

GABA对烟草花粉管Ca²⁺和K⁺的动态调节表明 离子通道参与了花粉管生长的调控

赵 丽¹ 赵志龙² 龚汉雨¹ 覃永华¹ 余光辉^{1*}

(¹中南民族大学生命科学院, 武汉 430074;

²中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032)

摘要 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)对烟草花粉管生长具有重要的调节作用, 但其分子机制还远未得到阐明。该研究运用非损伤微测技术对花粉管顶端的Ca²⁺、K⁺流动模式进行探讨。结果表明, GABA可以特异性地触发Ca²⁺内流和K⁺外流。离子通道特异性阻断剂实验表明, GABA是通过激活渗透性的Ca²⁺通道而引起Ca²⁺内流, 且这种调节模式不同于谷氨酸(Glu)引起的Ca²⁺流动模式。GABA可能是通过GABA-B受体来调节烟草花粉管的Ca²⁺、K⁺通道, 导致顶端Ca²⁺内流、K⁺外流, 从而调节花粉管的极性生长。

关键词 烟草; 花粉管; γ -氨基丁酸; 离子通道; 非损伤微测技术

In vivo Dynamic Ca²⁺ and K⁺ Oscillation Responding to GABA Reveals Ion Channels Participating in Tobacco Pollen Tube Growth Regulation

Zhao Li¹, Zhao Zhilong², Gong Hanyu¹, Qin Yonghua¹, Yu Guanghui^{1*}

(¹College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China; ²Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract γ -aminobutyric acid (GABA) plays an important role in pollen tube growth, however, the molecular mechanism underlying is far from being clarified. Here, we present evidences to show that GABA could regulate the flux direction of Ca²⁺, K⁺ using Non-invasive Micro-test Technique. The results indicate that GABA could specially facilitate Ca²⁺ influx and trigger K⁺ outflux across the membrane on the tip of tobacco pollen tubes. The experiment applying specific inhibitor of permeable Ca²⁺ channel shows that this Ca²⁺ currency is specially induced by the activation of permeable Ca²⁺ channel. This Ca²⁺ oscillation pattern is very different from the pattern caused by Glutamate. Our results imply that GABA may regulate Ca²⁺ channels and K⁺ channels via the activation of putative GABA-B type receptor on tobacco pollen tube cell membrane, and lead to Ca²⁺ influx and K⁺ outflux to modulate tobacco pollen tube polar growth and morphogenesis.

Key words *Nicotiana tabacum*; pollen tube; GABA; ion channels; Non-invasive Micro-test Technique

收稿日期: 2013-01-20 接受日期: 2013-03-29

国家自然科学基金(批准号: 30700427、31270361)、湖北省自然科学基金杰出青年基金(批准号: 2010CDA099)、中国国家留学基金委优秀青年人才项目和中南民族大学植物发育遗传学术团队资助的课题

*通讯作者。Tel: 027-67842689, E-mail: yusheen@163.com

Received: January 20, 2013 Accepted: March 29, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30700427, 31270361), Outstanding Young Talent Fund from Key Projects in Hubei Province Natural Science Foundation (Grant No.2010CDA099), China Scholarship Council Project for Young Outstanding Talents, and the Academic Innovation Team for Plant Development and Genetics in South-Central University for Nationalities

*Corresponding author. Tel: +86-27-67842689, E-mail: yusheen@163.com

网络出版时间: 2013-04-27 13:15

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130427.1315.001.html>

花粉管的极性生长对高等植物生殖发育的成起着至关重要的作用^[1]。从花粉落在柱头上开始,经过黏附、识别、水合、萌发,花粉管在花柱内生长,直至到达子房发生双受精作用,整个过程发生在雌、雄两性细胞和组织之间,受到严格的信号调控。多种信号分子及基因产物参与了这一精细和复杂的调控过程^[2-3]。10年前,Palanivelu等^[4]在筛选拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)花粉管生长方向异常的突变体时发现,参与 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)代谢(通过POP2或叫作 γ -氨基丁酸转氨酶GABA-T催化)基因的突变造成了从雌蕊柱头到子房胚轴的梯度破坏,从而引起了花粉管生长的方向性紊乱。从那时起,研究者试图阐明GABA在花粉管生长调节中的分子机制^[5-6]。但受限于人们对植物中的GABA受体的一无所知,在拟南芥基因组序列文库中也无法找到与动物中GABA受体相似的基因序列,使得这一研究进展较为缓慢。研究者用量子点荧光成像新技术检测到,在烟草花粉管原生质体、拟南芥叶肉细胞内含有GABA的结合蛋白^[7],但这一蛋白的受体属性还远未阐明。花粉管的离体培养技术较为成熟,是研究信号转导的理想实验体系^[8]。前期的研究证实了GABA可以调节花粉原生质体中Ca²⁺的振荡变化^[7],但GABA如何调控生长的花粉管中Ca²⁺的振荡模式还未可知。Ca²⁺是快速生长的花粉管中的重要调节信使^[9]。准确分析和测量细胞内钙离子浓度的瞬时动态变化是研究的重要手段。有关细胞内Ca²⁺的测定技术主要有电极法、同位素示踪法、核磁共振法以及钙离子荧光探针为中介的合成指示剂法(包括单波长激发指示剂、双波长发射指示剂、发光蛋白指示剂法)^[10]。其中,离子选择性微电极作为一种快速、方便的方法已得到广泛采用。用微电极研究花粉管中Ca²⁺变化的研究最早可追溯到1990年Kühtreiber等^[11]的报道。Kühtreiber等^[11]用自制的微电极检测到了百合花花粉管生长过程中顶端的Ca²⁺的动态振荡变化。经过二十几年的发展,这种非损伤的离子测定技术日益成熟,得到改进和设备化的仪器灵敏度更高、可以测定多种离子的动态变化,在生物学研究中发挥着越来越重要的作用。本文用非损伤测微技术(Non-invasive Micro-test Technique)对烟草花粉管顶端的Ca²⁺、K⁺的流向进行了动态的观察和追踪,阐明了GABA信号对离子流向的调节可能与其对离子通道的激活和调控有关。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 烟草花粉 烟草花粉为*Nicotiana tabacum* SR1的新鲜花粉。

