

葡萄果实成熟期花色苷与白藜芦醇 合成相关基因的表达

席 奔¹, 张敏敏¹, 柳巧禛¹, 代红军^{1,2*}

(1 宁夏大学 农学院, 银川 750021; 2 宁夏大学 葡萄与葡萄酒教育部工程中心, 银川 750021)

摘 要:以酿酒葡萄‘赤霞珠’为试材, 采用 pH 示差法和高效液相色谱(HPLC)法分别测定葡萄成熟期果皮花色苷和白藜芦醇含量, 用实时荧光定量 PCR 检测两者合成途径中相关基因的表达量, 分析花色苷含量和白藜芦醇含量与其相关基因表达的关系, 以揭示结构基因与调控基因的调控机制, 为筛选富含花色苷和白藜芦醇的酿酒葡萄提供理论依据。结果显示: (1) 葡萄果皮花色苷含量在花后 112 d 达到最高值(0.77 mg/g), 反式白藜芦醇含量在花后 126 d 达到最高值(30.87 μ g/g)。 (2) 花色苷和白藜芦醇合成途径中, *CHSs*、*CHI*、*STS*、*UFGT*、*MybA1*、*MybA2* 基因的表达量除花后 98 d 下调外, 其余时间均呈上调表达, 而 *Myb5a* 则始终呈上调表达。 (3) 相关分析表明, *STS* 基因表达量与 *CHS1*、*CHS2* 基因表达量呈极显著和显著正相关关系, *MybA1*、*MybA2* 基因表达量与 *CHSs*、*CHI*、*STS*、*UFGT* 基因的表达量呈极显著正相关关系; *Myb5a* 基因表达量与 *CHS3* 基因表达量呈极显著正相关关系。研究表明, 部分结构基因的表达与花色苷和白藜芦醇的变化不同步, *MybA1* 和 *MybA2* 可能调控花色苷合成途径中多个结构基因的表达, 花色苷与白藜芦醇的关系并不固定, 而是处在动态变化中。

关键词: 葡萄; 花色苷; 白藜芦醇; 生物合成; 基因表达

中图分类号: Q946.83⁺6; Q789

文献标志码: A

Expression of Anthocyanin and Resveratrol Biosynthesis Related Genes in Grapevine Ripening Stage

XI Ben¹, ZHANG Minmin¹, LIU Qiaozhen¹, DAI Hongjun^{1,2*}

(1 College of Agronomy, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; 2 Engineering Center of Viticulture and Enology, Ministry of Education, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: In this study, we used *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon to study anthocyanins and resveratrol accumulation at maturity stage, expression of anthocyanins and resveratrol biosynthesis genes by using HPLC technology, pH differential method and real-time quantitative PCR. The study aims to reveal the regulatory mechanism of structural genes and to provide theoretical basis for screening grape wine rich in anthocyanins and resveratrol. The research findings suggested that: (1) the anthocyanins contents at 112 days after anthesis reached the maximum of 0.77 mg/g, the contents of *trans*-resveratrol at 126 days after anthesis reached the maximum of 30.87 μ g/g. (2) The expression of *CHSs*, *CHI*, *STS*, *UFGT*, *MybA1* and *MybA2* genes in the pathway of anthocyanin and resveratrol synthesis were up-regulated, but they were down-regulated on 98 days after anthesis. (3) The correlation analysis showed that the expres-

收稿日期: 2017-05-31; 修改稿收到日期: 2017-09-12

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金(31260456)

作者简介: 席 奔(1992—), 男, 硕士, 主要从事葡萄栽培生理研究。E-mail: 15209179076@139.com

* 通信作者: 代红军, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事葡萄栽培生理研究。E-mail: dai_hj@nxu.edu.cn

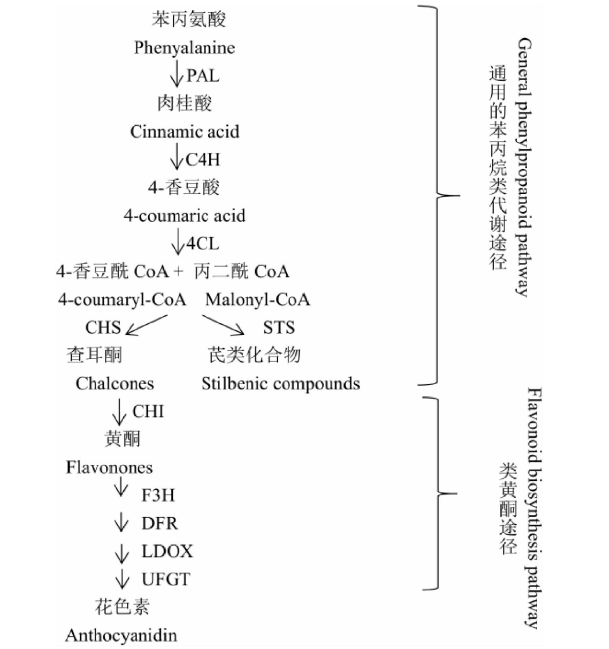
sion of *STS* gene was the most significantly and significantly positively correlated with the expression of *CHS1* and *CHS2* genes. The expression of *MybA1* and *MybA2* genes was the most significantly positively correlated with the expression of *CHSs*, *CHI*, *STS* and *UFGT* genes, and the expression of *Myb5a* gene was significantly positively correlated with the expression of *CHS3* gene. The research showed that the expression of some structural genes was not synchronized with the accumulation of anthocyanins and resveratrol. *MybA1* and *MybA2* may express multiple structural gene regulation of anthocyanins synthesis pathway. The relationship between anthocyanins and resveratrol was not fixed, but in a dynamic change.

