

DOI: 10.16861/j.cnki.zggc.2024.0164

# 山药块茎膨大期 *DoCDPK1* 基因生物信息学及低温胁迫下的表达分析

高晶晶<sup>1</sup>, 张艳芳<sup>1</sup>, 邢丽南<sup>1</sup>, 葛明然<sup>1</sup>, 季祥<sup>2</sup>, 霍秀文<sup>1</sup>

(1. 内蒙古农业大学园艺与植物保护学院 呼和浩特 010019; 2. 内蒙古自治区农牧业技术推广中心 呼和浩特 010011)

**摘要:** 钙依赖性蛋白激酶(CDPK)在植物的生长发育及逆境胁迫方面发挥着重要作用。以大和长芋和毕克齐山药为试验材料,克隆钙依赖性蛋白激酶基因 *DoCDPK1*, 并对其进行生物信息学分析,为 *DoCDPK1* 基因的功能研究奠定基础。采用生物信息学方法分析 *DoCDPK1* 基因结构,构建瞬时表达载体,对 *DoCDPK1* 蛋白进行亚细胞定位;采用 qRT-PCR 分析 *DoCDPK1* 基因在不同山药品种的不同发育阶段及低温胁迫处理下的表达模式。结果表明:(1) *DoCDPK1* 基因序列长度为 2023 bp, 编码 521 个氨基酸。(2) *DoCDPK1* 与几内亚薯蓣 CDPK 蛋白序列的一致性为 97%, 且 *DoCDPK1* 存在 STKc\_CAMK 结构域。(3) 瞬时表达分析表明, *DoCDPK1* 蛋白定位于细胞核与细胞膜。(4) 大和长芋山药中的 CDPK 活性更高, *DoCDPK1* 可能参与调控山药块茎膨大后期的生长发育。(5) 经 4 °C 低温胁迫后, CDPK 活性降低, *DoCDPK1* 表达量上调, 且表达水平在不同时间处理下存在差异。综上所述, *DoCDPK1* 可能参与调控山药块茎膨大后期的生长发育及低温胁迫响应过程。

**关键词:** 山药; 钙依赖性蛋白激酶; 亚细胞定位; 低温胁迫; 基因表达量

中图分类号: S632.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2024)07-042-10

## Bioinformatics and expression analysis of *DoCDPK1* gene under low temperature stress during tuber expansion stage of yam

GAO Jingjing<sup>1</sup>, ZHANG Yanfang<sup>1</sup>, XING Li<sup>1</sup>, GE Mingran<sup>1</sup>, JI Xiang<sup>2</sup>, HUO Xiuwen<sup>1</sup>

(1. College of Horticulture and Plant Protection, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, Inner Mongolia, China;

2. Inner Mongolia Agricultural and Animal Husbandry Technology Extension Center, Hohhot 010011, Inner Mongolia, China)

**Abstract:** Calcium-dependent protein kinase plays an important role in plant growth and osmotic stress. Using Dahechangyu and Bikeqi yam as experimental materials, the calcium dependent protein kinase gene *DoCDPK1* was cloned and bioinformatic analysis was performed to lay a foundation for the functional study of *DoCDPK1*. The structure of *DoCDPK1* was analyzed by bioinformatics and subcellular localization of *DoCDPK1* protein was performed by constructing transient expression vector. qRT-PCR was used to analyze the expression patterns of *DoCDPK1* at different developmental stages and under low temperature stress in different yam varieties. The results indicated: (1) The length of *DoCDPK1* gene sequence was 2023 bp, encoding 521 amino acids. (2) The consistency of the protein sequence between *DoCDPK1* and CDPK protein sequence of *Dioscorea cayenensis* subsp. was 97%, and *DoCDPK1* had STKc\_CAMK domain. (3) Transient expression analysis showed that *DoCDPK1* protein was localized in cell nucleus and membrane. (4) The CDPK activity in Dahechangyu was higher, and *DoCDPK1* might be involved in regulating the growth and development of yam tuber at the later stage of enlargement. (5) After low temperature stress at 4 °C, CDPK activity decreased, and the expression of *DoCDPK1* was up-regulated, with differences in expression levels observed under different time treatments. In conclusion, *DoCDPK1* gene may be involved in regulating the growth and development of yam tuber and its response to low temperature stress.

**Key words:** Yam; Calcium-dependent protein kinase; Subcellular localization; Low temperature stress; Gene expression

收稿日期: 2024-03-13; 修回日期: 2024-04-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(32260759); 内蒙古自治区自然科学基金项目(2022MS03052)

作者简介: 高晶晶, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为蔬菜遗传育种与生物技术。E-mail: 1981324930@qq.com

通信作者: 霍秀文, 女, 教授, 研究方向为蔬菜种质资源与育种。E-mail: huoxiuwen@imau.edu.cn

山药(*Dioscorea opposita* Thunb.)为薯蓣科薯蓣属多年生缠绕草本单子叶植物<sup>[1]</sup>。山药块茎中含有大量的淀粉、蛋白质和氨基酸等营养物质,是日常生活的滋补佳品<sup>[2-3]</sup>。中国是山药重要的原产地和驯化中心<sup>[4]</sup>,随着“南薯北移”和“北种西扩”策略的实施,内蒙古西部地区以其独特的气候环境和地理条件,山药的种植面积逐年扩大。但由于气温较低,山药的有效发育周期不足 180 d,中晚熟品种不能完全成熟,因此山药产量和品质偏低。如果能增强山药的耐寒能力,延长生育期,从而提高山药的产量和品质,就能实现经济效益的最大化。因此,如何提高山药的耐寒性是内蒙古西部地区种植山药亟待解决的问题和当下研究的热点<sup>[5-7]</sup>,其中对抗逆基因的挖掘是培育高抗逆性山药品种的重要工作。

植物发育过程中会受到逆境胁迫,使其正常生长受到影响,甚至死亡。植物在适应环境的过程中,逐渐形成了各种调控机制来应对不利环境,而钙信号传导系统就是其中之一<sup>[8-9]</sup>。 $Ca^{2+}$ 作为重要的第二信使,经  $Ca^{2+}$ 受体蛋白、钙调素(calmodulin, CaM)和钙依赖性蛋白激酶(calcium-dependent protein kinase, CDPK)等的协同作用,感知  $Ca^{2+}$ 浓度的变化并识别钙信号,将钙信号向下游传递并级联放大,从而促进产生响应蛋白,进一步调控植物的生长发育以及免疫应答和胁迫响应,以应对环境胁迫损伤,提高自身抗性<sup>[10-12]</sup>。CDPK 在植物细胞中是主要的  $Ca^{2+}$ 传感器,是一类依赖  $Ca^{2+}$ 的 Ser/Thr 型蛋白激酶,在植物的生长发育过程及应对非生物胁迫反应中发挥重要作用<sup>[13-14]</sup>。CDPK 基因在植物种子、果实、茎、叶以及根中均有高度表达<sup>[15-16]</sup>。目前,有些植物 CDPK 基因的家族成员已经被鉴定,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中有 34 个<sup>[17]</sup>,玉米(*Zea mays*)中有 40 个<sup>[18]</sup>,水稻(*Oryza sativa*)中有 31 个<sup>[19-20]</sup>,此外,铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)<sup>[21]</sup>、广东桑(*Morus atropurpurea*)<sup>[22]</sup>、番茄(*Solanum lycopersicum*)<sup>[23]</sup>和山药<sup>[24]</sup>等多种植物中的 CDPK 基因也被陆续分离和鉴定<sup>[25-27]</sup>。通过深入研究发现,CDPK 基因具有能够响应逆境胁迫的生物学功能,秋石斛的 *DenCDPKs* 基因受低温诱导表达,参与低温胁迫响应过程<sup>[28]</sup>;玉米的 *ZmCDPK6* 基因可以响应高温胁迫,同时还受到盐和低温胁迫的诱导表达<sup>[29]</sup>。

