丹参钙依赖蛋白激酶 (CDPK) 家族鉴定及其镉胁迫响应研究

刘俐君[1,2], 张文颖[1,2], 罗红梅[1,2*]

(1. 中国医学科学院北京协和医学院, 药用植物研究所, 道地药材品质保障与资源持续利用全国重点实验室, 北京 100193; 2. 中国医学科学院北京协和医学院, 药用植物研究所, 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100193)

摘要: 钙依赖蛋白激酶 (calcium-dependent protein kinase, CDPK) 是植物特有的钙信号感应因子, 广泛参与植物的生长发育与逆境响应。为系统鉴定丹参 (*Salvia miltiorrhiza*) *CDPK* 基因家族成员及其对镉 (cadmium, Cd) 胁迫的响应机制, 本研究在丹参基因组中鉴定出26个全长 *CDPK* 基因 (*SmCDPKs*), 分布于7条染色体, 并对其蛋白理化性质、二级结构及亚细胞定位进行了系统预测和分析。通过构建系统进化树, 将SmCDPKs划分为四个亚族, 并结合基因结构与保守基序分析, 预测其功能的保守性与多样性。顺式作用元件分析显示, *SmCDPKs* 启动子区富含响应光照、激素及胁迫的调控元件。转录组数据分析结果表明, *SmCDPK* 基因在不同Cd浓度胁迫下呈现组织特异性表达模式, 其中 *SmCDPK18* 在根和叶中均受Cd胁迫诱导上调表达, 而 *SmCDPK2*、*SmCDPK8*、*SmCDPK22* 等基因的表达水平受Cd胁迫诱导后显著下调。通过实时荧光定量PCR (qRT-PCR) 检测Cd胁迫下基因的相对表达量, 结果与转录组数据一致, 验证了关键差异表达的 *SmCDPKs* 的Cd响应模式。本研究从基因组层面对丹参 *CDPK* 基因家族进行了系统鉴定并探讨其在Cd胁迫诱导下的响应特征, 为丹参应对Cd胁迫的机制研究及分子育种提供了关键基因资源与理论依据。

关键词: 钙依赖蛋白激酶; 丹参; 镉胁迫; 基因家族; 表达分析

中图分类号: R931 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2026)03-0961-12

Genome-wide analysis and cadmium-induced expression profiling of the *CDPK* gene family in *Salvia miltiorrhiza*

LIU Li-jun[1,2], ZHANG Wen-ying[1,2], LUO Hong-mei[1,2*]

(*1. State Key Laboratory for Quality Ensurance and Sustainable Use of Dao-Di Herbs, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 2. Engineering Research Center of Chinese Medicine Resource, Ministry of Education, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China*)

Abstract: Calcium-dependent protein kinases (CDPKs) serve as crucial calcium sensors in plants, playing key roles in regulating plant growth, development, and stress responses. In this study, a total of 26 *Salvia miltiorrhiza CDPK* (*SmCDPK*) genes were identified through genome-wide analysis, which were unevenly distributed across seven chromosomes. Phylogenetic analysis grouped the 26 SmCDPKs into four distinct subfamilies (I−IV), and systematic predictions were conducted for their physicochemical properties, secondary structures, and subcellular localization. Promoter analysis uncovered multiple *cis*-elements associated with light, phytohormones, and abiotic stress. Transcriptome profiling under 50 and 100 μmol·L^{-1} cadmium (Cd) stress demonstrated tissue-specific expression patterns of these *SmCDPK* genes. Notably, *SmCDPK18* was upregulated in both roots and leaves under Cd

收稿日期: 2025-09-18; 修回日期: 2025-12-08.
基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2021-I2M-1-071).
*通讯作者 E-mail: hmluo@implad.ac.cn
DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-1114

exposure, suggesting involvement in Cd detoxification and oxidative regulation. In contrast, *SmCDPK2*, *SmCDPK8*, and *SmCDPK22* were significantly downregulated in roots. These expression patterns were confirmed by quantitative reverse-transcription PCR (qRT-PCR). This study provides insight into the *CDPK* gene family in *S. miltiorrhiza* and its potential roles in cadmium stress response, offering valuable theoretical support and key gene resources for future molecular breeding and environmental adaptation studies in medicinal plants.

Key words: calcium-dependent protein kinase; *Salvia miltiorrhiza*; cadmium stress; gene family; expression analysis

植物通过复杂的信号转导网络调节代谢过程, 以适应多变的环境条件。该信号转导网络由多种蛋白质与非蛋白质成分共同构成, 其中钙离子 (Ca^{2+}) 作为重要的第二信使之一, 在植物对外界刺激 (如温度、光照、盐分及渗透压变化) 作出快速应答过程中发挥关键作用[1]。当植物感受到这些刺激时, 细胞内 Ca^{2+} 浓度迅速波动, 形成具有时空特异性的钙信号, 这些信号随后被钙传感蛋白识别并激活下游转录与代谢反应[2]。目前在植物中已鉴定出四类主要的 Ca^{2+} 传感蛋白, 包括钙调蛋白 (calmodulins, CaMs)、类钙调蛋白 (calmodulin-like proteins, CMLs)、类钙调磷酸酶 B 蛋白 (calcineurin B-like proteins, CBLs) 及钙依赖蛋白激酶 (calcium-dependent protein kinase, CDPKs)[3]。前三者作为典型的信号中继蛋白 (sensor relays), 仅含 Ca^{2+} 感应结构域, 需依赖下游效应因子发挥功能; 而 CDPKs 同时具备丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶催化结构域和 Ca^{2+} 感应结构域, 能在感知 Ca^{2+} 信号时直接调控靶蛋白, 因而被归类为“感应–响应蛋白”(sensor responders), 在植物 Ca^{2+} 信号转导过程中具有重要地位[4]。

CDPKs 广泛存在于植物、原生生物、卵菌及绿藻中[5], 并在植物生长发育及逆境应对中发挥关键作用。在拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.][6]、水稻 (*Oryza sativa* L.)[7]、小麦 (*Triticum aestivum* L.)[8]、玉米 (*Zea mays* L.)[9]、辣椒 (*Capsicum annuum* L.)[10] 以及野生多毛番茄 (*Solanum habrochaites* S. Knapp & D. M. Spooner)[11] 中分别鉴定出 34、29、20、40、31 种 *CDPKs*。研究表明, *CDPKs* 在植物逆境应答中具有多样化的功能, 沉默多毛番茄中的 *ShCDPK6* 和 *ShCDPK26* 基因后, 植株对灰葡萄孢菌侵染 (生物胁迫) 以及低温、干旱等非生物胁迫的抗性显著下降[11]; 烟草 (*Nicotiana benthamiana* Domin) 中过表达 *MDCPK1A* 能够清除活性氧 (ROS) 积累并调控胁迫相关基因表达, 从而显著增强抗寒性与耐盐性[12]。综上所述, 不同植物中 *CDPKs* 的数量存在差异, 在胁迫应答中的功能也表现出高度多样性。

丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 是唇形科 (Lamiaceae) 鼠尾草属 (*Salvia*) 植物, 入药部位为根及根茎[13]。丹参被广泛应用于心血管疾病治疗, 其主要活性成分包括脂溶性丹参酮与水溶性丹酚酸[14]。近年全球工业化与农业活动加剧导致土壤重金属污染日趋严重, 其中镉 (cadmium, Cd) 因高迁移性及强生物毒性, 已成为威胁药用植物安全生产的关键污染物[15]。丹参主产区 (四川、山东、陕西和河南等地) 普遍存在 Cd 污染问题[16]。已有研究证实有些丹参药材中存在 Cd 残留, 且残留水平与炮制加工阶段呈显著正相关[17]。

虽然 *CDPK* 家族在模式植物和经济作物中响应胁迫的机制研究已取得了显著进展, 但其在药用植物重金属胁迫响应中的功能解析仍鲜有报道。丹参作为药用模式植物[18], 其药效物质 (丹参酮、丹酚酸) 主要在根及根茎中积累, 易受环境胁迫影响[19,20], 同时由于丹参的入药部位直接接触土壤中 Cd 污染, 为丹参药材的品质和用药安全带来隐患。目前, 丹参 *CDPK* 家族 (*SmCDPKs*) 尚未被鉴定, *SmCDPKs* 是否参与了丹参 Cd 胁迫响应过程尚未见报道。本研究通过整合基因组学、转录组学等数据, 利用生物信息学等方法, 对 *SmCDPK* 家族成员进行鉴定, 并结合表达谱数据分析, 探索 *SmCDPK* 基因在不同浓度 Cd 胁迫下的表达特性, 为深入研究 *SmCDPK* 基因家族的功能及其在丹参响应重金属胁迫过程中的作用机制提供依据。

