

# 草莓 CIPK 基因家族的鉴定与表达分析

刘 涛, 王萍萍, 何红红, 梁国平, 卢世雄, 陈佰鸿, 毛 娟\*

(甘肃农业大学园艺学院, 兰州 730070)

**摘 要:** 从拟南芥数据库中获得 CIPK 基因家族注册号, 运用生物信息学分析的方法, 在蔷薇科森林草莓 (*Fragaria vesca*) 数据库中得到 CIPK 基因家族成员 19 个, 可分为 6 个亚族。该基因家族分布在草莓 7 条染色体中的 6 条上。其编码蛋白的氨基酸数 157~1 196, 理论等电点 3.91~9.34, 分子量 18 667.68~133 714.31 D。基因结构分析表明, 有 11 条基因只有 1 个外显子, 其余基因外显子数 2~15。亚细胞定位结果表明, 该基因家族成员主要在细胞质、细胞核和叶绿体上表达。蛋白质二级结构预测表明, 该基因家族成员主要以  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -转角和不规则卷曲为主。对上游 2 kb 区域启动子顺式作用元件分析表明, 该基因家族成员对逆境胁迫应答 MYB 响应明显, 除 *FvCIPK02*、*FvCIPK15*、*FvCIPK17* 外, 其他基因均对脱落酸应答元件 ABRE 响应明显。qRT-PCR 数据分析表明, *FvCIPK16*、*FvCIPK10* 和 *FvCIPK09* 分别在 PEG、ABA 和 NaCl 处理下, 草莓试管苗中的相对表达量最高, 分别是对照的 18.4 倍、29 倍、13 倍, 说明 *FvCIPK16* 强响应干旱胁迫, *FvCIPK10* 强响应 ABA 诱导, *FvCIPK09* 强响应高盐胁迫; 另外发现各处理的 *FvCIPK03* 相对表达量均下调, 推测 *FvCIPK03* 在植物逆境胁迫中起负调节作用。

**关键词:** 草莓; CIPK 基因家族; qRT-PCR; 生物信息学分析

**中图分类号:** S 668.4

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2020) 01-0127-16

## Identification and Expression Analysis of CIPK Gene Family in Strawberry

LIU Tao, WANG Pingping, HE Honghong, LIANG Guoping, LU Shixiong, CHEN Baihong, and MAO Juan\*

(College of Horticulture, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** The *Arabidopsis* CIPK gene family registration numbers were obtained from the Database, and 19 CIPK gene family members were obtained from the *Fragaria vesca* database by bioinformatics analysis, which were divided into six subfamilies: A - E. The six subfamilies were distributed on 6 of the 7 chromosomes of strawberry. By analyzing physicochemical properties, we found that the number of encoded amino acids is ranged from 157 to 1 196, the theoretical isoelectric point is covered from 3.91 to 9.34 and the molecular weight is distributed from 18 667.68 to 133 714.31 D. Meanwhile, there are 11 genes that have only one exon, the others have 2 - 15 exons through genes structure analysis. The CIPK gene family were mainly expressed on the cytoplasm, nucleus and chloroplast during subcellular localization analysis of the gene family members. Moreover, the prediction of secondary structure indicated that the members of the gene family mainly consisted of  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -turn and irregular curl.

**收稿日期:** 2019 - 11 - 13; **修回日期:** 2019 - 12 - 11

**基金项目:** 甘肃省科技重大专项 (18ZD2NA006); 甘肃省现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (GARS-SG-3)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: maojuan@gsau.edu.cn; Tel: 13659425539)

Additionally, analysis of the *cis*-acting element of the upstream 2 kb promoter sequence found that the members of the gene family contained stress response MYB element. Except for *FvCIPK02*, *FvCIPK15* and *FvCIPK17*, all genes contained the abscisic acid (ABA) response element (ABRE). The qRT-PCR analysis showed that the *FvCIPK16*, *FvCIPK10* and *FvCIPK09* had the highest expression under PEG, ABA and NaCl, respectively, about 18.4 times, 29 times and 13 times more than the control, which indicated that *FvCIPK16* responded strongly to drought stress, *FvCIPK10* strongly responded to ABA induction, and *FvCIPK09* strongly responded to high salt stress. In addition, the relative expression of *FvCIPK03* was down-regulated under each treatment, then we can speculate that *FvCIPK03* play a negative regulatory role in plant stress.

**Keywords:** strawberry; CIPK gene family; qRT-PCR; bioinformatics analysis.

植物在受到外界各种非生物逆境胁迫时,如干旱、寒冷、高盐、高温和氧化胁迫等,会进化出一套应对逆境的保护机制以确保植物正常生长发育。在不利的环境下,植物可以通过启动相关基因表达以及改变某些蛋白结构等来保护体内正常的新陈代谢反应,从而维持植物体结构与功能的完整性(Kim et al., 2003; 李琳和柳参奎, 2010)。在植物逆境信号转导过程中  $Ca^{2+}$  作为第二信使起着至关重要的作用(赵晋锋等, 2011)。蛋白激酶 CIPK (CBL-interacting protein kinase) 是一类植物特有的丝氨酸/苏氨酸 (Ser/Thr) 蛋白激酶(颜彦等, 2018)。钙调磷酸酶 B 样蛋白 (calcineurin B-like proteins, CBL) 是植物体内重要的钙离子感应器,它能够感受到  $Ca^{2+}$  在植物体内的变化情况,并与蛋白激酶 CIPK 结合形成 CBL-CIPK 复合体,胁迫发生时,该复合体与相应的靶蛋白结合发生磷酸化反应,将信号传递到下游以提高植物在胁迫中的应激反应(Batistič & Kudla, 2012; 唐湖斌等, 2015)。CBL-CIPK 蛋白复合体能够参与植物多种逆境信号传递网络,如干旱、低温、高盐、低钾等均可以引起植物 CIPK 基因表达模式的变化(Zhu et al., 1998; Martinez-Atienza et al., 2007)。通常 CIPK 蛋白 N 端含有一个保守的催化激酶结构域, C 端是 1 个由 24 个氨基酸组成的 NAF 调节控制域,该结构域高度保守且在 CIPK 与 CBL 蛋白互作中起介导作用(Kim et al., 2000; Albrecht et al., 2001)。

目前在拟南芥(Yu et al., 2007)、葡萄(路志浩等, 2017)、玉米(Chen et al., 2011)、水稻(Kolukisaoglu et al., 2004)、油菜(张翰风, 2014)、杨树(Yu et al., 2007)、番茄(王傲雪和刘思源, 2018)和梨(许园园等, 2015)等植物中分别鉴定得到 CIPK 基因家族中的 25、16、43、30、23、27、22 和 26 个。前期研究表明 CIPK 基因信号因子在植物逆境胁迫响应中起重要的作用(Xiang et al., 2007; 沈金秋等, 2014; 李洋等, 2018)。在拟南芥中研究发现, *AtCIPK15* 与 PP2C 型磷酸酶 *ABI2* 发生蛋白互作形成复合体,可调控 ABA 相关基因的表达;过表达 *AtCIPK23* 的拟南芥对低钾胁迫的耐受性有显著提高;另外 *AtCIPK3* 可通过依赖或不依赖 ABA 途径对多种非生物胁迫做出响应(Kim et al., 2003; Li et al., 2006; Xu et al., 2006)。颜彦等(2018)对木薯进行  $H_2O_2$  处理发现, *MeCIPK1* 对氧化胁迫起正向调节作用。袁志恒等(2012)在玉米研究中发现, *ZmCIPK3* 能够参与多种非生物信号胁迫的响应机制,如低温、干旱、高盐胁迫,在干旱胁迫下 *ZmCIPK3* 表达量显著提高,并且  $Ca^{2+}$  在某种程度上影响 *ZmCIPK3* 的表达。水稻 CIPK 基因家族中 *OsCIPK3*、*OsCIPK12*、*OsCIPK15* 过表达以后可提高植株对低温、干旱和盐胁迫的耐受性(Xiang et al., 2007)。王荣凯(2011)将拟南芥 *AtCBL4* 基因转入苹果后,发现苹果 CIPK6 能够与拟南芥 CBL4 蛋白互作,提高了苹果幼苗对低温、干旱和高盐等逆境胁迫的抗性。过表达 *MdCIPK6L* 的转基因番茄对低温、

高盐以及干旱的耐受性有显著提高 (Wang et al., 2012)。Deng 等 (2013) 在小麦中发现, 过表达 *TaCIPK24* 的植株对高盐的抗性增加。葡萄中 *VvCIPK13* 和 *VvCIPK14* 可以响应干旱和高盐胁迫, 且 *VvCIPK14* 响应强烈 (闫朝辉 等, 2017)。

本试验中运用生物信息学分析的方法, 在蔷薇科草莓数据库 (*Fragaria vesca*) 中进行 CIPK 基因家族检索, 对所得草莓 CIPK 基因家族进行分析, 初步探索该基因在草莓逆境胁迫中的表达特点和响应机制, 为其功能验证和育种工作提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与处理

试验于 2018 年 6 月—2019 年 1 月在甘肃农业大学园艺学院果树生理与生物技术开放实验室进行。试验材料为‘红颜’草莓试管苗。基本培养基为 MS + 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.2 mg · L<sup>-1</sup> IAA, 蔗糖 30 g · L<sup>-1</sup>, 琼脂 6 g · L<sup>-1</sup>, pH 5.8~6.0。人工气候箱的培养条件为: 25 °C 光照 16 h, 20 °C 黑暗 8 h。

