

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2026.01.004

引用格式:李迪娜,王凯,陶佳丽,等.偏关苜蓿*MsMYB44*基因的克隆、亚细胞定位及表达分析[J].草地学报,2026,34(1):33-42

LI Di-na, WANG Kai, TAO Jia-li, et al. Cloning, Subcellular Localization and Expression Analysis of *MsMYB44* Gene of *Medicago sativa* 'Pianguan' [J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34(1):33-42

偏关苜蓿 *MsMYB44* 基因的克隆、亚细胞定位及表达分析

李迪娜¹, 王 凯¹, 陶佳丽^{1,2}, 许 涛¹, 李青秀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: MYB(V-myb Avian myeloblastosis viral Oncogene Homolog)基因家族是植物中最大的转录因子家族之一,广泛参与植物的生长发育和逆境胁迫等过程。本研究以‘偏关’苜蓿(*Medicago sativa* ‘Pianguan’)为材料,通过基因克隆、生物信息学分析、亚细胞定位及表达模式分析来探究*MsMYB44*基因的特性。结果显示:‘偏关’苜蓿*MsMYB44*基因长966 bp,共编码321个氨基酸。*MsMYB44*蛋白与蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)MtMYB44蛋白高度同源且定位于细胞核内。*MsMYB44*基因在‘偏关’苜蓿不同生育期的不同部位均有表达,表现出组织表达特异性。*MsMYB44*基因对干旱、盐胁迫及ABA处理均有响应。干旱胁迫下,*MsMYB44*相对表达量呈现出先升高后降低再升高的趋势,并在12 h时达到峰值;盐胁迫下,*MsMYB44*相对表达量在48 h后逐渐升高,且在72 h时达到最高值;ABA处理下,*MsMYB44*在12 h时相对表达量最高,随后逐渐降低。研究结果有望为阐释*MsMYB44*基因调控紫花苜蓿非生物胁迫响应机制提供一定理论参考。

关键词: *MsMYB44*; ‘偏关’苜蓿; 克隆鉴定; 亚细胞定位; 表达模式; 非生物胁迫

中图分类号: Q943

文献标识码: A

文章编号: 1007-0435(2026)01-0033-10

Cloning, Subcellular Localization and Expression Analysis of *MsMYB44* Gene of *Medicago sativa* ‘Pianguan’

LI Di-na¹, WANG Kai¹, TAO Jia-li^{1,2}, XU Tao¹, LI Qing-xiu¹, ZHU Hui-sen^{1*}, CEN Hui-fang¹

(1. College of Grassland Science, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi Province 030801, China;

2. Department of Mining Engineering, Shanxi Institute of Technology, Yangquan, Shanxi Province 045000, China)

Abstract: The MYB (V-myb Avian myeloblastosis viral Oncogene Homolog) gene family represents one of the most extensive groups of transcription factors in plants, playing a crucial role in various processes including plant growth, development, and stress responses. This study utilized *Medicago sativa* ‘Pianguan’ to investigate the characteristics of the *MsMYB44* gene through methodologies such as gene cloning, bioinformatics analysis, subcellular localization, and expression pattern analysis. The findings revealed that the *MsMYB44* gene of *Medicago sativa* ‘Pianguan’ comprised 966 base pairs and encoded a total of 321 amino acids. The *MsMYB44* protein exhibited a high degree of homology to the MtMYB44 protein in *Medicago truncatula* and was localized within the nucleus. The expression of the *MsMYB44* gene was observed in various tissues of *Medicago sativa* ‘Pianguan’ across different developmental stages, indicating tissue-specific expression patterns. The *MsMYB44* gene was responsive to drought, salt stress, and abscisic acid (ABA) treatment. Under drought conditions, the relative expression level of *MsMYB44* initially increased, subsequently decreased, and

收稿日期: 2024-12-27; 修回日期: 2025-03-30

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

作者简介: 李迪娜(1999-), 女, 汉族, 黑龙江哈尔滨人, 硕士研究生, 主要从事牧草种质资源与育种相关研究, E-mail: 13354593936@163.com; *通信作者 Author for correspondence, E-mail: zhuhuisen@126.com

then increased again, peaking at 12 hours. In response to salt stress, the relative expression level of *MsMYB44* gradually increased after 48 hours, reaching its maximum at 72 hours. Following ABA treatment, the relative expression level of *MsMYB44* peaked at 12 hours and then progressively declined. These findings would provide a theoretical framework for elucidating the role of the *MsMYB44* gene of *Medicago sativa* in mediating the abiotic stress response.

Key words: *MsMYB44*; *Medicago sativa* ‘Pianguan’; Cloning identification; Subcellular localization; Expression pattern; Abiotic stress

全球气候不断变化,自然灾害频发,加剧了非生物胁迫对植物的不利影响^[1]。据统计,干旱和土壤盐分被认为是影响植物生存的主要因素^[2]。在我国,干旱/半干旱区占国土面积的42%,盐碱地规模近 $1 \times 10^6 \text{ km}^2$ 约占世界总量的1/10,严重威胁我国农业生产及种质安全^[3-4]。为应对这一挑战,迫切需要挖掘优良抗逆基因并进行新种质创新^[5-6],而转录因子(Transcription factor, TF)作为关键的调控元件,在这一过程中扮演着至关重要的角色。

转录因子又称反式作用因子,通过结合特定基因转录调控区域来调节靶基因表达,参与植物的多种生物过程并发挥重要作用^[7]。MYB转录因子家族是植物中数量最多的转录因子家族,在N末端存在高度保守的DNA结合结构域,根据MYB结构域的数量,可将其分为1R-MYB, R2R3-MYB, 3R-MYB, 4R-MYB 4个亚家族^[8],其中R2R3-MYB是最大的MYB亚家族,在植物生长发育和非生物胁迫响应中起调控作用^[9-11]。盐胁迫下, *AtMYB30*可与 *AOX1a* 启动子结合进而促进 *AOX1a* 基因表达,以维持细胞稳态,从而增强植物耐盐性^[12]。在文冠果(*Xanthoceras sorbifolium* Bunge)中过表达 *XsMYB44* 基因,以及在大白菜(*Brassica campestris*)中过表达 *BcMYB44* 基因,均可显著提升植物的渗透调节功能和活性氧(Reactive oxygen species, ROS)稳态,从而有效增强这两种植物的抗旱性^[13-14]。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中过表达橡胶(*Hevea brasiliensis*) *HbMYB44* 可以显著增强其对于干旱胁迫的耐受性^[15]。Jung等研究发现,在拟南芥中 *MYB44* 基因通过增强对ABA(Abscissic acid, ABA)的敏感性来参与调控种子萌发和气孔关闭过程,从而提高植株的耐旱性^[16]。除此之外, R2R3-MYB转录因子对高温、磷酸盐及氮胁迫也均有响应^[17-19],在多种非生物胁迫方面发挥着不可替代的作用。

