

孙龙飞,黄 萍. 紫花苜蓿生长调节因子的全基因组鉴定及干旱胁迫下特征分析[J]. 江苏农业科学,2024,52(12):45-52.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2024.12.006

紫花苜蓿生长调节因子的全基因组鉴定 及干旱胁迫下特征分析

孙龙飞,黄 萍

(河南农业职业学院园艺园林学院,河南郑州 450000)

摘要:为揭示紫花苜蓿(*Medicago sativa*)生长调节因子(GRF)响应干旱胁迫中的生理功能及响应机制,以劲能 5020 为试验材料,基于全基因组分析,对紫花苜蓿 GRF 家族成员进行鉴定和生物信息学分析,并采用 RT-qPCR 方法分析相关基因在干旱胁迫下的表达模式。结果表明,在紫花苜蓿中共鉴定出 8 个 GRF 编码基因的非冗余成员,可定位于 7 条染色体上。系统发育分析表明,紫花苜蓿 GRF(MsGRF)可分为 4 个亚家族,同一亚家族的 MsGRF 都包含共同的高度保守基序、基因结构及多种顺式作用元件,表明 MsGRF 具有潜在的功能多样性。RNA-seq、qPCR 表达模式表明,MsGRF 在幼嫩组织和根系中具有较高的表达活性。RT-qPCR 进一步表明,8 个 MsGRF 成员中,6 个基因(*MsGRF1*、*MsGRF3*、*MsGRF5*、*MsGRF6*、*MsGRF7*、*MsGRF8*)在干旱胁迫下上调表达,其中 *MsGRF1* 相对表达水平 45.8 ~ 83.1,表达活性最高、契合度最佳。综上,MsGRF 在紫花苜蓿抗干旱过程中具有重要作用,推测 *MsGRF1* 是紫花苜蓿耐旱的关键基因。

关键词:紫花苜蓿;生长调节因子;全基因组;干旱胁迫;表达分析

中图分类号:S541.9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2024)12-0045-08

生长调节因子(GRF)是植物重要的转录因子,广泛分布于绿色植物中,在调节植物生长发育以及植物对非生物胁迫的响应中扮演着重要角色^[1]。生长调节因子(GRF)是转录因子的重要家族成员之一,GRF 在 N 端区域包含 2 个特征和保守的功能域,即 QLQ 域(Gln、Leu、Gln)和 WRC 域(Trp、Arg、Cys)^[2,3]。QLQ 结构域包含 GRF 相互作用因子(GIF)相互作用的位点^[4],而 WRC 结构域包含 DNA 结合基序和核定位信号,WRC 结构域由 DNA 结合的 C3H 基序和核定位信号(NLS)组成,因此 QLQ 域比 WRC 域更为保守^[5]。所有真核生物都含有 QLQ、WRC 为植物特异性结构域,GRF 的 C 端区域、氨基酸残基的种类和数量差异较大,这使得不同植物、同植物不同基因型,同基因型不同成员的相似度均较低^[6]。由于 C 端结构域差异较大,且 C 末端区域的长度决定着蛋白质的大小,因此植物 GRF 蛋白往往具备功能多样性^[7]。

GRF 参与植物早期生长发育,在植物组织或器官的形成中发挥重要的调控作用,如叶拓展、茎伸长和根系分化^[8]。这些转录因子直接影响植物形态建成,进而影响植物生理代谢强度及产量。水稻(*Oryza sativa*)的 *OsGRF1* 是在植物中发现的第一个 GRF 成员,基因克隆显示其可编码赤霉素生物合成蛋白从而诱导茎伸长,且其他 GRF 成员可以通过调节细胞增殖来调节目标植物叶片的形状和大小^[3]。在模式植物拟南芥中,与野生型相比, *AtGRF1*、*AtGRF2* 和 *AtGRF5* 过表达植株的叶片更厚,但包括 *GRF3-1*、*GRF5-1*、*GRF1-1*、*GRF2* 和 *GRF3* 突变体的叶片比宽型植物小^[4]。目前,一些研究表明,GRF 基因可抑制 KNOX 基因表达以调节关键生物合成基因 GA20 氧化酶来抑制 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)循环中的 GA 生物合成或通过控制降解 GA 的 GA2 氧化酶水平,从而调节细胞增殖^[9]。

大多数 GRF 基因是 microRNA396(miR396)的靶基因,有证据表明 miR396 可以通过转录后调控直接抑制 GRF 表达^[10]。目前,GRF 基因家族的鉴定和功能已在多种植物中进行了研究,在拟南芥中鉴定得到 GRF 9 个^[4]、大豆 22 个^[11]、水稻 12 个^[12]、黑果枸杞^[13]、玉米 15 个^[14]、马铃薯 12 个^[15]、谷子 18 个^[16]。紫花苜蓿(*Medicago sativa*)

