

Ca²⁺ 对拟南芥侧根生长发育影响的递进因子分析

周 索¹, 赵丽英¹, 杜瑞卿¹, 马纳纳¹, 雷 莹¹, 王永勤²

(1 南阳师范学院 生命科学与技术学院, 河南 南阳 473061; 2 北京农业生物技术研究中心, 北京 100097)

[摘 要] **【目的】**确定 Ca²⁺ 在异三聚体 G 蛋白调控的拟南芥侧根生长发育过程中的作用及可能的信号传递途径。**【方法】**以拟南芥的野生型(ws)、异三聚体 G 蛋白 α 亚基基因 *GPA1* 缺失突变体(*gpa1-1*, *gpa1-2*)和超表达突变体(*wG α* , *cG α*)为材料,在含有不同质量浓度(0~0.2 mg/L)NAA 的培养基内,添加无机钙通道抑制剂 AlCl₃,对拟南芥侧根生长发育的形态进行观测,并对 NAA、Ca²⁺、AlCl₃ 的影响作用大小进行递进因子分析。**【结果】**相同质量浓度的 NAA 对 5 种基因型拟南芥侧根的生长发育无显著影响;Ca²⁺ 对 5 种基因型拟南芥侧根生长发育均有显著影响,侧根数目依次为缺失突变体<野生型<超表达突变体;AlCl₃ 对 5 种基因型拟南芥侧根生长发育影响显著;Ca²⁺ 和 AlCl₃ 是拟南芥侧根生长发育的重要影响因素。**【结论】**(1)Ca²⁺ 通道可能是异三聚体 G 蛋白 α 亚基调节的下游效应器,Ca²⁺ 可能是下游信号,AlCl₃ 对细胞膜上的 Ca²⁺ 通道阻断数量可能是按一定比例阻断,而不是一个绝对数量,机制尚不明确。(2)3 个处理因素在不同的处理层次中所起的作用不同,对 5 种不同基因型拟南芥个体侧根生长的影响也不同。递进因子分析结果与实际情况基本一致,是一种科学的、可行的、有创新性的方法,值得推广应用。

[关键词] 拟南芥;异三聚体 G 蛋白;突变体;递进因子分析

[中图分类号] Q945.41

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)02-0147-06

Progressive factor analysis of lateral roots growth of *Arabidopsis thaliana* regulated by Ca²⁺

ZHOU Suo¹, ZHAO Li-ying¹, DU Rui-qing¹, MA Na-na¹, LEI Ying¹, WANG Yong-qin²

(1 College of Life Science and Technology, Nanyang Normal University, Nanyang, He'nan 473061, China;

2 Beijing Research Center of Agro-Biotechnology, Beijing 100097, China)

Abstract: **【Objective】** The study determined the role of Ca²⁺ in the lateral roots growth of *Arabidopsis thaliana* regulated by heterotrimeric G protein and the possible signal transduction pathways. **【Method】** The wild type *A. thaliana* (ws) and its mutants in which heterotrimeric G protein α subunit gene *GPA1* was null (*gpa1-1*, *gpa1-2*) or overexpressed (*wG α* , *cG α*) were used as main materials. By adding calcium channel blockers AlCl₃, some morphological parameters of the lateral root growth of *A. thaliana* were measured and progressive factor analysis of the role of NAA, Ca²⁺, AlCl₃ was carried out in mediums supplemented with different concentrations of NAA (0—0.2 mg/L). **【Result】** The impact on the lateral roots growth of 5 genotypes *A. thaliana*, NAA approach in the same concentration had no significant difference, but Ca²⁺ (Sequence of the number of lateral roots was: mutants<wild type<overexpressed) and AlCl₃ did. **【Conclusion】** (1) Ca²⁺ channels might be downstream effectors of heterotrimeric G protein α subunit regulation. And Ca²⁺ might be downstream signal. The block of the number of Calcium channel blockers AlCl₃ to calcium channel blockers on cell membrane might be blocked by a certain percentage, rather than an absolute number, and the mechanism was not clear. (2) Three factors played different roles in different levels

* [收稿日期] 2009-06-03

[基金项目] 河南省科技厅基础与前沿项目(082300460170)