培养 40 d 后选择生长健壮、长势一致且无污染的试管苗分别在 100 μmol · L<sup>-1</sup> ABA、200 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl 和 10% PEG 条件下处理 24 h, 以正常培养的试管苗为对照。每个处理 3 次生物学重复。取叶片液氮速冻, -80 °C 保存备用。RNA 提取采用植物提取试剂盒 RNAPlant-RTR2303 (中科瑞泰生物技术有限公司, 北京) 并按操作说明书进行。所得 RNA 经凝胶电泳和核酸检测仪检测合格后在 -80 °C 下保存备用。

### 1.2 草莓 CIPK 家族基因成员鉴定

对拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 数据库 (<https://www.arabidopsis.org/>) 中的 25 个已知 CIPK 基因保守序列蛋白, 在森林草莓 (*Fragaria vesca*) 数据库 (<https://www.rosaceae.org/species/fragaria/all>) 中经同源基因比对获得草莓 CIPK 基因组成员信息, 为避免重复对获得的所有序列进行 DNAMAN 比对筛选。对在草莓基因库获取已知序列的基因号、CDS 长度、氨基酸数、等电点、分子量大小等理化性质数据进行分析 (<https://web.expasy.org/protparam/>)。

### 1.3 草莓 CIPK 基因家族进化关系及基因结构系列分析

利用 MEGA5.0 和 Clustalx.exe 分析蛋白系统进化关系; GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 进行基因结构分析 (许瑞瑞 等, 2018); MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 进行 motif 分析 (Bailey et al., 2009); WoLF PSORT (<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>) 在线进行亚细胞定位; PRABI ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)) 进行蛋白二级结构分析; PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行启动子顺式作用元件分析。

### 1.4 实时荧光定量 PCR

将草莓 CIPK 家族基因的 CDS 序列进行在线引物设计并合成 (表 1) [生工生物工程 (上海) 股份有限公司]。

表 1 草莓 CIPK 基因家族表达分析的实时荧光定量引物  
 Table 1 qRT-PCR primers for expression analysis of CIPK in strawberry

基因 Gene	引物序列 (5'-3') Primer sequence	退火温度/℃ Annealing temperature
<i>FvCIPK01</i>	F: ATTTCTTACTCGGCGGGTCT; R: CCCAATCCTTCTTCCTCCTC	F: 56.0; R: 55.0
<i>FvCIPK02</i>	F: CACCGGGATATTAAGCCAGA; R: CGGGAGATAACCAGCCAATA	F: 54.1; R: 54.1
<i>FvCIPK03</i>	F: AGCGCACTATCTCAACAAGTCAGG; R: AAGTCCGCAGTTGCTCCATCATAG	F: 59.2; R: 59.4
<i>FvCIPK04</i>	F: ACCGTGACATCAAGCCAGAGAATC; R: ACATAAGCAGGAGTCCGCAAGTG	F: 59.3; R: 59.7
<i>FvCIPK05</i>	F: CACAACCTTCACTCGAACACCTC; R: GACGCCTTGGTCGGTCTTGATG	F: 60.4; R: 61.3
<i>FvCIPK06</i>	F: GACGCCTTGGTCGGTCTTGATG; R: CACAACCTTCACTCGAACACCTC	F: 61.3; R: 60.4
<i>FvCIPK07</i>	F: CCTGAAGCCAGAGAATTTGC; R: CGCTCCATCATAACCCTTTGT	F: 54.1; R: 54.8
<i>FvCIPK08</i>	F: GGTCGTGCGGAGTGATTCTGTTC; R: GCTCAGGATCGGACACCAACAAC	F: 60.8; R: 61.0
<i>FvCIPK09</i>	F: GCCATTTCGGCAAAGTTAAG; R: TGAATATGCGTTTGTCTGC	F: 52.2; R: 51.5
<i>FvCIPK10</i>	F: AGCAAGGGGATGGTCTTCTT; R: AGGTTTGCCTCATCAAATGG	F: 56.1; R: 52.9
<i>FvCIPK11</i>	F: ATGAGGTATGGCAAGCAAGTCC; R: TCAGATCGCGGTGGTAGACTCC	F: 60.2; R: 61.3
<i>FvCIPK12</i>	F: GGGGAGAGGATGGGGTATAA; R: TTCAAGTCTCCCAAAGCAG	F: 55.6; R: 54.9
<i>FvCIPK13</i>	F: AGCTGCTGCAATGGATGTGAGTC; R: GTTGTACGGTCCAAGCTCTCCTG	F: 60.3; R: 60.3
<i>FvCIPK14</i>	F: CCGATTACATGAGGTCGTGGCAAG; R: AACACCTTGGTTGTGGCAGTAGC	F: 60.5; R: 60.4
<i>FvCIPK15</i>	F: TCTGAGTGCATTGCCTGAAC; R: ACCAAGATGGGCATGAGAAC	F: 55.5; R: 55.1
<i>FvCIPK16</i>	F: CGCCAAGGTGGATATATGGT; R: GCCAACACTGAACCAAGGAT	F: 54.4; R: 55.5
<i>FvCIPK17</i>	F: AGGAGGTAAGACCAGGTCTCAAGG; R: AGGTTGTTGCTCTTGCTGCTCTG	F: 60.2; R: 60.4
<i>FvCIPK18</i>	F: TGCCAAGGTCAAGTTCGCAAG; R: ACCATCTGTGCTTGAGGACTTGC	F: 60.9; R: 60.0
<i>FvCIPK19</i>	F: AGCCGTTCAAGGTAATGTGG; R: ATTCAAAGAAATGGGCAACG	F: 55.2; R: 50.9
<i>18S-rRNA</i>	F: GCTCGCTGTTTTGCAGTTCTAC; R: AACATAGGTGAGGCCGCACTT	F: 58.2; R: 59.1

使用 Primer Script™ RT Regent Kit with gDNA Eeaser (TaKaRa, 上海) 试剂盒进行反转录获得 cDNA, 并用 SYBR Primer Ex Taq™ II (TaKaRa) 试剂盒进行定量, 定量 PCR 仪为 Light Cycler® 96 Real-Time PCR System (Roche, 瑞士)。以 *18S-rRNA* 为内参基因。

反应体系为 20 μL: 1 μL cDNA, 上、下游引物各 0.8 μL, SYBR 10 μL, ddH<sub>2</sub>O 补齐 20 μL, 反应程序为: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环, 重复 3 次。反应结束后分析荧光值变化曲线及熔解曲线。基因的相对表达量采用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 计算 (Livak & Schmittgen, 2001)。

## 2 结果与分析

### 2.1 草莓 CIPK 家族蛋白氨基酸理化性质分析

经草莓数据库同源比对得到了 19 条草莓 CIPK 家族基因, 命名为 *FvCIPK01* ~ *FvCIPK19* (表 2)。这些基因分布在草莓 7 条染色体中的 6 条上, 其中 3 号染色体上分布最多, 有 7 个基因, 其次是 4 号染色体, 有 4 个基因, 1 号上有 3 个基因, 6、7 号上各有 2 个基因, 2 号上只有 1 个基因 (*FvCIPK08*)。这些基因的片段大小各不相同, 编码的氨基酸数在 157 ~ 1 196 之间, 其中 *FvCIPK06* 编码氨基酸最少, *FvCIPK19* 编码氨基酸最多; 同一亚族不同基因编码氨基酸数差异不大, 如 *FvCIPK03*、*FvCIPK07*、*FvCIPK10*、*FvCIPK15*、*FvCIPK18* 均属于家族中的 D 亚族。推测的分子量在 18 667.68 ~ 133 714.31 D 之间; 理论等电点 (pI) 在 3.91 ~ 9.34 之间, 其中编码酸性氨基酸序列有 4 个, 分别是 *FvCIPK03*、*FvCIPK06*、*FvCIPK09* 和 *FvCIPK13*, 且 6 号染色体上的单独为一个亚族 E 族; 基因全长在 1 029 ~ 8 940 bp 之间。

