

葡萄果实中 $(-)-\alpha$ -萜品醇的积累与其合成酶基因 *Vvter* 表达的关系

王志群, 段长青, 朱保庆, 吴玉文, 涂 崔, 潘秋红*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘 要: 以不同发育期的‘赤霞珠’和‘雷司令’葡萄果实为试材, 应用气相色谱质谱联用技术和荧光实时定量 PCR 技术, 研究了果实发育过程中游离态和糖苷态 $(-)-\alpha$ -萜品醇含量与 $(-)-\alpha$ -萜品醇合成酶 [*Vitis vinifera* $(-)-\alpha$ -terpineol synthase] 基因 *Vvter* 表达的关系。结果表明, 糖苷态 $(-)-\alpha$ -萜品醇在两个品种果实发育过程中均没有明显变化, 游离态 $(-)-\alpha$ -萜品醇在‘赤霞珠’中表现为随果实发育而降低, 而在‘雷司令’中呈现先下降再上升后下降的趋势, 同一品种中 $(-)-\alpha$ -萜品醇总含量的变化与 *Vvter* 基因的表达成正相关。

关键词: 葡萄; 果实; $(-)-\alpha$ -萜品醇; $(-)-\alpha$ -萜品醇合成酶

中图分类号: S 663.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 11-2187-06

Relationship Between $(-)-\alpha$ -terpineol Accumulation and *Vvter* Expression in Grape Berries

WANG Zhi-qun, DUAN Chang-qing, ZHU Bao-qing, WU Yu-wen, TU Cui, and PAN Qiu-hong*

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: The present study focused on the relationship between changes of free and glycosidic $(-)-\alpha$ -terpineol concentrations and expression of a *Vvter* gene encoding $(-)-\alpha$ -terpineol synthase during development of grape (*Vitis vinifera* L. ‘Cabernet Sauvignon’ and ‘Riesling’) berries by using technologies of GC-MS and real-time PCR. The results showed that in these two cultivars glycosidic $(-)-\alpha$ -terpineol concentrations varied little in the process of berry development. Free $(-)-\alpha$ -terpineol concentration gradually decreased with development of ‘Cabernet Sauvignon’ berries and showed decrease-increase-decrease variation trends with development of ‘Riesling’ berries. In respect of a variety, the variation trend of total $(-)-\alpha$ -terpineol was in good agreement with that of transcript.

Key words: grape; berries; $(-)-\alpha$ -terpineol; $(-)-\alpha$ -terpineol synthase

在葡萄果实中, 单萜化合物以有香味的游离态和无味的糖苷结合态存在 (Maicas & Mateo, 2005), 一般结合态单萜含量是游离态的 2~8 倍 (Berger, 2007)。根据果实中游离态单萜物质的含量, 欧洲种 (*Vitis vinifera* L.) 酿酒葡萄可分为麝香型 (游离态单萜总量高达 $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、非麝香芳

收稿日期: 2011-08-09; 修回日期: 2011-10-24

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-30)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: panqh@cau.edu.cn)

香型（游离态单萜总量为 $1 \sim 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ）和非芳香型（游离态单萜总量低于 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ）3 种类型。Martin 和 Bohlmann（2004）从欧洲种葡萄‘琼瑶浆’（*Vitis vinifera* L. ‘Gewürztraminer’）中克隆得到两条编码（-）- α -萜品醇合成酶的基因序列，这两条序列均为 1 773 bp，且相似度 99.99%，只有两个碱基的差别，其推测的氨基酸序列有两个氨基酸的差异；对其原核表达蛋白质的体外催化特性分析表明，这两个酶催化反应的底物和产物完全相同，它们均可催化焦磷酸香叶酯（GPP）产生 14 种单萜化合物，包括 3 种主要产物：（-）- α -萜品醇（50.1%）、1, 8-桉油精（11.8%）、（+）- β -蒎烯（8.5%）和 11 种微量单萜物质，认为这两个序列为同一基因。在后续的研究中，研究者们没有将这两条序列区分开，统一命名为 *Vvter* [*Vitis vinifera*（-）- α -terpineol synthase]（Lücker et al., 2004）。

