

DOI: 10. 11686/cyxb2024416

<http://cyxb.magtech.com.cn>

鲜燃, 邓雨, 付秋月, 等. 紫花苜蓿 *MsMYB86* 基因克隆及其对非生物胁迫的响应分析. 草业学报, 2025, 34(9): 162—172.

XIAN Ran, DENG Yu, FU Qiu-yue, *et al.* Cloning of alfalfa *MsMYB86* and analysis of its transcriptional response to abiotic stress. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(9): 162—172.

紫花苜蓿 *MsMYB86* 基因克隆及其对非生物胁迫的响应分析

鲜燃¹, 邓雨¹, 付秋月¹, 蒋晶霞¹, 陶佳丽^{1,2}, 许涛^{1*}, 朱慧森^{1*}, 岑慧芳¹

(1. 山西农业大学草业学院, 山西 太谷 030801; 2. 山西工程技术学院矿业工程系, 山西 阳泉 045000)

摘要: 紫花苜蓿作为营养价值高、适应性强的优质饲草, 在草业生产中占据重要地位。MYB 家族是植物中最大的转录因子家族之一, 在植物生长发育、次生代谢以及对生物和非生物胁迫的响应中发挥关键作用。本试验以紫花苜蓿为研究对象, 通过对 *MsMYB86* 基因进行克隆, 利用 ExPASy、Prabi 以及 SMART 等在线网站和软件对 *MsMYB86* 基因编码蛋白的序列特性进行分析, 包括相对分子质量、蛋白二级结构预测以及识别蛋白结合域等。采用 RT-qPCR 技术对 *MsMYB86* 基因的组织表达特异性及对不同非生物胁迫的响应情况进行分析。结果显示: *MsMYB86* 基因全长为 1104 bp, 编码 367 个氨基酸。该蛋白质的相对分子质量为 41.27 kDa, 理论等电点 (pI) 为 7.10, 脂肪指数高达 65.61, 显示出明显的亲水性。*MsMYB86* 蛋白质包含两个高度保守的 SANT-MYB 结构域, 且主要定位于细胞核内。*MsMYB86* 基因表达存在组织特异性, 且在老茎中的表达水平显著高于其他组织。干旱、盐胁迫以及脱落酸处理下 *MsMYB86* 基因均表现出显著的响应性, 推测其可能在调控紫花苜蓿对非生物胁迫的响应中发挥作用。研究结果可为阐释 *MsMYB86* 基因调控紫花苜蓿非生物胁迫响应机制提供理论基础。

关键词: 紫花苜蓿; *MsMYB86*; 非生物胁迫; 表达模式

Cloning of alfalfa *MsMYB86* and analysis of its transcriptional response to abiotic stress

XIAN Ran¹, DENG Yu¹, FU Qiu-yue¹, JIANG Jing-xia¹, TAO Jia-li^{1,2}, XU Tao^{1*}, ZHU Hui-sen^{1*}, CEN Hui-fang¹

1. College of Grassland Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China; 2. Department of Mining Engineering, Shanxi Institute of Technology, Yangquan 045000, China

Abstract: Alfalfa (*Medicago sativa*) occupies a prominent position in forage production as a high-quality forage with excellent nutritional value and wide adaptability. The MYB family is one of the largest families of transcription factors in plants, and its members play crucial roles in plant growth and development, secondary metabolism, and responses to biotic and abiotic stresses. In this study, *MsMYB86* was cloned from alfalfa and its putative encoded protein was analyzed using online websites and software such as ExPASy, Prabi, and SMART. These analyses predicted the relative molecular mass, protein secondary structure, and protein-binding domains of the putative

收稿日期: 2024-10-24; 改回日期: 2024-12-25

基金项目: 国家自然科学基金 (32071872), 山西省中央引导地方科技发展资金项目 (YDZJSX2022B006), 山西重点研发计划课题 (202102140601006-3), 山西省基础研究计划 (202303021221101), 山西省来晋科研奖励 (SXBYKY2022118) 和优秀博士启动项目 (2021BQ01, 2023BQ03) 资助。

作者简介: 鲜燃 (2000—), 女, 四川广元人, 在读硕士。E-mail: xr667320@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: zhuhuisen@126.com; xutao@sxau.edu.cn

MYB86 protein. Tissue-specific transcript profiles of *MsMYB86* and its transcriptional response to different abiotic stresses were analyzed by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The results showed that the full-length *MsMYB86* coding sequence was 1104 bp long, encoding a polypeptide of 367 amino acids. The protein was predicted to have a relative molecular mass of 41.27 kDa, an isoelectric point of 7.10, and a high lipid index of 65.61, indicating that it is a hydrophilic protein. The *MsMYB86* protein was predicted to contain two highly conserved SANT-MYB structural domains and to localize in the nucleus. We detected tissue-specific transcript profiles of *MsMYB86*, and its transcript levels were significantly higher in mature stems than in other tissues. Transcription of the *MsMYB86* gene was responsive to drought, salt stress, and abscisic acid treatment, suggesting that it plays a role in the alfalfa response to abiotic stresses. The results of this study provide a theoretical basis for further studies on the role of *MsMYB86* in regulating the abiotic stress response of alfalfa.

Key words: alfalfa; *MsMYB86*; abiotic stress; expression pattern

转录因子是真核生物进化过程中形成的一类特有的蛋白,在调控基因表达中扮演着核心角色,主要结合在基因启动子区的特定位点调控转录过程^[1]。MYB家族是植物中最大的转录因子家族之一,其成员广泛参与到植物的生长发育、代谢调节以及对胁迫的响应。MYB蛋白通常含有数个重复的SANT保守结构域(R),通过R的数量可将MYB蛋白分为4个大类:1R-MYB, R2R3-MYB, 3R-MYB及非典型MYB(4或5个MYB结构域)^[2]。MYB转录因子家族因其独特的结构特征和多样化的生物学功能,成为植物分子生物学的研究热点。

胁迫条件下MYB转录因子与基因启动子区域的结合元件结合,激活或抑制应激反应基因的表达,从而调控植物对环境变化的适应性反应。例如,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)*AtMYB2*转录因子能够激活脱落酸(abscisic acid, ABA)相关的干旱胁迫响应基因*RD22*, *ADH1*的表达^[3]。白桦(*Betula platyphylla*)*BpMYB123*转录因子能够结合*BpLEA14*基因的启动子区激活其表达,提高植株抗旱性^[4]。在番茄(*Solanum lycopersicum*)中沉默*SlMYB86*基因降低了植株对青枯病的抗性,表明*SlMYB86*正向调节番茄对青枯病的抵抗能力,在青枯病的抗性中发挥着关键作用^[5]。此外,MYB转录因子还可以通过调节植物次生代谢产物的合成,从而适应外界环境的变化。如:苹果(*Malus domestica*)*MdMYB114*促进花青素合成通路相关基因*MdANS*, *MdUFGT*和*MdGST*的表达,促进花青素的生物合成和运输^[6],有利于苹果对环境的适应性。除调节植物次生代谢物的合成外,MYB转录因子还能够调节植物次生代谢物的转运和积累。例如,在茶树(*Camellia sinensis*)中,MYB转录因子可以调控茶多酚的积累和转运,从而影响茶树的环境适应性^[7]。

