

文章编号: 1674-7054(2013)03-0251-06

# 避雨栽培对酿酒葡萄有机酸的影响

刘蕊, 高茜, 段长青, 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:** 利用反相高效液相色谱技术, 对同一地区露地和避雨栽培下‘赤霞珠’和‘霞多丽’葡萄果实中4种有机酸含量进行了比较, 同时利用 Real-time PCR 分析了葡萄果实中酒石酸合成关键酶——艾杜糖酸脱氢酶基因(*L-VldnDH*)表达差异。结果表明: 避雨栽培显著提高了发育中的‘赤霞珠’果实酒石酸、苹果酸和草酸含量, 但在采收期2种栽培方式下的果实中有机酸含量无显著差异; 避雨栽培对‘霞多丽’果实发育过程4种有机酸积累无明显影响; 避雨栽培显著上调了幼果期‘赤霞珠’果实中 *L-VldnDH* 基因的表达, 并在发育中后期保持较高转录本。这可能是导致该品种果实避雨栽培下酒石酸积累较多的主要原因。

**关键词:** 避雨栽培; 有机酸; 酿酒葡萄

中图分类号: S 663.1

文献标志码: A

葡萄果实中的有机酸主要有苹果酸、酒石酸和柠檬酸, 还有少量的草酸、琥珀酸等<sup>[1]</sup>, 其含量是决定葡萄果实风味品质的重要因素之一。果实味感取决于甜味、酸味和苦味之间的平衡, 味感质量则取决于不同味感之间的和谐程度。有机酸是葡萄果实的重要味感物质之一, 对葡萄酒稳定性和感官品质均起着重要作用<sup>[2]</sup>。在葡萄果实中酒石酸含量仅次于苹果酸, 它不仅决定葡萄酒的 pH, 而且为葡萄酒提供骨架物质<sup>[3]</sup>, 参与葡萄酒味感平衡, 进而影响葡萄酒微生物和物化稳定性以及颜色稳定性。此外, 它还影响葡萄酒的陈酿潜力<sup>[2, 4, 5]</sup>。酿酒葡萄风味品质一方面取决于品种或品系的基因型(内因), 另一方面与葡萄生长环境(外因)密切相关<sup>[6]</sup>。在葡萄果实中, 草酸和酒石酸生物合成具有相同的上游途径, 它们均来自抗坏血酸<sup>[3]</sup>, 而苹果酸和柠檬酸则来自三羧酸循环<sup>[2]</sup>, 环境条件通过调控上游基因的表达, 从而影响代谢产物的积累, 最终影响葡萄果实中有机酸的组成和含量。葡萄避雨栽培技术是将薄膜覆盖在树冠顶部以躲避雨水, 阻断发病因子, 防病健树, 保护葡萄, 提高葡萄品质和扩大栽培区域的一种方法。避雨栽培技术的推广, 有效地减轻了葡萄黑痘病、炭疽病、灰霉病、白腐病、霜霉病等的发生<sup>[7]</sup>, 降低了农药的使用量, 减少了人工成本。同时, 避雨栽培也改变了叶幕微气候, 如光照、水分、湿度等, 进而对葡萄品质产生影响。笔者以我国常见的酿酒葡萄品种‘赤霞珠’和‘霞多丽’为试材, 分析了避雨栽培对酿酒葡萄发育期有机酸含量的影响, 以为该技术在酿酒葡萄生产中的推广应用提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 以2010年山东蓬莱香格里拉葡萄酒有限公司酿酒葡萄基地的避雨栽培和露地栽培的‘赤霞珠’(*Vitis vinifera* ‘Cabernet Sauvignon’)和‘霞多丽’(*V. vinifera* ‘Chardonnay’)为试验材料。花后2周(2010-06-28)开始在树顶搭塑料大棚避雨, 花后2周开始取样, 间隔1或2周取样1次, 直至葡萄果实

收稿日期: 2013-05-12

基金项目: 国家大学生科研创新项目和国家葡萄产业技术体系专项(CARS-30)