[作者简介] 周 索(1970—),女,河南南阳人,副教授,硕士,主要从事植物生理学研究。E-mail: zhousuo2046@163.com

[通信作者] 杜瑞卿(1968—),男,山西吕梁人,副教授,硕士,主要从事生物统计学研究。E-mail: duruiqing8@163.com

and had different influence on the growth of roots of five different genotypes. The results of progressive factor analysis and other statistical analysis were basically consistent, so it was scientific and feasible. Furthermore, this analysis had a certain degree of innovation and should be popularized and applied.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; heterotrimeric G protein; mutant; progressive factor analysis

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)侧根是由位于木质部束部位的中柱鞘细胞恢复分裂和形成新的根尖分生组织并经伸长生长形成的^[1]。侧根的发生密度受多种因素,如生长素的运输^[1]、C/N 的高低^[2]、可利用的磷酸盐含量^[3]、细胞外 Ca^{2+} 等^[4-5] 的影响。Himanen 等^[6] 在研究生长素诱导侧根发生前中柱鞘细胞中的表达基因时,发现一个编码异三聚体 G 蛋白 α 亚基的基因被强烈表达,这与 Ullah 等^[7-8] 所提出的异三聚体 G 蛋白 α 亚基对细胞的分裂增殖具有促进作用,以及 G 蛋白在生长素诱导的侧根发生信号传导级联过程中发挥作用的假设相一致。因此笔者推测异三聚体 G 蛋白可能直接或间接地参与了生长素调节下的根系发育过程。有研究证明,植物细胞内异三聚体 G 蛋白关联的胞外环境信号主要有:植物激素、光、病原激发子^[9]、干旱刺激、 O_3 和胞外钙调素等,这些信号与植物生长、发育和抗性形成密切相关。进一步研究表明,GPA1 基因(异三聚体 G 蛋白 α 亚基基因)的过表达促进了生长素诱导的侧根的形成,而 GPA1 缺失会导致突变体侧根发生减少^[10]。

以上结果均表明,G 蛋白参与了拟南芥根系的生长发育。目前,国际上通用的研究 G 蛋白 α 亚基功能的材料是拟南芥 G 蛋白 α 亚基基因 GPA1 缺失突变体(gpa1-1, gpa1-2)和超表达突变体(wG α , cG α)^[11]。异三聚体 G 蛋白参与生长素调控的拟南芥侧根的生长发育过程,但此过程中异三聚体 G 蛋白下游的效应器是否包含 Ca^{2+} 目前还缺少证据。基于以上研究结果,本试验在生长素诱导下,研究细胞外有无 Ca^{2+} 以及钙通道抑制剂等对拟南芥侧根生长的影响,确定 Ca^{2+} 在异三聚体 G 蛋白调控的拟南芥侧根生长发育过程中的作用及可能的信号传递途径,为植物生理多因素影响研究提供新方法。

本研究涉及到 5 个不同研究对象(拟南芥 5 个基因型)和 3 个不同影响因素(NAA、 Ca^{2+} 、 AlCl_3)。因素 NAA 又设有 7 个试验水平,不同影响因素及其试验水平对不同植物个体表现出不同的影响,影响因素间又表现出不同的协同或拮抗作用。因此,如何揭示影响因素和因素间的复杂关系及其对植物个体的影响程度和机理,就显得十分重要,而这往往

需要通过因素分析来进行。目前,关于影响因素分析的方法,主要有方差分析和因子分析法两种。方差分析是一种判断分析,无法反映出因素以及因素相互作用对个体的影响程度,从而无法揭示因素间的复杂关系;而因子分析法可以将多个因素的影响结果最大可能地转化为少数几个影响因子进行分析,但它是一种静态分析,也无法揭示因素间相互影响的复杂关系。基于此,本研究在通常的因子分析法的基础上,提出了一种动态的因子分析法,即递进因子分析法,并采用该方法研究了 NAA、 Ca^{2+} 、 AlCl_3 对拟南芥侧根生长发育影响作用的大小,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 供试材料及拟南芥的种植