收稿日期:2024-02-28

基金课题:河南省科技计划(编号:182102110469)。

作者简介:孙龙飞(1985—),女,河南鲁山人,硕士,讲师,从事园林植物资源应用方向研究。E-mail:Zjjin0726@163.com。

通信作者:黄 萍,硕士,副教授,从事从事园林植物资源应用研究。
E-mail:hhappy2000@163.com。

是多年生豆科植物,紫花苜蓿富含蛋白质、矿物质、维生素等营养成分,是一种高产优质的重要饲料作物^[17,18]。然而,由于紫花苜蓿的遗传复杂性和对环境胁迫的不耐受性,尤其是干旱胁迫,导致苜蓿产量和品质不稳定^[19]。研究紫花苜蓿发育过程和逆境耐受机制,对于培育优质苜蓿种质资源至关重要。本研究对紫花苜蓿 GRF 基因家族进行了全基因组分析,表征了 GRF 的系统发育关系、基因结构及顺式作用元件,检测了不同 GRF 成员响应干旱的转录谱,研究结果有助于揭示紫花苜蓿的耐旱机制以及为未来紫花苜蓿的基因工程改良提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料和培养方法

试验 2023 年 2—5 月于河南农业职业学院植物培养室中进行。供试紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 品种为劲能 5020,购自河南合博草业有限公司。

1.2 紫花苜蓿 GRF 基因的全基因组分析

1.2.1 紫花苜蓿 GRF 基因家族成员的鉴定及系统发育分析 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, At)、大豆 (*Glycine max*, Gm)、蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*, Mt) 和水稻 (*Oryza sativa*, Os) 的 GRF 通过搜索 NCBI 的基因数据库下载。为了鉴定紫花苜蓿中潜在的 GRF 蛋白序列,在 Figshare 数据库 (<https://figshare.com/articles/dataset/>) 中下载得到所有的紫花苜蓿 GRF,并设置为隐马尔可夫模型文件。并基于上述作物的 GRF 蛋白序列进行 BLAST 搜索,使用简单模块化架构研究工具数据库 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 检查候选序列以鉴定包含 WRC 结构域 (PF08879) 和 QLQ 结构域 (PF08880) 的 GRF 蛋白序列,然后使用 HMMER v3.03 对 HMM 进行搜索和检索序列,并采用 SMART4 (<http://smart.embl.de/>) 和 Batch - CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 重复筛选以去除 GRF 保守结构域不完整的蛋白质,从而获得非冗余序列,并命名为 MsGRF。

1.2.2 MsGRF 的理化性质表征与系统发育分析 采用 ExPASy 工具 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析推定 MsGRF 蛋白质序列的蛋白质长度、分子量 (Mw) 及等电点 (PI);采用 NCBI 的开放阅读框 (ORF) 工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 确定 ORF 的长度。随后,采用 Clustal W6 进行多序列比对,并导入所有 AtGRF、GmGRF、OsGRF、MtGRF、MsGRF 蛋白序列,使用

MEGA 7.0 在线软件 (<https://www.megasoftware.net/>) 中的邻接法生成系统发育树,bootstrap 值设置为 1 000,其余参数为默认值^[20]。

1.2.3 MsGRF 染色体定位、基因结构和启动子顺式元件分析 紫花苜蓿 GRF 基因的染色体位置从基因组组装平台 (https://figshare.com/projects/whole_genome_sequencing_and_assembly_of_Medicago_sativa/) 获取,并采用 TBtools (<https://github.com/CJ-Chen/TBtools>) 绘制染色体分布图。采用基因结构显示服务器 (GSDS) (<http://gsds.gao-lab.org/>) 以获得紫花苜蓿 GRF 家族成员的内含子 - 外显子特征。利用 MEME 在线网站 (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 对保守基序进行预测。使用 PlantCARE 10 预测 MsGRF 启动子上游 2 000 bp 序列中的顺式作用元件,并采用 TBtools 可视化顺式作用元件。

1.3 MsGRF 基因转录组数据的获取与表达分析

利用 MsGRF 家族成员的基因序列在紫花苜蓿参考转录组数据库 (<https://figshare.com/projects/>) 进行 blast 比对,下载获得的默认格式文件转换为 .fastq 格式,再将 fastq 通过 .Trim Galore 软件 (<http://bioinformatics.babraham.ac.uk/>) 进行质控。质控后的高质量序列采用利用 RNA - Seq 数据量化软件 kallisto 软件 (0.43.1 版本) 进行定量,定量获取的数值以 TPM 表示,通过 TBtools 进行热图可视化^[21]。

1.4 相关 MsGRF 的筛选及 qRT - PCR 分析

1.4.1 供试紫花苜蓿植物的培养方法 挑选饱满尺寸一致的种子在 0.8% 次氯酸钠中消毒 3 min,以流动蒸馏水冲洗 5 次;采用豆科植物育苗基质将紫花苜蓿种子在人工气候室中培养 28 d,土壤含水率保持为 80% ~ 85%,干旱处理则加入 15 mL 5% 的甘露醇模拟干旱胁迫。在各时间点取样时采用 PBS 缓冲液进行快速冲洗并液氮速冻保存于 -80 ℃ 环境以用于植株 RNA 提取。

1.4.2 紫花苜蓿 RNA 的提取及 RT - qPCR 分析 将紫花苜蓿样品 (250 mg) 采用液氮快速研磨,按照 RN38EASYspin Plus 植物提取试剂盒相关说明提取样品总 RNA,采用使用 Thermo Scientific 的反转录试剂盒将 RNA 逆转录 cDNA。采用 Primer 6.0 软件设计扩增引物 (表 1),以 *Actin* 作为内参基因。PCR 体系、扩增条件及热循环程序参照苏倩等的方法^[22],使用 Thermo Scientific Stepone plus 6x 荧光定量 PCR

