生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):142-152

葡萄苹果酸脱氢酶*MDH*基因家族鉴定及*VvMDH10*基因功能分析

高亮[1] 崔鑫源[1] 刘名原[1,2] 韩蕾[1*]
（1.鲁东大学园艺学院,烟台 264025；2.山东省蚕业研究所,烟台 264002）

摘 要： 【目的】探究葡萄（*Vitis vinifera*）苹果酸脱氢酶（malate dehydrogenase, MDH）的基因结构与表达，揭示*VvMDH*基因的生物学功能，为进一步培育优质葡萄品种提供参考。【方法】利用生物信息学方法对葡萄11个*MDH*基因进行鉴定，并分析其蛋白理化性质、基因同源性、染色体位置、保守基序（motif）、基因结构和启动子区域等，实时荧光定量PCR（RT-qPCR）验证葡萄*MDH*基因家族成员在干旱和盐碱胁迫下的表达模式。利用花序浸染法获得异源过表达*VvMDH10*的拟南芥植株，进行干旱表型分析，探究*VvMDH10*对植株抗旱性的影响。【结果】共鉴定到11个*VvMDH*基因家族成员不均匀分布在9条染色体上。理化性质分析表明，VvMDH多为碱性蛋白，亚细胞定位预测显示VvMDH分布于细胞质基质、叶绿体和线粒体。系统发育分析将VvMDH成员分为5个亚家族，与拟南芥同源蛋白聚类模式高度保守。同一亚族成员具有相似的基因结构及motif分布。启动子顺式作用元件分析结果显示，*VvMDH*基因富含光响应、激素应答及干旱等胁迫响应元件，表明*VvMDH*基因可能受到多种植物激素或胁迫的调控。转录组数据分析显示，*VvMDH*在不同组织间特异性表达。RT-qPCR结果表明，干旱及盐碱处理能够诱导多个*VvMDH*基因的表达，尤其在干旱胁迫下，*VvMDH10*的表达量显著上调。异源过表达*VvMDH10*的拟南芥离体叶片失水率显著低于野生型，干旱处理后，过表达植株生物量和抗氧化相关酶活性显著高于野生型，体内MDA含量显著低于野生型。【结论】*VvMDH10*基因能够正向调控植株的抗旱性，可作为葡萄抗旱分子育种的基因资源。

关键词： ‘马瑟兰’葡萄；苹果酸脱氢酶(MDH)；*VvMDH10*；抗旱；耐盐碱；全基因组鉴定；过表达
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-0661

Identification of Malate Dehydrogenase *MDH* Gene Family and Functional Characterization of *VvMDH10* in Grape

GAO Liang[1] CUI Xin-yuan[1] LIU Ming-yuan[1,2] HAN Lei[1*]
（1. *College of Horticulture, Ludong University, Yantai* 264025; 2. *Shandong Sericultural Research Institute, Yantai* 264002）

Abstract: 【Objective】To investigate the gene structure and expression of malate dehydrogenase (MDH) in grapevine (*Vitis vinifera*), and to provide insights into the biological functions of *VvMDH* genes and to support further breeding of high-quality grape varieties. 【Method】Bioinformatics approaches were employed to identify 11 *MDH* genes in grapevine, followed by analyses of their protein physicochemical properties, gene homology, chromosomal locations, conserved motifs, gene structures, and promoter regions. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to validate the expression patterns of *VvMDH* gene family members under drought and saline-alkali stress conditions. *Arabidopsis* plants heterologously overexpressing *VvMDH10* were obtained using the floral dip method for drought phenotype analysis, to investigate the effect of *VvMDH10* on plant drought tolerance. 【Result】A total of 11 *VvMDH* gene family members were identified, unevenly distributed across 9 chromosomes. Physicochemical analysis revealed that most VvMDH proteins are alkaline. Subcellular localization predictions indicated VvMDH is located in the cytosol, chloroplasts, and mitochondria. Phylogenetic analysis classified the *VvMDH* members into 5 subfamilies, showing high conservation in clustering patterns with homologous proteins from *Arabidopsis*. Members of the same subfamily

收稿日期：2025-06-23
基金项目：山东省自然科学基金项目（ZR2021MC086）
*通信作者：韩蕾 hanlei@ldu.edu.cn

exhibited similar gene structures and motif distributions. Promoter *cis*-acting element analysis demonstrated that *VvMDH* genes are enriched with light-responsive, hormone-responsive, and stress-responsive elements (e.g., drought stress), suggesting their potential regulation by various phytohormones or stresses. Transcriptome data revealed tissue-specific expression patterns of *VvMDH* genes. RT-qPCR results indicated that drought and saline-alkali treatments could induce the expression of multiple *VvMDH* genes, with *VvMDH10* expression significantly upregulated especially under drought stress. Detached *Arabidopsis thaliana* leaves heterologously overexpressing *VvMDH10* exhibited a significantly lower water loss rate compared to wild-type plants. Under drought stress, the overexpressing lines showed significantly higher biomass and activities of antioxidant-related enzymes, significantly lower malondialdehyde (MDA) content compared to the wild type. 【Conclusion】The *VvMDH10* gene can positively regulate plant drought tolerance and can serve as a genetic resource for molecular breeding of drought-resistant grapevines.

Keywords: Marselan grape; malate dehydrogenase (MDH); *VvMDH10*; drought resistance; salt-alkali tolerance; genome-wide identification; overexpression

葡萄（*Vitis vinifera* L.）是一种在全球范围内广泛种植的重要经济果树，不仅可以直接食用，还可用于酿酒、制汁、制干等加工产业。然而，在葡萄的生长过程中，常常会受到各种逆境胁迫，如低温、干旱、盐碱以及病原菌的侵害，影响葡萄的产量和品质[1-2]。因此，深入研究葡萄的抗逆分子机制，挖掘与抗逆相关的基因资源，对于培育具有优良抗逆性的葡萄新品种具有重要意义。

