

葡萄花色苷的生物合成

刘闯萍¹, 王军^{1,2,*}东北林业大学¹ 林学院, ² 林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨 150040

Anthocyanin Biosynthesis in Grapevine

LIU Chuang-Ping¹, WANG Jun^{1,2,*}¹School of Forestry, ²Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

摘要: 文章介绍葡萄花色苷的生物合成途径, 及与其相关酶的种类、结构基因和调节基因的研究进展, 并对今后这一领域需要进一步研究的问题作了展望。

关键词: 葡萄; 花色苷; 生物合成

黄酮类化合物(flavonoid)是植物次生代谢的一大类化合物, 具有防护紫外线损伤, 抵抗病原体侵染, 促进豆科植物结瘤、种子传播及花粉管伸长等作用(Koes 等 1994; Sparvoli 等 1994; Holton 和 Cornish 1995)。花色苷(anthocyanin)为黄酮类化合物中的一类, 除了赋予植物器官各种颜色外, 作为昆虫和一些动物的引诱剂, 对授粉和种子传播都有作用(Sparvoli 等 1994; Wrolstad 2004)。正因为花色苷的多种作用, 因此有关其生物合成和调控引起了人们的兴趣。

有关花色苷合成的遗传学研究, 可以追溯到 19 世纪孟德尔的豌豆实验。此后, 人们相继对不同植物花色苷的遗传和生物合成进行了研究。早期的研究主要集中在表型的遗传变异上, 如花色苷及其它黄酮类化合物结构的鉴定, 这为研究控制其生物合成的有关基因奠定了基础。同时, 对突变体的研究也促进了有关花色苷生物合成和调控的工作。目前, 已经克隆了与葡萄花色苷生物合成有关的结构和调节基因(Sparvoli 等 1994; Kobayashi 等 2001, 2002, 2004, 2005), 并采用重组 DNA 技术对其功能作了鉴定(Kobayashi 等 2002; Deluc 等 2006; Bogs 等 2006)。

葡萄浆果的颜色对加工和鲜食品种都有作用, 而花色苷等黄酮类化合物对葡萄酒的颜色、质量和营养价值的作用更大(González-Manzano 等 2007; Fritz 等 2006)。上世纪 90 年代以来, 借助于玉米(*Zea mays*)、金鱼草(*Antirrhinum majus*)、

矮牵牛(*Petunia hybridia*)花色苷生物合成和调控的研究成果, 葡萄花色苷的相关研究也取得了很大进展。本文介绍葡萄花色苷生物合成途径、有关酶类、结构基因及调节基因的研究进展, 并对今后这一领域需要解决的问题作了展望。

1 葡萄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细胞质中合成, 在液泡中积累, 最初合成的是花青素(cyanidin)和花翠素(delphinidin)的葡萄糖苷, 然后转变为其它类型的花色苷(Koes 等 2005; Castellarin 等 2007a)。由于花色苷在果皮中的积累, 葡萄果实遂呈现红色、蓝色、紫色或黑色。葡萄成熟时的果实颜色对其商品质量有影响, 特别是对于酿酒用的葡萄。不同种或品种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(Pomar 等 2005; Castellarin 等 2006; Jeong 等 2006)。欧亚洲种的葡萄(*Vitis vinifera*)品种一般都只含有单糖苷化的花青素、花翠素、甲基花青素(peonidin)、3'-甲花翠素(petunidin)和二甲花翠素(malvidin)的 3-葡萄糖苷、3-乙酰葡萄糖苷、3-*p*-香豆酰葡萄糖苷和 3-咖啡酰葡萄糖苷衍生物, 其中二甲花翠素及其衍生物是其主要成分, 一般不含有天竺葵色素(pelargonidin)衍生物

收稿 2007-12-03 修定 2008-03-05

资助 黑龙江省博士后科研启动基金(602025)。

* 通讯作者(E-mail: junwang1966@126.com; Tel: 0451-82191829)。

(Boss 等 1996a; Arozarena 等 2002; Ageorges 等 2006)。但也有一些是例外, 如‘黑比诺(Pinot Noir)’品种只含有非酰化的花色苷(Fong 等 1971), 一些具有玫瑰香味的品种含有的二甲花翠素衍生物比其它花色苷少(Cravero 等 1994)。

两类基因为花色苷生物合成所必需, 一类为结构基因, 这些基因是不同种植物所共有, 其编码的酶蛋白直接参与花色苷及其它黄酮类化合物的合成和贮藏; 另一类为调节基因, 这类基因不仅调节结构基因的表达, 还控制色素类物质的时空积累(Sparvoli 等 1994; Holton 和 Cornish 1995; Winkel-Shirley 2001; Koes 等 2005)。葡萄为非跃变型果实, 浆果的生长曲线表现为双 S 形, 即在 2 个生长阶段[第一阶段(stage I)和第三阶段(stage III)]中间有一个停滞期[(lag phase), 第二阶段(stage II)] (Coombe 和 Hale 1973)。在葡萄栽培中由停滞期过渡到第三阶段称为果实转色期, 也就意味着浆果开始成熟, 浆果中糖份和花色苷的积累从果实转色期开始, 贯穿于整个成熟过程, 品种、栽培地区和栽培条件都会影响花色苷的含量和各种花色苷的比例(Boss 等 1996a; Jeong 等 2004; Mori 等 2005, 2007; Ageorges 等 2006; Castellarin 等 2006, 2007a, 2007b; Sanchez-Ballesta 等 2007)。花色苷的生物合成除依赖于基因型外, 还具有器官(组织)合成特异性(主要在果皮中合成), 受光诱导, 如红皮葡萄果皮中含有花色苷而不含原花色素(proanthocyanidin), 白皮葡萄果皮中含原花色素而不含花色苷; 成熟的‘西拉(Shiraz)’品种果皮中含花色苷, 叶片、卷须、绿枝、根尖、花、花后 4 周的和成熟果实果肉中只含原花色素, 而不含花色苷(Boss 等 1996b); 夜间高温抑制果皮花色苷的积累, 但对黄酮类物质的合成无影响(Mori 等 2005); 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(Castellarin 等 2007a, b); 外源生长调节物质和乙醇对花色苷的生物合成也有影响(El-Kereamy 等 2002, 2003; Jeong 等 2004); 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(Sparvoli 等 1994)。

花色苷生物合成过程分为两个阶段, 苯丙氨酸先转化为 4-香豆酰 CoA, 后合成木质素、香

豆素和 1,2-二苯乙烯等, 这一阶段一般称为苯丙烷类代谢途径(phenylpropanoid metabolic pathway); 第二个阶段为类黄酮途径(flavonoid pathway), 由 4-香豆酰 CoA 转化为各种黄酮类化合物, 如橙酮(aurone)、黄酮(flavone)、黄酮醇(flavonol)、异黄酮(isoflavonoid)、原花色素、花色苷, 此途径受光调节(Sparvoli 等 1994; Boss 等 1996b)。由苯丙氨酸形成花色苷阶段包含很多反应, 这些反应分别由不同的酶催化。据文献报道, 葡萄花色苷生物合成途径如图 1 所示(Goto-Yamamoto 等 2002; Koes 等 2005; Bogs 等 2006; Jeong 等 2006; Zhang 等 2006)。苯丙氨酸在苯丙氨酸解氨酶(PAL)、肉桂酸 4-羟化酶(C4H)、4-香豆酰 CoA 连接酶(4CL)作用下生成 4-香豆酰 CoA; 由查尔酮合成酶(CHS)催化丙二酰 CoA 和 4-香豆酰 CoA 形成黄色的查尔酮(chalcone); 查尔酮异构化形成无色的黄烷酮(flavanone), 此步骤可自发进行, 但在查尔酮异构酶(CHI)催化下可加速完成; 在黄烷酮 3-羟化酶(F3H)的催化下, 黄烷酮在 C3 位置羟化形成无色的黄烷酮醇(dihydroflavonol); 进一步还原成无色花色素(leucoanthocyanidin), 由黄烷酮醇 4-还原酶(DFR)催化完成; 在无色花色素双加氧酶(LDOX)作用下, 无色花色素转变成有色不稳定的花色素(anthocyanidin), 包括花翠素和花青素; UDP-葡萄糖: 类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶(UFGT)催化不稳定的花色素糖苷化分别形成花翠素-3-葡萄糖苷和花青素-3-葡萄糖苷; 在 O-甲基转移酶(OMT)的催化下分别形成花翠素类(3'-甲花翠素、二甲花翠素)葡萄糖苷和花青素类(甲基花青素)葡萄糖苷(Holton 和 Cornish 1995; Jaakola 等 2002; Jenog 等 2006; Castellarin 等 2007a)。

在花色苷的生物合成过程中(图 1), 由于大多数中间产物是另一个生物合成过程的前体物质, 所以与花色苷生物合成相关酶基因在非花色苷合成器官中同样可以表达(Boss 等 1996b)。有研究表明, 在类黄酮途径中, 不同器官(组织)中原花色素含量与相关基因表达呈现出数量上的相关关系, 也就是说原花色素含量高的器官(组织), 其相关基因(不包括 UFGT)的表达水平也高; 在非花色苷合成器官(如叶片、卷须、绿枝、根、花、种子)中类黄酮途径中相关基因(不包括 UFGT)的表达

