

# 植物细胞 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的信号转导途径\*

程艳丽 宋纯鹏\*\*

(河南大学生命科学学院, 河南省植物逆境生物学重点实验室, 开封 475001)

**摘要** 光、环境胁迫和植物激素 ABA 可以引起植物体内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 升高, 而 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作为一个较早进化出来的信号分子, 不仅在诱导氧化性光合作用中起了关键的作用, 并且可以调节诸如气孔运动、超敏反应、细胞凋亡和基因表达等许多过程。细胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度必须维持在一种精细平衡状态, 它一方面可以通过质膜氧化还原系统和光呼吸系统产生, 另一方面也存在完善的清除机制。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 从质外体或者产生源进入细胞, 然后进入亚细胞区域。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可以调节信号转导蛋白, 如蛋白质磷酸化酶、转录因子、以及位于质膜或其它膜上的 Ca<sup>2+</sup>通道。其中, 蛋白质可逆磷酸化可启动细胞质和细胞核的下游信号转导, 通过影响转录因子而影响基因的表达; 转录因子通过氧化而激活自身或诱导其定向转运至细胞核内。然而, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作为信号分子的研究相对处于“年轻”阶段, 诸如细胞如何感受 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 以及在细胞感受 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 信号转导过程中哪种细胞过程是最主要的或是限速步骤, 何种基因对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 是特异和必需的等问题仍然所知甚少, 这些问题的破解依赖于功能基因组学和遗传学分析。

**关键词** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 信号转导 ABA 环境胁迫 基因表达 细胞凋亡

生命离不开氧, 它对于生命的生存和发展至关重要。研究生命如何感受氧化信号, 已成为生命科学的重大基本课题。光、环境胁迫(如干旱)和植物激素 ABA 可以引起植物体内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 升高, 这成为细胞连接外界环境刺激的重要枢纽之一。弄清植物对外界因子的反应机理, 不仅有利于阐明其基本的生物学特征, 而且对农业生产极为重要。氧化还原状态的改变作为一个古老的信息, 存在于细菌到高等动植物的细胞内<sup>[1]</sup>。目前, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作为信号分子作用引起了人们

的极大关注<sup>[2~4]</sup>。

## 1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 生命进化的衍生物或必要的分子?

通常认为早期的地球上大气是还原型的(富含 H<sub>2</sub>)或者是中性的(CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub>), 相反现在的大气处于高度氧化状态(20% O<sub>2</sub>)。这些氧的主要来源是光合作用。然而, 在生命进化过程中, 在无氧的条件下氧化性的光合作用如何进化出来, 或者是这种产生氧的能力是

2005-02-28 收稿, 2005-08-30 收修改稿

\* 国家重点基础研究发展规划(批准号: 2003CB114305)和国家自然科学基金(批准号: 30370765, 30440079&30530430)资助项目

\*\* 联系人, E-mail: [songcp@henu.edu.cn](mailto:songcp@henu.edu.cn)

如何演化的呢? 这是一个非常重要的问题。大气氧化剂中非生物性产物可能会提供一种这样的机制: 在空间上限定的栖息地以维持局部的氧化条件, 消除可用的还原剂, 迫使氧化性的光合生物利用水作为电子供体。有人提出大气中的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>在诱导氧化性光合作用中起了关键的作用, 因为局部环境中过氧化物的增加, 有机体不但面对还原剂的丧失, 同时还要被迫发展生化的机制(如过氧化氢酶)以应对氧化条件的改变。这些对于保护生命体免遭氧化性光合作用产物伤害是必须的<sup>[5]</sup>。因此在无氧环境中, 这种条件可以迫使地球让的早期氧化性光合作用演化出来。

## 2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>平衡(homoestasis): 产生和清除

在正常的代谢条件下, 细胞可以从不同的渠道产生H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。细胞内H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度变化范围较大, 如拟南芥中 0.06~7 mmol/L<sup>[6]</sup>, 而玉米和水稻中为 1~2 mmol/L<sup>[7]</sup>, 然而, 人们至今仍不知道不同亚细胞区域的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量的差异。尽管对细胞毒害的精确胞间H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度不同, 但是细胞通常通过非常有效的抗氧化剂系统平衡高浓度H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>存在的寿命较长, 具有较高的跨膜通透性并能在植物细胞间迅速扩散; 同时, 外界刺激能迅速的刺激其合成和分解等特点<sup>[8,9]</sup>, 符合胞间信号所有的重要标准, 因而成为人们比较关注的氧化信号分子。然而, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>在何种条件下分别作为信号分子和对细胞产生毒性, 仍然是一个悬而未决的问题。通常, 起信号作用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>在细胞内的浓度为 1~700 nmol/L之间<sup>[10]</sup>。

### 2.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的产生

在植物细胞正常代谢过程中, 活性氧(reactive oxygen species, ROS)可由多种途径产生。质膜上的氧化还原酶系统(plasma membrane redox system, PMRS)是产生H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的重要部位<sup>[11]</sup>, 同时植物细胞壁中的过氧化物酶和叶绿体PSI也可能与植物氧化猝发有关。

已知产生H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的NADPH氧化酶是PMRS的一个重要成分。植物拟南芥基因组存在 10 个NADPH氧化酶的同源基因, 但是直到最近才证明这些基因在产生H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>中的作用和功能<sup>[12~14]</sup>。植物中氧化猝发(oxidative burst, OXB)和哺乳动物细胞激活嗜中性细

胞相似, 是由NADPH氧化酶的激活而产生的<sup>[15]</sup>。用In-gel激酶分析, 在土豆和烟草细胞质膜鉴定到产生O<sub>2</sub><sup>-</sup>(因而产生H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)的活性<sup>[16]</sup>, 这种活性直接被Ca<sup>2+</sup>激活。用DPI作为抑制剂也在保卫细胞质膜鉴定到了NADPH参与ABA诱导H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的产生<sup>[17,18]</sup>。用拟南芥AtrobohD和AtrobohF基因的敲除突变体证实H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产生需要NADPH氧化酶<sup>[12]</sup>。用病毒诱导基因沉默(VIGS)方法, 发现细胞积累H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>需要NbrbohA和NbrbohB<sup>[14]</sup>。位于质膜外侧的过氧化物酶、NADPH氧化酶及多胺氧化酶等都可以产生H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 质膜上还原型的电子载体也可以氧化产生H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和O<sub>2</sub><sup>-</sup>, 后者经歧化作用可形成H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。