作者简介: 刘蕊(1991-) 陕西富平人, 中国农业大学食品科学与营养工程学院2013级硕士研究生。

通信作者: 潘秋红(1966-) 教授, 博士, 研究方向: 葡萄与葡萄酒化学。E-mail: panqh@cau.edu.cn

完全成熟(‘赤霞珠’为花后 21 周,‘霞多丽’为花后 19 周)。以同一葡萄园露地栽培的同品种葡萄为对照,在整个试验过程,棚内、外采用完全一致的栽培管理模式。每次采样时间固定在上 10:00~11:00,采样时消除边际效应,周边 5 行和行端 7 m 不取,兼顾阴阳面、叶幕层内外和上中下果穗,以及每穗葡萄肩、中、顶部,分散随机采取葡萄果实。所有样品经液氮速冻后,−80 °C 冰箱中保存,用干冰保护运回北京。

1.2 试剂与仪器 标样草酸(Oxalic acid)、酒石酸(Tartaric acid)、苹果酸(Malic acid)、柠檬酸(Citric acid)、抗坏血酸(Ascorbic acid),纯度均高于 99.5%(美国 Sigma 公司);甲醇、磷酸为色谱纯(美国 Tedia 公司);磷酸二氢钾为分析纯(国药集团化学试剂有限公司);DNase I(RNase free,日本 TaKaRa 公司);EZ-10 Spin Column RNA Purification Kit(加拿大 BioBasic 公司);RNA 用逆转录试剂盒(美国 Promega 公司);SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒(日本 TaKaRa 公司);实验用水为娃哈哈纯净水。7300 Real-time PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

1.3 果实有机酸提取 有机酸提取参考崔婧等的方法进行<sup>[8]</sup>,将葡萄样品破碎除籽除梗,液氮保护下研磨成粉状,准确称取 1.000 g 样品,加入含  $w = 0.8\%$  的  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸的蒸馏水 25 mL,25 °C 水浴中振荡浸提 10 min,然后 4 °C  $8\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 20 min,取上清液,用  $0.45 \mu\text{m}$  的水系滤膜过滤后用于反相高效液相色谱(RT-HPLC)分析。

1.4 RT-HPLC 色谱条件 采用美国 Agilent 1200 系列高效液相色谱仪 G1314C VWD 检测器进行分析,所用色谱柱为瑞典 Kromasil C-18 ( $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm} \ 5 \mu\text{m}$ ),保护柱为 Agilent C18,流动相为  $3\% \text{ CH}_3\text{OH} + 0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,pH2.8,流速  $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,柱温 25 °C,进样量  $10 \mu\text{L}$ ,检测波长 210 nm。

1.5 有机酸定性定量方法 将 5 种有机酸标准品配制成适合浓度的混合标准品,在上述色谱条件下进样,确定标准物质的保留时间。将葡萄提取液色谱图与标准品的有机酸色谱图进行对照,根据保留时间确定葡萄提取液中有有机酸种类,然后利用峰面积外标法进行定量。

1.6 葡萄果实总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 采用改进 CTAB 法<sup>[9]</sup>提取葡萄果实的总 RNA,用 DNase I 和 EZ-10 Spin Column RNA Purification Kit 除去 DNA。以总 RNA 为模板用逆转录试剂盒合成 cDNA,−80 °C 保存备用。

1.7 Real-time PCR 特异引物 选取 *VvUbiquitin 1* 作为葡萄果实基因表达的参比标准,这是因为 *VvUbiquitin 1* 编码 1 条 C 末端为核糖体 L40 的泛素延伸蛋白,其转录量远小于多聚泛素基因的转录量,并且在贯穿葡萄果实发育的整个过程中保持相对恒定<sup>[10]</sup>。分别设计用于 Real-time PCR 分析的 *L-VvIdnDH*(葡萄杜艾糖酸脱氢酶基因)和 *VvUbiquitin 1* 的特异性引物(见表 1)。以葡萄果实 cDNA 为模版,分别进行每对引物的 PCR 分析以检测扩增产物是否与理论值相符,接着分析每对引物的 Real-time PCR 溶解曲线,结果均得到了理想的单一峰型溶解曲线,其溶解温度均符合理论期望,这进一步证明了这些引物 Real-time PCR 扩增的特异性很好。

