

# 钙调素及钙调素相关蛋白在植物细胞中的研究进展

夏快飞<sup>1,2</sup>, 梁承邨<sup>1\*</sup>, 叶秀琳<sup>1</sup>

(1. 中国科学院华南植物园, 广东广州 510650; 2. 中山大学生物工程中心, 广东广州 510275)

**摘要:** 植物对一系列生物和非生物刺激所产生的反应都与细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  信号转导有关, 而钙调素、钙调素相关蛋白则是  $\text{Ca}^{2+}$  信号转导的下游靶蛋白。该文介绍了钙调素的结构及其在植物细胞中的分布, 钙调素及钙调素相关蛋白在植物细胞中的表达等方面的最近研究进展。

**关键词:** 钙调素; 钙调素相关蛋白; 信号转导

**中图分类号:** Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2005)03-0269-05

## Study on calmodulin and calmodulin-related proteins in plant cells

XIA Kuai-fei<sup>1,2</sup>, LIANG Cheng-ye<sup>1\*</sup>, YE Xiu-lin<sup>1</sup>

(1. *South China Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;*

*2. Biotechnology Research Center, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China*)

**Abstract:** Most reactions of plant cells to abiotic and biotic stimuli were thought to be related with  $\text{Ca}^{2+}$  signal transduction. Calmodulin and calmodulin-related proteins were downstream target proteins of  $\text{Ca}^{2+}$  signal transduction. This paper discussed the structure of calmodulin and its distribution in plant cells, especially its latest progress.

**Key words:** calmodulin; calmodulin-related proteins; signal transduction

钙是高等植物中普遍存在的一种信号转导分子, 一些非生物刺激(如: 光照、冷、热、运动、缺氧、干旱等)和生物刺激(如: 植物激素、抗原刺激等)所引起的生理生化反应都被证明与  $\text{Ca}^{2+}$  信号转导有关(Roberts 等, 1992; Poovaiah 等, 1993)。  $\text{Ca}^{2+}$  信号的产生离不开另一种蛋白质—— $\text{Ca}^{2+}$  受体, CaM (calmodulin) 和 CaM 相关蛋白是细胞内主要的  $\text{Ca}^{2+}$  受体, 在  $\text{Ca}^{2+}$  所介导的各种细胞反应过程中充当中间媒介, 细胞受到胞外或胞内刺激后, 细胞质内  $\text{Ca}^{2+}$  或由胞内  $\text{Ca}^{2+}$  库(富含  $\text{Ca}^{2+}$  的细胞器——内质网、线粒体、叶绿体、液泡等)释放, 或由胞外进入而增加, 然后与其胞内受体 CaM 或 CaM 相关蛋白等结合, 进一步通过与细胞内多种酶或蛋白质结合调节细

胞生理生化过程。CaM 是 1967 年美籍华人张槐耀在研究细胞内 cAMP 的浓度变化中环腺苷酸磷酸二酯酶(PDE)的调节作用时发现的。Krostinger 建议命名为(Calmodulin, CaM), 我国于 1987 年正式被命名为钙调素(顾永清, 1994)。因此 CaM 所介导的  $\text{Ca}^{2+}$  信号转导功能甚至远比 cAMP 广泛, 且在生物学上有着重要的意义。本文将重点论述植物中 CaM 和 CaM 相关蛋白的最近研究进展。

### 1 CaM 的结构

CaM 是一种小分子量单链可溶性球蛋白, 分子量约 16.7~16.8 kDa, 有 4 个 EF 臂, 能结合 4 个

收稿日期: 2004-04-13 修订日期: 2004-07-20

基金项目: 中国科学院院长基金(20003269); 国家自然科学基金(30170061)资助。

作者简介: 夏快飞(1975-), 女, 湖南常德人, 博士后, 主要从事植物化学与分子生物学方面的研究, E-mail: flyxia936@163.com

\* 通讯作者, 主要从事植物遗传学研究。

$\text{Ca}^{2+}$ , 分别被称之为结合域 I、II、III、IV。EF 臂是由一个中央螺旋连结两个球状结构所形成的螺旋一线一螺旋的结构, 每两个 EF 臂由一条长的可自由伸展的  $\alpha$  螺旋连结成一组 (Raymond 等, 1998; Anireddy 等, 2001)。CaM 在进化过程中具高度保守性, 所有哺乳动物的钙调素有 90% 的氨基酸序列相似性, 植物钙调素与脊椎动物和酵母的氨基酸序列相似性分别为 91% 和 84%, 与藻类的相似性为 84%~100%。CaM 具热稳定性、酸性 (等电点 3.9~4.3), 其中 1/3 是带有侧链的谷氨酸和天冬氨酸, 具疏水性, 结合  $\text{Ca}^{2+}$  后分子构象发生改变, 由哑铃状变为球状, 其疏水区呈激活态, 能与多种靶蛋白结合, 如 PDE 等, 改变靶蛋白的活性 (Raymond 等, 1998; Anireddy 等, 2001)。

