

紫花苜蓿ADK基因家族成员鉴定与分析

王仪明 雷艳芳 徐俊山 魏臻武 魏佳 闵学阳 Identification and analysis of ADK gene family members in alfalfa (Medicago sativa) WANG Yiming, LEI Yanfang, XU Junshan, WEI Zhenwu, WEI Jia, MIN Xueyang

在线阅读 View online: https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0774

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

紫花苜蓿bZIP基因家族的鉴定、进化及表达分析

The identification, evolutionary characterization and expression analysis of the bZIP transcription factor family in Medicago sativa 草业科学. 2017, 11(8): 1635 https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2016-0520

蒺藜苜蓿PYL基因家族的全基因组鉴定、表达和功能分析

Identification and function analysis of the PYL gene family in Medicago truncatula 草业科学. 2019, 36(2): 422 https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2018-0392

蒺藜苜蓿GPAT基因家族的全基因组鉴定、序列变异和表达分析

Genome-wide identification, sequence variation, and expression of the *GPAT* gene family in *Medicago truncatula* 草业科学. 2021, 38(10): 1966 https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0040

谷子RNA干扰相关酶类基因家族的鉴定与分析

Identification and analysis of RNA interference-related enzyme gene families in *Setaria italica* 草业科学. 2021, 38(7): 1380 https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0024

紫花苜蓿响应低温胁迫转录因子的鉴定及表达分析

Identification and expression analysis of transcription factors in alfalfa under low temperature stress 草业科学. 2017, 11(9): 1824 https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2016-0552

水稻金属硫蛋白基因(rgMT)遗传转化的紫花苜蓿耐盐性分析

Salt stress tolerance analysis of rgMT gene transformed Medicago sativa 草业科学. 2018, 12(4): 829 https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2017-0321



关注微信公众号,获得更多资讯信息

DOI: 10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0774

王仪明, 雷艳芳, 徐俊山, 魏臻武, 魏佳, 闵学阳.紫花苜蓿 ADK 基因家族成员鉴定与分析. 草业科学, 2022, 39(9): 1803-1814.

WANG Y M, LEI Y F, XU J S, WEI Z W, WEI J, MIN X Y. Identification and analysis of *ADK* gene family members in alfalfa (*Medicago sativa*). Pratacultural Science, 2022, 39(9): 1803-1814.

紫花苜蓿 ADK 基因家族成员鉴定与分析

王仪明¹, 雷艳芳², 徐俊山¹, 魏臻武³, 魏 佳³, 闵学阳³

(1. 上海鼎赢农业有限公司, 上海 202178; 2. 光明食品(集团)有限公司, 上海 200040;3. 扬州大学动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009)

摘要:腺苷酸激酶 (ADK) 是广泛分布于动植物体内维持细胞能量动态平衡的关键酶,在调控植物生长发育和逆境应 答等过程中发挥重要功能。基于紫花苜蓿 (Medicago sativa) 基因组数据,在全基因组水平对 ADK 基因进行鉴定,通 过生物信息学方法分析了 MsADK 基因的理化性质、基因结构、染色体定位、顺式作用原件、系统进化关系、蛋白二 级和三级结构,以及在不同组织和非生物胁迫下的表达模式。结果表明,紫花苜蓿 MsADK 家族有 10 个成员,分布 于7条染色体上,3 对基因为片段复制;编码区序列长度 627~1515 bp,平均长度为 768 bp;外显子数目以 3~6 个 居多;蛋白表现为亲水性,亚细胞定位多样,主要位于细胞质;系统进化分析表明 MsADK 在不同物种间高度保守, 与豆科植物亲缘关系更近;顺式作用元件的预测结果表明,MsADK 启动子区存在许多与激素、胁迫和光响应有关的 反应元件。在不同组织和非生物胁迫下的表达模式表明,MsADK 基因在茎中的表达丰度更高;在脱落酸 (ABA)、干 旱和盐胁迫条件下,除 MsADK1、MsADK3 和 MsADK8 上调表达外,其余基因随着胁迫时间的延长均下调表达。但是 在低温胁迫下,除 MsADK2、MsADK5 下调表达外,其他成员均上调表达。研究结果表明,MsADK 基因和理论依据。 关键词: ADK 基因;生物信息学;基因复制;系统进化;生长发育;表达模式;非生物胁迫

文献标志码: A 文章编号: 1001-0629(2022)09-1803-12

Identification and analysis of ADK gene family members in alfalfa (Medicago sativa)

WANG Yiming¹, LEI Yanfang², XU Junshan¹, WEI Zhenwu³, WEI Jia³, MIN Xueyang³

(1. Dingying Agriculture Co., Ltd., Shanghai 202178, China; 2. Bright Food (Group) Co, Ltd., Shanghai 200040, China;

3. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University; Institute of Pratacultural

Science, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China)

Abstract: Adenylate Kinase (ADK) is a key enzyme widely distributed in animals and plants that maintains the dynamic balance of cell energy. It plays an important role in growth and stress response. We identified *MsADK* genes at a genome-wide level based on the alfalfa genome data. Bioinformatics methods were used to analyze the physical and chemical properties, gene structure, chromosome location, promoter *cis*-acting, phylogenetic relationship, and secondary and tertiary structure of *MsADK*. Furthermore, *MsADK* gene expression in different tissues and its response to abiotic stress was analyzed. Ten members of the *MsADK* gene family were identified in alfalfa and distributed on seven chromosomes; three of these pairs were segmental duplication. The coding regions were between 627 and 1515 bp, with an average length of

