北京林业大学学报
JOURNAL OF BEIJING FORESTRY UNIVERSITY

蓝莓*CLC*基因家族的全基因组鉴定及盐胁迫表达分析

李孜文 赵鑫焱 张灿 张凌云 曹一博

Genome-wide identification and expression analysis of the *CLC* gene family in blueberry (*Vaccinium corymbosum*) under salt stress

Li Ziwen, Zhao Xinyan, Zhang Can, Zhang Lingyun, Cao Yibo

引用本文:
李孜文, 赵鑫焱, 张灿, 张凌云, 曹一博. 蓝莓*CLC*基因家族的全基因组鉴定及盐胁迫表达分析[J]. 北京林业大学学报, 2026, 48(6):116–129. doi: 10.12171/j.1000–1522.20260046
Li Ziwen, Zhao Xinyan, Zhang Can, Zhang Lingyun, Cao Yibo. Genome–wide identification and expression analysis of the *CLC* gene family in blueberry (*Vaccinium corymbosum*) under salt stress[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2026, 48(6):116–129. doi: 10.12171/j.1000–1522.20260046

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20260046

您可能感兴趣的其他文章
Articles you may be interested in

水曲柳*FmPLT*基因家族的鉴定及表达分析
Identification and expression analysis of *FmPLT* gene family of *Fraxinus mandschurica*
北京林业大学学报, 2022, 44(2): 11–21. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210105

油松*SAUR*基因家族鉴定及其干旱胁迫表达模式分析
Identification of *SAUR* gene family in *Pinus tabuliformis* and analysis on its expression patterns under drought stress
北京林业大学学报, 2024, 46(8): 57–67. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20230333

枸杞 *SnRK*基因家族鉴定及表达分析
Identification and expression analysis of *SnRK* gene family in *Lycium barbarum*
北京林业大学学报, 2025, 47(11): 96–108. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20250274

油松*PtDof*基因家族鉴定与*PtDof*1基因响应低温胁迫的功能分析
Identification of *PtDof* gene family and functional analysis of *PtDof*1 gene in response to low temperature stress in *Pinus tabuliformis*
北京林业大学学报, 2025, 47(10): 84–95. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20250179

山新杨*PdaGLK*1基因在盐胁迫响应中的功能研究
Functional study of *PdaGLK*1 gene in salt stress response of *Populus davidiana* × *Populus alba* var. *pyramidalis*
北京林业大学学报, 2025, 47(7): 11–20. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20240440

枣果胶甲酯酶基因家族鉴定及基于RNA–Seq表达分析
Identification and expression analysis based on RNA–Seq of the pectin methylesterase gene family in *Ziziphus jujuba*
北京林业大学学报, 2021, 43(4): 8–16. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20200338

DOI:10.12171/j.1000−1522.20260046

蓝莓 *CLC* 基因家族的全基因组鉴定及盐胁迫表达分析

李孜文　赵鑫焱　张　灿　张凌云　曹一博
（北京林业大学林学院，林木资源高效生产全国重点实验室，森林培育与保护教育部重点实验室，北京 100083）

摘要:【目的】CLC 蛋白在植物盐胁迫响应中发挥关键作用，然而蓝莓中 *CLC* 家族成员的盐胁迫表达模式及分子调控网络尚不清楚。本研究在全基因组范围内鉴定蓝莓 *CLC* 基因家族，系统分析其盐胁迫响应模式，旨在为揭示其介导 Cl^-稳态、调控蓝莓耐盐性的分子机制奠定基础。**【方法】**利用生物信息学方法分析蓝莓 *CLC* 家族的蛋白理化性质、基因结构、保守基序、支架定位、共线性关系、启动子区顺式作用元件及系统进化关系等，并利用转录组数据筛选差异表达基因，通过 RT-qPCR 分析其在盐胁迫下的表达模式。**【结果】**(1)从基因组中共筛选到 19 个编码 *CLC* 家族的基因，不均匀分布于 12 个支架上。系统进化分析将其划分为 4 个亚家族，不同亚家族成员在基因结构与保守基序组成上差异显著。(2)启动子顺式作用元件和上游转录因子预测分析结果显示，*VcCLCs* 启动子中含有多个与生长发育、植物激素和胁迫相关的调节元件，其表达可能受到 ERF、NAC、WRKY 等转录因子的调控。(3)基于盐胁迫下耐盐品种‘Duke’和盐敏感品种‘Sweetheart’的转录组数据，筛选到 3 个在两品种根中均差异表达的基因，命名为 *VcCLCc*1、*VcCLCc*2 和 *VcCLCf*2。RT-qPCR 结果显示，上述 3 个基因在‘Duke’根中均受盐胁迫诱导显著上调，而在‘Sweetheart’根中显著下调，说明它们可能参与了蓝莓盐胁迫应答。**【结论】**本研究明确了蓝莓 CLC 家族的核心特征及盐胁迫响应关键基因，为解析盐胁迫下蓝莓 Cl^-稳态维持的分子机制提供了候选基因和理论基础。

关键词：蓝莓；*CLC* 基因家族；全基因组鉴定；盐胁迫；表达分析；氯离子通道
中图分类号：S663.9；Q943.2　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1000−1522(2026)06−0116−14
引文格式：李孜文，赵鑫焱，张灿，等. 蓝莓 *CLC* 基因家族的全基因组鉴定及盐胁迫表达分析［J］. 北京林业大学学报，2026，48(6)：116−129. Li Ziwen, Zhao Xinyan, Zhang Can, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the *CLC* gene family in blueberry (*Vaccinium corymbosum*) under salt stress［J］. Journal of Beijing Forestry University, 2026, 48(6): 116−129.

Genome-wide identification and expression analysis of the *CLC* gene family in blueberry (*Vaccinium corymbosum*) under salt stress

Li Ziwen　Zhao Xinyan　Zhang Can　Zhang Lingyun　Cao Yibo
(College of Forestry, Beijing Forestry University, State Key Laboratory of Efficient Production of Forest Resources, Key Laboratory of Silviculture and Conservation of the Ministry of Education, Beijing 100083, China)

Abstract:［**Objective**］CLC proteins play pivotal roles in plant responses to salt stress; however, the salt stress expression patterns and molecular regulatory networks of the *CLC* family in blueberry (*Vaccinium corymbosum*) remain largely unknown. This study performed a genome-wide identification of the blueberry *CLC* gene family and systematically analyzed their expression profiles under salt stress, aiming to lay a foundation for elucidating the molecular mechanisms by which CLCs mediate Cl^- homeostasis and regulate salt tolerance in blueberry.［**Method**］Bioinformatics methods were used to analyze the physicochemical properties, gene structures, conserved motifs, scaffold locations, collinearity relationships, cis-acting

收稿日期: 2026−01−26　**修回日期:** 2026−06−12
基金项目: 山东省重点研发计划(2024LZGCQY025)，北京林业大学“5·5 工程”科研创新团队项目(BLRC2023B08)。
第一作者: 李孜文。主要研究方向：蓝莓耐盐分子机理。Email: liziwen_1029@163.com　地址：100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学林学院。
责任作者: 曹一博，副教授。主要研究方向：经济林抗逆分子机理。Email: caoyibo@bjfu.edu.cn　地址：同上。
本刊网址: https://j.bjfu.edu.cn; https://journal.bjfu.edu.cn

elements in promoter regions, and phylogenetic relationships in *VcCLCs* family. Differentially expressed genes were screened based on transcriptome data, and RT-qPCR was used to analyze the expression patterns under salt stress. [**Result**] (1) 19 genes encoding CLC family members were identified from the genomic data and unevenly distributed across 12 scaffolds. Phylogenetic analysis classified them into four subfamilies, with significant variations in gene structure and conserved motif composition among the members of different subfamilies. (2) Analysis of promoter cis-acting elements and upstream transcription factor prediction revealed that *VcCLCs* promoters contain multiple regulatory elements related to growth and development, phytohormones, and stress responses. Their expression is likely regulated by transcription factors such as ERF, NAC, and WRKY. (3) Based on the salt-stress transcriptome analysis of roots from the salt-tolerant cultivar 'Duke' and the salt-sensitive cultivar 'Sweetheart', three common differentially expressed genes were identified and designated as *VcCLCc*1, *VcCLCc*2, and *VcCLCf*2. RT-qPCR results demonstrated that these three genes were significantly upregulated in 'Duke' roots under salt stress but were notably downregulated in 'Sweetheart' roots, indicating their potential involvement in blueberry salt-stress responses. [**Conclusion**] This study elucidates the core characteristics of the CLC gene family in blueberry and identifies key genes responsive to salt stress, providing candidate genes and a theoretical foundation for understanding the molecular mechanisms of Cl^- homeostasis maintenance under salt stress.

Key words: *Vaccinium corymbosum*; *CLC* gene family; genome-wide identification; salt stress; expression profiling; chloride channel

蓝莓（*Vaccinium corymbosum*）为杜鹃花科（Ericaceae）越橘属（*Vaccinium*）植物，在世界范围内广泛种植。蓝莓果实富含花青苷、类黄酮、花青素等多种生理活性物质[1−2]，是世界粮农组织推荐的五大健康水果之一。在我国，蓝莓产业已形成规模化发展格局，建成了由南到北的云贵川、长江流域、胶东半岛、辽东半岛和长白山等五大优势产区和产业化生产基地[3]，实现了蓝莓产业化种植的全国覆盖。