表 1 紫花苜蓿基因的 RT-qPCR 引物序列信息表

基因名	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')	产物长度 (bp)
<i>Actin</i>	GACAATGGAAGTGAATGG	CAATACCGTGCTCAATGG	73
<i>MsGRF1</i>	GTTAGGTGTTGGAAGTAGTGCTC	TTGTTGTGCTCTGCCATAGTG	86
<i>MsGRF2</i>	TCCAGAGCCAGGTAGATGTAGAAG	AGTGATGAAATCCAAGTGATGAAG	80
<i>MsGRF3</i>	AATGAATGCTGCGAGTGATGATG	TTGTTGTGTGAGAGGTGATGATG	91
<i>MsGRF4</i>	ATCATAATCATCACCACCGTTCATT	TAGCATTAGCACCTACAGCAGAAG	75
<i>MsGRF5</i>	CGGAGCCAGGAAGATGTAGGA	TGCCACCAGCGACAGTTAGC	89
<i>MsGRF6</i>	TCTGCTTCTGTTACTGCTGCTTC	GGTGTCTCTCTGCTTCCG	85
<i>MsGRF7</i>	CTCATCAACACCACCAACAATC	GGAGGAACAGAAGCACCAACC	91
<i>MsGRF8</i>	TAACCACCTTTCTCTACCATAA	TTCATCCACCTCTCTTTCAGTCC	77

仪的实时检测系统进行 RT-qPCR 分析,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算基因的相对表达量。

1.5 数据处理与统计分析

采用 Excel 2019 进行数据整理,采用 DPS 14.0 进行单因素方差分析,采用相应在线绘图工具、R 软件作图。

2 结果与分析

2.1 MsGRF 家族的理化性质特征分析

同源性搜索在紫花苜蓿基因组中获得了 22 个推定的 GRF 蛋白序列,在去除不完整 QLQ、WRC 结构域序列后,根据 Figshare 数据库中蒺藜苜蓿

(*Medicago truncatula*) 和 NCBI 数据库中拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的分类,采用递次命名法从紫花苜蓿基因组识别出 8 个完整的生长调节因子成员 *MsGRF1* ~ *MsGRF8*。基于 ExPASy 检测相关 MsGRF 物理和化学特性可知,紫花苜蓿 GRF 基因家族蛋白质长度 224 ~ 516 aa,分子量在 25.38 ~ 56.22 ku,等电点为 6.28 ~ 10.25,其中仅 *MsGRF6* 为酸性蛋白(等电点 > 7.0),其他均为碱性蛋白。亚细胞定位预测显示,紫花苜蓿 *MsGRF3*、*MsGRF5* 位于细胞质中,其他 6 个 MsGRF 成员均位于细胞核中;且所有蛋白亲水指数均为正值,表示成员均为疏水蛋白(表 2)。

表 2 紫花苜蓿 GRF 基因的鉴定及理化性质信息表

基因标志	基因名	亲水指数	等电点 (PI)	分子量 (ku)	蛋白质长度 (aa)	亚细胞定位
MsG0180000350.01.T01	<i>MsGRF1</i>	0.655	8.97	56.22	516	细胞核
MsG0280008385.01.T01	<i>MsGRF2</i>	0.563	8.43	41.97	369	细胞核
MsG0380016593.01.T01	<i>MsGRF3</i>	0.797	7.32	55.45	513	细胞质
MsG0380016639.01.T01	<i>MsGRF4</i>	0.811	7.81	50.86	463	细胞核
MsG0480020006.01.T01	<i>MsGRF5</i>	0.606	9.58	34.29	305	细胞质
MsG0580025368.01.T01	<i>MsGRF6</i>	0.726	6.28	37.23	332	细胞核
MsG0780041090.01.T01	<i>MsGRF7</i>	0.759	10.25	25.38	224	细胞核
MsG0880047345.01.T01	<i>MsGRF8</i>	0.446	7.30	42.14	370	细胞核

2.2 MsGRF 家族成员鉴定及系统发育分析

为了系统地揭示紫花苜蓿生长调节因子蛋白(MsGRF)、拟南芥生长调节因子蛋白(ArGRF)、大豆生长调节因子蛋白(GmGRF)、蒺藜苜蓿生长调节因子蛋白(MtGRF)、水稻生长调节因子蛋白(OsGRF)成员的进化关系,基于氨基酸序列的邻接法构建系统发育树(图 1)。通过对 MsGRF 与上述

不同植物蛋白质序列的同源比较分析,8 个 MsGRF、9 个 AtGRF、20 个 GmGRF、8 个 MtGRF、12 个 OsGRF,共 67 个生长调节因子蛋白可分为 5 个不同的亚家族。其中,C 组是数量最少的亚家族,包含 2 个成员,A 组是数量最多的亚家族,包含 18 个成员。对 MsGRF 进行分组,结果显示 A、B、D、E 亚家族分别包含 3、1、3、1 个成员。

