

大白菜钙运输基因*ECA*和钙响应基因*CAS*在缺钙胁迫下的表达分析

程涣^{1,2}, 苏同兵², 于拴仓², 张凤兰², 余阳俊², 张德双², 赵岫云², 汪维红², 卢桂香², 龚义勤¹, 柳李旺^{1,*}

¹南京农业大学园艺学院, 南京210095; ²北京市农林科学院蔬菜研究中心, 北京100097

摘要: 以干烧心抗性显著不同的两个大白菜自交系为材料, 研究了Ca²⁺运输基因*ECA*和Ca²⁺响应基因*CAS*在缺钙处理过程的表达变化。同源序列比对发现大白菜共有7个*ECA*基因和4个*CAS*基因; 缺钙处理后, 2个材料中的*ECA*基因都上调表达, 但在抗病材料中的上调更为显著; *CAS*基因在缺钙处理后的表达也有显著改变, 但各个*CAS*基因的表达模式表现较大差异。表明大白菜*ECA*和*CAS*基因的表达受钙胁迫影响, 并可能与大白菜苗期干烧心病的发生相关。

关键词: 大白菜; 干烧心; Ca²⁺; 钙信号; 基因表达

Expression Analysis of Ca²⁺ Transport and Response Genes, *ECA* and *CAS*, in Cabbage under Calcium Deficiency Condition

CHENG Huan^{1,2}, SU Tong-Bing², YU Shuan-Cang², ZHANG Feng-Lan², YU Yang-Jun², ZHANG De-Shuang², ZHAO Xiu-Yun², WANG Wei-Hong², LU Gui-Xiang², GONG Yi-Qin¹, LIU Li-Wang^{1,*}

¹College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ²Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China

Abstract: In this study, a total of 7 *ECA* and 4 *CAS* genes were identified in Chinese cabbage by protein sequence alignment. Phylogenetic analysis of *ECA* and *CAS* genes revealed that there were great differences between genes in the each gene family, which suggested that different genes might execute different functions. The expression of *ECA* and *CAS* genes was detected in tipburn-susceptible and resistant lines after Ca²⁺ deficiency treatment. The results showed that *ECA* genes were up-regulated in both lines, and expressed at a higher level in resistant plant than in sensitive plant. However, the expression pattern of different *CAS* genes was not consistent, which might be caused by functional division of different *CAS* genes. Our study suggested the expression of *ECA* and *CAS* was affected by calcium deficiency, and associated with tipburn occurrence in seedling of Chinese cabbage, which provided helpful information for further study the molecular mechanism of tipburn resistance in Chinese cabbage.

Key words: Chinese cabbage; tipburn; calcium; calcium signal; gene expression

大白菜(*Brassica pekinensis*)属十字花科芸薹属作物, 原产中国, 栽培历史悠久。近年来, 大白菜干烧心(tipburn)病发生极为普遍, 严重影响了大白菜的产量和品质(张鹤等2009)。大白菜干烧心病多在莲座期和包心期开始发病, 但环境不适合或品种抗性弱时, 在苗期也经常发生。发病初期, 叶缘出现水渍、透明等症状, 随着病情发展, 最终表现为干枯; 干烧心病在贮藏期间仍有一定的发展, 并易与其他腐生菌并发侵染, 诱发叶球内部发生“干叶”、“夹叶烂”现象, 最终导致整个植株腐烂。早期研究认为大白菜干烧心病是由于环境缺钙引起的生理性病害; 后来研究认为引发大白菜干烧心病的真正原因是植株对钙的吸收与利用受

阻、生长环境异常和生长不协调等因素综合作用的结果(Aloni等1986; 石姜超等2012; 缪颖等1998; Ho和Adams 1989; Francois等1991)。目前对干烧心病的研究多集中在诱病因素、发病机理和田间防控上, 但对发病的分子机理及遗传规律的研究报道较少(孙秀峰等2008)。

