

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2010.00833

胞内钙库对小麦叶锈菌侵染之过敏反应的影响

张蓓 阎爱华 刘刚 刘猛 侯春燕 王冬梅*

河北农业大学生命科学学院, 河北保定 071001

摘要: 使用影响胞内 Ca^{2+} 库和钙通道的药物预注射小麦叶片, 观察其对小麦受叶锈菌侵染诱发的过敏反应(HR)的影响。结果表明, 对小麦叶片预注射不同浓度的胞内 Ca^{2+} 螯合剂(BAPTA-AM)后接种叶锈菌小种 260, 随着注射药物浓度的增高, 寄主细胞发生 HR 的面积逐渐减小。而注射胞内 Ca^{2+} 激活剂(caffiene)后接种, HR 的面积有所增加。进一步用胞内 Ca^{2+} 通道抑制剂(herapin、RR 和 8-Br-cADPR)预处理, 结果 herapin 对 HR 的影响呈浓度依赖型, 而 RR 和 8-Br-cADPR 对 HR 没有明显作用。据此提出, 胞内 Ca^{2+} 可能参与小麦抵抗叶锈菌侵染过程中钙信号的形成, 且这一过程主要通过 IP_3 途径完成。

关键词: 小麦; 叶锈菌; Ca^{2+} ; 过敏性反应

Effect of Intracellular Calcium Stores on Hypersensitive Reaction Induced by Wheat Leaf Rust Fungus

ZHANG Bei, YAN Ai-Hua, LIU Gang, LIU Meng, HOU Chun-Yan, and WANG Dong-Mei*

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

Abstract: With injecting drugs to affect intracellular calcium stores and calcium channel in wheat (*Triticum aestivum*) leaves, we investigated hypersensitive reaction (HR) changes in wheat leaves invaded by leaf rust (*Puccinia triticina*). The results showed that the intracellular calcium chelators (BAPTA-AM) could obviously reduce the area of dying cells caused by HR. The higher the concentration was, the smaller the area of dying cell was. While intracellular calcium activator (caffiene) was injected into wheat leaves, HR could also be detected. The HR area increased with caffiene concentration. Calcium channel blockers (heparin, RR, and 8-Br-cADPR) were separately injected into wheat leaves before inoculation. The results showed that there was a concentration-depended effect on HR with herapin, and no obviously effect with RR and 8-Br-cADPR. Therefore, we deduced that intracellular calcium might involve in the formation of calcium signal transduction through IP_3 pathway during infection of wheat leaf rust fungus.

Keywords: Wheat (*Triticum aestivum* L.); *Puccinia triticina*; Calcium; Hypersensitive response

钙离子作为普遍存在的胞内第二信使, 通过其浓度的时空变化, 把胞外信号传递到胞内, 在细胞中控制着许多生理过程。然而, 这种简单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, 其机制尚不清楚。人们推测不同外界刺激因素能够产生特异性钙信号, 特异性的钙离子变化决定生理反应的特异性。在高度区域化的植物细胞内, 质膜、液泡膜、内质网膜和细胞质之间都存在跨膜的钙离子电化学梯度, 这些梯度在细胞静息状态下是相对稳定的, 一旦细胞受到刺激会导

致胞质钙离子浓度变化, 产生具有特定时间和空间特征的 Ca^{2+} 信号, 保证刺激与反应之间的高度特异性。所以, 要明确某一生理过程中特异性钙信号的形成机制, 明确 Ca^{2+} 来源是关键。

业已证实, 钙信使系统参与植物抗病性表达过程, 钙信号是病原菌侵染后产生的早期反应之一。Xu 等^[1]在研究豇豆-豇豆锈菌的互作中发现, Ca^{2+} 参与了过敏反应(hypersensitive response, HR), 当利用 EGTA 和 Ca^{2+} 通道抑制剂抑制胞质 Ca^{2+} 浓度($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$)升高时, 可延迟 HR 的发生。本实验室的前期工作已

本研究由国家自然科学基金项目(30671244), 河北省应用基础研究计划重点基础研究项目(08965505D)和河北省自然科学基金项目(303180, C2005000220, C2007000515)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 王冬梅, E-mail: dongmeiwang63@hotmail.com

第一作者联系方式: E-mail: zjkzhangbei@sohu.com

Received(收稿日期): 2009-11-09; Accepted(接受日期): 2010-02-07.

