

## 研究报告 Original Papers

芍药 *CIPK* 基因克隆及其响应钙调控的表达水平研究汤寓涵<sup>1</sup>, 夏星<sup>2</sup>, 陈德伟<sup>2</sup>, 赵大球<sup>2</sup>, 陶俊<sup>1,\*</sup><sup>1</sup>扬州大学动物科学与技术学院, 江苏扬州225009<sup>2</sup>扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏扬州225009

**摘要:** 研究钙离子传感器 *CIPK* (calcineurin B-like protein-interacting protein kinase) 基因在芍药 (*Paeonia lactiflora*) 不同组织及在正反向钙处理后花茎中的表达变化, 为通过采前喷施钙溶液调控芍药花茎挺直度提供理论依据。本文实验以芍药‘红艳争辉’花茎RNA为模板, 采用PCR技术对芍药 *CIPK* 基因进行克隆, 并通过定量实时PCR技术对 *PICIPK* 基因表达进行分析。结果显示, 克隆获得的 *PICIPK* 基因(GeBank MH748106)长1 467 bp, 具有由1 314个碱基组成的完整开放阅读框, 共编码438个氨基酸。 *PICIPK* 基因在N端具有一个蛋白激酶催化域, 在C端具有一个高度保守的NAF调控域, 属于 *CIPK* 家族基因。 *PICIPK* 基因在芍药各组织中均有表达, 但在花茎中表达最高; 在芍药花茎中, *PICIPK* 基因的表达随着生长发育逐渐增加; 采前钙处理提高了芍药花茎中 *PICIPK* 基因的表达, 而钙螯合剂处理降低了其表达, 推测钙能够调控芍药花茎中 *PICIPK* 基因的表达, 影响其强度。本研究从一定程度上说明钙处理使钙调磷酸酶B蛋白(CBL)-*CIPK* 调控增强, 花茎品质提高, 也为应用钙提高芍药切花花茎挺直度提供一定的理论参考。

**关键词:** 芍药; *CIPK*; 克隆; 表达分析; 钙调控

芍药 (*Paeonia lactiflora*) 是我国十大传统名花之一, 享有“花中宰相”的美誉。近年来, 芍药已成为国际市场上的高档切花, 广泛应用于婚礼、庆典等喜庆场合(王历慧等2011)。当前我国芍药切花主要来源于传统芍药品种, 花色艳丽, 花型丰富, 但花朵硕大, 花茎纤细, 因此许多芍药品种花茎呈现弯曲形态, 挺直度差, 严重影响了切花的品质。前人研究表明, 采前喷施4%乙酸钙处理能显著提高芍药‘黄金轮’和‘银线绣红袍’的花茎钙含量、茎粗、花蕾直径和植株株高(于晓南等2010); 采前喷施4%氯化钙处理能明显提高芍药‘大富贵’花茎内纤维素、木质素、果胶和钙含量, 增加花茎鲜重和机械强度(李成忠等2012; Li等2012); 采前喷施4%乙酸钙处理和去侧蕾交互作用能显著提高芍药‘春晓’切花花茎内纤维素和木质素含量, 增加花茎茎粗和机械强度(王昕2016)。

钙元素是植物体内必需营养元素之一。作为细胞壁的组成成分和第二信使, 钙在维持细胞壁的形态结构和生理生化信号传导上发挥重要作用, 例如其影响开花结实(Islam等2016; Shiri等2015)、抗逆胁迫(Bakeer 2016; Erinle等2016)和茎秆品质(Shams等2012)。植株的挺直程度主要由茎中次生细胞壁的加厚程度决定, 次生细胞壁主要组成成分为纤维素、半纤维素和木质素(黄成和李来庚

2016; Kumar等2016)。因此, 芍药采前喷施钙处理后, 可能通过提高花茎中钙元素含量从而增加木质素、纤维素等的含量, 最终提高其花茎强度, 改善花茎品质。植物体内钙离子浓度发生变化后, 主要通过3种接收信号的感受器来传导信号从而起到调控作用, 分别是钙调素、钙依赖性蛋白激酶和钙调磷酸酶B类似蛋白家族(calcineurin B-like proteins, CBLs) (Kudla等2018; 郑远和陈兆进2015)。其中CBL本身没有活性, 在接收钙信号后, 必须和唯一的特异性靶蛋白 *CIPK* (CBL-interacting protein kinase) 结合形成CBL-*CIPK* 复合体才能起到传导调控作用(王琦等2011)。张洁(2011)通过采用外源钙对非洲菊 (*Gerbera jamesonii*) 切花进行处理后发现, 植株体内钙调素含量增加, 作为钙离子感受器钙调素的调控机制增强, 从而在一定程度上控制住了非洲菊弯茎的发生。作为重要的钙离子感受器, CBL-*CIPK* 可能同样也在提高花茎品质方面起到重要作用, 但是却少见报道, 尤其是在芍药中。目前已在水稻 (*Oryza sativa*) (Kolukisaoglu等2004)、玉米 (*Zea mays*) (Tai等2013)、小麦 (*Triticum aes-*

