

茶树钙调素基因 *CsCaMs* 的克隆及其低温胁迫下的表达分析

黄玉婷¹, 钱文俊^{1,2}, 王玉春^{1,2}, 曹红利¹, 王璐¹, 郝心愿¹, 王新超¹, 杨亚军¹

(¹ 中国农业科学院茶叶研究所/国家茶树改良中心/农业部茶树生物学与资源利用重点实验室, 杭州 310008;

² 西北农林科技大学园艺学院, 杨凌 712100)

摘要: 钙调素(CaM)是植物钙离子信号通道的主要参与者,参与低温胁迫下多种植物的抗寒生理作用。本研究根据钙调素基因相关表达序列标签(EST)序列,借助 RACE-PCR 技术,获得 *CsCaM1* 和 *CsCaM2* 两条 cDNA 全长序列,GenBank 登录号分别为 KT238971 和 KT238972,长度分别为 693 bp 和 841 bp,均包含 450 bp 的完整开放阅读框(ORF),编码 149 个氨基酸,两条氨基酸序列仅一个氨基酸有差异,且均含有 4 个植物 CaM 家族的共同特征手型结构 EF(EF-hand)。采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析 *CsCaMs* 在茶树低温胁迫下各种处理中的表达模式。结果表明,*CsCaMs* 无组织表达特异性,低温胁迫处理和 CaCl_2 均能诱导 *CsCaMs* 的表达,而钙调素拮抗剂 W7 与钙离子通道抑制剂 LaCl_3 则会抑制其表达。本研究结果对阐明茶树抗寒性的分子机理有一定理论意义,为茶树的抗寒性育种提供参考。

关键词: 茶树; 钙调素; 低温胁迫; 表达分析

Molecular Cloning and Expression of CaM Family Gene *CsCaMs* Under Cold Stress in Tea Plant [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]

HUANG Yu-ting¹, QIAN Wen-jun^{1,2}, WANG Yu-chun^{1,2}, CAO Hong-li¹, WANG Lu¹,

HAO Xin-yuan¹, WANG Xin-chao¹, YANG Ya-jun¹

(¹ Tea Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, National Center for Tea Improvement, Key Laboratory of Tea Biology and Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Hangzhou 310008;

² Horticultural College of Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100)

Abstract: Calmodulin(CaM) is a major participant in calcium signaling pathway, involved in multiple physiological processes of plant under cold stress. Using RACE-PCR and RT-PCR, two full-length cDNAs of *CsCaM* were cloned from tea plant based on the available EST sequences. *CsCaM1* had 693 bp in length, and *CsCaM2* had 841 bp in length. Both of them contained a 450 bp open reading frame(ORF) encoding 149 amino acid residues. *CsCaMs* had four EF-hands, which were CaM gene families' characteristic. *CsCaM1* and *CsCaM2* were submitted to GenBank with accession number of KT238971 and KT238972, respectively. The expression profiles of *CsCaMs* under cold treatment were investigated using quantitative real-time PCR. Results indicated that the expressions of *CsCaMs* were induced gradually with the extension of cold treatment. Under CaCl_2 treatment, the expressions of *CsCaMs* were up-regulated. However, the expressions of *CsCaMs* were down-regulated under W7 and LaCl_3 treatments. Above results demonstrated that *CsCaMs* might play an important role in cold tolerance of tea plant.

Key words: tea plant; CaM; cold stress; expression analysis

收稿日期: 2015-09-21 修回日期: 2015-11-08 网络出版日期: 2016-08-15

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20160815.1420.002.html>

基金项目: 国家自然科学基金(31170650); 国家茶叶产业技术体系(CARS-23); 浙江省农业新品种选育重大专项(2012C2905-3); 中国农科院科技创新工程(CAAS-ASTIP-2014-TRICAAS)

第一作者主要从事茶树育种与抗性机制研究。E-mail: hyutea@126.com

通信作者: 王新超, 研究方向为茶树育种与抗性机制研究。E-mail: xcw75@tricaas.com

杨亚军, 研究方向为茶树育种与抗性机制研究。E-mail: yjyang@tricaas.com

茶树 [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] 起源于我国西南地区^[1], 是一种喜温不耐低温的植物。近年来, 随着茶产区的北移和极端寒冷气候在各大茶产区的肆虐, 茶树经常遭受低温危害, 严重影响着产量与经济效益, 因而探讨茶树抗寒的分子机制进而服务于茶树育种与茶叶生产是有待探究的热点问题^[2]。

