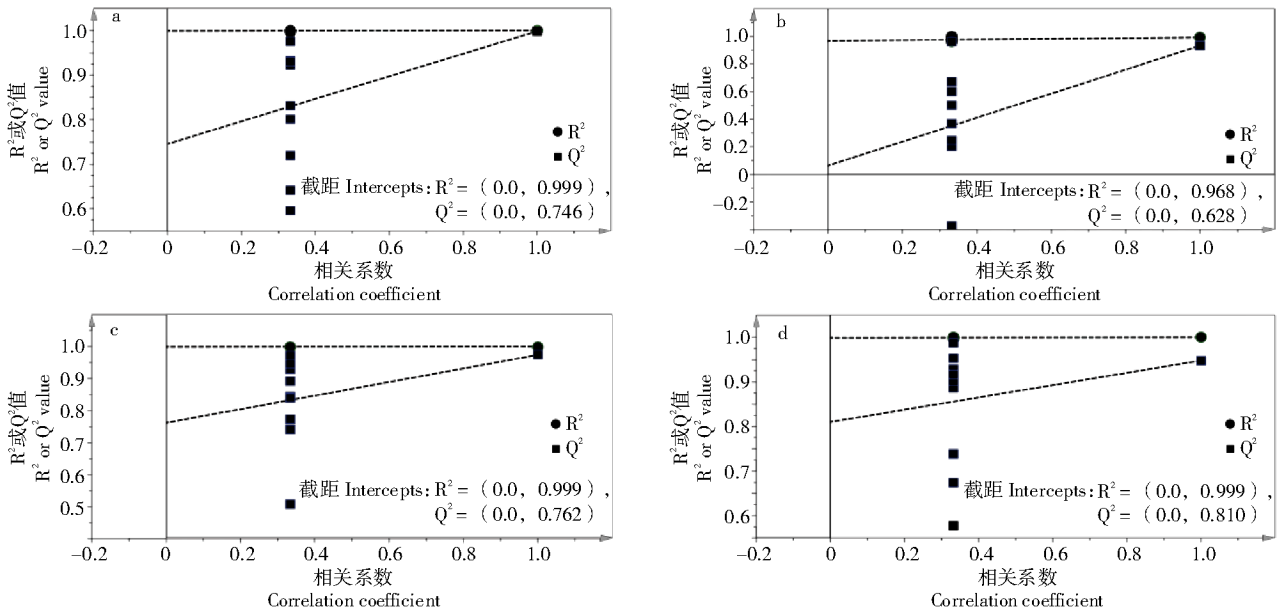


图3 OPLS-DA得分  
Fig.3 OPLS-DA score Chart



图中横坐标表示置换检验的置换保留度,纵坐标表示R<sup>2</sup>或Q<sup>2</sup>的取值,圆点表示置换检验得到的R<sup>2</sup>值,方点表示置换检验得到的Q<sup>2</sup>值,2条虚线分别表示R<sup>2</sup>和Q<sup>2</sup>的回归线。右侧2点对应原模型的R<sup>2</sup>和Q<sup>2</sup>原模型R<sup>2</sup>接近1,建立的模型符合样本数据的真实情况;Q<sup>2</sup>接近1,说明如果有新样本加入模型,会得到近似的分布情况

Fig. 4. the abscissa represented the replacement retention degree of the replacement test, the ordinate represented the value of R<sup>2</sup> or Q<sup>2</sup>, the dot represented the R<sup>2</sup> value obtained by the replacement test, the square dot represented the Q<sup>2</sup> value obtained by the replacement test, and the two dotted lines represented the regression lines of R<sup>2</sup> and Q<sup>2</sup> respectively. The two points on the right corresponded to R<sup>2</sup> and Q<sup>2</sup> of the original model. The R<sup>2</sup> of the original model was close to 1, and the established model conforms to the real situation of the sample data; Q<sup>2</sup> was close to 1, indicating that if a new sample was added to the model, an approximate distribution would be obtained

图4 OPLS-DA模型构建与验证  
Fig.4 Construction and verification of OPLS-DA model

2.2 差异代谢物的筛选与鉴定

2.2.1 差异代谢物统计 不同处理间具有显著差异的代谢物 (Significantly differential metabolites, SDM) 如表 1, 盛花期 FFS 15-1 与 FFS 0-1 间共出现 54 个 SDM, 到膨大期 FFS 15-2 与 FFS 0-2 间

SDM 增加到 64 个, 这是 GA 引起的代谢差异变大。FES 25 与 FFS 0-2 处理间产生 33 个 SDM, 而 FES 25 与 FFS 15-2 处理间有 23 个 SDM, 表明后者代谢差异较小。

