

草业科学
Pratacultural Science
ISSN 1001-0629, CN 62-1069/S

《草业科学》网络首发论文

题目：花苜蓿 SBP 基因家族的鉴定与表达模式分析
作者：李健忱，韩秉成，罗栋，王召明，刘志鹏，马文雪
收稿日期：2024-12-07
网络首发日期：2025-09-16
引用格式：李健忱，韩秉成，罗栋，王召明，刘志鹏，马文雪. 花苜蓿 SBP 基因家族的鉴定与表达模式分析[J/OL]. 草业科学.
<https://link.cnki.net/urlid/62.1069.S.20250916.0920.002>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

DOI: 10.11829/j.issn.1001-0629.2024-0806

李健忱, 韩秉成, 罗栋, 王召明, 刘志鹏, 马文雪. 花苜蓿 SBP 基因家族的鉴定与表达模式分析. 草业科学, 10.11829/j.issn.1001-0629.2024-0806.

LI J C, HAN B C, LUO D, WANG Z M, LIU Z P, MA W X. Identification and expression pattern analysis of *Medicago ruthenica* SBP gene family. Pratacultural Science, 10.11829/j.issn.1001-0629.2024-0806.

花苜蓿 SBP 基因家族的鉴定与表达模式分析

李健忱¹; 韩秉成¹; 罗栋²; 王召明³; 刘志鹏¹; 马文雪¹

1. 草种创新与草地农业生态系统全国重点实验室/兰州大学草地农业科技学院, 甘肃 兰州 730020;
2. 广西大学动物科学技术学院, 广西 南宁 530004;
3. 国家草业技术创新中心(筹), 内蒙古 呼和浩特 010051)

摘要: SQUAMOSA 启动子结合蛋白 (promoter binding protein, SBP) 是一类植物特有的转录因子, 通过激活或抑制多个靶基因的转录, 在逆境胁迫应答和植物生长发育中发挥重要作用。SBP 基因家族编码的转录因子参与植物的生长发育、信号转导和多种生理生化过程。本研究采用生物信息学方法进行染色体定位、系统进化分析、基因结构研究, 鉴定了花苜蓿 (*Medicago ruthenica*) 中 SBP 基因家族的 22 个成员, 并分析其在干旱胁迫下的表达模式。同时, 利用 RT-qPCR 验证这些基因在干旱胁迫下的表达变化。结果显示, *MruSBP06A*、*MruSBP13D* 和 *MruSBP14* 基因在不同时间点的干旱胁迫和不同浓度甘露醇处理下均表现出下调表达, 而 *MruSBP02*、*MruSBP07* 和 *MruSBP12* 则在干旱胁迫下显著 ($P < 0.01$) 上调表达, 提示这些基因可能在花苜蓿的干旱响应中起着重要作用。本研究为深入揭示花苜蓿 SBP 基因的功能及其在耐旱育种中的潜在应用提供理论依据。

关键词: 干旱; 转录表达分析; 进化分析; RT-qPCR

收稿日期: 2024-12-7

基金项目: 内蒙古自治区“揭榜挂帅”项目 (2022JBGS0040); 2023 年国家草业技术创新中心(筹)重大创新平台建设专项 (CCPTZX2023N04); 甘肃省首席科学家负责制项目 (23ZDKA013)。

第一作者: 李健忱 (1996-), 男, 黑龙江哈尔滨人, 在读硕士生, 主要研究方向为牧草种质资源与分子育种。E-mail: ljianchen2023@lzu.edu.cn

通信作者: 马文雪 (1995-), 女, 甘肃天水人, 在读博士生, 主要研究方向为紫花苜蓿抗逆分子育种。E-mail: mawx21@lzu.edu.cn

Identification and expression pattern analysis of *Medicago*

ruthenica SBP gene family

LI Jianchen¹, HAN Bingcheng¹, LUO Dong², WANG Zhaoming³, LIU Zhipeng¹, MA Wenxue¹

(1.State Key Laboratory of Herbage Improvement and Grassland Agro-ecosystems/College of Pastoral Agriculture Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730020, Gansu,China;

2.College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi,China;

3.National Center of Pratacultural Technology Innovation (Under Preparation), Huhehaote 010051, Neimenggu,China)

Abstract: SQUAMOSA promoter-binding protein (SBP) are a class of plant-specific transcription factors that play crucial roles in stress responses and plant growth and development by activating or repressing the transcription of multiple target genes. The SBP gene family encodes transcription factors involved in plant growth, signal transduction, and various physiological and biochemical processes. In this study, bioinformatics methods were employed for chromosomal localization, phylogenetic analysis, and gene structure investigation to identify 22 members of the SBP gene family in *Medicago ruthenica* and analyze their expression patterns under drought stress. Additionally, RT-qPCR was used to validate the expression changes of these genes under drought stress. The results showed that the *MruSBP06A*, *MruSBP13D*, and *MruSBP14* genes were downregulated under drought stress at different time points and under various concentrations of mannitol. Conversely, the *MruSBP02*, *MruSBP07*, and *MruSBP12* genes were significantly ($P<0.01$) upregulated under drought stress, suggesting that these genes may play important roles in the drought response of *M. ruthenica*. This study provides a theoretical foundation for further elucidating the functions of *M. ruthenica* SBP genes and their potential applications in drought-resistant breeding.

Keywords: drought; transcriptional expression analysis; evolutionary analysis; RT-qPCR

转录因子 (Transcription factors, TFs) 是几乎所有生物体内的关键蛋白质分子^[1], 能够特异性地与 DNA 序列结合, 进而调控靶基因的转录过程。转录因子通过识别并结合到基因上特定的 DNA 序列, 激活或抑制相关基因的表达, 从而影响细胞内各种蛋白质的合成, 最终决定细胞的多种生物学功能^[2]。SQUAMOSA 结构域存在于植物蛋白质中, 是一种特定序列的结合结构域, 属于 SBP (SQUAMOSA promoter binding protein) 基因家族, 其成员可能作为转录因子参与调控早期花发育^[3]。该结构域包含 10 个保守的半胱氨酸和组氨酸残基, 它们可能是锌配体^[4]。近年来, SBP 基因在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 以外的植物中的功能

研究逐渐增多。张等^[5]揭示了 miR156 和 MsSPLs 在调控紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 植物形态和非生物胁迫中的作用。王等^[6]发现, 茶树 (*Camellia sinensis*) 中的 20 个 SBP 基因在脱落酸、赤霉素和茉莉酸甲酯信号通路依赖的非生物胁迫响应中发挥积极作用。郭庆等^[7]发现, 杨树 (*Populus trichocarpa*) 中 SBP 基因家族在盐胁迫下具有多样的基因表达模式, 响应高盐胁迫并参与生长发育和其他非生物胁迫。此外, SBP 基因家族成员的分组在不同植物中有所不同。大多数植物的 SBP 基因可分为 8 个分支, 如番茄 (*Solanum lycopersicum*)^[8]、拟南芥^[9]、苹果 (*Malus pumila*)^[10]、棉花 (*Gossypium hirsutum*)^[11]、烟草 (*Nicotiana tabacum*)^[12] 和油菜 (*Brassica napus*)^[13], 葡萄 (*Vitis vinifera*) 有 7 个分支^[14], 而辣椒 (*Capsicum annuum*)^[15] 和杨树 (*Populus trichocarpa*)^[16] 则有 6 个分支。

花苜蓿 (*Medicago ruthenica*) 是一种多年生豆科牧草, 与世界上最重要的饲料作物之一^[17,18] 紫花苜蓿同源^[19]。与紫花苜蓿对水分和土壤肥力要求较高^[20] 不同, 花苜蓿适应干旱、高寒和贫瘠土壤。由于其抗旱、耐寒、耐盐碱, 叶片丰富, 适口性好, 营养品质高, 不仅是苜蓿遗传改良的材料, 还是优质牧草的理想选择^[17,18]。尽管已有研究对模式植物和其他作物中的 SBP 基因家族进行一定程度的分析, 但对花苜蓿这一物种的相关研究仍较为有限。本研究以花苜蓿基因组数据^[21,22] 为基础, 系统分析了 SBP 基因家族成员的多种理化特性以及基因家族的系统发育关系。此外, 还对这些基因在干旱胁迫处理下根尖中的表达模式进行了分析。这些分析结果不仅为深入理解 SBP 基因家族的生物学功能和作用机制提供了重要信息, 同时也为揭示其在植物抗逆性中的调控作用奠定了理论基础。更进一步, 本研究筛选出了具有潜在应用价值的候选基因, 为从分子水平开发优质抗逆牧草品种提供了新的研究思路和技术方向。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本实验以“中科 1 号”花苜蓿品种作为试验材料, 挑选 2000 粒健康饱满的花苜蓿种子进行打磨处理, 破除硬实。使用 5% 的次氯酸钠溶液对种子进行消毒, 消毒后用无菌水充分冲洗, 并将种子均匀铺于方形培养皿中进行萌发处理, 在步入式培养箱倒置培养 4 d 后, 选取长势健壮的幼苗移至水培盒, 采用 MS 营养液水培 4 d, 每 2 d 更换一次培养液。随后使用不同浓度的甘露醇对幼苗进行干旱胁迫处理, 分为 3 组: (A) 对照处理: 使用 MS 营养液处理, 第 13 d 取样; (B) 不同浓度干旱胁迫组: 分别用 50 mmol/L、100 mmol/L、200 mmol/L、300 mmol/L、400 mmol/L 的甘露醇处理 12 日龄幼苗, 处理 1 d 后取样; (C) 模拟干旱胁迫组: 12 日龄幼苗开始进行 400 mmol/L 甘露醇处理 (处理时间分别为 1 h、3 h、6 h、12 h 和