收稿 2018-05-16 修定 2018-08-15

资助 国家自然科学基金(31572148和31772341)、扬州市优秀青年基金(YZ2017097)和扬州大学优秀青年骨干教师项目。

\* 通讯作者(taojun@yzu.edu.cn)。

*tivum*) (Sun等2015)、棉花(*Gossypium raimondii*和*G. arboreum*) (Wang等2016)等多种植物中分离出CIPK基因, 这些基因在植物抗逆胁迫方面发挥着重要作用。本研究基于课题组前期测序获得的芍药花茎转录组数据库, 提取完RNA后, 通过PCR技术对芍药CIPK基因进行克隆, 并对序列进行了生物信息学分析, 随后检测了该基因在正反向钙处理下的表达特性, 为阐明CBL-CIPK调控网络对花茎强度的影响, 也为应用钙提高芍药切花花茎挺直度提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以紫红色芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.)主栽品种‘红艳争辉’为试验材料, 在其地上部刚刚展叶时, 分别用去离子水、200 mmol·L<sup>-1</sup>纳米碳酸钙溶液(粒径40 nm, 比普通碳酸钙溶液粒径更细, 达到纳米级别)、10 mmol·L<sup>-1</sup>钙螯合剂乙二醇二乙醚二胺四乙酸(ethylene glycol tetraacetic acid, EGTA)溶液对植株整株进行喷雾处理, 每种均处理60株生长

状态基本一致的植株。每周处理1次, 共处理5次, 每次在晴朗的傍晚17:00左右喷施处理。从花蕾期至盛花期分为4个阶段(S1、S2、S3和S4) (图1), 随机采集各个处理花茎顶部12 cm茎秆作为材料, 使用液氮处理后存于-80°C冰箱用于后续试验。

### 1.2 基因序列克隆与分析

芍药花茎总RNA使用MiniBEST Plant RNA Extraction Kit (TaKaRa)试剂盒进行提取, 提取出的RNA浓度与纯度用核酸蛋白质分析仪(6132, Eppendorf)进行测定。浓度和纯度符合要求的RNA采用TaKaRa试剂盒进行反转录, 获得的cDNA存于-20°C冰箱用于PCR和定量实时PCR (qRT-PCR)反应。采用Primer 5.0软件, 基于课题组前期使用芍药花茎测序所获得的转录组数据库的Unigene21586\_All设计引物(表1), 引物由上海生工合成。采用2×Taq Master Mix for PAGE (Novoprotein)进行PCR反应。随后使用1%琼脂糖对PCR产物进行电泳检测, 获取目的条带后, 切胶并使用MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit (TaKaRa)试剂盒进行胶回收, 然后采用pEASY-T5 Zero Cloning Kit



图1 芍药不同发育时期

Fig.1 Different developmental stages of *P. lactiflora*  
S1、S2、S3和S4分别表示从花蕾期至盛花期间的不同时期。

表1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

基因名称或编号	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')	用途
Unigene21586_All	TTTCAAGGCTGGTTTTCTAAAGGGA	ACCCAATCTTTAAATCAGAGTGTA	PCR
<i>Actin</i>	ACTGCTGAACGGGAAATT	ATGGCTGGAACAGGACTT	qRT-PCR
<i>CIPK</i>	CTCTGCCTTGGGTCGTCT	GCGATTCAGCCTTCCTCAC	qRT-PCR

(TransGen)试剂盒克隆, 最终将阳性质粒送至上海生工测序。

测序后所得核苷酸序列使用DNAMAN 5.0进行比对和翻译, 序列的相似性通过NCBI Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)进行比对, 进化树使用MEGA 5.05软件构建, 蛋白结构域预测和氨基酸序列分析使用ExPASy软件(<http://prosite.expasy.org>和<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>), 二级结构分析与预测使用PRABI ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_hnn.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn.html)), 信号肽分析与预测使用SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), 跨膜结构域的分析与预测使用TMHMM 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), 糖基化位点分析与预测使用NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>), 磷酸化位点分析与预测使用NetPhos 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)。

### 1.3 基因表达水平检测

使用芍药*Actin*基因作为内参基因(Zhao等2012), 采用qRT-PCR方法使用ChamQ SYBR qPCR Master Mix (Vazyme)试剂盒来检测*CIPK*基因的表达水平。引物序列同样采用Primer 5.0进行设计(表1), 并使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算结果(Schmittgen2008)。

## 2 实验结果

### 2.1 基因序列获得

从课题组前期使用芍药花茎测序所获得的转录组数据库中筛选到1条长1 467 bp的基因, 编号为Unigene21586\_All, 注释结果为*CIPK*基因。根据该序列设计一对特异性引物, 以提取的芍药花茎总RNA反转的cDNA为模板, 采用PCR对*CIPK*基因的序列进行扩增。随后采用琼脂糖电泳凝胶检测, 对目的条带进行胶回收和克隆测序等, 最终获得芍药*PICIPK*基因(GenBank MH748106)长1 467 bp, 具有由1 314个碱基组成的完整开放阅读框, 由58个碱基组成的5'端非编码区, 由92个碱基组成的3'端非编码区, 共编码438个氨基酸(图2)。通过DNAMAN 5.0软件进行序列比对后发现扩增获得的*PICIPK*基因序列与测序获得的转录组数据库中的序列完全一致。