供试材料为拟南芥的野生型 ws(wassilewskija 生态型),G 蛋白 α 亚基基因 GPA1 缺失的 gpa1-1、gpa1-2 (gpa1-1 是将 GPA1 基因的第 7 个内含子敲除,gpa1-2 是将 GPA1 基因的第 8 个外显子敲除)2 个突变体及 cG α 、wG α (cG α 是将 GPA1 基因的 Glu-222 点突变成 Leu,wG α 是通过转基因技术转入了一段 GPA1 基因)2 个超表达突变体。

取同批成熟的野生型和突变体种子(以下操作均在超净工作台上进行),用体积分数 70% 酒精表面消毒 30 s,再用体积分数 2% 次的氯酸钠浸泡 2 min,无菌去离子水清洗 6~8 次;灭菌后种子于避光、4℃ 下低温春化 48 h,以提高种子萌发的一致性;将消毒后的种子播种在装有无菌 MS 培养基(30 g/L 蔗糖,8 g/L 琼脂粉,用 KOH 调 pH 至 5.8)的小培养皿上;将培养皿垂直放置于光照培养箱中,于 21℃ 光照培养 24 h。

1.2 药剂处理方法

待 5 种基因型拟南芥幼苗长出 2 片绿色小叶时,将其移至装有无菌 MS 培养基的大培养皿(直径 220 mm)中,每个培养基分为对称的两部分,左边为野生型,右边为突变体,每个培养基种植 32 株苗,每处理重复 4 次。根据文献[12],在 Ca^{2+} 通道无机抑制剂中, AlCl_3 作用较为显著,所以制作培养基时预先在含有不同质量浓度(0,0.01,0.02,0.05,0.10,

0.15,0.20 mg/L) NAA 的培养基中加入无机抑制剂 AlCl₃ (10 μmol/L),移栽后,将培养皿竖直摆放于光照培养室进行培养。

1.3 根生长发育指标的测定

不同基因型的拟南芥在相同环境条件下生长,从幼苗移栽到大培养皿后的第 2 天起,对侧根数目进行连续 5 d 的观测与记录,5 种基因型拟南芥植株在不同质量浓度 NAA 处理下各取样 80 株进行统计,数据用 SPSS 14.0、MATLAB2007a 进行分析。

1.4 递进因子分析法

设有 A₁,A₂,A₃,⋯,A_n 等 *n* 个研究对象(本试验中 *n*=5),研究层次为 3,以下说明均结合本研究进行。

(1)第 1 层次:首先用因素 B(无菌 MS 培养基,内含不同质量浓度的 NAA,但不含 Ca²⁺)处理,可得 X₁,X₂,X₃,⋯,X_n 等 *n* 个变量观察值(侧根数目),统计假设检验,X₁,X₂,X₃,⋯,X_n 之间无显著差异,说明因素 B 可作基础处理因素。对 X₁,X₂,X₃,⋯,X_n 进行不旋转因子分析,可得第一因子的载荷向量 *a*1,并将因素 B 作为第一因子。

(2)第 2 层次:用因素 B(无菌 MS 培养基,内含不同质量浓度的 NAA)+因素 C(Ca²⁺)处理,可得 Y₁,Y₂,Y₃,⋯,Y_n 等 *n* 个变量观察值(侧根数目)。将 X₁,X₂,X₃,⋯,X_n 与 Y₁,Y₂,Y₃,⋯,Y_n 分别作配对性 *t* 检验,有显著性差异,说明因素 C 是一个主要因素。对 Y₁,Y₂,Y₃,⋯,Y_n 作旋转因子分析,可得第一因子和第二因子的载荷向量 *b*1 和 *b*2。

对 Y₁−X₁,Y₂−X₂,⋯,Y_n−X_n 作不旋转因子分析,可得第一因子的载荷向量 *a*2,并将因素 C 作为第一因子。

求 *a*1、*a*2 与 *b*1、*b*2 间的相关系数。采用绝对值

最大优先原则和不重复原则,确定因素 B 和因素 C 在对 Y₁,Y₂,Y₃,⋯,Y_n 作旋转因子分析时第一因子和第二因子的归属划分。

(3)第 3 层次:用因素 B(无菌 MS 培养基,内含不同质量浓度的 NAA)+因素 C(Ca²⁺)+因素 D (无机抑制剂 AlCl₃)进行处理并观察,可得 Z₁,Z₂,Z₃,⋯,Z_n 等 *n* 个变量观察值(侧根数目)。将 Z₁,Z₂,Z₃,⋯,Z_n 与 Y₁,Y₂,Y₃,⋯,Y_n 分别作配对性 *t* 检验,有显著性差异,说明因素 D 是一个主要因素。对 Z₁,Z₂,Z₃,⋯,Z_n 作旋转因子分析,可得第一因子、第二因子和第三因子的载荷向量 *c*1、*c*2 和 *c*3。

