

DOI: 10.11686/cyxb2024247

http://cyxb.magtech.com.cn

周昕越, 王丽萍, 蒋庆雪, 等. 紫花苜蓿低温诱导蛋白 MsLTI65 的分离及其对不同逆境的响应. 草业学报, 2025, 34(5): 89—104.

ZHOU Xin-yue, WANG Li-ping, JIANG Qing-xue, et al. Isolation of the low-temperature induced protein MsLTI65 from alfalfa and its response to different stresses. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(5): 89—104.

紫花苜蓿低温诱导蛋白 MsLTI65 的分离及其对不同逆境的响应

周昕越¹, 王丽萍², 蒋庆雪¹, 马晓冉¹, 仪登霞¹, 王学敏^{1*}

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193; 2. 山西省太原市东西山林区管护中心, 山西 太原 030000)

摘要: LTI 是植物中一类低温诱导蛋白, 在植物响应非生物胁迫中发挥着重要的作用。为明确紫花苜蓿 LTI 蛋白的结构特征及在不同非生物胁迫下的响应, 通过 RT-PCR 和 3'/5' RACE PCR 技术, 成功从“中苜 1 号”紫花苜蓿中克隆得到 MsLTI65 基因 cDNA 序列。利用生物信息学软件对基因序列和结构进行分析, 并与其他植物的 LTI 蛋白进行系统进化树构建, 分析它们之间的进化关系。采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和蛋白免疫印迹 (western-blot, WB) 技术分析 MsLTI65 在不同非生物胁迫条件下的表达模式。序列分析表明, MsLTI65 基因编码区序列长 2016 bp, 编码 671 个氨基酸, 分子量 74 kDa, 理论等电点为 4.55, MsLTI65 蛋白与蒺藜苜蓿的 MtLTI65 蛋白具有较高的同源性。qRT-PCR 检测结果表明, MsLTI65 基因在冷、盐、干旱、Cu²⁺、Zn²⁺ 和脱落酸 (ABA) 胁迫下表达量均受到诱导上调表达。抗体制备结果表明, 已成功制备 MsLTI65 多克隆抗体, 该多克隆抗体特异性高, 能够识别天然 LTI65 样本。Western-blot 验证结果表明, MsLTI65 蛋白受冷、干旱、盐、ABA 胁迫诱导表达。以上结果表明, MsLTI65 基因可能作为一个正向调控因子在冷、干旱、Cu²⁺、Zn²⁺、盐等多种非生物胁迫信号和 ABA 激素信号转导过程中发挥重要作用。

关键词: 紫花苜蓿; MsLTI65; 基因克隆; 表达分析; 抗体; 非生物胁迫

Isolation of the low-temperature induced protein MsLTI65 from alfalfa and its response to different stresses

ZHOU Xin-yue¹, WANG Li-ping², JIANG Qing-xue¹, MA Xiao-ran¹, YI Deng-xia¹, WANG Xue-min^{1*}

1. Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Taiyuan Dongxishan Forest Area Management Center, Taiyuan 030000, China

Abstract: Low temperature-inducible (LTI) proteins are a class of stress-responsive proteins in plants that play a crucial role in response to abiotic stress. To elucidate the structural characteristics of the MsLTI65 protein in alfalfa (*Medicago sativa*) and its response to various abiotic stresses, the cDNA sequence of the MsLTI65 gene was successfully cloned from alfalfa cultivar “Zhongmu No. 1” using reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and 3'/5' rapid-amplification of cDNA ends (RACE PCR) techniques. Bioinformatics tools were employed to analyze the gene sequence and structure, and a phylogenetic tree was constructed to explore the evolutionary relationships between MsLTI65 and LTI proteins from other plants. The expression pattern of MsLTI65 under

收稿日期: 2024-06-24; 改回日期: 2024-07-22

基金项目: 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系 (CARS-34), 中国农业科学院科技创新工程项目 (ASTIP-IAS10) 和农业种质资源普查收集、保护鉴定服务 (19240485) 资助。

作者简介: 周昕越 (1998—), 男, 蒙古族, 内蒙古赤峰人, 在读博士。E-mail: zhouxinyuenmg@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: wangxuemin@caas.cn

different abiotic stress conditions was analyzed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blotting (WB). Sequence analysis indicated that the *MsLTI65* gene had a coding region sequence length of 2016 bp, encoding a polypeptide of 671 amino acids with a molecular weight of 74 kDa and a theoretical isoelectric point of 4.55. The *MsLTI65* protein showed high homology with the *MtLTI65* protein from *Medicago truncatula*. The qRT-PCR results showed that *MsLTI65* expression was induced and upregulated under cold, salt, drought, Cu^{2+} , Zn^{2+} , and abscisic acid (ABA) stresses. The antibody preparation results indicated that a polyclonal antibody against *MsLTI65* was successfully generated. This polyclonal antibody exhibited high specificity and was able to recognize native *LTI65* samples. Western-blot validation demonstrated that *MsLTI65* protein expression is induced by drought, salt, cold and ABA stresses. The results of this study suggest that *MsLTI65* functions as a positive regulatory factor in the signal transduction of various abiotic stresses, including cold, drought, Cu^{2+} , Zn^{2+} , salt, and ABA hormone signaling.

Key words: *Medicago sativa*; *MsLTI65*; gene cloning; expression analysis; antibody; abiotic stresses

紫花苜蓿(*Medicago sativa*)是一种用途广泛的多年生苜蓿属豆科牧草,具有适口性好、营养物质含量丰富、抗逆性强等优点,有着“牧草之王”的美誉^[1-3]。然而现有紫花苜蓿品种的抗逆性较差,高盐、低温、干旱等非生物胁迫严重影响了紫花苜蓿的品质和产量^[4-7]。因此,分离调控非生物胁迫关键基因,解析关键基因的逆境响应特性,可为紫花苜蓿的遗传育种和品质改良提供重要理论基础和基因资源。

低温诱导蛋白(low-temperature-induced protein, LTI)又称冷诱导蛋白,是伴随着植物的低温驯化而出现的新蛋白质。1970年,Weiser首先提出了低温诱导能够调节植物基因发生改变从而合成新的蛋白质的观点,这些伴随着植物的低温驯化而出现的新蛋白质被称为低温诱导蛋白^[8]。最早发现的植物低温诱导蛋白是Briggs等^[9]在越冬期的黑槐(*Styphnolobium japonicum*)树皮中发现2~3条新蛋白谱带。目前,已在小麦(*Triticum aestivum*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)等30多种植物的低温诱导中观察到特异蛋白的合成^[10-12]。Joaquín等^[13]研究发现拟南芥*AtRCI2A*(rare cold inducible 2A)不但可以被低温诱导,还同时被干旱、盐和脱落酸(abscisic acid, ABA)等多种非生物胁迫条件诱导表达。黎娟华等^[14]对木薯(*Manihot esculenta*)*MeLTI6A*启动子进行克隆及序列分析,该启动子具有与干旱胁迫相关的激素类的响应元件和逆境胁迫的响应元件。Shi等^[15]对拟南芥LTI30研究表明,*AtLTI30*通过正向调控过氧化氢酶(catalase, CAT)活性和内源脯氨酸(proline, PRO)含量,负调控过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)积累,进而正向调控拟南芥抗旱性。LTI65蛋白同样不但可以被低温诱导,还可以被多种非生物胁迫条件(如干旱、盐胁迫、ABA胁迫等)所诱导而产生响应。例如在拟南芥中LTI65蛋白又名响应干旱29B蛋白(responsive to desiccation 29B, AtRD29B)。Jia等^[16]研究表明RD29B在干旱、低温和高盐条件下均可以被诱导。此外,高盐、厌氧、水分胁迫、重金属离子和脱落酸等都可以诱导低温诱导蛋白类热激蛋白(heat shock proteins, HSP)的表达^[17]。综上所述,*LTI65*基因在植物抵御非生物胁迫过程中发挥着重要作用。

目前,紫花苜蓿中低温诱导蛋白LTI65的系统分析和挖掘还鲜有报道。本研究以紫花苜蓿为材料,克隆得到紫花苜蓿*MsLTI65*基因,对该基因的理化性质、系统进化关系、基因结构特征等进行了分析;并制备了*MsLTI65*多克隆抗体;此外,利用荧光定量PCR技术和蛋白免疫印迹(Western-blot, WB)技术明确了*MsLTI65*在不同非生物胁迫处理不同时期的表达模式,可为进一步深入研究*MsLTI65*调控紫花苜蓿的抗逆生物功能和调控机制奠定基础,同时也可为紫花苜蓿抗逆育种提供优异的基因资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料和处理

