

葡萄果实降异戊二烯类物质合成调控研究进展

孟楠, 刘斌, 潘秋红*

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

摘要: 降异戊二烯类物质是构成葡萄果实香气的重要组分, 其极低的感官阈值和怡人的花果香味, 对葡萄及葡萄酒香气品质具有重要的贡献。综述了葡萄果实中主要降异戊二烯类物质的种类、香气特点、生物合成途径及关键酶、生物合成的影响因素等方面的研究进展, 并提出关键酶的调节及相关转录因子、栽培措施的影响等是今后主要的研究方向。

关键词: 葡萄; 果实; 降异戊二烯; 合成; 调控

中图分类号: S 663.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2015) 09-1673-10

Research Advance on Biosynthesis and Regulation of Norisoprenoids in Grape Berry

MENG Nan, LIU Bin, and PAN Qiu-hong*

(Center for Viticulture and Enology, College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Norisoprenoids are the main components constituting grape varietal aroma. Norisoprenoid compounds make a great contribution to aroma quality of grapes and wines owing to their extremely low perception threshold and pleasant floral fruit characteristics. The present paper summarized the composition of norisoprenoids in grape berries, the representative aroma attribute, the norisoprenoid biosynthesis pathway and the involving key enzymes, as well as the factors affecting norisoprenoid accumulation. The future research focuses in this field are considered on the regulation of key enzymes, transcription factors, the effect of cultivation measures and so on.

Key words: grape; berry; norisoprenoid; biosynthesis; regulation

香气是衡量葡萄及葡萄酒品质的重要指标, 直接影响消费者的认可程度。优质的香气使产品具有馥郁、稀有、独特的品质特性。葡萄果实中的香气物质主要为源于脂肪酸的 C6/C9 化合物, 源于异戊二烯的萜烯类和降异戊二烯类化合物, 以及源于氨基酸的芳香族类和甲氧基吡嗪等, 这些物质的感官作用不仅受其浓度和类型的影响, 还与其感官阈值有密切关系 (Mendes-Pinto, 2009)。由于感官阈值的差异, 一些含量低至 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 的物质对香气表现却具有重要贡献, 一些含量高达 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的物质对香气表现的贡献却可忽略不计。降异戊二烯类物质 (Norisoprenoids) 虽然在葡萄果实中含量较低 (几微克至几十微克每升), 并且多以无味的不具挥发性的糖苷结合态形式存在, 具有挥发性

收稿日期: 2015-05-25; **修回日期:** 2015-08-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31272118, 31471814)

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

的游离态所占比例较小, 但该类物质阈值极低, 结合态还可在发酵过程中被酶促或酸解释放出游离态物质而呈现特定香气 (Williams et al., 1992), 因此被认为对葡萄酒特征香气起着举足轻重的作用。

萜烯类和降异戊二烯类物质主要呈现花、果香气。其中游离态萜烯总量被用作葡萄香型的依据, 通常含量在 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上被定义为麝香型, $1 \sim 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为非麝香芳香型, 低于 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为非芳香型 (Mateo & Jiménez, 2000)。在麝香型及非麝香芳香型的葡萄及葡萄酒中, 降异戊二烯类物质对香气的贡献远远小于萜烯; 而在非芳香型葡萄及葡萄酒中, 萜烯含量通常不及其感官阈值, 多以糖苷结合态形式存在, 降异戊二烯类物质的含量却远高于阈值。常见的欧亚种酿酒葡萄 (*Vitis vinifera* L.), 如赤霞珠 (Cabernet Sauvignon)、美乐 (Merlot)、西拉 (Syrah)、霞多丽 (Chardonnay) 等都属于非芳香型品种 (Mateo & Jiménez, 2000), 在这些品种中, 降异戊二烯是其葡萄酒香气的主要贡献者之一。降异戊二烯类物质的种类较多, 生物合成途径比较复杂, 目前对葡萄果实中降异戊二烯合成与调控机理的认识仍然十分有限。因此研究降异戊二烯类物质对了解非芳香型葡萄及葡萄酒的香气特征尤为重要。近年来, 随着仪器分析技术以及转录组学、代谢组学研究技术的发展, 对葡萄果实降异戊二烯类香气物质的生物合成与调控的研究取得了一些重要突破, 本文中对此进行综述, 以期为该领域的研究提供参考。

1 葡萄果实中主要的降异戊二烯类香气物质

1.1 主要降异戊二烯类物质的种类及其存在形式

类胡萝卜素是降异戊二烯类物质的前体物质, 类胡萝卜素分子具有高度共轭的双键结构, 经过降解反应产生具有羰基结构的 C9、C10、C11 和 C13 降异戊二烯类物质, 这类物质仍会保留前体物质类胡萝卜素分子的末端基团, 并具有挥发性及呈香性 (Mendes-Pinto, 2009)。在葡萄果实中, C9 降异戊二烯类物质有 TCH (2,2,6-三甲基环己酮; 2,2,6-trimethylcyclohexanone); C10 降异戊二烯类物质有 β -环柠檬醛、 β -环香叶醇等; C11 降异戊二烯类物质有 DHA (dihydroactinolide); C13 降异戊二烯类物质的种类最多, 如 β -大马士酮 (β -damascenone)、 β -紫罗兰酮 (β -ionone)、 α -紫罗兰酮 (α -ionone)、香叶基丙酮 (geranylacetone)、顺式茶螺烷 (cis-theaspirane)、反式茶螺烷 (trans-theaspirane) 等。朱保庆等 (2011) 从 ‘雷司令’ (*Vitis vinifera* ‘Riesling’) 果实中鉴定到 15 种降异戊二烯类物质。在这些降异戊二烯中, C13 型对葡萄果实的花香、果香的贡献最为重要 (Ferreira et al., 2008)。

