

机械刺激诱导的烟草悬浮细胞一氧化氮产生途径及其与Ca²⁺和钙调素的关系

柯学^{1,2}, 李忠光^{2,3,4}, 刘娴^{2,3,4}, 龚明^{2,3,4,*}

¹ 中国农业大学水利与土木工程学院, 北京 100083; ² 云南师范大学² 生命科学学院, ³ 生物能源持续开发利用教育部工程研究中心, ⁴ 云南省生物质能与环境生物技术重点实验室, 昆明 650092

摘要: 通过提高摇床转速对烟草细胞施加机械刺激(MS)可诱导其胞内一氧化氮(NO)的快速产生和一氧化氮合酶(NOS)活性的提高, 这种MS诱导的NO产生可被NO清除剂cPTIO和NOS抑制剂L-NMMA显著抑制。此外, Ca²⁺螯合剂EGTA、质膜Ca²⁺通道阻断剂La³⁺、胞内Ca²⁺通道拮抗剂钨红, 以及钙调素抑制剂CPZ和TFP预处理均不同程度地抑制了机械刺激诱导的烟草细胞NO的产生, 而机械刺激过程中钙调素活性显著上升并与NOS活性和NO含量的变化相一致。这些结果暗示着(类)NOS酶催化的精氨酸依赖途径可能是机械刺激诱发烟草细胞NO产生的主要途径, Ca²⁺/CaM可能通过调节(类)NOS活性来调控NO的产生。

关键词: 机械刺激; 一氧化氮; 一氧化氮合酶; 钙; 钙调素; 烟草细胞

Pathways of Mechanical Stimulation-Induced Nitric Oxide Production and Their Relationship with Ca²⁺ and Calmodulin in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Suspension Culture Cells

KE Xue^{1,2}, LI Zhong-Guang^{2,3,4}, LIU Xian^{2,3,4}, GONG Ming^{2,3,4,*}

¹College of Water Conservancy & Civil Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China; ²School of Life Sciences, ³Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy, Ministry of Education, ⁴Key Laboratory of Biomass Energy and Environmental Biotechnology, Yunnan Province, Yunnan Normal University, Kunming 650092, China

Abstract: Application of mechanical stimulation (MS) on tobacco (*Nicotiana tabacum*) suspension culture cells led to rapid production of intracellular nitric oxide (NO) and increased activity of nitric oxide synthase (NOS), but this MS-induced NO production could be significantly inhibited by the NO scavenger cPTIO and NOS inhibitor L-NMMA. In addition, the Ca²⁺ specific chelator EGTA, plasma membrane Ca²⁺ channel blocker La³⁺, intracellular Ca²⁺ channel antagonist ruthenium red, and the calmodulin inhibitors chlorpromazine and trifluoperazine pretreatments all led to the inhibition of the MS-induced NO production to some extent; on the other hand, the MS treatment raised calmodulin activity in the tobacco cells, being consistent with the change of NO content and NOS activity. All this results suggested that the arginine-dependent pathway catalyzed by NOS-like enzyme could be main source for this MS-induced NO production and Ca²⁺/calmodulin was involved in the regulation of the NO production by control of NOS activity.

Key words: mechanical stimulation; nitric oxide; nitric oxide synthase; calcium; calmodulin; tobacco suspension cells

机械刺激(mechanical stimulation, MS)作为一种普遍存在而又易被忽视的环境因子, 其形式包括风吹、雨淋、触摸、创伤、重力、土壤阻力等。植物对机械刺激的反应包括感触性反应(thigmonastic response), 向触性反应(thigmotropic response)和接触形态建成(thigmomorphogenesis)等(Braam 2005; Telewski 2006; Chehab 等 2009; 张斐斐等 2010)。在植物对机械刺激的感受和响应过程

中, Ca²⁺、活性氧和一氧化氮(nitric oxide, NO)等信号分子都参与了机械刺激过程的信号转导, 而且各条信号转导途径可能通过相互作用或交谈(crosstalk)

