PIBB 生物化学与生物物理进展
Progress in Biochemistry and Biophysics
2011, 38(1): 36~45
www.pibb.ac.cn

钙调素参与拟南芥根细胞增殖及幼苗对外源脱落酸的敏感性反应过程 *

程玉豆 ** 韩书云 ** 赵军峰 高英杰 孙大业 崔素娟 ***
(河北师范大学生命科学学院，河北省分子细胞生物学重点实验室，石家庄 050016)

摘要 钙调素作为真核细胞的重要信号蛋白，在真核生物正常及逆境条件下的生长发育中发挥着重要作用．研究报道钙调素可促进离体培养的高等动植物细胞的增殖，但有关钙调素蛋白在植物体内的细胞增殖功能尚未见报道．特别是拟南芥基因组中存在 7 个编码经典钙调素亚型的基因，多数编码基因的功能有待进一步探究．首先借助常用的钙调素拮抗剂 W7 进行药理学实验，结果表明，野生型拟南芥幼苗根的生长受到了明显的抑制，根尖分生区的面积变小、细胞数目明显减少，根尖分生区中细胞分裂标记基因 *CYCB1;1* 的表达受到了明显抑制，这表明在根尖分生区 W7 可能通过对活性钙调素的抑制作用影响了根尖分生区域的细胞增殖，而根尖分生区正常的细胞增殖需要一定量活性钙调素蛋白的存在．脱落酸(ABA)是植物逆境下的重要激素，在植物种子萌发及幼苗生长发育中发挥着重要作用，W7 存在下的拟南芥幼苗对 ABA 的敏感性下降．借助反向遗传学手段获得了拟南芥中三个编码典型钙调素蛋白基因的三重缺失突变体 *cam234*，蛋白质印迹结果表明三重缺失突变体中钙调素蛋白的含量明显降低．相同培养条件下与野生型相比，三重突变体幼苗根长变短，并且幼苗对 ABA 敏感性也表现下降趋势，暗示着这三个基因编码的钙调素蛋白可能参与了根分生区域细胞增殖过程及幼苗对脱落酸的敏感性反应，讨论了钙调素的细胞增殖功能及与幼苗对脱落酸的敏感性反应间的关系．

关键词 钙调素拮抗剂 W7，脱落酸(ABA)，拟南芥，根尖，细胞增殖，钙调素 *cam234* 三重突变体
学科分类号 Q291 **DOI**: 10.3724/SP.J.1206.2010.00441

Ca^{2+} 作为第二信使，在植物生长和发育过程中发挥重要的作用．许多环境刺激均能够引起胞内钙离子浓度的变化，如热、风、冷、光、触摸、伤害、盐胁迫等都能引起胞内钙离子浓度的升高[1-4]．这些报道暗示着 Ca^{2+} 可能参与并调节了细胞的许多基本生命活动．Ca^{2+} 信号产生后，需要被下游的受体识别并传递，目前已报道的 Ca^{2+} 受体主要有钙依赖蛋白激酶(Ca^{2+}-dependent protein kinases，CDPKs 或 CPKs)，钙调磷酸酶 B 亚基样蛋白(calcinurium B-like，CBLs)，钙调素(calmodulins，CaMs)和钙调素样蛋白(CaM-like，CMLs)，其中动物 CaM 自 20 世纪 60 年代末被发现以来，一直是人们关注的热点信号蛋白，主要从钙调素蛋白的结构、生化特性、结合蛋白的检测及功能等方面进行了一系列的研究[5-7]．

与酵母和动物中钙调素编码基因数量较少不同，模式植物拟南芥(*Arabidopsis theliana*)基因组中存在着 7 个典型的 *CaM* 编码基因(*AtCaM1*～*7*)，这 7 个基因所编码的钙调素蛋白被分为 4 个亚型[8-11]，4 个亚型 CaM 在氨基酸序列上高度保守，相互间仅有 1～5 个氨基酸的差异，与人类中的 CaM 蛋白相比，氨基酸一致率可达到 90%左右．此外，拟南芥中还存在着约 50 种 *CMLs* 基因，这些 CMLs 蛋白均至少含有一个预测的 EF 手型钙离子结合结构域，氨基酸序列上与典型的 CaM 相比约有 16%的一致性[12]．拟南芥中拥有如此众多的 CaMs 及 CMLs 暗示着它们的重要性及在功能上可能存在着

* 国家重大科学研究计划项目课题(2006CB910605)，教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-06-0256)和河北省自然科学杰出青年项目(C2009001516)资助项目．
** 共同第一作者．
*** 通讯联系人．
Tel: 0311-86269144，E-mail: cuisujuan@263.net
收稿日期：2010-08-25，接受日期：2010-11-09

冗余性，解析这些基因及编码蛋白的功能是一种挑战，同时也有助于认识植物多样钙调素基因及蛋白质亚型的生物学意义.

在动物中，钙调素能通过与多种细胞增殖相关的生长因子、激素相互作用来调控细胞增殖[13]，当老鼠 C127 细胞超表达 CaM 时，细胞迅速增殖，而降低 CaM 表达时，细胞增殖减缓[14]. 在植物中，一些 CaM 结合蛋白陆续被报道参与了细胞增殖，如 DRL1 在拟南芥分生组织活性及器官的生长发育中发挥着重要功能[15]，衣藻中的驱动蛋白样(kinesin-like)钙调素结合蛋白在细胞分裂过程中发挥着重要的作用[16]. 我室早期研究表明外源钙调素能够促进白芷悬浮细胞的增殖、原生质体细胞壁再生及细胞分裂[17-19]以及促进花粉萌发和花粉管伸长[20]. 然而这些结果多来源于体外实验，由于酵母及动物中钙调素缺失突变往往造成个体不能存活，对钙调素在动物个体水平的研究很难开展，植物由于钙调素多个基因的存在，对一个或少数钙调素基因的缺失突变的研究还刚刚开始，只有少数钙调素基因的功能有文献报道，但有关哪些钙调素基因参与植物个体生长发育中的细胞增殖过程尚未见报道.