苹果酸（malate）是三羧酸循环中重要中间产物[3]。苹果酸脱氢酶（malate dehydrogenase, MDH）广泛存在于动物、植物和微生物中，其以NAD^+/$NADP^+$为辅因子，催化苹果酸与草酰乙酸的可逆转化[4-6]。NAD-MDH主要存在于线粒体中，参与三羧酸循环，为细胞提供能量和碳骨架；NADP-MDH主要存在于叶绿体中，参与光合作用中的C_4和景天酸代谢途径，调节CO_2浓度和光合效率[7]。多项研究表明，高等植物的*MDH*基因家族在能量代谢、呼吸作用、活性氧代谢及植物抗逆性过程中发挥重要作用[8-11]。目前，已在拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）[12-13]、番茄（*Solanum lycopersicum*）[14]、玉米（*Zea mays*）[15]、小麦（*Triticum aestivum*）[16]、水稻（*Oryza sativa*）[17]、土豆（*Solanum tuberosum*）[18]、花生（*Arachis hypogaea*）[19]、棉花（*Gossypium hirsutum*）[20-21]、杨树（*Populus trichocarpa*）[22]、杉树（*Cunninghamia lanceolata*）[23]和苹果（*Malus domestica*）[24-26]等多个物种中对*MDH*基因进行全基因组鉴定或功能分析。在强光下，拟南芥NADP-MDH功能缺失突变体的ROS累积显著增加[27]。过量表达玉米*ZmNADP-MDH*的拟南芥植株在盐胁迫下叶绿素和脯氨酸含量增加，ROS含量降低，从而表现出耐盐性[15]。水稻*osmdh1*突变体呈现耐盐表型，而过表达转基因植株则呈现盐敏感表型[28]。过量表达苹果*MdcyMDH*能够提高苹果植株的耐寒性和耐盐性[25]。多个杉木*ClMDH*在低磷胁迫下表达上调[23]。拟南芥线粒体苹果酸脱氢酶（*mMDH2*）能够被缺铁胁迫诱导，与野生型相比，功能缺失突变体*mmdh2*对缺铁胁迫更敏感，且体内H_2O_2含量较高，而过表达植株对缺铁胁迫更耐受，H_2O_2含量更低[29]。干旱胁迫后，*MdmMDH*-RNAi转基因苹果植株叶片含水量降低[30]。综上，*MDH*基因在不同物种进化过程中发生了功能分化，因此对不同物种的*MDH*基因进行研究，有利于丰富和完善*MDH*的功能研究。

本研究从葡萄基因组中鉴定*MDH*家族基因，并对各基因的蛋白理化性质、基因同源性、染色体位置、保守基序（motif）、基因结构和启动子区域等进行分析。结合干旱和盐碱胁迫处理下的表达分析，将受干旱诱导显著上调的基因*VvMDH10*异源过表达拟南芥，探究其参与调节植株抗旱性的功能，为葡萄抗旱遗传改良提供基因资源。

1　材料与方法

1.1　材料

试验于2025年3-6月在鲁东大学北区日光温室进行，温室平均温度20-30 ℃，湿度55%-70%，每天光照时间不少于6.5 h。供试材料为一年生酿酒葡萄‘马瑟兰’（*Vitis vinifera* cv. Marselan）扦插苗。于2024年11月收集‘马瑟兰’葡萄一年生枝条，修剪成具有2个或以上完整芽的小段，插入装有泥炭

土的黑色塑料花盆中，种植深度为5-8 cm，正常水肥管理3个月，然后选取木质茎段长短粗细、长势一致的48棵葡萄苗转移到含有蛭石：珍珠岩（1∶1）的花盆中（20 cm×18 cm×20 cm），每盆种1棵，每3 d浇1次1/2改良版霍格兰营养液，每次浇1 L，待植株长到8-10片叶子时进行试验。试验设计4个处理：对照（只浇1/2霍格兰营养液）、盐胁迫处理（1/2霍格兰营养液+200 mmol/L NaCl）、碱胁迫处理（1/2霍格兰营养液+200 mmol/L $NaHCO_3$）、盐碱复合胁迫处理（1/2霍格兰营养液+100 mmol/L NaCl +100 mmol/L $NaHCO_3$）。以浇灌开始为第0小时，处理1、6和24 h后采集生长点下第3片真叶叶片，每个时间点选取3株以上植物叶片，液氮速冻后保存于-80 ℃冰箱。干旱处理为葡萄幼苗停止浇灌营养液7 d后（浇灌后基质含水量为142.1%，7 d后基质含水量为29.5%），选取3株以上植物叶片，液氮速冻后保存于-80 ℃冰箱。

1.2 方法

1.2.1 葡萄*MDH*家族成员鉴定 从TAIR（https://www.arabidopsis.org/）网站下载拟南芥MDH家族所有成员序列；从Ensembl Plants数据库（https://plants.ensembl.org/index.html）下载葡萄基因组文件（ftp://ftp.ensemblgenomes.org/pub/plants/release-45/fasta/vitis_vinifera/，版本号：ASM3070453v1）。以拟南芥MDH蛋白序列为查询序列，在葡萄基因组蛋白数据库中BLASTP搜索，e值小于$1\times e^{-10}$，初步获得葡萄*MDH*基因。从Pfam蛋白家族数据库（http://pfam.xfam.org/）下载MDH蛋白结构域（PF00056和PF02866），使用TBtools的HMM search对候选蛋白进行分析。删除重复及冗余后，通过NCBI CDD（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）对候选蛋白是否具有完整MDH结构域进行验证，最终确定11个*VvMDH*家族成员。

1.2.2 葡萄MDH家族成员染色体定位和理化性质分析 从葡萄基因组注释信息中获得*VvMDH*基因在染色体的位置信息。利用TBtools软件绘制*VvMDH*基因的染色体分布图。通过ExPasy网站（https://web.expasy.org/protparam/）对VvMDH蛋白的分子量、等电点（pI）等理化性质进行预测分析。通过WoLF PSORT（http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html）进行VvMDH蛋白的亚细胞定位预测。

1.2.3 葡萄MDH家族系统发育树构建、基因结构及保守基序（motif）分析 通过MEGA 11[31]软件采用邻接法（neighbor-joining method）对葡萄和拟南芥的MDH成员构建系统发育树，Bootstrap设置为1 000，其他参数设置为默认值，使用Evolview（https://www.evolgenius.info/evolview/）在线网站对进化树进行美化。从葡萄基因组蛋白注释文件中获得*VvMDH*基因家族成员的外显子-内含子结构信息，使用TBtools生成基因结构图。根据氨基酸序列，利用MEME[32]在线工具（https://meme-suite.org/meme/）分析序列中的保守基序，motif预测数设定为10，其余参数默认，TBtools软件可视化生成蛋白质结构图。使用TBtools绘制VvMDH进化树、基序、基因结构分析组合图。

1.2.4 启动子顺式作用元件预测 使用TBtools提取11个*VvMDH*家族成员起始密码子上游2 000 bp的序列，使用PlantCARE[33]（https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/）进行顺式作用元件分析。将筛选后的结果导入TBtools进行可视化处理。

