

曹兴 张秀省 高祥斌 等. 百合 *CBL1* 与 *CBL3* 基因的克隆与表达分析 [J]. 江西农业大学学报, 2018, 40(6): 1248–1255.



百合 *CBL1* 与 *CBL3* 基因的 克隆与表达分析

曹 兴¹ 张秀省¹ 高祥斌¹ 义鸣放² 吕福堂^{1*}

(1. 聊城大学 农学院, 山东 聊城 252059; 2. 中国农业大学 园艺学院/花卉发育与品质调控北京市重点实验室, 北京 100193)

摘要: 为了深入研究百合响应盐胁迫的分子机制, 研究以麝香百合杂种系品种‘白天堂’为试验材料, 从中分离得到 *LICBL1* 与 *LICBL3* 基因, 分别编码 213 和 223 个氨基酸。亚细胞定位分析表明 *LICBL1* 在细胞膜中表达, *LICBL3* 在细胞膜、细胞质和细胞核中表达。基因表达分析表明 *LICBL1* 和 *LICBL3* 在根、鳞茎、叶中均有表达; *LICBL1* 和 *LICBL3* 的表达受盐胁迫诱导, 其中 *LICBL1* 响应盐胁迫的上调表达更加显著。研究结果表明 *LICBL1* 基因可能与百合的盐胁迫响应密切相关。

关键词: 百合; 类钙磷酸酶 B 亚基蛋白; 盐胁迫; 基因克隆; 亚细胞定位; 表达分析

中图分类号: S682.2⁺65 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2018)06-1248-08

Cloning and Expression Analysis of *CBL1* and *CBL3* Genes in Lily

CAO Xing¹ ZHANG Xiu-sheng¹ GAO Xiang-bin¹ ,
YI Ming-fang² LYU Fu-tang^{1*}

(1. College of Agronomy, Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252059, China; 2. Beijing Key Laboratory of Development and Quality Control of Ornamental Crops, College of Horticulture, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: To explore the molecular mechanism of lily in response to salt stress, *LICBL1* and *LICBL3* genes were isolated from lily cultivar ‘White Heaven’. *LICBL1* composed of 213 amino acid residues was expressed in plasma membrane, while *LICBL3* composed of 223 amino acid residues was expressed in plasma membrane, cytoplasm and nucleus. The qPCR results showed that *LICBL1* and *LICBL3* transcripts were detected in root, bulb and leaf, and were induced by salt stress, of which *LICBL1* transcript was up-regulated more significantly. These data indicated that *LICBL1* might be correlated to salt stress-response in lily.

Keywords: lily; CBL; salt stress; gene cloning; subcellular localization; expression analysis

百合 (*Lilium* spp.) 为百合科百合属球根花卉, 具有重要的观赏、食药价值。百合多数喜微酸性土壤, 土壤高盐分会抑制百合的生长发育, 降低切花的产量和质量, 并造成种球退化。因此, 解析百合的盐

收稿日期: 2018-04-13 修回日期: 2018-05-01

基金项目: 国家自然科学基金 (31601788)、山东省自然科学基金 (ZR2016CB36) 和聊城大学博士科研启动基金 (318051312)

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (31601788), Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2016CB36) and Doctor Foundation of Liaocheng University (318051312)

作者简介: 曹兴 (1984—), 男, 讲师, 博士, 主要从事园艺作物抗逆生理研究, caoxinglina@163.com; * 通信作者: 吕福堂, 教授, lvfutang@lcu.edu.cn。

胁迫响应机制 鉴定调控耐盐性的关键基因 对于采用基因工程技术来提高百合的耐盐性具有重要的理论和实践意义。

作为植物体中普遍存在的第二信使, Ca^{2+} 参与调控植物的生长发育和多种逆境胁迫响应。植物感受外界刺激后, 细胞中的 Ca^{2+} 浓度在时空上出现特异性的变化, 这种变化会被相应的 Ca^{2+} 感受器所感知, 进一步将信号传递给下游的靶蛋白, 从而引发细胞内一系列的生理生化反应来响应逆境胁迫。目前, 植物中发现的 Ca^{2+} 受体蛋白主要分为三类: 钙调蛋白(calmodulin, CaM)、类钙调磷酸酶 B 亚基蛋白(calcineurin B-like proteins, CBL) 和钙依赖蛋白激酶(calcium-dependent protein kinase, CDPK)^[1]。其中, CBL 仅存在于高等植物中, 与其下游靶蛋白 CIPK(CBL-interacting protein kinase) 组成 CBL-CIPK 信号转导途径, 在植物响应逆境胁迫过程中发挥重要作用。到目前为止拟南芥中鉴定了 10 个 *CBL* 基因和 25 个 *CIPK* 基因, *CBL1*、*CBL4*、*CBL10* 都能与 *CIPK24* 互作提高拟南芥的耐盐性^[2-4]。

本研究以麝香百合杂种系(*L. longiflorum* Hybrids) 品种‘白天堂’(‘White Heaven’) 为试验材料, 从中克隆了 *CBL* 基因, 分析了百合 *CBL* 蛋白特性及 *CBL* 基因在盐胁迫下的表达模式, 以期为进一步研究 *CBL* 基因在百合耐盐性调节方面的功能及作用机制提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为麝香百合杂种系品种‘白天堂’(*L. longiflorum* cv. ‘White Heaven’) 组培苗, 培养条件为 22 ℃, 光照时间为 16 h/d。亚细胞定位使用的材料为紫皮洋葱(*Allium cepa*)。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 试验所用引物见表 1。DNA 测序由北京六合华大基因科技有限公司完成。

