

拟南芥保卫细胞微丝骨架的解聚 可能参与了细胞外钙调素诱导的气孔关闭*

肖玉梅^① 陈玉玲^{①②} 黄荣峰^③ 陈 珈^① 王学臣^{①**}

(①中国农业大学生物学院, 植物生理生化国家重点实验室, 北京 100094; ②河北师范大学生物系, 石家庄 050016;

③中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘要 细胞外钙调素(CaM)在植物的许多生理活动中都执行着重要功能, 但它对气孔运动的作用及其调控机制, 人们了解的很少. 以模式植物拟南芥为材料, 研究了细胞外 CaM 在保卫细胞壁上的存在及其对气孔运动的调控机制. 结果表明, 拟南芥保卫细胞壁中存在有分子量为 17 kD 的 CaM, 并应用 W7-琼脂糖和 CaM 抗血清初步证明了保卫细胞壁中存在的 CaM 可能具有促进气孔关闭和抑制气孔开放的作用. 在应用外源 CaM 诱导气孔关闭的实验中, 保卫细胞微丝骨架由长而呈辐射状分布的聚合态逐步解聚, 气孔开度也随着降低. 药理学实验结果表明, 保卫细胞微丝骨架的解聚能明显地促进外源 CaM 诱导的气孔关闭, 而微丝骨架的聚合则抑制这一过程. 研究结果还表明, 外源 CaM 能诱导保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高; 当使用 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA 时, 外源 CaM 诱导的 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高和气孔关闭运动均受到抑制. 为此推测细胞外 CaM 可能是通过诱导保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高, 导致微丝骨架的解聚, 进而促进气孔的关闭运动.

关键词 拟南芥 气孔运动 细胞外 CaM 微丝骨架 $[Ca^{2+}]_{cyt}$

CaM普遍存在于真核细胞内, 其基因的表达和蛋白的亚细胞定位受光、渗透胁迫、病原体及植物激素等多种因子调控^[1]. 细胞内CaM在植物的病原体和伤害反应^[2]及超敏感反应^[3]中都执行着重要的生理功能. CaM也普遍存在于高等植物细胞质外体中, 如燕麦胚芽鞘的细胞壁^[4]、小麦胚芽鞘的细胞壁^[5]、玉米的根尖细胞^[6]以及胡萝卜和烟草悬浮细胞的介质中

^[7,8]. 植物内源细胞外CaM具有促进细胞与原生质体增殖^[7,8]、启动花粉萌发和促进花粉管伸长^[9]、诱导基因的表达^[10]等多种生物学功能. 花粉质膜上的异三聚体G蛋白参与了细胞外CaM跨膜信号转导, 胞内钙信使系统和肌醇磷脂系统可能参与了其在胞内的信号传递^[11,12]. 最近我们实验室的工作表明存在于蚕豆保卫细胞壁中的内源细胞外CaM能够调控气孔运动

2003-09-04 收稿, 2003-12-30 收修改稿

* 国家重点基础研究发展规划项目(批准号: G1999011700)和国家自然科学基金项目(批准号: 30370129)资助

** 联系人, E-mail: xewang@public.bta.net.cn

[13].

有报道指出在气孔开闭运动过程中, 保卫细胞微丝骨架和微管骨架处于高度的聚合和解聚的动态变化中, 并参与了如光照、黑暗、ABA等多种细胞外信号在保卫细胞的信号转导[14-17]. 其中微管骨架的聚合和解聚分别促进了气孔的开放和关闭[18], 而微丝骨架的解聚对气孔的开放和关闭运动都具有促进作用, 聚合态的微丝对气孔的开放和关闭运动都具有抑制作用[14-17]. 但是, 细胞外CaM在对气孔运动的调控中是否有微丝骨架的参与尚未见报道.

为了研究细胞外 CaM 调控气孔运动的机制, 本文以模式植物拟南芥为材料, 重点探讨了细胞外 CaM 诱导气孔关闭过程中保卫细胞微丝骨架和胞内 Ca²⁺的作用.

