

毛欧杂种葡萄 ‘NW196’ 花色苷组成与相关基因表达分析

成果¹, 周思泓², 张劲¹, 张瑛¹, 管敬喜¹, 杨莹¹, 谢林君¹, 文仁德^{1,*}

(¹广西农业科学院葡萄与葡萄酒研究所, 南宁 530007; ²广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 南宁 530007)

摘要: 以不同发育期毛欧杂种葡萄 ‘NW196’ 为试验材料, 利用 HPLC - MS 检测其果皮中花色苷的组成及含量, Real-time PCR 检测花色苷合成相关基因表达水平, 并与欧亚种 ‘赤霞珠’ 比较。结果表明, 成熟后期 ‘NW196’ 果皮中花色苷总量显著高于 ‘赤霞珠’; 采收期 ‘NW196’ 葡萄果皮中共检测到 23 种花色苷, 成熟后期单糖苷所占比例高于双糖苷, 其中含量最高的是花翠素 - 3 - O - 葡萄糖苷, 3’5’ - 羟基取代花色苷比例高于 3’ - 羟基取代花色苷; 与欧亚种 ‘赤霞珠’ 相比, ‘NW196’ 果皮中酰化和甲基化花色苷比例较低。结论: 毛欧杂种 ‘NW196’ 花色苷组成与欧亚种 ‘赤霞珠’ 差异明显, 这与其品种特性有关, 并受到类黄酮代谢路径相关基因的调控; 此外, 花色苷双糖苷主要在转色初期合成。

关键词: 葡萄; 果皮; 花色苷; 基因表达; HPLC-MS

中图分类号: S 663.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2017) 06-1073-12

Analysis of Anthocyanin Composition and Genes Expression Patterns of *Vitis quinquangularis* × *V. vinifera* ‘NW196’

CHENG Guo¹, ZHOU Sihong², ZHANG Jin¹, ZHANG Ying¹, GUAN Jingxi¹, YANG Ying¹, XIE Linjun¹, and WEN Rende^{1,*}

(¹Grape and Wine Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China; ²Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Laboratory, Nanning 530007, China)

Abstract: The composition and content of anthocyanins were surveyed by HPLC - MS in berry skin of ‘NW196’ (*Vitis quinquangularis* × *V. vinifera*), transcript levels of both structural and regulatory genes involved in anthocyanin synthesis confirmed by Real-time PCR, which were compared with *V. vinifera* L. ‘Cabernet Sauvignon’. The results indicated that the ‘NW196’ berry skin had significantly higher total anthocyanin content than ‘Cabernet Sauvignon’ berry skin during late-ripening. At harvest, 23 anthocyanins were detected in ‘NW196’ berry skins, and the berry skins of ‘NW196’ contained higher proportions of monoglucoside anthocyanins than diglucoside anthocyanins during late-ripening. Delphinidin-3-O-diglucoside was the most abundant anthocyanins in berry skin of ‘NW196’, and 3’5’-substituted showed higher proportion than 3’-substituted anthocyanins. When compared with ‘Cabernet Sauvignon’,

收稿日期: 2016 - 12 - 16; **修回日期:** 2017 - 06 - 05

基金项目: 广西农业科学院科技发展基金项目 (桂农科 2015JZ150); 广西农业科学院基本科研业务专项 (2015YT85)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: wenrende@126.com)

lower proportions of acylated and methylated anthocyanins detected in 'NW196' berry skins. These results suggested that the composition and content of anthocyanins in berry skins of 'NW196' and 'Cabernet Sauvignon' showed great differences, which related to the variety's own characteristics and regulated by genes in flavonoid metabolic pathways. In addition, diglucoside anthocyanins were synthesized at the beginning of veraison.

Keywords: grape; berry skins; anthocyanin; gene expression; HPLC - MS

花色苷是赋予红葡萄和红葡萄酒颜色的主要酚类物质, 它们经由类黄酮代谢路径合成, 与黄酮醇和黄烷-3-醇共享一条代谢路径 (Ribéreau-Gayon & Glories, 1986; 何建军, 2010)。葡萄花色苷的合成始于果实进入成熟阶段 (花后 8~10 周), 随后含量逐渐增加, 采收期含量达到最高 (Boss et al., 1996; 赵权 等, 2010)。分析酿酒葡萄品种花色苷组成和含量一直是酿酒品质研究领域的热点之一 (Jin et al., 2009; 赵权 等, 2010; 孙磊 等, 2015)。

花色苷是由花色素作为糖苷配基或乙酰化的糖苷配基与糖结合生成, 由于糖苷配基羟基化和甲基化程度的不同具有不同的修饰方式 (Mazza, 1995)。花色素的核心结构, 即花色基元, 具有典型的 C6-C3-C6 类黄酮骨架。每一类花色苷所占的比例和含量取决于基因型, 并受环境和栽培条件地影响极大, 而其比例和含量又决定了葡萄及葡萄酒色度及颜色的稳定性。二甲花翠素单糖苷 (Malvidin-3-O-monoglucoside) 是欧亚种葡萄中最主要的一类花色苷 (Mattivi et al., 2006), 欧亚种葡萄和其他种之间的最主要的区别在于有无花色素双糖苷 (Jánváry et al., 2009)。北美种群和东亚种群中同时存在花色素的单糖苷和双糖苷 (Zhu et al., 2012)。

'NW196' 葡萄 (*Vitis quinquangularis* × *V. vinifera*) 又名 '凌丰', 是以野生毛葡萄为母本, 欧亚种葡萄 '粉红玫瑰' 为父本的杂交品种 (吴莹 等, 2010), 其栽培性状和酿造特性优于野生毛葡萄, 坐果率高, 抗病性强, 通过 "一年两收" 栽培技术生产的冬果 (第二季果) 可溶性固形物含量高, 果皮颜色深, 单宁物质丰富, 是广西当地颇具潜力的酿酒品种 (黄宏惠 等, 2007; 管敬喜 等, 2014)。目前有关 'NW196' 果实发育过程中花色苷成分、含量变化以及相关基因表达规律的研究仍为空白。本研究中以 'NW196' 葡萄浆果为试材, 用 HPLC-MS 技术测定果实发育过程中果皮花色苷组成及含量变化, 采用 Real-time PCR 检测相关基因表达, 并与欧亚种葡萄 '赤霞珠' 进行对比, 为进一步研究其花色苷合成的结构基因进化和调控机制奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 试验地点与amp;材料

试验地位于广西壮族自治区农业科学院科研基地 (22°50'59" N, 108°14'35" E)。供试葡萄品种为 2005 年定植的 'NW196' 和 2007 年定植的 '赤霞珠'。两个品种的整形方式分别为 Y 字形和单干双臂形, 栽植密度 2.5 m × 1.5 m, 南北行向, 灌溉方式均为滴灌。于 2015 年 9 月 28 日, 即花后 4 周开始, 每 2 周采集 1 次 (上午 9:00—10:00 时) 果实样品直至果实成熟采收。选择树体生长状况相对一致的 9 株作为采样株, 每 3 株为一个生物学重复。样品采集后立即用冰盒保存带回实验室。

