

# 水稻 CCaMK 互作蛋白的筛选

倪岚, 蒋明义

(南京农业大学, 生命科学学院, 南京, 210095)

**摘要:** : 水稻中钙/钙调素依赖型蛋白激酶 (CCaMK) OsDMI3 是脱落酸 (ABA) 信号转导的一个重要组分。然而, CCaMK 调节植物细胞抗氧化防护的分子机制尚有待阐明。为了研究水稻 CCaMK 在 ABA 信号转导中的作用机制, 本研究利用 Clontech 的 Y2H 酵母双杂系统, 以全长的 OsDMI3 连接到 pGBKT7 载体上作为诱饵, 筛选 ABA 处理的水稻叶片文库, 获得 6 个与 OsDMI3 互作的蛋白。进一步确定分析这些互作蛋白与 OsDMI3 的关系, 将为阐明 OsDMI3 在 ABA 信号转导中的分子机制提供理论依据

**关键词:** OsDMI3; ABA 信号转导; 酵母双杂; 互作蛋白

**中图分类号:** Q945.78

## Screening of Interacting Protein of OsDMI3 in rice

NI Lan, JIANG Mingyi

(NanJing Agricultural University, College of Life Science, NanJing, 210095)

**Abstract:** Rice  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-dependent protein kinase (OsDMI3) have been shown to play an important role in abscisic acid (ABA) signaling. However, the mechanism of OsDMI3 involved in ABA signaling remains to be determined. In order to clear the role of OsDMI3 in this process, we used full-length OsDMI3 as a bait to screen the ABA treated rice leaf cDNA library by Y2H system. In this work, we identified 6 interacting protein of OsDMI3. Further study of their relationship and functions with OsDMI3 would be conducive to illustrating the molecular mechanism of OsDMI3 in ABA signaling.

**Keywords:** OsDMI3; ABA signaling; Y2H, interacting protein

## 0 引言

水分胁迫是限制植物生长发育、影响作物产量的重要的胁迫因子。植物响应水分胁迫最重要的反应之一就是迅速积累植物激素 ABA。ABA 能够刺激气孔关闭, 调节基因表达, 诱导渗透调节物质的积累以及上调抗氧化防护系统来增强植物抵抗环境胁迫的能力。

$\text{Ca}^{2+}$  作为植物信号转导中的第二信使, 是 ABA 信号转导途径中一个重要的中间组分<sup>[1-3]</sup>。植物体内  $\text{Ca}^{2+}$  信号变化会被  $\text{Ca}^{2+}$  受体所识别并传递。 $\text{Ca}^{2+}$  受体有钙调素 CaM、钙依赖型蛋白激酶 (CDPK)、钙调磷酸酶 B 类似蛋白 (CBL) 以及  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM 依赖型蛋白激酶 (CCaMK)。这些感受器感受  $\text{Ca}^{2+}$  变化后, 能够调节下游的各种靶蛋白, 从而导致各种生理反应。CCaMK 被证实能够传感结瘤因子诱导的  $\text{Ca}^{2+}$  震荡, 在菌根感染以及根瘤发育过程中起着关键性的作用<sup>[4-6]</sup>。在水稻基因组中, 已鉴定出一个 CCaMK 基因 (OsDMI3)。OsDMI3 被证实是根瘤发育和水稻丛枝菌根 (AM) 共生所必需的<sup>[7]</sup>。研究表明, ABA、 $\text{H}_2\text{O}_2$  以及 PEG 均能诱导水稻叶片 OsDMI3 基因表达和激酶活性。原生质体瞬时表达体系分析的结果表明 OsDMI3 的过表达能上调 ABA 诱导的抗氧化防护酶 SOD 和 CAT 的活性<sup>[8]</sup>。说明 OsDMI3 是 ABA 信号转导中的一个重要组分。然而 OsDMI3 是如何参与调控这一过程的尚不清楚。

拟南芥中并不存在 CCaMK 激酶基因, 而在百合, 烟草, 玉米, 水稻, 苜蓿中被鉴定出

**基金项目:** 高等学校博士学科点专项科研基金 (2130097110025)

**作者简介:** 倪岚 (1985), 女, 博士后

**通信联系人:** 蒋明义 (1962), 男, 教授, 博导. E-mail: myjiang@njau.edu.cn

[9-14]。在苜蓿中，CCaMK 能够直接磷酸化细胞核中的 IPD3<sup>[15]</sup>，百脉根中 CCaMK 也能磷酸化 IPD3 同源的 CYCLOPS<sup>[16]</sup>。在水稻中，已鉴定出 OsDMI3 和 OsIPD3 互作。用 OsDMI3 的激酶区作为诱饵，通过酵母双杂的方法找到另一个互作蛋白 OsCIP73<sup>[17]</sup>。这些互作蛋白都被证明是 CCaMK 参与的根瘤形成过程中的靶蛋白。而在 ABA 信号途径中，OsDMI3 的互作蛋白尚未被鉴定。

