

NAA 和 ABA 处理对‘京优’葡萄花色苷生物合成 相关基因表达的影响

周莉^{1,3} 王军^{1,2*}

(1. 东北林业大学 林学院/林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨 150040;

2. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院 葡萄与葡萄酒研究中心, 北京 100083;

3. 齐齐哈尔林业学校, 齐齐哈尔 161006)

摘要 为人工调控花色苷合成,以‘京优’葡萄为实验材料,应用液相色谱-质谱(HPLC-MS)技术和荧光定量PCR,研究了萘乙酸(NAA)和脱落酸(ABA)处理对葡萄果皮花色苷积累及其生物合成相关基因表达的影响。结果表明:在‘京优’葡萄果皮中,可检测到16种花色苷;ABA处理的花色苷含量高于对照,NAA处理低于对照,并且ABA处理的果皮比对照和NAA多出3种花色苷;葡萄果实发育进入转色期,花色苷合成过程中类黄酮途径的结构基因上调表达,完熟后下调表达;ABA处理的果皮花色苷结构基因相对表达量高于对照,而NAA则低于对照。外源ABA促进花色苷积累及其合成相关基因的表达,而NAA则抑制其表达。

关键词 葡萄; 花色苷; 脱落酸; 萘乙酸; 定量PCR

中图分类号 S 482.8; S 663.1

文章编号 1007-4333(2011)04-0030-08

文献标志码 A

Effects of NAA and ABA treatments on the expression of anthocyanin biosynthetic genes in ‘Jing You’ grape berry skin

ZHOU Li^{1,3}, WANG Jun^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology of Ministry of Education/College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;

2. Center for Viticulture and Enology, College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

3. Qiqihaer Forestry School, Qiqihaer 161006, China)

Abstract In order to control anthocyanin synthesis of ‘Jingyou’ grape, we applied high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) and real time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for studying the effects of naphthaleneacetic acid (NAA) and abscisic acid (ABA) treatments on the accumulation of anthocyanins, as well as the expression of anthocyanin biosynthetic correlative genes. The results showed that there were 16 sorts of anthocyanins in ‘Jing You’ berry skin. The anthocyanin contents of ABA treatment were higher but NAA treatment lower than that of control. And there were three extra anthocyanins in ABA treatment of berry skin. The structural genes in flavonoid pathway of anthocyanin synthesis were up-regulated at veraison, but down-regulated after complete maturity. The expression of anthocyanin structural genes was higher in ABA treatment than control, but lower for NAA treatment than control. The accumulation of anthocyanin and the correlative genes of anthocyanin synthesis were promoted by exogenous ABA. And NAA treatment had the opposite impacts.

Key words grape; anthocyanin; ABA; NAA; RT-PCR

收稿日期: 2010-11-30

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-30)

第一作者: 周莉, 硕士研究生, E-mail: zll36820032005@163.com

通讯作者: 王军, 教授, 博士, 主要从事葡萄遗传育种研究, E-mail: jun-wang1966@yahoo.com.cn

葡萄果皮花色苷主要在葡萄浆果表皮细胞的细胞质中合成,并于液泡中积累^[1-3],积累始于果实转色期,直至成熟^[4]。花色苷生物合成分为2个过程:苯丙烷类代谢途径(Phenylpropanoid metabolic pathway)和类黄酮途径(Flavonoid pathway)^[1,5]。查尔酮合酶(CHS)是类黄酮途径中的第一个酶,它催化3分子丙二酰 CoA 和1分子4-香豆酰 CoA 缩合形成黄色的查尔酮。黄色的查尔酮能自发或在查尔酮异构酶(CHI)作用下很快异构化形成无色的黄烷酮^[6]。黄烷酮3-羟化酶(F3H)催化黄烷酮在C3位置羟化形成无色的黄烷酮醇^[1,6-8]。类黄酮3'-羟化酶(F3'H)催化花色苷B环的3'位羟化,类黄酮3',5'-羟化酶(F3'5'H)催化花色苷B环的3',5'位羟化。黄烷酮醇4-还原酶(DFR)催化黄烷酮醇还原成无色花色苷。(无色花色苷双加氧酶LDOX)催化无色花色苷转变为有色花色苷,包括花翠素和花青素^[1,6,9],但此时的花色苷不稳定。UDP葡萄糖-类黄酮3-O-葡萄糖基转移酶(UFGT)将不稳定的花色苷糖苷化形成各种花色苷^[2,4,10-11]。O-甲基转移酶(OMT)催化花青素(cyanidin)3'甲基化产生甲基花青素(peonidin),或催化花翠素(delphinidin)3'位或3'和5'位,分别产生甲基花翠素(petunidin)和二甲基花翠素(malvidin)^[2,6,9,12-13]。不同种或品种的葡萄都具有自己独特的花色苷类型,各种花色苷的比例决定着果皮颜色^[1,9,12,14]。花色苷的生物合成除受遗传基因调控外,外界条件对花色苷积累也有一定影响。夜间高温抑制果皮花色苷的积累^[15];水分胁迫不仅可以提高果实花色苷的含量,而且可以提高花色苷的O-甲基化和羟基化水平^[2,11];外源生长调节物质和乙醇对花色苷的生物合成也有影响^[4,16-17];持续光照可以诱导花色苷在下胚轴和根中合成,光质和光照时间也影响花色苷的积累^[5]。葡萄成熟时的果实颜色对其商品价值有着重要影响,尤其是对葡萄酒的色泽、质量和营养价值起着重要作用^[18-19]。因此,人为调节花色苷的合成对葡萄生产实践具有重大意义。为此,本试验着重研究外施脱落酸和萘乙酸对转色期‘京优’葡萄果皮中花色苷的积累及其生物合成相关结构基因表达的影响,旨在通过利用外源植物生长调节剂调节花色苷生物合成,为指导生产实践提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选用东北林业大学林木遗传育种试验基地长势

