

葡萄果实(*E*)- β -丁香烯合酶基因的克隆及其表达分析

陶 然, 任国慧, 房经贵^①, 李晓鹏, 李阿英

(南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 利用生物信息学方法, 通过电子克隆获得葡萄(*Vitis vinifera* Linn.) (*E*)- β -丁香烯合酶基因的 cDNA 序列; 以从葡萄品种‘德引 84-1’ (‘Deyin 84-1’) 果肉中提取的 mRNA 为 cDNA 模板, 利用特异 PCR 技术克隆得到 1 个全长 1 880 bp 的基因, 被命名为 *Vv-ECar* (GenBank 登录号 JF808010), 该基因序列包括开放阅读框 1 674 bp, 3’非翻译编码区 209 bp 和 poly⁺(A) 28 bp, 可编码 557 个氨基酸。比对结果显示: 葡萄 *Vv-ECar* 基因的核苷酸序列与葡萄 *VvGwECar2* 基因的同源性达 93%, 二者编码的氨基酸序列同源性达 90.8%, 均含有植物萜类合酶家族共有的保守域 DDXXD; 葡萄 *Vv-ECar* 与茶 [*Camellia sinensis* (Linn.) O. Kuntze] 和杨 (*Populus balsamifera* subsp. *trichocarpa* × *P. deltoids*) 的萜类合酶相关基因同源性均在 73% 以上; 分子进化树的分析结果也显示葡萄 *Vv-ECar* 基因编码的氨基酸序列与其他植物的同源序列具有高度保守性。半定量 RT-PCR 和荧光定量 PCR 分析结果显示: 在葡萄果实发育的不同阶段均有 *Vv-ECar* 基因的表达, 但其相对表达量随果实的发育呈先低后高的趋势, 其中在幼果期相对表达量最高。

关键词: 葡萄; (*E*)- β -丁香烯合酶; *Vv-ECar* 基因; 克隆; 表达; 同源性

中图分类号: S663.1; Q943.2; Q785 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2013)01-0014-06

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2013.01.03

Cloning and expression analysis of (*E*)- β -caryophyllene synthase gene from *Vitis vinifera* fruit

TAO Ran, REN Guohui, FANG Jinggui^①, LI Xiaopeng, LI Aying (College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2013, 22(1): 14-19

Abstract: Using bioinformatics method, cDNA sequence of (*E*)- β -caryophyllene synthase gene of *Vitis vinifera* Linn. was obtained by the silico cloning method. Taking mRNA isolated from flesh of *V. vinifera* ‘Deyin 84-1’ as the cDNA template, a gene with the full-length of 1 880 bp was cloned by means of specific PCR, which is named *Vv-ECar* (GenBank accession No. JF808010). And this gene includes an opening reading frame of 1 674 bp, 3’ untranslated coding region of 209 bp and poly⁺(A) of 28 bp, and it can encode 557 amino acids. The alignment result shows that the homology of nucleotide sequence of *Vv-ECar* gene of *V. vinifera* with that of *VvGwECar2* gene of *V. vinifera* reaches 93%, and the homology of amino acid sequence encoded by two genes reaches 90.8% which all have the common conserved box DDXXD of plant terpenoid synthase family. The homology between *Vv-ECar* of *V. vinifera* and terpenoid synthase related genes of *Camellia sinensis* (Linn.) O. Kuntze and *Populus balsamifera* subsp. *trichocarpa* × *P. deltoids* is more than 73%. And also, the result of molecular phylogenetic tree indicates that there is highly conservation in the amino acid sequences encoded by *Vv-ECar* of *V. vinifera* with homologous sequence of other plants. The analysis results of semi-quantitative RT-PCR and fluorescence quantitative PCR show that *Vv-ECar* gene expression exists in different development stages of *V. vinifera* fruit, but its relative expression amount appears the trend of decreasing firstly and then increasing with fruit developing with the highest relative expression amount in young fruit stage.