收稿 2010-09-15 修定 2010-09-27

资助 国家自然科学基金(30460016)和云南省教育厅基金(07Z11860, 09Y0145)。

* 通讯作者(E-mail: gongming63@163.com; Tel: 0871-5516516)。

形成一个信号转导网络,但具体机制仍不清楚(Braam 2005; Scippa等2008; Chehab等2009; 李忠光和龚明2008, 2009, 2010; 李忠光等2009; 张斐斐等2010)。

NO作为信号分子广泛参与植物生长发育的调控和对逆境胁迫的响应。目前的研究认为植物细胞内NO的产生途径主要有两条:硝酸/亚硝酸还原酶(nitrate/nitrite reductase, NR/NiR)途径和类一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)途径(Crawford 2006; Arasimowicz 和 Floryszak-Wieczorek 2007; Besson-Bart等2008a, b)。此外, Ca^{2+} 也是植物细胞在各种环境刺激下引发的一个重要第二信使(McAinsh和Pittman 2009),而NO的产生和NOS活性可能受 Ca^{2+} /CaM调控(Besson-Bart等2008a, b)。各种机械刺激如风吹、触摸、离心处理都能引起植物细胞内 Ca^{2+} 浓度的迅速升高(Knight等1991; Trewavas和Knight 1994; Haley等1995; Xiong等2004)和NO含量的增加(Garces等2001)。NO被认为是控制细胞 Ca^{2+} 稳态的重要信号分子(Lamotte等2006; Wang等2009)。而 Ca^{2+} 对植物细胞内NO的积累也具有调控作用,拟南芥在病原菌侵染中钙调素类似蛋白(camodulin-like proteins)参与了钙信号对NO累积的调控(Tsai等2007; Ma等2008),表明植物细胞中存在 Ca^{2+} 和NO的信号交谈。

有关机械刺激能否诱发植物细胞内NO的积累也存在争议。一些实验表明NO参与了细胞对机械刺激的信号转导(Pedroso等2000; Garces等2001; Jih等2003),但不清楚其产生途径;也有实验表明机械刺激不能诱导NO的产生(Orozco-Cardenas和Ryan 2002; Gould等2003)。而机械刺激过程中NO的产生与 Ca^{2+} /CaM的相互作用及其关系也未见报道。针对上述问题,本试验利用我们实验室建立的机械刺激实验体系(李忠光和龚明2008, 2009, 2010),研究了机械刺激诱导的烟草悬浮细胞NO的产生途径及其与 Ca^{2+} /CaM的关系。

材料与方 法

烟草(*Nicotiana tobacum* L.)细胞的培养和继代参见李忠光等(2005)的方法。继代4 d的悬浮细胞用于下列实验。

培养4 d的烟草悬浮细胞从转速为110 r·min⁻¹、26 °C的摇床中转到转速分别为130、150、170、

200 r·min⁻¹、26 °C的另一组摇床中进行机械刺激处理30 min或者60 min(NO动态曲线、CaM和NOS活性测定实验)。对照组始终培养在转速为110 r·min⁻¹、26 °C的摇床中。

在机械刺激处理前10 min,分别用400 μmol·L⁻¹ cPTIO [2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetra-methylimidazole-1-oxyl-3-oxide]、500 μmol·L⁻¹ L-NMMA (N^G-methyl-L-arginine)、100 μmol·L⁻¹ NaN₃及不同浓度的CaCl₂、EGTA [ethylene glycol-bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid]、LaCl₃、RR (ruthenium red, 钌红)、CPZ (chlorpromazine)和TFP (trifluoperazine)预处理烟草悬浮细胞,然后按下述方法测定NO含量。

在生理指标测定中,用Archer(1993)的方法测定NO含量,用王成彬等(1996)和Chandok等(2003)的方法测定NOS活性,用我们实验室以前的方法(黄号栋等2003)测定CaM活性,用Bradford(1976)的方法测定蛋白质含量。

