

葡萄‘小白玫瑰’及其突变品种‘小红玫瑰’果皮颜色变异机理分析

牛生洋^{1,2,3}, 姜建福¹, 樊秀彩¹, 张颖¹, 刘崇怀^{1,*}, 王华³

(¹中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009; ²河南科技学院, 河南新乡 453003; ³西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: ‘小红玫瑰’葡萄是源自于‘小白玫瑰’的突变品种, 二者都是优良的酿酒葡萄品种, 但其果实颜色变异的分子机理尚不清楚。用 12 对 SSR (Simple sequence repeats) 荧光标记特征引物对两品种进行分析, 结果表明这些位点在二者之间无差别。对色泽变异决定基因 *VvmybA1* 的基因型进行分析, ‘小白玫瑰’仅检测到含有插入逆转座子 *Gret1* (grapevine retrotransposon 1) 的 *VvmybA1a*, 说明其为 *VvmybA1a/VvmybA1a* 纯合体; 而‘小红玫瑰’检测到了 *VvmybA1a* 和残留 *Gret1* 3'-LTR (long terminal repeat) 的 *VvmybA1b*, 说明其为 *VvmybA1a/VvmybA1b* 的杂合体。花色苷合成相关基因的表达分析表明, *VvmybA1*、*UFGT*、*F3'5'H*、*CHS*、*GST* 和 *OMT* 在‘小红玫瑰’及有色对照品种‘黑比诺’中大量表达, 而在‘小白玫瑰’和无色对照品种‘白比诺’中几乎不表达。通过 HPLC-ESI-MS/MS 对花色苷主要成分进行测定, 结果表明矢车菊素 3-O-葡萄糖苷 (CyG)、矢车菊素 3,5-O-双葡萄糖苷 (Cy2G)、飞燕草素 3-O-葡萄糖苷 (DpG)、锦葵色素 3-O-葡萄糖苷 (MvG)、芍药色素 3-O-葡萄糖苷 (PnG) 和矮牵牛色素 3-O-葡萄糖苷 (PtG) 等 6 种花色苷在有色品种‘小红玫瑰’和‘黑比诺’果皮中的含量均显著高于无色品种, 花葵素 3-O-葡萄糖苷 (PgG)、花葵素 3,5-O-双葡萄糖苷 (Pg2G) 在有色/无色品种间无显著差异, 且含量很低。说明‘小红玫瑰’的着色是由于转录因子基因 *VvmybA1* 及其调控结构基因的表达引起的, 而无功能的 *VvmybA1a* 等位基因突变为有功能的 *VvmybA1b* 等位基因是其果皮颜色变异的遗传学原因。

关键词: 葡萄; 果实颜色; *VvmybA1*; 基因突变

中图分类号: S 663.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2017) 02-0245-10

Analysis on Molecular Basis of the Color Mutation in ‘Muscat Rouge’ and ‘Muscat Blanc’ Grapes

NIU Shengyang^{1,2,3}, JIANG Jianfu¹, FAN Xiucui¹, ZHANG Ying¹, LIU Chonghuai^{1,*}, and WANG Hua³

(¹Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, China; ²Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003, China; ³College of Enology, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Light-red-skinned ‘Muscat Rouge’ grape is mutation of white-skinned ‘Muscat Blanc’. Both of them are high-quality grapewine cultivars. However, the mechanism of the color mutation in

收稿日期: 2016-08-01; **修回日期:** 2017-01-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31372024); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-30-yz-1); 河南省教育厅科学技术研究重点项目 (14A550015); 国家林业局科技推广项目 (2014-45)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: liuchonghuai@caas.cn)

'Muscat Rouge' has not been elucidated so far. In this study, 12 SSR markers were applied to analyze the relationship of these two cultivars firstly. The results revealed that there was not amplification difference between them. The *VvmybA1* gene sequence analysis results revealed that 'Muscat Blanc' harbored only *VvmybA1a* at the *VvmybA1* locus, both *VvmybA1a* and *VvmybA1b* alleles in 'Muscat Rouge'. The qRT-PCR results indicated that the higher levels of expression of *VvmybA1* gene, 3-*O*-glucosyltransferase (*UFGT*), flavanone 3',5'-hydroxylase (*F3'5'H*), chalcone synthase (*CHS*), *O*-methyltransferase (*OMT*), and glutathione-*S*-transferase (*GST*) were detected in 'Muscat Rouge' and 'Pinot Noir'. The elementary composition of the anthocyanin profiles were analyzed using high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry (HPLC - ESI - MS/MS), revealing divergent chemical profiles. 'Muscat Rouge' and 'Pinot Noir' both showed higher abundance of Cyanidin 3-*O*-glucoside (CyG), Cyanidin 3-*O*-glucoside-5-*O*-glucoside (Cy2G), Delphinidin 3-*O*-glucoside (DpG), Malvidin 3-*O*-glucoside (MvG), Peonidin 3-*O*-glucoside (PnG), Petunidin 3-*O*-glucoside (PtG) than 'Muscat Blanc' and 'Pinot Blanc'. These results suggested that the red-skinned 'Muscat Rouge' phenotype is the re-mutation of *VvmybA1a* allele to *VvmybA1b* gene.

