拟南芥微管结合蛋白 WDL3 参与 ABA 诱导的气孔关闭过程

席小慧, 王攀, 王朝阳, 于荣*

首都师范大学生命科学学院, 北京 100048

* 联系人, E-mail: yurong@cnu.edu.cn

2018-07-25 收稿, 2018-10-08 修回, 2018-10-08 接受, 2018-11-22 网络版发表

国家自然科学基金(31470011, 31871351)资助

摘要 以拟南芥 *WDL3* RNA干扰株系(*WDL3* RNAi)和Tubulin5A-YFP植株等为材料,从叶片的失水率、气孔开度、保卫细胞微管骨架动态排布以及 Ca^{2+} 流动等不同角度探究在脱落酸(abscisic acid, ABA)诱导的气孔关闭信号通路中,微管结合蛋白WDL3与微管骨架以及 Ca^{2+} 之间的功能关系,深入了解气孔运动机理.结果表明:(1)相同条件下,*WDL3* RNAi的叶片蒸腾速率明显慢于野生型.(2)气孔开度实验中,*WDL3* RNAi对ABA信号比野生型更敏感,气孔关闭更快;微管稳定剂紫杉醇(Paclitaxel)可部分阻碍ABA的作用,微管解聚剂黄草消(Oryzalin)则进一步促进ABA诱导的气孔关闭,但*WDL3* RNAi与野生型之间仍存在显著差异;激光共聚焦扫描显微镜观察发现,ABA条件下*WDL3* RNAi保卫细胞内微管解聚明显加快,微管成束程度(bundling)显著降低.(3)胞内 Ca^{2+} 螯合剂BAPTA与ABA共同处理,野生型和*WDL3* RNAi的气孔关闭均受到不同程度的抑制,关闭减缓,处理前后差异显著.亚细胞结构观察发现,BAPTA阻碍了ABA引起的保卫细胞微管解聚,但*WDL3* RNAi与野生型相比,依然维持相对较高的微管解聚比例.此外,非损伤微测技术检测发现,ABA引起的保卫细胞 Ca^{2+} 内流在*WDL3* RNAi中较野生型的流速更快,流量加大,显示 Ca^{2+} 在该信号通路中具有重要作用.综上实验结果表明,微管结合蛋白WDL3通过与微管骨架及 Ca^{2+} 相互作用参与ABA诱导的气孔关闭过程.

关键词 WDL3, 微管骨架, Ca^{2+} , 气孔关闭, 脱落酸

对于陆地植物来说,气孔使叶片内部与大气相连接,提供了一条绕过角质层的气体交换途径.气孔蒸腾占植物总蒸腾量的80%~90%,对全球的水循环和碳循环有重要的影响^[1].IPCC(the Intergovernmental Panel on Climate Change)^[2]在2014年提出,持续干旱和荒漠化地区的扩大在这个世纪越来越普遍,干旱已成为可持续农业的最大阻碍.由于全球70%的淡水用于灌溉,旱作农业是目前最大的水消耗者.植物绝大部分水分又是通过气孔的蒸腾作用流失的,调节气孔有序开关的机制研究显得尤为重要.2017年

6月, *Plant Physiology*更是以“小气孔大影响(Small pores with a big impact)”为卷首语的专刊形式详细阐述了气孔保卫细胞在今后20~30年全球面临的水资源危机和粮食危机中的巨大潜力,彰显了国际研究热点.

脱落酸(abscisic acid, ABA)是一种抗逆相关的植物激素,在抗旱中发挥重要作用.它通过诱导气孔关闭减少水分散失,与下游多种成分组成了调控气孔运动的庞大信息传递网络^[3~8],其中,微管骨架的作用已受到人们越来越多的关注^[9~18].在蚕豆保卫细胞

引用格式: 席小慧, 王攀, 王朝阳, 等. 拟南芥微管结合蛋白 WDL3 参与 ABA 诱导的气孔关闭过程. 科学通报, 2019, 64: 95–106

Xi X H, Wang P, Wang Z Y, et al. The microtubule-associated protein WDL3 mediates ABA-induced stomatal closure in *Arabidopsis* (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 95–106, doi: 10.1360/N972018-00745

气孔开关的昼夜循环节律中, 黑暗时辐射状排布(radial arrays)的微管列阵明显减少, 光照后又逐渐恢复. 此外, 微管特异性药物紫杉醇通过稳定微管延缓气孔关闭, 戊炔草胺(propyzamide, PPM)则通过使微管解聚加速气孔关闭进程^[11]. ABA与微管解聚剂黄草消(oryzalin)或PPM共同作用下, 拟南芥磷脂酶D(phospholipase D, PLD)突变体*plda1*与野生型气孔孔径均显著减小, 但由于ABA诱导的微管解聚在*plda1*中受阻, 其气孔开度明显大于野生型^[19]. 欧洲山杨中 α -tubulin(微管蛋白)表达异常不仅影响保卫细胞的细胞壁中果胶和木聚多糖的装配, 而且干旱条件下的气孔关闭和光照条件下的气孔开放都被延迟^[20]. 拟南芥纤维素合酶(cellulose synthase, CESA)的分布随着气孔的关闭由相对均匀(relatively uniform)变为多纤丝状(more fibrillar), 与胞内微管的共定位比例也呈下降趋势, 这些是保卫细胞响应ABA、壳梭孢素(fusicoccin, FC)诱导气孔开关过程中细胞变形所必需的^[21].

