

‘桂葡6号’葡萄花色苷组成特点与基因表达规律解析

成果¹, 周思泓², 黄羽¹, 张瑛¹, 管敬喜¹, 杨莹¹, 文仁德¹, 张劲^{1,*}

¹广西农业科学院葡萄与葡萄酒研究所, ²广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 南宁530007

摘要: 葡萄果皮颜色的变化取决于花色苷组成和含量的不同。利用高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)检测不同发育期‘桂葡6号’葡萄(*Vitis* sp.)果皮中花色苷的组成及含量, 实时荧光定量PCR检测花色苷合成相关结构基因和转录因子表达水平, 并与欧亚种‘赤霞珠’做对比。结果表明, ‘桂葡6号’葡萄果皮中检测到27种不同种类的花色苷, 且不同种类的花色苷含量随发育期的变化规律存在差异; ‘桂葡6号’果皮中花色苷总量/浓度随果实成熟逐渐升高, 采收期‘桂葡6号’葡萄果皮中花色苷总量/浓度显著高于‘赤霞珠’, 这与*VvDFR*和*VvLDOX*的表达水平较高有关; ‘桂葡6号’花色苷组成与欧亚种‘赤霞珠’差异明显, 其果皮中的花色苷多以花色苷双糖苷为主, 其中含量最高的是甲基花青素-3,5-*O*-双葡萄糖苷; 不同修饰方式的花色苷比例随发育期变化且受品种影响; ‘桂葡6号’果皮中花青素类(3'-羟基取代)花色苷比例高于‘赤霞珠’, 这与其较高的*VvF3'H*表达量有关; ‘桂葡6号’甲基化花色苷比例高于‘赤霞珠’, 而酰基化花色苷比例比‘赤霞珠’低。

关键词: ‘桂葡6号’; 果皮; 花色苷; 基因表达; HPLC-MS

花色苷(anthocyanin)由类黄酮代谢途径合成(He等2010)。红葡萄(*Vitis* L.)和红葡萄酒颜色主要是酚类物质花色苷所赋予的, 花色苷的抗氧化和清除自由基能力也是葡萄酒保健功效的贡献者之一。花色苷还可以通过压榨和发酵等过程由葡萄皮进入酒中发挥一系列化学作用(Mori等2007)。分析特色酿酒品种花色苷组成和含量一直是酿酒品质研究领域的热点问题之一(Jin等2009; 赵权等2010; 孙磊等2015)。

花色苷由花色苷作为糖苷配基或乙酰化的糖苷配基与糖结合生成, 花色苷拥有典型的C6-C3-C6类黄酮骨架, 由于羟基化和甲基化程度的不同, 衍生出6种主要的花色苷元, 包括花葵素(pelargonidin)、花青素(cyanidin)、花翠素(delphinidin)、甲基花青素(peonidin)、甲基花翠素(petunidin)和二甲基花翠素(malvidin) (Holton和Cornish 1995; Mazza 1995)。每一类花色苷所占的比例和含量高低受基因型和栽培条件的影响极大, 而其比例和含量又决定了葡萄及葡萄酒色度及颜色的稳定性。类黄酮-3'-羟基化酶(flavonoid 3'-hydroxylase, F3'H)和类黄酮-3',5'-羟基化酶(flavonoid 3',5'-hydroxylase, F3'5'H)是类黄酮代谢路径上与花青素与花翠素类花色苷合成相关的两类羟基化酶(Castellarin等2007)。黄酮醇还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)催化二氢黄酮醇生成相应的无色花色苷, 无色花色苷经由无色花色苷双加氧酶(leucoanthocyanidin dioxygenase, LDOX)催化合成花色苷, 葡萄糖基转移酶(UDP glucose-flavonoid 3-*O*-glucosyl transferase, UFGT)催化

花色苷与糖基的连接。在欧亚种葡萄中, 葡萄糖分子通过糖苷键仅连接在C3位形成3-*O*-单葡萄糖苷, 因为它们缺乏形成双糖苷的显性等位基因(Jánváry等2009)。在非欧亚种葡萄中, 糖苷键的连接同时发生在C3和C5位(Jánváry等2009)。花色苷-5-糖基转移酶(anthocyanidin 5-glucosyltransferase, 5-GT)能够催化花色苷-3-单糖苷形成花色苷-3,5-双糖苷(Hausmann等2009), 双糖苷比同类型的单糖苷稳定, 但颜色浅(Jackson 2008)。目前, 高效液相色谱-质谱联用(high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS)以及核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)能快速分离和鉴定花色苷(Castañeda-Ovando等2009)。

‘桂葡6号’是经驯化筛选出的丰产、抗病性好的酿造葡萄品种, 源于广西本地收集的野生资源, 2015年经审定后命名。‘桂葡6号’冬果酿酒品质优良, 可溶性固形物可达18%以上, 果实中酚类物质含量较高(谢太理等2015), 是广西当地颇具潜力的酿酒品种。目前, 对‘桂葡6号’果实发育过程中花色苷成分、含量变化以及相关基因表达规律不清楚。本研究用HPLC-MS技术测定‘桂葡6号’葡萄果实发育过程中果皮中花色苷成分及其含量的变化, 实时荧光定量PCR检测相关基因表达规律, 并

收稿 2016-09-20 修定 2016-11-24

资助 广西农业科学院基本科研业务专项(桂农科2015JZ150、2015YM05和2015YT85)和广西自然科学基金(2015GXNS-FBA139091)。

* 通讯作者(E-mail: zhangji@gxaas.net)。

与欧亚种葡萄‘赤霞珠’进行对比,进一步完善‘桂葡6号’品质评价体系,为深入研究其代谢特点和颜色稳定性奠定基础。

材料与amp;方法

1 实验地点与amp;材料

实验地点位于广西农业科学院葡萄与葡萄酒研究所科研基地(22°50'59"N 108°14'35"E)。供试葡萄(*Vitis* L.)品种为2014年定植的‘桂葡6号’(*Vitis* sp. cv. Guipu No. 6)和2007年定植的‘赤霞珠’(*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon),两个品种的整形方式分别为一字型和单干双臂型,栽植密度为2.5 m×1.5 m,南北行向,灌溉方式均为沟灌。‘桂葡6号’和‘赤霞珠’葡萄冬果采集始于2015年9月28日,即花后4周,之后每隔2周进行果实样品采集直至采收。每个品种选择树体生长状况相对一致的9株葡萄树作为采样株,每3株为一个生物学重复。每次采样时间均固定于上午9:00~10:00,样品采集后立即用冰盒保存带回实验室。

2 理化指标测定

从每个生物学重复的3棵植株上随机剪下100粒果(每个发育期每个品种共300粒),保证剪下的果粒来自于果穗的各个部位,其中150粒果实样品(每个生物学重复50粒)用于果实重量、果皮鲜重、可溶性固形物浓度和可滴定酸的测定,具体步骤为:果实称重后榨汁,然后小心将果皮与果肉和种子分离,吸水纸吸去多余水分后称重。利用PAL-1型手持折射计(Atago, Tokyo, Japan)对挤压获得的果汁进行可溶性固形物(total soluble solids, TSS)测定。利用酸碱滴定法测定可滴定酸(titratable acid, TA),结果换算成酒石酸表示。每个生物学重复进行3次技术重复实验。每个品种每个发育期剩下的150粒果实(每个生物学重复50粒)用液氮速冻后于-80°C冰箱保存。

3 果皮花色苷类物质检测

每个发育期的150粒果实(每个生物学重复50粒)样品在处于冷冻状态时,迅速将果皮与果肉分离。果皮液氮速冻,破碎成粉末后在-40°C条件下冷冻干燥,同时记录果实重量、果皮鲜重及干重,以备后续计算。果皮中花色苷的提取参照何建军(2010)的方法。

