

DOI:10.11686/cyxb2024517

http://cyxb.magtech.com.cn

边林, 张岩, 霍晓伟, 等. 紫花苜蓿CKX基因家族鉴定及其对非生物胁迫的响应. 草业学报, 2025, 34(11): 125—135.

BIAN Lin, ZHANG Yan, HUO Xiao-wei, et al. Identification of the CKX gene family in alfalfa and its responses to abiotic stress. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(11): 125—135.

## 紫花苜蓿CKX基因家族鉴定及其对非生物胁迫的响应

边林<sup>1</sup>, 张岩<sup>1</sup>, 霍晓伟<sup>1</sup>, 代蕊<sup>1</sup>, 郭娜<sup>1</sup>, 伊风艳<sup>2</sup>, 高翠萍<sup>1</sup>, 张志强<sup>1,3\*</sup>

(1. 草地资源教育部重点实验室, 内蒙古农业大学草业学院, 内蒙古呼和浩特 010000; 2. 内蒙古农牧科学院, 内蒙古呼和浩特 010031; 3. 国家林业草原北方抗旱耐寒草品种繁育工程技术研究中心, 内蒙古呼和浩特 010000)

**摘要:** 紫花苜蓿是世界上种植最广泛的豆科牧草, 具有产量高、抗逆性强以及适口性好等特点。低温和干旱是影响苜蓿产量、品质及大面积推广的重要非生物胁迫因子。细胞分裂素氧化酶/脱氢酶 (cytokinin oxidase/dehydrogenase, CKX) 能够不可逆地降解细胞分裂素, 调节植物的生长发育, 帮助植物应对环境胁迫。本研究采用生物信息学方法在全基因组水平对紫花苜蓿CKX基因家族进行鉴定和生物信息学分析。结果表明, 紫花苜蓿基因组中鉴定出31个CKX基因, 分布于1、2、3、4、7和8号染色体上。紫花苜蓿CKX基因家族成员编码氨基酸数为273~545个, 除MsCKX30其余均为亲水性蛋白; CKX基因家族分为3个亚族, 且具有较高的保守性; 紫花苜蓿CKX基因家族与蒺藜苜蓿的同源性较高。qPT-PCR结果表明, MsCKX2、MsCKX3、MsCKX7、MsCKX8、MsCKX15、MsCKX16和MsCKX18的表达量受低温胁迫诱导; 干旱胁迫诱导MsCKX2、MsCKX15的表达; 低温和干旱胁迫均能诱导MsCKX15表达。研究结果为紫花苜蓿MsCKX基因功能鉴定提供了参考。

**关键词:** 紫花苜蓿; CKX基因家族; 生物信息学分析; 表达分析

## Identification of the CKX gene family in alfalfa and its responses to abiotic stress

BIAN Lin<sup>1</sup>, ZHANG Yan<sup>1</sup>, HUO Xiao-wei<sup>1</sup>, DAI Rui<sup>1</sup>, GUO Na<sup>1</sup>, YI Feng-yan<sup>2</sup>, GAO Cui-ping<sup>1</sup>, ZHANG Zhi-qiang<sup>1,3\*</sup>

1. Key Laboratory of Grassland Resources of the Ministry of Education, College of Grassland Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010000, China; 2. Inner Mongolia Academy of Agricultural & Animal Husbandry Sciences, Hohhot 010031, China; 3. Technology Engineering Center of Drought and Cold-resistant Grass Breeding in North of the National Forestry and Grassland Administration, Hohhot 010000, China

**Abstract:** Alfalfa (*Medicago sativa*) is the most widely planted legume forage in the world, with a high yield, strong stress resistance, and good palatability. Low temperature and drought are important abiotic stress factors affecting the yield, quality, and distribution of alfalfa. Cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX) irreversibly degrades cytokinin, thereby regulating plant growth and development, and it also contributes to the plant response to environmental stress. In this study, the CKX gene family of alfalfa was identified and analyzed by bioinformatics methods at the whole-genome level. In total, 31 CKX genes were identified in the alfalfa genome, distributed on chromosomes 1, 2, 3, 4, 7, and 8. Members of the CKX gene family members encoded polypeptides of 273—545 amino acids, all of which were hydrophilic proteins except for MsCKX30. In a phylogenetic analysis, the CKX gene

收稿日期: 2024-12-27; 改回日期: 2025-03-10

基金项目: 内蒙古自治区高等学校“青年科技英才支持项目”(NJYT23009), 内蒙古一流学科专项项目(YLXKZX-NND-033), 国家自然科学基金(32060388)和苜蓿分子育种体系构建及种质创制(BR22-11-12)资助。

作者简介: 边林(2000—), 女, 内蒙古包头人, 在读硕士。E-mail: 19847376825@163.com

\* 通信作者 Corresponding author. E-mail: zhangzq19890102@126.com

family grouped into three subfamilies with highly conserved domains, and alfalfa *CKX* genes showed high homology with those of *Medicago truncatula*. Analyses of gene transcript levels by quantitative real-time polymerase chain reaction showed that *MsCKX2*, *MsCKX3*, *MsCKX7*, *MsCKX8*, *MsCKX15*, *MsCKX16*, and *MsCKX18* were induced under low-temperature stress, *MsCKX2* and *MsCKX15* were induced under drought stress, and *MsCKX15* was induced by both low temperature stress and drought stress. These results provide a reference for further research on the functions of *CKX* genes in alfalfa.

**Key words:** alfalfa; *CKX* gene family; bioinformatics analysis; expression analysis

植物激素是植物体内的一类内源性信号分子,主要包括细胞分裂素(cytokinin, CTK)、生长素(indole-3-acetic acid, IAA)、赤霉素(gibberellin, GA)、脱落酸(abscisic acid, ABA)和乙烯(ethylene)<sup>[1]</sup>。尽管其浓度极低,却在植物的整个生命周期中发挥着至关重要的作用。从种子萌发到开花结果,植物激素通过影响基因表达、蛋白质活性和细胞代谢,调节各种生理过程<sup>[2-3]</sup>。CTK最早由Miller等<sup>[4]</sup>在20世纪50年代从玉米(*Zea mays*)胚中发现,是植物生长发育过程中不可或缺的激素,调控植物的许多生长发育过程<sup>[4]</sup>。CTK主要分布在植物茎、根尖的分裂细胞、未成熟和发芽的种子以及生长中的果实中。有研究表明,CTK在根系发育、叶片衰老及逆境表达中扮演着重要角色,特别是在顶端优势的维持和侧芽萌发的过程中,CTK通过与生长素的相互作用,协调植物的生长发育<sup>[5-6]</sup>。细胞分裂素氧化酶/脱氢酶(cytokinin oxidase/dehydrogenase, CKX)作为降解内源性CTK的关键酶,在维持细胞内CTK稳态和适应环境胁迫方面发挥着重要作用<sup>[7-8]</sup>。

