

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2026.09.007

引用格式:樊文娜,张梦瑶,石亚奇,等.紫花苜蓿 *MsphyA* 基因鉴定分析及非生物胁迫下表达[J].草地学报,2026,34(9):3211–3222

FAN Wen-na, ZHANG Meng-yao, SHI Ya-qi, et al. Identification and Analysis of *MsphyA* Gene in Alfalfa and its Expression under Abiotic Stress[J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34(9):3211–3222

紫花苜蓿 *MsphyA* 基因鉴定分析及非生物胁迫下表达

樊文娜*, 张梦瑶, 石亚奇, 杨怡欣
(河南科技大学动物科技学院, 河南 洛阳 471023)

摘要:光敏色素 A(phyA)是植物感知远红光信号并调控生长发育及逆境应答的关键受体。为探究 *MsphyA* 基因功能及其在紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)中响应非生物胁迫的分子机制,本研究对已克隆的 *MsphyA* 基因全长质粒进行测序鉴定及完整结构域生物信息学分析,并通过 qRT-PCR 技术检测该基因在不同非生物胁迫下的表达模式。生物信息学分析显示 *MsphyA* 基因编码序列(Coding sequence, CDS)区全长 3375 bp,编码 1124 个氨基酸,具有典型的 PHY 家族的 PAS,PHY 和 GAF motifs 特殊结构域;蛋白分析显示其相对分子量为 124.3 kDa,理论等电点为 6.1,属于不含信号肽的非分泌不稳定亲水性蛋白且不具备跨膜结构;亚细胞定位预测该蛋白定位于细胞核;系统进化树表明 *MsphyA* 蛋白与蒺藜苜蓿 *MtphyA* 亲缘关系最近。qRT-PCR 结果表明,盐、干旱、酸、高温、低温处理均能诱导 *MsphyA* 的表达, *MsphyA* 广泛参与紫花苜蓿的非生物胁迫应答过程,本研究为进一步探究紫花苜蓿 *MsphyA* 基因功能提供了参考。

关键词:紫花苜蓿;phyA;生物信息学分析;非生物胁迫

中图分类号:S541.9

文献标识码:A

文章编号:1007-0435(2026)09-3211-12

Identification and Analysis of *MsphyA* Gene in Alfalfa and its Expression under Abiotic Stress

FAN Wen-na*, ZHANG Meng-yao, SHI Ya-qi, YANG Yi-xin

(College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan Province 471023, China)

Abstract: Phytochrome A (phyA) is a key receptor that enables plants to perceive far-red light signals and regulates their growth, development, and stress responses. To investigate the function of the *MsphyA* gene and its molecular mechanism in response to abiotic stress in alfalfa (*Medicago sativa* L.), this study conducted a bioinformatic analysis of the cloned *MsphyA* gene and detected its expression patterns under various abiotic stresses using qRT-PCR. Bioinformatic analysis revealed that the *MsphyA* gene has a CDS length of 3375 bp, encoding 1124 amino acids, and possesses typical PAS, GAF, and PHY motifs characteristic of the PHY family. Protein analysis indicated that *MsphyA* has a relative molecular mass of 124.3 kDa and a theoretical isoelectric point of 6.1. It is classified as an unstable, hydrophilic, non-secretory protein without a signal peptide and lacks transmembrane domains. Subcellular localization prediction suggested that *MsphyA* is localized to the nucleus. Phylogenetic analysis showed that *MsphyA* is most closely related to *MtphyA* from *M. truncatula*. qRT-PCR results demonstrated that salt, drought, acid, high-temperature, and low-temperature stresses all induced *MsphyA* expression. These findings indicate that *MsphyA* is widely involved in the abiotic stress responses in alfalfa. This study provides a foundation for further exploration of the *MsphyA* gene's function.

Key words: Alfalfa; phyA; Bioinformatics analysis; Abiotic stress

光是影响植物生长发育的关键环境因子,为感知并响应光信号,植物进化出多种光受体。其中,

光敏色素(Phytochromes, Phys)作为感知红光与远红光的核心受体,在植物适应荫蔽胁迫和竞争环境

收稿日期:2025-11-13;修回日期:2025-12-18

基金项目:国家自然科学基金(32102585)资助

作者简介:樊文娜(1981-),女,汉族,河南许昌人,博士,副教授,主要从事饲料饲草资源开发与利用研究, E-mail: chou0516@163.com

中起着至关重要的作用^[1]。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)等双子叶植物中,光敏色素家族包含 phyA~phyE 五个成员,而在玉米(*Zea mays*)和水稻(*Oryza sativa*)等单子叶植物中,该家族通常仅包括 phyA~phyC 三个成员^[2]。所有光敏色素具有相似的结构域组成:N端为感光区包括 PAS(Per-ARNT-Sim 结构域是广泛存在于原核和真核生物蛋白中的保守信号感知模块)、GAF(cGMP-specific phosphodiesterase/adenylate cyclases/FhlA, 结构域因存在于 cGMP 特异性磷酸二酯酶、腺苷酸环化酶等蛋白中得名,是光敏色素光信号接收的核心区域)和 PHY 结构域,C端则参与二聚体形成^[3]。除在种子萌发、光形态建成和开花时间等光依赖过程中发挥核心作用外,光敏色素还广泛参与植物的非生物胁迫应答^[4-6]。phyA 是植物中特异性感知远红光信号的受体。除介导远红光条件下的暗形态建成向光形态建成的转变外^[7],其功能还延伸至调控植物生长发育及其对生物胁迫与非生物胁迫的响应^[8]。有研究表明,水稻各组织中 *OsphyA* 的积累水平在黑暗条件下高于光照条件下,该基因在极低光量反应(Very low fluence response, VLFR)中正向调控种子萌发,同时在 VLFR 和高辐照度反应(High-Irradiance response, HIR)中均抑制胚芽鞘的伸长。然而,水稻(品种:日本晴)*phyA* 突变体在主要农艺性状上未表现出显著表型差异^[9]。研究表明,高温胁迫下,番茄(*Solanum lycopersicum*) *SlphyA* 基因突变体植株表现出更强的耐热性,敲除 *SlphyA* 能够增强番茄对高温胁迫的抵御能力^[10];此外,也有研究认为光激活的 *SlphyA* 能够通过上调脱落酸(Abscisic acid, ABA)合成关键基因的表达,提高内源 ABA 含量,进而激活 ABA 和茉莉酸(Jasmonic acid, JA)信号通路调控下游转录因子 CBF(C-repeat Binding Factor)途径,正向调控植物的抗寒性^[11]。拟南芥中, *AtpyA* 已被证实是抗旱性的正向调节因子,其能够通过减少 ABA 含量调控植株抗旱性和蒸腾速率^[12];与 *phyA* 突变体拟南芥植株相比,野生型植株表现出更强的耐盐性^[13]。在谷子(*Setaria italica*)中, *SiphyA* 和 *SiphyB* 对高盐、高热、低温和干旱均有响应^[14]。敲除 *NtphyA* 的烟草突变体在盐胁迫下表现出较高的过氧化氢酶活性,且 MDA 含量较低^[15]。综上, *phyA* 基因在响应逆境胁迫方面起着非常重要的作用,深入解析其作用机制对于阐明植物的抗逆机理具有重要理论价值。

紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)是一种多年生豆科牧草,因其产量高、营养丰富、抗逆性强,被誉为“牧草之王”^[16],其强大的固氮能力与发达根系,在生态修复与草牧业可持续发展中扮演着关键角色^[17]。然而,随着全球生态环境恶化,非生物胁迫已严重制约其生长发育,导致产量与品质显著下降^[18]。因此,挖掘紫花苜蓿抗逆相关基因,对选育抗逆性强、产量高、品质优良的新品种具有重要意义。紫花苜蓿 *MsphyA* 在不同非生物胁迫下的响应机制尚不明确,本研究通过生物信息学分析 *MsPhyA* 基因特征,并利用 qRT-PCR 检测其在非生物胁迫下的表达模式,以探究 *MsPhyA* 在紫花苜蓿抗逆性中的调控功能,为进一步解析光敏色素介导的抗逆机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料及处理

供试紫花苜蓿品种为‘中苜3号’,由河南农业大学草业科学实验室提供。选取均匀饱满的紫花苜蓿种子,经 0.1% HgCl₂ 溶液消毒 8 分钟、无菌蒸馏水充分冲洗及 12 小时浸泡后,播种于高温灭菌的培养皿中。每皿播种 40 粒,每处理设 3 次重复。加入无菌蒸馏水浸润后,将培养皿置于人工气候箱中,设定光周期为 14 h 光照/10 h 黑暗,光照强度按时段分别设置为 4000 lx, 6000 lx 和 8000 lx,昼夜温度控制为 25℃/20℃,定期浇水培养 15 d。