Key words:grape; anthocyanin; resveratrol; biosynthesis; gene expression

葡萄成熟期是葡萄浆果品质形成的重要时期。成熟期浆果的外形和生物化学发生一系列变化^[1-3]。花色苷和白藜芦醇是葡萄浆果中 2 种重要的多酚类物质。花色苷 (anthocyanin) 是一种天然的水溶性色素,从果实转色期开始合成,在葡萄浆果表皮细胞液泡中积累^[4],直至浆果成熟^[5]。花色苷对酿酒葡萄和葡萄酒的品质有着重要的作用^[6-7]。白藜芦醇 (resveratrol) 是一种天然的多酚类物质,化学名称芪三酚 (3,4',5-trihydroxystilbene),它是芪类物质单体中最重要的生物活性物质^[8],其结构式存在顺式和反式 (*cis*-,*trans*-) 2 种构象,植物中主要以反式构象形式存在。白藜芦醇在葡萄抵抗逆境和病原菌感染过程中有着重要的作用^[9]。同时,白藜芦醇类化合物具有多种有益于人体健康的生物学活性功能^[10]。

目前,对于葡萄花色苷和白藜芦醇生物合成已经有了清晰的认识^[11-12] (图 1),两者的合成都源于通用的苯丙烷类代谢途径 (General phenylpropanoid pathway),即由苯丙氨酸生成 4-香豆酸 CoA,4-香豆酰 CoA 和丙二酰 CoA 在查尔酮合成酶 (CHS) 作用下生成查尔酮,或者在白藜芦醇合成酶 (RS) 作用下生成白藜芦醇。查尔酮会在一系列相关酶作用下通过类黄酮途径 (Flavonoid biosynthesis pathway) 合成稳定的花色苷。花色苷和白藜芦醇的生物合成受结构基因和调节基因的控制^[13-14]。目前,已经从拟南芥、玉米、番茄等植物中分离鉴定出 *MYB* 基因家族、*b-HLH* 家族基因、*WCRY*、*WD40*、锌指蛋白等调控花色苷合成的调节基因^[15]。由于 *MYB* 基因在葡萄着色方面具有重要作用,因此,研究葡萄果实颜色形成机理的焦点主要集中在 *MYB* 转录因子基因的调控方面^[16]。Höll 等^[17] 首次证明了 *MYB* 基因家族的 *MYB14* 和 *MYB15* 转录因子能够调节葡萄 *STS* 基因的表达。

本研究以酿酒葡萄‘赤霞珠’为试材,用 pH 示差法和高效液相色谱 (HPLC) 法分别测定葡萄成熟期果皮花色苷含量和白藜芦醇含量,并利用实时荧光定量 PCR 检测两者合成途径中相关基因的表达



PAL. 苯丙氨酸裂解酶;C4H. 肉桂酸-4-羟化酶;4CL. 4-香豆酸-CoA 连接酶;CHS. 查尔酮合成酶;STS. 芪合成酶;CHI. 查尔酮异构酶;F3H. 黄酮 3-羟化酶;DFR. 黄烷酮醇 4-还原酶;LDOX. 无色花色素双加氧酶;UFGT. 类黄酮葡萄糖转移酶

图 1 花色素生物合成途径^[18]

PAL. Phenylalanin ammo-nialyase;C4H. Cinnamic acid -4-hydroxylase;4CL. 4-Coumarate-CoA ligase;CHS. Chalcone synthase;STS. Stilbene synthase;CHI. Chalcone isomerase;F3H. Flavanone 3-hydroxylase;DFR. Dihydroflavonol 4-reductase;LDOX. Leucoanthocyanidin dioxygenase;UFGT. UDP glucose flavonoid glucosyl-transferase

Fig. 1 Biosynthesis pathway of anthocyanin^[18]

