

G 蛋白可能参与细胞外钙调素 促进蚕豆气孔关闭的过程*

陈玉玲** 肖玉梅 陈 珈 王学臣***

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

摘要 存在于蚕豆保卫细胞质外体的细胞外钙调素(CaM)具有调控气孔运动的重要作用. 以蚕豆表皮条为材料, 利用激光共聚焦显微技术以及表皮条的生物分析方法研究了细胞外 CaM 促进气孔关闭的机理. 实验结果表明, 细胞外 CaM 能诱导保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高, 且升高程度随细胞外 Ca^{2+} 浓度的升高而增加; 使用 Ca^{2+} 通道抑制剂的结果表明细胞外 CaM 诱导保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高的过程以细胞外 Ca^{2+} 内流为主. 利用 G 蛋白抑制剂 PTX 和激活剂 CTX 后发现, PTX 能抑制细胞外 CaM 诱导的保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高和气孔关闭, CTX 也能通过诱导保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高来促进气孔关闭, 且 Ca^{2+} 主要来源于细胞外. 说明 G 蛋白可能参与了细胞外 CaM 促进气孔关闭的过程. 根据以上结果我们提出了细胞外 CaM 调控气孔运动的可能模式: 细胞外 CaM 可能通过激活保卫细胞 G 蛋白打开质膜 Ca^{2+} 通道, 诱导细胞外 Ca^{2+} 内流, 导致气孔关闭.

关键词 蚕豆 细胞外 CaM $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ CTX PTX

在缺水情况下, 植物可以通过调控气孔的开关来决定如何充分利用植物体内的水分, 既能尽量减少水分散失, 又能保证光合作用等代谢过程的正常进行. 气孔的开关运动受到多种因子的调控, 目前的研究表明脱落酸(ABA), 光, Ca^{2+} , 离子通道, 细胞骨架, H_2O_2 , NO, 蛋白激酶和磷酸酶等都在气孔开关运动中起到重要的作用^[1, 2]. 我们最近的研究表明蚕豆保卫细胞外存在 CaM, 且细胞外 CaM 能够促进气孔关闭过程^[3], 但其作用机理尚待探讨. 本文以蚕豆表皮条为材料, 利用激光共聚焦显微技术和表皮条生物分析方法, 研究了 G 蛋白和 Ca^{2+} 在细胞外 CaM 促进气孔关闭中的作用.

1 材料和方法

1.1 植物材料培养

蚕豆(*Vicia faba* L.)种子用 0.1% HgCl 消毒后浸泡 24 h, 然后在 25℃ 培养箱中催芽 2~3 d, 待胚

根长至 0.5 cm 时, 培养在营养土中(营养土:蛭石=2:1). 温室条件: 光/暗周期为 12 h/12 h, 光照强度为 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 温度为 22℃/17℃, 相对湿度为 70%. 培养期间无任何水分胁迫. 取生长 3~4 周幼苗顶端完全展开的叶子进行实验.

1.2 保卫细胞内 Ca^{2+} 浓度 ($[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$) 测定方法

Fluo-3 AM(Molecular Probe, USA)溶于二甲基亚砜, 使达到 1 mmol/L. 选取生长良好的 3~4 周幼苗顶端完全展开的叶片, 撕取下表皮, 置于 $10 \mu\text{mol/L}$ fluo-3 AM (10 mmol/L MES/Tris, pH 6.1)中, 在 4℃ 细胞壁酯酶活性很低的情况下, 暗中孵育 2 h; 再在室温避光条件下放置 1 h, 在此期间, 胞内的酯酶将进入细胞内的 fluo-3 AM 的乙酰甲酯(AM)水解掉, 使 fluo-3 能与胞内的自由 Ca^{2+} 结合, 从而反应其动态变化. 用缓冲液多次冲洗表皮条, 然后置于 0.1, 1, 10 mmol/L $CaCl_2$ (10 mmol/L MES/Tris, 50 mmol/L KCl, pH 6.1)缓冲液中 30 min 以上, 使细胞内外

2002-11-19 收稿, 2003-01-09 收修改稿

* 国家重点基础研究发展规划资助项目(批准号: G1999011700)

** 现通讯地址: 河北师范大学生命科学学院, 石家庄 050016

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

Ca^{2+} 达到平衡. 以后实验溶液的组分均为 50 mmol/L KCl, 1 mmol/L CaCl_2 (10 mmol/L MES/Tris, pH 6.1).