1.2 试验方法

1.2.1 百合 *CBL* 基因的克隆 取百合叶片用液氮研磨, 根据天根公司多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒说明书提取 RNA。cDNA 的合成根据 Takara 公司的 Reverse Transcriptase M-MLV(RNase H) 说明书进行, 反转录接头引物为 AP。

(1) *LICBL1* 基因的克隆。基因 5'端序列的克隆: 按照 TaKaRa 公司 5'-Full RACE kit 说明书进行。根据实验室之前获得的百合 *CBL1* 基因片段设计两条下游特异引物 SPR1 和 SPR2, 与试剂盒自带的两条 5'端接头引物进行巢式 PCR 扩增。第一轮引物为 5'RACE Outer primer 和 SPR1, 反应程序为: 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 62 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 10 min。取第一轮产物 1 μL 进行第二轮反应, 引物为 5' RACE Inner primer 和 SPR2, 反应程序为: 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 33 个循环; 72 ℃ 10 min。

开放阅读框(Open Reading Frame, ORF) 序列的校正: 将已经获得的目的基因片段用 DNAMAN 5 软件拼接, 并在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上预测其 ORF, 根据 ORF 两端序列设计上游特异引物 SPF1 和下游特异引物 SPR3, 用保真性较高的 PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase 扩增目的基因的 ORF 序列。反应程序为: 98 ℃ 5 min; 98 ℃ 10 s, 60 ℃ 15 s, 72 ℃ 50 s, 33 个循环; 72 ℃ 10 min。

PCR 产物用 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测后切胶回收, 连接到 pUM-T 载体并转化至大肠杆菌 DH_{5α} 感受态中, Amp 抗性培养基过夜培养后, 挑取单克隆进行菌落 PCR 检测, 将含有目的基因片段的阳性克隆送公司测序。

(2) *LICBL3* 基因的克隆。根据 NCBI 上已报道的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) *AtCBL3* 的 mRNA 序列, 利用 BLAST 程序搜索与其高度相似的百合表达序列标签(Expressed Sequence Tag, EST)。然后将该序列在 NCBI 上进行同源比对, 用 ORF Finder 程序预测其 ORF。在起始密码子上游设计特异引物 SPF2(上游), 在终止密码子下游设计特异引物 SPR4(下游), 使用 PrimeSTAR[®] HS DNA 聚合酶进行 ORF 全长校正, PCR 反应条件: 98 ℃ 5 min, 98 ℃ 10 s, 60 ℃ 15 s, 72 ℃ 1 min, 33 个循环; 72 ℃ 10 min。

1.2.2 *LICBL1* 与 *LICBL3* 的生物信息学分析 用 Primer Premier 5 软件将目的基因的 ORF 序列翻译成氨基酸序列; 用 EXPASY(<https://www.expasy.org/tools/>) 中的 ProtParam、SMART、SignalP、TMHMM、PSORT、NetPhos、PSMP(<http://plantsp.genomics.purdue.edu/myrist.html>) 等在线工具对蛋白质进行生物信息学分析; 用 DNAMAN 5 对氨基酸序列进行多重比对分析; 用 MEGA 5 软件构建系统进化树。

1.2.3 *LICBL1* 与 *LICBL3* 的亚细胞定位 利用 DNAMAN 5 分析 *LICBL1* ORF 序列的酶切位点, 结合

pSAT6-GFP 载体,选用 *Hind*Ⅲ和 *Pst*I 作为融合表达载体构建的酶切位点,并设计上游特异引物 SPF3 和下游特异引物 SPR5 进行 PCR 扩增。双酶切 *pSAT6-GFP* 空载质粒和 PCR 扩增产物,纯化酶切产物并用 T4 连接酶连接,获得 *pSAT6-LICBL1-GFP* 重组表达载体。双酶切和测序验证连接是否成功。用同样的方法构建 *pSAT6-LICBL3-GFP* 重组表达载体,选用的限制性内切酶为 *Hind*Ⅲ和 *Pst*I,设计的特异引物为 SPF4(上游)和 SPR6(下游)。用基因枪轰击法^[5]将构建好的重组表达载体轰击到在 MS 培养基上预培养 24 h 的洋葱表皮细胞中,暗培养 24 h 后用激光共聚焦显微镜(Nikon Eclipse TE2000-E)观察和拍照,并用 EZ-C1 软件对照片进行分析和处理。

1.2.4 *LICBL1* 与 *LICBL3* 的表达分析 选择生长良好、长势一致的‘白天堂’组培苗作为基因表达分析的材料。

LICBL1、*LICBL3* 在不同组织中的表达:分别取常温(22 ℃)培养的百合组培苗的根、鳞茎和叶片。

LICBL1、*LICBL3* 在盐胁迫下的表达:常温(22 ℃)下,用 20 mL 100 mmol/L NaCl 溶液浸没百合组培苗根系,分别在处理 0、1、3、6 和 12 h 取叶片。

所取组织用液氮速冻并保存于-80 ℃的超低温冰箱中备用提取 RNA。采用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 的方法检测基因的表达, *LICBL1* 的扩增引物为 qF1 和 qR1, *LICBL3* 的扩增引物为 qF2 和 qR2,内参基因 18S rRNA 的扩增引物为 18SqF 和 18SqR。实验参照 Takara 公司的 SYBR Premix Ex Taq™ kit 荧光定量试剂盒说明书进行,仪器为 Applied Biosystems Prism 7300 PCR 仪。采用两步法进行 PCR 扩增,反应程序为:95 ℃ 10 s, 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 31 s, 40 个循环; 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 95 ℃ 15 s, 1 个循环。每个样品重复 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法^[6]分析基因的相对表达量,用 Excel 软件分析数据。

