

DOI: 10.13718/j.cnki.xdsk.2024.01.004

邵晓庆, 卢一铭, 徐卫红. 钙诱导下白菜的转录特征及钙富集关键基因表达研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2024, 46(1): 47-58.

钙诱导下白菜的转录特征及钙富集 关键基因表达研究

邵晓庆, 卢一铭, 徐卫红

西南大学 资源环境学院, 重庆 400715

摘要: 白菜是喜钙作物, 对钙的需求量较大且易在体内富集。目前白菜钙富集的代谢途径及分子机理尚未被完全解析。本研究采用盆栽试验结合室内分析, 研究了不同钙水平(0, 0.2, 0.4, 0.6 和 0.8 g/kg)对‘黑叶五月慢’和‘上海六月慢’两个白菜品种生长及钙质量分数的影响, 运用转录组学和基因组学初步探讨了白菜钙富集代谢途径和生物学信息, 以及钙富集关键基因家族的表达特征。结果显示, 钙诱导下, ‘黑叶五月慢’和‘上海六月慢’地上部钙质量分数较对照分别增加了 14.0%~21.6% 和 6.6%~41.3%。两个白菜品种的地上部钙质量分数大小为‘黑叶五月慢’>‘上海六月慢’。转录组分析发现, 钙处理下两个白菜品种的差异表达基因主要富集在细胞组分、转运和分解代谢通路、信号转导通路、氨基酸的生物合成等通路上。随着供钙水平的增加, 两个白菜品种的 *BcECA* 和 *BcCAS* 家族基因表达量具有上调现象, *BcECA* 和 *BcCAS* 家族基因表达量与钙质量分数之间呈正相关关系。

关键词: 钙诱导; 白菜; 钙富集; 基因表达; 转录组分析

中图分类号: X53

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2024)01-0047-12

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Transcriptional Characteristics and Expressions of Key Genes of Calcium Enrichment in Chinese Cabbage Induced by Calcium

SHAO Xiaoqing, LU Yiming, XU Weihong

College of Resources and Environmental Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Chinese cabbage has a large demand on calcium, which is easy to be accumulated by cabbage. At present, the metabolic pathway and molecular mechanism of calcium enrichment in Chinese cabbage have not been fully analyzed. In this study, the effects of different levels of calcium (0, 0.2, 0.4, 0.6 and 0.8 g/kg) on the growth and calcium content of two Chinese cabbage varieties ‘Heiyewuyue man’ and ‘Shanghai liuyue man’ were studied by pot experiment and laboratory analysis. Transcriptomics and genomics were used to preliminarily explore the metabolic pathways and biological information of calcium enrichment in Chinese cabbage. The expression characteristics of key gene families for calcium enrichment

收稿日期: 2023-06-12

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-23-B08); 国家重点研发计划项目(2018YFD0201200)。

作者简介: 邵晓庆, 硕士研究生, 主要从事植物营养与环境生态研究。

were analyzed. The results showed that under calcium induction, the calcium content in the shoots of ‘Heiyewuyueman’ and ‘Shanghailiuyueman’ increased by 14.0%–21.6% and 6.6%–41.3%, respectively. The above ground and root calcium contents of the two varieties of Chinese cabbage shows the calcium content of ‘Heiyewuyueman’ was higher than that of ‘Shanghailiuyueman’. Transcriptomic analysis showed that the differentially expressed genes of the two Chinese cabbage varieties were mainly concentrated in cell components, transport and catabolic pathways, signal transduction pathways, and amino acid biosynthesis pathways. The expression levels of *BcECA* and *BcCAS* family genes were up-regulated with the increase of calcium supply, and the expression levels of *BcECA* and *BcCAS* family genes were positively correlated with calcium content.

Key words: calcium induction; Chinese cabbage; calcium enrichment; gene expression; transcriptome analysis

钙是人体不可缺少的营养元素,缺钙会导致骨质疏松、营养不良,严重影响人体正常发育和骨骼发展.正常情况下人体每日所需钙量为 800 mg,但儿童、老人群体每日需要的钙量为 1 200 mg.随着人们生活水平的提高,对高品质、功能型蔬菜的需求也不断提升.钙作为蔬菜正常生长发育过程中不可或缺的营养元素,参与蔬菜种子萌发、生长分化、形态建成和开花结果等过程^[1].同时,钙离子在细胞信号转导系统中作为第二信使参与蔬菜细胞内信号的传递,从而调控蔬菜的各种生理生化反应和生长发育过程^[2].0.5~4.0 mmol/L 钙水平可显著提高白菜叶片的净光合速率、气孔导度以及蒸腾速率,且对钙敏感型品种菊春的影响显著大于迟钝型品种德高春^[3].喷施 0.2% 的外源氯化钙后,番茄的单果质量、单株结果数和单株产量均显著增加^[4].钙肥的施用还可以改良土壤性能,调节土壤酸碱性,消除某些离子的毒害作用^[5].在营养液中添加 10 mmol/L CaCl_2 ,可缓解铜离子胁迫,明显促进花椰菜地上部和根系的生长,使地上部和根系的鲜质量、干质量增加^[6].但也有研究显示,高钙水平会抑制蔬菜对钾、镁的吸收,也会降低铁、锰、硼、锌等元素的有效性,使蔬菜体内养分失衡,甚至会影响蔬菜的光合作用,从而导致其正常的生长发育受阻^[7-8].另外,细胞中过多的游离钙离子会和磷酸根离子形成沉淀,使钙离子信号传递受阻,磷代谢等有关过程也会受到干扰,从而使细胞的正常功能受损,甚至死亡,影响蔬菜的生长发育.我国土壤溶液中的钙浓度约为 10^{-2} mol/L,土壤表土层平均含钙量可达 1.37%,正常情况下能够满足大多数作物的需要^[9].但近期有研究表明,南方因降雨充沛,土壤含钙量较低,而北方土壤富钙,在干旱条件下,土壤溶液钙浓度会升高,从而抑制根系对钙的吸收,导致部分作物出现生理性缺钙,钙需求量较大的果树、蔬菜缺钙现象更为普遍^[10].同时,近年来由于追求高产、土壤酸化和化肥施用等因素的作用,土壤钙供应不足^[9],加之设施栽培的大量涌现,更容易导致棚室土壤缺钙^[11].

蔬菜吸收钙的主要部位是根尖和侧根处^[12].蔬菜根系对钙离子(Ca^{2+})的吸收过程一般包括:① 土壤中的 Ca^{2+} 通过质流扩散和根系截获的方式转移到蔬菜根系的表面,根系通过扩散或细胞间隙的交换使 Ca^{2+} 进入根系细胞,之后 Ca^{2+} 通过质外体途径进行短距离横向运输,到达木质部^[13];② 部分 Ca^{2+} 还可以通过离子通道进入内皮层细胞,转入共质体,从而进入木质部薄壁细胞组织^[14-15].蔬菜中的 Ca^{2+} 主要在木质部进行长距离运输,在韧皮部的运输十分有限,蒸腾作用是其运输的主要动力^[16].另外, Ca^{2+} 的运输分配还受钙传递分子途径、木质部水分流量和钙信号与细胞壁的相互作用等影响^[17]. Ca^{2+} 转运系统在蔬菜从外界环境中吸收钙以及运输和分配钙的过程中发挥着重要作用^[18],该转运系统主要包括 2 类:胞质 Ca^{2+} 外流系统($\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向转运蛋白和 Ca^{2+} -ATPase)和 Ca^{2+} 进入胞质的内流系统(Ca^{2+} 通道)^[19].其中, Ca^{2+} -ATPase 又称钙泵(calcium pump), Ca^{2+} -ATPase 属于 P-型 ATP 酶,根据其蛋白质氨基酸序列和生化特征的差异可以分为 2 个家族:内质网(ER)型钙泵(ER-type calcium ATPase, ECA)和自抑制的质膜(PM)型钙泵(autoinhibited calcium ATPase, ACA)^[20].其中, ECA 分布在质膜、内质网和液泡膜上,只能水解底物 ATP,对其有专一性,被 CPA(cyclopiazonic acid)专性抑制,不受钙调素(calmodulin, CaM)蛋白激活调控^[21-22].蔬菜细胞内感受胞质钙离子浓度变化的原件被称为 Ca^{2+} 感受器(calcium sensor, CAS).