通信作者: 闵学阳 (1991-), 男, 甘肃张掖人, 讲师, 博士, 研究方向为草种质资源与育种。E-mail: minxy@yzu.edu.cn

收稿日期: 2021-12-25 接受日期: 2022-03-17

基金项目:上海市科技兴农项目(沪农科推字(2020)第1-2号);江苏省高等学校自然科学研究项目(22KJB230011);江苏省博士后科研资助计划项目(2021K197B)

第一作者: 王仪明 (1980-), 男, 甘肃天水人, 硕士, 研究方向为牧草种质资源评价与利用。E-mail: wangyiming1129@aliyun.com

768 bp. The number of exons was mostly between three and six. MMsADK protein is hydrophilic, and its subcellular location is diverse, mainly located in the cytoplasm. Phylogenetic analysis showed that MsADK is highly conserved among different species and has a close relationship with legumes. The prediction results of *cis*-acting elements showed that MsADK promoter regions had many response elements related to hormones, stress, and light. Analysis of MsADK expression pattern in different tissues and under abiotic stress revealed that MsADK expression was higher in stems than in other parts. MsADK1, MsADK3, and MsADK8 were up-regulated under ABA, drought, and salt stress conditions, whereas the remaining MsADK genes were down-regulated. MsADK2 and MsADK5 were down-regulated, while all other MsADK genes were up-regulated under low-temperature stress. Results also showed that MsADK has two regulatory patterns (positive or negative) under different stress conditions. These results will provide candidate genes and a theoretical basis for the genetic improvement of alfalfa based on the ADK gene.

Keywords: *ADK* gene; bioinformatics; gene duplication; phylogenesis; growth and development; expression analysis; abiotic stress

Corresponding author: MIN Xueyang E-mail: minxy@yzu.edu.cn

腺苷酸代谢不仅是生命活动中初级代谢的 重要组成部分,也是影响细胞代谢的主要因素之 一。核酸代谢库前体分子单磷酸腺苷 (adenosine monophosphate, AMP) 是构成细胞核糖核酸的主要 单核苷酸之一, AMP 的形成通常伴随着生物体内能 量的释放。AMP、能量分子二磷酸腺苷 (adenosine diphosphate, ADP) 和糖类代谢库前体三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 3 种形式的比例决定了 能量电荷比和碳水化合物代谢,进而直接影响植物 的生长发育和对外界不良环境的适应性[1-2]。腺苷 酸激酶 (adenylate kinase, ADK, EC 2.7.4.3) 是维持能 量代谢和各种腺苷酸库大小平衡的单体磷酸转移 酶, 催化 ATP + AMP ↔ 2ADP 的可逆转磷酸化反 应^[3-4]。在植物线粒体中, ADK 的活性将会显著影响 细胞质和质体中游离态与结合态镁离子在腺苷酸 库中的代谢平衡。

通常, ADK蛋白由一个AMP结构域, 一个ATP 结构域和一个相对保守的核心结构域 (CORE)组 成^[5]。研究表明, ADK 在动植物中高度保守, 其活 性己在拟南芥 (Arabidopsis thaliana)、水稻 (Oryza sativa)、玉米 (Zea mays)、豌豆 (Pisum sativum)、马铃 薯 (Solanum tuberosum)等植物中得到证实, 而 ADK 的亚细胞定位在不同植物中差异很大, 如在细 胞质、线粒体、细胞核、质体中等均有报道^[6-10]。在 拟南芥中,鉴定到一个重要的茎生长调控因子 AAK6, T-DNA 插入纯合突变体 (Salk_015281) 与野 生型植株相比, 突变体茎的生长减缓^[11]; 拟南芥 ADK (At2g37250) 基因的 T-DNA 插入纯合突变体, 表现出氨基酸含量提高和根生长增强的特性[12]; 另一项相关研究表明, 拟南芥 ADK (At5g47840) 基 因的 T-DNA 插入纯合突变体, 植株叶绿体完整 性丧失,从而导致早期胚胎到幼苗发育过程中出现 白化苗,表明ADK基因在拟南芥的生长发育过程中 发挥重要调控作用^[13]。在马铃薯中的研究表明,沉 默 StADK 基因的表达后,转基因植株的腺苷酸含量 和淀粉含量得到显着提高^[14]。此外, ADK3 可以与 叶绿体 3-磷酸甘油醛脱氢酶相互作用,在绿藻 (*Chlorophyta*)的叶绿体中形成稳定的复合物^[15]。 除了在调控植物生长和发育方面发挥重要功能, ADK 还广泛参与植物对非生物胁迫的应激反应。以 豌豆种子为模型,研究了种子脱水吸水过程中腺苷 酸的平衡情况,结果表明 ADK 的活性在保持种子干 燥和成熟过程中腺苷酸的平衡中发挥关键作用^[16]。 大豆 (Glycine max) GmADK 基因受到盐胁迫后,在耐 盐品种中的表达高于盐敏感性品种,推测大豆 GmADK基因参与盐胁迫的应答^[17]。然而在番茄 (Solanum lycopersicum)中,基因的微阵列分析显示, ADK 同源基因 (SGN-U214214) 在盐处理的番茄组织 中表达受到抑制,在耐旱番茄品种中,ADK基因 (SGN-U232826)的表达受到干旱胁迫的诱导^[18]。目 前,已在拟南芥、番茄和水稻中分别鉴定到7、10和 11个 ADK 基因,不同成员间的亚细胞定位,表达模 式存在差异,具体的生理功能还需进一步研究[19-20]。 虽然 ADK 基因在生物体能量代谢中发挥重要功能, 但是在豆科牧草中的研究尚未见报道。