鉴于 CDPK 基因在响应低温逆境胁迫过程中的重要性,推测山药中的 CDPK 基因也有可能存在该生物学功能。因此,笔者通过测定山药块茎的

CDPK 活性,基于转录组测序和 RT-PCR 技术,克隆 *DoCDPK1* 基因,进行生物信息学分析及亚细胞定位,比较不同发育时期毕克齐与大和长芋山药块茎中该基因的表达情况,同时对低温胁迫下大和长芋组培苗中 *DoCDPK1* 基因的表达情况进行比较,为进一步研究 *DoCDPK1* 基因在山药生长发育过程中的功能及参与低温胁迫响应过程奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以内蒙古农业大学蔬菜种质资源课题组种植、保存的毕克齐山药(B1)与大和长芋山药(DHCY)种质资源为试验材料。B1 为内蒙古主栽品种,为细长形山药;DHCY 为高产山药品种,山药茎为圆形(图 1)。2023 年 5—10 月在内蒙古农业大学种质资源圃,选取 10~15 cm 晾晒好的山药栽子播种,采用搭架栽培、双行种植的模式,行距 70 cm,株距 20 cm,于 5 月 8 日人工种植,常规田间管理。选择种植后 90、105、120、135、150 和 165 d 长势一致的山药,每个时期随机挖取 3 株,进行地下块茎采样,洗净后称取 2 g,3 株等量混样;选取在 MS 固体培养基中生长 4 周的 DHCY 山药组培苗叶片,称取 1 g,3 株等量混样;各样本均设 3 次生物学重复,经液氮速冻,置于-80 °C 冰箱保存,以备后续试验。

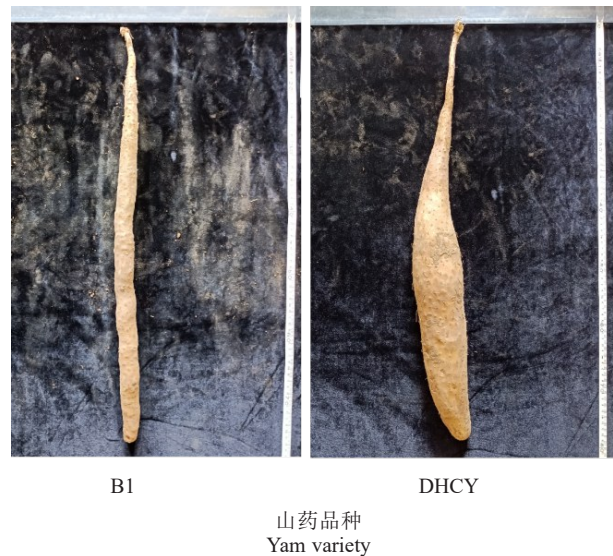


图 1 不同山药品种块茎

Fig. 1 Different tuber of yam variety

### 1.2 钙依赖性蛋白激酶活性测定

称取山药块茎 0.2 g,组培苗叶片 0.1 g,在预冷过的 pH 7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)中漂洗,滤纸拭干,放入 5 mL 的匀浆管中。按质量(g):体积

(mL)=1:9 的比例加入 9 倍体积的 PBS 于匀浆管中,冰水浴条件下,剪碎组织块。用高通量组织研磨机(SCIENTZ-192)在冰水中制备匀浆液,将制备好的匀浆液用低温低速离心机(Allegra X-30R Centrifuge),在 4 °C、3000 r·min<sup>-1</sup>下离心 15 min,取上清液。参考植物钙依赖性蛋白激酶(CDPK)测定试剂盒说明书进行测定,试剂盒购自上海优选生物科技公司。对 B1 与 DHCY 6 个取样时期的山药块茎及 DHCY 山药组培苗叶片的钙依赖性蛋白激酶活性进行测定,3 次生物学重复,取平均值。

### 1.3 基于山药转录组数据分析 *DoCDPK1* 基因表达水平

基于课题组的山药转录组测序数据(2019 年诺

禾致源生物信息科技有限公司测定),筛选钙依赖性蛋白激酶 *DoCDPK1* 基因(XP\_010261434.1),并对 B1 与 DHCY 6 个取样时期山药块茎中 *DoCDPK1* 基因的表达水平进行分析。

### 1.4 山药总 RNA 的提取及 cDNA 合成

参照索宁宁等<sup>[30]</sup>的试验方法,分别提取 B1 与 DHCY 山药不同发育时期块茎以及 DHCY 山药组培苗的总 RNA。用 TaKaRa 公司的(PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit)试剂盒反转录成单链 cDNA。

### 1.5 *DoCDPK1* 基因 cDNA 序列扩增

参照葛明然等<sup>[31]</sup>的试验方法,设计 *DoCDPK1* 基因的引物(表 1)进行序列扩增。

表 1 *DoCDPK1* 基因相关的引物序列  
Table 1 Related primer sequences of *DoCDPK1* gene

引物类型 Primer type	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Prime sequence(5'-3')
ORF 引物	<i>DoCDPK1</i> -ORF-F	ACTTCCGAGTCTCCAACCCGA
ORF primer	<i>DoCDPK1</i> -ORF-R	CAACCAAACAAAACCCATGCC
qRT-PCR 引物	<i>DoCDPK1</i> -qF	CGACGTTTCGCGAGTTCTA
qRT-PCR primer	<i>DoCDPK1</i> -qR	TTGACGAGCTTCCTCGTG
瞬时表达载体引物	<i>DoCDPK1</i> -SF	GGGGTACCCCATGGGCAACTGCAACGGCCTC
Transient expression vector primer	<i>DoCDPK1</i> -SR	GCTCTAGAGCTTTGCGTCTACGGTTAGGAAC
内参基因 <i>18S rRNA</i> 引物	18S-F	GATCGGAGTAATGATTAACAG
Reference gene <i>18S rRNA</i> primer	18S-R	TTATGGTTGAGACTA3GGACG

### 1.6 生物信息学分析

对 *DoCDPK1* 基因进行生物信息学分析。通过 ExPASy- ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>)在线网站进行蛋白理化性质的分析。通过 TMHMM2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)在线网站对 *DoCDPK1* 蛋白的跨膜结构进行预测。利用在线网站 SOPMA ([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))预测蛋白的二级结构。通过 SWISS-MODEL (<https://swiss-model.expasy.org/>)预测蛋白的三维结构建模。通过 Blast ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=Blast-Search&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=Blast-Search&LINK_LOC=blasthome))检索 *DoCDPK1* 与其他物种的氨基酸序列,利用 DNAMAN 软件进行序列比对。利用 MEME (<https://meme-suite.org/meme/>)分析 *DoCDPK1* 蛋白及其同源家族序列保守结构域。利用 iTOL (<https://itol.embl.de/itol.cgi>)在线网站构建系统进化树。

### 1.7 *DoCDPK1* 基因的亚细胞定位

设计含有 *Kpn* I 和 *Xba* I 酶切位点引物(表 1),参照王金鑫等<sup>[32]</sup>的试验方法,构建瞬时表达载体(CaMV35S-GFP-*DoCDPK1*)。提取质粒后,转化农杆菌感受态细胞(LBA 4404),制备侵染液并将其注射到本氏烟草叶片,2 d 后通过激光共聚焦显微镜(C2-ER)观察 GFP 荧光信号的表达情况。

### 1.8 *DoCDPK1* 基因的表达量分析

为了分析不同品种不同发育时期的 *DoCDPK1* 基因表达水平,选取种植后 6 个不同时期的山药块茎;为了分析低温胁迫对 *DoCDPK1* 基因量表达的影响,将 DHCY 山药组培苗置于 4 °C 条件下,在 0、4、8、12、24 和 48 h 进行叶片取样;设置 3 次生物学重复。参照赵令敏等<sup>[33]</sup>的试验方法,设计 *DoCDPK1* 基因的 qRT-PCR 引物(表 1)。

### 1.9 统计分析

采用 Microsoft Excel 2010 进行试验数据分析与制图,采用 SPSS 26.0 统计分析软件进行差异显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 基于山药转录组数据的 *DoCDPK1* 基因表达水平分析

笔者基于山药转录组测序数据,对 B1 与 DH-CY 山药块茎 6 个时期的 *DoCDPK1* 基因表达水平进行分析,结果表明,B1 与 DHCY 的基因表达水平均在 105 d 时达到最高值;120 d 时,B1 中 *DoCDPK1* 基因表达水平最低,DHCY 中 *DoCDPK1* 基因表达水平在 135 d 时最低(图 2)。

