

时丕彪,洪立洲,王 军,等. 藜麦 *CqCIPK7* 基因的克隆与表达分析[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(4): 1068-1072.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2020.04.037

## 藜麦 *CqCIPK7* 基因的克隆与表达分析

时丕彪<sup>1</sup>, 洪立洲<sup>1</sup>, 王 军<sup>1</sup>, 费月跃<sup>1</sup>, 王伟义<sup>1</sup>, 吕远大<sup>2</sup>, 顾闽峰<sup>1</sup>

(1.盐城市新洋农业试验站,江苏 盐城 224049; 2.江苏省农业科学院种质资源与生物技术研究所,江苏 南京 210014)

**关键词:** 藜麦; *CqCIPK7* 基因; 基因克隆; 序列分析; 表达分析

**中图分类号:** S512.901

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-4440(2020)04-1068-05

## Cloning and expression analysis of *CqCIPK7* gene in quinoa

SHI Pi-biao<sup>1</sup>, HONG Li-zhou<sup>1</sup>, WANG Jun<sup>1</sup>, FEI Yue-yue<sup>1</sup>, WANG Wei-yi<sup>1</sup>, LYU Yuan-da<sup>2</sup>, GU Min-feng<sup>1</sup>

(1.Xinyang Agricultural Experiment Station of Yancheng City, Yancheng 224049, China; 2.Institute of Germplasm Resources and Biotechnology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Key words:** quinoa; *CqCIPK7* gene; gene cloning; sequence analysis; expression analysis

土壤盐碱化不利于作物生长,从而影响作物产量,严重限制农业的可持续发展<sup>[1-4]</sup>。过量的盐分会引起离子和渗透胁迫,严重危害植物的光合作用、生长发育、能量代谢和蛋白质合成<sup>[5-7]</sup>。植物主要通过感知和转导胁迫信号来响应盐胁迫。在长期的进化过程中,植物形成了多种复杂的机制来保护自己免受盐胁迫的危害,包括限制  $\text{Na}^+$  吸收、增加  $\text{Na}^+$  外排以及液泡内  $\text{Na}^+$  的区隔化,还可以控制  $\text{Na}^+$  从根部向植株地上部的运输<sup>[8-9]</sup>。研究者还发现,维持细胞质中  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  的稳定比值对植物细胞功能的发挥非常重要<sup>[10]</sup>。

$\text{Ca}^{2+}$  作为第二信使,在多种信号转导途径中发挥着重要作用<sup>[11]</sup>。植物体内含有多重  $\text{Ca}^{2+}$  调节蛋白,包括钙调蛋白、钙调磷酸酶 B 亚基蛋白 (CBL) 和钙依赖蛋白激酶 (CDPK)。CBL 是一种植物特异基因,编码一种类似于酵母和动物细胞

蛋白磷酸酶的钙调蛋白 B 亚基的蛋白质<sup>[12]</sup>。CBL 在拟南芥中被认为是盐胁迫反应的重要参与者<sup>[13]</sup>,它能与 CIPK (CBL-interacting protein kinase) C 末端保守的 NAF/FISL 结构域特异性结合<sup>[14]</sup>。CIPK 是植物所特有的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,与非生物胁迫相关<sup>[2]</sup>。CIPK 蛋白通常含有一个激酶激活结构域、一个调节结构域以及连接二者的连接结构域<sup>[15]</sup>。随着生物信息学和比较基因组学的不断向前发展,越来越多物种的 CIPK 基因被挖掘出来。迄今,在拟南芥中已发现 26 个 *AtCIPK*<sup>[16]</sup>,水稻中有 31 个 *OsCIPK*<sup>[17]</sup>,玉米中有 43 个 *ZmCIPK*<sup>[18]</sup>,高粱中有 32 个 *SbCIPK*<sup>[19]</sup>,甘蔗中有 8 个 *ScCBL*<sup>[20]</sup>,油菜中有 23 个 *BnaCIPK*<sup>[21]</sup> 等。