量,分析花色苷含量和白藜芦醇含量与其相关基因表达的关系;了解其结构基因与调控基因的调控机制,为提高富含花色苷和白藜芦醇的酿酒葡萄原料提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料采自宁夏永宁县黄羊滩农场 17 年生‘赤霞珠’ (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon),篱架栽培模式,南北行向,株行距 0.5 m×3

m,多主蔓扇形。花后 56 d(56 days after anthesis, 56 DAA,2015 年 7 月 26 日)开始采样,每 2 周采样 1 次,直至果实采收(126 DAA)结束。采样时,选取葡萄园中部树势中庸,长势一致的葡萄 10 株,于植株东西两侧,上中下部位随机选取果粒 300 颗,液氮冷冻后,带回实验室,−80 ℃冰箱中保存。

1.2 方 法

1.2.1 花色苷含量的测定 采用 pH 示差法^[19]测定葡萄果皮中花色苷含量,重复 3 次,求平均值。

1.2.2 白藜芦醇含量的测定 参照李晓东等^[20]的方法,并加以改进。将葡萄果实放入蒸馏水中剥皮,吸水纸吸干后精确称取果皮 1 g,放入 95 ℃的热水中中热烫 30 s 后取出,放入研钵中,加入 3 mL 甲醇和少量石英砂,研磨至匀浆,再用 3 mL 甲醇转移到刻度试管中,超声波提取 30 min,用超低温离心机 12 000 r/min 离心 15 min,重复提取 3 次,合并上清液,将上清液转移到圆底烧瓶中,40 ℃下旋转蒸发,干燥物用 2 mL 甲醇溶解,−20 ℃避光保存待测。测定前经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后进样,每个样品重复 3 次。

高效液相色谱条件。色谱仪:安捷伦 AGILENT1100 型;色谱柱:C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);检测器:二极管阵列(DAD);检测波长 306 nm;流动相乙腈:水(40:60,V/V),等梯度洗脱,流速 1.0 mL·min^{−1};柱温 30 ℃;进样量 50 μL。

取反式-白藜芦醇标准品 5 mg 加色谱纯定容至 50 mL 容量瓶中,配制成 100 mg/L 标准溶液作为储备液。分别取储备液 1、2、4、8、16 mL 于 100 mL 容量瓶定容至刻度线,从而得到 1、2、4、8、16 mg/L

的标准溶液。

1.2.3 总 RNA 的提取和实时荧光定量 PCR 总 RNA 提取按照 Omega EZNA Plant RNA kit 试剂盒说明书进行。以总 RNA 为模板,使用 HiScript Q Select RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)试剂盒进行反转录与纯化。选取 *βActin* 为内参基因,基因 *PAL*、*CHSs*、*CHI*、*STS*、*UFGT*、*MYBA1*、*MYBA2*、*MYB5a* 的引物根据 GenBank 中所查找到的特异性引物序列,登录 <http://www.idtdna.com/primeruest/Home/Index> 进行引物设计(表 1),引物在北京梓熙生物科技有限公司合成。

PCR 反应体系为 20 μL:模板 DNA 1 μL,上游引物和下游引物各 1 μL,2×TransStart TipTop Green qPCR SuperMix 10 μL,ddH₂O 7 μL。qRT-PCR 扩增运行程序:94 ℃预热 30 s,94 ℃变性 5 s,72 ℃延伸 10 s,50~60 ℃退火 15 s(收集荧光),39 个循环。每个样品设置 3 次生物学重复取平均值,数据分析参照 Schmittgen 等^[21]的方法,公式为 2^{−ΔΔCt}。

1.2.4 数据处理 采用 SAS 8.1 进行数据处理与统计分析,Sigmaplot 12.0 和 Excel 进行绘图,通过 Duncan 法(*P*≤0.05)进行 ANOVO 分析。

2 结果与分析

2.1 白藜芦醇标准曲线的绘制

将 5 个不同浓度白藜芦醇标准样品溶液用 0.45 μm 滤膜过滤后,依次进样,每次进样 20 μL,得到白藜芦醇标准品溶液的色谱图(图 2,A),其标准样品的保留时间为 5.875 min。以标准样品的浓度为横坐标,对应峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。结果得