表 2 草莓 CIPK 理化性质  
 Table 2 Physical and chemical property of CIPK in strawberry

蛋白 Protein	基因登录号 Gene accession No.	氨基 酸数 Amino acid	分子量/D Molecular weight	pI	分子式 Formula	起始与终止位置 Position	cDNA 全长/bp LF-cDNA	基因全长/ bp Full length genomic
FvCIPK01	FvH4_3g40260.1	439	49 480.94	8.52	C <sub>2205</sub> H <sub>3508</sub> N <sub>600</sub> O <sub>651</sub> S <sub>20</sub>	34 016 904 ~ 34 018 223	1 320	1 320
FvCIPK02	FvH4_3g40220.1	468	53 651.70	8.77	C <sub>2390</sub> H <sub>3818</sub> N <sub>662</sub> O <sub>703</sub> S <sub>18</sub>	33 993 641 ~ 33 996 125	2 485	2 485
FvCIPK03	FvH4_3g27610.1	437	50 055.59	6.27	C <sub>2236</sub> H <sub>3538</sub> N <sub>602</sub> O <sub>658</sub> S <sub>21</sub>	20 681 264 ~ 20 687 870	2 218	6 607
FvCIPK04	FvH4_3g07630.1	464	52 286.93	9.16	C <sub>2337</sub> H <sub>3681</sub> N <sub>645</sub> O <sub>681</sub> S <sub>18</sub>	4 492 826 ~ 4 494 220	1 395	1 395
FvCIPK05	FvH4_3g07620.1	507	56 289.52	7.64	C <sub>2513</sub> H <sub>3991</sub> N <sub>689</sub> O <sub>743</sub> S <sub>17</sub>	4 488 053 ~ 4 489 576	1 524	1 524
FvCIPK06	FvH4_3g07610.1	157	18 667.68	3.91	C <sub>826</sub> H <sub>1261</sub> N <sub>215</sub> O <sub>269</sub> S <sub>5</sub>	4 487 445 ~ 4 488 477	528	1 033
FvCIPK07	FvH4_3g05110.1	467	52 161.89	9.06	C <sub>2340</sub> H <sub>3710</sub> N <sub>636</sub> O <sub>685</sub> S <sub>14</sub>	2 958 452 ~ 2 964 366	2 359	5 915
FvCIPK08	FvH4_2g41050.1	449	50 486.09	8.94	C <sub>2267</sub> H <sub>3576</sub> N <sub>608</sub> O <sub>660</sub> S <sub>18</sub>	29 122 749 ~ 29 124 098	1 035	1 035
FvCIPK09	FvH4_1g17990.1	342	39 320.25	6.90	C <sub>1771</sub> H <sub>2789</sub> N <sub>487</sub> O <sub>504</sub> S <sub>11</sub>	10 459 751 ~ 10 460 779	1 029	1 029
FvCIPK10	FvH4_1g03090.1	448	50 770.53	8.93	C <sub>2281</sub> H <sub>3608</sub> N <sub>622</sub> O <sub>655</sub> S <sub>17</sub>	1 745 934 ~ 1 750 527	1 847	4 594
FvCIPK11	FvH4_1g01070.1	427	47 962.67	9.34	C <sub>2149</sub> H <sub>3445</sub> N <sub>583</sub> O <sub>619</sub> S <sub>19</sub>	549 852 ~ 551 135	1 284	1 284
FvCIPK12	FvH4_4g02010.1	438	47 505.11	8.87	C <sub>2114</sub> H <sub>3418</sub> N <sub>588</sub> O <sub>614</sub> S <sub>19</sub>	1 798 580 ~ 1 799 896	1 317	1 317
FvCIPK13	FvH4_4g08900.1	451	50 441.36	5.80	C <sub>2223</sub> H <sub>3532</sub> N <sub>600</sub> O <sub>694</sub> S <sub>21</sub>	9 796 010 ~ 9 799 571	2 108	3 562
FvCIPK14	FvH4_4g21530.1	464	51 954.47	7.61	C <sub>2312</sub> H <sub>3717</sub> N <sub>631</sub> O <sub>701</sub> S <sub>12</sub>	24 576 399 ~ 24 581 047	1 880	4 649
FvCIPK15	FvH4_5g33970.1	448	50 984.57	7.23	C <sub>2291</sub> H <sub>3606</sub> N <sub>614</sub> O <sub>668</sub> S <sub>17</sub>	24 641 189 ~ 24 650 128	3 720	8 940
FvCIPK16	FvH4_6g10160.1	439	49 580.99	7.58	C <sub>2236</sub> H <sub>3524</sub> N <sub>600</sub> O <sub>647</sub> S <sub>13</sub>	6 029 925 ~ 6 031 244	1 320	1 320
FvCIPK17	FvH4_6g10210.1	471	53 280.52	9.00	C <sub>2395</sub> H <sub>3833</sub> N <sub>645</sub> O <sub>698</sub> S <sub>14</sub>	6 064 268 ~ 6 067 075	2 808	2 808
FvCIPK18	FvH4_7g17430.1	427	48 986.43	8.93	C <sub>2195</sub> H <sub>3466</sub> N <sub>598</sub> O <sub>634</sub> S <sub>19</sub>	14 814 308 ~ 14 818 804	2 256	4 497
FvCIPK19	FvH4_7g25640.1	1 196	133 714.31	8.49	C <sub>5995</sub> H <sub>9536</sub> N <sub>1622</sub> O <sub>1742</sub> S <sub>47</sub>	19 572 743 ~ 19 579 892	3 773	7 150

## 2.2 草莓 CIPK 家族多序列比对及其进化分析

对草莓 CIPK 家族蛋白氨基酸进行多序列比对分析发现: 草莓 CIPK 家族基因 C 端保守性差, 多数基因中均含有 NAF 控制域, 但 N 端具有较强的保守性, 含有共同的蛋白激酶激活域, 其在功能上可能具有相似性。其中, *FvCIPK19* 中的 NAF 控制域 N 突变为 S, *FvCIPK06* 的保守性最差, 缺失了 NAF 控制域, 可能与其执行的功能有关 (图 1)。

为了进一步了解草莓 CIPK 家族谱系及功能特点, 对拟南芥、葡萄和草莓 CIPK 家族基因 (*AtCIPK*、*VvCIPK* 和 *FvCIPK*) 采用最大简约法 (Maximum Parsimony) 共同构建系统发育树, 通过构建聚类树将其分为 6 个亚族 (A ~ F), 其中 E 亚族中只有一个基因 *FvCIPK06*, B 亚族和 C 亚族中各有 2 个草莓基因, 在 F 亚族中, *FvCIPK05* 和其他基因不在一个谱系 (图 2), 在各分支中, 草莓与拟南芥的 CIPK 基因有较高的同源性, 推测直系同源基因之间具有相同的功能。

## 2.3 草莓 CIPK 家族基因结构分析

从图 3 可以看出, *FvCIPK01*、*FvCIPK04*、*FvCIPK05*、*FvCIPK08*、*FvCIPK09*、*FvCIPK11*、*FvCIPK12*、*FvCIPK16* 整条基因均为外显子, 且 *FvCIPK05*、*FvCIPK08*、*FvCIPK11* 均在 F 亚族, *FvCIPK01*、*FvCIPK04* 在 B 亚族, *FvCIPK09*、*FvCIPK16* 在 A 亚族, F 亚族中 *FvCIPK02* 和 *FvCIPK17* 不含有内含子, 而且这些亚族基因中都存在内含子缺失现象, 结构存在相似性, 为内含子缺失类, 我们推测其功能可能相同。该基因家族的外显子数目都分布在 1 ~ 15 之间, 其中 D 亚族在 14 ~ 15 之间, 且均有上下游编码区, 与其他亚族相比, 内含子数较多, 属于内含子富集类, 但是氨基酸在外显子上的分布位置差异较大, 序列的长度也各不相同, 无明显规律, 推测 D 亚族与其他亚族相比功能上差异较大。



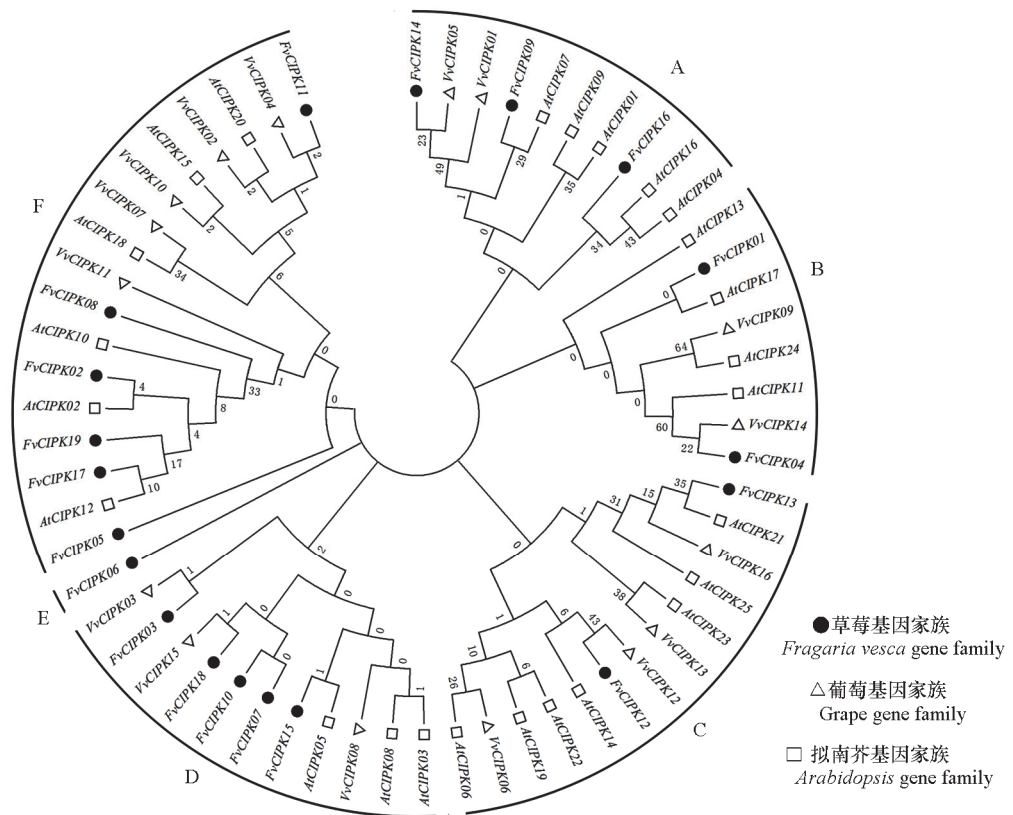


图2 草莓 (*Fv*)、拟南芥 (*At*) 和葡萄 (*Vv*) CIPK 基因进化树

节点处数字表示 1 000 个复制的引导值。

Fig. 2 The unrooted phylogenetic tree of CIPK gene in strawberry (*Fv*), *Arabidopsis* (*At*) and grape (*Vv*)

The number at the node represents the boot value of 1 000 replicates.

