



结球甘蓝类钙调蛋白基因 *CML48* 和 *CML50* 在不同胁迫下的表达分析

李振林¹, 彭梦玲^{1,2}, 苏甜^{1,2}, 吕霞¹, 张国平¹, 张应华¹, 许俊强¹

(1. 云南农业大学 云南省滇台特色农业产业化工程研究中心, 昆明 650201;

2. 云南农业大学 园林园艺学院, 昆明 650201)

摘要 为探究结球甘蓝类钙调蛋白(CMLs)响应不同胁迫时的功能,丰富 CMLs 参与钙信号网络调控,为 CMLs 参与植物逆境途径及其功能的研究提供依据。以结球甘蓝 ZG 为材料,克隆得到 *CML48* 和 *CML50* 基因,序列分析表明 *CML48* 开放阅读框(ORF)为 672 bp,含 4 个内含子,编码 223 aa,分子量为 25.28 ku;*CML50* 开放阅读框 ORF 为 1 095 bp,编码 364 aa,分子量为 38.06 ku,含 3 个内含子;均为亲水蛋白,均含有 2 个 EF-hand 结构域;系统发育树表明 *CML48* 和 *CML50* 均与甘蓝处于同一进化枝,与白菜、油菜的亲缘关系最近。qPCR 表明 *CML48* 和 *CML50* 在干旱(PEG6000)、盐胁迫(NaCl)、低温(4 ℃)、高温(37 ℃)、H₂O₂、脱落酸(ABA)、水杨酸(SA)和茉莉酸甲酯(MeJA)等不同胁迫处理下,在叶和根中的表达均有上调,且 *CML50* 的表达量均显著高于 *CML48*,*CML48* 在茎尖中高度响应高温胁迫,而在根中不响应高温和 H₂O₂ 胁迫。初步说明 *CML48* 和 *CML50* 在根和叶中均可响应上述 8 种非生物胁迫。

关键词 结球甘蓝; *CML48*; *CML50*; 胁迫; 表达分析

干旱、盐胁迫、高温、低温等非生物胁迫严重影响植物的生长发育,是影响作物产量的主要因素^[1-2],而水杨酸、茉莉酸甲酯、脱落酸等植物激素可作为植物抗逆反应所需的信号分子来激活植物防御保护机制^[3]。钙结合蛋白广泛参与植物抗逆境反应过程,对钙结合蛋白的研究是 Ca²⁺ 信号转导的关键环节^[4-5]。

类钙调蛋白(Calmodulin-Like Protein, CML)是植物特有的 Ca²⁺ 受体蛋白中一个大的亚家族,具有 EF-hand 结构域^[6],是 Ca²⁺ 信号传导的关键部分^[7]。目前已经在多种植物中鉴定了 CMLs 基因。其中拟南芥 50 个 *AtCMLs*^[8],水稻 32 个 *OsCMLs*^[9]、大豆 68 个 *GmCMLs*^[10],棉花 60 个 *GrCMLs*^[11],番茄中有 52 个 *ShCMLs*^[12],百脉根 19 个 *LjCMLs*^[13],白菜 79 个 *BrCMLs*^[14],结球甘蓝 76 个 *BoCMLs*^[15]。相较 CaMs,CMLs 更多地参与到植物的非生物、激素胁迫响应。研究表明,*AtCML9* 可通过调节 ABA

通路提高植物的耐盐性^[16];*OpCML13* 在 NaCl 胁迫下表达明显增强^[17];*AtCML15* 参与调控 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白 AtNHX1 的活性,提高植物耐盐性,*AtCML15* 与 NHX1 互作降低 Na⁺/H⁺ 交换的活性,在逆境胁迫时发挥作用^[18];*CML24* 能够响应高温、低温、氧胁迫及 ABA 的诱导表达^[19];*AtCML24* 在植物各个部位均有表达,受到触碰、黑暗、高温、低温、H₂O₂、ABA 和 IAA 处理时表达水平逐渐增强^[20];*GsCML27* 可以通过 Na⁺、K⁺ 含量和调节渗透压力降低耐盐性^[21];水稻 *OsCML4* 可通过清除活性氧及 ABA 独立方式诱导其他应激相关基因表达来提高耐旱性^[22];*OsMSR2* (Multi-Stress- Responsive gene 2)与 *AtCML37*、*AtCML38* 和 *AtCML39* 序列高度相似,通过调节 ABA 通路提高对干旱和盐碱的抗性^[23];*AtCML42/43* 能够参与生物和非生物胁迫^[24];具有 *ShCML44* 超表达的番茄植株在寒冷和干旱胁迫条件下,膜损伤程度降低,抗氧化酶

收稿日期:2022-01-01 修回日期:2022-02-28

基金项目:云南省科技专项重点项目(202102AE090005);云南省科技人才和平台计划(2019IC009,202005AF150035);国家自然科学基金(31560560);昆明市科技计划项目(2019-1-H-24615)。

第一作者:李振林,男,讲师,从事蔬菜育种及栽培研究。E-mail:375542523@qq.com

通信作者:许俊强,男,助理研究员,从事蔬菜育种及分子生物学研究。E-mail:xujunqiang101@163.com

活性、气体交换和保水性增强;还表现出 ROS 减少和相对含水量增加的现象^[12]; *OsCML16* 的表达可增强植株的根系生长和耐旱性^[25]。由此看出,多种植物的多个 CMLs 参与植物高温、低温、干旱、盐胁迫及其他激素胁迫,并在不同的胁迫下行使不同的功能。

结球甘蓝(*Brassica oleracea* L. var. *capitata*)是十字花科芸薹属重要的蔬菜作物,全国广泛种植^[26]。但在甘蓝生长发育过程中经常受到干旱、高盐、低温、高温和病虫害等逆境胁迫。目前很多 CMLs 家族成员的功能还是未知的,但已知的成员在不同的生长发育过程及环境条件下发挥着重要作用,结球甘蓝 CMLs 有些家族成员已经被鉴定,但 *CML48* 和 *CML50* 未见报道。本研究从结球甘蓝中克隆得到 *CML48* 和 *CML50*,对两者在不同非生物胁迫后的表达进行分析,初步解析 *CML48* 和 *CML50* 响应 8 种不同胁迫下的生物学功能。

1 材料与方法

1.1 试验材料

结球甘蓝材料(ZG)(*Brassica oleracea* L. var. *capitata*)由云南农业大学滇台中心实验室保存。植物总 DNA、RNA 提取试剂盒(天根,北京)

购自天根生化科技(北京)有限公司;pEASY-Blunt Simple Cloning Kit,大肠杆菌感受态细胞 Trans1-T1, Trans2K Plus II DNA Marker, TransStart FastPfu Fly DNA 聚合酶(全式金,北京)均购自全式金公司;逆转录试剂盒、5×All-In-One RT MasterMix 等(ABM,美国)购自 ABM 公司;昆明硕擎生物科技有限公司合成引物及测序。

1.2 结球甘蓝 *CML48* 和 *CML50* 的 cDNA 和 gDNA 的克隆

各取 100 mg 2~3 片真叶期的甘蓝茎尖,研钵中加液氮迅速研磨,分别提取总 RNA 及 DNA,1%琼脂糖凝胶电泳及浓度检测,质量完好的 RNA 逆转录合成第一链 cDNA,置 -20 ℃ 保存。

