

拟南芥 *AtCIPK23* 基因对烟草抗旱能力的影响

杨玲珑¹, 李珂¹, 鲁黎明^{1,2*}

(1 四川农业大学 农学院, 成都 611130; 2 植物生理学与生物化学国家重点实验室, 北京 100094)

摘要: 为了探索拟南芥 *AtCIPK23* 基因对烟草耐旱能力的影响, 对 3 个转 *AtCIPK23* 基因阳性纯合株系 KA13、KA14 和 KA44 与野生型烟草 K326(对照)进行了自然干旱处理, 测定离体叶片的失水速率、叶绿素含量、相对电导率、脯氨酸和可溶性糖含量, 并分析了转基因及野生型材料对活性氧的清除能力, 对活性氧清除基因 *NtSOD*、*NtCAT* 和 *NtAPX* 及干旱胁迫相关基因 *NtDREB*、*NtLEA5* 和 *NtCDPK2* 的表达量进行检测。结果表明: (1) 转基因烟草离体叶片的失水速率明显低于 K326; 自然干旱 7 d 后, 野生型 K326 出现了明显的干旱胁迫症状; 干旱 7 d 进行复水后, 转基因株系的复水存活率明显高于 K326。(2) 转基因株系中的叶绿素、脯氨酸及可溶性糖含量比 K326 显著提高, 电导率则明显降低。(3) 野生型烟草 K326 中 H_2O_2 的积累量明显高于 3 个转基因株系, 转基因株系中 ROS 清除机制的 3 个关键基因 *NtSOD*、*NtCAT* 和 *NtAPX* 被诱导上调表达。(4) 抗旱相关基因 *NtDREB*、*NtLEA5* 和 *NtCDPK2* 仅在转基因烟草中受干旱诱导。研究认为, *AtCIPK23* 基因可能具有提高植物抗旱能力的功能。

关键词: 烟草; 转基因; *AtCIPK23*; 钙信号; 干旱

中图分类号: Q789 **文献标志码:** A

Physiological Response of Transgenic Tobacco Carrying *AtCIPK23* Genes to Drought Stress

YANG Linglong¹, LI Ke¹, LU Liming^{1,2*}

(1 College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 2 State Key Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, Beijing 100094, China)

Abstract: In order to study the roles of Arabidopsis *AtCIPK23* gene played in response to drought stress, we treated three *AtCIPK23* gene transgenic lines and wide type tobacco K326 by drought stress. The leaf water loss rate, proline, chlorophyll, soluble sugar contents and electrical conductivity were measured. Meanwhile, ROS elimination ability, and gene expression of ROS elimination and drought resistance related genes were analyzed. The results showed that: (1) the water loss speed of leaves detached from transgenic lines distinctly slower than that of K326. After 7 days of drought stress treatment in natural environment, K326 plants showed yellowish and withered. The re-watering survival rate of transgenic lines was higher than that of K326 after 7 days drought stress. (2) The contents of proline, chlorophyll and soluble sugar in transgenic lines were obvious higher than that of K326. The electrical conductivity of transgenic lines leaves was significantly lower than that of K326. (3) Under drought stress, the accumulation of H_2O_2 in K326 was significantly higher than that of three transgenic lines, and three ROS elimination related

收稿日期: 2016-05-08; 修改稿收到日期: 2016-07-08

基金项目: 植物生理学与生物化学国家重点实验室开放课题(SKLPPBKF1505)

作者简介: 杨玲珑(1989-), 女, 在读硕士研究生, 主要从事烟草栽培生理研究。E-mail: 23702967@qq.com

* 通信作者: 鲁黎明, 副教授, 主要从事烟草栽培生理研究。E-mail: luliming@sicau.edu.cn

genes *NtSOD*, *NtCAT* and *NtAPX* were up-regulated only in the transgenic lines. (4) The drought resistance related genes *NtAREB*, *NtLEA5* and *NtCDPK2* were induced by drought stress in transgenic tobacco plants. These results suggest that the *AtCIPK23* gene can improve the drought stress ability of transgenic tobacco.