Keywords: grape; berry skin; *VvmybA1*; gene mutation

'小白玫瑰'葡萄原名 Muscat Белый, 欧亚种 (*Vitis vinifera* L.), 是原产于地中海东部沿岸的古老麝香型葡萄品种, 果实白色。'小红玫瑰'被认为是'小白玫瑰'的红色突变体。田间观察发现, 这两个品种除果实颜色差异外, 其他性状基本一致 (刘延琳 等, 2002; 孔庆山, 2004)。

葡萄果皮颜色取决于果实花色苷的合成 (Mamiko et al., 2011)。转录因子基因 *VvmybA1* 是花色苷合成的关键调节基因, 白色葡萄果实中由于 *VvmybA1* 的启动子区插入 *Gret1* 逆转座子, 导致该基因不能正常表达, 从而影响下游结构基因的表达, 最终导致花色苷无法合成, 果皮呈白色 (Kobayashi et al., 2004)。大量研究证实葡萄果实颜色主要是由 *VvmybA1* 决定 (Cutanda-Perez et al., 2008; Czermel et al., 2009; Mitani et al., 2009)。如黑色品种 '黑比诺' 的白色芽变品种 '白比诺' 是由于有功能的 *VvmybA1c* 的缺失, 导致基因型由 *VvmybA1a/c* 变为 *VvmybA1a/-* (Yakushiji et al., 2006); 而白色品种 '意大利' 的红色突变品种 '红高' 是因为 *Gret1* 的移动而使 *VvmybA1* 的功能再次恢复所致 (Azuma et al., 2009)。然而, 也有报道指出, 在一些白色葡萄品种果实中也检测到了有功能的 *VvmybA1* 等位基因 (This et al., 2007; 慕茜 等, 2011)。

葡萄果实颜色发生突变的频率相对较高, 是培育新品种的重要来源之一 (Azuma et al., 2009)。「小白玫瑰」和「小红玫瑰」是两个优良的酿酒葡萄品种, 「小红玫瑰」虽然被认为是「小白玫瑰」红色突变体, 但其颜色变异的机理至今未见报道。本研究中通过分析二者 MYB 转录因子基因 *VvmybA1* 的序列、花色苷合成相关基因的表达以及花色苷的含量, 探讨「小红玫瑰」颜色变异的分子机理, 以为优质葡萄育种及种质资源利用提供理论参考。

1 材料与amp;方法

1.1 植物材料

白色葡萄品种「小白玫瑰」及其红色突变体品种「小红玫瑰」, 对照黑色品种「黑比诺」及其白色芽变品种「白比诺」来源于中国农业科学院郑州果树研究所国家果树种质郑州葡萄圃。每品种

设 3 个重复。

1.2 方法

1.2.1 SSR 荧光标记毛细管电泳检测

取供试样品幼嫩叶片, 用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (上海生工) 提取 DNA 后, 根据文献报道的 SSR (Simple sequence repeat) 引物 (Azuma et al., 2009) 中选择用于鉴定葡萄芽变的 12 对引物, 在上游引物 5'端分别用 FAM、HEX、ROX 及 TAMRAD 等染料进行荧光标记, 经 PCR 反应后, 用毛细管电泳检测其片段大小。荧光引物序列合成及毛细管电泳检测由金唯智生物科技有限公司 (江苏苏州) 完成。

1.2.2 *VvmybA1* 基因型分析及编码区序列分析

参考 Kobayashi 等 (2005) 的 *VvmybA1a*、*VvmybA1b/c* 特征引物及编码区引物 (表 1) 检测 ‘小白玫瑰’ 和 ‘小红玫瑰’ *VvmybA1* 基因型。PCR 体系及条件为: 10× Buffer 2.0 μL, dNTPs 2.0 μL (10 mmol · L⁻¹), *Taq* 聚合酶 0.2 μL (TaKaRa 公司), 上下游引物各 1.0 μL (10 mmol · L⁻¹), 模板 60 ng, 20 μL 反应体系; 94 °C 预变性 3 min 后, 94 °C 变性 40 s, 62 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后, 紫外分析仪拍照。

在紫外灯下将目标片段切割, 用胶回收试剂盒 (TaKaRa 公司) 将其回收, 按照试剂盒操作说明连接到 pMD 19-T 后转入 DH5α 感受态细胞, 经氨苄青霉素 (Ampicillin) 筛选单克隆活化, 菌液 PCR 检测后送上海生工公司测序。测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对, 并利用 DNAMAN 软件对序列比对分析。

表 1 测序及 qRT-PCR 所用引物序列及扩增片段大小
Table 1 Sequence of primers and sizes of amplicons in sequencing qRT-PCR

基因名称 Gene name	登录号 Accession number	序列 (5' - 3') Sequence of primer	大小/bp Size	文献来源 Reference
<i>VvmybA1a</i>	AB111101	F AAAAAGGGGGCAATGTAGGGACCC	1 558	Kobayashi et al., 2004
		R GAACCTCCTTTTGAAGTGGTGACT		
<i>VvmybA1b/c</i>	AB111101	F GGACGTAAAAAATGGTTGCACGTG	1 034	Kobayashi et al., 2004
		R GAACCTCCTTTTGAAGTGGTGACT		
<i>VvmybA1</i>	AB427165	F GGCTTCTGGAGAGGTGCTTA	149	Azuma et al., 2008
		R CTGTGTTGGGAAAATCCCA		
<i>UFGT</i>	AF000372	F GGGATGGTAATGGCTGTGG	151	Jeong et al., 2004
		R ACATGGGTGGAGAGTGAGTT		
<i>OMT</i>	FJ460168	F GTTCAACTTCATGAGATGGA	163	Azuma et al., 2008
		R GGAGAACTACCTCAACTACCA		
<i>GST</i>	GU370062	F AAAAGTCATGGAGCTCGCTG	116	Jeong et al., 2004
		R CAGCTTCCTTCACCAAGTAT		
<i>CHS</i>	AB066275	F GAAGATGGGAATGGCTGCTG	131	Jeong et al., 2004
		R AAGGCACAGGGACACAAAAG		
<i>LDOX</i>	X75966	F AGGGAAGGAAAACAAGTAG	109	Jeong et al., 2004
		R ACTTTTGGGGATTGACTGG		
<i>DFR</i>	X75964	F GAAACCTGTAGATGCCAGGA	114	Jeong et al., 2004
		R GGCCAAATCAAACCTACCAGA		
<i>F3'H</i>	AJ880357	F GCCTCCGTTGCTGCTCAGTT	167	Jeong et al., 2004
		R GAGAAGAGGTGGACGGAGCAAATC		
<i>F3'5'H</i>	AB213606	F AAACCGCTCAGACAAAACC	100	Jeong et al., 2004
		R ACTAAGCCACAGGAACTAA		
<i>Actin</i>	EC969944	F CTTCATCCCTCAGCACCTT	82	Reid et al., 2006
		R TCCTGTGGACAATGGATGGA		
<i>EFL-α</i>	EC959059	F GAACCTGGGTGCTTGATAGGC	150	Reid et al., 2006
		R AACCAAAATATCCGGAGTAAAAGA		