参考结球甘蓝基因组的序列设计引物(表 1),通过 PCR 扩增,克隆 *CML48* 和 *CML50* 基因全长,PCR 反应体系为 PCR Mixster Mix 5 μL、dNTPs 2.5 μL、上/下游引物各 1 μL、FastPfu Fly DNA 聚合酶 1 μL、cDNA 模板 1 μL、ddH₂O 至 25 μL;反应程序为 95 ℃ 3 min;95 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s,38 个循环;72 ℃ 5 min。PCR 产物连接克隆载体,转化大肠杆菌感受态细胞,PCR 检测正确后进行测序。

表 1 本研究所使用的引物序列

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence	产物大小/bp Product size	用途 Usage
CML48-F	CCTTTCAATGGCGTACGCACCG	689	<i>CML48</i> 基因克隆
CML48-R	CTTGTCTAGATTAGTCATATGA		Cloning for <i>CML48</i>
CML50-F	TTCCAGCGATGTCAGGTTACCCT	1 112	<i>CML50</i> 基因克隆
CML50-R	GGTTCATCCGTTATGCGATGAGG		Cloning for <i>CML50</i>
qCML48-f	TCAGCTTGATGATGGGACTG	114	<i>CML48</i> 荧光定量
qCML48-r	TAACCGGGGTCCTTCTCTTT		qPCR for <i>CML48</i>
qCML50-f	ACCAACGCCATGAAGATAGG	112	<i>CML50</i> 荧光定量
qCML50-r	CATCTATTCTCCGCTCCTG		qPCR for <i>CML50</i>
β-Actin-F	TGCAGACCGTATGAGCAAAG	105	内参基因 Reference gene
β-Actin-R	GAACCACCGATCCAGACACT		

1.3 基因序列及蛋白生物信息学分析

序列检索及比对采用 BLAST 在线程序进行,其他物种中的同源氨基酸序列由 NCBI 网站下载。分别采用 ProtParam Tool(<https://web.expasy.org/protparam/>)及 ProtScale(<https://web.expasy.org/protscale/>)在线软件对蛋白理

化性质和亲疏水性进行分析;利用 SignalP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行信号肽预测;TMHMM(<http://genome.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)进行跨膜域分析;利用 NCBI 中 CDD(Conserved Domain Database)程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

cdd)进行保守结构域分析,利用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)在线软件进行蛋白三级结构建模。采用 DNAMAN v6.0 及 Muscle 软件进行序列同源性比对分析。系统发育进化树利用 MEGA 7.0 软件,采用 Neighbor-joining 进行构建。

1.4 结球甘蓝材料种植及胁迫处理

挑选饱满的甘蓝种子,播种到腐殖土:珍珠岩=1:1(体积比)的 50 孔穴盘中。种子出芽后,25 °C 光照 16 h、20 °C 黑暗 8 h 培养,待植株长至 2~3 片真叶时进行以下不同胁迫处理。参考赵陆滢等^[27]的方法将 2~3 片真叶期的幼苗分别置于 15% PEG-6000、200 mmol/L NaCl 溶液中水培处理 0、1、3、6、12 和 24 h;将甘蓝幼苗分别放入 4 °C、37 °C 恒温培养箱分别生长 0、1、3、6、12 和 24 h;将幼苗分别置于配制好的 30 mmol/L H₂O₂、100 μmol/L ABA、2 mmol/L SA、100 μmol/L MeJA 溶液中水培处理 0、1、2 和 4 h。分别取不同处理的植株幼嫩叶片及根,液氮速冻后-80 °C 冰箱保存。

1.5 结球甘蓝 *CML48* 和 *CML50* 胁迫表达分析

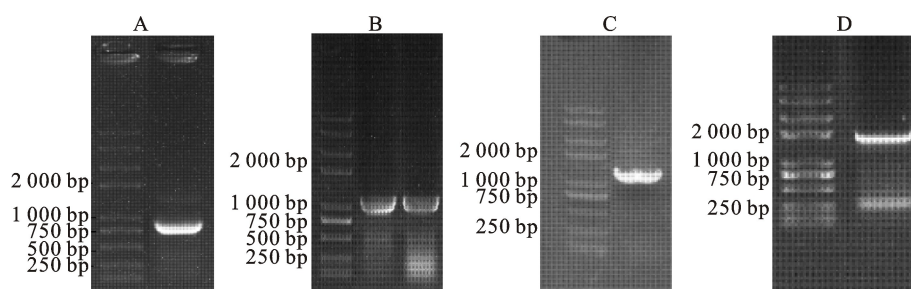
分别提取不同处理植株幼苗的茎尖和根组织的总 RNA,以 β -Actin 为内参基因,在 Bio-RAD

CFX96 荧光定量 PCR 仪上进行。反应体系为 EvaGreen 2× qPCR MasterMix 10 μL,引物各 0.6 μL,cDNA 模板 1 μL,补水至 20 μL。扩增程序为 95 °C 预变性 3 min;95 °C 15 s,57 °C 15 s,72 °C 30 s,共 39 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行 *CML48* 和 *CML50* 基因在不同处理下相对定量表达分析。

2 结果与分析

2.1 结球甘蓝 *CML48* 和 *CML50* 基因的克隆

依据结球甘蓝基因组信息,设计特异性引物。分别以 *CML48*-F/ *CML48*-R、*CML50*-F/ *CML50*-R 为正反向引物,从结球甘蓝茎尖 cDNA 中分别扩增得到 *CML48* 和 *CML50* 基因,测序分析表明两者大小分别 689 bp 和 1 112 bp,包含完整开放阅读框分别为 672 bp 和 1 095 bp(图 1-A 和 1-B);以 *CML48*-F/ *CML48*-R、*CML50*-F/ *CML50*-R 引物从甘蓝基因组中 gDNA 分别扩增得到 *CML48*、*CML50* 全长分别为 1 051 bp 和 1 705 bp(图 1-C 和 1-D)。*CML48*、*CML50* gDNA 序列中分别含有 4 个和 3 个内含子。经测序及 NCBI 序列比对表明该基因正确为 *CML48*、*CML50*。



M. Trans2K plus II; A. *CML48* 基因 cDNA 克隆;B. *CML50* 基因 cDNA 克隆;C. *CML48* 基因 gDNA 克隆;D. *CML50* 基因 gDNA 克隆

M. Trans2K plus II; A. Clone of *CML48* from cDNA;B. Clone of *CML50* from cDNA;C. Clone of *CML48* from gDNA;D. Clone of *CML50* from gDNA

图 1 结球甘蓝 *CML48* 和 *CML50* 基因 cDNA(A、B)和 gDNA(C、D)克隆

Fig. 1 Cloning of cDNA(A,B)and gDNA(C,D)in *CML48* and *CML50* of *Brassica oleracea* L. var. *capitata*