所有实验重复不少于3次,每次实验的测定重复2次,数据均为平均值±标准误。利用SPSS(13.0)对实验数据进行统计分析和t检验。

实验结果

1 机械刺激可诱导烟草悬浮细胞迅速产生NO

在110 r·min⁻¹下正常培养的烟草悬浮细胞中,NO含量为1 506.7 nmol·g⁻¹(FW),当转入130、150、170和200 r·min⁻¹下进行机械刺激处理30 min后,其NO含量与对照相比分别增加21.9%、85.4%、111.2%和134.2%(图1)。

此外,在150 r·min⁻¹的机械刺激处理过程中,细胞中的NO产生量迅速上升,30 min时到达峰值,为2 865.5 nmol·g⁻¹(FW),比对照增加112.3%,20~60 min内细胞NO的含量极显著高于对照(图2)。而用400 μmol·L⁻¹的NO清除剂cPTIO在机械刺激处理前预处理烟草细胞10 min,显著抑制机械刺激诱导的NO的产生(图2),表明机械刺激能诱导烟草细胞中NO的产生,且NO产生的幅度与机械刺激强度成正比(图1)。

2 一氧化氮合酶(NOS)在机械刺激诱导的NO产生中起重要作用

对NOS活性测定的结果表明,烟草细胞NOS活

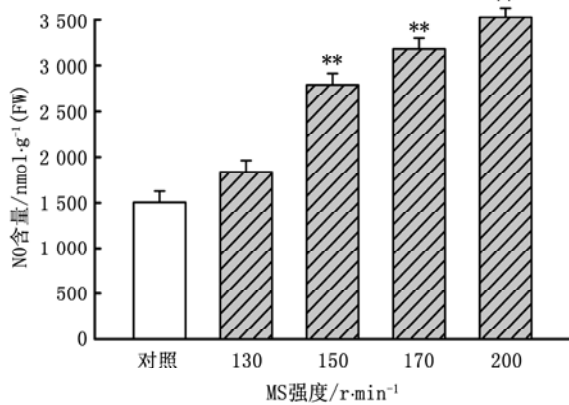


图1 不同强度机械刺激处理30 min对烟草悬浮细胞NO积累的影响

Fig.1 Effects of different strength of mechanical stimulation (MS) for 30 min on NO production in tobacco suspension culture cells

** $P < 0.01$, 与未经MS处理的对照相比。

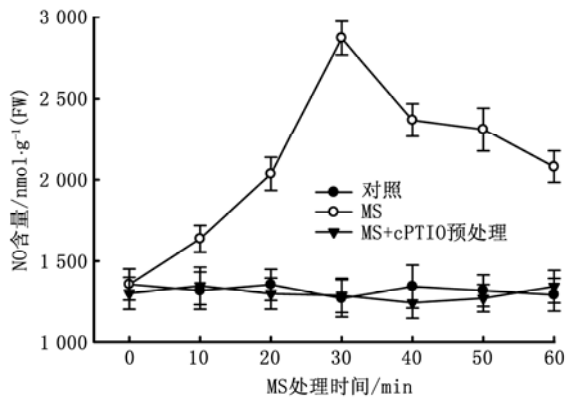


图2 $150 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 机械刺激下烟草悬浮细胞NO含量动态变化及其cPTIO预处理的效应

Fig.2 Time course of NO production in tobacco suspension culture cells during mechanical stimulation (MS) at $150 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ and effect of cPTIO pretreatment

性随机械刺激处理时间延长而迅速增加,由0 min的 $10.2 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白) $\cdot\text{min}^{-1}$ 的基础活性上升到30 min时的 $23.0 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白) $\cdot\text{min}^{-1}$,增加了125.5%。30 min后NOS活性有小幅回落,但仍极显著高于对照(图3),这与机械刺激诱导的NO产生的动态变化相吻合(图2)。