## 2 CaM 在植物细胞中的分布及 CaM 基因的表达

### 2.1 CaM 在植物细胞中的分布

CaM 广泛地分布于几乎所有已知的真核生物中, 但在不同组织、器官和原生质体中它的含量不同, 分布也不一样。细胞内 CaM 的水平最终是由胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度控制的, 胞内静息态  $\text{Ca}^{2+}$  浓度为  $10\sim7$  mol/L, 当胞内浓度高于  $10^{-5}$  mol/L 时,  $\text{Ca}^{2+}$  则结合 CaM。Ling 等 (1992) 用光密度测定法和酶活性试验检测了 *Vicia faba* 不同器官、组织和原生质体中 CaM 的含量。发现保卫细胞、表皮、胚轴中 CaM 的浓度为  $1\sim2$   $\mu\text{mol/L}$ , 细胞质内总 CaM 浓度约为  $5\sim20$   $\mu\text{mol/L}$ , Fisher 等 (1996) 检测胡萝卜细胞悬浮液中 CaM 含量相似。CaM 和 CaM mRNA 在培养细胞的分生群体和植物分生组织中分布最多。如: 在花粉管的萌发过程中, 花粉管和柱头中 CaM 含量最高。大麦叶片的分生组织、顶端分生组织中 CaM mRNA 的含量增加 (Choi 等, 1996; Chye 等, 1995)。CaM mRNA 在雌蕊正在发育过程中的细胞核和核仁中大量表达, 特别是在核仁中的表达最多。在成熟植物细胞的细胞质和细胞核中 CaM mRNA 的表达量一致, CaM 蛋白在细胞质中的表达却高于细胞核中的表达 (Ling 等, 1992; 陈绍荣等, 1998; Ma 等, 1996)。杨军等 (2002) 用胶体金免疫电镜技术观察了水稻受精前后胚囊中的钙调素的分布变化。发现授粉后, 卵细胞、助细胞和中央细胞内的钙调素含量均有所增加, 授粉到受精期间, 钙调

素的主要分布形式由分散的单颗粒转变为聚集颗粒, 受精完成后再变为分散的单颗粒形式。李师弢等 (1999) 研究了烟草受精前后胚囊中 CaM mRNA 和 CaM 的变化。发现在卵细胞与中央细胞之间, 受精后宿存助细胞与退化细胞之间, 合子与胚乳细胞之间, 2-细胞原胚的顶细胞与基细胞均存在表达的差异。成熟胚囊中的 CaM mRNA 主要分布在珠孔极的卵器和合点端的反足细胞; 中央细胞较少。在受精前后, 卵细胞和中央细胞之间出现富含 CaM 的短暂性区带, 而在授粉后到受精前卵器与极核之间出现一条暂时的 CaM mRNA 条带, 受精后此条带消失。受精后 CaM mRNA 主要集中于伸长的合子和原胚的合点端。在植物根冠和分生组织区域具有专一性增加的 CaM 位点 (杨军等, 2002)。大麦叶片的分生组织、顶端分生组织中 CaM mRNA 的含量增加 (Takezawa 等, 1995; Chye 等, 1995)。赵洁等 (1998) 在研究小麦分离合子与幼胚的发育过程中发现, 在不同的胚期 CaM 分布不一样, 较大的梨形期, 胚体较胚柄含量高, 刚分化出胚芽鞘和胚芽时, 基部的 CaM 含量很高。