1.2.5 葡萄*VvMDH*表达分析 从NCBI下载已公布的葡萄（*Vitis vinifera* cv Corvina）转录组数据（GSE36128）[34]，用TBtools分析葡萄根、茎、叶、花、果实及种子中的*MDH*基因表达数据，构建基因表达热图。使用多糖多酚植物总RNA提取试剂盒（RC401，诺唯赞生物，南京）提取葡萄叶片总RNA，再使用HiSiciptII1st strand cDNA Synthesis Kit（诺唯赞生物，南京）合成第一链cDNA，置于-20 ℃保存备用。利用Primer3.0（https://primer3.ut.ee/）设计基因的引物（附表1），选择葡萄*GAPDH*作为内参基因[35]。使用SupRealQ Purple Universal SYBR qPCR Master Mix（U+）（Q412，诺唯赞生物，南京）进行定量分析。反应体系（20 μL）：2×SupRealQ Purple Universal SYBR qPCR Master Mix（U+）10 μL，上、下游引物（10 μmmol/L）各0.4 μL，cDNA模板2 μL，ddH_2O 7.2 μL。反应程序为95 ℃ 30 s；95 ℃ 10 s，60 ℃ 15 s，40个循环。每个样品进行3次生物学重复。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各基因表达量。

1.2.6　*VvMDH10*基因克隆　根据生信分析得到的*VvMDH10*基因序列信息，设计引物：*VvMDH10*F/R（附表1），下划线部分为pCambia2300载体序列，以葡萄叶片cDNA为模板，使用Phanta Flash Super-Fidelity DNA Polymerase（P521-d1，诺唯赞生物，南京）进行PCR。反应体系（20 μL）：2×Phanta Flash Buffer 10 μL，上、下游引物（10 μmmol/L）各0.4 μL，cDNA模板2 μL，Phanta Flash Super-Fidelity DNA Polymerase 0.4 μL，ddH_2O 6.8 μL。PCR反应体系如下：98 ℃预变性30 s；98 ℃变性10 s，60 ℃退火5 s，72 ℃延伸10 s，共30个循环；72 ℃终延伸1 min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测后回收。pCambia2300载体经*Bam*H I和*Pst* I双酶切后胶回收，将回收的PCR产物与pCambia2300载体利用ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit V3试剂盒（C117-01，诺唯赞生物，南京）进行重组反应，重组体系为：pCambia2300载体1 μL，PCR回收产物4 μL，2×CE Mix V3 5 μL，50 ℃ 15 min。将重组产物转化到大肠杆菌DH5α感受态细胞中，涂布于含有卡那霉素的LB固体培养基上，37 ℃培养12–16 h。挑取单菌落，进行菌落PCR鉴定，阳性克隆送测序公司进行测序。

1.2.7　*VvMDH10*异源表达分析　将测序正确的VvMDH10-pCambia2300质粒转入农杆菌GV3101中，采用花序浸染法进行拟南芥遗传转化[36]，单株收获种子并在含50 mg/L卡那霉素的培养基上进行筛选。将筛选到的阳性拟南芥幼苗移栽至基质中土培3周，剪取其叶片，提取基因组DNA，以提取的DNA为模板，用载体和基因序列上的引物进行PCR扩增反应，得到目的大小条带的即为阳性植株。

1.2.8　干旱处理　在植物生长室进行实验，生长室温度（23±0.5）℃，湿度60%–70%，光照强度120 μmol/(m^2·s)。选取培养4周的拟南芥，剪下整个莲座叶，称取鲜重（M0）后放入光照培养箱中[（23±0.5）℃，湿度65%–75%，光周期16 h/8 h，光照强度100 μmol/(m^2·s)]。分别在0.5、1、2、3、4、5和6 h称重（Mt）[37]。叶片失水率（%）=(M0−Mt)/M0×100%。3个莲座叶为一组，一组3个重复。

1.2.9　过氧化物酶活性测定　分别采集正常和干旱处理下的野生型和过表达植株叶片，蒸馏水冲洗表面灰尘，液氮速冻，保存于-80 ℃冰箱。丙二醛（malondialdehyde, MDA）含量、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）、过氧化物酶（peroxidase, POD）、过氧化氢酶（catalase, CAT）活性均采用南京建成生物试剂盒测定。

1.2.10　数据处理　本研究数据采用Microsoft Excel 2017进行整理，用SPSS 2025软件对数据差异的显著性进行Duncan多重比较法分析，并用SigmaPlot 15.0作图。

2　结果

2.1　*VvMDH*基因理化性质及染色体定位分析

在葡萄基因组中鉴定出11个*MDH*基因，根据其在染色体上的顺序进行命名（*VvMDH1*–*VvMDH11*）（附表2）。理化性质分析显示，11个VvMDH蛋白长度为332–437个氨基酸，分子量为35.5–48.1 kD，等电点为5.76–8.79，多为碱性蛋白。亚细胞定位预测表明，VvMDH分布于叶绿体（6个）、细胞质基质（3个）和线粒体（2个）。染色体定位分析显示，11个葡萄*MDH*基因不均匀分布于9条染色体上，其中第7染色体和第15染色体上含有2个*VvMDH*，其余均只有1个*VvMDH*（图1）。

2.2　*VvMDH*基因系统发育分析

为研究葡萄*MDH*家族的系统进化关系，构建拟南芥（9个）、水稻（12个）、番茄（12个）、杨树（15个）和葡萄（11个）*MDH*的系统发育树。结果（图2）显示，*VvMDH*与*AtMDH*聚类模式一致，进化树分为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ5个分支，Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ均包含2个*VvMDH*家族成员，Ⅱ包含3个*VvMDH*家族成员。在Ⅱ、Ⅲ、Ⅴ亚族中，拟南芥和葡萄MDH蛋白同源性很高，Ⅰ、Ⅳ亚族中拟南芥和葡萄MDH蛋白有较显著区分。

2.3　*VvMDH*基因结构及蛋白保守基序分析

利用MEME在线工具分析VvMDH蛋白序列中的保守基序，结果（图3）显示，VvMDH蛋白的基序种类和数量在亚家族间存在差异，而在亚家族内部则一致性较高。VvMDH蛋白中存在3–9个保守基序，其中Motif 1、Motif 4、Motif 5在所有VvMDH蛋白中均存在。