材料与方法

植物材料 丹参植物材料来自中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所试验田, 为山东泗水产地丹参品种。丹参全基因组信息来源于本课题组前期数据。

试剂 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (批号: AO11111A)、TB Green® Premix Ex Taq™ II (批号: AO71182A) 购自 TaKaRa 公司; $CdCl_2·2.5H_2O$ (批号: C13129708) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司; Hoagland 营养液 (批号: NS34224010) 购自北京酷来搏科技有限公司。本实验所用引物由苏州安升达生物科技有限公司合成。

丹参镉胁迫处理 选取生长约 45 天、高度约 12 cm、长势一致的丹参幼苗期植株, 剪取其地上部分

转移至含有标准 Hoagland 营养液的容器中进行水培培养。待植株恢复生长并诱导出新根系后 (约 60 天), 向营养液中分别添加 50 和 100 μmol·L^{-1} $CdCl_2·2.5H_2O$ 溶液, 进行 Cd 胁迫处理, 处理时间参照文献[21,22]研究并作出适当调整后定为 3 天。胁迫处理结束后, 分别收集各处理组及对照组 (未添加 $CdCl_2·2.5H_2O$) 的根和叶样品, 迅速置于液氮中冷冻, 并转移至−80 ℃超低温冰箱, 送至北京百迈克生物科技有限公司进行转录组测序分析。

丹参 *CDPK* 家族基因鉴定 从 TAIR 数据库 (https://www.arabidopsis.org) 下载拟南芥 CDPK 蛋白序列, 通过本地 BLAST 程序与丹参基因组蛋白数据库进行同源比对, 筛选 *E*-value ≤ 1×e^{-10}, identity ≥ 50% 的候选序列。同时, 基于 Interpro 数据库下载的 Pkinase 结构域 (PF00069) 和 EF-hand 结构域 (PF13499) 的隐马尔可夫模型 (Hidden Markov Model, HMM), 使用 HMMER 3.0 的 hmmsearch 命令对丹参全蛋白组进行扫描, 筛选出同时包含这两个保守结构域的蛋白序列。整合上述 BLAST 同源比对和 HMM 结构域扫描的候选结果, 通过 SMART 在线数据库 (https://smart.embl.de) 验证候选蛋白的结构域。最后保留具备完整 Pkinase 结构域和至少一个 EF-hand 结构域的序列, 将其定义为丹参 CDPK 家族成员。

丹参 *CDPKs* 染色体定位及蛋白特征分析 基于丹参基因组注释文件提取出 *SmCDPKs* 的染色体位置信息, 并利用 TBtools II软件[23]Gene Location Visualize 功能绘制其在染色体上的分布图谱; 利用 One stepMCScanX 功能进行共线性分析; 利用 Protein Paramter Calc 功能, 计算 SmCDPKs 的氨基酸数量 (number of amino acids)、分子量 (molecular weight)、理论等电点 (theoretical pI)、不稳定性指数 (instability index)、脂肪族指数 (aliphatic index) 及亲水性平均值 (grand average of hydropathicity, GRAVY); 利用 NCBI BLASTp (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) 工具进行蛋白序列比对; 利用 SOPMA (https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) 在线工具进行 SmCDPKs 的蛋白质二级结构预测; 利用 WoLF PSORT (https://wolfpsort.hgc.jp) 在线工具进行 SmCDPKs 亚细胞定位的预测。

丹参 *CDPK* 基因家族进化分析 从 TAIR 数据库 (https://www.arabidopsis.org) 和 Interpro 数据库 (https://www.ebi.ac.uk/interpro) 分别下载拟南芥和水稻的完整 CDPKs 蛋白序列; 使用 MEGA 11.0 软件[24]对上述物种的 CDPKs 蛋白序列进行比对, 采用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建丹参、水稻和拟南芥 CDPKs 蛋白的系统进化树, 自展检验 (bootstrap) 设置 1 000 次重复。使用 iTOL 在线工具 (https://itol.embl.de) 进行进化树的可视化。

丹参 *CDPK* 基因结构、保守基序、保守结构域及启动子顺式作用元件分析 利用 TBtools II 软件[23]对 *SmCDPKs* 进行相关分析: 采用最大似然法 (maximum likelihood, ML) 构建 SmCDPKs 系统发育树, 自展检验设置 5 000 次重复; 基于丹参基因组注释文件, 提取 *SmCDPKs* 的完整基因信息并进行可视化分析; 使用 MEME (multiple Em for motif elicitation) 在线工具对全部 SmCDPKs 蛋白序列进行保守基序预测, motif 数量上限设为 15; 用 Interpro 在线工具中的 Pfam 数据库对 SmCDPKs 蛋白序列进行保守结构域分析。提取所有 *SmCDPK* 基因转录起始位点 (transcription start site, TSS) 上游 2 000 bp 的基因组 DNA 序列作为启动子区域, 将启动子序列提交至植物顺式作用元件数据库 (PlantCARE, https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html) 进行在线扫描分析, 重点关注与植物激素响应、非生物胁迫响应、光响应元件以及参与防御和胁迫反应等相关的核心元件。

丹参 *CDPK* 基因在镉胁迫下的表达量分析 基于转录组数据, 分析 50 μmol·L^{-1} 和 100 μmol·L^{-1} Cd 胁迫处理 3 d 后丹参 *CDPK* 家族成员在根和叶中的相对表达量 (fragments per kilobase million, FPKM), 将表达量取对数并利用 TBtools 的 Heatmap 工具绘制 *SmCDPK* 基因表达聚类热图。基于热图和表达量数据筛选差异表达的 *SmCDPKs*。

利用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 合成 cDNA。利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 方法检测候选基因在不同浓度 Cd 胁迫及不同部位的表达水平。利用 NCBI 网站 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) 设计候选基因的荧光定量引物。以 *SmActin* 作为内参基因[25], 使用 TB Green® Premix Ex Taq™ II进行 qRT-PCR 反应, 数据处理使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算相对表达量。使用单因素方差分析 (ANOVA) 及 Sidák 多重比较检验进行统计学分析, $P < 0.05$ 视为差异具有统计学显著性。

结果与分析

1 丹参 *CDPK* 基因家族成员鉴定及特征分析

基于 HMM 模型对丹参基因组中 *CDPK* 基因家族成员进行筛选, 获得 25 个同时包含 Pkinase 结构域与 EF-hand 结构域的候选基因。以拟南芥 CDPK 家族蛋白序列为参考, 通过本地 BLAST 分析鉴定出 24 个同源基因。整合上述结果, 将候选基因蛋白序列提交至 SMART 数据库进行结构域验证, 最终确定丹参 *CDPK*

家族包含26个全长非冗余成员。对26个丹参*CDPK*基因进行染色体定位分析，并依次命名为*SmCDPK1*～*SmCDPK26* (图1A)。结果表明，丹参*CDPK*基因不均匀分布在7条染色体上，Chr05染色体上无*CDPK*基因。共线性分析结果显示，丹参*CDPK*基因在基因组中呈分散分布，未检测到明显的大片段复制或广泛的共线区段。仅有两对基因 (*SmCDPK1*/*SmCDPK2* 和 *SmCDPK10*/*SmCDPK11*) 在染色体上的位置相对较近 (图1B)，但BLASTp比对的氨基酸序列相似性较低 (33.75%和61.12%)，进一步表明这些基因并非近期串联复制形成。

丹参CDPK家族成员蛋白质的氨基酸数目为402～607，分子质量为45.48～67.66 kDa，平均亲水性为−0.624～−0.159，均为亲水性蛋白。丹参CDPK蛋白质等电点在4.9～8.89之间，绝大部分CDPK蛋白等电点 ⩽ 7，仅有SmCDPK8和SmCDPK22等电点分别为8.88和8.89，为碱性蛋白。26个SmCDPK蛋白的脂肪族指数介于72.86至96.75之间，其中11个为稳定蛋白 (instability index < 40)，见表1。

亚细胞定位预测结果显示26个丹参CDPK家族成员中有16个定位于细胞质 (cytoplasm)，6个CDPKs定位于叶绿体 (chloroplast)，剩余3个CDPKs分别定位于液泡 (vacuole)、细胞膜 (plasma membrane) 和过氧化物酶体 (peroxisomes)。蛋白质二级结构预测结果表明，丹参CDPK家族成员的二级结构以*α*-螺旋和无规则卷曲占主导，14个成员*α*-螺旋占比最高，11个成员无规则卷曲占比最高，SmCDPK19的*α*-螺旋和无规则卷曲占比相同；所有成员的延伸链占比均为最低 (表2)。

