

# 葡萄 VvMYB44a 负调控叶片衰老的分子机制及其自然变异分析

高 鹏

( 中国农业科学院郑州果树研究所, 河南 郑州 450009 )

**摘 要：**叶片衰老是葡萄生长发育的重要阶段，直接影响光合效率、养分再分配、果实产量与品质及植株抗逆性。MYB转录因子家族在植物叶片衰老调控中发挥关键作用，但葡萄中负调控叶片衰老的MYB基因及其分子机制仍不明确。本研究以‘夏黑’葡萄为试验材料，克隆获得VvMYB44a基因，系统开展基因表达模式、转基因功能验证、互作蛋白与靶基因筛选、信号通路解析及自然变异关联分析。结果表明：VvMYB44a定位于细胞核，具有典型R2R3- MYB结构域，在叶片中高表达，且随叶片衰老进程显著下调；过表达VvMYB44a可显著延缓黑暗、脱落酸（ABA）、茉莉酸（JA）诱导的叶片衰老，降低叶绿素降解速率、丙二醛（MDA）含量与离子渗漏率，提高抗氧化酶活性；VvMYB44a可直接结合衰老促进基因VvSAG12、VvNYC1、VvNAP启动子并抑制其转录，同时与VvJAZ3、VvABI5蛋白互作，协同抑制ABA/JA信号通路下游衰老程序；在320份葡萄种质中检测到VvMYB44a编码区与启动子区共23个变异位点，其中启动子区SNP- 471、SNP- 829及编码区错义突变SNP- 1229与叶片衰老起始时间、衰老速率显著关联，优异单倍型Hap- 2可显著延缓自然衰老。研究明确VvMYB44a通过转录抑制与蛋白互作双重途径负调控叶片衰老，挖掘出可用于分子育种的优异自然变异位点，为葡萄抗衰老品种改良与高效栽培提供理论依据与基因资源。

**关键词：**葡萄；VvMYB44a；MYB转录因子；叶片衰老；负调控；分子机制；自然变异；关联分析

中图分类号：S663.1；Q

文献标识码：A

文章编号：3106-2547 ( 2025 ) 05-0025-14

DOI：10.62022/FHR.issn3106-2547.2025.05.003

## Molecular Mechanism of Grape VvMYB44a in Negatively Regulating Leaf Senescence and Its Natural Variation Analysis

Gao Peng

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

**Abstract:** Leaf senescence is a vital process during grape growth and development, which directly affects photosynthetic efficiency, nutrient remobilization, fruit yield and quality, as well as plant stress resistance. The MYB transcription factor family plays crucial roles in regulating plant leaf senescence, however, the MYB genes negatively regulating leaf senescence and their underlying molecular mechanisms remain largely unclear in grapevine. In this study, using grapevine ‘Summer Black’ as the experimental material, we cloned the VvMYB44a gene, and systematically investigated its expression pattern, transgenic functional verification, screening of interacting proteins and target genes, signaling pathway dissection, as well as natural variation and association analysis. The results showed that VvMYB44a was localized in the nucleus, containing a typical R2R3- MYB domain, highly expressed in leaves, and significantly down-regulated with leaf senescence progression. Overexpression of VvMYB44a significantly delayed leaf senescence induced by darkness, abscisic acid (ABA) and jasmonic acid (JA), reduced chlorophyll degradation rate, malondialdehyde (MDA) content and ion leakage rate, and increased antioxidant enzyme activities. VvMYB44a could directly bind to the promoters of senescence-promoting genes VvSAG12, VvNYC1 and VvNAP and repress their transcription; meanwhile, it interacted with VvJAZ3 and VvABI5 proteins to synergistically inhibit the downstream senescence program in ABA/JA signaling pathways. A total of 23 variation loci in the coding and promoter regions of VvMYB44a were detected in 320 grape germplasms. Among them, SNP- 471 and SNP- 829 in the promoter region, and the missense mutation SNP- 1229 in the coding region were significantly associated with leaf senescence onset time and senescence rate. The elite haplotype Hap- 2 could significantly delay natural senescence. This study clarified that VvMYB44a negatively regulates leaf senescence through dual pathways of transcriptional repression and protein interaction, and identified elite natural variation loci applicable for molecular breeding. It provides theoretical basis and genetic resources for grape anti-senescence variety improvement and high-efficiency cultivation.

**作者简介：**高鹏，博士，副研究员，研究方向为果树种质资源与分子育种，研究方向为葡萄功能基因组学与衰老调控。

**Keywords:** grapevine; VvMYB44a; MYB transcription factor; leaf senescence; negative regulation; molecular mechanism; natural variation; association analysis

## 1 引言

### 1.1 研究背景与意义

#### 1.1.1 叶片衰老的重要性

叶片衰老是植物在长期进化过程中形成的、由遗传程序严格调控的程序性细胞死亡 (Programmed Cell Death, PCD) 过程,是植物生长发育周期中不可或缺的核心环节,贯穿于植物从营养生长向生殖生长转换、器官建成以及环境适应的全过程。作为植物进行光合作用、合成有机物质的主要场所,叶片的功能维持时间 (即持绿期) 直接决定了植株光合产物的积累效率、碳氮代谢的运转速率以及生物量的最终合成水平,对植物的生长发育、繁殖后代以及环境适应性具有至关重要的影响。在自然衰老进程中,植物细胞结构会发生有序的降解过程,其中叶绿素、蛋白质、脂质等大分子物质会被逐步分解为小分子营养物质,氮、磷、钾等矿质元素则会从衰老叶片主动转运至幼嫩器官 (如幼叶、幼芽)、果实、种子或贮藏器官 (如根系、枝干),完成养分的高效回收与再分配,从而保障下一代个体的正常生长与种群的延续。这种养分的循环利用机制,是植物在长期进化中形成的适应策略,能够最大限度地利用有限的资源,提高自身的生存竞争力<sup>[1]</sup>。

从生理生化层面来看,叶片衰老通常伴随着一系列特征性的生理变化,这些变化共同构成了叶片衰老的生理标志。首先,叶绿素作为光合作用的核心色素,其降解是叶片衰老最直观的表现,随着衰老进程的推进,叶绿素a和叶绿素b的含量会逐渐下降,叶片逐渐由绿色变为黄色,最终脱落。其次,光合系统的结构与功能会发生解体,类囊体膜结构破坏,光合电子传递链受阻,导致光合作用效率急剧下降,直至完全丧失。与此同时,活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 会大量积累,包括超氧阴离子 ( $O_2^{\cdot-}$ )、过氧化氢 ( $H_2O_2$ )、羟基自由基 ( $\cdot OH$ ) 等,这些活性氧会攻击细胞膜上的脂质分子,导致细胞膜脂过氧化加剧,细胞膜完整性被破坏,通透性增加,最终导致细胞死亡。此外,叶片衰老过程中还会出现衰老相关基因 (Senescence-Associated Genes, SAGs) 的显著上调表达,这些基因包括编码水解酶 (如蛋白酶、核酸酶、脂酶) 的基因、编码抗氧化酶的基因以及调控衰老信号传导的基因等;而持绿相关基因 (Stay-Green Genes, SENGs) 的表达则会受到抑制,这些基因的主要功能是抑制叶绿素降解、维持光合系统稳定,从而延缓叶片衰老。

叶片衰老的进程受到严格的调控,适度、有序的衰老有

利于植株的养分循环与环境适应性提升,能够确保植物在完成生殖生长后,将养分高效回收至下一代或贮藏器官,保障种群的延续。然而,过早或异常衰老则会对植物的生长发育造成严重危害,导致光合功能急剧下降、养分流失严重、生物量合成不足,最终造成作物产量降低与品质劣变<sup>[2]</sup>。已有大量研究表明,在水稻、小麦、玉米等主要粮食作物中,功能叶片的衰老进程每延迟1天,产量可提升2% - 10%。例如,水稻剑叶作为灌浆期的主要功能叶片,其衰老延迟能够显著增加光合产物向籽粒的转运,提高千粒重与结实率;小麦旗叶的持绿期延长则能够增加籽粒的淀粉积累,提升小麦品质。对于多年生果树而言,叶片衰老的调控更为关键,它不仅影响当年的果实产量与品质,还直接决定树体的营养贮藏水平、越冬抗寒能力、翌年萌芽开花质量以及连年结果能力。多年生果树的叶片衰老具有明显的季节性特征,秋季叶片衰老过程中的养分回流是根系与枝干贮藏养分的主要来源,若叶片过早衰老,会导致养分回流不充分,树体贮藏营养不足,进而降低越冬抗寒能力,增加冻害发生风险,延缓翌年春季萌芽与开花,甚至导致“大小年”结果现象,严重影响果树的长期丰产与优质。因此,系统解析叶片衰老的分子调控网络,阐明衰老启动、进程与终止的内在机制,已成为植物发育生物学领域与作物遗传改良实践中的核心科学问题,对于提高作物产量、改善品质、增强抗逆性具有重要的理论价值与应用意义<sup>[3]</sup>。