NOS和NR/NiR是植物细胞内NO产生的两条主要酶学途径(Arasimowicz和Floryszak-Wieczorek 2007; Besson-Bart等2008a, b)。用NOS抑制剂L-

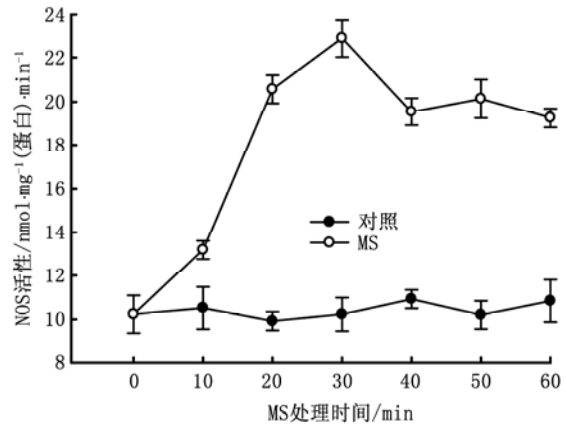


图3 $150 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 机械刺激下烟草悬浮细胞NOS活性动态变化

Fig.3 Change of NOS activity in tobacco suspension cells during mechanical stimulation (MS) at $150 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$

NMMA (Wendy等2001)预处理的结果表明, $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的L-NMMA可极显著抑制经 $150 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的机械刺激诱导的细胞NO的产生。此时细胞NO含量为 $1465.3 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW),即细胞中由机械刺激诱导产生的NO近90%可被L-NMMA抑制(图4)。另一方面, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NR抑制剂 NaN_3 (Yamasaki和Sakihama 2000)预处理烟草细胞对机械刺激诱导的NO产生无显著影响(图4),表明NOS是机械刺激诱导的烟草细胞中NO产生的主要酶源。

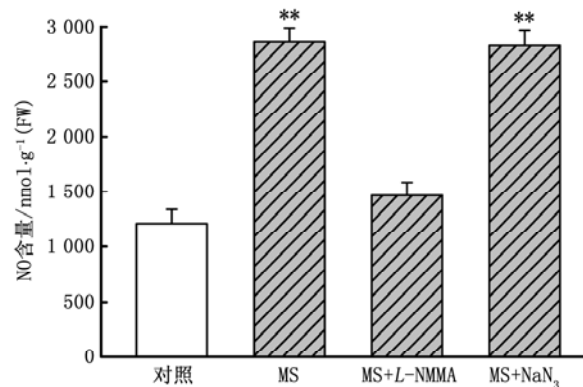


图4 L-NMMA ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和 NaN_3 ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)预处理对机械刺激(MS, $150 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 30 min; 未MS的为对照)诱导的烟草悬浮细胞NO产生的影响

Fig.4 Effects of L-NMMA ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and NaN_3 ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) pretreatment on MS-induced NO production in tobacco suspension cells under $150 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ for 30 min

** $P < 0.01$, 与未经MS处理的对照相比。

3 Ca^{2+} /CaM 参与机械刺激诱导的烟草细胞 NO 产生的调控

用不同浓度的 Ca^{2+} 专一整合剂EGTA (Gong等 1998)预处理烟草细胞10 min,发现 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGTA对机械刺激诱导的NO的产生量无显著影响;随着EGTA浓度增加,NO产生量迅速减少,4~10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGTA处理能显著抑制MS诱导的细胞NO的产生(图5-A)。0.5~10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的外源 Ca^{2+} 预处理对机械刺激诱导的细胞NO的产生量无显著影响,而50~100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Ca^{2+} 显著抑制机械刺激诱导的

细胞NO的产生(图5-B),这种情况可能是高浓度的 Ca^{2+} 对细胞的毒害作用所致(White 和 Broadley 2003)。

质膜 Ca^{2+} 通道阻断剂 La^{3+} 和胞内 Ca^{2+} 通道拮抗剂RR(钨红)能分别抑制胞外 Ca^{2+} 流入胞内及胞内 Ca^{2+} 库的 Ca^{2+} 进入细胞质(Gong等 1998)。 La^{3+} 和RR预处理能抑制机械刺激诱导的烟草细胞NO的产生,且在0~1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内,随着 La^{3+} 和RR浓度增加,抑制程度逐渐加剧(图6)。