1.1.2 花粉萌发培养液和测试校正液 花粉萌发培养液配方为50 $\mu\text{mol/L}$ CaCl₂、100 $\mu\text{mol/L}$ KCl、1.6 mmol/L H₃BO₄、50 $\mu\text{mol/L}$ MES和1%蔗糖(pH5.8)。Ca²⁺测定的校正液如下:低浓度校正液,10 $\mu\text{mol/L}$ CaCl₂(100 $\mu\text{mol/L}$ KCl、1.6 mmol/L H₃BO₄、50 $\mu\text{mol/L}$ MES、1%蔗糖, pH5.8);高浓度校正液,100 $\mu\text{mol/L}$ CaCl₂(100 $\mu\text{mol/L}$ KCl、1.6 mmol/L H₃BO₄、50 $\mu\text{mol/L}$ MES、1%蔗糖, pH5.8)。K⁺测定的校正液如下:低浓度校正液,50 $\mu\text{mol/L}$ KCl(50 $\mu\text{mol/L}$ CaCl₂、1.6 mmol/L H₃BO₄、50 $\mu\text{mol/L}$ MES、1%蔗糖, pH5.8);高浓度校正液,500 $\mu\text{mol/L}$ KCl(50 $\mu\text{mol/L}$ CaCl₂、1.6 mmol/L H₃BO₄、50 $\mu\text{mol/L}$ MES、1%蔗糖, pH5.8)。

1.1.3 烟草花粉体外培养 取盛花期的烟草花,用镊子轻轻夹取雄蕊花药置于1.5 mL eppendorf离心管中。实验前盖上盖子用手振荡离心管,使花粉从花药中散落出来,然后在细胞培养皿中加入2 mL已灭菌的花粉培养液,用牙签挑取少许花粉置于培养液中,摇匀然后置于28 °C的恒温箱中培养3 h。用显微镜观察花粉的萌发状况,用于后续测试。

1.2 方法

1.2.1 仪器 测试仪器和系统为NMT system BIO-IM(Younger USA, LTC)。

1.2.2 花粉管的固定 在无菌的细胞培养皿底部滴一滴校正液,然后将多聚赖氨酸处理过的盖玻片放在校正液上,压紧,防止有气泡产生。然后滴一滴花粉培养液(含有生长3 h的花粉管),静止3 min以使花粉管黏附在盖玻片上,便于寻找合适的花粉管进行后续操作。然后在培养皿中加入3 mL花粉培养液,准备测定。

1.2.3 用Ca²⁺选择性电极检测不同药品对烟草花粉管顶端Ca²⁺流动性的影响 实验用到的药剂组合有以下几组:1.0 mmol/L GABA+10 mmol/L GABA+25 mmol/L GABA; 1.0 mmol/L GABA+1.0 $\mu\text{mol/L}$ Ga³⁺; 50 $\mu\text{mol/L}$ 3-巯基丙醇(3-MPA)+1.0 mmol/L GABA; 1.0 mmol/L TFP+50 $\mu\text{mol/L}$ EGTA+1.0 mmol/L GABA; 1.0 mmol/L GABA+86 $\mu\text{mol/L}$ CNQX; 1.0 mmol/L Glu+86 $\mu\text{mol/L}$ CNQX。

1.2.4 用K⁺选择性电极检测不同药品对烟草花粉管顶端K⁺流动性的影响 药剂组合有以下几组: 1.0 mmol/L GABA+86 μmol/L CNQX; 1.0 mmol/L Glu+86 μmol/L CNQX。