### 2.2 植物中 CaM 和 CaM 相关蛋白基因的表达

研究者们已经从不同的植物中如: 苹果 (Wattillon 等, 1992)、拟兰芥 (Chandra 等, 1994; Ito 等, 1995)、马铃薯 (Takezawa 等, 1995)、水稻 (Choi 等, 1996)、小麦 (Yang 等, 1996)、藻类 (Zimmer 等, 1988)、苜蓿 (Barnett 等, 1990) 分离或克隆出 CaM 基因。在所有的高等植物中的 Cam 序列中, 编码区域包括两个外切子, 一个内含子。植物 Cam 基因的启动子富含 AT 区域, 具有 TATA 结构模块。有的学者提出“多个基因—一种蛋白”的假设用以解释不同组织和器官具有不同 Cam 的特异表达。所有的 Cam 基因的 cDNA 克隆编码了一段 148 个氨基酸多肽链, 此多肽链具有高度保守性。对植物不同器官中 CaM mRNA 的检测 (Takezawa 等, 1995; Gawienowski 等, 1993) 表明在植物中存在多种 Cam 基因表达系统, CaM mRNA 存在于各种不同的组织中。为了适应水喷射、地下灌溉、风、触动、伤流、黑暗等, 拟兰芥至少启动了四个基因的表达, 刺激 30 min 后 CaM mRNA 水平增加了 100 倍。TCH (touch-induced)<sub>2</sub>, TCH<sub>3</sub> 与 CaM 分别具有 44% 和 70% 的氨基酸序列相似性。为了对触动 (touches) 产生适应性, 细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度立即暂时地大量增加。CaM 和其它一些 CaM 类似物结合增

加了的  $\text{Ca}^{2+}$  激活产生细胞反应 (Janet 等, 1990)。Yang 等 (1999) 以马铃薯 cDNA 为探针从水稻种至少获得了四个 CaM 和 CaM 相关基因。Poovaiah 等 (1999) 研究报导, 用酵母双杂交系统获得了编码 CCaMK (Calmodulin dependent protein kinase) 的 cDNA 克隆, 其中 LIEN-1 与 CCaMK 的磷酸化作用位点具有高亲和性 (Poovaiah, 1999)。Cam 一般存在于细胞质中, 但最近的研究发现在细胞核中也存在 Cam。Schuurink 等 (1996) 用免疫荧光检测发现在大麦糊粉原生质体细胞的细胞核中存有一定数量的 Cam。他们发现不同的激素 GA 和 ABA 处理后, 糊粉层中 CaM mRNA 和 CaM 蛋白在细胞质和

细胞核中 CaM 的含量没有明显的变化, 证明激素处理对 CaM 的分布没有明显的联系。有些研究者发现生长素 (Dolmetsch 等, 1997), 赤霉素 (GA) (Ito 等, 1995; Schuurink 等, 1996)、光照 (Bowler 等, 1994; Neuhaus 等, 1993) 等能引起细胞核内 Cam 基因表达的不同, 在很多情况下刺激了 Cam 基因的表达, 随即引起细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的改变。外部刺激引起细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的改变怎样导致了基因水平的变化? 在动物  $\text{Ca}^{2+}$  信号转导中是通过转录因子 CREB (Enslin 等, 1994; Matthews 等, 1994)、ERK、JNK、NFAT 和 NF $\kappa$ B (Dolmetsch 等, 1997) 来改变体内的基因表达模式。这些转录因子通过 CaM 激

