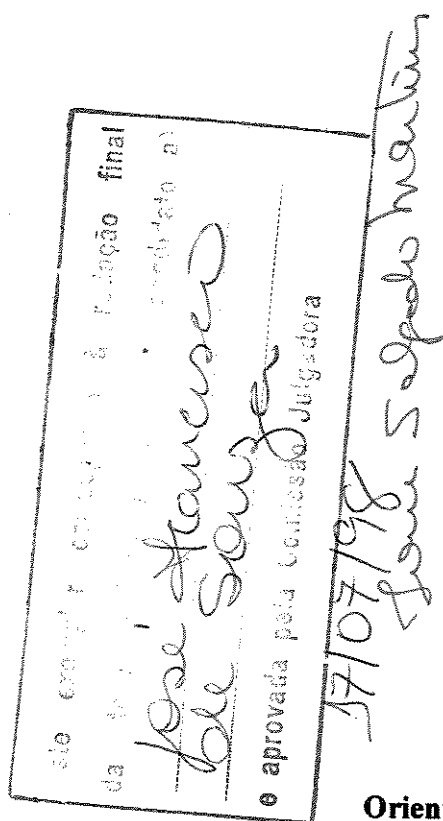


JOSÉ FRANCISCO DE SOUZA



**TRANSPORTE E HOMEOSTASE DE Ca^{2+} EM
PROTOPLASTOS ISOLADOS DE CÉLULAS DE
*Citrus sinensis***



Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas, área de concentração
em Biologia Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Ione Salgado Martins

Campinas - SP
1998



DADE	BC
CHAMADA:	Unicamp
891	
34891	
395/98	
G	D X
28.11.00	
TA 01/09/98	
CPD	

CM-001154B4-0

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Souza, José Francisco de

So891 Transporte e homeostase de Ca^{2+} em protoplastos isolados de células de
Citrus sinensis / José Francisco de Souza. -- Campinas, SP:[s.n.], 1998.
94f.: ilus.

Orientadora: Ione Salgado Martins

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

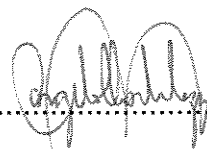
1. Homeostase. 2. Protoplastos. 3. Cálcio. 4. Planta. I. Martins,
Ione Salgado. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

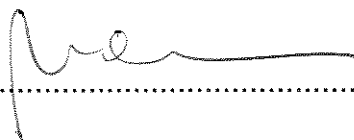
Campinas, 17 de julho de 1998

BANCA EXAMINADORA

TITULARES:

Profa. Dra. Ione Salgado Martins (orientadora).....

Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo.....

Profa. Dra. Nilce Correa Meirelles.....

SUPLENTE:

Profa. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato.....

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Ione Salgado Martins, pela orientação que tornou possível a execução deste trabalho e pelo muito que me ensinou.

À Profa. Dra. Cibele M.C.P. Gouvêa, pela sua amizade e pelo seu incentivo no início deste trabalho.

À Profa. Dra. Beatriz M.J. Mendes do CENA-USP pela doação de calos e células de *C. sinensis* para a realização deste trabalho.

A meus pais, pelo amor e compreensão dedicados em mais esta etapa da minha vida, pelo incentivo nas horas incertas e por tudo que fizeram para que eu chegasse até aqui.

Aos meus irmãos, Zeli e Lucimar, pelo apoio que sempre me deram e pelo amor e carinho que sempre tiveram por mim.

Aos meus sobrinhos, Clayton, Lucineide e Lioneide, por todo carinho que me dedicam.

Aos meus dois grandes amigos, Roberto e Neusa, pelo companheirismo, amizade e pelos momentos alegres que passamos juntos, em especial nos últimos dois anos.

A todos os colegas do laboratório, em especial à Elzira e à Jusceley, pelos bons e alegres momentos.

A todos os amigos que não listei aqui para não correr o risco de esquecer alguém mas que, direta ou indiretamente, colaboraram com esse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de Bolsa de Estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa da UNICAMP (FAEP) pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	i
Resumo.....	ii
Summary.....	iv
1. Introdução.....	1
1.1. A transdução de sinais.....	2
1.2. A transdução de sinais em células vegetais.....	8
1.3. Ca^{2+} como segundo mensageiro em células vegetais.....	11
1.4. Homeostase do Ca^{2+} em células vegetais.....	13
1.5. Sistemas de transporte de Ca^{2+} em células vegetais.....	14
1.6. Determinação da concentração de Ca^{2+} citossólico.....	21
2. Objetivos.....	23
3. Materiais e Métodos.....	24
3.1. Obtenção e manutenção da cultura de células de <i>C. sinensis</i>	24
3.2. Isolamento de protoplastos de <i>C. sinensis</i>	26
3.3. Viabilidade dos protoplastos.....	28
3.4. Tratamento dos protoplastos com EGTA.....	29
3.5. Medidas do fluxo de Ca^{2+}	29
3.6. Tratamento de protoplastos com indicador de Ca^{2+} fluorescente.....	30
3.7. Medidas de fluorescência.....	30
4. Resultados e Discussão.....	32
4.1. Efluxo de cálcio induzido por antagonistas de calmodulina.....	34
4.2. Inibição do efluxo de cálcio por bloqueadores de canais.....	40
4.3. Efeito do EGTA no efluxo de cálcio induzido	42

4.4. Captação de Ca^{2+} por protoplastos de <i>C. sinensis</i> : efeito da depleção de cálcio	46
4.5. Medidas de cálcio citoplasmático em protoplasto de <i>C. sinensis</i> utilizando indo-1	48
5. Conclusões.....	55
6. Literatura Citada.....	57

ABREVIATURAS

Chelex 100: resina quelante (ácido iminodiacético)

Clorpromazina (CP): 2-cloro-N-N-dimetil-10H-phenotiazina-10-propananina.

cADPR: ADP cíclico ribose.

1,2 DAG: 1,2 diacil glicerol.

DMSO: dimetil sulfoxido.

EGTA: ácido etileno glicol bis (β -aminoetil éter) N-N'-tetraacético.

HEPES: ácido (N-[2-hidroxietil] piperazina N'-[2-etanosulfônico]).

InsP₃: 1,4,5-inositol trisfosfato.

MES: ácido 2-(N-morfolino)etanosulfônico.

Nifedipina: ácido 1,4-Dihidro-2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-3,5-piridina dicarboxílico dimetil ester.

Trifluoperazina(TFP):N,N-Dimetil-2-(trifluometil)-10H-fenotiazina-10-propanamine.

TRIS: tris (hidroximetil) aminometano.

Verapamil: α -[3-[[2-(3,4-Dimetoxifenil)etil] -metilamino]propil] -3,4dimetoxi- α -(1-metiletil)benzenoacetonitrila.

TRANSPORTE E HOMEOSTASE DE Ca^{2+} EM PROTOPLASTOS ISOLADOS DE CÉLULAS DE *Citrus sinensis*

RESUMO

Protoplastos isolados a partir de cultura de células de *Citrus sinensis* em suspensão foram utilizados como modelo experimental para o estudo do transporte e da homeostase de Ca^{2+} em células vegetais. Fluxos de Ca^{2+} foram acompanhados por observação das alterações de Ca^{2+} livre do meio, utilizando-se o indicador de Ca^{2+} arsenazo III, que é sensível a baixas concentrações desse íon. Alterações na concentração de Ca^{2+} citossólico foram acompanhadas por microscopia confocal de fluorescência, utilizando-se o indicador de Ca^{2+} fluorescente, indo-1. Protoplastos incubados na presença de $20\mu\text{M}$ de Ca^{2+} livre apresentaram-se praticamente inativos para a captação do íon, uma vez que a baixa concentração externa de Ca^{2+} não foi suficiente para gerar um gradiente capaz de impulsionar a entrada do íon na célula. Entretanto, quando o Ca^{2+} foi removido do meio por adição de EGTA, o efluxo de Ca^{2+} foi estimulado por antagonistas de calmodulina como trifluoperazina (TFP), clorpromazina (CP) e calmidazolium, de uma maneira dose-dependente. A eficiência com que os diferentes antagonistas de calmodulina induziram o efluxo de Ca^{2+} em protoplastos de *C. sinensis* indicaram que este processo foi resultante de um efeito inespecífico na membrana dos protoplastos e não devido a uma ação anti-calmodulina. As concentrações utilizadas dos compostos anti-calmodulina não interferiram na integridade dos protoplastos, eliminando a possibilidade de que o aumento de Ca^{2+} no meio, induzido por estes compostos, seria devido à lise celular. O efluxo de Ca^{2+} induzido por TFP foi inibido quando os protoplastos foram pré-incubados com verapamil ou nifedipina, antagonistas de canais de Ca^{2+}

do tipo voltagem-dependente. A inibição por verapamil foi mais eficiente do que aquela provocada por nifedipina. Esse efluxo também não ocorreu quando os protoplastos foram lavados com EGTA. Após este tratamento, foi observado que a captação de Ca^{2+} pelos protoplastos estava estimulada e que esta captação foi inibida por La^{3+} . Protoplastos incorporados com indo-1 e lavados com EGTA apresentaram um aumento transiente na concentração de Ca^{2+} citossólico, quando expostos a uma alta concentração de Ca^{2+} externa. Os resultados deste trabalho indicam que a membrana plasmática dos protoplastos de *C. sinensis* contém um canal de Ca^{2+} do tipo voltagem-dependente, mais sensível às fenilalquilaminas do que às dihidropiridinas. Ainda, os protoplastos parecem conter uma segunda classe de canal de Ca^{2+} , sensível ao lantânio, que é ativado pela depleção de Ca^{2+} . A observação de que a depleção de Ca^{2+} dos protoplastos induziu tanto um estímulo no influxo de Ca^{2+} através da membrana plasmática, como um aumento transiente do Ca^{2+} citossólico, quando estas células foram novamente expostas a esse íon, sugere a existência de um mecanismo capacitativo para a entrada de Ca^{2+} nesse tipo de célula.

Ca²⁺ TRANSPORT AND HOMEOSTASIS IN CELL *Citrus sinensis* ISOLATED PROTOPLASTS

SUMMARY

Isolated protoplasts from suspension-cultured *Citrus sinensis* cells were used as an experimental model for the study of the Ca²⁺ transport and homeostasis in plant cells. Ca²⁺ fluxes were accompanied through the medium free Ca²⁺ alterations using the Ca²⁺ indicator arsenazo III that is sensitive to low concentrations of that ion. Cytosolic free Ca²⁺ concentration changes were accompanied through fluorescence confocal microscopy, using the fluorescent Ca²⁺ indicator, indo-1. In the presence of 20 μM free Ca²⁺ protoplasts were practically inactive for the uptake of that ion, since the low external Ca²⁺ concentration did not generate a enough gradient able to impel the entrance of the ion inside of the cell. However, when Ca²⁺ was removed from the medium through the EGTA addition, the Ca²⁺ efflux was stimulated by calmodulin antagonists such as trifluoperazin (TFP), chlorpromazin (CP) and calmidazolium, in a dose-dependent manner. The efficiency in which the different calmodulin antagonists induced the Ca²⁺ efflux from the *C. sinensis* protoplasts indicated that this process resulted from an unspecific effect in the protoplast membrane and not due to an anti-calmodulin action. The used concentrations of the anti-calmodulin compounds did not interfere with the protoplasts integrity, eliminating the possibility that the Ca²⁺ increase in the medium, induced by these compounds, would be due to cellular lysis. The Ca²⁺ efflux induced by TFP was inhibited in protoplasts preincubated with verapamil. Verapamil was more efficient than nifedipine, known antagonists of voltage-dependent Ca²⁺ channels, to inhibit this efflux. That efflux did not also happen when the protoplasts were washed with

EGTA. After EGTA-washing Ca^{2+} uptake by the protoplasts was stimulated in a La^{3+} -sensitive manner. EGTA-washed protoplasts, incorporated with indo-1, presented a transient increase in cytosolic free Ca^{2+} by exposure to a high external Ca^{2+} concentration. The present results indicate that the plasma membrane of the *Citrus sinensis* protoplasts contain a voltage-dependent type of Ca^{2+} channel more sensitive to the phenylalkylamines than to the dihydropyridines family blockers. The protoplasts seem also to contain a second class of Ca^{2+} channel, La^{3+} -sensitive, that is activated by Ca^{2+} depletion. The observation that the Ca^{2+} depletion of the protoplasts induced both, an stimulus in the Ca^{2+} influx through the plasma membrane and a transient increase in cytosolic Ca^{2+} , by further exposition of the cells to that ion, suggest the existence of a capacitative mechanism for Ca^{2+} uptake in that cell type.

1. INTRODUÇÃO

O Ca^{2+} apresenta um papel essencial no crescimento e desenvolvimento de vegetais, uma vez que alterações na concentração citossólica de Ca^{2+} regulam uma enorme variedade de processos celulares, através da ação de proteínas que são moduladas por este íon. Assim, o Ca^{2+} tem sido considerado um dos elementos mais importantes em muitos sistemas de transdução de sinal em vegetais (TREWAVAS & GILROY, 1991; BUSH, 1995; TREWAVAS & MALHÓ, 1997). Embora a elevação da concentração do Ca^{2+} citoplasmático seja geralmente responsável por desencadear a resposta fisiológica, níveis elevados de Ca^{2+} por um período prolongado podem inviabilizar a sobrevivência da célula (CLAPHAM, 1995). Assim, a habilidade da célula vegetal em manter baixas concentrações de Ca^{2+} citoplasmático, bem como, de restaurar as elevações resultantes de estímulos desencadeados por sinalizadores, é um requerimento essencial para a função desse íon como regulador de vários processos celulares. No estado de repouso a concentração citoplasmática de Ca^{2+} é da ordem nM, enquanto que no interior das organelas e no meio extracelular, a concentração livre de Ca^{2+} está na faixa de μM ou mM (BUSH *et al.*, 1989; DUPONT *et al.*, 1990). Acredita-se que transportadores localizados na membrana plasmática, bem como nas membranas das organelas, sejam responsáveis pela manutenção dos baixos níveis de Ca^{2+} livre citoplasmático, contra um alto gradiente de Ca^{2+} do lado extracitossólico. Como o efluxo de Ca^{2+} do citoplasma para o meio extracelular, ou para o interior das organelas, ocorre contra seu gradiente eletroquímico, este processo requer energia, devendo ser catalisado por proteínas de membrana que utilizam ATP ou uma força motriz para dirigir o movimento de Ca^{2+} . Ao contrário, o influxo de Ca^{2+} para o citoplasma é

energeticamente favorável, e deve ser mediado por canais de Ca^{2+} , que são poros que podem ser abertos ou fechados. A manutenção da concentração de Ca^{2+} citossólico, bem como a resposta a estímulos que alteram sua concentração, são resultados da regulação das vias de efluxo e influxo, características para cada tipo de célula.

O presente trabalho estuda os sistemas de transporte de Ca^{2+} da membrana plasmática bem como o efeito do conteúdo de reservas internas de Ca^{2+} na captação e homeostase citossólica desse íon em protoplastos derivados de células de *Citrus sinensis* mantidas em cultura líquida. O conhecimento dos sistemas responsáveis pela manutenção da homeostase citoplasmática do Ca^{2+} permitirá estudos futuros sobre vias de transdução de sinal nesse sistema, onde o Ca^{2+} participa como segundo mensageiro.

1.1. A TRANSDUÇÃO DE SINAIS

As células vegetais são capazes de perceber sinais exógenos tão diversos como luz (ASSMANN et al., 1985; SERRANO et al., 1988; QUAIL et al., 1995; SMITH, 1995; VON ARMIN & DENG, 1996; CHORY, 1997; JINKINS, 1997), temperatura (KNIGHT et al., 1996), vento (BRAAM & DAVIS, 1990; KNIGHT et al., 1992), toque (BRAAM & DAVIS, 1990; KNIGHT et al., 1991; TREWAVAS & KNIGHT, 1994), gravidade (POOVAIAH et al., 1987; BELYAVSKAYA, 1996), hormônios (FELLE, 1988; GILROY et al., 1990; McAINSH et al., 1990; SCHROEDER & HAGIWARA, 1990; GILROY & JONES, 1994; MILLNER, 1995; BLEECKER & SCHELLER, 1996; VAN DER MEULEN et al., 1996; KENDE & ZEEVAART, 1997), ataque de patógenos (BOLLER, 1995; GIRAUDAT, 1995; DMITRIEV et al., 1996; GELLI & BLUMWALD, 1997; ZIMMERMANN et al., 1997),

estresse osmótico (ALLEN & SANDERS, 1994), etc. Os mecanismos pelos quais diversos sinais exógenos induzem uma resposta biológica eram, até recentemente, muito pouco conhecidos em sistemas vegetais (TREWAVAS & MALHÓ, 1997). Entretanto, na última década, houve uma explosão no estudo da transdução de sinais em células vegetais (GILROY & TREWAVAS, 1994; STONE & WALKER, 1995; WARD *et al.*, 1995; IRVINE & CULLEN, 1996; JENSEN, *et al.*, 1996; TREWAVAS & MALHÓ, 1997). O crescente avanço no esclarecimento das vias de sinalização em plantas tem mostrado que existe uma grande complexidade e interação entre os sistemas sinalizadores, à semelhança do que se observa em células animais (WILSON *et al.*, 1997). Entretanto, apesar desses avanços, o que se entende hoje sobre transdução de sinal em vegetais é muito mais rudimentar que em animal (BRAUN & WALKER, 1996; VITORELLO & HAUG, 1996; BAUER *et al.*, 1997), embora tanto a célula animal quanto a vegetal detectem vários estímulos diferentes, transduzam essas informações para componentes intracelulares apropriados e respondam pela alteração do seu metabolismo, crescimento e desenvolvimento (BRAUN & WALKER, 1996). Assim, os mecanismos gerais de transdução de sinais em sistemas vegetais podem ser resumidos seguindo-se o esquema (Figura 1), já bem estabelecido para células animais.

O mecanismo de transdução de sinal se inicia através da interação de sinais (ambientais ou químicos) com receptores específicos, que frequentemente se localizam na membrana plasmática (SCHIMIDT & EBEL, 1987; KOGEL *et al.*, 1991; BOLLER, 1995; BRAUN & WALKER, 1996), mas podem também ocorrer no citossol (GINSBURG *et al.*, 1992) ou no núcleo (TREWAVAS & KNIGHT, 1994; MULLIGAN *et al.*, 1997). A formação do complexo receptor-sinalizador desencadeia uma cascata de eventos que vão modificar a atividade celular e/ou a expressão gênica resultando numa resposta biológica (MULLIGAN *et al.*, 1997).

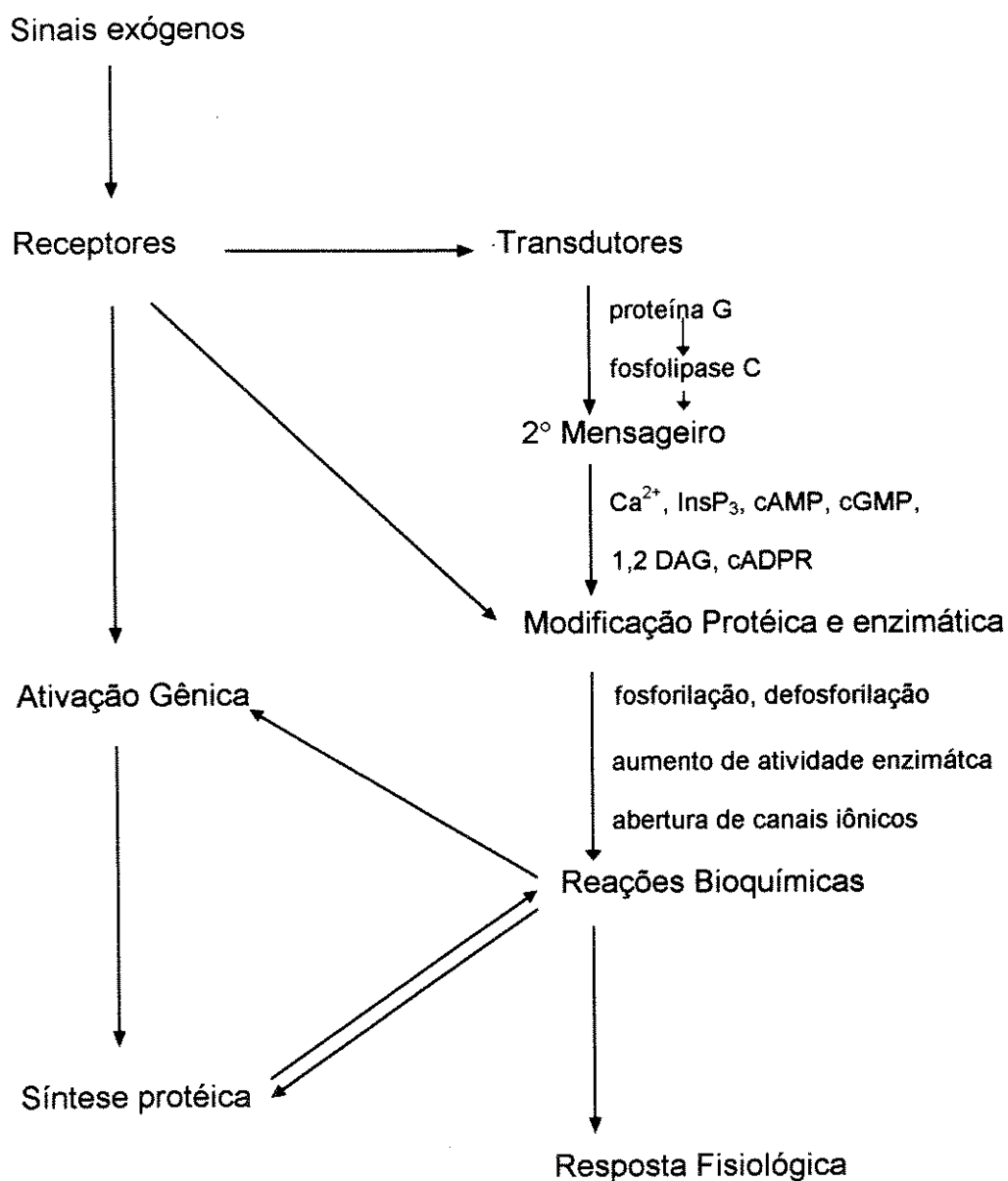


FIGURA 1. Transdução de sinal em células vegetais (adaptado do esquema desenvolvido por MUTO, 1992).

Uma célula pode ter mais de um tipo de receptor ou, vários tipos de células podem ter diferentes conjuntos de receptores para o mesmo sinalizador, cada um deles induzindo uma resposta diferente (DOHLMAN *et al.*, 1987; LEFKOWITZ & CARON, 1988; ASHKENAZI *et al.*, 1989). Também, o mesmo receptor pode ocorrer em diferentes tipos celulares e a ligação da mesma molécula sinalizadora pode iniciar diferentes respostas em cada tipo de célula (HART *et al.*, 1988; ASHKENAZI *et al.*, 1989).

Alguns sinais induzem a modificação da atividade de uma ou mais enzimas já presentes na célula alvo provocando uma resposta rápida (minutos ou segundos). Em células animais, a maioria das moléculas sinalizadoras que induzem alterações rápidas são solúveis em água se ligando a receptores localizados na membrana plasmática (CHINKERS *et al.*, 1989). Outras moléculas sinalizadoras alteram primariamente o padrão de expressão gênica. Geralmente as moléculas desta segunda classe, por serem lipossolúveis, atravessam a membrana plasmática e se ligam a receptores solúveis presentes no citoplasma ou no núcleo. O complexo resultante, atuando no DNA, induz a síntese de proteínas responsáveis pela resposta fisiológica. Este tipo de sinalização induz uma resposta mais lenta e duradoura na célula alvo (CZECH *et al.*, 1988; CZECH, 1989).

