

# 紫花苜蓿 *CNGC* 基因家族全基因组鉴定及干旱胁迫下的调控模式分析

邱应德,罗永忠,齐建伟,周晓彤,马超,于思敏

(甘肃农业大学林学院,甘肃兰州730070)

**摘要:**环核苷酸门控通道蛋白(cyclic nucleotide-gated channel proteins, *CNGC*)在 $Ca^{2+}$ 信号转导过程中发挥着重要作用。利用生物信息学和分子生物学的研究方法对四倍体紫花苜蓿(*Medicago sativa* 'Xinjiangdaye')*CNGC*基因家族成员进行全基因组鉴定和干旱胁迫下的调控模式分析。结果表明:新疆大叶苜蓿基因组中共包含67个*MsCNGC*基因,不均匀地分布在30条染色体上,分属5个亚家族,共包含20个Motif,其启动子区域存在多种响应逆境胁迫的作用元件。新疆大叶苜蓿叶片中共表达了28个*MsCNGC*基因,有26个在干旱胁迫下不均匀上调,其中*MsCNGC59*表达量最高且在干旱胁迫下上调倍数最大。*MsCNGCs*含有29~120个磷酸化位点,能被LRR蛋白激酶磷酸化,*MsLRRs*与*MsCNGCs*基因表达之间呈显著的正相关关系。此外, $Ca^{2+}$ 信号转导相关基因*MsCaM*、*MsCML*和*MsCDPK*表达量在干旱胁迫下显著上调。综上,四倍体紫花苜蓿*MsCNGCs*对干旱胁迫的响应包括转录调控和蛋白质的磷酸化调控,在干旱胁迫下能通过参与 $Ca^{2+}$ 信号转导途径提高紫花苜蓿的抗旱性。

**关键词:**同源四倍体紫花苜蓿;*CNGC*基因家族;蛋白质磷酸化;干旱胁迫;表达模式

中图分类号:S963.22<sup>+</sup>3.3; Q945.78 文献标志码:A

## Identification of the whole *CNGC* gene family in alfalfa and analysis of its regulatory patterns under drought stress

QIU Yingde, LUO Yongzhong, QI Jianwei, ZHOU Xiaotong, MA Chao, YU Simin

(College of Forestry, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

**Abstract:** Cyclic nucleotide-gated channel proteins (*CNGC*) play an important role in  $Ca^{2+}$  signal transduction. Genome-wide identification of *CNGC* gene family members in tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* 'Xinjiangdaye') and analysis of their regulatory patterns under drought stress were carried out using bioinformatics and molecular biology research methods. The results revealed that the 'Xinjiangdaye' alfalfa genome contains 67 *MsCNGC* genes, unevenly distributed across 30 chromosomes. These genes were classified into five subfamilies, contain 20 Motifs, and exhibit various regulatory elements in their promoter regions that respond to environmental stress. A total of 28 *MsCNGC* genes were expressed in the leaves of 'Xinjiangdaye' alfalfa, and 26 of them were unevenly up-regulated under drought stress, among which *MsCNGC59* was the highest expressed and the most multiplicatively up-regulated under drought stress. The proteins of *MsCNGCs* contained 29~120 phosphorylation sites, which could be phosphorylated by the LRR protein kinase, and the gene expression of *MsLRRs* and *MsCNGCs* showed a significant positive correlation. In addition, the expression levels of  $Ca^{2+}$  signal transduction-related genes *MsCaM*, *MsCML* and *MsCDPK* were found to be significantly up-regulated under drought stress. In summary, the response of tetraploid alfalfa *MsCNGCs* to drought stress included transcriptional regulation and protein phosphorylation regulation, which can improve the drought resistance of alfalfa under drought stress by participating in the  $Ca^{2+}$  signal transduction pathway.

**Keywords:** tetraploid alfalfa; *CNGC* gene family; protein phosphorylation; drought stress; expression mode

收稿日期:2024-04-23

修回日期:2024-07-05

基金项目:国家自然科学基金(32160409)

作者简介:邱应德(1996-),男,甘肃礼县人,硕士研究生,研究方向为植物逆境生理与分子生物学。E-mail:1517660339@qq.com

通信作者:罗永忠(1970-),女,甘肃酒泉人,教授,博士生导师,主要从事植物逆境生理研究。E-mail:493517987@qq.com

紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 作为世界上广泛栽培的豆科牧草,在控制水土流失、涵养水源、调节气候和改善土壤肥力等方面发挥重要作用,是草畜产业发展和生态恢复广泛种植的品种<sup>[1]</sup>。其中四倍体新疆大叶苜蓿 (*Medicago sativa* Xinjiangdaye) 是中国西北地区农场主要种植的牧草品种之一<sup>[2]</sup>。苜蓿生长过程需要消耗较多水分,但我国西北地区水资源匮乏,干旱成为新疆大叶苜蓿生长和推广种植的主要限制因素。近年来,国内外学者从形态、生理、分子等层面对紫花苜蓿耐旱机理进行了大量研究<sup>[3-4]</sup>。弋钦等<sup>[5]</sup>研究表明,干旱胁迫下施加适宜浓度外源  $\text{Ca}^{2+}$  处理的紫花苜蓿种子萌发率、发芽指数及活力指数显著提高; Safarnejad<sup>[6]</sup> 研究发现,紫花苜蓿叶片中  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{K}^{+}$  浓度随干旱程度的增加而增加,且增加趋势在耐旱性强的紫花苜蓿中表现更显著。以上研究均说明紫花苜蓿可通过提高细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度来提高对干旱胁迫的耐受性。

植物对干旱胁迫的适应包括信号感知、信号转导和下游响应 3 个层次,其中信号转导是激活下游应答的关键环节<sup>[7]</sup>。在植物中,  $\text{Ca}^{2+}$  信号是转导不同环境和发育刺激信号的重要机制。  $\text{Ca}^{2+}$  在植物细胞中内流主要受环核苷酸门控离子通道 (cyclic nucleotide-gated channel proteins, CNGCs)、双孔通道蛋白 (two-pore channels, TPCs)、谷氨酸受体 (glutamate receptor, GLR) 和高渗促钙内流蛋白 (hyperosmolality-induced  $\text{Ca}^{2+}$  increase OSCA) 酶的共同调控,其中 CNGCs 是调控  $\text{Ca}^{2+}$  内流的主要膜通道蛋白,其位于质膜、液泡膜或核膜中,由钙调蛋白 (CaM) 和环核苷酸单磷酸 (cNMPs; 3', 5'-cAMP 和 3', 5'-cGMP) 等二级信使在细胞内控制,是  $\text{Ca}^{2+}$  等渗透性阳离子传导通道,可跨膜运输钠、钙和钾阳离子<sup>[8]</sup>。CNGCs 在植物适应干旱胁迫中发挥重要的调控作用。Kirungu 等<sup>[9]</sup> 研究表明,棉花的 *CNGC4* 和 *CNGC5* 在干旱胁迫后表达丰度显著升高,在沉默后植株对干旱胁迫的耐受性显著降低。转录组学的研究表明,多个 *CNGCs* 家族基因参与了外源  $\text{Ca}^{2+}$  介导的番茄对干旱胁迫的响应<sup>[10]</sup>。此外, CNGCs 蛋白质可能受到蛋白激酶的磷酸化调控。如拟南芥 *CNGC4* 蛋白质包含 9 个磷酸化位点, BIK1 的磷酸化可缓解 CaM7 介导的对 flg22 信号传导中 AtCNGC2/4 复合物的抑制<sup>[11]</sup>; 水稻细胞质激酶 OsRLCK185 负责通过磷酸化激活 OsCNGC9, 触发防御反应<sup>[12]</sup>。可见, *CNGCs* 可能通过转录调控和蛋白磷酸化广泛参与植物对干旱胁迫的响应过程。

研究表明,水稻 (*Oryza sativa*)、玉米 (*Zea mays*)

和番茄 (*Solanum lycopersicum*) 基因组中分别有 16、12 个和 18 个 *CNGC* 成员<sup>[13-15]</sup>, 陆地棉 (*Gossypium hirsutum*)、小麦 (*Triticum aestivum*) 和油菜 (*Brassica napus*) 的基因组中分别有 33、47 个和 61 个 *CNGC* 成员<sup>[16-18]</sup>。目前,干旱胁迫下紫花苜蓿  $\text{Ca}^{2+}$  内流的分子机制和 *CNGCs* 基因家族的遗传基础尚未见报道。因此,本研究利用已发表的新疆大叶苜蓿基因组对 *MsCNGC* 基因家族成员进行鉴定,并通过自然干旱处理分析 *MsCNGCs* 及相关基因在干旱胁迫下的调控模式和相关功能,以期改良紫花苜蓿的抗旱性提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

从 FigShare (<https://figshare.com/>) 数据库下载新疆大叶苜蓿的基因组相关文件 (包含基因组及其注释文件)<sup>[19]</sup>, 拟南芥和蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) 全基因组数据分别下载自 TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) 和 Ensembl Plants (<https://plants.ensembl.org/>) 数据库。干旱胁迫转录组分析使用的材料为新疆大叶苜蓿。

### 1.2 *MsCNGC* 基因家族生物信息学分析

1.2.1 *MsCNGC* 基因家族成员的鉴定 从 Pfam (<https://pfam.xfam.org/>) 下载 CNGC 蛋白质的结构域文件 (cNMP/CNBD, PF00027; ITP, PF00520)<sup>[20]</sup>, 使用 HMMER 3.0 软件在蛋白质文件中搜索获得包含 CNGC 结构域的序列, 参数设置为  $E\text{-value} \leq 1 \times 10^{-5}$ 。利用蛋白序列在 Interpro、SMART、NCBI 在线网站鉴定含有的结构域, 去除冗余序列。

1.2.2 染色体定位与理化性质分析 使用 Tbtools 软件<sup>[21]</sup> 对鉴定的 *MsCNGC* 家族成员进行染色体定位分析, 并根据家族成员所在位置对其进行命名。使用 ExPasy protparam tool 网站 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 对紫花苜蓿 *MsCNGC* 家族的氨基酸长度、分子量、等电点、不稳定指数、脂肪指数、平均疏水性等理化性质进行预测。利用 WoLF PSORT 网站 (<https://wolfpsort.hgc.jp/>) 对紫花苜蓿 *MsCNGC* 家族进行亚细胞定位。

1.2.3 *MsCNGC* 基因家族系统进化分析 使用 Mafft 软件将鉴定的 *MsCNGC* 成员与拟南芥 *AtCNGC* 成员进行比对, 在 Trimal 软件中进行去除非保守间隙, 在 IQ-tree 软件中采用最大似然法构建系统进化树, Bootstrap 参数设置为 1 000。最后使用 iTOL 网站 (<https://itol.embl.de/>) 进行系统发育树的可视化处理。

1.2.4 *MsCNGC* 基因结构与保守基序及启动子顺式作用元件分析 使用 MEME 网站 (<https://meme-suite.org/meme/>) 进行 *MsCNGC* 基因序列 motif 的鉴定,保守基序数值为 20,其他参数保持默认状态。使用 Tltools 软件<sup>[21]</sup>完成基因结构分析和提取上游 2 000 bp 的启动子序列,在 PlantCARE 网站 (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行顺式作用元件预测,将预测结果在 Tltools 软件上可视化绘图。