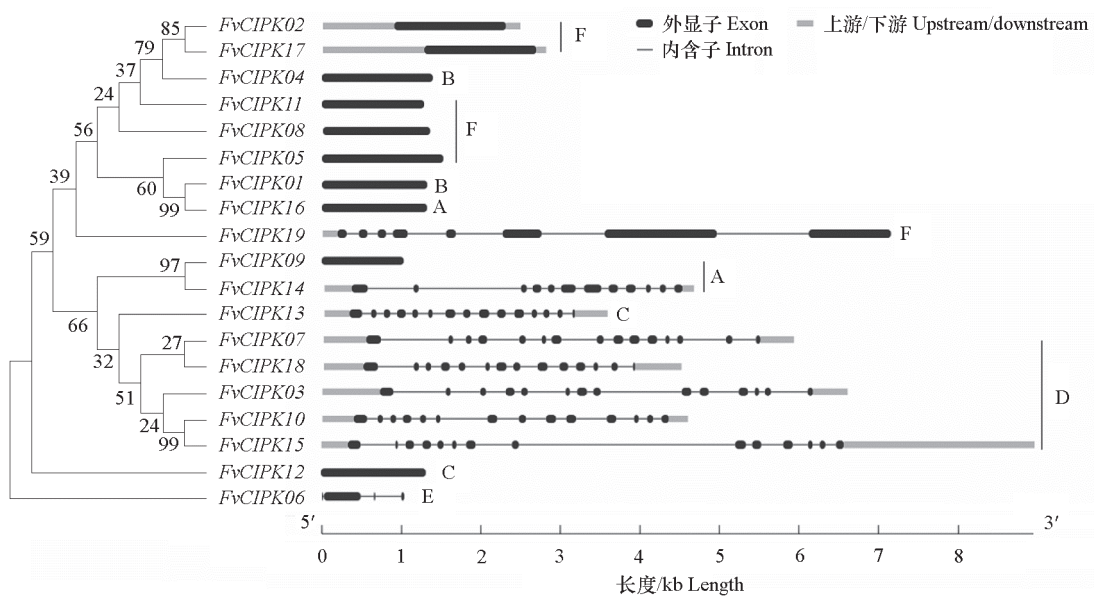


图3 草莓 CIPK 基因外显子—内含子结构分析

Fig. 3 Exon - intron structure of CIPK genes in strawberry

## 2.4 草莓 CIPK 家族 motif 序列分析

在草莓 CIPK 家族中共找到了 20 个 motif (图 4, 表 3)。除 E 亚族的 FvCIPK06 和 F 亚族的 FvCIPK19 外, 其他亚族内 motif 分布的相对比较均匀, 尤其在 D 亚族中, 分布的数量和位置都基本相同, 具有高度的保守性, 我们推测在同一亚族内其结构域和功能单位均基本相似。motif3 在所有

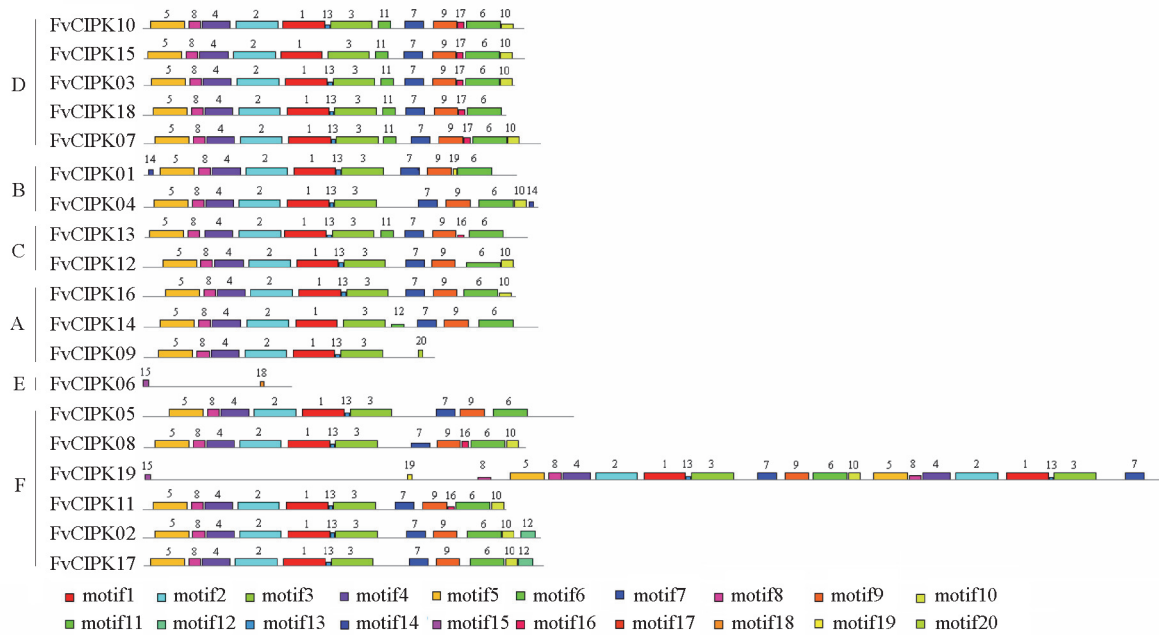


图 4 草莓 CIPK 家族 motif1 ~ motif20 分析

Fig. 4 motif1 - motif20 analysis of CIPK family in strawberry

表 3 草莓 CIPK 蛋白氨基酸保守序列

Table 3 Conserved motifs of CIPK proteins in strawberry

Motif	长度/bp Length	氨基酸保守序列 Amino acid conserved sequence
motif1	50	DGLLHTTCGTPAYVAPEVLNKKGYDGAKADIWSCGVILFVLLAGYLPFDD
motif2	50	EDEARKYFQQLISAVDYCHSRGVYHRDLKPENLLDENGNLKVSDFGLSA
motif3	50	YRKIYKGEFRCPWFSPPEARLJSRILDPNPNTRITIAEIMEDEWFKKGY
motif4	34	HPNIVQLYEVMASKTKIYIVMEYVKGGELFDKIA
motif5	41	LVGKYELGRTLGEFTFAKVYFARNLETGZSVAIKIJDKKVV
motif6	41	EGRKGNLSIAAEIFEVTPSLHVVEVKKSAGDTLEYHKKFYKK
motif7	23	PTNLNAFDJISLSSGLDLSSGLFE
motif8	15	MMDQIKREISIMRLL
motif9	29	RFTSQKPASEIHSKIEEVAKALGFKVKKK
motif10	15	LRPALKDIVWTWQGE
motif11	16	EDEDVNLDDVBAVFBD
motif12	18	QQPQZQEPQPZQQEQQP
motif13	6	SNLMAM
motif14	6	QQQQQP
motif15	7	MSCWPDF
motif16	8	NYKLRLZG
motif17	7	IYJVMEY
motif18	6	RSSWWQ
motif19	6	DWGMEM
motif20	7	CCFGFCI



成员上分布的数量最多, motif14 只分布在 FvCIPK01 上, motif15 只分布在 FvCIPK06 和 FvCIPK19 上, 且 FvCIPK06 和 FvCIPK19 分布情况与其他成员相比差异明显 (图 4)。

## 2.5 草莓 CIPK 家族亚细胞定位预测和蛋白质二级结构分析

草莓 CIPK 基因家族表达主要集中在细胞质、细胞核和叶绿体 (表 4), 其次在线粒体、内质网和细胞膜中表达, 另外在细胞骨架、液泡和高尔基体和过氧化物酶体中有少量的表达, 在细胞质基

表 4 草莓 CIPK 亚细胞定位预测  
 Table 4 Subcellular location prediction of CIPK in strawberry

蛋白 Protein	细胞质 Cytoplasm	细胞核 Nucleus	细胞质和细胞核 Cytoplasm and nucleus	线粒体 Mitochondria	细胞骨架 Cytoskeleton	叶绿体 Chloroplast	细胞质和细胞膜 Cytoplasm and cell membrane
FvCIPK01	6	2	—	—	3	2	—
FvCIPK02	12	—	—	—	—	—	—
FvCIPK03	1	—	—	1	1	—	—
FvCIPK04	2	—	—	2	—	2	—
FvCIPK05	0	1	—	—	—	11	—
FvCIPK06	10	—	—	—	—	4	—
FvCIPK07	5	3	—	5	—	—	—
FvCIPK08	8.5	1.5	5.5	—	—	1	—
FvCIPK09	3	—	—	—	—	—	—
FvCIPK10	5.5	1.5	4	3	—	3	—
FvCIPK11	—	—	—	—	—	—	4
FvCIPK12	11	—	—	3	—	—	—
FvCIPK13	5	4	—	1	—	1	—
FvCIPK14	12	0	—	—	—	1	—
FvCIPK15	2.5	3.5	3.5	1	—	3	—
FvCIPK16	4	—	—	—	9	—	—
FvCIPK17	3	1.5	—	1.5	—	2	—
FvCIPK18	1	—	—	4	—	5	—
FvCIPK19	—	—	—	—	—	12	—

