

DOI:10.12171/j.1000-1522.20210334

枣 *CML* 基因的分子特征及其抗寒性表达模式分析

高梦娇¹ 王林霞¹ 罗 智¹ 赵若雨¹ 刘志国^{1,2}
刘 平^{1,2} 刘孟军^{1,2} 王立新^{1,2}

(1. 河北农业大学园艺学院, 河北 保定 071001; 2. 河北农业大学中国枣研究中心, 河北 保定 071001)

摘要:【目的】探究枣类钙调蛋白(*ZjCML*)在抗寒性中的重要作用,旨在挖掘关键抗寒 *ZjCML* 基因,为进一步利用其进行枣抗寒育种提供理论参考。【方法】本研究利用生物信息学技术,全面分析了枣 *CML* 基因家族成员的数目及相关结构特征,并利用 RNA-seq 和实时荧光定量 PCR 技术分析其响应低温胁迫时的表达模式,为筛选关键抗寒基因奠定基础。【结果】在枣基因组数据中共鉴定到 23 个 *ZjCML* 基因,不均匀地分布在 12 条染色体上。与拟南芥 *CMLs* 蛋白构建进化树分析发现 *ZjCMLs* 可被分为 12 个类群。蛋白网络互作预测发现 16 个 *ZjCMLs* 存在于该网络中,且具有一定的互作关系。RNA-seq 结果表明 *ZjCML13* 和 *ZjCML6* 基因表达模式在‘冬枣’及其同源四倍体响应低温胁迫中具有显著差异,其中 *ZjCML13* 在‘冬枣’响应低温胁迫 6 和 24 h 时极显著上调表达,而在‘冬枣’同源四倍体中表达差异不显著。外源 CaCl_2 和褪黑素处理后, *ZjCML13* 在‘冬枣’同源四倍体响应低温胁迫 6 和 24 h 时极显著上调表达,说明其可能通过诱导 *ZjCML13* 表达调控‘冬枣’同源四倍体抗寒性。【结论】枣 *CML* 基因家族具有特定的结构特征及响应低温胁迫, *ZjCML13* 可能在调控‘冬枣’及其同源四倍体抗寒性差异中发挥重要作用。

关键词: 枣; 类钙调蛋白(*CML*); 基因家族; 抗寒性; 表达分析

中图分类号: S722.3+6; S665.1 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2023)03-0058-10

引文格式: 高梦娇, 王林霞, 罗智, 等. 枣 *CML* 基因的分子特征及其抗寒性表达模式分析 [J]. 北京林业大学学报, 2023, 45(3): 58-67. Gao Mengjiao, Wang Linxia, Luo Zhi, et al. Molecular characteristics of *CML* genes in Chinese jujube and their expression patterns in resistance to cold stress [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2023, 45(3): 58-67.

Molecular characteristics of *CML* genes in Chinese jujube and their expression patterns in resistance to cold stress

Gao Mengjiao¹ Wang Linxia¹ Luo Zhi¹ Zhao Ruoyu¹ Liu Zhiguo^{1,2}
Liu Ping^{1,2} Liu Mengjun^{1,2} Wang Lixin^{1,2}

(1. College of Horticulture, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, Hebei, China;

2. Research Center of Chinese Jujube, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, Hebei, China)

Abstract: [Objective] This paper aims to investigate the important function of CaM-like proteins in Chinese jujube in resistance to cold stress and identify the key *ZjCML*, which could provide theoretical basis for cold breeding in Chinese jujube by using them. [Method] Through using bioinformatics technology, the number and related structural information of *CML* in Chinese jujube were analyzed comprehensively in the current study. And then, we used RNA-seq and real-time fluorescence quantitative PCR technology to analyze its expression pattern in response to low temperature stress, laying a foundation for screening key cold resistance genes. [Result] A total of 23 *ZjCML* genes were identified in Chinese jujube genome. All of

收稿日期: 2021-08-28 修回日期: 2021-10-22

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(32201594), 河北省教育厅科学技术研究项目(QN2022017), 河北省省属高校基本科研业务费研究项目(KY2021059), 河北省引进留学人员资助项目(C20210114), 国家重点研发计划课题(2019YFD1001605)。

第一作者: 高梦娇。主要研究方向: 枣树逆境生理与分子生物技术。Email: mjgaomengjiao@163.com 地址: 071000 河北省保定市莲池区乐凯南大街 2596 号河北农业大学西校区。

责任作者: 王立新, 博士, 讲师。主要研究方向: 枣树逆境生理与分子生物技术。Email: wanglxht@163.com 地址: 同上。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

them distributed unevenly on 12 chromosomes. In addition, *ZjCML* can be divided into 12 subgroups, and protein interaction network prediction showed that 16 *ZjCML* existed in the network and they had mutual interaction relationships. Moreover, RNA-seq analysis showed that the expression patterns of *ZjCML13* and *ZjCML6* in response to cold stress between ‘Dongzao’ and its autotetraploids were significantly different. The expression level of *ZjCML13* in response to cold stress in ‘Dongzao’ was significantly higher than that in its autotetraploid at 6 and 24 h. External CaCl_2 and melatonin treatments could significantly induce the expression of *ZjCML13* in autotetraploids ‘Dongzao’ under cold stress at 6 and 24 h, indicating that it may regulate cold resistance of autotetraploid ‘Dongzao’ by inducing the expression of *ZjCML13*. [Conclusion] The *ZjCML* gene family have specific characteristics and expression patterns, *ZjCML13* might play important role in regulation of cold difference between ‘Dongzao’ and its autotetraploids.

Key words: Chinese jujube; CaM-like protein (CML); gene family; cold resistance; expression analysis

钙离子(Ca^{2+})作为第二信使,在植物生长发育和响应逆境胁迫信号转导中发挥重要的作用。逆境胁迫下,向细胞质中快速流入的 Ca^{2+} 信号首先被 Ca^{2+} 感受器或钙受体蛋白感知^[1-2]。钙调素(calmodulin, CaM)和类钙调蛋白(CaM-like protein, CML)是主要的钙受体蛋白之一,在 Ca^{2+} 信号转导过程中具有重要功能。CML 与 CaM 氨基酸的相似性不少于 16%^[3],当 CML 等钙受体蛋白结合 Ca^{2+} 后,蛋白的空间构象发生变化,然后与下游受体蛋白结合,启动 Ca^{2+} 依赖的级联信号放大反应,广泛参与生物胁迫和非生物胁迫等生物学过程^[4-6]。