迄今没有关于葡萄果实发育过程中（-）- α -萜品醇积累与其相应基因 *Vvter* 关系的报道，本研究中以非芳香型葡萄品种‘赤霞珠’和非麝香芳香型葡萄品种‘雷司令’为试材，分析了果实发育过程中游离态和结合态（-）- α -萜品醇的含量和 *Vvter* 基因转录本丰度的变化，从中比较两个葡萄品种中（-）- α -萜品醇积累的差异，初步揭示（-）- α -萜品醇的积累和 *Vvter* 基因表达之间的关系，为今后深入研究葡萄果实单萜化合物的积累与调控机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试材为河北省怀来县中法葡萄庄园的‘赤霞珠’（*Vitis vinifera* L. ‘Cabernet Sauvignon’）与‘雷司令’（*Vitis vinifera* L. ‘Riesling’）葡萄，取样时间为 2009 年盛花后 4（5）周至 16（17）周采集，每两周采样 1 次，采样时间均在上午 10 时左右。每个品种每次随机采集约 100 粒发育期一致，大小相近，无机械损伤，无病虫害的果粒，用湿纱布包袱，放进泡沫箱中，2 h 内运回实验室。将葡萄果实用去离子水冲洗干净后置于干净的纱布上，室温自然晾干，随后用液氮速冻，放于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待用。

1.2 葡萄果实总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

采用本实验室改进的 CTAB 法提取葡萄果实的总 RNA（He et al., 2009），用 DNase I（RNase free，日本 TaKaRa 公司）和 EZ-10 Spin Column RNA Purification Kit（加拿大 BioBasic 公司）除去 DNA。经核酸凝胶电泳检测发现，28S 和 18S rRNA 条带完整，28S 条带的亮度约为 18S 条带亮度的 2 倍，紫外分光光度计检测发现其 A_{260}/A_{280} 在 1.8 ~ 2.0 之间，表明总 RNA 有较好的完整性和纯度，能满足后续反转录试验的要求。得到总 RNA 用逆转录试剂盒（美国 Promega 公司）合成 cDNA，置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 Real-time PCR 特异引物的设计

根据 *Vvter*（GenBank 序列号 XM002269696.1）基因的 cDNA 序列设计特异性引物（正向引物：5'-GATTATGTGGGAGAAACATACACC-3'，反向引物：5'-CAAGACATCGATTAGCTCCA-3'）。*VvUbiquitin*（正向引物：5'-GTGGTATTATTGAGCCATCCTT-3'，反向引物：5'-AACCTCCAATCCAGTCATCTAC-3'）为葡萄果实的组成型表达基因，其表达不受发育阶段的影响，在本研究中被用作内参基因。

以花后 14（15）周葡萄果实 cDNA 为模板，对每对引物进行 PCR 扩增分析，以检测扩增产物是否与理论值相符。在两个品种的葡萄果实中扩增得到特异目的条带长度，*VvUbiquitin* 约为 182 bp，

Vvter 约为 114 bp, 该长度与对应的 *VvUbiquitin* 和 *Vvter* 的理论片段长度相符。

对扩增片段进行测序分析, 结果表明扩增片段的核苷酸序列与理论序列完全相符, 表明目的片段的引物设计合理。引物经 Real-time PCR 溶解曲线分析显示只有一个特异的溶解峰, 且其融解温度均符合理论期望, 进一步表明引物 Real-time PCR 扩增特异性很好 (Bogs et al., 2005)。

1.4 Real-time PCR 检测分析

用 7300 Real Time PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司) 检测分析转录本丰度, 所用的试剂为 SYBR®Premix Ex Taq™ (日本 TaKaRa 公司)。反应体系为: 5 μ L SYBR Green RT-PCR Master Mix、0.2 μ L ROX Reference Dye (50 \times), 4.5 μ L ddH₂O (中国天根生物试剂公司)、1/6 μ L cDNA、1/3 μ L 正反引物混合物 (10 μ mol \cdot L⁻¹)。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 31 s, 进行 40 个循环。

1.5 基因表达相对定量分析计算

基因表达相对定量分析采用 $2^{-\Delta Ct}$ 法 (Bogs et al., 2005), $\Delta Ct = Ct(\text{目的基因}) - Ct(VvUbiquitin)$ 。每个样品提取两份 RNA, 每份 RNA 设置两个分析重复。

