

## 激发子诱发的小麦叶肉细胞原生质体 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高主要源于胞外钙离子内流

刘刚, 刘娜, 王冬梅\*

河北农业大学生命科学学院, 河北保定071001

**摘要:** 以小麦叶肉细胞原生质体-激发子互作为研究体系, 借助共聚焦激光扫描显微镜观察结合药理学试验, 对激发子刺激后不同抗叶锈性小麦品种原生质体 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的动态变化和 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高的钙来源进行了研究。结果表明: 抗叶锈小麦品种‘洛夫林10’的原生质体在激发子处理后,  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 明显升高, 随后有所下降, 但在试验检测时间范围内仍保持较高浓度水平; 而感病品种‘郑州5389’经激发子处理后,  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 只发生轻微的波动。使用质膜钙通道抑制剂抑制胞外钙离子流入胞内, 再经激发子处理, 原生质体 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 虽有升高, 但升高幅度大大降低。这一结果表明, 激发子刺激诱发的 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高主要源于胞外钙离子内流。

**关键词:** 小麦; 原生质体; 叶锈菌; 激发子;  $Ca^{2+}$

## Elicitor-Induced $[Ca^{2+}]_{cyt}$ Elevation Mainly Depends on $Ca^{2+}$ Influx in Mesophyll Protoplasts of Wheat

LIU Gang, LIU Na, WANG Dong-Mei\*

College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China

**Abstract:** Combining confocal laser scanning microscope (CLSM) with pharmacology experiment, the elicitor-induced  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  dynamics in wheat (*Triticum aestivum*) mesophyll protoplast were observed for further research of intracellular calcium sources. Calcium concentration of mesophyll protoplast in wheat cultivar ‘Lovrin 10’ (resistant) showed a trend of distinctly ascend and later descend after intercellular washing fluid (IWF) treatment. Whereas in ‘Zhengzhou 5389’ (susceptible), the trend was inconspicuous. Calcium channel inhibitor was used to elucidate the sources of  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  elevation in protoplast, which resulted in a reduced increasing rate of  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  dynamics. The results indicates that elicitor-induced  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  rise in wheat mesophyll protoplast is mainly from extracellular  $Ca^{2+}$  influx.

**Key words:** wheat (*Triticum aestivum*); protoplast; *Puccinia triticina*; elicitor; calcium

钙离子作为普遍的胞内第二信使, 通过其浓度的时空变化, 把胞外信号传递到胞内, 并在细胞中控制着许多的生理过程。在植物细胞中, 众多刺激都能引起胞质 $Ca^{2+}$ 浓度( $[Ca^{2+}]_{cyt}$ )的变化, 如机械刺激(Beneloujaephajri等2013)、热胁迫(Wu和Jinn 2012)、光(Baum等1999)、氧化胁迫(Jiang等2013)、渗透胁迫(Monetti等2014)、重力(Tatsumi等2014)、结瘤因子(Nod factors)(Morieri等2013)和激发子(Blume等2000)。这种简单的离子变化是如何感受、区分不同的外界刺激, 并调节下游特异性生理反应的, 一直是人们关注的热点问题。大量的试验证据表明, 植物能够利用包括 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 变化的时空特征在内的信号途径来感受一些外来刺激(Michal Johnson等2014), 随后 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 根据刺激的性质和强度会发生各种形式的改变, 如振荡(oscillation)(Granqvist等2012)、短暂的钙峰

(Shacklock等1992)、局部的钙梯度和钙波等(Choi等2014)。弄清 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 变化过程中 $Ca^{2+}$ 的来源是探究这些特异性钙信号特征及其形成机制的关键。近些年来, 人们已认识到钙信使系统参与植物抗病性表达过程, 并已证实钙信号是病原菌感染后产生的早期反应之一。我们课题组从胞外钙、钙调素浓度的变化, 钙信使阻断和激活药物等试验(关春蕾等2006; 侯春燕等2007), 多个方面证明钙信使系统介导了小麦-叶锈菌的互作过程。为探讨 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高的来源, 我们采用焦锑酸钾沉淀法, 并