1.2.3 花色苷合成相关结构基因表达分析

采集转色期后 10 d 的供试葡萄样品果实 30 ~ 50 粒, DEPC 水洗净表面后将果皮分离, 用植物总 RNA 提取试剂盒 (上海生工) 提取供试葡萄果实果皮总 RNA, 经 DNase 清除 DNA 后按照反转录试剂盒 (TOYOBO 上海) 说明书合成 cDNA, 以 *Actin* 和 *EF1- α* 为内参基因, qRT-PCR 反应采用 SYBR Green Master (Roche, Germany) 试剂盒, 罗氏公司 LightCycler[®] 480 实时荧光定量 PCR 仪对 *VvmybA1* 基因及花色苷合成结构基因 (表 1) mRNA 表达进行相对定量分析。反应总体积为 20 μ L, 10 μ L 荧光 buffer, cDNA 模板 2 μ L (2 ng), 上下游引物各 0.5 μ L (10 mmol \cdot L⁻¹); 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火及延伸 30 s, 35 个循环, 熔解扩增产物 65 ~ 95 $^{\circ}$ C 60 min (0.5 $^{\circ}$ C \cdot min⁻¹)。数据分析采用 2^{- Δ Ct} 法 (Schmittgen & Livak, 2008)。

1.2.4 果皮花色苷含量的 HPLC - ESI - MS/MS 检测

参考 Liang 等 (2011) 的方法, 略有改动。在成熟期采集葡萄果实 30 ~ 50 粒, 自来水冲洗表面后用双蒸水冲洗干净, 用无菌手术刀将果皮分离, 液氮速冻后研磨成粉, 取 1.0 g 粉末于 10 mL 离心管中, 加提取液 8 mL (甲酸: 超纯水: 甲醇 = 28 : 2 : 70), 低温避光提取后过 0.22 μ m 滤膜后检测花色苷。试验所用标样购自德国 Phytolab 公司。质谱检测在国家农业部果品苗木质量检验检测中心 (郑州) 完成。仪器为 Agilent 6460 B Triple Quad LC - MS/MS (QQQ); 色谱柱: ZORBAX SB-C18 (2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μ m), 参考 Liang 等 (2011) 的方法, 色谱条件为: 0 min, A 94%, B 6%; 2.0 min, A 60%, B 40%; 3.0 min, A 20%, B 80%; 4.0 min, A 20%, B 80%; 5.0 min, A 94%, B 6%; 6.0 min, A 94%, B 6%。数据收集为 MassHunter 工作平台 (Agilent, USA)。

2 结果与分析

2.1 遗传背景分析

对 '小白玫瑰' 和 '小红玫瑰' 的植株及果实特征调查表明, 二者除果实颜色外, 其他表型特征极为相似 (图 1)。利用前人筛选出来的 12 对在葡萄品种间多态性较高的 SSR 引物鉴定 '小白玫瑰'、'小红玫瑰'、'白比诺' 和 '黑比诺' 的遗传多样性。结果表明, 12 对引物在两组材料扩增出的片段大小各不相同, 说明使用这些多态性较高的引物进行供试葡萄品种间的遗传背景分析, 其结果是准确可信的。而 '小白玫瑰' 与 '小红玫瑰' 扩增出的条带大小完全相同 (表 2), 这与芽变品种 '黑比诺' 和 '白比诺' 的结果一致, 说明其遗传背景极为相似。

表 2 12 对 SSR 引物荧光标记毛细管电泳结果
 Table 2 Capillary electrophoresis of 12 SSR primers fluorescent labeling

引物名称 Primer name	扩增片段大小/bp Size of amplication			
	小白玫瑰 Muscat Blanc	小红玫瑰 Muscat Rouge	白比诺 Pinot Blanc	黑比诺 Pinot Noir
VrZAG21	204, 204	204, 204	199, 203	199, 203
VrZAG47	179, 192	179, 192	167, 179	167, 179
VrZAG62	185, 194	185, 194	187, 202	187, 202
VrZAG64	140, 159	140, 159	151, 159	151, 159
VrZAG79	248, 252	248, 252	247, 257	247, 257
VVMD5	224, 233	224, 233	223, 237	223, 237
VVMD6	204, 206	204, 206	203, 206	203, 206
VVMD7	231, 246	231, 246	246, 246	246, 246
VVMD8	135, 135	135, 135	137, 137	137, 137
VVS1	179, 179	179, 179	178, 178	178, 178
VVS2	130, 130	130, 130	130, 150	130, 150
VVS4	166, 174	166, 174	175, 177	175, 177