1.2.5 蛋白跨膜结构、二级和三级结构预测分析 利用 TMHMM-2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service/TMHMM-2.0/>) 分析 *MsCNGC* 蛋白跨膜结构,利用在线网站 SOPMA (<https://npsa.lyon.inserm.fr/>) 进行 *MsCNGC* 蛋白二级结构的预测,使用 SWISS-MODEL 网站 (<https://swissmodel.expasy.org/>) 对 *MsCNGC* 蛋白的三级结构进行预测。

1.2.6 *MsCNGC* 基因共线性分析 利用 Tltools 软件对新疆大叶苜蓿、蒺藜苜蓿和拟南芥 *MsCNGC* 基因进行共线性分析并可视化。

1.2.7 GO 注释、蛋白互作与磷酸化位点分析 使用 Agrigo (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/index.php>) 数据库完成 GO 注释,注释类别为:生物过程 (biological process)、细胞组分 (cellular components) 和分子功能 (molecular function),使用 Origin 可视化注释结果。使用在线工具 NetPhos 3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/>) 对蛋白磷酸化位点分析。蛋白互作网络分析使用 STRING 12.0 (<https://cn.string-db.org/>) 完成,使用 Cytoscape (3.10.0) 完成互作网络可视化。GO 注释与蛋白互作网络分析参考物种均为蒺藜苜蓿 (NCBI 登录号:GCA\_003473485.1)<sup>[22]</sup>。

### 1.3 干旱胁迫下的转录组分析

1.3.1 材料处理与转录组测序 供试新疆大叶紫花苜蓿种子来源于甘肃农业大学草业学院。于自然条件下进行盆栽试验,采用开口直径 30.0 cm、高 23.0 cm 的塑料盆,每盆装筛选土 (筛孔 0.5 cm) 8 kg。紫花苜蓿于 2023 年 3 月 16 日进行播种,播种量为每桶 30 粒,苗期留取生长基本一致的壮苗,定苗为 15 株。试验设 4 组水分处理,分别为充分供水处理 CK (土壤含水量控制为田间持水量的 80%~85%)、轻度水分胁迫处理 D1 (土壤含水量控制为田间持水量的 60%~65%)、中度水分胁迫处理 D2 (土壤含水量控制为田间持水量的 40%~45%)、重度水分胁迫处理 D3 (土壤含水量控制为田间持水量的 20%~25%),每处

理 6 个重复。于 2023 年 6 月 21 日开花初期开始控水,用感量 5.0 g 电子秤于每天 18:00 对各处理进行称重补水,架设塑料防雨棚,控制土壤水分含量范围。干旱胁迫第 14 天时 D2 和 D3 处理叶片出现明显萎蔫,此时对 CK、D1、D2、D3 处理下植株的完整健康叶片进行采样,用于转录组比较分析。

RNA 的提取和质量控制、文库制备和定量、测序和 QC 分析参考 Rao 等<sup>[23]</sup>的方法。使用 Hisat2 (2.2.1)<sup>[24]</sup>将 Clean reads 比对到新疆大叶苜蓿的参考基因组上,使用 featureCounts (2.0.3)<sup>[25]</sup>计算基因比对情况,然后根据基因长度计算每个基因的 *FPKM* (fragments per kilobase million), $P < 0.05$ ,  $FDR < 0.05$  且  $|\log_2 FPKM| \geq 1$  条件的基因表达量显著变化 (上调/下调)。 $FPKM = (10^6 \times nf) / (L \times N)$ ,其中, $nf$  代表比对至目标基因的片段数量; $L$  代表目标基因的外显子长度之和除以 1 000 (Kb); $N$  代表有效比对至基因组的片段总数量。

1.3.2 基因表达量和 qRT-PCR 分析 从干旱胁迫下的新疆大叶苜蓿转录组 (未公开发表)<sup>[26]</sup> 中获取 *MsCNGC* 家族基因的表达量数据,利用 Tltools 软件<sup>[21]</sup>可视化制图并进行分析。在叶片中表达的 *MsCNGC* 基因中随机选取 4 个进行 qRT-PCR 分析,qRT-PCR 的样品收集方法与转录组的取样方法一致。使用 CTAB 方法从叶中提取总 RNA,随后使用逆转录试剂盒 (SweScript All-in-One RT SuperMix, G3337) 逆转录成 cDNA。qRT-PCR 反应体系为 15  $\mu$ L,反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,然后 40 个循环,包括 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s 和 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s。qRT-PCR 引物是针对表 1 中列出的靶基因单独设计,选取紫花苜蓿 *Actin* 基因 (MS.gene001874) 为内参,每组处理重复 3 次,利用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法<sup>[27]</sup>进行相对表达计算。

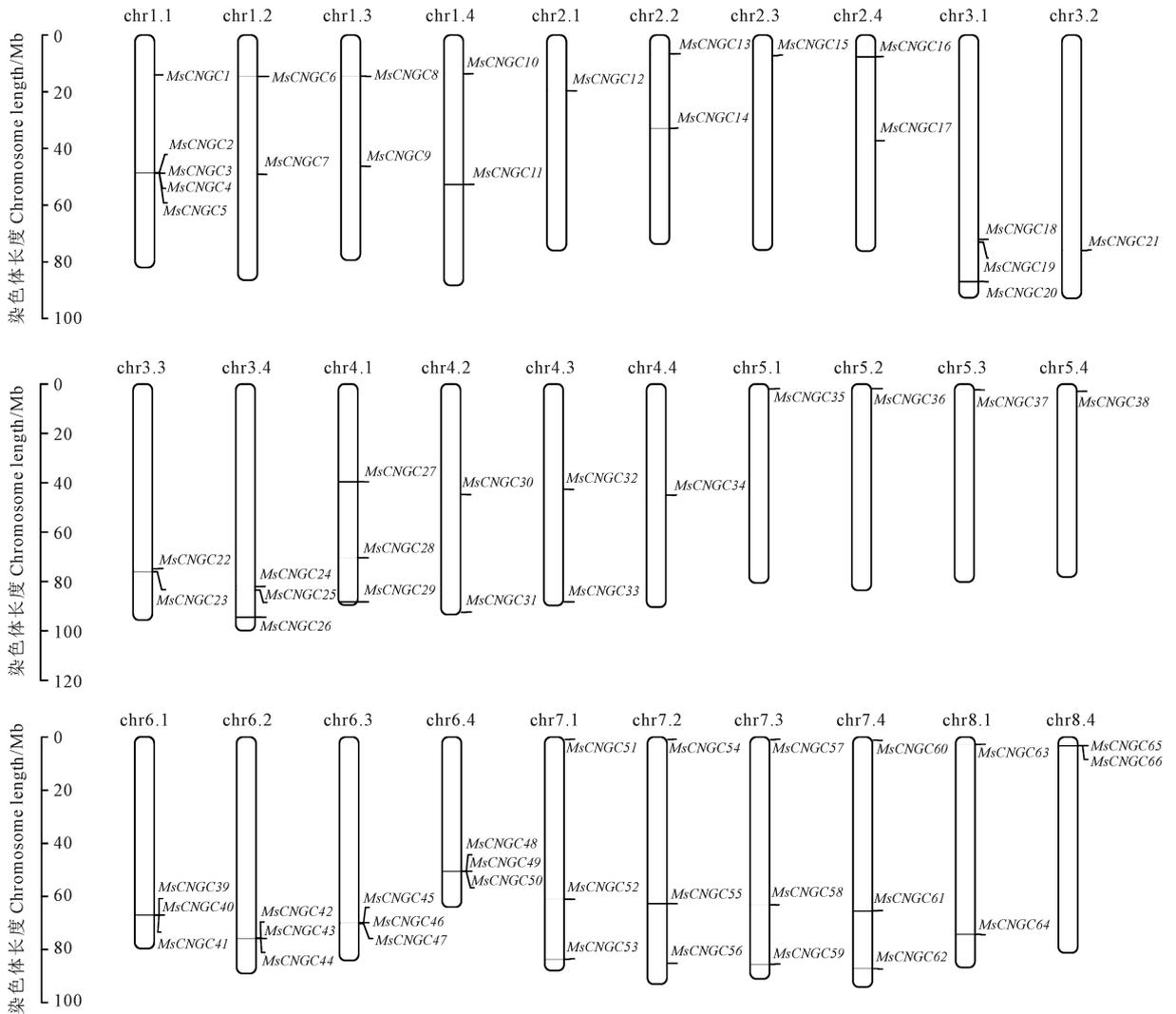
## 2 结果与分析

### 2.1 紫花苜蓿 *CNGC* 基因家族鉴定和染色体定位

在紫花苜蓿的基因组中共鉴定获得 67 个 *MsCNGC* 基因,其中 66 个定位在染色体上,1 个未定位在染色体上 (图 1),依据基因所在染色体号和位置将 66 个 *MsCNGC* 基因命名为 *MsCNGC1*~*MsCNGC66*,未定位在染色体上的基因命名为 *MsCNGC67*,未定位于染色体上的基因可能是数据质量问题或其存在于染色体之外的遗传物质中。结果显示,chr8.2 与 chr8.3 上没有基因分布,66 个 *MsCNGC* 基因不均匀地分布在 30 条染色体上,数量介于 1~5 之间,chr1.1 上分布数量最多,为 5 个。

表 1 qRT-PCR 引物信息  
Table 1 Primers used for qRT-PCR

基因 Gene	正向引物 Forward primer(5'-3')	反向引物 Reverse primer(5'-3')	扩增效率/% Amplification efficiency	相关系数 $R^2$ Correlation coefficient	退火温度/°C Annealing temperature
<i>MsCNCG7</i>	TTCCGCCGGTTACATAGCAA	TGATCCTTTTGGCACCTGCA	98.73	0.995	60
<i>MsCNCG17</i>	TTGCCATCTGGGACTTGTATT	TCTTCGCCTTAGCCTCCACTCT	98.26	0.994	60
<i>MsCNCG39</i>	TTACAACTGGGCTGCAACGAG	TCACAAATGGCGTCCAGAATAG	96.54	0.991	60
<i>MsCNCG56</i>	CCAGGTATTCTACATGCAGTCA	CTCCTCAAACCCTCAGGTAAGTC	97.81	0.993	60
<i>MsActin</i>	ATGGAAGTGAATGGTGAAGGC	ACATAGGCATCCTTTTGACCCAT	95.68	0.990	60



注: chr1.1~chr8.4 表示染色体序号。下同。

Note: chr1.1~chr8.4 represents the chromosomal number. The same below.

