

苹果 MdCBL 家族基因表达分析及 *MdCBL1* 的功能鉴定

马齐军, 胡大刚, 由春香, 郝玉金*

(山东农业大学园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点实验室, 农业部黄淮地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 山东泰安 271018)

摘要: 利用生物信息学的方法, 对 10 个苹果 MdCBLs 家族蛋白的功能域进行预测, 并与拟南芥 AtCBLs 家族的 10 个蛋白进行了系统进化分析, 同时对苹果 *MdCBLs* 基因进行了系统的命名。利用 qRT-PCR, 检测了苹果 *MdCBLs* 基因在不同组织的表达及对非生物胁迫 (包括盐、低温、ABA、干旱) 的响应, 结果表明, *MdCBLs* 在苹果不同组织及非生物胁迫中起重要作用。另外, 通过遗传转化苹果愈伤组织鉴定了 *MdCBL1* 在盐胁迫中的功能, *MdCBL1* 过量表达明显提高了转基因愈伤组织的盐胁迫抗性。

关键词: 苹果; *MdCBLs* 家族基因; 非生物胁迫; 表达分析; *MdCBL1*; 愈伤组织

中图分类号: S 661.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 06-1053-10

Classification and Expression Analysis of Apple MdCBL Family Genes with a Functional Characterization of *MdCBL1*

MA Qi-jun, HU Da-gang, YOU Chun-xiang, and HAO Yu-jin*

(State Key Laboratory of Crop Biology, MOA Key Laboratory of Horticultural Crop Biology (Huanghuai Region) and Germplasm Innovation, College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: In this study, the functional domains of apple MdCBL family proteins were predicted with bioinformatics methods. Their phylogenetic relationship with 10 *Arabidopsis* AtCBL proteins were analyzed. They were systematically named based on the similarity to their *Arabidopsis* counterparts, respectively. Subsequently, Real-time quantitative RT-PCRs were performed to determine the expression levels of apple *MdCBLs* in different tissues and in response to various abiotic stresses including salt, low temperature, ABA and drought. Results demonstrated that *MdCBLs* may play roles in different tissues and be involved in the response to abiotic stresses in plants. Finally, *MdCBL1* was genetically transformed into apple callus. Salt-tolerance assay indicated that overexpression of *MdCBL1* remarkably increased the tolerance of transgenic apple callus to high salinity, further supporting that *MdCBLs* genes participate in the response of plants to abiotic stress.

Key words: apple; *MdCBLs* genes; abiotic stress; expression analysis; *MdCBL1*; callus

收稿日期: 2013-12-25; 修回日期: 2014-05-30

基金项目: 山东省现代农业产业技术体系项目 (SDAIT-03-022-03); 教育部长江学者和创新团队发展计划创新团队项目 (IRT1155)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: haoyujin@sdau.edu.cn; Tel: 0538-8246692)

植物时常处于各种生物胁迫和非生物胁迫中,比如光、植物激素、病原菌等(Zhang et al., 2008)。各种逆境胁迫都能作用于植物细胞,作用的后果是首先引起细胞内钙离子浓度的改变(即钙信号),钙目前被认为是最普遍的第二信使(Sanders et al., 2008)。钙参与植物的很多生命活动,比如保卫细胞气孔的开闭、花粉管的生长、根毛伸长等(Evans et al., 2001; Sanders et al., 2002)。

植物通过不同的钙感应器来应对不同的外界刺激。钙感应器大体可以分成三类:第一类是钙调素(CaM)和类钙调素蛋白(CaM-Like),第二类是钙依赖性蛋白激酶(CDPK),第三类是类磷酸酶蛋白(CBL)(Gu et al., 2008)。

本研究中主要针对第三类CBLs钙感应器。CBL家族基因可以和钙调素一样,被认为是一类钙感应器。CBL基因最初在拟南芥中被克隆出来,同酵母中钙调磷酸酶B和动物中的神经钙调传感器非常相似,因此被命名为类钙调磷酸酶B(Zhu et al., 1998)。后来在很多高等植物,如玉米、水稻、豌豆、大豆和大麦中也发现有CBL基因(Martine et al., 2007; Wang et al., 2007)。

在拟南芥中,AtCBLs家族包含10个基因。CBLs蛋白含有EF手型结构域,可以结合钙离子和特异的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(CIPKs)形成复合物,从而调节下游基因,响应外界环境刺激。目前研究表明CBL4和CIPK24可以形成复合物,从而影响CIPK24活性,调节植物对盐逆境的响应。CBL4-CIPK24复合物能够激活下游的SOS1 Na⁺/H⁺转运活性,从而把进入细胞内的钠盐排出细胞,使植物适应盐胁迫伤害(Liu et al., 2000)。研究表明,CBL10也可以与CIPK24形成复合物来响应盐逆境信号(Quan et al., 2007)。还有其他CBL和CIPK之间形成复合物,可以响应其他一系列的外界环境刺激(Luan et al., 2002; Gao et al., 2008)。在拟南芥中,SOS信号途径是植物响应盐胁迫的重要途径,已经研究的很清楚(Ahajan et al., 2008)。AtCBL1是AtCBL蛋白家族成员之一,能被低钾、干旱、盐等诱导促进一系列逆境基因的表达,抵制外来胁迫(Pandey et al., 2008)。研究发现AtCBL1和AtCIPK24互作调控植物钠离子的吸收,提高植物盐抗性(Li et al., 2009)。

对于CBLs来说,在模式植物拟南芥中的研究较多,关于木本植物苹果等果树中CBL的研究很少。研究CBLs在苹果中的作用有助于砧木改良和遗传育种,为提高苹果树对非生物胁迫的抗性提供理论基础。本研究中利用生物信息学分析,表达分析及苹果愈伤组织遗传转化等方法,对CBLs家族基因进行相关的分析,为进一步研究它们在苹果逆境响应中的功能奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 苹果CBL家族基因的确定及生物信息学的分析