钙(Ca²⁺)不但是植物生长发育所必需的一种大量营养元素, 而且也是一种转导多种生理过程

收稿 2014-11-28 修定 2015-03-10

资助 科技部“973”项目(2012CB113906)、国家自然科学基金(31171970和31401875)、国家科技支撑计划(2012BAD-02B01)和大宗蔬菜产业技术体系(CARS-25-A-11)。

* 通讯作者(E-mail: nauliulw@njau.edu.cn; Tel: 025-84395563)。

的胞内胞外信号分子(Gilroy和Trewavas 2001)。研究表明, 环境缺钙和钙利用效率低是导致大白菜干烧心病发生的重要原因之一, 是影响大白菜的产量和品质的重要因子。钙对植物细胞的结构和生理功能有重要作用, 能维持细胞壁、细胞膜及膜结合蛋白的稳定性, 参与胞内稳态和生长发育的调节过程(王瑞云和王玉国2001; Lecourieux等2006; Ma和Berkowitz 2007); Ca^{2+} 还是植物细胞信号转导中最重要的第二信使: 多种外界刺激都能引起胞质 Ca^{2+} 浓度的变化, 从而将外界刺激转化成植物可感知的内部信号, 介导植物完成对环境刺激和发育信息的感知和响应(Sanders等1999; McAinsh和Pittman 2009; Dodd等2010; Kudla等2010)。

胞质 Ca^{2+} 浓度的变化需要胞外的 Ca^{2+} 进入细胞质或者胞内 Ca^{2+} 库的释放, 这个过程需要 Ca^{2+} 泵(Ca^{2+} pumps)的参与。最近研究显示, 在缺钙环境下, 拟南芥 P_{2A} 型 Ca^{2+} 泵*ECA1*和*ECA3*的敲除可导致植物发育迟缓、叶尖死亡和叶片黄化(Wu等2002; Mills等2008); P_{2B} 型 Ca^{2+} 泵*ACA4*和*ACA11*的敲除可导致植物新叶生长缓慢、干边, 严重时萎蔫死亡的典型超敏性反应(Boursiac等2010; Baxter等2003)。上述表型与大白菜干烧心病苗期发病症状类似, 这暗示此类基因可能与干烧心发病进程相关。而细胞内感受胞质 Ca^{2+} 浓度变化的原件被称为 Ca^{2+} 感受器*CAS* (calcium sensor), 如CaM (钙调素)、CBL (钙调磷酸酶B类蛋白)和CDPK (钙依赖性蛋白激酶) (Defalco等2010)。感受器可将钙信号传递下去, 进而实现调控基因表达以提高植物抗逆性。

不同品种的大白菜材料对干烧心病抗性存在着较大差异。干烧心病的发生受环境影响很大, 在田间进行大量筛选抗性比较困难, 且耗时较长。因此在室内一般采用改良的Hoagland营养液对不同大白菜进行苗期抗干烧心鉴定, 鉴定结果与田间基本吻合(余阳俊等2001)。本文以干烧心病抗性显著不同的两个大白菜高代自交系为材料, 利用缺钙处理, 通过RT-qPCR检测, 发现 Ca^{2+} 运输基因*ECA*和 Ca^{2+} 响应基因*CAS*的表达受钙胁迫影响; 并且在抗/感两种材料中, *ECA*和*CAS*的表达模式存在明显不同。这暗示*ECA*和*CAS*可能与大白菜苗期干烧心病的发生相关, 为今后通过分子手段解析干烧心发病机理提供一定的理论基础。

材料与方法

1 材料

选用对干烧心病抗性明显差异的大白菜 [*Brassica pekinensis* (Lour.) Rupr.]高代自交系43#和80#为供试材料。43#为较抗干烧心自交系, 来源于一代杂交种(F_1)品种‘秦二小’(陕西); 80#为感干烧心自交系, 来源于一代杂交种(F_1)品种‘早大橘’(日本); 二者均由北京市农林科学院蔬菜研究中心白菜课题组提供。