降异戊二烯类物质在葡萄果实中主要以糖苷结合态的形式存在, 糖苷全部为单糖苷。糖苷结合态的降异戊二烯类物质不具有挥发性, 不能被酵母降解 (Mateo & Jiménez, 2000), 而在发酵过程中, 在糖苷酶或酸的作用下可发生水解反应, 形成具有香气的游离态的降异戊二烯类物质。糖苷结合态可以将香气物质很好地保留在葡萄果实中, 减少香气损失, 在葡萄酒酿造过程中再通过水解反应形成游离态物质进行香气的释放, 有利于香气的维持。

1.2 主要降异戊二烯类物质的香气特点

在葡萄果实中已经鉴定出来的降异戊二烯类物质有十几种, 其中研究最多的是 β -大马士酮、 β -紫罗兰酮和 TDN (1,1,6-三甲基-1,2-二氢萘; 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene), 其次是 TCH (2,2,6-三甲基环己酮; 2,2,6-trimethylcyclohexanone), Vitispirane 及雷司令缩醛 (riesling acetal) 等 (图 1)。

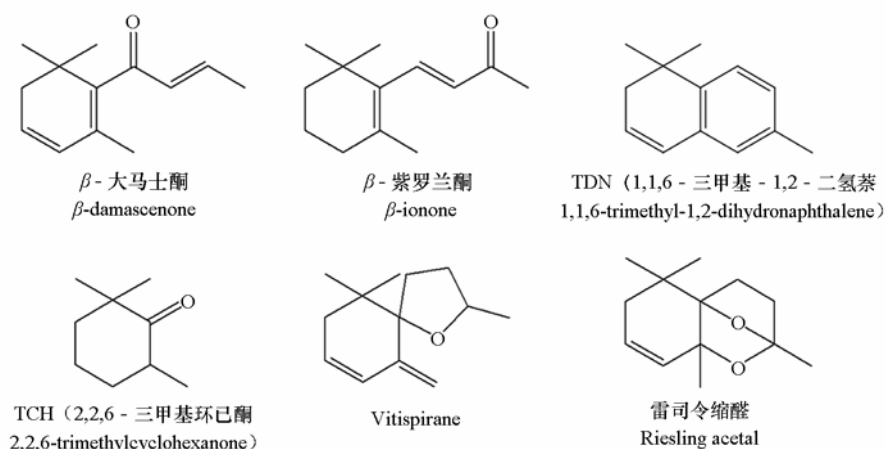


图1 葡萄果实中常见的降异戊二烯类化合物

Fig. 1 Common norisoprenoids in grape berry

β -大马士酮广泛存在于植物中,在葡萄及葡萄酒中均被鉴定出来,该物质呈现“熟苹果”或“柑橘”的香气。在水溶液中, β -大马士酮阈值极低,仅为 $2 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (Winterhalter, 1991);在模拟酒溶液中的阈值为 $50 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (Pineau et al., 2007),而 β -大马士酮在酒中的含量远高于阈值,尤其在红葡萄酒中可达到 $4000 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (Sabon et al., 2002)。

β -紫罗兰酮呈“紫罗兰/木本/覆盆子”的香气,在水中的阈值为 $7 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (Mendes-Pinto, 2009),在模拟酒溶液的阈值达到 $90 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (Falcão et al., 2007),在新葡萄酒中 β -紫罗兰酮的含量在 $0.3 \sim 1.4 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Ferreira & de Pinho, 2004)。在葡萄果实中, β -大马士酮和 β -紫罗兰酮的总量占C13降异戊二烯类物质总量的85%。

TDN是葡萄酒中被关注较多的一种物质,这种物质呈现“煤油/汽油”的气味,阈值为 $20 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 。通常情况下,葡萄酒中TDN含量低于阈值,但在“雷司令”葡萄及葡萄酒中TDN含量可达到 $200 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,赋予了该品种的典型香气特征。

TCH呈现“玫瑰花”的香气,只在波特酒中被鉴定出来,该物质在水溶液中的阈值为 $44.3 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,而在新酒中的含量只有 $50 \sim 400 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (de Freitas et al., 1999),在陈酒中的含量为 $2.7 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Ferreira & de Pinho, 2004),酒中TCH的含量远低于阈值,被认为对葡萄及葡萄酒的香气没有明显贡献 (Sacks et al., 2012)。

Vitispirane呈现“桉树/樟脑”的气味,最初阈值测定为 $800 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$;后经研究发现,Vitispirane分子有两个手性碳原子,因此存在4种立体构型。不同的非对应异构体呈现出不同的香气特征,(2R, 5R)和(2S, 5S)具有浓烈的花香和果香,而(2R, 5S)和(2S, 5R)具有泥土和木头的味道。在葡萄酒中,Vitispirane 4种对应异构体的总含量远低于 $800 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,各立体构型单独的阈值还没有被报道 (Eggers et al., 2006)。

雷司令缩醛是一种具有水果香气的物质,尚且没有阈值报道。

降异戊二烯类物质在葡萄酒中的含量会随陈酿发生变化, β -大马士酮和 β -紫罗兰酮的含量会随酒的成熟而降低,而超过40年的陈葡萄酒中的TDN、Vitispirane和TCH的含量分别比新酒高15倍、5倍和3倍 (Ferreira & de Pinho, 2004)。