经证明在小麦-叶锈菌的互作体系中,钙信使介导了叶锈菌侵染诱发的小麦叶肉细胞 HR 表达的信号转导过程, $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高可能是诱发小麦叶肉细胞 HR 所必需的^[2]。 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高过程中钙离子可能来自胞外或胞内钙库,也可能是两者共同作用的结果。我们的前期工作中,对小麦叶片分别预注射 Ca^{2+} 螯合剂(EGTA)和 Ca^{2+} 通道抑制剂(LaCl₃ 和 verapamil)后接种叶锈菌,寄主叶片发生 HR 的面积明显减少,并且随着注射药物浓度的增高,寄主细胞发生 HR 的面积逐渐减小;在只注射 Ca^{2+} 释放剂(A23187)而不接种的试验中,寄主细胞也发生 HR,且 HR 面积随 A23187 浓度增加而增加^[2]。上述结果表明,胞外钙离子内流是 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高的主要原因之一。液泡是植物细胞内贮量最大的钙离子库,其游离钙离子水平估计在 $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ 左右^[3-4]。液泡膜上存在可对刺激因子起反应的钙离子通道,即三磷酸肌醇激活的钙离子释放通道(IP₃-activated Ca^{2+} release channel)^[5]、cADPR 激活的钙离子释放通道(cADPR-activated Ca^{2+} release channel)^[6]和钙离子诱导的钙离子释放通道(Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release channel)^[7]。当细胞受刺激时会释放钙离子到细胞质中,提高 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 水平,它是信号转导过程中胞内钙离子信号的重要来源。本研究在前期工作的基础上,进一步利用影响胞内 Ca^{2+} 库和钙通道的药物预注射小麦叶片再行接种,通过观察其对 HR 的影响来探讨胞内 Ca^{2+} 库与小麦受叶锈菌侵染后诱发的 HR 的关系,以期明确在小麦-叶锈菌互作早期,胞外钙是否为 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高的唯一来源,胞内钙库是否也参与这一生理反应,为进一步深入探讨钙参与小麦抵抗叶锈菌侵染诱发的防卫反应的信号转导机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 小麦品种和供试菌种

将小麦(*Triticum aestivum* L.)品种洛夫林 10 的种子播于直径 15 cm 的花盆,于人工气候培养室生长 7 d 至第一叶完全展开时进行注射处理。培养条件设置为昼/夜温度 25°C/20°C,光照强度(镝灯照射) $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$,光照周期 14 h d⁻¹。

供试菌种为小麦叶锈菌(*Puccinia triticina*)生理小种 260 和 165,均为单孢菌系(由河北农业大学植物逆境生理研究室提供)。洛夫林 10 与叶锈菌小种 260 组成不亲和组合,与叶锈菌小种 165 组成亲和组合。

1.2 药物浓度及其注射处理

选用胞内 Ca^{2+} 螯合剂 BAPTA-AM、胞内 Ca^{2+} 库激动剂咖啡因(cafeine)、胞外 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA 及胞内 Ca^{2+} 通道抑制剂肝素(heparin)、钆红(RR)和 8-Br-cADPR,其中 BAPTA-AM 溶于 DMSO, DMSO 浓度不高于 0.15%。各药剂经大范围浓度梯度预备试验,最后确定 BAPTA-AM、肝素、钆红和咖啡因的注射浓度分别为 50、100、200 和 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 8-Br-cADPR 的浓度为 20、50 和 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, EGTA 的浓度为 5 000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 。所有药物在上述浓度范围内对小麦幼苗的长势几乎没有影响。每种处理均设 3 次重复。

采用邓恩新等^[8]改进的注射装置对小麦幼苗叶片进行注射。

1.3 叶锈菌接种方法

注射药物后用毛笔蘸取滑石粉与叶锈菌小种 260 夏孢子(15:1)的混合物,均匀涂于 7 d 龄小麦第一片真叶表面,于黑暗条件下保湿 16~18 h 后,移入培养室内继续培养。以注射重蒸馏水后立即接种为对照。在预备试验中,注射 0.15% DMSO 和注射重蒸馏水不接种的小麦幼苗均未产生过敏反应。