*CKX*基因家族在植物体内广泛存在,其成员在结构上高度保守,但在功能上却呈现多样性。近年来,*CKX*基因家族成员已经在多种植物中被鉴定出来,主要集中于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)<sup>[9]</sup>、水稻(*Oryza sativa*)<sup>[10-11]</sup>、玉米<sup>[12]</sup>和大豆(*Glycine max*)<sup>[13]</sup>等植物中。其中,在拟南芥中鉴定出7个*AtCKX*基因,水稻中鉴定出11个*OsCKX*基因,玉米中鉴定出13个*ZmCKX*基因,大豆中鉴定出18个*GmCKX*基因。研究表明,*CKX*基因在调控植物生长发育及胁迫响应等方面具有重要作用<sup>[14-16]</sup>。拟南芥是研究*CKX*基因家族功能的模式植物,Tomás等<sup>[9]</sup>研究发现,*CKX*基因通过调控细胞分裂素水平,影响根尖分生组织活性、侧芽发育以及叶片衰老。Ashikari等<sup>[10]</sup>研究发现,*CKX*基因的过表达导致水稻穗部生长受到抑制,籽粒产量下降,而抑制*CKX*基因的表达可显著增加籽粒产量和粒重,从而能够有效地提高水稻产量。在大豆的研究中发现,*GmCKXs*在苗期盐和干旱胁迫的响应中发挥重要作用。在6-苄基腺嘌呤(6-benzylaminopurine, 6-BA)和IAA处理下,*GmCKX1*、*GmCKX6*和*GmCKX9*的表达量减少,而*GmCKX10*和*GmCKX18*的表达量增加<sup>[13]</sup>。

紫花苜蓿(*Medicago sativa*)是一种优质的豆科牧草,具有产量高、品质好和抗逆性强等特点<sup>[17]</sup>。在我国,紫花苜蓿主要种植于东北、华北和西北等寒冷干旱地区,其生长发育常受逆境胁迫的影响,因此挖掘提高植物抗逆性的基因具有重要意义。迄今为止,在全基因组水平对紫花苜蓿*WRKY*、*ERF*、*NAC*等转录因子基因家族已进行了较为系统的鉴定及功能分析<sup>[18-20]</sup>,但关于紫花苜蓿*CKX*基因家族的系统研究未见报道。因此,本研究利用生物信息学手段,从基因组水平对紫花苜蓿*CKX*基因家族成员进行系统分析和鉴定,并对其蛋白理化性质、基因结构、染色体定位、系统进化以及对干旱胁迫和冷胁迫的响应进行分析,以期对紫花苜蓿*CKX*基因家族在冷胁迫、干旱胁迫中的功能研究提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与处理

试验材料为‘草原4号’紫花苜蓿,由内蒙古农业大学草育种课题组保存。将种子消毒后放入铺有蒸馏水浸润双层滤纸的培养皿中,置于25℃光照培养箱内萌发,于2024年4月将苜蓿种子种植于盛有营养土和蛭石(2:1)的花盆中,栽培时间为长日照条件(16 h光照/8 h黑暗),定期浇水。

将紫花苜蓿幼苗置于4℃低温培养箱中,分别于0、2、6、12、24、48 h采集样品;进行空气干旱处理<sup>[21]</sup>,分别于0、2、4、8、12和24 h取样。所有处理设置3次重复。取样后,立即将样品快速冷冻在液氮中,并在-80℃保存以供后续分析。

## 1.2 紫花苜蓿 CKX 基因家族成员的鉴定

从 Figshare 数据库中下载紫花苜蓿<sup>[22]</sup>全基因组的序列、基因注释以及蛋白序列文件([https://figshare.com/projects/whole\\_genome\\_sequencing\\_and\\_assembly\\_of\\_Medicago\\_sativa](https://figshare.com/projects/whole_genome_sequencing_and_assembly_of_Medicago_sativa))等,从 PFAM 数据库中获取 CKX 基因家族的隐马氏模型序列谱(PF09265),利用 TBtools 软件进行 CKX 基因家族鉴定与筛选,获得潜在的 CKX 蛋白质序列,使用 SMART (<http://smart.embl.de>)和 NCBI 在线工具 BatchCD-Search(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)进行蛋白保守结构分析,以确定其含有 CKX 基因家族特有的保守结构域。

## 1.3 紫花苜蓿 CKX 基因家族蛋白理化性质及结构预测分析

使用 ExPASy(<https://www.expasy.org/>)在线网站对紫花苜蓿 CKX 基因家族氨基酸序列进行氨基酸数目、总平均亲水性、等电点、分子量、不稳定系数等相关的蛋白理化性质分析<sup>[23]</sup>,利用在线软件 WOLF PSORT [WoLF PSORT: Protein Subcellular Localization Prediction ([hgsc.jp](http://hgsc.jp))]对蛋白质亚细胞定位进行预测,利用 NCBI Blast [BLAST: Basic Local Alignment Search Tool ([nih.gov](http://nih.gov))]在线网站进行序列比对,通过 SOPMA([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred\\_sopma.pl](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl))在线网站预测蛋白质二级结构;利用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)在线软件预测蛋白质三级结构。从紫花苜蓿基因组 gff 文件中提取 MsCKX 的基因结构信息,从软件上获取基因的上下游序列、外显子以及内含子等信息。利用在线工具 MEME([https://meme-suite.org/meme/doc/meme.html?man\\_type=web](https://meme-suite.org/meme/doc/meme.html?man_type=web))获得保守结构域氨基酸位点的 XML 文件,保守基序(Motif)的数目定义为 10。使用 TBtools 工具结合所获取的信息对紫花苜蓿 CKX 家族的基因结构组成及保守结构域氨基酸位点的 XML 文件进行绘制。

## 1.4 紫花苜蓿 CKX 基因家族系统进化分析和共线性分析

使用 MEGA 7.0 软件对紫花苜蓿 CKX 基因家族氨基酸序列以及拟南芥 2 个物种的氨基酸序列进行多序列比对,再通过 MEGA 7.0 软件,采用邻接法(neighbor-joining algorithm)构建系统进化树<sup>[24]</sup>,并使用在线软件 Evolview (<https://evolgenius.info/evolview-v2/#login>)进行美化。利用 TBtools 软件对紫花苜蓿、蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*)、大豆进行共线性分析并分别可视化处理。

## 1.5 RNA 提取和实时荧光定量 PCR 分析

使用 TRIzol Ragent (康为)试剂从采集的紫花苜蓿叶片样品中提取总 RNA,将所提取的 RNA 放置于  $-80^{\circ}\text{C}$  保存,利用 Easy Script First-Strand cDNA Synthesis 试剂盒(江苏)获得相应的 cDNA,将其置于  $-20^{\circ}\text{C}$  储存,便于后续试验。利用软件 Primer 5.0 设计引物(表 1), $\beta$ -actin 为内参引物。荧光定量 PCR 的反应体系为  $20\ \mu\text{L}$ ,包含 TB Green Premix Ex Taq II (TliR NaseH Plus) ( $2\times$ )  $10\ \mu\text{L}$ 、上下游引物各  $0.4\ \mu\text{L}$ 、cDNA 模板  $4\ \mu\text{L}$  ( $80$