2.2 结球甘蓝 *CML48* 和 *CML50* 基因及编码蛋白序列分析

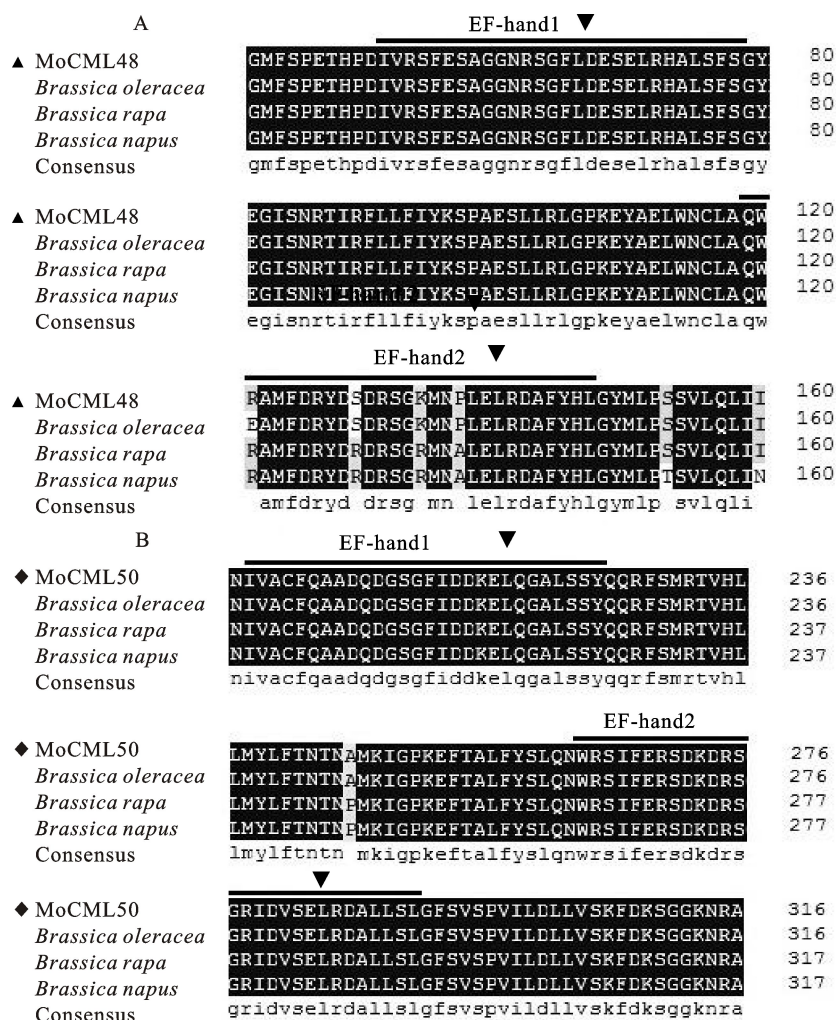
序列分析表明:*CML48* 基因编码 223 个氨基酸,蛋白质分子量为 25.28 ku,pI 为 4.54,含有 2 个 EF-hand 结构域,分别位于 50~78、118~146 位氨基酸处,在 69、138 位处含有保守的谷氨酸(E)(图 2-A),亚细胞定位预测 *CML48* 蛋白定位于细胞核中;*CML50* 基因编码 364 个氨基酸,

蛋白质分子量为 38.06 ku,pI 为 6.27,该序列中含有 2 个具有钙离子结合能力的 EF-hand 结构域,分别位于 197~225、263~291 位氨基酸处,在 217、183 位处含有保守的谷氨酸(E)(图 2-B),亚细胞定位预测 *CML50* 蛋白定位于细胞膜和细胞核中;结球甘蓝 *CML48* 和 *CML50* 基因编码蛋白均不含信号肽,不含跨膜域,为胞外蛋白,均为亲水性蛋白。

2.3 结球甘蓝 *CML48* 和 *CML50* 编码蛋白的同源性比对分析

利用 NCBI 数据库和甘蓝基因组数据库(<http://www.ocri-genomics.org/bolbase/index.html>)对 *CML48* 和 *CML50* 氨基酸同源序列进

行检索和比对,发现 *CML48* 与甘蓝、白菜和油菜的氨基酸序列同源性分别为 98.65%、96.41%和 95.52%(图 2-A); *CML50* 与甘蓝、白菜和油菜的氨基酸序列同源性分别为 100%、96.47%和 97.28%(图 2-B)。



“▼”所指 E 表示钙离子结合的保守谷氨酸

“▼” E represents conservative glutamic acid bound by calcium ions

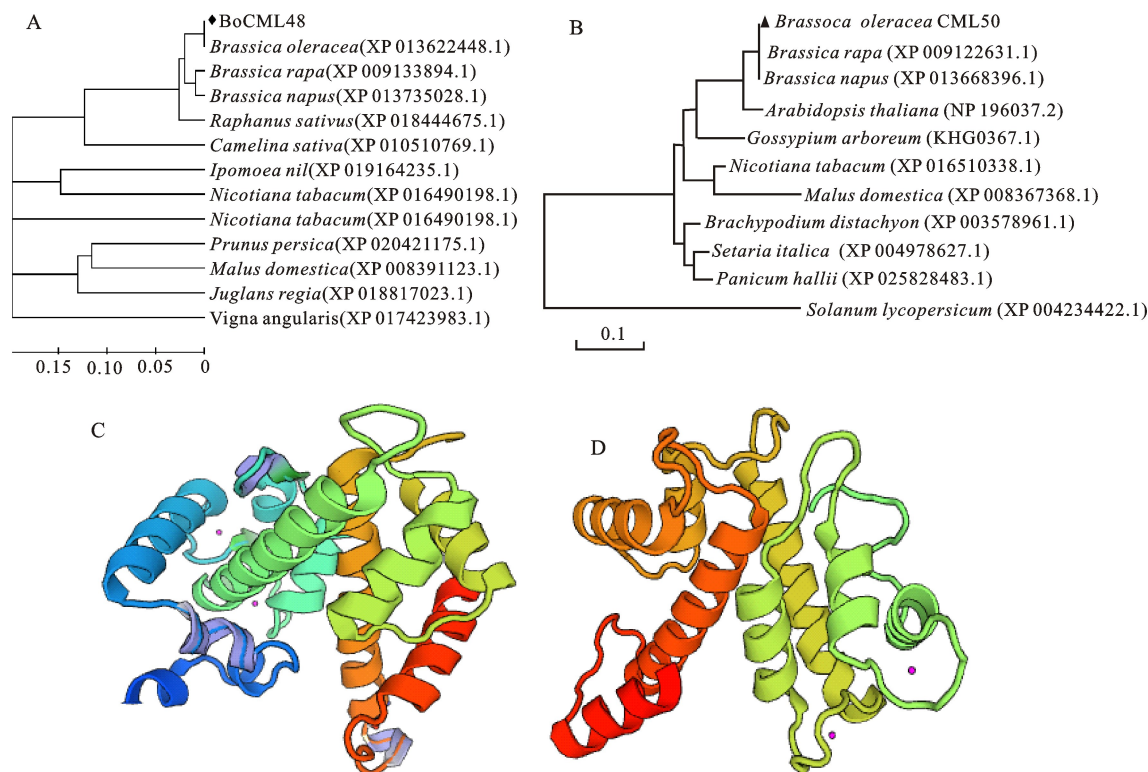
图 2 结球甘蓝 *CML48* (A) 和 *CML50* (B) 氨基酸序列比对

Fig. 2 Alignment of *CML48* (A) and *CML50* (B) protein sequence in *Brassica oleracea* L. var. *capitata*

2.4 结球甘蓝 *CML48* 和 *CML50* 进化分析及三级结构预测

利用 DNAMAN6.0.3 软件进行多序列比对,在氨基酸水平上,结球甘蓝 *CML48* 与白菜 (*Brassica rapa* [XP_009122631.1]) 和油菜 (*Brassica napus* [XP_013668396.1]) 氨基酸序列同源性最高,均达到 98%;结球甘蓝 *CML50* 与白菜 (*Brassica rapa* XP_009122631.1) 和油菜

(*Brassica napus* [XP_013668396.1]) 氨基酸序列同源性最高,均达到 98%。用 MEGA 7.0 软件以氨基酸作为分析对象进行多序列比对,绘制分子进化树(图 3-A 和 3-B),分析结果表明结球甘蓝与白菜 (*Brassica rapa*)、油菜 (*Brassica napus*) 的亲缘关系最近。利用 SWISS-MODEL 对 *CML48*、*CML50* 蛋白进行三级结构预测(图 3-C 和 3-D)。