植物遭受低温胁迫时 Ca^{2+} 信号通道是其主要调节途径之一^[3]。而 *CaM* 是细胞内 Ca^{2+} 信号的一种重要受体蛋白, 是钙离子信号通路传递的第一关, 在感知各类环境变化信号的过程中发挥着重要作用^[4], *CaM* 参与信号转导、酶活性调控、光合作用、花粉萌发和激素反应、抵御逆境胁迫等各种生命活动过程^[5-11]。近年来, *CaM* 在植物逆境胁迫下发挥的作用得到了广泛研究。当植物受到逆境胁迫时, *CaM* 直接作用于靶酶或通过 Ca^{2+} 结合形成 Ca^{2+} -*CaM* 复合体再作用于靶酶, 调控相关基因的表达, 进而形成防御反应系统, 并对外界刺激进行反应^[12]。目前 M. C. Gawienowski 等^[13] 与 R. E. Zielinski^[14] 已经从拟南芥中克隆到 9 个 *CaM* 基因。S. H. Lee 等^[15] 从大豆中分离出了 4 个 *CaM* 亚型, F. D. Dural 等^[16] 从豌豆种子中鉴定出了 3 个 *CaM* 亚型。苹果^[17]、无梗花楸^[18]、欧洲栗^[19]、木榄^[20]、西伯利亚蓼^[21] 等多种植物的 *CaM* 基因也成功被相继克隆。X. C. Wang 等^[22] 在 2010 年 10 月至 2011 年 3 月间每隔 10~15 d 均对茶树成熟叶进行了取样, 通过对样品进行转录组测序发现钙离子信号通道相关基因与茶树抗寒性密切相关。本研究以实验室前期获得的茶树冷驯化转录组数据为基础, 搜索茶 *CsCaMs* 的 EST 序列片段, 克隆 *CsCaMs* 的 cDNA 序列全长, 分析其序列特征, 并分析 *CsCaMs* 在低温以及低温处理下施用外源钙调素拮抗剂 W7、钙离子通道抑制剂 LaCl_3 以及外源 CaCl_2 处理下的表达情况, 以期阐明 *CaM* 基因与茶树抗寒性的关系, 为研究茶树抗寒的分子机理及茶树抗寒育种奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

所选品种为龙井 43。分子生物学试剂: Advantage Polymerase Mix 和 SMART RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech (Mountain View, CA, USA) 公司; SYBR Premix Ex Taq II (Perfect Real Time) 试剂盒、Taq 聚合酶、TA Cloning Kit PCR 2.1 Vector 和大

肠杆菌 DH5 α 感受态细胞均购自 TaKaRa (大连) 公司; DNase I Digestion of RNA Preparation 与 First-Strand cDNA Synthesis 试剂盒购自 Invitrogen (Carlsbad, USA) 公司。生化试剂: 钙调素拮抗剂 W7 [N-(6-Aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide, HCl] 与钙离子通道抑制剂 LaCl_3 均购于 Sigma 公司, CaCl_2 等试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取与 cDNA 合成 茶树总 RNA 提取参考 S. Chang 等^[23] 的方法进行。取 1.0 g 样品用于提取总 RNA, 测定浓度, 电泳检测完整性之后, 将浓度调整为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 保存至 -80°C 备用。

参照 DNase I Digestion of RNA Preparation 和 First-Strand cDNA Synthesis 试剂盒说明书合成 cDNA, 稀释 40 倍后保存于 -20°C 下备用。

1.2.2 茶树 *CsCaMs* 基因的克隆 参照茶树冷驯化转录组测序结果 (NCBI 登录号: SRA061042), 从中筛选出与其他植物中 *CaM* 基因高度同源的 EST 序列, 使用 DNASTAR 软件拼接得到数条序列, 使用 Primer Premier 5 分别设计 *CsCaM1* 与 *CsCaM2* 的 3' 端 RACE-PCR 特异引物, 引物分别为 5'-GGTTGATGCTGATGGAAATGGGAC-3' 与 5'-GAGGTTGATGCTGATGGAAATGGG-3', 用以进行 RACE-PCR 扩增。体系参照 SMART RACE cDNA Synthesis Kit 试剂盒, PCR 反应条件为 94°C 预变性 4 min; 94°C 变性 30 s, 68°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 30 个循环。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 将所需目的条带切胶回收, 连接转化后测序, 将测序结果与原序列拼接, 得到 cDNA 全长。使用 DNASTAR 软件查找 ORF, 在其上、下游设计 RT-PCR 引物, *CsCaM1* 的 RT-PCR 上下游特异引物分别为 5'-GTTGATGAGATGATTCGTGAGGC-3' 与 5'-TCCAACTTATCTGCCCTGCTTC-3'; *CsCaM2* 的 RT-PCR 上下游特异引物分别为 5'-ATGATCAGATCTCCGAGTT CAAG-3' 与 5'-CTTCCTCTTTTCTGTTTTGGGT-3'。以 RT-PCR 扩增验证 ORF 序列, 反应条件为 94°C 预变性 4 min; 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 30 个循环。重复连接转化步骤, 验证得到茶树 *CaM* 基因 ORF 序列, 再次拼接。

1.2.3 *CsCaMs* 生物信息学分析 使用 NCBI 的 Blast 进行 *CsCaMs* 基因序列比对; 使用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测 *CaM* 蛋白质分子量和理论等电点; 用 NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 预测 *CaM*

