

# 杜仲类钙调蛋白基因 *EuCML5* 的克隆及表达分析

刘伟<sup>1,3,\*</sup>, 滕腾<sup>2,3,\*</sup>, 赵懿琛<sup>2,3,\*\*</sup>, 赵德刚<sup>3,4</sup>

(<sup>1</sup>贵州大学药学院, 贵阳 550025; <sup>2</sup>贵州大学茶学院, 贵阳 550025; <sup>3</sup>贵州大学生命科学学院, 农业生物工程研究院, 山地植物资源保护与种质创新省部共建教育部重点实验室, 贵阳 550025; <sup>4</sup>贵州省农业科学院, 国家农业农村部植物新品种 DUS 测试贵阳分中心, 贵阳 550006)

**摘要:** 在前期构建的杜仲基因组数据库的基础上, 克隆得到了类钙调蛋白 (Calmodulin-like protein, CML) 基因 *EuCML5*。分析发现 *EuCML5* 开放阅读框长度为 282 bp, 编码 93 个氨基酸, 不含跨膜结构和信号肽, 属于胞内蛋白, 氨基酸序列中含有 EF-Hand motif 结构, 在进化关系上与一些木本植物类钙调蛋白较近。实时荧光定量 PCR 分析发现, *EuCML5* 在杜仲根中表达较高, 茎和叶中表达较低。杜仲苗经过模拟干旱、高盐、茉莉酸甲酯、生长素处理后, *EuCML5* 表达量有不同程度提高, 表明 *EuCML5* 能够被非生物胁迫和植物生长调节剂诱导表达, 并且受钙离子通道抑制剂 LaCl<sub>3</sub> 和钙调蛋白拮抗剂 TFP 抑制。

**关键词:** 杜仲; 类钙调蛋白; 表达; 胁迫

**中图分类号:** S 567

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2020) 03-0590-11

## Cloning and Expression Analysis of *EuCML5* Gene in *Eucommia ulmoides*

LIU Wei<sup>1,3,\*</sup>, TENG Teng<sup>2,3,\*</sup>, ZHAO Yichen<sup>2,3,\*\*</sup>, and ZHAO Degang<sup>3,4</sup>

(<sup>1</sup>College of Pharmacy, Guizhou University, Guiyang 550025, China; <sup>2</sup>College of Tea Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China; <sup>3</sup>College of Life Sciences, Academy of Agricultural Bioengineering, The Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), Guizhou University, Guiyang 550025, China; <sup>4</sup>Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang Branch Center for DUS Testing of New Plant Varieties of the Ministry of Agriculture of China, Guiyang 550006, China)

**Abstract:** Based on the *Eucommia ulmoides* genome database, the Calmodulin-like (CML) gene *EuCML5* was cloned. The open reading frame of *EuCML5* was 282 bp in length, encoding a total of 93 amino acids. It contained no transmembrane structure and signal peptide, belonging to intracellular protein. The amino acid sequence contained the EF-Hand motif, close to calmodulin-like protein of some woody plants in evolutionary relationship. Quantitative real-time PCR analysis revealed that the expression of *EuCML5* was higher in *Eucommia ulmoides* roots and lower in stems and leaves. After treatment with drought (Mannitol), salt, methyl jasmonate and auxin, the expression of *EuCML5* in *Eucommia ulmoides* was increased, indicating that *EuCML5* can be induced by abiotic stress and phytohormone.

**收稿日期:** 2019-11-28; **修回日期:** 2019-12-10

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (31660076); 贵州省教育厅青年科技人才成长项目 (黔教科 KY[2016]126); 贵州省生物学一流学科建设项目 (GNYL[2017]009)

\* 同等贡献作者

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: yczhao@gzu.edu.cn)

In addition, calcium channel inhibitors  $\text{LaCl}_3$  and calmodulin antagonist TFP inhibited *EuCML5* expression.

**Keywords:** *Eucommia ulmoides*; CML; expression; stress

环境中不同的刺激都能使植物体内产生不同的钙信号。植物通过钙感受器解码钙信号。常见的钙感受器主要有 3 种 (曾后清 等, 2016a) ——钙调蛋白 (Calmodulin, CaM) /类钙调蛋白 (Calmodulin-like protein, CML)、钙依赖性蛋白激酶 (Calcium-dependent protein kinase, CDPK) 和类钙调神经素 B (Calcineurin B-like protein, CBL)。CML 与 CaM 序列结构相似, 具有广泛的生物学功能 (曾后清 等, 2016a), 在油菜素类固醇 (Wang et al., 2013)、脱落酸 (Yang et al., 2011)、乙烯和生长素 (Shen et al., 2015) 等植物激素途径中发挥重要作用, 也能够参与低温 (Yuan et al., 2018)、干旱 (Shen et al., 2015) 和盐胁迫 (Rao et al., 2013) 等各种胁迫响应。

杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliv.) 是一种名贵中药材, 对高血压、糖尿病、类风湿性关节炎等具有很好的治疗作用 (Zhang et al., 2014; Li & Zhang, 2016; Wang et al., 2018)。其主要药用部位是树皮, 常用环剥的方式采收。剥皮后的杜仲极易因木质部大范围暴露在空气中而导致水分蒸发, 破坏水盐平衡 (张小军, 2018), 因此杜仲常常面临水/盐胁迫。在杜仲新皮再生过程中, 常用外源植物生长调节剂处理以促进愈伤组织形成和维管束形成层再生 (张庆瑞 等, 2014)。 $\text{Ca}^{2+}$  - 钙感受器信号通路与激素信号途径密切相关 (易籽林 等, 2010), 已有研究表明钙感受器可以通过激素途径起作用 (汪澈 等, 2009), 同时钙信号也是水/盐胁迫的重要信号通路 (刘小龙 等, 2014), 因此, CML 可能参与杜仲体内信号激素调节和对干旱和盐胁迫的响应。目前对 CML 基因的研究较少, 且主要集中在拟南芥 CaM/CML 家族, CML 在生理和分子水平上的作用在很大程度上未知 (Ranty et al., 2006; Magnan et al., 2008; 曾后清 等, 2016a)。通过对杜仲类钙调蛋白基因 *EuCML5* 进行克隆及表达分析, 研究其在非生物胁迫和植物生长调节剂诱导下的表达模式, 为阐明其在杜仲中的调控机理奠定一定的理论基础, 也为合理高效利用杜仲资源提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验于 2018—2019 年在贵州大学农业生物工程研究院进行。杜仲种子来自于本院转基因种植基地。无菌苗为杜仲种子消毒后在 MS 培养基上培养 2~3 月龄的苗; 温室苗为温室营养土中萌发生长 2~3 月龄的苗。

### 1.2 *EuCML5* 的克隆

根据本实验室前期构建的杜仲基因组数据库注释信息, 使用 NCBI 数据库中 ORF 分析, 筛选出 *EuCML5* 开发阅读框, 设计引物 (表 1)。通过 Trizol 法提取杜仲叶片总 RNA, 进行 RT-PCR 扩增。扩增体系为:  $10\times$  PCR Buffer for KOD-Plus-Neo 1.5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度上、下游引物各 1.5  $\mu\text{L}$ , 2  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTPs 3.0  $\mu\text{L}$ ,  $\text{ddH}_2\text{O}$  3.5  $\mu\text{L}$ ,  $\text{MgSO}_4$  0.8  $\mu\text{L}$ , cDNA 1.0  $\mu\text{L}$ , KOD-Plus-Neo (1 U  $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) 1.0  $\mu\text{L}$ 。反应程序为 95  $^\circ\text{C}$  3 min; 95  $^\circ\text{C}$  30 s, 60  $^\circ\text{C}$  30 s, 72  $^\circ\text{C}$  30 s, 35 个循环; 最后 72  $^\circ\text{C}$  延伸 5 min。扩增验证后进行凝胶回收, 连接到克隆载体 pTOPO-Blunt Vector 上, 委托华大基因公司进行测序。

植物总 RNA 提取辅助剂 Fruit-mate (TAKARA, 中国大连)、总 RNA 提取试剂 RNAiso-plus 购自宝生物工程(大连)有限公司, KOD-Plus-Neo 高保真 DNA 聚合酶购自东洋纺(上海)生物科技有限公司, 胶回收试剂盒 E.Z.N.A.<sup>TM</sup> Gel Extraction Kits 购自 Omega Bio-tek 公司, 零背景 pTOPO-Blunt 平末端克隆试剂盒购自北京艾德莱生物科技有限公司。

### 1.3 *EuCML5* 的生物信息分析

利用 SeqMan 软件对测序结果进行拼接, 使用 SnapGene Viewer 软件将其翻译为氨基酸序列, 利用在线工具 ExPasy 分析蛋白质的理化性质和亲疏水性 (<https://web.expasy.org/>), 利用 SignalP 在线软件对蛋白信号肽序列进行预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Signalp>), 使用在线工具 TMHMM 预测蛋白的跨膜结构 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/tmhmm>), 通过在线软件 SOPMA 对 *EuCML5* 蛋白进行二级结构预测 (<https://npsa-prabi.ibcp.fr>), 使用在线软件 SWISS-MODEL 对 *EuCML5* 蛋白的三级结构进行建模 (<https://swissmodel.expasy.org/>), 通过日本京都大学的 Motif Search 在线工具 (<http://www.genome.jp/>), 搜索 *EuCML5* 蛋白的 motif 结构, 使用 NCBI 数据库中 BLAST 程序进行同源性比对并下载相似序列 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 利用 MEGA5 软件构建系统进化树。

### 1.4 *EuCML5* 的表达分析

#### 1.4.1 植物材料处理

胁迫处理: 取长势相同的杜仲无菌苗, 在培养基( $MS + 4.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂)中分别添加  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 和  $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  甘露醇, 进行高浓度盐胁迫处理和缺水干旱胁迫处理。

植物生长调节剂处理: 取长势相同的杜仲温室苗, 分别使用  $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  生长素 (IAA) 和  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  茉莉酸甲酯 (MeJA) 溶液对叶片进行喷施处理。

外源钙离子和钙离子信号抑制剂处理: 取长势相同的杜仲温室苗, 使用纯水、 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  氯化钙、 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氯化镧 ( $\text{LaCl}_3$ )、 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  三氟拉嗪 (TFP) 溶液进行水培处理。

每个处理 3 个重复, 胁迫与植物生长调节剂处理于处理 0、3、6、12 和 24 h 分别采集全株和叶片样本, 钙离子及抑制剂处理于 6 h 时取根部样品。所有样品采后立即用液氮速冻,  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  保存。