使用TBtools对*VvMDH*基因的外显子和内含子结构进行分析和可视化。结果显示，同一亚族的

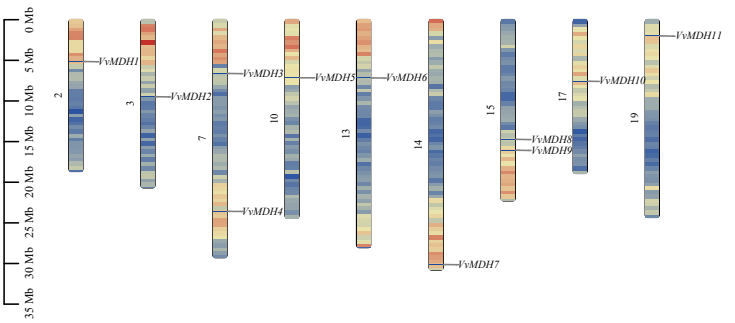


图1 *VvMDH*基因染色体定位

Fig. 1 Chromosome localization of *VvMDH* genes in grape

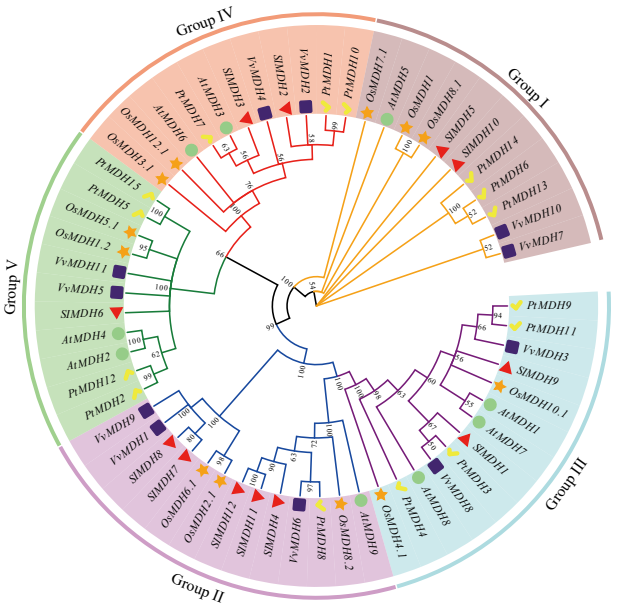


图2 葡萄(Vv)、拟南芥(At)、水稻(Os)、番茄(Sl)和杨树(Pt)MDH蛋白系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of MDH proteins in *Vitis vinifera* (Vv), *Arabidopsis thaliana* (At), *Oryza sativa* (Os), *Solanum lycopersicum* (Sl) and *Populus trichocarpa* (Pt)

*VvMDH*家族成员基因结构相似，不同亚族间存在较大差异。除*VvMDH2*和*VvMDH9*以外的所有基因均有5′或3′的非编码区（UTR）。*VvMDH7*和*VvMDH10*只有1个外显子，*VvMDH1*和*VvMDH9*有2个外显子，其他*VvMDH*基因均含有7个或7个以上外显子，其中*VvMDH6*外显子最多（14个）。*VvMDH9*基因序列最短（1 308 bp），而*VvMDH3*基因序列最长（15 414 bp）。以上分析暗示不同*VvMDH*功能可能存在差异。

2.4 *VvMDH*基因顺式作用元件分析

为探究*VvMDH*基因的潜在生物学功能，本研究截取*VvMDH*基因上游2 000 bp序列，将该序列视为启动子区，对该区域的顺式作用元件进行分析，结果（图4）显示，*VvMDH*启动子除了含有多个TATA盒和CAAT盒外，大多数基因含有参与干旱（MBS）、低温（LTR）、缺氧（AI）及外伤（DSR）等非生物胁迫相关的顺式作用元件，其中*VvMDH4/6/8/10*分别含有1、1、2和2个MBS元件；所有*VvMDH*都含有参与光响应（LRE）的顺式作用元件。此外，在11个*VvMDH*的启动子中还发现参与植物激素响应的顺式作用元件，如赤霉素（GRE）、脱落酸（ABRE）、生长素（Auxin）、茉莉酸（JA）、水杨酸（SA），其中*VvMDH4/6/8/10/11*分别含有2、1、2、2和1个ABRE元件，表明这些基因可能参与ABA介导的植物响应干旱、高盐、低温等非生物胁迫或生物胁迫过程。*VvMDH*基因响应元件的多样性表明这些基因可能参与多种生理和生物学过程。

2.5 *VvMDH*基因在不同组织中的表达模式分析

为进一步分析*VvMDH*在葡萄生长发育过程中的作用，通过转录组数据分析葡萄根、茎、叶、花、果实及种子中11个*VvMDH*基因的表达情况。*VvMDH3*和*VvMDH5*在整个葡萄植株中都有较强的表达，而*VvMDH4*和*VvMDH9*的表达较弱。*VvMDH8*在果实（包括果皮、果肉和种子）中的表达水平较高，而在绿色组织（如嫩茎、嫩叶、成熟叶、卷须）中的表达水平较低；除了根部和果肉，*VvMDH6*在其他组织中的表达水平都较高；*VvMDH1*在根中的表达较高；*VvMDH2*在叶片中的表达水平最高；*VvMDH10*

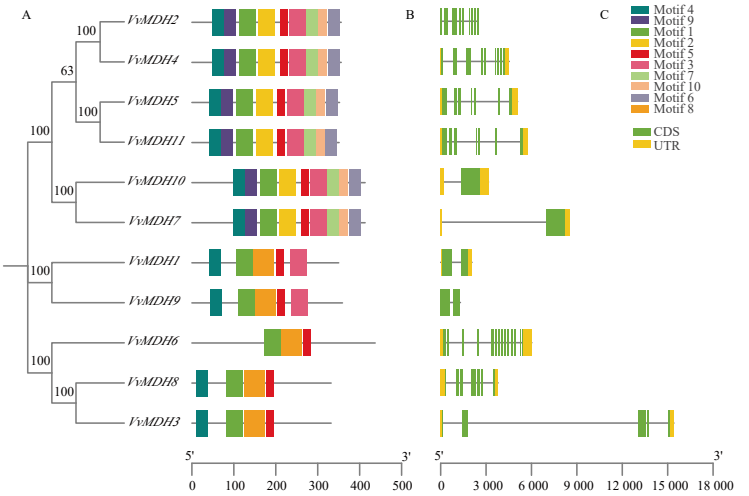


图3　*VvMDH*基因系统进化树(A)、基因结构(B)和蛋白保守基序(C)

Fig. 3　Phylogenetic tree (A), gene structure (B), and protein conserved motif (C) of *VvMDH* gene family