CPZ和TFP是2种常用的CaM拮抗剂(李忠光

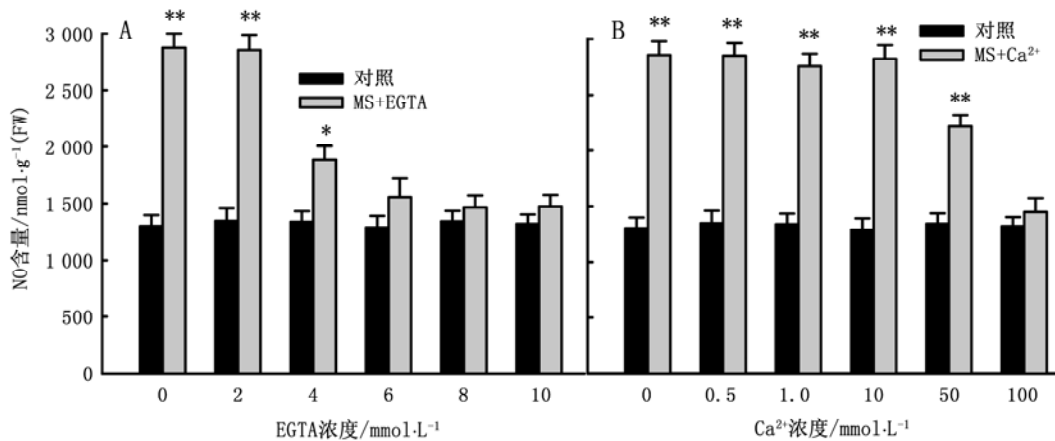


图5 外源EGTA (A)和 Ca^{2+} (B)预处理对机械刺激($150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 30 min)诱导的烟草细胞NO产生的效应

Fig.5 Effects of exogenous EGTA (A) and Ca^{2+} (B) pretreatment on the MS-induced NO production in tobacco suspension cells under $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ for 30 min

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与未经MS处理的对照相比。

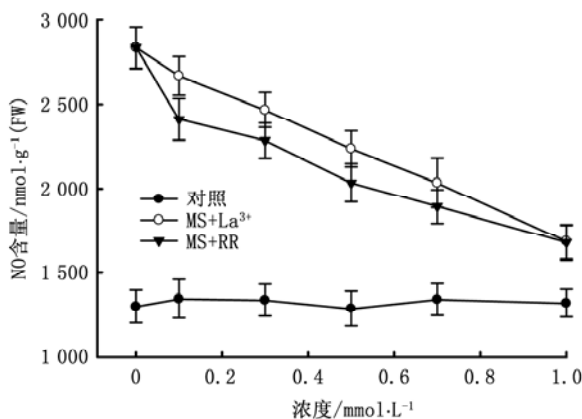


图6 La^{3+} 和RR预处理对机械刺激($150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 30 min)诱导的烟草细胞NO产生的效应

Fig.6 Effects of La^{3+} and ruthenium red (RR) on the MS-induced NO production in tobacco cells under $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ for 30 min

和龚明 2009, 2010)。用CPZ和TFP预处理烟草细胞,结果显示 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的CPZ和TFP对机械刺激诱导的细胞NO的产生量有显著抑制,分别减少39.5%和41.1%。而70~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的CPZ和TFP能减少机械刺激诱导的细胞NO产生量的91.4%和90.6% (图7)。