1 材料与amp;方法

1.1 植物材料

将野生型拟南芥和表达标记微丝骨架融合蛋白(为鼠的 talin 蛋白和绿色荧光蛋白的融合蛋白, 记为 GFP-mTn)的转基因拟南芥置于 MS 固体培养基上萌发, 然后再将幼苗移植到温室营养土中继续生长, 光周期为 12 h/12 h (光/暗), 温度为 22°C/18°C(光/暗), 光照强度为 200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 湿度为 75%. 以生长 4~5 周、长势良好的拟南芥叶片为实验材料.

1.2 CaM 在叶片表皮条中存在的免疫印迹鉴定

提取拟南芥叶片表皮条的细胞壁蛋白[15], 将得到的壁蛋白用Bio-Rad公司微型电泳仪进行 15%的 SDS-PAGE电泳, 上样量为 60 μg 蛋白, 经 100 V, 4 °C电泳 1 h后转移至硝酸纤维素(NC)膜上, 37°C, 3% BSA封闭NC膜 1 h, 一抗(抗小麦CaM全蛋白的抗血清, 工作浓度为 1:50)37°C孵育 1 h, 二抗(碱性磷酸酯酶交联的羊抗兔IgG, 工作浓度为 1:500, Sigma产品)37°C孵育 1 h, 然后避光室温显色.

1.3 CaM 在保卫细胞壁存在的免疫荧光鉴定

撕取拟南芥叶片的下表皮, 轻轻地刷去叶肉细胞, 在4%的多聚甲醛中固定 1 h, PBS漂洗 3 次, 然后置于 3%的 BSA 中封闭 10 min, 37°C一抗孵育 1 h,

PBS漂洗后用羊抗兔 FITC-IgG(0.1 mg/mL)孵育 1 h, PBS漂洗, 50%甘油封片, 用激光共聚焦扫描显微镜(Bio-Rad MRC1024)记录图片. 对照试验以正常兔血清代替一抗.

1.4 气孔开度测定

撕取拟南芥叶片的下表皮, 轻轻刷去叶肉细胞, 然后将其置于 MES 缓冲液中(10 mmol/L pH 6.1 的 Mes-Tris, 50 mmol/L K⁺, 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Ca²⁺). 在进行气孔关闭实验时, 先将表皮条经冷光源照射 2 h(光强度为 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$), 使气孔充分张开后移至室内光线下进行如下处理: (i) 加入纯化的 10⁻⁸~10⁻¹⁰ mol/L 菜花 CaM; (ii) 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ CD 和 0.1 mmol/L Phalloidin 预处理 30 min, 然后用 10⁻⁹ mol/L CaM 处理; (iii) 2 mmol/L EGTA 处理 30 min 后, 用 10⁻⁹ mol/L CaM 处理 1 h. 在进行光诱导气孔开放实验时, 先将表皮条经黑暗处理 2 h, 使气孔开度最小后移至冷光源下进行如下处理: (i) 10⁻⁹ mol/L CaM; (ii) 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ W7-琼脂糖或 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CaM 抗血清. 实验中所用的各种药剂均由 MES 缓冲液稀释到所需浓度. 在光镜下记录气孔孔径, 所有的试验结果和标准差均为 4 次实验的平均值(每次实验测定 30 个气孔的孔径).

1.5 保卫细胞微丝骨架动态变化的观察

撕取表达 GFP-mTn 的转基因拟南芥叶片的下表皮, 冷光源照射 2 h 后, 将其置于 10⁻⁹ mol/L CaM 溶液中并于室内光线下处理, 然后在激光共聚焦显微镜下观测外源 CaM 处理前及处理过程中保卫细胞微丝骨架的状态, 记录具有代表性的图片. 每次观测的细胞至少为 80 个.

1.6 保卫细胞内游离 Ca²⁺浓度([Ca²⁺]_{cyt})的测定

Fluo-3 AM(Molecular Probe, 美国)溶于二甲基亚砜, 使其达到 1 mmol/L. 撕取拟南芥叶片下表皮, 置于 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ fluo-3 AM 的 MES 缓冲液中, 37°C避光孵育 10 min 后在室温条件下避光放置 1 h, 用缓冲液多次冲洗表皮条, 再用激光共聚焦显微镜扫描, 并记录荧光变化图像及数据. 处理方法: 预扫描, 待[Ca²⁺]_{cyt}荧光强度稳定时(约 100 s), 用 10⁻⁹ mol/L CaM 处理表皮, 继续记录荧光变化图像及数据. 在 LaserSharp

Processing 软件下处理图像. 激发波长为 488 nm, 发射波长为 535 nm.