紫花苜蓿 (Medicago sativa) 是奶牛等草食动物

的重要优质饲草,素有"牧草之王"的美誉^[21]。近年 来,国家实施振兴奶业苜蓿发展行动,有力促进了 苜蓿产业的发展。尽管已在其他植物中鉴定、分析 了 *ADK* 基因家族,但是紫花苜蓿 *ADK* 基因的功能 仍有待进一步阐明。在本研究中,利用生物信息学 方法从紫花苜蓿基因组中鉴定了 *ADK* 基因,并分析 了序列特征、基因结构、染色体定位、进化关系、顺 式作用元件,以及 *ADK* 基因在不同组织和非生物胁 迫下[干旱、低温、盐和脱落酸 (abscisic acid, ABA)] 的表达模式。研究结果将为进一步研究 *MsADK* 家 族的功能和调控机制提供有用信息。

1 材料与方法

1.1 紫花苜蓿 ADK 基因家族鉴定

紫花苜蓿基因组序列、蛋白质序列、CDS 序列, 以及 gff 文件下载自 figshare 数据库 (https://figshare. com/projects/whole_genome_sequencing_and_assembly_ of_Medicago_sativa/66380)。ADK 蛋白的保守结构域 序列 (PF00406) 下载自 pfam 数据库 (http://pfam.xfam. org/),在 bio-linux 系统下通过"Hmmsearch"命令 鉴定紫花苜蓿 *ADK* 家族成员,并在 CDD 数据库 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/)进一步验证是否 含有 ADK 蛋白的保守结构域。最后,利用 CD-HIT (http://weizhong-lab.ucsd.edu/cd-hit/)软件去除冗余序 列,序列特征参数为 98%。

1.2 紫花苜蓿 ADK 蛋白质理化性质, 亚细胞定 位, 二级和三级结构预测分析

利用在线工具 ProtParam (https://web.expasy.org/ protparam/)预测 MsADK 蛋白质的氨基酸数、分子 量、等电点、疏水性指数、稳定指数等理化性质。 在WoLFPSORTII 网站(https://www.genscript.com/wolfpsort.html)预测 MsADK 蛋白成员的亚细胞定位。通 过在线工具 SOMPA (https://prabi.ibcp.fr/htm/site/web/ home)预测 MsADK 蛋白质二级结构, SWISS-MODE (https://swissmodel.expasy.org/)预测 MsADK 蛋白质 三级结构。

1.3 紫花苜蓿 ADK 基因系统进化树分析

利用 MEGA 7 软件构建 34 个 ADK 蛋白序列的 系统进化树,包括紫花苜蓿 (10 个 MsADK)、拟南芥 (7 个 AtADK)、蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*, 7 个 MtADK) 和水稻 (10个 OsADK)。采用最大似然法 (maximum likelihood estimate, MLE),步长值 (bootstrap values) 为1000次,其他参数设置默认。

1.4 紫花苜蓿 ADK 基因结构、保守基序和顺式 作用原件分析

GSDS 2.0 (http://gsds.gao-lab.org/index.php) 工具 用于分析 *MsADK* 成员的基因结构。MEME (https:// meme-suite.org/meme/tools/meme) 用于预测蛋白的保 守基序, 保守基序数为 10, 其他参数默认。PlantCARE (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/ html/) 工具用于启动子序列 (2.0 kb) 顺式作用原件 分析,并通过 TBtools 工具进行可视化分析^[22]。

1.5 紫花苜蓿 ADK 基因共线性和染色体定位分析

在 Phytozome 13 (https://phytozome-next.jgi.doe. gov/)网站分别下载拟南芥、蒺藜苜蓿以及大豆的全 基因组序列和 gff 文件,利用 TBtools 工具对 MsADK 基因成员进行共线性、基因重复事件和染色体定位 分析,并实现结果的可视化。

1.6 紫花苜蓿 ADK 基因的表达模式分析

利用 BLAST 比对工具在 Alfalfa Breeder's Toolbox (https://www.alfalfatoolbox.org/)数据库鉴定 MsADK 最匹配的转录本序列,得到 MsADK 基因分别在紫 花苜蓿和黄花苜蓿中不同组织的表达量^[23]。通过本 地 BLAST 程序检索紫花苜蓿'中苜 1号'的转录本 序列,获取 MsADK 基因分别在干旱、低温、ABA 以 及盐胁迫下的表达模式^[24-26],并利用 TBtools 工具绘 制热图。

2 结果与分析

2.1 紫花苜蓿 ADK 基因家族成员信息

紫花苜蓿基因组中共鉴定到 10 个 MsADK基因,并按照染色体上排序命名为 MsADK1-MsADK10 (表 1)。MsADK蛋白的平均长度为 273.4 aa,其中MsADK2最长 (504 aa),其余序列的长度均在 250 aa 左右。MsADK蛋白的平均分子量 30.5 kDa,其中MsADK2 的分子量最大为 56.8 kDa,其余蛋白均小于 31 kDa;蛋白质理论等电点介于 5.46 (MsADK10)~9.33 (MsADK8)。MsADK蛋白的疏水性指数 (GRAVY)的平均值为-0.31,均小于 0,表明 MsADK为亲水性