那么, 保卫细胞如何实现对微管骨架空间排布和动态变化的精细调控, 具体的作用机制仍在深入研究中. 微管结合蛋白(microtubule-associated proteins, MAPs)是微管动态组装最直接的调控者, 各种信号通路对于微管动态的调节最后都集中到对微管结合蛋白生物活性的调节上. 因此, 想要深入了解微管骨架如何发挥生物学功能, 研究MAPs的作用机制不失为一条有效途径. EB1(end binding protein 1)属于微管正端结合蛋白+TIP的成员之一, 在活细胞内标记正在组装的微管(+)端, 以达到追踪的目的^[22]. Eisinger等人^[17]发现 ABA 诱导的气孔关闭过程中, 保卫细胞内可观测到的微管数量明显减少, 但GFP-EB1成像显示现存的微管正端的生长速度均保持恒定. 由此推测, 微管数量的减少是由于气孔关闭过程中微管不稳定性增加使负极去组装速率加快, 微管纤维完全解聚为游离tubulin造成的. 植物MAP65(microtubule-associated protein 65)家族有9个成员, MAP65-1是其中最早被发现也是研究较为深入的一个. 于荣等人^[23]报道, 气孔开闭过程中拟南芥AtMAP65-1在保卫细胞中的定位与微管骨架的动态行为表现出紧密的同步性, 即气孔开放时AtMAP65-1排列规则有序, 呈现整齐的纤维束状结构, 沿保卫细胞的腹壁向背壁辐射状排布; 气孔关闭时AtMAP65-1呈随机的无规则排布, 充满整个保卫细胞. 据此推测

AtMAP65-1可能参与气孔运动中微管骨架动态变化的调节. 另外, 植物受到干旱胁迫时, ABA引起胞内 Ca^{2+} 浓度升高, 微管结合蛋白AtTCTP(translationally controlled tumor protein)与动物细胞中的TCTP具有类似的分子特性, 通过与 Ca^{2+} 结合促进其与微管相互作用, 最终导致微管解聚, 引起气孔关闭, 参与逆境信息传递^[24].

WVD2(WAVE-DAMPENED 2)是一种高度亲水的微管结合蛋白, 分子大小为23 kD, 在植物界广泛存在. Yuen等人^[25]将野生型拟南芥置于倾斜的琼脂培养基上, 发现根会以一种波浪型的模式(wavy pattern)生长并向右倾斜, 根冠细胞的微管几乎全部横向排列; 相同条件下*wvd2-1*并未出现波浪型生长现象, 且根向左倾斜, 根冠细胞内微管横向、纵向和斜向交错排列, 根部生长受到明显的抑制. 在拟南芥基因组中存在7种WDL(WVD2-LIKE)基因, 分别命名为WDL1~WDL7. 体外实验表明, WDL3直接结合并稳定微管, 使之成束. 没有WDL3存在时, 体外游离微管蛋白tubulin只能聚合形成单根微管纤维; 加入WDL3后, 则形成大的微管束(large microtubule bundles). 去除WDL3后, 其诱导形成的微管束又重新分散为单根. 此外, WDL3可保护并稳定微管在低温(10℃)以及稀释tubulin浓度(50×)条件下不发生解聚^[26]. Liu等人^[26]发现, 光下WDL3 RNAi下胚轴细胞的微管重排(由横向排列转变为纵向或斜向)被阻碍, 下胚轴伸长生长明显快于野生型; 在WDL3过表达植株中则重排加速, 抑制伸长生长, 显示WDL3在该过程中是一个负调控因子. 黑暗中WDL3直接被E3泛素连接酶COP1(CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1)泛素化降解, 下胚轴快速生长^[27], WDL3在光/暗调节下胚轴伸长生长的信号传递通路中发挥重要作用. 考虑到光/暗也是自然界调节保卫细胞气孔开/关的基本信号, 因此不难联想到WDL3是否也在气孔运动机制中有一定作用呢? 目前关于植物WDL3的工作刚刚起步, 在气孔运动中的作用尚待研究.

本实验以拟南芥WDL3 RNAi, Tubulin5A-YFP为材料, 利用药理学实验、激光共聚焦扫描显微镜技术及非损伤微测等, 探讨了ABA诱导的气孔关闭信号通路中WDL3与微管骨架、 Ca^{2+} 之间可能存在的调节关系, 旨在深入了解气孔运动机理, 拓展WDL3在植物中的生理功能, 为农作物抵御干旱、保证产量提供可靠的理论依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料和试剂

(i) 实验材料. 拟南芥野生型植株(Col)、*WDL3* RNA干扰株系(*WDL3* RNAi)、Tubulin5A-YFP等.

(ii) 培养条件. 将成熟饱满的种子加入适量蒸馏水置于4℃环境下春化3~5 d, 播种于1/2 MS培养基, 置于光照培养箱中(光照16 h, 黑暗8 h, 温度22℃/18℃, 光照强度120 μmol/(m² s), 相对湿度75%), 待长出4片子叶时将幼苗移植到已灭菌且含有蛭石的培养土中, 继续生长1~2周供实验使用.

(iii) 表皮条缓冲液: 10 mmol/L MES, 50 mmol/L KCl, 100 μmol/L CaCl₂, pH 6.1; ABA由表皮条缓冲液配置为50 μmol/L; 紫杉醇(paclitaxel)、黄草消(oryzalin)均由无水乙醇溶解, 使用时用表皮条缓冲液分别稀释至30, 10 μmol/L; Ca²⁺螯合剂BAPTA(C₃₄H₄₀N₂O₁₈)由DMSO溶解, 使用时用表皮条缓冲液稀释至20 μmol/L.

1.2 实验方法

(i) 叶片失水率的测定. 取生长3~4周, 营养状态良好的拟南芥野生型Col, *WDL3* RNAi植株叶片各15片, 置于通风橱内, 室温下(25℃)使其失水, 每15 min进行一次称重, 以叶片离体时重量为初始值, 计算叶片失水率, 以同样的方法重复3次($n=3$)^[24].

(ii) 气孔开度的测定. 选取生长3~4周的野生型Col, *WDL3* RNAi拟南芥植株, 将生长状况良好的叶片剪下置于表皮条缓冲液中并放至冷光源(光强度为500 μmol/(m² s))下光照2 h使气孔充分打开, 然后分别移至不同处理液(表皮条缓冲液, 50 μmol/L ABA, 50 μmol/L ABA+30 μmol/L Paclitaxel, 50 μmol/L ABA+10 μmol/L Oryzalin, 50 μmol/L ABA+20 μmol/L BAPTA, 20 μmol/L BAPTA), 30 min后撕取下表皮并制片, 在显微镜(ZEISS Axiovert 200M)下观察并测量气孔开度(以缓冲液MES处理为对照组). 气孔开度的大小为2个保卫细胞腹壁中心连线的距离. 测量时每个株系随机选取2个植株, 每个植株随机选取1片莲座叶片, 每个叶片随机选取3~6个视野. 每个处理至少重复3次($n\geq 3$), 统计平均值以及差异的显著性.