2 材料的缺钙处理

大白菜苗期抗干烧心鉴定主要参考余阳俊等(2001)方法。

苗期缺钙处理实验在人工气候室中进行: 首先在铺有湿润滤纸的培养皿中催芽, 待种子露白时播入穴盘。当幼苗长到二叶一心时, 将幼苗移至Hoagland完全营养液中进行培养。一周后更换 Ca^{2+} 浓度不同的Hoagland营养液进行缺钙处理, 诱导大白菜干烧心病的发生。 Ca^{2+} 浓度分别为5.7、1.71、1.14和0.57 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

缺钙营养液采用不含钙的改良Hoagland营养液配方, 即除去原配方中的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 同时使总N量和原营养液基本持平: NH_4NO_3 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, KNO_3 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 其他成分同Hoagland营养液。

3 取样及RNA提取

缺钙处理培养2周后, 易感材料表现明显症状; 收取生长点附近的3片真叶, 利用液氮速冻, 置于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中备用。

总RNA提取使用Plant Total RNA Purification Kit试剂盒(GeneMark), 按说明书操作。利用Nano Drop测定RNA浓度与质量, 使用1%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性。

反转录使用FastQuant RT Kit (with gDNase)试剂盒(TIANGEN), 将RNA反转录成cDNA, 并稀释至250 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 备用。

4 DNA引物设计及荧光定量PCR

利用TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>)获得模式植物拟南芥 Ca^{2+} 运输基因*ECA1*~*ECA4*和 Ca^{2+} 响应基因*CAS*, 并获得氨基酸序列; 利用BRAD (<http://brassicadb.org/brad/index.php>)的Blastp工具获得大白菜中相应的同源基因及其序列; 利用T-A克隆,

分别将来源于43#和80#自交系材料的*ECA*和*CAS*基因进行全长ORF (开放阅读框)克隆和测序。利用Primer5软件在目的基因和内参基因的保守序列区域设计引物(表1)。

荧光定量PCR使用Roche Light Cycler® 480, 采用罗氏SYBR Green I Master试剂盒, 参照基因选用三磷酸甘油醛脱氢酶基因(*GAPDH*) (Qi等2010)。PCR反应体系10 μ L, 包含: Master Mix (2 \times) 5 μ L, 上游引物(10 μ mol \cdot L⁻¹) 0.5 μ L, 下游引物(10 μ mol \cdot L⁻¹) 0.5 μ L, Water PCR-grade 2 μ L, cDNA 2 μ L, 每个样品设置3个重复。Real-Time PCR扩增程序: 95 $^{\circ}$ C预变性5 min; 95 $^{\circ}$ C变性10 s, 60 $^{\circ}$ C退火12 s, 72 $^{\circ}$ C延伸15 s, 40个循环; 在延伸步骤收集荧光信号; 温度从65 $^{\circ}$ C缓慢递增到95 $^{\circ}$ C时测定熔解曲线。数据处理利用Light Cycler 480SW软件分析, 以*GAPDH*作为内参对2个材料中Ca²⁺运输和响应相关基因进行相对定量分析。根据2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算各基因在2个材料中的表达差异。

实验结果

1 Ca²⁺缺乏可导致大白菜苗期干烧心病发生

大白菜干烧心病是植株缺钙和营养吸收障碍的综合性病症。为进一步验证缺钙和干烧心病的关系, 本研究利用不同Ca²⁺浓度梯度的Hoagland营养液处理苗期植株, 感病株系80#干烧心病症状明显。正常Hoagland营养液(Ca²⁺浓度5.7 mmol \cdot L⁻¹)培养2周时, 植株能够生长正常, 无明显症状; 而不同程度缺钙的Hoagland营养液(Ca²⁺浓度分别为1.71、1.14和0.57 mmol \cdot L⁻¹)则会导致大白菜苗期干烧心病的发生, 具体表现为植株叶片皱缩, 幼叶边缘干枯失水(图1), 发病程度随着Ca²⁺浓度的降低而逐渐升高, 这种负相关性表明Ca²⁺缺乏是导致苗期干烧心病发病的重要原因(图1)。

