

王馨磊, 朱思琪, 田晓娜, 等. 紫花苜蓿 *RALF* 基因家族的全基因组鉴定及盐胁迫下表达分析[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(7):1260-1269.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2025.07.002

# 紫花苜蓿 *RALF* 基因家族的全基因组鉴定及盐胁迫下表达分析

王馨磊, 朱思琪, 田晓娜, 杨 杞

(内蒙古农业大学旱寒区植物逆境适应与遗传修饰改良自治区重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010018)

**摘要:** 快速碱化因子 *RALF* 是一类在植物生长发育及胁迫响应中发挥重要作用的小分子信号肽。为探讨盐胁迫条件下 *RALF* 基因家族中的关键基因,本研究对紫花苜蓿全基因组进行了 *RALF* 基因家族成员的鉴定,并分析了其盐胁迫响应特征。通过全基因组 BLAST 分析,鉴定出紫花苜蓿有 9 个 *RALF* 基因,编码的蛋白质氨基酸序列长度从 59 aa 到 128 aa,等电点为 5.13~5.41,均为疏水性蛋白。这些基因分布于 6 条染色体上,其中 2 对基因表现出共线性关系。系统发育分析将紫花苜蓿中 9 个 *RALF* 基因分为 4 个组,且所有基因编码的蛋白质均保留了 motif1 和 motif2 保守基序。此外,启动子分析结果显示大多数 *MsRALF* 基因具有响应植物生长发育及胁迫的顺式作用元件。盐胁迫处理 7 d 结果显示,*MsRALF1*、*MsRALF2*、*MsRALF3* 的表达量呈先下降后上升的趋势,并在第 7 d 达到峰值;*MsRALF6* 的表达量呈先下降后上升再下降的趋势,并在第 3 d 达到峰值;*MsRALF4*、*MsRALF5*、*MsRALF7*、*MsRALF8*、*MsRALF9* 的表达量均在盐胁迫当天达峰值。本研究结果表明,紫花苜蓿中鉴定出的 9 个 *MsRALF* 基因可能参与了植物对盐胁迫的响应,且其表达受到盐胁迫调控。

**关键词:** 紫花苜蓿; *RALF* 基因; 表达分析; 生物信息学分析; 盐胁迫

中图分类号: S68;Q946.83<sup>+</sup>6 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2025)07-1260-10

## Genome-wide identification of the *RALF* gene family in *Medicago sativa* and expression analysis under salt stress

WANG Xinlei, ZHU Siqi, TIAN Xiaona, YANG Qi

(Key Laboratory of Plants Adversity Adaptation and Genetic Improvement in Cold and Arid Regions of Inner Mongolia, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

**Abstract:** Rapid alkalization factor (*RALF*) is a class of small peptides that play crucial roles in plant growth, development, and stress response. To investigate key genes involved in salt stress response, we identified members of the *RALF* gene family in the whole genome of *Medicago sativa* and analyzed their response characteristics under salt stress.

收稿日期:2024-11-27

基金项目:内蒙古自然科学基金项目(2022MS03034);国家自然科学基金项目(32060066);内蒙古自治区植物逆境生理与分子生物学重点实验室能力建设项目(BR221021)

作者简介:王馨磊(1999-),男,内蒙古通辽人,硕士,研究方向为植物分子生物学。(E-mail)3041706586@qq.com

通讯作者:杨 杞,(E-mail)atp\_yangqi@imau.edu.cn

Through whole-genome BLAST analysis, we identified nine *RALF* genes in *M. sativa*. The encoded proteins ranged from 59 to 128 amino acids in length. Their isoelectric points clustered between 5.13 and 5.41. All exhibited hydrophobic properties. These genes were distributed across six chromosomes, with two pairs exhibiting collinearity. Phylogenetic analysis grouped these genes into four subgroups, and all members retained the conserved motif1 and

motif2. Furthermore, promoter analysis revealed that most *MsRALF* genes contained *cis*-regulatory elements associated with plant growth, development, and stress response. Under salt stress, *MsRALF1*, *MsRALF2* and *MsRALF3* expression initially decreased but subsequently increased, peaking at 7 d, while *MsRALF6* declined, then increased, and finally decreased, reaching maximal expression at 3 d. *MsRALF4*, *MsRALF5*, *MsRALF7*, *MsRALF8* and *MsRALF9* all peaked immediately on day 0 of salt exposure. These findings suggest that the nine *MsRALF* genes identified in *M. sativa* may be involved in the plant's response to salt stress, with their expression being regulated by salt stress conditions.

**Key words:** *Medicago sativa*; *RALF* gene; expression analysis; bioinformatics; salt stress

植物小分子信号肽是一类具有特殊功能的多肽,其长度通常少于 100 个氨基酸。这些信号肽在植物中广泛存在,除了调节植物生长发育外,还参与应对非生物逆境胁迫等重要过程<sup>[1]</sup>。

快速碱化因子 RALF (Rapid alkalization factor) 是一种相对分子量约为 5 000 的小分子信号肽,首次在烟草 (*Nicotiana tabacum*) 叶片中发现,因其可以引起培养基的快速碱化而得名<sup>[2]</sup>。RALF 是一种含有大量半胱氨酸的多肽,其整体结构由 49 个氨基酸组成,并且具有一个保守的 C 端结构域。此外, RALF 的 C 末端结构域富含半胱氨酸 (Cys), 通常包含 4 个 Cys, 这些 Cys 之间能够通过分子内二硫键形成连接, 从而进一步生成成熟的活性肽<sup>[2]</sup>。

*RALF* 基因存在于一些单子叶植物、双子叶植物以及裸子植物中,其在植物不同器官和组织中的表达模式各不相同。*RALF* 基因参与植物的生长发育过程,例如首次被克隆的是番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 中的一个 *RALF* 基因,该基因可以在特定时期抑制番茄花粉管的生长且不影响花粉活力<sup>[3]</sup>。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中 *AtRALF1* 基因和 *AtRALF23* 基因在根中特异性表达,此外,植物在该基因过表达后可能表现出根系减少和生长缓慢的表型。也有研究结果表明,在拟南芥中 *AtRALF1* 基因通过快速胞外碱化作用抑制根尖生长<sup>[4]</sup>。RALF4 和 RALF19 是拟南芥的两种肽配体,它们与受体 BUPS1 和 BUPS2 相互作用,调控花粉管的生长和发育,并保持其完整性<sup>[2]</sup>。RALF 多肽与 *FERONIA* (*FER*)、*ANJEA* (*ANJ*) 和 *HERCULES RECEPTOR KINASE1* (*HERK1*) 受体激酶相互作用,从而调节花粉管的行为,最终确保成功受精并防止多精现象<sup>[5]</sup>。