表 1 PCR 引物
Tab.1 Primers applied in PCR

引物 Primer	序列 Sequence
AP	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTGT ₍₁₈₎
5'RACE outer primer	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG
SPR1	CAATGACGCCCTTGTGCTTGACATC
5'RACE inner primer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA
SPR2	CAAAGCAAGCTGAAACTCCTCCTTG
SPF1	ATGGGCTGCCTTCCGTCGAA
SPR3	TCAAGTCGCAATATCATCTACCTCGG
SPF2	CCGCTTGGTGCTGTCAATTGGAGAG
SPR4	CAGATAAACAGAACAGCAGAGGCAT
SPF3	CCCAAGCTTATGGGCTGCCTTCCGTCGAAG
SPR5	AACTGCAGAGTCGCAATATCATCTACCTCGG
SPF4	CCCAAGCTTATGTTGCAGTGGCTCAGGCAT
SPR6	AACTGCAGGGAATCGTCAACTTGGGAGTG
qF1	GTGAATCAGGATGGGAAGATAGAC
qR1	CATGATTACCAGCGTTCACGG
qF2	GTCTTGATTGCGACATCCTTCTC
qR2	GTTCAAATCTCTTGCGATGCTTC
18SqF	AGTTGGTGGAGCGATTTGTCT
18SqR	CCTGTTATTCCTCAAACCTCC

表中下划线表示酶切位点

Underline represents enzyme cleavage site

2 结果与分析

2.1 百合 *LICBL1* 与 *LICBL3* 基因的克隆

将获得的目的基因在 NCBI 上进行 BLAST 比对,分别定名为 *LICBL1*(GenBank 登录号 JQ911694) 和

LICBL3 (GenBank 登录号 JQ713001)。其中 *LICBL1* 基因 ORF 区序列长为 642 bp, 编码 213 个氨基酸 (图 1 a); *LICBL3* 基因 ORF 区序列长为 672 bp, 编码 223 个氨基酸 (图 1 b)。

```

a
ATGGGCTGCTTCCTTCGTAAGGCTAGAGGAGTTCGCGGGTACGAGGACCCGGTGT
M G C L P S K A R R Q F A G Y E D P V L
CTTCTCTCAGACAGCTTTCAGCGTTAGCGAAGTTGAGGACCTTTTGTAGCTTTTAA
L S S Q T A I S V S E V B A L I B L F K
AGCAFCAGCAGTTCCTTGGTGTGATGAGGCTGATAAACAGGAGGAGTTTTCAGCTTGT
S I S S S L V D D G L I N K E E F Q L A
TTGTTTAAAAACAGGAAAAGGAAATCTCTTTGCAACAGGATATTCGACCTGTTTGT
L F K N R K K E N L F A N R I F D L F D
GTCAAGCACAAGGCGGTCACTGATTTGGTGTATTTGTCGGGTCTCAATGTTTTCAT
V K H K G V I D F G D F V R S L N V F H
CCAAATGCTCCACATGAAGATAAAGTCACTTTCAATCAAGCTCTATGATTGGATGGC
P N A P I I E D K V N F S F K L Y D L D G
ACAGGCTTCATTGAAAGGAATGAGGTCAAGCAGATGCTAATTCGACCTCTTTGTGAATCA
T G F I E R N E V K Q M L I A L L C E S
GACATGAGATTATCTGATGAGACATTTAGTTAATCTTGATAAGACATTTTGGAACT
D M R L S D E T I E L I L D K T F L E A
GACGTGAATCAGGATGGGAAGATAGACAAAACAGAAATGGGAAAATTTTCTCTGTAAT
D V N Q D G K I D K T E W E N F V S R N
CCATCATTATTGAAGATAATGACATCTTCTATCTCAGGGATATAACGACAACTTCCCA
P S L L K I M T L S Y L R D I T T T F P
AGTTTCGTGTTCAATCCGAGTAGATGATATGCGACCTGA
S F V F N S E V D D I A T *

b
ATGTTGCACTGGCTCAGGCATTTAGGCGCTGCGCTGGTTAAGTGTCTGTGATCTTGAAC
M L Q W L R H L G A A L V K C C D L D L N
AAGCAGCCGAAGGCGCTCGAAGATCTGAACTCTTAGCTAGAGAAACAGTGTGTTAGTGTGAGT
K Q P K G L E D P E L L A R E T V F S V S
GAAATAGAACATTTGATGAGCTATTTAAGAAGATCAGCAGTGTGTGTGATGACGGGIG
E I E A L Y E L F K K I S S A V V D D G V
ATCAACAAGGAAGATTTTCACTTTGCACTATTCAAGACTAACAAAAAGGAGAGCTATTGTCT
I N K E D F Q F A L E K T N K K E S L F A
GACCGGGTGTGTGACATTTGATACAAAACAAATGGAATCTUGGATTTGAGGAGTTTGA
D R V F D L F D T K H N G I L G F E E F A
CGTGCTCTCTCCGTCTTTCATCTAACGCCCATTCATGAGAGAAATCGAGTTTCTTTCCAA
R A L S V F H P N A P I D E K I E F S F Q
CTATATGATCTCAACAGCAAGGATTCATTGAAAGCAAGAGGTGAAACAAATGGTAGTGGT
L Y D L K Q Q G F I E R Q V K Q M V V A
ACTCTGTGAGTCCGGGAATGAATCTAACGGATGAAGTATAGAAAGATATCATAGACAAAGCA
T L A E S G M N I L T D E V I E S I I D K T
TTTGAAGAAAGTGTATACAAAACATGACGGAAAAATCGAGGAAGAGTGGCGAGTCTGTGA
F E E A D T K H D G K I D K E E W R S L V
TTGGGACATCTTCTCTTTTGAAGAACATGACCTTCAATATCTCAAGGACATAACACCCACA
L R H P S L L K N M T L Q Y L K D I T T T
TTCCCGAGCTTCGTTTTCATCCCAAGTTGACGATTCTCTGA
F P S F V F H S Q V D D S *