处理好的表皮条置于显微镜下观察, 先在荧光镜下找到合适的视野, 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: (1) 预扫描, 用 10^{-8} mol/L CaM 或 400 ng/mL CTX (Calbiochem USA) 处理; (2) 400 ng/mL PTX (Calbiochem USA) 溶液预处理 30 min, 预扫描, 再用 10^{-8} mol/L CaM 处理; (3) 2 mmol/L EGTA 溶液预处理 10 min, 用不含 Ca^{2+} 的溶液清洗, 预扫描, 再用 10^{-8} mol/L CaM 处理; (4) 分别用 1 mmol/L LaCl_3 , 1 $\mu\text{mol/L}$ 尼群地平 (NIF), 2 $\mu\text{mol/L}$ 异博定, 50 $\mu\text{mol/L}$ 钆红溶液预处理 30 min, 预扫描, 再用 10^{-8} mmol/L CaM 或 400 ng/mL CTX 处理; 继续记录荧光变化图像及数据. 在 LaserSharp Processing 下处理图像, 在 Excel 下处理数据, 作曲线图. 激发波长为 488 nm, 发射波长为 535 nm.

1.3 表皮条的生物分析

撕取蚕豆下表皮, 用毛笔轻轻刷去残存的叶肉细胞, 在 50 mmol/L KCl (10 mmol/L MES/Tris, pH 6.1) 溶液中照光 90 min, 使气孔完全开放, 然后于室内光照条件下进行不同处理: (1) 2 mmol/L EGTA 溶液预处理 10 min 后, 用含及不含 10^{-8} mol/L CaM 的 0, 0.1, 1, 10 mmol/L CaCl_2 溶液 (10 mmol/L MES/Tris, 50 mmol/L KCl, pH 6.1) 处理 2 h; (2) 用含 1 mmol/L LaCl_3 , 1 $\mu\text{mol/L}$ NIF, 2 $\mu\text{mol/L}$ 异博定, 50 $\mu\text{mol/L}$ 钆红溶液 (10 mmol/L MES/Tris, 50 mmol/L KCl, 1 mmol/L CaCl_2 , pH 6.1) 预处理 30 min, 再用 10^{-8} mol/L CaM 溶液处理 2 h; (3) 400 ng/mL PTX 溶液预处理 30 min 后, 再用 10^{-8} mol/L CaM 溶液处理 2 h; (4) 用 100, 200, 300, 400 ng/mL CTX 溶液处理 2 h. 在光学显微镜下进行观察, 测量气孔孔径. 每个表皮条选取 5 个视野, 每个视野测量 10 个气孔的孔径. 实验重复 3 次, 取平均值, 计算标准偏差, $n = 150$.

2 结果

2.1 细胞外 CaM 对保卫细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的影响

孵育好的表皮条在含 0.1, 1, 10 mmol/L Ca^{2+} 的缓冲液中放置 30 min, 然后用 10^{-8} mol/L CaM 处理后, 细胞外 CaM 能诱导保卫细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高, 且当细胞外 Ca^{2+} 浓度不同时, 在处理的 800 s

内, CaM 引起保卫细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 增高的程度不同: 当细胞外 Ca^{2+} 浓度为 0.1 mmol/L 时, 相对荧光强度增加 40.7%; 细胞外 Ca^{2+} 浓度为 1 mmol/L 时, 相对荧光强度增加 54.4%; 细胞外浓度为 10 mmol/L 时, 相对荧光强度增加 63.3% (图 1, 图版 I A). 如果用 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA 将细胞外 Ca^{2+} 螯合掉,

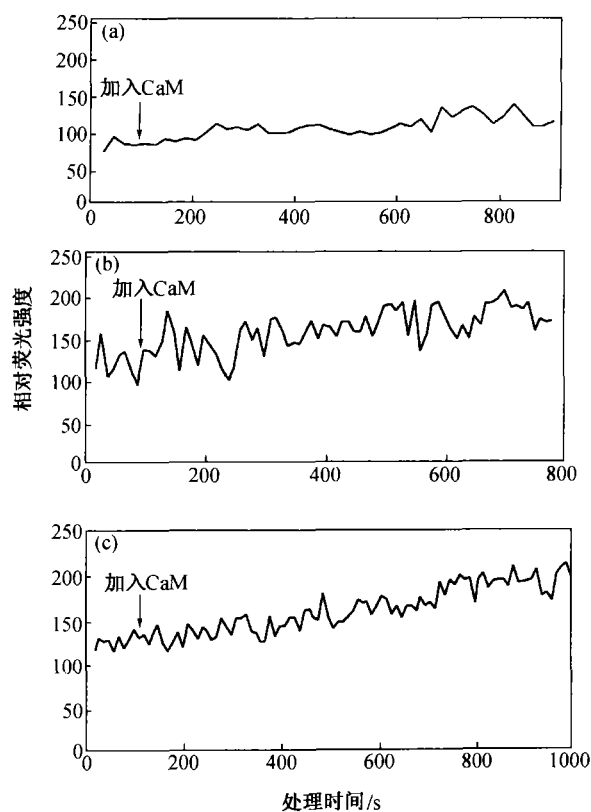


图 1 保卫细胞外 Ca^{2+} 浓度对细胞外 CaM 引起保卫细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 增加的作用