采用Agilent 1100系列配有二极管阵列检测器(diode array detector, DAD)的LC/MSD Trap-VL液相色谱-离子阱质谱联用仪进行样品定性定量分析,MSD包括电喷雾离子源和离子阱质谱检测器,所有部件由安捷伦v. 5.2化学工作站控制完成检测。色谱柱: Zorbax Eclipse SB C-18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相A: 含2% (V/V)甲酸和6% (V/V)乙腈的水溶液;流动相B: 含2%甲酸和54%乙腈的水溶液。洗脱程序: 10%~25% B, 18 min; 25% B, 2 min; 25%~40% B, 10 min; 40%~70% B, 5 min; 70%~100% B, 5 min。流速: 1.0 mL·min⁻¹;柱温: 50°C;检测波长: 525 nm;波长扫描范围: 200~900 nm;进样量: 30 μL。质谱条件为: 电喷雾离子源(electronic spray ion, ESI), 正离子模式。离子扫描范围为: 100~1 500 m·z⁻¹;雾化器压力: 35 psi;干燥气流速: 12 L·min⁻¹;干燥气温度: 300°C。每个样品重复进样3次,作为3次技术重复。

4 果皮中花色苷类物质定性&定量检测

参照中国农业大学葡萄酒研究中心建立的“葡萄与葡萄酒花色苷HPLC-UV-MS指纹谱库”进行花色苷定性(何建军2010)。建立5~500 mg·L⁻¹之间、9个水平、3个重复的二甲花翠素-3-O-葡萄糖苷(malvidin 3-O-glucoside)标准曲线,相关系数在0.999以上,其他花色苷以相当于二甲花翠素-3-O-葡萄糖苷的含量计。果皮中花色苷浓度单位用“mg·kg⁻¹ (FW)”表示,含量单位用“μg·粒⁻¹”表示。

5 基因表达分析

使用植物总RNA提取试剂盒(Sigma, 北京, 中国)提取‘桂葡6号’和‘赤霞珠’葡萄果皮RNA,随后利用PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (cat. #RR047A, TaKaRa)反转录合成cDNA。采用SYBR® Premix Ex Taq™ (cat. #RR420A, TaKaRa)试剂盒检测‘桂葡6号’和‘赤霞珠’葡萄果皮与花色苷合成直接相关的7个结构基因和1个转录因子的表达水平,实时定量PCR于LightCycler® 480实时荧光定量PCR系统(Roche Diagnostics Ltd., Forrentrasse CH-6343 Rotkreuz, Switzerland)进行。所有基因引物序列参照成果(2015)和Hausmann等(2009)进行设计(表1),并通过琼脂糖凝胶电泳和溶解曲线分析检测引物特异性。选取ubiquitin1和actin基因作为内参基因,采用2^{-ΔC_t}, ΔC_t=C_{t(目的基因)}-

表1 用于实时定量PCR的引物

Table 1 Primer used for quantification of transcripts by means of real-time PCR

基因名称	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')
<i>VvF3'5'H</i>	AAACCGTCAGACCAAAACC	ACTAAGCCACAGGAAACTAA
<i>VvF3'H</i>	ACTCATGGTGCACCCACG	CACAAAATACTAAACTCGCTC
<i>VvDFR</i>	GAAACCTGTAGATGGCAAGA	GGCCAAATCAAACCTACCAGA
<i>VvLDOX</i>	AGGGAAGGGAAAACAAGTAG	ACTCTTTGGGGATTGACTGG
<i>VvUFGT</i>	GGGATGGTAATGGCTGTGG	ACATGGGTGGAGAGTGAGTT
<i>Vv5GT</i>	ATAGTCTTCACATCCCCTC	CCAACCTCAATCGACTTAAAC
<i>VvMYBA1</i>	TAGTCACCACCTCAAAAAGG	GAATGTGTTTGGGGTTTATC
<i>VvUbiquitin1</i>	GTGGTATTATTGAGCCATCCTT	AACCTCCAATCCAGTCAICTAC
<i>VvActin</i>	GCATCCCTCAGCACCTTCCAGCAG	CCACCTCAACACATCTCCATGTCAA

C_t (内参几何平均值), C_t 为循环阈值(Bogs等2005)。每个发育期样品的基因表达量为3个生物学重复的平均值。

6 试剂与标样

花色苷标样和二甲花翠素-3-*O*-葡萄糖苷购自Sigma-Aldrich公司(St. Louis, MO, USA)。色谱级甲醇、甲酸和乙腈购自Fisher公司(Fairlawn, NJ, USA)。分析纯甲醇和甲酸分别购自成都市科龙化工和天津市富宇精细化工有限公司。

7 实验数据处理

利用独立样本 T 检验在 $P < 0.05$ 水平下进行显著性分析。利用主成分分析(principal component analysis, PCA)更加直观反映不同品种花色苷组成差异。数据处理和主成分分析采用SPSS 20.0软件(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)。聚类分析采用MetaboAnalyst 3.0进行。绘图采用Origin 8.0。

实验结果

1 ‘桂葡6号’不同发育期果实重量和品质分析

‘赤霞珠’果实于花后8周进入转色期, 而‘桂葡6号’转色始于花后10周(图1)。从花后6周开始‘桂葡6号’单粒果实鲜重约为同期‘赤霞珠’果重的2倍, 在采收期前者约为后者的2.5倍, 且差异达到显著性水平(图1-A)。两个品种单粒果皮重量随发育时间逐渐增加, 且‘桂葡6号’单粒果皮鲜重始终高于‘赤霞珠’, 采收时约为‘赤霞珠’的2倍, 且差异显著(图1-B)。自花后8周到采收期, ‘桂葡6号’果实可溶性固形物浓度始终低于‘赤霞珠’, 但在采收期两个品种的差异不显著, ‘桂葡6号’为18.0°Brix, ‘赤霞珠’为19.1°Brix (图1-C)。花后4至8周两个品种果实可滴定酸浓度不断增加, 随后迅速下降直至采

收, 且采收期‘桂葡6号’果实可滴定酸含量显著高于‘赤霞珠’(图1-D)。

2 ‘桂葡6号’不同发育期果皮花色苷组成特点

利用HPLC-MS鉴定不同发育期‘桂葡6号’葡萄果皮的花色苷组成, 与‘赤霞珠’进行对比。结果发现, 在采收期(花后14周)两个葡萄品种的果皮中共检测到29种不同类型的花色苷, 其中的15种是两个品种共有的花色苷类型(表2和图2)。此外, ‘桂葡6号’中还检测到12种双糖苷及其酰化衍生物。值得关注的是, ‘桂葡6号’中未检测‘赤霞珠’具有的甲基花青素-3-*O*-(6-*O*-乙酰化)-单葡萄糖苷和甲基花翠素-3-*O*-(顺式-6-*O*-香豆酰化)-单葡萄糖苷。

为了更好了解‘桂葡6号’果实花色苷组成特点, 对不同发育期‘桂葡6号’与‘赤霞珠’葡萄果皮中检测到的花色苷进行主成分分析(图3)。由图3-A可以看出, 主成分1 (principal components 1, PC1)解释了总变量的42.63%, 主成分2 (PC2)解释了总变量的25.91%, 成熟后期‘赤霞珠’聚集在一起, 可与‘桂葡6号’明显区分开(图3-A)。由载荷图可以看出, 双糖苷及其酰化衍生物是‘桂葡6号’葡萄果皮中的特征物质(A2、A3、A5、A6、A14、A17、A18、A22和A23), 且采收期‘桂葡6号’葡萄果皮中的花色苷总量(单位: $\mu\text{g}\cdot\text{粒}^{-1}$)高于同期‘赤霞珠’(图3-B)。两个品种都具有的15类花色苷中, ‘桂葡6号’果皮中的花翠素-3-*O*-单葡萄糖苷(A4)、甲基花青素-3-*O*-单葡萄糖苷(A9)和甲基花翠素-3-(6-*O*-香豆酰)-单葡萄糖苷(A25)含量高于‘赤霞珠’(图3-B)。

