

# 杨树 *CDPK* 基因家族的表达分析及功能预测

张进, 李建波, 刘伯斌, 陈军, 卢孟柱\*

(林木遗传育种国家重点实验室, 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

**摘要:**为探究 *CDPK* 基因在木材形成过程中的作用, 本研究在基因组水平上对杨树 *CDPKs* 基因家族的成员进行分析, 找到 32 个 *CDPKs* 及 10 个 *CRKs* 成员。对 *CDPK* 基因家族成员在杨树中表达特性进行了分析, 发现其家族成员在不同组织、不同发育阶段以及毛白杨次生维管发育不同时期的表达特性不同。分析杨树 *CDPK* 基因家族中 3 个基因 *PtCPK1*、*PtCPK6*、*PtCPK15*, 其蛋白质一级结构均存在 1 个跨膜区, 其蛋白定位在细胞膜上。

**关键词:** 杨树; *CDPK*; 基因家族; 基因表达

中图分类号: S792.11

文献标识码: A

## Expression and Functional Analysis of *CDPK* Gene Family in *Populus*

ZHANG Jin, LI Jian-bo, LIU Bo-bin, CHEN Jun, LU Meng-zhu

(State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

**Abstract:** Calcium-dependent protein kinases (CDPKs) are important  $\text{Ca}^{2+}$  sensors and effectors in  $\text{Ca}^{2+}$  signal transduction pathway. They play crucial roles in regulation of plant development and tolerance of various environmental stresses. In this study, a genome-wide analysis of *Populus CDPKs* was performed, including phylogeny, gene structure and expression patterns. Thirty-two *CDPK* genes and ten *CRK* genes were identified. Furthermore, the gene expression profiles showed that a number of *Populus CDPK* differentially expressed across different tissues and developmental stages. Three *Populus CDPK* gene, i. e. *PtCPK1*, *PtCPK6* and *PtCPK15*, were cloned and analyzed, revealing their proteins localized in cell membrane. These results may lay the foundation for functional analysis of *Populus CDPK* gene family in the future.

**Key words:** *Populus*; *CDPK*; gene family; gene expression

植物在其生长发育过程中, 会受到各种内外因素的影响, 植物体自身形成了一套复杂的信号网络途径来适应多变的外界环境。 $\text{Ca}^{2+}$  作为植物中重要的第二信使, 在细胞信号转导过程中起重要作用<sup>[1]</sup>。在植物中, 各种外界刺激, 如光照、激素、生物胁迫及非生物胁迫都会触发  $\text{Ca}^{2+}$  在胞内浓度的变化, 胞外信号经受体进行一系列跨膜信号转换后, 调节  $\text{Ca}^{2+}$  的分布及其在特定部位的

瞬间变化而产生  $\text{Ca}^{2+}$  信号<sup>[2-6]</sup>,  $\text{Ca}^{2+}$  信号能被各种不同的  $\text{Ca}^{2+}$  传感器感知并将其传递给下游分子, 如下游靶蛋白的磷酸化等<sup>[7-8]</sup>。植物体内存在 4 类  $\text{Ca}^{2+}$  传感蛋白/ $\text{Ca}^{2+}$  结合蛋白, 即钙调素 (Calmodulin, CaM)、类钙调素蛋白 (Calmodulin-like proteins, CaML)、钙调磷酸酶 B 类似蛋白 (Calcineurin B like proteins, CBLs/SCaBPs) 和钙依赖蛋白激酶 (Calcium-dependent protein kinases,

收稿日期: 2013-06-20

基金项目: “十二·五”863 计划课题“杨树分子育种与品种创制”(2011AA100201); 中国博士后科学基金面上资助(2014M550104)

作者简介: 张进(1985-), 男, 博士研究生。主要研究方向: 树木性状的分子基础。电话: 010-62824020。E-mail: zhang-007jin@163.com

\* 通讯作者: 研究员, 博士生导师, 从事分子生物学研究。E-mail: Lumz@caf.ac.cn

CDPKs)<sup>[9-12]</sup>,其中,CaM、CaML和CBL仅包含Ca<sup>2+</sup>结合域,缺乏效应域,因此,它们只能作为Ca<sup>2+</sup>信号感应器,通过与其它靶蛋白的结合来调节其活性<sup>[3]</sup>。相比之下,CDPK蛋白则包含1个N-端可变区及3个功能区,功能区分别为具有催化活性的Ser/Thr蛋白激酶区、自抑制区以及包含EF-hand模块负责结合Ca<sup>2+</sup>的CaM区<sup>[9,13]</sup>。CDPK独特的结构使它同时具备Ca<sup>2+</sup>感应器和效应器的功能。CDPK通过解除其自抑制的机制使其具有活性<sup>[14]</sup>。当Ca<sup>2+</sup>结合到CDPK的CaM区时,CDPK蛋白构象发生改变,将自抑制区从激酶区释放,从而激活其酶活性。近年来,有研究表明,所有C端区同催化区一起行使激活活性<sup>[15-16]</sup>。