一致、树势健壮的5年生‘京优’葡萄(砧木为‘贝达’)为试材,在果实变软进入转熟期(2008年8月12日)进行NAA和ABA处理。各处理均为单株小区,重复3次。每2周取同一处理不同株的葡萄果实各1穗。每个处理选择3株果树,每隔1周取各处理的3株果树各1串果实,共计9串果实。采样直至对照果实发育成熟为止。采样时间集中在16:00—18:00。取样后立即放入液氮罐,带回实验室于-80℃冰箱保存备用。NAA(200 mg/L)和ABA(1 000 mg/L),分别用少量的乙醇完全溶解,加体积分数为0.1%的吐温80,定容。对照溶液只加入少量的乙醇和0.1%吐温80,定容。在转熟期用喷壶对准葡萄果实进行喷雾,直至整串果实都挂满水珠。

1.2 方法

1.2.1 花色苷提取与检测

剥取果皮,液氮保护下研磨成粉,冷冻干燥。精称2 g果皮,加入10 mL 1%的盐酸乙醇溶液,于30℃避光提取2 h,8 000 r/min离心5 min,重复提取5次,合并提取液,35℃旋转减压蒸干,残留物用甲醇定容至10 mL,-40℃保存备用。二甲基花翠素-3-O-葡萄糖苷(Malvidin-3-O-glucoside,分析纯,Extrasynthese SA公司)作为标准品。色谱柱采用Zorbax Eclipse SB C-18(250 mm(4.6 mm i. d.),5 μm 粒度色谱柱);流动相A:V(水):V(甲酸)为90:10;流动相B:V(水):V(甲醇):V(甲酸)=40:50:10。洗脱程序为:0~4 min,6%~15% B;4~13 min,15%~25% B;13~20 min,25%~50% B;20~35 min,50%~80% B;35~40 min,80%~100% B;40~45 min,100%~6% B;流速:1.0 mL/min;柱温:30℃;检测波长:525 nm;进样量:10 μL。

1.2.2 RNA提取

果皮RNA提取参照温鹏飞的CTAB法^[20],稍有修改:1)果皮在液氮保护下研磨成粉状,转移至预冷的离心管中,迅速加入1.5 mL预冷的Washing Buffer(内含0.1 mol/L Tris-硼酸,pH 7.4,0.35 mol/L sorbitol,10% PEG 6 000),加80~100 μL β-巯基乙醇,振荡混匀后,静置10 min,4℃10 000 r/min离心10 min,弃上清。2)加入2 mL CTAB buffer(内含0.1 mol/L Tris-硼酸,pH 7.4,1.4 mol/L NaCl,0.02 mol/L EDTA,2% CTAB),振荡混匀后,55℃提取20 min。3)加入0.1 mL 5 mol/