表 1 差异代谢物统计  
Tab.1 Statistics of differential metabolites

个

处理 Treatment	上调差异 代谢物 Up regulation of differential metabolites	下调差异 代谢物 Down regula- tion of differen- tial metabolites	总差异 代谢物 Total differ- ential metabo- lites	处理 Treatment	上调差异 代谢物 Up regulation of differential metabolites	下调差异 代谢物 Down regula- tion of differen- tial metabolites	总差异 代谢物 Total differ- ential metabo- lites
FFS 15-1 与 FFS 0-1	31	23	54	FES 25 与 FFS 0-2	23	10	33
FFS 15-2 与 FFS 0-2	42	22	64	FES 25 与 FFS 15-2	7	2	9

2.2.2 盛花期 GA 处理 FFS 15-1 与 FFS 0-1 间 差异代谢物与 KEGG 途径如表 2 所示。

表 2 FFS 15-1 与 FFS 0-1 间差异代谢物与 KEGG 途径  
Tab.2 Differential metabolites and KEGG pathway of FFS 15-1 vs FFS 0-1

代谢物 Metabolite	保留时间/ min Retention time	差异倍数 Difference multiple Log <sub>2</sub> FC	P	变量投影 重要度 Variable projec- tion importance	KEGG 代谢途径 KEGG pathway
儿茶素 Catechin	5.38	1.02	0.022 5	12.57	ko00941
菜豆酸 Phaseolic acid	5.33	2.10	0.000 5	6.50	/
亮氨酸 Leucine	1.34	-1.33	0.007 5	4.54	ko00280;ko00970;ko00290;ko00966
D-(+)-脯氨酸 D-(+)-Proline	0.83	-1.33	0.005 3	4.45	/
没食子酸己糖 Gallic acid hexoside	1.34	1.03	0.003 9	2.96	/
4-香豆酸 4-Coumaric acid	5.34	1.02	0.000 3	2.72	ko00940;ko00130
缬氨酸 Valine	0.86	-1.01	0.003 6	2.56	ko00966;ko00290;ko00770;ko00970;ko00280
圣草素 Eriodictyol	8.87	2.04	0.002 3	2.01	ko00941
(-)-杜鹃花素 (-)-Rhododendrin	6.42	-1.72	0.031 0	1.96	/
苏氨酸 Threonine	0.81	-1.18	0.043 4	1.87	ko00970;ko00290;ko00260
茶黄素 Theaflavin	7.21	3.21	0.026 5	1.74	/
3,4,5-三羟基苯甲酸酯 3,4,5-Trihydroxybenzoate	5.66	3.49	0.002 6	1.73	/
β-乳香酸 β-boswellic acid	15.96	2.17	0.006 0	1.70	/
苯甲酸戊酯 Pentyl benzoate	16.36	-2.58	0.001 0	1.59	/
羽扇豆酮 Lupenone	16.50	4.60	0.001 6	1.52	ko00941
槲皮素 Quercetin	6.99	2.15	0.018 2	1.36	/
表没食子儿茶素没食子酸酯 Epigallocatechin gallate	5.98	2.39	0.023 2	1.21	/
3-甲氧基肉桂酸 3-Methoxycinnamic acid	16.87	-2.56	0.000 5	1.181	/
茶黄素-3-没食子酸酯 Theaflavin-3-gallate	7.92	2.23	0.001 3	1.16	/
L-酪氨酸 L-tyrosine	6.69	-1.46	0.008 7	1.12	/

注:“/”表示未富集 KEGG 途径。表 3 同。  
Note: “/” indicated no KEGG pathway was enriched. The same as Tab.3.

从表 2 可以看出,花期使用 GA3 处理 7 d 后, FFS 15-1 与 FFS 0-1 间出现的 SDMs 按 VIP 排序,

前 20 种 SDMs 中上调的有 12 种,包括酚类、黄酮类和有机酸类,且多具有抗氧化能力,如 Catechin,

Phaseolic acid 等。下调的 8 种 SDMs 包括 5 种氨基酸,分别为 Leucine, D-(+)-Proline, Valine, Threonine 和 L-tyrosine。此外, Rhododendrin 具有良好的抗氧化能力,但发生显著下调。表明 GA 处理花梗后,首先对抗氧化类和氨基酸代谢物产生影响。从显著富集的代谢途径(Metabolic pathways of significant enrichment, MPSE)看, ko00941 途径包含 3 种抗氧化类 SDMs, ko00970、ko00290 途径有 3 种氨基酸类 SDMs 参与,而 Valine 参与 5 条 MPSEs,意味着这些代谢途径和代谢物比较活跃。