本试验共设置干旱、盐碱、高温、低温及酸胁迫,共 5 种非生物胁迫处理。干旱胁迫通过聚乙二醇 6000 (Polyethylene Glycol, PEG-6000)模拟不同水分条件,水势梯度设为 0, -0.10, -0.20, -0.40 MPa,每日采用称重法维持培养皿重量恒定,处理至第 9 天取样。盐碱胁迫采用 NaHCO₃ 与 Na₂CO₃ 按 9:1 摩尔比配制的混合溶液(pH 值 9.17),设置 0(CK, 蒸馏水 pH 值 6.8)、 3.0×10^{-2} 、 5.0×10^{-2} 、 7.0×10^{-2} mol·L⁻¹ 四个浓度梯度,每日早晚各浇灌 5 mL 对应处理液,其余时间补充 1/4 霍格兰营养液,于第 9 天取样。高低温胁迫在人工气候箱中进行,设置 4℃(低温)、25℃(常温)和 35℃(高温)三个温度处理,分别于处理 0, 4, 8, 12, 16 h 后取样。酸胁迫利用 H₂SO₄ 和 NaOH 调节营养液 pH,设置 pH 为 2, 3, 4, 5, 6, 7 共 6 个梯度(对照组直接使用蒸馏水, pH 值 6.8),每日监测 pH 值变化,于处理第 9 天取样。所有处理均设置 3 次生物学重复(采样分别来自三个

培养皿,每皿采 5 株),取样后立即使用液氮速冻后转移至-80℃冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及反转录 cDNA 合成 使用 RNAiso Plus 试剂盒(大连宝生物科技有限公司)提取总 RNA,利用 NanoDrop 检测 RNA 质量。利用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒(大连宝生物科技有限公司)将其反转录为 cDNA,于-20℃保存备用。

1.2.2 *MsphyA* 基因序列来源与验证 紫花苜蓿 *MsphyA* 基因的编码序列克隆工作由本课题组前期完成,具体实验策略与方法详见文献^[19-20]。该研究通过 RT-PCR 结合 RACE 技术获得核心 cDNA 片段及其末端序列,并经染色体步移法补全 5'端上游序列,通过序列比对拼接最终获得 *MsphyA* 基因完整 CDS 序列。为确保该序列的准确性,将本实验保存的包含 *MsphyA* 基因完整 CDS 序列的质粒送至武汉康测科技有限公司进行测序验证。

1.2.3 生物信息学分析 使用 Expasy ProtParam (web.expasy.org/protparam/)对 *MsphyA* 氨基酸序列的氨基酸数、分子量、理论等电点、氨基酸正负电残基、不稳定系数、总平均亲水性系数、氨基酸分子式及其原子个数进行分析;利用在线软件 PSORT Prediction (https://www.genscript.com/psort.html?src=leftbar)和 Cell-PLoc 2.0(http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/)预测 *MsphyA* 的亚细胞定位;利用 SOPMA (https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl)在

线工具对 *MsphyA* 基因编码的蛋白进行二级结构预测;使用 SWISS-MODEL 网站 (https://swissmodel.expasy.org/) 预测蛋白质三级结构;使用 TMHMM-2.0(https://services.healthtech.dtu.dk/cgi-bin/webface2.cg)对该蛋白跨膜区进行分析;采用 SignalP5.0(https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/)对 *MsphyA* 蛋白进行信号肽预测分析;使用 NetPhos3.1(https://services.healthtech.dtu.dk/)对 *MsPhyA* 蛋白进行磷酸化位点预测;使用 NetGlycate 1.0 (https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetGlycate-1.0/)进行糖基化位点分析;使用 interpro(https://www.ebi.ac.uk/interpro)数据库进行蛋白质保守结构域分析。使用 Plant care (https://nfix2008.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/)进行启动子顺式作用元件分析;使用 TBtools 软件进行可视化;使用在线软件 STRING (https://cn.string-db.org/) 和 GENEMANIA (https://genemania.org/)进行互作蛋白分析;使用 NCBI 在线网站上 BLAST 工具搜索 *MsphyA* 同源蛋白,再使用 MEGA11 软件构建系统进化树。

1.2.4 qRT-PCR 分析 基于前期关于紫花苜蓿内参基因筛选的研究^[21],选用在非生物胁迫条件下表达稳定的 *Ms. 99505* 作为内参基因,并采用 Primer 5.0 软件设计特异性引物(表 1)。荧光定量 PCR 总体积 25 μL,全程在冰上进行配置。具体为:TB Green Premix Ex Taq II 试剂 12.5 μL,cDNA 模板 2 μL,上下游引物各 1 μL,灭菌水 8.5 μL。反应程序为:95℃ 30 s;95℃ 5 s;60℃ 30 s;95℃ 15 s;40 个循环,使用 2^{-ΔΔCt} 方法计算基因的相对表达量。

表 1 引物序列

Table 1 The primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	扩增长度 Amplify length
<i>phyA-F</i>	GAGAGATAGCTTTATGGATGTC	168 bp
<i>phyA-R</i>	GCGACCTAAACCAGAAAAC	
<i>Ms.99505-F</i>	TTCCTCAGGTCTGCGAAGTAGG	60 bp
<i>Ms.99505-R</i>	CAGTGGTGAAGAAACGCAAGACG	

1.2.5 数据处理及分析 使用 Excel 2019 和 GraphPad Prism 10.0 处理数据和制作图表,使用 SPSS 17.0 进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 *MsphyA* 基因序列分析

通过 RACE 技术扩增获得 3'末端与 5'末端(图

1A,图 1B),与 RT-PCR 获得的 549 bp 核心片段(图 1C)进行拼接得到 3130 bp 序列(GenBank: GQ379905),随后通过染色体步移法获得 1260 bp 的 5'端序列(GenBank: GQ379904;图 1D)补齐缺失序列,最终经比对确定 *MsphyA* 基因完整 CDS 全长 3375 bp,编码 1124 个氨基酸(图 2)。测序结果表明该基因 CDS 序列高度保守,仅存在 1 个同义突变。序列比对显示,该基因与豆科植物如豌豆、百脉根

等同源性高达92%,揭示了其在豆科植物中的保守性。

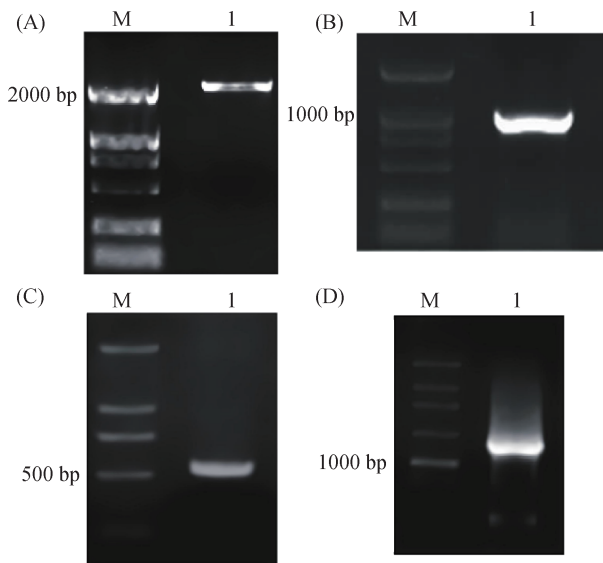


图1 *MsphyA* 基因CDS全长的克隆

Fig. 1 Cloning of the full-length CDS of the *MsphyA* gene
注: A为 *MsphyA* 3'RACE-PCR 扩增产物; B为 *MsphyA* 5'RACE-PCR 扩增产物; C为 *phyA* RT-PCR 扩增产物; D为 *phyA* genome walking 扩增产物。M 表示分子量标记

Note: A, *phyA* 3'RACE-PCR amplification. B, *phyA* 5'RACE-PCR amplification. C, *phyA* RT-PCR. D, *phyA* genome walking amplification. M represents DNA Marker

2.2 *MsphyA* 生物信息学分析

2.2.1 *MsphyA* 理化性质分析 对 *MsphyA* 蛋白进行理化性质分析,结果表明 *MsphyA* 蛋白分子式为 $C_{5491}H_{8830}N_{1504}O_{1658}S_{58}$, 相对分子量为 124.3 kDa, 理论等电点为 6.1, 带正电荷天冬氨酸和谷氨酸残基 (Aspartic acid + Glutamic acid, Asp + Glu) 132 个, 带负电荷精氨酸和赖氨酸残基 (Arginine + Lysine, Arg + Lys) 有 117 个。氨基酸组成中, 亮氨酸 (Leu-

cine, Leu) 含量最高, 占 10.9%; 其次为丝氨酸 (Serine, Ser), 占 7.8%; 丙氨酸 (Alanine, Ala) 占 7.5%; 缬氨酸 (Valine, Val) 占 7.3% (表 2)。蛋白分析显示, *MsphyA* 蛋白亲水指数为 -0.093, 不稳定指数为 46.05, 预测 *MsphyA* 属于不含信号肽的非分泌不稳定亲水性蛋白 (图 3A), 两种软件 PSORT Prediction 和 Cell-PLoc 2.0 亚细胞定位预测结果均显示该蛋白定位在细胞核。

2.2.2 *MsphyA* 蛋白结构预测 对 *MsphyA* 蛋白的二级 (图 3B) 与三级结构 (图 3C) 预测分析结果表明, 其二级结构主要由 56.23% 的 α -螺旋 (alpha helix, 632 个氨基酸)、33.36% 的无规卷曲 (random coil, 375 个氨基酸) 及 10.41% 的延伸链 (extended strand, 117 个氨基酸) 组成。 α -螺旋和不规则卷曲为主要构成成分, 表明该组蛋白整体结构较为复杂。该蛋白三级结构预测模型与二级结构相符, 且与其他光敏色素蛋白相似, 推测该蛋白同样具备光温双重受体功能, 且能被各类响应逆境胁迫的激酶磷酸化。