从拟南芥基因组数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中下载已注册的10个AtCBLs基因,根据AtCBLs的氨基酸序列,从苹果基因网(<http://genomics.research.iasma.it/>)中检索并下载对应的苹果MdCBLs的核酸和蛋白序列。

利用MEGA4.0软件对拟南芥AtCBLs蛋白和预测的苹果MdCBLs蛋白进行序列同源性和进化树分析,并将其命名,分析MdCBLs家族基因的功能域(<http://smart.embl-heidelberg.de/>; http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat)。

1.2 总RNA的提取和qRT-PCR分析

‘嘎啦’苹果不同组织取自于山东农业大学组培室中的组培苗,果实取自南校区苹果树。2013年3月,分别用100 mmol·L⁻¹ NaCl、低温(4℃)、ABA、干旱处理组培苗,取样液氮冷冻备用。然后采用RNAplant plus Reagent试剂盒(天根公司)提取RNA,利用反转录试剂盒PrimeScript[®] RT

reagent Kit (Perfect Real Time, TaKaRa) 获得用于 qRT-PCR 的 cDNA。

通过对苹果基因组中 *MdCBLs* 家族基因序列分析, 设计定量引物 (表 1)。qRT-PCR 采用 SYBR Green I 荧光试剂发光原理, 具体方法参照 Hu 等 (2012) 的操作完成。

表 1 特异引物
Table 1 Specific primers

基因 Gene	上游引物 (5' - 3') Forward primer	下游引物 (5' - 3') Reverse primer
<i>MdCBL1</i>	ATCAAGCAGGAAGGTGGTGATA	CGTCGCTACAACCCTGTCTAAT
<i>MdCBL2</i>	GTGTGATTGGTTAGGGAATGA	CCGAGAGCAGAGACGAATAAT
<i>MdCBL3</i>	GATGGATGGTGGAATCTGA	AGAGGCTGCTCCAAGTCT
<i>MdCBL4</i>	GCACGCCGAGTTATTTATGA	ACCAAAGTGAAGGGCACAA
<i>MdCBL5</i>	TTACTGGCAATGAAGTGTGTG	CAAAACAACGGATGGCTAAGA
<i>MdCBL6</i>	CCCCAATCCAAAACAAACAT	CAACGGTCCACGAACACTAA
<i>MdCBL7</i>	TGAGCCCCACGGATTCTA	TCCCATCTCTCTCTGTCA
<i>MdCBL8</i>	CCCCAATCCAAAACAAACAT	CAACGGTCCACGAACACTAA
<i>MdCBL9</i>	CAGCCGTCCGATTACCTATT	GATTCAGAGATGCAACGAAGT
<i>MdCBL10</i>	CCCACCTCTCTCTACTAAC	GATTCAGAGATGCAACGAAGT

1.3 植物表达载体构建

参照 Wang 等 (2012) 的方法提取组培苗总 RNA, 反转录获得 cDNA, 以其为模板进行 PCR 扩增。设计 *MdCBL1* 的引物 (表 2), 进行 *MdCBL1* 的扩增, 获得 *MdCBL1* 的 ORF 序列, 用于遗传转化。10 个 *MdCBLs* 家族基因从 ‘嘎啦’ 苹果中扩增。

1.4 农杆菌介导的苹果愈伤组织遗传转化

采用 ‘王林’ 苹果的愈伤组织进行遗传转化, 固体培养基为 MS + 1.0 mg · L⁻¹ 6-BA + 1.0 mg · L⁻¹ 2,4-D + 30 g · L⁻¹ 蔗糖 + 7 g · L⁻¹ 琼脂 (pH 5.8), 每 2 周继代 1 次, 继代 2 ~ 3 次后取约 2 g 愈伤组织移入 100 mL 悬浮培养基 (不含琼脂, 其它成分与固体培养基相同), 为提高细胞的增殖能力, 在 (25 ± 1) °C 和黑暗条件下振荡培养 (110 r · min⁻¹)。继代周期为 2 周, 连续培养 2 ~ 3 代后获得生长均可的悬浮细胞系, 用于遗传转化。

苹果愈伤组织的遗传转化参照 Hu 等 (2012) 的方法进行。取继代 10 d 左右处于指数生长期的悬浮培养愈伤组织进行农杆菌侵染, 浸泡 10 min 后除去农杆菌菌液, 将愈伤组织转移至固体继代培养基上, 暗培养 2 d 后, 用无菌水清洗 3 ~ 5 次, 清除表面的农杆菌后将愈伤组织转移至含 300 mg · L⁻¹ 头孢霉素、30 mg · L⁻¹ 卡那霉素的筛选培养基上进行筛选, 继代筛选 3 ~ 5 次后获得稳定生长的抗性愈伤组织, 从中提取 DNA, 用于 PCR 鉴定。

1.5 愈伤组织鲜质量和相对电导率的测定

愈伤组织鲜质量: 用电子天平称取愈伤组织在盐处理 20 d 后的质量。

植物抗性指标相对电导率的测定: 将愈伤组织用自来水洗净后再用蒸馏水冲洗 3 次, 用滤纸吸干表面水分, 快速称取鲜样 3 份, 每份 0.1 g, 分别置于 10 mL 去离子水的刻度试管中, 盖上玻璃塞于室温下浸泡 12 h, 用相对电导仪 (Mettler Toledo Inlab[®] 738) 测定浸提液电导率 (R1), 然后沸水浴加热 30 min, 冷却至室温后摇匀, 再次测定浸提液电导率 (R2)。相对电导率 (%) = R1/R2 × 100。

2 结果与分析

2.1 苹果 CBL 家族基因序列比对与功能域分析

从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载拟南芥中的 10 个 *AtCBLs*, 以其序列搜索苹果基因组数据库, 发现苹果基因组中有 13 个同源的 *MdCBLs* 基因。功能域分析发现, 其中 10 个 *MdCBLs* 蛋白均含有 4 个保守的螺旋—环—螺旋 EF 手形结构域 (Lewit & Pety, 2000), 该结构域含有 12 个氨基酸; 这 10 个 *MdCBL* 蛋白均含有激活域 (图 1)。而另外 3 个, *MDP0000188435*、*MDP0000295085* 和 *MDP0000464276* 编码蛋白中没有 EF 结构域, 因此这 3 个基因并不是 *MdCBLs* 家族基因。