紫花苜蓿(*Medicago sativa*)作为全球范围内广泛种植的豆科牧草,兼具高生物量、强适应性、优良适口性以及丰富的营养价值等特性,因而在草食畜牧业生产中占据重要地位^[8]。近年来,紫花苜蓿基因组测序和重测序工作作为研究该物种提供了重要的分子基础。中国农业大学王涛团队破译了紫花苜蓿栽培种中苜1号的基因组,并进行了核心种质的重测序,为紫花苜蓿分子育种提供了宝贵的资源^[9]。尽管在植物生长调控以及提高植物抗性方面,MYB86基因已有相关研究报道,但在紫花苜蓿中对MYB86基因的功能研究尚未见报道。本研究在紫花苜蓿中克隆了MYB86基因,利用生物信息学方法对MYB86蛋白进行分析,并初步研究了紫花苜蓿*MsMYB86*基因在不同器官中的表达特异性及对非生物胁迫的响应,该研究可为进一步探明*MsMYB86*基因功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所使用的紫花苜蓿种子来源于山西农业大学草业学院种质资源库。2023年10月,挑选籽粒饱满的中苜1号紫花苜蓿种子,将其播种于蛭石与营养土(按1:1比例混合)配制的基质中,置于温度(25±2)℃,光周期16 h光照/8 h黑暗下培养。生长30 d时,随机选取5株长势良好的紫花苜蓿植株,液氮速冻,−80℃冰箱保存,提取总RNA反转录,用于目的基因的克隆。同时分别使用20% PEG 6000溶液、250 mmol·L^{−1}的NaCl溶液和80 μmol·L^{−1}的脱落酸(abscisic acid, ABA)溶液对生长30 d的植株进行胁迫处理,在0、6、12、24、48 h取样检测目的

基因表达量,重复5次。待植株生长至60 d时,收集植株的根、茎、叶、花各器官,检测 *MsMYB86* 基因在紫花苜蓿不同器官中的表达量,具体方法参考岑慧芳等^[10]的研究。根部用英文字母 r 表示;幼茎用英文字母 ys 表示;老茎用英文字母 os 表示;叶片用英文字母 l 表示;花用英文字母 f 表示。

1.2 总 RNA 的提取及反转录 cDNA 合成

采用北京华越洋生物科技有限公司的植物总 RNA 提取试剂盒(0416-50gk),从紫花苜蓿植株叶片中提取总 RNA。利用美国 Nandrop One 2000 超微量紫外分光光度计对提取的 RNA 浓度及质量进行检测,结合琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。使用北京金沙生物有限公司的反转录试剂盒(SR 511),将提取的总 RNA 反转录合成 cDNA。

1.3 目的基因克隆

本研究将 *MYB86* 基因序列与已发表的拟南芥数据库、中苜 1 号数据库、中苜 4 号数据库等进行对比;采用 Primer 5.0 在线工具,针对提取出的该基因序列设计引物(表 1)。使用北京宝日医生物技术有限公司的高保真酶(Code NO. R060A)进行 PCR 扩增,25 μ L 的 PCR 扩增体系,PCR 扩增产物利用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测分析,将符合目的片段大小的条带进行切胶回收,其产物连接 pTOPO001 Blunt Simple Cloning Kit 载体(北京金沙生物技术有限公司),转化至大肠杆菌中,筛选阳性单克隆菌,菌液鉴定后送至上海生工生物有限公司进行测序。

1.4 生物信息学分析

为解析 *MsMYB86* 基因的特性,进行一系列生物信息学分析。首先从 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)公共数据库下载氨基酸序列,随后利用 ExPASy(<https://web.expasy.org/protparam/>)分析其理化性质,包括分子量和等电点。通过 SMART(<https://smart.embl.de/>)预测蛋白质的结合域,使用 NSP@(https://npsa.lion.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_server.html)预测蛋白二级结构,并借助 SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)预测蛋白三级结构。PSORT(<https://www.genscript.com/psort.html>)用于亚细胞定位预测,而 ProtScale Expasy(<https://web.expasy.org/protscale/>)则用于分析蛋白质的亲疏水性。此外,通过 DNAMAN 9.0 软件进行多物种序列比对,MEGA 11.0 软件用于构建系统进化树,还通过 EMBOSS 在线网页(<http://emboss.open-bio.org/>)及 Gene pioneer 在线网页密码子工具(<http://cCloud.genepioneer.com:9929/#/home>)分析密码子偏好性,同时使用 NetPhos 3.1(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>)和 NetNGlyc 1.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/>)分析蛋白翻译的磷酸化与糖基化位点。最后,利用 STRING(<https://cn.string-db.org/>)工具构建蛋白互作网络,以揭示 *MsMYB86* 潜在生物学功能和作用途径,为理解 *MsMYB86* 在细胞内的角色和调控网络提供数据支撑。

1.5 目的基因表达模式分析

将上述收集的植物样品提取总 RNA,反转录 cDNA,进行实时荧光定量 PCR,重复 5 次,利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法^[11]计算紫花苜蓿 *MsMYB86* 基因的相对表达量,所用 *MsMYB86* 定量引物及内参 *Actin* 引物序列参考表 1。

表 1 引物列表

Table 1 Primers list

名称 Name	上游引物序列 Primer-forward sequence (5'-3')	下游引物序列 Primer-reverse sequence (5'-3')
<i>MsMYB86</i>	ATGGGAAGACATTCTTGCTGCT	CTACATAGTTTGTCCAAAAGCCAC
<i>q-MsMYB86</i>	GCAGCACAATTACCAGGAAGAACAG	CAGAGAGTGGTTTGTGAGTGTTTGG
<i>Actin</i>	CAAAAGATGGCAGATGCTGAGGAT	CATGACACCAGTATGACGAGGTCC

1.6 数据分析

利用 SPSS 18.0 软件分析数据,采用 GraphPad Prism 9.5.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 紫花苜蓿 MYB86 基因的克隆及理化性质分析

以中苜 1 号的 cDNA 为模板,利用引物 *MsMYB86*-Forward 和 *MsMYB86*-Reverse,进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,结果显示 1100 bp 左右有特异性条带出现(图 1),且条带的大小与目的片段的预期大小一致。菌液测序结果显示克隆得到的 *MsMYB86* 基因长度为 1104 bp,包含完整的 CDS 序列,共编码 367 个氨基酸(图 2)。使用 ExPASy 在线工具对 *MsMYB86* 蛋白理化性质进行分析,结果显示,*MsMYB86* 蛋白相对分子量为 41267.96 Da,理论等电点(isoelectric point, pI)为 7.10,脂肪指数为 65.61,带负电残基的总数(天冬氨酸+谷氨酸, aspartic acid+glutamic acid)为 34,带正电残基的总数(精氨酸+赖氨酸, arginine+lysine)为 34,半衰期为 30 h,不稳定性指数为 58.34,表明 *MsMYB86* 蛋白较为稳定。

