

钙调素在 IAA 和 6-BA 诱导绿豆下胚轴 原生质体膨大过程中的含量变化

李德红* 王小菁 潘瑞炽

(华南师范大学生物系, 广州 510631)

摘要 含钙培养液和含激素培养液中的绿豆下胚轴原生质体在培养 30 min 时分别检测到钙调素 (CaM) 峰, 在含钙培养液中加入 IAA 或 6-BA, CaM 含量急剧降低, 这与先前的试验结果即 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 积累增多和体积膨大正好对应。异博定 (verapamil)、 LaCl_3 、EGTA 或 W_7 可使激素 + CaCl_2 处理的 CaM 含量不同程度地回升, 甚至接近或超过对照的水平。而 A23187 处理或 K^+ 、 Zn^{2+} 等代替 Ca^{2+} 则使 CaM 含量保持在与激素处理相似的低水平。这也与先前观察到的 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 积累和体积的变化相对应。表明钙调素在 IAA 和 6-BA 诱导绿豆下胚轴原生质体膨大过程中的确与 Ca^{2+} 共同起着调节作用。

关键词 钙调素; IAA; 6-BA; 原生质体膨大, 绿豆

中图分类号 Q942.6

CHANGES IN CONTENT OF CALMODULIN IN IAA- AND 6-BA-INDUCED SWELLING OF PROTOPLASTS FROM HYPOCOTYL IN ETIOLATED MUNG BEAN SEEDLINGS

Li Dehong Wang Xiaojing Pan Ruichi

(Department of Biology, South China Normal University, Guangzhou 510631)

Abstract Calmodulin (CaM) content in protoplasts cultured with CaCl_2 - or IAA (or 6-BA)-bearing medium raised after being incubated for 30 minutes. When treated with IAA (or 6-BA) + CaCl_2 , the CaM content decreased sharply, which just coincided with the increase of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ accumulation and protoplast swelling as indicated in our previous studies. Either verapamil, LaCl_3 , EGTA or W_7 could increase the low CaM content to an approximate or even higher value than that of control. A23187 and cations such as K^+ and Zn^{2+} , however, could reduce CaM level just as the influences of IAA or 6-BA with Ca^{2+} . It was also consistent with the changes of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ accumulation and protoplast volume. These results showed that CaM did act with Ca^{2+} during the modulation of protoplast swelling

国家自然科学基金资助项目 (No. 39470361)

* 联系地址: 华南师范大学激光生命科学研究所, 广州 510631.

缩写 Abbreviations: A23187: 钙离子载体 4-bromo-calcium ionophore; CPZ: 氯丙嗪 Chlorpromazine; EGTA: 乙二醇双乙胺醚 -N,N' 四乙酸 Ethyleneglycol-bis (β -aminoethyl ether) -N,N' -tetraacetic acid; ELISA: 酶联免疫吸附测定法 Enzyme-linked immuno-sorbent assay; TFP: 三氟噻嗪 Trifluoroperazine; W_7 : N-(6-氨基己基)-5-氯-1-萘-磺胺 N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalene-sulfonamide.

1998-06-21 收稿; 1998-11-15 修回

induced by IAA or 6-BA.

