

## 葡萄浆果着色分子机理的重要研究进展

孙欣, 韩键, 房经贵\*, 上官凌飞, 王西成, 宋长年, 李晓颖

南京农业大学园艺学院, 南京210095

**摘要:** 葡萄浆果的颜色主要是由花色苷的量决定的, 花色苷的生物合成受结构基因和调节基因的控制。葡萄浆果着色是一个非常复杂的过程, 不同种葡萄乃至同品种群不同品种的着色机制特性不同。近些年来, *Myb*调控葡萄花色苷生物合成机理的发现使人们对花色苷生物合成有了更进一步的了解。

**关键词:** 葡萄; 着色; 花色苷

## Important Research Progress of Coloring Molecular Mechanisms in Grape Berry

SUN Xin, HAN Jian, FANG Jing-Gui\*, SHANGGUAN Ling-fei, WANG Xi-Cheng, SONG Chang-Nian, LI Xiao-Ying

College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

**Abstract:** The color of grape berry is determined by the quantity of anthocyanins, and the biosynthesis of these anthocyanins is controlled both by structural genes and regulatory genes. Grape berry coloring is a complex system in that different grape species and even different cultivars of same grape cultivar group are different in coloring mechanism. In recent years, with the discovery of *Myb*-related genes, an important regulatory gene family, the anthocyanin biosynthesis was much better understood.

**Key words:** grape; coloring; anthocyanins

葡萄为落叶藤本植物, 是全球性重要果树之一, 分布十分广泛, 其产量和栽培面积仅次于柑桔, 居世界第二位。随不同葡萄品种间的杂交以及人工选择, 如今葡萄浆果果皮颜色的种类变得越来越丰富。果皮颜色是葡萄的一个重要经济性状, 也是葡萄育种中的一个重要选择指标。花色苷的总量以及不同花色苷的组成比例对浆果与葡萄酒的颜色至关重要, 能够提高两者的感官品质(Ageorges等2006; Bogs等2006)。花色苷是植物次生代谢过程中产生的一类黄酮类物质, 它是花色素与糖基以糖苷键结合形成的一类化合物。花色苷是自然界中一类水溶性色素, 广泛存在于植物的花、果实、茎、叶和根等器官。花色苷还具有极强的抗氧化能力和消除自由基的作用, 并能预防心血管疾病(王晨等2009)。花色苷的生物合成需要两类基因的参与, 一类是结构基因, 编码直接参与花色苷的合成与积累的酶; 另一类是调节基因, 调控结构基因的时空表达(Ageorges等2006; Holton和Cornish 1995)。对玉米、金鱼草和矮牵牛花色苷的生物合成和调控机理的研究使人们对植物花色苷生物合成及其调控有了很好的认识, 人们借助于这些研究成果对葡萄的花色苷的相关合成研

究取得了很大的进展, 尤其是葡萄基因组测序的完成更是给在分子水平上进一步研究和阐明葡萄花色苷的代谢机理奠定了有利条件与工作基础。

### 1 花色苷的生物合成途径

花色苷主要在葡萄浆果的表皮细胞的细胞质中合成, 然后再运输到液泡中积累(Castellarin等2007), 葡萄中的花色苷主要有甲基化的花青素葡萄苷(红色)和甲基化的花翠素葡萄糖苷(蓝紫色)(Castellarin等2006)。各种花色苷的比例以及积累水平的不同而使不同葡萄浆果呈现出红色、紫色或黑色(Castellarin等2006; Jeong等2006; Pomar等2005)。花色苷的生物合成可以分为2个阶段, 首先由苯丙氨酸先转化为4-香豆酰CoA, 这一阶段称为苯丙烷类代谢途径; 第二阶段为类黄酮途径, 由4-香豆酰CoA转化为各种黄酮类化合物。花色苷生物合成涉及到多种结构基因和调节基因。根据已经克隆与分析的葡萄花色苷生物合成相关的多个基因(表1)可以推测葡萄花色苷的生物合成途径(图1)与已

收稿 2012-01-04 修订 2012-01-21

资助 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-08-0796)。

\* 通讯作者(E-mail: fanggg@njau.edu.cn; Tel: 025-84399069)。

表1 葡萄花色苷生物合成途径的结构基因

Table 1 Structure genes of anthocyanin biosynthesis in grape

结构基因	GenBank登录号	所在染色体
<i>PAL</i>	EF192469	Chr 16
<i>CHS1</i>	AB015872	Chr 14
<i>CHS2</i>	AB066275	Chr 14
<i>CHS3</i>	AB066274	Chr 5
<i>CHI</i>	X75963	Chr 13
<i>F3H</i>	X75965	Chr 4
<i>F3'H</i>	AB213605	Chr 17
<i>F3',5'H</i>	DQ786631	Chr 6
<i>DFR</i>	X75964	Chr 18
<i>LDOX</i>	X75966	Chr 2
<i>UFGT</i>	DQ513314	Chr 16
<i>OMT</i>	FJ460168	Chr 1
<i>GST</i>	AF501625	Chr 19

报道的花色苷的生物合成途径基本相一致。

苯丙氨酸解氨酶(PAL)和查尔酮合成酶(CHS)分别是葡萄花色苷生物合成过程中苯丙烷类代谢途径和类黄酮途径的第一个关键酶。葡萄中*PAL*基因在大多数有色品种表达强,但在白色品种中表达弱或不表达(Azuma等2009)。另外有的研究发现在前体(苯丙氨酸)充足的情况下花色苷的积累与PAL的活性无关(王惠聪等2004)。CHS在果实的发育过程中无论是否积累花色苷都保持较高的活性。目前从‘赤霞珠’(‘Cabernet Sauvignon’)葡萄品种中分离得到3个*CHS*的cDNA克隆,分别是*CHS1*、*CHS2*和*CHS3*。系统发育学的研究显示*CHS1*和*CHS2*的进化关系较近,而均与*CHS3*进化