```

a. *LICBL1* 开放阅读框及编码的氨基酸序列; b. *LICBL3* 开放阅读框及编码的氨基酸序列

a. The open reading frame of *LICBL1* and the predicted amino acid sequences;

b. The open reading frame of *LICBL3* and the predicted amino acid sequences

图 1 百合 *CBL* 基因开放阅读框及编码的氨基酸序列

Fig.1 The open reading frame of lily *CBL* genes and the predicted amino acid sequences

2.2 百合 *LICBL1* 与 *LICBL3* 的生物信息学分析

ProtParam 在线工具预测百合 *LICBL1* 蛋白包含 213 个氨基酸残基, 分子式为 $C_{1102}H_{1709}N_{279}O_{334}S_6$, 分子量为 24.41 ku, 属于稳定蛋白、亲水性蛋白和酸性蛋白。*LICBL3* 蛋白包含 223 个氨基酸残基, 分子式为 $C_{1162}H_{1806}N_{294}O_{349}S_6$, 分子量为 25.67 ku, 属于不稳定蛋白、亲水性蛋白和酸性蛋白。蛋白质信号肽预测程序 SignalP 预测 *LICBL1* 和 *LICBL3* 均不含信号肽, 蛋白质跨膜区域预测软件 TMHMM 未发现 *LICBL1* 和 *LICBL3* 有明显的跨膜区域, 蛋白质亚细胞定位工具 PSORT 预测 *LICBL1* 主要定位于细胞质、细胞核内, *LICBL3* 主要定位于细胞质、线粒体内。

蛋白质磷酸化位点预测工具 NetPhos 预测 *LICBL1* 含有 13 个丝氨酸 (Ser)、5 个苏氨酸 (Thr) 及 1 个酪氨酸 (Tyr) 潜在磷酸化位点, *LICBL3* 含有 12 个丝氨酸 (Ser)、7 个苏氨酸 (Thr) 潜在磷酸化位点, 这些潜在的磷酸化位点可能是 CBL 活性和功能调控所必需的。蛋白质结构域预测工具 SMART 预测 *LICBL1* 和 *LICBL3* 均含有 4 个 EF 手型基序 (EF-hand motif) (图 2)。EF 手型结构域是 CBL 的特征结构, 该结构能够结合 Ca^{2+} , 使得 CBL 能够解码环境 Ca^{2+} 信号。与百合钙调蛋白 LiCaM3^[7] 的典型 EF 手 (canonical EF-hand) 相比, *LICBL1* 的 EF1 和 EF2 的关键氨基酸位点发生了取代, 导致 Ca^{2+} 结合活性降低甚至不能结合 Ca^{2+} , 这些称为非典型 EF 手 (noncanonical EF-hand), 因此 *LICBL1* 含有 2 个典型 EF 手型基序和 2 个非典型 EF 手型基序。与 LiCaM1 相比, *LICBL3* 的 4 个 EF 手均为非典型 EF 手型基序。*LICBL1* 和 *LICBL3* 的 C 端含有 1 个保守的 PFPF 基序 (PFPF motif), 在该结构域中被苯丙氨酸-脯氨酸残基 (Phe-Pro) 和 Phe 残基包围的 Ser 残基是 CIPK 磷酸化作用的靶点 (图 2)。与 *LICBL3* 相比, 蛋白质豆蔻酰化预测工具 PSMP 在 *LICBL1* 的 N 端发现了 1 个豆蔻酰化基序 (N-Myristoylation motif) (图 2), 该基序可能在 *LICBL1* 的蛋白互作和膜锚定过程中发挥重要作用。

	N-myristoylation motif	EF1	EF2	EF3	EF4	PFPF motif
<i>LICBL1</i>	MGCLPSK	SLVDGGLINKEE	DVKHRCVITDFD	DLDTGTFIERNE	DVNQDGRIDRTE	PSLLKIMTLSYLRLDITTFPSFV
<i>LICBL3</i>		AVVDGGLINKED	DTKHNGILGFEE	DLKQGGFIERQE	DTKHDCRIDKEE	PSLLKNMTLCYLKIDITTFPSFV
LiCaM3		DKDCDGLITKEE	DADGNGTIDFEE	DKDQNGFISAAE	DVDGDCQINYEY	*

Li: 百合 *Lilium longiflorum*; *LICBL1*: AFU36090; *LICBL3*: AFI41211; LiCaM3: AFA89863

图 2 百合 CBL 与 CaM 氨基酸序列比对

Fig.2 Alignment of the amino acid sequences of *LICBL1*, *LICBL3* and LiCaM3

将百合 *LICBL1* 及与其同源性较高的其他植物的 *CBL1*、*LICBL3* 及与其同源性较高的其他植物的 *CBL3*、拟南芥 *AtCBL1*–*AtCBL10* 的氨基酸序列, 用 MEGA 5 构建系统进化树, 结果显示 CBL 家族可分为

两个亚族: 第 I 亚族包括 CBL1、CBL4、CBL5、CBL8、CBL9; CBL2、CBL3、CBL6、CBL7、CBL10 归属第 II 亚族。百合 *LICBL1* 与同为单子叶植物的油棕 (*Elaeis guineensis*) *EgCBL1*、海枣 (*Phoenix dactylifera*) *PdCBL1* 的亲缘关系最近 (图 3) 相似度达 92%。百合 *LICBL3* 与同为百合科的石刁柏 (*Asparagus officinalis*) *AoCBL3* 的亲缘关系最近 (图 3), 相似度达 92%。特征结构域和系统进化分析的结果进一步说明本研究分离得到的 *LICBL1* 和 *LICBL3* 基因分别属于植物 *CBL1* 和 *CBL3* 的同源基因。