收稿 2014-09-28 修定 2014-12-19

资助 国家自然科学基金(31171472)、高等学校博士学科点专项科研基金资助课题(优先发展领域)(20111302130001)、河北省应用基础研究计划重点基础研究项目(12967149D)。

\* 通讯作者(E-mail: dongmeiwang63@126.com; Tel: 0312-7528276)。

结合电镜观察,对叶锈菌侵染过程中不同抗性的小麦品种叶片胞质钙离子分布进行了亚细胞定位,从原位水平呈现了小麦应答叶锈菌侵染的早期,大量钙离子由胞间隙通过细胞壁和质膜进入到细胞质中(Liu等2010)。

目前,钙离子参与抗病反应的证据已有很多,然而很少有试验提供 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 变化的动力学曲线及其形成机制(关键是钙离子的来源)。而只有获得这些详细的钙离子信号信息,才能够更好地解释在病原物与植物互作过程中钙离子信号特异性及其诱发的特异下游反应间的关系。但由于 $Ca^{2+}$ 作为信号分子反应量小、速度快,尤其是原位检测像小麦叶肉细胞应答外界刺激时 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的实时变化,还存在很大的困难。

近期,我们以浓缩的胞间洗脱液(intercellular washing fluids, IWF)作为激发子刺激原生质体,建立了小麦叶肉细胞原生质体-激发子互作体系,来模拟小麦叶肉组织与叶锈菌的互作系统,取得了一些研究结果(刘刚等2007;刘刚和王冬梅2005;陈晓波等2002)。结合钙离子荧光指示剂Fluo-3AM的装载,我们采用荧光指示剂孵育法测定小麦叶肉细胞原生质体 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ ,还实现了对单个原生质体的跟踪观察(刘刚等2004)。这些工作为实时检测细胞质中 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的变化提供了保障。

本试验中,我们仍选用本实验室常用的两个抗叶锈性不同的小麦品种‘洛夫林10’和‘郑州5389’为材料,以激发子-原生质体简化的试验系统来模拟叶锈菌侵染小麦叶片的互作体系,借助钙离子荧光染料的装载和共聚焦激光扫描显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)观察,对激发子刺激后不同抗叶锈品种原生质体 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的变化进行了研究,得到了 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 应答激发子刺激的动力学特征曲线;并通过药理学试验整合胞外钙离子或抑制质膜钙通道,对激发子刺激引起的 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 变化进行了观察,从药理学角度探索 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高的来源问题,为进一步探讨这一互作体系中信号转导通路的其他信号分子及其相互间的作用方式奠定了基础。

## 材料与方法

### 1 植物和真菌材料

采用小麦(*Triticum aestivum* L.)品种‘郑州

5389’和‘洛夫林10’,分别与小麦叶锈菌(*Puccinia triticina*)生理小种260组成亲和及不亲和组合。

### 2 小麦叶肉细胞原生质体的制备

参照刘刚和王冬梅(2005)的方法,取六天龄小麦第一真叶,在距叶尖端0.5 cm处切去叶尖,用双面刀片将叶片横切成0.5 mm的细丝,置于酶液中,在 $(26\pm 1)^\circ\text{C}$ 水浴摇床( $50\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ )上进行酶解脱除细胞壁。将酶解液用280目尼龙网过滤,以除去未酶解完全的叶肉组织碎片,滤液以 $150\times\text{g}$ 离心2 min收集原生质体,再用Pipes缓冲液洗涤2次,用血球计数板记数, Pipes缓冲液稀释至 $1\times 10^9$ 个 $\cdot\text{L}^{-1}$ ,常温下静置备用。

### 3 IWF的制备

参照陈晓波等(2002)的方法,对生长7 d的小麦‘洛夫林10’幼苗,采用扫菌的方法接种生理小种260,  $25^\circ\text{C}$ 黑暗保湿16 h后放入培养室。于接种后第3天(即接种后72 h),取接种叶片,将切掉叶尖和叶基部后的叶段放入大离心管中,在 $4^\circ\text{C}$ 条件下将重蒸水真空渗入叶片,离心后收集液体,经透析袋浓缩,记作IWF<sub>260</sub>,以考马斯亮蓝G-250法测定蛋白质含量。IWF可在 $-10^\circ\text{C}$ 环境中短期避光保存。以同样的方法提取未接种小麦叶片的IWF作为对照,记作IWF<sub>CK</sub>。