本研究克隆了水稻 OsDMI3 基因，选用酵母双杂的方法，采用 Clontech 的 Y2H 系统，将 OsDMI3 全长连接到 BD 载体 pGBKT7 上作为诱饵。构建 ABA 处理的水稻叶片 cDNA 文库，以 OsDMI3 为诱饵筛选到 6 个与 OsDMI3 可能互作的蛋白，这些互作蛋白的鉴定有助于人们对 CCaMK 参与 ABA 信号转导作用机制的认识

## 1 实验材料与方法

### 1.1 材料

本实验所用到的水稻材料为日本晴。酵母菌株 Y187Yeast Strain、Y2HGold Yeast Strain 和筛库载体 pGBKT7、pGBKT7-53、pGBKT7-lam、pGADT7-T 均来自 clontech 公司，从大连宝生物工程有限公司（TAKARA）购买得到。质粒小提试剂盒、DNA 回收纯化试剂盒、各种 DNA Marker、限制性内切酶、ExTaq 聚合酶、T4DNA 连接酶、YPDA 培养基，SD-Trp 培养基，SD-Leu 培养基、SD-Leu/-Trp 培养基、SD-Ade/-Trp/-Leu/-His 培养基、AbA(antibiotic Aureobasidin A)、X- $\alpha$ -gal、酵母小提试剂盒、酵母蛋白提取试剂 Yeast Protein Extraction Reagent 试剂购自大连宝生物工程有限公司。GAL4 DNA-BD 抗体来自 clontech 公司。

实验所涉及引物均有上海生工生物工程有限公司合成，基因测序均有上海美吉生物科技有限公司完成（表 1）。

表 1 所用引物  
Table 1 Primer sequences

Abbreviation	Sequence 5'—3'	Description
OsDMI3-BD-1	CATATGATAATGTCCAAGACT GAG	Forward
OsDMI3-BD-2	CTGCAGCTGTGGGCGGAGGGAGGA	Reverse
AD-1	GGAGTACCCATACGACGTACC	Forward
AD-2	TATCTACGATTCATCTGCAGC	Reverse
pGADT7-F	GGAGTACCCATACGACGTACC	Forward
pGADT7-R	TATCTACGATTCATCTGCAGC	Reverse

### 1.2 方法

#### 1.2.1 水稻叶片文库构建

稻日本晴叶片 ABA 处理后由液氮速冻保存后交由 TaKaRa 大连宝生物工程有限公司提取 RNA，并由其构建水稻叶片文库。公司完成构建文库后交付扩增文库的质粒和菌株。

自-80℃冰箱取出含有 cDNA 文库的甘油菌株，置于冰中化冻。从 1ml 上述菌中取 1 $\mu$ l 加入到 1mlLB 培养基中，混匀。此为稀释液 A（1: 10<sup>3</sup>）。再从上述稀释液中取 1 $\mu$ l，加入到另一个含有 1mlLB 培养基的试管中，轻轻混匀。此为稀释液 B（1:10<sup>6</sup>）。取稀释液 A 和 B 各 50 $\mu$ l 和 100 $\mu$ l 分别涂于 LB/Amp 平板上，37℃倒置培养过夜，统计平板上单克隆菌落数。从扩增的平板上选取多个单克隆进行菌落 PCR，引物分别为 pGADT7-F 和 pGADT7-R，

用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测插入片段大小。

75 参照 clontech 的 Yeastmaker<sup>TM</sup> Yeast Transformation System, 将水稻文库 pGADT7-library 质粒转入酵母菌株 Y187, 涂布于 SD-Leu 固体培养基上, 30℃ 培养 3-5 天。待酵母长至 2mm, 用 1ml 液体培养基将平板上所有的酵母菌落收集, 以便后续筛库使用

### 1.2.2 诱饵表达载体的构建

80 根据 *OsDMI3* 基因序列和 pGBKT7 载体信息, 设计并合成 *OsDMI3*-BD-1 和 *OsDMI3*-BD-2 引物, 以水稻 cDNA 为模板进行常规 PCR 扩增。将纯化后的 PCR 产物与 pGBKT7 分别利用 *NdeI* 和 *PstI* 酶切后进行纯化、连接后转化大肠杆菌感受态细胞, 挑取阳性克隆子, 经测序鉴定获得诱饵载体 pGBKT7-*OsDMI3*。