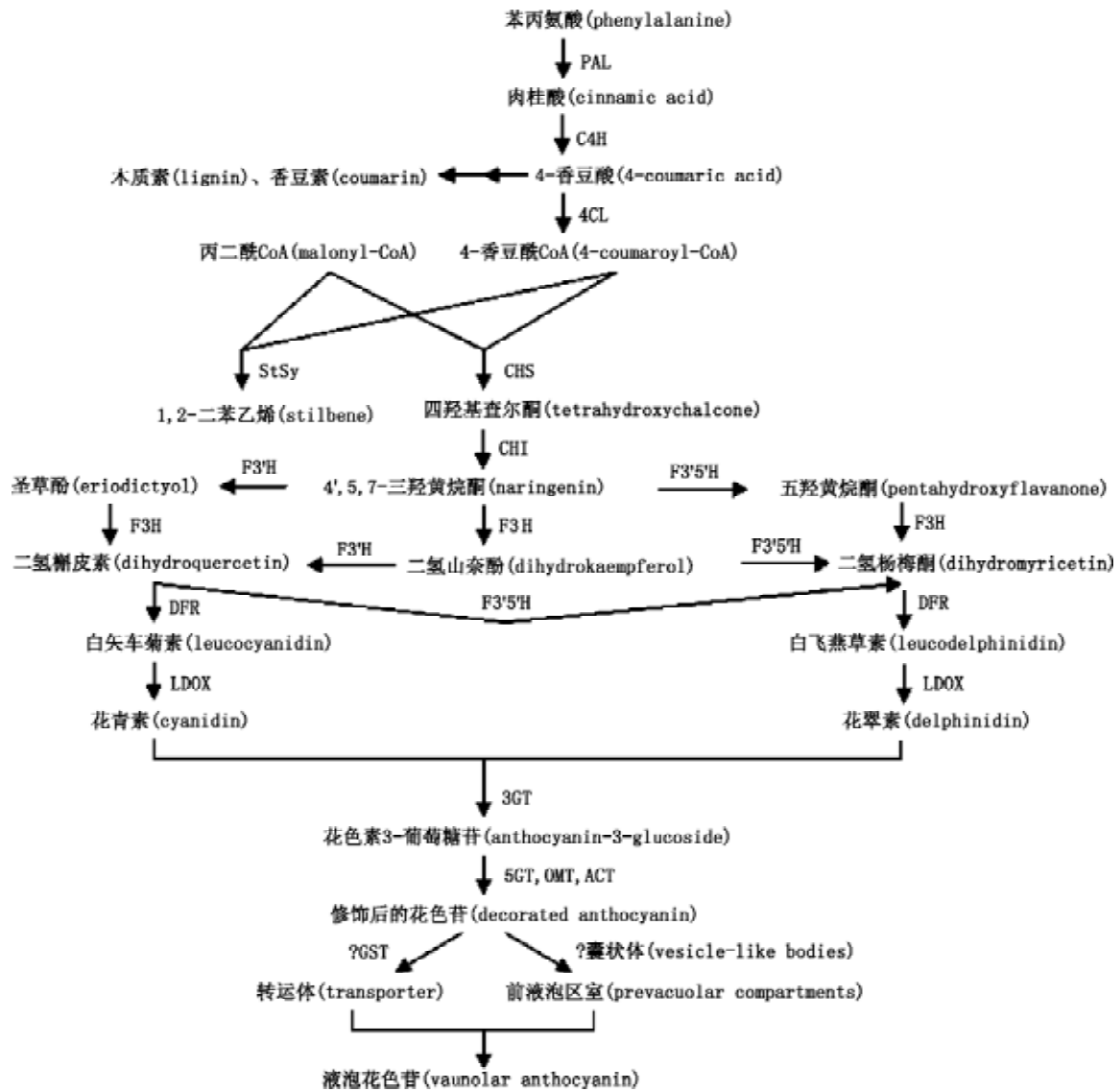


图1 花色苷的生物合成途径(Goto-Yamamoto等2002; Koes等2005; Bogs等2006; Jeong等2006; Zhang等2006)

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); StSy: 二苯乙烯合酶(stilbene synthase); CHS: 查尔酮合成酶(chalcone synthase); CHI: 查尔酮异构酶(chalcone isomerase); F3H: 黄酮酮 3-羟化酶(flavanone 3-hydroxylase); F3'H: 类黄酮 3'-羟化酶(flavonoid 3'-hydroxylase); F3'5'H: 类黄酮 3',5'-羟化酶(flavonoid 3',5'-hydroxylase); DFR: 黄酮醇 4-还原酶(dihydroflavonol 4-reductase); LDOX: 无色花色素双加氧酶(leucoanthocyanidin dioxygenase); UFGT 或 3GT: 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); 5GT: UDP-葡萄糖: 花色苷-5-O-葡萄糖基转移酶(UDP-glucose: anthocyanin 5-O-glucosyltransferase); ACT: 花色苷酰基转移酶(anthocyanin acyltransferase); GST: 谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase)。

是由于合成原花色素(Boss等1996b)。UFGT表达具有品种和时间特异性,也就是该基因只在花色苷合成组织(红色品种一定发育时期的果皮)中表达,其表达强度与花色苷含量呈正相关,白色品种类黄酮途径可能止于DFR(Boss等1996b; Kobayashi等2001)。因此,认为葡萄花色苷生物

合成的关键酶是UFGT,而非LDOX(Sparvoli等1994; Boss等1996a, b; Kobayashi等2001),这与玉米、金鱼草和矮牵牛中花色苷生物合成关键酶基因不同(Holton和Cornish1995)。果皮颜色突变体的研究表明,虽然UFGT在白色葡萄果皮中不表达,但该基因是存在的;白色果皮葡萄及

其红色果皮突变体中的 *UFGT* 及启动子的碱基序列相同(Boss 等 1996a, b; Kobayashi 等 2001)。Kobayashi 等(2002)认为果皮颜色由白色突变为红色是由一个控制 *UFGT* 表达的调节基因发生了突变之果。

2 结构基因

Sparvoli 等(1994)以金鱼草和玉米的 cDNA 为异源探针, 从葡萄实生苗中分离出编码 *PAL*、*CHS*、*CHI*、*F3H*、*DFR*、*LDOX* 和 *UFGT* 的 cDNA 亚克隆。有关葡萄花色苷生物合成过程的研究, 主要集中在这 7 个酶基因上。

2.1 苯丙氨酸解氨酶(*PAL*)基因 *PAL* 是植物次生代谢中 3 个关键酶之一, 它催化 *L*- 丙氨酸形成反式肉桂酸。此反应为不可逆反应, 是一个限速反应。该酶参与植保素、木质素、花青素和水杨酸等的生物合成(陈晓亚 1998)。除和防卫反应相关外, 木质素参与导管的形成, 一些黄酮类物质参与抗辐射、根瘤诱发、生长素极性运输或调节一些苯丙烷类合成途径中酶活性(薛应龙和欧阳光察 1998)。所以 *PAL* 除在抗病时表达外(Bézier 等 2002; Kortekamp 2006; Trotel-Aziz 等 2006), 在植物抗辐射(Teklemariam 和 Blake 2004)、创伤愈合(Campos-Vargas 等 2005)、高低温胁迫(Soleska 和 Kacperska 2003)、花青素合成(Boss 等 1996a; Kobayashi 等 2001)、施用外源激素后也被激活而表达(Repka 2001; Lafuente 等 2004; Wen 等 2005)。

作为植物次生代谢关键酶基因之一, *PAL* 表达的组织特异性不强, 在葡萄中龄叶、卷须、绿枝、根尖、花、花后 4 周的种子和成熟果皮中都有较强的表达, 而在老叶和成熟果实果肉中表达较弱或不表达(Boss 等 1996b)。*PAL* 在花器中表达最强烈; 在果实中, 花后 2 周表达最强, 然后逐渐下降, 至果实转色期趋于平稳(Waters 等 2005)。葡萄幼苗叶子 *PAL* 的表达不受光诱导, 在持续光照和黑暗条件下都有很强的表达(Sparvoli 等 1994)。不同颜色葡萄品种成熟果实的果皮或果实中的研究表明, *PAL* 在大多数有色品种中表达强, 而在白色品种中表达弱或不表达(Boss 等 1996b; Kobayashi 等 2001; Ageorges 等 2006)。在红色葡萄果实发育过程中, *PAL* 主要在花后 2~4 周的果皮中表达, 然后表达减弱或不表达,

随着果实着色表达加强, 果实成熟时的表达水平最高(Boss 等 1996a; Kobayashi 等 2001), 而果肉组织在发育过程中检测不到 *PAL* 的表达(Boss 等 1996a)。*PAL* 表达依赖于品种, 如在品种 'Gamay Noir' (红皮白肉)果实和果皮中的表达比品种 'Lacryma Christii' (红皮红肉)和 'Gamay Fréaux' (红皮红肉)中的表达弱, 品种 'Gamay Noir' 果肉中几乎检测不到 *PAL* 的表达; 在品种 'Lacryma Christii' 果肉中的表达强于果皮(Ageorges 等 2006)。夜间低温促进花色苷积累时, 果皮中 *PAL* 的活性也较高, 但两者之间没有数量上的相关性(Mori 等 2005); 在进入果实转色期后, *PAL* 活性急剧上升, 成熟期又下降到较低水平(Chen 等 2006)。Chen 等(2006)检测到有 2 个 *PAL* 等位基因在果实发育过程中表达, 67 kDa 蛋白持续表达, 90 kDa 蛋白在转色期后表达; *PAL* 主要分布在果实细胞细胞壁、次生壁和薄壁细胞中。

PAL 由多个成员组成的基因家族所编码, 如葡萄 *PAL* 家族的成员有 15~20 个(Sparvoli 等 1994), 而用来杂交的探针只是其中之一。因此, 用 Northern 杂交技术有可能检测不到 *PAL* 家族其它成员在果肉组织或白色品种果皮中的表达(Sparvoli 等 1994; Boss 等 1996a, b; Kobayashi 等 2001), 实时定量 PCR 的结果证明了这一推断(Ageorges 等 2006)。不同植物中 *PAL* 碱基序列和编码的蛋白质氨基酸序列相似性较高(Sparvoli 等 1994), 该基因家族可能起源于一个古老基因, 基因的复制(duplication)和分子上的歧异(divergence)可能会形成功能不同的基因, 以应对不同环境条件的影响, 分别在不同组织和发育时期表达(Sparvoli 等 1994)。

2.2 查尔酮合成酶(*CHS*)基因 *CHS* 是类黄酮途径中的第一个酶, 丙二酰 CoA 和 4- 香豆酰 CoA 在 *CHS* 作用下形成查尔酮, 而在 *StSy* 作用下最终形成 1,2- 二苯乙烯(图 1)。由于两者催化的底物相同, 碱基序列、酶蛋白氨基酸序列、内含子位置及序列的相似性也较高, 故推测 *StSy* 是从 *CHS* 独立进化而来(Tropf 等 1994)。但随后的研究表明, 两者的起源和亲缘关系很复杂(Goodwin 等 2000; Goto-Yamamoto 等 2002)。