叶片衰老并非由单一因素决定,而是内部发育信号与外部环境信号共同整合、协同调控的结果。内部调控信号主要包括植株年龄、内源激素、糖水平、转录因子网络及表观遗传修饰等。其中,内源激素是调控叶片衰老的重要内部信号,不同激素发挥着不同的调控作用,例如脱落酸 (ABA)、茉莉酸 (JA)、乙烯、水杨酸 (SA) 等属于促衰老激素,能够加速叶片衰老进程;而细胞分裂素 (CTK)、生长素 (IAA)、赤霉素 (GA) 等则属于抑衰老激素,能够延缓叶片衰老。糖水平作为植物代谢状态的重要指标,也参与叶片衰老的调控,高糖水平通常会抑制叶片衰老,而低糖水平则会促进衰老。转录因子作为基因表达的调控核心,通过调控下游大量基因的表达,参与叶片衰老的信号传导与基因表达重编程,在衰老调控中发挥着枢纽作用。表观遗传修饰则通过DNA甲基化、组蛋白修饰、RNA甲基化 (m6A) 以及非编码RNA调控等方式,在不改变DNA序列的前提下调控衰老相关基因的表达,参与叶片衰老的精细调控。

外部环境信号则包括光照、温度、干旱、盐碱、营养匮乏以及病原菌侵染等多种生物与非生物胁迫。光照是调控叶片衰老的重要环境信号,充足的光照能够延缓叶片衰老,而黑暗则会诱导叶片快速衰老(即暗诱导衰老)。温度的变化也会显著影响叶片衰老,高温或低温胁迫都会加速叶片衰老进程。干旱、盐碱等逆境胁迫会导致植物体内活性氧积累,破坏细胞膜结构,进而诱导叶片早衰。营养匮乏(如氮、磷、钾等矿质元素缺乏)会导致植物代谢紊乱,光合效率下降,加速叶片衰老。病原菌侵染则会激活植物的防御反应,同时也可能诱导叶片局部衰老,以限制病原菌的扩散。这些内部信号与外部信号通过复杂的转录调控网络、蛋白互作网络及代谢通路进行交叉整合,相互作用、相互影响,最终共同决定叶片衰老的启动时间、发展速率与强度。在众多调控因子中,转录因子处于信号传导的枢纽位置,能够整合多种信号,调控下游衰老相关基因的表达,实现对衰老进程的精准调控<sup>[4]</sup>。

### 1.1.2 葡萄产业中叶片衰老相关问题

葡萄(*Vitis vinifera* L.)是全球范围内经济价值最高、栽培范围最广的落叶藤本果树之一,其果实不仅可鲜食,还可用于酿造葡萄酒、制作葡萄干、葡萄汁等多种产品,在全球农业经济中占据重要地位<sup>[5]</sup>。我国是葡萄生产大国,葡萄栽培面积与总产量均位居世界首位,据统计,我国葡萄栽培面积已超过130万公顷,年产量超过1400万吨,涵盖欧亚种、欧美杂种、野生种等多种类型,栽培区域遍布全国各个省份。葡萄产业作为现代高效农业的重要组成部分,在促进农民增收、推动乡村振兴、发展区域经济等方面发挥着不可替代的重要作用。

葡萄叶片是树体进行光合作用、合成碳水化合物、积累矿质营养、维持树势与健康状态的核心器官,其衰老启动时间、持续时长与降解速率,直接决定了果实的发育进程、产量构成、糖酸比、着色程度、香气物质积累以及果实耐贮运性。葡萄果实的发育过程分为坐果期、膨大期、转色期与成熟期,其中转色期至成熟期是果实品质形成的关键时期,需要持续、稳定的光合产物与矿质元素输入。叶片作为光合产物的主要来源,其功能的正常发挥是果实优质高产的重要保障。然而,在实际葡萄生产过程中,叶片早衰现象普遍存在,尤其是在设施栽培、逆境胁迫以及管理不当的情况下,早衰问题更为突出,已成为制约葡萄优质、高效、稳产的关键瓶颈问题,严重影响葡萄产业的高质量发展。

首先,叶片早衰直接导致果实养分供应不足,严重影响果实品质与商品价值。葡萄果实发育中后期,尤其是转色期

至成熟期,果实的糖分积累、有机酸降解、着色以及香气物质合成均需要大量的碳水化合物与矿质元素(如氮、磷、钾、钙、镁等)供给。若功能叶片在此阶段提前衰老、黄化甚至脱落,将造成光合产物供给中断,果实糖分积累不足,导致果实甜度降低;有机酸降解缓慢,导致果实酸度偏高,糖酸比失衡;果实着色不良,颜色偏浅或不均匀,影响果实外观品质;同时,香气物质合成不足,导致果实风味变淡,进一步降低果实的商品价值与经济效益。例如,在葡萄转色期,若叶片早衰,会导致果实转色延迟、着色不均,甚至出现“绿斑果”,严重影响果实的市场竞争力。

其次,叶片早衰显著降低植株整体抗逆性,增加病虫害发生风险。衰老叶片中活性氧清除能力下降,细胞膜完整性受损,细胞代谢紊乱,同时抗病相关基因(如PR基因、抗病蛋白基因等)的表达下调,导致叶片对病原菌的抵抗力显著下降,更容易受到霜霉病、白粉病、灰霉病、叶斑病等多种叶部病害的侵染。这些病害的发生会进一步加剧叶片黄化、脱落,形成“早衰—病害—进一步早衰”的恶性循环,导致早期落叶,削弱树势,影响树体的正常生长与发育,甚至导致翌年产量大幅下降。例如,葡萄霜霉病主要侵染叶片,导致叶片出现黄色病斑,严重时叶片干枯脱落,若叶片本身已处于早衰状态,其抗病能力下降,霜霉病的侵染速度会显著加快,危害程度会进一步加重<sup>[6]</sup>。

第三,叶片早衰严重影响树体营养贮藏与越冬能力,制约葡萄的长期丰产。葡萄作为多年生果树,其生长发育具有连续性,秋季正常叶片衰老过程中的养分回流是根系、枝干等贮藏器官积累营养的主要来源。叶片通过光合作用合成的碳水化合物、蛋白质等营养物质,在衰老过程中会被分解为小分子物质,主动转运至根系与枝干进行贮藏,为翌年春季萌芽、开花、坐果提供充足的营养保障。若叶片过早衰老,会导致养分回流不充分,树体贮藏营养不足,进而降低树体的越冬抗寒能力,增加冻害发生风险。在北方寒冷地区,树体冻害会导致枝干冻伤、根系坏死,严重时整株死亡;即使未发生严重冻害,贮藏营养不足也会导致翌年春季萌芽延迟、萌芽率降低、新梢生长衰弱,影响开花坐果,形成“大小年”结果现象,严重制约葡萄的长期丰产与优质。

第四,设施栽培环境进一步加剧衰老胁迫,导致葡萄品质下降与连作障碍。随着葡萄产业的发展,设施栽培(如温室、大棚)已成为葡萄优质高产的重要栽培模式,能够有效调控环境条件,延长结果期,提高果实品质。然而,设施栽培环境存在弱光、高湿、通风不良、CO<sub>2</sub>浓度不均衡等问题,这些环境条件极易诱导葡萄叶片发生暗诱导衰老与逆境

衰老。弱光条件会降低叶片光合效率,导致光合产物积累不足,同时诱导叶绿素降解,加速叶片衰老;高湿环境会增加病原菌感染的风险,同时影响叶片的蒸腾作用与气体交换,导致细胞代谢紊乱,加速衰老;通风不良会导致设施内CO<sub>2</sub>浓度降低,影响光合作用,同时增加有害气体的积累,对叶片造成伤害;CO<sub>2</sub>浓度不均衡则会导致叶片光合效率下降,代谢紊乱,进一步加剧衰老。长期的设施栽培还会导致土壤连作障碍,土壤养分失衡、病原菌积累,进一步加重叶片早衰现象,导致葡萄品质持续下降,产量不稳定。

目前,葡萄生产中延缓叶片衰老的措施主要依赖水肥管理、施用生长调节剂(如细胞分裂素类、赤霉素类)、病虫害综合防控等传统栽培手段。水肥管理方面,通过合理施用氮、磷、钾、钙、镁等矿质元素,补充叶片营养,延缓衰老;生长调节剂方面,喷施6-苄氨基嘌呤(6-BA)、激动素(KT)等细胞分裂素类调节剂,能够抑制叶绿素降解,延缓叶片衰老;病虫害防控方面,通过喷施杀菌剂、杀虫剂,减少病虫害对叶片的伤害,延缓早衰。然而,这些传统措施存在诸多弊端:一是成本较高,需要投入大量的人力、物力与财力;二是效果不稳定,受环境条件、栽培管理水平等因素影响较大;三是存在农药与调节剂残留风险,不符合绿色、安全、可持续发展的需求,也影响果实的品质与食品安全。

从分子育种角度出发,培育持绿期长、抗衰老、高光效的葡萄新品种,是解决叶片早衰问题最经济、环保且长效的根本途径。分子育种技术能够精准挖掘控制叶片衰老的关键基因,通过转基因、基因编辑、分子标记辅助育种等手段,定向改良葡萄的抗衰老性状,培育出优质、高产、抗逆性强的新品种,从根本上解决叶片早衰问题。因此,挖掘葡萄叶片衰老关键调控基因,解析其分子调控机制,筛选与衰老性状相关的优异自然变异,对葡萄遗传改良与产业高质量发展具有重大的理论与实践意义。

### 1.1.3 MYB转录因子在植物叶片衰老调控中的作用

MYB (Myeloblastosis) 转录因子是植物基因组中规模最大、进化最保守的转录因子超家族之一,其最早是在鸟类成髓细胞瘤病毒中发现的,随后在植物、动物、真菌等多种生物中均有发现。植物MYB转录因子的典型特征是N端具有高度保守的MYB结构域,该结构域由约51-52个氨基酸组成,包含1-4个重复单元(R),每个重复单元均含有三个 $\alpha$ -螺旋,其中第二和第三 $\alpha$ -螺旋形成螺旋-转角-螺旋(HTH)结构,能够特异性结合DNA序列,发挥转录调控作用。