A. 结球甘蓝 *CML48* 系统进化树；B. 结球甘蓝 *CML50* 系统进化树；C. 结球甘蓝 *CML48* 三级结构预测；D. 结球甘蓝 *CML50* 三级结构预测；图中小球代表 Ca^{2+}

A. Phylogenetic tree of Bo *CML48* ; B. Phylogenetic tree of Bo *CML50* ; C. Tertiary structure of Bo *CML48* ; D. Tertiary structure of Bo *CML50* ; the balls in the figure represents Ca^{2+}

图3 结球甘蓝 *CML48* 和 *CML50* 蛋白的进化分析及三级结构预测

Fig. 3 Phylogenetic tree and tertiary structure prediction of *CML48* and *CML50* of *Brassica oleracea* L. var. *capitata*

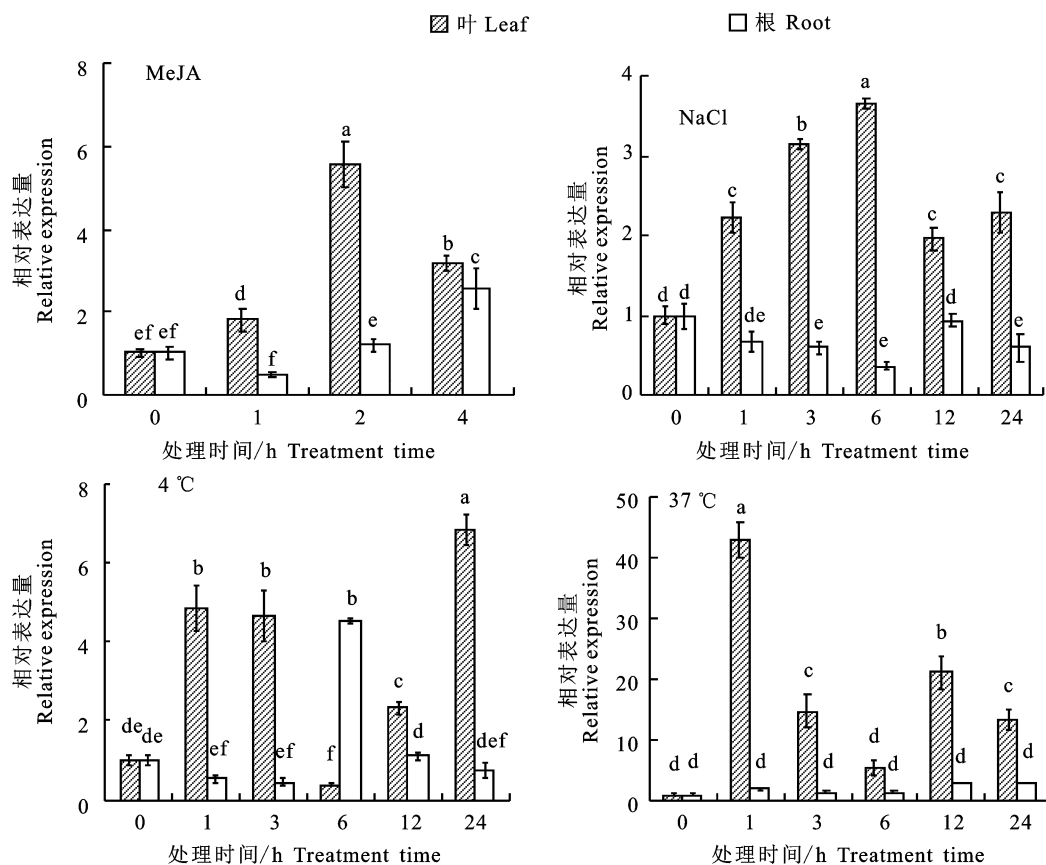
2.5 结球甘蓝 *CML48* 和 *CML50* 在干旱、NaCl、高温和低温胁迫条件下的表达

对结球甘蓝 *CML48* 基因在干旱、NaCl、高温、低温胁迫下的表达分析表明(图4、图5)。模拟干旱条件下, *CML48* 的表达量在茎尖和根中均呈现先升后降的趋势,茎尖中,PEG6000处理1 h后 *CML48* 的表达量迅速上升,3 h后达到最高约0 h的5.3倍,后逐渐下降;在根部, *CML48* 表达量1 h时达到最大值,约为0 h的2.8倍,后缓慢下降至0 h的水平。 *CML50* 在模拟干旱胁迫下在茎尖和根中均高度表达,茎尖中1 h表达急剧增高,3 h最大值约为0 h的50倍,6 h下降到0 h的34倍,并趋于稳定;根部中,处理1 h后 *CML50* 表达量达到最大,约为0 h的84倍,3 h后骤降到32倍并缓慢降低。NaCl胁迫下的茎尖中,处理1 h后 *CML48* 的表达量开始上升,6 h达到最大值约为0 h的3.65倍,而后下降但高于对照,12 h和24 h时NaCl处理无显著差异,约为0 h的2倍;在根部,处理1 h后 *CML48* 表达量

下降,6 h下降到最低约为0 h的0.37倍,其中处理3 h、6 h、24 h时的表达量显著低于对照,处理12 h的表达量与0 h无显著差异。 *CML50* 在NaCl胁迫时在茎尖和根中处理均有较高表达,在茎尖中呈先上升后下降再上升的趋势,茎尖中1 h后均急剧上调表达,达到对照的20倍,3 h后达到较高水平,24 h后达到最高为0 h的51倍,根中 *CML50* 表达量急剧上升,3 h达到最高值为0 h的20倍,后下降并维持在17倍左右的水平。低温胁迫下的茎尖中,处理1 h后 *CML48* 的表达量迅速上升,约为处理0 h的近4.8倍,6 h急剧下降达到最小值约为0 h的0.4倍,而后又上升,24 h达到最高峰值约为0 h的6.8倍,1 h和3 h处理无差异;在根部,呈现先升后降的趋势,处理6 h时 *CML48* 表达上升到最大值约为4.5倍,12 h后下降到对照水平。 *CML50* 在低温胁迫下的表达总体呈上升趋势,24 h表达急剧增高到最大为0 h的84.4倍;根中 *CML50* 表达量先上升后降低,1 h和3 h均到达0 h的14倍,6 h到

达最高值约为 0 h 的 49 倍,后下降到 20 余倍。高温胁迫下的茎尖中,处理 1 h 后 *CML48* 的表达量迅速上升,3 h 后达到最高约 0 h 的 43 倍,而后急剧下降达到最小值,6~24 h 稳定到 0 h 表达水平;在根部,随着处理时间的延长, *CML48* 表达量总体无差异。高温胁迫下在茎尖和根中 *CML50* 基因均高度表达,茎尖中 1 h 表达量剧增到最大,达到 0 h 的 154 倍,3 h 后急剧下降到约为 0 h 的 60 倍左右,并趋于稳定;根部中,高温胁迫

处理 1~24 h 表达量总体处于较高水平,约为 0 h 的 50 倍左右,且趋于稳定。综上说明结球甘蓝 *CML48* 在茎尖中和根中均响应干旱、NaCl、高温、低温胁迫,且在茎尖中的表达量总体高于根部,甘蓝 *CML48* 仅在茎尖响应高温胁迫,而在根中无响应; *CML50* 高水平响应干旱、NaCl、高温、低温胁迫,在胁迫诱导下的茎尖和根部均有高水平的上调表达。



不同小写字母表示差异显著性 ($P < 0.05$), 下同

Different lowercase letters indicate significant differences at 0.05 level, the same below