1.3 葡萄果实发育过程降异戊二烯类物质的积累

降异戊二烯类物质在葡萄的花、叶及果实中均有分布。杨晓帆等(2014)发现,降异戊二烯物质在葡萄果实发育早期就有积累,在转色结束时达到高峰,而在成熟采收前其含量反而下降。

2 降异戊二烯类物质的生物合成

2.1 降异戊二烯类物质的合成路径

降异戊二烯类物质是由类胡萝卜素或含 40 个碳原子的萜类(terpenoids)经氧化裂解产生,其前体物质类胡萝卜素是由 8 个异戊二烯单位缩合而成的 C₄₀ 的四萜类色素。异戊二烯的合成来自于质体中的 MEP(2-C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸)途径。

如图 2 所示,糖代谢产生的丙酮酸及 3-磷酸甘油醛作为初始物质在多个酶的作用下生成 MEP,其依次在 2-C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸胞苷酰转移酶[4-(CDP)-2-C-methyl-D-erythritol synthase, CMS]、4-(5'-焦磷酸胞苷)-2-C-甲基-赤藓醇激酶(2-C-methyl-D-erythritol kinase, CMK)、2-C-甲基-赤藓醇-2,4-环焦磷酸合成酶(2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclo-PP synthase, MCS)、(E)-4-羟基-3-甲丁-2-烯基二磷酸合成酶(1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-PP synthase, HPS)的共同催化下生成 HMBPP[(E)-4-羟基-3-甲丁-2-烯基二磷酸],然后经由(E)-4-羟基-3-甲丁-2-烯基二磷酸还原酶(1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-PP reductase, HDR)催化 HMBPP 生成 IPP(异戊二烯焦磷酸)和 DMAPP(二甲基烯丙基焦磷酸),这也是 MEP 途径的最后一步(Okada et al., 2002; Dubey et al., 2003; Enfissi et al., 2005)。

MEP 途径中所产生的 IPP 不仅为萜烯类香气物质的合成,也为降异戊二烯衍生物的合成提供前体。一方面,IPP 和 DMAPP 可以通过异戊二烯焦磷酸异构酶(Isopentenyl diphosphate isomerase, IPI)进行相互转换(Dubey et al., 2003),1 分子 IPP 与 1 分子 DMAPP 被催化合成 GPP(牻牛儿基焦磷酸),GPP 在单萜合成酶(Monoterpene synthase)的作用下生成单萜类物质;GPP 与第 2 个 IPP 分子合成 FPP(法呢基焦磷酸),FPP 与第 3 个 IPP 分子反应生成 GGPP(牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸),GGPP 在二萜合成酶(Diterpene synthase)的作用下可生成二萜类物质。上述逐一增加 IPP 单元的聚合反应由烯丙基转移酶催化作用。另一方面,GGPP 在八氢番茄红素合成酶(Phytoene synthase, PSY)的作用下生成类胡萝卜素代谢途径中的第一种类胡萝卜素——八氢番茄红素(Gil et al., 2012)。八氢番茄红素在八氢番茄红素环化酶的作用下生成 β -胡萝卜素及 α -胡萝卜素两个分支,进而生成其他种类的类胡萝卜素。类胡萝卜素在类胡萝卜素裂解双加氧酶(Carotenoid cleavage dioxygenase, CCD)及 9-顺式环氧类胡萝卜素双加氧酶(9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, NCED)的催化下选择性断裂不同位置的双键,形成降异戊二烯类物质或脱落酸(ABA)。C₁₃ 降异戊二烯类物质是葡萄果实异戊二烯代谢途径中生成的含量最高的降异戊二烯类物质,从类胡萝卜素至 C₁₃ 降异戊二烯类物质主要分为三步。首先,氧化酶类将类胡萝卜素降解为 C₁₃ 降异戊二烯的醛酮化合物,然后在氧化酶或还原酶的作用下对分子结构进行调整,最后在糖基转移酶作用下分子结构进行糖基化,形成糖基化的 C₁₃ 降异戊二烯物质,即结合态。目前为止,这一系列过程还没有研究清楚,但第一步中氧化酶的相关研究与后两步相比,研究比较深入(Mendes-Pinto, 2009)。

降异戊二烯类物质对葡萄香气具有重要作用,因此对其代谢路径的研究逐渐受到关注。该路径的上游过程已经清晰,其中的关键酶基因已通过生物信息学方式筛选得到,部分基因已经得到试验验证,但类胡萝卜素生成降异戊二烯的下游过程仍有待研究(Young et al., 2012)。