1.2.5 数据处理 从原始数据中找到Nernst斜率和截距, 再从原始数据中找到origin作为V₀, origin-X作为dv, 新建Excel表格, 复制V₀和dv到Excel中, 共两列数据, 保存为.csv格式文件。然后登陆MAGEFLUX在线软件上传数据, 在线处理后导出所测离子的流速, 然后作图。

2 结果

2.1 GABA对烟草花粉管顶端Ca²⁺流动的影响

2.1.1 离子测定的原理 在离子测定体系中, 选取长度约300 μm的花粉管作为测定对象。电极尖端放置在离花粉管顶端10 μm处(图1A)。Ca²⁺选择性微电极通过前端灌注液态离子交换剂(liquid ion exchanger, LIX)实现Ca²⁺的选择性测定(图1B)。其它离子的选择性电极应选择相应的离子交换剂。微电极通过机械装置自动控制, 分别测定已知距离dx的两点电压V₁和V₂。根据该微电极的电压/浓度校正曲线(基于Nernst方程)计算两点间的离子浓度差dc, 然后根据Fick's第一扩散定律公式 $J = -D \cdot dc/dx$ [D是离子的扩散常数(cm²/s)], 计算该离子的流动速率(pmol/cm²·s), 即: 每秒钟通过每平方厘米的该离子的分子摩尔数(皮摩尔级)。根据这一原理, 可以动态监测γ-氨基丁酸(GABA)信号分子对花粉管生长过程中的离子调节规律, 进而推断信号响应的分子机制。

2.1.2 1.0 mmol/L的GABA对烟草花粉管顶端Ca²⁺内流的影响最大 高效液相色谱(HPLC)实验结果证明, 烟草雌蕊组织中从雌蕊柱头到子房区段存在GABA的梯度分布(表1), 经计算雌蕊组织中GABA的浓度介于0.8~4.2 mmol/L之间。

离体花粉管的培养实验表明, 1.0 mmol/L GABA能显著促进花粉管的生长。为理解这一机制, 在离子测试体系中首先验证GABA的浓度效应, 观察烟草花粉管顶端Ca²⁺流动性的变化规律。结果表明, 不同浓度的GABA对Ca²⁺内流速度的效应不同(图2)。其中1.0 mmol/L的GABA能够明显促进Ca²⁺内流, 而10 mmol/L和25 mmol/L的GABA处理后, Ca²⁺开始呈现内流趋势, 然后逐渐变为外流。所以后续的实验选择1.0 mmol/L GABA这一浓度来处理烟草花粉管。

2.1.3 GABA通过花粉管质膜上渗透性的Ca²⁺通道调节Ca²⁺的内流 Ca²⁺内流通常与质膜上Ca²⁺通道

表1 烟草雌蕊柱头各区段的GABA含量(HPLC分析)

Table 1 GABA content in different sections of tobacco pistils (by HPLC)

烟草雌蕊柱头各部 Tobacco pistil section	GABA含量(μmol/g FW*) GABA content(μmol/g FW*)
Stigma section	0.76±0.03
Upper style	1.97±0.12
Bottom style	2.76±0.21
Ovary section	4.17±0.33

3次实验重复(平均值±标准误)。*FW: 材料鲜重。

Data from three independent replications(means±SD). *FW: fresh weight of plant materials.

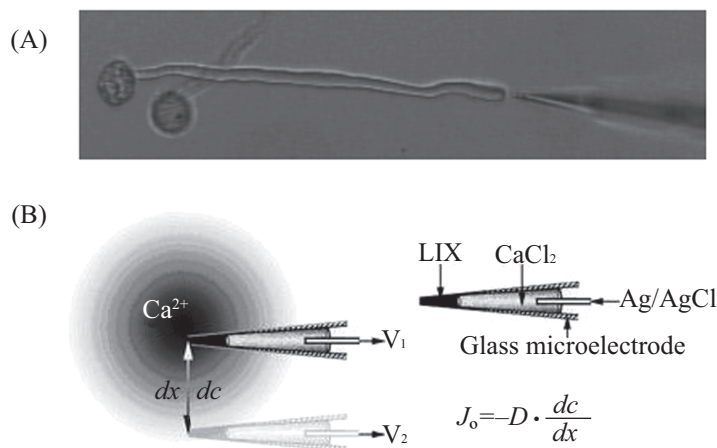
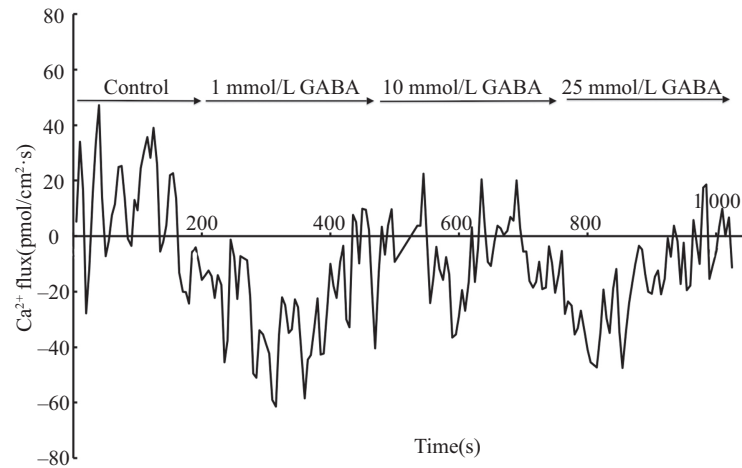