CML 在植物中普遍存在,在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[7]、水稻(*Oryza sativa*)^[8]、番茄(*Solanum lycopersicum*)^[9]、大豆(*Glycine max*)^[10]、大白菜(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)^[11]、小兰屿蝴蝶兰(*Phalaenopsis equestris*)和铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)^[12]、甜瓜(*Cucumis melon*)^[13]等基因组中分别鉴定到 50、32、52、68、79、60 和 54 个 CML 家族基因,该家族均含有保守的 EF-hand 结构域,在植物应答逆境胁迫中发挥重要功能。在拟南芥中,通过 SDS-PAGE 迁移率变动分析法证明 AtCML20 可与 Ca^{2+} 结合,过表达 AtCML20 可显著降低其抗旱性,说明 AtCML20 受到 Ca^{2+} 激活负调控拟南芥抗干旱胁迫能力^[14]。拟南芥中敲除 AtCML9 可以增强其对盐、干旱胁迫的耐受性,并且促进根系的生长与发育^[15],而 CML24 参与编码一种潜在的 Ca^{2+} 传感器,响应 ABA、日照及盐胁迫^[16]。在水稻中研究发现,OsCML16 在低温、干旱和盐胁迫下显著高表达,并与 OsERD2 互作^[17]。在茶树(*Camellia sinensis*)中研究发现,CsCML16、CsCML18-2 和 CsCML42 在盐胁迫下显著上调表达^[18]。葡萄(*Vitis vinifera*)中研究发现:VaCML21v2 在拟南芥中过表达可增强低温胁迫相关基因 DREB1A 和 DREB2A 的表达,从而提高其抗寒性^[19]。而枣(*Ziziphus jujuba*)中 CML 基因家族

成员的特征和功能尚不清楚。

枣为鼠李科(Rhamnaceae)枣属(*Ziziphus*)植物^[20],是我国重要的经济果树之一,在我国栽培范围较广。我国北方冬季低温异常频发,经常对枣树带来不同程度的低温伤害,严重可导致整株枣树死亡。目前,枣树抗寒性方面的研究主要集中在对不同枣树品种抗寒性比较和相关生理生化指标的测定等方面,对枣树抗寒性的分子机制研究较少^[21]。本研究将利用各种生物信息学手段,全面挖掘枣 CML 基因家族成员,具体分析枣 CML 基因家族成员的基因结构、进化树、染色体定位、保守结构域等信息;并探讨部分 CML 家族基因在‘冬枣’(*Ziziphus jujuba* ‘Dongzao’)及其同源四倍体中响应低温胁迫,以及在 Ca^{2+} 和褪黑素处理下的表达特性,旨在挖掘关键抗寒 CML 基因,为进一步进行枣 CML 家族基因功能验证提供数据基础和参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验材料为‘冬枣’及其由秋水仙素田间诱导的同源四倍体,生长于河北省赞皇县皇农有限责任公司试验基地,年平均气温为 13.3 °C,年降水量 568 mm,管理水平一致。供试材料的接穗于 2006 年分别嫁接到生长状态一致的砧木上,在田间稳定生长且已进入稳定的结果期。本研究于 2021 年 5 月 19 日在该试验基地进行样品采集,每棵树采集至少 3 个枣头,每个品种至少采集 3 棵树,放于冰盒中立即带回实验室用于本次研究^[22]。将采回来‘冬枣’同源四倍体枣头每 3 个一组,共 3 组,分别进行 100 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钙和 100 $\mu\text{mol/L}$ 褪黑素处理后,低温(4 °C)处理 0、6 和 24 h,后采集叶片,并进行液氮速冻,保存于 -80 °C,用于后续 RNA 提取和枣 CML 家族基因表达分析。以同时期末处理的叶片(0 h)作为对照,生物学重复为 3 次。

1.2 试验方法

1.2.1 枣 CML 基因家族的鉴定和理化性质分析

为筛选获得枣 CML 家族基因序列,在 TAIR 基因组序列数据库(<https://www.arabidopsis.org/>)下载拟南芥已公布的 50 条 CML 已知基因,通过在 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行 blastp 比对搜索,初步得到枣 CML 基因家族的候选蛋白编码序列。然后,将蛋白序列提交 Pfam、cd-search、InterProscan 等鉴定上述候选蛋白序列,剔除不含 EF-hand 结构域的 CML 基因,将含有 EF-hand 结构域的基因认定为枣 CML 基因家族成员。进而利用在线分析软件 ExPASy(<http://web.expasy.org/protparam/>)对鉴别出的全部枣 CML 基因家族成员进行等电点、氨基酸数量和相对分子量等理化属性分析^[23]。

1.2.2 枣 CML 家族成员染色体定位、基因结构和亚细胞定位预测峰分析

运用 MG2C 在线软件(http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.0/)绘制染色体定位图,运用 GSDS 在线软件(<http://gsds.gao-lab.org/>)进行基因结构分析,采用 Cell-Ploc2.0(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-Ploc-2/>)在线预测蛋白的亚细胞定位,最后使用 Tbttools 本地工具对基因结构进行分析并绘图^[24]。

1.2.3 枣 CML 家族保守基序分析

利用 MEME 在线工具^[25]预测分析枣 CML 家族基因的保守基序,参数设置为:保守基序最小宽度设置为 6,最大为 50,保守基序数目为 5,其他参数按默认值设置。

1.2.4 枣 CML 家族系统发育分析

使用 MEGA-X 中的 ClustaW 程序将拟南芥、枣的 CML 蛋白序列进行多序列比对,其中 Max Iterations 参数设置为 100,其他参数按照默认设置。采用邻接法(neighbor-joining, NJ),bootstrap 值设置为 1 000,构建进化树。

1.2.5 枣 CML 家族成员蛋白互作预测分析

利用 STRING 数据库(<https://string-db.org/>)对所获得的 23 个枣 CML 家族成员氨基酸序列进行互作共表达预测分析,以拟南芥的相关同源序列作为参考。

1.2.6 枣 CML 家族成员在‘冬枣’及其同源四倍体响应低温胁迫 RNA-seq 表达分析

利用本课题组在‘冬枣’及其同源四倍体响应低温胁迫时的转录组数据^[26]分析 ZjCMLs 家族成员的表达模式,利用 Tbttools 软件以 log₂(FPKM)构建热图,以显示不同基因的表达谱。

1.2.7 枣 CML 家族基因表达特性分析

首先,利用 RNA Easy Fast 植物组织 RNA 快速

提取试剂盒对‘冬枣’及其同源四倍体材料进行总 RNA 提取,参照反转录试剂盒说明书进行,反应条件为:42 ℃ 15 min, 95 ℃ 3 min, 4 ℃ 保存。产物 -20 ℃ 保存。

以枣 *Actin* 基因作为内参基因,通过 NCBI 根据各基因序列设计特异性引物(表 1),进行实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析,反应条件为:95 ℃ 15 min, 40 个循环的 95 ℃ 5 s、50~60 ℃ 30 s、72 ℃ 20 s, 4 ℃ 保存。反应体系为:2 × SuperReal PreMix Plus 10 μL, ddH₂O 8.2 μL, 上下游引物各 0.4 μL, cDNA 1 μL, 最后采用 2^{-ΔΔCt} 法进行基因相对表达量计算^[27]。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物表