### 2.2 基因序列分析

用NCBI对芍药*PICIPK*基因序列进行比对, 发现其与北美云杉(*Picea sitchensis*, EF086151.1)相似度达77%, 与野芭蕉(*Musa acuminata*, XM009407784.2)、醉蝶花(*Tarenaya hassleriana*, XM010544863.2)、油橄榄(*Olea europaea* var. *sylvestris*, XM023022100.1)等植物的相似度均高于72%。

通过ExPASy对芍药*PICIPK*基因蛋白结构域进行分析, 显示该蛋白含有2个结构域, 分别为第13~267位氨基酸组成的N端高度保守的蛋白激酶结构域和第268~438位的C端具有NAF结构域的调控区域(图3-A)。进一步分析表明, 该N端蛋白激酶结构域中第19~42位为蛋白激酶ATP结合区, 序列为LGQGNFAKVYYAKHLKTGQSVAIK; 第131~143位为丝氨酸/苏氨酸激酶活性位点, 序列为VYHRDLKPENLLL; 第153~182位为蛋白激酶的激活环, 序列为DFGLSALPEQFRQDGLLHTTC-GTPAYVAPE。在C端调控区域中, 第307~331位为高度保守的NAF结构域, 序列为SKPTCLNAFDI-ISQSPGFNLSGLFE。

使用ExPASy对芍药*CIPK*基因编码的氨基酸序列进行分析, 显示其分子质量为49.474 kDa, 理论等电点为9.11。组成序列的氨基酸中, 最多的为赖氨酸(lysine, Lys), 占10.0%; 其次为亮氨酸(leucine, Leu), 占8.7%; 而最少的为色氨酸(tryptophan, Trp), 只占1.1%。并且蛋白质中总的带负电荷残基天冬氨酸(aspartic acid, Asp)和谷氨酸(glutamic, Glu)数目为51个, 总的带正电荷残基精氨酸(arginine, Arg)和Lys数目为62个。对氨基酸元素构成进行分析, 该序列共含有碳原子2 235个, 氢原子3 527个, 氮原子593个, 氧原子631个, 硫原子21个。该蛋白激酶的不稳定系数为33.72, 属于稳定蛋白; 平均亲水指数为-0.290, 为亲水性蛋白。

使用PRABI对芍药*CIPK*基因编码的氨基酸序列进行分析, 显示其二级结构中主要由 $\alpha$ -螺旋、延伸链以及无规则卷曲三种结构组成, 其中 $\alpha$ -螺旋共有177处, 占40.41%; 延伸链共有54处, 占12.33%; 无规则卷曲共有207处, 占47.26% (图3-B)。