1.6 葡萄果实香气物质提取

葡萄果实中游离态单萜化合物的提取参考本实验室的方法进行 (Wu et al., 2009)。从 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中取出 200 g 葡萄果实, 迅速将果梗除去, 液氮冷冻, 用研杵敲碎去籽后分别加入 0.5 g D-葡萄糖酸内酯 (抑制葡萄果实内源 β -D-葡萄糖苷酶的活性) 和 2 g 交联聚乙烯基吡咯烷酮 (抑制葡萄果实内源多酚氧化酶的活性), 磨成粉末。室温下 (20 $^{\circ}$ C) 置于 50 mL 离心管中密封浸渍 120 min 后, 在 9 000 r \cdot min⁻¹ 下离心 10 min, 得到澄清葡萄汁。

糖苷态单萜化合物的提取参考 Villena 等 (2006) 和 Loscos 等 (2009) 的方法进行。样品前处理与游离态香气物质相同, 得到澄清葡萄汁。Cleanert PEP-SPE 固相萃取柱依次经 10 mL 甲醇和 10 mL 水活化后, 加入 2 mL 澄清葡萄汁样品。经 2 mL 水洗脱去除一些糖、酸等低分子量的极性化合物后, 加入 5 mL 二氯甲烷进一步洗脱除去游离态香气物质的干扰, 最后用 20 mL 甲醇将糖苷结合态香气物质洗脱, 收集至 50 mL 的圆底烧瓶内, 整个固相微萃取过程洗脱剂流速保持 2 mL \cdot min⁻¹。甲醇溶解糖苷态香气物质置于 30 $^{\circ}$ C 下真空旋转蒸干后, 加入 10 mL 柠檬酸/磷酸缓冲液 (2 mol \cdot L⁻¹, pH 5) 重新溶解, 在糖苷酶 AR2000 (100 g \cdot L⁻¹, 100 μ L) 的作用下, 置于 40 $^{\circ}$ C 恒温金属浴充分酶解 24 h。

1.7 顶空固相微萃取

在 15 mL 的样品瓶中加入 5 mL 的样品、1 g NaCl、10 μ L 4-甲基, 2-戊醇 (内标) 和磁力转子上, 迅速用带有聚四氟乙烯隔垫的样品瓶盖拧紧后置于磁力搅拌加热台上, 40 $^{\circ}$ C 加热搅拌 30 min, 将已活化或热解析过的 PDMS/CAR/DVB 萃取头插入样品瓶的顶空部分, 萃取头距离液面约 1 cm。在 40 $^{\circ}$ C 搅拌加热条件下吸附 30 min, 然后将萃取头插入气相色谱的进样口, 250 $^{\circ}$ C 热解析 8 min。每个样品做 3 个独立的萃取重复。

1.8 GC-MS 分析香气

果实香气物质分析参考本实验室的方法进行 (Zhang et al., 2011)。采用 Agilent 6890 GC 和 Agilent 5975B MS 联用仪 (美国 Agilent 公司) 进行定性定量分析, 所用的毛细管柱为 HP-INNOWAX (60 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m (美国 J & W scientific 公司), 载气为高纯氦气, 流速 1 mL \cdot min⁻¹; 固相微萃取

手动进样, 采用不分流模式, 插入气相色谱的进样口, 进样口温度为 250 °C, 热解析 8 min。柱温箱的升温程序为: 40 °C 保持 5 min, 然后以 3 °C · min⁻¹ 的速度升温至 200 °C, 200 °C 保持 2 min。质谱接口温度为 280 °C, 离子源温度为 230 °C, 电离方式 EI, 离子能量 70 eV, 质量扫描范围为 20 ~ 350 u。

1.9 定性定量分析

定性分析: 采用质谱全离子扫描谱图(scan), 依据已有标样的色谱保留时间和质谱信息、NIST05 标准谱库比对对葡萄果实中的 (-)- α -萜品醇进行定性分析。定量分析: 利用已有的标准化合物制备标准曲线[(-)- α -萜品醇与内标化合物峰面积比/化合物的浓度]对葡萄果实中的 (-)- α -萜品醇进行定量分析。