2.2.3 蛋白保守结构域及基因启动子顺式作用元件分析 保守结构域分析显示 (图 4A), *MsphyA* 蛋白含多个进化上高度保守的功能域, 该蛋白 N 端具典型光感应模块, 包括介导发色团结合的 cGMP 特异性磷酸二酯酶结构域和参与信号感知与蛋白互作的 PAS (Period-Arnt-Single-minded domain) 结构域; C 端则含有与组氨酸激酶活性相关的组氨酸磷酸酶超家族 (HATPase) 结构域, 通常与磷酸传递信号过程相关。此外, 原核生物双组分信号系统的膜结合传感器激酶 (KdpD) 结构域通常与渗透胁迫响应及离子转运调控相关, 表明 *MsphyA* 可能通过与胁迫响应蛋白互作或构象变化, 整合光信号与非

表 2 紫花苜蓿 *MsphyA* 氨基酸组成分析

Table 2 Amino acid composition analysis of *MsphyA* in alfalfa

氨基酸 Amino acid	数目 Number	含量 Content/%	氨基酸 Amino acid	数目 Number	含量 Content/%
丙氨酸 Alanine	84	7.5	赖氨酸 Lysine	67	6.0
精氨酸 Arginine	50	4.4	甲硫氨酸 Methionine	37	3.3
天冬酰胺 Asparagine	46	4.1	苯丙氨酸 Phenylalanine	39	3.5
天冬氨酸 Aspartic acid	60	5.3	脯氨酸 Proline	40	3.6
半胱氨酸 Cysteine	21	1.9	丝氨酸 Serine	88	7.8
谷氨酰胺 Glutamine	47	4.2	苏氨酸 Threonine	67	6.0
谷氨酸 Glutamic acid	72	6.4	色氨酸 Tryptophan	10	0.9
甘氨酸 Glycine	70	6.2	酪氨酸 Tyrosine	21	1.9
组氨酸 Histidine	30	2.7	缬氨酸 Valine	82	7.3
异亮氨酸 Isoleucine	71	6.3	吡咯咯氨酸 Pyrrolysine	0	0.0
亮氨酸 Leucine	122	10.9	硒代胱氨酸 Selenocysteine	0	0.0

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
1	ATGTCGACCAACGAGGCTAGCCCAATCATCCAACATTCAGGGAGATCAAGAAATAGTCTAGGATTATTGCTCAGACACAGTAGATGCAAACTTCATGAGGAGTCTGGT											
1	M S T T R F S Q S S N N S G R S R N S A R I I A Q T T V D A K L H A T F E E S G											
	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
121	AGTTCCTTTGACTACTCGAGTTCGGTGGTGTCTCTGGTTTCAGTTGATGGAGAGCATCAACCAAGGTCCACAAAGTAACACAGCTTACCTCAATACAAAGAGGCAAGCAGATC											
41	S S F D Y S S S V R V S G S V D G E H Q P R S N K V T T A Y L N T I Q R G K Q I											
	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360
241	CAGCCTTTTGGTTGCTTGTAGCTTTAGACGAGAAACGTGCAAGGTATTGCATACAGTGAGAATGCACCGAAATGCTGACCATGGTGAGTCATGCTGTCCTAGTGTGGTGACAC											
81	Q P F G C L L A L D E K T C K V I A Y S E N A P E M L T M V S H A V P S V G D H											
	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480
361	CCTGCCCTTGGCATTGGAATGACATAAGAACTATCTTCACCGCACCGAGTCTTCTGCTACAAAGGCACTAGGATTTCGGAGGTTTCGCTCTTAAACCCATCTCTTGTTCATTGC											
121	P A L G I G T D I R T I F T A P S A S A L Q K A L G F A E V S L L N P I L V H C											
	490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
481	AAGACTTCTGGGAGGCATTTATGCGATTATTCACCGTGTTCACCGTAGTTTTCATTCAGCTTTGAGCCAGTGAAGCCTTATGAAGTCCCAGTACTGACGAGGCGCATACAGTCT											
161	K T S G K P F Y A I I H R V T G S L I I D F E P V K P Y E V P M T A A G A L Q S											
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	710	720
601	TACAACTTCTGCTAAAGCAATTACAAGATTGCAATCTTGCCTAGTGGCAGCATGGAAAGGCTTTGCGATACAAATGGTTCAAGAAAGTTTGAACAGGTTATGACAGGGTGATG											
201	Y K L A A K A I T R L Q S L P S G S M E R L C D T M V Q E V F E L T G A C D R V M											
	730	740	750	760	770	780	790	800	810	820	830	840
721	GCTTATAAATTTACAGGAGTATCATGGGAGGTGATTGCTGAGGTAAACAGCAGGCTAGAGCCATATCTGGGTTTGCACATCCGGCCACAGATATCCCGAGGCTGGGGCTTT											
241	A Y K F H E D D H G E V I A E V T G L E P Y L G L H Y P A T D I P Q A A R F											
	850	860	870	880	890	900	910	920	930	940	950	960
841	TTATTTATGAAGCAACAGTCCGTATGATGATTGTTGTCACGCAAAACATGTGAAGTTCTTCAAGATGAAAACTCCCAATTTGACTTTGTGGTTCGACCTTGAAGGCCCA											
281	L F M K N K V R M I V D C H A K H V K V L Q D E K L P F D L T L C G S T L R A P											
	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080
961	CATAGTTGCCATTTCAGTATATGGCTAACATGGATTCAATTGCTTCTTGGTTAGTGTAGTCAATGACAGCGATGAAGATGGAGATAGTGTGATGCAGCTCTCCCAACAAAG											
321	H S C H L Q Y M A N M D S I A S L V M A V V V N D S D E D G D S A D A A L P Q K											
	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
1081	AAAAGAGACCTTTGGGTTTGGTAGTTTGCATACACATACACCAAGGTTTGTCCCTTCTCTAAGTATGCTTGTGAATTTCTGGCTCAAGTATTTGGCATCCATGTGAACAAGAA											
361	K K R L W G L V V C H N T T P R F V P F P L R Y A C E F L A Q V F A I H V N K E											
	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	1310	1320
1201	ATAGAATTAGAATACAGATTCTGAGAAGATATCCTGGCAGCAGACATGTTGTGCGATATGCTGATGCGAGATGACCCCTTAGGTATTGTATCAACAAAGCCCTAATATAATGGAT											
401	I E L E Y Q I L E K N I L R T Q T L L C D M L M R D A P L G I V S Q S P N I M D											
	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430	1440
1321	CTAGTGAATGTGATGGGGCTGCACCTCTGTATAGAAACAGTTATGGATATTAGGATCGACCGGAGTGAACCTCAGATAAGAGAGATAGCTTTATGGATGTCCGAGTACCATACGGAT											
441	L V K C D G A A L L Y R N K L W I L G S T P S E P Q I R E I A L W M S E Y H T D											
	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560
1441	TCGACTGGTTTGAATACGATAGCTTGTCTGATGCAAGGTTTCCAGGGCTCTTCAATCTTAATGATATCTGTATGTGAATGGCAGCTGTTAGAATTTCAAAGACATAGTTTCTCGG											
481	S T G L T S D S L S D A G F P G A L K L N D T V C G M A A V I R I T S K C A D I T F W											
	1570	1580	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680
1561	TTTAGTTCGCACACTGCTGCAGAAATCCGATGGGTGGTGCAAAAGCATGAACCTGGCGAAGCAGGATGATGGTAGGAAGATGCATCAAGATCATCTTCAAGGCTTTCCTCGAAGTGTGG											
521	F R S H T A A E I R W G H A K H E P G E Q D D G R K M H P R S F T K F A F L E V V											
	1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800
1681	AAGGCTAGGAGCATACCATGGAAGACTTTGAAATGGATGCTATTCTTCGTTACAGTTAATACTGAGAAAGCATCCAAAGATACGGATATGATTGATTAACTCAAAGGCAATCAAT											
561	K A R S I P W K D F E M D A I H S L Q L I L R N A S K D T D M I D L N S K A I N											
	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920
1801	ACAAAGCTAAATGATTGAAGATCGAAGGGATCGAGGAATTGGAAGCAGTGACGATGAGATGGTTTCGTTAATTGAAACAGCAACAGTGCCAAATTTGGCAGTGGATGTTGATGGATG											
601	T R L N D L K I E G M Q E L E A V T S E M V R L I E T A T V P I L A V D V D G M											
	1930	1940	1950	1960	1970	1980	1990	2000	2010	2020	2030	2040
1921	GTCAATGGTTGGAATACAAATTTCCGAGTTGACAGGCTTCCGGTTGGAGGCTTACTCACTTGTGAGGATTTTCAACTGATATAGTGAAGAGATGCTTT											
641	V N G W N I K I S E L T G L P V G E A I G K H L L T L V E D S S T D I V K K M L											
	2050	2060	2070	2080	2090	2100	2110	2120	2130	2140	2150	2160
2041	AATCTGGCACTGCAAGGCTCAAGAAGAGAAGATGTTCAATTCGAGATCAAAACACACGGGTCTAAGACGGATTCGGCTCTTATTAGTTTATAGTAAATGCGGTGTCAGAGGATCTT											
681	N L A L Q G Q E E K N V Q F E I K T H G S K T D S G P I S L I V N A C A S R D L											
	2170	2180	2190	2200	2210	2220	2230	2240	2250	2260	2270	2280
2161	CATGAAATGTAGTGGGAGTTTGTGTTGTGGCCCAAGATATACTGCTCAGAAGCAGTCATGACAAATTCACCGGAATTGAAGGAGATTACAAGGCAATGTACAGAGCCCAATCAA											
721	H E N V V G V C F V A Q D I T A Q K T V M D K F T R I E G D Y K A I V Q N P N Q											
	2290	2300	2310	2320	2330	2340	2350	2360	2370	2380	2390	2400
2281	TTAATCCCTCCTATATTCGGCACAGATGAATTTGGCTGTTGTGAGTGGATGCACTATGATTAAGATAAATGGATGGAAGCAGAGGAGGTGATGGATAAAATGCTTCTAGGAGAG											
761	L I P P I F G T D E F G W C C E E W N A A M I K I T G W K R E E V M D K M L L G E											
	2410	2420	2430	2440	2450	2460	2470	2480	2490	2500	2510	2520
2401	GTTCCTCGAATCATATGCTTGTGCTCTAAGAAATCAAGAAGCTTTCCTTAATTCGCAATGCTACTTAATAAAGCATGACTGGTTTGGAAACAGAAAGGTTCTTTTGGTTTT											
801	V F G T H M S C C R L K N Q E A F V N F F G I V L N K A M T G L E T E K V P F G F											
	2530	2540	2550	2560	2570	2580	2590	2600	2610	2620	2630	2640
2521	CTCTCTCGGAAGGGAAGATGTAGAGTGCCTACTTCTGTGAGTAAGAAATAGATGGGAGGCGCTAGTTACCGGGCTCTCTGTTTCTCGAGCTAGCTAGCGGAGCTGCAACAA											
841	L S R K G K Y V E C L L S V S K K I D A E G L V T G V F C F L Q L A S P E L Q Q											
	2650	2660	2670	2680	2690	2700	2710	2720	2730	2740	2750	2760
2641	GGGTATACATATTCAAGCTATCTGAACAAACCGCTCTCAAGAGACTGAAAGTATTAATCTATGAGAAGCAATCAGGAATCCTTTGTCTGGGATTGTGTTTCCAGTAAATGTTG											
881	A L H I Q R L S E Q T A L K R L K V L T Y M R R Q I R N P L S G I V F S S K M L											
	2770	2780	2790	2800	2810	2820	2830	2840	2850	2860	2870	2880
2761	GAGAATAGTGAATGGGAACCGAACAACAAACGAATTGTGAACACTAGTTCTCAGTGCCAGCGCCAGTTAGCAAAATTTCTGATGACTCGGATCTAGACAGCATCATTGATGGGTACTTG											
921	E N T E L G T E Q K R I V N T S S Q C Q R Q L S K I L D D S D L D S I I D G Y L											
	3010	3020	3030	3040	3050	3060	3070	3080	3090	3100	3110	3120
3001	ATGGAACCTTGTATGGTAGTATCTTAGACTTCAGCAGGCTTGGCTGACTTCTTACTGATTTCACATCAATCCACACCAATGGAAGTCAAGTGTATAGCAGGCATCTAATCTAA											
1001	M E T L Y G D S L R L Q Q V L A D F L L I S I N S T P N G G V T I A G A T L T K											
	3130	3140	3150	3160	3170	3180	3190	3200	3210	3220	3230	3240
3121	GAACAGTTAGGGAATCTGTCCATCTGTAAATTTGGAGCTCAGCATACACATGTGGAAATGGGGTGGCAGAACAGTCTGAACAGATGTTTGGAAATAATGGGCTAGAAATCAGAA											
1041	E Q L G K S V H L V N L E L S I T H G G N G V A E A V L N Q M F G N N G L E S E											
	3250	3260	3270	3280	3290	3300	3310	3320	3330	3340	3350	3360
3241	GAGGGTATTAGCTACCATCAGTAGAAAGTTGTTAAAGCTTATGAACGGCGATGTTGATATTTAAAGAACGAGGAAATCATCCTTTATCTCTGTGTAACCTGCAGCAGCCCAA											
1081	E G I S L H I S R K L L K L M N G D V R Y L K E A G K S S F I L S V E L A A A Q											
	3370											
3361	AAGTTGAGAGTTAA											
1121	K L R G *											

