

# 葡萄初级核心种质资源 *MybA* 基因型分析

孙磊, 焦健, 樊秀彩, 姜建福, 张颖, 刘崇怀

(中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009)

**摘要:** 探究 *MybA* 类基因在不同类型葡萄品种中的分布, 可为葡萄品种鉴定, 以及有色葡萄育种的亲本选择提供依据。本研究以欧亚种、欧美杂种、法美杂种、山欧杂种以及美洲种在内的 118 个葡萄初级核心种质为材料, 对其 *MybA* 基因型进行分析。结果表明: 欧亚种及其杂种普遍具有 *VvmybA1* 基因的等位基因 *VvmybA1a*, 仅 10 个欧亚种及其杂种品种中没有检测到 *VvmybA1a* 基因; 欧亚种、欧美杂种以及法美杂种中普遍同时具有 *VvmybA1*、*VvmybA2* 和 *VvmybA3* 基因, 仅少数品种未检测到 *VvmybA2* 或 *VvmybA3* 基因; 山欧杂种中北玫、公酿 1 号和熊岳白葡萄同时具有 *VvmybA1*、*VvmybA2* 和 *VvmybA3* 基因, 北醇和北红中仅检测到 *VvmybA1* 和 *VvmybA3* 基因; 仅在具有美洲种血缘的葡萄品种中检测到 *VlmybA2* 基因, 而 5 个认为是美洲种的品种未检测到 *VlmybA2* 基因, 且检测到了欧亚种特有的 *VvmybA1a* 等位基因, 推测它们为含美洲种血缘较多的欧美杂种, 而非纯美洲种。

**关键词:** 葡萄; 初级核心种质; *MybA* 基因; 基因型分析

## Genotyping *MybA* Genes in Primary Core Germplasm Resources of Grape

SUN Lei, JIAO Jian, FAN Xiu-cai, JIANG Jian-fu, ZHANG Ying, LIU Chong-huai

(Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009)

**Abstract:** The study of *MybA* genotypes in different grape cultivars can provide the basis for identification and classification of grape cultivars as well as selection of parents in colored grape breeding. The result of genotyping *MybA* in 118 primary core germplasm resources of grape showed that most *Vitis vinifera* cultivars and their hybrids had *VvmybA1a* which was an allele of *VvmybA1* gene, with the exception of 10 *Vitis vinifera* cultivars and their hybrids. *VvmybA1*, *VvmybA2* and *VvmybA3* genes were all detected in most *Vitis vinifera*, hybrids of *V. labrusca* and *V. Vinifera*, and hybrid wine grapes, except for a few grape cultivars with *VvmybA2* or *VvmybA3* undetected. Hybrids of *V. amurensis* and *V. vinifera*, Beimei, Xiongyuebai and Gongniangyihao had all *VvmybA1*, *VvmybA2* and *VvmybA3*, while Beichun and Beihong had only *VvmybA1* and *VvmybA3*. *VlmybA2* gene were only detected in some hybrids of *V. labrusca* and *V. vinifera*, and hybrid wine grapes. It was noteworthy that in five *Vitis labrusca* cultivars *VvmybA1a* (typical genotype of *V. vinifera*) but not *VlmybA2* was detected. We speculated that they were the hybrids of *V. labrusca* and *V. vinifera*, with more *V. labrusca* parentage, and they were not the pure *Vitis labrusca*.

**Key words:** grape; primary core collection; *MybA* gene; genotyping

葡萄果皮颜色丰富多彩, 与果皮中花色苷 (anthocyanin) 的种类和含量有着密切关系<sup>[1]</sup>。作为一类重要的植物色素, 花色苷通过类黄酮代谢途径合

成, 并需要一系列酶的催化。其中一种关键酶是糖基转移酶 (UFGT, Flavonoid 3-O-glucosyltransferase)<sup>[2]</sup>, 它催化不稳定的花色苷糖苷化形成各种

收稿日期: 2015-03-20 修回日期: 2015-04-23 网络出版日期: 2016-01-28

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20160128.1520.010.html>

基金项目: 国家自然科学基金(31372024); 国家葡萄产业技术体系(CARS-30); 中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ASTIP-2015-ZFTRI)

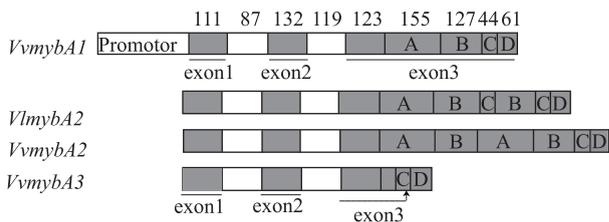
第一作者研究方向为葡萄种质资源。E-mail: slcaas@163.com

通信作者: 刘崇怀, 研究方向为葡萄种质资源。E-mail: liuchonghuai@caas.cn

类型的花色苷,使其稳定性大大增加<sup>[3]</sup>。糖基转移酶由 *UGFT* 基因编码,*UGFT* 基因的表达又受到 *MybA* 转录因子的调控<sup>[4]</sup>。

植物体中的 MYB 蛋白是与其生长发育和防御功能相关的一大类转录因子家族<sup>[5]</sup>。在葡萄中,*MybA* 是花色苷合成途径中的重要转录调节因子<sup>[6]</sup>,如欧美杂种品种巨峰(*Vitis labrusca-Vitis vinifera* ‘Kyoho’)的 *VlmybA1-1*,通过调节 *UGFT* 基因的表达来控制花色苷的生物合成<sup>[4]</sup>。将 *VlmybA1-1* 导入葡萄体细胞后,发现与花色苷合成相关的所有基因表达增强,花色苷含量增加<sup>[7]</sup>。欧亚种葡萄(*Vitis vinifera*)中,*VlmybA1-1* 的同源基因<sup>[8-9]</sup>,在其启动子区插入一个逆转录转座子 *Gret1*,突变产生了非功能性的 *VvmybA1a* 基因<sup>[8]</sup>。当葡萄 *VvmybA1a* 基因为纯合型时,葡萄果皮的花色苷合成将受阻,呈现白色或黄绿色<sup>[10]</sup>。