收稿日期: 2012-06-13

基金项目: 江苏省现代园艺科学优势学科建设工程专项

作者简介: 陶 然(1988—), 女, 山东济南人, 硕士研究生, 主要从事果树分子生物学方面的研究。

^①通信作者 E-mail: fanggg@njau.edu.cn

Key words: *Vitis vinifera* Linn.; (*E*)- β -caryophyllene synthase; *Vv-ECar* gene; cloning; expression; homology

香气在果实品质构成中是一项重要的经济性状, 多样的香气成分使果实具备了不同的风味特点^[1]。果树是大田与经济作物中以果实为直接食用部分的主要作物种类, 果实中富含的香味成分决定了其特有的食用价值^[2]。葡萄(*Vitis vinifera* Linn.)素有“水果皇后”的美称, 是一种加工产品颇为丰富的水果, 在世界果树栽培中属于种植面积较大的果树树种^[3]。目前从葡萄果实中已鉴定出 800 多种芳香成分^[4], 一些低分子量的挥发性萜类化合物(如单萜和倍半萜等)还是许多鲜食和酿酒葡萄品种特有的风味和香气成分^[5-7]。有关葡萄果实芳香成分的研究^[8-9]较多。近年来, 随着植物代谢工程的兴起, 许多果实风味成分的生物合成途径及其相关酶的重要性逐渐明晰。葡萄全基因组测序的结果表明: 葡萄所包含的“制造”香气中萜类化合物的“香味基因”数目是已经完成基因组测序的其他植物的 2 倍^[10]。这些研究结果都为在分子水平上对葡萄香气成分的合成以及葡萄品质的改良提供了有益的参考与新的思路。

萜类化合物属植物次生代谢产物, 因其种类繁多、结构多样, 被认为是自然界中最大的一类复合物家族, 由 4 万多种成分组成^[11]。在果实香气成分合成的三大主要途径中, 萜类合成途径就是其中之一^[12]。萜类合酶(terpenoid synthase, TPS)是萜类化合物合成的直接催化者, 也是萜类生物合成中研究较多的一类关键酶, 统称为 TPS 家族。按形成产物的不同, TPS 家族酶可分为单萜合酶、倍半萜合酶和二萜合酶等, 它们分别以牻牛儿基焦磷酸(geranyl diphosphate, GPP)、橙花基焦磷酸(neryl diphosphate, NPP)、法呢基焦磷酸(farnesyl diphosphate, FPP)和牻牛儿酰牻牛儿基焦磷酸(geranylgeranyl diphosphate, GGPP)为直接前体底物合成相应的单萜、倍半萜和二萜成分^[13]。此外, 一些萜类合酶的构成特性使其可催化单一底物产生多个萜类产物, 因此很多 TPS 都以主产物命名^[14]。Martin 等^[15]从葡萄品种‘琼瑶浆’(‘Gewürztraminer’)和‘黑比诺’(‘Pinot noir’)中分别克隆得到了 3 个(*VvGwECar1*、*VvGwECar2* 和 *VvGwECar3*)和 2 个(*VvPNECar1* 和 *VvPNECar2*)萜类合酶家族基因, 大肠杆菌体外表达结果显示它们编码的酶生成的主要产物都为(-)-丁香烯, 与此同时也

不同程度地产生了部分 α -萹草烯和香叶烯 D, 因而这 5 个基因编码的酶均被称为(*E*)- β -丁香烯合酶。目前, 在葡萄果实发育时期有关(*E*)- β -丁香烯合酶基因调控表达方面的研究尚未见报道。

为了对葡萄(*E*)- β -丁香烯合酶基因有进一步认识, 作者以欧美杂种中具有典型香味的酿酒葡萄品种‘德引 84-1’(‘Deyin 84-1’)为实验材料, 成功分离出(*E*)- β -丁香烯合酶[(*E*)- β -caryophyllene synthase]基因, 并统一命名为 *Vv-ECar*, 在比较其序列特征的基础上对葡萄果实发育时期 *Vv-ECar* 的半定量和定量表达进行了分析, 以期对葡萄果实中萜类成分的调控机制研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 电子克隆

