

# 简易避雨栽培对‘赤霞珠’葡萄 果实类黄酮物质表征的影响

李舒婷, 李小溪, 高媛, 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·农业部葡萄酒加工重点实验室, 北京 100083)

**摘要:**【目的】通过对2种不同栽培模式下葡萄果实中类黄酮物质的定性定量分析, 探究避雨栽培对类黄酮物质代谢及积累的影响, 为避雨栽培措施在酿酒葡萄生产中的应用提供依据。【方法】采用高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)技术, 分析2012和2013年避雨栽培和露地栽培2种模式下生长的‘赤霞珠’葡萄果实果皮中类黄酮物质的组成及其含量。【结果】与露地栽培相比, 避雨栽培没有改变果皮中黄酮醇、黄烷醇和花色苷物质的种类, 总体上则促进了黄酮醇类物质, 主要是3'4'-取代的槲皮素类物质的积累, 并有利于黄酮醇和黄烷醇甲基化比例提高, 但对黄烷醇物质总量没有显著影响。2012年避雨栽培的果实中花色苷含量显著高于露地栽培, 而在2013年其含量则明显较低。偏最小二乘判别分析表明, 避雨栽培对花色苷物质的影响最为显著, 其中花翠素香豆酰化-3-O-葡萄糖苷在2个年份的避雨栽培果实中均有显著降低, 而甲基花翠素香豆酰化-3-O-葡萄糖苷的含量则明显提高。【结论】避雨栽培有助于缓解气候变化对果皮中花色苷等类黄酮物质积累的显著影响, 在一定程度上保持果实类黄酮代谢的相对稳定。

**关键词:**‘赤霞珠’葡萄; 避雨栽培; 黄酮醇; 黄烷醇; 花色苷

中图分类号: S663.1 文献标志码: A 文章编号: 1009-9980(2018)07-0802-15

## Effect of simple rain-shelter cultivation on flavonoid profiling in *Vitis vinifera* ‘Cabernet Sauvignon’ grape berries

LI Shuting, LI Xiaoxi, GAO Yuan, PAN QiuHong\*

(Center for Viticulture and Enology, College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University·Key Laboratory of Viticulture and Enology, Ministry of Agriculture, Beijing 100083, China)

**Abstract:**【Objective】Different from the white wine grape berries, the red wine grape berries contain flavonoid metabolites such as anthocyanins, flavon-3-ols and flavanols. Flavonoids are important components that determine the color, taste and aging potential of the wine, and their composition and content in the fruits directly affect the quality of the wine. Although the effects of rain-shelter cultivation on the accumulation of phenolic compounds in grape berries have been described considerably, the results are not consistent due to variations in climates and culture variables. The influence of rain-shelter cultivation on flavonoid profile in developing grape berries has not yet been investigated in detail. The present study assessed the variations in the composition and contents of various flavonoid components during the development of grape berries (*Vitis vinifera* ‘Cabernet Sauvignon’) under the rain-shelter and open-field cultivations in two cropping seasons, and analyzed the impact of the rain-shelter cultivation on flavonoid metabolism in grape berry. The outcome of the study would provide guidance to viticulturists and winemakers who consider the application of rain shelter in wine grape production.【Methods】The experiment was carried out in 2012 and 2013 in the vineyard of Changyu Aibifu International Winery in Miyun County, Beijing. The test materials used in this experiment were self-rooted seedlings of *V. vinifera* ‘Cabernet Sauvignon’ colonized in 2003. In the experiment, three experimental plots with similar

收稿日期: 2018-01-18 接受日期: 2018-04-02

基金项目: 国家葡萄产业技术体系专项经费(CARS-29)

联系方式: 李舒婷, 在读硕士研究生, 研究方向为葡萄酒化学。Tel: 18110024869, E-mail: Lishuting@cau.edu.cn

\*通信作者 Author for correspondence. Tel: 13810787962, E-mail: panqh@cau.edu.cn

growth status of grapevine plants were selected. Three experimental plots (regarded as three biological replicates) were set up in each of the two cultivation methods. There were 40 grapevines in each plot. The simple rain shelter was built with a height of 185 cm (about 12 cm from the top of the canopy), a width of 110 cm and a roof curvature of 125 cm. The covered material was 6.5 filament longevity film, which was polyethylene anti-aging film with a thickness of 0.10-0.12 mm and light transmittance about 80%. Sampling interval was 1-2 weeks until the berries were fully ripe. In rainy days, the sampling time was 1-2 days in advance or postponed. According to this principle, grape berries were sampled at 20, 37, 50, 64, 71, 78, 87, 97, 112, 125 and 135 DAF for the 2012 vintage and at 14, 28, 41, 57, 67, 78, 97, 112 and 124 DAF for the 2013 vintage, of which the first two sampling dates had samples only under open-field cultivation. Samples were analyzed for weight, volume, Brix, pH and total acids. The flavonoid components, including flavonols, flavan-3-ols and anthocyanins were qualitatively analyzed during the development of the berries under the rain-shelter cultivation and the open-field cultivation by high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS). 【Results】During the two years, the weight of grape berry showed a typical double “S” pattern during the growth process. As the fruit developed, the weight gradually increased. And there was no significant difference in ripening and harvest period. The trend of fruit volume was similar to that of fruit weight in the two years, but in 2012 the berry volume under open-field cultivation was always higher than that under rain-shelter cultivation. The trend of sugar/acid ratio was the same under the two cultivation modes in the two years. In both years, the weight and the volume of the berries during harvest period were higher in 2013 than in 2012. The sugar/acid ratio was higher in 2012 under the two cultivation types. The HPLC-MS results showed that the composition of flavonols, flavan-3-ols and anthocyanins were not modified under rain-shelter cultivation in comparison to that under the open-field cultivation. Generally, the rain-shelter cultivation led to increased concentrations of flavonols, in particular the accumulation of 3'4'-substituted quercetins, and it also elevated the proportion of 5'-methylated flavonols and 5'-methylated flavan-3-ols. However, the total content of flavan-3-ols was hardly affected under rain-shelter cultivation. Besides, this cultivation mode promoted the synthesis of 3'4'5-substituted delphinidin-form anthocyanins in the two experimental years as well, although it was observed that the rain-shelter measurement produced different impacts on anthocyanin production. The total content of anthocyanins in rain-sheltered fruit in 2012 was significantly higher than in fruit produced under open-field cultivation, but the opposite situation appeared in 2013. This was possibly because the more rainfall in 2012 enlarged the difference between the two cultivation modes. Partial least square discriminant analysis (PLS-DA) indicated that anthocyanins changed most significantly among the three kinds of flavonoids in the berries, and delphinidin-3-O-glucoside-6-coumaroyl was obviously reduced in the rain-sheltered grapes in both years, whereas petunidin-3-O-glucoside-6-coumaroyl was markedly raised. 【Conclusion】The rain-shelter cultivation could minimize the variation in the synthesis of flavonoids especially anthocyanins in berry skin caused by climate changes.

**Key words:** *Vitis vinifera* ‘Cabernet Sauvignon’; Rain-shelter cultivation; Flavonols; Flavan-3-ols; Anthocyanins

中国葡萄酒产区大部分属于大陆季风性气候区,气候呈现干冷同期、雨热同季的特点,尤其在中国南方和东部沿海地区,年降雨量通常在1 500~3 000 mm,且降雨多集中于葡萄生长成熟季节,这就导致果实病虫害的发生较为严重。许多研究表

明,避雨栽培可有效降低葡萄病虫害的发生,扩展葡萄栽培区域和品种适应性。这种栽培措施在我国长江中下游及以南各省的鲜食葡萄生产中较为常见<sup>[1]</sup>。简易避雨栽培通常指在大棚顶部覆膜,不用裙边,保持四周通风,以避免雨水直接侵袭葡萄果实<sup>[2]</sup>。避雨棚

是通过控制雨水,来防控与水分有关的病虫害发生<sup>[3]</sup>,使得重要病害得到控制。例如霜霉病、黑痘病、炭疽病已基本得到抑制停止发病,降低了对农药的依赖。不仅如此,这种避雨棚或多或少改变了葡萄果际微气候,可对葡萄品质产生一定的影响。类黄酮代谢是葡萄中重要的次生代谢,其代谢产物对葡萄和葡萄酒品质起着决定性的作用,探究避雨栽培对类黄酮物质积累的影响,可为研究酿酒葡萄类黄酮代谢机制提供一定的理论基础,在生产实际上可为该项措施在酿酒葡萄生产中的应用提供直接依据。

与白色酿酒葡萄‘霞多丽’不同,红色品种的类黄酮代谢产物包括花色苷、黄烷醇、黄酮醇等。其中花色苷作为葡萄和葡萄酒的主要呈色物质,其含量及组成比例直接决定了葡萄酒的色度、色调及颜色的稳定性<sup>[4]</sup>。主要贡献葡萄酒红色色调的物质为单体花色苷,包括花青素-3-O-葡萄糖苷、花翠素-3-O-葡萄糖苷、甲基花青素-3-O-葡萄糖苷、甲基花翠素-3-O-葡萄糖苷、二甲花翠素-3-O-葡萄糖苷。其中二甲花翠素-3-O-葡萄糖苷及其衍生物是葡萄酒红色的主要来源<sup>[5]</sup>。黄烷醇、黄酮醇物质通过与花色苷物质结合也可起到辅色作用。黄烷-3-醇类物质可以与花色苷通过乙醛桥连接进而形成稳定的复合产物或者直接结合就可形成聚合色素<sup>[5]</sup>。其中表儿茶素比儿茶素与花色苷结合能力更强<sup>[6]</sup>。黄酮醇类物质如杨梅酮和槲皮素则对葡萄酒颜色具有更好的稳定性<sup>[7]</sup>。葡萄酒中的苦涩味主要来源于黄烷醇类物质,其中黄烷醇的没食子酸酯的苦味相对较重<sup>[1]</sup>,不同聚合度和结构的缩合单宁也决定了葡萄酒的收敛性和苦涩感,单宁聚合度越高,使得葡萄酒中的苦涩感越强;表儿茶素比儿茶素的涩感更强,没食子酯化

