

钙调素 mRNA 在梨子房和幼果中的表达

岳海林^{1,2}, 邓秀新¹, 彭抒昂²

(¹华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070; ²华中农业大学园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070)

摘要:【目的】通过研究钙调素 mRNA 在梨 (*Pyrus pyrifolia* NaKai) 子房和幼果中的表达特性, 探讨其在盛花后子房和幼果发育中的生理作用。【方法】以 10 年生黄花梨盛花前后子房和幼果为试材。Northern 杂交检测钙调素基因表达水平。mRNA 原位杂交进一步检测钙调素 mRNA 在梨子房和幼果发育过程中组织特异性表达。【结果】Northern 杂交结果表明, 钙调素基因在梨子房和幼果中的表达水平, 花前逐渐上升, 至盛花时最高, 花后又下降。mRNA 原位杂交结果表明, 钙调素 mRNA 在梨果中的表达多集中于果皮、果肉、胚珠和果肉微管组织, 而在果心的表达较少, 且表达水平为果皮>果肉>果心, 珠心>胚囊>珠被。在细胞水平上, 钙调素 mRNA 的表达主要集中于细胞的胞间隙和胞间层及细胞核; 钙调素 mRNA 的表达水平在各组织不同发育阶段也表现为盛花时最高, 花前稍高于花后。【结论】钙调素 mRNA 在梨子房和幼果中大量表达, 以盛花期最高, 表达的部位主要集中在果皮、果肉、胚珠、维管束、细胞间隙及胞间层。钙调素 mRNA 在盛花期子房/幼果中的大量表达, 可能与果实钙的增加有一定关系。

关键词: 钙调素 mRNA; 原位杂交; 子房/幼果; 梨

Expression of Calmodulin mRNAs in Ovaries and Fruitlets of Pear

YUE Hai-lin^{1,2}, DENG Xiu-xin¹, PENG Shu-ang²

(¹National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070;

²Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: 【Objective】 In order to investigate the physiology roles of calmodulin during the ovaries and fruitlets development after blossoming, the temporal and spatial expression pattern of calmodulin mRNA in pear (*Pyrus pyrifolia* NaKai) ovaries and fruitlets was studied. 【Method】 The ovaries and fruitlets before and after flowering of ten-year-old 'Huanghua' pear (*Pyrus pyrifolia* NaKai) were used as materials to detect the expression level and localization of calmodulin gene via northern hybridization and mRNA *in situ* hybridization. 【Result】 The expression level of calmodulin gene was higher before flowering, reached a peak at full blossom, and then decreased after flowering. mRNA *in situ* hybridization showed that calmodulin mRNA was located on the pericarp, flesh, ovule and flesh vascular bundles, while expression signal could not be detected at core. The expression levels of calmodulin mRNA were as follows from high to low: pericarp, flesh and core, nucellus, embryonic sac and integument. At cellular level, calmodulin mRNA located at nucleolus, interstitial space and intercellular layer. The highest expression level in different tissues was found at full blossom, followed by before blossom and after blossom. 【Conclusion】 Calmodulin mRNA accumulated mainly in ovaries and fruitlets, and reached the highest at blossoming. It was located mainly on the pericarp, flesh, ovule, vascular bundles, interstitial space and intercellular layer. Results revealed that perhaps the high expression of calmodulin in ovaries and fruitlets at blossoming related to the calcium uptake.