脱落酸(abscisic acid，ABA)是非常重要的植物激素，调控着植物的逆境反应和生长发育. 研究报道表明，Ca^{2+} 信号参与了 ABA 信号转导途径，三类 Ca^{2+} 结合蛋白 CPKs、CBLs、CMLs 中的某些成员参与了 ABA 信号转导途径. 当超表达 *CPK32* 时，拟南芥表现出对 ABA 的超敏感性[21]，CPK3 和 CPK6 参与了 ABA 对气孔运动的调节[22]，CPK4 和 CPK11 作为蛋白激酶，通过磷酸化 ABA信号途径中的转录因子 ABF1 和 ABF4 来实现对 ABA 信号途径的调控[23]. *cbl1* 突变体对外源 ABA 不敏感，而 *cbl9* 突变体对外源 ABA 敏感，进一步研究证实 CBL1 和 CBL9 能够与 CIPK3 相互作用来完成 ABA 反应[24]. 最近 CML 家族的两个成员 CML9、CML24 被证实也参与了 ABA 反应途径，*CML9* 突变后，拟南芥幼苗表现出对 ABA 的超敏感性[25]. 当 *CML24* 表达下调时，拟南芥植株对 ABA 不敏感[26]. 然而作为发现最早、研究报道最多的一类重要的 Ca^{2+} 受体蛋白——钙调素，目前还未见报道其是否参与了 ABA 信号转导途径及 ABA 反应.

我们首先观察了在含有钙调素拮抗剂的培养基上拟南芥幼苗根的生长、细胞分裂及 ABA 反应的变化，同时筛选鉴定了钙调素不同编码基因的拟南芥缺失突变体，遗传杂交得到了三重缺失突变体，观察了正常及 ABA 处理下的表型变化，旨在揭示钙调素基因或编码钙调素蛋白亚型在植物个体水平上的细胞增殖、正常及逆境生长发育中的作用.

1　材料与方法

1.1　植物材料

拟南芥 col-0 生态型野生型种子由我室保存. 转 *CYCB1;1::GUS* 基因的拟南芥种子由中国农业大学巩志忠教授馈赠. 拟南芥 T-DNA 插入种子购于美国俄亥俄州立大学的 ABRC(http://abrc.osu.edu)或欧洲的 NASC(http://arabidopsis.info)种子中心.

1.2　拟南芥种子的消毒及萌发

拟南芥种子经 75%乙醇表面消毒 30 s，无菌水洗 3 次后，播种在 1/2 MS 固体培养基(1/2×MS 盐和维生素，1.5%蔗糖，0.8%琼脂粉，KOH 调 pH 至 5.8)上，4℃ 黑暗处理 3 天后水平置于光照培养箱中，在 22℃，16 h 光照(光强 130 μmol/(m^2•s))及 8 h 黑暗的光周期条件下培养，数码相机拍照并计算子叶变绿的速率.

1.3　拟南芥幼苗的培养及根长测量

拟南芥种子经消毒及 4℃ 暗中处理 3 天后，分别点种于 MS 固体或含不同量药剂的液体培养基中，光照培养箱 22℃，16 h 光照(光强 130 μmol/(m^2•s))及 8h 黑暗的光周期条件下竖直或 55 r/min 摇荡培养，5～6 天后利用直尺或 Motic Images 2000 软件测量根长，每种株系至少测量 30 个样本.

1.4　根尖细胞的显微观察

取 **1.2**，**1.3** 方法中不同处理条件生长 5～6 天的幼苗，将其分别放于载玻片上，滴加 50 μl 根透明液(3 ml 纯水，8 g 水合氯醛，1 ml 甘油，避光搅拌 1～4 h)，盖上盖玻片，室温放置过夜，倒置显微镜(日本尼康公司，型号 TE2000-U)下 DIC 物镜观察, Nikon ACT-1 软件记录图像, Motic Images 2000 软件测量根分生区的面积及统计单位视野面积的细胞总数，每种处理样本至少测量 30 个.

1.5　蛋白质电泳及免疫印迹

取 1/2MS 培养基上生长 6 天的拟南芥整株幼苗(seedling)或分别取子叶(cotyledon)、根(root)，置液氮中研磨，加样品缓冲液后混匀，12 000 *g* 离心 5 min，进行 12% 非连续 SDS-PAGE 后，电　转移至 PVDF 膜(密理博公司)，5%脱脂奶粉 37℃ 封闭 1～2 h，加入我室自制的抗钙调素血清(1∶2 000

稀释)室温孵育过夜，洗膜，转入碱性磷酸酶标记的二抗(1∶500 稀释，中杉金桥公司)中室温孵育 1 h, 洗膜后，加碱性磷酸酶底物显色，采用 microtek scanmaker i800 扫描仪记录图片.

1.6 转基因植株 GUS 染色

转 CYCB1;1 启动子与 β- 葡糖醛酸酶(GUS)融合基因(*CYCB1;1::GUS*)拟南芥幼苗的 GUS 染色参照 Jefferson 等方法[27]. 首先配置 X-gluc 母液(100 mg X-gluc 溶于 5 ml DMF)和基液(50 mmol/L PBS，pH7.0，10 mmol/L EDTA-2Na，0.1% Triton X-100，0.5 mmol/L 铁氢化钾，0.5 mmol/L 亚铁氢化钾)，用时将母液与基液按 1∶19 的体积比混合成染色使用液. 将在有或无钙调素拮抗剂存在的 1/2 MS 培养液中培养 5 天的拟南芥幼苗分别置于上述染色使用液中，室温染色过夜，透明后，显微照相.

1.7 RT-PCR

总 RNA 的提取参照 Trizol reagent (Invitrogen 公司)试剂盒提供的方法，利用两步 RT-PCR 法(TaKaRa 公司)对野生型(col-0)及突变体进行转录本的鉴定. *AtCaM2* (At2g41110)转录本扩增所用引物为：上游引物 FP, 5′ CCCTTTTTCTCCAATCAC-AG 3′,下游引物 RP, 5′ CAATCCTCACTTAGCCA-TCATAAC 3′,扩增片段大小为 494 bp. *AtCaM3* (At3g56800)转录本扩增所用引物为：FP，5′ TTT-CCAGCAGAGACACTTTTTC 3′，RP，5′ CGCGA-ACTAGACCAAGGTTAC 3′，扩增片段大小为 1 399 bp. *AtCaM4* (At1g66410)转录本扩增所用引物为：FP, 5′ GGCTCAAATCAAACCCAAGAC 3′，RP, 5′ CCAAAGAAACGAGAAGAAGAAGC 3′，扩增片段大小为 583 bp. 内参对照 *ACTIN* (At2g37620) 转录本扩增所用引物为：FP, 5′ AGG-CACCTCTTAACCCTAAAGC 3′，RP, 5′ GGACA-ACGGAATCTCTCAGC 3′，扩增片段大小为 454 bp, 引物合成自上海生工生物技术公司(www.sangon.com).