同时,对CaM活性动态变化的测定也表明,烟草细胞在机械刺激过程中CaM活性迅速上升,30 min至峰值,比对照高出26.1% (图8)。

讨 论

1 机械刺激诱导烟草悬浮细胞NO的快速产生及其可能的途径

机械刺激能否诱导植物细胞产生NO尚存在争议(Garces等 2001; Orozco-Cardenas和Ryan

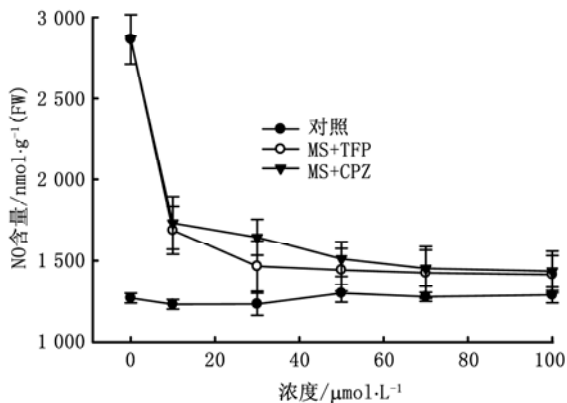


图7 TFP 和 CPZ 预处理对机械刺激($150 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 30 min)诱导的烟草细胞 NO 产生的效应

Fig.7 Effects of TFP and CPZ pretreatment on MS-induced NO production in tobacco cells under $150 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ for 30 min

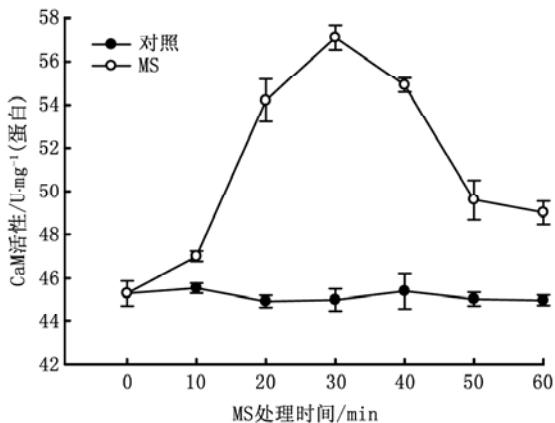


图8 $150 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 机械刺激下烟草悬浮细胞 CaM 活性动态变化

Fig.8 Change of calmodulin activity in tobacco suspension cells under mechanical stimulation at $150 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$

2002; Gould 等 2003), 这可能是由于刺激方式及实验材料不同而导致的差异。本实验中, 150 、 170 和 $200 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的机械刺激显著提高烟草悬浮细胞的 NO 产生量, 并且 NO 的量与机械刺激强度呈正相关(图 1)。而 NO 的清除剂 cPTIO (Tun 等 2001) 能显著抑制 $150 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 机械刺激处理对 NO 产生的诱导作用(图 2), 这表明机械刺激的确能诱导烟草悬浮细胞快速产生 NO。

精氨酸依赖途径和亚硝酸依赖途径是细胞 NO 产生的两个主要来源, 但植物中精氨酸依赖性的 NO 产生机制仍然不清楚, 原因在于没有分离到真

正的 NOS 酶, 在植物中可能只存在(类)NOS 酶 (Crawford 等 2006; Besson-Bard 等 2008a, b)。在本实验中, 机械刺激处理可显著诱导细胞(类)NOS 活性的快速上升(图 3), 而 NOS 抑制剂 L-NMMA 预处理则能显著减少烟草细胞由机械刺激诱导的 NO 产生量, 但 NR 抑制剂 NaN_3 对此影响不显著(图 4), 暗示机械刺激诱导烟草悬浮细胞产生 NO 的主要途径是(类)NOS 酶催化的精氨酸依赖途径。