蛋白 Protein	液泡 Vacuole	内质网 Endoplasmic reticulum	细胞膜 Cell membrane	高尔基体 Golgi apparatus	细胞质基质 Cytoplasmic matrix	过氧化物酶体 Peroxisome	高尔基体和细胞膜 Golgi apparatus and cell membrane	细胞骨架 和细胞核 Cytoskeleton and nucleus
FvCIPK01	—	—	—	—	—	—	—	—
FvCIPK02	—	—	—	—	—	1	—	—
FvCIPK03	1	—	1	1	—	—	—	—
FvCIPK04	2	3	2	—	2	—	—	—
FvCIPK05	—	—	1	—	—	—	—	—
FvCIPK06	—	—	—	—	—	—	—	—
FvCIPK07	—	—	—	—	—	—	—	—
FvCIPK08	—	1	1	—	—	—	—	—
FvCIPK09	—	5	5	—	—	—	—	—
FvCIPK10	—	—	—	—	—	—	—	—
FvCIPK11	—	4	6.5	—	—	—	—	—
FvCIPK12	—	—	—	—	—	—	—	—
FvCIPK13	—	—	1.5	—	—	—	1.5	—
FvCIPK14	—	—	—	—	—	—	—	—
FvCIPK15	—	2	1	—	—	—	—	—
FvCIPK16	—	—	—	—	—	—	—	—
FvCIPK17	2	3	—	—	—	—	—	1.5
FvCIPK18	—	2	—	1-	—	—	—	—
FvCIPK19	—	—	1	—	—	—	—	—

注: 表中数值根据分选信号、氨基酸组成和功能域数, 经 kNN 算法而得到; 数值表示所占比例; “—” 表示无数值。

Note: The value is obtained according to sorting signals, amino acid composition and functional motifs from kNN. The numerical value represents the proportion column. “—” is used to signify the absence of a value.

质中只有 *FvCIPK04* 表达, 在过氧化物酶体中只有 *FvCIPK02* 表达。每个基因在不同的细胞器中的表达位置和表达量又各不相同, 推测这与基因所执行的功能有关。

蛋白质的二级结构主要以  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角、延伸链和不规则卷曲构成, 通过 EXPASy 提供的在线 SOPMA 程序对草莓 CIPK 蛋白进行分析得出, 19 个 CIPK 蛋白主要以  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -转角和不规则卷曲为主 (表 5)。

表 5 草莓 CIPK 蛋白二级结构分析

Table 5 The secondary structure of CIPK protein sequence in strawberry

蛋白 Protein	$\alpha$ -螺旋/% Alpha helix	$\beta$ -转角/% Beta turn	不规则卷曲/% Random coil	蛋白 Protein	$\alpha$ -螺旋/% Alpha helix	$\beta$ -转角/% Beta turn	不规则卷曲/% Random coil
FvCIPK01	38.72	9.11	34.17	FvCIPK11	36.53	10.30	34.43
FvCIPK02	37.60	10.04	35.04	FvCIPK12	41.78	7.99	32.88
FvCIPK03	39.59	11.44	32.95	FvCIPK13	41.69	9.09	31.26
FvCIPK04	38.15	9.48	35.56	FvCIPK14	36.42	8.62	35.13
FvCIPK05	32.94	10.65	38.26	FvCIPK15	37.05	10.04	35.04
FvCIPK06	49.71	8.57	18.29	FvCIPK16	35.08	9.57	35.99
FvCIPK07	37.47	9.21	36.19	FvCIPK17	34.61	9.77	38.43
FvCIPK08	36.53	9.80	36.53	FvCIPK18	34.89	9.60	36.07
FvCIPK09	33.92	10.53	36.26	FvCIPK19	36.54	9.95	33.70
FvCIPK10	39.96	9.60	33.04				

## 2.6 草莓 CIPK 家族基因上游 2 kb 顺式作用元件分析

为了确定草莓 CIPK 基因家族启动子上游 2 kb 的顺式作用区域, 在该基因的起始密码子上游搜索 2 kb 碱基序列进行分析, 19 条草莓 CIPK 基因中均含有逆境胁迫应答元件 MYB 和抗寒元件识别位点 MYC (表 6); 除 *FvCIPK09*、*FvCIPK12*、*FvCIPK16*、*FvCIPK17*、*FvCIPK19* 外, 其他 15 个基因均含有乙烯应答元件 ERE; 除 *FvCIPK02*、*FvCIPK15*、*FvCIPK17* 外, 其他 16 个基因均含有脱落酸应答元件 ABRE, 且 *FvCIPK11* 含有最多, 推测该基因在 ABA 胁迫应答机制中起关键作用; 除

表 6 草莓 CIPK 上游 2 kb 顺式作用元件分布

Table 6 Putative cis-acting existed in the 2 kb upstream region of CIPK genes in strawberry

基因 Gene	乙烯应答 元件 ERE	脱水应答元件 DRE	脱落酸应答元件 ABRE	逆境胁迫应答元件 MYB	抗寒元件识别位点 MYC	MYB 结合位点诱导干旱 MBS
<i>FvCIPK01</i>	2	1	2	11	9	3
<i>FvCIPK02</i>	1	1	—	8	1	—
<i>FvCIPK03</i>	1	—	6	10	2	—
<i>FvCIPK04</i>	1	—	4	9	6	1
<i>FvCIPK05</i>	1	—	16	8	3	1
<i>FvCIPK06</i>	1	1	14	7	4	2
<i>FvCIPK07</i>	1	—	2	7	7	—
<i>FvCIPK08</i>	1	1	4	13	1	1
<i>FvCIPK09</i>	—	—	4	10	5	3
<i>FvCIPK10</i>	3	1	4	4	5	—
<i>FvCIPK11</i>	3	—	17	9	4	1
<i>FvCIPK12</i>	—	1	1	3	2	—
<i>FvCIPK13</i>	2	—	1	3	4	1
<i>FvCIPK14</i>	1	—	10	9	3	—
<i>FvCIPK15</i>	1	—	—	13	7	2
<i>FvCIPK16</i>	—	1	6	9	6	—
<i>FvCIPK17</i>	—	—	—	10	5	3
<i>FvCIPK18</i>	1	—	7	6	4	0
<i>FvCIPK19</i>	—	—	3	12	7	2

注: 数值表示数量, “—”表示无数值。

Note: Numerical representation of quantity; “—” is used to signify the absence of a value.

*FvCIPK02*、*FvCIPK03*、*FvCIPK07*、*FvCIPK10*、*FvCIPK12*、*FvCIPK14*、*FvCIPK16*、*FvCIPK18* 这 8 个基因外, 其他基因均含有响应 MYB 结合位点诱导干旱的作用元件 MBS; *FvCIPK01*、*FvCIPK02*、*FvCIPK06*、*FvCIPK08*、*FvCIPK10*、*FvCIPK12*、*FvCIPK16* 这 7 条基因均含有 DRE 元件, 启动子作用元件决定了该基因对逆境信号的胁迫机制。