2 结 果

2.1 W7 抑制拟南芥幼苗根的生长

在拟南芥中，7 个典型的 *CaM* 基因以及 50 个 *CML* 基因已被克隆，这些基因编码的 CaM 及 CML 蛋白在功能上可能存在着冗余性，因此借助单个基因的突变体可能较难观测到明显的表型变化，因此我们借助了钙调素蛋白的拮抗剂 W7 (N-(6-aminohexyl)-5-chloro- 1-naphthalenesulfonamide), W7 是一种小分子可跨膜的化学药剂，常被用于特异性地抑制钙调素蛋白活性的实验中，而 W7 结构类似物 W5 对钙调素蛋白活性无影响. 在含有一定量 W7 药剂的固体培养基上，拟南芥幼苗根的生长受到了明显抑制，进而采用液体培养这一有利于药剂施加的培养方式，观察了在 W7 存在条件下，拟南芥幼苗根的生长情况(图 1a). 在液体培养体系中振摇培养 5 天时，无外加其他任何药剂的正常培养液中，拟南芥幼苗的根长平均为(3.99±0.25) mm；外加 100 μmol/L 的 W5 处理时，根长平均为(4.15±0.27) mm，与正常培养液培养的幼苗根长相比差异不显著；外加同样浓度的 W7 时，根的长度减少到(0.52±0.02) mm，只有 W5 处理对照组的 12.5%左右，差异极显著(图 1b). 统计分析表明 W7 处理条件下，根的生长受到显著抑制.

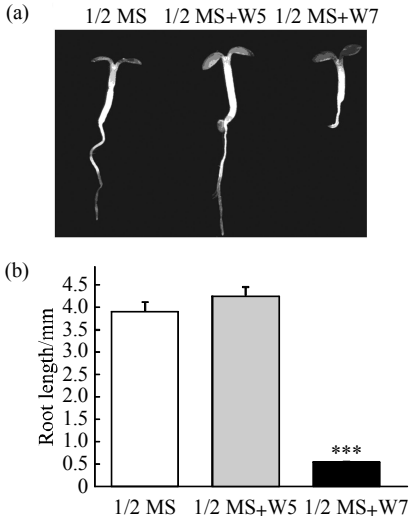

Fig. 1 W7 inhibited the growth of *Arabidopsis* root

(a) The picture of seedlings in 1/2 MS liquid medium supplemented with or without 100 μmol/L W7, W5 at 5 days after germination. (b) Measurement of root length of seedlings as mentioned in (a). The data and error bars represent the $\bar{x} \pm s$ ($n \geqslant 30$, at least two independent experiments, $^{***}P < 0.001$).

2.2 W7 抑制根分生组织细胞增殖

根生长受抑制可能由下面的原因造成：一是根分生区细胞的分裂能力降低，造成细胞数目减少，根生长受抑制；二是根分生区的细胞分裂活动正常，但根伸长区细胞的伸长生长受抑制；三是前两个原因同时存在造成的. 为了确定哪种原因影响了 W7 对根生长的抑制，我们对液体培养生长 5 天的拟南芥幼苗的根部进行了水合氯醛透明化处理，并进行了显微镜观察(图 2a)及根分生区的面积及细胞

大小数目的测量统计分析(图 2b, c). 结果表明，W7 处理的拟南芥幼苗的根分生组织明显变小，与两个对照相比，其分生区在最清晰最大的一个焦平面的面积约为对照组的 43%(图 2b)，对该焦平面的分生区细胞数目的统计结果显示，W7 处理的拟南芥幼苗根分生组织的细胞数目仅为两个各对照实验组的 40%左右(图 2c)，而 W7 处理的幼苗分生组织区细胞在大小上没有明显的变化(未显示数据). 表明 W7 对于根伸长的抑制主要是通过抑制分生区细胞增殖，降低了根细胞总数造成的.

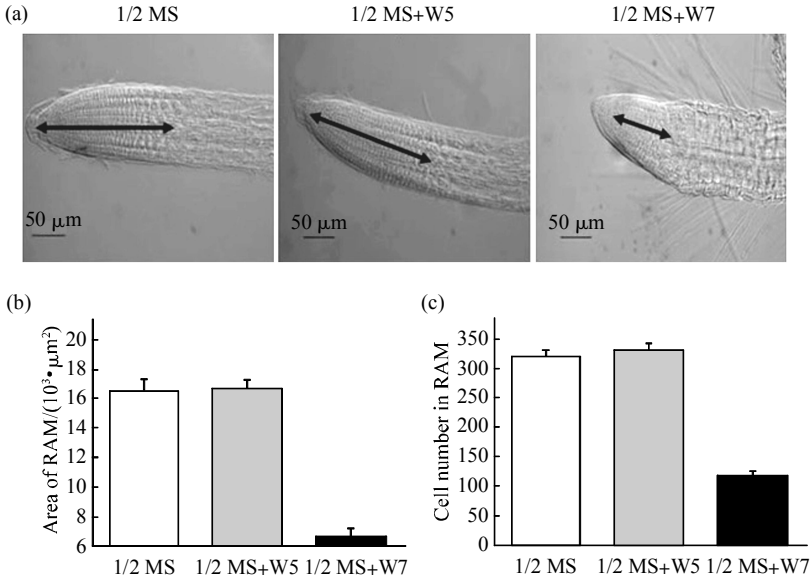

Fig. 2　W7 inhibited the cell proliferation in root apical meristem of *Arabidopsis*

(a) The micrograph of seedlings' root in 1/2 MS liquid medium, or supplement with 100 μmol/L W7 or W5 at 5 days after germination (DAG). Double arrow indicated the root apical meristem (RAM). (b) and (c) The statistic of RAM area and cell number in RAM in 5-DAG seedlings in 1/2 MS liquid medium ,or supplement with 100 μmol/L W7 or W5. The data and error bars represent the $\bar{x} \pm s$ ($n \geqslant 30$, two independent experiments).