随后采用SignalP 4.1 Server对芍药*CIPK*基因编码的氨基酸序列信号肽进行预测分析, 其中最高的原始剪切位点位于第41位异亮氨酸(isoleucine,



```

1 AGATCTGATTGTGGCTGATTGTTGTTCTTTGTGAGAATTTGAGCA
46 ATTTGGGGATAAAATGGAGGCTCCGAAAGCAAATGTTTTGATGGG
      M E A P K Y N V L M G
91 GAAGTATGAATTAGGGAAGCAGCTGGGGCAAGGAACTTTGCCAA
      K Y E L G K Q L G Q G N F A K
136 GGTATTATTATGCTAAGCACCTGAAGACGGGACAAAGTGTGGCGAT
      V Y Y A K H L K T G Q S V A I
181 TAAGGTCATGGACAAGGAAAAGATTATGCAGATCGGCATGATCGA
      K V M D K E K I M Q I G M I E
226 GCAAATAAAGAGGGAGATTTCTGTCATGAGACTGGTTCGGCATCC
      Q I K R E I S V M R L V R H P
271 GAATATTGTTTCAGCTCTATGAAGTAATGGCGTCCAAGACAAAGAT
      N I V Q L Y E V M A S K T K I
316 TTATTTTGTTCATGGAGTATGTAAGGGAGGAGAGCTGTTTAATAA
      Y F V M E Y V K G G E L F N K
361 GGTTCAGAAGGGTAAATTTGAAGGAGCATGAAGCCAGAAAGTATTT
      V Q K G K L K E H E A R K Y F
406 CCAGCAGCTCATTAGCGCAGTGGATTTCTGTCATAGCCGAGGGT
      Q Q L I S A V D F C H S R G V
451 TTATCACAGAGATCTCAAGCCGGAAAATCTGTTACTTGACGAAAA
      Y H R D L K P E N L L L D E N
496 TGGAGATCTGAAGATTTCCGACTTTGGTCTCAGTGTCTTTGCCGA
      G D L K I S D F G L S A L P E
541 GCAGTTCGCGCCAGGACGGGCTGCTCCATACGACCTGCGGGACGCC
      Q F R Q D G L L H T T C G T P
586 GGCCTACGTGGCACCCGAGGTGATTGTGAAGAAGGGCTACGATGG
      A Y V A P E V I V K K G Y D G
631 TGCAAAGGCCGATATCTGGTTCATGTGGAGTCATCCTGTTCTCT
      A K A D I W S C G V I L F V L
676 CATGGCGGGCTATTTGCCTTTTTCATGACGCCAAATCITATGGTCAT
      M A G Y L P F H D A N L M V M
721 GTACAGGAAAATCTACAAAAGGGGAATTCAAATGCCCGCCGTGGTT
      Y R K I Y K G E F K C P P W F
766 CTCATCAACGGCGGTGAAGCTCATTTCGAGTCTCCTAAACCCTAA
      S S T A V K L I S S L L N P N
811 TCCCAAGGGGCGGATAACTATACCGCGGTTAATGGAGGTGCACTG
      P K G R I T I P R L M E V H W
856 GTTCAAAAAGGGTTTCAAACCTCTGCGGCCGGCTGTGCAAGATGA
      F K K G F K P L R P A V Q D D
901 CGAAATTGACCTCGTTGACGTGGACTCTGCCTTTGGGTCTGCTTC
      E I D L V D V D S A F G S S S
946 GCCGGAGGAATCACAGCCCAAGCCAGCAGAGTCCAAACCGACTTG
      P E E S Q P K P A E S K P T C
991 CCTGAATGCCTTCGACATAATTTCCCAGTCTCCGGGTTTCAATCT
      L N A F D I I S Q S P G F N L
1036 CTCCGGCCTCTTTGAAAAGGACAATGTGAGGAAGGCTGAATCGCG
      S G L F E K D N V R K A E S R
1081 CTTCAITGTCGACGCAGCCGGCCTCTAGCATAATTTCCAAGCTTGA
      F M S T Q P A S S I I S K L E
1126 GGAATCGCAAAGCTATTTCAGATTTAGCGTGAAGAAAAGAGGGGA
      E I A K L F R F S V K R R G D
1171 TTCCAGGATGAAGATGCAGGGGACTGTGTGCGGGAGAAAAGGGCA
      S R M K M Q G T V G G R K G H
1216 CCTTGCAATTGCTGCAGAAATATTTGAGGTACACCTTCTCTGTT
      L A I A A E I F E V T P S L F
1261 TGTTGTTGAGGTTCAGTAAGGCGGGAGGTGACACGCTCGAATATAA
      V V E V S K A G G D T L E Y N
1306 CAACTTTTGCAGCAGGAGCTCCGGCCTGGCCTCAAAGACATTGT
      N F C K Q E L R P G L K D I V
1351 CTGGACATGGCATGATGAACAATAGCACITTTGTTTTTTTGGTTT
      W T W H D E Q *
1396 TCATTTACTTTCATTTTGTATAGCAAAAATTTTCGTTACACTCTG
1426 ATTTAAAGAATTGGGTAATTTTGAATC
    
```

图2 芍药CIPK基因序列及其推导的氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *P. lactiflora* CIPK gene

推导的氨基酸序列标示于相应核苷酸序列下方, 其余为非编码区; \*表示终止密码子。

Ile)残基, C-得分为0.112; 最高的综合剪切位点位于第70位组氨酸(histidine, His)残基, Y-得分为0.102; 最高的信号肽位于第57位谷氨酰胺(glutamine, Gln)残基, S-得分为0.106。预测分析表明芍药CIPK基因

不存在信号肽酶切位点, 不具有信号肽(图3-C)。随后采用TMHMM 2.0 Server对氨基酸序列跨膜结构域进行预测, 结果如图3-D所示, 其不存在跨膜结构域。

