



论文

胁迫相关基因 *CIPK14* 在 *PHYA* 介导抑制拟南芥
远红光黄化苗转绿过程中的作用秦玉芝^①, 郭明^②, 李旭^②, 熊兴耀^①, 何长征^①, 聂先舟^{③*}, 刘选明^{②*}^① 湖南农业大学园艺园林学院, 湖南省作物种质创新与资源利用国家重点实验室, 长沙 410128;^② 湖南大学生命科学与技术研究院, 长沙 410028;^③ Potato Research Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Fredericton, New Brunswick E3B 4Z7, Canada

* 联系人, E-mail: xianzhou.nie@agr.gc.ca; sw_xml@hnu.cn

收稿日期: 2010-07-30; 接受日期: 2010-08-09

教育部面向 21 世纪教育振兴行动计划世界一流大学建设项目、国家自然科学基金(批准号: 30770200)和国家科技攻关计划(批准号: 2007BAD41B to XL)资助

摘要 本文对 CBL 互作蛋白激酶, *CIPK14* 参与拟南芥光敏色素 A 介导的, 远红光黄化苗转绿抑制调控进行了研究. 结果发现, 拟南芥光敏色素 A 功能缺失突变体(*phyA*)远红光黄化苗(4 天)转入白光处理后, 仅 0.5 h 叶片迅速转绿; 相同条件下, *CIPK14* 基因插入失活突变体(*cipk14*)远红光黄化苗, 经过 15 h 白光处理之后叶片才开始转绿; 野生型(*Col-4*)远红光黄化苗转绿时间介于突变体 *phyA* 与 *cipk14* 之间. 基因表达分析表明, 上述不同基因型拟南芥远红光黄化苗转绿的快慢, 与原叶绿素酸酯还原酶基因表达量存在正相关性. 结合研究发现——*CIPK14* 基因受到远红光调节, 并且表达具有时钟节律性认为, Ca^{2+} 调节蛋白 *CIPK14*, 可能在 *PhyA* 信号传导途径的上游分支介入 *PhyA* 介导的远红光黄化苗转绿抑制调控.

关键词
叶绿素
CIPK14
远红光
转绿抑制
POR
光敏色素 A

钙是生物体不可或缺的重要元素^[1], 细胞质内存在着大量自由钙离子, 作为最普遍的“细胞第二信使”, 参与并调节各种细胞生物的许多重要生理生化和信号转导过程^[2,3], 从而影响生物的生长发育和对环境刺激的应答^[4-9]. 人们发现, 胞内自由钙离子的浓度具有周期性振荡现象, 这种周期性振荡波是启动细胞下游不同反应的重要信号^[3].

植物体内已发现 3 种主要的钙离子受体蛋白: 钙调素(calmodulin, CaM)、钙依赖蛋白激酶(Ca^{2+} -dependent protein kinases, CDPKs)与钙调磷酸酶 B 类似蛋白(calcineurin B like, CBLs)^[10]. CBL 互作蛋白激酶

(CIPKs)是钙依赖蛋白激酶(CDPKs)外, 另一个在植物 Ca^{2+} 信号传导过程中起重要作用的 Ser/Thr 蛋白. 它通过特殊的 Ser/Thr 蛋白酶结构域, 与 CBL 中 4 个 Ca^{2+} 结合 EF 臂结合而被激活^[11,12]. 目前, 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中发现了 10 个 CBLs 和 25 个 CIPKs, 水稻(*Oryza sativa*)的 10 个 CBLs 和 30 个 CIPKs 已被报道^[10]. 植物细胞中 CBL 往往通过与 CIPK 形成不同的复合体对各种信号产生相应反应. 例如, CBL4(SOS3/SALT OVERLY SENSITIVE3)与 CIPK24(SOS2/SALT OVERLY SENSITIVE2)结合在盐胁迫应答中起重要作用^[11,13]; CBL1, CBL9, CIPK1

和 CIPK3 共同参与不同的非生物胁迫应答和 ABA 信号传导^[14-16]. 本研究发现, 拟南芥 CIPK14 受 Ca^{2+} 调控, 与 ABA 和盐胁迫信号传导有关, CIPK14 基因功能缺失, 导致拟南芥 ABA 应答系统中关键基因的表达模式发生改变^[17].

昼夜交替变化使生物有机体内一些生理反应和分子表达出现节律性日变化. 植物细胞胞质自由 Ca^{2+} 在 1 天的 24 h 中出现规律性波动^[18]. 胞质 Ca^{2+} 的这种时钟规律性波动, 在受 Ca^{2+} 信号系统调控的光周期诱导开花与调节细胞系列生理过程中起重要作用^[18-22].

这种生物节律性变化, 通过一些基因的规律性表达, 或那些受时钟控制的产物的规律性输出得到进一步证实. 6%~15% 的拟南芥转录体被证实受生理时钟调控^[23-25]. 高达 80%~90% 的基因具有时钟表达特性^[26,27], 而其中的很大一部分基因又对脱落酸 (ABA) 或茉莉酸甲酯 (MJ)^[27] 有反应. 除了时钟基因, 大部分基因并不参与时钟调控过程, 而只是受到时钟调控^[26]. Xu 等人^[28] 报道, 生物钟系统受到时钟基因和光受体调节后, 会输出相应的 Ca^{2+} 信号.