紫花苜蓿作为世界范围内广泛种植的优质豆科牧草,富含蛋白质等营养成分,牛羊喜食。有报道, *MsMYB4*, *MsMYB58*, *MsMYB144* 等转录

因子分别参与紫花苜蓿盐胁迫^[20]、干旱胁迫^[21]、冷胁迫响应^[22]等过程。MYB44转录因子在拟南芥中通过调控种子萌发和气孔关闭过程提高抗旱性^[15],在大白菜中通过增强渗透调节功能和活性氧稳态发挥抗旱作用^[14],同时在陆地棉中被证实可参与ABA信号通路传导响应逆境胁迫^[23],但在紫花苜蓿中尚未见相关研究报道。‘偏关’苜蓿是山西农业大学畜牧研究所和偏关县畜牧局选育登记的地方紫花苜蓿品种,具有抗寒性强、耐瘠薄、产量高、营养价值高等特点^[24-25],常用作优质人工草地建植和退化草地植被重建的优质种源。本研究在课题组前期开展的‘偏关’苜蓿抗旱功能基因挖掘及调控机制研究基础上,采用基因克隆、生物信息学分析、亚细胞定位、实时荧光定量等手段,系统解析‘偏关’苜蓿 *MsMYB44* 基因的生物学功能,旨在为紫花苜蓿新种质创制提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料的准备

本试验中‘偏关’苜蓿和本氏烟草(*Nicotiana tabacum*)种子由山西农业大学草业学院牧草种质资源库提供。从中挑选籽粒饱满的种子分别种植于蛭石与营养土(按1:1比例混合)配制的基质中,在温度为25℃,相对湿度为60%,光周期为16 h光照/8 h黑暗的条件下进行培养,每隔1周浇1次Hoagland营养液。待‘偏关’苜蓿生长至1月龄时,随机选取生长良好的植株叶片,液氮速冻,-80℃冰箱保存,用于目的基因的克隆。同时分别使用含500 mmol·L⁻¹甘露醇的Hoagland营养液、含250 mmol·L⁻¹ NaCl的Hoagland营养液以及含80 μmol·L⁻¹ ABA的Hoagland营养液进行胁迫处理,每个处理设置3个生物学重复,分别在处理的第0 h, 0.5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h和72 h取植株相同部位的成熟叶片进行荧光定量检测。待苜蓿植株处于幼苗期、分枝前期、分枝中期、分枝后期、开花期、结荚期时,分别收集其子叶、真叶、复叶、根、茎、花、种荚等各

部位样品,检测 *MsMYB44* 基因在‘偏关’苜蓿不同生育时期不同部位的相对表达量。待烟草长至 1 月龄有 4~6 个叶片时,选取叶片饱满大小一致的烟草植株进行亚细胞定位实验。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计 登录 NCBI 检索并下载‘中苜一号’紫花苜蓿 *MYB44* 基因的 CDS 序列,使用 Primer 5.0 软件,按照序列设计扩增引物 MYB44-

F/R 及荧光定量引物 RT-MYB44-F/R,分别用于 *MsMYB44* 基因的 PCR 扩增及表达量的检测。进行定量检测时以紫花苜蓿 *Actin* 基因作为内参,荧光定量引物为 RT-Actin-F/R。同时结合亚细胞定位载体序列,设计带有同源臂的扩增引物 MYB44-eGFP-F/R,用于 *MsMYB44* 亚细胞定位载体的构建。M13-F/R 为通用鉴定引物,eGFP-F/R 为重组载体的鉴定引物,分别用于 *MsMYB44* 基因的测序鉴定和重组载体鉴定。引物序列见表 1。

表 1 扩增引物及序列
Table 1 Amplification primer and sequence

引物 Primer name	序列 Sequence (5'—3')
MYB44-F	ATGGATCGGATCAAAGGTCCAT
MYB44-R	TTACGAATCGATTCTGCTAATTCC
M13-F	GTTGTAAAACGACGGCCAG
M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC
MYB44-eGFP-F	AATTACTATTTACAATTACGGATCATGGATCGGATCAAAGGTCCAT
MYB44-eGFP-R	CAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATCGAATCGATTCTGCTAATTCC
eGFP-F	CTCAAGCAATCAAGCATTCTAC
eGFP-R	TGTAACCTCCTCACCTCTG
RT-Actin-F	CAAAAGATGGCAGATGCTGAGGAT
RT-Actin-R	CATGACACCAGTATGACGAGGTCG
RT-MYB44-F	GTTAGTGCTGGTGCTGCTATTCC
RT-MYB44-R	TACGCTGGACTCGCTCACATC

1.2.2 *MsMYB44* 基因克隆 选取 1 月龄长势良好的‘偏关’苜蓿植株叶片,采用北京华越洋生物科技有限公司 RNA 提取试剂盒提取叶片总 RNA,将其反转录为 cDNA,扩增 *MsMYB44* 基因。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测鉴定后进行纯化回收。将纯化产物与克隆载体 pTOPO001 连接,并将其导入 DH5 α 感受态细胞中,复苏 1 h 后吸取菌液涂布于含 50 mg·L⁻¹ 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上,37℃ 倒置培养 12~16 h,筛选阳性单克隆菌,菌液 PCR 鉴定后送上海生工生物有限公司进行测序。