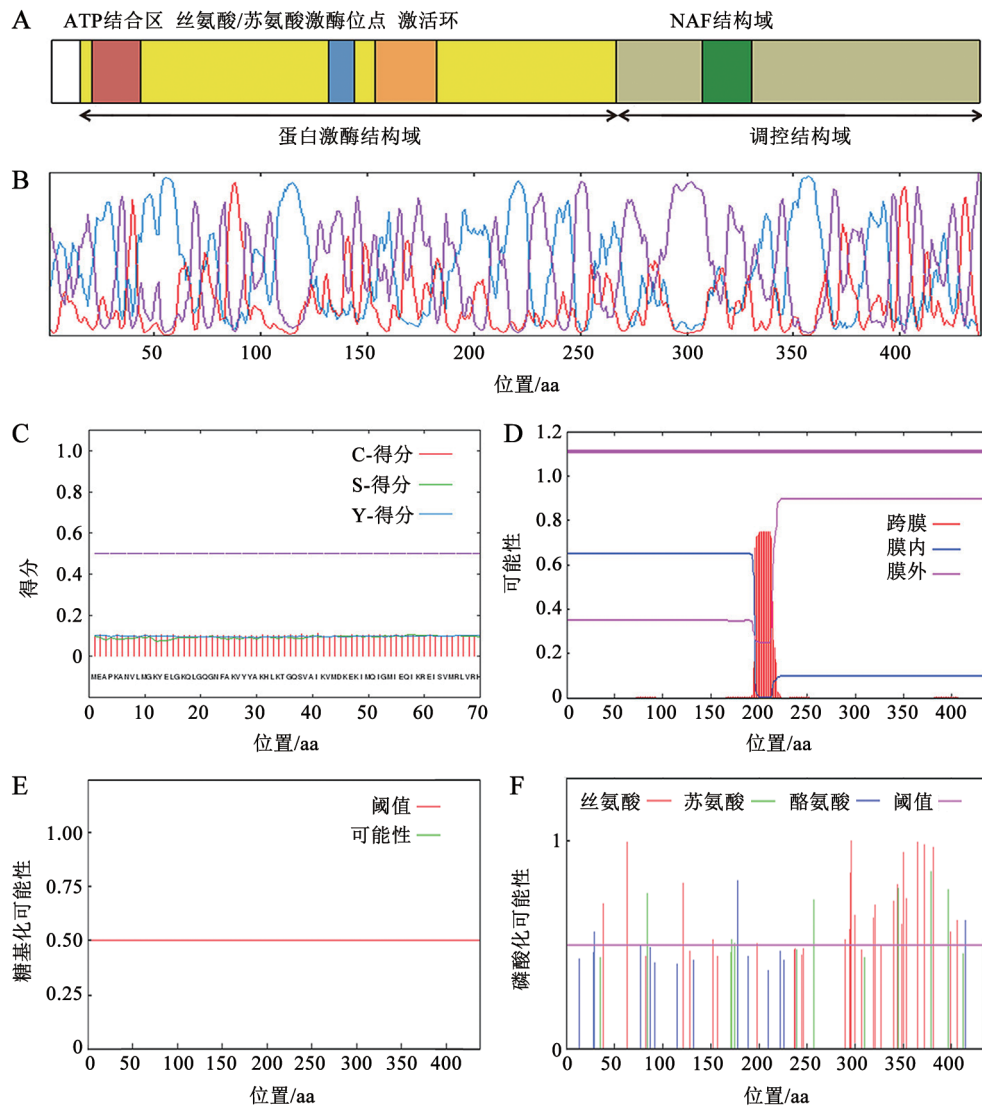


图3 芍药CIPK基因序列分析

Fig.3 Analysis of *P. lactiflora* CIPK sequence

A: 芍药CIPK基因结构。B: 芍药CIPK基因二级结构预测。蓝线:  $\alpha$ -螺旋; 红线: 延伸链; 紫线: 无规则卷曲。C: 芍药CIPK基因信号肽预测。D: 芍药CIPK基因跨膜结构域预测。E: 芍药CIPK基因糖基化位点分析。F: 芍药CIPK基因磷酸化位点分析。

最后, 使用NetNGlyc 1.0 Server和NetPhos 3.1 Server分别对芍药CIPK基因编码的氨基酸序列的糖基化位点和磷酸化位点进行了分析, 图3-E显示其不存在糖基化位点; 图3-F显示共有33个潜在的磷酸化位点, 包括22个丝氨酸(serine, Ser)、8个苏氨酸(threonine, Thr)和3个酪氨酸(tyrosine, Tyr)位点。

### 2.3 系统进化分析

采用MEGA 5.05软件构建CIPK同源蛋白的系统进化树, 结果表明, 小麦、水稻等单子叶植物聚为一类, 独叶宽行菜(*Lepidium latifolium*)、欧洲油

菜(*Brassica napus*)、豌豆(*Pisum sativum*)、甘蔗(*Saccharum hybrid*)等双子叶植物聚为一类, 而芍药属于双子叶植物(图4)。

### 2.4 钙处理下基因表达特性分析

通过qRT-PCR技术对CIPK基因在芍药盛花期不同植物组织以及正反向钙处理后不同时期芍药花茎中的表达特性进行检测, 结果表明, CIPK基因在芍药不同组织中均能够检测到, 但是在茎中表达量最高, 是表达量最低的花中的27.88倍(图5-A); 同时发现在芍药花茎发育过程中, CIPK基因无论是在对照还是在正反向钙处理花茎中均能够检测



图4 CIPK同源蛋白的系统进化分析  
Fig.4 Phylogenetic analysis of CIPK-homologous proteins

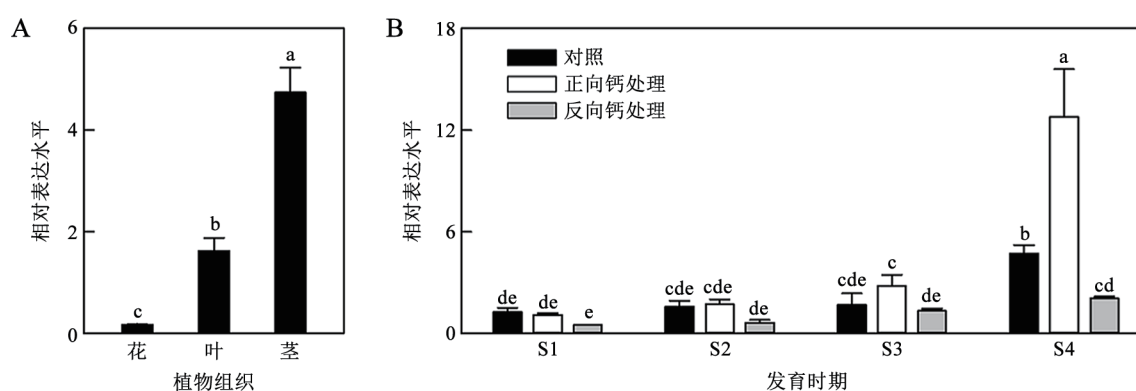


图5 芍药CIPK基因在不同组织(A)和正反向钙处理下(B)表达特性分析  
Fig.5 Expression characterization analysis of *P. lactiflora* CIPK in different tissues (A) and under forward and reverse calcium treatments (B)

