陈金绘,姚艳丽,王文波,等.菠萝*AcCAX1*克隆及表达分析[J].山西农业大学学报(自然科学版),2025,45(1):52-60.
Chen J H, Yao Y L, Wang W B, et al.Identification and expression analysis of pineapple *AcCAX1*[J].Journal of Shanxi Agricultural University(Natural Science Edition), 2025,45(1):52-60.
doi: 10.13842/j.cnki.issn1671-8151.202406027

菠萝*AcCAX1*克隆及表达分析

陈金绘[1,2],姚艳丽[2],王文波[2],谭丹[2],吴青松[2],贺军军[2],朱祝英[2],付琼[2],徐娟[1],
李川玲[2*],张秀梅[2*]

(1.华中农业大学 园艺林学学院,湖北 武汉 430070;2.中国热带农业科学院 南亚热带作物研究所/
农业农村部热带果树生物学重点实验室/海南省热带园艺产品采后生理与保鲜重点实验室,广东 湛江 524091)

摘　要:[目的]克隆鉴定菠萝Ca^{2+}/H^{+}反向转运蛋白AcCAX1,并对其全长序列和表达谱进行分析,可为该蛋白的功能研究奠定基础。[方法]利用PCR扩增和基因克隆技术获得*AcCAX1*的cDNA全长序列;通过生物信息学方法对该基因编码的氨基酸序列进行结构预测、序列比对和进化树分析;最后结合实时荧光定量PCR技术检测*AcCAX1*对不同离子、不同温度胁迫以及不同植物激素的响应。[结果]该基因开放阅读框为1428 bp,编码1个由475个氨基酸组成、相对分子质量50 801.11 Da、理论等电点为6.24的稳定疏水蛋白。序列分析表明,AcCAX1氨基酸序列中包含11个典型的跨膜结构域,组成了2个保守的Ca^{2+}/H^{+}反向转运蛋白结构域。CAX1蛋白二级结构中α螺旋占比最大为58.74%,其次是无规则卷曲、延伸链和β—折叠,占比分别为21.68%、14.95%和4.63%。实时荧光定量PCR分析表明,*AcCAX1*的转录水平可以受外源$CaCl_2$和NaCl诱导升高,受$MnCl_2$处理降低。*AcCAX1*在菠萝老叶和茎中转录水平较高,在果实和花蕾中较低。烟草亚细胞定位结果显示,AcCAX1在细胞膜、细胞质以及细胞核中均存在表达。此外,*AcCAX1*启动子区域包含大量非生物胁迫响应元件,并且*AcCAX1*转录水平受4 ℃低温和37 ℃高温胁迫显著抑制。[结论]AcCAX1作为菠萝中Ca^{2+}/H^{+}反向转运蛋白,可能在菠萝非生物胁迫响应中发挥重要作用。

关键词:菠萝; *AcCAX1*; Ca^{2+}/H^{+}反向转运蛋白; 基因表达; 胁迫响应
中图分类号:S668.3　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1671-8151(2025)01-0052-09

Identification and expression analysis of pineapple *AcCAX1*

Chen Jinhui[1,2], Yao Yanli[2], Wang Wenbo[2], Tan Dan[2], Wu Qingsong[2], He Junjun[2], Zhu Zhuying[2], Fu Qiong[2], Xu Juan[1], Li Chuanling[2*], Zhang Xiumei[2*]

(*1.School of Horticulture and Forestry, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2.South Subtropical Crops Research Institute/Key laboratory of tropical fruit biology, ministry of agriculture and rural affairs/Key Laboratory of Hainan Province for Postharvest Physiology and Technology of Tropical Horticultural Products, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang 524091, China*)

Abstract: [Objective] This study aimed to clone and identify the Ca^{2+}/H^{+} antiport protein AcCAX1 in pineapple, analyze its full-length sequence and expression profile, and establish a foundation for functional studies of this gene. [Methods] The *AcCAX1* sequence was obtained through PCR amplification techniques, and its protein structure, sequence alignment, and phylogenetic relationships were analyzed using bioinformatics tools. Real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) was employed to assess the response of *AcCAX1* to different ion, temperature stress, and plant hormones. [Results] *AcCAX1* has an open

收稿日期:2024-06-15　　**修回日期**:2024-07-30
基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(1630062024007);海南省自然科学基金(324MS101)
作者简介:陈金绘(ORCID:0009-0006-3215-7215),硕士,研究方向:菠萝栽培技术
* **通信作者**:张秀梅(ORCID:0000-0002-3061-9280),博士,研究员,研究方向:热带水果品质机理,E-mail:asiazhang1975@163.com;
李川玲(ORCID:0009-0002-4729-204X),博士,助理研究员,研究方向:热带水果品质调控机制,E-mail:chuanlingzz@163.com

reading frame of 1428 base pairs and encodes a stable hydrophobic protein consisting of 514 amino acids with a relative molecular mass of 50 801.11 Da and a theoretical isoelectric point of 6.24. Sequence analysis revealed that the amino acid sequence of AcCAX1 contained 11 typical trans-membrane domains, including two Ca^{2+}/H^{+} antiporter domains. Secondary structure predications revealed that the α-helix constituted the largest proportion of the CAX1 protein structure at 58.74%, followed by irregular coils (21.68%), elongation chains (14.95%), and β-sheets (4.63%). Real-time qPCR analysis showed that the transcript level of *AcCAX1* was upregulated by exogenous $CaCl_2$ and NaCl treatments, while $MnCl_2$ treatment led to a decrease in transcript levels. Spatial expression analysis revealed that *AcCAX1* exhibited higher expression levels in older leaves and stems but lower levels in fruits and flower buds. Subcellular localization in tobacco showed that AcCAX1 was expressed in the cell membrane, cytoplasm, and nucleus. In addition, the promoter region of *AcCAX1* contained a large number of abiotic stress response elements. The transcript level of *AcCAX1* was significantly down-regulated under both cold and heat stress conditions. [Conclusion]The Ca^{2+}/H^{+} antiport protein AcCAX1 in pineapple likely plays a significant role in the plant's response to abiotic stresses.