用 GA 处理 20 d 后,按 VIP 对 FFS 15-2 和 FFS 0-2 间的前 20 种差异代谢物排序(表 3),发现 4 种 SDMs 下调,包含 3 种氨基酸和 1 种丙酸衍生物,其中 Leucine、D-(+)-Proline 的下调倍数最大。上调的 SDMs 有 13 种,为氨基酸和酰胺类物质,列 VIP 前 3 位的为 L-Glutamine, Catechin, L-Pyroglutamic acid。ko00970, ko00220, ko00330 分别包含 5、3、3 个 SDMs。而 L-Glutamic acid, L-Glutamine, Leucine 分别参与 9、7、4 个 MPSEs,表明这些代谢物和代谢途径是该时期比较重要的。

表 3 FFS 15-2 与 FFS 0-2 间的差异代谢物与 KEGG 途径  
Tab.3 Differential metabolites and KEGG pathway of FFS 15-2 vs FFS 0-2

代谢物 Metabolite	保留时间/ min Retention time	差异倍数 Difference multiple Log <sub>2</sub> FC	P	变量投影重要度 Variable projec- tion importance	KEGG 代谢途径 KEGG Pathway
L-谷氨酰胺 L-Glutamine	0.78	1.43	0.001 5	12.58	ko00230;ko00910;ko00250;ko00970; ko00240;ko00220;ko00630
儿茶素 Catechin	5.38	1.02	0.022 5	12.57	/
焦谷氨酸 L-Pyroglutamic acid	0.78	1.41	0.001 6	12.40	ko00480
D-丝氨酸 D-Serine	0.78	1.39	0.002 1	9.90	ko00260
L-(+)-精氨酸 L-(+)-Arginine	0.75	2.52	0.003 4	9.87	ko00970;ko00220;ko00330
L-谷氨酸 L-Glutamic acid	0.78	1.29	0.000 5	7.73	ko00650;ko00860;ko00910;ko00250; ko00970;ko00480;ko00220;ko00330; ko00630
菜豆酸 Phaseolic acid	5.33	2.10	0.000 5	6.50	/
亮氨酸 Leucine	1.34	-1.33	0.007 5	4.54	/
D-(+)-脯氨酸 D-(+)-Proline	0.83	-1.33	0.005 3	4.45	/
吲哚-3-丙烯酸 Indole-3-acrylic acid	4.56	1.62	0.000 0	4.23	/
胆碱 Choline	0.76	1.46	0.000 0	4.10	ko00564;ko00260
脯氨酸 Proline	0.81	1.78	0.000 0	4.00	ko00970;ko00330
2-(4-溴苯基)-3-磺酰丙酸 2-(4-Bromobenzyl)-3-sulfanylpropanoic acid	0.69	-1.29	0.000 2	3.62	/
没食子酸己糖 Gallic acid hexoside	1.34	1.03	0.003 9	2.96	/
谷氨酰谷氨酰胺 Glu-Gln	0.78	2.28	0.003 9	2.92	/
亮氨酸 Leucine	1.33	1.22	0.003 0	2.77	ko00290;ko00280;ko00970;ko00966
4-香豆酸 4-Coumaric acid	5.34	1.02	0.000 3	2.72	/
缬氨酸 Valine	0.86	-1.01	0.003 6	2.56	/
DL-精氨酸 DL-Arginine	0.72	2.12	0.007 2	2.24	/

2.2.3 果实膨大期 GA 处理 从表 4 可以看出,果实膨大期使用 GA 处理 7 d 后, FFS 25 与 FFS 0-2 间总 SDMs 不足 20 个,仅 6 种 SDMs 参与 MPSEs,下调的 3 种 SDMs 包括 2 种有机酸(Glucoheptonic Acid 和 Urocanic acid)和一种含硫化合物(thiourea)。上调的 SDMs 主要为 5 种氨基酸和 3 种糖。按 VIP 排序, Indole-3-acrylic acid, Proline, 2-Hydroxycinnamic acid 排列前 3 位,是 2 个处理间最重要的

SDMs。L-Tyrosine 则参与 5 条 MPSEs,表明 L-Tyrosine 是该时期比较重要的代谢物。

FES 25 与 FFS 15-2 处理间仅出现 9 个 SDMs,其中,2 个下调的 SDMs 可调节细胞周期。上调的 SDMs 中 2-(4-Bromobenzyl)-3-sulfanylpropanoic acid 的 VIP 最高。2 个处理间未富集任何 1 条 MPSEs,表明 2 个处理间代谢特征相似(表 5)。