试验于2023年11月在中国农业科学院北京畜牧兽医研究所开展,本研究选取的植物材料为紫花苜蓿“中苜

1号”(*M. sativa* cv. Zhongmu No. 1)。选取颗粒饱满、大小一致的紫花苜蓿种子,置于铺有两层湿滤纸的培养皿中进行发芽。待种子露白后,转移至无菌培养土中放至植物培养室内培养,生长条件为14 h光照/10 h黑暗,温度为24 °C(昼)/18 °C(夜),湿度为70%。

培养一个月后,选取长势一致且生长状况良好的幼苗分别进行4 °C、NaCl、聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)和ABA处理。分别配制15%的PEG溶液、250 mmol·L⁻¹的NaCl溶液、0.05 mmol·L⁻¹的Cu²⁺溶液、0.05 mmol·L⁻¹的Zn²⁺溶液和0.1 mmol·L⁻¹的ABA溶液,将紫花苜蓿幼苗胁迫处理0、2、4、8、12和24 h后取样。对于4 °C处理,将紫花苜蓿幼苗在4 °C下分别处理0、2、4、8、12和24 h后取样。Western-blot蛋白表达试验在15%的PEG溶液、250 mmol·L⁻¹的NaCl溶液、0.1 mmol·L⁻¹的ABA溶液和4 °C胁迫处理0、2、6、12、24和48 h后取样。所有胁迫处理取样部位均为植株地上部分和根组织,取样后所有样品用液氮速冻并存放于-80 °C冰箱中备用,每个试验设置3次生物学重复。

1.2 RNA的提取与cDNA的合成

收集处于成熟期的紫花苜蓿叶片,置于研钵中,加入液氮充分研磨,采用Trizol法^[18]进行总RNA的提取。使用PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒(北京宝日医生物技术有限公司)进行cDNA第一链的合成,并将得到的cDNA溶液置于-20 °C冰箱保存备用。

1.3 *MsLTI65*基因的克隆

以实验室前期的转录组测序数据为基础,发现1个编码LTI的Unigene序列,用Primer 6.0软件设计扩增引物(表1),由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。以cDNA第一链为模板,进行PCR扩增。反应体系为:2 μL cDNA模板,25 μL高保真聚合酶PrimeSTAR(北京宝日医生物技术有限公司),上、下游引物各2 μL,ddH₂O 19 μL,总体积50 μL。PCR反应条件设置为94 °C 5 min,94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 90 s,35次循环,72 °C 5 min,16 °C保存。PCR产物通过琼脂糖凝胶电泳检测合格后进行胶回收,并将其连接至pCAMBIA1300克隆载体(长沙艾碧维生物科技有限公司),菌液PCR验证后送北京睿博兴科生物技术有限公司测序。

表1 所用引物信息

Table 1 Primer information used in the experiment

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	用途 Function
<i>MsLTI-3'-RACE</i>	TGATGAGTCAAAACCTGCCACAGAACCA	基因克隆
<i>MsLTI-5'-RACE</i>	CCAACAGCATCCTTAACCTTGTC AACCA	Gene cloning
<i>MsLTI65-F</i>	ATGGATTCAAGAGTTGTTTCATAGTC	
<i>MsLTI65-R</i>	TTACTCCTGTTTTTCCTCCTTCA	
<i>Actin-F</i>	CAAAAGATGGCAGATGCTGAGGAT	内参基因
<i>Actin-R</i>	CATGACACCAGTATGACGAGGTCG	Reference genes
q1TI65-F	AGCTGATAAAGCTTCTAAGCTCGG	表达分析
q1TI65-R	GTTTCAGTTCCGTCATTAGTTCCA	Expression analysis
LTI65-F	TCAGGGATCCGTGCATGATGAGCCAAAACC	抗体制备
LTI65-R	CGTAGTCGACTTACTCCTGTTTTTCCTCCTT	Antibody preparation

1.4 生物信息学分析

对克隆得到的*MsLTI65*基因序列利用生物信息学工具进行分析,分析工具及用途见表2。

1.5 *MsLTI65*基因的表达分析

根据*MsLTI65*基因序列,设计实时荧光定量PCR(qRT-PCR)引物(表1),以紫花苜蓿*Actin*基因作为内参基因,对紫花苜蓿分别在不同非生物胁迫(NaCl、PEG、4 °C、ABA、Cu²⁺和Zn²⁺)下处理0、2、4、8、12和24 h后进行基

表2 所用生物信息学工具

Table 2 Bioinformatics tools used

生物信息学工具 Bioinformatics tools	网址 Website	用途 Purpose
Open Reading Frame Finder	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/	开放阅读框分析 Open reading frame analysis
SMART	https://smart.embl.de/	蛋白质保守结构域分析 Protein conserved domain analysis
ExPasy-ProtParam tool	https://web.expasy.org/protparam/	蛋白质理化性质分析 Analysis of physical and chemical properties of proteins
PRABI	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa%20_sopma.html	蛋白质二级结构分析 Protein secondary structure analysis
AlphaFold	https://alphafoldserver.com/	蛋白质三级结构分析 Protein tertiary structure analysis
BLAST	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	同源蛋白序列分析 Homologous protein sequence analysis
DNAMAN	https://www.lynnon.com/qa.html	多序列比对 Multiple sequence alignment
Plant CARE	https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/	顺式作用元件分析 Cis-acting element analysis
MEGA	https://www.megasoftware.net/	系统进化树构建 Phylogenetic tree construction
NetPhos-3.1	https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/	蛋白磷酸化位点分析 Protein phosphorylation site analysis
SignalL. P-5.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/	蛋白质信号肽分析 Protein signal peptide analysis
TMHMM-2.0	https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/	蛋白跨膜结构分析 Protein transmembrane structure analysis

因表达分析。每个试验设3次生物学重复。按照 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法^[19]对结果进行数据分析,通过SPSS 25.0软件进行样品间的差异性分析。

1.6 MsLTI65原核融合表达载体构建

基于免疫原性、信号肽、跨膜序列和可溶性预测,选择一段免疫原性强且适合表达的MsLTI65蛋白序列构建重组表达载体。使用Primer 6.0软件设计同源重组引物(表1)。利用同源重组技术,将MsLTI65插入pGEX-3X载体(上海联迈生物工程有限公司)中,使用合成的MsLTI65序列作为模板进行PCR扩增,并通过1%琼脂糖凝胶电泳进行片段回收。利用Sal I和BamH I酶(纽英伦生物技术有限公司)对载体进行切割,然后通过T4 DNA连接酶将扩增片段与载体连接。连接成功的片段转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中,经过筛选和扩增后的阳性克隆,送往武汉金开瑞生物工程有限公司进行序列验证。

1.7 MsLTI65蛋白的多克隆抗体制备

1.7.1 小量表达 经过测序验证后,将重组质粒转化至表达宿主,并挑选含有质粒的单菌落,在3 mL LB液体培养基(胰蛋白胨、酵母提取物、氯化钠)中于37 °C条件下进行过夜培养。取30 μ L菌液接种至3 mL新的LB培养基中,继续在37 °C振荡培养至吸光度(optical density, OD) OD_{600} 约为0.6。将剩余的菌液与甘油按8:2的体积比混合,并于-80 °C保存,作为工作种子备用。取部分液体不进行诱导作为对照组,其余加入异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG)诱导至终浓度0.5 mmol \cdot L⁻¹作为试验组,37 °C振荡培养3 h。收集菌体,用1%十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)重悬后进行离心,取上清进行SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析。

1.7.2 蛋白表达与破菌检测 取保存于-80 °C的菌种20 μ L转接到20 mL LB液体培养基(含抗生素)中。取2 mL过夜培养液接种到2000 mL的LB培养基中,在37 °C下振荡培养至 OD_{600} 约为0.6后,添加IPTG至终浓度为0.5 mmol \cdot L⁻¹,30 °C下振荡培养3 h。收集菌体,使用预冷的NTA-0缓冲液将菌体悬浮于40 mL,通过超声波对菌体进行破碎,离心收集上清和沉淀进行SDS-PAGE分析,剩余样品于0~7 °C保存备用。

1.7.3 蛋白纯化 配制Buffer A:称取6.06 g Tris base和14.61 g NaCl,加去离子水溶解,调节pH至8.5,并定容至500 mL;配制Buffer B:称取4.10 g CH₃COONa、14.61 g NaCl,加去离子水溶解,调节pH至4.5,定容至

