

苹果‘国光’花柱中与 S-RNase 互作的钙调素结合蛋白研究

呼荣媚 孟冬 白松龄 胡建芳 李天忠*

(中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100193)

摘要 通过酵母双杂交的方法寻找苹果‘国光’花柱中与 S-RNase 互作的非 S 因子。以苹果‘国光’花柱为试材,构建了酵母 cDNA 文库,检测插入片段大小在 300~2 000 bp 之间,符合库容要求。将 S_1 -RNase 成熟区 cDNA 序列 S_1 -mat 构建到 pGBKT7 载体上作为诱饵,筛选‘国光’花柱酵母 cDNA 文库。经文库筛选,获得一个大小为 371 bp 的片段,与苹果全基因组序列比对后发现,该片段位于第 9 号染色体,其全长序列为 552 bp。NCBI BLAST 比对及蛋白结构域分析显示其与拟南芥钙调素结合蛋白的同源性最高,且具有钙调素结合蛋白特有的磷酸二酯酶结构域。同时,酵母互作实验显示其与‘国光’花柱钙调素(CaM)有强烈互作,故认为此基因是苹果钙调素结合蛋白基因,命名为 *MdCaMBP*。半定量 RT-PCR 结果显示其在‘国光’叶片及花的各组织中均有表达,与苹果花柱 S_1 -、 S_2 -、 S_3 -RNase 成熟多肽区均有互作且作用强烈。推测 *MdCaMBP* 可能作为一种 S-RNase 辅助因子参与了自交不亲和反应。

关键词 苹果; 花柱; S-RNase; 钙调素结合蛋白; 酵母双杂交

中图分类号 S 661.1 **文章编号** 1007-4333(2012)04-0062-06 **文献标志码** A

Preliminary study of calmodulin binding protein interacting with stylar S-RNase in apple ‘Ralls Genet’

HU Rong-mei, MENG Dong, BAI Song-ling, HU Jian-fang, LI Tian-zhong*

(College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract The research was to investigate non-S factors interacting with S-RNase in SI through the yeast two-hybrid (Y2H) system. Yeast cDNA library was successfully constructed for apple ‘Ralls Genet’ style, and being inserted by inserting sequences of 300 – 2 000 bp in size. One cDNA fragment of 371 bp was obtained from the library screening by apple pGBKT7; S_1 -mat as bait through the yeast two-hybrid (Y2H) system. With comparison in NCBI and structure projection, the fragment had highly homology with calmodulin binding protein in *Arabidopsis thaliana*, and had the peculiar phosphodiesterase structure domain with calmodulin binding protein. The the calmodulin binding protein gene named as *MdCaMBP* could be considered as the segment, located on chromosome 9 of apple and interacted with calmodulin(CaM). This gene had one complete ORF of 552 bp and expressed in leaf, sepal, petal, ovary and pollen, style of apple ‘Ralls Genet’. The Y2H assay showed that *MdCaMBP* interacted with mature peptide area of S_1 -RNase, S_2 -RNase, S_3 -RNase. All these results indicated that apple *MdCaMBP* might be one of style non-S factors interacting with S-RNase nonspecifically in SI.

Key words apple; style; S-RNase; calmodulin binding protein; yeast two-hybrid

自交不亲和性是被子植物中促进异交的特殊有性生殖方式^[1]。苹果属于 S-RNase 介导的配子体自交不亲和,主要由连锁在 S-Locus 基因座上的花柱决定因子 S-RNase 和花粉决定因子 F-box 共同

控制^[2-4]。S-RNase 是一种分泌性糖蛋白,在细胞质基质中大量存在^[5]。目前的自交不亲和理论认为, S-RNase 进入自我花粉管后,不能被自我的 F-box 识别,会作为一种细胞毒素降解自我花粉管 RNA,

收稿日期: 2012-03-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071784,31171941); 北京市自然科学基金项目(6102017)