除质膜NADPH氧化酶外, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>也可由一种pH依赖性的细胞壁过氧化物酶(POD)产生<sup>[19]</sup>。病原菌侵染植物细胞时, 在该酶的催化下, O<sub>2</sub>迅速被还原为O<sub>2</sub><sup>-</sup>和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>[20]</sup>。质膜上NADPH氧化酶可与胞壁POD起串联作用。同时, 光合电子传递系统是植物细胞中ROS的一个重要来源, 叶绿体光合电子传递链PS 的受体端存在大量的自动氧化酶类, 能够通过米勒反应将氧还原成超氧化物, 超氧阴离子可通过酶促反应歧化成H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和O<sub>2</sub>。PS 的抑制剂atrazine也可强烈抑制强光条件下气孔保卫细胞中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的产生<sup>[8]</sup>。

### 2.2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的清除

细胞内H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度必须处在一种精细的平衡状态, 因此在进化过程中植物体已形成了复杂和有效的氧化应激机制。植物体内有效清除H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的机制分为酶促和非酶促两类: 酶促类包括过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)等<sup>[21]</sup>; 非酶促类包括抗坏血酸、谷胱甘肽、甘露醇和类黄酮等。

CAT可以催化H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成H<sub>2</sub>O和氧, 它是第一个纯化和结晶的抗氧化酶。植物中CAT可以清除线粒体电子传递、脂肪酸β-氧化和最为重要的呼吸氧化产生的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。在拟南芥基因组中存在 3 种编码不同过氧化氢酶的基因Cat1, Cat2 和Cat3。生物和非生物胁迫可以促使Ca<sup>2+</sup>流入细胞, 胞内Ca<sup>2+</sup>的增加可以刺激H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产生, 它可以作为信号分子, 引起相应的生理反应<sup>[22]</sup>。

胞内 $\text{Ca}^{2+}$  / CaM水平的提高可以刺激CAT活性，降低胞内 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的水平<sup>[23]</sup>。CAT的缺失可以很明显地影响强光引起的基因表达的变化<sup>[24]</sup>。

APX需要抗坏血酸和GSH再生系统，即抗坏血酸-谷胱甘肽循环。在叶绿体基质或类囊体膜上，ASA-POD可将 $\text{H}_2\text{O}_2$ 分解为 $\text{H}_2\text{O}$ 。除 $\text{O}_2$ 外，单脱氢抗坏血酸(MDA)是光合电子另一个受体分子，其在体内的产生和减少直接影响Mehler反应中 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的调节。和其他生物不同，植物有多个基因编码SOD和APX，分别分布在叶绿体、线粒体、过氧化物酶体、细胞质和质外体。当保卫细胞中抗坏血酸(ASC)氧化还原状态升高，可以降低其对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 反应和ABA信号转导<sup>[25]</sup>。拟南芥缺失细胞质中APX1，叶绿体内整个 $\text{H}_2\text{O}_2$ 清除系统的功能都会丧失<sup>[26]</sup>。当保卫细胞具有较高ASC的水平时，气孔对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 和ABA的信号不敏感<sup>[27]</sup>。

在拟南芥基因组中GPX家族含有7个基因，其中几个基因可被生物胁迫所诱导<sup>[28]</sup>。令人兴奋的是，在酵母中发现一个谷胱甘肽过氧化物酶(Gpx3)可以作为 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的受体和氧化还原信号传递子，激活基因的表达<sup>[29]</sup>。同时，酵母质膜SLN1(synthetic lethal of N-end rule1)组氨酸激酶高度对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 敏感，可以作为过氧化的感应子<sup>[30]</sup>。拟南芥基因组含有几个SLN1同源体，有可能一个或较多编码这些蛋白的基因作为过氧化的感应子起作用。

作为光呼吸途径的组成部分， $\text{H}_2\text{O}_2$ 在过氧化物酶体中形成。但是，植物在进化过程中也相应地产生了光氧化保护机制，其主要目的是调节光合作用。在上述条件下，为阻止电子传递链的过度还原，植物演化出光呼吸途径产生 $\text{NADP}^+$ <sup>[31]</sup>。另一方面，通过光呼吸在过氧化物酶体产生的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 可以作为信号分子，并可以影响叶片抗氧化系统的氧化还原状态，尤其是在干旱条件下更是如此<sup>[32]</sup>。

### 3 $\text{H}_2\text{O}_2$ 信号转导途径

#### 3.1 刺激与感受

(1) 激发子和氧化猝发：人们普遍认为植物具有一种先天的“免疫系统”——氧化猝发，即植物细胞在胁迫条件下能迅速产生一些活性氧分子，进而启动

体内其他信号级联过程，引起一些特有的生理反应。

在植物-病原菌互作过程中，ROS的产生通常十分迅速，其对应的OXB模式也有所不同。Baker等人<sup>[33]</sup>和Levine等人<sup>[34]</sup>用非亲和性病原菌分别处理烟草和大豆细胞，发现胞内 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的产生具有双时相特征。时相(1~2 h)是一个快速和短暂的过程，此过程可被一些亲和性及非亲和性病原菌诱导产生；而时相(2~5 h)出现较为缓慢且持续时间较长，此过程仅为非亲和性病原菌与植物互作(不相容系统)所特有。在非亲和性病原菌与植物互作过程中，时相与质膜 $\text{H}^+$ 的吸收/ $\text{K}^+$ 外流相偶联。现已证实，时相是抗病基因与无毒基因相互作用的后续反应，与植物的抗病性密切相关<sup>[15]</sup>。