*RALF* 还在植物的生物和非生物胁迫防御反应中发挥作用。相关研究结果表明,*AtRALF8* 是一种在拟南芥中参与应激反应和细胞壁修饰的信号分子

基因,然而,其过度表达会对植物生长、耐旱性以及对抗线虫感染的抗性产生负面影响<sup>[6]</sup>。*ALF23* 和 *RALF33* 通过抑制病原体相关分子模式诱导的活性氧 (ROS) 暴发,负调控植物免疫反应<sup>[7]</sup>。盐胁迫条件下,*RALF22/RALF23-FER* 和 *LRX3/LRX4/LRX5* 通过维持细胞壁完整性、调节离子稳态及抑制 ROS 过度积累,共同提高植物的耐盐性<sup>[8]</sup>。此外,过表达藜麦 (*Chenopodium quinoa*) *CqRALF15* 基因的拟南芥在高盐环境下仅表现出叶片失绿表型,表明该基因参与调控植物的耐盐性<sup>[9]</sup>。

*RALF* 可被玫瑰花类受体样激酶 1 蛋白 (CrRLK1L) 家族感知,RALF 通过与 CrRLK1L 家族的受体相互作用,诱导植物细胞外区域的快速碱化,并导致植物生长受到抑制,RALF 和 CrRLK1L 受体复合物在其他组织中也参与调控细胞生长。这些结果表明,RALF 和 CrRLK1L 受体家族在植物细胞伸长信号传导中与许多生理反应相互作用<sup>[10]</sup>。

全球范围内,土壤盐渍化已成为亟待解决的重要生态问题,盐渍化土壤面积庞大且分布广泛。据统计,全球盐碱地中中国占比达 10.38%,盐碱地对植物生长及全球生态环境均带来重大威胁<sup>[11]</sup>。紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 为多年生草本植物,属于豆科苜蓿属,凭借其优良品质,在现代草产业中占有重要地位。因其产量高、营养价值高等特点被誉为“牧草之王”<sup>[12]</sup>。中国紫花苜蓿主要分布在内蒙古、新疆、甘肃等盐碱地较多的地区<sup>[13]</sup>。因此,研究紫花苜蓿的耐盐机制,对合理开发和利用盐碱地具有重要意义。

本研究对紫花苜蓿基因组中 *RALF* 基因家族成员进行了鉴定,随后进行系统发育分析、基因结构解析、染色体定位及启动子响应元件的研究。此外,还检测在盐胁迫处理下紫花苜蓿 *RALF* 家族基因的表达,为深入探讨 *RALF* 家族基因在紫花苜蓿盐胁迫响应中的作用提供基础。

# 1 材料与amp;方法

## 1.1 植物培养与盐胁迫处理

选取饱满均匀的紫花苜蓿(品种为中苜 1 号)种子,播种在装有蛭石:营养土=3:1(体积比)的培养钵中,培养 30 d 后进行盐胁迫处理。

利用浓度为 300 mmol/L 的 NaCl 溶液浇灌紫花苜蓿幼苗进行盐胁迫处理,分别在处理当天与处理后 1 d、3 d 和 7 d 取样,每个时间点取 4 株幼苗,迅速用水冲洗干净,将样品在研钵中磨碎,然后放入 50 mL 离心管中液氮速冻,将样品储存于 -80 ℃ 的超低温冰箱中备用。

## 1.2 方法

**1.2.1 紫花苜蓿 *RALF* 家族基因的鉴定、染色体定位和共线性分析** 中苜 1 号紫花苜蓿数据下载自 Figshare 数据库 (<https://info.figshare.com/>)<sup>[14]</sup>。为了鉴定紫花苜蓿中的 *RALF* 基因,从 TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) 数据库中获得 39 个 *RALF* 家族基因序列作为种子序列,通过 TBtools<sup>[15]</sup> 的 Blastp 功能鉴定紫花苜蓿中的 *RALF* 同源基因;使用 ExPASy 网站 (<http://expasy.org/tools/>) 预测 MsRALF 蛋白的相对分子量、等电点、亲水性总平均值(*GRAVY*)。本研究从紫花苜蓿基因组的 GFF 文件中获取了 9 个 *MsRALF* 基因的染色体位置信息,并通过 TBtools 进行了可视化分析和共线性分析。基因的复制事件则通过 KaKs\_Calculator2.0<sup>[16]</sup> 进行分析。

**1.2.2 系统发育、基因结构及保守基序分析** 使用 MEGA11<sup>[17]</sup> 软件的 MUSCLE 工具比对 9 个 *MsRALF*

基因编码蛋白质氨基酸序列与 39 个拟南芥 *RALF* 蛋白氨基酸序列,并采用邻接法(NJ)构建系统发育树,Bootstrap 检验次数为 1 000 次。拟南芥 *RALF* 蛋白氨基酸序列来自 TAIR 数据库。将 9 个 *MsRALF* 基因编码蛋白质氨基酸序列上传至 MEME 网站<sup>[18]</sup> (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 进行基序分析,并使用 MEGA11 软件构建系统发育树。通过 TBtools 整合并可视化分析结果。

**1.2.3 蛋白质结构预测** 使用在线工具 SOPMA (<https://npsa-prabi.ib-cp.fr>) 对 9 个 MsRALF 蛋白进行蛋白质二级结构预测<sup>[19]</sup>。

**1.2.4 顺式作用元件分析** 从紫花苜蓿基因组中提取 9 个 *RALF* 基因起始密码子上游 2 000 个碱基对的序列,使用 TBtools 获取每个基因起始密码子上游 2 000 bp 的 CDS 序列,验证后上传至 Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plant-care/html/>),筛选反馈结果并通过 TBtools 进行可视化分析。