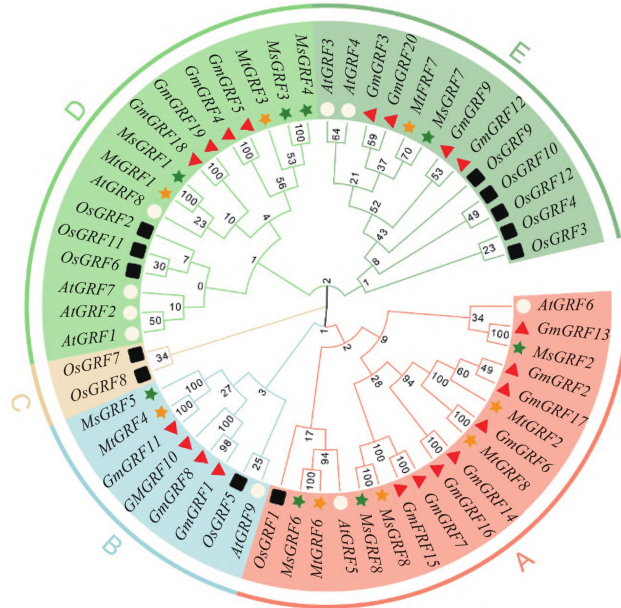


图1 紫花苜蓿 GRF 家族成员鉴定及系统发育分析

2.3 MsGRF 基因结构和蛋白质序列比对分析

由图 2 - A 可知,基因结构显示服务器 (GSDS) 预测 MsGRF 的外显子 - 内含子结构以深入了解紫花苜蓿在基因进化过程中的变异情况,结果表明, *MsGRF1* 拥有最多的内含子 (10 个),其他 MsGRF 成员外显子数量在 3 ~ 7 个,且内含子长度可达 2.8 kb;而所有的 MsGRF 成员皆含有 5 个或 6 个外显子。

为了更好地了解 GRF 蛋白序列的特征,对覆盖 QLQ 和 WRC 结构域的最保守区域进行了分析。结果表明,8 个 MsGRF 蛋白都具有相同的 QLQ 和 WRC 氨基酸序列,并且这 2 个结构域之间的序列高度保守,而 TQL 结构域仅存在于一些与拟南芥 GRF 成员相似的 MsGRF 成员 (*MsGRF1*、*MsGRF3*) C 端 (图 2 - B)。

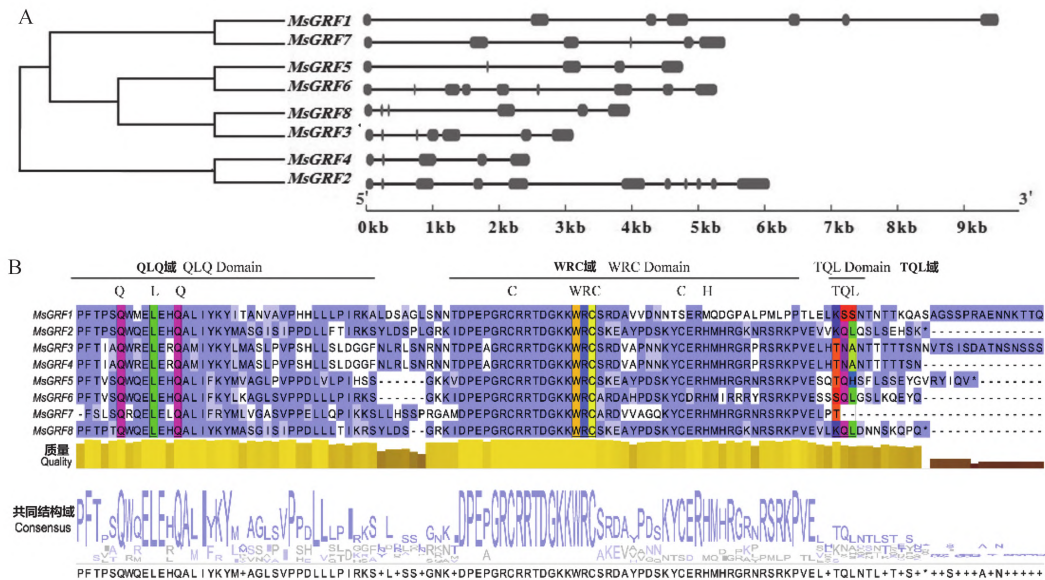


图2 紫花苜蓿 GRF 基因家族的基因结构和序列比对分析

2.4 MsGRF 启动子中的顺式元件分析

使用 PlantCARE 数据库分析了 8 个 MsGRF 基因的上游序列,分析结果表明,紫花苜蓿 GRF 启动子区域包含光照响应、MYB 转录因子、植物激素元

件 (ABA、GA、SA、Me - JA) 以及厌氧诱导元件等一系列元件 (图 3),这些顺式元素是响应非生物应激反应的重要组成部分。例如, *MsGRF7*、*MsGRF8* 含有与冷胁迫相关的顺式元件,而 *MsGRF8*、*MsGRF6*、

MsGRF2、*MsGRF1* 含有脱落酸 (ABA)、茉莉酸甲酯 (Me-JA)、水杨酸 (SA) 及赤霉素 (GA) 等激素反应元件; *MsGRF3*、*MsGRF4*、*MsGRF5* 的启动子特异地含有 1 个与分生组织表达相关的元件, 表明这些 GRF 基因可能与分生组织的生长发育有关。