2.3　W7 抑制细胞分裂标记基因 *CYCB1;1* 在根分生组织的表达

根据前人文献报道，得到细胞周期素 B1;1 启动子融合 β- 葡萄糖醛酸酶报告基因(*CYCB1;1::GUS*)的拟南芥转基因株系，通过 GUS 报告基因的化学底物显色，可以很方便地检测到细胞是否处于分裂中[28]. W7 处理的拟南芥幼苗根分生区面积及细胞数目明显减小，这说明细胞的分裂活动可能受到了抑制. 为了验证这一点，采用与野生型拟南芥相同处理条件，对 *CYCB1;1::GUS* 融合基因的转基因拟南芥幼苗进行了处理， GUS 组织染色结果表明，在两个对照组(图 3a, b)，*CYCB1;1* 基因表达正常，而用 100 μmol/L W7 和另一种常用的钙调素抑制剂三氟拉嗪(trifluoperazine, TFP)处理的幼苗根尖分生区均未见到明显的染蓝现象，表明 *CYCB1;1* 基因在此区域基本上未表达或表达水平很低(图 3c, d)，这表明 W7 和 TFP 处理抑制了根尖分生区的细胞增殖.

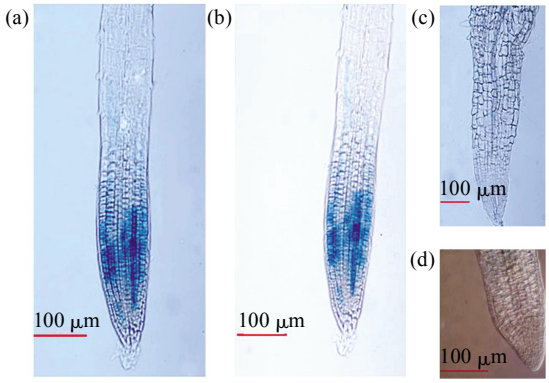

Fig. 3　The effect of W7 and TFP on the expression of *CYCB1;1* in the root meristem of *Arabidopsis* transgenic Pro*CYCB1;1::GUS* seedling by GUS stain

(a)1/2 MS liquid medium. (b) 1/2 MS liquid medium with 100 μmol/L W5. (c) 1/2 MS liquid medium with 100 μmol/L W7. (d) 1/2 MS with 100 μmol/L TFP. Bar =100 μm.

2.4　钙调素拮抗剂 W7 处理的拟南芥幼苗对 ABA 不敏感

我们将 col-0 种子点种到含有不同浓度的 CaM 拮抗剂 W7 以及不同浓度顺反式混合的 ABA 的 1/2 MS 固体培养基上，在长日照条件下观察了拟南芥幼苗子叶变绿及后期生长的情况．结果表明，150 μmol/L W7 处理的幼苗对 ABA 的敏感性明显降低，而 W7 结构类似物 W5 处理的幼苗，则与正常培养基对照组相比没有明显不同(图 4a)．统计结果显示，处理 10 天后，当 ABA 浓度≥2 μmol/L 时，150 μmol/L W7 处理的幼苗子叶变绿速率明显快于两个对照组(图 4b)，在 2 μmol/L ABA 存在的条件下，150 μmol/L W7 处理的小苗在第 11 天时，已有约 90%子叶变绿，而对照组的小苗仅有约 40%左右(图 4c)．这暗示着被 W7 抑制的 CaM 蛋白在幼苗对 ABA 敏感性反应中可能起着重要作用．

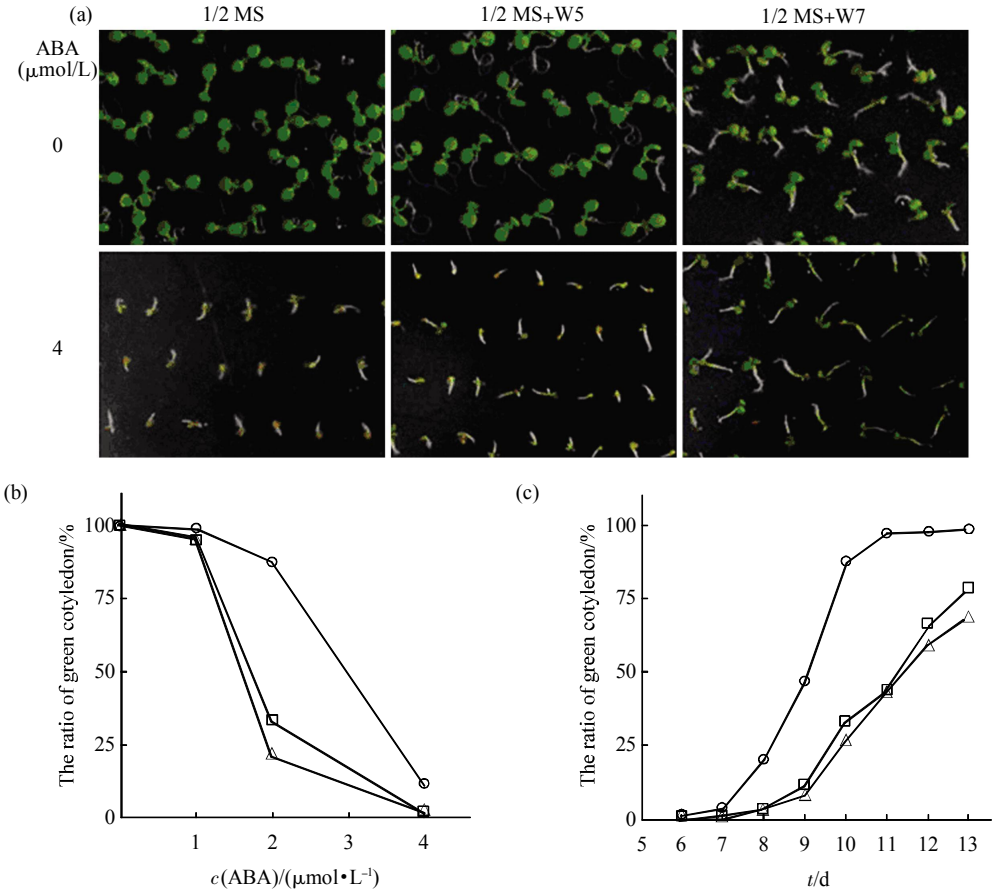

Fig. 4　*Arabidopsis* seedlings with treatment of W7 had decreased sensitivity to exogenous ABA