2 结果

2.1 CaM 在保卫细胞壁存在的鉴定

免疫印迹结果表明叶片细胞壁上存在分子量为 17 kD 的 CaM(图 1); 免疫荧光定位结果表明内源细胞外 CaM 主要存在于保卫细胞的背壁, 在腹壁有少量分布. 而在同样条件下, 对照气孔保卫细胞腹壁只有很弱的自发荧光(图 2). 以上结果表明, 拟南芥保卫细胞壁中存在内源细胞外 CaM.

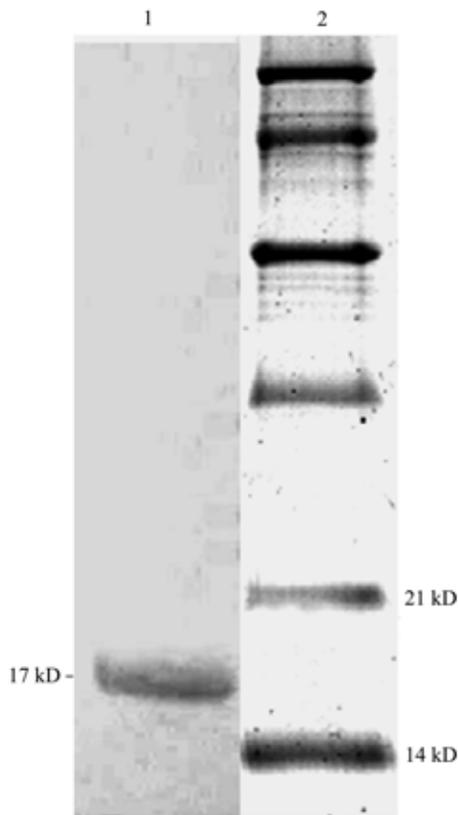


图 1 CaM 在拟南芥叶片表皮条细胞壁上存在的免疫印迹鉴定

1 示叶片表皮条细胞壁蛋白的免疫印迹; 2 示分子量标准蛋白

2.2 W7-琼脂糖和 CaM 抗血清对气孔运动的影响

图 3(a)显示不能通过质膜的大分子 CaM 拮抗剂 W7-琼脂糖和 CaM 抗血清都能促进光照诱导的气孔开放. 经 W7-琼脂糖和 CaM 抗血清处理 0.5 h 时气孔