L 醋酸钾, 0.1 mL 乙醇, 1 mL 氯仿, 室温下振荡 30 min。4) 4 °C 10 000 r/min 离心 10 min, 上清转入另一新管, 加入 1/3 体积 10 mol/L 氯化锂, -20 °C 过夜沉淀。5) 4 °C 10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 沉淀用 0.5 mL DEPC-H₂O 溶解并转入新管。6) 加入 0.5 mL 水饱和酚, 剧烈振荡 5 min, 4 °C 15 000 r/min 离心 10 min, 上清转入新管, 加入 0.5 mL 氯仿, 室温静置 5 min。7) 4 °C 15 000 r/min 离心 10 min, 上清转入新管, 加入 1/3 体积 10 mol/L 氯化锂, -20 °C 下沉淀 2 h 或过夜。8) 4 °C 15 000 r/min 离心 30 min, 弃上清, 沉淀用 75% 乙醇洗涤, 真空或自然干燥。9) 用适量 DEPC-H₂O 溶解, 1% 琼脂糖/TAE 凝胶电泳检测 RNA 完整性, 用核酸分析仪检测 RNA 的纯度。

1.2.3 反转录

反转录体系为 2 μL 5 × PrimeScript 缓冲液、

0.5 μL Random 6 mers (100 μmol/L)、0.5 μL Oligo dT Primer (50 μmol/L) 和 500 ng 总 RNA, 用水补足体积至 10 μL。反转录程序为 37 °C 15 min, 85 °C 5 s。将逆转录产物稀释 10 倍, 用作定量 RT-PCR 模板。

1.2.4 实时定量 PCR

实时定量 RT-PCR 反应试剂盒为按照 SYBR Premix Ex Taq™ (TaKaRa Code: DRR041A) 说明书操作。反应体系为 12.5 μL SYBR Premix Ex Taq (2 ×), 引物 (10 μmol) 各 0.5 μL, 9.5 μL 水, 2 μL 模板。反应条件为: 94 °C 预变性 30 s; 94 °C 12 s, 58 °C 30 s, 72 °C 40 s, 81 °C 1 s, 45 个循环。在 OPTION 2 荧光定量 PCR 仪上完成 RT-PCR。用 18S rRNA 和 *KyActin1* (AB073011) 基因作为内参基因。用 2^{-ΔΔCt} 方法进行基因的相对定量分析。引物序列见表 1, 由上海生工合成。

表 1 实时定量 PCR 引物序列

Table 1 PCR primers for real-time Q-PCR

基因	序列号	引物序列(5'-3')	基因	序列号	引物序列(5'-3')
<i>CHS1</i>	(AB015872) ^a	F AAACACTATGTGCTACAGTCC	<i>F3'5'H</i>	(AB213606) ^b	F AAACCGCTCAGACCAAAAACC
		R GACTACAGTTCAGAAATAA			R ACTAAGCCACAGGAAACTAA
<i>CHS2</i>	(AB066275) ^a	F GAAGATGGGAATGGCTGCTG	<i>DFR</i>	(X75964) ^a	F GAAACCTGTAGATGGCAGGA
		R AAGGCACAGGGACACAAAAG			R GGCCAAATCAAACCTACCAGA
<i>CHS3</i>	(AB066274) ^a	F TCGGCTGAGGAAGGGCTGAA	<i>LDOX</i>	(X75966) ^a	F AGGGAAGGGAACAAGTAG
		R GGCAAGTAAAGTGAAACAG			R ACTCTTTGGGGATTGACTGG
<i>CHI1</i>	(X75963) ^a	F CAGGCAACTCCATTCTTTTC	<i>UFGT</i>	(AF000372) ^a	F GGGATGGTAATGGCTGTGG
		R TTCTCTATGACTGCATTCCC			R ACATGGGTGGAGAGTGAGTT
<i>CHI2</i>	(VitiB655) ^c	F TCCAGATCAAGTTCACAGCA	<i>OMT</i>	BQ796057	F CCATAAGCAAACCTAAACC
		R GAAACAAGAGCCTCAAAGAA			R TGAACAAATTCTTGCCATCA
<i>F3H1</i>	(X75965) ^a	F CCAATCATAGCAGACTGTCC	<i>KyActin1</i>	(AB073011) ^c	F GATTCTGGTGATGGTGTGAGT
		R TCAGAGGATACACGGTTGCC			R GACAATTTCCCGTTCAGCAGT
<i>F3H2</i>	(VitiA130) ^c	F CTGTGGTGAACCTCCGACTGC	<i>18S rRNA</i>		F CTTTGCCGCTTGCTCTGATG
		R CAAATGTTATGGGCTCCTCC			R TGCTGCCTTCCTTGTTGTG
<i>F3'H</i>	(AB113261) ^b	F GCCTCCGTTGCTGCTCAGTT			
		R GAGAAGAGGTGGACGGACAAATC			

注: a 引物序列来自于文献[4]; b 引物序列来自于文献[9]。c 引物序列来自于文献[21]。

2 结果与分析

2.1 ‘京优’葡萄果皮中花色苷的种类变化

应用 HPLC-MS 可检测到 ABA 处理的‘京优’