2 结果与分析

2.1 葡萄果实发育过程中 (-)- α -萜品醇含量的变化

从图 1 和图 2 可以看出, ‘雷司令’果实中 (-)- α -萜品醇的总含量显著高于 ‘赤霞珠’; 而在这两个品种中糖苷态 (-)- α -萜品醇含量均是游离态的 3 ~ 5 倍, 且在果实发育过程中没有明显变化。

在 ‘赤霞珠’果实发育过程中 (图 1), 游离态 (-)- α -萜品醇含量整体呈现出下降的趋势, 花后 4 周到 8 周下降较快, 从花后 8 周开始整体下降缓慢, 到花后 12 周时基本趋于稳定。就 (-)- α -萜品醇的总含量而言, 在果实发育过程中整体呈现下降规律, 其中前期下降速度比后期快。

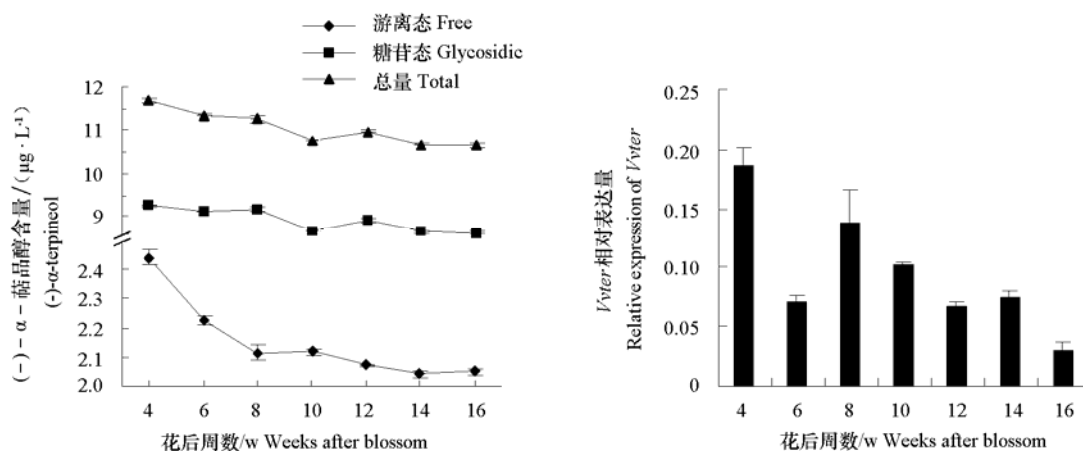
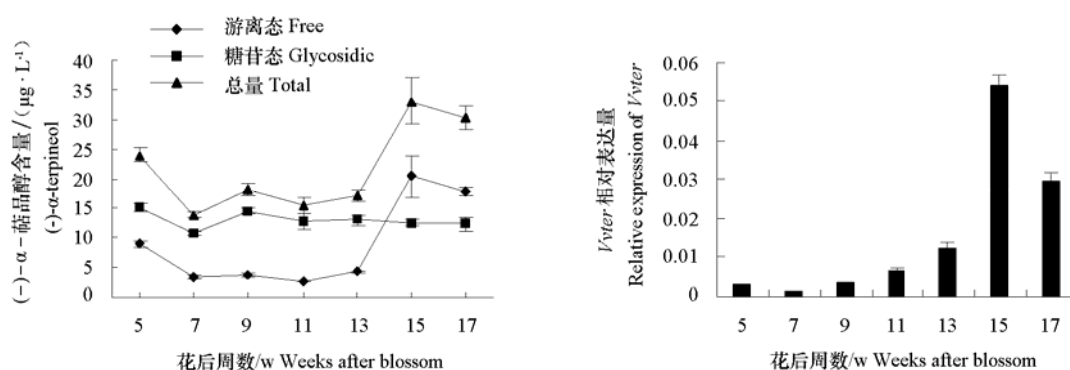


图 1 ‘赤霞珠’果实发育期 (-)- α -萜品醇含量积累与 *Vvter* 基因相对表达量

Fig. 1 (-)- α -terpineol accumulation and *Vvter* relative expression in developing ‘Cabernet Sauvignon’ berries