表 1 荧光定量 PCR 引物列表

Tab. 1 List of the primers used for Real-time PCR

引物名称 Primer	GenBank 序列号 Accession number	引物序列 Primer sequences	PCR 产物长度/bp PCR product length
<i>L-VvIdnDH</i>	XM_002269900	Forward: 5′-GTCCGGCTTCAACAAAACCAT-3′	193
		Reverse: 5′-TGCCACTCCTCAAAAACCTCA-3′	
<i>VvUbiquitin 1</i>	BN000705	Forward: 5′-GTGGTATTATTGAGCCATCCTT-3′	182
		Reverse: 5′-AACCTCCAATCCAGTCATCTAC-3′	

1.8 Real-time PCR 检测分析 用 7300 Real-time PCR 仪分析转录本丰度,所有试剂均来自 SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒。每个反应体系包括  $5 \mu\text{L}$  SYBR Green RT-PCR Master Mix,  $0.2 \mu\text{L}$  ROX Reference Dye ( $50 \times$ ),  $4.5 \mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O,  $1/6 \mu\text{L}$  cDNA,  $1/3 \mu\text{L}$  正反引物混合物( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。反应条件为:

95 ℃ 预变性 30 s; 95 ℃ 10 s 60 ℃ 31 s, 进行 40 个循环。

基因相对表达量分析采用  $2^{-\Delta Ct}$  法<sup>[10]</sup>,  $\Delta Ct = Ct(L-VvIdnDH) - Ct(VvUbiquitin 1)$ 。每份 RNA 重复检测 3 次。

## 2 结果与分析

2.1 葡萄果实中有机酸质量含量的比较 如图 1 所示, 酒石酸在‘赤霞珠’和‘霞多丽’葡萄果实中的质量含量较高, 整体呈下降趋势, 且下降最明显时期为转色期, 果实成熟过程中酒石酸的质量含量变化不明显。‘赤霞珠’葡萄果实整个发育过程中, 避雨棚内葡萄果实中酒石酸的质量含量均显著高于露地栽培的, 但在采收期, 它们之间的质量含量没有显著差异。‘霞多丽’葡萄果实发育过程中, 避雨栽培和露地栽培的果实酒石酸的质量含量差异不明显。