Key words: tobacco; transgenic plants; *AtCIPK23* gene; Ca^{2+} signal; drought stress

干旱是给农业生产造成重大威胁的自然灾害。干旱会导致农作物生长发育受到严重阻碍,给农作物的产量造成巨大的损失^[1]。因此,深入了解植物抗旱的生理机制,提高农作物的耐旱性,保证干旱胁迫下农作物的产量,具有十分重要的意义。

在分子层面,植物响应干旱胁迫可以分为两种途径,即依赖 ABA 途径和不依赖 ABA 途径。两者的区别在于,在遭受干旱胁迫时,前者会伴随着植物细胞内 ABA 含量的增加^[2]。当 ABA 含量增加时,会激发胞内的由 CDPK、MAPK 等蛋白激酶的磷酸化和去磷酸化所导致的信号转导,从而指导下游基因的表达。在此过程中, Ca^{2+} 信号转导发挥着极其重要的作用。研究表明,当 *AtCML9* 基因被敲除后,*atcml9* 突变体具有更强的抗旱能力^[3]。而 *At-CAMTA1* 基因却正调控植物的抗旱过程,其敲除后植株的抗旱能力却明显降低^[4]。CDPK 同样在植物干旱响应中发挥重要作用。*cpk3cpk6* 双突变体中,ABA 诱导气孔关闭的功能降低,导致其抗旱能力下降^[5]。另外过表达 *AtCPK4* 和 *AtCPK11* 时,植株抗旱能力增强,而 *cpk4cpk11* 双突变体的抗旱能力明显减弱^[6-7]。拟南芥 *cpk8* 及 *cpk10* 突变体对干旱表现出敏感的表型,而 *CPK8* 与 *CPK10* 的过表达植株的耐旱能力则较野生型大幅度提高^[8-9]。CBL (calcineurin B-like proteins) 也参与了植物的干旱胁迫响应,如 *AtCBL5* 正调控不依赖于 ABA 抗旱途径,当其过表达时,植株的抗旱能力明显提高^[10]; *AtCBL9* 的表达受 ABA 的诱导,同时,其敲除突变体则表现出对渗透胁迫的敏感^[11]。

此外,CIPK(CBL-interacting protein kinase)蛋白也参与了植物的干旱胁迫响应。研究发现,*AtCIPK6* 基因的表达受干旱胁迫的强烈诱导^[12]; 在干旱条件下 *AtCBL1/9* 与 *AtCIPK1* 的互作能力增强,有利于平衡干旱条件下细胞内的渗透压^[13-14]。过表达 *OsCIPK23* 基因后,水稻中抗旱相关基因被诱导表达,而 *OsCIPK23* 基因表达量的降低,则导致水稻植株的抗干旱能力降低^[15]。

AtCIPK23 基因在拟南芥应答低钾胁迫时起关键作用^[16-17],然而,其在干旱胁迫响应中的作用尚不清楚。因此,本文通过将 *AtCIPK23* 转入烟草,

并研究转基因植株的抗旱性,以为 *AtCIPK23* 的抗旱功能研究提供借鉴。

1 材料和方法

1.1 试验材料

普通烟草 K326,转 *AtCIPK23* 基因烟草株系 KA13、KA14 和 KA44 均由植物生理学与生物化学国家重点实验室武维华教授实验室提供。

1.2 烟草的培养及样品采集

烟草种子经表面消毒后,播种于花盆中,并置于温度为 25 ℃,相对湿度为 60%~80% 的大棚中培养。正常供水条件下生长 40 d 之后,进行自然干旱胁迫处理,即停止浇水 12 d,然后复水,并统计复水成活率。

在干旱处理后的第 7 天,各材料分别采集 10 株烟草的叶片,进行相关生理指标的测定。

1.3 生理指标的测定方法

1.3.1 叶片失水率 摘取生长 30 天的烟草同一部位叶片,置于 25~35 ℃ 环境下,自然风干 12 h。每小时测 1 次样品重量,重复 3 次。叶片失水率=(鲜重-风干后重量)/鲜重×100%

1.3.2 相对电导率 在每片叶片上取 10 个直径为 10 mm 的圆形样品,置于 10 mL ddH₂O 中浸泡 12 h 后用电导仪测定电导率(R1),然后沸水浴孵育 30 min 后,再次测定电导率(R2),每个品种重复 3 次。相对电导率=R1/R2×100%。

1.3.3 叶绿素含量 选取同一部位的叶片,使用叶绿素测量仪 SPAD,对叶片的 5 个不同部位进行叶绿素含量测定,计算平均值。

1.3.4 DAB 染色 将叶片置于含有 20% PEG 6000 的 MS 营养液中模拟干旱胁迫 12 h 后,使用 DAB(3,3'-diaminobenzidine-HCl)染色。然后,抽真空 2 min,而后室温放置 2 h,去除染色液,加入适量的脱色液(乙醇:水:冰醋酸:甘油=8:1:1:1)于 60 ℃ 烘箱中进行脱色。