第一作者: 呼荣媚, 硕士研究生, E-mail: rm_hu@yahoo. com. cn

通讯作者: 李天忠, 博士, 教授, 主要从事果树生理与分子生物学研究, E-mail: litianzhong1535@163. com

导致花粉管停止生长^[6-7]; 而 S-RNase 进入非自我花粉管后, F-box 会识别 S-RNase, 并与 SSK、Cullin 等形成 SCF 复合体, 泛素化降解被识别的 S-RNase^[8], 花粉管得以正常生长。随着研究的深入, 越来越多的证据表明, 植物的自交不亲和机制并不仅仅只是 S-RNase 与 F-box 二者间的特异性识别, 许多非 S 因子也参与到自交不亲和反应中^[9]。在此过程中可能参与自交不亲和反应的非 S 因子, 在花柱中研究比较多的是 HT-B^[10-11] 和 120 K^[12] 蛋白, 在花粉中主要有 SSK^[13-14]、Cullin I^[15] 等。这些非 S 因子在花粉和花柱相互识别过程中, 可能起到调节花粉管生长, 识别和抑制 S-RNase 的作用。因此找到参与自交不亲和作用的非 S 因子对于进一步解释自交不亲和机制具有重要意义。上述工作为本研究提供了很好的启示, 酵母双杂交试验是筛选互作蛋白常用且有效的方法。本研究利用酵母双杂交技术以苹果‘国光’花柱决定因子 S₁-RNase 为诱饵筛选其花柱 cDNA 文库, 获得苹果‘国光’花柱中与 S₁-RNase 互作的非 S 因子, 旨在进一步丰富自交不亲和理论, 解释自交不亲和机制。

1 材料与方 法

1.1 材料

苹果‘国光’(S₁S₂) 叶片及蕾期花的萼片、子房、花瓣、花丝、花柱和花药采自辽宁省果树科学研究所资源圃。叶片、萼片、子房、花瓣、花丝和花柱液氮处理后置于 -80 °C 冰箱中保存备用, 花粉散粉后, 放置于 -20 °C 保存备用。

表达载体 pGBKT7 质粒, pGADT7 质粒, 酵母菌株 AH109, Y187 为实验室保存, 培养酵母用 SD-base, SD/-Trp, SD/-Trp/-Leu, SD/-Trp/-Leu/-His, SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade, X- α -Gal 等(美国 Clontech 公司), 半硫酸腺苷(Sigma 公司), 反转录及 DNA 消化酶、DNA 限制性内切酶及 T4 连接酶(TaKaRa 公司)。其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 花柱酵母 cDNA 文库构建

CTAB 法提取花柱总 RNA, 文库构建方法参见参考文献^[16]。

1.2.2 花柱 S₁-RNase 诱饵质粒及后续鉴定质粒的构建

苹果 S₁-、S₂-、S₉-RNase 成熟区序列利用本实验室已有质粒, 经酶切、连接, 构建到表达载体

pGBKT7, 即 pGBKT7: S₁-mat、pGBKT7: S₂-mat、pGBKT7: S₉-mat。钙调素(CaM)根据 NCBI 中已登录序列(登录号: x60738.1)设计全长特异引物, 上游: 5'-TTGGCACTGTCATGAGATCATTTGGG-3', 下游: 5'-CAAGTGAGTTGGGATTTTGACATGA-3'; 以‘国光’花柱 cDNA 为模板, PCR 扩增获得全长序列, 反应程序: 94 °C, 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环, 72 °C, 后延伸 10 min; 获得全长序列连接到 pMD18-T 克隆载体上, 转化后挑取单克隆送公司测序, NCBI 比对; 将测序正确的质粒经酶切、连接, 构建到表达载体 pGBKT7, 用于后续酵母互作实验进一步鉴定。

1.2.3 酵母筛库及互作因子再鉴定

将测序正确的诱饵质粒 pGBKT7: S₁-mat 转化到酵母 Y187 中^[17], 与在 AH109 菌中的花柱酵母文库交配筛选, 详细方法参考 Matchmaker™ Library Construction & Screening Kits(PT3955-1, Clontech)说明书。筛选后, 挑取阳性菌落于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 液体培养基中过夜培养, 提取酵母质粒, 转化大肠杆菌, 在 LB(氨苄抗性)培养基扩繁后提取 AD 质粒, 与 pGBKT7: S₁-mat 质粒使用醋酸锂法共转酵母菌株 AH109, 进行再鉴定, 在四缺培养基上生长并 X- α -gal 染色成功的质粒, 即互作质粒。