表 1 qRT-PCR 引物设计序列

Table 1 Primer sequences of real-time fluorescence quantitative PCR

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence(5'→3')		GenBank 登录号 Accession GenBank
	正向 Forward	反向 Reverse	
<i>βActin</i>	TCCTGTGGACAATGGATGGA	CTTGCAATCCCTCAGCACCTT	AF369524.1
<i>PAL</i>	CTGCGAGAAGGACTTGCTAAA	TTCCACCAGAAGCTTGCCCTTAC	EF192469
<i>CHS1</i>	CGTTTGTGATAAACTATGTGCTACAG	AATCATCTCCATGGAACGTAGAC	AB015872
<i>CHS2</i>	AGAAAGTCCCAAAGAGCTGAG	TGGTGATGCGGAAGTAGTAATC	AB066275
<i>CHS3</i>	TAATGCTTCTGACTGGTTGGTG	GGCCTTCACAAGTGACGAAT	AB066274
<i>STS</i>	CCGAAGATGCTTTGGACT	TGTTTGGGCTGCTGAGAC	AF128861
<i>CHI</i>	GAGTTTGGCAGCAAGATTATCG	CTCTCCTTCAACCACTTAACA	X75963
<i>UFGT</i>	CTGGTAGCTGACGCATTCAT	GTAAACATGGGTGGAGAGTGAG	DQ786631
<i>MYBA1</i>	AAGGGATCAGTATTTATTTGTG	CTCCTTTTTGAAGTGGTGACTA	DQ886417
<i>MYBA2</i>	GAAAAAAACCCCAAACACATT	GAATGTGTTCCCTTTTCTGT	DQ886419
<i>MYB5a</i>	GGTAACAGGTGGTCTCTGATTG	GGGATCTATTCTTGGCTGATG	AY555190

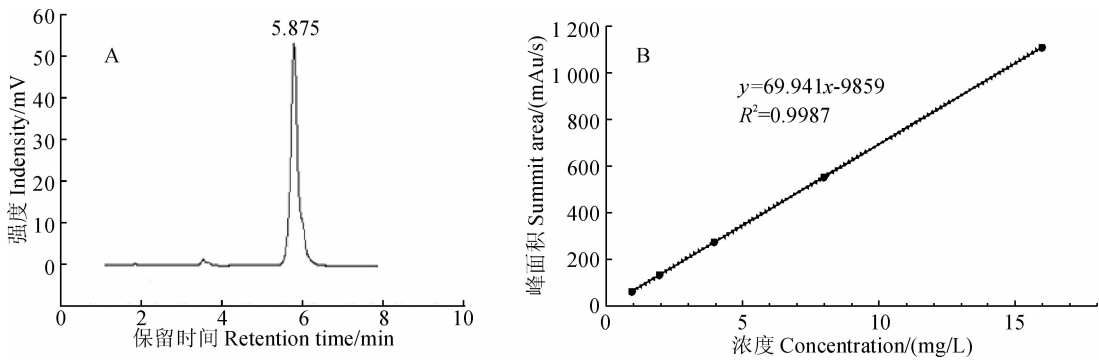
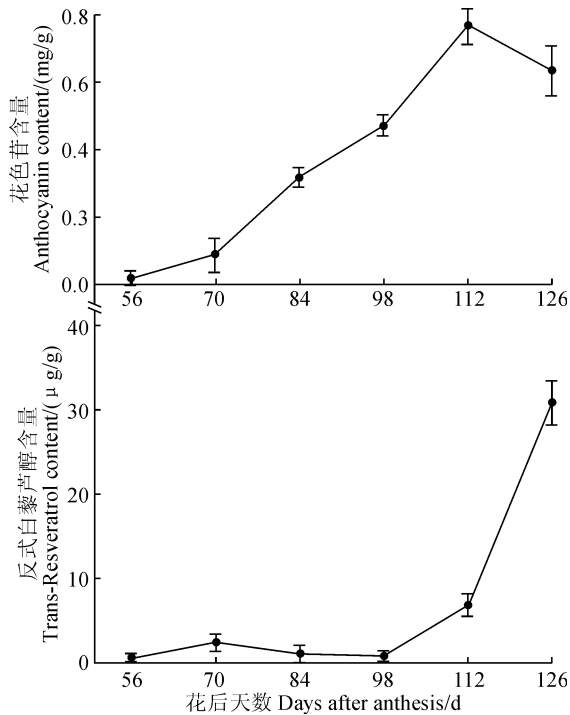


图 2 反式白藜芦醇标准品的色谱图及标准曲线

Fig. 2 The chromatogram of *trans*-resveratrol standard sample and the standard curve



每个点的值由 3 个生物学重复的平均值±标准差(SD)表示

图 3 葡萄成熟期花色苷与白藜芦醇含量变化

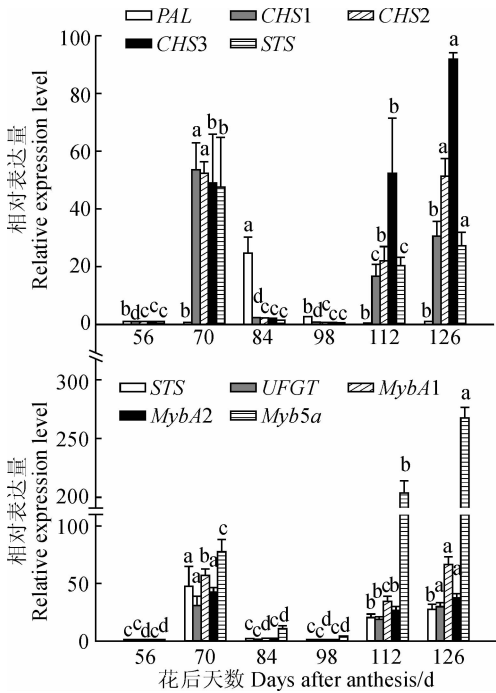
The value of each point is represented by the means±SD (n=3)