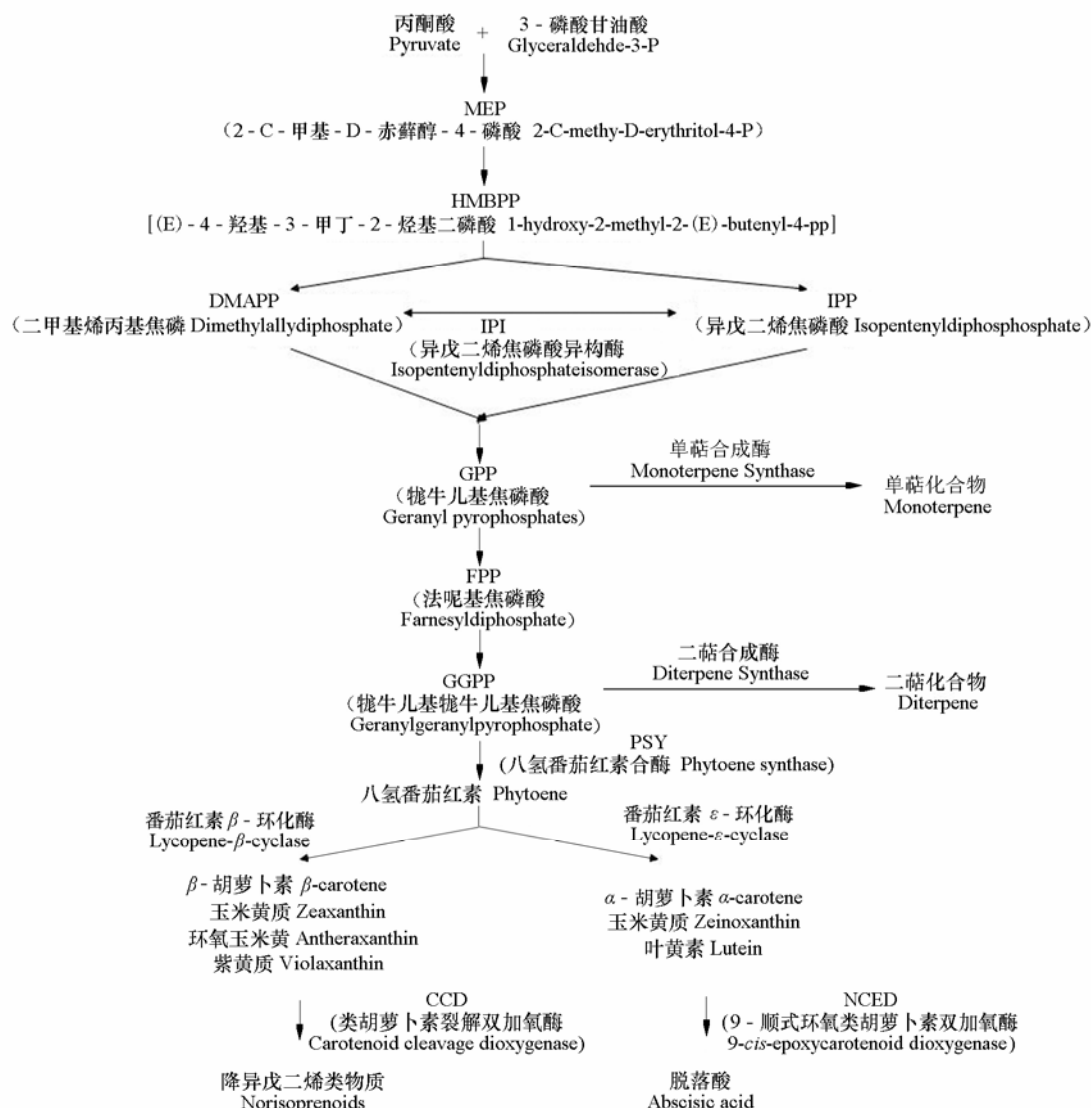


图2 葡萄果实中异戊二烯代谢的生物合成途径
Fig. 2 Metabolic pathway of norisoprenoids in grape berry

2.2 降异戊二烯类物质合成的关键酶基因

2.2.1 (E)-4-羟基-3-甲丁-2-烯基二磷酸还原酶 (HDR) 基因

HDR 是 MEP 途径中最末端的酶, 可以把 HMBPP 按照 5:1 的比例转化为 IPP 和 DMAPP (Zhang et al., 2008)。Cunningham 和 Gantt (2000) 已通过试验证实 HDR 是植物 MEP 代谢途径中的一个限速酶。HDR 的分布具有组织特异性, 在植物根中表达量低, 在叶、花梗、花苞中表达量高, 印证了 HDR 主要在叶绿体中合成并对色素细胞中类胡萝卜素代谢产生影响 (Huang et al., 2009)。HDR 与植物类胡萝卜素代谢关系密切且正相关。在番茄中, HDR 的表达随着果实的成熟度逐渐提高, 类胡萝卜素含量增加, 番茄颜色发生变化。在拟南芥幼苗中, 过表达 HDR 使叶绿体中的类胡萝卜素含量显著增加 (Botella-Pavía et al., 2004)。在葡萄基因组中, *VvHDR* (XP_002284659.1) 已经标注, 定位于 3 号染色体。Sweetman 等 (2012) 运用基因芯片技术及 RPKM (Reads Per Kilobase of exon per

Million mapped reads) 技术结合葡萄基因组测序结果对‘西拉’葡萄中 *VvHDR* 在绿果期、转色期前、转色期及成熟期的表达情况进行分析, 发现其表达量在转色期及成熟期出现上调。

2.2.2 八氢番茄红素合成酶 (PSY) 基因

PSY 是将牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸 (GGPP) 合成八氢番茄红素的关键酶。在拟南芥中, PSY 由一个单拷贝基因进行编码, 但是多数植物中, 如番茄 (Bartley et al., 1992; Bartley & Scolnik, 1993)、烟草 (Busch et al., 2002)、草 (Gallagher et al., 2004)、玉米 (Li et al., 2008)、木薯 (Arango et al., 2010) 中, PSY 基因家族包含 2 个或 3 个成员基因 (López-Emparán et al., 2014)。在葡萄果实基因组中已被报道的 PSY 基因家族成员基因有两个, 分别为 *VvPSY1* (GSVIVG01035255001) 和 *VvPSY2* (GSVIVG01020828001)。*VvPSY1* 已得到全长基因并进行体外酶活鉴定, 证实可催化合成八氢番茄红素, 但 *VvPSY2* 编码蛋白的生化功能尚未得到证实。Young 等 (2012) 还利用基因芯片技术对 *VvPSY1* 和 *VvPSY2* 在果实发育过程中表达量变化进行分析, *VvPSY1* 表达量呈下降趋势, 坐果时表达量是果实成熟期的 4~6 倍, *VvPSY2* 表达量在转色期达到最高。