500 mL。取GST柱流干,水洗5个柱体积,用Buffer A和Buffer B各洗5个柱体积;水洗至pH为中性,70%乙醇洗3个柱体积;水洗5个柱体积;STET缓冲液平衡至流出液pH与STET pH相同;用0.22 μm 滤器过滤STET破菌上清。控制速度为1 mL \cdot min⁻¹进行上样;上样结束后,继续用STET洗至一滴流穿液加入100 μL 考马斯亮蓝(Coomassie brilliant blue)G250不变蓝为止。磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)洗杂,洗至G250不变蓝为止;用20 mmol \cdot L⁻¹谷胱甘肽(glutathione, r-glutamyl cysteine1+glycine, GSH)洗脱缓冲液洗脱,G250检测变蓝开始收集洗脱峰,当检测基本无蓝色停止收集洗脱峰;20 mmol \cdot L⁻¹ GSH继续冲洗柱子,洗至G250完全不变蓝为止(100 μL G250的小管接一滴不变蓝);20%乙醇封柱。样品跑胶,浓缩蛋白。

1.7.4 免疫/效价检测 采用重组LTI65蛋白作为抗原,浓度为2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。在聚苯乙烯96孔板中,每孔添加100 μL 抗原溶液,并在4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜。次日使用洗涤液清洗后加入待测样品(一抗),加入含待测抗体的抗血清(4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜后4000 r \cdot min⁻¹离心10 min得上清),进行逐级稀释(以空白血清做阴性对照),并添加至每孔100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育1 h;洗涤,加入稀释比例为1:5000的HRP标记羊抗兔IgG(北京博奥森生物技术有限公司)(二抗)。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育40 min后洗涤;加入四甲基联苯胺(tetramethyl benzidine, TMB)底物溶液至每孔,置于室温暗处5 min,每孔加50 μL 终止液(2 mol \cdot L⁻¹ H₂SO₄)终止显色。利用酶标仪(Multiskan SkyHigh,赛默飞世尔科技公司)测定酶标板各孔的OD_{450nm}。

1.7.5 抗体纯化 使用Protein A+G Agarose(上海碧云天生物技术股份有限公司)纯化抗体。层析柱使用PBS溶液进行清洗,平衡至适合条件。将含有目标抗体的血清或其他体液与等体积的2 \times PBS缓冲液混合。将混合液缓慢通过层析柱,使用PBS进行冲洗,直至检测不到蛋白为止。然后,加入2倍柱体积0.1 mol \cdot L⁻¹柠檬酸(citrate acid, pH 2.7),暂停出液,静置5 min后收集穿出液,重复此步骤3次。使用SDS-PAGE评估抗体纯度。洗脱后的抗体加入2/5体积的1 mol \cdot L⁻¹ Tris缓冲液(pH 8.0)进行中和,使用Millipore蛋白浓缩管转换至包含0.02%叠氮化钠(sodium azide, NaN₃)和1 mmol \cdot L⁻¹乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)的2 \times PBS缓冲液中。浓缩至所需体积,经过SDS-PAGE检测纯度,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,避免重复冻融。

1.7.6 Western-blot抗体检测 利用MsLTI65多克隆抗体检测其是否可以识别MsLTI65天然样本的表达。利用MsLTI65多克隆抗体检测样本Lane 1(NaCl胁迫6 h),样本Lane 2(NaCl胁迫12 h)的表达,MsLTI65抗体采用11 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 孵育。

1.8 Western-blot表达分析

使用植物组织蛋白试剂盒(BC3720,北京索莱宝科技有限公司)提取不同非生物胁迫(NaCl、4 $^{\circ}\text{C}$ 、PEG、ABA)处理条件下紫花苜蓿叶片的总蛋白。采用Qubit 4荧光计(赛默飞世尔科技公司)对蛋白浓度进行精准测量,将测定后的蛋白与loading混合均匀,然后进行SDS-PAGE凝胶电泳分析。电泳完成后,以Rubisco蛋白条带作为内部参照^[20],利用Western-blot技术分析不同处理条件下的蛋白表达变化。一抗为制备的多克隆抗体,二抗为羊抗兔IgG(H+L)-HRP(1:5000)。通过Image Proplus软件量化目标蛋白条带的灰度值,以评估其在各种处理条件下的表达水平。

1.9 数据分析

通过Excel 2019软件整理数据,利用SPSS Statistics 26.0软件进行显著性分析,使用Origin 2021作图。

2 结果与分析

2.1 MsLTI65基因的克隆

以紫花苜蓿总RNA反转录的cDNA为模板,逆转录分别合成3'RACE与5'RACE cDNA第一链进行RACE PCR扩增。通过3'-RACE和5'-RACE扩增得到了长度分别为1310和1130 bp的基因3'和5'端序列(图1)。利用DNASTAR软件去除序列中的载体序列,得到5'和3'端的两段序列,将两段序列进行比对,去除重叠序列,根据已知的Unigene序列拼接出目的基因的开放阅读框(open reading frame, ORF)全长序列,利用RT-PCR技术扩增获得目的基因ORF全长序列。测序结果表明该序列ORF长度为2016 bp,编码671个氨基酸(图2)。

2.2 紫花苜蓿 MsLTI65 编码蛋白的理化性质分析

利用 ExPASy-ProtParam tool 对 MsLTI65 蛋白质理化性质进行预测,结果表明分子量为 74 kDa,理论等电点为 4.55,分子式为 $C_{3146}H_{4998}N_{880}O_{1168}S_5$,氨基酸组成为丙氨酸(Ala, 4.3%)、精氨酸(Arg, 2.1%)、天冬酰胺(Asn, 5.5%)、天冬氨酸(Asp, 8.2%)、谷氨酰胺(Gln, 13.9%)、甘氨酸(Gly, 6.3%)、组氨酸(His, 6.4%)、异亮氨酸(Ile, 4.6%)、亮氨酸(Leu, 4.0%)、赖氨酸(Lys, 9.5%)、甲硫氨酸(Met, 0.7%)、苯丙氨酸(Phe, 0.7%)、脯氨酸(Pro, 6.4%)、丝氨酸(Ser, 9.8%)、苏氨酸(Thr, 7.0%)、色氨酸(Trp, 0.1%)、酪氨酸(Tyr, 2.5%)、缬氨酸(Val, 6.9%),其中含量最多的是谷氨酰胺(Gln),脂肪系数为 57.91,不稳定系数为 51.6。利用 ProtScale 预测 MsLTI65 编码蛋白的亲疏水性,结果显示,最大亲水分值为 0.956,最小亲水分值为 -3.011,总平均亲水指数(grand average of hydropathicity, GRAVY)为 -1.207,初步推测 MsLTI65 蛋白为不稳定的亲水性蛋白(图 3A)。使用 NetPhos 预测 MsLTI65 蛋白的磷酸化位点(图 3B),分析结果显示,该蛋白共有 127 个磷酸化位点,其中 66 个丝氨酸(Serine)位点,45 个苏氨酸(Threonine)位点,16 个酪氨酸(Tyrosine)位点,表明 MsLTI65 蛋白发生磷酸化时主要以丝氨酸磷酸化为主。跨膜区预测分析表明,MsLTI65 蛋白没有跨膜区,不是跨膜蛋白,且全都在膜内(图 3C)。MsLTI65 蛋白的信号肽预测结果表明,MsLTI65 蛋白没有信号肽,不具有分泌蛋白的特性(图 3D)。