Fig. 3 Changes of anthocyanin and resveratrol contents in mature grape

到线性回归方程: $y = 69.941x - 9.858$ (图 2, B), 其中, y 代表 306 nm 波长处的面积, x 代表白藜芦醇的浓度, 方程的相关系数 $R^2 = 0.9987$ 。

2.2 葡萄成熟期花色苷含量与白藜芦醇含量的变化

葡萄浆果的着色度取决于果实中花色苷的含量。如图 3 所示, 花后 56 d 后果实开始着色, 花色苷含量逐渐增加, 在花后 112 d 达到最大值 0.77 mg/g, 之后有所下降, 采收时含量为 0.63 mg/g。白藜芦醇含量在葡萄刚开始着色时较低, 但在花后 98 d 后快速增加, 采收时即花后 126 d 达到最大值 30.87 μg/g。



以花后 56 d 的样品作为对照, 基因表达量定为 1。各基因相对表达量以 3 个生物学重复的平均值±标准差(SD)表示大小。不同小写字母表示差异达显著水平 ($P < 0.05$)

图 4 葡萄成熟期花色苷与白藜芦醇合成相关基因的相对表达量

Samples of 56 days after anthesis were used as control, gene expression is 1. The relative expression of each gene indicate the means±SD (n = 3). Values with different letters indicate significant difference at $P = 0.05$

Fig. 4 Relative expression of anthocyanin and resveratrol biosynthesis related genes in mature grape

2.3 葡萄成熟期花色苷与白藜芦醇合成相关基因的表达量

葡萄成熟期参与花色苷与白藜芦醇合成途径的相关基因的表达量呈现不同的变化趋势。如图 4 所示, 苯丙烷类代谢途径中的 PAL 基因表达量在成熟期呈现先升高后下降的趋势, 花后 84 d 的表达量达到峰值, 是花后 56 d 的 24 倍。CHSs 基因家族中

CHS1 与 *CHS2* 表达量呈现先上升后下降的变化趋势,两者均在花后 70 d 出现峰值,分别是花后 56 d 的 53 和 54 倍;*CHS3* 基因则不同,采收时(花后 126 d)的表达量最大,是花后 56 d 的 92 倍。成熟期 *STS* 基因表达量在花后 98 d 下调表达,在其他时间均上调表达,且在花后 70 d 的表达量达到最大。

参与花色苷合成途径的基因中,*CHI* 基因在花后 70 和 126 d 的表达量相对较高,花后 126 d 的表达量最大,是花后 56 d 的 55 倍。*UFGT* 基因表达量在花后 70 d 与花后 126 d 非常接近,是花后 56 d 的 30 倍。

调控基因 *MYB* 基因家族在葡萄着色方面具有重要作用^[16]。由图 4 可以看出,*MYB* 基因家族中的 *MybA1*、*MybA2* 基因在花后 98 d 的表达量最低,*MybA1*、*MybA2* 分别在花后 126 和 70 d 的表达量最大,分别是花后 56 d 的 66 倍和 43 倍。*Myb5a* 基因在葡萄整个成熟期均上调表达,其表达量在花后 126 d 最大。

调控基因 *MybA1* 表达量的变化与结构基因 *CHS2*、*CHS3*、*CHI* 的表达相似,*MybA2* 基因则与 *CHS1*、*UFGT* 基因表达量的变化相似,表明 *MybA1* 与 *MybA2* 基因可能参与了结构基因的调控。

参与花色苷与白藜芦醇生物合成的结构基因中,*CHSs*、*CHI*、*STS*、*UFGT* 基因的表达与花后 56 d 相比,除了花后 98 d 略微下调外,其余时间均上调表达;调控基因 *MybA1*、*MybA2* 与某些结构基因的表达量变化趋势相似;*Myb5a* 基因的表达与花后 56 d 相比,在果实成熟期均上调表达。

2.4 葡萄成熟期花色苷与白藜芦醇合成相关基因表达量的相关性分析

由表 2 可知,*STS* 基因表达量与 *CHS1* 基因表

达量的相关系数为 0.99,呈极显著正相关,与 *CHS2* 基因表达量的相关系数为 0.95,呈显著正相关。调控基因 *MYBA1*、*MYBA2* 与结构基因 *UFGT* 的相关系数都为 0.99,呈极显著正相关,与 *CHSs*、*CHI* 基因达到显著或极显著正相关;*MYB5a* 与 *CHS3* 基因表达量的相关系数为 0.86,达到显著正相关。

