

沙冬青 *AmCaM1* 基因的克隆及其功能初步分析

薛敏¹, 王雪峰¹, 王志林¹, 李连国², 赵鸿彬¹, 王茅雁¹

(¹内蒙古农业大学生命科学学院, 呼和浩特 010018; ²内蒙古农业大学农学院, 呼和浩特 010018)

摘要: 钙调素 (CaMs, calmodulins) 是一类非常保守的 Ca^{2+} 感受蛋白, 在 Ca^{2+} 信号转导中起重要调节作用。本研究分析了强抗逆植物沙冬青 (*Ammopiptanthus mongolicus*) *AmCaM1* 在非生物胁迫下的表达变化, 克隆了该基因并将其构建到植物表达载体上, 然后转化拟南芥进行了初步的功能分析。结果表明, *AmCaM1* 的转录水平在低温、干旱和盐胁迫下迅速上调; 其 cDNA 编码区由 450 bp 组成, 编码蛋白含 149 个氨基酸残基, 在其一级结构中具有 4 个保守的 EF-手型基序; 将该基因转化拟南芥可提高种子萌发期对水分胁迫的耐性, 而对耐盐和耐冷性无明显作用。

关键词: 沙冬青; CaM; 基因克隆; 功能分析

Cloning and Preliminary Functional Analysis of *AmCaM1* from *Ammopiptanthus mongolicus*

XUE Min¹, WANG Xue-feng¹, WANG Zhi-lin¹, LI Lian-guo², ZHAO Hong-bin¹, WANG Mao-yan¹

(¹College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018;

²College of Agriculture, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018)

Abstract: Calmodulins (CaMs) are highly conserved Ca^{2+} sensor proteins and play important regulatory role in Ca^{2+} signal transduction. In the present study, we analyzed the expression patterns of *AmCaM1* in *Ammopiptanthus mongolicus*, a plant with very strong resistance to adverse abiotic stresses. We then cloned this gene and constructed its plant expression vector. We also transformed *Arabidopsis thaliana* with *AmCaM1* and performed a preliminary analysis of its function. The results showed that the transcription levels of *AmCaM1* were rapidly up-regulated by cold, drought and salt stresses. The complete coding region cDNA of *AmCaM1* contained 450 base pairs and encoded a protein consisting of 149 amino acid residues. Four conserved EF-hand motifs existed in the primary structure of *AmCaM1* protein. The transgenic *Arabidopsis* lines of *AmCaM1* showed enhanced tolerance to water stress but had no obvious change in salt and cold tolerances during their seed germination.

Key words: *Ammopiptanthus mongolicus*; CaM; gene cloning; functional analysis

干旱、低温和高盐等不良环境是影响植物生长发育和作物生产的主要非生物胁迫因子。大量研究发现, 当植物遭受到各种非生物胁迫时, 胞质内 (有时在细胞核或其他细胞器中) 游离 Ca^{2+} 的浓度会发生瞬间增高, 产生 Ca^{2+} 信号。由不同胁迫所诱发产生的 Ca^{2+} 信号具有特异性, 即在空间分布、变化幅度和持续时间等方面存在差异^[1]。目前认为, Ca^{2+}

信号的产生是植物细胞应答环境胁迫最普遍的早期事件之一, 并由 Ca^{2+} 结合蛋白即 Ca^{2+} 感受器来感知、破解并向下游的效应蛋白传递, 最终使植物产生相应的应答反应^[2]。

钙调素 (CaMs, calmodulins) 是较早发现的一类 Ca^{2+} 传感蛋白, 由一个小的基因家族所编码, 在结构上非常保守而且简单。每个成员均含有 2 个球形

收稿日期: 2015-01-21 修回日期: 2015-02-15 网络出版日期: 2015-10-29

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20151029.0950.006.html>

基金项目: 内蒙古自然科学基金重大项目 (2012ZD02); 转基因生物新品种培育重大专项 (2009ZX08009-019B)