(a) Ca^{2+} 浓度 0.1 mmol/L; (b) Ca^{2+} 浓度 1 mmol/L;
(c) Ca^{2+} 浓度 10 mmol/L

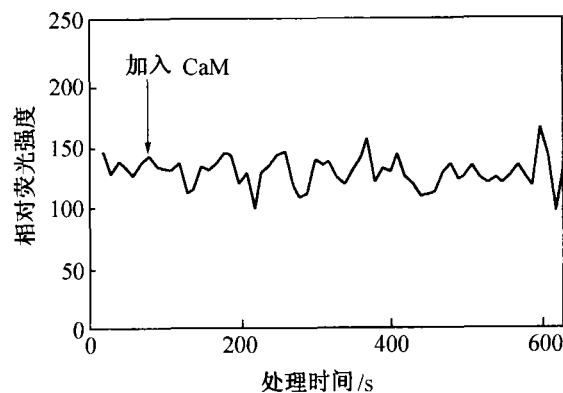


图 2 EGTA 处理后, 细胞外 CaM 影响保卫细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 变化的相对荧光强度

CaM 则不能引起保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 增高(图 2, 图版 I B). 提示细胞外 CaM 诱导保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高过程有细胞外 Ca^{2+} 内流. 表皮条生物分析的结果与保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的测量结果是一致的. 当保卫细胞外 Ca^{2+} 浓度不同时, 细胞外 CaM 促进气孔关闭的程度也不同. 用 EGTA 将细胞外 Ca^{2+} 螯合掉, 细胞外加入的 Ca^{2+} 浓度不同时, 细胞外 CaM 促进气孔关闭的程度不同: 溶液中不含 Ca^{2+} 时, 细胞外 CaM 不能促进气孔关闭; 当细胞外 Ca^{2+} 浓度为 0.1 mmol/L 时,

气孔孔径是对照的 74.8%; 当细胞外 Ca^{2+} 浓度为 1 mmol/L 时, 气孔孔径是对照的 67.3%; 当细胞外 Ca^{2+} 浓度为 10 mmol/L 时, 气孔孔径是对照的 57.2% (图 3). 这一结果初步揭示了细胞外 CaM 促进气孔关闭的作用机理, 和其他促进气孔关闭的信号分子如 ABA, CO_2 等相似, 细胞外 CaM 也能通过诱导保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高促进气孔关闭, 且在这一过程中有细胞外 Ca^{2+} 的内流, 说明在细胞外 CaM 促进气孔关闭的过程中, Ca^{2+} 也能作为第二信使起作用.

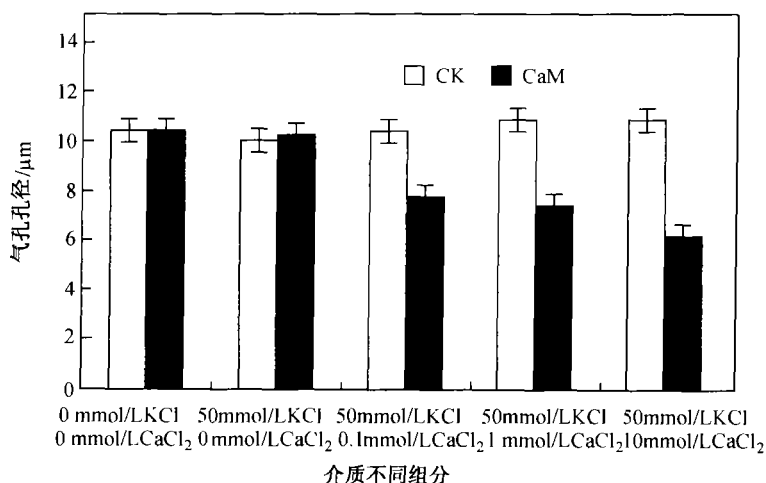


图 3 不同保卫细胞外 Ca^{2+} 浓度时的胞外 CaM 促进气孔关闭的程度

2.2 G 蛋白激活剂 CTX 和抑制剂 PTX 对细胞外 CaM 诱导保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 增加的影响

已有报道表明 G 蛋白参与 ABA 促进气孔关闭过程, 但 G 蛋白与 Ca^{2+} 的关系尚无直接证据. 我们的实验结果表明 G 蛋白激活剂 CTX 能引起保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高, 在处理的 800 s 内相对荧光强度