Sinalizadores que se ligam a receptores de membrana plasmática, geralmente ativam uma enzima ou um grupo de enzimas, denominados transdutores, que geram um incremento na concentração de um sinalizador intracelular denominado segundo mensageiro (STERNWEIS & SMRCKA, 1992; CLAPHAM, 1995). Segundos mensageiros incluem AMP cíclico (cAMP) (SIBLEY & LEFKOWITS, 1985; MUTO, 1992; STONE & WALKER, 1995), GMP cíclico (cGMP) e 1,2-diacilglicerol (DAG) (STONE & WALKER, 1995), inositol 1,4,5-

trifosfato (Ins-P₃) (HOTH & PENNER, 1992; McDONALD *et al.*, 1993; PETERSEN & BERRIDGE, 1994; ALLEN *et al.*, 1995; CLAPHAM, 1995; DeLISLE *et al.*, 1995; PUTNEY Jr., 1997); ADP cíclico ribose (cADPR) (ALLEN *et al.*, 1995; WU *et al.*, 1997) e Ca²⁺ (HEPLER & WAYNE, 1985; POOVAIAH & REDDY, 1987; RASMUSSEN, 1989; MUTO, 1992; GILROY & TREWAVAS, 1994). O aumento na concentração intracelular de um ou mais destes segundos mensageiros desencadeia uma rápida alteração na atividade de uma ou mais enzimas ou proteínas não enzimáticas, geralmente atuantes em pontos estratégicos do metabolismo. A remoção ou degradação do sinalizador reduz o nível do segundo mensageiro finalizando a resposta fisiológica (TAYLOR & MARSHALL, 1992; FINCH & GOLDIN, 1994).

Outros receptores podem não utilizar segundos mensageiros, modificando diretamente a atividade de proteínas citoplasmáticas fosforilando-as (proteínas quinases) ou promovendo remoção de fosfato destas proteínas (proteínas fosfatases) (KLOTZ, 1982; HUNTER, 1987; COHEN, 1989). As proteínas quinases são há muito tempo reconhecidas por atuarem como amplificadoras, propagadoras e integradoras de sinais primários (COHEN, 1982; RANJEVA & BOUDET, 1987). Ainda, em outros casos, a ligação ao receptor altera sua conformação abrindo um canal específico para íons na própria proteína. O fluxo resultante de íons altera o gradiente iônico através da membrana, desencadeando a sinalização (BERRIDGE, 1995).

A ligação de sinalizadores em receptores da membrana plasmática, resulta muitas vezes na interação direta com transdutores, que são membros da superfamília das GTPases, como as proteínas-G e membros da família Ras (MA, 1994; LIN *et al.*, 1996). Receptores que tem sua ação através de proteínas-G ou de tirosina quinase podem utilizar via de transdução mediada por Ca²⁺

(FRIESSMUTH *et al.*, 1989; BOSSEN *et al.*, 1990; BIRD & PUTNEY Jr., 1993). Para ambos os tipos de receptores, sinais exógenos ativam o receptor resultando na produção de Ins-P₃ citossólico. Este se liga então a um receptor para Ins-P₃ que provoca a liberação de Ca²⁺ de reservas intracelulares, normalmente do retículo endoplasmático, em células animais (BERRIDGE & IRVINE, 1989; PUTNEY Jr. *et al.*, 1989; PUTNEY Jr., 1997), provocando um aumento na concentração de Ca²⁺ citoplasmático (BERRIDGE, 1993).

Em muitos tipos de células animais, principalmente em células não excitáveis, após estimulação prolongada da liberação de Ca²⁺ de estoques intracelulares observa-se um aumento na velocidade de influxo de Ca²⁺ através da membrana plasmática. Visando explicar este fenômeno, PUTNEY Jr. (1986) propôs a teoria capacitativa que estabelece que a entrada de Ca²⁺ nessas células seria regulada pelo conteúdo de Ca²⁺ de reservas internas. Vários canais na membrana plasmática permeáveis ao Ca²⁺ são ativados pela depleção de estoques intracelulares. O mais bem caracterizado foi descrito por HOTH & PENNER (1992) mostrando que a depleção de estoques de Ca²⁺, por mecanismos independentes, induziu ativação de uma corrente interna sustentada de Ca²⁺ em células de animais superiores que chamaram de I_{CRAC} (calcium release-activated current). A I_{CRAC} é ativada por vários processos que resultam na depleção dos estoques de Ca²⁺; é altamente seletiva ao Ca²⁺; é inativada por altos níveis de Ca²⁺ intracelular e tem uma condutância extremamente baixa (FASOLATO *et al.*, 1994; CLAPHAN, 1995). Embora, a existência de correntes do tipo I_{CRAC} já tenha sido demonstrada em muitos tipos de células, a natureza do mecanismo de permeação ao Ca²⁺ ainda não foi elucidada (BERRIDGE, 1995).

O aumento transiente da concentração de Ca²⁺ livre citossólico durante a transdução de sinal, independente do mecanismo, pode desempenhar várias

funções. O mecanismo mais simples é a ligação de Ca^{2+} em proteínas específicas, como por exemplo, proteínas quinases dependentes de Ca^{2+} , que podem regular várias atividades celulares, (HETHERINGTON & TREWAVAS, 1982; HUNTER, 1987; HARPER *et al.*, 1991; STONE & WALKER, 1995). Um outro mecanismo envolve uma proteína ligante de Ca^{2+} , a calmodulina, cuja expressão é regulada pelo Ca^{2+} , isto é, desreprime os genes que controlam sua síntese. A calmodulina (e algumas outras proteínas similares) são inativas no seu estado livre e se ativam quando complexadas com Ca^{2+} . O complexo Ca^{2+} -calmodulina interage com outras proteínas estruturais que fixam o complexo Ca^{2+} -calmodulina, conhecidas como proteínas ligantes de calmodulina (RAGHOTHAMA *et al.*, 1985; LING & ZIELINSKI, 1989; MEANS, 1994; JAMES *et al.*, 1995). Na verdade, estas proteínas ligantes de calmodulina, assim como as proteínas quinases dependentes de Ca^{2+} , são proteínas que fosforilam enzimas regulatórias fundamentais, quando em contato com ATP. Proteínas fosfatases agem de maneira oposta nestas enzimas-chave, ativando-as ou inibindo-as.

1.2. TRANSDUÇÃO DE SINAIS EM CÉLULAS VEGETAIS

Recentemente tem-se conseguido progredir na identificação de mecanismos de recepção inicial e de elementos envolvidos na cascata de sinalização em vegetais (KUROSAKI & NISHI, 1993; WARD *et al.*, 1995). Vários exemplos têm mostrado que plantas, assim como animais, usam receptores da superfície celular para sinalizar a presença de seus ligantes extracelulares iniciando a via de transdução de sinal (BRAUN & WALKER, 1996). Receptores para etileno (BLEECKER & SCHALLER, 1996; KENDE & ZEEVAART, 1997), luz vermelha (FURUYA & SCHAFER, 1995) e luz azul (SHORT & BRIGGS, 1994;

AHMAD & CASHMORE, 1996; CHORY, 1997) já foram identificados. Receptores citossólicos de Ca^{2+} como calmodulina e proteína quinase dependente de Ca^{2+} (HARPER *et al.*, 1991) e muitos receptores tipo-proteína quinase (STONE & WALKER, 1995) já foram isolados e sequenciados. Fortes candidatos a receptores para ácido abscísico (GIRAUDAT, 1995), auxina (MILLNER, 1995; BENNETT *et al.*, 1996), citocininas (KAKIMOTO, 1996) e luz azul (SHORT & BRIGGS, 1994) já foram sequenciados ou investigados em detalhes. Receptores para InsP_3 , cADP-ribose e elicitores fúngicos já foram detectados, mas ainda não purificados (BROSNAN & SANDERS, 1990; ALLEN & SANDERS, 1994; NURNBERGER *et al.*, 1994; ALLEN *et al.*, 1995; WU *et al.*, 1997). A identificação destes receptores e a elucidação de suas propriedades têm contribuído para o esclarecimento da regulação do crescimento e desenvolvimento de vegetais.

O envolvimento de GTPases pode aumentar enormemente a flexibilidade das vias de transdução de sinais. Proteínas G com alta afinidade e especificidade já foram identificadas em várias células vegetais (JACOBS *et al.*, 1988; BOSSEN *et al.*, 1990; EINSPAHR & THOMPSON, 1990). Proteínas de várias plantas apresentam reação cruzada com anticorpos para a subunidade α da proteína G de mamíferos e o gene para esta proteína foi encontrado em *Arabidopsis thaliana* (MA *et al.*, 1990). Evidências recentes sugerem que as respostas à luz azul, luz vermelha (MUTO, 1992; BOWLER *et al.*, 1994; NEUHAUS *et al.*, 1997), auxina, giberelina, elicitores fúngicos e o controle da abertura estomática em células guarda, são todas mediadas por GTPases (TREWAVAS & MALHÓ, 1997). Ainda, as GTPases participam na síntese protéica, secreção e ciclo celular (JACOBS, 1997).

Quando as células são sinalizadas, o compartimento citoplasmático recebe esta informação através da alteração na concentração de uma grande variedade

de segundos mensageiros. Em plantas muitos segundos mensageiros operando em um ou outro sistema de sinalização têm sido identificados. Mobilização de Ca^{2+} dependente de Ins-P_3 já foi demonstrada em vacúolo (GELLI & BLUMWALD, 1993; ALLEN & SANDERS, 1994; ALLEN *et al.*, 1995; LOMMEL & FELLE, 1997) células guarda (GILROY *et al.*, 1990; KEARNS & ASSMANN, 1993; LEE *et al.*, 1996), protoplastos (RINCON & BOSS, 1987) e tubos de pólen (FRANKLIN-TONG *et al.*, 1996). Ins-P_3 foi capaz de induzir a abertura de canais de Ca^{2+} de vesículas de tonoplasto de raízes de aveia (SCHUMAKER & SZE, 1987), de vacúolos intactos de células de *Acer* (RANJEVA *et al.*, 1988) e beterraba (ALEXANDRE *et al.*, 1990; ALEXANDRE & LASSALES, 1990; 1992), provocando a liberação de Ca^{2+} para o meio. A primeira indicação de que fosfoinosítídeos poderiam estar envolvidos em vias de transdução de sinais em plantas veio da observação de que a elevação artificial de InsP_3 em células guarda elevou o nível de Ca^{2+} citossólico provocando o fechamento do estômato (GILROY *et al.*, 1990). O envolvimento de fosfoinosítídeos na via de transdução de sinal que regula o crescimento do tubo polínico também já foi demonstrado (FRANKLIN-TONG *et al.*, 1996). Recentemente cADP-ribose foi identificada como a molécula sinalizadora na resposta de plantas ao ácido abscísico, o principal hormônio envolvido na resposta a estresse, como frio, seca e salinidade. Foi mostrado que cADP-ribose exerce seu efeito por provocar a liberação de Ca^{2+} de reservas internas (WU *et al.*, 1997), provavelmente do vacúolo (ALLEN *et al.*, 1995).

Respostas devidas ao cAMP têm sido relatadas em uma variedade de sistemas, entre elas inclui-se a estimulação da abertura estomática de *Vicia faba* (CURVETTO *et al.*, 1994), estimulação da absorção de Ca^{2+} em cultura de células de cenoura (KUROSAKI & NISHI, 1993; KUROSAKI *et al.*, 1994), aumento de volume de protoplasto de trigo estiolado (BOSSSEN *et al.*, 1990),

alongamento do tubo polínico de lírio (TEZUKA *et al.*, 1993) e estimulação da atividade de proteína quinase em folhas de arroz (KOMATSU & HIRANO, 1993).

Embora pouco se conheça sobre a função da calmodulina em plantas, seus genes e a própria proteína de várias espécies vegetais já foram isolados e seu papel regulatório em células vegetais começa a ser esclarecido (LING & ZIELINSKI, 1989; BRAAM & DAVIS, 1990; BAUM *et al.*, 1996; YANG *et al.*, 1996). Várias enzimas e proteínas dependentes de Ca^{2+} /calmodulina já foram identificadas em vegetais, como proteínas quinases, Ca^{2+} -ATPases e NAD-quinase, miosina V, cinesina, canais de Ca^{2+} e glutamato descarboxilase (ALLAN & TREWAVAS, 1987; BAUM *et al.*, 1996; YANG *et al.*, 1996).

A atividade de muitas enzimas vegetais é modulada pela fosforilação (RANJEVA & BOUDET, 1987; MUTO, 1992) e mais de setenta genes para proteínas quinases vegetais já foram identificados. Proteínas fosfatases também já foram identificadas em células vegetais. Entretanto, o papel preciso de proteínas quinases e fosfatases durante o crescimento e desenvolvimento vegetal, foi elucidado em apenas alguns casos (STONE & WALKER, 1995).

1.3. Ca^{2+} COMO SEGUNDO MENSAGEIRO EM CÉLULAS VEGETAIS

O cálcio já é considerado em muitos tipos celulares como o elemento mais importante no processo de transdução de sinal e vem emergindo com esta função em células vegetais (TREWAVAS & GILROY, 1991; BUSH, 1995; WARD *et al.*, 1995; TREWAVAS & MALHÓ, 1997). Alterações na concentração de cálcio livre citossólico já foram observadas em resposta a diferentes estímulos como luz (CHAE *et al.*, 1990; RUSS *et al.*, 1991; BOWLER *et al.*, 1994; MILLAR *et al.*, 1994), elicitores (KNIGHT *et al.*, 1991; TAKAGI & NAGAI, 1992; BACH *et al.*

1993), frio (KNIGHT *et al.* 1996), toque e vento (KNIGHT *et al.*, 1992; TREWAVAS & KNIGHT, 1994; HALEY *et al.*, 1995), ácido abscísico (GILROY *et al.*, 1990; MaCAINSH *et al.*, 1990; SCHROEDER & HAGIWARA, 1990; IRVING *et al.*, 1992; CURVETTO *et al.*, 1994; ALLEN & SANDERS, 1994; TAKAHASHI *et al.*, 1997; WU *et al.*, 1997), auxina (FELLE, 1988), citocinina (HAHM & SANDERS, 1991; GOUVÊA *et al.*, 1997), giberelina (BUSH & JONES, 1987; GILROY & JONES, 1992) e despolarização da membrana (THULEAU *et al.*, 1994b). Pesquisas recentes mostram também que, mecanismos independentes de Ca^{2+} , juntamente com processos dependentes de Ca^{2+} (GILROY, 1996), podem controlar respostas celulares como a ativação do fitocromo que leva ao desenvolvimento do cloroplasto e à produção de pigmentos (MILLAR *et al.*, 1994) e regulação hormonal da atividade secretória em protoplasto de aleurona de cevada (GILROY, 1996).

Evidências experimentais demonstram que o Ca^{2+} influencia a germinação, o crescimento e a senescência induzidos por hormônios vegetais (TAKAGI & NAGAI, 1992) e está também envolvido na via de transdução de sinal que leva ao crescimento do tubo de pólen. Vários grupos já mostraram que existe um alto gradiente de Ca^{2+} citossólico na extremidade de crescimento dos tubos polínicos (JAFFE *et al.*, 1975; RATHORE *et al.*, 1991; MILLER *et al.*, 1992; MALHÓ *et al.*, 1994; PIERSON *et al.*, 1994). A elevada concentração de Ca^{2+} citossólico nesta região parece resultar do aumento do influxo de Ca^{2+} (PIERSON *et al.*, 1994) resultante da ativação de canais da membrana plasmática, sensíveis a lantânio (MALHÓ *et al.*, 1994).

Influxo de Ca^{2+} através de canais de cátion existentes na membrana plasmática de células de plantas superiores parece ser um dos mecanismos mais comuns que resulta na elevação do nível de Ca^{2+} citoplasmático e ativação

de cascatas de sinalização (SCHROEDER & THULEAU, 1991). O Ca^{2+} extracelular parece ser o principal responsável pelo aumento de Ca^{2+} citossólico durante o potencial de ação e a regulação do turgor em *Charophyta* (WILLIAMSON & ASHLEY, 1982). Influxo de Ca^{2+} externo, induzido por ácido abscísico (ABA) precede e controla o fechamento de estômatos (McAINSH *et al.*, 1990; SCHROEDER & HAGIWARA, 1990; IRVING *et al.*, 1992; VAN DER MEULEN *et al.*, 1996). A forma ativa do fitocromo, obtida pela ação da luz vermelha, ativa o influxo de Ca^{2+} via canais presentes na membrana plasmática (MEHTA, *et al.*, 1993; BOWLER *et al.*, 1994; NEUHAUS *et al.*, 1997).

A existência de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem que são ativados pela despolarização da membrana plasmática já foi descrita em células vegetais (PING *et al.*, 1992a; HUANG *et al.*, 1994; THULEAU *et al.*, 1994a; 1994b). THULEAU *et al.* (1994a) observaram que protoplastos derivados de células de cenoura possuem canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, quiescentes, que podem ser ativados através de estímulo elétrico. Foi sugerido que estes canais poderiam ser rapidamente recrutados em vias de transdução dependentes de Ca^{2+} .

1.4. HOMEOSTASE DO Ca^{2+} EM CÉLULAS VEGETAIS

Vários trabalhos mostram que uma grande variedade de estímulos induzem alterações na concentração de Ca^{2+} citossólico em vegetais. Embora estas alterações tenham sido medidas em um número relativamente pequeno de tipos celulares, elas têm mostrado enorme variabilidade na amplitude, cinética e distribuição espacial (BUSH, 1995). É importante ressaltar que, apesar do Ca^{2+} ser um segundo mensageiro importante na transdução de sinal, níveis elevados

de Ca^{2+} intracelular por um tempo prolongado podem causar a morte celular (CLAPHAM, 1995). Assim, a habilidade da célula vegetal em manter concentrações baixas de Ca^{2+} citoplasmático é um requerimento essencial para a função desse cátion divalente como regulador de processos celulares fundamentais (ALLAN & TREWAVA, 1987; POOVAIAH & REDDY, 1987; EVANS, 1988; GILROY *et al.*, 1993; BUSH, 1993; 1995).

No estado de repouso, a concentração de Ca^{2+} citoplasmático é mantida a um nível bastante baixo (30 a 200nM). Por outro lado, a concentração de Ca^{2+} no meio extracelular (apoplasto), vacúolo (DuPONT *et al.*, 1990; GELLI & BLUMWALD, 1993) e retículo endoplasmático (BUSH & SZE, 1986; BUSH *et al.*, 1989; BYGRAVE & BENEDETTI, 1996) está na faixa de 1,0 μM a 10,0mM. Acredita-se com isto que, transportadores localizados nas diferentes membranas sejam responsáveis pela manutenção dos baixos níveis de Ca^{2+} livre no citoplasma; pelas distintas alterações do Ca^{2+} citossólico durante eventos de sinalização onde ele participa como segundo mensageiro, bem como pelo restabelecimento de sua concentração basal após a sinalização (EVANS, 1988; EVANS *et al.*, 1991; BUSH, 1995).

1.5. SISTEMAS DE TRANSPORTE DE Ca^{2+} EM CÉLULAS VEGETAIS

A Figura 2 apresenta os sistemas de transporte envolvidos na manutenção da homeostase citossólica de Ca^{2+} em uma célula vegetal ideal.

A membrana plasmática contém uma H^+ -ATPase eletrogênica (sistema 1) que acidifica o meio extracelular, gerando um gradiente eletroquímico de H^+ que é utilizado para dirigir a troca $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ pela Ca^{2+} -ATPase (sistema 2) (RASI-

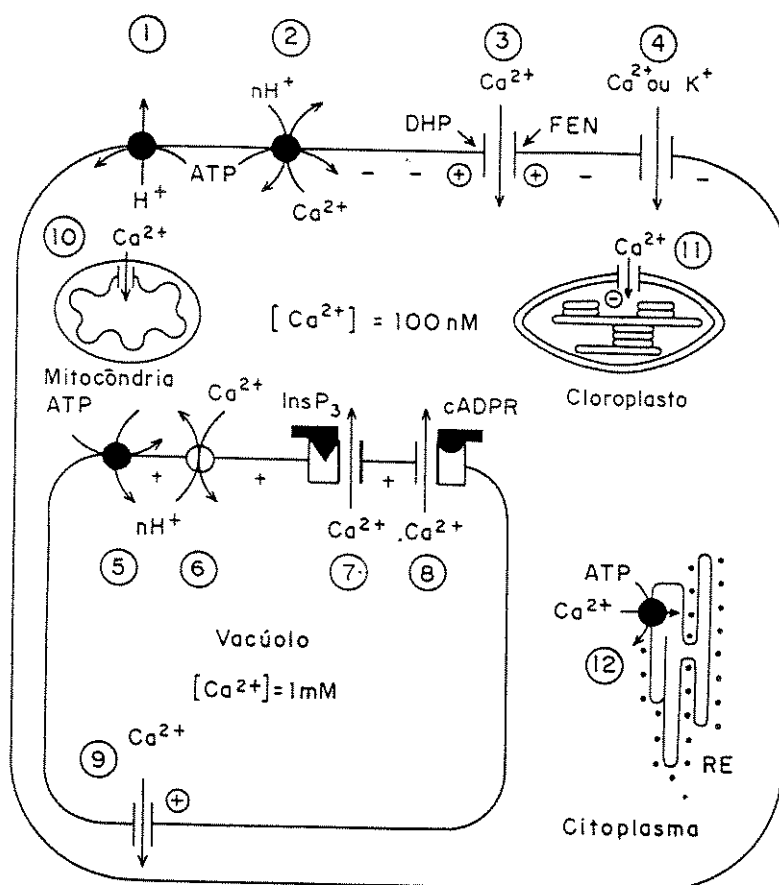


FIGURA 2. Identificação e localização dos sistemas de transporte envolvidos na manutenção da homeostase citossólica de Ca^{2+} em uma célula vegetal idealizada (adaptada de JOHANNES *et al.*, 1991). 1-4 são sistemas de transporte localizados na membrana plasmática: 1, H^+ -ATPase eletrogênica; 2, Ca^{2+} -ATPase; 3, canal de Ca^{2+} voltagem-dependente; 4, canal de Ca^{2+} ou K^+ voltagem-independente. 5-9 são sistemas de transporte localizados no tonoplasto: 5, H^+ -ATPase eletrogênica; 6, antiporte $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$; 7, canal de Ca^{2+} operado por InsP_3 ; 8, canal de Ca^{2+} operado por cADPR; 9, canal de Ca^{2+} voltagem-dependente. 10, canal de Ca^{2+} localizado na membrana interna da mitocôndria. 11, canal de Ca^{2+} localizado na membrana do tilacóide do cloroplasto. 12, Ca^{2+} -ATPase localizada na membrana do retículo endoplasmático.