#### 1.4.2 荧光定量分析

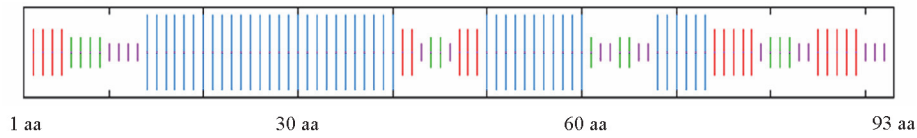
使用 RNA 提取试剂盒 (含 DNA 酶) 提取样本杜仲总 RNA, 反转为 cDNA 后进行实时荧光定量分析。参考 Ye 等 (2018) 的报道, 以杜仲 *EuACTIN* 作为内参基因。使用 Primer Premier 5 和 Oligo7 软件进行 *EuCML5* 引物设计 (表 1)。反应程序为:  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  预变性 3 min;  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  变性 10 s,  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  退火延伸 30 s, 共 40 个循环。每个样品设置 3 个机械重复, 按照  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  计算和分析基因的表达水平。

表 1 引物序列  
Table 1 Primer sequence

用途 Application	引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence
基因克隆 Gene cloning	<i>EuCML5</i> -F/R	F: ACGGGGACTCTAGAGGATCCATGATTGAGAAGATTTATGAGAACAGAGA R: ACCGAATTCGAGCTCGGTACCTCATCTGCTTGAACCTTAAATCCACC
荧光定量 Real-time PCR	<i>EuCML5</i> -rt-F/R	F: ACGGGTTTATCACTGTCGATG R: ATCTTATCCCCATTGGCATCC
	<i>EuACTIN</i> -rt-F/R	F: TTGTTAGCAACTGGGATGATATGG R: CAGGGTGTCTTCAGGAGCAA



三级结构（图 4）主要由螺旋和折叠构成，与植物 CaM 结构（吁亭 等，2013）相似。

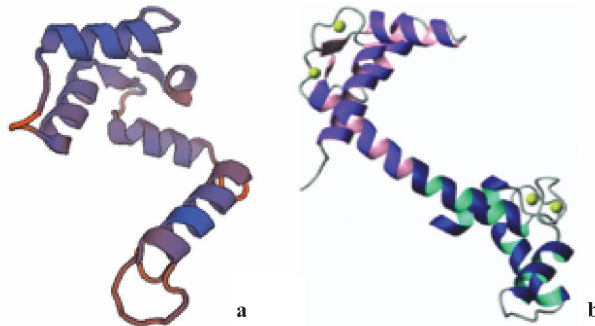


**图 3 EuCML5 蛋白二级结构预测**

$\alpha$  螺旋（蓝色）、延伸链（红色）、 $\beta$  转角（绿色）和无规则卷曲（紫色）。

**Fig. 3 Prediction of EuCML5 protein secondary structure**

alpha helix (blue), extended strand (red), beta turn (green) and random coil (purple) .



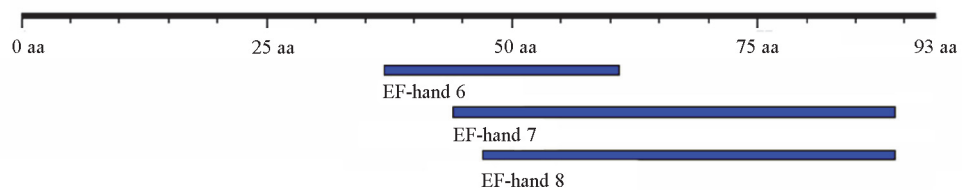
**图 4 EuCML5 蛋白三级结构对比**

a: EuCML5 三级结构; b: CaM 三级结构（吁亭 等，2013）。

**Fig. 4 Comparison of EuCML5 protein tertiary structure**

a: Structure of EuCML5; b: Structure of CaM (Yu et al., 2013) .

分析 EuCML5 蛋白的 motif 结构，发现其存在 3 个 EF-hand motif 结构（图 5）。



**图 5 EuCML5 蛋白的 motif 结构**

**Fig. 5 Motif of EuCML5 protein**

将其氨基酸序列与 NCBI 数据库进行 BLAST 比对分析，发现与其他植物类钙调蛋白相似度较高。下载相似性较高的氨基酸序列，利用 DNAMAN 进行多序列比对（图 6）。

使用 MEGA5 软件构建系统进化树。结果(图 7)显示, *EuCML5* 编码蛋白和木本植物川桑(*Morus notabilis*)、榴莲(*Durio zibethinus*)、香樟(*Cinnamomum micranthum f. kanehirae*)、巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*) 和欧洲栓皮栎 (*Quercus suber*) 的进化关系较近，与草本植物大豆 (*Glycine max*)、番茄 (*Solanum pennellii*) 和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 等较远。



图 6 *EuCML5* 的氨基酸多序列比对

Fig. 6 Multiple alignment of *EuCML5* amino acid sequences with other species

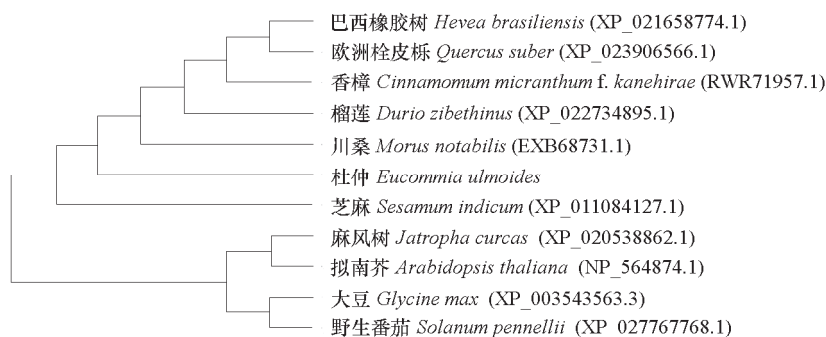


图 7 *EuCML5* 蛋白进化树分析

Fig. 7 Evolutionary tree analysis of *EuCML5*

## 2.2 *EuCML5* 的组织特异性分析

利用 qRT-PCR 方法检测 *EuCML5* 在杜仲无菌苗不同部位的表达量, 分析发现, *EuCML5* 在根、茎和叶中均有表达, 并且根中表达量显著高于叶片和茎, 茎和叶中表达量无明显差异 (图 8)。表明 *EuCML5* 可能在根中发挥特殊作用。