葡萄果皮中含有 16 种花色苷(表 2)。其中双糖苷 5 种, 乙酰化的花色苷 2 种, 香豆酰化的花色苷 5 种。对照和 NAA 处理与 ABA 处理相比少 3 种花色苷, 分别是花翠素-3,5-双葡萄糖苷、花青素-3,5-双葡萄

表 2 不同处理对‘京优’葡萄果皮花色苷种类和含量的影响
Table 2 Effects of different treatment on anthocyanin content
in ‘Jing You’ berry skin mg/g

花色苷种类	花色苷含量		
	CK	NAA 处理	ABA 处理
Dp-3,5-G			0.040 7
Cy-3,5-G			0.071 2
Pt-3,5-G			0.071 5
Dp-3-G	0.036 3	0.010 6	0.274 3
Pn-3,5-G	0.011 8		0.270 7
Mv-3,5-G	0.025 9	0.015 8	0.504 5
Pt-3-G	0.025 4	0.009 1	0.141 7
Pn-3-G	0.017 3	0.016 5	0.120 9
Mv3-G	0.045 5	0.014 2	0.219 3
De-3-O-(6-O-acetyl)-G	0.011 1	0.006 3	0.030 8
Pt-3-O-(6-O-acetyl)-G	0.012 2	0.006 8	0.026 1
Dp-3-O-(6-O-coumaryl)-G	0.035 5	0.010 4	0.129 9
Cy-3-O-(6-O-coumaryl)-G	0.009 8	0.013 2	0.038 1
Pt-3-O-(6-O-coumaryl)-G	0.018 5	0.009 1	0.057 7
Trans-Pn-3-O-(6-O-coumaryl)-G	0.009 8	0.013 5	0.026 7
Trans-Mv-3-O-(6-O-coumaryl)-G	0.043 1	0.016 8	0.110 8

注：Dp 为花翠素；Pt 为甲基花翠素；Mv 为二甲花翠素；Pn 为甲基花青素；Cy 为花青素；Glu 为葡萄糖；Trans 为反式。

糖苷、甲基花翠素-3,5-双葡萄糖苷。

2.2 NAA、ABA 处理对花色苷含量的影响

葡萄果皮花色苷积累始于果实转色期^[4]。在转色期,ABA 处理的果皮花色苷含量随着果实发育而逐渐增加,在 9 月 10 日含量达到最高,随之下降,对照和 NAA 处理于 9 月 24 日果皮花色苷含量达到最大值(图 1),分别为 2.135 1、0.301 9 和 0.141 9 mg/g。三者相比,ABA 处理的果皮花色苷含量最高,NAA 处理最低。此结果表明 ABA 处理促进花色苷积累,NAA 处理则抑制花色苷积累,与 Jeong 等^[4]的研究结果一致,亦符合观察到的葡萄果皮表型变化见图 2 中的(a)、(b)和(c)。当不同处理果皮中花色苷含量达到最大时,ABA 处理果皮中单种花色苷含量均高于对照,NAA 处理则低于对照(表 2)。其中,对照的双糖苷占总花色苷 12.45%,NAA 处理为 11.1%,ABA 处理是 44.91%。此外,ABA 处理比对照和 NAA 处理多出 3 种双糖花色

苷。二者皆说明 ABA 促进花色苷双糖苷化,NAA 则相反。对照、NAA 和 ABA 处理花翠素类的花色苷与花青素类的花色苷比率分别为 5.22、2.3 和 3.04。花翠素类(3',4',5'羟化)的花色苷呈蓝色,而花青素类(3',4'羟化)的花色苷呈红色。NAA 和 ABA 处理降低了二者的比率,使果实颜色红移。

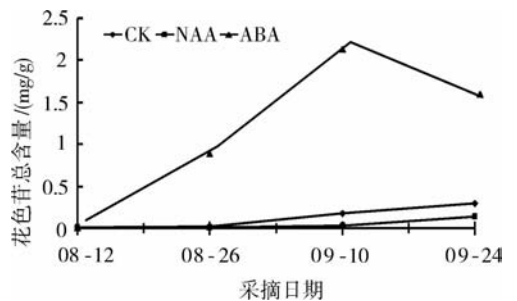


图 1 不同处理对‘京优’葡萄果皮中花色苷总含量的影响
Fig. 1 Effects of different treatment on total anthocyanins in ‘Jing You’ berry skin