光敏色素和隐花色素与各种受光调节的植物生长与发育过程^[29-31], 及光的节律性调控紧密相关^[32]. 已报道的 5 种拟南芥光敏色素 (phyA~phyE)^[33-35] 中, phyA 和 phyB 在这方面的作用尤为突出^[36]. phyA 在黄化苗中大量积累, 相反, phyB 在光培养作物中具有较高活性^[37,38]. 拟南芥光敏色素单一突变体和多重突变体的获得, 为研究光敏色素在植物生长发育过程中的各种功能提供了方便. 大量研究分析了 Ca^{2+} 在光受体信号传导中的作用. Ca^{2+} 结合蛋白 SUB1, 被证明同时介导隐花色素和光敏色素信号传导. 另有研究表明, 光诱导的植物气孔运动受到光敏色素和隐花色素与 COPI 基因构成的信号网络共同调节^[39], 提示这两个信号途径具有叠加性.

本研究发现, CBL 互做蛋白激酶, CIPK14 与 PhyA 介导的拟南芥远红光黄化苗转绿抑制调控有关, 并影响原叶绿素酸酯还原酶 (POR) 基因的表达. cipk14 突变体远红光黄化苗转入白光 15 h 后才开始转绿, 光敏色素 A 功能缺失突变体 phyA 远红光黄化苗, 则在转入白光 0.5 h 后便迅速转绿, 相同条件下, 野生型 (Col-4) 黄化苗转绿时间比 cipk14 快但滞后于 phyA. 结合已发现的 CIPK14 基因表达时钟节律性, 与受到远红光调节属性, 认为 Ca^{2+} 调节蛋白 CIPK14,

参与拟南芥 PhyA 介导的远红光黄化苗转绿抑制调控.

1 材料与方法

1.1 材料

拟南芥突变体 cipk14^[17] 和 phyA-211^[40,41], 及其野生型背景株系 Columbia-4 (Col-4) 用于本实验研究.

1.2 光源

冷白色荧光灯 (F48T12/CW/HO; General Electric, Cleveland, OH) 用作白光光源 (W); 蓝光光源 (B): 发射峰 470 nm, 半谱带宽度 30 nm; 红光光源 (R): 发射峰 660 nm, 半谱带宽度 20 nm^[42]; LED 远红光光源 (FR): 发射峰 740 nm, 半谱带宽度: 25 nm (www.ledsupply.com)^[43]. 白光、蓝光和红光光源的光通量用 Li-250 量子光度计 (LI-COR) 测量. 远红光光通量: 用 Li-250 量子光度计测量相对光通量, 再由分光辐射度计绘制近直线标准曲线确定.

1.3 材料处理

Col-4, cipk14 和 phyA 3 种基因型种子分别播种在 MS 培养基中^[17], 4℃ 暗培养 4 天后, 转入 23℃ 白光诱导 12 h, 随后分别进行以下实验: (1) 用于转绿分析和 POR 基因表达分析: 分别置于 23℃ 不同强度 (0.01, 10 和 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 远红光下连续培养 4 天, 第 5 天转入 23℃ 白光处理, 并进行全天候监测; (2) 不同光照处理 (白光、蓝光、红光和远红光) 分析 CIPK14 基因表达: 于 23℃ 黑暗培养 6 天, 之后转入不同光照条件 (光通量: 白光, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; 蓝光, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; 红光, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; 远红光, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 处理 24 h, 并在不同时间点取样; (3) CIPK14 基因表达的时钟节律性研究: 野生型种子低温春花后分别转入 23℃ 长日照 (LD, 16 h 光照/8 h 黑暗) 和短日照 (SD, 8 h 光照/16 h 黑暗) 培养 10 天 (白天光强: $(30 \pm 3) \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), 随后将两种处理材料转入连续光照培养 2 天, 在特定时间点取样. 所有实验重复至少 3 次.

1.4 RT-PCR 分析 CIPK14, PORA, PORB 和 PORC 基因表达

参照文献^[17] 运用半定量 RT-PCR 法, Actin 作为

内参, 进行 *CIPK14*, *PORA*, *PORB* 和 *PORC* 基因的表
达分析. 引物序列、长度与基因号见表 1.