85 采用 clontech 的 Yeastmaker<sup>TM</sup> Yeast Transformation System 将构建好的诱饵载体质粒转入酵母菌株 Y2HGold 内, 待酵母长成后提取酵母总蛋白后进行 SDS-PAGE 电泳分离, 并用 Western blot 检测融合蛋白 BD-*OsDMI3* 融合蛋白的表达情况。

### 1.2.3 诱饵蛋白的毒性检测自激活检测和 AbA 浓度筛选

90 分别将诱饵载体 pGBKT7-*OsDMI3* 和空载体 pGBKT7 分别转入 Y2HGold 酵母, 至 SD-Trp 平板上, 置 30℃ 培养 3-5 天, 观察其生长状况进行毒性检测实验。将转化的诱饵载体和空载的酵母菌单克隆挑进 SD-Trp 液体培养基中, 30℃ 震荡培养至 OD600 达到 1, 以 1:10, 1:100, 1:1000 的稀释倍数滴于 SD-Trp/X- $\alpha$ -gal 平板上, 观察其生长状况进行自激活实验检测。将诱饵载体和阳性对照的酵母菌株单克隆划线涂在不同浓度 AbA (125ng/ml, 150ng/ml, 200ng/ml) 的 SD-Trp 平板上, 观察其生长状态, 挑选最合适的 AbA 浓度。

### Mating 方法进行酵母双杂

95 将 1ml 构建好的水稻叶片 cDNA 文库的 Y187 酵母菌液与 4ml 的含有 pGBKT7-*OsDMI3* 的 Y2HGold 酵母菌, 加入 45ml 的 2×YPDA 培养基, 30℃ 50rpm 震荡培养 20-24h。用 10ml 的 0.5×YPDA 重悬沉淀的酵母细胞。将重悬液全部涂到 50-60 个 15mm 的 SD-Trp/-Leu/X- $\alpha$ -gal/AbA 的琼脂平板上, 30℃ 倒置培养 3-5 天, 观察其生长。挑取 X- $\alpha$ -gal 显蓝色的菌落, 划线到 SD-Trp-Leu-His-Ade/X- $\alpha$ -gal/AbA 平板上, 进一步观察其生长。

100 将 SD-Trp-Leu-His-Ade/X- $\alpha$ -gal/AbA 平板上生长出来显蓝色的菌落挑取至 SD-Trp/-Leu 液体培养基中, 30℃ 220rpm 震荡培养 20h。参照酵母质粒提取试剂盒说明, 提取酵母质粒, 用 pGADT7 载体引物对其进行 PCR, 选择插入片段在 500bp 到 3kb 所对应的克隆作进一步分析。

105 将挑选的酵母质粒分别再次转入到酵母 Y187 菌株的感受态中, 挑取在 SD-Leu 平板上生长的单菌落分别和携带 pGBKT7-*OsDMI3* 和空载的 Y2HGold 酵母单菌落进行融合, 在 1ml 2×YPDA 培养基中 30℃, 220rpm 震荡培养 24h。收集融合好的酵母菌液涂板于 SD-Trp-Leu-His-Ade/X- $\alpha$ -gal/AbA 平板上, 30℃ 倒置培养, 观察生长。将回转后仍为阳性的克隆进行基因测序, 并且将测序得到的结果通过同源性比对 (BLAST) 找出插入片段所对应的基因, 并验证是否与 GAL4-BD 在同一读码框内。

## 2 结果与分析

### 2.1 文库的质量鉴定

在制作水稻 cDNA 文库的过程中,我们选用了 100 $\mu$ MABA 处理的水稻,在处理 0、30、60、90、120、150、180、240 与 300 分钟时取样,将各样品等量混合,由 TaKaRa 大连宝生物工程有限公司构建,交付的为文库扩增甘油菌,根据公式:克隆数 $\times$ 稀释倍数/涂板体积=cfu/ml,取不同稀释倍数的菌液计算其平均滴度 (cfu/ml)。根据方法 1.2.1 分别算出稀释 1000 倍滴度数 A,和稀释  $10^6$  倍的滴度数 B。分别为:稀释 1000 倍的菌液取体积为 20 $\mu$ l 涂板,平均长了近 1 万个左右的菌落,滴定数 A 为  $10000 \times 10^3 / 0.002 = 5 \times 10^{10}$  cfu/ml。稀释  $10^6$  倍的菌液取体积 50 $\mu$ l 涂板,平均长了 1800 个菌落,滴定数 B 为  $1800 \times 106 / 0.1 = 3.5 \times 10^{10}$  cfu/ml,文库经测定容量为  $10^{10}$  cfu/ml。