1.4 寄主过敏性反应观察及菌丝扩展面积测定

分别于接种后 24、48、72 和 96 h 取样,除去叶尖和下部后取上、中、下各 1.5 cm 的叶段,用荧光染色法染色^[9],在荧光显微镜下健康叶肉细胞呈淡绿色,侵染引致的死亡细胞呈亮黄色荧光。每次每种处理取 5 个叶片,利用显微镜的测微尺测量发生 HR 细胞的长度和宽度,两数据相乘即为发生 HR 的细胞的面积。观测时,每种处理随机选取 150 个侵染点,测量每个侵染点处寄主细胞发生过敏反应的面积。采用 SPSS 16.0 软件进行数据处理和统计分析。

为明确所注射药物的浓度是否对叶锈菌生长产生影响,以各药物的最高浓度注射后再接种叶锈菌小种 165,以注射重蒸馏水后再接种 165 为对照,并采用相同方法观测 BAPTA-AM、heparin、RR、8-Br-cADPR 及 cafeine 对菌丝扩展面积的影响。

2 结果与分析

2.1 注射药物后对叶锈菌生长的影响

在亲和组合中,预注射各药物的荧光显微检测结果与 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 8-Br-cADPR 预注射结果(图 1)相似。在接种后 96 h 及其他观测时间点,叶锈菌菌丝扩展情况与对照相比无明显差异。因此可以认为,

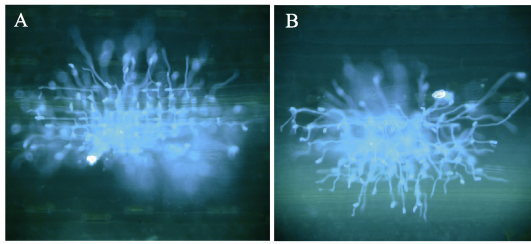


图 1 预注射 8-Br-cADPR (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) 96 h 后亲和组合中叶锈菌菌丝的扩展

Fig. 1 Hyphal area in compatible interaction at 96 h after injecting 8-Br-cADPR (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$)

A: 健康叶片接种叶锈菌小种 165 ($\times 200$); B: 预注射 8-Br-cADPR 后接种叶锈菌小种 165 ($\times 200$).

A: healthy leaf inoculated with *P. triticina* race 165 ($\times 200$); B: injecting 8-Br-cADPR before inoculation with *P. triticina* race 165 ($\times 200$).

在试验所用浓度范围内, BAPTA-AM、heparin、RR、8-Br-cADPR 和 caffeine 对叶锈菌生长基本无影响。

2.2 小麦叶片预注射 BAPTA-AM 对叶锈菌诱导的细胞过敏反应的影响

于小麦叶片预注射不同浓度的 BAPTA-AM, 与对照相比较, 发生 HR 的细胞面积均减少, 并且面积减少的程度随注射 BAPTA-AM 浓度的增高而增大, 各取样时间点表现的规律相似(图 2 和图 3)。如在接种后 72 h, 预注射 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ BAPTA-AM 的处理中, 小麦叶片 HR 面积减少 27.3%; 而注射 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ BAPTA-AM 的处理中, 小麦叶片 HR 面积减少 56.4%。

注射 EGTA 和 BAPTA-AM, 两种药物共同作用对发生 HR 的细胞面积的影响大于单独使用其中任何一种药物所产生的作用(图 4)。即接种后 72 h, 预注射 5 000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ EGTA 的处理中, 小麦叶片 HR 面积为 3 855.81 μm^2 ; 注射 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ BAPTA-AM 的处理中, 小麦叶片 HR 面积为 3 935.94 μm^2 。而同时注射两种药物后, 小麦叶片 HR 面积为 3 156.41 μm^2 , 分别为单独注射 EGTA 和 BAPTA-AM 的 81.81% 和 80.14%。另外, 无论对照还是注药处理, HR 均在接种后 24 h 开始出现, 而且 HR 面积随时间的延长呈逐渐增加趋势, 在接种后 72 h 达到最大。上述结果表明, BAPTA-AM 螯合掉小麦叶肉细胞胞内钙库的钙离子, 使得叶锈菌诱导的细胞 HR 受到很大程度的抑制。说明胞内钙库可能参与了小麦抵抗叶锈菌侵染的 HR 的信号转导过程。