在 ‘雷司令’果实发育过程中 (图 2), 游离态 (-)- α -萜品醇含量整体呈现出先下降再上升后下降的趋势。发育早期 5 周到 7 周, (-)- α -萜品醇含量下降; 发育中期 7 到 13 周, 含量较为稳定; 发育后期 13 周到 15 周, 含量急剧上升, 并在花后 15 周达到最大值, 到 17 周含量略有下降, 但仍处于较高水平。

就游离态和糖苷结合态的总量而言, 两个品种的葡萄果实中 (-)- α -萜品醇总量呈现与游离态相似的变化趋势。

图 2 ‘雷司令’果实发育期 (-)- α -萜品醇含量积累与 *Vvter* 基因相对表达量Fig. 2 (-)- α -terpineol accumulation and *Vvter* relative expression in developing ‘Riesling’ berries

2.2 在葡萄果实发育过程中 *Vvter* 表达的变化

在‘赤霞珠’果实发育过程中(图 1), *Vvter* 基因的相对表达量整体呈下降趋势,在花后 16 周表达量达到最低,其变化趋势与 (-)- α -萜品醇的总量相似。在‘雷司令’果实发育过程中(图 2), *Vvter* 基因的表达规律不同于‘赤霞珠’果实,呈现先上升后下降的变化趋势,其中从花后 13 周开始,基因表达量剧增,在 15 周表达量达到最大值,到 17 周时基因表达量急剧下降,但仍高于发育早期水平。‘雷司令’果实中 *Vvter* 的表达也与 (-)- α -萜品醇的总量成正相关。

3 讨论

一般来说,在麝香型葡萄果实发育过程中,游离和结合态单萜类的积累是从颜色的变化开始的,且随着葡萄果实的成熟总体含量逐渐上升,甚至葡萄过熟(Ebeler & Thorngate, 2009)。Martin & Bohlmann (2004)指出, *Vvter* 酶催化生成的产物主要有 3 种: (-)- α -萜品醇, 1, 8-桉油精和 (+)- β -蒎烯,本研究没有检测到 1, 8-桉油精和 (+)- β -蒎烯,因此只讨论 (-)- α -萜品醇含量的变化。(-)- α -萜品醇作为葡萄果实中典型的单萜醇(Park & Noble, 1993),在本研究中其在非麝香芳香型品种‘雷司令’果实发育过程中游离态和总量的积累规律与麝香型果实单萜的积累规律相符,但是其糖苷态含量并没有随果实发育而积累,而是呈现缓慢下降的现象;在非芳香品种‘赤霞珠’果实发育过程中, (-)- α -萜品醇含量变化规律恰好相反,呈现逐渐降低的规律。Kalua 和 Boss (2009, 2010)的研究也发现,萜烯在‘赤霞珠’果实发育早期有大量积累,随着果实发育萜烯含量逐渐降低,甚至在转色后有的萜烯消失。由此,推断不同香型葡萄果实发育过程中 (-)- α -萜品醇的积累有品种差异性。

Lücker 等 (2004) 用 Northern 技术检测了此基因在酿酒葡萄品种‘琼瑶浆’果实发育期的表达。研究显示 *Vvter* 基因在‘琼瑶浆’果实的整个发育过程中没有信号检出,他们的解释为葡萄果实在发育期尤其是成熟期发生了巨大的生理变化,这主要为葡萄果实在坐果后,有一个短暂的发育滞留期,当果实再发育时葡萄转色期也开始,这个时期葡萄的果实生长加速,糖和花色苷大量积累,酸度开始降低,因此,这些剧烈的生理和生化变化影响了 *Vvter* 基因的表达和检测。本试验中用 Real-time PCR 技术检测到 *Vvter* 在‘赤霞珠’和‘雷司令’葡萄中均有表达,与前人研究结果不同,这可能与所采用的技术和葡萄品种不同有关。

已有的关于葡萄果实发育过程香气物质含量变化的研究主要集中于转色期到成熟期,对于果实发育早期香气物质含量的变化研究很少(Gomez et al., 1995; Coelho et al., 2006, 2007)。本文既