根据文库菌落 PCR 电泳图,检测到所挑取的克隆的插入片段大小不一,平均插入 cDNA 片段长度大于 700bp (图 1)

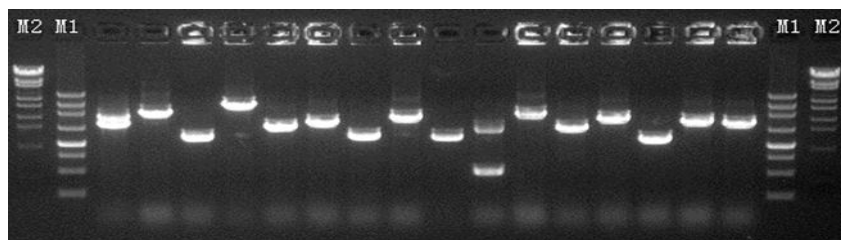


图 1cDNA 文库插入片段鉴定图

M1 为 250bpMarker, M2 为 1Kb DNA Marker

Figure 1 Analysis of size-fractionated cDNA inserted the pGADT7 vector

M1:250bp DNA Ladder Marker, M2: 1Kb DNA Ladder Marke

### 2.2 诱饵表达载体 pGBKT7-OsDMI3 的构建以及诱饵蛋白的表达

以保存的 pXZ008-DMI3 质粒为模板,通过上下游引物经 PCR 扩增得到 1500bp 的特异性条带,回收后连接到 PMD-19T 载体上,测序无误后通过 *NdeI* 和 *PstI* 内切酶连到 pGBKT7 载体上,转化 DH5 $\alpha$ ,得到的阳性克隆经质粒提取后由 *NdeI* 和 *PstI* 双酶切鉴定,在 1500bp 出现相同大小的特异性条带,说明成功构建了 pGBKT-OsDMI3 载体 (图 2)。

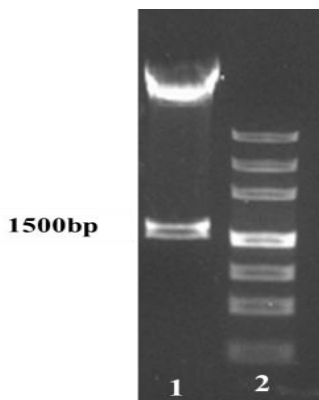


图 2 pGBKT7-OsDMI3 双酶切验证

1: *NdeI*+*PstI* 酶切验证构建好的 pGBKT7-OsDMI3 载体; 2: DNA MarkerIII

Figure2 Enzyme of pGBKT7-OsDMI3 plasmids

1: Identification of recombinant plasmids of pGBKT7-OsDMI3 by *NdeI*+*PstI*; 2: DNA MarkerIII

转入 pGBKT7-OsDMI3 的酵母在 SD-Trp 液体培养基中 30 $^{\circ}$ C 220rpm 震荡培养摇至



OD600 达到 0.6 后，用酵母蛋白提取液提取蛋白，进行 western-blot 验证。用 pGBKT7 载体上 GAL4 抗体杂出一个大小在 70KD 的特异性条带和 OsDMI3-GAL4 融合蛋白大小一致(图 3)，证明 OsDMI3 在酵母里表达正确。



图 3western blot 检测诱饵蛋白的表达

1:蛋白 Marker 2: 携带 pGBKT7-OsDMI3 plasmids 的酵母蛋白

Figure3 Detecting Bait Expression Using Western Blot

1:Marker 2: Proteins of the yeast containing pGBKT7-OsDMI3 plasmids

### 2.3 OsDMI3 诱饵表达载体的毒性和自激活检测

将 pGBKT7-OsDMI3 和 pGBKT7 空载转化入 Y2HGold 酵母感受态中，涂板于 SD-Trp 平板上，30℃倒置培养 3 天后，观察发现携带 pGBKT7-OsDMI3 的酵母菌和携带空载的酵母菌无论在生长大小还是生长速度上都基本没有差异(图 4)，说明 OsDMI3 对酵母并没有毒性。