Keywords: Pineapple, *AcCAX1*, Ca^{2+}/H^{+} antiporter, Gene expression, Stress response

钙(Ca^{2+})在植物生长发育过程中扮演重要角色,Ca^{2+}不仅是植物的必需营养元素,而且是细胞信号转导中重要的第二信使[1-2]。通常,植物细胞外的Ca^{2+}浓度比游离在细胞质的Ca^{2+}浓度高出上万倍。这种巨大的浓度梯度可以促使特定条件下细胞质Ca^{2+}浓度迅速增加,从而作为植物用来响应环境变化的关键信号机制[3]。然而,细胞质长时间存在过量的Ca^{2+}对植物细胞具有毒性,并且抑制生长。因此,细胞内的钙信号通常都具有"瞬时性",即需要及时地清除细胞质中过量的Ca^{2+}以降低其毒性并重置钙稳态[4-5]。其中CAXs(Ca^{2+}/H^{+} antipoter)是植物体内主要定位于液泡膜上的一种Ca^{2+}/H^{+}反向转运蛋白,负责Ca^{2+}由胞质向液泡的运输,对于细胞内Ca^{2+}的及时清除及细胞内Ca^{2+}稳态维持至关重要[6]。

Ca^{2+}/H^{+}反向转运蛋白(CAX)是依赖于H^{+}-ATPase或H^{+}-PPase产生的跨膜质子梯度动力势来协调运输并且再分配Ca^{2+}等阳离子的转运体,主要定位于液泡膜上,负责将细胞质中的Ca^{2+}转运至液泡,对于细胞内钙离子的稳态至关重要[7]。CAXs根据其氨基酸序列同源性可以分为I、II、III这3个亚型,I型主要存在于植物、真菌和细菌中,II型主要存在于真菌和低等脊椎动物中,III型主要存在于大肠杆菌等细菌中。此外,植物中I型的CAX又进一步可以分为IA型和IB型,其中IA型CAX蛋白专门负责Ca^{2+}转运,IB型蛋白除了可以转运Ca^{2+}外,还参与Cd^{2+}、Zn^{2+}和Mn^{2+}等其它阳离子的转运[8-9]。CAX蛋白具有11个保守的跨膜结构域,分别被命名为MR和MR1-10,其N末端位于胞质中,C末端位于液泡中,并且其N末端的亲水性区域可以与激酶等信号蛋白相互作用调节CAX的功能[10-11]。例如近期栾升团队研究发现,定位于液泡膜的钙感受器蛋白CBL2/3以及相互作用的蛋白激酶CIPK3/9/26形成的复合体,可以通过磷酸化CAX1/3自抑制结构域中保守的丝氨酸簇(SSSSLRKKS)激活CAX1/3,从而降低细胞质中的钙对植物潜在的毒害[5]。

CAXs是植物组织中Ca^{2+}积累的驱动因素,对于植物体中钙离子的积累和运输至关重要。植物体内CAXs蛋白的异常表达,会导致植物体内钙离子分布异常进而诱发植物的多种疾病。例如,拟南芥中*AtCAX1*的突变可以有效降低液泡中Ca^{2+}含量,增强植物对低温和缺氧胁迫的耐受性[12-14]。将拟南芥中*AtCAX1*过表达至番茄中,会导致番茄果肉细胞中细胞膜的离子泄露率明显增加,质外体以及胞质中Ca^{2+}含量降低,液泡中Ca^{2+}含量升高,导致细胞渗透压异常并出现质壁分离现象,最终引起细胞破裂死亡,诱发番茄脐腐病[15-17]。目前,CAXs蛋白在拟南芥、水稻、苹果、葡萄、草莓以及番茄等多种物种中均进行了相关报道,而在菠萝中CAXs蛋白的功能还未进行详细的研究[12,14,17-21]。

菠萝(*Ananas comosus* (L.) Merr.)是凤梨科凤梨属多年生单子叶草本果树,原产南美洲,是全球第3大热带水果。菠萝在我国种植历史悠久,种植面积及产量分别居世界第4和第6,是特色高效的热带经济作物,也是热作区农民重要的经济来源[22]。近年来随着温室效应的不断积累,全球温度异常,菠萝生理性病害频发,品质和产量不稳定,严重影响了产业效益,制约了菠萝产业高质量

发展[23-24]。研究发现,AcCAX1作为菠萝中的Ca^{2+}/H^{+}反向转运蛋白,可能在菠萝对温度胁迫的响应过程中发挥重要功能。因此,进行菠萝*AcCAX1*的克隆与表达分析,进一步揭示AcCAX1在菠萝中的功能,对于菠萝抵抗非生物胁迫侵扰至关重要。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究选用菠萝主栽品种'巴厘'为试验材料,2023年5月采自中国热带农业科学院南亚热带作物研究所菠萝试验基地(21.16° N,110.27° E)。

1.2 菠萝不同组织部位RNA提取和cDNA合成

本试验中所有RNA的提取均使用华越洋快速通用植物RNA提取试剂盒,用超微量分光光度计测定RNA含量及OD_{260}/OD_{280}比值,取少量RNA加入DNA Loading Buffer后进行1%琼脂糖凝胶电泳,检测RNA质量。以提取的总RNA为模板,使用一步法gDNA去除及cDNA合成试剂盒(全式金)去除残留的DNA,并合成cDNA第一条链,分别得到不同组织部位的cDNA。