CIPK 在植物响应外部刺激的反应中起着极其重要的作用。SOS (Salt overly sensitive) 通路是盐信号转导中最重要的通路之一<sup>[22]</sup>,比如 *AtCIPK24* 与 *AtCBL4* 的互作,直接作用于  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白 *AtSOS1* (*AtNHX7*),能够增强拟南芥的耐盐能力<sup>[23]</sup>,*AtCBL10-AtCIPK24* 复合物使地上部组织免遭盐害<sup>[24]</sup>。拟南芥 *atciph21* 突变体表现出较弱的耐盐性<sup>[25]</sup>。小麦 *TaCIPK14* 和 *TaCIPK29* 分别增强了转基因烟草的耐盐性和耐寒性<sup>[26-27]</sup>。*TaCIPK25* 过表达减弱了小麦的耐盐性<sup>[4]</sup>。将 *MdCIPK6L* 基因转入苹果和拟南芥中均能增强其对盐、旱和冷胁迫的抗性<sup>[28]</sup>。将玉米 *ZmCIPK16* 转入拟南芥 *sos2* 突变体促进 *AtSOS1* 基因的表达,从而提高其耐盐性<sup>[29]</sup>。二穗短柄草 *BdCIPK31* 基因则通过 ABA 信号通路

收稿日期:2019-12-20

**基金项目:** 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX(19)3116]; 国家自然科学基金面上项目 [31771813]; 江苏现代农业 (蔬菜) 产业技术体系 (盐城) 推广示范基地项目 [JATS(2018)137]; 江苏省农业科学院探索性颠覆性创新计划项目 [ZX(17)2015]

**作者简介:** 时丕彪 (1989-), 男, 山东菏泽人, 硕士, 助理研究员, 主要从事农作物新品种选育及分子育种研究。(E-mail) 1032175660@qq.com

**通讯作者:** 顾闽峰, (E-mail) ycgmf@126.com

增强植株对于干旱和盐胁迫的抗性<sup>[30]</sup>。

藜麦(*Chenopodium quinoa* Willd.)是一种阔叶草本植物,不仅具有极其丰富的营养价值,还具有对各种环境条件适应性强的特点<sup>[31]</sup>。然而,藜麦作为一种耐盐作物,我们对其耐盐机理尚不清楚。藜麦参考基因组的公布<sup>[32]</sup>以及关于藜麦盐碱性转录组研究的完成都为挖掘藜麦耐盐基因及解析其耐盐机理提供了重要的参考价值,有望加快耐盐藜麦育种进程。本研究从藜麦中克隆 *CqCIPK7* 基因的 cDNA 全长序列,并对该基因及其编码蛋白质的结构特征进行分析,利用 RT-qPCR(Real-time quantitative PCR)技术分析其在藜麦不同组织器官及盐胁迫下的表达模式,为进一步研究 *CqCIPK7* 的生物学功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料和试剂

藜麦材料为本课题组保存的 R-64。主要试剂为 RNeasy Pure 植物总 RNA 提取试剂盒(TIAGEN)、PrimeScript™ RT-PCR Kit 反转录试剂盒(TaKaRa)、Trans2K DNA Marker(TransGen Biotech)、Gel Extraction Kit(OMEGA)、Fast Start Universal SYBR Green Master(Roche)。

### 1.2 材料处理

将藜麦种子用 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 杀菌消毒后于发芽盒进行催芽,待种子萌发子叶平展时进行水培处理。六叶一心期挑选长势一致的幼苗用 300 mmol/L NaCl 溶液处理,在处理 0 h、6 h、12 h 和 24 h 后取藜麦的根部组织,液氮速冻后保存于 -80 °C 冰箱用于 RNA 提取,每个处理设 3 次生物学重复,以处理 0 h 的样品作为对照。

### 1.3 藜麦总 RNA 提取及 cDNA 合成

用植物总 RNA 提取试剂盒提取样品总 RNA,包括组织特异性材料的种子、根、茎、叶、花序、幼苗及经 NaCl 处理的幼苗的根。基因克隆和表达分析所用的 cDNA 模板均按照 PrimeScript™ RT-PCR Kit 试剂盒说明书合成。

### 1.4 *CqCIPK7* 基因的克隆

根据藜麦转录组测序数据及 UniGene 功能注释结果获得 *CIPK7* 基因碱基序列,设计基因特异性引物 *CqCIPK7*-cDNA-F 和 *CqCIPK7*-cDNA-R(表 1),以藜麦叶片 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增体系总体积 50 μl,含 2×Taq Master Mix 25 μl, cDNA 模板 1 μl,正反向引物各 1 μl, ddH<sub>2</sub>O 22 μl。PCR 反应程序为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min 30 s,共 35 个循环;72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经胶回收纯化后,连接到 pMD18-T 载体上,再转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中。菌液 PCR 验证为阳性单菌落的菌液送至测序公司进行测序。