(2) 水杨酸：水杨酸(SA)作为植物抗病信号分子目前正引起人们更多的注意，尤其在OXB及系统获得性抗性(SAR)形成过程中，SA起着重要作用。已知OXB产生的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 和SA可能是诱导SAR信号转导途径的中间成分<sup>[7]</sup>，但二者在抗病信号转导过程中的地位还有待研究。SA可通过抑制细胞内的CAT而促进胞内 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的累积<sup>[35]</sup>，还可作用细胞质膜NADPH氧化酶促进 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的产生<sup>[36]</sup>。同时，较高浓度的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 也可诱导SA的合成。总之，OXB过程中，SA可在 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的上游或下游起作用。同时，SA可以诱导保卫细胞 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的产生，并导致气孔的关闭<sup>[37]</sup>。

(3) ABA：水分胁迫下植物激素ABA在细胞中积累并诱导一系列胁迫适应反应。在拟南芥中ABA可以刺激 $\text{H}_2\text{O}_2$ 积累，并通过激活 $\text{Ca}^{2+}$ 通道活性诱导气孔的关闭<sup>[13,38]</sup>。与此同时，苗雨晨等人<sup>[17]</sup>和张晓等人<sup>[18]</sup>发现ABA在诱导蚕豆气孔关闭过程中有 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的产生，其产生的位点可能在质膜NADPH氧化酶和叶绿体，因此产生的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 可能是ABA诱导气孔关闭过程中信号转导链的一个中间成分。

#### 3.2 信号转换

(1) MAPK：促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)以蛋白磷酸化的形式把细胞外信号刺激传递到细胞内，同时特异性的放大信号。这个信号转导途径的3个核心组成元件依次为：MAPKKK, MAPKK (MEK)和MAPK<sup>[39]</sup>。MAPK介

导的级联反应参与很多种胁迫和激素信号转导过程。用外源的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理拟南芥叶肉原生质体，激活了与烟草细胞NPK相似的拟南芥ANP激酶，然后激活MAPK的上游因子，启动了MAPK级联的信号传递，最终导致谷胱甘肽-S-转移酶(GST)基因的表达<sup>[40]</sup>。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>也能增加拟南芥核苷酸二磷酸(NDP)激酶2的表达<sup>[41]</sup>。超表达NDPK2可以减少H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的积累，提高包括冷、氧化和盐等多种胁迫的抗性。这些数据表明，不同的胁迫可以诱导ROS的产生，然后激活MAPK信号转导链。用MEK1/2的特异性抑制剂(PD98059)处理蚕豆叶片的表皮，研究了MEK1/2在ABA和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导气孔关闭信号转导过程中的作用，发现MAPK在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>介导的ABA引起气孔关闭信号转导链上有着双重的作用：一是通过激活H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产生系统和抑制清除系统的酶活性迅速放大氧化信号，促进ABA诱导的蚕豆气孔关闭；二是MAPK可以调节H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>信号反应的专一性<sup>[42]</sup>。但是，至今仍未在保卫细胞中克隆出特异MEK1/2基因，以显示其控制气孔的反应。

(2) G-蛋白：许多工作已经证明Rop(Rho-like small G protein)可以调节H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的产生<sup>[43]</sup>。通过对拟南芥Rop信号转导的突变体分析，提出了其作用的模型：Rop可调节乙醇脱氢酶(ADH)基因的表达和植物对缺氧的忍耐。低氧激活Rop信号转导，RopGTP酶激活H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产生，可能是通过NADPH氧化酶，而后H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导ADH和Rop失活蛋白RopGAP4基因的表达。这种通过RopGAP4的负调节作用是控制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产生所必需的<sup>[44]</sup>，从而强调了Rops在调节所有H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产生过程中起重要作用，这种证据令人兴奋。依赖Rop的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导可被DPI抑制，因此这强有力地说明在激活质膜有关NADPH氧化酶的过程中植物Rop的功能和人类Rac相同。现已证明植物细胞中也存在gp91<sup>phox</sup>，但是不存在p47<sup>phox</sup>，p67<sup>phox</sup><sup>[45]</sup>。据此有人推测植物细胞中存在另外新的植物蛋白，可以作为其调节分子，但是这需要新的研究证据说明植物是否通过其它的机制调节H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的产生。

(3) NO：NO和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>协同作用参与植物应答生物胁迫和非生物胁迫的反应<sup>[45,46]</sup>，如：NO和ROS相互作用调节根源逆境信号诱导的ABA合成<sup>[46]</sup>，NO可增强植物的耐旱性<sup>[47]</sup>，清除强光诱导的ROS，以减轻植物

的光氧化胁迫伤害<sup>[48]</sup>等。目前，许多报道表明NO作为信号分子参与保卫细胞ABA信号转导过程<sup>[49~53]</sup>，其调节气孔运动的机制可能是通过激活质膜Cl<sup>-</sup>通道、抑制质膜内向K<sup>+</sup>通道<sup>[51]</sup>以及调节保卫细胞MAPK的活性等<sup>[54,55]</sup>。

在植物中，NO和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的相互作用受到较多的关注<sup>[56,57]</sup>。在蚕豆悬浮细胞中，诱导细胞超敏感死亡需要NO和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的浓度的平衡<sup>[56]</sup>。Lum等人<sup>[58]</sup>发现H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作为上游信号诱导NO的产生，同时，钙离子介导了ABA诱导的NO产生，因为它可以被钙离子通道阻断剂verapamil所抑制。另外，有结果显示在ABA信号转导途径中NO很可能作为H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的上游信号起作用，并且磷酸酶和Ca<sup>2+</sup>也参与其调节<sup>[59]</sup>。尽管已经有人把ABA，NO和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>联系起来，但有关ABA信号转导过程中三者之间的相互关系的研究还很缺乏。