表 1 植物中钙调素相关蛋白及其基本功能

Table 1 CaM related proteins on plants and their basic functions

蛋白质 Protein	基本功能 Basicfunction	文献参考 References
GAD (Glutamate decarboxylase)	催化 L-谷氨酸为 $\gamma$ -氨基丁酸, 由 $\text{Ca}^{2+}$ -CaM 激活, 与许多胁迫反应有关, 与 CaM 紧密结合	Snedden 等, 1996; Bown 等, 1997
NAD kiase	催化 $\text{NAD} \rightarrow \text{NADP}$ , 由 $\text{Ca}^{2+}$ -CaM 激活, 与缺氧胁迫有关	Harding 等, 1997
Amyrase nucleoside triphosphatase	在光调控生态形成中影响了拟南芥的新陈代谢和生长	Askerlund 等, 1992
Elongation factor 1a	调控 CaM 与 EF-1a 结合介导微管活动	Durso 等, 1994
Myosin V homolog (MYA1)	与肌球蛋白 V 相似, 具有 CaM 结合特征	Kinkema 等, 1994; Knight 等, 1993
Vacuolar $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase	存在于液泡膜, 起着 $\text{Ca}^{2+}$ 泵的作用	Malmstrom 等, 1997
Plasmalemma $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase	与 $\text{Ca}^{2+}$ 结合 $K_m$ 值低, 对钒酸盐敏感, 具有较宽范围的最低 pH 值, 起着 $\text{Ca}^{2+}$ 泵的作用	Rasi-Caldogno 等, 1993; Rasi-Caldogno 等, 1995
ER $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase	存在于内质网膜, 120kDa, $K_m$ 值与细胞质膜 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 相似, 起着 $\text{Ca}^{2+}$ 泵的作用	Askerlund 等, 1992; Hsieh 等, 1991; Gilroy 等, 1993
CaM-dependent protein kinase II	$\text{Ca}^{2+}$ 和 CaM 介导的分布广泛的靶蛋白, 在很多组织中存在, 参与了细胞内的很多功能, 具有 $\alpha\beta\gamma\delta$ 四个同形异构体, 分子量范围在 50~60kDa 之间	Lu 等, 1996; Watil-lon 等, 1993
potato calmodulin-binding protein(PCBP)	在非植物系统中没有发现 PCBP, 具有植物转移性, 在有 $\text{Ca}^{2+}$ 存在的情况下与 CaM 结合起着 $\text{Ca}^{2+}$ 信使的作用能与核结合, 具核信号定位的作用, 由单基因编码	Anireddy 等, 2001
KCBP (kinase-like calmodulin binding protein)	植物中特有的微管运动蛋白, 与细胞分裂有关, 由 $\text{Ca}^{2+}$ 和 CaM 负调控, 具有多种同形异构体 (CaM-2, -4, -6, etc) 与动力蛋白结合, 具有不同的亲和力	Mariana 等, 2001; Yusuke 等, 2001
$\text{Ca}^{2+}$ -CaM-activated protein kinase	与 CaM-like domain protein kinase(CDPK) 相似, 其 mRNA 的表达具有空间限制, 只在发育中的花药组织中表达	Patil, 1995
Basic Leucine zipper protein(TGA3)	转录因子, 在拟南芥 CaM 基因 Cam-3 的启动作用下与 cDNA 元件结合	Gawienowski 等, 1996

酶级联反应的磷酸化/去磷酸化作用和 CaM 依赖蛋白磷酸酶激活钙调神经酶。在植物中还没有这方面的详细研究报导。Corneliusse (1994) 报导了 *Vigna radiata* 细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的改变在转录水平影响了 CaM 基因的表达。在  $\text{Ca}^{2+}$  存在下 CaM 基本螺旋—线—螺旋结构上的几个转录因子抑制了它与 DNA 的结合, 且抑制了转录基因的表达。在植物中, Szymanski 等 (1996) 报导了在花椰菜植物中存在 bZIP

转录因子 TGA3 和相关蛋白介导 CaM 和 DNA-结合蛋白之间的作用。 $\text{Ca}^{2+}$  增加了拟南芥中 Cam3 启动子与 CaM 和 DNA 结合蛋白之间的结合。

### 3 CaM 相关蛋白

$\text{Ca}^{2+}$ -CaM 信号途径要通过 CaM 相关蛋白来实现。植物中 CaM 由多个基因编码, 不同器官、不

同细胞有不同的表达形式。同时不同的 CaM 异构体与不同的靶蛋白结合(Antosiewicz 等, 1995; Xing 等, 1997)。Ca<sup>2+</sup> 与 CaM 的结合引起异构体的改变暴露出疏水区域后与靶蛋白结合(Sinclair 等, 1996; Lu 等, 1996), 由于靶蛋白、CaM 表达形式的不同等产生了体内 Ca<sup>2+</sup> 信号途径的多样性。这些靶蛋白可分为: (1) 蛋白酶类; (2) 钙泵; (3) 核作用因子。那么分离和确定真核生物中 CaM 结合蛋白(Calmodulin-binding proteins, CBPs) 对于理解 Ca<sup>2+</sup>-CaM 介导的信号转导无疑具有重大的意义。CBPs 的 CaM 结合区域不具保守性, Berridge(1987)、Collins 等(1990) 主要运用蛋白质-蛋白质的相互作用生物化学和分子生物学的方法确定 CBPs, 用此方法已确定了很多与植物形态建成, 细胞分裂, 细胞延长, 离子运输, 基因调控, 细胞骨架形成, 胞质环流, 花粉管伸长和胁迫诱导有关的一些 CBPs。已获得的 CBPs 及这些蛋白的基本特征、功能见表 1。