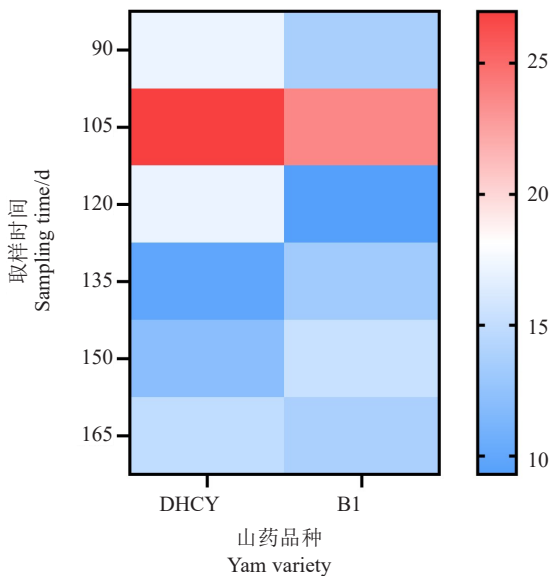
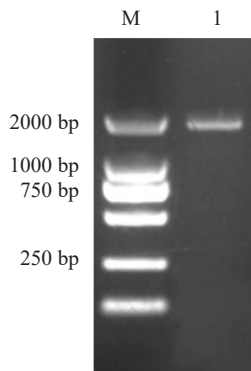


图 2 转录组中 *DoCDPK1* 的基因表达量

Fig. 2 Gene expression of *DoCDPK1* gene in the transcriptome

### 2.2 *DoCDPK1* 基因的克隆

以山药块茎的 cDNA 为模板,利用 *DoCDPK1*-ORF-F/R 引物进行 PCR 扩增,获得约 2000 bp 的特异性条带(图 3),回收目的片段,连接转化后送测序,



注: M. DL2000 分子标记;1. *DoCDPK1* PCR 产物。

Note: M. DL2000 molecular marker; 1. *DoCDPK1* PCR product.

图 3 *DoCDPK1* 基因的 PCR 扩增电泳图

Fig. 3 PCR amplification electrophoresis of *DoCDPK1* gene

经比对分析,*DoCDPK1* 基因片段大小为 2023 bp,包含一个 1566 bp 的完整 ORF,编码 521 个氨基酸(图 4)。

### 2.3 *DoCDPK1* 蛋白理化性质分析

通过 ExPASy-ProtScale 在线网站分析,山药 *DoCDPK1* 基因编码蛋白的理论分子质量为 58.50 kD,分子式为  $C_{2583}H_{4083}N_{721}O_{781}S_{24}$ ,总原子数为 8192,包含 521 个氨基酸残基,带负电残基数为 81,带正电残基数为 69。*DoCDPK1* 蛋白的理论等电点为 5.77,不稳定系数为 40.44,属于不稳定蛋白,总平均疏水指数为 -0.451,说明 *DoCDPK1* 为亲水蛋白。*DoCDPK1* 编码的蛋白中谷氨酸(Glu)占比较大,达 8.8%,色氨酸(Trp)的含量为 0.7%,占比最小。通过 TMHMM2.0 在线网站对 *DoCDPK1* 蛋白的跨膜结构进行分析,该蛋白不具有跨膜结构域。

利用在线网站 SOPMA 对 *DoCDPK1* 蛋白的二级结构进行预测分析,*DoCDPK1* 蛋白的二级结构主要由  $\alpha$ -螺旋(43.19%),无规则卷曲(38.58%),延伸链(9.60%), $\beta$ -折叠(8.64%)构成(图 5)。通过 SWISS-MODEL 在线预测 *DoCDPK1* 蛋白的三维结构建模,匹配到最佳模型的蛋白序列一致性为 85.13%。

### 2.4 *DoCDPK1* 结构域保守性分析

通过 Blast 检索,将山药 *DoCDPK1* 氨基酸序列与 *DcCDPK1* 几内亚薯蓣(*Dioscorea cayenensis* subsp.)、*PdCDPK1* 海枣(*Phoenix dactylifera*)、*QICDPK1* 加州橡树(*Quercus lobata*)、*NnCDPK1* 荷花(*Nelumbo nucifera*)和 *AgCDPK3* 石菖蒲(*Acorus gramineus*)氨基酸序列采用 DANMAN 软件进行序列多重比对分析,发现不同植物的 CDPK 具有较高的一致性,*DoCDPK1* 氨基酸序列与几内亚薯蓣的一致性最高,达 97.71%(图 6)。

为了进一步分析 *DoCDPK1* 蛋白的结构,利用 MEME 分析 *DoCDPK1* 及其同源家族序列保守结构域,可以明显看出,*DoCDPK1* 及其同源家族序列蛋白共鉴定出 12 个保守基序。其中基序 1 为 ST-Kc\_CAMK 结构域(Ser/Thr 蛋白激酶区),是 CDPK 家族特有的保守结构域(图 7)。

为了进一步分析山药 *DoCDPK1* 与其他植物 CDPK 的进化层面关系,基于上述氨基酸序列多重比对基础,利用 MEGA5.0 软件对 *CnCDPK1* 椰子(*Cocos nucifera*)、*MeCDPK1* 木薯(*Manihot esculenta*)、*VaCDPK3* 山葡萄(*Vitis amurensis*)、*CpCDPK1* 木瓜(*Carica papaya*)、*CiCDPK1* 山核桃(*Carya illinoensis*)、*JrCDPK1* 核桃(*Juglans regia*)、*QsCD-*

```

1  ATGGGCAACTGCAACGGCTCCCGTCGGCCTCCGGAGAACCTCCGGCGACCGGATCCACTGCCGGACCTCCCGACCGCCTCCTCTCCA
1  M G N C N G L P S A S G E P P A T G S T A G P P D R P P P P
91  GCT CCCACCAACGGTTCATCACCGTCTCCCTCCGCAAGCCA TCCCACCTCATGCCTCCGCCCCTGTACGGCCGTGTTCTT GGC
31  A P T N G S I T V L P S A K P S P P H A S R P V Y G R V L G
181  CGTCCGATCTCCGACGTTCCGGAGTTCTACACCTTCGGCCGTGAG CTGGTCTGTGGCCAG TTCGGCGTACGACTTGGTCACCGATCGG
61  R P I S D V R E F Y T F G R E L G R G Q F G V T Y L V T D R
271  CGGACGGGCGAGCGCCTTGCTGCAAGTCGATCGCCACGAGGAAGCTCGTCAACCGCGATGACATCGAGGATGTGCGGCGGAGGTGCAG
91  R T G E R L A C K S I A T R K L V N R D D I E D V R R E V Q
361  ATCATGCACCATCTGACCGGC CACCGCAACATCGTCGAGCTGAAGGGAGCGTACGAAGACCGCCACTCGGTGCACTTGGTGATGGAGCTC
121  I M H H L T G H R N I V E L K G A Y E D R H S V H L V M E L
451  TGCGAGGGTGGGGAGCTCTTTGATAGGATTACTAAGGGCCACTACTCGGAGCGAGCCGCGTGCCTGTGCGCGGAGATCGTCACT
151  C E G G E L F D R I I T K G H Y S E R A A A A L C R E I V T
541  GTTGTGCATAACTGCTACTCCATGGGGTTCATGCATCGGACCTCAAGCCGGAGAAC TTTTGTCTTAGCAAAGATGAGAACTCTCCG
181  V V H N C H S M G V M H R D L K P E N F L F L S K D E N S P
631  CTCAAGGCCACGGACTTGGTCTTCCGTT TTCTCAAGCCTGGAGATGTATTCAAAGACCTTGTGGC AGTGCAATTATGTTGCTCCT
211  L K A T D F G L S V F F K P G D V F K D L V G S A Y Y V A P
721  GAGGTATTGAGCGGAATTATGGTGCAGAGGCTGATATTTGGAGTGTGGTGTATACTTAT ATCCTCTTTGTGGTTCCTCCTTTT
241  E V L R R N Y G A E A D I W S A G V I L Y I L L C G V P P F
811  TGGGCTGAGAATGAACAGGGTATA TTTGATGCTGTTTACGT GGCCATATTGATTCTCATCTGATCCTTGGCCT TCCATATCAAGTGA
271  W A E N E Q G I F D A V L R G H I D F S S D P W P S I S S G
901  GCAAAAGAAGTGTAAAAAGATGCTTCGGCAAGATCCAAAAGAGAGGCTTTCTGCAGTTGAAATTTGAATCATCCATGGGTTTCGAGAA
301  A K E L V K K M L R Q D P K E R L S A V E I L N H P W V R E
991  GATGGTGATGCTTCTGATAAGCCAATTGATATCACGGTCTTGAGCAGAATGAAGCAGTTTAGGGCCATGAATAAACTTAAGAAAAGTAGCG
331  D G D A S D K P I D I T V L S R M K Q F R A M N K L K K V A
1081  TTGAAGGTAATTGCGGAAAATCTATCTGAGGAGGAAATCATCGGTTTAAAAGAAATGTTCAAATCT ATGATACTGACAATAGTGAACA
361  L K V I A E N L S E E E I I G L K E M F K S M D T D N S G T
1171  ATAACCTTTGAGGAACTAAAAGCTGGTCTGCAAAATAGGCAGCAAGCTTTCAGAATCTGAAGTTCGACAAGTATGGAAGCGGCTGAT
391  I T F E E L K A G L P K L G S K L S E S E V R Q L M E A A D
1261  GTGGATGGAATGGGACCATTGACTATCTGAGTTTATAACAGCCACGATGCACATG AACAGAATGGAAAAAGAGGACCATTATACAAG
421  V D G N G T I D Y L E F I T A T M H M N R M E K E D H L Y K
1351  GCTTTTGAGTATTTGACAAGGATAAGAGCGGTTACATCACAATGGAGGAGTTAGAGCAAGCTCTCAAGGAGTACAACATGGGTGACGAG
451  A F E Y F D K D K S G Y I T M E E L E Q A L K E Y N M G D E
1441  AAAACAATAAAGAGATTATTGCAGAAGTTGACTCAGATCAGATGGACGGATAAACTATGATGAATTTGTAGCAATGATGAGGAAAGGA
481  K T I K E I I A E V D S D H D G R I N Y D E F V A M M R K G
1531  AACCCAGAAATAGTTCCTAACCGTAGACGCAAATAG
511  N P E I V P N R R R K *
    
```