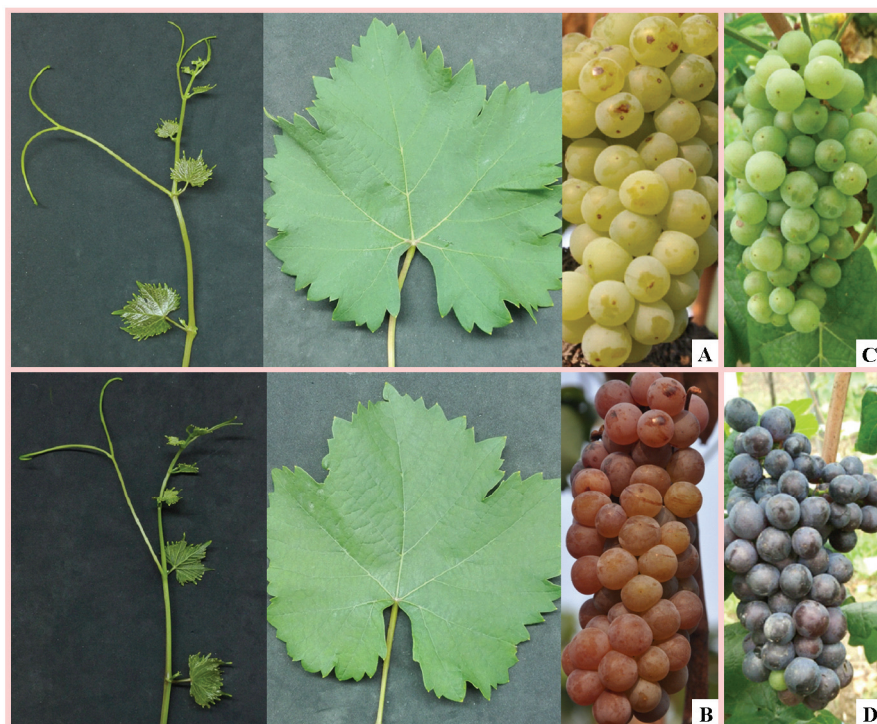


图1 ‘小白玫瑰’ (A) 与 ‘小红玫瑰’ (B), ‘白比诺’ (C) 与 ‘黑比诺’ (D)
 Fig. 1 Muscat Blanc (A) and Muscat Rouge (B), Pinot Blanc (C) and Pinot Noir (D)

2.2 *VvmybA1* 基因型分析

为分析‘小白玫瑰’和‘小红玫瑰’的突变是否是由于 *VvmybA1* 基因序列变化所致, 对这两个品种的 *VvmybA1* 基因型进行了鉴定。结果如图2所示, 用引物 *VvmybA1a* 在供试样品中都扩增出了约 1 500 bp 的条带。克隆测序结果表明该片段大小为 1 559 bp, 在 NCBI 中进行 BLAST, 该序列与 NCBI 公布的 *VvmybA1* 基因插入 *Gret1* 后的 *VvmybA1a* 等位基因相似性为 99%。此外, 用引物 *VvmybA1b/c* 在‘小红玫瑰’和‘黑比诺’中还分别扩增出了约 1 700 bp 和 800 bp 的条带, 测序结果表明, ‘小红玫瑰’扩增出的条带为 1 674 bp, BLAST 比对表明其存在着 *Gret1* 的 3'-LTR 序列, 为等位基因 *VvmybA1b*, 而‘黑比诺’扩增出的片段为 845 bp 的 *VvmybA1c* (图3)。这些结果说明‘小白玫瑰’是 *VvmybA1a/VvmybA1a* 基因纯合体, 而‘小红玫瑰’是 *VvmybA1a/VvmybA1b* 杂合体。