(iii) 微管骨架组织重排的观察. 以杂交得到的表达Tubulin5A-YFP的*WDL3* RNAi以及普通

Tubulin5A-YFP(对照)为材料, 叶片预先光照处理, 使气孔打开, 然后分别置于不同药物处理: (1) Control(-ABA); (2) 50 μmol/L ABA; (3) 50 μmol/L ABA+20 μmol/L BAPTA; (4) 20 μmol/L BAPTA. 30 min后, 撕取部分叶片并制片后置于激光共聚焦扫描显微镜(ZEISS LSM 780)下观察. 100倍油镜, 514 nm激发光条件下采集微管排布清晰的保卫细胞图像后进行分类(Type1~3). 每种药物处理采集的保卫细胞数目不小于100个($n\geq 100$).

(iv) 保卫细胞内微管骨架的密度及成束能力测定. 以下均参照2010年Higaki等人^[28]的研究方法用Image J软件完成操作, 且所有的分析都使用8位(8 bit)原始的扫描图像进行. (1) 微管密度有2种评价策略: 第1种, 在软件中将每个保卫细胞内荧光强度大于50的峰的数量定义为微管的数量, 沿着保卫细胞纵轴线在细胞中央画一条线, 绝大部分微管被包括在内^[17], 软件分析可分辨出的微管数量(numbers of resolvable microtubules); 第2种, 将每张图像中保卫细胞内的微管骨骼化(skeletonized): 通过微管的像素值占整个细胞区域总像素值的百分比(occupancy)即占有率来估算微管的密度. (2) 另一个动力参数—微管集束程度(bundling)/偏度(skewness)是对微管分布不对称程度的一种度量, YFP荧光强度分布的偏度是微管成束能力的重要指标. 每个参数都是不少于30个保卫细胞的统计结果($n\geq 30$).

(v) 非损伤微测技术测定保卫细胞Ca²⁺流动情况. 将生长3~4周的野生型Col及*WDL3* RNAi用于非损伤Ca²⁺微电极的检测. 先使用冷光源使气孔全部打开, 然后每种植株进行2组实验测定: (1) Control(-ABA), (2) 50 μmol/L ABA 处理30 min. 其中正值Ca²⁺外流, 负值为Ca²⁺内流. 相关具体测量操作及数据处理分析在北京旭月公司协助下完成.

2 实验结果

2.1 *WDL3* RNAi蒸腾失水表型分析

取相同部位、生长状态相似的叶片置于通风橱中干燥处理. 结果发现, 干燥后野生型叶片的脱水程度明显高于*WDL3* RNAi株系, 叶片皱缩更严重, 如图1(a)所示. 整个检测过程中, *WDL3* RNAi的失水率始终低于野生型. 15 min时, 野生型的叶片失水率已达13.6%, 而*WDL3* RNAi株系仅为6.9%. 如图1(b)所示,

图1 *WDL3* RNAi株系叶片失水速率比野生型慢。(a) *WDL3* RNAi与野生型Col的失水枯萎表型(Bar=1.4 cm); (b) 失水率的定量测定。叶片失水率数据为3组的独立实验的平均值 $\pm$ SE, 每组实验各取相应植株莲座叶15片, 双尾 t 检验, $*P<0.05$

Figure 1 The *WDL3* RNAi leaves show delayed transpirational water loss. (a) The wilted phenotypes of *WDL3* RNAi and wild-type (Col); (b) water loss from detached rosette leaves of wild-type (Col) and *WDL3* RNAi plants. Data are means of three independent experiments $\pm$ SE (with 15 leaves in each experiment). Statistical analysis was performed by paired t test ($*P<0.05$)

经 t 检验分析差异显著($P<0.05$)。

2.2 WDL3通过调节保卫细胞微管动态参与ABA诱导的气孔关闭过程

2.2.1 气孔开度测定

ABA是重要的干旱胁迫信号, 因此随后实验以ABA为外源信号, 探究WDL3在ABA诱导气孔关闭中的作用。如图2所示, ABA处理30 min后野生型气孔孔径由平均4.20 μm 缩小至2.70 μm , 下降了35.7%; 而*WDL3* RNAi由4.22 μm 缩小至2.36 μm , 下降了44.1%, 关闭速度明显比野生型快, 经统计学分析差异极显著。初步表明WDL3功能异常可影响ABA诱导气孔关闭的信号传递。

考虑到WDL3为微管结合蛋白, 采用微管特异性药物进一步检验WDL3与微管解聚、聚合的动态不稳定性在此过程中的作用。ABA与微管解聚剂黄草消(oryzalin)共同处理, 野生型气孔关闭与ABA单独处理相比有进一步的加速, 气孔平均开度继续缩小14.9%。*WDL3* RNAi植株气孔关闭更迅速, 相同条件

下平均气孔孔径递减了20.2%, 统计学分析差异极显著($P<0.01$)。相反, 微管稳定剂紫杉醇与ABA共同处理, 则在一定程度上阻碍ABA诱导的气孔关闭。显示WDL3可能通过调节保卫细胞微管动态参与ABA诱导气孔关闭的信号传递过程, *WDL3* RNAi植株对微管解聚剂Oryzalin反应更敏感。

2.2.2 保卫细胞内微管骨架组织排布观察

在药理学气孔开度实验基础上, 为了在体内更直接地检测WDL3是否影响了微管骨架的动态排布, 采用激光共聚焦扫描显微镜技术对微管在保卫细胞中的排布进行了观察。根据已有报道^[31], 将保卫细胞内微管的组织排布方式分为3种类型, 如表1及图3(a)所示。

以杂交得到的表达Tubulin5A-YFP的*WDL3* RNAi和Tubulin5A-YFP(对照)为材料, ABA处理30 min后在激光共聚焦扫描显微镜下观察发现, 如图3(b)所示, 对照组在ABA信号诱导下, 保卫细胞中整齐规则的辐射状微管排布(Type1)的保卫细胞所占比例由39.5%下降为14.9%, 解聚、碎片化(Type3)微管排布

图2 微管特异性药物对WDL3参与的ABA诱导气孔关闭的影响. 数据为3组独立实验的平均值±SD, 每组测量20~40个气孔开度. 双尾 t 检验, ** $P<0.01$

Figure 2 Effects of microtubule specific drugs on WDL3-involved stomatal closure in response to ABA. Data are means of three independent experiments ±SD (with 20–40 stomata in each experiment). Statistical analysis was performed by paired t test (** $P<0.01$)

的细胞数量升至31.7%. 相同条件下, WDL3 RNAi中辐射状(Type1)排布比例更是骤减为9.1%, 微管Type3排布的保卫细胞比例则增至49.7%, 微管解聚程度更大, 对ABA信号更敏感.