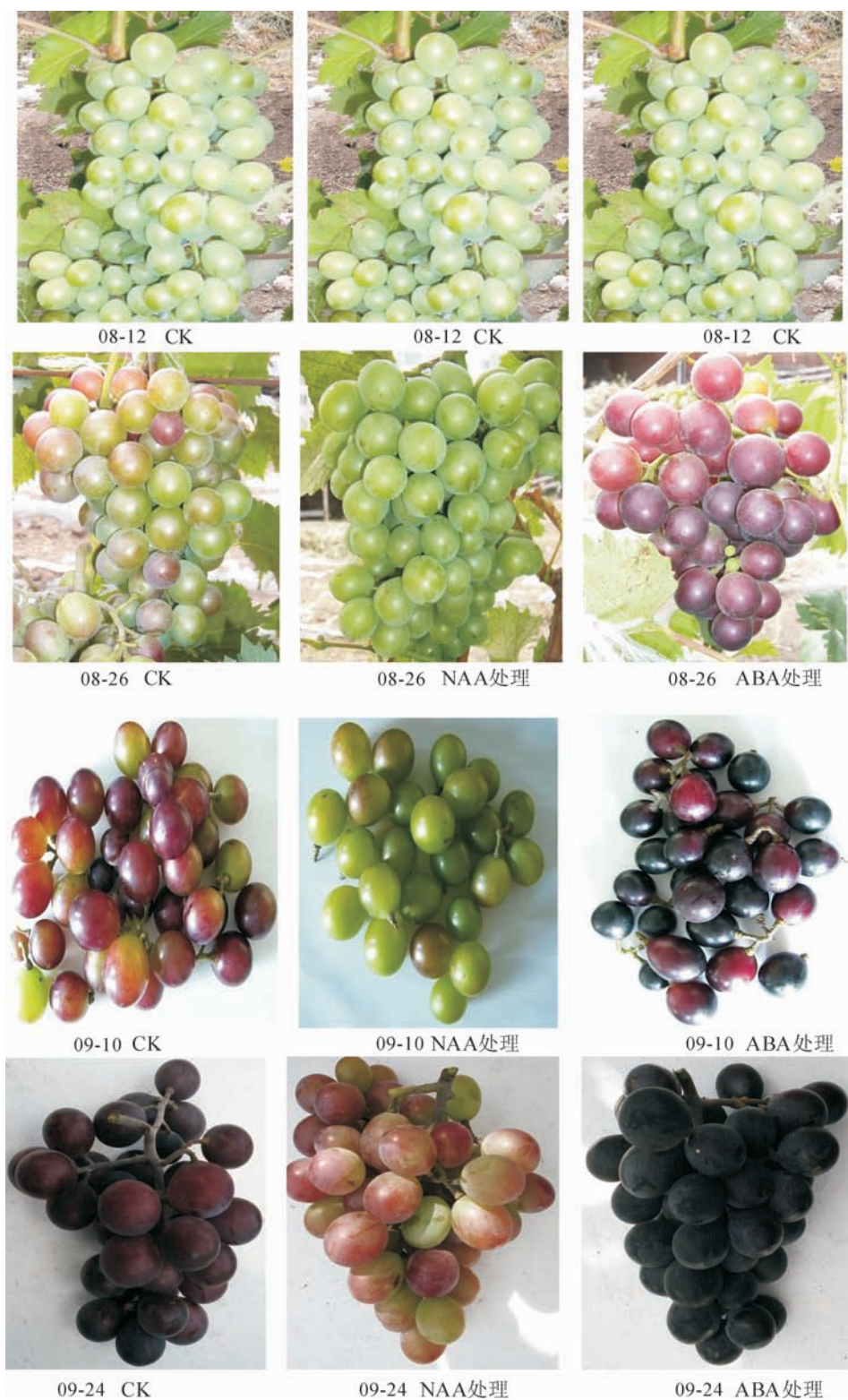


图2 不同处理对‘京优’葡萄果实发育的影响

Fig. 2 Effects of different treatment on the development of ‘Jing You’ grape

2.3 NAA、ABA 处理对类黄酮途径中各个基因表达量的影响

利用荧光定量 PCR 检测得到的花色苷生物合

成相关基因的表达结果如图 3 所示。ABA 处理的葡萄果皮中各个基因(除 F3H2)分别在处理后的 8 月 26 日和 9 月 10 日(即处理后的第 2 周和第 4 周)