2.3 百合 *LICBL1* 与 *LICBL3* 亚细胞定位

利用基因枪将构建好的瞬时表达载体 *pSAT6-LICBL1-GFP* 和 *pSAT6-LICBL3-GFP* 轰击到经过 24 h 预培养的洋葱表皮细胞中, 暗培养 24 h 后放置于激光共聚焦显微镜下观察。结果表明, 空载对照 *pSAT6-GFP* 的荧光信号分布在整個细胞中, 包括细胞膜、细胞质和细胞核。在细胞膜、细胞质和细胞核中也检测到了 *pSAT6-LICBL3-GFP* 的荧光信号, 而 *pSAT6-LICBL1-GFP* 的荧光信号仅在细胞膜中检测到 (图 4)。表明 *LICBL3* 在细胞膜、细胞质和细胞核中表达, *LICBL1* 在细胞膜中表达。

2.4 百合 *LICBL1* 与 *LICBL3* 的表达分析

利用 qPCR 检测了 *LICBL1* 与 *LICBL3* 的时空表达。结果表明, 常温 (22 °C) 下 *LICBL1*、*LICBL3* 在百合根、鳞茎和叶中均有表达, *LICBL1* 在根中的表达量最高, 鳞茎中次之, 叶中最低; *LICBL3* 在叶中的表达量最高, 根中次之, 鳞茎中最低 (图 5 a)。在盐胁迫处理 1~12 h 内, 百合叶片中 *LICBL1* 的相对表达量呈现出先上升后下降的趋势, 但始终高于对照, 在处理 6 h 时达到峰值, 约为对照的 6.33 倍 ($P<0.05$); 百合叶片中 *LICBL3* 的相对表达量也呈现出先上升后下降的趋势, 但仅在 1~3 h 内的相对表达量显著高于对照 ($P<0.05$), 盐胁迫处理 3 h 的相对表达量是对照的 3.10 倍 (图 5 b)。

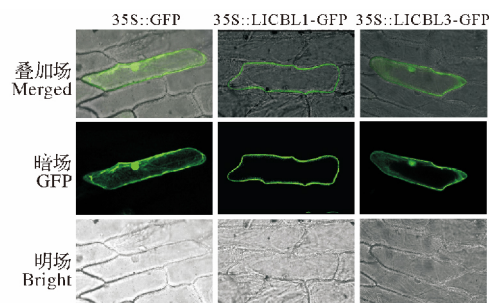
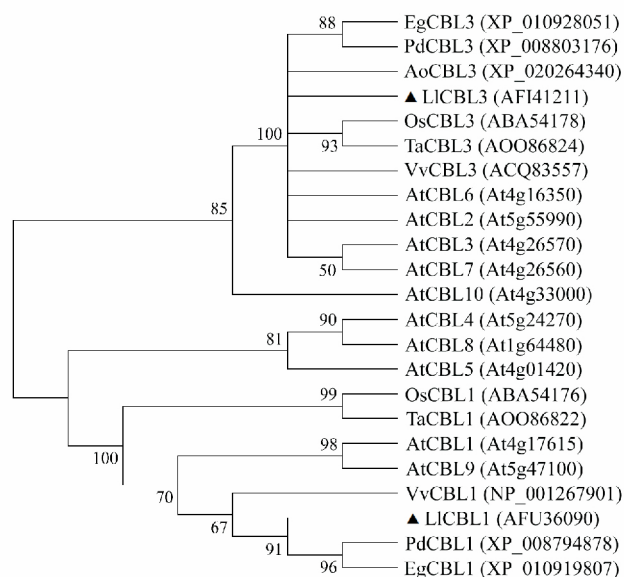


图 4 *LICBL1* 与 *LICBL3* 在洋葱表皮中的亚细胞定位

Fig.4 Subcellular localization of *LICBL1* and *LICBL3* in onion epidermal cells

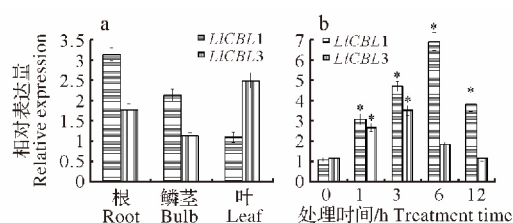


图中各节点处数字代表可信度。Eg: 油棕; Pd: 海枣; Ao: 石刁柏; Ll: 百合; Os: 水稻; Ta: 小麦; Vv: 葡萄; At: 拟南芥

The numbers at the node of the figure is credibility. Eg: *Elaeis guineensis*; Pd: *Phoenix dactylifera*; Ao: *Asparagus officinalis*; Ll: *Lilium longiflorum*; Os: *Oryza sativa*; Ta: *Triticum aestivum*; Vv: *Vitis vinifera*; At: *Arabidopsis thaliana*

图 3 百合 *LICBL1*、*LICBL3* 与其他植物 CBL 家族系统进化树

Fig.3 Phylogenetic relationship of *LICBL1*, *LICBL3* with other plant CBLs



a. *LICBL1* 与 *LICBL3* 在根、鳞茎、叶中的表达; b. 叶片 *LICBL1* 与 *LICBL3* 在不同 NaCl 处理时间下的表达, * 表示各点与 0 h 的表达量在 $P<0.05$ 水平差异显著

a. The expression of *LICBL1* and *LICBL3* in root, bulb and leaf; b. The expression of *LICBL1* and *LICBL3* in leaf treated with 100 mM NaCl at different time; * represent significant correlation at 0.05 level