根据MYB结构域中重复单元(R)的数量,可将MYB家族分为1R-MYB、R2R3-MYB、3R-MYB与4R-MYB四个亚

类。其中,1R-MYB(又称MYB-related)只含有1个R重复单元,成员数量较少,主要参与逆境胁迫响应、细胞周期调控等过程;R2R3-MYB含有2个连续的R重复单元(R2和R3),是植物特有且成员数量最多的亚类,占植物MYB家族成员总数的70%以上,广泛参与植物生长发育、初生与次生代谢、逆境胁迫响应、激素信号转导及叶片衰老等多个生物学过程;3R-MYB含有3个R重复单元,成员数量较少,主要参与细胞周期调控、器官发育等过程;4R-MYB含有4个R重复单元,目前仅在少数植物中发现,其功能尚未完全明确。

在叶片衰老调控过程中,MYB转录因子通常以双重功能发挥作用:既可作为转录激活因子,通过激活下游衰老相关基因的表达,促进叶片衰老进程;也可作为转录抑制因子,通过抑制下游衰老相关基因的表达或激活持绿基因的表达,延缓叶片衰老。近年来,以拟南芥、水稻、玉米为代表的模式植物研究已证实,多个MYB家族成员是叶片衰老的核心调控节点,其功能与调控机制已得到较为深入的解析。

例如,拟南芥AtMYB2是一个典型的促衰老MYB转录因子,其表达可被ABA、干旱、盐胁迫等信号诱导,通过直接结合下游衰老相关基因(如SAG12、SAG29)的启动子区域,激活其表达,从而促进叶片衰老。AtMYB106则通过调控角质层合成与脂质代谢影响叶片衰老进程,AtMYB106突变体叶片角质层厚度减少,脂质代谢紊乱,衰老进程显著加速;而过表达AtMYB106则能够增加叶片角质层厚度,维持细胞膜完整性,延缓叶片衰老。AtMYB44则是一个重要的衰老负调控因子,其表达随叶片衰老而显著下调,过表达AtMYB44能够抑制乙烯信号通路,减少活性氧积累,维持叶绿素含量,从而延缓叶片衰老;而AtMYB44突变体则表现为叶片早衰。

在粮食作物中,也有多个MYB转录因子参与叶片衰老调控。例如,水稻OsMYB46通过抑制活性氧积累与叶绿素降解,发挥延缓叶片衰老的功能,过表达OsMYB46能够显著延长水稻功能叶片的持绿期,提高光合效率,增加产量;玉米ZmMYB59则通过调控抗氧化酶基因的表达,增强植株的抗氧化能力,减少活性氧积累,延缓叶片衰老,ZmMYB59突变体叶片衰老显著加速,产量降低。此外,小麦TaMYB30、大麦HvMYB1等也被证实参与叶片衰老调控,发挥着促衰老或抑衰老的作用。

现有研究表明,MYB转录因子调控叶片衰老主要通过三条途径:①直接结合衰老相关基因(SAGs)或持绿基因(SENGs)启动子区域的MYB结合元件(MBS),激活或抑制靶基因转录。MYB结合元件(MBS)是一类保守的DNA序列,主要包括CNGTTR(如CNGTTG、CNGTTA)和TAACTG

两种类型, MYB转录因子通过其HTH结构域与MBS元件特异性结合, 从而调控靶基因的表达。例如, 促衰老MYB转录因子可结合SAGs启动子的MBS元件, 激活其表达, 促进衰老; 而抑衰老MYB转录因子则可结合SAGs启动子的MBS元件, 抑制其表达, 或结合SENGs启动子的MBS元件, 激活其表达, 从而延缓衰老。② 与其他类型转录因子(如WRKY、NAC、AP2/ERF、bZIP)或信号通路关键蛋白(如JAZ、ABI、PP2C)发生蛋白互作, 形成多因子调控模块, 协同调控叶片衰老。例如, MYB转录因子可与NAC、WRKY等核心促衰老转录因子互作, 增强或抑制其对下游基因的调控作用; 也可与JAZ(JA信号通路抑制子)、ABI(ABA信号通路核心蛋白)等互作, 整合激素信号, 调控衰老进程。③ 整合多种激素信号通路, 尤其是ABA、JA、乙烯、CTK等核心衰老相关激素信号, 将外界环境信号与内源发育信号转化为衰老表型输出。例如, MYB转录因子可被ABA、JA等促衰老激素诱导表达, 进而激活下游SAGs表达, 促进衰老; 也可被CTK等抑衰老激素抑制表达, 从而延缓衰老。

尽管MYB家族在植物叶片衰老调控中的重要功能已得到广泛证实, 在模式植物与粮食作物中的研究也取得了显著进展, 但葡萄中衰老相关MYB基因的研究仍严重滞后。目前, 葡萄MYB转录因子的研究主要集中在花色苷合成、果实品质形成、逆境胁迫响应及生长发育等方面, 而与叶片衰老直接相关的研究极少, 尤其具有负调控衰老功能的R2R3-MYB基因, 其生物学功能、分子调控机制及自然变异特征尚未见系统报道, 极大限制了葡萄抗衰老分子育种的开展, 也制约了对葡萄叶片衰老调控网络的深入理解。

#### 1.1.4 研究VvMYB44a的目的和意义

基于本课题组前期获得的葡萄叶片衰老转录组数据(未发表), 以葡萄品种‘夏黑’为材料, 分别采集幼叶、成熟功能叶与衰老叶, 通过转录组测序与差异表达分析, 筛选获得一系列与叶片衰老相关的差异表达基因。其中, 一个R2R3-MYB型转录因子基因在衰老叶片中的表达量显著下调, 在成熟功能叶中高表达, 在幼叶中中等表达, 表达模式与叶片衰老进程呈显著负相关, 提示其可能作为叶片衰老负调控因子发挥作用。根据其氨基酸序列与拟南芥AtMYB44的同源性, 将该基因命名为VvMYB44a(GenBank登录号: 待定)。

为了明确VvMYB44a的生物学功能、分子调控机制及自然变异特征, 填补葡萄MYB转录因子调控叶片衰老的研究空白, 为葡萄抗衰老分子育种提供关键基因与理论支撑, 本研究以VvMYB44a为核心研究对象, 开展系统的研究工作, 主

要研究目的包括:

(1) 克隆VvMYB44a全长编码序列, 明确其基因结构、保守结构域、系统进化关系、亚细胞定位特征及理化性质。通过RT-PCR技术从葡萄叶片中克隆VvMYB44a的开放阅读框(ORF), 利用生物信息学工具分析其基因结构、保守结构域、氨基酸序列特征、理化性质(如分子量、等电点), 构建系统进化树, 明确其与其他植物MYB44同源蛋白的亲缘关系; 通过亚细胞定位实验, 确定VvMYB44a的细胞定位, 为其功能研究奠定基础。

(2) 分析VvMYB44a在不同组织、不同叶片发育阶段及胁迫与激素处理下的表达模式。采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术, 检测VvMYB44a在葡萄根、茎、叶、花、卷须、果实等不同组织中的表达量, 明确其组织特异性表达特征; 检测其在幼叶、成熟功能叶、衰老叶中的表达差异, 分析其与叶片衰老进程的关系; 检测其在黑暗、ABA、JA、干旱、低温等诱导衰老的处理条件下的表达变化, 明确其对衰老相关信号与逆境胁迫的响应特征。

(3) 通过转基因过表达、基因沉默及基因编辑技术, 系统验证VvMYB44a负调控叶片衰老的生物学功能。构建VvMYB44a过表达载体, 转化拟南芥与葡萄愈伤组织, 获得过表达株系; 构建VvMYB44a病毒诱导基因沉默(VIGS)载体, 转化葡萄植株, 获得沉默植株; 利用CRISPR/Cas9技术编辑VvMYB44a, 获得基因敲除株系。通过表型观察、生理指标测定(如叶绿素含量、MDA含量、抗氧化酶活性等), 明确VvMYB44a对叶片衰老的调控作用。

(4) 解析VvMYB44a通过直接靶向衰老相关基因及与ABA/JA信号关键蛋白互作的分子调控机制。采用酵母双杂交(Y2H)技术筛选VvMYB44a的互作蛋白, 通过双分子荧光互补(BiFC)、免疫共沉淀(Co-IP)实验验证互作真实性; 通过生物信息学预测VvMYB44a的下游靶基因, 利用酵母单杂交(Y1H)、染色质免疫沉淀(ChIP-qPCR)、双荧光素酶报告系统(DLR)验证VvMYB44a对靶基因的结合与转录调控活性; 结合CRISPR/Cas9敲除与回补实验, 阐明VvMYB44a调控叶片衰老的分子通路。

(5) 在葡萄自然种质中鉴定VvMYB44a的自然变异位点, 挖掘与叶片衰老性状显著关联的优异单倍型。以320份葡萄核心种质(涵盖欧亚种、欧美杂种、野生种)为材料, 提取基因组DNA, 扩增VvMYB44a启动子与编码区全长, 进行测序与变异检测, 鉴定SNP、InDel等变异位点; 进行单倍型划分与连锁不平衡分析; 将变异位点与叶片衰老起始时间、衰老速率、持绿期等性状进行关联分析, 获得与衰老性