### 1.5 *CqCIPK7* 基因的生物信息学分析

运用 ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)在线分析 *CqCIPK7* 基因的开放阅读框架并翻译成氨基

酸,利用 ExPASy ProtParam 工具(<https://web.expasy.org/protparam/>)预测蛋白质相对分子质量和理论等电点等,利用 NCBI CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)分析蛋白质保守结构域,用 GORIV ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_gor4.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html))预测蛋白质二级结构,用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)预测蛋白质三级结构,用 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>)预测蛋白质的亲水性,用 SignalP-5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行蛋白质信号肽分析,用 PSORT (<http://psort1.hgc.jp/form.html>)进行亚细胞定位预测。使用 ClustalX 2.0 软件对 *CqCIPK7* 的氨基酸序列及 NCBI 上下载的其他物种同源 CIPK7 蛋白的氨基酸序列进行多重比对。使用 MEGA 5.05 软件,采用邻接法(Neighbor-Joining, NJ)(bootstrap = 1 000)构建系统进化树。

表 1 *CqCIPK7* 基因克隆与定量表达所用引物序列

Table 1 Primers for gene cloning and quantitative expression of *CqCIPK7*

引物名称	引物序列 (5'→3')	用途
<i>CqCIPK7</i> -cDNA-F	ATGGCGGCAGCGTTGCAGAACC	RT-PCR
<i>CqCIPK7</i> -cDNA-R	CTACATAACAGAGGCACCCTGCAG	RT-PCR
<i>CqEF1a</i> -Q-F	GTACGCATGGGTGCTTGACAAACTC	RT-qPCR
<i>CqEF1a</i> -Q-R	ATCAGCCTGGGAGGTACCAGTAAT	RT-qPCR
<i>CqCIPK7</i> -Q-F	GACTTCGGGCTTTCGGCTGT	RT-qPCR
<i>CqCIPK7</i> -Q-R	AAGACCACGCATCCGCCTTC	RT-qPCR

### 1.6 *CqCIPK7* 基因表达分析

根据 *CqCIPK7* 基因的碱基序列设计 RT-qPCR 引物 *CqCIPK7*-Q-F 和 *CqCIPK7*-Q-R(表 1), *CqEF1a* 为内参基因<sup>[33]</sup>,进行定量表达分析。PCR 反应体系为 20.0 μl:10.0 μl SYBR green supermix,2.5 μl cDNA、正反向引物各 1.0 μl、5.5 μl ddH<sub>2</sub>O。反应条件:95 °C 预变性 10 min;95 °C 变性 10 s,60 °C 退火 30 s,40 个循环。采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法<sup>[34]</sup>计算目的基因的相对表达量。

## 2 结果与分析

### 2.1 *CqCIPK7* 基因克隆与序列分析

利用特异性引物进行 RT-PCR 扩增,从藜麦叶片中克隆得到 *CqCIPK7* 基因 1 407 bp 的 cDNA 全长序列,GenBank 登录号为 XP\_021744082.1。序列分析结果表明该基因包含 4 个外显子和 3 个内含子,不含有 5'端或 3'端非翻译区,含有一个 1 407 bp 的开放阅读框架,编码 468 个氨基酸。

### 2.2 *CqCIPK7* 蛋白的生物信息学分析

2.2.1 *CqCIPK7* 蛋白的理化性质分析 利用 ExPASy 软件分析 *CqCIPK7* 蛋白的氨基酸序列,结果显示该蛋白质分子

式为  $C_{2245}H_{3603}N_{655}O_{670}S_{26}$ , 相对分子质量为  $5.13 \times 10^4$ , 理论等电点为 9.33; 在构成蛋白质的 20 种氨基酸中, 丝氨酸含量最多 (10.3%), 其次是甘氨酸 (9.2%) 和亮氨酸 (8.8%), 半胱氨酸 (1.9%) 和色氨酸 (1.3%) 含量最少; 脂肪族指数为 80.66, 不稳定系数为 47.06。预测 CqCIPK7 蛋白为一种不稳定的碱性蛋白质。