图 5 *LICBL1* 与 *LICBL3* 时空表达模式

Fig.5 Expression pattern of *LICBL1* and *LICBL3* in lily

3 讨论

百合属于盐敏感性植物, 我国北方地区土壤的盐渍化阻碍了百合的种植及发展, 因此培育耐盐品种

是百合育种的重要内容。目前,有关百合的盐胁迫研究主要集中在以下几个方面:(1)百合对盐胁迫的形态及生理响应^[8-9]。(2)百合种质耐盐性比较^[10-11]。(3)利用化学、微生物或杂交育种的方法提高百合的耐盐性^[12-15]。除常规杂交育种外,百合耐盐转基因育种也取得了初步进展。盐胁迫条件下,转 *JERF3* 基因的百合小鳞茎的发芽率显著高于野生型,死亡率显著低于野生型,表明转基因百合的耐盐性能明显提高^[16]。将 6-磷酸山梨醇脱氢酶(*S6PDH*) 基因导入麝香百合,盐胁迫下转化植株的电导率和 MDA 含量均小于对照,可溶性蛋白含量高于对照,且具有比对照更高的酶活性,说明转化苗的抗盐性较强^[17]。

对百合耐盐功能基因的研究除了上述的 *S6PDH*、*JERF3* 外,还包括 *APX*^[18]、*LLA23*^[19] 等,但对于在植物盐胁迫响应中起关键作用的 *CBL* 基因的研究尚未见报道。*CBL* 通过与 *CIPK* 互作解码特异钙信号所组成的 Ca^{2+} -*CBL*-*CIPK* 信号系统是植物逆境信号传导的关键途径,在植物的耐盐性调控中发挥重要作用^[20]。*CBL* 为多基因家族,现已发现拟南芥、水稻、玉米和杨树 *CBL* 家族均含有 10 个成员,本研究从百合中分离鉴定了 *LICBL1* 和 *LICBL3* 基因,还分离鉴定了 *LICBL2* 与 *LICBL4* (未发表),百合的基因组较大,推测百合中还存在其他 *CBL* 基因。*CBL* 蛋白主要由 N 端和 C 端两个球状结构域组成,每个结构域均含有一对 EF 手型基序,每个 EF 手型基序由 12 个氨基酸残基组成。与 *CaM* 的典型 EF 手型基序的氨基酸序列(DXD(N)XD(N)(S)GX(I)V)D(N)(S)XXE)相比,*CBL* 的 EF 手型结构存在不同程度的变异,如拟南芥 *CBL* 家族的 10 个成员中,AtCBL1 和 AtCBL9 有 2 个典型 EF 手型基序,AtCBL6、AtCBL7、AtCBL8 和 AtCBL10 只含有一个典型 EF 手型基序,而 AtCBL2、AtCBL3、AtCBL4 和 AtCBL5 则没有典型 EF 手型基序^[1]。百合 *LICBL1* 和 *LICBL3* 的 EF 手型基序的部分关键位点也发生了氨基酸取代,*LICBL1* 含有 2 个典型 EF 手型基序和 2 个非典型 EF 手型基序,*LICBL3* 的 4 个 EF 手型基序均为非典型 EF 手型基序。EF 手型基序中氨基酸序列的变化导致 *CBL* 具有不同的 Ca^{2+} 结合活性,可能解码来自不同环境胁迫的 Ca^{2+} 信号。在 *LICBL1* 和 *LICBL3* 的 C 端含有保守的 PFPE 基序,其中 P、M、L、F、P 和 F 氨基酸残基完全保守,位于 P 与 F 之间的 S 残基是 *CIPK* 磷酸化作用的靶点,这一磷酸化机制能够促进 *CBL* 与 *CIPK* 互作,并参与对下游靶蛋白活性的调控,是 *CBL*-*CIPK* 信号途径的重要调控机制之一^[21]。根据 N 端的结构,*CBL* 可以分为两个亚族,第 I 亚族的 N 端具有高度保守的豆蔻酰化模序 MGCXXSK/T,豆蔻酰化是蛋白质翻译后修饰的一种方式,在蛋白互作和膜定位方面发挥作用。在 MGCXXSK/T 模序中,豆蔻酰化作用发生在蛋氨酸后的甘氨酸残基,发生豆蔻酰化作用的 *CBL* 蛋白具有较低的膜定位活性,但当甘氨酸后面的半胱氨酸残基发生棕榈酰化后,就能将蛋白定位在细胞膜上^[22]。在 *LICBL1* 的 N 端发现了 1 个豆蔻酰化基序,亚细胞定位的结果证实了 *LICBL1* 主要在细胞膜上表达,这与对同属第 I 亚族 AtCBL1 和 AtCBL9 的研究结果类似^[20]。第 II 亚族的 N 端较长,缺少豆蔻酰化、棕榈酰化等脂质修饰位点。*LICBL3* 归属于第 II 亚族,亚细胞定位的结果表明 *LICBL3* 在细胞膜、细胞质和细胞核中均有表达,这与同属第 II 亚族的 AtCBL3 在细胞膜和液泡膜上表达的结果不同^[20]。同属第 II 亚族的 AtCBL2 和 AtCBL6 定位于液泡膜上,AtCBL10 定位在细胞膜和液泡膜上,AtCBL7 在细胞膜、细胞质和细胞核中均有表达^[20]。这些多样而特异的亚细胞定位暗示 *CBL* 作为钙感受器能够快速传递局部钙释放事件。