CDPK是植物中研究最为深入的Ca<sup>2+</sup>传感器之一,到目前为止,已经在植物界中从绿藻到显花植物以及原生生物中都发现了CDPK,但在酵母、线虫、果蝇和人中都没有发现CDPK的存在<sup>[17]</sup>。在各类植物中的大量研究表明,CDPK广泛参与植物的各种响应,如高光强、激素响应、机械损伤、非生物胁迫以及病原菌侵染等。水稻中OsCDPK13、OsCDPK12和OsCDPK21分别在低温、低氮及盐胁迫响应过程中起作用<sup>[18-20]</sup>。蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)CDPK1参与根系发育,将CDPK1通过RNAi沉默后,导致转基因植株发根数量与根细胞长度显著降低,基因芯片分析表明,CDPK1沉默后改变了细胞壁以及防御相关基因的表达<sup>[21]</sup>。葡萄CPKI在拟南芥中超表达促进了植物生长,增强了萌发、萌发后生长和气孔运动中的ABA超敏性<sup>[22]</sup>。此外,Ca<sup>2+</sup>和CDPK还参与黄瓜中NO和生长素诱导的不定根形成<sup>[23]</sup>。这些研究都表明CDPK广泛参与了植物的各种环境响应,但其确切的生物学功能目前并不十分清楚。目前,在拟南芥基因组中共发现34个CDPK基因成员<sup>[9]</sup>,水稻中检测到31个CDPK基因成员<sup>[24]</sup>。杨树全基因组序列虽已公布,但对于CDPK基因家族成员的研究尚不系统。本研究利用拟南芥CDPK蛋白序列,在杨树基因组数据库中查找相应的同源序列,共检测到32个CDPK基因及10个CRK(CDPK-Related Kinase)基因成员。在此基础上,构建了杨树CDPK蛋白的系统进化树,并对其中3个CDPK蛋白的亚细胞定位进行了分析。研究结果为以后解析

杨树CDPK基因的功能提供了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用杨树次生维管再生材料取自毛白杨(*Populus tomentosa* Carr.)形成层区域,由中国林业科学研究院林木遗传育种国家重点实验室保存。杨树次生维管再生材料取材方法详见Du<sup>[25]</sup>,所用组织部位为包含未成熟木质部的形成层区域,毛白杨剥皮后第6、10、12、14、16、18和22天的样本用于基因表达分析。大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株Trans1-T1购自天根生化科技有限公司(北京),根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株GV3101由本实验室保存。

### 1.2 实验试剂

PCR所用试剂和Marker购自天根生化科技有限公司(北京)。RNA提取和反转录试剂盒Super-scriptIII First-strand Kit等购买于Invitrogen公司(上海)。用Primer 5.0软件设计引物,Real-time PCR所用引物使用在线设计软件Primer3 Input 0.4.0(<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>)设计,实验所需引物均在Invitrogen公司合成。

### 1.3 数据来源

拟南芥CDPK基因及其编码的蛋白质序列来源于TAIR(<http://www.arabidopsis.org/>)数据库。利用得到的拟南芥蛋白质序列为搜索对象,通过blastp程序在杨树基因组数据库(<http://www.phytozome.net/poplar.php>)中搜索相似的蛋白序列。

### 1.4 系统进化树分析

为评估杨树和拟南芥CDPK基因的进化关系,利用Clustal X<sup>[26]</sup>对其氨基酸序列进行多序列比对,使用MEGA5.0<sup>[27]</sup>中的Neighbor-Joining(NJ)法构建系统进化树。

### 1.5 基因结构分析

杨树及拟南芥CDPK基因的外显子及内含子结构使用GSDS<sup>[28]</sup>程序(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)完成,其基因组DNA序列及CDS序列下载自Phytozome数据库(<http://www.phytozome.net>)。

### 1.6 基因表达分析

RNA提取方法参照植物总RNA提取试剂盒(RNeasy Plant Kit)操作方法,反转录为cDNA第1链,以cDNA为模板进行qRT-PCR。引物序列见表1。

