

网络出版时间:2018-09-27 09:46

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2019.04.007

网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20180927.0945.014.html

# 不同颜色刺葡萄花色苷合成相关基因的表达分析

牛生洋<sup>1,2</sup>,郝峰鸽<sup>1</sup>,扈惠灵<sup>1</sup>,姜建福<sup>2</sup>,刘崇怀<sup>2</sup>,王 华<sup>3</sup>

(1 河南科技学院 食品学院,河南 新乡 453003;2 中国农业科学院 郑州果树研究所,河南 郑州 450009;

3 西北农林科技大学 葡萄酒学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】【目的】探索不同果皮颜色中国野生刺葡萄(*Vitis davidii*)花色苷合成相关基因的表达差异,为中国野生刺葡萄资源的利用奠定基础。【方法】以白色及黑色果实的中国野生刺葡萄、欧亚种葡萄‘白比诺’及‘黑比诺’为材料,利用 HPLC-ESI-MS/MS 分析不同发育期果皮中花色苷的组成及其含量,通过序列检测分析几种刺葡萄 *VvmybA1* 基因序列的不同,用实时荧光定量 PCR 检测花色苷合成相关结构基因表达的差异。【结果】锦葵色素葡萄糖苷(Malvidin 3-O-glucoside)仅在黑色果实转色后被检测到,其在中国野生刺葡萄黑色果实和‘黑比诺’中的含量分别为 0.12~7.14 mg/kg 与 4.90~180.79 mg/kg,其他花色苷如矢车菊素 3,5-O-双葡萄糖苷(Cyanidin 3-O-glucoside-5-O-glucosid)、飞燕草素 3-O-葡萄糖苷(Delphinidin 3-O-glucoside)、花葵素 3-O-葡萄糖苷(Pelargonidin 3-O-glucoside)、矮牵牛素 3-O-葡萄糖苷(Petunidin 3-O-glucosid)等在黑、白色葡萄果实不同发育期均能检测到,其含量为 0.01~49.28 mg/kg。*VvmybA1a* 等位基因在中国野生刺葡萄黑、白色果实中都存在,且序列与欧亚种一致;*VvmybA1c* 等位基因只在中国野生刺葡萄黑色果实中可检测到,与欧亚种相比其序列有 33 bp 的插入片段和 47 bp 的缺失片段。*MybA1* 基因只在黑色果实成熟期表达;合成花色苷的关键结构基因 *UFGT* 在供试葡萄各个时期均有表达,但其表达量在黑色果实成熟期显著高于白色果实;*F3'5'H*、*GST* 及 *OMT* 等结构基因也在黑色果实成熟期表达上调,而其他结构基因的表达则在中国野生刺葡萄和欧亚种之间表现出了较大差异。【结论】中国野生刺葡萄花色苷合成相关基因具有特殊结构,与欧亚种葡萄相比有明显差异。

【关键词】刺葡萄;花色苷;HPLC-ESI-MS/MS;*VvmybA1* 基因

【中图分类号】S663.101

【文献标志码】A

【文章编号】1671-9387(2019)04-0049-09

## Analysis on anthocyanin profiles and expressions of related biosynthesis structural genes in berry skin of *Vitis davidii*

NIU Shengyang<sup>1,2</sup>,HAO Fengge<sup>1</sup>,HU Huiling<sup>1</sup>,JIANG Jianfu<sup>2</sup>,

LIU Chonghuai<sup>2</sup>,WANG Hua<sup>3</sup>

(1 College of Food, Henan Institute of Science and Technology,Xinxiang,Henan 453003,China;

2 Zhengzhou Fruit Research Institute,Chinese Academy of Agricultural Sciences,Zhengzhou,Henan 450009,China;

3 College of Enology,Northwest Agriculture and Forestry University,Yangling,Shaanxi 712100,China)

**Abstract:** 【Objective】 This study investigated the differences in relative expression of anthocyanins biosynthesis structural genes between white skin berry and corresponding colored type of Chinese wild grape *V. davidii* to provide basis for its utilization in future. 【Method】 The compositions and contents of anthocyanins from four cultivars/lines including white skin berry and colored berry of *V. davidii*, ‘Pinot Blanc’ and ‘Pinot Noir’ of *V. vinifera* were analyzed by HPLC-ESI-MS/MS. The *MybA1* transcription factors

【收稿日期】 2018-01-29

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31772265);河南省科技计划项目(182102310642,182300410076,182102110050);河南科技学院博士启动基金项目(205010617005)

【作者简介】 牛生洋(1976—),男,甘肃张掖人,讲师,博士,主要从事葡萄生物技术研究。E-mail:niushengyang@163.com

【通信作者】 刘崇怀(1965—),男,陕西西安人,研究员,博士,主要从事葡萄种质资源研究。E-mail:liuchonghuai@caas.cn

regulating anthocyanin biosynthesis were detected, and the gene sequences of *MybA1* were cloned from different samples and compared to explore the relationships between *Vitis species*. The expressions of anthocyanins related biosynthesis structural genes were analyzed by real-time PCR. 【Result】 Only malvidin 3-*O*-glucoside was detected in color skin grapes during ripening stage, and the contents of colored *V. davidii* and ‘Pinot Noir’ were 0.12–7.14 mg/kg and 4.90–180.79 mg/kg, respectively. The contents of other anthocyanins (0.01–49.28 mg/kg), such as cyanidin 3-*O*-glucoside-5-*O*-glucosid, delphinidin 3-*O*-glucoside, pelargonidin 3-*O*-glucoside and petunidin 3-*O*-glucosid, were lower by several-fold to hundreds-fold compared to the colored grape varieties. Compared with *V. vinifera*, there were a 33 bp short insertion and a 47 bp gene fragment missing in the *VvmybA1c* allele of *V. davidii*. *MybA1* regulated anthocyanin accumulation in grape berry skin via *UFGT* gene expression. Colored berry skin had high levels of *MybA1* and *UFGT* genes expression at harvest stages compared with white berry skin. In addition, the levels of *F3'5'H*, *GST* and *OMT* genes expression were similar to *UFGT*. Other structure genes expressions were significantly different between *V. davidii* and *V. vinifera*. 【Conclusion】 There were significant differences identified in the sequences of *MybA1* between *V. vinifera* and *V. davidii*.