分析了 (-)- α -萜品醇含量在非芳香品种‘赤霞珠’和非麝香芳香品种‘雷司令’果实整个发育期的变化,又跟踪了相应基因 *Vvter* 的表达,发现在这两个香型的葡萄品种中,(-)- α -萜品醇积累规律和 *Vvter* 基因表达规律明显不同,但是就同一品种而言,(-)- α -萜品醇积累和 *Vvter* 基因表达呈相似的趋势。

上述结果表明在葡萄果实中,(-)- α -萜品醇的合成受基因 *Vvter* 在转录水平表达的调控,而 *Vvter* 基因的表达具有品种特异性。继续深入研究造成上述品种差异的原因,有助于更深刻的认识酿酒葡萄品种香气品质形成的分子机理,为调控果实中萜类香气物质的合成提供理论依据。

References

- Berger R G. 2007. Flavours and fragrances. Berlin: Springer.
- Bogs J, Downey M O, Harvey J S, Ashton A R, Tanner G J, Robinson S P. 2005. Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. *Plant Physiology*, 139 (2): 652 - 663.
- Coelho E, Rocha S M, Barros A S, Delgadillo I, Coimbra M A. 2007. Screening of variety- and pre-fermentation-related volatile compounds during ripening of white grapes to define their evolution profile. *Analytica Chimica Acta*, 597 (2): 257 - 264.
- Coelho E, Rocha S M, Delgadillo I, Coimbra M A. 2006. Headspace-SPME applied to varietal volatile components evolution during *Vitis vinifera* L. cv. ‘Baga’ ripening. *Analytica Chimica Acta*, 563 (1-2 SPEC. ISS.): 204 - 214.
- Ebeler S E, Thorngate J H. 2009. Wine chemistry and Flavor: Looking into the crystal glass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (18): 8098 - 8108.
- Gomez E, Martinez A, Laencina J. 1995. Changes in volatile compounds during maturation of some grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67 (2): 229 - 233.
- He F, Fang X X, Hu M, Pan Q H, Shi Y, Duan C Q. 2009. Preparation and biological application of antibodies against leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase from grape berry. *Vitis*, 48 (2): 69 - 75.
- Kalua C M, Boss P K. 2009. Evolution of volatile compounds during the development of cabernet sauvignon grapes (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (9): 3818 - 3830.
- Kalua C M, Boss P K. 2010. Comparison of major volatile compounds from Riesling and Cabernet Sauvignon grapes (*Vitis vinifera* L.) from fruitset to harvest. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16 (2): 337 - 348.
- Loscos N, Hernández-Orte P, Cacho J, Ferreira V. 2009. Comparison of the suitability of different hydrolytic strategies to predict aroma potential of different grape varieties. *Food Chemistry*, 57 (6): 2468 - 2480.
- Lücker J, Bowen P, Bohlmann J. 2004. *Vitis vinifera* terpenoid cyclases: Functional identification of two sesquiterpene synthase cDNAs encoding (+)-valencene synthase and (-)-germacrene D synthase and expression of mono- and sesquiterpene synthases in grapevine flowers and berries. *Phytochemistry*, 65 (19): 2649 - 2659.
- Maicas S, Mateo J J. 2005. Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67 (3): 322 - 335.
- Martin D, Bohlmann J. 2004. Identification of *Vitis vinifera* (-)- α -terpineol synthase by in silico screening of full-length cDNA ESTs and functional characterization of recombinant terpene synthase. *Phytochemistry*, 65: 1223 - 1229.
- Park S K, Noble A C. 1993. Monoterpenes and monoterpene glycosides in wine aromas. *American Chemical Society Series*, 536: 98 - 109.
- Villena M A, Pérez J D, Úbeda J F, Navascués E, Briones A I. 2006. A rapid method for quantifying aroma precursors: Application to grape extract, musts and wines made from several varieties. *Food Chemistry*, 99 (1): 183 - 190.
- Wu Y, Pan Q H, Qu W J, Duan C Q. 2009. Comparison of volatile profiles of nine litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) cultivars from Southern China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (20): 9676 - 9681.
- Zhang M X, Pan Q H, Yan G L, Duan C Q. 2011. Using headspace solid phase micro-extraction for analysis of aromatic compounds during alcoholic fermentation of red wine. *Food Chemistry*, 125 (2): 743 - 749.