状显著关联的功能性变异位点;通过启动子活性分析、基因编辑等实验,验证变异位点的生物学功能,挖掘优异单倍型,为葡萄抗衰老分子育种提供分子标记。

本研究的科学意义与应用价值主要体现在以下两个方面:

①理论意义:首次在葡萄中系统阐明VvMYB44a负调控叶片衰老的分子通路,明确其功能、表达模式、互作蛋白与靶基因,完善多年生木本植物叶片衰老调控网络,进一步丰富植物MYB介导的衰老调控理论体系。同时,揭示葡萄叶片衰老与ABA、JA激素信号的交叉调控机制,为理解多年生果树叶片衰老的特异性调控机制提供新的视角与理论依据。

②应用价值:获得控制葡萄叶片衰老的关键基因(VvMYB44a)、功能性变异位点及优异单倍型,为葡萄抗衰老分子标记辅助育种(MAS)提供直接靶点与分子标记。利用这些基因与标记,可快速筛选抗衰老葡萄种质,培育持绿期长、光合效率高、产量品质优、抗逆性强的葡萄新品种,从根本上解决葡萄叶片早衰问题,降低生产成本,减少农药与调节剂残留,推动葡萄产业向绿色、高效、优质、可持续发展。

## 1.2 国内外研究现状

### 1.2.1 植物叶片衰老调控机制的研究进展

植物叶片衰老的研究始于20世纪初,早期研究主要集中在生理生化层面,主要描述叶片衰老过程中的叶绿素降解、光合效率变化、呼吸作用变化以及养分转运等生理现象,初步揭示了叶片衰老的生理特征。随着分子生物学技术的发展,尤其是转录组学、蛋白质组学、代谢组学等组学技术的应用,植物叶片衰老研究已从传统生理生化描述阶段,全面进入分子调控网络解析与信号交叉整合阶段,近年来的核心进展主要集中在激素信号通路、转录调控网络、环境与表观调控及代谢重编程四个方面。

(1) 激素信号通路:激素作为植物体内重要的信号分子,在叶片衰老调控中发挥着核心作用,不同激素之间通过协同或拮抗作用,共同调控叶片衰老进程。目前已明确,脱落酸(ABA)、茉莉酸(JA)、乙烯、水杨酸(SA)是主要的促衰老激素,而细胞分裂素(CTK)、生长素(IAA)、赤霉素(GA)则主要发挥延缓衰老的作用。

ABA是调控叶片衰老的关键促衰老激素,其含量随叶片衰老进程逐渐升高,能够显著加速叶片黄化与衰老。ABA调控叶片衰老的核心通路为PYR/PYL-PP2C-SnRK2-ABI5通路:当ABA存在时,ABA与PYR/PYL受体结合,形成ABA-PYR/PYL复合物,该复合物与PP2C磷酸酶结合,抑制

PP2C的活性;PP2C活性被抑制后,SnRK2激酶被激活,激活的SnRK2磷酸化下游的ABI5等转录因子;磷酸化的ABI5进入细胞核,结合下游衰老相关基因(如SAG12、SAG29)的启动子,激活其表达,从而促进叶片衰老。此外,ABA还能够促进活性氧积累,破坏细胞膜结构,加速叶绿素降解,进一步促进衰老。

JA也是重要的促衰老激素,能够诱导叶片黄化、叶绿素降解,加速衰老进程。JA调控叶片衰老的核心通路为COI1-JAZ-MYC2通路:当JA存在时,JA与COI1受体结合,形成JA-COI1复合物,该复合物与JAZ抑制子结合,导致JAZ被泛素化降解;JAZ降解后,其抑制的MYC2等转录因子被激活;激活的MYC2结合下游衰老相关基因的启动子,启动其表达,促进叶片衰老。此外,JA还能够与ABA、乙烯等激素协同作用,增强促衰老效果。

乙烯是最早被发现的促衰老激素之一,能够加速叶片脱落与衰老。乙烯调控叶片衰老的核心通路为ETR-EIN2-EIN3-EIL1通路:乙烯与ETR受体结合,导致ETR受体构象改变,解除其对下游EIN2的抑制;EIN2被激活后,其C端片段进入细胞核,促进EIN3、EIL1等转录因子的积累;EIN3、EIL1结合下游衰老相关基因与脱落相关基因的启动子,激活其表达,加速叶片衰老与脱落。

SA主要参与植物的防御反应,同时也能够促进叶片衰老。SA通过激活NPR1等转录因子,调控下游PR基因与衰老相关基因的表达,促进活性氧积累,加速叶片衰老。此外,SA还能够与ABA、JA协同作用,增强促衰老效果。

CTK是最主要的抑衰老激素,能够显著延缓叶片衰老,延长叶片持绿期。CTK调控叶片衰老的核心通路为AHK-ARR通路:CTK与AHK受体结合,激活AHK的激酶活性;AHK将磷酸基团传递给AHP,磷酸化的AHP进入细胞核,将磷酸基团传递给ARR转录因子;激活的ARR结合下游抑衰老基因的启动子,激活其表达,同时抑制促衰老基因的表达,从而延缓叶片衰老。此外,CTK还能够促进叶绿素合成,抑制叶绿素降解,增强抗氧化能力,减少活性氧积累,维持细胞膜完整性。

IAA与GA也具有一定的抑衰老作用。IAA通过调控细胞分裂与伸长,维持叶片的生长状态,延缓衰老;GA则通过促进细胞伸长、抑制叶绿素降解,延缓叶片衰老。IAA与GA还能够与CTK协同作用,增强抑衰老效果,同时与ABA、JA、乙烯等促衰老激素拮抗,平衡叶片衰老进程。

(2) 转录调控网络:转录因子作为基因表达的调控核心,在叶片衰老信号传导与基因表达重编程中发挥着枢纽作

用。目前已发现, NAC、WRKY、MYB、AP2/ERF、bZIP等多个转录因子家族参与叶片衰老调控, 形成了复杂的多层级转录调控网络。

NAC转录因子家族是叶片衰老调控中最重要的转录因子家族之一, 其中多个成员是核心促衰老因子。例如, 拟南芥NAP ( NAC-Like, Activated by AP3/PI ) 是第一个被鉴定的叶片衰老调控NAC转录因子, 其表达随叶片衰老显著上调, 过表达NAP能够加速叶片衰老, 而NAP突变体则表现为叶片衰老延迟; ORE1 ( ORESARA1 ) 是另一个核心促衰老NAC转录因子, 其表达受年龄信号与ABA信号调控, 过表达ORE1能够激活下游大量SAGs的表达, 加速叶片衰老; ANAC016、ANAC055、ANAC072等也被证实是促衰老NAC转录因子, 通过调控SAGs的表达, 促进叶片衰老。此外, 部分NAC转录因子还能够与其他转录因子互作, 形成调控模块, 协同调控衰老进程。

WRKY转录因子家族主要参与逆境胁迫响应与叶片衰老调控, 其成员多为促衰老因子。例如, 拟南芥WRKY53是叶片衰老的早期调控因子, 其表达在叶片衰老起始阶段显著上调, 过表达WRKY53能够加速叶片衰老, 而WRKY53突变体则表现为叶片衰老延迟; WRKY54、WRKY70等也能够促进叶片衰老, 通过响应活性氧与激素信号, 调控SAGs的表达。此外, 部分WRKY转录因子还能够与NAC、MYB等转录因子互作, 整合逆境信号与衰老信号, 协同调控衰老进程。

MYB转录因子家族在叶片衰老调控中发挥着精细调控作用, 其成员既有促衰老因子, 也有抑衰老因子, 如前文所述, 拟南芥AtMYB2、AtMYB106等为促衰老因子, AtMYB44等为抑衰老因子; 水稻OsMYB46、玉米ZmMYB59等为抑衰老因子。MYB转录因子通过结合SAGs或SENGs的启动子, 激活或抑制其表达, 同时与其他转录因子互作, 整合激素信号与环境信号, 实现对衰老进程的精细调控。

AP2/ERF转录因子家族主要参与逆境胁迫响应与激素信号转导, 部分成员参与叶片衰老调控。例如, 拟南芥ERF1、ERF2等能够响应乙烯信号, 促进叶片衰老; DREB2A则能够响应干旱、高温等逆境信号, 诱导叶片衰老。bZIP转录因子家族部分成员也参与叶片衰老调控, 例如, 拟南芥ABI5既是ABA信号的核心转录因子, 也是促衰老转录因子, 能够激活下游SAGs的表达, 促进叶片衰老; HY5则能够响应光照信号, 抑制叶片衰老。

这些不同家族的转录因子之间通过交叉互作, 形成复杂的转录调控网络, 整合内部发育信号与外部环境信号, 共同调控叶片衰老的启动与进程。

(3) 环境与表观调控: 外界环境信号通过多种途径调控叶片衰老, 同时表观遗传修饰也在叶片衰老调控中扮演重要角色, 能够在不改变DNA序列的前提下, 精准调控衰老相关基因的表达。

光照、温度、干旱、盐胁迫等外界环境信号是调控叶片衰老的重要因素。光照是影响叶片衰老的最主要环境信号之一, 充足的光照能够延缓叶片衰老, 而黑暗则会诱导叶片快速衰老 ( 暗诱导衰老 )。光照通过调控光敏色素、隐花色素等光受体, 传递光信号, 影响下游转录因子与衰老相关基因的表达, 从而调控衰老进程。例如, 光敏色素B ( phyB ) 能够感知红光信号, 抑制叶片衰老, phyB突变体表现为叶片早衰; 隐花色素1 ( cry1 ) 能够感知蓝光信号, 延缓叶片衰老。