土壤盐渍化会对植物造成渗透胁迫和离子毒害，影响叶片光合效率，造成叶片黄化甚至坏死[4]。蓝莓根系浅且对土壤环境敏感，而我国上述主栽区也同样面临着盐渍化威胁：一方面，沿海地区因海水入侵导致土壤中以 NaCl 为主的盐分沉积，易形成盐渍土[5]；另一方面，随着蓝莓产业向设施化、集约化发展，长期的化肥灌溉也会导致严重的次生盐渍化现象。近年来，国内外有关蓝莓低温胁迫、干旱胁迫开展了许多研究[6]，但有关蓝莓盐胁迫的研究相对较少，主要集中在不同蓝莓品种间的耐盐性比较以及盐胁迫下的生理指标、形态变化等方面。例如，北高丛蓝莓'Duke'的耐盐性优于北高丛蓝莓'Sweetheart'[7]，研究人员以 200 mmol/L NaCl 对两品种进行盐处理，结果发现相比于'Duke'，'Sweetheart'叶片明显变黄甚至脱落，同时其由根系向叶片的 Na^+运输速率显著高于'Duke'。Wright 等[8]比较了不同浓度的 NaCl 灌溉水对不同蓝莓品种的影响，结果表明当灌溉水中 NaCl 含量超过 100 mmol/L 时，就会对南高丛蓝莓品种'Sharpblue'和兔眼蓝莓品种'Tifblue'造成较大影响，且对'Tifblue'的影响更明显。乌凤章[9]的研究表明较高浓度的 NaCl 胁迫会使北高丛蓝莓品种'Bluecrop'的净光合速率下降，抑制其生长，同时低浓度盐胁迫对'Bluecrop'生长影响较小，而对南高丛蓝莓品种'O' Neal'影响较大。近年来，多个参与蓝莓盐胁迫应答的转录因子被鉴定，例如 *VcWRKY*13 和 *VcWRKY*25 是盐胁迫响应中的正调控因子[10]；bZIP 转录因子 *VabZIP*12 的表达水平受盐胁迫及有益真菌共生诱导，通过激活下游抗氧化基因表达正调控蓝莓耐盐[11]；Zhang 等[12]发现蓝莓 R2R3-MYB 转录因子 *VcMYB*4*a* 通过结构域 C2/EAR 招募抑制复合体以阻遏转录，是胁迫响应的重要负调控因子。除此之外，许多功能基因也逐渐被挖掘，例如蓝莓钠离子选择性转运蛋白 VcHKT1;1，其主要在根中柱表达，通过将从木质部汁液中的 Na^+转运到木质部薄壁细胞，减少 Na^+由根往地上部的运输[7]，同时 *VcbHLH*104 和 *VcDof*2.1 分别正向和负向调控 *VcHA*11.1 表达，*VcSAUR*72 与 *VcbZIP*11 可激活其转录，而 *VcMYB*2 与 *VcIDD*7 则抑制 *VcHA*8 启动子活性[13]。

植物抵抗盐胁迫的核心机制研究主要包括：以 SOS 通路为代表的核心调控网络，SOS 通路由钙感受器蛋白 SOS3/SCaBP8、蛋白激酶 SOS2、Na^+/H^+逆向转运蛋白 SOS1 组成，通过磷酸化级联反应激活 SOS1，从而将胞质内的 Na^+排出胞外，是植物维持 Na^+稳态的核心机制；HKT 转运蛋白是植物耐盐性的关键决定因子，作为根–茎 Na^+回收的主要参与者，HKT 家族分为两个亚组，I 类 HKT 基本上是 Na^+选

择性转运蛋白，负责在单子叶和双子叶植物中从木质部汁液中回收 Na^+，II 类 HKT 则主要调节单子叶植物根中的 Na^+和 K^+同向转运；除此之外，液泡 Na^+/H^+逆向转运蛋白 NHXs，可以将 Na^+从细胞质区隔化到特定细胞器（如液泡中），是植物避免离子毒性的另一种适应策略[5]。目前植物盐胁迫领域有关 Na^+的转运与稳态调控的相关机制已较为清晰，相比之下，有关 Cl^-稳态的关键基因和分子机制还缺乏研究。Cl^-是植物生长的必需元素，但细胞中过量 Cl^-积累会诱导渗透胁迫并抑制光合作用[14]，同时还会诱导质膜（plasma membrane，PM）脂质过氧化破坏电化学平衡，进而降低其选择通透性，由此造成植株黄化、矮小、叶片早落[15]。截至目前，已有众多研究表明，Cl^-通道蛋白（chloride channel，CLC）可在盐胁迫条件下维持植物 Cl^-稳态，从而提高植物耐盐性[16]。例如，*AtCLCc* 的过表达增强了拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）对盐胁迫的耐受性，而 *atclcc* 突变体表现出对 Cl^-更加敏感[17]，盐胁迫诱导 *AtCLCf* 从高尔基体转移至细胞质膜，促进根部 Cl^-外排，从而提高拟南芥耐盐性[18]。棉花（*Gossypium hirsutum*）中 *GhCLCg* 可以通过调节 Cl^-积累正向调控植物耐盐性[19]。大豆（*Glycine max*）中，定位于液泡膜的 *GsCLC-c2* 在野生大豆和栽培大豆中基因表达和序列均存在差异，研究发现该基因可以通过将 Cl^-区隔化至根液泡中，从而降低地上部 Cl^-水平[20]，这可能是导致野生品种较栽培种具有更强耐盐性的原因之一，除此之外，*GmCLC1* 也是以同样的方式提高了大豆的耐盐性[21]。苹果（*Malus hupehensis*）中，盐胁迫诱导 *MhCLC-c1* 表达，进一步的盐胁迫实验发现，与野生型相比，过表达 *MhCLC-c1* 的苹果愈伤组织和拟南芥植株中的 Cl^-积累量显著降低，且细胞死亡现象得到明显缓解[22]。番茄（*Solanum lycopersicum*）中，盐处理后 *SlCLC8* 沉默的番茄植株与对照组相比表现出较高的萎蔫和氧化胁迫，耐盐性显著降低，说明 *SlCLC8* 是番茄耐盐性的正调控因子[23]。此外，也有研究表明辣椒（*Capsicum annuum*）叶片中的 *CaCLCs* 基因受 NaCl 胁迫的诱导表达，这表明 *CaCLCs* 基因可能在响应 NaCl 胁迫中起关键作用[24]。

CLC 蛋白在植物应对盐胁迫响应中发挥着重要作用，但蓝莓 CLC 家族成员在盐胁迫下的表达模式和分子调控网络还尚不清楚。因此，本研究拟利用生物信息学分析在全基因组范围内鉴定蓝莓 CLC 家族成员，并对其理化性质、系统进化、启动子顺式作用元件等进行分析，同时基于盐胁迫转录组数据筛选盐差异基因，并分析其在盐胁迫下的表达模式，旨在挖掘蓝莓 CLC 家族盐胁迫响应关键基因。研究结果将为解析盐胁迫下蓝莓 Cl^-稳态维持的分子机制提供候选基因和理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料及其盐胁迫处理

植物材料为两个北高丛蓝莓品种‘Sweetheart’（盐敏感品种）和‘Duke’（耐盐品种），通过茎段继代的方式获得组培苗，在温度 25 ℃，光周期为 16 h 光照和 8 h 黑暗下的温室培养。选择继代 60 d 左右长势基本一致的蓝莓组培苗，移栽于育苗容器中，生长约 50 d 后使用 200 mmol/L NaCl 溶液对蓝莓材料进行浇灌，浇灌至土壤饱和，分别在处理 0、3、12 h 时采集根和叶片组织，蒸馏水洗净，于液氮中速冻，保存于–80 ℃ 冰箱备用。

1.2 研究方法

1.2.1 蓝莓 *CLC* 基因家族的成员鉴定及理化性质

为系统鉴定蓝莓 CLC 家族成员，从越橘基因组 GDV 数据库（https://www.vaccinium.org）下载蓝莓基因组数据，以北高丛蓝莓品种‘Draper’作为参考基因组[25]（PRJNA494180），从 TAIR（https://www.arabidopsis.org）网站下载所有拟南芥 CLC 蛋白序列。在 TBtools 软件中 BLAST 工具基于序列相似度进行比对，初步筛选蓝莓 CLC 序列，后下载 swissprot 数据库（https://ngdc.cncb.ac.cn/databasecommons），将初步筛选的蓝莓 CLC 序列进行二次筛选。后通过 PFAM（http://pfam-legacy.xfam.org）下载 CLC 蛋白保守结构域（PF00481）的隐马尔可夫模型，基于保守结构域进行 CLC 蛋白结构域验证。通过 NCBI-CDD（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd）和 InterPro（https://www.ebi.ac.uk/interpro）再一次进行验证比对，去除结构域不完整的序列，之后通过 DNAMAN 软件去除冗余序列，从而得到蓝莓 CLC 家族成员。

为明确鉴定出的蓝莓 CLC 家族成员的基本理化特征，使用 ExPASy ProtParam 网站（https://web.expasy.org/protparam/）进行 VcCLCs 蛋白理化性质分析，使用 Plant-mPLoc 在线工具（http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/#）预测 VcCLCs 蛋白的亚细胞定位。

1.2.2 进化树、基因结构、蛋白保守基序

为了研究蓝莓和模式植物拟南芥、大豆 *CLC* 基因家族的进化关系，本研究基于邻接法，使用 MEGA11 对拟南芥、蓝莓和大豆的 CLC 蛋白序列构建系统进化发育树，Bootstrap 值重复 1 000 次，其他参数为默认值。使用 iTOL（https://itol.embl.de/）对进化树进行美化。为从基因结构层面验证系统发育树

的划分是否合理，并揭示不同亚族 *VcCLC* 的结构保守性，使用蓝莓基因组注释文件 gff3 数据及蓝莓 CLC 进化树文件在 TBtools 软件进行基因结构分析及可视化。使用 MEME（https://meme-suite.org/meme/tools/meme）进行蓝莓 *CLC* 基因家族 motif 预测和分析，基序数量设置为 10，后续使用 TBtools 软件进行蛋白保守基序可视化。

1.2.3　支架定位、种间共线性和保守结构域

为明确 *VcCLC* 在基因组中的分布位置，在 TBtools 软件上，根据蓝莓基因组注释文件 gff3 数据对 *VcCLCs* 进行支架定位可视化，构建蓝莓 *CLC* 基因物理位置图谱。为阐明 *VcCLC* 进化保守型，根据拟南芥和蓝莓的基因组注释文件在 TBtools 软件的 One Step MCScanX 插件中提取信息，再进行共线性分析可视化。为了进一步分析 VcCLC 蛋白的结构特征，对 19 个 VcCLC 成员进行了保守结构域分析。使用 NCBI 中的 Batch Web CD-Search 以及 PFAM 的 SWEET 工具确认结构域，随后通过 TBtools 软件进行可视化。