对 Z₁−Y₁,Z₂−Y₂,⋯,Z_n−Y_n 作不旋转因子分析,可得第一因子的载荷向量 *a*3,并将因素 D 作为第一因子。

求 *a*1、*a*2、*a*3 与 *c*1、*c*2、*c*3 间的相关系数。采用绝对值最大优先原则和不重复原则,确定因素 B、因素 C、因素 D 在对 Z₁,Z₂,Z₃,⋯,Z_n 作旋转因子分析时第一因子、第二因子、第三因子的归属划分。

(4)在确定了因素 B、因素 C、因素 D 在各个层次的因子属性后,根据因子载荷,分析各因素与各研究对象的关系。

2 结果与分析

2.1 不含胞外 Ca²⁺ 条件下 5 种基因型拟南芥侧根的生长发育

从表 1 可以看出,在不含 Ca²⁺ 的培养基内,当 NAA 质量浓度为 0 mg/L 时,5 种基因型拟南芥的侧根数目均最低;随着 NAA 质量浓度的不断升高,5 种基因型拟南芥侧根数目均有所增加;在相同 NAA 质量浓度处理下,*t* 检验分析显示,4 种突变体与野生型拟南芥的侧根数目差异均不显著。

表 1 不含胞外 Ca²⁺ 条件下 NAA 处理对 5 种基因型拟南芥侧根数目的影响

Table 1 Effects of different NAA concentrations without extracellular Ca²⁺ on the lateral roots numbers of 5 genotypes of *A. thaliana*

NAA/ (mg · L ⁻¹)	拟南芥基因型 Genotype of <i>A. thaliana</i>									
	gpal-1		gpal-2		ws		wGα		cGα	
	$\bar{x}$	<i>s</i>	$\bar{x}$	<i>s</i>	$\bar{x}$	<i>s</i>	$\bar{x}$	<i>s</i>	$\bar{x}$	<i>s</i>
0	0.53	0.88	0.46	0.75	0.53	0.84	0.64	0.97	0.83	1.02
0.01	3.15	2.70	2.90	3.69	3.93	2.56	3.12	1.77	3.46	2.12
0.02	5.28	2.67	5.17	2.96	5.27	3.42	4.83	2.95	4.96	3.65
0.05	7.64	2.41	6.79	2.76	7.40	3.63	6.97	3.12	7.53	3.75
0.10	8.05	2.24	8.08	3.14	8.27	2.87	8.19	2.76	8.74	3.09
0.15	8.44	3.58	8.03	3.77	8.31	4.26	9.87	4.38	10.59	3.69
0.20	8.73	2.65	8.52	2.83	9.27	3.01	10.98	3.43	9.76	2.97

注: $\bar{x}$ 为均值;*s* 为标准差。下表同。
Note: $\bar{x}$ is mean;*s* is standard deviation. Same as below.

2.2 含胞外 Ca²⁺ 条件下 5 种基因型拟南芥侧根的生长发育

从表 2 可以看出,与 0 mg/L NAA 处理相比,随着 NAA 质量浓度的增大,各基因表型拟南芥侧根数目均有所增加。在相同质量浓度 NAA 下,拟南芥缺失突变体 gpa1-1、gpa1-2 的侧根数目明显比野生型少,而超表达突变体 cGα、wGα 的侧根数目明显比野生型多。在 NAA 质量浓度为 0.10 mg/L

时,野生型侧根数目最多;在 NAA 质量浓度为 0.20 mg/L 时,gpa1-1、gpa1-2 侧根最多;cGα 在 NAA 质量浓度为 0.15 mg/L、wGα 在 NAA 为 0.20 mg/L 时侧根最多。在相同 NAA 质量浓度处理下,*t* 检验分析显示,4 种突变体与野生型拟南芥侧根数目的差异均达显著水平。观察结果显示,在测量的 6 d 内,野生型和缺失突变体均没有二级侧根出现,但超表达突变体在第 4 天出现二级侧根。