2.2.3 类胡萝卜素裂解双加氧酶 (CCD) 基因

CCD 是催化类胡萝卜素走向降异戊二烯合成方向的关键入口酶, 它可以选择性催化类胡萝卜素分子的双键发生断裂。*CCD* 是一个有多成员的基因家族, 在拟南芥中已分离得到 4 个基因, *AtCCD1*、*AtCCD4*、*AtCCD7* 和 *AtCCD8* (Lashbrooke et al., 2013), 在葡萄果实中已克隆得到 *VvCCD1*、*VvCCD4a* 和 *VvCCD4b*, 通过生物软件还预测到 *VvCCD7* 和 *VvCCD8* 基因序列 (Young et al., 2012; Lashbrooke et al., 2013)。

VvCCD1、*VvCCD4a* 和 *VvCCD4b* 能够将类胡萝卜素催化降解生成 C9、C10、C11 和 C13 降异戊二烯类物质。*VvCCD1*、*VvCCD4a* 与 *VvCCD4b* 不仅作用于同一底物, 例如催化 ϵ -胡萝卜素 9, 10 (9', 10') 位双键断裂生成 α -紫罗兰酮, 催化番茄红素 5, 6 (5', 6') 位双键断裂生成 MHO (6-methyl-5-hepten-2-one), 还作用于不同的底物, *VvCCD4b* 可催化 ζ -胡萝卜素 9, 10 (9', 10') 位双键断裂生成牻牛儿基丙酮 (Meranylacetone), *VvCCD1* 可催化 β -胡萝卜素 9, 10 (9', 10') 位双键断裂生成 β -紫罗兰酮 (Lashbrooke et al., 2013)。根据上述酶作用位点的规律, Lashbrooke 等 (2013) 认为只有在作用位点相邻位置仍为双键时, CCD 才会将作用位点上的双键催化断裂, 这也与 Vogel 等 (2008) 的结论一致。*VvCCD1*、*VvCCD4a* 和 *VvCCD4b* 之间表达量的变化趋势也存在差异。在‘西拉’ (*Vitis vinifera* ‘Shiraz’) 和‘亚历山大麝香’葡萄 (*Vitis vinifera* ‘Muscat of Alexandria’) 中, *VvCCD1* 主要在叶和果实中表达, 从转色期前到转色期后一周, 表达量呈显著上升趋势, 在转色期后 2~5 周, 表达量略有下降, 但仍比转色期前表达量高 (Mathieu et al., 2005)。*VvCCD4a* 主要在叶中表达, *VvCCD4b* 主要在果实中进行表达, 二者均随果实发育而表达量增加, *VvCCD4b* 的增加尤为显著, 转色期和成熟期的表达量分别是绿果期的 256 倍和 315 倍, *VvCCD4a* 成熟期的表达量是绿果期的 13 倍 (Young et al., 2012; Lashbrooke et al., 2013)。

3 降异戊二烯类物质生物合成调控

3.1 转录水平调控

降异戊二烯类物质的合成在转录水平上主要受前体物质类胡萝卜素含量及 *CCD* 表达量的调控。对拟南芥的研究表明, 类胡萝卜素的合成与积累主要发生在幼苗时期, 此时, *PSY* 的表达量及酶活性均非常高 (Botella-Pavía et al., 2004), 可见类胡萝卜素的含量与 *PSY* 的表达呈正相关。同时, 该

研究证实类胡萝卜素的含量受异戊二烯代谢途径中关键酶的调控, *PSY* 的表达受转录因子的调控。在黑暗条件下, 拟南芥转录因子 *PIF1* 与 *PSY* 的启动子结合, 抑制 *PSY* 的表达, 但是 *PIF1* 对类胡萝卜素合成途径中的其它基因无影响 (Toledo-Ortiz et al., 2010)。因此, 类胡萝卜素的合成量减少, 导致降异戊二烯类物质生成量减少。*PSY* 同样受 *RAP2.2* 转录因子的调节。拟南芥中 *AtRAP2.2* 转录水平降低时, *PSY* 表达量也显著降低 (Hannoufa & Hossain, 2012)。本实验室从‘赤霞珠’葡萄果实中克隆到两条 *PIF* 全长基因, 生物信息学分析表明其分别位于 14 号和 12 号染色体, 蛋白二级结构具有螺旋—转角—螺旋 (HLH) 的 DNA 结合域。通过对 60 个‘赤霞珠’果实样品全基因表达谱进行网络相关性分析, 发现其中一条 *PIF* 与 *VvPSY* 表达有较强正相关 (0.695), 但是尚未有试验证据表明 *PIF* 参与了葡萄 *VvPSY* 的表达调节。迄今为止也没有从葡萄中克隆到 *RAP2.2* 的同源基因。

调控 *CCD* 基因表达的转录因子尚未发现。对葡萄异戊二烯代谢途径的研究表明, *CCD* 表达与脱落酸 ABA 合成关键酶 9-顺式环氧类胡萝卜素双加氧酶 (NCED) 基因的表达密切相关, 这两类酶均可将类胡萝卜素分解生成下游产物。ABA 在绿果期开始合成、积累, 含量逐渐升高, 在转色期开始时含量达到最大, 是绿果期的 5 倍, 随后含量下降, 成熟期的含量是转色期的 1/4 (Young et al., 2012)。降异戊二烯类物质的积累过程与之相似。研究 ABA 的合成与积累规律, 探讨降异戊二烯类物质在果实成熟后期含量下降的原因, 对理解降异戊二烯的合成与调控机理具有重要的意义。