## 2.3 *EuCML5* 参与响应盐和干旱胁迫

对杜仲进行盐胁迫处理, *EuCML5* 表达量在呈现上升趋势, 并于 48 h 达到最高值; 对杜仲进行甘露醇模拟的干旱处理, *EuCML5* 表达量在 8 h 升高, 12 h 后逐渐降低至原水平 (图 9)。这表明 *EuCML5* 参与盐胁迫和干旱胁迫响应。

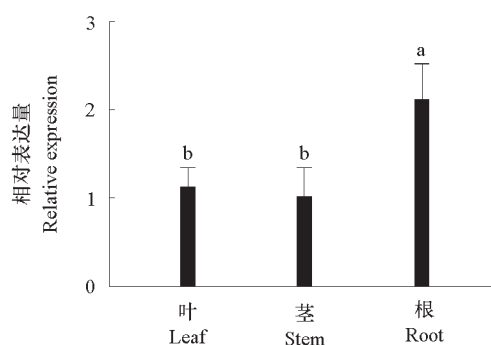


图 8 *EuCML5* 在杜仲各部位中的相对表达量

不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同。

Fig. 8 Relative expression of *EuCML5* in different organs of *Eucommia ulmoides*

Different lowercase letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ). The same below.

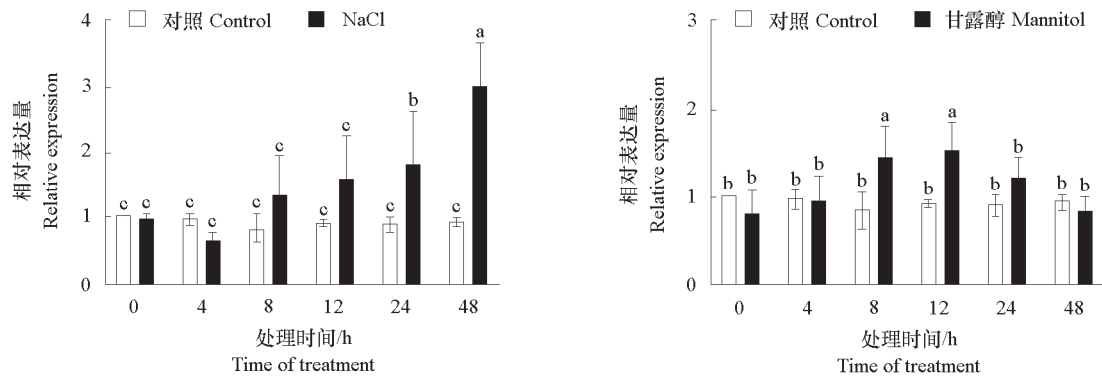


图9 杜仲中 *EuCML5* 在盐 (NaCl) 胁迫和模拟干旱 (甘露醇) 胁迫时的表达量  
Fig. 9 The expression level of *EuCML5* under salt stress and drought (Mannitol) treatments

## 2.4 *EuCML5* 参与 IAA 和 MeJA 响应

经过 IAA 喷施处理的杜仲苗, *EuCML5* 表达量呈上升趋势, 6 h 表达量达到最高, 随后下降, 逐渐恢复正常 (图 10), 表明 *EuCML5* 受 IAA 诱导表达。经过 MeJA 喷施处理的杜仲苗中, *EuCML5* 表达量 3 h 时最高, 之后迅速恢复正常水平, 又在 24 h 出现上调趋势 (图 10), 表明 *EuCML5* 会被 MeJA 诱导表达。

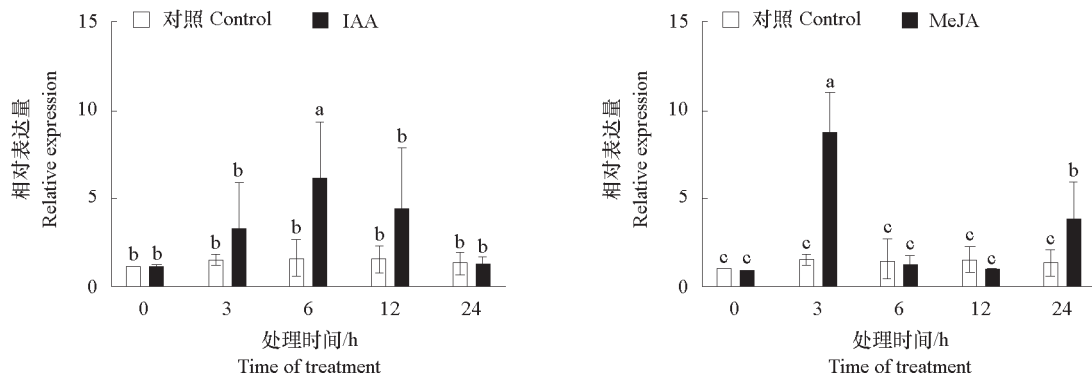


图10 杜仲中 *EuCML5* 在 IAA 和 MeJA 处理后的表达量  
Fig. 10 The expression level of *EuCML5* under IAA and MeJA treatments