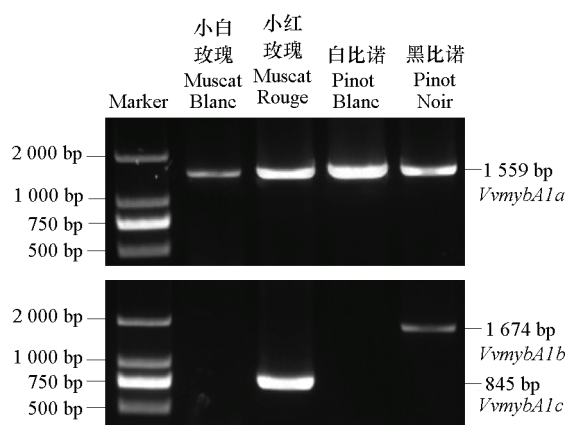


图2 *VvmybA1* 基因 PCR 扩增产物
 Fig. 2 PCR amplified products of *VvmybA1* gene

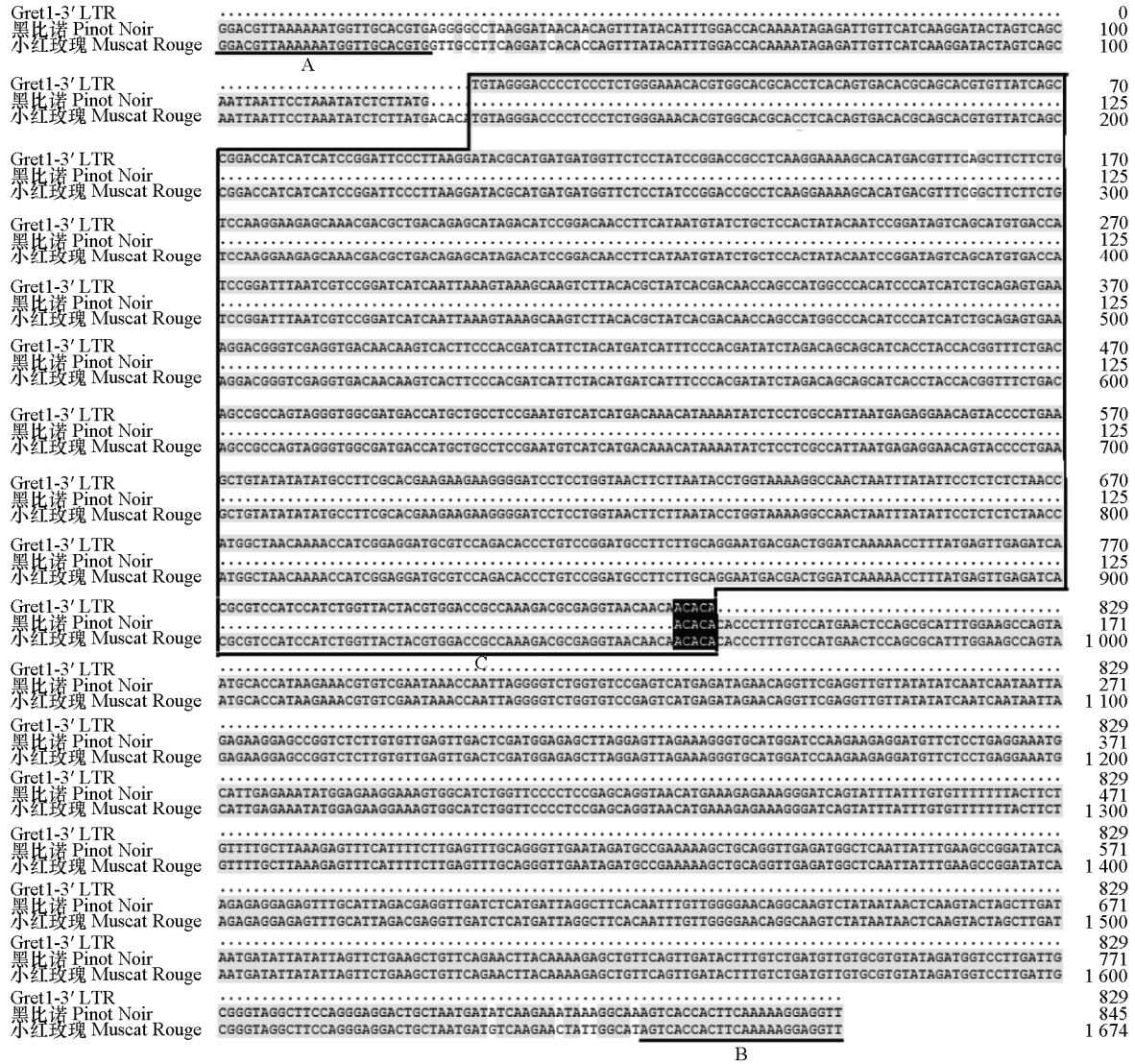


图3 *VvmybA1b* 基因片段测序结果比对

A: 上游引物序列; B: 下游引物反向互补序列; C: *Gret1* 的 3'-LTR 序列。

Fig. 3 The result of the *VvmybA1b* gene fragments sequence alignment

A: Sequence of forward primer; B: Reverse complementary sequence of reverse primer; C: 3'-LTR of *Gret1*.

2.3 花色苷合成相关基因的表达分析

VvmybA1 基因在启动子区域由于 *Gret1* 插入位点的变化而形成了 *VvmybA1a*、*VvmybA1b* 及 *VvmybA1c* 等 3 种不同的基因型，但其编码区是一致的 (Kobayashi et al., 2004)。为了分析 *VvmybA1* 基因以及相关结构基因的表达与果实颜色的关系，利用实时荧光定量分析这些基因的表达，结果 (图 4) 表明，*VvmybA1* 在有色品种 ‘小红玫瑰’ 和 ‘黑比诺’ 中表达量很高，而在白色品种 ‘小白玫瑰’ 和 ‘白比诺’ 中表达量很低。花色苷合成途径中的结构基因 *UFGT*、*F3'H*、*OMT*、*GST* 及 *CHS* 在果皮中的表达与 *VvmybA1* 一致，只在有色果实成熟时表达，说明这些基因的表达可能受 *VvmybA1* 调控，并且与葡萄果实着色关系密切。而 *DFR*、*F3'H* 和 *LDOX* 的表达在不同颜色品种间中无明显差异。