CAS 是一种跨膜蛋白,可以传递钙信号,进而调控基因的表达,达到维持蔬菜胞质钙离子浓度稳态的

目的^[23]. CAS 感受到胞外钙离子后, 产生肌醇三磷酸(inositol triphosphate, IP₃)和环腺苷酸二磷酸核糖(cyclic adenylyate diphosphate ribose, cADPR)等第二信使, 从而引起胞内钙离子浓度的变化^[24]. Han 等^[25]通过功能基因筛选法(functional screening approach)首次在拟南芥中成功克隆了胞外钙感受器基因 CAS, 这为进一步研究其在蔬菜钙富集中的作用奠定了坚实的基础. 植物 ECA、CAS 基因可以感受胞外 Ca²⁺ 水平, 提高胞内 Ca²⁺ 的浓度, 因此探究其在不同 Ca²⁺ 浓度蔬菜中的表达情况将为提高蔬菜中的钙质量分数提供分子基础. 本试验基于课题组前期研究, 以我国白菜栽培较为广泛的两个品种‘黑叶五月慢’和‘上海六月慢’为试验材料, 采用盆栽试验研究了钙诱导下两个白菜品种的转录代谢信息差异, 以及钙富集关键酶基因表达水平的影响, 探讨了钙富集关键酶基因表达与白菜钙质量分数之间的相关性, 以期高钙白菜品种选育提供技术支撑.

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

供试白菜(*Brassia chinensis* L.), 品种为‘黑叶五月慢’和‘上海六月慢’. 栽培基质以草炭土、珍珠岩、蛭石按体积比 3 : 1 : 1 混合, 其基本理化性质为: pH 值为 6.50, 有机质为 221.8 g/kg, 全氮为 3.13 g/kg, 碱解氮为 0.57 g/kg, 有效磷为 17.97 mg/kg, 速效钾为 150.32 mg/kg, 有效钙为 0.32 g/kg.

1.2 试验方法

盆栽试验于 2021 年 3 月 15 日至 2021 年 4 月 30 日在西南大学 1 号玻璃温室内进行. 蔬菜种植在无孔黑色塑料桶中(上口直径 25 cm, 底部直径 20 cm, 高度 29 cm), 每盆装入栽培基质 9.5 L. 钙肥品种选择 CaSO₄ · 2H₂O, 用作基肥与氮、磷、钾肥一起以土施的方式施入, 试验设置 5 个浓度(0, 0.2, 0.4, 0.6 和 0.8 g/kg)与两个白菜品种两两组合, 随机排列, 每盆种植 4 株, 每个处理设置 3 次重复. 白菜氮肥总施用量为 180 mg/kg, 磷肥 100 mg/kg、钾肥 150 mg/kg, 氮肥、磷肥和钾肥分别以尿素、磷酸二氢铵和硫酸钾为肥源, 其中, 磷、钾作为基肥施入, 氮肥用量的 70% 作为基肥施入, 同时施入钙肥, 与土壤混匀, 平衡 2 周, 剩余 30% 的氮肥作追肥在移栽后的第 20 天施入. 土壤平衡结束后, 选取长势一致且健壮的 4 叶 1 心的白菜幼苗进行移栽, 培养期间用纯水保持基质含水量为饱和含水量的 70%~80%. 白菜生长 45 天后收获.

1.3 测定指标与方法

1.3.1 基质基本理化性质和植物钙质量分数分析

pH 采用土水比 1 : 1 的方法测定; 有机质、全氮、碱解氮、有效磷、速效钾等基本理化指标用常规方法测定^[26]. 植株收获后先用自来水冲洗干净, 然后用去离子水清洗 3 次, 然后分离根、茎、叶和果实, 在 105 ℃ 下杀青 15 min, 60 ℃ 下烘干称重, 用破壁机打磨干样, 全钙质量分数采用 HNO₃-HClO₄ 消化, 原子吸收分光光度法进行测定^[26]. 参照刘双等^[27]和王春晓等^[28]的计算方法计算植株钙元素积累量, 计算公式如下:

$$\text{钙积累量(g/株)} = \text{钙质量分数(g/kg)} \times \text{干质量(kg/株)}$$

1.3.2 转录组测序

1.3.2.1 总 RNA 提取、cDNA 文库构建及 Illumina 测序

选取成熟期白菜第 5~6 位叶片用于总 RNA 提取、mRNA 纯化、cDNA 文库构建及高通量测序(深圳华大基因股份有限公司). 基本过程为: 用 mRNA 富集法对总 RNA 进行处理, 用打断 buffer 把获得的 RNA 片段化, 结合 cDNA 二链形成双链 DNA, 双链 DNA 处理过后进行 PCR 扩增、热变性成单链直至得到单链环状 DNA 文库, 将检测合格的文库进行 Illumina 测序.

1.3.2.2 RNA-seq 分析

原始测序数据首先通过 SOAPnuke 1.4.0 软件去除接头及低质量的序列, 之后利用 Hisat 2.1.0 将获得的 clean reads 比对到大白菜参考基因组, 使用 Bowtie 2 将 clean reads 比对到基因组序列上, 然后使用 RSEM 计算各个样品的基因表达水平. 通过 DESeq 2 软件进行样品组间差异表达分析, 将满足阈值 $|\log_2\text{FC}| \geq 1$ 且 $\text{FDR} < 0.05$ 的基因定义为差异表达基因(DEG), 并对差异表达基因进行 GO(Gene Ontology)功能注释及 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)富集分析^[29].

1.3.3 钙富集关键酶基因表达研究

1.3.3.1 总 RNA 提取与质量检测

本试验白菜材料的总 RNA 采用北京全式金有限公司 TransZol Up Plus RNA Kit 抽提试剂盒提取，提取出的一部分 RNA 用于 RNA 的质量检测，剩余的 RNA 保存在-80℃冰箱中，等待进一步的纯化和反转录。

1.3.3.2 RNA 的纯化与反转录

使用北京全式金生物技术有限公司反转录试剂盒(TransCript One-Step gDNA Removal and Cdna Synthesis SuperMix)进行 RNA 反转录。首先去除残存基因组 DNA，再按照试剂盒说明进行 RNA 反转录反应。反转录所合成的 cDNA 置于-20℃条件下保存。

1.3.3.3 引物及目标基因的 qRT-PCR 分析

用 ddH₂O 将反转录产物 cDNA 稀释 3 倍，荧光定量 PCR 采用 Power Up TM SYBRTM Green Master Mix(Applied Biosystems, Vilnius, Lithuania)试剂盒配制反应体系。使用 Applied Biosystems 7500 Real Time PCR system 进行定量 PCR 反应。PCR 反应程序为：95℃预变性 10 min，95℃变性 30 s，60℃退火 30 s，40 个循环；60℃上升至 95℃检测产物溶解曲线，所有试验重复 3 次。用 2^{-ΔΔCT} 的方法计算目标基因的相对表达量，CT 值表示荧光信号达到设定阈值所经历的反应循环数^[30]。其中 PCR 反应体系为 2 μL cDNA，7.2 μL ddH₂O，0.4 μL Primer-Forward(10 μM)，0.4 μL Primer-Reverse(10 μM)，10 μL 2×SYBR Green Mix。引物设计如表 1 所示。