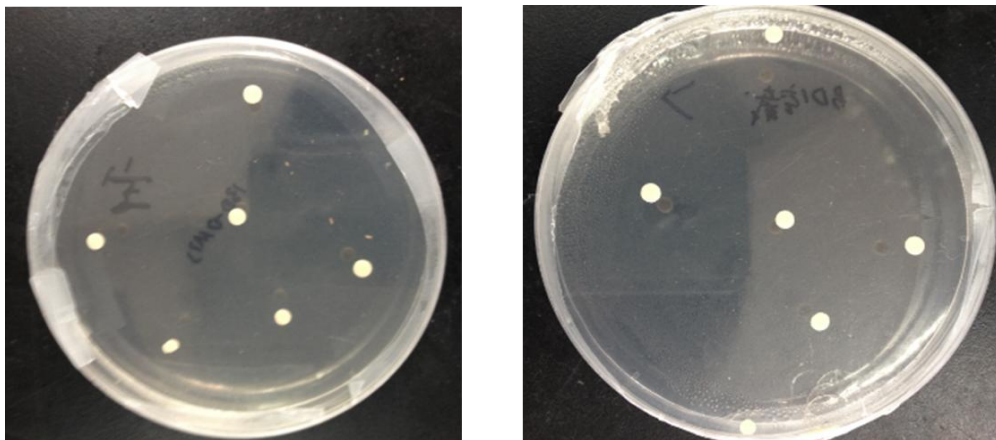


图 4 诱饵蛋白的毒性检测

酵母转化 pGBKT7-OsDMI3 载体和 pGBKT7 (左) 空载后，稀释 1/100 涂布在 SD/-Trp 培养基上，30℃培养直到菌落出现。

Figure4 Testing bait for toxicity

Transform pGBKT7-OsDMI3 和 pGBKT7(empty) vector in yeast and spread 1/100 dilution of transformation mixture onto SD/-Trp plates. Incubate the plates at 30℃ until the colonies appeared.

pGBKT7 载体上携带 *MEL1* 报告基因，当两个蛋白互动时，能激活该报告基因，而使得携带互作蛋白的酵母在加入 X- $\alpha$ -gal 的固体培养基上生长出蓝色酵母菌落。构建好 pGBKT7-OsDMI3 载体后转入 Y2HGold 菌株内，检测 OsDMI3 是否能自激活 *MEL1* 报告基因。挑取上述两个酵母菌的单克隆扩大培养至 OD600=1，以 1、1/10、1/100、1/1000、1/10000 比例稀释滴于 SD-Trp/X- $\alpha$ -gal 平板上 30℃培养，发现 pGBKT7-OsDMI3 和空载一样都不能使 X- $\alpha$ -gal 显蓝色(图 5)，说明其不具有自激活 *MEL1* 报告基因的可能性。

稀释倍数 1    1/10    1/100    1/1000    1/10000

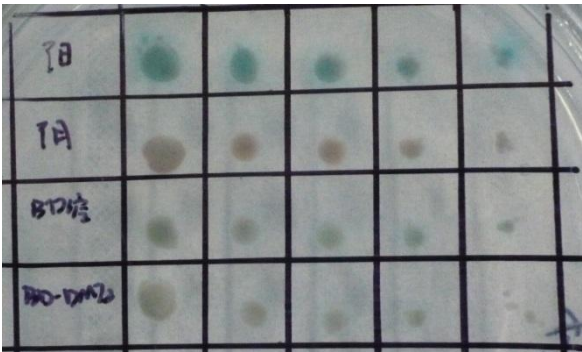


图 5 诱饵 *MEL1* 报告基因自激活检测  
分别转化 pGBKT7-OsDMI3、pGBKT7 空载、阴性对照和阳性对照载体到 Y2HGold 酵母菌里，稀释浓度分别为 1、1/10、1/100、1/1000、1/10000 涂在 SD/-Trp 板上，30℃ 培养直到菌落出现。

Figure 5 Testing bait for autoactivation of reporter gene *MEL1* in Y2HGold  
Transform pGBKT7-OsDMI3 vector、pGBKT7(empty) vector、native control vector、and positive control vector in yeast and spread 1、1/100、1/1000、1/10000 dilution of transformation mixture onto SD/-Trp plates。Incubate the plates at 30℃ until the colonies appeared.

AbA ， antibiotic Aureobasidin A，抑制酵母体内的肌醇磷酸基神经胺合成酶，低浓度的范围 0.1–0.5 μg/ml 内对酵母细胞有毒性，能抑制酵母的生长 pGBKT7 载体上携带报告基因 *AURI-C*，编码 AbA 抑制的肌醇磷酸基神经胺合成酶。当酵母中两个蛋白互作时，激活 *AURI-C* 报告基因，在外源加入的 AbA 培养板上正常生长。有时转入诱饵载体的酵母菌株会对外源加入 AbA 有一定的抗性，浓度太低的 AbA 并不能起到筛选作用，浓度太高的 AbA 会过分抑制酵母的生长，从而不能起到筛选互作蛋白的功效。将上述的携带 pGBKT7-OsDMI3 载体和阳性对照载体的两个菌株的阳性克隆分别划线至含有不同浓度 125ng/ml、150ng/ml、200ng/ml 的 AbA 的 SD-Trp 平板上 30℃ 培养，观察其生长状态。实验发现，如图 6，125ng/ml 的 AbA 并不能完全抑制酵母的生长，200ng/ml 浓度的 AbA 过分抑制了酵母的生长，阳性对照生长状态明显不如低浓度的酵母。而 150ng/ml 的 AbA 浓度最为合适，可以用该浓度来进行酵母的筛选。