表 2 含胞外 Ca²⁺ 条件下 NAA 处理对 5 种基因型拟南芥侧根数目的影响
Table 2 Effects of different NAA concentrations with extracellular Ca²⁺ on the lateral roots numbers of 5 genotypes of *A. thaliana*

NAA/ (mg • L ⁻¹)	拟南芥基因型 Genotypes of <i>A. thaliana</i>									
	gpa1-1		gpa1-2		ws		wGa		cGa	
	$\bar{x}$	<i>s</i>	$\bar{x}$	<i>s</i>	$\bar{x}$	<i>s</i>	$\bar{x}$	<i>s</i>	$\bar{x}$	<i>s</i>
0	0.64 *	1.12	0.52 *	0.80	0.97	0.77	1.12 *	0.68	1.37 * *	0.65
0.01	5.25 * *	3.18	5.56 * *	3.67	9.01	3.33	10.14 *	2.58	9.97 *	2.68
0.02	8.50 *	3.58	8.49 *	3.88	10.77	3.07	15.85 * *	3.76	16.63 * *	3.05
0.05	9.59	3.86	9.88 * *	3.28	12.03	3.25	15.40 * *	2.88	17.44 * *	2.23
0.10	9.56 * *	2.62	9.14 *	2.46	12.15	2.11	16.55 * *	2.32	17.80 * *	1.43
0.15	9.87 *	1.32	9.32 *	1.34	11.96	1.12	16.26 * *	1.01	18.03 * *	0.68
0.20	10.02 *	1.15	9.98 * *	1.14	12.05	0.98	16.78 * *	0.78	17.82 * *	0.63

注:以 ws 为对照组,在同一质量浓度水平上(同一行)进行 *t* 检验分析,* 表示在 0.05 水平上差异显著;* * 表示在 0.01 水平上差异显著。下表同。
Note:By using the wild type *A. thaliana* as the control group(on the same line),*t* test analysis was carried out at the same level of concentration,* shows the significant differences in the level of 0.05;and * * in the level of 0.01. Same as below.

2.3 钙通道无机抑制剂对 NAA 诱导的拟南芥侧根生长发育的影响

从表 3 可以看出,在 AlCl₃ 浓度为 10 μmol/L 时,在相同质量浓度 NAA 处理下,拟南芥缺失突变体的侧根数略少于野生型,而超表达突变体的侧根数略多于野生型。在相同 NAA 质量浓度处理下,以野生型 ws 为对照组,*t* 检验分析显示,4 种突变体与野生型的

侧根数目均无显著差异。这说明施加 Ca²⁺ 通道无机抑制剂 AlCl₃ 后,其对 NAA 诱导的 5 种基因型拟南芥侧根生长发育的影响程度有一定差异,但差异并不显著。表明在 NAA 诱导的拟南芥侧根的生长发育过程中,细胞外 Ca²⁺ 可能通过细胞膜上 Ca²⁺ 通道进入细胞内部,参与根系生长发育,进一步证明此过程中 G 蛋白的下游可能是 Ca²⁺ 通道。

表 3 钙通道无机抑制剂 AlCl₃ 对 NAA 诱导的拟南芥侧根生长发育的影响
Table 3 Effects of different NAA concentrations under 10 μmol/L diltiazem on the lateral roots of 5 genotypes of *A. thaliana* AlCl₃

NAA/ (mg • L ⁻¹)	拟南芥基因型 Genotype of <i>A. thaliana</i>									
	gpa1-1		gpa1-2		ws		wGα		cGα	
	$\bar{x}$	<i>s</i>	$\bar{x}$	<i>s</i>	$\bar{x}$	<i>s</i>	$\bar{x}$	<i>s</i>	$\bar{x}$	<i>s</i>
0	0.53	1.54	0.47	1.27	0.86	1.59	0.98	1.19	1.06	1.71
0.01	4.25	2.05	4.62	2.74	8.79	2.57	5.42	3.12	5.16	3.01
0.02	6.78	2.86	5.32	2.73	8.86	3.58	8.88	2.74	7.56	2.89
0.05	7.72	2.47	7.89	2.25	9.42	2.19	9.24	2.97	8.85	2.12
0.10	8.19	2.78	7.97	2.68	9.33	3.12	9.79	3.58	9.08	3.57
0.15	8.42	3.57	8.38	1.92	9.58	2.12	10.08	2.36	10.27	1.97
0.20	8.75	2.46	8.13	2.52	10.06	2.97	11.98	2.13	11.56	2.55