使酒的单宁感变粗糙,而三羟基化黄烷醇能够降低这种粗糙的口感,柔顺酒体<sup>[8]</sup>。

关于避雨栽培对葡萄果实类黄酮的影响也存在不同的结果,笔者研究了简易避雨栽培对山东蓬莱地区‘赤霞珠’葡萄果皮花色苷代谢的影响,结果表明,避雨栽培没有改变花色苷的组成及其比例,但增加了所检测到的大部分花色苷组分的浓度<sup>[9]</sup>。在北京密云地区研究避雨栽培对‘霞多丽’酚类物质代谢影响,发现避雨栽培降低了类黄酮代谢中F3'H和F3H路径产物的含量与比例,提高了F3'5'H支路产生的酚类物质的含量和比例<sup>[9]</sup>。笔者在前期研究的基础上,采用高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)技术,分析了北京市密云县张裕爱斐堡葡萄园内2012和2013年避雨栽培和露地栽培2种模式下生长的‘赤霞珠’葡萄果实中类黄酮物质的组成及其含量,探究避雨栽培对葡萄果实类黄酮物质表征的影响,为避雨栽培在我国酿酒葡萄生产中的应用和推广提供理论依据和实际指导。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料与地点

本试验分别于2012年和2013年在北京市密云县张裕爱斐堡国际酒庄的葡萄园内进行。密云县位于北京市东北部,处于燕山山地与华北平原交接地,属温带大陆性气候。葡萄园地理坐标为东经116°55',北纬40°30',位处向阳坡地,坡度约10°,土壤为砂砾结构土质。从中国气象科学数据共享服务网(<http://cdc.cma.gov.cn/home.do>)获得了这2个年份葡萄果实生长成熟期的主要气象参数,整理如表1所示。根据果实生长发育不同时期,将其生长过程

表1 北京密云县2012和2013年果实不同发育时期主要气象参数

Table 1 Main meteorological parameters of Miyun, Beijing in grape growth seasons of 2012 and 2013

果实发育时期 Development stages of fruit	时间 Time/d		降雨量 Rainfall/mm		光照时间 Sunshine time/h		日平均气温 Average temperature/°C		平均昼夜温差 Temperature difference/°C		有效积温 Effective accumulative temperature/°C	
	2012	2013	2012	2013	2012	2013	2012	2013	2012	2013	2012	2013
第1阶段 Stage I	64	56	427.2	350.9	292.9	317.9	24.5	24.7	10.9	9.5	928.8	824.9
第2阶段 Stage II	32	28	97.0	129.7	212.2	179.9	24.5	25.6	10.1	9.9	465.4	436.1
第3阶段 Stage III	39	40	108.9	71.7	278.2	210.8	18.3	18.0	12.8	11.1	324.7	311.8
总发育时期 Total	135	124	633.1	552.3	783.3	708.6	22.7	22.8	11.4	10.1	1 718.9	1 582.8

分为3个阶段,分别为坐果期-转色期开始(Stage I)、转色期(Stage II)和成熟期(Stage III)。

本试验所用的试材为2003年定植的‘赤霞珠’(*V. vinifera* ‘Cabernet Sauvignon’)自根苗,南北行向

种植,行距2.5 m,株距为1.0 m。栽培管理采用水平式独龙蔓树形和单臂篱架架式,结果带分布在距地面35 cm处。试验选取了长势相近的葡萄植株,2种栽培方式均分别设3个试验小区(视为3个生物学重

复),每个小区有40株葡萄树,整个试验共用240株。简易避雨棚搭建于树体顶端,棚高185 cm(离树冠顶部约12 cm),宽110 cm,棚顶弧度为125 cm。覆膜材料为6.5丝长寿膜,是一种聚乙烯耐老化膜,厚度为0.10~0.12 mm,透光率约为80%。棚搭建时间为:2012年6月14日(花后14 d)、2013年7月13日(花后36 d)。间隔7~14 d采样1次,直至果实完全成熟,如遇雨天则提前或延后1~2 d。依据此原则,2012年的采样时间为花后20、37、50、64、71、78、87、97、112、125、135 d,而2013年采样时间在花后14、28、41、57、67、78、84、97、112、124 d(其中前2个取样点仅有露地栽培的样品)。每个果穗每次随机采样2~3粒(注意兼顾阴阳面、叶幕层内外和上中下果穗以及每穗葡萄肩、中、顶部果实),并保留2 mm左右的果柄。采样时间固定在8:00—10:00 am。每次每个处理采集大约1 000粒果实,采样时,挑选大小一致、无损伤、无病虫害的果粒,用保温袋包裹,放进泡沫保温箱中,立即运回实验室。在所采样品中,200粒鲜果用来测定百粒质量、百粒体积、可溶性固形物含量、pH值和可滴定酸含量;剩余样品用液氮速冻,-80 °C保存。

## 1.2 方法

**1.2.1 葡萄果实理化指标的测定** 随机取出200粒新鲜果实样品,其中100粒采用千分之一天秤测定百粒果质量,之后应用排水法测定百粒果体积;另外100粒果实取汁,采用便携式糖度计测可溶性固形物含量,采用氢氧化钠滴法测定可滴定酸含量。

**1.2.2 葡萄果实黄酮醇的提取与检测** 果皮中黄酮醇的提取参照梁娜娜等<sup>[10]</sup>的方法进行,并有所改进。具体步骤如下:准确称取0.500 0 g葡萄皮冻干粉于50 mL离心管中,加入15 mL提取液[50%( $\varphi$ ,后同)乙醇+1%乙酸水溶液],超声提取35 min,之后于室温8 000 r·min<sup>-1</sup>下离心10 min,沉淀物按上述步骤重复提取4次(第3、4次提取液减少至10 mL),合并上清液并转移至250 mL分液漏斗中,加入50 mL去离子水,用乙酸乙酯萃取40 mL,共萃取3次。收集有机相旋蒸至干,用25%甲醇水溶液定容至2 mL,待过滤及色谱分析。每个样品分别提取3次。

采用Bruker amaZon SL系列LC-UV仪进行样品分析。色谱条件:色谱柱为Zorbax Eclipse XDB-C18(4.6 mm×250 mm, 5  $\mu$ m);柱温40 °C;进样量为50  $\mu$ L;检测波长360 nm;流速为0.63 mL·min<sup>-1</sup>。流动相A:乙腈:甲酸:水=5:8.5:86.5(V/V/V);流动相B:乙腈:甲醇:甲酸:水=25:45:8.5:21.5(V/V/V/V)。洗脱程序:0~7 min, 0% B; 7~24.2 min, 0%~14.2% B; 24.2~27 min, 14.2%~15.7% B; 27~27.4 min, 15.7%~16.3% B; 27.4~33.4 min, 16.3%~18.8% B; 33.4~39 min, 18.8%~23.5% B; 39~45 min, 23.5%~26% B; 45~47 min, 26%~27.4% B; 47~51.6 min, 27.4%~32% B; 54~61.8 min, 33.4%~40% B; 61.8~67.8 min, 40%~100% B; 67.8~78.4 min, 100%~0% B。每个样品重复进样2次,作为2次技术重复;检测结果n=6。

**1.2.3 葡萄果皮黄烷醇类物质的提取与检测** 果皮中黄烷-3-醇的提取参照梁娜娜等<sup>[10]</sup>的方法。具体步骤如下:取0.100 0 g葡萄皮干粉于10 mL离心管中,加入1 mL间苯三酚缓冲液和0.005 g抗坏血酸,在50 °C下静置裂解20 min后,加入1 mL乙酸钠溶液终止反应,离心15 min(10 000 r·min<sup>-1</sup>)后取出上清液置于新的10 mL离心管中;重复提取3次合并上清液摇匀,滤膜过滤后于-40 °C保存待用。每个样品分别提取3次。

采用Bruker amaZon SL系列LC-UV-MS仪进行样品分析。色谱条件:色谱柱:Zorbax Eclipse XDB-C18(4.6 mm×250 mm, 5  $\mu$ m);柱温:25 °C;进样量:25  $\mu$ L;检测波长:280 nm。流动相A:醋酸:水=2:998(V/V);流动相B:乙腈:流动相A=4:1(V/V)。梯度洗脱程序:0~20 min, 10.0% B; 20~30 min, 10%~15% B; 30~40 min, 15%~20% B; 40~50 min, 20%~33% B; 50~55 min, 33%~40% B; 55~58 min, 40%~100% B; 58~63 min, 100% B; 63~64 min, 10% B。流速:1.0 mL·min<sup>-1</sup>;柱温:25 °C;检测波长:280 nm。

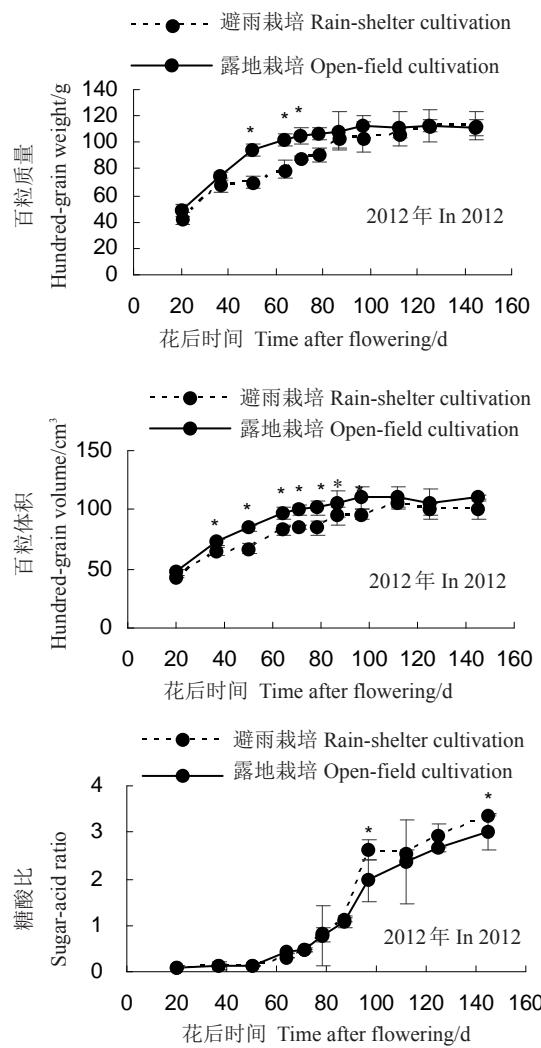
质谱条件:采用电喷雾离子源(ESI),负离子模式,离子扫描范围:100~1 500 m/z;雾化气压力:30 psi;干燥气流速:10 L·min<sup>-1</sup>;干燥气温度:325 °C;Trap ICC:30 000 units;最大累计时间:300 ms;CID的MS/MS诱导碰撞能量为1.0 V。每个样品重复进样2次,作为2次技术重复;检测结果n=6。