葡萄幼苗叶子 *CHS* 的表达受光诱导, 黑暗条

件下表达很弱, 持续光照 6 h 后表达增强, 48 h 光照后表达有所减弱(Sparvoli 等 1994)。以葡萄幼苗中分离到的 *CHS* cDNA 为探针, 研究 *CHS* 表达组织特异性的结果表明, 在叶片(幼、中、老)、卷须、绿枝、根尖、花和花后 4 周的种子中都有较强的表达, 在成熟果实果皮和果肉中表达较弱或不表达(Boss 等 1996b)。*CHS* 在红色品种成熟果皮中表达强, 在白色品种中表达弱或不表达(Boss 等 1996b; Kobayashi 等 2001); 在红色葡萄果实发育过程中, *CHS* 主要在花后 2~4 周的果皮中表达, 然后表达减弱, 随着果实着色表达的加强, 果实成熟时表达水平最高(Boss 等 1996a; Kobayashi 等 2001; Waters 等 2005), 而果肉组织在花后 4 周表达最强, 随着果实的发育表达急剧下降(Boss 等 1996a); 转色期开始至成熟期的夜间高温(30/30)对 *CHS* 在葡萄果皮中的表达几乎没有影响(Mori 等 2005), 乙烯利(2-chloroethylphosphonic acid, 2-CEPA)促进 *CHS* 的表达(El-Kereamy 等 2003), 而乙醇对 *CHS* 的表达则基本上无影响(El-Kereamy 等 2002); *CHS* 在花后 2 周的果实中表达最强, 转色前降至最低水平, 进入转色期后缓慢上升(Waters 等 2005)。*CHS* 在葡萄果肉、白色品种果皮、转色期前后表达水平之所以低或不表达的原因, 可能与其结构、采用的检测方法和探针的特异性有关(Sparvoli 等 1994; Kobayashi 等 2001; Waters 等 2005; Ageorges 等 2006)。

葡萄 *CHS* 由多基因家族编码, 其成员有 3~4 个, 与其它植物 *CHS* 碱基序列和编码的蛋白质氨基酸序列的相似性较高。与 *PAL* 类似, *CHS* 基因家族可能起源于一个古老基因, 基因的复制和分子上的歧异可能形成功能不同的基因, 以应对不同环境条件的影响, 并分别在不同组织和发育期表达(Sparvoli 等 1994)。迄今已从‘赤霞珠(Cabernet Sauvignon)’分离到 3 个 *CHS* 的 cDNA 克隆, 分别为 *CHS1*、*CHS2* 和 *CHS3*, 其转录可能受不同因素控制(Sparvoli 等 1994; Durbin 等 2000; Goto-Yamamoto 等 2002; Jeong 等 2004)。对根据 *CHS* 碱基序列推测的蛋白质氨基酸序列进行系统发育学研究的结果显示, *CHS1* 和 *CHS2* 亲缘关系很近, 而与 *CHS3* 亲缘关系较远(Goto-Yamamoto 等 2002)。*CHS3* 的 mRNA 主要在红色

品种着色期间的果皮中积累, 而 *CHS1* 和 *CHS2* 的 mRNA 同时在白色品种果皮、幼叶和红色品种的果皮中积累(Goto-Yamamoto 等 2002; Castellarin 等 2006)。结合 cDNA 微阵列和实时定量 PCR 技术, 采用抑制消减杂交(suppressive subtractive hybridization, SSH), 分析不同发育时期不同颜色(果皮、果肉)葡萄品种的结果表明, *CHS3* 与果实颜色紧密相关(Ageorges 等 2006)。类黄酮途径相关基因(如 *CHS1* 和 *CHS2*)在非花色苷合成器官(如叶片、根、花、种子)中的表达可能是由于合成原花色素之果(Boss 等 1996b; Ageorges 等 2006)。在品种‘赤霞珠’葡萄转色期施以 ABA、NAA 和遮荫处理的结果显示, 果实着色期间果皮中 *CHSs* mRNA 以 *CHS2* 和 *CHS3* 为主, 以 ABA 处理可以促进 *CHSs* 的表达, 而以 NAA 和遮荫处理则抑制 *CHSs* 的表达(Jeong 等 2004); 水分胁迫处理的结果表明, 果实着色期间果皮中 *CHSs* mRNA 以 *CHS2* 和 *CHS3* 为主, 干旱可以促进 *CHS2* 和 *CHS3* mRNA 的转录(Castellarin 等 2007a)。*CHSs* 表达的机制还需进一步研究。

2.3 查尔酮异构酶(CHI)基因 黄色的查尔酮能自发或在 CHI 作用下很快异构化形成无色的黄烷酮(Holton 和 Cornish 1995)。Sparvoli 等(1994)认为葡萄 *CHI* 为单拷贝, 果实发育过程中用表达序列标签(expressed sequence tag, EST)分析的结果也证明这一推断(Terrier 等 2001), 但随后的 EST 数据库报道认为有 2 个 *CHI* 序列(*CHI1* 和 *CHI2*) (Waters 等 2005; Ageorges 等 2006), 浆果转色后 *CHI1* 表达, *CHI2* 在非生物胁迫的叶片中表达(Jeong 等 2004)。

葡萄幼苗叶子 *CHI* 的表达受光诱导, 黑暗条件下表达较弱, 持续光照后表达增强(Sparvoli 等 1994)。*CHI* 在幼叶和中龄叶、卷须、绿枝、根尖、花、花后 4 周种子和果皮中都有表达, 而在老叶和果肉中不表达(Boss 等 1996b)。*CHI* 在红色品种成熟果皮中表达强, 而在白色品种中表达弱(Boss 等 1996b; Kobayashi 等 2001), 在体细胞胚(白色)及其突变体(紫红色)中的表达分析也证明了这一点(Kobayashi 等 2002); 在红色葡萄果实发育过程中, *CHI* 主要在花后 2~4 周的果皮中表达, 而后表达减弱, 随着果实着色表达加强, 果实成熟时的表达水平与花后 4 周相等(Boss 等

1996a; Kobayashi 等 2001; da Silva 等 2005), 而果肉组织在花后 4 周的表达最强, 而后下降, 随着果实的成熟表达增强(Boss 等 1996a); 果实成熟过程中, 果皮中 *CHIs* 表达渐强, *CHI1* 表达强, *CHI2* 表达弱; 以 ABA 处理可以促进 *CHIs* 的表达, 而以 NAA 和遮荫处理则抑制 *CHIs* 的表达(Jeong 等 2004)。

2.4 黄烷酮 3-羟化酶(F3H)基因 F3H 催化黄烷酮在 C3 位置羟化形成无色的黄烷酮醇(Holton 和 Cornish 1995; Dixon 和 Steele 1999; Winkel-Shirley 2001; Koes 等 2005)。葡萄 *F3H* 为 2 个拷贝(Sparvoli 等 1994; Jeong 等 2004; Waters 等 2005), 幼苗叶子 *F3H* 的表达受光诱导, 黑暗条件下表达较弱, 持续光照后表达增强(Sparvoli 等 1994), 在叶片(幼、中、老)、卷须、绿枝、根尖、花和花后 4 周的种子中都有较强的表达, 特别是中龄叶、种子和花中表达更强, 在果肉中表达弱, 在成熟果实果皮中表达较强(Boss 等 1996b; Castellarin 等 2006); 在红色品种成熟果皮中表达强, 而在白色品种中表达弱(Boss 等 1996b; Kobayashi 等 2001; Ageorges 等 2006)。在红色葡萄果实发育过程中, *F3H* 主要在花后 2~4 周的果皮中表达, 然后表达减弱, 果实转色期为上调表达(Boss 等 1996a; Kobayashi 等 2001; Waters 等 2005; Castellarin 等 2007a, b), 而果肉组织在花后 4 周表达最强, 然后下降, 随着果实的成熟虽然可以检测到表达, 但水平很低(Boss 等 1996a), 在转色期后的果皮中为下调表达(Waters 等 2006; Castellarin 等 2007a, b)。

转色期开始至成熟期夜间以高温(30 /30) 处理, *F3H* 在葡萄果皮中的表达稍被抑制(Mori 等 2005); 转色期以乙烯利处理可促进 *F3H* 的表达, 而以乙醇处理则促进花色苷的合成, 抑制 *F3H* 的转录(El-Kereamy 等 2002, 2003); 水分胁迫促进 *F3H* 的表达(Castellarin 等 2007a, b); 以 ABA 处理促进 *F3H* 的转录, 以 NAA 和遮荫处理则抑制 *F3H* 的转录(Jeong 等 2004)。在葡萄果实转色后, 果皮中可检测到 2 个 *F3H* (*F3H1* 和 *F3H2*), *F3H2* 表达量是 *F3H1* 的 5 倍(Jeong 等 2004)。由于大多数研究所用的探针均为 *F3H1*, 因此, 推测 *F3H1* 可能与果皮颜色无关, 而与果肉组织合成花色苷有关(Ageorges 等 2006)。

2.5 黄烷酮醇 4-还原酶(DFR)基因 DFR 催化黄烷酮醇还原成无色花色素, 包括白矢车菊素和白飞燕草素(Holton 和 Cornish 1995; Koes 等 2005; Jeong 等 2006)。葡萄 *DFR* 为单拷贝, 其表达受光、蔗糖和 Ca^{2+} 诱导(Sparvoli 等 1994; Gollop 等 2002), 在叶片(幼、中、老)、卷须、绿枝、根尖、花和花后 4 周的种子中都有很强的表达, 在成熟果实果皮和果肉中表达较弱(Boss 等 1996b; Castellarin 等 2006); 在红色品种成熟果皮中表达强, 而在白色品种中表达弱(Boss 等 1996b; Kobayashi 等 2001; Ageorges 等 2006; Bogs 等 2006), *DFR* 在果肉中的表达可能与原花色素和黄酮类物质的合成有关(Boss 等 1996b; Goto-Yamamoto 等 2002)。在红色葡萄果实发育过程中, *DFR* 在花后 2~4 周的果皮中表达最强, 然后减弱, 并随着果实的着色表达加强(Boss 等 1996a; Kobayashi 等 2001; Castellarin 等 2007a, b), 而果肉组织在花后 4 周、种子在转色期开始表达最强(Boss 等 1996a; Bogs 等 2006)。转色期开始至成熟期夜间以高温(30 /30) 处理对 *DFR* 在葡萄果皮中的表达几乎没有影响(Mori 等 2005); 转色期以乙烯利处理不影响 *DFR* 的转录, ABA 处理促进 *DFR* 的转录, 乙醇、NAA 和遮荫处理抑制 *DFR* 的转录(El-Kereamy 等 2002, 2003; Jeong 等 2004); 品种 'Gamay Fréaux' 细胞悬浮培养过程中添加二氢槲皮素(DHQ)可提高 *DFR* 活性(Dédaldéchamp 和 Uhel 1999); 水分胁迫对 *DFR* 转录的影响主要在转色期(Castellarin 等 2007a, b)。*DFR* 的表达至少可能受 3 种机制调节, 即光、糖类物质和发育阶段(Gollop 等 2002)。