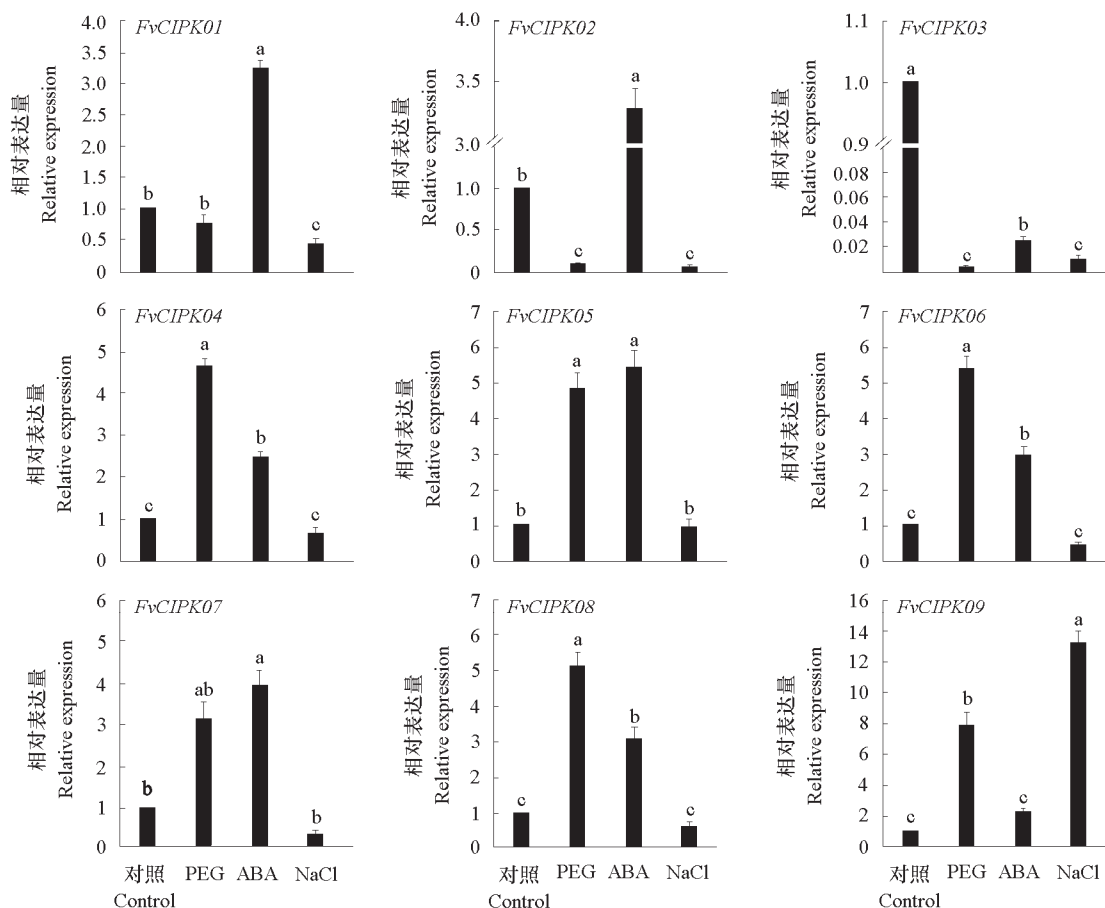
## 2.7 草莓 CIPK 家族基因实时荧光定量分析

对草莓试管苗分别进行了 PEG、ABA 和 NaCl 诱导处理, 19 个 CIPK 基因家族成员各处理间相对表达量 (qRT-PCR) 存在着显著差异 (图 5)。 *FvCIPK09*、*FvCIPK11* 和 *FvCIPK16* 不同处理后相对表达量均呈现上调, 且 *FvCIPK09* 和 *FvCIPK16* 属于 A 亚族, 说明 A 亚族在响应各种逆境胁迫可能发挥重要作用。

在 PEG 处理下, *FvCIPK04* ~ *FvCIPK09*、*FvCIPK11*、*FvCIPK12*、*FvCIPK15*、*FvCIPK16* 均上调表达, 相对表达量均在对照的 3 倍以上, 其中 *FvCIPK16* 最高, 是对照的 18.4 倍, 推测 *FvCIPK16* 在植物干旱胁迫中起正向调节作用。

在 ABA 处理下, 除 D 亚族的 *FvCIPK03* 和 *FvCIPK15* 受 ABA 抑制表达下调外, 大多基因家族成员的相对表达量上调, 其中以 *FvCIPK10* 的响应最为强烈, 达到对照的 29 倍, 因此, 推测 CIPK 基因可能在 ABA 信号调节途径中起重要作用。

在 NaCl 处理下, *FvCIPK09* 相对表达量显著上调, 是对照的 13 倍, *FvCIPK03*、*FvCIPK13*、*FvCIPK17* 和 *FvCIPK18* 表达量均表现出不同程度下调。另外 *FvCIPK03* 对所有处理相对表达量均表现出下调, 推测该基因可能在植物逆境胁迫中起负调节作用。



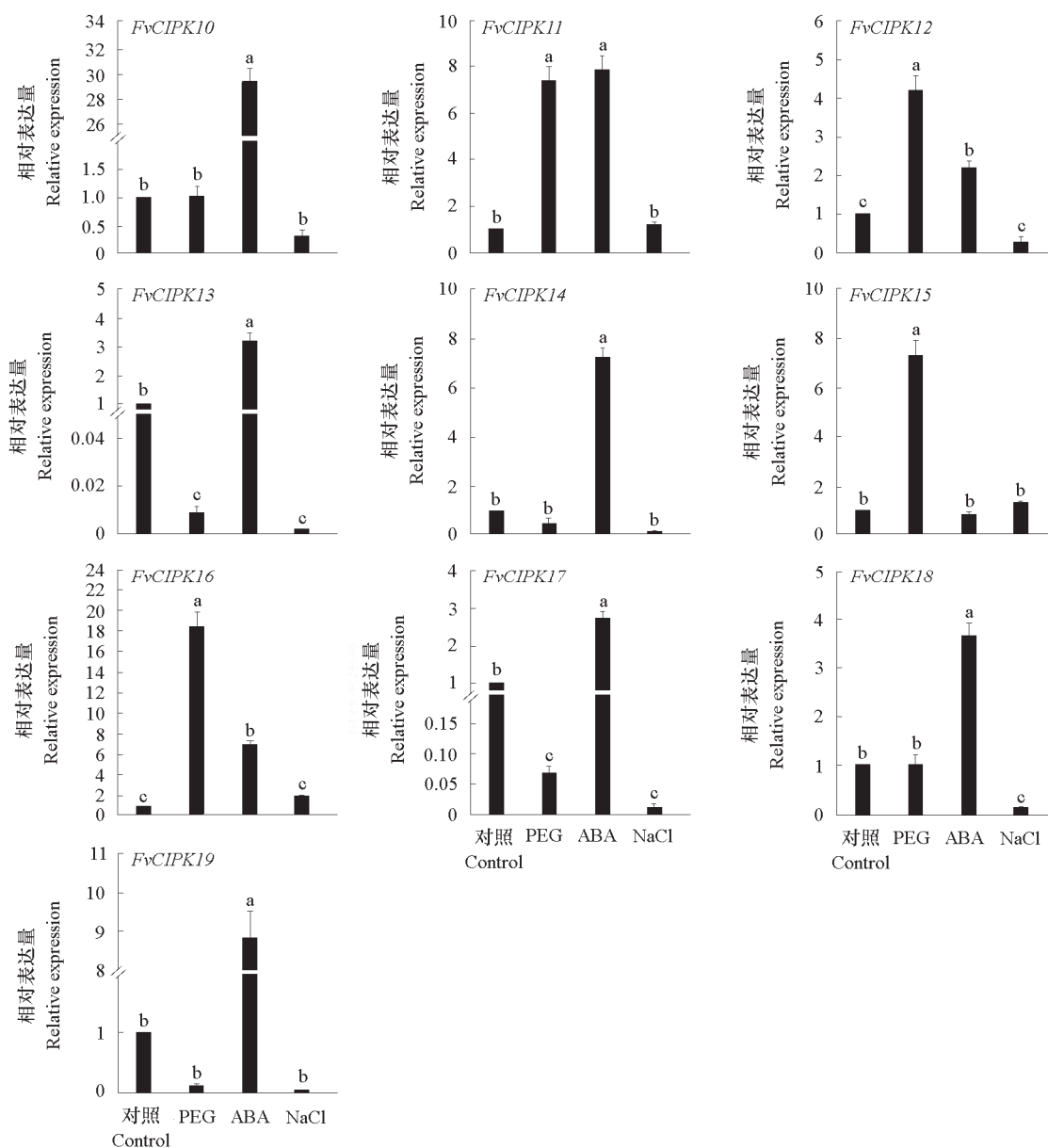


图5 在 PEG、ABA 和 NaCl 处理下草莓 CIPK 基因家族表达分析

不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 5 Expression analysis of CIPK gene family under PEG, ABA and NaCl treatments in strawberry

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

### 3 讨论

CIPK 蛋白包含保守的 N 端催化激酶域和 C 端调控域 (Kim et al., 2000; Albrecht et al., 2001)。Yu 等 (2007) 在杨树中发现 *PtCIPK5* 中 NAF 的 N 突变为 T。在西瓜中也有类似情况 (栾非时 等, 2018)。通过序列比对和检索, 共得到了 19 条草莓 CIPK 基因家族成员。19 个草莓 CIPK 基因 N

端均存在一个催化激活域,除 *FvCIPK06*、*FvCIPK09*、*FvCIPK19* 外,C 端都有 NAF 域,其中,*FvCIPK19* 由 N 突变为 S,而 *FvCIPK06* 中 NAF 缺失,这些结构域发生突变是否会影响其功能有待进一步研究。

聚类分析结果表明,草莓 CIPK 蛋白可分为 6 个亚族 A~F, *FvCIPK09*、*FvCIPK13*、*FvCIPK16* 与拟南芥 CIPK 同源性较高, *FvCIPK04*、*FvCIPK12*、*FvCIPK14* 与葡萄 CIPK 同源性较高,说明这些基因在亲缘关系方面比较接近。在拟南芥中根据内含子分布情况,可将 CIPK 基因分为不含内含子或含 1 个内含子和含 9 个或以上内含子两大分支(Hrabak et al., 2003)。基因结构分析表明:CIPK 基因家族中存在部分基因中无内含子或者内含子数少于 3 个,B 与 F 亚族中的基因成员以及基因 *FvCIPK09*、*FvCIPK12*、*FvCIPK16* 中均不含内含子,因此为内含子缺失类;D 亚族中的基因以及 *FvCIPK13*、*FvCIPK14*、*FvCIPK19* 为内含子富集类,这与 Li 等(2010)在高粱和 Hu 等(2015)在木薯上的发现一致。拟南芥 CIPK 蛋白主要定位在细胞核和细胞质中(Batistič et al., 2010)。本试验亚细胞定位预测分析表明,草莓 CIPK 基因家族表达主要集中在细胞质、细胞核和叶绿体上,与路志浩等(2017)在葡萄中的研究结果相符。