Tab. 1 Primers used in qRT-PCR

基因名称 Gene name	引物序列(5'—3') Primer sequence (5'—3')
ZjCML1	F: AGCACATGAAGCCCGAACC R: CGGACCCAACATCCACCTC
ZjCML2	F: GGGGTGTAGTAGGAAAGGCT R: TTCCTTGAGATGACCTCCGC
ZjCML3	F: TAGCCTTGGGACTATCCGCT R: CGCCAGTGACCAAGACAAC
ZjCML4	F: TGCTGAAGAGGAGCTTCGAG R: CCATCACCATCCAAATCAGCTT
ZjCML5	F: CGAAGGTTCCGTTCCGTGAAA R: TTGCTTTCTGGGCTGCAAAA
ZjCML6	F: AACGGCAAGTCTGTAGACGA R: CAATGTGTCCGTCGCCATTTC
ZjCML7	F: CGTGACCGCATTTTCAAGCG R: GGCCATCATACGACTCACCT
ZjCML8	F: TTGCAGGTTCAATGGCGAAG R: GCTGACTTTGCCATCACAGA
ZjCML9	F: TCTGTGGGAAAACCATGCCT R: ATGAAACCGTCGCCGTTGAT
ZjCML10	F: AGGAGGACATGAGAGAGGCTT R: GTTGACCATCCCATCACCGT
ZjCML11	F: AGCTGAAAAGAGGCATTCCGA R: GGTTAGCTTCTCACCAGAGTT
ZjCML12	F: ACAAGGATGGAAGTGGTGCAA R: TCTCACCAAGATCCTTTGCCA
ZjCML13	F: ACCAAGAATCAACAGCGGCA R: TACTACCGACCGATCCGAA
ZjCML14	F: GATTACAGACGGCTTCATT R: TCTATTGTCCCATTTCCA
ZjCML15	F: ATCCCAAGACAGGCAAGGCTC R: GATGCCCTTGTATTCTGTGCTG
ZjCML16	F: ATGGAGACGGGAAGATATCGC R: CCAAACCAAGCAACCCATCTC
ZjCML17	F: GCCAGCGAAAACGACAACAA R: CGGTGGCATGTTGACCTAGA
ZjCML18	F: TCAATGGAGGTTTTCGGTGC R: CGACAGCTACGGTATGTCA
ZjCML19	F: CTCATACACAGAGGACCAGC R: GCCTCCTTGATCATCCCTGTC
ZjCML20	F: TCGACAAGAACAGAGACGGC R: GTCCCTCATTTCCGGGTCTT
ZjCML21	F: CGCCATGATGTTGAGCGAAG R: GCCGTGATTTTCCCATCGTG
ZjCML22	F: AGAGGTTTGACCGTGACAGG R: ACTTGACACCAGCAAATCCA
ZjCML23	F: TCGGGACCATAACGGACTCA R: ACAGATCGGATCATCGCTCG
ZjActin	F: AGCCTTCCTGCCAACGAT R: TTGCTTCTCACCTTGATGC

2 结果与分析

2.1 枣 CML 基因家族鉴定及理化特性分析

利用生物信息学手段, 最终以含 EF-hand 且不含其他结构域蛋白作为枣类钙调素蛋白, 最终筛选得到 23 个 *ZjCML* 基因成员。所有 *ZjCMLs* 基因依照其在染色体上的分布和排列顺序(从上到下)命

名为 *ZjCML1*~*ZjCML23*(表 2)。经分析可知:*ZjCMLs* 基因编码区序列(CDS)全长为 255~807 bp, 蛋白序列全长为 84~268 aa, 分子量为 9.34~29.25 kDa, 蛋白等电点位于 4.07~6.62 之间。*ZjCML* 基因家族成员 EF-hand 结构域个数为 1~5, 结构域个数为 4 的 *ZjCML* 蛋白最多。另外, 亚细胞定位预测分析发现:*ZjCML* 家族蛋白主要分布在细胞膜、细胞质、液泡

表 2 枣 CML 基因家族基本信息
Tab. 2 Basic information of CML gene family in Chinese jujube

基因名称 Gene name	基因登录号 Gene ID	染色体 定位 Chromosome location	基因组 全长 Genomic total length/bp	CDS长度 CDS length/bp	EF-hand 数目 Number of EF-hand	氨基酸数量 Number of amino acid/aa	分子量 Molecular mass/ kDa	等电点 Isoelectric point	亚细胞定位 Subcellular location
<i>ZjCML1</i>	LOC107420771	1	962	444	3	147	16.52	4.73	细胞膜、液泡 Cell membrane and vacuole
<i>ZjCML2</i>	LOC107417331	1	1 325	582	3	193	21.71	5.17	细胞核 Cell nucleus
<i>ZjCML3</i>	LOC107409684	2	1 250	777	3	258	28.86	6.16	细胞膜、细胞核 Cell membrane and nucleus
<i>ZjCML4</i>	LOC107413144	3	846	483	3	160	18.10	4.12	细胞膜、细胞质 Cell membrane and cytoplasm
<i>ZjCML5</i>	LOC107415541	4	1 014	642	2	213	24.62	4.72	细胞膜 Cell membrane
<i>ZjCML6</i>	LOC107416249	4	562	459	4	152	16.68	4.80	液泡 Vacuole
<i>ZjCML7</i>	LOC107416258	4	667	255	2	84	93.44	4.45	细胞膜 Cell membrane
<i>ZjCML8</i>	LOC107418957	5	782	486	4	161	17.45	4.14	液泡 Vacuole
<i>ZjCML9</i>	LOC107421107	6	1 158	507	3	168	19.01	4.33	细胞膜 Cell membrane
<i>ZjCML10</i>	LOC107422102	7	1 214	729	5	242	27.62	4.93	细胞膜 Cell membrane
<i>ZjCML11</i>	LOC107423403	7	952	450	4	149	16.84	4.11	细胞膜、细胞质 Cell membrane and cytoplasm
<i>ZjCML12</i>	LOC107424787	8	889	516	4	171	19.44	4.88	细胞膜 Cell membrane
<i>ZjCML13</i>	LOC107424831	8	856	573	3	190	21.34	4.82	细胞膜 Cell membrane
<i>ZjCML14</i>	LOC107425895	9	887	447	4	148	16.77	4.07	细胞膜、细胞质 Cell membrane and cytoplasm
<i>ZjCML15</i>	LOC107427067	9	1 294	561	4	186	21.34	6.62	细胞膜 Cell membrane
<i>ZjCML16</i>	LOC107427847	9	580	423	4	140	15.56	4.30	细胞膜 Cell membrane
<i>ZjCML17</i>	LOC107429242	10	1 224	606	4	201	22.19	4.50	细胞膜 Cell membrane
<i>ZjCML18</i>	LOC107429541	10	721	480	4	159	17.65	4.34	液泡 Vacuole
<i>ZjCML19</i>	LOC107431195	11	1 286	492	4	163	18.02	4.57	液泡 Vacuole
<i>ZjCML20</i>	LOC107431392	11	1 219	645	3	214	23.89	4.34	细胞膜 Cell membrane
<i>ZjCML21</i>	LOC107431644	12	1 192	693	3	230	25.22	4.74	细胞核 Cell nucleus
<i>ZjCML22</i>	LOC107431634	12	1 166	807	3	268	29.24	6.59	细胞核 Cell nucleus
<i>ZjCML23</i>	LOC107434111		930	507	4	168	18.60	4.37	液泡 Vacuole

和细胞核中,其中定位在细胞膜的最多。

2.2 枣 *CML* 家族基因的染色体定位

对 23 个 *ZjCML* 基因进行了染色体定位分析,并利用 MG2C 在线软件绘制枣 *CML* 染色体物理图谱(图 1),发现 22 个 *ZjCML* 家族成员不均匀分布于 12 条染色体上,其中 1 个不能明显定位于任何染色体上,第 4 条和第 9 条染色体分布最多,各分布 3 个基因,分别是 *ZjCML5*、*ZjCML6*、*ZjCML7* 以及 *ZjCML14*、*ZjCML15* 和 *ZjCML16*。