Key words Calmodulin; IAA; 6-BA; Protoplast swelling; Mung bean

我们先前的试验结果^[1,2]表明, IAA 和 6-BA 可诱导原生质体体积膨大和 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 积累增多, 外加异博定 (verapamil)、 LaCl_3 或 EGTA 阻止 Ca^{2+} 进入原生质体, 可减少原生质体内 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 积累, 削弱体积膨大效应。用 CaM 拮抗剂 TFP、CPZ 或 W_7 处理 IAA 或 6-BA 刺激的原生质体, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 积累和体积膨大效应也不同程度地受到抑制(另文发表)。但是, 高浓度的钙调素拮抗剂常具有非专一性的作用, 如影响质膜的稳定性、对靶酶单纯疏水性的抑制或对非 CaM 调节的酶也有抑制作用等^[3,4]。因此, CaM 拮抗剂的抑制效果不能作为 CaM 参与生理作用的直接证据, 它只表明一种可能性: CaM 很可能与 Ca^{2+} 结合在一起共同参与信号传递。根据 CaM 与靶酶作用的敏感性调节原理, 在一个生理过程中如果 CaM 数量发生变化, 很可能这个过程受 CaM 的影响。比如: 细胞有丝分裂期和 G_1 期、种子萌发及果实成熟的过程中 CaM 含量增加, 说明它们可能是受 CaM 调节的过程^[4-7]。为了进一步认识 CaM 在植物激素信号传递中的作用, 我们用酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定原生质体内的 CaM 含量, 以考察 CaM 在原生质体膨大中的作用和方式等。虽然目前植物 CaM 只有非 Ca^{2+} 依赖的抗体, 测得的是总 CaM 含量^[8], 应用有一定局限性, 但仍可得到 CaM 的一些重要信息。

1 材料与方 法

材料 按文献[1]所述方法培养绿豆 (*Phaseolus radiatus* L.) 的黄化幼苗, 取其下胚轴进行分离、纯化。得到的原生质体培养在含钙或不含钙的培养液中, 依次加入激素及其它相应试剂(详见各图表)。各试验处理完毕后立即冷冻 ($-10\text{ }^\circ\text{C}$) 以终止反应并破碎原生质体, 保存备用。

钙调素 (CaM) 含量的测定 参照文献[8]的酶联免疫吸附测定法(ELISA)略加改进。测定时原生质体在黑暗中 $20 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ 保温 30 min。每个测定三次重复。植物钙调素标准品、兔抗 CaM 血清和正常兔血清由河北师范大学生物系细胞生化研究室制备; 过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 由北京生物制品研究所制备; 酶底物液由中山医科大学附属第三医院传染病实验室郭万里老师惠赠。

蛋白质含量的测定 采用考马斯亮蓝 G-250 法^[9]。

2 结果

2.1 IAA 和 6-BA 对绿豆下胚轴原生质体内 CaM 含量的影响

含钙或不含钙培养液中的原生质体内 CaM 含量一般在 $250\text{ }\mu\text{g g}^{-1}\text{protein}$ 左右, 单独用 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的 IAA 或 6-BA 处理, 无钙培养液中的原生质体内 CaM 含量略有下降, 但与对照差异不明显 ($P > 0.05$) (表 1)。在含钙培养液中加入上述激素后, 原生质体内 CaM 含量急剧降低, 远远低于对照的水平 ($P < 0.01$)。在先前的试验中^[1,2], 我们已发现在含钙培养液中加入上述激素可使原生质体自由 Ca^{2+} 浓度提高, 体积明显膨大, 而且这种效应在处理后 30 min 时最好。 Ca^{2+} 在此过程中起着第二信使和渗透调节剂的作用, 即激素的生理作用依赖于 Ca^{2+} , 暗示 Ca^{2+} 与 CaM 含量变化在植物激素诱导原生质体体积膨大的过程中具有某种内在联系。

2.2 Ca²⁺ 等阳离子对 CaM 含量的影响

Ca²⁺ 是否 IAA 和 6-BA 引起原生质体 CaM 含量降低所必需的呢? 我们分别以 K⁺、Zn²⁺、Ba²⁺、Mg²⁺ 等替代 Ca²⁺。从图 1 可见, 激素对无钙培养液中原生质体的 CaM 含量影响不大(处理 2), 与表 1 中处理 3 和 4 相似。在分别含有以上阳离子的培养液中 IAA 或 6-BA(1 μmol/L) 均明显影响 CaM 含量, 它们都使之显著降低。其中 K⁺ 和 Zn²⁺ 的替代效果较好, 可使 IAA 和 6-BA 处理的原生质体 CaM 含量降低到与 Ca²⁺ 存在时相似的低水平, Ba²⁺ 和 Mg²⁺ 也有类似效应, 只是在 IAA 和 6-BA 之间表现不一致。Ca²⁺ 等阳离子对 CaM 的影响正好与其在激素对原生质体体积的影响试验中的作用相对应^[1,2]。