各柱形上用不同小写字母标识表示数据间差异显著( $P < 0.05$ )。

到, 并且其表达水平一直呈上升趋势, 在S4时表达水平最高, 分别为S1时期的3.79、11.72、4.06倍。就正向钙处理而言, 芍药花茎中CIPK基因的表达水平除S1时期外均高于对照, 从S2时期比对照提高7.59%到S4时期比对照提高1.69倍; 而反向钙处理后, 芍药花茎中CIPK基因的表达水平一直低于对照, 从S1时期比对照降低59.20%到S4时期比对照降低56.31% (图5-B)。

### 3 讨论

CIPK作为CBL的唯一特异性靶蛋白激酶, 是目前发现的植物中所特有的一类具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性的蛋白激酶家族(Luan等2002)。CIPK家族基因具有2个特征功能结构域, 分别为N端的蛋白激酶催化域和C端的调控域, 其中C端调控域含有特定24个氨基酸组成的SNRK3家族高度保守的NAF结构域(Hrabak等2003)。本研究中克隆的

芍药CIPK基因具有CIPK家族基因的2个特征功能结构域, 通过BLAST比对, 该CIPK基因序列与其他植物的相似度均高于72%, 属于CIPK家族基因。

CIPK家族基因在植物生长发育以及响应非生物刺激中发挥着重要作用, 如Wang等(2016)发现大多数CIPK家族基因在低温、干旱和盐胁迫处理后的棉花叶、茎和根中表达量显著增加; Xi等(2017)发现低温或高温胁迫处理葡萄(*Vitis vinifera*)后都会引起多数CIPK家族基因表达的增加。Ma等(2017)通过多元分析发现过表达CBL和CIPK能够显著提高植物抗盐胁迫能力, 验证了CIPK家族基因能够在非生物刺激中发挥重要作用。此外, CIPK家族基因表达特性十分复杂, 受到编码调控域的序列、植物组织部位与生长发育时期等多方面影响(Luan 2009)。在葡萄中, *VvCIPK13*和*VvCIPK14*在卷须中的表达量最高, 而在根中的表达量最低(闫朝辉等2017); 在甘蔗中, *CIPK23*基因



在根、茎、叶和叶鞘中均有表达,但是在茎秆中的表达量明显高于其他部位(凌秋平等2015);在小麦中,大部分CIPK家族基因在雄蕊、雌蕊以及结实期的根、茎、叶中有丰富的表达,而在盛花期的根、茎、叶中部分CIPK基因几乎没有表达(Sun等2015)。通过对本研究分离的芍药PICIPK基因在不同植物组织与不同花茎发育时期下表达特性进行研究,表明其在茎、叶、花中均有表达,但在茎中的表达最高,芍药PICIPK可能更多地参与调控茎秆的生长发育或对外部环境的响应;同时发现该基因在花茎不同发育时期也均有表达,并且随着发育时期推进,表达量逐渐增加,在盛花期表达最高,推测钙离子相关的CBL-CIPK调控机制随着芍药生长发育调控能力逐渐增强。

作为钙离子的重要感受器之一,CBL在感受到钙离子浓度变化后,与其特异性靶蛋白CIPK结合成CBL-CIPK复合体,调节一系列基因表达,构成植物响应外界刺激的复杂信号传导网络,在应对各种环境胁迫、病虫害、机械损伤、植物激素刺激等时发挥重要作用(郇付菊等2008)。采用外源氯化钙处理玉米叶片能够提高ZmCIPK的表达量,与通过干旱胁迫信号的诱导效果相似;而使用钙螯合剂处理干旱处理下玉米叶片后,能够抑制干旱对其所诱导的ZmCIPK的表达(吴晨2017;袁志恒等2012)。本研究在前期采前喷施钙处理能显著增强芍药花茎的挺直度,而喷施钙螯合剂处理却显著降低其花茎挺直度的研究基础之上,检测了PICIPK基因在正反向钙处理后在芍药花茎中的表达模式。钙处理提高了芍药花茎中PICIPK的表达,而钙螯合剂EGTA处理降低了芍药花茎中PICIPK的表达,表明芍药PICIPK基因确实参与了钙离子的信号传导,并且钙离子浓度增加能够促进PICIPK的表达,而减少植株中钙离子浓度后PICIPK表达受到抑制。由此可见,芍药花茎可能是通过增强CBL-CIPK等钙信号传导感受器的调控机制响应钙处理,促进茎秆的生长发育而提高花茎挺直度,这也为在生产上推广钙处理提高芍药花茎挺直程度提供参考。