1.2 果实质量、可溶性固形物和可滴定酸含量的测定

从每个生物学重复的 3 个植株各个部位剪下 100 粒浆果 (每个发育期每个品种共 300 粒)。其

中 150 粒浆果样品用于浆果质量、果皮鲜样质量、可溶性固形物和可滴定酸含量的测定。利用 PAL-1 型手持折射计 (Atago, Tokyo, Japan) 测定可溶性固形物含量。可滴定酸利用酸碱滴定法测定。其余用液氮速冻后于 -80 °C 冰箱保存。

1.3 葡萄果皮中花色苷类物质的检测

150 粒剩余浆果在处于冷冻状态时, 迅速将果皮与果肉分离。果皮用液氮速冻, 破碎成粉末后在 -40 °C 条件下冷冻干燥。同时记录果实质量、果皮鲜样质量及干质量, 以备后续计算。果皮中花色苷的提取和检测参照何建军 (2010) 的方法。每个样品重复进样 3 次。

花色苷定性检测对照中国农业大学葡萄酒研究中心建立的“葡萄与葡萄酒花色苷 HPLC - UV - MS 指纹谱库” (何建军, 2010) 完成。建立 5 ~ 500 mg · L⁻¹ 之间 9 个水平 3 个重复的二甲花翠素 - 3 - O - 葡萄糖苷 (Malvidin-3-O-glucoside) 标准曲线, 相关系数在 0.999 以上, 其他花色苷以相当于 Malvidin-3-O-glucoside 的含量计。果皮中花色苷含量单位用 μg · berry⁻¹ 表示。

1.4 基因表达分析

使用植物总 RNA 提取试剂盒 (Sigma, 北京, 中国) 提取果皮 RNA, 利用 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (RR047A, TaKaRa) 反转录合成 cDNA。采用 SYBR[®] Premix Ex TaqTM (RR420A, TaKaRa) 试剂盒检测果皮花色苷合成直接相关的 10 个基因的表达水平, 实时定量 PCR 反应采用 LightCycler[®] 480 实时荧光定量 PCR 系统 (Roche Diagnostics Ltd., Forrentrasse CH-6343 Rotkreuz, Switzerland)。所有基因引物序列参照成果 (2015) 和 Hausmann 等 (2006) 的文献 (表 1), 并通过琼脂糖凝胶电泳和熔解曲线分析检测引物特异性。选取 *Ubiquitin1* 和 *Actin* 作为内参基因, 采用 2^{-ΔCt} 计算相对表达量 (Bogs et al., 2005)。每个发育期样品的基因表达量为 3 个生物学重复的平均值。

表 1 用于 RT-PCR 的引物

Table 1 Primer used for quantification of transcripts by means of real time quantitative PCR

基因名称 Gene name	正向引物序列 (5'→3') Forward primer	反向引物序列 (5'→3') Reverse sequence primer	参考文献 Reference
<i>VvF3'5'H</i>	AAACCGCTCAGACCAAAACC	ACTAAGCCACAGGAAACTAA	成果, 2015
<i>VvF3'H</i>	ACTCATGGTGCACCCACG	CACAAAATACTAAACTCGCTC	成果, 2015
<i>VvDFR</i>	GAAACCTGTAGATGGCAAGA	GGCCAAATCAAACCTACCAGA	成果, 2015
<i>VvLAR1</i>	CTCCAACGGATTCTTCC	CGTCCACTGTTTTTCATCGT	成果, 2015
<i>VvLAR2</i>	TAAACGAGCTGGCATCAC	GCAGCGGCTAGTAGGTC	成果, 2015
<i>VvANR</i>	CTTGATGGGACAGGTCTGGT	TGTCTTGAGGCGAGGATAGC	成果, 2015
<i>VvLDOX</i>	AGGGAAGGGAAAACAAGTAG	ACTCTTTGGGGATTGACTGG	成果, 2015
<i>VvUFGT</i>	GGGATGGTAATGGCTGTGG	ACATGGGTGGAGAGTGAGTT	成果, 2015
<i>Vv5GT</i>	ATAGTCTTACATCCCCTC	CCAACCTCAATCGACTTAAAC	Hausmann et al., 2006
<i>VvUbiquitin1</i>	GTGGTATTATTGAGCCATCCTT	AACCTCAATCCAGTCATCTAC	成果, 2015
<i>VvActin</i>	GCATCCCTCAGCACCTTCCAGCAG	CCACCTCAACACATCTCCATGTCAA	成果, 2015

2 结果与分析

2.1 不同发育期果实质量和可溶性固形物、可滴定酸含量

‘NW196’ 和 ‘赤霞珠’ 果实于花后 8 周进入转色期。从花后 4 周开始两品种单粒浆果质量随果实发育期变化趋势一致, 且在花后 14 周 (采收期) 时差异不显著。两个品种果皮质量随发育期逐渐增加, 但 ‘NW196’ 果皮质量自花后 10 周起低于同期的 ‘赤霞珠’, 采收时显著低于 ‘赤霞珠’。

‘NW196’ 和 ‘赤霞珠’ 果实可溶性固形物和可滴定酸含量随发育期变化趋势一致。花后 14 周 (采

收期)时, ‘NW196’ 果实可溶性固形物含量显著高于 ‘赤霞珠’, 但两个品种的可滴定酸含量没有显著差异。

2.2 不同发育期果皮花色苷组成

在采收期(花后 14 周)两个品种的果皮中共检测到 29 种不同类型的花色苷, 两个品种共有的花色苷 11 种, 只在 ‘NW196’ 中检测到的有 12 种, 只在 ‘赤霞珠’ 中检测到的有 6 种(表 2)。

表 2 ‘NW196’ 与 ‘赤霞珠’ 葡萄果皮中花色苷 HPLC - UV - MS 的分子离子与碎片离子信息
 Table 2 Molecular and fragmentation ions of anthocyanins in grapes of ‘NW196’ and ‘Cabernet Sauvignon’