2.3 枣 *CML* 家族保守基序与进化树联合分析

保守结构域的分析在确定基因功能方面发挥了重要作用,本研究利用在线工具 MEME 对枣 *CML* 家族蛋白进行预测分析,同时利用最大似然法构建进化树,并将其与保守基序预测结果相结合(图 2)。结果发现:*ZjCML* 基因家族可聚为 8 类,且 5 个保守

基序存在于该家族中。其中所有 *ZjCML* 蛋白均含有 Motif 1 和 Motif 2,即为 EF-hand 结构域。另外,大部分 *ZjCML* 蛋白含有 Motif 3 和 Motif 4,也为 EF-hand 结构域,而 *ZjCML5* 只含有 Motif 1 和 Motif 2, Motif 5 只存在于 *ZjCML3*、*ZjCML10* 和 *ZjCML22*。

2.4 枣 *CML* 家族基因结构分析

在鉴定到的 23 个 *ZjCML* 成员中,只有 1 个家族成员 *ZjCML3* 含有内含子,其余的 *ZjCML* 缺乏内含子结构(图 3)。

2.5 枣 *CML* 家族蛋白系统进化分析

为揭示 *ZjCML* 基因家族的同源进化关系,对 23 个 *ZjCML* 家族成员的编码蛋白与拟南芥的 50 个 *CML* 蛋白采用 NJ 法构建系统进化树(图 4)。结果表明:23 个 *ZjCML* 蛋白被分为 I ~ XII 个亚家族,每