采用安比奥公司生产的 RNA 提取试剂盒, 提取
总 RNA; RNase free 离心管中加约 2 μ g 总 RNA 和
0.5 μ g Olig(dT)15, 混匀, 4 $^{\circ}$ C 短暂离心, 65 $^{\circ}$ C 水浴 7
min 后, 立即冰浴冷却. 离心后, 依次加入 10 $\times$ Buffer
2.5 μ L, 10 mmol/L dNTPs 1.25 μ L, RNaseA 抑制剂 25
U, M-MLV 逆转录酶 200 U, 加 RNase free 水至 25 μ L,
42 $^{\circ}$ C 反应 60 min 后, 70 $^{\circ}$ C 水浴 10 min 使酶失活, 即
得 cDNA 第一链. 之后分别进行 PCR 退火温度、引
物浓度、镁离子浓度和模板浓度优化实验. 根据优
化的条件, 进行 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,
55~60 $^{\circ}$ C (因目的基因而异) 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s;
循环数为 20~27 个 (因目的基因而异), 最后 72 $^{\circ}$ C 延
伸 5 min, *CIPK14* (F: 576~599 bp; R: 1038~1017 bp)
和胁迫相关基因引物见表 1. 反应结束后, 取 16 μ L
PCR 反应液, 在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳. 每个实验
的 RT-PCR 反应至少重复 3 次, 以持家基因 *Actin*
(*ACT2*) 的 PCR 产物作为分子内标, 用定量软件
Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) 计算所检测基因的
相对水平.

1.5 叶绿素测定

叶绿素含量参考 Barnes 等人^[44]所用方法确定,
浓度为 mg/seedling.

2 结果

2.1 *CIPK14* 基因受生物钟调节

研究表明, 多数 ABA 应答基因同时具有时钟表
达特性^[27]. 为了分析受 ABA 和盐诱导的 *CIPK14* 基

因^[17]是否也具有这一表达特性, 分别将拟南芥野生
型 Col-4 幼苗置于短日照 (8 h L/16 h D) 和长日照 (16 h
L/8 h D) 下培养 10 天, 之后转入连续光照培养 2 天,
最后 3 天 (1 天周期光照, 2 天全光照) 每 3 h 取一次样,
用于分析 *CIPK14* 基因表达情况 (图 1). 分析发现, 短
日照条件下, 在进入光照培养的第 3 个 *hCIPK14* 基因
便出现了一个表达峰值, 表达峰值一直持续到 6 h.
植物进入黑暗培养阶段, *CIPK14* 基因的表达量骤降.
有趣的是, 当幼苗转入连续光照培养后这种节律性
变化并没有消失 (24~72 h): 表达峰值仍出现在第
27~30, 51, 71 h. 虽然长日照处理下 *CIPK14* 基因的表
达量在整体上稍高于短日照处理, 但 *CIPK14* 基因在
两种处理情况下出现了相同的节律性表达规律 (图 1).

2.2 光敏色素 A 调节 *CIPK14* 基因的表达

受时钟调控的基因往往与光信号网络紧密关联.
胁迫相关基因介导光信号传导, 为传统胁迫相关基
因功能研究提出了一个新的思路. 以光敏色素 A 功
能缺失突变体 *phyA* 和隐花色素 1, 2 双突变体
cry1cry2, 野生型 Col-4 为研究材料, 进行不同波长光
照处理, 用于分析 *CIPK14* 基因表达与光信号传导的
关联. 黑暗培养 6 天的野生型 Col-4 黄化苗, 分别转
入“材料与方法”小节所介绍的白光、红光、蓝光与远
红光的光照条件处理, 分析不同处理时间下 *CIPK14*
基因表达情况. 结果可见, 所有被测试的光照种类都
能诱导野生型 Col-4 中 *CIPK14* 基因的表达, 只是表
达的动力学规律各不相同 (图 2). 白光条件下, 随着
处理时间增加 *CIPK14* 基因的表达量持续增加; 而蓝
光照射 6 h 后 *CIPK14* 基因的表达才开始增加, 并在之
后的处理时间内一直维持较高表达量; 红光处理下,
CIPK14 基因在出现短暂表达峰值后回落 (图 2(A));

表 1 RT-PCR 中的引物

基因 (acc. #)	引物 ^{a)}	DNA 片段长度/bp
<i>Actin2</i> (NM_112764.3)	F: 5'-CACTGTGCCAATCTACGAGGGT-3' R: 5'-CACAAACGAGGGCTGGAACAAG-3'	318
<i>CIPK14</i> (NM_120260.2)	F: 5'-CAAAGTCTCCAAGGGCAGGTTCT-3' R: 5'-CGTCTGCGGATTCGTGTCTAAAA-3'	464
<i>PORA</i> (NM_124799.3)	F: 5'-AATGCCGCGAGTCTATCAG-3' R: 5'-AAAGTTATGCCGGTGTCT-3'	389
<i>PORB</i> (NM_001036654.1)	F: 5'-TACCACCGAAGGCGAATC-3' R: 5'-GAAAGGGAGGGAAGAGGG-3'	272
<i>PORC</i> (NM_100243.3)	F: 5'-AGGCTTAGCGTCAGGATT-3' R: 5'-GACTAGGGTCACTCACAAC-3'	318

a) F(forward primer): 正向引物; R(reverse primer): 反向引物

CIPK14 基因从远红光处理 0.5 h 开始表达, 第 6 h 后一直处于较低转录水平(图 2(B), Col-4). 与野生型幼苗相似, 远红光下突变体 *phyA* 植株中 *CIPK14* 基因的转录也出现了短暂的表达峰值(图 2(B), *phyA*). 只是峰值推迟到处理后 1 h 出现, 并且只维持了 2 h. 虽然 *CIPK14* 在野生型和 *phyA* 突变体中呈现出相似的动力学表达谱, 但在 *phyA* 突变体中 *CIPK14* 基因的表达量明显减弱, 表明 *PhyA* 功能缺失影响了 *CIPK14* 基因的表达. 同时检测了蓝光下 Col-4 和 *cry1cry2* 双突变体中 *CIPK14* 基因的表达情况, 发现 *CIPK14* 基因并没有因为隐花色素 1, 2 的双缺失而出现基因表达异常(数据未显示). 根据以上结果, 认为光敏色素, 而不是隐花色素介导 *CIPK14* 基因的表达.