**1.2.4 果皮花色苷的提取与检测** 果皮中花色苷的提取参照笔者实验室的方法<sup>[11]</sup>进行。具体步骤如下:称取0.500 g葡萄皮干粉,浸入10 mL含1%甲酸的甲醇溶液中,避光超声萃取10 min,再在25 °C下避光200 r·min<sup>-1</sup>摇床震荡萃取30 min,然后8 000×g离心10 min,取上清液于100 mL圆底烧瓶中,重复提

取5次。最后合并上清液,30 °C真空旋转蒸发除去甲酸和甲醇,最后用A相与B相按照9:1比例配好的定溶剂定容,上样缓冲液最终定容体积为10 mL。上样前用0.22 μm滤膜(Micro Pes, Membrana, Wupperthal, Germany)过滤。每个样品分别提取3次。

色谱条件:色谱柱:Zorbax Eclipse SB C-18(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相A:含2%甲酸和6%乙腈的水溶液;流动相B:含2%甲酸和54%乙腈的水溶液。洗脱程序:1~18 min, 10%~25% B; 18~20 min, 25% B; 20~30 min, 25%~40% B; 30~35 min, 40%~70% B; 35~40 min, 70%~100% B。流速:1.0 mL·min<sup>-1</sup>;柱温:50 °C;检测波长:525 nm;波长扫描范围:200~900 nm;进样量:30 μL。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI),正离子模式。



\*表示在避雨栽培和露地栽培模式之间差异显著( $p < 0.05$ );下同。  
\* indicates significant difference between the rain-shelter and open-field cultivations ( $p < 0.05$ ). The same below.

图 1 2012 和 2013 年避雨和露地栽培模式下葡萄果实的百粒质量、百粒体积和糖酸比

Fig. 1 Hundred-grain weight, hundred-grain volume and sugar-acid ratio in grape berries under the rain-shelter and open-field cultivations in 2012 and 2013

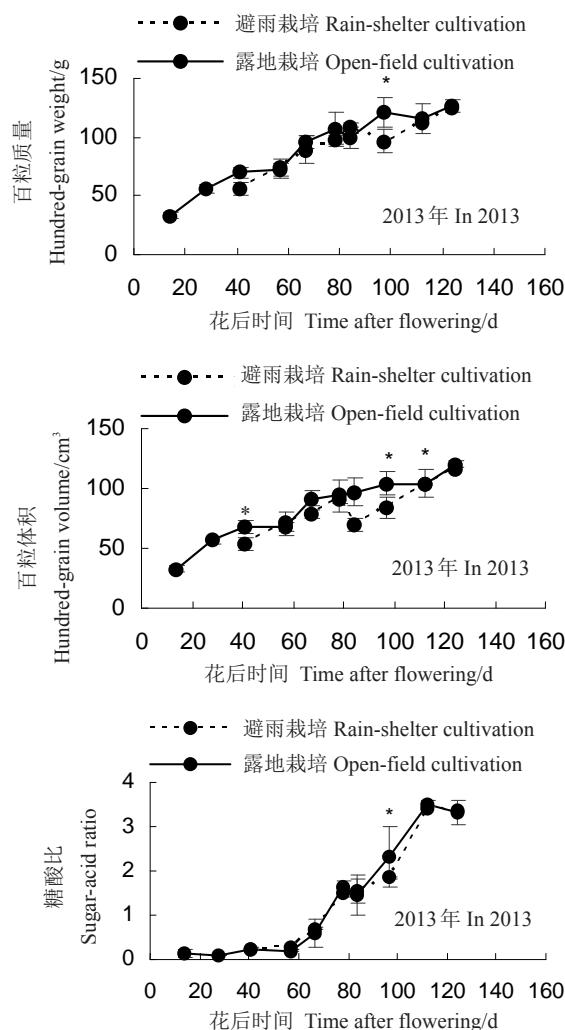
离子扫描范围为100~1500 m/z;雾化器压力:35 psi;干燥气流速:12 L·min<sup>-1</sup>;干燥气温度:300 °C。每个样品重复进样2次,作为2次技术重复;检测结果 $n=6$ 。

1.2.5 数据处理与统计分析 数据的统计分析采用SPSS 20.0软件,其中用T-test法分析避雨栽培和露地栽培之间的差异显著性,应用偏最小二乘判别分析(PLS-DA)方法得筛选差异的酚类组分;绘图软件采用Origin 2017。

## 2 结果与分析

### 2.1 对果实理化指标的影响

图1记录了2012、2013年避雨栽培和露地栽培模式下葡萄果实发育过程中百粒质量、百粒体积和



\*表示在避雨栽培和露地栽培模式之间差异显著( $p < 0.05$ );下同。

糖酸比的变化。在2个年份中,葡萄果实在生长过程中均呈现典型的双“S”形曲线,随着果实发育,果实质量逐渐增加。2012年,避雨栽培果实在进入转色期后果实质量显著低于露地栽培,到成熟至采收期两者没有显著性差异;2013年,2种栽培模式下果实质量处于交替上升的趋势,仅在转色前和转色完成后第1个点露地栽培高于避雨栽培,其他时期二者没有显著性差异。

观察果实体积的变化发现,2 a(年)间变化趋势与果实质量相似,不同的是,2012年露地栽培果实体积始终高于避雨栽培,尤其在采收期出现了一个明显的上升趋势;而2013年果实体积在露地栽培与避雨栽培下大多数发育期没有显著性差异,仅在转色结束时避雨栽培的果实体积出现降低,显著低于露地栽培。

2个年份的糖酸比在2种栽培模式下的变化趋势均一致。在2012年坐果期至转色结束,2种栽培模式下糖酸比随着果实成熟逐渐上升,在采收期时,露地栽培下果实糖酸比均高于避雨栽培,其他时期二者没有显著性差异;2013年整个果实发育期内,2种栽培模式下糖酸比都没有显著性差异,仅在采收期糖酸比在2种栽培模式下都有所下降。比较2个年份,在采收期,果实质量和果实体积均为2013年高于2012年,糖酸比则为2012年更高。

## 2.2 对果皮黄酮醇组成和含量的影响

由表2可见,在2个年份中,2种栽培模式下生长的果实中均检测到12种黄酮醇类化合物,包含5种槲皮素类、3种山奈酚类和4种杨梅酮类,表明年份和栽培模式对果实黄酮醇的种类没有影响。在成熟采收期的果实中,含量最高的黄酮醇为槲皮素-3-

表2 2012、2013年避雨栽培和露地栽培模式下葡萄果实在采收点各种黄酮醇物质的含量

Table 2 The concentrations of various flavonols in grape berries at harvest under rain-shelter and open-field cultivations in 2012 and 2013

(mg·kg<sup>-1</sup>)

黄酮醇 Flavonols	年份 Years	栽培模式 Cultivations	
		避雨栽培 Rain-shelter cultivation	露地栽培 Open-field cultivation
槲皮素类 Quercetins	槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷	2012	0.73
	Quercetin-3-O-glucuronide	2013	0.73
	二氢槲皮素-3-O-葡萄糖苷	2012	0.11
	Dihydroquercetin-3-O-glucoside	2013	0.11
	槲皮素-3-O-半乳糖苷	2012	0.07
	Quercetin-3-O-galactoside	2013	0.07
	槲皮素-3-O-葡萄糖苷	2012	0.43
	Quercetin-3-O-glucoside	2013	0.43
	异鼠李素-3-O-葡萄糖苷	2012	0.09
山奈酚类 Kaempferols	Iisorhamnetin-3-O-glucoside	2013	0.09
	山奈酚-3-O-半乳糖苷	2012	0.10
	Kaempferol-3-O-galactoside	2013	0.20
	山奈酚-3-O-葡萄糖醛酸苷	2012	0.07
	Kaempferol-3-O-glucuronide	2013	0.14
	山奈酚-3-O-葡萄糖苷	2012	0.12
杨梅酮类 Myricetins	Kaempferol-3-O-glucoside	2013	0.22
	杨梅酮-3-O-葡萄糖醛酸苷	2012	0.05
	Myricetin-3-O-glucuronide	2013	0.05
	杨梅酮-3-O-葡萄糖苷	2012	0.03
	Myricetin-3-O-glucoside	2013	0.03
	西伯利亚落叶松黄酮	2012	0.05
	Laricitrin	2013	0.06
	丁香亭	2012	0.07
	Syringetin	2013	0.08

O-葡萄糖醛酸苷和槲皮素-3-O-葡萄糖苷,二者含量占总黄酮醇含量的61%以上。

观察黄酮醇总量的变化(图2)可以发现,2012和2013年2种栽培模式下黄酮醇总量呈现波折上升的趋势。2012年,坐果至转色结束,露地栽培下生长的果实中黄酮醇总量略高于避雨栽培,但在统计

学上没有显著性差异;进入成熟期时,避雨栽培下黄酮醇显著高于露地栽培;而在成熟采收时,两者没有显著性差异。在2013年,避雨栽培下采收期的果实中总黄酮醇含量显著高于露地栽培。比较2个年份间采收期的数据可以发现,露地栽培下黄酮醇的总量没有差异,但2013年避雨栽培下黄酮醇的含量显