DFR 启动子长 2 227 bp, 其上含有 MYB 和 GBF (G-box factor)同源结合位点、BoxII 顺式作用元件、SBF-1 转录因子同源结合位点、蔗糖框(sucrose box)及 AGAMOUS 同源结合位点(Gollop 等 2002)。通过 *DFR* 酶蛋白结晶的衍射和多波长不规则色散 3D 结构分析的结果表明, 酶蛋白 N 末端为 Rossmann 折叠结构, C 末端区结构可变, 参与与底物的结合, 其 135~156 位分布着底物结合位点(Petit 等 2007)。葡萄 *DFR* 的空间结构特点是不以二氢山奈酚(DHK)为底物, 因此, 不能合成天竺葵色素类花色苷。

2.6 无色花色素双加氧酶(LDOX)基因 LDOX 催化

无色花色素转变成有色不稳定的花色素, 包括花翠素和花青素(Holton 和 Cornish 1995; Koes 等 2005; Jeong 等 2006)。葡萄 *LDOX* 为单拷贝, 黑暗条件下不表达, 光、蔗糖和 Ca^{2+} 可诱导其表达(Sparvoli 等 1994; Gollop 等 2001), 在叶片(幼、中、老)、卷须、绿枝、根尖、花、花后 4 周的种子和果皮中都有较强的表达, 而在果肉中不表达(Boss 等 1996b; Goto-Yamamoto 等 2002; Castellarin 等 2006); 在红色品种成熟果皮中表达强, 而在白色品种中表达弱或不表达(Boss 等 1996b; Kobayashi 等 2001; Bogs 等 2006), 在红色葡萄果实发育过程中, *LDOX* 在花后 2~4 周的果皮中表达最强, 然后减弱, 随着果实着色表达加强(Boss 等 1996a; Kobayashi 等 2001; Castellarin 等 2007a, b), 果肉组织在花后 4 周表达最强, 然后检测不到表达(Boss 等 1996a), 其在果皮、种子和叶子中的表达谱不同(Bogs 等 2005)。转色期开始至成熟期夜间以高温(30 /30)处理对 *LDOX* 在葡萄果皮中的表达几乎无影响(Mori 等 2005); 转色期以乙烯利或 ABA 处理可促进 *LDOX* 的转录, 以乙醇、NAA 和遮荫处理则抑制 *LDOX* 的转录(El-Kereamy 等 2002, 2003; Jeong 等 2004); 水分胁迫对 *LDOX* 转录的影响主要表现在转色期开始时的增加(Castellarin 等 2007a, b)。*LDOX* 启动子长 2 348 bp, 其上含有 MYB 和 GBF 同源结合位点、BoxII 顺式作用元件、SBF-1 转录因子同源结合位点、蔗糖框(Gollop 等 2001)。

2.7 UDP- 葡萄糖: 类黄酮-3-O- 葡萄糖基转移酶 (UFGT 或 3GT) 基因 UFGT 催化不稳定的花色素糖苷化形成各种花色苷(Boss 等 1996a; Jeong 等 2006; Castellarin 等 2007a, b)。*UFGT* 在 2 倍体葡萄中为单拷贝, 在葡萄幼苗叶子的表达受光诱导, 黑暗条件下几乎不表达, 随着持续光照时间的延长其表达加强(Sparvoli 等 1994)。在自然条件下, *UFGT* 只在红色葡萄转色期后的果皮中表达, 在白色品种和果肉中不表达, 转色期为上调表达, 随着果实成熟表达加强(Boss 等 1996a, b; Kobayashi 等 2001; Goto-Yamamoto 等 2002; Terrier 等 2005; Bogs 等 2006; Ageorges 等 2006; Castellarin 等 2006, 2007a, 2007b)。转色期开始至成熟期夜间以高温(30 /30)处理会降低果

皮中 *UFGT* 活性和花色苷的含量, 抑制 *UFGT* 在葡萄果皮中的表达(Mori 等 2005)。转色期以乙烯利和乙醇处理可促进花色苷的积累和 *UFGT* 表达(El-Kereamy 等 2002, 2003), 以 NAA 和遮荫处理抑制花色苷的积累和 *UFGT* 的表达, 以 ABA 处理则促进 *UFGT* 的转录而对花色苷的合成有一定抑制作用(Jeong 等 2004)。水分胁迫可以促进花色苷的积累和 *UFGT* 的表达(Castellarin 等 2007a, b)。*UFGT* 的 cDNA 和编码的蛋白序列分析结果表明, 其氨基酸序列与其它植物的 *UFGT* 相似性较低, 不同的糖基受体和供体 *UFGT* 活力不同, 在叶片中可能存在对槲皮素(querceetin)的糖苷化更为有效的 *UFGT*, *UFGT* 也有可能通过空间结构的变化适应不同的糖基受体和供体(Ford 等 1998; Offen 等 2006)。

UFGT 酶蛋白已从品种 ‘Gamay Fréaux’ 细胞悬浮培养物中提取纯化, 此酶蛋白的分子量为 56 kDa, 最适 pH 值 8.0, 等电点 4.5, K_m 值(花青素、花翠素、UDP- 葡萄糖)分别为 $18 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $28 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Do 等 1995)。实验结果表明, 此酶只能使花色素葡糖苷化, 而对黄酮醇[山奈酚(kaempferol)、槲皮素]的葡糖苷化无作用, 葡糖苷最好的受体为花青素和花翠素, 它也可以使天竺葵色素、甲基花青素和二甲花翠素葡糖苷化, 但活性较低(Do 等 1995)。2,4-D、IAA、生长素类物质可以提高葡萄细胞悬浮培养物 *UFGT* 的活性(Kokubo 等 2001)。

DNA 序列分析表明, 白色葡萄品种 ‘Italia’、‘Muscat of Alexandria’ 及其红色芽变品种 ‘Ruby Okuyama’、‘Flame Muscat’ 中 *UFGT* 的编码区和启动子的序列没有差异, 其启动子含有与某些转录因子(如 MYB、MYC 蛋白)共有 DNA 结合位点的同源序列, 因此认为控制 *UFGT* 表达的调节基因在红色突变体中发生了变异(Kobayashi 等 2001)。根据 *UFGT* 表达的时空特点可以推论, *UFGT* 是葡萄果皮花色苷生物合成过程中的关键酶, 而调节基因在葡萄花色苷生物合成过程中起关键作用(Boss 等 1996a, b; Kobayashi 等 2001, 2002)。

另外, 葡萄中有一些品种在果肉中也可以合成花色苷, *PAL* (CX127428)、*CHS3* (CX126991)、*F3H1* (CX127413)、*Vv-MybA1* (AB097923)、*GST*

(CX127411)在红皮红肉果实的果肉中表达量比较高,而在红皮白肉品种的果肉中几乎不表达,在果皮中表达量也相对较低(Ageorges等2006)。因此,认为这些基因可能与果肉组织花色苷合成的关系更为密切(Ageorges等2006)。以往有关花色苷生物合成基因表达和调控的研究主要集中在 *UFGT* 及上游基因上(Sparvoli等1994; Boss等1996a, b; Kobayashi等2001, 2002),而有关 *UFGT* 研究所用的都是非特异性 cDNA 片段,有关 *UFGT* 的下游基因的相关信息比较少(Waters等2005; Ageorges等2006)。总之,葡萄花色苷生物合成过程中可能存在几个关键酶基因,如 *CHS3*、*UFGT*、*CCoAOMT* (caffeoyl-CoA *O*-methyltransferase)和 *GST* (Ageorges等2006)。

2.8 其它结构基因 由 *CHI* 催化生成的 4',5,7-三羟黄酮酮可以在 *F3H* 催化下生成二氢山奈酚,然后在类黄酮 3'-羟化酶(*F3'H*)作用下生成二氢槲皮素,或在类黄酮 3',5'-羟化酶(*F3'5'H*)作用下生成二氢杨梅酮(dihydromyricetin, DHM);也可以在 *F3'H* 作用下生成圣草酚,或在 *F3'5'H* 作用下生成五羟黄酮酮,圣草酚和五羟黄酮酮在 *F3H* 作用下分别生成二氢槲皮素和 DHM。此外, *F3'5'H* 还可以将二氢槲皮素转化为 DHM,二氢槲皮素和 DHM 在 *DFR* 作用下分别生成白矢车菊素和白飞燕草素,然后分别形成花青素和花翠素类葡萄糖苷(Holton和Cornish1995; Bogs等2006; Jeong等2006)。因此认为, *F3'H* 和 *F3'5'H* 在花色苷、原花色苷和黄酮醇生物合成中起作用, *F3'H* 和 *F3'5'H* 之间比例也可能控制葡萄果皮中花色苷的组成和果皮颜色(Jeong等2006; Castellarin等2007a)。

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(Jeong等2006; Castellarin等2007a, b)。谷胱甘肽 *S*-转移酶(*GST*)催化谷胱甘肽与花色苷共价结合,有利于花色苷向液泡中运输(Mol等1998; Koes等2005; Terrier等2005; Ageorges等2006)。