2.3 *CIPK14* 介入 *PhyA* 介导的远红光黄化苗转绿抑制调控

为进一步研究 *CIPK14* 基因是否参与 *PhyA* 信号传导途径, Col-4, *phyA* 和 *cipk14* 3 种基因型萌动的种子, 进行连续 4 天远红光培养后转入白光处理. 所有

基因型幼苗的子叶, 在 3 种强度远红光下都表现为黄化(数据未显示). 同时比较了在不同强度远红光下, 连续培养 4 天的 Col-4, *phyA* 和 *cipk14* 拟南芥幼苗的下胚轴长度. 结果发现, 与 100 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光强相比, 所有在 0.01 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光强下生长的基因型幼苗都形成了细长的下胚轴, 三者之间差异不显著(数据未显示). 100 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光强下, *phyA* 的下胚轴与 Col-4 和 *cipk14* 相比显著增长, Col-4 和 *cipk14* 之间下胚轴长度差异不明显(图 3(A)).

将各基因型远红光黄化苗转入白光处理 15 h(hours-post-white light-illumination hpwi), *cipk14* 的子叶维持黄化, 相同条件下 *phyA* 的子叶已全部转为深绿, Col-4 的子叶则转为淡绿(图 3(A)). 进一步观察发现, *phyA* 在 0.5 hpwi 时子叶就已全部转绿, 与叶绿素含量分析结果相符. 3 种基因型幼苗的叶绿素含量在转入白光前都处于极低值(图 3(B)), *phyA* 幼苗 0.5 hpwi 时的叶绿素含量剧增到 0.09 mg/seedling. 虽然随着白光处理时间的延长, Col-4 和 *cipk14* 幼苗中叶绿素含量也随之增加, 但两者所含叶绿素仍显著低于 *phyA* 幼苗. Col-4 和 *cipk14* 之间表现出的差值

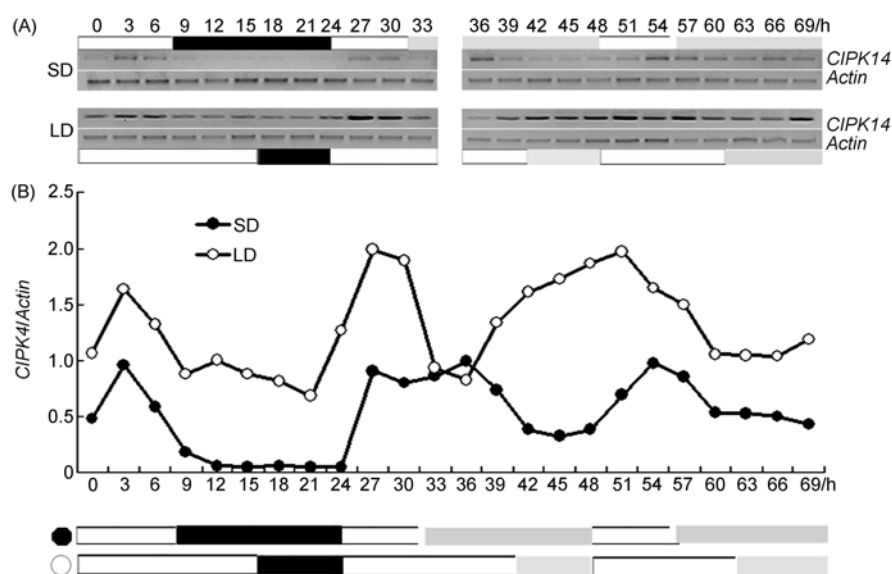


图 1 *CIPK14* 基因的表达特性分析

萌动的野生型种子分别置于长日照和短日照下培养 10 天后, 转入全白光继续培养 2 天. 转入全白光前 1 天开始, 每 3 h 取一次样, 包括连续白光培养的 2 天, 一共取 3 天样. 样品地上部分取下随即液氮速冻, -80°C 保存用于提取总 RNA. *CIPK14* 基因半定量分析参照材料与方法进行. 肌动蛋白 *Actin* 基因作为分子内标. 实验重复 3 次, 每次基因半定量分析重复 3 次以上. 运用 ImageJ(<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)软件分析凝胶电泳图, 并进行 *CIPK14* 基因的表达定量, 用分子内标换算 *CIPK14* 基因的相对表达量并作图. (A) 长日照和短日照下 *CIPK14* 表达的凝胶电泳图; (B) *CIPK14* 相对表达量曲线图. 数据取 3 次独立实验的 $\bar{x} \pm \text{SD}$. 白/夜分别用 和 表示; 表示全光照培养中相当于前光周期培养阶段的黑夜时段. 数据取 3 次独立实验的 $\bar{x} \pm \text{SD}$