2.2 生物信息学分析

蛋白结构域预测分析结果显示:紫花苜蓿 *MsMYB86* 蛋白具有两个典型的 SANT-MYB 结构域,分别位于 13~63 氨基酸和 66~114 氨基酸处,其属于 MYB 家族中亚家族之一的 R2R3-MYB 蛋白家族(图 3A);蛋白磷酸化预测位点结果显示,该蛋白共含有 53 个磷酸化位点,其中包含 36 个丝氨酸(serine)磷酸化位点、12 个苏氨酸(threonine)磷酸化位点、5 个酪氨酸(tyrosine)磷酸化位点(图 3B)。同时,预测表明紫花苜蓿 *MsMYB86* 蛋白主要以丝氨酸的磷酸化为主。蛋白亲水性、疏水性预测结果显示,在第 80 个氨基酸处疏水性峰值最高(2.189),第 340 个氨基酸处亲水性峰值最高(-2.911),与疏水性氨基酸总数相比,亲水性氨基酸总数更多,亲水部分大于疏水部分,总平均疏水指数(grand average of hydropathicity, GRAVY): $-0.680 < 0$,推测紫花苜蓿 *MsMYB86* 蛋白为亲水性蛋白(图 3C);紫花苜蓿 *MsMYB86* 蛋白的糖基化位点预测结果显示,存在 5 个潜在糖基化位点,分别是 143 位:NKTN(72%),182 位:NNSS(50%),183 位:NNSS(49%),222 位:NAST(49%),286 位:NNTN(51%)(图 3D)。

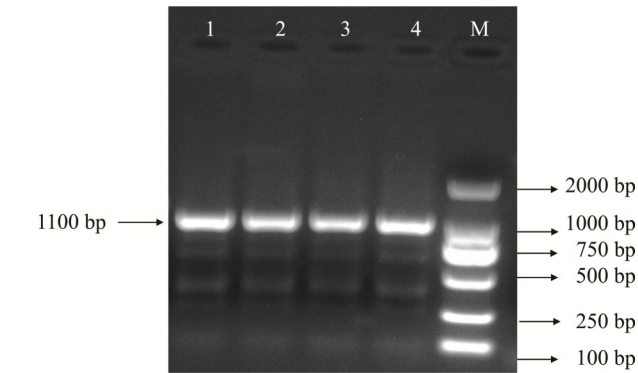


图 1 *MsMYB86* 基因扩增电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis results of *MsMYB86* gene amplification
M 为 DL 2000 DNA 分子量标准,泳道 1~4 为紫花苜蓿 *MsMYB86* 基因克隆。M is DL 2000 DNA maker and lane 1 to 4 are the alfalfa *MsMYB86* gene clones.

```
1  ATGGGAAGACATTCTTGCTGCTACAAGCAGAAGTTAAGGAAAGGACTTGGTCTCCAGAG
1  M G R H S C C Y K Q K L R K G L W S P E
61  GAAGATGAGAACTTCTGAATTACATTACCAACATGGTCATGGATGTTGGAGTTCTGTC
21  E D E K L L N Y I T K H G H G C W S S V
121 CCCAACTAGCAGGTTTGCAAAGGTGTGGAAGAGTTGCAGGTTAAGATGGATAAATTAC
41  P K L A G L Q R C G K S C R L R W I N Y
181 TTGAGCCTGATTGAAAAGAGGAGCATTCTCACAACAAGAAGAATTGATCATTGAA
61  L R P D L K R G A F S Q Q E E N L I I E
241 CTTTCATGCAGTACTTGGTAACAGATGGTCTCAGATTGCAGCACAATTACCGAAGAACA
81  L H A V L G N R W S Q I A A Q L P G R T
301 GACAATGAGATTAATAATCTATGGAATTCATGTCTCAAGAAAGATTGAGACAAAGTGGC
101 D N E I K N L W N S C L K K R L R Q S G
361 ATTGATCCAACTCACAACCACTCTCTGAGGTTGAAAATGACAATGAAAATCACTC
121 I D P N T H K P L S E V E N D N E K S L
421 ACATCCAACAAAACCAATCAAAAAGCTTCAGTTTCATCCAATGAAGTTATGAGTTTGATG
141 T S N K T N Q K A S V S S N E V M S L M
481 ATTGAACCTACAAAAGCTTCTATAGAAGGATACCCCTCTAGAAGTTTCTACTACCTCAAG
161 I E P T K A S I E G Y P L E V S T T S K
541 ATCAACAATAGTAGCAGCAGCAGCCATGAATTATCTAGATACCAGGTTTGGTAGCAGT
181 I N N S S S S S H E L F L D T R F G S S
601 TCAAGTTATTTTCTTCCAGAAGTTGAAGTATGGATCAACATAGGAGTTTCTGAAAAT
201 S S Y F S F Q N L N Y G S N I G I S E N
661 CCAATGATCTATTTGTTTACACCAACTTCAACTTCTTCAAAATGATGTCAGATACA
221 P N A S I C F T P T S T S S Q I M S D T
721 AATTCTGTATATACTTCCAATATGCTCCATTCTGTATCACCTCAATTTCTCAACTTCA
241 N S V I T S N M L H S V S P S I F S T S
781 ACATGTGTAAGCAACTGTTTCGGTTTCTCGGACGGAGTTTCATAACTGGGAAGCAAGT
261 T H V K P T V S V S S D G V H N W E A S
841 AACTACAACAACATTAAACAACAACAACGCGCTTTACCGTTACAAGAAGAAATGAAA
281 N Y N N I N N T N N G A L P L Q E E M K
901 TGGTCTGAGTATCTTAACACACCATTTCTTATGCAGAATCAACCTTCCCCATCAATGTAC
301 W S E Y L N T P F L M Q N Q P S P S M Y
961 ACTGAGGCTAAACAGAAACAGGTTTCATAACAGATGAATCATGCACTAGTTGGCAGCAG
321 T E A K P E T G F I T D E S C T S W Q Q
1021 CAGCAACAACAAAATTTCAACTTCTGATATATAGCAAGGATCTGCAGAGATTTTCA
341 Q Q Q Q N F Q L S D I Y S K D L Q R F S
1081 GTGGCTTTTGACAACTATGTAG
361 V A F G Q T M *
```