**Key words:** *Vitis davidii*; anthocyanins; HPLC-ESI-MS/MS; *VvmybA1* gene

刺葡萄(*V. davidii*)属于葡萄科葡萄属东亚种群,是原产于我国的一种野生种质资源,因其果粒大、抗性强、具有商品生产价值,在湖南怀化市、江西崇义县、福建福安市等地均有栽培<sup>[1]</sup>。原产中国的野生葡萄果皮颜色大多为黑色或者紫色,只有刺葡萄及毛葡萄的个别株系中发现了白色果实<sup>[2-3]</sup>。葡萄果皮颜色取决于果实花色苷的合成,人们普遍认为葡萄花色苷主要存在于成熟期有色果实果皮中,而白色果实中不含有花色苷<sup>[4]</sup>。白色果实中之所以不含有花色苷,是因为花色苷合成的关键基因 *UFGT* (UDP-glucose: flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase)不能正常表达,阻碍其最终合成花色苷,而造成这种差异的原因是由于白色葡萄转录因子基因 *MybA1* 的启动子区域被插入了一个 *Gret1* (grapevine retrotransposon 1)逆转座子,无法调节 *UFGT* 的表达<sup>[5]</sup>。*MybA1* 和 *UFGT* 基因表达异常是葡萄果实颜色变异的主要原因,这一结论在大量白色果实葡萄中被证实<sup>[6-8]</sup>。然而,在有些白葡萄果实中并未检测到 *VvmybA1a* 基因<sup>[9-10]</sup>,而且近年来不断有人在白色葡萄果实中检测到花色苷的存在<sup>[11-13]</sup>,这说明葡萄果实颜色差异并非仅仅只有 *VvmybA1* 基因差异一种原因,而且白色葡萄中也并非不含花色苷,这为葡萄果实颜色形成机制研究带来了新的问题。中国野生刺葡萄白色果实的发现,为探索葡萄果实颜色变异的研究提供了新材料。本试验以白色及黑色果实的中国野生刺葡萄为材料,以欧亚种‘黑比诺’及其白色突变品种‘白比诺’<sup>[14]</sup>为对照,分析不同颜色果实中的花色苷组分及其合成相关基因的

表达差异,研究刺葡萄果实颜色变异的原因,以期为刺葡萄种质资源的利用及育种提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 葡萄材料及样品采集

试验所用材料中国野生刺葡萄白色(D1)及黑色果实(D2)株系,对照欧亚种葡萄‘白比诺’(V1)及‘黑比诺’(V2)均采集于中国农业科学院郑州果树研究所国家葡萄种质资源圃。试验选择在盛花期后(days after anthesis, DAA)20 d 开始,采集葡萄果实并测其生长量,根据生长曲线,分别在花后 40, 60, 90, 100 和 120 d 5 个时期采集 D1、D2 的果实,在花后 40, 60, 80, 90 和 100 d 5 个时期采集对照 V1、V2 的果实,每次采集 30~50 粒(图 1),用自来水冲洗表面浮尘后以双蒸水清洗干净,再用无菌手术刀分离果皮,液氮速冻后于 -80 °C 冰箱保存备用。样品平行设置 3 个重复。

### 1.2 葡萄果皮花色苷提取

参考 Liang 等<sup>[12]</sup>的方法并略作改动。将不同时期葡萄果皮用液氮研磨成粉后,取 1 g 粉末于 10 mL 离心管中,加提取液(V(甲酸):V(超纯水):V(甲醇)=28:2:70)8 mL,锡箔纸包裹离心管,低温振荡 10 min 后 13 000 r/min 离心 10 min,收集上清液低温避光保存,沉淀中加入提取液重复上述操作 2 次,将 3 次重复的上清液于 30 °C 避光旋蒸后用 10 mL 甲醇定容,过 0.22 μm 滤膜后用于花色苷的质谱检测。

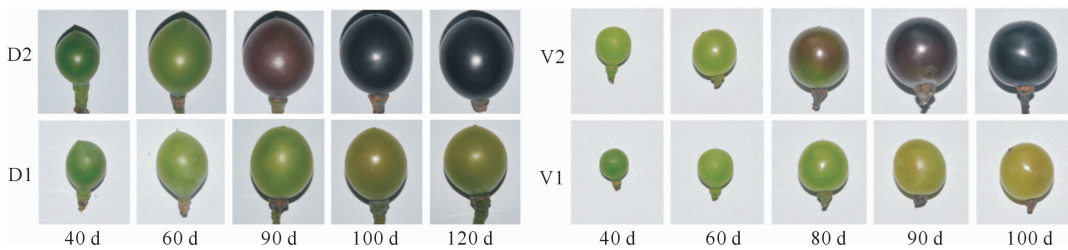


图 1 不同生长期中国野生刺葡萄 D1、D2 和对照 V1、V2 葡萄果实样品

Fig. 1 Samples of *V. davidii* D1,D2 and *V. vinifera* V1,V2 at different growth stages

1. 3 果皮花色苷的 HPLC-ESI-MS/MS 检测

试验所用标样如表 1 所示,所有标样均购自德国 Phytolab 公司。质谱检测在农业部果品苗木质量检验检测中心(郑州)完成。质谱仪为 Agilent 6460 B Triple Quad LC-MS/MS(QQQ),色谱柱为 ZORBAX SB-C18(2.1 mm×100 mm×1.8 μm),柱温为 30 ℃,流动相 A 为体积分数 0.1% 甲酸水溶液,流动相 B 为乙腈。梯度洗脱条件(A、B 相用量均为体积分数):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%。质谱条件为:进样量 5 μL,干燥气温度 350 ℃,干燥气流速 8 L/min,雾化气压力 0.275 MPa,鞘流气温度 350 ℃,鞘流气流速 10 L/min。检测方式采用 ESI(+)离子化模式。采用多反应检测 MRM(Multi Reaction Montior)系统进行定量检测,用 MassHunter 工作平台(Agilent, USA)收集数据。

表 1 花色苷标样及质谱结果

Table 1 Chromatography and mass spectrometry characteristics of anthocyanins

| 花色苷<br>Anthocyanins                                         | 缩写<br>Abbr. | 保留时间/min<br>Retention time | 分子离子<br>Molecular ions | 碎片离子<br>Fragment ions |
|-------------------------------------------------------------|-------------|----------------------------|------------------------|-----------------------|
| 矢车菊素<br>Cyanidin chloride                                   | Cy          | 2.544                      | 286.7                  | 286.2,136.6           |
| 矢车菊素 3-O-葡萄糖苷<br>Cyanidin 3-O-glucoside                     | CyG         | 2.050                      | 448.4                  | 286.2,447.9           |
| 矢车菊素 3,5-O-双葡萄糖苷<br>Cyanidin 3-O-glucoside-5-O-glucoside    | Cy2G        | 1.819                      | 610.3                  | 285.9,448.1           |
| 飞燕草素 3-O-葡萄糖苷<br>Delphinidin 3-O-glucoside                  | DpG         | 1.962                      | 464.5                  | 228.4,302.2           |
| 锦葵色素 3-O-葡萄糖苷<br>Malvidin 3-O-glucoside                     | MvG         | 2.257                      | 492.5                  | 330.3,491.7           |
| 花葵素 3-O-葡萄糖苷<br>Pelargonidin 3-O-glucoside                  | PgG         | 2.201                      | 432.4                  | 270.1,431.3           |
| 花葵素 3,5-O-双葡萄糖苷<br>Pelargonidin 3-O-glucoside-5-O-glucoside | Pg2G        | 1.932                      | 594.3                  | 270.3,432.7           |
| 芍药色素<br>Peonidin chloride                                   | Pn          | 2.805                      | 300.7                  | 257.1,285.6           |
| 矮牵牛色素 3-O-葡萄糖苷<br>Petunidin 3-O-glucoside                   | PtG         | 2.105                      | 478.4                  | 315.7,477.6           |