增加了 55.4%, 与细胞外 CaM 的作用效果相近(图版 4(a), 图版 I A); 而且 CTX 也能促进气孔关闭, 作用强度随 CTX 浓度的增加而增强, CTX 浓度为 400 ng/mL 时, 处理后气孔孔径是对照的 62.0% (图 4(b), 图版 I C). 而如果先用 G 蛋白抑制剂 PTX 预处理 30 min, 再用细胞外 CaM 处理, 则保卫

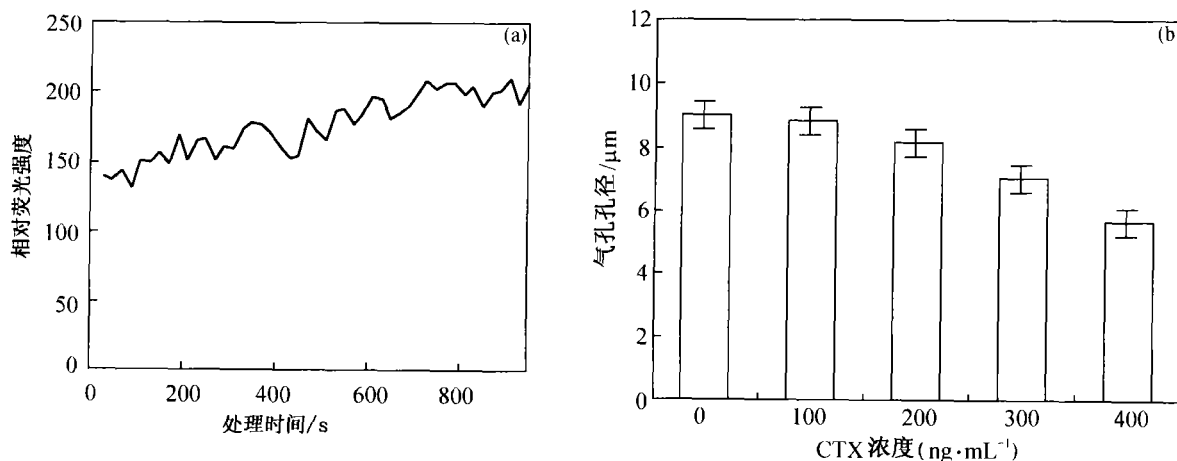


图 4 CTX 诱导保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高

(a) 相对荧光强度曲线; (b) 气孔关闭程度. bar = 10 μm

细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 基本不增加(图 5(a)); 而且 PTX 能抑制细胞外 CaM 促进的气孔关闭过程, 但 PTX 本身并不影响气孔开度(图 5(b)). 说明 G 蛋白可能参

与了细胞外 CaM 诱导保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高和促进气孔关闭的过程.