#### 4 结束语

植物钙调素和钙调素相关蛋白是由多个基因家族编码的, 在植物细胞内有不同的时空表达, 它的多样性是 Ca<sup>2+</sup>-CaM 信号转导多样性的基础(Roberts 等, 1992; Raymond 等, 1998)。因此对 CaM 及 CaM 相关蛋白在细胞内的分布、三维结构、基因分离、与 Ca<sup>2+</sup> 结合的方式、CaM 及其相关蛋白的分离以及 CaM 的生理功能等一直是科学家们研究的热点, 也是了解 Ca<sup>2+</sup>-CaM 信号转导的基础。CaM 本身不具有酶的活性, 它必须与 Ca<sup>2+</sup> 及 CaM 相关蛋白结合后才具酶活性功能(Raymond 等, 1998), 因此 Ca<sup>2+</sup>-CaM 信号转导的差异性主要依赖于它的靶蛋白, 分离出更多的靶蛋白仍将是今后的研究热点之一。了解 CaM 在亚细胞中的分布对 CaM 功能的研究有重要作用, 需要借助形态学、遗传学、分子生物学等多方面的研究手段对 CaM 的时空分布进行研究, 以更好地掌握 CaM 所介导信号转导的作用。另外 CaM 与不同靶蛋白的作用模式以及 CaM 家族的庞大功能等有待进行更深入的探讨研究。

#### 参考文献:

顾永清. 1994. 钙调素的生理功能[J]. 生物学通报, 29(10): 12-14.  
Anireddy S N Reddy, Irene S Day, S B Narasimhulu, et al. 2001. Isolation and characterization of a novel calmodulin-

binding protein from potato[J]. *J Biol Chem*, 277(6), 4 206-4 214.  
Akezawa D, Liu ZH, An G, et al. 1995. Calmodulin gene family in potato; developmental and touch-induced expression of the mRNA encoding a novel isoform[J]. *Plant Mol Biol*, 27(4): 693-703.  
Antosiewicz DM, Polisensky DH, Braam J. 1995. Cellular localization of the Ca<sup>2+</sup> binding TCH3 protein of *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 8(6): 623-636.  
Askerlund P, Evans DE. 1992. Reconstitution and characterization of a calmodulin-stimulated Ca<sup>2+</sup> pumping ATPase purified from *Brassica oleracea* L. [J]. *Plant Physiol*, 100 (4): 1 670-1 681.  
Barnett MJ, Long SR. 1990. Nucleotide sequence of an alfalfa calmodulin cDNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 18(11): 3 395.  
Berridge MJ. 1987. Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers[J]. *Annu Rev Biochem*, 56(1): 159-193.  
Bowler C, Neuhaus G, Yamagata H, et al. 1994. Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction [J]. *Cell*, 77(1): 73-78.  
Bown AW, Shelp BJ. 1997. The metabolism and function of g-aminobutyric acid[J]. *Plant Physiol*, 115(1): 1-5.  
Chandra A, Thungapathra M, Upadhyaya KC. 1994. Molecular cloning and characterization of a calmodulin gene from *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Plant Biochem Biotachnol*, 3 (1): 31-35.  
Chen SR(陈绍荣), Han HM(韩红梅), Lu YT(吕应堂). 1998. In situ localization mRNA and protein in the developing anthers and pistils in rice(钙调素 mRNA 和蛋白在水稻花药和雌蕊发育过程中的原位定位)[J]. *Act Bot Sin(植物学报)*, 40(12): 1 087-1 092.  
Choi YJ, Cho EK, Lee SI, et al. 1996. Developmentally regulated expression of the rice calmodulin promoter in transgenic tobacco plants[J]. *Mol Cells*, 6(3): 541-546.  
Chye ML, Liu CM, Tan CT. 1995. A cDNA clone encoding *Brassica* calmodulin[J]. *Plant Mol Biol*, 27: 415-423.  
Collins K, Sellers JR, Matsudaira P. 1990. Calmodulin dissociation regulates brush border myosin I (110kD-calmodulin) mechanochemical activity *in vitro* [J]. *J Cell Biol*, 110(4): 1 137-1 147.  
Corneliusson B, Holm M, Wakterson Y, et al. 1994. Calcium/calmodulin inhibition of basic helix-loop-helix transcription factor domains[J]. *Nature*, 368(6473): 760-764.  
Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, et al. 1997. Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration[J]. *Nature*, 386: 355-358.  
Durso NA, Cyr RJ. 1994. A calmodulin-sensitive interaction between microtubules and a higher plant homolog of elongation factor-1 alpha[J]. *Plant Cell*, 6(6): 893-905.  
Enslin H, Sun PQ, Brickley D, et al. 1994. Characterization of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IV: role in transcriptional regulation[J]. *J Biol Chem*, 269(22): 15 520-15 527.  
Fisher DD, Gilroy S, Cyr RJ. 1996. Evidence for opposing effects of calmodulin on cortical microtubules [J]. *Plant Physiol*, 112(3): 1 079-1 087.  
Gawienowski MC, Szymanski D, Perera IY, et al. 1993.