2.8.1 类黄酮 3'-羟化酶(*F3'H*)和类黄酮 3',5'-羟化酶(*F3'5'H*)基因 *F3'H*和 *F3'5'H*属于细胞色素P450家族,在二倍体葡萄中 *F3'H*为2个拷贝, *F3'5'H*为1个拷贝(Jeong等2006)。 *VvF3'H* cDNA长1733 bp,内含1527 bp长的开放阅读框架(open

reading frame, ORF),编码509个氨基酸残基的蛋白,与矮牵牛的 *F3'H* 相似性最高; *VvF3'5'H* cDNA长1792 bp,内含1524 bp长的ORF,编码508个氨基酸残基的蛋白,与陆地棉(*Gossypium hirsutum*)的 *F3'5'H* 相似性最高, *F3'H* 和 *F3'5'H* 分别属于细胞色素P450家族的 *CYP75B* 家族和 *CYP75A* 家族(Bogs等2006)。分析 *VvF3'H* 和 *VvF3'5'H* 在矮牵牛花异位表达表明,转 *VvF3'H* 或 *VvF3'5'H* 提高总花色苷含量而降低总黄酮醇含量,转 *VvF3'H* 提高3'-甲花青素和二氢槲皮素含量,转 *VvF3'5'H* 提高二甲花翠素和二氢槲皮素含量(Bogs等2006)。 *VvF3'H* 和 *VvF3'5'H* 在花期有一表达高峰,转色期后其在果皮中的表达逐渐增强;在花期、幼果期和种子发育过程中, *VvF3'H* 的相对表达量高于 *VvF3'5'H*,而在果实成熟过程中则相反; *VvF3'H* 在不同颜色品种中都有表达,红色品种表达相对较强,而 *VvF3'5'H* 只在红色品种中表达,白色品种中几乎不表达(Bogs等2006; Jeong等2006; Castellarin等2007a, b);果实成熟期间 *F3'5'H* 的转录丰度与花色苷的羟基化水平密切相关,因此认为, *F3'H* 和 *F3'5'H* 的转录水平可能决定花青素类花色苷和花翠素类花色苷的比率,进而影响果皮的颜色(Bogs等2006; Jeong等2006; Castellarin等2006, 2007a)。

Castellarin等(2006)认为, *VvF3'H* 和 *VvF3'5'H* 在葡萄基因组中为低或中等拷贝, *VvF3'5'H* 基因簇包括4个拷贝的 *VvF3'5'H-1* 和5~7个拷贝的 *VvF3'5'H-2*, *VvF3'H* 和 *VvF3'5'H-1* 分别被定位在 Riaz等(2004)的 LG17 和 LG6 连锁组上。 *VvF3'H-1* 在幼叶和花中表达强,在展开的叶子中表达较弱,在果皮和果肉中都有表达, *VvF3'H-2* 可能为假基因; *VvF3'5'H-1* 在着色的幼叶、花、种子、果肉和果皮中都有表达,根和展开的绿叶中不表达,其表达方式与 *CHS2*、*CHS3* 和 *F3H* 类似; *VvF3'5'H-2* 的逆转录产物长度不同,较短的2个产物在各种组织中几乎都有表达,长的转录产物只在花和着色的果皮中表达(Castellarin等2006)。 *VvF3'H* 在整个果实发育都有表达,在转色期前表达强,转色期有一表达高峰,而 *VvF3'5'H-1* 在转色期前表达很弱,进入转色期后表达量急剧增加(Castellarin等2006, 2007a, 2007b)。 *VvF3'5'H* 的表达与光照和昼夜温度相关

($R^2=0.93$, $R^2=0.89$), 果实转色期表现为明显的上调表达; 水分胁迫促进 *VvF3'5'H* 的转录, 提高花色苷的羟基化水平, 而对 *VvF3'H* 转录的影响则无规律性(Castellarin 等 2007a, b)。

2.8.2 O-甲基转移酶(OMT)基因 O-甲基化作用可以改变受体物质的生理特性、降低酚羟基的化学活动性, 有利于物质间的转换, 特别是花色苷类物质的 O-甲基化作用, 由于这类物质极性的改变, 从而会影响其在细胞中的区隔化(Suelves 和 Puigdomènech 1998; Gauthier 等 1998; Kim 等 2006)。OMT 的催化反应依赖于 SAM (S-adenosyl-L-methionine), 也就是能将甲基从供体 SAM 转移到受体分子的羟基或羧基上(Ibrahim 等 1998)。植物中的 O-甲基化反应由两类不同的 OMT 催化: 一类为 CCoAOMT, 主要参与木质素的生物合成; 另一类为 COMT (caffeic acid O-methyltransferase), 以咖啡酸、类黄酮、生物碱、香豆素及其它酚类化合物为底物(Kim 等 2006)。

OMT 催化花青素-3-葡萄糖苷 B 环 3'-OH、花翠素-3-葡萄糖苷 B 环 3'-OH 或 3'-OH 和 5'-OH O-甲基化, 分别形成甲基花青素、3'-甲花翠素和二甲花翠素-3-葡萄糖苷(Castellarin 等 2007a, b)。CCoAOMT 的转录与花色苷含量成正相关($R^2=0.92$), 在果实转色前基本上不表达, 转色期为上调表达, 在着色果皮中的表达量明显高于未着色果皮, 水分胁迫在促进 CCoAOMT 转录的同时, 也提高 O-甲基化花色苷的含量, 提高甲基花青素和二甲花翠素葡萄糖苷的含量, 而对甲基花翠素葡萄糖苷的含量无影响(Ageorges 等 2006; Castellarin 等 2007b)。

2.8.3 谷胱甘肽 S-转移酶(GST)基因 GST 通过催化谷胱甘肽与底物的共价结合, 形成谷胱甘肽 S-耦联物(glutathione S-conjugate)而使杂环化合物(如除草剂)解毒; 液泡膜上的谷胱甘肽 S 耦联结合泵(GSH S-conjugate pump)可以识别并促使谷胱甘肽化的物质进入液泡(Marrs 等 1995; Alfenito 等 1998)。花色苷是植物体内 GSTs 的底物之一, 如玉米的 *Bz2* (type III GST)和矮牵牛的 *An9* (type I plant GST)均受花色苷生物合成途径中保守的转录激活子(conserved transcriptional activators)调节, 编码的酶蛋白可促使花色苷谷胱甘肽化而在液泡中沉积(Marrs 等 1995; Alfenito 等 1998)。因此认

为, GST 可能是花色苷生物合成过程中的最后一个酶(Marrs 等 1995; Alfenito 等 1998; Terrier 等 2005; Ageorges 等 2006)。

Zhang 等(2007)从葡萄细胞悬浮培养中分离到 5 个 *GST*, *GST4* 与花色苷的积累紧密相关, 蔗糖、茉莉酸、光照在促进葡萄细胞悬浮培养花色苷生物合成的同时, 也诱导 *GST1* 的表达。葡萄果实转色期果皮 *GST* 为上调表达, 果实转色前表达量很低, 进入转色期后大量转录; 在红皮红肉果实的果肉中表达量比较高, 而在红皮白肉品种的果肉中几乎不表达; 水分胁迫促进 *GST* 的表达(Castellarin 等 2007a, b; Terrier 等 2005; Ageorges 等 2006)。

3 调节基因

调节基因控制花色苷生物合成过程中相关结构基因的时空表达, 影响花色苷生物合成的强度和模式(Holton 和 Cornish 1995)。植物中一般有两类调节基因(*CI* 和 *R* 基因家族)调节着花色苷生物合成过程中相关的结构基因的表达(Holton 和 Cornish 1995; Mol 等 1998)。*CI* 编码的蛋白与 *Myb* 原癌基因家族编码的蛋白同源, *R* 编码的蛋白与 *Myc* 转录激活子的两亲性基础螺旋-环-螺旋(helix-loop-helix, bHLH)基序同源, 这些基因编码的蛋白通过与相关结构基因启动子的结合来控制结构基因的转录(Quattrocchio 等 1993; Kobayashi 等 2002)。

3.1 转录因子 葡萄花色苷生物合成相关结构基因的表达可能也受类 *Myb* 和类 *Myc* 转录因子的控制, 葡萄果实发育过程中除了 *UFGT* 外, *PAL*、*CHS*、*CHI*、*F3H*、*DFR* 和 *LDOX* 为共表达, 果皮中可能有两类调节基因, 一类在早期表达, 并促使除了 *UFGT* 以外的结构基因转录, 另一类在晚期表达, 并促使所有结构基因的转录(Boss 等 1996a)。也可能是一类调节基因控制 *PAL*、*CHS*、*CHI*、*F3H*、*DFR* 和 *LDOX* 的表达, 另一类在转色期后控制 *UFGT* 的表达(Boss 等 1996a; Deluc 等 2006)。迄今已从葡萄中分离到大约 20 个与花色苷生物合成相关的调节基因(表 1), 这些调节基因编码的蛋白大部分为 R2R3 MYB 蛋白。

VlmybA 只在果肉和果皮中表达, *VlmybB*~*VlmybD* 在叶片、花、卷须、根、体细胞胚、

表1 葡萄花色苷生物合成的调节基因

品种	位点	登录号	基因	参考文献
‘巨峰’	<i>VlmybA1-1</i>	AB073010	<i>UFGT</i>	Kobayashi 等 2002
	<i>VlmybA1-2</i>	AB073012	<i>UFGT</i>	
	<i>VlmybA2</i>	AB073013	<i>UFGT</i>	
	<i>VlmybB1-1</i>	AB073016	不详	
	<i>VlmybB1-2</i>	AB073017	不详	
	<i>VlmybC</i>	AB073014	不详	
	<i>VlmybD</i>	AB073015	不详	
‘Italia’	<i>VvmybA1</i>	AB097923	不详	Kobayashi 等 2004
‘Flame Muscat’	<i>VvmybA2</i>	AB097924	不详	
‘Ruby Okuyama’	<i>VvmybA3</i>	AB097925	不详	
‘Muscat of Alexandria’				
‘赤霞珠’	<i>VvMYB5a</i>	AY555190	<i>CHS, CHI, F3H, DFR, LDOX</i>	Deluc 等 2005
	<i>VvMYB5b</i>	AY899404	不详	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
	<i>VvMYBA1</i>		<i>UFGT</i>	Walker 等 2006
	<i>VvMYBA2r</i>		<i>UFGT</i>	
	<i>VvMYBA2w</i>		不详	
	<i>VvMYBA3</i>		不详	
‘西拉’	<i>VvMYBPA1</i>	AM259485	<i>CHI, LDOX, F3'5'H1, ANR, LARI</i>	Bogs 等 2007

ANR: 花色苷还原酶(anthocyanidin reductase); LAR: 无色花色苷还原酶(leucoanthocyanidin reductase)。