成分 Component	峰号 Peak number		分子离子 Molecular ion M+ (m/z)	碎片离子 Fragment ion M (m/z)
	NW196	赤霞珠 Cabernet Sauvignon		
花翠素 - 3 - O - 葡萄糖苷 Delphinidin-3-O-monoglucoside	4	4	465	303
甲基花翠素 - 3 - O - 葡萄糖苷 Petunidin-3-O-monoglucoside	8	8	479	317
甲基花青素 - 3 - O - 葡萄糖苷 Peonidin-3-O-monoglucoside	10	10	463	301
二甲花翠素 - 3 - O - 葡萄糖苷 Malvidin-3-O-monoglucoside	11	11	493	331
甲基花翠素 - 3 - O - (6 - O - 乙酰化) - 葡萄糖苷 Petunidin-3-O-(6-O-acetyl)-glucoside	17	17	521	317
花翠素 - 3 - O - (反式 - 6 - O - 香豆酰化) - 葡萄糖苷 Delphinidin-3-O-(trans-6-O-coumaroyl)-glucoside	20	20	611	303
二甲花翠素 - 3 - O - (6 - O - 乙酰化) - 葡萄糖苷 Malvidin-3-O-(6-O-acetyl)-glucoside	21	21	535	331
花青素 - 3 - O - (6 - O - 香豆酰化) - 葡萄糖苷 Cyanidin-3-O-(6-O-coumaroyl)-glucoside	24	24	595	287
甲基花翠素 - 3 - O - (6 - O - 乙酰化) - 葡萄糖苷 Petunidin-3-O-(6-O-coumaroyl)-glucoside	25	25	625	317
二甲花翠素 - 3 - O - (顺式 6 - O - 香豆酰化) - 葡萄糖苷 Malvidin-3-O-(cis-6-O-coumaroyl)-glucoside	27	27	639	331
二甲花翠素 - 3 - O - 反式 6 - O - 香豆酰化) - 葡萄糖苷 Malvidin-3-O-(trans-6-O-coumaroyl)-glucoside	29	29	639	331
花翠素 - 3,5 - 双葡萄糖苷 Delphinidin-3,5-O-diglucoside	1		627	465, 303
花青素 - 3,5 - 双葡萄糖苷 Cyanidin-3,5-O-diglucoside	2		611	449, 287
甲基花翠素 - 3,5 - 双葡萄糖苷 Petunidin-3,5-O-diglucoside	3		641	479, 317
甲基花青素 - 3,5 - 双葡萄糖苷 Peonidin-3,5-O-diglucoside	5		625	463, 301
二甲花翠素 - 3,5 - 双葡萄糖苷 Malvidin-3,5-O-diglucoside	6		655	493, 331
甲基花翠素 - 3 - O - (6 - O - 乙酰化) - 5 - 双葡萄糖苷 Petunidin-3-O-(6-O-acetyl)-glucoside-5-glucoside	9		683	641, 479, 317
花翠素 - 3 - O - (6 - O - 香豆酰化) - 5 - 双葡萄糖苷 Delphinidin-3-O-(6-O-coumaroyl)-glucoside-5-glucoside	14		773	611, 465, 303
甲基花翠素 - 3 - O - (6 - O - 香豆酰化) - 5 - 双葡萄糖苷 Petunidin-3-O-(6-O-coumaroyl)-glucoside-5-glucoside	15		787	625, 479, 317
花翠素 - 3 - O - (顺式 - 6 - O - 香豆酰化) - 葡萄糖苷 Delphinidin-3-O-(cis-6-O-coumaroyl)-glucoside	18		611	303
二甲花翠素 - 3 - O - (顺式 - 6 - O - 香豆酰化) - 5 - 双葡萄糖苷 Malvidin-3-O-(cis-6-O-coumaroyl)-glucoside-5-glucoside	19		801	639, 493, 331
甲基花青素 - 3 - O - (6 - O - 香豆酰化) - 5 - 双葡萄糖苷 Peonidin-3-O-(6-O-coumaroyl)-glucoside-5-glucoside	22		771	609, 463, 331
二甲花翠素 - 3 - O - (反式 - 6 - O - 香豆酰化) - 5 - 双葡萄糖苷 Malvidin-3-O-(trans-6-O-coumaroyl)-glucoside-5-glucoside	23		801	639, 493, 331
花青素 - 3 - O - 葡萄糖苷 Cyanidin-3-O-glucoside		7	449	287
花翠素 - 3 - O - (6 - O - 乙酰化) - 葡萄糖苷 Delphinidin-3-O-(6-O-acetyl)-glucoside		12	507	303
甲基花青素 - 3 - O - (6 - O - 乙酰化) - 葡萄糖苷 Peonidin-3-O-(6-O-acetyl)-glucoside		13	505	301
花青素 - 3 - O - (6 - O - 乙酰化) - 葡萄糖苷 Cyanidin-3-O-(6-O-acetyl)-glucoside		16	491	287
甲基花翠素 - 3 - O - (顺式 - 6 - O - 香豆酰化) - 葡萄糖苷 Petunidin-3-O-(cis-6-O-coumaroyl)-glucoside		26	609	301
甲基花翠素 - 3 - O - (反式 6 - O - 香豆酰化) - 葡萄糖苷 Petunidin-3-O-(trans-6-O-coumaroyl) glucoside		28	609	301

2.3 不同发育期 ‘NW196’ 花色苷含量与比例变化

利用不同发育期 ‘NW196’ 与 ‘赤霞珠’ 葡萄果皮中检测到的花色苷进行主成分分析 (Principal component analysis, PCA), 可以看出, 主成分 1 (PC1) 解释了总变量的 62.37%, 主成分 2 (PC2) 解释了总变量的 24.61%。花后 8 周的 ‘NW196’ 和 ‘赤霞珠’ 聚在一起, 而成熟后期 (花后 10~14 周) ‘NW196’ 聚集在一起, 可与 ‘赤霞珠’ 明显区分开 (图 1, a)。花后 10~12 周的 ‘NW196’ 全部位于 X 轴正半轴, 说明其花色苷含量较高。载荷图 (图 1, b) 中花色苷所处位置对应成分图 (图 1, a) 中样品位置。

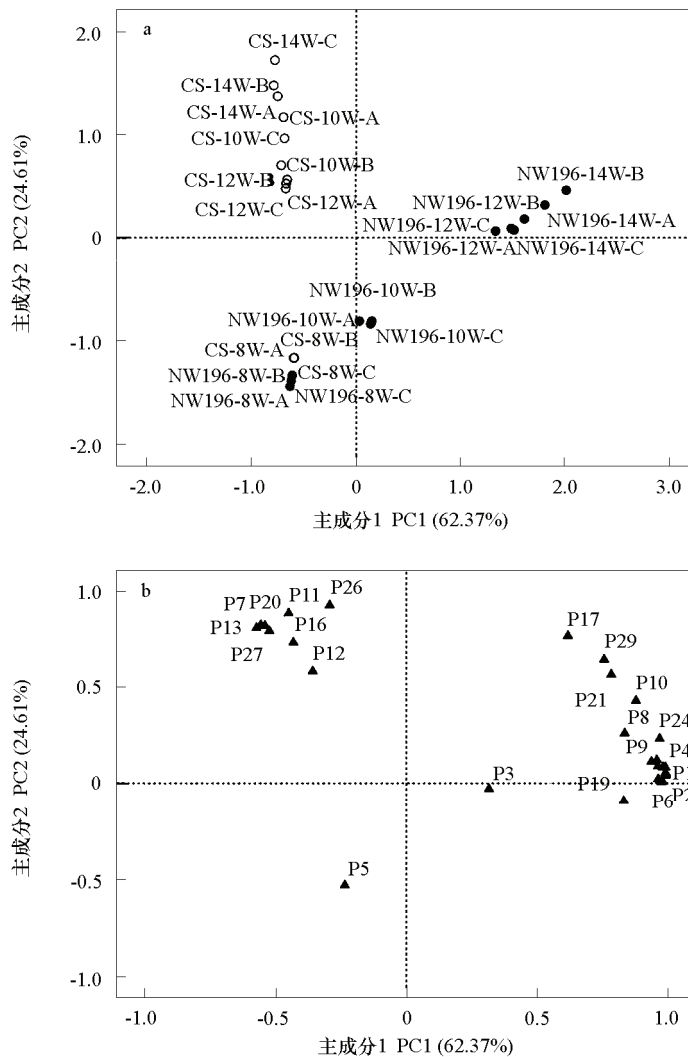


图 1 不同发育期 ‘NW196’ 和 ‘赤霞珠’ (CS) 葡萄果皮中花色苷主成分分析

a: 成分图 [浆果发育期表示为 8、10、12 和 14 周 (W); A、B、C 表示 3 个生物学重复];

b: 载荷图 (图中 P 后数字对应表 1 中两个品种果皮中检测到的花色苷峰号)。

Fig. 1 PCA of anthocyanin compounds in the berry skin of ‘NW196’ and ‘Cabernet Sauvignon’ grapes during different developmental stages

a: Score plot [8, 10, 12 and 14 weeks (W) represent the berry development; A, B, C mean three biological repeats];

b: Loading plot (P+ number correspond the anthocyanin peak detected in Table 1).