1. 4 刺葡萄 MybA1 基因型分析及编码区序列分析

取萌芽后的葡萄幼嫩叶片,用改良 CTAB 法<sup>[15]</sup>提取基因组 DNA,用 *VvmybA1a*、*VvmybA1b* 和 *VvmybA1c* 特征引物及编码区引物(表 2)检测刺葡萄 *MybA1* 基因型。PCR 反应体系 20 μL: 10 × Buffer 2.0 μL, dNTPs 2.0 μL, *Taq* 聚合酶 0.2 μL (TaKaRa 公司), 上、下游引物各 1.0 μL (10 mmol/L), 模板 2.0 μL (60 ng), 其余用双蒸水补齐; PCR 反应条件为:94 ℃ 预变性 3 min 后,94 ℃ 变性

40 s,62 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 1 min,30 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃ 保存。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测后,紫外分析仪扫描拍照。  
在紫外灯下将目标片段切割后,用胶回收试剂盒(TaKaRa 公司)回收,按照试剂盒操作说明书连接到 PMD-19 载体后转入 DH5α 感受态细胞,氨苄青霉素(Amp)筛选单克隆活化,菌液经 PCR 检测后测序。测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对,并利用 DNAMAN 序列分析软件进行序列比对分析。

表 2 测序及 qRT-PCR 所用引物序列及扩增片段的大小  
Table 2 Primers and sizes of amplicons in sequencing and qRT-PCR

| 基因名称<br>Gene name | 登录号<br>Accession number | 引物序列 (5'→3')<br>Sequence of primer                        | 产物长度/bp<br>Production size | 参考文献<br>Reference |
|-------------------|-------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------------|-------------------|
| <i>VvmybA1a</i>   | AB111101                | F:AAAAAGGGGGGCAATGTAGGGACCC<br>R:GAACCTCCTTTTGAAGTGGTGACT | 1 558                      | [4]               |
| <i>VvmybA1b</i>   | AB111101                | F:GGACGTTAAAAAATGGTGCACGTG<br>R:GAACCTCCTTTTGAAGTGGTGACT  | 1 034                      | [4]               |
| <i>VvmybA1c</i>   | AB111101                | F:GGACGTTAAAAAATGGTGCACGTG<br>R:GAACCTCCTTTTGAAGTGGTGACT  | 845                        | [4]               |
| <i>MybA1</i>      | AB242302                | F:ATGGAGAGCTTAGGAGTTAGAAAGGGT<br>R:TCAGATCAAGTGATTACTTGT  | 959                        | [4]               |
| <i>MybA1</i>      | AB427165                | F:GGCTTCTGGAGAGGTGCTTA<br>R:CTGTGTTGGGAAAATCCCA           | 149                        | [16]              |
| <i>UFGT</i>       | AF000372                | F:GGGATGGTAATGGCTGTGG<br>R:ACATGGGTGGAGAGTGAGTT           | 151                        | [17]              |
| <i>OMT</i>        | FJ460168                | F:GTTCAACTTCATGAGATGGA<br>R:GGAGAACTACCTCAACTACCA         | 163                        | [16]              |
| <i>GST</i>        | GU370062                | F:AAAAGTCATGGAGCTCGCTG<br>R:CAGCTTCCTTCACCAAGTAT          | 116                        | [16]              |
| <i>CHI</i>        | XM002280122             | F:TCCAGATCAAGTTCACAGCA<br>R:GAAATAAGAGCCTCAAAGAA          | 127                        | [17]              |
| <i>CHS</i>        | AB066275                | F:GAAGATGGGAATGGCTGCTG<br>R:AAGGCACAGGGACACAAAAG          | 131                        | [17]              |
| <i>LDOX</i>       | X75966                  | F:AGGGAAGGGAACAAGTAG<br>R:ACTCTTGGGGATTGACTGG             | 109                        | [17]              |
| <i>DFR</i>        | X75964                  | F:GAAACCTGTAGATGGCAGGA<br>R:GGCCAAATCAAACCTACCAGA         | 114                        | [17]              |
| <i>F3'H</i>       | AJ880357                | F:GCCTCCGTTGCTGCTCAGTT<br>R:GAGAAGAGGTGGACGGAGCAAATC      | 167                        | [17]              |
| <i>F3'5'H</i>     | AB213606                | F:AAACCGCTCAGACCAAAACC<br>R:ACTAAGCCACAGGAAACTAA          | 100                        | [17]              |
| <i>Actin</i>      | EC969944                | F:CTTGCATCCCTCAGCACCTT<br>R:TCCTGTGGACAATGGATGGA          | 82                         | [18]              |
| <i>EF1-α</i>      | EC959059                | F:GAACTGGGTGCTTGATAGGC<br>R:AACCAAAATATCCGGAGTAAAGA       | 150                        | [18]              |

1.5 花色苷合成相关结构基因的表达分析

参照植物总 RNA 提取试剂盒(上海生工)说明书,用 CTAB 法提取葡萄果皮总 RNA,按反转录试剂盒(TOYOBO)说明书合成 cDNA,用 SYBR Green Master (Roche, Germany) 试剂盒进行 Real time PCR 反应,用实时荧光定量 PCR 仪(LightCycler® 480,罗氏公司)分析 *MybA1* 基因及花色苷合成结构基因的 mRNA 表达情况,并采用 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> 法<sup>[19]</sup>进行相对定量计算。反应体系为 20 μL,其中 cDNA 模板 2 ng,Buffer 缓冲液 10 μL,上、下游引物各 0.5 μL(10 μmol/L),其余用 ddH<sub>2</sub>O 补齐。

2 结果与分析

2.1 刺葡萄不同颜色果实生长过程中果皮花色苷的变化

对供试葡萄果实花色苷提取液进行质谱检测

后,再通过与标样的对比分析确定其成分组成。结果(表 3,4)表明,不同颜色葡萄果实的果皮花色苷组成及含量不仅是在成熟期差异较大,而是从果实发育早期开始,部分花色苷组分就表现出了明显的不同。从果实发育早期到成熟期,D1 中 Cy 含量是 D2 的 8 倍多;在 V1 和 V2 之间,发育早期 Cy 含量无明显差异,但以 V1 高于 V2;而从花后 80 d 开始,V2 的 Cy 含量开始高于 V1,并于成熟期二者差异达到显著水平。不同种间黑、白果实花色苷组分的差异很大,CyG 和 Cy2G 的变化更加突出了这种差异,CyG 在刺葡萄中从果实发育早期到成熟期含量都较低,而且 D1 和 D2 之间无差异;Cy2G 在 D2 发育早期含量较低,在成熟期含量明显升高且显著高于 D1。相比而言,V2 的 CyG 含量很高,在成熟期显著高于 V1,但 Cy2G 的变化在 V1 和 V2 果实发育期间无明显差异。DpG 在葡萄果实发育期间并