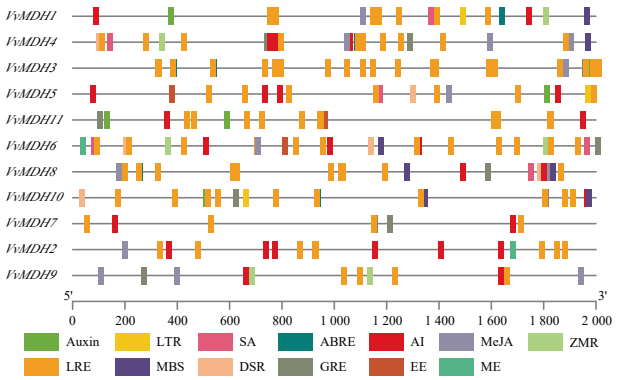


图4　*VvMDH*启动子区顺式作用元件分析

Fig. 4　Analysis of *cis*-acting elements in the promoter region of *VvMDH*

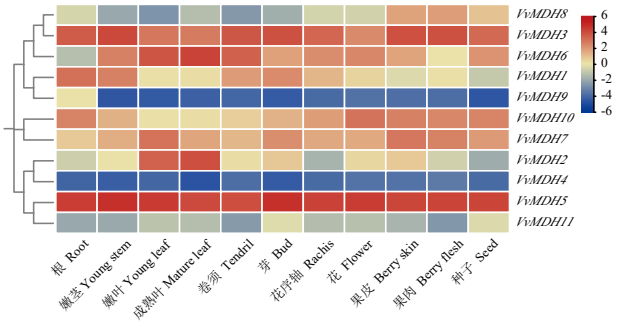


图5　*VvMDH*基因在不同组织中的表达分析

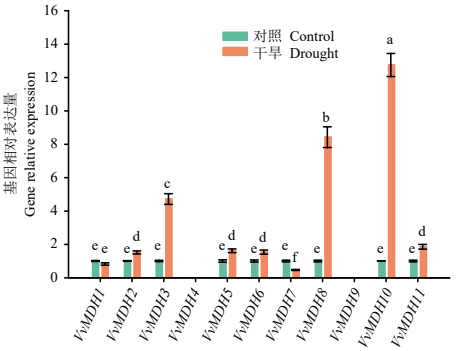
Fig. 5　Expression analysis of *VvMDH* in different tissues of grape

在根、花及果实中的表达较高；*VvMDH7*在叶片、芽和果实中的表达较高（图5）。

2.6　*VvMDH*基因在干旱和盐碱胁迫处理下的表达模式分析

分析葡萄叶片中*MDH*基因对干旱和盐碱的响应，除*VvMDH4*和*VvMDH9*在所有处理、所有时间点都不表达外，其余*VvMDH*基因的表达水平呈现不同的变化趋势（图6）。

停止浇水7 d后，*VvMDH3/8/10*的表达量分别上升到对照的4.7倍、8.4倍和12.8倍；而*VvMDH7*的表达受到抑制（下降到对照的47.6%），其他基因没有受到明显的影响（图6）。



不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。下同

Different lower letters indicate significant differences (P<0.05). The same below

图6　*VvMDH*基因在干旱处理下的相对表达量

Fig. 6　Relative expression of *VvMDH* genes under drought treatments

VvMDH1/2/5/11 均受盐、碱及盐碱复合处理的诱导（图7）。处理24 h后，*VvMDH2* 的表达量分别上升到对照的5.8倍（盐处理）、3.9倍（碱处理）和8.4倍（盐碱处理）；*VvMDH11* 的表达量分别上升到对照的8.5倍（盐处理）、12.5倍（碱处理）和15.3倍（盐碱处理）。*VvMDH7* 和 *VvMDH10* 的表达变化较为复杂，具体表现为：盐、碱及盐碱复合处理1 h后，*VvMDH7* 的表达分别下降到对照的41.2%（盐）、67.4%（碱）、36.3%（盐碱）；24 h后，其表达又上升到对照的1.4倍（盐处理）、1.8倍（碱处理）或恢复到正常表达水平（盐碱处理）。盐处理后，*VvMDH10* 的表达水平呈现先上升又下降的趋势，而碱处理和盐碱处理后该基因均呈现先下降又上升的趋势。其他基因的表达变化不明显。

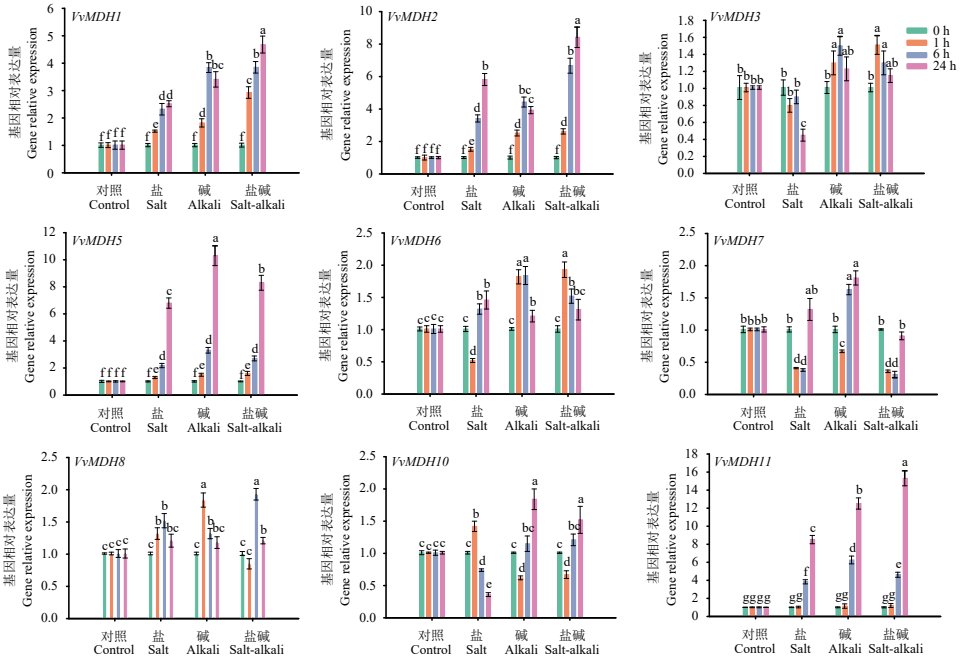


图7 *VvMDH* 基因在盐碱处理下的相对表达量

Fig. 7 Relative expression of *VvMDH* genes under salt-alkali treatments

2.7 *VvMDH10* 基因在拟南芥中过表达分析

将 *VvMDH10* 转入拟南芥Col-0，建立过表达株系，通过荧光定量PCR，鉴定 *VvMDH10* 在Col-0中的表达量，结果（图8）显示，在野生型拟南芥中，*VvMDH10* 几乎没有表达，而在转基因植株中，*VvMDH10* 均有较高表达，在多个株系中，OE#4和OE#7的表达量较高，因此本试验选用OE#4和OE#7用于后续分析。

2.8 过表达 *VvMDH10* 增强拟南芥植株抗旱能力

将拟南芥野生型及过表达株系置于含有泥炭土的营养钵中培养4周，先将整个营养钵充分灌水，然后停止浇水，观测植物干旱胁迫下的表型。3–4周后，野生型拟南芥叶片出现萎蔫，且叶片失绿，荚果减少，基本停止生长（图9-A）；而同样受到干旱处理的过表达株系，叶片仍保持膨压，叶片依旧呈