第一作者从事植物抗逆分子生物学研究。E-mail: xuemin914@126.com

通信作者: 王茅雁, 从事植物抗逆性生理与分子生物学研究。E-mail: wangmaoyan@163.com

结构域,中间由一段具有延展性的螺旋区相连。每个球形域中含有2个可结合 Ca^{2+} 的EF-手型基序,当与 Ca^{2+} 结合后其构型发生变化并与靶蛋白结合,进而改变其活性,调控其所参与的生理生化反应^[3-6]。CaMs的靶蛋白种类多样,包括蛋白激酶与磷酸酶、离子通道或转运蛋白、代谢酶类和转录因子等^[4,6],表明其可能通过多种机制广泛参与植物的生长发育和逆境应答进程。

目前对于CaMs的研究多见于拟南芥、水稻、大豆和烟草等草本类非典型抗逆植物,而在木本类强抗逆植物中鲜有报道。沙冬青(*Ammopiptanthus mongolicus*)是分布于内蒙古和宁夏等中国西北省区荒漠地带唯一的常绿阔叶灌木。由于分布区冬季严寒(最低温度可达 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下),且降水很少、气候干燥,沙冬青在进化中形成了很强的抗寒和抗旱等抗逆特性,成为研究植物抗逆性机理和挖掘抗逆基因的好材料^[7-8]。近年来从该植物分离和鉴定抗逆相关基因的报道迅速增多,但目前尚未见到关于其CaM的研究报道。本课题组前期通过构建沙冬青低温和干旱胁迫全长cDNA文库^[9-10],获得了一个编码CaM蛋白的全长cDNA序列,命名为*AmCaM1*。本研究对该基因进行了表达分析、cDNA克隆及其转基因拟南芥抗逆性初步鉴定,为深入分析其功能和作用机理奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料与试剂 沙冬青种子由内蒙古自治区巴彦淖尔市磴口县林业局提供;根癌农杆菌GV3101和植物表达载体pCAMBIA3301(p3301)由本实验室保存;*Escherichia coli* TOP10感受态购自宝生物公司;RQ1 RNase-Free DNase, M-MLV逆转录酶和T4 DNA连接酶购自Promega公司;Taq酶、pMD19-T载体和限制酶购自Takara公司;质粒DNA提取试剂盒和琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒购自天根公司;草丁膦(PPT, phosphinothricin)购自日本明治制药株式会社。

1.1.2 引物序列 *AmCaM1*: 5'-GAAAGATCTA-AGAAAAGAGCGATTAC-3'(加Bgl II酶切位点)和5'-CATGTCACCTTGGTGGACATGTTGTG-3'(加BstE II酶切位点);*AmACTIN*: 5'-TGTTTCCGGGTATTGCTGAC-3'和5'-ACCCAGAGCCATCAAATAAG-3';*AtACTIN*: 5'-TGTTCCAGCCCTCGTTTGTG-3'和5'-TGCAC-CTGCCTCATCATACTCG-3'。

1.2 试验方法

1.2.1 沙冬青胁迫处理 按照王学峰^[11]的方法,即用沙培法将沙冬青培养一个半月,然后进行低温($4\sim-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ 梯度降温)、干旱($25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 自然干燥)和高盐(300 mmol/L NaCl 溶液浇幼苗)处理,分别在处理前(0 h,作对照)和处理后1 h、3 h、8 h和24 h取幼苗,经液氮速冻后保存于 $-76\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.2 基因表达分析 用半定量RT-PCR方法。利用改进的Trizol法提取冻存样品的总RNA,并用RQ1 RNase-Free DNase进行纯化,以去除基因组DNA污染^[11],然后用电泳和紫外分光光度法检测其完整性、浓度及纯度。取纯化的总RNA $1.5\text{ }\mu\text{g}$ 作模板,用M-MLV逆转录酶合成cDNA第一链。以沙冬青*AmACTIN*作为内参基因,对不同样品的cDNA模板量进行均一化。然后用均一化的cDNA模板和*AmCaM1*特异性引物进行PCR扩增。反应体系中含 $10\times\text{PCR}$ 缓冲液 $1.5\text{ }\mu\text{L}$,dNTP(2.5 mmol/L) $1.2\text{ }\mu\text{L}$,上下游引物各 $0.3\text{ }\mu\text{L}$ ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$),cDNA模板 $3\text{ }\mu\text{g}$,rTaq酶($5\text{ U}/\mu\text{L}$) $0.15\text{ }\mu\text{L}$,用ddH₂O补足至总体积 $15\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR扩增程序为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s,28个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳。