2.2.3 保卫细胞内微管的定量分析

Type1~3比例变化反映了保卫细胞微管排布方式整体的动态重排. 随后利用Image J软件分别对每一种排布类型中微管密度(density)及其成束能力(bundling)进行了进一步的定量分析. 我们发现即使同为辐射状、网状或解聚状, 野生型与WDL3 RNAi保卫细胞内微管精细的组织行为仍有不同.

如图4(a)所示, 同为辐射状(Type1), WDL3 RNAi

图3 ABA条件下, WDL3 RNAi的保卫细胞微管骨架解聚比例高于野生型. (a) 气孔运动中保卫细胞微管排布的3种主要类型, 图中标尺为10 μm; (b) ABA处理下, 保卫细胞微管骨架各类型排布的百分比. 数据至少由3组独立重复实验所得, 每种药物处理中每类植株分析大于100个保卫细胞

Figure 3 The depolymerization of microtubule filaments is enhanced in WDL3 RNAi guard cells in response to ABA. (a) Three typical patterns of microtubules organization (Types 1 to 3, from up to down) were observed in guard cells. Bar=10 μm; (b) percentage of guard cells displaying the indicated type of microtubules at each condition. Data are from three independent experiments at least (at least 100 guard cells for each sample)

表1 保卫细胞内微管组织排布的3种类型

Table 1 Three typical patterns of microtubules organization in guard cells

排布类型	特点
辐射状 (Type1)	微管骨架均匀而有序地由保卫细胞腹壁向背壁方向呈辐射状排列, 微管束之间大多相互平行, 多出现于开放气孔的保卫细胞中
网状 (Type2)	规则整齐的微管束开始出现不同程度交叉、倾斜, 相互交错成网状排布, 为微管动态转换中的过渡状态
解聚状 (Type3)	细胞内微管趋于解聚、碎片化, 弥散在细胞中, 清晰可辨的微管束很少, 多见于关闭气孔的保卫细胞

保卫细胞内软件可分辨出的微管数量(YFP荧光强度大于50)明显多于对照($P<0.05$), 标记微管的荧光信号相对更分散一些; 同理软件分析骨骼化后(skeletonized)的图像发现, 对于微管密度对应参数一占有率(occupancy)来说, WDL3 RNAi中Type1, Type2类型的微管列阵内微管密度同样明显高于野生型, 差异极显著($P<0.01$), 2种方法所得结果一致. 接下来对反映微管成束能力(bundling)的参数一偏度(skewness)

图4 (网络版彩色) *WDL3* RNAi保卫细胞内微管密度和成束程度发生明显改变。(a) 野生型和*WDL3* RNAi的保卫细胞中, Type1型微管束YFP信号的连续荧光强度以及微管束荧光强度高于50的峰的数量; (b) 被骨骼化的保卫细胞和3种微管排布类型的占有率和偏度。数据为3组独立实验的平均值 $\pm$ SE, 用来分析的保卫细胞数量大于30个, 双尾t检验, 差异水平为* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。图中标尺为10 μ m

Figure 4 (Color online) The microtubule density and bundling are greatly altered in *WDL3* RNAi guard cells. (a) Continuous fluorescent intensity of the YFP signal along the line in guard cells with Type1 microtubule orientation was measured in wild type and *WDL3* RNAi. Filament numbers of Type 1 were determined by the number of fluorescent peaks with an intensity higher than 50; (b) skeletonized microtubule arrays and the measurement of their occupancy and skewness in guard cells. Data are presented as the mean $\pm$ SE. At least 30 guard cells were analyzed for each sample. The P -values (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) were relative to that control in the same type. Bar=10 μ m

进行分析统计, 如图4(b)所示, 虽然*WDL3* RNAi保卫细胞中微管数量总体多于野生型, 但体现成束能力的偏度值则基本相反。*WDL3* RNAi的3种排布类型中微管的成束能力均不及野生型, 差异极显著($P < 0.01$)。这些结果表明, *WDL3*功能异常后, 微管稳定聚集成束的能力下降, 形成的微管偏分散疏离, 数量增多, 没有野生型那样聚集程度更高、更粗大明亮的微管束。

以上表明, 在ABA诱导气孔关闭过程中, 微管结合蛋白*WDL3*通过稳定保卫细胞内的微管骨架, 促进微管成束, 发挥一定的负调节作用。

2.3 Ca^{2+} 在*WDL3*介导的ABA信号通路中可能的作用

2.3.1 Ca^{2+} 螯合剂对气孔开度的影响

由于 Ca^{2+} 在ABA诱导气孔关闭信号通路及调节

微管动态变化中均有重要作用^[19,24], 接下来我们探讨了WDL3参与ABA诱导气孔关闭过程中Ca²⁺可能的作用. 如图5所示, 胞内Ca²⁺螯合剂BAPTA试剂本身对气孔开度在统计学意义上并没有影响, 但可以削弱ABA诱导的气孔关闭. 与ABA单独作用相比, BAPTA的加入使野生型和WDL3 RNAi气孔关闭分别被阻碍了9.3%和12.9%, 处理前后差异显著. 并且WDL3 RNAi植株的气孔开度对Ca²⁺螯合剂更敏感, 初步表明在ABA诱导气孔关闭通路中, Ca²⁺可能在WDL3的上游发挥作用.