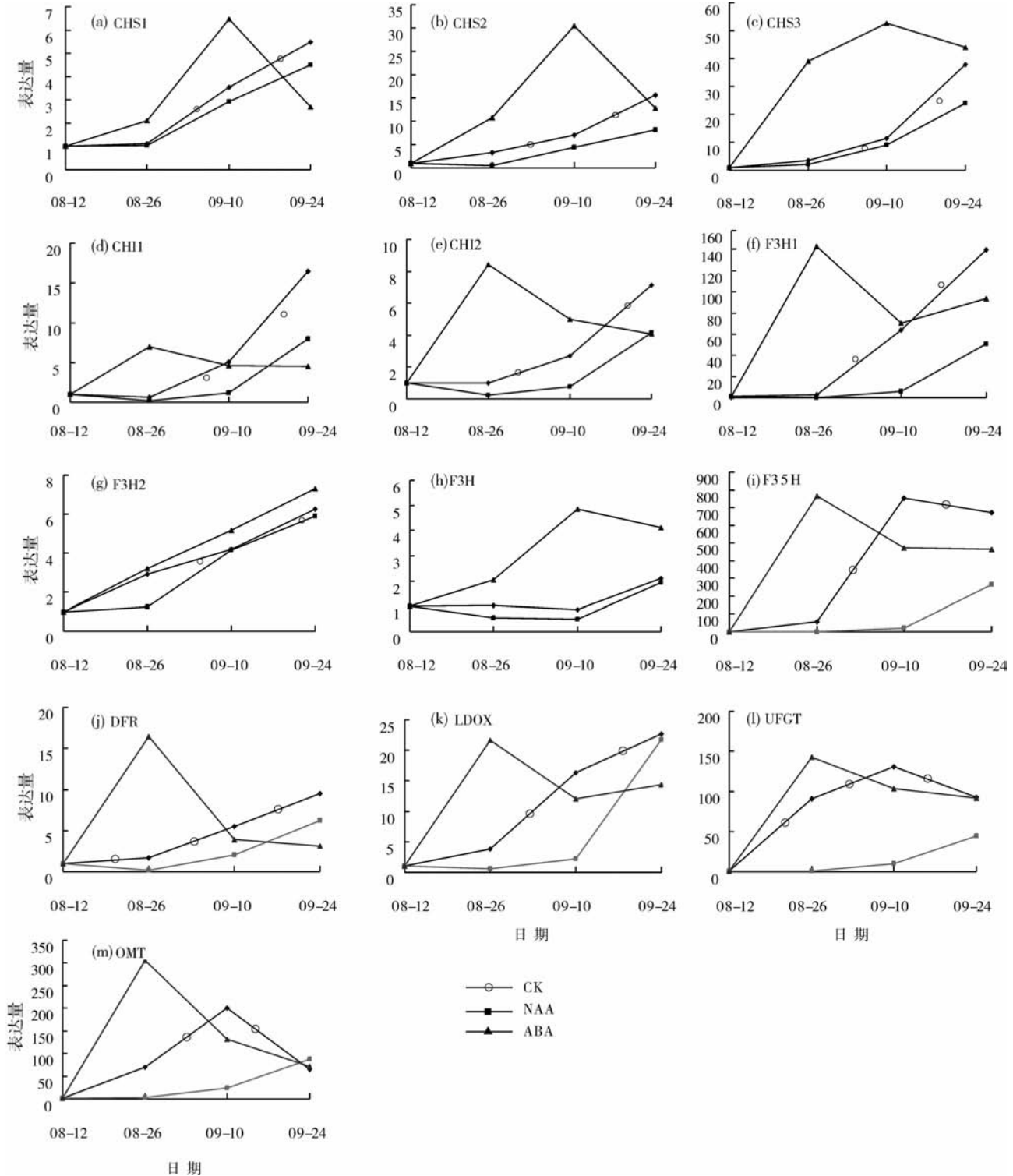


图 3 花色苷生物合成相关基因的表达水平

Fig. 3 Expression profile of anthocyanin biosynthetic genes

表达量达到最大。NAA 和对照在 9 月 24 日达到对照(除 *F3'5'H*、*UFGT*、*OMT*)和 NAA 处理的各个基因表达量在采样过程中一直呈增加趋势。ABA 处理的各个基因表达量明显高于 NAA 处理。葡萄果实发育进入转色期,这些基因大量上调表达,完熟后,下调表达。基因表达谱符合观察到的花色苷积累的变化(图 1 和图 3)。比较 *CHSs*、*CHIs* 和 *F3Hs* 基因家族中的每个基因的 mRNA 转录水平发现,在果实转色期,*CHS2* 和 *CHS3*、*CHI1* 和 *F3H1* 与花色苷合成关系密切。