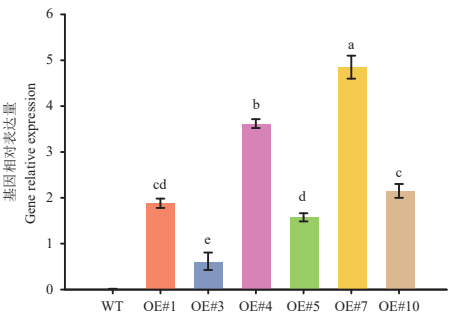
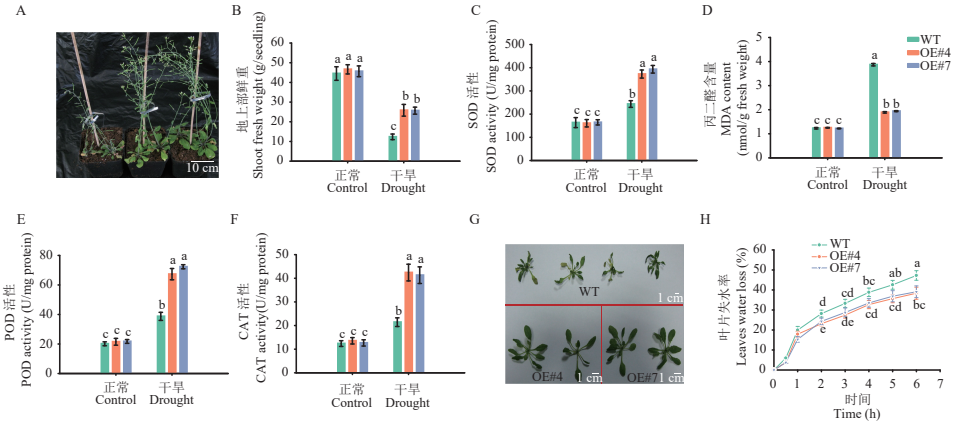


图8 *VvMDH10* 在转基因拟南芥中的相对表达量

Fig. 8 Relative expression of *VvMDH10* in transgenic *A. thaliana*



将拟南芥野生型及过表达株系置于含有泥炭土的营养钵中培养4周，先将整个营养钵充分灌水，然后停止浇水，观测植物干旱处理前后的表型，测定丙二醛含量和多种酶活性。后将拟南芥野生型及过表达株系置于含有泥炭土的营养钵中培养4周，分别剪取其整个莲座叶，置于培养皿中，放入光照培养箱，每隔一段时间称取其鲜重。A：植株表型；B：地上部鲜重；C：SOD活性；D：丙二醛含量；E：POD活性；F：CAT活性；G：叶片失水表型；H：叶片失水率统计；图B–F、H中数据为平均值±标准差

Arabidopsis thaliana wild-type and overexpression lines were grown in pots containing peat soil for 4 weeks. The entire pots were fully watered first, then watering was stopped. The phenotypes of the plants before and after drought treatment were observed, and MDA content and activities of various enzymes were determined. Then the *Arabidopsis thaliana* wild-type and overexpression lines were grown in pots containing peat soil for 4 weeks, and their entire rosette leaves were cut separately, placed in petri dishes, and put into an illumination incubator. The fresh weight was measured at regular intervals. A: Plant phenotype. B: Shoot fresh weight. C: SOD activity. D: MDA content. E: POD activity. F: CAT activity. G: Leaf water loss phenotype. H: Statistical analysis of leaf water loss rate. Data in Figures B–F and H are presented as mean ± standard deviation

图9　干旱胁迫下*VvMDH10*异源过表达转基因拟南芥的表型和生理指标比较

Fig. 9　Comparisons of phenotype and physiological indices in *VvMDH10*-overexpressing *Arabidopsis* under drought stress

绿色，荚果较多，仍能继续生长，其地上部鲜重为野生型的2.0倍（图9-B），表明*VvMDH10*能够增强拟南芥对干旱的耐受能力。进一步测定植株的丙二醛（MDA）含量及SOD、POD和CAT酶活性，结果显示（图9-C–F），正常生长条件下，野生型和转基因植株的上述指标基本一致。干旱处理后，所有植株的MDA含量及SOD、POD和CAT酶活性均有所提高。不同的是，干旱处理下野生型拟南芥MDA含量上升到正常生长条件下的3.1倍，而转基因植株仅上升到1.5–1.6倍；野生型植株的SOD、POD和CAT活性分别上升到正常生长条件下的1.5倍、1.9倍和1.7倍，而转基因植株上升到2.4倍、3.2倍和3.2倍。

剪取生长约4周的野生型和转基因拟南芥莲座叶，置于培养皿中，放入光照培养箱，每隔一段时间称取其重量。与野生型相比，过表达株系水分散失相对较少（图9-G、H），表明过表达*VvMDH10*能够减少拟南芥的水分散失。

3　讨论

有机酸普遍存在于所有植物中，不同的植物种类、相同植物不同的发育阶段和不同的组织类型，其体内有机酸的种类及积累量存在差异[38]。苹果酸是葡萄中最主要的有机酸之一，在体内参与多种生物学功能[39]。苹果酸脱氢酶（*MDH*）基因介导苹果酸向草酰乙酸的可逆转化，在能量平衡、植物发育和耐盐性中起着至关重要的作用。研究显示，植物*MDH*基因在应对寒冷[24–25]、盐胁迫[14–15, 17, 24–25]、低磷胁迫[23]、锰毒害[19]及铝毒[40]等非生物胁迫中起着重要作用，但干旱和盐碱胁迫下的*MDH*基因家族尚未得到系统的研究。

本研究对葡萄*MDH*基因家族成员进行基因组鉴定、理化性质分析、染色体定位、基因结构及保守基序（Motif）分析、启动子区顺式作用元件分析等详细的生物信息学分析。共鉴定出11个*VvMDH*基因。该家族基因与拟南芥MDH蛋白构建系统发育树后聚类模式一致，表明两者亲缘关系可能较近。

*VvMDH*基因间外显子总数差异较大，第Ⅰ组基因（*VvMDH7*和*VvMDH10*）只含有1个外显子，这与番茄[14]和杨树[22]中的结果一致。

*VvMDH*基因存在组织特异性表达，在葡萄营养部位（根、茎、叶和卷须）表达的*MDH*多于在生殖器官（花和果实）中的，*MDH*在葡萄不同组织的表达暗示其在植物生长发育中具有不同的功能。特别是*VvMDH2*仅在叶片中特异性表达，同时亚细胞定位显示该蛋白定位于叶绿体中，表明该基因可能参与葡萄叶片叶绿体苹果酸脱氢酶功能的行使。