图 2 *MsfhyA* 基因编码区序列及其编码的氨基酸序列Fig. 2 The full-length coding sequence of *MsfhyA* gene and its amino acid sequence

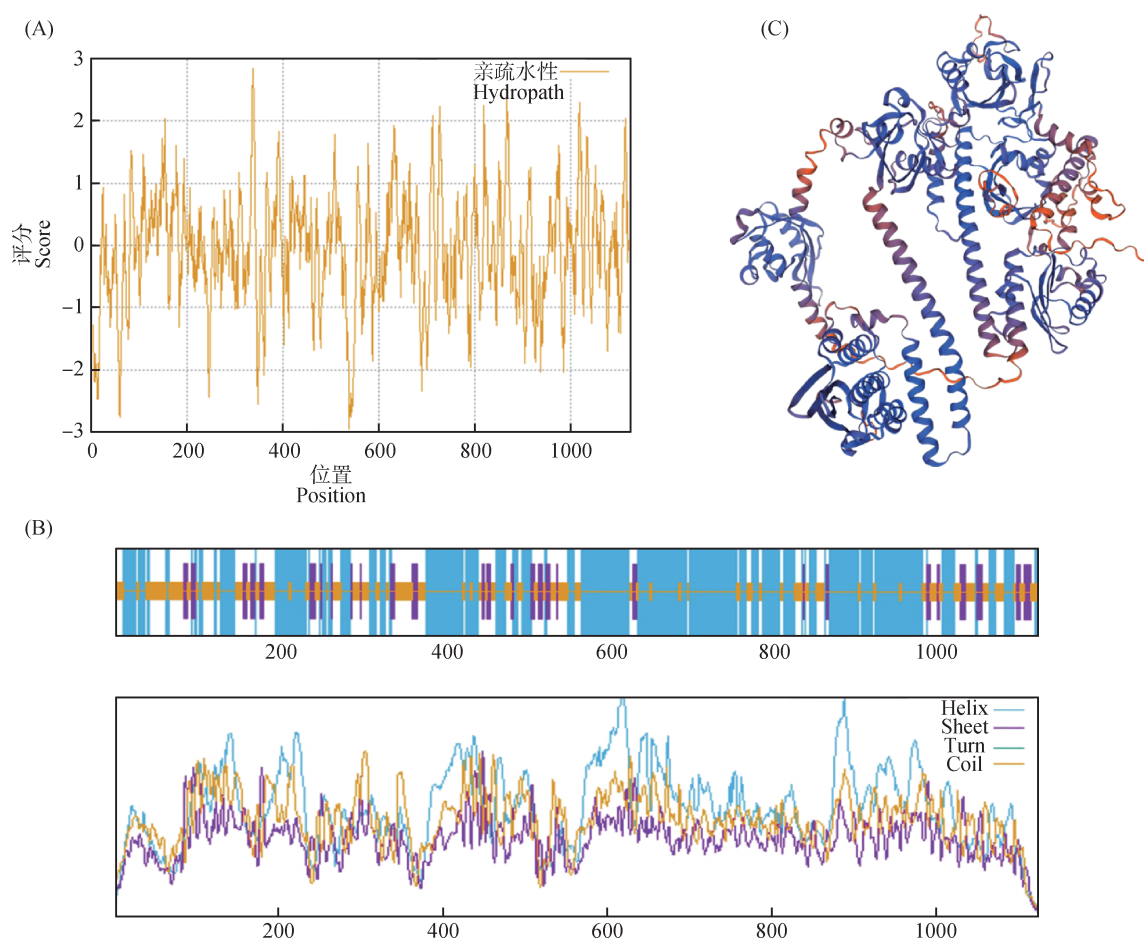


图 3 MsphyA 蛋白亲水性分析及蛋白结构预测

Fig. 3 Protein hydrophilicity and protein structure prediction analysis of MsphyA

注: A 为 MsphyA 蛋白亲水性分析; B 为二级结构预测; C 为三级结构预测

Note: A, Hydrophilicity analysis of MsphyA protein. B, Secondary structure prediction. C, Tertiary structure prediction

生物胁迫信号。对 *MsphyA* 基因启动子序列的分析显示(图 4B),除光响应元件外,该区域还含有多种抗逆相关顺式作用元件,包括可与类 WRKY 转录因子(*MsWRKY33*)特异性结合的 W-box 以及 MYB 转录因子结合位点,尤其是与干旱诱导密切相关的 MYB 转录因子的特异性结合位点(MBS)元件。表明 *MsphyA* 能够参与紫花苜蓿的逆境胁迫响应过程,且该过程可能受 WRKY 及 MYB 转录因子调控。

2.2.4 MsphyA 蛋白跨膜结构及信号肽预测 蛋白跨膜区分析显示, *MsphyA* 蛋白不含跨膜区且没有跨膜转运功能(图 5A)。进一步在 UniProt 网站分析该蛋白,发现 *MsphyA* 在细胞核内行使相关生物学功能,但该蛋白不具备跨膜结构域,推测 *MsphyA* 需要进入细胞核结合其他转录因子来调控下游响应基因,与先前研究 *phyA* 自身不含有核定位信号,其入核依赖 FHY1 和 FHL 介导的入核转运机制一致^[22]。对 *MsphyA* 进行信号肽预测分析(图