2.3 Verapamil 和 LaCl₃ 对原生质体内 CaM 的影响

在 Ca²⁺ 存在时激素处理使原生质体的 CaM 含量处于很低的水平。我们曾以 verapamil、LaCl₃ 阻止 Ca²⁺ 进入原生质体, 原生质体内 ⁴⁵Ca²⁺ 积累减少, 体积膨大效应减弱^[1,2]。用 La³⁺ 竞争抑制 Ca²⁺

表 2 Verapamil 和 LaCl₃ 对 IAA 处理的绿豆下胚轴原生质体内 CaM 含量的影响

Table 2 Effects of verapamil and LaCl₃ on CaM content in protoplasts from hypocotyls of mung bean seedlings treated with IAA

IAA	CaCl ₂	verapamil	LaCl ₃	CaM	%
(μmol/L)				(μg g ⁻¹ protein)	
1	0	250	0	244.23 ± 15.35	100
2	1	0	0	210.31 ± 44.13	86.11
3	1	250	0	55.63 ± 21.11	22.78
4	1	250	0.1	94.98 ± 57.57	38.89
5	1	250	1.0	154.68 ± 9.38	63.33
6	1	250	0	39.80 ± 4.08	16.30
7	1	250	0	72.37 ± 14.43	29.63

表 1 IAA 和 6-BA 对绿豆幼苗下胚轴原生质体内 CaM 含量的影响

Table 1 Effects of IAA and 6-BA on CaM content in protoplasts from hypocotyls of mung bean seedlings

	IAA	6-BA	CaCl ₂	CaM	%
	(μmol/L)			(μg g ⁻¹ protein)	
1	0	0	0	248.05 ± 36.46	100
2	0	0	250	254.83 ± 29.27	102.73
3	1	0	0	207.15 ± 72.72	83.51
4	0	1	0	219.81 ± 39.59	88.62
5	1	0	250	28.24 ± 9.59**	11.38
6	0	1	250	10.60 ± 7.68**	4.27

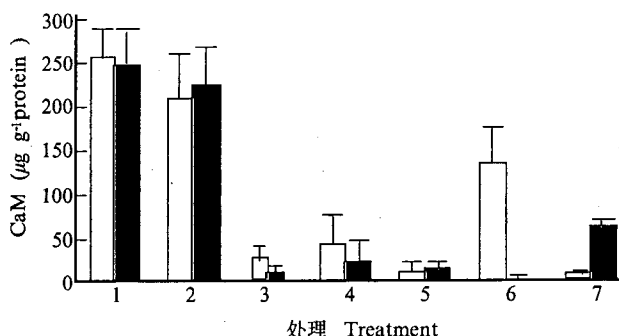


图 1 Ca²⁺ 等阳离子对绿豆幼苗下胚轴原生质体内 CaM 含量的影响
Fig. 1 Effects of Ca²⁺ and some other cations on CaM content in protoplasts from hypocotyls of mung bean seedlings

1. -CaCl₂; 2. (IAA or 6-BA)-CaCl₂; 3. (IAA or 6-BA) + CaCl₂;
4. (IAA or 6-BA) + KCl; 5. (IAA or 6-BA) + ZnCl₂;
6. (IAA or 6-BA) + BaCl₂; 7. (IAA or 6-BA) + MgCl₂.

所有阳离子和 IAA(或 6-BA) 的浓度分别为 1 mmol/L 和 1 μmol/L。All cations and IAA (or 6-BA) were at the concentrations of 1 mmol/L and 1 μmol/L, respectively.