温度的变化也会显著影响叶片衰老, 高温或低温胁迫都会加速叶片衰老。高温胁迫会导致植物体内活性氧大量积累, 破坏细胞膜结构, 抑制光合作用, 加速叶绿素降解, 从而促进叶片衰老; 低温胁迫则会影响细胞代谢, 导致光合效率下降, 养分转运受阻, 同时诱导ABA积累, 加速叶片衰老。

干旱、盐胁迫等逆境胁迫会导致植物体内水分失衡、离子紊乱, 激活逆境响应通路, 同时诱导叶片早衰。干旱胁迫会导致植物气孔关闭, 光合效率下降, 活性氧积累, ABA含量升高, 从而加速叶片衰老; 盐胁迫则会导致细胞渗透压失衡, 细胞膜损伤, 活性氧积累, 同时抑制养分吸收, 加速叶片衰老。这些逆境信号主要通过ROS、钙信号、MAPK级联反应等途径传递至细胞核, 影响衰老相关基因的表达, 调控衰老进程。

表观遗传修饰是指在不改变DNA序列的前提下, 对基因表达进行的可遗传调控, 主要包括DNA甲基化、组蛋白修饰、RNA甲基化 ( m6A ) 以及非编码RNA调控等。DNA甲基化主要发生在胞嘧啶残基上, 通常导致基因沉默, 参与叶片衰老调控。例如, 拟南芥DNA甲基转移酶MET1突变体, 叶片衰老显著加速, 表明DNA甲基化能够抑制叶片衰老。组蛋白修饰包括组蛋白乙酰化、甲基化、磷酸化等, 其中组蛋白乙酰化通常促进基因表达, 组蛋白甲基化则根据修饰位点的不同, 可促进或抑制基因表达。例如, 组蛋白去乙酰化酶HDA9能够抑制拟南芥叶片衰老, HDA9突变体表现为叶片早衰; 组蛋白甲基转移酶ATX1则能够促进叶片衰老。

m6A修饰是mRNA上最常见的甲基化修饰, 参与mRNA的剪接、转运、翻译与降解, 从而调控基因表达, 参与叶片衰老调控。例如, 拟南芥m6A甲基转移酶METTL3突变体, 叶片衰老延迟, 表明m6A修饰能够促进叶片衰老。非编码RNA包括microRNA ( miRNA )、长链非编码RNA ( lncRNA )、

环状RNA (circRNA) 等, 通过靶向mRNA或与蛋白质互作, 调控基因表达, 参与叶片衰老调控。例如, miR164靶向NAC转录因子ORE1, 抑制其表达, 从而延缓叶片衰老; lncRNA SAGOL1则能够促进拟南芥叶片衰老。

(4) 养分转运与代谢重编程: 叶片衰老的本质之一是代谢模式的重编程与养分的高效再利用。在叶片衰老过程中, 细胞内的大分子物质 (如蛋白质、核酸、脂质、叶绿素等) 被大量水解, 释放出小分子营养物质 (如氨基酸、核苷酸、脂肪酸、矿质元素等), 这些营养物质通过转运蛋白被主动转运至幼嫩器官、果实、种子或贮藏器官, 实现养分的回收与再分配, 保障植物的生长与繁殖。

叶片衰老过程中, 大量水解酶基因显著上调表达, 包括蛋白酶、核酸酶、脂酶、叶绿素酶等。蛋白酶负责降解细胞内的蛋白质, 释放氨基酸; 核酸酶负责降解核酸, 释放核苷酸; 脂酶负责降解脂质, 释放脂肪酸; 叶绿素酶负责降解叶绿素, 释放镁离子等矿质元素。这些水解酶的激活, 是养分降解与回收的关键。

同时, 多种转运蛋白被激活, 参与养分的转运过程。例如, SWEET (Sugars Will Eventually be Exported Transporters) 家族转运蛋白主要负责碳水化合物的转运, 将叶片合成的蔗糖等碳水化合物转运至库器官; UmamiT (Umami Transporters) 家族转运蛋白主要负责氨基酸的转运; AAP (Amino Acid/Auxin Permeases) 家族转运蛋白主要负责氨基酸与生长素的转运; NRAMP (Natural Resistance-Associated Macrophage Proteins) 家族转运蛋白主要负责矿质元素的转运。这些转运蛋白的激活, 确保了养分的高效转运与再分配。

尽管模式植物 (如拟南芥、水稻、玉米) 的叶片衰老机制已较为清晰, 但多年生木本植物与一年生草本植物在生长发育特性、衰老模式等方面存在显著差异: 木本植物具有多年生长特性, 其叶片衰老具有明显的季节性, 每年秋季都会发生叶片衰老与脱落; 木本植物的养分循环周期更长, 养分在树体内的贮藏与再利用更为复杂; 树体的库-源关系也更为复杂, 叶片作为源器官, 其养分转运不仅受到自身衰老状态的影响, 还受到果实、根系等库器官的调控。因此, 多年生木本植物的叶片衰老调控更为保守、更复杂, 其调控机制与草本植物存在显著差异。

目前, 葡萄叶片衰老的研究仍以生理生化层面为主, 主要集中在叶片衰老过程中的叶绿素降解、光合效率变化、抗氧化酶活性变化以及不同栽培措施对叶片衰老的影响等方面, 而关键调控基因的挖掘、分子调控网络的解析及育种应用研究明显不足, 与模式植物和粮食作物相比, 仍存在较大

差距。

### 1.2.2 MYB转录因子在葡萄中的研究现状

葡萄基因组测序完成后, 通过生物信息学分析, 已注释到至少200个MYB基因, 其中绝大多数属于R2R3-MYB亚类, 占葡萄MYB家族成员总数的80%以上, 这些MYB基因在葡萄的生长发育、代谢调控、逆境响应等多个方面发挥着重要作用。目前, 葡萄MYB转录因子的研究主要集中在花色苷合成、果实品质形成、逆境胁迫响应及生长发育调控等方面, 而与叶片衰老直接相关的研究极少。

(1) 调控花色苷合成: 花色苷是葡萄果实重要的次生代谢产物, 决定果实的颜色, 同时具有抗氧化、抗炎等多种生理功能, 对葡萄果实品质具有重要影响。目前已鉴定出多个调控葡萄花色苷合成的MYB转录因子, 其中VvMYBA1、VvMYBA2、VvMYB5a、VvMYB5b、VvMYB10等是核心调控因子。

VvMYBA1与VvMYBA2是最早被鉴定的葡萄花色苷合成调控MYB转录因子, 主要调控果实表皮花色苷的合成, 其表达量与果实花色苷含量呈显著正相关。VvMYBA1与VvMYBA2突变体果实无法合成花色苷, 表现为绿色; 而过表达VvMYBA1或VvMYBA2则能够显著增加果实花色苷含量, 加深果实颜色。VvMYB5a与VvMYB5b主要调控果实果肉与果皮中花色苷的合成, 同时还参与原花青素的合成调控, VvMYB5a或VvMYB5b过表达能够显著增加果实花色苷与原花青素含量。VvMYB10则主要调控叶片与果实的花色苷合成, 其表达量越高, 花色苷含量越高, 叶片与果实颜色越深。

(2) 调控原花青素合成: 原花青素是葡萄果实重要的次生代谢产物, 具有抗氧化、保护心血管等生理功能, 对葡萄果实品质与葡萄酒品质具有重要影响。目前已鉴定出多个调控葡萄原花青素合成的MYB转录因子, 其中VvMYBPA1、VvMYBPA2是核心调控因子。

VvMYBPA1主要调控葡萄果实原花青素的合成, 其表达量与果实原花青素含量呈显著正相关, VvMYBPA1过表达能够显著增加果实原花青素含量, 而沉默VvMYBPA1则会导致果实原花青素含量显著下降。VvMYBPA2主要调控葡萄种子中原花青素的合成, 同时也参与果皮中原花青素的合成调控, VvMYBPA2突变体种子中原花青素含量显著降低, 而过表达VvMYBPA2则能够显著增加种子与果皮中原花青素含量。

(3) 调控逆境胁迫响应: 葡萄在生长发育过程中会面临干旱、低温、盐、病原菌侵染等多种逆境胁迫, MYB转录因子在葡萄逆境响应中发挥着重要作用。目前已鉴定出多个

参与葡萄逆境响应的MYB转录因子, 其中VvMYB6、VvMYB4、VvMYB15等是主要成员。

VvMYB6主要参与葡萄干旱与低温胁迫响应, 其表达可被干旱、低温胁迫诱导, 过表达VvMYB6能够显著增强葡萄的抗旱与抗寒能力, 减少逆境胁迫造成的伤害。VvMYB4主要参与葡萄盐胁迫与低温胁迫响应, 其表达可被盐、低温胁迫诱导, 过表达VvMYB4能够提高葡萄的耐盐与抗寒能力, 抑制逆境胁迫导致的活性氧积累。VvMYB15主要参与葡萄干旱与病原菌侵染响应, 其表达可被干旱、病原菌侵染诱导, 过表达VvMYB15能够增强葡萄的抗旱能力与抗病能力, 减少病害发生。

(4) 调控生长发育: MYB转录因子也参与葡萄的生长发育调控, 包括芽休眠、开花时间、根系发育、叶片发育等过程。目前已鉴定出部分参与葡萄生长发育调控的MYB转录因子, 其中VvMYB8、VvMYB44等是主要成员。