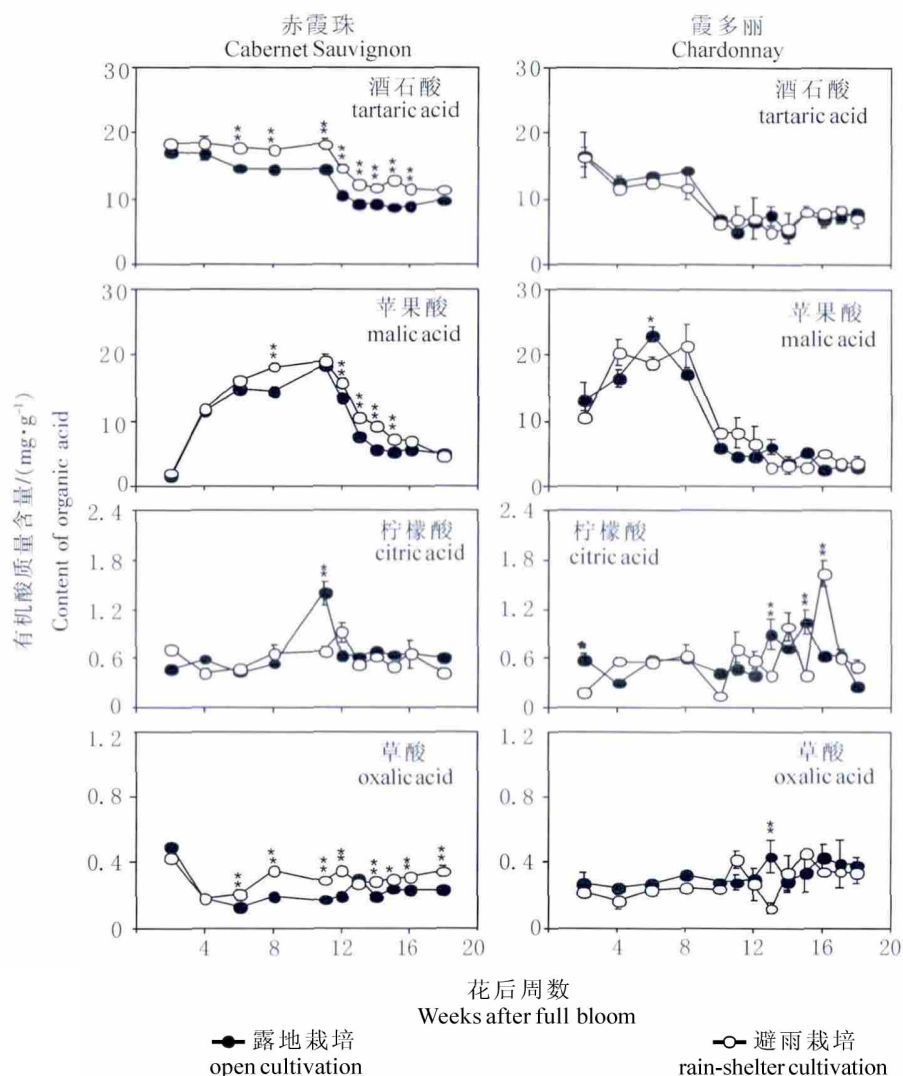


图 1 避雨和露地栽培的‘赤霞珠’和‘霞多丽’葡萄果实中 4 种主要有机酸质量含量的变化

\* 表示避雨栽培与露地栽培之间有机酸质量含量有显著差异 ( $P < 0.05$ ), \*\* 表示有极显著差异 ( $P < 0.01$ ); 下同  
Fig. 1 Contents of 4 organic acids in the berries of *Vitis vinifera* ‘Cabernet Sauvignon’ and *Vitis vinifera* ‘Chardonnay’ in rain-shelter cultivation and open cultivation

\* in the figure means the concentrations of organic acids had significant difference between rain-shelter cultivation and open cultivation ( $P < 0.05$ ); \*\* means the difference reached the high significance level ( $P < 0.01$ ). Similarly hereinafter

苹果酸在‘赤霞珠’和‘霞多丽’葡萄果实中的质量含量较高,且呈先上升后下降的趋势。‘赤霞珠’葡萄发育过程中,避雨棚内果实的苹果酸的质量含量略高于露地栽培的,但花后 18 周它们的质量含量趋于一致。‘霞多丽’葡萄中,避雨栽培和露地栽培果实苹果酸的质量含量有交替变化趋势,但差别不大。

柠檬酸在葡萄果实中的质量含量远低于前 2 种有机酸,随果实发育的质量含量呈波动式变化。在‘赤霞珠’中,采收期避雨栽培的葡萄果实柠檬酸的质量含量明显低于露地栽培的,而在‘霞多丽’2 种栽培方式下的果实柠檬酸的质量含量差别不大。

草酸在葡萄果实中的质量含量很低,小于  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,发育期均呈降低趋势。避雨棚内‘赤霞珠’果实整个发育过程中草酸的质量含量略高于露地栽培。‘霞多丽’葡萄果实中,它们之间的差异不明显。