#### 参考文献(References)

- Bakeer SM (2016). Effect of ammonium nitrate fertilizer and calcium chloride foliar spray on fruit cracking and sunburn of Manfalouty pomegranate trees. *Sci Hortic*, 209: 300–308
- Erinle KO, Jiang Z, Ma B, et al (2016). Exogenous calcium induces tolerance to atrazine stress in Pennisetum seedlings and promotes photosynthetic activity, antioxidant enzymes and *psbA* gene transcripts. *Ecotox Environ Safe*, 132: 403–412
- Hrabak EM, Chan CWM, Gribskov M, et al (2003). The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol*, 132: 666–680
- Huang C, Li LG (2016). Research progress on regulation of plant secondary cell wall thickening. *Plant Physiol J*, 52 (1): 8–18 (in Chinese with English abstract) [黄成, 李来庚(2016). 植物次生细胞壁加厚调控研究进展. *植物生理学报*, 52 (1): 8–18]
- Islam MZ, Mele MA, Baek JP, et al (2016). Cherry tomato qualities affected by foliar spraying with boron and calcium. *Hortic Environ Biotechnol*, 57 (1): 46–52
- Kolukisaoglu Ü, Weinel S, Blazevic D, et al (2004). Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant Physiol*, 134: 43–58
- Kudla J, Becker D, Grill E, et al (2018). Advances and current challenges in calcium signaling. *New Phytol*, 218 (2): 414–431
- Kumar M, Campbell L, Turner S (2016). Secondary cell walls: biosynthesis and manipulation. *J Exp Bot*, 67 (2): 515–531
- Li C, Tao J, Zhao D, et al (2012). Effect of calcium sprays on mechanical strength and cell wall fractions of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) inflorescence stems. *Int J Mol Sci*, 13: 4704–4713
- Li CZ, Tao J, Sun Y, et al (2012). Effects of spraying calcium on the inflorescence stem quality and leaf photosynthesis of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.). *Chin J Ecol*, 31 (11): 2817–2822 (in Chinese with English abstract) [李成忠, 陶俊, 孙燕等(2012). 喷钙对芍药花茎品质及叶片光合特性的影响. *生态学杂志*, 31 (11): 2817–2822]
- Ling Q, Zeng Q, Hu F, et al (2015). Molecular cloning and expression analysis of *CIPK23* gene from sugarcane under low potassium, drought and salt stress. *Mol Plant Breeding*, 13 (6): 1329–1335 (in Chinese with English abstract) [凌秋平, 曾巧英, 胡斐等(2015). 甘蔗CIPK23基因克隆及对低钾、干旱、盐胁迫的响应. *分子植物育种*, 13 (6): 1329–1335]
- Luan S (2009). The CBL-CIPK network in plant calcium signaling. *Trends Plant Sci*, 14 (1): 37–42
- Luan S, Kudla J, Rodriguez-Concepcion M, et al (2002). Calmodulins and calcineurin B-like proteins: Calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell*, 14: S389–S400