表 4 FES 25 与 FFS 0-2 间的差异代谢物与 KEGG 途径  
 Tab.4 Differential metabolites and KEGG pathway of FES 25 vs FFS 0-2

代谢物 Metabolite	保留时间/ min Retention time	差异倍数 Difference multiple Log <sub>2</sub> FC	P	变量投影 重要度 Variable pro- jection im- portance	KEGG 代谢途径 KEGG Pathway
吲哚-3-丙烯酸 Indole-3-acrylic acid	4.56	1.19	0.000 6	4.63	/
脯氨酸 Proline	0.81	1.14	0.000 7	3.69	ko00330;ko00970
2-羟基肉桂酸 2-Hydroxycinnamic acid	1.22	1.26	0.000 7	2.73	/
1,6-二磷酸果糖 Fructose 1,6-bisphosphate	0.80	2.05	0.008 4	1.90	/
β-D-吡喃葡萄糖 β-D-glucopyranose	8.91	1.09	0.002 5	1.84	/
(4R)-5-羟基-L-亮氨酸 (4R)-5-Hydroxy-L-leucine	0.84	1.62	0.001 2	1.68	/
DL-哌胆酸 DL-Pipecolinic acid	0.84	1.70	0.001 8	1.67	ko00310
DL-瓜氨酸 DL-Citrulline	0.77	1.31	0.023 4	1.66	ko00220
葡糖庚酸 Glucoheptonic Acid	0.75	-1.09	0.022 3	1.60	/
3-氨基苯乙酮 3-Aminoacetophenon	1.22	1.25	0.001 3	1.59	/
蔗糖 Sucrose	8.91	1.05	0.002 8	1.57	/
吲哚-4-甲醛 Indole-4-carboxaldehyde	4.56	1.17	0.000 4	1.35	/
吲哚 Indole	4.56	1.13	0.001 0	1.31	ko00400
L-酪氨酸 L-Tyrosine	1.22	1.12	0.008 4	1.28	ko00970;ko00130;ko00350; ko00400;ko00950
4-胍丁醛 4-guanidinobutanal	0.75	1.36	0.012 1	1.27	ko00330
黄芩素 Scutellarin	7.08	1.04	0.006 7	1.25	/
尿苷酸 Urocanic acid	1.12	-1.86	0.009 2	1.24	/
硫脲 Thiourea	0.84	-1.65	0.002 4	1.22	/
甘氨酸 Glycine	8.75	1.46	0.031 4	1.06	/

表 5 FES 25 与 FFS 15-2 间的差异代谢物与 KEGG 途径  
 Tab.5 Differential metabolites and KEGG pathway of FES 25 vs FFS 15-2

代谢物 Metabolite	保留时间/ min Retention time	差异倍数 Difference multiple Log <sub>2</sub> FC	P	变量投影 重要度 Variable pro- jection impor- tance	KEGG 代 谢途径 KEGG Pathway
2-(4-溴苯基)-3-磺酰丙酸 2-(4-Bromobenzyl)-3-sulfanylpropanoic acid	0.69	1.30	0.000 2	4.07	/
葫芦巴碱 Trigonelline	0.80	-1.05	0.002 3	2.01	/
双(3-氯丙基)二硫化物 Bis(3-chloropropyl)disulfide	0.68	1.55	0.000 0	1.53	/
2-((5-溴-1,3-噻唑-2-基)氨基)-2-氧乙基(4-氯苯氧基)醋酸盐 2-((5-Bromo-1,3-thiazol-2-yl)amino)-2-oxoethyl(4-chlorophenoxy)acetate	0.68	1.20	0.048 3	1.34	/
甘油磷酸甘油 Glycerophosphoglycerol	0.77	1.03	0.000 8	1.16	/
丙二酸 Malonate	0.77	2.44	0.008 0	1.16	/
高车前素 Hispidulin	5.58	1.16	0.000 2	1.13	/
天冬氨酸甘酯 Glycylaspartate	8.60	2.22	0.000 0	1.10	/
(15Z)-9,12,13-三羟基-15-十八烯酸 (15Z)-9,12,13-Trihydroxy-15-octadecenoic acid	9.91	-1.54	0.022 0	1.02	/

### 3 结论与讨论

果穗松紧程度能影响葡萄商品性<sup>[12]</sup>。GA 是葡萄生产中最常用的生长调节剂,并在一个生长季多次使用,GA 作用于果粒的同时,也影响花梗生长,

而花梗是水、糖、营养物质和信号输送到葡萄浆果的必经之路<sup>[13]</sup>。GA 处理诱导的花梗代谢物变化,既反映花梗本身代谢特征,也反映果实膨大期间的代谢需求,对揭示花梗在果实膨大中的作用有重要意义。