以与编码葡萄倍半萜合酶基因同源性较高的 EST 序列(序列号 EC953713.1)作为探针, 对葡萄属(*Vitis* Linn.)EST 数据库进行 BLAST 检索, 得到多条与之高度同源的葡萄 EST 序列。将获得的 EST 序列用 DNAMAN 软件进行首尾拼接, 获得新的 Contig, 将获得的 Contig 反复对葡萄 EST 公共数据库进行 BLAST 检索及拼接, 直到没有新的 EST 序列可供拼接为止。最终拼接得到的目的基因可能的全长 cDNA 序列长度为 1 843 bp。

1.2 实验克隆

1.2.1 材料 供试材料为酿酒葡萄品种‘德引 84-1’, 于 2011 年采自中国农业科学院郑州果树研究所; 分别于葡萄盛花后 20、40、60 和 80 d(即果实发育的幼果期、膨大期、转色期和成熟期), 从标记植株的东、西、南、北 4 个方向各选 1~2 穗果, 从每穗果的上、中、下、里、外各方位取大小一致的果实 4~5 粒, 其中幼果期采果约 100 粒, 其他时期各采果约 50 粒; 所有样品采集后立即投入液氮并带回实验室将种子剔除(处于幼果期的果实较小, 无法剔除种子), 然后将样品全部贮存于 -70 °C 用于总 RNA 的提取。

大肠杆菌菌株 DH5 α 由作者所在实验室保存。PowerScript II™ 反转录酶购自美国 Clontech 公司; DNase I 酶、*LA Taq* 酶、*Ex Taq* 酶、pMD18-T Simple 载

体、dNTP 和 DNA Marker 均购自宝生物工程(大连)有限公司;Trizol[®] Reagent 购自美国 Invitrogen 生命技术有限公司;荧光定量染料 SYBR Green I 购自东洋纺(上海)生物科技有限公司;DNA 回收试剂盒及 DL2000

Plus DNA Marker 由北京全式金生物技术有限公司生产;PloyA Ttract[®] mRNA Isolation System IV 试剂盒由美国 Promega 公司生产。所用的 10 个引物由上海英骏生物技术有限公司合成,其序列及用途见表 1。

表 1 用于葡萄果实 *Vv-ECar* 基因克隆的引物序列及用途

Table 1 Sequence and use of primers used for cloning of *Vv-ECar* gene of *Vitis vinifera* Linn. fruit

编号 No.	序列(5'→3') Sequence(5'→3')	用途 Use
P01	GCAGGACTGCAGCTGACTGACTACT ₃₀ VN	cDNA 合成 Synthesis of cDNA
P02	GACCACTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG	cDNA 合成 Synthesis of cDNA
P03	ATGTCTGTTTCAGTCTTCAGTGGTACTTCTT	<i>Vv-ECar</i> 基因 ORF 扩增 Amplification of ORF of <i>Vv-ECar</i>
P04	TCATATTGGCACAGGATCAATTAGC	<i>Vv-ECar</i> 基因 ORF 扩增 Amplification of ORF of <i>Vv-ECar</i>
P05	TTCACAAAGTTTGAGCAGAAGAGAG	扩增 <i>Vv-ECar</i> 基因 3' 末端 Amplification of 3'-end of <i>Vv-ECar</i>
P06	GGTGTAGAGCTCGCAGGACTGCAGCTGACTG	扩增 <i>Vv-ECar</i> 基因 3' 末端 Amplification of 3'-end of <i>Vv-ECar</i>
P07	AGTAGATGACTGGATTGGAGGT	<i>UBI</i> 扩增 Amplification of <i>UBI</i>
P08	GAGTATCAAAAACAAAAGCATCG	<i>UBI</i> 扩增 Amplification of <i>UBI</i>
P09	AGATGGCTATACTCATTCTGGGAC	<i>Vv-ECar</i> 定量 RT-PCR Quantitative RT-PCR of <i>Vv-ECar</i>
P10	ATCTCTCCAAGCAAGCAGCA	<i>Vv-ECar</i> 定量 RT-PCR Quantitative RT-PCR of <i>Vv-ECar</i>

1.2.2 RNA 提取与纯化 采用改良 CTAB 法^[16-17] 提取葡萄果实总 RNA;采用 PloyA Ttract[®] mRNA Isolation System IV 试剂盒进行 mRNA 的纯化。

1.2.3 cDNA 合成 以葡萄 mRNA 为模板,用引物 P01 反转录合成 cDNA 第 1 条链,用引物 P02 延伸加帽子,在空气加热条件下于 42 °C 保温 1 h、75 °C 保温 10 min,于冰上冷却 2 min 后置于 -70 °C 保存备用。