**1.2.5 紫花苜蓿总 RNA 提取** 使用 TIANGEN 总 RNA 提取试剂盒按照操作手册提取 RNA,利用 TaKaRa 反转录试剂盒进行 cDNA 合成。

**1.2.6 表达模式分析** 以紫花苜蓿 cDNA 为模板,目的基因和内参基因(*MsEIF4A*)引物见表 1。反应体系(20 μL):5 μL 模板 cDNA,0.8 μL 引物(浓度为 10 μmol/L),TB Green<sup>®</sup> Premix *Ex Taq*<sup>™</sup> (Tli RNaseH Plus) 10 μL,ddH<sub>2</sub>O 补至 20 μL。PCR 反应程序为:94 ℃ 预变性 30 s,94 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 退火 15 s,72 ℃ 延伸 10 s,45 个循环。基因相对表达量通过 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法计算<sup>[20]</sup>。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

基因名称	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
<i>MsRALF1</i>	ATAGAAGAAACCTAGCTGAAGGCAA	TCCACAACCATAATAAGAATCTCCAATA
<i>MsRALF2</i>	CTGTCAATGTTATCGGTAATCTCTGC	CCACGGCACCTTTCTTCTGTCT
<i>MsRALF3</i>	GTTGTGTTTCCTTAGTGCTCTTTTGATT	ACAGCCTCTCCGATATGTGTTTTG
<i>MsRALF4</i>	ATATGGTTCCTTGTGATAGACCTGGT	AAGTGTGATTTCTTGACTTTGAGCA
<i>MsRALF5</i>	TGCAGTGGTTCATAGCTGAATG	TCAGAAATGTATCTCCTTTGCTCC
<i>MsRALF6</i>	AGAAGAAAATGAAATGTTGATGGATTG	AGGGTTAGCCTGACCTCTGTCC
<i>MsRALF7</i>	CAACACCAACTTGCCAAGGC	GCTAGGATACGCCGTGAGAC
<i>MsRALF8</i>	CAGGCGTATCTTAGCAACGACCA	AAGCACACGGCGAGAACAA
<i>MsRALF9</i>	TGTCACCTTCATCATCTCCACC	ACTCAGTTTCATCTTCATCTCCGC
<i>MsEIF4A</i>	AAAAGGTGTGCTATCAACTTCGTC	ACATTTGAAGGCAGTTCTCTTACG

## 2 结果与分析

### 2.1 紫花苜蓿 *MsRALF* 基因家族成员的鉴定、基因染色体定位以及共线性关系

本研究从中苜 1 号基因组中鉴定到 9 个 *MsRALF*

基因,分别命名为 *MsRALF1*~*MsRALF9*(表 2)。通过 ExPASy 分析,*MsRALF* 基因编码的蛋白质氨基酸序列长度在 59 aa 至 128 aa 之间,且 *MsRALF9* 的氨基酸序列最长,相对分子量为 32 088.28。9 个 *MsRALF* 的等电点为 5.13~5.41,且均为疏水蛋白。

表 2 紫花苜蓿中 *MsRALF* 基因鉴定结果

Table 2 Results of the identification of *MsRALF* genes in *Medicago sativa*

基因 ID	基因名称	编码的蛋白质			
		等电点	相对分子量	亲水性总平均值	氨基酸序列长度(aa)
MsG0280010744.01.T01	<i>MsRALF1</i>	5.41	14 572.03	0.762	59
MsG0280010774.01.T01	<i>MsRALF2</i>	5.34	18 587.68	0.806	76
MsG0280010775.01.T01	<i>MsRALF3</i>	5.34	18 587.68	0.806	74
MsG0380016143.01.T01	<i>MsRALF4</i>	5.37	22 654.71	0.665	93
MsG0480019461.01.T01	<i>MsRALF5</i>	5.13	23 124.16	0.590	94
MsG0680034224.01.T01	<i>MsRALF6</i>	5.31	22 899.59	0.755	91
MsG0780041290.01.T01	<i>MsRALF7</i>	5.22	30 159.36	0.896	118
MsG0780041533.01.T01	<i>MsRALF8</i>	5.28	26 358.46	0.781	106
MsG0880047048.01.T01	<i>MsRALF9</i>	5.21	32 088.28	0.761	128

亲水性总平均值大于 0 的为疏水蛋白,小于 0 的为亲水蛋白。

如图 1 所示,*MsRALF* 基因主要集中在 2 号染色体上,共 3 个基因,3 号染色体、4 号染色体、6 号染

色体、7 号染色体和 8 号染色体上有 1~2 个基因。1 号染色体和 5 号染色体上未发现 *MsRALF* 基因。

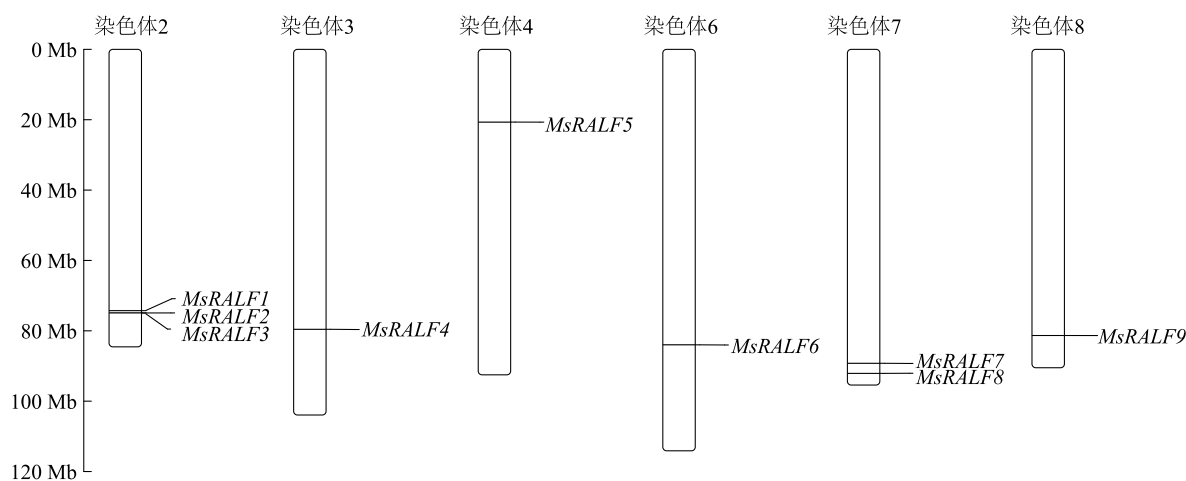


图 1 *MsRALF* 基因染色体定位

Fig.1 Chromosomal localization of *MsRALF* genes

共线性分析结果表明,*MsRALF* 基因家族成员中有 2 对基因存在共线性关系,分别是 *MsRALF7* 和 *MsRALF9*、*MsRALF8* 和 *MsRALF9*(图 2)。为评估其进化选择模式,对串联重复基因进行非同义替换率( $K_a$ )与同义替换率( $K_s$ )比值的计算结果显示,非同义替换率( $K_a$ )和同义替换率( $K_s$ )之间的比值小于