3 讨 论

葡萄花色苷含量在成熟过程中持续增加,是果实内一系列生化反应的结果。参与花色苷生物合成的代谢酶基因已经被克隆和分析^[22]。孙润泽等^[23]研究发现赤霞珠葡萄果皮中 *PAL15* 基因的表达量从转色初期到采收期经历了先上升后下降的变化趋势。Chen 等^[24]也研究发现果实进入转色期,*PAL* 活性急剧上升,之后又下降到较低水平。本研究中‘赤霞珠’果皮,*PAL* 基因表达量在成熟期呈现先升高后降低的趋势,这与前人研究结果一致。Boss 等^[25]研究发现 *CHS* 基因在果实成熟时表达最高,本研究中 *CHS2*、*CHS3* 基因表达量均在成熟时最高,与其研究结果一致。Kobayashi 等^[26]研究发现 *CHI* 基因不是花色苷生物合成所必须的,Dooner 等^[27]认为花色苷的合成机理较为复杂,花色苷只是查尔酮异构酶催化生成的产物之一,*CHI* 活性的上升与花色苷合成不相关;也有报道称,*CHI* 活性的上升会导致花色苷的累积合成。本研究中‘赤霞珠’果皮中 *CHI* 基因在花后 70 和 126 d 的表达量较高。*PAL*、*CHI* 基因的表达可能与花色苷含量变化不同步,但两者对花色苷合成的前体物质以及类黄酮类化合物的转化中起着重要的作用。*UFGT* 可以催化不稳定的花色素形成稳固的花色苷,是葡萄花

表 2 葡萄成熟期花色苷与白藜芦醇合成相关基因表达量的相关性分析

Table 2 Correlation analysis of related gene expression of anthocyanins and resveratrol synthesis during grape ripening period

	<i>CHS1</i>	<i>CHS2</i>	<i>CHS3</i>	<i>CHI</i>	<i>STS</i>	<i>UFGT</i>	<i>MYBA1</i>	<i>MYBA2</i>	<i>MYB5a</i>
<i>CHS1</i>	1	—	—	—	0.99**	—	0.98**	0.93**	0.49
<i>CHS2</i>		1	—	—	0.95*	—	0.98**	0.97**	0.69
<i>CHS3</i>			1	—	0.75	—	0.94**	0.87*	0.95**
<i>CHI</i>				1	—	—	0.92**	0.86*	0.62
<i>STS</i>					1	—	0.91*	0.97**	0.56
<i>UFGT</i>						1	0.99**	0.99**	0.79
<i>MYBA1</i>							1	—	—
<i>MYBA2</i>								1	—
<i>MYB5a</i>									1

注: * 表示显著($P\leqslant0.05$), ** 表示极显著($P\leqslant0.01$), — 表示未分析
Note: * indicates significant correlation ($P\leqslant0.05$), ** indicates the most significant correlation ($P\leqslant0.01$), — means no analysis

色苷合成的关键酶^[28]。葡萄 *MybA1* 和 *MybA2* 调控基因可以通过调节 *UFGT* 的表达影响欧亚种葡萄的果实着色。关于调控基因研究的报道指出, *MybA1* 对 *VvUFGT* 的表达对花色苷促进作用^[29-31]。本研究中 *MybA1*、*MybA2* 基因与 *UFGT* 基因的表达量达到极显著正相关水平,另外, *UFGT* 基因在成熟期的表达量的变化趋势与 *MybA1*、*MybA2* 相似,表明 *MybA1*、*MybA2* 基因能够通过调节 *UFGT* 的表达影响果实着色,与前人研究结果一致。Castellarin 等^[32]的研究结果则认为 *MYBA* 在成熟时表达量最高,本研究中 *MybA1*、*Myb5a* 均在成熟时表达量最高,与其结果一致。本实验中 *MybA1*、*MybA2* 基因表达量的变化趋势与 *CHSs*、*CHI* 的变化趋势相似,且它们之间呈显著或者极显著的相关性,因此,推测 *MybA1* 和 *MybA2* 基因既调控 *UFGT* 的表达,也可能调控花色苷合成途径其他结构基因的表达。Deluc 等^[33]认为 *Myb5a* 主要在果实的发育早期表达,在果实成熟过程中为下调表达。而本实验中 *Myb5a* 在成熟期均上调表达,这可能是由于环境因素导致。*STS* 是白藜芦醇合成的关键酶。李阿英^[34]发现 *STS* 基因的表达量在葡萄始熟期最高,本研究中 *STS* 基因表达量在花后 70 d 最