24 h)，第 13 d 集中对 A、B 和 C 组根尖进行取样。

1.2 试验方法

1.2.1 MruSBP 基因家族的鉴定与理化性质分析

在 The Arabidopsis Information Resource 数据库^[23]下载 17 个拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) AtSPL 蛋白序列作为查询序列，利用 TBtools-II 软件^[24]筛选出 22 条花苜蓿候选基因的蛋白序列。通过从 Pfam 数据库 (<http://pfam-legacy.xfam.org/>) 下载 SBP 结构域 (PF03110) 对应的隐马尔科夫模型 (HMM) 文件，使用 TBtools-II 分析，获得 22 条含有 MruSBP 结构域的蛋白序列。利用在线网站 Batch CD-Search^[25]进行蛋白保守结构域分析，结果显示这 22 条序列结构域完整。在 PlantTFDB 网站 (<http://planttfdb.gao-lab.org/>) 网站下载蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) 的 SBP 基因家族蛋白序列，按前述方法鉴定了 23 个蒺藜苜蓿 SBP 基因家族的蛋白序列，并按蒺藜苜蓿与拟南芥的同源关系依次命名为 *MtSPL01*~*MtSPL16*。MruSBP 基因根据与最接近的蒺藜苜蓿同源基因命名为 *MruSBP01A*~*MruSBP15*^[5]。使用 TBtools-II 中 Protein Pairwise Similarity Matrix 分析花苜蓿 SBP 蛋白序列的理化性质，亚细胞定位使用 Plant-mPLoc^[26]进行预测。

1.2.2 花苜蓿 SBP 在染色体上的定位

使用 TBtools-II 软件，根据花苜蓿基因组注释文件，对 SBP 基因在花苜蓿染色体上的定位进行可视化展示。

1.2.3 花苜蓿 SBP 家族基因系统发育分析

花苜蓿、拟南芥、蒺藜苜蓿的全部 SPL 蛋白的多序列对比和进化树构建均使用 MEGA7 软件^[27]完成，构建系统进化树方法为邻接法 (Neighbor-Joining)，Bootstrap 值为 1000 次重复。进化树的可视化及美化通过 Evolview v2 网站^[28]完成。

1.2.4 花苜蓿 SBP 家族同源性分析、保守基序、保守结构域及顺式作用元件分析

使用 TBtools-II 软件中的 MCscanX 工具分析 *MruSBP* 基因的复制事件，检测 *MruSBP* 基因与拟南芥、蒺藜苜蓿、紫花苜蓿 (中苜 1 号^[29])、水稻 (*Oryza sativa*) 和大豆 (*Glycine max*) 的 SBP 基因家族之间的共线性区域。利用 MEME 工具^[30]分析花苜蓿 SBP 蛋白的保守基序 (Motif)，最大基序设置为 16，最佳基序宽度设置为 6~150。利用 TBtools-II 提取 *MruSBP* 基因上游 2000 bp 碱基序列，在 PlantCARE 网站^[31]分析其启动子顺式作用元件。用 TBtools-II 对上述结果绘图。

1.2.5 MruSBP 基因在干旱胁迫下的表达模式分析

为探讨 *MruSBP* 基因在干旱胁迫下的表达水平，本实验利用王天佐等^[22]的花苜蓿干旱

处理 0 d、5 d、7 d 和 9 d 的花苜蓿根尖的转录组数据进行分析，使用 fastp 软件^[32]对原始测序数据进行质控和过滤以去除低质量数据，使用 HISAT2 将处理后的数据比对到任广鹏等^[21]的参考基因组，并使用 feature Counts 工具对基因表达量进行定量分析，通过 TBtools-II 软件生成干旱胁迫下 *MruSBP* 基因表达的热图。

1.2.6 花苜蓿总 RNA 提取与实时定量 PCR 分析

总 RNA 提取采用天根公司的植物总 RNA 提取试剂盒，RNA 反转录使用思科捷公司提供的 SPARKscript II All-in-one RT SuperMix for qPCR（含 gDNA 去除试剂）。操作步骤均严格按照试剂盒说明书进行。反转录生成的 cDNA 产物经 20 倍稀释后用作 RT-qPCR 模板。引物设计通过 Primer3Plus 在线工具完成^[33]，由擎科公司合成。使用 Taq SYBR Green qPCR Premix 试剂盒（百时美，EG20117M）进行 RT-qPCR 实验，反应体系如表 1 所示，使用两步法扩增，并技术重复 2 次，基因相对表达水平用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算。*MruSBP01A*~*MruSBP15* 基因 RT-qPCR 引物序列以及内参基因^[34]*MruACTIN* 引物序列如表 2 所示。

表 1 RT-qPCR 反应体系

Table1 RT-qPCR reaction system

组分	体积
2×SYBR Green qPCR Premix	7 μL
ddH ₂ O	1 μL
cDNA	1 μL
上游引物	0.5μL
下游引物	0.5μL

表 2 RT-qPCR 引物

Table2 Primers for RT-qPCR

基因名称	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
Gene name	Primer forward sequence (5'-3')	Primer reverse sequence (5'-3')
<i>MruSBP01A</i>	CGGAAAAGCTGAAGTAAGACGT	CCCATCTGAAAGGTCGGAACA
<i>MruSBP02</i>	CAAGCCCCACTCCCTCATAC	AATCCAGCTGGTTGCAAGGG
<i>MruSBP06A</i>	TCTTAGCTCCTCGAAAGATTACC	CTCAGATATCCTGTTGCACTGC
<i>MruSBP06C</i>	CGTGTGAAGATGATGCAACCA	TCCGGAGAGTGCAAGAAGAA
<i>MruSBP07</i>	GAGTTGCCTAAAAGATGTGACCA	ACTCGTTAACCCCTCCCATGATG

<i>MruSBP12</i>	CACTACCTTTGAGATTGGAAATGC	GGAATATATACAGAACTTCCGGCG
<i>MruSBP13C</i>	GTCAAGCATCAACAACAGTCCA	AGAGTCACTGAGTTATCGTTTTTCG
<i>MruSBP13D</i>	GCATCAACAACAGTCCAACACA	ACTCCCAGAAGAATGGAAGAGT
<i>MruSBP14</i>	CACTGGGAATTGAGCTAATGCA	GAGCCTACAAAAGGGGTTCCA
<i>MruACTIN</i>	ATCCAGGCTGTCCTCTCCCT	ACGAAGGATGGCATGTGGGA

1.3 数据分析

使用 Excel 2021 软件对所得数据进行计算，用 GraphPad Prism 9.5.0.730 软件进行单因素方差分析并制作柱状图。

2 结果与分析

2.1 花苜蓿 SBP 基因家族的鉴定

MruSBP 基因的理化性质和预测的亚细胞定位结果列于表 3。22 个 *MruSBP* 蛋白的氨基酸数目在 54~1014 之间，分子量最大是 112457.54 Da，最小是 6223.11 Da；理论等电点在 5.85~9.24 之间，其中 8 个 SBP 蛋白的理论等电点小于 7，归类为酸性蛋白，其余 14 个蛋白大于 7，归类为碱性蛋白。蛋白不稳定系数均在 40 以上，均为不稳定蛋白。*MruSBP* 蛋白脂肪系数在 38.25~91.04 之间，且均呈现亲水性（亲水性值小于 0）。亚细胞定位预测结果表明，12 个 *MruSBP* 蛋白位于细胞核上，10 个 *MruSBP* 蛋白位于细胞核和细胞质上。

表 3 花苜蓿 SBP 基因家族成员理化性质

Table3 Physicochemical Properties of the *M. ruthenica* SBP Gene Family Members

蛋白名称 Protein name	基因 ID Gene ID	氨基酸数 Number of amino acid/aa	分子量 Molecular weight/Da	等电点 pI	不稳定系数 Instability index	脂肪系数 Aliphatic index	疏水性 Hydrophaticity	亚细胞定位 Subcellular localization
MruSBP01A	MruT004533.1	1003	111461.2	5.88	52.54	77.56	-0.476	细胞核
MruSBP01B	MruT048412.1	1003	111646.46	5.92	53.11	77.95	-0.476	细胞核
MruSBP02	MruT015941.1	434	48125.33	8.52	59.83	53.29	-0.831	细胞核，细胞质
MruSBP03	MruT022735.1	143	17070.72	7.04	107.63	38.25	-1.553	细胞核
MruSBP04	MruT022736.1	122	14471.13	5.98	92.76	60	-1.067	细胞核，细胞质
MruSBP05	MruT010279.1	170	19505.67	8.23	81.5	47.59	-1.076	细胞核，细胞质
MruSBP06A	MruT036366.1	54	6223.11	9.1	40.54	64.81	-0.667	细胞核