图 2 紫花苜蓿 *MsMYB86* CDS 全长及编码氨基酸序列

Fig. 2 Alfalfa *MsMYB86* CDS full length and coding amino acid sequence

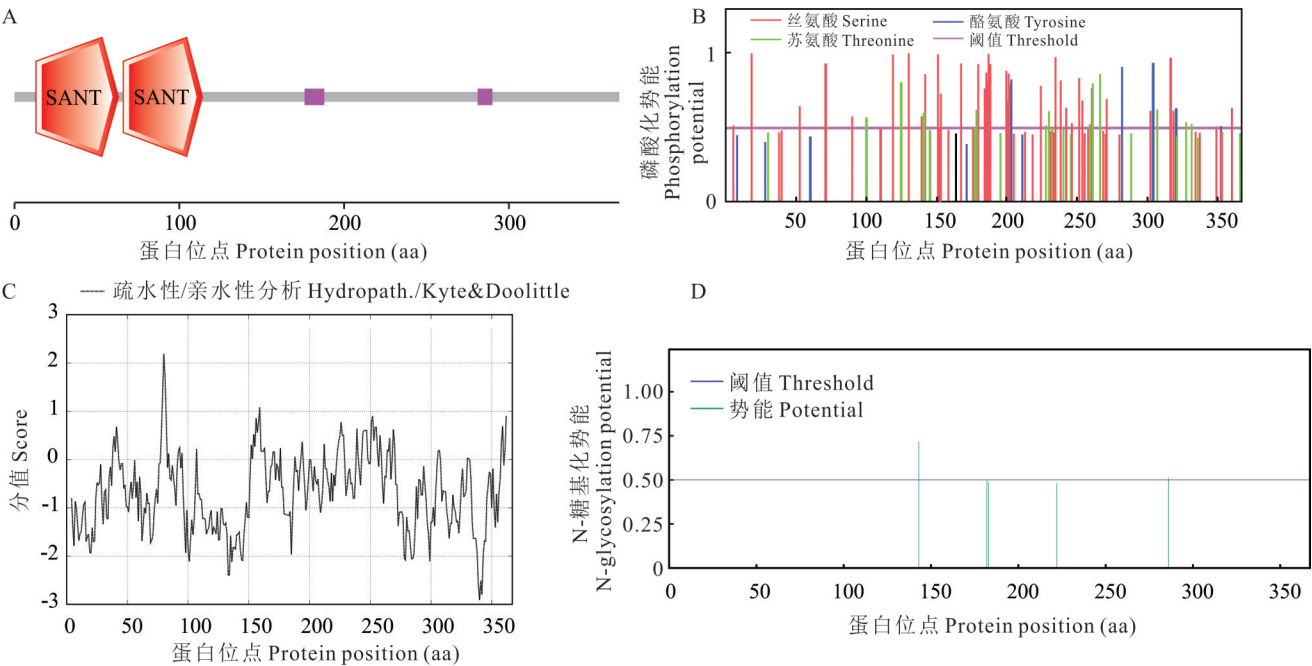


图3 紫花苜蓿 MsMYB86 蛋白结构域位置预测 (A)、MsMYB86 蛋白磷酸化位点 (B)、MsMYB86 蛋白亲水性/疏水性 (C)、MsMYB86 蛋白糖基化位点 (D)

Fig. 3 Prediction of structural domain positions of alfalfa MsMYB86 protein (A), MsMYB86 protein phosphorylation site (B), MsMYB86 protein hydrophilicity/hydrophobicity (C), MsMYB86 protein glycosylation site (D)

SANT 区域(SWI3, ADA2, N-CoR, TFIIB)是 MYB 家族蛋白的特征性 DNA 结构域。The SANT regions (SWI3, ADA2, N-CoR, TFIIB) are characteristic DNA structural domains of MYB family proteins.

利用 PSORT 在线工具进行亚细胞定位预测(图 4A),结果显示,紫花苜蓿 MsMYB86 蛋白 87% 位于细胞核内,13% 位于线粒体。利用 EMBOSS 在线分析平台及 Gene Pioneer 在线网页密码子分析工具,对 MsMYB86 基因的密码子使用偏好性进行系统性分析(图 4B),结果显示高频密码子[相对同义密码子使用度(relative synonymous codon usage, RSCU)>1]有 24 个,分别为 AGA、UAG、GUU、CCA、GCA、AGG、GGA、UCA、CAU、

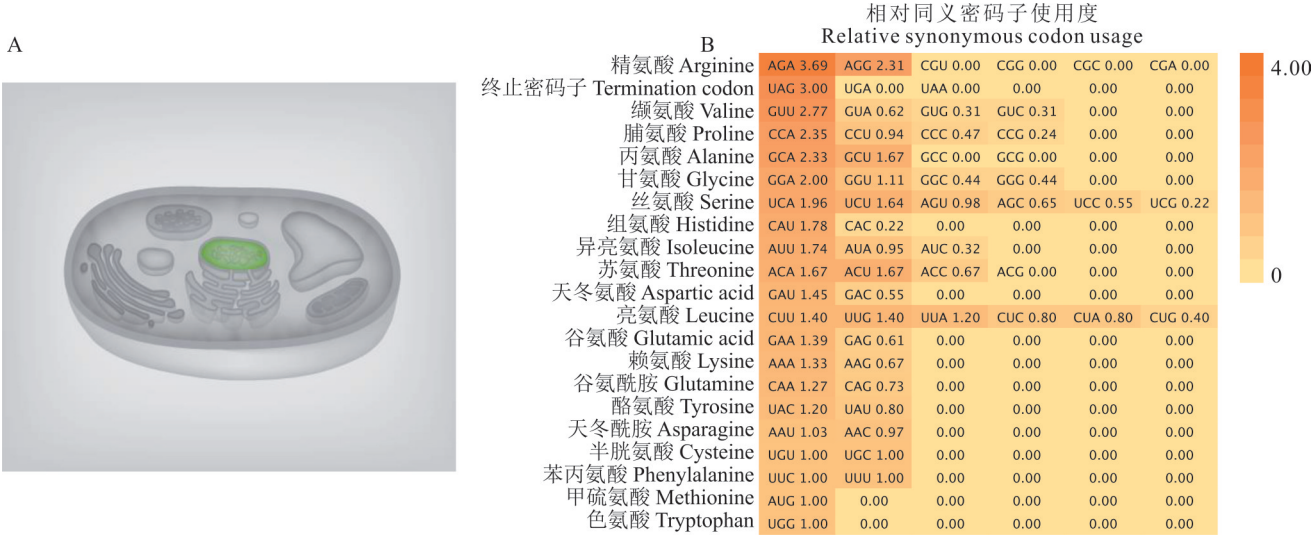


图4 亚细胞定位预测(A)和密码子偏好性分析(B)

Fig. 4 Subcellular localisation prediction (A) and codon preference analysis (B)

A 为亚细胞定位预测细胞内定位示意图,预测定位结果(真核生物域):细胞核(GOID:GO:0005634),预测置信度为 47%。A shows a schematic diagram of subcellular localisation predicting intracellular localisation with predicted localisation result (eukaryotic domain): nucleus (GOID: GO: 0005634) with a predicted confidence of 47%.

AUU、GCU、ACA、ACU、UCU、GAU、CUU、UUG、GAA、AAA、CAA、UUA、UAC、GGU、AAU。整体来看, *MsMYB86* 基因偏好以 A 或 U 结尾的密码子。

2.3 多序列比对及系统进化树分析

对紫花苜蓿中苜 1 号 (Zhongmu No. 1)、紫花苜蓿中苜 4 号 (Zhongmu No. 4)、拟南芥、蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*)、大豆 (*Glycine max*)、狭叶羽扇豆 (*Lupinus angustifolius*)、桃树 (*Prunus persica*)、梅树 (*Prunus mume*)、可可树 (*Theobroma cacao*)、枣树 (*Ziziphus jujuba*)、芝麻 (*Sesamum indicum*)、啤酒花 (*Humulus lupulus*)、大麻 (*Cannabis sativa*)、榛子 (*Corylus avellana*)、水稻 (*Oryza sativa*)、烟草 (*Nicotiana tabacum*)、林烟草 (*Nicotiana sylvestris*)、渐狭叶烟草 (*Nicotiana attenuata*), 这 18 种植物的 MYB86 蛋白进行多序列比对分析, 结果显示, 中苜 1 号 MYB86 蛋白的氨基酸序列与其余 17 种植物 MYB86 氨基酸序列表现出高度保守性 (图 5)。