图1 烟草花粉管顶端离子检测电极的位置及离子测定原理

Fig.1 Schematic presentation depicts electrode position away tobacco pollen tubes and ion detection principle

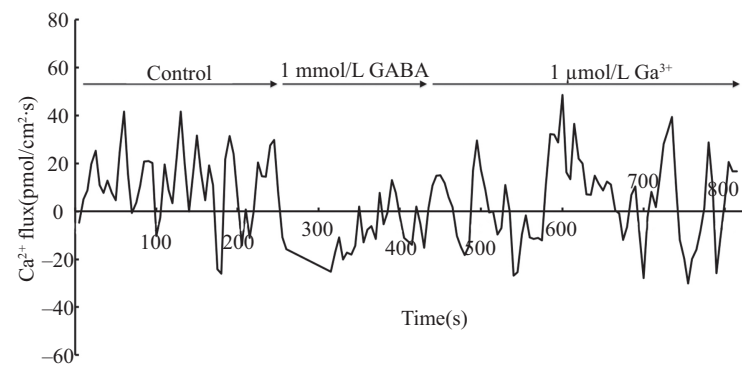


箭头线表示时间进程中试剂添加的顺序(线型图是3次实验数据的拟合), 对照(control)为只有花粉萌发培养液的处理。

Arrow lines indicate the reagents addition sequence within the time course(line chart is drawn by fitting method from 3 independent experiments data via regression assay), control is the treatment with only the pollen tube germination medium.

图2 不同浓度的GABA对烟草花粉管顶端Ca²⁺流动的影响

Fig.2 Influence of different concentrations of GABA on Ca²⁺ flux in the tip of tobacco pollen tubes



箭头线表示时间进程中试剂添加的顺序(线型图是3次实验数据的拟合), 对照(control)为只有花粉萌发培养液的处理。

Arrow lines indicate the reagents addition sequence within the time course(line chart is drawn by fitting method from 3 independent experiments data via regression assay), control is the treatment with only the pollen tube germination medium.

图3 GABA和Ga³⁺处理对烟草花粉管顶端Ca²⁺流动的影响

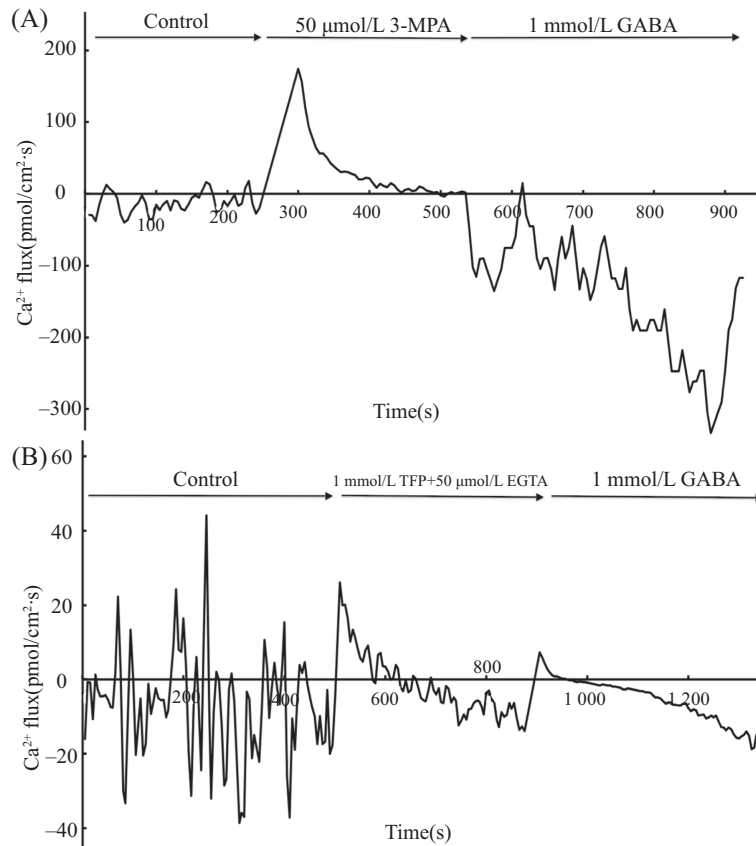
Fig.3 Influence of GABA and Ga³⁺ on Ca²⁺ flux in the tip of tobacco pollen tubes