Key words: Calmodulin mRNA; *in situ* hybridization; Ovary/fruitlet; Pear (*Pyrus Pyrifolia* Nakai)

收稿日期: 2007-01-31; 接受日期: 2007-04-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30270924, 30471202)和教育部创新团队项目 (IRT0548)

作者简介: 岳海林 (1979-), 女, 湖北襄樊人, 博士, 研究方向为果树分子生理。Tel: 027-87281300; E-mail: yuehailin@126.com。通讯作者彭抒昂 (1957-), 男, 湖北江陵人, 教授, 研究方向为果树生理。Tel: 027-87281886; E-mail: ganjiuli_2002@mail.hzau.edu.cn

0 引言

【研究意义】钙调素 (CaM) 是真核生物中普遍存在的保守且高度特异性的钙结合蛋白, 是胞内 Ca^{2+} 结合的主要受体^[1], 与 Ca^{2+} 结合作为第二信使调节一系列生理活动^[2]。探讨钙调素 mRNA 在果实发育早期的表达, 对了解 CaM 在这一活跃时期的生理作用具有重要意义。【前人研究进展】迄今的一些研究表明, 在土壤和树体均不缺钙的情况下果实也可能缺钙, 原因可能与果实发育过程中钙转运机制有关^[3]。有些报道显示钙的吸收可能是一个与植物激素相关的途径^[4,5], 外源加喷 GA 和 IAA 均可促进苹果果肉质膜微囊 Ca^{2+} -ATPase 活性和钙离子吸收, 这可能是通过对果肉质膜微囊上紧密结合的 CaM 起作用^[6], 用 CaM 抑制剂处理可阻止 IAA 处理的玉米对钙吸收, 但 CaM 是否直接参与激活钙离子吸收或还有其它机制还不清楚^[7]。梨和苹果等发育过程中钙吸收主要发生在果实生长前期即幼果期, 受精作用促进果实 Ca 和 CaM 含量的增加^[8-10], 在水稻和烟草上也发现受精作用促进胚囊 CaM 含量的增加和钙含量的改变^[11,12]。【本研究切入点】CaM 基因是一类分布广泛的非特异表达基因, 且必须和 Ca^{2+} 结合后才具有生理活性, 但在不同组织不同发育时期的表达水平存在明显差异^[13], mRNA 原位杂交可在一定程度上反映钙调素的动态与调控机理。【拟解决的关键问题】本研究以钙调素 mRNA 在盛花前后梨子房和幼果中的表达, 来探讨 CaM 对幼果期钙含量增加的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料取自华中农业大学附属农场 10 年生黄花梨 (*Pyrus pyrifolia* Nakai), 分别采集其盛花及盛花前后的子房和幼果, 1~5 d 采 1 次, 共 5 次。将取好的材料一部分立即用 FAA (10%甲醛、70%乙醇、5%冰乙酸) 固定, 另一部分用液氮速冻后置 -70℃ 冰箱保存备用。

1.2 试剂

*Sma*I、*Hind*III、*Kpn*I 和 *Eco*R I 内切酶、RNase inhibitor、T3 和 T7 RNA 聚合酶等均购自 MBI 公司, BSA、硫酸葡聚糖为 Sigma 分装, 去离子甲酰胺、地高辛标记检测试剂购自 Roche 公司, 其它常规试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 RNA 的提取 黄花梨子房和幼果 RNA 的提取参照 Kiefer 等^[14]和 Xu 等^[15]的 CTAB 法, 并略加修改。取 1~2 g 低温保存的样品, 液氮研磨后, 加 10 ml 65℃ 预热的提取缓冲液 (2% CTAB, 2% PVPK30, 0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0), 25 mmol·L⁻¹ EDTA (pH 8.0), 2.0 mol·L⁻¹ NaCl, 0.5 g·L⁻¹ 亚精胺, 4% β-巯基乙醇)。充分混匀后 65℃ 水浴 2 min, 室温冷却。依次加入 0.1×体积的 3 mol·L⁻¹ NaAC (pH 5.2)、等体积的氯仿/异戊醇 (24:1), 缓慢摇动 10 min 使充分混匀。4℃ 5 000 r/min 离心 10 min。取上清至 50 ml 离心管中, 加入等体积的氯仿/异戊醇 (24:1) 再纯化 1 次。在上清液中加入 10 mol·L⁻¹ LiCl 使终浓度为 2 mol·L⁻¹。-20℃ 沉淀 3 h 以上, 4℃ 5 000 r/min 离心 10 min。沉淀用 75%乙醇浸泡过夜, 风干沉淀后溶于 200 μl DEPC-H₂O 中。