表 1 RT-qPCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	
	正向引物	反向引物
ECA2	AAGGCATAAGCAAGAGATCGTTAG	ATCATCTGCAAGAACCATATCTGA
ECA3.1	GGTCTTTCTGATTCTCAGTTGAT	AGAAATCGTGTTAAGCCAGTCTCT
ECA4.1	AGTCATGGTCATAACTGGAGACAA	TCTAGAGAACAAGATCCCTCCACT
ECA4.2	GATGGTGATGTCTTACGTTGTTGT	GCGTACTCCTTTCCAATACATTCT
CAS1	CTGTCTGGTCTGCGATATCTTTTAA	TACTCTTCTTAGCATTTGAAGGGAG
CAS2	ACTCTTCCTCCTTCTTCTTCGTCTT	CTTGGTTGATTGTCTTCTCCACTTC
CAS4	CCAAAACCTGAGACAACACTTACCA	CGTCTTGTTTGAAATCTTCCGAGTC

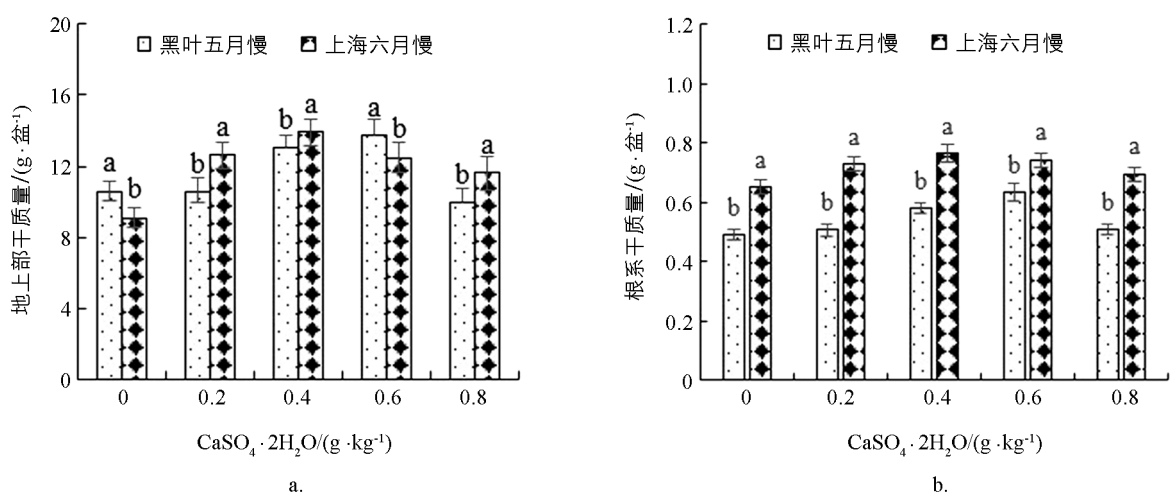
1.4 数据处理与统计分析

使用 Microsoft Excel 2019 进行数据的统计处理和制图，采用 IBM SPSS Statistics 25.0 进行相关性分析(Pearson 相关系数法)，Fisher least significant difference(LSD)检测法进行不同处理均值的差异显著性比较($p<0.05$)。

2 结果分析

2.1 供钙水平对白菜生物量的影响

不同施钙水平(0, 0.2, 0.4, 0.6 和 0.8 g/kg CaSO₄ · 2H₂O)下‘黑叶五月慢’和‘上海六月慢’的地上部生物量和根生物量如图 1 所示。‘黑叶五月慢’的地上部随着钙肥水平的提高呈先升高再降低的趋势，根生物量的变化趋势与之相似，先升高后降低，与对照组相比各处理的地上部和根生物量分别增加了 23.22%~29.79%和 3.35%~28.96%，‘黑叶五月慢’的地上部和根生物量均在 0.6 g/kg CaSO₄ · 2H₂O 处理下达到最大值。‘上海六月慢’的地上部和根生物量的变化趋势相同，均表现为先升高后降低，各处理的地上部和根生物量较对照分别增加了 27.62%~53%和 6.91%~17.74%，在 0.4 g/kg CaSO₄ · 2H₂O 处理下该品种的地上部和根生物量达到最大值，分别为 116.11 和 5.11 g/盆。与对照相比，‘黑叶五月慢’的地上部和根生物量均在 0.4 和 0.6 g/kg CaSO₄ · 2H₂O 处理下存在显著差异；‘上海六月慢’各施钙处理下的地上部生物量较对照均表现出显著差异，而根生物量仅在 0.2, 0.4 和 0.6 g/kg CaSO₄ · 2H₂O 处理下表现出显著差异。

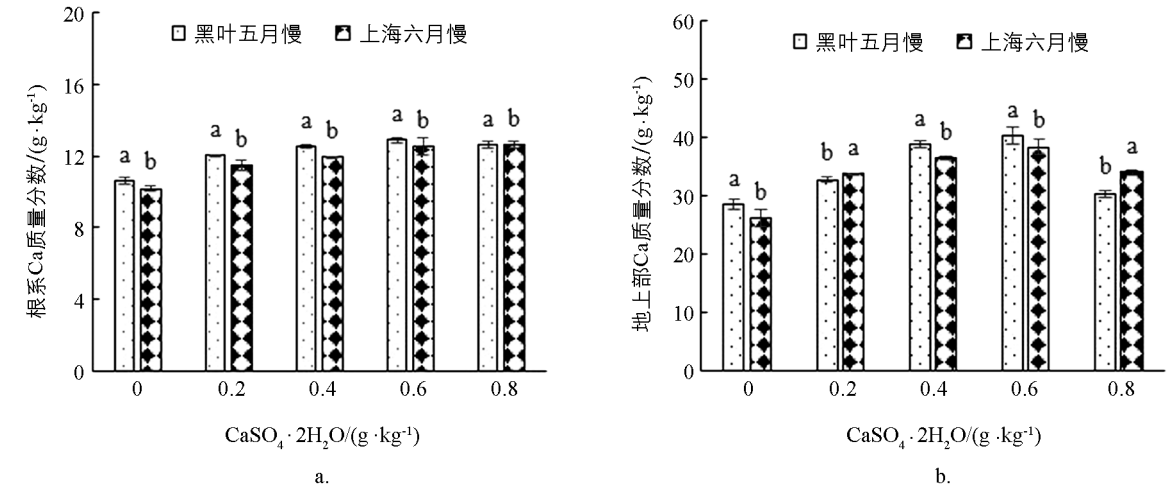


不同小写字母表示不同品种间的差异显著性($p < 0.05$).

图 1 不同钙水平下白菜生物量

2.2 钙质量分数

如图 2 所示, ‘黑叶五月慢’和‘上海六月慢’的地上部和根系钙质量分数均随着施钙水平的增加呈先增加后降低的趋势, 在 0.6 g/kg $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 处理下达到最大值. ‘黑叶五月慢’地上部和根系钙质量分数较对照分别增加了 14.0%~21.6%和 12.7%~24.4%; ‘上海六月慢’地上部和根系钙质量分数分别较对照增加了 6.6%~41.3%和 29.1%~46.9%. 总体来讲, ‘黑叶五月慢’的地上部和根系钙质量分数均高于‘上海六月慢’.