2.3.2 Ca²⁺螯合剂及WDL3功能缺失对保卫细胞内微管骨架组织排布的影响

在药理学实验基础上, 我们进一步用激光共聚焦扫描显微镜观察了BAPTA对保卫细胞微管组织重排的影响. 如图6所示, 加入BAPTA后, ABA引起的保卫细胞内微管解聚过程均受到不同程度抑制. 与ABA单独处理相比, 对照组Type3型排布保卫细胞所占比例减少了7.6%, WDL3 RNAi中解聚的Type3型排布的保卫细胞数量更是缩减了12.2%, 而辐射状Type1型比例由ABA单独处理时的9.1%升至15.6%. 显示BAPTA作用下两种植株ABA诱导的保卫细胞内正常的微管重排均遭到破坏, 且WDL3 RNAi植株受阻程度相对更严重. 以上表明, Ca²⁺可以在微管结合蛋白WDL3的上游, 通过WDL3对微管动态排布的调节影响气孔运动.

2.3.3 非损伤微测技术检测保卫细胞内外Ca²⁺流动

细胞骨架成分不仅是信号传递的接收者, 同时也是信息传递的主动参与者. 已有报道发现保卫细

胞内微管、微丝的聚合、解聚同样可以调节胞内Ca²⁺的变化^[29,30], 利用非损伤微测技术对ABA条件下2种不同植株保卫细胞内外Ca²⁺流动情况进行了检测.

如图7所示, 在ABA处理前, 野生型与WDL3 RNAi植株均以Ca²⁺外流为主, ABA处理30 min后, 2种植株保卫细胞中Ca²⁺流向发生明显改变, 转为以内流为主. 此时Ca²⁺穿过野生型和WDL3 RNAi保卫细胞质膜的平均净流速为-9.6和-22.4 pmol cm⁻² s⁻¹ (负值表示向保卫细胞内流). WDL3 RNAi的Ca²⁺内流更快, 流速远高于对照, 统计学分析差异均极显著 ($P<0.01$). 表明WDL3功能缺失后, 保卫细胞Ca²⁺正常流动受到明显影响, 内流加速.

3 讨论与结论

3.1 WDL3通过对微管骨架动态变化的调节参与到了ABA诱导的气孔关闭信号通路中

本实验气孔开度测定中微管解聚剂Oryzalin在一定程度上可以促进ABA诱导的气孔关闭作用, 且WDL3 RNAi对Oryzalin更敏感, ABA条件下气孔关闭较野生型更快. 该结果与Liu等人^[26]发现WDL3 RNAi的表皮细胞微管对Oryzalin更敏感, 相同浓度和处理时间下比野生型和WDL3过表达植株更容易被解聚, 与WDL3是一个微管稳定因子(a microtubule stabilizer)的报道相一致. 且根据Lian等人^[27]报道中提到的, 利用CRISPR/Cas9技术获得的wld3突变体(wld3-1, wld3-2)验证在下胚轴中的表型, 与之前WDL3 RNAi所得结果一致, 因此也在一定程度上表明本文中我们采用WDL3 RNAi材料所得的实验结果是可靠可信的.

基于气孔开度结果, 又进一步用激光共聚焦扫描显微镜观察微管的动态变化情况. ABA诱导下, 野生型保卫细胞微管原有的规则的聚合态会发生解聚和片段化, 而在WDL3 RNA干扰后, 保卫细胞微管正常的动态转换遭到破坏, 解聚态(Type3)微管的比例更多, 最终表现为相同时间内气孔关闭速度明显快于野生型. 由此可见, 在ABA诱导气孔关闭过程中, 微管结合蛋白WDL3起一定的负调节作用, 抑制保卫细胞微管的解聚和随后的气孔关闭. 已知WDL3是稳定微管的结合蛋白, 在WDL3 RNAi细胞中, 微管由生长/暂停→缩短(from growth or pause to shortening)的转换频率, 即灾变频率(catastrophe frequency)比野生型大大提高^[26], 因此符合在WDL3 RNAi保卫细胞

图5 Ca²⁺螯合剂BAPTA在WDL3参与ABA诱导气孔关闭中的作用. 数据为3组独立实验的平均值±SD, 每组测量数量大于20~40个气孔, 双尾t检验, ** $P<0.01$

Figure 5 Effect of BAPTA on WDL3-involved ABA signaling during stomatal closure. Data are means of three independent experiments ±SD (with 20~40 stomata in each experiment). Statistical analysis was performed by paired *t* test (** $P<0.01$)

图6 Ca^{2+} 螯合剂对ABA诱导下保卫细胞微管重排的影响。(a) ABA和BAPTA共同处理后保卫细胞内微管排布, 标尺为10 μm; (b) 不同微管排布类型所占比例。数据至少由3组独立重复实验所得, 每种药物处理中每类植株分析大于100个保卫细胞

Figure 6 Effects of Ca^{2+} chelator (BAPTA) on microtubule reorganization in ABA-induced stomatal closure. (a) Arrangement of cortical microtubules in guard cells from wild type and WDL3 RNAi treated with ABA plus BAPTA; (b) percentage of guard cells displaying the indicated type of microtubules at each condition. Data are from three independent experiments at least (at least 100 guard cells for each sample)

图7 ABA处理后WDL3 RNAi拟南芥保卫细胞 Ca^{2+} 的内流比野生型快。(a) ABA处理前后 Ca^{2+} 流势折线图; (b) 相对应的 Ca^{2+} 平均流势柱状图。每个点的数为6~8个保卫细胞的平均值±SE, 双尾 t 检验, ** $P<0.01$

Figure 7 WDL3 RNAi guard cells show significantly higher ABA-induced Ca^{2+} influx than wild type. (a) The integrated Ca^{2+} flux pattern. (b) The mean Ca^{2+} fluxes of Col and WDL3 RNAi guard cells before and after exposure to ABA. Each point represents the mean for 6–8 individual guard cells and bars represent the standard error of the mean. Statistical analysis was performed by paired t test (** $P<0.01$)

中观察到解聚态微管比例升高, 动态不稳定性增强, 气孔关闭加速。根据已有研究^[26,27], WDL3作为拟南

芥下胚轴伸长生长的负调节因子(negative regulator), 受光照、黑暗2种环境信号的严格控制, 由COP1泛素

降解途径调节自身蛋白含量,进而影响下胚轴细胞内微管的重排。ABA同样是一种植物界普遍存在的逆境信号,结合本研究中叶片失水率、气孔开度及保卫细胞微管组织排布的实验结果,不难推测,在ABA诱导气孔关闭过程中,WDL3可以作为一种中介信号转导分子,在ABA的下游,接力外源信号ABA,传递至保卫细胞微管骨架,从而参与调节气孔的开关运动。

