

基于家族分析的苜蓿逆境应答Ca²⁺ ATPase家族基因筛选与鉴定

张美萍, 杨珺凯, 孙明哲, 贾博为, 孙晓丽*

黑龙江八一农垦大学, 作物逆境分子生物学实验室, 黑龙江大庆163319

摘要: Ca²⁺ ATPase属于P型ATPase超家族, 在植物对外界逆境的应答中发挥重要作用, 但迄今尚未有苜蓿Ca²⁺ ATPase基因研究的相关报道。为筛选逆境胁迫应答Ca²⁺ ATPases, 本研究鉴定获得了16个苜蓿Ca²⁺ ATPase家族成员, 分布在7条染色体上, 且存在一对旁系同源基因。系统进化分析表明苜蓿Ca²⁺ ATPases分为ACA和ECA亚家族, ACA亚家族分为4组, 且组内成员具有相似的内含子-外显子组成模式。此外, 苜蓿Ca²⁺ ATPase家族具有高度保守的蛋白序列组成, 包括4个功能结构域、10个跨膜结构域和11个保守motif。转录组数据分析发现该家族具有不同的逆境诱导表达模式, 且多数苜蓿Ca²⁺ ATPases家族基因受低温和冷冻胁迫诱导表达, 其中*MtACA9*和*MtACA8*上调表达最明显。qRT-PCR结果证实*MtACA9*和*MtACA8*表达在低温和冷冻胁迫下显著上调。本研究结果为揭示苜蓿Ca²⁺ ATPase基因在低温冷害应答中的功能提供了重要参考。

关键词: 苜蓿; Ca²⁺ ATPase; 家族分析; 逆境应答; 表达分析

Ca²⁺作为第二信使, 在植物对外界逆境的感应和信号传递过程中发挥重要的作用(陈莎莎和兰海燕2011; 韩宁等2005; 刘刚和王冬梅2006; 郑仲仲等2013)。当植物感受到外界刺激后, 胞内Ca²⁺浓度迅速增加(Choi等2014; Jiang等2013; 郑远和陈兆进2015)。细胞可感受胞内Ca²⁺波动, 并通过不同的机制调控胞内Ca²⁺平衡(Dodd等2010; Kleist和Luan 2016; 贾如等2014)。Ca²⁺ ATPase (钙泵)是调节胞内Ca²⁺浓度的重要蛋白质之一(Spalding和Harper 2011; 王精明等2004)。

植物Ca²⁺ ATPase属于P型ATPase超家族, 由ATP提供能量, 将胞内Ca²⁺运出胞外或运送至细胞器中(Huda等2013b)。一般来说, Ca²⁺ ATPase家族蛋白具有4个高度保守的功能结构域, 即Cation transporter/ATPase N-terminus (PF00690)、Cation transporter/ATPase C-terminus (PF00689)、E1-E2 ATPase (PF00122)和haloacid dehalogenase-like hydrolase (PF00702) (Palmgren和Nissen 2011)。此外, Ca²⁺-ATPase蛋白还含有10个典型的跨膜结构域, 在第4个和第5个跨膜结构域间通常含有天冬氨酰磷酸化位点和ATP结合位点。根据蛋白序列同源性和生化特性, Ca²⁺ ATPase家族可分为ECA (ER-type Ca²⁺ ATPase)和ACA (auto-inhibited Ca²⁺ ATPase) 2个亚家族(Pedersen等2012)。ECA亚家族位于内质网上, 对底物ATP具有专一性, 不受钙调素激活。而ACA亚家族一般位于细胞质膜, 对底物ATP没有专一性, 其N端具有一个自抑制结构域, 在此区域内常含有一个钙调素结合位点和一个丝氨酸磷酸化位点(Baekgaard等2006)。

随着基因组学的快速发展, 科研工作者已系统地鉴定了拟南芥和水稻的Ca²⁺ ATPase基因家族(Baxter等2003)。拟南芥和水稻Ca²⁺ ATPase基因家族均有15个成员。拟南芥中有4个ECAs和11个ACAs, 水稻中有3个ECAs和12个ACAs。其中, *AtACA9*、*AtACA10*和*AtACA13*在花粉管伸长、受精、花序形成等生殖生长过程中发挥重要作用(George等2008; Iwano等2014; Schiott等2004)。水稻*OsACA6*基因参与盐和干旱胁迫下体内离子平衡和ROS清除过程(Huda等2013a)。我们前期从大豆基因组中鉴定出29个Ca²⁺ ATPase基因, 约为拟南芥和水稻的2倍, 其中包括5个ECAs和24个ACAs(Sun等2016)。通过染色体定位和同线性分析发现大豆Ca²⁺ ATPase基因存在大量基因复制现象。此外, 我们还发现野生大豆Ca²⁺ ATPase基因*GsACA1*在苜蓿中过量表达, 能够显著提高转基因苜蓿的耐盐碱性(Sun等2016)。但迄今尚未有研究报道苜蓿Ca²⁺ ATPase基因家族。

苜蓿(*Medicago sativa*)是世界上栽培面积最大的豆科牧草之一, 素有“牧草之王”的美誉(马利超等2012; 宋辉和南志标2014)。然而, 盐碱、低温、冷害等逆境严重影响苜蓿的生长和利用价值(张振亚等2016)。苜蓿基因组测序工作已于2011年完成并发布(Young等2011), 为从全基因组水平揭示苜

收稿 2016-10-08 修定 2016-12-28

资助 国家自然科学基金(31500204)和黑龙江省自然科学基金(C2015035)。

* 通讯作者(E-mail: csmbl2016@126.com)。

苜蓿重要基因家族的功能奠定了重要基础。因此, 本研究以Ca²⁺ ATPases为研究对象, 从基因家族分析角度入手, 利用转录组测序数据筛选了逆境胁迫应答的苜蓿Ca²⁺ ATPases, 并通过定量real-time PCR分析了其表达模式, 最终获得了2个低温冷害应答的苜蓿Ca²⁺ ATPases家族基因*MtACA8*和*MtACA9*。本研究结果为后续深入解析苜蓿Ca²⁺ ATPase基因在逆境胁迫应答中的生物学功能和分子机制提供了一定的理论依据。

材料与方法

1 苜蓿Ca²⁺ ATPase家族成员全基因组鉴定

下载拟南芥Ca²⁺ ATPase家族成员的蛋白序列, 利用ClustalX软件进行多重序列比对, 利用HMM-build构建隐马尔可夫模型。下载苜蓿(*Medicago truncatula* Gaertn.)蛋白序列数据库(<http://www.jcvi.org/medicago/>), 利用HMMER 3.0软件进行比对搜索, 人工去除冗余序列。利用保守结构域预测软件SMART和Pfam, 对上述候选蛋白序列进行分析, 剔除不含完整结构域的序列。

2 苜蓿Ca²⁺ ATPase染色体定位及系统发育树构建

利用植物基因组数据库Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)获得苜蓿Ca²⁺-ATPase基因在染色体中的信息, 利用MapInspect本地软件绘制苜蓿Ca²⁺ ATPase家族基因在染色体上的位置图。苜蓿Ca²⁺ ATPase基因复制信息从植物基因组复制数据库PGDD (<http://chibba.agtec.uga.edu/duplication/>)获得。从Phytozome下载苜蓿Ca²⁺-ATPase蛋白序列, 利用MEGA 5.0软件分别构建邻接树、极大似然树和最小进化树。