## 2.5 *EuCML5* 与钙离子信号通路

为进一步探讨 *EuCML5* 和钙离子信号通路中的钙离子、钙离子通道以及钙调蛋白的关系, 分别使用纯水、CaCl<sub>2</sub>、钙离子通道阻滞剂 LaCl<sub>3</sub> 和钙调蛋白抑制剂 TFP 溶液对杜仲进行水培处理, 结果 (图 11) 发现, CaCl<sub>2</sub> 处理与对照相比并无显著性差异, 而 LaCl<sub>3</sub> 处理和 TFP 处理表达量出现显著下调, 表明 LaCl<sub>3</sub> 和 TFP 显著抑制了 *EuCML5* 的表达。

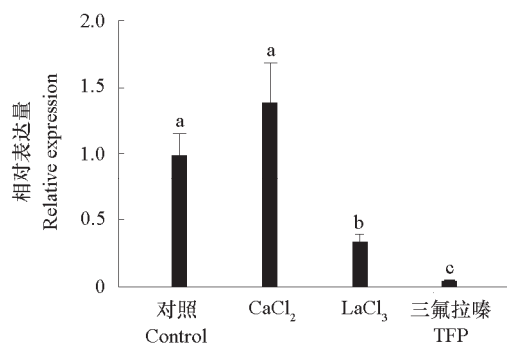


图 11 杜仲中 *EuCML5* 在不同处理后的表达量

Fig. 11 The expression level of *EuCML5* under different treatments

### 3 讨论

本试验成功从杜仲中克隆得到了 *EuCML5* 基因, 经过鉴定, *EuCML5* 与其他物种类钙调蛋白基因编码序列相似度较高, 又具有典型的 EF-hand 结构, 基本可以认定其为杜仲类钙调蛋白基因。类钙调蛋白是植物中特有的一种钙感受器, 和 CaM 结构相似, 除了 EF-hand 结构域之外, 不具备其他已知的结构域, 也因此常常将 CML 和 CaM 划分为同一蛋白家族(曾后清 等, 2016a; Mohanta et al., 2017; 曹绍玉 等, 2018)。在植物中 CML 基因数远大于 CaM (McCormack & Braam, 2003; Boonburapong & Buaboocha, 2007; 王雪霁, 2016; 杨前宇 等, 2018), 表明保守的 CaM 可能在进化过程中无法满足植物应对复杂环境变化的需求, 而 CML 的逐渐进化可对 CaM 的功能进行补充(杨前宇 等, 2018)。Mohanta 等(2017)在对 41 种不同物种的 CaM 和 CML 家族进行分析后也发现了 CML 比 CaM 更早进化, 并在后来发展中逐渐多样化。CaM/CML 序列和结构具有一定的相似性, 并且已有研究证实 CaM 和 CML 的靶蛋白存在广泛的重叠, 因此 CaM 和 CML 都应具有广泛的生物学功能(曾后清 等, 2016a)。

CaM/CML 具有组织特异性。宋明等(2012)发现结球甘蓝类钙调蛋白基因 *BoCML49* 在花粉萌发初期表达量最高, 萌发后逐渐下调。百脉根钙调蛋白基因 *LjCaM4* 在根中表达最高, 很可能参与调控根的发育以及根瘤共生固氮体系的遗传途径(舒茂荣 等, 2017)。茶树 *CsCML21* 在花粉管发育过程中呈现下降趋势(蒋芯, 2013)。本试验中发现, *EuCML5* 在根中表达较高, 在茎和叶片中较低, 这和百脉根 *LjCaM4* 表达(舒茂荣 等, 2017)类似。根部是植物水和无机盐代谢的主要部位, *EuCML5* 基因很可能在根中发挥了特殊作用。

杜仲树皮的采收通常采用环剥的方法。杜仲新皮再生期间, 因木质部的大范围暴露, 极易引起水分大量蒸发而脱水(张庆瑞 等, 2014)。水分的流动和蒸腾可以影响细胞钙的分布, 因此钙信号是植物干旱胁迫的重要信号通路, 能促使气孔关闭, 维持植株水分, 提高水分利用率, 同时, Ca<sup>2+</sup>-CaM 还可以调节植物的气孔密度, 增强植物的保水能力(刘小龙 等, 2014)。在香蕉中, 钙调蛋白基因 *MaCaM* 在干旱胁迫下表达量随胁迫程度加重呈现明显的上升趋势, 而在对抗盐胁迫时会随着时间先上升后下降(程晓培 等, 2013)。巴西橡胶树中 *HbCML27* 在干旱处理 48 h 表达量显著上调(刘辉 等, 2015)。小麦中 *TaCML79* 在干旱胁迫 12 h 呈现出上升趋势(周硕 等, 2016)。本研究结果表明, *EuCML5* 在杜仲响应盐和干旱胁迫中发挥重要作用, 可能通过提高 *EuCML5* 的表达来提高对高盐和干旱的抗性, 并且随着时间延长逐渐适应干旱环境, 表达量出现回落。