2 大白菜*ECA*和*CAS*基因的获得及系统发育树分析

拟南芥*ECA*蛋白是Ca²⁺运输的关键因子, 其敲除可导致植物新叶生长缓慢、叶片萎蔫黄化(Mills等2008), 这与大白菜苗期干烧心病发病症状类

表1 RT-qPCR目的基因及内参基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of target genes used in real-time PCR

基因名称	拟南芥基因编号	大白菜基因编号	引物序列(5'→3')
<i>GAPDH</i>		AF536826	F: CAGGTTTGGGAATTGTGCGAGG R: GAGCTGTGGAAGCACCTTTC
<i>ECA1</i>	AT1G07810	Bra018690	F: GATTTGTTTCATGCCTCCTATTTTC R: TATGTAGTTTTTGCGTTGCATTTT
<i>ECA2</i>	AT4G00900	Bra037404	F: AAGGCATAAGCAAGAGATCGTTAG R: ATCATCTGCAAGAACCATACTGA
<i>ECA3</i>	AT1G10130	Bra031701	F: GGTCTTTCTGATTCTCAGGTTGAT R: AGAAATGCTGTAAAGCCAGTCTCT
		Bra019960	F: GACTGCTGGGATTCGTGTTATAG R: CCATATCTGAAGCACTCTTTGCT
<i>ECA4</i>	AT1G07670	Bra031593	F: AGTCATGGTCATAACTGGAGACAA R: TCTAGAGAACAAGATCCCTCCACT
		Bra031583	F: GATGGTGATGCTTACGTTGTTGT R: GCGTACTCCTTTCCAATACATTCT
		Bra029645	F: TCTGGCTCATCAATGTGAAATACT R: AGAGCCAAACATGTCGTAATAACA
<i>CAS</i>	AT5G23060	Bra037620	F: CTGTCTGGTCTGCGATATCTTTTAA R: TACTGTTCTTAGCATTTGAAGGGAG
		Bra013013	F: ACTCTTCCTCCTTCTTCTCGTCTT R: CTTGGTTGATTGTCTTCTCCACTTC
		Bra010161	F: TGATGGATACGGAGAATATGGACAC R: GATGGTAACAGCACGGAACGAAAT
		Bra003389	F: CCAAAACCTGAGACAACACTTACCA R: CGTCTTGTTGAAATCTTCCGAGTC

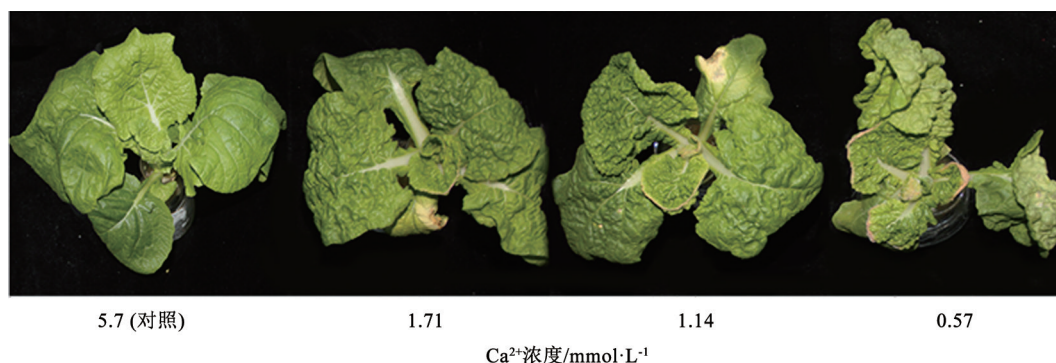


图1 不同程度的 Ca^{2+} 缺乏导致的大白菜干烧心病发病程度
Fig.1 Different levels of Ca^{2+} deficiency cause tipburn disease in Chinese cabbage