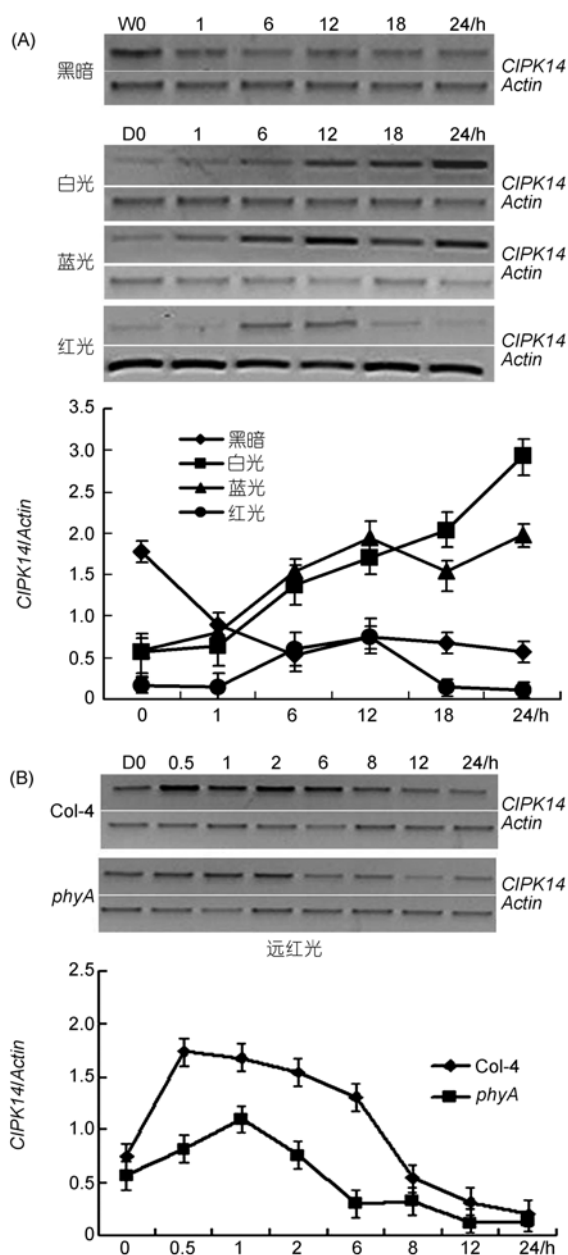


图2 不同波长光照对拟南芥 *CIPK14* 基因表达的影响

萌动的野生型 *Col-4* 和突变体 *phyA* 的种子置于暗培养6天后, 转入不同波长光照处理. 分别于不同的处理时间点取样, 样品地上部分取下随即液氮速冻, -80°C 保存用于提取总 RNA. *CIPK14* 基因半定量分析参照材料与方法进行. 肌动蛋白 *Actin* 基因作为分子内标. 实验重复3次, 每次基因半定量分析重复3次以上. 运用 ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) 软件分析凝胶电泳图法, 进行 *CIPK14* 基因的定量分析, 用分子内标换算 *CIPK14* 基因的相对表达量并作图. (A) 不同波长光照对野生型 *CIPK14* 基因表达的影响; (B) 远红光对野生型和突变体 *phyA* 中 *CIPK14* 基因表达的影响. 照片为 *CIPK14* 表达的凝胶电泳图谱; 曲线图为 *CIPK14* 的相对表达量. 数据取3次独立实验的 $\bar{x} \pm \text{SD}$

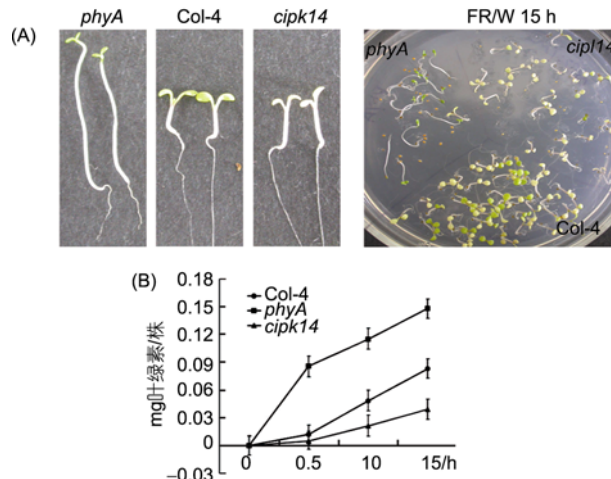


图3 不同基因型拟南芥远红光黄化苗的转绿分析

萌动的野生型 *Col-4* 和突变体 *phyA*, *cipk14* 的种子分别置于 0.01 和 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 连续远红光培养4天后, 转入白光处理并进行实时监测. (A) 白光处理15 h; (B) 白光处理0.5, 10和15 h不同基因型叶绿素含量分析. 叶绿素含量参照 Barnes 等人^[44]的方法, 由测定20株幼苗的平均值确定, 重复3次

(*Col-4* vs *cipk14*: 0.03 vs $0.015/10$ hpwi; 0.07 vs $0.03/15$ hpwi)与外部表型差异一致.