3 苜蓿Ca²⁺ ATPase基因结构及蛋白保守结构域分析

从Phytozome网站下载苜蓿Ca²⁺ ATPase基因家族DNA和CDS序列, 利用GSDS软件(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)绘制内含子-外显子结构图。苜蓿Ca²⁺ ATPase家族功能结构域信息从Phytozome网站直接获取, 蛋白序列的保守基序分析采用MEME在线软件(<http://meme-suite.org/>)预测, 参数设置如下: Optimum motif width ≥ 50且 ≤ 200; Maximum number of motifs为15; Occurrences of a single motif为zero or one per sequence。

4 苜蓿Ca²⁺ ATPase蛋白序列比对及跨膜结构域预测

利用ClustalX2程序进行苜蓿Ca²⁺ ATPase蛋白序列多重比对, 利用SOSUI在线软件(<http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/>)预测苜蓿Ca²⁺ ATPase蛋白跨膜结构域。10个跨膜结构域位置根据MtACA1蛋白进行标注。

5 逆境胁迫应答的苜蓿Ca²⁺ ATPase基因筛选

苜蓿不同逆境胁迫处理下的转录组数据由哈尔滨师范大学束永俊提供(Song等2016)。利用Tophat和Cufflink程序分析转录组数据并进行表达量计算, 提取Ca²⁺ ATPase基因家族成员的表达数据, 使用MeV4软件(<http://www.tm4.org/mev.html>)绘制热图, 并进行聚类分析。

6 Real-time PCR分析

将8周龄的苜蓿幼苗进行低温(4°C)和冷冻(-8°C)处理, 分别在处理0、1、3、6、12和24 h取材。采用Trizol (Invitrogen)法提取总RNA, 经DNase消化基因组DNA后, 采用反转录试剂盒Super-Script™ IV Reverse Transcriptase kit (Invitrogen)反转录获得cDNA, 利用基因特异引物进行Real-time PCR分析。采用比较C_T法(ΔΔC_T)计算基因表达量, 以苜蓿*GAPDH*基因为内参基因, 以未经处理的样品作为对照。每个样品包括3次生物学重复和3次技术重复, 数据取3次生物学重复平均值。所用基因特异引物序列如下: *MtACA8* (5'-GTTTCACCTGCAATCTCGAC-3'和5'-GCATCTTTAACTTCCTCCGG-3'), *MtACA9* (5'-CCAACACTTACAAAAAACACC-3'和5'-ACCTTTAGCCGACGACCA-3'), *MtGAPDH* (5'-TAAGGGTGGTGCCAAGAAGGT-3'和5'-AGCAAGAGGAGCAAGGCAGTT-3')。

实验结果

1 苜蓿基因组中Ca²⁺ ATPase家族成员鉴定及染色体定位分析

鉴于Ca²⁺ ATPase基因在植物对逆境应答中的关键作用, 本研究通过家族分析筛选鉴定逆境胁迫应答的苜蓿Ca²⁺ ATPases。首先对苜蓿基因组中的Ca²⁺ ATPase家族成员进行了鉴定。利用拟南芥Ca²⁺ ATPase家族成员蛋白序列进行多重比对, 构建隐马尔可夫模型序列谱。使用HMMER 3.0软件对苜蓿蛋白序列数据库进行比对搜索, 人工去除冗

余序列, 获得候选蛋白序列。根据植物Ca²⁺ ATPase 家族典型的4个功能结构域(Palmgren和Nissen 2011), 我们进一步利用保守结构域预测软件SMART和 Pfam, 对上述候选蛋白序列进行分析, 剔除不含完整结构域的序列, 最终得到16个苜蓿Ca²⁺ ATPase家

族成员(表1)。理化性质分析发现由于具有4个高度保守的功能结构域, Ca²⁺ ATPase家族蛋白序列普遍较长, 且各成员之间长度基本相似(956~1 111个氨基酸)。但是, 不同成员之间内含子的数目差异较大(从0到33个)。

表1 苜蓿Ca²⁺ ATPase 基因家族成员信息

Table 1 Detailed information of the Ca²⁺ ATPase family genes in *M. truncatula*

序号	位点	基因名	染色体位置	mRNA/bp	氨基酸/个	内含子/个
P-type Ca ²⁺ ATPase IIB亚家族(ACA)						
1	Medtr0005s0140	<i>MtACA1</i>	scaffold0005: 220946..228587	2 871	956	4
2	Medtr2g038310	<i>MtACA2</i>	chr2: 16684216..16696562	3 282	1 093	32
3	Medtr3g103070	<i>MtACA3</i>	chr3: 47484864..47491044	3 715	1 019	6
4	Medtr4g008170	<i>MtACA4</i>	chr4: 1429990..1449394	4 093	1 111	32
5	Medtr4g008650	<i>MtACA5</i>	chr4: 1618848..1628712	3 673	1 033	6
6	Medtr4g043690	<i>MtACA6</i>	chr4: 14583510..14596432	3 126	1 041	6
7	Medtr4g096990	<i>MtACA7</i>	chr4: 39949248..39954195	3 039	1 012	6
8	Medtr5g015590	<i>MtACA8</i>	chr5: 5415896..5421812	4 040	1 014	6
9	Medtr6g016470	<i>MtACA9</i>	chr6: 6184404..6187753	3 130	1 020	2
10	Medtr7g095710	<i>MtACA10</i>	chr7: 38355788..38359677	3 890	1 062	0
11	Medtr8g045070	<i>MtACA11</i>	chr8: 17063356..17068386	3 193	962	7
12	Medtr8g090125	<i>MtACA12</i>	chr8: 37755179..37760016	2 979	992	6
13	Medtr8g446010	<i>MtACA13</i>	chr8: 17579887..17584698	2 958	985	6
P-type Ca ²⁺ ATPase IIA亚家族(ECA)						
14	Medtr3g103270	<i>MtECA1</i>	chr3: 47601880..47629455	3 529	1 032	33
15	Medtr7g100110	<i>MtECA2</i>	chr7: 40388311..40394855	3 669	1 072	7
16	Medtr8g027160	<i>MtECA3</i>	chr8: 9542188..9547424	3 919	1 053	7

根据苜蓿基因组信息, 对16个Ca²⁺ ATPase基因进行了染色体定位分析(图1)。结果表明, 其中1个基因未定位到染色体上, 而是存在于第1个scaffold

上。其余15个Ca²⁺ ATPase基因分布在7条染色体上(除1号染色体上没有)。其中, 4号和8号染色体上有4个, 3号和7号染色体上有2个, 而2、5和6号染色