1,表示 *MsRALF* 基因受到正选择,即有利突变被保留(表 3)。

### 2.2 紫花苜蓿 *MsRALF* 基因的系统发育、基因结构和保守基序

将拟南芥中的 39 个 *RALF* 基因与本研究鉴定出的 9 个紫花苜蓿 *MsRALF* 基因进行系统进化分

析。结果显示,拟南芥和紫花苜蓿共 48 个 *RALF* 基因被分成 6 个组,其中拟南芥的 *RALF* 基因在 6 个组中都有成员分布,而紫花苜蓿 *MsRALF* 基因只分布于 I 组、II 组、III 组和 VI 组中(图 3)。其中属于 I 组的紫花苜蓿 *MsRALF* 基因数量有 4 个,分别是

*MsRALF4*、*MsRALF7*、*MsRALF8* 和 *MsRALF9*, I 组包括拟南芥中已经报道的与盐胁迫响应相关的 *RALF22*、*RALF23* (即 *AT3G05490.1*、*AT3G16570.1*)。紫花苜蓿 *MsRALF1*、*MsRALF6* 与调控拟南芥花粉管伸长的 *AT1G28270.1* 基因均处于 II 组。

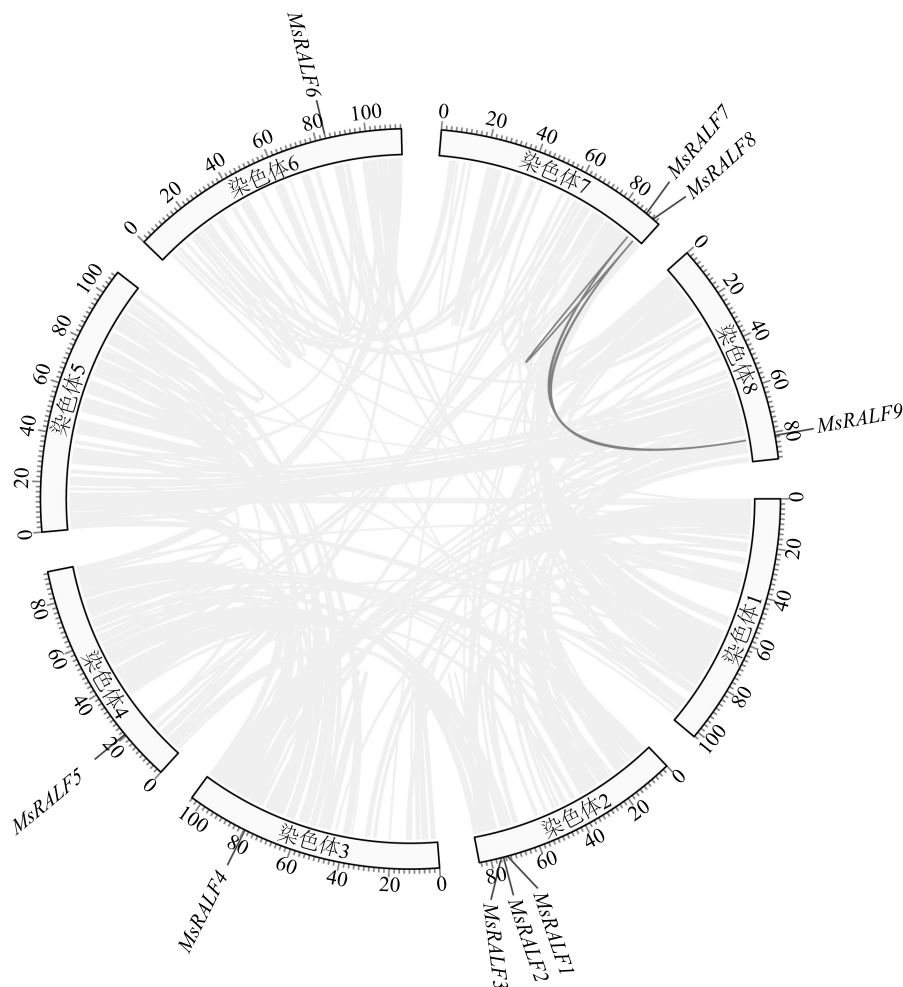


图 2 *MsRALF* 的共线性关系

Fig.2 Collinearity of *MsRALF*

表 3 *MsRALF* 基因中非同义替换率、同义替换率及其比值

Table 3 Non-synonymous substitution rate, synonymous substitution rate and their ratio in *MsRALF* genes

基因名称	非同义替换率 ( $K_a$ )	同义替换率 ( $K_s$ )	$K_a/K_s$
<i>MsRALF7/ MsRALF8</i>	0.369 456 328	-	-
<i>MsRALF7/ MsRALF9</i>	0.431 937 817	1.647 918 433	0.262 111 163
<i>MsRALF8/ MsRALF9</i>	0.332 827 494	1.243 244 072	0.267 708 893

对紫花苜蓿 *MsRALF* 蛋白保守基序进行分析,

结果发现共有 5 个不同的保守基序(图 4)。其中, motif1 和 motif2 基序在 9 个 *MsRALF* 蛋白中都存在, motif4 仅在 *MsRALF2* 蛋白和 *MsRALF3* 蛋白中存在。*MsRALF4*、*MsRALF5*、*MsRALF7*、*MsRALF8* 和 *MsRALF9* 则都由 motif1、motif2、motif3 和 motif5 4 个基序组成。

### 2.3 紫花苜蓿 *MsRALF* 蛋白二级结构

利用 SOPMA 网站预测和分析 *MsRALF* 基因编码蛋白的二级结构。结果显示, *MsRALF* 蛋白的二级结构包括 4 种类型:  $\alpha$ -螺旋、延伸链、 $\beta$ -转角和无

规则卷曲。其中,  $\alpha$ -螺旋的比例在 18.86% 至 35.11% 之间, 延伸链的比例为 11.84% ~ 27.36%,  $\beta$ -