1.2.3 基因克隆与蛋白序列分析 基因克隆采用RT-PCR方法,反应体系中含 $10\times\text{Ex Taq}$ 缓冲液 $2.5\text{ }\mu\text{L}$,dNTP(2.5 mmol/L) $2.0\text{ }\mu\text{L}$,*AmCaM1*上下游引物各 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$),cDNA模板 $1.0\text{ }\mu\text{L}$,*Ex Taq*酶($5\text{ U}/\mu\text{L}$) $0.25\text{ }\mu\text{L}$,ddH₂O $18.25\text{ }\mu\text{L}$,总体积 $25\text{ }\mu\text{L}$ 。扩增程序同1.2.2。将PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,回收目的条带并与pMD19-T载体连接。将连接产物用热激法转化*E. coli* TOP10感受态细胞,单菌落经PCR检测为阳性者送北京华大基因公司测序。用DNAMAN软件预测蛋白分子量和等电点,用Clustal-X 1.83和GeneDoc程序进行蛋白多序列比对,均采用默认参数。用于多序列比对的CaMs(GenBank中登录号)包括:拟南芥*AtCaM1*(NP_198594)和*AtCaM3*(AEE79567);水稻*OsCam1-1*;大豆*GmCaM1*(AAA34013);玉米*ZmCaM2*(NP_001105547);蕨藜苜蓿*MtCaM*(XP_003624801)。

1.2.4 植物表达载体构建 将含有pMD19-T-*AmCaM1*和表达载体p3301的*E. coli*单克隆摇菌、提取质粒DNA,分别用Bgl II和BstE II进行双酶切,琼脂糖凝胶电泳和目的基因片段与载体的回收。然后用T4 DNA连接酶将二者连接并转化*E. coli* TOP10感受态

细胞,经菌落 PCR 检测和质粒酶切鉴定获得重组表达载体。再用冻融法将其转化根瘤农杆菌 GV3101 感受态细胞,经菌落 PCR 检测获得阳性克隆。

1.2.5 转基因拟南芥的获得与抗逆性鉴定 按照常规方法培养野生型拟南芥,待幼苗生长近 4 周,制备农杆菌转化菌液,用沾花法对其进行转化。将转化植株混合收种获得 T_1 种子。将 T_1 在营养钵中培养 3 周,用 0.5% 的 PPT 溶液每天喷雾 1 次,连续喷 3 d。取存活植株的幼叶,用 SDS 法提取基因组 DNA 进行 PCR 检测。将检测到目的基因条带的植株单株收种,获得 T_2 种子。将 T_2 点种在含 6.5 mg/L PPT 的 1/2 MS 固体培养基上培养 12 d,从绿苗与白苗接近 3:1 的株系选绿苗移入营养钵中继续培养。从每个株系取幼叶提取总 RNA 并进行纯化,然后反转录成 cDNA,以拟南芥 *AtACTIN* 作为内参基因进行半定量 RT-PCR 检测(同 1.2.2)。选 *AmCaM1* 表达量较高的株系繁殖 T_3 。将 T_3 点种在与 T_2 同样的 PPT 筛选培养基上,全部为绿苗者为纯合体。将 T_3 纯合体和 WT 点种在附加 NaCl(100、125 和 150 mmol/L)或甘露醇(250、300 和 375 mmol/L)的 1/2 MS 固体培养基上,经 4 °C 春化 3 d 后置于 22 °C、每天 16 h 光照和 8 h 黑暗条件下培养,或者将种子点种在 1/2 MS 固体培养基上,经 4 °C 春化 3 d 后置于 8 °C、每天 16 h 光照和 8 h 黑暗条件下培养(在 BD-PRX-1000A 低温光照培养箱中),观测种子萌发(以胚根长出为标准)和幼苗生长状况。每次点种量至少 20 粒,试验至少重复 3 次。种子萌发率和幼苗根长以 3 次试验的平均值和标准差(SD)表示,差异显著性测验按照 SAS 软件中的单因子 student's *t*-测验方法进行。