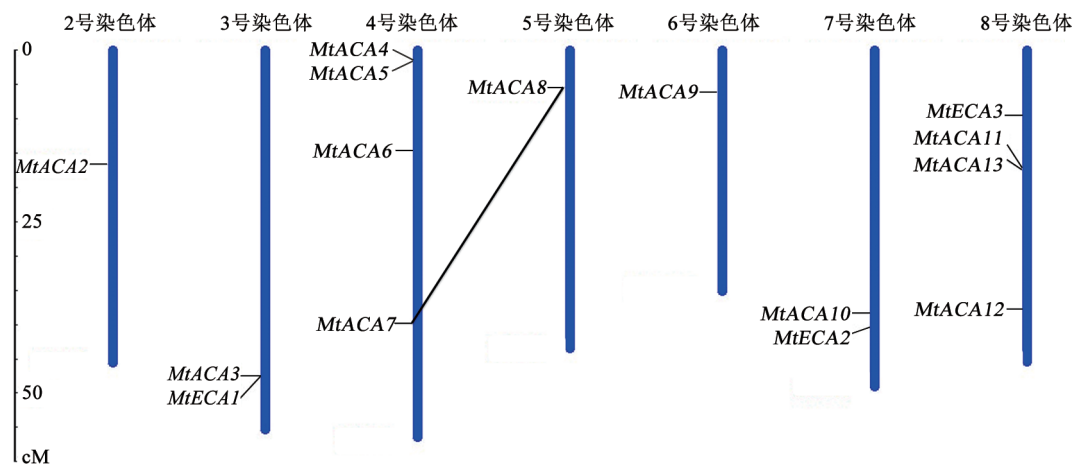


图1 苜蓿Ca²⁺ ATPase家族成员的染色体定位及同源关系分析

Fig.1 Chromosomal distribution and homologous members of the Ca²⁺ ATPase family in alfalfa

体上各1个。利用植物基因组复制数据库PGDD, 我们分析了苜蓿Ca²⁺ ATPase基因复制情况, 发现了一对旁系同源基因(*MtACA7*和*MtACA8*)。

2 苜蓿Ca²⁺ ATPase家族进化关系分析

为了揭示苜蓿Ca²⁺ ATPase基因家族的进化关系, 我们以拟南芥Ca²⁺ ATPase家族基因为参考, 利用MEGA 5.0软件进行蛋白多序列比对, 并分别构建了邻接树、极大似然树和最小进化树, 三者的拓扑结构高度相似。对邻接树拓扑结构分析表明(图2), 与拟南芥一样, 苜蓿Ca²⁺ ATPase基因被分成2个亚家族。第1个亚家族包括3个苜蓿和4个拟南芥Ca²⁺ ATPase成员, 即P-type Ca²⁺ ATPase IIA (ECA) 亚家族。第2个亚家族包含13个苜蓿和11个拟南芥基因, 即P-type Ca²⁺ ATPase IIB (ACA) 亚家族。ECA亚家族又可分为2组, 而ACA亚家族则被分为4组; 且每组都至少包含了一个苜蓿和拟南芥Ca²⁺ ATPase基因, 这说明Ca²⁺ ATPase家族的分化时间早于苜蓿和拟南芥的物种分化时间。

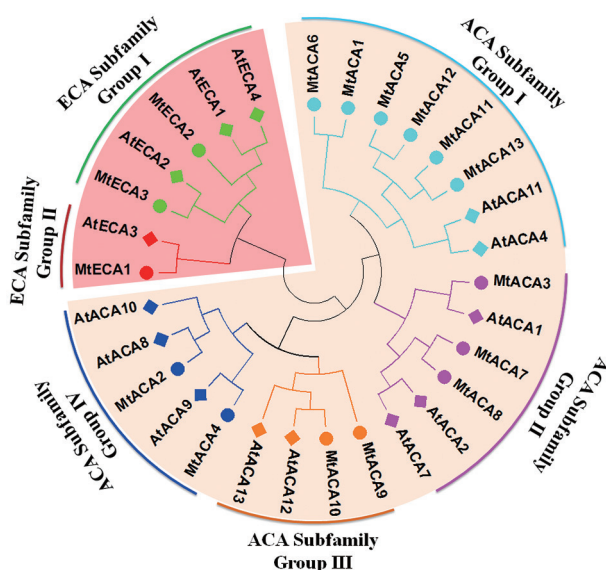


图2 苜蓿和拟南芥Ca²⁺ ATPase基因家族进化关系分析
Fig.2 Phylogenetic relationship of the Ca²⁺ ATPase gene family from alfalfa and *Arabidopsis*

3 苜蓿Ca²⁺ ATPase家族的基因结构分析

前期分析发现苜蓿Ca²⁺ ATPase家族不同成员之间内含子的数量差异较大(表1)。因此, 我们进一步对苜蓿ACA亚家族成员的内含子-外显子基

因结构组成进行了分析。如图3-A所示, 苜蓿ACA亚家族成员被分为4组(Group I~IV)。已有研究报道拟南芥和大豆的ACA亚家族不同组间的成员数目大致相同, 拟南芥中每组有2~3个成员, 大豆中每组为5~7个(Kamrul Huda等2013; Sun等2016)。本研究发现苜蓿不同组间的成员数目差异较大, 其中第2、3和4组成员数目与拟南芥较为接近(2~3个), 但第1组中则有6个成员。

基因结构分析发现, 同一组内的ACA基因内含子数目较为保守, 且具有相似的内含子-外显子组成模式, 而不同组间的内含子数目和基因结构组成模式差异较大(图3-B)。其中, Group II成员内含子数目最多, 而Group III成员内含子数目最少。除*MtACA1* (4个内含子)外, Group I和Group IV均具有6个内含子。类似的现象同样存在于拟南芥、水稻和苜蓿中(Kamrul Huda等2013; Sun等2016)。

4 苜蓿Ca²⁺ ATPase家族蛋白序列保守性分析

在了解苜蓿Ca²⁺ ATPase基因内含子-外显子组成模式的基础上, 进一步分析了其蛋白序列的保守性。多重序列比对显示苜蓿Ca²⁺ ATPase家族蛋白具有高度的序列保守性, 包括10个保守的跨膜结构域(图4-A), 这一结果与拟南芥、水稻和大豆中的研究相一致(Kamrul Huda等2013; Sun等2016)。跨膜结构域的存在(图4-B)也支持了Ca²⁺ ATPase在膜系统的定位。除此以外, 苜蓿Ca²⁺ ATPase家族蛋白还具有植物Ca²⁺ ATPase共有的11个保守基序(图4-A)。其中, Motif 2 (PAD)和Motif 4 (PEGL)保守性最高, 在所有Ca²⁺ ATPase家族成员中序列完全一样。

5 苜蓿ACA亚家族成员蛋白保守结构域分析

为进一步明确苜蓿ACA亚家族成员的蛋白结构, 分析了其功能结构域。如图5-A所示, 苜蓿ACA亚家族成员均具有其他Ca²⁺ ATPase高度保守的4个功能结构域, 即Cation transporter/ATPase N-terminus、Cation transporter/ATPase C-terminus、E1-E2 ATPase和haloacid dehalogenase-like hydrolase。与ECA相比, ACA亚家族成员N端往往包含一个自抑制结构域, 即Ca²⁺ ATPase N-terminal autoinhibitory domain。本研究发现苜蓿中7个ACA蛋白包含该结构域, 而其余5个则不含此结构域。与此类似, 大豆中也有部分ACA成员不包含自抑制结构域(Sun等2016)。