Table 1 Information of ADK gene family in Medicago sativa												
基因 名称 Gene Name	基因号 Gene ID	染色体 Chr. No	蛋白 长度 Amino acids length/aa	cDNA 长度 cDNA length/bp	蛋白质 分子量 Protein molecular weight/kDa	等电 点 pI	疏水性 指数 Protein GRAVY	亚细胞 定位 Subcellular localization	蛋白稳定 指数 Instability index	拟南芥 同源基因 Homologous gene of <i>Arabidopsis</i>		
MsADK1	MS.gene029884.t1	chr1.4	280	843	30.75	6.67	-0.164	叶绿体 Chloroplast	44.68	AT2G37250.1		
MsADK2	MS.gene81523.t1	chr2.2	504	1515	56.79	6.41	-0.382	细胞质 Cytoplasmic	42.45	AT5G35170.1		
MsADK3	MS.gene045674.t1	chr4.3	244	735	27.71	8.64	-0.312	叶绿体 Chloroplast	49.23	AT4G25280.2		
MsADK4	MS.gene77729.t1	chr4.4	242	729	27.52	7.29	-0.324	过氧化体 Peroxisomal	52.32	AT4G25280.2		
MsADK5	MS.gene97107.t1	chr4.4	234	705	26.11	6.53	-0.311	细胞质 Cytoplasmic	35.63	AT5G47840.1		
MsADK6	MS.gene060445.t1	chr7.1	265	798	29.90	6.80	-0.448	细胞核 Nuclear	50.29	AT3G01820.1		
MsADK7	MS.gene007478.t1	chr7.1	268	807	219.28	7.39	-0.206	线粒体 Mitochondrial	53.86	AT2G37250.1		
MsADK8	MS.gene09796.t1	chr7.3	246	738	27.04	9.33	-0.150	线粒体 Mitochondrial	48.54	AT2G37250.1		
MsADK9	MS.gene011389.t1	chr8.3	243	732	26.67	7.97	-0.326	细胞质 Cytoplasmic	35.91	AT5G63400.1		
MsADK10	MS.gene39664.t1	chr8.3	208	627	23.15	5.46	-0.466	细胞质 Cytoplasmic	43.44	AT5G26667.4		

表1 紫花苜蓿 ADK 基因家族信息 Table 1 Information of ADK gene family in Medicago sative

pI: 等电点; GRAVY: 疏水性指数。

pI: isoelectric; GRAVY: grand average of hydropathicity.

蛋白。亚细胞定位预测表明, MsADK2、MsADK5、 MsADK9和 MsADK10定位于细胞质; MsADK1和 MsADK3定位于叶绿体; MsADK7和 MsADK8定位 于线粒体; MsADK4定位于过氧化体; MsADK6 定位于细胞核。除 MsADK9(II = 35.91)蛋白的稳 定指数小于 40,表现为蛋白稳定外,其余 MsADK 蛋白均表现为不稳定。与拟南芥基因组序列进行 BLAST 比对,结果表明, MsADK包含了拟南芥中全 部的 ADK 同源基因。

2.2 紫花苜蓿 ADK 家族成员系统进化分析

*MsADK*与拟南芥(双子叶)、水稻(单子叶)、蒺 藜苜蓿(豆科)*ADK*的进化关系表明,10个*MsADK* 被划分为5个(Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、V)亚家族(图1)。每 个亚家族均包含上述4个物种的*ADK*成员,表明 *ADK*在不同物种间高度保守,在单双子叶物种分离 前就已存在。MsADK蛋白与蒺藜苜蓿ADK蛋白高度同源,拟南芥次之,水稻最远。紫花苜蓿MsADK数目大于蒺藜苜蓿,其中MsADK6和MsADK10被划分为单独的分枝,说明ADK在紫花苜蓿中更为复杂。在I亚家族中包含MsADK1、MsADK7和MsADK8;在II亚家族中包含MsADK2和MsADK5两个成员;在II亚家族中包含MsADK9;在IV亚家族中包含MsADK3、MsADK4和MsADK10;在V亚家族中包含MsADK6一个成员。

2.3 紫花苜蓿 ADK 保守基序和基因结构分析

依据 MsADK 基因的进化距离进行基因结构和 保守基序分析 (图 2),结果表明,MsADK 蛋白的 10 个基序 (Motif 1~Motif 10)在不同亚家族中分布 具有差异,每个基因都含有 4~7个保守基序不等。 MsADK 蛋白均含有 Motif 1 和 Motif 3 两个基序,表



图 1 紫花苜蓿、蒺藜苜蓿、拟南芥和水稻 ADK 蛋白的系统进化分析

Figure 1 Phylogenetic tree of *ADK* genes from *Medicago sativa*, *M. truncatula*, *Arabidopsis thaliana*, and *Oryza sativa* 图中正方形、三角形、圆形和菱形分别代表紫花苜蓿、水稻、蒺藜苜蓿和拟南芥。

Squares, triangles, circles and diamonds represent Medicago sativa, Oryza sativa, M. truncatula, and, Arabidopsis thaliana, respectively.

明这两个基序是 MsADK家族的核心组成。Motif 4和 Motif 7 仅在 I 和 V 亚家族中存在; Motif 9 仅 在 II 和 III 亚家族中存在; Motif 8 仅在 IV 和 V 亚家族 中存在;不同亚家族特定的基序可能决定了 MsADK 基因的功能多样性。MsADK 基因的外显 子一内含子结构图表明 (图 2B),各成员间外显子数 目 4~18 个,以 3~6 个居多 (60%), MsADK2 基因序 列最长,含外显子数目最多为 18 个。

2.4 紫花苜蓿 MsADK 基因染色体定位和共线性 分析

对 10 个 MsADK 基因进行染色体定位分析,家 族成员随机的分布在 32 条同源染色体中的 7 条上 (图 3)。大多数 MsADK 基因位于染色体的近端或远 端, chr4.4、chr7.1和 chr8.3染色体上均有两个 MsADK 基因; chr1.4、chr2.2、chr4.3和 chr7.3染色体上均只 有1个 MsADK 基因。对 MsADK 基因进行共线性分 析,基因对 MsADK1/MsADK7、MsADK3/MsADK4和 MsADK7/MsADK8 之间存在共线性关系,并被划分 到同一亚类,推断上述3对基因是经过全基因组复 制而形成的。

为了进一步推断 ADK 基因成员的系统发育机制, 分别构建了 MsADK 基因与拟南芥、水稻、蒺藜苜蓿 和大豆 4 个代表性物种的比较共线性图谱,其中 MsADK 基因和水稻基因间不存在共线性关系 (图 4)。 紫花苜蓿和大豆,蒺藜苜蓿都属于豆科植物,同源 性更近。MsADK 基因与 21 个大豆间存在共线性关系







图 3 MsADK 基因的染色体上的分布 Figure 3 Chromosomal location of MsADK genes

chr No: 染色体; 图 4 同。蓝色连线表示 *MsADK* 基因复制事件。 chr No: chromosome; this is applicable for Table 4 as well. The blue lines indicate duplicated gene pairs of *MsADK*.