pGBKT7-53 和 pGADT7-SV40 为阳性对照, pGBKT7 和 pGADT7 为阴性对照。

1.2.4 阳性质粒的克隆与分析

以 pGBKT7: S₁-mat 为诱饵筛选得到的 AD 质粒, 用 pGADT7 载体通用引物对其插入片段扩增并测序。将测序结果在 DNAMAN 中进行分析, 通过 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>)中 BLAST 寻找其同源基因, 在苹果基因组网站(<http://genomics.research.iasma.it/index.html#>)中分析其在苹果基因组中的位置, 结合对基因的注释结果找到其全长序列。设计全长序列的特异引物, PCR 扩增出该片段的全长序列。在 NCBI 网站上对全长基因序列进行分析。

1.2.5 阳性质粒的互作鉴定

以 1.2.4 中获得的基因全长序列为模板, 设计特异性引物构建 pGADT7 载体, 上游引物: 5'-CCGGAATTCATGTCACAGGGCTAT-3', 引入酶切位点 EcoR I, 下游引物: 5'-TCCCCGGGATGC-

TTCCACTGTGTTAC-3',引入酶切位点 *Sma*I。

将构建好的 pGADT7 质粒分别与 pGBKT7:CaM, pGBKT7:S₁-mat, pGBKT7:S₂-mat, pGBKT7:S₃-mat 质粒以醋酸锂法共转酵母菌株 AH109,进行互作鉴定,观察混合质粒是否在四缺培养基上生长, X- α -gal 染色鉴定。

1.2.6 基因的组织特异性分析

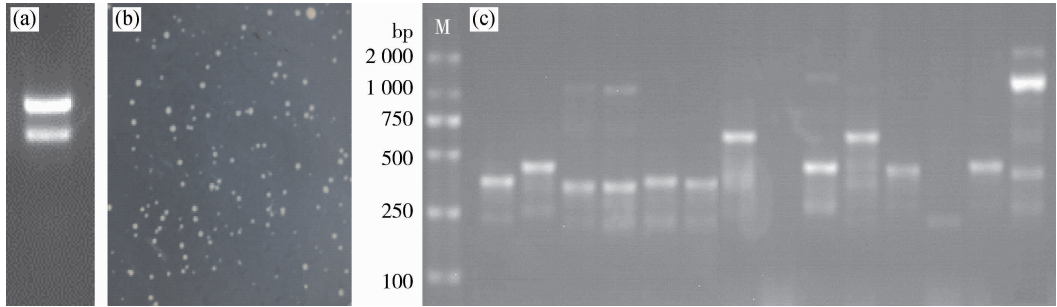
采用 CTAB 法提取‘国光’叶片、萼片、子房、花瓣、花丝、花柱和花粉总 RNA(方法同 1.2.1),调整 cDNA 模板量进行 RT-PCR 反应,所用引物为获得片段的全长特异引物,上游引物:5'-ATGTCACAGGGCTATGCAATCGAGC-3',下游引物:5'-TCATGCTTCCACTGTGTTACCTAGC-

3',反应程序为:94℃,预变性 5 min,94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 45 s,28 个循环,72℃,延伸 10 min。以 *MdActin* 作为内参基因。

2 结果与分析

2.1 苹果‘国光’花柱酵母 cDNA 文库构建

提取的‘国光’花柱总 RNA 浓度为 0.79 μ g/ μ L, A_{260}/A_{280} 为 1.97,28S 与 18S 的浓度及亮度比接近 2:1(图 1(a)),反转录后所得 ds cDNA 弥散较长,为高丰度表达基因。经计算库容量为 1.2×10^6 (图 1(b))^[18],检测插入片段的长度为 300~2 000 bp 之间(图 1(c)),证明苹果‘国光’花柱 cDNA 文库构建成功。



(a)为花柱总 RNA;(b)为酵母文库的容量检测(pGADT7-cDNA 的酵母菌稀释 10 000 倍长出的克隆);
(c)为花柱文库质量鉴定图(M 为 DL 2 000 marker)。