图 1 *MsCNCG* 基因家族成员染色体定位

Fig.1 Chromosomal localization of *MsCNCG* genes

## 2.2 *MsCNCG* 蛋白质理化性质和亚细胞预测

对 *MsCNCG* 蛋白的理化性质进行分析发现(表 2), *MsCNCG* 蛋白的氨基酸数量预测范围介于 420 (*MsCNCG25*)~1 694(*MsCNCG65*)之间, 平均为 700 个; 分子量介于 48.62590 (*MsCNCG25*)~195.11928 (*MsCNCG64*) kDa 之间; 等电点介于 8.52 (*MsCNCG3*)

~9.55 (*MsCNCG43*) 之间, 均属于碱性蛋白; 不稳定系数介于 38.73 (*MsCNCG42*)~56.99 (*MsCNCG29*) 之间, 有 8 个为稳定蛋白, 59 个为不稳定蛋白; 脂肪指数介于 79.50 (*MsCNCG49*)~99.34 (*MsCNCG47*) 之间; 平均疏水性介于 -0.616 (*MsCNCG49*)~0.083 (*MsCNCG31*) 之间, 大多数为亲水性蛋白, 少数 (8

个)为疏水性蛋白。亚细胞预测显示,有 19 个定位于细胞核,该细胞器基因可能参与基因调控以及 DNA 的复制、修复和重组等相关过程;17 个定位于内质网,内质网是蛋白质合成后进行折叠的主要场所,此处的基因可能编码分子伴侣蛋白,帮助新合成的多肽链正确折叠成有功能的蛋白质结构;17 个定位于液泡,其相关基因可能参与某些离子和小分子的转运及储存过程;10 个定位于线粒体,这些基因可能与氧化磷酸化过程密切相关;3 个定位于叶绿体,这些基因很可能参与光合作用各个环节;1 个定位于高尔基体,该基因可能为识别不同蛋白质运输信号的蛋白基因。

### 2.3 *MsCNGC* 系统进化分析

为明确新疆大叶苜蓿 67 个 *MsCNGC* 与拟南芥 20 个 *AtCNGC* 的进化关系,采用最大似然法构建了系统发育树。如图 2 所示,系统发育树可分成 5 个亚群(I、II、III、IV-A 和 IV-B),其中亚群 I 含有

12 个 *MsCNGC* 成员和 6 个 *AtCNGC* 成员,亚群 II 含有 7 个 *MsCNGC* 成员和 5 个 *AtCNGC* 成员,亚群 III 含有 27 个 *MsCNGC* 成员和 5 个 *AtCNGC* 成员,亚群 IV-A 含有 16 个 *MsCNGC* 成员和 2 个 *AtCNGC* 成员,亚群 IV-B 含有 5 个 *MsCNGC* 成员和 2 个 *AtCNGC* 成员。

### 2.4 *MsCNGC* 保守基序和基因结构分析

Motif 预测结果(图 3A)显示,同一亚家族的保守基序分布相似, Motif1、Motif2、Motif5、Motif10 和 Motif11 在所有成员中均出现, Motif15 在家族成员中出现最少,只在 15 个 *MsCNGC* 基因中出现,说明 Motif1、Motif2、Motif5、Motif10 和 Motif11 在该基因家族中高度保守,在 *MsCNGC* 功能方面起着重要作用。*MsCNGC* 基因的外显子和内含子数量分别为 5~22 个和 4~21 个,大部分 *MsCNGC* 基因的外显子数量为 6~7 个,内含子数量为 5~6 个, *MsCNGC67* 基因含有的外显子与内含子数量最多,分别为 22 个和 21 个(图 3B)。

表 2 *MsCNGC* 基因家族的理化性质及其亚细胞定位预测

Table 2 Physicochemical properties and subcellular prediction of *MsCNGC*

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	蛋白质大小 Protein length/aa	分子量 Molecular weight/kDa	等电点 <i>PI</i> Isoelectric point	不稳定指数 Instability index	脂肪指数 Aliphatic index	平均疏水性 Grand average of hydrophaticity	亚细胞定位 Subcellular location
<i>MsCNGC1</i>	MS.gene31806	716	83.25617	9.29	49.30	87.44	-0.211	Vacu
<i>MsCNGC2</i>	MS.gene055909	619	71.59176	8.56	50.57	94.85	-0.078	Chlo
<i>MsCNGC3</i>	MS.gene029823	710	82.26780	8.52	49.78	89.14	-0.198	E.R.
<i>MsCNGC4</i>	MS.gene055911	602	69.79184	9.02	49.90	94.14	-0.073	Vacu
<i>MsCNGC5</i>	MS.gene029821	681	78.85599	8.80	49.73	89.79	-0.170	Vacu
<i>MsCNGC6</i>	MS.gene046812	716	83.31824	9.28	49.91	87.44	-0.212	Vacu
<i>MsCNGC7</i>	MS.gene24611	710	82.20075	8.60	49.48	89.14	-0.194	E.R.
<i>MsCNGC8</i>	MS.gene054121	716	83.34334	9.32	49.01	87.99	-0.205	Vacu
<i>MsCNGC9</i>	MS.gene029819	710	82.26780	8.52	49.78	89.14	-0.198	E.R.
<i>MsCNGC10</i>	MS.gene32357	716	83.31927	9.28	49.18	87.44	-0.208	Vacu
<i>MsCNGC11</i>	MS.gene75014	710	82.14164	8.52	49.53	89.00	-0.197	E.R.
<i>MsCNGC12</i>	MS.gene031353	494	57.15766	9.44	45.15	94.47	-0.057	Chlo
<i>MsCNGC13</i>	MS.gene063959	699	80.29628	9.28	50.32	91.76	-0.086	Nucl
<i>MsCNGC14</i>	MS.gene78201	666	76.80692	9.32	43.35	94.73	-0.140	Nucl
<i>MsCNGC15</i>	MS.gene058927	703	80.62169	9.34	47.97	91.38	-0.087	E.R.
<i>MsCNGC16</i>	MS.gene31265	703	80.65868	9.25	49.89	91.24	-0.085	Nucl
<i>MsCNGC17</i>	MS.gene84405	654	75.34910	9.29	45.15	92.58	-0.162	Nucl
<i>MsCNGC18</i>	MS.gene052925	648	74.52996	9.03	43.65	83.84	-0.181	Vacu
<i>MsCNGC19</i>	MS.gene48518	585	67.67756	9.13	47.84	89.90	-0.092	Chlo
<i>MsCNGC20</i>	MS.gene014719	704	81.56050	9.04	46.70	95.68	-0.091	Nucl
<i>MsCNGC21</i>	MS.gene02507	648	74.52996	9.03	43.65	83.84	-0.181	Vacu
<i>MsCNGC22</i>	MS.gene02629	648	74.52996	9.03	43.65	83.84	-0.181	Vacu
<i>MsCNGC23</i>	MS.gene06737	713	82.34861	9.41	50.74	87.01	-0.133	Nucl
<i>MsCNGC24</i>	MS.gene013710	648	74.52996	9.03	43.65	83.84	-0.181	Vacu
<i>MsCNGC25</i>	MS.gene013614	420	48.62590	9.02	54.55	85.24	-0.318	Nucl
<i>MsCNGC26</i>	MS.gene073020	726	84.19052	9.06	45.09	94.26	-0.129	Nucl
<i>MsCNGC27</i>	MS.gene050127	461	53.00534	8.91	47.96	91.15	-0.025	Vacu
<i>MsCNGC28</i>	MS.gene94887	667	77.24246	9.22	51.93	87.83	-0.186	Nucl
<i>MsCNGC29</i>	MS.gene034223	744	86.10023	9.19	56.99	85.94	-0.251	Nucl
<i>MsCNGC30</i>	MS.gene08752	463	53.17387	8.89	44.04	96.87	0.043	Mito
<i>MsCNGC31</i>	MS.gene053202	744	86.14231	9.23	56.57	85.94	-0.253	Nucl
<i>MsCNGC32</i>	MS.gene007682	857	96.90642	8.69	44.42	96.57	0.083	E.R.
<i>MsCNGC34</i>	MS.gene08690	450	51.80126	8.93	45.81	95.53	0.037	Golg
<i>MsCNGC35</i>	MS.gene21859	734	83.46085	9.19	46.65	96.78	-0.001	Nucl
<i>MsCNGC36</i>	MS.gene21767	707	80.37615	9.17	48.60	96.22	-0.049	Nucl
<i>MsCNGC37</i>	MS.gene024784	734	83.44678	9.16	46.98	96.78	-0.001	Nucl