2　丹参CDPK家族的系统进化树

将26个丹参SmCDPKs与拟南芥及水稻的CDPKs蛋白质构建系统进化树 (图2)。结果表明，拟南芥、水稻和丹参的CDPKs蛋白根据聚类关系可以分为4个亚族 (group I～IV)，丹参CDPK蛋白在4个亚族中呈现不均匀分布，I亚族和III亚族中分布数量相同且最多，IV亚族分布最少。其中，SmCDPK9、SmCDPK10、SmCDPK11、SmCDPK13、SmCDPK17、SmCDPK23、SmCDPK24和SmCDPK26属于第I亚族；SmCDPK1、SmCDPK3、SmCDPK12、SmCDPK14、SmCDPK16、

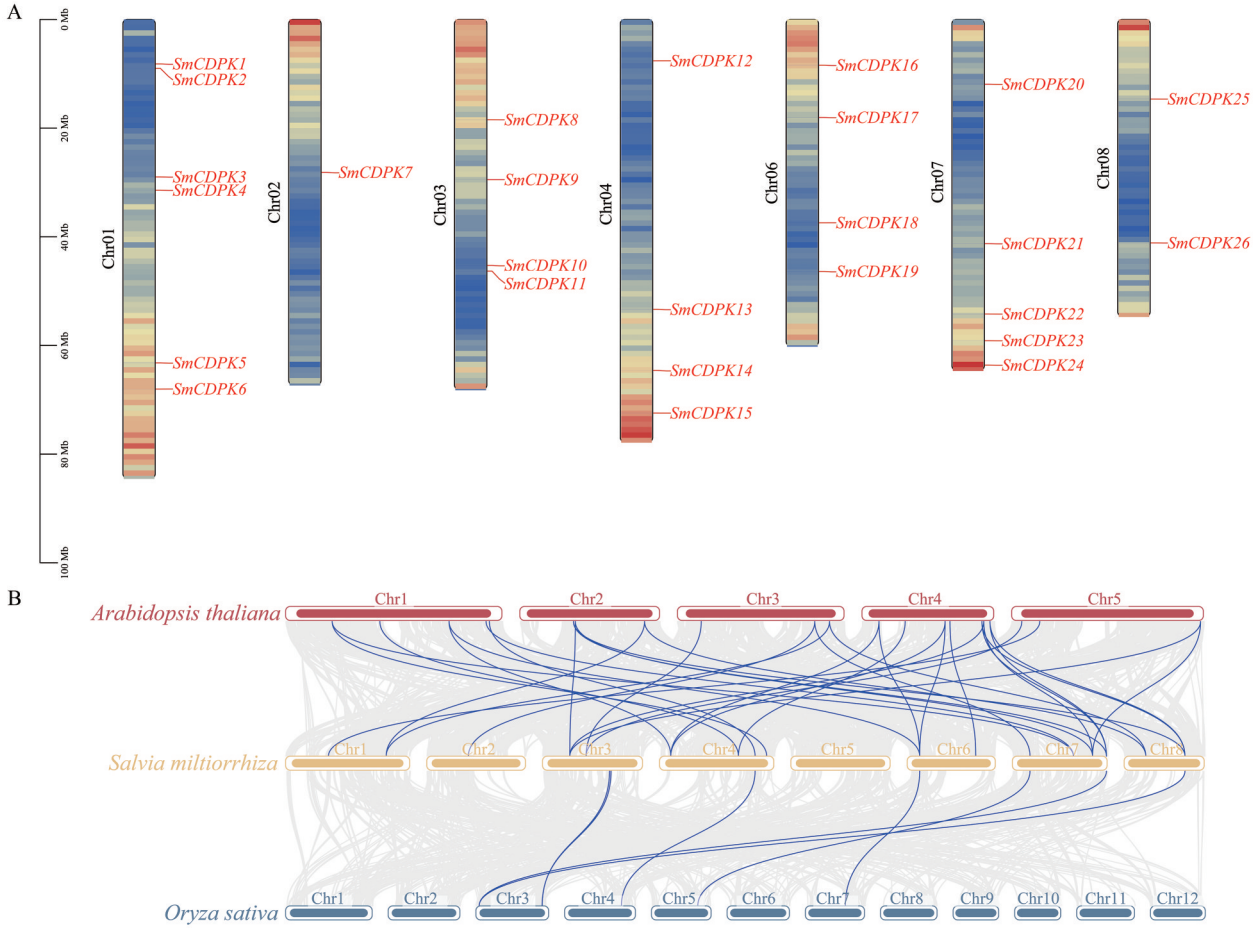


Figure 1　A: Chromosome localization of *CDPK* genes in *Salvia miltiorrhiza*; B: Synteny analysis of *CDPK* genes among *Salvia miltiorrhiza*, *Arabidopsis thaliana*, and *Oryza sativa*. CDPK: Calcium-dependent protein kinase; Sm: *Salvia miltiorrhiza*

Table 1 Analysis of the physicochemical properties of CDPKs in *S. miltiorrhiza*

Protein name	Number of amino acid	Molecular weight	Theoretical pI	Instability index	Aliphatic index	Grand average of hydropathicity
SmCDPK1	535	59.81	4.9	38.62	73.33	−0.546
SmCDPK2	496	55.17	5.29	45.57	96.75	−0.159
SmCDPK3	518	58.03	5.38	36.44	75.56	−0.518
SmCDPK4	533	60.41	6.23	41.8	81.74	−0.505
SmCDPK5	531	60.84	5.65	40.81	83.67	−0.434
SmCDPK6	532	60.49	6.1	36.75	74.96	−0.563
SmCDPK7	528	59.64	5.88	34	86.97	−0.385
SmCDPK8	577	64.76	8.88	41.81	75.6	−0.569
SmCDPK9	573	63.85	5.36	38.97	80.96	−0.386
SmCDPK10	607	67.12	5.62	44.1	76.94	−0.453
SmCDPK11	584	65.50	6	43.69	82.64	−0.346
SmCDPK12	539	60.27	6.22	41.88	73.51	−0.513
SmCDPK13	503	56.58	5.28	40.74	84.14	−0.382
SmCDPK14	522	58.91	5.49	40.38	81.26	−0.431
SmCDPK15	543	61.50	6	36.06	83.81	−0.418
SmCDPK16	538	60.89	7	44.42	72.86	−0.624
SmCDPK17	402	45.48	5.99	45.12	85.6	−0.287
SmCDPK18	512	57.17	6.18	32.23	81	−0.383
SmCDPK19	515	57.47	5.97	39.82	81.05	−0.38
SmCDPK20	528	59.56	5.74	35.12	84.2	−0.459
SmCDPK21	542	61.35	6.09	35.02	83.97	−0.389
SmCDPK22	562	63.73	8.89	42.97	78.63	−0.62
SmCDPK23	601	67.66	5.33	42.51	80.63	−0.377
SmCDPK24	532	59.24	5.33	46.17	86	−0.251
SmCDPK25	523	59.03	5.69	37.11	82.75	−0.477
SmCDPK26	564	62.67	5.44	42.24	86.31	−0.297

Table 2 Secondary structure and subcellular localization of *CDPK* gene family in *S. miltiorrhiza*

Protein name	Alpha helix/%	Extended strand/%	Random coil/%	Subcellular localization
SmCDPK1	46.17	9.16	44.67	Nucleus
SmCDPK2	51.81	8.67	39.52	Cytoplasm
SmCDPK3	45.75	9.65	44.59	Cytoplasm
SmCDPK4	47.47	9.38	43.15	Cytoplasm
SmCDPK5	47.83	9.42	42.75	Cytoplasm
SmCDPK6	48.31	9.77	41.92	Cytoplasm
SmCDPK7	47.16	9.09	43.75	Chloroplast
SmCDPK8	41.77	8.84	49.39	Chloroplast
SmCDPK9	43.98	8.2	47.82	Chloroplast
SmCDPK10	40.86	8.57	50.58	Plasma membrane
SmCDPK11	42.64	9.42	47.95	Cytoplasm
SmCDPK12	43.41	9.46	47.12	Vacuole
SmCDPK13	50.7	10.14	39.17	Chloroplast
SmCDPK14	45.4	9.39	45.21	Cytoplasm
SmCDPK15	47.88	9.21	42.91	Cytoplasm
SmCDPK16	44.42	9.48	46.1	Cytoplasm
SmCDPK17	42.54	11.19	46.27	Cytoplasm
SmCDPK18	46.48	9.38	44.14	Peroxisomes
SmCDPK19	45.24	9.51	45.24	Chloroplast
SmCDPK20	49.05	8.71	42.23	Chloroplast
SmCDPK21	47.42	8.86	43.73	Cytoplasm
SmCDPK22	41.28	9.07	49.64	Cytoplasm
SmCDPK23	42.6	9.15	48.25	Cytoplasm
SmCDPK24	45.11	9.4	45.49	Cytoplasm
SmCDPK25	50.1	9.75	40.15	Cytoplasm
SmCDPK26	44.86	8.16	46.99	Cytoplasm