CALDOGNO *et al.*, 1987; 1989; KASAI & MUTO, 1990; FELLE *et al.*, 1992). A presença de um sistema de transporte de Ca^{2+} dependente de ATP já foi identificada em frações microssomais ou frações de membrana plasmática parcialmente purificada de várias plantas superiores (GROSS & MARMÉ, 1978; KUBOWICS *et al.*, 1982; COCUCCI, 1986; BUTCHER & EVANS, 1987; GIANNINI *et al.*, 1987; MALATIALY *et al.*, 1988; PALIYATH & THOMPSON, 1988; RASI-CALDOGNO *et al.*, 1987; 1989; WILLIAMS *et al.*, 1990). A Ca^{2+} -ATPase presente na membrana plasmática de células vegetais parece ser estruturalmente semelhante àquela encontrada em células animais (RASI-CALDOGNO *et al.*, 1989; BELYAVSKAYA, 1996).

Uma das primeiras evidências de que o Ca^{2+} estaria envolvido na regulação do metabolismo e transdução de sinal em células vegetais foi demonstrada com o uso de agentes farmacológicos que, em células animais bloqueiam ou promovem a abertura de canais de Ca^{2+} operados por voltagem. Esses agentes incluem as dihidropiridinas como nifedipina, as fenilalquilaminas como o verapamil e as benzotiazepinas como o diltiazem. Em células animais esses agentes bloqueiam a entrada de Ca^{2+} por se ligarem a regiões específicas da subunidade α_1 de canais de Ca^{2+} operados por voltagem (TSIEN & TSIEN, 1990). Estudos de potencial de ação com a alga *Charophyta*, mostraram que a captação de Ca^{2+} podia ser bloqueada por nifedipina (SHIINA & TAZAWA, 1987) enquanto que, protoplastos derivados de raízes de cenoura tiveram a captação de cálcio bloqueada por antagonistas da série das fenilalquilaminas (GRAZIANA *et al.*, 1988). A habilidade das fenilalquilaminas se ligarem a proteínas de membranas foi inclusive utilizada na tentativa de se identificar este canal de Ca^{2+} em células vegetais (GRAZIANA *et al.*, 1988; HARVEY *et al.*, 1989; THULEAU *et al.*, 1993). Assim, é aceito que a membrana plasmática de células vegetais

contém uma classe de canal de Ca^{2+} do tipo operado por voltagem (sistema 3) embora medidas elétricas da atividade desses canais têm sido raras (THULEAU *et al.*, 1994b).

O lantânio é capaz de bloquear tanto respostas fisiológicas como o influxo de cálcio em muitos processos, incluindo germinação de esporos (TESTER & MAC-ROBBIE, 1990), organogênese (HUSH *et al.*, 1991), choque térmico (KNIGHT *et al.*, 1991) e o ritmo circadiano (LONERGAN, 1990). Embora o La^{3+} possa exercer esses efeitos através dos canais de Ca^{2+} do tipo 3 (Fig. 2), tem se observado que este íon é um eficiente bloqueador de canais de K^+ (TESTER & MAC-ROBBIE, 1990; KETCHUM & POOLE, 1991). Assim, acredita-se que a entrada de Ca^{2+} na célula vegetal possa também ocorrer através de canais de K^+ (sistema 4) ou outros tipos de canais não seletivos como aqueles operados por tensão (BUSH, 1995).

A membrana do vacúolo contém uma H^+ -ATPase eletrogênica (sistema 5) responsável por estabelecer um gradiente eletroquímico de H^+ transmembrana, com potencial elétrico positivo e pH ácido no interior do vacúolo (KASAI & MUTO, 1990; LOMMEL & FELLE, 1997). O antiporte $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ da membrana vacuolar (sistema 6) é capaz de remover o Ca^{2+} citoplasmático para dentro do vacúolo, utilizando o gradiente de H^+ gerado pela H^+ -ATPase (BLACKFORD *et al.*, 1990). Um antiporte $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ foi primeiramente detectado em tonoplasto de aveia (SCHUMAKER & SZE, 1987; 1990) e beterraba (BLACKFORD *et al.*, 1990).

A existência de classes distintas de canais de Ca^{2+} co-residentes no tonoplasto, capazes de liberar Ca^{2+} para o citossol, já foram identificadas em vegetais. Um primeiro tipo é sensível ao Ins-P_3 (sistema 7) (SCHUMAKER & SZE, 1987; RANJEVA *et al.*, 1988; ALEXANDRE *et al.*, 1990; ALEXANDRE & LASSALLES, 1990; 1992) e apresenta uma grande similaridade com o localizado

no retículo endoplasmático de células animais (BERRIDGE & IRVINE, 1989; ROSS *et al.*, 1989). Apesar da diferença de localização, os canais de Ca^{2+} sensíveis ao InsP_3 , de células animais e vegetais, apresentam propriedades similares. O efluxo de Ca^{2+} em ambos é inibido por glicosaminoglicanoheparina (BROSNAN & SANDERS, 1990; GHOSH *et al.*, 1988) e, em ambos os casos, o InsP_3 se liga com alta afinidade ($K_d < 100 \text{ nM}$) ao receptor solubilizado (SUPATTAPONE *et al.*, 1988).

Observações de que cADP-ribose era capaz de induzir a liberação de Ca^{2+} de vacúolos de beterraba (ALLEN *et al.*, 1995; MUIR & SANDERS, 1996) sugeriram a existência de um canal de Ca^{2+} sensível à cADP-ribose no tonoplasto (sistema 8). Recentemente foi demonstrado que este tipo de canal é o responsável pela elevação de Ca^{2+} citoplasmático na resposta ao estresse desencadeada pelo ácido abscísico (WU *et al.*, 1997). Esta foi considerada uma descoberta que poderá contribuir para a elucidação de vias de sinalização em células animais que contêm este tipo de canal sensível a cADP-ribose, capaz de liberar Ca^{2+} de reservas internas (PENNISI, 1997). Este tipo de canal em células animais está localizado na membrana do retículo endoplasmático e tem a liberação de Ca^{2+} inibida por rianodine, sendo por isto denominado de receptor para rianodine (TSIEN & TSIEN, 1990).

Dois tipos de canais de Ca^{2+} operados por voltagem já foram identificados na membrana do vacúolo (sistema 9). Um primeiro tipo, que se abre quando o potencial elétrico é negativo dentro do vacúolo, foi encontrado em batata doce (PANTOJA *et al.*, 1992) e fumo (PING *et al.*, 1992b). Um segundo tipo é ativado quando o potencial elétrico dentro do vacúolo é positivo (BUSH, 1995). A função destes canais em plantas ainda não é conhecida.

A captação de Ca^{2+} pela mitocôndria (sistema 10) em resposta ao

gradiente eletroquímico de H^+ gerado pela respiração, pode ter um papel importante na homeostase do Ca^{2+} na célula vegetal uma vez que, várias espécies vegetais apresentam este sistema de transporte (MARTINS & VERCESI, 1985; MARTINS *et al.*, 1986; CARNIERI *et al.*, 1987; MARTINS *et al.*, 1993; SIEWERT & MARTINS, 1996). A capacidade de transporte de Ca^{2+} pela mitocôndria vegetal varia entre as diferentes espécies (DIETER & MARMÉ, 1980; CHEN & LEHNINGER, 1983; MARTINS & VERCESI, 1985; CARNIERI *et al.*, 1987) bem como em tecidos e idade dentro da mesma espécie (DIETER & MARMÉ, 1980). Em tecidos fotossintetizantes canais de Ca^{2+} presentes na membrana do tilacóide do cloroplasto (sistema 11) são responsáveis pela captação de Ca^{2+} utilizando o potencial desenvolvido durante a fotossíntese (KREIMER *et al.*, 1985a; 1985b). A importância do transporte de Ca^{2+} pelo cloroplasto na regulação da concentração do Ca^{2+} citoplasmático não está muito clara devido à sua baixíssima afinidade pelo Ca^{2+} (K_m aparente = $189\mu M$) (KREIMER *et al.*, 1985a). Entretanto, as mitocôndrias e cloroplastos podem ser fonte de Ca^{2+} citossólico, quando o potencial eletroquímico de membrana destas organelas é diminuído, o que favorece a saída de Ca^{2+} pelo reverso das vias de influxo (sistemas 10 e 11).

A Ca^{2+} -ATPase presente na membrana do retículo endoplasmático (sistema 12) é capaz de bombear Ca^{2+} para o lúmen do retículo, às custas da hidrólise de ATP (BUCKOUT, 1983; BUSH & SZE, 1986; BUSH *et al.*, 1989; EVANS *et al.*, 1991). Esse sistema de transporte, bem como a Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática, apresentam alta afinidade por Ca^{2+} ($K_m < \mu M$) e são por isso considerados como os principais sistemas responsáveis pela manutenção do Ca^{2+} citoplasmático basal (BUSH & SZE, 1986; BUSH *et al.*, 1989; BUSH, 1993). Além destes sistemas, o mecanismo de entrada de Ca^{2+} para o vacúolo, através

do acoplamento dos sistemas 5 e 6 (H^+ -ATPase e antiporte Ca^{2+}/H^+) é considerado importante para manter a homeostase do Ca^{2+} a longo prazo (EVANS *et al.*, 1991) e para recompor a concentração de Ca^{2+} citoplasmático (FELLE *et al.*, 1992). Embora o sistema de entrada de Ca^{2+} para o vacúolo seja de baixa afinidade, $K_m > 10 \mu M$ (MUTO, 1992; BUSH, 1995), esta organela, que chega a ocupar 90% do volume celular, contém a maior parte do Ca^{2+} intracelular, mostrando sua grande capacidade de acumular esse íon.

As alterações na concentração de Ca^{2+} livre citossólico durante a transdução de sinal, são provavelmente iniciadas através de mudanças na atividade de canais de Ca^{2+} que catalizam o influxo passivo desse íon dos compartimentos extra e intracelulares para o citossol (JOHANNES *et al.*, 1991). Muitas investigações nesta área têm sido feitas usando-se compostos conhecidos como inibidores de alguns sistemas responsáveis pela manutenção do balanço de Ca^{2+} livre citossólico. Tais compostos podem se ligar ao cálcio (quelantes como EGTA) ou competir pelo seu sítio de ligação (lantânio), ou ainda interagir com moléculas do sistema de transporte de cálcio (bloqueadores de canais de Ca^{2+}) (BELYAVSKAYA, 1996). A ação de inibidores de canais iônicos, já bem estabelecida em células animais, têm sido amplamente utilizada para a caracterização de sistemas de transporte de Ca^{2+} na célula vegetal, presumindo-se que esses transportadores iônicos teriam propriedades semelhantes em plantas e animais (THOMINE *et al.* 1994). Embora bloqueadores de canais de Ca^{2+} inibam uma variedade de respostas fisiológicas (SCHROEDER & THULEAU, 1991; HETHERINGTON *et al.*, 1992; TERRY *et al.*, 1992; WILKINSON *et al.*, 1992; WILKINSON & DUNCAN, 1992; 1993a; 1993b), pouco se conhece a respeito dos componentes moleculares de canais de Ca^{2+} em vegetais.

1.6. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE Ca^{2+} CITOSSÓLICO

Tentativas de medir a concentração de Ca^{2+} citossólico em células vegetais usando técnicas desenvolvidas para células animais, têm encontrado dificuldades impostas pela composição da célula vegetal (DARJANIA *et al.* 1993). A geração de corantes sensíveis ao Ca^{2+} (como quin-2, fura-2 e indo-1) desenvolvido por R. TSIEN e seu grupo (TSIEN, 1981; TSIEN *et al.*, 1982; GRYNKIEWICZ *et al.*, 1985; TSIEN & POENIE, 1986), que têm sido amplamente utilizados em diferentes tipos de células animais, não tem tido o mesmo sucesso em vegetais. Com exceção de quin-2, que foi introduzido em células vegetais por eletroporação (GILROY *et al.* 1986), a forma esterificada acetoximetil destes corantes não é capaz de penetrar nas células vegetais em uma forma que os torne úteis para as medidas do Ca^{2+} citoplasmático. Muitas células vegetais não contêm as estearases necessárias que permitam o acúmulo do corante no citoplasma e a penetração no vacúolo pode interferir com as medidas do Ca^{2+} citoplasmático.

A presença da parede celular também se apresenta como um obstáculo à penetração dos indicadores de Ca^{2+} (DARJANIA *et al.*, 1993). Entretanto, este problema pode ser superado pelo uso de protoplastos, que são células vegetais completas, porém desprovidas da parede celular.

Visando superar as limitações impostas pela célula vegetal, BUSH & JONES (1987) desenvolveram uma técnica não disruptiva para medir o Ca^{2+} citoplasmático nestas células. Protoplastos de aleurona de cevada foram capazes de acumular e reter o corante indo-1, na sua forma sensível ao Ca^{2+} (não esterificada), em pH ácido. Nesta faixa de pH, as formas iônicas do corante indo-1, que é um ácido fraco, permearam a membrana plasmática com mais

facilidade que em pH 7.0. Uma vez no citoplasma, que tem pH neutro, o corante é retido devido às espécies iônicas de baixa permeabilidade predominantes neste pH.

Adaptando-se a metodologia descrita por BUSH & JONES (1987), para a incorporação de indo-1 em meio ácido, foi mostrado recentemente que a concentração citoplasmática de Ca^{2+} em protoplastos isolados de *C. sinensis* em repouso é da ordem de 150 nM, podendo ser elevada a 350 nM na presença de citocinina e alto Ca^{2+} extracelular (GOUVÊA *et al.*, 1997). Entretanto, a microscopia convencional de fluorescência não permite um acompanhamento das variações dos níveis de Ca^{2+} citossólico em tempos contínuos, o que pode ser feito através da microscopia confocal de varredura.

2. OBJETIVOS

Considerando-se a importância do íon cálcio na transdução de sinais em células vegetais, o presente trabalho se desenvolveu com os seguintes objetivos:

1. Estudar o transporte de Ca^{2+} por protoplastos isolados a partir de células de *Citrus sinensis* cultivadas *in vitro*
2. Identificar as classes de canais de Ca^{2+} existentes na membrana plasmática dos protoplastos utilizando bloqueadores e antagonistas de canais de Ca^{2+}
3. Analisar o efeito da depleção do Ca^{2+} intracelular na captação bem como na concentração citossólica de Ca^{2+} dos protoplastos

Os resultados deste estudo poderão contribuir para a elucidação de vias de transdução de sinais em plantas, mediadas pelo Ca^{2+} .

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DA CULTURA DE CÉLULAS DE *C. sinensis*

Uma cultura de células em suspensão é um meio rápido de propagação clonal em larga escala que contém células livres e agregados de células, dispersos, facilitando o isolamento de protoplastos.

Culturas de células em meio líquido de *Citrus sinenses* (L) Osbeck cv. Pera (laranja pera) foram estabelecidas e mantidas em meio de MURASHIGE & SKOOG (1962) com vitaminas de MURASHIGE & TUCKER (1969), acrescido de sacarose 50g/l, myo-inositol 0,1g/l, extrato de malte 0,5g/l, 6-benzil aminopurina (6BA) 10mg/l (TABELA 1), sob agitação constante de 150 rpm em agitador série 25 (New Brunswick Scientific Co., Inc.) a 26 °C, no escuro.

Para o estabelecimento da cultura líquida, calos embriogênicos (250-500 mg) derivados de cultura de nucelos foram colocados em erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml do meio de cultura líquido. Nos primeiros 10 dias o meio foi trocado em intervalos de 2-3 dias para eliminação de substâncias fenólicas que escurecem o meio e são prejudiciais ao desenvolvimento celular. Após 2 semanas as células foram decantadas, o sobrenadante foi descartado e o mesmo volume do meio foi repostado a cada 3-5 dias até que os pedaços de calos iniciais fossem quebrados em pedaços menores mas continuassem em crescimento. Nesse período a quantidade de células aumentou, produzindo uma grande quantidade de material celular, até atingir um ponto máximo aos 14 dias. Uma vez estabelecida, a cultura de células em suspensão foi repicada a cada 14 dias para uma propagação contínua.

TABELA 1. Meio de cultura utilizado para manutenção de suspensão celular de *C. sinensis*. Nutrientes de MURASHIGE e SKOOG (1962) e vitaminas de MURASHIGE e TUCKER (1969).

MACRONUTRIENTES	CONCENTRAÇÃO
NH ₄ NO ₃	20,60mM
KNO ₃	18,80mM
CaCl ₂ .2H ₂ O	3,00mM
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,50mM
KH ₂ PO ₄	11,25mM
MICRONUTRIENTES	
H ₃ BO ₃	100,00µM
MnSO ₄ .4H ₂ O	100,00µM
NaEDTA	100,00µM
FeSO ₄ .7H ₂ O	100,00µM
ZnSO ₄ .7H ₂ O	30,00µM
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,10µM
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,10µM
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1,00µM
KI	6,00µM
VITAMINAS	
tiamina	30,00µM
ácido nicotínico	40,00µM
piridoxina	48,60µM
OUTROS	
sacarose	146,00mM
inositol	555,00µM
6-BA	44,00µM
extrato de malte	0,50g/L

Calos e células de *C. sinensis* em suspensão foram gentilmente cedidos pela Dra. Beatriz M.J. Mendes do CENA-USP.

A manutenção da cultura de células *in vitro* requer condições assépticas. Os procedimentos utilizados para esterilização do meio foram: filtração utilizando-se membrana de millipore com poro de 0,22µm e esterilização por calor úmido (autoclave, 20 min a 121 °C). Para a vidraria a esterilização foi feita por calor seco (forno, 2h à 180 °C). Todos os procedimentos com manipulação de células foram realizados dentro de um aparelho de fluxo laminar o qual mantém uma área estéril fazendo circular o ar através de um sistema de filtros. Antes da utilização, o fluxo laminar teve sua superfície limpa com álcool a 70%(v/v) e luz ultravioleta por 30 min.

3.2. ISOLAMENTO DE PROTOPLASTOS DE *C. sinensis*

O protoplasto, é um estado transitório obtido em laboratório, em que as células são desprovidas de parede celular. O isolamento de protoplastos foi feito através do tratamento das células de *C. sinensis* com enzimas que digerem a parede celular, sob uma pressão osmótica adequada, de acordo com o método desenvolvido por D'ULTRA VAZ *et al.* (1993).

Antes do tratamento enzimático foi realizada uma plasmólise das células. Estas foram filtradas e incubadas (2g/10ml) em um controlador de pressão osmótica - saís de CPW - (TABELA 2), contendo manitol a 13% (p/v) e MES 20mM a pH 5,6 (CPW 13M). As células permaneceram incubadas nesse meio por um período de 1 hora, sob agitação constante de 50 rpm, a 26 °C, no escuro. A seguir foram novamente filtradas e mantidas por 16h em CPW 13M contendo celulase a 1% (p/v), macerase a 0,2% (p/v) e driselase a 0,1% (p/v). Os

TABELA 2. Composição da solução de sais inorgânicos de CPW (FREARSON et al., 1973; POWER et al., 1989), pH 5,8, utilizada para isolamento de protoplastos de *C. sinensis*.

SAIS	CONCENTRAÇÃO
KH ₂ PO ₄	0,20mM
KNO ₃	1,00mM
CaCl ₂ .2H ₂ O	10,00mM
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,00mM
KI	1,00mM
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,10mM

protoplastos foram separados das células não digeridas e restos celulares através de filtração em peneira de 45 mesh. O filtrado obtido foi centrifugado a 60xg por 4 min. O sobrenadante contendo restos celulares e a solução enzimática foi descartado e o precipitado, ressuspenso em CPW 13M, foi centrifugado a 60xg por 4 min. Esse procedimento foi repetido por mais três vezes.

Após isolamento, os protoplastos foram purificados em um gradiente de sacarose/manitol para a obtenção de protoplastos livres de impurezas. A solução com protoplastos obtida acima, foi aplicada sobre uma solução de CPW 13M acrescida de sacarose a 25% (p/v): cerca de 4mL da solução de sacarose 25% foram colocados em um tubo de centrífuga de 8mL e a solução contendo os protoplastos, cerca de 1ml, foi colocada na parte superior. Em seguida o gradiente foi centrifugado a 60xg por 8 min à temperatura ambiente e os protoplastos na interface das soluções, que permaneceram viáveis, foram coletados com uma pipeta Pasteur e lavados por 3 centrifugações sucessivas a 60xg por 4 min em tampão HEPES 10mM a pH 7,2 contendo manitol a 13% (p/v) e KCl 5mM.

3.3. VIABILIDADE DOS PROTOPLASTOS

A viabilidade dos protoplastos foi determinada utilizando-se TRYPAN BLUE a 0,01% (p/v) que juntamente com observações morfológicas permitem avaliar a integridade estrutural das membranas. Esse ensaio permite medir a habilidade das células vivas que por possuírem membranas intactas são capazes de excluir esse corante permitindo a quantificação do número de células viáveis pela diferença entre o número de células coradas, e portanto inviáveis, e o

número de células não coradas, viáveis. A contagem das células foi feita com o auxílio de uma câmara de Newbauer e o número de protoplastos (ppts) encontrados foi expresso em ppts. $\times 10^6/\text{mL}$.

3.4. TRATAMENTO DOS PROTOPLASTOS COM EGTA

Em experimentos com o objetivo de depletar o Ca^{2+} de reservas internas, os protoplastos ($5 \times 10^6/\text{mL}$) foram incubados 3 vezes por 20 min em meio contendo manitol a 13% (p/v), KCl 5mM, HEPES 10mM a pH 7,2 e EGTA $100\mu\text{M}$. A troca do meio foi feita por precipitação dos protoplastos com centrifugações a $60 \times g$ por 4 min.

3.5. MEDIDAS DO FLUXO DE Ca^{2+}

O fluxo de Ca^{2+} foi verificado utilizando-se arsenazo III como indicador de Ca^{2+} (SCARPA, 1979). Os protoplastos ($2-5 \times 10^6/\text{mL}$) foram incubados em 1mL de meio contendo manitol a 13% (p/v), KCl 5mM, tampão HEPES 10mM a pH 7,2 e arsenazo III $40\mu\text{M}$. Adições de outros compostos durante os experimentos estão especificadas nas legendas das figuras.

A concentração de Ca^{2+} livre do meio de reação foi determinada pela diferença de absorbância entre 675 e 685 nm usando-se um espectrofotômetro de duplo feixe AMINCO SLM DW-2000. A concentração de Ca^{2+} no meio de reação foi calculada através de um programa de computador (INESI *et al.*, 1980) adaptado de acordo com FABIATO & FABIATO (1978) e as constantes de dissociação tomadas segundo SCHWARZEMBACK *et al.* (1957). Para a remoção de Ca^{2+} do meio de reação, esse foi submetido a um tratamento "overnight" com

chelex 100.

3.6. TRATAMENTO DE PROTOPLASTOS COM INDICADOR DE Ca^{2+} FLUORESCENTE

O carregamento dos protoplastos de *C. sinensis* com o indicador fluorescente sensível ao cálcio, indo-1, foi feito através do método descrito por BUSH & JONES (1987) e adaptado para protoplastos e células permeabilizadas de *C. sinensis* por GOUVÊA *et al.* (1997). Protoplastos foram incubados por 2h, no escuro, à temperatura ambiente, em meio contendo ácido dimetilglutárico 20mM a pH 4,5, contendo manitol 0,52M, KCl 50mM e indo-1 20 μ M. A seguir a suspensão foi centrifugada a 60xg por 4 min e lavada três vezes com tampão Tris-HCl 20mM a pH 7,2, contendo manitol 0,52M e KCl 50mM.