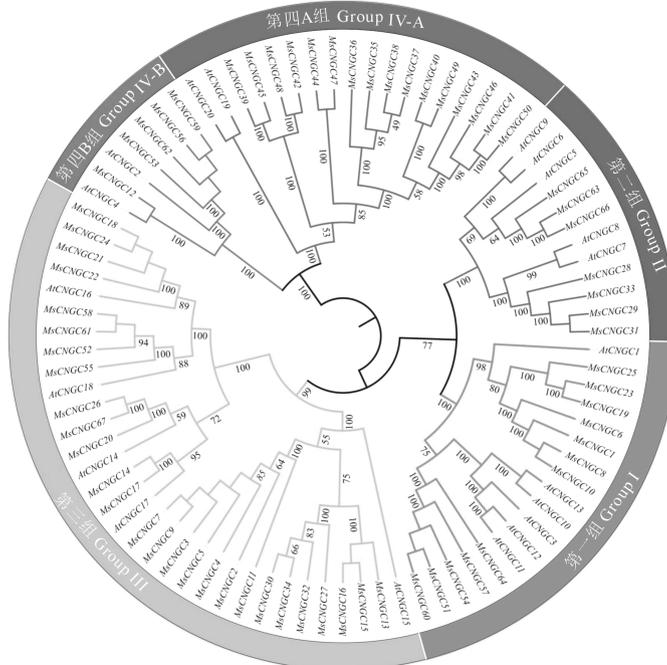
续表 2

Continued table 2

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	蛋白质大小 Protein length/aa	分子量 Molecular weight/kDa	等电点 <i>PI</i> Isoelectric point	不稳定指数 Instability index	脂肪指数 Aliphatic index	平均疏水性 Grand average of hydropathicity	亚细胞定位 Subcellular location
<i>MsCNCG38</i>	MS.gene058101	734	83.39378	9.13	46.39	96.65	0.008	Nucl
<i>MsCNCG39</i>	MS.gene069674	777	89.12716	9.31	39.78	89.70	-0.127	E.R.
<i>MsCNCG40</i>	MS.gene069671	704	80.21105	9.41	50.08	98.04	-0.133	Nucl
<i>MsCNCG41</i>	MS.gene069665	757	86.37483	9.43	51.97	91.04	-0.166	E.R.
<i>MsCNCG42</i>	MS.gene065923	771	88.44364	9.32	38.73	90.52	-0.127	E.R.
<i>MsCNCG43</i>	MS.gene40445	757	86.44813	9.55	52.62	93.36	-0.149	E.R.
<i>MsCNCG44</i>	MS.gene40444	701	80.12490	9.12	40.41	98.56	-0.076	E.R.
<i>MsCNCG45</i>	MS.gene041684	768	88.14217	9.30	39.33	90.36	-0.124	E.R.
<i>MsCNCG46</i>	MS.gene041688	755	86.30481	9.51	51.71	91.92	-0.166	E.R.
<i>MsCNCG47</i>	MS.gene041697	666	75.91503	8.81	41.62	99.34	-0.015	E.R.
<i>MsCNCG48</i>	MS.gene27389	771	88.44763	9.32	39.65	90.65	-0.125	E.R.
<i>MsCNCG49</i>	MS.gene27385	818	93.26166	8.69	50.79	79.50	-0.616	Mito
<i>MsCNCG50</i>	MS.gene27383	757	86.37483	9.43	51.97	91.04	-0.166	E.R.
<i>MsCNCG51</i>	MS.gene025911	718	82.84734	9.55	49.45	90.97	-0.180	Mito
<i>MsCNCG52</i>	MS.gene29991	679	78.51070	8.96	39.82	91.77	-0.119	Mito
<i>MsCNCG53</i>	MS.gene021807	711	80.97774	9.49	46.65	97.05	0.046	Vacu
<i>MsCNCG54</i>	MS.gene024441	718	82.84734	9.55	49.45	90.97	-0.180	Mito
<i>MsCNCG55</i>	MS.gene52515	679	78.53472	8.90	39.82	91.77	-0.120	Mito
<i>MsCNCG56</i>	MS.gene057537	711	80.97774	9.49	46.65	97.05	0.046	Vacu
<i>MsCNCG57</i>	MS.gene050645	718	82.84734	9.55	49.45	90.97	-0.180	Mito
<i>MsCNCG58</i>	MS.gene054928	679	78.51070	8.96	39.82	91.77	-0.119	Mito
<i>MsCNCG59</i>	MS.gene45237	711	80.97774	9.49	46.65	97.05	0.046	Vacu
<i>MsCNCG60</i>	MS.gene22694	718	82.83327	9.53	49.57	90.97	-0.179	Mito
<i>MsCNCG61</i>	MS.gene87174	679	78.53875	8.96	39.82	92.05	-0.115	Mito
<i>MsCNCG62</i>	MS.gene97592	711	80.97774	9.49	46.65	97.05	0.046	Vacu
<i>MsCNCG63</i>	MS.gene035594	731	84.08310	9.41	47.69	91.00	-0.209	Vacu
<i>MsCNCG64</i>	MS.gene95273	1694	195.11928	9.20	44.92	90.98	-0.124	Nucl
<i>MsCNCG65</i>	MS.gene57768	480	55.29344	9.05	46.82	84.79	-0.356	Vacu
<i>MsCNCG66</i>	MS.gene57766	566	65.35148	9.43	48.68	91.02	-0.236	E.R.
<i>MsCNCG67</i>	MS.gene40376	704	81.58247	9.04	46.42	94.57	-0.101	Nucl

注: Vacu:液泡;Nucl:细胞核;E.R.:内质网;Chlo:叶绿体;Mito:线粒体;Golg:高尔基体。

Note: Vacu: Vacuole; Nucl: Nucleus; E.R.: Endoplasmic reticulum; Chlo: Chloroplast; Mito: Mitochondrion; Golg: Golgi apparatus.



注: 每个分支节点处的数值为自展值, 是衡量进化树分支结构的可信度, 其数值越大, 说明可信度越高。

Note: The value at each branch node is the self-extrusion value, which is a measure of the credibility of the branch structure of the evolutionary tree, the higher the value, the higher the credibility.

图 2 紫花苜蓿与拟南芥 *CNCG* 系统进化树

Fig.2 *CNCG* phylogenetic tree of *Medicago sativa* and *Arabidopsis thaliana*

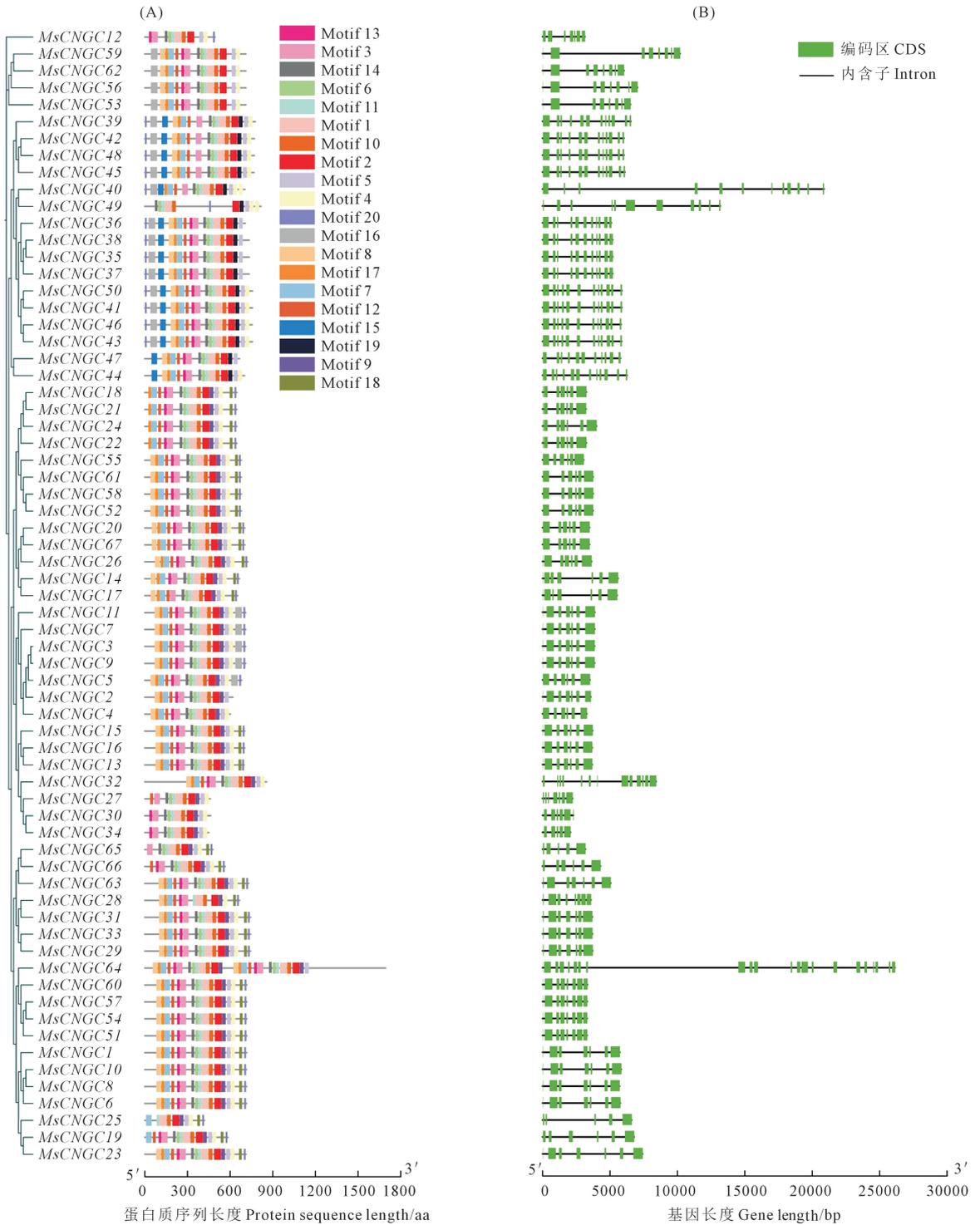


图 3 *MsCNGC* 保守基序和基因结构分析

Fig.3 Conserved motif and structural analysis of *MsCNGC*

## 2.5 *MsCNGC* 启动子顺式作用元件分析

由图 4 可知, *MsCNGC* 基因成员含有的元件数量和类型均存在差异, 这些元件与非生物胁迫、植物激素和生长发育响应有关, 主要包括脱落酸响应、厌氧诱导响应、光响应、水杨酸响应、防御和应激响应、低温响应、干旱响应、茉莉酸甲酯响应、赤霉素响应、生

长素响应及类黄酮生物合成调节。数量最多的顺式元件(光响应)有 323 个, 在 65 个 *MsCNGC* 基因中被预测到; 含有干旱诱导元件结合位点的有 41 个 *MsCNGC* 成员, 参与防御和应激响应的元件有 38 个 *MsCNGC* 成员。以上结果说明 *MsCNGC* 基因在响应非生物胁迫以及激素响应中可能发挥重要的作用。

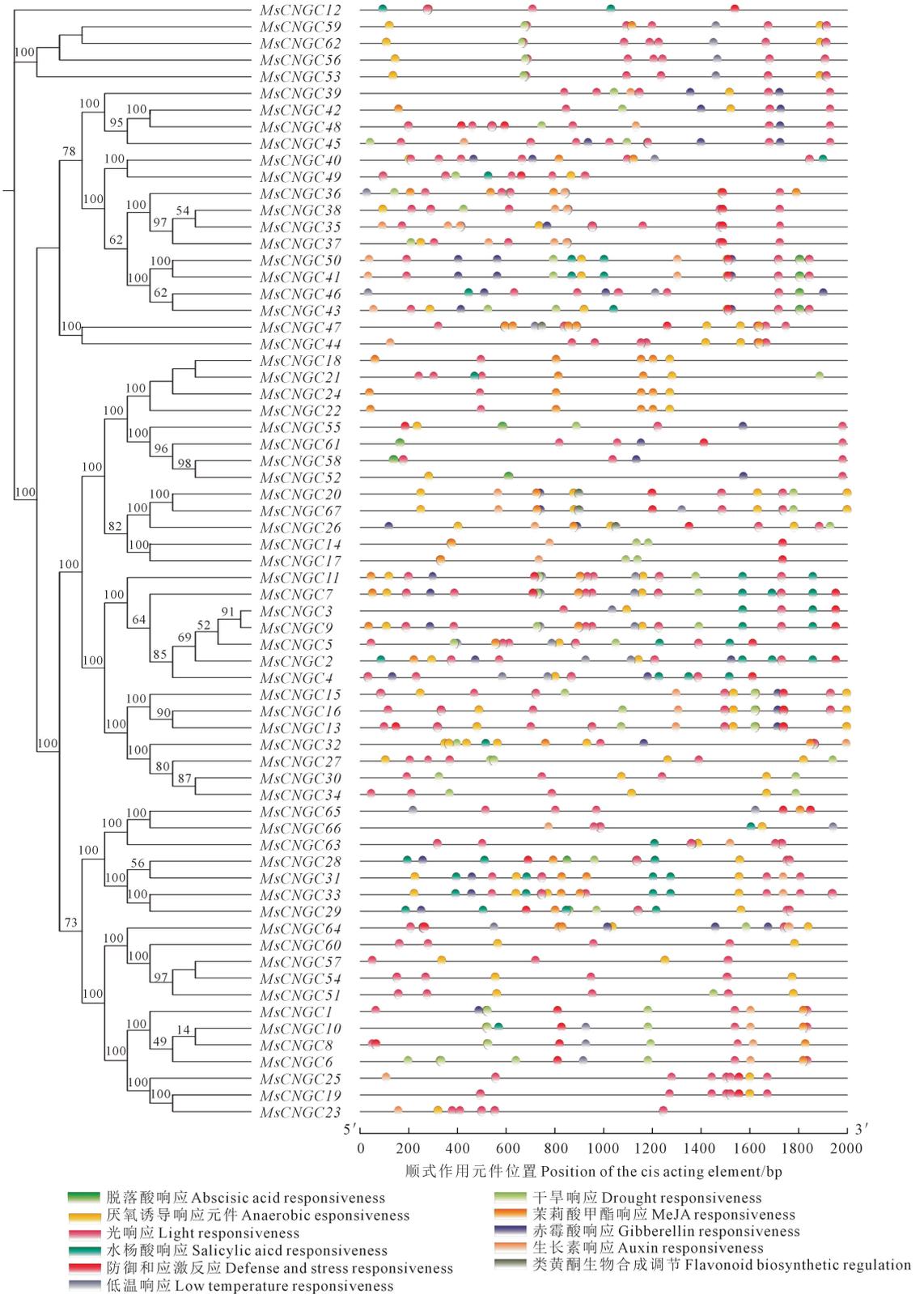


图 4 *MsCNGC* 家族顺式作用元件

Fig.4 Cis acting elements of the *MsCNGC* family

## 2.6 MsCNGC 蛋白跨膜结构、二级和三级结构预测分析

由图 5 可知, MsCNGC 的跨膜螺旋数量介于 1~12 个之间, 跨膜螺旋结构最少与最多的蛋白分别为 MsCNGC49(1 个) 和 MsCNGC64(12 个), 跨膜螺旋数量介于 4~6 个的蛋白有 55 个, 占比 82.09%, 且跨膜螺旋氨基酸残基数量的期望值均大于 18, 说明该基因家族有跨膜结构, 为跨膜蛋白。