3.2 环境因素调控

3.2.1 光照

光照影响葡萄果实中类胡萝卜素与降异戊二烯类物质的含量。充足的光照可以增加果实中 β -紫罗兰酮 (Song et al., 2015)、猕猴桃醇 (Actinidols) 和 Vitispirane 含量 (Marais, 2002)。在植物叶片中, 类胡萝卜素的含量与叶绿素的含量呈正相关, 光照可以促进叶绿素的生成, 有可能因此而影响类胡萝卜素的含量 (Lashbrooke et al., 2013), 从而间接影响降异戊二烯类物质的含量。

增加光照最有效的办法就是对葡萄植株进行摘叶处理。在气候较寒冷的种植区, 摘掉部分叶片可增加空气流通和光照, 减少病虫害, 会使果际微气候发生改变。Feng 等 (2015) 连续 3 年对‘黑比诺’葡萄进行了摘叶处理, 结果显示, 连续 3 年 100%摘叶处理的葡萄果实中结合态 β -大马士酮含量显著高于未经处理的对照; 3 年中有 2 年 100%摘叶处理的葡萄果实中游离态 β -大马士酮的含量高于对照。但是也有试验显示, 摘叶处理对 β -大马士酮的积累没有影响 (Lee et al., 2007)。

果穗曝光时间长短同样影响葡萄果实中降异戊二烯的含量, 在‘雷司令’葡萄坐果后 2、33 和 68 d 分别进行摘叶处理, 使葡萄接受更多阳光, 对照组不进行摘叶。结果显示, 33 d 时摘叶处理的果实中, TDN 含量是其他实验组及非摘叶组的 3 倍, 游离态和结合态 Vitispirane 的总量明显比非摘叶组高, 而其他实验组与非摘叶组相比没有明显变化 (Kwasniewski et al., 2010)。*‘芳蒂娜麝香’* 葡萄 (*Vitis vinifera* ‘Muscat of Frontignan’) 的遮光试验得到相似的结论, 从坐果期开始对果穗光照程度进行处理, 试验组分别设为全摘叶、果穗遮光 50%、果穗遮光 70%, 对照组为自然生长。结果显示, 果穗遮光 50%及 70%的葡萄果实中单萜及 C13 降异戊二烯类物质的含量低于全摘叶组及对照组 (Bureau et al., 2000)。因此, 增加果穗曝光, 有利于降异戊二烯类物质的积累。

3.2.2 土壤与水分

土壤持水及水分含量会影响类胡萝卜素的合成与代谢。持水力小的土壤中, 经过灌溉生长成熟的果实中类胡萝卜素的含量低于未经灌溉生长的, 但是在持水力大的土壤中生长的葡萄果实, 无论灌溉与否, 类胡萝卜素的含量无差异 (Oliveira et al., 2003)。这一现象反映出葡萄植株根系更倾向于较干燥的土壤环境, 与葡萄的生理需求符合 (Ristic et al., 2007)。

灌溉方式对葡萄果实中降异戊二烯类物质的含量会产生重要影响。对两块葡萄田用两种方式浇水,一种是每天对葡萄根系的一部分进行浇水,每7 d浇完一圈,中午时水量减少,早晨与傍晚水量正常(partial root zone drying, PRD);另一种正常浇水作为对照,两年重复试验结果显示,PRD处理的葡萄果实压榨成汁后,葡萄汁中水解为游离态的 β -大马士酮和TDN的含量连续两年高于对照处理, β -紫罗兰酮的含量在第2年高于对照。这种现象可能是由于果实水分缺失,导致果粒变小、表皮皱缩,使果粒的比表面积增加,降异戊二烯类物质的前体物质类胡萝卜素主要分布在果皮中,因此会出现葡萄汁中降异戊二烯类物质含量升高的现象(Bindon et al., 2007)。

降异戊二烯类物质合成与积累受环境因素影响的报道较少,而环境因素对其上游产物类胡萝卜素合成与积累影响的报道较多。因此通过了解环境因素对类胡萝卜素合成的影响,可间接推测环境因素对降异戊二烯类物质合成与积累的调控规律并进行研究。各环境因素对降异戊二烯类物质代谢的作用会互相影响,在实际栽培与试验中应综合考虑各方面因素的交互作用对结果进行判断。

4 总结与展望

近10年来,中国葡萄酒产业迅猛发展,年增长幅度均超过15%,但国产葡萄酒整体质量偏低。究其原因,受产地地理因素的影响,也受栽培管理模式的影响。中国葡萄与葡萄酒产区均为典型的大陆季风性气候,完全有别于世界葡萄与葡萄酒先进生产地区的地中海式或海洋性气候,而且自东向西不同产区之间差别也很大。但是中国的酿酒葡萄栽培管理长期引用了鲜食葡萄栽培技术或国外的经验,没有根据果实风味物质的产生规律采取与具体地区、气候相适应的栽培模式,导致酿酒葡萄普遍存在果香较弱、色泽不深、口感单薄等品质问题。降异戊二烯物质是葡萄酒香的主要来源,目前关于葡萄果实中降异戊二烯类物质的组成和含量已有很多报道,但对其生物合成与调控的研究才刚刚起步,许多问题尚待解析,如葡萄降异戊二烯代谢关键酶基因有哪些?调控基因表达的转录因子是什么?不同葡萄种或品种之间这些基因表达有何异同?气候因子及栽培管理等对基因表达和降异戊二烯类物质积累有何影响?探明这些问题,不仅有助于阐明葡萄果实降异戊二烯物质的积累机制,而且对于通过栽培学手段调控优质葡萄原料的生产有重要的指导作用,对提高中国酿酒葡萄质量将产生深远的、积极的影响和贡献。