有研究报道, 植物钙信号和激素信号途径可以相互交叉形成复杂的信号网络(汪澈 等, 2009)。



CaM 结合蛋白 SAUR 是参与生长素早期响应的一个家族, 大多数 SAUR 家族蛋白 N 端都含有能与 CaM 结合的位点, 虽然其作用机制尚不完全清楚(曾后清 等, 2016b), 但也印证了  $Ca^{2+}$ -CaM 信号系统与生长素途径密切相关(易籽林 等, 2010)。此外, CaM 通过钙调蛋白结合转录因子(CAMTA), 对油菜素类固醇、乙烯和生长素等激素信号途径都能起到调节作用(Wang et al., 2013; Shen et al., 2015)。巴西橡胶树 *HbCaM1-HbCaM7* 受到乙烯利刺激时, 表达量均出现了一定程度的上升(肖小虎 等, 2016), *HbCML27* 在受到乙烯利和茉莉酸甲酯(MeJA)刺激时, 也均出现了上升趋势(刘辉 等, 2015)。杜仲在采收树皮后, 常用各种生长调节剂处理以提高新皮的恢复速度, 有利于愈伤组织的形成, 促进维管束形成层的发生与活动(张庆瑞 等, 2014), 同时, 通过外源生长调节剂处理能够提高杜仲中总黄酮、绿原酸等药用成分的含量(徐咏梅, 2007; 魏艳秀 等, 2017)。在本试验中通过外源 IAA 和 MeJA 处理发现, 杜仲中 *EuCML5* 能够响应诱导, 在短时间内表达量上升后又快速回落, 这意味着杜仲 CML 基因能够参与激素信号途径。

CAM/CML 参与钙离子信号通路的传递, 钙/钙调蛋白信号途径与多种胁迫应答密切相关, 当钙离子信号通路受阻时, CAM/CML 基因也会出现不同的表达情况。此前有研究表明, 钙离子通道抑制剂以及钙调蛋白拮抗剂处理能够抑制半夏钙调蛋白基因 *PtCaMs*(刘兴 等, 2019)和茶树钙调素基因 *CsCaMs*(黄玉婷 等, 2016)的表达。在本试验中, 当使用钙离子通道抑制剂  $LaCl_3$  以及钙调蛋白拮抗剂 TFP 对杜仲进行处理时, *EuCML5* 的表达出现了显著下调。其中, 钙离子通道抑制剂  $LaCl_3$  能够减少植物对钙离子的吸收, 降低胞内钙离子浓度, 对钙信号的传导起到一定的抑制作用, 而钙调蛋白拮抗剂 TFP 能够直接阻止钙调蛋白与钙离子的结合, 导致钙信号的传导受阻。这些结果表明 *EuCML5* 能够受到胞内钙离子浓度和钙调蛋白的调控, 也进一步验证了钙离子信号通路在杜仲胁迫应答中发挥着重要的作用。

本研究证实了 *EuCML5* 基因能够参与干旱、盐胁迫响应, 并受 IAA 和 MeJA 诱导, 钙离子通道抑制剂和钙调蛋白拮抗剂也会影响该基因的表达, 但该基因被激活后, 对下游的哪些基因以及蛋白产生影响尚不清楚, 有待进一步试验研究。

## References

- Boonburapong B, Buaboocha T. 2007. Genome-wide identification and analyses of the rice calmodulin and related potential calcium sensor proteins. *BMC Plant Biology*, 7: 4.
- Cao Shaoyu, Wang Yanfang, Su Wanyu, Zhang Lin, Zhang Yinghua, Xu Junqiang. 2018. Research progress on functions of calmodulin-like proteins in processes of plant growth and developments and stresses. *Plant Physiology Journal*, 54 (10): 4 - 13. (in Chinese)
- 曹绍玉, 王艳芳, 苏婉玉, 张琳, 张应华, 许俊强. 2018. 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. *植物生理学报*, 54 (10): 4 - 13.
- Cheng Xiaopei, Xu Biyu, Liu Juhua, Jia Caihong, Zhang Jianbin, Miao Hongxia, Jin Zhiqiang. 2013. Expressional analysis of *MaCAM* in banana under abiotic stresses. *Life Science Research*, 17 (1): 20 - 23. (in Chinese)
- 程晓培, 徐碧玉, 刘菊华, 贾彩虹, 张建斌, 苗红霞, 金志强. 2013. 香蕉钙调蛋白基因 *MaCAM* 在非生物胁迫下的表达分析. *生命科学研究*, 17 (1): 20 - 23.
- Huang Yuting, Qian Wenjun, Wang Yuchun, Cao Hongli, Wang Lu, Hao Xinyuan, Wang Xinchao, Yang Yajun. 2016. Molecular cloning and expression of CaM family gene *CsCaMs* under cold stress in tea plant [*Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 17 (5): 906 - 913. (in Chinese)
- 黄玉婷, 钱文俊, 王玉春, 曹红利, 王璐, 郝心愿, 王新超, 杨亚军. 2016. 茶树钙调素基因 *CsCaMs* 的克隆及其低温胁迫下的表达分析. *植物遗传资源学报*, 17 (5): 906 - 913.
- Jiang Xin. 2013. Isolation and expression of genes in tea [*Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze] pollen tube under cold stress[M. D. Dissertation].