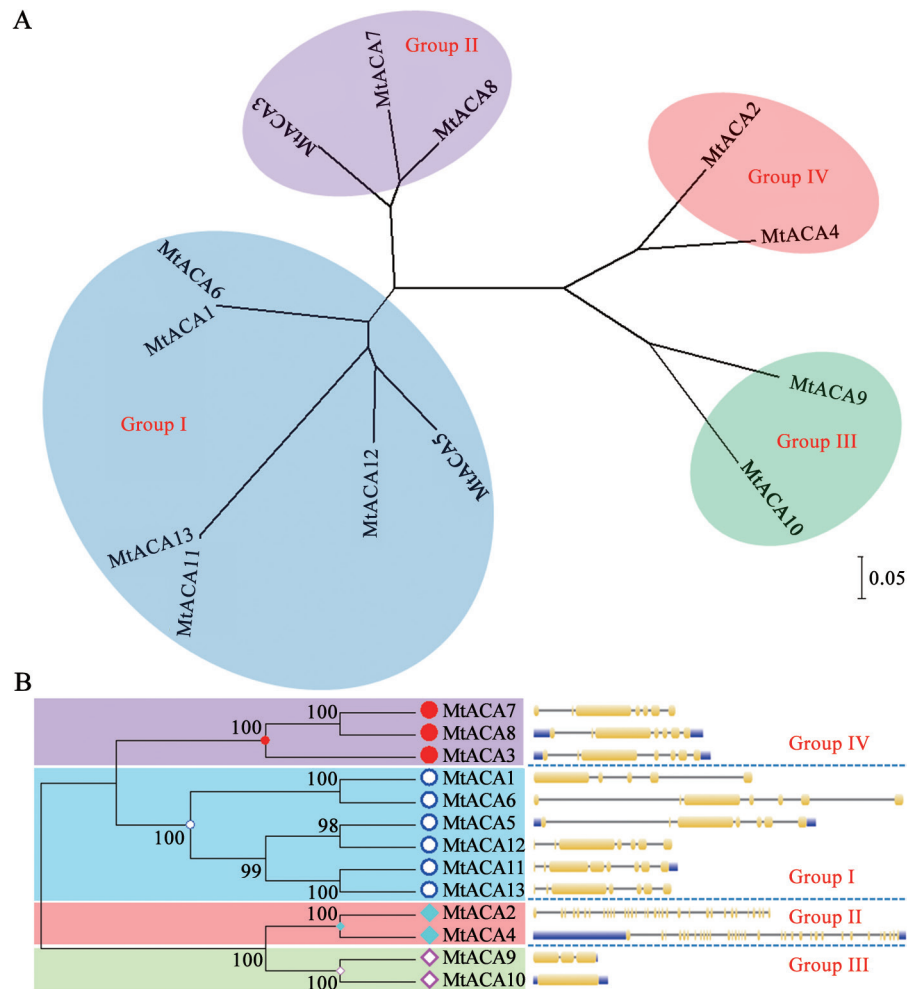


图3 苜蓿ACA亚家族基因结构和进化关系分析

Fig.3 Gene architecture and phylogenetic analyses of the alfalfa ACA subfamily genes

A: 苜蓿ACA亚家族进化关系分析; B: 苜蓿ACA亚家族基因结构分析。蓝色框代表非编码区, 黄色框代表外显子, 横线代表内含子。

为了验证这一结果, 我们采用MEME软件分析了苜蓿ACA亚家族成员的保守基序, 发现其蛋白序列高度保守, 且与N端自抑制结构域相对应的Motif 8仅存在于其中7个ACA成员中(图5-B)。此外, 与E1-E2 ATPase功能结构域对应的基序保守性较差, 在Group I和IV的ACA蛋白中为Motif 2, 而在Group II和III的ACA成员中则是由与Motif2序列相似的Motif 10和Motif 14组成(图5-C)。

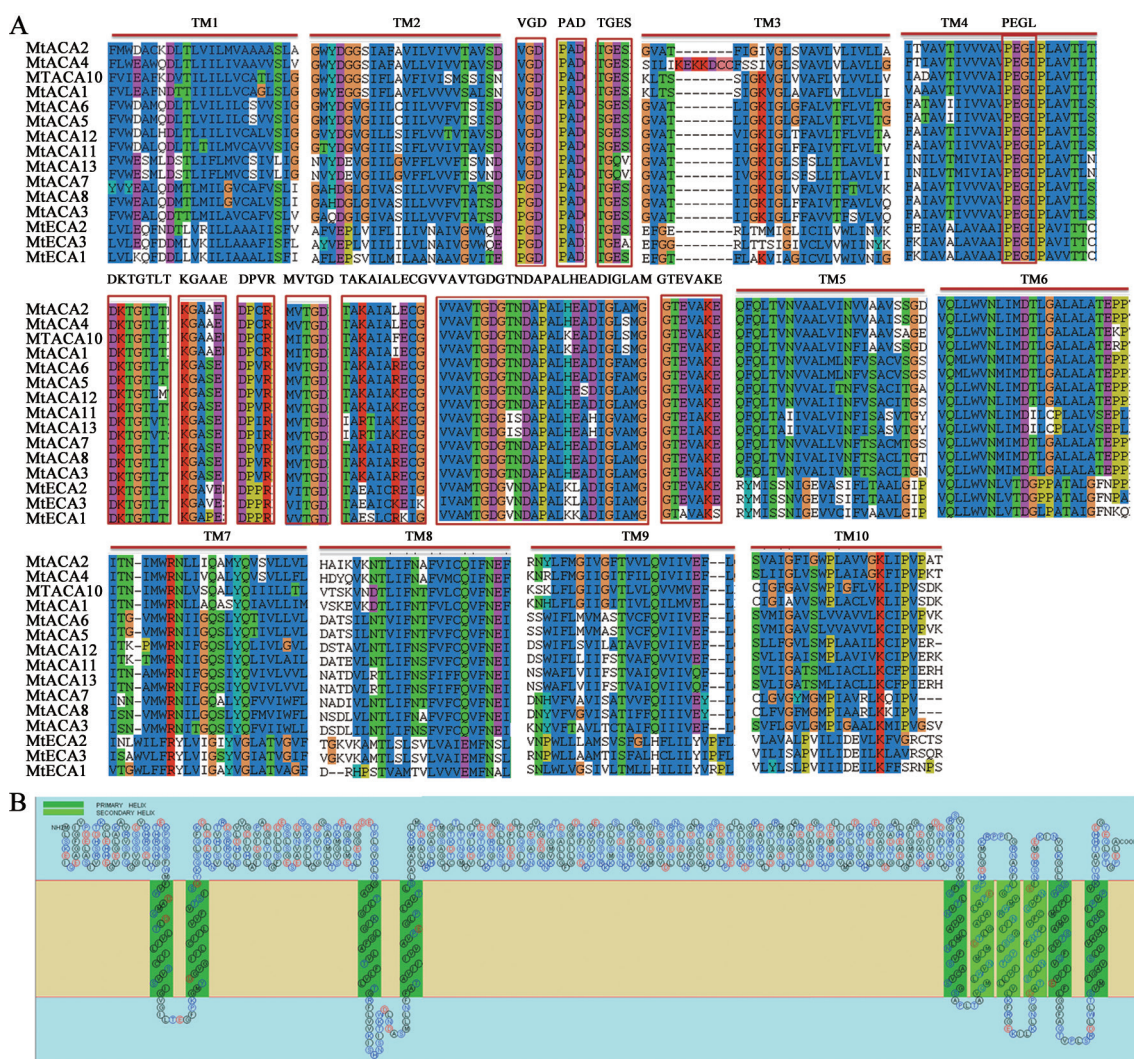
6 逆境胁迫应答的苜蓿Ca²⁺ ATPase基因筛选与验证

为了筛选响应逆境胁迫的苜蓿Ca²⁺ ATPase基因, 我们利用转录组数据分析了苜蓿Ca²⁺ ATPases在不同逆境胁迫下的表达。如图6-A所示, 该基因家族具有不同的逆境胁迫表达模式, 层次聚类显示其