高,与其研究结果一致。

葡萄果实花色苷与白藜芦醇的合成受多种环境因素的影响,例如:温度、水分、激素、光照等。Jean-det 等^[35]研究发现在短时间紫外线照射后葡萄果皮中白藜芦醇含量与花色苷含量呈负相关,且 *STS* 与 *CHS* 之间存在竞争关系。而本研究发现 *STS* 基因的表达量与 *CHS1*、*CHS2* 的表达量呈极显著和显著正相关,与 Jeandet 研究结果不一致,原因可能是白藜芦醇作为植物的一种抗毒素,正常情况下,其含量比较低且维持在低水平,葡萄果皮花色苷含量会随着葡萄的成熟持续增加,因此两者并不会呈现负相关的关系;酿酒葡萄在采收前一段时间会停止灌溉,可能会对葡萄造成一定程度的水分胁迫,同时 *STS* 是诱导型酶,从而引起白藜芦醇含量在短时间内增加,而花色苷含量也在增加。此外,葡萄花色苷与白藜芦醇生物合成还受多种酶的作用,并可能还受到底物供给的影响,因此葡萄果皮花色苷含量与白藜芦醇含量的关系并不是固定的一种模式,而是处在动态变化中。本实验对葡萄果皮花色苷和白藜芦醇合成途径中相关基因的具体研究,充分体现了二者动态变化的特性,为更清晰地理解葡萄浆果成熟过程中酚类物质的积累变化提供理论依据。

参考文献:

- [1] 许雪峰, 罗国光, 彭宜本. 玫瑰香葡萄浆果生长发育动态及其变化特点[J]. 园艺学报, 1995, (4): 318-322.
XU X F, LUO G G, PENG Y B. Dynamics and characteristics of berry growth and development of grape (*Vitis vinifera* L. cv. ‘Muscat Hamburg’) [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 1995, (4): 318-322.
- [2] COOMBE B G. Research on development and ripening of the grape berry[J]. *American Journal of Enology & Viticulture*, 1992, **43**(1): 101-110.
- [3] DREIER L P, HUNTER J J, RUFFNER H P. Invertase activity, grape berry development and cell compartmentation[J]. *Plant Physiology & Biochemistry*, 1998, **36**(12): 865-872.
- [4] KOES R, VERWEIJ W, QUATTROCCHIO F. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways[J]. *Trends in Plant Science*, 2005, **10**(5): 236-242.
- [5] 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.
- [6] 刘丽媛, 苑 伟, 刘延琳. 红葡萄酒中花色苷辅助成色作用的

- 研究进展[J]. 中国农业科学, 2010, **43**(12): 2 518-2 526.
- LIU L Y, YUAN W, LIU Y L. Advances in research of red wine's anthocyanin copigmentation[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, **43**(12): 2 518-2 526.
- [7] 陈继峰. 红葡萄酒颜色研究进展[J]. 农业工程学报, 2004, **20**(s1): 18-24.
CHEN J F. Research advances of red wine color[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2004, **20**(s1): 18-24.
- [8] 孙文基, 绳金房. 天然活性成分简明手册[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1998.
- [9] JEANDET P, DOUILLET-BREUIL A C, BESSIS R, et al. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity and metabolism. [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2002, **50**(10): 2 731-2 741.
- [10] VANG O, AHMAD N, BAILE C A, et al. What Is New for an Old Molecule? Systematic Review and Recommendations on the Use of Resveratrol[J]. *PloS One*, 2011, **6**(6): e19881.
- [11] ALI M B, HOWARD S, CHEN S, et al. Berry skin development in Norton grape: distinct patterns of transcriptional regulation and flavonoid biosynthesis. [J]. *BMC Plant Biology*, 2011, **11**(1): 1-23.