2 结果与分析

2.1 *AmCaM1* 在不同胁迫处理下的表达变化

将沙冬青幼苗进行低温、干旱或盐胁迫处理,分别在处理前(0 h)和处理后不同时间点取样,提取其总 RNA 并进行纯化。将纯化的 RNA 进行电泳并测定其在不同波长紫外光下的 OD 值,结果其 28S 和 18S rRNA 条带清晰明亮无拖尾,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.95 ~ 2.19、OD₂₆₀/OD₂₃₀ 在 2.01 ~ 2.28 之间,表明所提总 RNA 的完整性和纯度均较高。将总 RNA 逆转录合成 cDNA 第一链,以沙冬青 *AmACTIN* 作为内参基因,用半定量 RT-PCR 方法分析 *AmCaM1* 在不同胁迫处理下的表达变化。结果表明,在正常条件下(0 h) *AmCaM1* 有较高水平的基础表达,在低温、干旱和盐胁迫处理 1 h 后其表达量均明显增加;在

处理 3 h 后,其表达量在干旱胁迫下仍有所增加,而在低温和高盐胁迫下略有降低;在处理 8 h 后,其表达量在干旱胁迫下基本不变,而在低温和高盐胁迫下又有所上调;在处理 24 h 后,无论哪种胁迫,*AmCaM1* 的表达量均回落到接近对照水平(图 1)。

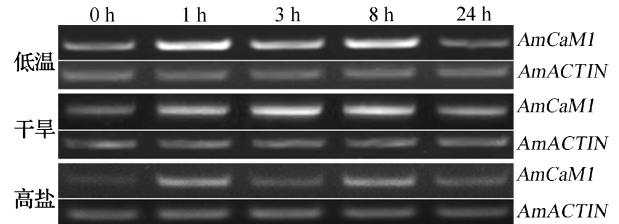
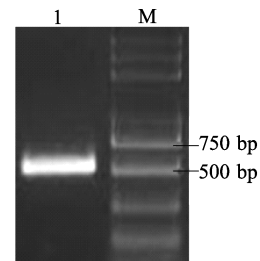


图 1 *AmCaM1* 在低温、干旱和盐胁迫下的表达变化模式
Fig. 1 Expression patterns of *AmCaM1* under cold, drought and salt stresses

2.2 *AmCaM1* 的克隆与蛋白结构预测

以沙冬青 cDNA 作模板,用 *AmCaM1* 编码区特异性引物进行 PCR 扩增,得到一条与预期大小(505 bp)相近的片段(图 2)。将该片段回收并与 pMD19-T 载体连接,然后转化 *E. coli*,经菌落 PCR 检测获得了阳性克隆。将阳性克隆测序,证明所扩增的片段为 *AmCaM1* 编码区 cDNA 且序列正确,由 450 bp 组成,编码含 149 个氨基酸残基的蛋白,其分子量为 16.85 kD,等电点为 4.12。



1: *AmCaM1* 的 RT-PCR 产物; M: Trans 2K plus DNA Marker
1: RT-PCR product of *AmCaM1*, M: Trans 2K plus DNA Marker

图 2 *AmCaM1* 的 RT-PCR 扩增图谱

Fig. 2 Amplification pattern of *AmCaM1* by RT-PCR approach

将 *AmCaM1* 与拟南芥和水稻等植物的 6 个 CaM 进行多序列比对,发现其含有这些蛋白所共有的 4 个 EF-手型基序,在每个 EF-手型基序中涉及与 Ca²⁺ 结合的 6 个保守氨基酸残基也与这些蛋白一致(Mt-CAM 在第 1 个 EF-手型基序中有一个氨基酸与其他蛋白不同)(图 3),表明 *AmCaM1* 具备感受和传递 Ca²⁺ 信号的结构基础。此外,*AmCaM1* 与这些蛋白氨基酸序列的一致性高达 97% ~ 99%。