2.3 小麦叶片预注射肝素、钌红和 8-Br-cADPR 对叶锈菌诱导的细胞过敏反应的影响

为明确胞内 Ca^{2+} 库中是哪条途径在小麦抵抗叶锈菌侵染而诱发 HR 的信号转导过程中起作用, 选用肝素(herapin)抑制 IP_3 产生, 钌红(ruthenium red, RR)和 8-Br-cADPR 抑制 cADPR 门控的钙流。结果显示, 预注射 herapin 寄主细胞发生过敏性反应的进程与注射 BAPTA-AM 处理表现出相似的趋势, 即当对小麦叶片预注射 herapin 的浓度由低到高逐渐增

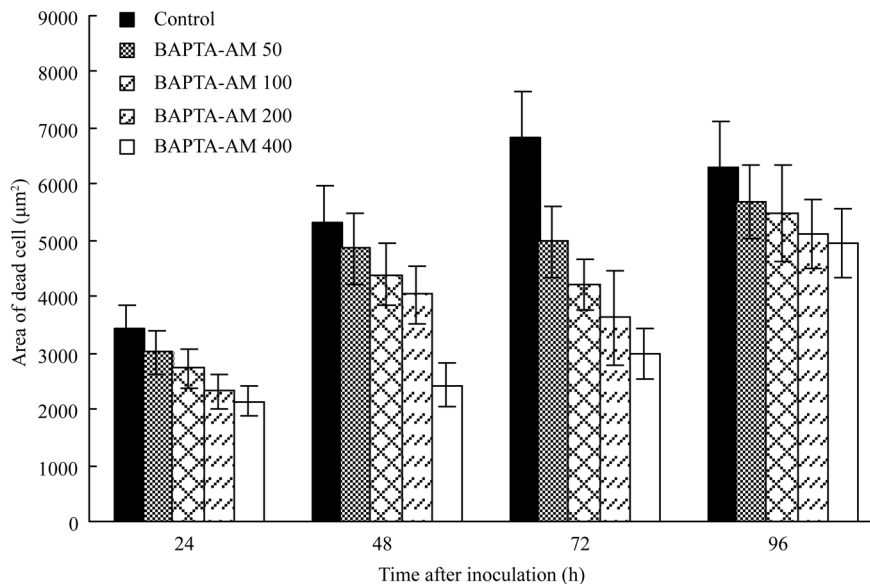


图 2 注射不同浓度的 BAPTA-AM 对过敏反应的影响

Fig. 2 Effect of different concentrations of BAPTA-AM on hypersensitive reaction BAPTA-AM 后面的数字表示处理浓度 ($\mu\text{mol L}^{-1}$)。误差棒表示 3 次生物学重复的标准差。

Figures after "BAPTA-AM" denote concentrations ($\mu\text{mol L}^{-1}$) of BAPTA-AM in the treatments. Error bars show the standard deviations of three biological repeats.

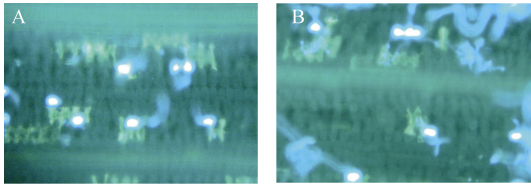


图3 注射 $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ BAPTA-AM 后对过敏反应的观察 ($\times 200$)

Fig. 3 HR after injecting $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ BAPTA-AM ($\times 200$)
接种叶锈菌小种 260 后 72 h, 对小麦叶片荧光的观察。A: 预注射蒸馏水; B: 预注射 $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ BAPTA-AM。

Observation of the fluorescence of wheat leaves at 72 h after inoculated leaf rust race 260. A: Pre-injection of distilled water; B: Pre-injection of $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ BAPTA-AM.

加时, 与对照比较, 发生 HR 细胞的面积明显减少, 并且面积减少的程度呈浓度依赖型, 即注射的 herapin 浓度越高, 发生 HR 的细胞面积越小, 各取样时间点都表现出同样的趋势(结果未显示)。同时注射 EGTA 和 herapin 后接种, 发现 HR 受到抑制的程度大于单独使用其中任一种药物(图 5)。当小麦叶片预注射不同浓度的 RR 和 8-Br-cADPR 后接种, 寄主细胞发生 HR 的面积与对照相比均无明显差异。而同时注射 EGTA 和 RR(或 8-Br-cADPR)后接种, 与对照和单独注射 RR(或 8-Br-cADPR)相比, 发生 HR 的面积减小, 但大于单独注射 EGTA 后所引起的 HR 面积(图 6 和图 7)。