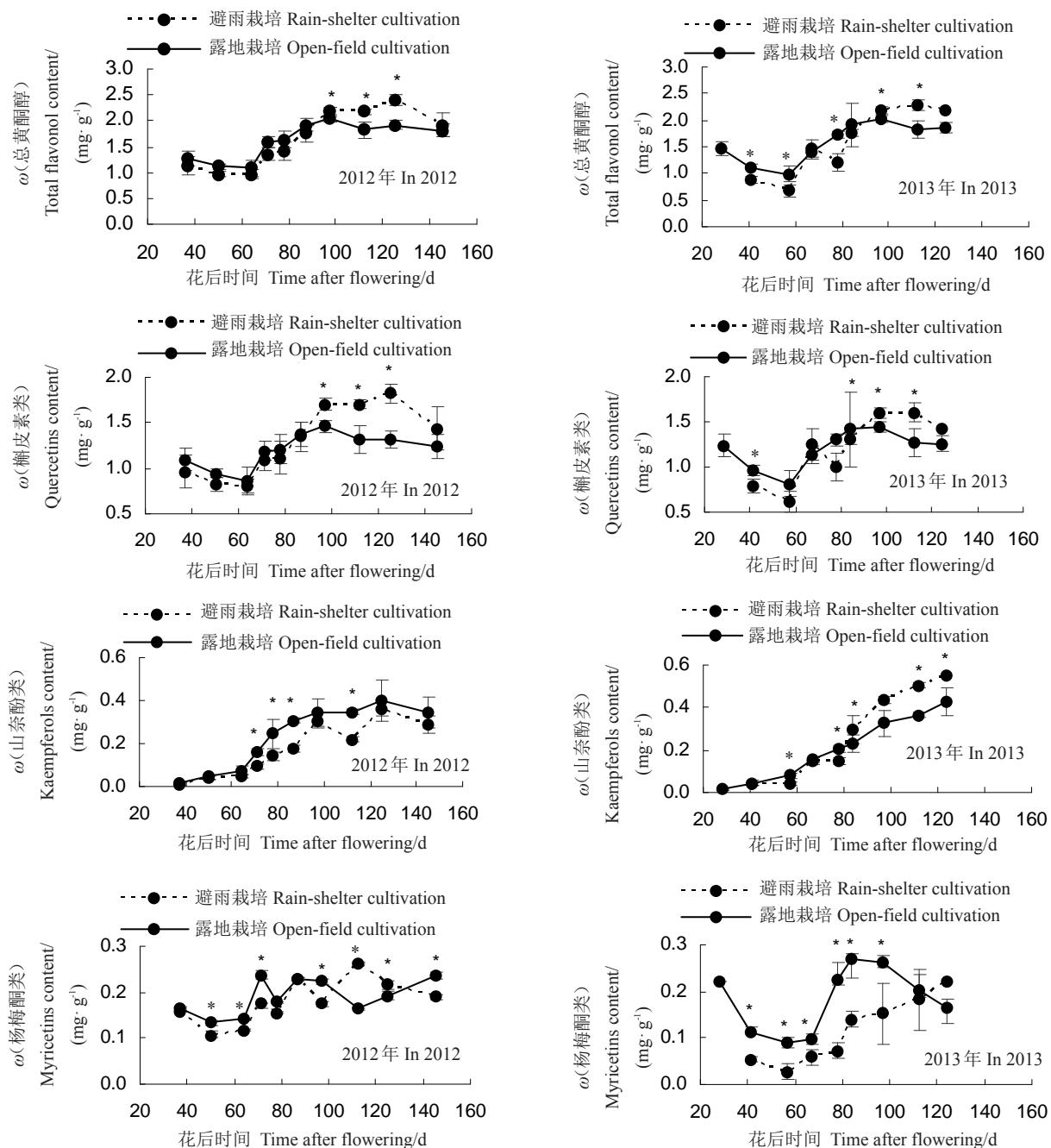


图 2 2012 和 2013 年避雨栽培和露地栽培模式下果皮黄酮醇总量及各种黄酮醇物质含量

Fig. 2 The contents of total flavonols and various flavonols in grape peel under rain-shelter and open-field cultivations in 2012 and 2013

著高于 2012 年。

就 B 环取代基数目不同的黄酮醇而言, 槲皮素类物质( $3',4'$ -取代黄酮醇)在 3 类黄酮醇中含量最高, 占黄酮醇总量 75%以上, 其变化趋势基本代表了总黄酮醇的变化。山奈酚类黄酮醇含量最低, 在采收期为黄酮醇总量的 10%左右。从图 2 中可见, 2 个年份, 避雨栽培均促进了果实成熟过程中槲皮素类物质( $3',4'$ -取代黄酮醇)的积累, 但在采收期, 避雨

和露地生长的果实槲皮素类物质含量没有统计学上的显著差异。而避雨栽培对山奈酚类物质(4'-取代黄酮醇)的影响则依年份而异: 2012 年果实发育过程中露地栽培果实中山奈酚含量始终高于避雨栽培, 但是在采收期二者没有显著性差异; 2013 年自坐果至转色结束, 避雨栽培和露地栽培下二者都没有显著性差异, 但是果实进入成熟期后避雨栽培山奈酚显著高于露地栽培, 直至采收。杨梅酮类物质

(3'4'5'-取代黄酮醇)含量随着果实发育也呈现波折上升的趋势,但是增加幅度远小于其他2类黄酮醇;2012年采收期露地栽培显著高于避雨栽培,2013年果实发育过程中露地栽培均显著高于避雨栽培,但是采收期二者没有显著性差异。在所有杨梅酮类组分中,坐果-转色前期检测不到西伯利亚落叶松黄酮和丁香亭,但是随着果实的转色和成熟,这2种物质的含量迅速上升,可见随着果实的发育杨

梅酮类黄酮醇虽然总量没有很大的变化,但甲基化的进程增加了。比较2种栽培模式,2个年份采收期避雨栽培下西伯利亚落叶松黄酮和丁香亭的含量和其所占比例均显著高于露地栽培(表2),说明避雨栽培可以促进黄酮醇甲基化的进程。

### 2.3 对果皮黄烷醇含量的影响

由图3可以看出,黄烷醇总量在果实发育早期含量最高,随着果实的发育和成熟逐渐降低。2个

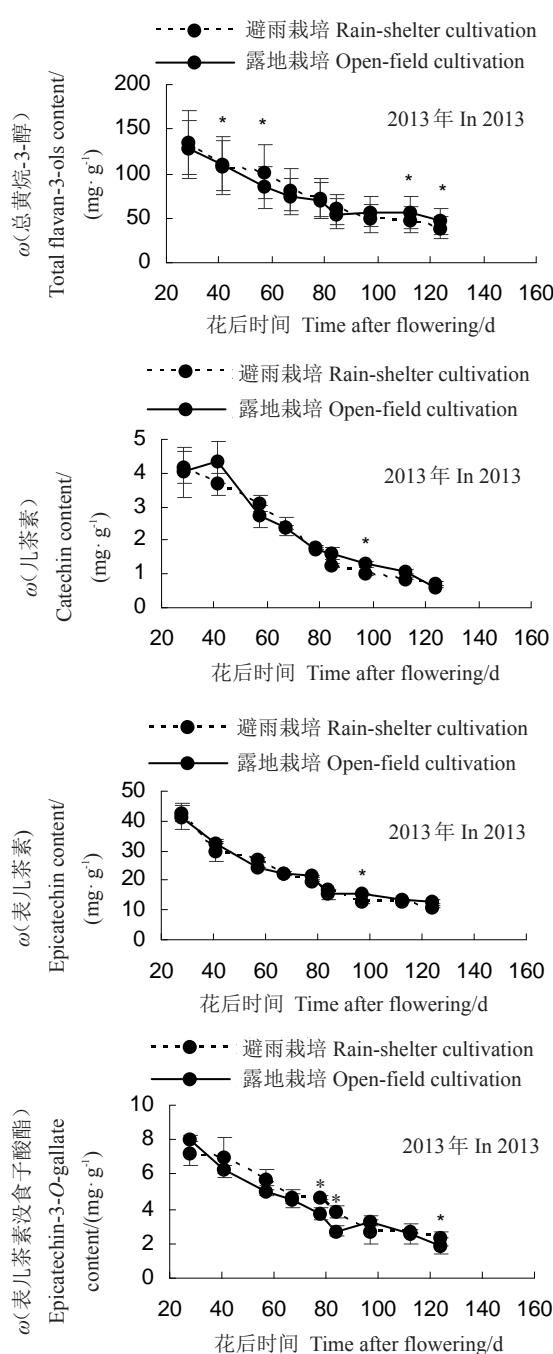
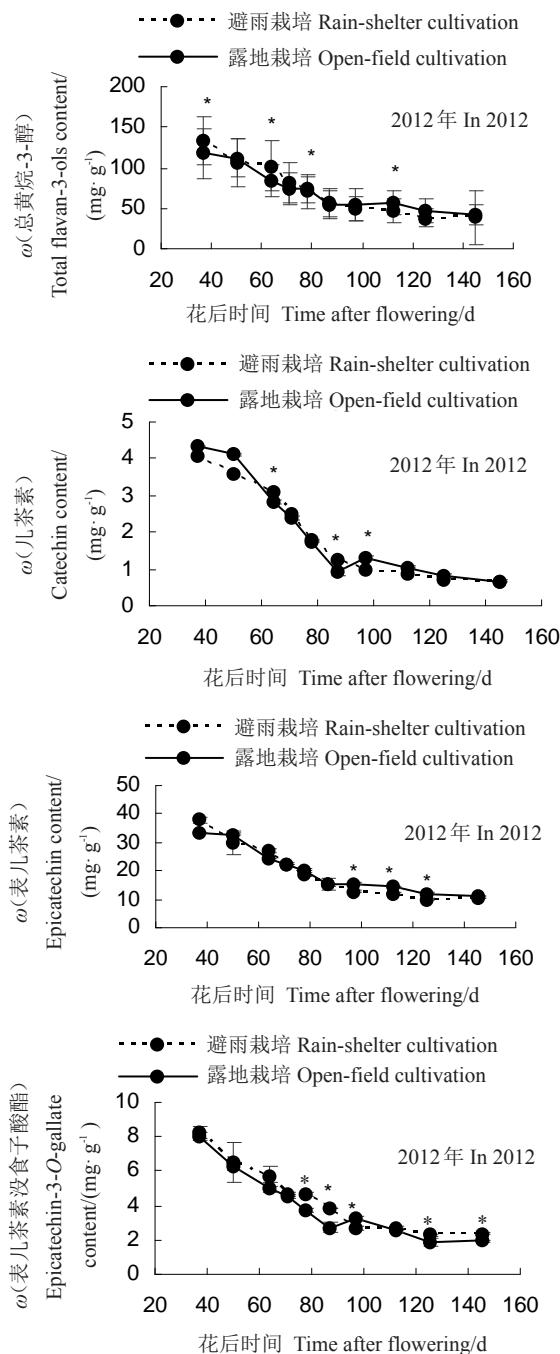