- Nanjing: Nanjing Agricultural University. (in Chinese)
- 蒋 蕊. 2013. 低温胁迫下茶树花粉管相关基因的分离与表达分析[学位论文]. 南京: 南京农业大学.
- Li X Z, Zhang S. 2016. Effervescent granules prepared using *Eucommia ulmoides* Oliv. and moso bamboo leaves: hypoglycemic activity in HepG2 cells. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, doi: org/10.1155/2016/6362094.
- Liu Hui, Deng Zhi, Chen Jiangshu, Li Dejun. 2015. Cloning and expression analysis of calmodulin-like protein gene *HbCML27* from *Hevea brasiliensis*. Molecular Plant Breeding, 13 (12): 2721 - 2727. (in Chinese)
- 刘 辉, 邓 治, 陈江淑, 李德军. 2015. 巴西橡胶树类钙调素蛋白基因 *HbCML27* 克隆与表达分析. 分子植物育种, 13 (12): 2721 - 2727.
- Liu Xiaolong, Li Xia, Qian Baoyu, Tang Yuting. 2014.  $Ca^{2+}$  signal transduction and its regulation role under drought stress in plant. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 34 (9): 1924 - 1936. (in Chinese)
- 刘小龙, 李 霞, 钱宝玉, 唐玉婷. 2014. 植物体内钙信号及其在调节干旱胁迫中的作用. 西北植物学报, 34 (9): 1927 - 1936.
- Liu Xing, Dai Huanhuan, Shan Yusi, Yang Yi, Liao Zhihua, Wu Nengbiao. 2019. Cloning and expression analysis of calmodulin gene from *Pinellia ternate*. China Journal of Chinese Materia Medica, 44 (13): 2777 - 2784. (in Chinese)
- 刘 兴, 代欢欢, 山雨思, 杨 怡, 廖志华, 吴能表. 2019. 半夏钙调蛋白基因的克隆与表达分析. 中国中药杂志, 44 (13): 2777 - 2784.
- Magnan F, Benoît R, Charpentreau M, Sotta B, Galaud J P, Aldon D. 2008. Mutations in AtCML9, a calmodulin-like protein from *Arabidopsis thaliana*, alter plant responses to abiotic stress and abscisic acid. The Plant Journal, 56 (4): 575 - 589.
- Mccormack E, Braam J. 2003. Calmodulins and related potential calcium sensors of *Arabidopsis*. New Phytologist, 159 (3): 585 - 598.
- Mohanta T K, Kumar P, Bae H. 2017. Genomics and evolutionary aspect of calcium signaling event in calmodulin and calmodulin-like proteins in plants. BMC Plant Biology, 17 (1): 38.
- Ranty B, Aldon D, Galaud J P. 2006. Plant calmodulins and calmodulin-related proteins: multifaceted relays to decode calcium signals. Plant Signaling & Behavior, 1 (3): 96 - 104.
- Rao S S, El-Habbak M H, Havens W M, Singh A, Zheng D, Vaughn L, Haudenshield J S, Hartman G L, Korban S S, Ghabrial S A. 2013. Overexpression of *GmCaM4* in soybean enhances resistance to pathogens and tolerance to salt stress. Molecular Plant Pathology, 15 (2): 145 - 160.
- Shen C J, Yang Y J, Du L Q, Wang H Z. 2015. Calmodulin-binding transcription activators and perspectives for applications in biotechnology. Applied Microbiology and Biotechnology, 99 (24): 10379 - 10385.
- Shu Maorong, Qin Zongzhi, Chen Yanghan, Tang Ruyong, Liao Jinqiu. 2017. Cloning by 3'-RACE and expression of *LjCaM4* gene in *Lotus japonicus*. Genomics and Applied Biology, 36 (8): 3057 - 3064. (in Chinese)
- 舒茂荣, 秦宗志, 陈杨晗, 汤如勇, 廖进秋. 2017. 百脉根钙调素基因 *LjCaM4* 的 3'-RACE 克隆及其表达量分析. 基因组学与应用生物学, 36 (8): 3057 - 3064.
- Song Ming, Xu Junqiang, Sun Zijian, Tang Qinglin, Wang Zhimin, Wang Xiaojia. 2012. Molecular cloning and expression analysis of CaM-like protein genes (*BoCML49*) from cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*). Acta Agronomica Sinica, 38 (12): 2162 - 2169. (in Chinese)
- 宋 明, 许俊强, 孙梓健, 汤青林, 王志敏, 王小佳. 2012. 结球甘蓝花粉类钙调素蛋白基因 *BoCML49* 的克隆及表达分析. 作物学报, 38 (12): 2162 - 2169.
- Wang C, Shang J X, Chen Q X, Prieto J A O, Yang Y H, Yuan M, Zhang Y L, Mu C C, Deng Z P, Wei C, Burlingame A L, Wang Z Y, Sun Y. 2013. Identification of bzl1-interacting proteins as potential components of the brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis* through tandem affinity purification. Molecular & Cellular Proteomics, 12 (12): 3653 - 3665.
- Wang Che, Zhang Lijun, Fan Jinjuan, Ruan Yanye, Cui Zhenhai. 2009. Calcium-binding proteins in plants. Plant Physiology Journal, 45 (3): 209 - 216. (in Chinese)
- 汪 澈, 张立军, 樊金娟, 阮燕晔, 崔震海. 2009. 植物钙结合蛋白. 植物生理学报, 45 (3): 209 - 216.
- Wang J Y, Chen X J, Zhang L, Pan Y Y, Gu Z X, He S M, Song Z P, Yuan Y. 2018. Comparative studies of different extracts from *Eucommia ulmoides* Oliv. against rheumatoid arthritis in CIA rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, doi: org/10.1155/2018/7379893.
- Wang Xueji. 2016. Bioinformatics analysis of *CaM/CML* gene family in *Populus*[M. D. Dissertation]. Beijing: Chinese Academy of Forestry. (in Chinese)
- 王雪霁. 2016. 杨树 *CaM* 及 *CML* 基因家族生物信息学分析[学位论文]. 北京: 中国林业科学研究院.
- Wei Yanxiu, Liu Huidong, Du Hongyan, Miao Zuoyun, Sun Zhiqiang, Cui Faxi. 2017. Efficacy of exogenous hormones enhancing active ingredients