### 3.1 盛花期 GA 处理与代谢变化

有研究证实,外源 GA 处理后,植物器官抗氧化能力增强,这与多个相似研究的结果一致<sup>[14-15]</sup>。本研究发现,盛花期用 GA 处理果穗后,FSS 15-1 与 FSS 0-1 间上调的 SDM 中多数具有抗氧化活性,如 Catechin, Eriodictyol, (-)-Rhododendrin 等,且它们参与的代谢途径 ko00941 也被显著富集,这对保持花梗活力有重要意义。上调的 SDM 中 Phenolic acid 是一种羟基肉桂酸,具有抗氧化、延迟衰老作用<sup>[16]</sup>,其同类物质 4-Coumaric acid 也发生显著上调,且参与 ko00940、ko00130 途径,这与其他研究结果一致,即 GA3 处理后苯丙素的生物合成代谢途径增强,促进木质素或类黄酮的生物合成,这也在很多研究中得到证实<sup>[17]</sup>。虽然花梗器官中木质素持续积累可增强机械强度,但过度积累可能是造成葡萄成熟和贮藏期间落粒严重的关键因素<sup>[18]</sup>,这是 GA 处理后造成的主要负面影响。3-Methoxycinnamic acid 也是一种肉桂酸,但发生显著代谢下调,这可能与该 SDM 性质活泼,易转化成 Isoorientin 2-O-(E)-p-coumarate 和 Kaempferol 3-(6-p-coumaryl-galactoside) 等有关<sup>[19]</sup>。FSS 15-1 与 FSS 0-1 间下调的 SDM 主要是氨基酸,包括 Leucine、Valine、Threonine,分别参与 5、4、3 条 MPSEs, L-tyrosine 也发生下调,但未被富集到某一代谢途径。所富集的 Aminoacyl-tRNA biosynthesis (ko0097) 途径包括基因表达的核心反应,氨基酸在掺入肽链以前必须活化获得额外能量,活化反应是在氨酰-tRNA 合成酶催化下进行<sup>[20]</sup>。本研究多种氨基酸代谢下调可能主要用于合成 Aminoacyl-tRNA。此外,Leucine 和 Valine 还参与 ko00280 途径,其中 Valine 降解产生 1 个丙酰辅酶 A,Leucine 分解代谢产生 3 个乙酰辅酶 A,再进入 TCA 循环彻底氧化分解,产生 ATP<sup>[21]</sup>,所以,此时大量氨基酸降解、转运可满足快速生长期对物质和能量需求。

20 d 后,FFS 15-2 与 FFS 0-2 间的 Leucine、Valine 代谢持续下调。此期重要的上调 SDM 有 L-Glutamine、L-Glutamic acid 和 L-Pyroglutamic acid 等,L-Glutamine 可帮助快速增殖的细胞满足对 ATP、生物合成前体和还原剂的需求<sup>[22]</sup>,而在植物组织培养中,L-Glutamine 对芽伸长的影响大于 GA<sup>[23]</sup>,此外,它还在器官间的氮运输中起着关键作用<sup>[24]</sup>,有助于更多的氮素往果实积累。L-Glutamic acid 作为 GA 的前体,触发植物从营养生长阶段到生殖生长阶段的过渡,并在植物生殖阶段发挥作

用<sup>[25]</sup>。L-Pyroglutamic acid 则在氮同化中起重要作用,表明此时植物对氮素的需求增大。研究还发现,L-Glutamic acid 参与 9 条 MPSEs,涉及多种氨基酸的生成和转化,因此,L-Glutamic acid 是此期最活跃的 SDM。实际生产中,盛花期用 GA 处理 20 d 后,正是葡萄快速生长阶段,也是葡萄进行 GA 膨大处理的关键时期,此期葡萄对氮素需求旺盛。该时期花梗中与氮素代谢相关的 SDM 最终会被运输至果粒发挥作用,更多体现花梗的运输功能。