植物受到干旱[41-42]、盐碱[43-44]等非生物胁迫时，体内会产生H_2O_2、$O_2^{\cdot-}$和·OH等活性氧（ROS），细胞能够启动酶促系统或非酶促系统清除ROS。本研究结果显示，3个*MDH*（*VvMDH3/8/10*）的表达受到干旱胁迫的诱导，这与顺式作用元件分析结果一致。大多数*VvMDH*基因的表达受到盐胁迫的诱导，这与水稻[17]、番茄[14]及杨树[22]中的结果一致。此外，*VvMDH1/2/5/11*还受碱及盐碱复合处理的诱导，其他物种中的*MDH*是否能够响应碱胁迫，还有待进一步验证。过量表达*VvMDH10*增强拟南芥植株的抗旱能力，表现为与野生型相比，叶片失水率降低，干旱胁迫后生物量较高。这与苹果中的结果一致，干旱处理9 d后，苹果*MdmMDH*-RNAi转基因植株叶片的相对含水量明显低于野生型[30]。干旱处理后，转基因拟南芥体内MDA、SOD、POD、CAT等与抗旱及活性氧清除相关的指标均增强，这与过量表达苹果*MDH*能够增强转基因愈伤的SOD和CAT活性一致[24]。多个花生*MDH*基因的表达受到锰胁迫的诱导[19]，植物受到锰毒害后体内抗氧化相关酶活增强[45]。VvMDH10可能催化产生的NAD^+，进入叶绿体等细胞器，通过转氢作用间接促进NADPH的生成[15]。NADPH是植物核心抗氧化系统——抗坏血酸–谷胱甘肽循环必需的还原力来源，该循环中的关键酶如单脱氢抗坏血酸还原酶（MDHAR）等直接依赖NADPH。充足的NADPH能保障抗坏血酸和谷胱甘肽处于还原态，使整个循环高效运转，及时清除干旱胁迫下过量积累的活性氧，保护膜脂、蛋白质和核酸免受氧化[46-47]。拟南芥*MDH*敲除突变体ROS积累显著增强[27]。苹果*MdcyMDH*转录水平受到轻度冷和盐处理诱导，过表达该基因的苹果植株相比野生型呈现出更强的耐寒性和耐盐性，并且过表达转基因植株在正常及胁迫条件下（尤其是胁迫条件下）体内抗坏血酸、谷胱甘肽、H_2O_2和水杨酸含量增加，表明MdcyMDH通过增强还原型氧化还原态并提升水杨酸水平，赋予转基因苹果植株更高的胁迫耐受性[25]，而本文过量表达*VvMDH10*也能够提高转基因拟南芥的抗氧化酶活性，其两者的内在机制可能类似，但还需进一步试验验证。以上结果表明，*VvMDH10*可能通过活性氧信号调节植物对干旱的响应，下一步将利用转录组学和代谢组学，鉴定转基因植株中关键活性氧靶向的离子通道或调控蛋白，进一步揭示VvMDH10参与活性氧信号与其他信号分子（如ABA、Ca^{2+}）的互作网络。

4 结论

从葡萄基因组中鉴定出11个*MDH*基因，不均匀地分布在9条染色体上，共分为5个亚家族。多个*VvMDH*基因的表达受到干旱和盐碱胁迫的诱导，过量表达*VvMDH10*能够提高转基因拟南芥植株抗旱性。

文章所有附表数据请点击链接获取（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260423135852_NewsFile_31.pdf）

参考文献

[1] Jiao SZ, Zeng FW, Huang YP, et al. Physiological, biochemical and molecular responses associated with drought tolerance in grafted grapevine [J]. BMC Plant Biol, 2023, 23: 110.

[2] Rienth M, Vigneron N, Darriet P, et al. Grape berry secondary metabolites and their modulation by abiotic factors in a climate change scenario-a review [J]. Front Plant Sci, 2021, 12: 643258.

[3] Fernie AR, Martinoia E. Malate. Jack of all trades or master of a few [J]. Phytochemistry, 2009, 70(7): 828-832.

[4] Cosse M, Rehders T, Eirich J, et al. Cysteine oxidation as a regulatory mechanism of *Arabidopsis* plastidial NAD-dependent malate dehydrogenase [J]. Physiol Plant, 2024, 176(3): e14340.

[5] Baird LM, Berndsen CE, Monroe JD. Malate dehydrogenase in plants: evolution, structure, and a myriad of functions [J]. Essays Biochem, 2024, 68(2): 221-233.

[6] Martinez-Vaz BM, Howard AL, Jamburuthugoda VK, et al. Insights into the regulation of malate dehydrogenase: inhibitors, activators, and allosteric modulation by small molecules [J]. Essays Biochem, 2024, 68(2): 173-181.

[7] Hebbelmann I, Selinski J, Wehmeyer C, et al. Multiple strategies

to prevent oxidative stress in *Arabidopsis* plants lacking the malate valve enzyme NADP-malate dehydrogenase [J]. J Exp Bot, 2012, 63(3): 1445-1459.

[8] Liu J, Wang XC, Guan ZY, et al. The LIKE SEX FOUR 1-malate dehydrogenase complex functions as a scaffold to recruit β-amylase to promote starch degradation [J]. Plant Cell, 2023, 36(1): 194-212.

[9] Yokochi Y, Yoshida K, Hahn F, et al. Redox regulation of NADP-malate dehydrogenase is vital for land plants under fluctuating light environment [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118(6): e2016903118.

[10] Talla SK, Sunil B, Rao DE, et al. Redox basis of photosynthesis inhibition at supra-optimal bicarbonate in mesophyll protoplasts of *Arabidopsis thaliana* [J]. J Plant Physiol, 2023, 287: 154047.

[11] Balparda M, Elsässer M, Badia MB, et al. Acetylation of conserved lysines fine-tunes mitochondrial malate dehydrogenase activity in land plants [J]. Plant J, 2022, 109(1): 92-111.

[12] Selinski J, König N, Wellmeyer B, et al. The plastid-localized NAD-dependent malate dehydrogenase is crucial for energy homeostasis in developing *Arabidopsis thaliana* seeds [J]. Mol Plant, 2014, 7(1): 170-186.

[13] Beeler S, Liu HC, Stadler M, et al. Plastidial NAD-dependent malate dehydrogenase is critical for embryo development and heterotrophic metabolism in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2014, 164(3): 1175-1190.

[14] Imran M, Munir MZ, Ialhi S, et al. Identification and characterization of malate dehydrogenases in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(17): 10028.

[15] Kandoi D, Mohanty S, Tripathy BC. Overexpression of plastidic maize NADP-malate dehydrogenase (ZmNADP-MDH) in *Arabidopsis thaliana* confers tolerance to salt stress [J]. Protoplasma, 2018, 255(2): 547-563.

[16] Ding Y, Ma QH. Characterization of a cytosolic malate dehydrogenase cDNA which encodes an isozyme toward oxaloacetate reduction in wheat [J]. Biochimie, 2004, 86(8): 509-518.