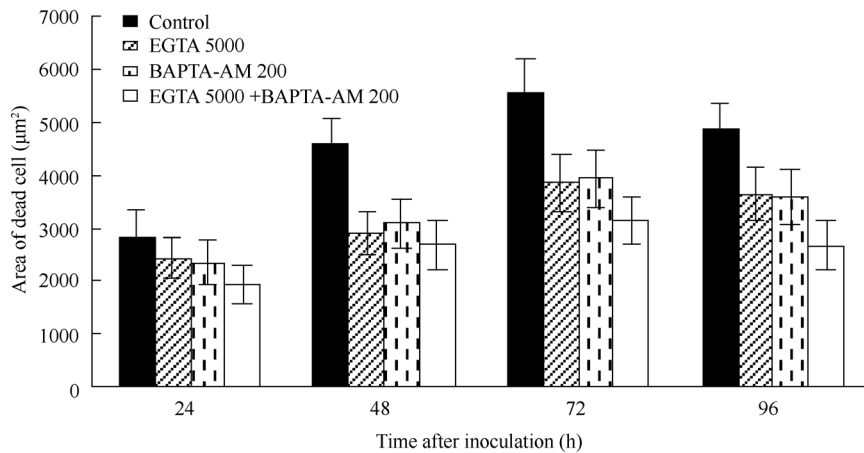


图4 注射 EGTA 和 BAPTA-AM 对过敏反应的影响

Fig. 4 Effect of injecting EGTA and BAPTA-AM on hypersensitive reaction

药剂名称后的数字表示处理浓度($\mu\text{mol L}^{-1}$)。误差棒表示 3 次生物学重复的标准差。

Figures after pharmacy name denote concentrations ($\mu\text{mol L}^{-1}$) of pharmacy in the treatments. Error bars show the standard deviations of three biological repeats.

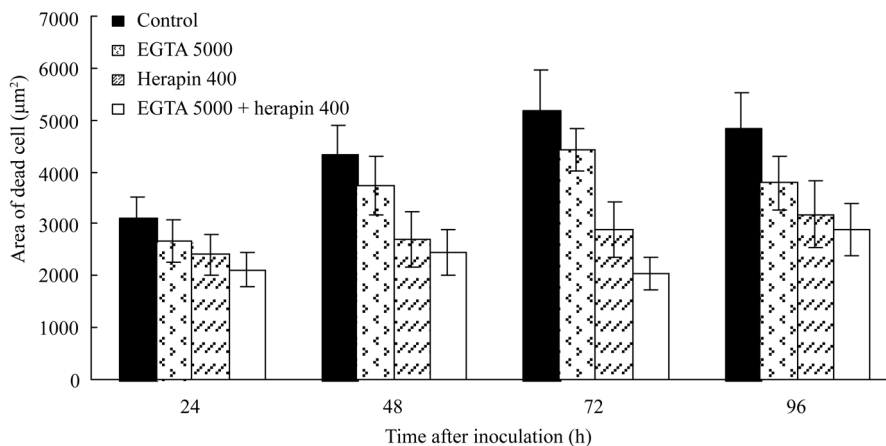


图5 注射 EGTA 和 herapin 对过敏反应的影响

Fig. 5 Effect of injecting EGTA and herapin on hypersensitive reaction

药剂名称后的数字表示处理浓度($\mu\text{mol L}^{-1}$)。误差棒表示 3 次生物学重复的标准差。

Figures after pharmacy name denote concentrations ($\mu\text{mol L}^{-1}$) of pharmacy in the treatments. Error bars show the standard deviations of three biological repeats.