表达模式可分为4组。A组基因(*MtECA1*和*MtACA4*)表达基本不受逆境影响; B组基因(*MtACA2/3/5*)表达受低温(cold)胁迫诱导; C组基因(*MtECA2*和*MtACA8/9/10*)受多种逆境胁迫诱导表达; 而D组*MtECA3*基因表达受冷冻(freezing)逆境诱导表达。结果表明多数苜蓿Ca²⁺ ATPase基因表达均受低温或冷冻逆境诱导(图6-A), 其中*MtACA9*和*MtACA8*上调表达最为明显(图6-B)。

7 qRT-PCR验证*MtACA8*和*MtACA9*基因低温冷害诱导表达模式

为了验证*MtACA8*和*MtACA9*基因在低温、冷害胁迫下的上调表达模式, 采用qRT-PCR分析了其在胁迫处理不同时间点的表达变化趋势。结果如

图4 苜蓿Ca²⁺ ATPase家族蛋白序列保守性和跨膜结构域分析Fig.4 Multiple sequence alignment and transmembrane domain prediction of the alfalfa Ca²⁺ ATPase family proteins

A: 苜蓿Ca²⁺ ATPase 家族蛋白序列比对, 红色横线标注的为10个跨膜结构域, 红色方框标注的为11个保守motif; B: 苜蓿MtACA1蛋白跨膜结构域预测。跨膜结构域预测采用SOSUI在线软件。

图7所示, 这2个基因在低温和冷害胁迫下均呈现出较明显的上调表达的趋势。其中, *MtACA8*在低温胁迫3 h后表达量达到最高点, 而在冷害处理6 h后表达量达到最高。*MtACA9*基因在低温胁迫6 h后表达量达到最高点, 而在冷害处理3 h后表达量达到最高。上述结果说明这2个基因均响应低温、冷害逆境, 可能在苜蓿对低温冷害应答过程中发挥作用, 后续将深入研究其耐低温、冷害功能。

讨论

由于基因组小、二倍体、转化效率高等特点,

苜蓿被称之为豆科模式植物(陈爱民等2006; 魏臻武和盖钧镒2008)。自2011年苜蓿基因组测序完成并公布以来(Young等2011), 越来越多的科研工作者从基因家族角度对苜蓿基因表达特征进行研究, 已鉴定了ARF (Shen等2015)、AP2/ERF (Shu等2015)、14-3-3 (Qin等2016)等基因家族。

现有研究已证明Ca²⁺ ATPase在植物生长发育及对外界逆境胁迫的应答中发挥重要作用(Huda等2013b; Iwano等2014; Kamrul Huda等2013; Zhang等2014; 程涣等2015; 刘驰等2013; 朱炜等2008)。但迄今为止, 对Ca²⁺ ATPase的研究多数集中在模

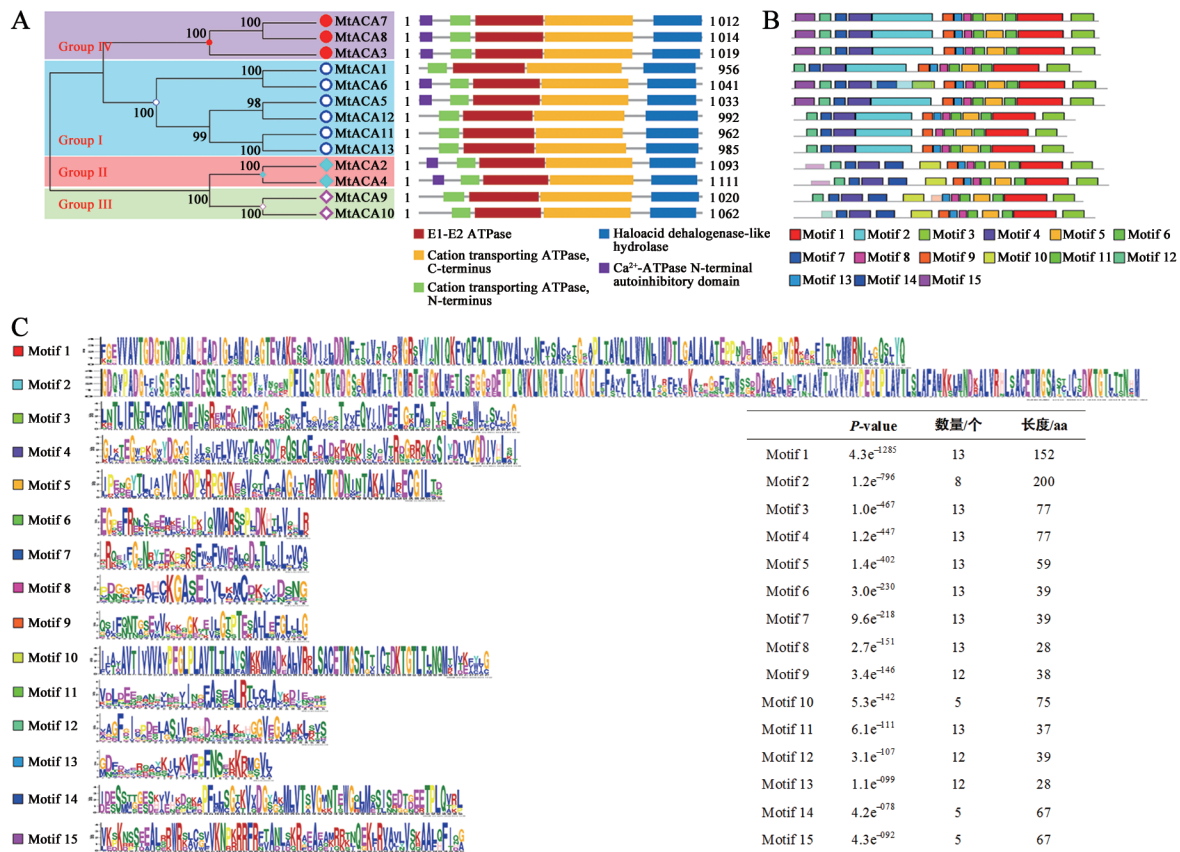


图5 苜蓿ACA亚家族成员蛋白保守结构域分析

Fig.5 Characterization of conserved domains within the alfalfa ACA subfamily proteins

A: 苜蓿ACA亚家族蛋白保守功能结构域分析; B: MEME分析苜蓿ACA亚家族保守Motif; C: MEME软件预测的15个保守Motif信息。Motif 8对应N端自抑制结构域, Motif 2对应Group I和IV ACA蛋白的E1-E2 ATPase功能结构域, Motif 10和Motif 14对应Group II和III ACA蛋白的E1-E2 ATPase结构域。