除了 *VvmybA1* 基因外,巨峰葡萄中的 *VlmybA2* 也能调控花色苷的生物合成<sup>[4]</sup>。欧亚种品种赤霞珠中发现序列与 *VvmybA1* 相似的 *VvmybA2* 基因,也具有调节花色苷生物合成的功能<sup>[11]</sup>。通过 QTL 定位发现,欧亚种葡萄 2 号染色体存在一个由 *VvmybA1*、*VvmybA2* 和 *VvmybA3* 基因组成的基因簇,其中 *VvmybA1* 和 *VvmybA2* 均能够调节花色苷的生物合成,但 *VvmybA3* 的相关功能还没有验证<sup>[12]</sup>。从结构上看,*VvmybA1*、*VvmybA2*、*VvmybA3* 和 *VlmybA2* 基因同源性较高,仅在第 3 个外显子区存在片段插入、缺失以及倒换的差异(图 1)。



数字代表对应序列片段的大小(bp);

相同字母代表相同的基因片段

Figures stand for the size of sequence(bp).

The same letter indicates the same gene fragment

图 1 *MybA* 相关基因的结构比对

Fig. 1 Comparison of *MybA*-related gene structure

葡萄属植物根据地理分布和生态特征可分为欧亚种群、北美种群和东亚种群。由于其分布和起源不同,使得 3 个种群的葡萄 *MybA* 基因的分布存在差异。*VvmybA1a* 普遍存在于欧亚种葡萄中,而在其他种群葡萄中未有发现<sup>[13]</sup>。同时,欧亚种及欧美杂

种的不同葡萄品种中 *VvmybA1* 基因型存在明显不同<sup>[14]</sup>。在东亚种群的中国野生葡萄中未检测到欧亚种葡萄特有的 *VvmybA1a*、*VvmybA2* 和 *VvmybA3* 基因<sup>[15-16]</sup>。山葡萄中仅检测到 *VvmybA1* 基因,并且山欧杂种品种中 *VvmybA* 基因型具有多样性<sup>[17]</sup>。

葡萄中 *MybA* 基因的差异不仅决定了其果皮颜色的有无,而且也能反映出葡萄的遗传背景差异。本试验对 118 份葡萄初级核心种质资源进行 *MybA* 基因型分析,并结合它们所属的种群和起源探讨 *MybA* 类基因在不同葡萄品种间的分布状况,以期对葡萄品种的起源与演化研究以及有色葡萄育种的亲本选择提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

材料取自中国农业科学院郑州果树研究所国家果树种质郑州葡萄圃,共 118 个葡萄品种,包括 59 个欧亚种品种、36 个欧美杂种品种、13 个法美杂种品种、5 个美洲种品种和 5 个山欧杂种品种(表 1)。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 DNA 提取** 采集葡萄幼嫩叶片,采用改良 CTAB 法<sup>[18]</sup>提取 DNA,提取好的 DNA 用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测,并用 Nanodrop 1000 微量紫外可见分光光度计检测质量及浓度,稀释到 40 ng/ $\mu$ L 放入  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**1.2.2 引物设计** 引物 F1/R1 用以扩增 *VvmybA1a*,其设计参考 A. Azuma 等<sup>[19]</sup>的方法并作了一定的改动。如图 2 所示,上游引物 F1 位点位于转座子 *Gret1* 区域,下游引物 R1 位点在 *VvmybA1* 保守区,F1/R1 扩增出的产物长 1560 bp。

根据 *VvmybA1*、*VvmybA2*、*VvmybA3* 和 *VlmybA2* 的序列特征,参照焦健等<sup>[20]</sup>的引物设计方法,设计 K/S 引物用来扩增这 4 条基因,其扩增的基因可根据片段长度进行区分,具体引物序列见表 2。

**1.2.3 不同材料 *MybA* 基因 PCR 扩增** 引物 F1/R1 的 PCR 反应体系为 20  $\mu$ L: 10  $\times$  Buffer 2.0  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTPs 1.6  $\mu$ L, 25 mmol/L 的  $\text{Mg}^{2+}$  1.2  $\mu$ L, DNA 模板 2.0  $\mu$ L, ExTaq 酶 (5 U/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L,上下游引物 (10 mmol/L) 各 1.0  $\mu$ L,双蒸水 11  $\mu$ L。PCR 反应条件:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,62  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 90 s,共 35 个循环;最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min,4  $^{\circ}\text{C}$  保存。扩增产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像仪上观察拍照。