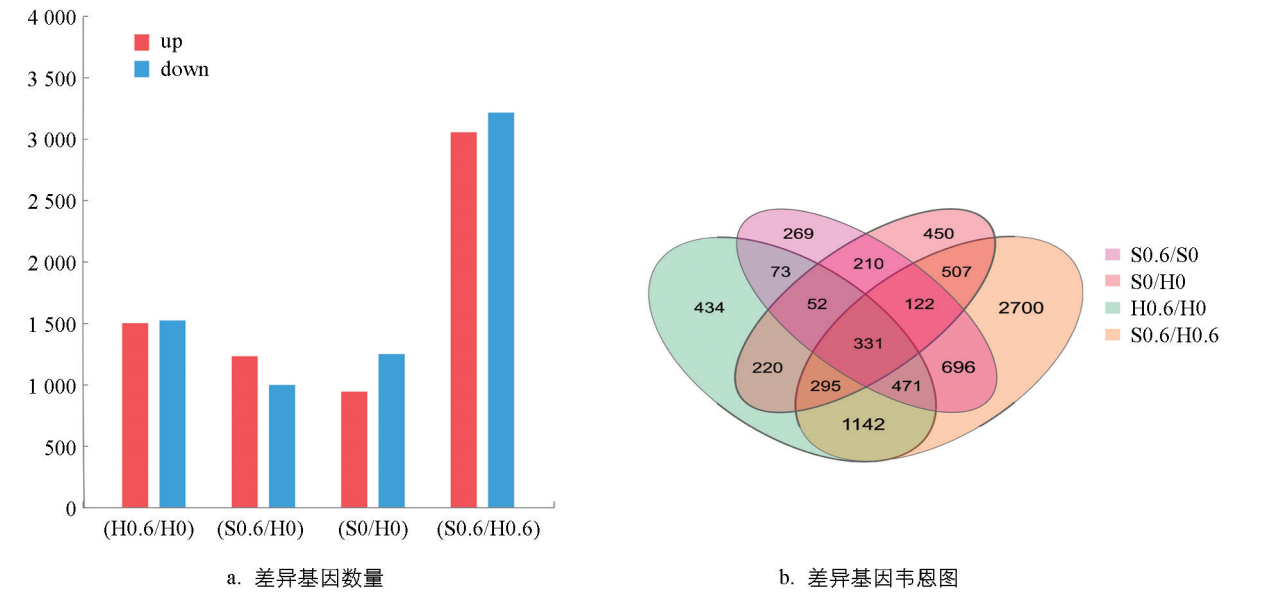


不同小写字母表示不同品种间的差异显著性($p < 0.05$).

图 2 不同钙水平下白菜地上部和根系钙质量分数

2.3 差异表达基因分析

本试验以 $|\log_2\text{FC}| \geq 0$, Q 值 ≤ 0.05 为标准来筛选差异表达基因, 并对差异表达基因进行统计分析, 如图 3 所示, ‘黑叶五月慢’施钙处理与对照组相比共筛选到 3 018 个差异表达基因, 其中 1 498 个上调表达, 1 520 个下调表达; ‘上海六月慢’施钙处理与对照组相比共筛选到 2 224 个差异表达基因, 其中 1 229 个上调表达, 995 个下调表达; ‘黑叶五月慢’对照组与‘上海六月慢’对照组相比共筛选到 2 187 个差异表达基因, 其中 941 个上调表达, 1 246 个下调表达; ‘黑叶五月慢’施钙处理与‘上海六月慢’施钙处理相比共筛选到 6 264 个差异表达基因, 其中 3 052 个上调表达, 3 212 个下调表达. 对这些差异表达基因作韦恩图分析, 结果表明: ‘黑叶五月慢’施钙处理及对照组与‘上海六月慢’施钙处理及对照组之间存在 927 个差异表达基因; ‘黑叶五月慢’和‘上海六月慢’的对照组与‘黑叶五月慢’和‘上海六月慢’的施钙处理之间存在 1 255 个差异表达基因.



H0: ‘黑叶五月慢’对照处理, H0.6: ‘黑叶五月慢’0.6 g · kg⁻¹ 钙处理; S0: ‘上海六月慢’对照处理, S0.6: ‘上海六月慢’0.6 g · kg⁻¹ 钙处理, 下同。

图 3 不同钙处理下白菜的差异表达基因

2.4 差异表达基因 GO 分析

如图 4 所示, ‘黑叶五月慢’和‘上海六月慢’的差异表达基因主要富集在生物学过程(biological process)、细胞组分(cellular component)和分子功能(molecular function). ‘黑叶五月慢’施钙处理与对照组在生物过程类别中包含基因数较多的条目依次是: 细胞过程(cellular process)322 个、代谢过程(metabolic process)320 个、应激反应(response to stimulus)64 个和生物调控(biological regulation)61 个; 在细胞组分类别中富集较多的条目依次是: 细胞(cell)321 个、细胞部分(cell part)321 个、细胞器(organelle)259 个、膜(membrane)183 个和膜部分(membrane part)171 个; 在分子功能类别中富集较多的条目依次是: 催化活性(catalytic activity)377 个、联结(binding)357 个、结构分子活动(structural molecule activity)86 个和转运活动(transporter activity)57 个. ‘上海六月慢’施钙处理与对照组在生物过程类别中包含基因数较多的条目依次是: 细胞过程 312 个、代谢过程 299 个、应激反应 42 个和细胞组分或生物合成(cel-lular component organization or biogenesis)35 个; 在细胞组分类别中富集较多的条目依次是: 细胞 317 个、细胞部分 317 个、细胞器 282 个、蛋白质复合物(protein-containing complex)195 个和膜(membrane)125 个; 在分子功能类别中富集较多的条目依次是: 联结 283 个、催化活性 238 个、结构分子活动 137 个和转运活动 31 个.

2.5 差异表达基因 KEGG 通路分析

由图 5 可知, ‘黑叶五月慢’和‘上海六月慢’施钙处理较对照组在转运和分解代谢(transport and catab-olism)通路中的差异表达基因数目分别为 67 和 47 个; 在环境信息处理类别下, 两个品种施钙处理较对照组在信号转导(signal transduction)通路中的差异表达基因数目分别为 68 和 50 个; 在新陈代谢类别下, 两个品种施钙处理较对照组在氨基酸代谢(amino acid metabolism)通路中的差异表达基因数目分别为 163 和 130 个, ‘黑叶五月慢’施钙处理和对照组的差异表达基因主要富集在碳代谢(carbon metabolism)、氨基酸的生物合成(biosynthesis of amino acids)、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢(glycine, serine and threonine metabolism)、丙酮酸代谢(pyruvate metabolism)、氮代谢(nitrogen metabolism)、α-亚麻酸代谢(alpha-Linolenic acid metabolism)等代谢通路. ‘上海六月慢’施钙处理和对照组的差异表达基因主要富集在氨基酸的生物合成(biosynthesis of amino acids)、赖氨酸生物合成(lysine biosynthesis)、色氨酸代谢(trypto-phan metabolism)、半胱氨酸和蛋氨酸代谢(cysteine and methionine metabolism)、戊糖磷酸途径(pentose

phosphate pathway)、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成(valine, leucine and isoleucine biosynthesis)、生物素代谢(biotin metabolism)代谢通路。