(MsADK7/Glyma.03G176800/Glyma.10G048200/Glyma. 13G136000/Glyma.19G177500、MsADK1/Glyma.10G0 48200/Glyma.03G176800/Glyma.13G136000/Glyma.19 G177500、MsADK3/Glyma.12G004200/Glyma.09G232 300、MsADK6/Glyma.19G088000/Glyma.16G059400、 MsADK8/Glyma.10G048200/Glyma.03G176800/Glyma. 13G136000/Glyma.19G177500、MsADK4/Glyma.09G23 2300/Glyma.12G004200、MsADK2/Glyma.15G203100/ Glyma.09G096800、MsADK5/Glyma.09G234300); 10 个 MsADK 基因与蒺藜苜蓿间存在共线性关系 (MsADK7/ Medtr7g100530/Medtr1g067050、MsADK1/Medtr7g100 530/Medtr1g067050、MsADK3/Medtr4g035850、MsAD K8/Medtr7g100530/Medtr1g067050、MsADK4/Medtr4g 035850、MsADK2/Medtr2g461290、和MsADK5/Medtr4g 035170); 5个MsADK 基因与拟南芥基因存在共线性 关系(MsADK1/AT2G37250/AT2G37250、MsADK6/ AT3G01820、MsADK8/AT2G37250、MsADK7/AT2G3 7250)。

2.5 紫花苜蓿 ADK 基因启动子顺式作用元件分析

MsADK 基因顺式作用元件预测分析结果显示 (图 5), 上游 2.0 kb 的启动子序列中含有大量与激素 和生长发育(如植物激素、非生物胁迫、光照、生理 生长等)有关的作用元件,但是成员间含有的顺式 元件的类型和数量均有所差异。其中 MsADKI 和 MsADK6所含元件种类最多为10种。所有 MsADK 家族成员的启动子序列中都含有与植物激素相关 的元件,如 MsADK1、MsADK2、MsADK6、MsADK7、 MsADK8含有生长素 (TGA-element、TGA-box) 响应 元件; MsADK2、MsADK3、MsADK4、MsADK5、MsADK6、 MsADK7、MsADK8 含有赤霉素 (P-box、TATC-box、 GARE-motif) 响应元件; MsADK1、MsADK3、MsADK4、 MsADK5、MsADK7、MsADK8、MsADK9 含有脱落酸 (abscisic acid responsiveness, ABRE)响应元件; MsADK1、MsADK3、MsADK4、MsADK6含有水杨酸 (salicylic acid responsiveness, SARE 和 TCA-element) 响应元件; MsADK1、MsADK2、MsADK3、MsADK5、 MsADK6、MsADK10含有茉莉酸 (CGTCA-motif 和 TGACG-motif)响应元件。响应胁迫相关作用元件





红线代表 MsADK 基因和其他植物基因组内的共线性关系。

The red lines highlight the syntenic of MsADK genes with other plant genomes.



图 5 *MsADK* 基因的启动子序列顺式作用元件分析 Figure 5 The promoter *cis*-acting analysis of *MsADK* genes

在 MsADK 家族中同样分布比较广泛,所有基因均 含有厌氧诱导元件 (anaerobic induction, ARE) 和光 响应元件 (AAAC-motif、ACE、AE-box、AT1-motif、 ATC-motif、ATCT-motif、Box 4、chs-CMA1a、chs-CMA2a、GA-motif、Gap-box、GATA-motif、G-box、 GT1-motif、GTGGC-motif、I-box、LAMP-element、 MRE、TCCC-motif、TCT-motif), MsADK6、MsADK9、 *MsADK10* 含有防御与应激响应元件 (TC-rich repeats), *MsADK1、MsADK2、MsADK3、MsADK4、MsADK9、 MsADK10* 含有干旱诱导元件 (MYB binding site involved in drought-inducibility, MBS); *MsADK1、 MsADK2、MsADK4、MsADK6*含有低温响应元件 (low temperature responsiveness, LTR);此外,启动子 区域还有与生长发育和合成代谢相关的作用元件, 如昼夜节律调控 (Circadian)、黄酮生物合成 (MYB binding site involved in flavonoid biosynthesis, MBSI)、分生组织表达 (GCN4_motif) 和根特异性 (Motif I) 等,表明 *MsADK* 同样在紫花苜蓿的生长发育过程中发挥重要功能。

2.6 MsADK 蛋白二级、三级结构预测

蛋白质结构的变化将会直接影响其功能的改 变, SOMPA 预测结果显示, MsADK 蛋白的蛋白二 级结构以α-螺旋和无规则卷曲为主, β-转角和延伸 链所占比例较低。蛋白质的α-螺旋占 37.40%~ 53.72%, 平均值为 46.43%; 无规则卷曲占 27.35%~ 45.93%, 平均值为 33.89%; 延伸链占 10.71%~ 12.98%, 平均值为 11.84%; β-转角绝大多数低于 10%, 介于 5.69%~10.29%, 平均值为 8.24% (表 2)。 推测 MsADK 蛋白序列的二级结构中, α-螺旋和无 规则卷曲起主要作用。