当植物遭受外界逆境胁迫时,如干旱、高温、盐碱胁迫等,这些胁迫信号会转化为信号因子通过一系列信号传递,激活相应的转录因子,并与相对应基因的顺式作用元件结合,从而激活相关基因的表达,对外界逆境信号做出应答反应(Shinozaki & Yamaguchi, 1997; Hadiarto & Tran, 2011)。刘思源等(2017)在辣椒 CIPK 基因中发现多个应答不同逆境和植物激素的顺式作用元件。本研究中发现,草莓 CIPK 基因中均含有 MYB 转录因子和 MYC 应答元件,并且多数基因中含有与 ABA 响应相关的作用元件,说明 CIPK 基因与不同逆境胁迫和植物激素应答机制密切相关,并在其中行使不同的功能。

现已有研究表明,CIPK 基因在植物逆境胁迫中具有重要的作用。在拟南芥中,发现 *AtCIPK16* 在植物耐盐性方面具有正向调节作用, *AtCIPK23* 对植物抗旱具有负调节作用(Cheong et al., 2007; Amarasinghe et al., 2016)。葡萄 *VvCIPK15* 在 PEG、ABA、NaCl 和低温处理下上调表达(路志浩等, 2017)。本研究中草莓 CIPK 基因家族成员在 PEG、ABA、NaCl 诱导下,其表达量均出现不同程度的变化,其中 *FvCIPK03* 表达均下调,表明 *FvCIPK03* 可能在植物抗干旱、高盐和 ABA 信号途径中起负调节作用,这与颜彦等(2018)在木薯 *MeCIPK1* 研究中发现一致。前期研究表明,  $Ca^{2+}$  作为第二信使参与植物多种逆境胁迫的调控机制(赵晋锋等, 2011; Batistič & Kudla, 2012; 唐湖斌等, 2015)。袁志恒等(2012)在玉米中发现干旱诱导下, *ZmCIPK3* 的表达量显著上调,在  $Ca^{2+}$  介导的干旱胁迫途径中起重要作用。Zhao 等(2009)在玉米研究中发现 *ZmCIPK16* 可以响应干旱、高盐和 ABA 诱导。Piao 等(2010)发现水稻突变体 *OsCIPK31* 在幼苗生长和种子萌发均对干旱、高盐和 PEG 胁迫高度敏感。植物在高盐或干旱胁迫的信号通路至少通过 ABA 依赖和 ABA 不依赖两种信号途径(Angelo et al., 2006)。

本试验中,PEG 处理下 *FvCIPK16* 表达量显著上调,推测 *FvCIPK16* 参与植物抗干旱胁迫并在其中起关键作用,是否为  $Ca^{2+}$  介导信号通路的关键基因有待进一步验证。*FvCIPK09*、*FvCIPK11*、*FvCIPK16* 在 PEG、ABA、NaCl 诱导时表达量均上调,说明这 3 个基因的表达可能在高盐或干旱胁迫的信号通路中为 ABA 依赖途径,与路志浩等(2017)在葡萄 CIPK 研究中发现一致。ABA 处理下, *FvCIPK03* 相对表达量下调,其他基因多上调,其中 *FvCIPK10* 显著升高,说明 CIPK 基因参与 ABA 胁迫的逆境调控途径,且 *FvCIPK03* 和 *FvCIPK15* 在其中起负调节作用。NaCl 处理下, *FvCIPK09* 相对表达量显著上调,说明该基因对高盐胁迫响应强烈。结合系统进化树和 qRT-PCR 分析表明,可预测草莓 CIPK 基因家族 A、B、C、E、F 在响应 ABA 处理的逆境胁迫中起正向调节作用, *FvCIPK03*

在植物抗逆境胁迫中起负调节作用。本试验的结果表明，CIPK 家族基因在草莓抗逆境胁迫中起着重要的作用，并为后续该基因在功能和作用机制上的研究奠定了基础以及通过基因手段改良草莓提供了理论依据。

## References

- Albrecht V, Ritz O, Linder S, Harter K, Kudla J. 2001. The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in  $Ca^{2+}$  regulated kinases. *Embo Journal*, 20 (5): 1051 - 1063.
- Angelo D C, Weigl S, Batistic O, Pandey G K, Cheong Y H, Stefanie Schültke, Albrecht V, Ehlert B, Schulz B, Harter K, Luan S, Bock R, Kudla J. 2006. Alternative complex formation of the  $Ca^{2+}$  regulated protein kinase CIPK1 controls abscisic acid-dependent and independent stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 48 (6): 857 - 872.
- Amarasinghe S, Watson-Haigh N S, Gilliam M, Roy S, Baumann U. 2016. The evolutionary origin of *CIPK16*: a gene involved in enhanced salt tolerance. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 100: 135 - 147.
- Bailey T L, Boden M, Buske F A, Frith M, Grant C E, Clementi L, Ren J Y, Li W W, Noble W S. 2009. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*, W202 - W208.
- Batistič O, Kudla J. 2012. Analysis of calcium signaling pathways in plants. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 1820 (8): 1283 - 1293.
- Batistič O, Waadt R, Steinhorst L, Held K, Jörg Kudla. 2010. CBL-mediated targeting of CIPKs facilitates the decoding of calcium signals emanating from distinct cellular stores. *Plant Journal*, 61 (2): 211 - 222.
- Chen X, Gu Z, Xin D, Hao L, Liu C, Huang J, Ma B, Zhang H. 2011. Identification and characterization of putative *CIPK* genes in maize. *Journal of Genetics and Genomics*, 38 (2): 77 - 87.
- Cheong Y H, Pandey G K, Grant J J, Batistic O, Li L, Kim B G, Lee S C, Kudla J, Luan S. 2007. Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 52 (2): 223 - 239.
- Deng X, Zhou S, Hu W, Feng J, Zhang F, Chen L. 2013. Ectopic expression of wheat *TaCIPK14*, encoding a calcineurin B-like protein-interacting protein kinase, confers salinity and cold tolerance in tobacco. *Physiologia Plantarum*, 149 (3): 367 - 377.
- Hadiarto T, Tran L S. 2011. Progress studies of drought-responsive genes in rice. *Plant Cell Reports*, 30 (3): 297 - 310.
- Hrabak E M, Chan C W M, Gribskov M, Harper J F, Choi J H, Halford N, Kudla J, Luan S, Nimmo H G, Sussman M R, Thomas M, Walker-Simmons K, Zhu J K, Harmon A C. 2003. The *Arabidopsis* CDPK-SnRK super family of protein kinases. *Plant Physiology*, 132 (2): 666 - 680.
- Hu W, Xia Z, Yan Y, Ding Z, Tie W, Wang L, Zou M, Wei Y, Lu C, Hou X, Wang W, Peng M. 2015. Genome-wide gene phylogeny of CIPK family in cassava and expression analysis of partial drought-induced genes. *Frontiers in Plant Science*, 30 (6): 914 - 929.
- Kim K N, Cheong Y H, Gupta R, Luan S. 2000. Interaction specificity of *Arabidopsis* calcineurin B-like calcium sensors and their target kinases. *Plant Physiology*, 124 (4): 1844 - 1853.
- Kim K N, Lee J S, Han H, Choi S A, Go S J, Yoon I S. 2003. Isolation and characterization of a novel rice  $Ca^{2+}$  regulated protein kinase gene involved in responses to diverse signals including cold, light, cytokinins, sugars and salts. *Plant Molecular Biology*, 52 (6): 1191 - 1202.
- Kolukisaoglu U, Weigl S, Blazevic D, Batistic O, Kudla J. 2004. Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant Physiology*, 134 (1): 43 - 58.
- Li L, Kim B G, Cheong Y H, Pandey G K, Luan S. 2006. A  $Ca^{2+}$  signaling pathway regulates a  $K^+$  channel for low-K response in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (33): 12625 - 12630.
- Li L B, Zhang Y R, Liu K C, Ni Z F, Fang Z J, Sun Q X, Gao J W. 2010. Identification and bioinformatics analysis of SnRK2 and CIPK family genes in *Sorghum*. *Agricultural Sciences in China*, 9 (1): 19 - 30.
- Li Lin, Liu Can-kui. 2010. The SnRK protein kinase family and the function of SnRK2 protein kinase. *Molecular Plant Breeding*, 8 (3): 547 - 555. (in Chinese)
- 李琳, 柳参奎. 2010. SnRK 蛋白激酶家族及其成员 SnRK2 的功能. *分子植物育种*, 8 (3): 547 - 555.