(4) 细胞质中Ca<sup>2+</sup>：已有的实验表明，用激发子处理植物细胞，可导致胞外Ca<sup>2+</sup>内流。在悬浮培养的植物细胞体系中，加入Ca<sup>2+</sup>螯合剂EGTA，可有效地抑制细胞的过敏死亡和植物抗毒素(PA)的合成；并且在激发子诱导的植物细胞防御反应中，胞外Ca<sup>2+</sup>及其内流可能是信号转导中的最初反应<sup>[9]</sup>。Miura等人<sup>[60]</sup>报道，在马铃薯块茎组织切片或悬浮培养细胞，同时加入激发子和外源Ca<sup>2+</sup>螯合剂，可有效地抑制OXB。这表明其作用位点在细胞死亡和PA形成之前，当有外源Ca<sup>2+</sup>存在时，加入Ca<sup>2+</sup>载体A<sub>23187</sub>可有效地激发OXB，而无Ca<sup>2+</sup>时，则无此作用<sup>[60]</sup>。同样，当用cryptogein处理烟草细胞时，Ca<sup>2+</sup>内流出现在氧化猝发之前，并持续60 min之久<sup>[61]</sup>；H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>形成之后，仍有较高的Ca<sup>2+</sup>内流<sup>[34]</sup>。若用非亲和性病原菌或H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理大豆细胞，则胞外Ca<sup>2+</sup>内流对诱导细胞的死亡是十分必要的。Ca<sup>2+</sup>通道阻断剂(La<sup>3+</sup>)可阻止细胞的诱导死亡，而A<sub>23187</sub>则可促进细胞的死亡。豇豆受到锈病真菌侵染时，细胞质中[Ca<sup>2+</sup>]升高，因此认为这是细胞过敏反应的重要信号<sup>[62]</sup>。由此说明，细胞质中Ca<sup>2+</sup>信号在OXB的上游和下游均起着重要作用。

### 3.3 反应

(1)  $H_2O_2$ 与气孔运动:许多环境胁迫(如干旱、盐碱等)可导致保卫细胞内 $H_2O_2$ 的积累,进而促进气孔关闭。McAinsh等人<sup>[63]</sup>观察到 $H_2O_2$ 和 $O_2^-$ 可增加保卫细胞中游离 $Ca^{2+}$ 的浓度,通过 $Ca^{2+}$ 信号系统调节气孔的运动。用膜片钳全细胞记录技术研究发现, $H_2O_2$ 能促进气孔关闭是因为它抑制了保卫细胞质膜内向 $K^+$ 通道,而 $K^+$ 的流出和溶质丧失都会引起膨压降低,促进气孔关闭<sup>[64,65]</sup>。同时, $H_2O_2$ 可影响气孔保卫细胞pH<sup>[66]</sup>。

更多的研究表明, $H_2O_2$ 作为信号分子调节了气孔保卫细胞的运动,其调节过程与ABA对气孔运动的调节有许多类似之处。已知, $H_2O_2$ 可能作为正调节因子参与了ABA对气孔运动的调节<sup>[17,38]</sup>。ABA通过NADPH氧化酶激活保卫细胞内 $H_2O_2$ 的合成, $H_2O_2$ 可以极低的浓度(mmol/L级)参与ABA诱导的气孔关闭和激活质膜钙离子通道<sup>[33]</sup>。Schroeder等人<sup>[67]</sup>提出, $H_2O_2$ 可能作为ABA途径与非ABA(non-ABA)途径的胁迫信号与保卫细胞氧化还原状态对气孔运动调节的交叉位点,如病原菌感染植物引起保卫细胞中产生ROS,导致气孔关闭。最近发现,ABA诱导保卫细胞内 $H_2O_2$ 产生和积累的过程中,磷脂酰肌醇3-磷酸(phosphatidylinositol 3-phosphate, PI3P)正调节了 $H_2O_2$ 的产生<sup>[68]</sup>。

对ABA不敏感突变体 $abi1-1$ 和 $abi2-1$ 遗传学分析表明,蛋白磷酸化也参与了保卫细胞的信号转导过程。ABI1和ABI2编码蛋白质磷酸化酶2C类的酶,二者都参与了保卫细胞关闭过程。已经证明,在 $abi1$ 中ABA不能诱导 $H_2O_2$ 的产生,相反, $abi2$ 突变体中仍能产生 $H_2O_2$ <sup>[59]</sup>,说明ABI1可能在 $H_2O_2$ 信号转导的上游,而ABI2则在其下游。

$ost1$ 突变体对ABA不敏感。ABA可以激活野生型保卫细胞原生质体OST1激酶活性,但是 $ost1$ 突变体中却相反: $ost1$ 中ABA不能诱导 $H_2O_2$ 产生,但是 $H_2O_2$ 仍能诱导气孔的关闭<sup>[69]</sup>。有可能OST1调节的 $H_2O_2$ 直接作用于NADPH氧化酶。尽管这种理论非常有吸引力,但是仍缺乏实验证据。

另外,气孔在下午关闭,而保卫细胞内 $H_2O_2$ 产生在早上较低,上午开始升高,下午2点左右达到高

峰,然后下降。这种日变化的模式和保卫细胞的ASC氧化还原状态有关<sup>[25]</sup>,因此脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)作用是保持ASC循环的基本水平,这样就不足清除下午高水平的 $H_2O_2$ 导致气孔的关闭,从而抑制DHAR表达可以增加干旱的抗性。

(2)  $H_2O_2$ 与细胞凋亡:与植物超敏反应(hypersensitive response, HR)有关的细胞死亡是一种程序性死亡。植物受到病原菌侵染时,可产生氧化猝发,在极短的时间内积累活性氧<sup>[19,70,71]</sup>。由HR引起的膜脂过氧化过程中,某种信号物质在植物体内传递,这种信号物质可能是不饱和脂肪酸过氧化的代谢产物。 $H_2O_2$ 是细胞凋亡中的主要因子,但是 $H_2O_2$ 引起的细胞死亡的分子机制仍然不清楚。几个方面的研究证明 $H_2O_2$ 可能作用于线粒体,如用 $H_2O_2$ 处理拟南芥的细胞,可以引起线粒体中 $H_2O_2$ 的升高,导致其功能的改变和细胞凋亡<sup>[71]</sup>。ROS可直接作为信号传递过程中的中间体,在转录水平上激活和调控植物体内各种防御相关基因的表达。同时,ROS还可能与NO相互作用激活过敏细胞的死亡<sup>[50]</sup>。转基因拟南芥中组成型激活AtMEK4和AtMEK5,可以打破氧化还原的平衡,产生 $H_2O_2$ ,诱导细胞死亡<sup>[72]</sup>。