1.3 菠萝*AcCAX1*基因cDNA的克隆

参考菠萝基因组数据库(http://pineapple.zhangjisenlab.cn/pineapple/html/index.html)中*AcCAX1*序列,运用Primer 6.0设计克隆引物(详见表1),送往广州市安升达生物科技有限公司合成。以反转录得到的不同组织cDNA为模板进行PCR扩增。PCR扩增体系(100.0 μL):cDNA 2.0 μL,ddH_2O 44.2 μL,dNTP Mix 2 μL,2×phanta Mix Buffer 50 μL,上、下游引物各0.4 μL,phanta Mix Super-Fidelity 1 μL。PCR扩增程序:95 ℃预变性5 min,95 ℃变性15 s,60 ℃退火15 s,72 ℃延伸1 min 30 s,共40个循环,72 ℃终延伸5 min,4 ℃结束反应并保存。

PCR反应完成后,可将获得的目标带进行电泳分离,采用快速凝胶回收试剂盒(诺唯赞)对符合大小要求的产物片段进行回收。随后将回收产物连接至*pEASY-T5 zero*载体后,进行DH5α感受态细胞的转化,转化后的细胞涂在含卡那霉素的固体培养基上,倒置培养1~2 d后挑取单克隆,经过PCR验证阳性克隆后,正确的条带可送至广州市安升达生物科技有限公司进行测序。

1.4 菠萝*AcCAX1*基因序列分析及系统进化树构建

使用NCBI数据库Blast工具获得AcCAX1在其它物种中的同源氨基酸序列,用DNAMAN软件对氨基酸序列进行多重比对分析,使用MEGA11软件采用临近法(Neighbor joining,NJ),设置Bootstrap为1000,构建AcCAX1与其它物种中同源序列系统进化树。

1.5 菠萝*AcCAX1*基因的生物信息学

使用ExPASy在线服务器上的ProtParam ProtScale在线工具(https://web.expasy.org/protparam/、https://web.expasy.org/protscale/)对蛋白质的各种理化性质、亲疏水性进行分析;利用Prab在线平台(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)预测蛋白质的二级结构;利用SWISS-MODEL在线平台预测AcCAX1蛋白的三级结构。

1.6 菠萝*AcCAX1*基因实时荧光定量RT-PCR检测

用2个温度4 ℃、37 ℃和4种激素脱落酸(ABA)、水杨酸(SA)、赤霉素(GA)、茉莉酸(JA)处理菠萝愈伤组织,并将样品进行RNA提取和cDNA反转录,以反转录的cDNA为模板进行荧光定量PCR,根据本试验克隆测序所得的*AcCAX1*基因序列设计荧光定量PCR引物(见表1),以菠萝*Actin*作为内参(引物详见表1),分析菠萝不同组织中*AcCAX1*的相对表达量。PCR反应体系(25.0 μL):cDNA模板1.0 μL,2×PCR SuperMix 10 μL,上、下游引物(10 mmol/L)各0.5 μL,加高压灭菌水补足体积至25.0 μL。反应程序:94 ℃预变性30 s;94 ℃变性5 s,60 ℃退火15 s,72 ℃延伸10 s,共45个循环,每个样品设置3个重复。利用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算分析基因在不同组织的相对表达量。用SPSS和GraphPad Prism软件分析差异显著性。

1.7 AcCAX1的亚细胞定位分析

使用无缝克隆试剂盒(Vazyme)构建pCAMBIA2300-CAX1-GFP融合表达载体。以pCAMBIA2300-GFP空载体作为阴性对照,冻融法转化农杆菌GV3101。将鉴定正确的农杆菌注射至烟草叶片,在烟草叶片中瞬时表达,观察AcCAX1亚细胞定位。具体步骤如下:选择阳性单克隆农杆菌株,在LB中扩大培养2次,保持菌液活力;

4000 r/min离心3 min,收集菌体,使用MNA重悬液(10 mmol/L $MgCl_2$、10 mmol/L MES和100 μmmol/L AS)重悬菌体2次,调整菌液浓度至OD_{600}=0.6;从苗室中,选取生长状态良好的烟草叶片,进行菌液的注射。用去掉针头的注射器,将农杆菌缓慢的推入烟草叶片的下表皮,并做好标记。将侵染后的植株置于培养室中培养48 h;培养2 d后,取下侵染后的叶片,在激光共聚焦显微镜下观察荧光信号,并拍照记录。

1.8　引物设计

本研究所用引物见表1。

表1　基因克隆和定量所用到的引物

Table.1　Primers used for gene cloning and quantification

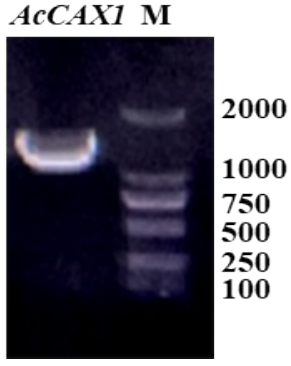
引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	用途 Usage
AcCAX1−qF	TCTTCCTGGGGACTAAGCT	荧光定量PCR引物
AcCAX1−qR	TGACACGCTCAGCAAGTG	荧光定量PCR引物
AcCAX1−F	ATGGCTTCGGCGGCGCAT	基因扩增引物
AcCAX1−R	GGCATCCAGAACCATCGATCT	基因扩增引物
AcActin−F	CTGGCCTACGTGGCACTTGACTT	荧光定量内参引物
AcActin−R	CACTTCTGGGCAGCGGAACCTTT	荧光定量内参引物

2　结果与分析

2.1　菠萝*AcCAX1*基因克隆及生物信息学分析

以'巴厘'菠萝果肉组织为材料,提取总RNA,反转录获得cDNA模板,利用基因特异性引物*AcCAX1−F*和*AcCAX1−R*经PCR扩增获得*AcCAX1*序列,用1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物,于1500 bp处获得1条明显的特异性条带,与预期结果一致(图1)。目的片段经纯化回收后与*pEASY−T5 zero*载体连接,转化DH5α感受态细胞,选取阳性克隆菌液测序,获得全长为1428 bp的*AcCAX1* cDNA序列。