3 不同发育期‘桂葡6号’花色苷含量与比例变化

利用不同发育期‘桂葡6号’果皮中检测到的花

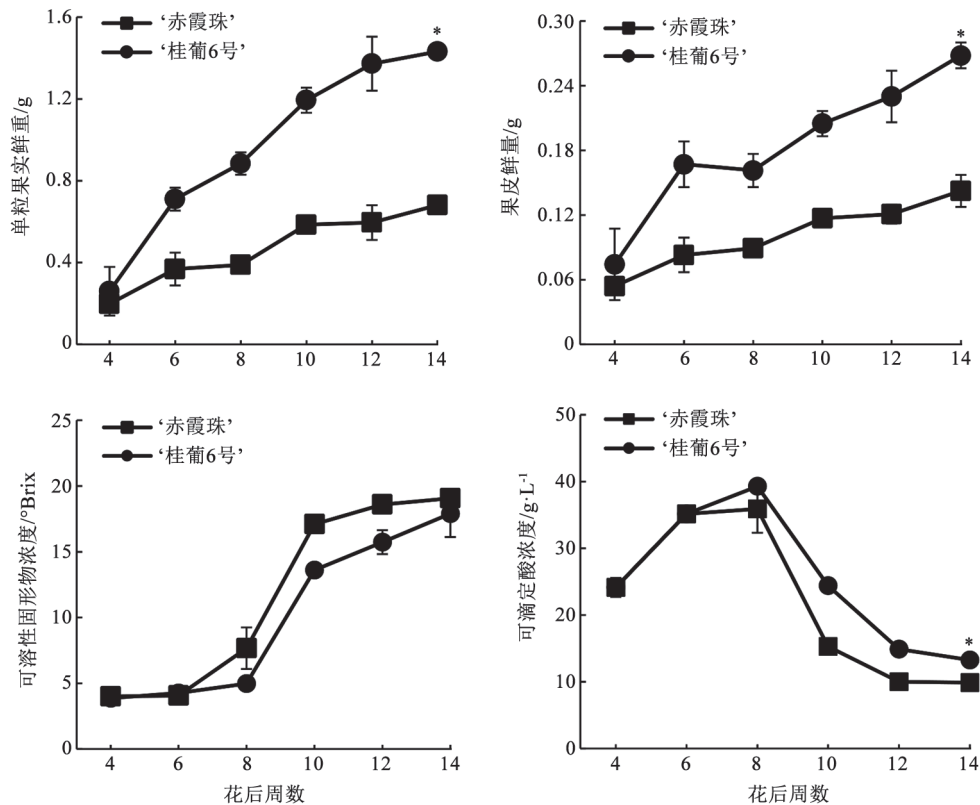


图1 ‘桂葡6号’与‘赤霞珠’葡萄果实发育期理化指标

Fig.1 Physical and chemical characteristics during berry development periods of ‘Guipu No. 6’ and ‘Cabernet Sauvignon’ grapes

*表示采收期(花后14周)时两个品种间指标差异达显著水平($P < 0.05$)。

色苷含量将各类花色苷以及花色苷总量的变化规律分为3类(图4), 第一类是在果实的成熟早期无积累, 到采收期(花后14周)可检测到的花色苷, 如花青素-3-*O*-(6-*O*-乙酰)-单葡萄糖苷(15)、甲基花青素-(顺式-6-*O*-香豆酰)-双葡萄糖苷(18)、花翠素-3-(6-*O*-香豆酰)-双葡萄糖苷(14)、甲基花翠素-3-*O*-单葡萄糖苷(8)、甲基花翠素-3,5-*O*-双葡萄糖苷(3)、甲基花翠素-3-(6-*O*-香豆酰)-单葡萄糖苷(25)、二甲花翠素-3-*O*-单葡萄糖苷(10)和二甲花翠素-3-(反式-6-*O*-香豆酰)-双葡萄糖苷(23)。

第二类是在转色初期(花后10周)没有积累, 到花后12周积累, 采收时含量达到最高的花色苷, 如花青素-3,5-*O*-双葡萄糖苷(2)、甲基花青素-3,5-*O*-双葡萄糖苷(5)、甲基花青素-3-(反式-6-*O*-香豆酰)-双葡萄糖苷(22)、花翠素-3-*O*-单葡萄糖苷(4)、花翠素-3-(反式-6-*O*-香豆酰)-单葡萄糖苷(19)、甲基花翠素-3-*O*-(6-*O*-乙酰)-单葡萄糖苷(16)、甲基花翠素-3-(反式-6-*O*-香豆酰)-单葡萄糖苷(28)、甲基

花翠素-3-(6-*O*-香豆酰)-双葡萄糖苷(17)、二甲花翠素-3-*O*-(6-*O*-乙酰)-单葡萄糖苷(20)和二甲花翠素-3-(顺式-6-*O*-香豆酰)-单葡萄糖苷(27)。

第三类是在成熟早期含量高, 采收期下降的花色苷, 包括: 花青素-3-*O*-单葡萄糖苷(7)、甲基花青素-3-*O*-单葡萄糖苷(9)、花翠素-3-*O*-(6-*O*-乙酰)-单葡萄糖苷(11)、花青素-3-(6-*O*-香豆酰)-单葡萄糖苷(24)、花翠素-3-*O*-双葡萄糖苷(1)和二甲花翠素-3-*O*-双葡萄糖苷(6)。由此可见, ‘桂葡6号’果皮中不同种类的花色苷含量随发育期的变化趋势存在差异。

表3所示果实转色开始直至采收的葡萄果皮花色苷总量、总浓度以及各修饰类型花色苷占总花色苷比例, 结果表明, 花后10周, ‘桂葡6号’果皮中花色苷总量和总浓度低于同期‘赤霞珠’, 之后‘桂葡6号’果皮中花色苷含量和浓度迅速增加, 在采收期时高于‘赤霞珠’, 总量和总浓度差异达到显著性水平。‘赤霞珠’葡萄果皮中仅检测到单糖苷,

表2 '桂葡6号'与'赤霞珠'葡萄果皮中花色苷HPLC-MS的分子离子与碎片离子信息
Table 2 Molecular and fragmentation ions of anthocyanins in grapes 'Guipu No. 6' and 'Cabernet Sauvignon' using HPLC-MS