2.4 原叶绿素酸酯还原酶 *POR* 基因表达受 *PhyA* 和 *CIPK14* 的调控

原叶绿素酸酯还原酶(POR)是高等植物叶绿素合成的关键酶. 为了分析 *CIPK14* 基因功能缺失突变体, *cipk14* 远红光黄化苗转绿抑制现象是否与 *POR* 基因(*PORA*, *PORB* 和 *PORC*)表达异常有关, *Col-4*, *phyA* 和 *cipk14* 远红光黄化苗经白光处理15 h取样, 半定量分析不同基因型 *POR* 基因的表达情况(图4). 结果发现, *phyA* 幼苗中3种 *POR* 基因的表达量都处于最高水平; 突变体 *cipk14* 中的 *POR* 基因表达量都处于最低值, 其中 *PORA* 甚至无法测出; *Col-4* 介于两者之间. *POR* 基因在3种拟南芥基因型中的表达差异, 刚好与图3所示该时间点的叶绿素含量, 及转绿表型差异一致.

3 讨论

CBL 互做蛋白激酶在许多细胞生理过程, 尤其是非生物胁迫应答中起作用^[11-16]. 拟南芥CBL互做蛋白激酶 *CIPK14* 不仅参与 ABA 和盐胁迫信号传导^[17], *CIPK14* 基因表达还受到生物钟的调控(图1). 胞质

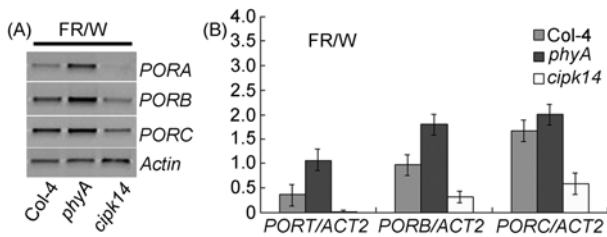


图 4 *POR* 基因的 RT-PCR 分析

萌动的野生型 Col-4 和突变体 *phyA*, *cipk14* 的种子置于 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 连续远红光培养 4 天, 转入白光处理 15 h 后, 分别将各基因型样品地上部分取下随即液氮速冻, -80°C 保存用于提取总 RNA. *POR* 基因半定量分析参照“材料与方法”进行. 肌动蛋白 *Actin* 基因作为分子内标. 实验重复 3 次, 每次基因半定量分析重复 3 次以上. 运用 ImageJ(<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)软件分析凝胶电泳图, 并进行 *POR* 基因的定量分析, 用分子内标换算 *POR* 基因的相对表达量并作图. (A) *POR* 基因表达凝胶电泳; (B) *POR* 基因相对表达量统计. 数据取 3 次独立实验的 $\bar{x} \pm \text{SD}$

Ca^{2+} 的时钟规律性波动很可能是生物钟的一种输出信号, 该信号由时钟基因和光受体调节^[28]. 有理由相信, 至少部分受 Ca^{2+} 调节的 CIPKs 可能也受光受体调控. 研究发现, 远红光能引起拟南芥细胞中 *CIPK14* 基因表达量迅速提高(图 2), 意味着光敏色素可能与 *CIPK14* 基因表达有关. 随后用 *PhyA* 功能缺失突变体进行同样的处理, 虽然其中 *CIPK14* 基因的表达动力学规律不变, 但 *CIPK14* 基因表达量与野生型相比明显减少(图 2), 这一结果证实了之前光敏色素 A 调控 *CIPK14* 基因表达的推断.

光敏色素 A 调控钙调蛋白 *CIPK14* 基因表达, 是否意味着 Ca^{2+} 信号途径与光敏色素介导的信号途径之间存在某种关联. 下胚轴伸长是受光敏色素尤其是 *PhyA* 调控的典型事例^[45,46]. *PhyA* 功能缺失促进连续远红光下拟南芥下胚轴伸长生长^[46], 相反, 过量表达 *PhyA* 抑制远红光下拟南芥下胚轴伸长生长^[45]. 本实验也在此证实了这一点. 但是, 野生型和 *CIPK14* 功能缺失突变体 *cipk14* 的下胚轴之间差异却不显著. 鉴于高强度远红光($\geq 10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)

抑制 *cipk14* 和野生型下胚轴伸长, 但不能抑制 *phyA* 下胚轴伸长的实验结果, 可以做以下推断: (1) 高强度远红光抑制下胚轴伸长; (2) 远红光介导的下胚轴伸长抑制通过 *PhyA* 起作用, 与 *CIPK14* 关系不明显.