双糖苷及其酰化衍生物 P1、P2、P3、P6、P9、P19 是 ‘NW196’ 葡萄果皮中的特征物质，且采收期 ‘NW196’ 葡萄果皮中的花色苷总量 ($\mu\text{g} \cdot \text{berry}^{-1}$) 高于同期 ‘赤霞珠’。在两个品种共有的 11 种花色苷中，‘NW196’ 果皮中的甲基花翠素 - 3 - O - 葡萄糖苷 (P8)、甲基花青素 - 3 - O - 葡萄糖苷 (P10)、甲基花翠素 - 3 - O - (6 - O - 乙酰化) - 葡萄糖苷 (P17)、二甲花翠素 - 3 - O - (6 - O - 乙酰化) - 葡萄糖苷 (P21) 和花青素 - 3 - O - (6 - O - 香豆酰化) - 葡萄糖苷 (P24) 含量高于 ‘赤霞珠’ (图 1, b)。

在 ‘NW196’ 果皮中共检测到 23 种花色苷单糖苷。图 2 中每种颜色代表花色苷含量经过数据归一化的结果。可以看出，花翠素 - 3 - O - 葡萄糖苷 (P4) 是成熟期葡萄果皮中含量最高的花色苷，其次是甲基花青素 - 3 - O - 葡萄糖苷 (P10) 和二甲花翠素 - 3 - O - (6 - O - 乙酰化) - 葡萄糖苷 (P21)。另外，甲基花翠素 - 3,5 - 双葡萄糖苷 (P3) 和甲基花青素 - 3,5 - 双葡萄糖苷 (P5) 在 ‘NW196’ 成熟后期的果皮中仅检测到痕量。花翠素 - 3 - O - (6 - O - 香豆酰化) - 5 - 双葡萄糖苷 (P14)、二甲花翠素 - 3 - O - (顺式 - 6 - O - 香豆酰化) - 5 - 双葡萄糖苷 (P19) 和甲基花青素 - 3 - O - (6 - O - 香豆酰化) - 5 - 双葡萄糖苷 (P22) 的含量也在整个发育期处于极低水平。

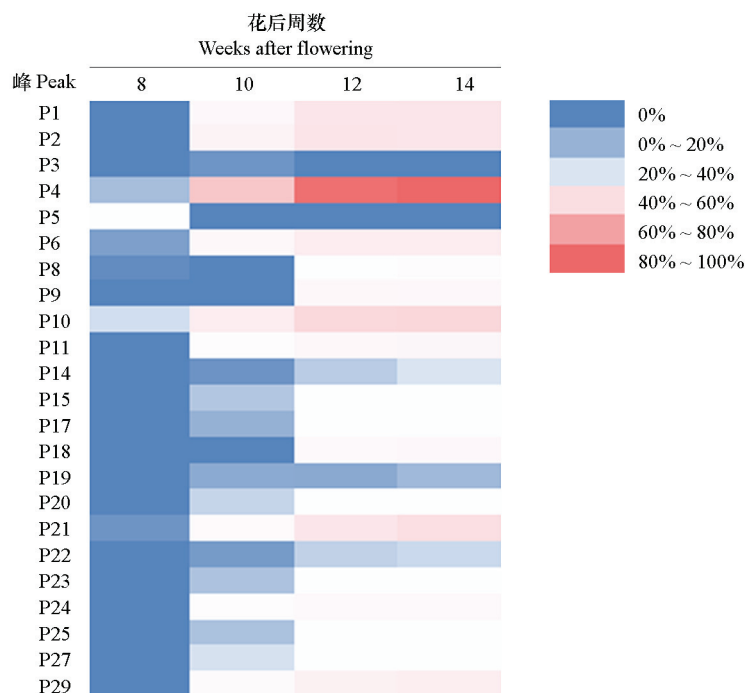


图 2 不同发育期 ‘NW196’ 葡萄果皮中各类花色苷含量分析
 所有数据画图前进行均一化处理。

Fig. 2 Analysis of concent of each anthocyanins in grape skins of ‘NW196’ during different developmental stages
 Data homogenization processing before plotting.

转色开始 (花后 8 周) 直至采收期 (花后 14 周), ‘NW196’ 和 ‘赤霞珠’ 葡萄果皮花色苷总量以及各修饰类型花色苷占总量的比值如表 3 所示。除了花后 10 周以外, ‘NW196’ 果皮中花色苷总量显著高于同期 ‘赤霞珠’。‘赤霞珠’ 葡萄果皮中未检测到双糖苷, 仅检测到单糖苷, ‘NW196’ 果皮中双糖苷比例随发育期呈降低趋势, 单糖苷比例则逐渐升高。‘NW196’ 中 3’5’ - 羟基取代花色苷比例随发育期逐渐升高, 而 ‘赤霞珠’ 中该比例在花后 12 周时达到最大值, 随后又降低。除了

采收期以外, ‘NW196’ 中 3’5’-羟基取代花色苷比例显著低于 ‘赤霞珠’, 而前者 3’-羟基取代花色苷比例显著高于同期 ‘赤霞珠’。‘NW196’ 果皮中乙酰化与香豆酰化花色苷比例随发育期逐渐升高, 但始终显著低于同期 ‘赤霞珠’ (花后 12 周两个品种乙酰化花色苷除外)。另外, ‘NW196’ 中甲基化花色苷比例显著低于同期 ‘赤霞珠’。

表 3 ‘NW196’ 与 ‘赤霞珠’ 葡萄果皮中不同修饰类型花色苷所占比例 (%) 与花色苷总含量 ($\mu\text{g} \cdot \text{berry}^{-1}$) 变化
Table 3 Total anthocyanin content ($\mu\text{g} \cdot \text{berry}^{-1}$) and the proportion (%) of different modified anthocyanins in berry skins of ‘NW196’ and ‘Cabernet Sauvignon’ during different developmental stages