研究表明,不同种属 ADK 蛋白的三维结构具 有相同的,由 α/β 折叠构成的"三明治"状结构。利 用 SWISS-MODEL 在线工具预测 MsADK 蛋白的三 级结构, MsADK 蛋白都含有 α-螺旋、β-折叠、无规 则卷曲等空间构象, MsADK6 和 MsADK7 构象最为 接近,其余同成员间结构具有差异性 (图 6)。另外, 各 MsADK 成员含有的螺旋-转角-螺旋 (HTH) 数目 存在差异。

2.7 紫花苜蓿 ADK 基因在不同组织和非生物胁 迫下的表达分析

分析了 MsADK 基因在紫花苜蓿和黄花苜蓿不 同组织中的表达量, MsADK 基因在两个品种间具有 相同的表达模式(图7)。MsADK1、MsADK3、MsADK7 基因在不同组织间的表达量一致。MsADK5、 MsADK8、MsADK9 基因在所有组织中均有较高的 表达水平,尤其在根瘤中高表达。MsADK2 的表达 具有组织特异性,在根瘤和根中均不表达,而在叶 片中的表达量最高。同样, MsADK6 在地上组织中的 表达量要显著的高于地下组织。MsADK4 和 MsADK10 则在茎中的表达量高于其他组织。表明 MsADK 基 因在调节紫花苜蓿生长发育中发挥不同的作用。

为了进一步解析 MsADK 基因在不同非生物胁 迫的潜在功能,分析了它们分别在 ABA、干旱、低温 和盐胁迫下的转录表达谱(图 8)。用 ABA 处理紫花 苜蓿 3 h后,除 MsADK1 和 MsADK8 在 12 h表达量 增加,剩余 MsADKs 基因的表达量在各处理时间段 均明显下调。同样,在干旱和盐胁迫下, MsADK4、 MsADK6、MsADK7、MsADK9 和 MADKs10的表达在 处理早期(干旱胁迫:1~6 h;盐胁迫:0.5~1 h)和对 照保持相对一致的表达量,但随着处理时间的延长, 上述 5 个基因明显下调。在两种渗透胁迫下, MsADK1、 MsADK3 和 MsADK8 随着处理时间的增加,均出现

其田夕称	<i>α</i> -螺旋	α-helix	<i>β</i> -转角	β-turn	无规则卷曲	Random coil	延伸链 Extended chain	
基因石标 Gene name	数量 Number	占比 Ratio/%	数量 Number	占比 Ratio/%	数量 Number	占比 Ratio/%	数量 Number	占比 Ratio/%
MsADK1	125	44.64	27	9.64	98	35.00	30	10.71
MsADK2	213	46.26	41	8.13	180	35.71	70	13.89
MsADK3	113	46.31	16	6.56	84	34.43	31	12.70
MsADK4	130	53.72	18	7.44	67	27.69	27	11.16
MsADK5	121	51.71	21	8.97	64	27.35	28	11.97
MsADK6	134	50.57	21	7.92	79	29.81	31	11.70
MsADK7	111	41.42	23	8.58	105	39.18	29	10.82
MsADK8	92	37.40	14	5.69	113	45.93	27	10.98
MsADK9	111	45.68	25	10.29	79	32.51	28	11.52
MsADK10	97	46.63	19	9.13	65	31.25	27	12.98
平均值 Mean	124.7	46.43	22.5	8.24	93.4	33.89	32.8	11.84

表 2 MsADK 蛋白二级结构 Table 2 Secondary structure of MsADK proteins



图 6 MsADK 蛋白三级结构 Figure 6 Tertiary structure of MsADK proteins





了不同程度的上调表达,其中 MsADK1 和 MsADK8 对胁迫的反应更为敏感。值得注意的是,低温胁迫 下 MsADK 基因表现出了不同于其他非生物胁迫的 表达模式,除了 MsADK2、MsADK5 下调表达外,其 余基因从 6 h 开始,出现不同程度的上调表达。

3 讨论

腺苷酸类化合物在生物体内的含量变化被认为是引起细胞能量代谢的主要因素,其中腺苷酸激酶是生成 ADP 和平衡磷酸化反应的关键酶,在细胞质、线粒体和叶绿体等细胞器中均有分布^[20,27]。研究表明 ADK 基因的转录表达,将直接影响腺苷代谢库容大小。目前已从大豆、甘薯 (Dioscorea esculenta)、番茄等多种植物种中克隆了 ADK 基

因。然而,尚未在紫花苜蓿中对 ADK 基因家族进 行全基因组水平的鉴定与分析。在紫花苜蓿、拟南 芥、水稻、蒺藜苜蓿、番茄和马铃薯中分别鉴定到 10、7、10、7、11 和 12 个 ADK 基因,不同物种间 ADK 基因的数目接近,表明 ADK 基因在物种间高度保 守,与物种基因组大小无关。用拟南芥、水稻、蒺 藜苜蓿和紫花苜蓿的 ADK 蛋白构建系统进化树, 将 34 个 ADK 蛋白划分为 5 个亚家族,每个亚家族 均包含了上述 4 个物种的 ADK 蛋白。蒺藜苜蓿和 紫花苜蓿间表现出了高度的同源性,且每个紫花 苜蓿的 ADK 蛋白都有一个高度同源的蒺藜苜蓿蛋 白。此外,单双子叶植物间无明显的分离,表明 ADK 蛋白在单双子叶植物分化之前就已存在。紫 Lower temperature

2

0

低温





0

0.5

3

处理时间

1

12

24

6

湖

体、线粒体、细胞质、细胞核等细胞器中均有分 布,主要位于细胞质中(40%),与番茄和木薯(Manihot esculenta)中主要定位于线粒体中的研究结果不 同^[14, 20]。基序分析显示 Motif 1 和 Motif 3 在所有 MsADK 蛋白序列中都含有, 但是不同亚家族成员 间含有特异的基序。同样,聚类到相同亚家族成员 的外显子数目接近, 推测 MsADK 成员间可能存在 功能差异。