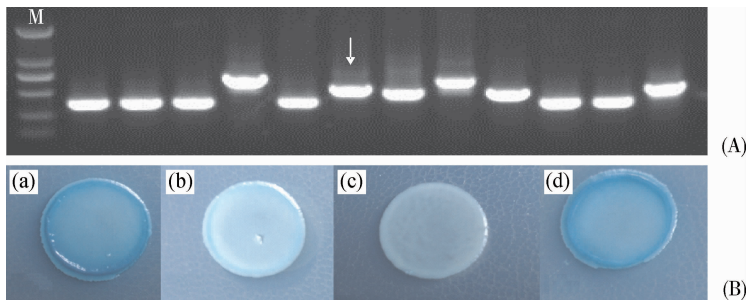
图 1 苹果‘国光’花柱 cDNA 酵母文库的构建

Fig. 1 Construction of yeast style cDNA library for apple ‘Ralls Genet’

2.2 苹果‘国光’花柱 S₁-RNase 筛选花柱酵母 cDNA 文库及互作因子再鉴定

以 pGBKT7:S₁-mat 为诱饵筛选‘国光’花柱酵母 cDNA 文库,得到 32 个阳性克隆。分离这些阳性克隆中的 pGADT7 质粒,用载体通用引物进行 PCR,得到 12 个扩增片段长度大于 300 bp 的质

粒,将这些质粒送去测序,合并相同序列,最后得到 8 种 cDNA 序列。在 NCBI 中对序列进行 BLAST 分析,4 种为未知序列,4 种为已知序列。经过结构及功能分析,我们选定其中一个插入片段在 400 bp 左右的 AD 质粒进行进一步研究(图 2(A)),命名为 E5。



(A)为捕获质粒中插入的 cDNA 大小,箭头所示为 AD-E5 的 PCR 条带;(B)为同上图修改双质粒共转 AH109 后 X- α -gal 染色结果:(a)为阴性对照;(b)为阳性对照;(c)为 pGADT7:E5 与 pGBKT7:S₁-mat 共转 AH109;(d)为 pGADT7:E5 与 pGBKT7 共转 AH109

M 为 DL 2 000 marker,自上至下一次为 2 000、1 000、750、500、250 和 100 bp

图 2 苹果‘国光’花柱 pGADT7-cDNA 酵母文库筛选与阳性克隆的鉴定

Fig. 2 Screen of apple ‘Ralls Genet’ style pGADT7-cDNA library and identification of the positive clone

将筛选出来的 AD 质粒,与 pGBKT7:S₁-mat 用醋酸锂法共同转化酵母菌株 AH109。具有 AD 及 BK 2 种混合质粒的酵母菌在二缺培养基 SD/-Trp/-Leu 生长正常,转至四缺培养基 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 上生长并进行 X- α -gal 染色,结果 3 h 内菌斑变蓝(图 2B),证明此质粒与 S₁-mat 互作。

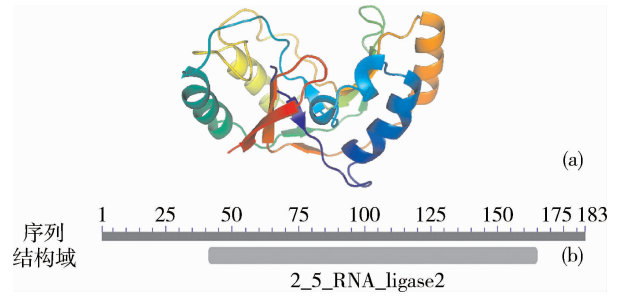
2.3 互作因子 E5 全长基因的获得及序列分析

将上述得到的与 pGBKT7:S₁-mat 互作的 E5 质粒,以 AD 通用引物测序,得到长度为 371 bp 的片段。BLAST 发现此序列与拟南芥中钙调素结合蛋白基因的同源性高达 75%。经苹果基因组分析,此序列位于苹果基因组第 9 号染色体。基因注释找到了该片段的完整开放读码框序列 552 bp,位于 9 号染色体 2 139 075 到 2 162 487 bp 位置。

根据苹果基因组分析结果,设计 E5 基因全长特异性引物,PCR 扩增测序获得 552 bp 基因全长。DNAMAN 软件分析,此基因编码 183 个氨基酸,分子质量约为 20.5 ku,等电点 PI 为 4.5,无跨膜区,性质稳定。NCBI 网站对氨基酸序列分析,预测其蛋白质三维结构(图 3(a))。保守结构域分析发现其第 17 个氨基酸残基到 89 个氨基酸残基包含一个 RNA 连接酶(图 3(b)),此结构域中包含一个保守的 HXTX 框,是钙调素依赖的环核苷酸磷酸二酯酶发挥活性所必须的。