**2.2.2 CqCIPK7 蛋白的保守结构域及亚细胞定位预测** 结构域预测结果显示, 该蛋白质在第 28~290 个氨基酸之间含有一个 S<sub>TKc</sub> 保守结构域, 为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶区; 在第 341~364 个氨基酸之间含有一个 NAF 保守结构域, 为与 CBLs 互作的调控结构域。亚细胞定位预测结果表明, CqCIPK7 蛋白可能定位于叶绿体基质、叶绿体类囊体膜、叶绿体类囊体空间和微体 (过氧化物酶体), 概率分别为 91.8%、70.4%、67.1% 和 30.0%。

**2.2.3 CqCIPK7 蛋白的二级结构和三级结构预测** 二级结构预测结果显示, CqCIPK7 蛋白主要由  $\alpha$  螺旋、延伸链和无规则卷曲组成, 其中无规则卷曲比例最大, 为 49.15%, 其次是  $\alpha$  螺旋占 29.70%, 延伸链比例最小, 为 21.15%。三级结构预测结果与二级结构预测结果基本一致, CqCIPK7 蛋白的空间结构以无规则卷曲为主, 含有少量  $\alpha$  螺旋和延伸链。

**2.2.4 CqCIPK7 蛋白的亲水性分析** 利用 ProtScale 在线分析 CqCIPK7 蛋白的亲水性, 结果显示, 在第 226 位具有最高分值, 为 3.111, 疏水性最强; 在第 371 位和 372 位具有最低分值, 为 -3.644, 亲水性最强。该蛋白质的亲水性平均值为 -0.315, 表明 CqCIPK7 蛋白是一种亲水性蛋白质。同时, 此蛋白质没有信号肽, 属于非分泌蛋白质。

**2.2.5 CqCIPK7 蛋白的同源性及系统进化关系分析** 在 NCBI 数据库通过 BLASTP 比对得到菠菜 SoCIPK7 (*Spinacia oleracea*, XP\_021838560.1)、甜菜 BvCIPK7 (*Beta vulgaris*, XP\_010669683.1)、苹果 MdCIPK7 (*Malus domestica*, NP\_001315663.1)、青蒿 AaCIPK7 (*Artemisia annua*, PWA86146.1)、棉花 GhCIPK7 (*Gossypium hirsutum*, XP\_016729098.1)、拟南芥 AtCIPK7 (*Arabidopsis thaliana*, NP\_188940.1)、黄瓜 CsaCIPK7 (*Cucumis sativus*, KGN56923.1)、番茄 SlCIPK7 (*Solanum lycopersicum*, XP\_004247630.1)、核桃 JrcIPK7 (*Juglans regia*, XP\_018818635.1) 和榴莲 DzCIPK7 (*Durio zibethinus*, XP\_022761105.1) 蛋白的氨基酸序列, 并与藜麦 CqCIPK7 蛋白的氨基酸序列进行同源性比对, 序列一致性分别为 89.04%、82.57%、54.14%、54.25%、55.65%、51.78%、58.07%、55.62%、50.34% 和 55.00%, 表现出不同的同源性。

系统进化树分析结果显示, 藜麦 CqCIPK7 蛋白与同科植物菠菜 SoCIPK7 蛋白和甜菜 BvCIPK7 蛋白处于同一分支, 同源性最高, 亲缘关系最近。而 CqCIPK7 蛋白与其他植物 CIPK7 蛋白的进化距离较长, 处于不同分支, 遗传关系较远。

### 2.3 CqCIPK7 基因组织特异性表达

RT-qPCR 结果表明, CqCIPK7 基因在藜麦种子、根、茎、叶、

花序中均有表达, 但具有明显的组织表达特异性。在根中表达量最高, 且显著高于其他组织, 其次是茎和花序, 在叶和种子中表达量最低, 分别约为根的 0.5 倍和 0.4 倍。

### 2.4 CqCIPK7 基因在盐胁迫下的表达

盐胁迫对 CqCIPK7 基因表达产生一定的影响。试验结果显示, 该基因的表达量随着盐胁迫时间的延长而逐渐增加, 呈上调表达模式, 处理 6 h 与对照之间表达量差异不显著, 处理 12 h 和 24 h 的表达量均显著高于对照。说明 CqCIPK7 基因可能参与了盐胁迫响应过程。