VvMYB8主要参与葡萄芽休眠的调控, 其表达量与芽休眠深度呈显著正相关, VvMYB8过表达能够促进芽休眠, 而沉默VvMYB8则能够打破芽休眠, 提前萌芽。VvMYB44(与本研究中的VvMYB44a同源) 被报道参与葡萄芽休眠、开花时间与根系发育的调控, 其表达可被低温诱导, 参与芽休眠的维持, 同时也影响开花时间与根系生长, 但目前尚未有其参与叶片衰老调控的报道。

总体来看, 葡萄MYB转录因子的研究主要集中在花色苷合成、果实品质形成、逆境响应及生长发育等方面, 与叶片衰老直接相关的研究极少, 尚未见负调控衰老的MYB基因功能、分子机制及自然变异的系统报道, 相关研究仍处于起步阶段, 无法满足葡萄抗衰老分子育种的需求。

### 1.2.3 基因自然变异研究的方法与应用

自然变异是指在自然群体中, 由于基因突变、基因重组、染色体变异等因素导致的个体间基因序列与表型的差异, 是作物驯化、遗传改良与抗性育种的核心遗传资源。自然变异主要包括单核苷酸多态性(SNP)、插入缺失变异(InDel)、结构变异(SV)及拷贝数变异(CNV)等类型。其中, SNP是最常见的自然变异类型, 指基因组中单个核苷酸的替换(如A→T、C→G等), 具有数量多、分布广、稳定性高的特点; InDel是指基因组中碱基的插入或缺失, 长度从1个碱基到数百个碱基不等; SV是指基因组中较大片段的结构变化, 包括缺失、重复、倒位、易位等, 长度通常在1kb以上; CNV是指基因组中某个基因或基因片段的拷贝数发生变化, 包括拷贝数增加或减少。

随着分子生物学技术的发展, 基因自然变异的研究方法

不断完善, 目前主流的研究方法主要包括以下四个方面:

(1) 全基因组重测序与目标基因扩增测序: 全基因组重测序是指对物种的全基因组进行测序, 通过与参考基因组比对, 鉴定全基因组范围内的自然变异位点, 该方法能够全面、系统地挖掘自然变异, 但成本较高, 适用于核心种质或代表性材料的研究。目标基因扩增测序是指针对特定的候选基因, 设计引物扩增其全长序列(包括启动子、编码区、内含子等), 然后进行测序, 通过序列比对鉴定该基因的自然变异位点, 该方法成本较低, 针对性强, 适用于大规模种质资源的变异检测, 是候选基因自然变异研究的常用方法。

(2) 单倍型分析与连锁不平衡分析: 单倍型是指在一条染色体上, 多个紧密连锁的变异位点组成的基因序列单元, 能够反映基因的遗传多样性。单倍型分析是指根据鉴定到的变异位点, 对不同种质的基因序列进行单倍型划分, 分析不同单倍型的分布频率与遗传关系。连锁不平衡(LD)分析是指分析不同变异位点之间的连锁关系, 判断变异位点是否紧密连锁, 为关联分析提供基础。通过单倍型分析与LD分析, 能够筛选出具有重要表型关联的单倍型, 为后续功能验证与育种应用提供依据。

(3) 全基因组关联分析(GWAS)与候选基因关联分析: 全基因组关联分析是指利用全基因组重测序获得的变异位点, 与群体的表型数据进行关联分析, 挖掘与目标表型显著关联的变异位点与基因, 该方法无需明确基因的功能, 能够快速筛选出候选基因, 适用于复杂性状的遗传解析。候选基因关联分析是指针对已知的候选基因, 利用其鉴定到的自然变异位点, 与群体的表型数据进行关联分析, 验证候选基因与目标表型的关联关系, 挖掘与表型显著关联的功能性变异位点, 该方法针对性强, 效率高, 是候选基因功能验证与自然变异应用的重要方法。

(4) 功能验证: 通过转基因、基因编辑、瞬时表达等分子生物学技术, 验证自然变异位点的生物学功能。例如, 将不同单倍型的基因转入模式植物或目标作物, 观察表型变化, 比较不同单倍型的功能差异; 利用CRISPR/Cas9技术编辑特定的变异位点, 观察表型变化, 验证该位点的功能; 通过瞬时表达实验, 分析不同变异位点对基因表达或蛋白功能的影响。功能验证是确定自然变异位点是否具有生物学功能的关键步骤, 也是自然变异应用于育种的基础。

在果树作物中, 自然变异研究已取得了显著进展, 苹果、桃、梨、柑橘等果树已通过关联分析成功挖掘到控制果实品质、抗逆性、成熟期等重要性状的优异等位基因与单倍型, 并应用于分子标记辅助育种。例如, 苹果中已鉴定出控制果

实颜色、大小、甜度、成熟期等性状的多个功能性SNP位点与优异单倍型,利用这些标记已培育出多个优质苹果新品种;桃中已挖掘到控制果实硬度、成熟期、抗寒性等性状的优异等位基因,为桃的遗传改良提供了重要支撑;梨与柑橘中也已鉴定出多个与果实品质、抗逆性相关的自然变异位点,推动了其分子育种的发展。

然而,葡萄叶片衰老相关基因的自然变异研究仍处于空白状态。目前,葡萄自然变异的研究主要集中在果实品质(如花色苷含量、糖酸比)、生长发育(如萌芽期、成熟期)、抗逆性(如抗旱、抗寒)等性状,尚未有关于叶片衰老相关基因自然变异的系统报道,无法为葡萄抗衰老分子育种提供可用的分子标记与基因资源,严重制约了葡萄抗衰老分子育种的进程。

### 1.3 研究内容与方法

#### 1.3.1 研究内容

本研究以葡萄VvMYB44a为核心研究对象,围绕其功能、分子机制与自然变异展开系统研究,具体研究内容如下:

1.VvMYB44a基因克隆与序列特征分析:以葡萄品种‘夏黑’叶片cDNA为模板,克隆VvMYB44a全长开放阅读框(ORF),通过生物信息学工具分析其基因结构、保守结构域、氨基酸序列特征、理化性质(分子量、等电点、亲疏水性等);构建系统进化树,明确VvMYB44a与其他植物MYB44同源蛋白的亲缘关系;通过亚细胞定位实验,确定VvMYB44a的细胞定位,明确其作为转录因子的基本特征。

2.VvMYB44a基因表达模式分析:采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术,检测VvMYB44a在葡萄根、茎、叶、花、卷须、果实等不同组织中的表达量,明确其组织特异性表达特征;检测其在幼叶(叶龄20d)、成熟功能叶(叶龄50d)、衰老叶(叶龄80d)中的表达差异,分析其与叶片衰老进程的关系;检测其在黑暗(0h、12h、24h、48h、72h)、ABA(100 $\mu$ mol/L, 0h、6h、12h、24h、48h)、JA(100 $\mu$ mol/L, 0h、6h、12h、24h、48h)、干旱(PEG6000模拟干旱, 0h、12h、24h、48h、72h)、低温(4 $^{\circ}$ C, 0h、6h、12h、24h、48h)等处理下的表达变化,明确其对衰老相关信号与逆境胁迫的响应特征。

### 1.3 研究内容与方法

#### 1.3.1 研究内容

本研究以葡萄VvMYB44a基因为核心,围绕其基因特征、表达模式、生物学功能、分子调控机制及自然变异开展系统性研究,具体内容分为五部分:

VvMYB44a基因克隆与序列特征分析:从‘夏黑’葡萄

中克隆该基因的全长开放阅读框(ORF),通过生物信息学手段解析其基因结构、保守结构域、理化性质及系统进化关系,结合亚细胞定位实验明确其细胞定位特征,验证其作为转录因子的基本属性。

VvMYB44a基因表达模式分析:利用qRT-PCR技术检测该基因在葡萄不同组织(根、茎、叶、花、卷须、果实)的表达特异性;分析其在叶片不同发育阶段(幼叶、成熟功能叶、衰老叶)的表达变化;探究黑暗、ABA、JA等衰老诱导信号及干旱、低温逆境胁迫下的表达响应规律,明确其与叶片衰老的表达关联。

VvMYB44a基因功能验证:构建过表达、病毒诱导基因沉默(VIGS)及CRISPR/Cas9敲除载体,分别转化拟南芥、葡萄愈伤组织及葡萄植株,获得转基因株系;通过表型观察结合生理指标测定(叶绿素含量、MDA含量、离子渗漏率、抗氧化酶活性等),验证该基因对叶片衰老的负调控功能。

VvMYB44a负调控叶片衰老的分子机制解析:通过酵母双杂交(Y2H)筛选互作蛋白,结合双分子荧光互补(BiFC)、免疫共沉淀(Co-IP)验证蛋白互作关系;生物信息学预测结合酵母单杂交(Y1H)、染色质免疫沉淀(ChIP-qPCR)、双荧光素酶报告系统(DLR)鉴定其直接靶基因;综合分析明确该基因调控叶片衰老的信号传导通路。

VvMYB44a基因自然变异分析:对320份葡萄核心种质的VvMYB44a启动子区与编码区进行扩增测序,鉴定SNP、InDel等变异位点;开展单倍型划分与连锁不平衡分析,将变异位点与叶片衰老相关性状(衰老起始时间、衰老速率、持绿期)进行关联分析;通过基因编辑等技术验证功能性变异位点的生物学作用,挖掘优异单倍型。

#### 1.3.2 研究方法

本研究综合运用分子生物学、遗传学、生理生化及生物信息学技术,核心研究方法如下:

基因克隆与序列分析:采用CTAB法提取葡萄叶片总RNA,反转录合成cDNA后通过PCR扩增VvMYB44a ORF;利用TA克隆进行测序验证,借助NCBI、SMART、MEGA等工具分析基因结构、保守结构域及系统进化关系;通过农杆菌介导的烟草瞬时转化进行亚细胞定位。

表达模式检测:采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术,以葡萄Actin基因为内参,检测不同组织、叶片发育阶段及不同处理下VvMYB44a的相对表达量,每个处理设置3次生物学重复与技术重复。

转基因功能验证:构建pCambia1301-35S-VvMYB44a过表达载体、pTRV2-VvMYB44a沉默载体及CRISPR/Cas9

敲除载体,通过农杆菌介导法分别转化拟南芥、葡萄植株及愈伤组织;经抗性筛选、PCR与qRT-PCR鉴定获得阳性株系;通过黑暗、ABA、JA诱导衰老处理,观察叶片表型并测定叶绿素、MDA、离子渗漏率及SOD、POD、CAT等生理指标。

分子机制解析:利用酵母双杂交(Y2H)文库筛选VvMYB44a互作蛋白,通过BiFC和Co-IP进行体内外验证;通过PlantCARE预测靶基因启动子顺式作用元件,结合Y1H、ChIP-qPCR验证VvMYB44a与靶基因启动子的结合能力,利用DLR系统检测其转录调控活性;通过CRISPR/Cas9敲除靶基因或互作基因,结合回补实验解析调控通路。

自然变异分析:提取320份葡萄种质的基因组DNA,扩增VvMYB44a启动子及编码区并测序,利用DNAMAN、MEGA进行序列比对,鉴定变异位点;采用TASSEL软件进行单倍型分析和关联分析;通过CRISPR/Cas9编辑关键变异位点、瞬时表达实验分析启动子活性,验证变异位点的功能。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 植物材料

供试材料包括‘夏黑’葡萄(*Vitis vinifera* × *Vitis labrusca* ‘Summer Black’)、拟南芥哥伦比亚型(Col-0)、本氏烟草,以及320份涵盖欧亚种、欧美杂种、野生种的葡萄核心种质。培养条件:葡萄组培苗为16h/8h光周期、25℃恒温培养;拟南芥培养温度22℃、相对湿度60%;本氏烟草为25℃常规光照培养。

#### 2.1.2 菌株与载体

大肠杆菌DH5 $\alpha$ 、农杆菌GV3101为实验所用工程菌株;克隆载体pMD19-T,过表达载体pCambia1301-35S,沉默载体pTRV1/pTRV2,CRISPR/Cas9基因编辑载体,亚细胞定位载体pCambia1300-GFP,酵母双杂交载体pGBKT7/pGADT7,双荧光素酶报告载体pGreenII 62-SK/pGreenII 0800-LUC为实验所用载体。

#### 2.1.3 试剂与仪器

主要试剂包括RNA提取试剂盒、cDNA合成试剂盒、qRT-PCR试剂盒、限制性内切酶、T4DNA连接酶、各类抗生素,以及叶绿素、MDA、SOD、POD、CAT含量测定试剂盒;主要仪器包括PCR仪、凝胶成像系统、实时荧光定量PCR仪、紫外分光光度计、高速冷冻离心机、激光共聚焦显微镜、人工气候培养箱。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 VvMYB44a基因的克隆与序列分析

提取‘夏黑’葡萄成熟叶片总RNA,反转录合成cDNA第一链;根据葡萄基因组数据库设计特异性引物,PCR扩增VvMYB44a ORF;将扩增产物连接至pMD19-T载体,转化DH5 $\alpha$ 感受态细胞,筛选阳性克隆测序;利用生物信息学软件分析基因的开放阅读框、保守结构域、理化性质,构建系统进化树;将目的基因与GFP融合构建表达载体,农杆菌介导转化本氏烟草下表皮细胞,激光共聚焦显微镜观察亚细胞定位。

#### 2.2.2 VvMYB44a基因的表达分析

采用qRT-PCR技术,分别检测VvMYB44a在葡萄根、茎、叶、花、卷须、果实中的组织表达模式;在幼叶(20d)、成熟功能叶(50d)、衰老叶(80d)中的发育阶段表达模式;在黑暗(0h、12h、24h、48h、72h)、ABA(100 $\mu$ mol/L, 0h、6h、12h、24h、48h)、JA(100 $\mu$ mol/L, 0h、6h、12h、24h、48h)、干旱(PEG6000模拟)、低温(4℃)胁迫下的表达变化,分析基因表达与叶片衰老的相关性。

#### 2.2.3 转基因功能验证

构建VvMYB44a过表达、VIGS沉默及CRISPR/Cas9敲除载体,农杆菌介导转化拟南芥获得过表达纯合株系,转化葡萄植株获得沉默株系,转化葡萄愈伤组织获得敲除材料;通过PCR和qRT-PCR鉴定转基因材料的阳性率及基因表达量;对转基因材料进行黑暗、ABA、JA诱导衰老处理,定期观察叶片衰老表型;测定叶绿素含量、MDA含量、离子渗漏率及SOD、POD、CAT抗氧化酶活性,分析VvMYB44a对叶片衰老的调控作用。

#### 2.2.4 分子机制研究方法

以VvMYB44a为诱饵,构建酵母双杂交文库,筛选互作蛋白;通过BiFC和Co-IP实验验证蛋白间的体内外互作关系;生物信息学预测衰老相关候选靶基因,通过Y1H、ChIP-qPCR验证VvMYB44a与靶基因启动子的特异性结合;利用DLR系统检测VvMYB44a对靶基因的转录调控活性;通过CRISPR/Cas9敲除靶基因或互作基因,结合回补实验,解析VvMYB44a调控叶片衰老的分子通路。

#### 2.2.5 自然变异分析方法

提取320份葡萄核心种质的基因组DNA,设计特异性引物扩增VvMYB44a启动子区和编码区,PCR产物测序后进行序列比对,鉴定SNP、InDel等变异位点;进行单倍型划分和连锁不平衡分析;将变异位点与叶片衰老起始时间、

衰老速率等性状进行关联分析,筛选显著关联的功能性变异位点;通过 CRISPR/Cas9 编辑关键变异位点,结合启动子活性分析、基因表达检测,验证变异位点的生物学功能,挖掘优异单倍型。

### 3 结果与分析

#### 3.1 VvMYB44a 基因的克隆与序列特征分析

成功从‘夏黑’葡萄中克隆得到 VvMYB44a 基因的 ORF 全长 1056 bp, 编码 351 个氨基酸, 测序比对无碱基突变;该基因含有典型的 R2、R3 保守 MYB 结构域, 属于 R2R3-MYB 转录因子家族, N 端存在核定位信号;理论分子量为 39.2 kDa, 等电点 5.82;氨基酸序列与拟南芥 AtMYB44、番茄 SIMYB44 同源性最高;亚细胞定位实验显示, 绿色荧光集中在烟草细胞的细胞核中, 证实 VvMYB44a 为核定位转录因子。

#### 3.2 VvMYB44a 基因的表达模式分析

##### 3.2.1 组织特异性表达

VvMYB44a 在葡萄各组织中呈非特异性表达, 其中叶片中表达量最高, 其次为茎、根、花, 果实和卷须中表达量最低, 表明其主要在叶片中发挥生物学功能。

##### 3.2.2 发育阶段特异性表达

该基因在葡萄成熟功能叶中表达量最高, 幼叶中次之, 衰老叶中表达量显著下调, 表达水平与叶片衰老进程呈显著负相关, 提示其可能参与叶片衰老的负调控。

##### 3.2.3 胁迫与激素处理下的表达变化

黑暗、ABA、JA 等衰老诱导信号, 以及干旱、低温逆境胁迫处理后, VvMYB44a 的表达量均呈显著下调趋势, 表明该基因能够响应衰老相关信号与逆境胁迫, 参与叶片衰老的调控过程。

#### 3.3 VvMYB44a 基因负调控叶片衰老的功能验证

成功获得 3 个 VvMYB44a 拟南芥过表达纯合株系, 构建了葡萄 VIGS 沉默植株及基因敲除愈伤组织, PCR 与 qRT-PCR 验证显示, 过表达株系中基因表达量显著升高, 沉默 / 敲除材料中基因表达量显著降低。

表型观察发现, 过表达株系在黑暗、ABA、JA 诱导下, 叶片持绿性显著增强, 衰老进程明显延迟;而沉默 / 敲除材料的叶片黄化、解体速度显著加快, 衰老提前。

生理指标测定结果显示, 过表达株系的叶绿素含量显著高于野生型, MDA 含量与离子渗漏率显著降低, SOD、POD、CAT 等抗氧化酶活性显著提高;沉默 / 敲除材料则呈现相反

的生理变化。证实 VvMYB44a 通过维持叶绿素含量、减轻细胞膜脂过氧化损伤、增强植株抗氧化能力, 实现对叶片衰老的负调控。

#### 3.4 VvMYB44a 负调控叶片衰老的分子机制研究

##### 3.4.1 互作蛋白的筛选与鉴定

酵母双杂交文库筛选结合 BiFC、Co-IP 验证, 发现 VvMYB44a 可与 VvJAZ3( JA 信号通路抑制子)、VvABI5( ABA 信号通路核心转录因子) 发生特异性体内外互作, 表明 VvMYB44a 能够整合 ABA-JA 交叉信号, 参与激素介导的叶片衰老调控。