SmCDPK18、SmCDPK19 属于第II亚族; SmCDPK4、SmCDPK5、SmCDPK6、SmCDPK7、SmCDPK15、SmCDPK20、SmCDPK21、SmCDPK25 属于第III亚族; SmCDPK2、SmCDPK8、SmCDPK22 属于第IV亚族。

3 丹参 *CDPK* 基因结构、保守基序及保守结构域分析

丹参CDPK家族成员的保守基序分析, 有助于进一步验证其进化关系的合理性。通过在线工具MEME共预测丹参CDPK家族中的15个motif, 结果表明所有家族成员均包含7个高度保守的motif, 即motif 1、motif 2、motif 3、motif 4、motif 5、motif 7、motif 10 (图3A、B), 构成了该家族最核心的保守基序。各亚族成员之间的motif数量和排列方式具有相似性, 与系统进化树的结果较为一致。其中, motif 11仅存在于第III亚族; 第IV亚族的motif数量最少; 除第四亚族, motif 9、motif 12和motif 15在其他亚族中均存在不同数量 (图3A)。表明同一亚族的CDPK蛋白可能具有相似功能, motif差异化分布也暗示其蛋白功能和进化的多样性。

丹参CDPK保守结构域分析显示, Pkinase结构域 (蛋白激酶结构域) 和EF-hand结构域在所有成员中高度保守, 但数量各不相同。大部分丹参CDPKs成员包含2个EF-hand结构域, 而SmCDPK17仅有1个EF-hand结构域, 数量最少 (图4A)。表明亲缘关系越近的

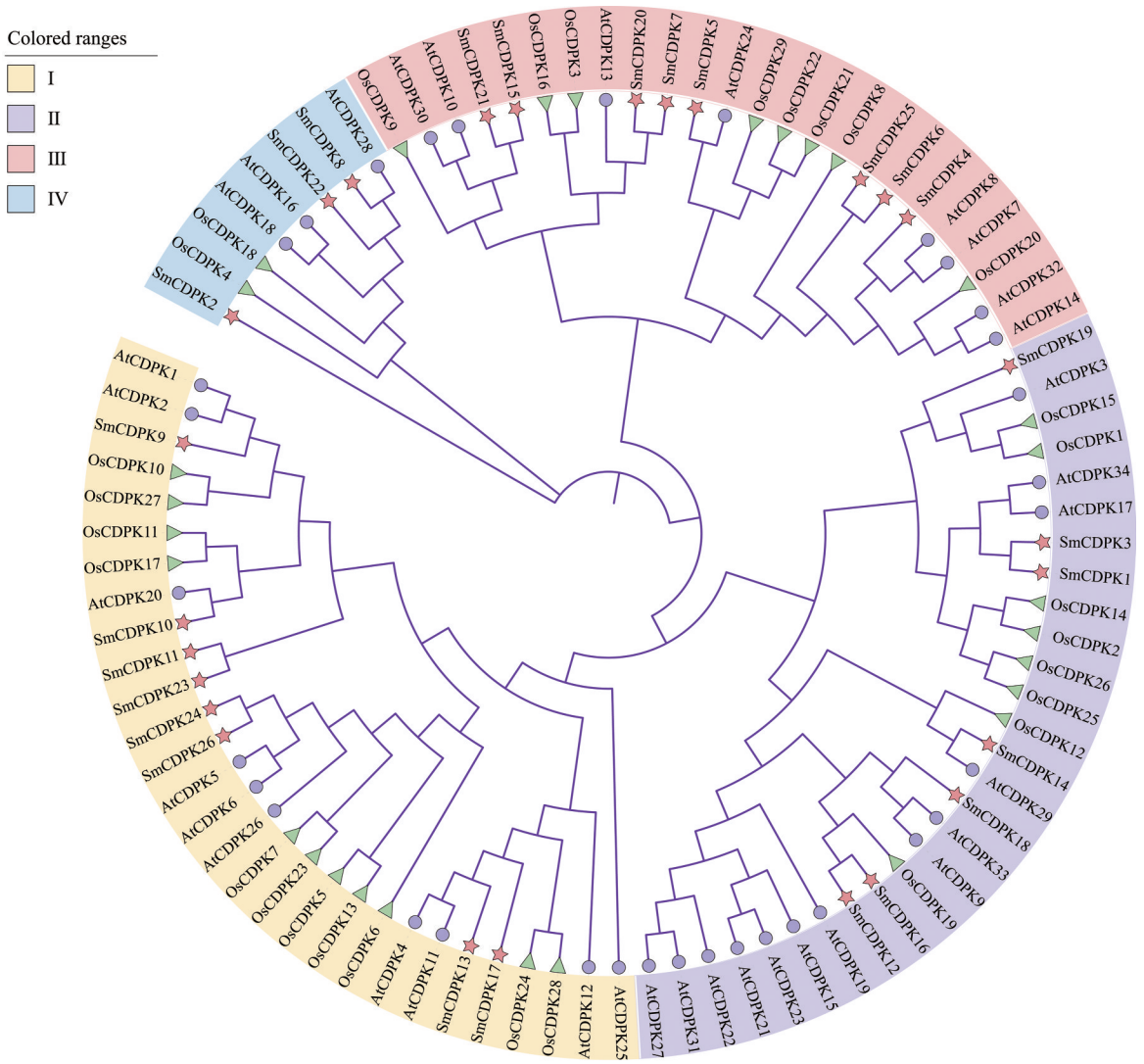


Figure 2 Phylogenetic tree of CDPK proteins from *S. miltiorrhiza* (★), *Arabidopsis thaliana* (●), and *Oryza sativa* (▲). At: *Arabidopsis thaliana*; Os: *Oryza sativa*

SmCDPKs 成员, 其保守结构域的数量和排列也越相似。基因结构分析显示丹参 *CDPK* 基因家族不同成员之间的基因结构差异较大 (图 4B): 各成员中的外显子数量介于 4～12 之间, 以 7 个外显子居多; 部分成员缺失非翻译区 (untranslated region, UTR), 如 *SmCDPK1*、*SmCDPK5*、*SmCDPK8* 和 *SmCDPK10*, 其中 *SmCDPK1* 结构最简单, 仅含 4 个外显子, 而 *SmCDPK8* 则包含 12 个外显子, 与 *SmCDPK22* 同为所有成员中最多。

4 丹参 *CDPK* 基因启动子顺式作用元件分析

植物顺式作用元件是转录因子的结合位点, 在植物生长发育和抵抗逆境胁迫中通过与特定转录因子的结合, 启动相应基因的转录而发挥重要功能。*SmCDPKs* 顺式作用元件预测分析结果 (图 5) 显示该家族成员的启动子区域主要包含五大类功能元件, 按分布频率排序依次为: 光响应类、激素响应类、胁迫响应类、组织发育调控类和代谢调控类元件。光响应 (light responsive) 元件在所有成员中平均密度高, 且覆盖率 100%, 表明 *CDPK* 家族广泛参与光信号介导的生理过程。各 *SmCDPK* 基因普遍含有多种激素响应元件, 其中以茉莉酸甲酯响应 (MeJA-responsive) 元件与脱落酸响应 (abscisic acid responsive) 元件分布最广。

丹参 *CDPK* 基因家族中含有的胁迫响应类顺式作用元件包括厌氧诱导 (anaerobic induction) 调控元件、缺氧特异性诱导 (anoxic specific inducibility) 增强子元件、干旱诱导 (MYB drought-inducibility) 结合位点、低温响应 (low-temperature responsive) 元件、防御与胁迫响应 (defense and stress responsive) 元件和伤害响应 (wound-responsive) 元件 (图 5), 提示丹参 *CDPK* 家族成员在丹参抗逆境胁迫中具有重要功能。此外, 有 14 个丹参 *CDPKs* 含有分生组织表达 (meristem expres-