对筛选获得的*AcCAX1*序列通过NCBI网站的Blast程序进行同源检索,匹配到位于菠萝第23条染色体上的液泡定位的阳离子/质子交换器,基因ID为*LOC109727776*,相似度100%,基因编码区全长1428 bp,共编码475个氨基酸残基,将其命名为*AcCAX1*(图2A),其编码氨基酸序列如图2B。利用在线网址(SIB Swiss Institute of Bioinformatics|Expasy)对AcCAX1氨基酸序列进行理化性质分析,发现AcCAX1相对分子重量为50 801.11 Da,理论等电点6.24(图2A)。比较*AcCAX1* mRNA与其基因组DNA全长后发现,*AcCAX1*含有11个外显子(Exon)和10个内含子(Intron),各个外显子的长度和位置如图2C所示。此外,本研究还分析了*AcCAX1*启动子上游2 kb启动子中的顺式作用元件,发现*AcCAX1*启动子中存在大量非生物胁迫如低温、光胁迫以及植物激素如ABA、SA以及GA等的响应元件,且多个元件重复出现,表明AcCAX1在菠萝非生物胁迫响应和抗性调控方面可能发挥重要功能(图2D)。



M:DNA分子量标准

M:DNA Marker

图1　菠萝*AcCAX1*扩增结果

Fig.1　Cloning of *AcCAX1* gene from *A.comosus*

2.2　AcCAX1蛋白特性及空间结构分析

通过分析其它物种已发表的CAXs相关文献得知,CAX1为定位于液泡膜上的Ca^{2+}/H^+反向转运蛋白,具有保守的跨膜结构域[17,25]。为了进一步分析菠萝中AcCAX1蛋白的理化特性,本研究利用SOPMA和SMART软件在线分析了AcCAX1蛋白结构及其编码蛋白的功能结构域。结果显示,CAX1蛋白二级结构中α-螺旋占比最大为

A

菠萝*AcCAX1*基因特征

Characteristics of pineapple *AcCAX1* gene

名称 Name	基因号 Gene ID	染色体位置 Chromosome location	CDS长度 CDS length	蛋白大小 Ptotein length	分子量/Da Molecular weight	等电点 pI
AcCAX1	*LOC109727776*	*LG23591236487*7	1428	475	50 801.11	6.24

B

```
        10         20         30         40         50         60
MASAAHEAAR SLEAGNHIHQ LKAGNGGGGV GLSKEEMRHG HGHGHGHGHG RTAHNMSSSS

        70         80         90        100        110        120
LRKKSDLSLV SKVRWGLLRS FLTNLQEIFL GTKLFVLFPA VPLAIFAHYF HFGRAWLFVL

       130        140        150        160        170        180
SLLGLTPLAE RVSFLTEQIA YYTGPTVGGL LNATCGNATE MIIAMFALHQ GKIDVVKCSL

       190        200        210        220        230        240
VGSILSNLLL VLGSSLLCGG LANLGKEQLY DRKQADVNTG LLLLGALCHL LPLLFRYALN

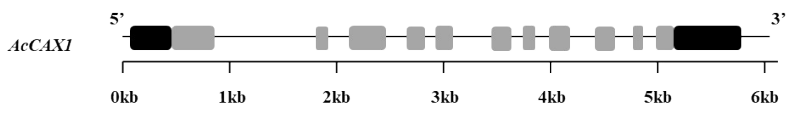
       250        260        270        280        290        300
SGEHVGATVP TLELSRACSI VMLLAYAAYL FFQLKTHRQL FESQEGDDDN DDVISEDEAV

       310        320        330        340        350        360
IGFPSALAWL AGMTVVIAVL SEYVVGTIEA ASESWGISVS FISIILLPIV GNAAEHAGAI

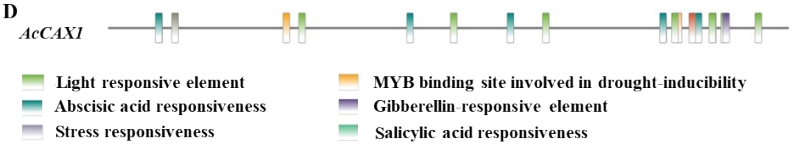
       370        380        390        400        410        420
IFAFKNKLDI TLGVSLGSAT QISMFVVPLS VTVAWIMGIQ MDLDFKLLET GSLILAILVT

       430        440        450        460        470
AFSLQDGTSH YLKGLNLLLC YIAIGACFFV LKTPSHQAND INLGVSTARS MVLDA
```

C



D



A:*AcCAX1*理化性质分析;B:AcCAX1全长及其编码氨基酸序列;C:*AcCAX1*结构图;D:*AcCAX1*启动子区顺式作用元件分析

A: Analysis of physicochemical properties of *AcCAX1*; B: Full-length sequence of cDNA and its coded amino acid for AcCAX1; C: Structure of *AcCAX1*; D: Cis-element analysis of the *AcCAX1* genes promoter regions in *A. comosus*