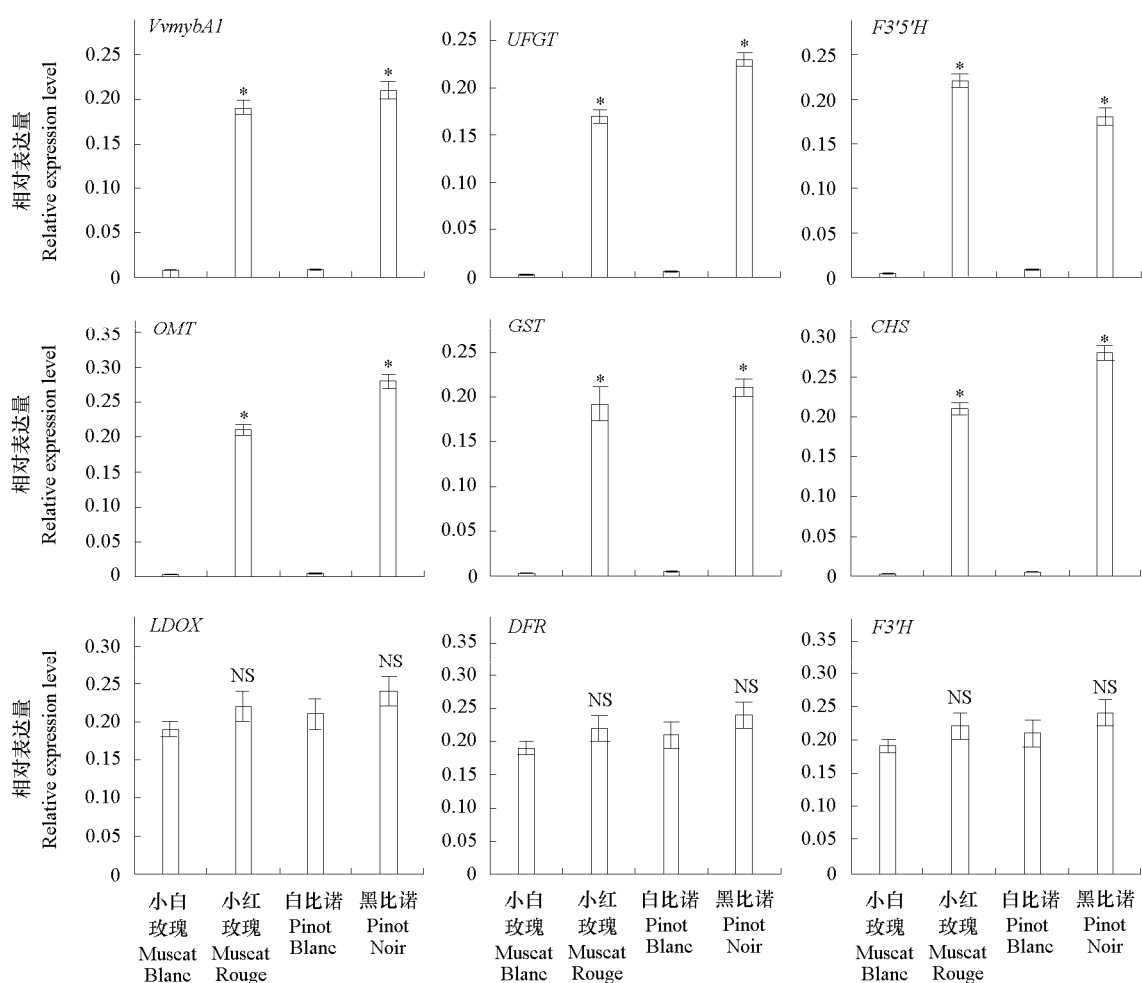


图4 花色苷合成相关基因相对表达量

同组品种有色和无色果实进行 *t* 测验, * 表示差异显著, NS 表示差异不显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 4 Relative expression level of anthocyanins biosynthesis gene

The comparison between ‘Muscat Rouge’ and ‘Muscat Blanc’, ‘Pinot Noir’ and ‘Pinot Blanc’ within the asterisk (*) indicate significant difference and NS indicate no significant at $P < 0.05$ by *t*-test.

2.4 果皮中花色苷组分含量分析

提取成熟期葡萄果皮中的花色苷, 利用 HPLC-ESI-MS/MS 进行检测。结果 (表 3) 表明, 在 ‘小红玫瑰’ 和 ‘黑比诺’ 中, 矢车菊素 3-*O*-葡萄糖苷 (CyG) 等 6 种花色苷的含量显著高于其白色对照品种, 特别是锦葵色素 3-*O*-葡萄糖苷 (MvG), 在有色果实中的含量很高, 而在白色果实中检测不到。花葵素 3,5-*O*-双葡萄糖苷 (Pg2G) 在有色及白色葡萄间无显著差异, 但是该物质在葡萄果皮含量极低, 而花葵素 3-*O*-葡萄糖苷 (PgG) 在供试品种中均检测不到, 说明花葵素类葡萄糖苷不是决定葡萄果实颜色的关键物质。

表3 葡萄果实成熟期不同花色苷组分含量
 Table 3 Different Anthocyanin content in mature stage of grape berry skin mg · kg⁻¹ FW

花色苷 Anthocyanins	缩写 Abbr.	小白玫瑰 Muscat blanc	小红玫瑰 Muscat rouge	白比诺 Pinot Blanc	黑比诺 Pinot Noir
矢车菊素 3-O-葡萄糖苷 Cyanidin 3-O-glucoside	CyG	2.73 ± 0.194	14.42 ± 0.976*	2.12 ± 0.158	17.23 ± 0.925*
矢车菊素 3,5-O-双葡萄糖苷 Cyanidin 3-O-glucoside-5-O-glucoside	Cy2G	0.24 ± 0.013	1.14 ± 0.059*	0.07 ± 0.001	0.94 ± 0.044*
飞燕草素 3-O-葡萄糖苷 Delphinidin 3-O-glucoside	DpG	2.17 ± 0.251	10.75 ± 0.752*	1.97 ± 0.252	9.44 ± 0.434*
锦葵色素 3-O-葡萄糖苷 Malvidin 3-O-glucoside	MvG	ND	5.11 ± 0.223	ND	60.34 ± 2.122
花葵素 3-O-葡萄糖苷 Pelargonidin 3-O-glucoside	PgG	ND	ND	ND	ND
花葵素 3,5-O-双葡萄糖苷 Pelargonidin 3-O-glucoside-5-O-glucoside	Pg2G	0.09 ± 0.005	0.15 ± 0.011	0.07 ± 0.003	0.12 ± 0.004
芍药色素 3-O-葡萄糖苷 Peonidin 3-O-glucoside	PnG	0.02 ± 0.013	1.24 ± 0.059*	0.03 ± 0.002	1.51 ± 0.082*
矮牵牛色素 3-O-葡萄糖苷 Petunidin 3-O-glucoside	PtG	1.73 ± 0.194	14.42 ± 0.976*	1.81 ± 0.053	17.58 ± 1.153*

注：同组品种有色和无色果实进行 *t* 测验，* 表示差异显著 ($P < 0.05$)，ND 表示未检出。

Note: The same cultivar of colored fruit and colorless within the asterisk (*) indicate significant difference at $P < 0.05$ by *t*-test. ND means no detected.