□ IAA; ■ 6-BA

表 3 Verapamil 和 LaCl₃ 对 6-BA 处理的绿豆下胚轴原生质体内 CaM 含量的影响

Table 3 Effects of verapamil and LaCl₃ on CaM content in protoplasts from hypocotyls of mung bean seedlings treated with 6-BA

	6-BA	CaCl ₂	verapamil	LaCl ₃	CaM	%
	(μmol/L)				(μg g ⁻¹ protein)	
1	0	250	0	0	234.28 ± 28.67	100
2	1	0	0	0	200.36 ± 34.50	85.52
3	1	250	0	0	61.06 ± 46.05	26.06
4	1	250	1	0	146.77 ± 24.63	62.65
5	1	250	10	0	125.67 ± 58.05	56.34
6	1	250	0	10	47.26 ± 21.11	20.17
7	1	250	0	50	121.06 ± 57.93	51.67
8	1	250	0	100	89.55 ± 49.24	38.22

通道, 对 IAA + CaCl₂ (处理 3) 的原生质体内 CaM 含量的影响较小。而用 verapamil 阻断 Ca²⁺ 通道, 处理 3 的原生质体 CaM 含量不同程度地回升。例如 1.0 μmol/L 的 verapamil (处理 5) 可使 CaM 含量比处理 3 增加 178.1% 而接近对照的水平 (表 2)。

表 3 显示 verapamil、LaCl₃ 也影响 6-BA + CaCl₂ (处理 3) 的原生质体内的 CaM 含量。与处理 3 相比, 50 μmol/L 的 LaCl₃ (处理 7) 使 CaM 含量提高 98.3%, 1.0 μmol/L 的 verapamil (处理 4) 则使原生质体 CaM 含量提高 140.4%。可见适当浓度的 verapamil 和 LaCl₃ 都不同程度地使 CaM 含量升高, 但这种变化似乎与所用抑制剂的剂量无明显的关联。

2.4 EGTA 和 A23187 对原生质体内 CaM 含量的影响

EGTA 专一螯合 Ca²⁺ 可使原生质体内 ⁴⁵Ca²⁺ 积累减少, 削弱体积膨大效应^[1,2]。若在培养液中加入 EGTA, 激素 (IAA 或 6-BA) + CaCl₂ 处理的原生质体内 CaM 含量明显回升, 1.0 mmol/L 的 EGTA 甚至可使 6-BA 处理的原生质体的 CaM 含量超过对照 (CaCl₂ 处理) 42.22% (图 2)。EGTA 浓度高低与 CaM 含量的变化也无明显的关系。

而 Ca²⁺ 载体 A23187 可部分模拟激素的作用, 使原生质体内 ⁴⁵Ca²⁺ 积累增加, 体积膨大^[10]。这里 A23187 可使激素处理的原生质体内 CaM 维持较低水平 (图 3)。1 μmol/L 的 A23187 对 IAA + CaCl₂ 处理的原生质体内 CaM 含量无明显影响, 10 μmol/L 的 A23187 则使之有所升高。而 A23187 使 6-BA + CaCl₂ 处理的原生质体内 CaM 含量从 61.06 μg g⁻¹protein 下降到 24.05–31.09 μg g⁻¹protein。

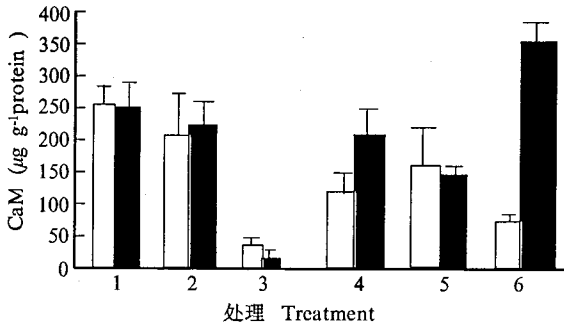


图 2 EGTA 对 IAA、6-BA 处理的绿豆下胚轴原生质体内 CaM 含量的影响

Fig. 2 Effect of EGTA on CaM content in protoplasts from hypocotyls of mung bean seedlings treated with IAA or 6-BA

1. CaCl₂; 2. IAA or 6-BA; 3. (IAA or 6-BA)+CaCl₂;
4. (IAA or 6-BA)+CaCl₂+0.25 μmol/L EGTA;
5. (IAA or 6-BA)+CaCl₂+0.50 μmol/L EGTA;
6. (IAA or 6-BA)+CaCl₂+1.0 μmol/L EGTA.

□ IAA (1 μmol/L); ■ CaCl₂ (250 μmol/L); same for Figs. 3–4.