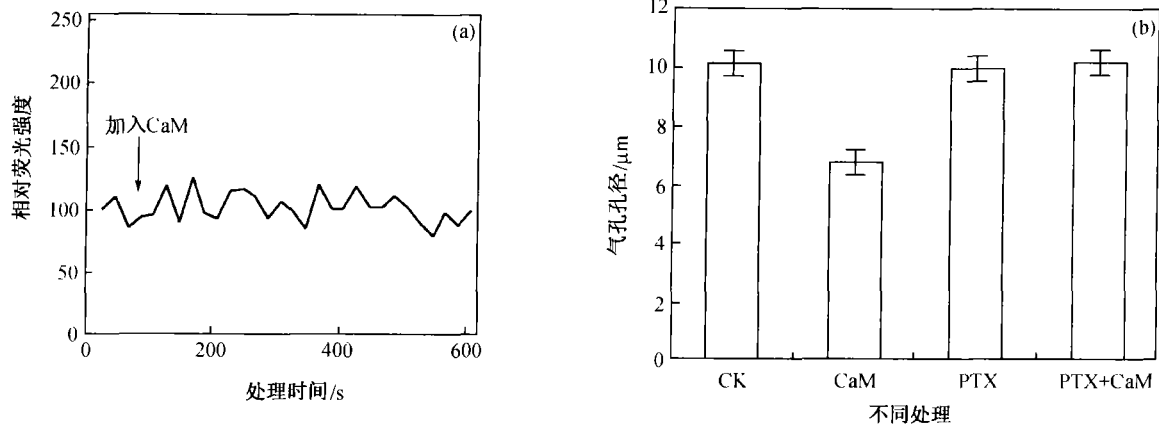


图 5 PTX 抑制细胞外 CaM 诱导的保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高

(a) 相对荧光强度曲线; (b) 气孔关闭程度

2.3 Ca^{2+} 通道抑制剂对 CaM 和 CTX 诱导保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高过程的影响

CaM 和 CTX 能诱导保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高, 但 Ca^{2+} 是源于细胞内还是细胞外呢? 我们用质膜 Ca^{2+} 通道抑制剂 $LaCl_3$, NIF, 异博定和细胞内 Ca^{2+} 通道抑制剂钆红处理孵育好的表皮条, 然后再用 CaM 或 CTX 处理, 观察保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的变化, 以确定 Ca^{2+} 的来源. 表 1 显示加入质膜 Ca^{2+} 通道抑制剂 $LaCl_3$, NIF, 异博定后, 细胞外 CaM 和 CTX 基本不能引起保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高, 说明细胞外 CaM 和 CTX 引起保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高主要来源于细胞外. 而用细胞内 Ca^{2+} 通道抑制剂钆红处理后, 细胞外 CaM 和 CTX 还能引起保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高, 但升高幅度变小; CaM 和 CTX 处理后相对荧光强度分别增加了 21.2% 和 17.2%, 说明细胞外 CaM 和 CTX 诱导保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 增高也有来源于细胞内的一部分 Ca^{2+} . 从这两方面的结果看, 细胞外 Ca^{2+} 内流在细胞外 CaM 和 CTX 引起保卫细胞内升高的过程中起着决定作用, 因为在质膜 Ca^{2+} 通道被抑制时, 即使细胞内 Ca^{2+} 通道仍正常开放, 细胞外 CaM 和 CTX 也不能诱导保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高; 细胞外 Ca^{2+} 进入细胞后, 还能引起细胞内 Ca^{2+} 库的 Ca^{2+} 进一步释放, 因为如果仅抑制胞内 Ca^{2+} 通道, 质膜 Ca^{2+} 通道仍正常开放时, 虽然细胞外 Ca^{2+} 仍能正常进入, 保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高幅度不能达到不使用 Ca^{2+} 通道抑制剂

的水平. 气孔孔径测量结果表明, $LaCl_3$, NIF, 异博定能抑制细胞外 CaM 和 CTX 诱导的气孔关闭, 而钆红只能部分抑制细胞外 CaM 和 CTX 诱导的气孔关闭(图 6). 这与保卫细胞内 Ca^{2+} 浓度的测定结果一致.

表 1 Ca^{2+} 通道抑制剂对细胞外 CaM 和 CTX 诱导保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 增加的影响

不同处理	CaM(相对荧光强度)		CTX(相对荧光强度)	
	处理前	处理后	处理前	处理后
$LaCl_3$	171.0 ± 14.5	175.9 ± 9.4	113.0 ± 14.9	106.0 ± 14.3
NIF	149.0 ± 14.0	141.4 ± 15.5	122.0 ± 13.0	118.4 ± 13.4
异博定	176.2 ± 6.2	178.1 ± 8.6	110.2 ± 9.8	111.4 ± 10.2
钆红	138.5 ± 16.5	167.7 ± 11.8	183.3 ± 5.0	214.7 ± 5.0

3 讨论

近年来的研究表明, 有些多肽类物质能在植物细胞外作为信号分子调节植物的生长、发育和对外界刺激的反应等. 其中细胞外钙调素作为多肽信使在植物细胞外的存在及对细胞增殖、花粉萌发、基因表达的影响已进行了广泛的研究^[4-8], 但这些研究主要集中在植物的发育过程中. 气孔的开关运动受多种因子调节, 研究多肽类物质作为细胞外信使调节气孔运动一方面可丰富我们对细胞外 CaM 功能的认识, 另一方面能使我们气孔运动机理的理解更深入、也更全面. 我们已经用免疫胶体金标记电镜及免疫荧光显微技术, 证明了蚕豆下表皮的保卫细胞和表皮细胞外都存在 CaM, 而且内源细胞外 CaM 能抑制气孔开放, 促进气孔的关闭过程^[3]. 本