表1 供试葡萄品种及PCR扩增结果

Table 1 Experimental samples and amplified result

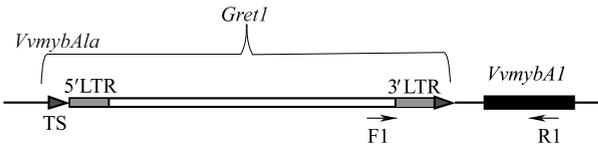
编号 Code	品种名 Cultivar	种 Species	果皮颜色 Skin color	<i>VvmybA1a</i>	<i>VvmybA1</i>	<i>VvmybA2</i>	<i>VvmybA3</i>	<i>VlmybA2</i>
1	白香蕉 Triumph	VL	黄 Yellow	+	+	+	+	-
2	脆红 Cuihong	VL	紫 Purple	+	+	+	+	-
3	地拉洼 1005 Delaware1005	VL	紫 Purple	+	+	+	+	-
4	地拉洼 0199 Delaware0199	VL	紫 Purple	+	+	+	+	-
5	翡翠玫瑰 Feicuimeigui	VL	黄绿 Yellow	+	+	+	+	-
6	峰后 Fenghou	VL	紫 Purple	+	+	+	+	-
7	高墨 Takasumi	VL	紫 Purple	+	+	+	+	+
8	高尾 Takao	VL	紫黑 Black	+	+	+	+	-
9	国宝 Kokuho	VL	紫黑 Black	+	+	+	+	+
10	黑奥林 Black Olimpia	VL	紫黑 Black	+	+	+	+	+
11	红富士 Benni fuji	VL	红 Red	+	+	+	+	-
12	红双味 Hongshuangwei	VL	紫 Purple	+	+	+	+	-
13	红伊豆 Beniizu	VL	红 Red	+	+	+	+	-
14	吉峰 Jifeng	VL	紫 Purple	+	+	+	+	-
15	京亚 Jingya	VL	紫黑 Black	+	+	+	+	+
16	京优 Jingyou	VL	黄 Yellow	+	+	+	+	+
17	井川 1060	VL	紫 Purple	+	+	+	+	-
18	巨峰 Kyoho	VL	紫黑 Black	+	+	+	+	+
19	巨鲸 Kyozei	VL	紫 Purple	+	+	+	+	-
20	康拜尔 Campbell	VL	紫黑 Black	+	+	+	+	-
21	玫瑰后 Rose Guen	VL	红 Red	+	+	+	+	-
22	蜜尔紫 Mills	VL	紫黑 Black	-	+	-	+	-
23	尼加拉 Nigara	VL	黄绿 Green	+	+	+	+	-
24	田野红 Tano Red	VL	红 Red	+	+	+	+	-
25	甜峰 Tianfeng	VL	紫黑 Black	+	+	+	+	+
26	先锋 Pione	VL	紫黑 Black	+	+	+	+	+
27	早巨选 Shimomura Kyoho seedling	VL	紫黑 Black	+	+	+	+	+
28	早康可 Zaokangke	VL	紫黑 Black	+	+	+	+	-
29	紫珍香 Zizhenxiang	VL	紫 Purple	+	+	+	+	-
30	中圃3号 Zhengpu 3#	VL	紫黑 Black	+	+	+	+	-
31	郑果2号 Zhengguo 2#	VL	紫黑 Black	+	+	+	+	+
32	40-1	VL	红 Red	+	+	+	+	-
33	S. 13053	VR	紫黑 Black	+	+	+	+	+
34	S. 2007	VR	紫黑 Black	+	+	+	+	+
35	S. 2653	VR	黄绿 Green	+	+	+	+	-
36	S. 4986	VR	黄绿 Green	+	+	+	+	-
37	S. 6059	VR	紫 Purple	+	+	+	+	+
38	S. 7053	VR	紫 Purple	+	+	+	+	+
39	S. 8746	VR	紫 Purple	-	+	+	+	-
40	S. V. 20-473	VR	黄绿 Green	+	+	+	+	-
41	gF. C43-31	VR	黄绿 Green	+	+	+	+	-
42	黑赛必尔 Seibel Noir	VR	紫黑 Black	+	+	+	+	-
43	凤凰 Phoenix	VR	黄绿 Green	+	+	+	+	-
44	波鲁克斯 Pollux	VR	黄绿 Green	+	+	+	+	-
45	巨摩光 Kamabikaki	VL	紫黑 Black	+	+	+	+	-
46	小黑粒 Clinton	VL	紫黑 Black	+	+	+	+	-
47	巴柯 Bacco Noir	VR	紫黑 Black	+	+	+	+	+
48	黑后 Black Queen	VL	紫黑 Black	-	+	+	-	-
49	酒神 Bacchus	VL	红 Red	+	+	+	+	-
50	阿尔其尔 Galbenade Ardeal	VV	黄绿 Green	+	+	+	+	-
51	阿里戈特 Aligote	VV	黄绿 Green	+	+	+	+	-
52	白斯兰卡 Slankamenka biela	VV	黄绿 Green	+	+	+	+	-
53	白玉霓 Ugni Blanc	VV	黄绿 Green	+	+	+	+	-
54	赤霞珠 Cabernet Sauvignon	VV	紫黑 Black	+	+	+	+	-
55	埃兰菲舍尔 Ehrenfelser	VV	黄绿 Green	+	+	+	+	-
56	贵人香 Italian Riesling	VV	黄绿 Green	-	+	+	+	-
57	黑多内 Khyndogny	VV	紫黑 Black	-	+	+	-	-
58	红玫瑰 Red Muscat	VV	红 Red	+	+	+	+	-
59	甲州 Kosyu	VV	黄绿 Green	+	+	+	+	-

表 1(续)