注:以 ws 为对照组,在同一质量浓度水平上进行 *t* 检验分析,结果不具有差异显著性。
Note:By using the wild type *A. thaliana* as the control group(on the same line),*t* test analysis was carried out at the same level of concentration,results show no significant differences.

2.4 递进因子分析

2.4.1 层次间的配对检验 依据表 1、表 2 和表 3,

对每一种基因型拟南芥,将第 1 层次与第 2 层次观察的侧根数目、第 2 层次与第 3 层次观察的侧根数

目分别进行配对 t 检验,结果均有显著差异,说明细胞外 Ca^{2+} 和 Ca^{2+} 通道无机抑制剂 AlCl_3 均是影响 NAA 诱导的拟南芥侧根生长发育的重要因素。

2.4.2 第 1 层次的因子分析 对表 1 中 5 种基因型拟南芥侧根数目均值 $\bar{x}$ 进行因子分析,结果第一因子的方差贡献率是 98.46%,5 种基因型拟南芥侧根数目变量在第一因子上的载荷向量 $a1=(0.995, 0.995, 0.994, 0.987, 0.991)$ 。可以看出, NAA 是一个主要因子,而且对 5 种基因型侧根数目的影响基本相同,这与在相同质量浓度 NAA 处理下, t 检验分析显示不存在显著差异是一致的。

2.4.3 第 2 层次的因子分析 对表 2 中 5 种基因型拟南芥侧根数目均值 $\bar{x}$ 进行方差极大法旋转因子分析,结果第一因子、第二因子的方差贡献率分别为 44.43%和 39.02%,累计为 83.45%。第一因子、第二因子的载荷向量分别为: $b1=(0.722, 0.707, 0.569, 0.632, 0.691)$, $b2=(0.576, 0.616, 0.734, 0.608, 0.575)$ 。

将表 2 中 5 种基因型拟南芥侧根数目均值 $\bar{x}$ 减去表 1 中相应的 5 种基因型侧根数目均值 $\bar{x}$,可获得 5 个差值变量,其表示消除因素 NAA 的直接影响后因素 Ca^{2+} 的影响值。对这 5 个差值变量进行不旋转因子分析,结果第一因子的方差贡献率是 83%,5 种基因型拟南芥侧根数目变量在第一因子上的载荷向量 $a2=(0.773, 0.855, 0.947, 0.985, 0.972)$ 。

将 $a1, a2$ 与 $b1, b2$ 进行相关性分析,结果见表 4。

表 4 $a1, a2$ 与 $b1, b2$ 的相关系数

Table 4 Correlation coefficient of $a1, a2$ and $b1, b2$

向量 Vector	$a1$	$a2$
$b1$	0.283	-0.638
$b2$	0.206	0.289

按绝对值最大优先原则和不重复原则, $a2$ 应归属于 $b1$, $a1$ 应归属于 $b2$, 即在第 2 层次方差极大法旋转因子分析中,细胞外 Ca^{2+} 是第一因子, NAA 是第二因子。从向量 $b1$ 来看,缺失突变体与 Ca^{2+} 相关系数均较大,其次是超表达突变体,野生型最小。这说明缺失突变体上 Ca^{2+} 通道数量可能较少,流入的 Ca^{2+} 少,从而明显影响了侧根数目,使侧根数目明显少于野生型;相反,超表达突变体上 Ca^{2+} 通道数量较多,流入的 Ca^{2+} 多,从而明显增加了侧根数目,使侧根数目明显多于野生型。以上两者侧根数目均表现出与细胞外 Ca^{2+} 的极大相关性。从向量