将 10 个 *MdCBLs* 家族蛋白与 *AtCBLs* 家族蛋白进行亲缘关系分析。系统进化树 (图 2) 表明, 10 个 *MdCBLs* 家族基因与 *AtCBLs* 家族基因同源关系很近。根据它们的亲缘关系对每个 *MdCBLs* 家族基因进行了系统的命名。这 10 个 *MdCBLs* 家族基因从 ‘嘎啦’ 苹果中扩增, 发现 4 个 *MdCBLs* 编码的蛋白与基因组数据库预测的序列有差异, *MdCBL1*、*MdCBL4*、*MdCBL6* 和 *MdCBL8* 分别比对应的预测蛋白短了 280、137、191 和 191 个氨基酸 (表 2)。

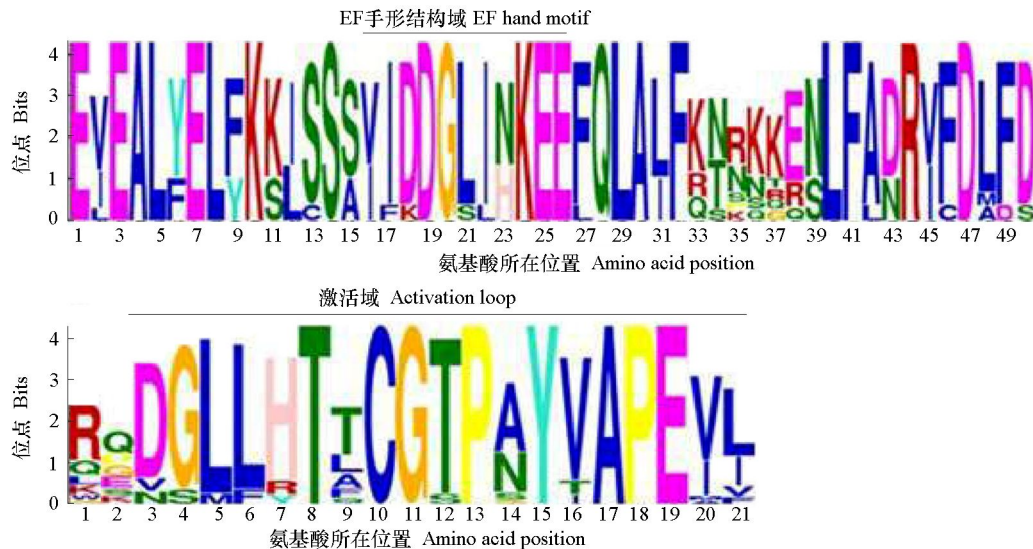


图 1 苹果 *MdCBLs* 功能域分析

Fig. 1 Schematic diagram of the structures for *MdCBLs*' conserved function domains

表 2 扩增引物及氨基酸数

Table 2 PCR primers and amino acid numbers of *MdCBLs* genes and proteins

基因 Gene	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer	氨基酸数/aa Amino acid number		
			PCR	基因组预测 Predict	拟南芥同源蛋白 Homologus
<i>MdCBL1</i>	GCTGCCAGTTACAAGATTGCG	CAACATACCGATTTCATTCCCT	434	714	213
<i>MdCBL2</i>	CAGGTATGGAGTGTTTTGATCTG	GCAATTGTTTATTCGCCATGAC	250	250	226
<i>MdCBL3</i>	GATGGTGGAATACTGAGGGAC	CAGACTACATATACACGTACCTT	284	284	223
<i>MdCBL4</i>	CGGCTATCTAGTACATGAGGGG	TTAAGCACCTCACTCCCAAACC	297	434	256
<i>MdCBL5</i>	CTTAGCCATCCGTTGTTTGTGTC	TCGCAACTTCATCTTAAACTCG	257	257	223
<i>MdCBL6</i>	CGACTACAAACATAAGGTCCTC	CATTCTTCAGAAACGTGCAACC	226	417	227
<i>MdCBL7</i>	TCTGGGATATTGTTGTAGGAAG	GTGCGCTATGATTGGCTTCTG	353	353	223
<i>MdCBL8</i>	CGACTACAAACATAAGGTCCTC	CTACTAGGCCCTTTTACACAAGT	226	417	227
<i>MdCBL9</i>	TGGTGTGTTAGGTAGATGCTC	AACCCGACTTMCCCAAGCAAG	214	214	213
<i>MdCBL10</i>	AGCTGAACCTTTGGTGTGTTAG	CCGATTTCATTCCGTTTCCTTT	214	214	213