图2 菠萝中AcCAX1蛋白特征

Fig.2 Characterization of the AcCAX1 proteins in *A.comosus*

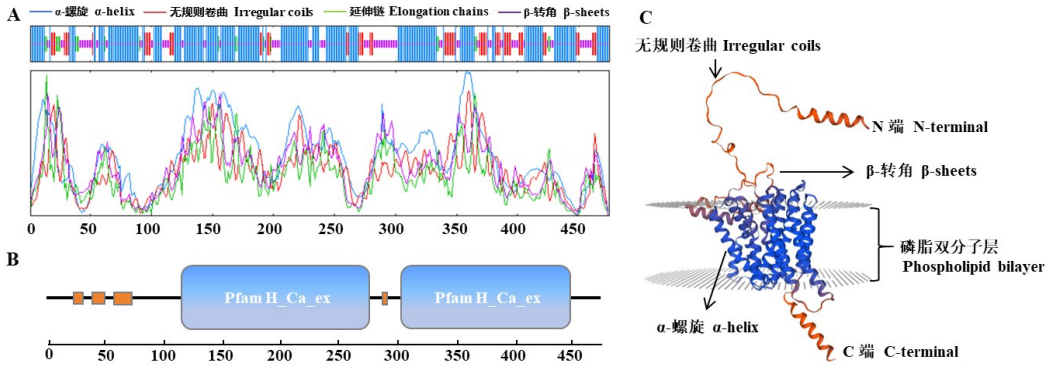
58.74%,其次是无规则卷曲、延伸链和β-转角,占比分别为21.68%、14.95%和4.63%,且AcCAX1蛋白具有2个保守的Ca^{2+}/H^{+}反向转运蛋白结构域(图3A、图3B)。为进一步了解AcCAX1蛋白结构域结构特征,本研究利用SWISS-MODEL在线平台,进行AcCAX1蛋白三维模型预测。结果显示,AcCAX1蛋白三维模型与典型的CAXs蛋白模型高度相似,均具有由11个跨膜α-螺旋和无规则卷曲组成的Ca^{2+}/H^{+}反向转运蛋白结构域,与AcCAX1蛋白二级结构预测结果高度一致(图3C)。

2.3 AcCAX1蛋白的系统发育分析

为了确定AcCAX1蛋白在植物中的进化地位,本研究将AcCAX1蛋白序列于NCBI数据库进行比对分析,选取了25个与AcCAX1蛋白同源性较高的其它植物的氨基酸序列,用MEGA4.1通过NJ法构建了系统发育树(图4)。结果显示,菠萝中的AcCAX1与海枣(XP_008793971.2)、油棕(XP_029121729.1)和椰子(KAG1363236.1)中CAX蛋白亲缘关系较近,与复叶槭(KAI9154082.1)、尖叶紫柳(KAJ6746953.1)以及木薯(XP_021624120.1)亲缘关系较远。

2.4 AcCAX1蛋白的多序列比对

本研究将AcCAX1的蛋白序列与拟南芥AtCAXs家族中6个成员的蛋白序列进行多序列比对分析,结果显示,AcCAX1的蛋白序列与AtCAXs家族蛋白序列高度相似,均具有保守的11个跨膜结构域(MR和M1-M10)。与拟南芥中AtCAX1/3一致,AcCAX1蛋白序列N端同样存在保



A:菠萝 AcCAX1 蛋白的二级结构预测;B:菠萝 AcCAX1 氨基酸保守域分析;C:菠萝 AcCAX1 蛋白的三级结构预测

A: Secondary structure analysis of AcCAX1 from *A. comosus*; B: Analysis of the conserved domains of AcCAX1 protein from *A. comosus*; C: Three-dimensional structure prediction of AcCAX1

图 3　AcCAX1 蛋白特性及三维结构预测

Fig.3　AcCAX1 protein characterization and three-dimensional structure prediction

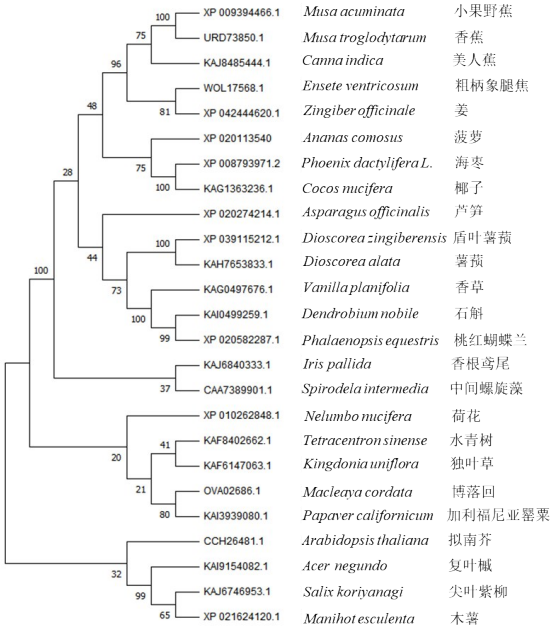


图 4　AcCAX1 与其它物种 CAX1 蛋白系统进化分析

Fig.4　Phylogenetic analysis of AcCAX1 and CAX1 proteins of other species

守的自抑制结构域,推测其可能具有相似的结构和功能(图 5)。

2.5　菠萝不同组织中 *AcCAX1* 的转录水平及亚细胞定位

为了进一步解析 AcCAX1 在菠萝中的功能,本研究检测了菠萝茎、幼叶、老叶、花蕾以及果实中 *AcCAX1* 的转录水平。结果发现,*AcCAX1* 在菠萝茎及老叶中转录水平较高,在果实和花蕾中转录水平较低(图 6A)。此外,本研究还利用无缝克隆方法构建 pCAMBIA2300-CAX1-GFP 融合表达载体,利用农杆菌介导法在烟草叶片中瞬时表达 AcCAX1,在激光共聚焦显微镜下观察了 AcCAX1 的荧光信号。结果如图 6B 所示,AcCAX1 在细胞膜、细胞质以及细胞核中普遍表达。

2.6　Ca^{2+} 影响菠萝 *AcCAX1* 的转录水平

CAXs 蛋白作为植物中的 Ca^{2+}/H^{+} 反向转运蛋白,可以对细胞质中钙离子变化做出快速响应,并负责 Ca^{2+} 由胞质向液泡的运输,对于细胞内 Ca^{2+} 的及时清除及细胞内 Ca^{2+} 稳态维持至关重要[6]。为了进一步探究菠萝中 AcCAX1 的功能,本研究用不同浓度的 $CaCl_2$ 以及 NaCl、$MgCl_2$ 和 $MnCl_2$ 对菠萝愈伤组织进行处理,并通过 qRT-PCR 技术测定了 *AcCAX1* 对不同金属离子的响应。结果显示,*AcCAX1* 的转录水平可以受外源 $CaCl_2$ 及 NaCl 诱导显著升高,并且随着 $CaCl_2$ 浓度升高,*AcCAX1* 的转录水平相较于低浓度 $CaCl_2$ 处理显著降低,$MnCl_2$ 处理则抑制了 *AcCAX1* 转录,而 $MgCl_2$ 处理并未诱导 *AcCAX1* 转录水平变化(图 7)。