研究发现, 远红光通过 *PhyA* 影响质体的发育, 从而抑制拟南芥远红光黄化植株转绿^[44]. 本研究中, 虽然野生型远红光黄化苗转入白光后, 细胞叶绿素合成并没有完全受阻, 但是叶绿素合成在较长时间内出现了障碍. 相同条件下, *phyA* 细胞叶绿素合成受到的影响却很小, 转入白光后极短时间内便完全转绿(图 3). 该结果与 Barnes 等人^[44], McCormac 和 Terry^[47]的研究相同: *PhyA* 抑制远红光黄化苗转绿. 有趣的是, *cipk14* 远红光黄化苗转入白光后, 转绿明显滞后, 并且在白光处理第 15 h 监测单株叶绿素含量仅为 0.03 mg/seedling , 远远低于 *phyA* 的 0.15 mg/seedling 和 Col-4 的 0.07 mg/seedling (图 3). 显然, *PhyA* 与 *CIPK14* 介导的远红光抑制转绿, 可能与叶绿素合成酶的积累或活性有关. 叶绿素合成酶中原叶绿素酸酯还原酶(POR)是光依赖性的, 在高等植物叶绿素合成中起关键作用^[48,49]. *PhyA* 介导的远红光转绿抑制作用, 已被证明与这类核基因的表达受阻有关^[47], 远红光抑制 *POR* 基因表达造成质体不可逆的损伤^[44]. 结果发现, 经过 4 天远红光/1 天白光处理的 *phyA* 突变体中, *POR* 基因表达量最高, Col-4 次之, *cipk14* 突变体中的 *POR* 基因表达量最低, 这与其表现出的不同转绿表型刚好一致.

由于 *cipk14* 植株在普通培养条件下未出现异常叶色(数据未显示), *cipk14* 远红光黄化苗转绿滞后应该不是 *CIPK14* 基因功能缺失的直接结果. 但是, *CIPK14* 基因受到远红光调节(图 2), 同时对 *phyA* 依赖性的 *POR* 基因表达产生影响(图 4), 因此, *CIPK14* 很可能与 *PhyA* 协同调节拟南芥远红光转绿抑制作用, 并且可能在 *PhyA* 信号传导途径的上游分支介入.

致谢 感谢美国加州大学(University of California, Los Angeles, USA)林辰涛教授对本工作的悉心指导!

参考文献

- 1 Trewavas A J, Knight M R. Mechanical signalling, calcium and plant form. *Plant Mol Biol*, 1994, 26: 1329—1341
- 2 Weinl S, Kudla J. The CBL—CIPK Ca^{2+} -decoding signalling network: function and perspectives. *New Phytol*, 2009, 184: 517—528

- 3 Mcainch M R, Pittman J K. Shaping the calcium signature. *New Phytol*, 2009, 181: 275—294
- 4 Chung E, Park J M, Oh S K, et al. Molecular and biochemical characterization of the *Capsicum annuum* calcium-dependent protein kinase 3 (CaCDPK3) gene induced by abiotic and biotic stresses. *Planta*, 2004, 220: 286—295
- 5 Ludwig A A, Saitoh H, Felix G, et al. Ethylene-mediated cross-talk between calcium-dependent protein kinase and MAPK signaling controls stress responses in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 10736—10741
- 6 Frohnmeier H, Loyall L, Blatt M R, et al. Millisecond UV-B irradiation evokes prolonged elevation of cytosolic-free Ca^{2+} and stimulates gene expression in transgenic parsley cell cultures. *Plant J*, 1999, 20: 109—117
- 7 Kim K N, Cheong Y H, Grant J J, et al. CIPK3, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2003, 15: 411—423
- 8 Trewavas A J, Malhó R. Ca^{2+} signalling in plant cells: the big network! *Curr Opin Plant Biol*, 1998, 1: 428—433
- 9 Nie X, Durnin D C, Igamberdiev A U, et al. Cytosolic calcium is involved in the regulation of barley hemoglobin gene expression. *Planta*, 2006, 223: 542—549
- 10 Kolukisaoglu U, Weinl S, Blazevic D, et al. Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant Physiol*, 2004, 134: 43—58
- 11 Ishitani M, Liu J, Halfter U, et al. SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *Plant Cell*, 2000, 12: 1667—1678
- 12 Nagae M, Nozawa A, Koizumi N, et al. The crystal structure of the novel calcium-binding protein AtCBL2 from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 2003, 278: 42240—42246
- 13 Halfter U, Ishitani M, Zhu J K. The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 3735—3740
- 14 Hrabak E M, Chan C W, Gribskov M, et al. The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol*, 2003, 132: 666—680
- 15 Zhu J K. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2002, 53: 247—273
- 16 Pandey G K, Grant J J, Cheong Y H, et al. Calcineurin-B-like protein CBL9 interacts with target kinase CIPK3 in the regulation of ABA response in seed germination. *Molecular Plant*, 2008, 1: 238—248
- 17 秦玉芝, 李旭, 郭明, 等. 钙传感蛋白互作激酶 CIPK14 参与拟南芥盐和 ABA 胁迫应答调节. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2008, 38: 446—457
- 18 Johnson C H, Knight M R, Kondo T, et al. Circadian oscillations of cytosolic and chloroplastic free calcium in plants. *Science*, 1995, 269: 1863—1865
- 19 Webb A A R. The physiology of circadian rhythms in plants. *New Phytol*, 2003, 160: 281—303
- 20 Dodd A N, Love J, Webb A A R. The plant clock shows its metal: circadian regulation of cytosolic free Ca^{2+} . *Trends Plant Sci*, 2005, 10: 15—21
- 21 Nancy A E. Circadian regulation of Ca^{2+} signalling. *Plant Cell*, 2007, 19: 3317
- 22 Love J, Dodd A N, Webb A A R. Circadian and diurnal calcium oscillations encode photoperiodic information in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2004, 16: 956—966
- 23 Harmer S L, Hogenesch J B, Straume M, et al. Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science*, 2000, 290: 2110—2113
- 24 Edwards K D, Anderson P E, Hall A, et al. *FLOWERING LOCUS C* mediates natural variation in the high-temperature response of the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell*, 2006, 18: 639—650
- 25 Covington M F, Harmer S L. The circadian clock regulates auxin signaling and responses in *Arabidopsis*. *PLoS Biol*, 2007, 5: e222
- 26 Michael T P, Mockler T C, Breton G, et al. Network discovery pipeline elucidates conserved time-of-day-specific cis-regulatory modules. *PLoS Genet*, 2008, 4: e14
- 27 Mizuno T, Yamashino T. Comparative transcriptome of diurnally oscillating genes and hormone-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*: insight into circadian clock-controlled daily responses to common ambient stresses in plants. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49: 481—487
- 28 Xu X, Hotta C T, Dodd A N, et al. Distinct light and clock modulation of cytosolic free Ca^{2+} oscillations and rhythmic CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN2 promoter activity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2007, 19: 3474—3490
- 29 Schafer E, Nagy F. *Photomorphogenesis in Plants and Bacteria*, 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2006
- 30 Casson S A, Franklin K A, Gray J E, et al. Phytochrome B and PIF4 regulate stomatal development in response to light quantity. *Curr Biol*, 2009, 19: 229—234