1.2.3 *MsMYB44* 基因生物信息学分析 利用 NCBI 中 BLAST 对 *MsMYB44* 的核酸序列及编码氨基酸进行比对分析,通过在线分析工具: SMART, ExPASy, SignalP, SOPMA, SwissModel, PSORT 等对 *MsMYB44* 氨基酸组成及理化性质、蛋白结构、亚细胞定位等进行预测分析。

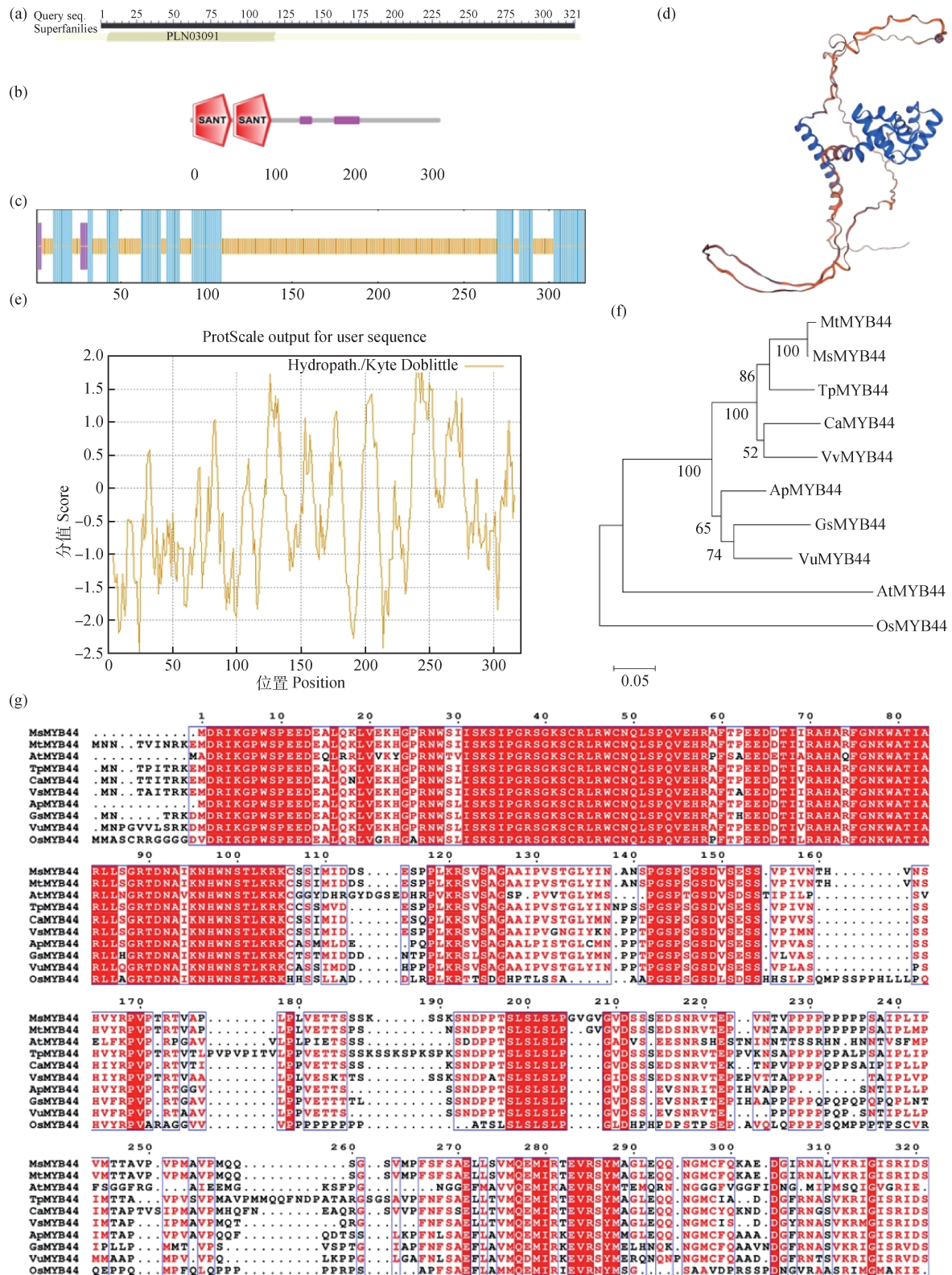
1.2.4 重组质粒构建 以基因克隆质粒 pTOPO001-*MsMYB44* 为模板,利用引物 MYB44-eGFP-F/R 进行扩增,将符合预期大小的条带切胶纯化回收并连接 PEG100 载体(pEarleyGate100 为

农杆菌双元表达载体,用于构建 *MsMYB44* 亚细胞定位载体)。将重组质粒导入感受态细胞 DH5 α ,挑取阳性单克隆菌进行培养,鉴定无误后提取质粒 PEG100-*MsMYB44*-eGFP,置于 -20℃,备用。

1.2.5 *MsMYB44* 蛋白亚细胞定位 利用冻融法将重组质粒 PEG100-*MsMYB44*-eGFP 转入农杆菌感受态细胞 GV3101 中进行培养,OD600 为 0.6~0.8 时用注射器将菌液注射到 1 月龄的烟草叶片下表皮细胞中,避光培养 48 h。将叶片制成玻片,在激光共聚焦显微镜下观察,根据 eGFP 荧光信号的分布情况确定目的基因所在位置。

1.2.6 *MsMYB44* 表达的组织特异性及非生物胁迫响应分析 将保存备用的植物样品,提取总 RNA 并反转录成 cDNA,以 cDNA 为模板,紫花苜蓿 *Action* 基因为内参,利用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算在不同非生物胁迫处理下 *MsMYB44* 基因的相对表达量。

1.2.7 数据处理 数据使用 Excel 和 SPSS 软件进行单因素方差分析,处理间的差异性由 0.05 水平上的 Duncan 分析方法评价,最后利用 Origin 软件作图。

图 3 ‘偏关’苜蓿 *MsMYB44* 基因的生物信息学分析Fig. 3 Bioinformatics analysis of *M. sativa* ‘Pianguan’ *MsMYB44* gene