编号 Code	品种名 Cultivar	种 Species	果皮颜色 Skin color	<i>VvmybA1a</i>	<i>VvmybA1</i>	<i>VvmybA2</i>	<i>VvmybA3</i>	<i>VlmybA2</i>
60	灰比诺 Pinot Gris	VV	紫 Purple	+	+	+	+	-
61	琼瑶浆 Roter Traminer	VV	红 Red	+	+	+	+	-
62	桑娇维塞 Sangiovese	VV	紫黑 Black	+	+	+	+	-
63	品丽珠 Cabernet Franc	VV	紫黑 Black	+	+	+	+	-
64	麝香沙斯拉 Chasselas Musqué	VV	黄绿 Green	+	+	+	+	-
65	麝香葡萄 Myzkat	VV	黑紫 Black	+	+	+	+	-
66	蛇龙珠 Shelongzhu	VV	紫黑 Black	-	+	+	+	-
67	晚红蜜 Saperavi	VV	紫黑 Black	-	+	+	+	-
68	郁金香 Yujinxiang	VV	黄绿 Green	+	+	+	+	-
69	香槟康可 Константиновский	VV	红 Red	+	+	+	+	-
70	霞多丽(N14) Chardonnay	VV	黄绿 Green	+	+	+	+	-
71	87-1	VV	紫 Purple	+	+	+	+	-
72	阿米利亚 Amilia	VV	黄绿 Green	-	+	+	+	-
73	奥利文 Irsay oliver	VV	黄绿 Green	+	+	+	+	-
74	奥林匹亚 Olimpia	VV	黄 Yellow	+	+	+	+	-
75	白鸡心 Кировабалкий столовый	VV	黄 Yellow	+	+	+	+	-
76	保尔加尔 Bolgar	VV	黄绿 Green	+	+	+	+	-
77	粉红太妃 Тайфи розовый	VV	红 Red	+	+	+	+	-
78	芳香葡萄 Mathiasz Pipiske muskotaly	VV	黄绿 Green	+	+	+	+	-
79	凤凰 51 Fenghuang 51#	VV	紫 Purple	+	+	+	+	-
80	瑰宝 Guibao	VV	紫 Purple	+	+	+	+	-
81	红地球 Red Globe	VV	红 Red	+	+	+	+	-
82	红马拉加 Malaga Rose	VV	黄绿 Green	+	+	+	+	-
83	黄蜜斯 Huaangmisi	VV	紫 Purple	+	+	+	+	-
84	京秀 Jingxiu	VV	紫 Purple	+	+	+	+	-
85	玫瑰香 Muscat Hamburg	VV	紫 Purple	+	+	+	+	-
86	马奶 Manai	VV	黄 Yellow	+	+	+	+	-
87	木纳格 Munage	VV	黄绿 Green	+	+	+	+	-
88	马斯卡 Masika	VV	黄绿 Green	+	+	+	+	-
89	普列文玫瑰 Miskat plevenski	VV	紫黑 Black	+	+	+	+	-
90	葡萄园皇后 Queen of vineyard	VV	黄 Yellow	+	+	+	+	-
91	美人指 Manicure Finger	VV	红 Red	+	+	+	+	-
92	莎巴珍珠株选 Selection of Pearl of Csaba	VV	黄绿 Green	+	+	+	+	-
93	莎巴珍珠 Pearl of Csaba	VV	黄绿 Green	+	+	+	+	-
94	沈阳玫瑰 Shenyangmeigui	VV	紫红 Mauve	-	+	-	+	-
95	瑞比尔 AlpHonse Lavallée	VV	蓝黑 Black	-	+	+	+	-
96	洋葡萄 Yangputao	VV	红 Red	+	+	+	+	-
97	亚历山大 Muscat of Alexandria	VV	黄绿 Green	+	+	+	+	-
98	谢花红 Muscat Mathiasz Janosne	VV	红 Red	+	+	+	+	-
99	夏白 Xiabai	VV	黄 Yellow	+	+	+	+	-
100	意大利 Italia	VV	黄绿 Green	+	+	+	+	-
101	早玛瑙 Zaomanao	VV	紫 Purple	+	+	+	+	-
102	早甜玫瑰香 Zaotianmeiguixiang	VV	紫 Purple	+	+	+	+	-
103	郑州早玉 Zhengzhouzaoyu	VV	黄绿 Green	+	+	+	+	-
104	泽香 Zexiang	VV	黄 Yellow	+	+	+	+	-
105	紫鸡心 Zijixin	VV	紫 Purple	+	+	+	+	-
106	京早晶 Jingzaojing	VV	黄绿 Green	+	+	+	+	-
107	无核白 Thompson Seedless	VV	黄 Yellow	+	+	+	+	-
108	郑果大无核 Zhengguodawuhe	VV	黄绿 Green	+	+	+	+	-
109	北醇 Beichun	VA	紫黑 Black	+	+	-	+	-
110	北红 Beihong	VA	蓝黑 Black	+	+	-	+	-
111	北玫 Beimei	VA	紫黑 Black	+	+	+	+	-
112	公酿 1 号 Gongniang No. 1	VA	蓝黑 Black	+	+	+	+	-
113	熊岳白葡萄 Xiongyuebaiputao	VA	黄绿 Green	+	+	+	+	-
114	俄罗斯康可 Russia Concord	VNA	紫 Purple	+	+	+	+	-
115	香槟 Champion	VNA	蓝黑 Black	+	+	+	+	-
116	郑果 6 号 Zhengguo 6#	VNA	紫黑 Black	+	+	+	+	-
117	黑虎香 Heihuxiang	VNA	紫黑 Black	+	+	+	+	-
118	康可 Concord	VNA	紫黑 Black	+	+	+	+	-

VL: 欧美杂种; VR: 法美杂种; VV: 欧亚种; VA: 山欧杂种; VNA: 北美种群。‘+’、‘-’分别表示具有或不具有相应的基因组 DNA 片段

VL: Hybrids of *V. labrusca* and *V. Vinifera*, VR: America and france crossing, VV: *Vitis vinifera*, VA: Hybrids of *V. amurensis* and *V. vinifera*, VNA: North America species group. ‘+’, ‘-’ stand for the existence or inexistence of the corresponding genomic DNA fragments



F1:上游引物;R1:下游引物;Gret1:葡萄逆转录转座子;LTR:长末端重复;TS:复制的 *Gret1* 插入位点  
F1:Forward primer,R1:Reverse primer,Gret1:Grapevine retrotransposon1,LTR:Long terminal repeat,TS:Duplicated target site for the *Gret1* insertion