2 Ca^{2+} /CaM 对机械刺激诱导烟草悬浮细胞产生 NO 的调控作用

Ca^{2+} 在植物细胞对机械刺激信号的感受与转导中有重要作用(Braam 2005; Scippa 等 2008; McAinsh 和 Pittman 2009)。机械刺激能使胞质 Ca^{2+} 浓度迅速升高(Knight 等 1991), 能使触摸诱导基因在 $10\sim 30 \text{ min}$ 内表达量增加上百倍, 而这些触摸诱导基因有 CaM 和 CaM 相关蛋白基因(Braam 和 Davis 1990), 由此机械刺激信号将转化为 Ca^{2+} 信号并引发下游信号事件和生理生化响应(Braam 2005; Scippa 等 2008)。也有报道植物中 NOS 活性受 Ca^{2+} 和 CaM 调控(Crawford 2006; Besson-Bart 等 2008a)。本实验中, 调控细胞内的 Ca^{2+} 含量和 CaM 活性能够影响机械刺激诱导的 NO 的产生量(图 5、6), 机械刺激处理过程中细胞 CaM 活性变化与 NO 含量及 NOS 活性变化有类似性(图 8、2、3), 暗示着机械刺激可能通过 Ca^{2+} /CaM 调控细胞内的(类)NOS 酶, 来实现对 NO 产生量的调控。

综上所述, (类)NOS 酶催化的精氨酸依赖途径可能是机械刺激诱发烟草细胞 NO 产生的主要途径, Ca^{2+} /CaM 可能通过调节(类)NOS 活性来调控 NO 的产生。

参考文献

- 黄号栋, 杨静, 龚明(2003). 用磷酸二酯酶定量检测钙调素方法的改进. 植物生理学通讯, 39: 156~160
- 李忠光, 龚明(2008). 机械刺激诱导的烟草悬浮培养细胞耐热性及其与过氧化氢的关系. 植物生理学通讯, 44: 42~45
- 李忠光, 龚明(2009). 钙和钙调素对机械刺激诱导的烟草悬浮培养细胞耐热性的调控. 植物生理学通讯, 45: 363~366
- 李忠光, 龚明(2010). 钙信使系统对机械刺激诱导的烟草悬浮培养细胞中 H_2O_2 爆发的调控. 植物生理学通讯, 46: 135~138
- 李忠光, 龚明, 陈秀娟(2009). 细胞壁中的过氧化物酶参与机械刺激诱导的烟草悬浮培养细胞的氧化爆发. 植物生理学通讯, 45: 111~114
- 李忠光, 杨仕忠, 周滔, 龚明(2005). 烟草悬浮培养细胞的建立及