注: (a) 氨基酸保守序列分析; (b) 基因编码蛋白保守结构域; (c) 蛋白二级结构预测; (d) 蛋白三级结构预测; (e) 蛋白亲疏水性预测; (f) *MsMYB44* 系统发育分析; (g) *MsMYB44* 蛋白序列比对

Note: (a) The amino acid conservative sequence analysis; (b) Gene coding protein conserved domain; (c) Prediction of protein secondary structure; (d) Prediction of protein tertiary structure; (e) Prediction of protein hydrophilicity; (f) Phylogenetic analysis of *MsMYB44*; (g) Sequence alignment of *MsMYB44* protein

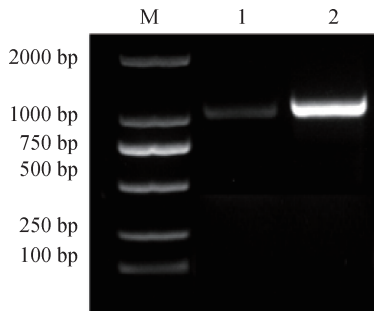


图4 重组载体菌液PCR

Fig. 4 Bacterial culture PCR of recombinant vector

注: M为2000 DNA Marker; 1为亚细胞定位重组质粒鉴定结果; 2是扩增MYB44片段结果, 为阳性对照

Note: M stands for the 2000 DNA Marker; 1 the results of identification of recombinant plasmid primers for subcellular localization; 2 is the result of amplifying the MYB44 fragment, which is a positive control

eGFP质粒的烟草只在细胞核内显示绿色荧光, 表明MsMYB44蛋白定位于细胞核内(图5)。

2.5 MsMYB44基因表达模式分析

实时荧光定量PCR结果显示, ‘偏关’苜蓿处于不同生育时期时MsMYB44基因在不同部位均有表达, 但表达量有所差别(图6a-6f)。在幼苗期, MsMYB44基因在子叶中表达量最高, 在茎中表达量最低。进入分枝期后, MsMYB44基因高表

达的部位会发生变化, 由分枝前期在子叶中表达量最高, 变为分枝中期在根中表达量最高, 最后变为分枝后期在茎中表达量最高。在开花期, MsMYB44基因在花中高表达, 在复叶中低表达。之后进入结荚期时, MsMYB44基因会变化为在复叶中高表达。从中可以看出MsMYB44基因从幼苗期到结荚期的整个过程均有表达, 且表达具有特异性。为深入探究MsMYB44基因可能具有的功能, 本研究检测了在不同非生物胁迫处理下MsMYB44基因的相对表达量。结果显示, 干旱、盐和ABA处理均能诱导MsMYB44基因表达, 并响应抗逆调控过程。干旱胁迫处理下, MsMYB44基因的相对表达量呈先上升后下降再上升的趋势, 其中12 h的表达量显著高于72 h的表达量($P < 0.05$)(图7a)。盐胁迫处理0~24 h, MsMYB44基因的相对表达量无明显变化, 但在24~72 h表达量呈现逐渐上升的趋势(图7b)。ABA处理下, MsMYB44基因的相对表达量呈现先上升后下降的趋势, 12 h的表达量最高且显著高于0 h($P < 0.05$), 而后随着处理时间的延长MsMYB44基因的相对表达量呈现下降趋势(图7c)。以上结果表明MsMYB44基因可能参与调控‘偏关’苜蓿对干旱、盐、ABA处理的响应。

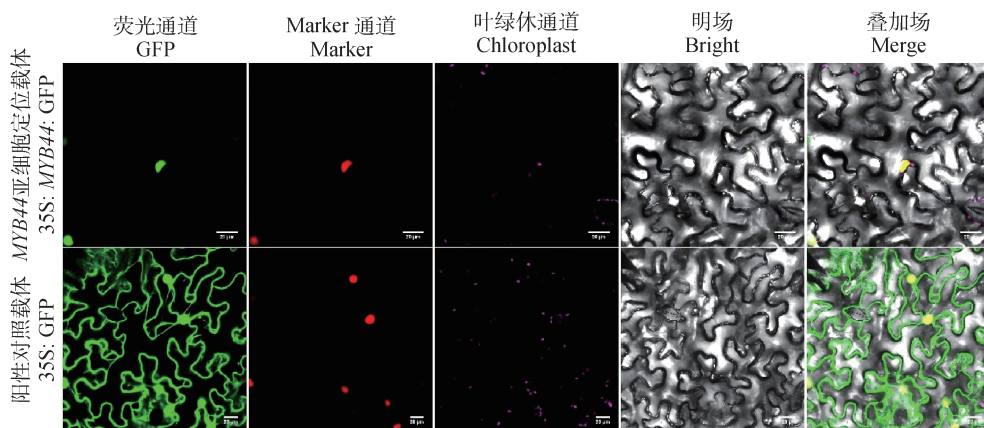


图5 MsMYB44蛋白亚细胞定位

Fig. 5 Subcellular localization of MsMYB44 protein

3 讨论

3.1 MYB44转录因子的理化性质

MYB转录因子家族是高度保守的DNA结合蛋白, 含有MYB结构域, 能够形成螺旋-转角-螺旋(Helix-turn-helix, HTH)结构, 从而准确结合靶基因^[26-27]。Grune等发现MYB结构域与SANT结构为

同系物, 具有相似功能^[28]。本研究从‘偏关’苜蓿中成功克隆到MsMYB44基因, 进行保守结构域分析发现MsMYB44蛋白的N端含有2个SANT结构域, 具有HTH构型, 与拟南芥AtMYB44^[29]、茄子(Solanum melongena)SmMYB44^[30]、陆地棉GhMYB44^[31]等转录因子基因所编码的蛋白质结构相似, 均属于R2R3-MYB类转录因子。为了进一步明确