二级结构显示(图 6A, 见 67 页), 67 个 MsCNGC 均由  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -转角、无规则卷曲和延伸链 4 部分构成,  $\alpha$ -螺旋占比最大, 为 37.78%~62.44%;  $\beta$ -转角占比最小, 为 2.16%~6.91%; 无规则卷曲占比为 24.19%~41.18%; 延伸链占比为 8.33%~18.30%。对 MsCNGC 蛋白三级结构进行预测发现, 大多数 MsCNGC 蛋白结构很保守, 每个亚家族列出 1 个三级结构(图 6B, 见 67 页)。

## 2.7 MsCNGC 基因共线性分析

MsCNGC 基因共线性结果表明(图 7A), 新疆大叶苜蓿基因组有 75 对共线性基因, 涉及 57 个 MsCNGC 成员, 它们来源于片段重复, 表明片段重复在 MsCNGC 基因扩增中发挥重要的作用。MsCNGC 家族同源基因对的  $Ka/Ks$  值均小于 1, 表明 MsCNGC 基因经过纯化选择。

为进一步探究 MsCNGC 基因家族在不同作物中的进化关系, 构建了新疆大叶苜蓿与蒺藜苜蓿和拟南芥 MsCNGC 基因共线性图(图 7B)。结果表明, 新疆大叶苜蓿与拟南芥之间有 45 个共线 CNGC 基因对, 新疆大叶苜蓿与蒺藜苜蓿之间有 91 个共线 CNGC 基因对。说明新疆大叶苜蓿与蒺藜苜蓿关系较近, 可能是因为这两种植物同属于豆科植物。

## 2.8 GO 注释、蛋白互作和磷酸化位点分析

GO 功能注释结果显示, MsCNGCs 主要参与种间相互作用(GO0044419)、共生作用(GO0044403)和丛枝菌根联合(GO0036377)等生物过程; 细胞组分主要是核膜(GO0031965)和膜的组成部分

(GO0016021); 分子功能主要是具有离子通道活性(GO0005216)、蛋白质结合活性(GO0005515)和 cAMP 结合活性(GO0030552)等活性(图 8A)。

蛋白互作结果显示, MsCNGCs 蛋白只有少数成员间存在互作关系(MsCNGC5、MsCNGC13 和 MsCNGC34), 值得关注的是, 有 17 个 MsCNGCs 蛋白与 LRR 家族的 LRR1 和 LRR2 之间存在显著的互作关系(图 8B)。

磷酸化位点结果显示, MsCNGC 蛋白质磷酸化位点总数介于 29~120 之间, 其中丝氨酸位点为 18~72 个, 苏氨酸磷酸化位点为 9~44 个, 酪氨酸磷酸化位点为 0~6 个。磷酸化位点总数最少的是 MsCNGC25, 为 29 个; 最多的是 MsCNGC64, 为 120 个。以上结果进一步证明 MsCNGCs 在蛋白质水平上受到 MsLRR 的调控(图 8C)。

## 2.9 基因表达量分析

2.9.1 干旱胁迫下 MsCNGC 基因的表达分析 基因表达量分析结果表明(图 9), 有 26 个 MsCNGCs 表达量上调, 如 MsCNGC6、MsCNGC19、MsCNGC45 等基因在 D1 处理下表达量较高, MsCNGC23、MsCNGC39 等基因在 D2 处理下表达量较高, MsCNGC7、MsCNGC11、MsCNGC59 等基因在 D3 处理下表达量较高, 其中 MsCNGC59 表达量最高, 在 D3 处理下上调 1.62 倍; MsCNGC8 和 MsCNGC25 在干旱处理后下调表达, 说明 MsCNGC 成员在干旱胁迫处理后有不同的响应模式。

为确定 MsCNGCs 在干旱胁迫下的表达模式, 随机选取 4 个 MsCNGCs 基因进行 qRT-PCR 验证。如图 10 所示, 干旱胁迫下 MsCNGC7、MsCNGC56 的相对表达量与对照组相比均有显著升高, MsCNGC39 在 D1 与 D2 处理下的相对表达量与对照组相比显著上调, MsCNGC62 在 D1 与 D3 处理下的相对表达量与对照组相比显著上调, 4 个 MsCNGCs 基因均在 D3 处理下表达量最高, 与干旱胁迫下 MsCNGC 表达量分析结果(图 9)一致, 说明验证结果可靠。

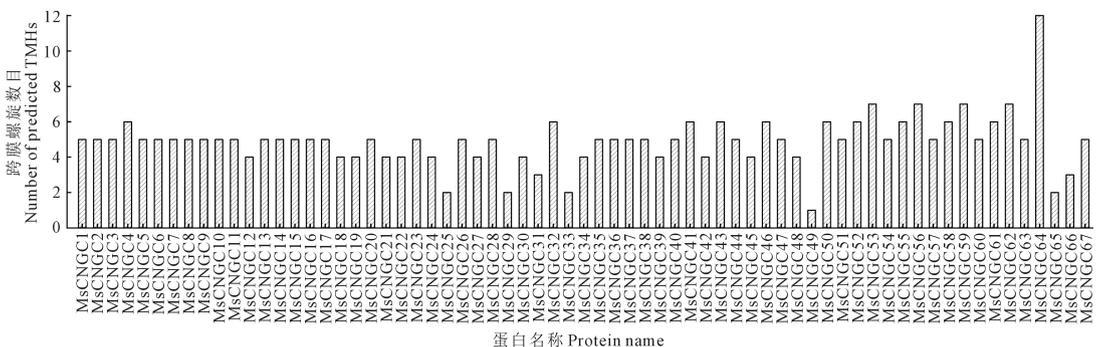
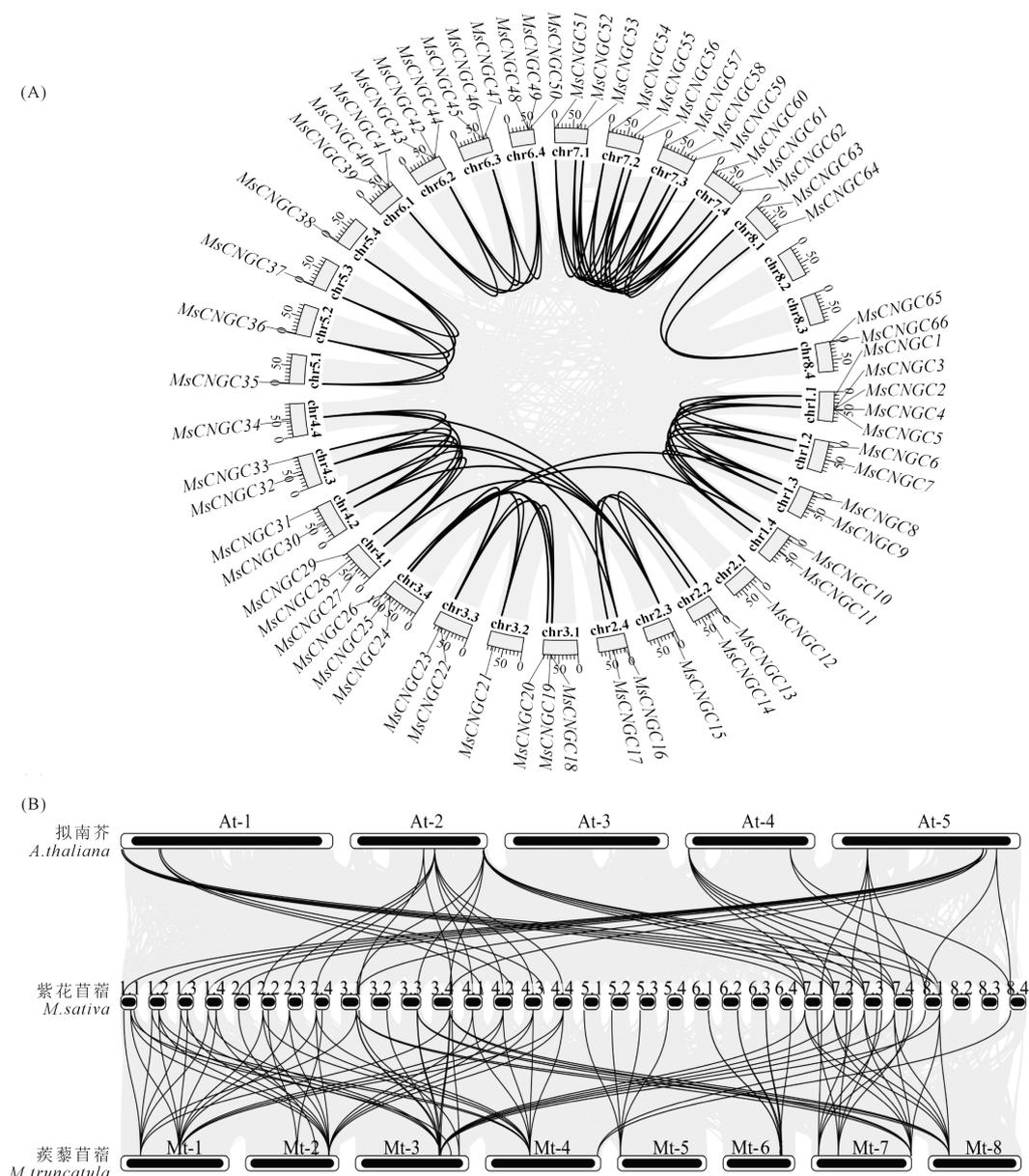