- Ma Y, Cheng Q, Cheng Z, et al (2017). Identification of important physiological traits and moderators that are associated with improved salt tolerance in CBL and CIPK overexpressors through a meta-analysis. *Front Plant Sci*, 8: 856
- Schmittgen TD, Livak KJ (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative  $C_T$  method. *Nat Protoc*, 3 (6): 1101–1108
- Shams M, Etemadi N, Baninasab B, et al (2012). Effect of boron and calcium on growth and quality of ‘Easy lover’ cut rose. *J Plant Nutr*, 35: 1303–1313
- Shiri MA, Ghasemnezhad M, Moghadam JF, et al (2015). Enhancing and maintaining nutritional quality and bioactive compounds of “hayward” kiwifruit: comparison of the effectiveness of different  $CaCl_2$  spraying times. *J Food Process Pres*, 40: 850–862
- Sun T, Wang Y, Wang M, et al (2015). Identification and comprehensive analyses of the CBL and CIPK gene families in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biol*, 15: 269
- Tai F, Wang Q, Yuan Z, et al (2013). Characterization of five CIPK genes expressions in maize under water stress. *Acta Physiol Plant*, 35 (5): 1555–1564
- Tai FJ, Wang W, Liu QJ, et al (2008). Research progress of CBL/CIPK single system in plant cell. *J Anhui Agr Sci*, 36 (32): 13957–13958, 14035 (in Chinese with English abstract) [郇付菊, 王伟, 刘全军等(2008). CBL/CIPK信号系统在植物细胞中的研究进展. *安徽农业科学*, 36 (32): 13957–13958, 14035]
- Wang JJ, Lu XK, Yin ZJ, et al (2016). Genome-wide identification and expression analysis of CIPK genes in diploid cottons. *Genet Mol Res*, 15 (4): gmr15048852
- Wang LH, Zheng LW, Yu XN (2011). Studies on the application and flora market trend of cut peonies in China and overseas. *Heilongjiang Agr Sci*, (2): 147–149 (in Chinese with English abstract) [王厉慧, 郑黎文, 于晓南(2011). 中西方芍药切花应用与市场趋势分析. *黑龙江农业科学*, (2): 147–149]
- Wang Q, Wang W, Shen TF, et al (2011). Expression analysis of three CIPKs homologous gene in maize under drought and cold stresses. *J Huazhong Agr Univ*, 30 (5): 545–551 (in Chinese with English abstract) [王琦, 王伟, 申腾飞等(2011). 玉米中3个CIPK同源基因在干旱和低温胁迫下的表达分析. *华中农业大学学报*, 30 (5): 545–551]
- Wang X (2016). Effects of the interaction of spraying calcium and removing lateral buds on the qualities of peony cut flowers (dissertation). Beijing: Chinese Academy of Forestry (in Chinese with English abstract) [王昕(2016). 采前喷钙和去蕾交互作用对芍药切花品质的影响(学位论文). 北京: 中国林业科学研究院]
- Wu C (2017). Effects of calcium on physiological and biochemical characteristics of maize under drought stress and cloning and expression analysis of CIPK (dissertation). Shenyang: Shenyang Agricultural University (in Chinese with English abstract) [吴晨(2017). 干旱胁迫下钙对玉米生理生化的影响及CIPK的克隆与表达分析(学位论文). 沈阳: 沈阳农业大学]
- Xi Y, Liu J, Dong C, et al (2017). The CBL and CIPK gene family in grapevine (*Vitis vinifera*): genome-wide analysis and expression profiles in response to various abiotic stresses. *Front Plant Sci*, 8: 978
- Yan C, Li G, Hu Y, et al (2017). Cloning and expression analysis of CIPK genes in grapevine. *Acta Horti Sin*, 44 (8): 1463–1476 (in Chinese with English abstract) [闫朝辉, 李桂荣, 扈岩松等(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]
- Yu XN, Lu GP, Cheng FY, et al (2010). Effect of calcium on the stem quality of cut herbaceous peony. *J Hunan Agr Univ-Nat Sci*, 36 (5): 531–535 (in Chinese with English abstract) [于晓南, 陆光沛, 成仿云等(2010). 采收前喷钙对切花芍药茎秆品质的影响. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 36 (5): 531–535]
- Yuan ZH, Shen TF, Wang Q, et al (2012). Cloning and expression analysis of a CBL-interacting protein kinase of maize. *J Henan Agr Uni*, 46 (4): 359–369 (in Chinese with English abstract) [袁志恒, 申腾飞, 王琦等(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): 359–369]
- Zhang J (2008). Effect of calcium and calmodulin on neck-bending of gerbera cut-flower (dissertation). Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University (in Chinese with English abstract) [张洁(2008).  $Ca^{2+}$ 和CaM对非洲菊切花弯茎的影响(学位论文). 福州: 福建农林大学]
- Zhao D, Tao J, Han C, et al (2012). An *actin* gene as the alternative internal control for gene expression analysis in herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.). *Afr J Agr Res*, 7 (14): 2153–2159
- Zheng Y, Chen ZJ (2015). Organellar calcium signaling in plants. *Plant Physiol J*, 51 (8): 1195–1203 (in Chinese with English abstract) [郑远, 陈兆进(2015). 植物细胞器钙信号研究进展. *植物生理学报*, 51 (8): 1195–1203]



## Cloning of herbaceous peony *CIPK* gene and its expression level analysis in response to calcium regulation

TANG Yu-Han<sup>1</sup>, XIA Xing<sup>2</sup>, CHEN De-Wei<sup>2</sup>, ZHAO Da-Qiu<sup>2</sup>, TAO Jun<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China

<sup>2</sup>College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China

**Abstract:** To provide a theoretical basis for regulating the straightness of the inflorescence stems in herbaceous peony (*Paeonia lactiflora*) by spraying calcium solution before harvesting, the expression of calcium ion sensor calcineurin B-like protein-interacting protein kinase gene (*CIPK*) in different tissues of *P. lactiflora* and the inflorescence stems after treatment with positive and negative calcium were studied. In this study, RNA extracted from *P. lactiflora* 'Hongyan Zhenghui' inflorescence stem were taken as templates by using PCR method to clone *PICIPK* and quantitative real-time PCR method to examine the expression levels of *PICIPK*. The results show that *PICIPK* obtained by the clone was 1 467 bp in length and has a complete open reading frame consisting of 1 314 bases, encoding a total of 438 amino acids. *PICIPK* had a protein kinase catalytic domain at the N-terminus and a highly conserved NAF regulatory domain at the C-terminus, belonging to the *CIPK* family. *PICIPK* was expressed in all tissues of *P. lactiflora* with the expression being the highest in the inflorescence stem; besides, the expression of *PICIPK* in *P. lactiflora* inflorescence stem increased with the development. Pre-harvest calcium treatment increased the expression of *PICIPK* in the *P. lactiflora* inflorescence stems, while the calcium chelator treatment reduced its expression, indicating that calcium would regulate the expression of *PICIPK* in the *P. lactiflora* inflorescence stem and affect its mechanical strength as a result. To a certain extent, this study suggests that calcium treatment could enhance the regulation of calcineurin B-like protein (CBL)-CIPK and improve the quality of inflorescence stems. In addition, it also provides a theoretical basis for the application of calcium in improving the straightness of *P. lactiflora* inflorescence stems.

**Key words:** herbaceous peony; *CIPK*; cloning; expression analysis; calcium regulation

---

Received 2018-05-16 Accepted 2018-08-15

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31572148 and 31772341), Yangzhou Outstanding Youth Fund (YZ2017097), and Outstanding Youth Teacher Project of Yangzhou University.

\*Corresponding author (taojun@yzu.edu.cn).