3.7. MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA

As medidas de fluorescência foram analisadas em microscópio confocal de varredura laser UV duplo da Bio-Rad, modelo MCR-1024 UV acoplado a um microscópio fluorescente Zeiss Axiovert-100. O indicador foi excitado com laser argônio UV (50 mW a 351 nm) usando-se um filtro bloqueador padrão da Bio-Rad IN1 (380LP dicróico) e um IN2 (440LP dicróico) e os filtros de emissão 405/35 e 460LP. A quantificação da concentração de Ca^{2+} foi feita através da razão entre a imagem obtida a 405nm e aquela obtida a 460nm usando um programa da Bio-Rad TCSM (Time Course Scanning Microscopy).

Uma objetiva de imersão em água 40X-C-apochromat da Zeiss, de abertura numérica 1,2 foi utilizada para se obter as imagens confocais do

microscópio invertido e a impressora Codonics NP 1600 foi utilizada para imprimir as imagens obtidas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Protoplastos isolados a partir de células de *Citrus sinensis* mantidas em cultura líquida foram utilizados para o desenvolvimento deste trabalho. Protoplasto isolado é um instrumento mais conveniente para se medir fluxos de Ca^{2+} através da membrana plasmática de plantas visto que nesse sistema as paredes celulares, que têm uma alta capacidade e afinidade para ligar cátions divalentes, são eliminadas (REID & TESTER, 1992). A eliminação da parede celular permite que os protoplastos sejam manipulados como células animais sem no entanto perderem a potencialidade de uma célula vegetal completa.

As células de *C. sinensis* se mostraram bastante adequadas como fonte de protoplastos já que apresentam um crescimento relativamente rápido, chegando a dobrar o número inicial de células a cada 14 dias. Para um bom andamento deste trabalho foi imprescindível a facilidade de se manter as células em suspensão. Além disso foi obtido um bom rendimento na preparação de protoplastos ($1\text{-}2 \times 10^7$ protoplastos/g de célula).

Análise morfológica realizada através da obtenção de imagens confocais da luz transmitida mostraram que as células de *C. sinensis* crescem como microcalos, apresentando uma parede celular espessa, um formato oval e um diâmetro médio de $25,7\mu\text{m}$ (Fig. 3A e 3B). Após tratamento enzimático para digestão da parede celular, os protoplastos derivados apresentaram um diâmetro médio de $21 \pm 5,0\mu\text{m}$, normalmente contendo um vacúolo que variou em tamanho (Fig. 3C e 3D)

A utilização de células mantidas em cultura *in vitro* como fonte de protoplastos garantiu com que o material de trabalho fosse proveniente de um único tipo celular. Muitos estudos de transdução de sinal em plantas têm

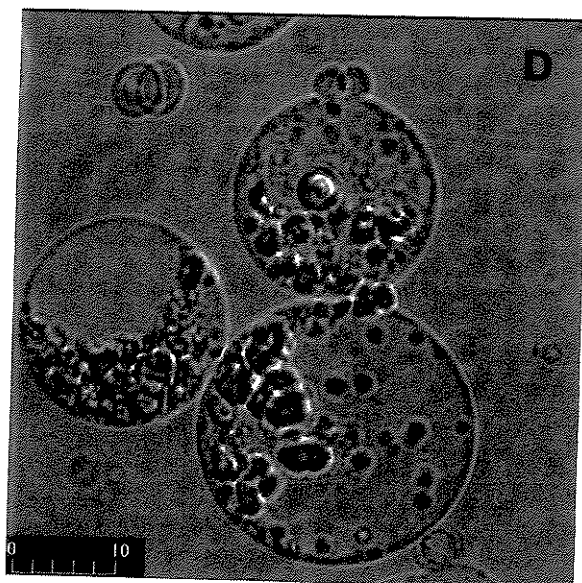
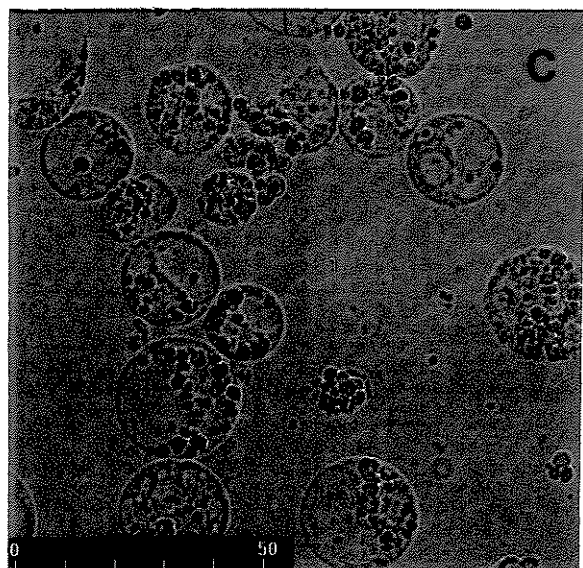
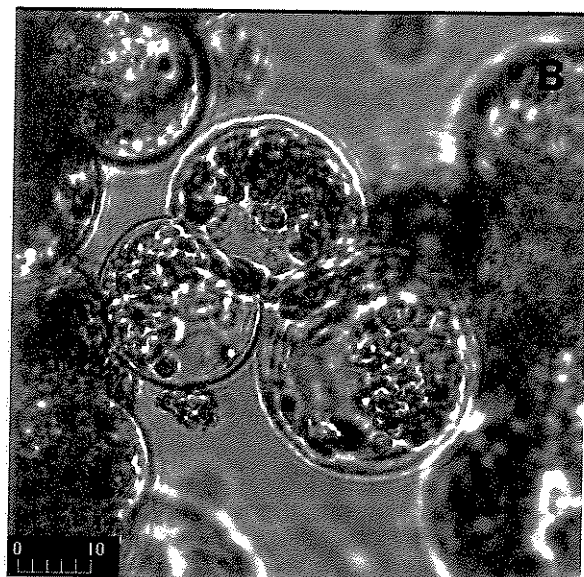
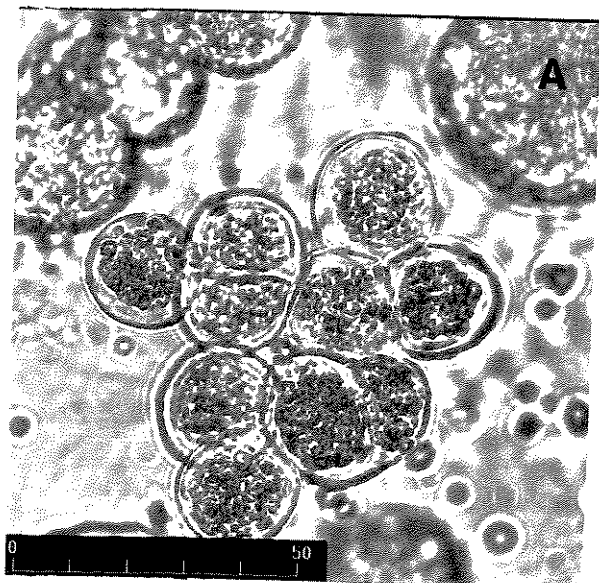


FIGURA 3. Imagens sob luz transmitida de células e protoplastos isolados de *C. sinensis*. A, B: células em suspensão. C, D: protoplastos isolados.

encontrado dificuldades quando tecidos intactos são utilizados. Por exemplo, as primeiras análises sobre o conteúdo de fosfolípidos em células vegetais sugeriram que as quantidades de PIP_2 , o precursor para a síntese de Ins-P_3 , eram muito baixas para que eles tivessem um papel sinalizador. Entretanto, estudos subsequentes mostraram que o problema da concentração de PIP_2 provinha da diluição; apenas um tipo de célula, que pode estar em pequeno número em determinado tecido vegetal, será competente para transduzir um sinal específico, num determinado tempo. Assim, somente estas células terão níveis apropriados dos intermediários sinalizadores e seus respectivos receptores (DROBAK, 1993). No caso do cAMP, embora já tenha sido demonstrado que os vegetais contêm elementos para a resposta ao cAMP e proteínas que se ligam a este segundo mensageiro, indicando a capacidade para resposta, as quantidades de cAMP que têm sido detectadas em células vegetais (geralmente tecidos intactos) é considerada muito baixa para um papel sinalizador (ASSMANN, 1995). Novamente, este problema poderia ser resolvido se ensaios com cAMP fossem realizados com um mesmo tipo de célula, como os utilizados para resolver o problema do Ins-P_3 .

4.1. EFLUXO DE CÁLCIO INDUZIDO POR ANTAGONISTAS DE CALMODULINA

Fluxos de Ca^{2+} em protoplastos isolados a partir de cultura de células de *C. sinensis* em suspensão, foram acompanhados através das alterações do Ca^{2+} livre do meio, utilizando-se o indicador de Ca^{2+} arsenazo III. Este indicador é sensível a baixas concentrações deste íon (SCARPA, 1979), já tendo sido utilizado com êxito para medir o transporte de Ca^{2+} tanto por mitocôndrias

(VALLIÈRES *et al.*, 1975; CROMPTON *et al.*, 1976), retículo sarcoplasmático (CHIU & HAYNES, 1977; HERBETTE *et al.*, 1977), vesículas (JOHNSON & SCARPA, 1976; TU *et al.*, 1996), lipossomas (WEISSMAN *et al.*, 1976; ANANTHANARAYANAN *et al.*, 1992; BRINBLE & ANANTHANARAYANAN, 1992; 1993), como também por células intactas (DIPOLO *et al.*, 1976; MILLEDI *et al.*, 1977; BRINKLEY *et al.*, 1977).

Quando protoplastos de *C. sinensis* foram incubados na presença de 20 μ M de Ca²⁺ livre, não foi possível observar variações na concentração de Ca²⁺ do meio através desta metodologia, indicando uma baixa capacidade de captação de Ca²⁺ pelos protoplastos nestas condições (Fig. 4). Assim, a concentração externa desse íon não foi suficiente para gerar um gradiente capaz de impulsionar a entrada do mesmo para a célula. Entretanto, quando o Ca²⁺ do meio externo foi removido pela adição de EGTA, um quelante de Ca²⁺ (McAINSH *et al.*, 1990; SCHROEDER & HAGIWARA, 1990; DARJANIA *et al.*, 1993; AYLING & CLARKSON, 1996; DMITRIEV *et al.*, 1996; ISHIHARA *et al.*, 1996), a metodologia utilizada foi bastante sensível para se estudar o efluxo de Ca²⁺ dos protoplastos, induzido por diferentes tratamentos. Assim, com a diminuição de Ca²⁺ livre do meio, o efluxo do íon de protoplastos isolados de *C. sinensis* foi bastante estimulado pela adição de clorpromazina, um antagonista da calmodulina (MEHTA *et al.*, 1993; QIU *et al.*, 1994; BELYAVSKAYA, 1996), (Fig. 4). A velocidade de efluxo de Ca²⁺ foi dependente da concentração utilizada, sendo que uma velocidade máxima de efluxo foi observada utilizando-se 50 μ M de clorpromazina (Fig. 5).

Os resultados da Fig. 6 mostram que outros antagonistas de calmodulina como trifluoperazina (GILROY *et al.*, 1987; BATTEY & VENIS, 1988; GONZALEZ-DARÓS *et al.*, 1993; KUROSAKI *et al.*, 1994; SUN *et al.*, 1994; ISHIHARA *et al.*,

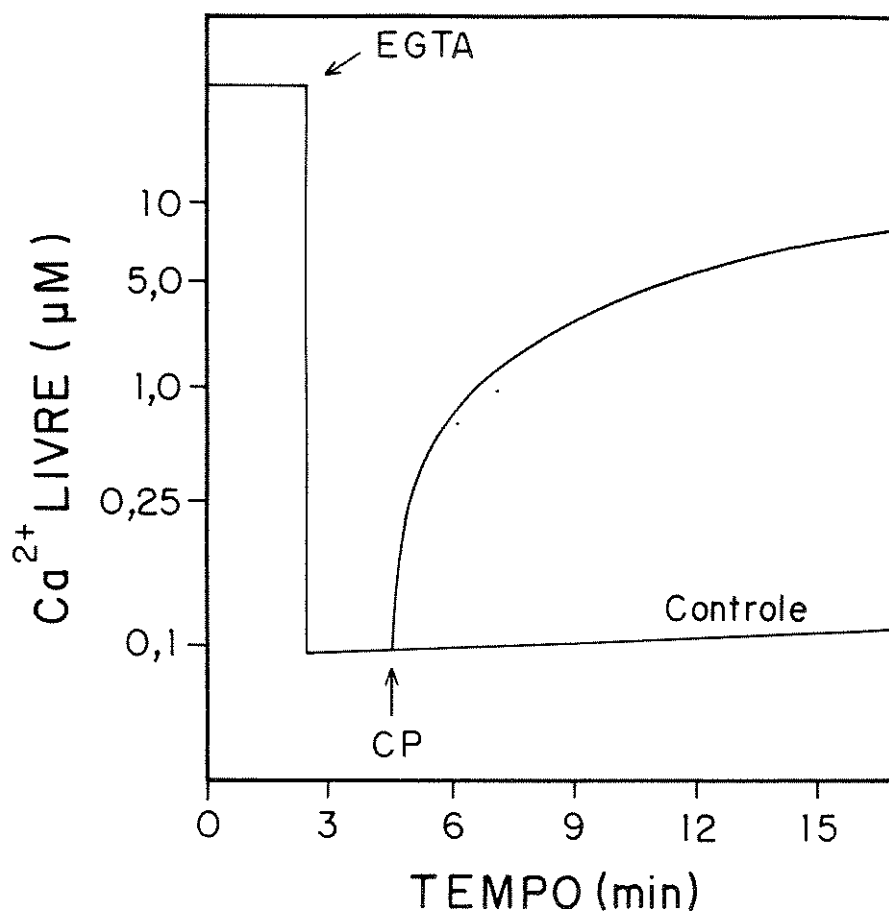


FIGURA 4. Efeito de clorpromazina (CP) no efluxo de Ca^{2+} por protoplastos isolados de *C. sinensis*. À suspensão de protoplastos (2×10^6 células/mL) foi adicionado arsenazo III ($40 \mu\text{M}$), em seguida, o Ca^{2+} livre do meio foi quelado com EGTA ($100 \mu\text{M}$) e CP ($50 \mu\text{M}$) adicionados conforme indicado. A variação do Ca^{2+} livre do meio de incubação foi acompanhada pela medida da diferença de absorbância do arsenazo III, entre 675 e 685 nm.

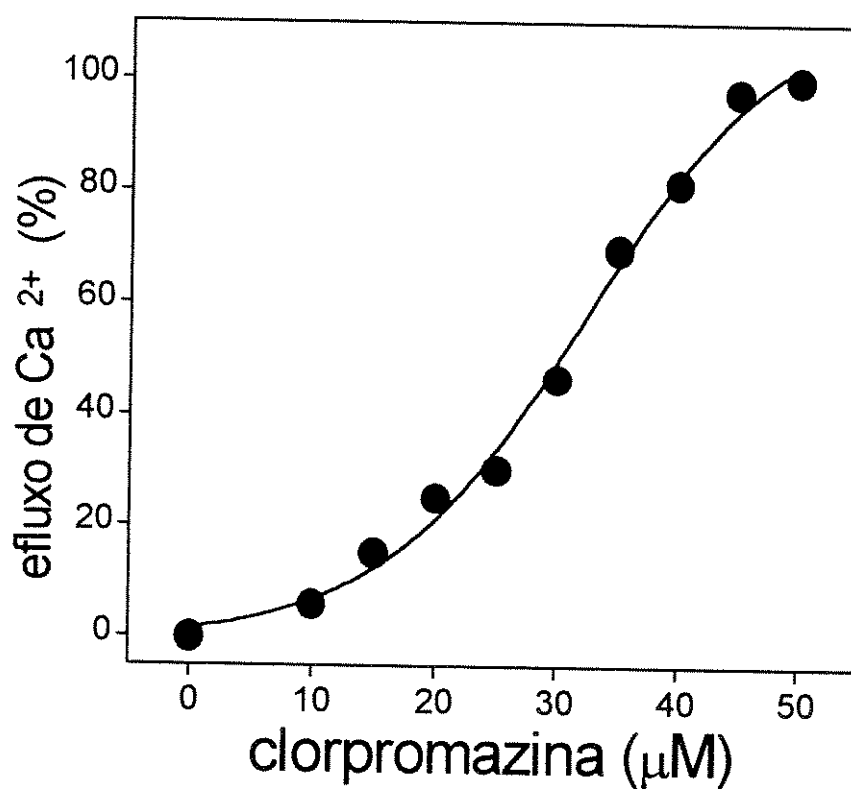


FIGURA 5. Efeito da concentração de clorpromazina na liberação de Ca^{2+} por protoplastos de *C. sinensis*. O efluxo de Ca^{2+} foi determinado na presença de várias concentrações de CP. Os resultados foram expressos em porcentagens em relação à taxa máxima de efluxo, obtido com $50\mu\text{M}$ de CP.

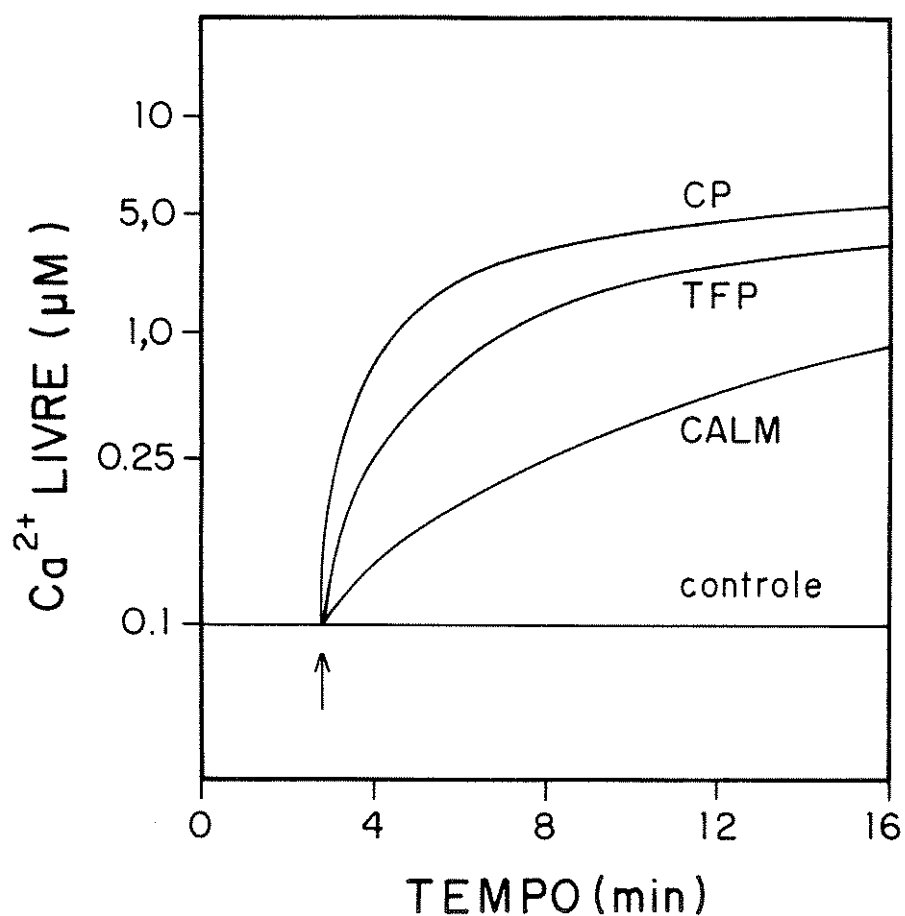


FIGURA 6. Indução do efluxo de Ca^{2+} em protoplastos de *C. sinensis* por antagonistas de calmodulina. Experimentos realizados de acordo com o descrito na fig. 4. Trifluoperazina (TFP, $50\mu\text{M}$), clorpromazina (CP, $50\mu\text{M}$) ou calmidazolium (CALM, $1\mu\text{M}$) foram adicionados onde indicado pela seta.

1996) e calmidazolium (BUTCHER & EVANS, 1987; KRÜGER *et al.*, 1990; GONZALEZ-DARÓS *et al.*, 1993) também foram capazes de induzir o efluxo de Ca^{2+} em protoplastos de *C. sinensis*. A eficiência com que os antagonistas de calmodulina induziram esse efluxo foi clorpromazina > trifluoperazina > calmidazolium. Embora o calmidazolium tenha sido utilizado numa concentração menor que os outros compostos, este antagonista é cerca de 150 vezes mais potente que a trifluoperazina como um inibidor de fosfodiesterase de cérebro dependente de calmodulina (GRETZEN *et al.*, 1982). Protoplastos de *C. sinensis*, entretanto, se mostraram menos sensíveis à ação do calmidazolium.

As concentrações nas quais a clorpromazina induziu eficientemente o efluxo de cálcio, bem como a pequena sensibilidade dos protoplastos de *C. sinensis* ao calmidazolium, considerado um potente antagonista da calmodulina (GRETZEN *et al.*, 1982), sugeriram que as respostas a estas drogas foram provavelmente o resultado de um efeito não específico nas membranas dos protoplastos e não devido à um efeito anti-calmodulina. Efeitos não específicos de drogas anti-calmodulina em vegetais, quando utilizadas em concentrações elevadas, já foram observadas em protoplastos de cenoura (GILROY *et al.* 1987) e em mitocôndrias, retículo endoplasmático e cloroplastos isolados de células vegetais (MOORE & AKERMAN, 1984).

Como pode ser observado nas Figs. 4 e 6, a adição de CP elevou o Ca^{2+} livre do meio de 0,1 para 5,0 μM . Considerando-se o volume dos protoplastos utilizados (diâmetro médio de $21 \pm 5,0 \mu\text{m}$, $n=50$), o número de células utilizadas no experimento (2×10^6) e a concentração atingida de Ca^{2+} extracelular com a adição de CP (em um volume de meio de reação de 1 mL), se esse Ca^{2+} tivesse sido proveniente do citoplasma, a concentração de Ca^{2+} livre citoplasmático destas células estaria na faixa de 0,5-2,5mM (considerando protoplastos sem

vacúolo e protoplastos com 80% do volume citoplasmático ocupado por vacúolos, respectivamente). Entretanto, sabe-se que a concentração de Ca^{2+} livre citoplasmático está numa faixa nM e especificamente para protoplastos de *C. sinensis* foi mostrado por nosso grupo ser 150 nM (GOUVÊA *et al.*, 1997). Assim, este cálcio deve ser proveniente de reservas internas mantidas nas organelas, onde a concentração de Ca^{2+} está na faixa de μM a mM (BUSH *et al.*, 1989; DuPONT *et al.*, 1990).

É conhecido que drogas anti-calmodulina, por serem substâncias lipofílicas, têm a propriedade de interagir com membranas celulares e, em altas concentrações, podem provocar a lise celular (YAMAGUCHI *et al.*, 1985; LUXNAT & GALLA, 1986). A Fig. 7 mostra que a CP não interferiu na integridade dos protoplastos de *C. sinensis* nas concentrações em que promoveu o efluxo de Ca^{2+} (Fig. 5). Estes resultados eliminam a possibilidade de que, o aumento do Ca^{2+} externo, induzido por CP estaria ocorrendo devido à lise dos protoplastos.