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of qRT-PCR

引物名称 Primers name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	引物名称 Primers name	引物序列 Primer sequence (5'-3')
qRT-PCR-MsCKX2-F1	GGAGGGCTTGGTCAATTTGG	qRT-PCR-MsCKX10-R2	AGGCCATATTGTTCCACCCA
qRT-PCR-MsCKX2-R1	TTGGCTGGCTTTAAGAGGGT	qRT-PCR-MsCKX15-F1	ATAGCAGCCAGAGGACAAGG
qRT-PCR-MsCKX2-F2	AGCACGTCAAGGACTAGTCA	qRT-PCR-MsCKX15-R1	CAGGTGCAAGTCCATGTTCA
qRT-PCR-MsCKX2-R2	AAGAGTGCCTCCAACAGTGA	qRT-PCR-MsCKX15-F2	CTACCACCAGAGCTAGCCAA
qRT-PCR-MsCKX3-F1	GCAACAAGTGGGCTGATAGG	qRT-PCR-MsCKX15-R2	CCTTGTCCTCTGGCTGCTAT
qRT-PCR-MsCKX3-R1	AGTGCCAAAGTGTTC AACCC	qRT-PCR-MsCKX16-F1	CACACGAGGACAAGCTATGG
qRT-PCR-MsCKX7-F2	AATTCCCAGCAGCAGTGTTC	qRT-PCR-MsCKX16-R1	CAGTCCAAGAAACAGGTGCA
qRT-PCR-MsCKX7-R2	TCAACAACAACACCATCACGT	qRT-PCR-MsCKX16-F2	TGGCAACCTCGTACATGAAT
qRT-PCR-MsCKX8-F1	GCTGGTGTAAGTGGACAAGC	qRT-PCR-MsCKX16-R2	ATAGCTTGTCCTCGTGTGGA
qRT-PCR-MsCKX8-R1	TGGAAGGTGCTGGTTCAAGA	qRT-PCR-MsCKX18-F2	AAGCCCCTGATATGGTGAGG
qRT-PCR-MsCKX8-F2	TGTTGCAGCAAGAGGACATG	qRT-PCR-MsCKX18-R2	ATAGAGAACCGGTCCAGCTG
qRT-PCR-MsCKX8-R2	AGAGAGTGCCACCAACTGTT	qRT-PCR- $\beta$ -actin-F	TTTGAGACTTTCAATGTGCCGCC
qRT-PCR-MsCKX10-F2	TGAACCGAACAAAGTGGGATG	qRT-PCR- $\beta$ -actin-R	TAGCATGTGGGAGTGATAACCCT

ng·μL<sup>-1</sup>)、ROX Reference Dye(50×) 0.2 μL、ddH<sub>2</sub>O 5 μL。反应程序为:95 °C 30 s;95 °C 5 s;60 °C 30 s;95 °C 15 s;40个循环。每个样品3个重复,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法<sup>[25]</sup>计算基因的相对表达量。

## 1.6 数据处理

利用Excel 2019统计相关试验数据,利用SPSS 21.0进行方差分析,使用 $t$ 检验比较5%显著性水平下的平均值,使用Origin绘制柱形图。

## 2 结果与分析

### 2.1 紫花苜蓿CKX基因家族成员鉴定与基本信息分析

通过对紫花苜蓿基因家族成员进行筛选和鉴定,最终在紫花苜蓿中鉴定出31个CKX基因家族成员,并将其命名为 $MsCKX1\sim MsCKX31$ 。理化性质预测结果显示(表2),紫花苜蓿 $MsCKX$ 基因家族编码的氨基酸为273~

表2  $MsCKX$ 基因家族的基本信息分析

Table 2 Bioinformatic analysis of  $MsCKX$  gene family in alfalfa

基因登录号 Gene ID	基因名 Gene name	染色体号 Chromosome number	氨基酸数目 Number of amino acids (aa)	分子质量 Molecular weight (MW, Da)	等电点 Isoelectric point (pI)	总平均亲水性 Grand average of hydropathicity (GRAVY)	不稳定系数 Instability index (II)	亚细胞定位 Subcellular localization
MS.gene57642.t1	$MsCKX1$	Chr8.3	526	59752.51	8.37	-0.193	35.42	叶绿体 Chloroplast
MS.gene025106.t1	$MsCKX2$	Chr2.3	518	58195.70	6.13	-0.105	31.71	叶绿体 Chloroplast
MS.gene85633.t1	$MsCKX3$	Chr2.1	518	58155.64	6.13	-0.098	30.53	叶绿体 Chloroplast
MS.gene21966.t1	$MsCKX4$	Chr2.4	518	57982.41	6.36	-0.090	29.52	叶绿体 Chloroplast
MS.gene051863.t1	$MsCKX5$	Chr8.2	476	53638.81	5.11	-0.192	38.56	叶绿体 Chloroplast
MS.gene57641.t1	$MsCKX6$	Chr8.3	537	61217.66	5.77	-0.288	41.04	细胞质 Cytoplasm
MS.gene85629.t1	$MsCKX7$	Chr2.1	545	62258.97	8.15	-0.293	37.19	叶绿体 Chloroplast
MS.gene026082.t1	$MsCKX8$	Chr2.2	545	62135.90	7.72	-0.267	36.00	叶绿体 Chloroplast
MS.gene051862.t1	$MsCKX9$	Chr8.2	415	47459.29	7.24	-0.267	37.40	细胞质 Cytoplasm
MS.gene069617.t1	$MsCKX10$	Chr3.4	454	51318.47	6.07	-0.205	37.62	细胞质 Cytoplasm
MS.gene42561.t1	$MsCKX11$	Chr7.1	544	61440.09	6.33	-0.144	36.79	内质网 Endoplasmic reticulum
MS.gene014082.t1	$MsCKX12$	Chr7.2	544	61459.14	6.39	-0.147	37.30	内质网 Endoplasmic reticulum
MS.gene017841.t1	$MsCKX13$	Chr7.3	544	61426.02	6.26	-0.144	36.95	内质网 Endoplasmic reticulum
MS.gene85631.t1	$MsCKX14$	Chr2.1	463	51802.53	6.42	-0.087	29.53	细胞质 Cytoplasm
MS.gene025468.t1	$MsCKX15$	Chr4.4	459	52111.26	6.88	-0.260	41.46	细胞质 Cytoplasm
MS.gene71156.t1	$MsCKX16$	Chr4.1	459	52137.21	6.75	-0.263	40.36	细胞质 Cytoplasm
MS.gene012275.t1	$MsCKX17$	Chr8.4	324	37503.00	8.87	-0.399	45.53	细胞核 Nucleus
MS.gene016164.t1	$MsCKX18$	Chr1.2	509	56811.82	6.29	-0.202	34.52	细胞质 Cytoplasm
MS.gene57615.t1	$MsCKX19$	Chr8.3	312	35813.91	8.27	-0.357	42.27	细胞核 Nucleus
MS.gene63612.t1	$MsCKX20$	Chr3.2	406	45391.81	6.68	-0.180	34.28	叶绿体 Chloroplast
MS.gene93997.t1	$MsCKX21$	Chr3.1	352	39525.18	6.12	-0.109	35.72	叶绿体 Chloroplast
MS.gene070417.t1	$MsCKX22$	Chr3.3	352	39425.07	6.23	-0.100	34.43	叶绿体 Chloroplast
MS.gene34593.t1	$MsCKX23$	Chr4.3	370	41484.16	6.49	-0.221	39.43	细胞质 Cytoplasm
MS.gene025112.t1	$MsCKX24$	Chr2.4	297	35130.28	8.98	-0.467	43.14	叶绿体 Chloroplast
MS.gene42306.t1	$MsCKX25$	Chr3.2	422	46570.09	5.54	-0.099	27.05	胞外 Extracellular
MS.gene051560.t1	$MsCKX26$	Chr1.3	411	45309.57	5.47	-0.123	32.81	细胞质 Cytoplasm
MS.gene52444.t1	$MsCKX27$	Chr1.4	405	44558.64	5.38	-0.134	32.55	细胞质 Cytoplasm
MS.gene33043.t1	$MsCKX28$	Chr1.1	405	44544.57	5.29	-0.133	32.55	细胞质 Cytoplasm
MS.gene35542.t1	$MsCKX29$	Chr4.2	301	33828.21	5.95	-0.196	39.14	细胞质 Cytoplasm
MS.gene014478.t1	$MsCKX30$	Chr3.1	386	42018.91	5.48	0.042	30.42	细胞膜 Plasma membrane
MS.gene064702.t1	$MsCKX31$	Chr3.4	273	29908.98	5.29	-0.039	32.93	细胞质 Cytoplasm