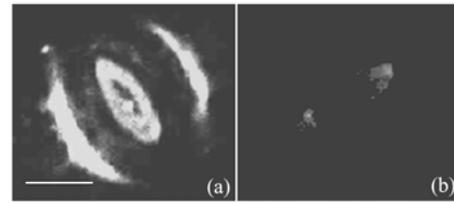


图 2 CaM 在拟南芥保卫细胞壁存在的免疫荧光鉴定
(a) 绿色荧光主要分布在保卫细胞的背壁, 腹壁也有一定的分布;
(b) 对照, 腹壁有微弱的自发荧光

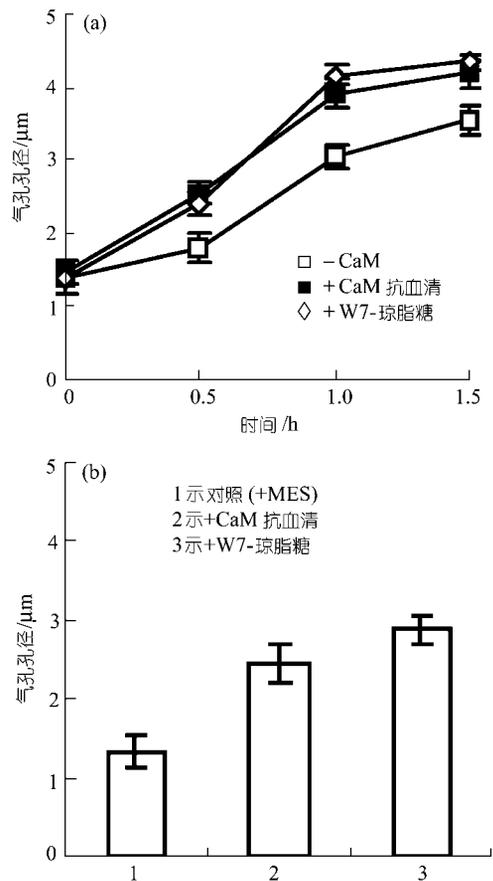


图 3 W7-琼脂糖和 CaM 抗血清对气孔运动的影响

(a) 1 $\mu\text{mol/L}$ W7-琼脂糖或 20 $\mu\text{g/mL}$ CaM 抗血清对光照诱导气孔开放的影响; (b) 1 $\mu\text{mol/L}$ W7-琼脂糖或 20 $\mu\text{g/mL}$ CaM 抗血清对黑暗诱导气孔关闭的影响

孔径分别是对照气孔的 1.4 倍和 1.3 倍. W7-琼脂糖和 CaM 抗血清也能明显的抑制黑暗诱导的气孔关闭. 处理 1 h 时对照的气孔孔径已接近关闭, 而经 W7-琼脂糖和 CaM 抗血清处理的气孔孔径分别是对照的 1.87 倍和 2.15 倍(图 3(b)). 这说明内源细胞外 CaM 具

有抑制气孔开放, 促进气孔关闭的作用.

2.3 外源 CaM 对气孔运动的影响

用系列浓度的外源 CaM 处理表皮条, 结果表明 10^{-8} ~ 10^{-10} mol/L CaM 都能促进气孔关闭, 其中 10^{-9} mol/L CaM 作用效果最显著, 1 h 后, 气孔孔径仅为对照的 28%(图 4(a)). 10^{-9} mol/L CaM 诱导气孔关闭的时间进程表明, 外源 CaM 促进气孔关闭是时间依赖的, 40 min 时, 气孔孔径下降了 71%; 60 min 时气孔孔径下降已不明显. 而对照的气孔一直处于室内光线下, 气孔孔径没有明显的变化(图 4(b)).

许多诱导气孔关闭的因子都能抑制气孔开放, 因此推测外源 CaM 也能抑制气孔开放. 将表皮条置于黑暗 2 h 后, 用冷光源照射, 每隔半小时记录气孔孔径. 结果表明 10^{-9} mol/L CaM 能明显地抑制光诱导的气孔开放, 从 0.5 h 到 1.5 h, 对照的气孔孔径增加了 86%, 而经外源 CaM 处理的气孔孔径仅增加了 17%(图 4(c)).

2.4 外源 CaM 对保卫细胞微丝骨架排列的影响

外源 CaM 诱导气孔关闭过程中, 保卫细胞微丝骨架的分布主要呈 3 种形式: (i) 沿背壁呈辐射状分布的长而粗的微丝束(图 5(a)); (ii) 微丝仍呈辐射状分布, 但已经变少, 变细, 变短(图 5(b)); (iii) 呈辐射状分布的微丝消失, 大部分微丝已解聚成短的片段并随机分布(图 5(c)). 在外源 CaM 处理前, 下表皮经冷光源照射 2 h, 气孔充分张开, 保卫细胞的微丝骨架主要呈图 5(a)的方式分布(占观测细胞的 86%); 10^{-9}

mol/L CaM 处理 20 min 后, 气孔孔径降低, 保卫细胞中的微丝分布明显改变, 微丝已部分解聚, 主要呈图 5(b)的方式分布(占观测细胞的 76%); 40 min 时, 气孔孔径进一步降低, 微丝骨架解聚剧烈, 主要呈图 5(c)的方式分布(占观测细胞的 90%); 60 min 时, 微丝骨架仍呈图 5(c)的解聚态分布, 气孔孔径变化不再明显. 对照实验中, 气孔一直处于室内光线下, 保卫细胞中的微丝分布没有明显变化, 仍呈图 5(a)方式分布, 气孔孔径也没有明显的变化.