蛋白质磷酸化位点;使用 SingalP 4.1 Server 预测 CaM 氨基酸序列的信号肽存在与否;使用 TMHMM Server V. 2.0 预测 CaM 氨基酸序列的跨膜结构域;使用 the HMMTOP server 预测显示 CaM 氨基酸序列跨膜螺旋个数;使用 CFSSP (<http://cho-fas.sourceforge.net/>) 与 Jpred3 预测 CaM 氨基酸序列的二级结构;使用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 进行 CaM 氨基酸序列的保守域分析;下载其他物种的氨基酸序列,用 DNAMAN 进行 CaM 氨基酸的多序列比对,使用 MEGA5.2 构建 CaM 的系统进化树,方法为邻近相连法;用 SWISS-MODEL space (<http://swissmodel.expasy.org>) 构建 CaM 的三维模型,输出使用 PyMol 软件。

1.2.4 茶树低温胁迫处理 茶树低温胁迫处理参照本实验室及其他已报道的方法^[24-26],选取3年生长势一致、健康无病害的盆栽茶树,搬至人工气候室进行低温(4℃)胁迫处理,分别于0 h、1 h、3 h、9 h、1 d、2 d、3 d、4 d 采集成熟叶片,保存至-80℃冰箱中以备 RNA 提取。

1.2.5 茶树钙离子信号抑制剂以及外源 Ca^{2+} 处理 W7 与 LaCl_3 、 CaCl_2 的处理:选取长势一致、健康无病害的6年生盆栽茶树,搬至人工气候室,设定生长条件为:8:00 至 18:00 之间昼温为 15℃,18:00 至次日 8:00 之间夜温为 10℃,恒定湿度 65%,2 d 低温诱导后将处理分成4组,每组3个重复,4个处理分别为 1 mmol/L W7、1 mmol/L LaCl_3 、20 mmol/L CaCl_2 和蒸馏水(CK)。每个重复选取 10 根长势一致的健壮枝条标记,将溶液(加入微量吐温 20)在每支枝条上所有叶片的背面均匀涂抹 100 μL 。然后改变气候室环境条件:昼温 2℃,夜温 0℃,恒定湿度 65%。处理后分别于 0 d、1 d、2 d、3 d、4 d、5 d 采集已处理成熟叶片,保存至-80℃冰箱中以备 RNA 提取。

1.2.6 *CsCaMs* 实时荧光定量 PCR 表达分析 以茶树 *PTB* 基因作为内参基因^[27],其上下游引物序列分别为 5'-TGACCAAGCAGCTCCACACTATCG-3' 与 5'-TGCCCCCTTATCATCATCCACAA-3'。以 *CsCaM1* 与 *CsCaM2* 的全长设计荧光定量引物。*CsCaM1* 的 qRT-PCR 上下游特异引物分别为 5'-CAAGGAGCTTGAACGGTGA-3' 与 5'-ACCCGGAAGCTTCCTTGAG-3';*CsCaM2* 的 qRT-PCR 上下游特异引物分别为 5'-TTGGAACGGTGATGCGGTC-3' 与 5'-CTTGTCGAAAACCCG-GAAAGC-3'。参照 SYBR Premix Ex Taq II(Perfect real-time)的操作说明书对 *CsCaMs* 基因的表达进行荧光

定量 PCR 分析。在 ABI PRISM 7500 实时定量 PCR 仪上进行反应,程序为 95℃ 30 s,94℃ 5 s,60℃ 34 s,35 个循环,加溶解曲线。反应结束后采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法^[28] 结合熔解曲线与荧光值变化曲线进行分析结果。

2 结果与分析

2.1 *CsCaMs* 基因克隆与生物信息学分析

2.1.1 *CsCaMs* 全长 cDNA 克隆 实验室前期对冷驯化处理过的茶树进行转录组测序获得数条 EST 序列,拼接后进行 BlastX 同源性比对,结果显示这些序列与其他植物中的 *CaM* 基因序列高度同源。设计 3'-RACE 特异引物通过 RACE-PCR 扩增 *CaM* 基因 3' 端序列,再设计 RT-PCR 引物验证,最终获得两条 *CaM* 基因的 cDNA 全长,分别长 693 bp 和 841 bp,均由 450 bp 的序列编码 149 个氨基酸。*CsCaMs* 编码的两条氨基酸序列仅仅在第 140 位氨基酸有所差别,*CsCaM1* 的第 140 位氨基酸为谷氨酸,*CsCaM2* 的相同位置则为天冬氨酸。

用 DNAMAN 软件将所得 *CaM* 基因的氨基酸序列与其他物种氨基酸序列对比可知,*CaM* 家族极其保守,*CsCaMs* 与其他物种也仅有部分区域氨基酸不一致(图 1)。以 *CsCaM1* 为例对其氨基酸序列分析显示,氨基酸序列第 12~40、48~76、85~113、121~149 位为 4 个典型的 EF-hand 结构(图 2)。以此可证明得到的两条基因属于 *CaM* 家族,此结论与将所得核苷酸序列进行 NCBI 中 BlastX 同源比对所得结果相同。将两条序列分别命名为 *CsCaM1* (GenBank 登录号为 KT238971) 和 *CsCaM2* (GenBank 登录号为 KT238972)。