图2 *VvmybA1a* 基因结构图

Fig. 2 Structures of *VvmybA1a* allele

表2 所用引物序列及扩增片段大小

Table 2 Sequence of primers and amplicons sizes of fragments

编号 Code	序列(5'-3') Sequence	基因 Gene	扩增片段 大小(bp) Amplicons size
F1	AAAAAGGGGGCAATGTAGGGACCC	<i>VvmybA1a</i>	1560
R1	GAACCTCCTTTTGAAGTGGTGACT		
K	CTCGATGGAGAGCTTAGGAGTTAG	<i>VvmybA1</i>	959
S	TAAATCAGATCAAGTGATTTACTT	<i>VvmybA2</i>	1241
		<i>VvmybA3</i>	750
		<i>VlmybA2</i>	1130

引物 K/S 的 PCR 反应体系为 20  $\mu$ L:10  $\times$  Buffer 2.0  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTPs 1.6  $\mu$ L, 25 mmol/L 的  $Mg^{2+}$  1.2  $\mu$ L, DNA 模板 2.0  $\mu$ L, ExTaq 酶(5 U/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L, 上下游引物(10 mmol/L)各 1.0  $\mu$ L, 双蒸水 11  $\mu$ L。PCR 反应条件:94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,54  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 90 s,共 35 个循环;最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4  $^{\circ}$ C 保存。为提高电泳分辨率,扩增产物改用 8% 的聚丙烯酰胺(PAGE)凝胶电泳,银染显色后拍照。

**1.2.4 不同材料 *MybA* 基因克隆测序** 为了确保扩增产物的正确性,选择欧美杂种巨峰、法美杂种 S. 13053 和巴柯、欧亚种红玫瑰、美洲种香槟和俄罗斯康可以及山欧杂种北醇作为不同种群的代表品种,对其 *MybA* 基因进行克隆、测序以及序列比对分析。K/S 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后用天根 DNA 纯化试剂盒进行切胶回收,回收方法参照试剂盒说明书。按照 TakaRa 公司 pMD18-TVector 载体连接试剂盒说明书的方法对回收产物进行克隆测序。测得的序列通过 DNAMAN 软件与 NCBI 数据库中相关序列进行比对分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 葡萄品种中的 *VvmybA1a* 基因检测

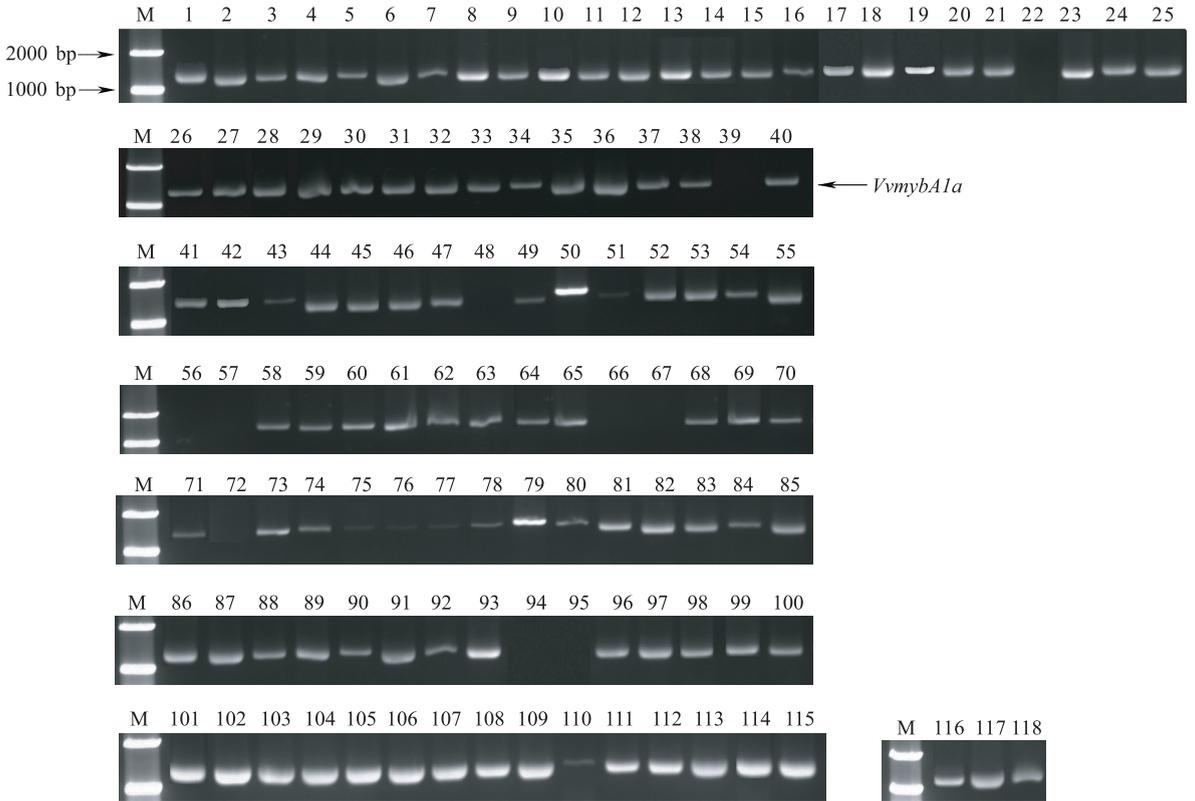
利用引物 F1/R1 检测 *VvmybA1a* 基因。经检测,118 份材料除了杂种品种蜜尔紫、S. 8746 和黑后,以及欧亚种品种贵人香、黑多内、蛇龙珠、晚红蜜、阿米利亚、沈阳玫瑰和瑞比尔以外,绝大多数含有 *VvmybA1a* 基因。在不含有 *VvmybA1a* 基因的品种中,除贵人香和阿米利亚为白色品种外,其余均为有色品种(图 3)。