4.2. INIBIÇÃO DO EFLUXO DE CÁLCIO POR BLOQUEADORES DE CANAIS

Bloqueadores de canais de Ca^{2+} foram utilizados com a finalidade de verificar se os antagonistas de calmodulina estariam facilitando o efluxo de Ca^{2+} nos protoplastos de *C. sinensis* através de canais específicos. Nifedipina, um bloqueador de canal de Ca^{2+} pertencente à classe das dihidropiridinas, tem a capacidade de bloquear movimento de Ca^{2+} através da membrana plasmática (BEAN, 1989; WILKINSON *et al.*, 1992) e tanto nifedipina quanto verapamil (DMITRIEV *et al.*, 1996) têm sido aplicados como inibidores específicos de canais de Ca^{2+} (TAKAGI & NAGAI, 1988; HEDRICH & SCHROEDER, 1989; HARVEY *et*

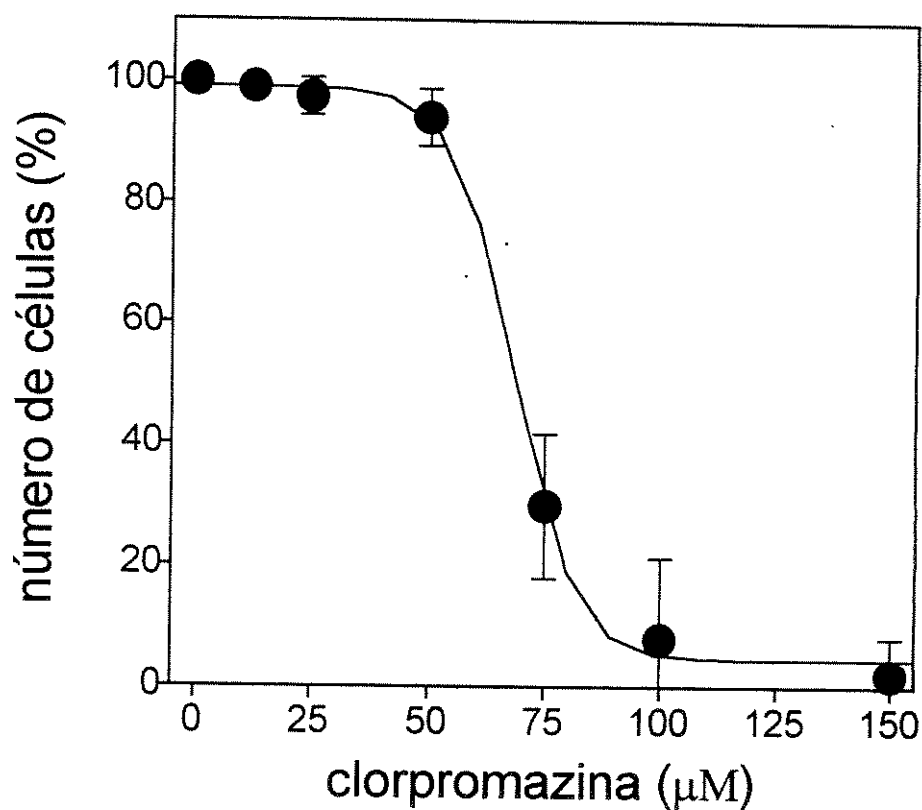


FIGURA 7. Efeito da concentração de clorpromazina (CP) na lise de protoplastos de *C. sinensis*. Os protoplastos foram submetidos a várias concentrações de CP por um período de 15 min. A contagem do número de células foi feita antes e depois de cada tratamento através de observações microscópica em câmara de Newbauer.

al., 1989; BRINDLEY, 1990; THOMINE *et al.*, 1994).

O efluxo de Ca^{2+} induzido por TFP foi parcialmente inibido quando os protoplastos foram previamente incubados com verapamil ou nifedipina (Fig. 8). Estes resultados indicaram que, pelo menos parte do efluxo de Ca^{2+} induzido por antagonistas de calmodulina, parece ter ocorrido através de canais de Ca^{2+} presentes na membrana plasmática.

Verapamil foi mais eficiente do que a nifedipina, na prevenção do efluxo de Ca^{2+} induzido por TFP (Fig. 8). Resultados anteriores de outros grupos mostraram que as drogas pertencentes à classe das fenilalquilaminas, como o verapamil, são geralmente mais eficientes inibidores para plantas (ANDREJAUSKAS *et al.*, 1985; GRAZIANA *et al.*, 1988). O efeito inibitório do verapamil no efluxo de Ca^{2+} induzido por clorpromazina foi acentuado com o tempo de pré-incubação (inserção da Fig. 9) e com a concentração do inibidor (Fig. 9). A sensibilidade do efluxo de Ca^{2+} a bloqueadores como o verapamil e a nifedipina indicaram que a membrana plasmática dos protoplastos de *C. sinensis* contém um canal do tipo voltagem-dependente (canal 3 da Fig. 2) que é mais sensível às fenilalquilaminas do que às dihidropiridinas.

4.3. EFEITO DE EGTA NO EFLUXO DE CÁLCIO INDUZIDO

O efluxo de Ca^{2+} provocado por antagonistas de calmodulina foi prevenido quando os protoplastos foram previamente lavados com tampão contendo EGTA (conforme descrito em Materiais e Métodos). Os dados apresentados na Fig. 10 mostram que, quando os protoplastos de *C. sinensis* foram previamente lavados com 100 μM de EGTA, o efluxo de Ca^{2+} estimulado por TFP foi completamente inibido em relação ao controle. O tratamento de células animais com EGTA tem

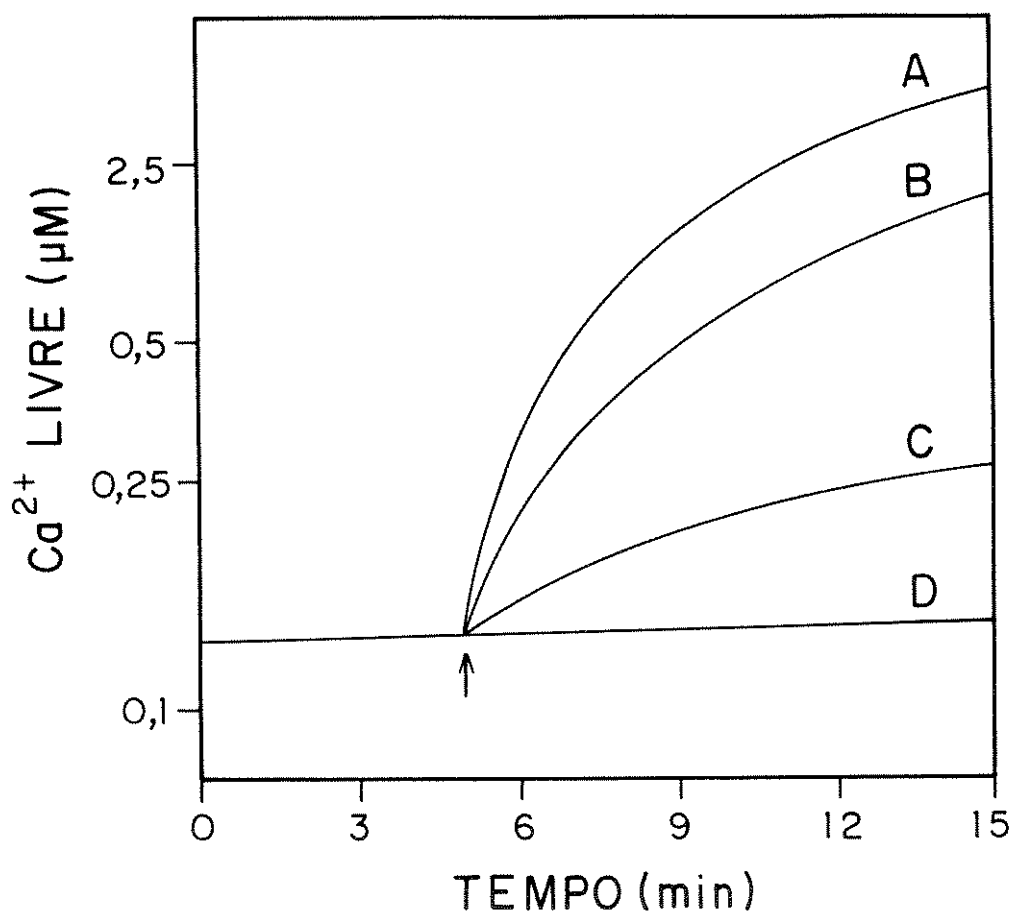


FIGURA 8. Efeito de verapamil e nifedipina no efluxo de Ca^{2+} induzido por trifluoperazina (TFP). Protoplastos (2×10^6 células/mL) foram preincubados por 30 minutos com verapamil ($50 \mu\text{M}$) ou nifedipina ($50 \mu\text{M}$) e TFP foi adicionada, onde indicado pela seta, após remoção de Ca^{2+} do meio de reação (pela adição de EGTA). (A) controle + TFP; (B) nifedipina + TFP; (C) verapamil + TFP; (D) controle - TFP.

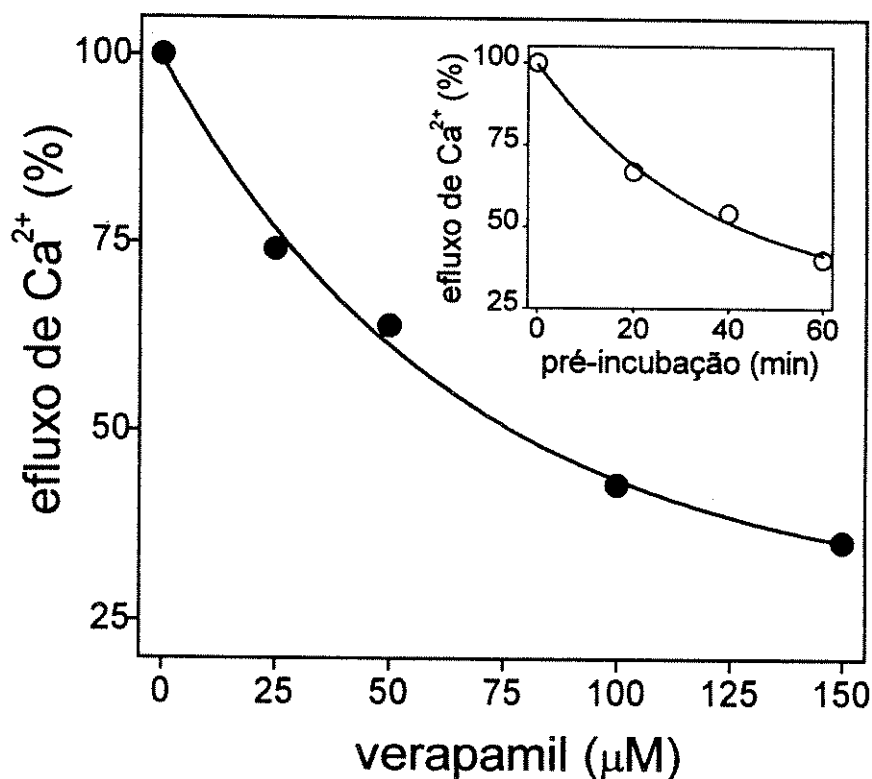


FIGURA 9. Inibição do efluxo de Ca^{2+} por verapamil: efeito da concentração e do tempo de pré-incubação. O efluxo de Ca^{2+} induzido por clorpromazina em protoplastos de *C. sinensis*, foi determinado após pré-incubação de 20min. com diferentes concentrações de verapamil. O inset da figura mostra o efeito do tempo de pré-incubação com 50 μM de verapamil.

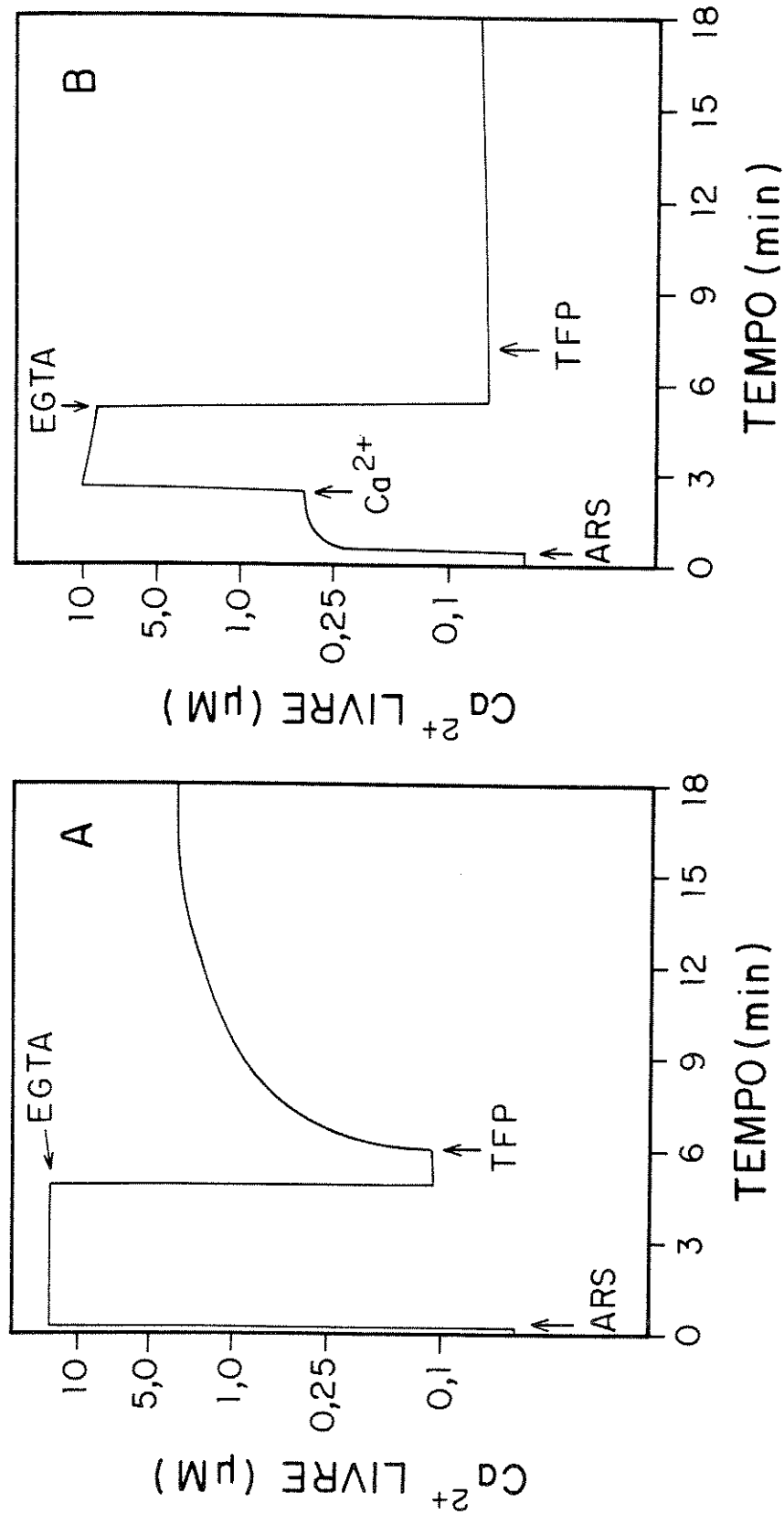


FIGURA 10. Efeito da lavagem por EGTA, no influxo de Ca^{2+} induzido por trifluoperazina. O experimento foi iniciado com a adição de $40\mu\text{M}$ de arsenazo III à suspensão de protoplastos de *C. sinensis* ($2 \times 10^9/\text{mL}$): (A) controle, protoplastos sem lavagem prévia com EGTA; (B) protoplastos previamente lavados com EGTA. As setas indicam adições Ca^{2+} ($5\mu\text{M}$), EGTA ($10\mu\text{M}$) TFP ($50\mu\text{M}$) e arsenazo III (ARS). Mudança na concentração de Ca^{2+} livre foi monitorada pela diferença de absorbância de arsenazo III entre 675 e 685nm.

sido utilizado para depletar o Ca^{2+} da célula (HOTH & PENER, 1992; LAUZA *et al.*, 1996). Assim, a depleção de Ca^{2+} de estoques intracelulares poderia explicar a diminuição no efluxo de Ca^{2+} induzido por antagonistas de calmodulina, após pré-tratamento dos protoplastos com EGTA.

4.4. CAPTAÇÃO DE Ca^{2+} POR PROTOPLASTOS DE *C. sinensis*: EFEITO DA DEPLEÇÃO DE CÁLCIO

Após tratamento dos protoplastos com EGTA foi possível detectar uma diminuição no Ca^{2+} livre do meio de reação com o indicador arsenazo-III, mostrando que este tratamento induziu um estímulo na captação de Ca^{2+} . Na tentativa de identificar o canal de Ca^{2+} que estaria sendo ativado por esse tratamento, foi analisado o efeito do verapamil e nifedipina no influxo de Ca^{2+} observado após tratamento com EGTA. Entretanto, estes bloqueadores não foram eficientes em inibir essa captação mesmo utilizando-se altas concentrações e pré-incubando-se os protoplastos com as referidas drogas (dados não apresentados). Estes resultados sugeriram que os canais do tipo 3 (Fig. 2) não estariam envolvidos no influxo de Ca^{2+} estimulado pelo tratamento com EGTA.

Com a finalidade de confirmar a hipótese de que um outro tipo de canal estaria envolvido no influxo de Ca^{2+} , foi adicionado $40\mu\text{M}$ de La^{3+} aos protoplastos (Fig. 11) e observou-se uma inibição significativa do influxo de Ca^{2+} sugerindo que a captação estimulada do Ca^{2+} nesse tipo de célula é sensível a esse íon. Esse efeito antagônico do La^{3+} já é conhecido em células vegetais (SHARMA *et al.*, 1992; TRIVEDI & ERDEI, 1992) e esse íon é considerado um potente bloqueador do influxo de Ca^{2+} em células internodais de *Chara corallina*

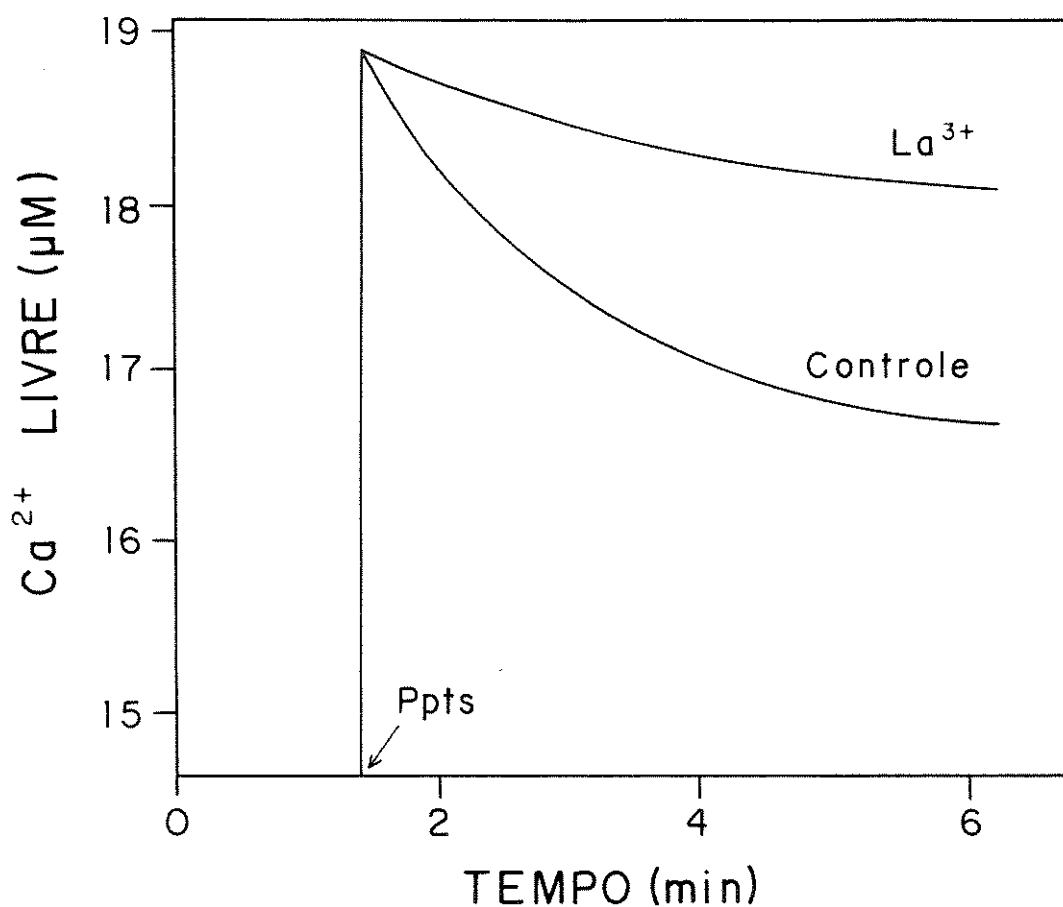


FIGURA 11. Efeito de LaCl_3 no influxo de Ca^{2+} por protoplastos de *C.sinensis* lavados com EGTA. Protoplastos ($5 \times 10^6/\text{mL}$) tratados com EGTA foram centrifugados ($100 \times g$, 4min) e o pellet ressuspensão em 1mL de um meio de reação contendo $40 \mu\text{M}$ de arsenazo III. O tratamento com lantânio foi feito pela pré-incubação dos protoplastos em $30 \mu\text{M}$ de LaCl_3 , por 30min e depois centrifugando-se a suspensão como no controle.

(REID & TESTER, 1992), protoplastos de *Amaranthus* (TERRY *et al.*, 1992), raízes de milho (MARSHALL *et al.*, 1994), tubo polínico de *Agapanthus umbellatus* (MALHÓ *et al.*, 1994) e em vesículas de coleoptile de milho (MARKOVA *et al.*, 1995).

Em vários tipos de células animais não-excitáveis, a ativação de receptores acoplados à hidrólise de fosfoinosítídeos, provoca inicialmente uma liberação de Ca^{2+} de estoques intracelulares sensíveis ao Ins-P_3 (McDONALD *et al.*, 1993). A estimulação prolongada da célula resulta na depleção do estoque intracelular de Ca^{2+} o que induz a um estímulo da captação de Ca^{2+} pela membrana plasmática, um processo que é inibido por lantânio (BERRIDGE & IRVINE, 1989; BERRIDGE, 1995). Sabe-se hoje, que este processo denominado entrada capacitativa de Ca^{2+} (PUTNEY, 1990; 1997), pode ser induzido por diferentes tratamentos que levam à depleção do estoque intracelular de Ca^{2+} , como o tratamento das células com EGTA (HOTH & PENNER, 1992; LAUZA O *et al.*, 1996). Assim, o tratamento dos protoplastos de *C. sinensis* com EGTA, pode ter depletado estas células de Ca^{2+} e o estímulo observado na captação desse íon sugere que estas células poderiam apresentar um mecanismo capacitativo para a entrada de Ca^{2+} .