花色苷	峰号		分子离子(碎片离子)/ $m \cdot z^{-1}$
	'桂葡6号'	'赤霞珠'	
两个品种中均检测到的花色苷			
花翠素-3-O-单葡萄糖苷(delphinidin 3-O-monoglucoside)	4	4	465 (303)
花青素-3-O-单葡萄糖苷(cyanidin 3-O-monoglucoside)	7	7	449 (287)
甲基花翠素-3-O-单葡萄糖苷(petunidin 3-O-monoglucoside)	8	8	479 (317)
甲基花青素-3-O-单葡萄糖苷(peonidin 3-O-monoglucoside)	9	9	463 (301)
二甲花翠素-3-O-单葡萄糖苷(malvidin 3-O-monoglucoside)	10	10	493 (331)
花翠素-3-O-(6-O-乙酰化)-单葡萄糖苷[delphinidin 3-O-(6-O-acetyl)-glucoside]	11	11	507 (303)
花青素-3-O-(6-O-乙酰化)-单葡萄糖苷[cyanidin 3-O-(6-O-acetyl)-glucoside]	15	15	491 (287)
甲基花翠素-3-O-(6-O-乙酰化)-单葡萄糖苷[petunidin 3-O-(6-O-acetyl)-glucoside]	16	16	521 (317)
花翠素-3-O-(反式-6-O-香豆酰化)-单葡萄糖苷[petunidin 3-O-(trans-6-O-coumaroyl)-glucoside]	19	19	611 (303)
二甲花翠素-3-O-(6-O-乙酰化)-单葡萄糖苷[malvidin 3-O-(6-O-acetyl)-glucoside]	20	20	535 (331)
花青素-3-O-(6-O-乙酰化)-单葡萄糖苷[cyanidin 3-O-(6-O-acetyl)-glucoside]	24	24	595 (287)
甲基花翠素-3-O-(6-O-乙酰化)-单葡萄糖苷[petunidin 3-O-(6-O-acetyl)-glucoside]	25	25	625 (317)
二甲花翠素-3-O-(6-O-乙酰化)-单葡萄糖苷[petunidin 3-O-(6-O-coumaroyl)-glucoside]	27	27	639 (331)
甲基花翠素-3-O-(顺式-6-O-香豆酰化)-单葡萄糖苷[malvidin 3-O-(cis-6-O-coumaroyl)-glucoside]	28	28	609 (301)
二甲花翠素-3-O-(反式-6-O-香豆酰化)-单葡萄糖苷[malvidin 3-O-(trans-6-O-coumaroyl)-glucoside]	29	29	639 (331)
仅在'桂葡6号'中检测到的花色苷			
花翠素-3,5-双葡萄糖苷(delphinidin 3,5-O-diglucoside)	1	—	627 (465, 303)
花青素-3,5-双葡萄糖苷(cyanidin 3,5-O-diglucoside)	2	—	611 (449, 287)
甲基花翠素-3,5-双葡萄糖苷(petunidin 3,5-O-diglucoside)	3	—	641 (479, 317)
甲基花青素-3,5-双葡萄糖苷(peonidin 3,5-O-diglucoside)	5	—	625 (463, 301)
二甲花翠素-3,5-双葡萄糖苷(malvidin 3,5-O-diglucoside)	6	—	655 (493, 331)
二甲花翠素-3-O-(6-O-乙酰化)-5-双葡萄糖苷[malvidin 3-O-(6-O-acetyl)-glucoside-5-glucoside]	12	—	697 (655, 493, 331)
花翠素-3-O-(6-O-香豆酰化)-5-双葡萄糖苷[delphinidin 3-O-(6-O-coumaroyl)-glucoside-5-glucoside]	14	—	773 (611, 465, 303)
甲基花翠素-3-O-(6-O-香豆酰化)-5-双葡萄糖苷[petunidin 3-O-(6-O-coumaroyl)-glucoside-5-glucoside]	17	—	787 (625, 479, 317)
甲基花青素-3-O-(顺式-6-O-香豆酰化)-5-双葡萄糖苷[peonidin 3-O-(cis-6-O-coumaroyl)-glucoside-5-glucoside]	18	—	771 (609, 463, 331)
二甲花翠素-3-O-(顺式-6-O-香豆酰化)-5-双葡萄糖苷[malvidin 3-O-(cis-6-O-coumaroyl)-glucoside-5-glucoside]	21	—	801 (639, 493, 331)
甲基花青素-3-O-(反式-6-O-香豆酰化)-5-双葡萄糖苷[peonidin 3-O-(trans-6-O-coumaroyl)-glucoside-5-glucoside]	22	—	771 (609, 463, 331)
二甲花翠素-3-O-(反式-6-O-香豆酰化)-5-双葡萄糖苷[malvidin 3-O-(trans-6-O-coumaroyl)-glucoside-5-glucoside]	23	—	801 (639, 493, 331)
仅在'赤霞珠'中检测到的花色苷			
甲基花青素-3-O-(6-O-乙酰化)-单葡萄糖苷[peonidin 3-O-(6-O-acetyl)-glucoside]	—	13	505 (301)
甲基花翠素-3-O-(顺式-6-O-香豆酰化)-单葡萄糖苷[petunidin 3-O-(cis-6-O-coumaroyl)-glucoside]	—	26	609 (301)

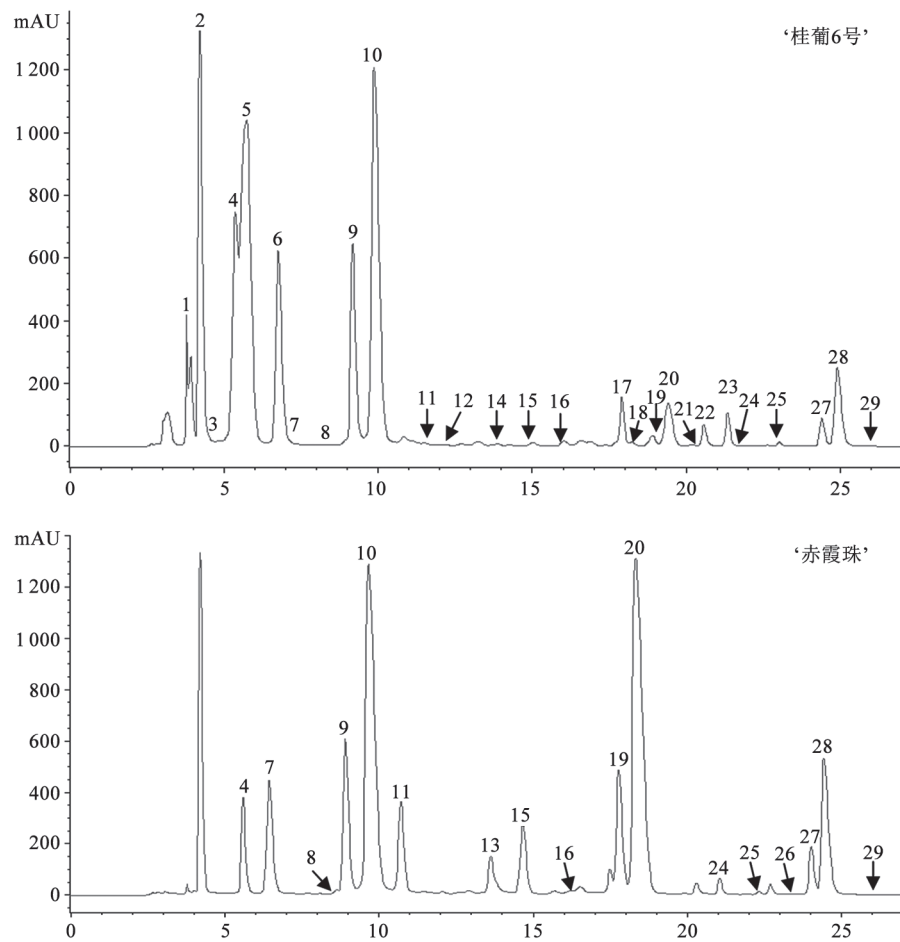


图2 ‘桂葡6号’(A)与‘赤霞珠’(B)成熟期果皮花色苷液相色谱图

Fig.2 HPLC chromatograms of anthocyanin compounds in the berry skin of ‘Guipu No. 6’ (A) and ‘Cabernet Sauvignon’ (B) in maturation period

图中每一个峰号对应的物质名称和质谱信息已在表1中列出, 具体的液相色谱条件见本文材料与与方法部分。

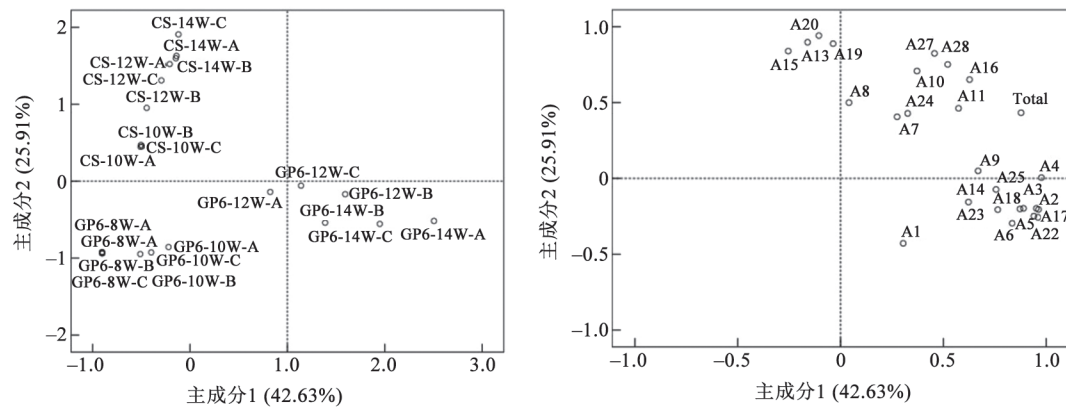


图3 不同发育期‘桂葡6号’和‘赤霞珠’葡萄果皮中花色苷主成分分析

Fig.3 PCA of anthocyanin compounds in the berry skin of ‘Guipu No. 6’ and ‘Cabernet Sauvignon’ during different development periods