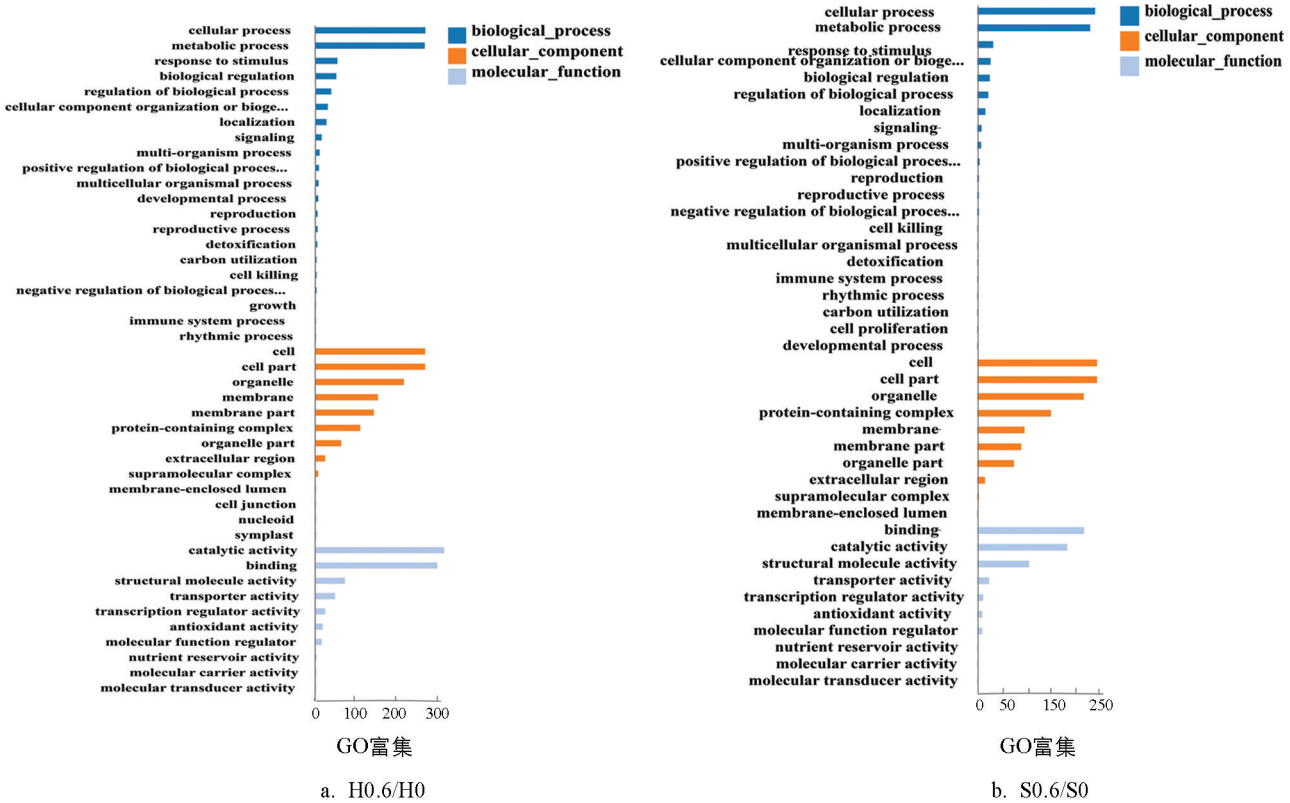


图 4 白菜差异表达基因的 GO 功能富集分析

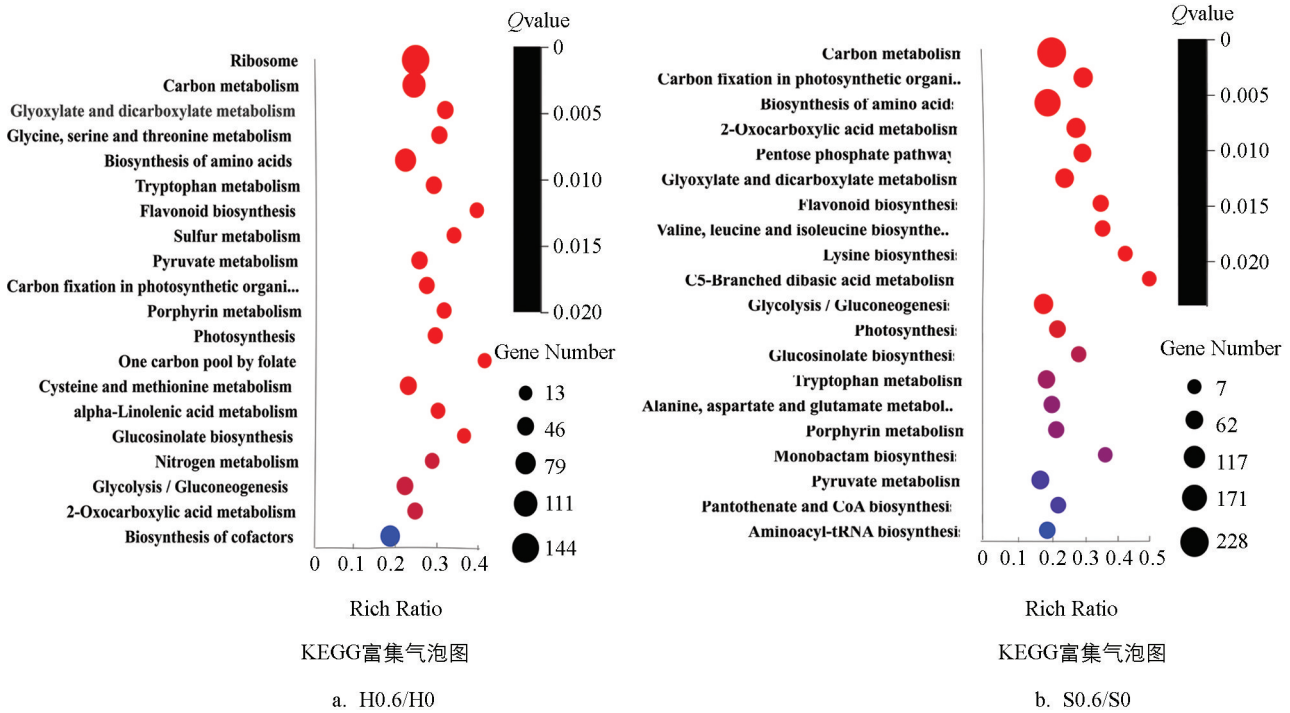
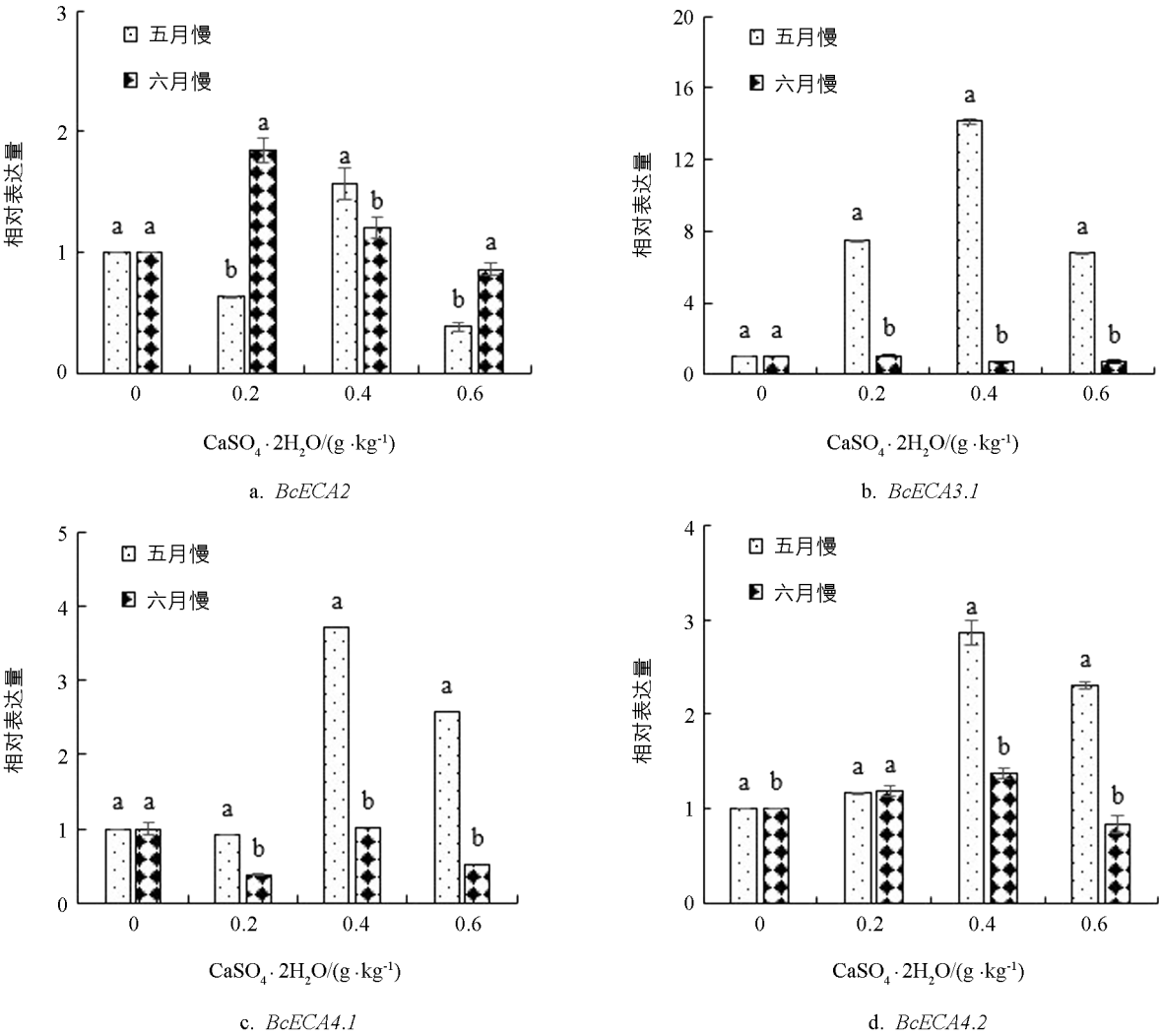