表1 实验所用引物序列

引物	引物序列(5'-3')
<i>PtCPK1</i> -F1	TGGGCTTAGGACCGAGTATG
<i>PtCPK1</i> -R1	TCCCTTCTCACATCCTCCAC
<i>PtCPK3</i> -F1	GCCGATGGAGGATGTAAGAA
<i>PtCPK3</i> -R1	TCCTCGTAAGCTCCCTTCAA
<i>PtCPK4</i> -F1	AACAGAATCAGGAATCTTCAGACAG
<i>PtCPK4</i> -R1	GACAATACTGCAGAATCAAGAGGTT
<i>PtCPK6</i> -F1	GGAGGAAATTGCTGCTTTGA
<i>PtCPK6</i> -R1	TCCTGGCGCTCTAATTTGTT
<i>PtCPK15</i> -F1	AAGCTCTCTGAAGCTGAAGTCAA
<i>PtCPK15</i> -R1	ATACCCACTGCTGCTTATCAA
<i>PtCPK33</i> -F1	GGCAATATTACGGGAAAGA
<i>PtCPK33</i> -R1	CCCCATGACAAAACAAATTC
<i>PtCPK36</i> -F1	TTTGACCTGGAGGATTTTC
<i>PtCPK36</i> -R1	CAGGCAACAGAAGCATTGAA
<i>PtActin</i> -F	GTGCTTCTAAGTTCGAACAGTGC
<i>PtActin</i> -R	GACTACCAAAGTGTCTGACCACCA

Real-time PCR 操作参照 SYBR®Premix Ex Taq™ Kit (Perfect Real Time, TaKaRa) 进行。每个样品设置 6 个重复,用 *PtActin* 作为内参对照。

分析杨树 CDPK 基因表达所用的基因芯片数据下载自 NCBI Gene Expression Omnibus (GEO)<sup>[29]</sup> 数据库。本研究中用到的芯片数据序列号分别为 GSE13043 及 GSE21481。

### 1.7 亚细胞定位

构建 35S 启动子驱动下的 *PtCPK1-YFP*、*PtCPK6-YFP* 及 *PtCPK15-YFP* 融合表达载体。将构建完成的质粒转化农杆菌 GV3101 后,于 LB 培养基

中 28℃ 摇培。离心重新悬浮后,用注射器吸取菌液,从下表皮经气孔将菌液缓缓注射进烟草叶片中。培养 36 h 后,于激光共聚焦显微镜下观察荧光信号在烟草表皮细胞内的分布。

## 2 结果与分析

### 2.1 杨树中 CDPK 基因的发现及系统进化分析

钙依赖蛋白激酶 (CDPKs, CPKs) 是一种钙依赖的 Ser/Thr 型蛋白激酶,由多基因编码,广泛存在于各种植物中。在杨树全基因组数据库中搜索相似的蛋白质序列,选取  $E \leq 10^{-10}$  的序列为候选序列,共筛选得到 32 个 CDPK 基因及 10 个 CRK (CDPK-Related Kinase) 基因。有研究表明,杨树中的基因数目大约是拟南芥中同源基因的 1.4 ~ 1.6 倍<sup>[30]</sup>。目前,已知拟南芥中 CDPK 有 34 个,而杨树中 CDPK 基因数目仅有 32 个,并不符合这个比例。推测可能的原因是一些功能冗余的基因在杨树基因组复制重组的过程中丢失,而 30 个左右的 CDPK 足够使其完成正常的生物学功能。图 1 是这些 CDPK 和 CRK 在基因组连锁群上的物理位置,发现除了第 XIII、XVII 和第 XVIII 号连锁群上没有 CDPKs 的分布外,其他连锁群上都有 CDPKs 的分布。同拟南芥一样,杨树 CDPKs 分布于 4 个组中,其中,Group II 和 Group III 又可以分别进一步分为 a、b 2 个亚组,Group IV 中含有的 CDPK 数量最少(图 2)。