- Calmodulin isoforms in *Arabidopsis* encoded by multiple divergent mRNAs[J]. *Plant Mol Biol*, **22**(2): 215-225.
- Gawienowski MC, Zielinski RE. 1996. Calmodulin isoforms differentially enhance the binding of cauliflower nuclear proteins and recombinant TGA3 to a region derived from the *Arabidopsis* CaM-3 promoter[J]. *Plant Cell*, **8**(6): 1 069-1 077.
- Gilroy S, Jones RL. 1993. Calmodulin stimulation of unidirectional calcium uptake by the endoplasmic reticulum of barley aleurone[J]. *Planta*, **190**(2): 289-296.
- Harding SA, Oh SH, Roberts DM. 1997. Transgenic tobacco expressing a foreign calmodulin gene shows an enhanced production of active oxygen species[J]. *EMBO J*, **16**(6): 1 137-1 144.
- Hsieh WL, Pierce WS, Sze H. 1991. Calcium-pumping ATPases in vesicles from carrot cells. Stimulation by calmodulin or phosphatidylserine and formation of a 120 kilodalton phosphoenzyme[J]. *Plant Physiol*, **97**(4): 1 535-1 544.
- Ito T, Hirano M, Akama K, et al. 1995. Touch-inducible genes for calmodulin and a calmodulin-related protein are located in tandem on a chromosome of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Cell Physiol*, **36**(11): 1 369-1 373.
- Janet Bream, Ronald W Davise. 1990. Rain, wind, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in *Arabidopsis*[J]. *Cell*, **60**(2): 357-364.
- Kinkema M, Wang HY, Schiefelbein J. 1994. Molecular analysis of the myosin gene family in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Mol Biol*, **26**(4): 1 139-153.
- Knight A, Kendrick-Jones J. 1993. A myosin-like protein from a higher plant[J]. *J Mol Biol*, **231**(1): 148-154.
- Li ST(李师弢), Chen SR(陈绍荣), Lu YT(吕应堂), et al. 1999. Using isolated embryo sacs and early proembryos or localization calmodulin mRNA before and after fertilization in *Nicotiana*(钙调素 mRNA 在受精前后分离的烟草胚囊内的定位)[J]. *Act Bot Sin*(植物学报), **41**(7): 686-689.
- Ling V, Assmann SM. 1992. Cellular distribution of calmodulin and calmodulin-binding proteins in *Vicia faba* L. [J]. *Plant Physiol*, **100**(3): 970-978.
- Lu YT, Hidaka H, Feldmann LJ. 1996. Characterization of a calcium/calmodulin-dependent protein kinase homolog from maize roots showing light-regulated gravitropism[J]. *Planta*, **199**(1): 18-24.
- Ma Li-geng, Sun Da-Ye. 1996. The extracellular reaction sites of calmodulin on pollen and pollen tubes of *Hippeastrum rutilum* He[J]. *Adv Natl Sci*, **6**: 505-509.
- Malmstrom S, Askerlund P, Palmgren MG. 1997. A calmodulin-stimulated Ca<sup>2+</sup>-ATPase from plant vacuolar membranes with a putative regulatory domain at its N-terminus [J]. *FEBS Lett.*, **400**(2): 324-328.
- Mattews RP, Guthrie CR, Wailes LM, et al. 1994. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase types II and IV differentially regulate CREB-dependent gene expression [J]. *Mol Cell Biol*, **14**(1): 107-116.
- Mariana LM, Liliana B. 2001. A rice membrane-bound calcium-dependent protein kinase is activated in response to low temperature[J]. *Plant Physiol*, **125**(4): 1 442-1 449.
- Neuhaus G, Bower C, Kern R, et al. 1993. Calcium/calmodulin-dependent and calcium/calmodulin-independent phytochrome signal transduction pathways[J]. *Cell*, **73**(4): 937-952.
- Okamoto H, Tanaka Y, Sakai S. 1995. Molecular cloning and analysis of the cDNA for an auxin-regulated calmodulin gene [J]. *Plant Cell Physiol*, **36**(10): 1 531-1 539.
- Patil S, Takezawa D, Poovaiah BW. 1995. Chimeric plant calcium/calmodulin-dependent protein kinase gene with a neural visinin-like calcium-binding domain[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**(11): 4 897-4 901.
- Poovaiah BW, Reddy ASN. 1993. Calcium and signal transduction in plants[J]. *CRC Crit Rev Plant Sci*, **12**(3): 185-211.
- Poovaiah BW. 1999. Protein Kinase With a Homolog of Eukaryotic Elongation factor-1 [M]. ASGSB Annual Meeting Abstracts.
- Raymond E, Zielinski. 1998. Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **49**(3): 697-725.
- Rasi-Caldogno F, Carnelli A, De Michelis MI. 1993. Controlled proteolysis activates the plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump of higher plants. A comparison of the effects of calmodulin in plasma membrane from radish seedlings[J]. *Plant Physiol*, **103**(2): 385-390.
- Rasi-Caldogno F, Carnelli A, De Michelis MI. 1995. Identification of the plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase and of its autoinhibitory domain[J]. *Plant Physiol*, **108**(1): 105-113.
- Rhoads AR, Friedberg F. 1997. Sequence motifs for calmodulin recognition[J]. *FASEB J*, **11**(5): 331-340.
- Roberts DM, Harmon AC. 1992. Calcium-modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **43**(2): 375-414.
- Schuurink RC, Chan PV, Jones RL. 1996. Modulation of calmodulin mRNA and protein levels in barley aleurone[J]. *Plant Physiol*, **111**(2): 371-380.
- Snedden WA, et al. 1996. Activation of a recombinant petunia glutamate decarboxylase by calcium/calmodulin or by a non-clonal antibody which recognizes the calmodulin binding domain[J]. *J Biol Chem.*, **271**(8): 4 148-4 153.
- Sinclair W, Oliver I, Maher P, et al. 1996. The role of calmodulin in the gravitropic response of the *Arabidopsis thaliana* agr-3 mutant[J]. *Planta*, **199**(2): 343-351.
- Szymanski DB, Liao B, Zielinski RE. 1996. Calmodulin isoforms differentially enhance the binding of cauliflower nuclear proteins and recombinant TGA3 to a region derived from the *Arabidopsis* CaM-3 gene promoter[J]. *Plant Cell*, **8**(6): 1 266-1 273.
- Trewavas AJ, Malho R. 1997. Signal perception and transduction: the origin of the phenotype[J]. *Plant Cell*, **9**(7): 1 181-1 195.
- Watillon B, Kettmann R, Boxus P, et al. 1992. Cloning and characterization of an apple (*Malus domestica* (L) Borkh) calmodulin gene[J]. *Plant Sci*, **82**(2): 201-212.
- Watillon B, Kettmann R, Boxus P, et al. 1993. A calcium/calmodulin-binding serine/threonine protein kinase homologous to the mammalian type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase is expressed in plant cells[J]. *Plant Physiol*, **101**(4): 1 381-1 384.
- Xing T, Higgins VJ, Blumwald E. 1997. Race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum* promote translocation of cy-