图3 2012和2013年避雨栽培和露地栽培模式下果皮黄烷醇总量及各种黄烷醇含量

Fig. 3 The content of total flavanols and various flavanols in grape peel under rain-shelter and open-field cultivations in 2012 and 2013

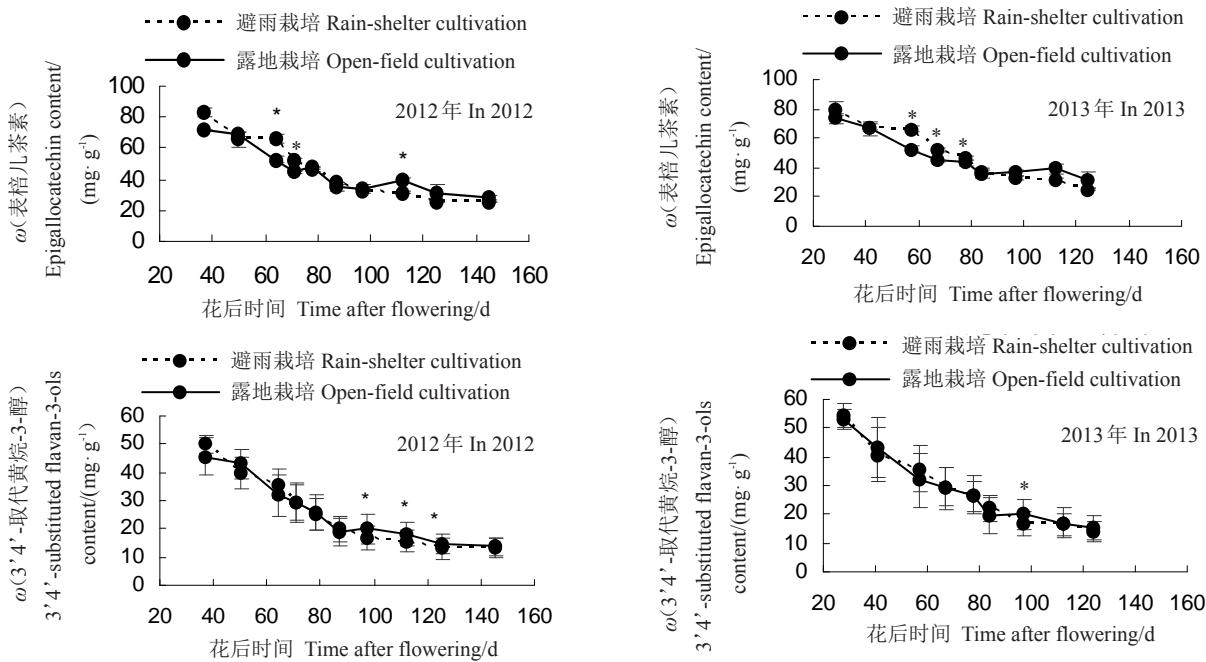


图3(续) Fig. 3 (continued)

年份果实发育初期避雨栽培下黄烷-3-醇总量高于露地栽培,进入成熟期后露地栽培较高,但是在采收期二者没有显著性差异。黄烷-3-醇是单宁的基本组成单元,在葡萄果皮中大部分黄烷醇都以聚合态的形式存在,其中延伸单元占黄烷醇总量的85%以上。葡萄果皮中黄烷-3-醇主要有4种单元,即儿茶素[(+)-Catechin]、表儿茶素[(-)-Epicatechin]、表棓儿茶素[(-)-Epigallocatechin]和表儿茶素没食子酸酯[(-)-Epicatechin-3-O-gallate]<sup>[12]</sup>。从图3中可以看出,2个年份2种栽培模式下,4种单元的含量从高到低依次为表棓儿茶素、表儿茶素、儿茶素和表儿茶素没食子酸酯。栽培模式对黄烷醇单体的组成和种类没有影响,但在含量上有一定差异,均表现为坐果期至转色初期避雨栽培的果实中含量较高,在转色之后,露地栽培下果皮各种黄烷-3-醇单元的含量较高;在采收期,2013年露地栽培下表儿茶素的含量显著高于避雨栽培,而2012年避雨栽培比露地栽培下的表儿茶素没食子酸酯的含量高,其他单元在不同栽培模式下2个年份的采收期没有显著性差异。

黄烷-3-醇类物质根据B环取代基的数目,可以分为2类:一类是由F3'H途径催化产生的儿茶素、表儿茶素和表儿茶素没食子酸酯,即3',4'-取代黄烷醇;另一类是由F3',5'H途径催化产生表棓儿茶素,即3',4',5'-取代黄烷醇。如图3所示,3',4'-取代黄烷醇在2个年份2种栽培模式下,随果实的发育进程

所有时期均没有显著性差异,说明避雨栽培对3',4'-取代黄烷醇的积累没有显著影响;对3',4',5'-取代黄烷醇,2 a间也呈现较为一致的规律:进入转色期后避雨栽培下3',4',5'-取代黄烷醇的含量显著高于露地栽培,随着果实的成熟露地栽培高于避雨栽培,采收期露地栽培略高,但是二者没有显著性差异。观察2种取代方式黄烷醇占总量的比例可以发现,露地栽培可以提高3',4',5'-取代黄烷醇所占总量的比例。可见,避雨栽培会降低代谢流向3',4',5'-取代黄烷醇的分支。

#### 2.4 对果皮花色苷含量的影响

在‘赤霞珠’葡萄果皮中共检测到15种花色苷,其中包括9种花翠素类花色苷(3种基本花翠素糖苷、3种乙酰化花翠素糖苷和3种香豆酰化花翠素糖苷)以及6种花青素类花色苷(2种基本花青素糖苷、2种乙酰化花青素糖苷和2种香豆酰化花青素糖苷),避雨栽培对果皮中花色苷的种类没有影响(表3)。在这些组分中,含量最高的是二甲花翠素-3-O-葡萄糖,其次为二甲花翠素乙酰化葡萄糖苷和二甲花翠素反式香豆酰化葡萄糖苷,这3类均属于花翠素类花色苷。花翠素-3-O-葡萄糖苷、二甲花翠素-3-O-葡萄糖苷、花翠素乙酰化葡萄糖苷、花青素乙酰化葡萄糖苷等组分的含量在2种栽培模式之间存在显著性差异。

从图4可见,2012年采收期,避雨和露地栽培下

表3 2012、2013年避雨栽培和露地栽培模式下葡萄果实在采收点各种花色苷物质含量

Table 3 The concentrations of various anthocyanins in grape berries under rain-shelter and open-field cultivations in 2012 and 2013

花色苷 Anthocyanins	年份 Years	栽培模式 Cultivations		(mg·kg <sup>-1</sup> )
		避雨栽培 Rain-shelter cultivation	露地栽培 Open-field cultivation	
花翠素类 Delphinidin	花翠素-3-O-葡萄糖苷	2012	1 861.72±24.06*	1 079.15±44.71
	Delphinidin-3-O-glucoside	2013	2 676.24±24.46	3 183.13±115.72*
	花翠素乙酰化葡萄糖苷	2012	1 038.47±33.00*	754.32±39.54
	Dp-acetylglucoside	2013	1 156.12±31.65	1 156.12±31.65*
	花翠素香豆酰化葡萄糖苷	2012	83.01±4.41	75.62±1.64
	Dp-coumaroylglucoside	2013	140.02±3.43	176.07±3.09*
	甲基花翠素-3-O-葡萄糖苷	2012	1 133.44±42.75*	753.13±21.96
	Petunidin-3-O-glucoside	2013	1 540.69±42.91	1 567.59±21.38
	甲基花翠素乙酰化葡萄糖苷	2012	481.44±24.34*	337.53±9.42
	Pt-acetylglucoside	2013	902.26±30.30	1 152.00±9.42*
	甲基花翠素香豆酰化葡萄糖苷	2012	130.98±4.93*	107.42±4.73
	Pt-coumaroylglucoside	2013	212.43±4.94	157.28±111.59
	二甲花翠素-3-O-葡萄糖苷	2012	10 066.28±193.24*	7 760.52±216.58
	Malvidin-3-O-glucoside	2013	9 658.89±252.79	10 475.32±307.18*
花青素类 Cyanidin	二甲花翠素乙酰化葡萄糖苷	2012	6 107.40±231.66*	4 690.95±201.19
	Mv-acetylglucoside	2013	6 921.92±231.32	7 405.75±276.57
	二甲花翠素反式香豆酰化葡萄糖苷	2012	1 813.16±33.68*	1 553.12±84.49
	Mv-coumaroylglucoside	2013	2 763.51±203.71	3 317.87±279.51
	花青素-3-O-葡萄糖苷	2012	276.33±11.13*	155.43±5.49
	Cyanidin-3-O-glucoside	2013	6 203.29±10.95	6 867.16±28.82
	花青素香豆酰化葡萄糖苷	2012	21.33±0.34*	41.87±0.77
	Cy-coumaroylglucoside	2013	62.19±0.35	67.26±2.94*
	花青素乙酰化葡萄糖苷	2012	78.89±0.77*	52.86±1.34
	Cy-acetylglucoside	2013	92.47±2.81	112.59±3.09*
	甲基花青素-3-O-葡萄糖苷	2012	1 224.32±18.50*	805.38±40.88
	Peonidin-3-O-glucoside	2013	1 199.07±30.27	1 199.07±30.27
	甲基花青素乙酰化葡萄糖苷	2012	591.69±16.39*	397.44±13.50
	Pe-acetylglucoside	2013	876.77±24.44	886.11±51.69
	甲基花青素反式香豆酰化葡萄糖苷	2012	269.66±6.19*	219.32±11.27
	Pe-coumaroylglucoside	2013	500.44±20.58	572.27±31.85*