1.3.5 脯氨酸和可溶性糖含量测定 脯氨酸含量的测定用酸性水合茚三酮法进行^[18],可溶性糖含量测定用蒽酮比色法进行^[19]。

1.4 基因表达量分析

采用 Trizol 法提取烟草样品的总 RNA,用

DNase 进行纯化处理。然后,取 200 ng 纯化后的总 RNA,使用 Reverse TranscriptionM-MLV 酶进行反转录,用 ddH₂O 将 cDNA 稀释 10 倍用于 qRT-PCR 实验。最后使用 QuantiTect SYBR Green PCR Kit 进行相关基因表达量分析。qRT-PCR 分析所用引物见表 1。qRT-PCR 反应体系为:cDNA 1 μ L,2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 5 μ L,Primer F (10 μ mol/L) 0.5 μ L,Primer R (10 μ mol/L) 0.5 μ L, ddH₂O 3 μ L, 总体积 10 μ L。qRT-PCR 反应程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 60 s,95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,35 个循环。

表 1 qRT-PCR 引物

Table 1 Primers for qRT-PCR

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
<i>Actin</i> -F	ATTGTAAGCAACTGGGATGATA
<i>Actin</i> -R	AGAGGTGCCTCAGTGAGAAG
<i>AtCIPK23</i> -F	TTACTTCCAAATCTTCGGCTAATGAG
<i>AtCIPK23</i> -R	GTCCCGTGGTAAGGTTCTTGTA AAA C
<i>NtSOD</i> -F	AGCTACATGACGCCATTTCC
<i>NtSOD</i> -R	CCCTGTAAAGCAGCACCTTC
<i>NtAPX</i> -F	CAAATGTAAGAGGAAACTCAGAGGA
<i>NtAPX</i> -R	AGCAACA ACTCCAGCTAATTGATAG
<i>NtCAT</i> -F	AGGTACCGCTCATTACACC
<i>NtCAT</i> -R	AAGCAAGCTTTTGACCCAGA
<i>NtDREB</i> -F	GGACCCACTTGCTGATTCTT
<i>NtDREB</i> -R	GCGCCTCCTCATCCATATAA
<i>NtLEA5</i> -F	TTGTTAGCAGGCGTGGGTAT
<i>NtLEA5</i> -R	CTCTCGCTCTTGTTGGGTTTC
<i>NtCDPK2</i> -F	AGGTGAGCTTTTCGATAGGATTATT
<i>NtCDPK2</i> -R	ACTTCTGGTGCAACATAGTAAGGAC

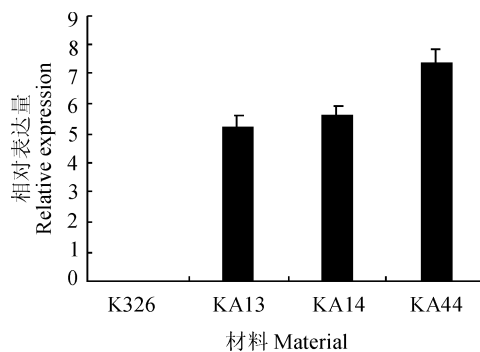
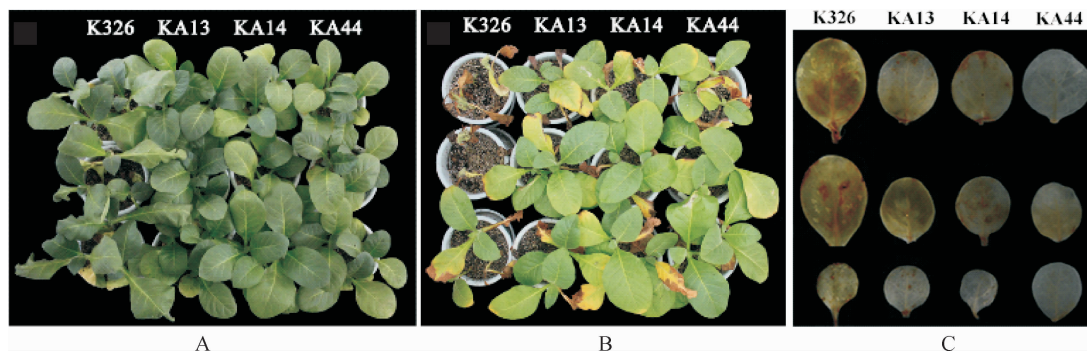
2 结果与分析

2.1 转基因烟草的分子检测

采用 qRT-PCR 的方法,对参试的转基因烟草及野生型 K326 进行了外源基因 *AtCIPK23* 的表达检测。结果表明,在野生型 K326,没有检测到外源基因 *AtCIPK23* 的表达;而在 3 个转基因株系中,*AtCIPK23* 的表达水平较高,而且,3 个株系的表达量并不相同(图 1)。由此说明,外源基因 *AtCIPK23* 在 3 个转基因烟草株系中,均得到了表达。