休眠期,待这种抑制作用消除后,种子才能萌发。种胚的离体培养不仅可以打破种子的休眠和缩短育种周期,而且还可以解决远缘杂种胚不能正常发育的难题,所以本实验结果也为将来圆瓣姜花的新品种培育奠定了一定的基础。

通常认为细胞分裂素与生长素的比例决定外植体的分化再生的方向,较高的细胞分裂素与生长素的比例将诱导外植体分化芽(Skoog等,1957)。在本试验中,细胞分裂素 6-BA 与生长素 NAA 的比例较高时确实可以大大提高丛生芽的增殖系数,但它们的比例也不宜过高,如果这种比例过高,反而会抑制丛生芽的增殖,以 6-BA 4.0 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.2 mg · L<sup>-1</sup> 效果最佳;在试管苗诱导生根方面已有文献报道,1/2MS 培养基对试管植物的长根具有促进作用(谭文澄等,1991),在本实验中采用 1/2MS 培养基附加 0.5 mg · L<sup>-1</sup> IBA 在诱导生根时也取得了很好的效果,生根率达 97.7%;圆瓣姜花试管苗的移栽基质适应性比较广,但以疏松透气,有机质含量高的基质为佳,移栽 1 个月后观察,植株叶色浓绿,生长健壮,长势良好。