相同的氨基酸残基用黑色表示,相似的氨基酸残基用灰色表示。序列上面的黑色线条表示 4 个 EF-手型基序所在的位置,序列下面的黑三角表示涉及与 Ca²⁺-结合的保守氨基酸残基

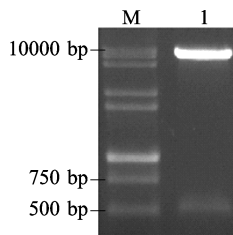
Identical residues are highlighted in black, and similar residues are highlighted in grey. Locations of the four predicted EF-hands are denoted in black lines above the sequences, and the conserved residues involved in Ca²⁺-binding are shown in closed triangles under the sequences

图 3 *AmCaM1* 与其他已知 CaM 蛋白的多序列比对

Fig. 3 Sequence alignment of *AmCaM1* with other known CaM proteins

2.3 *AmCaM1* 植物表达载体构建

为了通过转基因植物鉴定 *AmCaM1* 的功能,将其编码区 cDNA 片段与植物表达载体 p3301 定向连接(由 CaMV35S 启动子驱动),然后转化 *E. coli*,经菌落 PCR 检测获得阳性克隆。从阳性克隆中提取质粒 DNA 进行酶切鉴定,得到与预期大小一致的条带(图 4),表明目的基因片段已成功构建到 p3301 载体上,将其命名为 p3301-35S-*AmCaM1*。将该重组载体转化农杆菌 GV3101,经菌落 PCR 检测获得了阳性克隆,为进一步转化拟南芥做好了准备。



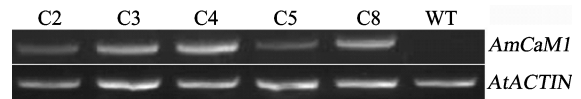
M: D15000 + 2000 DNA Marker; 1: 质粒酶切产物
M: D15000 + 2000 DNA Marker, 1: Enzyme-digested product of the plasmid
图 4 *AmCaM1* 表达载体质粒酶切鉴定图谱

Fig. 4 Restriction analysis of *AmCaM1* expression vector

2.4 *AmCaM1* 转基因拟南芥的获得与分子检测

用农杆菌介导法转化野生型拟南芥 (WT), 得到 T₁ 种子。将其播种成苗后用除草剂 PPT 筛选, 得到 18 株抗性植株。将其中 10 株及 WT 提取基因组 DNA, 用 *AmCaM1* 特异性引物进行 PCR 扩增, 结果有 9 株检测到目的条带, 而对照 WT 未检测到任何条带, 表明目的基因片段已经整合到拟南芥基因组中。为了明确 *AmCaM1* 是否在转基因拟南芥中表达, 在 T₂ 用半定量 RT-PCR 方法对其中 5 个株系

(C2、C3、C4、C5 和 C8, 其绿苗和白苗比例均接近 3 : 1) 进行了分析, 结果均检测到较明显的目的条带, 而 WT 无任何条带(图 5), 表明 *AmCaM1* 在这些株系中均有较高水平的表达。



C2、C3、C4、C5 和 C8; T₂ 株系; WT: 未转化对照
C2, C3, C4, C5 and C8: T₂ transgenic lines, WT: Untransformed control

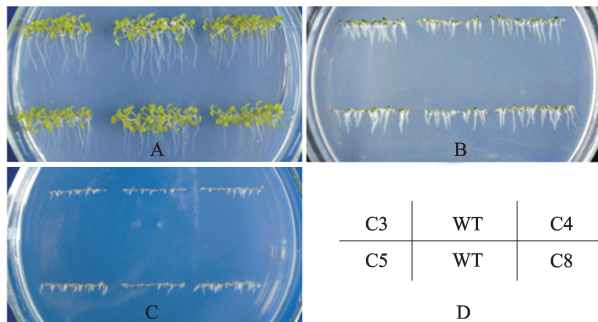
图 5 T₂ 株系中 *AmCaM1* 的半定量 RT-PCR 检测

Fig. 5 Detection of *AmCaM1* expression in T₂ transgenic lines by RT-PCR approach