左图中‘桂葡6号’和‘赤霞珠’分别用GP6和CS表示, 发育期的8、10、12、14周分别表示为8W、10W、12W、14W, A、B、C表示3个生物学重复; 右图中A后的数字对应表1中两个品种果皮中检测到的花色苷峰号, Total表示花色苷总量($\mu\text{g}\cdot\text{粒}^{-1}$); 峰号为12、21、29的物质仅检测到痕量, 因此图中未显示; 图4同。

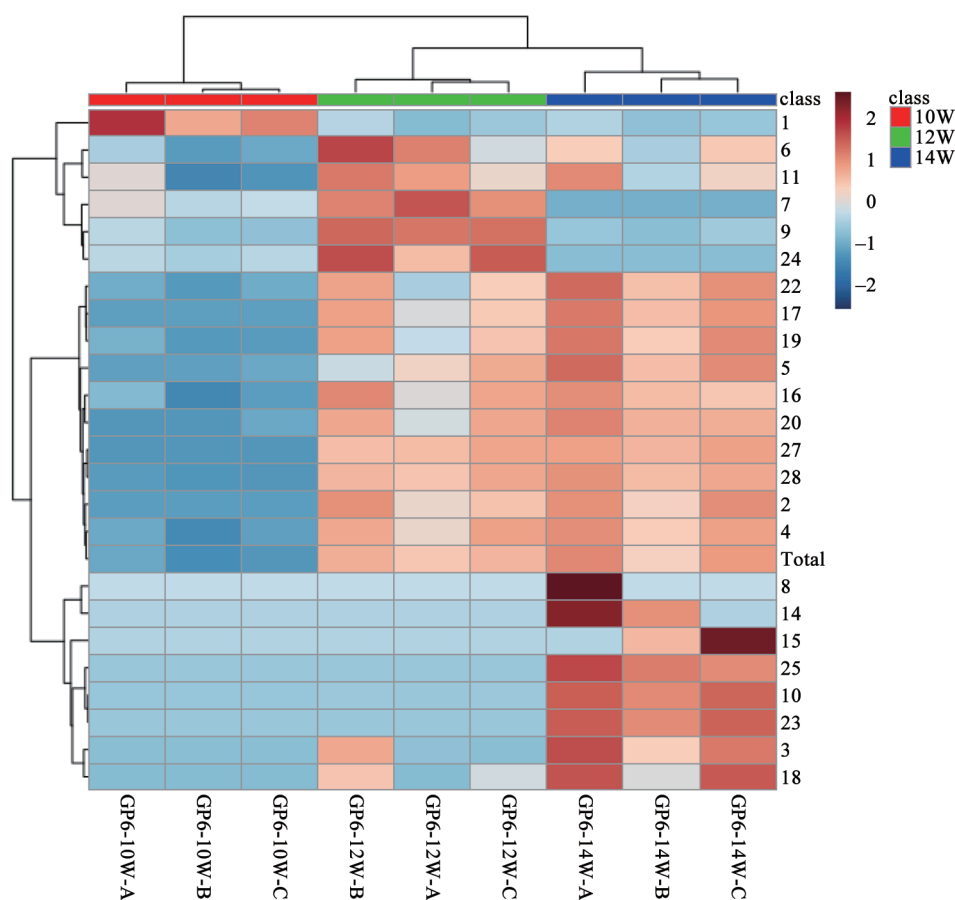


图4 不同发育期‘桂葡6号’葡萄果皮中各类花色苷含量与花色苷总含量聚类分析

Fig.4 Cluster analysis of total anthocyanin concentration and concentration of each anthocyanin in grape skin of ‘Guipu No. 6’ during different development periods

图中数字对应表1中两个品种果皮中检测到的花色苷峰号, class表示对不同发育期进行标记。

表3 ‘桂葡6号’与‘赤霞珠’葡萄果皮中不同修饰类型花色苷比值、总含量和总浓度变化

Table 3 Total anthocyanin concentration, total concentration and the ratio of different modified anthocyanins in grape skin of ‘Guipu No. 6’ and ‘Cabernet Sauvignon’ during different development periods

花色苷	花后8周		花后10周		花后12周		花后14周	
	‘桂葡6号’	‘赤霞珠’	‘桂葡6号’	‘赤霞珠’	‘桂葡6号’	‘赤霞珠’	‘桂葡6号’	‘赤霞珠’
双糖苷比例/%	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^d	45.94±0.94 ^c	0.00±0.00 ^d	58.85±2.34 ^a	0.00±0.00 ^d	51.19±2.25 ^b	0.00±0.00 ^d
单糖苷比例/%	0.00±0.00 ^e	100.00±0.00 ^a	54.06±0.94 ^b	100.00±0.00 ^a	41.15±2.34 ^d	100.00±0.00 ^a	48.81±2.25 ^c	100.00±0.00 ^a
3',5'-取代比例/%	0.00±0.00 ^f	45.11±0.83 ^c	48.84±1.85 ^c	75.90±0.11 ^c	45.67±5.82 ^e	83.02±0.18 ^a	53.88±1.13 ^d	80.58±0.47 ^b
3'-取代比例/%	0.00±0.00 ^e	54.89±0.83 ^b	51.16±1.54 ^b	24.10±0.11 ^d	54.33±5.82 ^e	16.94±0.18 ^f	46.12±1.13 ^c	19.42±0.47 ^e
未酰化比例/%	0.00±0.00 ^h	45.11±0.83 ^b	94.84±0.59 ^a	52.28±0.86 ^d	89.09±1.43 ^b	49.20±0.24 ^e	87.87±0.70 ^c	48.17±0.20 ^f
乙酰化比例/%	0.00±0.00 ^e	54.89±0.83 ^b	1.59±0.45 ^f	15.33±0.36 ^b	2.94±0.20 ^f	9.61±0.15 ^d	3.03±0.31 ^e	12.54±0.20 ^c
香豆酰化比例/%	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00 ^f	3.56±0.03 ^c	32.39±0.59 ^c	7.97±1.23 ^d	41.15±0.09 ^a	9.09±0.39 ^d	39.29±0.02 ^b
未甲基化比例/%	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00 ^e	40.61±1.31 ^b	43.78±0.91 ^a	35.38±2.56 ^e	40.59±0.20 ^b	25.14±0.71 ^d	42.35±0.14 ^b
甲基化比例/%	0.00±0.00 ^f	100.00±0.00 ^a	59.39±1.31 ^d	56.22±0.91 ^c	64.62±2.56 ^e	59.41±0.20 ^d	74.86±0.71 ^b	57.65±0.14 ^e
总量/ $\mu\text{g}\cdot\text{粒}^{-1}$	0.00±0.00 ^h	2.19±0.07 ^e	457.08±89.85 ^f	811.47±43.22 ^d	1439.43±89.67 ^b	791.56±6.84 ^e	1547.91±30.19 ^a	1124.71±29.97 ^c
总浓度/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (FW)	0.00±0.00 ^h	5.14±0.17 ^e	400.89±78.80 ^f	1368.35±72.88 ^c	937.89±97.13 ^c	1281.12±11.07 ^d	1852.26±75.45 ^a	1696.16±96.02 ^b