References

- Arango J, Wüst F, Beyer P, Welsch R. 2010. Characterization of phytoene synthases from cassava and their involvement in abiotic stress-mediated responses. *Planta*, 232 (5): 1251 - 1262.
- Bartley G E, Scolnik P A. 1993. cDNA cloning, expression during development, and genome mapping of PSY2, a second tomato gene encoding phytoene synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 268 (34): 25718 - 25721.
- Bartley G E, Viitanen P V, Bacot K O, Scolnik P A. 1992. A tomato gene expressed during fruit ripening encodes an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 267 (8): 5036 - 5039.
- Bindon K A, Dry P R, Loveys B R. 2007. Influence of plant water status on the production of C13-norisoprenoid precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon grape berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (11): 4493 - 4500.
- Botella-Pavía P, Besumbes O, Phillips M A, Carretero-Paulet L, Boronat L, Rodríguez-Concepción M. 2004. Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: Evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *The Plant Journal*, 40 (2): 188 - 199.
- Bureau S M, Razungles A J, Baumes R L. 2000. The aroma of muscat of frontignan grapes: Effect of the light environment of vine or bunch on

- volatiles and glycoconjugates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (14): 2012 – 2020.
- Busch M, Seuter A, Hain R. 2002. Functional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology*, 128 (2): 439 – 453.
- Cunningham F X, Gantt E. 2000. Identification of multi-gene families encoding isopentenyl diphosphate isomerase in plants by heterologous complementation in *Escherichia coli*. *Plant and Cell Physiology*, 41 (1): 119 – 123.
- de Freitas V A P, Ramalho P S, Azevedo Z, Macedo A. 1999. Identification of some volatile descriptors of the rock-rose-like aroma of fortified red wines from Douro demarcated region. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (10): 4327 – 4331.
- Dubey V S, Bhalla R, Luthra R. 2003. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *Journal of Biosciences*, 28 (5): 637 – 646.
- Eggers N J, Bohna K, Dooley B. 2006. Determination of vitispirane in wines by stable isotope dilution assay. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57 (2): 226 – 232.
- Enfissi E, Fraser P D, Lois L M, Boronat A, Schuch W, Bramley P M. 2005. Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate – forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. *Plant Biotechnology Journal*, 3 (1): 17 – 27.
- Falcão L D, de Revel G, Perello M C, Moutsiou A, Zanús M C, Bordignon-Luiz M T. 2007. A survey of seasonal temperatures and vineyard altitude influences on 2-methoxy-3-isobutylpyrazine, C13-norisoprenoids, and the sensory profile of Brazilian Cabernet Sauvignon wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (9): 3605 – 3612.
- Feng H, Yuan F, Skinkis P A, Qiana M C. 2015. Influence of cluster zone leaf removal on Pinot noir grape chemical and volatile composition. *Food Chemistry*, 173: 414 – 423.
- Ferreira A C S, de Pinho P G. 2004. Nor-isoprenoids profile during port wine ageing—influence of some technological parameters. *Analytica Chimica Acta*, 513 (1): 169 – 176.
- Ferreira A C S, Monteiro J, Oliveira C, Guedes de Pinho P. 2008. Study of major aromatic compounds in port wines from carotenoid degradation. *Food Chemistry*, 110 (1): 83 – 87.
- Gallagher C E, Matthews P D, Li F, Wurtzel E T. 2004. Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses. *Plant Physiology*, 135 (3): 1776 – 1783.
- Gil M, Pontin M, Berli F, Bottini R, Piccoli P. 2012. Metabolism of terpenes in the response of grape (*Vitis vinifera* L.) leaf tissues to UV-B radiation. *Phytochemistry*, 77: 89 – 98.
- Hannoufa A, Hossain Z. 2012. Regulation of carotenoid accumulation in plants. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1 (3): 198 – 202.
- Huang J Z, Cheng T C, Wen P J, Hsieh M H, Chen F C. 2009. Molecular characterization of the *Oncidium* orchid HDR gene encoding 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase, the last step of the methylerythritol phosphate pathway. *Plant Cell Reports*, 28 (10): 1475 – 1486.
- Kwasniewski M T, Vanden Heuvel J E, Pan B S, Sacks G L. 2010. Timing of cluster light environment manipulation during grape development affects C13 norisoprenoid and carotenoid concentrations in Riesling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (11): 6841 – 6849.
- Lashbrooke J G, Young P R, Dockrall S J, Vasanth K, Viver M A. 2013. Functional characterisation of three members of the *Vitis vinifera* L. carotenoid cleavage dioxygenase gene family. *BMC Plant Biology*, 13 (1): 156 – 171.
- Lee S H, Seo M J, Riu M, Cotta J P, Block D E, Dokoozlin N K, Ebeler S E. 2007. Vine microclimate and norisoprenoid concentration in Cabernet Sauvignon grapes and wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58 (3): 291 – 301.
- Li F, Vallabhaneni R, Wurtzel E T. 2008. PSY3, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the Poaceae and regulator of abiotic stress-induced root carotenogenesis. *Plant Physiology*, 146 (3): 1333 – 1345.
- López-Emparán A, Quezada-Martínez D, Zúñiga-Bustos M, Cifuentes V, Iñiguez-Luy F, Federico M L. 2014. Functional analysis of the *Brassica napus* L. phytoene synthase (PSY) gene family. *PLoS ONE*, 9 (12): e114878.
- Marais J. 2002. The significance of 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene in the production of high quality Riesling wines. *ACS Symposium Series*, 802: 273 – 284.
- Mateo J J, Jiménez M. 2000. Monoterpenes in grape juice and wines. *Journal of Chromatography A*, 881 (1): 557 – 567.
- Mathieu S, Terrier N, Bigey F, Bigey F, Gunata Z. 2005. A carotenoid cleavage dioxygenase from *Vitis vinifera* L.: Functional characterization and expression during grape berry development in relation to C13-norisoprenoid accumulation. *Journal of Experimental Botany*, 56 (420): 2721 – 2731.