### 3.2 果实膨大期 GA 处理与代谢变化

FES 25 进行了保果和膨大 2 次处理,而 FFS 0-2 前期仅用清水处理,它们间出现的 SDM 中,Indole-3-acrylic acid 的 VIP 值最大,研究显示它可由 L-色氨酸解氨酶将 L-色氨酸转化为吲哚 3-丙烯酸和氨生成<sup>[26]</sup>,被认为是一种植物生长激素,这可能是外源 GA 促进器官快速生长的关键 SDM。对芳香族氨基酸研究发现,色氨酸在单独使用 GA<sub>3</sub> 或 PAC+GA<sub>3</sub> 处理的植物中含量明显升高,而在 GA 缺乏的植物中色氨酸含量持续降低<sup>[27]</sup>,而这能间接影响 Indole-3-acrylic acid 生成,进而影响组织生长。该对比组还发现,Indole-4-carboxaldehyde 代谢显著上调,在小麦中的研究证实代谢物 tryptophan 和 4-indolecarbaldehyde 与每穗粒数显著相关<sup>[28]</sup>,结合本研究葡萄发育时间和 GA 处理时间分析,Tryptophan 和 4-indolecarbaldehyde 对促进葡萄坐果也有直接作用。该对比组中 Fructose 1,6-bisphosphate 和  $\beta$ -D-glucopyranose 显著上调,但未被富集到糖酵解途径。此外,蔗糖在植物生长发育中起着重要作用,是光合作用的主要终产物,并作为初级运输糖发挥作用,最终会被运输到果实,也间接证实 GA 处理后有助于糖的积累<sup>[29]</sup>。GA 对中枢代谢物积累模式的影响早期证据表明,在正常(非应激)生理条件下,植物在向开花过渡期间积累 Proline<sup>[30-31]</sup>。该对比组 Proline 显著上调,参与被显著富集的 ko00330、ko00970 途径,意味着 Proline 代谢和运输的重要性,这与前期的研究结果一致<sup>[32-33]</sup>。

FES 25 进行了保果和膨大 2 次处理,FFS 15-2 仅进行保果处理,它们间的 SDM 仅 9 个,其中,2 个下调,没有任何一条代谢途径被富集,证实二者间的代谢特征相似。上调的 SDMs 中 2-(4-Bromobenzyl)-3-sulfanylpropanoic acid 结构与 Cysteine 相似,也可能在防御逆境和氧化还原过程中发挥作用<sup>[34]</sup>,而二硫化物的形成是氧化应激的常见结果,以作为蛋白质高阶结构的稳定剂或其生物活性

的活性中心<sup>[35]</sup>。本研究还发现,Trigonelline 显著下调,并细胞周期调节因子发挥作用,可导致 G2 期细胞停滞,干扰 DNA 复制,进而延长细胞周期<sup>[36]</sup>。SDMs 中还发现,(15Z)-9,12,13-Trihydroxy-15-octadecenoic acid 也发生显著下调,研究证实该物质存在于丁香芽的乙醇部分中,具有最高的抗氧化活性,可诱导线粒体活性并延迟细胞周期的 G1 期,使酵母细胞周期停滞在 G1 期<sup>[37]</sup>。所以,果实膨大期用 GA 处理果穗后,葡萄果肉的细胞周期缩短,这是促进葡萄快速膨大的核心机制。

盛花期用 15 mg/L GA 处理果穗 7 d,花梗中先上调的差异代谢物多具有抗氧化活性,这有利于保持花梗活力。4-Coumaric acid 也显著上调并参与 Phenylpropanoid biosynthesis 途径,这能加剧木质素的积累,从而影响花梗组织结构。下调的氨基酸类代谢物主要参与 Aminoacyl tRNA biosynthesis 途径,有利于氮素转运,并为后期的快速生长提供物质和能量准备。20 d 后,Leucine、Valine 代谢保持持续下调,上调的差异代谢物均与氮素的转运、转化有关,表明该时期葡萄生长对氮素需求旺盛,而 L-Glutamic acid 参与 9 条代谢途径,是这个时期最活跃的代谢物。

果实膨大期用 25 mg/L GA 处理的果穗,与未经任何处理的果穗相比,花梗中的 Indole-3-acrylic acid、Indole-4-carboxaldehyde 显著上调,能直接促进果实膨大和坐果,这可能是外源 GA 发挥作用的核心代谢产物。此期,脯氨酸和多种糖类物质显著上调,也是该时期的代表性差异代谢物。FES 25 与 FFS 15-2 间被富集的差异代谢物仅出现 9 个,且没有任何一条代谢途径被富集,证实两者间的代谢特征相似,但其中 Trigonelline 和 (15Z)-9,12,13-Trihydroxy-15-octadecenoic acid 显著下调,能缩短细胞周期,加速浆果膨大,这是 GA 在 FES 期的主要作用机制。