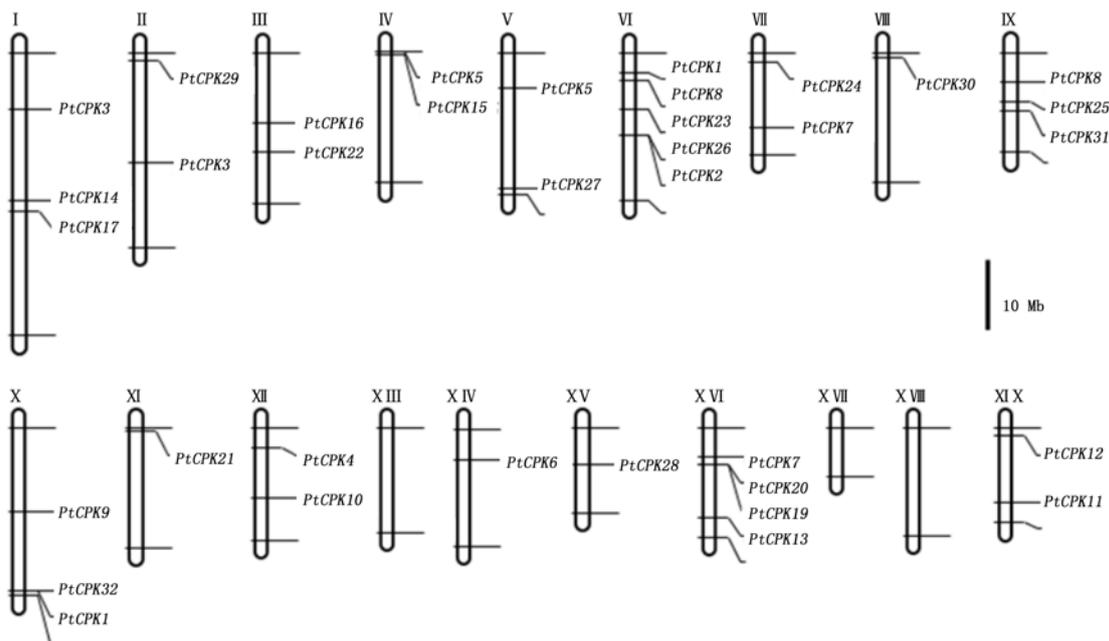
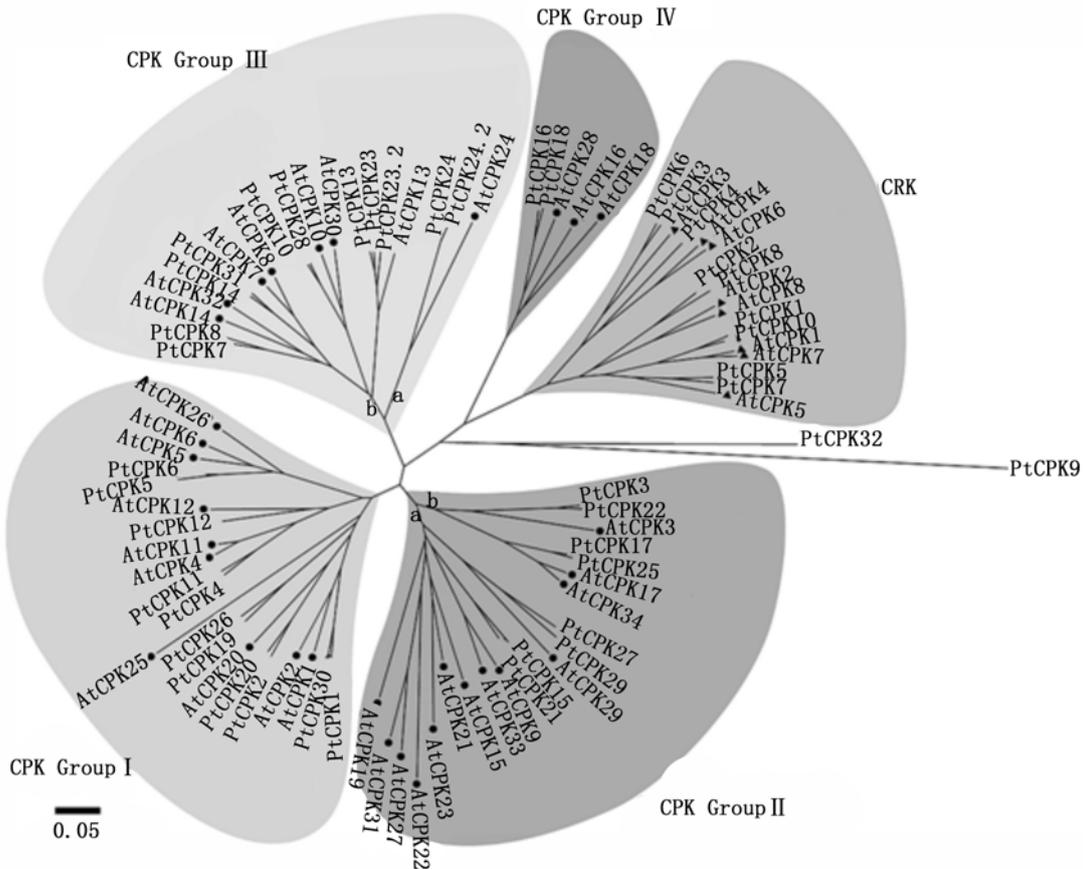


图1 杨树 CDPKs 基因家族成员的染色体定位(杨树 19 条染色体标记为:I - XIX)