似。利用拟南芥*ECA1* (AT1G07810)、*ECA2* (AT4G00900)、*ECA3* (AT1G10130)和*ECA4* (AT1G07670)基因的氨基酸序列, 通过BRAD (<http://brassicadb.org/brad/index.php>)同源序列比对, 获得7个大白菜*ECA*基因: *ECA1*同源基因Bra018690, *ECA2*同源基因Bra037404, *ECA3*同源基因Bra031701和Bra019960, *ECA4*同源基因Bra031593、Bra029645和Bra031583。通过DNAMAN对上述基因的氨基酸序列进行分析, 并利用Observed Divergency方法构建了上述基因的系统发育树(图2-A)。结果显示, 大白菜*ECA*基因共分成4支, 其中*ECA2*、*ECA3*和*ECA4*均与相应的拟南芥同源基因聚类成小支; 支内基因间序列相似度达到95%, 这些大白菜*ECA*基因和其同源拟南芥*ACA*基因可能具有类似功能。

利用同样的方法, 构建了与拟南芥 Ca^{2+} 响应基因*CAS* (AT5G23060)同源的大白菜*CAS*基因系统发育树(图2-B)。结果显示, 大白菜基因组共有4个*CAS*基因, 分别是Bra013013、Bra037620、Bra003389和Bra010161。其中Bra013013和Bra037620之间的同源性高达96%, 而二者与其拟南芥同源基因AT5G2306同源性达90%, 这两个大白菜*CAS*基因的功能可能与拟南芥AT5G2306基因类似。

3 Ca^{2+} 运输基因*ECA*在缺钙时的表达特征分析

环境缺钙和 Ca^{2+} 运输、利用效率低是造成植物缺钙的两个主要原因。本研究检测了大白菜*ECA*基因在缺钙时的表达变化情况。如图3所示, 无论在抗性植株(43#)还是感病植株(80#)中, 在缺钙处理后, 除Bra018690外, 所有*ECA*基因都上调表

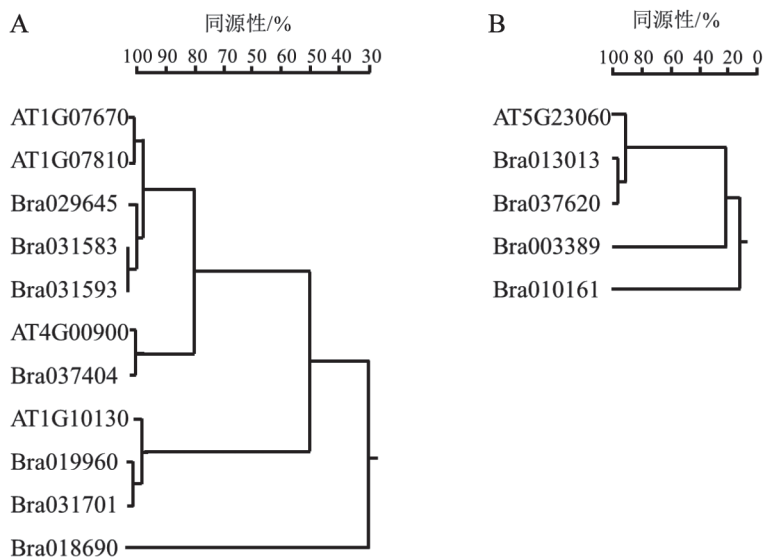


图2 大白菜 Ca^{2+} 运输基因*ECA* (A)和响应基因*CAS* (B)的系统进化树
Fig.2 Phylogenetic tree of *B. pekinensis* *ECA* (A) and *CAS* (B)