1.2.4　启动子顺式元件以及转录因子预测

为研究 *VcCLC* 转录调控的潜在机制，根据蓝莓基因组注释文件提取蓝莓 *CLC* 基因起始密码子上游 2 000 bp 序列作为启动子序列，输入到 PlantCARE 网站进行在线分析（https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/），对这些候选启动子序列上的激素和逆境相关的顺式作用元件进行预测分析。CLC 蛋白作为协助 Cl^- 转运的功能蛋白，其表达受上游转录因子调控，因此本研究进一步使用 PlantTFDB 在线工具（http://planttfdb.gao-lab.org/prediction.php）[26] 对调控 19 个 *VcCLCs* 的上游转录因子进行了预测和分析，预测结果使用 Hiplot（https://hiplot. com.cn/cloud-tool/drawing-tool/）进行可视化作图，绘制在结合位点数量上大于 100 的转录因子的网络图。

1.2.5　盐胁迫下基因表达分析

为筛选响应盐胁迫的关键基因，基于课题组前期报道的蓝莓盐胁迫转录组（NCBI 项目号 PRJNA907966）对蓝莓 *CLC* 基因在盐胁迫下的表达模式进行分析。实验材料选取两个北高丛蓝莓品种‘Sweetheart’（盐敏感）和‘Duke’（耐盐），经 200 mmol/L NaCl 处理后，分别于 0、3、12 h 采集根系和叶片，具体培养条件及胁迫处理流程详见 1.1。转录组数据分析在 Majorbio 云平台（https://cloud.majorbio.com/）上进行，将鉴定到的蓝莓 *CLC* 基因上传到 Majorbio 云平台的蓝莓盐胁迫有参转录组项目上，下载蓝莓 *CLC* 基因表达量数据，表达水平使用 TPM（Transcripts Per Million reads）法计算，在 Excel 2021 上对基因表达量数据进行 $\log_{10}$（TPM + 1）处理，再上传到 TBtools 软件上进行可视化。差异表达基因的鉴定基于以下比较组设置：针对每个品种，分别将盐胁迫处理组（3 和 12 h）与相应的对照组（0 h）进行比较（即 3 h vs 0 h 和 12 h vs 0 h）。筛选标准为 $P_{adjust} < 0.05$，差异倍数为 2。

1.2.6　实时荧光定量 PCR 验证盐胁迫下基因表达量

使用诺唯赞生物科技公司的 FastPrue Universal Plant Total RNA Isolation Kit 提取蓝莓材料的 RNA。使用 Applied Biological Materials（abm）公司的 5X All-In-One RT MasterMix（with AccuRT Genomic DNA Removal Kit）进行 RNA 反转录 cDNA。使用赛默飞世尔科技公司的 PowerUp SYBR Green Master Mix 进行 RT-qPCR。利用 RT-qPCR 实验鉴定盐胁迫后差异倍数在 2 倍以上的 3 个 *VcCLCs* 的表达水平。体系为 10 μL 的体系（0.5 μL 模板、0.25 μL 前引物、0.25 μL 后引物、5 μL 酶、4 μL 水）。使用 *VcUBC*28 作为内参基因，引物详情见表 1，每个样本设置 3 次重复。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达量，利用 Origin 2020 等软件进行分析并作图。

1.3　数据分析

实验均基于至少 3 个技术重复的平行实验，使用 SPSS 软件进行单因素方差分析，并用不同的小写字母表示，$P < 0.05$ 表明有显著性差异，使用 GraphPad Prism 8 绘制图表。

2　结果与分析

2.1　蓝莓 CLC 基因家族鉴定及理化性质

从蓝莓基因组中共鉴定出 19 个 *VcCLCs* 家族成员，根据聚类分析依次命名为 *VcCLCc*1 ~ *VcCLCc*7、

表 1　RT-qPCR 引物

Tab. 1　Primers used for RT-qPCR

基因	上游引物（5′—3′）	下游引物（5′—3′）
*VcCLCc*1	TGAGAGAGCCTCTGCTTCTGA	TTTCCTAGATCTCCAGTCCTCCT
*VcCLCc*2	GCGAGGTGGGATTTGGGTATG	AGCTATTGCTCATCCGACTCCTG
*VcCLCf*2	CAGCGATCGCGACATACTGTT	TCCCGTAAACCCTCGATCTAA
*VcUBC*28	CCATCCACTTCCCTCCAGATTATCCAT	ACAGATTGAGAGCAGCACCTTGGA

*VcCLCd*1 ~ *VcCLCd*3、*VcCLCe*1 ~ *VcCLCe*4、*VcCLCf*1 ~ *VcCLCf*2 和 *VcCLCg*1 ~ *VcCLCg*3(表 2)。*VcCLCs* 的理化性质分析结果显示：VcCLCs 的氨基酸数量范围介于 488(VcCLCc2) ~ 1 135 aa (VcCLCd1/2/3)，平均值为 794.79 aa；分子质量介于 53 158.55(VcCLCc2) ~ 126 446.36 Da(VcCLCd1)，平均值为 86 910.08 Da；理论等电点介于 5.20 (VcCLCe3) ~ 8.85(VcCLCg3)，其中 7 个 VcCLCs 理论等电点小于 7，属于酸性蛋白，12 个蓝莓 VcCLCs 理论等电点大于 7，属于碱性蛋白；不稳定系数介于 33.26(VcCLCc5) ~ 49.51(VcCLCe3)，平均值为 40.90，所有 VcCLCs 蛋白的不稳定系数均小于 50，表明这些蛋白在体外相对稳定；脂肪系数介于 95(VcCLCd1/2/3) ~ 111.94(VcCLCc1)，平均值为 103.65，较高的脂肪系数表明这些蛋白具有较好的热稳定性；总平均亲水性介于−0.054(VcCLCf2) ~ 0.535(VcCLCc1)，平均值为 0.28，其中 17 个 VcCLCs 蛋白的 GRAVY 值大于 0，属于疏水性蛋白，仅 VcCLCf2 为亲水性蛋白。亚细胞定位预测结果表明，所有 VcCLCs 均定位于质膜，这与 CLC 蛋白作为跨膜离子通道的功能特征高度一致，表明 VcCLCs 可能在细胞膜上发挥 Cl^- 转运和维持离子平衡的重要作用。

2.2 系统进化发育

参照 AtCLCs 的亚家族分类，将 VcCLCs 分为 4 个亚家族。其中 A 亚家族包含 3 个 VcCLCs，B 亚家族包含 6 个 VcCLCs，C 亚家族未鉴定到蓝莓 CLC 成员，推测该亚家族成员在蓝莓进化过程中可能已丢失或发生功能替代；D 亚家族成员数目最多，包含 10 个 VcCLCs(图 1)。

2.3 基因结构和保守基序

基因结构分析显示(图 2A)，*VcCLCs* 非编码区 UTR 数量为 0 ~ 2 个，编码区 CDS 的外显子数量存在显著差异，其中 D 亚家族成员外显子数量为 6 ~ 8 个，均包含 5′和 3′ UTR 区域；A 亚家族成员包含较多的外显子(20 ~ 30 个)，外显子较小且分布密集，UTR 区域较短；B 亚家族成员包含 5 ~ 7 个外显子。聚类在同一簇的基因呈现较为相似的外显子–内含子分布模式，而不同簇间存在显著差异，这种结构差异可能反映了不同亚家族在功能上的分化。

蛋白保守基序分析显示，VcCLCs 蛋白中共鉴定出 10 个保守基序(Motif 1 ~ 10)，不同亚家族成员间的 Motif 数量和分布存在显著差异(图 2B)。其中，Motif 2、Motif 10 是所有 VcCLCs 蛋白均包含的保

表 2 蓝莓 *CLC* 基因家族基本特征

Tab. 2 Characterization of the *CLC* gene family in blueberry

基因名	基因ID	氨基酸数/aa	分子质量/Da	等电点	不稳定系数	脂肪系数	总平均亲水性	亚细胞定位
*VcCLCc*1	VaccDscaff2-augustus-gene-355.25	535	58 630.87	7.36	37.19	111.94	0.535	质膜
*VcCLCc*2	VaccDscaff14-snap-gene-303.32	488	53 158.55	6.46	39.48	100.88	0.334	质膜
*VcCLCc*3	VaccDscaff25-snap-gene-353.36	543	59 313.95	8.26	36.23	111.68	0.534	质膜
*VcCLCc*4	VaccDscaff39-augustus-gene-127.26	825	90 849.18	8.20	34.08	105.33	0.367	质膜
*VcCLCc*5	VaccDscaff6-augustus-gene-300.24	825	90 886.26	8.30	33.26	104.86	0.362	质膜
*VcCLCc*6	VaccDscaff38-augustus-gene-118.47	825	90 724.09	8.08	33.77	106.04	0.385	质膜
*VcCLCc*7	VaccDscaff37-processed-gene-193.8	876	96 398.65	8.25	33.64	105.32	0.403	质膜
*VcCLCd*1	VaccDscaff35-snap-gene-42.35	1 135	126 446.36	7.77	43.21	95.00	0.020	质膜
*VcCLCd*2	VaccDscaff4-snap-gene-94.31	1 135	126 420.33	7.78	43.21	95.00	0.018	质膜
*VcCLCd*3	VaccDscaff36-snap-gene-267.24	1 135	126 420.33	7.78	43.21	95.00	0.018	质膜
*VcCLCe*1	VaccDscaff39-augustus-gene-110.26	799	85 847.18	5.67	45.92	102.97	0.249	质膜
*VcCLCe*2	VaccDscaff6-augustus-gene-310.30	775	82 866.56	5.35	48.05	103.90	0.257	质膜
*VcCLCe*3	VaccDscaff38-processed-gene-107.1	775	82 671.33	5.20	49.51	104.77	0.268	质膜
*VcCLCe*4	VaccDscaff37-snap-gene-207.31	799	85 719.08	5.63	47.58	104.69	0.253	质膜
*VcCLCf*1	VaccDscaff1-processed-gene-461.1	691	73 269.47	6.89	36.58	101.26	0.138	质膜
*VcCLCf*2	VaccDscaff78-processed-gene-6.19	569	61 206.27	6.87	41.11	96.87	–0.054	质膜
*VcCLCg*1	VaccDscaff6-augustus-gene-378.34	782	85 846.58	8.79	43.15	107.98	0.422	质膜
*VcCLCg*2	VaccDscaff39-augustus-gene-37.26	782	85 932.67	8.73	43.86	108.24	0.418	质膜
*VcCLCg*3	VaccDscaff38-augustus-gene-39.28	807	88 683.87	8.85	44.05	107.65	0.417	质膜