同一行数据用不同小写字母标识表示差异达显著性水平($P<0.05$)。

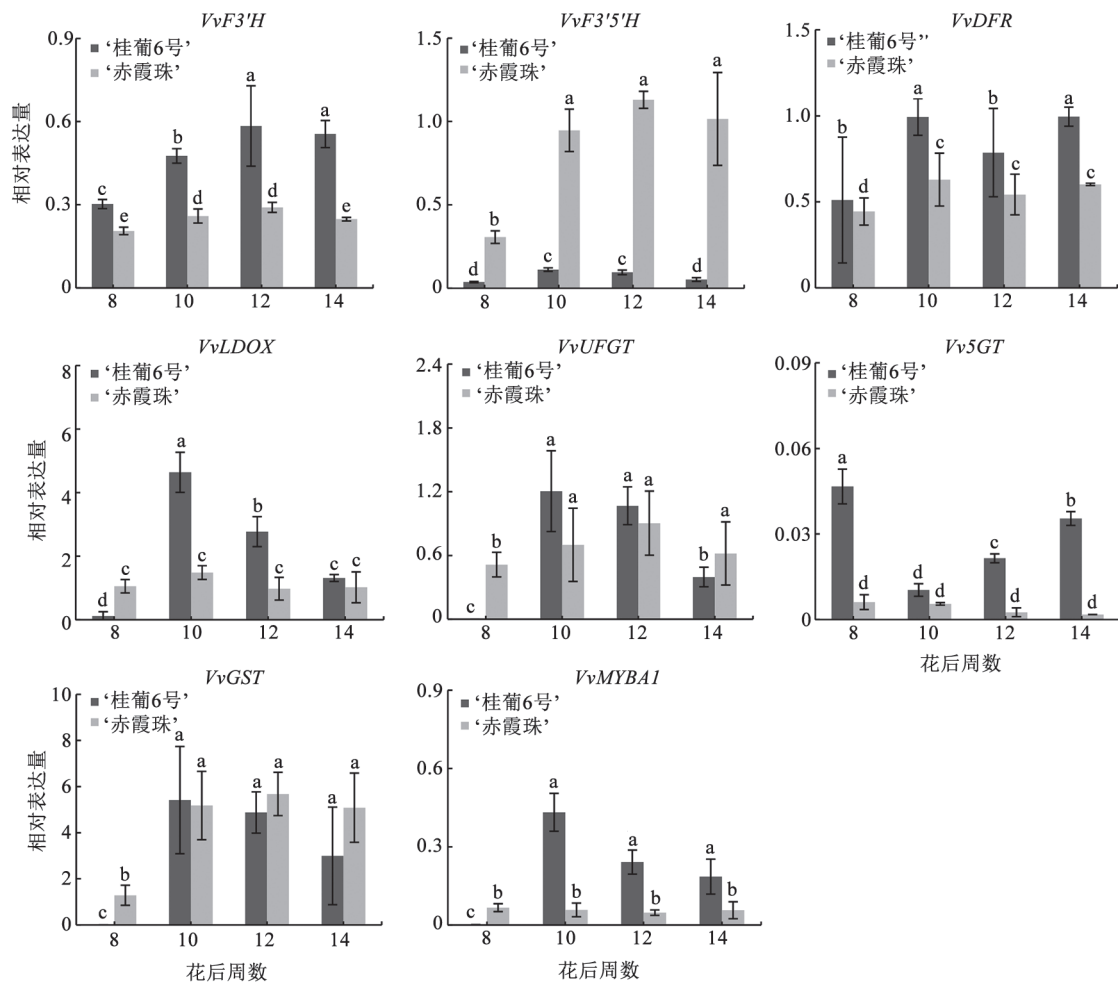


图5 不同发育期两个葡萄品种果皮中花色苷合成相关基因的相对表达量

Fig.5 Relative expression levels of genes in the anthocyanin pathway in grape skin of two cultivars during different development periods

单个图中各柱形上用不同小写字母标识表示不同发育期两个品种果皮中该基因的表达量差异达到显著性水平($P < 0.05$)。

‘桂葡6号’果皮中双糖苷比例随成熟度增加呈先增加后降低趋势。‘桂葡6号’葡萄果皮中3',5'-羟基取代花色苷比例始终显著低于‘赤霞珠’。此外,‘桂葡6号’和‘赤霞珠’果皮中未酰化花色苷比例随发育期逐渐降低,酰化花色苷比例升高,且‘桂葡6号’乙酰化和香豆酰化比例始终低于‘赤霞珠’。花后10周至采收期,‘桂葡6号’果皮中甲基化花色苷比例显著高于‘赤霞珠’,且在采收时差异达到最大。

4 不同发育期‘桂葡6号’花色苷合成相关基因相对表达量

F3'H和F3'5'H羟化柚皮素的B环走向类黄酮代谢的两条分支路径,最终合成3'-羟基取代花色苷(花青素类)和3',5'-羟基取代花色苷(花翠素类)。

定量PCR结果表明(图5),花后8~14周,‘桂葡6号’果皮中VvF3'5'H的表达量显著低于‘赤霞珠’,而前者VvF3'H的表达量显著高于后者。‘桂葡6号’果皮中VvF3'H的表达水平在花后12周达到最大值。花后8、10和12周,两个品种果皮中VvDFR表达量没有显著性差异;花后14周时,‘桂葡6号’果皮中VvDFR表达量显著高于‘赤霞珠’。VvLDOX的表达量随发育期在两个葡萄品种中呈先升高后降低的趋势,花后10和12周,‘桂葡6号’果皮中VvDFR表达量显著高于‘赤霞珠’。欧亚种中的UFGT也被简称为3-O-glucosyl transferase (3-GT)。花后8周,‘桂葡6号’果皮中VvUFGT表达量显著低于‘赤霞珠’,而花后10、12和14周两个品种果皮中VvUFGT表达量

无显著性差异。在多数非欧亚种葡萄或它们的杂交品种中,糖基化会发生在C3和C5位(5-*O*-glucosyltransferase, 5-GT)形成花色苷双糖苷(anthocyanidin 3,5-*O*-diglucoside)。花色苷合成后是通过谷胱甘肽S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)转运到液泡中的(Alfenito等1998)。花后8、12和14周,‘桂葡6号’果皮中*Vv5GT*的表达量显著高于‘赤霞珠’。花后8周,‘桂葡6号’果皮中*VvGST*的表达量显著低于‘赤霞珠’,而花后10、12和14周两个品种果皮中*VvGST*表达量无显著性差异。花后8周,‘桂葡6号’果皮中*VvMYB1*的表达量显著低于‘赤霞珠’,而花后10、12和14周*VvMYB1*在‘桂葡6号’中的表达水平显著高于‘赤霞珠’。

讨 论

葡萄的不同种、品种、品系之间花色苷的种类及含量差异很大(Liang等2008; 韩梅梅等2014; 孙磊等2015),同一品种中每种花色苷所占比例较为稳定(Pomar等2005)。Liang等(2008)检测了110个不同品种的葡萄果实的花色苷组成,包括欧亚种、美洲种、欧美杂种、山欧杂种等,发现不同种葡萄花色苷组分存在很大差异。Jin等(2009)检测了10个来自于我国西北地区的欧亚种酿酒葡萄品种的花色苷组成,结果表明花色苷组成和含量在不同品种间差异很大。在本研究中,‘桂葡6号’果皮中未检测‘赤霞珠’具有的到乙酰化甲基花青素单葡萄糖苷和顺式-香豆酰化甲基花翠素单葡萄糖苷,这与其品种特性有关。二甲花翠素单糖苷(malvidin 3-*O*-monoglucoside)是欧亚种葡萄中最主要的一类花色苷。北美种群葡萄和东亚种群葡萄中同时存在花色素的单糖苷和双糖苷。圆叶葡萄(*V. rotundifolia*)含有5种花色素的双糖苷,而无单糖苷(Huang等2009)。本研究结果表明,在转色后至采收期‘桂葡6号’葡萄果皮中双糖苷比例>50%,说明双糖苷是该品种主要的花色苷类型,与欧亚种亲缘关系较远。孙磊等(2015)分析我国野生葡萄果皮花色苷组成,结果表明,中国野生葡萄果皮中的花色苷以双糖苷为主,且含有较多的花葵素类花色苷。‘桂葡6号’葡萄果皮中的花色苷以双糖苷为主,仅有花翠素和花青素两类花色苷,其中含量最高的是甲基花青素-3,5-*O*-双葡萄糖苷,且其含量