花后周数 Weeks after flowering	品种 Cultivar	双糖苷/% Diglucoside	单糖苷/% Monoglucoside	3’5’-取代/% 3’5’-substituent	3’-取代/% 3’-substituent	未酰化/% Non-acylated
8	NW196	57.32 ± 0.19 a	42.68 ± 0.19 b	27.91 ± 0.18 b	72.09 ± 0.18 a	96.37 ± 3.51 a
	赤霞珠 Cabernet Sauvignon	0 b	100.00 ± 0.00 a	45.11 ± 0.83 a	54.89 ± 0.83 b	45.11 ± 0.83 b
10	NW196	25.89 ± 0.68a	74.11 ± 0.68 b	73.67 ± 0.82 a	26.33 ± 0.82 a	86.34 ± 0.91 a
	赤霞珠 Cabernet Sauvignon	0 b	100.00 ± 0.00 a	75.90 ± 0.11 a	24.10 ± 0.11 b	52.28 ± 0.86 b
12	NW196	25.93 ± 3.27a	74.07 ± 3.27 b	79.47 ± 2.83 b	20.53 ± 2.83 a	77.81 ± 2.85 a
	赤霞珠 Cabernet Sauvignon	0 b	100.00 ± 0.00 a	83.02 ± 0.18 a	16.94 ± 0.18 b	49.20 ± 0.24 b
14	NW196	24.08 ± 2.46a	75.92 ± 2.46 b	80.00 ± 0.96 a	20.00 ± 0.96 a	76.27 ± 1.33 a
	赤霞珠 Cabernet Sauvignon	0 b	100.00 ± 0.00 a	80.58 ± 0.47 a	19.42 ± 0.47 a	48.17 ± 0.20 b

花后周数 Weeks after flowering	品种 Cultivar	乙酰化/% Acetylated	香豆酰化/% Coumaroylated	未甲基化/% Non-methylated	甲基化/% Methylated	总量/ Total content ($\mu\text{g} \cdot \text{berry}^{-1}$)
8	NW196	3.63 ± 0.51 b	0 a	14.23 ± 0.38a	85.77 ± 0.38 b	9.63 ± 0.27 a
	赤霞珠 Cabernet Sauvignon	54.89 ± 0.83 a	0 a	0 b	100.00 ± 0.00 a	2.19 ± 0.07 b
10	NW196	4.44 ± 0.46 b	9.22 ± 0.45 b	64.70 ± 0.32 a	35.30 ± 0.32 b	584.01 ± 17.15 b
	赤霞珠 Cabernet Sauvignon	15.33 ± 0.36 a	32.39 ± 0.59 a	43.78 ± 0.91 b	56.22 ± 0.91 a	811.47 ± 43.22 a
12	NW196	9.81 ± 1.46 a	12.38 ± 1.43 b	62.34 ± 0.21 a	37.66 ± 0.21 b	1 644.30 ± 86.29 a
	赤霞珠 Cabernet Sauvignon	9.61 ± 0.15 a	41.15 ± 0.09 a	40.59 ± 0.20 b	59.41 ± 0.20 a	791.56 ± 6.84 b
14	NW196	10.71 ± 0.98 b	13.02 ± 0.48 b	61.67 ± 1.53 a	38.33 ± 1.53 b	1 761.25 ± 40.68 a
	赤霞珠 Cabernet Sauvignon	12.54 ± 0.20 a	39.29 ± 0.02 a	42.35 ± 0.14 b	57.65 ± 0.14 a	1 124.71 ± 29.97 b

注: 不同小写字母表示同一发育期两个品种间差异达显著性水平 ($P < 0.05$)。

Note: Different small letter between cultivars indicate significant differences at 5% level.

2.4 不同发育期花色苷合成相关基因相对表达量变化

类黄酮-3’-羟化酶 (Flavonoid 3’-hydroxylase, F3’H) 和类黄酮-3’5’-羟化酶 (Flavonoid 3’5’-hydroxylase, F3’5’H) 羟化柚皮素的 B 环走向类黄酮代谢的两条分支路径, 最终合成 3’-羟基取代花色苷 (花青素类) 和 3’5’-羟基取代花色苷 (花翠素类)。实时定量 PCR 分析结果 (图 3) 表明, ‘NW196’ 果皮中, 花后 8 周至 14 周, $VvF3’5’H$ 的表达量显著低于 ‘赤霞珠’; 除了花后 8 周外, $VvF3’H$ 的表达量显著高于同期 ‘赤霞珠’; $VvF3’5’H$ 和 $VvF3’H$ 的表达水平在整个成熟过程中呈先升高后降低趋势, 在花后 10 周达到最大值。黄酮醇还原酶 (Dihydroflavonol 4-reductase, DFR) 催化二氢黄酮醇生成相应的无色花色素。花后 8、10 和 12 周, 两个品种果皮中 $VvDFR$ 的表达量没有显著差异, 但花后 14 周时, ‘NW196’ 显著低于 ‘赤霞珠’。无色花色素除了用来合成花色苷, 也能通过无色花色素还原酶 (Leucoanthocyanidinreductase, LAR) 催化合成 (2R,3S) - 反式 - 黄烷-3-醇, 它可参与原花色素的聚合 (Bogs et al., 2005)。花后 12 周时, ‘NW196’ 果皮中 $VvLAR1$ 和 $VvLAR2$ 表达量显著高于 ‘赤霞珠’, 而其他发育期两个品种间差异不显著。无色花色素不仅仅是合成花色苷的底物, 也可由花色素还原酶 (Anthocyanidinreductase, ANR) 催化合成 (2R,3S) - 反式 - 黄烷-3-醇, 它是合成原花色素的重要单元 (Fujita et al., 2005)。花后 8~14 周, ‘NW196’ 和 ‘赤霞珠’ 果皮中 $VvANR$ 的表达量无显著性差异。