CPK Group I、II、III、IV 分别表示 CPK 家族的组 I、组 II、组 III、组 IV

图 2 杨树和拟南芥的 CDPK 基因进化关系

### 2.2 CDPK 及 CRK 基因外显子/内含子结构

通过对杨树 32 个 CDPK 及 10 个 CRK 基因结构(外显子/内含子)及其与拟南芥的 CDPK 家族成员的基因结构比较,内含子数目分别为 6、7、8、10 和 11,其中,以含有 6 个内含子的 CDPK 基因最多。通过其基因结构分析,由于染色体复制的存在,该家族中存在一些基因对: *PtCPK1/PtCPK30*、*PtCPK2/PtCPK20*、*PtCPK19/PtCPK26*、*PtCPK6/PtCPK5*、*PtCPK4/PtCPK11*、*PtCPK17/PtCPK25*、*PtCPK3/PtCPK22*、*PtCPK27/PtCPK29*、*PtCPK15/PtCPK21*、*PtCPK7/PtCPK8*、*PtCPK14/PtCPK31*、*PtCPK10/PtCPK28*、*PtCPK13/PtCPK23*、*PtCPK16/PtCPK18*、*PtCRK6/PtCRK3*、*PtCRK1/PtCRK10*、*PtCRK2/PtCRK8* 及 *PtCRK5/PtCRK7*。这些基因对不仅在蛋白水平上有很高的相似度,而且内含子的插入大小和插入位点也非常保守(图 3),这些基因对是由于染色体复制造成的。

### 2.3 杨树 CDPK 基因的表达特性

基因的表达特性能够对基因的功能提供一些线索。为了检测杨树中 CDPKs 基因的表达特性,利用

已公布的杨树基因芯片数据,分析了杨树 CDPKs 基因在不同节间以及不同部位的表达情况。在茎第 2 节间, *PtCPK8*、*PtCPK13*、*PtCPK23* 及 *PtCPK25* 表达较高,表明它们可能在初生茎发育过程中起主要作用;而在第 5 节间中,许多 CDPKs 基因表达较高,如 *PtCPK7*、*PtCPK12*、*PtCPK14*、*PtCPK19*、*PtCPK26*、*PtCPK30*、*PtCPK31* 等,表明这些基因可能参与了从初生茎到次生茎的发育过程;在茎第 9 节间中, *PtCPK7*、*PtCPK11*、*PtCPK16*、*PtCPK19*、*PtCPK26*、*PtCPK27*、*PtCPK30*、*PtCRK2*、*PtCRK3*、*PtCRK7* 表达较高,这些基因可能参与了杨树茎的次生生长(图 4A)。对不同组织中 CDPKs 表达情况进行分析,发现 *PtCPK16*、*PtCPK18*、*PtCPK19* 和 *PtCPK32* 在根中表达较高, *PtCPK3*、*PtCPK13* 及 *PtCPK14* 在雄花中表达较高, *PtCPK4*、*PtCPK11* 及 *PtCPK24* 在幼苗中表达较高,这些基因的组织表达差异表明它们可能参与了不同组织的发育进程(图 4B)。

### 2.4 杨树 CDPK 基因在次生维管再生系统不同时期表达分析

作者之前的研究发现,杨树 CDPK 基因家族中 7



图3 杨树及拟南芥 CDPK 基因的内含子结构

个成员 (*PtCPK1*、*PtCPK3*、*PtCPK4*、*PtCPK6*、*PtCPK15*、*PtCPK23* 及 *PtCPK26*) 在毛白杨剥皮后次生维管再生系统不同时期表达量有变化。本文利用 Real-time PCR 分析这 7 个 CDPK 基因在毛白杨剥皮再生不同时期的表达量。次生维管再生第 10~12 天为次生维管系统重建的关键时期, 研究发现, *PtCPK1*、*PtCPK6* 及 *PtCPK15* 在次生维管再生第 10、12 天表达显著增加, 表明它们可能在次生维管系统重建过程中起调控作用(图 5)。