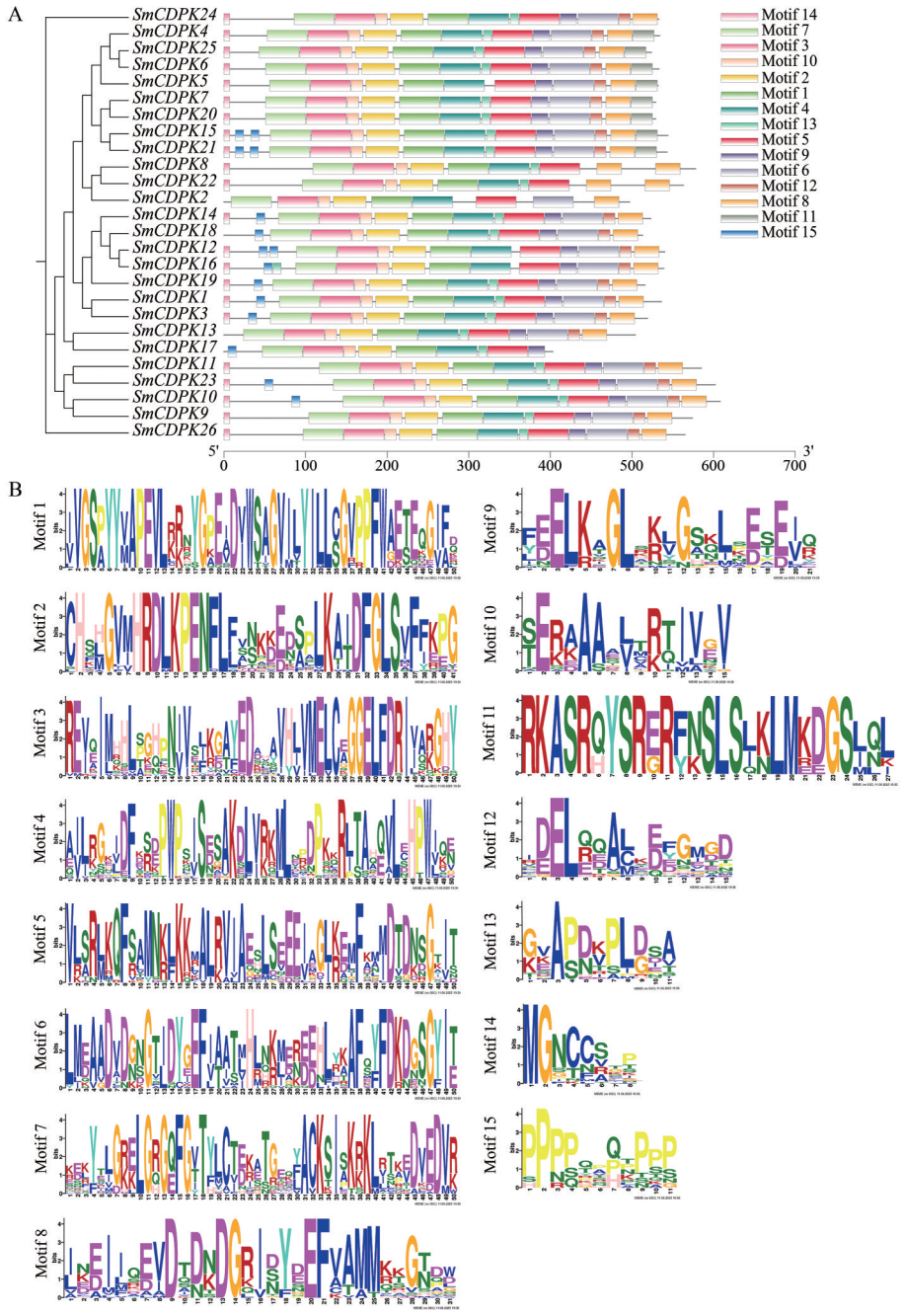


Figure 3 Analysis of conserved motifs in *SmCDPK* genes. A: Phylogenetic tree and motif distribution of all *SmCDPK* genes, each colored box represents a distinct motif (1-15); B: Detailed sequence information and logos of the 15 identified conserved motifs. SmCDPK: *Salvia miltiorrhiza* calcium-dependent protein kinase

sion) 调控元件, 提示其可参与细胞分裂与器官形态建成; *SmCDPK3*、*SmCDPK11* 和 *SmCDPK14* 含有 MYB 黄酮类生物合成基因调控结合位点 (MYB binding site involved in flavonoid biosynthetic genes regulation), 提示其在次生代谢化合物生物合成方面可能具有潜在功能; *SmCDPK3*、*SmCDPK4*、*SmCDPK5*、*SmCDPK6*、*SmCDPK13* 和 *SmCDPK24* 包含有生物钟调控 (circadian control) 元件, 暗示它们可能存在调节生物节律方面的功能。

5 丹参 *CDPK* 基因在镉胁迫下的表达分析

为探索丹参 *CDPKs* 对重金属胁迫的响应特征, 将丹参 *CDPK* 基因在重金属 Cd 胁迫下的表达量进行热图可视化 (图 6A、B)。分析发现对照组样品中丹参 *CDPK* 基因表达量呈现组织特异性。部分成员 (如 *SmCDPK1*、*SmCDPK3* 和 *SmCDPK5*) 在各组织中的表达量较低, FPKM 值均低于 1, 表明其在正常条件下可

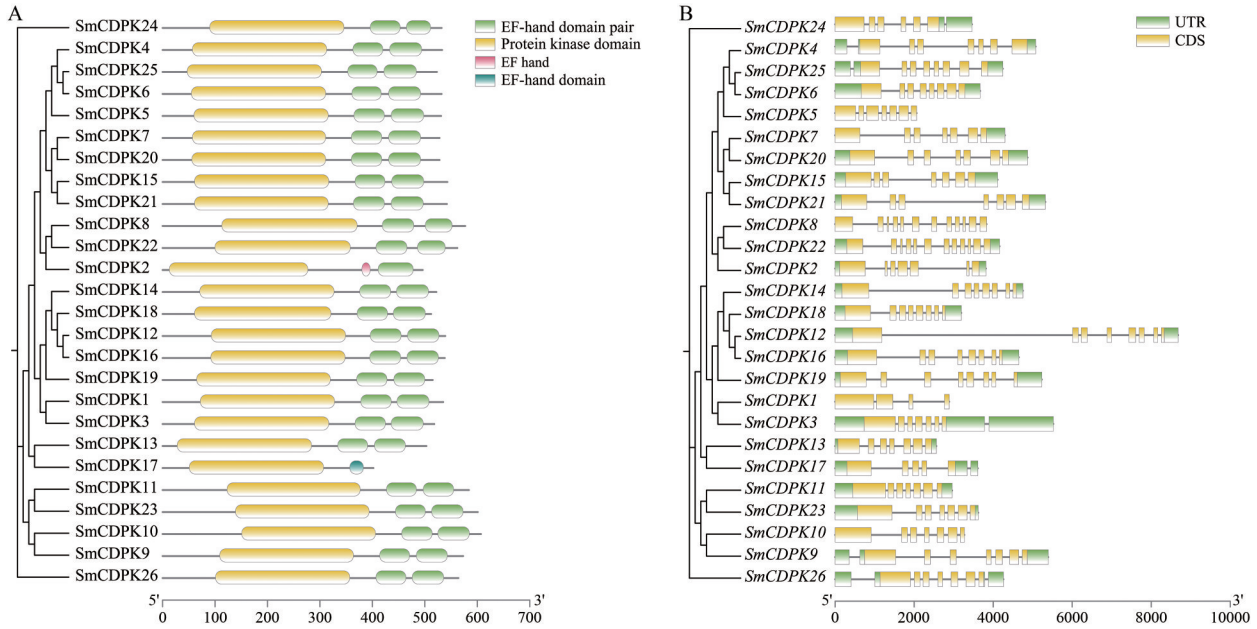


Figure 4 Structural analysis of *SmCDPK* genes. A: Schematic representation of conserved domains in the SmCDPKs; B: CDS and UTR organization of *SmCDPK* genes; CDS: Coding sequence; UTR: Untranslated region