24 48

6

处理时间

MsADK7

MsADK9

非生物胁迫是影响全球农作物产量的主要原 因,每年约有50%的作物减产是由非生物胁迫造成 的。ADK除了直接影响能量代谢外,还影响植物的 其他方面,包括生长、发育、开花、抗逆等^[11,27]。研 究表明 ADK 基因的下调将会导致腺苷酸库积累增 加,进而影响亚细胞的氧化还原状态,并刺激 AGPase (淀粉合成的关键酶)的二硫键断裂,将其从 非活性形式转化为活性形式^[28-29]。拟南芥细胞核定 位的 AAK6 基因调控茎的生长速度^[11]:马铃薯质体 中的 ADK 基因下调表达, 使淀粉的积累量增加 60%^[14]。紫花苜蓿 MsADK 基因在不同组织中均 有表达,茎中的表达量普遍高于其他组织,其中 MsADK5、MsADK8 和 MsADK9 在根瘤中高度表达, 表明 MsADK 基因在调控紫花苜蓿地上和地下组织 的生长发育中均发挥重要功能。

通过分析 ADK 在干旱、盐、ABA 和低温胁迫下 的表达模式, MsADK1 和 MsADK8 在所有非生物胁 迫下具有明显的上调表达外,多数 MsADK 基因在 干旱、盐和 ABA 胁迫下与低温胁迫呈现相反的表 达模式,如 MsADK4, MsADK7, MsADK9 和 MsADK10 等在干旱、盐和 ABA 胁迫中下调表达, 但是在低温 胁迫下上调表达。MsADK 基因与大豆间的共线性 关系最强,有研究分析了耐盐(南农 1138-2)和盐敏 感(科丰1号)品种在盐胁迫下 GmADK 基因的表达 模式,结果表明 GmADK 基因在盐敏感品种中表达 量降低,而在耐盐品种中升高^[17]。在番茄的研究中 表明,大多数 SlADK 基因受干旱诱导上调表达^[20]。 非生物胁迫下, ADK 基因在不同物种间的表达模式 存在差异,具有正向和负向两种调控机制,推测可 能与选择的研究材料和胁迫类型有关,精确的调控 机理还有待进一步深入研究。

MsADK7

MsADK9

4 结论

本研究在全基因组水平鉴定了紫花苜蓿 ADK 基因家族,并对其理化性质、基因结构、进化关系、 顺式作用元件等进行分析。在此基础上,对其不同 组织和不同非生物胁迫下的表达模式进行分析,在 不同胁迫类型下 ADK 基因表现出正、负两种调控 机制。MsADK 基因在进化过程中高度保守性,参与 调控紫花苜蓿生长发育和逆境胁迫响应,本研究对 于 MsADK 成员功能验证,将为紫花苜蓿基于基因 工程的遗传改良提供一定基础。

参考文献 References:

- [1] REGIERER B, FERNIE A R, SPRINGER F, PEREZ-MELIS A, LEISSE A, KOEHL K, WILLMITZER L, GEIGENBERGER P, KOSSMANN J. Starch content and yield increase as a result of altering adenylate pools in transgenic plants. Nature Biotechnology, 2002, 20(12): 1256-1260.
- [2] LANGE P R, GESERICK C, TISCHENDORF G, ZRENNER R. Functions of chloroplastic adenylate kinases in *Arabidopsis*. Plant Physiology, 2007, 146(2): 323-324.
- [3] CHING T M, CRANE J M, STAMP D L. Adenylate energy pool and energy charge in maturing rape seeds. Plant Physiology, 1974, 54(5): 748-751.
- [4] RAYMOND P, PRADET A. Stabilization of adenine nucleotide ratios at various values by an oxygen limitation of respiration in germinating lettuce (*Lactuca sativa*) seeds. Biochemical Journal, 1980, 190(1): 39-44.
- [5] 叶纯. 分子动力学模拟研究腺苷酸激酶催化循环及 PLA₁ 脂肪酶底物识别机制. 合肥: 中国科学技术大学博士学位论文, 2019.
 YE C. Molecular dynamics simulation studies on the adenylate kinase catalytic cycle and the substrate recognition mechanism of lipase PLA₁. PhD Thesis. Hefei: University of Science and Technology of China, 2019.
- [6] BIRKENHEAD K, WALKER D, FOYER C. The intracellular distribution of adenylate kinase in the leaves of spinach, wheat and barley. Planta, 1982, 156(2): 171-175.
- [7] THIEULIN-PARDO G, SCHRAMM A, LIGNON S, LEBRUN R, KOJADINOVIC M, GONTERO B. The intriguing CP12-like tail of adenylate kinase 3 from chlamydomonas reinhardtii. FEBS Journal, 2016, 283(18): 3389-3407.
- [8] 曾令江,陈敏,潘夕春,张启堂,廖志华. 马铃薯腺苷酸激酶基因的克隆分析及其植物表达载体的构建. 生物技术通讯, 2007, 18(3): 405-408.
 ZENG L J, CHEN M, PAN X C, ZHANG Q T, LIAO Z H. Cloning, characterization and constructing of plant expression vector of adenylate kinase gene from potato. Letters in Biotechnology, 2007, 18(3): 405-408.
- [9] HAMPP R D, GOLLER M, ZIEGLER H. Adenylate levels, energy charge, and phosphorylation potential during dark-light and light-dark transition in chloroplasts, mitochondria, and cytosol of mesophyll protoplasts from *Avena sativa* L. Plant Physiology, 1982, 69(2): 448-455.
- [10] KAWAI M, UCHIMIYA H. Biochemical properties of rice adenylate kinase and subcellular location in plant cells. Plant Molecular Biology, 1995, 27(5): 943-951.
- [11] FENG X, YANG R, ZHENG X, ZHANG F. Identification of a novel nuclear-localized adenylate kinase 6 from *Arabidopsis thaliana* as an essential stem growth factor. Plant Physiology and Biochemistry, 2012, 61: 180-186.
- [12] CARRARI F, COLL-GARCIA D, SCHAUER N, LYTOVCHENKO A, PALACIOS-ROJAS N, BALBO I, ROSSO M, FERNIE A R. Deficiency of a plastidial adenylate kinase in *Arabidopsis* results in elevated photosynthetic amino acid biosynthesis and enhanced growth. Plant Physiology, 2005, 137(1): 70-82.
- [13] LANGE PR, GESERICK C, TISCHENDORF G, ZRENNER R. Functions of chloroplastic adenylate kinases in Arabidopsis. Plant Physiology, 2008, 146(2): 492-504.
- [14] BOONRUENG C, TANGPRANOMKORN S, YAZHISAI U, SIRIKANTARAMAS S. Molecular cloning, subcellular localization and characterization of two adenylate kinases from cassava, *Manihot esculenta* Crantz cv. KU50. Journal of Plant Physiology, 2016, 204: 66-73.
- [15] ZHANG Y, LAUNAY H, LIU F, LEBRUN R, GONTERO B. Interaction between adenylate kinase 3 and glyceraldehyde-3phosphate dehydrogenase from *Chlamydomonas reinhardtii*. FEBS Journal, 2018, 285(13): 2495-2503.
- [16] RAVENEAU M-P, BENAMAR A, MACHEREL D. Water content, adenylate kinase, and mitochondria drive adenylate balance in dehydrating and imbibing seeds. Journal of Experimental Botany, 2017, 68(13): 3501-3512.
- [17] 盖江涛,赵团结,李艳,盖钧镒. 大豆腺苷酸激酶基因 GmADK 的克隆与表达分析. 作物学报, 2013, 39(10): 1739-1745.
 GAI J T, ZHAO T J, LI Y, GAI J Y. Cloning and expression analysis of an adenylate kinase gene GmADK in soybean. Acta