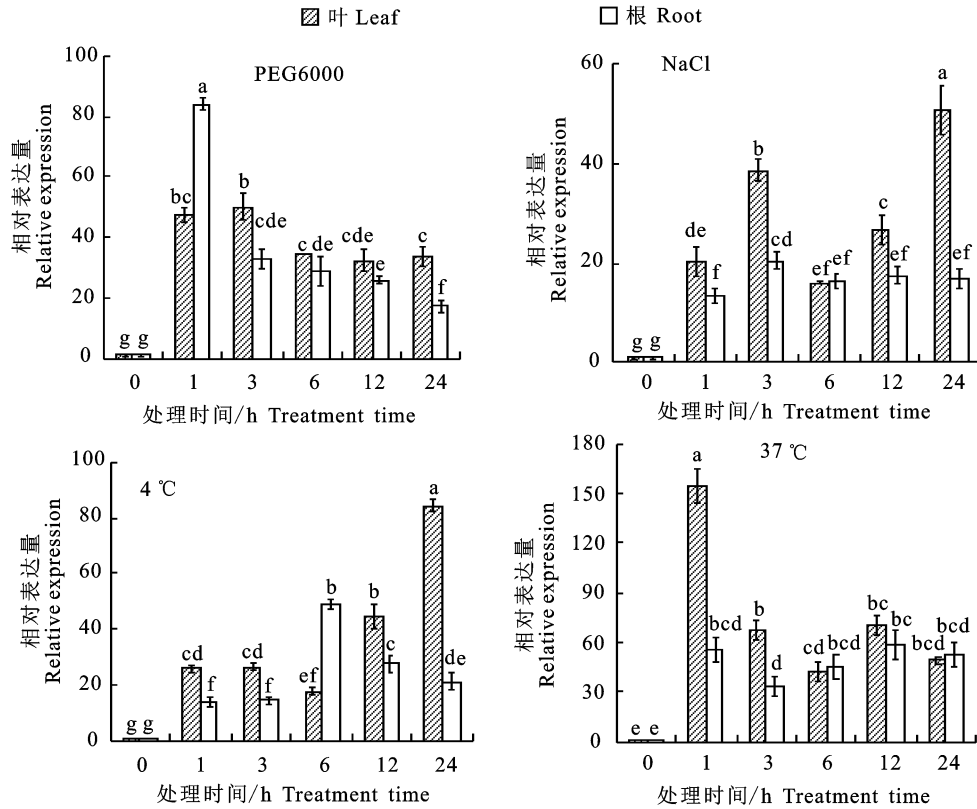
图 4 结球甘蓝 *CML48* 在干旱、NaCl、4 °C 及 37 °C 胁迫处理下的表达

Fig. 4 Expression of *CML48* under PEG6000, NaCl, 4 °C and 37 °C stresses

2.6 结球甘蓝 *CML48* 和 *CML50* 在 H_2O_2 、SA、ABA 及 MeJA 胁迫条件下的表达

对甘蓝 *CML48* 和 *CML50* 在 H_2O_2 、SA、ABA 及 MeJA 胁迫下的表达分析,结果表明(图 6、图 7)。茎尖中, H_2O_2 处理 1 h 后 *CML48* 的表达量与 0 h 相当,2 h 时迅速上升达到最大值,约为 0 h 的 8.8 倍,4 h 时迅速下降但显著高于对照;而在根部, H_2O_2 处理 *CML48* 基因表达量无差异。在茎尖和根中 *CML50* 表达量均高度表达,茎尖中 2 h 表达量剧增到最大,达到 0 h 的

100.6 倍,后急剧下降,但总体处于高表达水平;根部中, H_2O_2 处理 *CML50* 表达量总体处于较高水平,约为 0 h 的 24 倍左右,且处于稳定水平。说明甘蓝 *CML48* 在干旱胁迫下对茎尖的响应较大,而在根中无响应;而 *CML50* 在根与茎尖中均较高表达。ABA 胁迫茎尖中 *CML48* 表达量有所增加,约为 0 h 的 2 倍左右,显著高于对照并稳定在这一水平;根部中,ABA 处理 1~4 h 表达量呈上升趋势,4 h 增加达到最高为 0 h 的 3.1 倍,显著高于其他时间。ABA 处理下, *CML50* 基因

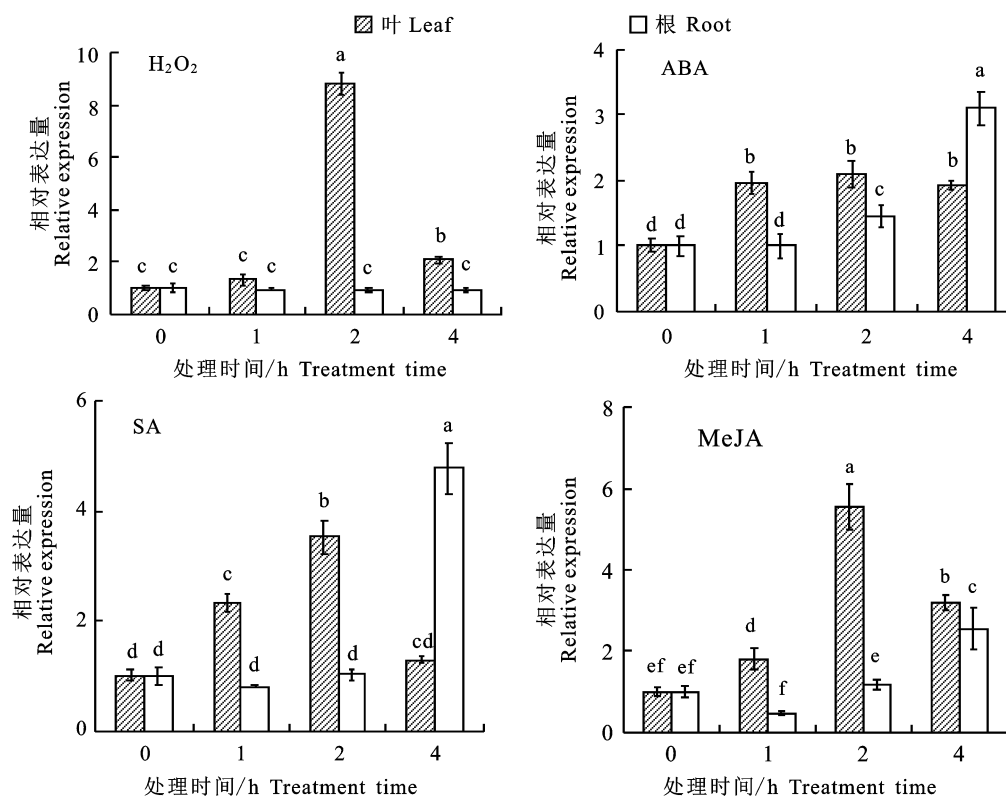
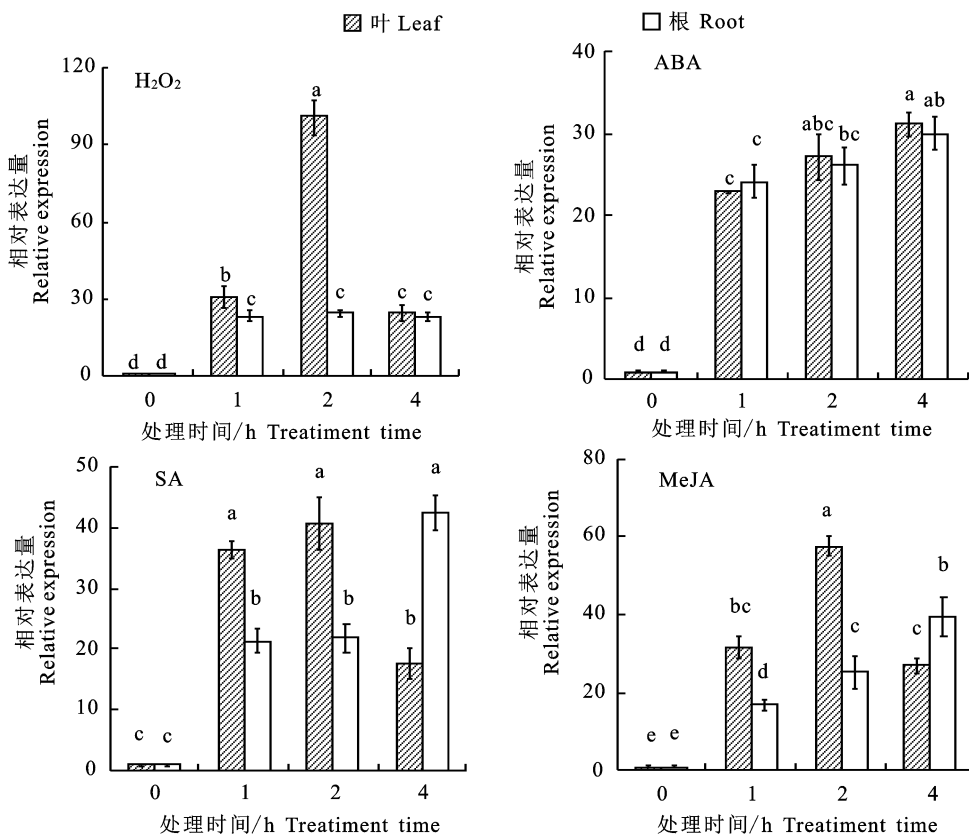
图5 结球甘蓝 *CML50* 在干旱、NaCl、4 °C 及 37 °C 胁迫下的表达Fig. 5 Expressions of *CML50* under PEG6000, NaCl, 4 °C and 37 °C stresses