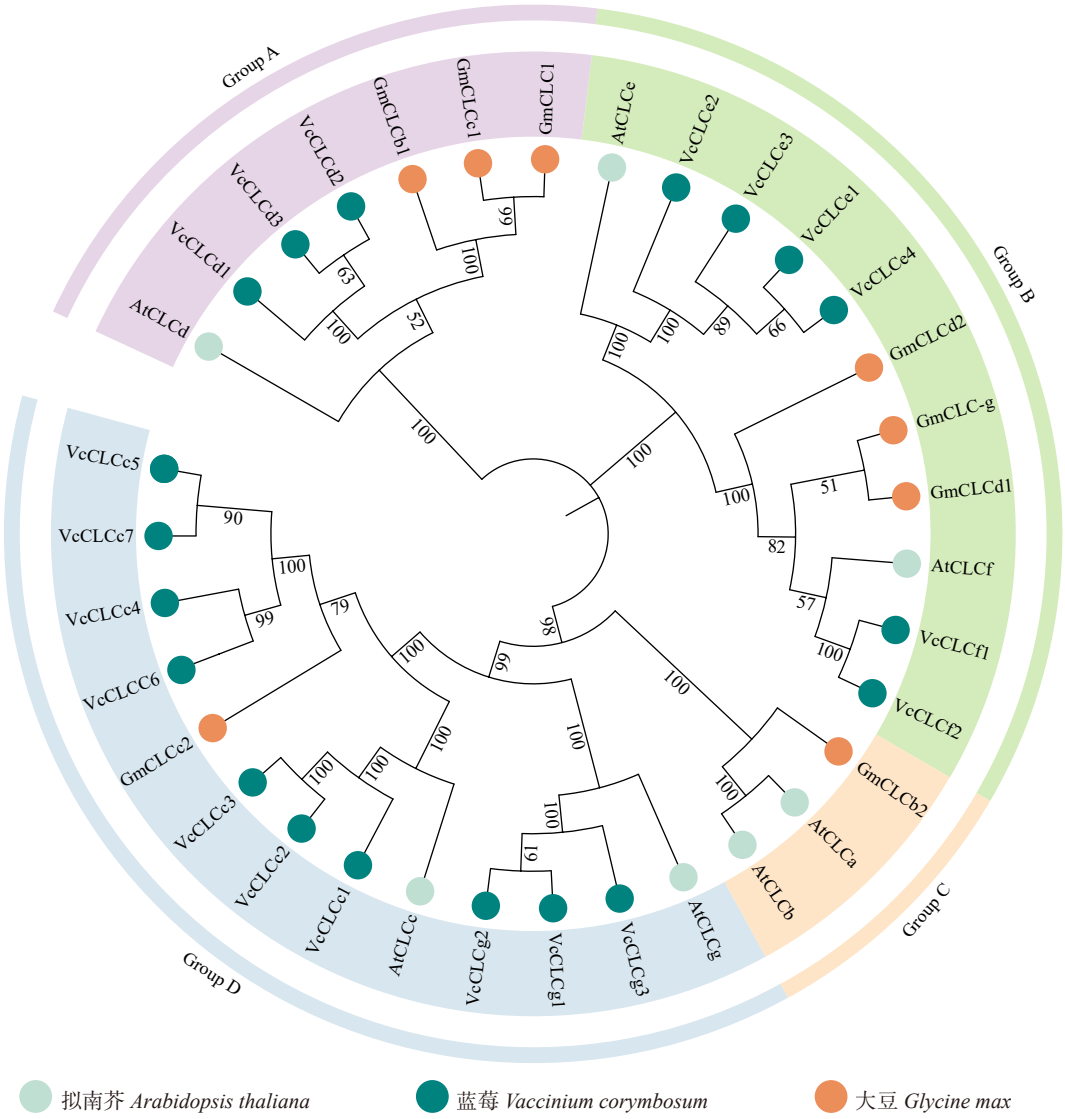


图 1　蓝莓 *CLC* 基因家族系统发育进化树

Fig. 1　Phylogenetic evolutionary tree of *VcCLC* gene family

守基序，推测二者为 VcCLC 家族的必要基序，VcCLCc4/5/6/7、VcCLCg1/2/3 包含了全部的 10 个保守基序，而同为 D 亚家族的 VcCLCc1 缺少 Motif 3、Motif 9、Motif 1，VcCLCc2 缺少 Motif 5、Motif 7 和 Motif 1，VcCLCc3 缺少 Motif 5、Motif 8 和 Motif 1。A 亚家族成员具有独特的 Motif 分布模式，其特征是 Motif 1 在 N 端、C 端均有出现，B 亚家族成员 VcCLCe1/2/3/4 具有高度一致的基序组成，VcCLCf1/2 基序数量相对较少。

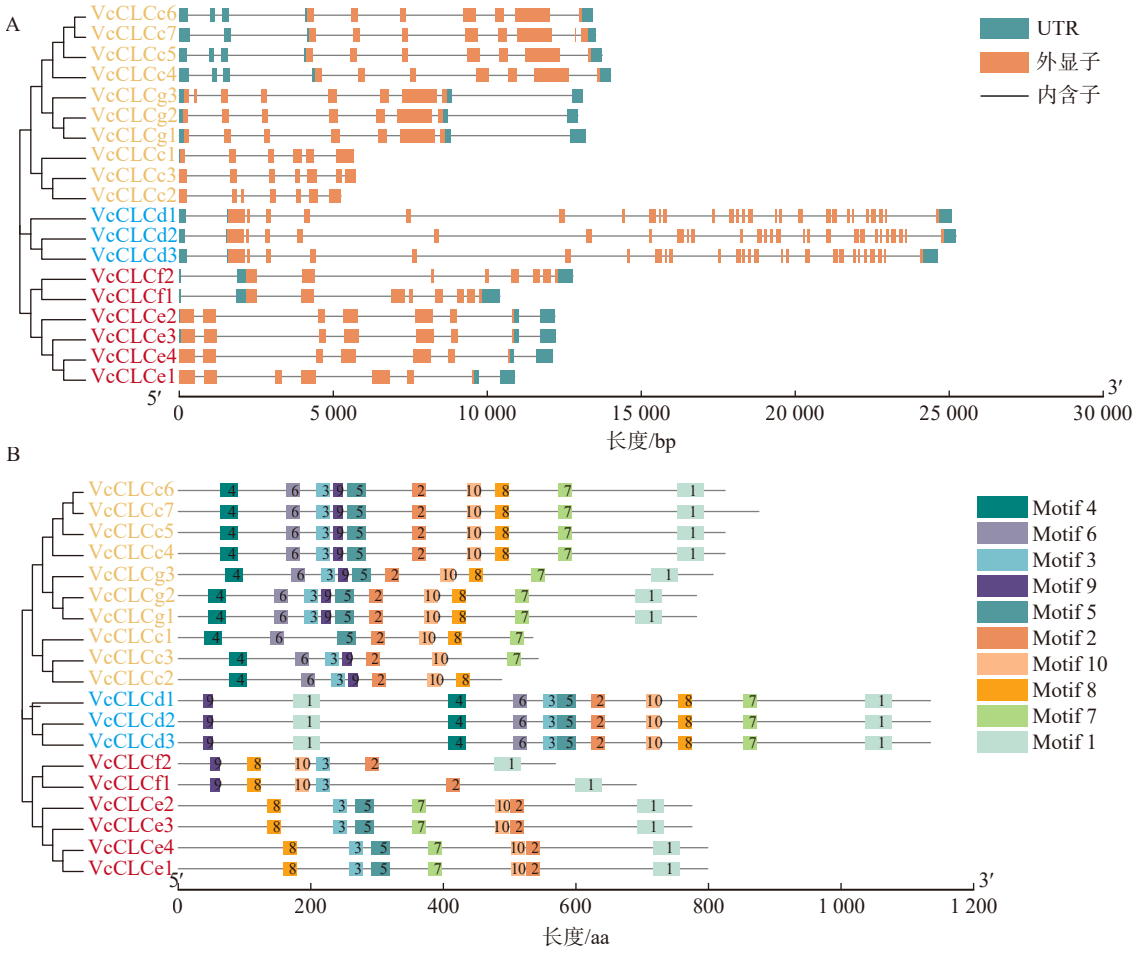
2.4　支架定位和种间共线性

基于蓝莓基因组数据进行 *VcCLCs* 的支架（Scaffold）定位，结果显示，19 个 *VcCLCs* 定位在 12 个不同的支架上（图 3）。在支架 VaccDscaff38、VaccDscaff6、VaccDscaff39 上各有 3 个 *VcCLCs* 分布，在支架 VaccDscaff37 上有 2 个 *VcCLCs* 分布，其余 8 个支架上各有 1 个 *VcCLCs* 分布。

基于蓝莓和拟南芥的基因组数据进行物种间共线性分析，结果表明，在蓝莓和拟南芥种间进化关系中，*CLC* 基因共有 22 对同源片段重复基因对。在拟南芥每个染色体上均存在片段重复事件，但蓝莓并不是每个支架上都存在片段重复事件（图 4）。

2.5　保守结构域

VcCLC 成员保守结构域如图 5 所示，所有 VcCLC 蛋白均含有 Voltage_CLC/Voltage_CLC superfamily 结构域，该结构域是介导 Cl^-跨膜转运的核心功能单元，在植物中该结构域通常与 H^+/Cl^-反向转运活性相关，通过将细胞质中的 Cl^-区隔化至液泡或排出细胞外，从而维持细胞离子稳态[15]。除 VcCLCc1/2/3 以外，其他 VcCLC 蛋白均含有 CBS 结构域，该结构域多以串联重复形式存在，可通过感知细胞内配体变化参与蛋白的变构调节，进而调控 CLC 蛋白的离子转运活性[27]。此外，VcCLCd1/2/3 具有独特的结构域组成，在 N 端约 150 ~ 350 氨基酸单位含有一个 Cyclin_N superfamily 结构域，该结构域主要参与蛋