在本研究中,‘京优’葡萄 *F3'5'H* 基因的 mRNA 水平高于 *F3'H* 基因的 mRNA 水平。*F3'H* 催化花色素 B 环的 3'位羟化,*F3'5'H* 催化花色素 B 环的 3'、5'位羟化。前者最终生成花青素类的花色苷,后者产生花翠素类的花色苷。对照、NAA 和 ABA 处理 *F3'5'H* 与 *F3'H* 表达比率分别为 209.58、12.02 和 63.97,与检测到的对照、NAA 和 ABA 处理中花翠素类的花色苷与花青素类的花色苷比率分别为 5.22、2.3 和 3.04 相符。ABA 处理 2 周时 *UFGT* 表达出现最高峰,随后下调表达,与对照差别不大。此结果与 Peppi^[22] 报道的对‘克瑞森无核’进行 ABA 处理 1 周后 *UFGT* 表达量最高,第 3 周至第 9 周时,仅略微高于对照的结果很相似。

3 讨论

1)‘京优’葡萄果皮中花色苷的种类。若花色素分子的 B 环不发生修饰,就会产生花葵素,但葡萄花色素的 B 环经过羟化,所以葡萄中没有花葵素^[23]。因此,葡萄果皮中一般含有花翠素、花青素、甲基花翠素、甲基花青素、二甲花翠素这 5 种花色素^[24]。欧亚种葡萄(*V. vinifera*)中只含有花色素单葡萄糖苷,不含有花色素双葡萄糖苷。北美种群葡萄和东亚种群葡萄中均含有花色素的单葡萄糖苷和双葡萄糖苷,含有双糖苷是美洲种葡萄(*Vitis rupestris*, *Vitis riparia*, *Vitis labrusca*)的显性特征。因此,有无花色素双葡萄糖苷是欧亚种葡萄和其他种葡萄之间的最重要的区别。‘京优’葡萄为欧美杂交种,因而可检测到 $C_{3,5}$ -双糖苷。‘京优’果皮中含有乙酰化和香豆酰化的糖配基,未检测到咖啡酰化的糖配基。

2)ABA 处理对花色苷及其相关基因表达的影响。研究表明:ABA 可促进花色苷积累及其合成过程中类黄酮途径的相关酶基因的表达。ABA 可能

是乙烯上游调节因子,从而启动了非跃变型果实(葡萄)的成熟。其中 ABA 介导植物的成熟、抗逆反应已经得到证实,它可以通过影响各种代谢酶直接引起快速生理生化反应,也可以启动相关基因的表达调节代谢^[25]。外源 ABA 可促进 *VvmybA1* 和花色苷合成的相关基因的表达及花色苷的合成,其中 *VvmybA1* 的产物不但可以调控 *UFGT* 的表达,还调控与花色苷合成有关的其它基因的表达^[4]。此外,ABA 还可促进单糖而不是蔗糖的积累^[26],而单糖正是花色素糖苷化所必须的物质。因此,ABA 可促进花色苷的积累和花色素的双糖苷化。关于 NAA 抑制花色苷合成相关的分子生物学基础尚未有详细报道。

3)类黄酮途径中各个基因的表达情况。荧光定量 PCR 结果表明,大多数与花色苷合成相关的结构基因表达谱符合观察到的花色苷积累的变化(图 1 和图 3)。葡萄果实发育进入转色期,花色苷生物合成相关结构基因上调表达,在果实完熟后,下调表达^[2]。在花色苷生物合成过程中,由于大多数中间产物是另一个生物合成过程的前体物质,因而花色苷合成过程中的酶基因在非花色苷合成的器官中也表达^[3,26]。白色和红色葡萄品种中,*CHS*、*CHI*、*F3H*、*DFR*、*LDOX* 在叶片、枝条、种子、根等器官中都表达,而 *UFGT* 只在转色期的红色品种的果皮中表达,且表达的强度与花色苷合成呈正相关^[27-28],说明 *UFGT* 是花色苷合成的关键酶。ABA 处理的各个基因相对表达量高于对照,而 NAA 处理则低于对照。表明外源 ABA 促进花色苷结构基因的表达,NAA 则抑制其表达。ABA 处理的果皮花色苷含量高于对照,NAA 处理低于对照(图 1)。各处理的基因相对表达量与花色苷含量及果实着色情况相符合(图 1、图 2 和图 3)。在哈尔滨地区,‘京优’葡萄在自然状态下,于九月下旬成熟^[27]。这可能是 9 月 24 日对照果皮中的一些花色苷结构基因(*F3'5'H*、*UFGT*、*OMT*)相对表达水平降低的原因。在 8 月 12 日对照和 8 月 26 日 NAA 处理的葡萄果皮中,可以检测到 *UFGT* 的相对含量,但果皮尚未着色(图 2(c))。这是因为 *UFGT* 基因受调节基因控制,虽然在未着色的果皮中存在,但不表达,其表达具有时间特异性。