## 3 讨论

植物经过长期的进化历程, 形成了一系列复杂且高度协调的信号途径, 以应对不利的生长环境。钙信号参与多种植物信号转导途径,  $Ca^{2+}$  在植物胁迫信号转导中的作用已被证实<sup>[35-38]</sup>。CBL-CIPK 蛋白在  $Ca^{2+}$  信号通路中起重要的调控作用, 影响植物生长发育, 并参与生物和非生物胁迫响应<sup>[1]</sup>。目前, 已在拟南芥<sup>[39]</sup>、水稻<sup>[1]</sup>、玉米<sup>[18,31]</sup>、甘蔗<sup>[20]</sup> 和油菜<sup>[40]</sup> 等作物中对 CBL 和 CIPK 进行了鉴定和功能验证, 但关于藜麦 CBL 和 CIPK 的研究至今还没有报道。本研究从藜麦中克隆到一个蛋白激酶基因, 命名 CqCIPK7。生物信息学分析结果表明, CqCIPK7 蛋白属于亲水性不稳定碱性蛋白质, 也是一种非分泌型蛋白质, 相对分子质量  $5.13 \times 10^4$ , 理论等电点 9.33; 该蛋白质包含 2 个保守结构域, 即 N 末端 S<sub>TKc</sub> 激酶结构域和 C 末端 NAF 调控结构域, 与前人在玉米<sup>[3]</sup>、二穗短柄草<sup>[30]</sup>、小麦<sup>[2]</sup>、茄子<sup>[41]</sup> 等作物上的研究结果一致。CqCIPK7 蛋白定位于叶绿体基质 (概率 91.8%)、叶绿体类囊体膜 (70.4%) 和叶绿体类囊体空间 (67.1%), 而拟南芥 AtCIPK1 定位于细胞质、细胞膜和细胞核, 这种差异可能与 CIPK 互作的 CBL 有关<sup>[42]</sup>。CqCIPK7 蛋白与亲缘关系较近物种 (如菠菜和甜菜) 相应蛋白质的同源性在 80% 以上, 而与亲缘关系较远物种相应蛋白质的同源性只有 50% 左右, 说明不同物种间 CIPK7 蛋白的保守性一般。

CIPK 基因的表达受植物发育时期和取样部位的不同而呈现不同的表达模式。油菜 BnCIPK9 在叶片中表达量最高, 其次是茎, 在角果皮、花和芽中表达量较低, 在种子和根中几乎不表达<sup>[43]</sup>。拟南芥 AtCIPK25 在花中表达量最高, 其次是根和茎, 在叶片中表达量最低<sup>[44]</sup>。本研究结果表明藜麦 CqCIPK7 基因具有明显的组织表达特异性, 在根中表达量最高, 其次是茎和花序, 在叶片和种子中表达量最低, 推测该基因可能参与了藜麦根系的生长发育过程。

CIPK 是植物非生物胁迫信号通路的重要组成部分, 在响应非生物胁迫过程中发挥着重要的调控作用。将油菜 BnCIPK6 基因转入拟南芥增强了其耐盐性、耐低钾性及对 ABA 的敏感性<sup>[45]</sup>。SlCIPK24 的过量表达增强了转基因番茄植株的耐盐性<sup>[46]</sup>。GhCIPK6 的过表达显著提高了转基因拟南芥对盐、干旱和 ABA 胁迫的耐受性<sup>[47]</sup>。本研究结果表



明, *CqCIPK7* 受盐胁迫诱导后上调表达, 其表达量在盐胁迫处理 24 h 内处于持续上升状态, 并且在 12 h 时就已经显著高于对照。因此, 推测 *CqCIPK7* 基因可能在藜麦耐盐胁迫过程中发挥着重要作用, 但关于其功能验证及调控机理解析有待于进一步研究。