果皮中花色苷总质量分数分别为25 178.27 mg·kg<sup>-1</sup>和18 784.06 mg·kg<sup>-1</sup>, 避雨栽培比露地栽培高约34%; 2013年, 避雨和露地栽培下果皮中花色苷总质量分数分别为29 294.22 mg·kg<sup>-1</sup>和32 140.43 mg·kg<sup>-1</sup>, 露地栽培下花色苷的质量分数比避雨栽培下高出约

10%, 这说明年份间的差异在露地栽培下表现更加明显, 而比较不同年份试验结果表明, 避雨栽培在不同的年份间果皮中花色苷的含量的变化更小。

花色苷可以根据B环取代基数目的不同将其分成2类: 一是花青素类(即3'-羟基取代花色苷), 另

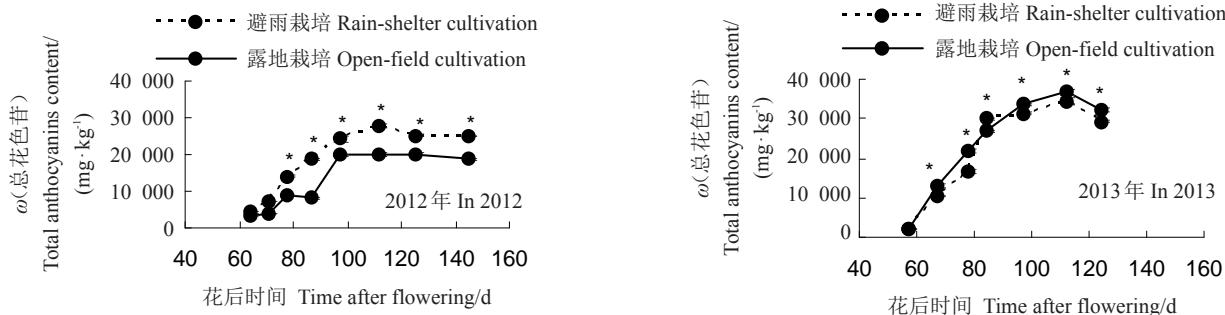


图4 2012和2013年避雨栽培对花色苷总量的影响

Fig. 4 Effect of rain-shelter cultivation on the content of total anthocyanins in 2012 and 2013

一是花翠素类(即3'5'-羟基取代花色苷)。从图5中可见,花翠素类花色苷占有很高的比例,其变化决定了总花色苷含量的变化趋势,在2012年避雨栽培下花翠素类和花青素类花色苷的含量均有所增长,而在2013年呈现正好相反的趋势。从采收期来看,2012年避雨和露地栽培下花翠素类花色苷的含量( $\omega$ ,后同)分别为 $20\ 902.73\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $15\ 558.64\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,

均占各自栽培模式下花色苷总量的83%,可见避雨栽培对2012年花翠素所占比例没有显著性影响;2013年避雨和露地栽培下花翠素类花色苷含量分别为 $23\ 090.93\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $25\ 273.27\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,分别占花色苷总量的79%和78%,可见避雨栽培对2013年花翠素所占比例没有显著性影响;相反,年份对于花翠素类所占比例影响更大。

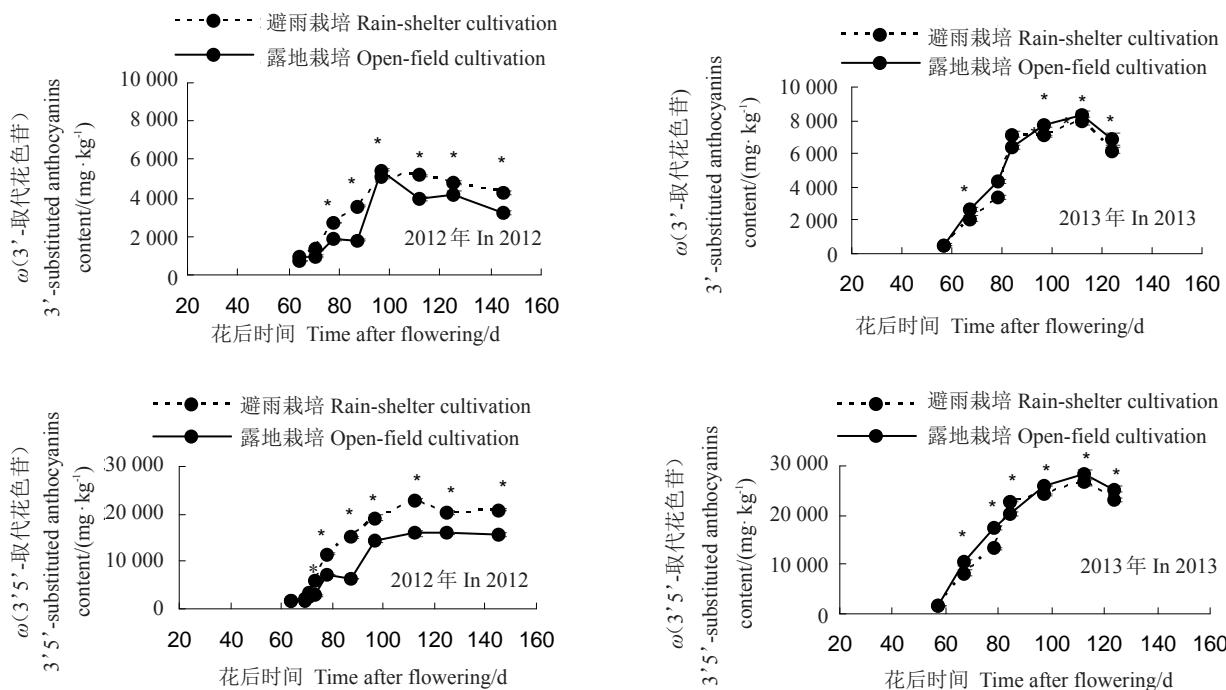


图5 2012和2013年避雨栽培对3'-取代和3',5'-取代花色苷含量的影响  
Fig. 5 Effect of rain-shelter cultivation on the contents of 3'-substituted and 3',5'-substituted anthocyanins in 2012 and 2013

如图6所示,在2个年份2种栽培模式下,未酰化花翠素、乙酰化花翠素和3种酰化形式的花青素均与花色苷总量的变化趋势较为一致。2012年,在采收期6种花色苷均为避雨栽培含量高于露地栽培;2013年,采收期非酰化花翠素、乙酰化花翠素和香豆酰化花青素均呈现露地栽培显著高于避雨栽培,而另外3种酰化形式花色苷在2种栽培模式下没有显著性差异。观察6种花色苷的比例可以发现,2012年,花翠素类花色苷中,露地栽培下乙酰化和香豆酰化的比例高于避雨栽培;花青素中,避雨栽培有利于乙酰化比例的升高,露地栽培提高了香豆酰化的比例。2013年,避雨栽培有助于提高花翠素类香豆酰化所占的比例;而花青素中,与2012年一致,避雨栽培有利于乙酰化比例的升高,露地栽培提高了香豆酰化的比例。综上可见,2012年避雨栽培不利于酰化的进程,而2013年,避雨栽培有助于乙酰

化的进程,不利于香豆酰化形式花色苷的形成。

## 2.5 避雨栽培和年份对类黄酮物质积累影响差异的分析

为进一步明确哪些类黄酮组分受栽培模式的影响最为显著,以2012、2013年避雨栽培和露地栽培下葡萄果实中检测到的所有类黄酮物质的含量为变量进行偏最小二乘判别分析(PLS-DA)。从样品得分散点图(图7-A)看出,2个年份的样品可以较好地分开,2012年的样品大致分布在Component 1的负半轴,2013年的样品大致分布在Component 1的正半轴。在各个年份中,2种栽培模式的区分均不明显,说明年份因素对葡萄果实中类黄酮组分积累的影响要远大于栽培模式。从组分得分图(图7-B)可以看出,区分2个年份的最主要物质是花青素-3-O-葡萄糖苷、二甲花翠素-3-O-葡萄糖苷、二甲花翠素乙酰化葡萄糖苷。此外,有14种花色苷在2013年的