未因果实颜色差异而不同,而且在果实发育早期的含量就比较高,且随着果实的成熟逐渐升高,但是在果实完全成熟时却有所下降。最符合供试葡萄果实颜色变化规律的花色苷组分是 MvG,其在供试葡萄果实转色前均未被检测到,但在黑色果实转色后其含量却很高,D2 和 V2 中的含量分别占此时所有检测花色苷总量的 42.9%和50.6%。由于在白色果实中几乎检测不到 MvG,导致白色果实的花色苷总量远低于黑色果实,这或许正是长期以来认为白色葡萄果实中不含花色苷的主要原因。有报道指出,锦

葵色素类花色苷(MvG)是葡萄果皮颜色组成的主要成分,其含量在成熟期黑色果实中占到花色苷总量的 50%~80%<sup>[20-21]</sup>。需要说明的是,PgG 未能在供试样品中检测出来,但双葡萄糖苷 Pg2G 却在果实各个发育时期都能检测到,而且黑、白果实之间无明显差异。Pn 和 PtG 含量基本相似,从果实发育早期到成熟期都可以检测到,而且在转色期后有明显升高,只是种间差异较大,在中国野生刺葡萄黑色果实中的含量虽然略高于白色果实,但无明显差异,而在‘黑比诺’中的含量却显著高于‘白比诺’。

表 3 中国野生刺葡萄黑、白果实发育不同时期花色苷含量的变化

|                    |  | Table 3 Changes of anthocyanin contents in different growth stages of <i>V. davidii</i> |           |             |           |             |             |             |             |             |             | mg/kg |  |
|--------------------|--|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|--|
| 花色苷<br>Anthocyanin |  | 花后时间/d Days after anthesis                                                              |           |             |           |             |             |             |             |             |             |       |  |
|                    |  | 40                                                                                      |           | 60          |           | 90          |             | 100         |             | 120         |             |       |  |
|                    |  | D1                                                                                      | D2        | D1          | D2        | D1          | D2          | D1          | D2          | D1          | D2          |       |  |
| Cy                 |  | 3.22±0.15 *                                                                             | 0.40±0.02 | 3.57±0.16 * | 0.45±0.02 | 4.49±0.18 * | 0.54±0.02   | 2.86±0.15 * | 0.76±0.03   | 3.94±0.16 * | 0.73±0.03   |       |  |
| CyG                |  | 0.17±0.01                                                                               | 0.14±0.00 | 0.19±0.01   | 0.16±0.01 | 0.22±0.01   | 0.23±0.01   | 0.13±0.01   | 0.33±0.02   | 0.14±0.01   | 0.34±0.01   |       |  |
| Cy2G               |  | 0.03±0.00                                                                               | 0.01±0.00 | 0.02±0.00   | 0.03±0.00 | 0.02±0.00   | 0.40±0.02 * | 0.02±0.00   | 2.05±0.11 * | 0.01±0.01   | 2.49±0.11 * |       |  |
| DpG                |  | 1.23±0.03                                                                               | 2.90±0.12 | 1.42±0.03   | 4.57±0.21 | 2.05±0.05   | 6.96±0.52   | 1.77±0.05   | 3.88±0.13   | 1.62±0.04   | 5.88±0.21   |       |  |
| MvG                |  | nd                                                                                      | nd        | nd          | nd        | nd          | 0.12±0.01   | nd          | 1.19±0.06   | nd          | 7.14±0.28   |       |  |
| PgG                |  | nd                                                                                      | nd        | nd          | nd        | nd          | nd          | nd          | nd          | nd          | nd          |       |  |
| Pg2G               |  | 0.02±0.00                                                                               | 0.04±0.00 | 0.03±0.00   | 0.04±0.00 | 0.05±0.00   | 0.06±0.00   | 0.06±0.00   | 0.08±0.00   | 0.06±0.00   | 0.09±0.01   |       |  |
| Pn                 |  | 0.01±0.00                                                                               | 0.10±0.01 | 0.01±0.00   | 0.12±0.01 | 0.02±0.00   | 0.34±0.00   | 0.02±0.00   | 0.17±0.00   | 0.02±0.00   | 0.05±0.00   |       |  |
| PtG                |  | 0.15±0.01                                                                               | 0.19±0.01 | 0.12±0.01   | 0.17±0.01 | 0.09±0.00   | 0.18±0.00   | 0.08±0.01   | 0.20±0.01   | 0.08±0.01   | 0.23±0.05   |       |  |

注:表中数据为“平均值±标准误”;黑白果实在同一时期进行 *t*-测验,“\*”表示差异有统计学意义(*P*<0.05);“nd”表示未检出。表 4 同。  
Note: All values are “mean±SE”, “\*” indicates significant difference at *P*<0.05 by *t*-test, “nd” means not detected. Table 4 is the same.

表 4 ‘黑比诺’及‘白比诺’果实发育不同时期花色苷含量的变化

|                    |  | Table 4 Changes of anthocyanin contents in different growth stages of ‘Pinot Blanc’ and ‘Pinot Noir’ |           |           |           |           |              |           |              |            |              | mg/kg |  |
|--------------------|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------|-----------|--------------|------------|--------------|-------|--|
| 花色苷<br>Anthocyanin |  | 花后时间/d Days after anthesis                                                                           |           |           |           |           |              |           |              |            |              |       |  |
|                    |  | 40                                                                                                   |           | 60        |           | 80        |              | 90        |              | 100        |              |       |  |
|                    |  | V1                                                                                                   | V2        | V1        | V2        | V1        | V2           | V1        | V2           | V1         | V2           |       |  |
| Cy                 |  | 0.65±0.04                                                                                            | 0.13±0.02 | 0.72±0.05 | 0.30±0.02 | 1.55±0.11 | 3.58±0.17    | 2.18±0.12 | 4.25±0.23    | 4.67±0.26  | 19.49±1.02 * |       |  |
| CyG                |  | 0.30±0.15                                                                                            | 0.16±0.02 | 0.50±0.01 | 0.43±0.03 | 1.30±0.06 | 13.91±0.51 * | 2.12±0.15 | 17.23±0.95 * | 4.35±0.18  | 89.96±3.15 * |       |  |
| Cy2G               |  | 0.01±0.00                                                                                            | 0.03±0.00 | 0.02±0.00 | 0.03±0.00 | 0.05±0.00 | 0.45±0.05    | 0.07±0.00 | 0.54±0.04    | 0.11±0.01  | 0.72±0.03    |       |  |
| DpG                |  | 1.24±0.07                                                                                            | 3.13±0.16 | 1.74±0.13 | 3.57±0.21 | 4.45±0.25 | 8.09±0.42    | 6.01±0.25 | 9.70±0.45    | 11.72±0.42 | 15.28±0.51   |       |  |
| MvG                |  | nd                                                                                                   | nd        | nd        | nd        | nd        | 4.90±0.31    | nd        | 60.34±2.12   | nd         | 180.79±6.25  |       |  |
| PgG                |  | nd                                                                                                   | nd        | nd        | nd        | nd        | nd           | nd        | nd           | nd         | nd           |       |  |
| Pg2G               |  | 0.08±0.00                                                                                            | 0.24±0.01 | 0.07±0.00 | 0.18±0.01 | 0.06±0.00 | 0.09±0.00    | 0.04±0.00 | 0.12±0.00    | 0.02±0.00  | 0.16±0.01    |       |  |
| Pn                 |  | 0.03±0.00                                                                                            | 0.02±0.00 | 0.02±0.00 | 0.03±0.00 | 0.03±0.00 | 0.98±0.07 *  | 0.03±0.00 | 1.51±0.08 *  | 0.02±0.00  | 0.16±0.01    |       |  |
| PtG                |  | 0.41±0.03                                                                                            | 0.80±0.04 | 0.50±0.02 | 0.95±0.05 | 1.19±0.06 | 5.50±0.48 *  | 1.21±0.05 | 17.58±1.15 * | 4.73±0.19  | 49.28±1.15 * |       |  |