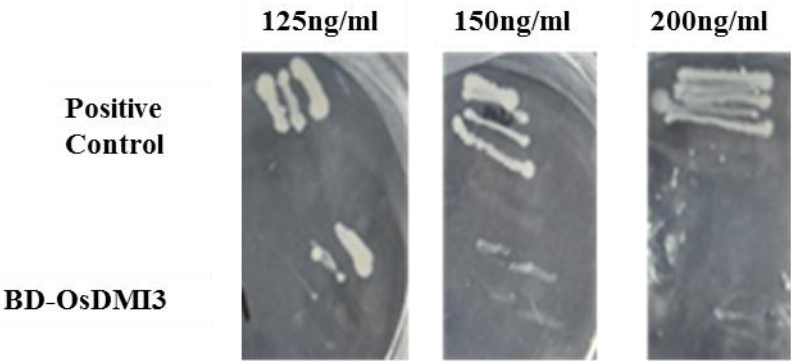


图 6 AbA 浓度检测  
携带 pGBKT7-OsDMI3 载体和阳性对照载体的酵母菌株分别涂在 125ng/ml、150ng/ml、200ng/ml 浓度的 SD/-Trp 固体培养基上，30℃ 培养 3-5 天。

Figure 6 AbA concentration sensitivity determination  
Transform pGBKT7-OsDMI3 vector and positive control vector in yeast and spread onto SD/-Trp plates with different concentration of AbA (125ng/ml,150ng/ml,200ng/ml).Incubate the plates at 30℃ for 3-5 days

## 2.4 OsDMI3 互作蛋白的筛选

本章所采用的是 Clontech 的 Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System 酵母双杂系统，该体系采用的是融合携带诱饵载体的 Y2HGold 酵母菌株和携带水稻文库的 Y187 菌株，在两个菌株共融后通过检测报告基因来筛选互作蛋白。将融合了 20-24 小时的酵母菌用取少量用显微镜观察，观察到酵母有典型的类似三叶草或者米老鼠头的共融形状出现，标志着酵母融合完成。携带文库的酵母菌和携带诱饵的酵母菌融合后，涂板 30℃ 倒置培养 3-5 天后，将显蓝色的菌落划线到 SD-Trp-Leu-His-Ade/X-α-gal/AbA 平板上，继续 30℃ 培养 3-5 天，仍然生长且显蓝色的菌落为初次筛选出的携带和诱饵互作的蛋白的酵母菌。

筛选文库共进行了三次，每次将挑选出的酵母菌划线到 SD-Trp-Leu-His-Ade/X-α-gal/AbA 的平板上。然后将平板上生长出的酵母菌扩大培养，提取质粒转化大肠杆菌 DH5α，将单一的靶蛋白载体质粒从大肠杆菌中提取出来，再次转 Y187 中单独和携带诱饵载体的 Y2HGold 酵母菌融合，经行回复验证。将仍旧激活所有报告基因的靶蛋白载体测序，测序的结果和水稻数据库进行比对，找到 6 个与 OsDMI3 互作的蛋白(图 7)。

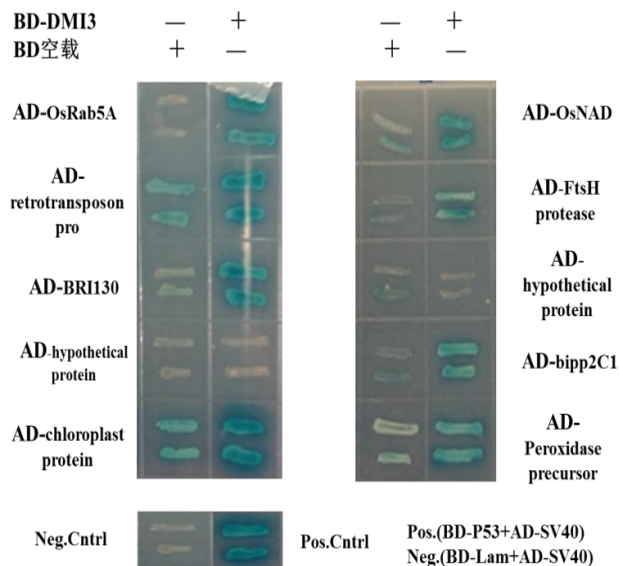


图 7 以 OsDMI3 为诱饵，筛选水稻叶片 cDNA 文库通过酵母双杂筛选的得到与 OsDMI3 互作的蛋白，再次在酵母中回复验证与诱饵 OsDMI3 的互作，确定了 6 个与 OsDMI3 互作的靶蛋白。