2.4 苹果‘国光’花柱钙调素基因克隆及与 E5 的酵母互作分析

根据 NCBI 已登录的苹果钙调素基因全序列设



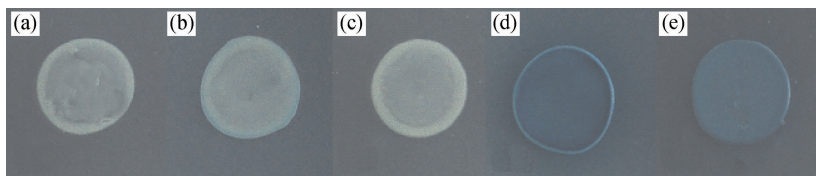
(a)为 E5 全长基因编码的蛋白三维结构预测;
(b)为 E5 全长基因编码的蛋白保守结构域分析。

图 3 E5 全长基因编码的蛋白三维结构预测及保守结构域分析

Fig. 3 Tertiary structure(a)and conserved domain(b)predictipon of ORF for E5

计全长特异性引物,以‘国光’花柱 cDNA 为模板,克隆获得 342 bp 的全长基因序列,与 NCBI 中苹果‘Mcintich’已登录钙调素基因同源性为 100%(登录号:x60738.1),确定该基因为苹果‘国光’钙调素基因,命名为 *MdCaM*。

将获得的 *MdCaM* 全长序列构建在酵母载体 pGBKT7 上,将 E5 基因全长序列构建在 pGADT7 上(构建方法见 1.2.2)。将这 2 种质粒以醋酸锂法共转化酵母菌株 AH109,涂布于二缺培养基 SD/-Trp/-Leu 上长出大小 2 mm 左右菌斑,将其移至四缺培养基上,菌斑均正常生长,经 X- α -gal 半乳糖苷酶染色,3 h 内均呈现蓝色(图 4),说明 *MdCaM* 与 E5 有明显的互作关系。



(a)为 pGBKT7+pGADT7(阴性对照);(b)为 pGBKT7:CaM+pGADT7;(c)为 pGBKT7+pGADT7:MdCaMBP;
(d)为 pGBKT7-53+pGADT7-SV40(阳性对照);(e)为 pGBKT7:CaM+pGADT7:MdCaMBP。

图 4 E5 与 *MdCaM* 的酵母互作

Fig. 4 Interaction between E5 and *MdCaM* in yeast

根据 NCBI 比对及蛋白质结构域分析,且其能与 *MdCaM* 有确定的互作关系,因此,从苹果‘国光’花柱中获得的互作因子 E5 为苹果钙调素结合蛋白,命名为 *MdCaMBP*。

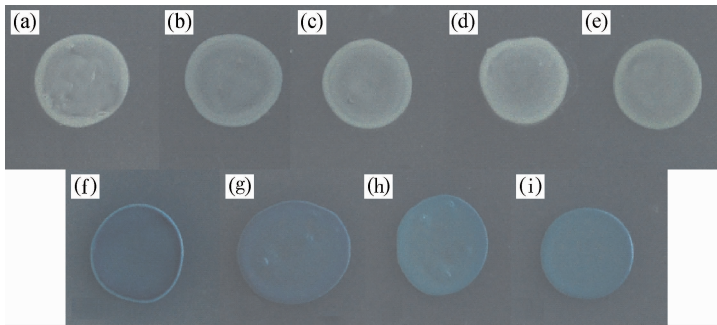
2.5 酵母双杂交检测 *MdCaMBP* 与 S₁-mat、S₂-mat、S₉-mat 的互作关系

将构建成功的 pGADT7:*MdCaMBP* 质粒分别

与 pGBKT7:S₁-mat、pGBKT7:S₂-mat、pGBKT7:S₉-mat 质粒以醋酸锂法共转酵母菌株 AH109,方法同 2.4。结果说明 *MdCaMBP* 与 S₁-mat、S₂-mat、S₉-mat 均存在明显的互作关系(图 5)。