3 讨论

‘小红玫瑰’葡萄是由‘小白玫瑰’突变而来，但其是否为花色苷合成基因突变所致至今尚不清楚。田间调查发现，二者之间除果实颜色之外其他生物学性状基本一致。

SSR 标记是一种具有高稳定性和高准确性的分子标记，目前已被广泛用于葡萄品种鉴定及品种之间亲缘关系分析 (Summaira et al., 2008; Emanuelli et al., 2013)。Lamboy 和 Alpha (1998) 用 5 对 SSR 引物 (*VVS2*、*VVS4*、*VVMD6*、*VVMD7* 及 *VVMD8*) 将随机选择的 110 份葡萄种质资源成功分开，其区分度高达 2×10^8 。后来 Yakushiji 等 (2006) 又筛选了 8 对引物 (*VVSI*、*VrZAG21*、*VrZAG47*、*VrZAG62*、*VrZAG64*、*VrZAG79*、*VrZAG86* 及 *VVMD5*)，并用这些引物成功鉴定出‘黑比诺’的芽变品种‘白比诺’，Azuma 等 (2009) 在验证‘意大利’与‘红高’为芽变品种时也采用了这些引物。越来越多的研究发现，应用这些引物在分析葡萄亲缘关系时具有很高的准确性，因此，上述引物成为国内外学者在进行葡萄分类及品种鉴定时的首选引物 (郝宇 等, 2010; Doulati-baneh et al., 2013; 成冰 等, 2014)。本研究中利用这些引物对‘小红玫瑰’和‘小白玫瑰’葡萄进行亲缘关系鉴定时发现，两者在各个位点上的片段大小明显与对照不同，但两者之间片段大小却完全相同，说明‘小红玫瑰’与‘小白玫瑰’的遗传背景极为相似，符合芽变品种的遗传特征。

葡萄果实颜色主要由果皮花色苷的含量和组分决定 (Jeong et al., 2006; Czempl et al., 2012)。研究表明，*VvmybA1* 基因的表达与葡萄果皮颜色的形成密切相关 (Lijavetzky et al., 2006; Azuma et al., 2008)。由于逆转座子 *Gret1* 的插入及缺失而导致了 *VvmybA1* 的 3 种等位基因，其中 *VvmybA1a* 是 *VvmybA1* 启动子区域有 *Gret1* 的插入而不具有功能；*VvmybA1b* 是由于 *Gret1* 的转移后只留下了单拷贝的 3'-LTR，该等位基因只在少数几个红色品种中被报道过 (Azuma et al., 2009)；*VvmybA1c* 被认为是 *VvmybA1* 的原始序列 (Kobayashi et al., 2004, 2005)。大量报道指出白葡萄果实中只有无功能的 *VvmybA1a*，不存在有功能的 *VvmybA1b* 或 *VvmybA1c*，致使 *VvmybA1* 基因表达受阻；而绝大部分欧亚种有色品种的 *VvmybA1* 基因型为 *VvmybA1a* 和 *VvmybA1c* 杂合型，因此，大部分白色果实欧亚种是杂交产生了 *VvmybA1a* 的纯合型 (Cutanda et al., 2008; Czempl et al., 2009)。This 等 (2007) 研究发现，在黑色、红色、粉红色等有色葡萄品种内都存在至少一条功能性的 *VvmybA1* 等位基因，而 98% 的白色品种表现为 *VvmybA1a* 的纯合基因型。‘赤霞珠’ (Cabernet Sauvignon) 的白色果实芽

变品种‘Shalistin’是由于存在一个无功能的等位基因 *VvmybA1a*, 同时有功能的 *VvmybA1* 基因出现大片段的缺失造成的 (Walker et al., 2007)。白色品种‘霞多丽’(Chardonnay)的芽变有色品种‘红霞多丽’(Red chardonnay)是由于无功能的 *VvmybA1a* 中 *Gret1* 位点出现大片段的缺失, 使 *VvmybA1* 功能恢复所致 (Lijavetzky et al., 2006)。本试验中发现‘小白玫瑰’只有 *VvmybA1a* 基因, 而‘小红玫瑰’的基因型为 *VvmybA1a* 和 *VvmybA1b*, 说明是‘小白玫瑰’中一条 *VvmybA1a* 的逆转座子 *Gret1* 部分缺失突变成了 *VvmybA1b* 等位基因, 恢复了 *VvmybA1* 的功能, 使‘小白玫瑰’突变成为红色品种‘小红玫瑰’。