(a) The picture of seedlings at 10th day after stratification on 1/2 MS medium supplemented with different concentrations of (±) ABA, W7, W5(with structure similarity to W7, but no CaM-inhibitor activity). (b)The effect of exgenous ABA on the appearance of green cotyledons with or without 150 μmol/L W7. The data and error bars represent the $\bar{x} \pm s$ ($n \geqslant 200$, at least three independent experiments). □—□ : 1/2 MS; △—△ : 1/2 MS+W5; ○—○ : 1/2 MS+W7. (c) Time course of appearance of green cotyledons with 2 μmol/L (±) ABA and 150 μmol/L W7. □—□ : 1/2 MS + 2 μmol/L ABA; △—△: 1/2 MS+2 μmol/L ABA+W5; ○—○: 1/2 MS+2 μmol/L ABA+W7.

2.5　拟南芥钙调素突变体筛选鉴定与表型观察

为了确定哪些钙调素基因参与了拟南芥根细胞增殖与 ABA 反应，我们借助反向遗传学手段对 *AtCaM* 家族多个基因的 T-DNA 插入突变体进行了筛选鉴定分析，本文只涉及其中的三个基因，即 *AtCaM2*、*AtCaM3*、*AtCaM4* 三个基因的 T-DNA 插入缺失突变体(图 5)，T-DNA 分别插在了这三个基因的第二个外显子、5′非编码区及内含子上(图 5a)，RT-PCR 检测表明得到了 *cam2*，*cam3*，和 *cam4* 三个基因的缺失突变体(图 5b 左图)，通过遗传杂交及 RT-PCR 鉴定，我们得到了三重突变体 *cam2 cam3 cam4* (简写为 *cam234*)，在 *cam234* 中同

时缺失了 *AtCaM2*、*AtCaM3* 和 *AtCaM4* 3 个基因的转录本(图 5b 右图). 蛋白质印迹结果显示，在 *cam234* 三重突变体的全苗及子叶全蛋白中，CaM 含量与野生型相比有略微下降，但根全蛋白中，CaM 含量与野生型相比有显著下降.

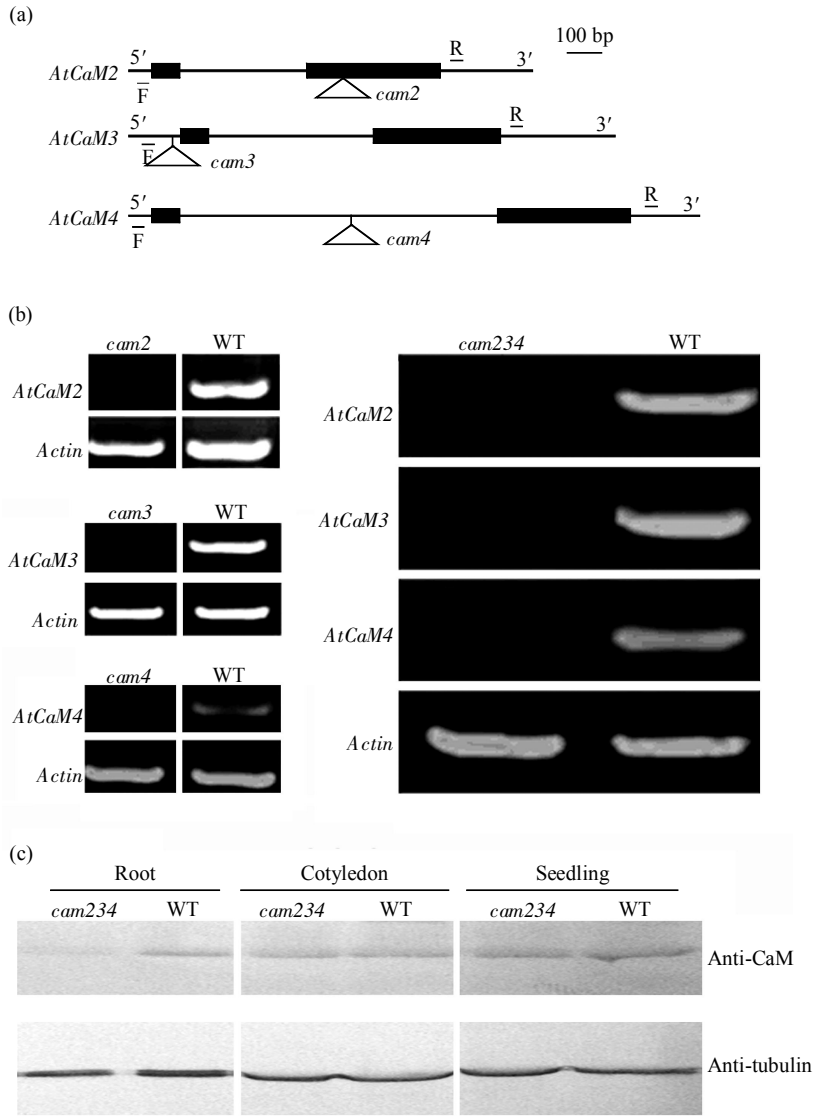

Fig. 5　Identification of *cam234* triple mutant by RT-PCR and Western blot

(a) The structure map of *AtCaM2*, *AtCaM3*, and *AtCaM4* gene. The black boxes represent exons, lines indicate introns, 5′ and 3′ untranslated regions, and triangles indicated the T-DNA insertions. F, forward primer; R, reverse primer; (b) RT-PCR analyses to detect *AtCaM2*, *AtCaM3*, and *AtCaM4* transcripts in 2-week-old wild-type (WT) and *cam234* triple mutant seedlings. *Actin* as loading control. (c) Western blotting showing CaM protein in seedling, cotyledon and root of wild type (WT) and *cam234* mutant at 6 days after germination. Tubulin as loading control.