此外,中国野生刺葡萄黑、白果实从花色苷组成成分的差异上和欧亚种葡萄表现出来的结果类似,只是与欧亚种葡萄相比种间差异较大,刺葡萄黑色果实中某些花色苷组分含量还低于‘白比诺’(如 DpG、PtG),但颜色表现差异却很大,这是因为果实颜色的形成不仅与花色苷含量有关,而且组成比例的影响也很大<sup>[22-23]</sup>。

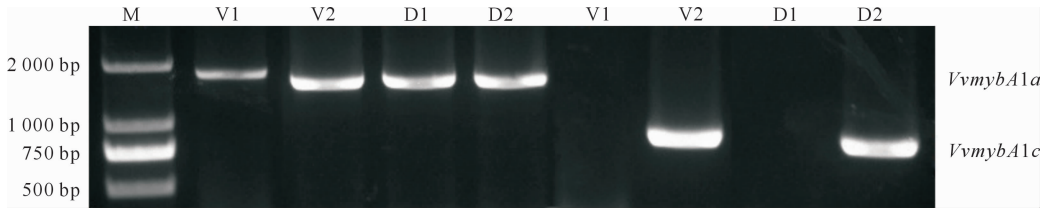
2.2 不同颜色中国野生刺葡萄 *MybA1* 基因型分析

*VvmybA1* 基因的表达与葡萄果皮颜色的形成密切相关<sup>[16,24]</sup>,由于逆转座子 *Gret1* 的插入及缺失而形成了 3 种等位基因,分别为 *VvmybA1a*、*Vvmy-*

*bA1b* 及 *VvmybA1c*,其中只有 *VvmybA1a* 不具有功能。大量报道指出,白葡萄果实中只有 *VvmybA1a* 基因,不存在 *VvmybA1b* 或 *VvmybA1c* 等有功能的基因,致使 *VvmybA1* 的表达受阻,花色苷无法合成<sup>[5-7]</sup>。为检测中国野生刺葡萄 *MybA1* 的基因型,选择了特征引物 *VvmybA1a*(F:5'-AAAAAGGGG-GGCAATGTAGGGACCC-3', R: 5'-GAACCTC-CTTTTTGAAGTGGTGA-3') 和 *VvmybA1b/c* (F: 5'-GGACGTATAAAAAATGGTTGCACGTG-3',R:5'-GAACCTCCTTTTTGAAGTGGTGA-3'),对中国野生刺葡萄 *MybA1* 基因进行克隆测序及特征分析。结果(图 2)表明,在中国野生刺葡萄

D1、D2 及对照 V1、V2 中都检测到了 *MybA1a* 等位基因,而 *MybA1c* 等位基因只在 D2 及 V2 中检测到,通过 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) BLAST 比较,中国野生刺葡萄黑、白色果实的 *MybA1a* 等位基因并无差异,且与 *VvmybA1a* 高度一

致,其 *MybA1* 基因编码区也保持着高度一致性,这与 Jiao 等<sup>[3]</sup>的研究结果一致,说明中国野生刺葡萄白色果实产生的原因在 *MybA1* 基因序列上的表现与欧亚种一致。



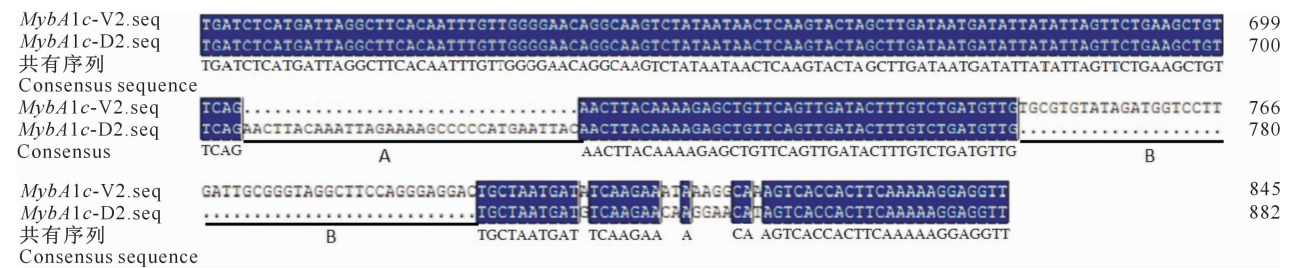
M. 标准分子 DL2000; V1. 白比诺; V2. 黑比诺; D1. 白色果实刺葡萄; D2. 黑色果实刺葡萄  
M. Marks DL2000; V1. Pinot Blanc; V2. Pinot Noir; D1. White berry of *V. davidii*; D2. colored berry of *V. davidii*

图 2 中国野生刺葡萄及对照样品 *MybA1* 基因的扩增产物

Fig. 2 Banding patterns of *MybA1* gene PCR amplified products of *V. davidii* and control cultivars

序列分析结果(图 3)表明,与黑比诺相比,刺葡萄 *MybA1c* 在第二个外显子区域多了一个 33 bp 的插入片段(图 3 的 A 部分),另出现了 47 bp 的缺失片段(图 3 的 B 部分),这和欧亚种差异较大,但与

Mamiko 等<sup>[4]</sup>报道的欧亚种东方品种群特征更为接近。测序结果已提交至 GenBank,登录号分别为 KM496338, KM496339, KM496341, KM496342。