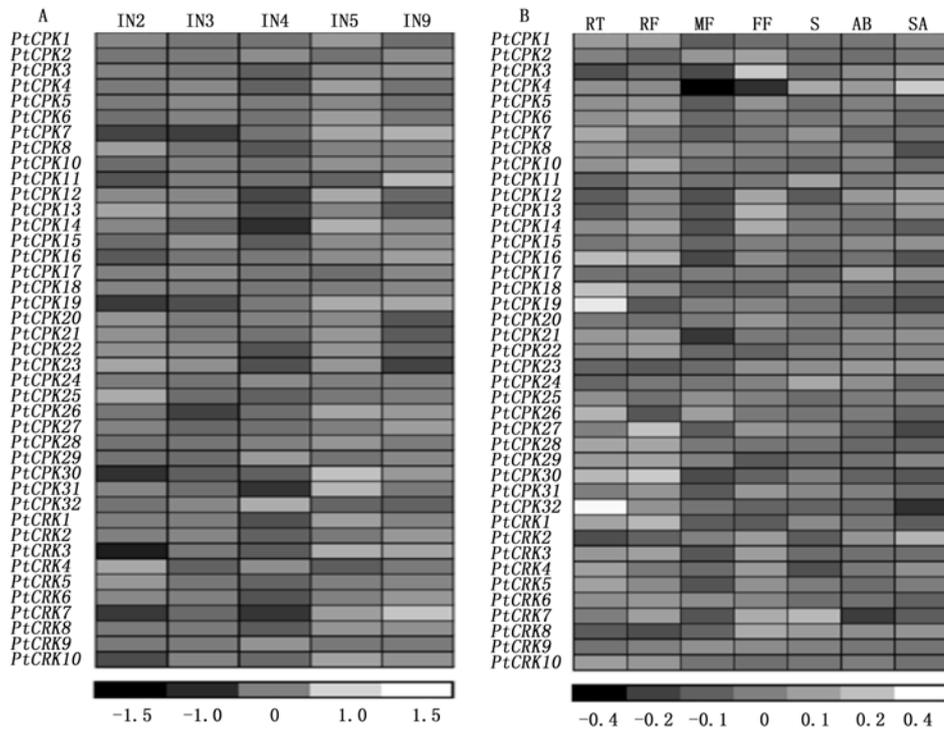
### 2.5 杨树 *PtCPK1*、*PtCPK6* 及 *PtCPK15* 的组织表达及亚细胞定位分析

在图 6 中, 分别分析了 *PtCPK1*、*PtCPK6* 及 *PtCPK15* 在毛白杨根、叶片、茎段、包含韧皮部区域的形成层以及包含未成熟木质部区域的形成层中的表达情况, *PtCPK15* 在各组织中的表达量均较高。

为了更好的研究基因的功能, 分析了毛白杨 *PtCPK1*、*PtCPK6* 及 *PtCPK15* 在细胞中的亚细胞定位。通过软件分析序列, 显示这几个蛋白均存在一个跨膜区。将 *PtCPK1*、*PtCPK6* 及 *PtCPK15* 基因分别与 YFP 黄色荧光蛋白构建融合表达载体, 注射烟草下表皮叶片瞬时表达, 通过激光共聚焦显微镜观察发现, 选取的 *PtCPK1*、*PtCPK6* 及 *PtCPK15* 定位在细胞膜上, 这与通过序列分析预测的结果一致(图 7)。

### 3 讨论与结论

本研究利用已知的拟南芥 CDPK 蛋白序列在杨树数据库中进行搜索, 共找到 32 个 CDPK 基因及 10 个 CRK 基因, 其中, 包含 14 个 CDPK 基因对及 4 个 CRK 基因对, 这些基因是在植物进化过程中染色体复制产生的。植物体内的 CDPK 以多成员组成的基



基因在杨树不同节间的表达特性(GEO:GSE13043),IN2-第2节间,IN3-第3节间,IN4-第4节间,IN5-第5节间,IN9-第9节间;  
B. 杨树 CDPKs 基因在杨树不同组织中的表达特性(GEO:GSE21481),RT(组培条件下的根),RF(野生条件下的根),MF(雄花芽),FF(雌花芽),S(幼苗),AB(腋芽),SA(茎尖)

图 4 杨树 CDPK 基因表达特性

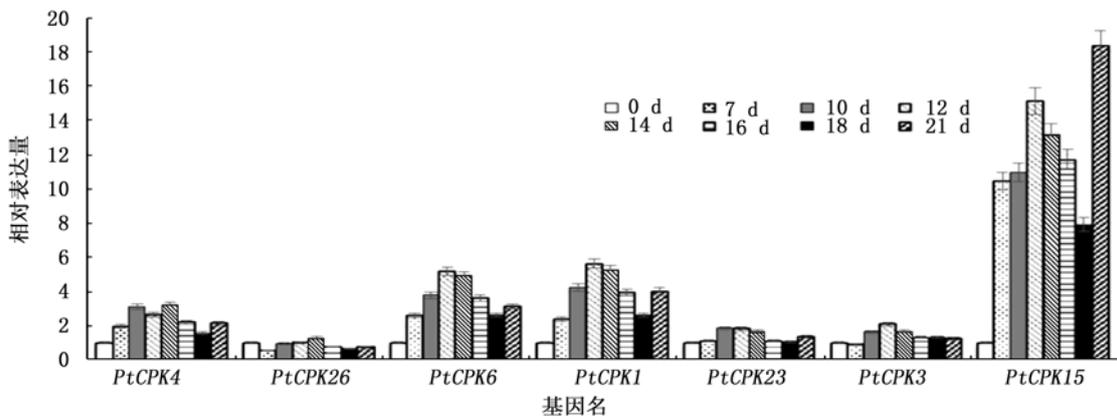


图 5 Real-time PCR 分析杨树次生维管系统再生不同时期 CDPKs 基因表达

因家族形式存在,并通过各自的结构特征和功能,分别介导其自身生长发育信号及外界胁迫刺激信号的信号转导。前人已在多种植物中鉴定了许多 CDPK 基因并对其功能进行了研究,但对于木本模式植物中 CDPK 基因家族的研究并不系统。因此,杨树 CDPK 基因家族的发现对于研究杨树生长发育有着重要的意义。