2.1.2 *CsCaMs* 编码的蛋白质理化性质分析 *CsCaM1* 与 *CsCaM2* 编码的蛋白质仅仅相差了一个氨基酸,依据 ProtParam 预测 *CsCaM1* 编码的蛋白质的理论等电点为 4.11,推测分子量为 16.847 kD,含有 38 个酸性氨基酸(Asp + Glu),15 个碱性氨基酸(Arg + Lys)。预测 *CsCaM2* 编码的蛋白质的理论等电点为 4.10,推测分子量为 16.833 kD,含有 38 个酸性氨基酸(Asp + Glu),15 个碱性氨基酸(Arg + Lys)。

使用 NetPhos 2.0 Serve 进行磷酸化位点预测,结果显示 *CsCaMs* 编码的两条氨基酸序列中均含有 3 个苏氨酸(Threonine)位点和 3 个丝氨酸(Serine)位点,说明钙调蛋白的活性可能受磷酸化作用的调控。

ZmCaM	MADQLTDDQISEFKEAFSLFDKDGDCITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADGNGTIDFFPEFLNLMARKMKDT	80
DcCaM	MADQLTDDQISEFKEAFSLFDKDGDCITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADGNGTIDFFPEFLNLMARKMKDT	80
TaCaM	MADQLTDDQISEFKEAFSLFDKDGDCITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADGNGTIDFFPEFLNLMARKMKDT	80
PtCaM	MADQLTDDQISEFKEAFSLFDKDGDCITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADGNGTIDFFPEFLNLMARKMKDT	80
AtCaM	MADQLTDDQISEFKEAFSLFDKDGDCITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADGNGTIDFFPEFLNLMARKMKDT	80
BvCaM	MADQLTDDQISEFKEAFSLFDKDGDCITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADGNGTIDFFPEFLNLMARKMKDT	80
CmCaM	MADQLTDDQISEFKEAFSLFDKDGDCITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADGNGTIDFFPEFLNLMARKMKDT	80
CsCaM1	MADQLTDDQISEFKEAFSLFDKDGDCITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADGNGTIDFFPEFLNLMARKMKDT	80
CsCaM2	MADQLTDDQISEFKEAFSLFDKDGDCITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADGNGTIDFFPEFLNLMARKMKDT	80
Consensus	madql d qi efkeafslfdkdgdgcittkelgtvmrslgqnptea elqdminevdadgngtidffpeflnlmarkmkdt	
ZmCaM	DSEEEELKEAFRVFDKQNGFISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADV DGDGQINYE FVKVMMAK.	149
DcCaM	DSEEEELKEAFRVFDKQNGFISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADV DGDGQINYE FVKVMMAK.	149
TaCaM	DSEEEELKEAFRVFDKQNGFISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADV DGDGQINYE FVKVMMAK.	149
PtCaM	DSEEEELKEAFRVFDKQNGFISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADV DGDGQINYE FVKVMMAK.	149
AtCaM	DSEEEELKEAFRVFDKQNGFISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADV DGDGQINYE FVKVMMAK.	149
BvCaM	DSEEEELKEAFRVFDKQNGFISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADV DGDGQINYE FVKVMMAK.	149
CmCaM	DSEEEELKEAFRVFDKQNGFISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADV DGDGQINYE FVKVMMAK.	149
CsCaM1	DSEEEELKEAFRVFDKQNGFISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADV DGDGQINYE FVKVMMAK.	149
CsCaM2	DSEEEELKEAFRVFDKQNGFISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADV DGDGQINYE FVKVMMAK.	149
Consensus	dseeeelkeafrvfdkdqngfisaaelrhvmtnlgekltddevdem readv dgdgqiny efvkvmmak	

方框内为 EF-Hand 结构域

Sequences in this frames are EF-hand structures

ZmCaM: *Zea mays* (ACF87450.1), *DcCaM*: *Daucus carota* (AAQ63461.1), *TaCaM*: *Triticum aestivum* (AAC49582.1), *TiCaM*: *Populus tomentosa* (AAX63770.1), *AtCaM*: *Arabidopsis thaliana* (NP_189967.1), *BvCaM*: *Beta vulgaris* (ACB32228.1), *CmCaM*: *Glycine max* (NP_001236711.1)

图1 *CsCaMs* 编码的氨基酸序列及其他物种 *CaM* 编码的氨基酸序列比对结果

Fig.1 Alignment results of *CsCaMs* encoding amino acid sequences and other species *CaM* encoding amino acid sequences