不同颜色字体代表不同亚家族成员：黄色代表 D 亚家族成员，蓝色代表 A 亚家族成员，红色代表 B 亚家族成员。

图 2 蓝莓 *CLC* 基因家族基因结构(A)和保守基序(B)组合图

Fig. 2 Gene structure (A) and conserved motifs (B) of *VcCLC* gene family

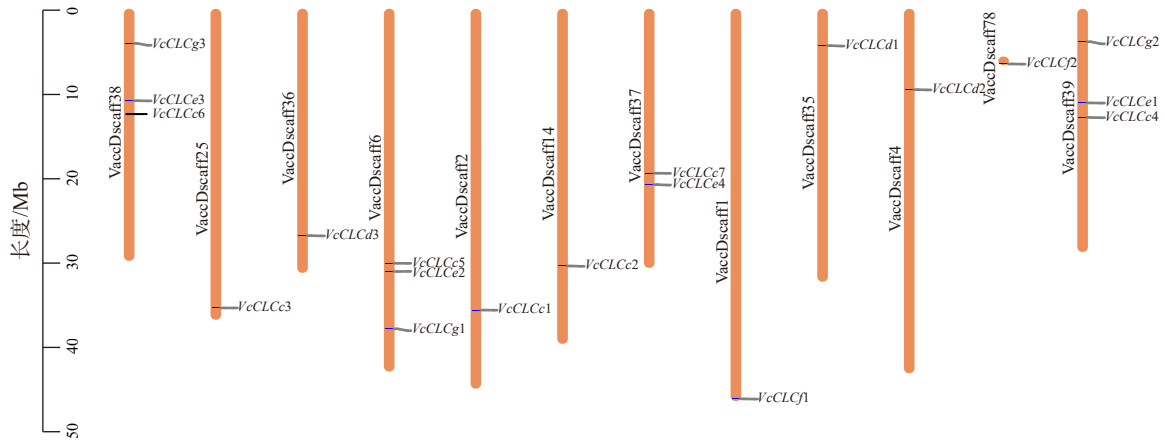


图 3 蓝莓 *CLC* 基因家族支架定位

Fig. 3 Scaffold localization of *VcCLC* gene family

白互作与信号整合。

2.6 启动子顺式作用元件及转录因子预测

本研究选择 *VcCLCs* 基因上游 2 000 bp 的区域作为启动子进行分析，结果如图 6 所示。根据顺式作用元件的功能将其分为 4 类：第一类是胁迫响应相关元件，例如低温响应元件 LTR，干旱响应元件 MBS，厌氧响应元件 ARE，其中 ARE 在所有 *VcCLCs* 中均有存在，提示 *VcCLCs* 可能在淹水或缺氧条件下被诱导，以维持根部离子平衡；第二类是激素响应相关元件，所有成员都具有多种激素响应元件，其中 D 亚家族成员及 *VcCLCd*1/2/3 分布有较多的茉莉酸甲酯(MeJA)响应元件 CGTCA-motif 和

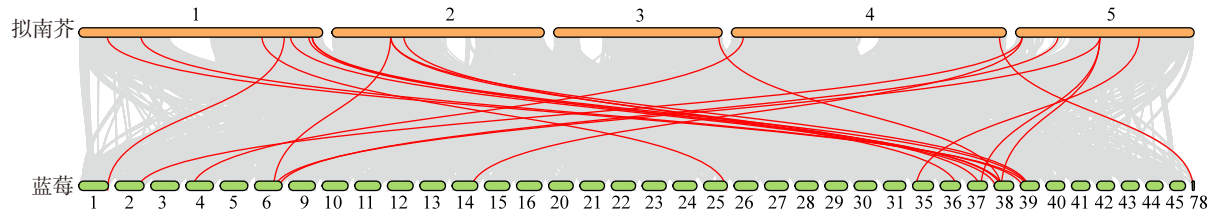
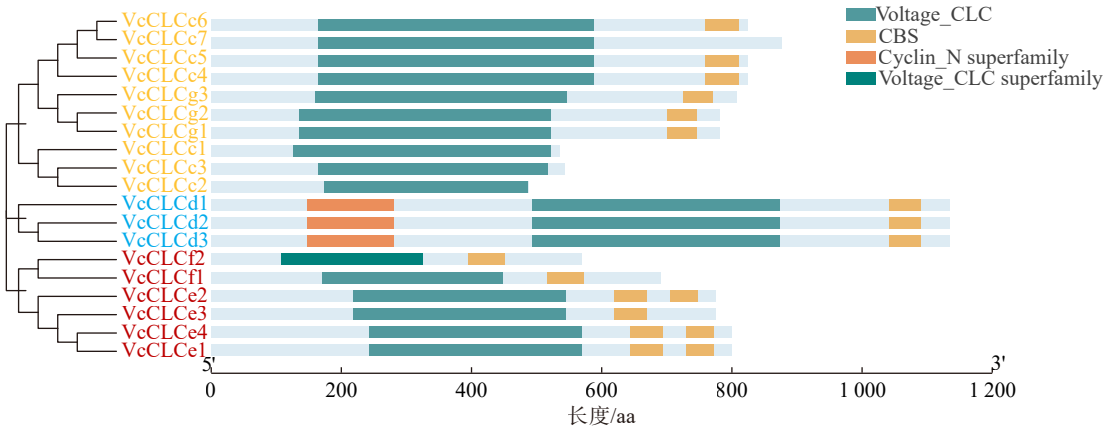


图 4　蓝莓和拟南芥 *CLC* 基因种间共线性

Fig. 4　Colinearity analysis of *CLC* genes between *Vaccinium corymbosum* and *Arabidopsis thaliana*



图中不同颜色字体代表不同亚家族成员：黄色代表 D 亚家族成员，蓝色代表 A 亚家族成员，红色代表 B 亚家族成员。

图 5　蓝莓 *CLC* 基因家族保守结构域分析

Fig. 5　Conserved domain analysis of *VcCLC* gene family

TGACG-motif。除此之外还有水杨酸(SA)响应元件 TCA-element，赤霉素(GA)响应元件 P-box、TATC-box 以及生长素(IAA)响应元件 TGA-element 和 AuxRR-core，其中脱落酸(ABA)响应元件 ABRE 是出现频率最高的元件，在每个成员的启动子区域均有存在，ABRE 主要参与 ABA 信号通路，并参与干旱、盐胁迫等非生物逆境的响应[28]；第三类是生长发育相关元件，例如参与昼夜节律调控的 circadian 元件，在 *VcCLCf*1/2、*VcCLCg*1/2/3 被发现，与分生组织形成相关的 CAT-box，在 *VcCLCc*4/*e*2 的启动子中被发现；第四类是光响应相关元件，热图结果显示 *VcCLCs* 均含有大量的光响应元件，其中 *VcCLCc*1/*e*2/*g*1 等成员携带高达 7 ~ 8 种不同类型的光响应元件，暗示这些基因的转录活性可能受到光信号的影响。

转录因子预测结果显示，*VcCLCs* 启动子区域可能结合的转录因子家族包括 ERF、NAC、WRKY、TCP、bHLH、bZIP、C2H2、MYB、LBD 等多个家族，其中，ERF、NAC、WRKY 是出现频率最高的转录因子家族，表明更有可能受到这些转录因子的调控(图 7)。

2.7　盐胁迫下基因表达分析及差异基因筛选

蓝莓盐胁迫转录组分析结果显示，19 个 *VcCLCs* 在盐胁迫下呈现不同的表达模式。*VcCLCc*1 在‘Duke’根中盐处理后表达量显著升高，*VcCLCc*2/3 在‘Sweetheart’根处理前高表达，盐处理后显著下调，*VcCLCe*1/2/3/4 和 *VcCLCg*1/2/3 在‘Duke’和‘Sweetheart’两个品种的叶中表达量都较高，但其表达量并没有受到盐诱导，*VcCLCf*2 的表达量在‘Duke’根中随着时间变化而显著升高(图 8A)。在‘Sweetheart’和‘Duke’根中共鉴定出 3 个差异表达的 *VcCLCs* 基因，在叶中没有鉴定出差异基因(差异倍数为 2，$P_{adjust} < 0.05$)(图 8B)。

2.8　盐胁迫下蓝莓 *CLC* 基因表达的 RT-qPCR 验证

为了验证转录组数据的可靠性，采用 RT-qPCR 对筛选到的 3 个差异表达基因进行验证。结果显示，盐处理 3 h 后，‘Sweetheart’根中 *VcCLCc*1、*VcCLCc*2 和 *VcCLCf*2 的表达水平显著下调，在‘Duke’根中则显著上调，在盐胁迫敏感性不同的两个品种中呈现相反的表达趋势(图 9A)。同样在盐处理 3 h 后，‘Sweetheart’叶中 *VcCLCc*1 的表达水平呈现先升高后降低的趋势，在‘Duke’叶中则下调后趋于稳定；*VcCLCc*2 在两个品种叶中的表达水平变化均不显著；*VcCLCf*2 在‘Sweetheart’、‘Duke’叶中随着处理时间变化其表达量逐渐降低(图 9B)，以上结果与转录组数据趋势基本一致。