2.2 葡萄果实中艾杜糖酸脱氢酶基因(*L-VvIdnDH*)的相对表达 酒石酸是酿酒葡萄果实重要的有机酸,也是含量较高的有机酸之一,考虑到酒石酸对葡萄酒品质的重要性,且 2 种栽培方式对果实发育过程中酒石酸质量含量有明显影响,酒石酸在葡萄酒发酵过程中不会被分解利用,因此,本研究分析了酒石酸合成途径关键基因——艾杜糖酸脱氢酶(*L-Idonate Dehydrogenase; L-IdnDH*) 基因的表达。如图 2 所示,葡萄果实 *L-VvIdnDH* 只在花后 5 周内丰富表达,随后表达量迅速下降并维持在一定水平,这表明酒石酸积累主要在花后 5 周内,这与前人的报道一致<sup>[3,11]</sup>。

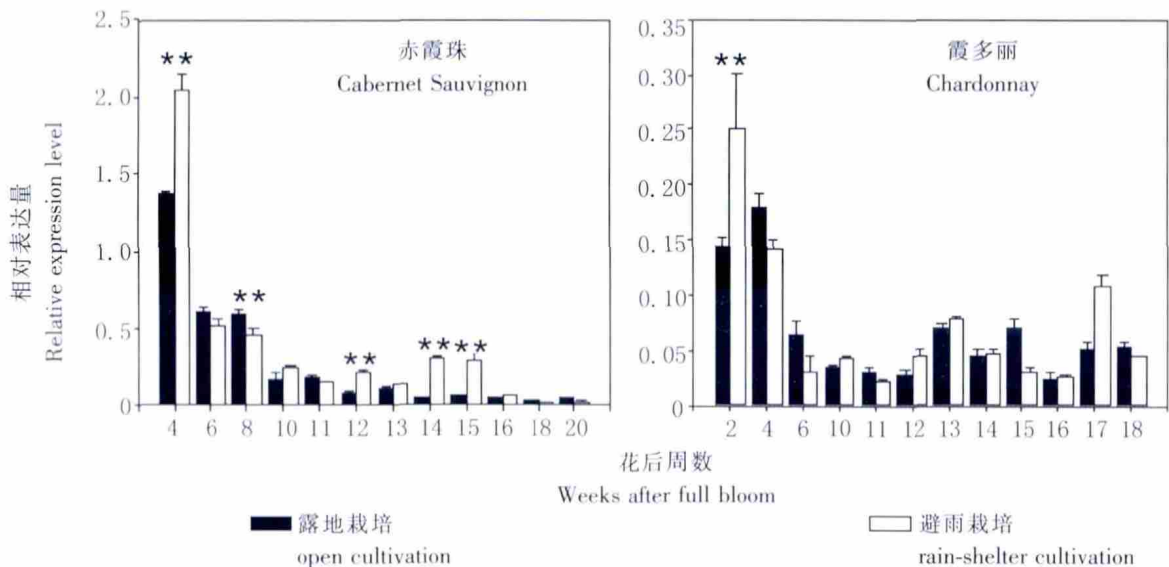


图 2 ‘赤霞珠’和‘霞多丽’葡萄果实中艾杜糖酸脱氢酶(*L-VvIdnDH*) 基因相对表达量

Fig. 2 Relative expression amount of *L-VvIdnDH* genes of the berries of *Vitis vinifera* ‘Cabernet Sauvignon’ and *Vitis vinifera* ‘Chardonnay’ in rain-shelter cultivation and open cultivation

避雨栽培的‘赤霞珠’果实在花后 4 周时,该基因表达显著高于露地栽培果实,且在花后 12,14 和 15 周表达量也较高,这可能是该栽培方式下‘赤霞珠’果实在发育的大部分时间内,酒石酸质量含量相对较高的主要原因。

虽然避雨栽培下的‘霞多丽’果实在花后 2 周 *L-VvIdnDH* 表达量显著高于露地栽培,但花后 4 周时其表达量迅速下降到低于露地栽培的水平,这可能是导致该品种果实中 2 种栽培方式之间酒石酸质量含量没有显著差异的原因。