### 4 原生质体 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 变化的观察

将装载了Fluo-3AM的原生质体溶液滴于带有小槽的载玻片上,载玻片放在激光共聚焦显微镜(Bio-Rad MR/A-2型,配备50 mV氩激光器)的载物台上,补加200  $\mu\text{L}$  Pipes缓冲液,使液体充满小槽,保持液面水平。以氩激光为激发光源,激发光波长为488 nm (FITC, Alexa),选取一个装载完好的原生质体,添加所需药剂,然后调节微调至合适层面,通过计算机控制扫描和数据采集系统(Time course),对该层面上钙离子的荧光强度和分布随时间的变化进行观察和采集,采集图像和数据记录于计算机中。图像采集选用 $256\times 256$ 像素,循环次数为300次,间隔2 s,共计10 min。

用Confocal Assistant 4.0 软件对储存于计算机中的数字化图像按时间点选取并进行加工处理,而后用Adobe Photoshop 7.0软件对图片进行编辑排版。用与共聚焦激光扫描显微镜配套的Laser Pix (Version 4.0)分析软件对所获得的Time course

扫描图进行分析: 圈定一个原生质体胞质的某一特定区域, 经软件处理后得到这个原生质体在特定层面上的钙离子荧光强度相对值的变化数据, 然后用Excel软件导出此原生质体特定区域的相对荧光强度的百分比变化, 即可作图。

## 实验结果

### 1 IWF处理后小麦叶肉细胞原生质体 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的变化特征

共聚焦激光扫描显微镜的观察结果显示, 经激发子处理后2个小麦品种的叶肉细胞原生质体 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 动态变化有明显的差异。‘洛夫林10’原生质体在激发子IWF<sub>260</sub>处理后50 s,  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 开始缓慢上升, 约250 s时 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 达到高峰, 一直持续到360 s,

其相对荧光百分比为1.4, 随后稍有下降, 但仍维持较高浓度的钙离子水平, 相对荧光百分比在1.2左右, 600 s时仍没有恢复到静息态水平(图1-A, 图2-A、B)。而‘郑州5389’原生质体经IWF<sub>260</sub>处理后,  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 水平只发生了轻微变化, 在处理约200和330 s时,  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 水平只出现了极微弱的钙振荡, 600 s内一直呈现这样的趋势(图1-A、图2-C)。“洛夫林10”原生质体经IWF<sub>CK</sub>处理后600 s内,  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 水平与未经任何处理的“洛夫林10”原生质体相比基本上没有发生变化(图1-B); “郑州5389”也表现相似趋势(资料未列出)。可见, 抗、感不同的2个小麦品种原生质体 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 水平对激发子刺激的反应有明显的差异, 说明钙离子可能参与了激发子刺激诱发的防卫反应表达过程。

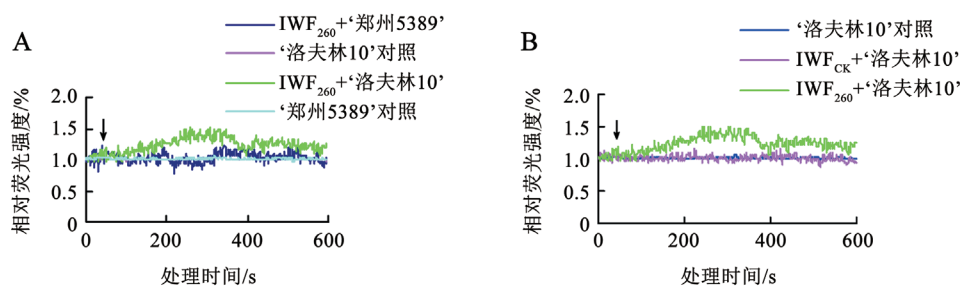


图1 小麦叶肉细胞原生质体经IWF处理后 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的动态变化

Fig.1 Cytosolic calcium dynamics in wheat mesophyll protoplast after IWF treatment

A: ‘洛夫林10’和‘郑州5389’叶肉细胞原生质体经IWF<sub>260</sub>处理; B: ‘洛夫林10’叶肉细胞原生质体经IWF<sub>260</sub>和IWF<sub>CK</sub>处理。对照为未经IWF处理的叶肉细胞原生质的静息态 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 变化。箭头所指处为加入IWF<sub>260</sub>的时间。