### 2.2 葡萄品种的 *MybA* 基因型分析

以 118 个葡萄品种的 DNA 为模板,利用 K/S 引物进行 PCR 扩增,共检测出 *VvmybA1*、*VvmybA2*、*VvmybA3* 和 *VlmybA2* 4 个相关基因。结果表明,59 个欧亚种品种中均未检测出 *VlmybA2* 基因,欧亚种品种除沈阳玫瑰没有检测到 *VvmybA2* 基因,黑多内没有检测到 *VvmybA3* 基因外,其余均具有 *VvmybA1*、*VvmybA2* 和 *VvmybA3* 基因;36 个欧美杂种品种中除蜜尔紫没有检测到 *VvmybA2* 基因,黑后没有检测到 *VvmybA3* 基因外,其余品种也全部具有 *VvmybA1*、*VvmybA2* 和 *VvmybA3* 基因,并且在高墨、国宝、黑奥林、京亚、京优、巨峰、甜峰、先锋、早巨选和郑果 2 号等 10 个欧美杂种品种中检测到 *VlmybA2* 基因;13 个法美杂种中均具有 *VvmybA1*、*VvmybA2* 和 *VvmybA3* 基因,且在 S. 13053、S. 2007、S. 6059、S. 7053 和巴柯中检测出 *VlmybA2* 基因;5 个山欧杂种品种中也均未检测出 *VlmybA2* 基因,北醇和北红中仅检测到 *VvmybA1* 和 *VvmybA3* 基因,北玫、公酿 1 号和熊岳白葡萄具有 *VvmybA1*、*VvmybA2* 和 *VvmybA3* 基因;5 个美洲种品种中全部具有 *VvmybA1*、*VvmybA2* 和 *VvmybA3* 基因,但均未检测到 *VlmybA2* 基因(表 1)。

### 2.3 *MybA* 基因克隆测序

对欧美杂种巨峰、法美杂种 S. 13053 和巴柯、欧亚种红玫瑰、美洲种香槟和俄罗斯康可以及山欧杂种北醇等 7 份材料 K/S 引物的 PCR 产物进行克隆测序,测序结果与数据库中序列进行比对,结果表明,PCR 产物的电泳条带确定对应 *VvmybA1*、*VvmybA2*、*VvmybA3* 和 *VlmybA2* 基因,不同的品种之间仅个别位点或片段存在碱基差异。以 *VvmybA1* 基因编码区的测序结果为例,仅俄罗斯康可出现了 33 bp 的插入和 6 bp 的缺失,巴柯出现了 9 bp 的缺失,其余品种仅在个别碱基位点存在差异(图 4)。



M: DL2000 Marker; 1~118: 对应表 1 中的 118 个葡萄品种

M: DL2000 Marker, 1-118: The corresponding 118 grapevine cultivars listed in Table 1

图 3 118 个葡萄品种 F1/R1 引物 PCR 扩增产物条带特征

Fig. 3 Banding patterns of the PCR amplified products of 118 grapevine cultivars from F1/R1 primer pairs

### 3 讨论

在欧亚种葡萄的 2 号染色体上有 1 个由 *VmybA1*、*VmybA2* 和 *VmybA3* 基因组成的基因簇<sup>[12]</sup>。本试验中绝大多数品种同时具有 *VmybA1*、*VmybA2* 和 *VmybA3* 基因。欧亚种品种中,仅沈阳玫瑰没有检测到 *VmybA2* 基因,沈阳玫瑰是玫瑰香的芽变品种<sup>[21]</sup>,玫瑰香同时具有 *VmybA1*、*VmybA2* 和 *VmybA3* 基因,是芽变导致该位点发生突变,致使 *VmybA2* 没有检测出,还是另有原因,都有待进一步研究;仅黑多内未检测到 *VmybA3* 基因,其原因也有待进一步研究。在欧美杂种中,仅蜜尔紫未检测出 *VmybA2* 基因,黑后未检测出 *VmybA3* 基因,这种单个基因的缺失是杂交分离,还是基因突变的结果,其原因还不清楚。中国野生山葡萄中仅有 *VmybA1* 基因,没有 *VmybA2* 和 *VmybA3* 基因<sup>[17]</sup>。本研究的 5 个山欧杂种中北玫、公酿 1 号和熊岳白葡萄同时检测出 *VmybA1*、*VmybA2* 和 *VmybA3* 基因,北醇和北红中未检测出 *VmybA2* 基因,表明 *VmybA1*、*Vmy-*

*bA2* 和 *VmybA3* 基因可以通过杂交传给后代,杂交的过程中出现了基因分离,导致了部分品种缺失 *VmybA2* 基因。

*VlmybA2* 基因仅存在于部分美洲种及其杂种中<sup>[4,22]</sup>。本试验中仅在高墨、国宝、黑奥林、京亚、京优、巨峰、甜峰、先锋、早巨选和郑果 2 号等 10 个欧美杂种品种以及 S. 13053、S. 2007、S. 6059、S. 7053 和巴柯等 5 个法美杂种中检测到 *VlmybA2* 基因。在欧亚种及山欧杂种中均未检测到该基因,表明在不含有美洲种血缘的葡萄品种不具有 *VlmybA2* 基因。