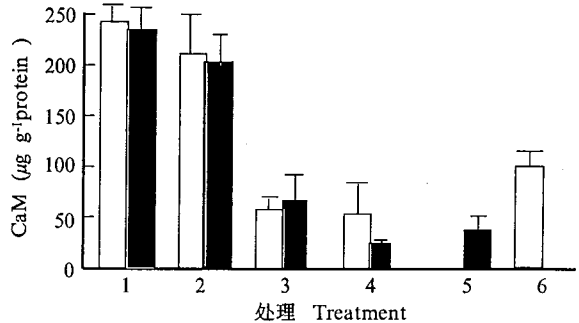


图 3 A23187 对 IAA、6-BA 处理的绿豆下胚轴原生质体内 CaM 含量的影响

Fig. 3 Effect of A23187 on CaM content in protoplasts from hypocotyls of mung bean seedlings treated with IAA or 6-BA

1. CaCl₂; 2. IAA or 6-BA; 3. (IAA or 6-BA)+CaCl₂;
4. (IAA or 6-BA)+CaCl₂+1 μmol/L A23187;
5. (IAA or 6-BA)+CaCl₂+5 μmol/L A23187;
6. (IAA or 6-BA)+CaCl₂+10 μmol/L A23187.

2.5 CaM 拮抗剂对原生质体内 CaM 含量的影响

当用 TFP、CPZ 处理 IAA 或 6BA 刺激的原生质体时, 未能检测到 CaM。是否因其拮抗 CaM 作用时使之构象变化, 封闭了某些专一结合位点, 影响 ELISA 测定, 目前尚未见这方面的资料。

而用 W_7 拮抗 CaM 的作用可使 IAA 或 6-BA + $CaCl_2$ 处理的原生质体内 CaM 含量明显回升。对于 6-BA 处理的原生质体, W_7 0.1 – 10 $\mu\text{mol/L}$ 可使 CaM 含量达对照 ($CaCl_2$ 处理) 的 35.0% – 69.0%; 对于 IAA 处理的原生质体, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的 W_7 使 CaM 含量达到对照的 55.9%, 1.0 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 W_7 处理则明显超过了对照的 CaM 水平 (图 4)。

3 讨论

CaM 参与植物激素诱导的多种生理过程的调节。如生长素诱导细胞伸长, ABA 诱导气孔关闭, 壳梭孢菌素促进或 ABA 抑制种子萌发等过程中, CaM 水平均发生明显变化^[5,11,12]。CaM 拮抗剂可抑制种子萌发^[5,11,13]。研究还发现, 分生组织细胞内 CaM 的含量高于伸长区的^[12], 不同组织和器官 CaM 分布以及不同生长阶段的含量变化暗示着 CaM 对某些特定的依赖于 CaM 的生理过程起调节作用^[14]。我们对不同处理下绿豆下胚轴原生质体内 CaM 含量的动态变化进行了观察, 在试验处理的 90 min 内, 无论 $CaCl_2$ 、激素处理或激素与 $CaCl_2$ 结合处理的原生质体, 都只在处理后 30 min 时出现 CaM 峰, 在其它时间检测到的 CaM 很少甚至没有 (结果未列出)。我们发现激素处理含钙培养液中的原生质体体积显著膨大^[1,2], 与此相对应, 本试验检测到的 CaM 含量急剧降低 (低一个数量级)。

虽然 CaM 作为 Ca^{2+} 的主要结合蛋白, 在 Ca^{2+} 稳态调节中起作用^[15,16], 但有关自由 Ca^{2+} 浓度变化对 CaM 水平影响的报告却极少见到。Negrini 等^[17] 在萝卜种子萌发过程进行了初步观察, 加入 5 mol m^{-3} Na-EGTA 使细胞中 Ca^{2+} 缺乏, 在 24 h 内萝卜胚胎的 CaM 含量增加 5 倍, 活性增加了 7 倍; 当 Na-EGTA 降到 1 mol m^{-3} 时, CaM 含量在培养 24 h 后减少 30%。Cocucci 和 Negrini 认为, 这可能是萝卜种子中与蛋白酶类的 CaM 拮抗剂结合的那部分 CaM 减少造成的^[5]。无激素的含钙培养液中原生质体 $^{45}Ca^{2+}$ 积累较少; 加入激素后, 原生质体内 $^{45}Ca^{2+}$ 积累增多^[1,2]。本试验则证实原生质体自由 Ca^{2+} 缺乏, CaM 水平很高; 自由 Ca^{2+} 增加, 引起 (可测定的) CaM 水平降低。这种现象与 Negrini 等报告的萝卜种子萌发过程中 Ca^{2+} 、CaM 含量变化的趋势一致^[17]。