2.5 CD 和 phalloidin 对外源 CaM 诱导气孔关闭的影响

如图 6 所示, 单独用微丝解聚剂 20 μ mol/L CD 和微丝稳定剂 0.1 mmol/L phalloidin 处理表皮条, 对气孔的开关运动没有明显的影响, 但 CD 能明显地促进 10^{-9} mol/L 外源 CaM 诱导的气孔关闭, 20 min 时, 气孔孔径下降了 58%, 而对照的气孔孔径仅下降了 22%; phalloidin 能明显地抑制外源 CaM 诱导的气孔关闭, 60 min 时, 气孔孔径仅下降了 25%, 而对照的气孔孔径下降了 70%. 这表明微丝骨架解聚能促进外源 CaM 诱导的气孔关闭, 而微丝骨架聚合则抑制这一过程, 微丝骨架的解聚参与了外源 CaM 诱导的气孔关闭过程.

2.6 外源 CaM 能诱导保卫细胞游离 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的增加

研究结果表明 10^{-9} mol/L CaM 能诱导保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 增高, CaM 处理 80 s 时, 相对荧光强度就有了

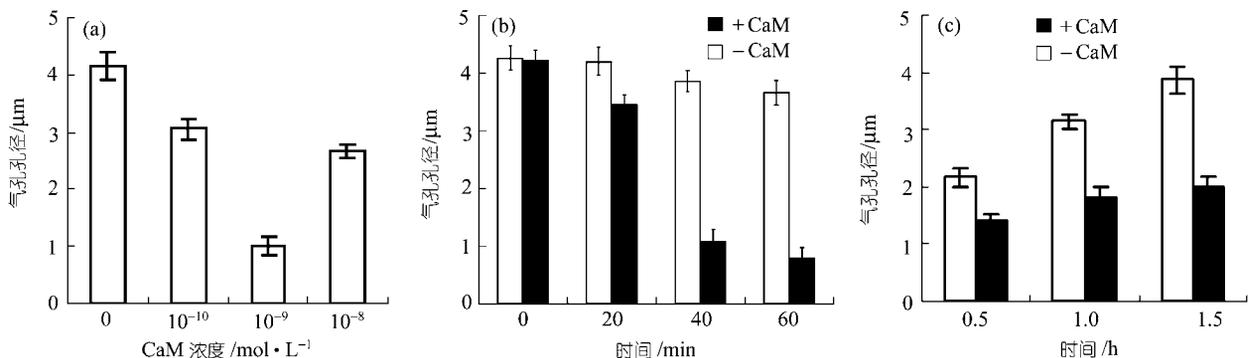


图 4 外源 CaM 对气孔运动的影响

(a) 气孔经冷光源照射 2 h 后, 不同浓度的外源 CaM 处理气孔 1 h 时气孔的状态; (b) 气孔经冷光源照射 2 h 后, 10^{-9} mol/L CaM 诱导气孔关闭的时间进程; (c) 气孔经黑暗处理 2 h 后, 10^{-9} mol/L CaM 抑制光照诱导气孔开放的时间进程

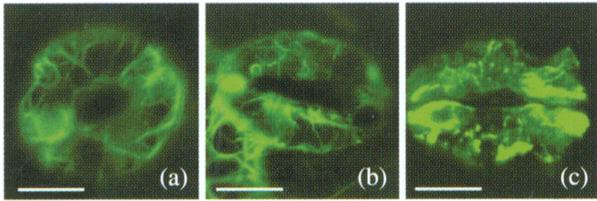


图 5 外源 CaM 对拟南芥保卫细胞微丝骨架排列的影响 (a) 光照 2 h 时; (b) 10^{-9} mol/L CaM 处理 20 min 时; (c) 10^{-9} mol/L CaM 处理 40 min 时. 标尺示 5 μ m

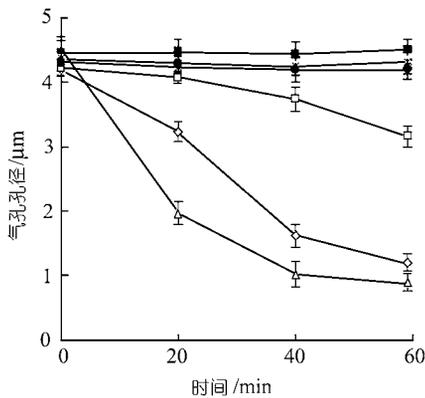


图 6 CD 和 phalloidin 对外源 CaM 诱导气孔关闭的影响 * 示-CaM, ◇ 示+CaM, ● 示+CD, △ 示+CD+CaM, ■ 示+phalloidin, □ 示+phalloidin +CaM