图 5 MsCNGC 跨膜结构预测

Fig.5 Prediction of MsCNGC transmembrane structure



注:图 A 中黑色线条表示物种内 *MsCNGC* 基因共线性,图 B 中黑色线条表示物种间 *CNGC* 家族共线性关系。

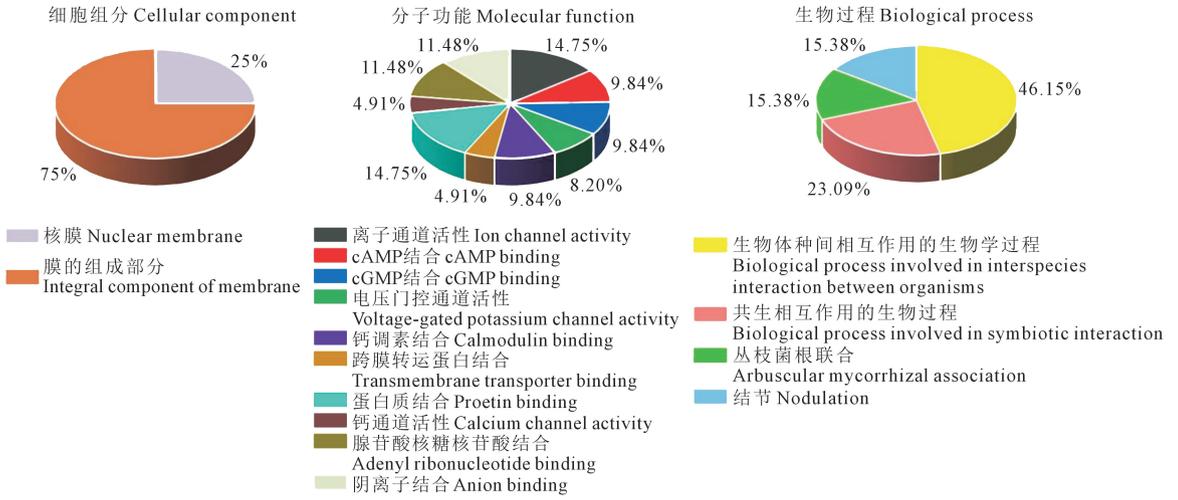
Note: The black line in figure A represents collinearity of *MsCNGC* genes within species, while the black line in figure B represents collinearity of *CNGC* family relationships between species.

图 7 *MsCNGC* 基因共线性分析

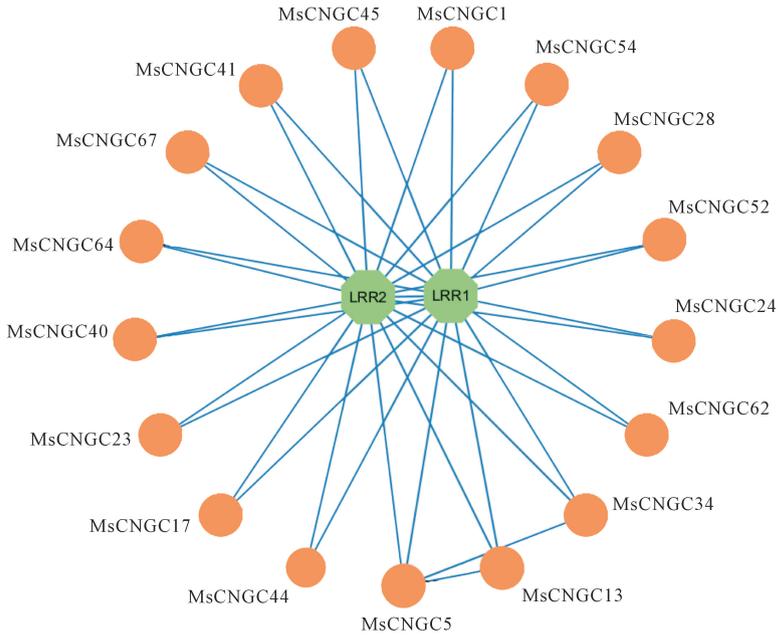
Fig.7 Collinearity analysis of *MsCNGC* genes

2.9.2 LRR 激酶家族表达量分析 为探索 LRR 激酶家族是否参与紫花苜蓿对干旱胁迫的响应以及对 *MsCNGCs* 的调控关系,分析了 *LRR* 基因家族成员在干旱胁迫下的表达模式。如图 11 所示,干旱胁迫下新疆大叶苜蓿中表达了 24 个 *MsLRR* 基因,大多在干旱胁迫后上调表达,其中 *MsLRR4*、*MsLRR7*、*MsLRR9* 随着干旱胁迫程度的增加持续上调,这些基因可能是 *MsLRR* 家族中参与干旱胁迫的主要成员。相关性分析结果显示,*MsLRRs* 与 *MsCNGCs* 基因表达量之间大部分呈正相关关系(图 12, 见 67 页)。

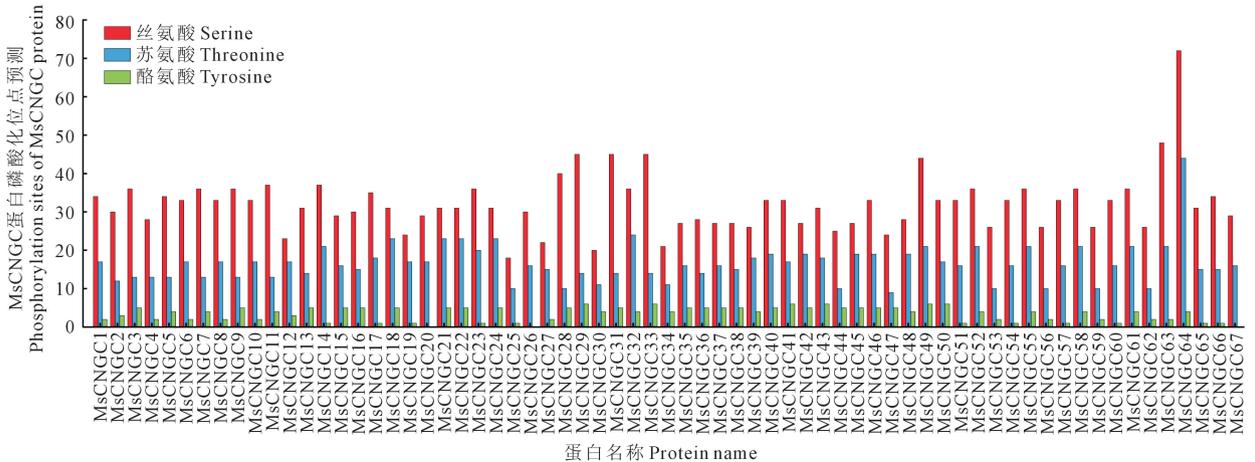
2.9.3  $Ca^{2+}$  信号传导通路相关基因表达分析 基于本课题组前期的研究<sup>[26]</sup>,在  $Ca^{2+}$  信号传导通路中有 3 个基因差异表达,由图 13(见 68 页)可知,1 个钙依赖蛋白激酶 (calcium-dependent protein kinase, CDPK) 被注释,命名为 *MsCDPK*;钙调蛋白和类钙调蛋白 (CAM/CML) 中注释了 2 个基因,分别命名为 *MsCAM* 和 *MsCML*。对以上 3 个基因的表达量进行分析发现,*MsCDPK* 与 *MsCML* 基因表达量在 D3 处理下分别上调了 7.55 倍和 3.13 倍,*MsCAM* 在 D1 处理下上调 2.91 倍。以上结果说明紫花苜蓿会通过激活  $Ca^{2+}$  信号转导途径参与对干旱胁迫的适应过程。



(A) GO注释分析 GO annotation analysis



(B) 蛋白互作分析 Protein-protein interaction analysis



(C) 磷酸化位点预测 Phosphorylation site analysis

图 8 GO 注释、蛋白互作和磷酸化位点分析

Fig.8 GO annotation, protein interaction and phosphorylation site analysis

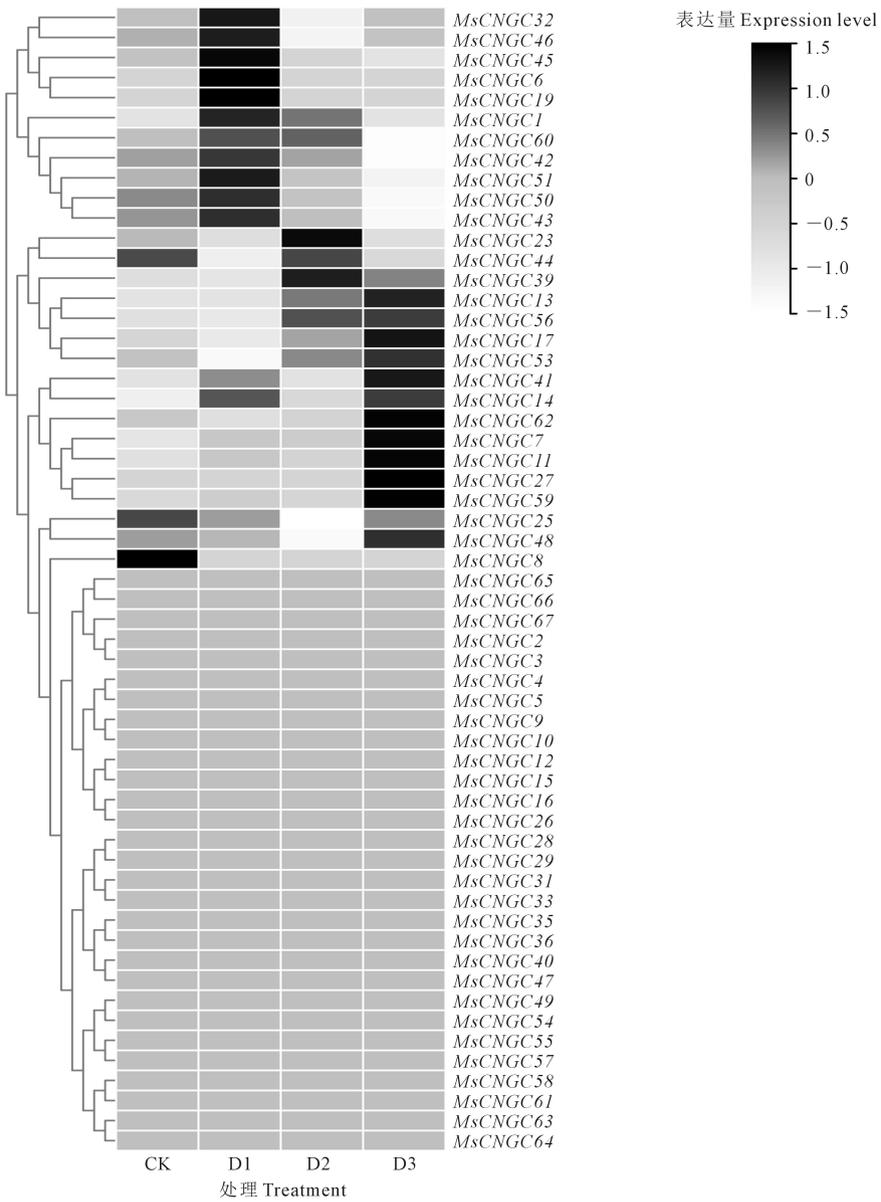
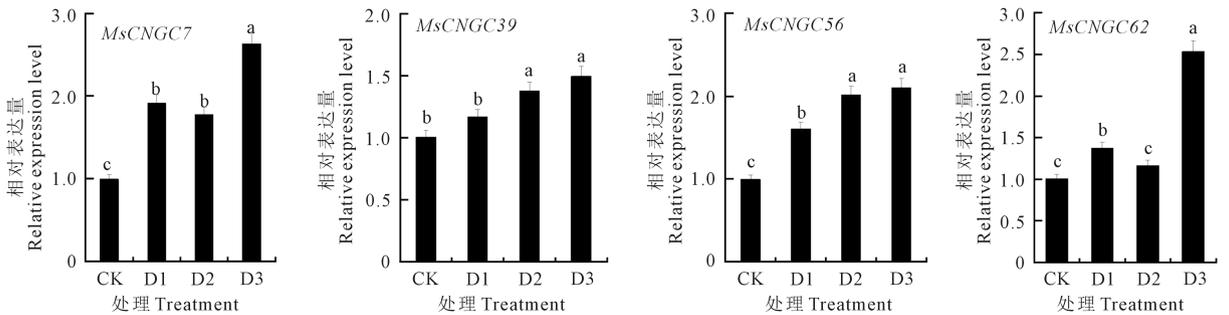