2.5 *MsGRF* 的染色体定位分析

为确定紫花苜蓿生长调节因子基因在染色体

上的位置和相关基因扩增片段区域, 以 97% 序列相似性为标准将 *MsGRF* 映射到相应染色体锚定支架上, TBtools 可视化显示 8 个 *MsGRF* 均可被定位到 7 条染色体上 (图 4), 且不均匀地分布于不同染色体臂的远端区域。其中 7 号染色体拥有最多的 *MsGRF* (*MsGRF3*、*MsGRF4*), 其他染色体上均包含 1 个 *MsGRF*。

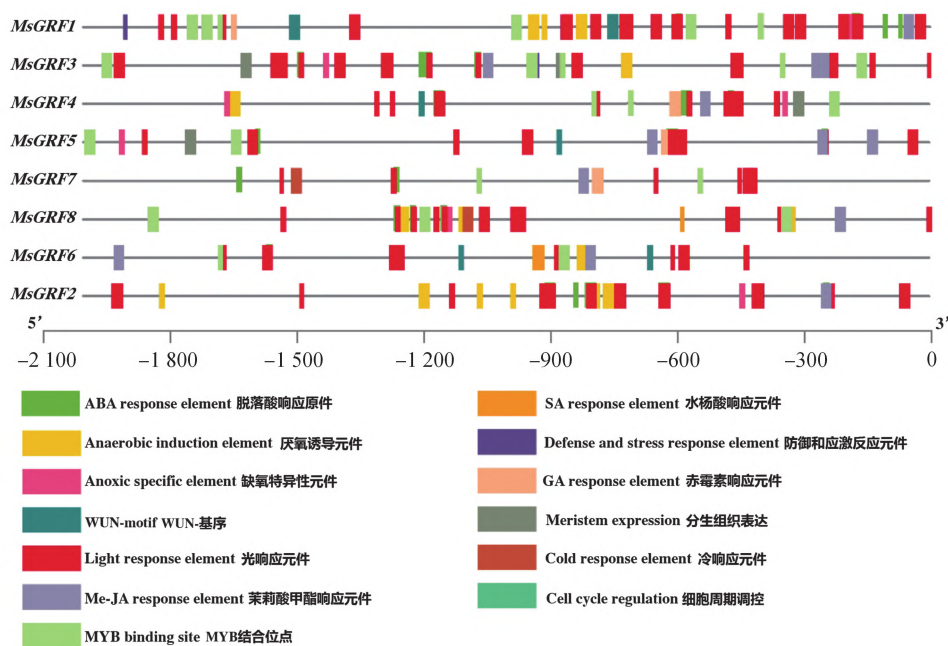


图3 紫花苜蓿 GRF 启动子顺式元件预测

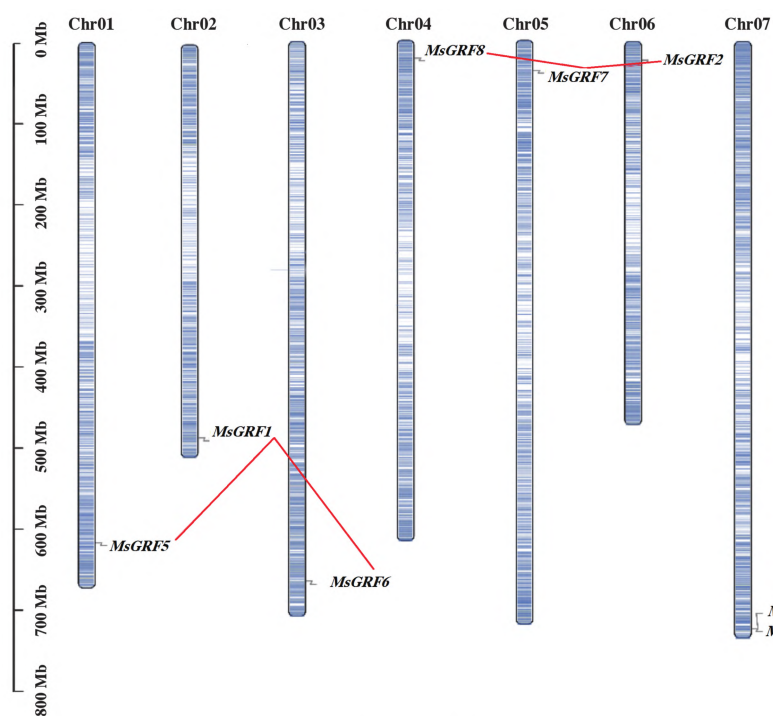


图4 *MsGRF* 的染色体定位

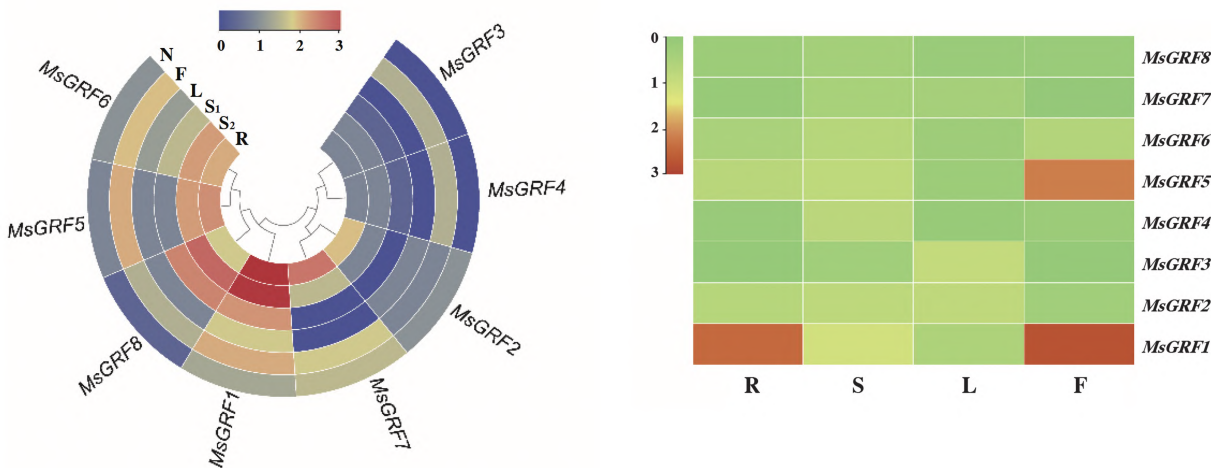
2.6 *MsGRF* 基因在不同组织中的 RNA-seq 表达谱分析

根据转录组数据分析了紫花苜蓿的 6 种组织,包括根瘤、花序、分枝茎、幼嫩茎、主茎、根系;其中, *MsGRF1* 在多种组织中表现出较高的表达水平,尤其是在根系和幼嫩茎中。3 个基因 (*MsGRF2*、*MsGRF3*、*MsGRF4*) 在所有组织中均具有相对较低的表达水平。*MsGRF7* 基因在根瘤中的表达水平高于其他基因。*MsGRF5*、*MsGRF6* 和 *MsGRF8* 在幼嫩茎和花序中的表达量比在其他组织中要高(图 5-A)。通过 qPCR 分析,发现 *MsGRF4* 在花中表现出最高的表达水平,这与图 5-A 的结果大体一致。分析表明, *MsGRF1* 基因在根系和花序中的表达水平远高于主茎和叶片,同时亦高于所有其他 *MsGRF*

基因(图 5-B)。

2.7 干旱胁迫下 *MsGRF* 基因的 RT-qPCR 分析

综合图 5 可知, *MsGRF* 在根系的表达水平较高,因此以根系为主要测定对象,探索了干旱胁迫下各基因的实时表达水平。由图 6 可知,在不同时间点(0、2、4、8、12、24 h)下不同 *MsGRF* 表达模式存在明显差异。其中, *MsGRF2*、*MsGRF4* 全部时间点中的表达水平皆较低。*MsGRF3*、*MsGRF5*、*MsGRF6*、*MsGRF7*、*MsGRF8* 在干旱处理 0 h 时处于较高水平,而后略微增加,而在干旱处理 24 h 后皆具有最低水平。就 *MsGRF1* 表达水平而言,干旱处理 0 h 时,表达水平较低,而在处理 2、4、8、12 h 中均保持较高的相对表达量(58.0~83.1),在处理 24 h 后,相对表达量降低,但仍处于较高水平(45.8)。