3　讨　　论

3.1　蓝莓 *CLC* 基因家族的进化特征与结构保守性

植物生长发育中面临许多环境胁迫，如低温、高

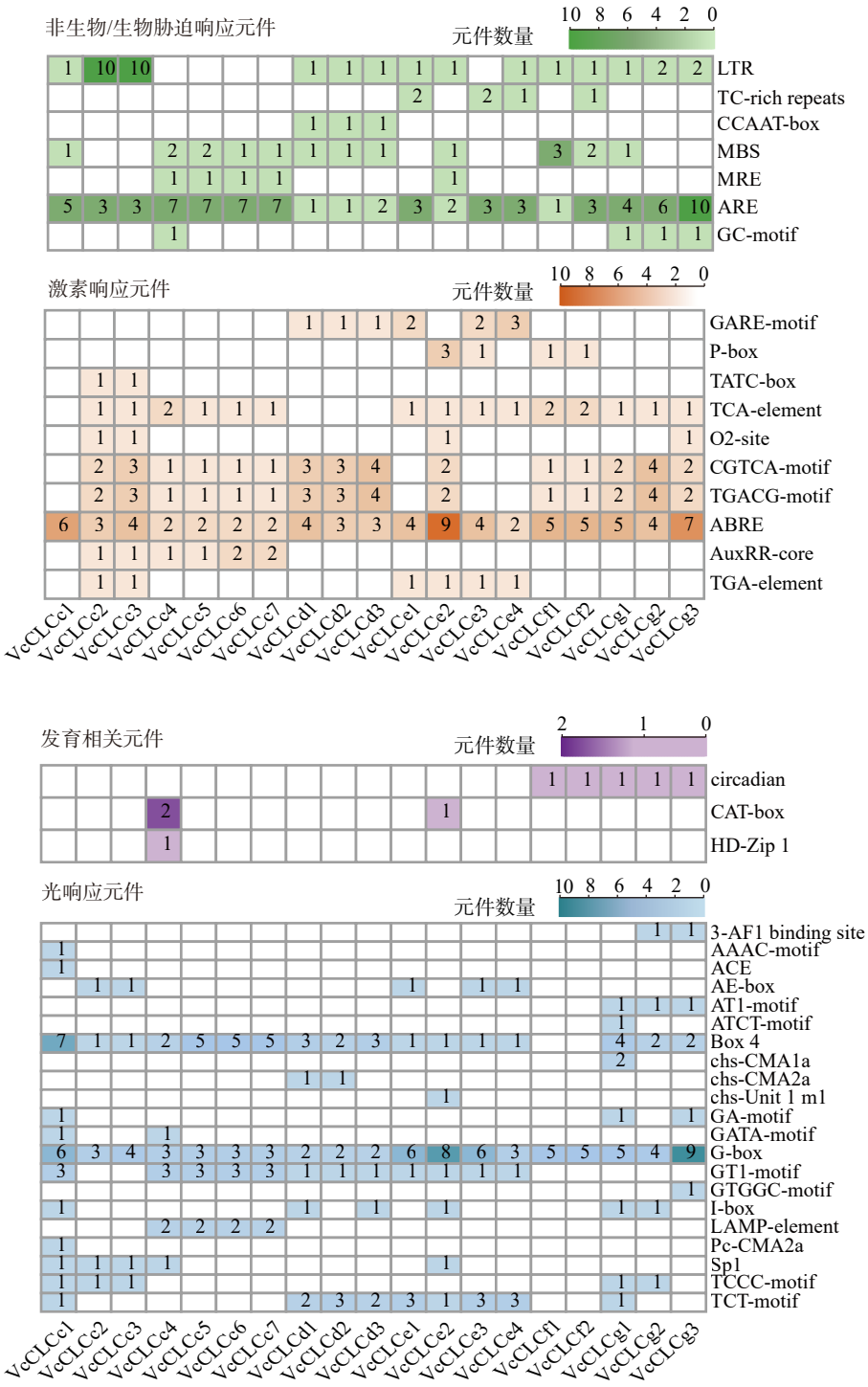


图 6 蓝莓 *CLC* 基因家族启动子顺式作用元件分析

Fig. 6 Cis-acting elements analysis in the promotors of *VcCLC* gene family

温、干旱、积水和盐分胁迫[29]。在盐胁迫下，细胞内离子浓度增加，细胞渗透压升高，抑制植物的正常生长和发育，严重时会导致植物萎蔫甚至死亡[30]。维持细胞内离子稳态是植物应对盐胁迫的重要途径之一，离子通道和转运蛋白在此过程中起着重要作用[15]。CLC 蛋白可以参与 Cl^-、NO_3^- 以及其他阴离子的跨膜运输，提高植物耐盐性[31−33]。因此，对蓝莓 *CLC* 基因家族进行全基因组鉴定分析对于深入了解植物耐盐调控网络具有重要意义。到目前为止，植物 *CLC* 基因家族已经在多个物种中被鉴定，如拟南芥、毛果杨（*Populus trichocarpa*）[34]、水稻（*Oryza sativa*）[35]、小麦（*Triticum aestivum*）[36]、玉米（*Zea mays*）[37]、大豆[38]、棉花[39]、甘蔗（*Saccharum officinarum*）[40]、辣椒[24]、番茄[23]、毛竹（*Phyllostachys edulis*）[41]、土豆（*Solanum tuberosum*）[42]等，但蓝莓 *CLC* 基因家族还未被鉴定。本研究从蓝莓基因组中共鉴定出 19 个蓝莓 *CLC* 基因家族成员，其数量介于甘蔗（29 个）、小麦（23 个）、棉花（22 个）、毛竹（18 个）、辣椒（12 个）、

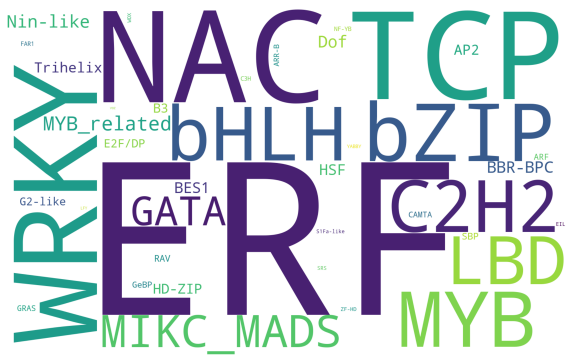


图 7　蓝莓 *CLC* 基因家族上游转录因子预测

Fig. 7　Prediction about the upstream transcription factors of the *VcCLC* gene family

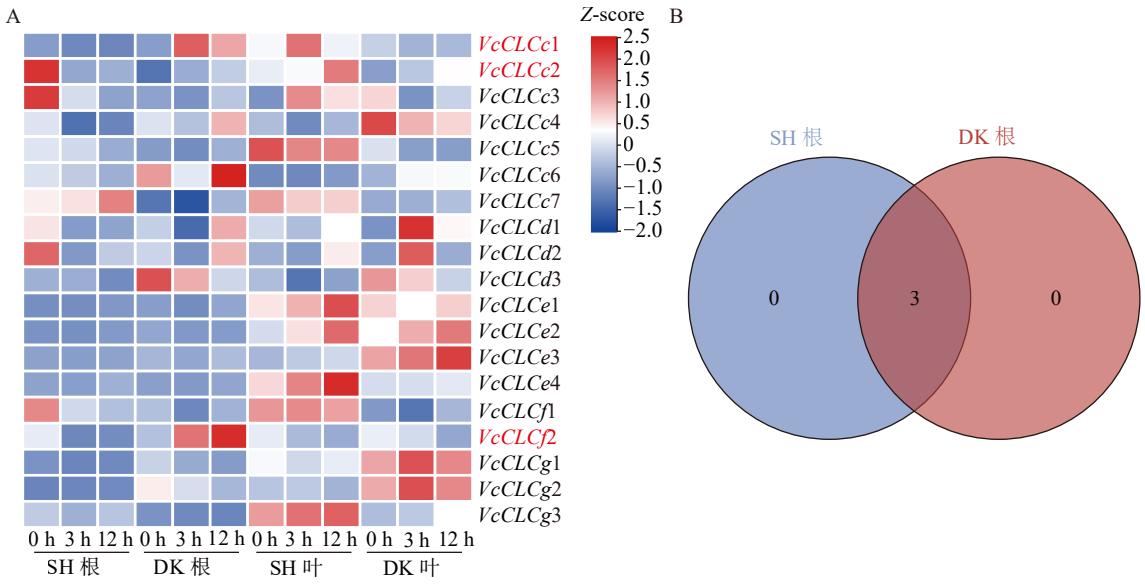
番茄(8 个)之间。

系统进化分析将 VcCLCs 分为 4 个亚家族，值得注意的是，蓝莓中未鉴定出 C 亚家族成员，可能反映了物种特异性的进化适应，而 D 亚家族的扩张可能与基因复制事件有关(图 1)。同一亚家族成员的基因结构通常相似，这一点在该研究以及其他物种中都已被证实，但蓝莓 *CLC* 基因结构与其他物种相比也有所区别，例如本研究中 *VcCLCs* 基因结构更为保守紧凑，内含子数量分化较小(图 2)，未出现甘蔗中 0 ~ 22 个的极端结构差异，也不存在无内含子的基因[40]，此外 *VcCLCs* 基因在蓝莓 12 条支架中呈非均匀分布，且多数集中在支架两端(图 3)，这一分布特征在多数基因家族研究中普遍存在[43−45]，暗示这些区域的 *VcCLC* 基因可能具有较高的表达活性。共线性分析显示，尽管拟南芥是草本模式植物，但仍能与蓝莓形成 22 对直系同源关系(图 4)，这表明 *CLC* 具有高度进化保守型。亚细胞定位预测结果显示所有的 VcCLC 蛋白均定位于细胞膜(表 2)，但根据以往研究，该家族成员定位也会在液泡膜[17]、叶绿体膜[46]、高尔基体囊泡[18]等多种膜室中，因此具体的定位还需通过实验手段进行论证。

3.2　蓝莓 *CLC* 基因家族顺式作用元件及上游转录因子预测

为了探究 *VcCLCs* 的潜在功能和调控机制，我们在 19 个 *VcCLCs* 的启动子区域鉴定出 4 种类型的顺式作用元件，这表明 *VcCLCs* 基因功能多样，响应不同的生物过程，同时多数 *VcCLCs* 富含 ABA 响应元件、逆境响应元件及激素调控相关元件(图 6)，ABA 作为植物响应盐胁迫的核心激素，通过调控气孔运动、离子平衡与渗透调节等多个途径增强植物耐盐性。据报道，盐胁迫可迅速诱导 ABA 合成并激活 SnRK2-AREB/ABF 信号通路，促进气孔关闭以减少水分散失，同时通过 CBL-CIPK 模块协同激活 SOS 通路，加速 Na^+外排并维持 K^+稳态，降低细胞内 Na^+/K^+比值。此外，在平邑甜茶(*Malus hupehensis*)中，研究发现外源施加 ABA 可促进根系 Cl^-外排，其核心机制是 ABA 可诱导 *MhABI5* 转录，MhABI5 可与 *MhZAT10L* 启动子结合并抑制其转录，从而解除了 MhZAT10L 对 *MhSLAH3* 的抑制，*MhSLAH3* 编码一个 Cl^-外排通道蛋白，由此加速了根部的 Cl^-外流，提高了植物对氯盐胁迫的耐受性[47]。ABA 还可促进脯氨酸、可溶性糖等渗透物质积累，提升细胞渗透调节能力，并通过增强抗氧化系统清除活性氧，维持细胞膜稳定性[48]。