果肉、果皮等组织中表达; *VlmybA* 和 *VlmybB* 主要在果实开始着色后的果皮中表达, 而 *VlmybC* 和 *VlmybD* 在幼果的表皮中表达强(Kobayashi 等 2002)。 *VlmybA* 和 *VlmybB* 相关调节基因的全长 cDNA 序列分析表明, 虽然 *VlmybA1* 和 *VlmybA2* 序列相似, 但 X-Y 酸性区在 *VlmybA1* 中为 1 个拷贝, 在 *VlmybA2* 为 2 个拷贝, 在 X 区 *VlmybA1-2* 比 *VlmybA1-1* 短 10 个碱基, 除了 X-Y 酸性区拷贝数和一个内含子外, *VlmybA1-1* 和 *VlmybA2* 序列完全一致; 而 *VlmybB* 不含 X-Y 酸性区, *VlmybB1-1* 和 *VlmybA1-1* 的氨基酸序列无论在 DNA 结合结构域内、外完全不同, *VlmybA1-1* 与矮牵牛的 AN2、*VlmybB1-1* 与矮牵牛的 *Myb.Ph2* 氨基酸序列相似性高, *VlmybB1-1* 与 *VlmybB1-2* 碱基序列相似性很高(98.3%) (Kobayashi 等 2002)。 *MybA* 通过促进 *UFGT* 的转录调节花色苷的生物合成, 而 *MybC* 可能参与所有与花色苷生物合成相关结构基因转录的调节(Kobayashi 等 2002)。水分胁迫可促使 *MybC* 在转色期后为上调表达, 而对 *MybB*、*MybD* 的转录无影响(Castellarin 等 2007a)。

VvmybA1 只在有色品种上转录, *VvmybA2* 和 *VvmybA3* 在 ‘Ruby Okuyama’ (红)、‘Flame Muscat’ (红)、‘Italia’ (白)、‘Muscat of Alexandria’ (白) 都有转录(Kobayashi 等 2004,

2005); *VvmybA* 与 *UFGT* 的转录谱一致, 即只在进入转色期后表达(Bogs 等 2006; Castellarin 等 2007a); *VvmybA1* 与果皮颜色密切相关, 很可能就是 Doligez 等(2002)和 Riaz 等(2004)定位到连锁图上果皮的色位点, 大部分鲜食葡萄果皮颜色的遗传变异和体细胞突变均与它有关(Lijavetzky 等 2006); ABA 和水分胁迫促进 *VvmybA1* 转录, NAA 和遮荫处理则抑制 *VvmybA1* 的转录(Jeong 等 2004; Castellarin 等 2007a), *VvmybA1* 可能是花色苷生物合成相关结构基因的共同调节基因(Terrier 等 2005; Ageorges 等 2006)。 *VvMYBA2r* C 末端比 *VlmybA2* 长, *VvMYBA1r* 相当于 *VvmybA1*, *VvMYBA2w* 相当于 *VvmybA2*, *VvMYBA3* 相当于 *VvmybA3*, *VvMYBA1-3* 在 ‘西拉’ 葡萄转色期后的果皮上都有转录(Walker 等 2007)。瞬时表达分析表明, *VvMYBA1* 和 *VvMYBA2* 能够作用于 *UFGT* 的启动子而使其表达, *VvMYBA* 与 *UFGT* 的表达和花色苷的积累成正相关, *VvMYBA2* 在白皮葡萄中发生突变, 这种突变不能活化 *UFGT* 的启动子或减少花色苷的形成, *VvMYBA3*、*VvMYBA4* 及其它未鉴定的基因均可能在其它组织(如叶片)中调节花色苷的合成(Walker 等 2007)。

VvMYB5a 编码由 320 个氨基酸残基组成的

R2R3 MYB 蛋白, 酶蛋白系统发育学的研究表明, *VvMYB5a* 与陆地棉种子 *BnGHI233* 相似性最高, 而与 *VlmybA* 和 *VlmybB* 相似性较低; *VvMYB5a* 在葡萄上表达无组织(器官)特异性, 水分胁迫促进其在转色期的转录, 果实成熟过程中为下调表达; *VvMYB5a* 在烟草(*Nicotiana tabacum*)中的过量表达影响原花色素、花色苷、黄酮醇、单宁和木质素生物合成过程中结构基因的转录, 在花瓣中促进 *CHS*、*CHI*、*F3H*、*LDOX* 的转录, 抑制 *DFR* 的转录, 在雄蕊中可促进 *CHS*、*CHI*、*F3H*、*DFR* 的转录, 而对 *LDOX* 的转录无影响, 可促进花色苷、黄酮醇和缩合单宁等物质的积累, *VvMYB5a* 可能参与葡萄花色苷生物合成过程中不同代谢方向的调节(Deluc 等 2006; Castellarin 等 2007a)。

VvMYBPA1 编码由 286 个氨基酸残基组成的 MYB 型蛋白, 与黑云杉(*Picea mariana*) *PmMBF1* 编码的蛋白相似性最高, 而与 *VvmybA1* 相似性较低; *VvMYBPA1* 在葡萄花、种子和果皮中都有表达, 其表达与组织(器官)中原花色素的累积相关, 在果实发育前期和后期表达水平很低, 转色后有一个表达高峰; *VvMYBPA1* 可以激活 *ANR*、*LARI*、*F3'5'H1*、*CHI* 和 *LDOX* 的启动子, 但对 *UFGT* 的启动子无影响, 而 *VvmybA2* 的作用与其相反(Bogs 等 2007)。因此认为, *VvMYBPA1* 主要参与葡萄原花色素生物合成相关结构基因的转录调节(Bogs 等 2007)。水分胁迫可以促进 *MybA1*、*Myb5a*、*MybC* 的表达, 而对 *MybB* 和 *MybD* 的表达无影响(Castellarin 等 2007a)。

3.2 反转录转座子 转座子可以被一些未知的信号激活, 在染色体 DNA 上从一个基因座跳到另一个基因座。当它插入到一个功能基因后, 可以起到一种开关作用而影响基因的表达, 引起暂时性的突变; 也有一些转座子由于丧失从染色体上割离出来的能力而变成永久性突变(刘良式 2003)。由 RNA 介导转座的元件称为反转录转座子(刘良式 2003)。

Kobayashi 等(2004, 2005)从葡萄品种 'Ruby Okuyama' 中克隆到 *VvmybA1a* (AB111100) 和 *VvmybA1b* (AB111101) 两个基因, 其编码区序列一致, *VvmybA1a* 在编码区的上游(启动子)含有一个反转录转座子 *Gret1* (grapevine retrotransposon

1), *VvmybA1a* 在品种 'Italia' 中为纯合体, 在品种 'Ruby Okuyama' 上为杂合体。 *Gret1* 长 10 422 bp, 5'-LTR (long terminal repeat) 和 3'-LTR 均为 824 bp, 间区(internal region) 为 8 774 bp, 与 Ty3-gypsy 型反转录转座子 *RetroSor1*、*RIRE2*、*Cinful-1* 的 *gag-pol* 区相似(Kobayashi 等 2004, 2005)。反转录转座子插入基因内部或某一基因的附近后, 可能改变基因的表达或编码蛋白的结构而引起突变(Kumar 和 Bennetzen 1999)。 *Gret1* 类反转录转座子在欧洲葡萄(*V. vinifera*)基因组中为多拷贝, 它遍布基因组的常染色质区, 具有多重插入位点, 它可能会引起基因结构的变化, 以及调节其它基因的表达(Pereira 等 2005), *Gret1* 的转座是产生果色体细胞突变体的主要原因(Lijavetzky 等 2006)。 *Gret1* 纯合时果色为白色, 着色品种至少带有 1 个不含 *Gret1* 的 *VvmybA1* 等位基因, *VvmybA1a* 等位基因广泛分布于欧洲葡萄和欧美杂种葡萄(*V. labruscana*)品种中(Kobayashi 等 2004)。 *Gret1* 插入 *VvmybA1* 的启动子, 与白色品种的形成密切相关; *Gret1* 从 *VvmybA1* 启动子上切除, 与白色品种的红色或粉红色突变体的形成有关(Kobayashi 等 2005; This 等 2007), 在一些品种中可以见到 *Gret1* 转座后留下的痕迹(Kobayashi 等 2004, 2005; This 等 2007)。白色葡萄品种由于失去花色苷合成能力, 因此被认为是由不同的红色品种通过独立突变而来(Slinkard 和 Singleton 1984; Boss 等 1996b), 花色苷生物合成相关结构基因或相应的调节基因(转录因子)都有可能发生突变(Boss 等 1996b), 一个调节基因发生变化, 能产生一系列与果色变化相关的等位基因。因此认为, 白色品种的出现也可能是其它基因突变的结果(This 等 2007)。Kobayashi 等(2004)推测, *Gret1* 最初插入到红皮葡萄祖先品种 *VvmybA1* 编码区的上游, 引起 *VvmybA1* 失活后再通过自然杂交产生 *VvmybA1a* 纯合体, 从而产生白皮葡萄, 葡萄果皮颜色由单基因控制(Doligez 等 2002; Riaz 等 2004; Kobayashi 等 2005)。Walker 等(2007)认为, *VvMYBA2* 的突变和 *VvMYBA1* 启动子 *Gret1* 的插入是产生白色葡萄的关键。某些红色品种的白色突变体可能是由于大的 DNA 区段(包括 *VvMYBA1* 和 *VvMYBA2*)的缺失, 而白色品种的红色突变体则可能是 *Gret1* 的缺失(Walker 等

2006)。

4 结语

有关葡萄花色苷的生物合成及调控研究取得了很大进展,特别是有关逆转录转座子(Kobayashi等2004),DFR和UFGT的三维结构的研究(Offen等2006;Petit等2007)。但与其它植物的相关研究相比仍有许多问题需要阐明。

(1)花色苷的甲基化可以改变其在溶液状态下的颜色,而与芳香基的酰化作用可以提高其稳定性和颜色的持久性(Dangles等1993)。所以应该进一步研究花色苷生物合成途径末端的花色苷修饰酶(如OMT和ACT)的生理生化及分子生物学问题。