A. 33 bp 插入片段; B. 47 bp 缺失片段

A. 33 bp insertion fragment; B. 47 bp deletion fragment

图 3 中国野生刺葡萄 *MybA1c* 基因片段的测序结果

Fig. 3 Fragments sequence alignment of *MybA1c* gene of *V. davidii*

2.3 刺葡萄 *MybA1* 基因及花色苷合成结构基因的表达

*VvmybA1* 基因目前被认为是决定葡萄果皮颜色的决定性调节基因,且只在有色葡萄成熟期才有表达<sup>[25]</sup>。以 *Actin* 和 *EF1-α* 为内参基因,对刺葡萄和对照葡萄的 *MybA1* 基因(149 bp)及 *UFGT*、*CHI*、*CHS* 等 9 个花色苷合成相关的结构基因(表 2)进行实时荧光定量检测,结果(表 5、6)发现, *MybA1* 基因在供试葡萄发育早期表达量均很低,随着果实逐渐成熟,在白色果实(D1、V1)中几乎检测不到,而在黑色果实(D2、V2)转色后表达量显著增加。受转录因子 MYB 直接调控的关键基因 *UFGT* 与 *MybA1* 的检测结果基本一致,也仅在黑色果实转色期后表达增强。与此类似的还有 *F3'5'H*、*GST* 及 *OMT* 基因,其表达均在黑色果实转色期后上升。

*CHS* 基因的表达也基本符合上述结果,所不同的是在成熟期表达会有所下降。比较奇怪的是 *CHI* 基因和 *F3'H* 基因,其在中国野生刺葡萄和对照欧亚种葡萄中的表达有明显区别:尽管在果实成熟期其表达均明显加强,但刺葡萄黑色果实(D2)显著高于白色果实(D1),而对照 V1 和 V2 之间却无明显差异; *F3'H* 的结果刚好相反,在刺葡萄黑、白果实中表达无差异,而在黑比诺(V2)成熟期的表达量却显著高于白比诺(V1)。 *DFR* 和 *LDOX* 基因的表达在供试葡萄黑色和白色果实之间并无区别,这和 Jeong 等<sup>[17]</sup>的研究结果一致。所不同的是,在中国野生刺葡萄黑、白果实中,随着果实成熟其表达量均显著升高,但在对照欧亚种的整个发育过程中其表达并无明显变化。结合质谱检测结果可知,在葡萄果实早期发育期间就有花色苷检测出,说明花色苷

的合成是伴随着葡萄果实发育开始的。

表 5 中国野生刺葡萄黑、白果实发育不同时期葡萄果皮花色苷合成结构基因表达的分析  
Table 5 Relative expression analysis of anthocyanins biosynthesis structural gene in different growth stages of *V. davidii*

| 基因<br>Gene    | 材料<br>Material | 花后时间/d Days after anthesis |              |              |              |              |
|---------------|----------------|----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|               |                | 40                         | 60           | 80           | 100          | 120          |
| <i>MybA1</i>  | D1             | 0.01±0.00 a                | 0.02±0.00 a  | 0.02±0.00 a  | 0.03±0.00 a  | 0.03±0.00 a  |
|               | D2             | 0.02±0.00 a                | 0.03±0.00 a  | 0.07±0.01 b* | 0.19±0.03 c* | 0.24±0.05 c* |
| <i>UFGT</i>   | D1             | 0.02±0.00 a                | 0.02±0.00 a  | 0.03±0.00 a  | 0.03±0.00 a  | 0.03±0.00 a  |
|               | D2             | 0.02±0.00 a                | 0.03±0.00 a  | 0.18±0.02 b* | 0.20±0.03 b* | 0.23±0.05 b* |
| <i>CHI</i>    | D1             | 0.03±0.00 a                | 0.02±0.00 a  | 0.03±0.00 a  | 0.04±0.00 a  | 0.04±0.00 a  |
|               | D2             | 0.04±0.00 a                | 0.07±0.01 b* | 0.17±0.02 c* | 0.23±0.04 c* | 0.20±0.05 c* |
| <i>CHS</i>    | D1             | 0.03±0.00 a                | 0.02±0.00 a  | 0.03±0.00 a  | 0.04±0.00 a  | 0.04±0.00 a  |
|               | D2             | 0.04±0.00 a                | 0.08±0.01 b* | 0.17±0.03 c* | 0.22±0.05 c* | 0.19±0.03 c* |
| <i>DFR</i>    | D1             | 0.01±0.00 a                | 0.02±0.00 a  | 0.03±0.00 a  | 0.11±0.02 b  | 0.12±0.03 b  |
|               | D2             | 0.02±0.00 a                | 0.02±0.00 a  | 0.06±0.01 a  | 0.12±0.02 b  | 0.14±0.03 b  |
| <i>F3'H</i>   | D1             | 0.02±0.00 a                | 0.01±0.00 a  | 0.13±0.02 b  | 0.17±0.02 b  | 0.19±0.03 b  |
|               | D2             | 0.03±0.00 a                | 0.01±0.00 a  | 0.17±0.03 b  | 0.24±0.05 b  | 0.26±0.05 b  |
| <i>F3'5'H</i> | D1             | 0.01±0.00 a                | 0.02±0.00 a  | 0.02±0.00 a  | 0.03±0.00 a  | 0.02±0.00 a  |
|               | D2             | 0.02±0.00 a                | 0.03±0.00 a  | 0.13±0.03 b* | 0.24±0.04 c* | 0.26±0.04 c* |
| <i>GST</i>    | D1             | 0.01±0.00 a                | 0.02±0.00 a  | 0.03±0.00 a  | 0.03±0.00 a  | 0.02±0.00 a  |
|               | D2             | 0.02±0.00 a                | 0.02±0.00 a  | 0.13±0.02 b* | 0.23±0.04 c* | 0.26±0.05 c* |
| <i>LDOX</i>   | D1             | 0.01±0.00 a                | 0.02±0.00 a  | 0.04±0.00 a  | 0.12±0.02 b  | 0.13±0.03 b  |
|               | D2             | 0.02±0.00 a                | 0.02±0.00 a  | 0.07±0.01 b  | 0.13±0.02 c  | 0.15±0.03 c  |
| <i>OMT</i>    | D1             | 0.01±0.00 a                | 0.02±0.00 a  | 0.02±0.00 a  | 0.03±0.00 a  | 0.03±0.00 a  |
|               | D2             | 0.02±0.00 a                | 0.01±0.00 a  | 0.02±0.00 a  | 0.09±0.01 b* | 0.15±0.03 b* |

注:表中数据为“平均值±标准误”;同种葡萄黑白果实同一时期进行 *t*-测验,“\*”表示差异有统计学意义(*P*<0.05);不同时期采用邓肯氏新复极差法进行多重比较,不同字母表示差异显著(*P*<0.05)。下同。

Note: All values are “mean±SE”, “\*” indicates significant difference among different grapes at *P*<0.05 by *t*-test. Different letters (a—c) within the same column indicate significant difference at *P*<0.05 by Duncan’s test. The same below.