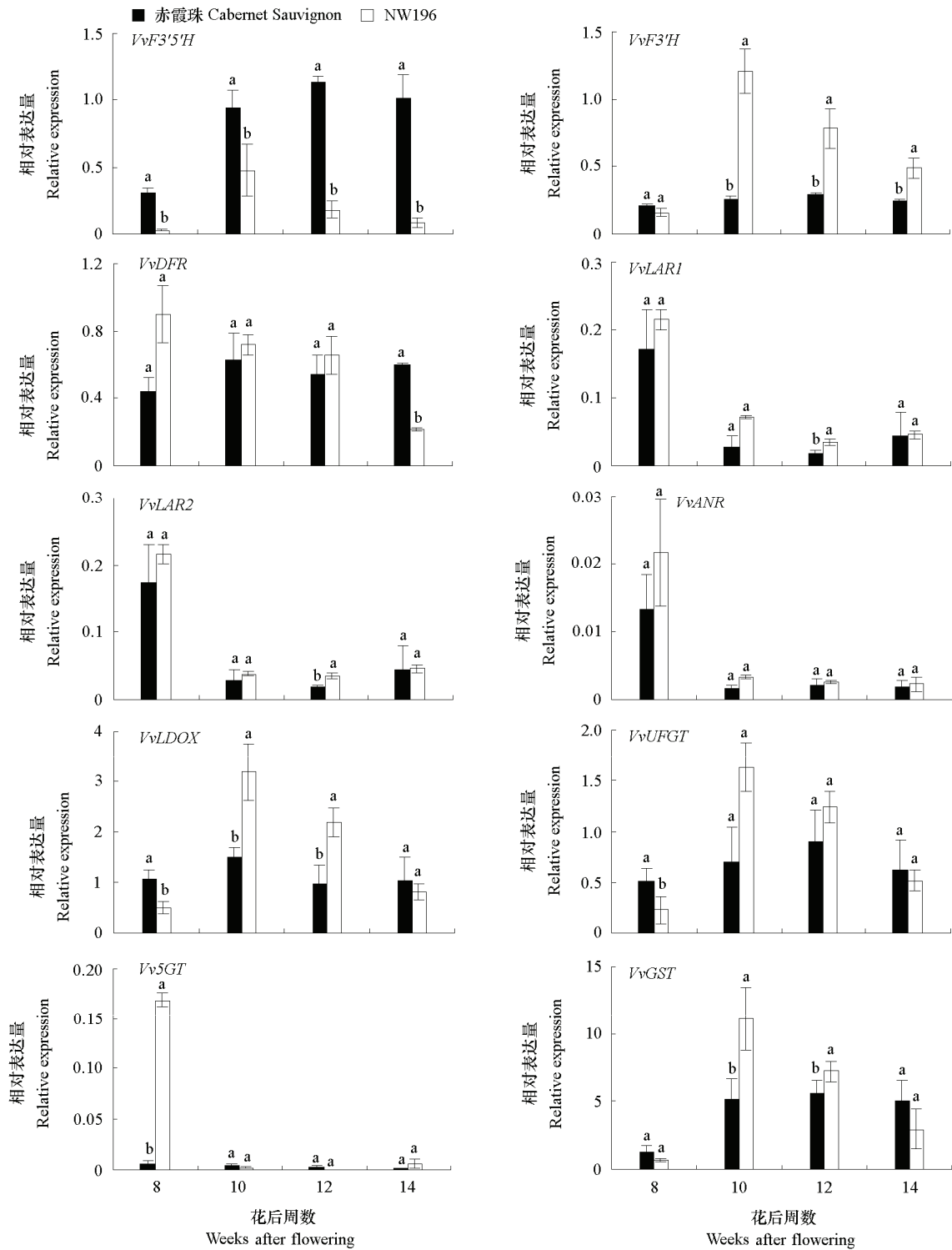


图3 不同发育期两个品种葡萄果皮中花色苷合成相关基因的相对表达量

不同小写字母表示同一发育期两个品种果皮中该基因的表达量差异达到显著性水平 ($P < 0.05$)。

Fig. 3 Relative expression levels of genes in the anthocyanin pathway in grape skins of two cultivars during different developmental stages

Different small letter between cultivars indicate significant differences of genes expression levels at 5% level.

无色花色苷经由无色花色苷双加氧酶 (Leucoanthocyanidin dioxygenase, LDOX) 催化合成花色苷。*VvLDOX* 的表达量随发育期在两个葡萄品种中呈先升高后降低的趋势。花后 10 周和 12 周, ‘NW196’果皮中 *VvLDOX* 表达量显著高于‘赤霞珠’。

葡萄糖基转移酶 (UDP glucose-flavonoid 3-*O*-glucosyl transferase, UFGT), 催化花色苷与糖基的连接。欧亚种中的 UFGT 也被简称为 3-*O*-glucosyltransferase (3-GT)。花后 8 周, ‘NW196’果皮中 *VvUFGT* 表达量显著低于‘赤霞珠’, 而花后 10 周后两个品种无显著差异。

在多数非欧亚种葡萄或它们的杂交品种中, 糖基化会发生在 C3 和 C5 位 (5-*O*-glucosyltransferase, 5-GT) 形成花色苷双糖苷。花后 8 周, ‘NW196’果皮中 *Vv5GT* 的表达量显著高于‘赤霞珠’, 但在其他发育期二者之间没有显著差异, 且均处于极低水平。

花色苷合成后是通过谷胱甘肽 *S*-转移酶 (Glutathione *S*-transferase, GST) 转运到液泡中的 (Alfenito et al., 1998)。花后 10 周和 12 周, ‘NW196’果皮中 *VvGST* 的表达量显著高于‘赤霞珠’, 而花后 8 周和 14 周两个品种无显著差异。

3 讨论

不同品种葡萄果皮的花色苷组成和含量差异很大, 主要由其遗传背景决定。因此花色苷组分经常用来鉴别不同品种的葡萄及葡萄酒 (Liang et al., 2008; 赵权 等, 2010; 韩梅梅 等, 2014; 孙磊 等, 2015)。欧亚种葡萄仅含有花色苷单糖苷 (García-Beneytez et al., 2003; Liang et al., 2008; Oh et al., 2008), 而美洲种和圆叶葡萄不仅含有单糖苷也含有双糖苷 (Liang et al., 2008; Huang et al., 2009)。*‘NW196’* 是野生毛葡萄和欧亚种酿酒葡萄品种‘粉红玫瑰’的杂交后代 (吴莹 等, 2010)。因此, 在果皮中均检测到了花色苷的双糖苷和单糖苷。本研究结果表明, 转色初期‘NW196’果皮中花色苷双糖苷比例最高, 以后随发育期降低。这说明, 转色初期是双糖苷大量合成的阶段, 这一结果也与 *Vv5GT* 在整个发育期的表达规律相吻合。*‘NW196’* 果皮中含量最高的花色苷是花翠素-3-*O*-葡萄糖苷, 且其含量随发育期逐渐增加。这代表了‘NW196’的品种特征, 对于其生物学性状的描述具有重要意义。

类黄酮-3'-羟化酶 (F3'H) 和类黄酮-3'5'-羟化酶 (F3'5'H) 是类黄酮代谢路径上与花青素类和花翠素类花色苷合成相关的两类羟基化酶 (Castellarin et al., 2007)。3'5'-羟基取代花色苷包括花翠素、甲基花翠素、二甲花翠素以及它们的衍生物; 3'-羟基取代花色苷包括花青素、甲基花青素以及它们的衍生物 (Matsuyama et al., 2014)。葡萄果皮中的花翠素类 (3'5'-羟基取代) 花色苷含量越高, 将会使果实蓝紫色色调更强, 而花青素类 (3'-羟基取代) 使葡萄果皮呈现紫红色 (He & Giusti, 2010; Matsuyama et al., 2014)。本研究中, 成熟阶段‘NW196’与‘赤霞珠’葡萄果皮中 3'5'-羟基取代花色苷为主要类型, 并且在采收期两个品种中该类花色苷比例无显著差异。然而基因表达的结果表明, ‘NW196’葡萄果皮中 *VvF3'5'H* 表达水平低于 *VvF3'H*。F3'H 和 F3'5'H 羟化柚皮素的 B 环走向类黄酮代谢的两条分支路径, 不仅走向合成不同修饰方式的花色苷, 也在 FLS、LAR 和 ANS 的催化下生成不同类型的黄酮醇和黄烷-3-醇。因此, 羟基取代花色苷含量与 *VvF3'5'H* 和 *VvF3'H* 基因表达的结果不一致。二甲花翠素-3-*O*-葡萄糖苷是欧亚种葡萄果皮中含量最高的一类花色苷 (Jin et al., 2009; Dimitrovska et al., 2011), 而‘NW196’葡萄果皮中含量最高的是甲基花青素-3,5-*O*-双葡萄糖苷, 且其含量随发育期变化逐渐增加。另外, ‘NW196’葡萄果皮中 3'5'-羟基取代花色苷比例大多低于同期‘赤霞珠’。*‘NW196’* 葡萄果皮中 *VvF3'H* 表达