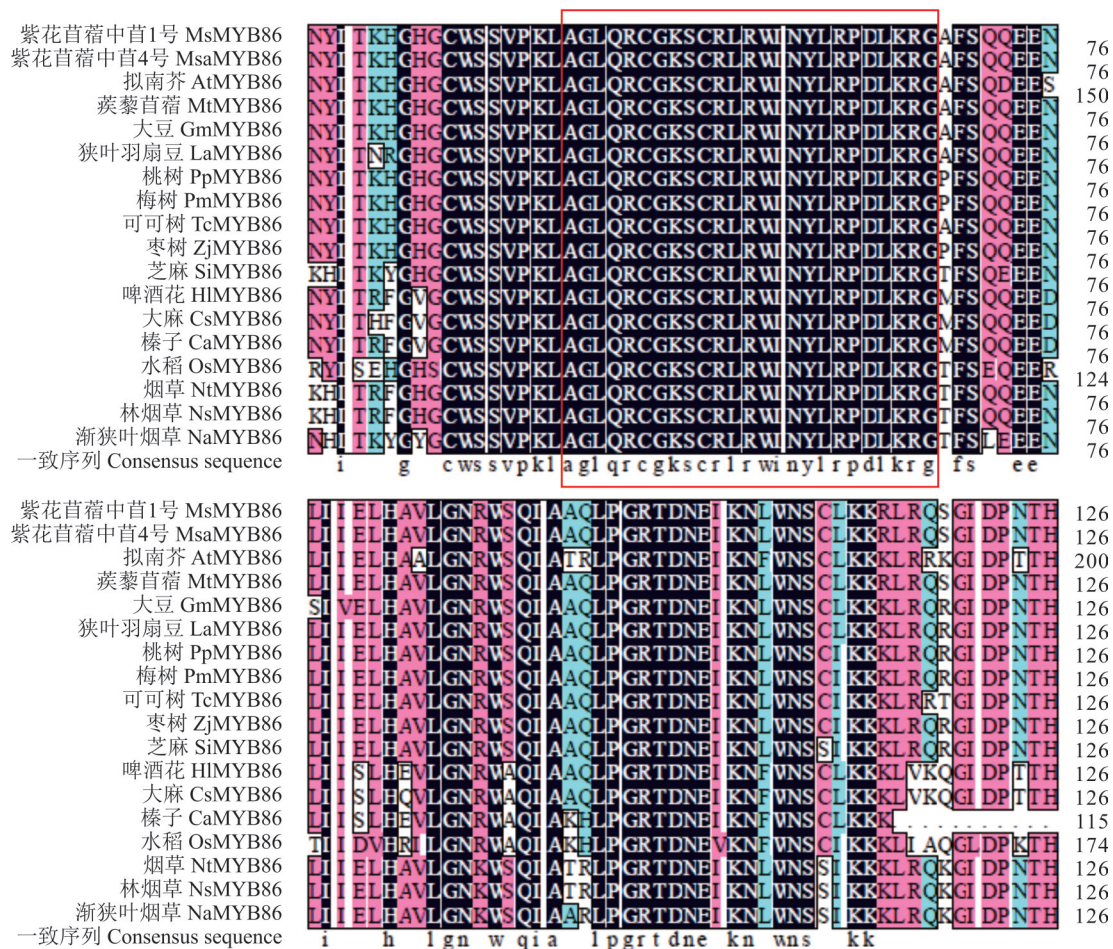


图 5 不同物种 *MsMYB86* 蛋白的同源序列对比

Fig. 5 Homologous sequence comparison of *MsMYB86* protein in different species

Ms: 紫花苜蓿中苜 1 号 *M. sativa* Zhongmu No.1; Msa: 紫花苜蓿中苜 4 号 *M. sativa* Zhongmu No.4; At: 拟南芥 *A. thaliana*; Mt: 蒺藜苜蓿 *M. truncatula*; Gm: 大豆 *G. max*; La: 狭叶羽扇豆 *L. angustifolius*; Pp: 桃树 *P. persica*; Pm: 梅树 *P. mume*; Tc: 可可树 *T. cacao*; Zj: 枣树 *Z. jujuba*; Si: 芝麻 *S. indicum*; Hl: 啤酒花 *H. lupulus*; Cs: 大麻 *C. sativa*; Ca: 榛子 *C. avellana*; Os: 水稻 *O. sativa*; Nt: 烟草 *N. tabacum*; Ns: 林烟草 *N. sylvestris*; Na: 渐狭叶烟草 *N. attenuata*. 下同 The same below. 红色方框标注为不同物种氨基酸序列高度保守区。Highly conserved regions of amino acid sequences of different species of MYB86 are marked by red boxes.

为深入探究 *MYB86* 基因的系统发育关系, 将上述 18 个 *MYB86* 蛋白利用 MEGA 11.0 软件构建邻接法系统进化树。结果显示, 中苜 1 号 *MYB86* 蛋白、中苜 4 号 *MYB86* 蛋白以及蒺藜苜蓿 *MYB86* 蛋白亲缘关系较近, 说明这 3 个氨基酸序列差异较小, 相似性较高; 其次与大豆、狭叶羽扇豆氨基酸序列亲缘关系较近, 推测其在功能上可能也具有相似性 (图 6)。

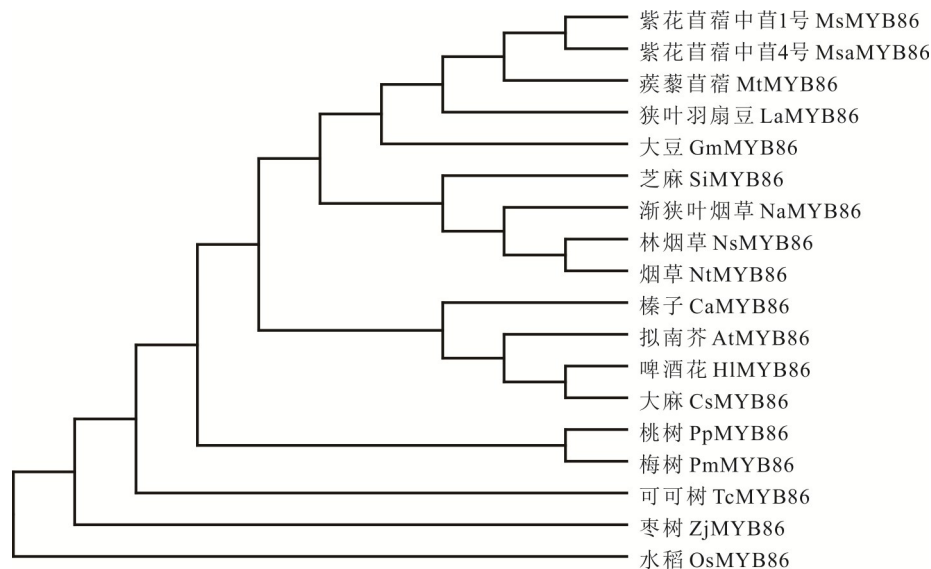


图6 不同物种 MYB86 氨基酸序列系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of MYB86 amino acid sequences of different species