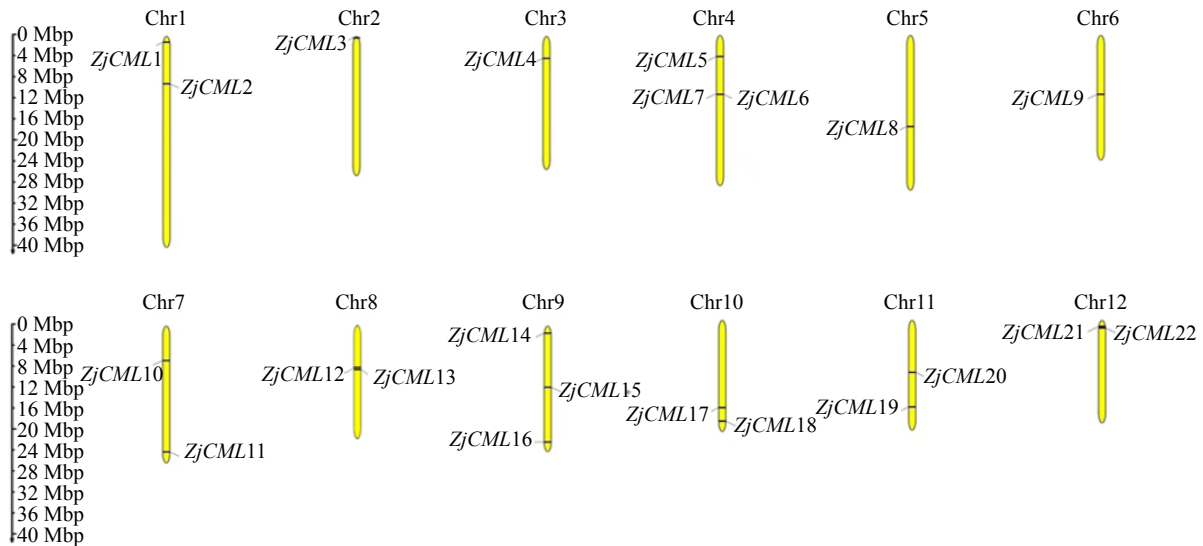


图 1 枣 *CML* 基因在染色体上的定位

Fig. 1 Position of *CML* genes on the chromosomes of Chinese jujube

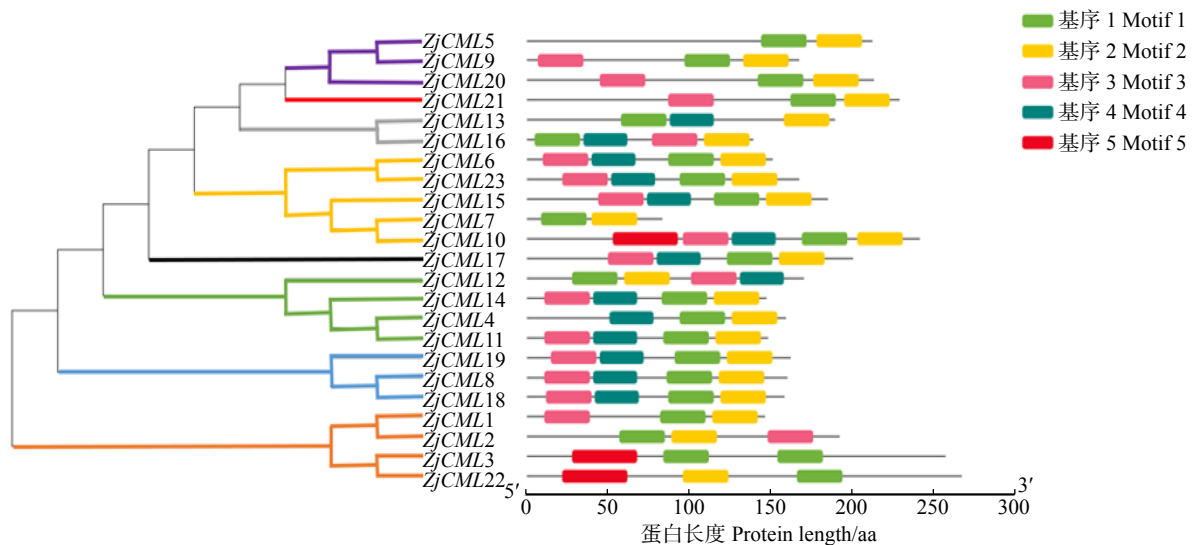


图 2 枣 *CML* 的保守基序分析

Fig. 2 Analysis of the conserved motifs of *CMLs* in Chinese jujube

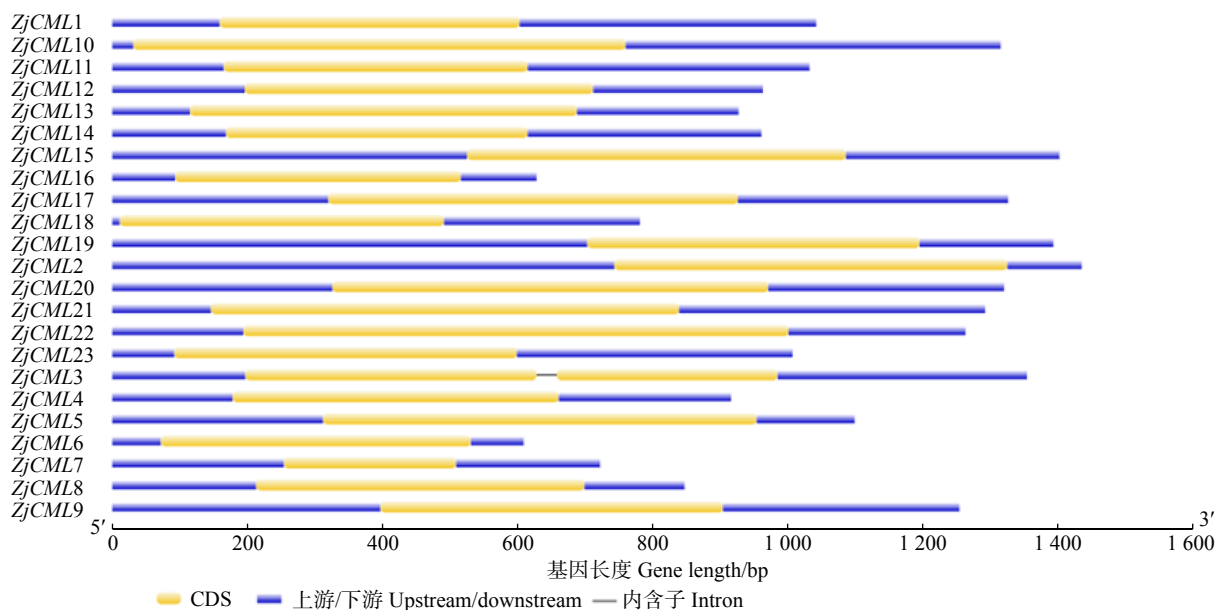


图3 枣 CML 家族基因结构

Fig. 3 Gene structure of CML family in Chinese jujube

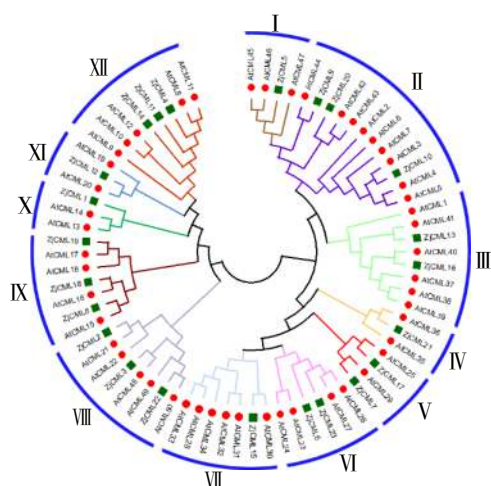


图4 枣和拟南芥 CML 蛋白系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of CML protein in Chinese jujube and *Arabidopsis thaliana*

个亚家族分别包含 1~3 个 ZjCML, 2~9 个 AtCML, 且每个亚类群蛋白具有较高的同源性, 进化关系较近。其中 ZjCML9、ZjCML10 和 ZjCML20 为 II 亚类, ZjCML13 和 ZjCML16 为 III 亚类, ZjCML7 和 ZjCML17 为 V 亚类, ZjCML6 和 ZjCML23 为 VI 亚类, ZjCML2、ZjCML3 和 ZjCML22 为 VIII 亚类, ZjCML8、ZjCML18 和 ZjCML19 为 IX 亚类, ZjCML4、ZjCML11 和 ZjCML14 为 XII 亚类, 其中, ZjCML13 和 AtCML41 高度同源, 属于第 III 亚类。

2.6 枣 CML 家族蛋白网络互作预测分析

对所获得的 23 个 ZjCML 家族成员氨基酸序列进行互作共表达预测分析, 以拟南芥的相关同源序列作为参考。结果表明(图 5): 16 个 ZjCML 存在于

该网络中且具有一定的互作关系, 4 个 ZjCML 与其他 ZjCML 不存在任何关系。其中, ZjCML6、ZjCML10、ZjCML15、ZjCML17、ZjCML21 形成更密切的蛋白互作网络。同样的现象存在于 ZjCML8 和 ZjCML20、ZjCML13 和 ZjCML21 之间。

2.7 ZjCML 家族基因在‘冬枣’及其同源四倍体响应低温时 RNA-seq 表达模式分析

‘冬枣’二倍体抗寒性显著高于其同源四倍体, 为了进一步探究 ZjCML 家族在‘冬枣’及其同源四倍体响应低温胁迫时的功能, 我们对其在二者响应低温胁迫时的 RNA-seq 数据表达模式进行分析。研究表明: 8 个 ZjCML 基因存在一定的表达, 其中 ZjCML6 和 ZjCML13 在低温 0、6 和 24 h 处理过程中表达水平存在明显差异(图 6)。进一步分析发现: ZjCML13 在‘冬枣’中显著上调表达(24 h), 在其同源四倍体中上调表达不显著; ZjCML6 在‘冬枣’及其同源四倍体中均上调表达; 其他基因在低温处理后表达差异不明显。然后, 对 ZjCML6 和 ZjCML13 进行 qRT-PCR 发现: ZjCML6 在‘冬枣’响应低温胁迫 6 和 24 h 时显著上调表达, 在其同源四倍体中表达无变化; ZjCML13 在‘冬枣’响应低温胁迫 6 和 24 h 时极显著上调表达, 在其同源四倍体中表达差异不显著(图 7)。因此, ZjCML6 和 ZjCML13 基因可能在调控‘冬枣’及其同源四倍体抗寒性差异中发挥重要作用。

2.8 ZjCML 家族基因响应 CaCl₂ 和褪黑素处理后低温胁迫下的表达模式分析

对外源 CaCl₂ 和褪黑素处理的‘冬枣’同源四倍体

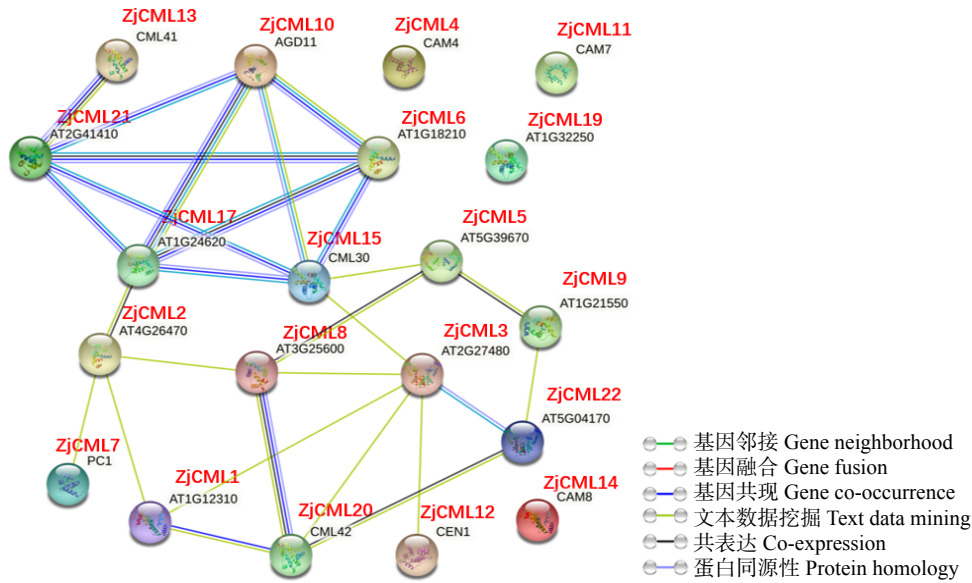
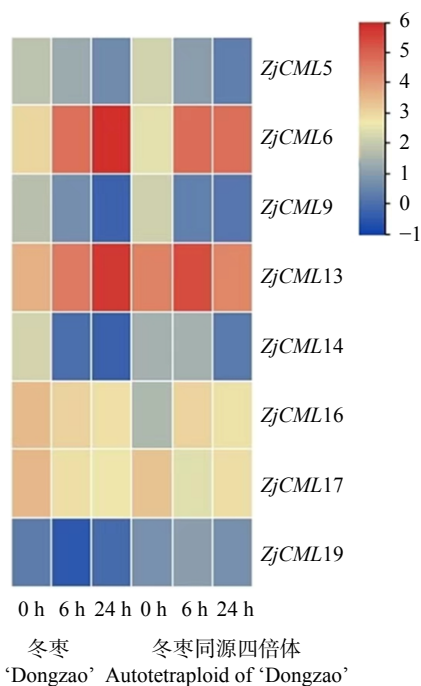