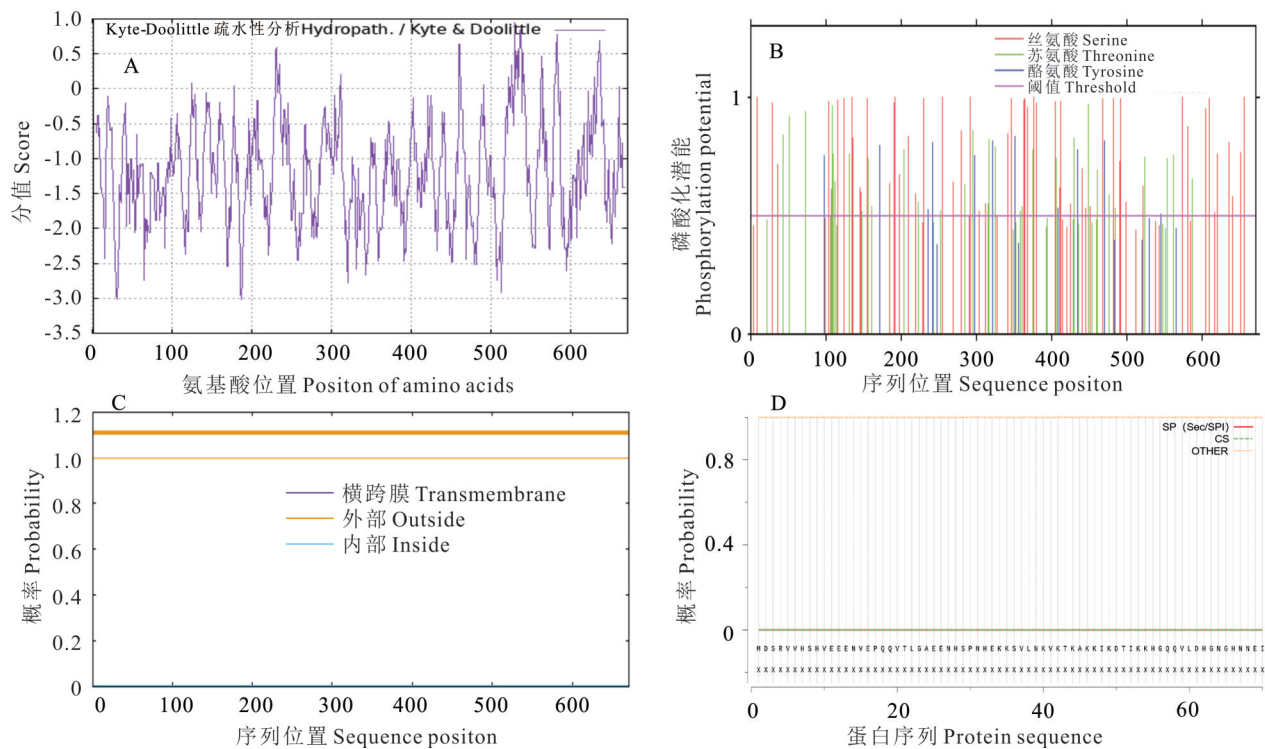


图 3 紫花苜蓿 MsLTI65 蛋白理化性质分析

Fig. 3 Analysis of physicochemical properties of alfalfa MsLTI65 protein

A: 亲疏水性及保守性分析 Hydrophobicity and conservation analysis; B: 磷酸化位点分析 Phosphorylation site analysis; C: 跨膜结构预测 Transmembrane structure prediction; D: 信号肽预测 Signal peptide prediction.

2.3 MsLTI65 蛋白结构特征分析

对 MsLTI65 蛋白进行二级结构预测分析,预测表明 MsLTI65 含有 29.66% 的 α -螺旋,6.56% 的延伸链,59.91% 的不规则卷曲。 α -螺旋对于紫花苜蓿 MsLTI65 蛋白质结构来说具有一定稳定性,不规则卷曲在功能上充当酶和蛋白质的活性中心(图 4A)。通过 AlphaFold3 在线软件对 MsLTI65 蛋白的三级结构进行预测,结果表明 MsLTI65 的三级结构比较简单,主要由 α -螺旋和延伸链结构组成(图 4B)。通过在线工具 WoLF PSORT Protein Subcellular localization Prediction 对 MsLTI65 蛋白进行亚细胞定位预测,结果显示该蛋白位于细胞核中。

2.4 MsLTI65 基因的系统进化树分析

为了更好地了解 MsLTI65 在物种中的进化位置和亲缘关系,将紫花苜蓿与大豆(*Glycine max*)、野大豆(*Glycine soja*)、蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)、拟南芥、水稻和木豆(*Cajanus cajan*)等共 22 个 LTI 蛋白利用 MEGA 7.0 软件与 ITOL 软件构建系统进化树,根据进化树分支,将 22 个 LTI 转录因子划分为 I、II、III、IV、V 共 5 类,其中紫花苜蓿 MsLTI65 蛋白与蒺藜苜蓿 MtLTI65、红三叶(*Trifolium pratense*)TpLTI65、白三叶(*Trifolium repens*)TrLTI65、豌豆(*Pisum sativum*)PsLTI65、鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)CaLTI65 聚为同一类,且紫花苜蓿 MsLTI65 蛋白与蒺藜苜蓿 MtLTI65 聚为同一分支,表明两者氨基酸序列差异较小,亲缘关系较近,具有较高的同源性,在功能上可能也具有相似性(图 5)。

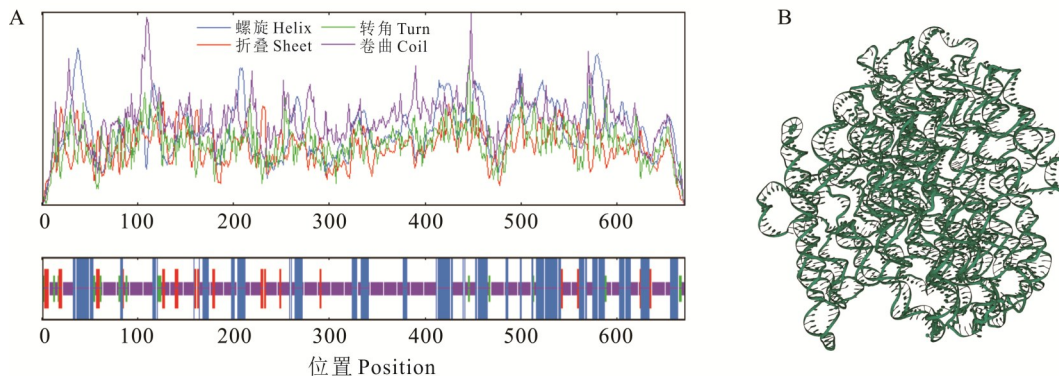


图 4 MsLTI65 蛋白的二级结构和三级结构预测

Fig. 4 Prediction of the secondary and tertiary structures of MsLTI65 protein

A: MsLTI65 蛋白的二级结构;红色为延伸链结构;紫色为无规则卷曲结构;绿色为 β -折叠结构;蓝色为 α -螺旋结构。The secondary structure of MsLTI65 protein; Red: Extended chain structure; Purple: Irregular coiled structure; Green: β -sheet structure; Blue: α -helix structure; B: MsLTI65 蛋白的三级结构 The tertiary structure of MsLTI65 protein.

2.5 紫花苜蓿 MsLTI65 蛋白保守基序分析

利用 MEME 在线软件对蒺藜苜蓿、大豆、拟南芥等植物中与 MsLTI65 相似性较高的 18 条蛋白序列的保守基序进行预测。结果表明,保守基序(motif)的分布表现出高度的保守性:每个蛋白序列均含有 Motif 6 和 Motif 7, MsLTI65 和 MtLTI65 相比仅多了 1 个 Motif 9; MsLTI65、TpLTI65、GmLTI65 均含有 20 个 motif,且从 5' 到 3' 端 motif 的排列有相似的规律性(图 6)。说明 LTI 蛋白家族在进化上具有很强的保守性,依此推断 MsLTI65 与 LTI 家族其他成员具有类似的生理功能。

2.6 紫花苜蓿 MsLTI65 启动子顺式作用元件分析

利用生物信息学网站 PlantCARE 对 MsLTI65 上游启动子区域进行顺式作用元件分析发现,该启动子除具有 CAAT-box、TATA-box 等基本元件外,还含有 TCT-motif、Box 4 和 GT1-motif 等光反应元件,参与低温响应的顺式作用元件(low temperature responsive *cis*-acting element, LTR),参与脱水反应的顺式作用元件(dehydration responsive element, DRE),参与脱落酸反应的顺式作用元件(abscisic acid responsive *cis*-acting element, ABRE),参与防御和胁迫反应的 TC-rich repeats 等重要顺式作用元件(表 3)。

2.7 紫花苜蓿 MsLTI65 基因在不同非生物胁迫下的表达分析

为进一步探究 MsLTI65 基因在紫花苜蓿中可能发挥的功能,对 MsLTI65 基因在 PEG、NaCl、4 $^{\circ}$ C、ABA、Cu²⁺、Zn²⁺ 处理下的表达模式进行分析(图 7)。结果表明,紫花苜蓿 MsLTI65 基因可以响应多种逆境胁迫,PEG 模拟干旱胁迫处理下,MsLTI65 的表达量整体呈上升趋势,在处理 24 h 时表达量升到最高,且显著高于对照(0 h, $P < 0.05$);在 4 $^{\circ}$ C 冷处理下,MsLTI65 的表达量呈先上升后下降趋势,在处理 8 h 时出现峰值,但处理 24 h 时表达量急剧下降;在 NaCl 胁迫下,MsLTI65 的表达量在处理 12 h 时升到最高,整个处理过程中表达量始终显著高于对照(0 h, $P < 0.05$);在 ABA 处理下,MsLTI65 的表达量呈逐渐上升趋势,在处理 24 h 时达到峰值;在 Zn²⁺ 处理下,