#### 参考文献:

- [1] GUO Y S. Embryo rescue of crosses between diploid and tetraploid grape cultivars and production of triploid plants[J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(82): 19005-19010.
- [2] 张倍宁. 不同生长调节剂对设施‘玫香宝’果实无核化及品质影响研究[D]. 太谷:山西农业大学,2022.  
ZHANG B N. Study on the effect of different growth regulators on the seedless and quality of ‘Mei xiang bao’ fruit in facility[D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2022.
- [3] 苏晓兰,童巧云,张雪梅,等. CPPU 对设施栽培玫瑰香葡萄无核化及果实品质的影响[J]. 山西农业科学, 2023, 51(11): 1290-1298.
- [4] SU X L, TONG Q Y, ZHANG X M, et al. Effects of CPPU on seedless and fruit quality of muscat hamburg grape in greenhouse[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2023, 51(11): 1290-1298.
- [5] KNIPFER T, FEI J, GAMBETTA G A, et al. Water transport properties of the grape pedicel during fruit development: insights into xylem anatomy and function using microtomography[J]. Plant Physiology, 2015, 168(4): 1590-1602.
- [6] XIAO Z Y, CHIN S, WHITE R G, et al. Vascular connections into the grape berry: the link of structural investment to seedlessness[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 662433.
- [7] BUSTAN A, ERNER Y, GOLDSCHMIDT E E. Interactions between developing citrus fruits and their supportive vascular system[J]. Annals of Botany, 1995, 76(6): 657-666.
- [8] ZHANG C X, TANABE K, TAMURA F, et al. <sup>13</sup>C-photosynthate accumulation in Japanese pear fruit during the period of rapid fruit growth is limited by the sink strength of fruit rather than by the transport capacity of the pedicel[J]. Journal of Experimental Botany, 2005, 56(420): 2713-2719.
- [9] ALONI R. Differentiation of vascular tissues[J]. Annual Review of Plant Physiology, 1987, 38: 179-204.
- [10] BEN-TAL Y. Effects of gibberellin treatments on ripening and berry drop from Thompson seedless grapes[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1990, 41(2): 142-146.
- [11] GARCÍA-ROJAS M, MENESES M, OVIEDO K, et al. Exogenous gibberellic acid application induces the overexpression of key genes for pedicel lignification and an increase in berry drop in table grape[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2018, 126: 32-38.
- [12] 章智钧,刘怀锋,孙军利,等. 非靶向代谢组学对赤霞珠果皮不同砧穗组合差异代谢物的分析[J]. 食品科学, 2020, 41(24): 22-30.  
ZHANG Z J, LIU H F, SUN J L, et al. Analysis of differential metabolites in cabernet sauvignon skins from different rootstock-scion combinations by non-targeted metabolomics[J]. Food Science, 2020, 41(24): 22-30.
- [13] 张瑛,朱建华,彭宏祥,等. 野生毛葡萄及其远缘杂交种后代花粉萌发试验研究[J]. 中国南方果树, 2004, 33(5): 79-82.  
ZHANG Y, ZHU J H, PENG H X, et al. Test on the pollen germination of wild grape and its distant relative hybrids[J]. South China Fruits, 2004, 33(5): 79-82.
- [14] DOAIGEY A R, AL-WHAIBI M H, SIDDIQUI M H, et al. Effect of GA3 and 2,4-D foliar application on the anatomy of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seedling leaf[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2013, 20(2): 141-147.
- [15] 左月桃,王子沐,焦健,等. GA3 浸种对低温下玉米种胚抗氧化酶及内源激素的影响[J]. 生态学杂志, 2021, 40(5): 1340-1346.  
ZUO Y T, WANG Z M, JIAO J, et al. Effects of GA3 seed soaking on antioxidant enzymes and endogenous hormones of maize embryo under low temperature[J]. Chinese Journal of Ecology, 2021, 40(5): 1340-1346.
- [16] MEIRA P R, DAVID J P, DE O. RIBEIRO E M, et al. Abiotic factors influencing podophyllotoxin and yatein overproduction in *Leptochyptis macrostachys* cultivated *in vitro*[J]. Phyto-