(3)  $H_2O_2$ 与基因的表达:在高等动物细胞中, $H_2O_2$ 是一个多效活化因子,作为胞内第二信使它可激活转录因子的原始类型核因子 $\kappa B$ (NF- $\kappa B$ ),并对各种不同刺激作出迅速的反应<sup>[73]</sup>。在拟南芥中发现 $NIM1$ 基因所编码的蛋白与NF- $\kappa B$ 的抑制性亚单位I $\kappa B$ 有许多相似之处。据报道, $NIM1$ 基因是在植物细胞防御反应的局部基因表达和SAR的形成过程中起作用<sup>[74]</sup>。另外, $H_2O_2$ 也可作为胞内信使激活转录因子和促进细胞外信号对基因表达的调控。植物细胞中也存在Ref-1的类似物。在动物细胞中,Ref-1是一个氧化还原因子,当其受到氧化胁迫时,即可调节Fos-Jun二聚体与AP-1顺式作用元件结合,于是氧化胁迫应答基因即被活化和得以表达<sup>[75]</sup>。

$H_2O_2$ 调节很多基因的表达,包括那些编码抗氧化剂的酶和 $H_2O_2$ 产生的调节因子。因此,细胞以复杂方式监测和保持其内恒定的 $H_2O_2$ 水平<sup>[3,4]</sup>。 $H_2O_2$ 可以激活许多基因的表达如MAPK激酶等<sup>[76]</sup>。同时, $H_2O_2$ 作为植物对病原反应的调节分子,能选择性诱导一

些防御基因的表达, 如谷胱甘肽-S-转移酶和谷胱甘肽氧化酶<sup>[77,78]</sup>。GSTs作为氧化胁迫过程中的一个保护酶, 不仅可与GSH结合使膜免遭氧化, 而且还可作为非酶载体蛋白(配体)参与动物细胞内类固醇、胆红素、血红素和胆汁盐的转运过程<sup>[79]</sup>。尽管植物细胞GST启动子不含有动物细胞GST启动子中的亲电反应元件EpRE(electrophile responsive element), 但它却含有合成章鱼碱合成酶的元件(ocs)。这种含有20 bp的ocs元件最先是从花椰菜病毒(CaMV)和农杆菌基因启动子中发现的<sup>[80]</sup>。目前为止, 植物细胞中仅有GSTs基因的启动子含有ocs。此种元件与EpRE有许多相似之处, 两者都可被氧化胁迫所诱导表达, 可以说, 植物细胞的GST启动子中ocs元件是氧化胁迫诱导元件。尽管已经发现 $H_2O_2$ 反应的启动子, 以及植物细胞的GST启动子中ocs元件是氧化胁迫诱导元件<sup>[40,81]</sup>, 但至今仍没有分离和定性 $H_2O_2$ 调控的DNA序列以及与它们相关的转录因子。

Microarray研究表明, 参与细胞凋亡的基因、信号转导蛋白(如CaM)、蛋白激酶和一些转录因子均可被 $H_2O_2$ 诱导。 $H_2O_2$ 处理后, 在11000个基因中175个基因在表达水平上发生了变化<sup>[82]</sup>。我们用基因芯片系统研究拟南芥幼苗中 $H_2O_2$ 引起的基因表达的变化, 发现 $H_2O_2$ 可分别诱导464和抑制221个基因的表达<sup>[83]</sup>。但是, 对于 $H_2O_2$ 调节的基因转录是否参与细胞质或细胞核内的氧化变化和转录因子自身修饰, 以及其他修饰反应(如磷酸化)最终是否由 $H_2O_2$ 启动目前也知之甚少。

## 4 结论和展望

综合最近的研究进展, 植物细胞 $H_2O_2$ 信号转导可以概括为(图1):  $H_2O_2$ 从质外体或者产生源进入细胞, 然后扩散进入亚细胞区域。叶绿体和PMRS系统可能是 $H_2O_2$ 的主要来源。 $H_2O_2$ 可以氧化或者调节信号转导蛋白, 如蛋白质磷酸化酶(包括质膜组蛋白激酶和MAPK反应链在内的蛋白质激酶)、转录因子, 以及位于质膜或其它膜上的 $Ca^{2+}$ 通道。胞内 $Ca^{2+}$ 浓度的升高, 通过钙结合蛋白的作用进一步启动下游的反应。蛋白质可逆磷酸化也可启动细胞质和细胞核的下游信号转导, 通过影响转录因子而影响基因的