$b2$ 来看, NAA 对野生型拟南芥的影响高于突变体,而对缺失突变体和超表达突变体的影响基本相同。

以上分析说明, Ca^{2+} 与拟南芥侧根生长密切相关,能够促进侧根的生长; Ca^{2+} 通道可能在异三聚体 G 蛋白调节的下游。

2.4.4 第 3 层次的因子分析 对表 3 中 5 种基因型拟南芥侧根数目均值,进行方差极大法旋转因子分析,结果第一因子、第二因子和第三因子的方差贡献率分别为 50.23%, 34.50%和 14.97%,累计为 99.70%。第一因子、第二因子、第三因子的载荷向量分别为: $c1=(0.749, 0.651, 0.483, 0.807, 0.802)$, $c2=(0.522, 0.525, 0.824, 0.519, 0.477)$, $c3=(0.396, 0.549, 0.294, 0.279, 0.355)$ 。

将表 3 中 5 种基因型拟南芥侧根数目均值 $\bar{x}$ 减去表 2 中相应的 5 种基因型侧根数目均值 $\bar{x}$,可获得 5 个差值变量,其表示消除因素 NAA 和因素 Ca^{2+} 的直接影响后因素 AlCl_3 的影响值。对这 5 个差值变量进行不旋转因子分析,结果第一因子的方差贡献率是 84.95%,5 种基因型拟南芥侧根数目变量在第一因子上的载荷向量 $a3=(0.980, 0.798, 0.862, 0.961, 0.992)$ 。

将 $a1, a2, a3$ 与 $c1, c2, c3$ 进行相关性分析,结果见表 5。

表 5 $a1, a2, a3$ 与 $c1, c2, c3$ 的相关系数

Table 5 Correlation coefficient of $a1, a2, a3$ and $c1, c2, c3$

向量 Vector	$a1$	$a2$	$a3$
$c1$	-0.572	0.046	0.722
$c2$	0.293	0.175	-0.436
$c3$	0.621	-0.611	-0.563

按绝对值最大优先原则和不重复原则, $a1$ 应归属于 $c3$, $a2$ 应归属于 $c2$, $a3$ 应归属于 $c1$, 即在第 3 层次方差极大法旋转因子分析中, AlCl_3 是第一因子,细胞外 Ca^{2+} 是第二因子, NAA 是第三因子。从向量 $c1$ 来看,超表达突变体与 AlCl_3 的相关系数均较大,其次是缺失突变体,野生型最小。这可能说明,超表达突变体上 Ca^{2+} 通道数量较多,但 AlCl_3 阻断也较多,流入的 Ca^{2+} 明显减少,从而明显影响了侧根数目;缺失突变体上 Ca^{2+} 通道数量较少,流入的 Ca^{2+} 本来就少,因而 AlCl_3 阻断侧根数目增加的作用更为明显,使侧根数目明显少于野生型;以上两者侧根数目均表现出与细胞 Ca^{2+} 通道有极大的相关性。从向量 $c2$ 来看,野生型与 Ca^{2+} 相关系数最大,缺失突变体和超表达突变体与 Ca^{2+} 相关系数基本相同。从向量 $c3$ 来看, NAA 与缺失突变体相关系数均较大,其次是超表达突变体 $cG\alpha$,最后是野

生型和超表达突变体 wGa。

以上分析说明:(1) Ca^{2+} 通道与拟南芥侧根生长密切相关,它的打开能够促进侧根的生长。(2) Ca^{2+} 通道可能在异三聚体 G 蛋白调节的下游。(3) AlCl_3 对细胞膜上的 Ca^{2+} 通道阻断数量可能是按一定比例阻断,而不是一个绝对数量,机制尚不明确。(4)不同处理因素在不同处理层次中所起的作用有差异,对 5 种不同基因型拟南芥个体的影响也不同,其中对 2 个缺失突变体和 2 个超表达突变体的影响基本相似,而对缺失突变体、超表达突变体、野生型拟南芥三者的影响不同。

3 结论与讨论

本研究结果显示:(1)只使用 NAA 处理对 5 种基因型拟南芥的影响基本相同。(2) Ca^{2+} 是与拟南芥侧根生长密切相关的重要影响因素,能够促进侧根的生长,可能是 G 蛋白的下游信号; Ca^{2+} 对 5 种基因型拟南芥的影响不同。(3) Ca^{2+} 通道无机抑制剂 AlCl_3 是影响拟南芥侧根生长的重要因素,对细胞膜上的 Ca^{2+} 通道阻断数量可能是按一定比例阻断,而不是一个绝对数量,其机制尚不明确。(4)不同处理因素在不同处理层次中所起的作用有差异,其对 5 种不同基因型拟南芥个体侧根生长的影响不同,对 2 个缺失突变体、2 个超表达突变体的影响基本相似,对缺失突变体、超表达突变体、野生型拟南芥的影响不同。