5B),结果表明该蛋白不存在信号肽,属于非分泌型蛋白。

2.2.5 MsphyA 磷酸化位点与糖基化位点分析 NetPhos 3.1 预测结果显示, *MsPhyA* 蛋白包含 63 个丝氨酸(Ser)、32 个苏氨酸(Thr)和 7 个酪氨酸(Tyr)磷酸化位点; NetGlycate 1.0 预测该蛋白存在 25 个糖基化位点。 *MsPhyA* 主要被丝/苏氨酸蛋白激酶和酪氨酸蛋白激酶(包括 CK1, CK2, CaM, GSK3 和 SRC)磷酸化修饰,进而参与调控紫花苜蓿的多种生理生化过程(图 5C, 5D)。

2.2.6 MsphyA 互作蛋白预测 通过对 *MsphyA* 蛋白互作网络的生物信息学预测分析(图 5E, 5F),鉴定出多个在光信号传导中起关键作用的保守相互作用蛋白。综合两软件分析结果表明, *MsphyA* 可与光敏色素信号通路核心组分光敏色素互作因子 3 (Phytochrome-interacting factor 3, PIF3)、SPA1 (Suppressor of PHYA 1)及 COP1 蛋白(Constitu-

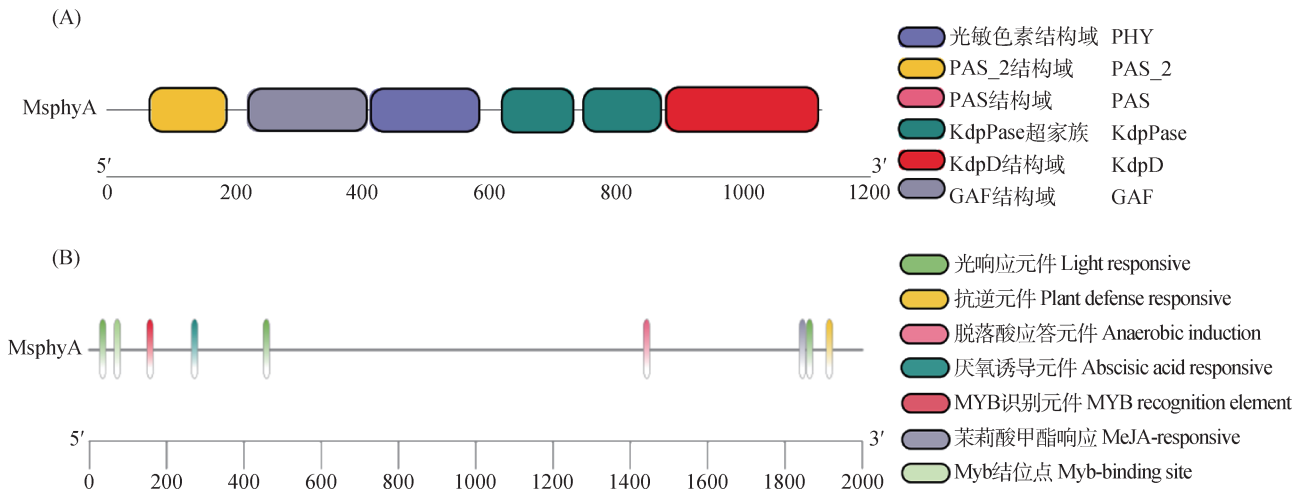


图4 *MspHyA* 蛋白保守结构域和基因启动子顺式作用元件

Fig. 4 Conserved domains of *MspHyA* protein and cis-acting elements in the gene promoter

注:A, *MspHyA* 蛋白保守结构域的组成;B, *MspHyA* 基因启动子顺式作用元件

Note: A, Composition of the conserved domains of the *MspHyA* protein; B, cis-acting elements in the promoter of the *MspHyA* gene

tive Photomorphogenic 1) 等发生互作, 其中 COP1-SPA1 复合物作为关键的 E3 泛素连接酶, 在光依赖的蛋白降解中发挥核心作用。多个 PRT 家族蛋白也被预测与其互作, 这些蛋白可能参与 phyA 信号输出的精细调控。通过该互作网络推测 *MspHyA* 可能通过 COP1 整合光信号与逆境应答通路, 并经由 PIFs 等转录因子调控下游胁迫应答相关基因的表达。此外, 互作蛋白隐花色素 2 (Cryptochrome 2, CRY2) 在蓝光应答与胁迫适应中具有已知功能, 进一步支持 *MspHyA* 在紫花苜蓿中介导光与环境胁迫交叉应答的潜在作用。

2.2.7 *MspHyA* 系统进化分析 为深入解析 *MspHyA* 的系统发育关系, 本研究基于 NCBI 在线 BLAST 工具获取其同源蛋白序列, 并利用 MEGA11 软件构建系统发育进化树。结果如图 6 所示, 紫花苜蓿 *MspHyA* 与蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) *MtpHyA* 的序列同源性最高, 表明二者在进化上高度保守。其次, 该蛋白与山豆 (*Lathyrus sativus*) 的两个 phyA 同源蛋白 *LsphyA1* (NP_001413894.1) 与 *LsphyA2* (KAI5398706.1) 具有较高的同源性。同时, 大豆属 (*Glycine*) 中的栽培大豆 (*Glycine max*) *GmphyA* 与野大豆 (*Glycine soja*) *GsphyA* 在进化树上聚为一支, 显示出较近的亲缘关系。整体来看, 来源于同一物种的 phyA 蛋白在系统发育树中均优先聚在一起, 而紫花苜蓿 *MspHyA* 与上述物种的 phyA 蛋白在分支结构上相对接近, 进一步揭示其在进化过程中具有较近的亲缘关系, 推测其功能上也具有相似性。

2.3 *MspHyA* 基因非生物胁迫表达分析

利用实时荧光定量 PCR 技术检测 *MspHyA* 在不同非生物胁迫下的表达情况。结果显示, *MspHyA* 基因的表达在不同非生物胁迫条件下呈不同变化趋势 (图 7)。在干旱胁迫下, *MspHyA* 基因的表达受到普遍抑制。各处理组 *MspHyA* 表达量仅为对照的 10%~50%, 但无明显浓度依赖性。盐碱胁迫处理则呈现浓度依赖性效应: 低盐碱 (3.0×10^{-2}) 和高盐碱 (7.0×10^{-2}) 环境下 *MspHyA* 表达虽下降, 但差异不显著, 而中度盐碱 (5.0×10^{-2}) 诱导表达显著增加 ($P < 0.05$), 其中度盐碱处理下的表达量达到对照的 5~7 倍。酸胁迫下, 在酸性至中性条件 (pH2-pH7) 下, *MspHyA* 的表达均被强烈诱导, 其表达量远超对照组。该基因的表达水平在 pH2 至 pH5 区间显著下降 ($P < 0.05$), pH6、pH7 和对照组没有显著差异。在温度胁迫下, 低温处理 4 小时即快速诱导 *MspHyA* 表达, 12 小时达到峰值后略有回落; 高温胁迫下, 其表达在 4 小时被强烈激活, 8 小时暂时回落持续上升, 于 16 小时达到峰值。综上, *MspHyA* 基因参与紫花苜蓿对干旱、盐、酸及温度等多种非生物胁迫的应答过程。

3 讨论

光敏色素家族是植物中感知红光和远红光的关键光受体, 广泛调控从种子萌发到开花时间等诸多发育过程^[23]。其中, phyA 作为唯一的远红光受体, 其功能已超越传统的光形态建成, 被证实直接