表 6 ‘黑比诺’及‘白比诺’果实发育不同时期葡萄果皮花色苷合成结构基因表达的分析  
Table 6 Relative expression analysis of anthocyanins biosynthesis structural gene in different growth stages of ‘Pinot Blanc’ and ‘Pinot Noir’

| 基因<br>Gene    | 材料<br>Material | 花后时间/d Days after anthesis |              |              |              |              |
|---------------|----------------|----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|               |                | 40                         | 60           | 80           | 90           | 100          |
| <i>MybA1</i>  | V1             | 0.02±0.00 a                | 0.02±0.00 a  | 0.03±0.00 a  | 0.03±0.00 a  | 0.03±0.00 a  |
|               | V2             | 0.02±0.00 a                | 0.03±0.00 a  | 0.08±0.01 b* | 0.23±0.04 c* | 0.24±0.05 c* |
| <i>UFGT</i>   | V1             | 0.02±0.00 a                | 0.03±0.00 a  | 0.03±0.00 a  | 0.03±0.00 a  | 0.03±0.00 a  |
|               | V2             | 0.03±0.00 a                | 0.03±0.00 a  | 0.18±0.02 b* | 0.23±0.03 b* | 0.24±0.04 b* |
| <i>CHI</i>    | V1             | 0.03±0.00 a                | 0.02±0.00 a  | 0.14±0.03 b  | 0.19±0.04 b  | 0.21±0.04 b  |
|               | V2             | 0.03±0.00 a                | 0.02±0.00 a  | 0.17±0.03 b  | 0.22±0.03 b  | 0.24±0.04 b  |
| <i>CHS</i>    | V1             | 0.02±0.00 a                | 0.03±0.00 a  | 0.03±0.00 a  | 0.03±0.00 a  | 0.04±0.00 a  |
|               | V2             | 0.03±0.00 a                | 0.04±0.00 a  | 0.21±0.04 b* | 0.28±0.06 b* | 0.24±0.05 b* |
| <i>DFR</i>    | V1             | 0.01±0.00 a                | 0.02±0.00 a  | 0.01±0.00 a  | 0.02±0.00 a  | 0.03±0.00 a  |
|               | V2             | 0.01±0.00 a                | 0.01±0.00 a  | 0.02±0.00 a  | 0.03±0.00 a  | 0.05±0.01 a  |
| <i>F3'H</i>   | V1             | 0.03±0.00 a                | 0.02±0.00 a  | 0.03±0.00 a  | 0.03±0.00 a  | 0.04±0.00 a  |
|               | V2             | 0.03±0.00 a                | 0.08±0.01 b* | 0.18±0.03 c* | 0.26±0.05 c* | 0.28±0.06 c* |
| <i>F3'5'H</i> | V1             | 0.02±0.00 a                | 0.03±0.00 a  | 0.03±0.00 a  | 0.03±0.00 a  | 0.04±0.00 a  |
|               | V2             | 0.03±0.00 a                | 0.04±0.00 a  | 0.12±0.02 b* | 0.27±0.05 c* | 0.24±0.04 c* |
| <i>GST</i>    | V1             | 0.02±0.00 a                | 0.02±0.00 a  | 0.03±0.00 a  | 0.03±0.00 a  | 0.04±0.00 a  |
|               | V2             | 0.03±0.00 a                | 0.04±0.00 a  | 0.11±0.02 b* | 0.16±0.03 b* | 0.19±0.04 b* |
| <i>LDOX</i>   | V1             | 0.01±0.00 a                | 0.02±0.00 a  | 0.01±0.00 a  | 0.02±0.00 a  | 0.02±0.00 a  |
|               | V2             | 0.01±0.00 a                | 0.01±0.00 a  | 0.02±0.00 a  | 0.02±0.00 a  | 0.03±0.00 a  |
| <i>OMT</i>    | V1             | 0.01±0.00 a                | 0.01±0.00 a  | 0.02±0.00 a  | 0.03±0.00 a  | 0.03±0.00 a  |
|               | V2             | 0.02±0.00 a                | 0.02±0.00 a  | 0.08±0.01 b* | 0.18±0.03 c* | 0.15±0.03 c* |

### 3 讨论与结论

花色苷是一种水溶性酚类物质,广泛存在于植物的根、茎、叶、花及果实等各个组织部位,葡萄中花色苷含量尤其丰富,特别是在果实中。目前,在葡萄中发现的花色苷已有上百种之多<sup>[26-27]</sup>。葡萄中花色苷种类繁多,但组成其复杂结构的基本单元主要有花青素(Cyanidin)、花翠素(Delphinidin)、甲基花青素(Peonidin)、甲基花翠素(Petunidin)及二甲花翠素(Malvidin)等 5 种,这些基本单元在苯环上被不同的糖苷,如葡萄糖(Glucose)、半乳糖(Galactose)、阿拉伯糖(Arabinose)、木糖(Xylose)及鼠李糖(Rhamnose)等取代,再加上酰基化(Acetyl)、香豆酰化(Coumaryl)等的衍生,就会形成复杂多样的花色苷物质<sup>[28]</sup>。花色苷含量与环境、气候条件、栽培措施及品种特性等各个因素密切相关<sup>[29-32]</sup>,葡萄中花色苷含量及组成因为品种、产地不同差异也比较大。尽管葡萄中花色苷种类复杂,但含量较高且在不同葡萄中被容易检测到的花色苷种类却基本一致<sup>[33-34]</sup>。因此,选择典型的花色苷组分,既简化了试验过程,节约了试验成本,又能够区别不同颜色果实花色苷之间的差异。

花色苷的合成从苯丙氨酸途径开始,经历多个阶段,由一系列酶催化完成。在葡萄中,比较重要的酶主要有查尔酮合成酶(CHS)、查尔酮异构酶(CHI)、黄酮醇-3-羟化酶(F3H)、二氢黄酮醇还原酶(DFR)、无色花色素双加氧酶(LDOX)、甲基转移酶(OMT)及谷胱甘肽 S 转移酶(GST)等,而决定花色苷形成的关键酶是尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶(UFGT)。UFGT 基因是否表达,主要受转录因子 MYB 调控<sup>[15]</sup>。目前认为白色葡萄果实之所以无花色苷,主要是因为合成花色苷的相关基因不表达,尤其是 UFGT<sup>[25]</sup>,白比诺就是因为黑比诺缺失了功能性 *VvmybA1b/c* 基因才突变而来的<sup>[14]</sup>,而刺葡萄白色果实也被证明只有 *MybA1a* 基因的纯合型<sup>[3]</sup>。在葡萄果实发育早期,黑、白果实花色苷合成的结构基因都有表达,而且部分花色苷也在葡萄果实成熟早期被检测到,这说明花色苷的合成是从果实发育早期开始的,而且不同颜色的果实合成途径一致。白色果实在成熟期花色苷含量偏低,或许是花色苷在成熟时转向了其他物质的合成,或者在积累和运输过程中受阻,使得白色葡萄中部分花色苷无法积累到能表现出颜色的浓度。总之,还需要进行更加深入的研究,才能彻底揭开不同种葡萄果实花色苷

合成的准确途径,进而为选育优质葡萄品种提供理论支持。

由中国野生刺葡萄调节基因 *MybA1* 的序列差异及结构基因的表达差异可以看出,不同颜色果实的中国野生刺葡萄花色苷变化机理与欧亚种基本一致,但刺葡萄存在着一些独特的地方,这为刺葡萄是中国野生种质资源提供了更加有力的证据,也为其利用奠定了基础。