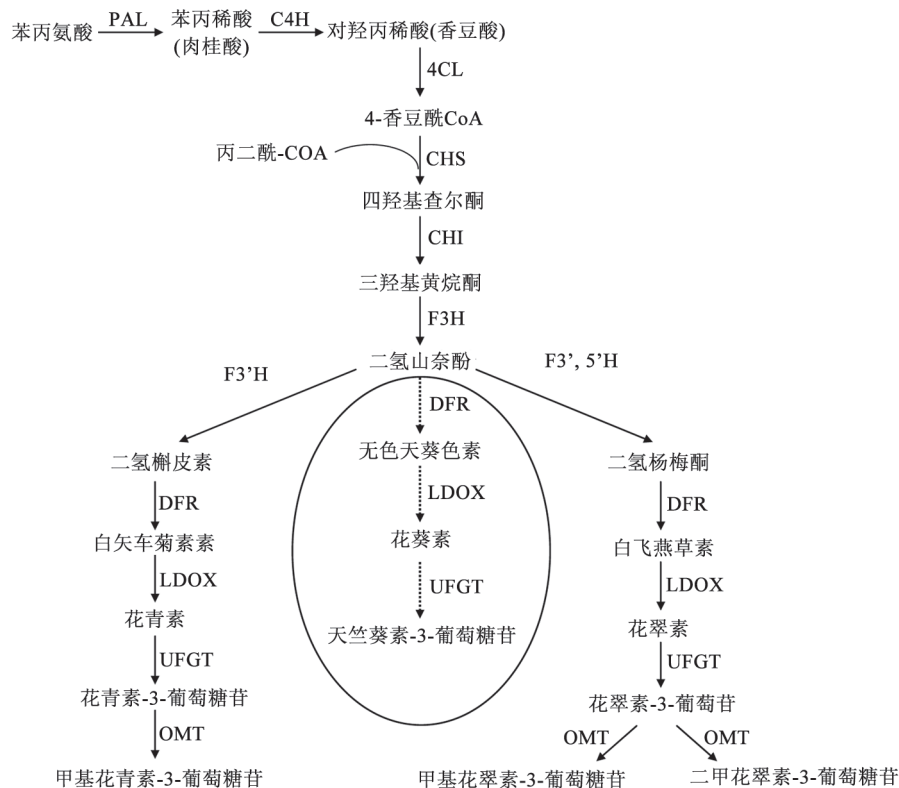


图1 花色苷的生物合成途径

Fig.1 The biosynthetic pathways of anthocyanins

参考Azuma等(2009)文献并作修改。PAL: 苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase); C4H: 肉桂酸4-羟化酶(cinnamate-4-hydroxylase); 4CL: 4-香豆酰CoA连接酶(4-coumarate:CoA ligase); CHS: 查尔酮合成酶(chalcone synthase); CHI: 查尔酮异构酶(chalcone isomerase); F3H: 黄烷酮3-羟化酶(flavanone 3-hydroxylase); F3'H: 类黄酮3'-羟化酶(flavanone 3'-hydroxylase); F3',5'H: 类黄酮3',5'-羟化酶(flavanone 3',5'-hydroxylase); DFR: 黄烷酮醇4-还原酶(dihydroflavonol 4-reductase); LDOX: 无色花色素双加氧酶(leucoanthocyanidin dioxygenase); UFGT: UDP葡萄糖-类黄酮3-O-葡萄糖基转移酶(UDP glucose-flavonoid 3-O-glucosyltransferase); OMT: O-甲基转移酶(O-methyltransferase)。圆圈所示虚线箭头处表示葡萄花色苷生物合成途径中有别于其他物种而不具有的代谢过程。

关系较远(Goto-Yamamoto等2002)。*CHS3*主要在红色品种着色期间的果皮表达, 而*CHS1*和*CHS2*主要在白色品种果皮、幼叶和红色品种的果皮中积累(Castellarin等2006; Goto-Yamamoto等2002)。*CHS1*和*CHS2*在没有花色苷合成的器官也能表达, 这一现象说明其主要参与黄酮醇(flavonols)和原花青素(phenylpropanoids)的合成(Ageorges等2006)。通过基因芯片和抑制消减杂交(suppressive subtractive hybridization, SSH)对不同发育时期不同颜色葡萄品种分析发现只有*CHS3*与果实颜色紧密相关(Ageorges等2006; Goto-Yamamoto等2002)。

查尔酮异构酶(CHI)催化查尔酮环的异构化形成无色黄酮烷。研究发现即使没有CHI的催化, 查尔酮也可以以极低的速率自发形成三羟基黄酮(Holton和Cornish 1995)。*CHI*基因不是花色苷生物合成所必须的, 但当其完全缺失的情况下会使突变体产生其他特殊颜色, 如缺少*CHI*的玉米, 其籽粒呈现古铜色(Dooner和Robbins 1991), 缺少*CHI*的洋葱导致鳞茎产生金色突变(Kim等2004)。可以说, *CHI*的参与可以确保花色苷正常水平的合成与相关器官正常颜色的形成。

黄酮3-羟化酶(*F3H*)是花色苷的生物合成途径中的关键酶之一。其催化产物二氢山奈酚是花色苷2个代谢支路的前体物质, *F3H*可能是花色苷生物合成途径的中枢。葡萄*F3H*基因有2个拷贝(Boss和Davies 2009), 位于4号染色体上。葡萄*F3H*主要在花后2~4周的果皮中表达, 然后, 随着果实的发育表达随之减弱。在果实着色期又出现表达上调, 并且在红色品种成熟的果皮中表达强于白色品种(Goto-Yamamoto等2002)。*F3H*分别和*F3'H*(类黄酮3'-羟化酶)、*F3',5'H*(类黄酮3',5'-羟化酶)共同参与调控葡萄花色苷生物合成的2个支路(花青素支路和花翠素支路), *F3'H*和*F3',5'H*分别属于P450家族的CYP75B家族和CYP75A家族, *F3'H*控制的途径合成红色的花青素, 而*F3',5'H*控制蓝紫色的花翠素的合成。通过*F3'H*和*F3',5'H*在矮牵牛花的异位表达分析发现, 转*F3'H*能提高3'-二甲花青素含量, 转*F3',5'H*能提高二甲花翠素的含量(Bogs等2006)。*F3'H*和*F3',5'H*分别调控花色苷生物合成的2个支路的代谢水平与强度决定着葡萄果皮中的花色苷的组成和果皮的颜色。缺乏*F3',5'H*的植

物, 如玫瑰、郁金香和香石竹等, 不能形成蓝色花, 因而*F3',5'H*被称为“蓝色基因”。葡萄中*F3'H*在不同颜色品种中都有表达, 但在红色品种中表达相对较强, *F3',5'H*只在红色品种中表达, 白色品种中几乎不表达(Bogs等2006; Castellarin等2007)。这说明在葡萄中调控*F3'H*与*F3',5'H*表达的机制不同。尽管*F3',5'H*只在有色品种中表达的特点与*UFGT*(UDP葡萄糖-类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶基因)一样, 但*UFGT*的表达是发生在转色期后, 而*F3',5'H*在转色期前已经开始表达, 这表明在葡萄浆果着色过程中*F3',5'H*和*UFGT*表达与作用的机制以及参与代谢的途径存在不同(Bogs等2006)。