图 5 白菜差异表达基因的 KEGG 功能富集分析

2.6 供钙水平对白菜钙富集关键基因表达的影响

2.6.1 *BcECA* 家族基因

由图 6 可知,‘黑叶五月慢’*BcECA2* 基因仅在 0.4 g/kg 钙水平处理时上调表达,表达量是对照的 1.08 倍;‘上海六月慢’*BcECA2* 基因表达量随着施钙量的增加先上调后下调,在 0.2 g/kg 和 0.4 g/kg 钙水平处理下分别是对照的 1.91 和 1.14 倍.与对照相比,施钙处理后‘黑叶五月慢’*BcECA3.1* 基因均上调表达,表达量随施钙水平的提高先上调后下调;‘上海六月慢’*BcECA3.1* 基因表达量在 0.4 g/kg 和 0.6 g/kg 钙水平处理下均表现为下调.两个品种的 *BcECA4.1* 基因表达量变化趋势一致,均在 0.4 g/kg 钙水平处理下达到最大值.与对照相比,施钙处理后‘黑叶五月慢’*BcECA4.2* 基因表达量均上调,在 0.4 g/kg 和 0.6 g/kg 钙水平处理下较对照提高了 1.93 和 1.35 倍;‘上海六月慢’*BcECA4.2* 基因表达量随着施钙量的增加先上调后下调,在 0.4 g/kg 钙水平处理下达到最大.



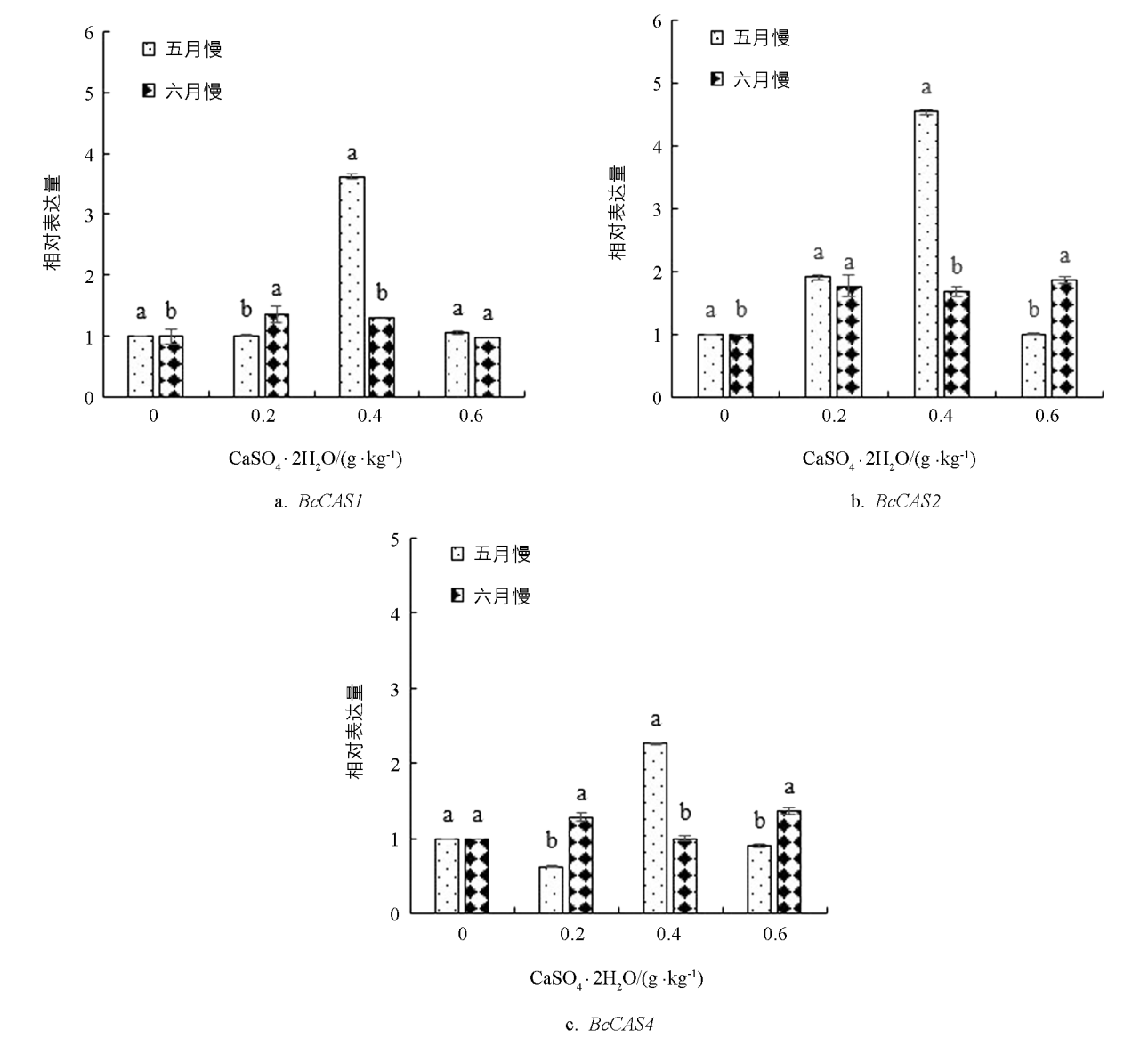
不同小写字母表示不同品种间的差异显著性($p < 0.05$).