在正常生长条件下，与野生型材料相比，各单突变体及双重突变体在根伸长等方面没有观察到明显的表型差异(数据未显示)，而 *cam234* 三重突变体的根长变短(图 6a)，只有野生型的 70%左右，统计分析表明差异显著(图 6b)，根分生区面积与野生型相比也明显变小(图 6c). 当培养基中加入 4 μmol/L 顺反式(±)ABA 混合物时，*cam234* 子叶变绿的速率要明显快于野生型(图 6d). 统计结果显示，处理 22 天后，在 4 μmol/L ABA 存在的条件下，*cam234* 三重突变体幼苗有 40%子叶变绿，而野生型幼苗仅有 20%左右(图 6e)，而各单、双重突变体未见明显表型(数据未展示).

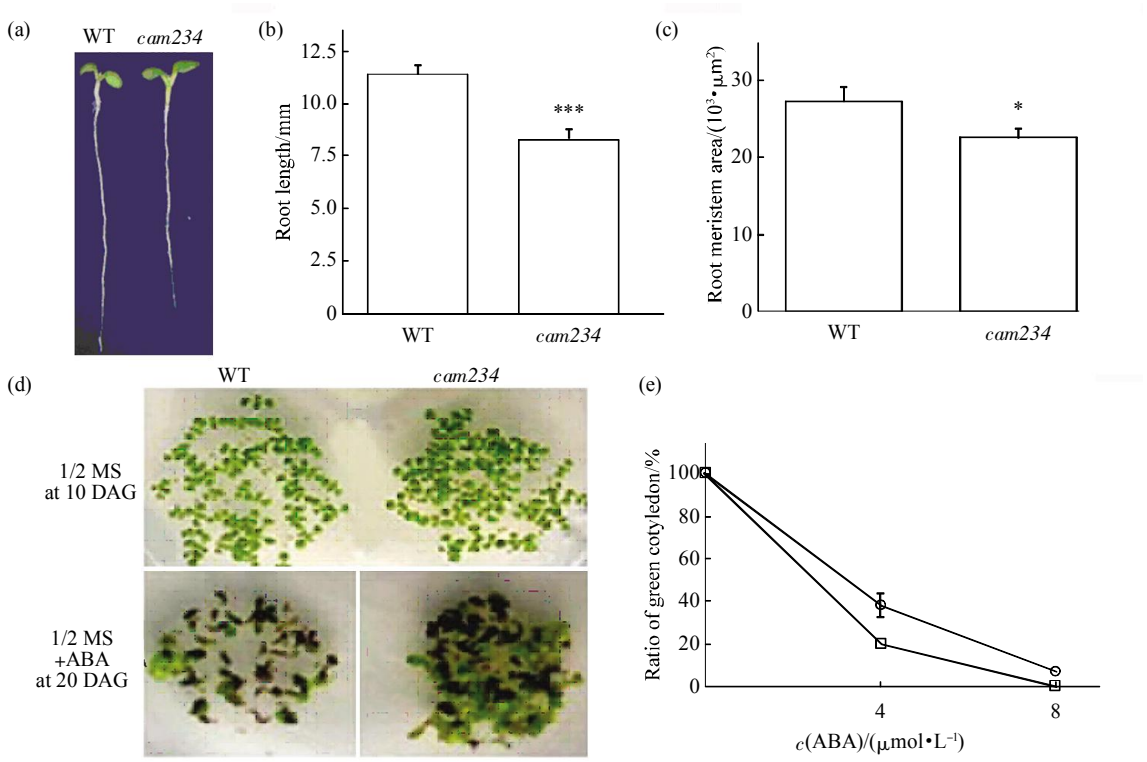

Fig. 6　Root and cotyledon phenotypes of *cam234* triple mutant

(a) The photo of wild type(WT) and *cam234* triple mutant seedlings at 6 days after germination (DAG). (b) The statistics of root length of wild type (WT) and triple mutant *cam2cam3cam4* (*cam234*) at 6 DAG. (c) The statistic of root meristem area of WT and *cam234* at 6 DAG. (d) The photos of WT and *cam234* seedlings grew in 1/2 MS mediumwith or without ABA at 10 or 20 DAG. (e) Ratio of the green cotyledons treated with different concentrations of ABA at 20 DAG. □—□: WT; ○—○: *cam234*. The data and error bars represent the $\bar{x} \pm s$ ($n \geqslant 100$ in three independent experiments, $^*P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$).

3　讨　　论

不同的生物及非生物刺激会使细胞产生不同的 Ca^{2+} 信号，这些 Ca^{2+} 信号由下游的 Ca^{2+} 受体蛋白接收，通过信号转导，最终引起生理反应．在植物中，Ca^{2+} 信号的受体蛋白主要有 CDPKs、CBLs、CaMs 和 CMLs 等几种[29-30]，CaM 作为 Ca^{2+} 受体蛋白在 Ca^{2+} 信号通路中起着非常重要的作用．Snedden 等[31]分析并总结了 CaM 亚型特异性，提出了不同的 CaM 可能接收相同或不同的 Ca^{2+} 信号的观点．随着研究的逐渐深入，CaM 单基因相关的功能陆续被报道，如我室报道 CaM3 在热激信号转导途径中起着重要的作用[32]，CaM7 作为一个转录调节因子在拟南芥幼苗的光控生长发育过程中扮演着重要的角色[33]．这些研究暗示着 CaM 在植物体生长发育过程中存在着广泛的功能．在动物中已有研究表明，CaM 在细胞的增殖过程中发挥着重要的功能，其通过与下游靶蛋白如 Calcineurin 和 CaMKs 相互作用来完成对细胞的增殖调控[34-35]．有关植物 CaM 蛋白，或是某些特定钙调素基因编码的蛋白质亚型，是否调控在体植物细胞的增殖尚少见报道．我们利用反向遗传学手段，通过遗传杂交得到了 *cam234* 三重突变体，且三重突变体植物根全蛋白中钙调素含量明显降低(图 5)，在正常生长条件下，三重突变体植株根的生长受到了抑制，根尖分生区面积减小(图 6a, b)．此外，借助 CaM 蛋白的拮抗剂 W7 处理使拟南芥幼苗根的生长受到明显的抑制，幼苗根分生区面积减小，细胞数目减少(图 1～3)，而且较高浓度的 W7 存在下，根分生区细胞增殖受抑程度较高．拟南芥 *cam234*三重突变体和钙调素抑制剂处理的实验数据表明，*CaM2*、*CaM3*、*CaM4* 编码的典型钙调素蛋白可能均参与了根的生长及根尖分生区细胞增殖过程．