随发育期变化逐渐增加,这代表了‘桂葡6号’的品种特征,对于其生物学形状的描述具有重要意义。

3',5'-羟基取代花色苷包括花翠素、甲基花翠素、二甲花翠素以及它们的衍生物,3'-羟基取代花色苷包括花青素、甲基花青素以及他们的衍生物(Matsuyama等2014)。葡萄果皮中的花翠素类(3',5'-羟基取代)花色苷含量越高将会使果实蓝紫色色调更强,而花青素类(3'-羟基取代)使葡萄果皮呈现紫红色(He和Giusti 2010; Matsuyama等2014)。本研究中,成熟阶段‘桂葡6号’葡萄果皮中花青素类花色苷总量高于欧亚种‘赤霞珠’,因此,与‘赤霞珠’相比,‘桂葡6号’葡萄果皮的红色色调更强,这与‘桂葡6号’葡萄酒呈宝石红色的外观一致。葡萄果实中花色苷的酰化方式主要分为两种:乙酰化和肉桂酰化,花色苷经酰基化修饰可增加其在酸性和中性条件下的稳定性(何建军2010)。「桂葡6号」果皮中乙酰化和香豆酰化花色苷的比例随发育期逐渐升高,采收期二者比例达到最大值,分别是3.03%和9.09%,但始终低于同期‘赤霞珠’。「桂葡6号」果皮中含量最高的前5种花色苷都为未酰化修饰的单糖苷或双糖苷,分别是甲基花青素-3,5-*O*-双葡萄糖苷、二甲花翠素-3-*O*-单葡萄糖苷、花青素-3,5-*O*-双葡萄糖苷、花翠素-3-*O*-单葡萄糖苷和甲基花青素-3-*O*-单葡萄糖苷。类黄酮结构骨架中B环经过甲基化取代会降低酚羟基的化学活性,在结构上更加稳定,甲基化花色苷主要包括甲基花青素、甲基花翠素和二甲花翠素(Kim等2006)。在整个发育阶段,‘桂葡6号」葡萄果皮中甲基化花色苷的比例呈上升趋势,且始终高于‘赤霞珠’,采收期其甲基化花色苷占总花色苷比例为74.86%,这对于颜色的稳定起到积极作用。通过调节成熟期果实的曝光程度能够改变葡萄果皮中酰化花色苷与不同程度羟基化花色苷的比例(Tarara等2008; 成果2015),这对于后续从栽培角度研究如何提升‘桂葡6号」果皮中酰化花色苷比例,进而提高其颜色稳定性具有指导意义。

对于红色葡萄品种,花色苷随果实成熟在果皮中积累,也有些品种其果肉中也含有花色苷(Burns等2002)。花色苷赋予葡萄果实由红到蓝不同的颜色,花色苷的合成始于果实进入成熟阶段(花后8~10周),随后含量逐渐增加,采收期含量达

到最高(Boss等1996; 赵权等2010)。在本研究中, ‘桂葡6号’葡萄果实自花后10周开始转色, 标志其进入成熟阶段, 果皮花色苷含量和浓度随发育期逐渐增加。‘桂葡6号’与‘赤霞珠’以“ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (FW)”和“ $\mu\text{g}\cdot\text{粒}^{-1}$ ”两种单位表示的花色苷浓度和含量随发育期的变化趋势不同, 两个品种之间以含量和浓度单位的比较结果也存在差异, 这与两个品种葡萄果实本身物理结构特点有关。

花色素经由类黄酮代谢路径合成, 之后还会发生进一步的糖基化、甲基化和酰基化等修饰作用。在葡萄果实细胞中, 内质网膜或细胞质是花色苷合成的场所, 之后运输至液泡中累积(Chen等2006)。本研究结果显示, ‘桂葡6号’葡萄果皮中*VvF3'H*表达水平高于*VvF3'5'H*, 且在整个发育期*VvF3'H*的表达水平显著高于‘赤霞珠’, 这解释了花青素类(3'-羟基取代)花色苷在‘桂葡6号’葡萄果皮中的比例较高。在进入转色期之后, ‘桂葡6号’葡萄果皮中花色苷总量迅速增加, 并显著高于‘赤霞珠’, 这是由于‘桂葡6号’中*VvDFR*和*VvLDOX*的表达水平高于‘赤霞珠’。*VvUFGT*和*Vv5GT*在‘桂葡6号’和‘赤霞珠’葡萄果皮中均有表达, 但*Vv5GT*在后者中的表达维持在极低水平, 因此, 在‘赤霞珠’葡萄果皮中未检测到花色苷双糖苷。花后8周, ‘赤霞珠’葡萄果皮中*VvLDOX*、*VvUFGT*、*VvGST*和*VvMYBA1*的表达量显著高于‘桂葡6号’, 这与‘桂葡6号’尚未进入转色期有关。大量报道指出, 转录因子MYBA1对*VvUFGT*的表达具有促进作用(Kobayashi等2002; Cutanda-Perez等2009; Soubeyrand等2014)。本研究中, 花后10~14周, *VvUFGT*在两个品种间的差异不显著, 但‘桂葡6号’果皮中*VvMYBA1*的表达量显著高于‘赤霞珠’, 这与*Vv5GT*在两个品种中的表达规律类似, 因此, 转录因子MYBA1对*Vv5GT*的表达是否具有调节作用有待进一步研究。

成熟期‘桂葡6号’葡萄果皮中共检测到27种花色苷, 双糖苷是其中最主要的花色苷类型, 含量最高的是甲基花青素-3,5-*O*-双葡萄糖苷, 花翠素类与花青素类花色苷比例相当。与欧亚种‘赤霞珠’相比, ‘桂葡6号’果皮中花青素类和甲基化花色苷比例较高, 而酰基化花色苷比例较低。‘桂葡6号’花色苷组成与欧亚种‘赤霞珠’差异明显, 由花色苷代谢相关结构基因和转录因子的调控, 而MYB家

族转录因子MYBA1对于*Vv5GT*的调节作用有待进一步研究。

参考文献

- 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 (7): 1135–1149
- 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 (2): 652–663
- Boss PK, Davis C, Robinson SP (1996). 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 (4): 1059–1066
- Burns J, Mullen W, Landraut N, Teissedre P, Lean MEJ, Crozie A (2002). Variations in the profile and content of anthocyanins in wines made from Cabernet Sauvignon and hybrid grapes. *J Agric Food Chem*, 50 (14): 4096–4102
- Castañeda-Ovando A, de Lourdes Pacheco-Hernández M, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA, Galán-Vidal CA (2009). Chemical studies of anthocyanins: a review. *Food Chem*, 113 (4): 859–871
- Castellarin SD, Pfeiffer A, Sivilotti P, Degan M, Peterlunger E, Di Gaspero G (2007). Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit. *Plant Cell Environ*, 30 (11): 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 (2): 115–127
- Cheng G (2015). The research on anthocyanin biosynthesis in ‘Cabernet Sauvignon’ berries regulated by microenvironment (PhD thesis). Yangling: Northwest A&F University (in Chinese with English abstract) [成果(2015). 微环境调控‘赤霞珠’葡萄果实花色苷代谢的研究(博士论文). 杨凌: 西北农林科技大学]
- Cutanda-Perez MC, Ageorges A, Gomez C, Vialet S, Terrier N, Romieu C, Torregrosa L (2009). Ectopic expression of *VvmybA1* in grapevine activates a narrow set of genes involved in anthocyanin synthesis and transport. *Plant Mol Biol*, 69 (6): 633–648
- Han M, Yang X, Wang J, Pan Q (2014). Comparison of anthocyanins in berry skins among grapevine clones. *Chin J Trop Crops*, 35 (3): 425–432 (in Chinese with English abstract) [韩梅梅, 杨晓帆, 王军, 潘秋红(2014). 葡萄品系间果实花色苷的比较研究. 热带作物学报, 35 (3): 425–432]
- Hausmann L, Neumann K, Eibach R, Zyprian E, Töpfer R (2009). Development of a molecular marker for an anthocyanin 5-*O*-glucosyltransferase homologous gene of *Vitis* ssp. correlated with anthocyanin 3,5-diglucoside formation in berry skin. *Acta Hort*, 827: 457–460
- He F, Mu L, Yan GL, Liang NN, Pan QH, Wang J, Reeves MJ, Duan