2.5 *AmCaM1* 转基因拟南芥抗逆性鉴定

将转基因株系 C3、C4、C5 和 C8 的 T₃ 纯合体及 WT 点种在 1/2 MS 和 1/2 MS 附加不同浓度 NaCl 或甘露醇的培养基上, 观察种子萌发和幼苗生长状况。结果在 1/2 MS 培养基上, 转基因株系和 WT 均能正常萌发和生长, 彼此间无明显差异(图 6A); 在 2 种胁迫培养基上, 所有种子的萌发和幼苗生长均受到抑制, 但在附加 NaCl 的培养基上转基因株系和 WT 受抑制的程度无明显差别, 而在附加 300 mmol/L 和 375 mmol/L 甘露醇的培养基上, 4 个转基因株系受抑制的程度均低于 WT(图 6B 和 C)。在培养第 4 天统计, 4 个转基因株系在附加 300 mmol/L 和 375 mmol/L 甘露醇培养基上的萌发率分别在 75.0% ~ 82.3% 和 43.2% ~ 55.9% 之间, 平均为 79.7% 和 50.7%, 而 WT 分别为 61.1% 和 19.4%, 经统计学分析, 转基因株系与 WT 之间的差异有统计学意义。在萌发第 7 天测量, 4 个转基因株系在这 2 种培养基上的

根长分别在 6.1 ~ 6.7 mm 和 1.8 ~ 2.3 mm 之间,平均为 6.4 mm 和 2.1 mm,而 WT 根长分别为 4.4 mm 和 1.2 mm,转基因株系与 WT 之间的差异也有统计学意义(图 7)。转基因株系子叶生长变绿的速度也快于 WT(图 6 B)。此外,还在 8 °C 条件下比较了转基因株系与 WT 的种子萌发情况,未发现有明显差异。这些结果表明, *AmCaM1* 可以提高转基因拟南芥在种子萌发期对水分胁迫的耐性,而对其耐盐和耐冷性无明显作用。

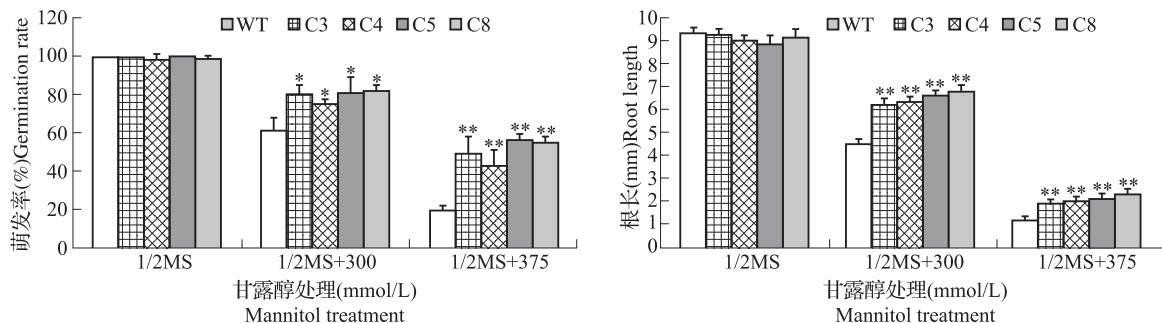


A: 1/2 MS 培养基; B: 1/2 MS + 300 mmol/L 甘露醇培养基; C: 1/2 MS + 375 mmol/L 甘露醇培养基; D: 不同材料在培养基上的位置, C3、C4、C5 和 C8 为转基因株系, WT 为野生型对照。分别在 22 °C 萌发第 7 天(A) 或第 6 天(B 和 C) 拍照