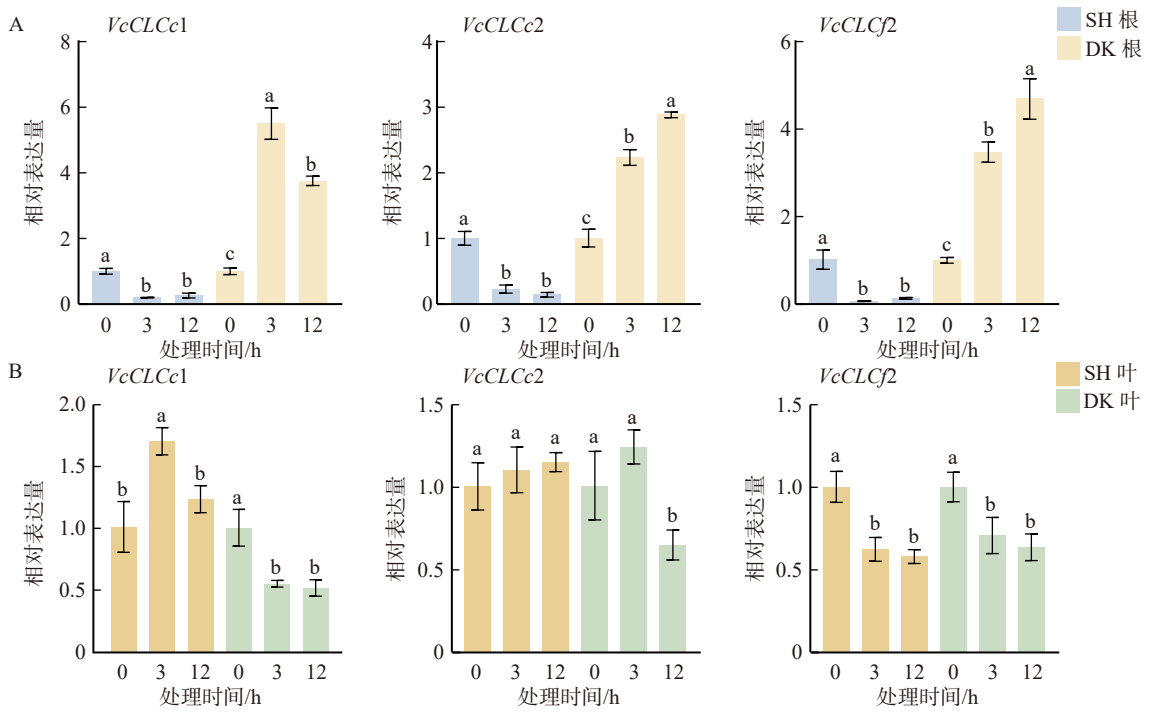
近年来，虽然越来越多的物种都开展了有关 *CLC* 基因的深入研究，但相应转录调控机制的研究



SH 代表盐敏感品种 ‘Sweetheart’，DK 代表耐盐品种 ‘Duke’。

图 8　蓝莓 *CLC* 基因家族在 NaCl 胁迫下的基因表达分析(A)和差异基因 Venn 图(B)

Fig. 8　Expression analysis of *VcCLC* gene family under NaCl treatment (A) and Venn diagram of differentially expressed genes (B)



A 为 ‘Sweetheart’（SH）与 ‘Duke’（DK）根中 *CLC* 基因的相对表达量；B 为 ‘Sweetheart’ 与 ‘Duke’ 叶中 *CLC* 基因的相对表达量；显著性标注是以每个品种内部的不同处理时间为组别进行比较分析。不同小写字母表示各组间在 $P < 0.05$ 水平上差异显著。

图 9 蓝莓 *CLC* 基因 NaCl 处理后的 RT-qPCR

Fig. 9 RT-qPCR of the *VcCLC* gene after NaCl treatment

不多，本研究首次针对全基因组水平上 *VcCLC* 基因家族进行了上游转录因子的预测，筛选到了 ERF、NAC、WRKY、bHLH 等转录因子（图 7）。在拟南芥中，盐胁迫下，AtWRKY9 能直接结合到 *AtCLCf* 的启动子区域，从而增强其表达，提高植物耐盐性[18]。在玉米中，ZmbHLH118 能够直接结合 *ZmCLCa* 基因的启动子特定区域，并抑制其表达，从而限制过量的硝酸盐进入液泡，实现硝酸盐储备的精准调控[49]。在草莓（*Fragaria* × *ananassa*）中，天然小分子物质 ALA（5-氨基乙酰丙酸）可以削弱 FaMYB44 对 *FaCLC-c*4 的转录抑制作用，帮助植物将 Cl^- 截留并贮存于根部液泡中，同时优先 NO_3^- 向地上部运输，提高了草莓耐盐性[50]。这些结果佐证了我们的预测结果，后续将会使用实验手段确定具体的转录因子，并对其表达量及调控功能进行确认。

3.3 盐胁迫下蓝莓 *CLC* 基因的组织特异性表达

先前研究表明，植物维持 Cl^- 稳态的两种方式分别是将 Cl^- 从根部排出或区隔化至根液泡中[51−52]。根作为直接感知土壤盐分并介导离子吸收与排出的关键器官，基因的快速上调可能有助于 Cl^- 的外排或液泡区隔化，从而减轻 Cl^- 过量的积累。本文通过蓝莓 *CLC* 基因盐胁迫表达热图结合 RT-qPCR 实验对盐差异基因的组织特异性表达模式进行分析。结果表明，在根组织中，*VcCLCc*1、*VcCLCc*2 与 *VcCLCf*2 在耐盐品种‘Duke’受盐诱导显著上调，而在盐敏感品种‘Sweetheart’中则呈下调（图 9A）。这一发现，与此前在水稻中的发现相吻合，该研究发现经盐处理后，*OsCLC*1 在盐敏感品种‘IR29’和耐盐品种‘Pokkali’根中，其表达分别下调和上调[35]。与此同时，他们在拟南芥里的同源基因 *AtCLCc* 被证明能够运输 Cl^- 进入液泡并调节气孔运动，从而调控 Cl^- 在液泡中的积累提高植物耐盐性[17]；突变体 *atclcf* 幼苗分生区长和伸长区长显著降低、根长变短，而回补株系在盐胁迫下恢复了表型，此外研究还发现 NaCl 诱导了 *AtCLCf* 从高尔基体转移到质膜，促进了根部 Cl^- 外排[18]。因此我们推测本研究的 3 个基因可能在根中发挥了类似的功能，且其表达调控具有品种特异性，这或许是‘Duke’耐盐性优于‘Sweetheart’的分子基础之一。与基因在根组织表现出的显著差异不同，在叶片中，*VcCLCe*1/2/3/4 与 *VcCLCg*1/2/3 处理前表达量均较高，但经盐处理后其表达量变化不明显（图 9B）。据报道，*VcCLCe*1/2/3/4 在拟南芥中的同源基因 *AtCLCe* 定位于叶绿体类囊体膜，主要在光转暗的过程中发挥作用，通过维持 Cl^- 平衡保障叶绿体结构与光合电子传递稳定。*atclce* 突变体在暗适应条件下表现出显著的光合异常，具体表现为叶绿素荧光 OJIP 曲线改变、光合电子传递速率加快、叶绿体超微结构异常等[53]，由此我们推测这类基因主要负责维持叶片基础生理代谢过程中的 Cl^- 稳态，为光合作用等核心生理活动提供离子平衡保障。上述基因在

叶片中盐胁迫下表达变化不显著，也可能与处理时间较短有关，其调控机制有待进一步探究。此外，*VcCLCc*1 盐处理后在叶中的表达呈现先升后降的趋势，暗示其可能在盐胁迫早期参与叶片离子的调节，缓解初期离子失衡带来的胁迫影响（图 9B）。

4　结　　论

本研究在蓝莓全基因组范围内共鉴定到 19 个 *CLC* 基因家族成员，并对其进行理化性质、基因结构、进化关系和表达模式进行了分析。同时，利用生信分析预测 ERF、NAC、MYB 等转录因子可能调控 *VcCLCs* 的表达。基于盐胁迫条件下，耐盐品种‘Duke’和盐敏感品种‘Sweetheart’的转录组数据，筛选到 3 个在两品种根中均差异表达的基因，RT-qPCR 结果显示 3 个基因在‘Duke’根中均受盐胁迫诱导显著上调，而在‘Sweetheart’根中显著下调，提示它们可能在蓝莓盐胁迫应答与品种耐盐性差异中发挥作用。

本研究首次系统鉴定了蓝莓 *CLC* 基因家族，并筛选出响应盐胁迫的候选基因，为解析盐胁迫下蓝莓 Cl^- 稳态维持的分子机制提供了理论基础，但上述结论主要基于表达分析和生物信息学预测，所筛选基因的 Cl^- 转运功能及上游转录调控关系未来仍需通过遗传转化、酵母单杂交等实验进一步验证。

参　考　文　献

[1] Basu A, Rhone M, Lyons T J. Berries: emerging impact on cardiovascular health [J]. Nutrition Reviews, 2010, 68(3): 168−177.

[2] Mengist M F, Grace M H, Xiong J, et al. Diversity in metabolites and fruit quality traits in blueberry enables ploidy and species differentiation and establishes a strategy for future genetic studies [J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 370.

[3] 吴林, 胡晶, 唐雪东, 等. 我国蓝莓产业的现状与思考 [J]. 中国果树, 2025(2): 1−5.
Wu L, Hu J, Tang X D, et al. Current situation and thinking of the blueberry industry in China [J]. China Fruits, 2025(2): 1−5.

[4] Yang Y, Guo Y. Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses [J]. New Phytologist, 2018, 217(2): 523−539.

[5] Ma L, Li J, Li J, et al. Plant salt-tolerance mechanisms: classic signaling pathways, emerging frontiers, and future perspectives [J]. Molecular Plant, 2026, 19(3): 538−570.

[6] 王法格. 兔眼蓝莓品种引选与苗木繁育技术研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2009.
Wang F G. Introduction and selection propagation of *Vaccinium Ashei*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2009.

[7] Song H, Cao Y, Zhao X, et al. Na^+-preferential ion transporter HKT1;1 mediates salt tolerance in blueberry [J]. Plant Physiology, 2023, 194(1): 511−529.

[8] Wright G C, Patten K D, Drew M C. Mineral composition of young rabbiteye and southern highbush blueberry exposed to salinity and supplemental calcium [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 1994, 119(2): 229−236.

[9] 乌凤章. NaCl 胁迫对高丛越橘幼苗生长和光合生理特性的影响 [J]. 西北植物学报, 2015, 35(11): 2258−2265.
Wu F Z. Impacts of NaCl stress on the growth and photosynthetic physiological characteristics of highbush blueberry seedling [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2015, 35(11): 2258−2265.