1.2.4 基因开放阅读框(ORF)的扩增 以上述 cDNA 为模板用引物 P03 和 P04 进行 PCR 扩增,反应体系总体积 50 μL,包含 cDNA 2.0 μL、10 μmol · L⁻¹ 引物各 2.0 μL、5 U · μL⁻¹ *Ex Taq* 酶 0.50 μL、10× PCR buffer(Mg²⁺ plus) 5.0 μL、2.5 mmol · L⁻¹ dNTP Mixture 4.0 μL 和双蒸水 34.5 μL。扩增程序为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 45 s、55 °C 退火 45 s、72 °C 延伸 90 s,共 35 个循环;最终于 72 °C 延伸 5 min。用质量体积分数 1.0% 琼脂糖凝胶对获得的 PCR 扩增产物进行电泳,切下目的片段并用 DNA 凝胶回收试剂盒回收目标片段并进行 TA 克隆,DNA 测序由上海博亚生物技术有限公司完成。

1.2.5 基因 3' 末端 PCR 扩增 以上述 cDNA 为模板用引物 P05 和 P06 进行 PCR 扩增获得基因的 3' 末端(3'UTR 区)。反应体系总体积 25 μL,包含 cDNA 1.0 μL、引物各 1.0 μL、5 U · μL⁻¹ *Ex Taq* 酶 0.15 μL、10× PCR buffer(Mg²⁺ plus) 2.5 μL、2.5 mmol · L⁻¹ dNTP Mixture 2.0 μL 和双蒸水 17.35 μL。扩增程序为:

94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 40 s、54 °C 退火 40 s、72 °C 延伸 40 s,35 个循环;最后于 72 °C 延伸 10 min。用质量体积分数 2.0% 琼脂糖凝胶对获得的 PCR 扩增产物进行电泳检测,然后用 DNA 回收试剂盒回收目标片段并进行 TA 克隆,DNA 测序由上海博亚生物技术有限公司完成。

1.2.6 生物信息学分析 利用 DNAMAN 软件对 *Vv-ECar* 的 ORF、3' 末端序列进行拼接分析;并分别利用 NCBI 的 BLASTn 和 BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 将基因的核苷酸序列和氨基酸序列与茶 [*Camellia sinensis* (Linn.) O. Kuntze]、毛果杨 (*Populus trichocarpa* Torr. et A. Gray)、美味猕猴桃 (*Actinidia deliciosa* C. F. Liang et A. R. Ferguson)、箭叶橙 (*Citrus hystrix* DC.)、杨 (*Populus balsamifera* subsp. *trichocarpa* × *P. deltoids*) 和香椿 [*Toona sinensis* (A. Juss.) Roem.] 的相应序列进行相似性分析。

1.3 *Vv-ECar* 基因的表达分析

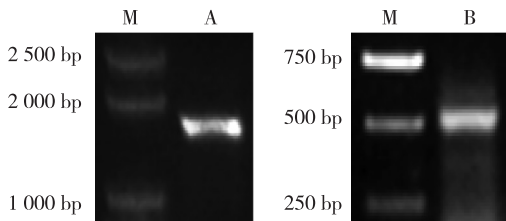
从不同时期果实中提取总 RNA,用 DNase I 酶(RNase free)消化和 CHCl₃ 抽提,然后分别取 2 μg,用引物 P01 逆转录合成的 cDNA 为模板,采用 Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) 设计的引物 P09 和 P10 进行半定量 RT-PCR 和荧光定量 PCR 分析,以确定 *Vv-ECar* 在果实发育时期相对表达水平的变化。为确保半定量 RT-PCR 和荧光定量 PCR 的特异性,引物 P09 和 P10 被设计在

Vv-ECar 基因的 3'非翻译区(3'UTR),内参基因是利用葡萄 UBI 的特异性引物 P07 和 P08 扩增获得的长度为 141 bp 的基因片段。定量 RCR 反应在 Rotor-Gene 荧光定量 PCR 仪上进行,实验体系设置参照 SYBR Green I 说明书,每个样品重复检测 3 次。实验数据采用 Lin-RegPCR^[18] 和 Excel 2003 软件进行分析。