2.2 干旱对转基因烟草生长的影响

为了鉴定 *AtCIPK23* 转基因烟草植株的耐旱能力,将 3 个转基因株系与野生型 K326 进行了自然干旱处理。在停止浇水 7 d 后,转基因烟草植株与野生型植株的生长,表现出明显的差异(图 2, A)。3 个转基因株系植株的生长较为正常,冠部较大,叶色浓绿。而野生型植株的生长受到抑制,多数叶片萎蔫,冠部偏小,表现出干旱胁迫症状。

图 1 转基因植株 *AtCIPK23* 表达量分析Fig. 1 Expression analysis of *AtCIPK23* in three transgenic lines and K326

A、B. 干旱处理后 7 d 与复水后 5 d 烟草的长势;C. DAB 染色

图 2 干旱对转基因烟草生长的影响及 DAB 染色结果

A and B, the phenotype of tobacco after 7 days drought stress treatment and 5 days re-watering. C, DAB staining

Fig. 2 The effect of drought stress on transgenic tobacco and DAB staining

干旱 12 d 后,转基因植株也出现黄化和萎蔫现象,但野生型植株的干旱胁迫表现更为严重。此时,进行复水,5 d 之后,统计各个参试材料的复水存活率。结果表明,转基因株系 KA13、KA14 和 KA44 的复水存活率分别为 90%、87% 和 90%,明显高于野生型 K326 的 70%(图 2,B)。干旱表型分析及复水存活率的比较结果,表明了转基因植株具有较强的耐旱能力。

2.3 干旱对烟草叶片失水率及叶绿素含量的影响

为了探究 *AtCIPK23* 转基因植株较为抗旱的原因,以正常生长 30 d 的野生型 K326 和 3 个转基因株系叶片为材料,测定了离体叶片的失水率。结果表明,随着时间的延长,4 个株系的相对失水率均逐渐增加。其中野生型 K326 的相对失水率显著高于其余 3 个转基因株系(图 3,A),其相对失水率的高低顺序为 K326 > KA13 > KA14 > KA44。此结果说明,叶片的保水能力较强,可能是转基因烟草植株较为耐旱的原因之一。

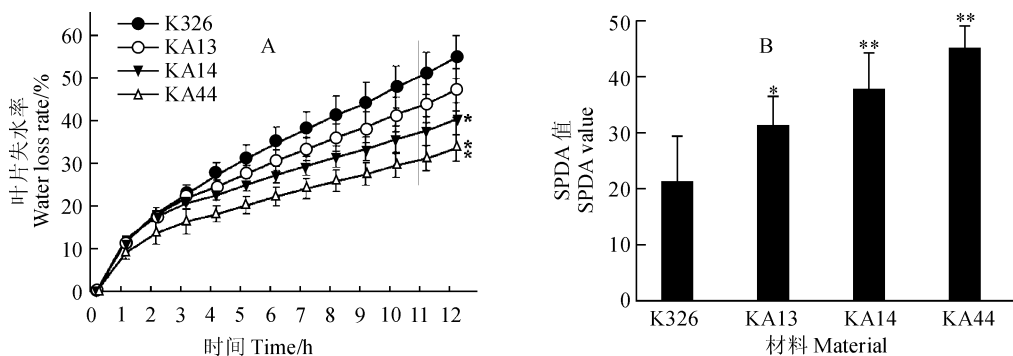
干旱 7 d 后,测定了转基因植株及野生型植株的 SPAD 值。结果表明,转基因株系的 SPAD 值显

著高于野生型 K326(图 3,B)。SPAD 值的高低顺序为 KA44 > KA14 > KA13 > K326。由于 SPAD 值在一定程度上反映了叶绿素含量的高低,因此,本结果也说明,在干旱胁迫下,转基因植株具有较高的叶绿素含量。而叶绿素含量较高,则意味着转基因植株具有较强的光合能力。

2.4 干旱对烟草叶片脯氨酸、可溶性糖含量及相对电导率的影响

脯氨酸及可溶性糖,是植物细胞的渗透调节物质,其含量的高低,在一定程度上反映了植物细胞的耐旱程度。对参试材料的脯氨酸及可溶性糖的测定结果表明,转基因材料这两个物质的含量均明显高于野生型材料(图 4)。各材料脯氨酸含量的高低顺序为 KA14 > KA13 > KA44 > K326;而可溶性糖含量的高低顺序则为 KA44 > KA14 > KA13 > K326。渗透调节物质的测定结果表明,转基因株系具有较强的渗透调节能力,因而,表现较为耐旱。