2.4 蛋白质二级、三级结构及蛋白互作分析

紫花苜蓿 MYB86 蛋白的二级结构通过 NPS@蛋白二级结构在线工具进行预测,结果显示(图 7A):主要构成元件为 α -螺旋和无规则卷曲,其中 α -螺旋有 71 个,蛋白结构的占比为 19.35%;无规则卷曲有 294 个,蛋白结构的占比为 80.38%;单条延伸链为 1 个,蛋白结构的占比为 0.27%。为进一步探究紫花苜蓿中 MsMYB86 蛋白的功能,利用 STRING 在线工具构建了蛋白互作网络(图 7B),并通过蛋白互作关系综合得分鉴定出 10 种与 MsMYB86 互作的蛋白,其中与 CYP73A5(0.894)的互作分值最高,其他互作蛋白按分值排序依次为:BHLH2(0.855)、GL3(0.853)、TTG1(0.828)、DFRA(0.795)、F3H(0.792)、NAC012(0.791)、FLS1(0.785)、TT8(0.785)、CYP75B1(0.785)。CYP450s(细胞色素 P450 单加氧酶)家族在植物的次生代谢、抗氧化剂和激素合成中起核心作用^[12]。碱性螺旋-环-螺旋结构域的 BHLH(basic helix-loop-helix)转录因子^[13]和 GL3(GLABRA3)蛋白^[14]则涉及植物生长发育和逆境响应。上述 10 种蛋白与 MsMYB86 蛋白形成的互作网络关系表明,MsMYB86 蛋白可能通过影响这些蛋白的功能进而参与植物对非生物胁迫的适应性响应。使用 SWISS-MODEL 在线网页预测蛋白三级结构,MsMYB86 蛋白三级结构与大豆中 MYB/HD-like 转录因子(gene: 778182)的三级结构模型相似度较高,模型质量相似度为 75.49%(图 7C,D)。

2.5 MsMYB86 基因的表达模式分析

试验结果表明,MsMYB86 基因在根、老茎、幼茎、叶和花中均有表达,但表达水平存在显著差异($P < 0.05$),其中老茎中的相对表达量最高,叶片中的表达量最低(图 8A)。干旱胁迫下,MsMYB86 基因的相对表达量显著上调($P < 0.05$),在 12 h 时达到峰值,之后表达量逐渐下降,48 h 时降至最低(图 8B)。盐胁迫下,MsMYB86 基因的相对表达量呈升—降—升—降的趋势,6 和 24 h 表达量较高,且显著高于其余各时间点(图 8C)。ABA 处理下,MsMYB86 基因的相对表达量在 6 和 12 h 时显著下降($P < 0.05$),但在 24 h 时表达量显著上升,并在 48 h 时达到最高点(图 8D)。上述结果表明,MsMYB86 基因对干旱、盐胁迫及 ABA 处理具有响应性。

3 讨论

MYB 转录因子家族在植物中广泛存在,对植物生命过程具有重要影响。尽管科研人员已经对 MYB 转录因子家族进行了广泛的研究,但在紫花苜蓿中 MYB 基因家族的研究还相对较少,尤其是 MYB86 基因,目前尚未见相关报道,这表明在紫花苜蓿 MYB 转录因子家族的研究领域,还有很大的探索空间。

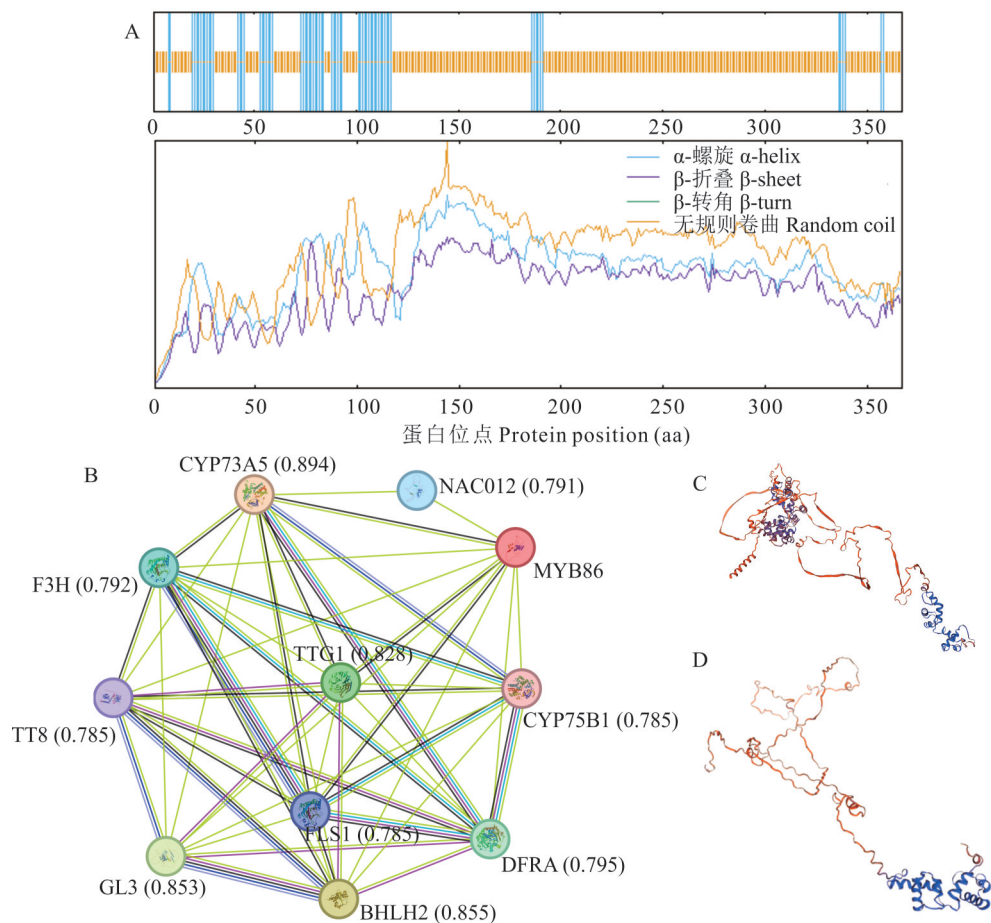


图 7 紫花苜蓿 *MsMYB86* 氨基酸二级结构预测 (A), 蛋白互作网络分析 (B), 紫花苜蓿 *MsMYB86* 蛋白三级结构 (C) 以及大豆 *MYB/HD-like* 转录因子蛋白三级结构 (D)

Fig. 7 Prediction of amino acid secondary structure of alfalfa *MsMYB86* (A), protein interaction network analysis (B), tertiary structure of alfalfa *MsMYB86* protein (C) and tertiary structure of soybean *MYB/HD-like* transcription factor protein (D)