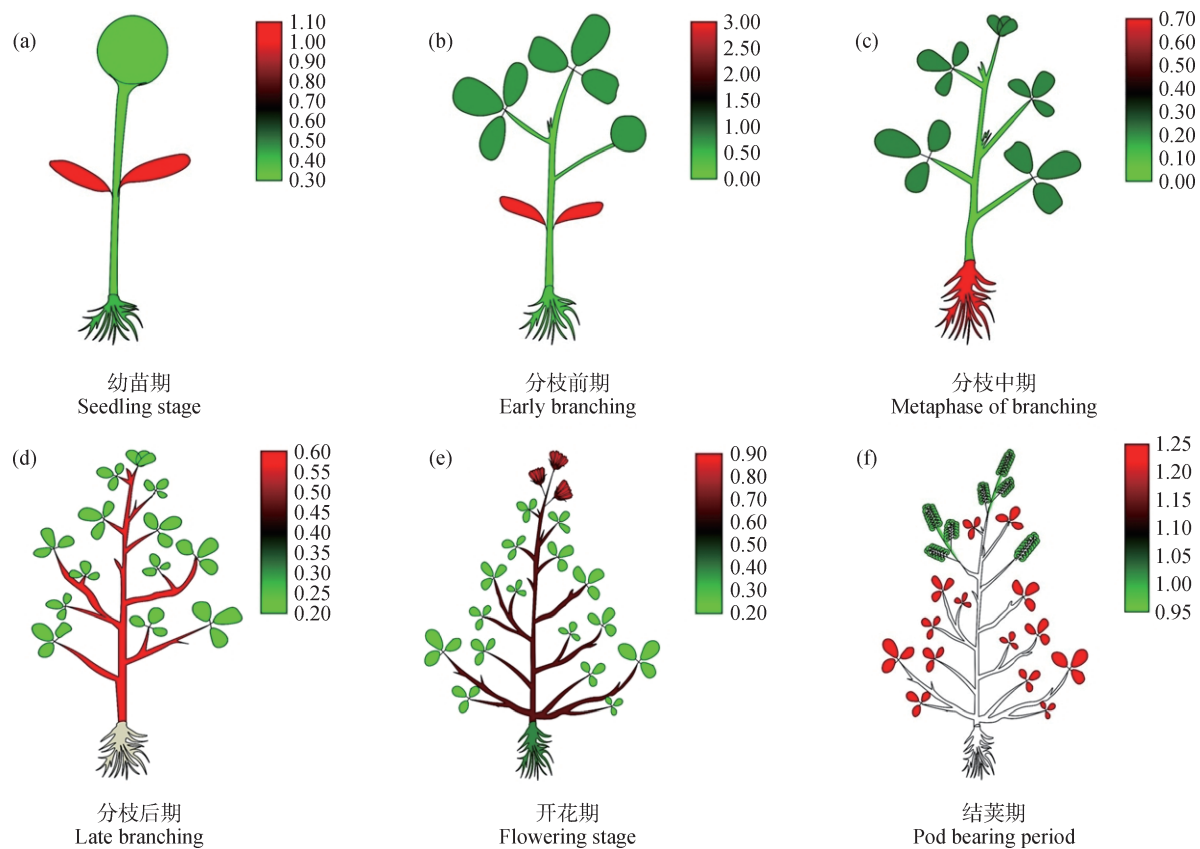


图 6 *MsMYB44* 基因各生育期不同组织部位的差异表达量

Fig. 6 The differential expression levels of the *MsMYB44* gene in different tissue parts at each growth stage

注: (a) 幼苗期; (b) 分枝前期; (c) 分枝中期; (d) 分枝后期; (e) 开花期; (f) 结荚期

Note: (a) Seedling stage; (b) Early branching; (c) Metaphase of branching; (d) Late branching; (e) Flowering stage; (f) Pod bearing period

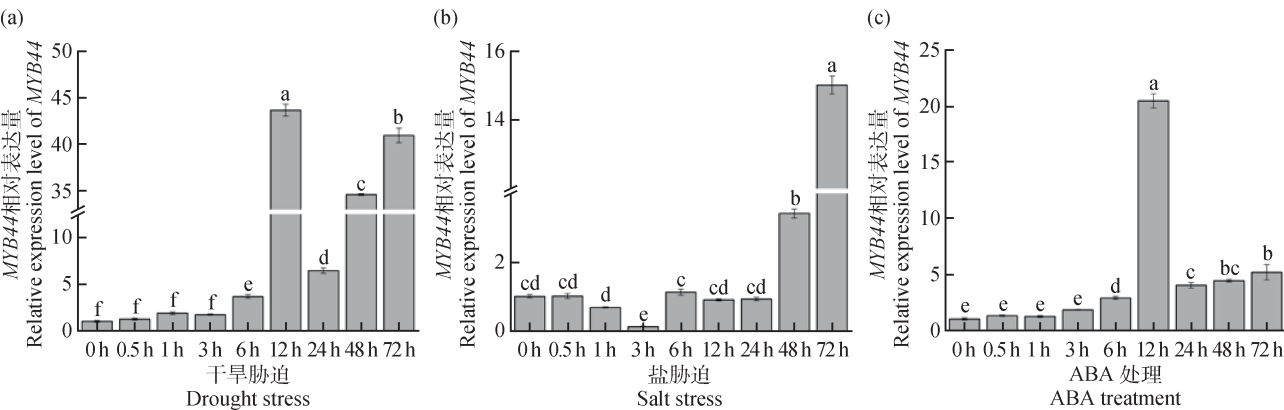


图 7 *MsMYB44* 基因不同处理下的相对表达量

Fig. 7 The relative expression levels of the *MsMYB44* gene under different treatments

注: 图中不同小写字母者表示差异显著 ($P < 0.05$)

Note: Different lowercase letters in the figure indicate significant differences ($P < 0.05$)

MsMYB44 蛋白理化性质, 本研究对该蛋白进行了预测, 结果显示 *MsMYB44* 蛋白属于亲水性不稳定蛋白, 无信号肽, 具备典型的转录因子特性。根据亚细胞定位结果可知, ‘偏关’ 苜蓿 *MsMYB44* 蛋白

定位于细胞核, 与前人对草地早熟禾 (*Poa pratensis*) *PpMYB2*^[32]、番茄 (*Solanum lycopersicum*) *SlMYB44*^[33]、甘蔗 (*Saccharum* spp.) *ScMYB52-1*^[34] 等蛋白的研究结果一致, 为核定位型转录因子。