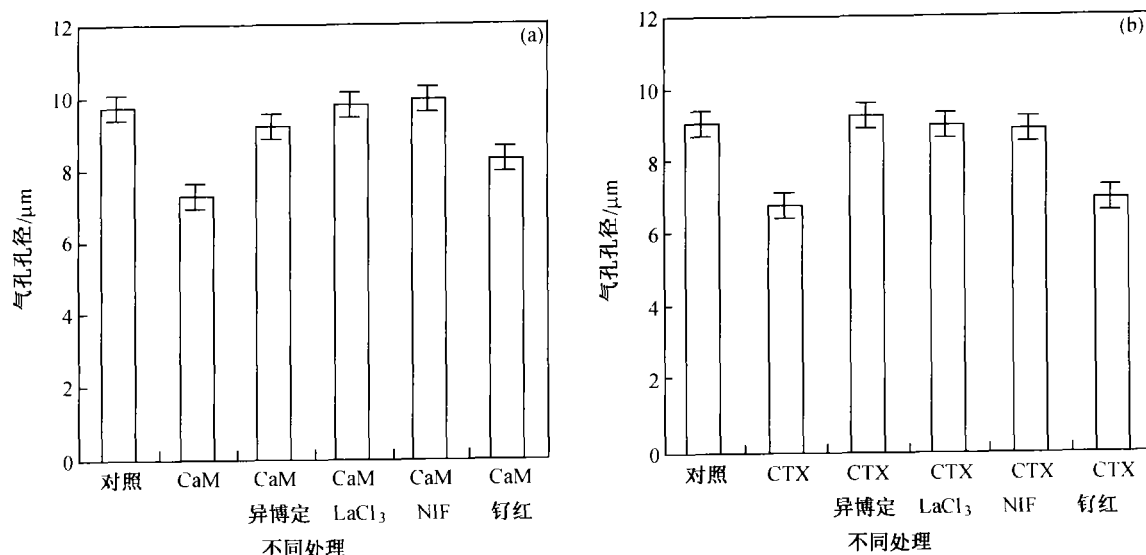


图6 Ca²⁺通道抑制剂对细胞外CaM(a)和CTX(b)诱导气孔关闭的影响

文对细胞外CaM促进气孔关闭的机理进行了研究。

保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 能作为多种刺激的第二信使调节气孔运动,它能否在细胞外CaM促进气孔关闭的过程中起作用呢?为此我们记录了细胞外CaM处理后保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的变化。结果表明,细胞外CaM能诱导保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 增加,这和细胞外CaM诱导百合花粉 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高的结果相似^[9]。已有报道表明,保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 增加后,可以抑制内向K⁺通道活性,激活外向K⁺通道和阴离子通道,导致K⁺,Cl⁻等离子外流,促进气孔关闭^[11]。从本文的结果可以推测,Ca²⁺很可能作为第二信使介导了细胞外CaM促进气孔关闭的过程。这一结果和其他促进气孔关闭的物质如ABA的情况相似,也说明细胞外CaM促进气孔关闭的信号成分和ABA的有共同之处。

关于保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 增加的来源,不同刺激可能是不同的。如MacRobbie等^[10]在研究ABA诱导保卫细胞液泡K⁺释放的过程中,发现ABA启动K⁺外流要求 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 达到一定的域值,但高浓度ABA(100 μmol/L)主要诱导细胞外Ca²⁺内流,低浓度ABA(10 μmol/L)主要诱导细胞内Ca²⁺库释放Ca²⁺。Wood等^[11]报道不同的刺激如ABA,机械刺激,低温等都诱导保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 变化,但不同刺激诱导保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 变化的Ca²⁺来源也是不同的:ABA和机械刺激诱导的保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 增加主要源于细胞内,低温诱导保卫细胞

$[Ca^{2+}]_{cyt}$ 增加主要源于细胞外。本实验中,细胞外CaM诱导保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 增加的幅度及促进气孔关闭的程度都依赖于细胞外Ca²⁺浓度,暗示细胞外CaM诱导保卫细胞内增加的Ca²⁺主要源于细胞外。我们用Ca²⁺通道抑制剂进一步研究了细胞外CaM诱导保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 增加的来源:当质膜上Ca²⁺通道被阻断、细胞内Ca²⁺通道仍正常打开时,细胞外CaM不能诱导保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 增加;在细胞内Ca²⁺通道被抑制、质膜Ca²⁺通道仍打开的情况下,细胞外CaM仍能诱导保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 增加,但增加幅度下降。说明细胞外CaM诱导保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 增加主要来源于细胞外,但进入细胞内的Ca²⁺可能还要进一步引起胞内Ca²⁺库释放Ca²⁺。