545 个, 分子量为 29908.98~62258.97 Da; 9 个蛋白的等电点小于 6, 其余蛋白等电点均在 6 以上; 除 *MsCKX6*、*MsCKX15*、*MsCKX16*、*MsCKX17*、*MsCKX19* 和 *MsCKX24* 以外, 其余蛋白的不稳定系数均在 40 以下, 具有较好的稳定性; *MsCKX30* 总平均亲水性为正值, 其余均为负值, 说明大部分蛋白属于亲水性蛋白; 亚细胞定位预测分析结果显示, *MsCKX* 基因家族大部分成员位于叶绿体和细胞质中, *MsCKX11*~*MsCKX13* 位于内质网中, *MsCKX17*、*MsCKX19* 位于细胞核中, *MsCKX30* 位于细胞膜中, 而 *MsCKX25* 位于胞外。

## 2.2 紫花苜蓿 *CKX* 基因家族蛋白的二级结构和三级结构预测分析

通过 SOPMA 在线网站预测蛋白二级结构, 结果显示(表 3), *CKX* 蛋白二级结构主要由  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -转角、延伸链、无规则卷曲组成。其中无规则卷曲占比最高, 为 44.40%,  $\alpha$ -螺旋次之, 为 39.39%,  $\beta$ 转角最低, 为 7.31%。蛋白三级结构预测由 SWISS-MODEL 完成, 结果显示(图 1), *MsCKX1*、*MsCKX2*、*MsCKX3*、*MsCKX4* 结构相似, *MsCKX12*、*MsCKX13*、*MsCKX14* 结构相似, *MsCKX21*、*MsCKX22*、*MsCKX23*、*MsCKX29*、*MsCKX31* 结构相似, *MsCKX15*、*MsCKX16* 结构相似, *MsCKX26*、*MsCKX27* 结构相似, 剩下家族成员结构均不相似。

表 3 *MsCKX* 蛋白质二级结构

Table 3 The secondary structure of *MsCKX* proteins in alfalfa (%)

基因登录号 Gene ID	基因名 Gene name	蛋白质 Protein	$\alpha$ -螺旋 Alpha helix	$\beta$ -转角 Beta turn	延伸链 Extended strand	无规则卷曲 Random coil
MS. gene57642. t1	<i>MsCKX1</i>	<i>MsCKX1</i>	33.46	5.70	18.63	42.21
MS. gene025106. t1	<i>MsCKX2</i>	<i>MsCKX2</i>	35.71	5.41	19.69	39.19
MS. gene85633. t1	<i>MsCKX3</i>	<i>MsCKX3</i>	33.98	5.79	20.08	40.15
MS. gene21966. t1	<i>MsCKX4</i>	<i>MsCKX4</i>	34.94	6.18	20.46	38.42
MS. gene051863. t1	<i>MsCKX5</i>	<i>MsCKX5</i>	32.35	6.72	19.75	41.18
MS. gene57641. t1	<i>MsCKX6</i>	<i>MsCKX6</i>	37.43	5.59	16.95	40.04
MS. gene85629. t1	<i>MsCKX7</i>	<i>MsCKX7</i>	31.93	6.24	17.43	44.40
MS. gene026082. t1	<i>MsCKX8</i>	<i>MsCKX8</i>	33.39	5.69	17.98	42.94
MS. gene051862. t1	<i>MsCKX9</i>	<i>MsCKX9</i>	32.53	7.71	20.00	39.76
MS. gene069617. t1	<i>MsCKX10</i>	<i>MsCKX10</i>	33.26	6.17	19.82	40.75
MS. gene42561. t1	<i>MsCKX11</i>	<i>MsCKX11</i>	31.07	5.51	19.30	44.12
MS. gene014082. t1	<i>MsCKX12</i>	<i>MsCKX12</i>	29.04	6.99	20.77	43.20
MS. gene017841. t1	<i>MsCKX13</i>	<i>MsCKX13</i>	31.07	6.07	19.85	43.01
MS. gene85631. t1	<i>MsCKX14</i>	<i>MsCKX14</i>	33.05	5.62	20.52	40.82
MS. gene025468. t1	<i>MsCKX15</i>	<i>MsCKX15</i>	32.24	6.54	19.61	41.61
MS. gene71156. t1	<i>MsCKX16</i>	<i>MsCKX16</i>	32.24	6.10	20.70	40.96
MS. gene012275. t1	<i>MsCKX17</i>	<i>MsCKX17</i>	37.35	5.86	17.59	39.20
MS. gene016164. t1	<i>MsCKX18</i>	<i>MsCKX18</i>	31.83	6.29	20.04	41.85
MS. gene57615. t1	<i>MsCKX19</i>	<i>MsCKX19</i>	38.46	5.45	17.63	38.46
MS. gene63612. t1	<i>MsCKX20</i>	<i>MsCKX20</i>	36.70	5.91	19.95	37.44
MS. gene93997. t1	<i>MsCKX21</i>	<i>MsCKX21</i>	31.53	5.40	20.74	42.33
MS. gene070417. t1	<i>MsCKX22</i>	<i>MsCKX22</i>	31.82	6.25	20.45	41.48
MS. gene34593. t1	<i>MsCKX23</i>	<i>MsCKX23</i>	30.81	5.68	19.46	44.05
MS. gene025112. t1	<i>MsCKX24</i>	<i>MsCKX24</i>	39.39	5.39	16.50	38.72
MS. gene42306. t1	<i>MsCKX25</i>	<i>MsCKX25</i>	37.44	5.45	17.06	40.05
MS. gene051560. t1	<i>MsCKX26</i>	<i>MsCKX26</i>	30.90	5.60	19.46	44.04
MS. gene52444. t1	<i>MsCKX27</i>	<i>MsCKX27</i>	31.60	7.16	18.52	42.72
MS. gene33043. t1	<i>MsCKX28</i>	<i>MsCKX28</i>	33.09	6.91	19.51	40.49
MS. gene35542. t1	<i>MsCKX29</i>	<i>MsCKX29</i>	32.89	7.31	22.59	37.21
MS. gene014478. t1	<i>MsCKX30</i>	<i>MsCKX30</i>	36.27	7.25	20.98	35.49
MS. gene064702. t1	<i>MsCKX31</i>	<i>MsCKX31</i>	34.07	6.59	20.51	38.83