3.2 MYB44基因的表达式

基因的表达模式与其功能密切相关,同一个基因往往在植物不同生育期的各个部位中有不同程度的表达,以发挥不同功能。在幼苗期,植物的抗逆调控基因一般在根中高表达,有助于植物提高对水分和养分的吸收能力,从而增强幼苗对干旱等胁迫的抵抗力;进入分枝期后,抗逆调控基因往往在叶片中的表达量显著增加,有利于促进叶片细胞内抗氧化酶的活性,降低活性氧的积累,保护细胞膜的完整性,有效减轻胁迫对光合作用的影响。此外,在结荚期,抗逆调控基因常在花和果实中高表达,有助于植物在逆境条件下维持正常的生殖生长,确保种子的形成和成熟,从而保证了植物种群的繁衍和生态系统的稳定。随着研究的不断深入,大量结果表明,MYB44基因在不同植物不同部位中有不同程度的表达,如烟草 *NtMYB44b*^[35]、文冠果 *XsMYB44*^[13]、花生 (*Arachis hypogaea*) *AhMYB44*^[36]、草地早熟禾 *PpMYB44*^[27]等基因在根、茎、叶、花中均有表达,但表达量存在差异。本研究中通过定量分析可知‘偏关’苜蓿 *MsMYB44* 基因在根、茎、叶、花、种荚中也均有表达,且在不同生育时期高表达的部位不同,表明 *MsMYB44* 基因的表达具有组织特异性。

3.3 MYB44基因响应非生物胁迫

MYB转录因子基因可响应多种非生物胁迫过程^[37]。有研究发现在蓝莓 (*Vaccinium* spp.)、牛耳朵 (*Primulina eburnean*)等植物中有多个对干旱胁迫显著响应的MYB基因参与调控过程^[38-39]。烟草中异源过表达 *MsMYB58*可增强干旱胁迫下转基因烟草的光合能力和抗氧化能力,从而显著提高转基因烟草的抗旱性^[21]。在拟南芥中过表达野草莓 (*Fragaria vesca*) *FvMYB24* 和猕猴桃 (*Actinidia chinensis*) *AcMYB3R* 基因能够上调盐胁迫或应激反应相关基因的表达,从而提高转基因拟南芥的耐盐性^[40-41]。另外,MYB转录因子也可以通过ABA依赖性途径调控基因表达,如杨树 (*Populus* spp.) 在干旱条件下,R2R3型MYB转录因子基因 *PtrMYB94* 受到外源ABA诱导后转录活性提高,并增强了ABA和干旱相关基因的表达^[42]。在蒺藜苜蓿中,经盐和干旱胁迫后 *MtMYB16* 基因表达量会显著增加。当前蒺藜苜蓿研究多关注其他MYB转录因子,MYB44转录因子研究尚未报道。不过,已有文献表明R2R3型MYB转录因子MYB44在部分植物

胁迫应答中起作用,为后续紫花苜蓿MYB44的研究奠定了基础^[43]。在花生根部和拟南芥中,干旱胁迫可分别诱导 *AtMYB44* 及 *AhMYB44* 基因表达,从而提高植物本身的抗旱性^[44-45]。本研究结果与 *AtMYB44* 及 *AhMYB44* 的结果相似,干旱胁迫下 *MsMYB44* 表达量显著升高,且在胁迫处理12 h时表达量达到最高,说明干旱胁迫可能诱导了‘偏关’苜蓿MYB44基因表达,从而参与抗逆调控过程。在NaCl胁迫下, *AtMYB44* 可以通过降低蛋白磷酸酶2C (Protein phosphatase 2C) 活性来增强植物的耐盐性。由此推测非生物胁迫条件下,植物组织或细胞被破坏时,可以通过MYB44基因大量表达来激活或抑制相关酶活性抵御胁迫^[11]。本研究中盐胁迫同样可以显著诱导 *MsMYB44* 表达,且在胁迫处理72 h时表达量达到最高。ABA作为植物激素,在植物适应逆境胁迫及表达调控基因等方面有重要作用。Li等对核桃 (*Juglans regia*) MYB基因在ABA处理下的表达模式进行分析,发现在外源ABA诱导下, *JrMYBs* 的表达量明显升高^[46]。本研究在ABA处理下, *MsMYB44* 基因的表达量显著上调且在胁迫处理12 h时表达量达到最高。综上所述,在非生物胁迫和激素处理下, *MsMYB44* 转录水平显著升高,这表明 *MsMYB44* 在苜蓿逆境调控过程中发挥重要作用。后续研究中可以制备过表达载体,通过遗传转化技术对‘偏关’苜蓿进行基因改造,以增强 *MsMYB44* 基因的表达,在分子层面探讨 *MsMYB44* 基因的作用,进而评估其对‘偏关’苜蓿逆境耐受性的影响;同时也可以利用酵母双杂交等实验来鉴定与 *MsMYB44* 相互作用的蛋白质,以揭示其潜在的靶点。

4 结论

本研究成功克隆得到‘偏关’苜蓿 *MsMYB44* 基因,该基因全长996 bp,编码321个氨基酸。生物信息学分析结果预测 *MsMYB44* 蛋白为亲水性不稳定蛋白,位于细胞核内,与蒺藜苜蓿 *MtMYB44* 蛋白高度同源。 *MsMYB44* 基因从幼苗期到结荚期的整个生育期中均有表达,且表达具有组织特异性,表明其在植物生长发育过程中可能发挥重要作用。此外,该基因对干旱、盐胁迫以及ABA处理均有响应,推测其在植物逆境响应过程中扮演重要角色。