2.7　不同胁迫及不同激素处理下 *AcCAX1* 转录水平

近期多项研究表明,CAXs 蛋白可以响应各种非生物胁迫,例如低温、水涝、盐、干旱和重金属胁迫等[5,17,25]。课题组前期研究发现,*AcCAX1* 启动子中存在大量非生物胁迫响应元件,暗示 AcCAX1 在菠萝的非生物胁迫响应中可能发挥重要功能(图 2D)。为了进一步研究 AcCAX1 对非生物逆境的响应,本研究对菠萝愈伤组织进行了 4 ℃低温和 37 ℃高温以及植物激素 ABA、SA、GA 和 JA 处理,并通过荧光定量 PCR 检测了 *AcCAX1* 的

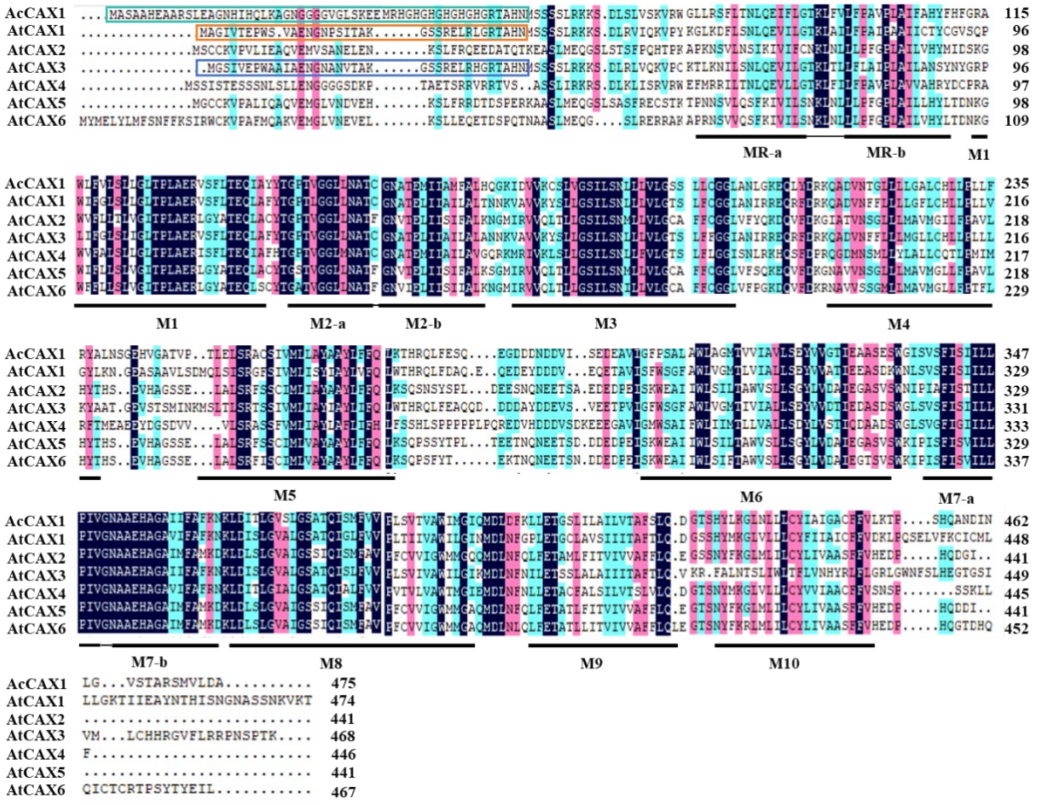
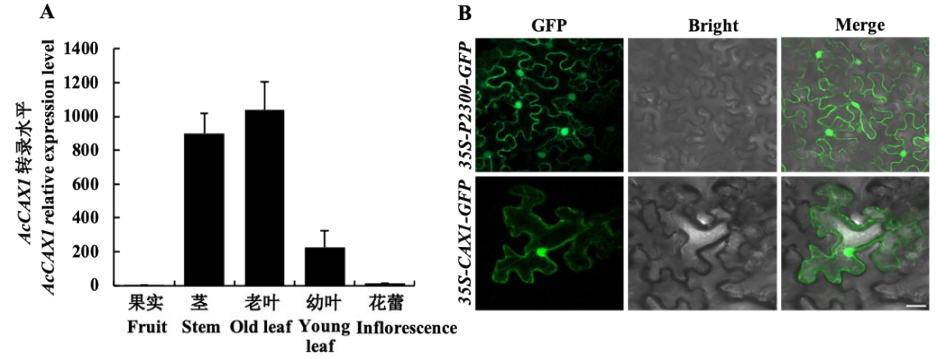


图5 AcCAX1蛋白序列与拟南芥蛋白序列对比

Fig.5 Multiple alignment of the AcCAX1 with that of *A. thaliana*



A:不同组织中*AcCAX1*转录水平;B:AcCAX1亚细胞定位结果

A: Transcript levels of *AcCAX1* in different tissues; B: Subcellular localisation of AcCAX

图6 不同组织中AcCAX1的转录水平及亚细胞定位

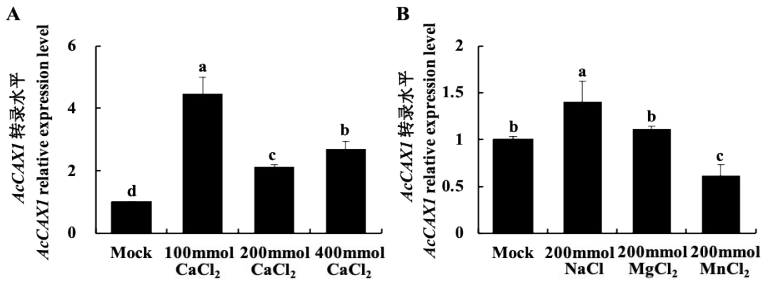
Fig.6 Transcript levels of *AcCAX1* in different tissues and subcellular localisation