- 其对机械刺激的敏感性研究. 云南师范大学学报, 25 (6): 43~45
- 王成彬, 田亚平, 沈文梅, 汪德清, 蒋赐恩(1996). 大鼠脑组织中一氧化氮合酶测定. 生物化学与生物物理进展, 23: 548~551
- 张斐斐, 李忠光, 杜朝昆, 龚明(2010). 植物对机械刺激响应及信号转导. 植物生理学通讯, 46: 517~528
- Arasimowicz M, Floryszak-Wieczorek J (2007). Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Sci*, 172: 876~887
- Archer S (1993). Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J*, 7: 350~362
- Besson-Bard A, Courtois C, Gauthier A, Dahan J, Dobrowolska G, Jeandroz S, Pugin A, Wendehenne D (2008a). Nitric oxide in plants: production and cross-talk with Ca^{2+} signaling. *Mol Plant*, 1: 218~228
- Besson-Bard A, Pugin A, Wendehenne D (2008b). New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 59: 21~39
- Braam J (2005). In touch: plant responses to mechanical stimuli. *New Phytol*, 165: 373~389
- Braam J, Davis RW (1990). Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in *Arabidopsis*. *Cell*, 60: 357~364
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248~254
- Chandok MR, Ytterberg AJ, van Wijk KJ, Klessig DF (2003). The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase complex. *Cell*, 113: 469~482
- Chehab EW, Eich E, Braam J (2009). Thigmomorphogenesis: a complex plant response to mechano-stimulation. *J Exp Bot*, 60: 43~56
- Crawford NM (2006). Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *J Exp Bot*, 57: 471~478
- Crawford NM, Galli M, Tischner R, Heimer YM, Okamoto M, Mack A (2006). Response to Zemojtel *et al*: Plant nitric oxide synthase: back to square one. *Trend Plant Sci*, 11: 526~527
- Garces H, Durzan D, Pedroso MC (2001). Mechanical stress elicits nitric oxide formation and DNA fragmentation in *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot*, 87: 567~574
- Gong M, Van der Luit AH, Knight MR, Trewavas AJ (1998). Heat-shock-induced changes in intracellular Ca^{2+} level in tobacco seedling in relation to thermotolerance. *Plant Physiol*, 116: 429~437
- Gould KS, Lamotte O, Klinguer A, Pugin A, Wendehenne D (2003). Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? *Plant Cell Environ*, 26: 1851~1862
- Haley A, Russell AJ, Wood N, Allan AC, Knight M, Campbell AK, Trewavas AJ (1995). Effects of mechanical signaling on plant cell cytosolic calcium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 4124~4128
- Jih PJ, Chen YC, Jeng ST (2003). Involvement of hydrogen peroxide and nitric oxide in expression of the ipomoelin gene from sweet potato. *Plant Physiol*, 132: 381~389
- Knight MR, Campbell AK, Smith SM, Trewavas AJ (1991). Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature*, 352: 524~526
- Lamotte O, Courtois C, Dobrowolska G, Besson A, Pugin A, Waendehenne D (2006). Mechanism of nitric-oxide-induced increase of free cytosolic Ca^{2+} concentration in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Free Radic Biol Med*, 40: 1369~1376
- Ma W, Smigel A, Tsai YC, Braam J, Berkowitz GA (2008). Innate immunity signaling: cytosolic Ca^{2+} elevation is linked to downstream nitric oxide generation through the action of calmodulin or a calmodulin-like protein. *Plant Physiol*, 148: 818~820
- McAinsh MR, Pittman JK (2009). Shaping the calcium signature. *New Phytol*, 181: 275~294
- Orozco-Cardenas ML, Ryan CA (2002). Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. *Plant Physiol*, 130: 487~493
- Pedroso MC, Magalhaes JR, Durzan D (2000). Nitric oxide induces cell death in *Taxus* cells. *Plant Sci*, 157: 173~180
- Scippa GS, Trupiano D, Rocco M, Di Iorio A, Chiatante D (2008). Unravelling the response of poplar (*Populus nigra*) roots to mechanical stress imposed by bending. *Plant Biol*, 142: 401~413
- Telewski FW (2006). A unified hypothesis of mechanoperception in plants. *Am J Bot*, 93: 1466~1476
- Trewavas A, Knight M (1994). Mechanical signaling, calcium and plant form. *Plant Mol Biol*, 26: 1329~1341
- Tsai YC, Delk NA, Chowdhury NI, Braam J (2007). *Arabidopsis* potential calcium sensors regulate nitric oxide levels and the transition to flowering. *Plant Signal Behav*, 2: 446~454
- Tun NN, Holk A, Scherer GFE (2001). Rapid increase of NO release in plant cell cultures induced by cytokinin. *FEBS Lett*, 509: 174~176
- Wang YH, Chen T, Zhang CY, Hao HQ, Liu P, Zheng MZ, Balušks F, Šamaj J, Lin JX (2009). Nitric oxide modulates the influx of extracellular Ca^{2+} and actin filament organization during cell wall construction in *Pinus bungeana* pollen tubes. *New Phytol*, 182: 851~862
- White PJ, Broadley MR (2003). Calcium in plants. *Ann Bot*, 92: 487~511
- Xiong TC, Jauneau A, Ranjeva R, Mazars C (2004). Isolated plant nuclei as mechanical and thermal sensors involved in calcium signaling. *Plant J*, 40: 12~21
- Yamasaki H, Sakihama Y (2000). Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: *in vitro* evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett*, 468: 89~92