的激活有关^[12]。为验证GABA引起的Ca²⁺内流是否和Ca²⁺通道的激活有关, 在GABA处理花粉管后, 添加了通透性Ca²⁺通道的阻断剂Ga³⁺。实验结果表明, 用Ga³⁺处理后, Ca²⁺内流趋势减弱, Ca²⁺外流趋势增强(图3)。这一结果证实GABA是通过激活渗透性的Ca²⁺通道来调节烟草花粉管顶端的Ca²⁺流动的。

2.1.4 外源性的GABA能够弥补内源性GABA缺失对花粉管顶端Ca²⁺流动产生的影响 为验证外源性GABA能否弥补内源性GABA缺失对花粉管顶端Ca²⁺流动的影响, 运用内源性GABA合成的阻断剂进行如下药剂实验: 3-MPA能够抑制内源性的GABA合成^[13], EGTA和TFP通过抑制CaM的活性从而抑制

谷氨酸脱羧酶(GAD, GABA合成的关键酶, 其活性受到CaM的调节)的活性, 从而抑制GABA的合成。内源性GABA合成抑制后, 不论是直接抑制(图4A)还是间接抑制(图4B), Ca²⁺的流向明显呈现外流趋势。这一结果表明, GABA正常的功能代谢对于烟草花粉管顶端Ca²⁺内流起着重要作用。然而, 在实验体系中加入外源性的GABA后, Ca²⁺又呈现明显的内流现象(图4)。这一结果显示, 外源性的GABA能够弥补内源性的缺失, 从而引起Ca²⁺内流。

2.1.5 GABA通过花粉管质膜上的GABA受体调节Ca²⁺通道从而引起Ca²⁺内流 有研究表明, 花粉管上存在谷氨酸(Glu)受体, Glu能够通过激活该受体



A: 直接抑制内源性GABA合成; B: 间接抑制内源性GABA合成。箭头线表示时间进程中试剂添加的顺序(线型图是3次实验数据的拟合), 对照(control)为只有花粉萌发培养液的处理。

Direct inhibition(A) and indirect inhibition(B) of endogenous GABA synthesis. Arrow lines indicate the reagents addition sequence within the time course(line chart is drawn by fitting method from 3 independent experiments data via regression assay), control is the treatment with only the pollen tube germination medium.

图4 阻断内源GABA合成和加入外源GABA对烟草花粉管顶端Ca²⁺流动的影响

Fig.4 Influence of inhibiting synthesis of endogenous GABA and exogenous GABA addition on Ca²⁺ flux in the tip of tobacco pollen tubes

来激活Ca²⁺通道, 从而使Ca²⁺内流^[14]。植物细胞内GABA合成的前体为Glu^[15], 因此, 有必要比较二者引起的Ca²⁺内流和Ca²⁺通道的激活是否具有相同的模式, 进而推断这两种信号是否通过激活相同的受体起作用。

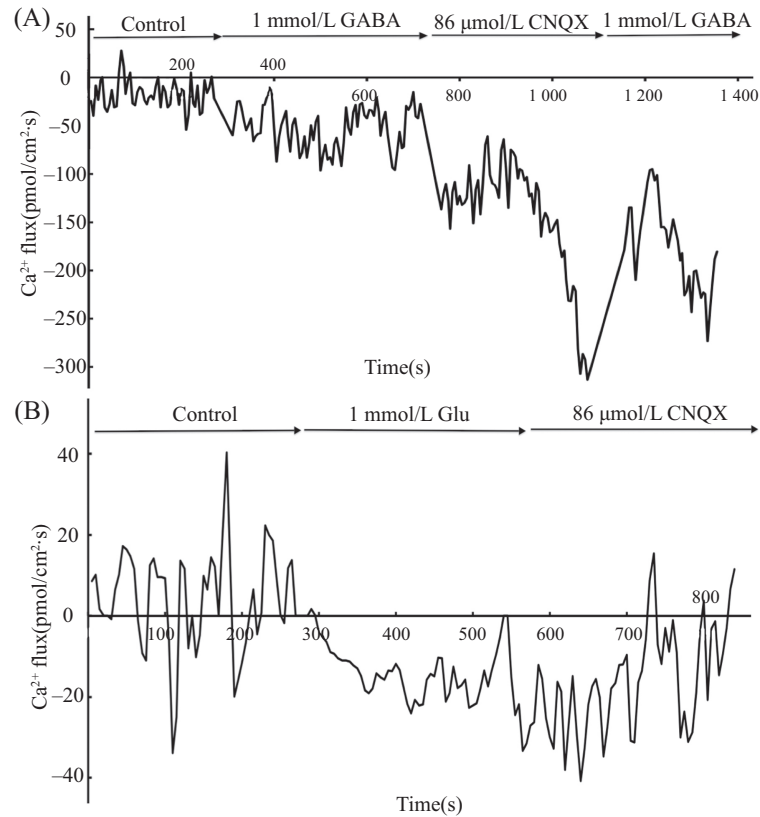
实验结果表明, 在实验体系中分别加入GABA、Glu后都不同程度地引起Ca²⁺内流(图5)。与Glu相比, GABA引起的Ca²⁺内流更为明显, 且在测试体系中添加CNQX(Glu受体特异性的拮抗剂)后, Ca²⁺内流增大(图5A); 测试体系中添加CNQX后, Glu引起的Ca²⁺内流有不同程度的降低(图5B)。这一结果表明, Glu引起的Ca²⁺内流与其对Glu受体的激活有关, 而GABA引起的Ca²⁺内流和Glu受体的激活无关。这一结果说明在烟草花粉管中, GABA对Ca²⁺通道的调节模式与Glu不同, GABA激活的受体不是Glu受体, 而