(2)欧亚种葡萄不含花色苷双糖苷(anthocyanidin diglucosides),而美洲种葡萄及欧美杂种都含花色苷双糖苷(Hrazdina等1970;Hebrero等1989;Gao和Cahoon 1995;Favretto和Flamini 2000;Arozarena等2002)。有关研究者指出,除欧亚种之外所有葡萄种及种间杂种均可检出花色苷双糖苷(Nesbitt等1974;Goldy等1989;段长青等1997)。因此,研究5GT的结构、表达方式、调节机制和5GT蛋白的空间结构,对阐明葡萄花色苷双糖苷的生物合成显然是有意义的。

(3)转录因子控制结构基因的时空表达(Holton和Cornish 1995)。在葡萄中主要对MybA、Myb5a和MybPA1进行了较为全面的研究,今后应该研究MybC、MybB、MybD的调节位点和调节机制。另外,在红色葡萄果实成熟过程中,有一些转录因子为上调表达(Terrier等2005),它们与花色苷生物合成的关系还需进一步阐明。逆转录转座子大量存在于植物基因组DNA(Kumar和Bennetzen 1999),在葡萄中已发现Gret1和Vine-1(Verriès等2000;Pereira等2005)两类逆转录转座子,但是否还存在控制花色苷生物合成相关结构基因转录和表达的其它逆转录转座子?转录因子间、转录因子与逆转录转座子之间又是如何相互作用而协同调节花色苷生物合成的?这些也值得深入研究。

(4)由于大部分研究仅限于相关结构基因的转录,而转录后、翻译后的调控也会影响结构基因的表达。同时,酶蛋白空间结构的变化同等影响其功能的发挥。另外,花色苷在植物体内处于合成和分解的动态平衡过程之中,因此,研究其分解代谢相关酶及基因也有必要。

此外,有关UFGT和DFR酶蛋白空间结构研究表明(Offen等2006;Petit等2007),酶蛋白空间结构的变化会不仅影响酶反应动力学,而且会影响底物种类和产物类型。因此,研究花色苷生物合成中相关结构基因酶蛋白的三维结构,会有助于采用生物工程技术选育不同果色的葡萄品种,或用细胞培养技术生产不同类型的花色苷的探讨。

(5)花色苷的合成在浆果表皮细胞的细胞质和内质网膜上,然后运输到液泡中予以固定、积累与贮存。GST可能参与花色苷由细胞质向液泡内的运输和扣押(sequestration)(Marrs等1995;Alfenito等1998;Mueller等2000)。但Zhang等(2006)的研究表明,在草原龙胆(*Eustoma grandiflorum*)花瓣中,花色苷以囊状体(vesicle-like bodies)的形式在细胞质中积累,被包裹在前液泡区室(prevacuolar compartments, PVCs)中,PVCs与液泡膜相互作用而将囊状体运输到液泡中,含有花色苷的囊状体进入液泡后立即破裂而使花色苷变为丝线状。但葡萄花色苷以何种形式进入液泡?是单个分子进入,然后在液泡中聚集?或者是通过细胞质中含有花色苷聚集体的PVCs与液泡膜相互作用而进入液泡?这些都还不清楚,值得探讨。

参考文献

- 陈晓亚(1998). 植物次生代谢及其调控. 见: 余叔文, 汤章城主编. 植物生理与分子生物学. 第2版. 北京: 科学出版社, 390~399
- 段长青, 贺普超, 康靖全(1997). 中国葡萄野生种花色苷双糖苷的研究. 西北农业大学学报, 25(5): 23~28
- 刘良式(2003). 植物分子遗传学. 第2版. 北京: 科学出版社, 586~605
- 薛应龙, 欧阳光察(1998). 植物抗病的物质代谢基础. 见: 余叔文, 汤章城主编. 植物生理与分子生物学. 第2版. 北京: 科学出版社, 770~806
- Ageorges A, Fernandez L, Vialet 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
- Arozarena I, Ayestarán B, Cantalejo MJ, Navarro M, Vera M, Abril I, Casp A (2002). Anthocyanin composition of Tempranillo, Garnacha and Cabernet Sauvignon grapes from high- and low-quality vineyards over two years. *Eur Food Res Technol*, 214: 303~309
- Bézier A, Lambert B, Baillieul F (2002). Study of defense-related

- gene expression in grapevine leaves and berries infected with *Botrytis cinerea*. Eur J Plant Pathol, 108: 111~120
- Bogs J, Downey MO, Harvey JS, Ashton AR, Tanner GJ, Robinson SP (2005). Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. Plant Physiol, 139: 652~663
- Bogs J, Ebadi A, McDavid D, Robinson SP (2006). Identification of the flavonoid hydroxylases from grapevine and their regulation during fruit development. Plant Physiol, 140: 279~291
- Bogs J, Jaffé 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, Robinson SP (1996a). 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, Davies C, Robinson SP (1996b). Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes. Plant Mol Biol, 32: 565~569
- Campos-Vargas R, Nonogaki H, Suslow T, Saltveit ME (2005). Heat shock treatments delay the increase in wound-induced phenylalanine ammonia-lyase activity by altering its expression, not its induction in Romaine lettuce (*Lactuca sativa*) tissue. Physiol Plant, 132: 82~91
- Castellarin SD, Gaspero GD, Marconi R, Nonis A, Peterlunge E, Paillard S, Adam-Blondon A-F, 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 cyanidin-/blue delphinidin-based anthocyanins in berry skin. BMC Genomics, 7: 12
- Castellarin SD, Matthews MA, Gaspero GD, Gambetta GA (2007a). Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries. Planta (online), DOI 10.1007/s00425-007-0598-8
- Castellarin SD, Pfeiffer A, Silvilotti P, Degan M, Peterlunger E, Gaspero GD (2007b). Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit. Plant Cell Environ, 30: 1381~1399
- Chen JY, Wen PF, Kong WF, Pan QH, Wan SB, Huang WD (2006). Changes and subcellular localizations of the enzymes involved in phenylpropanoid metabolism during grape berry development. J Plant Physiol, 163: 115~127
- Coombe BG, Hale CR (1973). The hormone content of ripening grape berries and the effect of growth substance treatments. Plant Physiol, 51: 629~634
- Cravero MC, Guidoni S, Schneider A, Di Stefano R (1994). Morphological and biochemical characterisation of coloured berry-muscat grapevine cultivars. Vitis, 33: 75~80
- da Silva FG, Iandolino A, Al-Kayal F, Bohlmann MC, Cushman MA, Lim H, Ergul A, Figueroa R, Kabuloglu EK, Osborne C et al (2005). Characterizing the grape transcriptome. Analysis of expressed sequence tags from multiple *Vitis* species and development of a compendium of gene expression during berry development. Plant Physiol, 139: 574~597
- Dangles O, Saito N, Brouillard R (1993). Anthocyanin intramolecular copigment effect. Phytochemistry, 34: 119~124
- Dédaldéchamp F, Uhel C (1999). Induction of anthocyanin synthesis in nonpigmented grape cell suspensions by acting on DFR substrate availability or precursors level. Enzyme Microb Technol, 25: 316~321
- Deluc L, Barrieu F, Marchive C, Lauvergeat V, Decendit A, Richard T, Carde J-P, Mérillon J-M, Hamdi S (2006). Characterization of a grapevine R2R3-MYB transcription factor that regulates the phenylpropanoid pathway. Plant Physiol, 140: 499~511
- Dixon RA, Steele CL (1999). Flavonoids and isoflavonoids — a gold mine for metabolic engineering. Trends Plant Sci, 4: 394~400
- Do CB, Cormier F, Nicolas Y (1995). Isolation and characterization of a UDP-glucose: cyaniding 3-O-glucosyltransferase from grape cell suspension cultures (*Vitis vinifera* L.). Plant Sci, 112: 43~51
- Doligez A, Bouquet A, Danglot Y, Lahogue F, Riaz S, Meredith CP, Edwards KJ, This P (2002). Genetic mapping of grapevine (*Vitis vinifera* L.) applied to the detection of QTLs for seedlessness and berry weight. Theor Appl Genet, 105: 780~795
- Durbin ML, McCaig B, Clegg MT (2000). Molecular evolution of the chalcone synthase multigene family in the morning glory genome. Plant Mol Biol, 42: 79~92
- El-Kereamy A, Chervin C, Souquet J-M, Moutounet M, Monje M-C, Nepveu F, Mondies H, Ford CM, van Heeswijk R, Roustan JP (2002). Ethanol triggers grape gene expression leading to anthocyanin accumulation during berry ripening. Plant Sci, 163: 449~454
- El-Kereamy A, Chervina C, Roustan J-P, Cheynier V, Souquet J-M, Moutounet M, Raynal J, Ford C, Latché A, Pech J-C et al (2003). Exogenous ethylene stimulates the long-term expression of genes related to anthocyanin biosynthesis in grape berries. Physiol Plant, 119: 175~182
- Favretto D, Flamini R (2000). Application of electrospray ionization mass spectrometry to the study of grape anthocyanins. Am J Enol Vitic, 51: 55~64
- Fong RA, Kepner RE, Webb AD (1971). Acetic-acid-acylated anthocyanin pigments in the grape skins of a number of varieties of *Vitis vinifera*. Am J Enol Vitic, 22: 150~155
- Ford CM, Boss PK, Høj PB (1998). Cloning and characterization of *Vitis vinifera* UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase, a homologue of the enzyme encoded by the maize *Bronze-1* locus that may primarily serve to glucosylate anthocyanidins *in vivo*. J Biol Chem, 273: 9224~9233
- Fritz J, Kern M, Pahlke G, Vatter S, Marko D (2006). Biological activities of malvidin, a red wine anthocyanidin. Mol Nutr Food Res, 50: 390~395
- Gao Y, Cahoon GA (1995). High performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the red seedless table