在植物进化过程中,*CBLs* 和 *CIPKs* 基因数量的增加很可能与 *CBL*-*CIPK* 信号系统的功能进化相关,这有利于时空特异性 Ca^{2+} 信号的识别与解码,暗示 *CBL* 和 *CIPK* 进化的复杂性与植物的环境适应性相一致^[23]。拟南芥可以通过 *CBL4*-*CIPK24*-*SOS1* 通路^[3] 或 *CBL10*-*CIPK24*-*NHX* 通路^[4] 来提高植株对盐胁迫的耐受性。过表达玉米 *ZmCBL9*、烟草 *NsYL10* 或杨树 *PeCBL6* 提高了转基因拟南芥的耐盐性^[24-26]。AtCBL1 通过互作将 AtCIPK24 带至细胞膜参与盐胁迫反应,AtCBL1 还可以与 AtCIPK23 互作调控 AKT1 介导的根细胞 K^{+} 的吸收与运输,AtCBL1 还参与了干旱胁迫和冷胁迫应答等^[23]。沙冬青 *AmCBL1* 受盐、干旱和 CaCl_2 诱导表达,在烟草中过表达 *AmCBL1* 提高了植株的耐盐性和耐旱性^[27]。杜梨 *PbCBL1* 的表达受盐胁迫诱导上调,*PbCBL1* 的转入可以提高大肠杆菌对盐胁迫的耐受能力^[28]。盐胁迫显著促进了水稻 *OsCBL1*、*OsCBL3* 和杨树 *PeCBL1*、*PeCBL3* 的表达^[29-30]。本研究中,*LICBL1* 和 *LICBL3* 的表达受盐胁迫诱导,但二者的表达模式存在差异。*LICBL3* 在早期(1~3 h)响应盐胁迫,*LICBL1* 在 1~12 h 内持续响应盐胁迫,且 *LICBL1* 的相对表达量上调倍数显著高于 *LICBL3*。

多基因家族、多样而特异的表达模式和亚细胞定位表明了 *CBL*/*CIPK* 信号转导的特异性与功能的

多样性。课题组从百合中分离了两个 CBL 家族基因 *LICBL1* 和 *LICBL3*, 研究了 *LICBL1* 和 *LICBL3* 的亚细胞定位和基因表达模式, 结果表明 *LICBL1* 可能与百合的盐胁迫响应密切相关, 但是还需要进一步在模式植物和百合上分析基因功能。本研究为探讨百合 *CBL* 基因在百合耐盐性调节方面的功能及作用机制奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] Kolukisaoglu Ü, Weinl S, Blazevic D, et al. Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the Arabidopsis and rice CBL-CIPK signaling networks [J]. *Plant Physiology* 2004, 134(1): 43-58.
- [2] Cheong Y H, Kim K N, Pandey G K, et al. CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in Arabidopsis [J]. *Plant Cell* 2003, 15(8): 1833-1845.
- [3] Halfter U, Jshitani M, Zhu J K. The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium binding protein SOS3 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, 97(7): 3735-3740.
- [4] Kim B G, Waadt R, Cheong Y H, et al. The calcium sensor CBL10 mediates salt tolerance by regulating ion homeostasis in Arabidopsis [J]. *Plant Journal* 2007, 52(3): 473-484.
- [5] 徐淑平, 卫志明. 基因枪的使用方法介绍 [J]. *植物生理学通讯*, 1998, 34(1): 41-43.
Xu S P, Wei Z M. Introduction to method of microprojectile bombardment and its application [J]. *Plant Physiology Communications*, 1998, 34(1): 41-43.
- [6] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method [J]. *Nature Protocols* 2008, 3(6): 1101-1108.
- [7] Cao X, Yi J, Wu Z, et al. Involvement of Ca^{2+} and CaM3 in regulation of thermotolerance in lily (*Lilium longiflorum*) [J]. *Plant Molecular Biology Reporter* 2013, 31(6): 1293-1304.
- [8] 左志锐, 高俊平, 穆鼎, 等. 盐胁迫下百合两个品种的叶绿体和线粒体超微结构比较 [J]. *园艺学报* 2006, 33(2): 429-432.
Zuo Z R, Gao J P, Mu D, et al. A comparative electron microscopic of ultra structure in different lily cultivars under salt stress [J]. *Acta Horticulturae Sinica* 2006, 33(2): 429-432.
- [9] 华智锐, 马锋旺, 李小玲, 等. 百合组培苗对盐胁迫的生理反应 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)* 2007, 35(4): 179-184.
Hua Z R, Ma F W, Li X L, et al. Physiological effects of NaCl on salt stress of lily plantlets from tissue culture [J]. *Journal of Northwest A & F University (Nat. Sci. Ed.)* 2007, 35(4): 179-184.
- [10] 魏祎, 张克, 王树栋, 等. 盐胁迫对 4 个百合品种生理特性的影响 [J]. *北京农学院学报* 2010, 25(2): 52-56.
Wei W, Zhang K, Wang S D, et al. Physiological characters of four lily varieties under salt stress [J]. *Journal of Beijing University of Agriculture* 2010, 25(2): 52-56.
- [11] 周叶玲, 张延龙, 牛立新, 等. 秦巴山区野生百合组培苗耐盐性的初步评价 [J]. *西北农业学报* 2011, 20(8): 147-151.
Zhou Y L, Zhang T L, Niu L X, et al. Assessment of salt-tolerance of invitro *Lilium* species from Qinba Mountain Area [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica* 2011, 20(8): 147-151.
- [12] 刘艳妮, 王飞. 百合离体抗盐变异体的筛选及生理特性研究 [J]. *西北林学院学报* 2010, 25(2): 70-75.
Liu Y N, Wang F. Selection of salt-resistant mutant of lily in vitro and study on its physiological characteristics [J]. *Journal of Northwest Forestry University* 2010, 25(2): 70-75.
- [13] 马亚斌, 李伟, 徐萌, 等. AM 真菌对盐胁迫下百合生长和光合作用的影响 [J]. *青岛农业大学学报(自然科学版)*, 2014, 31(3): 157-161.
Ma Y B, Li W, Xu M, et al. Effects of Arbuscular Mycorrhiza fungi on growth and photosynthesis of lily under salt stress [J]. *Journal of Qingdao Agricultural University (Nat. Sci. Ed.)* 2014, 31(3): 157-161.
- [14] 崔光芬, 王祥宁, 蒋亚莲, 等. OT 百合新品种‘金门’ [J]. *园艺学报* 2014, 41(7): 1517-1518.
Cui G F, Wang X N, Jiang Y L, et al. OT lily cultivar ‘Jinmen’ [J]. *Acta Horticulturae Sinica* 41(7): 1517-1518.
- [15] 冯丽媛, 王文和, 赵祥云, 等. 景观应用百合新品种‘云景红’ [J]. *园艺学报* 2014, 41(6): 1275-1276.