式植物拟南芥和水稻中; 对于非模式植物, 尤其是豆科植物Ca²⁺ ATPase基因的研究鲜有报道。本研究中, 我们利用生物信息学方法, 鉴定获得了16个苜蓿Ca²⁺ ATPase基因(表1)。结合前人研究结果, 拟南芥和水稻均有15个Ca²⁺ ATPases基因, 说明水稻和苜蓿基因组的扩增并没有增加Ca²⁺ ATPase基因的数量(Baxter等2003)。与此类似, 植物基因组所含WRKY基因的多少也不与其基因组的大小呈正比(宋辉和南志标2014)。然而, 前期研究中我们发现, 同为豆科植物, 大豆却含有29个Ca²⁺ ATPase基因(Sun等2016)。这一数量差异是由于大豆Ca²⁺ ATPase家族存在大量的旁系同源基因, 基因复制几乎存在于所有的Ca²⁺ ATPase基因。而水稻Ca²⁺ ATPase家族中仅存在两对基因复制, 苜蓿中存在一对(图1), 拟南芥中则未发现Ca²⁺ ATPase基因复制现象(Baxter等2003)。

本研究通过对苜蓿Ca²⁺ ATPase家族进化关系、基因结构和蛋白保守结构域分析, 证实植物Ca²⁺ ATPase基因家族具有高度保守性。首先, 植物Ca²⁺ ATPase家族由ECA and ACA 2个亚家族组成(Pedersen等2012)。本研究通过构建系统发育树, 发现苜蓿16个Ca²⁺ ATPases基因同样分为2个亚家族, 其中有13个ACAs和3个ECAs(图2), 这一比例与拟南芥、水稻和大豆相一致(Singh等2014; Sun等2016)。其次, ACA亚家族内的Ca²⁺ ATPases进化关系高度保守。与拟南芥、水稻和大豆一样(Huda等2013b; Singh等2014), 苜蓿ACA亚家族也可分为4组(Group I-IV, 图3)。第三, Ca²⁺ ATPases家族具有高度保守的内含子-外显子结构组成。尽管苜蓿Ca²⁺ ATPases基因间内含子数目差异很大(表1), 但同一组内的ACA基因内含子数目较为保守, 且具有相似的内含子-外显子组成模式(图3)。

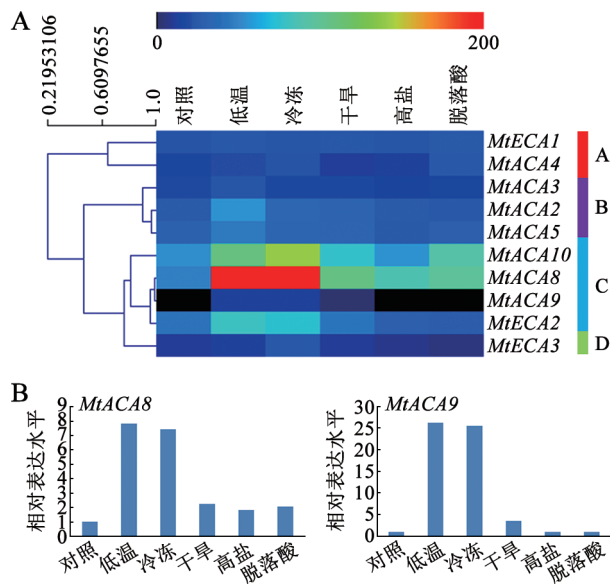


图6 逆境胁迫应答的苜蓿Ca²⁺ ATPase基因筛选
Fig.6 Screening of stress responsive alfalfa Ca²⁺ ATPase genes
A: 苜蓿Ca²⁺ ATPase基因在不同逆境胁迫下的表达聚类分析;
B: *MtACA9*和*MtACA8*基因在逆境胁迫下的表达分析。

不同物种的ACA亚家族中均有一组成员的内含子数量很少, 另有一组成员有很多内含子(Kamrul Huda等2013)。第四, Ca²⁺ ATPases家族蛋白序列和

结构特征具有高度保守性。所有苜蓿Ca²⁺ ATPases家族成员都含有其他Ca²⁺ ATPases蛋白典型的4个保守功能结构域(图5) (Palmgren和Nissen 2011)。值得注意的是, 苜蓿ACA亚家族中有5个成员没有该亚家族典型的N端自抑制结构域(图5)。我们前期研究发现这种现象同样存在于大豆中, 即大豆ACA亚家族Group IV的3个成员(*GmACA9*、*GmACA15*和*GmACA22*)同样缺少该自抑制区(Huda等2013b)。除此以外, 植物Ca²⁺ ATPases还具有10个跨膜结构域和11个保守的基序(图4)。

近年来对植物Ca²⁺ ATPase的基因表达和功能研究发现该家族基因表达响应各种逆境胁迫, 如*OsACA3*、*OsACA5*、*OsACA6*和*OsACA7*等(Huda等2013a; Singh等2014)。*OsACA6*通过调控体内ROS和离子平衡, 参与植物对高盐和干旱胁迫的应答过程(Huda等2013a)。我们前期研究发现野生大豆中15个Ca²⁺ ATPase基因表达受苏打盐碱(NaHCO₃)胁迫诱导, 且*GsACA1*超量表达显著提高了转基因苜蓿的耐盐碱性(Sun等2016)。本研究分析了苜蓿Ca²⁺ ATPases家族在低温、冷冻、干旱、高盐和ABA胁迫下的表达特征, 发现苜蓿Ca²⁺ ATPase家族基因具有不同的胁迫诱导表达模式, 且多数

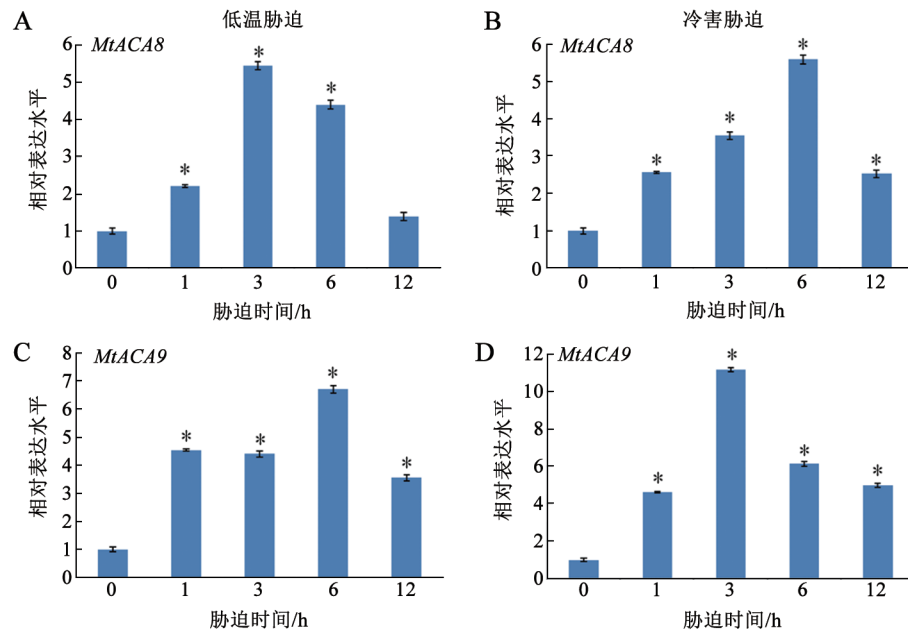


图7 低温冷害胁迫应答的苜蓿Ca²⁺ ATPase基因*MtACA8*和*MtACA9*鉴定
Fig.7 Identification of stress responsive alfalfa Ca²⁺ ATPase genes *MtACA9* and *MtACA8*

A: *MtACA8*和*MtACA9*基因在低温胁迫下的表达模式验证; B: *MtACA8*和*MtACA9*基因在冷害胁迫下的表达模式验证。图中*表示在P<0.05水平有显著差异。