### 2 ‘洛夫林10’原生质体经IWF<sub>260</sub>刺激后 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高的来源

为探讨 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高的来源, 预备试验中我们检测了多种钙通道抑制剂对‘洛夫林10’原生质体 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的影响。本试验中我们采用了抑制效果较好的 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{La}^{3+}$ 作为质膜钙离子通道的抑制剂。

$[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高一般源于胞外钙离子内流和胞内钙库的钙释放两个途径。当用IWF<sub>260</sub>处理‘洛夫林10’原生质体时, 可使其 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高(图1-B); 在加IWF<sub>260</sub>之前加入 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{La}^{3+}$ , 原生质体 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 虽也有升高, 但升高幅度大大降低, 峰值最高只达到1.2(图3-A)。在加入IWF<sub>260</sub>之前加入 $10 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的EGTA, 则激发子对‘洛夫林10’诱发的 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 变化被完全抑制, 其动态曲线近乎一条直线(图

3-B)。以上试验结果表明, ‘洛夫林10’原生质体经IWF<sub>260</sub>刺激后,  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高可能主要依赖于胞外钙离子的内流。

本文选取了部分不同处理条件下 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的动态变化以伪彩图的形式表示出来(图2), 一方面能更直观地再现 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的动态变化, 另一方面也可以把不同处理条件下 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的动态变化进行比较。

## 讨 论

### 1 抗性不同的小麦叶肉细胞原生质体应答激发子刺激的 $\text{Ca}^{2+}$ 信号特异性

植物细胞在众多因素刺激下, 都使用细胞内钙离子作为第二信使来调节植物生长、发育、抗逆等生理反应(Plattner和Verkhatsky 2013)。人们

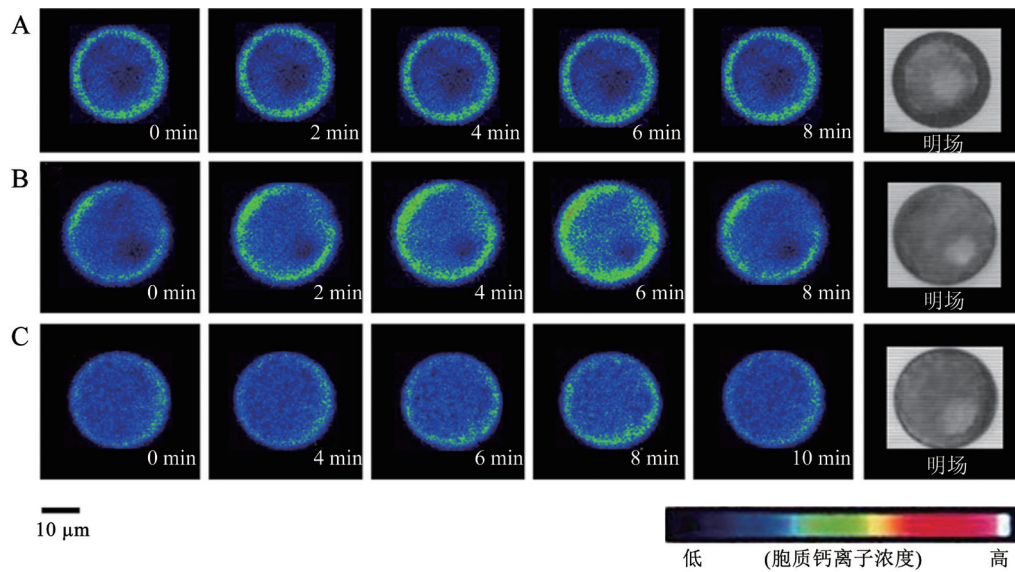


图2 小麦叶肉细胞原生质体经IWF处理后 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 变化的伪彩动态图

Fig.2 Pseudocolor images of cytosolic calcium in wheat mesophyll protoplast after IWF treatment