- Feng L Y ,Wang W H ,Zhao X Y ,et al.A new landscape lily cultivar ‘Yunjing Red’ [J].Acta Horticulturae Sinica 2014 ,41 (6) : 1275-1276.
- [16] 杨宇红 ,尹丽蓉 ,葛红 ,等.ERF 转录因子新成员 JERF3 提高百合的耐盐性[J].园艺学报 2007 ,34(6) : 1485-1490.
Yang Y H ,Yin L R ,Ge H ,et al.Overexpression of a novel member of ERF transcription factor JERF3 in lily enhances the tolerance to salt[J].Acta Horticulturae Sinica 2007 ,34(6) : 1485-1490.
- [17] 华智锐 ,马锋旺 ,李小玲 ,等.百合转 S6PDH 基因植株的抗盐性鉴定[J].干旱地区农业研究 2010 ,28(1) : 160-163.
Hua Z R ,Ma F W ,Li X L ,et al.Salt-resistance identification of transformed *Lilium* with S6PDH gene[J].Agricultural Research in the Arid Areas 2010 ,28(1) : 160-163.
- [18] 陈莉 ,辛海波 ,孙向荣 ,等.百合 APX 基因的克隆及转 LIAPX 提高拟南芥耐盐性[J].园艺学报 2010 ,37(12) : 1983-1990.
Chen L ,Xin H B ,Sun X R ,et al.Molecular cloning APX from *Lilium longiflorum* and overexpressing to *Arabidopsis thaliana* enhanced salt tolerance[J].Acta Horticulturae Sinica 2010 ,37(12) : 1983-1990.
- [19] Yang C Y ,Chen Y C ,Jauh G Y ,et al.A lily ASR protein involves abscisic acid signaling and confers drought and salt resistance in Arabidopsis [J].Plant Physiology 2005 ,139(2) : 836-846.
- [20] Yu Q Y ,An L J ,Li W L.The CBL-CIPK network mediates different signaling pathways in plants [J].Plant Cell Reports , 2014 ,33(2) : 203-214.
- [21] Mohanta T K ,Mohanta N ,Mohanta Y K ,et al.Genome-wide identification of Calcineurin B-Like (CBL) gene family of plants reveals novel conserved motifs and evolutionary aspects in calcium signaling events [J].BMC Plant Biology 2015 ,15 (1) : 189.
- [22] Li R F ,Zhang J W ,Wei J H ,et al.Functions and mechanisms of the CBL-CIPK signaling system in plant response to abiotic stress [J].Progress in Natural Science 2009 ,19(6) : 667-676.
- [23] Kim K N.Stress responses mediated by the CBL calcium sensors in plants [J].Plant Biotechnology Reports 2013 ,7(1) : 1-8.
- [24] Zhang F ,Li L ,Jiao Z Z ,et al.Characterization of the calcineurin B-Like (CBL) gene family in maize and functional analysis of *ZmCBL9* under abscisic acid and abiotic stress treatments [J].Plant Science 2016 ,253: 118-129.
- [25] Dong L H ,Wang Q ,Manik S M ,et al.*Nicotiana glauca* calcineurin B-like protein NsglCBL10 enhances salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J].Plant Cell Reports 2015 ,34(12) : 2053-2063.
- [26] Li D D ,Xia X L ,Yin W L ,et al.Two poplar calcineurin B-like proteins confer enhanced tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis thaliana* [J].Biologia Plantarum 2013 ,57 (1) : 70-78.
- [27] Chen J H ,Sun Y ,Sun F ,et al.Tobacco plants ectopically expressing the *Ammopiptanthus mongolicus* *AmCBL1* gene display enhanced tolerance to multiple abiotic stresses [J].Plant Growth Regulation 2011 ,63(3) : 259-269.
- [28] 韩金龙 ,李慧 ,丛郁 ,等.杜梨 *CBL1* 和 *CBL7* 基因对非生物逆境的响应 [J].果树学报 2014 ,31(4) : 529-535.
Han J L ,Li H ,Cong Y ,et al.Comparison of two CBL genes on stress tolerance functions from *Pyrus betulaefolia* [J].Journal of Fruit Science 2014 ,31(4) : 529-535.
- [29] Gu Z M ,Ma B J ,Jiang Y ,et al.Expression analysis of the calcineurin B-like gene family in rice(*Oryza sativa* L.) under environmental stresses [J].Gene 2008 ,415(12) : 1-12.
- [30] Zhang H ,Yin W L ,Xia X L.Calcineurin B-Like family in Populus: comparative genome analysis and expression pattern under cold ,drought and salt stress treatment [J].Plant Growth Regulation 2008 ,56(2) : 129-140.