- grape Reliance. *Am J Enol Vitic*, 46: 339~345
- Gauthier A, Gulick PJ, Ibrahim RK (1998). Characterization of two cDNA clones which encode *O*-methyltransferases for the methylation of both flavonoid and phenylpropanoid compounds. *Arch Biochem Biophys*, 351: 243~249
- Goldy RG, Maness EP, Stiles HD, Clark JR, Wilson MA (1989). Pigment quantity and quality characteristics of some native *Vitis rotundifolia* Michx. *Am J Enol Vitic*, 40: 253~258
- Gollop R, Even S, Colova-Tsolova V, Perl A (2002). Expression of the grape dihydroflavonol reductase gene and analysis of its promoter region. *J Exp Bot*, 53: 1397~1409
- Gollop R, Even S, Farhi S, Perl A (2001). Regulation of the leucoanthocyanidin dioxygenase gene expression in *Vitis vinifera*. *Plant Sci*, 161: 579~588
- González-Manzano S, Santos-Buelga C, Dueñas M, Rivas-Gonzalo JC, Escribano-Bailón T (2007). Colour implications of self-association processes of wine anthocyanins. *Eur Food Res Technol* (online), DOI 10.1007/s00217-007-0560-9
- Goodwin PH, Hsiang T, Erickson L (2000). A comparison of stilbene and chalcone synthases including a new stilbene synthase gene from *Vitis riparia* cv. Gloire de Montpellier. *Plant Sci*, 151: 1~8
- Goto-Yamamoto N, Wan GH, Masaki K, Kobayashi S (2002). Structure and transcription of three chalcone synthase genes of grapevine (*Vitis vinifera*). *Plant Sci*, 162: 867~872
- Hebrero E, Garcia-Rodriguez C, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC (1989). Analysis of anthocyanins by high performance liquid chromatography-diode array spectroscopy in a hybrid grape variety (*Vitis vinifera* × *Vitis berlandieri* 41B). *Am J Enol Vitic*, 40: 283~291
- Holton TA, Cornish EC (1995). Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell*, 7: 1071~1083
- Hrazdina G, Borzell AJ, Robinson WB (1970). Studies on the stability of the anthocyanidin-3,5-digucosides. *Am J Enol Vitic*, 21: 201~204
- Ibrahim RK, Bruneau A, Bantignies B (1998). Plant *O*-methyltransferase: molecular analysis, common signature and classification. *Plant Mol Biol*, 36: 1~10
- Jaakola L, Määttä K, Pirttilä AM, Törönen R, Kärenlampi S, Hohtola A (2002). Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development. *Plant Physiol*, 130: 729~739
- 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
- Jeong ST, Goto-Yamamoto N, Kobayashi S, Esaka M (2004). Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Sci*, 167: 247~252
- Kim BG, Lee HJ, Park Y, Lim Y, Ahn JH (2006). Characterization of an *O*-methyltransferase from soybean. *Plant Physiol Biochem*, 44: 236~241
- Kobayashi S, Goto-Yamamoto N, Hirochika H (2004). Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. *Science*, 304: 982~982
- Kobayashi S, Goto-Yamamoto N, Hirochika H (2005). Association of *VvmybA1* gene expression with anthocyanin production in grape (*Vitis vinifera*) skin-color mutants. *J Japan Soc Hort Sci*, 74: 196~203
- Kobayashi S, Ishimaru M, Ding CK, Yakushiji H, Goto N (2001). Comparison of UDP-glucose: flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase (UGT) gene sequences between white grapes (*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
- Koes R, Verweij W, Quattrocchio F (2005). Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci*, 10: 236~242
- Koes RE, Quattrocchio F, Mol JNM (1994). The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *BioEssays*, 16: 123~132
- Kokubo T, Ambe-Ono Y, Nakamura M, Ishida H, Yamakawa T, Kodama T (2001). Promotive effect of auxins on UDP-glucose: flavonol glucosyltransferase activity in *Vitis* sp. cell cultures. *J Biosci Bioeng*, 91: 564~569
- Kortekamp A (2006). Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. *Plant Physiol Biochem*, 44: 58~67
- Kumar A, Bennetzen JL (1999). Plant retrotransposon. *Ann Rev Genet*, 33: 479~532
- Lafuente MT, Sala JM, Zacarias L (2004). Active oxygen detoxifying enzymes and phenylalanine ammonia-lyase in the ethylene-induced chilling tolerance in citrus fruit. *J Agric Food Chem*, 52: 3606~3611
- Lijavetzky D, Ruiz-García L, Cabezas JA, De Andrés MT, Bravo G, Ibáñez A, Carreño J, Cabello F, Ibáñez A, Martínez-Zapater JM (2006). Molecular genetics of berry colour variation in table grape. *Mol Gen Genomics*, 276: 427~435
- Marrs KA, Alfenito MR, Lloyd AM, Walbot V (1995). A glutathione *S*-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*. *Nature*, 375: 397~400
- Mol J, Grotewold E, Koes R (1998). How genes paint flowers and seeds. *Trends Plant Sci*, 3: 212~217
- Mori K, Goto-Yamamoto N, Kitayama M, Hashizume K (2007). Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *J Exp Bot*, 58: 1935~1945
- Mori K, Sugaya S, Gemma H (2005). Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Scientia Hort*, 105: 319~330
- Mueller LA, Goodman CD, Silady RA, Walbot V (2000). AN9, a petunia glutathione *S*-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiol*, 123: 1561~1570
- Nesbitt WB, Maness EP, Ballinger WE, Carroll Jr DE (1974). Relationship of anthocyanins of black muscadine grapes (*Vitis rotundifolia* Michx.) to wine color. *Am J Enol Vitic*, 25:

30~32

- Offen W, Martinez-Fleites C, Yang M, Kiat-Lim E, Davis BG, Tarling CA, Ford CM, Bowles DJ, Davies GJ (2006). Structure of a flavonoid glucosyltransferase reveals the basis for plant natural product modification. *EMBO J*, 25: 1396~1405
- Pereira HS, Barao A, Delgado M, Morais-Cecilio L, Viegas W (2005). Genomic analysis of *Grapevine Retrotransposon 1 (Gret1)* in *Vitis vinifera*. *Theor Appl Genet*, 111: 871~878
- Petit P, Granier T, d'Estaintot BL, Manigand C, Bathany K, Schmitter JM, Lauvergeat V, Hamdi S, Gallois B (2007). Crystal structure of grape dihydroflavonol 4-reductase, a key enzyme in flavonoid biosynthesis. *J Mol Biol*, 368: 1345~1357
- 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
- Quattrocchio F, Wing JF, Leppen HTC, Mol JNM, Koes RE (1993). Regulatory genes controlling anthocyanin pigmentation are functionally conserved among plant species and have distinct sets of target genes. *Plant Cell*, 5: 1497~1512
- Repka V (2001). Elicitor-stimulated induction of defense mechanisms and defense gene activation in grapevine cell suspension cultures. *Biol Plant*, 44: 555~565
- Riaz S, Dangl GS, Edwards KJ, Meredith CP (2004). A microsatellite marker based framework linkage map of *Vitis vinifera* L. *Theor Appl Genet*, 108: 864~872
- Sanchez-Ballesta MT, Romero I, Jiménez JB, Orea JM, González-Ureña Á, Escribano MI, Merodio C (2007). Involvement of the phenylpropanoid pathway in the response of table grapes to low temperature and high CO₂ levels. *Post Biol Technol*, 46: 29~35
- Slinkard KW, Singleton VL (1984). Phenol content of grape skins and the loss of ability to make anthocyanins by mutation. *Vitis*, 23: 175~178
- Solecka D, Kacperska A (2003). Phenylpropanoid deficiency affects the course of plant acclimation to cold. *Physiol Plant*, 119: 253~262
- Sparvoli F, Martin C, Scienza A, Gavazzi G, Tonelli C (1994). Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Mol Biol*, 24: 743~755
- Suelves M, Puigdomènech P (1998). Specific mRNA accumulation of a gene coding for an *O*-methyltransferase in almond (*Prunus amygdalus*, Batsch) flower tissues. *Plant Sci*, 134: 79~88
- Teklemariam TA, Blake TJ (2004). Phenylalanine ammonia-lyase-induced freezing tolerance in jack pine (*Pinus banksiana*) seedlings treated with low, ambient levels of ultraviolet-B radiation. *Physiol Plant*, 122: 244~253
- Terrier N, Ageorges A, Abbal P, Romieu C (2001). Generation of ESTs from grape berry at various developmental stages. *J Plant Physiol*, 158: 1575~1583
- Terrier N, Glissant D, Grimplet J, Barrieu F, Abbal P, Couture C, Ageorges A, Atanassova R, Léon C, Renaudin J-P et al (2005). Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development. *Planta*, 222: 832~847
- 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
- Tropf S, Lanz T, Rensing SA, Schroder J, Schroder G (1994). Evidence that stilbene synthases have developed from chalcone synthases several times in the course of evolution. *J Mol Evol*, 38: 610~618
- Trotel-Aziz P, Coudercher M, Vernet G, Aziz A (2006). Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. *Eur J Plant Pathol*, 114: 405~413
- Verriès C, Bès C, This P, Tesnière C (2000). Cloning and characterization of *Vine-1*, a LTR-retrotransposon-like element in *Vitis vinifera* L, and other *Vitis* species. *Genome*, 43: 366~376
- Walker AR, Lee E, Bogs J, McDavid DAJ, Thomas MR, Robinson SP (2007). White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *Plant J*, 49: 772~785
- Walker AR, Lee E, Robinson SP (2006). Two new grape cultivars, bud sports of Cabernet Sauvignon bearing pale-coloured berries, are the result of deletion of two regulatory genes of the berry colour locus. *Plant Mol Biol*, 62: 623~635
- Waters DLE, Holton TA, Ablett EM, Lee LS, Henry RJ (2005). cDNA microarray analysis of developing grape (*Vitis vinifera* cv. Shiraz) berry skin. *Funct Integr Genomics*, 5: 40~58
- Waters DLE, Holton TA, Ablett EM, Lee LS, Henry RJ (2006). The ripening wine grape berry skin transcriptome. *Plant Sci*, 171: 132~138
- Wen PF, Chen JY, Kong WF, Pan QH, Wan SB, Huang WD (2005). Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. *Plant Sci*, 169: 928~934
- Winkel-Shirley B (2001). Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol*, 126: 485~493
- Wrolstad RE (2004). Anthocyanin pigments-bioactivity and coloring properties. *J Food Sci*, 69: C419~C421
- Zhang H, Wang L, Deroles S, Bennett R, Davies K (2006). New insight into the structures and formation of anthocyanic vacuolar inclusions in flower petals. *BMC Plant Biol*, 6: 29
- Zhang W, Conn S, Franco C (2007). Characterisation of anthocyanin transport and storage in *Vitis vinifera* L. cv. Gamay Fréaux cell suspension cultures. *J Biotechnol*, 131S: S208