MruSBP06B	MruT009392.1	526	57318.24	6.56	50.82	65.57	-0.586	细胞核, 细胞质
MruSBP06C	MruT043846.1	455	50606.36	6.39	53.94	66.81	-0.507	细胞核
MruSBP07	MruT007686.1	743	83330.73	6.34	49.27	91.04	-0.204	细胞核, 细胞质
MruSBP08	MruT039559.1	329	36343.74	8.75	68.82	45.14	-0.903	细胞核
MruSBP09	MruT003275.1	347	38305.6	8.79	62.7	54.47	-0.666	细胞核, 细胞质
MruSBP10A	MruT023661.1	390	44070.38	8.77	54.56	61.31	-0.655	细胞核, 细胞质
MruSBP10B	MruT023660.1	256	29196.16	8.94	57.22	75	-0.545	细胞核
MruSBP11	MruT023662.1	373	41896.54	7.09	56.89	62.47	-0.691	细胞核, 细胞质
MruSBP12	MruT038960.1	1003	110910.9	5.85	47.18	81.14	-0.404	细胞核
MruSBP13A	MruT024701.1	389	43352.81	8.3	56.79	50.1	-0.837	细胞核
MruSBP13B	MruT016945.1	376	41717.48	6.73	56.7	65.56	-0.661	细胞核
MruSBP13C	MruT035166.1	364	40649.54	8.73	53.45	60.52	-0.813	细胞核, 细胞质
MruSBP13D	MruT035167.1	364	40649.54	8.73	53.45	60.52	-0.813	细胞核, 细胞质
MruSBP14	MruT001666.1	1014	112457.54	7.33	53.07	71.89	-0.517	细胞核
MruSBP15	MruT037762.1	339	36797.5	9.24	62.37	52.09	-0.756	细胞核

2.2 *MruSBP* 基因染色体定位分析

根据花苜蓿染色体长度及每个 *MruSBP* 基因的位置注释信息, 绘制分布图, 结果除 1 个位于未组装到染色体上的 *MruSBP01B* 基因外, 其他所有 *SBP* 基因都被绘制到相应的染色体位置上 (图 1)。这 21 个 *SBP* 基因在花苜蓿染色体上分布不均匀, 在 chr5 或 chr6 上没有分布。在 chr4 和 chr7 上分布有更多的 *SBP* 基因, 分别有 6 个和 5 个, 在 chr1 和 chr2 上有 3 个 *SBP* 基因, chr3 和 chr8 上均有 2 个 *SBP* 基因。同时, 可以看到在 *MruSBP03* 和 *MruSBP04* 之间, *MruSBP10A*、*MruSBP10B* 和 *MruSBP11* 之间以及 *MruSBP13C* 和 *MruSBP13D* 之间都发生串联重复 (图 1)。

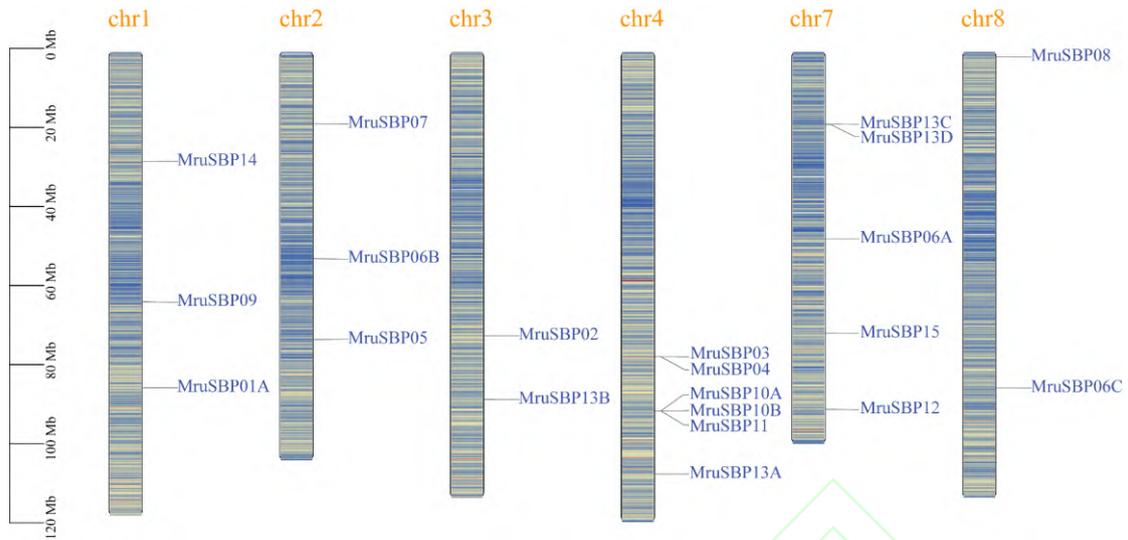


图 1 花苜蓿 *SBP* 基因在染色体上的分布

Fig.1 The Chromosomal Distribution of *M. ruthenica* *SBP* Genes.

2.3 花苜蓿 *SBP* 转录因子系统进化分析

为研究 *SBP* 基因的进化支系，本实验利用来自拟南芥、蒺藜苜蓿^[37]和花苜蓿的 51 条 *SBP* 序列构建系统发育树（图 2）。这些序列被聚为 7 组（G1~G7），组间成员数量差异很大，第 1 组成员数最多，有 15 个成员。*MruSBP* 家族基因在所有的类群中均有分布，且与拟南芥 *AtSPL* 家族基因密切相关。花苜蓿的许多基因与蒺藜苜蓿基因高度聚类，表明苜蓿属物种在 *SBP* 基因家族中具有较高的保守性。一些分支中花苜蓿基因与拟南芥基因距离较远（如 G7 组）。

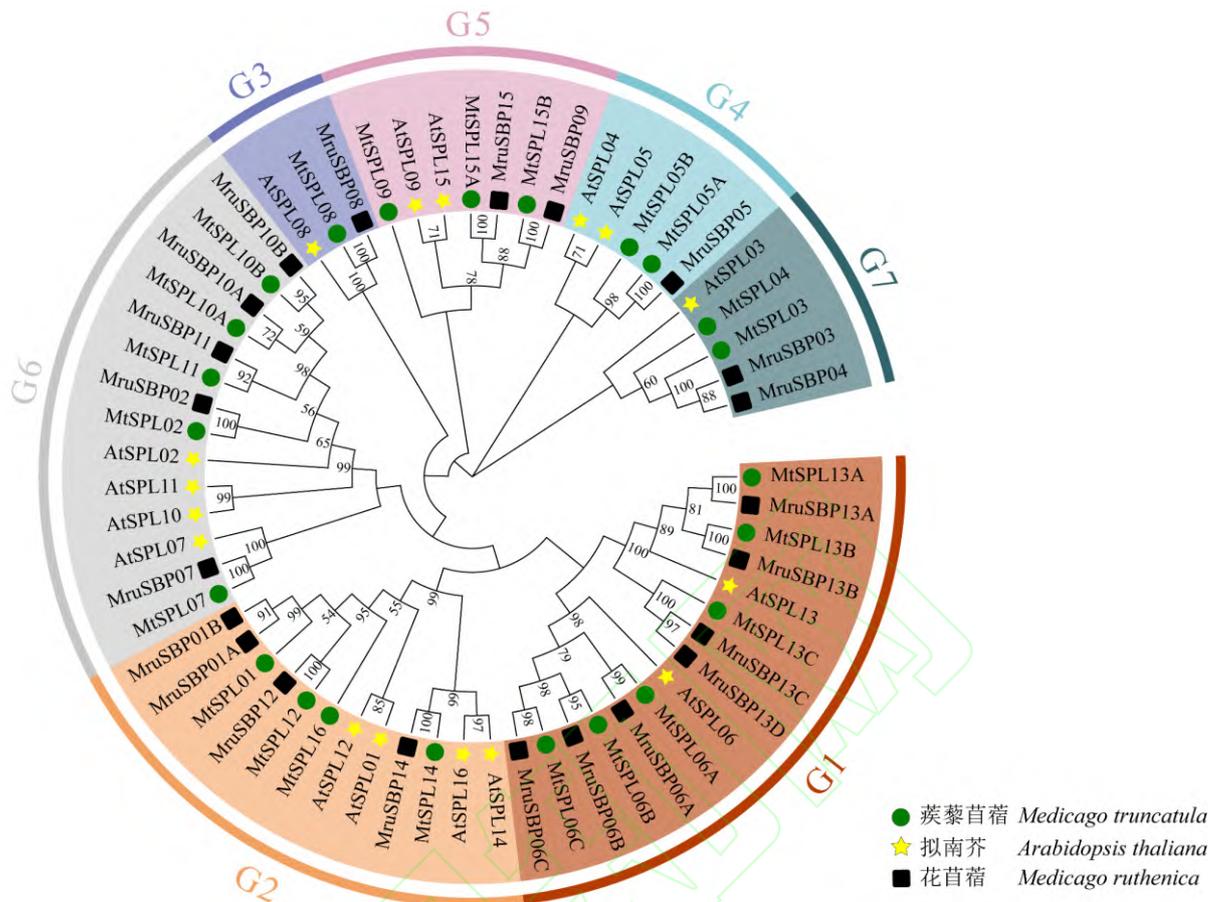


图 2 花苜蓿、拟南芥和蒺藜苜蓿的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of *M. ruthenica*, *A. thaliana* and *M. truncatula*