苜蓿Ca²⁺ ATPase基因表达受低温和冷冻胁迫诱导,其中*MtACA9*和*MtACA8*上调表达最为明显(图6)。qRT-PCR分析证实*MtACA9*和*MtACA8*基因表达在低温和冷冻胁迫下显著上调(图7)。这些结果说明这两个基因可能在苜蓿应对低温、冷害过程中发挥重要的作用,下一步将对其耐低温冷害功能进行解析。

参考文献

- Baekgaard L, Luoni L, De Michelis MI, Palmgren MG (2006). The plant plasma membrane Ca²⁺ pump *ACA8* contains overlapping as well as physically separated autoinhibitory and calmodulin-binding domains. *J Biol Chem*, 281 (2): 1058–1065
- Baxter I, Tchieu J, Sussman MR, Boutry M, Palmgren MG, Gribskov M, Harper JF, Axelsen KB (2003). Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol*, 132 (2): 618–628
- Chen AM, Lian RL, Sun J, Wang YZ (2006). Leguminous model plant-*Medicago truncatula*. *Plant Physiol Commun*, 42 (5): 997–1003 (in Chinese with English abstract) [陈爱民, 连瑞丽, 孙杰, 王彦章(2006). 豆科模式植物——蒺藜苜蓿. *植物生理学通讯*, 42 (5): 997–1003]
- Chen SS, Lan HY (2011). Signal transduction pathways in response to salt stress in plants. *Plant Physiol J*, 47 (2): 119–128 (in Chinese with English abstract) [陈莎莎, 兰海燕(2011). 植物对盐胁迫响应的信号转导途径. *植物生理学报*, 47 (2): 119–128]
- Cheng H, Su TB, Yu SC, Zhang FL, Yu YJ, Zhang DS, Zhao XY, Wang WH, Lu GX, Gong YQ, et al (2015). Expression analysis of Ca²⁺ transport and response genes, ECA and CAS, in cabbage under calcium deficiency condition. *Plant Physiol J*, 51 (4): 566–572 (in Chinese with English abstract) [程涣, 苏同兵, 于拴仓, 张凤兰, 余阳俊, 张德双, 赵岫云, 汪维红, 卢桂香, 龚义勤, 等(2015). 大白菜钙运输基因ECA和钙响应基因CAS在缺钙胁迫下的表达分析. *植物生理学报*, 51 (4): 566–572]
- Choi WG, Toyota M, Kim SH, Hilleary R, Gilroy S (2014). Salt stress-induced Ca²⁺ waves are associated with rapid, long-distance root-to-shoot signaling in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111 (17): 6497–6502
- Dodd AN, Kudla J, Sanders D (2010). The language of calcium signaling. *Annu Rev Plant Biol*, 61: 593–620
- George L, Romanowsky SM, Harper JF, Sharrock RA (2008). The *ACA10* Ca²⁺-ATPase regulates adult vegetative development and inflorescence architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 146 (5): 716–728
- Han N, Qi CH, Ding TL, Wang BS (2005). The membrane-bound Ca²⁺ transporters in plants and stress responses. *Plant Physiol Commun*, 41 (5): 577–582 (in Chinese with English abstract) [韩宁, 蔡翠华, 丁同楼, 王宝山(2005). 植物膜Ca²⁺运输系统与逆境应答. *植物生理学通讯*, 41 (5): 577–582]
- Huda KM, Banu MS, Garg B, Tula S, Tuteja R, Tuteja N (2013a). *OsACA6*, a P-type IIB Ca²⁺ ATPase promotes salinity and drought stress tolerance in tobacco by ROS scavenging and enhancing the expression of stress-responsive genes. *Plant J*, 76 (6): 997–1015
- Huda KM, Banu MS, Tuteja R, Tuteja N (2013b). Global calcium transducer P-type Ca²⁺-ATPases open new avenues for agriculture by regulating stress signalling. *J Exp Bot*, 64 (11): 3099–3109
- Iwano M, Igarashi M, Tarutani Y, Kaothien-Nakayama P, Nakayama H, Moriyama H, Yakabe R, Entani T, Shimosato-Asano H, Ueki M, et al (2014). A pollen coat-inducible autoinhibited Ca²⁺-ATPase expressed in stigmatic papilla cells is required for compatible pollination in the *Brassicaceae*. *Plant Cell*, 26 (2): 636–649
- Jia R, Lei MQ, Xu JN, Lu RQ, Huang X (2014). Research progress of Ca²⁺ channel and the effect of Ca²⁺ on plant resistance mechanism in plant cells. *Plant Physiol J*, 50 (12): 1791–1800 (in Chinese with English abstract) [贾如, 雷梦琦, 徐佳妮, 鲁瑞琪, 黄萱(2014). 植物细胞中钙通道的分布及其在植物抗逆机制中作用的研究进展. *植物生理学报*, 50 (12): 1791–1800]
- Jiang Z, Zhu S, Ye R, Xue Y, Chen A, An L, Pei ZM (2013). Relationship between NaCl- and H₂O₂-induced cytosolic Ca²⁺ increases in response to stress in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 8 (10): e76130
- Kamrul Huda KM, Yadav S, Akhter Banu MS, Trivedi DK, Tuteja N (2013). Genome-wide analysis of plant-type II Ca²⁺ATPases gene family from rice and *Arabidopsis*: potential role in abiotic stresses. *Plant Physiol Biochem*, 65: 32–47
- Kleist TJ, Luan S (2016). Constant change: dynamic regulation of membrane transport by calcium signalling networks keeps plants in tune with their environment. *Plant Cell Environ*, 39 (3): 467–481
- Liu C, Li MJ, Wang PF, Yang YH, Wang FQ, Zhang ZY, Li CQ, Chen XJ (2013). Cloning and expression analysis of endoplasmic reticulum type (ER) Ca²⁺-ATPase in *Rehmannia glutinosa* Libosch. *Plant Physiol J*, 49 (5): 445–451 (in Chinese with English abstract) [刘驰, 李明杰, 王鹏飞, 杨艳会, 王丰青, 张重义, 李春奇, 陈新建(2013). 地黄内质网型(ER) Ca²⁺-ATPase基因的克隆及表达分析. *植物生理学报*, 49 (5): 445–451]
- Liu G, Wang DM (2006). Relationship between Ca²⁺ and microtubule in cell signal transduction. *Plant Physiol Commun*, 42 (2): 331–336 (in Chinese with English abstract) [刘刚, 王冬梅(2006). 细胞信号转导中Ca²⁺和微管骨架的关系. *植物生理学通讯*, 42 (2): 331–336]
- Ma LC, Wang YR, Liu ZP (2012). Expression analysis of the *Medicago truncatula* floral specific expression genes. *Hereditas*, 34 (5): 621–634 (in Chinese with English abstract) [马利超, 王彦荣, 刘志鹏(2012). 蒺藜苜蓿花器官特异基因的表达分析. *遗传*, 34 (5): 621–634]
- Palmgren MG, Nissen P (2011). P-type ATPases. *Annu Rev Biophys*, 40: 243–266
- Pedersen CN, Axelsen KB, Harper JF, Palmgren MG (2012). Evolution of plant P-type ATPases. *Front Plant Sci*, 3: 31
- Qin C, Cheng L, Shen J, Zhang Y, Cao H, Lu D, Shen C (2016). Genome-wide identification and expression analysis of the 14-3-3 family genes in *Medicago truncatula*. *Front Plant Sci*, 7: 320
- Schiott M, Romanowsky SM, Baekgaard L, Jakobsen MK, Palmgren MG, Harper JF (2004). A plant plasma membrane Ca²⁺ pump is