水平高于 *VvF3'5'H*, 且在整个发育期 *VvF3'H* 的表达水平显著低于 '赤霞珠'。这与花青素类 (3'-羟基取代) 和花翠素类 (3'5'-羟基取代) 花色苷在 'NW196' 葡萄果皮中的积累规律相对应。

葡萄果实中花色苷的酰化方式主要有乙酰化、香豆酰化和咖啡酰化, 花色苷经酰基化修饰后可增加其在酸性和中性条件下的稳定性 (何建军, 2010)。「NW196」果皮中酰化花色苷的比例低于 '赤霞珠'。「NW196」果皮中含量最高的前两种花色苷均为未酰化修饰的单糖苷, 分别是花翠素-3-O-葡萄糖苷和甲基花青素-3-O-葡萄糖苷。类黄酮结构骨架中 B 环经过甲基化取代会降低酚羟基的化学活性, 在结构上更加稳定, 甲基化花色苷主要包括甲基花青素、甲基花翠素和二甲基花翠素的葡萄糖苷 (Kim et al., 2006)。在整个发育阶段, 「NW196」葡萄果皮中甲基化花色苷的比例显著低于 '赤霞珠'。这说明从花色苷酰化和甲基化修饰的角度来说, 「NW196」的颜色稳定性弱于 '赤霞珠'。通过调节成熟期果实的曝光程度能够改变葡萄果皮中酰化和甲基化花色苷的比例 (Tarara et al., 2008; 成果, 2015), 这对于今后从改变果际微气候的角度研究如何提升 'NW196」果皮中酰化和甲基化花色苷比例, 进而提高其颜色稳定性具有指导意义。

对于红色葡萄品种, 花色苷随果实成熟在果皮中积累, 也有些品种在其果肉中也含有花色苷 (Burns et al., 2002)。花色苷经由类黄酮代谢路径合成, 之后还会发生进一步的糖基化、甲基化和酰基化等修饰作用。在葡萄果实细胞中, 内质网膜或细胞质是花色苷合成的场所, 之后运输至液泡中累积 (Chen et al., 2006)。在本研究中, 「NW196」葡萄果实自花后 8 周开始转色, 标志其进入成熟阶段, 虽然成熟阶段「NW196」果皮质量低于 '赤霞珠', 但果皮花色苷含量显著高于后者。*VvUFGT* 和 *Vv5GT* 在「NW196」和 '赤霞珠」葡萄果皮中均有表达, 但 *Vv5GT* 在后者中的表达维持在极低水平。花后 10 周和 12 周, 「NW196」葡萄果皮中 *VvLDOX* 和 *VvGST* 的表达量显著高于 '赤霞珠', 这与成熟后期「NW196」果皮中花色苷的含量高于 '赤霞珠」的结果一致。

本研究中利用 HPLC-UV-MS 技术分析了不同发育期「NW196」葡萄果皮花色苷的组成, 并与欧亚种 '赤霞珠」进行对比, 并从花色苷组成特点、含量变化、修饰类型以及基因表达规律等方面进行了综合评价。成熟期「NW196」葡萄果皮中共检测到 23 种花色苷, 成熟后期单糖苷所占比例高于双糖苷, 其中含量最高的是花翠素-3-O-单葡萄糖苷, 花翠素类花色苷比例高于花青素类。与欧亚种 '赤霞珠」相比, 「NW196」果皮中酰化和甲基化花色苷比例较低。毛欧杂种「NW196」花色苷组成与欧亚种 '赤霞珠」差异明显, 这是其受到类黄酮代谢路径相关基因的调控的结果; 此外, 花色苷双糖苷主要在转色初期进行合成。

MYB 蛋白参与植物体内许多次生代谢路径、信号转导和抗病的调控过程 (Allan et al., 2008)。绝大多数 MYB 家族转录因子对类黄酮物质的合成相关的结构基因起到正调控作用, 葡萄果实中的花色苷合成受到 *VvMYBA1* 和 *VvMYBA2* 的调控 (Jaakola, 2013)。不同种类的 MYB 家族转录因子对花色苷合成的调节作用受到环境因素的影响 (Azuma et al., 2012)。本文中分析了「NW196」花色苷组成特点, 并阐明了其与相关结构基因的关系, 然而转录因子对结构基因的调控作用还需进一步研究。这对完善该品种在以广西为代表的高温高湿产区酿酒品质的评价具有重要意义。

References

- Alfenito M R, Souer E, Goodman C D, Buell R, Mol J, Koes R, Walbot V. 1998. Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases. *The Plant Cell*, 10: 1135 - 1149.
- Allan A C, Hellens R P, Laing W A. 2008. MYB transcription factors that colour our fruit. *Trends in Plant Science*, 13 (3): 99 - 102.
- Azuma A, Yakushiji H, Koshita Y, Kobayashi S. 2012. Flavonoid biosynthesis-related genes in grape skin are differentially regulated by temperature