Figure 7 Use OsDMI3 as a bait to screen rice cDNA library by Yeast-two-hybrid system Using OsDMI3 as a bait screened the rice library. Rescue plasmids form positive yeast clones. Cotransform OsDMI3 bait and positive library plasmids in yeast. Confirm of 6 positive interacting protein with OsDMI3.

## 3 讨论

在水稻中发现 CCaMK (OsDMI3) 能够被 ABA 诱导并参与 ABA 信号途径。然而 OsDMI3 是参与这一信号的分子机制仍有待澄清。研究一个蛋白在信号途径中的作用和位置，就需要寻找其相互作用的蛋白。

本研究以 OsDMI3 为诱饵，用酵母双杂寻找水稻叶片中与 DMI3 相互作用的靶蛋白。筛选了上百个转化子后得到多个与 OsDMI3 相互作用的蛋白。通过比对水稻基因组，分别找到了 OsRab5A, OsNAD, OsbiPP2C1 等 6 个互作蛋白。其中得到的一个靶蛋白属于 PP2C 家

族。PP2C 家族在 ABA 信号途径中扮演了重要的角色。拟南芥中 ABI1、ABI2、HAB1、HAB2、  
AtPP2CA 均被报道是 ABA 信号中的负调控因子<sup>[18-20]</sup>。OsbiPPC1 是 Hu 等<sup>[21]</sup>鉴定出了一个  
与植物抗病相关的 PP2C 基因,其受苯并噻二唑(BTH)诱导,还受到干旱、冷害以及 ABA  
的诱导。OsbiPP2C1 的 C 端蛋白结构催化域与已经报道的多个参与 ABA 信号的 PP2C 蛋白  
具有较高的同源性,说明 OsbiPP2C1 可能也参与 ABA 的信号。而另一个蛋白 OsRab5A 属  
于小 G 蛋白家族中的 Rab 亚家族,之前研究表明其参与细胞内吞途径,是小泡停泊和融合  
的关键调节因子。然而由于酵母双杂具有较高的假阳性,OsDMI3 与这些蛋白互作需要进一  
步的确认和验证。互作蛋白是否参与 ABA 信号途径需要进一步的验证。与 OsDMI3 的互作  
在 ABA 信号途径中起到什么作用有待进一步的分析。

## 4 结论

成功克隆了 OsDMI3 的全长序列,构建了 OsDMI3 诱饵载体,利用酵母双杂交技术从  
ABA 处理的水稻叶片 cDNA 文库中筛选到了 6 个与 OsDMI3 相互作用的蛋白。这一研究的  
开展有助于人们对植物细胞 CCaMK 参与 ABA 信号的作用机制的认识,拓展人们对 ABA  
信号转导机理的理解。