图4 *DoCDPK1* 基因的 ORF 序列及其推导的氨基酸序列

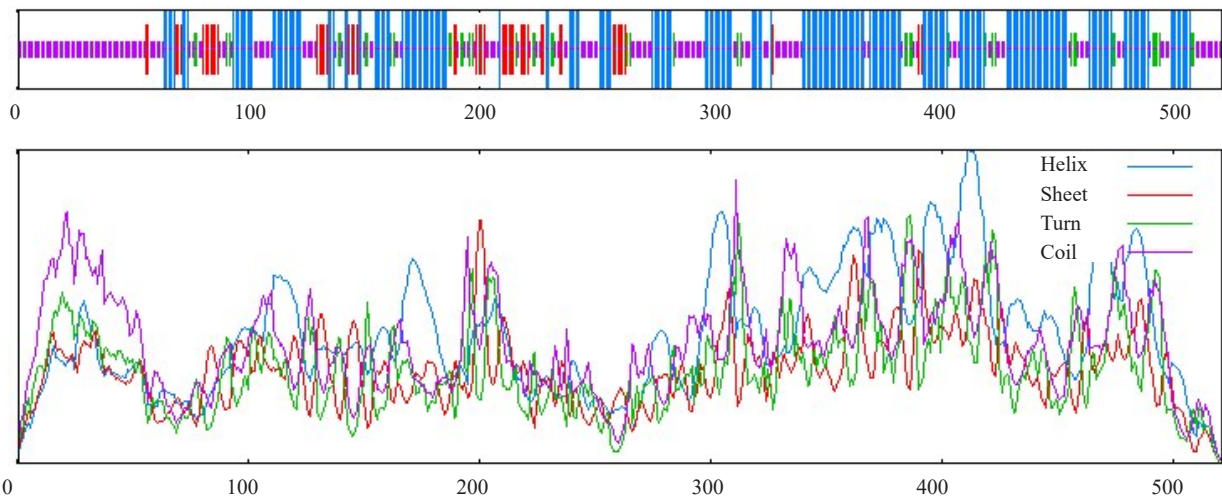
Fig. 4 ORF sequence of *DoCDPK1* gene and its deduced amino acid sequence

PK1 栓皮栎 (*Quercus suber*) 和 QrCDPK1 夏栎 (*Quercus robur*) 的蛋白序列, 构建系统进化树。结果表明, 山药 *DoCDPK1* 与几内亚薯蓣 *DeCDPK1* 的亲缘关系最近, 其次为石菖蒲 *AgCDPK3* (图 8)。

### 2.5 *DoCDPK1* 的亚细胞定位

将含有 CaMV35S-*DoCDPK1*-GFP 融合载体的

菌液注射到烟草叶片, 以 CaMV35S-GFP 空载为对照, 2 d 后观察 *DoCDPK1* 蛋白的定位情况, 发现空载 GFP 的荧光信号相对均匀地分布在烟草细胞中, *DoCDPK1* 蛋白的 GFP 荧光信号在细胞膜与细胞核中较强, 表明 *DoCDPK1* 蛋白定位于细胞膜与细胞核 (图 9)。



注: 蓝色.  $\alpha$ -螺旋; 红色. 延伸链; 绿色.  $\beta$ -折叠; 紫色. 无规则卷曲。

Note: Blue. Alpha helix; Red. Extended strand; Green. Beta sheet; Purple. Random coil.