很多植物中的DFR(黄酮醇4-还原酶)能够以二氢山奈酚为底物合成天竺葵色素类花色苷。*DFR*基因缺失突变体的花色呈现象牙色或白色(于晓南和张启翔2002)。但葡萄DFR的立体结构特点使其不能以二氢山奈酚为作用底物, 因此葡萄中不能合成天竺葵色素类花色苷。这是葡萄花色苷生物合成途径与其他很多植物的主要差异之处(图1)。*DFR*在红色成熟葡萄果皮中的表达水平高, 但在白色品种中表达弱(Bogs等2006), 这说明DFR在红色和白色葡萄浆果中表达的调控机制有异。

无色花色素双加氧酶(LDOX)和*UFGT*依次催化无色的原花色素氧化生成有色的花翠素/花青素(Jeong等2006)和催化不稳定的花色素糖苷化形成各种稳定花色苷。*LDOX*在红色葡萄品种成熟的果皮中表达强, 而在白色品种上表达弱或不表达(Boss等1996a; Kobayashi等2001)。*LDOX*曾被认为是葡萄花色苷合成中的关键酶。*UFGT*在白色品种和果肉中不表达, 只在有色葡萄品种转色期后的果皮中表达, 转色期为上调表达。*UFGT*的表达不仅呈现出红白品种特异性, 而且还表现出时空特异性。Boss等(1996a)和Kobayashi等(2001, 2002)根据*UFGT*表达的时空特点推断, *UFGT*是葡萄花色苷合成的关键酶。调节基因能够对*UFGT*表达的时空特异性和组织特异性进行调控, 从而在葡萄花色苷生物合成途径中起关键作用。据报道, 葡萄果皮中可能存在两类调节基因, 它们的表达方式有2种推测。第1种推测情况为一类调节基因是在浆果发育早期表达, 促使除*UFGT*以外的结构基因的转录, 另一类则在浆果发育晚期表达, 能

够促使所有结构基因的转录;第2种情况则是一类调节基因控制除*UFGT*以外的结构基因转录,另一类在转色期后控制*UFGT*的表达(Deluc等2006; Boss等1996b)。Kobayashi等(2002)通过从‘巨峰’(‘Kyoho’)葡萄中获得能够特异调控*UFGT*基因表达的一些*Myb*类基因,证明了葡萄中第2种调节基因的存在。

*O*-甲基转移酶(OMT)催化花青素-3-葡萄糖苷和花翠素-3-葡萄糖苷甲基化生成甲基花翠素、二甲花翠素和甲基花青素葡萄糖苷,OMT能够稍微增加花色苷的红色效果和增强花色苷的稳定性(Huguency等2009),*O*-甲基化还能够改变受体物质的生理特性、降低物质极性,从而影响在其细胞中的间隔化(刘闯萍和王军2008)。葡萄OMT在转色期前基本不表达,在转色期为上调表达,而且在着色果皮中的表达量明显高于未着色的果皮(Ageorges等2006; Castellarin等2007)。花色苷与谷胱甘肽在谷胱甘肽*S*-转移酶(GST)的作用下形成谷胱甘肽-*S*-偶联物,然后通过液泡膜上的谷胱甘肽*S*偶联结合泵(GSH-*S*-conjugate pump)由细胞质运输到液泡中积累(Alfenito等1998)。葡萄GST在果实转色期前表达量很低,进入转色期后大量表达,而且主要在有色品种中表达。葡萄GST和OMT的表达都存在时空特异性和红白品种特异性,造成这种特异性的原因可能是由于GST和OMT的表达和*UFGT*一样都受*MybA1*基因的调控所致(Cutanda-Perez等2009)。

## 2 *Myb*相关基因与花色苷的生物合成

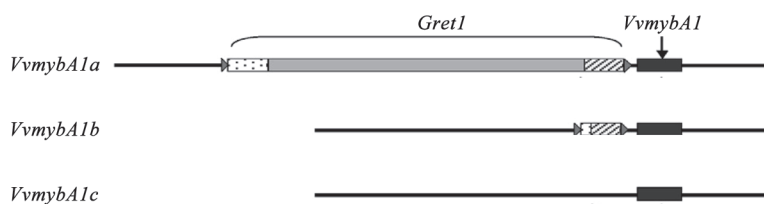
已有的研究报道植物花色苷的生物合成还受调节基因的调控。调节基因编码生成转录因子,通过控制结构基因的时空表达而影响花色苷的生物合成。*Myb*相关基因已被证实能够通过调节*UFGT*的表达而参与到葡萄花色苷的生物合成(Kobayashi等2002)。人们对*Myb*相关基因调节*UFGT*作用的认识是葡萄分子生物学研究领域的重大突破之一(Kobayashi等2004)。*Myb*蛋白是植物花色苷合成涉及的最为广泛也是最为重要的调节因子。*Myb*蛋白是一类DNA结合蛋白,具有一段保守的MYB结构域,其中N端具有高度保守的序列。根据蛋白质中*Myb*结构域的个数,*Myb*蛋白被分为3类:(1)单一*Myb*结构域(R1)蛋白;(2)2个重

复*Myb*结构域(R2R3)蛋白;(3)3个重复*Myb*结构域(R1R2R3)蛋白。与花色苷合成相关的是R2R3-*Myb*转录因子,它有2个*Myb*结构域,每个结构域具有大约由50个氨基酸形成的螺旋-螺旋-转角-螺旋(helix-helix-turn-helix, HHTH)结构,其中第3个螺旋是识别并结合短的DNA序列的关键(刘仕云等2006)。

### 2.1 *VvmybA1*基因型与葡萄果皮颜色

在很多欧洲葡萄(*Vitis vinifera*)中存在一个能够调节*UFGT*表达从而参与欧洲葡萄花色苷生物合成的调控*VvmybA1*基因(Kobayashi等2004)。此外,研究还发现*VvmybA1*在白色欧洲葡萄品种的果皮中不表达,在所有有色葡萄品种的果皮中表达(Kobayashi等2004, 2005)。这说明*VvmybA1*的表达对于葡萄果皮着色是必要的。Azuma等(2007)和Lijavetzky等(2006)都分别通过杂交试验证明了*VvmybA1*的基因型决定葡萄果皮颜色。