在茎尖和根中均高度表达,且在茎尖和根部的表达量基本一致;处理 1 h 表达量均急剧增高,4 h 时均达到最高,均为对照的 30 倍左右。说明 *CML48* 响应 ABA 在甘蓝根部胁迫, *CML50* 在茎尖和根中均响应 ABA 胁迫,且响应程度基本一致,ABA 对甘蓝茎尖和根部的生长发育起到重要作用。SA 胁迫的茎尖中 *CML48* 表达量呈先升后降的趋势,1 h 表达量显著高于对照,2 h 达到最高值为 0 h 的 3.5 倍,4 h 下降到起始水平;根部中,SA 处理 1~2 h 表达量与 0 h 无差异,4 h 达到最高约为 0 h 的 4.8 倍; *CML50* 在 SA 处理下在茎尖和根中均高度表达,茎尖中 *CML50* 表达量呈先升后降的趋势,1 h 后急剧升高,2 h 达到最高约为 0 h 的 40.6 倍,4 h 时下降到 0 h 的 17.6 倍;根部中, *CML50* 表达量 1 h 急剧增高,2 h 与 1 h 无差异,4 h 达到最高约为 0 h 的 42 倍。说明 *CML48*、*CML50* 在 SA 胁迫诱导下均有表达变化,表明结球甘蓝两基因响应 SA 胁迫。MeJA 处理时,随着 MeJA 胁迫处理时间的延长,在茎尖中 *CML48* 基因表达量呈先升后降的趋势,处理 2 h 后的表达量达到最高为 0 h 的 5.5 倍,4 h 时迅速下降至 0 h 的 3.2 倍,显著高于对

照;在根部, *CML48* 表达量总体呈上升的趋势,处理 1 h 后 *CML48* 表达量降到最低,2 h 恢复到原来水平,4 h 达到最高为 0 h 的 2.6 倍。 *CML50* 在茎尖和根中均高度表达,茎尖中 *CML50* 基因表达量呈先升后降的趋势,1 h 表达量急剧增高,2 h 达到最高,约为 0 h 的 57 倍,4 h 后下降到 0 h 的 27 倍,总体处于较高的表达水平;根部中,MeJA 处理时 *CML50* 呈上升趋势,4 h 达到最高,约为 0 h 的 39.4 倍。综上说明 *CML48* 和 *CML50* 在 H_2O_2 、SA 及 MeJA 胁迫时于茎尖中的响应高于根部,而处理后期在根部响应,但 *CML48* 在根中不响应 H_2O_2 胁迫,表明 *CML48* 和 *CML50* 能够响应 H_2O_2 、SA、ABA 及 MeJA 胁迫。

3 讨论

CMLs 是植物中特有的一类 Ca^{2+} 结合蛋白,在 Ca^{2+} 信号传导途径中具有重要的作用。目前已在多种植物中克隆了 CMLs 基因,如巴西橡胶树 *HbCML27*^[28]、无苞芥 *OpCML13*^[17]、结球甘蓝 *BoCML49*^[29] 及青稞 *CML19*^[30]、大白菜 *BrCML49*^[31] 等,但不同基因的表达特征及功能

图6 结球甘蓝 *CML48* 在 H_2O_2 、SA、ABA 和 MeJA 胁迫处理下的表达Fig. 6 Expressions of *CML48* under H_2O_2 , SA, ABA and MeJA stresses图7 结球甘蓝 *CML50* 在 H_2O_2 、SA、ABA 及 MeJA 胁迫处理下的表达Fig. 7 Expressions of *CML50* under H_2O_2 , SA, ABA and MeJA stresses

研究仍不清楚。本研究从结球甘蓝中克隆 *CML48* 和 *CML50* 基因, 预测编码蛋白均含有 2 个 EF-hand 结构域, 在 EF-hand1、2 上均有相同的保守谷氨酸(E)位点, 说明 *CML48* 和 *CML50* 均是 EF-hand 家族成员。生物信息学分析表明, 均属于亲水蛋白, 这与巴西橡胶树 *HbCML27* [28] 和新疆无苞芥 *OpCML13* [17] 的预测分析结果一致。系统进化分析表明 *CML48* 和 *CML50* 均与甘蓝、油菜和白菜亲缘关系较近, 氨基酸相似性均达到 97% 以上, 与其他物种较远。在 EF-hand1、2、4 上均有相同的保守谷氨酸(E)位点, 说明 *CML48* 和 *CML50* 均是 EF-hand 家族成员。

对拟南芥的研究表明多个 CMLs 参与逆境胁迫感知: 如 *AtCML24* [32]、*AtCML37* [33]、*AtCML38* [34]、*AtCML39* [34] 和 *AtCML42* [35] 等。ABA、MeJA 和 SA 作为重要的植物激素信号分子, 不仅能够调控植物生长发育, 同时参与植物逆境反应 [36-37]。*cml9* 突变体提高拟南芥对于干旱和盐害的耐受性 [38]。新疆无苞芥 *OpCML13* 对逆境胁迫的响应非常灵敏, 其在无苞芥响应逆境生理生态环境中可能起着重要的作用 [17]; *AtCML18* 在液泡中与 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 NHX1 (Na^+/H^+ exchanger 1) 互作, 结合在 NHX1 的 C 端, 两者互作可能在植物响应盐害反应中起作用 [18]; *AtCML15* 也可以与 NHX1 互作, 能减少 Na^+/H^+ 交换的活性, 在逆境胁迫时发挥作用 [18]。野生大豆 *GsCML27* 的异位表达可以通过改变细胞离子 (Na^+ 、 K^+) 含量和调节渗透压力来降低耐盐性 [21]。赵陆滢等 [27] 研究表明 8 种不同非生物胁迫处理均能上调结球甘蓝叶和根中 *BoCML39* 的表达。水稻 *OsMSR2* 受多种逆境条件的诱导表达, 超表达 *OsMSR2* 增强植株对 ABA 的敏感性, 可能是通过调节 ABA 通路上的基因, 提高拟南芥对于干旱和盐碱的抗性 [23]。本研究得到的 *CML48* 和 *CML50* 均响应非生物胁迫, 说明两者受不同逆境条件诱导。对两者而言, *CML50* 响应逆境时均超高表达, 反应比较灵敏; 而 *CML48* 也有响应, 但除在茎尖中高度响应高温胁迫外, 其余表达量均相对较低, 而在高温胁迫和 H_2O_2 的根中无响应。由于 *CML48* 和 *CML50* 基因在其他物种上研究较少, 对于 *CML48* 和 *CML50* 在逆境胁迫调控的通路仍需进一步研究。