4.5. MEDIDAS DE CÁLCIO CITOPLASMÁTICO EM PROTOPLASTOS DE *C. sinensis* UTILIZANDO INDO-1

As variações temporais na concentração de Ca^{2+} livre citossólico em protoplastos de *C. sinensis* incorporados com indo-1 foram acompanhadas através de microscopia confocal de fluorescência. Análises preliminares utilizando esta metodologia, mostraram que a autofluorescência apresentada pelos protoplastos foi praticamente nula, não interferindo portanto com os

comprimentos de onda emitidos pelo indicador indo-1 ligado ao Ca^{2+} . Na Fig. 12 são apresentadas as imagens confocais da luz refletida e da fluorescência dos protoplastos incorporados com indo-1. Utilizando esta metodologia foi possível observar as oscilações na concentração de Ca^{2+} citossólico dos protoplastos, quando estes foram submetidos à variações do Ca^{2+} externo. A Figura 13 compara as variações de Ca^{2+} citossólico dos protoplastos controle com as dos protoplastos pré-tratados com EGTA, quando expostos a uma alta concentração de Ca^{2+} externo, em função do tempo. Quando os protoplastos incorporados com indo-1 foram expostos a uma alta concentração de Ca^{2+} externo (1mM), não foi observado aumento na intensidade de fluorescência do indicador nos primeiros minutos de exposição. A determinação da concentração de Ca^{2+} citossólico mostrou que a concentração basal desse íon é de ~150nM e que, o aumento da sua concentração externa não altera o Ca^{2+} livre citossólico destas células no período observado. Diferentemente, quando os protoplastos foram previamente tratados com EGTA, com o objetivo de se depletar o Ca^{2+} da célula, obteve-se uma fluorescência basal e uma resposta à variação do Ca^{2+} externo, diferente do controle. A concentração basal de Ca^{2+} citossólico das células pré-tratadas com EGTA foi mais baixa, estando na faixa de 80nM. Quando estas células, depletadas de Ca^{2+} , foram expostas a uma alta concentração de Ca^{2+} externo, observou-se um rápido aumento na concentração de Ca^{2+} citossólico, que foi mantido por cerca de cinco minutos, retornando aos níveis iniciais após este período. A Figura 14 apresenta as imagens de fluorescência dos protoplastos incorporados com indo-1, em diferentes tempos, após pré-tratamento com EGTA e subsequente exposição a uma alta concentração de Ca^{2+} externa. A flutuação dos níveis de Ca^{2+} citossólico destas células é interpretada como resultante de

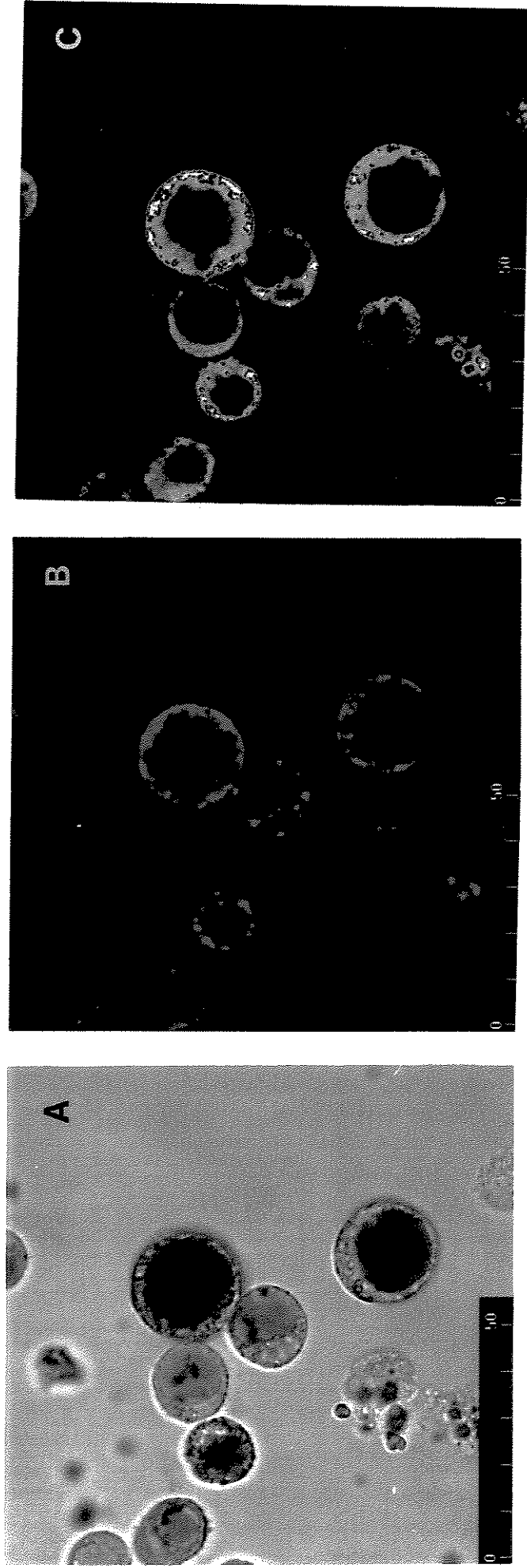


FIGURA 12. Imagem de protoplastos de *C. sinensis* incorporados com o indicador fluorescente de Ca^{2+} indo-1. (A) Imagem da luz transmitida mostrando vacúolos marcados com o indicador de meio ácido, vermelho neutro; (B) imagem fluorescente; (C) imagem fluorescente processada.

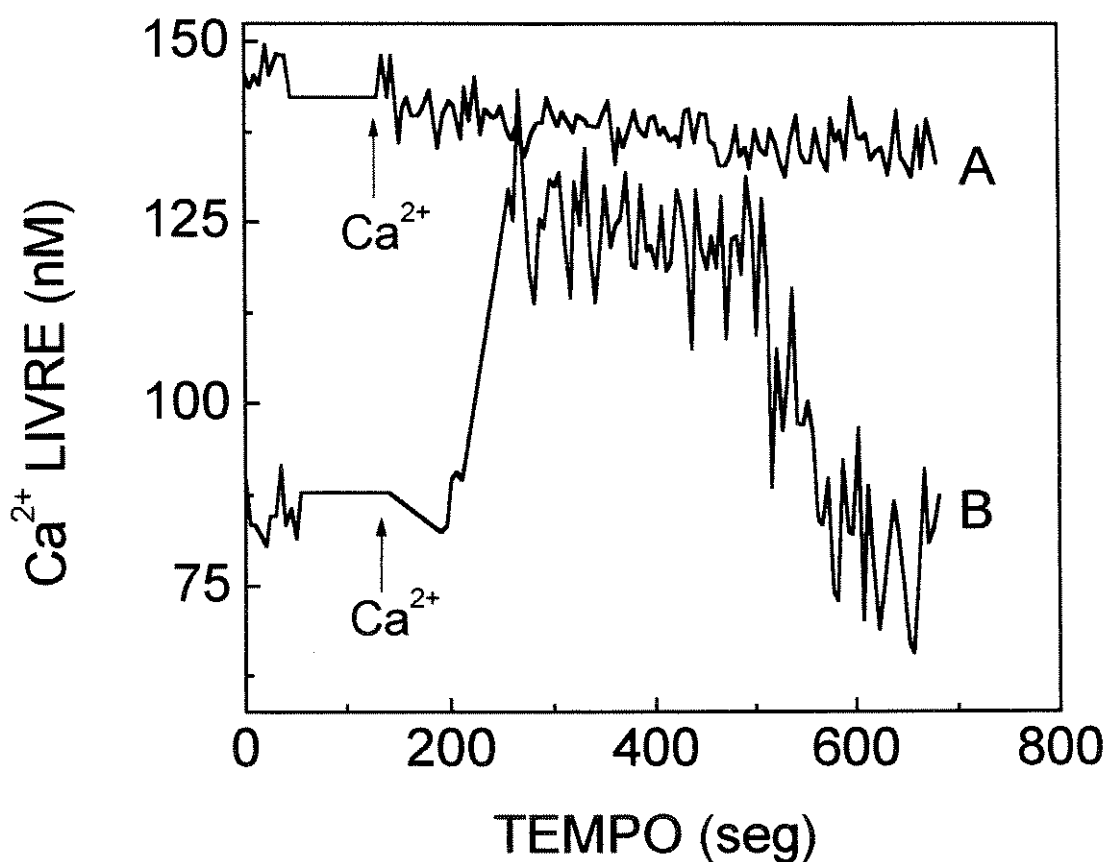


FIGURA 13. Variação da concentração de Ca^{2+} citossólico em protoplastos de *C. sinensis* incorporados com o indicador fluorescente de Ca^{2+} indo-1. (A) controle, (B) protoplastos pré-tratados com EGTA 1mM e expostos a 1mM de Ca^{2+} externo onde indicado pela seta.

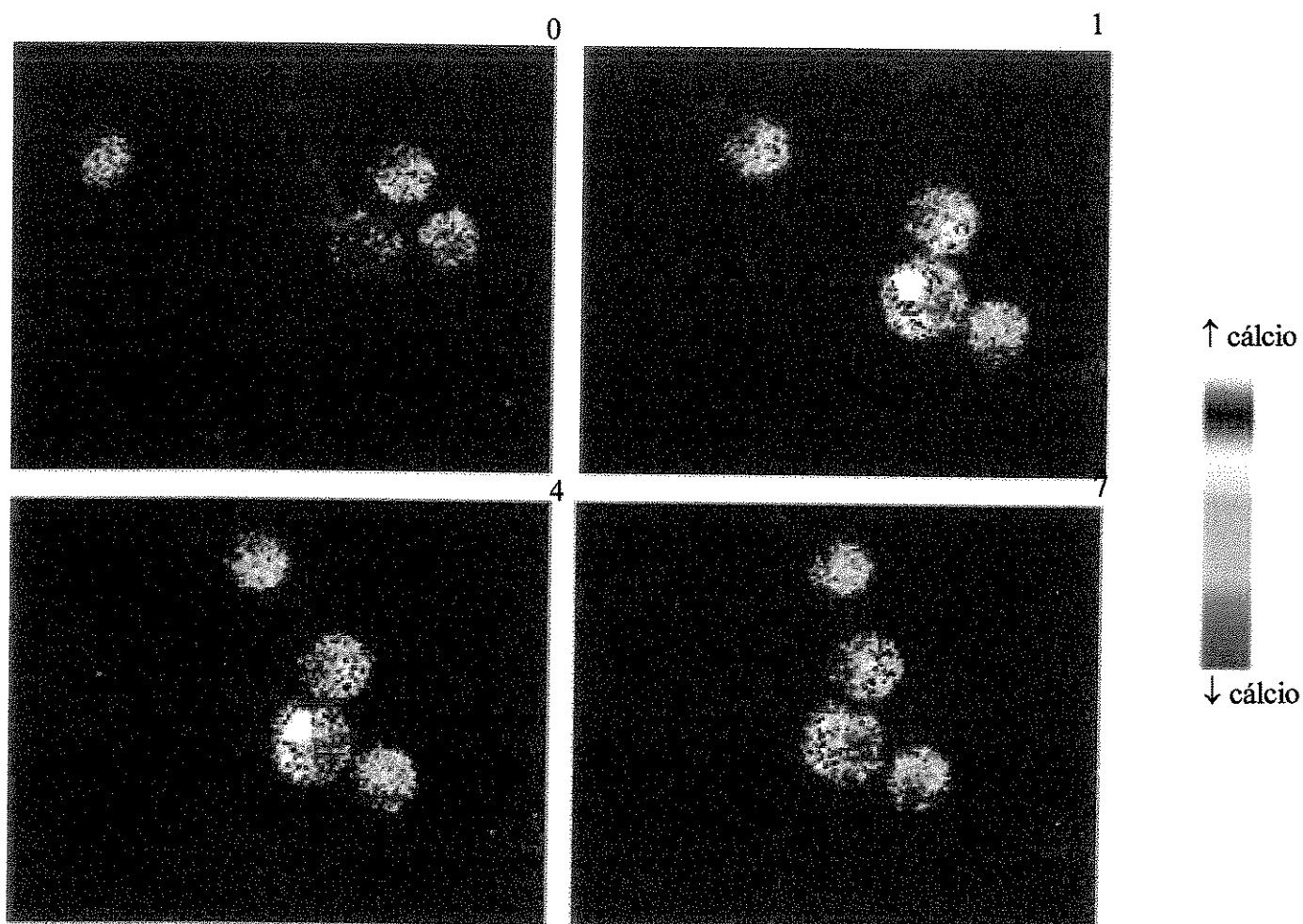


FIGURA 14. Imagens confocais fluorescentes do Ca^{2+} citossólico de protoplastos de *C. sinensis* depletados de Ca^{2+} . Os números no canto superior direito de cada imagem representam o tempo (em min) após a adição de 1mM de Ca^{2+} ao meio de incubação. As imagens foram coloridas para indicar a concentração de Ca^{2+} de acordo com a escala apresentada.

um estímulo na sua captação pela membrana plasmática, induzido pela depleção de Ca^{2+} . Em muitos tipos de células animais, durante o processo de reposição de estoques intracelulares, há um aumento associado na concentração de cálcio citossólico pela ativação de sua entrada na célula pelos canais da membrana plasmática (SCHOROEDER, 1992; WIESNER et al., 1996). O aumento da concentração de Ca^{2+} citossólico nos protoplastos depletados do mesmo estimularia em seguida a sua captação pelas organelas para reposição das reservas de Ca^{2+} celular, o que resultaria numa diminuição dos níveis de Ca^{2+} citossólico neste período. Estes resultados estão de acordo com as observações da Fig. 11 em que a capacidade de captação de Ca^{2+} pelos protoplastos de *C. sinensis* foi aumentada após tratamento destes com EGTA e corroboram para fortalecer a hipótese da existência de um mecanismo capacitativo para a entrada de Ca^{2+} nestes protoplastos. Este mecanismo pode ser importante para repor as reservas de Ca^{2+} na célula, resultantes de mecanismos de sinalização ou outras condições que tenderiam a depletar a célula de Ca^{2+} , bem como poderia explicar a grande variabilidade observada nas características cinéticas de captação de Ca^{2+} por células vegetais.

Apesar da abundância de cálcio nos tecidos vegetais e das pequenas quantidades requeridas por muitos processos celulares, o suprimento de Ca^{2+} para a planta precisa ser ininterrupto (GILROY et al. 1993). Em situações de estresse, que tenderiam a depletar as células de Ca^{2+} , a manutenção da homeostase celular do Ca^{2+} pode ser facilitada pela operação de um mecanismo capacitativo para a sua entrada na célula. Existe uma grande variedade de mecanismos de entrada de Ca^{2+} na célula e a entrada capacitativa pode ser uma possibilidade adicional para esse tipo de célula.

A função regulatória do Ca^{2+} tem sido demonstrada em muitos processos

fisiológicos, particularmente em células animais. Os conhecimentos em plantas são menos avançados, porém, é crescente o número de observações sobre a participação do Ca^{2+} nos mais variados mecanismos de transdução de sinais em células vegetais, participação esta que ocorre através de alterações do nível de Ca^{2+} citossólico das células. Como níveis de Ca^{2+} citossólico são importantes no controle das funções celulares e como alterações nos níveis de Ca^{2+} citossólico são sensíveis a alterações no fluxo de Ca^{2+} através da membrana plasmática, é de grande importância o estudo do fluxo de Ca^{2+} nas células, o que este estudo procurou abordar.

5. CONCLUSÕES

1. Protoplastos de *C. sinensis* isolados a partir de cultura de células em suspensão constituem-se num modelo eficiente para estudar o transporte e a homeostase de Ca^{2+} em células vegetais, uma vez que neste sistema a parede celular, que tem alta afinidade por Ca^{2+} é eliminada. Além disto, a cultura *in vitro*, assegura a utilização de um único tipo de célula.

2. O transporte de Ca^{2+} por protoplastos de *C. sinensis* pode ser estudado observando-se as alterações da concentração do Ca^{2+} livre do meio de reação utilizando-se o indicador de Ca^{2+} arsenazo III, que é sensível às baixas concentrações desse íon.

3. Alterações temporais na concentração de Ca^{2+} citoplasmático podem ser acompanhadas pela utilização de microscopia confocal de fluorescência, em protoplastos isolados de *C. sinensis* incorporados com o indicador fluorescente indo-1.

4. O efluxo de Ca^{2+} por protoplastos de *C. sinensis* pode ser induzido por antagonistas de calmodulina. Embora estes compostos, nas concentrações utilizadas, não causem a lise celular, sua ação não está relacionada a um efeito anti-calmodulina e sim a alterações na permeabilidade da membrana dos protoplastos.

5. O efluxo de Ca^{2+} pelos protoplastos, induzido por drogas anti-calmodulina, pode ser parcialmente bloqueado por inibidores de canais de Ca^{2+} , indicando que pelo menos parte do efluxo induzido ocorre através de canais de Ca^{2+} presentes na membrana plasmática.

6. A sensibilidade ao verapamil e à nifedipina, do efluxo induzido de Ca^{2+} , sugere que a membrana plasmática dos protoplastos de *C. sinensis* apresenta

canais de Ca^{2+} do tipo voltagem-dependente.

7. Estimativas da quantidade de Ca^{2+} liberada pelos protoplastos, sob ação das drogas anti-calmodulina, considerando-se o volume dos protoplastos e a concentração citoplasmática de Ca^{2+} destas células, sugerem que o Ca^{2+} liberado é proveniente de reservas internas.

8. A depleção de Ca^{2+} dos protoplastos, por tratamento com EGTA, um quelante de Ca^{2+} , resulta num estímulo da captação de Ca^{2+} , por um canal sensível à lantânio, distinto do tipo sensível às fenilalquilaminas e dihidropiridinas.

9. Protoplastos de *C. sinensis* previamente depletados de Ca^{2+} apresentam um aumento transiente na concentração citossólica de Ca^{2+} , quando expostos a uma alta concentração externa desse íon.

10. A observação de que a depleção de Ca^{2+} de reservas internas é seguida de um estímulo no influxo de Ca^{2+} através da membrana plasmática resultando num aumento transiente na concentração de Ca^{2+} citossólico, quando estas células são novamente expostas ao íon, permite-nos propor um mecanismo capacitativo para a entrada de Ca^{2+} nesse tipo de célula.

6. LITERATURA CITADA

- AHMAD, M. and CASHMORE, A.R. (1996) - Seeing blue: the discovery of cryptochrome. **Plant Mol. Biol.** 30: 851-861.
- ALEXANDRE, J. and LASSALLES, J.P. (1990) - Effect of D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate on the electrical properties of the red beet vacuole membrane. **Plant Physiol.** 93: 837-840.
- ALEXANDRE, J. and LASSALLES, J.P. (1992) - Intracellular Ca^{2+} release by IP_3 in plants and effect of buffers on Ca^{2+} diffusion. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.** 338: 53-61.
- ALEXANDRE, J.; LASSALLES, J.P. and KADO, R.T. (1990) - Opening of Ca^{2+} channels in isolated red beet root vacuole membrane by inositol 1,4,5-trisphosphate. **Nature** 343: 567-570.
- ALLAN, A.C. and TREWAVAS, A.J. (1987) - The role of calcium in metabolic control. In *The Biochemistry of Plants*, vol. 12 (eds. P.K. Stumpf & E.E. conn), pp 117-149. Academic Press, New York.
- ALLEN, G.J. and SANDERS, D. (1994) - Osmotic stress enhances the competence of *Beta vulgaris* vacuoles to respond to inositol 1,4,5-trisphosphate. **Plant J.** 6: 687-695.
- ALLEN, G.J.; MUIR, S.R. and SANDERS, D. (1995) - Release of Ca^{2+} from individual plant vacuoles by both InsP_3 and cyclic ADP-ribose. **Science** 268: 735-737.
- ANANTHANARAYANAN, V.S.; TAYLOR, L.B. and TIRRITANO, S. (1992) - Transport of Ca^{2+} by diltiazem across the lipid bilayer in model liposomes. **Biochem. Cell Biol.** 70(7): 608-612.
- ANDREJAUSKAS, E.; HERTEL, R. and MARME, D. (1985) - Specific binding of

the calcium antagonist (^3H)-verapamil to membrane fractions from plants.

J. Biol. Chem. 260: 5411-5414.

ASHKENAZI, A.; PERALTA, E.G.; WINSLOW, J.W.; RAMACHANDRAN, J. and CAPON, D.J. (1989) - Functionally distinct G proteins selectively couple different receptors to PI hydrolysis in the same cell. **Cell** 56: 631-632.

ASSMANN, S.M. (1995) - Cyclic AMP as a second messenger in higher plants. **Plant Physiol.** 108: 995-889.

ASSMANN, S.M.; SIMONCINI, L. and SCHROEDER, J.L. (1985) - Blue light activates electrogenic ion pumping in guard cell protoplasts in *Vicia faba* L. **Nature** 318: 285-287.

AYLING, S.M. and CLARKSON, D.T. (1996) - The cytoplasmic streaming response of tomato root hairs to auxin; the role of calcium. **Aust. J. Plant Physiol.** 23: 699-708.

BACH, M.; SCHNITZLER, J.P. and SEITZ, H.U. (1993) - Elicitor induced changes in Ca^{2+} influx, K efflux, and 4-hydroxybenzoic acid synthesis in protoplasts of *Daucus carota* L. **Plant Physiol.** 103: 407-412.

BATTEY, N.H. and VENIS, M.A. (1988) - Calcium-dependent protein kinase from apple fruit membranes is calmodulin-independent but has calmodulin-like properties. **Planta** 176: 91-97.

BAUER, C.S.; PLIETH, C.; HANSEN, U-P.; SATTELMACHER, B.; SIMONIS, W. and SCHÖNKENECHT (1997) - Repetitive Ca^{2+} spikes in a unicellular green alga. **FEBS Lett.** 405: 390-393.

BAUM, G.; LEV-YADUN, S.; FRIDMANN, Y.; ARAZI, T.; KATSNELSON, H.; ZIK, M. and FROMM, H. (1996) - Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation to glutamate and GABA metabolism and normal development in plants. **EMBO J.** 15: 2988-2996.

- BEAN, B.P. (1989) - Classes of calcium channels in vertebrate cells. **Annu. Rev. Physiol.** 51: 367-384.
- BELYAVSKAYA, N.A. (1996) - Calcium and graviperception in plants: Inhibitors analysis. **Int. Rev. Citol.** 168: 123.
- BENNETT, M.J.; MARCHANT, A.; GREEN, H.G.; MAY, S.T.; WARD, S.P.; MILLNER, P.A.; WALKER, A.R.; SCHULZ, B. and FELDMENN, K.A. (1996) - *Arabidopsis* AUX1 gene: A permease-like receptor of root gravitropism. **Science** 273: 948-950.
- BERRIDGE, M.J. (1993) - Inositol trisphosphate and calcium signalling. **Nature** 361: 315-325.
- BERRIDGE, M.J. (1995) - Capacitative calcium entry. **Biochem. J.** 312: 1-11.
- BERRIDGE, M.J. and IRVINE, R.F. (1989) - Inositol phosphate and cell signalling. **Nature** 341: 197-205.
- BIRD, G. St.J. and PUTNEY Jr., J.W. (1993) - Inhibition of thapsigargin-induced calcium entry by microinjected guanine nucleotide analogues. Evidence for the involvement of a small G-protein in capacitative calcium entry. **J. Biol. Chem.** 268: 21486-21488.
- BLACKFORD, S.; REA, P.A. and SANDERS, D. (1990) - Voltage sensitivity of H^+/Ca^{2+} antiport in higher plant tonoplast suggests a role in vacuolar calcium accumulation. **J. Biol. Chem.** 265: 9617-9620.
- BLEECKER, A.B. and SCHALLER, G.E. (1996) - The mechanism of ethylene perception. **Plant Physiol.** 111: 653-660.
- BOLLER, T. (1995) - Chemoperception of microbial signals in plant cells. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 46: 189-214.
- BOSSSEN, M.E.; KENDRICK, R.E. and VREDENBERG, W.J. (1990) - The involvement of a G-protein in phytochrome-regulated Ca^{2+} -dependent

- swelling of etiolated wheat protoplasts. **Physiol. Plant.** 80: 55-62.
- BOWLER, C.; NEUHAUS, G.; YAMAGATA, H.; and CHUA, N-H (1994) - Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. **Cell** 77: 73-81.
- BRAAM, J. and DAVIS, R.W. (1990) - Rain-induced, wind-induced and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in *Arabidopsis*. **Cell** 60(3): 357-364.
- BRAUN, M.D. and WALKER, J.C. (1996) - Plant transmembrane receptors: new pieces in the signaling puzzle. **TIBS** 21: 70-73.
- BRIMBLE, K.S. and ANANTHANARAYANAN, V.S. (1992) - Induction of Ca^{2+} transport in liposomes by insulin. **Biochim. Biophys. Acta** 1105(2): 319-327.
- BRIMBLE, K.S. and ANANTHANARAYANAN, V.S. (1993) - Calcium binding and translocation properties of glucagon and its fragments. **Biochem.** 32(6): 1632-1640.
- BRINDLEY, H.M. (1990) - Effect of light/dark and calcium-channel drugs on fluxes of $^{86}\text{Rb}^+$ in "isolated" guard cells of *Vicia faba* L. **Planta** 181: 440-447.
- BRINKLEY, F.J.; TIFFERT, T.; SCARPA, A. and MULLINS, L.J. (1977) - Intracellular calcium buffering capacity in isolated squid axons. **J. Gen. Physiol.** 70: 355-384.
- BROSNAN, J.M. and SANDERS, D. (1990) - Inositol trisphosphate-mediated Ca^{2+} release in beet microsomes is inhibited by heparin. **FEBS Lett.** 260: 70-72.
- BUCKHOUT, T.J. (1983) - ATP-dependent Ca^{2+} transport in endoplasmic reticulum isolated from roots of *Lepidium sativum* L. **Planta** 159: 84-90.
- BUSH, D.S. (1993) - Regulation of cytosolic calcium in plants. **Plant Physiol.** 103:

7-13.