转角的比例为 0~15.25%, 而无规则卷曲的比例在 36.17% 至 57.20% 之间。

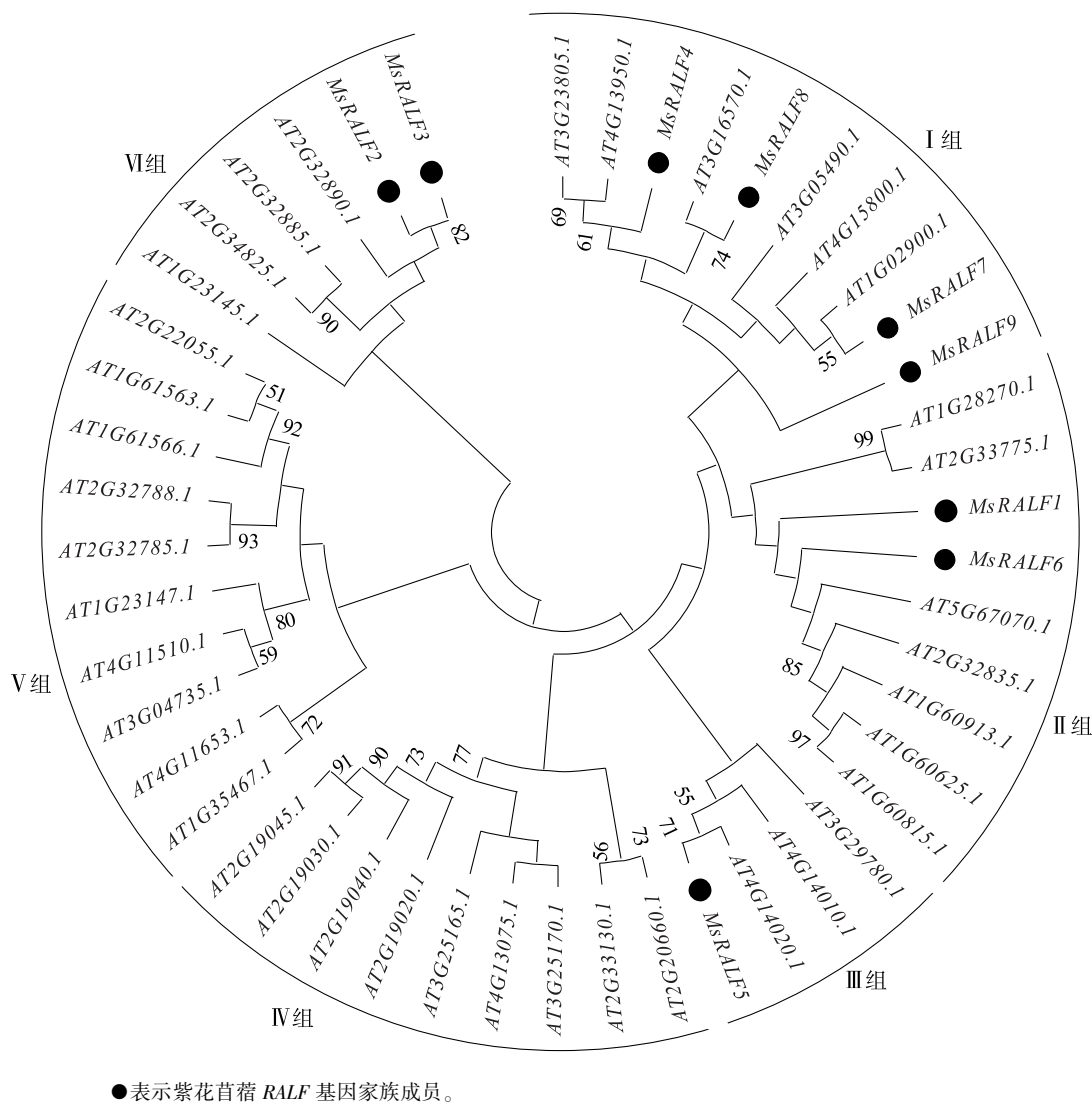


图3 紫花苜蓿与拟南芥 *RALF* 基因家族进化分析

Fig.3 Evolutionary analysis of the *RALF* gene family in *Medicago sativa* and *Arabidopsis thaliana*

## 2.4 紫花苜蓿 *MsRALF* 基因启动子顺式作用元件

对紫花苜蓿 *MsRALF* 基因启动子顺式作用元件分析结果显示, 9 个 *MsRALF* 基因启动子上都具有数量众多的胁迫响应顺式作用元件。序列中包含大量激素响应元件和非生物胁迫响应顺式作用元件。其中激素响应元件包括脱落酸 (ABA) 响应元件和赤霉素 (GA) 响应元件。非生物胁迫响应元件包括防御与胁迫响应元件、低温响应元件, 以及多个 MYB 转录因子结合元件 (调控类黄酮生物合成、光响应及干旱诱导等过程)。除此以外, 各基因启动子上还具有大量的光响应和昼夜节律相关顺式作用

元件。这些结果说明, 紫花苜蓿 *MsRALF* 基因表达可能受到各种激素和非生物胁迫的调控。

## 2.5 紫花苜蓿 *MsRALF* 基因在盐胁迫下的表达

为探究紫花苜蓿 *MsRALF* 基因表达是否受盐胁迫调控, 本研究采用 RT-qPCR 检测了 9 个 *MsRALF* 基因在盐胁迫下的转录水平。结果 (图 5) 表明, 随着处理时间的延长, *MsRALF1*、*MsRALF2*、*MsRALF3* 的表达量呈先下降后上升的趋势, 并在第 7 d 达到最高值; *MsRALF6* 的表达量呈先下降后上升再下降的趋势, 并在第 3 d 达到最高值。 *MsRALF4*、*MsRALF7* 和 *MsRALF9* 的表达量呈先下降后上升的趋势, 3 个基因的表达量均在 0 d 时