1	GAGCCACGCGTTATCTCTCACTTCCTTTTCATTTCTCTTCCATTTCTCTCTCACTTTCT
61	CGGAAAACAAAGACAATGGCCGATCAGCTCACCGATGATCAGATCTCCGAGTTCAAGGAG
	M A D Q L T D D Q I S E F K E
121	GCCTTCAGCCTCTTCGACAAGGACGGAGATGGTTGTATCACTACCAAGGAGCTTGAACA
	A F S L F D K D G D G C I T T K E L G T
181	GTGATGCGGTCGTTGGGACAGAACCAACAGAAGCTGAGCTGCAGGACATGATCAATGAG
	V M R S L G Q N P T E A E L Q D M I N E
241	GTTGATGCTGATGGAATGGGACAATTGATTCCAGAGTTTCTCAACCTGATGGCCCGG
	V D A D G N G T I D F P E F L N L M A R
301	AAGATGAAAGATACCGACTCCGAGGAGGAGCTCAAGGAAGCCTCCGGGTTTTCGACAAG
	K M K D T D S E E E L K E A F R V F D K
361	GACCAGAACGGCTTCATTTCTGCTGCTGAGCTCCGCCATGTAATGACAAATCTTGGTGAA
	D Q N G F I S A A E L R H V M T N L G E
421	AAGCTCACAGATGAGGAAGTTGATGAGATGATTCGTGAGGCCGATGTGGATGGTGACGGC
	K L T D E E V D E M I R E A D V D G D G
481	CAGATCAACTATGAGGAGTTCGTCAAGGTATGATGGCCAAGTGA
	Q I N Y E E F V K V M M A K *

图中下划线部分为 EF-hand 结构

The underlined parts are EF-hand structures

图2 *CsCaM1* 的 cDNA 核苷酸序列及预测氨基酸序列

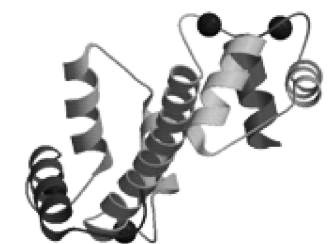
Fig.2 Nucleotide and putative amino acid sequence of *CsCaM1*

使用 SingalP 4.1 Server 进行信号肽预测,结果显示 *CsCaMs* 编码的氨基酸序列均无信号肽位点,可以判断钙调蛋白属于非分泌性蛋白质。使用 TM-HMM Server V. 2.0 预测显示 *CsCaMs* 编码的氨基酸序列均无跨膜结构。TargetP 预测显示 *CsCaMs* 的各项指标一致,cTP(叶绿体转运肽)、mTP(线粒体靶向肽)和 SP(分泌通路信号肽)值分别为 0.121、0.101、0.128,而在其他细胞器的预测值高达 0.894,表明钙调蛋白主要存在于线粒体、叶绿体以外的其他细胞器中,这与 chlorop v1.1 预测的结果也一致。

Jpred3:GOR4 预测 *CsCaMs* 编码的氨基酸序列的二级结构,发现其以 α 螺旋、无规则卷曲、延伸链为主,分别占 55.03%、39.60% 和 5.37%。以 *CsCaM1* 为例,使用 SWISS-MODEL space 进行 CaM 蛋白的三维结构模拟(图 3),发现空载钙调素的结构为哑铃型,具有由 α 螺旋组成的 EF-hand 手型结构,其上有钙离子结合位点。在结合了钙离子之后钙调蛋白发生构象改变形成 Ca^{2+} 饱和钙调素。



Apo-CsCaM1 (空载钙调素)



Holo-CsCaM1 (Ca^{2+} 饱和钙调素)

图 3 *CsCaM1* 蛋白三维结构图

Fig. 3 3-D structure of *CsCaM1* protein

2.2 *CsCaMs* 基因的表达分析

2.2.1 低温胁迫下 *CsCaMs* 基因的表达分析 采用荧光定量 PCR 技术对 *CsCaMs* 基因在 4 °C 低温胁迫下的表达模式进行了分析,结果显示,2 个 *Cs-*

CaMs 在 4 °C 低温胁迫下表达趋势基本一致,均为从 0 h 起逐渐上调,尤其是在 9 h 时加剧上升,于 24 h 时表达量达到最大值,*CsCaM1* 与 *CsCaM2* 的最大表达量分别为 7.29 与 8.28,且其中 *CsCaM2* 受低温影响的诱导程度更大(图 4)。