A: 1/2 MS medium, B: 1/2 MS + 300 mmol/L mannitol medium, C: 1/2 MS + 375 mmol/L mannitol medium, D: Distribution of the transgenic lines on media, C3, C4, C5 and C8 stand for four independent transgenic lines respectively, WT stands for wild-type. The photographs were taken on the seventh(A) or fifth day(B and C) after germinating at 22 °C

图 6 *AmCaM1* 转基因株系种子在附加甘露醇培养基上的萌发情况

Fig. 6 Germination of the seeds from *AmCaM1*-transgenic lines on the media supplemented with mannitol



所有的数值为平均值 ± 标准差 (n = 3); * 和 ** 分别表示在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 水平上转基因株系与 WT 的差异显著性

All the values are mean ± SD (n = 3) * and ** represent significant difference between the transgenic lines and WT in the level of $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively

图 7 *AmCaM1* 转基因株系在附加甘露醇培养基上的种子萌发率和根长
Fig. 7 Seed germination percentages and root lengths of the *AmCaM1*-transgenic lines on the media supplemented with mannitol

3 讨论

分析基因的表达特性可快速获取基因的功能信息。根据目前对拟南芥和水稻等植物 CaM 家族的研究,可知高温、高盐、干旱、低温和病菌侵染等多种非生物与生物胁迫均可诱导一些 CaM 基因的表达发生上调,其中部分基因的功能已得到验证。如在拟南芥基因组中有 7 个 CaM 基因,其中 *AtCaM3* 受热诱导并在热激信号转导和抗热性中起关键作用^[12-13];在水稻的 5 个 *OsCam* 基因中, *OsCam1-1* 参与对渗透胁迫和盐胁迫的响应^[14];超表达大豆 *GmCaM4* 可提高抗病性和耐盐性^[15]。本研究首次从强抗逆植物沙冬青中克隆到一个 CaM 基因 (*AmCaM1*),其编码蛋白与其他植物中已知的 CaMs 序列一致性高达 97% 以上,并含有 4 个保守的 EF-手型基序和其中参与 Ca^{2+} 结合的保守氨基酸残基,表明其具备 CaM 家族行使功能的分子结构基础。用半定量 RT-PCR 方法进行表达分析,发现 *AmCaM1* 的转录水平在低温、干旱和盐胁迫下均迅速上调,随着胁迫处理时间延长,其转录水平在干旱胁迫下继续升高然后逐渐回落,而在低温和盐胁迫下则呈现降低-升高-降低的变化趋势(图 1)。这表明 *AmCaM1* 可能是沙冬青响应低温、干旱和盐胁迫信号转导途径上的一个重要调节组分,但在不同胁迫下所起的作用可能存在差异。进一步通过转基因拟南芥进行功能验证,获知其在抵抗水分胁迫中起一定作用,而在耐受低温和盐胁迫中无明显作用。

近年来关于植物 CaMs 的作用机理已取得重要研究进展,普遍的观点认为 CaMs 以 Ca^{2+} 依赖的方

式与多种靶蛋白结合并改变其活性,或者以直接或间接的方式调控相关基因的表达,从而广泛参与植物的逆境应答和生长发育过程^[2,5-6]。例如,拟南芥 *AtCaM3* 通过调节热激转录因子的活性和热激蛋白的表达而对抗热性起正调节作用^[12-13];大豆 *Gm-CaM4* 通过上调 *PR* (pathogenesis related) 基因的表达和茉莉酸的合成而增强抗病性,还可能通过调节转录因子 Myb2 的活性而增强盐应答基因的表达和耐盐性^[15];拟南芥 *AtCaM7* 可作为转录因子直接上调光诱导基因的表达,进而调节幼苗的光形态建成^[16];陆地棉 *GhCaM7* 通过增加活性氧(ROS)的生成而促进棉纤维的伸长^[17];一些 CaMs 还可通过调节油菜素内酯的合成或生长素信号转导来调控植物的生长发育或胁迫应答反应^[18-19]。本研究克隆的 *AmCaM1* 可能通过类似的或者其他作用方式参与转基因拟南芥对水分胁迫的应答反应,但其具体作用机理尚需通过相关试验进行深入分析。