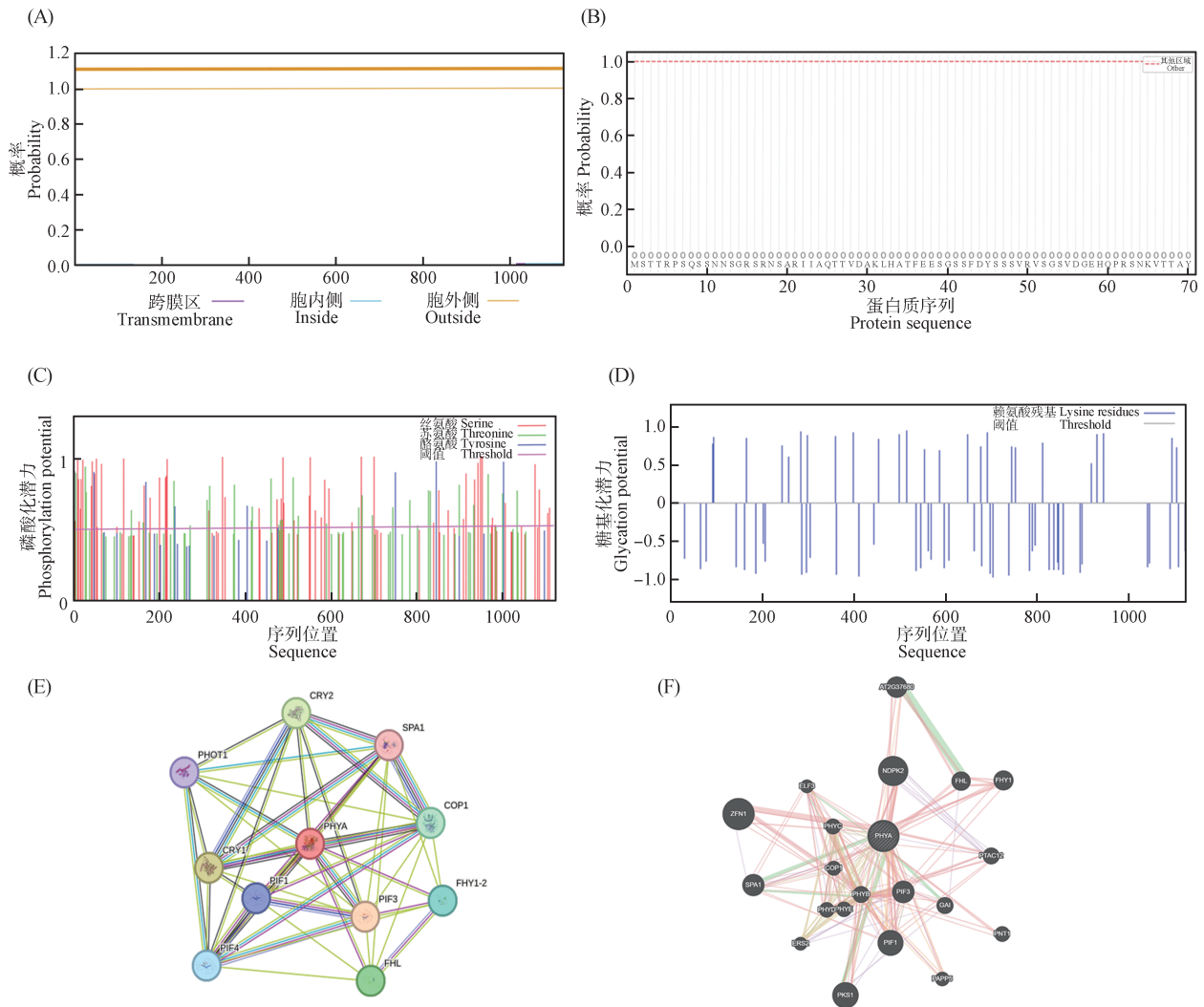


图5 MsphyA 结构功能及互作蛋白分析

Fig. 5 Structure, function and interacting protein analysis of MsphyA

注: A 为 MsphyA 蛋白跨膜结构; B 为 MsphyA 蛋白信号肽预测; C 为 MsphyA 蛋白磷酸化位点分析; D 为 MsphyA 糖基化位点分析; E 为 GENEMANIA 互作蛋白分析; F 为 STRING 互作蛋白分析

Note: A, Transmembrane structure of the MsphyA protein; B, Signal peptide prediction of the MsphyA protein; C, Phosphorylation site analysis of the MsphyA protein; D, Glycosylation site analysis of the MsphyA protein; E, STRING interacting protein analysis; F, GENEMANIA interacting protein analysis

参与非生物胁迫应答^[24-26]。本试验对紫花苜蓿 *MsphyA* 基因进行了系统的生物信息学鉴定,并深入解析了其在多种胁迫下的表达模式,旨在阐明 *MsphyA* 在紫花苜蓿抗逆调控网络中的功能。

3.1 紫花苜蓿 *MsphyA* 的生物学特性

本试验对紫花苜蓿 *MsphyA* 基因进行生物信息学分析,该基因编码序列全长 3357 bp,编码一个由 1124 个氨基酸组成的蛋白。生物信息学分析表明, *MsphyA* 蛋白具有典型的光敏色素家族特征:无跨膜结构域和信号肽,属于亲水性不稳定蛋白,其二级结构以 α -螺旋和无规卷曲为主。这些特性与拟

南芥^[27]、水稻^[28]等物种中报道的 phyA 蛋白高度相似,暗示其功能在进化上具有保守性。亚细胞定位预测 *MsphyA* 蛋白主要定位于细胞核,这与拟南芥^[29]、黑麦^[30] (*Secale cereale*)、豌豆^[31] (*Pisum sativum* L.) 等物种细胞定位结果一致。跨膜结构预测表明, *MsPhyA* 蛋白不具备跨膜结构域,其核转运需借助特定辅助蛋白。这一机制在拟南芥中已被阐明,即由 FHY1 和 FHL 介导 phyA 核输入;当两者同时突变时,突变体因 phyA 功能丧失而对远红光极不敏感^[32]。此外,我们预测 *MsphyA* 蛋白含有大量潜在的磷酸化位点,可被 CK2, CaM 等多种激酶识别。研究表明,蛋白激酶 CK2 能够介导燕麦

图 6 *MsphyA* 蛋白系统进化树分析Fig. 6 Phylogenetic tree analysis of *MsphyA* protein

注:来自同一物种的不同phyA蛋白通过后缀进行区分,*Lathyrus oleraceus* 中的两个旁系同源基因分别标记为 LophyA1 和 LophyA2(*MsphyA* 蛋白序列为本试验克隆完整 CDS 区翻译所得,暂无公共数据库蛋白登录号,蒺藜苜蓿 *MtpyA* 基因组 ID 为 Medtr1g085160,基因组信息来源于苜蓿专用数据库 MODMS,其他物种均可从 NCBI 公共数据库获得蛋白登录号)

Note: Different phyA proteins from the same species are distinguished by suffixes. The two paralogous genes in *Lathyrus oleraceus* are designated as LophyA1 and LophyA2, respectively. The *MsphyA* protein sequence was obtained by translating the complete CDS cloned in this experiment, and no protein accession number is available in public databases yet. The genome ID of *MtpyA* in *Medicago truncatula* is Medtr1g085160, and the genome information was retrieved from MODMS (a specialized database for *Medicago*), while the protein sequences of other species can be obtained from the NCBI public database via their respective protein accession numbers

(*Avena sativa* L.)phyA 特异性丝氨酸位点磷酸化,对其远红光生物学活性以及光诱导的泛素化降解过程至关重要,进而维持细胞稳态^[33]。因此推测磷酸化修饰可能是 *MsphyA* 响应逆境信号的关键调控机制。蛋白结构域分析表明 *MsphyA* 包含典型的 PHY、PAS 等结构域,与其他光敏色素蛋白类似,这些结构域不仅介导光感知与信号传导,还被报道可感知氧化还原状态、小分子代谢物等细胞内环境变化^[34]。同时 *MsphyA* 基因启动子区域富含大量与非生物胁迫相关的顺式作用元件,如抗逆、脱落酸应答及厌氧诱导元件等,表明 *MsphyA* 的转录表达受到多种逆境信号通路的精密调控。互作蛋白预测

包含多个光敏色素互作因子 PIFs,PIFs 已被报道不仅可调控种子萌发、生物节律、激素信号、糖代谢等生理过程,还可通过环磷酸鸟苷(Cyclic Guanosine Monophosphate,cGMP)植物体内各种激素途径,如油菜素内酯、脱落酸、赤霉素等途径,共同调节植物对逆境的响应^[35]。且低温能够促进光信号通路关键转录因子(Elongated Hypocotyl 5,HY5)积累进而结合 9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶 6(9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 6,NCED6)促进 ABA 积累诱导 CBF1 表达进而提高番茄的低温抗性^[36]。因此推测 *MsphyA* 进入细胞核后能够通过调控下游转录因子网络,进而介导植物对多种逆境胁迫的适应性响应。