明显的增加(图 7 的中图 180 s 记录的图像), 随着处理时间的延长, 保卫细胞中的 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 逐步增高. 经计算, 600 s 时相对荧光强度增加了 52%(图 7 的中图 600 s 记录的图像), 而对照中荧光强度没有变化(图 7 的上图); 当用 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA 将游离 Ca^{2+} 螯合掉, 外源 CaM 则不能引起保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 增高(图 7 的下

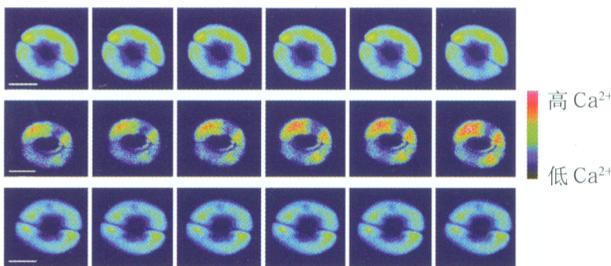


图 7 外源 CaM 引起保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 变化的图像 上图为对照, 以 MES 缓冲液代替 10^{-9} mol/L CaM; 中图为 10^{-9} mol/L CaM 对保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的影响; 下图为 2 mmol/L EGTA 处理后, 10^{-9} mol/L CaM 对保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的影响. 上图中的 MES 缓冲液和中、下图中的 CaM 均是在记录图像 100 s 时加入的. 标尺示 5 μ m

图), 并且 CaM 诱导的气孔关闭作用也被抑制了(图 8). 这表明拟南芥保卫细胞中的 Ca^{2+} 可能作为第二信使, 参与了外源 CaM 诱导气孔关闭的信号转导.

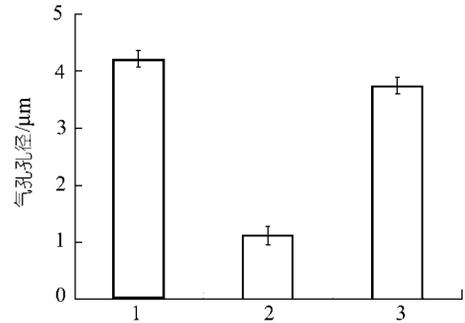


图 8 EGTA 对外源 CaM 诱导气孔关闭的影响 1 示-CaM; 2 示+CaM; 3 示+CaM+EGTA

3 讨论

目前在拟南芥中已知和推测的CaM基因有 14 个 [1], 但这些基因所编码的蛋白是否分布在细胞外还不清楚. CaM是真核细胞最为保守的蛋白之一, 小麦 CaM的抗血清能与多种植物的CaM发生免疫反应 [5], 为此我们用小麦CaM的抗血清来检测CaM在拟南芥保卫细胞壁的存在. 免疫印迹和免疫荧光定位结果表明拟南芥保卫细胞壁存在 17 kD 的CaM (图 1 和 2), 这与已知的拟南芥CaM蛋白的分子量是一致的 [1].

CaM存在于保卫细胞内并参与了气孔运动的调控. Donovan等人 [19]观察到CaM拮抗剂部分抑制ABA诱导的气孔关闭; Nejida [20]认为 CaM使质膜 H^+ -ATPase活性下降; Cotelle等人 [21]证明CaM能促进气孔关闭. 这些实验中所用到的CaM拮抗剂可以进入细胞内, 但也有一部分留在细胞外, 因此可能也有细胞外CaM的作用. 本研究发现不过膜的CaM抑制剂W7-琼脂糖和CaM抗血清都能促进光照诱导的气孔开放, 抑制黑暗诱导的气孔关闭(图 3), 这表明内源细胞外CaM可能具有促进气孔关闭的功能. 结合我们在蚕豆中的实验结果 [13], 推测内源细胞外CaM在调控气孔运动中发挥着重要作用.