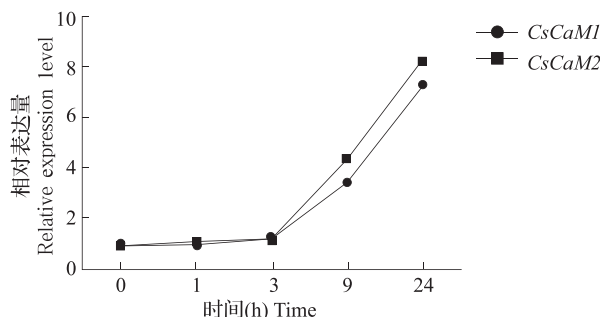


图 4 4 °C 低温胁迫处理下 *CsCaMs* 的相对表达量

Fig. 4 Relative expression of *CsCaMs* under 4 °C cold stress treatment

2.2.2 不同组织中 *CsCaMs* 基因的表达分析 分析了 *CsCaMs* 在不同组织中的表达模式,结果发现(图 5),*CsCaMs* 在不同组织中均有表达,但表达量之间的差异没有统计学意义。*CsCaM1* 在叶中的表达量为 1.38,为各组织中最高。而 *CsCaM2* 在花中表达量最高,为 1.42。说明 *CsCaMs* 在不同组织中表达的差异无统计学意义,即 CaM 蛋白在各类组织中均有可能发挥作用。

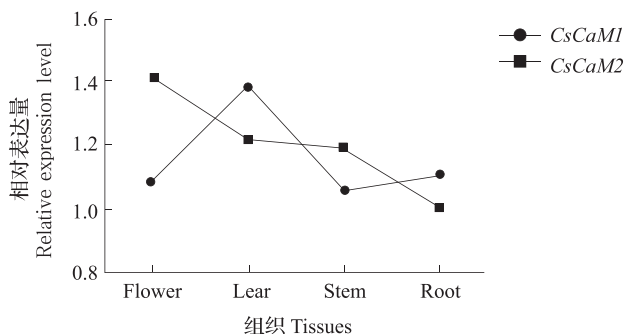


图 5 茶树不同组织中 *CsCaMs* 的相对表达量

Fig. 5 Relative expression of *CsCaMs* in different tissues of tea plant

2.2.3 外源 CaCl_2 与钙调素抑制剂 W7 和 LaCl_3 处理下 *CsCaMs* 基因的表达分析 低温下施加外源 CaCl_2 与钙调素抑制剂 W7 和 LaCl_3 时,*CsCaM1* 和 *CsCaM2*(图 6)的表达模式略有差异。未外源施用试剂的情况下,*CsCaM1* 在低温胁迫下表达从 1 d 起逐渐上调,在 4 d 时表达量达到最大值,然后有轻微下调。而低温胁迫下 W7 与 LaCl_3 处理之后,茶树叶

片中 *CsCaM1* 的表达均受到抑制,其中 W7 处理后的 *CsCaM1* 在 2 d 时表达量下降到最低,之后被抑制程度减轻;LaCl₃ 处理后 *CsCaM1* 的表达量在 4 d 时降至最低点。可以看出 LaCl₃ 处理之后的 *CsCaM1* 受抑制程度更高。而低温胁迫下对叶片施加 CaCl₂ 之后,*CsCaM1* 表达量大幅上调,1 d 时表达量就上升至最大值 6.43,1 d 后表达量逐渐下降,但是均比初始表达量高。*CsCaM2* 在低温胁迫下表达趋势与 *CsCaM1* 基本一致,但是 *CsCaM2* 被低温诱导的表达量更高,未外源施用试剂的情况下,其第 3 天时达到了极其显著的 13.14,但其在抑制剂 W7 与 LaCl₃ 处理之后的受抑制程度相比于 *CsCaM1* 更高,在 3 d 时降至最低,分别为 0.16 和 0.25。而在施加 CaCl₂ 之后 *CsCaM2* 的表达量增幅却比 *CsCaM1* 的增幅小。

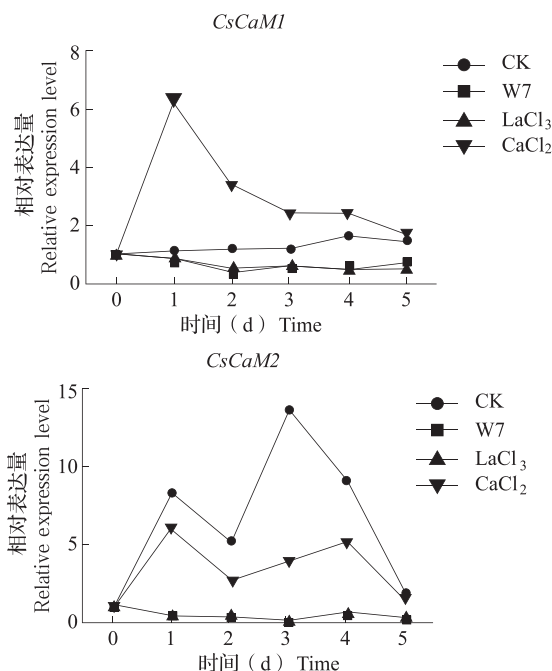


图6 W7与LaCl₃与CaCl₂处理下*CsCaMs*基因的相对表达量

Fig. 6 Relative expression of *CsCaMs* under W7, LaCl₃ and CaCl₂ treatments of tea plant