Kobayashi等(2004)认为,古老的野生葡萄品种的果皮都是有颜色的,白色葡萄是由于*Myb*相关基因发生了突变,抑制了*Myb*相关基因的表达,从而使葡萄花色苷的生物合成受阻。具体是*VvmybA1*的等位基因*VvmybA1a*由于在其编码序列的上游存在一个反转座子*Gret1*而使其表达受阻,而等位基因*VvmybA1b*和*VvmybA1c*都能够表达。*VvmybA1b*具有单拷贝的LTR (solo LTR),*VvmybA1c*的反转座子*Gret1*序列完全缺失,其序列与原始的*VvmybA1*的序列十分相似(Kobayashi等2004, 2005)(图2)。正是由于*VvmybA1*的DNA序列中插入了一个反转座子,导致了*VvmybA1*的失活,从而使欧洲葡萄等的白色葡萄品种的花色苷生物合成基因*UFGT*的转录受到抑制,从而呈现白色(Kobayashi等2004)。有研究还发现*VvmybA1*的其他变化也会导致葡萄浆果颜色的变化。*VvmybA1*的缺失则导致产生白色果实的变化,如‘黑比诺’(‘Pinot Noir’)的*VvmybA1*基因型是*VvmybA1a/VvmybA1c*,当缺失了具有功能的*VvmybA1c*的情况下,‘黑比诺’突变成‘白比诺’(‘Pinot Blanc’)(Yakushiji等2006)。有的白色葡萄品种的*VvmybA1*基因序列的intra-LTR重组变成solo-LTR,从而发生变异产生有色品种,如白色品种‘意大利’(‘Italia’)的芽变有色品种‘奥山红宝石’(‘Ruby Okuyama’)以及‘绿宝石’(‘Sugra-

图2 *VvmybA1a*、*VvmybA1b*和*VvmybA1c*的结构示意Fig.2 Structures diagrams of *VvmybA1a*, *VvmybA1b* and *VvmybA1c*

参考Azuma等(2007)文献修改。

one')的2个红色突变体‘超级红’(‘Super Red’)和‘茉莉无核’(‘Ralli Seedless’)都是由于intra-LTR重组的原因产生的变异品种(Lijavetzky等2006; Azuma等2009)。还有研究发现新*VvmybA1*基因的产生导致颜色变化,如白色品种‘意大利’的芽变有色品种‘红高’(‘Benitaka’)就是由于*VvmybA1a*和*VvmybA3*发生同源重组产生了新的具有功能的*VvmybA1<sup>BEN</sup>*,从而使‘红高’浆果可以产生花色苷而能够着色(Azuma等2009)。

此外*VlmybA1-1*基因最早是从‘巨峰’葡萄的cDNA文库中分离鉴定出的一个Myb相关基因,它具有和*VvmybA1*相似的功能,能够通过调节*UFGT*的表达从而参与欧美杂种葡萄(*Vitis × labruscana*)花色苷生物合成的调控(Kobayashi等2002),但目前它还没有被定位到染色体上。

但是,有学者认为由于*VvmybA1*的突变造成葡萄果皮颜色发生变化的结论是针对为数不多的几个品种研究的结果,并不能说明所有葡萄浆果着色的机理都如此。白葡萄的产生不仅仅只是由于*MybA1*基因突变的结果,可能还有由几个不同调控基因的突变所引起。人们还需要对更多的品种做进一步的研究而明确葡萄果皮颜色的分子遗传基础。

## 2.2 *MybA*基因单倍型与葡萄果皮颜色

Walker等(2007)通过细菌人工染色体(BACs)技术在‘赤霞珠’中发现了和*VvmybA1*位于同一染色体且功能相似的*VvmybA2*基因,进一步研究发现其在所有白色品种中发生突变产生了白色果皮基因*VvMybA2w*,其编码区发生一个核苷酸的变化,导致R2R3结构域的一个 $\alpha$ -螺旋的改变,从而使*VvMybA2w*丧失功能而没有发生突变的*VvMybA2*(*VvMybA2r*)具有功能。如果*VvmybA1*和*VvmybA2*

两个基因中只有一个发生突变并丧失功能,另一个会继续调控花色苷的合成,这表明二者均能独立地参与控制花色苷的生物合成。Fournier-Level等(2009)通过对性状遗传分析证明,决定欧洲葡萄果皮颜色的基因位点是位于2号染色体上的由3个Myb相关基因组成的基因簇,其中*VvmybA1*和*VvmybA2*对花色苷的合成具有调节功能,*VvmybA3*的表达在统计分析上与花色苷的合成具有相关性,但其功能还有待进一步被验证。由于决定颜色的*VvmybA1*和*VvmybA2*两个基因位点是共连锁的,因此可以把他们称为一个单倍型(haplotype)(Azuma等2011)。所谓单倍型是单倍体基因型的简称,在遗传学是指同一染色体上可进行共同遗传的多个基因位点等位基因的组合(Buntjer等2005)。

Azuma等(2008, 2011)通过PCR的方法确定了决定葡萄果皮颜色基因的单倍型(简写成Hap),共有6种单倍型(图3)。HapC包括2种类型:(1) HapC-N包含2个具有功能的基因*VvMybA1c*和*VvMyb2r*;(2) HapC-Rs包含一个具有功能的*VvMybA1c*和一个不具有功能的*VvMyb2w*(Azuma等2011; Fournier-Level等2010)。*VlMybA1-2*和*VlMybA1-3*位于果皮颜色基因位点的邻近区域,但Azuma等(2008)仍然把*VlMybA1-2*和*VlMybA1-3*看成一个单倍型HapE(Azuma等2008)。最近研究发现HapE也包括2种类型:(1) HapE1包含2个具有功能的基因*VlMybA1-2*和*VlMYBA1-3*; HapE2包含2个具有功能的基因*VlMybA2*和*VlMybA1-3*,但是*VlMybA1-2*、*VlMybA1-3*和*VlMybA2*在果皮颜色基因位点的具体位置还未知(Azuma等2011; Fournier-Level等2010)。Azuma等(2011)分别对欧亚种葡萄(*Vitis vinifera*)和欧美杂种葡萄的白色品种和有色品种的单倍型进行了检测(表2),发现HapE(HapE1和HapE2)只存在