为了研究内源细胞外CaM调控气孔运动的作用机制, 我们应用外源CaM来处理拟南芥叶片表皮条, 发现外源CaM能够诱导气孔关闭(图 4(b))和抑制光照

诱导的气孔开放(图 4(c)), 其有效浓度为 10^{-8} ~ 10^{-10} mol/L, 其中 10^{-9} mol/L CaM 是处理的最适浓度(图 4(a)). Sun 等人^[8]的研究结果表明当外源 CaM 的浓度从 10 μ g/mL 增加到 15 μ g/mL 时, CaM 对白芷悬浮培养细胞增殖的促进作用已明显下降. 我们的研究表明与 10^{-9} mol/L CaM 相比, 10^{-8} mol/L CaM 对气孔关闭的促进作用已经下降. 推测其原因可能是外源 CaM 作为多肽信使, 其生理功能可能与其浓度有关, 浓度过高反而会抑制其作用^[8,12].

外源 CaM 是如何诱导气孔关闭的呢? 保卫细胞微丝骨架是否参与了这一过程? 我们利用激光共聚焦显微技术观察了表达 GFP-mTn 的转基因拟南芥保卫细胞的微丝骨架, 结果表明外源 CaM 诱导气孔关闭的过程中, 保卫细胞微丝骨架逐步解聚(图 5), 推测微丝骨架的解聚可能参与了外源 CaM 诱导的气孔关闭. 进一步的实验表明微丝骨架解聚剂 CD 和微丝骨架稳定剂 phalloidin 都能影响外源 CaM 诱导的气孔关闭: CD 能明显地促进这一过程, 而 phalloidin 明显地抑制这一过程(图 6), 这说明微丝骨架的解聚可以促进气孔的关闭运动, 外源 CaM 是通过诱导保卫细胞微丝骨架的解聚而促进气孔关闭的.

有报道指出 ABA 是通过诱导保卫细胞 Ca^{2+} 浓度的升高来促进微丝骨架解聚的^[22], 在体外 CaM 可以以依赖 Ca^{2+} 的方式促进微丝骨架解聚^[23]. Shang 等人^[24]发现细胞外 CaM 能诱导百合花粉细胞 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的升高, 升高的 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 是细胞外 CaM 调控花粉萌发所必需的. 我们的研究表明外源 CaM 能明显的诱导保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 增高(图 7 的中图), 当用 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA 将游离 Ca^{2+} 螯合掉, 外源 CaM 则不能引起保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 增高(图 7 的下图), 并且外源 CaM 诱导的气孔关闭作用被抑制(图 8). 因此我们推测保卫细胞内 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 可能是细胞外 CaM 信号转导中调控微丝骨架解聚的一个重要的上游组分.

本文的实验结果不仅提出了作为多肽信号的细胞外 CaM 在诱导气孔关闭运动中的作用和可能的作用机制, 而且为深入探讨气孔运动的机理以及微丝骨架的动态变化机制提供了新的重要线索. 但关于细胞外 CaM 的受体、胞外 CaM 与胞内 CaM 以及胞外 CaM 与其他细胞外信号如 ABA 等的关系、胞外

CaM 诱导微丝骨架解聚的信号转导机制还需进一步研究.

致谢 感谢河北师范大学分子与细胞生物学的白娟教授赠予的小麦 CaM 全蛋白的抗血清和纯化的菜花 CaM; 感谢中国农业大学生物学院袁明教授赠予的转 GFP-mTn 融合基因的拟南芥植株.