相对电导率是植物细胞质膜完整性的标志指标之一,也是植物抗逆程度的反应。本研究在停止浇水 7 d 后,测定了参试材料的相对电导率,结果表明,



A. 叶片失水率;B. 叶绿素含量(SPAD 值)

图 3 各材料叶片失水率及叶绿素含量的比较

A. Water loss rate of tobacco leaves. B. Chlorophyll content of tobacco leaves (in SPDA value)

Fig. 3 The comparison of water loss rate and chlorophyll content of transgenic tobacco and wild type

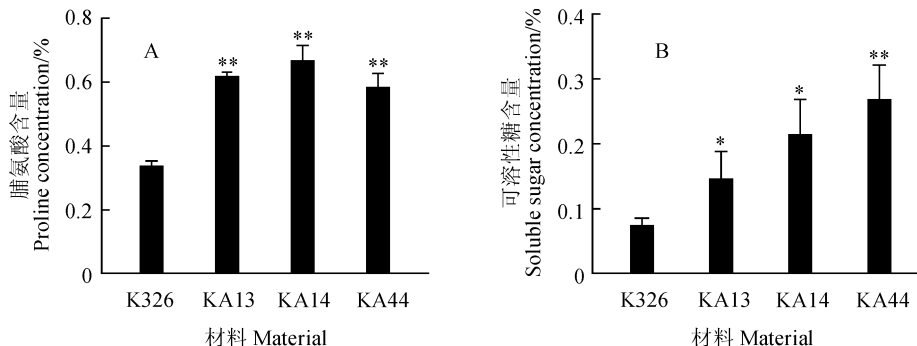


图 4 干旱对转基因烟草叶片脯氨酸(A)及可溶性糖含量(B)的影响

Fig. 4 The effect of drought stress on proline (A) and soluble sugar contents (B) in tobacco leaves

野生型材料的相对电导率(45%),显著高于转基因株系 KA14(28%),极显著高于 KA13(18%) 和 KA44(18%)。相对电导率测定的结果进一步说明,细胞质膜较为完整,也是转基因株系耐旱能力较强的原因之一。

2.5 干旱条件下各材料细胞内活性氧清除能力的比较

模拟干旱胁迫 12 h 后,通过 DAB 染色发现, K326 叶片绝大部分区域呈现黄褐色,而转基因植株中黄褐色的区域较少,株系 KA44 的叶片几乎看不到明显的黄褐色区域(图 2, C)。此结果说明,转基因株系对的 H_2O_2 清除能力较强,从而积累的 H_2O_2 较少。

为探索转基因株系对 H_2O_2 的清除能力产生的原因,对转基因株系中编码超氧化物歧化酶和过氧化氢酶及过氧化物酶的基因 *NtSOD*、*NtCAT* 和 *NtAPX* 的表达量进行了检测。结果表明, *NtCAT* 和 *NtAPX* 基因的表达量受干旱的强烈诱导,表达量增加很多。尤其是 *NtAPX* 基因的表达量在 KA14 和 KA44 中分别提高了近 15 与 20 倍(图 5,

B、C)。同时,尽管 *NtSOD* 基因的表达量受干旱诱导表达量增加较少,但其在转基因材料中的表达量却远高于野生型 K326(图 5, A)。

此结果说明, *AtCIPK23* 基因通过提高活性氧清除相关基因的干旱响应表达水平,有效促进了转基因植株在遭遇干旱胁迫后活性氧的清除能力,使转基因植物体内活性氧的积累维持在较低的水平,从而有利于提高转基因材料对干旱的耐受能力。

2.6 干旱条件下抗旱相关基因的诱导表达情况

采用 qRT-PCR 的方法,对干旱前后参试材料中 3 个干旱相关基因 (*NtDREB*、*NtLEA5* 和 *NtCDPK2*) 的表达量进行了分析,结果如图 6 所示。干旱处理前, *NtDREB*、*NtLEA5* 和 *NtCDPK2* 在转基因材料中的表达量均高于野生型 K326,其中以 *NtCDPK2* 增加的量最多, *NtDREB* 次之, *NtLEA5* 基因的表达量增加最小。干旱处理后,所检测的 3 个基因的表达量在转基因材料中均有较大幅度提高,其中,以 *NtDREB* 受诱导表达最为强烈,以 *NtCDPK2*、*NtLEA5* 基因的受诱导表达量最小。同时,检测的结果还表明,所检测的 3 个基因在不同