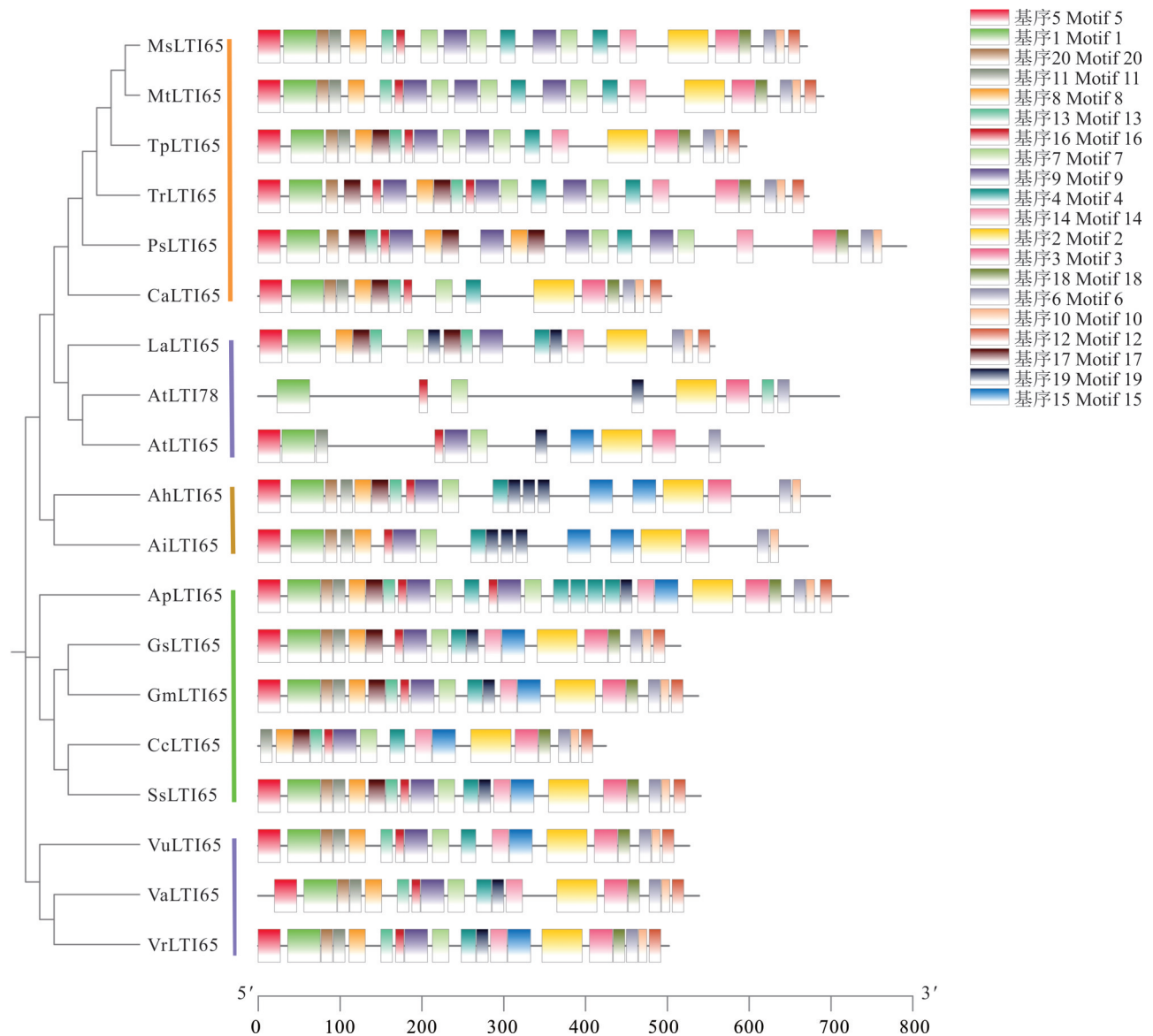


图6 紫花苜蓿 MsLTI65 蛋白保守基序分析

Fig. 6 Analysis of conserved motifs in the MsLTI65 protein of alfalfa

2.9 MsLTI65 蛋白在不同非生物胁迫下的表达分析

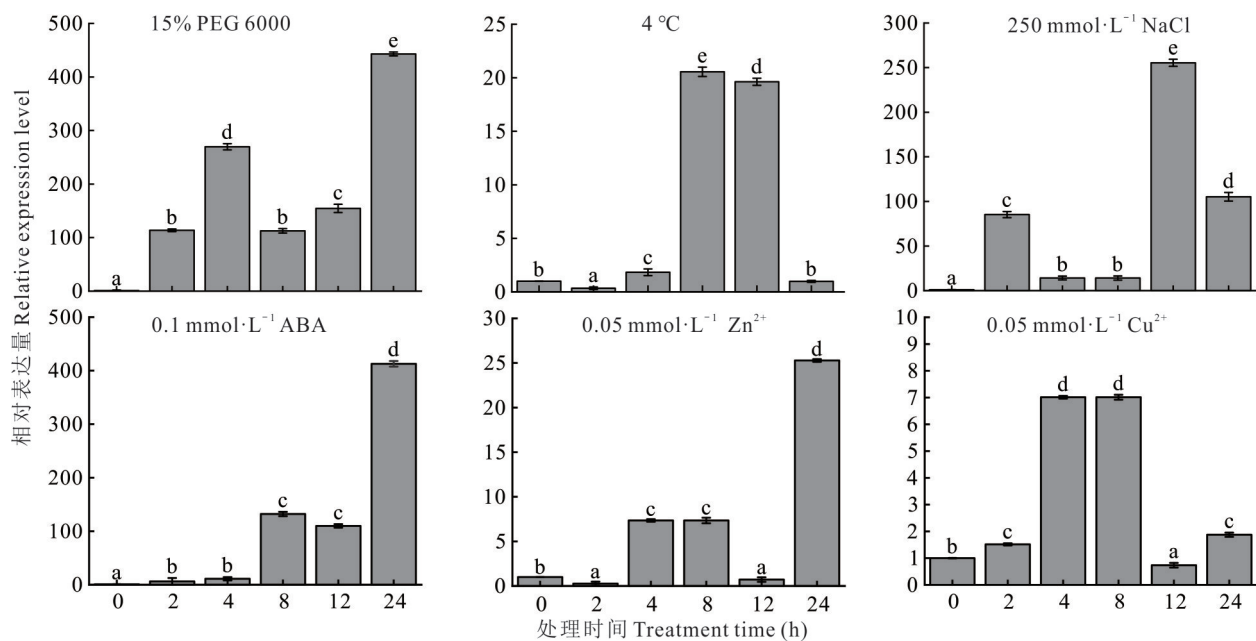
为了探究 MsLTI65 蛋白在干旱、盐、冷、ABA 胁迫下的表达模式,采用 Western-blot 的方法对 MsLTI65 蛋白进行检测。结果显示,MsLTI65 蛋白在不同非生物胁迫条件下的表达量不同,在 NaCl 胁迫下,MsLTI65 蛋白表达量随胁迫时间的增加表现出先增加后降低的趋势,在胁迫 6 h 时蛋白表达量最高。在冷胁迫下,MsLTI65 蛋白表达量随胁迫时间的增加表现出“升—降—升—降”的变化趋势,在胁迫 24 h 时表达量最高。在 PEG 胁迫下,MsLTI65 蛋白表达量随胁迫时间增加呈先升高后降低的趋势,且在胁迫 12 h 时表达量最高。在 ABA 胁迫下,MsLTI65 蛋白表达量随时间的增加呈先升高后降低的趋势(图 9)。

3 讨论

近年来,由于紫花苜蓿基因组数据的接连公布,在紫花苜蓿中进行优质抗逆基因的克隆及功能验证技术也愈发成熟。紫花苜蓿在生长发育过程中可能会受到各种不利环境因素的影响,如干旱、低温、高盐等非生物胁迫^[21-24]。LTI 蛋白是植物中一类低温诱导蛋白,在植物生长发育与逆境适应过程中发挥重要作用,并且受非生物胁迫诱导表达,是植物生长调控网络的关键成员^[25]。

表 3 *MsLTI65* 基因启动子部分顺式作用元件分析Table 3 Analysis of *cis*-acting elements in the promoter region of the *MsLTI65* gene

元件名称 Element name	序列 Sequence	数量 Amount	功能 Function
TCT-motif	TCTTAC	1	光响应模块的一部分 Part of a module for light response
MYC	CATTTG	5	MYC 结合位点 MYC binding site
Box 4	ATTAAT	1	光响应元件 Light responsive element
Chs-CMA1a	TTACTTAA	1	光响应元件 Light responsive element
GT1-motif	GGTTAA	1	光响应元件 Light responsive element
LTR	CCGAAA	2	参与低温响应的顺式作用元件 <i>Cis</i> -acting element involved in low-temperature responsiveness
ARE	AAACCA	4	无氧诱导调节元件 Anaerobic induction regulating element
TC-rich repeats	GTTTTCTTAC	2	参与防御和胁迫反应的顺式作用元件 <i>Cis</i> -acting element involved in defense and stress responsiveness
ABRE	CACGTG/ACGTG	4	参与脱落酸反应的顺式作用元件 <i>Cis</i> -acting element involved in the abscisic acid responsiveness
DRE	GCCGAC	1	参与脱水反应的顺式作用元件 <i>Cis</i> -acting elements involved in dehydration reactions

图 7 *MsLTI65* 在不同非生物胁迫处理下的相对表达量Fig. 7 Relative expression levels of *MsLTI65* under different abiotic stresses

不同小写字母表示不同处理时间间差异显著 ($P < 0.05$)。Different lowercase letters indicate significant differences among different treatment times ($P < 0.05$).