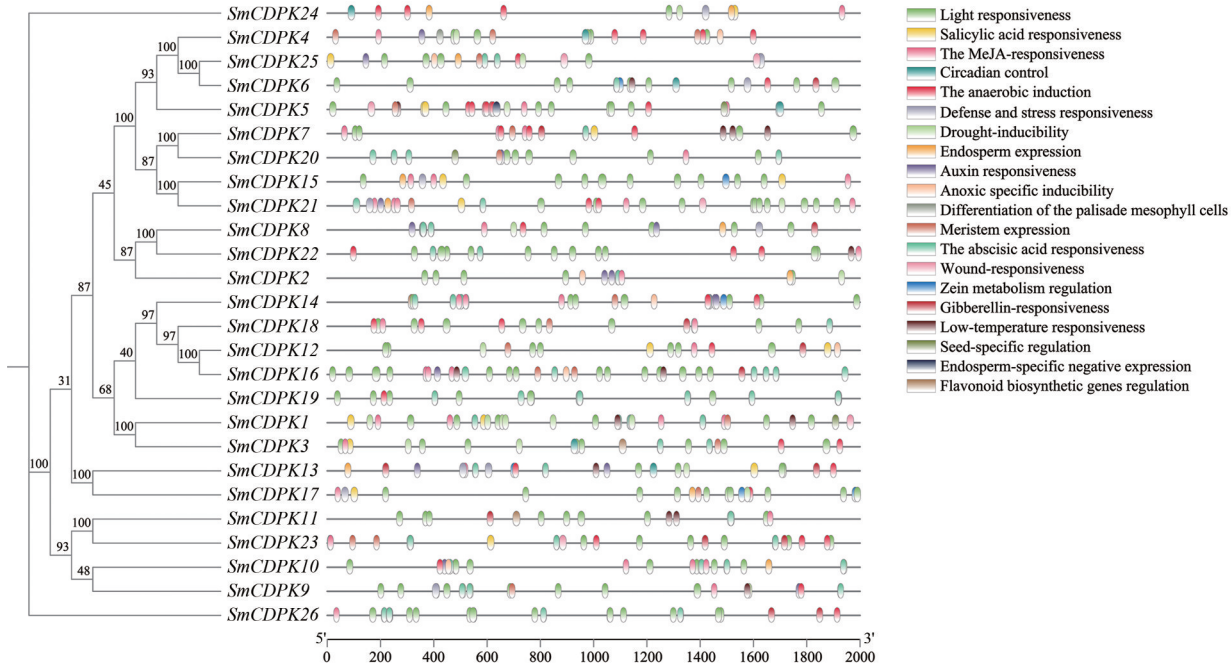


Figure 5 Analysis of putative *cis*-regulatory elements in promoter regions of *SmCDPK* genes

能处于低表达状态。*CDPK*家族部分成员存在Cd胁迫诱导的根部特异性响应: *SmCDPK4*和*SmCDPK18*在Cd胁迫处理后根部的表达量上调, 提示其可能参与丹参Cd胁迫的防御机制; *SmCDPK2*、*SmCDPK6*、*SmCDPK11*、*SmCDPK16*、*SmCDPK22*和*SmCDPK26*在Cd胁迫处理后根部表达量显著下调, 而*SmCDPK8*在Cd胁迫下根和叶中表达量均有明显下调趋势。值得注意的是第四亚族成员 (*SmCDPK2*、*SmCDPK8*和*SmCDPK22*) 在Cd胁迫处理后根部表达量均呈现明显下调趋势。

基于Cd胁迫下的转录组热图分析, 筛选出6个差异显著的*CDPKs* (|log$_2$FC| > 1), 分别为第I亚族的*SmCDPK11*, 第II亚族的*SmCDPK18*, 第III亚族的*SmCDPK6*和第IV亚族的*SmCDPK2*、*SmCDPK8*、*SmCDPK22*。采用qRT-PCR技术对以上6个基因在Cd胁迫下的组织表达模式进行了验证 (图6C)。*SmCDPK18*

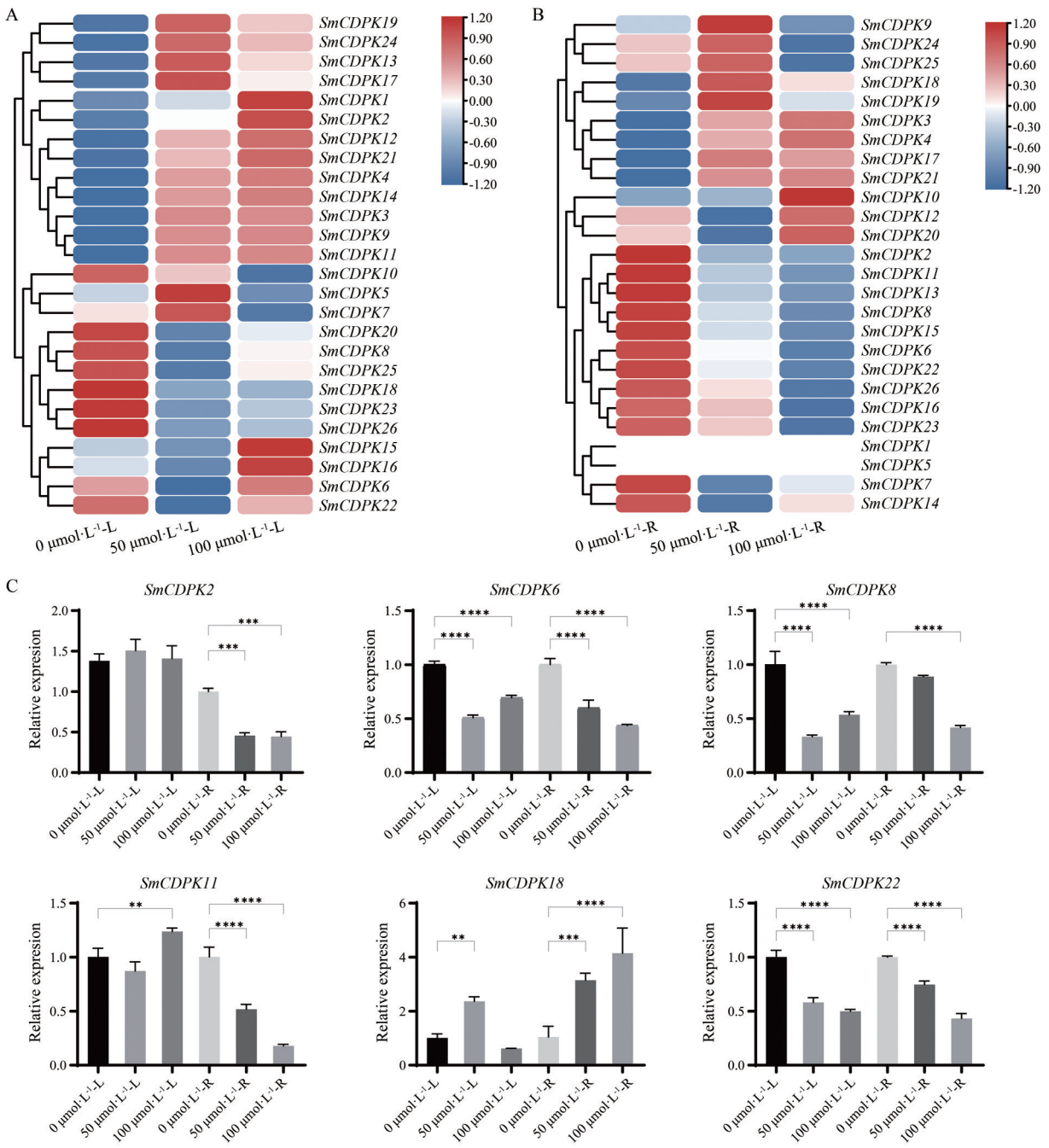


Figure 6 Expression of *SmCDPK* genes under cadmium stress. A: Heatmap of all *SmCDPK* genes in leaf; B: Heatmap of all *SmCDPKs* in root; C: qRT-PCR verification of selected *SmCDPKs*. qRT-PCR: Quantitative reverse-transcription PCR. L: Leaf; R: Root. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.000\ 1$

在根中正向响应Cd胁迫, 其余五个基因在Cd胁迫下根部的表达量均下降; 不同Cd胁迫浓度下*SmCDPK11*和*SmCDPK18*在叶片中的表达量上调, *SmCDPK2*在Cd胁迫叶片中的响应不明显, 其余基因在叶片中均负响应Cd胁迫。

讨论

近年来, 分子生物学与组学技术的融合为药用植物逆境生物学研究提供了新范式, 多组学整合分析已成为解析植物逆境响应网络的高效工具[26]。本研究从丹参基因组中鉴定出26个*SmCDPKs*, 并进一步对其进行了染色体定位、蛋白质理化性质、二级结构和亚细胞定位的预测分析, 为深入研究其生物学功能提供基础。共线性与序列比对综合分析表明, 丹参*CDPK*家族在进化上总体较为保守。*SmCDPKs*基因在基因组上呈分散分布, 未见明显的家族内共线区段或串联排