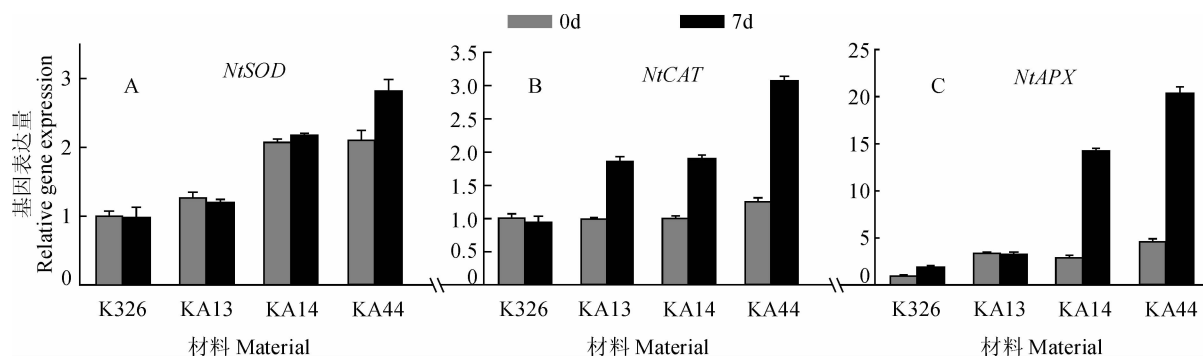


图 5 *NtSOD*、*NtCAT* 和 *NtAPX* 基因表达量分析

Fig. 5 Gene expression analysis of *NtSOD*, *NtCAT* and *NtAPX*

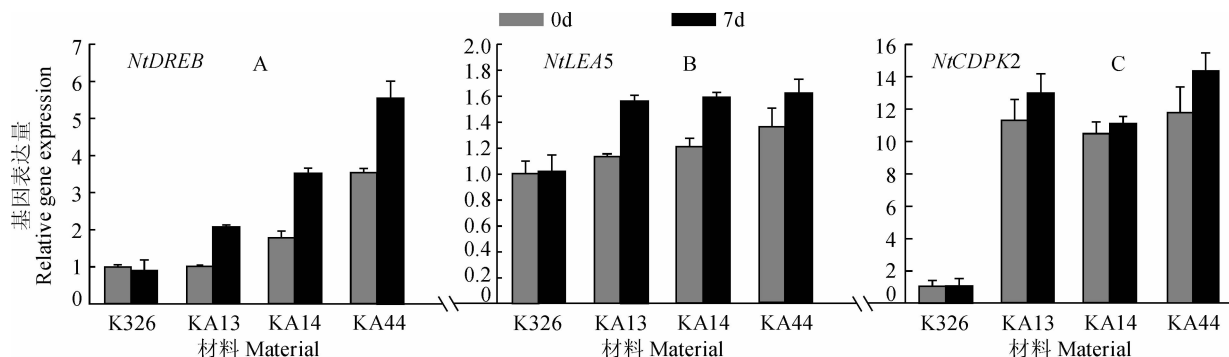


图 6 干旱胁迫前后 3 个干旱相关基因的表达量分析

Fig. 6 Expression profiles of 3 drought relative genes in WT and transgenic lines at 0 and 7 days after drought stress

转基因株系中的表达量不同,其中,以 *NtDREB* 在 3 个转基因株系中的表达量差异较大,趋势呈现为 $KA44 > KA14 > KA13$;而 *NtCDPK2* 和 *NtLEA5* 的表达量,无论干旱前后,在 3 个株系之间的差异均不大。

干旱相关基因表达量检测结果说明, *AtCIPK23* 基因促进了这 3 个基因的表达,并有可能导致了转基因材料抗旱性的提高。

3 讨 论

本研究通过对转 *AtCIPK23* 基因烟草及野生型 K326 进行自然干旱,探讨了各参试材料的耐旱性。结果表明,转 *AtCIPK23* 基因的烟草植株具有较强的耐旱性。

Ca^{2+} 作为细胞内的第二信使,广泛参与并调节了植物的生长、发育和抗逆等各项生命活动^[7,20]。在植物响应干旱胁迫的过程中,钙信号蛋白发挥了十分重要的作用^[3-8,11]。CIPK 蛋白是一类在植物体内发挥重要作用的蛋白^[20-23],也参与了植物的逆境响应^[12,15]。研究表明,CBL1/CBL9-CIPK23-AKT1 途径遭到抑制时,保卫细胞气孔开度降低,从而有效减少了植物的水分散失,间接提高了植物的抗旱能力^[16]。此结果说明,*AtCIPK23* 可能参与了植物的干旱逆境响应。本研究的结果表明,在干旱胁迫下,*AtCIPK23* 转基因烟草表现出了较为耐旱的表型。其叶片水分散失的速率较低、细胞膜的完整性较好,叶绿素含量较高,均有利于干旱环境中水分的吸收与保持、保护细胞内正常的生理生化反应,从而使转基因植株对于旱具有更强的耐受性。