3 讨论

钙是真核生物中调节细胞生长过程的重要离子,也是植物信号系统中最重要第二信使^[3]。植物在生长过程中,很多生物和非生物刺激均会引起Ca²⁺浓度的改变,从而触发下游效应器,形成钙信号通路。Ca²⁺作用的第一步是与CaM结合,因此对CaM的研究是了解植物钙信号通路调控的第一步。本实验室前期的研究发现,茶树冷驯化诱导抗寒性

与钙离子信号通路密切相关,其中涉及到CaM基因的表达改变^[22]。本研究基于上述研究结果,利用转录组测序的序列信息,克隆获得了茶树2个CaM基因的cDNA全长,二者氨基酸序列均具有其他植物中报道的4个EF-hand结构域,而且同源比对和进化树等分析表明,茶树CaM与其他植物物种的CaM相似性较高,具有较强的保守性,结论与其他研究一致^[21]。

在茶树花、叶、茎和根4种组织器官中均能够检测到*CsCaMs*基因的表达,但表达量差异无统计学意义。对美国山核桃的CaM基因研究发现,其表达具有组织和各种发育时期的特异性,表达量从高到低依次为叶、嫩叶、嫩茎^[29]。小麦CaM基因在茎、叶、种子、根中均有不同程度的表达^[30],TaCaM5表达量在小麦根部最高,茎部最少^[31]。组织RNA印迹分析发现马铃薯^[32]、大豆^[17]发育过程中不同器官中的CaM基因的表达差异均有统计学意义。CaM基因在各种植物的不同组织中均有表达,即其在各个组织中均发挥着钙离子信号转导的作用,但不同组织中表达水平不一致,有可能是由于不同组织有着不同程度的钙离子信号转导作用所致。

茶树在低温胁迫下,*CsCaMs*表达量逐渐上升,这与对小麦的研究结论表现一致^[31]。推测低温胁迫下CaM蛋白能够通过钙信号通道发挥作用,从而提高植物适应低温环境的能力。在对烟草的研究中发现,低温胁迫下转*BvM14-CaM*基因烟草存活率高于野生型烟草与转空载体烟草存活率,在表型上,叶片卷曲现象也不及后两者明显,也证明CaM基因能够提高植物低温胁迫下的抗寒性^[33]。

低温胁迫下W7与LaCl₃处理之后的茶树叶片中*CsCaMs*表达被抑制可以间接说明钙调素在维持茶树抗寒性方面发挥着作用。钙调素拮抗剂W7能够阻止Ca²⁺与CaM结合,抑制Ca²⁺-CaM复合体的形成,从而抑制下游钙调素结合蛋白的活性,导致钙离子信号通道受阻。LaCl₃作为钙离子通道抑制剂,能够降低植物吸收Ca²⁺的程度,使细胞中Ca²⁺浓度差低于钙离子信号转导的阈值,因而Ca²⁺不能与钙调素结合,从而起到阻止钙离子信号通道正常作用的效果。而低温胁迫下施加了外源CaCl₂之后,茶树叶片中*CsCaMs*表达量呈现出相比对照而言大量上调的趋势。可能是Ca²⁺施加之后被吸收至植物体内,由于整体Ca²⁺浓度的变化导致Ca²⁺信号强度增大,形成的Ca²⁺-CaM复合体数量增加,给予CaM基因正反馈,使其表达不断上调,生成更多CaM蛋

白进而形成更多 $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$ 复合体,激活下游一系列钙调素结合蛋白,使茶树适应低温的能力增强。这些结果与本实验室前期的生理研究结果一致^[10]。综合生理学和基因表达的研究结果,可以推测钙离子信号通路在茶树抗寒调控中起着重要的作用。