## [参考文献] (References)

- [1] Zhang A, Jiang M, Zhang J, Tan M, Hu X. Mitogen-activated protein kinase is involved in abscisic acid-induced antioxidant defense and acts downstream of reactive oxygen species production in leaves of maize plants[J]. Plant Physiol, 2006, 141: 475-487
- [2] Hu X, Jiang M, Zhang A, Lin F, Tan M. Calcium-calmodulin is required for abscisic acid-induced antioxidant defense and function both upstream and downstream of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in leaves of maize (Zea mays) plants[J]. New Phytol, 2006, 173: 27-28
- [3] Hu X, Song F, Zhang Z. Molecular characterization and expression analysis of a rice protein phosphatase 2C gene, OsBIPP2C1, and overexpression in transgenic tobacco conferred enhanced disease resistance and abiotic tolerance[J]. Physiologia Plantarum, 2006, 127: 225-236
- [4] Zhang A, Jiang M, Zhang J, Ding H, Xu S, Hu X, Tan M. Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves[J]. New Phytol, 2007, 175: 36-50
- [5] Hayashi T, Banda M, Shimoda Y, Kouchi H, Hayashi M, Imaizumi-Anraku A. A dominant function of CCaMK in intracellular accommodation of bacterial and fungal endosymbionts[J]. Plant J, 2010, 63: 141-154
- [6] Oldroyd GE. Speak, friend and enter: signaling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants[J]. Nat Rev Microbiol, 2013, 11: 252-263
- [7] Poovaiah BW, Du L, Wang H, Yang T. Recent advances in calcium/calmodulin-mediated signaling with an emphasis on plant-microbe interactions[J]. Plant Physiol, 2013, 163: 531-542
- [8] Shi B, Ni L, Zhang AY, Cao JM, Zhang H, Qin TT, Tan MP, Zhang JH, Jiang MY. OsDMI3 is a novel component of abscisic acid signaling in the induction of antioxidant defense in leaves of rice[J]. Mol Plant, 2012, 5: 1359-1374
- [9] Chen C, Gao M, Liu J, Zhu H. Fungal symbiosis in rice requires an ortholog of a legume common symbiosis gene encoding a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase[J]. Plant Physiol, 2007, 145: 1619-1628
- [10] Harbak EM, Chan CWM, Gribakov M, Harper JF, Choi GH, Halford N, Kudla J, Luan S, Nimmo HG, Sussman MR, Thomas M, Wlaker-simmons K, Zhu KJ, Harmon AC. The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases[J]. Plant Physiol, 2003, 132: 666-800
- [11] Harper JF, Breton G, Harmon A. Decoding Ca<sup>2+</sup> signals through plant protein kinases[J]. Annu Rev Plant Biol, 2004, 55: 263-288
- [12] Mitra RM, Gleason CA, Edwards A, Hadfield J, Downie JA, Oldroyd GD, Long SR. A Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: gene identification by transcript-based cloning[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 701-705
- [13] Asano T, Tanaka N, Yang G, Hayashi N and Komatsu S. Genome-wide identification of the rice calcium-dependent protein kinase and its closely related kinase gene families: comprehensive analysis of the CDPKs gene family in rice[J]. Plant Cell Physiol, 2005, 46: 356-366



- 270 [14] Tirichine L, Imaizumi-Anraku H, Yoshida S, Murakami Y, Madsen LH, Miwa H, Nakagawa T, Sandal N, Albrechtsen AS, Kawaguchi M, Downie A, Sato S, Tabata S, Kouchi H, Parniske M, Kawasaki S, Stougaard J. Deregulation of a  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development[J]. *Nature*, 2006, 441: 1081
- 275 [15] Capon W, Herder JD, Sun J, Verplancke C, Keryser AD, Rycke RD, Goormacintig S, Oldroyd G, Holsters M. Calcium spiking patterns and the role of the calcium/calmodulin-dependent kinase CCaMK in lateral root base nodulation of *Sesbania rostrata*[J]. *Plant Cell*, 2009, 21: 1526-1540
- [16] Messines E, Mun JH, Yeun LH, Jayaraman D, Rouge P, Barra A, Loughnon G, Schornack S, Bono JJ, Cool DR. A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium and calmodulin-dependent protein kinase of *Medicago truncatula*[J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2007, 20: 912-921
- 280 [17] Yano K, Yoshida S, Muller J, Singh S, Banba M, Vickers K, Markman K, White C, Schuller B, Sato S, Asamuzu E, Tabata S, Murooka Y, Perry J, Wang TL. Cyclops, a mediator of symbiotic intracellular accommodation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 20504-2054
- [18] Kang H, Zhu H, Chu X, Yang ZZ, Yuan SL, Yu DQ, Wang C, Hong ZL, Zhang ZM. A novel interaction between CCaMK and a protein containing the Scythe-N Ubiquitin-like Domain in *Lotus japonicus*[J]. *Plant Physiology*, 2011, 155: 1312-1324
- 285 [19] Allen GJ, Kuchitus K, Chu S, Murrata Y, Schroeder J. Arabidopsis abi1-1 and abi2-1 phosphatase mutations reduce abscisic acid-induced cytoplasmic calcium rises in guard cells[J]. *Plant Cell*, 1999, 11.9: 1785-1798
- [20] Kuhn JM, Boisson-Dernier A, Dizon MB, Makatabi-MH, Schroeder JI. The protein phosphatase AtPP2CA negatively regulates abscisic acid signal transduction in Arabidopsis and effects of abi1 on AtPP2CA mRNA[J]. *Plant Physiol*, 2006, 140: 127-139
- 290 [21] Barbieri M, Roberts R, Gumusboga A, Highfield H, Alvarez-Dominguez C, Stahl P. Epidermal growth factor and membrane trafficking EGF receptor activation of endocytosis requires Rab5a[J]. *J Cell Biol*, 2000, 151(3): 539-550