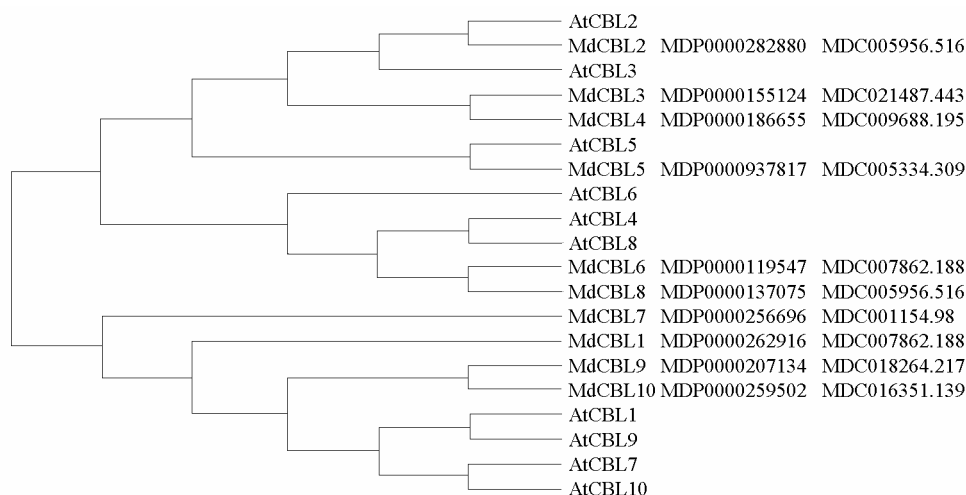
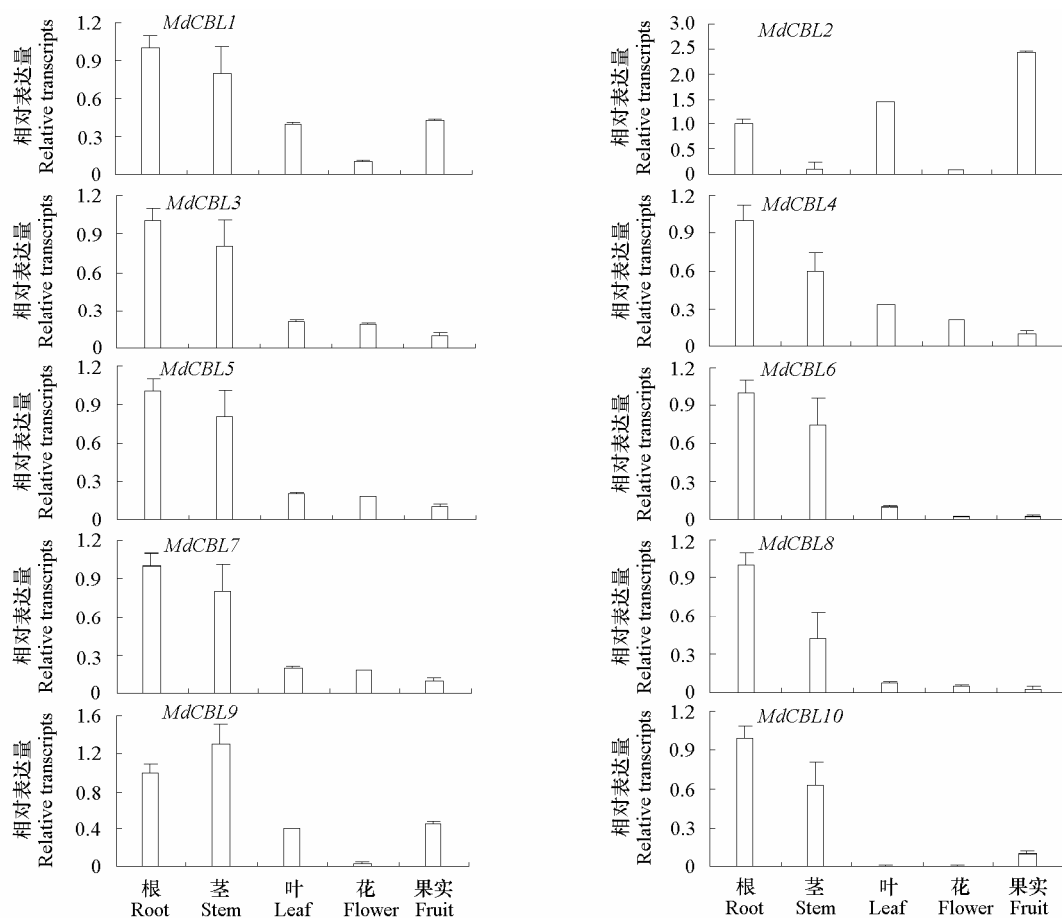


图 2 苹果和拟南芥 CBL 家族基因的遗传进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of apple and *Arabidopsis* CBL proteins

2.2 *MdCBL* 在‘嘎啦’苹果不同组织中的表达情况

MdCBL1、3 ~ 10 在根中有很高水平的表达，在茎中也有较高表达，但在其他的组织表达水平相对较低；*MdCBL2* 在果实和叶片中表达水平较高，高于根和茎中的表达（图 3）。

图 3 实时定量 RT-PCR 检测 *MdCBLs* 在‘嘎啦’苹果不同组织中的表达Fig. 3 Expression analysis of *MdCBLs* genes in different apple tissues with Real-time quantitative RT-PCR

2.3 *MdCBL* 对非生物胁迫的响应

以‘嘎啦’植株经过盐、干旱、ABA、低温处理的 cDNA 为模板,用各个基因的特异引物进行了荧光定量 RT-PCR 分析。在盐胁迫处理下,*MdCBL2*、*MdCBL4*、*MdCBL6*、*MdCBL7*、*MdCBL9* 和 *MdCBL10* 处理没有响应,而 *MdCBL1*、*MdCBL3*、*MdCBL5* 和 *MdCBL8* 的表达均受盐胁迫诱导,但它们的响应模式有差异:*MdCBL1* 的表达水平在 6 h 以内没有变化,12 h 时表达升高,*MdCBL3* 和 *MdCBL8* 的表达水平随着时间延长而逐渐升高,而 *MdCBL5* 先下降再升高(图 4)。