本研究克隆得到紫花苜蓿低温诱导蛋白基因 *MsLTI65*, 生物信息学分析表明紫花苜蓿 *MsLTI65* 蛋白的氨基酸数量为 671 aa, 分子量为 73.99 kDa, 等电点为 4.55, 为亲水性蛋白, 无跨膜区, 预测亚细胞定位在细胞核内。Nordin 等^[26]对拟南芥低温诱导蛋白 LTI65 进行研究发现, LTI65 属于胚胎发育晚期富集蛋白 (late embryogenesis abundant protein, LEA) 家族成员, 是一个含 600 个氨基酸的多肽, 分子量为 65 kDa, 等电点为 4.9, 具有极强的亲水性, 缺乏跨膜区、N 端信号肽和其他靶向信号, C 端包含 5 个不完全重复序列 (Val-Ala-Glu-Lys-Leu), *MsLTI65* 蛋白结构与 LEA 蛋白具有一定的相似性, 因此推测紫花苜蓿 LTI65 属于 LEA 蛋白家族成员。此外, 本研究系统发育树分析结果表明, LTI65 编码的蛋白与蒺藜苜蓿、红三叶、白三叶、豌豆等豆科植物聚为一簇, 其中与蒺藜苜

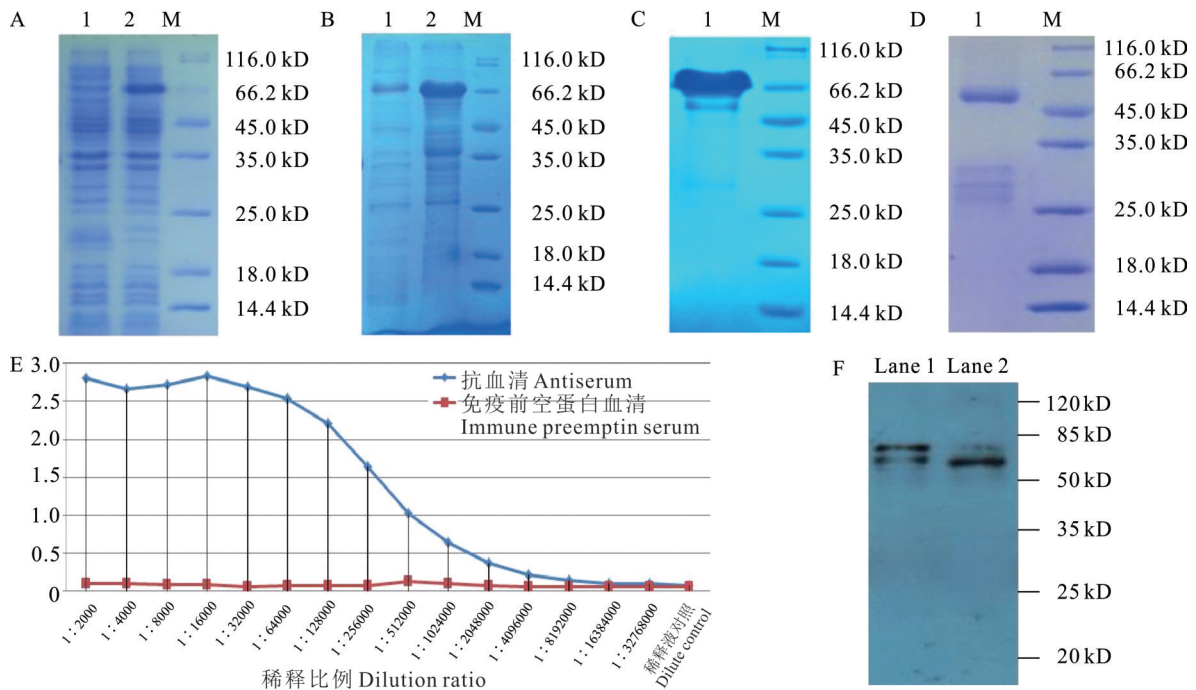


图8 MsLTI65的多克隆抗体制备及 Western-blot 检测

Fig. 8 Polyclonal antibody preparation and Western-blot detection of MsLTI65

A: 小量诱导表达 MsLTI65 融合蛋白检测; M: 非预染蛋白 Marker ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); 1: 未进行 IPTG 处理的菌液(对照组); 2: IPTG 处理的菌液(试验组)。A: Small amount of induced expression of MsLTI65 fusion protein detection; M: non-prestained protein Marker ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); 1: Bacterial solution without IPTG treatment (control group); 2: IPTG treated bacterial solution (experimental group). B: 大量诱导表达 MsLTI65 融合蛋白检测。1: 转化 pGEX-3X-MsLTI65 的菌种沉淀; 2: 转化 pGEX-3X-MsLTI65 的菌种上清。B: Large amounts of induced expression of MsLTI65 fusion protein detection. 1: Transformed pGEX-3X-MsLTI65 strain precipitation; 2: Transformed of pGEX-3X-MsLTI65 strain supernatant. C: MsLTI65 融合蛋白的纯化。1: 纯化的 MsLTI65 融合蛋白。C: Purification of MsLTI65 fusion protein. 1: Purified MsLTI65 fusion protein. D: MsLTI65 多克隆抗体的纯化。1: MsLTI65 纯化抗体。D: Purification of MsLTI65 polyclonal antibody. 1: MsLTI65 purified antibody. E: 抗血清中 MsLTI65 抗体效价检测。E: Titer detection of MsLTI65 antibody in antiserum. F: MsLTI65 多克隆抗体 Western-blot 检测。Lane1: NaCl 胁迫 6 h 的天然样本; Lane2: NaCl 胁迫 12 h 的天然样本。F: Western-blot analysis of MsLTI65 polyclonal antibody. Lane1: Natural samples subjected to NaCl stress for 6 h; Lane2: Natural sample subjected to NaCl stress for 12 h.

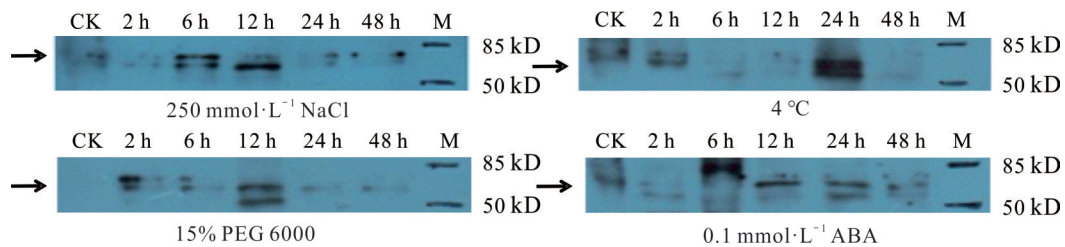


图9 MsLTI65 蛋白在不同非生物胁迫条件下的相对表达量

Fig. 9 Relative expression of MsLTI65 protein under different abiotic stress conditions

CK: 0 h; M: 蛋白质分子量标准 Protein marker.

聚为同一分支,亲缘关系较近,在功能上可能也具有相似性。启动子是一段位于基因 5' 端上游区的 DNA 序列,含有多种顺式作用元件,可被 RNA 聚合酶或转录因子特异结合,在响应生物和非生物胁迫、调控基因表达等生物学过程中起重要作用,可以根据不同的环境条件来调节基因的表达水平^[27-28]。

植物在面对环境胁迫时,会有一系列应急保障措施,缓解环境胁迫对机体造成的伤害,以维持其自身的正常生存与生长^[29]。植物抗逆过程如其他生理过程一样,当植物受到逆境胁迫时,植物能够采取相应的策略来应对胁迫,在长期适应环境中也演化出了相应的一套复杂的防御网络机制^[30-31]。多项研究表明 *LTI* 的过量表达可以有