参考文献

- [1] 虞富莲. 论茶树原产地和起源中心[J]. 茶叶科学, 1986, 6(1): 1-8
- [2] 杨亚军, 王新超. 茶树抗性育种研究现状[J]. 茶叶科学, 2003, 23(2): 94-98
- [3] Kim M C, Chung W S, Yun D J, et al. Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants[J]. Mol Plant, 2009, 2(1): 13-21
- [4] Wang Q, Li S, Li C Z, et al. The extra C-terminal tail is involved in the conformation, stability changes and the N/C-domain interactions of the calmodulin like protein from pearl oyster *Pinctada fucata* [J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1784: 1514-1523
- [5] Sanders D, Brownlee C, Harper J F. Communicating with calcium[J]. Plant Cell, 1999, 11(4): 691-706
- [6] Zhou R G, Li B. Progress in the participation of Ca^{2+} - calmodulin in heat shock signal transduction[J]. Prog Nat Sci, 2009, 19: 1201-1208
- [7] Al-Quraan N A, Locy R D, Singh N K. Expression of calmodulin genes in wild type and calmodulin mutants of *Arabidopsis thaliana* under heat stress[J]. Plant Physiol Biochem, 2010, 48: 697-702
- [8] Xu Y G, Pedro S C, Rocha F, et al. A novel rice calmodulin-like gene, *OsMSR2*, enhances drought and salt tolerance and increases ABA sensitivity in *Arabidopsis* [J]. Planta, 2011, 234: 47-59
- [9] Reddy A S, Ali G S, Celesnik H, et al. Coping with stresses: roles of calcium and calcium/calmodulin-regulated gene expressions[J]. Plant Cell, 2011, 23: 2010-2032
- [10] 黄玉婷, 钱文俊, 王博, 等. 外源 Ca^{2+} 及钙离子信号抑制剂对茶树抗寒性的影响[J]. 茶叶科学, 2015, 35(6): 520-526
- [11] 陈曦, 代焕琴, 张旭家, 等. 低温诱导及 Ca^{2+} 信号对胡萝卜悬浮培养细胞抗冻蛋白的合成及细胞抗冻能力的影响[J]. 科学技术与工程, 2002, 2(3): 23-26
- [12] 孙大业, 郭艳林, 马力耕. 细胞信号转导, 第3版[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [13] Gawienowski M C, Szymanski D, Perera I Y, et al. Calmodulin isoforms in *Arabidopsis* encoded by multiple divergent mRNAs[J]. Plant Mol Biol, 2003, 22: 215-225
- [14] Zielinski R E. Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 2008, 49: 1049-1055
- [15] Lee S H, Kim J C, Lee M S, et al. Identification of a novel divergent calmodulin isoform from soybean which has differential ability to activate calmodulin-dependent enzymes[J]. J Biol Chem, 1995, 270: 21806-21812
- [16] Duval F D, Renard M, Jaquinod M, et al. Differential expression and functional analysis of three calmodulin isoforms in germinating pea (*Pisum sativum* L.) seeds [J]. Plant J, 2002, 32: 481-493
- [17] Watillon B, Kettmann R, Boxus P, et al. Cloning and characterization of an apple (*Malus domestica* (L.) Borkh) calmodulin gene [J]. Plant Sci, 1992, 82(2): 201-212
- [18] Folzer H, Capelli N, Dat J, et al. Molecular cloning and characterization of calmodulin genes in young oak seedlings (*Quercus petraea* L.) during early flooding stress [J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1727: 213-219
- [19] Schafleitner R, Wilhelm E. Isolation of wound inducible genes from *Castanea sativa* stems and expression analysis in the bark tissue[J]. Plant Physiol Biochem, 2002, 40: 234-245
- [20] 庞俊峰, 张占路, 房永雨, 等. 木榄 *CaM* 基因的克隆及序列分析[J]. 生物技术通报, 2010(12): 126-131
- [21] 刘春, 刘关君, 曲春浦, 等. 西伯利亚蓼钙调蛋白基因的克隆及其在盐胁迫下的表达[J]. 植物生理学通讯, 2010(2): 113-119
- [22] Wang X C, Zhao Q Y, Ma C L, et al. Global transcriptome profiles of *Camellia sinensis* during cold acclimation[J]. BMC Genomics, 2013, 14: 415
- [23] Chang S, Puryear J, Cairney J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees[J]. Plant Mol Biol Rep, 1993, 2(11): 113-116
- [24] 曹红利, 岳川, 郝心愿, 等. 茶树胆碱单加氧酶 *CsCMO* 的克隆及甜菜碱合成关键基因的表达分析[J]. 中国农业科学, 2013, 46(15): 3087-3096
- [25] Paul A, Lal L, Ahuja P S, et al. Alpha-tubulin (*CsTUA*) up-regulated during winter dormancy is a low temperature inducible gene in tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] [J]. Mol Biol Rep, 2012, 39: 3485-3490
- [26] Wang Y, Jiang C J, Li Y Y, et al. *CsICE1* and *CsCBF1*: two transcription factors involved in cold responses in *Camellia sinensis* [J]. Plant Cell Rep, 2012, 31: 27-34
- [27] 郝娜. 茶树不同逆境条件下 QRT-PCR 适宜内参基因的筛选[D]. 南京: 南京农业大学, 2012
- [28] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. Methods, 2001, 25: 402-408
- [29] 郭丽君. 美国山核桃 *CaM* 基因的克隆及在盐胁迫下的表达[D]. 南京: 南京林业大学, 2013
- [30] Yang T, Lev-Yadun S, Feldman M, et al. Developmentally regulated organ-, tissue-, and cell-specific expression of calmodulin genes in common wheat[J]. Plant Mol Biol, 1998, 37: 109-120
- [31] 刘新颖, 王晓杰, 薛杰, 等. 小麦钙调素新亚型 *TaCaM5* 的克隆及表达分析[J]. 作物学报, 2010, 36(6): 953-960
- [32] Takezawa D, Liu Z H, An G, et al. Calmodulin gene family in potato: developmental and touch-induced expression of mRNA encoding a novel isoform[J]. Plant Mol Biol, 1995, 27: 693-703
- [33] 杜萍. *BvM14-CaM* 基因在烟草中的转化及表达[D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2010