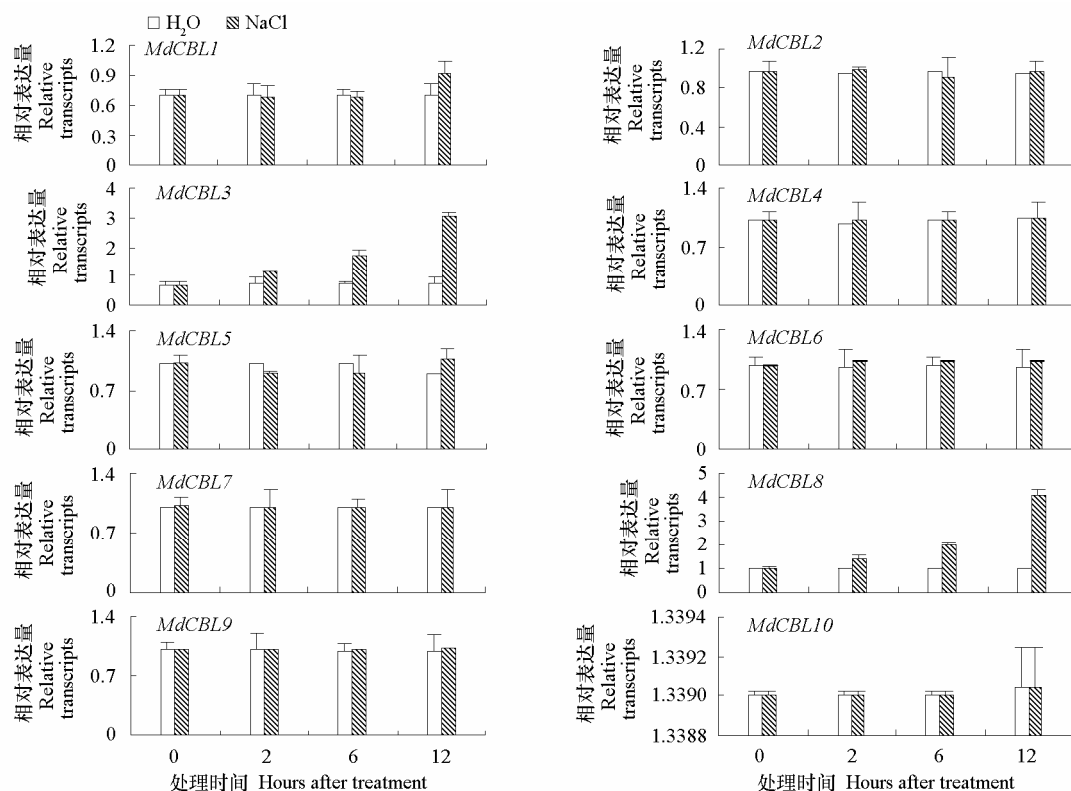


图 4 实时定量 RT-PCR 检测 *MdCBLs* 表达对盐胁迫的响应

Fig. 4 Expression analysis of *MdCBLs* genes in response to high salinity with Real-time quantitative RT-PCR

与对盐胁迫的影响相似,10个 *MdCBLs* 基因对低温胁迫的响应也有所不同,*MdCBL4* 和 *MdCBL9* 表达水平随着处理时间延长逐渐升高,处理 12 h 表达水平为对照的 4 倍(图 5);其他 *MdCBLs* 的表达对低温胁迫响应不明显。在 ABA 处理下,只有 *MdCBL7* 的表达水平受到 ABA 处理的诱导,表达量是对照的 2 倍多,其他 *MdCBLs* 的表达水平没有明显变化(图 6)。在干旱处理下,只有 *MdCBL4* 在 12 h 表达量明显升高,达到对照的 2 倍左右(图 7)。

2.4 鉴定 *MdCBL1* 过量表达苹果愈伤组织在盐胁迫中的功能

构建 *MdCBL1* 的正义(*MdCBL1*-TT)和反义愈伤组织(*MdCBL1*-RT)。用半定量方法检测转基因愈伤组织,证明 *MdCBL1* 确实转入愈伤组织中(图 8)。WL、*MdCBL1*-TT 和 *MdCBL1*-RT 在 MS 平板上长势基本一致,生长较好,但随着盐浓度增加,长势越来越差。200 mmol · L⁻¹ NaCl 处理时,*MdCBL1*-TT 愈伤组织长势比野生型和 *MdCBL1*-RT 愈伤组织好(图 9),说明过量表达 *MdCBL1* 能够提高苹果愈伤组织对盐胁迫的抵抗能力。

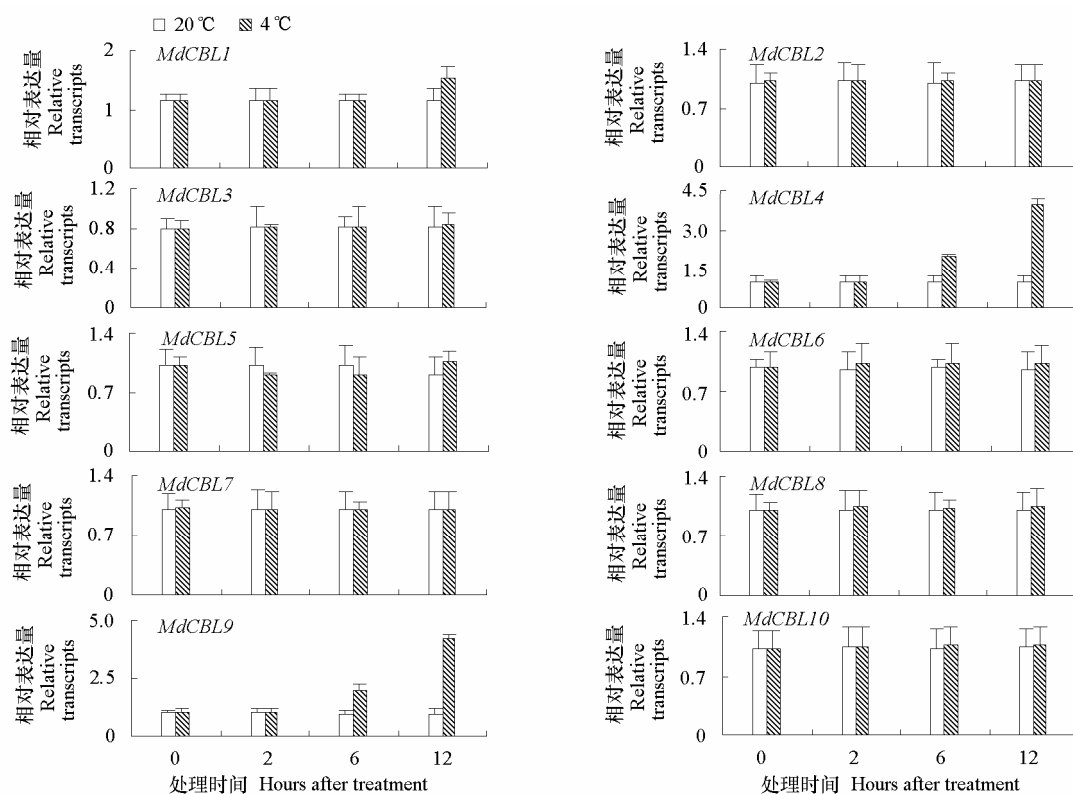


图 5 实时定量 RT-PCR 检测 *MdCBLs* 表达对低温胁迫的响应

Fig. 5 Expression analysis of *MdCBLs* genes in response to cold stress with Real-time quantitative RT-PCR