图 6 施钙水平对白菜 *ECA* 家族基因表达量的影响

2.6.2 *BcCAS* 家族基因

由图 7 可知,‘黑叶五月慢’和‘上海六月慢’的 *BcCAS1* 基因表达量均随着施钙量的增加先上调后下

调, ‘黑叶五月慢’在 0.4 g/kg 钙水平处理下 *BcCAS1* 基因表达量达到最大值, 较对照提高了 2.76 倍; ‘上海六月慢’在 0.2 g/kg 钙水平处理下达到最大值. ‘黑叶五月慢’的 *BcCAS2* 基因表达量随施钙水平的提高先上调后下调, 在 0.4 g/kg 钙水平处理下达到最大值; 与对照相比, 施钙处理后‘上海六月慢’的 *CAS2* 基因表达量整体上调, 是对照的 1.64~2.09 倍. ‘黑叶五月慢’的 *BcCAS4* 基因表达量在 0.4 g/kg 钙水平处理下较对照提高了 1.32 倍; 与对照相比, ‘上海六月慢’的 *BcCAS4* 基因表达量整体上调, 在 0.6 g/kg 钙水平处理下达到最大值.



不同小写字母表示不同品种间的差异显著性($p<0.05$).

图 7 施钙水平对白菜 CAS 家族基因表达量的影响

2.7 *BcECA* 和 *BcCAS* 家族基因表达与白菜钙质量分数相关性分析

如表 3 所示, Pearson 相关性分析结果表明, 白菜钙质量分数与 *BcECA2*, *BcECA3.1*, *BcECA4.1* 和 *BcECA4.2* 相对表达量均呈正相关关系, 其相关系数分别为 0.737, 0.204, 0.286 和 0.524, 且与 *BcECA2* 的相关性达到显著水平; 钙质量分数与 *BcCAS1*, *BcCAS2* 和 *BcCAS4* 相对表达量也均呈正相关关系, 其相关系数分别为 0.661, 0.489 和 0.184, 但其相关性均未达到显著水平.

表 3 *BcECA* 和 *BcCAS* 家族基因表达与钙质量分数间的相关系数

	钙质量分数	<i>BcECA2</i>	<i>BcECA3.1</i>	<i>BcECA4.1</i>	<i>BcECA4.2</i>	<i>BcCAS1</i>	<i>BcCAS2</i>	<i>BcCAS4</i>
钙质量分数	1							
<i>BcECA2</i>	0.737 [*]	1						
<i>BcECA3.1</i>	0.204	0.015	1					
<i>BcECA4.1</i>	0.286	0.148	0.809 [*]	1				
<i>BcECA4.2</i>	0.524	0.308	0.809 [*]	0.953 ^{**}	1			
<i>BcCAS1</i>	0.661	0.770 [*]	0.584	0.687	0.780 [*]	1		
<i>BcCAS2</i>	0.489	0.609	0.541	0.493	0.592	0.881 ^{**}	1	
<i>BcCAS4</i>	0.184	0.552	0.137	0.349	0.353	0.655	0.732 [*]	1

3 讨论

土壤缺钙或白菜对钙的吸收与利用受阻，会严重影响白菜正常生长和产量形成^[31]。本试验中，施钙显著促进了白菜生长，提高了地上部和根系的生物量。随着施钙水平的提高，‘黑叶五月慢’和‘上海六月慢’地上部和根系的钙质量分数及钙积累量均呈先上升后下降趋势，生物量和钙质量分数基本都在 0.4 或 0.6 g/kg CaSO₄ · 2H₂O 处理时达到最大值。说明适宜浓度或用量的外源钙能够提高白菜的产量和钙质量分数，但浓度或用量过大反而对白菜生长和钙吸收不利^[11]。

转录组分析发现‘黑叶五月慢’和‘上海六月慢’中分别有 3018 和 2224 个差异表达基因，说明钙对两个白菜品种的基因表达影响不同。在 GO 分析中，两个白菜品种对照和施钙处理的差异表达基因主要富集在细胞组分这一类别中，因为植物中绝大部分钙是细胞壁的果胶质结构成分，与果胶酸形成果胶酸钙被固定于相邻 2 个细胞壁之间。通过 GO 功能分析发现，差异表达基因主要富集在催化活性、联结、结构分子活动和转运活动，表明钙在白菜生长发育的多个代谢途径中均发挥着重要作用。该结果与张圣美等^[32]报道一致。对两个白菜品种的对照和施钙处理进行 KEGG 分析发现，差异表达基因富集在了转运和分解代谢通路中，表明外源施用钙肥后，为了调节植物体内外钙离子的平衡，相关转运基因开始表达。钙离子可与含 EF 手性单元结构的钙离子感受蛋白结合，调节下游靶蛋白活性，起到重要的信使作用^[33]。本研究结果显示，差异表达基因富集在信号转导通路中，这说明施钙后白菜能够迅速响应外界钙离子浓度的变化。‘黑叶五月慢’和‘上海六月慢’的对照和施钙处理的差异表达基因富集在氨基酸的生物合成、氨基酸代谢、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、氮代谢和 α-亚麻酸代谢等通路中。檀龙颜等^[34]指出，钙胁迫下越南槐萌发种子中谷氨酰胺合成酶基因表达上调，证明了越南槐种子通过调控氨基酸代谢适应高钙环境。而丝氨酸可以作为胁迫条件下次生代谢物合成的前体^[35]。这与本试验的研究结果一致。

环境缺钙和钙离子(Ca²⁺)运输、利用效率低是造成植物缺钙的 2 个主要原因^[31]。王照^[36]研究指出，*ECA* 基因家族参与调控植物对 Ca²⁺ 的吸收转运过程，同时，*RrECA2* 在刺梨根系中的表达与钙吸收速率呈正相关，*RrECA1* 在叶片中的表达与钙吸收速率呈正相关，对刺梨吸收 Ca²⁺ 具有重要意义。在本研究中，施用钙肥后，两个白菜品种的 *BcECA* 家族基因上调表达，*BcECA2* 表达量在两个品种中均显著上调，在 0.4 g/kg 的钙处理下，*BcECA3.1*，*BcECA4.1* 和 *BcECA4.2* 表达量在‘黑叶五月慢’品种中显著上调。*CAS* 在拟南芥基因组中是一个单拷贝基因，它编码了一个由 387 个氨基酸组成的蛋白质，分子量为 41 268 Da。实验表明 *BcCAS* 的氨基端是一个对 Ca²⁺ 低亲和但高结合的区域，每个 *BcCAS* 的氨基端能结合 10~12 个 Ca²⁺，定位于叶绿体的类囊体膜上调节 Ca²⁺ 水平^[37-39]。本试验中，施用钙肥提高了‘黑叶五月慢’和‘上海六月慢’植株中 *BcCAS* 家族基因的表达量，且 *BcCAS1* 和 *BcCAS2* 表达量在‘黑叶五月慢’品种中显著上调。Weinl 等^[39]报道了 *CAS* 受抑制的拟南芥在低钙时也能抽薹，但时间比野生

型晚,说明 CAS 在植物生长发育中起着重要的作用,同时其 Ca^{2+} 浓度比野生型高了 40%,也暗示了植物可能借助 CAS 来调节 Ca^{2+} 水平.

4 结论

施钙可以显著提高‘黑叶五月慢’和‘上海六月慢’地上部和根系生物量,‘黑叶五月慢’和‘上海六月慢’生物量分别在 0.6 g/kg 和 0.4 g/kg $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 处理时最佳.随着施钙水平的增加,两个白菜品种地上部和地下部的钙质量分数整体上表现为先增后减趋势,在 0.6 g/kg $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 处理下达到最大值.转录组分析发现,两个白菜品种的对照和施钙处理的差异表达基因主要富集在细胞组分这一类别中,富集的代谢通路包括转运和分解代谢通路、信号转导通路、氨基酸的生物合成、氨基酸代谢和氮代谢等通路中.施钙处理后,‘黑叶五月慢’和‘上海六月慢’的 *BcECA* 和 *BcCAS* 家族基因表达量上调. Pearson 相关性分析结果表明,不同钙水平处理下白菜 *BcECA* 和 *BcCAS* 家族基因表达量与钙质量分数之间具有正相关关系.