2 结果和分析

2.1 葡萄果实 *Vv-ECar* 基因的克隆

根据电子克隆的 *Vv-ECar* 的 cDNA 全长设计简并引物 P03 和 P04,以葡萄品种‘德引 84-1’果肉总 RNA 逆转录的 cDNA 第 1 链为模板,扩增获得长度为 1 674 bp 的全长开放阅读框 ORF(图 1-A)。利用引物 P05 和 P06 进行 3'RACE 克隆,得到长度为 209 bp 的 3'末端(图 1-B),将引物 3'端和 ORF 全长拼接获得 *Vv-ECar* 基因 cDNA,全长为 1 880 bp。*Vv-ECar* 的全长序列包括长度为 1 674 bp 的 ORF、209 bp 的 3'非翻译区(3'UTR)以及 28 bp 的 poly⁺(A),经推导其氨基酸序列含有 557 个氨基酸。该基因的 GenBank 登录号为 JF808010。



M: Marker DL3000; A: *Vv-ECar* 基因的 ORF 产物 ORF product of *Vv-ECar* gene; B: *Vv-ECar* 基因的 3'RACE 产物 3'RACE product of *Vv-ECar* gene.

图 1 葡萄果实 *Vv-ECar* 基因的 PCR 扩增结果
Fig. 1 PCR amplification result of *Vv-ECar* gene of *Vitis vinifera* Linn. fruit

2.2 葡萄果实 *Vv-ECar* 基因的序列分析

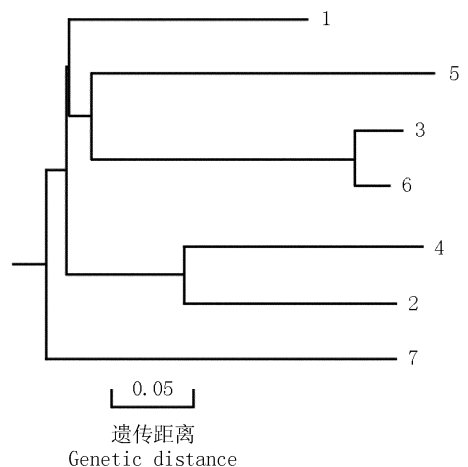
利用 DNAMAN 将克隆获得的 *Vv-ECar* 编码区序列与 Martin 等^[15] 在葡萄品种‘琼瑶浆’和‘黑比诺’中已克隆得到的 *VvGwECar1*、*VvGwECar2*、*VvGwECar3*、*VvPNECar1* 和 *VvPNECar2* 等 5 个(*E*)- β -丁香烯合酶基因编码区序列进行比对,发现 *Vv-ECar* 与 *VvGwECar2* 同源性最高,可达 93%,与其他 4 个基因的同源性也都在 60% 以上。该序列的编码区与

VvGwECar2 的编码区序列长度相同,都为 1 674 bp,其中存在 110 个碱基替换,包括 30 个颠换和 80 个转换。比对结果也表明:这 2 个序列编码的氨基酸序列同源性也高达 90.8%,氨基酸残基仅在 51 个位点上有差异;此外,2 个氨基酸序列都从第 310 位至第 314 位具有植物萜类合酶家族共有的 1 个天冬氨酸富集基序(DDXXD)。因此可初步推断在本研究中克隆获得的基因为(*E*)- β -丁香烯合酶基因。

同源性比对结果显示:葡萄 *Vv-ECar* 基因的核苷酸序列与茶(JQ247185.1)、毛果杨(JF449450.1)、美味猕猴桃(AY789791.1)、箭叶橙(HQ652871.1)、杨(AY438099.1)、香椿(AB509224.1)等植物的萜类合酶基因的序列同源性高达 70% 以上,其中与茶和杨的序列同源性高达 73%。从进化树(图 2)上也可看出:葡萄品种‘德引 84-1’果实 *Vv-ECar* 基因所编码的氨基酸序列与其他植物同源基因编码的氨基酸序列具有高度保守性。