图5 DoCDPK1 蛋白二级结构预测

Fig. 5 Prediction of secondary structure of DoCDPK1 protein

DoCDPK1 .seq	MCNCGNGLFSASGFFATG...STAGFFRFPFPF.....APTNGSIT.....VLESAPKESPEHASFVVMGFVIGREISDVRFEFYIFGRELGRGCFG	82
DcCDPK1 .seq	MCNCGNGLFSASGCFEATG...STAGFFRFPFPF.....PAPTNGSIT.....VLESAPKESPEHAFPMYGFVIGREISDVRFEFYIFGRELGRGCFG	84
PdCDPK1 .seq	MCNFGSRFFSSNRPDLSGRG..GSDRFFFTTPPFRHHTAASAGCGPKF.....VWFRFAASIFRRLTQKVGFLVIGREMDVRFAYTIFGRELGRGCFG	92
QlCDPK1 .seq	MCNCGSCYFSACSCIFPTDITTTDHDGFTTHHFAQN.....TAANSNIN.....IIPFTTQTQTFP.IVGFVIGREMDVRSSTYIFGRELGRGCFG	82
NnCDPK1 .seq	MCNCGNGLFSNGGLQPGCAANLHAPFFTNVINV.....RPLDKETFFFSILHCGEQCFESFVHRELSSTGFVIGREMDVRSSTYIFGRELGRGCFG	92
AgCDPK3 .seq	MCNCGNGLFALYGGSTAFPIENCGGEGCSTSCPPF.....APPCTLAIT.....VNFPKKVVVLEFLSSGIGFVIGREMDVRSSTYIFGRELGRGCFG	87
Consensus	mgn p grvlgrp dvr y fgrelgrgcf	
DoCDPK1 .seq	VYIIVTDRRICEERLACKSIATRKIVNRDDELDVREVQIMHHLTGHNRNIVELKAYEDRFSVHIVMEICGGELFDR.IITRGHYSERAAAICRFIVTV	181
DcCDPK1 .seq	VYIIVTDRRICEERLACKSIATRKIVNRDDELDVREVQIMHHLTGHNRNIVELKAYEDRFSVHIVMEICGGELFDR.IITRGHYSERAAAICRFIVTV	184
PdCDPK1 .seq	VYIIVTTRKEIGERLACKSIATRKILHFDDELDVREVQIMHHLTGHNRNIVELKAYEDRFSVNIIVMEICGGELFDR.IITARGHYSERAAAICRFIVTV	191
QlCDPK1 .seq	VYIIVTHKDIKCKEACKSIATRKILNKDDELDVREVQIMHHLTGHNRNIVELKAYEDRFSVNIIVMEICGGELFDR.IITRGHYSERAAAICRFIVTV	181
NnCDPK1 .seq	VYIIVTHKEIKCCYACKSIATRKIVNRDDELDVREVQIMHHLTGHNRNIVELKAYEDRFSVNIIVMEICGGELFDR.IITARGHYSERAAAICRFIVTV	191
AgCDPK3 .seq	VYIIVTHREIKERFACKSIATRKIFHRDDELDVREVQIMHHLTGHNRNIVELKAYEDRFSVNIIVMEICGGELFDR.IITARGHYSERAAAICRFIVTV	186
Consensus	vtvl t t acksi rkl dd edv revqimhhlthghnrniv el k aedr sv l relc ggelfdr kghyseraaa lcr ivtv	
DoCDPK1 .seq	VHNCISMVMHRLKRPENFIFLSKDEISELKATIFGLSVFRKREGVFRDIVGSAYYVAEVIIRRYGFEAD IWSAGVILYIILCGVFFPFWAENECCIFDA	281
DcCDPK1 .seq	VHNCISMVMHRLKRPENFIFLSKDEISELKATIFGLSVFRKREGVFRDIVGSAYYVAEVIIRRYGFEAD IWSAGVILYIILCGVFFPFWAENECCIFDA	284
PdCDPK1 .seq	VEICHSMVMHRLKRPENFIFLNKGETISELKATIFGLSVFRKSEGVFRDIVGSAYYVAEVIIRRYGFEAD IWSAGVILYIILCGVFFPFWAENECCIFDA	291
QlCDPK1 .seq	VHNCISMVMHRLKRPENFIFLSKDEISELKATIFGLSVFRKREGVFRDIVGSAYYVAEVIIRRYGFEAD IWSAGVILYIILCGVFFPFWAENECCIFDA	281
NnCDPK1 .seq	VHNCISMVMHRLKRPENFIFLSKDEISELKATIFGLSVFRKREGVFRDIVGSAYYVAEVIIRRYGFEAD IWSAGVILYIILCGVFFPFWAENECCIFDA	291
AgCDPK3 .seq	VHNCISMVMHRLKRPENFIFLNVSDEISELKATIFGLSVFRKREGCKFRDIVGSAYYVAEVIIRKSYGFEAD IWSAGVILYIILCGVFFPFWAENECCIFDA	286
Consensus	vhnc ismvmhrlkpenfl l e splkatc fglsvf k f dlvg sayyv ae vl rry g fe ad iws ag vil y iil cg v ff p fw a en e cc i f da	
DoCDPK1 .seq	VLRGHIDSSIFWFSISSAKELVKKMIFQDPKRFISAVEILNHFWRREIGVASTDKEILLITVLSRMKCFRANMKIKKVAIKVIAENISEEEITGLKEMFK	381
DcCDPK1 .seq	VLRGHIDSSIFWFSISSAKELVKKMIFQDPKRFISAVEILNHFWRREIGVASTDKEILLITVLSRMKCFRANMKIKKVAIKVIAENISEEEITGLKEMFK	384
PdCDPK1 .seq	VLRGHIDSSIFWFSISSAKELVKKMIFQDPKRFITAGQILNHFWRREIGVASTDKEILLITVLSRMKCFRANMKIKKVAIKVIAENISEEEITGLKEMFK	391
QlCDPK1 .seq	VLRGHIDSSIFWFSISSAKELVKKMIFQDPKRFISAVEILNHFWRREIGVASTDKEILLITVLSRMKCFRANMKIKKVAIKVIAENISEEEITGLKEMFK	381
NnCDPK1 .seq	VLRGHIDSSIFWFSISSAKELVKKMIFQDPKRFISAVEILNHFWRREIGVASTDKEILLITVLSRMKCFRANMKIKKVAIKVIAENISEEEITGLKEMFK	391
AgCDPK3 .seq	VLRGHIDSSIFWFSISSAKELVKKMIFQDPKRFISAVEILNHFWRREIGVASTDKEILLITVLSRMKCFRANMKIKKVAIKVIAENISEEEITGLKEMFK	386
Consensus	l rghid f s f w f s i s s a k e l v k k m i f q d p k r f i s a v e i l n h f w r r e i g v a s t d k e i l l i t v l s r m k c f r a n m k i k k v a i k v i a e n i s e e e i t g l k e m f k	
DoCDPK1 .seq	SMVDNSCTITFEELKAGLFKIGSKLSESEVQIMEAADVIGNGLIYLYEFITATMHHMNRMEKEEHLKYAFEFYFDKDKSGYITMEELECAIKRYNMGDEK	481
DcCDPK1 .seq	SMVDNSCTITFEELKAGLFKIGSKLSESEVQIMEAADVIGNGLIYLYEFITATMHHMNRMEKEEHLKYAFEFYFDKDKSGYITMEELECAIKRYNMGDEK	484
PdCDPK1 .seq	SMVDNSCTITFEELKAGLFKIGSKLSESEVQIMEAADVIGNGLIYLYEFITATMHHMNRMEKEEHLKYAFEFYFDKDKSGYITMEELECAIKRYNMGDEK	491
QlCDPK1 .seq	SMVDNSCTITFEELKAGLFKIGSKLSESEVQIMEAADVIGNGLIYLYEFITATMHHMNRMEKEEHLKYAFEFYFDKDKSGYITMEELECAIKRYNMGDEK	481
NnCDPK1 .seq	SMVDNSCTITFEELKAGLFKIGSKLSESEVQIMEAADVIGNGLIYLYEFITATMHHMNRMEKEEHLKYAFEFYFDKDKSGYITMEELECAIKRYNMGDEK	491
AgCDPK3 .seq	SMVDNSCTITFEELKAGLFKIGSKLSESEVQIMEAADVIGNGLIYLYEFITATMHHMNRMEKEEHLKYAFEFYFDKDKSGYITMEELECAIKRYNMGDEK	486
Consensus	srdtdnsctit eelkaglrklg k s e s e v q i m e a a d v i g n g l i y l y e f i t a t m h h m n r m e k e e h l y k a f e y f d k d k s g y i t m e e l e c a i k r y n m g d e k	
DoCDPK1 .seq	TIKEIIAEVSDIDGRINYLEFVAMMKCNDEIVNRRR	520
DcCDPK1 .seq	TIKEIIAEVSDIDGRINYLEFVAMMKCNDEIVNRRR	523
PdCDPK1 .seq	TIKEIIAEVSDIDGRINYLEEFAAMMKISHAIVNRRF	530
QlCDPK1 .seq	TIKEIIAEVSDIDGRINYLEFVAMMKCNDEIVNRRR	520
NnCDPK1 .seq	TIKEIIAEVSDIDGRINYLEFVAMMKCNDEIVNRRR	530
AgCDPK3 .seq	TIKEIIAEVSDIDGRINYLEEFAAMMKCNDEIVNRRR	525
Consensus	tikeiiae v d d g r i n y l e f v a m m k c n d e i v n r r	

注: 黑色下划线部分为 Ser/Thr 蛋白激酶区。

Note: The black underlined part is the Ser/Thr protein kinase region.