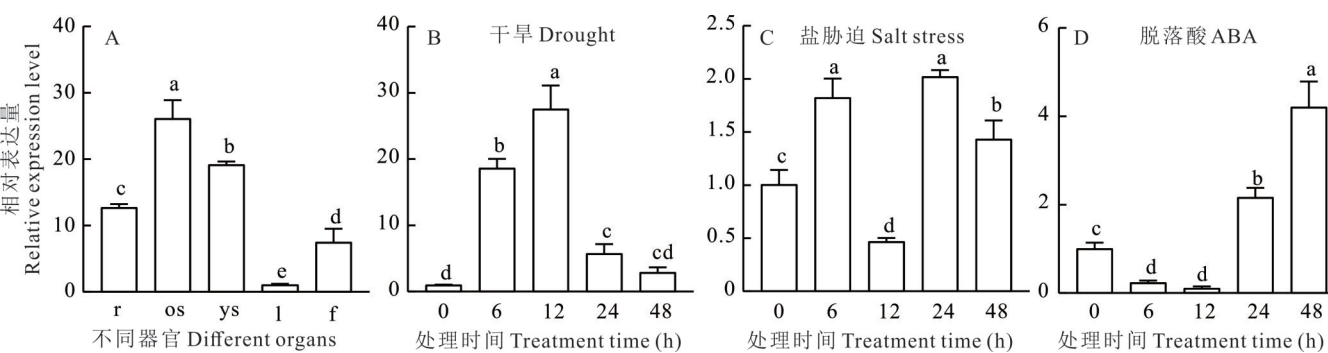


图 8 *MsMYB86* 基因植物组织特异性及在非生物胁迫下的表达模式

Fig. 8 Plant organs specificity and expression pattern of *MsMYB86* gene under abiotic stresses

A 为 *MsMYB86* 基因植物组织特异性相对表达量, r 为根, os 为老茎, ys 为幼茎, l 为叶, f 为花; B 为模拟干旱胁迫 (20% PEG 6000) 处理下 *MsMYB86* 基因的相对表达量; C 为盐胁迫 (NaCl , $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理下 *MsMYB86* 基因的相对表达量; D 为脱落酸 (ABA, $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理下 *MsMYB86* 基因的相对表达量。不同小写字母代表在 $P < 0.05$ 水平下差异显著。A is the plant tissue-specific relative expression of *MsMYB86* gene, r is root, os is old stem, ys is young stem, l is leaf, f is flower; B is the relative expression of *MsMYB86* gene under simulated drought stress (20% PEG 6000) treatment; C is the relative expression of *MsMYB86* gene under salt stress (NaCl , $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) treatment; D is the relative expression of *MsMYB86* gene under abscisic acid (ABA, $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) treatment. Different lowercase letters represent significant differences at 0.05 level.

3.1 紫花苜蓿 *MsMYB86* 蛋白的生物学特性

本研究成功克隆了紫花苜蓿 *MsMYB86* 基因, 该基因全长 1104 bp, 编码 367 个氨基酸。序列分析显示,

MsMYB86蛋白与蒺藜苜蓿、大豆和狭叶羽扇豆中的MYB86蛋白具有高度相似性,表明这些蛋白在进化上保守,可能在不同物种中发挥相似的生物学功能。亚细胞定位预测发现MsMYB86蛋白主要定位于细胞核,这与小麦(*Triticum aestivum*)^[15]、茄子(*Solanum melongena*)^[16]、水稻^[17]等物种亚细胞定位结果一致。这一发现支持了MYB86作为转录因子在细胞核内调控基因表达的角色,表明MsMYB86可能通过与特定的DNA序列相互作用,调节植物的生长发育和代谢过程,并且可能参与细胞分化和发育,从而影响植物的形态建成。这些结果为深入探究MsMYB86在紫花苜蓿中的分子功能及其调控机制提供了理论依据。蛋白结构域预测分析MsMYB86蛋白包含两个SANT-MYB结构域,与Chen等^[5]对番茄*SlMYB86*的研究结果一致,这些结构域在基因表达调控和染色质重塑中起关键作用,表明MsMYB86蛋白在基因调控和植物生长发育中发挥作用。植物的生长发育依赖于蛋白质间的相互作用^[18],这些相互作用精细调控着基因表达和信号传导,从而影响植物对环境变化的适应性和生长发育过程。蛋白网络分析预测MsMYB86蛋白与多个关键蛋白家族成员存在互作关系,包括CYP450s、BHLH转录因子和R2R3-MYB家族成员之一的GL3等,表明MsMYB86蛋白可能通过与这些蛋白的相互作用,参与植物初级代谢和次生代谢,进而在逆境胁迫下调节植物生长。

3.2 紫花苜蓿MsMYB86基因表达的组织特异性

研究表明,高表达基因的密码子偏好性与自然选择相关^[19]。在蒺藜苜蓿叶绿体基因组中,A或U结尾的密码子表现出偏好性,可能与翻译效率有关^[20]。密码子分析表明MsMYB86基因倾向于使用以A或U结尾的密码子,这一偏好可能与其高效的基因表达能力相关。MYB家族转录因子在植物的组织特异性表达和非生物胁迫响应中扮演着关键角色。番茄*SlMYB86*基因在根和叶中的表达量显著增加^[5],且茶树中MYB转录因子家族成员也表现出组织特异性^[21]。本研究中,MsMYB86基因在老茎中表达量最高,且显著高于其余各器官,表明该基因具有组织表达差异性。

3.3 紫花苜蓿MsMYB86基因对非生物胁迫的响应

MsMYB86基因的表达动态揭示了其在紫花苜蓿逆境响应中的潜在作用。干旱胁迫下,MsMYB86基因的表达量呈现出显著的动态变化,基因表达量在12 h时达到峰值,随着胁迫时间的延长逐渐降低。MsMYB86基因在紫花苜蓿中的表达模式揭示了其在干旱胁迫初期的快速响应,随后表达量下降,推测其在逆境初期可能发挥重要作用,随后可能被其他调节机制所替代。这与现有研究一致,表明植物在持续干旱胁迫下会激活复杂的信号传导途径和生理响应以维持水分平衡和细胞完整性^[22]。基因快速响应涉及激素信号转导,例如ABA调控花青素合成以应对氧化反应,以及吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)调控根系下扎以吸收更多土壤水分。这些信号转导途径的激活可能导致某些基因在干旱胁迫初期被迅速诱导表达,而随着胁迫的持续,这些基因的表达量可能会下降,反映了植物适应持续干旱条件的调节机制^[23]。当受到盐胁迫时,MsMYB86基因的表达模式呈现出双相变化。该基因的表达量在胁迫初期显著上升,随后在12 h时降至最低点。随后逐渐回升,到48 h时表达量下降。这些结果表明,MsMYB86可能在盐胁迫的早期阶段发挥关键作用,参与了植物的快速响应机制。脱落酸作用下,MsMYB86的表达模式与干旱胁迫和盐胁迫不同。在胁迫初期,MsMYB86的表达量下降,随着胁迫时间的延长,表达量逐渐上升,并在48 h达到峰值,推测MsMYB86可能参与ABA信号传导途径,从而有助于植物对水分胁迫的适应。综上,不同非生物胁迫下紫花苜蓿MsMYB86基因的表达模式反映出其参与了逆境响应,而不同胁迫条件下的响应趋势有差异又表明紫花苜蓿对逆境的应答机制复杂多样,需要进一步探究以揭示其作用机制。