达峰值。*MsRALF5*、*MsRALF8* 的表达量呈先下降后上升 再下降的趋势,2 个基因的表达量均在 0 d 时达峰值。

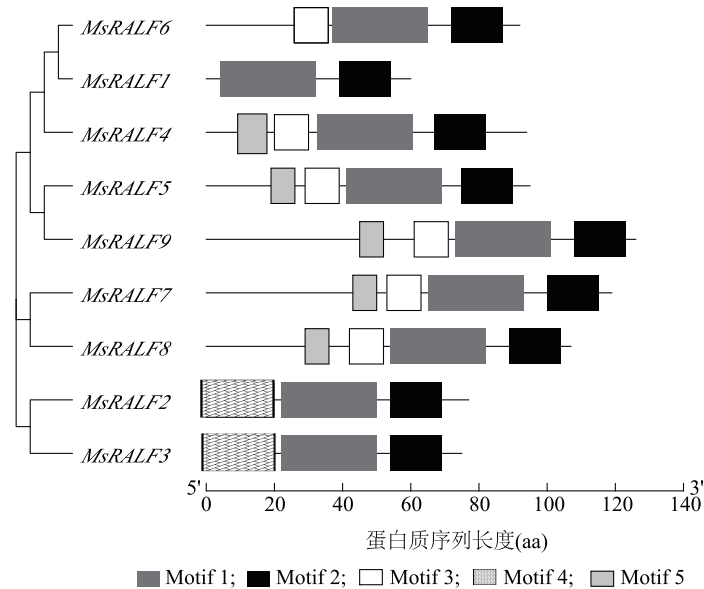


图 4 *MsRALF* 蛋白保守基序分析

Fig.4 Conserved motif analysis of *MsRALF* proteins

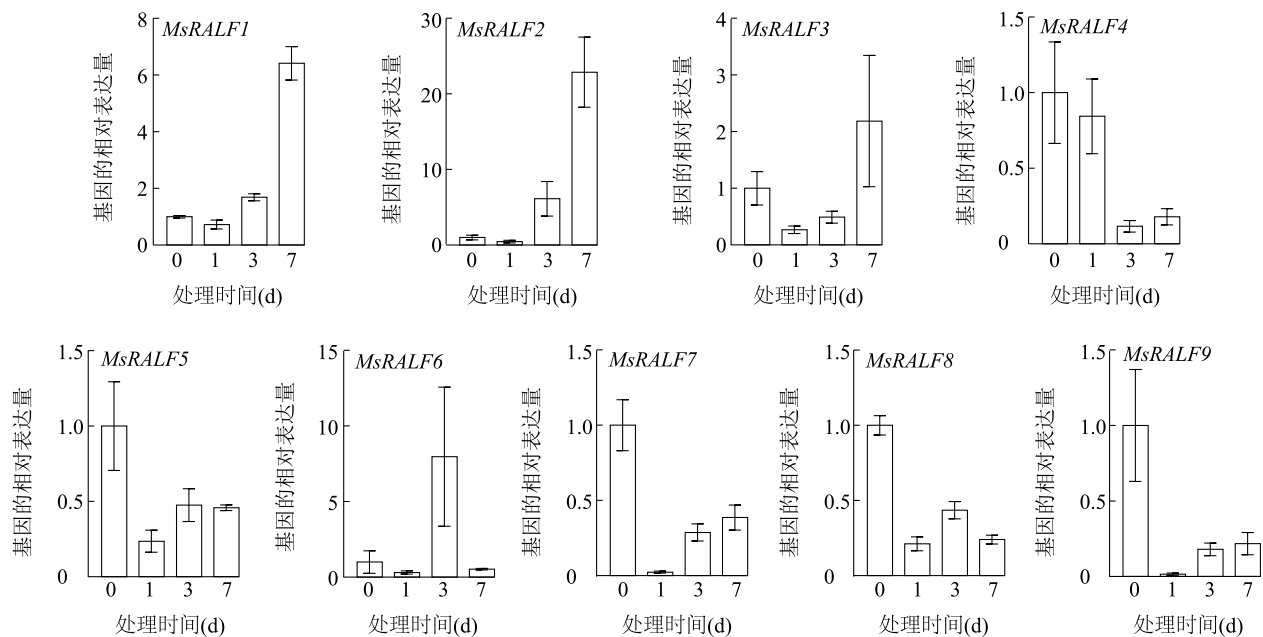


图 5 *MsRALF* 基因在盐胁迫下的表达特征

Fig.5 Expression patterns of *MsRALF* genes under salt stress

### 3 讨论

*RALF* 小分子信号肽在植物中广泛分布,在调节植物激素和调控植物生长等过程中发挥重要作用。前人利用基因组测序数据对很多种类植物的

*RALF* 基因家族成员进行了鉴定和分析。例如, Liu 等<sup>[21]</sup>在大豆中鉴定到 27 个 *RALF* 基因家族成员,并分析了其对真菌的响应;Jiang 等<sup>[9]</sup>在藜麦中鉴定到 18 个 *RALF* 基因家族成员,并对其在盐胁迫下的表达和功能进行了分析,鉴定到藜麦中与盐胁迫响应

相关的 *RALF* 基因;Sui 等<sup>[22]</sup> 在巴西橡胶树基因组中鉴定到 23 个 *RALF* 基因家族成员,并研究了割胶和乙烯对 *RALF* 基因表达的影响;Xue 等<sup>[23]</sup> 在玉米基因组中鉴定到 20 个 *RALF* 基因并分析了它们在非生物胁迫下的表达水平。此外,研究人员还对野生草莓 (*Fragaria vesca*) 和栽培草莓 (*Fragaria×anassa*) 等不同物种 *RALF* 基因家族成员进行了鉴定<sup>[24]</sup>。本研究通过全基因组 Blast 在紫花苜蓿中共鉴定到 9 个 *RALF* 基因家族成员,分布在 6 条不同的染色体上。作为豆科植物,紫花苜蓿中鉴定到的 *RALF* 基因家族成员数量远低于大豆,这种差异可能与不同植物基因组大小有关,也可能反映了紫花苜蓿 *RALF* 基因与大豆 *RALF* 基因在进化上不同。另外,已有研究表明,在豆科植物(如大豆、苜蓿)中,*RALF* 基因的数量通常少于非豆科植物(如拟南芥)。这是由于基因扩增模式的差异,非豆科植物的 *RALF* 基因扩增主要通过串联重复完成,而豆科植物则以片段重复为主<sup>[25]</sup>。