## 参考文献:

- [1] XIANG Y, HUANG Y M, XIONG L Z. Characterization of stress-responsive *CIPK* genes in rice for stress tolerance improvement [J]. *Plant Physiology*, 2007, 144: 1416-1428.
- [2] DENG X M, HU W, WEI S Y, et al. *TaCIPK29*, a CBL-interacting protein kinase gene from wheat, confers salt stress tolerance in transgenic tobacco [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69881. doi: 10.1371/journal.pone.0069881.
- [3] CHEN X J, HUANG Q S, ZHANG F, et al. *ZmCIPK21*, a maize CBL-interacting kinase, enhances salt stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(8): 14819-14834.
- [4] JIN X, SUN T, WANG X T, et al. Wheat CBL-interacting protein kinase 25 negatively regulates salt tolerance in transgenic wheat [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28884.
- [5] TANG Q, CHEN Z Z, ZHOU X F, et al. Over-expressing of *SOS* (*salt overly sensitive*) genes increases salt tolerance in transgenic arabidopsis [J]. *Molecular Plant*, 2009, 2: 22-31.
- [6] HASEGAWA K, LI Y F. Explosion investigation of asphalt-salt mixtures in a reprocessing plant [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2000, 79(3): 241-267.
- [7] RUIZ-LOZANO J M, PORCEL R, AZCON C, et al. Regulation by arbuscular mycorrhizae of the integrated physiological response to salinity in plants: new challenges in physiological and molecular studies [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(11): 4033-4044.
- [8] SHI H Z, XIONG L M, STEVENSON B, et al. The *Arabidopsis salt overly sensitive 4* mutants uncover a critical role for vitamin B6 in plant salt tolerance [J]. *Plant Cell*, 2002, 14(3): 575-588.
- [9] RAJENDRAN K A, TESTER M, ROY S J. Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2009, 32: 237-249.
- [10] KIM M J, SHIN R, SCHACHTMAN D P. A nuclear factor regulates abscisic acid responses in arabidopsis [J]. *Plant Physiology*, 2009, 151: 1433-1445.
- [11] ASANO T, HAKATA M, NAKAMURA H, et al. Functional characterisation of *OsCPK21*, a calcium-dependent protein kinase that confers salt tolerance in rice [J]. *Plant Molecular Biology*, 2011, 75: 179-191.
- [12] KUDLA J, XU Q, HARTER K, et al. Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(8): 4718-4723.
- [13] LIU J, ZHU J K. A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance [J]. *Science*, 1998, 280: 1943-1945.
- [14] ALBRECHT V, RITZ O, LINDER S, et al. The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in  $Ca^{2+}$ -regulated kinases [J]. *The EMBO Journal*, 2001, 20: 1051-1063.
- [15] BATISTIC O, KUDLA J. Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network [J]. *Planta*, 2004, 219: 915-924.
- [16] KOLUKISAOGU U, WEINL S, BLAZEVIĆ D, et al. Calcium sensors and their interacting protein kinases: Genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks [J]. *Plant Physiology*, 2004, 134(1): 43-58.
- [17] CHEN X F, GU Z M, LIU F, et al. Molecular analysis of rice *CIPKs* involved in both biotic and abiotic stress responses [J]. *Rice Science*, 2011, 18(1): 1-9.
- [18] CHEN X F, GU Z M, XIN D D, et al. Identification and characterization of putative *CIPK* genes in maize [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2011, 38(2): 77-87.
- [19] WEINL S, KUDLA J. The CBL-CIPK  $Ca^{2+}$ -decoding signaling network: function and perspectives [J]. *New Phytologist*, 2009, 184(3): 517-528.
- [20] SU W H, HUANG L, LING H, et al. Sugarcane calcineurin B-like (CBL) genes play important but versatile roles in regulation of responses to biotic and abiotic stresses [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 167.
- [21] ZHANG H F, YANG B, LIU W Z, et al. Identification and characterization of CBL and CIPK gene families in canola (*Brassica napus* L.) [J]. *BMC Plant Biology*, 2014, 14: 8.
- [22] MARTINEZ-ATIENZA J, JIANG X Y, GARCIADEBLAS B, et al. Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice [J]. *Plant Physiology*, 2007, 143: 1001-1012.
- [23] KUDLA J, BATISTIC O, HASHIMOTO K. Calcium signals: the lead currency of plant information processing [J]. *Plant Cell*, 2010, 22(3): 541-563.
- [24] QUAN R D, LIN H X, MENDOZA I, et al. SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect *Arabidopsis* shoots from salt stress [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(4): 1415-1431.
- [25] PANDEY G K, KANWAR P, SINGH A, et al. Calcineurin B-like protein-interacting protein kinase CIPK21 regulates osmotic and salt stress responses in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2015, 169: 780-792.
- [26] DENG X M, HU W, WEI S, et al. *TaCIPK29*, a CBL-interacting protein kinase gene from wheat, confers salt stress tolerance in transgenic tobacco [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e69881. doi: 10.1371/journal.pone.0069881.
- [27] DENG X M, ZHOU S Y, HU W, et al. Ectopic expression of wheat *TaCIPK14*, encoding a calcineurin B-like protein-interacting protein kinase, confers salinity and cold tolerance in tobacco [J].