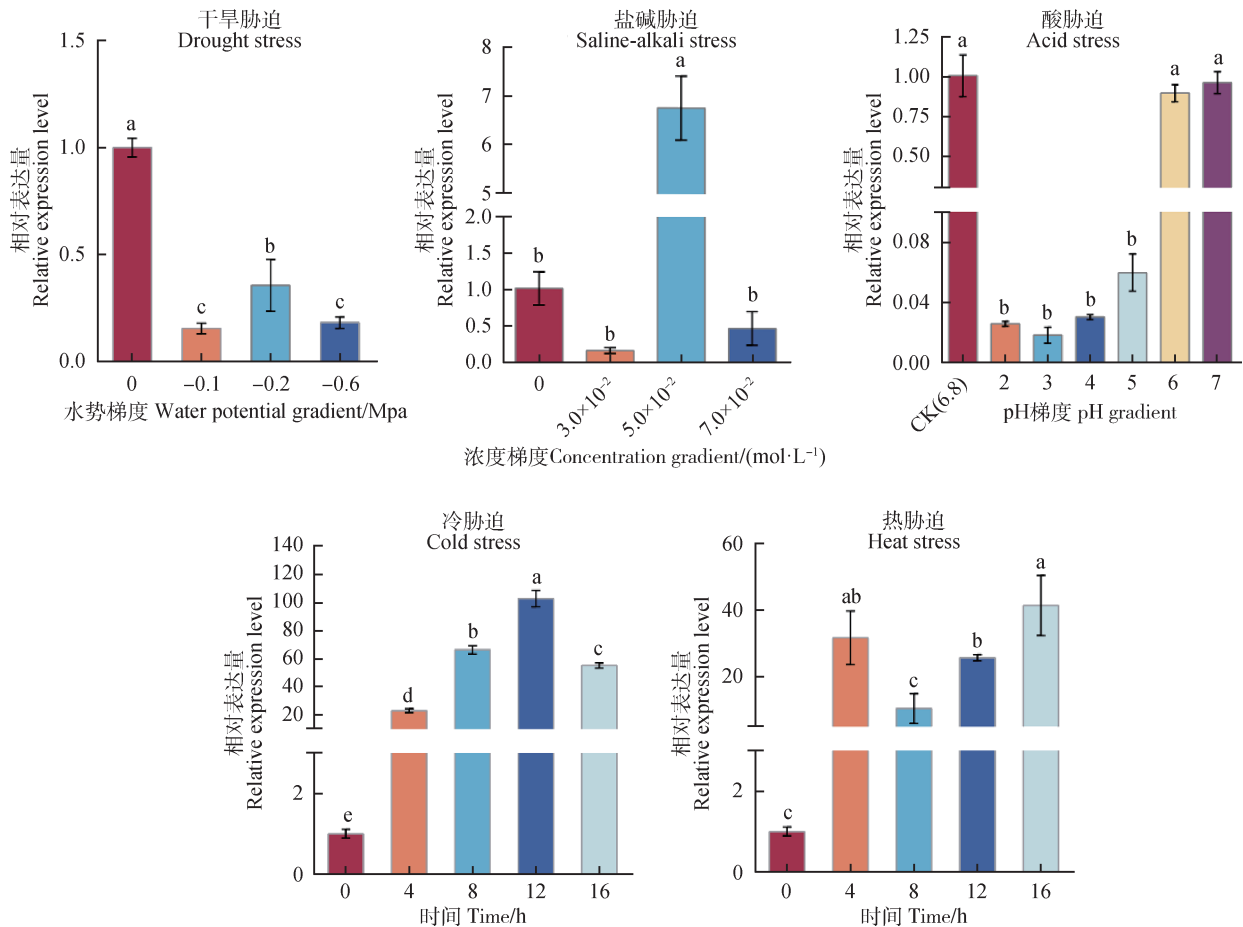


图 7 紫花苜蓿 *MsphyA* 响应不同非生物胁迫的表达模式

Fig. 7 Expression patterns of *MsphyA* in alfalfa in response to different abiotic stresses

注:不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Note: Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$)

3.2 非生物胁迫对紫花苜蓿 *MsphyA* 的表达及功能影响

本研究发现,不同水势梯度干旱胁迫下 *MsphyA* 表达均受到抑制,这与谷子和番茄中干旱胁迫的研究结果一致^[37-38]。番茄 *phyA* 突变体表现出增强的耐旱性,其机制与激活活性氧(Reactive oxygen species, ROS)清除系统以抑制氧化损伤,以及上调水通道蛋白基因表达以维持叶片相对含水量有关^[38],推测 *MsphyA* 可能通过增强 ROS 清除能力维持细胞稳态进而响应干旱胁迫。拟南芥中^[39], *AtphyA* 通过调控干旱胁迫下的气孔导度可塑性和 ABA 浓度,参与对干旱的响应,证实 *phyA* 在非生物胁迫响应中的特异性作用。不同盐碱浓度处理下,紫花苜蓿中 *MsphyA* 的表达有差异:在 $5.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理下其表达被显著上调 ($P < 0.05$), $7.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理下 *NtphyA* 的表达又呈下降态势,过高浓度盐碱环境抑制其表达。烟草在盐胁迫下会持续下调

NtphyA 的表达^[15], *NtphyA* 的功能缺失突变体通过解除对脱落酸(ABA)与茉莉酸(JA)合成的抑制,进而激活 ROS 清除系统、诱导盐防御基因烟草谷胱甘肽 S-转移酶基因(Nicotiana tabacum glutathione S-transferase, NtGST)、烟草胚胎发育晚期丰富蛋白 5 基因(Nicotiana tabacum late embryogenesis abundant protein 5, NtLEA5)表达并促进气孔关闭从而增强耐盐性,而这些生理特性可为 *phyA* 调控植物抗碱胁迫的生理机制提供重要依据。研究表明,植物在碱性盐土中高 pH 环境会加剧细胞氧化应激,还可能依赖环核苷酸类第二信使(cGMP)增强花青素合成和叶绿素积累以应对胁迫^[40]。在酵母细胞中, *phyA* 与 *phyB* 均对脱落酸信号通路起负调控作用,而 ABA 是植物应对碱胁迫的关键调控激素, *phyA* 在碱胁迫下通过激素信号来调控植物抗逆性,帮助植物适应碱胁迫下的高 pH、离子失衡等环境^[41]。光敏色素在植物温度胁迫响应中,既参与冷驯化过程,也调

控高温胁迫应答。早期研究表明,燕麦 *phyA* 基因在杂交白杨(欧洲山杨×美洲山杨, *Populus tremula*×*Populus tremuloides*)中异位表达会抑制冷驯化^[42];关于紫花苜蓿秋眠调控的研究表明, *phyA* 在低温诱导的秋眠过程中发挥作用^[43]。本研究发现,紫花苜蓿 *MsphyA* 在高温和低温胁迫下表达均显著上调,与番茄中的研究结果相呼应,番茄 *phyA* 突变体表现出耐热性增强的表型,但其耐寒性低于野生型^[10]。研究表明^[11],远红光激活 *SlphyA* 后诱导 ABA 和 JA 信号通路,进而上调 C 重复结合因子(CBF)表达以增强冷耐受性。已有光敏色素参与高温胁迫应答的研究主要集中于 *phyB* 及 PIFs 信号模块^[44],本研究结果证实 *MsphyA* 同样响应高温胁迫,与关于谷子^[37]非生物胁迫响应的相关报道一致。尽管目前尚未有 *phyA* 直接参与酸胁迫的报道,但相关研究证实光敏色素家族成员 *phys* 可通过调控 BR 和 GA 等激素信号增强烟草^[45]对重金属造成酸性环境的耐受性。结合本试验结果,推测 *MsphyA* 可能作为上游信号元件,通过介导下游激素信号通路如 BR, GA 或 JA 等的转录协调紫花苜蓿对不同 pH 环境的适应。

4 结论

本试验对克隆的紫花苜蓿 *MsphyA* 基因进行测序鉴定并进行生物信息学分析,其 CDS 区共编码 1124 个氨基酸,是不稳定亲水碱性蛋白,含 PHY 保守结构域,不具备跨膜结构,属 PHY 基因家族。亚细胞定位预测该蛋白定位于细胞核,具有响应抗逆和植物激素等顺式作用元件。*MsphyA* 与蒺藜苜蓿 *MtphyA* 亲缘关系最近,且 *MsphyA* 蛋白与多个关键蛋白家族成员存在互作关系。*MsphyA* 基因对紫花苜蓿应对干旱、盐胁迫、酸胁迫和高低温处理均有响应,表明 *MsphyA* 可能是紫花苜蓿抗逆育种的关键候选基因,为后续深入探究 *MsphyA* 的功能提供了理论基础。

参考文献

- [1] 姜敏,李魏,董铮,等. 光敏色素对植物抗逆反应的调控研究进展[J]. 生物技术通报,2017,33(7):15-21
JIANG M, LI W, DONG Z, et al. Recent advances on the regulation of phytochrome in plant defense resistance[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(7): 15-21
- [2] WANG H Y, DENG X W. Dissecting the phytochrome A-dependent signaling network in higher plants[J]. Trends in Plant Science, 2003, 8(4): 172-178
- [3] ULIJASZ A T, CORNILESCU G, CORNILESCU C C, et al. Structural basis for the photoconversion of a phytochrome to the activated Pfr form[J]. Nature, 2010, 463(7278): 250-254
- [4] WANG F F, LIAN H L, KANG C Y, et al. Phytochrome B is involved in mediating red light-induced stomatal opening in *Arabidopsis thaliana*[J]. Molecular Plant, 2010, 3(1): 246-259
- [5] CASSON S A, HETHERINGTON A M. Phytochrome B is required for light mediated systemic control of stomatal development[J]. Current Biology, 2014, 24(11): 1216-1221
- [6] BOCCALANDRO H E, RUGNONE M L, MORENO J E, et al. Phytochrome B enhances photosynthesis at the expense of water-use efficiency in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2009, 150(2): 1083-1092
- [7] BAE G, CHOI G. Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins[J]. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59: 281-311
- [8] 唐艳领,秦恒山,王腾起,等. 光质调控植物非生物胁迫抗性的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2025, 53(18): 62-68
TANG Y L, QIN H S, WANG T Q, et al. Research progress on light quality regulating plant abiotic stress resistance [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2025, 53(18): 62-68
- [9] 陈由,王亚琴. 水稻光敏色素 A 基因克隆及其在光形态建成中的作用[J]. 华南师范大学学报, 2014, 46(1): 71-76
CHEN Y, WANG Y Q. Cloning and function analysis of rice phytochrome a gene in photomorphogenesis [J]. Journal of South China Normal University (Natural Science Edition), 2014, 46(1): 71-76
- [10] ABDELLATIF I M Y, YUAN S Z, NA R H, et al. Functional characterization of tomato phytochrome A and B1B2 mutants in response to heat stress[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(3): 1681
- [11] WANG F, GUO Z X, LI H Z, et al. Phytochrome A and B function antagonistically to regulate cold tolerance via abscisic acid-dependent jasmonate signaling [J]. Plant physiology, 2016, 170(1): 459-471
- [12] BOGGS J Z, LOEWY K, BIBEE K, et al. Phytochromes influence stomatal conductance plasticity in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Growth Regulation, 2010, 60(2): 77-81
- [13] MA L, HAN R, YANG Y Q, et al. Phytochromes enhance SOS2-mediated PIF1 and PIF3 phosphorylation and degradation to promote *Arabidopsis* salt tolerance[J]. The Plant Cell, 2023, 35(8): 2997-3020
- [14] 杜晓芬,沈蒙蒙,王智兰,等. 谷子 *SiPHYA* 和 *SiPHYB* 基因对光质、光周期和非生物胁迫的响应[J]. 农业生物技术学报, 2024, 32(5): 983-994
DU X F, SHEN M M, WANG Z L, et al. Responses of *SiPHYA* and *SiPHYB* gene to light quality, photoperiod and abiotic stresses in foxtail millet (*Setaria italica*) [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2024, 32(5): 983-994
- [15] YANG T, LV R H, LI J, et al. Phytochrome A and B negatively regulate salt stress tolerance of *Nicotiana tobacum* via ABA-jasmonic acid synergistic cross-talk[J]. Plant and Cell Physiology, 2018, 59(11): 2381-2393
- [16] 张钿,冷华娟,崔婧,等. 紫花苜蓿突触结合蛋白家族成员鉴定与非生物胁迫下的表达分析[J]. 草业学报, 2026, 35(4): 158-168
ZHANG T, LENG H J, CUI J, et al. Identification of synaptotagmin gene family members in alfalfa and their transcript profiles under abiotic stresses[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(4): 158-168
- [17] 邹苇鹏,刘怡,翟佳兴,等. 紫花苜蓿 *MsNAC053* 基因克隆及其对非生物胁迫的响应分析[J]. 草业学报, 2025, 34(9): 121-133
ZOU W P, LIU Y, ZHAI J X, et al. Cloning of *MsNAC053* from alfalfa and analysis of its transcript profile in response to abiotic stresses[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(9): 121-133
- [18] 王美娇,彭晶,齐立娟,等. 光信号调控植物响应非生物胁迫的