[10] Lei L, Dong K, Liu S, et al. Genome-wide identification of the *WRKY* gene family in blueberry (*Vaccinium* spp.) and expression analysis under abiotic stress [J]. Frontiers in Plant Science, 2024, 15: 1447749.

[11] Qu D, Wu F, Zhao X, et al. A bZIP transcription factor VabZIP12 from blueberry induced by dark septate endocyte improving the salt tolerance of transgenic *Arabidopsis* [J]. Plant Science, 2022, 315: 111135.

[12] Zhang C Y, Liu H C, Zhang X S, et al. *VcMYB4a*, an R2R3-MYB transcription factor from *Vaccinium corymbosum*, negatively regulates salt, drought, and temperature stress [J]. Gene, 2020, 757: 144935.

[13] Zhao R, Chen L, Xiao J, et al. Functional activity analysis of plasma membrane H^+-ATPase gene promoter and physiological functional identification of interactive transcription factor in blueberry [J]. Environmental and Experimental Botany, 2022, 203: 105048.

[14] Teakle N L, Tyerman S D. Mechanisms of Cl^- transport contributing to salt tolerance[J]. Plant, Cell & Environment, 2010, 33(4): 566−589.

[15] Liu L, Li X, Wang C, et al. The role of chloride channels in plant responses to NaCl [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(1): 19.

[16] Zifarelli G, Pusch M. CLC transport proteins in plants [J]. FEBS Letters, 2010, 584(10): 2122−2127.

[17] Jossier M, Kroniewicz L, Dalmas F, et al. The Arabidopsis vacuolar anion transporter, AtCLCc, is involved in the regulation of stomatal movements and contributes to salt tolerance: AtCLCc in chloride homeostasis [J]. The Plant Journal, 2010, 64(4): 563−576.

[18] Rajappa S, Krishnamurthy P, Huang H, et al. The translocation of a chloride channel from the Golgi to the plasma membrane helps plants adapt to salt stress [J]. Nature Communications, 2024, 15: 3978.

[19] Liu W, Feng J, Ma W, et al. *GhCLCg*-1, a vacuolar chloride channel, contributes to salt tolerance by regulating ion accumulation in upland cotton [J]. Frontiers in Plant Science,

2021, 12: 765173.

[20] Wei P, Che B, Shen L, et al. Identification and functional characterization of the chloride channel gene, *GsCLC-c2* from wild soybean [J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 121.

[21] Wei P, Wang L, Liu A, et al. *GmCLC*1 confers enhanced salt tolerance through regulating chloride accumulation in soybean [J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 1082.

[22] Song J, Han M, Zhu X, et al. *MhCLC-c*1, a Cl channel c homolog from *Malus hupehensis*, alleviates NaCl-induced cell death by inhibiting intracellular Cl^- accumulation [J]. BMC Plant Biology, 2023, 23(1): 306.

[23] Lv R, Mo F, Li C, et al. Genome-wide identification of the *CLC* gene family in tomato (*Solanum lycopersicum*) and functional analysis of *SlCLC8* in salt stress tolerance [J]. Scientia Horticulturae, 2024, 338: 113754.

[24] 贺晓琳, 王飞, 尹延旭, 等. 辣椒 CLC 基因家族鉴定及表达模式分析 [J]. 分子植物育种, 2024, 1−12.
He X L, Wang F, Yin Y X, et al. Genome-wide identification and expression analysis of CLC gene family in pepper (*Capsicum annuum* L.)[J]. Molecular Plant Breeding, 2024, 1−12.

[25] Colle M, Leisner C P, Wai C M, et al. Haplotype-phased genome and evolution of phytonutrient pathways of tetraploid blueberry [J]. GigaScience, 2019, 8(3): giz012.

[26] Jin J, Tian F, Yang D C, et al. PlantTFDB 4.0: Toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants [J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(D1): D1040−D1045.

[27] Yoo K S, Ok S H, Jeong B C, et al. Single cystathionine β-synthase domain–containing proteins modulate development by regulating the thioredoxin system in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2011, 23(10): 3577−3594.

[28] Ndathe R, Dale R, Kato N. Dynamic modeling of ABA-dependent expression of the *Arabidopsis RD29A* gene [J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 928718.

[29] Cortina C, Culiáñez-Macià F A. Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis [J]. Plant Science, 2005, 169(1): 75−82.

[30] Zhao S, Zhang Q, Liu M, et al. Regulation of plant responses to salt stress [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(9): 4609.

[31] Ayadi M, Chiab N, Charfeddine S, et al. Improved growth and *Tuber* quality of transgenic potato plants overexpressing either NHX antiporter, CLC chloride channel, or both [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2022, 189: 46−58.

[32] Shi Y, Liu D, He Y, et al. CHLORIDE CHANNEL-b mediates vacuolar nitrate efflux to improve low nitrogen adaptation in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2023, 193(3): 1987−2002.

[33] Wang Y, Dong F, Chen H, et al. Effects of arbuscular mycorrhizal fungus on sodium and chloride ion channels of *Casuarina glauca* under salt stress [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(4): 3680.

[34] 於丙军, 刘振, 卫培培. 基于盐逆境下植物 *CLC* 同源基因的发掘和功能解析的研究进展 [J]. 南京农业大学学报, 2017, 40(2): 187−194.
Yu B J, Liu Z, Wei P P. Research progresses on whole genome discovery and function analysis of *CLC* homologous genes in plants based on salt stress [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2017, 40(2): 187−194.

[35] Diédhiou C J, Golldack D. Salt-dependent regulation of chloride channel transcripts in rice [J]. Plant Science, 2006, 170(4): 793−800.

[36] Mao P, Run Y, Wang H, et al. Genome-wide identification and functional characterization of the chloride channel TaCLC gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Frontiers in Genetics, 2022, 13: 846795.

[37] 曾廷儒, 张静, 张登峰, 等. 玉米 ZmCLCa 基因克隆及其对氮素吸收的功能验证 [J]. 植物遗传资源学报, 2017, 18(1): 112−116.
Zeng T R, Zhang J, Zhang D F, et al. Cloning of *ZmCLCa* gene in maize and its functional characterization of nitrogen absorption [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2017, 18(1): 112−116.

[38] 李伟, 王龙超, 曹金花, 等. 大豆基因组 CLC 同源基因家族的生物信息学分析 [J]. 南京农业大学学报, 2014, 37(3): 35−43.
Li W, Wang L C, Cao J H, et al. Bioinformatics analysis of CLC homologous genes family in soybean genome [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2014, 37(3): 35−43.

[39] Liu X, Pi B, Pu J, et al. Genome-wide analysis of chloride channel-encoding gene family members and identification of CLC genes that respond to Cl^-/salt stress in upland cotton [J]. Molecular Biology Reports, 2020, 47(12): 9361−9371.

[40] 杨宗桃, 杨婷, 王禹童, 等. 甘蔗 CLC 基因家族鉴定与表达分析 [J]. 作物学报, 2026, 52(3): 722−734.
Yang Z T, Yang T, Wang Y T, et al. Identification and expression analysis of the CLC gene family in sugarcane [J]. Acta Agronomica Sinica, 2026, 52(3): 722−734.

[41] 陈诗蕾, 郭琳, 鲁海雯, 等. 毛竹 CLCs 基因家族鉴定及高盐与干旱胁迫下的表达模式分析 [J]. 核农学报, 2025, 39(11): 2374−2387.
Chen S L, Guo L, Lu H W, et al. Identification and expression analysis of CLC genes in response to hypersaline stress and drought stress in moso bamboo (*Phyllostachys* edulis) [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2025, 39(11): 2374−2387.

[42] Gong H, Wang H, Chen J, et al. Genome-wide identification and expression pattern analysis of the chloride channel gene family in potato (*Solanum tuberosum* L.) under salt stress [J]. Frontiers in Plant Science, 2025, 16: 1703856.

[43] Khisti M, Avuthu T, Yogendra K, et al. Genome-wide identification and expression profiling of growth-regulating factor (*GRF*) and *GRF*-interacting factor (GIF) gene families in chickpea and pigeonpea [J]. Scientific Reports, 2024, 14: 17178.

[44] Xue G, He A, Yang H, et al. Genome-wide identification, abiotic stress, and expression analysis of PYL family in Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.) during grain development [J]. BMC Plant Biology, 2024, 24(1): 725.

[45] Zhang Y, Meng J, Xu F. Genome-wide identification of the PP1 and PPP1R3 gene family in oyster *Crassostrea gigas*: unraveling their roles in glycogen metabolism [J]. Aquaculture Reports, 2024, 37: 102258.

[46] Marmagne A, Vinauger-Douard M, Monachello D, et al. Two members of the *Arabidopsis* CLC (chloride channel) family, AtCLCe and AtCLCf, are associated with thylakoid and Golgi membranes, respectively [J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(12): 3385−3393.

[47] Song J, Yan J, Sun B, et al. Abscisic acid regulates Cl^- efflux via the ABI5-ZAT10-SLAH3 module in chloride-stressed *Malus hupehensis* [J]. Horticulture Research, 2024, 11(9): uhae200.

[48] Yu Z, Duan X, Luo L, et al. How plant hormones mediate salt stress responses [J]. Trends in Plant Science, 2020, 25(11): 1117−1130.

[49] Zhang C, Demes-Causse E, Li X, et al. The maize ZmbHLH118 transcription factor regulates vacuolar nitrate loading by the NO_3^- Transporter ZmCLCa [J]. Advanced Science, 2026, 13(25): e20219.

[50] Wei B, Zhang J, Wang L. ALA improves salt tolerance of strawberry by alleviating the negative regulation of FaMYB44 on *FaCLC* expression [J]. Journal of Plant Physiology, 2025, 315: 154633.

[51] Abbaspour N, Kaiser B, Tyerman S. Chloride transport and compartmentation within main and lateral roots of two grapevine rootstocks differing in salt tolerance [J]. Trees, 2013, 27(5): 1317−1325.

[52] Li B, Qiu J, Jayakannan M, et al. *AtNPF*2.5 modulates chloride (Cl^-) efflux from roots of *Arabidopsis thaliana* [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 7: 2013.

[53] Herdean A, Nziengui H, Zsiros O, et al. The *Arabidopsis* thylakoid chloride channel AtCLCe functions in chloride homeostasis and regulation of photosynthetic electron transport [J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 115.

（责任编辑　吴　娟　赵田芸
责任编委　马履一）