- BUSH, D.S. (1995) - Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 46: 95-122.
- BUSH, D.S. and JONES, R.L. (1987) - Measurement of cytoplasmic calcium in aleurone protoplasts using indo-1 and fura-2. **Cell Calcium** 8: 455-472.
- BUSH, D.S. and SZE, H. (1986) - Calcium transport in tonoplast and endoplasmic reticulum vesicles isolated from cultured carrot cells. **Plant Physiol.** 80: 549-555.
- BUSH, D.S.; BISWAS, A.K. and JONES, R.L. (1989) - Gibberellic-acid-stimulated Ca^{2+} accumulation in endoplasmic reticulum of barley aleurone: Ca^{2+} transport and steady-state levels. **Planta** 178: 411-420.
- BUTCHER, R.D. and EVANS, D.E. (1987) - Calcium transport by pea root membranes. **Planta** 172: 265-272.
- BYGRAVE, F.L. and BENEDETTI, A. (1996) - What is the concentration of calcium ions in the endoplasmic reticulum? **Cell Calcium** 19(6): 547-551.
- CARNIERI, E.G.S.; MARTINS, I.S. and VERCESI, A.E. (1987) - The mechanism and biological role of calcium transport by plant mitochondria. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 20: 635-638.
- CHAE, Q.; PARK, H.J. and HONG, S.D. (1990) - Loading of quin2 into the oat protoplast and measurement of cytosolic calcium ion concentration changes by phytochrome action. **Biochim. Biophys. Acta** 1051: 115-122.
- CHEN, C.H. and LEHNINGER, A.L. (1973) - Ca^{2+} transport activity in mitochondria from some plant tissues. **Arch. Biochem. Biophys.** 157: 183-186.
- CHINKERS, M.; GARBER, D.L.; CHANG, M.-S.; LOWE, D.G.; CHIN, H.; GOEDDEL, D.V. and SCHULZ, S. (1989) - A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor. **Nature** 338: 78-83.

- CHIU, V.C.K. and HAYNES, D.H. (1977) - High and low affinity Ca^{2+} binding to the sarcoplasmic reticulum. **Biophys. J.** 18: 3-22.
- CHORY, J. (1997) - Light modulation of vegetative development. **Plant Cell** 9: 1225-1234.
- CLAPHAM, D. E. (1995) - Calcium signaling. **Cell** 80: 259-268.
- COCUCCI, M.C. (1986) - Inhibition of plasma membrane and tonoplast ATPases by erythrosin B. **Plant Sci.** 47: 21-27.
- COHEN, P. (1982) - The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity. **Nature** 296: 613-620.
- COHEN, P. (1989) - The structure and regulation of protein phosphatases. **Annu. Rev. Biochem.** 58: 453-508.
- CROMPTON, M.; SIGEL, E.; SALZMANN, M. and CARAFOLI, E. (1976) - A kinetic study of the energy-linked influx of Ca^{2+} into heart mitochondria. **Eur. J. Biochem.** 69: 429-434.
- CURVETTO, N.; DARJANIA, L. and DELMASTRO, S. (1994) - Effect of two cAMP analogues on stomatal opening in *Vicia faba*. Possible relationship with cytosolic calcium concentration. **Plant Physiol. Biochem.** 32: 365-372.
- CZECH, M.; KLARLUND, J.F.; YAGALOFF, K.A.; BRADFORD, A.P. and LEWIS, R.E. (1988) - Insulin receptor signalling: activation of multiple serine kinases. **J. Biol. Chem.** 263: 11017-11020.
- CZECH, M. (1989) - Signal transmission by the insulin-like growth factors. **Cell** 59: 235-238.
- DARJANIA, L.; CURVETTO, N. and DELMASTRO, S. (1993) - Loading of *Vicia faba* guard cell protoplasts with Indo-1 to measure cytosolic calcium concentration. **Plant Physiol. Biochem.** 31(5): 793-798.
- DeLISLE, S.; MAYR, G.W. and WELSH, M.J. (1995) - Inositol phosphate

- structural requisites for Ca^{2+} influx. **Am. J. Physiol.** 268: C1485-C1491.
- DIETER, M. and MARMÉ, D. (1980) - Ca^{2+} transport in mitochondrial and microsomal fractions from higher plants. **Planta** 150: 1-8.
- DIPOLO, R.; JEQUENA, J.; BRINKLEY, F.J.; MULLINS, L.S.; SCARPA, A. and TIFFERT, T. (1976) - Ionized calcium concentrations in squid axons. **J. Gen. Physiol.** 67(4): 433-467.
- DMITRIEV, A.; DJATSOK, J. and GRODZINSKY, D. (1996) - The role of Ca^{2+} in elicitation of phytoalexin synthesis in cell culture of onion (*Allium cepa* L.). **Plant Cell Rep.** 15: 945-948.
- DOHLMAN, H.G.; CARON, M.G. and LEFKOWITZ, R.J. (1987) - A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. **Biochem.** 26: 2657-2664.
- DROBAK, B.K. (1993) - Plant phosphoinositides and intracellular signalling. **Plant Physiol.** 102: 705-709.
- D'ULTRA VAZ, F.B.; SANTOS, A.V.P.; MANDERS, G.; KOCKING, E.C.; DAVEY, M.R. and POWER, J.B. (1993) - Plant regeneration from leave mesophyll protoplast of tropical woody plant, passionfruit (*Passiflora edulis* fr. flavicarpa Degener.): the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. **Plant Cell Rep.** 12: 220-225.
- DuPONT, F.M.; BUSH, D.S.; WINDLU, J.I. and JONNES, R.L. (1990) - Calcium and proton transport in membrane vesicles from barley roots. **Plant Physiol.** 94: 179- 188.
- EINSPAHR, K.J. and THOMPSON, G.A. (1990) - Transmembrane signaling via phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in plants. **Plant Physiol.** 93: 361-366.
- EVANS, D.E. (1988) - Regulation of cytoplasmic free calcium by plant cell

- membranes. **Cell Biol. Int. Rep.** 12: 383-396.
- EVANS, D.E.; BRAIRS, S.A. and WILLIAMS, L.E. (1991) - Active calcium transport by plant cell membranes. **J. Exp. Bot.** 42: 285-303.
- FABIATO, A. and FABIATO, F. (1978) - Effect of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles. **J. Physiol.** 276: 233-255.
- FASOLATO, C.; INNOCENTI, B. and POZZAN, T. (1994) - Receptor-activated Ca^{2+} influx: how many mechanisms for how many channels? **TIBS.** 15:77-83.
- FELLE, H. (1988) - Auxin causes oscillations of cytosolic free calcium and pH in *Zea mays* coleoptiles. **Planta** 174, 495-499.
- FELLE, H.; TRETYN, A. and WAGNER, G. (1992) - The role of the plasma-membrane Ca^{2+} -ATPase in Ca^{2+} homeostasis in *Sinapis alba* root hairs. **Planta** 188: 306-313.
- FINCH, E.A. and GOLDIN, S.M. (1994) - Calcium and inositol 1,4,5-triphosphate-induced Ca^{2+} release. **Science** 265: 813-815.
- FRANKLIN-TONG, V.E.; DROBAK, B.K.; ALLAN, A.C.; WATKINS, P.A.C. and TREWAVAS, A.J. (1996) - Growth of pollen tubes of *Papaver rhoeas* is regulated by inositol triphosphate. **Plant Cell** 8: 1305-1321.
- FREARSON, E.M.; POWER, J.B. and COCKING, E.C. (1973) - The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. **Dev. Biol.** 33: 130-137.
- FRIESSMUTH, M.; CASEY, P.J. and GILMAN, A.G. (1989) - G proteins control diverse pathways of transmembrane signalling. **FASEB J.** 3: 2125-2131.
- FURUYA, M. and SCHAFER, E. (1995) - Photoperception and signalling of induction reactions by different phytochromes. **Trends Plant Sci.** 1: 301-

306.

- GELLI, A. and BLUMWALD, E. (1993) - Calcium retrieval from vacuolar pools. **Plant Physiol.** 102: 1139-1146.
- GELLI, A. and BLUMWALD, E. (1997) - Hiperpolarization-activated Ca^{2+} -permeable channels in the plasma membrane of tomato cells. **J. Memb. Biol.** 155: 35-45.
- GHOSH, T.K.; EIS, P.S.; MULLANEY, J.M.; EBERT, C.L. and GILL, D.L. (1988) - Competitive, reversible, and potent antagonism of inositol 1,4,5-trisphosphate- activated calcium release by heparin. **J. Biol. Chem.** 263: 11075-11079.
- GIANNINI, J.L.; RUIZ-CRISTIN, J. and BRISKIN, D.P. (1987) -Calcium transport in sealed vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue. **Plant Physiol.** 85, 1137-1142.
- GILROY, S. (1996) - Signal transduction in barley aleurone protoplasts is calcium dependent and independent. **Plant Cell** 8: 2193-2209.
- GILROY, S. and JONES, R.L. (1992) - Gibberellic acid and abscisic acid coordinately regulate cytoplasmic calcium and secretory activity in barley aleurone protoplasts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 89: 3591-3595.
- GILROY, S. and JONES, R.L. (1994) - Perception of gibberellin and abscisic acid at the external face of the plasma membrane of barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone protoplasts. **Plant Physiol.** 104: 1185-1192.
- GILROY, S. and TREWAVAS, T. (1994) - A decade of plant signals. **BioAssays.** 16 (9): 677-682.
- GILROY, S.; HUGHES, W.A. and TREWAVAS, A.J. (1986) - The measurement of intracellular calcium levels in protoplasts from higher plant cells. **FEBS Lett.** 199: 217-221.

- GILROY, S.; HUGHES, W.A. and TREWAVAS, A.J. (1987) - Calmodulin antagonists increase free cytosolic calcium levels in plant protoplasts in vivo. **FEBS Lett.** 212(1): 133-137.
- GILROY, S. READ, N.D. and TREWAVAS, A.J. (1990) - Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol triphosphate initiates stomatal closure. **Nature** 346: 769-771.
- GILROY, S.; BETNKE, P.C. and JONES, R.L. (1993) - Calcium homeostasis in plants. **J. Cell Sci.** 106: 453-462.
- GINSBURG, M.H.; XIAOPING, D.; PLOW, E.F. (1992) - Inside-out integrin signalling. **Curr. Opin. Cell Biol.** 4: 766-771.
- GIRAUDAT, J. (1995) - Absciscic acid signalling. **Curr. Opin. Cell Biol.** 7: 232-238.
- GONZÁLEZ-DARÓS, F.; CARRASCO-LUNA, F.; CALATAYUD, A. SALGUERO, J. and DEL VVALLE-TASCÓN, S. (1993) - Effect of calmodulin antagonists on auxin-stimulated proton extrusion in *Avena sativa* coleoptile segments. **Physiol. Plant.** 87: 68-76.
- GOUVÊA, C.M.C.P.; VIDAL, B.C. and MARTINS, I.S. (1997) - Measuring cytoplasmic calcium level in *Citrus* protoplasts using the fluorescent probe indo-1. **J. Plant Physiol.** 151: 329-333.
- GRAZIANA, A.; FOSSET, M.; RANJEVA, R.; HETHERINGTON, A.M.; LAZDUNSKI, M. (1988) - Ca^{2+} channel inhibitors that bind to plant cell membranes block Ca^{2+} entry into protoplasts. **Biochem.** 27: 764-768.
- GRETZEN, K.; SADORF, I. and BADER, H. (1982) - A model for the regulation of the calmodulin-dependent enzymes erythrocyte Ca^{2+} -transport ATPase and brain phosphodiesterase by activators and inhibitors. **Biochem. J.** 207: 541-548.

- GROSS, J. and MARMÉ, D. (1978) - ATP-dependent Ca^{2+} uptake into plant membrane vesicles. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 75: 1232-1236.
- GRYNKIEWICZ, G.; POENIE, M. and TSIEN, R.Y. (1985) - A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. **J. Biol. Chem.** 260: 3440-3450.
- HAHM, S.D. and SAUNDERS, M.J. (1991) - Cytokinin increases intracellular calcium in *Funaria*: detection with Indo-1. **Cell Calcium** 12: 675-681.
- HALEY, A.; RUSSEL, A.; WOOD, N.; ALLAN, A.; KNIGHT, M.R.; CAMPBELL, A.K.C. and TREWAVAS, A.J. (1995) - Mechanical effects on cytoplasmic calcium. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92: 4.124-4.128.
- HARPER, J.F.; SUSSMAN, M.R.; SCHALLER, G.E.; PUTNAM-EVANS, C.; CHARBONNEAU, H. and HARMON, A.C. (1991) - A calcium-dependent protein kinase with a regulatory domain similar to calmodulin. **Science** 252: 951-954.
- HART, C.E.; FORSTROM, J.W.; KELLY, J.D.; SEYFERT, R.A.; SMITH, R.A.; ROSS, R.; MURRAY, M.J. and BOWEN-POPE, D.F. (1988) - Two classes of PDGF receptor recognize different isoforms of PDGF. **Science** 240: 1529-1531.
- HARVEY, H.J.; VENIS, M.A. and TREWAVAS, A.J. (1989) - Partial purification of a protein from maize (*Zea mays*) coleoptile membranes binding the Ca^{2+} -channel antagonist verapamil. **Biochem. J.** 257: 95-100.
- HEDRICH, R. and SCHROEDER, J.I. (1989) - The physiology of ion channels and electrogenic pumps on higher plants. **Annu. Rev. Plant Physiol.** 40: 539-569.
- HEPLER, P.K. and WAYNE, R.O. (1985) - Calcium and plant development. **Annu. Rev. Plant Physiol.** 36: 397-439.

- HERBETTE, L. MARQUARDT, J.; SCARPA, A. and BLASIE, J.K. (1977) - A direct analysis of lamellar X-ray diffraction from hydrated oriented multilayers of fully functional sarcoplasmic reticulum. **Biophys. J.** 20: 245-272.
- HETHERINGTON, A.M. and TREWAVAS, A.J. (1982) - Calcium dependent protein kinase in pea shoot membranes. **FEBS Lett.** 145: 67-71.
- HETHERINGTON, A.M. GRAZIANA, A.; MAZARS, C.; THULEAU, P. and RANJEVA, R. (1992) - The biochemistry and pharmacology of plasma-membrane calcium channels in plants. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.** 338: 91-96.
- HOTH, M. and PENNER, R. (1992) - Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. **Nature** 355: 353-356.
- HUANG, J.W.; GRUNES, D.L. and KOCHIAN, L.V. (1994) - Voltage- dependent Ca^{2+} influx into right-side-out plasma membrane vesicles isolated from wheat roots: Characterization of a putative Ca^{2+} -channel. **Proc.Natl. Acad. Sci. USA** 91, 3473-3477.
- HUNTER, T. (1987) - A thousand and one protein kinases. **Cell** 50: 823-829.
- HUSH, J.M.; OVERALL, R.L. and NEWMAN, I.A. (1991) - A calcium influx precedes organogenesis in *Graptopetalum*. **Plant Cell Environ.** 14: 657-665.
- INESI, G.; KURZMACK, M.; COAN, C. and LEWIS, D.E. (1980) - Cooperative calcium binding and ATPase activation in sarcoplasmic reticulum vesicles. **J. Biol. Chem.** 255: 3025-3031.
- IRVINE, R. and CULLEN, P. (1996) - Intracellular signalling; inositol phosphates - whither bound? **Curr. Biol.** 6:537-540.
- IRVING, H.R.; GEHRING, C.A.; and PARISH, R.W. (1992) - Changes in cytosolic pH and calcium of guard cells precede stomatal movements. **Proc. Natl.**

Acad. Sci. USA 89: 1790-1794.

- ISHIHARA, A.; MIYAGAWA, H.; KUWAHARA, Y.; UENO, T. and MAYAMA, S. (1996) - Involvement of calcium ion in phytoalexin induction in oats. **Plant Sci.** 115: 9-16.
- JACOBS, T. (1997) - Why do plant cell divide? **Plant Cell** 9: 1021-1029.
- JACOBS, M.; THELEN, M.P.; FANDALE, R.W.; ASTLE, M.C. and RUBERY, P.H. (1988) - Specific guanine nucleotide binding by membranes from cucurbita pepo seedlings. **Biochem.Biophys. Res. Commun.** 155: 1478-1484.
- JAFFE, L.A.; WEISENSEEL, M.H. and JAFFE, L.F. (1975) - Calcium accumulations within the growing tips of pollen tubes. **J. Cell Biol.** 67: 488-492.
- JAMES, P.; VORHERR, T. and CARAFOLI, E. (1995) - Calmodulin-binding domains: just two faced or mult-faceted? **Trends Biochem. Sci.** 20: 38-42.
- JENSEN, A.B.; BUSK, P.K.; FIGUERAS, M.; ALBÀ, M.M.; PERACCHIA, G.; MESSEGUER, R.; GODAY, A. and PAGÈS, M. (1996) - Drought signal transduction in plants. **Plant Growth Reg.** 20: 105-110.
- JINKINS, G.I. (1997) - UV and blue light signal transduction in *Arabidopsis*. **Plant Cell Environ.** 20: 773-778.
- JOHANNES, E.; BROSNAN, J.M. and SANDERS, D. (1991) - Calcium channels and signal transduction in plant cells. **BioEssays** 13(7): 331-336.
- JOHNSON, R.G. and SCARPA, A. (1976) - Ion permeability of isolated chromaffin granules. **J. Gen. Physiol.** 68: 601-631.
- KAKIMOTO, T. (1996) - CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. **Science** 274: 982-985.

- KASAI, M. and MUTO, S. (1990) - Ca^{2+} pump and $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter in plasma membrane vesicles isolated by aqueous two-phase partitioning from corn leaves. **J. Memb. Biol.** 114: 133-142.
- KEARNS, E. V. and ASSMANN, S.N (1993) - The guard cell-environment connection. **Plant Physiol.** 102: 711-715.
- KENDE, H. and ZEEVAART, J.A.D. (1997) - The five "classical" plant hormones. **Plant Cell** 9: 1197-1210.
- KETCHUM, K.A. and POOLE, R.J. (1991) - Cytosolic calcium regulates a potassium current in corn (*Zea mays*) protoplasts. **J. Memb. Biol.** 119: 277-288.
- KLOTZ, I.M. (1982) - Number of receptor sites from Scatchard graphs: facts and fantasies. **Science** 217: 1247-1249.
- KNIGHT, H.; TREWAVAS, A.J. and KNIGHT, M.R. (1996) - Cold calcium signalling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. **Plant Cell** 8: 489-503.
- KNIGHT, M.R.; CAMPBELL, A.K.; SMITH, S.M. and TREWAVAS, A.J. (1991) - Transgenic plant aequorin reports the effects of touch, cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. **Nature** 352: 524-526.
- KNIGHT, M.R.; SMITH, S.M. and TREWAVAS, A.J. (1992) - Wind-induced plant motion immediately increases cytosolic calcium. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 89: 4967-4971.
- KOGEL, G.; BEISSMANN, B.; REISENER, H. and KOGEL, K. (1991) - Specific binding of a hypersensitive lignification elicitor from *Puccinia graminis* f. sp. tritici to the plasma membrane from wheat (*Triticum aestivum* L.). **Planta** 183: 164-169.
- KOMATSU, S. and HIRANO, H. (1993) - Protein kinase activity and protein

phosphorylation in rice (*Oriza sativa* L.) leaf. **Plant Sci.** 94: 127-137.

KREIMER, G.; MELKONIAN, M.; HOLTUM, J.A.M. and LATZKO, E. (1985a) - Characterization of Ca^{2+} fluxes across the envelop of intact spinach chloroplasts. **Planta** 166: 515-523.

KREIMER, G.; MELKONIAN, M. and LATZKO, E. (1985b) - An electrogenic uniport mediates light-dependent Ca^{2+} influx into intact spinach chloroplasts. **FEBS Lett.** 180- 253-258.

KRÜGER, H.; SCHRÖDER, W.; BUCHER, K. and HUCHO, F. (1990) - Protein kinase C inhibition by calmodulin and its fragments. **J. Protein Chem.** 9(4): 467-473.

KUBOWICZ, B.D.; VANDERHOEF, L.H. and HANSON, J.B. (1982) - ATP-dependent calcium transport in plasmalemma preparations from soybean hypocotyls. **Plant Physiol.** 69: 187-191.

KUROSAKI, F. and NISHI, A. (1993) - Stimulation of calcium influx and calcium cascade by cyclic AMP in cultured carrot cells. **Arch. Biochem. Biophys.** 302: 144-151.

KUROSAKI, F.; KABURAKI, H. and NISHI, A. (1994) - Involvement of plasma membrane-located calmodulin in the response decay of cyclic nucleotide-gated cation channel of cultured carrot cells. **FEBS Lett.** 340: 193-196.

LAUZAO, M.C.; RIBEIRO, C.M.P.; BIRD, G. St. J.; and PUTNEY Jr. J.W. (1996) - Cell type-specific modes of feedback regulation of capacitative calcium entry. **J. Biol. Chem.** 271(25): 14807-14813.

LEE, Y.; CHOI, Y.B.; SUH, S.; LEE, J.; ASSMANN, S.M.; JOE, C.O.; KELLEHER, J.F. and CRAIN, R.C. (1996) - Absciscic acid-induced phosphoinositide turnover in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. **Plant Physiol.** 110: 987-996.