- 研究进展[J]. 植物生理学报, 2023, 59(4): 682-704
- WANG M J, PENG J, QI L J, et al. Research advances on light control of plant responses to abiotic stresses[J]. Plant Physiology Journal, 2023, 59(4): 682-704
- [19] 李平, 杨玲玲, 陈其新, 等. 两种策略分别克隆紫花苜蓿光敏色素A、B基因[J]. 草业学报, 2011, 20(6): 85-92
- LI P, YANG L L, CHEN Q X, et al. Two strategies of cloning *Medicago sativa* phytochrome A and B genes[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2011, 20(6): 85-92
- [20] 杨玲玲. RACE法克隆紫花苜蓿光敏色素A基因[D]. 郑州: 河南农业大学, 2008: 29-46
- YANG L L. Cloning of alfalfa phytochrome a gene using rapid amplification of cDNA ends [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2008: 29-46
- [21] 杨怡欣. 不同胁迫条件下苜蓿内参基因的筛选及抗氧化指标的测定[D]. 洛阳: 河南科技大学, 2024: 21-35
- YANG Y X. Screening of alfalfa internal reference genes and determination of antioxidant indexes under different stress conditions [D]. Luoyang: Henan University of Science and Technology, 2024: 21-35
- [22] CHEN F, LI B, DEMONE J, et al. Photoreceptor partner PHY1 has an independent role in gene modulation and plant development under far-red light [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(32): 11888-11893
- [23] QUAIL P H. Phytochrome photosensory signalling networks[J]. Nature Reviews Molecular Cell biology, 2002, 3(2): 85-93
- [24] 陈倩, 喻奇伟, 郑登峰, 等. 烟草PHYA基因的光温敏感性及生物学功能分析[J]. 分子植物育种, 2021, 19(13): 4392-4400
- CHEN Q, YU Q W, ZHENG D F, et al. Regulation of PHYA gene on photothermal sensitivity and related traits in tobacco [J]. Molecular Plant Breeding, 2021, 19(13): 4392-4400
- [25] 岳玲琦, 邢巧娟, 张晓兰, 等. 光敏色素互作因子在植物抵御逆境胁迫中的作用研究进展[J]. 园艺学报, 2021, 48(4): 632-646
- YUE L Q, XING Q J, ZHANG X L, et al. Research progress on the effect of phytochrome-interacting factors in plant resistance to abiotic stress [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2021, 48(4): 632-646
- [26] SHICHIJO C, KATADA K, TANAKA O, et al. Phytochrome A-mediated inhibition of seed germination in tomato [J]. Planta, 2001, 213(5): 764-769
- [27] JOHNSON E, BRADLEY M, HARBERD N P, et al. Photo responses of light-grown phyA mutants of *Arabidopsis* (phytochrome A is required for the perception of daylength extensions) [J]. Plant physiology, 1994, 105(1): 141-149
- [28] WEI S, XU X H, LU X B, et al. The rice phytochrome genes, PHYA and PHYB have synergistic effects on anther development and pollen viability [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 6439
- [29] KIRCHER S, GIL P, KOZMA-BOGNÁR L, et al. Nucleocytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochrome A, B, C, D, and E is regulated differentially by light and exhibits a diurnal rhythm [J]. The Plant Cell, 2002, 14(7): 1541-1555
- [30] 李彦坤. 黑麦3个光敏色素基因在光形态建成中的功能分析[D]. 郑州: 河南农业大学, 2025: 27-39
- LI Y K. Functional analysis of three photosensitive pigment genes in rye during photomorphogenesis [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2025: 27-39
- [31] HISADA A, HANZAWA H, WELLER J L, et al. Light-induced nuclear translocation of endogenous pea phytochrome A visualized by immunocytochemical procedures [J]. The Plant Cell, 2000, 12(7): 1063-1078
- [32] RÖSLER J, KLEIN I, ZEIDLER M. *Arabidopsis fhl/fhyl* double mutant reveals a distinct cytoplasmic action of phytochrome A [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(25): 10737-10742
- [33] HAN Y J, KIM H S, KIM Y M, et al. Functional characterization of phytochrome autophosphorylation in plant light signaling [J]. Plant and Cell Physiology, 2010, 51(4): 596-609
- [34] ROCKWELL N C, SU Y S, LAGARIAS J C. Phytochrome structure and signaling mechanisms [J]. Annual Review of Plant Biology, 2006, 57(1): 837-858
- [35] 许建闻, 由云生, 徐亚伟, 等. PIFs转录因子功能研究进展[J]. 防护林科技, 2025(4): 74-80
- XU J W, YOU Y S, XU Y W, et al. Research progress on the function of PIFs transcription factors [J]. Protection Forest Science and Technology, 2025(4): 74-80
- [36] 王峰. PhyA、HY5和PIF4在光质调控番茄低温抗性中的机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2017: 19-55
- WANG F. Roles and mechanisms of phyA-, HY5- and PIF4-mediated light quality-regulated cold tolerance in tomato [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2017: 19-55
- [37] 贾小平, 张博, 何占祥, 等. 谷子光敏色素基因光周期、非生物胁迫响应特性及关键自然变异位点鉴定[J]. 生物工程学报, 2022, 38(5): 1929-1945
- JIA X P, ZHANG B, HE Z X, et al. The responsive characteristics of phytochrome genes to photoperiod, abiotic stresses and identification of their key natural variation sites in foxtail millet (*Setaria italica* L.) [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(5): 1929-1945
- [38] ABDELLATIF I M Y, YUAN S Z, YOSHIHARA S, et al. Stimulation of tomato drought tolerance by *PHYTOCHROME A* and *B1B2* mutations [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(2): 1560
- [39] GONZÁLEZ C V, IBARRA S E, PICCOLI P N, et al. Phytochrome B increases drought tolerance by enhancing ABA sensitivity in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant, Cell & Environment, 2012, 35(11): 1958-1968
- [40] PENG Y X, ZHU H Y, WANG Y T, et al. Revisiting the role of light signaling in plant responses to salt stress [J]. Horticulture Research, 2025, 12: uhac26
- [41] LI H, ZHOU Y Y, QIN X Y, et al. Reconstitution of phytochrome A-mediated light modulation of the ABA signaling pathways in yeast [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2023, 120(34): e2302901120
- [42] OLSEN J E, JUNTILLA O, NILSEN J, et al. Ectopic expression of oat phytochrome A in hybrid aspen changes critical daylength for growth and prevents cold acclimatization [J]. The Plant Journal, 1997, 12(6): 1339-1350
- [43] 樊文娜, 任冰冰, 史鹏飞, 等. 光敏色素A参与苜蓿秋眠调控分子机制的研究进展[J]. 中国饲料, 2022, 1(5): 112-116
- FAN W N, REN B B, SHI P F, et al. Advance in alfalfa of phytochrome A regulating fall dormancy [J]. China Feed, 2022, 1(5): 112-116
- [44] NIETO C, LÓPEZ-SALMERÓN V, DAVIÈRE J M, et al. ELF3-PIF4 interaction regulates plant growth independently of the evening complex [J]. Current Biology, 2015, 25(2): 187-193
- [45] YANG T, ZHANG H, JIANG X P, et al. Phytochrome alleviates cadmium toxicity by regulating gibberellic acid and brassinolide in *Nicotiana tabacum* [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2025, 219: 109375