是一种GABA受体。因此, 我们推测烟草花粉管上存在GABA特异性的受体, 且GABA受体对Ca²⁺通道的调节作用比Glu受体更明显。

2.2 GABA对烟草花粉管顶端K⁺流动的影响

2.2.1 不同浓度的GABA对烟草花粉管顶端K⁺流动性的影响差别不大 动物系统研究表明, GABA信号对代谢型GABA受体的激活与其对K⁺通道的激活有关^[12,16]。为探讨这种可能性, 我们用非损伤测微技术检测了花粉管顶端K⁺流动的动态变化。实验结果显示, GABA处理后K⁺内流大大减弱, 这表明GABA可以促进K⁺外流(图6)。较高浓度的GABA(10 mmol/L和25 mmol/L)对K⁺流动性影响的变化不是很大, 因此, 后续的研究用1.0 mmol/L的GABA来处理烟草花粉管观察K⁺的流动变化。

2.2.2 GABA受体对烟草花粉管顶端K⁺流动性的

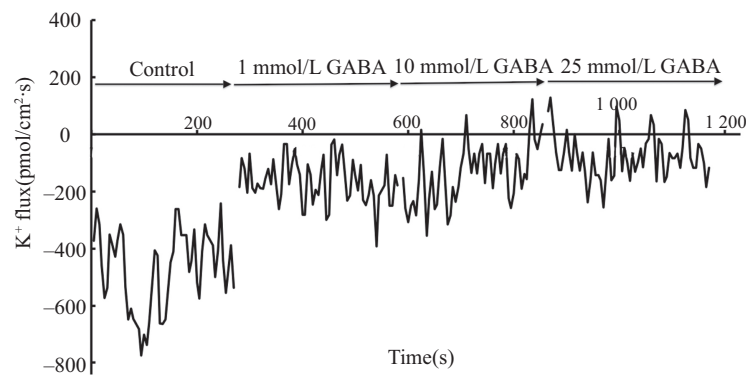


箭头线表示时间进程中试剂添加的顺序(线型图是3次实验数据的拟合), 对照(control)为只有花粉萌发培养液的处理。

Arrow lines indicate the reagents addition sequence within the time course(line chart is drawn by fitting method from 3 independent experiments data via regression assay), control is the treatment with only the pollen tube germination medium.

图5 用GABA(A)、Glu(B)处理后用CNQX处理对烟草花粉管顶端Ca²⁺流动的影响

Fig.5 Influence of CNQX after GABA(A), Glu(B) treatment on Ca²⁺ flux in the tip of tobacco pollen tubes



箭头线表示时间进程中试剂添加的顺序(线型图是3次实验数据的拟合), 对照(control)为只有花粉萌发培养液的处理。

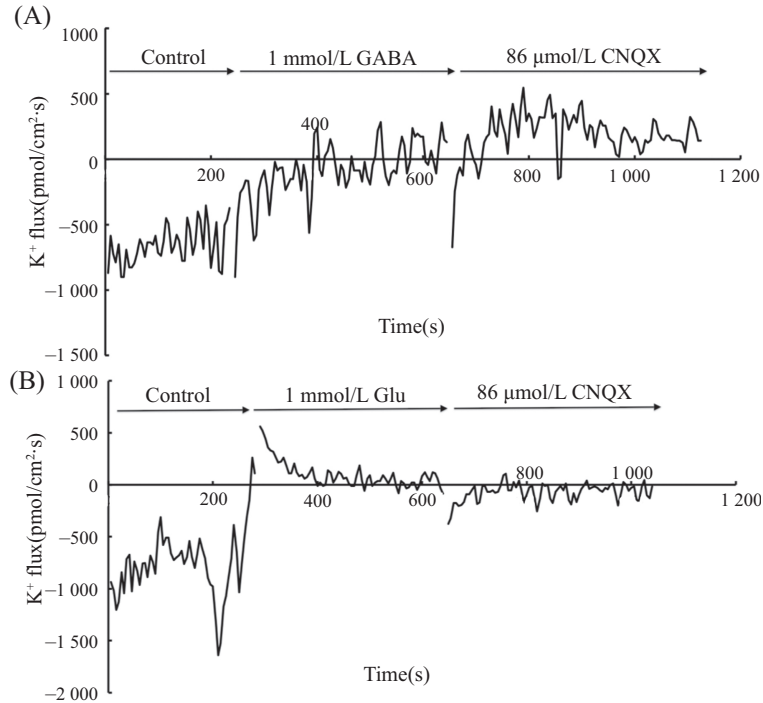
Arrow lines indicate the reagents addition sequence within the time course(line chart is drawn by fitting method from 3 independent experiments data via regression assay), control is the treatment with only the pollen tube germination medium.