表达。转录因子的氧化可以激活自身或诱导其定向转运至细胞核内。 $H_2O_2$ 的合成可以被Rop信号系统控制<sup>[44]</sup>。

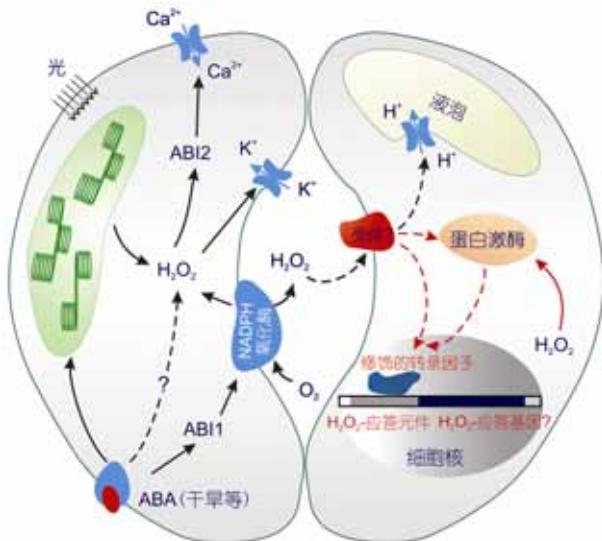


图1 植物细胞 $H_2O_2$ 信号转导的模式图(以保卫细胞为例)  
外界刺激可以诱导 $H_2O_2$ 产生<sup>[18,38]</sup>, 然后扩散进入亚细胞区域。 $H_2O_2$ 可以氧化或者调节信号转导蛋白, 如蛋白质磷酸化酶(例如, ABI1 和 ABI2)<sup>[59]</sup>、蛋白激酶<sup>[69]</sup>、转录因子<sup>[40]</sup>, 以及位于质膜或其它膜上的 $K^+$ 和 $Ca^{2+}$ 通道<sup>[38,40]</sup>。胞内 $Ca^{2+}$ 浓度的升高, 通过钙结合蛋白的作用进一步启动下游的反应。蛋白质可逆磷酸化也可启动细胞质和细胞核的下游信号转导, 通过影响转录因子而影响基因的表达。转录因子的氧化可以激活自身或诱导其定向转运至细胞核内。红色虚线部分示目前仍然未知的信号转导途径, 也是未来研究的重点

从进化的角度, 无疑 $H_2O_2$ 是一个古老 的信号, 尤其是氧化还原是生命的基本过程, 在许多生理生化过程和基因转录的许多方面有着非常重要的作用。但是对于 $H_2O_2$ 作为信号分子的其信号转导途径的详细过程了解仍然是相对年轻的课题, 许多基本的问题仍然不清楚。随着对 $H_2O_2$ 相关研究的不断深入, 使用转基因植物和 $H_2O_2$ 信号转导的突变体来阐明特异细胞和不同刺激情形下 $H_2O_2$ 的生物学功能; 还可能通过分析一些基因组成的变化, 在植物中发现 $H_2O_2$ 作用的专门元件如 $H_2O_2$ 的结合蛋白,  $H_2O_2$ 的受体等, 从而更加清楚地了解 $H_2O_2$ 在植物细胞内部尤其是气孔保卫细胞内的信号转导及作用。

尽管有较多的实验表明, ABA可诱导保卫细胞

中  $H_2O_2$  的产生和积累, 而  $H_2O_2$  又作为胞内信号成分构成了 ABA 信号转导体系的一个重要环节, 从而推测叶绿体的光电子传递系统、线粒体的电子传递体系和质膜上 NADPH 氧化酶等与 ABA 诱导的  $H_2O_2$  产生有关。但是, 没有人在亚细胞水平上对 ABA 诱导的  $H_2O_2$  的产生进行定位, 因而对保卫细胞内 ABA 诱导的  $H_2O_2$  的产生进行亚细胞定位就显得格外重要。

$H_2O_2$  可以调节气孔的运动。近 20 年来, 由于基因组学的发展和进步, 在植物生物学的其他领域如发育、矿质营养和抗盐等方面, 使用分子遗传学技术, 尤其是基于拟南芥模式系统的研究, 都已经发生了革命性的变化。然而, 在植物对保卫细胞信号转导的研究中, 利用拟南芥模式体系几乎没有成功的先例, 因为至今没有一个非常直观的观察方法来监测气孔的反应, 无法建立起有效的分子遗传学的筛选体系。目前, 研究保卫细胞内基因调控模式遇到的最大困难是确定这些基因是否在保卫细胞信号转导过程中起作用, 至今尚未发现  $H_2O_2$  特异的感受子和受体, 也就是说我们仍不知道细胞如何感受  $H_2O_2$ , 以及许多引起 ABA 反应的基因在保卫细胞反应过程中的功能, 同时, 我们也不知道在细胞感受  $H_2O_2$  信号转导过程中哪种细胞过程是最主要的或是限速步骤, 更不知道何种基因对  $H_2O_2$  是特异和必需的, 以及该基因是否在特异组织中表达, 所有这些问题的解决, 都要依赖于保卫细胞内功能性的遗传学和基因组学分析。

致谢 感谢河南大学生命科学学院王鹏程、江静、苗雨晨、郝福顺、吕东、王棚涛、蔺红帮助整理部分内容。

## 参 考 文 献

- 1 Jamieson D J, Storz G. In: Scandalios J G, ed. Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. 91~115
- 2 Foyer C H, Noctor G. Redox homeostasis and antioxidant signalling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, 2005, 17: 1866~1875 [[DOI](#)]
- 3 Neill S J, Desikan R, Hancock J T. Hydrogen peroxide signalling. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5: 388~395 [[DOI](#)]
- 4 Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Bio*, 2004, 55, 373~399 [[DOI](#)]
- 5 McKay C P, Hartman H. Hydrogen peroxide and the evolution of oxygenic photosynthesis. *Orig Life Environ Biosph*, 1991, 21: 157~163 [[DOI](#)]
- 6 Karpinski S, Reynolds H, Karpinska B, Wingsle G, Creissen G, Mullineaux P. Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science*, 1999, 284: 654~657 [[DOI](#)]
- 7 Jiang M, Zhang J. Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidant defencesystem and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42: 1265~1273 [[DOI](#)]
- 8 Allan A C, Fluhr R. Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell*, 1997, 9: 1559~1572 [[DOI](#)]
- 9 Alvarez M E, Lamb C. Oxidative burst-mediated defense responses in plant disease resistance. In: Scandalios J G, ed. Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. 815~839
- 10 Sone J R. An assessment of proposed mechanism for sensing hydrogen peroxide in mammalian systems. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 422: 119~124 [[DOI](#)]
- 11 Rubinstein B, Luster D G. Plasma membrane redox activity: Components and role in plant processes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1993, 44: 131~155 [[DOI](#)]
- 12 Torres M A, Dangl J L, Jones J D G. *Arabidopsis gp91^phox* homologues *AtrobohD* and *AtrobohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 517~522 [[DOI](#)]
- 13 Kwak J M, Mori I C, Torres M A, et al. NADPH oxidase *AtrobohD* and *AtrobohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J*, 2003, 22: 2623~2633 [[DOI](#)]
- 14 Yoshioka H, Numata N, Doke N, et al. *Nicotiana benthamiana* gp91phox homologs NbrbohA and NbrbohB participate in  $H_2O_2$  accumulation and resistance to Phytophthora infestans. *Plant Cell*, 2003, 15: 706~718 [[DOI](#)]
- 15 Lamb C, Dixon R A. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1997, 48: 251~275 [[DOI](#)]
- 16 Sagi M, Fluhr R. Superoxide production by plant homologues of the gp91<sup>phox</sup> NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol*, 2001, 126: 1281~1290 [[DOI](#)]
- 17 苗雨晨, 宋纯鹏, 董发才, 王学臣. ABA 诱导蚕豆气孔保卫细胞  $H_2O_2$  的产生. *植物生理学报*, 2000, 26 (1): 53~58