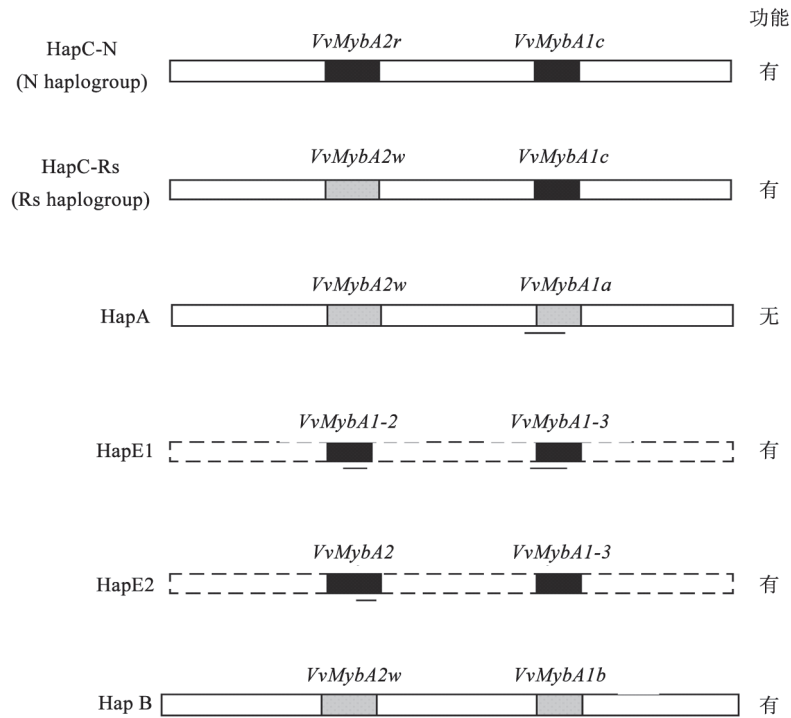


图3 葡萄浆果颜色基因位点的单倍型

Fig.3 Grape berry's haplotypes at color locus

参考Azuma等(2011)文献修改。

表2 不同种葡萄不同颜色的单倍型

Table 2 Haplotypes of various grape cultivar groups with different skin colors

种群	单倍型	
	白色品种	有色品种
欧洲种( <i>Vitis vinifera</i> )	HapA/HapA	HapA/HapC、HapA/HapB
欧美杂种( <i>Vitis × labruscana</i> )	HapA/HapA	HapA/HapC、HapA/HapE、HapE/HapE、HapC/HapC

欧美杂种葡萄中存在, 并且HapE起源于美洲葡萄 (*Vitis labrusca*)。欧洲有色葡萄的染色体单倍体型的种类明显少于欧美杂种有色葡萄。Azuma等(2011)和Fournier-Level等(2009, 2010)还发现含有HapA/HapE1或者HapC-Rs的葡萄果皮颜色趋向于红色, 而含有HapA/HapE2或HapC-N的葡萄果皮颜色趋向于黑色, 后者的花色苷含量高于前者。对2倍体和4倍体不同颜色的葡萄的单倍体型特点和花色苷的含量之间的关系进行研究, 有功能基因的单倍体型越多, 其花色苷的含量越多(Azuma等2011)。Shimazaki等(2011)最新研究发现, 欧洲葡萄东方品种群的部分品种具有一个新的源于 *VvmybA1* 但其第2个外显子存在一个33 bp的插入

片段, 从而可能会造成葡萄浆果的颜色变浅的新等位基因 *VvMybA1<sup>SUB</sup>*。Azuma等(2008)把 *VvMybA1<sup>SUB</sup>* 看成一个独立的单倍体型HapF, *VvMybA1<sup>SUB</sup>* 目前只在4个东方品种群品种: ‘无核白’ (‘Sultani-na’), ‘甲州’ (‘Koshu’), ‘龙眼’ (‘Ryugan’) 和 ‘牛奶’ (‘Niunai’) 中被检测到, 而且这4个品种中不存在其他的具有功能的 *VvmybA* 基因和 *VlmybA* 基因(Azuma等2008; Lijavetzky等2006)。 *VvMybA1<sup>SUB</sup>* 也有可能没有参与调控花色苷合成的情况, 因为在白色品种‘无核白’和‘牛奶’、有色品种‘甲州’和‘龙眼’都能检测到 *VvMybA1<sup>SUB</sup>* 表达, 而且这些品种的 *VvMybA1<sup>SUB</sup>* 序列都相同, 这说明白色品种的 *VvMybA1<sup>SUB</sup>* 启动子上游可能存在一个转座子插入而使

其无法表达或者存在第2个调控花色苷合成的基因位点。

### 2.3 其他Myb相关基因与花色苷的生物合成

Kobayashi等(2002)从‘巨峰’葡萄分离得到除了MybA外更多的Myb相关基因(MybB、MybC、MybD、MybE、MybF、MybG、MybH)(表3),它们主要位于葡萄第2条染色体上。进一步研究发现,MybA只在果肉和果皮中表达,并且主要在果实开始着色和软化时期表达;MybB在果实发育的各个时期都能表达,特别是在果实着色期表达最强;MybC主要在果实发育前期和着色期表达;MybD主要在果实发育前期表达;MybE~MybH用Northern在果实各个发育时期都没能检测到,且瞬时表达分析发现MybA1-1、MybA1-2和MybA2能够在葡萄体细胞胚中诱导出紫红色斑点,但MybB1-1和MybB1-2不能诱导出紫红色斑点(Kobayashi 2002)。

还有一些基因与MybA1、MybA2有所不同,虽然能够调节葡萄花色苷的生物合成,但其主要功能是调节原花色素的生物合成,如VvMybPA1从‘西拉’的cDNA文库中分离出来的Myb相关基因,它能够编码一个由286个氨基酸残基组成的Myb型蛋白,在葡萄花、果实、种子中都有表达。Vv-Myb-PA1能够激活NAR(花色素还原酶)、LAR(无色花

色素还原酶)、F3'5'H、CHI和LDOX的启动子,但对UFGT的启动子无影响,主要参与调节葡萄原花色素的生物合成过程中的相关结构基因(Bogs等2007)。VvMyb5a和VvMyb5b是从‘赤霞珠’的cDNA文库中分离出来的2个Myb相关基因,它分别编码由320和311个氨基酸残基组成的R2R3 Myb蛋白(Deluc等2006, 2008)。VvMyb5a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,VvMyb5b主要在果实成熟过程中表达,在果实发育前期表达量很低,在转色期后表达量最高,VvMyb5a和VvMyb5b都能促进ANS、CHI、F3'5'H、LAR的表达,VvMyb5b还能促进NAR的表达,但它们都不能促进UFGT的表达(Deluc等2006; Castellarin等2007)。