图6 不同浓度的GABA对烟草花粉管顶端K⁺流动的影响

Fig.6 Influence of different concentration of GABA on K⁺ flux in the tip of tobacco pollen tubes

影响小于Glu受体。为阐明GABA引起的K⁺流动的模式是否与受体的激活有关, 我们进一步比较了该模式和Glu模式的差异。GABA处理后K⁺内流明显减弱(图7A); 而Glu处理后, K⁺明显呈现外流趋

势(图7B)。这表明Glu对K⁺流动性影响的效应大于GABA。加入Glu受体特异性的抑制剂CNQX后, 两种处理都引起了K⁺的内流, 但Glu的效应更为明显(图7); 这表明Glu受体对K⁺通道的调节比GABA受体



箭头线表示时间进程中试剂添加的顺序(线型图是3次实验数据的拟合),对照(control)为只有花粉萌发培养液的处理。

Arrow lines indicate the reagents addition sequence within the time course(line chart is drawn by fitting method from 3 independent experiments data via regression assay), control is the treatment with only the pollen tube germination medium.

图7 GABA(A)、Glu(B)处理后用CNQX处理对烟草花粉管顶端 K^+ 流动的影响

Fig.7 Influence of CNQX after GABA(A), Glu(B) treatment on K^+ flux in the tip of tobacco pollen tubes

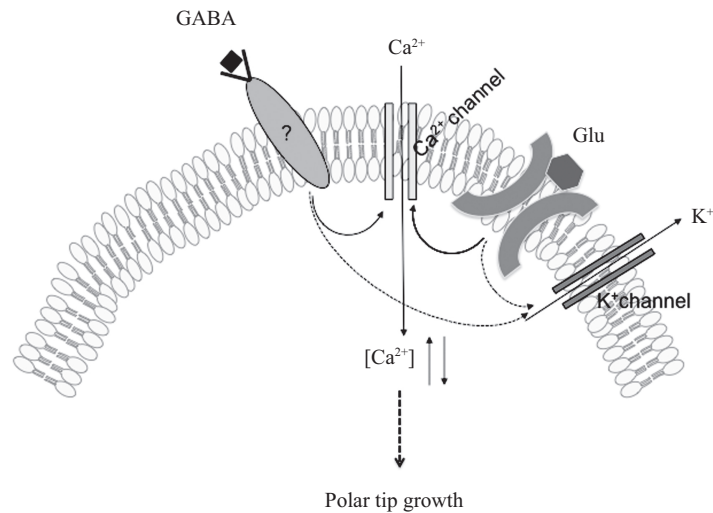


图8 GABA受体、Glu受体对 Ca^{2+} 通道和 K^+ 通道调控的模式图

Fig.8 Model pattern of regulation of GABA receptor and Glu receptor on Ca^{2+} channel and K^+ channel

更为明显,也进一步证明GABA受体系统独立于Glu系统对GABA信号起响应。

3 讨论

植物受精过程中花粉管的极性生长受到复杂的信号调控,我们的研究表明烟草花粉管上既存在

Glu受体也存在GABA受体。GABA受体和Glu受体都对 Ca^{2+} 和 K^+ 通道有明显的调控作用。GABA受体对 Ca^{2+} 通道的调控更显著,而Glu受体对 K^+ 通道的调控更为显著(图8)。动物体系的研究表明,GABA受体和谷氨酸受体在功能上相互抑制^[17]。在我们的烟草花粉管顶端测试体系中,加入谷氨酸受体的拮

抗剂CNQX后, GABA引起的Ca²⁺内流反而呈现内流增加的趋势, 一种可能的解释是, CNQX抑制谷氨酸受体后, 导致了Glu受体对GABA受体抑制的解除, 导致Ca²⁺内流增加。这说明GABA受体和Glu受体之间也存在相互抑制作用。而GABA受体根据其不同的药理学特征可分成3种类型: GABA-A受体、GABA-B受体、GABA-C受体。GABA-A受体和GABA-C受体都能形成配体门控Cl⁻通道, 而GABA-B受体属于G蛋白偶联受体家族, 通过G蛋白偶联受体调节Ca²⁺和K⁺通道^[18-20]。所以, 我们推测烟草花粉管上存在GABA-B型受体, GABA通过它来调节花粉管中Ca²⁺通道, 引起Ca²⁺浓度的变化, 从而调节花粉管的极性生长(图8)。