*VmybA1* 基因具有 *VmybA1a*、*VmybA1b*、*VmybA1c*、*VlmybA1-3* 和 *VmybA1<sup>SUB</sup>* 等多种等位基因<sup>[23]</sup>。*VmybA1a* 是在 *VmybA1* 基因的编码区上游的启动子区插入了一个 10 kb 左右的逆转录转座子 *Gert1*, 使该基因表达受阻,功能丧失<sup>[8]</sup>。*VmybA1* 的原始序列可能是 *VmybA1c*,在 *VmybA1c* 启动子区域插入了 *Gert1* 就产生了 *VmybA1a*<sup>[8]</sup>。*VmybA1a* 中 *Gert1* 大部分序列缺失就形成了 *VmybA1b*<sup>[7]</sup>。*VmybA1<sup>SUB</sup>* 是在 *VmybA1c* 的启动子区存在 44 bp 和



图 4 *VvmybA1* 基因编码区测序结果比对

Fig. 4 The result of the *VvmybA1* gene coding region sequence alignment

111 bp 的插入,并且在第 3 个内含子区域也存在 33 bp 的插入<sup>[24]</sup>。*VlmybA1-3* 是仅在 *VvmybA1c* 的启动子区域插入了 44 bp 和 111 bp 片段<sup>[23]</sup>。这些等

位基因中除了 *VvmybA1a* 和 *VvmybA1<sup>SUB</sup>* 外,其余的都能正常表达并对 *UFGT* 基因进行调控。欧亚种及其杂种普遍具有 *VvmybA1a* 基因,并且白色品种为

*VvmybA1a* 的纯合型<sup>[8,10,25]</sup>。本研究中多数欧亚种及其杂种中检测到 *VvmybA1a* 基因,仅在欧亚种黑多内、蛇龙珠、晚红蜜、沈阳玫瑰和瑞比尔,欧美杂种蜜尔紫和黑后,法美杂种 S. 8746 等有色品种,以及欧亚种白色品种贵人香和阿米利亚中未检测到 *VvmybA1a* 基因。白色品种贵人香和阿米利亚中未检测到 *VvmybA1a* 基因,与 S. Kobayashi 等<sup>[8]</sup> 的结论不符。P. This 等<sup>[25]</sup> 的研究结果表明,葡萄的有色品种中都存在 1 条或 2 条 *VvmybA1* 基因的功能性等位基因,98% 的欧亚种白色品种为 *VvmybA1a* 基因的纯合型,在 84 个白色品种中,有 3 个品种未检测到 *VvmybA1a* 基因。这些未检测到 *VvmybA1a* 基因的白色品种中,花色苷合成受阻可能不是因为 *VvmybA1* 基因功能的丧失,而是其调控的 *UFGT* 等结构基因发生了突变,这种现象在玉米<sup>[26-28]</sup> 和拟南芥<sup>[29]</sup> 中已有报道。

香槟、郑果 6 号、黑虎香、康可和俄罗斯康可等 5 个葡萄品种中均具有 *VvmybA1*、*VvmybA2* 和 *VvmybA3* 基因,且全部检测到 *VvmybA1a* 等位基因,而均未检测出 *VvmybA2* 基因,说明其具有欧亚种的血缘,不是纯的野生美洲种。俄罗斯康可为雌能花,香槟、郑果 6 号、黑虎香和康可均为两性花。康可是从野生美洲种实生选种而来,其父本不详,长期认为是纯美洲种 (*Vitis labrusca*) 品种,但其具有两性花特性,与美洲种雌雄异株的特性不符,通过基因组分析发现康可中大约具有 1/3 的欧亚种血缘<sup>[30]</sup>。香槟的父本是哈佛德 (Hartford),哈佛德是由伊沙贝拉 (Isabella) 与野生美洲种葡萄杂交产生,而伊沙贝拉是美洲种与欧亚种的杂交后代,所以香槟也不是纯正的美洲种葡萄 (<http://www.vivc.de>)。根据两性花性状推断,郑果六号和黑虎香也有欧亚种的血缘,也属于含美洲种血缘较多的欧美杂种。

果皮颜色是葡萄的重要外观品质和经济性状。通过对不同品种 *MybA* 基因型分析,对有色葡萄育种的亲本选择具有重要指导意义。黑比诺和赤霞珠的白色芽变品种都是由于功能性 *VvmybA1* 基因片段缺失导致<sup>[31-32]</sup>。A. Azuma 等<sup>[10]</sup> 将 2 个 *VvmybA1* 基因杂合的红色品种进行杂交,后代中红果株系与白果株系比例为 3:1,符合孟德尔分离定律。本研究中,多数有色品种具有 *VvmybA1a* 基因,其 *VvmybA1* 基因型为 *VvmybA1a* 等位基因与功能性 *VvmybA1* 等位基因的杂合型,这些品种与其他品种的杂交后代中会出现白果株系。未检测出 *VvmybA1a* 基因的有色品种蜜尔紫、S. 8746、黑后、黑多内、蛇龙珠、晚红

蜜、沈阳玫瑰和瑞比尔等,推测为功能性 *VvmybA1* 基因纯合体,或功能性 *VvmybA1* 基因与 *VvmybA1<sup>SUB</sup>* 基因的杂合体,具体的基因型可参考 A. Azuma 等<sup>[23]</sup> 的方法进一步确定。从理论上讲,如果为功能性 *VvmybA1* 基因的纯合体,它们与其他品种的杂交后代应该均有有色。这个推测还需要在育种实践中进一步证明。