图6 DoCDPK1 氨基酸序列比对

Fig. 6 DoCDPK1 amino acid sequence alignment

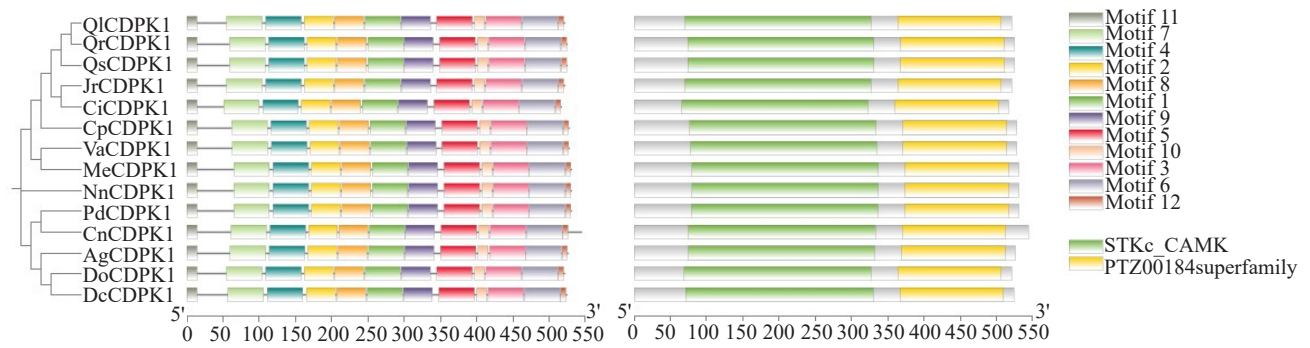


图7 DoCDPK1 序列的基序分析  
Fig. 7 Motif analysis of DoCDPK1

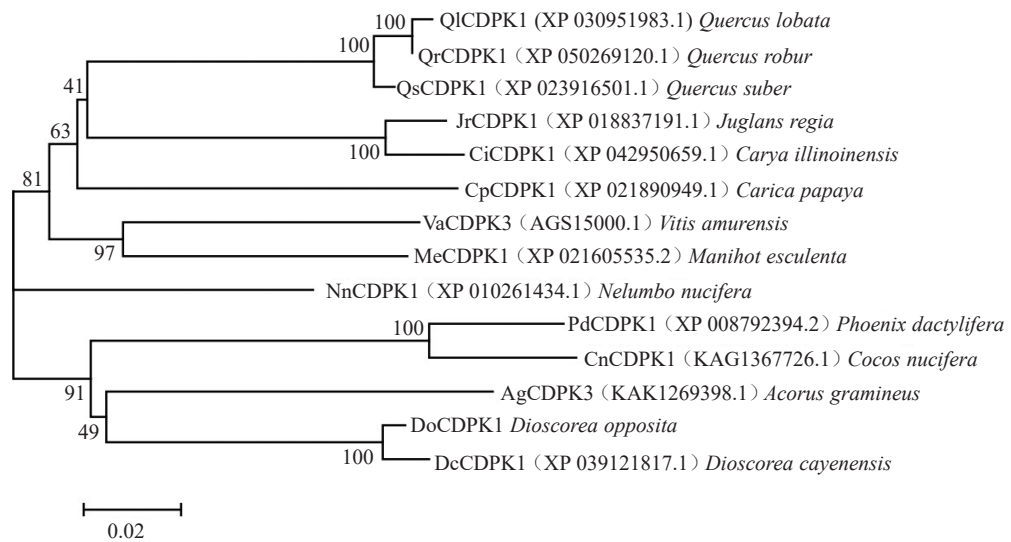


图8 DoCDPK1 及其同源序列的系统进化树  
Fig. 8 Phylogenetic tree of DoCDPK1 and its homologous sequences

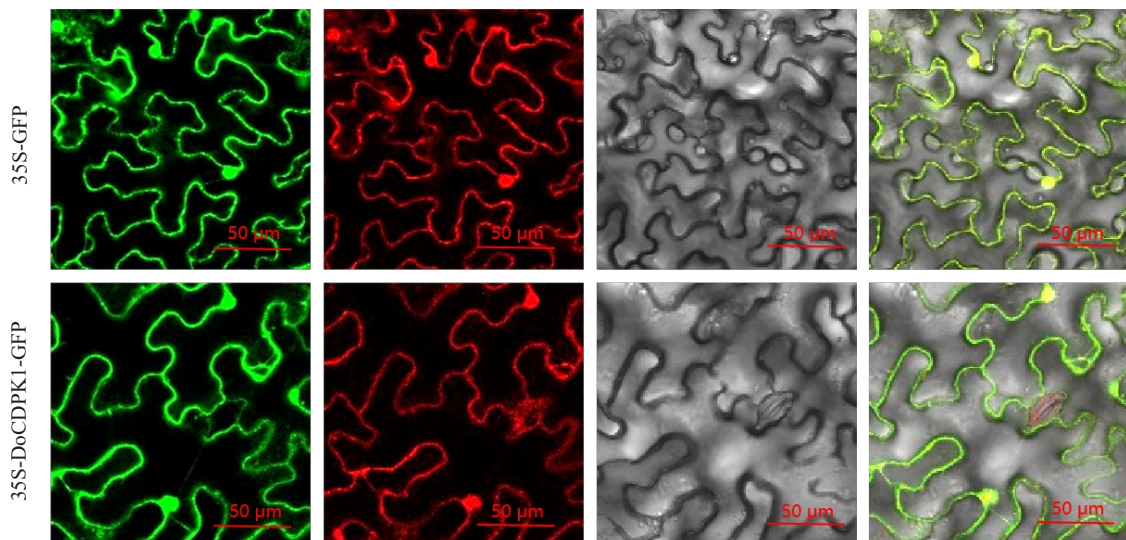
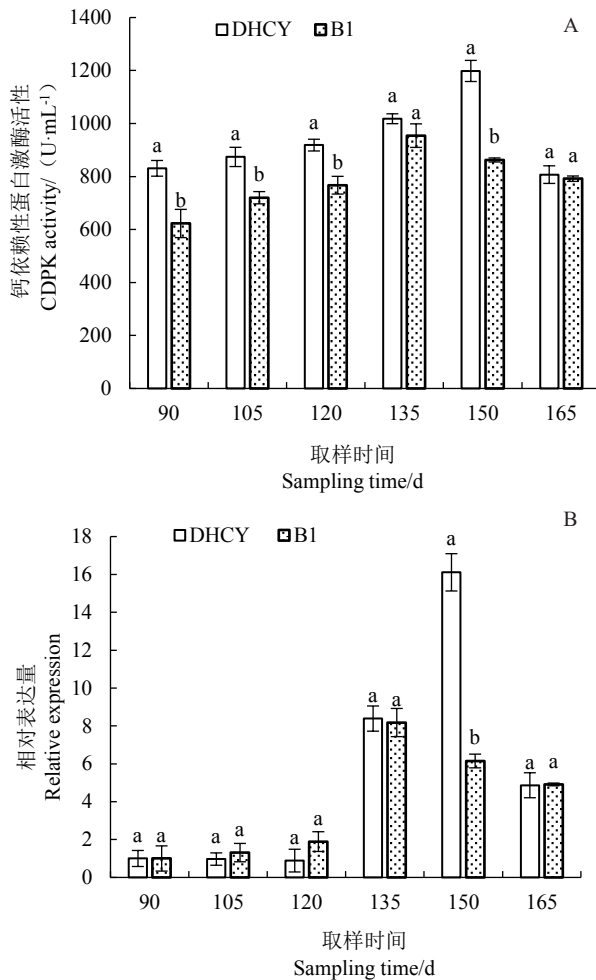


图9 DoCDPK1 的亚细胞定位  
Fig. 9 Subcellular localization of DoCDPK1

2.6 CDPK活性及*DoCDPK1*基因的表达量分析

DHCY的CDPK活性在种植后150d达到最高值,B1的CDPK活性在135d达到最高值;DHCY的CDPK活性在各个取样期均高于B1,在90、105、120和150d显著高于B1(图10-A)。利用qRT-PCR技术对2个品种6个不同发育时期*DoCDPK1*基因的表达量进行分析,在种植后90~135d时,2个山药品种中*DoCDPK1*基因的表达量不存在显著差异,在135d时,B1中*DoCDPK1*基因的表达量达到最高值;而DHCY中*DoCDPK1*基因的表达量在150d时达到最高值,且显著高于B1,在165d时2个山药品种中*DoCDPK1*基因的表达量无显著差异(图10-B)。