图 9 干旱胁迫下 *MsCNCGs* 基因的表达水平

Fig.9 Expression level of *MsCNCGs* gene under drought stress



注:不同小写字母表示处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同。

Note: Different lowercase letters indicate significance difference between different treatments ( $P < 0.05$ ). The same below.

图 10 干旱胁迫下 *MsCNCGs* 基因的 qRT-PCR 表达分析

Fig.10 qRT-PCR expression analysis of *MsCNCGs* gene under drought stress

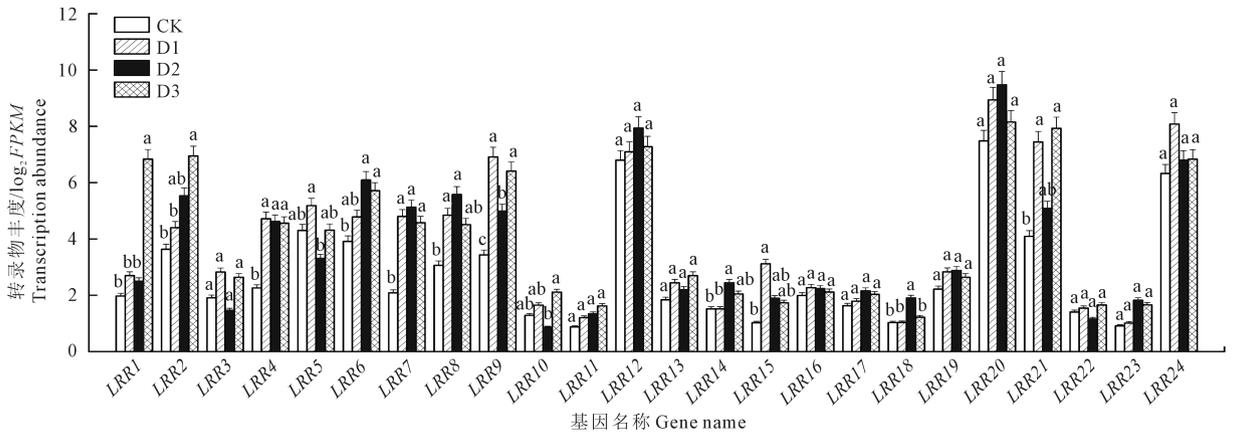


图 11 LRR 蛋白激酶家族表达量分析

Fig.11 Analysis of LRR kinase family expression levels

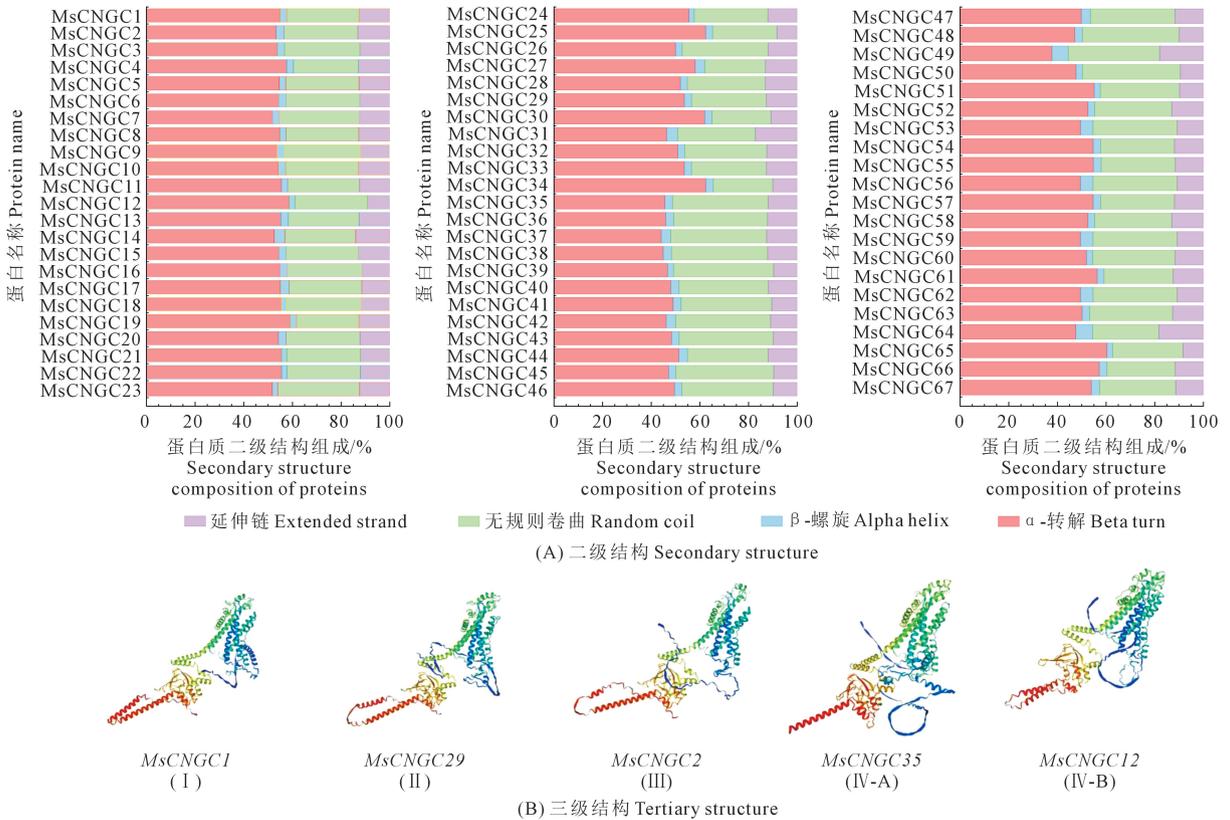
### 3 讨论

研究表明, *CNGC* 蛋白家族的主要特征是存在环核苷酸结合域 (CNBD)、6 个跨膜结螺旋及 S5 与 S6 之间的孔隙和 C 端钙调蛋白结合域 (CaMBD)<sup>[18]</sup>。本研究在紫花苜蓿中鉴定到的 67 个 *CNGC* 基因均含有以上结构, 说明鉴定结果较为准确。通过与拟南芥和其他物种相比可知, 四倍体紫花苜蓿的 *MsCNGC* 家族发生了明显的基因家族扩张, 一方面可能与全基因组复制事件有关<sup>[28]</sup>, 基因组学的研究结果显示, 新疆大叶苜蓿的 4 条等位基因染色体的基因数量和基因同源性方面存在高度的相似性<sup>[29]</sup>; 另一方面可能与片段重复事件有关, 本研究发现新疆大叶苜蓿 *CNGC* 基因家族有 75 对共线性基因, 均为片段重复 (图 7)。此外, 本研究中, *MsCNGC* 亚细胞定位在细胞核、内质网、液泡等细胞器中, 这与小麦 *CNGC* 基因家族中亚细胞定位预测在多个细胞器中分布的结果<sup>[17]</sup> 相似, 说明 *MsCNGC* 在多个细胞器中发挥作用。本研究中系统发育关系结果表明, 67 个基因被分为 5 个亚家族 (图 2), 与前人对拟南芥<sup>[30]</sup> 的研究结果类似, 每个亚组中基因数量差异很大, 说明不同亚家族的成员在进化过程中经历了不同的基因复制或删除事件<sup>[31]</sup>。本研究的 Motif 分析结果显示, 同一亚家族的 *MsCNGC* 含有相似的 Motif, 但亚家族间 Motif 数量和类型存在差异, 说明不同亚家族 *MsCNGC* 成员的生物学功能已经发生分化<sup>[14]</sup>。

本研究中, 蛋白质二级结构预测发现, 67 个 *MsCNGC* 均主要由  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -转角、无规则卷曲和延伸链 4 部分构成,  $\alpha$ -螺旋占比最大,  $\beta$ -转角占比最小 (图 6)。 *MsCNGC* 基因家族成员含有多种顺式作用元件, 如光响应元件、脱落酸响应元件、干旱响

应元件、防御和应激响应元件等, 这些元件对植物响应非生物胁迫非常重要<sup>[20]</sup>, 且不同基因的启动子顺式元件间存在显著差异, 表明 *MsCNGC* 基因可能对非生物胁迫有多样化的调控模式。

*CNGC* 是外源性钙离子内流的主要蛋白通道, 对于干旱胁迫下胞内钙离子浓度的升高有至关重要的作用<sup>[9]</sup>。转录调控是 *MsCNGC* 参与新疆大叶苜蓿应对干旱胁迫的主要调控方式。本研究发现, 新疆大叶苜蓿叶片中表达了 28 个 *MsCNGC* 基因 (图 9), 这可能与 *CNGC* 存在组织特异性表达有关<sup>[31]</sup>。 *CNGC* 受 *CaM* 的正向或负向调控, 这种调控模式有利于  $Ca^{2+}$  信号的传导和反馈, 在大多数植物中发现, *CNGC* 的转录水平在干旱胁迫下存在显著差异<sup>[9, 18, 31]</sup>。本研究发现, 26 个 *MsCNGC* 基因在干旱胁迫后不均匀上调, 2 个在干旱胁迫后持续下调, 其中 *MsCNGC59* 表达量高且在 D3 下上调了 1.62 倍 (图 9), 说明大部分 *MsCNGC* 正向调控紫花苜蓿对干旱胁迫的耐受性, 且 *MsCNGC59* 可能在干旱胁迫下起主要的调控作用。LRR 是广泛存在于植物中的蛋白激酶, 有研究显示 *LRR-FLS* 与 *CNGC* 的共表达在植物生长和应对环境变化中发挥作用<sup>[32-33]</sup>。本研究结果表明, *MsCNGC* 与 LRR 蛋白存在显著的互作关系, 且 *MsCNGC* 存在大量的磷酸化位点; 表达量分析结果显示, 24 个 LRR 基因均在干旱胁迫后上调, *MsCNGC* 与 LRR 表达量间存在显著的正相关关系 (图 11、图 12), 因此推测 *MsCNGC* 在蛋白质水平上受到 LRR 磷酸化的正向调控。在植物中, *CaM*、*CML* 和 *CDPK* 是作用于下游的  $Ca^{2+}$  信号传感器。在番茄中的研究发现, *SpCaM*、*SpCML* 及 *ShCDPK* 基因在干旱胁迫下的高表达对于  $Ca^{2+}$  的信号转导具有重要作用<sup>[34-35]</sup>。本研究发现, 在干旱胁迫下紫花苜蓿



(A) 二级结构 Secondary structure

(B) 三级结构 Tertiary structure

注:三级结构中, I ~ IV-B 代表不同的亚家族, IV-A 和 IV-B 中 A、B 字母代表这两个亚家族关系较近。

Note: In the tertiary structure, I~IV-B represent different subfamilies, the letters A and B in IV-A and IV-B indicate that these two subfamilies are close.