- 31 Kang C Y, Lian H L, Wang F F, et al. Cryptochromes, phytochromes, and COP1 regulate lightcontrolled stomatal development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2009, 21: 2624—2641
- 32 Somers D E, Devlin P F, Kay S A. Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science*, 1998, 282: 1488—1494
- 33 Sharrock R A, Quail P H. Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Dev*, 1989, 3: 1745—1757
- 34 Clack T, Mathews S, Sharrock R A. The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequence and expression of PHYD and PHYE. *Plant Mol Biol*, 1994, 25: 413—427
- 35 Franklin K A, Quail P H. Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. *J Exp Bot*, 2010, 61: 11—24
- 36 Wang H, Deng X W. Dissecting the phytochrome A-dependent signaling network in higher plants. *Trends Plant Sci*, 2003, 8: 172—178
- 37 Clough R C, Vierstra R D. Phytochrome degradation. *Plant Cell Environ*, 1997, 20: 713—721
- 38 Sharrock R A, Clack T. Patterns of expression and normalized levels of the five *Arabidopsis* phytochromes. *Plant Physiol*, 2002, 130: 442—456
- 39 Guo H, Mockler T, Duong H, et al. SUB1, an *Arabidopsis* Ca²⁺-binding protein involved in cryptochrome and phytochrome coaction. *Science*, 2001, 19: 487—490
- 40 Reed J W, Nagatani A, Elich T D, et al. Phytochrome A and phytochrome B have overlapping but distinct functions in *Arabidopsis* development. *Plant Physiol*, 1994, 104: 1139—1149
- 41 Mockler T, Yang H, Yu X, et al. Regulation of photoperiodic flowering by *Arabidopsis* photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 2140—2145
- 42 Mockler T C, Guo H, Yang H, et al. Antagonistic actions of *Arabidopsis* cryptochromes and phytochrome B in the regulation of floral induction. *Development*, 1999, 126: 2073—2082
- 43 Yu X, Shalitin D, Liu X, et al. De-repression of the NC80 motif is critical for the photoactivation of *Arabidopsis* CRY2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 7289—7294
- 44 Barnes S A, Nishizawa N K, Quaggio R B, et al. Far-red light blocks greening of *Arabidopsis* seedlings via a phytochrome A-mediated change in plastid development. *Plant Cell*, 1996, 8: 601—615
- 45 Boylan M T, Quail P H. Phytochrome A overexpression inhibits hypocotyl elongation in transgenic *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 10806—10810
- 46 Parks B M, Quail P H. *hy8*, a new class of *Arabidopsis* long hypocotyl mutants deficient in functional phytochrome A. *Plant Cell*, 1993, 5: 39—48
- 47 McCormac A C, Terry M J. Loss of nuclear gene expression during the phytochrome A-mediated far-red block of greening response. *Plant Physiol*, 2002, 130: 402—414
- 48 Armstrong G A, Runge S, Frick G, et al. Identification of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductases A and 6, a branched pathway for light-dependent chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 1995, 108: 1505—1517
- 49 Holtorf H, Reinbothe S, Reinbothe C, et al. Two routes of chlorophyllide synthesis that are differentially regulated by light in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 3254—3258