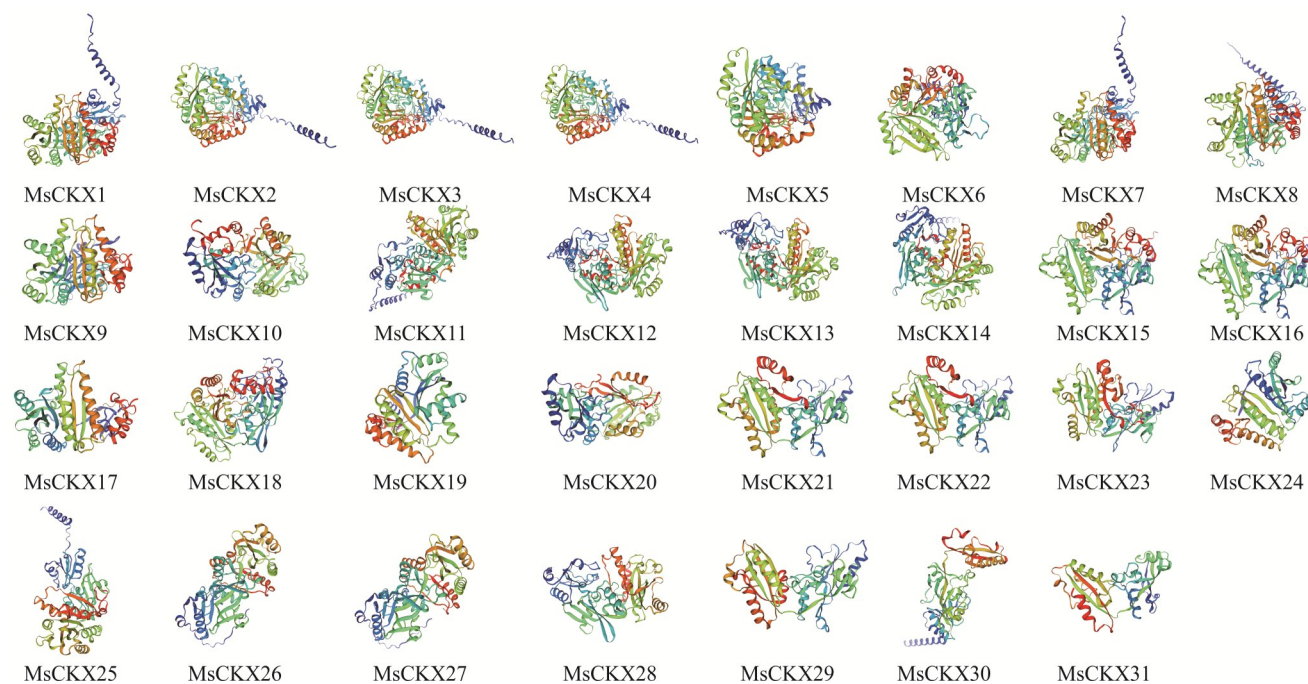


图1 MsCKX蛋白质三级结构

Fig. 1 The tertiary structure of MsCKX proteins in alfalfa

### 2.3 紫花苜蓿CKX基因家族保守基序和基因结构分析

通过MEME分析,CKX基因家族共分为3个亚家族(图2A),在CKX家族成员中共发现了10个保守基序,命名为motif 1~motif 10。这10个保守基序的序列长度最小为21个氨基酸,最大为50个氨基酸。其中,CKX基因家族的每个成员均包含motif 1~motif 9;MsCKX15缺少motif 7;MsCKX8、MsCKX9、MsCKX10缺少motif 10,但具有相似的基序且排序相同,这种基序分布可能导致CKX基因家族具有相同或相似的生物学功能(图2B)。对紫花苜蓿CKX基因结构分析,MsCKX家族成员由3~7个外显子组成,其中只有MsCKX27有3个外显子,MsCKX20有6个外显子,MsCKX17有7个外显子,MsCKX17、MsCKX18、MsCKX19、MsCKX21、MsCKX22、MsCKX26、MsCKX28、MsCKX30、MsCKX31有4个外显子,其余均具有5个外显子(图2C)。

### 2.4 紫花苜蓿CKX基因家族系统进化分析

为进一步了解紫花苜蓿CKX基因家族的系统发育,从NCBI数据库中选取紫花苜蓿和拟南芥的CKX基因家族成员进行聚类分析。31个MsCKX、7个AtCKX被划分为3个亚组(group1、group2、group3)。MsCKX基因家族集中于3个亚组中,在MsCKX蛋白中,group1包含13个蛋白,分别为MsCKX1、MsCKX2、MsCKX3、MsCKX4、MsCKX5、MsCKX6、MsCKX7、MsCKX8、MsCKX9、MsCKX14、MsCKX17、MsCKX19、MsCKX24;group2包含MsCKX25、MsCKX30和MsCKX31;group3包含15个蛋白,分别为MsCKX10、MsCKX11、MsCKX12、MsCKX13、MsCKX15、MsCKX16、MsCKX18、MsCKX20、MsCKX21、MsCKX22、MsCKX23、MsCKX26、MsCKX27、MsCKX28、MsCKX29(图3)。

### 2.5 紫花苜蓿CKX基因家族共线性分析

在31个MsCKX基因家族成员中,发现一些MsCKX基因在苜蓿基因组中存在片段、串联重复。在chr3、chr4和chr7中为染色体的内部基因复制事件,chr1和chr8之间存在串联基因,剩余染色体不存在内部基因复制和串联事件。为进一步了解CKX基因家族在不同物种之间可能发生的进化事件,构建了紫花苜蓿与拟南芥、蒺藜苜蓿的种间共线性图谱。结果显示,紫花苜蓿与拟南芥共线的CKX基因对有12对,与蒺藜苜蓿共线的CKX基因对有25对(图4)。紫花苜蓿与蒺藜苜蓿的同源基因对数量比紫花苜蓿与拟南芥的同源基因对高,这可能是由于蒺藜苜蓿和紫花苜蓿都是豆科植物。