### [参考文献]

- [1] 刘崇怀,姜建福,樊秀彩,等. 中国野生葡萄资源在生产和育种中利用的概况 [J]. 植物遗传资源学报,2014,15(4):720-727.  
Liu C H, Jiang J F, Fan X C, et al. The utilization of Chinese wild grape species in production and breeding [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2014, 15(4): 720-727.
- [2] 石雪晖,杨国顺,熊兴耀. 湖南省刺葡萄种质资源的研究与利用 [J]. 湖南农业科学, 2010(19): 1-4.  
Shi X H, Yang G S, Xiong X Y. Research and utilization status of germplasm resources of *Vitis davidii* in Hunan [J]. Hunan Agricultural Sciences, 2010(19): 1-4.
- [3] Jiao J, Fu X, Liu C, et al. Study of the relationship between the cultivars of *Vitis vinifera* and the white-fruited and hermaphrodite Chinese wild grapes [J]. Molecular Breeding, 2014, 34(3): 1401-1411.
- [4] Mamiko S, Keiko F, Hironori K, et al. Pink-colored grape berry is the result of short insertion in intron of color regulatory gene [J]. PLoS One, 2011, 66(6): 21308-21318.
- [5] Kobayashi S, Goto-Yamamoto N, Hirochika H. Retrotransposon-induced mutations in grape skin color [J]. Science, 2004, 304: 982.
- [6] Cutanda-Perez M C, Ageorges A, Gomez C, et al. Ectopic expression of *VlmybA1* in grapevine activates a narrow set of genes involved in anthocyanin synthesis and transport [J]. Plant Molecular Biology, 2008, 69(6): 633-648.
- [7] Czemmel S, Stracke R, Weisshaar B, et al. The grapevine R2R3-MYB transcription factor *VvMYB1* regulates flavonol synthesis in developing grape berries [J]. Plant Physiology, 2009, 151(3): 1513-1530.
- [8] Mitani N, Azuma A, Hirochika H, et al. A retrotransposon-inserted *VvmybA1a* allele has been spread among cultivars of *Vitis vinifera* but not North American or East Asian vitis species [J]. Vitis, 2009, 48(1): 55-56.
- [9] This P, Lacombe T, Cadle-Davidson M, et al. Wine grape (*Vitis vinifera* L.) color associates with allelic variation in the domestication gene *VvmybA1* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2007, 114(4): 723-730.
- [10] 慕茜, 吴为民, 房经贵, 等. 不同葡萄品种的 *VvmybA1* 基因型及其特征性 DNA 片段的序列分析 [J]. 园艺学报, 2011, 38(11): 2075-2084.  
Mu Q, Wu W M, Fang J G, et al. Genotyping *VvmybA1* in 59

- grapevine cultivars and characterization of the DNA fragment sequences acta [J]. Horticulturae Sinica, 2011, 38(11): 2075-2084.
- [11] Dietmar K, Achim C, Reinhold C, et al. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52: 4360-4367.
- [12] Liang Z, Owens C L, Zhong G Y, et al. Polyphenolic profiles detected in the ripe berries of *Vitis vinifera* germplasm [J]. Food Chemistry, 2011, 129(3): 940-950.
- [13] Arapitsas P, Oliveira J, Mattivi F. Do white grapes really exist? [J]. Food Research International, 2015, 69: 21-25.
- [14] Yakushiji H, Kobayashi S, Goto-Yamamoto N, et al. 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 [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2006, 70(6): 1506-1508.
- [15] Kobayashi S, Goto-Yamamoto N, Hirochika H. Association of *VvmybA1* gene expression with anthocyanin production in grape (*Vitis vinifera*) skin-color mutants [J]. Journal of Japan Soc Hort Science, 2005, 74(3): 196-203.
- [16] Azuma A, Kobayashi S, Mitani N, et al. Genomic and genetic analysis of Myb-related genes that regulate anthocyanin biosynthesis in grape berry skin [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2008, 117(6): 1009-1019.
- [17] Jeong S T, Goto-Yamamoto N, Kobayashi S, et al. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins [J]. Plant Science, 2004, 167(2): 247-252.
- [18] Reid K E, Olsson N, Schlosser J, et al. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development [J]. BMC Plant Biology, 2006, 6(1): 27-38.
- [19] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative  $C_T$  method [J]. Nature Protocols, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [20] Liang Z, Wu B, Fan P, et al. Anthocyanin composition and content in grape berry skin in *Vitis* germplasm [J]. Food Chemistry, 2008, 111(4): 837-844.
- [21] He J J, Liu Y X, Pan Q H, et al. Different anthocyanin profiles of the skin and the pulp of Yan73 (Muscat Hamburg  $\times$  Alicante Bouschet) grape berries [J]. Molecules, 2010, 15(3): 1141-1153.
- [22] Castellarin S D, Gaspero G D, Macconi R. Colour variation in red grapevines (*Vitis vinifera* L.): genomic organization, expression of flavonoid 3'-hydroxylase, flavonoid 3', 5'-hydroxylase genes and related metabolite profiling of red cyaniding-blue delphinidin-based anthocyanins in berry skin [J]. BMC Genomics, 2006, 7: 12.
- [23] Jeong S T, Goto-Yamamoto N, Hashizume K. 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.) [J]. Plant Science, 2006, 170: 61-69.
- [24] Lijavetzky D, Ruiz-García L, Cabezas J A, et al. Molecular genetics of berry colour variation in table grape [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2006, 276(5): 427-435.
- [25] Bogs J. Identification of the flavonoid hydroxylases from grapevine and their regulation during fruit development [J]. Plant Physiology, 2005, 140(1): 279-291.
- [26] Prior R L, Wu X L. Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities [J]. Free Radical Research, 2006, 40(10): 1014-1028.
- [27] Szajdek A, Borowska E J. Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review [J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2008, 63(4): 147-156.
- [28] Wu X, Prior R L. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53: 2589-2599.
- [29] Haselgrove L, Botting D, Heeswijck R, et al. Canopy microclimate and berry composition the effect of bunch exposure on the phenolic composition of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz grape berries [J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2000, 6: 141-149.
- [30] Esteban M A, Villanueva M J, Lissarrague J R. Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) grape berries during ripening [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2001, 81: 409-420.
- [31] Ryan J M, Revilla E. Anthocyanin composition of Cabernet Sauvignon and Tempranillo grapes at different stages of ripening [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51: 3372-3378.
- [32] Yamane T, Jeong S T, Goto-Yamamoto N, et al. Effects of temperature on anthocyanin biosynthesis in grape berry skins [J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2006, 57: 54-59.
- [33] Laätti A K, Kainulainen P S, Hayirlioglu-Ayaz S, et al. Characterization of anthocyanins in caucasian blueberries (*Vaccinium arctostaphylos* L.) native to Turkey [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(12): 5244-5249.
- [34] Arapitsas P, Perenzoni D, Nicolini G, et al. Study of sangiovese wines pigment profile by UHPLC-MS/MS [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(42): 10461-10471.