1.3.2 Northern 杂交 Northern 杂交按分子克隆实验手册第三版的方法进行^[16]。取 28 μg 总 RNA 95℃ 变性 10 min, 印迹转移法将其转移到尼龙膜上。以温州蜜柑 (*Citrus unshiu* Marc.) 钙调素 cDNA^[17]为探针, ³²P-dCTP 标记。42℃ 预先杂交 6 h, 加入同位素标记的探针后, 42℃ 杂交 16~24 h。

1.3.3 mRNA 原位杂交 材料经 FAA (10%甲醛、70%乙醇、5%冰乙酸) 固定, 常规乙醇系列脱水与石蜡切片, 切片厚度 8~10 μm。

钙调素 cDNA 由岳海林等从温州蜜柑 (*Citrus unshiu* Marc.) 幼果中分离, 克隆在 PMD18-T 载体上^[17]。经 *Sma*I 和 *Hind*III 双酶切后重新插入 pBlue SK II 载体。探针标记按照地高辛标记试剂盒说明进行。

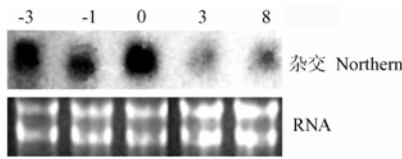
原位杂交参照陈绍荣等^[18]的方法, 略有修改。将干燥的石蜡切片脱蜡、复水, 经 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.6), 5 min; 1 μg·ml⁻¹ Proteinase K, 20 min; 0.2% 甘氨酸, 2 min; 1×PBS, 2×5 min; 0.2 mol·L⁻¹ HCl, 20 min; 2×SSPE, 2×5 min; DEPC-H₂O, 2×5 min; 含 1% 牛血清白蛋白的 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0), 10 min; DEPC-H₂O, 2×5 min; 再经 30%、50%、70%、95%、100%乙醇系列脱水, 每级 2 min, 室温凉干。60℃ 下与探针杂交 12~16 h。含 1% BSA 的 anti-DIG-AP 进行免疫反应, BCIP/NBT 显色观察。

2 结果与分析

2.1 钙调素在子房/幼果中的表达

2.1.1 Northern 杂交 以柑橘钙调素 cDNA 作为探针对盛花前 3 d、1 d、盛花、盛花后 3 d 和盛花后 8 d

的梨子房和幼果总 RNA 进行 Northern 杂交, 结果显示, 钙调素 mRNA 在盛花前子房中的表达水平花前较高, 盛花时达到最高, 随后又下降 (图 1)。



-3、-1、0、3 和 8 分别表示盛花前 3 d、花前 1 d、盛花、花后 3 d 和花后 8 d

-3, -1, 0, 3 and 8: Three days before flowering, one day before flowering, full blossom, three days after flowering and eight days after flowering, respectively

图 1 Northern 杂交

Fig. 1 The result of Northern blot

2.1.2 组织原位表达 以地高辛标记的钙调素反义链 RNA 作为探针进行 mRNA 原位杂交, 信号显示为蓝紫色, 而以钙调素正义链 RNA 作为探针进行杂交时没有颜色 (图 2F, 图 3、图 4 和图 5-D), 以此为阴性对照。由图 2 可见钙调素 mRNA 在盛花前后的梨子房和幼果中均有表达, 其表达水平存在时空差异, 盛花前钙调素的表达呈上升趋势, 盛花后则趋向下降, 这与 Northern 杂交的结果相一致。