[17] Zhang YH, Wang YL, Sun XM, et al. Genome-wide identification of *MDH* family genes and their association with salt tolerance in rice [J]. Plants, 2022, 11(11): 1498.

[18] Li ZQ, Shi L, Lin XJ, et al. Genome-wide identification and expression analysis of malate dehydrogenase gene family in sweet potato and its two diploid relatives [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(23): 16549.

[19] Liu Y, Zhao M, Shi JN, et al. Genome-wide identification of *AhMDHs* and analysis of gene expression under manganese toxicity stress in *Arachis hypogaea* [J]. Genes, 2023, 14(12): 2109.

[20] Imran M, Tang K, Liu JY. Comparative genome-wide analysis of the malate dehydrogenase gene families in cotton [J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0166341.

[21] Imran M, Zhang B, Tang K, et al. Molecular characterization of a cytosolic malate dehydrogenase gene (*GhcMDH1*) from cotton [J]. Chem Res Chin Univ, 2017, 33(1): 87-93.

[22] Chen XH, Zhang J, Zhang C, et al. Genome-wide investigation of malate dehydrogenase gene family in poplar (*Populus trichocarpa*) and their expression analysis under salt stress [J]. Acta Physiol Plant, 2021, 43(2): 28.

[23] Lin YW, Chen WT, Yang Q, et al. Genome-wide characterization and gene expression analyses of malate dehydrogenase (*MDH*) genes in low-phosphorus stress tolerance of Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(5): 4414.

[24] Yao YX, Dong QL, Zhai H, et al. The functions of an apple cytosolic malate dehydrogenase gene in growth and tolerance to cold and salt stresses [J]. Plant Physiol Biochem, 2011, 49(3): 257-264.

[25] Wang QJ, Sun H, Dong QL, et al. The enhancement of tolerance to salt and cold stresses by modifying the redox state and salicylic acid content via the *cytosolic malate dehydrogenase* gene in transgenic apple plants [J]. Plant Biotechnol J, 2016, 14(10): 1986-1997.

[26] Ma BQ, Yuan YY, Gao M, et al. Genome-wide identification, classification, molecular evolution and expression analysis of malate dehydrogenases in apple [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(11): 3312.

[27] Heyno E, Innocenti G, Lemaire SD, et al. Putative role of the malate valve enzyme NADP-malate dehydrogenase in H_2O_2 signalling in *Arabidopsis* [J]. Phil Trans R Soc B, 2014, 369(1640): 20130228.

[28] Nan N, Wang J, Shi YJ, et al. Rice plastidial NAD-dependent malate dehydrogenase 1 negatively regulates salt stress response by reducing the vitamin B6 content [J]. Plant Biotechnol J, 2020, 18(1): 172-184.

[29] 朱香豫. *mMDH2* 基因在调控拟南芥缺铁响应中的功能分析 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2021.
Zhu XY. Analyzing on the function of *mMDH2* in response to iron deficiency in *Arabidopsis thaliana* [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2021.

[30] 崔晓慧. 苹果 *MdmMDH* 和 *MdNADP-MDH-like* 基因的功能分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2021.
Cui XH. Functional analysis of *MdmMDH* and *MdNADP-MDH-like* genes in *Malus* [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2021.

[31] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. Mol Biol Evol, 2016, 33(7): 1870-1874.

[32] Bailey TL, Boden M, Buske FA, et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching [J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37 (suppl_2): W202-W208.

[33] Lescot M, Déhais P, Thijs G, et al. PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences [J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(1): 325-327.

[34] Fasoli M, Dal Santo S, Zenoni S, et al. The grapevine expression atlas reveals a deep transcriptome shift driving the entire plant into a maturation program [J]. Plant Cell, 2012, 24(9): 3489-3505.

[35] 付东艳, 汪蕾, 张龙生. 遮阳对马瑟兰葡萄花色苷组分及合成相关基因表达的影响 [J]. 果树学报, 2025, 42(1): 30-47.
Fu DY, Wang L, Zhang LS. Effects of sun shading on anthocyanin components and the expression of genes related to anthocyanin synthesis in Marselan grape [J]. J Fruit Sci, 2025, 42(1): 30-47.

[36] Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant J, 1998, 16(6): 735-743.

[37] Li JL, Han L, Su YH, et al. Functional identification of *Ammopiptanthus mongolicus* anion channel AmSLAC1 involved in drought induced stomata closure [J]. Plant Physiol Biochem, 2019, 143: 340-350.

[38] Ludwig M. The roles of organic acids in C_4 photosynthesis [J]. Front Plant Sci, 2016, 7: 647.

[39] Reshef N, Karn A, Manns DC, et al. Stable QTL for malate levels in ripe fruit and their transferability across *Vitis* species [J]. Hortic Res, 2022, 9: uhac009.

[40] Tesfaye M, Temple SJ, Allan DL, et al. Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum [J]. Plant Physiol, 2001, 127(4): 1836-1844.

[41] Wang JY, Li CN, Li L, et al. Exploitation of drought tolerance-related genes for crop improvement [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(19): 10265.

[42] 刘升学, 马爱芳, 秦峰, 等. 植物抗旱性研究进展 [J]. 科学通报, 2025, 70(25): 4297-4314.
Liu SX, Ma AF, Qin F, et al. Research advances in plant drought resistance [J]. Chin Sci Bull, 2025, 70(25): 4297-4314.

[43] van Zelm E, Zhang YX, Testerink C. Salt tolerance mechanisms of plants [J]. Annu Rev Plant Biol, 2020, 71: 403-433.

[44] Zhang HL, Yu FF, Xie P, et al. A Gγ protein regulates alkaline sensitivity in crops [J]. Science, 2023, 379(6638): eade8416.

[45] 刘秀春, 陈丽楠, 王炳华, 等. 锰胁迫对不同砧木苹果幼树锰吸收分配及抗氧化系统的影响 [J]. 园艺学报, 2013, 40(10): 1877-1886.
Liu XC, Chen LN, Wang BH, et al. Effects of Mn stress on Mn uptakes and antioxidant system of young apple trees of different rootstocks [J]. Acta Hortic Sin, 2013, 40(10): 1877-1886.

[46] Zhao YN, Luo LL, Xu JS, et al. Malate transported from chloroplast to mitochondrion triggers production of ROS and PCD in *Arabidopsis thaliana* [J]. Cell Res, 2018, 28(4): 448-461.

[47] 王福祥, 肖开转, 姜身飞, 等. 干旱胁迫下植物体内活性氧的作用机制 [J]. 科学通报, 2019, 64(17): 1765-1779.
Wang FX, Xiao KZ, Jiang SF, et al. Mechanisms of reactive oxygen species in plants under drought stress [J]. Chin Sci Bull, 2019, 64(17): 1765-1779.

（责任编辑　高洁）