早期的研究表明，Ca^{2+} 在 ABA 信号转导途径

发挥着重要的作用[36]，而 Ca^{2+} 信号的传递需要借助于受体蛋白，研究已证实，Ca^{2+} 结合蛋白 CDPKs，CBLs 和 CMLs 家族中的某些成员参与了 ABA 信号转导途径，而作为最重要的一类 Ca^{2+} 结合蛋白——CaM 则未见报道．已有研究报道 CaM 结合蛋白 AtMYB2 作为转录激活因子参与了 ABA 信号反应途径[37-40]．研究表明，ABA 可通过抑制细胞周期蛋白基因 *CDKA* 和 DNA 复制起始相关基因 *CDT1* 等的表达，阻止根尖、胚胎细胞 DNA 合成和细胞分裂．CDKA 在细胞周期中起着非常重要的作用，调控着细胞 G1/S 及 G2/M 的转变，CYCB1 能够正向调控 CDKA 的表达，从而促进细胞的增殖[41]．用 CaM 抑制剂 W7 和 TFP 处理拟南芥幼苗，其根分生组织细胞中 *CYCB1* 表达受到明显抑制(图 3c, d)，这表明活性钙调素的存在对于根细胞的正常增殖是必需的．当 W7 和 ABA 同时存在时，幼苗子叶变绿的表型呈现对 ABA 的敏感性下降(图 4)，这表明活性钙调素蛋白参与 ABA 信号或反应途径．在突变体表型观察中，*cam234* 三重突变体对 ABA 的敏感性下降(图 6d, e)，表明 *cam2*，*cam3*，*cam4* 三个基因可能均参与了 ABA 反应，但与 CaM 拮抗剂相比表型较弱，暗示着除上述三个基因外，可能仍有其他 *CaM* 基因，甚至非*CaM* 基因参与了 ABA 反应．通过对前人及本实验研究结果分析，我们推测 ABA 可能通过 CaM 调控了拟南芥根细胞增殖，至于详细的分子调控机制，还有待于进一步的深入研究．

致谢 感谢巩志忠教授馈赠 *CYCB1;1::GUS* 融合基因的转基因种子．

参 考 文 献

[1] Liu H T, Li B, Shang Z L, *et al*. Calmodulin is involved in heat shock signal transduction in wheat. Plant Physiol, 2003, **132** (3): 1186−1195

[2] Knight M R, Smith S M, Trewavas A J. Wind-induced plant motion immediately increases cytosolic calcium. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, **89**(11): 4967−4971

[3] Evans N H, McAinsh M R, Hetherington A M. Calcium oscillations in higher plants. Curr Opin Plant Biol, 2001, **4**(5): 415−420

[4] Sander D, Pelloux J, Brownlee C, *et al*. Calcium at the crossroads of signaling. The Plant Cell, 2002, **14**(Suppl): S401−417

[5] 马力耕, 孙大业. 钙调素的结构生物学研究进展. 生物化学与生物物理进展, 1999, **26**(3): 209−213
Ma L G, Sun D Y. Prog Biochem Biophys, 1999, **26**(3): 209−213

[6] Roberts D M, LukasT J, Watterson D M, *et al*. Structure, function, and mechanism of action of Calmodulin. Critical Reviews in Plant Sciences, 1986, **4**(4): 311−339

[7] 毛国红, 宋林霞, 孙大业. 植物钙调素结合蛋白研究进展. 植物生理与分子生物学学报, 2004, **30**(5): 481−488
Mao G H, Song L X, Sun D Y. J Plant Physiology and Molecular Biology, 2004, **30**(5): 481−488

[8] Ling V, Perera I, Zielinski R E. Primary structures of *Arabidopsis* calmodulin isoforms deduced from the sequences of cDNA clones. Plant Physiol, 1991, **96**(4): 1196−1202

[9] Perera I Y, Zielinski R E. Structure and expression of the *Arabidopsis* CaM-3 calmodulin gene. Plant Mol Biol, 1992, **19**(4): 649−664

[10] Gawienowski M C, Szymanski D, Perera I Y, *et al*. Calmodulin isoforms in *Arabidopsis* encoded by multiple divergent mRNAs. Plant Mol Biol, 1993, **22**(2): 215−225

[11] Zielinski R E. Characterization of three new members of the *Arabidopsis* thaliana calmodulin gene family: conserved and highly diverged members of the gene family functionally complement a yeast calmodulin null. Planta, 2002, **214**(3): 446−455

[12] McCormack E, Tsai Y C, Braam J. Handling calcium signaling: *Arabidopsis* CaMs and CMLs. Trends in Plant Science, 2005, **10**(8): 383−391

[13] Bodine P V, Tupper J T. Calmodulin antagonists decrease the binding of epidermal growth factor to transformed, but not to normal, human fibroblastss. Biochem J, 1984, **218**(2): 629−632

[14] Rasmussen C D, Means A R. Calmodulin is required for cell-cycle progression during G1 and mitosis. The EMBO J, 1989, **8**(1): 73−82

[15] Nelissen H, Clarke J H, De Block M, *et al*. DRL1, a homolog of the yeast TOT4/KTI12 protein, has a function in meristem activity and organ growth in plants. The Plant Cell, 2003, **15**(3): 639−654

[16] Erin E D, Daniel G, Tal K, *et al*. A kinesin-like calmodulin-binding protein in Chlamydomonas: evidence for a role in cell division and flagellar functions. J Cell Science, 2003, **119** (15): 3107−3116

[17] Sun D Y, Li H B, Cheng G. Extracellular calmodulin accelerate the proliferation of suspension cultured cells of Angelica dahurica. Plant Sci, 1994, **99**(1): 1−8