在植物的干旱响应中,渗透调节物质发挥着十分重要的作用。前人的研究结果说明,渗透调节物质的积累有利于对胁迫下植物体内产生的活性氧和自由基的清除、细胞渗透势的降低以及叶片水分含量的维持^[24]。本研究的结果也证实了转基因植株

积累了较多的脯氨酸及可溶性糖等渗透调节物质,这些物质的含量较高,可能也是导致转基因烟草具有较强的耐旱能力的原因之一。

植物在逆境胁迫时,会产生活性氧物质 ROS (reactive oxygen species, ROS)。ROS 如果不及时清除,则会攻击植物细胞的 DNA、蛋白质及膜脂质等生物大分子,从而使植物细胞不能够正常行使功能,导致植物生长受到影响,并降低农作物的产量与品质^[25]。SOD、POD、CAT 和 APX 等保护酶类,构成了植物的活性氧清除系统。它们在植物体内共同发挥作用,能够减轻 ROS 对植物细胞的伤害^[26-29]。Zhou 等^[8]的研究结果证实,CKP8 能够调节 CAT3 的活性,提高拟南芥对 ROS 的清除能力,从而提高了拟南芥的抗旱性。本研究也得出了类似的研究结果。DAB 染色的结果显示,过表达 *AtCIPK23* 的烟草植株对 ROS 的清除能力强于野生型,同时,其 *NtSOD*、*NtCAT* 和 *NtAPX* 基因的表达量明显提升,暗示了对 ROS 的清除能力较强,是转 *AtCIPK23* 的烟草植株抗旱能力增强的重要原因。

干旱相关基因的诱导表达,与植物的耐旱性密切相关。在干旱胁迫下,*OsCIPK23* 过表达植株的干旱相关基因 *DREB2A*、*rd29A*、*Rab18* 及 *NCED3* 被强烈诱导表达^[15]。本研究的结果表明,转 *AtCIPK23* 基因烟草表现出耐旱性增强,同时,伴随着 3 个干旱相关基因 *NtDREB*、*NtLEA5* 和 *NtCDPK2* 在转基因植株内表达量的急剧上升。这就说明,CIPK 蛋白在不同的物种内可能采取类似的机制参与了植物对干旱胁迫的响应。

本研究的结果证实,*AtCIPK23* 能够增强烟草的耐旱能力。然而,植物对外界干旱胁迫的分子响应,是一个较为复杂的过程。*AtCIPK23* 究竟是如何调控烟草细胞的生理生化活动,从而实现其耐旱能力的增强,尚待进一步研究。

参考文献:

[1] BRAY E A, BAILEY-SERRES J, WERETILNYK E. "Responses to abiotic stresses," in Biochemistry and Molecular Biology of Plants[M]. B. B. Buchanan, W. Gruissem, and R. L. Jones (Rockville: American Society of Plant Physiologists), 2000, 1 158-1 203.

[2] SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Gene expression and signal transduction in water stress response[J].

Plant Physiology, 1997, 115:327-334.

[3] MAGNAN F, RANTY B, CHARPENTEAU M, et al. Mutations in *AtCML9*, a calmodulin-like protein from *Arabidopsis thaliana*, alter plant responses to abiotic stress and abscisic acid[J]. *Plant Journal*, 2008, 56: 575-589.

[4] PANDEY N, RANJAN A, PANT P, et al. CAMTA1 regulates drought responses in *Arabidopsis thaliana*[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 216.