N、F、L、S₁、S₂、S、R 分别表示根瘤、花序、叶片、分枝茎、幼嫩茎、主茎、根系
图5 紫花苜蓿 GRF 基因的在不同组织中的转录表达谱



图6 干旱胁迫下 *MsGRF* 基因的 RT-qPCR 分析

3 讨论与结论

生长调节因子是植物特有的转录因子,可作用

调节早期植物形态发生和根部发育,在作物产量和抗性遗传改良中发挥着关键作用^[23]。本研究中,在紫花苜蓿中鉴定得到 22 个待定蛋白,多重序列比较

进一步发现仅 8 个 GRF 成员 (MsGRF) 同时含有完整的 QLQ 结构域和 WRC 基序。GRF 的数量因植物而异,一般而言,植物中 GRF 成员的数量在 8 ~ 27 个之间^[24]。以往的研究表明,大豆、水稻、番茄、玉米以及马铃薯中的 GRF 基因数量更多;植物物种间 GRF 基因数量的差异可能归因于基因的串联重复和片段复制。ExPASy 检测表明,MsGRF 蛋白质长度 224 ~ 516 aa,分子量 25.38 ~ 56.22 ku,所有的 MsGRF 成员均为疏水蛋白,且大多数成员呈碱性。亚细胞定位预测表明,除 MsGRF3、MsGRF5 位于细胞质外,其余 MsGRF 成员均位于细胞核中。

基因的结构和氨基酸结构是决定其转录水平与表达强弱的重要条件,基因结构已被确定为该基因可编辑性的重要特征之一^[25]。本研究中,所有的 MsGRF 成员的 QLQ 结构域和 WRC 基序皆存在于 N 末端(图 2 - B)。这一观察结果与水稻、拟南芥和大豆等模式植物^[12-16]观察到的结果一致。本研究发现 QLQ 和 WRC 的 N 末端结构是 MsGRF 家族的基本构架,但 TQL 结构域的 C 端仅存在于少数 MsGRF 成员中,因此推测 MsGRF 蛋白的功能多样性可能取决于 C 端结构域的多样性^[5]。本研究中,基因结构分析表明,不同 MsGRF 成员的外显子数量差异较小,但内含子数量差距较大(3 ~ 10 个);这与拟南芥的内含子特征相似,表明 MsGRF 的系统发育关系与其相应的基因结构和保守基序具有密切关系^[4]。内含子特征与基因进化有关,更多和更长的内含子往往存在于高表达的基因中,并可能导致基因的功能多样化^[26]。