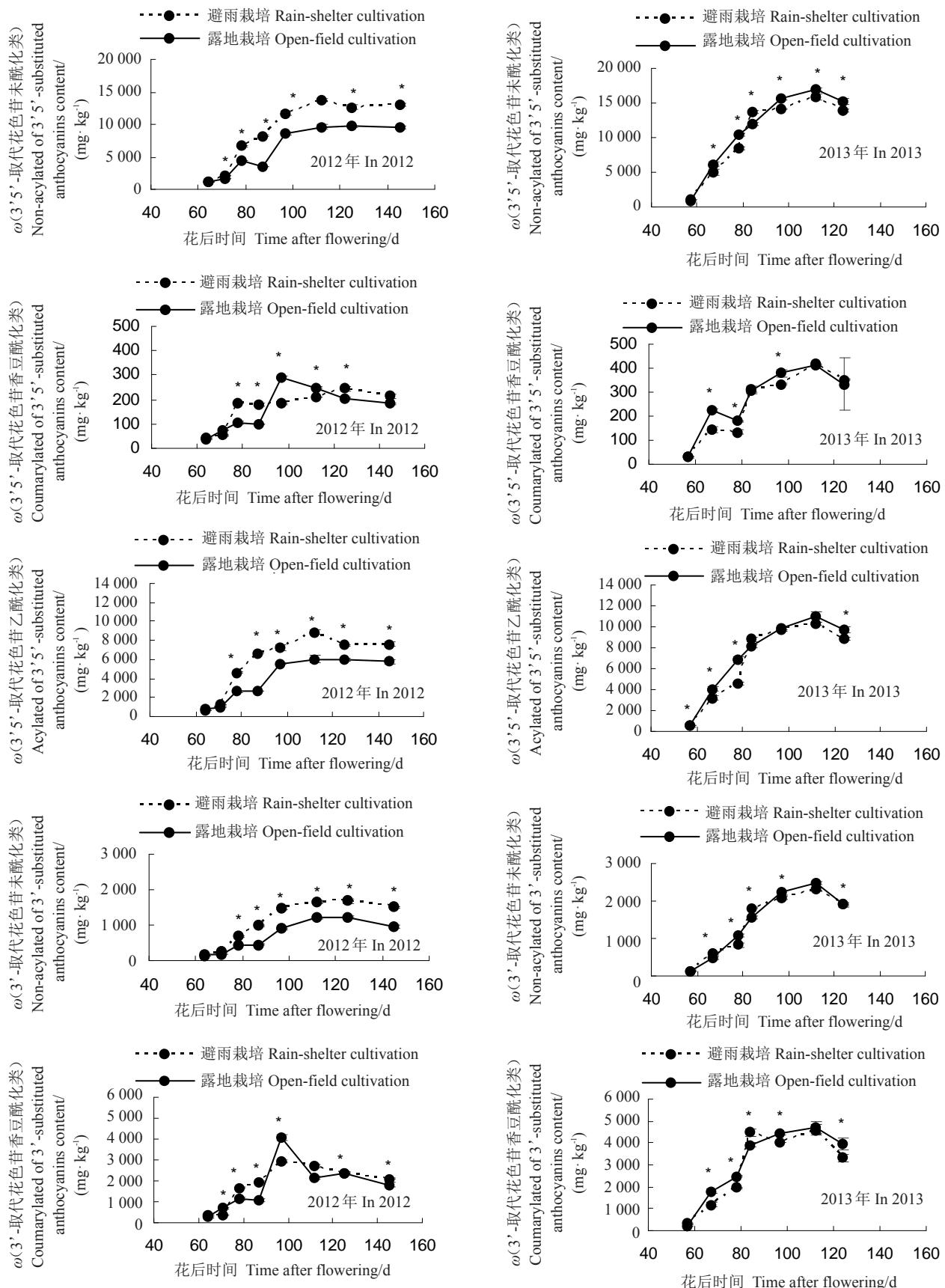


图 6 2012 和 2013 年避雨栽培对 3'，5' - 取代和 3' - 取代花色苷中未酰化、乙酰化和香豆酰化类含量的影响

Fig. 6 Effect of rain-shelter cultivation on the contents of non-acylated, coumarylated and acetylated of 3'-substituted and 3',5'-substituted anthocyanins in 2012 and 2013

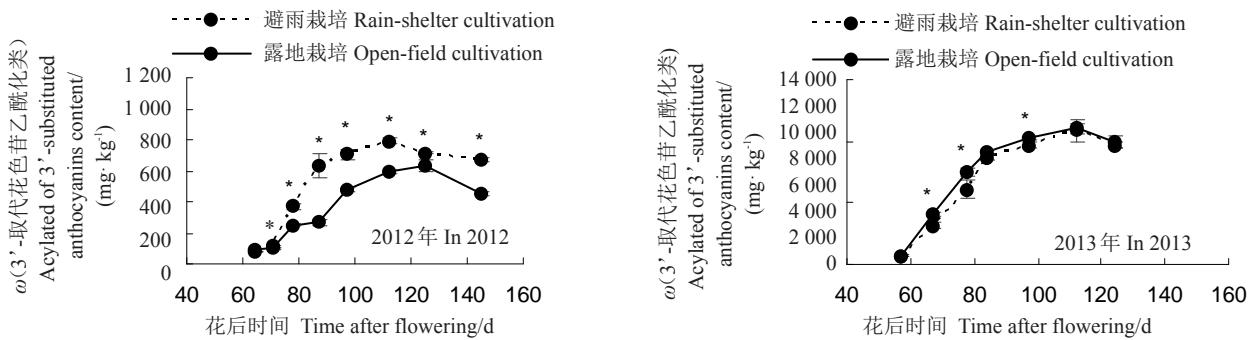
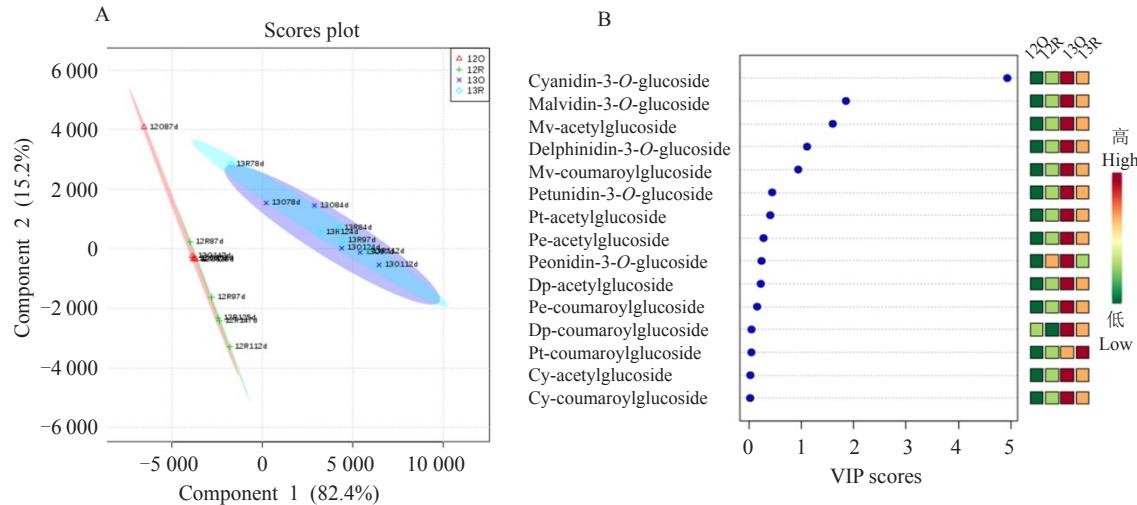


图 6 (续) Fig. 6 (continued)



A. 得分图;B. 根据 VIP 得分选择的化合物。  
A. Score plot; B. Selected compounds based on VIP scores.

图 7 2012、2013 年避雨栽培和露地栽培下葡萄果实类黄酮物质 PLS-DA 分析

Fig. 7 Analysis of PLS-DA of anthocyanins in grape berries under rain-shelter and open-field cultivations in 2012 and 2013

果实中含量要高于 2012 年的果实,且大部分组分在 2012 年表现为避雨栽培果实大于露地栽培,而 2013 年正好相反。只有 2 个组分例外,即在 2 个年份,避雨栽培均显著降低了果皮中花翠素香豆酰化葡萄糖苷(Dp-coumaroylgl)含量,而提高了甲基花翠素香豆酰化葡萄糖苷(Pt-coumaroylgl)的含量。

### 3 讨 论

有研究报道,避雨棚会改变果际周围的光、温、水等条件,进而影响果实品质相关代谢<sup>[13]</sup>。这种影响的出现一定程度上也取决于避雨棚的类型。笔者采用的是简易避雨棚,前期报道指出,与露地相比,该类避雨棚可以减少叶幕顶端日光总辐射和光合有效辐射约 25% 和 50%,在结果带减少约 20% 和 70%,但对温度和湿度几乎没有显著性影响;此外,避雨栽培下结果带紫外辐照(UV-A+UV-B)约为露地的 70%,而且对光强和紫外的滤减主要发生在 11:00—

15:00<sup>[9]</sup>,可见避雨栽培对果实风味品质的影响主要与光照改变有关。一些研究已经证实了避雨栽培可以减少叶片光伤害,延长功能叶片寿命,从而延长果实糖分积累<sup>[9,14]</sup>。

避雨栽培对葡萄果实酚类物质积累有不同的影响,有研究表明,避雨栽培促进了果实各种花色苷组分的积累<sup>[9]</sup>,也有研究认为这种措施降低了黄酮醇含量<sup>[11]</sup>,但这些研究多是 1 a 的结果,结论有一定的局限性。本研究进行 2 个年份的试验,结果表明,避雨栽培总体而言有利于黄酮醇总量的增加,而对黄烷醇总量改变不明显,但对花色苷的影响在 2 个年份截然相反,对比 2 a 花色苷含量数据发现,2013 年 2 种栽培模式下果实花色苷含量总体高于 2012 年果实,而 2012 年 2 种栽培模式间花色苷物质含量的差异大于 2013 年。有研究表明,适当干旱有利于果实花色苷积累<sup>[15]</sup>,推测 2013 年果实成熟期(Stage III)降雨较少可能是造成 2 个年份间花色苷物质含量差

异的主要原因。另一方面,在2013年这个阶段的光照时数少于2012年,加之避雨棚对光的滤减效应,使棚内光照相对较弱,导致避雨栽培对花色苷积累呈现负面效应。已有很多研究表达,适宜光强可促进果皮花色苷形成<sup>[14,16-17]</sup>。相比之下,2012年果实成熟期较多的降雨加上较长的日照时数,使避雨栽培的正面效应得以呈现。另外研究报告,光照对花色苷物质积累的影响主要表现在果实发育前期(Stage I)<sup>[18-19]</sup>,2012年避雨棚搭建早于2013年,可能是导致2012年2种栽培模式间花色苷物质含量的差异大于2013年的原因。