### 3 结语

葡萄是世界性的重要果树。有关葡萄分子生物学的研究进展较快,并且在有关矮化突变体(Boss和Thamas 2000)、着色机理(Kobayashi等2004)和基因组测序(Jaillon等2007)等研究方面取得了重要的研究成果。由于葡萄的色泽对于葡萄的加工用途、市场效益、经济价值具有重要的影响,所以对葡萄花色苷的生物合成以及浆果着色机理的研究具有重要的意义。基于对模式植物花色苷代谢

表3 葡萄花色苷生物合成途径的调节基因

Table 3 The regulation genes involved in anthocyanin biosynthesis in grape

品种	基因位点	所在染色体	GenBank登录号	所调节的基因	参考文献	
‘巨峰’	VlmybA1-1	Chr 2	AB073010	UFGT	Koybayashi等2002	
	VlmybA1-2	Chr 2	AB073012	UFGT、OMT、GST	Koybayashi等2002	
	VlmybA2	Chr 2	AB073013	UFGT	Koybayashi等2002	
	VlmybB1-1	Chr 2	AB073016	不详	Koybayashi等2002	
	VlmybB1-2	Chr 2	AB073017	不详	Koybayashi等2002	
	VlmybC	Chr 2	AB073014	不详	Koybayashi等2002	
‘意大利’	VlmybD	Chr 8	AB073015	不详	Koybayashi等2002	
	VmybA1	Chr 2	AB097923	UFGT	Koybayashi等2004	
‘红亚历山大’	VmybA2	Chr 2	AB097924	UFGT	Koybayashi等2004	
‘奥山红宝石’	VmybA3	Chr 2	AB097925	不详	Koybayashi等2004	
‘赤霞珠’	VvMyb5a	Chr 8	AY555190	ANS、CHI、F3H、F3'5'H、DFR、LAR	Deluc等2006	
	VvMyb5b	Chr 6	AY899404	ANS、CHI、F3'5'H、LAR、NAR	Deluc等2008	
	VvMybA1	Chr 2	DQ886417	UFGT	Walker等2007	
	VvMybA2r	Chr 2	DQ886419	UFGT	Walker等2007	
	VvMybA2w	Chr 2	DQ886420	不详	Walker等2007	
	‘康可德’	VlmybA1-3	Chr 2	AB427165	UFGT	Azuma等2008
	‘西拉’	VvMybPA1	Chr 15	AM259485	CHI、F3'5'H、NAR、LAR、LDOX	Bogs等2007

途径的研究,人们对葡萄花色苷代谢途径的认识不断深入,从分子水平来看葡萄浆果着色机理已经形成了比较清晰的轮廓。不同葡萄品种浆果着色机理不是一种简单模式,是由多个基因组合、多种作用方式共同作用的结果。葡萄不同品种花色苷代谢途径以及相关结构基因一致,但相关结构基因表达水平不同会造成不同花色苷的比例及总量的不同,例如, *F3'H*和*F3'5'H*的表达水平决定花青素花色苷和花翠素花色苷的比率,进而影响果皮的颜色, *UFGT*、*OMT*和*GST*(谷胱甘肽S-转移酶)基因也对花色苷的含量具有影响(Azuma等2009)。另外,调节基因对葡萄花色苷形成影响最大,研究表明*Myb*相关基因(*MybA1*和*MybA2*)的类型和数量对花色苷的含量具有决定性的作用,进而决定葡萄果皮颜色的深浅(Azuma等2008, 2011)。葡萄花色苷含量具有一定的数量性状特点(Fournier-Level等2009)其含量的多少不仅受到基因型的影响,还受外界环境条件(光照, 温度, 水分等),自

身糖的含量, 激素等条件的影响, 正是由于这些因素的共同对花色苷生物合成途径的影响, 从而使葡萄花色苷含量呈现一定数量性状特点。此外, *Myb*相关基因(*MybA1*和*MybA2*)也被看作是葡萄驯化有关基因(Miller和Gross 2011)。

*Myb*相关基因对葡萄花色苷生物合成的调控起到至关重要的作用, 在不同品种群与品种中表现出多种模式。在欧美杂种葡萄中, *VlmybA1-2*、*VlmybA2*和*VlmybA3*位于果皮颜色基因位点的邻近区域, 其具体位置未知, 但他们也被看成能够调控花色苷生物合成的基因簇(图4虚线框)。基因簇只要有一个基因具有功能, 它就能够编码产生Myb蛋白从而促使花色苷合成途径中*UFGT*的表达, 进而葡萄果皮能够产生花色苷着色。葡萄果皮颜色基因位点对花色苷生物合成的调控作用主要分为3种情况(图4), (1) *VvmybA1*和*VvmybA2*都能够发生突变, *VvmybA1a*和*VvmybA2w*不具有功能, *VvmybA1b*、*VvmybA1c*和*VvmybA2r*都具有功能, 此