基因表达受不同途径的顺式作用元件和反式作用因子的复杂相互作用调节^[27],之前的研究表明,生长调节因子基因可被不同的顺式元件模块诱导^[6,13,28]。本研究结果表明,MsGRF 基因的启动子包含各种应激反应元件,如冷反应、光诱导及植物激素元件。部分 MsGRF 成员基因启动子中还具有防御和应激反应元件、厌氧诱导以及植物激素 (ABA、GA、SA、Me - JA) 元件,这些结果表明 MsGRF 基因也可能通过介导活性氧代谢系统从而参与应对非生物胁迫及植物生长发育。据报道,与 AtGRF7 同源的基因可以结合 DREB2A 启动子并在非应激条件下抑制其表达。然而,值得注意的是,非生物胁迫会抑制 AtGRF7 表达,从而激活渗透胁迫响应基因^[29]。本研究中,MsGRF1、MsGRF3、MsGRF4 含有更多的 ABA 响应元件 (ABRE 元素) 并

且可能可以有效地响应渗透压。因此,MsGRF1、MsGRF3、MsGRF4 在调节苜蓿胁迫渗透压方面可能与 AtGRF7 具有相似的功能。

水资源短缺造成的干旱胁迫是影响全球植物生长的主要非生物胁迫类型^[30],因此提高植物(如紫花苜蓿)的干旱耐受性极其重要^[31]。本研究中,通过 RNA - seq 技术,发现幼嫩茎和根系中的 MsGRF 转录水平高于其他组织,且 qPCR 分析表明 MsGRF 在根系的转录水平较高。这些发现表明苜蓿中的 GRF 可能主要在调节种子发芽和根系发育过程中发挥作用。先前的研究已证实 GRF 可通过调节植物生长的复杂过程和对环境胁迫的反应来发挥作用^[29]。例如,干旱胁迫下,OsGRF1 可以调节赤霉素 (GA) 诱导的茎伸长和转录活性^[32]。对于干旱胁迫,综合而言根系比其他器官更敏感,因此基于实时荧光定量 (RT - qPCR) 分析了根系 MsGRF 对干旱胁迫的响应。结果表明,8 个 MsGRF 在干旱胁迫的不同时间点中均发生明显变化,但不同 MsGRF 的表达模式存在一定差异,表明 MsGRF 成员在物种进化过程中受到了不同程度的影响。其中在干旱处理 0 h 时,MsGRF1 相对表达量较低,此后的 24 h 内一直保持较高水平,表明 MsGRF1 在紫花苜蓿响应干旱胁迫反应中发挥关键作用。

本研究结果表明,从紫花苜蓿中共鉴定出 8 个 MsGRF,可分为 4 个亚家族,分布于 7 条染色体上。这些 MsGRF 在氨基酸序列、基序组成方面表现出高度相似性,在基因结构具有一定差异性。8 个 MsGRF 蛋白质的长度为 224 ~ 516 aa,分子量为 25.38 ~ 56.22 ku,绝大多数 MsGRF 为碱性蛋白且皆具有疏水性。基于 RNA - seq、qPCR 分析表明,MsGRF 主要在幼嫩部位和根系中具有较高的表达活性。RT - qPCR 分析表明,8 个 MsGRF 基因中,2 个 (MsGRF2、MsGRF4) 在干旱胁迫下无明显变化,6 个 (MsGRF1、MsGRF3、MsGRF5、MsGRF6、MsGRF7、MsGRF8) 在干旱处理 0 h 时较低,随着干旱处理时间的延长,呈被诱导上调表达而后降低;以 MsGRF1 表达水平最为显著,表明 MsGRF1 可能是耐旱的关键候选基因。研究结果为揭示 MsGRF 的进化和功能提供了理论依据,也为紫花苜蓿的育种改良提供了潜在靶点。

参考文献:

- [1] Meng L Y, Li X M, Hou Y, et al. Functional conservation and

- divergence in plant-specific GRF gene family revealed by sequences and expression analysis[J]. *Open Life Sciences*, 2022, 17(1): 155–171.
- [2] Lu J Y, Wang Z H, Li J X, et al. Genome-wide analysis of flax (*Linum usitatissimum* L.) growth-regulating factor (GRF) transcription factors[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(23): 17107.
- [3] 侯炳豪, 王鹏杰, 郭永春, 等. 茶树 GRF 转录因子的比较基因组学和杂种优势[J]. *应用与环境生物学报*, 2022, 28(6): 1477–1484.
- [4] Kim J H, Kende H. A transcriptional coactivator, *AtGIF1*, is involved in regulating leaf growth and morphology in *Arabidopsis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(36): 13374–13379.
- [5] 阮先乐, 王俊生, 刘红占, 等. 油菜 GRF 基因家族的鉴定和基本特征分析[J]. *分子植物育种*, 2018, 16(8): 2420–2428.
- [6] Liu H H, Guo S Y, Xu Y Y, et al. OsmiR396d-regulated OsGRFs function in floral organogenesis in rice through binding to their targets *OsJM1706* and *OsCR4*[J]. *Plant Physiology*, 2014, 165(1): 160–174.
- [7] 赵慧霞, 李凤霞, 郭瑞, 等. 辣椒属 GRF 基因家族全基因组鉴定和表达分析[J]. *园艺学报*, 2020, 47(11): 2145–2160.
- [8] Qin L, Chen H F, Wu Q F, et al. Identification and exploration of the GRF and GIF families in maize and foxtail millet[J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2022, 28(9): 1717–1735.
- [9] Du W X, Yang J F, Li Q, et al. Genome-wide identification and characterization of growth regulatory factor family genes in *Medicago* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(13): 6905.
- [10] 何彬, 王俞丹, 宋世威. miR396-GRF 模块参与植物逆境胁迫响应的研究进展[J]. *植物科学学报*, 2022, 40(3): 437–447.
- [11] Chen F, Yang Y Z, Luo X F, et al. Genome-wide identification of GRF transcription factors in soybean and expression analysis of GmGRF family under shade stress[J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 269.
- [12] Choi D, Kim J H, Kende H. Whole genome analysis of the OsGRF gene family encoding plant-specific putative transcription activators in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2004, 45(7): 897–904.
- [13] 杜雨, 刘筠, 胡晓桐, 等. 黑果枸杞 GRF 转录因子家族鉴定与生物信息学分析[J]. *草地学报*, 2022, 30(6): 1403–1412.
- [14] 赵训超, 盖胜男, 魏玉磊, 等. 玉米生长调节因子 (GRF) 家族的全基因组鉴定及在非生物胁迫下的表达研究[J]. *玉米科学*, 2020, 28(4): 33–40, 47.
- [15] 石蒙蒙, 王德颖, 谢浩杰, 等. 马铃薯 GRF 基因家族的鉴定和表达模式分析[J/OL]. *基因组学与应用生物学*, [2024-02-19]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/45>.
- [16] Chen H L, Ge W N. Identification, molecular characteristics, and evolution of GRF gene family in foxtail millet (*Setaria italica* L.) [J]. *Frontiers in Genetics*, 2022, 12: 727674.
- [17] 王晓雨, 于鑫, 沈禹颖, 等. 整合分析施肥类型对中国北方紫花苜蓿产量和营养品质的影响[J]. *草业科学*, 2023, 40(1): 208–217.
- [18] 孙洪仁, 王显国, 卜耀军, 等. 我国紫花苜蓿土壤有效磷丰缺指标与推荐施磷量[J]. *中国农业大学学报*, 2022, 27(5): 199–215.
- [19] 张德, 龙会英. 8 个紫花苜蓿品种在干热区生产性能和营养价值评价[J]. *中国草地学报*, 2024, 46(1): 70–77.
- [20] Sun Y, Li H, Wu J J, et al. Genome-wide identification of growth-regulating factor transcription factor family related to leaf and stem development in alfalfa [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 964604.
- [21] Chen C J, Chen H, Zhang Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194–1202.
- [22] 苏倩, 杜文宣, 马琳, 等. 紫花苜蓿 *MsCIPK2* 的克隆及功能分析[J]. *中国农业科学*, 2022, 55(19): 3697–3709.
- [23] 吴秀兰, 彭华丹, 唐文武. 白菜 GRF 转录因子家族全基因组鉴定、进化及表达模式分析[J]. *分子植物育种*, 2023, 21(24): 8013–8019.
- [24] Liu Y T, Guo P, Wang J, et al. Growth-regulating factors: conserved and divergent roles in plant growth and development and potential value for crop improvement[J]. *The Plant Journal*, 2023, 113(6): 1122–1145.
- [25] 张雪莹, 刘欣. 转录因子与叶片发育的研究进展[J]. *植物生理学报*, 2022, 58(1): 91–100.
- [26] Ren X Y, Vorst O, Fiers M W E J, et al. In plants, highly expressed genes are the least compact [J]. *Trends in Genetics*, 2006, 22(10): 528–532.
- [27] 杨林林, 韩敏琦, 高嘉, 等. 小麦超氧化物歧化酶基因家族鉴定及盐胁迫下响应钾的表达分析[J]. *山东农业科学*, 2023, 55(8): 11–20.
- [28] 石欣玥, 尚晓尧, 周玲芳, 等. 紫花苜蓿转录因子基因 *MsAP2* 的克隆及转化[J]. *生物技术通报*, 2021, 37(12): 13–21.
- [29] Kim J S, Mizoi J, Kidokoro S, et al. *Arabidopsis* growth-regulating factor7 functions as a transcriptional repressor of abscisic acid- and osmotic stress-responsive genes, including *DREB2A* [J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(8): 3393–3405.
- [30] 王凯悦, 陈芳泉, 黄五星. 植物干旱胁迫响应机制研究进展[J]. *中国农业科技导报*, 2019, 21(2): 19–25.
- [31] 卢前成, 宁松瑞, 颜安, 等. PEG-6000 干旱胁迫下 18 种牧草种子萌发特性与响应机制[J]. *江苏农业科学*, 2023, 51(22): 180–190.
- [32] Gao F, Wang K, Liu Y, et al. Blocking miR396 increases rice yield by shaping inflorescence architecture [J]. *Nature Plants*, 2015, 2: 15196.