Agronomica Sinica, 2013, 39(10): 1739-1745.

- [18] GONG P, ZHANG J, LI H, YANG C, ZHANG C, ZHANG X, KHURRAM Z, ZHANG Y, WANG T, FEI Z, YE Z. Transcriptional profiles of drought-responsive genes in modulating transcription signal transduction, and biochemical pathways in tomato. Journal of Experimental Botany, 2010, 61(13): 3563-3575.
- [19] LANGE P R, GESERICK C, TISCHENDORF G, ZRENNER R. Functions of chloroplastic adenylate ases in Arabidopsis, 2008, 146, 492-504.
- [20] YANG L, CAO H, ZHANG X, GUI L, CHEN Q, QIAN G, XIAO J, LI Z. Genome-wide identification and expression analysis of tomato ADK gene family during development and stress. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(14): 7708.
- [21] 闵学阳, 刘文献, 张正社, 韦兴燚, 齐晓, 张义, 刘志鹏, 王彦荣. 苜蓿 DUS 测试标准品种 SSR 分子标记指纹图谱的构建. 草业 学报, 2017, 26(11): 47-56.
 MIN X Y, LIU W X, ZHANG Z S, WEI X Y, QI X, ZHANG Y, LIU Z P, WANG Y R. Construction of SSR marker fingerprint database of standard alfalfa varieties utilizing DUS tests. Prataculturae Sinica, 2017, 26(11): 47-56.
- [22] CHEN C, CHEN H, ZHANG Y, THOMAS H R, FRANK M H, HE Y, XIA R. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. Molecular Plant, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [23] O'ROURKE J A, FU F, BUCCIARELLI B, YANG S S, SAMAC D A, LAMB J F S, MONTEROS M J, GRAHAM M A, GRONWALD J W, KROM N, LI J, DAI X, ZHAO P X, VANCE C P. The *Medicago sativa* gene index 1.2: A web-accessible gene expression atlas for investigating expression differences between *Medicago sativa* subspecies. BMC Genomics, 2015, 16(1): 502.
- [24] LUO D, ZHOU Q, WU Y, CHAI X, LIU W, WANG Y, YANG Q, WANG Z, LIU Z. Full-length transcript sequencing and comparative transcriptomic analysis to evaluate the contribution of osmotic and ionic stress components towards salinity tolerance in the roots of cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.). BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 32.
- [25] LUO D, WU Y, LIU J, ZHOU Q, LIU W, WANG Y, YANG Q, WANG Z, LIU Z. Comparative transcriptomic and physiological analyses of *Medicago sativa* L. indicates that multiple regulatory networks are activated during continuous ABA treatment. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(1): 47.
- [26] ZHOU Q, LUO D, CHAI X, WU Y, WANG Y, NAN Z, YANG Q, LIU W, LIU Z. Multiple regulatory networks are activated during cold stress in *Medicago sativa* L. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(10): 3169.
- [27] IGAMBERDIEV A U, KLECZKOWSKI L A. Equilibration of adenylates in the mitochondrial intermembrane space maintains respiration and regulates cytosolic metabolism. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(10): 2133-2141.
- [28] TIESSEN A, HENDRIKS J H M, STITT M, BRANSCHEID A, GIBON Y, FARRÉ E M, GEIGENBERGER P. Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: A novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply. The Plant Cell, 2002, 14(9): 2191-2213.
- [29] BALLICORA M A, FRUEAUF J B, FU Y, SCHÜRMANN P, PREISS J. Activation of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase by thioredoxin. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(2): 1315-1320.

(责任编辑 苔燕妮)