#### 参考文献:

- 朱至清. 2003. 植物细胞工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 39.
- 李浚明. 1992. 组织培养教程[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 40-43.
- 吴德邻. 1981. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 16(2): 30-31.
- 谭文澄, 戴策刚. 1991. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 99-199.
- Chen W(陈薇), He JM(和江明), Cun SX(寸守统). 2002. Tissue culture of stem apexes of *Hedychium forrestii*(圆瓣姜花茎尖组织培养)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), 38(2): 146.
- Endress Peter K. 1994. Diversity and evolutionary biology of tropical flowers[M]. Cambridge University Press, 358-365.
- Hu YJ(胡玉姬), Chen SZ(陈升振), Xian YL(羡蕴兰). 1990. Tissue culture of *Alpinia zerumbet* cv. *Variegata*(花叶艳山姜的组织培养)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), (4): 50-51.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures [J]. *Physiol Plant*, 15: 473-497.
- Raghavan V. 2003. One hundred years of zygotic embryo culture investigations[J]. *In vitro cellular and developmental biology-plant*, 39(5): 437-442.
- Skoog F, Miller CO. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue culture *in vitro* [J]. *Symp Soc Exp Biol*, 11: 118-131.
- Xian YL(羡蕴兰), Hu YJ(胡玉姬), Chen SZ(陈升振), et al. 1989. Tissue culture and plantlet regeneration of *Hedychium coccineum*(红姜花的组织培养和植株再生)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), (1): 43-44.
- Zeng SJ(曾宋君), Liu N(刘念), Peng XM(彭小明). 1999. Tissue culture and rapid propagation of *Curcuma kwangsiensis*(官粉郁金的组织培养和快速繁殖)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), 35(1): 37-38.
- Zhao Q(赵庆), Hao XJ(郝小江), Chen YZ(陈耀祖), et al. 1995. Studies on diterpenoid constituents of *Hedychium forrestii* and their cytotoxic activity(圆瓣姜花的二萜化合物及其细胞毒性研究)[J]. *Acta Pharm Sin*(药学报), 30(2): 119-122.
- tosolic components of NADPH oxidase to the plasma membrane of tomato cells[J]. *Plant Cell*, 9(2): 249-259.
- Yang JC, Gynheung AN. 1999. Structural Organization of Rice Calmodulin Genes[M]. *Rice Genetics Newsletters*; 41.
- Yang TB, Segal G, Abbo S, et al. 1996. Characterization of the calmodulin gene family in wheat: structure, chromosomal location, and evolutionary aspects[J]. *Mol Gen Genet*, 252(4): 684-694.
- Yang J(杨军), Zhao J(赵洁), Liang SP(梁世平). 2002. Changes of calmodulin distribution in the embryo sac of *Oryza sativa* before and after fertilization: an immunogold electron microspore study(水稻受精前后胚囊内钙调素分布的变化: 免疫金电镜观察)[J]. *Act Bot Sin*(植物学报), 43(3): 264-272.
- Yang T, et al. 1998. Developmentally regulated organ, tissue, and cell-specific expression of calmodulin genes in common wheat[J]. *Plant Mol Biol*, 37(1): 109-120.
- Yusuke S, Natssuko K, Keiki I, et al. 2001. A Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase that endows rice plants with cold-and salt-stress tolerance function in vascular bundles[J]. *Plant Cell Physiol*, 42(11): 1 228-1 233.
- Zhao J(赵洁), Zhou C(周嫻), Yang HY(杨弘远). 1998. Distribution of membrane-bound calcium and activated calmodulin in isolated zygotes and young embryos of *Triticum aestivum*(小麦分离合子与幼胚中膜钙和钙调素的分布)[J]. *Act Bot Sin*(植物学报), 48(1): 28-32.
- Zimmer WE, Schloss JA, Silflow CD, et al. 1988. Structural organization, DNA sequence, and expression of the calmodulin gene[J]. *J Biol Chem*, 263(36): 19 370-19 383.

(上接第 273 页 Continue from page 273)