对杨树 CDPK 基因家族成员在不同组织、生长

发育阶段及次生维管再生过程中的表达情况进行分析,发现其家族成员在不同条件下的表达明显不同,表明它们可能执行特定的生物学功能。本研究中选择 3 个 CDPK 基因 (*PtCPK1*、*PtCPK6*、*PtCPK15*),对其亚细胞定位分析,发现其均为膜定位蛋白,而位于 CDPK 基因 N 末端的豆蔻酰化位点是膜定位所必须的。外界信号导致的细胞质内增多的 Ca<sup>2+</sup>,主要来自于细胞内的 Ca<sup>2+</sup> 库,通过位于细胞质膜上的钙离

子通道进入胞质。因此,植物细胞膜上广泛分布着各种钙离子转运体,但各自转运体的调控机制不同,分别或协同完成植物细胞信号转导过程。近年来,通过对拟南芥、水稻等植物的研究表明,在34个拟南芥 CDPK 成员和31个水稻 CDPK 成员中,多数 CDPK 与逆境信号转导有关<sup>[31]</sup>。Sheen<sup>[32]</sup>发现,在干旱和盐诱导条件下,拟南芥 *AtCPK1* 和 *AtCPK2* 的表达量显著增加,拟南芥 *AtCPK10* 和 *AtCPK30* 参与了对 ABA 和非生物胁迫的信号转导。本研究中发现,杨树 CDPK 基因家族中有些成员在次生维管组