随后利用Image J软件对保卫细胞内微管骨架的3种排布类型进行了定量分析,发现WDL3的功能缺失影响了微管的密度与成束能力。首先,WDL3 RNAi保卫细胞内的微管数量比野生型多。我们推测WDL3的功能缺失影响微管骨架的稳定性从而加速微管的动态转换,导致更多新的微管生成。因此在WDL3 RNAi植株中软件检测到的微管纤维数量增多。而且从骨骼化后保卫细胞微管占有率/密度统计可以看出,在3种不同的微管排布类型(Type1~3)中,不论是野生型还是WDL3 RNAi,都是Type2的密度高于Type1和Type3,也就是说气孔在开↔关之间的过渡状态,即保卫细胞微管呈网状分布时数量更多,贮备充分,分布更分散更随机,利于其向最终开放或关闭的稳定状态切换。微管成束能力大小则恰好相反,表现为Type2小于Type1和Type3,表明气孔在处于开或关的稳定状态时更容易成束。该结果与Li等人^[31]对保卫细胞内微丝定量分析的研究结果相似。此外,结果还显示,WDL3 RNAi的Type1, Type2, Type3($P<0.01$)的成束能力均不及野生型,表明在保卫细胞中WDL3具有使微管成束的功能,这与Liu等人^[26]在表皮细胞中发现WDL3能够使微管成束的结果一致。

3.2 在ABA→WDL3→微管动态变化→气孔运动的信号通路中Ca²⁺的作用

Ca²⁺作为公认的植物细胞第二信使,是迄今为止了解较为深入的一个信号分子。ABA可引起细胞内Ca²⁺浓度升高(最高可达0.6 mmol/L),从而诱导气孔关闭^[32~36]。那么ABA→WDL3→微管动态变化→气孔运动的信号通路中, Ca²⁺将如何发挥作用呢?

气孔开度实验中, ABA与BAPTA共同作用后, 2种植株的气孔开度减小与ABA单独处理相比均有不同程度的延迟, 但WDL3 RNAi的气孔开度仍小于野生型。由于WDL3具有稳定微管的作用, ABA诱导的气孔关闭使微管趋于解聚, WDL3的功能缺失导致微

管不稳定性进一步加强,引起气孔关闭加快。因此虽然胞内游离Ca²⁺被部分螯合后抑制了ABA的作用,但这种抑制效应在WDL3 RNAi中被削弱。激光共聚焦扫描显微镜观察, ABA与BAPTA共同处理后, 2种植株中解聚型(Type3)微管比例下降, 辐射状(Type1)与网状排布(Type2)的微管比例有所上升, 但WDL3 RNAi植株中解聚型微管(Type3)仍然比野生型多。结果表明虽然胞内游离Ca²⁺被部分螯合后能够抑制ABA引起的微管解聚, 但WDL3功能缺失使微管不稳定性增强, 动态转换加速, 故这种抑制效应在WDL3 RNAi中被部分减弱, 说明在该信号通路中Ca²⁺可能在WDL3的上游, ABA的下游发挥作用。

目前, 在拟南芥中已发现植物中的微管结合蛋白AtTCTP有类似动物细胞中TCTP的分子性质, 与微管的tubulin结合的同时也结合Ca²⁺, 并且与Ca²⁺的结合可促进其与微管骨架之间的相互作用, 参与ABA诱导的气孔关闭和干旱耐受性^[24]。此外, 另一个微管结合蛋白MDP25, 其结合微管使微管去稳定, 以及在细胞膜与胞质中的定位均受胞内Ca²⁺水平的调节, 进而影响下胚轴细胞中微管排布及伸长生长^[37]。本研究中关于Ca²⁺对微管结合蛋白WDL3的作用与以上报道相符。

此外, 采用非损伤微测技术探究了ABA条件下2种植株保卫细胞内Ca²⁺的流动情况。结果表明, ABA处理后, WDL3 RNAi保卫细胞的Ca²⁺内流较野生型的速度更快。因为WDL3具有稳定微管的作用, 其功能缺失后, 保卫细胞微管的解聚加快, 而位于质膜下方附近的周质微管(cortical microtubules)可能通过调节质膜上的离子通道活性, 如Ca²⁺通道^[38], 使WDL3 RNAi保卫细胞的Ca²⁺内流大幅度增加, 促进气孔关闭, 表明在该信号通路中, 微管骨架的动态变化对保卫细胞Ca²⁺的流动有反馈作用。该结果与Zhang等人^[30]及王未等人^[29]的发现相一致, 结论可靠。王未等人^[29]报道在异三聚体G蛋白介导的ABA调节气孔运动的信号通路中, Ca²⁺通过调节保卫细胞微管动态排布进行信息传递, 微管解聚、聚合对Ca²⁺的流动也存在调节作用, 影响气孔的开关, 即ABA→G蛋白→Ca²⁺↔微管动态排布→抑制气孔开放。

磷脂酶D(phospholipase D, PLD)具有磷酸二酯酶的活性, 可以专一地水解卵磷脂产生脂质第二信使磷脂酸(phosphatidic acid, PA)。Jiang等人^[19]发现ABA引起[Ca²⁺]_{cyt}的增加能激发PLDα1活性以致产生更多

PA, 进而导致微管解聚, 最终诱发气孔关闭. 即 $\text{ABA} \rightarrow [\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}} \rightarrow \text{PLD}\alpha 1 \rightarrow \text{PA} \rightarrow \text{微管解聚} \rightarrow \text{气孔关闭}$. 在保卫细胞中还有大量的ABA信号通路中间体, 包括磷脂鞘氨醇-1-磷酸(SIP)、磷脂酶C(PLC)、活性氧(ROS)、过氧化氢(H_2O_2)和一氧化氮(NO)等机制都已经越来越清晰^[18,39-43]. 在这个庞大的信息传递网络中, 新成员微管结合蛋白WDL3作为中介信号分子加入其中, 可见气孔运动的调节机制精密而又丰富.

3.3 结论

微管结合蛋白WDL3参与了ABA诱导的气孔关闭过程.