- [5] BOUDSOCQ M, and SHEEN J. CDPKs in immune and stress signaling[J]. *Trend in Plant Science*, 2013, **18**(1): 30-40.
- [6] CHOI H I, PARK H J, PARK J H, *et al.* Arabidopsis calcium-dependent protein kinase AtCPK32 interacts with ABF4, a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, and modulates its activity[J]. *Plant Physiology*, 2005, **139**(4): 1 750-1 761.
- [7] ZHU S Y, YU X C, WANG X J, *et al.* Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2007, **19**: 3 019-3 036.
- [8] ZOU J J, LI X D, RATNASEKERA D, *et al.* Arabidopsis CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE8 and CATALASE3 function in abscisic acid-mediated signaling and H₂O₂ homeostasis in stomatal guard cells under drought stress[J]. *Plant Cell*, 2015, **27**: 1 445-1 460.
- [9] ZOU J J, WEI F J, WANG C, *et al.* Arabidopsis calcium-dependent protein kinase CPK10 functions in abscisic acid- and Ca²⁺-mediated stomatal regulation in response to drought stress[J]. *Plant Physiology*, 2010, **154**: 1 232-1 243.
- [10] CHEONG Y H, SUNG S J, KIM B G, *et al.* Constitutive overexpression of the calcium sensor CBL5 confers osmotic or drought stress tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Molecular Cells*, 2010, **29**(2): 159-165.
- [11] PANDEY G K, CHEONG Y H, KIM K N, *et al.* The calcium sensor calcineurin B-like 9 modulates abscisic acid sensitivity and biosynthesis in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2004, **16**(7): 1 912-1 924.
- [12] CHEN L, WANG Q Q, ZHOU L, *et al.* Arabidopsis CBL-interacting protein kinase (CIPK6) is involved in plant response to salt/osmotic stress and ABA[J]. *Molecular Biology Reports*, 2013, **40**(8): 4 759-4 767.
- [13] CHEONG Y H, KIM K N, *et al.* CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2003, **15**(8): 1 833-1 845.
- [14] THODAY-KENNEDY E L, JACOB A K, ROY S J. The role of the CBL-CIPK calcium signalling network in regulating ion transport in response to abiotic stress[J]. *Plant Growth Regulation*, 2015, **76**(1): 3-12.
- [15] YANG W Q, KONG Z S, OMO IKERODAH E, *et al.* Calcineurin B-like interacting protein kinase OsCIPK23 functions in pollination and drought stress responses in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2008, **35**(9): 531-543.
- [16] CHEONG Y H, PANDEY G K, *et al.* Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in *Arabidopsis*[J]. *Plant Journal*, 2007, **52**(2): 223-239.
- [17] XU J, LI H D, CHEN L Q, *et al.* A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K⁺ transporter AKT1 in *Arabidopsis*[J]. *Cell*, 2006, **125**(7): 1 347-1 360.
- [18] CLAUSSEN W. Proline as a measure of stress in tomato plants[J]. *Plant Science*, 2005, **168**: 241-248.
- [19] YANG D L, JING R L, CHANG X P, *et al.* Identification of quantitative trait loci and environmental interactions for accumulation and remobilization of water-soluble carbohydrates in wheat (*Triticum aestivum* L.) stems[J]. *Genetics*, 2007, **176**(1): 571-584.
- [20] MORI I C, MURATA Y, YANG Y, *et al.* CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion and Ca²⁺-permeable channels and stomatal closure[J]. *PLoS Biology*, 2006, **4**: 327.
- [21] KIM K N, CHONG Y H, GUPTA R, *et al.* Interaction specificity of *Arabidopsis* calcineurin B-like calcium sensors and their target kinases[J]. *Plant Physiology*, 2000, **124**: 1 844-1 853.
- [22] BATISTIC O, and KUDLA J. Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK proteins kinase network[J]. *Planta*, 2004, **219**: 915-924.
- [23] 王琦, 王伟, 申腾飞, 等. 玉米中3个CIPK同源基因在干旱和低温胁迫下的表达分析[J]. 华中农业大学学报, 2011, **30**(5): 545-551.
WANG Q, WANG W, SHEN T F, *et al.* Expression analysis of three CIPKs homologous gene in maize under drought and cold stresses[J]. *Journal of Huazhong Agriculture University*, 2011, **30**(5): 545-551.
- [24] BABITA M, MAHESWARI M, RAO L M, *et al.* Osmotic adjustment, drought tolerance and yield in castor (*Ricinus communis* L.) hybrids[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2010, **69**: 243-249.
- [25] BLOKHINA O, VIROLAINEN E, *et al.* Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress; a review[J]. *Annals of Botany*, 2003, **91**(2): 179-194.
- [26] LIANG Y C, CHEN Q, *et al.* Exogenous silicon increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.)[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2003, **160**(10): 1 157-1 164.
- [27] XI D M, LIU W S, *et al.* Seed specific overexpression of antioxidant genes in *Arabidopsis* enhances oxidative stress tolerance during germination and early seedling growth[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2010, **8**(7): 796-806.
- [28] WU T H, LIAO M H, *et al.* Characterization of copper/zinc and manganese superoxide dismutase in green bamboo (*Bambusa oldhamii*): cloning, expression and regulation [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2011, **49**(2): 195-200.
- [29] LECLERCQ J, MARTIN F, SANIER C, *et al.* Over-expression of a cytosolic isoform of the *HbCuZnSOD* gene in *Hevea brasiliensis* changes its response to a water deficit[J]. *Plant Molecular Biology*, 2012, **80**(3): 255-272.