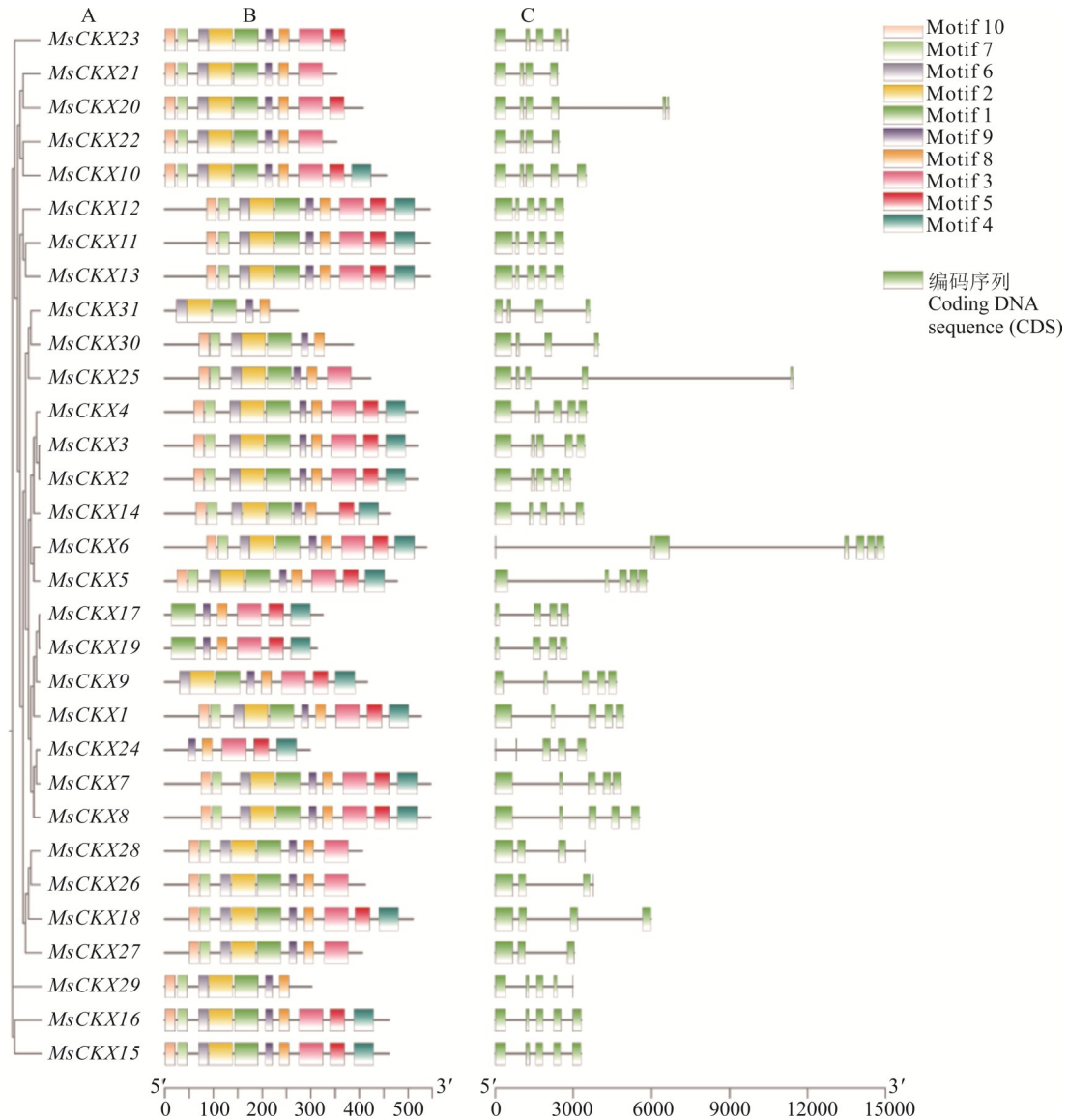


图 2 *MsCKX* 基因家族系统进化关系 (A)、保守基序 (B) 及基因结构 (C) 分析

Fig. 2 Phylogenetic relationships (A), conserved motif (B) and gene structure (C) analyses of the *MsCKX* gene family

## 2.6 紫花苜蓿 CKX 基因家族在非生物胁迫下的表达分析

为进一步确认紫花苜蓿 CKX 基因在非生物胁迫下的表达模式,选取 8 个紫花苜蓿 CKX 基因进行 qRT-PCR 验证。结果表明,紫花苜蓿 CKX 基因在低温胁迫处理下,除 *MsCKX10* 表达量下调,其余均上调。与对照相比 *MsCKX3*、*MsCKX7*、*MsCKX15* 和 *MsCKX16* 表达量均上调,*MsCKX2* 在 2、6、12、24 h 表达量上调,在 48 h 表达量下调;*MsCKX8*、*MsCKX18* 在 24 h 表达量下调,在其余时间表达量上调。与对照相比,*MsCKX3* 在 2、24 h 表达量显著上调,但是 2、24 h 间的表达量没有显著差异;*MsCKX7*、*MsCKX15*、*MsCKX16* 在 48 h 较对照有显著差异 ( $P < 0.05$ )。在干旱胁迫处理下,与对照相比,*MsCKX2* 表达量在各个时间均显著上调,分别上调了 48.71%、278.65%、48.74%、63.09% 和 243.71% ( $P < 0.05$ ),*MsCKX18* 表达量在 2、4、8、12、24 h 分别显著下调了 90.85%、96.11%、98.12%、88.13%、96.64% ( $P < 0.05$ ),*MsCKX10* 在 2 h 表达量最高,比对照高了 81.19%。与 0 h 相比,*MsCKX7*、*MsCKX15*、*MsCKX16* 在 12 h 表达量最高,*MsCKX2*、*MsCKX3* 在 4 h 表达量最高,*MsCKX8* 在 8 h 表达量最高。通过紫花苜蓿 CKX 基因家族在两种非生物胁迫处理下的分析,在低温、干旱胁迫处理下均可诱导紫花苜蓿 *MsCKX15* 基因表达(图 5)。