2.2 钙调素 mRNA 在子房和幼果中表达的部位

由图 2 可见, 钙调素 mRNA 在梨子房和幼果中的表达多集中于果皮、果肉、胚珠和维管组织, 而在果心部位的表达较少。

在胚珠中, 钙调素 mRNA 在珠被、珠心和胚囊细胞中均有表达, 在珠心细胞中的表达水平最高, 胚囊中次之, 珠被中最低 (图 3-A、B、C), 受精后珠被中已无表达 (图 3-C)。

在果肉组织中, 钙调素 mRNA 的表达水平为: 果皮 > 果肉 > 果心 (图 2 和图 4), 且钙调素多集中在分裂旺盛的细胞如珠心细胞等 (图 3-A、B、C), 果肉维管组织中的表达水平也很高 (图 5-A、B、C)。

在细胞水平上, 钙调素 mRNA 主要集中于细胞的胞间隙和胞间层 (图 4 和图 5 中箭头所示) 及细胞核中表达, 在盛花期的导管细胞内也有少量表达 (图 5-B)。

2.3 钙调素 mRNA 在子房和幼果中表达时期的动态变化

盛花前随着花器的发育, 钙调素 mRNA 在梨子房

和幼果中的表达有所增加但变化不大, 盛花时的表达量达到最高, 至花后 3 d 表达量下降 (图 1)。

胚珠: 钙调素 mRNA 在受精前随着花器的发育在胚珠的珠被细胞中有少量表达 (图 3-A), 盛花时大量表达 (图 3-B), 花后没有表达 (图 3-C); 珠心和胚囊中的表达在花前较少, 盛花时达到最高, 花后次之, 其表达量高于花前 (图 3)。

果皮和果肉: 钙调素 mRNA 在果皮和果肉中的表达, 在花前随着花器的发育均有较高表达, 盛花期达到最高, 盛花后 3 d 开始下降, 花后第 8 天最低 (图 2 和 4); 钙调素 mRNA 在果肉导管组织中的表达盛花前较低, 盛花时达到最高, 此后又有所下降 (图 5)。果心部位在受精前后均没有表达 (图 2 和 4)。

细胞水平: 钙调素 mRNA 在盛花前后的果肉细胞间层和胞间隙中均大量表达, 差异不明显 (图 4 中箭头所示); 在导管细胞胞间层和胞间隙中的表达盛花时最高, 花前次之, 花后最低 (图 5 中箭头所示), 在盛花期的导管细胞内也有少量表达 (图 5-B); 在分裂旺盛的细胞核中一直保持较高的表达水平 (图 3 和图 4)。

3 讨论

3.1 钙调素 mRNA 的表达与 Ca^{2+} 吸收

前人研究认为钙吸收主要通过蒸腾作用, 由于果实的蒸腾作用小于叶片的, 所以果实的钙含量低于叶片的。但往往生长旺盛的部位如幼果、幼叶等的蒸腾作用较小, 而吸收的钙却较多, 这里就有一个钙吸收的机制问题。生长激素是参与和促进果实钙吸收的主要原因之一, 生长素可通过共质体途径将钙逆向运输至果实^[19]。刘剑锋等^[9]认为受精促进果实钙的吸收, 可能与 IAA 和 GA_3 同时参与受精前后树体中的钙向幼果 (子房) 的运输有关。而果实钙含量往往果皮高于果肉, 种子和果心居中^[3]。本研究通过 mRNA 组织原位杂交从组织和细胞水平上研究钙调素 mRNA 在子房和幼果中的表达, 发现钙调素 mRNA 在果皮、果肉和胚珠中有大量表达, 在果心中几乎没有, 而且钙调素 mRNA 在盛花前子房中的表达水平较高, 至盛花时达到最高, 受精后又有所降低。这与果实受精前后钙吸收和 IAA 的动态^[9]基本一致, 也与受精后钙在果实中的分布一致^[3], 说明盛花期钙调素 mRNA 的大量表达, 可能与幼果期果实钙含量的大量增加有一定的关系。