效提高拟南芥、水稻和陆地棉(*Gossypium hirsutum*)等植物的耐寒及其他抗逆能力。例如,Wang等^[32]研究表明,*GhLTI65*基因和*GhPV42A*基因的互作能提高陆地棉的耐盐性。Kim等^[33]发现在低温胁迫下与对照组相比,*OsLTI6B*基因过量表达的水稻抗寒性更高。余成华等^[34]对云南黄连(*Coptis teeta*)开花时期不同时间段的花朵进行转录组测序,结果表明*LTI65*基因在开花过程中面对低温时有显著的差异表达。此外,拟南芥*LTI29*和*LTI30*基因的过表达增强了拟南芥对冷冻胁迫的耐受性^[35]。本研究对干旱、盐、ABA、冷、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 胁迫下*MsLTI65*基因的表达模式进行分析,结果表明在PEG模拟干旱胁迫和ABA胁迫处理下,*MsLTI65*的表达量整体呈上升趋势,在处理24 h时表达丰度达到最高,在NaCl胁迫下,*MsLTI65*的表达量在处理12 h时表达量升到最高,整个处理过程中表达量始终显著高于对照(0 h),在 Zn^{2+} 处理下,*MsLTI65*的表达量在处理24 h时达到峰值;在 Cu^{2+} 处理下,*MsLTI65*的表达量呈“升—降—升”趋势,在处理4 h时急剧上升,随后在处理12 h又急剧下降。在4 °C冷处理下,*MsLTI65*的表达量呈先上升后下降趋势,在处理8 h时出现峰值。*LTI65*为低温诱导蛋白,但是*MsLTI65*基因在盐和干旱胁迫下的响应比在低温胁迫下更为显著,有研究表明拟南芥*AtLTI65*和*AtLTI78*主要通过ABA依赖的信号途径参与对胁迫的响应,尤其是在高盐和干旱胁迫条件下表达增强^[16]。其启动子区域包含3个ABA响应元件(ABREs)和1个脱水响应元件(DRE),这表明*AtLTI65*和*AtLTI78*在ABA介导的胁迫响应中起着重要作用。盐和干旱胁迫可能通过提高细胞内ABA的浓度,激活*LTI65*的表达,从而在盐和干旱胁迫条件下表现出更强烈的响应。ABA作为一种在植物组织适应干旱和高盐度等非生物胁迫以及种子的成熟和休眠中都起着重要作用的植物激素,在其调控下,植株根系伸长、气孔关闭,缓解了因高盐分、干旱造成的脱水死亡^[36-37]。Shinozaki等^[38]对拟南芥进行干旱和外源ABA处理,发现*AtLTI78*基因分别存在一条ABA响应的胁迫应答途径和独立于ABA的应答响应途径,这与脱落酸反应顺式作用元件ABRE和脱水反应顺式作用元件DRE的调控有关,并且两种途径互相串扰,共同形成了启动子的诱导激活活性。本研究发现*MsLTI65*启动子中也含有脱落酸反应顺式作用元件ABRE和脱水反应顺式作用元件DRE,因此推测*MsLTI65*可能通过其启动子区域的顺式作用元件与其他ABA信号途径成分进行交互,协同调节胁迫响应,在盐和干旱胁迫条件下发挥重要作用。

Western-blot技术因其能精确检测特定蛋白质在不同胁迫条件下的表达水平,已成为研究植物对非生物胁迫响应中蛋白质表达变化的重要工具^[39-40]。为验证*MsLTI65*蛋白在不同非生物胁迫下的表达模式,本研究制备了*MsLTI65*蛋白的多克隆抗体,并通过Western-blot技术确认该抗体可以识别天然*MsLTI65*样本。通过对干旱、盐、冷、ABA胁迫处理下*MsLTI65*蛋白的表达情况进行验证,结果表明*MsLTI65*蛋白在不同非生物胁迫条件下均表达。由此推测,紫花苜蓿在感受外界刺激后,可能通过激活*MsLTI65*蛋白的表达,进而产生一系列反应以适应外界环境,表明*MsLTI65*蛋白在不同非生物胁迫条件下的存在可能涉及一个广泛的应答网络,而非特异性地响应某一单一胁迫类型。此外,结合蛋白和转录水平的表达情况,*MsLTI65*在不同非生物胁迫条件下的表达调控模式较为复杂。例如,在PEG胁迫下,*MsLTI65*的转录水平整体呈上升趋势,而蛋白表达则先增加后减少,暗示*MsLTI65*在干旱条件下可能受到翻译后调控。在NaCl和ABA胁迫下,基因和蛋白表达均表现为先上升后下降的趋势,但其峰值时间有所不同,表明其表达具有一定的一致性和差异性。在冷胁迫下,*MsLTI65*基因表达在初期上升但随后急剧下降,而蛋白表达则表现为“升—降—升—降”的变化趋势,反映出冷胁迫下更为复杂的调控机制。综上所述,*MsLTI65*在紫花苜蓿应对非生物胁迫中发挥了重要作用,其调控机制有待进一步研究。这些研究结果不仅为进一步探讨*MsLTI65*基因如何调控植物在多重非生物胁迫条件下的生理机制提供了基础,而且为紫花苜蓿的抗逆分子育种提供了重要的候选基因。

4 结论

本研究获得紫花苜蓿锌指蛋白家族转录因子*MsLTI65*,基因特性分析表明,该基因开放阅读框长度为2016 bp,编码671个氨基酸,为亲水性蛋白,预测蛋白亚细胞定位于细胞核。*MsLTI65*基因启动子区域包括光、低温、脱水、防御和胁迫等响应相关的元件。通过实时荧光定量PCR验证,紫花苜蓿*MsLTI65*基因表达受到冷、干旱、

盐、ABA、Cu²⁺和Zn²⁺胁迫诱导。此外,利用Western-blot方法验证MsLTI65蛋白在干旱、盐、低温和ABA胁迫下均表达。初步确定MsLTI65参与紫花苜蓿非生物胁迫应答,为后续深入探究MsLTI65在紫花苜蓿中的抗逆功能奠定了基础,也为进一步解析MsLTI65调控抗逆性的机制提供了理论依据。

参考文献 References:

- [1] Yang Q C, Kang J M, Zhang T J, *et al.* Distribution, breeding and utilization of alfalfa germplasm resources. Chinese Science Bulletin, 2016, 61(2): 261–270.
杨青川, 康俊梅, 张铁军, 等. 苜蓿种质资源的分布、育种与利用. 科学通报, 2016, 61(2): 261–270.
- [2] Li X L, Shen Y Y, Wan L Q. Potential analysis and policy recommendations for restructuring the crop farming and developing forage industry in China. Strategic Study of CAE, 2016, 18(1): 94–105.
李向林, 沈禹颖, 万里强. 种植业结构调整和草牧业发展潜力分析及政策建议. 中国工程科学, 2016, 18(1): 94–105.
- [3] Sun R, Liu Z D, Gao H J, *et al.* A brief analysis of the protection and restoration of China's grassland ecological environment. Animal Husbandry Industry, 2024(3): 55–58.
孙蕊, 刘泽东, 高海娟, 等. 简析我国草原生态环境的保护与修复. 畜牧产业, 2024(3): 55–58.
- [4] Chen C J, Wang X M, Liu W H, *et al.* Research advances on genetic diversity of grass germplasm. Acta Agrestia Sinica, 2024, 32(2): 349–357.
陈彩锦, 王学敏, 刘文辉, 等. 草种质资源遗传多样性研究进展. 草地学报, 2024, 32(2): 349–357.
- [5] Sun P B, Wang Z J, Ge G T, *et al.* Research progress of alfalfa salt and alkali stress tolerance and mitigation measures. Northern Horticulture, 2023(21): 131–137.
孙鹏波, 王志军, 格根图, 等. 紫花苜蓿耐盐碱胁迫与缓减措施的研究进展. 北方园艺, 2023(21): 131–137.
- [6] Mao P S, Hou L Y, Wang M Y. Limited factors and key technologies of forage seed production in the northern of China. Science Bulletin, 2016, 61(2): 250–260.
毛培胜, 侯龙鱼, 王明亚. 中国北方牧草种子生产的限制因素和关键技术. 科学通报, 2016, 61(2): 250–260.
- [7] Wang X, Li Z P, Sun J J, *et al.* Progress of alfalfa breeding in China. Pratacultural Science, 2014, 31(3): 512–518.
王雪, 李志萍, 孙建军, 等. 中国苜蓿品种的选育与研究. 草业科学, 2014, 31(3): 512–518.
- [8] Ma B, Sun J W, Li S F. Research advances about low temperature induced proteins in plants. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(12): 6085–6086, 6094.
马斌, 孙骏威, 李素芳. 植物低温诱导蛋白的研究进展. 安徽农业科学, 2010, 38(12): 6085–6086, 6094.
- [9] Briggs D R, Siminovitch D. The chemistry of the living bark of the black locust tree in relation to frost hardiness. II. Seasonal variations in the electrophoresis pattern of the water-soluble proteins of the bark. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1949, 23(1): 8–11.
- [10] Houde M, Danyluk J, Laliberte J F, *et al.* Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding a 50-kilodalton protein specifically induced by cold acclimation in wheat. Plant Physiology, 1992, 99(4): 1381–1387.
- [11] Yonca S, Bekir C, Betül B. Differential expression analysis of boron transporters and some stress-related genes in response to 24-epibrassinolide and boron by semi-quantitative RT-PCR in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Genetika, 2016, 48(2): 547–563.
- [12] Vigeland M D, Manuel S, Torben A, *et al.* Evidence for adaptive evolution of low-temperature stress response genes in a Pooideae grass ancestor. The New Phytologist, 2013, 199(4): 1060–1068.
- [13] Joaquín M, Marta F R, Andrés P, *et al.* *Arabidopsis* mutants deregulated in RCI2A expression reveal new signaling pathways in abiotic stress responses. The Plant Journal, 2005, 42(4): 586–597.
- [14] Li J H, Sun H Y, Zhao P J, *et al.* Cloning and sequence analysis of low-temperature inducible gene (*MeLTI6A*) of *Manihot esculenta*. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(27): 72–77.
黎娟华, 孙海彦, 赵平娟, 等. 木薯低温诱导基因*MeLTI6A*的克隆与序列分析. 中国农学通报, 2012, 28(27): 72–77.
- [15] Shi H, Chen Y, Qian Y, *et al.* Low temperature-induced 30 (*LTI30*) positively regulates drought stress resistance in *Arabidopsis*: Effect on abscisic acid sensitivity and hydrogen peroxide accumulation. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 893.
- [16] Jia H, Zhang S, Ruan M, *et al.* Analysis and application of *RD29* genes in abiotic stress response. Acta Physiologiae Plantarum, 2012, 34: 1239–1250.
- [17] Yang Y Z, Lei Z H, Peng F R. Research advances about low-temperature-induced proteins and the cold tolerance in plants.

- Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2007, 27(2): 421–428.
- 杨玉珍, 雷志华, 彭方仁. 低温诱导蛋白及其与植物的耐寒性研究进展. 西北植物学报, 2007, 27(2): 421–428.
- [18] Jia H L, Shi Y H, Wang X M, *et al.* Cloning and expression analysis of *MsLEA4* promoter from *Medicago sativa*. Acta Agrestia Sinica, 2019, 27(4): 789–796.
- 贾会丽, 石永红, 王学敏, 等. 紫花苜蓿 *MsLEA4* 启动子的克隆及表达分析. 草地学报, 2019, 27(4): 789–796.
- [19] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 2001, 25(4): 402–408.
- [20] Li T. The function of raffinose family oligosaccharides in plant drought stress tolerance and seed vigor of maize and Arabidopsis. Yangling: Northwest A & F University, 2017.
- 李涛. 棉子糖系列寡糖(RFOs)在玉米与拟南芥植株抗旱及种子活力中的功能研究. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [21] Wang S P, Liu J, Hong J, *et al.* Cloning and function analysis of *MsPPR1* in alfalfa under drought stress. Acta Prataculturae Sinica, 2023, 32(7): 49–60.
- 王少鹏, 刘佳, 洪军, 等. 紫花苜蓿 *MsPPR1* 基因的克隆及抗旱功能分析. 草业学报, 2023, 32(7): 49–60.
- [22] Zhang L S, Sun Y G, Ji J Q, *et al.* Flavonol synthase gene *MsFLS13* regulates saline-alkali stress tolerance in alfalfa. The Crop Journal, 2023, 11(4): 1218–1229.
- [23] Cen H F, Huang J Q, Shen W H, *et al.* Cloning of *MsUGT87A1* gene in alfalfa and analysis of its expression in the response to abiotic stress. Acta Agrestia Sinica, 2023, 31(6): 1682–1692.
- 岑慧芳, 黄洁琼, 申王晖, 等. 紫花苜蓿 *MsUGT87A1* 基因克隆及其对非生物胁迫的响应分析. 草地学报, 2023, 31(6): 1682–1692.
- [24] Ma L, Wen H Y, Wang X M, *et al.* Cloning and function analysis of *MsMAX2* gene in alfalfa (*Medicago sativa* L.). Scientia Agricultura Sinica, 2021, 54(19): 4061–4069.
- 马琳, 温红雨, 王学敏, 等. 紫花苜蓿 *MsMAX2* 的克隆及功能研究. 中国农业科学, 2021, 54(19): 4061–4069.
- [25] Sun X, Lei T, Yuan S, *et al.* Progress in research of dehydrins. Journal of Wuhan Botanical Research, 2005, 23(3): 299–304.
- 孙歆, 雷韬, 袁澍, 等. 脱水素研究进展. 武汉植物学研究, 2005, 23(3): 299–304.
- [26] Nordin K, Vahala T, Palva E T. Differential expression of two related, low-temperature-induced genes in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Plant Molecular Biology, 1993, 21: 641–653.
- [27] Wang J, Li B, Liu C C, *et al.* Advances of the studies on structure and function of promoter. Bulletin of Biotechnology, 2014(8): 40–45.
- 王婧, 李冰, 刘翠翠, 等. 启动子结构和功能研究进展. 生物技术通报, 2014(8): 40–45.
- [28] Yang P F, Duan G Q, Hu X W, *et al.* Overview of higher plant promoters research. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(5): 1482–1493.
- 杨鹏芳, 段国琴, 胡晓炜, 等. 高等植物启动子研究概述. 分子植物育种, 2018, 16(5): 1482–1493.
- [29] Zhao L, Wang P, Wu Q, *et al.* Research progress in histone modification of plant involved in the regulation of gene expression response to abiotic stress. Bulletin of Biotechnology, 2020, 36(7): 182–189.
- 赵琳, 王璞, 吴琦, 等. 非生物胁迫下植物组蛋白修饰参与基因表达调控的研究进展. 生物技术通报, 2020, 36(7): 182–189.
- [30] Li J X, Zhou L Y, Yuan F, *et al.* Cloning and expression analysis of *MsHB1* gene from *Medicago sativa*. Acta Agrestia Sinica, 2023, 31(12): 3617–3625.
- 李家兴, 周丽莹, 苑峰, 等. 紫花苜蓿 *MsHB1* 基因的克隆及表达分析. 草地学报, 2023, 31(12): 3617–3625.
- [31] Liu Y M, Zhou H Y, Wang K, *et al.* Research on response mechanism of plants to abiotic stress. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2018, 46(16): 35–37, 62.
- 刘燕敏, 周海燕, 王康, 等. 植物对非生物胁迫的响应机制研究. 安徽农业科学, 2018, 46(16): 35–37, 62.
- [32] Wang P L, Nie X, Ye Y L, *et al.* Forskolin improves salt tolerance of *Gossypium hirsutum* L. by upregulation of *GhLTI65*. Industrial Crops Products, 2023, 201: 116900.
- [33] Kim S H, Kim J Y, Kim S H, *et al.* Isolation of cold stress-responsive genes in the reproductive organs, and characterization of the *OsLti6b* gene from rice (*Oryza sativa* L.). Plant Cell Reports, 2007, 26(7): 1097–1110.
- [34] Yu C H, Zhu C Y, Duan S F, *et al.* Comparative transcriptome analysis of response to low temperature during flowering of *Coptis teeta* Wall. Molecular Plant Breeding, 2022, 20(14): 4642–4653.
- 余成华, 朱春艳, 段绍凤, 等. 比较转录组分析云南黄连开花过程对低温的应答. 分子植物育种, 2022, 20(14): 4642–

4653.

- [35] Puhakainen T, Hess M W, Mäkelä P, *et al.* Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 2004, 54(5): 743–753.
- [36] Zhang Y J, Sang H T, Wang H Q, *et al.* Research progress in signal transduction in systemic responses of plants to abiotic stress. *Acta Botanica Sinica*, 2024, 59(1): 122–133.
张悦婧, 桑鹤天, 王涵琦, 等. 植物对非生物胁迫系统性反应中信号传递的研究进展. *植物学报*, 2024, 59(1): 122–133.
- [37] Shi W J, Wang X J, Liu H, *et al.* A novel ABA-insensitive mutant in *Arabidopsis* reveals molecular network of ABA-induced anthocyanin accumulation and abiotic stress tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 2022, 278: 153810.
- [38] Shinozaki K Y, Shinozaki K. Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29 gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. *Molecular Genetics and Genomics*, 1993, 236: 331–340.
- [39] Zhang L, Shi J N, Liu G Z. The concept of an advanced version of western blot (WB 2.0) and its perspectives. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2019, 46(9): 917–924.
张柳, 史佳楠, 刘国振. 蛋白质印迹技术升级版(WB 2.0)的概念与设想. *生物化学与生物物理进展*, 2019, 46(9): 917–924.
- [40] Shu X T, Ouyang N, Jiang C J, *et al.* Expression patterns of dehydrin-like proteins in tea plant (*Camellia sinensis*) by Western-blot analysis. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2015, 35(12): 2448–2454.
舒锡婷, 欧阳娜, 江昌俊, 等. 茶树叶片类脱水素蛋白的 Western-blot 分析. *西北植物学报*, 2015, 35(12): 2448–2454.