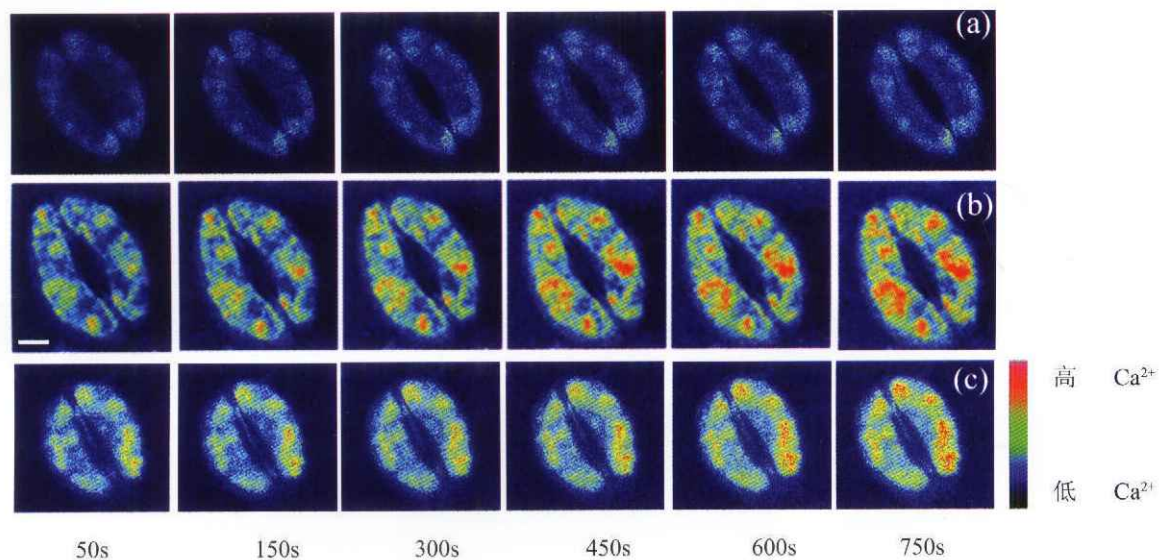
异三聚体G-蛋白在动物和微生物的信号转导途径中起着重要作用。目前很多证据都表明植物细胞中也存在异三聚体G-蛋白。一些植物的微囊泡或质膜对GTP有高亲和性,含有能被ADP核糖基化的多肽,并能与Gα亚基的抗血清起交叉反应^[12]。现在已从几种植物中分离出编码G蛋白的基因,可能至少存在10种以上Gα亚基,6种以上Gβ亚基,2种Gγ亚基^[13]。关于植物细胞中G-蛋白的功能,目前已证明G-蛋白参与调节细胞外CaM促进花粉萌发和诱导不依赖光的rbcS基因表达的过程^[14,15];也有报道表明G蛋白能调节苔藓细胞的Ca²⁺通道^[16]。拟南芥Gα亚基插入突变能导致保卫细胞的

内向 K^+ 通道对 ABA 的反应减弱, 而且 ABA 不能激活阴离子通道, 导致这种突变体的水分丢失远远高于野生型, 为 G-蛋白参与保卫细胞 ABA 信号转导提供了直接证据^[17]. 药理学实验结果表明 G-蛋白激活剂 GTP γ S, CTX, mas7 能抑制内向 K^+ 通道的活性^[18, 19], 但如果将细胞内的 Ca^{2+} 浓度缓冲到比较低的水平, 这种抑制作用将被消除, 说明 G 蛋白可能通过诱导 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高来抑制内向 K^+ 通道的活性. 但目前尚无 G 蛋白与保卫细胞内 Ca^{2+} 增加相关的直接证据, 也有少数证据表明 G 蛋白可能不通过第二信使而直接调节 K^+ 通道活性^[20]. 我们的实验结果表明, G-蛋白激活剂 CTX 也能诱导保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高, 而 G-蛋白抑制剂 PTX 能抑制细胞外 CaM 诱导的保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高过程; 同时 CTX 能促进气孔关闭, PTX 能抑制细胞外 CaM 促进的气孔关闭. 这些结果说明 G-蛋白激活后能通过诱导保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高促进气孔关闭, 而 G-蛋白活性被抑制后, 细胞外 CaM 不能促进气孔关闭, 表明 G-蛋白介导了细胞外 CaM 促进气孔关闭的过程. Ca^{2+} 通道抑制剂使用结果表明, 质膜 Ca^{2+} 通道抑制剂 $LaCl_3$, NIF, 异博定都抑制 CTX 诱导保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高的过程, 而细胞内 Ca^{2+} 通道抑制剂钆红部分抑制 CTX 诱导保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的升高. 这种效果和它们对细胞外 CaM 作用的影响是一致的, 进一步说明 G-蛋白参与了细胞外 CaM 诱导气孔关闭的过程.

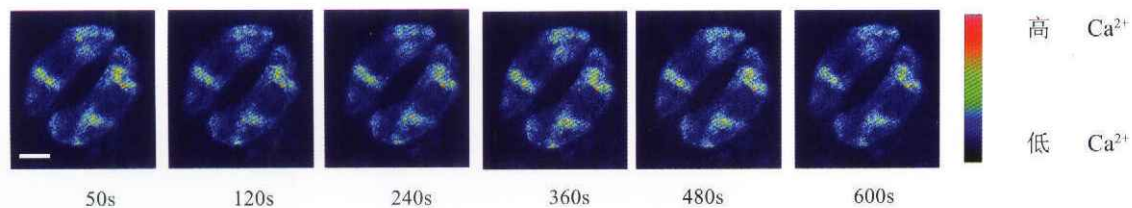
本研究初步证明细胞外 CaM 通过诱导保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高促进气孔关闭, 且 Ca^{2+} 主要源于细胞外; G-蛋白可能通过诱导保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高介导了细胞外 CaM 促进气孔关闭的过程. 在细胞外 CaM 诱导气孔关闭的过程中, 通过哪些途径动员细胞内 Ca^{2+} 库释放 Ca^{2+} , 另外, 还有哪些信号分子参与了细胞外 CaM 促进气孔关闭的过程, 这些问题还有待于进一步研究.