References

- Azuma A, Kobayashi S, Goto-Yamamoto N, Shiraishi M, Mitani N, Yakushiji H, Koshita Y. 2009. Color recovery in berries of grape (*Vitis vinifera* L.) ‘Benitaka’, a bud sport of ‘Italia’, is caused by a novel allele at the *VvmybA1* locus. *Plant Science*, 176 (4): 470 - 478.
- Azuma A, Kobayashi S, Mitani N, Shiraishi M, Yamada M, Ueno T, Kono A, Yakushiji H, Koshita Y. 2008. Genomic and genetic analysis of Myb-related genes that regulate anthocyanin biosynthesis in grape berry skin. *Theoretical and Applied Genetics*, 117 (6): 1009 - 1019.
- Cheng Bing, Zhang Jing-fang, Ma Zheng-qiang, Wang Yue-hui, Zhang Bei-bei. 2014. SSR analysis and identification of grape cultivars for making white wine. *Journal of Northwest Forestry University*, 29 (2): 103 - 106. (in Chinese)
- 成冰, 张京芳, 马正强, 王月晖, 张贝贝. 2014. 酿酒白葡萄品种的SSR分析与鉴定. *西北林学院学报*, 29 (2): 103 - 106.
- Cutanda-Perez M C, Ageorges A, Gomez C, Vialet S, Terrier N, Romieu C, Torregrosa L. 2008. Ectopic expression of *VlmybA1* in grapevine activates a narrow set of genes involved in anthocyanin synthesis and transport. *Plant Molecular Biology*, 69 (6): 633 - 648.
- Czemmel S, Heppel S C, Bogs J. 2012. R2R3 MYB transcription factors: key regulators of the flavonoid biosynthetic pathway in grapevine. *Protoplasma*, 249 (2): 109 - 118.
- Czemmel S, Stracke R, Weisshaar B, Cordon N, Harris N N, Walker A R, Robinson S P, Bogs J. 2009. The grapevine R2R3-MYB transcription factor *VvMYB1* regulates flavonol synthesis in developing grape berries. *Plant Physiology*, 151 (3): 1513 - 1530.
- Doulati-baneh H, Mohammadi S A, Labra M. 2013. Genetic structure and diversity analysis in *Vitis vinifera* L. cultivars from Iran using SSR markers. *Science Horticult*, 160: 29 - 36.
- Emanuelli F, Lorenzi S, Grzeskowiak L, Catalano V, Stefanini M, Troggio M. 2013. Genetic diversity and population structure assessed by SSR and SNP markers in a large germplasm collection of grape. *BMC Plant Biology*, 13: 39.
- Hao Yu, Zhang Shu-jing, Zhang Shi-hong, Liang Hai-yong. SSR identification and analysis of genetic diversity of grape cultivars. *Journal of Agriculture University of Hebei*, 33 (1): 54 - 59. (in Chinese)
- 郝宇, 张淑静, 张世红, 梁海永. 2010. 葡萄品种资源的SSR鉴定及遗传多样性分析. *河北农业大学学报*, 33 (1): 54 - 59.
- Jeong S T, Goto-Yamamoto N, Hashizume K, Esaka M. 2006. Expression of the flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and flavonoid composition in grapes and flavonoid composition in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Science*, 170 (1): 61 - 69.
- Jeong S T, Goto-Yamamoto N, Kobayashi S, Esaka M. 2004. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Science*, 167 (2): 247 - 252.
- Kobayashi S, Goto-Yamamoto N, Hirochika H. 2004. Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. *Science*, 304: 982.
- Kobayashi S, Goto-Yamamoto N, Hirochika H. 2005. Association of *VvmybA1* gene expression with anthocyanin production in grape (*Vitis vinifera*) skin-color mutants. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 74 (3): 196 - 203.
- Kong Qing-shan. 2004. Chinese Ampelography. Beijing: China Agriculture Press: 553 - 554. (in Chinese)
- 孔庆山. 2004. 中国葡萄志. 北京: 中国农业出版社: 553 - 554.
- Lamboy W F, Alpha C G. 1998. Using simple sequence repeats (SSRs) for DNA finger-printing germplasm accessions of grape (*Vitis* L.) species.

- Journal of the American Society for Horticultural Science, 123: 182 - 188.
- Liang Z, Owens C L, Zhong G Y, Cheng L. 2011. Polyphenolic profiles detected in the ripe berries of *Vitis vinifera* germplasm. *Food Chemistry*, 129 (3): 940 - 950.
- Lijavetzky D, Ruiz-García L, Cabezas J A, Andrés M T, Bravo G, Ibáñez A, Carreño J, Cabello F, Ibáñez J, Martínez-Zapater J M. 2006. Molecular genetics of berry color variation in table grape. *Molecular Genetics and Genomics*, 276 (5): 427 - 435.
- Liu Yan-lin, Xi Zhu-mei, Zhang Zhen-wen. 2002. Brief introduction of grape varieties for white wine. *Liquor Making*, 29 (5): 10 - 12. (in Chinese)
- 刘延琳, 惠竹梅, 张振文. 2002. 优良白葡萄酒品种简介. *酿酒*, 29 (5): 10 - 12.
- Mamiko S, Keiko F, Hironori K, Shunji S. 2011. Pink-colored grape berry is the result of short insertion in intron of color regulatory gene. *PLoS ONE*, 6 (6): 21308 - 21318.
- Mitani N, Azuma A, Fukai E, Hirochika H, Kobayashi S. 2009. A retrotransposon-inserted *VvmybA1a* allele has been spread among cultivars of *Vitis vinifera* but not North American or East Asian *Vitis* species. *Vitis*, 48 (1): 55 - 56.
- Mu Qian, Wu Wei-min, Fang Jing-gui, Sun Xin, Shangguan Ling-fei, Zhao Mi-zhen. 2011. Genotyping *VvmybA1* in 59 grapevine cultivars and characterization of the DNA fragment sequences. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (11): 2075 - 2084. (in Chinese)
- 慕茜, 吴为民, 房经贵, 孙欣, 上官凌飞, 赵密珍. 2011. 不同葡萄品种的 *VvmybA1* 基因型及其特征性 DNA 片段的序列分析. *园艺学报*, 38 (11): 2075 - 2084.
- Reid K E, Olsson N, Schlosser J, Peng F, Lund S T. 2006. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biology*, 6 (1): 27.
- Schmittgen T D, Livak K J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3 (6): 1101 - 1108.
- Summaira R, Tenscher A C, Smith B P, Daniel A N, Walker M A. 2008. Use of SSR markers to assess identity, pedigree, and diversity of cultivated muscadine grapes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 133: 559 - 568.
- This P, Lacombe T, Cadle-Davidson M, Owens C L. 2007. Wine grape (*Vitis vinifera* L.) color associates with allelic variation in the domestication gene *VvmybA1*. *Theoretical and Applied Genetics*, 114 (4): 723 - 730.
- Walker A R, Lee E, Bogs J, McDavid D A J, Thomas M R, Robinson P S. 2007. White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *The Plant Journal*, 49: 772 - 785.
- Yakushiji H, Kobayashi S, Goto-Yamamoto N, Jeong S, Sueta T, Mitani N, Azuma A. 2006. A skin color mutation of grapevine, from black-skinned pinot noir to white-skinned Pinot Blanc, is caused by deletion of the functional *VvmybA1* allele. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70 (6): 1506 - 1508.