参考文献

- [1] CHAUDHRY S, SIDHU G P S. Climate change regulated abiotic stress mechanisms in plants: a comprehensive review [J]. Plant Cell Reports, 2022, 41(1): 1-31
- [2] SINGH A K, GUPTA K J, SINGLA-PAREEK S L, et al. Raising crops for dry and saline lands: challenges and the way forward[J]. Physiologia Plantarum, 2022, 174(3): e13730
- [3] WU B F, FU Z J, FU B J, et al. Dynamics of land cover changes and driving forces in China's drylands since the 1970s [J]. Land Use Policy, 2024(140): 107097
- [4] WANG G Z, NI G, FENG G. Saline-alkali soil reclamation and utilization in China: progress and prospects[J]. Frontiers of Agricultural Science and Engineering, 2024, 2(11): 216-228
- [5] FU C B, MA Z G. Progress and reflection on the study of inter-decadal changes in dry and wet conditions in global arid and semiarid regions [J]. Transactions of Atmospheric Sciences, 2023, 46(4): 481-490
- [6] GUO W, XUE S, ZHANG Z C, et al. Research progress on bioremediation of saline-alkali grassland: a review[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(7): 200-208
- [7] GUAN F Y, ZHENG Y Y, MI X Y, et al. Research advance of the functions of R2R3-MYB transcription factors in plant response to biotic and abiotic stresses [J]. Plant Health and Medicine, 2024, 3(3): 1-9
- [8] FANG Q, WANG X Q, WANG H Y, et al. The poplar R2R3 MYB transcription factor PtrMYB94 coordinates with abscisic acid signaling to improve drought tolerance in plants [J]. Tree Physiology, 2020, 40(1): 46-59
- [9] OLUKAYODE T, CHEN J Y, ZHAO Y, et al. Phloem-mobile MYB44 negatively regulates expression of PHOSPHATE TRANSPORTER1 in arabidopsis roots [J]. Plants, 2023, 12(20): 3617
- [10] WEI Z Z, HU K D, ZHAO D L, et al. MYB44 competitively inhibits the formation of the MYB340-bHLH2-NAC56 complex to regulate anthocyanin biosynthesis in purple-fleshed sweet potato[J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1): 258
- [11] WANG X P, NIU Y L, ZHENG Y. Multiple functions of MYB transcription factors in abiotic stress responses[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(11): 6125
- [12] WEI X X, LAN H Y. Advances in the regulation of plant MYB transcription factors in secondary metabolism and stress response[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(8): 12-23
- [13] LI J B, ZHAO S, YU X, et al. Role of *Xanthoceras sorbifolium* MYB44 in tolerance to combined drought and heat stress via modulation of stomatal closure and ROS homeostasis [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2021(162): 410-420
- [14] HAO Y L, WANG J J, HU C M, et al. Regulation of *BcMYB44* on anthocyanin synthesis and drought tolerance in non-heading Chinese Cabbage (*Brassica campestris* ssp. chinensis Makino)[J]. Horticulturae, 2022, 8(5): 351
- [15] QIN B, FAN S L, YU H Y, et al. *HbMYB44*, a rubber tree MYB transcription factor with versatile functions in modulating multiple phytohormone signaling and abiotic stress responses [J]. Frontiers in Plant Science, 2022(13): 893-896
- [16] JUNG C, SEO J S, HAN S W, et al. Overexpression of *AtMYB44* enhances stomatal closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic arabidopsis [J]. Plant Physiology, 2008, 146(2): 623-635
- [17] LIU W K, CHEN G L, HE M M, et al. ABI5 promotes heat stress-induced chlorophyll degradation by modulating the stability of MYB44 in cucumber [J]. Horticulture Research, 2023, 10(6): 89-93
- [18] ZHOU X J, ZHA M R, HUANG J, et al. *StMYB44* negatively regulates phosphate transport by suppressing expression of *PHOSPHATE1* in potato [J]. Journal of Experimental Botany, 2017, 68(5): 1265-1281
- [19] CHEN J, WANG Z B, LIU S D, et al. Nitrogen stress inhibits root growth by regulating cell wall and hormone changes in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Journal of Agronomy and Crop Science, 2021, 207(6): 1006-1023
- [20] 刘锡江. 紫花苜蓿转录组测序及 *MsMYB4* 盐胁迫应答功能的初步探究[D]. 曲阜: 曲阜师范大学, 2020: 35-37
- LIU X J. Preliminary study on transcriptome sequencing of alfalfa and the response function of *MsMYB4* salt stress [D]. Qufu: Qufu Normal University, 2020: 35-37
- [21] 刘佳, 王少鹏, 史昆, 等. 紫花苜蓿 *MsMYB58* 基因克隆及抗旱功能鉴定[J]. 草地学报, 2023, 31(12): 3608-3616
- LIU J, WANG S P, SHI K, et al. Cloning and function identification of *MsMYB58* in alfalfa under drought stress [J]. Acta Agrestia Sinica, 2023, 31(12): 3608-3616
- [22] 周强. 紫花苜蓿冷胁迫转录组分析及 *MsMYB144* 基因的功能鉴定[D]. 兰州: 兰州大学, 2019: 102-109
- ZHOU Q. Transcriptional analysis of alfalfa during cold stress and functional identification of *MsMYB144* gene [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2019: 102-109
- [23] 段百林. *GhMYB44* 在陆地棉干旱胁迫中的功能研究[D]. 浙江: 浙江理工大学, 2023: 61-64
- DUAN B L. The study on function of *GhMYB44* in response to drought stress in *Gossypium hirsutum* [D]. Zhejiang: Zhejiang Sci-tech University, 2023: 61-64
- [24] 董宽虎, 朱慧森, 佟莉蓉, 等. 山西牧草种质资源[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2010: 1-435
- DONG K H, ZHU H S, TONG L R, et al. Forage germplasm resources in Shanxi [M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2010: 1-435
- [25] 王雨欣, 陶佳丽, 朱慧森, 等. 异源表达偏关苜蓿 miR397-5p 增强烟草干旱胁迫耐受能力[J]. 草业学报, 2024, 33(11): 123-134
- WANG Y X, TAO J L, ZHU H S, et al. Heterologous expression of miR397-5p from *Medicago sativa* cv. 'Pianguan' improves the drought tolerance of tobacco [J]. Acta Prataculurae Sinica, 2024, 33(11): 123-134