2.4 花苜蓿 SBP 基因家族保守基序、基因结构分析

本实验对花苜蓿 SBP 基因结构进行分析，发现花苜蓿的 MruSBP 基因家族成员结构差异较大，外显子从 2~10 个不等，内含子从 1~9 个不等，这与之前的研究趋势相同^[1,33,34]。

为更好地揭示 MruSBP 蛋白的结构特征，本实验使用 MEME 工具对花苜蓿 SBP 蛋白的保守基序进行分析（图 3），最终一共鉴定到 15 个 Motif 保守基序（Motif 01~15）。花苜蓿 SBP 基因保守基序的分析结果大部分支持 SBP 转录因子基因家族系统发育分析的分类。Motif 01、Motif 02 位于基因的 N 端，几乎在所有 SBP 基因中均有分布，推测其为 SBP 保守结构域。Motif 05、Motif 07、Motif 09、Motif 10、Motif 12 和 Motif 14 是亚组 G2 中特有的基序^[37]。与进化树分析结果相似，G3、G5 和 G7 亚组含有的蛋白保守基序比较简单且含有的特征较为一致，特有的基序可能在亚组的特异性功能、特殊环境响应或者特定表达模式相关。

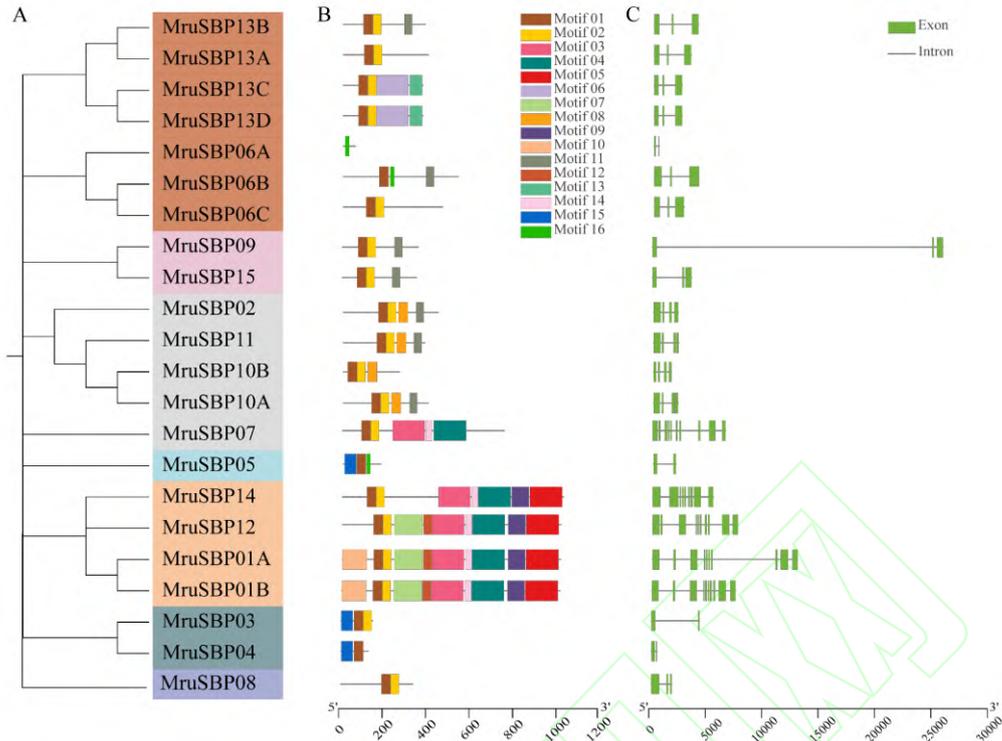


图 3 花苜蓿 SBP 家族蛋白的系统发育关系 (A)、保守基序 (B) 和基因结构分析 (C)

Fig.3 Phylogenetic relationships (A), conserved Motifs (B), and gene structure (C) analysis of the *M. ruthenica* SBP family proteins

2.5 花苜蓿 SBP 基因家族基因同源关系分析

为研究 *MruSBP* 基因之间可能发生的基因重复, 本实验利用花苜蓿基因组数据库绘制预测的 *MruSBP* 位点。预测结果表明, *MruSBP* 共存在 5 对片段重复 (图 4)。这些结果表明, 花苜蓿的 *SBP* 基因在数目上出现一定程度的扩张, 复制事件广泛存在于 *MruSBP* 的进化中。

为进一步揭示 *MruSBP* 基因家族的系统发育, 本实验构建花苜蓿和水稻、大豆、蒺藜苜蓿、拟南芥与紫花苜蓿的 5 个比较同源图谱 (图 5)。花苜蓿与大豆、蒺藜苜蓿、紫花苜蓿、拟南芥和水稻的同源基因对数分别为 41、26、25、14 和 5 个。由此可见, 花苜蓿与大豆的 *SBP* 基因亲缘关系最近, 比蒺藜苜蓿和紫花苜蓿更近; 同时, 花苜蓿与水稻的 *SBP* 基因亲缘关系最远。

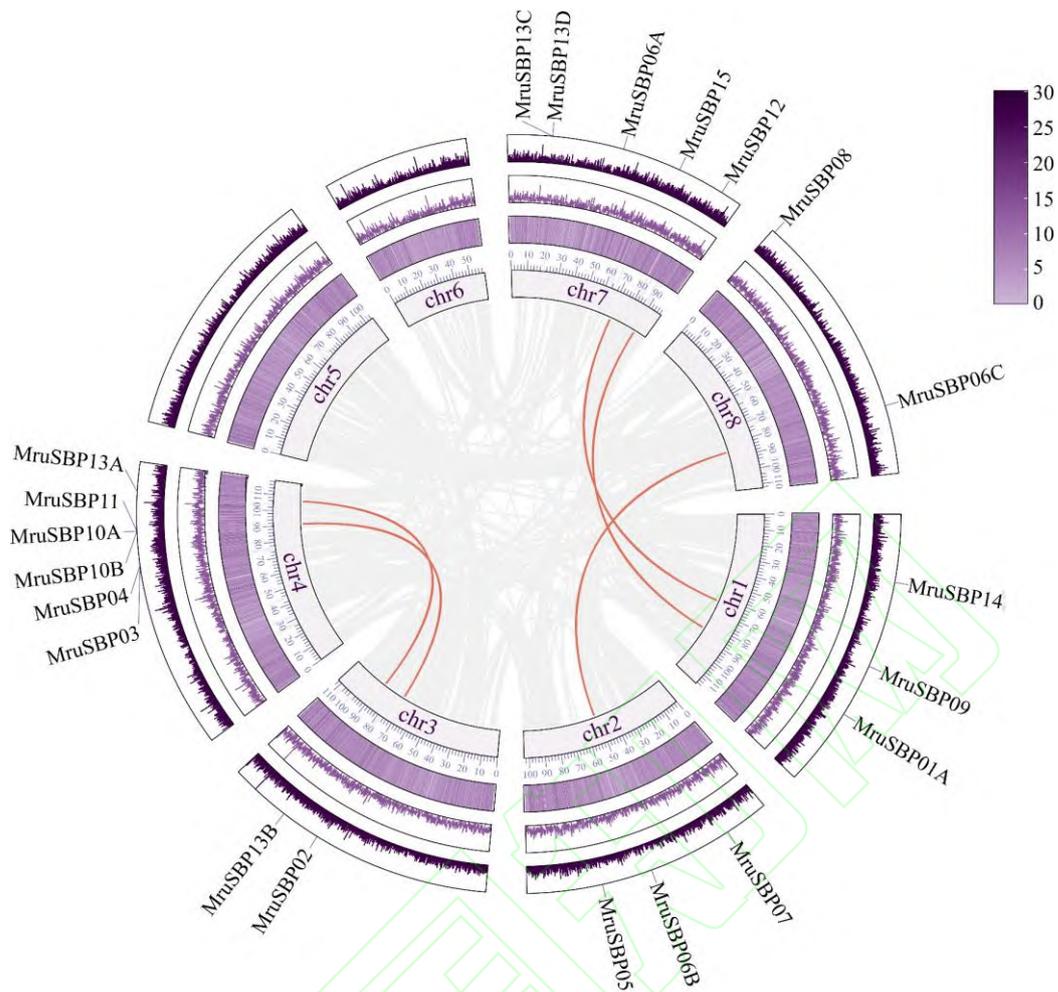


图4 花苜蓿 SBP 基因同源关系示意图

Fig.4 Schematic diagram of the syntenic relationships of SBP genes in *M. ruthenica*