注:不同小写字母表示同一时间的不同品种在 $p < 0.05$ 水平下差异显著。

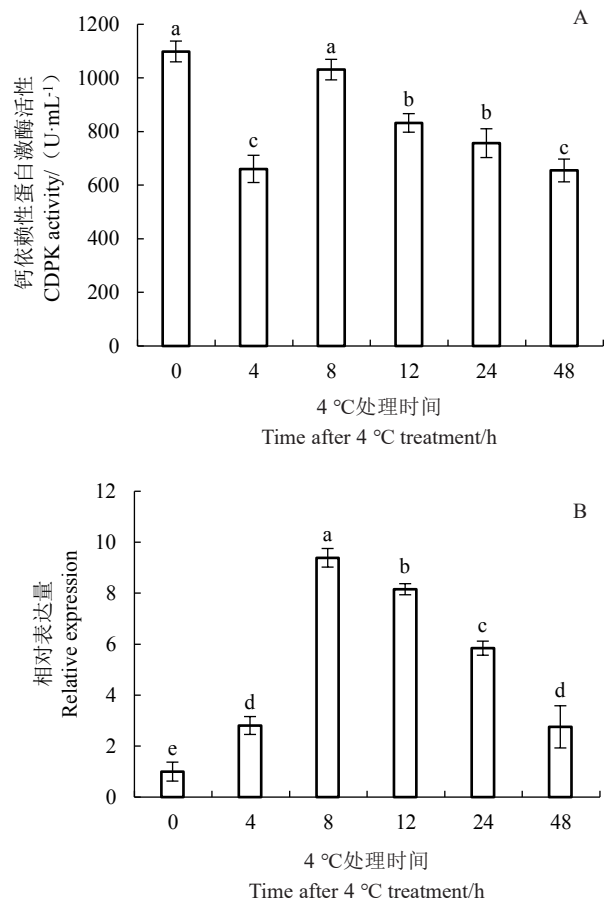
Note: Different lowercase letters indicate significant difference between different varieties of the same time at 0.05 level.

图10 CDPK活性及*DoCDPK1*基因在不同品种中的表达分析

Fig. 10 CDPK activity and expression analysis of *DoCDPK1* gene in different varieties

2.7 低温胁迫处理下CDPK活性及*DoCDPK1*基因的表达量分析

经4℃低温胁迫后,各个时间处理下叶片中的CDPK活性均低于对照组(0h)。处理4h后,CDPK活性显著下降,处理8h后,CDPK活性显著升高,并达到最高值,基本接近未处理时的水平;处理12、24及48h后的CDPK活性逐渐下降(图11-A)。笔者利用qRT-PCR技术检测DHCY山药组培苗中*DoCDPK1*基因在低温处理后的表达量变化。分析结果表明,各个时间处理下叶片中*DoCDPK1*基因的表达量均显著高于对照组(0h),随着处理时间的延长,叶片中*DoCDPK1*基因的表达量呈先升高后降低的变化趋势,在处理8h后,表达量最高,显著高于其他处理时间(图11-B)。



注:不同小写字母表示不同时间处理在 $p < 0.05$ 水平下差异显著。

Note: Different lowercase letters indicate significant difference between different time treatment at 0.05 level.

图11 低温胁迫下CDPK活性及*DoCDPK1*基因的表达分析

Fig. 11 CDPK activity and expression analysis of *DoCDPK1* gene under low temperature stress



### 3 讨论与结论

钙依赖性蛋白激酶是一类特殊的钙信号感受器,是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。经过多年的深入研究,许多植物的 CDPK 基因已被鉴定。笔者在山药 DHCY 块茎中分离鉴定了 *DoCDPK1* 基因,该基因编码 521 个氨基酸。分析基本理化性质和蛋白序列,发现山药 *DoCDPK1* 为亲水蛋白,具有 CDPK 家族特有的 STKc\_CAMK 保守结构域(Ser/Thr 蛋白激酶区),这与报道的青花菜和铁皮石斛等植物的序列结构特征一致<sup>[34-35]</sup>。本研究中 *DoCDPK1* 蛋白定位于细胞核与细胞膜,推测其主要在细胞核与细胞膜中发挥作用。雷蕾等<sup>[36]</sup>在茶树中克隆 *CsCDPK17* 基因,表明 *CsCDPK17* 融合蛋白是双定位蛋白,定位于细胞核与细胞质膜中。李宁等<sup>[37]</sup>在潘那利番茄中克隆 *SpCDPK4* 基因,表明 *SpCDPK4* 融合蛋白定位于细胞膜中。

CDPK 基因参与植物的生长发育,且在各种器官中均有表达。本研究中 DHCY 的 CDPK 活性在各个取样期均高于 B1,且在 90、105、120 和 150 d 时显著高于 B1,表明 DHCY 山药中的 CDPK 活性更高。*DoCDPK1* 基因在 2 个品种 6 个不同发育时期的表达量均存在差异,在 90~135 d 时,2 个山药品种中 *DoCDPK1* 基因的表达量不存在显著差异,在 135 d 时,B1 中 *DoCDPK1* 基因的表达量达到最高值;而 DHCY 中 *DoCDPK1* 基因的表达量在 150 d 时达到最高值,且显著高于 B1,在 165 d 时,2 个山药品种中 *DoCDPK1* 基因的表达量无显著差异。2 个山药品种中 *DoCDPK1* 基因的表达量在块茎发育前期无显著差异,在块茎发育后期则存在显著差异,并在高产山药 DHCY 中的表达量显著高于细长形山药 B1,表明该基因可能参与调控山药块茎膨大后期的生长发育。王丹丹等<sup>[38]</sup>从朝鲜淫羊藿中克隆了 *EkCDPK* 基因,其在根、茎和叶中均有表达。刘玉玲等<sup>[39]</sup>在天山雪莲的根、茎、叶、幼叶、幼茎及种子中,发现 *SikCDPK1* 基因均有表达。Raíces Marcela 等<sup>[40]</sup>的研究结果表明,马铃薯 *StCDPK1* 和 *StCDPK3* 基因均可以在匍匐茎中表达,与块茎早期的发育及膨大有关。

在植物细胞中,CDPK 参与调控多种生物和非生物胁迫过程(如低温、干旱、盐胁迫、病虫害等)。本研究结果表明,在低温胁迫处理 4 h 后,叶片中 CDPK 活性显著降低,*DoCDPK1* 基因的表达量显著升高;在处理 8 h 后,CDPK 活性与 *DoCDPK1* 基

因的表达量显著升高并达到最高值;随着处理时间的延长,活性与表达量均逐渐降低;且在各处理时间点 CDPK 活性均低于对照组(0 h),而 *DoCDPK1* 基因的表达量均显著高于对照组(0 h),表明低温胁迫会降低 CDPK 活性,诱导 *DoCDPK1* 基因的上调表达,且表达水平在不同时间处理下存在差异,推测 *DoCDPK1* 基因在山药中可以响应低温胁迫,而该基因启动子区是否存在低温相关的调控元件还需进一步研究。在玉米中,低温胁迫诱导 *ZmCPK1* 基因表达上调,该基因也是冷胁迫途径中的负调控因子<sup>[41]</sup>。马铃薯 *StCDPK* 基因的表达量在 4 °C 处理 12 h 时出现峰值<sup>[42]</sup>。*OsCPK27* 基因是水稻低温胁迫的负调控因子,4 °C 处理水稻 12 h 后,*OsCPK27* 基因的转录本会被诱导表达<sup>[43]</sup>。

综上所述,笔者克隆了山药 *DoCDPK1* 基因,包含一个 1566 bp 的完整 ORF,编码 521 个氨基酸。*DoCDPK1* 蛋白定位于细胞膜与细胞核。通过 qRT-PCR 分析的结果表明,DHCY 山药中的 CDPK 活性更高,*DoCDPK1* 基因可能参与调控山药块茎膨大后期的生长发育。经 4 °C 低温胁迫后,CDPK 活性降低,*DoCDPK1* 基因的表达量上调,且表达水平在不同时间处理下存在差异,推测该基因受低温胁迫诱导,在山药抗寒过程中发挥重要作用。