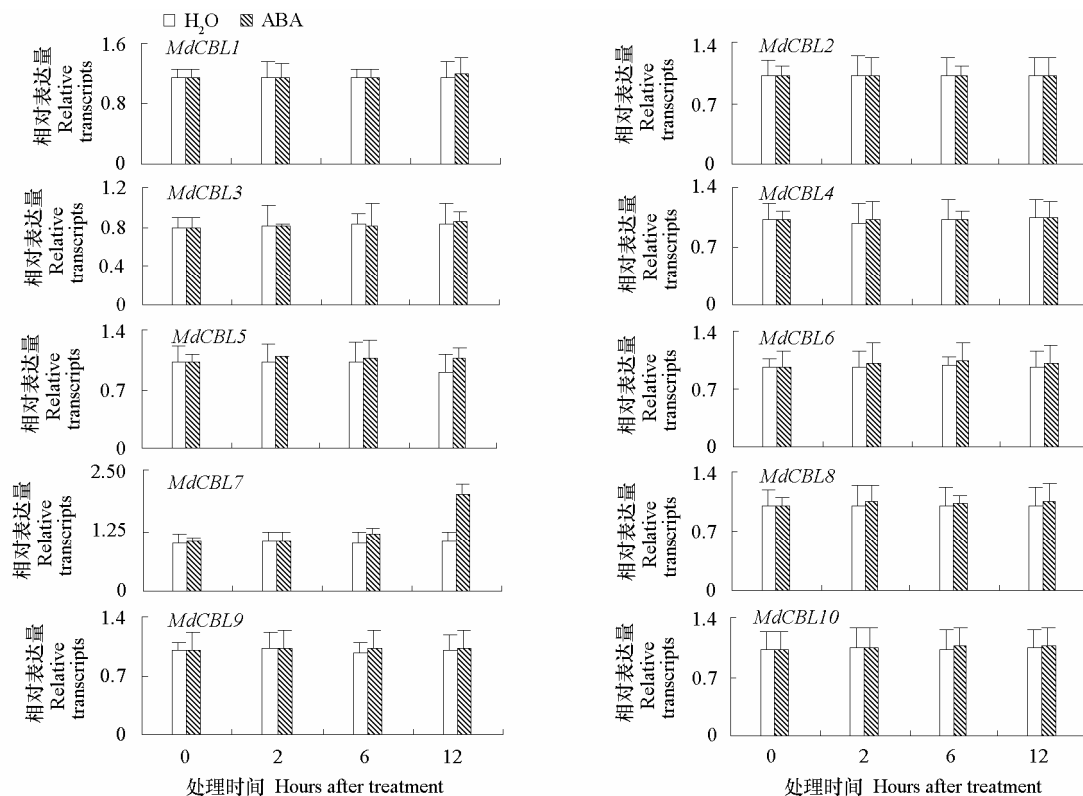


图 6 实时定量 RT-PCR 检测 *MdCBLs* 表达对 ABA 处理的响应

Fig. 6 Expression analysis of *MdCBLs* genes in response to ABA treatment with Real-time quantitative RT-PCR

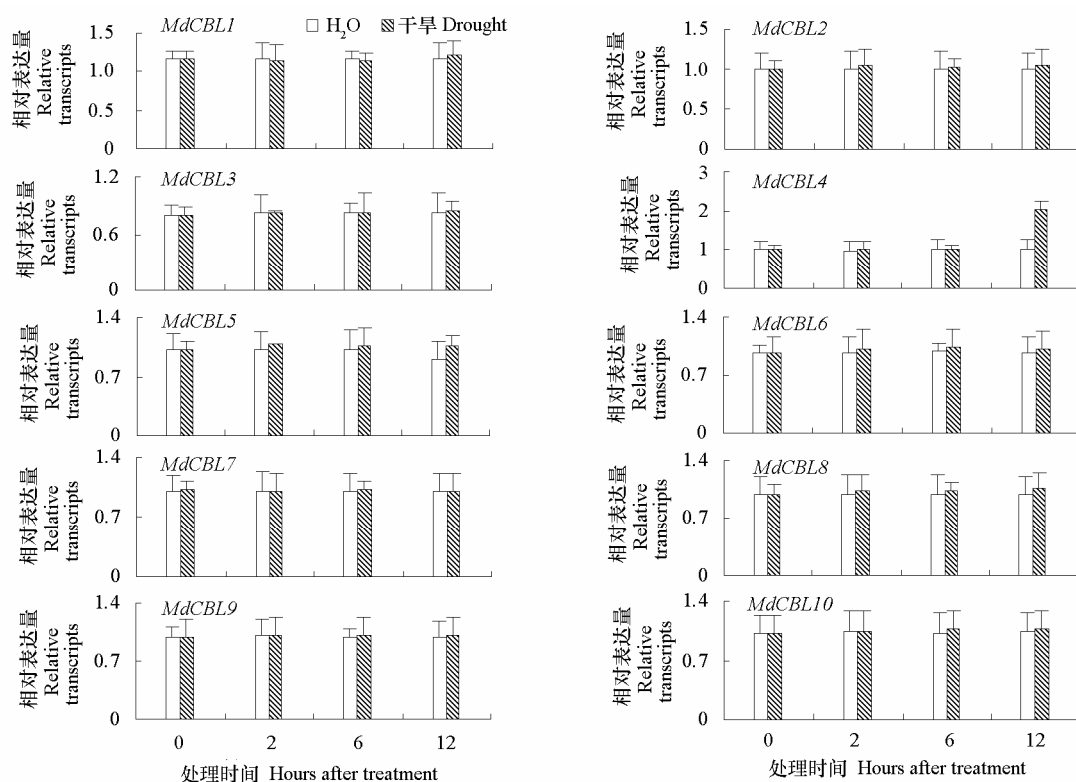


图 7 实时定量 RT-PCR 检测 *MdCBLs* 基因表达对干旱的响应

Fig. 7 Expression analysis of *MdCBLs* genes in response to drought with real-time quantitative RT-PCR