4 结论

本研究成功克隆了紫花苜蓿MYB转录因子家族成员MsMYB86基因,该基因全长1104 bp,编码367个氨基酸,生物信息学分析揭示其氨基酸序列包含两个SANT-MYB DNA结合结构域,同源性比较和系统进化树分析表明,MsMYB86蛋白与豆科牧草具有高度同源性和进化亲缘性,其序列在多个物种中高度保守,且MsMYB86蛋白与多个关键蛋白家族成员存在互作关系。MsMYB86基因在紫花苜蓿老茎中表达量最高,且对于干旱、盐胁迫以及ABA处理均有响应,表明其可能在植物逆境响应中扮演关键角色。研究结果为后续深入探究MsMYB86基因在紫花苜蓿中的功能提供了理论基础。

参考文献 References:

- [1] Pabo C O, Sauer R T. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annual Review of Biochemistry*, 1992, 61(1): 1053–1095.
- [2] Xu W J, Huang Y H, Han R R, *et al.* Systematic analysis of MYB transcription factors related to the geniposide biosynthesis in *Gardenia jasminoides* Ellis based on whole genome. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2023, 58(8): 2522–2531.
许文杰, 黄远浩, 韩蓉蓉, 等. 基于全基因组的栀子苷生物合成相关 MYB 转录因子系统分析. *药学学报*, 2023, 58(8): 2522–2531.
- [3] Abe H, Urao T, Ito T, *et al.* *Arabidopsis AtMYC2* (bHLH) and *AtMYB2* (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant Cell*, 2003, 15(1): 63–78.
- [4] Lv K, Wei H, Liu G F. A R2R3-MYB transcription factor gene, *BpMYB123*, regulates *BpLEA14* to improve drought tolerance in *Betula platyphylla*. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 22(12): 1–9.
- [5] Chen N, Zhan W W, Shao Q, *et al.* Cloning, expression, and functional analysis of the MYB transcription factor *SlMYB86-like* in tomato. *Plants*, 2024, 13(4): 488.
- [6] Jiang S H, Sun Q G, Zhang T L, *et al.* *MdMYB114* regulates anthocyanin biosynthesis and functions downstream of *MdbZIP4-like* in apple fruit. *Journal of Plant Physiology*, 2021, 257(12): 153353.
- [7] Zhang Y, Hu Y F, Wang S M, *et al.* Bioinformatic analysis of MYB transcription factors involved in catechins biosynthesis in tea plant (*Camellia sinensis*). *Journal of Tea Science*, 2018, 38(2): 162–173.
张玥, 胡云飞, 王树茂, 等. 茶树儿茶素合成相关 MYB 转录因子生物信息学分析. *茶叶科学*, 2018, 38(2): 162–173.
- [8] Chen C J, Bao M F, Wang W H, *et al.* Current situation and prospects for drought-resistance breeding in *Medicago sativa*. *Acta Prataculturae Sinica*, 2025, 34(3): 204–223.
陈彩锦, 包明芳, 王文虎, 等. 紫花苜蓿抗旱育种研究现状及展望. *草业学报*, 2025, 34(3): 204–223.
- [9] Shen C, Du H, Chen Z, *et al.* The chromosome-level genome sequence of the autotetraploid alfalfa and resequencing of core germplasms provide genomic resources for alfalfa research. *The Molecular Plant*, 2020, 13(9): 1250–1261.
- [10] Cen H F, Huang J Q, Shen W H, *et al.* Cloning of the *MsUGT87A1* gene in alfalfa and analysis of its expression in the response to abiotic stress. *Acta Agrestia Sinica*, 2023, 31(6): 1682–1692.
岑慧芳, 黄洁琼, 申王晖, 等. 紫花苜蓿 *MsUGT87A1* 基因克隆及其对非生物胁迫的响应分析. *草地学报*, 2023, 31(6): 1682–1692.
- [11] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [12] Kumar S M, Babu R P, Rao V K, *et al.* Organization and classification of cytochrome *P450* genes in castor (*Ricinus communis* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 2014, 84(1): 131–143.
- [13] Feller A, Machemer K, Braun E L, *et al.* Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 2011, 66(1): 94–116.
- [14] Payne C T, Zhang F, Lloyd A M. *GL3* encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with *GL1* and *TTG1*. *Genetics*, 2000, 156(3): 1349–1362.
- [15] Shan T L, Hong Y T, Du L P, *et al.* Development and characterization of *TaMYB86*-overexpressing transgenic wheat lines with resistance to common root rot. *Acta Agronomica Sinica*, 2016, 42(10): 1429–1436.
单天雷, 洪彦涛, 杜丽璞, 等. 抗根腐病的 *TaMYB86* 过表达转基因小麦的创制与分子功能鉴定. *作物学报*, 2016, 42(10): 1429–1436.
- [16] Li L Z, Li S H, Ge H Y, *et al.* A light-responsive transcription factor *SmMYB35* enhances anthocyanin biosynthesis in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Planta*, 2021, 255(1): 12.
- [17] Chen Z H. Genetic regulatory network of *MAPK-MYB86-CAD2* controls the leaf morphogenesis in rice. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2022.
陈振华. 控制水稻叶片形态 *MAPK-MYB86-CAD2* 遗传调控网络解析. 北京: 中国农业科学院, 2022.
- [18] Zhou P N, Li Y, Pu T Z, *et al.* Cloning and bioinformatics analysis of the β -1, 4-xylosyltransferase *IRX9* gene from *Dendrobium huoshanense*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2019, 50(5): 1212–1219.
周佩娜, 李阳, 蒲天珍, 等. 霍山石斛 β -1, 4-木糖基转移酶 (*IRX9*) 基因克隆及生物信息学分析. *中草药*, 2019, 50(5): 1212–1219.
- [19] Jiang R P, Zhao C H, Li W J, *et al.* Codon bias of *IP1* gene in leguminous plants. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2022, 34(6):

1114—1123.

蒋瑞平, 赵辰晖, 李文杰, 等. 豆科植物 *IPI* 基因密码子偏好性. 浙江农业学报, 2022, 34(6): 1114—1123.

- [20] Yang G F, Su K L, Zhao Y R, *et al.* Analysis of codon usage in the chloroplast genome of *Medicago truncatula*. Acta Prataculturae Sinica, 2015, 24(12): 171—179.

杨国锋, 苏昆龙, 赵怡然, 等. 蒺藜苜蓿叶绿体密码子偏好性分析. 草业学报, 2015, 24(12): 171—179.

- [21] Li P H, Xia E H, Fu J M, *et al.* Diverse roles of MYB transcription factors in regulating secondary metabolite biosynthesis, shoot development, and stress responses in tea plants (*Camellia sinensis*). The Plant Journal, 2022(4): 110.

- [22] Wang S, Jia X Q, He L, *et al.* Research progress on the response mechanisms of crops to drought stress and regulatory measures to improve crop drought resistance. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2022, 38(29): 31—44.

王硕, 贾潇倩, 何璐, 等. 作物对于旱胁迫的响应机制及提高作物抗旱能力的调控措施研究进展. 中国农学通报, 2022, 38(29): 31—44.

- [23] Li R X, Sun R J, Wang T C, *et al.* Research progress on identification and evaluation methods, and mechanism of drought resistance in plants. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(7): 40—48.

李瑞雪, 孙任洁, 汪泰初, 等. 植物抗旱性鉴定评价方法及抗旱机制研究进展. 生物技术通报, 2017, 33(7): 40—48.