- chemistry Letters, 2017, 22:287-292.
- [16] TAOFIQ O, GONZÁLEZ-PARAMÁS A M, BARREIRO M F, et al. Hydroxycinnamic acids and their derivatives: cosmetic significance, challenges and future perspectives, a review[J]. *Molecules*, 2017, 22(2):281.
- [17] VOGT T. Phenylpropanoid biosynthesis[J]. *Molecular Plant*, 2010, 3(1):2-20.
- [18] MENESES M, GARCÍA-ROJAS M, MUÑOZ-ESPINOZA C, et al. Transcriptomic study of pedicels from GA3-treated table grape genotypes with different susceptibility to berry drop reveals responses elicited in cell wall yield, primary growth and phenylpropanoids synthesis[J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1):66.
- [19] VOSMANN K, WEITKAMP P, WEBER N. Solvent-free lipase-catalyzed preparation of long-chain alkyl phenylpropanoates and phenylpropyl alkanoates[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(8):2969-2976.
- [20] SISSLER M, DELORME C, BOND J, et al. An aminoacyl-tRNA synthetase paralog with a catalytic role in histidine biosynthesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(16):8985-8990.
- [21] HILDEBRANDT T M, NUNES NESI A, ARAÚJO W L, et al. Amino acid catabolism in plants[J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(11):1563-1579.
- [22] KIRCHER B, EIBL G, ENRICH B, et al. The role of L-alanyl-L-glutamine in the immune response *in vitro*[J]. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 2002, 114(15/16):702-708.
- [23] GREENWELL Z L, RUTER J M. Effect of glutamine and arginine on growth of *Hibiscus moscheutos* "in vitro"[J]. *Ornamental Horticulture*, 2018, 24(4):393-399.
- [24] 宫香伟, 韩浩坤, 张大众, 等. 氮肥运筹对糜子生育后期干物质积累与转运及叶片氮素代谢的调控效应[J]. *中国农业科学*, 2018, 51(6):1045-1056.
- GONG X W, HAN H K, ZHANG D Z, et al. Effects of nitrogen fertilizer on dry matter accumulation, transportation and nitrogen metabolism in functional leaves of broomcorn millet at late growth stage[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(6):1045-1056.
- [25] GUPTA R, CHAKRABARTY S K. Gibberellic acid in plant: still a mystery unresolved[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2013, 8(9):e25504.
- [26] KUMAVATH R N, RAMANA C V, SASIKALA C, et al. Isolation and characterization of L-tryptophan ammonia lyase from *Rubrivivax benzoatilyticus* strain JA2[J]. *Current Protein & Peptide Science*, 2015, 16(8):775-781.
- [27] RIBEIRO D M, ARAÚJO W L, FERNIE A R, et al. Transcriptome and metabolome effects triggered by gibberellins during rosette growth in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(7):2769-2786.
- [28] SHI T T, ZHU A T, JIA J Q, et al. Metabolomics analysis and metabolite-agronomic trait associations using kernels of wheat (*Triticum aestivum*) recombinant inbred lines[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2020, 103(1):279-292.
- [29] 孙红梅, 何玲, 王微微, 等. IBA与GA3调控百合鳞片扦插繁殖的“淀粉—蔗糖”代谢机制[J]. *中国农业科学*, 2011, 44(4):798-806.
- SUN H M, HE L, WANG W W, et al. Mechanism of starch-sucrose metabolism regulated by IBA as well as GA3 during scale cutting propagation in *Lilium*[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(4):798-806.
- [30] MATTIOLI R, FALASCA G, SABATINI S, et al. The proline biosynthetic genes P<sub>5</sub>CS<sub>1</sub> and P<sub>5</sub>CS<sub>2</sub> play overlapping roles in *Arabidopsis* flower transition but not in embryo development [J]. *Physiologia Plantarum*, 2009, 137(1):72-85.
- [31] SCHWACKE R, GRALLATH S, BREITKREUZ K E, et al. LeProT1, a transporter for proline, glycine betaine, and  $\gamma$ -amino butyric acid in tomato pollen[J]. *The Plant Cell*, 1999, 11(3):377-391.
- [32] KAVI KISHOR P B, HIMA KUMARI P, SUNITA M S L, et al. Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6:544.
- [33] JADHAV U, MUNDHE S, KUMAR Y, et al. Gibberellic acid induces unique molecular responses in 'Thompson seedless' grapes as revealed by non-targeted metabolomics[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2021, 40(1):293-304.
- [34] BALMANT K M, LAWRENCE S R, DUONG B V, et al. Guard cell redox proteomics reveals a role of lipid transfer protein in plant defense[J]. *Journal of Proteomics*, 2021, 242:104247.
- [35] ROBINSON P J, KANEMURA S, CAO X F, et al. Protein secondary structure determines the temporal relationship between folding and disulfide formation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(8):2438-2448.
- [36] MAZZUCA S, BITONTI M B, INNOCENTI A M, et al. Inactivation of DNA replication origins by the cell cycle regulator, trigonelline, in root meristems of *Lactuca sativa*[J]. *Planta*, 2000, 211(1):127-132.
- [37] LESMANA D, ANDRIANTO D, ASTUTI R I. Antiaging properties of the ethanol fractions of clove (*Syzygium aromaticum* L.) bud and leaf at the cellular levels: study in yeast *Schizosaccharomyces pombe*[J]. *Scientia Pharmaceutica*, 2021, 89(4):45.