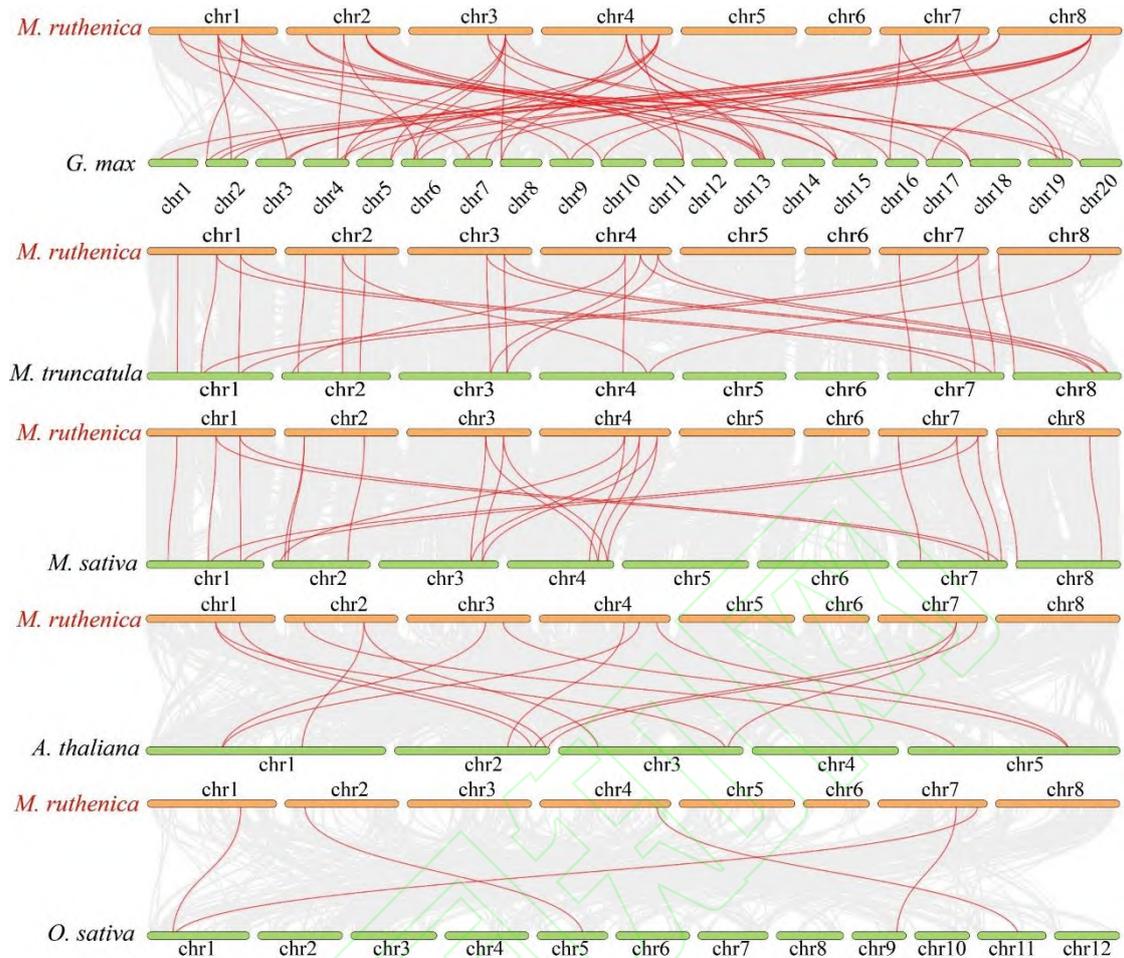


图 5 花苜蓿与 5 种植物 *SBP* 基因的同源性分析

Fig.5 Synteny analysis of *SBP* genes between *M. ruthenica* and five other plant species

2.6 花苜蓿 *SBP* 基因家族顺式作用元件分析

本实验对花苜蓿 *SBP* 基因家族成员启动子前 2000 bp 序列进行分析（图 6），列举除传统的 TATA 和 CAAT 外的其他顺式作用元件。本实验发现 4 个植物激素响应元件，包括水杨酸响应元件、脱落酸响应元件、茉莉酸甲酯响应元件、赤霉素响应元件。还包括一些与环境相关的转录调控元件，包括干旱胁迫响应元件、防御和应急响应元件、低温响应元件、厌氧诱导元件、光响应元件。在所有 *MruSBP* 基因的启动子区域，与光反应相关的顺式作用元件数量最多。*MruSBP09*、*MruSBP11*、*MruSBP13A*、*MruSBP14* 和 *MruSBP15* 中发现低温响应元件，这些基因可能编码渗透调节蛋白或信号转导相关蛋白。此外，在 *MruSBP05* 的启动子区域还发现与黄酮类化合物生物合成调控相关的顺式作用元件。

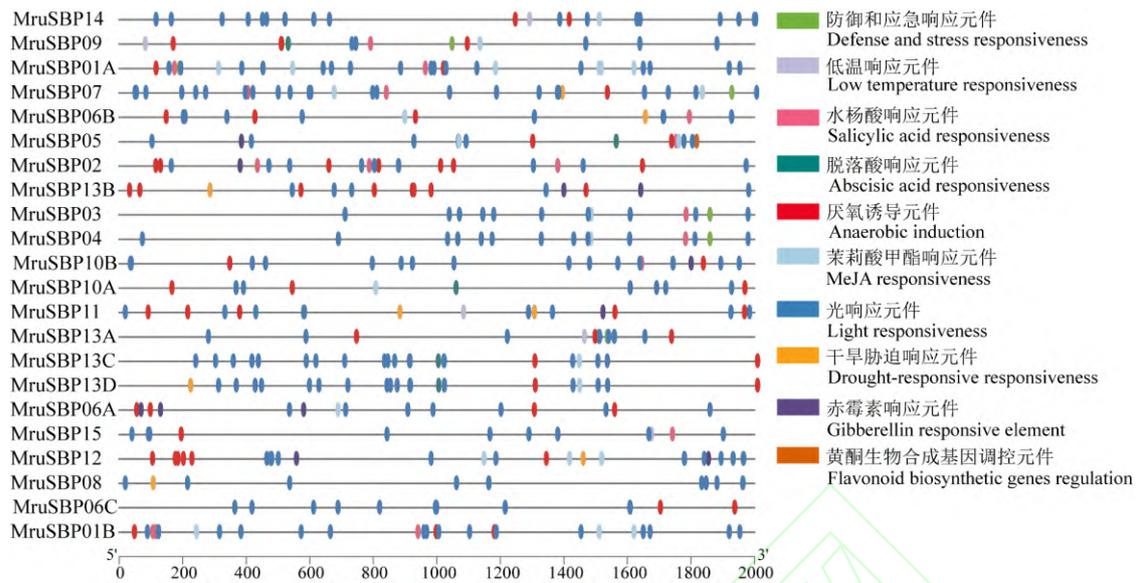


图 6 花苜蓿 SBP 家族成员启动子顺式作用元件分析

Fig.6 Analysis of *cis*-acting elements in promoters of SBP family members in *M. ruthenica*

2.7 干旱胁迫下基因的表达分析

为分析干旱处理下 *MruSBP* 基因表达水平的动态变化，本实验对王天佐等^[22]获得的花苜蓿根尖连续干旱处理 0 d、5 d、7 d、9 d 的转录组数据进行分析，并通过 TBtools-II 软件生成干旱胁迫下 *MruSBP* 基因表达的热图(图 7)，并进行聚类。根据热图，可以看到 *MruSBP* 基因大体分为两类，即干旱前期高表达与干旱后期高表达，其中干旱前期高表达有 8 个 (*MruSBP03*、*MruSBP04*、*MruSBP06A*、*MruSBP06B*、*MruSBP08*、*MruSBP13C*、*MruSBP13D* 和 *MruSBP15*)，干旱后期高表达有 9 个 (*MruSBP01A*、*MruSBP02*、*MruSBP07*、*MruSBP09*、*MruSBP10A*、*MruSBP10B*、*MruSBP11*、*MruSBP12* 和 *MruSBP14*)。