- in *Eucommia ulmoides* leaves. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 37 (5): 42 - 49. (in Chinese)
- 魏艳秀, 刘慧东, 杜红岩, 苗作云, 孙志强, 崔发喜. 2017. 外源激素提高杜仲叶中有效成分含量的效果. *中南林业科技大学学报*, 37 (5): 42 - 49.
- Xiao Xiaohu, Sui Jinlei, Qi Jiyan, Yang Jianghua, Qin Yunxia, Tang Chaorong. 2016. Cloning and expression of calmodulin genes from *Hevea brasiliensis*. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 36 (7): 37 - 48. (in Chinese)
- 肖小虎, 隋金蕾, 戚继艳, 阳江华, 秦云霞, 唐朝荣. 2016. 巴西橡胶树钙调蛋白基因的克隆和表达分析. *热带农业科学*, 36 (7): 37 - 48.
- Xu Yongmei. 2007. The effect of external hormones on the content of secondary metabolites in *Eucommia ulmoides* Oliv. [M. D. Dissertation]. Yangling: Northwest A & F University. (in Chinese)
- 徐咏梅. 2007. 外源激素对杜仲次生代谢物含量的影响[硕士论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Yang C, Li A, Zhao Y L, Zhang Z L, Zhu Y F, Tan X M, Geng S F, Guo H Z, Zheng X Y, Kang Z S, Mao L. 2011. Overexpression of a wheat *CCaMK* gene reduces ABA sensitivity of *Arabidopsis thaliana* during seed germination and seedling growth. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29 (3): 681 - 692.
- Yang Qianyu, Wang Tao, Liang Lixiong, Li Lubin, Liu Lei. 2018. Genome-wide analysis of *CaM/CML* gene family in two Orchidaceae species. *Forest Research*, 31 (6): 15 - 25. (in Chinese)
- 杨前宇, 王涛, 梁立雄, 李潞滨, 刘蕾. 2018. 两种兰科植物 *CaM* 及 *CML* 基因家族全基因组分析. *林业科学研究*, 31 (6): 15 - 25.
- Ye J, Jin C F, Li N, Liu M H, Fei Z X, Dong L Z, Li L, Li Z Q. 2018. Selection of suitable reference genes for qRT-PCR normalisation under different experimental conditions in *Eucommia ulmoides* Oliv. *Scientific Reports*, 8 (1): 15043.
- Yi Zilin, Xu Li, Huang Jinjia, Li Zhiying. 2010. Study on the interaction between calcium signal system and plant hormone. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 26 (15): 221 - 226. (in Chinese)
- 易籽林, 徐立, 黄锦佳, 李志英. 2010. 钙信号系统与植物激素信号的研究进展. *中国农学通报*, 26 (15): 221 - 226.
- Yu Ting, Zhao Yuwei, Yu Shaoning. 2013. Progress on the EF-hand proteins. *Biophysics*, 1: 1 - 10. (in Chinese)
- 吁亭, 赵宇威, 余绍宁. 2013. EF-Hand 蛋白研究进展. *Biophysics*, 1: 1 - 10.
- Yuan P G, Yang T B, Poovaiah B W. 2018. Calcium signaling-mediated plant response to cold stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (12): 3896.
- Zeng Houqing, Zhang Xiajun, Zhang Yaxian, Wang Shang, Pi Erxu, Wang Huizhong, Du Liqun. 2016a. Physiological functions of calmodulin-like proteins in plants. *Scientia Sinica (Vitae)*, 46 (6): 705 - 715. (in Chinese)
- 曾后清, 张夏俊, 张亚仙, 汪尚, 皮二旭, 王慧中, 杜立群. 2016a. 植物类钙调素生理功能的研究进展. *中国科学: 生命科学*, 46 (6): 705 - 715.
- Zeng Houqing, Zhang Yaxian, Wang Shang, Zhang Xiajun, Wang Huizhong, Du Liqun. 2016b. Calcium/calmodulin-mediated signal transduction system in plants. *Chinese Bulletin of Botany*, 51 (5): 705 - 723. (in Chinese)
- 曾后清, 张亚仙, 汪尚, 张夏俊, 王慧中, 杜立群. 2016b. 植物钙/钙调素介导的信号转导系统. *植物学报*, 51 (5): 705 - 723.
- Zhang Qingrui, Fu Guozan, Peng Xinglong. 2014. Technology of bark denudation and bark regeneration of *Eucommia ulmoides*. *Bulletin of Agricultural Science and Technology*, (6): 311 - 312. (in Chinese)
- 张庆瑞, 付国赞, 彭兴隆. 2014. 皮用杜仲树剥皮及树皮再生技术. *农业科技通讯*, (6): 311 - 312.
- Zhang R, Pan Y L, Hu S J, Kong X H, Juan W, Mei Q B. 2014. Effects of total lignans from *Eucommia ulmoides* barks prevent bone loss *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology*, 155 (1): 104 - 112.
- Zhang Xiaojun. 2018. The key technology of *Eucommia* peeling regeneration. *Agricultural Science-technology and Information*, (11): 72 - 73. (in Chinese)
- 张小军. 2018. 杜仲剥皮再生关键技术. *农业科技与信息*, (11): 72 - 73.
- Zhou Shuo, Liu Yongwei, Dong Fushuang, Yang Fan, Zhao He, Chai Jianfang, Lü Mengyu, Sun Guozhong, Wang Haibo. 2016. Cloning and expression analysis of *TaCML79* in wheat. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 31 (6): 1 - 6. (in Chinese)
- 周硕, 刘永伟, 董福双, 杨帆, 赵和, 柴建芳, 吕孟雨, 孙果忠, 王海波. 2016. 小麦类钙调素 *TaCML79* 基因的克隆和表达分析. *华北农学报*, 31 (6): 1 - 6.