参考文献:

- [1] 陈德伟,汤寓涵,石文波,等. 钙调控植物生长发育的进展分析 [J]. 分子植物育种, 2019, 17(11): 3593-3601.
- [2] BUTS K, HERTOOG M, HO Q T, et al. Influence of Pre-Harvest Calcium, Potassium and Triazole Application on the Proteome of Apple at Harvest [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2016, 96(15): 4984-4993.
- [3] 王莉莉. 不同基因型大白菜对外源钙水平的生理响应 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2018.
- [4] 丁富功,陈会丽,卢奕霏,等. 不同施钙量对温室番茄光合特性和产量及脐腐病发生率的影响 [J]. 东北农业科学, 2023, 48(4): 73-77, 132.
- [5] 陈兴强. 不同钙肥对几种蔬菜幼苗质量的影响 [D]. 广州: 华南农业大学, 2018.
- [6] 林琳琳. 外源钙对花椰菜铜胁迫的缓解作用 [D]. 福州: 福建农林大学, 2015.
- [7] 谢文文. 芸薹属主要蔬菜作物富硒比较研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2016.
- [8] 孙娇娇. 蔬菜幼苗根系发育及钙调节作用 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2019.
- [9] 张蒙,张怀方,黄晋霞,等. 氮、钾、钙不同配比对木薯生长发育及块根品质的影响 [J]. 中国土壤与肥料, 2023(6): 175-185.
- [10] 吴一群,林琼,陈子聪,等. 钙水平对无限生长型番茄钙吸收利用及果实品质和产量的影响 [J]. 水土保持学报, 2019, 33(5): 185-189.
- [11] 袁伟玲,陈磊夫,刘志雄,等. 外源钙对小白菜酶活性、钙含量及其产量和品质的影响 [J]. 中国土壤与肥料, 2020(6): 254-261.
- [12] MOORE C A, BOWEN H C, SCRASE-FIELD S, et al. The Deposition of Suberin Lamellae Determines the Magnitude of Cytosolic Ca^{2+} Elevations in Root Endodermal Cells Subjected to Cooling [J]. The Plant Journal, 2002, 30(4): 457-465.
- [13] WHITE P J. The Pathways of Calcium Movement to the Xylem [J]. Journal of Experimental Botany, 2001, 52(358): 891-899.
- [14] CHOLEWA E, PETERSON C A. Evidence for Symplastic Involvement in the Radial Movement of Calcium in Onion Roots [J]. Plant Physiology, 2004, 134(4): 1793-1802.
- [15] 杨洪强,接玉玲. 植物钙素吸收和运转(英文) [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2005(3): 227-234.
- [16] 井大炜,邢尚军,马丙尧,等. 土壤与植物中钙营养研究进展 [J]. 生物灾害科学, 2012, 35(4): 447-451.
- [17] GILLIHAM M, DAYOD M, HOCKING B J, et al. Calcium Delivery and Storage in Plant Leaves: Exploring the Link with Water Flow [J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(7): 2233-2250.
- [18] BROADLEY M R, BOWEN H C, COTTERILL H L, et al. Variation in the Shoot Calcium Content of Angiosperms [J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 54(386): 1431-1446.

- [19] PARK S, CHENG N H, PITTMAN J K, et al. Increased Calcium Levels and Prolonged Shelf Life in Tomatoes Expressing Arabidopsis H^+/Ca^{2+} Transporters [J]. Plant Physiology, 2005, 139(3): 1194-1206.
- [20] GARCÍABOSSI J, KUMAR K, BARBERINI M L, et al. The Role of P-Type IIA and P-Type IIB Ca^{2+} -ATPases in Plant Development and Growth [J]. Journal of Experimental Botany, 2020, 71(4): 1239-1248.
- [21] SZE H, LIANG F, HWANG I, et al. Diversity and Regulation of Plant Ca^{2+} Pumps: Insights from Expression in Yeast [J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 2000, 51: 433-462.
- [22] BAXTER I, TCHIEU J, SUSSMAN M R, et al. Genomic Comparison of P-Type ATPase Ion Pumps in Arabidopsis and Rice [J]. Plant Physiology, 2003, 132(2): 618-628.
- [23] PEI Y Z, LILLY M J, OWEN D J, et al. Efficient Syntheses of Benzothiazepines as Antagonists for the Mitochondrial Sodium-Calcium Exchanger: Potential Therapeutics for Type II Diabetes [J]. The Journal of Organic Chemistry, 2003, 68(1): 92-103.
- [24] 赵晓刚. 水稻胞外钙感受器基因 CAS 的克隆及功能研究 [D]. 北京: 首都师范大学, 2004.
- [25] HAN S C, TANG R H, ANDERSON L K, et al. A Cell Surface Receptor Mediates Extracellular Ca^{2+} Sensing in Guard Cells [J]. Nature, 2003, 425(6954): 196-200.
- [26] 杨剑虹, 王成林, 代亨林. 土壤农化分析与环境监测 [M]. 北京: 中国大地出版社, 2008.
- [27] 刘双, 吴安楠, 李海波, 等. 油用牡丹植株年生长周期对微量元素吸收和积累规律的研究 [J]. 沈阳农业大学学报, 2020, 51(3): 355-363.
- [28] 王春晓, 郑祖林, 凌飞, 等. 不同花生品种氮素利用特征相关指标研究 [J]. 核农学报, 2019, 33(12): 2421-2429.
- [29] WU J W, LIN Z T, CHEN G H, et al. Characterization of Chicken Skin Yellowness and Exploration of Genes Involved in Skin Yellowness Deposition in Chicken [J]. Frontiers in Physiology, 2021, 12: 585089.
- [30] 周琪. GA3 处理对葡萄果实水分及发育的调控机理研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2021.
- [31] 陈瑞祥, 袁敬平, 李鑫, 等. 大白菜 BrCML5 基因的生物信息学、蛋白互作及在低钙胁迫下的功能分析 [J]. 植物生理学报, 2023, 59(9): 1760-1770.
- [32] 张圣美, 裘波音, 徐谦等. 外源钙离子对高温胁迫下草莓幼苗影响的转录组分析 [J/OL]. 分子植物育种: 1-11 [2023-12-04]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210810.1133.008.html>.
- [33] 曾后清, 王国平, 王慧中, 等. 植物钙调素结合转录因子 CAMTA/SR 功能的研究进展 [J]. 植物生理学报, 2015, 51(5): 633-641.
- [34] 檀龙颜, 黄丽容, 马洪娜等. 越南槐 (*Sophora tonkinensis*) 种子萌发响应钙离子胁迫的转录组分析 [J/OL]. 分子植物育种: 1-14 [2023-12-04]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220517.1428.022.html>.
- [35] BATISTA-SILVA W, HEINEMANN B, RUGEN N, et al. The Role of Amino Acid Metabolism during Abiotic Stress Release [J]. Plant, Cell, Environment, 2019, 42(5): 1630-1644.
- [36] 王照. 参与刺梨钙吸收相关基因的鉴定与表达特征 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2022.
- [37] NOMURA H, KOMORI T, KOBORI M, et al. Evidence for Chloroplast Control of External Ca^{2+} -Induced Cytosolic Ca^{2+} Transients and Stomatal Closure [J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2008, 53(6): 988-998.
- [38] VAINONEN J P, SAKURAGI Y, STAEL S, et al. Light Regulation of CaS, a Novel Phosphoprotein in the Thylakoid Membrane of *Arabidopsis thaliana* [J]. The FEBS Journal, 2008, 275(8): 1767-1777.
- [39] WEINL S, HELD K, SCHLÜCKING K, et al. A Plastid Protein Crucial for Ca^{2+} -Regulated Stomatal Responses [J]. New Phytologist, 2008, 179(3): 675-686.

责任编辑 孙文静

崔玉洁