- [12] 刘闯萍, 王 军. 葡萄花色苷的生物合成[J]. 植物生理学报, 2008, **44**(2): 363-377.
LIU C P, WANG J. Anthocyanin biosynthesis in grapevine [J]. *Plant Physiology Journal*, 2008, **44**(2): 363-377.
- [13] 孙 欣, 韩 键, 房经贵, 等. 葡萄浆果着色分子机理的重要研究进展[J]. 植物生理学报, 2012, **48**(4): 333-342.
SUN X, HAN J, FANG J G, *et al.* Important research progress of coloring molecular mechanisms in grape berry [J]. *Plant Physiology Journal*, 2012, **48**(4): 333-342.
- [14] 王 华, 李茂福, 杨 媛, 等. 果实花青素生物合成分子机制研究进展[J]. 植物生理学报, 2015, (1): 29-43.
WANG H, LI M F, YANG Y, *et al.* Research on anthocyanins biosynthesis in fruit [J]. *Plant Physiology Journal*, 2015, (1): 29-43.
- [15] WALKER A R, LEE E, BOGS J, *et al.* White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. [J]. *The Plant Journal*, 2007, **49**(5): 722-85.
- [16] 牛生洋, 武陵峰, 赵瑞香, 等. 葡萄果实花色苷合成调控研究进展[J]. 食品科学, 2015, (9): 219-223.
NIU S Y, WU L F, ZHAO R X, *et al.* Progress of anthocyanin biosynthesis in grape berries [J]. *Food Science*, 2015, (9): 219-223.
- [17] HÖLL J, VANNOZZI A, CZEMMEL S, *et al.* The R2R3-MYB transcription factors MYB14 and MYB15 regulate stilbene biosynthesis in *Vitis vinifera* [J]. *Plant Cell*, 2013, **25**(10): 4135.
- [18] YU O, WANG Y, CHEN S, *et al.* Berry skin development in Norton grape: Distinct patterns of transcriptional regulation and flavonoid biosynthesis [J]. *BMC Plant Biology*, 2011, **11**(1): 1-23.
- [19] H. HÖLYA ORAK. Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenoloxidase activities of selected red grape cultivars and their correlations [J]. *Scientia Horticulturae*, 2007, **111**(3): 235-241.
- [20] 李晓东, 李绍华, 闫树堂. 葡萄白藜芦醇提取和 HPLC 定量测定适宜条件的研究 [J]. 园艺学报, 2006, **33**(4): 836-838.
LI X D, LI S H, YAN S T. Optimization for extraction and determination of resveratrol in grapes by HPLC [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2006, **33**(4): 836-838.
- [21] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method [J]. *Nature Protocol*, 2008, **3**(6): 1 101.
- [22] SPARVOLI F, MARTIN C, SCIENZA A, *et al.* Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.) [J]. *Plant Molecular Biology*, 1994, **24**(5): 743-755.
- [23] 孙润泽, 张 雪, 成 果, 等. 葡萄苯丙氨酸解氨酶基因家族的全基因组鉴定及表达分析 [J]. 植物生理学报, 2016, (2): 195-208.
SUN R Z, ZHANG X, CHENG G, *et al.* Genome-wide characterization and expression analysis of the phenylalanine ammonia-lyase gene family in grapevine (*Vitis vinifera* L.) [J]. *Plant Physiology Journal*, 2016, (2): 195-208.
- [24] CHEN J Y, WEN P F, KONG W F, *et al.* Changes and sub-cellular localizations of the enzymes involved in phenylpropanoid metabolism during grape berry development [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2006, **163**(2): 115-27.
- [25] BOSS P K, DAVIES C, ROBINSON S P. Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes [J]. *Plant Molecular Biology*, 1996, **32**(3): 565-569.
- [26] KOBAYASHI S, ISHIMARU M, DING C K, *et al.* Comparison of UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT) gene sequences between white grapes (*Vitis vinifera* L.) and their sports with red skin [J]. *Plant Science*, 2001, 160: 543-550.
- [27] DOONER H K, ROBBINS T P, JORGENSEN R A. Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis [J]. *Annual Review of Genetics*, 1991, **25**(1): 173.
- [28] 任国慧, 陶 然, 王 晨, 等. 葡萄浆果着色与 UFGT 和 MYBA 基因表达量的关系研究 [J]. 南京农业大学学报, 2013, (4): 30-36.
REN G H, TAO R, WANG C, *et al.* The research of the relationship between coloring and UFGT and MYBA gene expression level of the grape berry [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2013, (4): 30-36.
- [29] KOBAYASHI S, ISHIMARU M, HIRAOKA K, *et al.* Myb-like cDNAs isolated from Kyoho grape (*Vitis labruscana*) berries regulate the anthocyanin biosynthesis in the grape [C]. 2001.
- [30] CUTANDAPEREZ 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*, 2009, **69**(6): 633-648.
- [31] SOUBEYRAND E, BASTEAU C, HILBERT G, *et al.* Nitrogen supply affects anthocyanin biosynthetic and regulatory genes in grapevine cv. Cabernet-Sauvignon berries [J]. *Phytochemistry*, 2014, 103: 38-49.
- [32] CASTELLARIN S D, GAMBETTA G A, WADA H, *et al.* Fruit ripening in *Vitis vinifera*: spatiotemporal relationships among turgor, sugar accumulation, and anthocyanin biosynthesis [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, **62**(12): 4 345-4 354.
- [33] DELUC L, BARRIEU F, MARCHIVE C, *et al.* Characterization of a grapevine R2R3-MYB transcription factor that regulates the phenylpropanoid pathway [J]. *Plant Physiology*, 2006, **140**(2): 499.
- [34] 李阿英. 白藜芦醇在葡萄生长发育过程中的变化规律及与果实成熟、着色的关系 [D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
- [35] JEANDET P, SBAGHI M, BESSIS R, *et al.* The potential relationship of stilbene (resveratrol) synthesis to anthocyanin content in grape berry skins [J]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 1995, **26**(1): 165-174.