参考文献

- [1] Reddy V S, Reddy A S N. Proteomics of calcium-signaling components in plants [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65: 1745-1776
- [2] Reddy A S N, Ali G S, Celesnik H, et al. Coping with stresses: roles of calcium- and calcium/calmodulin-regulated gene expression [J]. *Plant Cell*, 2011, 23: 2010-2032
- [3] Shao H B, Chu L Y, Shao M A. Calcium as a versatile plant signal transducer under soil water stress [J]. *BioEssays*, 2008, 30: 634-641
- [4] Hashimoto K, Kudla J. Calcium decoding mechanisms in plants [J]. *Biochimie*, 2011, 93: 2054-2059
- [5] Batistič O, Kudla J. Analysis of calcium signaling pathways in plants [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1820: 1283-1293
- [6] Perochon A, Aldon D, Galaud J P, et al. Calmodulin and calmodulin-like proteins in plant calcium signaling [J]. *Biochimie*, 2011, 93: 2048-2053
- [7] 刘美芹, 卢存福, 尹伟伦. 珍稀濒危植物沙冬青生物学特性及抗逆性研究进展 [J]. *应用与环境生物学报*, 2004, 10 (3): 384-388
- [8] 林清芳, 王茅雁, 刘佳杰, 等. 沙冬青细胞与分子生物学研究进展 [J]. *植物遗传资源学报*, 2010, 11 (6): 793-797
- [9] 刘佳杰, 林清芳, 王茅雁, 等. 蒙古沙冬青冷冻胁迫 SMART cDNA 文库的构建及序列分析 [J]. *植物遗传资源学报*, 2011, 12 (5): 770-774
- [10] 林清芳, 王雪峰, 王茅雁, 等. 蒙古沙冬青干旱胁迫全长 cDNA 文库构建及序列分析 [J]. *生物工程学报*, 2012, 28 (1): 86-95
- [11] 王雪峰. 蒙古沙冬青 *AmDREB2* 和 *AmRD22* 基因的功能研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2012
- [12] Liu H T, Sun D Y, Zhou R G. Ca^{2+} and *AtCaM3* are involved in the expression of heat shock protein gene in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Environ*, 2005, 28(10): 1276-1284
- [13] Zhang W, Zhou R G, Gao Y G, et al. Molecular and genetic evidence for the key role of *AtCaM3* in heat-shock signal transduction in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2009, 149: 1773-1784
- [14] Chinpongpanich A, Limruengroj K, Phean-o-pas S, et al. Expression analysis of calmodulin and calmodulin-like genes from rice, *Oryza sativa* L. [J]. *BMC Res Notes*, 2012, 5: 625
- [15] Rao S S, El-Habbak M H, Havens W M, et al. Overexpression of *GmCaM4* in soybean enhances resistance to pathogens and tolerance to salt stress [J]. *Mol Plant Pathol*, 2014, 15(2): 145-160
- [16] Kushwaha R, Singh A, Chattopadhyay S. Calmodulin7 plays an important role as transcriptional regulator in *Arabidopsis* seedling development [J]. *Plant Cell*, 2008, 20: 1747-1759
- [17] Tang W X, Tu L L, Yang X Y, et al. The calcium sensor *GhCaM7* promotes cotton fiber elongation by modulating reactive oxygen species (ROS) production [J]. *New Phytol*, 2014, 202 (2): 509-520
- [18] Du L, Poovaiah B W. Ca^{2+} /calmodulin is critical for brassinosteroid biosynthesis and plant growth [J]. *Nature*, 2005, 437: 741-745
- [19] Galon Y, Aloni R, Nachmias D, et al. Calmodulin-binding transcription activator mediates auxin signaling and responds to stresses in *Arabidopsis* [J]. *Planta*, 2010, 232: 165-178