- Physiologia Plantarum, 2013, 149: 367-377.
- [28] WANG R K, LI L L, CAO Z H, et al. Molecular cloning and functional characterization of a novel apple *MdCIPK6L* gene reveals its involvement in multiple abiotic stress tolerance in transgenic plants [J]. Plant Molecular Biology, 2012, 79: 123-135.
- [29] ZHAO J F, SUN Z F, ZHENG J, et al. Cloning and characterization of a novel CBL-interacting protein kinase from maize [J]. Plant Molecular Biology, 2009, 69(6): 661-674.
- [30] LUO Q C, WEI Q H, WANG R B, et al. BdCIPK31, a calcineurin B-like protein-interacting protein kinase, regulates plant response to drought and salt stress [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1184.
- [31] SAAD-ALLAH K M, YOUSSEF M S. Phytochemical and genetic characterization of five quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) genotypes introduced to Egypt [J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2018, 24(4): 617-629.
- [32] JARVIS D E, HO Y S, LIGHTFOOT D J, et al. The genome of *Chenopodium quinoa* [J]. Nature, 2017, 542: 307-312.
- [33] LIU J X, WANG R M, LIU W Y, et al. Genome-wide characterization of heat-shock protein 70s from *Chenopodium quinoa* and expression analyses of *Cqhsp70s* in response to drought stress [J]. Genes, 2018, 9: 35.
- [34] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method [J]. Methods, 2001, 25: 402-408.
- [35] KNIGHT H, TREWAVAS A J, KNIGHT M R. Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation [J]. Plant Cell, 1996, 8(3): 489-503.
- [36] RUDD J J, FRANKLIN-TONG V E. Unravelling response-specificity in  $Ca^{2+}$  signalling pathways in plant cells [J]. New Phytologist, 2001, 151: 7-33.
- [37] SANDERS D, BROWNLEE C, HARPER J F. Communicating with calcium [J]. Plant Cell, 1999, 11(4): 691-706.
- [38] STEINHORST L, KUDLA J. Signaling in cells and organisms-calcium holds the line [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2014, 22: 14-21.
- [39] KOLUKISA OGLU U, WEINL S, BLAZEVIĆ D, et al. Calcium sensors and their interacting protein kinases: Genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks [J]. Plant Physiology, 2004, 134(1): 43-58.
- [40] ZHANG H F, YANG B, LIU W Z, et al. Identification and characterization of CBL and CIPK gene families in canola (*Brassica napus* L.) [J]. BMC Plant Biology, 2014, 14: 8.
- [41] LI J, JIANG M M, REN L, et al. Identification of *CBL* and *CIPK* gene families in eggplant (*Solanum melongena* L.) [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2016, 291: 1769-1781.
- [42] D'ANGELO C, WEINL S, BATISTIC O, et al. Alternative complex formation of the  $Ca^{2+}$ -regulated protein kinase CIPK1 controls abscisic acid-dependent and independent stress responses in *Arabidopsis* [J]. The Plant Journal, 2006, 48(6): 857-872.
- [43] GUO Y L, HUANG Y, GAO J, et al. CIPK9 is involved in seed oil regulation in *Brassica napus* L. and *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. [J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11: 124.
- [44] KUMAR MEENA M, KUMAR VISHWAKARMA N, TRIPATHI V, et al. CBL-interacting protein kinase 25 contributes to root meristem development [J]. Journal of Experimental Botany, 2019, 70(1): 133-147.
- [45] CHEN L, REN F, ZHOU L, et al. The *Brassica napus* Calcineurin B-Like 1/CBL-interacting protein kinase 6 (CBL1/CIPK6) component is involved in the plant response to abiotic stress and ABA signalling [J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(17): 6211-6222.
- [46] HUERTAS R, OLÍAS R, ELJAKAOUI Z, et al. Overexpression of *SISOS2* (*SICIPK24*) confers salt tolerance to transgenic tomato [J]. Plant, Cell & Environment, 2012, 35(8): 1467-1482.
- [47] HE L R, YANG X Y, WANG L C, et al. Molecular cloning and functional characterization of a novel cotton CBL-interacting protein kinase gene (*GhCIPK6*) reveals its involvement in multiple abiotic stress tolerance in transgenic plants [J]. Biochemical and Biophysical Research Communication, 2013, 435(2): 209-215.

(责任编辑:张震林)