- LEFKOWITZ, R.J. and CARON, M.G. (1988) - Adrenergic receptors: models for the study of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. **J. Biol. Chem.** 263: 4993-4996.
- LIN, Y.; WANG, Y.; ZHU, J.-K. and YANG, Z. (1996) - Localization of a Rho GTPase implies a role in tip growth and movement of the generative cell in pollen tubes. **Plant Cell** 8: 293-303.
- LING, V. and ZIELINSKI (1989) - Cloning of cDNA sequences encoding the calcium-binding protein, calmodulin, from barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Physiol.** 90: 714-719.
- LOMMEL, C. and FELLE, H.H. (1997) - Transport of Ca^{2+} across the tonoplast of intact vacuoles from *Chenopodium album* L. suspension cells: ATP-dependent import and inositol-1,4,5-trisphosphate-induced release. **Planta** 201: 477-486.
- LONERGAN, T.A. (1990) - Steps linking the photosynthetic light reactions to the biological clock require calcium. **Plant Physiol.** 93: 110-115.
- LUXNAT, M. and GALLA, H.-J. (1986) - Partition of chlorpromazine into lipid bilayer membranes: the effect of membrane structure and composition. **Biochim. Biophys. Acta** 856: 274-282.
- MA, H. (1994) - GTP binding proteins in plants: New members of an old family. **Plant Mol. Biol.** 26: 1611-1636.
- MA, H.; YANOFSKY, M.F. and MEYEROWITZ, E.M. (1990) - Molecular cloning and characterization of GPA1, a G protein α subunit gene from *Arabidopsis thaliana*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 87: 3821-3825.
- MALATIALY, L.; GREPPIN, H. and PENEL, C. (1988) - Calcium uptake by tonoplast and plasma membrane vesicles from spinach leaves. **FEBS**

Lett. 233: 196-200.

MALHÓ, R.; READ, N.D.; TREWAVAS, A.J. and PAIS, M.S. (1994) - Role of cytosolic free calcium in the reorientation of pollen tube growth. **Plant J.** 5: 331-341.

MARKOVA, I.V.; BATOV, Yu. A.; MOSHKOV, A.V. MAKSIMOV, G.B. and MEDVEDEV, S.S. (1995) - Calcium-transporting systems in the plasmalemma of maize coleoptiles. **Rus. J. Plant Physiol.** 42(2): 231-236.

MARSHALL, J.; CORZO, A.; LEIGH, R.A. and SANDERS, D. (1994) - Membrane potential-dependent calcium transport in right-side-out plasma membrane vesicles from *Zea mays* L. roots. **Plant J.** 5: 683-694.

MARTINS, I.S. and VERCESI, A.E. (1985) - Some characteristics of Ca^{2+} transport in plant mitochondria. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 129: 943-948.

MARTINS, I.S.; CARNIERE, E.G.S. and VERCESI, A.E. (1986) - Characteristics of Ca^{2+} transport by corn mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta** 850: 49-56.

MARTINS, I.S.; CARNIERI, E.G.S. and VERCESI, A.E. (1993) - Mechanisms of Ca^{2+} and anion transport across the inner membrane of plant mitochondria. In: (council Scient. Res. Int., ed.) **Curr. Top. Plant Physiol.** 1: 211-217.

McAINSH, M.R.; BROWNLEE, C. and HETHERINGTON, A.M. (1990) - Absciscic acid-induced elevation of guard cell cytosolic Ca^{2+} precedes stomatal closure. **Nature** 343: 186-188.

Cell. 7: 1207-1219.

McDONALD, T.V.; PREMACK, B.A. and GARDNER, P. (1993) - Flash photolysis of caged inositol-1,4,5-triphosphate activates plasma membrane calcium current in human T cells. **J. Biol. Chem.** 268: 3889-3896.

MEANS, A.R. (1994) - Calcium, calmodulin and cell cycle regulation. **FEBS Lett.** 347: 1-4.

MEHTA, M.; MALIK, M.K.; KHURAN, J.P.; MAHESHWARI, S.C. (1993) - Phytochrome modulation of calcium fluxes in wheat (*Triticum aestivum* L.) protoplasts. **Plant Growth Reg.** 12: 293-302.

MILLAR, A.J.; McGRATH, R.B. and CHUA, N.-H. (1994) - Phytochrome phototransduction pathways. **Annu. Rev. Genet.** 28: 325-349.

MILLEDY, R.; PARKER, I. and SCHALOW, G. (1977) - Calcium transients in frog slow muscle fibres. **Nature** 268: 750-752.

MILLER, D.B.; CALLAHAM, D.A.; GROSS, D.J. and HEPLER, P.K. (1992) - Free Ca^{2+} gradient in growing pollen tubes of *Lilium*. **J. Cell Sci.** 101: 7-12.

MILLNER, P.A. (1995) - The auxin signal. **Curr. Opin. Cell Biol.** 7: 224-231.

MOORE, D.G. and AKERMAN, K.E.O. (1984) - Calcium and plant organelles. **Plant Cell Environ.** 7: 423-429.

MUIR, S.R. and SANDERS, D. (1996) - Pharmacology of Ca^{2+} release from red beet microsomes suggests the presence of ryanodine receptor homologs in higher plants. **FEBS Lett.** 395: 39-42.

MULLIGAN, R.M.; CHORY, J. and ECKER, J.R. (1997) - Signaling in plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94: 2793-2795.

MURASHIGE, T. and SKOOG, F. (1962) - A revised medium for rapid growth and

- bioassay with tabacco tissue cultures. **Plant Physiol.** 15: 473-479.
- MURASHIGE, T. and TUCKER, D.P.H. (1969) - Growth factor requirements of *Citrus* tissue cultures. In: CHAPMAN, H.D. (ed.): Proc. First Int. *Citrus* Symp. Vol. 3, 1155-1161, University of California, Riverside.
- MUTO, S. (1992) - Intracellular Ca^{2+} messenger sistem in plants. **Int. Rev. Cytol.** 142: 305-345.
- NEUHAUS, G.; BOWLER, C.; KAZUYUKI, H.; YAMAGATA, H. and CHUA, N.H. (1997) - Phytochrome-regulated repression of gene expression requires calcium and cGMP. **EMBO J.** 16(10): 2554-2564.
- NURNBERGER, T.; NENNSTEIL, D.; JABS, T.; SACKS, W.R.; HAHLBROCK, K. and SCEEL, D. (1994) - High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. **Cell** 78: 449-460.
- PALIYATH, G. and THOMPSON, J.E. (1988) - Senescence-related changes in ATP-dependent uptake of calcium into microsomal vesicles from carnation petals. **Plant Physiol.** 88: 295-302.
- PANTOJA, O.; GELLY, A. and BLUMWALD, E. (1992) - Voltage-dependent calcium channels in plant vacuoles. **Science** 255: 1567-1570.
- PENNISI, E. (1997) - Plants decode a universal signal. **Science** 278: 2.054-2.055.
- PETERSEN, C.C.H. and BERRIDGE, M.J. (1994) - The regulation of capacitative calcium entry by calcium and protein kinase C in *Xenopus* oocytes. **J. Biol. Chem.** 269: 32246-32253.
- PIERSON, E.S.; MILLER, D.D.; CALLAHAM, D.A.; SHIPLEY, A.M.; RIVERS, B.A.; CRESTI, M. and HEPLER, P.K. (1994) - Pollen tube growth is coupled to the extracellular calcium ion flux and the intracellular calcium gradient:

Effect of BAPTA-type buffers and hypertonic media. **Plant Cell** 6: 1815-1828.

PING, Z.; YABE, I. and MUTO, S. (1992a) - Voltage-dependent Ca^{2+} channels in the plasma membrane and the vacuolar membrane of *Arabidopsis thaliana*. **Biochem. Biophys. Acta** 1112: 287-290.

PING, Z.; YABE, I. and MUTO, S. (1992b) - Identification of K^+ , Cl^- , and Ca^{2+} channels in the vacuolar membrane of tobacco cell suspension cultures. **Protoplasma**. 171: 7-18.

POOVAIAH, B.W. and REDDY, A.S.N. (1987) - Calcium messenger system in plants. **Crit. Rev. Plant Sci.** 6: 47-103.

POOVAIAH, B.W.; McFADDEN, J.J. and REDDY, A.S.N. (1987) - The role of calcium ions in gravity signal perception and transduction. **Physiol. Plant.** 71: 401-407.

POWER, J.B; DAVEY, M.R.; McLELLAN, M. and WILSON, D. (1989) - Laboratory Manual: Plant Genetic Manipulation Group, University of Nottingham, Nottingham, UK.

PUTNEY Jr., J.W. (1986) - A model for receptor-regulated calcium entry. **Cell Calcium** 7: 1-12.

PUTNEY Jr., J.W. (1990) - Capacitative calcium entry revisited. **Cell Calcium** 11: 611-624.

PUTNEY Jr., J.W. (1997) - Type 3 inositol 1,4,5-triphosphate receptor and capacitative calcium entry. **Cell Calcium** 21(3): 257-261.

PUTNEY Jr., J.W.; TAKEMURA, H. RUGHES, A.R.; HORSTMAN, D.A. and THASTRUP, O. (1989) - How do inositol phosphates regulate calcium signaling? **FASEB J.** 3: 1899-1905.

QUAIL, P.H.; BOYLAN, M.T.; PARKS, B.M.; SHORT, T.W.; XU, Y. and WAGNER,

- D. (1995) - Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. **Science** 268: 675-680.
- RAGHOTHAMA, K.G.; MIZRAHI, Y. and POOVAIAH, B.W. (1985) - Effect of calmodulin antagonists on auxin-induced elongation. **Plant Physiol.** 79: 28-33.
- RANJEVA, R. and BOUDET, A.M. (1987) - Phosphorylation of proteins in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol.** 38: 73-93.
- RANJEVA, R.; CARRASCO, A. and BOUDET, A.M. (1988) - Inositol trisphosphate stimulates the release of calcium from intact vacuoles of *Acer* cells. **FEBS Lett.** 230: 137-141.
- RASI-CALDOGNO, F.; PUGLIARELLO, M.C. and DE MICHELIS, M.I. (1987) - The Ca^{2+} -transport ATPase of plant plasma membrane catalyses an nH/Ca^{2+} exchange. **Plant Physiol.** 83: 994-1.000.
- RASI-CALDOGNO, F.; PUGLIARELLO, M.C.; OLIVARI, C. and DE MICHELIS, M.I. (1989) - Identification and characterization of the Ca^{2+} -ATPase which drives active transport of Ca^{2+} at the plasma membrane of radish seedlings. **Plant Physiol.** 90: 1429-1434.
- RASMUSSEN, H. (1989) - The cycling of calcium as an intracellular messenger. **Scient. Amer.** 261(4): 66-73.
- RATHORE, K.S.; CORK, R.J. and ROBINSON, K.R. (1991) - A cytoplasmic gradient of Ca^{2+} is correlated with the growth of lily pollen tubes. **Develop. Biol.** 148: 612-619.
- REID, R.J. and TESTER, M. (1992) - Measurements of Ca^{2+} fluxes in intact plant cells. **Phil. Trans. R. Soc Lond. B.** 338: 73-82.
- RINCON, M. and BOSS, W.F. (1987) - Myo-inositol trisphosphate mobilizes calcium from fusogenic carrot (*Daucus carota* L.) protoplasts. **Plant**

Physiol. 83: 395-398.

- ROSS, C.A.; MELDOLESI, J.; MILNER, T.A.; SATOH, T.; SUPATTONE, S. and SNYDER, S.H. (1989) - Inositol 1,4,5-triphosphate receptor localized to endoplasmic reticulum in cerebellar Purkinje neurons. **Nature** 339: 468-470.
- RUSS, U.; GROLIG, F. and WAGNER, G. (1991) - Changes of cytoplasmic free Ca^{2+} in the green alga *mougeotia scalaris* as monitored with indo-1, and their effect on the velocity of chloroplast movements. **Planta** 184: 105-112.
- SCARPA, A. (1979) - Measurements of cation transport with metallochromic indicators. **Meth. Enzimol.** 56: 301-338.
- SCHMIDT, W.E. and EBEL, J. (1987) - Specific binding of a fungal glucan phytoalexin elicitor to membrane fractions from soybean *Glycine max*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 84: 4117-4121.
- SCHROEDER, J.I. (1992) - Plasma membrane ion channel regulation during abscisic acid-induced closing of stomata. **Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B** 338: 83-89.
- SCHROEDER, J.I. and HAGIWARA, S. (1990) - Repetitive increases in cytosolic Ca^{2+} of guard cells by abscisic acid activation of nonselective Ca^{2+} -permeable channels. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 87: 9305-9309.
- SCHROEDER, J.I. and THULEAU, P. (1991) - Ca^{2+} channels in higher plant cells. **Plant Cell** 3: 555-559.
- SCHUMAKER, K.S. and SZE, H. (1987) - Inositol-1,4,5-triphosphate releases Ca^{2+} from vacuolar membrane vesicles of oat roots. **J. Biol. Chem.** 262: 3944-3946.
- SCHUMAKER, K.S. and SZE, H. (1990) - Solubilization and reconstitution of the oat root vacuolar H/Ca^{2+} exchanger. **Plant Physiol.** 92: 340-345.

- SCHWARZEMBACK, H.; SENN, H. and ANDEREG, G. (1957) - Komplexe
XXIX. Ein grosser chelateffekt besonderer art. **Helv. Chim. Acta** 40: 1886-1900.
- SERRANO, E.E.; ZEIGER, E. and HAGIWARA, S. (1988) - Red light stimulates an electrogenic proton pump in *Vicia faba* L. guard cell protoplasts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 85: 436-440.
- SHARMA, S.; SHARMA, S. and RAI, V.K. (1992) - The effect of EGTA, calcium channel blockers (lanthanum chloride and nifedipine) and their interaction with abscisic acid on seed germination of *Brassica juncea* cv. RLM 198. **Ann. Bot.** 70: 295-299.
- SHIINA, T. and TAZAWA, M. (1987) - Demonstration and characterization of a Ca^{2+} channel in tonoplast-free cells of *Nilelloopsis obtusa*. **J. Memb. Biol.** 96(3): 263-276.
- SHORT, T.T.W. and BRIGGS, W.R. (1994) - The transduction of blue light signals in higher plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 45: 143-171.
- SIBLEY, D.R. and LEFKOWITZ (1985) - Molecular mechanisms of receptor desensitization using the β -adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase system as a model. **Nature** 317: 124-129.
- SIEWERT, A.C.C. and MARTINS, I.S. (1996) - Effect of spermine on oxidative phosphorylation and Ca^{2+} transport by isolated *Citrus* mitochondria. **Res. XXV Reunião Anual da SBBq** E-28, pg. 34.
- SMITH, H. (1995) - Physiological and ecological function within the phytochrome family. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 46: 489-515.
- STERNWEIS, P.C. and SMRCKA, A.V. (1992) - Regulation of phospholipase C by G proteins. **Trends Biol. Sci.** 17:502-506.

- STONE, J.M. and WALKER, J.C. (1995) - Plant protein kinase families and signal transduction. **Plant Physiol.** 108: 451-457.
- SUN, D.; LI, H.; and CHENG, G. (1994) – Extracellular calmodulin accelerates the proliferation of suspension-cultured cells of *Angelica dahurica*. **Plant Sci.** 99: 1-8.
- SUPATTAPONE, S.; WORLEY, P.F.; BARABANN, J.M. and SNYDER, S.H. (1988) - Solubilization, purification, and characterization of an inositol trisphosphate receptor. **J. Biol. Chem.** 263: 1530-1534.
- TAKAGI, S. and NAGAI, R. (1988) - Light-effected Ca^{2+} fluxes in protoplasts from *Vallisneria mesophyll* cells. **Plant Physiol.** 88: 228-232.
- TAKAGI, S. and NAGAI, R. (1992) - Several aspects of current research into the role of calcium in plant physiology. **Bot. Mag. Tokio** 105: 687-697.
- TAKAHASHI, K.; ISOBE, M.; KNIGHT, M.R.; TREWAVAS, A.J. and MUTO, S. (1997) - Hypoosmotic shock induces increases in cytosolic Ca^{2+} in tobacco suspension-culture cells. **Plant Physiol.** 113: 587-594.
- TAYLOR, C.W. and MARSHALL, I.C.B. (1992) - Calcium and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: a complex relationship. **Trends Biochem. Sci.** 17: 403-407.
- TERRY, B.R.; FINDLAY, G.P. and TYERMAN, S.D. (1992) - Direct effects of Ca^{2+} -channel blockers on plasma membrane cation channels of *Amaranthus tricolor* protoplasts. **J. Exp. Bot.** 43, 1457-1473.
- TESTER, M. and MAC-ROBBIE, E.A.C. (1990) - Cytoplasmic calcium effects the gating of potassium channels in the plasma membrane of *Chara corallina*: a whole-cell study using calcium-channel effectors. **Planta** 180: 569-581.
- TEZUKA, T.; HIRATSUKA, S. and TAKAHASHI, S.Y. (1993) - Promotion of the growth of self-incompatible pollen tubes in *Lyli* by cAMP. **Plant Cell**

Physiol. 34(6): 955-958.

- THOMINE, S.; ZIMMERMANN, S.; VAN DUIJN, B.; BARGIER-BRYGOO, H. and GHERN, J. (1994) - Calcium channel antagonists induce direct inhibition of the outward rectifying potassium channel in tobacco protoplasts. **FEBS Lett.** 340: 45-50.
- THULEAU, P.; GRAZIANA, A.; RANJEVA, R. and SCHROEDER, J.L. (1993) - Solubilized proteins from carrot (*Daucus carota* L.) membranes bind calcium channel blockers and form calcium-permeable ion channels. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90: 765-769.
- THULEAU, P.; MOREAU, M.; SCHROEDER, J.I. and RANJEVA, R. (1994a) - Recruitment of plasma membrane calcium-permeable channels in carrot cells. **EMBO J.** 13: 5843-5847.
- THULEAU, P.; WARD, J.M.; RANJEVA, R. and SCHROEDER, J.I. (1994b) - Voltage-dependent calcium-permeable channels in the plasma membrane of a higher plant cell. **EMBO J.** 13: 2970-2975.
- TREWAVAS, A.J. and GILROY, S (1991) - Signal transduction in plant cells. **Trends Genet.** 7: 356-361.
- TREWAVAS, A.J. and KNIGHT, M.R. (1994) - Mechanical signalling, calcium and plant form. **Plant Molec. Biol.** 26: 1329-1341.
- TREWAVAS, A.J. and MALHÓ, R. (1997) - Signal perception and transduction: The origin of the phenotype. **Plant Cell** 9: 11811-1195.
- TRIVEDI, S. and ERDEI, L. (1992) - Effects of cadmium and lead on the accumulation of Ca^{2+} and K^+ and on the influx and translocation of K^+ in wheat of low and high K^+ status. **Plant Physiol.** 84: 94-100.
- TSIEN, R.W. and TSIEN, R.Y. (1990) - Calcium channels, stores, and oscillations. **Annu. Rev. Cell Biol.** 6: 715-760.

- TSIEN, R.Y. (1981) - A nondisruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. **Nature** 290: 527-528.
- TSIEN, R.Y. and POENIE, M. (1986) - Fluorescence ratio imaging: a new window on intracellular ion signalling. **Trends Biol. Sci.** 11: 450-455.
- TSIEN, R.Y.; POZZAN, T. and RINK, T.J. (1982) - T-cell mitogens causes early changes in cytoplasmic free Ca^{2+} and potential in lymphocytes. **Nature** 295: 68-70.
- TU, S.-I.; PATERSON, D.; SHEN, S.; BRAUER, D. and HSU, A.-F. (1996) - NADH-linked electron transfer induces Cd^{2+} movement in corn root plasma membrane vesicles. **Plant Cell Physiol.** 37(2): 141-146.
- VALLIÈRES, J.; SCARPA, A. and SOMLYO, A.P. (1975) - Subcellular fractions of smooth muscle. Isolation, substrate utilization and Ca^{++} transport by main pulmonary artery and mesenteric vein mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.** 170:659-669.
- VAN DER MEULEN, R.M.; VISSER, K. and WANG, M. (1996) - Effects of modulation of calcium levels and calcium fluxes on ABA-induced gene expression in barley aleurone. **Plant Sci.** 117: 75-82.
- VITORELLO, J.A. and HAUG, A. (1996) - Growing tobacco cells respond to rapid medium changes with a transient increase in localized Ca^{2+} entry. **Plant Cell Rep.** 16: 63-66.
- VON ARMIN, A. and DENG, X-W. (1996) - Light control of seedling development. **Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.** 47: 215-243.
- WARD, J.M.; PEI, ZHEN-MING and SCHROEDER, J.I. (1995) - Roles of ion channels in initiation of signal transduction in higher plants. **Plant Cell** 7: 833-844.
- WEISSMAN, G.; COLLINS, T.; EVERS, A. and DUNHAM (1976) - Membrane

- perturbation: Studies employing a calcium-sensitive dye arsenazo III, in liposomes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 73: 510-514.
- WIESNER, T.F.; BERK, B.C. and NEREM, R.M. (1996) - A mathematical model of cytosolic calcium dynamics in human umbilical vein endothelial cells. **Am. Physiol. Soc.** C1556-C1569.
- WILKINSON, R.E. and DUNCAN R.R. (1992) - Verapamil influence on calcium and aluminum absorption by roots of three sorghum cultivars. **J. Plant Nutr.** 15(1): 15-21.
- WILKINSON, R.E. and DUNCAN, R.R. (1993a) - Calcium ($^{45}\text{Ca}^{2+}$) absorption by sorghum seedling roots after exposure to PCMBs and three cation channel blockers. **J. Plant Nutr.** 16(10): 1983-1990.
- WILKINSON, R.E. and DUNCAN, R.R. (1993b) - Calcium ($^{45}\text{Ca}^{2+}$) absorption by sorghum seedling root tips in the presence of ruthenium red and verapamil. **J. Plant Nutr.** 16(10): 1969-1973.
- WILKINSON, R.E.; DUNCAN, R.R.; BERRY, C. and DERAM, I. (1992) - Nifedipine influence on calcium and aluminum absorption in roots of three sorghum cultivars. **J. Plant Nutr.** 15(2): 191-198.
- WILLIAMS, L.E.; SCHUELER, S.B. and BRISKIN, D.P. (1990) - Further characterization of the red beet plasma membrane Ca^{2+} -ATPase using GTP as an alternative substrate. **Plant Physiol.** 92: 747-754.
- WILLIAMSON, R. and ASHLEY, C.C. (1982) - Free Ca^{2+} and cytoplasmic streaming in the alga *Chara*. **Nature** 296: 647-651.
- WILSON, I.; VOGEL, J. and SOMERVILLE, S. (1997) - Signalling pathways: A common theme in plants and animals. **Curr. Biol.** 7: 175-178.
- WU, Y.; KUZMA, J.; MARÉCHAL, E.; GRAEFF, R.; LEE, H.C.; FOSTER, R. and CHUA, N.-H. (1997) - Absciscic acid signaling through cyclic ADP-ribose in

plants. **Science** 278: 2126-2130.

YAMAGUCHI, T.; WATANABE, S. and KIMOTO, E. (1985) - ESR spectral changes induced by chlorpromazine in spin-labeled erythrocyte ghost membranes. **Biochim. Biophys. Acta** 820: 157-164.

YANG, T.; SEGAL, G.; ABBO, S.; FELDMAN, M. and FROMM, H. (1996) - Characterization of the calmodulin gene family in wheat. **Mol. Gen. Genet.** 252: 684-694.

ZIMMERMANN, S.; NÜRNBERGER, T.; FRACHISSE, J-M.; WIRTZ, W.; GUERN, J.; NEDRICH, R. and SCHEEL, D. (1997) - Receptor-mediated activation of a plant Ca^{2+} -permeable ion channel involved in pathogen defense. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94: 2751-2755.