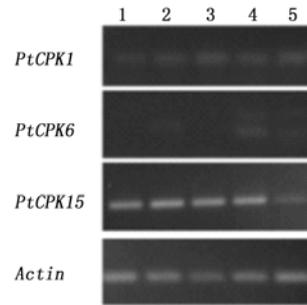


图6 杨树 *PtCPK1*、*PtCPK6* 及 *PtCPK15* 的组织表达分析

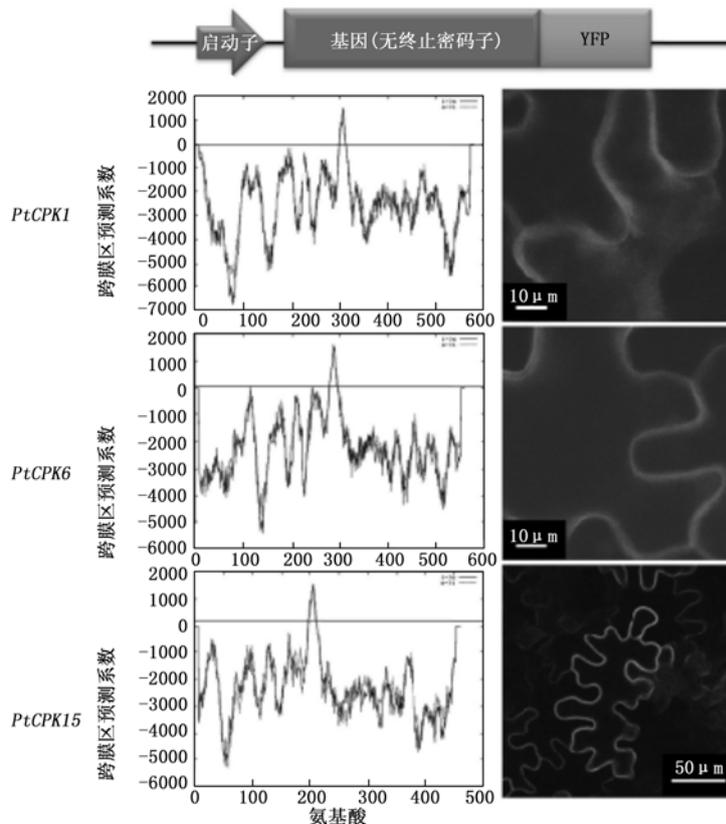


图7 杨树 *PtCPK1*、*PtCPK6* 及 *PtCPK15* 基因跨膜区结构预测及亚细胞定位分析

织发育中高表达,但其具体的功能目前尚不清楚,本文作者正在开展进一步的研究,以便为探究其在木材发育过程中的功能奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] Trewavas A J, Malhó R.  $Ca^{2+}$  signalling in plant cells: the big network! [J]. Current Opinion in Plant Biology, 1998, 1(5): 428-433.
- [2] Knight H, Knight M R. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk [J]. Trends in Plant Science, 2001, 6(6): 262-267.
- [3] Luan S, Kudla J, Rodriguez-Concepcion M, et al. Calmodulins and Calcineurin B-like Proteins Calcium Sensors for Specific Signal Response Coupling in Plants [J]. Plant Cell, 2002, 14(suppl 1): S389-S400.
- [4] Reddy A S. Calcium: silver bullet in signaling [J]. Plant Science, 2001, 160(3): 381-404.
- [5] Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, et al. Calcium at the crossroads of signaling [J]. Plant Cell, 2002, 14(suppl 1): S401-S417.
- [6] Snedden W A, Fromm H. Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants [J]. New Phytologist, 2001, 151(1): 35-66.
- [7] Sanders D, Brownlee C, Harper J F. Communicating with calcium [J]. Plant Cell, 1999, 11(4): 691-706.
- [8] Sebastià C H, Hardin S C, Clouse S D, et al. Identification of a new motif for CDPK phosphorylation in vitro that suggests ACC syn-

- these may be a CDPK substrate [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2004, 428(1):81-91.
- [9] Hrabak E M, Chan C W, Gribskov M, et al. The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases [J]. Plant Physiology, 2003, 132(2):666-680.
- [10] Kolukisaoglu ü, Weint S, Blazevic 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.
- [11] McCormack E, Braam J. Calmodulins and related potential calcium sensors of Arabidopsis [J]. New Phytologist, 2003, 159(3):585-598.
- [12] Zielinski R E. Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants [J]. Annual Review of Plant Biology, 1998, 49(1):697-725.
- [13] Cheng S H, Willmann M R, Chen H C, et al. Calcium signaling through protein kinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family [J]. Plant Physiology, 2002, 129(2):469-485.
- [14] Yang T, Poovaliah B. Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants [J]. Trends in Plant Science, 2003, 8(10):505.
- [15] Wernimont A K, Amani M, Qiu W, et al. Structures of parasitic CDPK domains point to a common mechanism of activation [J]. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2011, 79(3):803-820.
- [16] Wernimont A K, Artz J D, Jr Finerty P, et al. Structures of apicomplexan calcium-dependent protein kinases reveal mechanism of activation by calcium [J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2010, 17(5):596-601.
- [17] Harper J F, Harmon A. Plants, symbiosis and parasites: a calcium signalling connection [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2005, 6(7):555-566.
- [18] Abbasi F, Onodera H, Toki S, et al. OsCDPK13, a calcium-dependent protein kinase gene from rice, is induced by cold and gibberellin in rice leaf sheath [J]. Plant Molecular Biology, 2004, 55(4):541-552.
- [19] Asano T, Hakata M, Nakamura H, et al. Functional characterization of OsCPK21, a calcium-dependent protein kinase that confers salt tolerance in rice [J]. Plant Molecular Biology, 2011, 75(1-2):179-191.
- [20] Asano T, Wakayama M, Aoki N, et al. Overexpression of a calcium-dependent protein kinase gene enhances growth of rice under low-nitrogen conditions [J]. Plant Biotechnology, 2010, 27(4):369-373.
- [21] Ivashuta S, Liu J, Liu J, et al. RNA interference identifies a calcium-dependent protein kinase involved in Medicago truncatula root development [J]. Plant Cell, 2005, 17(11):2911-2921.
- [22] 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(10):3019-3036.
- [23] Lanteri M L, Pagnussat G C, Lamattina L. Calcium and calcium-dependent protein kinases are involved in nitric oxide-and auxin-induced adventitious root formation in cucumber [J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(6):1341-1351.
- [24] 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.
- [25] Du J, Xie H L, Zhang D Q, et al. Regeneration of the secondary vascular system in poplar as a novel system to investigate gene expression by a proteomic approach [J]. Proteomics, 2006, 6:881-895.
- [26] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24):4876-4882.
- [27] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10):2731-2739.
- [28] Guo A-Y, Zhu Q-H, Chen X, et al. GSDS: a gene structure display server [J]. Yi Chuan, 2007, 29(8):1023.
- [29] Barrett T, Edgar R. Gene Expression Omnibus (GEO): Microarray data storage, submission, retrieval, and analysis [J]. Methods in Enzymology, 2006, 411:352.
- [30] Tuskan G A, Difazio S, Jansson S, et al. The genome of black cottonwood, Populus trichocarpa (Torr. & Gray) [J]. Science, 2006, 313(5793):1596-1604.
- [31] Harper J F, Breton G, Harmon A. Decoding Ca<sup>2+</sup> signals through plant protein kinases [J]. Annual Review of Plant Biology, 2004, 55:263-288.
- [32] Sheen J. Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinases and stress signal transduction in plants [J]. Science, 1996, 274(5294):1900-1902.