CMLs 参与植物的各种生长发育、激素调控

的细胞活动、病原体防御及各种胁迫的诱导。对 CMLs 家族功能的研究, 将有利于探索 CMLs 家族成员之间的联系与区别, 完善植物钙信号系统网络。目前 CMLs 家族基因的研究其功能的鉴定还处于初级阶段, CMLs 的功能还需进一步探究。

4 结 论

克隆得到结球甘蓝 *CML48* 和 *CML50* 基因, 均含有 2 个保守的 EF-hand 结构域; *CML48* 和 *CML50* 均与白菜、油菜的进化关系最近; 8 种不同胁迫处理均能调控结球甘蓝 *CML48* 和 *CML50* 基因在茎尖和根中的表达量, 且 *CML50* 对各胁迫的响应显著高于 *CML48* 和 *CML48* 在茎尖中高度响应高温胁迫, 而在根中不响应高温和 H_2O_2 胁迫, 表明 *CML48* 和 *CML50* 响应不同胁迫时的调控过程。

参考文献 Reference:

- [1] WANG W X, VINOCUR B, ALTMAN A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance[J]. *Planta*, 2003, 218(1): 1-14.
- [2] XIONG L, SCHUMAKER K S, ZHU J K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress[J]. *The Plant Cell*, 2002, 14 (Suppl): 165-183.
- [3] AHMAD P, RASOOL S, GUL A, et al. Jasmonates: multifunctional roles in stress tolerance[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7(5): 813.
- [4] CHWVAL C, ALDON D, GALAUD J P, et al. Calcium/calmodulin-mediated regulation of plant immunity[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2013, 1833(7): 1766-1771.
- [5] SCHULZ P, ROMEIS H T. Calcium-dependent protein kinases: Hubs in plant stress signaling and development[J]. *Plant Physiology*, 2013, 163(2): 523-530.
- [6] ZENG H, ZHANG Y, ZHANG X, et al. Analysis of EF-hand proteins in soybean genome suggests their potential roles in environmental and nutritional stress signaling[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 877.
- [7] PEROCHON A, ALDON D, GALAUD J P, et al. Calmodulin and calmodulin-like proteins in plant calcium signaling[J]. *Biochimie*, 2011, 93(12): 2048-2053.
- [8] MCCORMACK E, BRAAM J. Calmodulins and related potential calcium sensors of *Arabidopsis* [J]. *New Phytologist*, 2010, 159(3): 585-598.
- [9] BOONBURAPONG B, BUABOOCHA T. Genome-wide identification and analyses of the rice calmodulin and related potential calcium sensor proteins[J]. *BMC Plant Biology*,

- 2007,7(1):1-17.
- [10] 陈超,端木慧子,朱丹,等.大豆CML家族基因的生物信息学分析[J].大豆科学,2015,34(6):957-963.
CHEN CH,DUANMUH Z,ZHU D,*et al.* Bioinformatics analysis of GmCML genes in soybean genome[J]. *Soybean Science*,2015,34(6):957-963.
- [11] 何永辉.棉花钙调素与类钙调素基因家族表达分析及棉花纤维离子组测定[D].武汉:华中农业大学,2015.
HE Y H. Expression analysis of calmodulin and calmodulin-like gene family and ionome analysis of cotton fiber [D]. Wuhan:Huazhong Agricultural University,2015.
- [12] MUNOR S,LIU H,XING Y,*et al.* Overexpression of calmodulinlike (ShCML44) stress-responsive gene from *Solanum habrochaites* enhances tolerance to multiple abiotic stresses[J]. *Scientific Reports*,2016,6:31772.
- [13] LIAO J,DENG J,QIN Z,*et al.* Genome-wide identification and analyses of calmodulins and calmodulin-like proteins in *Lotus japonicas* [J]. *Frontiers Plant Science*,2017,8:482.
- [14] NIE S S,ZHANG M J,ZHANG L G. Genome-wide identification and expression analysis of calmodulin-like (CML) genes in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) [J]. *BMC Genomics*,2017,18:842.
- [15] 蒲敏,罗绍兰,廉小平,等.结球甘蓝CML家族基因及其在授粉后柱头中的表达[J].园艺学报,2018,45(11):2129-2140.
PU M,LUO SH L,LIAN X P,*et al.* Study on CML family genes and expressions in stigma after pollination[J]. *Acta Horticulturae Sinica*,2018,45(11):2129-2140.
- [16] KOHLER C,NEUHAUS G. Characterisation of calmodulin binding to cyclic nucleotide-gated ion channels from *Arabidopsis thaliana* [J]. *FEBS Letters*,2000,471(2/3):133-136.
- [17] 赵云霞,魏艳玲,黄先忠.新疆无苞芥类钙调素蛋白基因 *OpCML13* 的克隆与分析[J].西北植物学报,2014,34(3):431-437.
ZHAO Y X,WEI Y L,HUANG X ZH. Clone and expression of calmodulin-like protein gene *OpCML13* form *Olimarbidopsis puila* of Xinjiang[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*,2014,34(3):431-437.
- [18] YAMAGUCHI T,AHARON G S,SOTTOSANTO J B,*et al.* Vacuolar Na^+/H^+ antiporter cation selectivity is regulated by calmodulin from within the vacuole in a Ca^{2+} -and pH-dependent manner[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,2005,102(44):16107-16112.
- [19] DELK N A,JOHNSON K A,CHOWDHURY N I,*et al.* CML24, regulated in expression by diverse stimuli, encodes a potential Ca^{2+} sensor that functions in responses to abscisic acid, daylength, and ion stress[J]. *Plant Physiology*,2005,139(1):240-253.
- [20] 曹绍玉,王艳芳,苏婉玉,等.类钙调蛋白在植物生长发育及逆境胁迫中的功能研究进展[J].植物生理学报,2018,54(10):4-13.
CAO SH Y,WANG Y F,SU W Y,*et al.* Research progress on functions of calmodulin-like proteins in processes of plant growth and developments and stresses[J]. *Plant Physiology Journal*,2018,54(10):4-13.
- [21] CHEN C,SUN X,DUANMU H,*et al.* GsCML27, a gene encoding a calcium-binding EF-hand protein from Glycine soja, plays differential roles in plant responses to bicarbonate, salt and osmotic stresses[J]. *PLoS One*,2015,10(11):e0141888.
- [22] YIN X M,HUANG L F,ZHANG X,*et al.* OsCML4 improves drought tolerance through scavenging of reactive oxygen species in rice [J]. *Journal of Plant Biology*,2015,58(1):68-73.
- [23] XU G Y,ROCHA P S C F,WANG M L,*et al.* A novel rice calmodulin-like gene, OsMSR2, enhances drought and salt tolerance and increases ABA sensitivity in *Arabidopsis* [J]. *Planta*,2011,234(1):47-59.
- [24] CHIASSEN D,EKENGREN S K,MARTIN G B,*et al.* Calmodulin-like proteins from *Arabidopsis* and tomato are involved in host defense against *Pseudomonas syringae* pv. tomato [J]. *Plant Molecular Biology*,2005,58(6):887-897.
- [25] JUNG H,CHUNG P J,PARK S H,*et al.* Overexpression of OsERF48 causes regulation of OsCML16, a calmodulin-like protein gene that enhances root growth and drought tolerance [J]. *Plant Biotechnol Journal*,2017,15(10):1295-1308.
- [26] 邢苗苗,刘星,孔枫枳,等.甘蓝NLR家族全基因组鉴定、进化分析及在不同病害胁迫下的表达分析[J].园艺学报,2019,46(4):723-737.
XING M M,LIU X,KONG C C,*et al.* Whole-genome identification and evolutionary analysis of cabbage NLR family genes and their expression profiles in response to various disease stress [J]. *Acta Horticulturae Sinica*,2019,46(4):723-737.
- [27] 赵陆滢,曹绍玉,张应华,等.结球甘蓝类钙调素蛋白基因 *BoCML39* 的克隆与表达分析[J].分子植物育种,2021,19(3):759-767.
ZHAO L Y,CAO SH Y,ZHANG Y H,*et al.* Clone and expression analysis of calmodulin-like protein gene *BoCML39* from *Hevea brasiliensis* [J]. *Molecular Plant Breeding*,2021,19(3):759-767.
- [28] 刘辉,邓治,陈江淑,等.巴西橡胶树类钙调素蛋白基因 *HbCML27* 克隆与表达分析[J].分子植物育种,2015,13(12):2721-2727.
LIU H,DENG ZH,CHEN J SH,*et al.* Cloning and expression analysis of calmodulin-like protein gene *HbCML27* from *Hevea brasiliensis* [J]. *Molecular Plant Breeding*,2015,13(12):2721-2727.
- [29] 宋明,许俊强,孙梓健,等.结球甘蓝花粉类钙调素蛋白基因 *BoCML49* 的克隆及表达分析[J].作物学报,2012,