参考文献 (References)

- 1 Qin Y, Yang ZB. Rapid tip growth: Insights from pollen tubes. *Semin. Cell Dev Biol* 2011; 22: 816-24.
- 2 Konrad KR, Wudick MM, Feijó JA. Calcium regulation of tip growth: New genes for old mechanisms. *Curr Opin Plant Biol* 2011; 14(6): 721-30.
- 3 Steinhorst L, Kudla J. Calcium—a central regulator of pollen germination and tube growth. *Biochim Biophys Acta* 2012; pii: S0167-4889(12)00291-1.
- 4 Palanivelu R, Brass L, Edlund AF, Preuss D. Pollen tube growth and guidance is regulated by *POP2*, an *Arabidopsis* gene that controls GABA levels. *Cell* 2003; 114(1): 47-59.
- 5 Yu GH, Sun MX. Deciphering the possible mechanism of GABA in tobacco pollen tube growth and guidance. *Plant Signal Behav* 2007; 2: 393-5.
- 6 Yu GH, Chen Y. The language of GABA in pollen tube growth and guidance. *Front Biol China* 2008; 3(4): 439-42.
- 7 Yu GH, Liang JG, He ZK, Sun MX. Quantum dot-mediated detection of γ -aminobutyric acid binding sites on the surface of living pollen protoplasts in tobacco. *Chem Biol* 2006; 13: 723-31.
- 8 方华红, 马兆武, 李 芬, 余光辉. 分子细胞生物学报烟草花粉管生长信号转导研究中一种简单的RNA提取方法. *分子细胞生物学报*(Fang Huahong, Ma Zhaowu, Li Fen, Yu Guanghui. A simplified RNA extraction method to study signal transduction in tobacco pollen tube growth. *Journal of Molecular Cell Biology*) 2009; 42(2): 173-8.
- 9 Konrad KR, Wudick MM, Feijó JA. Calcium regulation of tip growth: New genes for old mechanisms. *Curr Opin Plant Biol* 2011; 14(6): 721-30.
- 10 Pierson ES, Miller DD, Callaham DA, van Aken J, Hackett G, Hepler PK. Tip-localized calcium entry fluctuates during pollen tube growth. *Dev Biol* 1996; 174(1): 160-73.
- 11 Kührtreiber WM, Jaffe LF. Detection of extracellular calcium gradients with a calcium-specific vibrating electrode. *J Cell Biol* 1990; 110(5): 1565-73.
- 12 Mintz IM, Bean BP. GABA receptor inhibition of P-type Ca²⁺ channels in central neurons. *Neuron* 1993; 10: 889-98.
- 13 Netopilova M, Drsata J, Haugvicova R, Kubova H, Mares P. Inhibition of glutamate decarboxylase activity by 3-mercaptopropionic acid has different time course in the immature and adult rat brains. *Neurosci Lett* 1997; 226: 68-70.
- 14 Michard E, Lima PT, Borges F, Silva AC, Portes MT, Carvalho JE, et al. Glutamate receptor-like genes form Ca²⁺ channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine. *Sci* 2011; 332(6028): 434-7.
- 15 Liu CL, Zhao Li, Yu GH. The dominant glutamic acid metabolic flux to produce γ -amino butyric acid over proline in *Nicotiana tabacum* leaves under water stress relates to its significant role of antioxidant activity. *J Integr Plant Biol* 2011; 53(8): 608-18.
- 16 Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, Gassmann M. Molecular structure and physiological functions of GABA receptors. *Physiol Rev* 2004; 84: 835-67.
- 17 顾颖慧, 刘 永, 纵艳艳, 张光毅, 侯筱宇. GABA受体对谷氨酸受体的调控机制研究. *山东大学学报*(Gu Yinhui, Liu Yong, Zong Yanyan, Zhang Guangyi, Hou Youyu. Research of regulation in GABA receptor on glutamic acid receptor. *Journal of Shandong University*) 2010; 48(12): 56-61.
- 18 Vacher CM, Bettler B. GABA receptors as potential therapeutic targets. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2003; 2(4): 248-59.
- 19 Le CH, Alix P, Hue B. Differential sensitivity of two insect GABA-gated chloride channels to dieldrin fipronil and picrotoxinin. *J Insect Physiol* 2002; 48(4): 419-31.
- 20 Cromer BA, Morton CJ, Parker MW. Anxiety over GABA(A) receptor structure relieved by AChBP. *Trends Biochem Sci* 2002; 27(6): 280-7.