- Mendes-Pinto M M. 2009. Carotenoid breakdown products the norisoprenoids in wine aroma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 483 (2): 236 - 245.
- Okada K, Kawaide H, Kuzuyama T, Seto H, Curtis I S, Kamiya Y. 2002. Antisense and chemical suppression of the nonmevalonate pathway affects ent-kaurene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Planta*, 215 (2): 339 - 344.
- Oliveira C, Silva Ferreira A C, Mendes Pinto M, Hogg T, Alves F, Guedes de Pinho P. 2003. Carotenoid compounds in grapes and their relationship to plant water status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (20): 5967 - 5971.
- Pineau B, Barbe J C, Van Leeuwen C, Dubourdieu D. 2007. Which impact for β -damascenone on red wines aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (10): 4103 - 4108.
- Ristic R, Downey M O, Iland P G, Bindon K, Francis L, Herderich M A, Robinson S P. 2007. Exclusion of sunlight from Shiraz grapes alters wine colour, tannin and sensory properties. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 13 (2): 53 - 65.
- Sabon I, de Revel G, Kotseridis Y, Bertrand A. 2002. Determination of volatile compounds in Grenache wines in relation with different terroirs in the Rhone Valley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (22): 6341 - 6345.
- Sacks G L, Gates M J, Ferry F X, Lavin E H, Kurtz A J, Acree T E. 2012. Sensory threshold of 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) and concentrations in young Riesling and non-Riesling wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (12): 2998 - 3004.
- Song J, Smart R, Wang H, Damberg B, Sparrow A, Qian M C. 2015. Effect of grape bunch sunlight exposure and UV radiation on phenolics and volatile composition of *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir wine. *Food Chemistry*, 173: 424 - 431.
- Sweetman C, Wong C J D, Ford M C, Drew D P. 2012. Transcriptome analysis at four developmental stages of grape berry (*Vitis vinifera* cv. Shiraz) provides insights into regulated and coordinated gene expression. *BMC Genomics*, 13: 691 - 716.
- Toledo-Ortiz G, Huq E, Rodríguez-Concepción M. 2010. Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 (25): 11626 - 11631.
- Vogel J T, Tan B C, Mcarty D R, Klee H J. 2008. The carotenoid cleavage dioxygenase 1 enzyme has broad substrate specificity, cleaving multiple carotenoids at two different bond positions. *The Journal of Biological Chemistry*, 283: 11364 - 11373.
- Williams P J, Sefton M A, Francis I L. 1992. Glycosidic precursors of varietal grape and wine flavor. *ACS Symposium Series*, 490: 74 - 86.
- Winterhalter P. 1991. 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) formation in wine. Studies on the hydrolysis of 2,6,10,10-tetramethyl-1-oxaspiro [4.5] dec-6-ene-2,8-diol rationalizing the origin of TDN and related C13 norisoprenoids in Riesling wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39 (10): 1825 - 1829.
- Yang Xiao-fan, Gao Yuan, Han Mei-mei, Peng Zhen-xue, Pan Qiu-hong. 2014. Accumulation characteristics of volatile compounds in wine grape berries grown in high altitude regions of yunnan. *Scientia Agricultura Sinica*, 47 (12): 2405 - 2416. (in Chinese)
- 杨晓帆, 高媛, 韩梅梅, 彭振雪, 潘秋红. 2014. 云南高原区酿酒葡萄果实香气物质的积累规律. *中国农业科学*, 47 (12): 2405 - 2416.
- Young P R, Lashbrooke J G, Alexandersson E, Jacobson D, Moser C, Velasco R, Vivier M A. 2012. The genes and enzymes of the carotenoid metabolic pathway in *Vitis vinifera* L. *BMC Genomics*, 13 (1): 243 - 259.
- Zhang W, Wang Y, Lin J, Lu J, Sun X, Tang K. 2008. Transformation of *Ginkgo biloba* with 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase Gene. *Journal of Fudan University: Natural Science*, 5: 598 - 603.
- Zhu Bao-qing, Wen Ke-rui, Wang Jun, Duan Chang-qing. 2011. Identification of norsoprenoids from the developing berries of *Vitis vinifera* cv. Riesling by AMDIS. *Sino-Overseas Grapevine and Wine*, (6): 4 - 9. (in Chinese)
- 朱保庆, 温可睿, 王军, 段长青. 2011. 利用 AMDIS 技术解析雷司令果实发育过程中的降异戊二烯类香气物质. *中外葡萄与葡萄酒*, (6): 4 - 9.