- 38(12):2162-2169.
- SONG M, XU J Q, SUN Z J, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of CaM-Like protein genes (*BoC-ML49*) from cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2012, 38(12):2162-2169.
- [30] 韦泽秀, 原红军, 扎 桑, 等. 青稞类钙调素蛋白基因 *CML19* 的克隆、序列分析及原核表达[J]. 西北农业学报, 2018, 27(7):963-969.
- WEI Z X, YUAN H J, ZHA S, *et al.* Cloning, sequence analysis and prokaryotic expression of CaM-like protein gene *CML19* from Tibetan Hulless Barley (*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* HK. f. [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2018, 27(7):963-969.
- [31] 张倩雯, 吕春澍, 王若凡, 等. 大白菜 *BrCML49* 基因的分 离鉴定及表达特征分析[J]. 西北植物学报, 2020, 40(9): 1447-1453.
- ZHANG Q W, LÜ CH SH, WANG R F, *et al.* Identification and expression analysis of *BrCML49* gene in Chinese Cabbage[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2020, 40(9):1447-1453.
- [32] TSAI Y C, KOO Y, DELK N A, *et al.* Calmodulin-related CML24 interacts with ATG4b and affects autophagy progression in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Journal*, 2013, 73 (2):325-335.
- [33] SCHOLZ S S, REICHELT M, VADASSERY J, *et al.* Calmodulin-like protein CML37 is a positive regulator of ABA during drought stress in *Arabidopsis* [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2015, 10(6):e1011951.
- [34] VANDERBELD B, SNEDDEN W A. Developmental and stimulus-induced expression patterns of *Arabidopsis* calmodulin-like genes CML37, CML38 and CML39 [J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, 64(6):683-697.
- [35] VADASSERY J, REICHELT M, HAUSE B, *et al.* CML42-mediated calcium signaling coordinates responses to Spodoptera herbivory and abiotic stresses in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2012, 159(3):1159-1175.
- [36] ASSELBERGH B, DEVLEESSCHAUWER D, HOFTE M. Global switches and fine-tuning-ABA modulates plant pathogen defense [J]. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 2008, 21:709-719.
- [37] KUNKEL B N, BROOKS D M. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense [J]. *Current Opinion Plant Biology*, 2002, 5:325-331.
- [38] MAGNAN F, RANTY B, CHARPENTEAU M, *et al.* Mutations in AtCML9, a calmodulin-like protein from *Arabidopsis thaliana*, alter plant responses to abiotic stress and abscisic acid [J]. *The Plant Journal*, 2008, 56(4):575-589.

Expression Analysis of Calmodulin-like Protein Gene *CML48* and *CML50* under Different Stresses in *Brassica oleracea* L. var. *capitata*

LI Zhenlin¹, PENG Mengling^{1,2}, SU Tian^{1,2}, LÜ Xia¹,
ZHANG Guoping¹, ZHANG Yinghua¹ and XU Junqiang¹

(1. Dian-tai Engineering Research Center for Characteristic Agriculture Industrialization of Yunnan Province,
Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. College of Landscape and
Horticulture, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract In order to explore the function of calmodulin-like proteins (CMLs) in response to abiotic stress in *Brassica oleracea* L., enrich CMLs' participation in calcium signal network regulation, and provide evidences for CMLs' participation in plant stress pathways and study of their functions. In this study, *CML48* and *CML50* were cloned from *Brassica oleracea* L. The ORF of *CML48* is 672 bp, containing 4 introns, encoding 223 aa with molecular mass of 25.28 ku. And the ORF of *CML50* is 1 095 bp, encoding 364 aa, with molecular mass of 38.06 ku and three introns. Both of them are hydrophilic proteins, and all of which contain two EF-hand domains. Phylogenetic tree showed that *CML48* and *CML50* with cabbage were in the same evolutionary branch, and were closely related to *Brassica napus* and *Brassica rape*. qPCR showed that the expressions *CML48* and *CML50* could up-regulate in leaves and roots under stresses of drought (PEG6000), salt (NaCl), low temperature (4 °C), high temperature (37 °C), H₂O₂, abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA) and methyl jasmonate (MeJA). And the expressions of *CML50* was significantly higher than that of *CML48*, which was highly responsive to high temperature stress in shoot tip, but not responsive to high temperature and H₂O₂ stress in root. The results indicated that *CML48* and *CML50* responded to 8 kinds of abiotic stress above both in leaves and roots. This study is expected to provide reference for response of *CML48* and *CML50* to plant stress signal pathways and the research of their functions.

Key words *Brassica oleracea* L. var. *capitata*; *CML48*; *CML50*; Stresses; Expression analysis

Received 2022-01-01

Returned 2022-02-28

Foundation item The Major Project of Yunnan Science and Technology Plan (No. 202102AE09005); the Science and Technology Talents and Platform Plan of Yunnan Province (No. 2019IC009, No. 202005AF150035); the National Natural Science Foundation of China (No. 31560560); the Science and Technology Plan of Kunming Municipality (No. 2019-1-H-24615).

First author LI Zhenlin, male, lecturer. Research area: vegetable breeding and cultivation. E-mail: 375542523@qq.com

Corresponding author XU Junqiang, male, assistant research fellow. Research area: vegetable breeding and molecular biology. E-mail: xujunqiang101@163.com

(责任编辑: 潘学燕 Responsible editor: PAN Xueyan)