2.6 *MdCaMBP* 的苹果‘国光’组织特异性分析

采用半定量 RT-PCR 的方法检测了 *MdCaMBP* 在苹果‘国光’各组织中的表达情况。



(a) 为 pGBKT7+pGADT7(阴性对照);(b) 为 pGBKT7;S₁-mat+pGADT7;(c) 为 pGBKT7;S₂-mat+pGADT7;(d) 为 pGBKT7;S₉-mat+pGADT7;(e) 为 pGBKT7+pGADT7;MdCaMBP;(f) 为 pGBKT7-53+pGADT7-SV40(阳性对照);(g) 为 pGBKT7;S₁-mat+pGADT7;MdCaMBP;(h) 为 pGBKT7;S₂-mat+pGADT7;MdCaMBP;(i) 为 pGBKT7;S₉-mat+pGADT7;MdCaMBP。

图5 MdCaMBP与苹果花柱S-RNase的酵母互作

Fig. 5 The interaction between MdCaMBP and S-RNase in yeast

在叶片、萼片、子房、花瓣、花丝、花粉及花柱中此基因均有表达。(图6)。

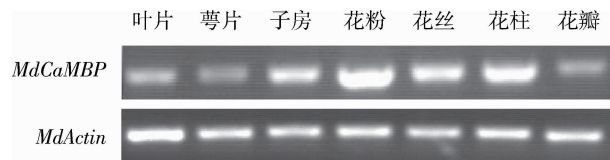


图6 MdCaMBP在苹果‘国光’中的组织特异性分析

Fig. 6 Expression pattern in several tissues of the MdCaMBP

3 讨论

植物的自交不亲和(SI)是花柱和花粉间相互识别的复杂过程,并不是仅由花柱决定子S-RNase与花粉决定子F-box二者的特异性识别所控制。目前研究发现,在配子体型自交不亲和反应中有很多非S因子参与其中并发挥重要作用,如HT-B、120K等。为寻找参与自交不亲和反应的非S因子,本研究利用苹果‘国光’花柱S₁-RNase为诱饵筛选‘国光’花柱cDNA酵母文库获得8个互作子,其中包括一个钙调素结合蛋白MdCaMBP。

钙调素结合蛋白是一类可以与钙调素结合并行使一定功能的蛋白质的统称^[19]。花粉管的正常生长离不开从顶端到基部由高到低的钙离子浓度梯度,并以此控制微丝的运动,实现高尔基体小泡的定向分泌,最终完成花粉管的定向生长^[20]。Hauber等^[21]在百合花粉管中也观察到类似Ca²⁺梯度的钙调素梯度的存在。因此推测MdCaMBP可能通过

影响钙调素浓度,进而影响Ca²⁺浓度梯度而控制花粉管生长。结构域分析发现,MdCaMBP蛋白包含有环核苷酸磷酸二酯酶结构域。环核苷酸磷酸二酯酶是一类能够降解cAMP的酶类,cAMP可以激活K⁺通道、调节Ca²⁺通道、激活下游蛋白激酶(促进蛋白磷酸化),核苷酸磷酸二酯酶在一定时期被激活可以起到平衡细胞内cAMP水平的作用,促进细胞正常生长^[22-24]。由于环核苷酸磷酸二酯酶一般都通过其功能域发挥作用,因此,推测S-RNase可能会与钙调素竞争性抑制MdCaMBP的功能,造成MdCaMBP无法发挥其环核苷酸磷酸二酯酶功能,使花粉管细胞内cAMP含量大量增加,影响花粉管内Ca²⁺浓度梯度,最终引起自交不亲和反应。

由于S-RNase具有单元型特异性,不同S基因的植株具有不同的S-RNase,因此,为了分析MdCaMBP是否在其他S基因型苹果中也发挥同样的作用,进行了MdCaMBP与S₁、S₂、S₉-mat的酵母互作实验,结果表明MdCaMBP与不同S-RNase均存在互作关系,说明MdCaMBP在不同S基因型苹果中可能均发挥同样的作用。

综上所述,推测MdCaMBP有可能与S-RNase作用间接影响花粉管内钙离子浓度变化,影响花粉管生长,但其具体发挥作用方式尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] de Nettancourt. Incompatibility in angiosperms [J]. Sexual Plant Report, 1997, 10: 185-199