转录水平。结果显示,4 ℃低温及37 ℃高温胁迫可以显著抑制*AcCAX1*的转录水平,植物激素JA则可以诱导*AcCAX1*转录,进一步表明,AcCAX1可能在菠萝的非生物胁迫响应和抗性调控方面发挥重要作用(图8)。

3 讨论与结论

本研究从菠萝果实中克隆得到了1个Ca^{2+}/H^{+}反向转运蛋白,命名为AcCAX1。氨基酸序列分析表明,AcCAX1也具有11个典型的跨膜结构域,组成了2个保守的Ca^{2+}/H^{+}反向转运蛋白功能结构域。与拟南芥中AtCAX1/3一致,AcCAX1蛋白序列N端同样存在保守的自抑制结构域,而AcCAX1的N端自抑制结构域是否可以抑制AcCAX1的钙离子转运功能仍需深入探究。

近期越来越多的研究表明,CAXs在植物抵御生物以及非生物胁迫过程中发挥了重要功能[5,17,25]。例如,苹果中主要包括11个CAXs蛋白,

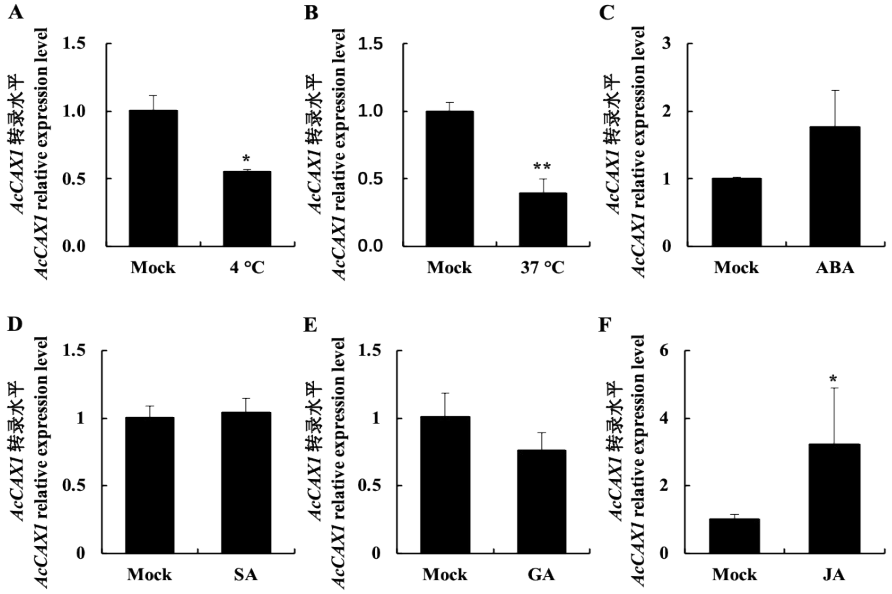


A:不同浓度$CaCl_2$处理后*AcCAX1*转录水平;B:NaCl、$MgCl_2$以及$MnCl_2$处理后*AcCAX1*转录水平

A: *AcCAX1* transcript levels after different concentrations of $CaCl_2$ treatment; B: *AcCAX1* transcript levels after NaCl, $MgCl_2$ and $MnCl_2$ treatments

图7　*AcCAX1*对不同离子的响应

Fig.7　Response of *AcCAX1* to different ions



不同胁迫4 ℃(A),37 ℃(B)及不同激素ABA(C)、SA(D)、GA(E)以及JA(F)处理下*AcCAX1*转录水平

AcCAX1 transcript levels under different stresses 4 ℃ (A), 37 ℃ (B) and different hormones ABA (C), SA (D), GA (E) and JA (F) treatments

图8　不同胁迫及不同激素处理下*AcCAX1*转录水平

Fig.8　*AcCAX1* transcript levels under different stresses and different hormone treatments

可以参与植物对各种非生物胁迫的响应。当苹果受到冷胁迫侵扰时,胞质中钙离子的含量迅速增加,钙离子依赖的蛋白激酶接收Ca^{2+}信号后,启动一系列级联响应帮助植物抵御胁迫侵扰。但是,胞质中持续的高Ca^{2+}浓度会对产生细胞毒性,此时高钙信号会诱发苹果中*CAXs*转录激活,促使胞质中的Ca^{2+}运输到液泡中储藏,降低胞质中的Ca^{2+}浓度,负调控冷信号通路调控[25-26]。本研究通过启动子区保守基序分析发现,菠萝中的*AcCAX1*启动子区域存在植物激素ABA、SA、GA与冷冻胁迫等响应的基本元件,荧光定量PCR结果显示,*AcCAX1*的转录水平可以受4 ℃低温及37 ℃高温胁迫显著抑制,受JA诱导升高,也进一步表明,与已发表的其它物种中CAX1功能一致,AcCAX1可能在菠萝对生物以及非生物胁迫的响应过程中扮演重要的功能,而其如何参与菠萝对胁迫的响应,后续还需利用转录组测序、遗传转化及生理表型分析等技术进一步验证。

综上所述,本研究对菠萝中AcCAX1的理化性质、进化关系、基因结构、蛋白结构和非生物胁迫与激素的响应进行了详细解析,为深入开展AcCAX1功能鉴定提供了依据。

参　考　文　献

[1]Aldon D, Mbengue M, Mazars C, et al. Calcium signalling in plant biotic interactions[J]. International Journal of Molecular

Sciences,2018,19(3):665.

[2]Hocking B, Tyerman S D, Burton R A, et al. Fruit calcium: transport and physiology[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7:569.