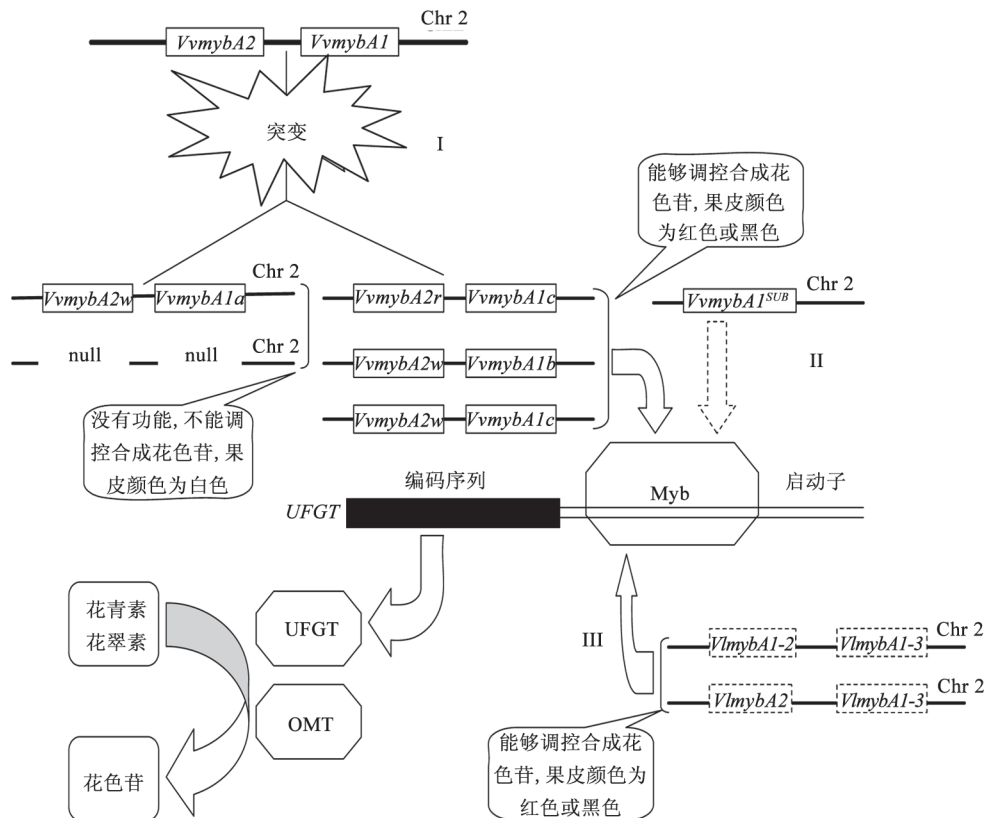


图4 葡萄果皮颜色基因位点对花色苷生物合成的调控示意图

Fig.4 The schematic diagrams of the regulation of skin color locus of grape on anthocyanin biosynthesis



外某些红色欧洲葡萄的白色芽变品种中 *VvmybA1* 和 *VvmybA2* 丢失, 不能合成花色苷。3个分别由 *VvmybA2r* 和 *VvmybA1c*、*Vvmyb2w* 和 *VvmybA1b*、*VvmybA2w* 和 *VvmybA1c* 组成的基因簇具有功能编码产生 Myb 蛋白, 果皮能够产生花色苷。这种情况在欧洲葡萄和欧美杂种葡萄都存在。(2) 欧洲葡萄东方品种群的4个品种中发现只存在 *VvmybA1<sup>SUB</sup>*, 不存在 *VvmybA2*、*VlmybA1-2*、*VlmybA2* 和 *VlmybA3*, 但其是否能够调控葡萄花色苷的生物合成目前还未知(图4虚线箭头)。这种情况目前只在欧洲葡萄的东方品种群中发现。(3) *VlmybA1-3* 分别和 *VlmybA1-2*、*VlmybA2* 组成的基因簇都能编码产生 Myb 蛋白促使 *UFGT* 的表达, 果皮能够产生花色苷。这种情况只在欧美杂种葡萄中存在。此外我们发现某些欧洲葡萄虽然具有 *VvmybA1b* 或 *VvmybA1c*, 但其果皮颜色仍然为白色(慕茜等2011)。This等(2007)在一些欧洲葡萄中也发现了这种情况, 他推测出现这种情况的原因是由于其他与花色苷生物合成有关的结构基因, 如 *UFGT*、*GST* 等发生突变导致的。但是造成这种情况的具体原因还不清楚, 阐明其具体原因将是我们下一步研究的内容。

### 参考文献

- 刘闯萍, 王军(2008). 葡萄花色苷的生物合成. 植物生理学通讯, 44 (2): 363~377
- 刘仕云, 黄艳岚, 张树珍(2006). 植物花青素生物合成中的调控基因. 植物生理学通讯, 42 (4): 747~754
- 慕茜, 吴为民, 房经贵, 孙欣, 宋长年, 赵密珍(2011). 不同葡萄品种的 *VvmybA1* 基因型及其特征性DNA片段的序列分析. 园艺学报, 38 (11): 2075~2084
- 王晨, 房经贵, 曹雪, 杨光(2009). 葡萄中原花青素的代谢. 中国农学通报, 25 (9): 169~173
- 王慧聪, 黄旭明, 胡桂兵, 黄辉白(2004). 荔枝果皮花青苷合成与相关酶的关系研究. 中国农业科学, 37 (12): 2028~2032
- 于晓南, 张启翔(2002). 观赏植物的花色素苷与花色. 林业科学, 38 (3): 147~153
- Ageorges A, Fernandez L, Violet S, Merdinoglu D, Terrier N, Romieu C (2006). Four specific isogenes of the anthocyanin metabolic pathway are systematically co-expressed with the red colour of grape berries. *Plant Sci*, 170: 372~383
- Alfenito MR, Souer E, Goodman CD, Buell R, Mol J, Koes R, Walbot V (1998). Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione *S*-transferases. *Plant Cell*, 10: 1135~1149
- Azuma A, Kobayashi N, Mitani N, Shiraishi M, Yamada M, Ueno T, Kono A, Yakushiji H, Yoshiko K (2008). Genomic and genetic analysis of *Myb*-related genes that regulate anthocyanin biosynthesis in grape berry skin. *Theor Appl Genet*, 117: 1009~1019
- Azuma A, Kobayashi S, Goto-Yamamoto N, Shiraishi M, Mitani N, Yakushiji H, Koshita Y (2009). Color recovery in berries of grape (*Vitis vinifera* L.) 'Benitaka', a bud sport of 'Italia', is caused by a novel allele at the *VvmybA1* locus. *Plant Sci*, 176: 470~478
- Azuma A, Kobayashi S, Yakushiji H, Yamada M, Mitani N, Sato A (2007). *VvmybA1* genotype determines grape skin color. *Vitis*, 46 (3): 154~155
- Azuma A, Udo Y, Sato A, Mitani N, Kono A, Ban Y, Yakushiji H, Koshita Y, Kobayashi S (2011). Haplotype composition at the color locus is a major genetic determinant of skin color variation in *Vitis* × *labruscana* grapes. *Theor Appl Genet*, 122: 1427~1438
- Bogs J, Ebasia A, McDavid D, Robinson SP (2006). Identification of the flavonoid hydroxylases from grapevine and their regulation during fruit development. *Plant Physiol*, 140 (1): 279~291
- Bogs J, Jaffe FW, Takos AM, Walker AR, Robinson SP (2007). The grapevine transcription factor *VvMYBPA1* regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development. *Plant Physiol*, 143: 1347~1361
- Boss PK, Davies C (2009). Molecular biology of anthocyanin accumulation in grape berries. In: Roubelakis-Angelakis KA (ed). *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology* (2nd edn). Berlin: Springer, 263~292
- Boss PK, Davies C, Robinson SP (1996a). Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes. *Plant Mol Biol*, 32: 565~569
- Boss PK, Davies C, Robinson SP (1996b). Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiol*, 111: 1059~1066
- Boss PK, Thomas MR (2000). Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation. *Nature*, 416: 847~850
- Buntjer JB, Sorensen AP, Peleman JD (2005). Haplotype diversity: the link between statistical and biological association. *Trends Plant Sci*, 10: 466~471
- Castellarin SD, Gaspero GD, Macconi R, Nonis A, Peterlunge E, Pailard S, Adam-Blondon AF, Testolin R (2006). 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 cyaniding-blue delphinidin-based anthocyanins in berry skin. *BMC Genomics*, 7: 12
- Castellarin SD, Matthews MA, Gaspero GD, Gambetta GA (2007). Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries. *Planta*, 227: 101~112
- Cutanda-Perez MC, Ageorges A, Gomez C, Violet S, Terrier N, Charles R, Torregrosa L (2009). Ectopic expression of *VlmybA1* in grapevine activates a narrow set of genes involved in anthocyanin synthesis and transport. *Plant Mol Biol*, 69: 633~648
- Deluc L, Barrieu F, Marchive C, Lauvergeat V, Decendit A, Richard T, Carde JP, Merillon JM, Hamdi S (2006). Characterization of a grapevine R2R3-MYB transcription factor that regulates the