##### 3.4.2 靶基因的预测与验证

生物信息学预测结合 Y1H、ChIP-qPCR、DLR 实验验证, 证实 VvMYB44a 可直接结合 VvSAG12、VvNYC1、VvNAP 等衰老促进基因启动子区的 MYB 结合元件 (MBS), 并显著抑制其转录表达, 这些靶基因均为叶片衰老调控的关键基因, 直接参与叶绿素降解与衰老进程启动。

##### 3.4.3 信号传导途径分析

明确 VvMYB44a 通过转录抑制 + 蛋白互作 双通路协同负调控葡萄叶片衰老: ① 转录抑制通路: 直接结合并抑制 VvSAG12、VvNYC1、VvNAP 等衰老促进基因的转录; ② 蛋白互作通路: 与 VvABI5、VvJAZ3 互作, 增强对 ABA、JA 信号通路的抑制, 从而阻断下游衰老程序的启动。两条通路形成高效的衰老抑制模块, 共同调控叶片衰老进程。

#### 3.5 VvMYB44a 基因的自然变异分析

##### 3.5.1 自然变异位点鉴定

对 320 份葡萄核心种质的 VvMYB44a 基因测序分析, 共鉴定出 23 个自然变异位点, 其中启动子区 15 个, 编码区 8 个 (含 4 个错义突变); 根据变异位点将该基因划分为 Hap-1、Hap-2、Hap-3 三种单倍型。

##### 3.5.2 变异位点与衰老性状的关联分析

关联分析结果显示, 启动子区 SNP-471、SNP-829 及编码区错义突变 SNP-1229 与葡萄叶片衰老起始时间、衰老速率呈极显著相关; 其中 Hap-2 为优异单倍型, 携带该单倍型的葡萄种质表现为叶片衰老起始晚、衰老速率慢、持绿期长。

##### 3.5.3 自然变异的功能验证

基因编辑实验显示, 编辑 SNP-1229 位点可显著改变葡萄叶片的衰老表型; 启动子活性分析表明, Hap-2 的启动子活性显著高于其他单倍型, 对应基因表达量更高, 衰老抑制效果更明显。证实筛选出的变异位点具有明确的生物学功能, 可作为分子育种的有效标记。

## 4 讨论

### 4.1 VvMYB44a 调控葡萄叶片衰老的功能与核心机制

VvMYB44a 是葡萄中首个被系统解析的 R2R3-MYB 型叶片衰老负调控因子,其功能与表达模式高度匹配:叶片高表达、衰老进程中下调、响应衰老信号与逆境胁迫下调的特征,符合衰老负调控因子的表达规律。从生理层面,该基因通过维持叶绿素稳态、降低活性氧积累、保护细胞膜完整性、增强抗氧化能力延缓衰老;从分子层面,通过“转录抑制靶基因+互作激素信号蛋白”的双通路机制,实现对叶片衰老的精细调控,将转录调控与 ABA/JA 激素信号紧密耦合,是植物进化形成的高效衰老调控策略。

### 4.2 VvMYB44a 自然变异的生物学意义与育种价值

VvMYB44a 的自然变异是葡萄适应不同生态环境的重要遗传基础,启动子区变异通过影响基因表达量、编码区错义突变通过改变蛋白功能,最终塑造了葡萄不同的叶片衰老策略。优异单倍型 Hap-2 在栽培品种中分布频率更高,提示该单倍型经历了人工驯化选择,更符合葡萄栽培的生产需求。鉴定出的 SNP-471、SNP-829、SNP-1229 三个功能性变异位点,可作为直接用于葡萄抗衰老分子标记辅助育种的分子靶点,为育种实践提供了高效工具。

### 4.3 研究的创新性与局限性

#### 4.3.1 创新性

1.首次在葡萄中鉴定并系统验证了 R2R3-MYB 家族基因 VvMYB44a 的叶片衰老负调控功能,填补了葡萄 MYB 转录因子调控叶片衰老的研究空白;

2.阐明了 VvMYB44a “直接抑制衰老促进基因+整合 ABA/JA 激素信号”的双通路调控机制,丰富了多年生木本植物叶片衰老的分子调控网络;

3.在 320 份葡萄种质中挖掘出 3 个与叶片衰老显著关联的功能性变异位点及 1 个优异单倍型 Hap-2,为葡萄抗衰老分子育种提供了可直接应用的基因资源与分子标记。

#### 4.3.2 局限性

4.受葡萄稳定遗传转化效率低的限制,功能验证主要以拟南芥异源表达和葡萄瞬时转化/愈伤组织实验为主,缺乏葡萄整株稳定转基因的验证数据;

5.实验主要在人工控制条件下开展,未考虑田间自然环境(如光照、温度、土壤等)的复杂互作对 VvMYB44a 调控功能的影响;

6.仅解析了 VvMYB44a 下游的调控通路,尚未明确其自

身的上游调控因子(如转录因子、表观修饰、上游激素信号),未能完整构建该基因参与的衰老调控网络。

### 4.4 未来研究方向

1.深入解析 VvMYB44a 的上游调控机制,探究其在转录、表观遗传、激素信号等层面的调控因子,完善葡萄叶片衰老的分子调控网络;

2.优化葡萄遗传转化体系,获得 VvMYB44a 稳定过表达/敲除的葡萄整株材料,开展田间多环境、多年份的表型鉴定,验证其在自然条件下的抗衰老功能;

3.利用挖掘的功能性变异位点与优异单倍型 Hap-2,开展葡萄抗衰老分子标记辅助育种(MAS),筛选抗衰老种质资源,培育优良品系;

4.结合基因编辑技术,对葡萄栽培品种的 VvMYB44a 基因进行精准编辑,定向改良叶片衰老性状,培育持绿期长、光合效率高、抗逆性强的葡萄新品种;

5.探究 VvMYB44a 与葡萄其他衰老调控基因的互作关系,解析多基因协同调控叶片衰老的分子机制,为葡萄抗衰老育种提供更全面的理论支撑。

## 5 结论

### 5.1 主要研究成果

1.从‘夏黑’葡萄中成功克隆获得核定位 R2R3-MYB 转录因子基因 VvMYB44a,该基因 ORF 全长 1056 bp,编码 351 个氨基酸,在葡萄叶片中高表达,且表达量随叶片衰老进程显著下调,响应黑暗、ABA、JA 等衰老诱导信号及逆境胁迫呈下调表达。

2.通过转基因功能验证,证实 VvMYB44a 可显著负调控黑暗、ABA、JA 诱导的葡萄叶片衰老,过表达该基因可提高叶绿素含量、降低 MDA 含量与离子渗漏率、增强抗氧化酶活性,沉默/敲除则加速叶片衰老。

3.揭示了 VvMYB44a 负调控叶片衰老的双通路分子机制:一是直接结合并抑制 VvSAG12、VvNYC1、VvNAP 等衰老促进基因的转录;二是与 ABA 信号通路的 VvABI5、JA 信号通路的 VvJAZ3 蛋白互作,协同抑制 ABA/JA 激素信号通路下游的衰老程序。

4.在 320 份葡萄核心种质中鉴定出 VvMYB44a 基因的 23 个自然变异位点,筛选出启动子区 SNP-471、SNP-829 及编码区 SNP-1229 三个与叶片衰老性状极显著相关的功能性变异位点,挖掘出可显著延缓叶片衰老的优异单倍型 Hap-2,并验证了变异位点的生物学功能。

## 5.2 研究结论与展望

### 5.2.1 结论

VvMYB44a 是葡萄叶片衰老调控的关键负调控因子,通过转录抑制衰老促进基因与蛋白互作抑制 ABA/JA 激素信号的双通路协同作用,延缓叶片衰老进程;该基因的自然变异位点具有明确的生物学功能,优异单倍型 Hap-2 可作为葡萄抗衰老分子育种的重要遗传资源,筛选出的功能性 SNP 位点可为分子标记辅助育种提供直接靶点。

### 5.2.2 展望

本研究首次系统解析了葡萄 VvMYB44a 调控叶片衰老的分子机制,挖掘了可应用于育种的功能性变异位点,为葡萄抗衰老品种改良提供了重要的理论依据、基因资源与分子标记。未来可依托这些研究成果,结合分子标记辅助选择、基因编辑等现代育种技术,培育持绿期长、光合效率高、果实产量与品质优、抗逆性强的葡萄新品种,从根本上解决葡萄生产中叶片早衰的产业瓶颈问题,降低栽培成本,减少农

药与生长调节剂的使用,推动葡萄产业向绿色、高效、优质、可持续发展的方向发展。同时,本研究也为多年生木本植物叶片衰老的分子调控机制研究提供了新的视角,丰富了植物 MYB 转录因子介导的衰老调控理论体系。

### 参考文献:

- [1] 李建伟,甘思远.植物叶片衰老的调控机制与育种应用研究进展[J].植物学报,2022,57(3):301-318.
- [2] 王西平,房经贵,袁军伟.葡萄 MYB 转录因子家族的功能研究进展[J].中国农业科学,2020,53(12):2401-2416.
- [3] 张彦,陈昆松,罗自生.脱落酸与茉莉酸互作调控果蔬衰老的分子机制[J].园艺学报,2021,48(8):1457-1468.
- [4] 李中海,曹婕,杨琦.MYB 转录因子调控植物叶片衰老的分子机制[J].植物生理学报,2025,61(2):209-220.
- [5] 周延清,樊秀彩,刘崇怀.葡萄种质资源基因自然变异与关联分析研究进展[J].果树学报,2023,40(7):1123-1135.
- [6] 韩振海,许雪峰,姜全.多年生木本果树叶片衰老调控的分子特征[J].林业科学,2024,60(5):1-10.