2.3 葡萄果实发育期 *Vv-ECar* 基因的表达分析

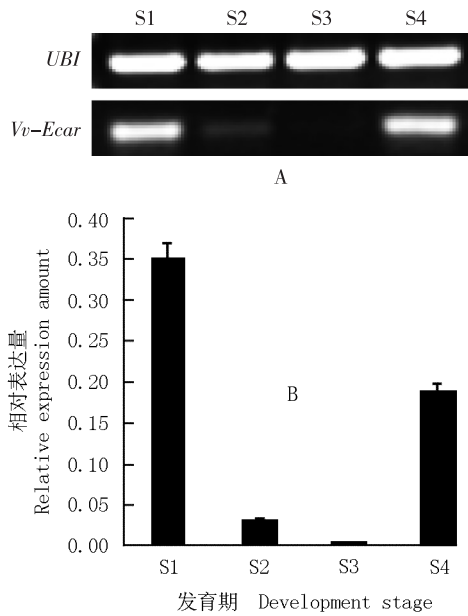
分别采用半定量 RT-PCR 和荧光定量 PCR 对葡萄果实发育期 *Vv-ECar* 基因的表达状况进行分析,结果见图 3。分析结果表明:采用荧光定量 PCR 检测的葡萄果实发育期 *Vv-ECar* 基因的相对表达量与半定量 RT-PCR 结果一致。总体上看,在幼果期 *Vv-ECar*



1. 葡萄 *Vitis vinifera* Linn.; 2. 茶 *Camellia sinensis* (Linn.) O. Kuntze.; 3. 毛果杨 *Populus trichocarpa* Torr. et A. Gray.; 4. 美味猕猴桃 *Actinidia deliciosa* C. F. Liang et A. R. Ferguso.; 5. 箭叶橙 *Citrus hystrix* DC.; 6. 杨 *Populus balsamifera* subsp. *trichocarpa* × *P. deltoids*.; 7. 香椿 *Toona sinensis* (A. Juss.) Roem.

图 2 葡萄果实 *Vv-ECar* 基因与其他植物同源基因编码的氨基酸序列的分子进化树
Fig. 2 Molecular phylogenetic tree of amino acid sequences encoded by *Vv-ECar* gene from *Vitis vinifera* Linn. fruit and homologous genes from other plants

表达最强,伴随果实的不断发育相对表达量逐渐下降,在果实成熟期时相对表达量又明显上升。



A: 半定量 RT-PCR 分析结果 Result of semi-quantitative RT-PCR analysis; B: 荧光定量 PCR 分析结果 Result of fluorescence quantitative PCR analysis.

UBI: 内参基因 Reference gene; S1: 幼果期 Young fruit stage; S2: 果实膨大期 Fruit expanding stage; S3: 果实转色期 Fruit turning-color stage; S4: 果实成熟期 Fruit maturation stage.

图 3 葡萄果实不同发育时期 *Vv-ECar* 基因表达的半定量 RT-PCR 和定量 PCR 分析结果

Fig. 3 Analysis results of semi-quantitative RT-PCR and quantitative PCR of *Vv-ECar* gene expression during different development stages of *Vitis vinifera* Linn. fruit

3 讨 论

葡萄果实香气是构成葡萄酒香气的重要组成部分之一,与发酵香和陈酿香共同构成了葡萄酒的香气和风格^[19]。作者利用生物信息学方法同源克隆获得了与葡萄香气品质相关的(*E*)- β -丁香烯合酶基因 *Vv-ECar*,该基因的核苷酸序列与 Martin 等^[15]在葡萄品种‘琼瑶浆’和‘黑比诺’果实中克隆获得的 5 个基因具有较高的同源性,与来源于茶、毛果杨、美味猕猴桃、箭叶橙、杨和香椿的萜类合酶的相关基因的同源性也较高,此外,葡萄 *Vv-ECar* 基因编码的氨基酸具有萜类合酶家族的共有基序,因此可推断本研究克隆获得的 cDNA 序列是葡萄 *Vv-ECar* 基因。