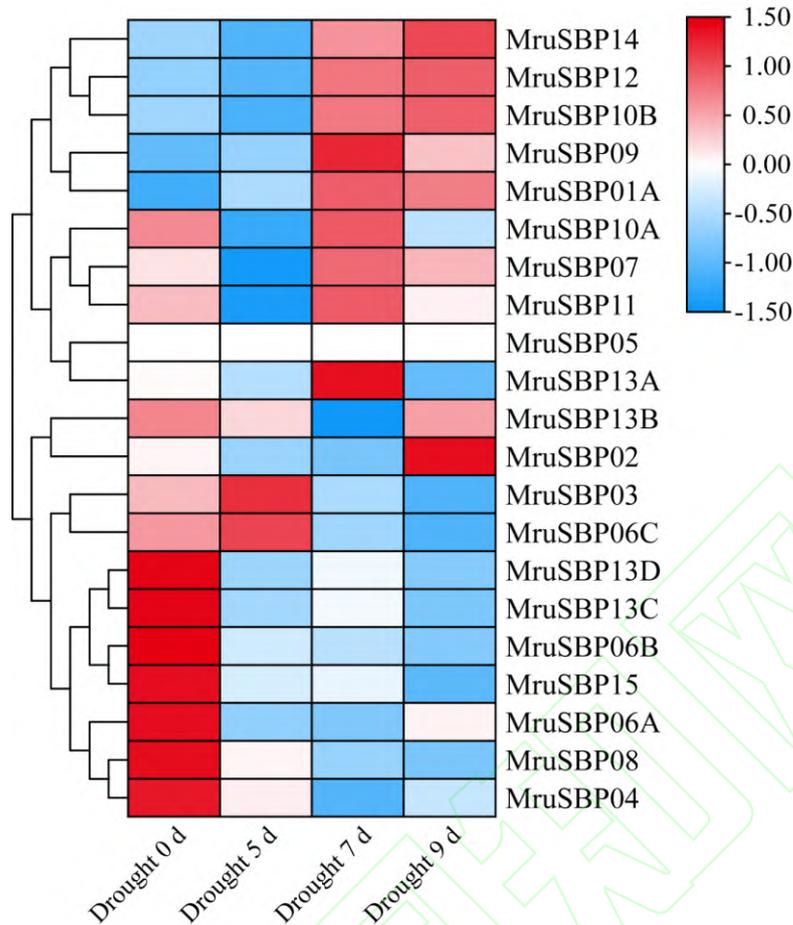


图 7 *MruSBP* 基因在连续干旱处理下的表达分析

Fig.7 Expression analysis of *MruSBP* genes under continuous drought treatment

2.8 RT-qPCR 分析

为进一步验证 *MruSBP* 在短期干旱（1 h、3 h、6 h、12 h 和 24 h）下的表达模式，本实验选择 9 个受干旱胁迫诱导的 *MruSBP* 基因（*MruSBP01A*、*MruSBP02*、*MruSBP06A*、*MruSBP06C*、*MruSBP07*、*MruSBP12*、*MruSBP13C*、*MruSBP13A* 和 *MruSBP14*）进行 RT-qPCR 验证，结果如图 8 所示。结果表明，所选的所有 *MruSBP* 基因在干旱胁迫期间均受到不同程度的诱导。*MruSBP01A*、*MruSBP06A*、*MruSBP06C*、*MruSBP07*、*MruSBP12*、*MruSBP13D* 和 *MruSBP14* 与 RNA-Seq 数据的变化趋势一致，而 *MruSBP02* 和 *MruSBP13C* 总体呈现表达量上升趋势。另外，在短期干旱胁迫下，*MruSBP06A*、*MruSBP13D* 和 *MruSBP14* 的表达量显著下降（ $P < 0.01$ ），分别在 3 h、3 h 和 6 h 时达到最小值。综上所述，RT-qPCR 实验中大多数 *MruSBP* 基因的表达模式与 RNA-Seq 分析结果一致。

为探究 *MruSBP* 基因调控与干旱程度的关系，本实验选择上述 9 个受干旱胁迫诱导的 *MruSBP* 基因，对不同浓度甘露醇（50 mmol/L、100 mmol/L、200 mmol/L、300 mmol/L、400

mmol/L) 诱导后的实验材料进行 RT-qPCR 验证, 结果如图 9 所示。结果显示, 在不同浓度甘露醇胁迫下, *MruSBP06A*、*MruSBP13D* 和 *MruSBP14* 表达量显著降低 ($P<0.01$), 这与不同时间干旱胁迫下的结果 (图 8) 一致, 其他基因均表现出一定程度的上调。

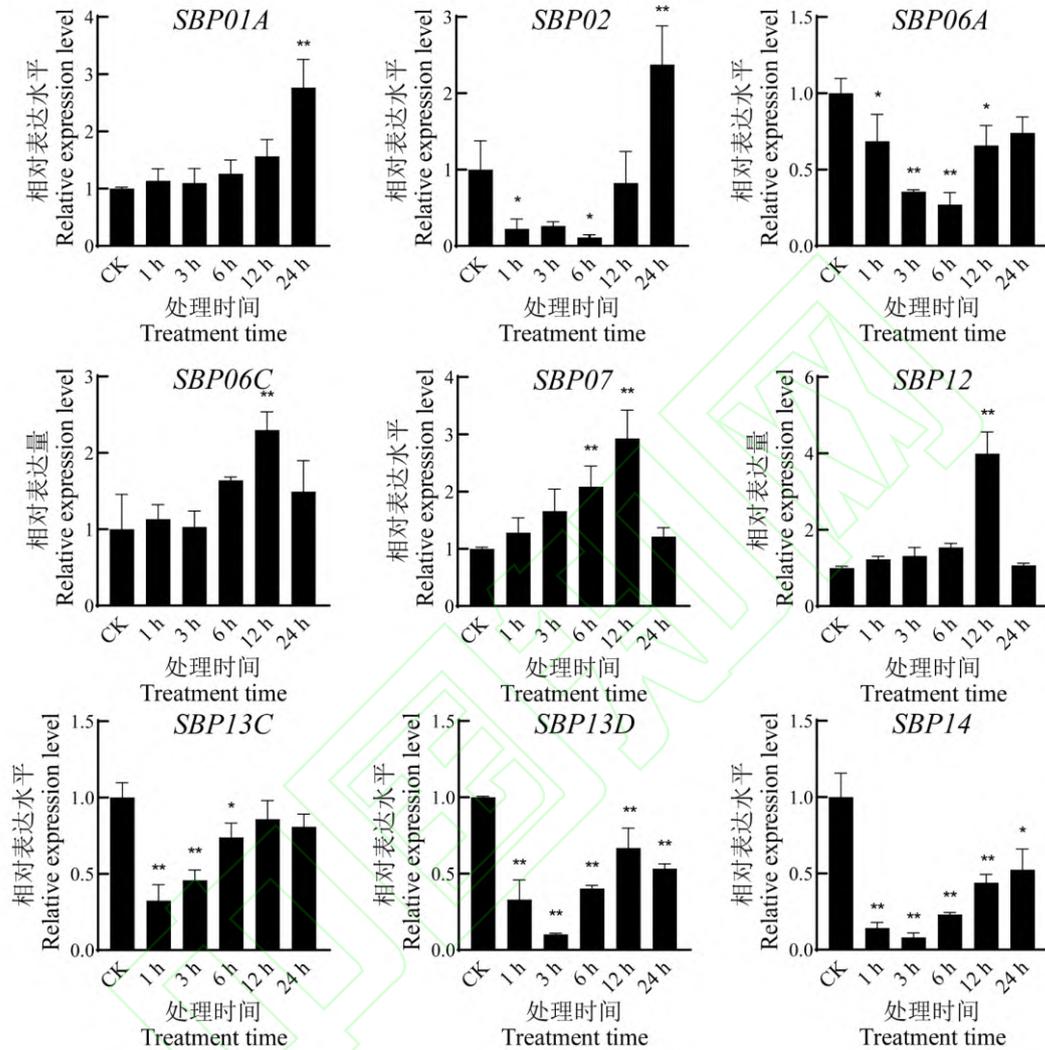


图 8 花苜蓿 *SBP* 基因在不同时间干旱胁迫下的表达模式分析

Fig.8 Analysis of the expression patterns of *M. ruthenica* SBP genes under drought stress at different time points

数据是三个生物重复的平均值。“**”代表当前数据与 CK 的显著差异, $P<0.05$ (*)被认为非常显著, $P<0.01$ (**) 被认为极显著; 下同。

The data represent the mean values of three biological replicates. “**” indicate significant differences between the current data and the control (CK): $P<0.05$ (*) is considered very significant, and $P<0.01$ (**) is considered extremely significant; similarly for the following tables.