在该信号通路中, 稳定微管的结合蛋白WDL3通过调节下游微管骨架的动态特性(如保卫细胞微管的密度、微管成束能力及微管整体的组织重排)进行信息传递, 微管解聚、聚合的动态变化可进一步调节保卫细胞内外 Ca^{2+} 流动, Ca^{2+} 内流降低, 进而抑制ABA引起的气

孔关闭, 最终影响叶片的蒸腾失水作用. 作用模式如图8所示.

图8 WDL3在ABA诱导气孔关闭中的作用模式图

Figure 8 Function model of WDL3 mediating ABA-induced stomatal closure

致谢 感谢中国农业大学袁明、毛同林教授赠予WDL3 RNAi, Tubulin5A-YFP种子以及毛同林教授课题组对本试验的指导, 感谢北京师范大学李杰婕教授对Image J软件使用的指导.

参考文献

- Godfray H C, Beddington J R, Crute I R, et al. Food security: The challenge of feeding 9 billion people. *Science*, 2010, 327: 812–818
- Fita A, Rodriguez-Burruezo A, Boscaiu M, et al. Breeding and domesticating crops adapted to drought and salinity: A new paradigm for increasing food production. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 978
- Popko J, Hansch R, Mendel R R, et al. The role of abscisic acid and auxin in the response of poplar to abiotic stress. *Plant Biol*, 2010, 12: 242–258
- Wilkinson S, Davies W J. Drought, ozone, ABA and ethylene: New insights from cell to plant to community. *Plant Cell Environ*, 2010, 33: 510–525
- Assmann S M. OPEN STOMATA1 opens the door to ABA signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Trends Plant Sci*, 2003, 8: 151–153
- Lee S C, Luan S. ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. *Plant Cell Environ*, 2012, 35: 53–60
- Nazareno A L, Hernandez B S. A mathematical model of the interaction of abscisic acid, ethylene and methyl jasmonate on stomatal closure in plants. *PLoS One*, 2017, 12: e0171065
- Sun L, Li Y, Miao W, et al. NADK2 positively modulates abscisic acid-induced stomatal closure by affecting accumulation of H_2O_2 , Ca^{2+} and nitric oxide in *Arabidopsis* guard cells. *Plant Sci*, 2017, 262: 81–90
- Khanna R, Li J, Tseng T S, et al. COP1 jointly modulates cytoskeletal processes and electrophysiological responses required for stomatal closure. *Mol Plant*, 2014, 7: 1441–1454
- Jiang C J, Nakajima N, Kondo N. Disruption of microtubules by abscisic acid in guard cells of *Vicia faba* L. *Plant Cell Physiol*, 1996, 37: 697–701
- Fukuda M, Hasezawa S, Asai N, et al. Dynamic organization of microtubules in guard cells of *Vicia faba* L. with diurnal cycle. *Plant Cell Physiol*, 1998, 39: 80–86
- Marcus A I, Moore R C, Cyr R J. The role of microtubules in guard cell function. *Plant Physiol*, 2001, 125: 387–395
- Yu R, Huang R F, Wang X C, et al. Microtubule dynamics are involved in stomatal movement of *Vicia faba* L. *Protoplasma*, 2001, 216: 113–118
- Galatis B, Apostolakis P. The role of the cytoskeleton in the morphogenesis and function of stomatal complexes. *New phytol*, 2004, 161: 613–639

- 15 Zhang Y, Wu Z, Wang X, et al. Rearrangements of microtubule cytoskeleton in stomatal closure of *Arabidopsis* induced by nitric oxide. *Chin Sci Bull*, 2008, 53: 848–852
- 16 Eisinger W, Ehrhardt D, Briggs W. Microtubules are essential for guard-cell function in *Vicia* and *Arabidopsis*. *Mol Plant*, 2012, 5: 601–610
- 17 Eisinger W R, Kirik V, Lewis C, et al. Quantitative changes in microtubule distribution correlate with guard cell function in *Arabidopsis*. *Mol Plant*, 2012, 5: 716–725
- 18 Livanos P, Galatis B, Apostolakis P. The interplay between ROS and tubulin cytoskeleton in plants. *Plant Signal Behav*, 2014, 9: e28069
- 19 Jiang Y, Wu K, Lin F, et al. Phosphatidic acid integrates calcium signaling and microtubule dynamics into regulating ABA-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Planta*, 2014, 239: 565–575
- 20 Swamy P S, Hu H, Pattathil S, et al. Tubulin perturbation leads to unexpected cell wall modifications and affects stomatal behaviour in *Populus*. *J Exp Bot*, 2015, 66: 6507–6518
- 21 Rui Y, Anderson C T. Functional analysis of cellulose and xyloglucan in the walls of stomatal guard cells of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2016, 170: 1398–1419
- 22 Nehlig A, Molina A, Rodrigues-Ferreira S, et al. Regulation of end-binding protein EB1 in the control of microtubule dynamics. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74: 2381–2393
- 23 Yu R, Sun L, Li X D, et al. Localization of plant microtubule associated protein AtMAP65-1 in stomatal guard cells of *Arabidopsis thaliana* (in Chinese). *J Mol Cell Biol*, 2007, 40: 258–262 [于荣, 孙丽, 李学东, 等. 植物微管结合蛋白 AtMAP65-1 在拟南芥气孔保卫细胞中的定位. *分子细胞生物学报*, 2007, 40: 258–262]
- 24 Kim Y M, Han Y J, Hwang O J, et al. Overexpression of *Arabidopsis* translationally controlled tumor protein gene AtTCTP enhances drought tolerance with rapid ABA-induced stomatal closure. *Mol Cells*, 2012, 33: 617–626
- 25 Yuen C Y, Pearlman R S, Silo-Suh L, et al. WVD2 and WDL1 modulate helical organ growth and anisotropic cell expansion in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2003, 131: 493–506
- 26 Liu X, Qin T, Ma Q, et al. Light-regulated hypocotyl elongation involves proteasome-dependent degradation of the microtubule regulatory protein WDL3 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2013, 25: 1740–1755
- 27 Lian N, Liu X, Wang X, et al. COP1 mediates dark-specific degradation of microtubule-associated protein WDL3 in regulating *Arabidopsis* hypocotyl elongation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 12321–12326
- 28 Higaki T, Kutsuna N, Sano T, et al. Quantification and cluster analysis of actin cytoskeletal structures in plant cells: Role of actin bundling in stomatal movement during diurnal cycles in *Arabidopsis* guard cells. *Plant J*, 2010, 61: 156–165
- 29 Wang W, Zhao S S, Wang P, et al. Microtubules and heterotrimeric G-protein regulate ABA-induced stomatal movement synergistically (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2017, 62: 3757–3767 [王未, 赵思爽, 王攀, 等. 微管骨架与异三聚体 G 蛋白协同参与 ABA 诱导的气孔运动. *科学通报*, 2017, 62: 3757–3767]
- 30 Zhang W, Fan L M, Wu W H. Osmo-sensitive and stretch-activated calcium-permeable channels in *Vicia faba* guard cells are regulated by actin dynamics. *Plant Physiol*, 2007, 143: 1140–1151
- 31 Li X, Li J H, Wang W, et al. ARP2/3 complex-mediated actin dynamics is required for hydrogen peroxide-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ*, 2014, 37: 1548–1560
- 32 Barbier-Brygoo H, De Angeli A, Filleur S, et al. Anion channels/transporters in plants: From molecular bases to regulatory networks. *Annu Rev Plant Biol*, 2011, 62: 25–51
- 33 Mustilli A C, Merlot S, Vavasseur A, et al. *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Physiol*, 2002, 14: 3089–3099
- 34 Koornneef M, Reuling G, Karssen C. The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plantarum*, 1984, 61: 377–383
- 35 Webb A A, Larman M G, Montgomery L T, et al. The role of calcium in ABA-induced gene expression and stomatal movements. *Plant J*, 2001, 26: 351–362
- 36 Mori I C, Murata Y, Yang Y, et al. 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: e327
- 37 Li J, Wang X, Qin T, et al. MDP25, a novel calcium regulatory protein, mediates hypocotyl cell elongation by destabilizing cortical microtubules in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2011, 23: 4411–4427
- 38 Zhang Q, Zhang W H. Regulation of developmental and environmental signaling by interaction between microtubules and membranes in plant cells. *Protein Cell*, 2016, 7: 81–88
- 39 Yao L L, Pei B L, Zhou Q, et al. NO serves as a signaling intermediate downstream of H_2O_2 to modulate dynamic microtubule cytoskeleton during responses to VD-toxins in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav*, 2012, 7: 174–177
- 40 An Y, Liu L, Chen L, et al. ALA inhibits ABA-induced stomatal closure via reducing H_2O_2 and Ca^{2+} levels in guard cells. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 482
- 41 Sierla M, Waszczak C, Vahisalu T, et al. Reactive oxygen species in the regulation of stomatal movements. *Plant Physiol*, 2016, 171: 1569–1580
- 42 Ng C K Y, Hetherington A M. Sphingolipid-mediated signalling in plants. *Ann Bot*, 2001, 88: 957–965
- 43 Hunt L, Mills L N, Pical C, et al. Phospholipase C is required for the control of stomatal aperture by ABA. *Plant J*, 2003, 34: 47–55