- phenylpropanoid pathway. *Plant Physiol*, 140: 499–511
- Deluc L, Bogs J, Walker AR, Ferrier T, Decendit A, Merillon JM, Robinson SP, Barrieu F (2008). The transcription factor VvMYB5b contributes to the regulation of anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in developing grape berries. *Plant Physiol*, 147: 2041–2053
- Dooner HK, Robbins TP (1991). Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis. *Annu Rev Genet*, 25: 173–193
- Fournier-Level A, Lacombe T, Le CL, Boursiquot JM, This P (2010). Evolution of the *VvMybA* gene family, the major determinant of berry colour in cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Heredity*, 104: 351–362
- Fournier-Level A, Le CL, Gomez C, Doligez A, Ageorges A, Roux C, Bertrand Y, Souquet JM, Cheynier V, This P (2009). Quantitative genetic bases of anthocyanin variation in grape (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) berry: a quantitative trait locus to quantitative trait nucleotide integrated study. *Genetics*, 183: 1127–1139
- Goto-Yamamoto N, Wang GH, Masaki K, Kobayashi S (2002). Structure and transcription of three chalcone synthase genes of grapevine (*Vitis vinifera*). *Plant Sci*, 162 (2): 867–872
- Holton TA, Cornish EC (1995). Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell*, 7 (7): 1071–1083
- Huguency P, Provenzano S, Verries C, Ferrandino A, Medudec E, Batelli G, Merdinoglu D, Cheynier V, Schubert A, Ageorges A (2009). A novel cation-dependent *O*-methyltransferase involved in anthocyanin methylation in grapevine. *Plant Physiol*, 150: 2057–2070
- Jaillon O, Aury JM, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C, Vezzi A et al (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, 449: 463–467
- Jeong ST, Goto-Yamamoto N, Hashizume K, Esaka M (2006). Expression of the flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and flavonoid composition in grape (*Vitis vinifera*). *Plant Sci*, 170: 61–69
- Kim S, Jones R, Yoo KS, Pike L M (2004). Gold color in onions (*Allium cepa*): a natural mutation of the chalcone isomerase gene resulting in a premature stop codon. *Mol Gen Genomics*, 272 (2): 411–419
- Kobayashi S, Goto-Yamamoto N, Hirochika H (2004). Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. *Science*, 304: 982
- Kobayashi S, Goto-Yamamoto N, Hirochika H (2005). Association of *VvmybA1* gene expression with anthocyanin production in grape (*Vitis vinifera*) skin-color mutants. *J Jpn Soc Hort Sci*, 74 (3): 196–203
- Kobayashi S, Ishimaru M, Ding CK, Yakushiji H, Goto N (2001). Comparison of UDP-glucose:flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase (UFGT) gene sequences between white grape (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin. *Plant Sci*, 160: 543–550
- Kobayashi S, Ishimaru M, Hiraoka K, Honda C (2002). *Myb*-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta*, 215: 924–933
- Lijavetzky D, Ruiz-Garcia L, Cabezas JA, de Andres MT, Bravo G, Ibanez A, Carreno J, Cabello F, Ibanez J, Martinez-Zapater JM (2006). Molecular genetics of berry colour variation in table grape. *Mol Gen Genomics*, 276 (5): 427–435
- Miller AJ, Gross BL (2011). From forest to field: perennial fruit crop domestication. *Am J Bot*, 98 (9): 1389–1414
- Pereira HS, Barao A, Delgado M, Morais-Cecilio L, Viegas W (2005). Genomic analysis of *Grapevine Retrotransposon 1 (Gretl)* in *Vitis vinifera*. *Theor Appl Genet*, 111: 871–878
- Pomar F, Novo M, Masa A (2005). Varietal differences among the anthocyanin profiles of 50 red table grape cultivars studied by high performance liquid chromatography. *J Chromatography A*, 1094: 34–41
- Shimazaki M, Fujita K, Kobayashi H, Suzuki S (2011). Pink-colored grape berry is the result of short insertion in intron of color regulatory gene. *PLoS ONE*, 6: e21308
- This P, Lacombe T, Cadle-Davidson M, Owens CL (2007). Wine grape (*Vitis vinifera* L.) color associates with allelic variation in the domestication gene *VvmybA1*. *Theor Appl Genet*, 114: 723–730
- Walker AR, Lee E, Bogs J, Thomas MR, Robinson SP (2007). White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *Plant J*, 49 (5): 772–785
- Yakushiji H, Kobayashi S, Goto-Yamamoto N, Jeong ST, Sueta T, Mitani N, Azuma A (2006). A skin color mutation of grapevine, from black-skinned Pinot Noir to white-skinned Pinot Blanc is caused by the deletion of the functional *VvmybA1* allele. *Biosci Biotechnol Biochem*, 70 (6): 1506–1508