A: ‘洛夫林10’原生质体未经IWF处理的静息态 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的动态变化; B: ‘洛夫林10’原生质体经IWF<sub>260</sub>处理后的 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 变化; C: ‘郑州5389’原生质体经IWF<sub>260</sub>处理后的 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 变化。右下角的数字为取景时间。

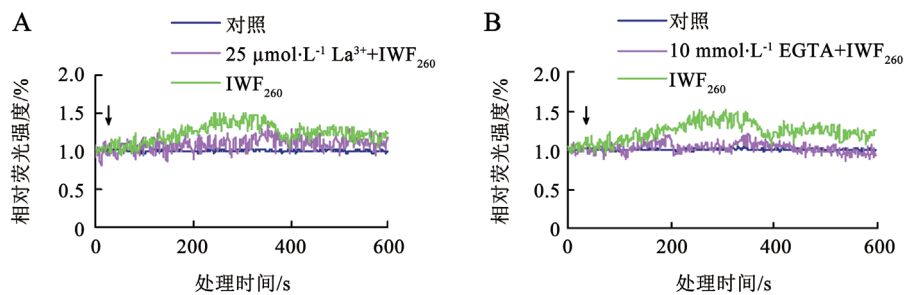


图3  $La^{3+}$ 和EGTA分别与IWF<sub>260</sub>共处理‘洛夫林10’叶肉细胞原生质体后 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的动态变化

Fig.3 Cytosolic calcium dynamics in ‘Lovrin 10’ mesophyll protoplast treated by IWF<sub>260</sub> with EGTA and  $La^{3+}$  respectively

A:  $La^{3+}$ 和IWF<sub>260</sub>共处理; B: EGTA和IWF<sub>260</sub>共处理。对照为未经IWF处理的‘洛夫林10’叶肉细胞原生质体的静息态 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 变化。箭头所指处为加入IWF<sub>260</sub>的时间。

推测植物产生特异性 $Ca^{2+}$ 信号或由 $Ca^{2+}$ 介导的特异性信号通路来感受和区分不同的外界刺激因素。

本试验中当用激发子刺激‘洛夫林10’原生质体时检测到一个 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 峰,且观察到随后有一个持续的高 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ ,在观察时间内 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 没有恢复到静息态水平。这种由激发子刺激引起的 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 变化曲线,不同于其他刺激如缺氧(Sedbrook等1996)、低渗(Chandra和Low 1998)和冷胁迫(Knight等1996)等在植物细胞中引起的 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 变化,后者的反应比激发子的反应更快。这也许正是细胞内的钙信号系统感受激发子刺激所表现出

来的钙离子信号特异性。相关方面的研究也有一些报道, Lecourieux等(2002)利用隐地疫霉(*Phytophthora cryptogea*)分泌的Cryptogein激发子处理转水母发光蛋白基因的烟草悬浮细胞时发现,激发子处理5 min后 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高到最高峰值,稍有下降后又有一个持续的上升,在30 min左右达到高峰,2.5 h以后 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 也没有恢复到静息态水平。Mithöfer等(2001)用 $\beta$ -葡聚糖和壳质激发子处理转水母发光蛋白基因的大豆细胞,在2.0~2.5 min时形成一个 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 高峰,在7~8 min时出现第二个 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 峰,峰值要低于第一个峰值。Kadota等(2004)用

Cryptogein激发子处理BY-2悬浮细胞时,也得到了相似的 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 峰。现在看来,不同种类的激发子诱发的钙离子变化可能是相似的,这表明也许不同的激发子被相似的钙离子信号途径调节。

许多试验表明,钙离子信号作为病原菌诱发的早期信号能够诱发下游一系列生理生化反应,包括植保素的合成、防卫基因的激活及细胞的过敏反应(hypersensitive reaction, HR)。这些下游的事件能被钙离子阻断剂抑制(Lecourieux等2002; Tavernier等1995; Binet等2001),表明原初的钙离子流动是诱发防卫反应的关键。本试验中,我们得到了抗病品种‘洛夫林10’受激发子刺激后 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 变化的动力学曲线,如果将之理解为寄主细胞应答激发子刺激表现出的特异钙信号,那么,这种特异的钙离子信号在小麦抗叶锈菌侵染的信号通路中起着怎样的作用,是否与激发子诱发的一系列防卫反应直接相关,动力学曲线的哪部分在其中起到了关键性作用,这些问题还有待于我们进一步研究。