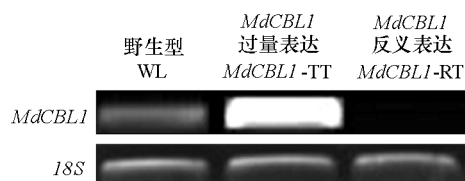


图 8 半定量 RT-PCR 分析野生型、*MdCBL1* 过量表达、*MdCBL1* 反义表达愈伤组织

Fig. 8 Semi-quantitative RT-PCR analysis of *MdCBL1* expression in wild type (WL), overexpression transgenic line (*MdCBL1*-TT) and suppression transgenic line (*MdCBL1*-RT)

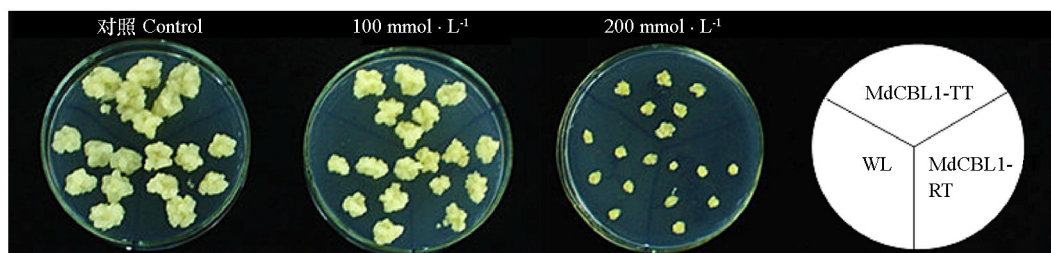


图 9 WL、*MdCBL1*-TT 和 *MdCBL1*-RT 愈伤组织在 NaCl 处理下的生长 20 d 后的状态

Fig. 9 Growth status of 20-day-old WL, *MdCBL1*-TT and *MdCBL1*-RT calluses under NaCl stress

在 MS 板上三者愈伤组织鲜质量相差不大 (图 10)。在 MS 板加上 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 之后, 愈伤组织生长受到影响, 但是 *MdCBL1* 正义愈伤组织比反义愈伤组织、野生型愈伤组织的长势好; *MdCBL1* 正义愈伤组织相对电导率要低于其他二者, 而 *MdCBL1* 反义愈伤组织电导率与野生型愈伤组织相差不大 (图 10)。

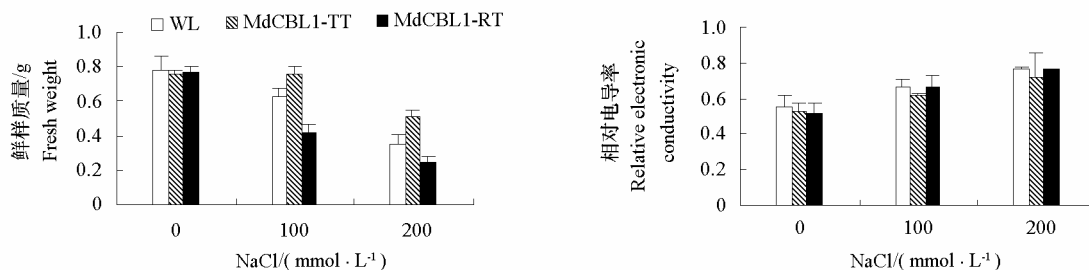


图 10 盐胁迫条件下 WL、MdCBL1-TT 和 MdCBL1-RT 愈伤组织的鲜质量和相对电导率

Fig. 10 Fresh weight and relative electronic conductivity of three kinds of calluses under NaCl stress

3 讨论

目前对拟南芥中 CBLs 家族基因的研究已经很清楚, 这个家族包括 10 个 CBLs, 并且在不同的胁迫响应中各有分工, 但是在木本植物上的研究却相对较少。CBLs 家族基因在胁迫过程中有很重要的作用 (Zhao et al., 2009)。AtCBLs 可以通过与下游的 CIPKs (Batistic & Kudla, 2009) 相互作用, 从而调节 CIPKs 活性将信号向下游传递 (Kolukisaoglu et al., 2004)。在木本植物苹果中, *MdCBLs* 家族基因是否也起这样的作用? 研究发现苹果中的 CBLs 家族基因在序列上存在不同, 表明它们可能在不同的胁迫途径中扮演不同的角色。这些结果为进一步研究苹果 CBLs 家族基因的功能奠定了一定的基础。同时也发现 *MdCBLs* 家族基因和 *AtCBLs* 基因功能域相似, 具有很高的序列同源性。说明 *MdCBLs* 家族基因可能具有拟南芥 *AtCBLs* 基因家族类似的功能。

对 *MdCBLs* 家族基因在不同组织中的表达分析发现, *MdCBLs* 家族基因有的在根中表达高, 有的在果实中有很高的表达, 说明 *MdCBLs* 在不同的组织中负责的功能各异: 有的 *MdCBLs* 可能在根中参与营养物质的吸收、运输及离子平衡等, 有的 *MdCBLs* 可能在调控果实品质中有着重要的功能。