### 3 讨论

避雨栽培对‘赤霞珠’和‘霞多丽’葡萄果实的影响有所不同,避雨栽培的‘赤霞珠’果实中 4 种有机酸质量含量上升,而‘霞多丽’果实中有机酸含量则变化不大,这表明不同葡萄品种采用避雨栽培产生的效应不同。

有机酸质量含量的差异主要体现在酒石酸和苹果酸上,尤其在‘赤霞珠’葡萄果实中,棚内果实中的

酒石酸和苹果酸质量含量较露地栽培的明显升高,由于这2种有机酸是由不同的代谢路径合成的<sup>[2,8]</sup>,因此,推测‘赤霞珠’葡萄对避雨环境的响应导致果实中碳的流向不同。

在葡萄成熟过程中,避雨处理的昼夜温差均大于露天栽培<sup>[12]</sup>,据 KLEWER<sup>[13]</sup>研究,果实成熟期间苹果酸的质量含量和温度呈负相关<sup>[14]</sup>,而 RUFFNER 等<sup>[15]</sup>也发现转色期后苹果酸受温度影响大,这就是避雨栽培的‘赤霞珠’葡萄果实中苹果酸质量含量高于露地栽培的原因。

然而,植物有机酸的合成和代谢是一个复杂的过程,需要多种酶体系,而这些酶的合成与代谢有不同的最适宜温度,因此,它们在不同的温度下表现出不同的作用<sup>[13]</sup>。所以,不同品种的葡萄在同样的栽培条件下难以得到一致的结论。

晴天避雨栽培植株冠层的平均湿度大于露天栽培的,而雨天避雨栽培植株冠层的平均湿度小于露天栽培的<sup>[12]</sup>,因此,避雨栽培利于植株保持合适的湿度。王华等<sup>[16]</sup>通过研究影响葡萄成熟度的气象因子得出,降水量对含糖量的增加和含酸量的降低均起阻碍作用。因此,在成熟过程中出现的露地栽培葡萄果实中的有机酸质量含量明显高于避雨栽培且变化幅度较大的,原因可能是降雨引起湿度升高,从而引起含酸量升高。总体而言,避雨栽培提高了‘赤霞珠’葡萄果实中的有机酸质量含量,而对‘霞多丽’果实中的有机酸影响较小。

## 参考文献:

- [1] LAMIKANRA O, INYANG I D, LEONG S. Distribution and effect of grape maturity on organic acid content of red muscadine grapes [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, 43(12): 3026–3028.
- [2] 问亚琴, 张艳芳, 潘秋红. 葡萄果实有机酸的研究进展 [J]. *海南大学学报: 自然科学版*, 2009, 27(003): 302–307.
- [3] DEBOLT S, COOK D R, FORD C M. L-Tartaric acid synthesis from vitamin C in higher plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(14): 5608–5613.
- [4] BOULTON R. The relationship between total acidity, titratable acidity and pH in grape tissue [J]. *Vitis*, 1980, 19(2): 113–120.
- [5] 赵新节. 葡萄果实物质代谢与品质调控 [J]. *中外葡萄与葡萄酒*, 2002(6): 21–22.
- [6] 李记明, 李华. 不同地区酿酒葡萄成熟度与葡萄酒质量的研究 [J]. *西北农业学报*, 1996, 4: 71–74.
- [7] 张兴旺. 葡萄避雨栽培好处和方法 [J]. *农业实用技术*, 2005(4): 21–22.
- [8] 崔婧, 段长青, 潘秋红. 反相高效液相色谱法测定葡萄中的有机酸 [J]. *中外葡萄与葡萄酒*, 2010(5): 25–30.
- [9] HE F, FANG X X, HU M, et al. Preparation and biological application of antibodies against leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase from grape berry [J]. *Vitis*, 2009, 48(2): 69–75.
- [10] BOGS J, DOWNEY M O, HARVEY J S, et al. Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves [J]. *Plant Physiology*, 2005, 139(2): 652–663.
- [11] DEBOLT S, MELINO V, FORD C M. Ascorbate as a biosynthetic precursor in plants [J]. *Annals of Botany*, 2007, 99(1): 3–8.
- [12] 杜飞, 朱书生, 王海宁 等. 不同避雨栽培模式对葡萄主要病害的防治效果和植株冠层温湿度的影响 [J]. *云南农业大学学报*, 2011, 26(2): 177–184.
- [13] KLEWER W M, WEAVER R J. Effect of crop level and leaf area on growth, composition, and coloration of Tokay grapes [J]. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1971, 22(3): 172–177.
- [14] 贺普超, 罗国光. 葡萄学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1994.
- [15] RUFFNER H P, HAWKER J S, HALE C R. Temperature and enzymic control of malate metabolism in berries of *Vitis vinifera* [J]. *Phytochemistry*, 1976, 15(12): 1877–1880.
- [16] 王华, 李记明, 陶士衡 等. 有效积温与降水量的比值(T/P)与酿酒葡萄成熟度关系的研究 [J]. *中外葡萄与葡萄酒*, 1994(2): 8–9.