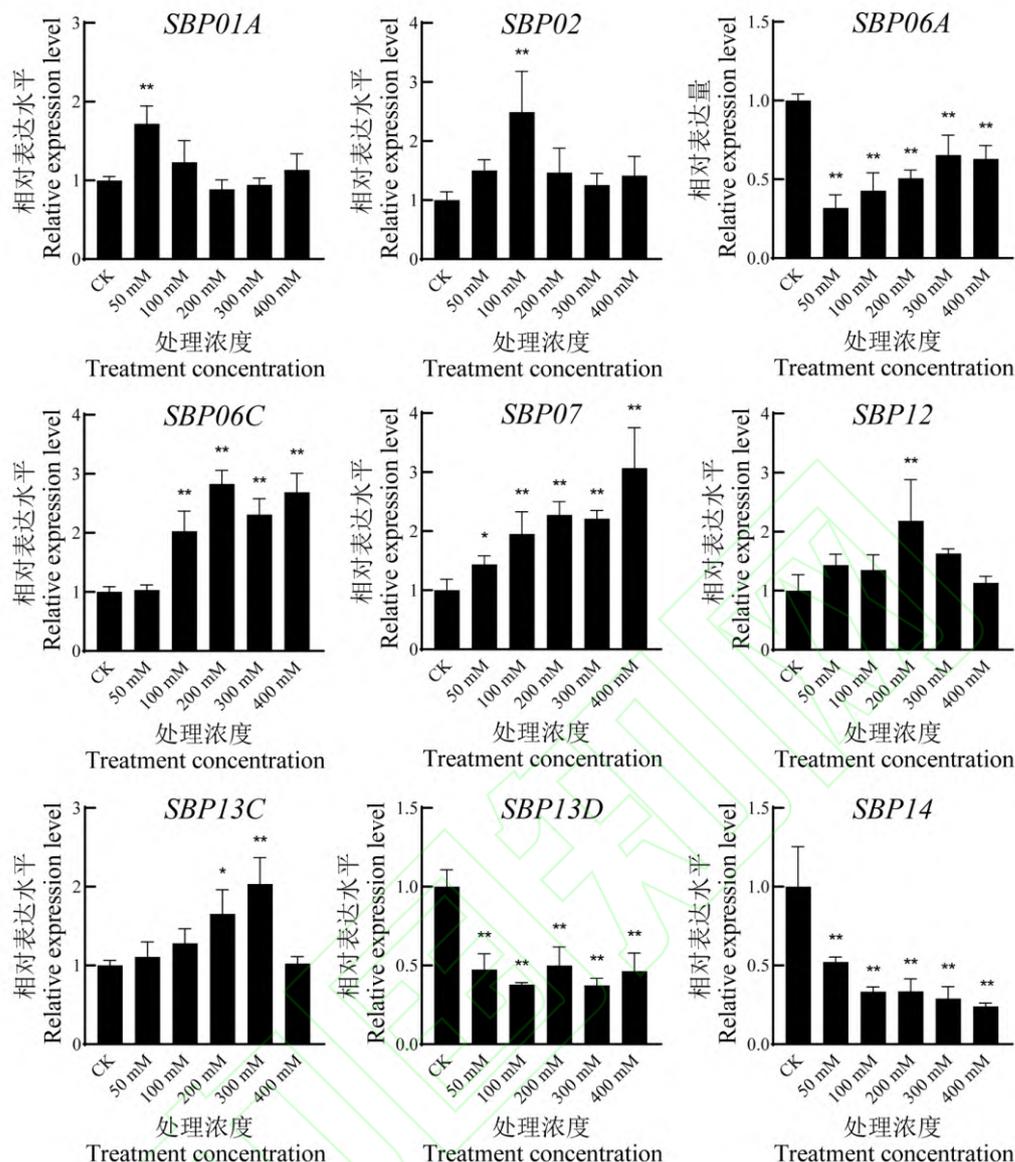


图 9 花苜蓿 *SBP* 基因在不同浓度甘露醇处理下的表达模式分析

Fig. 9 Analysis of the expression patterns of *M. ruthenica* *SBP* genes under mannitol treatment at different concentrations

3 讨论与结论

SBP 基因家族广泛存在于植物中，属于植物特有的转录因子家族，它们在植物的生长发育、生理生化过程以及对环境的响应中都有至关重要的作用^[38]。*SBP* 家族在几种植物中的功能已经被研究，但迄今为止，尚未报道有关 *SBP* 基因在花苜蓿中对非生物胁迫反应中的作用。本实验从花苜蓿的 6 条染色体中筛选出 22 个 *MruSBP* 基因，并验证它们在干旱胁迫下的表达模式，对研究 *SBP* 蛋白在花苜蓿中的作用机制有重要意义。

本实验鉴定到的 22 个属于 SBP 基因家族的蛋白中有 8 个是酸性的, 14 个是碱性的, 均为不稳定蛋白, 亲水性强, 且在染色体上分布不均匀。根据拟南芥中 SBP 蛋白的分类^[1], 花苜蓿 SBP 蛋白分为 7 组 (G1~G7), *MruSBP* 家族成员主要位于 G1 和 G2 组。G7 组中花苜蓿基因与拟南芥基因距离较远, 说明这些 SBP 基因可能在苜蓿属中具有特化的功能, 例如与环境胁迫响应相关。同一组的 SBP 蛋白关系更亲近, 例如 G5 组相比其他组含有一些特有的保守基序, 且其内含子数量明显更多。除 *MruSBP04* 和 *MruSBP06A*, 所有蛋白都含有基序 Motif01 和 Motif02, 代表它们是保守的, 可能代表着对花苜蓿生存和繁殖至关重要的功能结构域。而前述两个蛋白表现出保守基序缺失, 推测是因为它们的序列长度太短。通过分析基因结构, 对比 *MruSBP01A* 和 *MruSBP03* 可以发现例如它们的外显子和内含子排列方式有很大区别。在进化过程中, 这种结构的改变可能导致基因表达调控的变化, 增加基因产物的多样性^[7]。这种结构变化是否会导致功能变化还需进一步研究。

通过观察花苜蓿基因同源关系图, 可以发现不同染色体的基因密度存在差异。chr4 和 chr7 上存在较多的基因家族成员, 由此推测这两个染色体可能在花苜蓿 SBP 基因家族调控过程中起到关键作用。花苜蓿与大豆、蒺藜苜蓿、紫花苜蓿、拟南芥和水稻 SBP 基因的同源性分析显示, 花苜蓿与大豆的多个染色体有同源性关系, 表明这些染色体区域在进化过程中可能来源于共同的祖先。花苜蓿与拟南芥的同源性连线相对较少, 但仍存在一些保守区域, 表明在进化过程中这些区域有一定的保守性。水稻与花苜蓿的亲缘关系较远, 但图中仍能看到一些同源性连线, 说明在进化早期可能存在一些保守的基因序列。

启动子对于分析基因表达和调控至关重要^[27], 基因上游序列中顺式作用元件的鉴定和分析使我们能够确定这些基因是否具有调控生长、发育以及对生物或应对非生物胁迫的潜力。本实验分析 *MruSBP* 启动子区域的顺式作用元件, 包含光响应、非生物胁迫响应及激素响应等重要顺式作用元件, 表示 *MruSBP* 基因可能参与光、干旱等非生物胁迫, 还受到激素响应等多重调控。为探究干旱处理下 *MruSBP* 基因的表达水平, 本实验使用王天佐等^[22]的花苜蓿根尖连续干旱处理转录组数据进行初步筛查。结果显示除 *MruSBP05* 没有表达量外, 其他基因均对长期干旱胁迫做出响应。而 *MruSBP13A* 和 *MruSBP13B* 表达量变化趋势不明显, 没有在后续干旱胁迫分析中使用。为进一步探讨 *MruSBP* 在干旱下的表达模式, 本实验选择 *MruSBP01A*、*MruSBP02*、*MruSBP06A*、*MruSBP06C*、*MruSBP07*、*MruSBP12*、*MruSBP13C*、*MruSBP13D* 和 *MruSBP14* 这 9 个在长期干旱胁迫中均有表达趋势且表达模式不同的基因, 进行短期干旱胁迫和不同浓度的甘露醇处理。RT-qPCR 分析结果与 RNA-Seq 数据的分析结果一致, 9 个基因全部在干旱胁迫下表达。在短期干旱胁迫下, *MruSBP06A*、*MruSBP13D* 和

MruSBP14 的表达量相较 CK 均有一定程度的降低, 表明这 3 个基因在短期干旱胁迫下表达量降低, 其余基因在短期干旱下表达量均为升高。表达量升高的基因中, *MruSBP02* 和 *MruSBP13C* 的表达量先降低再升高, *MruSBP06C*、*MruSBP07* 和 *MruSBP12* 的表达量先升高然后略有降低, 均在 12 h 时达到峰值。在短期干旱胁迫下, *MruSBP19* 呈现出比其他基因更高的表达水平。在不同浓度甘露醇处理下, *MruSBP06A*、*MruSBP13D* 和 *MruSBP14* 表现出与不同时间的短期干旱胁迫下相同的表达模式, 即表达量相较 CK 均有显著降低 ($P<0.01$)。在不同浓度甘露醇处理下, *MruSBP12* 仍然呈现出比其他基因更高的表达水平, 这与花苜蓿 SBP 家族成员启动子顺式作用元件分析 (图 6) 的结果一致: 相较其他基因, *MruSBP12* 含有更多非生物胁迫响应元件。大多数 *MruSBP* 基因的表达模式与 RNA-Seq 分析中的表达模式相似, 但某些基因存在些许差异, 这可能是由花苜蓿个体之间的遗传多样性导致的^[38]。

综上, 本实验从花苜蓿全基因组中鉴定出 22 个 SBP 基因家族成员, 系统性分析基因结构与功能、进化关系, 并验证 9 个基因在干旱条件下的表达模式, 为花苜蓿 SBP 基因家族功能研究提供基础, 也为豆科育种和其他遗传研究提供相关依据。

参考文献 References:

- [1] YOU Y, ZHENG Y T, WANG J, CHEN G, LI S J, SHAO J F, QI G A, XU F, WANG G J, CHEN Z H, XU S C. Molecular evolution and genome-wide analysis of the SBP-box family in cucumber (*Cucumis sativas*). *Plant Growth Regulation*, 2021, 93(2): 175-187.
- [2] CUI J S, HOPPER J L, HARRAP S B. Genes and family environment explain correlations between blood pressure and body mass index. *Hypertension*, 2002, 40(1): 7-12.
- [3] KLEIN J, SAEDLER H, HUIJSER P. A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the *Antirrhinum majus* floral meristem identity gene SQUAMOSA. *Molecular and General Genetics MGG*, 1996, 250(1): 7-16.
- [4] YAMASAKI K, KIGAWA T, INOUE M, TATENO M, YAMASAKI T, YABUKI T, AOKI M, SEKI E, MATSUDA T, NUNOKAWA E, ISHIZUKA Y, TERADA T, SHIROUZU M, OSANAI T, TANAKA A, SEKI M, SHINOZAKI K, YOKOYAMA S. A novel zinc-binding motif revealed by solution structures of DNA-binding domains of *Arabidopsis* SBP-family transcription factors. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 337(1): 49-63.
- [5] ZHANG H, JIA S G, ZHANG M X, WANG K X, TENG F K, LIU Y R, ZHANG W J. Deciphering the regulatory network of miR156 in plant architecture and abiotic stress resistance of alfalfa (*Medicago sativa*) by transcriptome sequencing. *Industrial Crops and Products*, 2022, 189: 115828.