递进因子分析方法既有静态分析(克服了通常因子分析法中主要因子不易明确的不足),又有动态分析(体现了不同因子在不同因子组合中的作用大小),其分析结果与实际情况基本一致,是一种科学的、可行的、有创新性的方法,值得推广应用。

Cousson 等^[13]的研究结果表明,生长素活化 G 蛋白,后者可导致 cGMP 产生,而 cGMP 下游还需要胞质 Ca^{2+} 参与调节。此外还有证据表明,异三聚体 G 蛋白可能激活植物细胞 Ca^{2+} 信号。尚忠林等^[11]、Gelli 等^[14]的研究表明,GTP γ S 和 mastoparan 可以模仿真菌激发子在 Ca^{2+} 通道中效应的活性,而 GDP β S 则可消除这种效应。以上研究表明,G 蛋白可能激活 Ca^{2+} 通道。Aharon 等^[15]用野生型和重组体 TG α 1 以及膜片钳技术,研究 G 蛋白在番茄细胞质膜 Ca^{2+} 通道调节中的作用时发现,TG α 1 促进通道的开放,说明异三聚体 G 蛋白参与了番茄质膜 Ca^{2+} 通道的调节。本研究则通过对不加 Ca^{2+} 、加 Ca^{2+} 以及加 Ca^{2+} 通道抑制剂 AlCl_3 3 组试验结

果的对比分析,得知 Ca^{2+} 与拟南芥侧根生长密切相关,是 G 蛋白的下游信号,但 Ca^{2+} 通道调节的上游机制尚不明确,因为 AlCl_3 对 Ca^{2+} 通道的阻断数量可能是按一定比例阻断,而不是一个绝对数量。这也是本研究与其他研究的主要区别。

本试验结果仅仅是从形态学研究得出的结论,为了深入探索不同生长素诱导的拟南芥侧根生长发育过程中胞内信使 Ca^{2+} 浓度的变化,还需进一步利用膜片钳电生理学及激光共聚焦显微技术,并结合使用突变体材料进行更深入的研究。

[参考文献]

- [1] Himanen K, Boucheron E, Young J C, et al. Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation [J]. The Plant Cell, 2002, 14: 2339-2351.
- [2] Jocelyn E, Malamy P, Benfey N, et al. Environmental regulation of lateral root initiation in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2001, 127: 899-909.
- [3] José López-Bucio, Young J C, Jones A M, et al. Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system [J]. Plant Physiology, 2002, 129: 1-13.
- [4] 尚忠林, 孙大业. 植物细胞内的钙通道 [J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(6): 625-630.
Shang Z L, Sun D Y. Calcium channels in plant cells [J]. Plant Physiology Communications, 2002, 38(6): 625-630. (in Chinese)
- [5] Chang L, Jian X. Current progress in auxin signaling by using *Arabidopsis* Mutants [J]. Life Science Research, 2003, 7(2): 75-78.
- [6] Himanen K, Vuylsteke M, Boucheron E, et al. Transcript profiling of early lateral root initiation [J]. Proceedings of the National Academy of Science in the United States of America, 2004, 101: 5146-5151.
- [7] Ullah H, Chen J G, Young J C, et al. Modulation of cell proliferation by heterotrimeric G protein in *Arabidopsis* [J]. Science, 2001, 292: 2066-2069.
- [8] Ullah H, Chen J G, Temple B. The β -Subunit of the *Arabidopsis* G protein negative regulates auxin-induced cell division and affects multiple developmental processes [J]. The Plant Cell, 2003, 15: 393-409.
- [9] Ma H. GTP-binding proteins in plants; new members of an old family [J]. Plant Mole Biol, 1994, 26(12): 1611-1636.
- [10] Alan M, Jones Sarah M, Assmann. Plants: the latest model system for G-protein research [J]. European Molecular Biology Organization, 2004, 5: 572-577.