图 6 MsCNCG 蛋白质二级和三级结构分析

Fig.6 Analysis of the secondary and tertiary structures of MsCNCG protein

叶片中 *MsCaM*、*MsCML* 和 *MsCDPK* 基因表达水平显著上调,与 CK 相比,在 D3 处理下分别提高 7.55 倍、2.71 倍和 3.13 倍(图 13),说明 *MsCaM*、*MsCML* 和 *MsCDPK* 正向调控紫花苜蓿适应于干旱胁迫过程中的  $Ca^{2+}$  信号传导。综上可知, *MsCNCG* 通过调控外源性  $Ca^{2+}$  内流及  $Ca^{2+}$  信号转导过程参与紫花苜蓿对干旱胁迫的响应过程,转录调控和蛋白磷酸化是 *MsCNCG* 的主要调控策略。

#### 4 结 论

基因组鉴定结果表明,紫花苜蓿中有 67 个 *MsCNCG* 基因,不均匀地分布于 30 条染色体上。对基因结构、保守基序和蛋白结构的分析表明 *MsCNCG* 保守性较高。根据顺式元件分析, *MsCNCG* 基因家族与光响应、脱落酸响应、干旱胁迫、防御和应激反应等功能有关。在干旱胁迫下,26 个 *MsCNCG* 表达量显著上调,有助于干旱胁迫下紫花苜蓿细胞内  $Ca^{2+}$  浓度的积累。蛋白互作和 *LRR* 基因表达结果显示, *MsCNCG* 对干旱胁迫的响应涉及

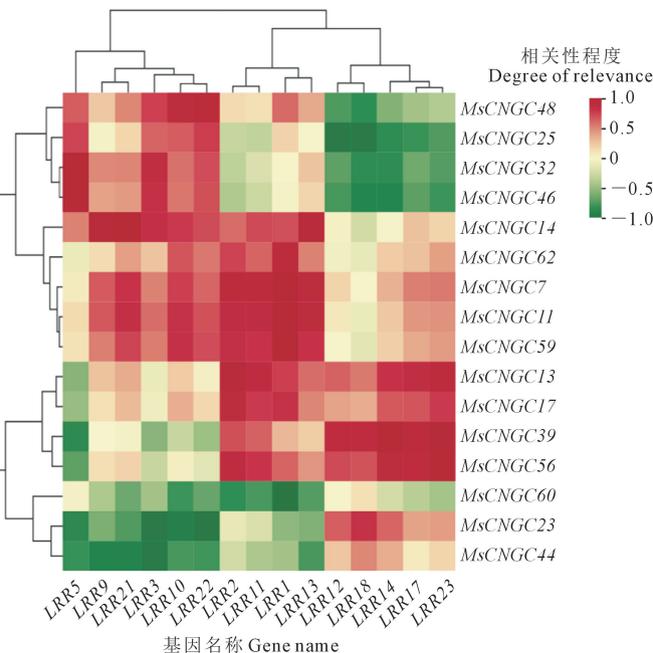
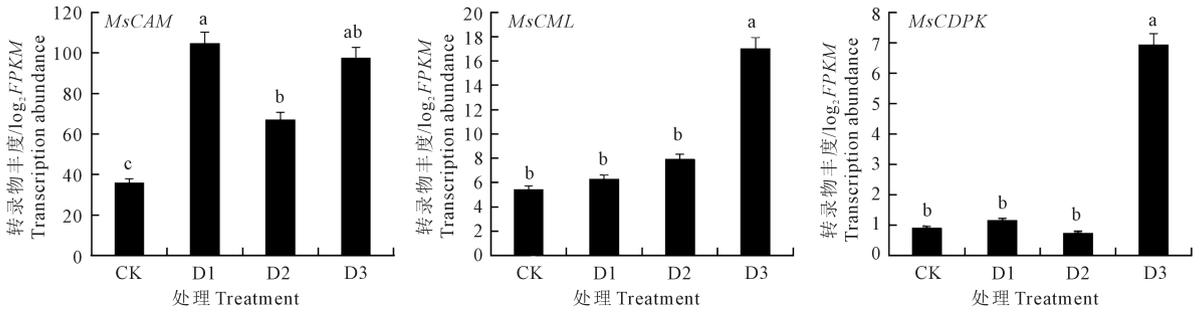


图 12 *MsLRRs* 与 *MsCNCGs* 基因表达量相关性

Fig.12 Correlation between *MsLRRs* and *MsCNCGs* gene expression levels

图 13 Ca<sup>2+</sup> 信号传导通路基因表达分析Fig.13 Analysis of gene expression in Ca<sup>2+</sup> signaling pathway

LRR 的磷酸化调控。此外,干旱胁迫下 *MsCaM*、*MsCML* 和 *MsCDPK* 基因表达水平上调,表明 Ca<sup>2+</sup> 信号转导途径参与了紫花苜蓿对于干旱胁迫的响应过程。综上,*MsCNGCs* 对干旱胁迫的响应包括转录调控和蛋白质的磷酸化调控,其在干旱胁迫下能通过参与 Ca<sup>2+</sup> 信号转导途径提高紫花苜蓿的抗旱性。

#### 参考文献:

- [1] 徐航, 何霖, 宋美琪, 等. 8 个紫花苜蓿品种在柴达木旱区的生产性能综合评价[J]. 干旱地区农业研究, 2024, 42(2): 33-40.  
XU H, HE L, SONG M Q, et al. Comprehensive evaluation of the production performance of eight alfalfa varieties in the arid area of Qaidam [J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2024, 42(2): 33-40.
- [2] FENG Y P, SHI Y, ZHAO M Y, et al. Yield and quality properties of alfalfa (*Medicago sativa* L.) and their influencing factors in China[J]. European Journal of Agronomy, 2022, 141: 126637.
- [3] 韩志顺, 郑敏娜, 梁秀芝, 等. 干旱胁迫对不同紫花苜蓿品种形态特征和生理特性的影响[J]. 中国草地学报, 2020, 42(3): 37-43.  
HAN Z S, ZHENG M N, LIANG X Z, et al. Effects of drought stress on morphological and physiological characteristics of different alfalfa cultivars[J]. Chinese Journal of Grassland, 2020, 42(3): 37-43.
- [4] 刘昊, 李显扬, 何飞, 等. 紫花苜蓿 *SAUR* 基因家族的鉴定及其在非生物胁迫中的表达模式研究[J]. 草业学报, 2024, 33(4): 135-153.  
LIU H, LI X Y, HE F, et al. Identification of the alfalfa *SAUR* gene family and its expression pattern under abiotic stress[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2024, 33(4): 135-153.
- [5] 弋钦, 魏小红, 强旭, 等. NO 介导的 Ca<sup>2+</sup> 信号在干旱胁迫下紫花苜蓿种子萌发及抗氧化酶中的传导作用研究[J]. 草业学报, 2016, 25(11): 57-65.  
YI Q, WEI X H, QIANG X, et al. Investigation into the mechanism of mo-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling during seed germination and antioxidation in *Medicago sativa* under drought stress[J]. Acta prataculturae Sinica, 2016, 25(11): 57-65.
- [6] SAFARNEJAD A. Morphological and biochemical response to osmotic stress in alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. Pakistan Journal of Botany, 2008, 40(2): 746-753.
- [7] 于波, 秦晓惠, 赵杨. 植物感应干旱信号的机制[J]. 生物技术通报, 2023, 39(11): 6-17.  
YU B, QIN X H, ZHAO Y. Mechanisms of plant sensing drought signals[J]. Biotechnology Bulletin, 2023, 39(11): 6-17.
- [8] ZHANG N N, LIN H Z, ZENG Q Y, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the cyclic nucleotide-gated ion channel (*CNGC*) gene family in *Saccharum spontaneum*[J]. BMC Genomics, 2023, 24(1): 281.
- [9] KIRUNGU J N, MAGWANGA R O, SHIRAKU M L, et al. Genome-wide identification and analysis of the *CNGC* gene family in upland cotton under multiple stress conditions[J]. Journal of Cotton Research, 2023, 6: 17.
- [10] SHI J Y, DU X G. Transcriptome analysis reveals the regulation of cyclic nucleotide-gated ion channels in response to exogenous abscisic acid and calcium treatment under drought stress in tomato[J]. Frontiers in Genetics, 2023, 14: 1139087.
- [11] LI X P, ZHANG J J, SHI H Y, et al. Rapid responses: receptor-like kinases directly regulate the functions of membrane transport proteins in plants[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2022, 64(7): 1303-1309.
- [12] WANG J C, LIU X, ZHANG A, et al. A cyclic nucleotide-gated channel mediates cytoplasmic calcium elevation and disease resistance in rice[J]. Cell Research, 2019, 29(10): 820-831.
- [13] WANG X C, WU F C, ZHANG J G, et al. Identification of the *CNGC* gene family in rice and mining of alleles for application in rice improvement[J]. Plants, 2023, 12(24): 4089.
- [14] HAO L D, QIAO X L. Genome-wide identification and analysis of the *CNGC* gene family in maize[J]. PeerJ, 2018, 6: e5816.
- [15] SAAND M A, XU Y P, LI W, et al. Cyclic nucleotide gated channel gene family in tomato: genome-wide identification and functional analyses in disease resistance [J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 303.
- [16] 刘文豪, 田琴, 余渝, 等. 陆地棉 *CNGC* 全基因组鉴定及表达分析[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(24): 49-56.  
LIU W H, TIAN Q, YU Y, et al. Genome identification and expression analysis of *CNGC* in *Gossypium hirsutum*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2021, 49(24): 49-56.
- [17] GUO J, ISLAM M A, LIN H, et al. Genome-wide identification of cyclic nucleotide-gated ion channel gene family in wheat and functional analyses of *TaCNGC14* and *TaCNGC16*[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 18.
- [18] WEI L, YU K, RUI R, et al. Identification and expression analysis of *BnaCNGC* family gene in the response to phytohormones, abiotic and biotic stresses in *Brassica napus*[J]. Journal of Plant Interactions, 2021, 16(1): 575-586.