本研究对紫花苜蓿的 9 个 *RALF* 基因家族成员进行了系统发育分析,结果显示, *MsRALF1* 和 *MsRALF6* 与调控拟南芥花粉管伸长的 *RALF4* (*AT1G28270.1*) 同处于 II 组,存在较近的亲缘关系。*RALF4* 是调节花粉管完整性和极性伸长的分泌型小肽,通过与富含亮氨酸重复序列-类伸展素蛋白(LRX)和长春花受体样激酶 1-类受体激酶配体(CrRLK1L-LG)蛋白家族的相互作用,形成复杂的信号网络,以维持花粉管的正常功能<sup>[26]</sup>,推测紫花苜蓿的 *MsRALF1*、*MsRALF6* 基因可能与花粉管发育有关。*MsRALF4*、*MsRALF7*、*MsRALF8* 和 *MsRALF9* 这 4 个基因与拟南芥 *RALF22* 和 *RALF23* 同处于 I 组,亲缘关系较近。拟南芥中 *RALF22* 和 *RALF23* 通过与 LRX3、LRX4、LRX5 及 FERONIA(FER)形成复合体,通过影响细胞壁的完整性进而调控植物的生长和对盐胁迫的响应<sup>[8]</sup>,因此处于同一组的紫花苜蓿 *MsRALF4*、*MsRALF7*、*MsRALF8* 和 *MsRALF9* 基因可能参与了盐胁迫响应的调控。

启动子顺式作用元件与基因表达、功能密切相关<sup>[27-33]</sup>,在紫花苜蓿的 *MsRALF* 基因启动子区域存在多个与植物激素响应和胁迫响应的顺式作用元件,尤其是 ABA 响应元件和 GA 响应元件,这些响应元件为启动子区域的功能研究提供了重要线索。ABA 是植物响应非生物胁迫的重要激素之一。

ABA 激素通过 ABRE 顺式作用元件招募转录因子(如 ABI5、AREB),进而调控盐胁迫响应基因的表达,这一机制有助于植物在盐胁迫下维持水分平衡和抗逆性。ABA 通过信号转导途径激活盐胁迫响应基因的表达,并协同调控离子通道和水通道蛋白,从而增强植物的耐盐性<sup>[34]</sup>。另一方面,GA 作为植物生长的关键调节因子,也在盐胁迫响应中发挥重要作用。GA 能够通过调节 GA 合成酶和降解酶的表达缓解盐胁迫引起的植物生长抑制<sup>[35]</sup>。在盐胁迫条件下,GA 通过调节与生长相关的基因表达和信号转导途径,协同作用于 ABA,达到共同调节植物生长和胁迫响应的目标。GA 与 ABA 在盐胁迫下的植物适应性调节中发挥了复杂而重要的作用。紫花苜蓿 *MsRALF* 基因的启动子不仅包含 ABA 和 GA 响应元件,还富含与防御和胁迫相关的顺式作用元件,如 MYB 转录因子结合位点和低温响应元件。这些调控元件可能与 ABA 和 GA 信号通路交叉调控,影响紫花苜蓿 *MsRALF* 基因的表达,进而调节植物对盐胁迫的响应。例如,MYB 转录因子家族成员已被证实在 ABA 介导的耐盐性调节中发挥重要作用<sup>[36]</sup>,而低温响应元件则可能使紫花苜蓿 *MsRALF* 基因在低温胁迫与盐胁迫的交互作用中产生响应。综上,紫花苜蓿 *MsRALF* 基因可能通过启动子区域的激素响应元件与 ABA 和 GA 信号通路协同作用,调节植物对盐胁迫的适应性响应。这种调控机制不仅会影响植物的耐盐能力,还可能影响其整体生长发育。

根据目前的研究结果,拟南芥中 *RALF* 基因主要通过 FERONIA(FER)受体激酶相互作用调控细胞壁重塑、离子平衡以及 ROS 信号通路,从而参与植物的抗逆性调节。尤其是在盐胁迫下,*RALF* 基因通过 FER 受体激酶影响 ABA 信号通路,是植物在胁迫条件下调节植物生长发育和抗逆性的一个重要机制<sup>[8]</sup>。与拟南芥相比,紫花苜蓿 *MsRALF4*、*MsRALF7*、*MsRALF8* 和 *MsRALF9* 基因在盐胁迫下表现出下调趋势,在系统发育分析中同属 I 组,这表明它们可能具有相似的调控机制。然而,这些基因在紫花苜蓿中的具体功能仍不完全明确,例如它们是否像拟南芥中的 *RALF* 基因一样通过 FER 受体及其他胁迫响应相关途径调控植物的盐胁迫响应。结合保守基序分析,具有相似表达模式的基因在其编码蛋白的保守基序组成上也有较高的相似性(如

*MsRALF4*、*MsRALF7* 等)。这一特点为进一步揭示这些基因的功能提供了线索。值得注意的是,*MsRALF* 基因的调控可能不仅与 ABA 信号通路相关,还可能涉及 GA 信号通路、MYB 转录因子调控、ROS 信号通路等多重机制。*MsRALF* 基因可能在盐胁迫的条件下通过调节这些信号传导通路来调控植物的耐盐性。

因此,未来的研究应进一步探索 *MsRALF* 基因在紫花苜蓿盐胁迫响应中的具体调控机制,特别是通过功能验证与拟南芥中已知的 *RALF* 基因功能进行对比分析,揭示其在盐胁迫中的作用。此外,还可结合基因敲除、过表达以及 RT-qPCR 等技术手段深入解析 *MsRALF* 基因在紫花苜蓿中的功能,为耐盐作物的育种改良提供理论依据。