- CQ (2010). Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. *Molecules*, 15 (12): 9057–9091
- He J (2010). Analysis on factors of affecting anthocyanin modification in wine grapes (*Vitis vinifera* L.) (PhD thesis). Beijing: China Agricultural University (in Chinese with English abstract) [何建军(2010). 影响酿酒葡萄果实中花色苷结构修饰的因素分析(博士论文). 北京: 中国农业大学]
- He J, Giusti MM (2010). Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annu Rev Food Sci Technol*, 1: 163–187
- Holton TA, Cornish EC (1995). Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell*, 7 (7): 1071–1083
- Huang Z, Wang B, Williams P, Pace RD (2009). Identification of anthocyanins in muscadine grapes with HPLC-ESI-MS. *LWT-Food Sci Technol*, 42 (4): 819–824
- Jackson RS (2008). *Wine Science: Principle and Applications*. 3rd ed. Burlington, VT, USA: Academic Press, 287–295
- Jánváry L, Hoffmann T, Pfeiffer J, Hausmann L, Töpfer R, Fischer TC, Schwab W (2009). A double mutation in the anthocyanin 5-*O*-glucosyltransferase gene disrupts enzymatic activity in *Vitis vinifera* L. *J Agr Food Chem*, 57 (9): 3512–3518
- Jin ZM, He JJ, Bi HQ, Cui XY, Duan CQ (2009). Phenolic compound profiles in berry skins from nine red wine grape cultivars in northwest China. *Molecules*, 14 (12): 4922–4935
- Kim BG, Lee HJ, Park Y, Lim Y, Ahn JH (2006). Characterization of an *O*-methyltransferase from soybean. *Plant Physiol Bioch*, 44 (4): 236–241
- Kobayashi S, Ishimaru M, Hiraoka K, Honda C (2002). *Myb*-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta*, 215 (6): 924–933
- Liang Z, Wu B, Fan P, Yang C, Duan W, Zheng X, Liu C, Li S (2008). Anthocyanin composition and content in grape berry skin in *Vitis* germplasm. *Food Chem*, 111 (4): 837–844
- Matsuyama S, Tanzawa F, Kobayashi H, Suzuki S, Takata R, Saito H (2014). Leaf removal accelerated accumulation of delphinidin-based anthocyanins in ‘Muscat Bailey A’ [*Vitis* × *labruscana* (Bailey) and *Vitis vinifera* (Muscat Hamburg)] grape skin. *J Japan Soc Hort Sci*, 83 (1): 17–22
- Mazza G (1995). Anthocyanins in grapes and grape products. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 35 (4): 341–371
- Mori K, Goto-Yamamoto N, Kitayama M, Hashizume K (2007). Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *J Exp Bot*, 58 (8): 1935–1945
- 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 Chromatogr A*, 1094 (1): 34–41
- Soubeyrand E, Basteau C, Hilbert G, van Leeuwen C, Delrot S, Gomès E (2014). Nitrogen supply affects anthocyanin biosynthetic and regulatory genes in grapevine cv. Cabernet-Sauvignon berries. *Phytochemistry*, 103: 38–49
- Sun L, Fan X, Zhang Y, Jiang J, Sun H, Liu C (2015). Analysis of anthocyanin composition in berry skin of Chinese wild grape. *J Fruit Sci*, 32 (6): 1143–1151 (in Chinese with English abstract) [孙磊, 樊秀彩, 张颖, 姜建福, 孙海生, 刘崇怀(2015). 部分中国野生葡萄果皮花色苷组分分析. 果树学报, 32 (6): 1143–1151]
- Tarara JM, Lee J, Spayd SE, Scagel CF (2008). Berry temperature and solar radiation alter acylation, proportion, and concentration of anthocyanin in Merlot grapes. *Am J Enol Vitic*, 59 (3): 235–247
- Xie T, Guan J, Yang Y, Zhang Y, Zhang J, Huang Y, Lin L, Liu J, Xie L, Zhang L (2015). Study on characteristics of a new strain of *V. quinquangularis* G203 and its wine-making quality. *Sino-Ov Grapevine Wine*, (1): 32–35 (in Chinese with English abstract) [谢太理, 管敬喜, 杨莹, 张瑛, 张劲, 黄羽, 林玲, 刘金标, 谢林君, 张龙婷(2015). 毛葡萄新品系G203的种质特点及酿酒品质的研究. 中外葡萄与葡萄酒, (1): 32–35]
- Zhao Q, Wang J, Duan CQ (2010). changes in components and content of anthocyanin and non-anthocyanin phenolic compounds during fruit development of *Vitis amurensis* Rupr. *Plant Physiol Commun*, 46 (1): 80–86 (in Chinese) [赵权, 王军, 段长青(2010). 山葡萄果实发育过程中花色苷和非花色苷酚成分及其含量的变化. 植物生理学通讯, 46 (1): 80–86]

Analysis of anthocyanin composition characteristics and gene expression patterns of ‘Guipu No. 6’ grape

CHENG Guo¹, ZHOU Si-Hong², HUANG Yu¹, ZHANG Ying¹, GUAN Jing-Xi¹, YANG Ying¹, WEN Ren-De¹, ZHANG Jin^{1*}

¹Grape and Wine Reaserch Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences / ²Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Laboratory, Nanning 530007, China

Abstract: The grape skin colour varies mainly due to the composition and the content of anthocyanins. The composition and content of anthocyanins were surveyed by HPLC-MS in berry skins of ‘Guipu No. 6’. Transcript levels of both structural and regulatory genes involved in anthocyanin synthesis were confirmed by real-time PCR, and then were compared with *Vitis vinifera* ‘Cabernet Sauvignon’. The results indicate that 27 anthocyanins were detected in ‘Guipu No. 6’ berry skins, and the content of each anthocyanin changed with development periods. Total anthocyanin content exhibited a continuous increase during the development period, and the total content/concentration of anthocyanin in ‘Guipu No. 6’ berry skins were higher than those in ‘Cabernet Sauvignon’ at harvest. That could be related to higher expression levels of *VvDFR* and *VvLDOX*. The composition of anthocyanin in ‘Guipu No. 6’ berry skins showed significant difference with that in ‘Cabernet Sauvignon’. ‘Guipu No. 6’ berry skins contained more diglucoside anthocyanins, and peonidin 3,5-*O*-diglucoside was the most abundant one. The proportions of different modified anthocyanins changed during development period, and were controlled by the cultivar. In the berry skins of ‘Guipu No. 6’, the proportion of cyanidin-type (3'-substituted) anthocyanins was higher than that in ‘Cabernet Sauvignon’. That could be related to higher expression levels of *VvF3'H*. The methylated anthocyanins had higher proportions in ‘Guipu No. 6’ berry skins, but lower acylated anthocyanins were presented in the ‘Guipu No. 6’ skins when compared to ‘Cabernet Sauvignon’.

Key words: ‘Guipu No. 6’; berry skin; anthocyanin; gene expression; HPLC-MS

Received 2016-09-20 Accepted 2016-11-24

This work was supported by the Basal Research Fund of Guangxi Academy of Agricultural Sciences (Guinongke Grant Nos. 2015JZ150, 2015YM05 and 2015YT85), and the Natural Science Foundation of Guangxi (Grant No. 2015GXNSFBA139091).

*Corresponding author (E-mail: zhangj@gxaas.net).