参 考 文 献

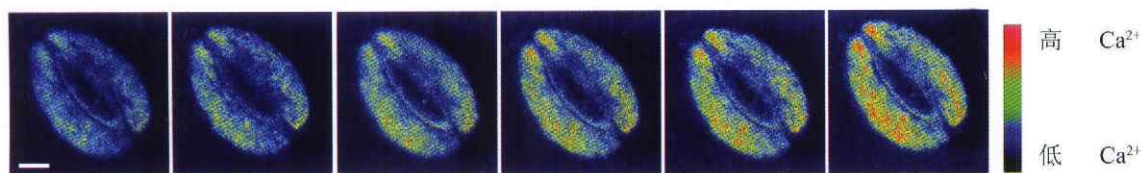
- Schroeder J I, et al. Guard cell signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2001, 52: 627
- 刘 新, 等. 在调控气孔运动中过氧化氢和一氧化氮信号途径的交叉. *自然科学进展*, 2003, 13 (4):
- Chen Y L, et al. Existence of extracellular calmodulin in lower epidermis of *Vicia faba* L. and its role in regulation of stomatal movements. *Acta Bot Sin*, 2003, 1: 40
- 叶正华, 等. 小麦细胞壁钙调素初步研究. *科学通报*, 1988, 33 (8): 624
- 叶正华, 等. 小麦黄化胚芽鞘的细胞壁钙调素和钙调素结合蛋白. *植物生理学报*, 1989, 15: 223
- Sun D Y, et al. Extracellular calmodulin accelerates the proliferation of suspension-cultured cells of *Angelica dahurica*. *Plant Sci*, 1994, 99: 1
- Sun D Y, et al. The effect of extracellular calmodulin on cell wall regeneration of protoplasts and cell division. *Plant Cell Physiol*, 1995, 36: 133
- Ma L G, et al. The presence of a heterotrimeric G protein and its role in signal transduction of extracellular calmodulin in pollen germination and tube growth. *Plant Cell*, 1999, 11: 1351
- 尚忠林, 等. 细胞外钙调素对百合花粉细胞内钙离子浓度的影响. *植物学报*, 2001, 43(1): 12
- MacRobbie EAC. ABA activates multiple Ca^{2+} fluxes in stomatal guard cells, triggering vacuolar K^+ (Rb^+) release. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(22): 12361
- Wood N T, et al. The characterization of differential calcium signaling in tobacco guard cells. *Plant J*, 2000, 24 (3): 335
- Ma H. GTP-binding proteins in plants: New members of an old family. *Plant Mol Biol*, 1994, 26: 1611
- Assman S M. Heterotrimeric and unconventional GTP binding proteins in plant cell signaling. *Plant Cell*, 2002, Supplement: 355
- Ma L G, et al. The presence of a heterotrimeric G protein and its role in signal transduction of extracellular calmodulin in pollen germination and tube growth. *Plant Cell*, 1999, 11: 1351
- 郭 毅, 等. 异三聚体 G 蛋白在细胞外钙调素调控 rbcS 基因表达中的作用. *科学通报*, 2000, 45(10): 2195
- Schumaker K S, et al. G proteins regulate dihydropyridine binding to moss plasma membranes. *J Biol Chem*, 1996, 271: 21292
- Wang X Q, et al. G protein regulation of ion channels and abscisic acid signal in *Arabidopsis* guard cells. *Science*, 2001, 292: 2070
- Fairley-Grenot K, et al. Evidence for G-protein regulation of inward K^+ channel current in guard cells of fava bean. *Plant Cell*, 1991, 3: 1037
- Armstrong F, et al. Evidence for K^+ channel control in *Vicia* guard cells coupled by G-proteins to a 7TMS receptor mimetic. *Plant J*, 1995, 8: 187
- Brown A M. Membrane-delimited cell signaling complexes: Direct ion channel regulation by G proteins. *J Membr Biol*, 1993, 131: 93



A 保卫细胞外Ca²⁺浓度不同时, 细胞外CaM引起保卫细胞[Ca²⁺]_{cyt}变化的图像
(a) Ca²⁺浓度0.1 mmol/L, (b) Ca²⁺浓度1 mmol/L, (c) Ca²⁺浓度10 mmol/L. bar=10 μm



B EGTA处理后细胞外CaM影响保卫细胞[Ca²⁺]_{cyt}变化的图像



C CTX诱导保卫细胞[Ca²⁺]_{cyt}升高的图像