图 5 枣 CML 蛋白网络互作预测分析

Fig. 5 Putative interaction network of CML protein in Chinese jujube

图 6 *ZjCML* 基因在‘冬枣’及其同源四倍体
响应低温胁迫时的 RNA-seq 热图Fig. 6 Heat map of *ZjCMLs* expressing profiles in response to cold stress between ‘Dongzao’ and its autotetraploids from RNA-seq data

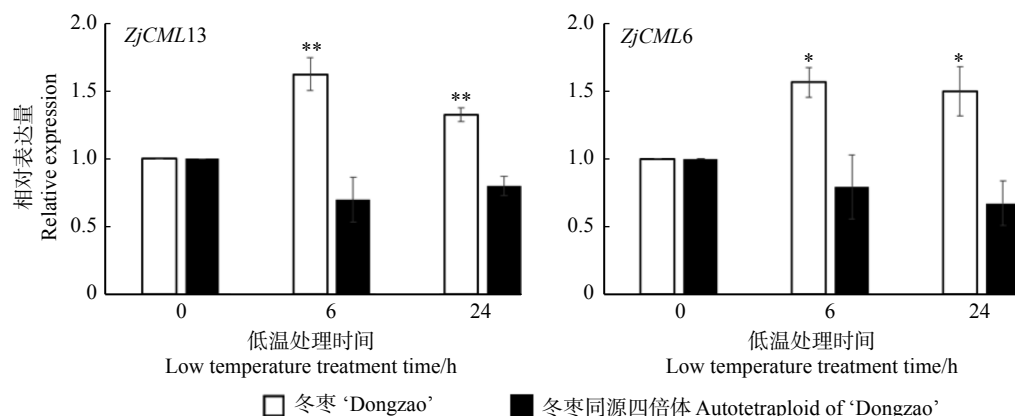
中 *ZjCML6*、*ZjCML9*、*ZjCML10*、*ZjCML13*、*ZjCML14* 和 *ZjCML21* 响应低温胁迫时的表达模式分析发现 (图 8): 外源 CaCl_2 和褪黑素处理后, *ZjCML6*、*ZjCML21* 表达水平在响应低温胁迫时无显著变化; *ZjCML9* 表达水平在响应低温胁迫时下调; *ZjCML10* 在褪黑素处理后低温胁迫 24 h 时显著上调; 而 *ZjCML13* 在 CaCl_2 和褪黑素处理后响应低温胁迫 6 和 24 h 时极显著上调表达。研究结果表明: 外源 CaCl_2 和褪黑素

处理可以诱导 *ZjCML13* 表达, 进而为探究外源 CaCl_2 和褪黑素处理是否能提高‘冬枣’同源四倍体抗寒性提供理论依据。

3 讨论与结论

类钙调素蛋白是一类具有独特的 EF-hand 结构域的蛋白, 能感知 Ca^{2+} 信号并与之结合调节下游靶蛋白, 参与植物信号转导过程^[28]。目前 *CML* 基因已在拟南芥、番茄等多种植物中鉴定出来, 并对其生物学功能进行了研究。本研究利用生物信息学方法从枣中鉴定出 23 个 *CML* 基因, 其不均匀地分布于枣 12 条染色体上。相较于最早在拟南芥和水稻中分别发现的 50 个和 32 个 *CML* 基因, 枣中 *CML* 基因数量远低于拟南芥, 略低于水稻, 表明不同物种 *CML* 基因家族数量差异较大。在拟南芥和水稻中, 片段复制和串联复制可能是导致 *CML* 基因家族扩张及其数目较多的主要原因^[29], 而枣近年来未发生全基因组复制, 可能是导致枣的 *CML* 基因家族成员数量较少的原因。同样在枣环核苷酸门控离子通道(*ZjCNGC*)的研究中也发现了类似的结果, 即 *ZjCNGC* 的成员数量低于其他植物物种的 *CNGC* 的数量^[30]。

CML 家族成员中存在 1 种 EF-hand 结构域, 该结构域可以与 Ca^{2+} 结合, 在 Ca^{2+} 调控其活性和信号转导中发挥重要的作用^[13]。在本研究中, 经比对发现 *ZjCML* 家族成员含有 1~5 个 EF-hand 结构域, 与拟南芥的特点相似, 说明其均可与 Ca^{2+} 结合。进而我们通过将枣与拟南芥 *CML* 基因家族进行进化树分析, 发现其可划分为 12 个亚族 (图 4), 说明枣 *CML* 家族蛋白成员起源不同且功能多样。另外, 研



*表示在 $P < 0.05$ 水平上有显著性差异; **表示在 $P < 0.01$ 水平上有极显著性差异。下同。* represents significant difference at $P < 0.05$ level; ** represents extremely significant difference at $P < 0.01$ level. The same below.

图7 ZjCML6 和 ZjCML13 基因在‘冬枣’及其同源四倍体中响应低温胁迫时 qRT-PCR 表达模式分析

Fig. 7 Expression profiles in response to cold stress between ‘Dongzao’ and its autotetraploids from qRT-PCR test of ZjCML6 and ZjCML13