列; 与双子叶模式植物拟南芥仍保留若干保守共线对, 而与单子叶模式植物水稻的共线性较弱。结合家族成员数 (丹参26个、拟南芥34个、水稻29个), 可推测丹参 *CDPK* 家族未发生明显的谱系特异性扩张或收缩, 其功能多样性更可能源于序列演化与表达调控的分化而非近期大规模复制。但要精确鉴别复制类型与估算复制时代, 应进一步结合分支模型与 *Ka*/*Ks* 等演化速率分析, 这将是后续研究的方向。亚细胞定位预测分析显示, 一半以上的丹参CDPKs蛋白定位于细胞质, 提示其可能直接感知胞内 Ca^{2+} 信号; 其次, 部分CDPKs定位于叶绿体, 推测其可能在光合作用的调控中发挥作用。CDPK在不同植物中的亚细胞分布存在差异[27-29], 这种亚细胞分布的多样性不仅反映了CDPK家族在植物细胞内的功能多样性, 还暗示了它们在多种重要生理过程如光合作用、逆境响应和代谢调控中可能发挥调控作用。此外, 蛋白质系统进化分析结果显示, 26个丹参CDPKs成员分为4个亚族 (I、II、III、IV), 其中第IV亚族成员最少, 这与多数植物的CDPK分类结果相一致[30-32], 该结果反映了CDPK在陆生植物演化过程中的结构稳定特征, 同时也暗示了Group IV亚族的CDPK在丹参中可能具有专属性的生物功能。

在基因家族鉴定研究中, 系统分析家族成员的基因结构、保守结构域与保守基序不仅能够揭示家族成员的结构多样性, 还能验证进化树分类准确性及推断基因功能[33]。本研究鉴定出7个motif存在于所有丹参CDPKs成员的序列中, 且motif的数量与排列方式与进化树聚类结果高度吻合。第IV亚族整体motif数量最少, 提示该亚族的CDPKs结构更简单、功能更专一, 这与二穗短柄草 [*Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv.][34]等物种的CDPK家族分类结果一致。CDPK家族的典型结构特征为同时含有激酶结构域 (Pkinase) 与EF-hand结构域, 通过EF-hand结构域感知细胞内 Ca^{2+} 浓度变化, 解除自抑制作用, 激活激酶结构域; 激酶结构域则将信号转导至下游靶蛋白, 调控植物多种生理活动[35]。大部分丹参CDPKs成员含4个EF-hands结构域, 但部分成员EF-hands结构域数量较少, 如SmCDPK17仅含1个EF-hand结构域, 这与先前在拟南芥[6]、水稻[7]、番茄[31]等物种的研究结果相似: 尽管绝大多数成员含有典型的4个EF-hands结构域以确保对 Ca^{2+} 信号的依赖性, 但也有少数成员失去或存在退化的EF-hands。但这些CDPKs可能自发激活或通过其他信号途径参与功能调控, 如玉米中的ZmCPK1包含退化的EF-hand结构域, 表现出钙非依赖的激酶活性, 能够在 Ca^{2+} 缺失条件下发挥作用并在低温胁迫中作为负调控因子发挥功能[36]。因此推测SmCDPK17可能表现为钙非依赖或钙低敏型激酶, 从而在信号转导和生理反应中发挥非典型或专属性的调控作用。

本研究预测的丹参 *CDPK* 基因启动子区域富含多种应答胁迫的顺式元件, 涵盖干旱、低温、水涝、缺氧、病原防御等类型, 提示丹参 *CDPKs* 在多种逆境条件下可能具有调控作用。部分成员同时包含厌氧和缺氧响应元件, 暗示其在水涝或土壤缺氧胁迫中具有潜在功能, 例如水稻中 *OsCDPK5* 和 *OsCDPK13* 可以通过调控水稻中的呼吸爆发氧化酶同源物 (RBOH) 介导的ROS生成, 在水稻适应低氧环境过程中发挥关键作用[37]。此外, 激素响应类元件在丹参启动子区域广泛分布, 尤其以茉莉酸甲酯和脱落酸响应元件最为丰富, 这与 *CDPK* 参与植物激素信号通路调控的功能高度一致。例如拟南芥 *CPK4* 和 *CPK11* 被证实能正向调控脱落酸 (abscisic acid, ABA) 信号通路, 通过磷酸化ABF1/ABF4等转录因子调控种子萌发、气孔关闭及抗盐能力[38]; 在野生烟草 (*Nicotiana attenuate* Torr. ex S. Watson) 中, *NaCDPK4* 和 *NaCDPK* 可调控茉莉酸合成以激活防御响应[39]。值得注意的是部分成员启动子区域中发现了MYB黄酮类生物合成基因调控结合位点, 提示这些基因可能参与黄酮类化合物的次级代谢调控。甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) 的 *CDPKs* 在盐胁迫下表达上调, 伴随黄酮类和甘草酸显著积累[40], 结合启动子结构预测, 推测其可能是通过磷酸化调控MYB转录因子, 从而激活下游黄酮合成酶基因表达。

丹参作为根及根茎入药的传统中药, 其药材安全深受土壤中Cd等重金属污染的影响。*CDPK* 是植物感知钙信号并将其转导至下游响应靶基因的关键信号因子, 在多种重金属胁迫响应中发挥着核心调控功能[41-44]。在胡杨 (*Populus euphratica* Oliv.)[45]、桑树 (*Morus alba* L.)[46]中也均鉴定出具有响应Cd胁迫功能的 *CDPK* 基因。*CDPK* 响应植物Cd胁迫的机制较为复杂: 有研究表明 *CDPK* 参与硫化氢 (H_2S) 信号调控, 产生更多的 H_2S 从而增强植物的抗氧化能力[47]; 在拟南芥中, *AtCPK21* 和 *AtCPK23* 能与Cd转运蛋白NRAMP6直接互作, 磷酸化NRAMP6的 Ser^{489} 和 Thr^{505} 位点, 从而抑制其 Cd^{2+} 转运活性[48]; 胡杨 *CDPK* 基因 *PeCPK21* 与Cd转运蛋白、液泡隔离相关蛋白、抗氧化和水通道蛋白都存在相互作用, 从而系统性调控胡杨Cd耐受机制[45]。为进一步探讨丹参 *CDPK* 在Cd胁迫中的生物学功能, 本研究基于高通量转录组数据对丹参各 *CDPK* 成员在Cd处理下的表达变化进行了深入分析。研究发现丹参 *CDPK* 基因表达模式的组织特异性明显, 根是植物对Cd胁迫响应的主要部位, 这也与丹参根系对Cd的富集特性一致[49]。Cd胁迫下部分 *CDPKs* 成员在根中的表

达下调, 可能反映了丹参根对Cd信号的敏感抑制, 避免Ca^{2+}-CDPK过度激活引发细胞损伤。*SmCDPK18*在根 (重要Cd积累部位) 和叶中同步上调, 提示其可能具备“抑制Cd积累 + 调节抗氧化”的双重功能。

本研究从全基因组水平对丹参*CDPK*家族进行了系统鉴定, 结合生物信息学分析, 并利用转录组数据解析了该家族成员在Cd胁迫下的表达特征, 探索其在丹参Cd胁迫响应研究中的应用潜力。该研究为筛选丹参抗Cd胁迫的关键*CDPK*基因及其功能研究提供基础, 对促进中药材抗重金属品种培育及生态栽培具有重要意义。

作者贡献: 刘俐君负责本课题数据分析、实验完成和论文撰写; 张文颖提供了学术指导, 参与修改论文手稿; 罗红梅整体负责本研究的实验设计和论文审阅修改。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

[1] Shi SJ, Li SG, Asim M, et al. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinases (CDPKs) and their roles in plant growth regulation and abiotic stress responses [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19: 1900.

[2] Yang CY, Li XY, Li MJ, et al. Identification and analysis of the calcium signaling system genes responding to continuous cropping injury in *Rehmannia glutinosa* L. [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2017, 52: 1951-1961.

[3] Batistič O, Kudla J. Analysis of calcium signaling pathways in plants [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1820: 1283-1293.

[4] Hashimoto K, Kudla J. Calcium decoding mechanisms in plants [J]. Biochimie, 2011, 93: 2054-2059.

[5] Valmonte GR, Arthur K, Higgins CM, et al. Calcium-dependent protein kinases in plants: Evolution, expression and function [J]. Plant Cell Physiol, 2014, 55: 551-569.

[6] Cheng SH, Willmann MR, Chen HC, et al. Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family [J]. Plant Physiol, 2002, 129: 469-485.

[7] Asano T, Tanaka N, Yang GX, et al. Genome-wide identification of the rice calcium-dependent protein kinase and its closely related kinase gene families: Comprehensive analysis of the *CDPKs* gene family in rice [J]. Plant Cell Physiol, 2005, 46: 356-366.

[8] Li AL, Zhu YF, Tan XM, et al. Evolutionary and functional study of the *CDPK* gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Plant Mol Biol, 2008, 66: 429-443.

[9] Kong XP, Lv W, Jiang SS, et al. Genome-wide identification and expression analysis of calcium-dependent protein kinase in maize [J]. BMC Genomics, 2013, 14: 433.