外加 verapamil、 $LaCl_3$ 或 EGTA 阻止 Ca^{2+} 进入原生质体, $^{45}Ca^{2+}$ 积累降低, 其体积膨大效应受抑制^[1,2]。本试验则表明, 在 (使用上述试剂后) $^{45}Ca^{2+}$ 积累减少的同时, CaM 含量水平不同程度地增加。我们注意到, 这些抑制剂对 CaM 含量变化的影响都未表现出剂量效应。而 A23187 促进 $^{45}Ca^{2+}$ 积累, 原生质体的 CaM 含量与激素处理的低水平相似。CaM 拮抗剂 W_7 强烈抑制原生质体膨大, 使 $^{45}Ca^{2+}$ 积累减少, 其 CaM 水平大幅度升高, 可以接近或超过对照

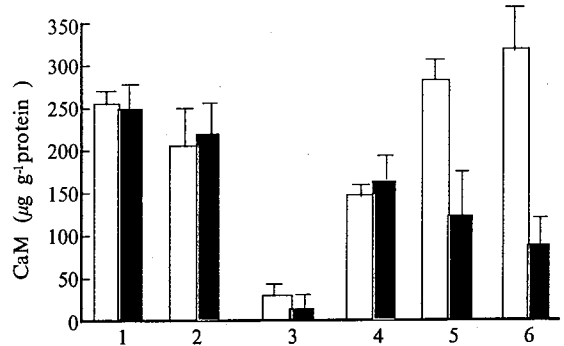


图 4 W_7 对 IAA、6-BA 处理的绿豆下胚轴原生质体内 CaM 含量的影响

Fig. 4 Effect of W_7 on CaM content in protoplasts from hypocotyls of mung bean seedlings treated with IAA or 6-BA

1. $CaCl_2$; 2. IAA or 6-BA; 3. (IAA or 6-BA) + $CaCl_2$;
4. (IAA or 6-BA) + $CaCl_2$ + 0.1 $\mu\text{mol/L}$ W_7 ;
5. (IAA or 6-BA) + $CaCl_2$ + 1.0 $\mu\text{mol/L}$ W_7 ;
6. (IAA or 6-BA) + $CaCl_2$ + 10 $\mu\text{mol/L}$ W_7 .

的水平。这些结果进一步证实 CaM 参与了激素诱导原生质体膨大的过程。

一般认为 CaM 调节细胞的生理过程有两种机制:调幅机制通过形成 Ca-CaM 复合物提高细胞内的活性全酶浓度来影响相应的生理反应,适于调节细胞内的快速反应;而调敏机制在 Ca^{2+} 浓度基本不变的情况下通过调节 CaM(或靶酶)对 Ca^{2+} 的敏感程度而调节活性全酶总量,可能是细胞内 Ca^{2+} 信号持续反应的一种机制^[4,18]。两种机制不能截然分开,它们往往同时或顺序进行,共同参与钙信使系统对生理反应的调控^[9]。从时间顺序来看,原生质体内 Ca^{2+} 浓度变化可能是较早的反应,激素处理 5 min(IAA)或 10 min(6-BA)原生质体内 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 积累增加,随后体积膨大(IAA 处理后 5 min、6-BA 处理后 15 min 膨大现象始明显)^[2],这种现象似乎是调幅机制调节的结果。本试验则表明 CaM 含量的变化发生较晚,似乎与原生质体内 Ca^{2+} 浓度变化有关联,激素处理后 30 min, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 积累最多,膨大效应也最显著,此时 CaM 含量变化也最剧烈。我们认为 CaM 极有可能通过其浓度变化或/和化学修饰引起构象变化来调节与 Ca^{2+} 和靶酶之间的亲和力,从而影响细胞内活性全酶的浓度,达到调控生理反应的目的,即调敏机制随后起作用^[4]。