以前研究发现 *AtCBL1* 对干旱胁迫、盐胁迫和冷胁迫相当敏感, 并且影响了另外一些胁迫基因的表达。氨基酸序列比对发现苹果 *MdCBL1* 和拟南芥 *AtCBL1* 有很高的序列同源性, *AtCBL1* 对盐和干旱都有响应, 在冷胁迫下, *AtCBL1* 扮演着负调控角色。Atcbl1 突变体可以提高对冷胁迫的适应能力 (Zhang et al., 2008)。在拟南芥中, 发现 Atcbl1 和 Atcbl9 突变体对干旱胁迫比较敏感, 从而对干旱的抵抗力下降 (Pandey et al., 2008)。而苹果 *MdCBL1* 只在盐胁迫中有响应, 对干旱和冷胁迫不能响应, 可能是苹果 *MdCBL1* 和拟南芥 *AtCBL1* 基因个别碱基的差异导致不同功能的差异所致。

研究表明 CBLs 家族基因可以响应多种胁迫, 尤其是盐胁迫 (Martine et al., 2007)。在以前的研究中, CBLs 可以响应非生物胁迫。在盐胁迫下, *AtCBL4* 可以和 *AtCIPK24* 相互结合形成复合物, 来调控下游基因 *SOS1* 的表达, 将 Na 离子排出细胞 (Guo et al., 2002)。同时根据以前研究结果 *AtCBL1* 和 *AtCBL10* 也可能和 *AtCIPK24* 形成复合物, 来响应盐逆境 (Gong et al., 2002)。因此本研究选择了 *MdCBLs* 家族中的 *MdCBL1* 进行了抗盐胁迫性分析, 结果发现过量表达 *MdCBL1* 能够提高转基因苹果愈伤组织的抗盐性 (图 7)。但在相对电导率测定结果中, 发现抑制表达的 *MdCBL1* 苹果愈伤组织与野生型苹果愈伤组织在盐胁迫条件下的相对电导率相差不大, 推测原因可能是 *MdCBLs* 家族基因存在一定的功能冗余来调控盐信号途径。综上, 认为 *MdCBLs* 家族基因能够参与多种生物与非

生物胁迫过程。这为进一步研究 *MdCBLs* 基因的功能奠定了基础, 并且为苹果砧木遗传改良提供了理论依据。

References

- Ahajan S, Pandey G, Tuteja N. 2008. Calcium and salt stress signaling in plants: Shedding light on SOS pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 471: 146 – 158.
- Batistic O, Kudla J. 2009. Plant calcineurin B-like proteins and their interacting protein kinases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793: 985 – 992.
- Evans N H, McAinsh M R, Hetherington A M. 2001. Calcium oscillations in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 4: 415 – 420.
- Gao P, Zhao P M, Wang J, Wang H Y, Du X M, Wang G X, Xia G X. 2008. Co-expression and preferential interaction between two calcineurin B-like proteins and a CBL-interacting protein kinase from cotton. *Plant Physiology*, 46: 935 – 940.
- Gong D M, Guo Y, Andre T J. 2002. Biochemical characterization of the *Arabidopsis* protein kinase SOS2 that functions in salt tolerance. *Plant Physiology*, 130: 256 – 264.
- Gu Z M, Ma B J, Jiang Y, Chen Z W, Su X, Zhang H S. 2008. Expression analysis of the calcineurin B-like gene family in rice (*Oryza sativa* L.) under environmental stresses. *Gene*, 415 (1 – 2): 1 – 12.
- Guo Y, Halfter U, Ishitani M. 2002. Molecular characterization of functional domain in the protein kinase SOS2 that functions in salt tolerance. *Plant Physiology*, 130: 256 – 264.
- Hu D G, Li M, Luo H, Dong Q L. 2012. Molecular cloning and functional characterization of MdSOS2 reveals its involvement in salt tolerance in apple callus and *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep*, 31: 713 – 722.
- Kolkisaoglu U, Weinl S, Blazevic D. 2004. Calcium sensors and their interacting protein kinases: Genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant Physiology*, 134 (1): 43 – 58.
- Lewit B A, Rety S. 2008. EF-hand calcium-binding proteins. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 637 – 643.
- Li R F, Zhang J W, Wei J H, Wang H Z, Wang Y Z, Ma R C. 2008. Functions and mechanisms of the CBL-CIPK signaling system in plant response to abiotic stress. *Progress in Natural Science*, 19: 667 – 676.
- Liu J P, Manabu I, Ursula H, CheolSoo K. 2000. The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 3730 – 3734.
- Luan S, Kudla J, Rodriguez C M. 2002. Calmodulins and calcineurin B-like proteins: Calcium sensors for specific signal response coupling in plant. *The Plant Cell*, 14: 389 – 400.
- Martínez-Atienza J, Jiang X, Garcíadeblas B, Mendoza I, Zhu J K, Pardo J M, Quintero F J. 2007. Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice. *Plant Physiology*, 143 (2): 1001 – 1012.
- Pandey G K, Grant J J, Cheong Y H, Kim B G, Luan S. 2008. Calcineurin-B-like protein CBL9 interacts with target kinase CIPK3 in the regulation of ABA response in seed germination. *Molecular Plant*, 1 (2): 238 – 248.
- Quan R, Lin H, Mendoza I, Zhang Y, Cao W, Yang Y, Guo Y. 2007. SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect *Arabidopsis* shoots from salt stress. *The Plant Cell Online*, 19 (4): 1415 – 1431.
- Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper J F. 2002. Calcium at the crossroads of signaling. *The Plant Cell*, 14 (S): 401 – 417.
- Wang M Y, Gu D, Liu T S, Wang Z Q, Guo X Y, Hou W, Bai Y F, Chen X P, Wang G Y. 2007. Overexpression of a putative maize calcineurin B-like protein in *Arabidopsis* confers salt tolerance. *Plant Molecular Biology*, 65: 733 – 746.
- 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.
- Zhang H C, Yin W L, Xia X L. 2008. Calcineurin B-like family in *Populus*: Comparative genome analysis and expression pattern under cold, drought and salt stress treatment. *Plant Growth Regulation*, 56: 129 – 140.
- 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, Wan J H. 2009. Cloning and characterization of a novel CBL-interacting protein kinase from maize. *Plant Molecular Biology*, 69: 661 – 674.
- Zhu J K, Liu J, Xiong L. 1998. Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 10: 1181 – 1191.