- Li Yang, Li Xiao-wei, Xu He-han, Xiao Hong-qing, Sun Da-qian, Wang Nan, Li Hai-yan. 2018. Research progress of CBL-CIPK signaling pathway in plants under abiotic stress. *Agriculture and Technology*, 38 (11): 7 - 10. (in Chinese)
- 李洋, 李晓薇, 徐赫韩, 肖红庆, 孙大千, 王南, 李海燕. 2018. 非生物胁迫下植物中 CBL-CIPK 信号通路研究进展. *农业与技术*, 38 (11): 7 - 10.
- Liu Si-yuan, Huang Hai-feng, Wang Xu-dong, Gong Chao, Song Hai-hui, Chen Xiu-ling, Wang Ao-xue. 2017. Identification and characterization of CBL and CIPK gene families in pepper genome. *Molecular Plant Breeding*, 15 (8): 2977 - 2985. (in Chinese)
- 刘思源, 黄海锋, 王旭东, 宫超, 宋海慧, 陈秀玲, 王傲雪. 2017. 辣椒全基因组中 CBL、CIPK 基因家族的鉴定及特性分析. *分子植物育种*, 15 (8): 2977 - 2985.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25: 402 - 408.
- Lu Zhi-hao, Huo Jian-qiang, Ma Yu, Hu Wei, Mao Juan. 2017. Identification and expression analysis of CIPK gene family in grape. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 26 (11): 1619 - 1630. (in Chinese)
- 路志浩, 霍建强, 马钰, 胡炜, 毛娟. 2017. 葡萄 CIPK 基因家族的鉴定表达分析. *西北农业学报*, 26 (11): 1619 - 1630.
- Luan Fei-shi, Lü Hui-ling, Zhu Zi-cheng, Zhang Chen, Lin Fan, Han Qian-kun. 2018. Identification and characterization of watermelon CIPK family genes. *Northern Horticulture*, (8): 1 - 7. (in Chinese)
- 栾非时, 吕慧玲, 朱子成, 张辰, 林凡, 韩前坤. 2018. 西瓜 CIPK 家族基因的鉴定与特征分析. *北方园艺*, (8): 1 - 7.
- Martinez-Atienza J, Jiang X, Garcíadeblas B, I Mendoza, Zhu J, Pardo J M, Quintero F J. 2007. Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice. *Plant Physiology*, 143 (2): 1001 - 1012.
- Mi Bao-qin, Mao Juan, Shen Peng, Chen Bai-hong, Hao Yan, Yang Rui. 2015. Construction and analyses of SSH libraries of cold resistance related genes in *Vitis amrensis* accession 'Tonghua-3'. *Journal of Fruit Science*, 32 (4): 546 - 554. (in Chinese)
- 米宝琴, 毛娟, 申鹏, 陈佰鸿, 郝燕, 杨瑞. 2015. 山葡萄通化-3 抗寒相关基因 SSH 文库的构建及分析. *果树学报*, 32 (4): 546 - 554.
- Peter K H. 2005. Calcium: a central regulator of plant growth and development. *The Plant Cell*, 17 (8): 2142 - 2155.
- Piao H L, Xuan Y L, Park S H, Je B I, Park S J, Park S H, Kim C M, Huang J, Wang G K, Kim M J. 2010. OsCIPK31, a CBL-interacting protein kinase is involved in germination and seedling growth under abiotic stress conditions in rice plants. *Molecules and Cells*, 30 (1): 19 - 27.
- Shinozaki K, Yamaguchi S K. 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiology*, 115 (2): 327 - 334.
- Shen Jin-qiu, Zhen Zhong-zhong, Pan Wei-huai, Pan Jian-wei. 2014. The function and mechanism of plant CBL-CIPK signal system. *Journal of Plant Physiology*, 50 (4): 641 - 650. (in Chinese)
- 沈金秋, 郑仲仲, 潘伟槐, 潘建伟. 2014. 植物 CBL-CIPK 信号系统的功能及其作用机理. *植物生理学报*, 50 (4): 641 - 650.
- Tang Hu-bin, Min Kang-kang, Xu Ling-ling, Hu Hai-tao, Yang Ling, Wang Chang-chun. 2015. Research progress of CBL-CIPK signal system. *Chinese Journal of Cell Biology*, 37 (1): 100 - 105. (in Chinese)
- 唐湖斌, 闵康康, 徐玲玲, 胡海涛, 杨玲, 王长春. 2015. CBL-CIPK 信号系统的研究进展. *中国细胞生物学学报*, 37 (1): 100 - 105.
- Wang Ao-xue, Liu Si-yuan. 2018. Identification and bioinformatics analysis on CIPK gene family in tomato. *Journal of Northeast Agricultural University*, 49 (2): 31 - 38. (in Chinese)
- 王傲雪, 刘思源. 2018. 番茄 CIPK 基因家族鉴定及生物信息学分析. *东北农业大学学报*, 49 (2): 31 - 38.
- Wang R K, Li L L, Cao Z H, Zhao Q, Li M, Zhang L Y, Hao Y J. 2012. Molecular cloning and functional characterization of a novel apple *MdCIPK6L* gene reveals its involvement in multiple abiotic stress tolerance in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, 79 (1 - 2): 123 - 135.
- Wang Rong-kai. 2011. *MdCIPK6* gene cloning in apple and its role in response to stress [M. D. Dissertation]. Tai'an: Shandong Agricultural University. (in Chinese)
- 王荣凯. 2011. 苹果 *MdCIPK6* 的基因克隆及其在逆境胁迫响应中的作用 [硕士论文]. 泰安: 山东农业大学.
- Xiang Y, Huang Y, Xiong L. 2007. Characterization of stress-responsive CIPK genes in rice for stress tolerance improvement. *Plant Physiology*, 144 (3): 1416 - 1428.

- Xu J, Li H D, Chen L Q, Wang Y, Liu L L, He L, Wu W H. 2006. A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates  $K^+$  transporter AKT1 in *Arabidopsis*. *Cell*, 125 (7): 1347 - 1360.
- Xu Rui-rui, Li Rui, Wang Xiao-fei, Hao Yu-jin. 2018. Identification and expression analysis under abiotic stresses of OFP gene family in apple. *Scientia Agricultura Sinica*, 51 (10): 141 - 152. (in Chinese)
- 许瑞瑞, 李睿, 王小非, 郝玉金. 2018. 苹果 OFP 基因家族的全基因组鉴定与非生物逆境表达分析. *中国农业科学*, 51 (10): 141 - 152.
- Xu Yuan-yuan, Li Xiao-gang, Li Hui, Lin Jing, Chang You-hong. 2015. Identification of calcium-dependent protein kinase (CDPK) gene family in pear. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 31 (3): 659 - 666. (in Chinese)
- 许园园, 李晓刚, 李慧, 蔺经, 常有宏. 2015. 梨 CDPK 基因家族全基因组序列鉴定分析. *江苏农业学报*, 31 (3): 659 - 666.
- Yan Chao-hui, Li Gui-rong, Hu Yan-song, Zhou Rui-jin, Hu Hui-ling, Miao Wei-dong, Zhu Zi-guo. 2017. Cloning and expression of CIPK gene in European grape. *Acta Horticulturae Sinica*, 44 (8): 1463 - 1476. (in Chinese)
- 闫朝辉, 李桂荣, 扈岩松, 周瑞金, 扈惠灵, 苗卫东, 朱自果. 2017. 欧洲葡萄中 CIPK 基因的克隆及表达分析. *园艺学报*, 44 (8): 1463 - 1476.
- Yan Yan, Tie Wei-wei, Ding Ze-hong, Wu Chun-lai, Hu Wei. 2018. Cloning and expression analysis of *MeCIPK1* gene in cassava. *Molecular Plant Breeding*, 16 (13): 4151 - 4156. (in Chinese)
- 颜彦, 铁韦韦, 丁泽红, 吴春来, 胡伟. 2018. 木薯 *MeCIPK1* 基因克隆及表达分析. *分子植物育种*, 16 (13): 4151 - 4156.
- Yu Y H, Xia X L, Yin W L, Zhang H C. 2007. Comparative genomic analysis of CIPK gene family in *Arabidopsis* and *Populus*. *Plant Growth Regulation*, 52 (2): 101 - 110.
- Yuan Zhi-heng, Shen Teng-fei, Wang Qi, Xue Rui-li, Tai Fu-ju. 2012. Cloning and expression of maize CIPK3 protein kinase. *Journal of Henan Agricultural University*, 46 (4): 359 - 363. (in Chinese)
- 袁志恒, 申腾飞, 王琦, 薛瑞丽, 邰付菊. 2012. 玉米 CIPK3 蛋白激酶的克隆及表达分析. *河南农业大学学报*, 46 (4): 359 - 363.
- Zhang Han-feng. 2014. Studies on the mechanism of calcineurin kinase gene regulation of abiotic stress response in rapeseed and *Arabidopsis thaliana* [M. D. Dissertation]. Yangling: Northwest A & F University. (in Chinese)
- 张翰风. 2014. 油菜与拟南芥中钙相关蛋白激酶基因调控非生物逆境响应的机制研究 [硕士论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Zhao J F, Sun Z F, Zheng J, Guo X Y, Dong Z G, Huai J L, Gou M Y, He J G, Jin Y S, Wang J H, Wang G Y. 2009. Cloning and characterization of a novel CBL-interacting protein kinase from maize. *Plant Molecular Biology*, 69 (6): 661 - 674.
- Zhao Jin-feng, Yu Ai-li, Wang Gao-hong, Tian Gang, Wang Han-yu, Du Yan-wei, Chang Hai-xia. 2011. Advances in plant CBL/CIPK network system stress response. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13 (4): 32 - 38. (in Chinese)
- 赵晋锋, 余爱丽, 王高鸿, 田岗, 王寒玉, 杜艳伟, 常海霞. 2011. 植物 CBL/CIPK 网络系统逆境应答研究进展. *中国农业科技导报*, 13 (4): 32 - 38.
- Zhu J K, Liu J, Xiong L. 1998. Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*: evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell*, 10 (7): 1181 - 1191.