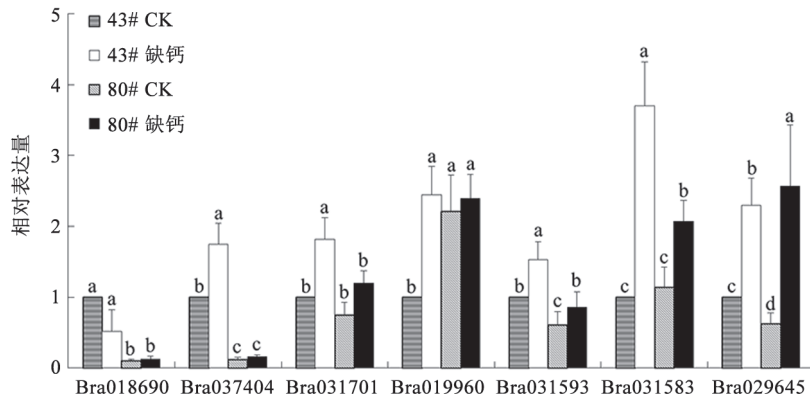


图3 Ca^{2+} 缺乏诱导大白菜抗/感干烧心病材料中钙运输基因差异表达

Fig.3 Ca^{2+} transport genes were differentially regulated in different materials after Ca^{2+} deficiency treatment
CK: 正常培养; Ca-Def: 缺钙培养; 同一序列基因各柱形上不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。图4同。

达; 但抗/感材料又有明显不同, *ECA*基因在抗病植株中的上调幅度要高于感病植株, 其中Bra037404、Bra031701和Bra031583在缺钙处理后, 抗病植株的上调表达趋势尤为明显。值得注意的是, Bra018690和Bra037404在感病植株中几乎不表达, 而在抗病植株正常表达。

4 Ca^{2+} 响应基因 *CAS* 在缺钙时的表达特征分析

Ca^{2+} 既是植物生长所必需的营养元素, 又是细胞内信号转导关键的第二信使。为探讨钙信号系统是否参与苗期干烧心病发生过程, 本研究利用实时定量PCR分析了缺钙处理前后, 抗/感干烧心病材料中 Ca^{2+} 响应基因*CAS*的表达变化情况。如图4所示, 在缺钙处理后, Bra013013、Bra037620、Bra003389和Bra010161的表达变化模式显著不同。在正常培养时, Bra037620在抗性材料中的表达量远

低于感病材料; 但在缺钙处理后Bra037620在抗性材料(43#)中的表达量几乎没有变化, 而在感病材料(80#)中的表达则显著下调。Bra013013在缺钙处理后, 在两种材料中都表现出明显的上调表达模式, 但在抗性材料中的表达量低于感病材料。Bra010161对缺钙处理不敏感, 表达量无明显变化。Bra003389在抗性材料中对缺钙处理敏感, 但在感病材料中处理前后表达量无明显变化。这些结果显示Bra013013和Bra037620可能是大白菜缺 Ca^{2+} 响应的关键基因, 但其功能可能有所差异。

讨 论

大白菜干烧心病近年来在北京、山东、河南、河北等地频繁发生且病情严重, 在有些产区甚至完全绝收, 严重影响了大白菜产量和质量。目前不同大白菜主栽品种间表现出程度不同的症状, 并且多数品种干烧心抗病能力较差, 因此抗干烧心成为重要的育种目标之一。但目前抗干烧心抗原缺乏, 遗传机制不清楚, 这一直是制约抗干烧心育种的关键原因。因此探明病害发生原因、阐明发病机理对于品种改良具有重要意义。

近年来国内外学者对于大白菜干烧心病做了较深入的研究, 但在发病原因与机理等方面仍然有很多争论。通常认为大白菜和甘蓝干烧心发病症状基本类似, 都是缺钙引起的生理性病害, 也有报道认为是由于缺锰造成的(吕佩珂等1998); 张纯胄等(2000)通过叶面喷施微量元素方法, 发现喷施锰肥和硼肥比钙肥防治干烧心的效果要好, 因此认为