无论 CaCl_2 或激素(IAA、6-BA)单独处理或激素 + CaCl_2 处理,我们仅在处理后 30 min 时检测到 CaM 峰。实验表明,GA 处理也如此(结果未列出)。应该指出,这三种激素处理原生质体,其体积膨大的效应也是 30 min 时最明显(另文发表)。这种激素处理原生质体后 30 min 膨大效应最好、并出现 CaM 峰的现象尚未见报道,两者之间有何内在联系,在此过程中发生了怎样的细胞生理生化变化(如核酸和蛋白质的变化),值得深入研究。

参考文献

- 1 李德红,王小菁,潘瑞炽. 钙在 6-BA 诱导黄化绿豆幼苗下胚轴原生质体膨大过程中的作用. 实验生物学报, 1998, 31(2):187-193
- 2 李德红,王小菁,潘瑞炽. 钙在 IAA 诱导绿豆下胚轴原生质体膨大过程中的作用. 实验生物学报, 1999, 32(1):55-61
- 3 胡卓逸. 钙调素拮抗剂的研究动态. 生物化学与生物物理进展, 1992, 19(6):427-431
- 4 孙大业,郭艳林. 细胞信号系统. 北京:科学出版社, 1993
- 5 Cocucci M, Negrini N. Changes in the level of calmodulin and of a calmodulin inhibitor in the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. Plant Physiol, 1988, 88:910-941
- 6 Rasmussen C D, Means A R. Calmodulin is required for cell-cycle progression during G_1 and mitosis. EMBO J, 1989, 8:73-76
- 7 吴有梅,刘愚. 番茄果实成熟过程中钙调素含量变化及其与乙烯生成的关系. 植物生理学报, 1990, 16:245-250
- 8 赵升皓,于宏林,张明志等. 钙调素的酶联免疫测定法. 徐州医学院学报, 1988, 8(1):54-58
- 9 张志良. 植物生理学实验指导. 第二版. 北京:高等教育出版社, 1992, 183-184
- 10 龙程,王小菁,潘瑞炽. 钙在红光诱导的绿豆原生质体膨大中的作用. 科学通报, 1994, 39(17):1602-1604
- 11 Cocucci M, Negrini N. Calcium-calmodulin in germination of *Phacelia tanacetifolia* seeds: effects of light, temperature, fusicoccin and calcium-calmodulin antagonists. Physiol Plant, 1991, 82:143-149
- 12 Hernandez-Nistal J, Radriguez D, Nicolas G. Abscisic acid and temperature modify the level of calmodulin in embryonic axis of *Cier arietinum* L. Physiol Plant, 1989, 80:891-894
- 13 Polya M G, Chandra S, Condron R. Purification and sequencing of radish seed calmodulin antagonists phosphorylated by calcium-dependent protein kinase. Plant Physiol, 1993, 101:545-551
- 14 Ling V, Assmann S M. Cellular distribution of calmodulin and calmodulin-binding proteins in *Vicia faba* L. Plant

- Physiol, 1992, 100:970-978
- 15 Bush D S. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1995, 46:95-122
 - 16 Evans D E. Calmodulin-stimulated calcium pumping ATPases located at higher plant intracellular membranes: a significant divergence from other eukaryotes? *Physiol Plant*, 1994, 90:420-426
 - 17 Negrini N, Rivetta A, Cocucci M. Calmodulin levels in radish (*Raphanus sativus* L.) seeds germinating at low calcium availability induced by EGTA treatments. *Plant Cell Environ*, 1995, 18:159-167
 - 18 Roberts D M, Harman A C. Calcium-modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1992, 43:375-414
 - 19 Poovaiah B W, Reddy A S N. Calcium messenger system in plants. *Crit Rev Sci*, 1987, 6(1):47-103