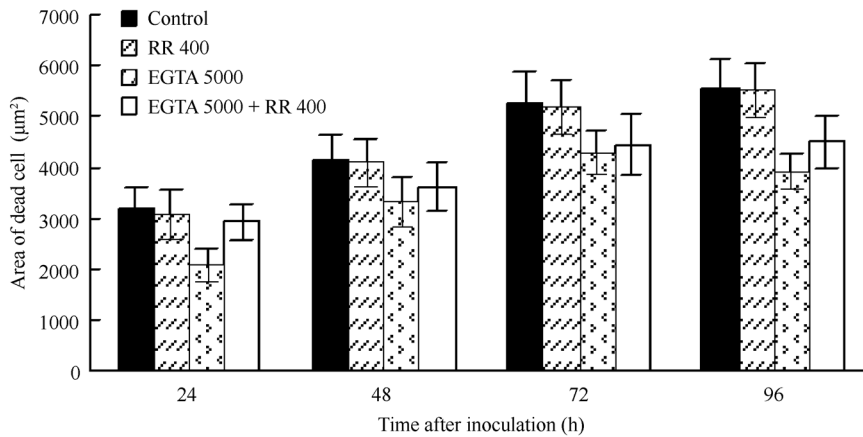


图 6 注射 EGTA 和 RR 对过敏反应的影响

Fig. 6 Effect of injecting EGTA and RR on hypersensitive reaction

药剂名称后的数字表示处理浓度($\mu\text{mol L}^{-1}$)。误差棒表示 3 次生物学重复的标准差。

Figures after pharmacy name denote concentrations ($\mu\text{mol L}^{-1}$) of pharmacy in the treatments. Error bars show the standard deviations of three biological repeats.

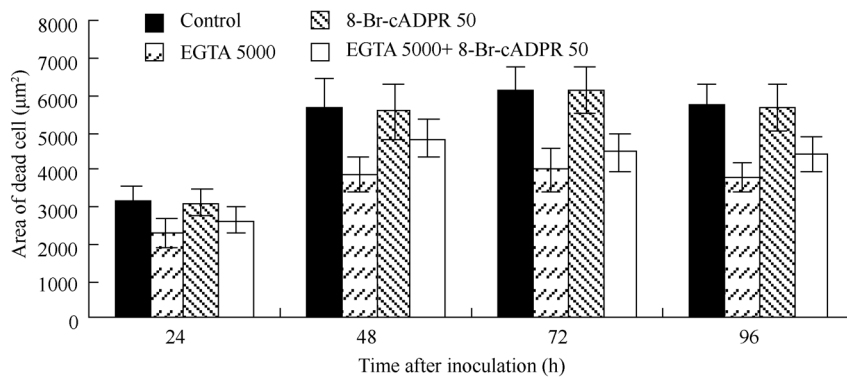


图 7 注射 EGTA 和 8-Br-cADPR 对过敏反应的影响

Fig. 7 Effect of injecting EGTA and 8-Br-cADPR on hypersensitive reaction

药剂名称后的数字表示处理浓度($\mu\text{mol L}^{-1}$)。误差棒表示 3 次生物学重复的标准差。

Figures after pharmacy name denote concentrations ($\mu\text{mol L}^{-1}$) of pharmacy in the treatments. Error bars show the standard deviations of three biological repeats.

由此可以推测,胞内钙库释放 Ca^{2+} 进入胞质,可能主要是通过 IP_3 途径,而 cADPR 途径在该过程中没有明显作用。

2.4 小麦叶片预注射咖啡因对叶锈菌诱导的细胞过敏反应的影响

注射咖啡因诱导的小麦叶片 HR 远远大于注射重蒸馏水后接种 260 的对照,但发生 HR 细胞的面积受咖啡因浓度变化的影响不大,这在各取样时间点都表现出相似的规律(结果未显示)。同时注射 EGTA 和咖啡因,与对照相比,并不能减小 HR 的面积(图 8)。表明胞内 Ca^{2+} 库释放 Ca^{2+} 能够引起胞质中 Ca^{2+} 浓度的升高,且与细胞 HR 有密切相关性。

3 讨论

钙离子作为一种信号在植物—病原菌互作中起

重要作用已被大量事实证明。尽管许多研究表明,胞外钙离子内流是 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高的主要原因,但不能排除胞内钙离子库的重要性。目前,由于对植物胞内钙库中编码钙通道蛋白的基因克隆还不多,所以探索 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高的胞内钙来源大多采用药理学试验。当用激发子处理欧芹 (*Petroselinum crispum*) 时,能够诱导植保素的合成,用新霉素(neomycin)抑制磷脂酶 C(PLC)后,植保素的合成受到抑制,说明植保素的合成过程中可能有 PLC- IP_3 信号系统参与,而 IP_3 是胞内钙库钙释放的诱发信号, IP_3 合成受抑制就会影响胞内钙库的钙释放,从而影响钙信号的形成^[10]。钙信号诱发植保素合成早已被证实,所以试验中用新霉素抑制 PLC 后,植保素的合成也受到抑制,可能是通过影响胞内钙库释放钙从而使胞质钙信号无法形成而导致的。胞内钙库对钙信号形成