#### 参考文献

- [1] Sparvoli F, Martin C, Scienza A, et al. Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.) [J]. *Plant Mol Biol*, 1994, 24(5):743-755
- [2] Boss P K, Davies C, Robinson S P. Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes [J]. *Plant Mol Biol*, 1996, 32(3):565-569
- [3] 王军, 于森. 葡萄次生代谢 UDP-糖基转移酶研究进展 [J]. *园艺学报*, 2010, 37(1):141-150
- [4] Kobayashi S, Ishimaru M, Hiraoka K, et al. Myb-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis [J]. *Planta*, 2002, 215:924-933
- [5] Xie D Y, Sharma S B, Wright E, et al. Metabolic engineering of proanthocyanidins through co-expression of anthocyanidin reductase and the P1 MYB transcription factor [J]. *Plant J*, 2006, 45(6):895-907
- [6] Pelsy F. Molecular and cellular mechanisms of diversity within grapevine varieties [J]. *Heredity* (Edinb), 2010, 104:331-340
- [7] Kobayashi S, Goto-Yamamoto N, Hirochika H. Association of *VvmybA1* gene expression with anthocyanin production in grape (*Vitis vinifera*) skin-color mutants [J]. *J Jpn Soc Hortic Sci*, 2005, 74:196-203
- [8] Kobayashi S, Goto-Yamamoto N, Hirochika H. Retrotransposon-induced mutations in grape skin color [J]. *Science*, 2004, 304:982
- [9] Jeong S T, Goto-Yamamoto N, Kobayashi S, et al. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins [J]. *Plant Sci*, 2004, 167(2):247-252
- [10] Azuma A, Kobayashi S, Yakushiji H, et al. *VvmybA1* genotype determines grape skin color [J]. *Vitis*, 2007, 46:154-155
- [11] Walker A R, Lee E, Bogs J, et al. White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes [J]. *Plant J*, 2007, 49(5):772-785
- [12] Fournier-Level A, Lacombe T, Le Cunff L, et al. Evolution of the *VvMybA* gene family, the major determinant of berry colour in cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.) [J]. *Heredity*, 2009, 104(4):351-362
- [13] Mitani N, Azuma A, Fukai E, et al. A retrotransposon-inserted *VvmybA1a* allele has been spread among cultivars of *Vitis vinifera* but not North American or East Asian *Vitis* species [J]. *Vitis*, 2009, 48(1):55-56
- [14] 慕茜, 吴伟民, 房经贵, 等. 不同葡萄品种的 *VvmybA1* 基因型及其特征性 DNA 片段的序列分析 [J]. *园艺学报*, 2011, 38(11):2075-2084
- [15] 焦健, 刘崇怀, 樊秀彩, 等. 中国野生种葡萄及种间杂种 *VvmybA1* 基因型和表达分析 [J]. *中国农业科学*, 2013, 46(12):2514-2525
- [16] Jiao J, Fu X, Liu C, et al. Study of the relationship between the cultivars of *Vitis vinifera* and the white-fruited and hermaphrodite Chinese wild grapes [J]. *Mol Breed*, 2014, 34(3):1401-1411
- [17] 付晓伟, 焦健, 刘崇怀, 等. 山葡萄及其杂种 *Myb* 相关基因的

- 基因型及 *VvmybA1* 片段的分析 [J]. 果树学报, 2014 (3): 353-361
- [18] 王玉娟, 张彦, 房经费, 等. 利用基于 RAPD 标记的 MCID 法快速鉴定 72 个葡萄品种 [J]. 中国农业科学, 2012, 45 (14): 2913-2922
- [19] Azuma A, Kobayashi S, Goto-Yamamoto N, et al. Color recovery in berries of grape (*Vitis vinifera* L.) 'Benitaka', a bud sport of 'Italia', is caused by a novel allele at the *VvmybA1* locus [J]. Plant Sci, 2009, 176 (4): 470-478
- [20] 焦健, 刘崇怀, 樊秀彩, 等. 中国野生种葡萄 *mybA* 转录因子 SNP 特征分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14 (5): 885-891
- [21] 孔庆山. 中国葡萄志 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2004: 88
- [22] Azuma A, Udo Y, Sato A, et al. Haplotype composition at the color locus is a major genetic determinant of skin color variation in *Vitis × labruscana* grapes [J]. Theor Appl Genet, 2011, 122 (7): 1427-1438
- [23] Azuma A, Kobayashi S, Mitani N, et al. Genomic and genetic analysis of Myb-related genes that regulate anthocyanin biosynthesis in grape berry skin [J]. Theor Appl Genet, 2008, 117 (6): 1009-1019
- [24] Lijavetzky D, Ruiz-García L, Cabezas J A, et al. Molecular genetics of berry colour variation in table grape [J]. Mol Genet Genom, 2006, 276 (5): 427-435
- [25] This P, Lacombe T, Cadle-Davidson M, et al. Wine grape (*Vitis vinifera* L.) color associates with allelic variation in the domestication gene *VvmybA1* [J]. Theor Appl Genet, 2007, 114 (4): 723-730
- [26] Bodeau J P, Walbot V. Regulated transcription of the maize Bronze-2 promoter in electroporated protoplasts requires the *Cl* and *R* gene products [J]. Mol General Genet, 1992, 233 (3): 379-387
- [27] Marrs K A, Alfenito M R, Lloyd A M, et al. A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2* [J]. Nature, 1995, 375: 397-400
- [28] Goodman C D, Casati P, Walbot V. A multidrug resistance-associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays* [J]. Plant Cell Online, 2004, 16 (7): 1812-1826
- [29] Zhang F, Gonzalez A, Zhao M, et al. A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of *Arabidopsis* [J]. Development, 2003, 130 (20): 4859-4869
- [30] Sawler J, Reisch B, Aradhya M K, et al. Genomics assisted ancestry deconvolution in grape [J]. PLoS ONE, 2013, 8 (11): e80791
- [31] Yakushiji H, Kobayashi S, Goto-Yamamoto N, et al. A skin color mutation of grapevine, from black-skinned Pinot Noir to white-skinned Pinot Blanc, is caused by deletion of the functional *VvmybA1* allele [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2006, 70 (6): 1506-1508
- [32] Walker A R, Lee E, Robinson S P. 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 [J]. Plant Mol Biol, 2006, 62 (4-5): 623-635