参 考 文 献

- Luan S, Kudla J, Rodriguez-Concepcion M, et al. Calmodulin and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signals response coupling in plants. *The Plant Cell*, 2002, 14: S389~400
- Yamakawa H, Mitsuhashi I, Ito N, et al. Transcriptionally and post-transcriptionally regulated response of 13 calmodulin genes to tobacco mosaic virus-induced cell death and wounding in tobacco plant. *Eur J Biochem*, 2001, 268: 3916~3929[DOI]
- Heo W D, Lee S H, Kim M C, et al. Involvement of specific calmodulin isoforms in salicylic acid-independent activation of plant disease resistance responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 766~771[DOI]
- Biro R L, Sun D Y, Serlin B S, et al. Characterization of oat calmodulin and radioimmunoassay of its subcellular distribution. *Plant Physiol*, 1984, 75(2): 382~386
- 叶正华, 孙大业, 郭季芳. 小麦细胞壁钙调素初步研究. *科学通报*, 1988, 33(8): 624~626
- Li J X, Liu J W, Sun D Y. Immunoelectron microscopic localization of calmodulin in corn root cells. *Cell Res*, 1993, 3: 11~19
- Sun D Y, Li H B, Cheng G. Extracellular calmodulin accelerates the proliferation of suspension-cultured cells of *Angelica dahurica*. *Plant Sci*, 1994, 99: 1~8[DOI]
- Sun D Y, Bian Y Q, Zhao B H, et al. The effects of extracellular calmodulin on cell wall regeneration of protoplasts and cell division. *Plant Cell Physiol*, 1995, 36: 133~138
- Ma L G, Sun D Y. The effects of extracellular calmodulin on initiation of *Hippeastrum rutilum* pollen germination and tube growth. *Planta*, 1997, 202: 336~340[DOI]
- 马力更, 周君莉, 张素巧, 等. 细胞外钙调素对转基因烟草悬浮细胞 rbs-GUS 基因表达的促进作用. *科学通报*, 2000, 45(19): 2075~2080
- Ma L G, Xue X D, Cui S J, et al. The presence of a heterotrimeric G protein and its role in signal transduction of extracellular calmodulin in pollen germination and growth. *The Plant Cell*, 1999, 11: 1351~1363
- 马立耕, 孙大业. 植物细胞多肽第一信使. *科学通报*, 2000, 45(18): 1920~1927[摘要][PDF]
- Chen Y L, Zhang X Q, Chen J, et al. Existence of extracellular calmodulin in abaxial epiderm of *Vicia faba* L. and its role in regulation of stomatal movements. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45(1): 40~46

- 14 Eun S O, Lee Y. Actin filaments of guard cell are reorganized in response to light and abscisic acid. *Plant Physiol*, 1997, 115: 1491~1498[DOI]
- 15 Eun S O, Lee Y. Stomatal opening by fusicoccin is accompanied by depolymerization of actin filaments in guard cells. *Planta*, 2000, 210: 1014~1017[DOI]
- 16 Huang R F, Wang X C, Lou C H. Cytoskeletal inhibitors suppress the stomatal opening of *Vicia faba* L. induced by fusicoccin and IAA. *Plant Sci*, 2000, 156: 65~71[DOI]
- 17 Liu K, Luan S. Voltage-dependent K⁺-channel as target of osmosensing in guard cells. *Plant Cell*, 1998, 10: 1957~1970[DOI]
- 18 Yu R, Huang R F, Wang X C. Microtubule dynamics are involved in stomatal movement of *Vicia faba* L. *Protoplasma*, 2001, 216: 113~118
- 19 Donovan N, Martin S, Donkin M E. Calmodulin binding drugs trifluoperazine and compound 48/80 modify stomatal responses of *Commelina communis* L. *J Plant Physiol*, 1985, 118: 177~187
- 20 Nejidat A. Effect of ophiobolin A on stomatal movement: Role of calcium. *Plant cell Physiol*, 1987, 28: 455~460
- 21 Cotellet V, Cyelle F, Vavasseur A. A reassessment of the intervention of calmodulin in the regulation of stomatal movement. *Physiol Plant*, 1996, 98: 619~628[DOI]
- 22 Hwang J U, Lee Y. Abscisic acid-induced actin reorganization in guard cells of dayflower is mediated by cytosolic calcium levels and by protein kinase and protein phosphatase activities. *Plant Physiol*, 2001, 125(4): 2120~2128[DOI]
- 23 Yokota E, Muto S, Shimmen T. Calcium-calmodulin suppresses the filamentous actin-binding activity of a 135-kilodalton actin-bundling protein isolated from Lily pollen tubes. *Plant Physiol*, 2000, 123: 645~654[DOI]
- 24 Shang Z L, Ma L G, Wang X C, et al. Effect of extracellular calmodulin on the cytosolic Ca²⁺ concentration in Lily pollen grains. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43(1): 12~17