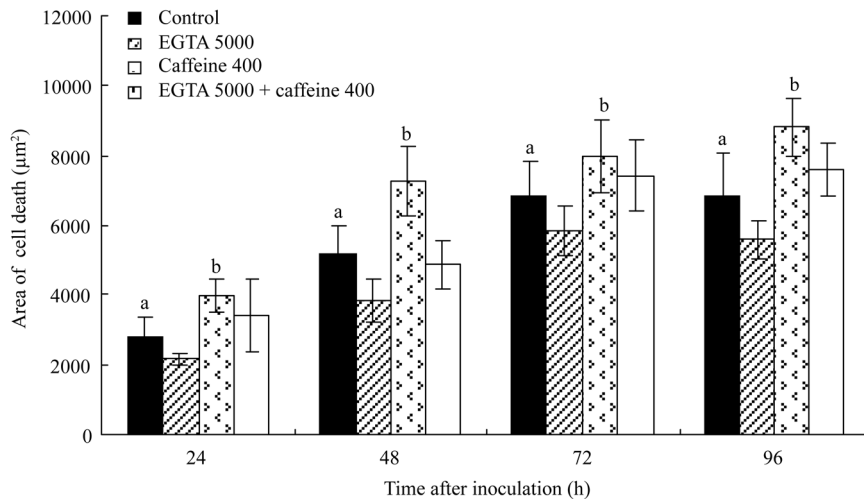


图8 注射EGTA和咖啡因对过敏反应的影响

Fig. 8 Effect of injecting EGTA and caffeine on hypersensitive reaction

药剂名称后的数字表示处理浓度($\mu\text{mol L}^{-1}$)。误差棒表示3次生物学重复的标准差。

误差棒上方字母表示同一时间处理间达显著差异($P < 0.05$)。

Figures after pharmacy name denote concentrations ($\mu\text{mol L}^{-1}$) of pharmacy in the treatments. Error bars show the standard deviations of three biological repeats. The letter at the top of error bars indicated that significant differences between distinct treatments at same time ($P < 0.05$).

的贡献除了依赖于 IP_3 的钙离子释放通道外,依赖于cADPR的钙离子通道也能调节液泡或内质网中的钙离子释放,参与多种防卫反应^[11-14]。用激发子*BcPGL*处理葡萄藤细胞时,加入RR抑制cADPR门控的钙通道后,抑制了NO和 H_2O_2 的产生,而NO和 H_2O_2 被确定是葡萄藤细胞应答激发子刺激产生防卫反应的信号分子且与 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 有关,说明胞内钙库可能参与了*BcPGL*诱发的防卫反应^[15]。

本试验为探讨胞内钙库是否参与小麦与叶锈菌的互作过程,在小麦叶片接种叶锈菌之前注射不同浓度的胞内钙离子螯合剂BAPTA-AM,使叶锈菌感染所诱导的小麦叶片HR均受到不同程度的抑制,并且这种抑制作用随注射药物浓度的增加而增大;同时注射EGTA和BAPTA-AM后接种,发生过敏反应的细胞面积小于单独注射其中任何一种药物的面积。由于抑制了胞内钙库的钙释放,可能降低了防卫反应中的钙信号强度,从而减弱了HR的诱发程度。试验还发现,当注射胞内钙库激活剂咖啡因后接种,发生过敏反应面积明显大于对照,从而推测胞内钙库可能参与了过敏反应的发生。而同时注射EGTA和caffeine后接种,发生过敏反应面积仍然大于对照,这种现象的出现,可能是人为地使用caffeine所释放的钙比自然状态下接种导致的胞内钙库释放的钙多得多,导致胞质钙离子大幅度提高,从而诱发HR的发生。

为了进一步探讨胞内钙库释放钙离子的方式,

试验中给小麦叶片分别注射 IP_3 的抑制剂herapin和cADPR的抑制剂RR、8-Br-cADPR后接种,结果显示,herapin能够明显抑制过敏反应的发生,而RR或8-Br-cADPR对过敏反应均没有影响。表明在小麦被叶锈菌侵染过程中, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的升高可能部分源于胞内钙库的释放,且这一过程主要通过 IP_3 途径来完成,而非cADPR途径。