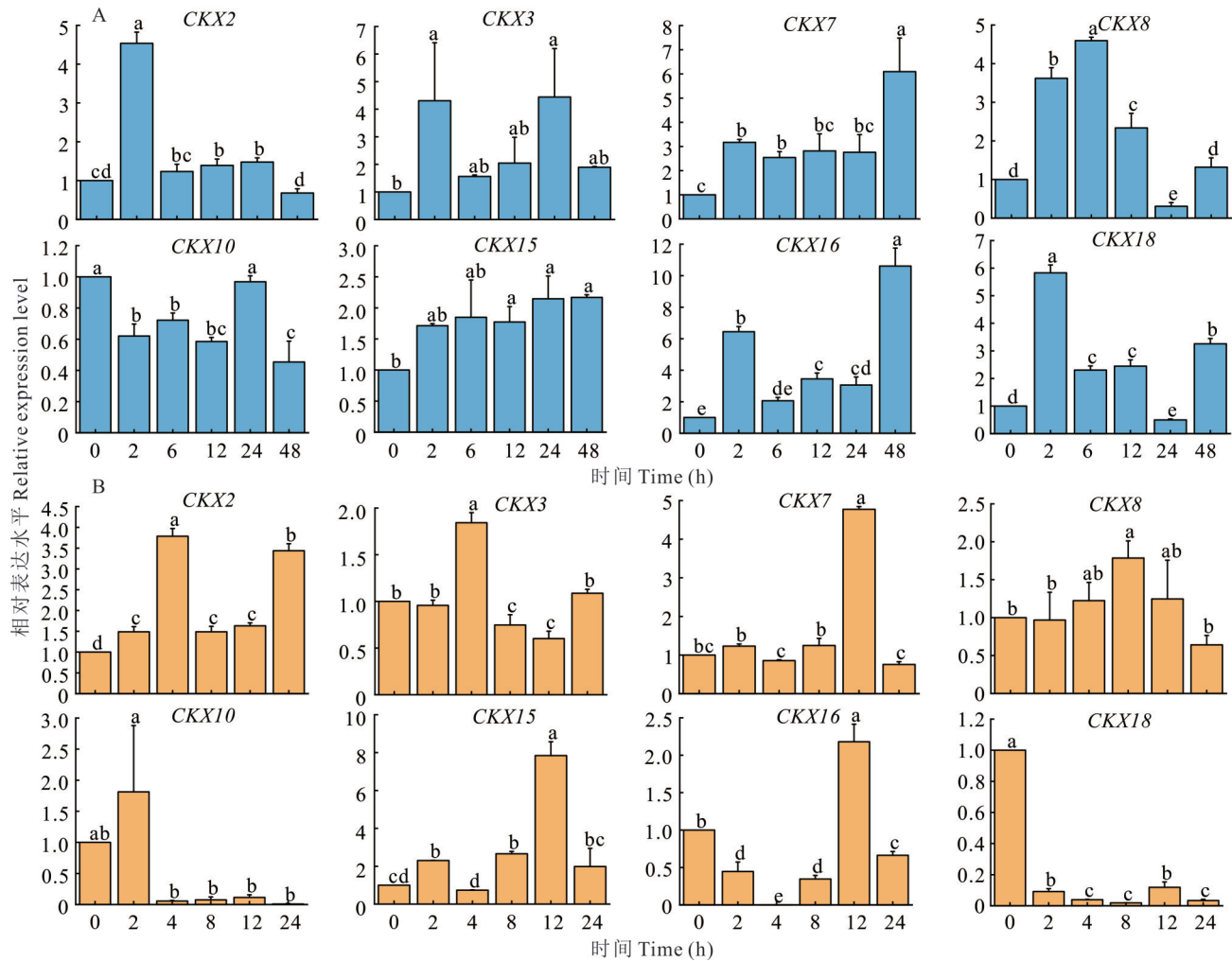


图 5 紫花苜蓿 *MsCKX* 基因在非生物胁迫下的 qRT-PCR 分析

Fig. 5 qRT-PCR analysis of *MsCKX* gene under abiotic stresses in alfalfa

A: *MsCKXs* 基因在低温胁迫下的表达量 Expressions of *MsCKXs* under low temperature stress; B: *MsCKXs* 基因在干旱胁迫下的表达量 Expressions of *MsCKXs* under drought stress. 不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。Different lowercase letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ )。)

*CKX* 家族基因对冷胁迫和干旱胁迫具有重要调控作用<sup>[34]</sup>, 可作为植物耐寒、抗旱分子育种的候选基因。为了探讨紫花苜蓿 *CKX* 家族基因对低温和干旱胁迫的响应, 本研究随机选取了 8 个 *CKX* 基因家族成员进行 qRT-PCR 分析。结果显示, 在干旱胁迫下 *MsCKX2*、*MsCKX15* 表达量上调, *MsCKX18* 表达量下调; 而在低温胁迫条件下, *MsCKX3*、*MsCKX7*、*MsCKX15* 和 *MsCKX16* 表达量上调, 只有 *MsCKX10* 的表达量下调。 *MsCKX15* 在低温胁迫下表达量在各个处理时间均上调, *MsCKX15* 在干旱胁迫下表达量在 2、8、12、24 h 上调。在大豆<sup>[13]</sup>中发现干旱胁迫下, *GmCKX13* 的表达量上调, 而 *GmCKX3*、*GmCKX9* 和 *GmCKX8* 的表达量下调。 *GmCKX14* 在叶片中表达量上调, 而在根系中下调。与对照相比, 干旱胁迫处理使大豆胚根中的 *CKX* 酶活性提高了 39.35%, 而 6-BA 和 IAA 处理使 *CKX* 酶活性分别降低了 38.33% 和 26.90%。在鹅掌楸 (*Liriodendron chinense*)<sup>[35]</sup> 中, *LcCKX5* 在低温胁迫处理下表达量下调; 在干旱胁迫下, *LcCKX5* 在根中的表达量先下调后上调, 茎中的表达无显著变化, 而在叶片中则表现为下调。因此, 基于本研究结果, 从全基因组水平研究紫花苜蓿 *CKX* 基因家族, 将为挖掘其抗寒、抗旱的优异基因以及通过基因工程技术创制高效抗寒、抗旱的新型紫花苜蓿种质奠定基础。

#### 4 结论

本研究从紫花苜蓿基因组中共鉴定获得 31 个 *CKX* 基因家族成员, 定位到 6 条染色体上。 *CKX* 基因家族成员的外显子为 4~7 个; *MsCKX* 基因家族成员除 *MsCKX30* 外其余均为亲水性蛋白; 亚细胞定位预测分布在细胞

质、叶绿体、内质网、细胞核、胞外和细胞膜中。通过qRT-PCR分析了8个CKX基因在低温和干旱条件下的表达情况,在低温胁迫处理中,与对照相比,*MsCKX3*、*MsCKX7*、*MsCKX15*和*MsCKX16*表达量上调,*MsCKX10*表达量则下调;在干旱胁迫处理下,*MsCKX2*、*MsCKX15*表达量上调,*MsCKX18*表达量下调。此外,紫花苜蓿*MsCKX15*基因在低温和干旱胁迫下的表达量均高于对照。