## Effects of Rain-shelter Cultivation on the Organic Acid Content of Wine Grape Berry

LIU Rui , GAO Qian , DUAN Changqing , PAN Qihong

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

**Abstract:** The concentrations of 4 organic acids in the berries of *Vitis vinifera* ‘Cabernet Sauvignon’ and *V. vinifera*. ‘Chardonnay’ subjected to rain-shelter cultivation and open cultivation were assessed by using high performance liquid chromatography. The expression of *VvIdnDH* encoding L-Idonate Dehydrogenase , a key enzyme involved in tartaric acid biosynthesis , was analyzed through Real-time PCR. The results showed that rain-shelter cultivation significantly increased the contents of tartaric acid , malic acid and oxalic acid in developing ‘Cabernet Sauvignon’ grape berries , but no significant difference in contents of these organic acids at harvest was observed between the two cultivation ways. Rain-shelter cultivation almost did not change the level of the four organic acids of ‘Chardonnay’ grape berries as compared to the open cultivation. Analysis of the expression of *VvIdnDH* revealed that gene expression in young berries was significantly up-regulated owing to rain-shelter cultivation and that the transcript abundance was maintained at a certain level during the following development , which may be a main reason for a high level of tartaric acid in developing grapes under rain-shelter cultivation. This work will not only provide some guidelines for the improvement of the rain-shelter cultivation in production of wine grapes , but also help to uncover the mechanism of tartaric acid accumulation in grape berries.

**Key words:** rain-shelter cultivation; organic acids; wine grape berries

---

( 上接第 250 页)

## Tissue Culture of *Gladiolus hybrids* Hort with Shoot Tips as Explants

ZHUANG Shujuan , LIU Yuming , MA Lijuan , WENG Ping

( Xiamen Botanical Garden , Xiamen , Xiamen 361003 , China)

**Abstract:** The shoot tips of the bulbs of *Gladiolus hybrids* were selected as explants for tissue culture. They were cultured on MS medium containing  $1 - 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BA and  $0.1 - 0.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA and induced to produce clustered buds. The clustered shoots were proliferated 3 to 4 times every 25 days after the clustered buds were subcultured. Rootless plantlets formed a strong root system on the  $1/2$  MS culture medium supplemented with  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA in 15 to 20 days , and then produced *in vitro* bulbs after 3 to 4 months of subculture. Virus detection showed that the *in vitro* bulbs of 5 varieties of *G. hybrids* were free of bean yellow mosaic virus ( BYMV ) , cucumber mosaic virus ( CMV ) , tobacco ring spot virus ( TRSV ) and broad bean wilt virus ( BB-WV ) . These virus-free *in vitro* bulbs ( initial bulbs ) were cultivated in the net house for propagation of *G. hybrids*. The virus-free bulbs propagated from the bulbs in the net house can be used for commercial cultivation in the field.

**Key words:** *Gladiolus hybrids*; shoot-tip culture; detoxification; *in vitro* bulb; proliferation system