Summary for “拟南芥微管结合蛋白 WDL3 参与 ABA 诱导的气孔关闭过程”

The microtubule-associated protein WDL3 mediates ABA-induced stomatal closure in *Arabidopsis*

Xiaohui Xi, Pan Wang, Zhaoyang Wang & Rong Yu*

College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100048, China

* Corresponding author, E-mail: yurong@cnu.edu.cn

Stomatal movements control CO₂ uptake for plant photosynthesis and water loss by transpiration, then determine plant productivity and water utilization efficiency. The microtubule dynamics is widely recognized to be essential for guard cell function. However, the molecular mechanisms underlying this process remain largely unknown. WDL3 belongs to the microtubule-associated protein WAVE-DAMPENED 2(WVD2)/WVD2-LIKE (WDL) family, which binds to and stabilizes microtubules against low-temperature and dilution-induced depolymerization. In the presence of WDL3, tubulins assemble into large microtubule bundles *in vitro*, otherwise only single filament patterns form. It has been intensively investigated that WDL3 participates in COP1(CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1)-mediated hypocotyl cell elongation in darkness, but whether and how it modulates the microtubule behaviors during guard cell signaling transduction is still an open question. In this study, we dissected the interplay among WDL3, microtubule dynamics and Ca²⁺ in ABA-induced stomatal closure. We found that transpirational water loss from detached leaves occurred slowly in the WDL3 RNA interference transgenic line. Stomatal bioassay revealed that guard cell sensitivity to ABA was promoted in the WDL3 RNAi seedlings, and this phenotype could be partially blocked by paclitaxel, a microtubule stabilizing agent. On the other hand, the microtubule-disrupting drug oryzalin, enhanced ABA-triggered stomatal closure even further, and the WDL3 RNAi guard cells were more sensitive to oryzalin treatment. Based on the pharmacological results above, we next tested the effect of WDL3 on cortical microtubules in guard cells directly by Confocal microscopy. The differences in the configurations of microtubule filaments between WDL3 RNAi and wild type (WT) were analyzed after ABA treatment. Microscopic images showed that ABA-induced microtubule disassembly took faster in WDL3 RNAi guard cells than in WT, and the extent of filament bundling decreased significantly in WDL3 RNAi seedlings, as evaluated by the Image J software. This was consistent with the rapid ABA-induced stomatal closing in WDL3 RNAi material. Moreover, we examined the potential role of Ca²⁺ in this signal pathway. The cytosolic Ca²⁺ chelator—BAPTA generally alleviated ABA effects in both WT and WDL3 RNAi materials. ABA-induced stomatal closure and microtubule remodeling were much more delayed in WDL3 RNAi seedlings, indicating that Ca²⁺ acted upstream in the WDL3 mediated-ABA signaling pathway for stomatal movement. In addition, when exogenous ABA was applied, the Ca²⁺ influx monitored by the non-invasive micro-test technique (NMT) in WDL3 RNAi guard cells was more pronounced than in WT.

Taken together, our results suggest that WDL3, probably coordinated with Ca²⁺, is involved in the precise regulation of microtubule architecture and dynamics, to accurately execute ABA-stimulated signaling transduction during stomatal movement. Thus it contributes to the proper control of leaf transpiration.

WDL3, microtubule, Ca²⁺, stomatal closure, abscisic acid

doi: 10.1360/N972018-00745