[18] Sun D Y, Bian Y Q, Zhao B H, *et al*. The effects of extracellular calmodulin on cell wall regeneration and cell division of protoplasts. Plant Cell Physiol, 1995, **36**(1): 133−138

[19] Cui S J, Guo X Q, Chang F, *et al*. Apoplastic calmodulin receptor-like binding proteins in suspension-cultured cells of *Arabidopsis* thaliana. J Biol Chem, 2005, **280**(36): 31420−31427

[20] Ma L G, Fan Q, Yu Z, *et al* . Does aluminum inhibit pollen germination *via* extracellular Calmodulin?. Plant Cell Physiol, 2000, **41**(3): 372−376

[21] Chico J M, Raíces M, Téllez-Iñón M T, *et al*. A calcium-dependent protein kinase is systemically induced upon wounding in tomato plants. Plant Physiol, 2002, **128**(1): 256−270

[22] Mori I C, Schroeder J I. CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA

regulation of guard cell S-type anion and Ca^{2+}-permeable channels and stomatal closure. PLoS Biol, 2006, **4**(10): 1749−1761

[23] 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*. The Plant Cell, 2007, **19**(10): 3019−3036

[24] 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*. Plant J, 2006, **48**(6): 857−872

[25] 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. Plant Physiol, 2008, **56**(4): 579−585

[26] Delk N A, Johnson K A, Chowdhury N I, *et al*. CML24, Regulated in expression by diverse stimuli, encodes a potential Ca^{2+} sensor that functions in responses to abscisic acid, daylength, and ion stress. Plant Physiol, 2005, **139**(1): 240−253

[27] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. Gus fusions: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene marker in higher plants. EMBO J, 1987, **6**(13): 3901−3907

[28] Harrar Y, Bellec Y, Bellini C, *et al*. Hormonal control of cell proliferation requires *PASTICCINO* genes. Plant Physiol, 2003, **132**(3): 1217−1227

[29] White P J, Martin R B. Calcium in plants. Annals of Botany, 2003, **92**(4): 487−511

[30] McCormack E, Braam J. Calmodulins and related potential calcium sensors of *Arabidopsis*. New Phytologist, 2003, **159**(3): 585−598

[31] Snedden W A, Hillel F. Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. New Phytologist, 2001, **151**(1): 35−66

[32] Zhang W, Zhou R G, Gao Y J, *et al*. Molecular and genetic evidence for the key role of AtCaM3 in heat-shock signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol, 2009, **149**(4): 1773−1784

[33] Kushwaha R, Singh A, Chattopadhyay S. Calmodulin 7 plays an important role as transcriptional regulator in *Arabidopsis* seedling development. The Plant Cell, 2008, **20**(7): 1747−1759

[34] Koledova V V, Khalil R A. Ca^{2+}, calmodulin and cyclins in vascular smooth muscle cell cycle. Circ Res, 2006, **98**(10): 1240−1243

[35] Rodriguez-Mora O G, LaHair M M, McCubrey J A, *et al*. Calcium/calmodulin-dependent kinase I and calcium/calmodulin-dependent kinase kinase participate in the control of cell cycle progression in MCF-7 Human breast cancer cells. Cancer Res, 2005, **65**(12): 5408−5416

[36] Kahl C R, Means A R. Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. Endocrine Reviews, 2003, **24**(6): 719−736

[37] Hirayama T, Shinozaki K. Perception and transduction of abscisicacid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. Trends in Plant Science, 2007, **12**(8): 343−351

[38] Abe H, Urao T, Ito T, *et al*. *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. The Plant Cell, 2003, **15**(1): 63−78

[39] Kim M C, Chung W S, Yun D J, *et al*. Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants. Molecular Plant, 2008, **2**(1): 13−21

[40] Yoo J H, Park C Y, Kim J C, *et al*. Direct interaction of a divergent CaM isoformand the transcription factor, MYB2, enhances salt tolerance in *Arabidopsis*. J Bio Chem, 2005, **280**(5): 3697−3706

[41] Gutierrez C. The *Arabidopsis* cell division cycle. The *Arabidopsis* Book, 2009, http://www.bioone.org/doi/full/10.1199/tab.0120 (doi: 10.1199/tab.0120)

Calmodulin Involved in The Cell Proliferation of Root Apical Meristem and ABA Response in *Arabidopsis*[*]

CHENG Yu-Dou[**], HAN Shu-Yun[**], ZHAO Jun-Feng, Gao Ying-Jie, SUN Da-Ye, CUI Su-Juan[***]

(*Institute of Molecular and Cell Biology, Hebei Key Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Hebei Normal University, Shijiazhuang* 050016, China)

Abstract Calmodulin (CaM) is an important signal protein in eukaryotes and play multiple regulatory roles in eukaryotes' development in normal and stress conditions. Previous reports showed that calmodulin could accelerate animals and plants' cell proliferation *in vitro*. However, there is nearly no reports on cell proliferation *in vivo* in plants under normal and stress conditions. Here, calmodulin antagonist W7 inhibited the root elongation of *Arabidopsis* seedlings, and the area and cell number of root apical meristem were reduced, the expression of *CYCB1;1* gene which plays a key role in cell proliferation was seriously restrained. This data indicates that activated calmodulin is required for cell proliferation. Abscisic acid (ABA), as a key hormone mediating plant adaptation to various environmental challenges, regulates many processes of plant growth and development, such as seed germination and seedling growth. In the present of W7, wild type arabidopsis seedlings are insensitive to ABA, and *cam2cam3cam4* triple mutant had decreased sensitvity to ABA. The results implied that CaM might play important role in cell proliferation of root apical meristem and involved in ABA response.

Key words CaM antagonist W7, ABA, *Arabidopsis*, root, cell proliferation, *cam2cam3cam4* triple mutant

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00441

---

*This work was supported by grants from National Key Scientific Program (2006CB910600), National Education Department New Century Excellent Teacher Project (NCET-06-0256) and Hebei Natural Science Foundation for Distinguished Young Scholar (C2009001516).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-311-86269144, E-mail: cuisujuan@263.net

Received: August 25, 2010 Accepted: November 9, 2010