- [26] THAKUR S, VASUDEV P G. MYB transcription factors and their role in Medicinal plants [J]. Molecular Biology Reports, 2022, 49(11): 10995-11008
- [27] 陈阳, 黄小芹, 尤学, 等. 草地早熟禾转录因子 *PpMYB44* 基因克隆及非生物胁迫响应分析[J]. 草地学报, 2024, 32(10): 3062-3070
- CHEN Y, HUANG X Q, YOU X, et al. Cloning and analysis of the abiotic stress response of *PpMYB44* gene in *Poa pratensis* L. [J]. Acta Agrestia Sinica, 2024, 32(10): 3062-3070
- [28] GRÜNE T, BRZESKI J, EBERHARTER A, et al. Crystal structure and functional analysis of a nucleosome recognition module of the remodeling factor ISWI [J]. Molecular Cell, 2003, 12(2): 449-460
- [29] ZHAO Y, XING L, WANG X G, et al. The ABA receptor *PYL8* promotes lateral root growth by enhancing *MYB77* dependent transcription of auxin-responsive genes [J]. Science Signaling, 2014, 7(328): ra53
- [30] QIU Z K, YAN S S, XIA B, et al. The eggplant transcription factor *MYB44* enhances resistance to bacterial wilt by activating the expression of spermidine synthase [J]. Journal of Experimental Botany, 2019, 70(19): 5343-5354
- [31] 段怡红, 阎媛媛, 陈丽婷, 等. 陆地棉开花时间相关基因 *GhMYB44* 的克隆与功能验证[J]. 中国农业科技导报, 2020, 22(12): 29-38
- DUAN Y H, YAN Y Y, CHEN L T, et al. Cloning and functional analysis of *GhMYB44* related to flowering time in *Gossypium hirsutum* [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2020, 22(12): 29-38
- [32] 苏浩天, 刘曼, 尹淑霞. 草地早熟禾 *PpMYB2* 基因的克隆、生物信息学及亚细胞定位分析[J]. 草地学报, 2024, 32(10): 3071-3079
- SU H T, LIU M, YIN S X. Cloning, bioinformatics analysis and subcellular localization of *PpMYB2* gene in *Poa pratensis* L. [J]. Acta Agrestia Sinica, 2024, 32(10): 3071-3079
- [33] 李颖, 王莹莹, 苏旭, 等. 番茄 *MYB44* 基因生物信息学及亚细胞定位分析[J]. 中国农学通报, 2021, 37(14): 34-40
- LI Y, WANG Y Y, SU X, et al. *MYB44* gene from *Solanum Lycopersicum*: bioinformatics analysis and subcellular localization [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2021, 37(14): 34-40
- [34] 林泳许, 于庆, 冯美嫦, 等. 甘蔗 *MYB* 转录因子基因 *ScMYB52-1* 的克隆及表达特性分析[J]. 热带作物学报, 2022, 43(7): 1328-1337
- LIN Y X, YU Q, FENG M E, et al. Cloning and expression analysis of an MYB transcription factor gene *ScMYB52-1* from sugarcane [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2022, 43(7): 1328-1337
- [35] 余婧, 郭玉双, 雷波, 等. 烟草 *NtMYB44b* 转录因子基因克隆以及生物信息学和表达分析[J]. 植物生理学报, 2020, 56(2): 200-208
- YU J, GUO Y S, LEI B, et al. Cloning and bioinformatic and expression analyses of *NtMYB44b* transcription factor gene in nicotiana tabacum [J]. Plant Physiology Journal, 2020, 56(2): 200-208
- [36] LIU Y H, SHEN Y, LIANG M, et al. Identification of peanut *AhMYB44* transcription factors and their multiple roles in drought stress responses [J]. Plants, 2022, 11(24): 3522
- [37] JIANG C K, RAO G Y. Insights into the diversification and evolution of R2R3-MYB transcription factors in plants [J]. Plant Physiology, 2020, 183(2): 637-655
- [38] WANG A B, LIANG K H, YANG S W, et al. Genome-wide analysis of MYB transcription factors of *Vaccinium corymbosum* and their positive responses to drought stress [J]. BMC Genomics, 2021, 22(1): 565
- [39] ZHANG J, ZHANG Y, FENG C. Genome-wide analysis of MYB genes in *Primulina eburnea* (hance) and identification of members in response to drought stress [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(1): 465
- [40] WANG S S, SHI M Y, ZHANG Y, et al. *FvMYB24*, a strawberry R2R3-MYB transcription factor, improved salt stress tolerance in transgenic arabidopsis [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2021(569): 93-99
- [41] ZHANG Y B, TANG W, WANG L H, et al. Kiwifruit (*Actinidia chinensis*) R1R2R3-MYB transcription factor *AcMYB3R* enhances drought and salinity tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2019, 18(2): 417-427
- [42] KONG X G, CHEN Y, LI H H, et al. Dissociation of transcription factor MYB94 and histone deacetylases HDA907/908 alleviates oxidative damage in poplar [J]. Plant Physiology, 2024, 196(1): 181-194
- [43] 王悦, 刘亚玲, 苑峰, 等. 蒺藜苜蓿 *MtMYB16* 基因克隆、表达及转录自激活分析[J]. 中国草地学报, 2024, 46(3): 1-10
- WANG Y, LIU Y L, YUAN F, et al. Cloning, expression and transcriptional autoactivation analysis of the *MtMYB16* gene in *Medicago truncatula* [J]. Chinese Journal of Grassland, 2024, 46(3): 1-10
- [44] ZHAO B, SHAO Z Y, WANG L K, et al. *MYB44*-ENAP1/2 restricts HDT4 to regulate drought tolerance in arabidopsis [J]. PLoS Genetics, 2022, 18(11): e1010473
- [45] TIEN N Q D, KHA H, LOC N H. Identification, characterization and expression of two transcription factors *MYB44* and *WRKY22* from drought tolerant peanut cultivar L14 [J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2024, 60(1): 26-37
- [46] LI D P, PENG S B, CHEN S W, et al. Identification and characterization of 5 walnut *MYB* genes in response to drought stress involved in ABA signaling [J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2021, 27(6): 1323-1335

(责任编辑 刘婷婷)