- [6] WANG P J, CHEN D, ZHENG Y C, JIN S, YANG J F, YE N X. Identification and expression analyses of SBP-Box genes reveal their involvement in abiotic stress and hormone response in tea plant (*Camellia sinensis*). *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(11): 19113404.
- [7] GUO Q, LI L, ZHAO K, YAO W J, CHENG Z H, ZHOU B R, JIANG T B. Genome-wide analysis of poplar SQUAMOSA-promoter-binding protein (SBP) family under salt stress. *Forests*, 2021, 12(4): 413.
- [8] SALINAS M, XING S, HÖHMANN S, BERNDTGEN R, HUIJSER P. Genomic organization, phylogenetic comparison and differential expression of the SBP-box family of transcription factors in tomato. *Planta*, 2012, 235(6): 1171-1184.
- [9] CARDON G, HÖHMANN S, KLEIN J, NETTESHEIM K, SAEDLER H, HUIJSER P. Molecular characterisation of the *Arabidopsis* SBP-box genes. *Gene*, 1999, 237(1): 91-104.
- [10] LI J, HOU H M, LI X Q, XIANG J, YIN X J, GAO H, ZHENG Y, BASSETT C L, WANG X P. Genome-wide identification and analysis of the SBP-box family genes in apple. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 70: 100-114.
- [11] ZHANG X H, DOU L L, PANG C Y, SONG M Z, WEI H L, FAN S L, WANG C S, YU S X. Genomic organization, differential expression, and functional analysis of the SPL gene family in *Gossypium hirsutum*. *Molecular Genetics and Genomics*, 2015, 290(1): 115-126.
- [12] HAN Y Y, Ma Y Q, LI D Z, YAO J W, XU Z Q. Characterization and phylogenetic analysis of fifteen *NtabSPL* genes in *Nicotiana tabacum* L. cv. Qinyan95. *Development Genes and Evolution*, 2016, 226(1): 1-14.
- [13] CHENG H T, HAO M Y, WANG W X, MEI D S, TONG C B, WANG H, LIU J, FU L, HU Q. Genomic identification, characterization and differential expression analysis of SBP-box gene family in *Brassica napus*. *BMC Plant Biology*, 2016, 16(1), 196.
- [14] HOU H M, LI J, GAO M, SINGER S D, WANG H, MAO L Y, FEI Z J, WANG X P. Genomic organization, phylogenetic comparison and differential expression of the SBP-Box family genes in grape. *PLOS One*, 2013, 8(3): 0059358.
- [15] ZHANG H X, JIN J H, HE Y M, LU B Y, LI D W, CHAI W G, KHAN A, GONG Z H. Genome-wide identification and analysis of the SBP-Box family genes under phytophthora capsici stress in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Frontiers in Plant Science*, 2016: 00504.
- [16] LI C L, LU S F. Molecular characterization of the SPL gene family in *Populus trichocarpa*. *BMC Plant Biology*, 2014, 14(1), 131.

- [17] Zhang H, Liu X Q, Wang X M, Sun M, Song R, Mao P S, Jia S G. Genome-wide identification of GRAS gene family and their responses to abiotic stress in *Medicago sativa*. International Journal of Molecular Sciences, 2021: 22147729.
- [18] ZHOU Q, JIA C L, MA W X, CUI Y, JIN X Y, LUO D, MIN X Y, LIU Z P. MYB transcription factors in alfalfa (*Medicago sativa*): genome-wide identification and expression analysis under abiotic stresses. PeerJ, 2019, 7: e7714.
- [19] SMALL E, JOMPHE M. A synopsis of the genus *Medicago* (Leguminosae). Canadian Journal of Botany, 1989, 67(11): 3260-3294.
- [20] 王茜, 纪树仁, 沈益新. 土壤水分和施氮水平对紫花苜蓿苗期生长的互作效应分析. 草业学报, 2017, 26(12): 48-55.
- WANG Q, JI S R, SHEN Y X. Interactive effects of soil moisture and nitrogen application rate on seedling growth of alfalfa. Acta Prataculturae Sinica, 2017, 26(12): 48-55.
- [21] YIN M, ZHANG S Z, DU X, MATEO R G, GUO W, LI A, WANG Z Y, WU S, CHEN J Y, LIU J Q, REN G P. Genomic analysis of *Medicago ruthenica* provides insights into its tolerance to abiotic stress and demographic history. Molecular Ecology Resources, 2021, 21(5): 1641-1657.
- [22] WANG T Z, REN L F, LI C H, ZHANG D, ZHANG X X, ZHOU G, GAO D, CHEN R J, CHEN Y H, WANG Z L, SHI F L, FARMER A D, LI Y S, ZHOU M Y, YOUNG N D, ZHANG W H. The genome of a wild *Medicago* species provides insights into the tolerant mechanisms of legume forage to environmental stress. BMC Biology, 2021, 19(1): 96.
- [23] REISER L, BAKKER E, SUBRAMANIAM S, CHEN X G, SAWANT S, KHOSA K, PRITHVI T, BERARDINI T Z. The *Arabidopsis* information resource in 2024. Genetics, 2024, 227(1): iyae027.
- [24] CHEN C J, WU Y, LI J W, WANG X, ZENG Z H, XU J, LIU Y L, FENG J T, CHEN H, HE Y H, XIA R. TBtools-II: A “one for all, all for one” bioinformatics platform for biological big-data mining. Molecular Plant, 2023, 16(11): 1733-1742.
- [25] WANG J Y, CHITSAZ F, DERBYSHIRE M K, GONZALES N R, GWADZ M, LU S N, MARCHLER G H, SONG J S, THANKI N, YAMASHITA R A, YANG M Z, ZHANG D C, ZHENG C J, LANCZYCKI C J, MARCHLER-BAUER A. The conserved domain database in 2023. Nucleic Acids Research, 2023, 51(D1): D384-D388.
- [26] CHOU K C, SHEN H B. Plant-mPLoc: A top-down strategy to augment the power for predicting plant protein subcellular localization. PLOS One, 2010, 5(6): e11335.

- [27] SUDHIR K, GLEN S, KOICHIRO T. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870–1874.
- [28] Shen C, Du H L, Chen Z, Lu H W, Zhu F G, Chen H, Meng X Z, Liu Q W, Liu P, Zheng L H, Li X X, Dong J L, Liang C Z, Wang T. The chromosome-level genome sequence of the autotetraploid alfalfa and resequencing of core germplasms provide genomic resources for alfalfa research. *Molecular Plant*, 2020, 13(9): 1250-1261.
- [29] HE Z L, ZHANG H K, GAO S H, LERCHER M J, CHEN W H, HU S N. Evolvview v2: an online visualization and management tool for customized and annotated phylogenetic trees. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(W1): W236-W241.
- [30] BAILEY T L, ELKAN C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymer. AAAI Press, 1994, 94: 28-36.
- [31] LESCOT M, DÉHAIS P, THIJS G, MARCHAL K, MOREAU Y, VAN DE PEER Y, ROUZÉ P, ROMBAUTS S. PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(1): 325-327.
- [32] CHEN S. Ultrafast one-pass FASTQ data preprocessing, quality control, and deduplication using fastp. *iMeta*, 2023, 2(2): e107.
- [33] HOSEA H A, PHILIP J Y N, MAEDA D G, MAHADHY A. Field-based cDNA-biosensor for accurate detection of canine distemper virus in tissue samples. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2024, 197: 1242–1257.
- [34] 石蕊. 基于转录组及小 RNA 分析的扁蓿豆抗旱性研究. 内蒙古农业大学博士学位论文, 2023.
SHI R. Study on drought resistance of *Medicago ruthenica* based on transcriptome and small RNA analysis. PhD Thesis. Inner Mongolia: Inner Mongolia Agricultural University, 2023.
- [35] 李月颖, 李菁, 刘长宁. 蒺藜苜蓿 SBP-box 转录因子基因家族全基因组分析. *湖南师范大学自然科学学报*, 2017, 40(6): 24-33.
LI Y Y, LI J, LIU C N. Genome-wide analysis of SBP-Box transcription factor gene family in *M. truncatula*. *Journal of Natural Science of Hunan Normal University*, 2017, 40(6): 24-33
- [36] 李永成. 普通烟草 SBP 基因家族生物信息学分析. *现代农业研究*, 2024, 30(12): 38-48.
LI Y C. Genome-wide identification and analysis of SBP gene family in tobacco. *Modern Agriculture Research*, 2024, 30(12): 38-48.
- [37] 李新, 杨丹, 牛奎举. 扁蓿豆 SWEET 基因家族鉴定及在干旱和寒冷胁迫下的表达分析. *中国草地*

学报, 2024, 46(9): 1-14.

LI X, YANG D, NIU K J. Identification of SWEET gene family in *Medicago ruthenica* and expression analysis under drought and cold stress. Chinese Journal of Grassland, 2024, 46(9): 1-14.

[38] ZHOU Q, CHEN T L, WANG Y R, LIU Z P. The development of 204 novel EST-SSRs and their use for genetic diversity analyses in cultivated alfalfa. Biochemical Systematics and Ecology, 2014, 57: 227-230.