## 2 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高的 $Ca^{2+}$ 来源

我们课题组在早期对 $Ca^{2+}$ 在小麦与叶锈菌互作中的变化及作用进行了许多的研究,当将不同浓度的 $Ca^{2+}$ 螯合剂EGTA、 $Ca^{2+}$ 通道阻断剂异博定与 $La^{3+}$ 、CaM拮抗剂TFP,采用注射法分别注入小麦‘洛夫林10’的叶片中,注射后再接种叶锈菌小种366(不亲和)和165(亲和),发现这3类药物均能部分抑制亲和组合与不亲和组合中的苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia lyase, PAL)、过氧化物酶(peroxidase, POX)的活性及HR表达的强度,不亲和组合受抑制的程度明显高于亲和组合,从而推测胞外 $Ca^{2+}$ 进入胞内介导叶锈菌侵染激活的小麦防卫反应的表达过程(关春蕾等2006;侯春燕等2007)。

本试验结果表明,当抗性小麦品种‘洛夫林10’叶肉细胞原生质体受到激发子刺激时,激发子能够诱发 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的升高,并且 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高的特征曲线除了一个 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 峰外,还有一个持续的高 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 水平维持过程。我们分别使用钙离子螯合剂EGTA和质膜钙离子通道抑制剂 $La^{3+}$ ,都明显抑制了激发子诱发的 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 峰(图3-A、B),初步表明 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的升高主要依赖于胞外钙离子的内流。我

们前期通过透射电镜观察也较为直观地反映出在不亲和组合中,小麦与叶锈菌互作早期钙离子由胞间隙通过细胞壁和质膜进入胞质的过程,从原位水平再现了 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高的来源(Liu等2010),这一结果与本文共聚焦激光扫描显微镜记录的结果相似,即采用两种不同的系统和试验方法,得到了相似的结论。

## 参考文献

- 陈晓波,王冬梅,刘娟,王智焱(2002). 接种叶锈菌的小麦叶片胞间洗脱液对叶肉细胞原生质体微丝骨架的影响. 植物生理学与分子生物学报, 28: 344-350
- 关春蕾,侯春燕,王冬梅(2006). 影响 $Ca^{2+}$ 代谢和钙通道的药物对小麦受叶锈菌侵染后诱发的HR的作用. 河北农业大学学报, 29: 4-8
- 侯春燕,王智焱,王冬梅(2007). 钙与叶锈菌侵染诱导小麦防卫反应的关系. 华北农学报, 22: 145-147
- 刘刚,党磊,王冬梅(2007). 激发子诱发小麦叶肉细胞原生质体微管骨架排列格局与 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的变化. 分子细胞生物学报, 40: 217-225
- 刘刚,刘娜,侯春燕,韩胜芳,张洁,赵军峰,王冬梅(2004). 荧光指示剂孵育法测定小麦叶肉细胞原生质体胞质游离 $Ca^{2+}$ 的变化. 河北农业大学学报, 27: 25-28
- 刘刚,王冬梅(2005). 小麦叶肉细胞原生质体中微管骨架的排列格局与 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的关系. 实验生物学报, 38: 331-339
- Baum G, Long JC, Jenkins GI, Trewavas AJ (1999). Stimulation of the blue light phototropic receptor NPH1 causes a transient increase in cytosolic  $Ca^{2+}$ . Proc Natl Acad Sci USA, 96: 13554-13559
- Beneloujaephajri E, Costa A, L'Haridon F, Métraux JP, Binda M (2013). Production of reactive oxygen species and wound-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Botrytis cinerea* are preceded and depend on a burst of calcium. BMC Plant Biol, 13: 160
- Binet MN, Humbert C, Lecourieux D, Vantard M, Pugin A (2001). Disruption of microtubular cytoskeleton induced by cryptogein, an elicitor of hypersensitive response in tobacco cells. Plant Physiol, 125: 564-572
- Blume B, Nürnberger T, Nass N, Scheel D (2000). Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. Plant Cell, 12: 1425-1440
- Chandra S, Low PS (1998). Measurement of  $Ca^{2+}$  fluxes during elicitation of the oxidative burst in aequorin-transformed tobacco cells. J Biol Chem, 272: 28274-28280
- Choi WG, Toyota M, Kim SH, Hilleary R, Gilroy S (2014). Salt stress-induced  $Ca^{2+}$  waves are associated with rapid, long-distance root-to-shoot signaling in plants. Proc Natl Acad Sci USA, 111: 6497-6502
- Granqvist E, Wysham D, Hazledine S, Kozłowski W, Sun J, Charpentier M, Martins TV, Haleux P, Tsaneva-Atanasova K, Downie JA et al (2012). Buffering capacity explains signal variation in symbiotic calcium oscillations. Plant Physiol, 160: 2300-2310