致谢 衷心感谢中国农业大学食品科学与营养工程学院葡萄与葡萄酒研究中心段长青教授帮助分析葡

萄果皮花色苷。

参 考 文 献

- [1] 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
- [2] Castellarin S D, Matthews M A, Gaspero G D, et al. Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries [J]. Planta, 2007, 227(1): 101-112
- [3] 刘闯萍, 王军. 葡萄花色苷的生物合成[J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(2): 363-377
- [4] 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
- [5] 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 Mol Biol, 1994, 24(5): 743-755
- [6] Holton T A, Cornish E C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis [J]. Plant Cell, 1995, 7(7): 1071-1083
- [7] Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology [J]. Plant Physiology, 2001, 126(2): 485-493
- [8] Dixon R A, Steele C L. Flavonoids and isoflavonoids—a gold mine for metabolic engineering [J]. Trends in Plant Science, 1999, 4(10): 394-400
- [9] Jeong S T, Goto-Yamamoto N, Hashizume K, et al. Expression of the flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3', 5'-hydroxylase genes and flavonoid composition in grape (*Vitis vinifera*) [J]. Plant Science, 2006, 170(1): 61-69
- [10] Boss P K, Davies C, Robinson S P. Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation [J]. Plant Physiology, 1996, 111(4): 1059-1066
- [11] Castellarin S D, Pfeiffer A, Silvilotti P, et al. Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit [J]. Plant, Cell and Environment, 2007, 30(11): 1381-1399
- [12] Castellarin S D, Gaspero G D, Marconi R, et al. Colour variation in red grapevines (*Vitis vinifera* L.); genomic organisation, expression of flavonoid 3'-hydroxylase, flavonoid 3', 5'-hydroxylase genes and related metabolite profiling of red cyanidin/blue delphinidin-based anthocyanins in berry skin [J]. BMC Genomics, 2006, 7: 12
- [13] Jaakola L, Määttä K, Pirttilä A M, et al. Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development [J]. Plant Physiology, 2002, 130: 729-739
- [14] Pomar F, Novo M, Masa A. Varietal differences among the anthocyanin profiles of 50 red table grape cultivars studied by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1094(1-2): 34-41
- [15] Mori K, Sugaya S, Gemma H. Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition [J]. Scientia Horticulturae, 2005, 105: 319-330
- [16] El-Kereamy A, Chervina C, Roustan J-P, et al. Exogenous ethylene stimulates the long-term expression of genes related to anthocyanin biosynthesis in grape berries [J]. Physiologia Plantarum, 2003, 119: 175-182
- [17] El-Kereamy A, Chervin C, Souquet J-M, et al. Ethanol triggers grape gene expression leading to anthocyanin accumulation during berry ripening [J]. Plant Science, 2002, 163: 449-454
- [18] González-Manzano S, Santos-Buelga C, Dueñas M, et al. Colour implications of self-association processes of wine anthocyanins [J]. European Food Research and Technology, 2008, 226(3): 383-490
- [19] Fritz J, Kern M, Pahlke G, et al. Biological activities of malvidin, a red wine anthocyanidin [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2006, 50(4/5): 390-395
- [20] 温鹏飞. 葡萄与葡萄酒中黄烷醇类多酚和果实原花色苷合成相关酶表达规律的研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2005
- [21] Kobayashi S, Ishimaru M, Hiraoka K, et al. Myb-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis [J]. Planta, 2002, 215(6): 924-933
- [22] Peppi M C, Walk M A, Fidelibus M W. Application of abscisic acid rapidly upregulated UFGT gene expression and improved color of grape berries [J]. Vitis, 2008, 47(1): 11-14
- [23] Boss P K, Davies C. Molecular biology of anthocyanin accumulation in grape berries [M]. Heidelberg: Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology, 2009: 263-292
- [24] 李华, 王华, 袁春龙, 等. 葡萄酒化学 [M]. 北京: 科学出版社, 2005: 106-110
- [25] 张大鹏, 张子莲, 贾文锁. 果实成熟激素信息的细胞识别和胞内信号转导研究进展 [C] // 张大鹏, 冷平. 果树生理与分子生物学研究. 北京: 中国农业大学出版社, 1999: 1-7
- [26] Pan Q H, Li M J, Peng C C, et al. Abscisic acid activates acid invertases in developing grape berry [J]. 2005, 125(2): 157-170
- [27] 周莉, 杨成君, 王军. 套袋和植物内源激素对京优葡萄果实发育及成熟的影响 [J]. 北方园艺, 2009, (1): 30-33

(责任编辑: 王燕华)