### 参考文献 References:

- [1] Jan Š, Ioanna A, Jitka Š, *et al.* Plant hormonomics: Multiple phytohormone profiling by targeted metabolomics. *Plant Physiology*, 2018, 177(2): 476–489.
- [2] Tu T L. Coordinated cytokinin signaling and auxin biosynthesis mediates arsenate-induced root growth inhibition. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2021.  
涂田莉. 细胞分裂素信号传导和生长素生物合成协同调控砷酸盐诱导的根生长抑制. 泰安: 山东农业大学, 2021.
- [3] Wang H B. Mechanism analysis of phytohormone regulates seed abortion and fruit development of seedlesspear. Yangling: Northwest A&F University, 2021.  
王会滨. 激素调控无籽梨种子败育及果实发育的机理解析. 杨凌: 西北农林科技大学, 2021.
- [4] Miller C O, Skoog F, Okumura F S, *et al.* Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division 1, 2. *Journal of the American Chemical Society*, 1956, 78(7): 1375–1380.
- [5] Dörte M, Ottoline L. Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. *Annals of Botany*, 2011, 107(7): 1203–1212.
- [6] O'Brien J A, Benková E. Cytokinin cross-talking during biotic and abiotic stress responses. *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4: 451.
- [7] Vyroubalová S, Václavíková K, Turecková V, *et al.* Characterization of new maize genes putatively involved in cytokinin metabolism and their expression during osmotic stress in relation to cytokinin levels. *Plant Physiology*, 2009, 151(1): 433–447.
- [8] Le D, Nishiyama R, Watanabe Y, *et al.* Identification and expression analysis of cytokinin metabolic genes in soybean under normal and drought conditions in relation to cytokinin levels. *PLoS One*, 2012, 7: e42411.
- [9] Tomás W, Václav M, Valérie L, *et al.* Cytokinin-deficient transgenic arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *The Plant Cell*, 2003, 15(11): 2532–2550.
- [10] Ashikari M, Sakakibara H, Lin S, *et al.* Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science*, 2005, 309(5735): 741–745.
- [11] Rong C Y, Liu Y X, Chang Z Y, *et al.* Cytokinin oxidase/dehydrogenase family genes exhibit functional divergence and overlap in rice growth and development, especially in control of tillering. *Journal of Experimental Botany*, 2022, 73(11): 3552–3568.
- [12] Zalabák D, Galuszka P, Mrízová K, *et al.* Biochemical characterization of the maize cytokinin dehydrogenase family and cytokinin profiling in developing maize plantlets in relation to the expression of cytokinin dehydrogenase genes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, 74: 283–293.
- [13] Du Y, Zhang Z, Gu Y, *et al.* Genome-wide identification of the soybean cytokinin oxidase/dehydrogenase gene family and its diverse roles in response to multiple abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1163219.
- [14] Mameaux S, Cockram J, Thiel T, *et al.* Molecular, phylogenetic and comparative genomic analysis of the cytokinin oxidase/dehydrogenase gene family in the Poaceae. *Plant Biotechnology Journal*, 2012, 10(1): 67–82.
- [15] Evans T G, Song J, Jameson P E. Micro-scale chlorophyll analysis and developmental expression of a cytokinin oxidase/dehydrogenase gene during leaf development and senescence. *Plant Growth Regulation*, 2012, 66: 95–99.
- [16] Brugière N, Jiao S, Hantke S, *et al.* Cytokinin oxidase gene expression in maize is localized to the vasculature, and is induced by cytokinins, abscisic acid, and abiotic stress. *Plant Physiology*, 2003, 132(3): 1228–1240.
- [17] Li S S, Li H, Yang Z, *et al.* Research progress on evaluation indexes of alfalfa germplasm resources in China. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2019(3): 47–51.  
李莎莎, 李红, 杨昱, 等. 我国苜蓿种质资源评价指标研究进展. 黑龙江畜牧兽医, 2019(3): 47–51.
- [18] Tang L L, Cai H, Zhai H, *et al.* Overexpression of *Glycine soja* *WRKY20* enhances both drought and salt tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2014, 118: 77–86.
- [19] Jin X, Yin X, Ndayambaza B, *et al.* Genome-wide identification and expression profiling of the *ERF* gene family in *Medicago sativa* L. under various abiotic stresses. *DNA and Cell Biology*, 2019, 38(10): 1056–1068.

- [20] Min X, Jin X, Zhang Z, *et al.* Genome-wide identification of NAC transcription factor family and functional analysis of the abiotic stress-responsive genes in *Medicago sativa* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2020, 39: 324–337.
- [21] Yang P, Zhang P, Li B, *et al.* Effect of nodules on dehydration response in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 2013, 86: 29–34.
- [22] Chen H, Zeng Y, Yang Y, *et al.* Allele-aware chromosome-level genome assembly and efficient transgene-free genome editing for the autotetraploid cultivated alfalfa. *Nature Communications*, 2020, 11: 2494.
- [23] Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, *et al.* ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(Web Server issue): W597–W603.
- [24] He F, Zhang L, Zhao G, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of the NAC gene family in alfalfa revealed its potential roles in response to multiple abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(17): 10015.
- [25] Wang Z H, Li W, Luo Y L, *et al.* Overview of PCR technology and calibration methods of PCR instrument. *Industrial Metrology*, 2024, 34(S1): 1–4.  
王智辉, 黎巍, 罗逸龙, 等. PCR技术及PCR仪校准方法概述. *工业计量*, 2024, 34(S1): 1–4.
- [26] Guo C Z. Identification and analysis of CKX gene family in apple. *Molecular Plant Breeding*, 2022, 20(4): 1104–1111.  
郭彩珍. 苹果CKX基因家族的鉴定及分析. *分子植物育种*, 2022, 20(4): 1104–1111.
- [27] Wang X Y, Zhang T, Li C S, *et al.* Identify CmCKXs gene family and its effect on fruit set in cucurbit melon. *Molecular Plant Breeding*, (2024-11-29)[2024-12-27]. <https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20241129.1148.015>.  
王雪艳, 张婷, 李朝森, 等. 甜瓜CKX基因家族鉴定及对坐果的影响. *分子植物育种*, (2024-11-29)[2024-12-27]. <https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20241129.1148.015>.
- [28] Ahmad B, Zhang S, Yao J, *et al.* Genomic organization of the B3-domain transcription factor family in grapevine (*Vitis vinifera* L.) and expression during seed development in seedless and seeded cultivars. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(18): 4553.
- [29] Xu G, Guo C, Shan H, *et al.* Divergence of duplicate genes in exon-intron structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(4): 1187–1192.
- [30] Jeffares D C, Penkett C J, Bähler J. Rapidly regulated genes are intron poor. *Trends in Genetics*, 2008, 24(8): 375–378.
- [31] Shaul O. How introns enhance gene expression. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2017, 91(Pt B): 145–155.
- [32] Li Y J, Chen D M, Luo S W, *et al.* Intron-mediated regulation of  $\beta$ -tubulin genes expression affects the sensitivity to carbendazim in *Fusarium graminearum*. *Current Genetics*, 2019, 65(4): 1057–1069.
- [33] Liu P, Zhang C, Ma J Q, *et al.* Genome-wide identification and expression profiling of cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX) genes reveal likely roles in pod development and stress responses in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Genes*, 2018, 9(3): 168.
- [34] Zhu M Z, Wang Y, Lu S J, *et al.* Genome-wide identification and analysis of cytokinin dehydrogenase/oxidase (CKX) family genes in *Brassica oleracea* L. reveals their involvement in response to *Plasmodiophora brassicae* infections. *Horticultural Plant Journal*, 2022, 8(1): 68–80.
- [35] Sun X, Zhu L, Hao Z, *et al.* Genome-wide identification and abiotic-stress-responsive expression of CKX gene family in *Liriodendron chinense*. *Plants*, 2023, 12(11): 2157.