[3]Allan C, Morris R J, Meisrimler C N. Encoding, transmission, decoding, and specificity of calcium signals in plants[J]. Journal of Experimental Botany, 2022, 73(11):3372-3385.

[4]Thor K. Calcium-nutrient and messenger[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10:440.

[5]Wang C, Tang R J, Kou S H, et al. Mechanisms of calcium homeostasis orchestrate plant growth and immunity[J]. Nature, 2024, 627(8003):382-388.

[6]Kudla J, Batistič O, Hashimoto K. Calcium signals: the lead currency of plant information processing[J]. The Plant Cell, 2010, 22(3):541-563.

[7]Kong X P, Xu L H, Jamieson P. Plant sense: the rise of calcium channels[J]. Trends in Plant Science, 2020, 25(9):838-841.

[8]Hirschi K D, Korenkov V D, Wilganowski N L, et al. Expression of *Arabidopsis CAX2* in tobacco. altered metal accumulation and increased manganese tolerance[J]. Plant Physiology, 2000, 124(1):125-133.

[9]Edmond C, Shigaki T, Ewert S, et al. Comparative analysis of CAX2-like cation transporters indicates functional and regulatory diversity[J]. Biochemical Journal, 2009, 418(1):145-154.

[10]Shigaki T, Hirschi K D. Diverse functions and molecular properties emerging for CAX cation/H^+ exchangers in plants[J]. Plant Biology, 2006, 8(4):419-429.

[11]高天歌,马翠敏,王锁民. 液泡膜阳离子转运蛋白在植物抗逆过程中的功能研究进展[J]. 安徽农业科学,2020,48(21):1-5.
Gao T G, Ma C M, Wang S M. Research progress of the roles of tonoplast cation transporters in stress tolerance of plants[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2020, 48(21):1-5.

[12]Rahmati Ishka M, Brown E, Rosenberg A, et al. *Arabidopsis* Ca^{2+}-ATPases 1, 2, and 7 in the endoplasmic reticulum contribute to growth and pollen fitness[J]. Plant Physiology, 2021, 185(4):1966-1985.

[13]Conn S J, Gilliham M, Athman A, et al. Cell-specific vacuolar calcium storage mediated by CAX1 regulates apoplastic calcium concentration, gas exchange, and plant productivity in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2011, 23(1):240-257.

[14]Yang J, Mathew I E, Rhein H, et al. The vacuolar H^+/Ca transporter CAX1 participates in submergence and *Anoxia* stress responses[J]. Plant Physiology, 2022, 190(4):2617-2636.

[15]Tonetto de Freitas S, Padda M, Wu Q Y, et al. Dynamic alternations in cellular and molecular components during blossom-end rot development in tomatoes expressing sCAX1, a constitutively active Ca^{2+}/H^+ antiporter from *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2011, 156(2):844-855.

[16]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.

[17]Han B B, Tai Y X, Li S P, et al. Redefining the N-terminal regulatory region of the Ca^{2+}/H^+ antiporter CAX1 in tomato[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13:938839.

[18]崔小月,尚泓泉,吕中伟,等. 欧洲葡萄VvCAX基因家族的鉴定与表达分析[J]. 河南农业科学,2023,52(11):113-123.
Cui X Y, Shang H Q, Lü Z W, et al. Identification, characterization, and expression analysis of VvCAX gene family in grapevine[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2023, 52(11):113-123.

[19]闫慧清,刘艳晶,黄绒,等. 森林草莓FvCAX基因家族的鉴定及生物学功能分析[J]. 安徽农业大学学报,2021,48(2):199-205.
Yan H Q, Liu Y J, Huang R, et al. Identification and biological function analysis of FvCAX gene family in *Fragaria vesca*[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2021, 48(2):199-205.

[20]张国香,郭卫冷,毕铭钰,等. 紫花苜蓿CAX基因家族鉴定及其对非生物胁迫的响应分析[J]. 草业学报,2022,31(12):106-117.
Zhang G X, Guo W L, Bi M Y, et al. Identification of *CAX* gene family and expression profile analysis of response to abiotic stress in alfalfa[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2022, 31(12):106-117.

[21]Kim K M, Park Y H, Kim C K, et al. Development of transgenic rice plants overexpressing the *Arabidopsis* H^+/Ca^{2+} antiporter *CAX1* gene[J]. Plant Cell Reports, 2005, 23(10-11):678-682.

[22]李腊团. 菠萝水心病和裂果发生原因与防治措施[J]. 世界热带农业信息,2022(4):50-51.
Li L T. Causes and control measures of pineapple water heart disease and fruit cracking[J]. World Tropical Agriculture Information, 2022(4):50-51.

[23]刘传和,贺涵,何秀古,等. 菠萝不同品种对低温胁迫响应差异的生理代谢机制[J]. 生物技术通报,2023,39(10):219-230.
Liu C H, He H, He X G, et al. Physiological and metabolitic mechanisms of different pineapple cultivars responding to low temperature stress[J]. Biotechnology Bulletin, 2023, 39(10):219-230.

[24]孙伟生,吴青松,窦美安,等. 菠萝寒冻害的发生及防治[J]. 中国热带农业,2007(2):58-59.
Sun W S, Wu Q S, Dou M A, et al. Occurrence and prevention of chilling injury of pineapple[J]. China Tropical Agriculture, 2007(2):58-59.

[25]Yang J, Guo X, Mei Q L, et al. MdbHLH4 negatively regulates apple cold tolerance by inhibiting MdCBF1/3 expression and promoting MdCAX3L-2 expression[J]. Plant Physiology, 2023, 191(1):789-806.

[26]Mao K, Yang J, Wang M, et al. Genome-wide analysis of the apple CaCA superfamily reveals that MdCAX proteins are involved in the abiotic stress response as calcium transporters[J]. BMC Plant Biology, 2021, 21(1):81.

(编辑:吕俊俐)