## 4 结论

本研究通过全基因组分析,鉴定到 9 个紫花苜蓿 *MsRALF* 基因家族成员,系统进化分析将其分在 4 个不同组中。紫花苜蓿 *RALF* 与拟南芥 *RALF* 进化关系、启动子顺式作用元件和基因表达分析结果表明,*MsRALF* 基因与紫花苜蓿对盐胁迫及其他非生物胁迫的响应有关,相同组的 *MsRALF* 基因在盐胁迫下的表达模式基本相同。本研究结果初步揭示了 *MsRALF* 基因参与了紫花苜蓿对盐胁迫的响应,为进一步探究 *RALF* 在盐胁迫响应中的调控机制奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] OLSSON V, JOOS L, ZHU S S, et al. Look closely, the beautiful may be small: precursor-derived peptides in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2019, 70: 153-186.
- [2] MECCHIA M A, SANTOS-FERNANDEZ G, DUSS N N, et al. RALF4/19 peptides interact with LRX proteins to control pollen tube growth in *Arabidopsis*[J]. Science, 2017, 358(6370): 1600-1603.
- [3] COVEY P A, SUBBAIAH C C, PARSONS R L, et al. A pollen-specific RALF from tomato that regulates pollen tube elongation[J]. Plant Physiology, 2010, 153(2): 703-715.
- [4] LI L X, CHEN H H, ALOTAIBI S S, et al. RALF1 peptide triggers biphasic root growth inhibition upstream of auxin biosynthesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2022, 119(31): 2121058119.
- [5] ZHONG S, LI L, WANG Z J, et al. RALF peptide signaling controls the polytubey block in *Arabidopsis*[J]. Science, 2022, 375(6578): 290-296.
- [6] ATKINSON N J, LILLEY C J, URWIN P E. Identification of genes involved in the response of *Arabidopsis* to simultaneous biotic and abiotic stresses[J]. Plant Physiology, 2013, 162(4): 2028-2041.
- [7] STEGMANN M, MONAGHAN J, SMAKOWSKA-LUZAN E, et al. The receptor kinase *FER* is a *RALF*-regulated scaffold controlling plant immune signaling[J]. Science, 2017, 355(6322): 287-289.
- [8] ZHAO C Z, JIANG W, ZAYED O, et al. The LRXs-RALFs-FER module controls plant growth and salt stress responses by modulating multiple plant hormones[J]. National Science Review, 2020, 8(1): nwaal149.
- [9] JIANG W, LI C, LI L T, et al. Genome-wide analysis of *CqCrRLKIL* and *CqRALF* gene families in *Chenopodium quinoa* and their roles in salt stress response[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 918594.
- [10] LAN Z J, SONG Z H, WANG Z J, et al. Antagonistic RALF peptides control an intergeneric hybridization barrier on Brassicaceae stigmas[J]. Cell, 2023, 186(22): 4773-4787.
- [11] 陈敏, 李海云, 吕福堂. 植物耐盐性研究进展[J]. 聊城大学学报(自然科学版), 2011, 24(3): 47-50.
- [12] 徐明, 蒋学乾, 何飞, 等. 紫花苜蓿种子产量与大小相关性状全基因组关联分析[J]. 草地学报, 2024, 32(8): 2419-2427.
- [13] 巴图. 苜蓿对盐胁迫的生理响应及抗盐调控措施研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2016.
- [14] SHEN C, DU H L, CHEN Z, et al. The chromosome-level genome sequence of the autotetraploid alfalfa and resequencing of core germplasm provide genomic resources for alfalfa research[J]. Molecular Plant, 2020, 13(9): 1250-1261.
- [15] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [16] WANG D P, ZHANG Y B, ZHANG Z, et al. KaKs\_Calculator 2.0: a toolkit incorporating gamma-series methods and sliding window strategies[J]. Genomics, Proteomics & Bioinformatics, 2010, 8(1): 77-80.
- [17] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [18] BAILEY T L, BODEN M, BUSKE F A, et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(7): 202-208.
- [19] GEURJON C, DELÉAGE G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments[J]. Computer Applications in the Biosciences, 1995, 11(6): 681-684.
- [20] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [21] LIU Y H, CHEN Y H, JIANG H K, et al. Genome-wide characterization of soybean *RALF* genes and their expression responses to

- Fusarium oxysporum* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 1006028.
- [22] SUI J L, XIAO X H, YANG J H, et al. The rubber tree *RALF* peptide hormone and its receptor protein kinase *FER* implicates in rubber production [J]. *Plant Science*, 2023, 326: 111510.
- [23] XUE B P, LIANG Z C, LIU Y, et al. Genome-wide identification of the *RALF* gene family and expression pattern analysis in *Zea mays* L. under abiotic stresses [J]. *Plants*, 2024, 13(20): 2883.
- [24] ZHANG H, JING X T, CHEN Y, et al. The genome-wide analysis of *RALF*-like genes in strawberry (wild and cultivated) and five other plant species (Rosaceae) [J]. *Genes*, 2020, 11(2): 174.
- [25] JIA Y C, LI Y G. Genome-wide identification and comparative analysis of *RALF* gene family in legume and non-legume species [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(10): 8842.
- [26] MOUSSU S, BROYART C, SANTOS-FERNANDEZ G, et al. Structural basis for recognition of *RALF* peptides by *LRX* proteins during pollen tube growth [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(13): 7494-7503.
- [27] 梁宇尧, 钟昌桦, 潘若云, 等. 百香果 *CBF* 基因家族鉴定与表达分析 [J]. *江苏农业科学*, 2024, 52(10): 55-61.
- [28] 江定, 李光光, 袁凡崇, 等. 菜心响应高温胁迫的转录组分析与基因挖掘 [J]. *南方农业学报*, 2024, 55(3): 766-783.
- [29] 刘芳, 段盼盼, 魏敏, 等. 辣椒 *CUL* 家族基因的鉴定与表达分析 [J]. *江苏农业学报*, 2023, 39(6): 1275-1285.
- [30] 李远超, 李可, 王连南, 等. 木薯根组织特异性启动子的克隆及鉴定 [J]. *南方农业学报*, 2023, 54(7): 1925-1932.
- [31] JING H W, WILKINSON E G, SAGEMAN-FURNAS K, et al. Auxin and abiotic stress responses [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2023, 74(22): 7000-7014.
- [32] WANG Y, GONG X W, LIU W K, et al. Gibberellin mediates spermidine-induced salt tolerance and the expression of *GT-3b* in cucumber [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, 152: 147-156.
- [33] WANG Y, MOSTAFA S, ZENG W, et al. Function and mechanism of jasmonic acid in plant responses to abiotic and biotic stresses [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(16): 8568.
- [34] NAKASHIMA K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. ABA signaling in stress-response and seed development [J]. *Plant Cell Reports*, 2013, 32(7): 959-970.
- [35] VISHAL B, KUMAR P P. Regulation of seed germination and abiotic stresses by gibberellins and abscisic acid [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 838.
- [36] ZHAO H X, YAO P F, ZHAO J L, et al. A novel *R2R3-MYB* transcription factor *FtMYB22* negatively regulates salt and drought stress through ABA-dependent pathway [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(23): 14549.

(责任编辑:黄克玲)