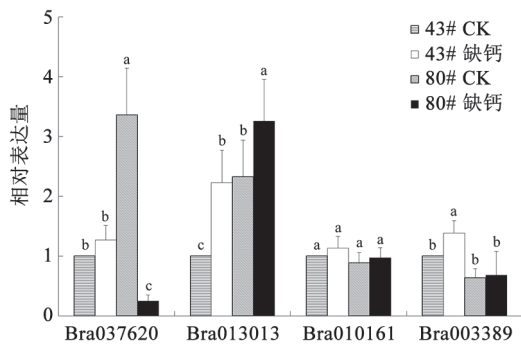


图4 Ca^{2+} 缺乏导致大白菜抗/感干烧心病材料中 Ca^{2+} 响应基因差异表达

Fig.4 Ca^{2+} response genes were differently regulated in different materials after Ca^{2+} deficiency treatment

干烧心与缺锰有一定关系, 但缺锰并不是主导病因, 缺水和营养吸收障碍导致代谢失调是干烧心的主要病因; Saure (1998)认为大白菜干烧心病是由于逆境胁迫造成的生理失调; 也有研究人员认为该病可能是由病原菌侵染引起的, 但并未得到证实。综上所述, 目前对干烧心的发病病因仍然存在很大争论, 这大大限制了对干烧心发病机理的研究。本文通过梯度缺钙处理显示, 随着培养液中 Ca^{2+} 浓度的逐渐降低, 大白菜苗期干烧心病渐发严重, 进一步证实缺钙是干烧心的重要原因之一。

植物组织在缺钙初期或钙供应不足时, 首先会引起细胞膜上 Ca^{2+} -ATPase活性的迅速增加, 而后随着缺钙程度增大, Ca^{2+} -ATPase活性逐渐下降。缪颖等(1999)研究了大白菜干烧心病发生过程中酶活性的变化情况, 发现在缺钙诱导大白菜干烧心病发生过程中, 膜 Ca^{2+} -ATPase活性发生了一系列变化。拟南芥 Ca^{2+} -ATPase基因*ECA*的敲除可导致类似大白菜干烧心病的表型。这些结果暗示*ECA*可能参与了大白菜干烧心病发病进程, 而进一步的real-time PCR检测结果证实大白菜*ECA*和*CAS*基因的表达受钙胁迫影响, 因此这2个基因可能与大白菜干烧心病的发生有密切关系。

大白菜与模式植物拟南芥亲缘关系较近, 极大方便了利用拟南芥信息进行大白菜功能基因研究。但与拟南芥相比, 大白菜基因组属复杂二倍体, 每个基因存在着多个拷贝或同源基因, 在进化过程中功能可能产生了分化, 这为目标基因的选择增加了难度(Wang等2011)。在本研究中共获得7个大白菜*ECA*基因和4个*CAS*基因, 通过比较这些*ECA*和*CAS*基因在缺钙环境下的表达不同变化情况, 从而推测上述基因可能参与大白菜苗期干烧心病发病进程, 为从分子水平上深入解析大白菜干烧心病的发病机理提供一定的理论依据。

参考文献

吕佩珂, 李明远, 吴钜文, 易齐, 张宝棣, 姜克英, 文奇, 李明周, 王润初(1998). 中国蔬菜病虫原色图谱(修订本). 北京: 农业出版社, 194

缪颖, 曹家树, 曾广文(1998). 渗透胁迫下大白菜吸收转运 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 的变化. 浙江农业大学学报, 24 (2): 126~130