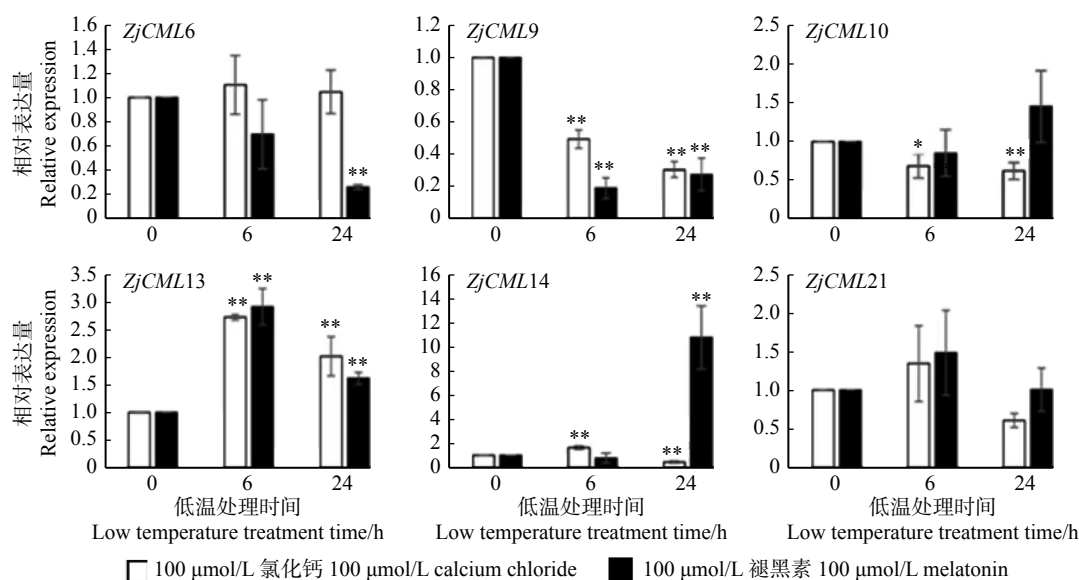


图8 ZjCML 家族基因在 CaCl₂ 和褪黑素处理冬枣四倍体后响应低温胁迫时的相对表达量分析

Fig. 8 Relative expression levels of some CML genes in tetraploid of ‘Dongzao’ in response to cold stress under CaCl₂ and melatonin treatments

究表明,在相同的亚家族或更细小的分支结构中,不同基因基本发挥相似的功能^[31]。在聚类分析中发现一些 ZjCML 与拟南芥 CML 蛋白具有同源性,且聚到 1 个亚类中,推测该家族成员功能存在相似性且与拟南芥 CML 蛋白之间存在较近的进化关系。同时保守基序分析表明:鉴定出的 2 个基序存在于大多数 ZjCML 家族成员中,即 ZjCML 在枣生长发育中可能表现出相对保守的功能,从而为进一步进行系统发育、基因表达分析和功能研究提供重要信息。Ca²⁺信号在植物信号转导中发挥重要作用,多种胁迫均可诱导 CML 基因的表达^[32-35]。其中,研究表明 CML 在植物抗寒性中发挥重要作用。例如:在拟南芥中研究发现,AtCaM4 与 Sec14 类蛋白 PATL1 相互作用,以独立于 CBF 的方式负调控拟南芥的抗寒性^[36]。在葡萄中发现, VaCML21v2 基因在拟南芥

中过表达可增强低温胁迫相关基因 DREB1A 和 DREB2A 的表达,从而提高其抗寒性^[19]。课题组前期研究表明,‘冬枣’抗寒性显著高于‘冬枣’同源四倍体。转录组数据分析发现,低温处理下类钙调素蛋白相关基因 ZjCML13 和 ZjCML6 在‘冬枣’中表达水平显著高于‘冬枣’同源四倍体,进而我们通过实时定量表达分析对该结果进行了验证,与转录组数据变化趋势一致,说明 ZjCML13 和 ZjCML6 可能在调控‘冬枣’及其同源四倍体抗寒性差异中发挥重要作用,将来可对其功能及调控二者抗寒性差异分子机制进行深入研究。另外,研究表明:植物细胞内 Ca²⁺浓度的变化与植物抗逆性密切相关,外源 CaCl₂ 处理可使辣椒(Capsicum annuum)细胞内可溶性糖维持较高水平,从而提高其抗寒性^[37]。对叶片喷施 CaCl₂ 可显著提高香蕉(Musa nana)苗的抗寒性^[38]。褪黑素在

调控植物逆境胁迫中发挥重要作用^[39], 外源褪黑素可通过调控叶绿素和渗透调节物质含量, 抗氧化酶活性等提高软枣猕猴桃(*Actinidia chinensis*)幼苗抗寒性^[40]。本研究发现: 外源 CaCl_2 和褪黑素处理‘冬枣’同源四倍体可显著诱导 *ZjCML13* 表达, 说明其可能在调控‘冬枣’同源四倍体抗寒性中发挥重要功能, 但其调控分子机制还有待深入研究。

CML 是所有真核生物中最保守的钙离子传感蛋白^[41], 其主要通过调节各类靶点而在细胞信号网络中发挥关键作用, 从而响应植物胁迫应答反应和系统发育。本研究在枣基因组数据中共鉴定到 23 个 *ZjCML* 基因, 其不均匀地分布在 12 条染色体上, *ZjCMLs* 可被分为 12 个类群, 其中 *ZjCML13* 在‘冬枣’中表达水平显著高于其同源四倍体, 且受外源 CaCl_2 和褪黑素调控, 表明 *ZjCML13* 在调控‘冬枣’及其同源四倍体抗寒性差异中发挥着重要作用, 可为将来进行枣倍性育种提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] Sun Q G, Yu S H, Guo Z F. Calmodulin-like (CML) gene family in *Medicago truncatula*: genome-wide identification, characterization and expression analysis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(19): 7142.
- [2] Wang L X, Sadeghnezhad E, Nick P. Upstream of gene expression: what is the role of microtubules in cold signalling?[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 71(1): 36–48.
- [3] Mohanta T K, Kumar P, Bae H. Genomics and evolutionary aspect of calcium signaling event in calmodulin and calmodulin-like proteins in plants[J]. *BMC Plant Biology*, 2017, 17(1): 38.
- [4] 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): 1517–1526.
Cao S Y, Wang Y F, Su W Y, et al. Advances in the function of calmodulin-like proteins in plant growth and development and under stress[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2018, 54(10): 1517–1526.
- [5] Andrews C, Xu Y T, Kirberger M, et al. Structural aspects and prediction of calmodulin-binding proteins[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 22(1): 308.
- [6] 王艳, 尹静, 马泓思, 等. 钙离子在介导 SA 诱导白桦悬浮细胞三萜合成途径中的作用[J]. *北京林业大学学报*, 2014, 36(2): 51–58.
Wang Y, Yin J, Ma H S, et al. Role of calcium ion in mediating the triterpenoid synthesis induced by SA in suspension cells of *Betula platyphylla*[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2014, 36(2): 51–58.
- [7] McCormack M, Tsai Y C, Braam J. Handling calcium signaling: *Arabidopsis* CaMs and CMLs[J]. *Trends in Plant Science*, 2005, 10(8): 383–389.
- [8] 杨俊. *OsCaM1-1* 和 *OsCML16* 调控水稻耐逆性机制的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.
Yang J. Studies on the mechanisms of *OsCaM1-1* and *OsCML16* in regulation of stress tolerance in rice[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018.
- [9] Munir S, Khan M R G, Song J, et al. Genome-wide identification, characterization and expression analysis of calmodulin-like (CML) proteins in tomato (*Solanum lycopersicum*)[J]. *Plant Physiology & Biochemistry*, 2016, 102: 167–179.
- [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 C, Duan M H Z, Zhu D, et al. Bioinformatics analysis of CML family genes in soybean[J]. *Soybean Science*, 2015, 34(6): 957–963.
- [11] 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(1): 842.
- [12] 杨前宇, 王涛, 梁立雄, 等. 两种兰科植物 CaM 及 CML 基因家族全基因组分析[J]. *林业科学研究*, 2018, 31(6): 18–28.
Yang Q Y, Wang T, Liang L X, et al. Genome-wide analysis of CaM /CML gene family in two orchidaceae species[J]. *Forest Research*, 2018, 31(6): 18–28.
- [13] 罗澜, 司修洋, 孙蕾, 等. 甜瓜 CML 基因家族的鉴定与表达特性分析[J]. *分子植物育种*, 2021, 19(24): 8081–8094.
Luo L, Si X Y, Sun L, et al. Identification and expression characteristic analysis of CML gene family of Melon[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19(24): 8081–8094.
- [14] Wu X M, Qiao Z, Liu H P, et al. CML20, an *Arabidopsis* calmodulin-like protein, negatively regulates guard cell ABA signaling and drought stress tolerance[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 824.
- [15] Magnan F, Ranty B, Charpentieu 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: For Cell and Molecular Biology*, 2008, 56(4): 575–589.
- [16] 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.
- [17] Yang J, Liu S, Ji L X, et al. Identification of novel *OsCML16* target proteins and differential expression analysis under abiotic stresses in rice[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2020, 249: 153165.
- [18] Ma Q Q, Zhou Q Q, Chen C M, et al. Isolation and expression analysis of *CsCML* genes in response to abiotic stresses in the tea plant (*Camellia sinensis*)[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 1–9.
- [19] Aleynova O A, Kiselev K V, Ogneva Z V, et al. The grapevine Calmodulin-like protein gene *CML21* is regulated by alternative splicing and involved in abiotic stress response[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(21): 7939.
- [20] 曲泽洲, 王永蕙. 中国果树志·枣卷[M]. 北京: 中国林业出版社,