3.2 钙调素 mRNA 的表达部位

彭抒昂等^[8]以焦锑酸钾沉淀法研究了梨果肉细胞

A: 盛花前 3 天; B: 盛花前 1 天; C: 盛花; D: 花后 3 天; E: 花后 8 天; F: 对照。o: 胚珠; p: 果皮; f: 果肉; c: 果心; 表达信号为蓝紫色。标尺=5mm
 A: Three days before flowering; B: One day before flowering; C: Full blossom; D: Three days after flowering; E: Eight days after flowering; F: The negative control. Expression is seen as blue/purple coloration. o: Ovule; p: Epicarp; f: Endocarp; c: Core Bar=5 mm

图 2 钙调素 mRNA 在子房和幼果中的原位表达
 Fig. 2 *in situ* expression of calmodulin mRNA in the ovaries and fruitlets

A: 花前 1 天; B: 盛花; C: 花后 3 天; D 对照。es: 胚囊; ic: 珠被细胞; nc: 珠心细胞。表达信号为蓝紫色。标尺=1mm
 A: One day before flowering; B: Full blossom; C: Three days after flowering; D: Control. es: Embryonic sac; ic: Inteyumentary cell; nc: Nucellar cell. Expression is seen as blue/purple coloration. Bar=1 mm

图 3 钙调素 mRNA 在胚珠中的表达
 Fig. 3 Expression of calmodulin mRNA in ovules

A: 花前 1 天; B: 盛花; C: 花后 3 天; D 对照。ec: 表皮细胞; f: 果肉。表达信号为蓝紫色。标尺=1mm
 A: One day before flowering; B: Full blossom; C: Three days after flowering; D: Control. ec: Epidermis cell; f: Flesh. Expression is seen as blue/purple coloration. Bar=1mm

图 4 钙调素 mRNA 在果肉中的表达
 Fig. 4 Expression of calmodulin mRNA in flesh

A: 花前 1 天; B: 盛花; C: 花后 3 天; D 对照。vb: 维管束。表达信号为蓝紫色。标尺=0.2mm
 A: One day before flowering; B: Full blossom; C: Three days after flowering; D: Control. vb: Vascule bundle. Expression is seen as blue/purple coloration. Bar=0.2 mm

图 5 钙调素 mRNA 在维管束中的表达
 Fig. 5 Expression of calmodulin mRNA in vascular bundles

在受精前后 Ca^{2+} 的定位分布变化, 结果表明受精后果肉中的导管、细胞间隙和胞间层可以检测到大量的 Ca^{2+} 。本研究结果显示, 盛花时钙调素 mRNA 在果肉、胚珠等组织的细胞、维管束、细胞间隙和胞间层也有大量表达, 在导管细胞也可见钙调素 mRNA 的表达 (图 5-B), 这也与 Ca^{2+} 定位分布的研究结果一致^[8]。钙离子和果胶结合成的果胶酸钙是维系胞间层牢固程度、从而影响到果实质地品质的主要成分, 盛花后果实细胞分裂旺盛, 需要大量 Ca^{2+} 形成原果胶以维持细胞结构。Sun 等研究发现胞外 CaM 具有促进细胞增殖^[20]以及原生质体分裂和原生质体壁再生^[21]等多种功能, 本研究中钙调素 mRNA 在盛花期的大量表达, 与此时果肉细胞的分裂旺盛、果肉细胞及其胞间层需要大量 Ca^{2+} 积累有关。另一方面, 果肉微管组织是钙进入果实的主要通道, 维管束的数目和质量直接影响果实对钙的吸收^[23,24], 而在盛花前后的幼果期, 果实表面积小, 蒸腾作用几乎为零, 而 Ca^{2+} 却大量吸收进入幼果, 此时钙调素 mRNA 在果肉维管束中大量表达, 可能与此时钙的吸收有密切关系, 而尚忠林等^[25]也发现外源纯化钙调素可以使百合花粉细胞内游离钙离子浓度升高。同时受精作用促使果实产生大量的激素, 作者以 Aux/IAA 蛋白基因进行原位杂交发现该基因在果实维管束导管中表达 (未发表), 说明生长素也参与了促进果实钙的吸收。同时生长素和 CaM 能够促进细胞分裂^[26], 受精作用可使幼果产生大量的激素, 促进细胞旺盛分裂, 此时钙调素 mRNA 的大量表达, 说明受精作用中钙调素和生长激素共同促进了细胞的分裂和钙的含量增加。