- required for normal pollen tube growth and fertilization. Proc Natl Acad Sci USA, 101 (25): 9502–9507
- Shen C, Yue R, Sun T, Zhang L, Xu L, Tie S, Wang H, Yang Y (2015). Genome-wide identification and expression analysis of auxin response factor gene family in *Medicago truncatula*. Front Plant Sci, 6: 73
- Shu Y, Liu Y, Zhang J, Song L, Guo C (2015). Genome-wide analysis of the AP2/ERF superfamily genes and their responses to abiotic stress in *Medicago truncatula*. Front Plant Sci, 6: 1247
- Singh A, Kanwar P, Yadav AK, Mishra M, Jha SK, Baranwal V, Pandey A, Kapoor S, Tyagi AK, Pandey GK (2014). Genome-wide expressional and functional analysis of calcium transport elements during abiotic stress and development in rice. FEBS J, 281: 894–915
- Song H, Nan ZB (2014). Genome-wide identification and analysis of WRKY transcription factors in *Medicago truncatula*. Hereditas, 36 (2): 152–168 (in Chinese with English abstract) [宋辉, 南志标(2014). 蒺藜苜蓿全基因组中WRKY转录因子的鉴定与分析. 遗传, 36 (2): 152–168]
- Song L, Jiang L, Chen Y, Shu Y, Bai Y, Guo C (2016). Deep-sequencing transcriptome analysis of field-grown *Medicago sativa* L. crown buds acclimated to freezing stress. Funct Integr Genomics, 16: 495–511
- Spalding EP, Harper JF (2011). The ins and outs of cellular Ca²⁺ transport. Curr Opin Plant Biol, 14: 715–720
- Sun MZ, Jia BW, Cui N, Wen YD, Duanmu HZ, Yu QY, Xiao JL, Sun XL, Zhu YM (2016). Functional characterization of a *Glycine soja* Ca²⁺ ATPase in salt-alkaline stress responses. Plant Mol Biol, 90: 419–434
- Wang JM, Li HQ, Li MR (2004). Characteristics of Ca²⁺-ATPase of plasma membrane and tonoplast membrane vesicles from roots of rice seedlings. Plant Physiol J, 40 (1): 22–26 (in Chinese with English abstract) [王精明, 李洪清, 李美茹(2004). 水稻幼苗根细胞质膜和液泡膜微囊Ca²⁺-ATP酶的特性. 植物生理学报, 40 (1): 22–26]
- Wei ZW, Gai JY (2008). Model legume: *Medicago truncatula*. Acta Prataculturae Sin, 17 (1): 114–120 (in Chinese with English abstract) [魏臻武, 盖钧镒(2008). 豆科模式植物——蒺藜苜蓿. 草业学报, 17 (1): 114–120]
- Young ND, Debellé F, Oldroyd GE, Geurts R, Cannon SB, Udvardi MK, Benedito VA, Mayer KF, Gouzy J, Schoof H, et al (2011). The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. Nature, 480: 520–524
- Zhang J, Zhang X, Wang R, Li W (2014). The plasma membrane-localised Ca²⁺-ATPase *ACA8* plays a role in sucrose signalling involved in early seedling development in *Arabidopsis*. Plant Cell Rep, 33: 755–766
- Zhang ZY, Pei CM, Ma J (2016). Screening of candidate salt tolerance-related genes in alfalfa based on transcriptome-proteome correlation research techniques. Plant Physiol J, 52 (3): 317–324 (in Chinese with English abstract) [张振亚, 裴翠明, 马进(2016). 基于转录组和蛋白质组关联研究技术筛选紫花苜蓿耐盐相关候选基因. 植物生理学报, 52 (3): 317–324]
- Zheng Y, Chen ZJ (2015). Organellar calcium signaling in plants. Plant Physiol J, 51 (8): 1195–1203 (in Chinese with English abstract) [郑远, 陈兆进(2015). 植物细胞器钙信号研究进展. 植物生理学报, 51 (8): 1195–1203]
- Zheng ZZ, Shen JQ, Pan WH, Pan JW (2013). Calcium sensors and their stress signaling pathways in plants. Hereditas, 35 (7): 875–884 (in Chinese with English abstract) [郑仲仲, 沈金秋, 潘伟槐, 潘建伟(2013). 植物钙感受器及其介导的逆境信号途径. 遗传, 35 (7): 875–884]
- Zhu W, Huang CL, Zhang XH, Wang YQ, Wei JM, Yu R, Wu ZY (2008). Analysis of *ECA1* function by RNA interference in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol J, 44 (3): 469–475 (in Chinese with English abstract) [朱炜, 黄丛林, 张秀海, 王永勤, 魏建民, 于荣, 吴忠义(2008). 采用RNA干扰技术分析拟南芥Ca²⁺泵基因ECA1的功能. 植物生理学报, 44 (3): 469–475]

Screening and identification of environmental stress responsive *Medicago sativa* Ca²⁺ ATPases based on gene family analyses

ZHANG Mei-Ping, YANG Jun-Kai, SUN Ming-Zhe, JIA Bo-Wei, SUN Xiao-Li*

Crop Stress Molecular Biology Laboratory, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China

Abstract: It is widely accepted that the Ca²⁺ ATPase gene family, belonging to the P-type ATPase superfamily, plays an important role in environmental stress responses. However, up to now, no researches reported the function of alfalfa Ca²⁺ ATPases. Hence, to screening the stress responsive Ca²⁺ ATPases, we used the Hidden Markov Model to search the alfalfa proteome database, and identified a total of 16 Ca²⁺ ATPase family genes in alfalfa genome. Chromosomal location and synteny analysis revealed that alfalfa Ca²⁺ ATPase family members located on 7 chromosomes, and possessed 1 pairs of duplicated genes. By analyzing the topological structure of the phylogenetic tree, we found that alfalfa Ca²⁺ ATPase family was clustered into ACA and ECA subfamilies. The ACA subfamily was further divided into four groups (Group I–IV), and members in each group displayed high similarity in terms of intron–exon organization pattern. Furthermore, we also suggested that alfalfa Ca²⁺ ATPase family protein sequences were highly conserved, including 4 conserved functional domains, 10 transmembrane domains, and 11 conserved motifs. By using the RNA-seq data, we also investigated the expression profiles of alfalfa Ca²⁺ ATPase genes under different environmental stresses, and found that the expression of alfalfa Ca²⁺ ATPase genes, especially *MtACA8* and *MtACA9*, was induced by cold and freezing stresses. By using quantitative real-time PCR analysis, we further confirmed that *MtACA8* and *MtACA9* expression was up-regulated by both cold and freezing stresses. Taken together, results presented in this study will facilitate further research about the biological function of alfalfa Ca²⁺ ATPases in plant responses to environmental stress.

Key words: alfalfa; Ca²⁺ ATPase; gene family analysis; stress responses; expression analyses

Received 2016-10-08 Accepted 2016-12-28

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31500204) and Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (Grant No. C2015035).

*Corresponding author (E-mail: csmb12016@126.com).