Lecourieux等^[16]试验表明,激发子引起的胞质钙离子浓度的增加依赖于持续的钙离子内流。这种钙离子内流随后引起钙离子通过 IP_3 激活的钙通道从细胞器中释放。本试验中同时注射EGTA和herapin,引起的过敏反应面积明显小于单独注射任一种药物,说明胞外钙离子内流和胞内钙离子释放均参与了这一过程,但并没有充分的证据证明 IP_3 途径依赖于胞外钙离子的内流。

4 结论

在小麦受叶锈菌侵染过程中,胞内钙库钙的释放参与了 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 信号的产生,其主要释放途径是通过 IP_3 途径完成的。

References

- [1] Xu H, Heath M C. Role of calcium in signal transduction during the hypersensitive response caused by basidiospore-derived infection of the cowpea rust fungus. *Plant Cell*, 1998, 10: 585-597
- [2] Guan C-L(关春蕾), Hou C-Y(侯春燕), Wang D-M(王冬梅). The role of drugs affecting calcium metabolism and calcium channel

- on HR induced by wheat leaf rust fungus. *J Agric Univ Hebei* (河北农业大学学报), 2006, 29(6): 4–8 (in Chinese with English abstract)
- [3] Bush D S. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1995, 46: 95–122
- [4] Sanders D, Brownlee C, Harper J F. Communicating with calcium. *Plant Cell*, 1999, 11: 691–706
- [5] Alexandre J, Lassalles J P, Kado R T. Opening of Ca^{2+} channels in isolated red beet root vacuole membrane by inositol 1,4,5-trisphosphate. *Nature*, 1990, 343: 567–570
- [6] Allen G J, Mair S R, Sanders D. Release of Ca^{2+} from individual plant vacuoles by both InsP_3 and cyclic ADP-ribose. *Science*, 1995, 268: 735–737
- [7] Ward J M, Schroeder J I. Calcium-activated K^+ -channels and calcium induced calcium release by slow vacuolar ion channels in guard cell vacuoles implicated in the control of stomatal closure. *Plant Cell*, 1994, 6: 669–683
- [8] Deng E-X(邓恩新), Wang W-Z(王文忠), Wang Z-X(王智忻). A simple equipment for injecting solution to plant leaves. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 1992, 28(4): 296 (in Chinese)
- [9] Rohringer K, Kim W K. An optical brighter for fluorescence microscopy of fungal plant parasites in leaves. *Phytopathology*, 1977, 67: 808–810
- [10] Renelt A, Colling C, Hahlbrock K, Nürnberger T, Parker J E, Sacks W, Scheel D. Studies on elicitor recognition and signal transduction in plant defence. *J Exp Bot*, 1993, 44 (suppl): 257–268
- [11] Mithöfer A, Ebel J, Bhagwat A A, Boller T, Neuhaus-Url G. Transgenic aequorin monitors cytosolic transients in soybean cells challenged with β -glucan or chitin elicitors. *Planta*, 1999, 207: 566–574
- [12] Durner J, Wendehenne D, Klessig D F. Defence gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 10328–10333
- [13] Klessig D F, Durner J, Noad R, Navarre D A, Wendehenne D, Kumar D, Zhou J M, Zhang S, Kachroo P, Trifa Y, Pontier D, Lam E, Silva H. Nitric oxide and salicylic acid signalling in plant defences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 8849–8855
- [14] Lamotte O, Gould K, Lecourieux D, Sequeira-Legrand A, Lebrun-Garcia A, Durner J, Pugin A, Wendehenne D. Analysis of nitric oxide signalling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol*, 2004, 135: 516–529
- [15] Vandelle E, Poinssot B, Wendehenne D, Bentéjac M, Pugin A. Integrated signalling network involving calcium, nitric oxide, and active oxygen species but not mitogen-activated protein kinases in BcPG1-elicited grapevine defences. *Mol Plant Microbe Interactions*, 2006, 19: 429–440
- [16] Lecourieux D, Mazars C, Pauly N, Ranjeva R, Pugin A. Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell*, 2002, 14: 2627–2641