萜类化合物种类繁多,是植物次生代谢物中种类最多的一类,更是特有香气组成的重要成分之一。通常萜类化合物的积累始于果实变色期,且随着葡萄果

实的成熟总体含量逐渐上升,在葡萄果实过度成熟时萜类化合物含量最高^[20]。葡萄果实发育过程中香气成分含量的变化主要集中于转色期到成熟期^[21-22]。而作者的研究结果显示:葡萄 *Vv-ECar* 基因在果实发育初期表达最强,随后逐渐减弱,在成熟期时该基因表达又明显增强。Lücker 等^[23]的研究结果表明:葡萄种子特别是幼小种子中含有较多的萜类合酶,而在种子其后的发育过程中几乎无萜类合酶基因的表达,且处于发育阶段的果实(包括种子在内)中萜类合酶基因的表达都十分微弱。在本研究中,葡萄幼果期 *Vv-ECar* 基因相对表达水平最高,也可能与幼果中含有幼嫩种子有关。Wilson 等^[24]认为:在熟透的麝香葡萄(*Vitis vinifera* ‘Muscat Hamburg’)中,萜类化合物的含量随着果实中糖分和一些单萜类化合物的积累达到峰值。作者认为葡萄果实成熟期萜类化合物含量较高,与葡萄果实发育后期 *Vv-ECar* 基因表达量的明显上升有关。

参考文献:

- CHEN X Y, CHEN Y, HEINSTEIN P, et al. Cloning, expression, and characterization of (+)- δ -cadinene synthase: a catalyst for cotton phytoalexin biosynthesis [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1995, 324(2): 255-266.
- 李晓颖, 谭洪花, 房经贵, 等. 果树果实的风味物质及其研究 [J]. 植物生理学报, 2011, 47(10): 943-950.
- 冷翔鹏, 张演义, 张春华, 等. 基于葡萄 EST 数据库糖代谢途径有关基因的分析 [J]. 植物生理学报, 2012, 48(3): 289-297.
- ORTEGA-HERAS M, GONZÁLEZ-SANJOSÉ M L, BELTRÁN S. Aroma composition of wine studied by different extraction methods [J]. Analytica Chimica Acta, 2002, 458(1): 85-93.
- BUCHBAUER G, JIROVETZ L, WASICKY M, et al. Headspace analysis of *Vitis vinifera* (Vitaceae) flowers [J]. Journal of Essential Oil Research, 1994, 6(3): 311-314.
- BUCHBAUER G, JIROVETZ L, WASICKY M, et al. Aroma von weißweibnlüten: korrelation sensorischer daten mit headspace-inhaltsstoffen [J]. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung, 1994, 199(1): 1-4.
- BUCHBAUER G, JIROVETZ L, WASICKY M, et al. Aroma von rotweibnlüten: korrelation sensorischer daten mit headspace-inhaltsstoffen [J]. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung, 1995, 200(6): 443-446.
- 涂正顺, 薛洁, 常伟, 等. 吉林地区山葡萄果实香气成分的 GC/MS 分析 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(10): 66-70.
- 张振华, 葛毅强, 倪元颖, 等. 葡萄芳香物质研究进展 [J]. 食品科学, 2004, 25(4): 181-184.
- JAILLON O, AURY J M, NOEL B, et al. The grapevine genome

- sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla[J]. *Nature*, 2007, 449: 463-467.
- [11] 宋丽娟,李雄伟,陈琳,等.果实香气合成与遗传控制研究概述[J].*果树学报*,2008,25(5):708-713.
- [12] GANG D R. Evolution of flavors and scents[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2005, 56: 301-325.
- [13] SCHILMILLER A L, SCHAUVINHOLD I, LARSON M, et al. Monoterpenes in the glandular trichomes of tomato are synthesized from a neryl diphosphate precursor rather than geranyl diphosphate [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(26): 10865-10870.
- [14] 徐应文,吕季娟,吴卫,等.植物单萜合酶研究进展[J].*生态学报*,2009,29(6):3188-3197.
- [15] MARTIN D M, AUBOURG S, SCHOUWEY M B, et al. Functional annotation, genome organization and phylogeny of the grapevine (*Vitis vinifera*) terpene synthase gene family based on genome assembly, F1cDNA cloning, and enzyme assays[J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10: 226.
- [16] 张彦苹,王晨,于华平,等.适于葡萄不同组织RNA提取方法的筛选[J].*西北农业学报*,2010,19(11):135-140.
- [17] CHANG S J, PURVEAR J, CAIRNEY J C. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1993, 11: 113-116.
- [18] RAMAKERS C, RUIJTERA J M, LEKANNE DEPREZA R H, et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data[J]. *Neuroscience Letters*, 2003, 339(1): 62-66.
- [19] 李华.葡萄酒品尝学[M].北京:科学出版社,2006:59-65.
- [20] EBELER S E, THORNGATE J H. Wine chemistry and flavor: looking into the crystal glass[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(18): 8098-8108.
- [21] COELHO E, ROCHA S M, DELGADILLO I, et al. Headspace-SPME applied to varietal volatile components evolution during *Vitis vinifera* L. cv. 'Baga' ripening [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 563(1/2): 204-214.
- [22] COELHO E, ROCHA S M, BARROS A S, et al. Screening of variety- and pre-fermentation-related volatile compounds during ripening of white grapes to define their evolution profile [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 597(2): 257-264.
- [23] LÜCKER J, BOWEN P, BOHLMANN J. *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 [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(19): 2649-2659.
- [24] WILSON B, STRAUSS C R, WILLIAMS P J. Changes in free and glycosidically bound monoterpenes in developing muscat grapes[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1984, 32(4): 919-924.

(责任编辑:张明霞)

(上接第7页 Continued from page 7)

- (4) 题目:不宜过长,以不超过25个字为宜,中、英文题目应一致,尽量不用副标题。
- (5) 作者:一般不超过6人,中国作者英文姓名用汉语拼音,按照GB/T 28039—2011《中国人汉语拼音字母拼写规则》拼写。外籍作者姓在前名在后,姓写全并大写,名缩写。第1作者需附简介:姓名,出生年份,性别,民族,籍贯,学位,职称,研究方向;置于第1页下方。
- (6) 法定计量单位:以GB 3100—1993,GB 3101—1993和GB 3102.1—1993~GB 3102.13—1993系列标准为准。
- (7) 图和表:图表应少而精,“自明性”强。插图应线条匀称,最大(包括图题和图注)不超过16 cm(宽)×21.5 cm(高),图题和图注应有中英文对照。图版照片应清晰,均应使用原图(除必要的剪裁外一般无需PS),按16 cm(宽)×19 cm(高)的版芯整齐拼版,图版说明须用中英文对照,附于文后。表格请用三线表格式制作,表内文字都应有中英文对照。
- (8) 参考文献:择主要的列入,文献的标注方式采用“顺序编码制”(GB/T 7714—2005),即按正文中引用文献出现的先后顺序连续编码,文献序号用方括号在正文中出现处的右上角注明。文献作者3人以下(包括3人)者,全部列出;3人以上者,只列出前3人,后加“等”(中文)或“et al”(外文)。文末参考文献表按序号依次编排,不分文种。
- (9) 文中涉及的植物类群均需附完整正确的拉丁学名;栽培植物请按照《国际栽培植物命名法规》进行命名及拉丁学名的书写。
4. 来稿请注明科研项目来源及项目号,对国家自然科学基金资助项目、省部级以上重大攻关项目和基础研究基金项目等的论文可优先发表。
5. 来稿请勿一稿多投。来稿时请注明联系电话、电子信箱(E-mail)(或QQ号)以及详细的通信地址,同时交审稿费80元。稿件处理情况将于收稿后4个月内通知作者。录用稿件收取一定的发表服务费。稿件一经刊登,酌付稿酬,并赠送该期期刊3册。不拟刊登的稿件恕不退回,请自留底稿。编辑部对稿件有删改权。
6. 来稿文责由作者自负。凡在本刊发表的论文将编入数据库供交流、查阅及检索,作者的著作权使用费与本刊稿酬一次性给付,不再另付。如作者不同意将论文编入数据库,请在来稿时声明。
7. 编辑部联系方式:江苏省南京市中山门外江苏省中国科学院植物研究所内(邮政编码210014)。Tel: 025-84347016,025-84347014;E-mail: zwzy@mail.cnbg.net;QQ:2219161478。