- [2] Sassa H, Kakui H, Minamikawa M. Pollen-expressed F-box gene family and mechanism of S-RNase-based gametophytic self-incompatibility (GSI) in *Rosaceae*[J]. Sex Plant Reprod, 2010, 23: 39-43
- [3] Tao R, Iezzoni A F. The S-RNase-based gametophytic selfincompatibility system in *Prunus* exhibits distinct genetic and molecular features[J]. Sci Hortic, 2010, 124: 423-433
- [4] Meng X, Sun P, Kao T. S-RNase-based self-incompatibility in *Petunia inflata*[J]. Ann Bot, 2011, 108: 637-646
- [5] McClure B A, Gray J E, Anderson M A, et al. Self-incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA[J]. Nature, 1990, 347: 757-760
- [6] Luu D T, Qin X, Morse D, et al. S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility[J]. Nature, 2000, 407: 649-651
- [7] Goldraij A, Kondo K, Lee C B, et al. Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana glauca*[J]. Nature, 2006, 439: 805-810
- [8] Lechner E, Achard P, Vansiri A, et al. F-box proteins everywhere[J]. Curr Opin Plant Biol, 2006, 9: 631-638
- [9] McClure B A, Cruz-Garcia F, Beecher B S, et al. Factors affecting inter- and intra-specific pollen rejection in *Nicotiana glauca*[J]. Annals of Botany, 2000, 85: 113-123
- [10] McClure B, Mou B, Canevascini S, et al. A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana glauca*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 13548-13553
- [11] Goldraij A, Kondo K, Lee C B, et al. Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana glauca*[J]. Nature, 2006, 439: 805-810
- [12] Lind J L, Bonig I, Clarke A E, et al. A style-specific 120 kDa glycoprotein enters pollen tubes of *Nicotiana glauca* in vivo[J]. Sexual Plant Reproduction, 1996, 9: 75-86
- [13] Huang J, Zhao L, Yang Q, et al. AhSSK1, a novel SKP1-like protein that interacts with the S-locus F-box protein SLF[J]. Plant Journal, 2006, 46: 780-793
- [14] Zhao L, Huang J, Zhao Z H, et al. The Skp1-like protein SSK1 is required for cross-pollen compatibility in S-RNase-based self-incompatibility[J]. Plant Journal, 2010, 62(1): 52-63
- [15] Li W T, Chetelat R T. A pollen factor linking inter- and intra-specific pollen rejection in tomato [J]. Science, 2010, 330(6012): 1827-1830
- [16] 孙会玲, 孟冬, 白松龄, 等. 苹果花粉中与花柱 S-RNase 互作的 γ -硫基筛选及鉴定[J]. 园艺学报, 2011, 38(8): 1437-1446
- [17] Mochizuki S, Tanaka R, Shimoda M, et al. Connective tissue growth factor is a substrate of ADAM28[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 402(4): 651-657
- [18] Parent A, Roy S J, Iorio-Morin C, et al. ANKRD13C acts as a molecular chaperone for G protein-coupled receptors[J]. Biol Chem, 2010, 11(2): 12-14
- [19] 孙大业, 郭艳林, 马力耕. 细胞信号转导[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 92-118
- [20] Hepler P K. Tip growth in pollen tubes; Calcium leads the way [J]. Trends Plant, 1997, 2: 79-88
- [21] Hauber I, Herth W, Reiss H D. Calmodulin in tip growing plant cell, visualized by fluorescing calmodulin-binding phenothiazines[J]. Planta, 1984, 162: 33-39
- [22] Li W, Luans, Scheriber S L, et al. Cyclic AMP stimulated K^+ channel activity in mesophyll cells of *Vicia faba* [J]. Plant Physiol, 1994, 106: 957-961
- [23] Maathuis M, Sanders D. Sodium uptake in roots is regulated by cyclic nucleotides[J]. Plant Physiol, 2001, 127: 1617-1625
- [24] Kurosaki F, Nishi A. Stimulation of calcium influx and calcium cascade by cyclic AMP in cultured carrot cells [J]. Arch Biochem Biophys, 1993, 302: 144-151

责任编辑: 王燕华