4 结 论

Northern 杂交和钙调素 mRNA 原位杂交结果表明, 钙调素 mRNA 在梨子房和幼果中大量表达, 花前较高, 至盛花时最高, 花后又下降; 表达的部位在果实形态上主要集中在果皮、果肉、维管束组织和胚珠中, 在细胞水平上集中在细胞核、细胞间隙及胞间层。钙调素 mRNA 在盛花期子房/幼果中的大量表达, 可能与果实钙的增加有一定关系。

References

- [1] Zielinski R E. Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1998, 49: 697-725.
- [2] Medvedev S S. Calcium signaling system in plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2005, 52(2): 249-270.
- [3] Saure M C. Calcium translocation to fleshy fruit: its mechanism and endogenous control. *Scientia Horticulturae*, 2005, 105: 65-89.
- [4] Weibei F P. Enhancing calcium uptake in organic apple growing. *Acta Horticulturae*, 1997, 448(3): 337-343.
- [5] Brown M M. Factors affecting calcium transport and basipetal IAA movement in tomato fruit in relation to blossom-end rot. *Journal of Experimental Botany*, 1993, 44(5): 1111-1117.
- [6] 周 卫, 汪 洪, 赵林萍, 林 葆. 苹果幼果钙吸收特性与激素调控. *中国农业科学*, 1999, 32(3): 52-58.
Zhou W, Wang H, Zhao L P, Lin B. Study on characteristics of calcium uptake by young fruit of apple (*Malus pumila*) and its regulation by hormone. *Scientia Agricultura Sinica*, 1999, 32(3): 52-58. (in Chinese)
- [7] Zocchi C, Rabotti G. Calcium transport in membrane vesicles isolated from maize coleoptiles. *Plant Physiology*, 1993, 101: 135-139.
- [8] 彭抒昂, 岩堀修一. 梨果实发育中 Ca^{2+} 在果肉细胞的定位及变化研究. *园艺学报*, 2001, 28(6): 497-503.
Peng S A, Shuichi I. Studies on localization and change of Ca^{2+} in fruit flesh cells during fruit development of pear. *Acta Horticulturae Sinica*, 2001, 28(6): 497-503. (in Chinese)
- [9] 刘剑锋, 张红艳, 彭抒昂. 受精前后子房(幼果)中钙与内源激素含量的关系. *植物生理学通讯*, 2004, 40(3): 297-299.
Liu J F, Zhang H Y, Peng S A. Relationship between calcium and endogenous hormones in ovary (fruitlet) of pear during pre- and post-fertilization stage. *Plant Physiology Communications*, 2004, 40(3): 297-299. (in Chinese)
- [10] 关军锋, 马至宏, 张 华, 周振涛, 张立军. 授粉受精状况与苹果子房发育和 Ca, Mg, K 水平的关系. *华北农学报*, 2000, 15(增刊): 139-144.
Guan J F, Ma Z H, Zhang H, Zhou Z T, Zhang L J. The pollination and fertilization in relation to development and Ca, Mg, K levels of apple ovaries. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2000, 15(Suppl.): 139-144. (in Chinese)
- [11] Tian H Q, Russell S D. Calcium distribution in fertilized and unfertilized ovules and embryo sacs of *Nicotiana tabacum* L.. *Planta*, 1997, 202: 93-105.
- [12] Yang J, Zhao J, Liang S P, Yang H Y. Changes of calmodulin distribution in the embryo sac of *Oryza sativa* before and after fertilization: an immunogold electron microscope study. *Acta Botanica Sinica*, 2002, 44(3): 264-272.
- [13] Yang T B, Lev-Yadun S, Feldman M, Fromm H. Developmentally regulated organ-, tissue-, and cell-specific expression of calmodulin