- and light conditions. *Planta*, 236 (4): 1067 - 1080.
- Bogs J, Downey M O, Harvey J S, Ashton A R, Tanner G J, Robinson S P. 2005. Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. *Plant Physiology*, 139: 652 - 663.
- Boss P K, Davis C, Robinson S P. 1996. Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiology*, 111 (4): 1059 - 1066.
- Burns J, Mullen W, Landrault N, Teissedre P, Lean M E J, Crozie A. 2002. Variations in the profile and content of anthocyanins in wines made from Cabernet Sauvignon and hybrid grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (14): 4096 - 4102.
- Castellarin S D, Pfeiffer A, Sivilotti P, Degan M, Peterlunger E, Di Gasparo G. 2007. Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit. *Plant Cell and Environment*, 30 (11): 1381 - 1399.
- Chen J Y, Wen P F, Kong W F, Pan Q H, Wan S B, Huang W D. 2006. Changes and subcellular localizations of the enzymes involved in phenylpropanoid metabolism during grape berry development. *Journal of Plant Physiology*, 163: 115 - 127.
- Cheng Guo. 2015. The Research on anthocyanin biosynthesis in ‘Cabernet Sauvignon’ berries regulated by microenvironment [Ph. D. Dissertation]. Yangling: Northwest Agriculture and Forestry University. (in Chinese).
- 成果. 2015. 微环境调控‘赤霞珠’葡萄果实花色苷代谢的研究 [博士论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Dimitrovska M, Bocevska M, Dimitrovski D, Murkovic, M. 2011. Anthocyanin composition of Vranec, Cabernet Sauvignon, Merlot and Pinot Noir grapes as indicator of their varietal differentiation. *European Food Research and Technology*, 232 (4): 591 - 600.
- Fujita A, Soma N, Goto-Yamamoto N, Shindo H, Kakuta T, Koizumi T, Hashizume K. 2005. Anthocyanidin reductase gene expression and accumulation of flavan-3-ols in grape berry. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56: 336 - 342.
- García-Beneytez E, Cabello F, Revilla E. 2003. Analysis of grape and wine anthocyanins by HPLC - MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 5622 - 5629.
- Guan Jing-xi, Xie Tai-li, Yang Ying, Wen Ren-de, Tao Wei, Xiao Zhan-hai. 2014. Study on the deacidification of *Vitis quinquangularis* NW196 dry wine. *Liquor-Making Science & Technology*, (3): 41 - 43. (in Chinese)
- 管敬喜, 谢太理, 杨莹, 文仁德, 陶伟, 肖战海. 2014. NW196 毛葡萄干酒降酸工艺的研究. *酿酒科技*, (3): 41 - 43.
- Han Mei-mei, Yang Xiao-fan, Wang Jun, Pan Qiu-hong. 2014. Comparison of anthocyanins in berry skins among grapevine clones. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 35 (3): 425 - 432. (in Chinese)
- 韩梅梅, 杨晓帆, 王军, 潘秋红. 2014. 葡萄品系间果实花色苷的比较研究. *热带作物学报*, 35 (3): 425 - 432.
- Hausmann L, Neumann K, Eibach R, Zyprian E, Töpfer R. 2006. Development of a molecular marker for an anthocyanin 5-O-glucosyltransferase homologous gene of *Vitis* ssp. correlated with anthocyanin 3,5-diglucoside formation in berry skin. *International Conference on Grape Genetics and Breeding*, 827: 457 - 460.
- He J, Giusti M M. 2010. Anthocyanins: natural colorants with health promoting properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, (1): 163 - 187.
- He Jian-jun. 2010. Analysis on factors of affecting anthocyanin modification in wine grapes (*Vitis vinifera* L.) [Ph. D. Dissertation]. Beijing: China Agricultural University. (in Chinese)
- 何建军. 2010. 影响酿酒葡萄果实中花色苷结构修饰的因素分析 [博士论文]. 北京: 中国农业大学.
- Huang Hong-hui, Peng Hong-xiang, Zhou Xi-sheng, Pan Rong-shan, Su Xiang-dong, Wang Pei-hong, Huang Jiang-liu. 2007. Comparison of grape wine produced by first-crop NW196 grape and by second-crop NW196 grape. *Liquor-Making Science & Technology*, (6): 21 - 23. (in Chinese)
- 黄宏慧, 彭宏祥, 周锡生, 潘荣善, 苏向东, 王佩红, 黄江流. 2007. 两性花毛葡萄改良新品种 NW196 两茬果酿酒对比试验. *酿酒科技*, (6): 21 - 23.
- Huang Z, Wang B, Williams P, Pace R D. 2009. Identification of anthocyanins in muscadine grapes with HPLC - ESI - MS. *LWT-Food Science and Technology*, 42 (4): 819 - 824.
- Jaakola L. 2013. New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. *Trends in Plant Science*, 18 (9): 477 - 483.
- Jánváry L, Hoffmann T, Pfeiffer J, Hausmann L, Töpfer R, Fischer T C, Schwab W. 2009. A double mutation in the anthocyanin 5-O-glucosyltransferase gene disrupts enzymatic activity in *Vitis vinifera* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (9): 3512 - 3518.

- Jin Z M, He J J, Bi H Q, Cui X Y, Duan C Q. 2009. Phenolic compound profiles in berry skins from nine red wine grape cultivars in northwest China. *Molecules*, 14 (12): 4922 - 4935.
- Kim B G, Lee H J, Park Y, Lim Y, Ahn J H. 2006. Characterization of an *O*-methyltransferase from soybean. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44 (4): 236 - 241.
- Liang Z, Wu B, Fan P, Yang C, Duan W, Zheng X, Liu C, Li S. 2008. Anthocyanin composition and content in grape berry skin in *Vitis* germplasm. *Food Chemistry*, 111 (4): 837 - 844.
- Matsuyama S, Tanzawa F, Kobayashi H. 2014. Leaf removal accelerated accumulation of delphinidin-based anthocyanins in ‘Muscat Bailey A’ [*Vitis* × *labruscana* (Bailey) and *Vitis vinifera* (Muscat Hamburg)] grape skin. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 83 (1): 17 - 22.
- Mattivi F, Guzzon R, Vrhovsek U, Stefanini M, Velasco R. 2006. Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (20): 7692 - 7702.
- Mazza G. 1995. Anthocyanins in grapes and grape products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35 (4): 341 - 371.
- Oh Y S, Lee J H, Yoon S H, Oh C H, Choi D S, Choe E, Jung M Y. 2008. Characterization and quantification of anthocyanins in grape juices obtained from the grapes cultivated in Korea by HPLC/DAD, HPLC/MS, and HPLC/MS/MS. *Journal of Food Science*, 73: 379 - 389.
- Ribéreau-Gayon P, Glories Y. 1986. Phenolics in grapes and wines//Proceedings of the 6th Australian Wine Industry Technical Conference. Australian Wine Industry Technical Conference Inc. Australian Industrial Publishers Adelaide: 247 - 256.
- Sun Lei, Fan Xiu-cai, Zhang Ying, Jiang Jian-fu, Sun Hai-sheng, Liu Chong-huai. 2015. Analysis of anthocyanin composition in berry skin of Chinese wild grape. *Journal of Fruit Science*, 32 (6): 1143 - 1151. (in Chinese)
- 孙磊, 樊秀彩, 张颖, 姜建福, 孙海生, 刘崇怀. 2015. 部分中国野生葡萄果皮花色苷组分分析. *果树学报*, 32 (6): 1143 - 1151.
- Tarara J M, Lee J, Spayd S E, Scagel C F. 2008. Berry temperature and solar radiation alter acylation, proportion, and concentration of anthocyanin in Merlot grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59 (3): 235 - 247.
- Wu Ying, Li Hua, Huang Hong-hui, Wang Hua. 2010. Determination of mono-phenols in wild *Vitis quinquangularis* wine in Guangxi Du’an. *Liquor-Making Science & Technology*, (7): 168 - 170. (in Chinese)
- 吴莹, 李华, 黄宏慧, 王华. 2010. 广西都安野生毛葡萄酒中单体酚的测定. *中国酿造*, (7): 168 - 170.
- Zhao Quan, Wang Jun, Duan Chang-qing. 2010. Changes in components and content of anthocyanin and non-anthocyanin phenolic compounds during fruit development of *Vitis amurensis* Rupr. *Plant Physiology Communications*, 46 (1): 80 - 86. (in Chinese)
- 赵权, 王军, 段长青. 2010. 山葡萄果实发育过程中花色苷和非花色苷酚成分及其含量的变化. *植物生理学通讯*, 46 (1): 80 - 86.
- Zhu L, Zhang Y, Lu J. 2012. Phenolic contents and compositions in skins of red wine grape cultivars among various genetic backgrounds and origins. *International Journal of Molecular Sciences*, 13 (3): 3492 - 3510.