缪颖, 曾广文, 朱祝军(1999). Ca^{2+} 与CaM对大白菜离体叶圆片

Ca^{2+} -ATPase和 β -1,3-葡聚糖合成酶活性的影响. 植物生理学通讯, 35 (5): 367~369

石姜超, 段岩娇, 张鲁刚(2012). 大白菜干烧心病病状特征与抗性遗传规律. 西北农业学报, 21 (10): 106~112

孙秀峰, 陈振德, 李德全(2008). 大白菜干烧心病性状的QTL定位和分析. 分子植物育种, 6 (4): 702~708

王瑞云, 王玉国(2001). 钙在植物生理代谢中的作用. 世界农业, (6): 41~43

余阳俊, 耿欣, 赵岫云, 徐家炳, 陈广, 张德双(2001). 大白菜品种苗期抗干烧心(缺钙)鉴定. 北京农业科学, (2): 14~15, 21

张纯胃, 陈永兵, 蒋志明, 胡丽秋(2000). 涂园大白菜干烧心病的灾变条件及关键防治技术. 上海农业学报, 16 (2): 89~93

张鹤, 赵熙, 刘莉 (2009). 大白菜干烧心病的研究进展. 天津农业科学, 15 (6): 47~48

Aloni B, Pashkar T, Libel R (1986). The possible involvement of gibberellins and calcium in tipburn of Chinese cabbage: study of intact plants and detached leaves. Plant Growth Regul, 4: 3~11

Baxter I, Tchieu J, Sussman MR, Boutry M, Palmgren MG, Gribskov M, Harper JF, Axelsen KB (2003). Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in *Arabidopsis* and rice. Plant Physiol, 132: 618~628

Boursiac Y, Lee SM, Romanowsky S, Blank R, Sladek C, Chung WS, Harper JF (2010). Disruption of the vacuolar calcium-ATPases in *Arabidopsis* results in the activation of a salicylic acid-dependent programmed cell death pathway. Plant Physiol, 154 (3): 1158~1171

Defalco TA, Bender KW, Snedden WA (2010). Breaking the code: Ca^{2+} sensors in plant signalling. Biochem J, 425: 27~40

Dodd AN, Kudla J, Sanders D (2010). The language of calcium signaling. Annu Rev Plant Biol, 16: 593~620

Francois LE, Donovan TJ, Maas EV (1991). Calcium deficiency of artichoke buds in relation to salinity. HortScience, 26 (5): 549~553

Gilroy S, Trewavas A (2001). Signal processing and transduction in plant cells: the end of the beginning. Nat Rev Mol Cell Biol, 2: 307~314

Ho LC, Adams P (1989). Effects of diurnal changes in the salinity of the nutrient solution on the accumulation of calcium by tomato fruit. Ann Bot, 64: 373~382

Kudla J, Batistic O, Hashimoto K (2010). Calcium signals: the lead currency of plant information processing. Plant Cell, 22: 541~563

Lecourieux D, Ranjeva R, Pugin A (2006). Calcium in plant defence-signalling pathways. New Phytol, 171: 249~269

Ma W, Berkowitz GA (2007). The grateful dead: calcium and cell death in plant innate immunity. Cell Microbiol, 9 (11): 2571~2585

McAinsh MR, Pittman JK (2009). Shaping the calcium signature. New Phytol, 181: 275~294

Mills RF, Doherty ML, Lopez-Marques RL, Weimar T, Dupree P, Palmgren MG, Pittman JK, Williams LE (2008). ECA3, a Gol-

- gi-localized P_{2A}-type ATPase, plays a crucial role in manganese nutrition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 146 (1): 116~128
- Qi J, Yu S, Zhang F, Shen X, Zhao X, Yu Y, Zhang D (2010). Reference gene selection for real-time quantitative polymerase chain reaction of mRNA transcript levels in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Plant Mol Biol Rep*, 28 (4): 597~604
- Sanders D, Brownlee C, Harper JF (1999). Communicating with calcium. *Plant Cell*, 11: 691~706
- Saure MC (1998). Causes of the tipburn disorder in leaves of vegetables. *Sci Hortic*, 76: 131~147
- Wang XW, Wang HZ, Wang J, Sun RF, Wu J, Liu SY, Bai YQ, Mun JH, Bancroft I, Cheng F et al (2011). The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. *Nat Genet*, 43: 1033~1039
- Wu ZY, Liang F, Hong BM, Young JC, Sussman MR, Harper JF, Sze H (2002). An endoplasmic reticulum-bound Ca²⁺/Mn²⁺ pump, ECA1, supports plant growth and confers tolerance to Mn²⁺ stress. *Plant Physiol*, 130: 128~137