- genes in common wheat. *Plant Molecular Biology*, 1998, 37: 109-120.
- [14] Kiefer E, Heller W, Ernst D. A simple and efficient protocol for isolation of functional RNA from plant tissues rich in secondary metabolites. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2000, 18: 33-39.
- [15] Xu Q, Wen X P, Tao N G, Hu Z Y, Yue H L, Deng X X. Extraction of high quality of RNA and construction of a suppression subtractive hybridization (SSH) library from chestnut rose (*Rosa roxburghii* Tratt). *Biotechnology Letters*, 2006, 28: 587-591.
- [16] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual (2nd ed). NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.
- [17] 岳海林, 孟海军, 邓秀新, 彭抒昂. 柑橘钙调蛋白 cDNA 的克隆及序列分析. *园艺学报*, 2006, 33(5): 1075-1078.
- Yue H L, Meng H J, Deng X X, Peng S A. Cloning and sequence analysis of *Citrus* calmodulin cDNA. *Acta Horticulturae Sinica*, 2006, 33(5): 1075-1078. (in Chinese)
- [18] 陈绍荣, 毕学知, 吕应堂, 杨弘远. 一种优化的植物组织 RNA 原位杂交技术. *遗传*, 1998, 20(3): 27-30.
- Chen S R, Bi X Z, Lü Y T, Yang H Y. A optimized *in situ* RNA hybridization technique in plant tissues. *Hereditas*, 1998, 20(3): 27-30. (in Chinese)
- [19] 周 卫, 林 葆. 苹果幼果组织钙运输途径与激素调控. *植物营养与肥料学报*, 2000, 6(2): 214-219.
- Zhou W, Lin B. Study on pathways of Ca^{2+} movement in young fruit tissue of apple and its regulation by hormones. *Plant Nutrition and Fertilizing Science*, 2000, 6(2): 214-219. (in Chinese)
- [20] Sun D Y, Li H B, Cheng G. Extracellular calmodulin accelerates the proliferation of suspension-cultured cells *angelica dahurica*. *Plant Science*, 1994, 99: 1-8.
- [21] Sun D Y, Bian Y Q, Zhao B H, Zhao L Y, Yu X M, Duan S J. The effects of extracellular calmodulin on cell wall regeneration of protoplasts and cell division. *Plant and Cell Physiology*, 1995, 36(1): 133-138.
- [22] Perere I Y, Zielinski R E. Synthesis and accumulation of camodulin in suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Physiology*, 1992, 100: 812-819.
- [23] Drazeta L, Lang A, Hall A J, Volz R K, Jameson P E. Causes and effects of changes in xylem functionality in apple fruit. *Annals of Botany*, 2004, 93(3): 275-282.
- [24] Ho L C, Belda R, Brown M, Andrews J, Adams P. Uptake and transport of calcium and the possible causes of blossom-end rot in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 1993, 44: 509-518.
- [25] 尚忠林, 马力耕, 王学臣, 孙大业. 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): 12-17.
- Shang Z L, Ma L G, Wang X C, Sun D Y. Effect of extracellular calmodulin on the cytosolic Ca^{2+} concentration in lily pollen grains. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43(1): 12-17. (in Chinese)
- [26] Bhatla S C, Haschke H P, Hartmann E. Distribution of activated calmodulin in the chloronema tip cells of the moss *Funaria hygrometrica*. *Journal of Plant Physiology*, 2003, 160(5): 469-474.

(责任编辑 曲来娥)