- Jiang Z, Zhu S, Ye R, Xue Y, Chen A, An L, Pei ZM (2013). Relationship between NaCl- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytosolic Ca<sup>2+</sup> increases in response to stress in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 8: e76130
- Kadota Y, Goh T, Tomatsu H, Tamauchi R, Higashi K, Muto S, Kuchitsu K (2004). Cryptogein-induced initial events in tobacco BY-2 cells: pharmacological characterization of molecular relationship among cytosolic Ca<sup>2+</sup> transients, anion efflux and production of reactive oxygen species. *Plant Cell Physiol*, 45 (2): 160~170
- Knight H, Trewavas AJ, Knight MR (1996). Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant Cell*, 8: 489~503
- Lecourieux D, Mazars C, Pauly N, Ranjeva R, Pugin A (2002). Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell*, 14: 2627~2641
- Liu G, Hou CY, Wang DM (2010). Calcium influx is required for the initiation of the hypersensitive response of *Triticum aestivum* to *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. *Physiol Mol Plant Pathol*, 74: 267~273
- Michal Johnson J, Reichelt M, Vadassery J, Gershenzon J, Oelmüller R (2014). An *Arabidopsis* mutant impaired in intracellular calcium elevation is sensitive to biotic and abiotic stress. *BMC Plant Biol*, 14: 162
- Mithöfer A, Fliegmann J, Daxberger A, Ebel C, Neuhaus-Url G, Bhagwat AA, Keister DL, Ebel J (2001). Induction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis by  $\beta$ -glucan elicitors in soybean is independent of cytosolic calcium transients. *FEBS Lett*, 508: 191~195
- Monetti E, Kadono T, Tran D, Azzarello E, Arbelet-Bonnin D, Biligui B, Briand J, Kawano T, Mancuso S, Bouteau F (2014). Deciphering early events involved in hyperosmotic stress-induced programmed cell death in tobacco BY-2 cells. *J Exp Bot*, 65: 1361~1375
- Morieri G, Martinez EA, Jarynowski A, Driguez H, Morris R, Oldroyd GE, Downie JA (2013). Host-specific Nod-factors associated with *Medicago truncatula* nodule infection differentially induce calcium influx and calcium spiking in root hairs. *New Phytol*, 200: 656~662
- Plattner H, Verkhatsky A (2013). Ca<sup>2+</sup> signalling early in evolution—all but primitive. *J Cell Sci*, 126: 2141~2150
- Sedbrook JC, Kronebusch PJ, Borisy GG, Trewavas AJ, Masson PH (1996). Transgenic *AEQUORIN* reveals organ-specific cytosolic Ca<sup>2+</sup> responses to anoxia in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiol*, 111: 243~257
- Shacklock PS, Read ND, Trewavas AJ (1992). Cytosolic free calcium mediates red-light induced photomorphogenesis. *Nature*, 358: 753~755
- Tatsumi H, Toyota M, Furuichi T, Sokabe M (2014). Calcium mobilizations in response to changes in the gravity vector in *Arabidopsis* seedlings: possible cellular mechanisms. *Plant Signal Behav*, 9. pii: e29099
- Tavernier E, Wendehenne D, Blein JP, Pugin A (1995). Involvement of free calcium in action of cryptogein, a proteinaceous elicitor of hypersensitive reaction in tobacco cells. *Plant Physiol*, 109: 1025~1031
- Wu HC, Jinn TL (2012). Oscillation regulation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin and heat-stress related genes in response to heat stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Signal Behav*, 7: 1056~1057