酿酒葡萄果实中黄酮醇类物质的组成比例与所酿葡萄酒的感官品质密切相关,葡萄果皮黄酮醇按照其B环取代基数目不同,分为杨梅酮类(myricetins)、槲皮素类(quercetins)、山奈酚类(kaempferols)、异鼠李素(isorhamnetins)、西伯利亚落叶松黄酮(laricitrins)和丁香亭(syringetins)六大类<sup>[20]</sup>,研究表明,对于红葡萄酒而言,黄酮醇类化合物可以作为较为理想的辅色素因子,尤其是槲皮素有较好的辅色效应,黄酮醇类物质具有很好的护色作用,它可以与花色苷作用使葡萄酒颜色更偏向于紫色且更为稳定<sup>[21]</sup>。笔者发现,避雨栽培有利于黄酮醇物质,尤其是槲皮素类物质的合成,且避雨栽培有利于黄酮醇甲基化的进程,有研究表明分子中甲氧基化和糖基化的程度越高,辅色作用的效果就越显著,综合这些结果,避雨栽培对该地区酿酒葡萄和葡萄酒品质有积极作用<sup>[22]</sup>。

果实中花色苷的含量与比例直接决定了葡萄酒色度、色调及颜色稳定性<sup>[4]</sup>,花色苷的修饰方式由B环羟基化和甲基化的程度决定,游离羟基数量越多蓝色色调越深,而羟基的进一步甲基化能够增强红色色调,酰化还能够促进花色苷颜色的加深,而且增加了花色苷在水溶液中的稳定性<sup>[23]</sup>。本研究表明,避雨栽培有助于减轻环境变化对果皮花色苷合成的显著影响,在一定程度上保持花色苷合成的稳定,而且对大部分花色苷组分的合成有相似作用,根据这些结果,笔者认为避雨栽培可以稳定酿酒葡萄和葡萄酒的颜色品质。此外,黄烷-3-醇类物质不仅与葡萄酒口感、苦涩感和收敛性有关<sup>[8]</sup>,而且可以与花色苷直接结合或者通过乙醛桥连接进而形成稳定的聚合产物<sup>[24]</sup>。本研究中,避雨栽培对黄烷-3-醇物质含量没有显著影响。

葡萄类黄酮代谢主要包括2个分支:即分别由类黄酮-3'-羟化酶(F3'H)和类黄酮-3'5'-羟化酶(F3'5'H)介导的支路途径,它们分别合成3'4'-取代和3'4'5'-取代的类黄酮物质<sup>[25]</sup>。避雨栽培会改变类黄酮代谢中碳的流向,提高白色葡萄品种‘霞多丽’果皮中F3'5'H支路代谢生成的杨梅酮类物质含量与比例,而降低F3'H和F3H路径代谢产物含量与比例<sup>[26]</sup>;本研究结果也表明了避雨栽培可以改变光合碳在类黄酮代谢中的流向,但不同的是,对红色品种‘赤霞珠’进行避雨栽培,则促进了碳流向3'4'-取代的槲皮素类黄酮醇和3'4'5-取代的花翠素类花色苷的合成反应,究其差异原因,可能与这2个品种类黄酮代谢不同有关,与前期白色品种‘霞多丽’相比,本研究中红色品种‘赤霞珠’的类黄酮代谢不仅包括了黄酮醇和黄烷醇合成,还包括了下游的花色苷合成途径,而且花色苷含量在总类黄酮中占有较大比例,因此,认为在F3'5'H支路上,碳更多地流向了下游的花色苷合成。

纵观本研究结果可以认为,避雨栽培对北京密云地区酿酒葡萄果实品质的影响不大;而在降雨较多和生长发育期较长的年份,避雨栽培不仅不会降低果实品质,还可以在一定程度上促进果实酚类物质的积累。

## 4 结 论

避雨栽培不会显著影响类黄酮物质的种类,但总体上有利于3'4'-取代的黄酮醇物质和3'4'5-取代的花色苷物质的积累,对黄烷醇总量的影响不显著。此外,避雨栽培增加了甲基化的黄酮醇物质和黄烷醇物质的含量。2012年避雨栽培的果实中花色苷含量显著高于露地栽培,而在2013年其含量则明显低于露地栽培的果实。偏最小二乘判别分析(PLS-DA)表明,年份因素对葡萄果实中类黄酮组分积累的影响要远大于栽培模式。结合2 a的气象资料分析认为,避雨棚建立有助于缓解气候变化对花色苷等类黄酮物质积累的显著影响,在一定程度上保持果实类黄酮代谢的相对稳定。

## 参考文献 References:

- [1] MENG J F, NING P F, XU T F, ZHANG Z W. Effect of rain-shelter cultivation of *Vitis vinifera* cv. Cabernet gernischet on the phenolic profile of berry skins and the incidence of grape diseases[J]. Molecules, 2012, 18(1): 381-397.

- [2] WINGLER A, MARES M, POURTAU N. Spatial patterns and metabolic regulation of photosynthetic parameters during leaf senescence[J]. *New Phytologist*, 2004, 161(3): 781-789.
- [3] 刘薇薇, 雷志强, 董丹, 任献来, 王忠跃. 南方地区葡萄避雨栽培病虫害防控技术[J]. *中外葡萄与葡萄酒*, 2014(3): 39-46.
- LIU Weiwei, LEI Zhiqiang, DONG Dan, REN Xianlai, WANG Zhongyue. Prevention and control of pests and diseases under the rain-sheltering grapes in the south of China [J]. *Sino-overseas Grapevine and Wine*, 2014(3): 39-46.
- [4] GOMEZPLAZA E, GILMUNOZ R, LOPEZROCA J M, MARTINEZCUTILLAS A, FERNANDEZ J I. Phenolic compounds and color stability of red wines: effect of skin maceration time [J]. *American Journal of Enology & Viticulture*, 2001, 52 (3): 266-270.
- [5] HE F, LIANG N N, MU L, PAN Q H, WANG J, REEVES M J. Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression[J]. *Molecules*, 2012, 17 (2): 1571.
- [6] LAMBERT S G, ASENSTORFER R E, WILLIAMSON N M, ILAND P G, JONES G P. Copigmentation between malvidin-3-glucoside and some wine constituents and its importance to color expression in red wine[J]. *Food Chemistry*, 2011, 125 (1): 106-115.
- [7] GOMEZ-MIGUEZ M, GONZALEZ-MANZANO S, ESCRIBANO-BAILON M T, HEREDIA F J, SANTOS-BUELGA C. Influence of different phenolic copigments on the color of malvidin 3-glucoside[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(15): 5422-5429.
- [8] LABARBE B, CHEYNIER V, BROSSAUD F, SOUQUET J M, MOUTOUNET M. Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization.[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 1999, 47(7): 2719.
- [9] LI X X, HE F, WANG J, LI Z, PAN Q H. Simple rain-shelter cultivation prolongs accumulation period of anthocyanins in wine grape berries[J]. *Molecules*, 2014, 19(9): 14843-14861.
- [10] LIANG N N, ZHU B Q, HAN S, WANG, J H, PAN Q H, REEVES M J. Regional characteristics of anthocyanin and flavonol compounds from grapes of four *Vitis vinifera* varieties in five wine regions of China[J]. *Food Research International*, 2014, 64: 264-274.
- [11] ZHANG W, HE J, PAN Q H, DUAN C Q. Separation and character analysis of anthocyanins from mulberry (*Morus alba* L.) pomace[J]. *Czech Journal of Food Sciences*, 2011, 29(3): 268-276.
- [12] SPANOS G A, WROLSTAD R E. Phenolics of apple, pear, and white grape juices and their changes with processing and storage. A review[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, 40(9): 1478-1487.
- [13] VOX G, SCHETTINI E, MUGNOZZA G S, PALMA L D, TARICONE L, GENTILESCO G. Influence on vine production of innovative covering plastic films[C]// Valencia, Spain: CIGR Journal, 2012.
- [14] MATTIVI F, GUZZON R, VRHOVSEK U, VELASCO R. Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54 (20): 7692-7702.
- [15] JEONG S T, GOTO-YAMAMTO N, KOBAYASHI S, ESAKA M. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins[J]. *Plant Science*, 2004, 167(2): 247-252.
- [16] TARARA J M, LEE J, SPAUD S E, SCAGEL C F. Berry temperature and solar radiation alter acylation, proportion, and concentration of anthocyanin in Merlot grapes[J]. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2008, 59(3): 235-247.
- [17] CHORTI E, GUIDONI S, FERRANDINO A, NOVELLO V. Effect of different cluster sunlight exposure levels on ripening and anthocyanin accumulation in Nebbiolo grapes[J]. *American Journal of Enology & Viticulture*, 2010, 61(1): 23-30.
- [18] DOWNEY M O, HARVEY J S, ROBINSON S P. The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes[J]. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2004, 10(1): 55-73.
- [19] KKOYAMA K, GOTO Y N. Bunch shading during different developmental stages affects the phenolic biosynthesis in berry skins of 'Cabernet Sauvignon' grapes[J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2008, 133(6): 743-753.
- [20] PORTER L J. Flavans and proanthocyanidins[M]. Springer, US: The Flavonoids, 1988: 21-62.
- [21] RUSTONI L, BEDGOOD D R, FAILLA O, PRENZLER P D, ROBARDS K. Copigmentation and anti-copigmentation in grape extracts studied by spectrophotometry and post-column-reaction HPLC[J]. *Food Chemistry*, 2012, 132(4): 2194-2201.
- [22] BO Z, RUI L, FEI H. Copigmentation of malvidin-3-O-glucoside with five hydroxybenzoic acids in red wine model solutions: Experimental and theoretical investigations[J]. *Food Chemistry*, 2015, 170(170): 226-233.
- [23] YONEKURA-SAKAKIBARA K, SAITO K. Functional genomics for natural product biosynthesis[J]. *Natural Product Reports*, 2009, 26(11): 1466-1487.
- [24] DEPREZ S, BREZILLON C, RABOT S, PHILIPPE C, MILA I, LAPIERRE C. Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids[J]. *Journal of Nutrition*, 2000, 130(11): 2733-2738.
- [25] DOWNEY M O, HARVEY J S, ROBINSON S P. Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.) [J]. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2003, 9(2): 110-121.
- [26] GAO Y, LI X X, HAN M M, YANG X F, LI Z, WANG J, PAN Q H. Rain-shelter cultivation modifies carbon allocation in the polyphenolic and volatile metabolism of *Vitis vinifera* L. Chardonnay grape[J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0156117.