- 1993.
- Qu Z Z, Wang Y H. Chinese fruit and jujube rolls [M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 1993.
- [21] 董梦怡, 杨植, 王振磊, 等. 应用灰色关联度法综合评价 8 个枣品种抗寒性[J]. 塔里木大学学报, 2021, 33(1): 28–37.
- Dong M Y, Yang Z, Wang Z L, et al. Comprehensive evaluation of cold resistance of 8 jujube varieties by grey correlation method[J]. Journal of Tarim University, 2021, 33(1): 28–37.
- [22] Wang L H, Luo Z, Wang L L, et al. Morphological, cytological and nutritional changes of autotetraploid compared to its diploid counterpart in Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.)[J]. *Scientia Horticulturae*, 2019, 249: 263–270.
- [23] 吕义品, 梁楠松, 宋婷婷, 等. 水曲柳 *FmPIF* 基因家族克隆及表达模式分析[J]. 北京林业大学学报, 2022, 44(1): 58–68.
- Lü Y P, Liang N S, Song T T, et al. Cloning and expression pattern analysis of *FmPIF* gene family in *Fraxinus mandshurica*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2022, 44(1): 58–68.
- [24] Chen C J, Chen H, Zhang Y, et al. Tbttools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant, 2020, 13(8): 702.
- [25] 王雪怡, 顾咏梅, 张雪梅, 等. 杨树 HSF 家族基因生物信息学与胁迫应答表达分析[J]. 北京林业大学学报, 2021, 43(2): 34–45.
- Wang X Y, Gu Y M, Zhang X M, et al. Bioinformatics and stress response expression analysis of poplar HSF family genes[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2021, 43(2): 34–45.
- [26] Gao M J, Wang L H, Li M, et al. Physiological and transcriptome analysis accentuates microtubules and calcium signaling in *Ziziphus jujuba* Mill ‘Dongzao’ autotetraploids with sensitive cold tolerance[J]. *Scientia Horticulturae*, 2021, 285: 110183.
- [27] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDCt method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [28] Alistair M H, Colin B. The generation of Ca^{2+} signals in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2004, 55: 401–427.
- [29] McCormack E, Braam J. Calmodulins and related potential calcium sensors of *Arabidopsis*[J]. New Phytologist, 2003, 159(3): 585–598.
- [30] Wang L X, Li M, Liu Z G, et al. Genome-wide identification of CNGC genes in Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) and *ZjCNGC2* mediated signalling cascades in response to cold stress[J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 191.
- [31] 王超楠, 朱强龙, 崔浩楠, 等. 西瓜 CDPK 基因家族鉴定与特征分析[J]. 北方园艺, 2018(17): 1–6.
- Wang C N, Zhu Q L, Cui H N, et al. Identification and characteristic analysis of CDPK gene family[J]. Northern Horticulture, 2018(17): 1–6.
- [32] Ali G S, Reddy V S, Lindgren P B, et al. Differential expression of genes encoding calmodulin-binding proteins in response to bacterial pathogens and inducers of defense responses[J]. *Plant Molecular Biology*, 2003, 51(6): 803–815.
- [33] Liu H T, Li B, Shang Z L, et al. Calmodulin is involved in heat shock signal transduction in wheat[J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(3): 1186–1195.
- [34] 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.
- [35] Shi J Y, Du X G. Identification, characterization and expression analysis of calmodulin and calmodulin-like proteins in *Solanum pennellii*[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 7474.
- [36] Chu M X, Li J J, Zhang J Y, et al. AtCaM4 interacts with a Sec14-like protein, PATL1, to regulate freezing tolerance in *Arabidopsis* in a CBF-independent manner[J]. Journal of Experimental Botany, 2018, 68(21): 5241–5253.
- [37] 李利兰. 外源 5-氨基乙酰丙酸和 $CaCl_2$ 对辣椒耐低温弱光能力的影响 [D]. 重庆: 西南大学, 2013.
- Li L L. Effect on enhancing anti-chilling and low light stress of ALA and $CaCl_2$ on papper seedlings [D]. Chongqing: Southwest University, 2013.
- [38] 王斌, 林芳柯, 李丹, 等. 印度梨形孢和 $CaCl_2$ 对香蕉抗寒性的影响 [J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2021, 50(6): 753–758.
- Wang B, Lin F K, Li D, et al. Effects of *Piriformospora indica* and $CaCl_2$ treatments on cold resistance of banana[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Nature Science Edition), 2021, 50(6): 753–758.
- [39] Wang Y, Guo D D, Wang J C, et al. Exogenous melatonin alleviates NO_2 damage in tobacco leaves by promoting antioxidant defense, modulating redox homeostasis, and signal transduction[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 424: 127265.1–127265.16.
- [40] 张俊康, 马丽, 吴姝青, 等. 外源褪黑素对软枣猕猴桃低温伤害的缓解效应[J]. 植物生理学报, 2020, 56(5): 1081–1087.
- Zhang J K, Ma L, Wu S Q, et al. Alleviation effect of exogenous melatonin on low temperature injury of *Actinidia arguta*[J]. Plant Physiology Journal, 2020, 56(5): 1081–1087.
- [41] 杨秀, 许艳超, 杨芳芳, 等. 棉花 CML 基因家族成员鉴定与功能分析[J]. 棉花学报, 2019, 31(4): 307–318.
- Yang X, Xu Y C, Yang F F, et al. Identification and functional analysis of CML gene family in cotton[J]. Cotton Science, 2019, 31(4): 307–318.

(责任编辑 范娟 赵田芸
责任编辑 卢孟柱)