- 18 Zhang X, Zhang L, Song C P, et al. Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Physiol*, 2001, 126: 1438~1448[DOI]
- 19 Peng M, Kuc J. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity *in vitro* and on tobacco leaf disks. *Phytopathol*, 1992, 82: 696~699
- 20 Bolwell G P, Butt V S, Zimmerlin A, et al. The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radical Res*, 1995, 23: 517~532
- 21 Hernández J A, Jiménez A, Sevilla F, et al. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell Environ*, 2000, 23: 853~862[DOI]
- 22 Grant J, Yun B W, Loake G J. Oxidative burst and cognate redox signalling reported by luciferase imaging: identification of a signal network that functions independently of ethylene, SA and Me-JA but is dependent on MAPKK activity. *Plant J*, 2000, 24: 569~582[DOI]
- 23 Yang T, Poovaiah B W. Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 4097~4102[DOI]
- 24 Vandenebeele S, Vanderauwera S, Vuylsteke M, et al. Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2004, 39: 45~58[DOI]
- 25 Dutilleul C, Garmier M, Noctor G, et al. Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. *Plant Cell*, 2003, 15: 1212~1226[DOI]
- 26 Devletova S, Rizhsky L, Mittler R, et al. Cytosolic ascorbate peroxides 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2005, 17: 268~281[DOI]
- 27 Chen Z, Gallie D R. The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *Plant Cell*, 2004, 16: 1143~1162[DOI]
- 28 Milla M A, Maurer A, Gustafson J P, et al. Glutathione peroxidase genes in *Arabidopsis* are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways. *Plant J*, 2003, 36: 602~615[DOI]
- 29 Delaunay A, Pflieger D, Toledano M B, et al. A thiol peroxidase is an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell*, 2002, 111: 471~481[DOI]
- 30 Singh K K. The *Saccharomyces cerevisiae* Sln1p-Ssk1p two-component system mediates response to oxidative stress and in an oxidant-specific fashion. *Free Radic Biol Med*, 2000, 29: 1043~1050[DOI]
- 31 Song C P, Du Z, Zhu Z, et al. NaHSO<sub>3</sub> inhibits photorespiration by decreasing the production of superoxide anion. In: Asada K, Yashikawa T, eds. *Frontiers of Reactive Oxygen Species in Biology and Medicine*. Amsterdam: Elsevier Science BV, 1994. 35~36
- 32 Noctor G, Gomez L, Foyer C H, et al. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. *J Exp Bot*, 2002, 53: 1283~1304[DOI]
- 33 Baker C J, O'Neill N R, Orlandi E W, et al. Early responses during plant-bacteria interactions in tobacco cell suspensions. *Phytopathol*, 1991, 81: 1504~1507
- 34 Levine A, Pennell R I, Lamb C, et al. Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Curr Biol*, 1996, 6: 427~437[DOI]
- 35 Chen Z X, Silva H, Klessig D F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, 1993, 262: 1883~1886
- 36 Shirasu K, Nakajima H, Lamb C, et al. Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell*, 1997, 9: 261~270[DOI]
- 37 Dong F C, Wang P T, Song C P, et al. The role of hydrogen peroxide in Salicylic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba* guard cells. *Acta Phytophysiol Sin*, 2001, 27: 296~302
- 38 Pei Z M, Murata Y, Schroeder J L, et al. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells. *Nature*, 2000, 406: 731~734[DOI]
- 39 Morris P C. MAP kinase signal transduction pathways in plants. *New Phytol*, 2001, 151: 67~89[DOI]
- 40 Kovtun Y, Chiu W L, Sheen J, et al. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 2940~2945[DOI]
- 41 Moon H, Lee B, Parasad T, et al. NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 358~363[DOI]
- 42 江静, 安国勇, 王鹏程, 等. MAP 激酶调节蚕豆保卫细胞中ABA诱导的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产生. *科学通报*, 2003, 48(12): 1256~1263
- 43 Yang Z. Small GTPases: Versatile signalling switches in plants. *Plant Cell*, 2002, 14: S375~S388
- 44 Baxter-Burrell A, Yang Z, Bailey-Serres J, et al. RopGAP4-dependent Rop GTPase rheostat control of *Arabidopsis* oxygen deprivation tolerance. *Science*, 2002, 296: 2026~2028[DOI]
- 45 Dangl, J. Plants just say NO to pathogens. *Nature*, 1998, 394: 525~526[DOI]
- 46 Zhao Z, Chen G, Zhang C. Interaction between reactive oxygen species and nitric oxide in drought-induced abscisic acid synthesis in root tips of wheat seedlings. *Aust J Plant Physiol*, 2001, 28:

- 1055~1061
- 47 Garcia-Mata C, Lamattina L. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiol*, 2001, 126: 1196~1204 [[DOI](#)]
- 48 Beligni M V, Lamattina L. Nitric oxide interferes with plant photo-oxidative stress by detoxifying reactive oxygen species. *Plant Cell Environ*, 2002, 25: 737~748 [[DOI](#)]
- 49 Desikan R, Griffiths R, Neill S J, et al. A new role for an old enzyme: Nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 25: 16314~16318 [[DOI](#)]
- 50 Garcia-Mata C, Gay R, Blatt M R, et al. Nitric oxide regulates K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 11116~11121 [[DOI](#)]
- 51 Neill S J, Desikan R, Hancock J T, et al. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol*, 2002, 128: 13~16 [[DOI](#)]
- 52 Neill S J, Desikan R, Hancock J T. Nitric oxide as a mediator of ABA signalling in stomatal guard cells. *Bulg J Plant Physiol*, 2003, Special Issue: 124~132
- 53 Lv D, Zhang X, Song C P, et al. NO may function in the downstream of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in ABA-induced stomatal closure in *Vicia faba* L. *J Plant Physiol Mol Biol* 2005, 31: 62~37
- 54 Lamattina L, Garcia-Mata C, Pagnussat G, et al. Nitric oxide: The versatility of an extensive signal molecule. *Annu Rev Plant Biol*, 2003, 54: 109~136 [[DOI](#)]
- 55 Desikan R, Cheung M K, Neill S J, et al. ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *J Exp Bot*, 2004, 55: 205~212 [[DOI](#)]
- 56 Neill S J, Desikan R, Hzncock J T, et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Exp Bot*, 2002, 372: 1237~1247 [[DOI](#)]
- 57 Delledonne M, Zeier J, Lamb C, et al. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 13454~13459 [[DOI](#)]
- 58 Lum H K, Butt Y K C, Lo S C L. Hydrogen peroxide induces a rapid production of nitric oxide in mung bean (*Phaseolus aureus*). *Nitric Oxide*, 2002, 2: 205~213 [[DOI](#)]
- 59 Murata Y, Pei Z M, Schroeder J I, et al. Abscisic acid activation of plasma membrane Ca<sup>2+</sup> channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants. *Plant Cell*, 2001, 13: 2513~2523 [[DOI](#)]
- 60 Miura Y, Yoshioka H, Doke N. An autophotographic determination of the active oxygen generation in potato tuber discs during hypersensitive responses to fungal infection or elicitor. *Plant Sci*, 1995, 105: 45~52 [[DOI](#)]
- 61 Tavernier E, Wendehenne D, Pugin A, et al. Involvement of free calcium in action of cryptogein, a proteinaceous elicitor of hypersensitive reaction in tobacco cells. *Plant Physiol*, 1995, 109: 1025~1031
- 62 Xu H, Heath M C. Role of calcium in signal transduction during the hypersensitive response caused by basidiospore-derived infection of the cowpea rust fungus. *Plant Cell*, 1998, 10: 585~597 [[DOI](#)]
- 63 McAinch M R, Clayton H, Hetherington A M, et al. Changes in stomatal behavior and cytosolic free calcium in response to oxidative stress. *Plant Physiol*, 1996, 111: 1031~1042
- 64 An G, Song C P, Zhang X, et al. Effect of peroxide generation on stomatas movement and K<sup>+</sup> channel on plasma membrane in *Vicia faba* guard cell. *Acta Phytophysiol Sin*, 2000, 26 (5): 458~464
- 65 Zhang X, Miao Y, Song C P, et al. K<sup>+</sup> channels inhibited by hydrogen peroxide mediate abacisic acid signaling in *Vicia faba* guard cells. *Cell Res*, 2001, 11: 195~202
- 66 Zhang X, Dong F C, Gao J, Song C P. Hydrogen peroxide-induced changes in intracellular pH of guard cells precede stomatal closure. *Cell Res*, 2001, 11: 37~43
- 67 Schroeder J I, Kwak J M, Allen G J. Guard cell abscisic acid signaling and engineering drought hardiness in plants. *Nature*, 2001, 410: 327~330 [[DOI](#)]
- 68 Park K Y, Jung J Y, Lee Y, et al. A role for phosphatidylinositol 3-phosphate in abscisic acid-induced reactive oxygen species generation in guard cells. *Plant Physiol*, 2003, 132: 92~98 [[DOI](#)]
- 69 Mustilli A C, Merlot S, Giraudat J, et al. *Arabidopsis OST1* protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell*, 2002, 14: 3089~3099 [[DOI](#)]
- 70 Bestwick C S, Brown I R, Mansfield J W, et al. Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of *Lettuce* cells to *Pseudomonas springae* pv *phaseolicola*. *Plant Cell*, 1997, 9: 209~221 [[DOI](#)]
- 71 Tiwari B S, Belenghi B, Levine A. Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. *Plant Physiol*, 2002, 128: 1271~1281 [[DOI](#)]
- 72 Ren D, Yang H, Zhang S. Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 2002, 277: 559~565 [[DOI](#)]

- 73 Bauerle P A, Baltimore D. NF-κB: Ten years after. *Cell*, 1996, 87: 13~20[DOI]
- 74 Ryals J, Weymann K, Ellis D, et al. The *Arabidopsis NIM1* protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor IκB. *Plant Cell*, 1997, 9: 425~439[DOI]
- 75 Xanthoudakis S, Curran T. Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity. *EMBO J*, 1992, 11: 653~665
- 76 Desikan R, Clarke A, Neill S J, et al. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activates a MAP kinase-like enzyme in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *J Exp Bot*, 1999, 50: 1863~1866[DOI]
- 77 Levine A, Tenhaken R, Lamb C, et al. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 1994, 79: 583~593[DOI]
- 78 Marrs K A. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, 47: 127~158[DOI]
- 79 Listowski I, Abramovitz M, Niitsu Y, et al. Intracellular binding and transport of hormones and xenobiotics by glutathione S-transferases. *Drug Metab Rev*, 1988, 19: 305~318
- 80 Zhang B, Singh K B. *Ocs* element promoter sequences are activated by auxin and salicylic acid in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 2507~2511
- 81 Ulmasov T, Ohmiya A, Guilfoyle T, et al. The soybean *GH2/4* gene that encodes a glutathione S-transferases has a promoter that is activated by a wide range of chemical agents. *Plant Physiol*, 1995, 108: 919~927[DOI]
- 82 Desikan R, Mackerness S A H, Neill S J, et al. Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol*, 2001, 127: 159~172[DOI]
- 83 Wang P C, Du Y Y, An G Y, Zhou Y, Song C P. Analysis of global expression profiles of *Arabidopsis* genes under abscisic acid and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> applications. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2006, 48: 62~74