#### 参考文献

- [1] 景娴,江海,杜欢欢,等.我国山药研究进展[J].安徽农业科学,2016,44(15):114-117.
- [2] 刘晓梅.山药的药理研究及临床新用[J].光明中医,2010,25(6):1087-1088.
- [3] 王耀琴,刘建平,高钰锋,等.6-BA 对山药增产效应的研究[J].农业科技通讯,2020(12):120-123.
- [4] 赵令敏,邵盈,张艳芳,等.山药块茎膨大期淀粉合成关键酶活性及调控基因的表达分析[J].河南农业大学学报,2019,53(6):847-854.
- [5] 朱燕丽,郑海英,杜冰,等.山药多糖的高得率挤压提取及性能研究[J].包装工程,2023,44(21):176-186.
- [6] 刘丽杰,王璐瑶,孙玉婷,等.东北不同地区细毛长山药品质分析及药理活性成分比较[J].云南农业大学学报(自然科学),2021,36(2):308-313.
- [7] 单桂云.山药生产中应引以为戒的问题[J].现代农业,2017(10):42-43.
- [8] 汤宇晨.干旱胁迫下唐古特白刺对外源 Ca<sup>2+</sup> 的生理响应及 *NtCDPK1*、*NtCIPK5* 的克隆与功能分析[D].呼和浩特:内蒙古大学,2019.
- [9] PEROCHON A, ALDON D, GALAUD J P, et al. Calmodulin and calmodulin-like proteins in plant calcium signaling[J]. Biochimie, 2011, 93(12):2048-2053.
- [10] 武志刚,武舒佳,王迎春,等.植物中钙依赖蛋白激酶(CDPK)

- 的研究进展[J].草业学报,2018,27(1):204-214.
- [11] 刘小龙,李霞,钱宝云,等.植物体内钙信号及其在调节干旱胁迫中的作用[J].西北植物学报,2014,34(9):1927-1936.
- [12] 李亚男,张豪杰,梁梦静,等.水生红球藻钙依赖蛋白激酶(CDPK)家族鉴定与表达分析[J].生物技术通报,2024,40(2):300-312.
- [13] 张洁,程凯,王迎春.长叶红砂钙依赖蛋白激酶*RtCDPK16*的非生物胁迫应答分析[J].草业学报,2023,32(2):97-109.
- [14] 刘晨,魏雅婷,于月华,等.大豆*Glyma.05G222700.2*基因生物信息学与逆境表达分析[J].大豆科学,2020,39(4):543-548.
- [15] 张洁.珍稀泌盐植物长叶红砂*RtCML42*和*RtCDPK16*的克隆与功能分析[D].呼和浩特:内蒙古大学,2020.
- [16] HUBBARD K E, SIEGEL R S, VALERIO G, et al. Abscisic acid and CO<sub>2</sub> signalling via calcium sensitivity priming in guard cells, new CDPK mutant phenotypes and a method for improved resolution of stomatal stimulus-response analyses [J]. *Annals of Botany*, 2012, 109(1): 5-17.
- [17] HRABAK E M, CHAN C W M, GRIBSKOV M, et al. The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases[J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(2): 666-680.
- [18] KONG X P, LV W, JIANG S S, et al. Genome-wide identification and expression analysis of calcium-dependent protein kinase in maize [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 433.
- [19] ASANO T, TANAKA N, YANG G X, 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 and Cell Physiology*, 2005, 46(2): 356-366.
- [20] RAY S, AGARWAL P, ARORA R, et al. Expression analysis of calcium-dependent protein kinase gene family during reproductive development and abiotic stress conditions in rice (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2007, 278(5): 493-505.
- [21] 盛况,高燕会,斯金平,等.铁皮石斛*DoCDPK6*基因及启动子的克隆与表达分析[J].农业生物技术学报,2017,25(4): 588-598.
- [22] CAO Z M, HE Q H, WANG P W, et al. Functional characteristics of a calcium-dependent protein kinase (*MaCDPK1*) enduring stress tolerance from *Morus atropurpurea* Roxb.[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2020, 141(1): 131-143.
- [23] HU Z J, LV X Z, XIA X J, et al. Genome-wide identification and expression analysis of calcium-dependent protein kinase in tomato[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 469.
- [24] GAO Y L, ZHANG Y F, JI X, et al. Identification of *Dioscorea opposita* Thunb. CDPK gene family reveals that *DoCDPK20* is related to heat resistance[J]. *PeerJ*, 2023, 11: e16110.
- [25] WANG H B, GONG J J, SU X G, et al. *MaCDPK7*, a calcium-dependent protein kinase gene from banana is involved in fruit ripening and temperature stress responses[J]. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2017, 92(3): 240-250.
- [26] 闫子飞,黎梦娟,马波,等.‘西伯利亚’百合钙依赖型蛋白激酶基因的克隆及表达分析[J].分子植物育种,2019,17(13): 4178-4184.
- [27] SHU B, JUE D W, ZHANG F, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the citrus calcium-dependent protein kinase (CDPK) genes in response to arbuscular mycorrhizal fungi colonization and drought[J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2020, 34(1): 1304-1314.
- [28] 林榕燕,钟淮钦,陈艺荃,等.秋石斛钙依赖蛋白激酶基因的克隆及表达分析[J].西北植物学报,2022,42(11): 1818-1826.
- [29] 张宇萍,杨少玉,胡秀丽,等.高温胁迫下玉米钙依赖蛋白激酶基因的表达及功能[J].河南农业大学学报,2021,55(2): 227-233.
- [30] 索宁宁,张艳芳,高圆丽,等.山药块茎膨大期淀粉积累及淀粉合成相关基因表达分析[J].中国瓜菜,2023,36(3): 69-76.
- [31] 葛明然,张艳芳,邢丽南,等.山药(*Dioscorea opposita* Thunb.)赤霉素合成酶基因*DoGA20ox1*的克隆及功能研究[J].西北农业学报,2023,32(6): 919-928.
- [32] 王金鑫,季祥,高圆丽,等.*CDPK20*基因表达及其对山药块茎膨大调控作用研究[J].西北植物学报,2021,41(2): 189-196.
- [33] 赵令敏,张艳芳,邢丽南,等.山药异淀粉酶基因克隆及其在淀粉代谢中的作用[J].西北植物学报,2022,42(11): 1827-1834.
- [34] 郭菲帆,王佳怡,戴晨宇,等.青花菜钙依赖蛋白激酶基因*BoCDPK1*的克隆与表达[J].浙江农业学报,2020,32(4): 624-631.
- [35] 盛况,高燕会,斯金平,等.铁皮石斛*DoCDPK*基因的克隆与表达分析[J].园艺学报,2016,43(12): 2412-2422.
- [36] 雷蕾,王璐,姚丽娜,等.茶树钙依赖性蛋白激酶基因*CsCDPK17*的鉴定及表达分析[J].茶叶科学,2019,39(3): 267-279.
- [37] 李宁,王娟,王柏柯,等.潘那利番茄*SpCDPK4*基因的克隆、原核表达及表达模式分析[J].植物生理学报,2021,57(3): 672-680.
- [38] 王丹丹,鲍佳乐,张雨婷.朝鲜淫羊藿*EkCDPK*基因的克隆及表达分析[J].西北植物学报,2020,40(6): 918-926.
- [39] 刘玉玲,朱新霞,吕新华,等.雪莲*SiCDPK1*基因的表达特征和蛋白激酶活性分析[J].草业学报,2023,32(9): 213-221.
- [40] RAICES M, GARGANTINI P R, CHINCHILLA D, et al. Regulation of CDPK isoforms during tuber development[J]. *Plant Molecular Biology*, 2003, 52(5): 1011-1024.
- [41] YUAN P G, YANG T B, POOVAIAH B W. Calcium signaling-mediated plant response to cold stress[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 19(12): 3896.
- [42] 田再民,赵益,纪艺红,等.马铃薯*CDPK*基因的克隆及生物信息学分析[J].分子植物育种,2022,20(5): 1435-1442.
- [43] LÜ X Z, LI H Z, CHEN X X, et al. The role of calcium-dependent protein kinase in hydrogen peroxide, nitric oxide and ABA-dependent cold acclimation[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(16): 4127-4139.