[10] Cai HY, Cheng JB, Yan Y, et al. Genome-wide identification and expression analysis of calcium-dependent protein kinase and its closely related kinase genes in *Capsicum annuum* [J]. Front Plant Sci, 2015, 6: 737.

[11] Li YY, Zhang HX, Liang SB, et al. Identification of *CDPK* gene family in *Solanum habrochaites* and its function analysis under stress [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23: 4227.

[12] Dong H, Wu C, Luo CG, et al. Overexpression of *MdCPK1a* gene, a calcium dependent protein kinase in apple, increase tobacco cold tolerance *via* scavenging ROS accumulation [J]. PLoS One, 2020, 15: e0242139.

[13] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2020 ed. Vol 1. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 77-78.

[14] La L, Jiang ZY, Feng YP, et al. Bioaccessibility analysis of active components in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2022, 57: 2435-2444.

[15] Fan PH, Wu LW, Wang Q, et al. Physiological and molecular mechanisms of medicinal plants in response to cadmium stress: Current status and future perspective [J]. J Hazard Mater, 2023, 450: 131008.

[16] Wang C, Liu C, Hu Q, et al. Pollution status of heavy metals in herbal medicine and their traceability and control in the whole chain production process [J]. Chin J Environ Eng (环境工程学报), 2021, 15: 3789-3800.

[17] Kum KY, Kirchhof R, Luick R, et al. Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) on the global market: What are the implications for products' quality? [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 621169.

[18] Song JY, Luo HM, Li CF, et al. *Salvia miltiorrhiza* as medicinal model plant [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2013, 48: 1099-1106.

[19] Yu WC, Yu Y, Wang C, et al. Mechanism by which salt stress induces physiological responses and regulates tanshinone synthesis [J]. Plant Physiol Biochem, 2021, 164: 10-20.

[20] Zhou Y, Bai YH, Han FX, et al. Transcriptome sequencing and metabolome analysis reveal the molecular mechanism of *Salvia miltiorrhiza* in response to drought stress [J]. BMC Plant Biol, 2024, 24: 446.

[21] Li J, Jiang XP, Yu Y, et al. Cloning and expression analysis of *WRKY19* gene in *Salvia miltiorrhiza* under cadmium stress [J]. J Lishizhen Tradit Chin Med (时珍国医国药), 2024, 35: 1750-1753.

[22] Huang XH. Study on Absorption, Accumulation, Physiological Response and Transport Characteristics of *Salvia miltiorrhiza* Bunge for Cadmium (丹参对于Cd的吸收积累、生理响应及转运特性研究) [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2022.

[23] Chen CJ, Wu Y, Li JW, et al. TBtools-II: A "one for all, all for one" bioinformatics platform for biological big-data mining [J]. Mol Plant, 2023, 16: 1733-1742.

[24] Tamura K, Stecher G, Kumar S, et al. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11 [J]. Mol Biol Evol, 2021, 38: 3022-3027.

[25] Yang YF, Hou S, Cui GH, et al. Characterization of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in various tissues of *Salvia miltiorrhiza* [J]. Mol Biol Rep, 2010, 37: 507-513.

[26] Yang LF, Yang Y, Huang LQ, et al. From single- to multi-omics: future research trends in medicinal plants [J]. Briefings Bioinf, 2023, 24: bbac485.

[27] Han BC, Dong XM, Shi CC, et al. Genome-wide identification and characterization of calcium-dependent protein kinase (CDPK) gene family in autotetraploid cultivated alfalfa (*Medicago sativa* subsp. *sativa*) and expression analysis under abiotic stresses [J]. BMC Plant Biol, 2024, 24: 1241.

[28] Xie KH, Zhang DW, Liu Y, et al. Identification of *PaCDPK* gene family in *Phytolacca americana* L. and expression analysis under heavy metal stress [J]. Mol Plant Breed (分子植物育种), 2025, 23: 71-79.

[29] Li YN, Zhang HJ, Liang MJ, et al. Identification and expression analysis of calcium-dependent protein kinase (CDPK) family in *Haematococcus pluvialis* [J]. Biotechnol Bull (生物技术通报), 2024, 40: 300-312.

[30] Zhang HF, Wei CH, Yang XZ, et al. Genome-wide identification and expression analysis of calcium-dependent protein kinase and its related kinase gene families in melon (*Cucumis melo* L.) [J]. PLoS One, 2017, 12: e0176352.

[31] Hu ZJ, Lv XZ, Xia XJ, et al. Genome-wide identification and expression analysis of calcium-dependent protein kinase in tomato [J]. Front Plant Sci, 2016, 7: 469.

[32] Zhu LP, Zheng BW, Song WY, et al. Evolutionary analysis of calcium-dependent protein kinase in five Asteraceae species [J]. Plants, 2019, 9: 32.

[33] Qin SS, Wei F, Liang Y, et al. Genome-wide analysis of the *R2R3-MYB* gene family in *Spatholobus suberectus* and identification of its function in flavonoid biosynthesis [J]. Front Plant Sci, 2023, 14: 1219019.

[34] Wen F, Ye F, Xiao ZL, et al. Genome-wide survey and expression analysis of calcium-dependent protein kinase (CDPK) in grass *Brachypodium distachyon* [J]. BMC Genomics, 2020, 21: 53.

[35] Jiang SS, Zhang D, Kong XP, et al. Research progress of structural characteristics and functions of calcium-dependent protein kinases in plants [J]. Biotechnol Bull (生物技术通报), 2013, 6: 12-19.

[36] Weckwerth P, Ehlert B, Romeis T. *ZmCPK1*, a calcium-independent kinase member of the *Zea mays CDPK* gene family, functions as a negative regulator in cold stress signalling [J]. Plant Cell Environ, 2015, 38: 544-558.

[37] Li JX, Ishii T, Yoshioka M, et al. *CDPK5* and *CDPK13* play key roles in acclimation to low oxygen through the control of RBOH-mediated ROS production in rice [J]. Plant Physiol, 2024, 197: kiae293.

[38] Zhu SY, Yu XC, Wang XJ, et al. Two calcium-dependent protein kinases, *CPK4* and *CPK11*, regulate abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2007, 19: 3019-3036.

[39] Hettenhausen C, Yang DH, Baldwin IT, et al. Calcium-dependent protein kinases, *CDPK4* and *CDPK5*, affect early steps of jasmonic acid biosynthesis in *Nicotiana attenuata* [J]. Plant Signal Behav, 2013, 8: e22784.

[40] Tong XC, Cao AP, Wang F, et al. Calcium-dependent protein kinase genes in *Glycyrrhiza uralensis* appear to be involved in promoting the biosynthesis of glycyrrhizic acid and flavonoids under salt stress [J]. Molecules, 2019, 24: 1837.

[41] González A, Cabrera MDLÁ, Henríquez MJ, et al. Cross talk among calcium, hydrogen peroxide, and nitric oxide and activation of gene expression involving calmodulins and calcium-dependent protein kinases in *Ulva compressa* exposed to copper excess [J]. Plant Physiol, 2012, 158: 1451-1462.

[42] Zhang ZQ, Fu D, Sun ZH, et al. Tonoplast-associated calcium signaling regulates manganese homeostasis in *Arabidopsis* [J]. Mol Plant, 2021, 14: 805-819.

[43] Feng YX, Lin YJ, Tian P, et al. Proline interacts with Ca^{2+}-dependent signaling to enhance chromium tolerance in rice by manipulating nitrate reductase and sucrose phosphate synthase [J]. Int J Biol Macromol, 2023, 253: 126655.

[44] Tian QY, Zhang XX, Yang A, et al. CIPK23 is involved in iron acquisition of *Arabidopsis* by affecting ferric chelate reductase activity [J]. Plant Sci, 2016, 246: 70-79.

[45] Yin KX, Zhao R, Liu Z, et al. *Populus euphratica* CPK21 interacts with heavy metal stress-associated proteins to mediate Cd tolerance in *Arabidopsis* [J]. Plant Stress, 2024, 11: 100328.

[46] Li Y. Mulberry Transcriptome, miRNA Analysis under Cadmium Stress and Gene Function Identification (桑树镉胁迫转录组、miRNA分析及基因功能鉴定) [D]. Zhenjiang: Jiangsu University of Science and Technology, 2021.

[47] Qiao ZJ, Jing T, Jin ZP, et al. CDPKs enhance Cd tolerance through intensifying H_2S signal in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Soil, 2016, 398: 99-110.

[48] Zhang YT, Wang ZQ, Liu YS, et al. Plasma membrane-associated calcium signaling modulates cadmium transport [J]. New Phytol, 2023, 238: 313-331.

[49] Fu HH, Yuan J, Liu RP, et al. Effects of cadmium on the synthesis of active ingredients in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Open Life Sci, 2023, 18: 20220603.