

# NADPH 氧化酶 NtrbohD 参与烟草悬浮细胞 ABA 诱导的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 快速产生过程<sup>\*</sup>

郝福顺<sup>1,2</sup> 张锦广<sup>1</sup> 于中连<sup>1</sup> 陈 珈<sup>1\*\*</sup>

1. 中国农业大学生命科学学院植物生理生化国家重点实验室, 北京 100094;

2. 河南大学生命科学学院植物逆境重点实验室, 开封 475004

**摘要** 研究了烟草 BY-2 悬浮细胞在脱落酸(ABA)诱导下产生过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)的机制, 发现 ABA 能够显著诱导 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 快速产生, 且 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 主要是由超氧化物歧化酶催化超氧阴离子产生的. ABA 处理可导致烟草悬浮细胞质膜 NADPH 氧化酶活性以时间依赖的方式快速增加, 其增加的幅度和时间与 ABA 诱导 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 积累一致, 而且, 这些增加的效应能够被 NADPH 氧化酶抑制剂碘二苯和咪唑显著抑制, 说明质膜 NADPH 氧化酶参与烟草悬浮细胞 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 快速积累过程. 另外, 用 RT-PCR 和蛋白印迹技术分析了烟草质膜 NADPH 氧化酶基因 *NtrbohD* 的表达水平, 发现该基因在 mRNA 和蛋白水平的表达受 ABA 上调, 表明 *NtrbohD* 参与烟草悬浮细胞 ABA 诱导 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 快速产生过程. 结果说明, ABA 能够诱导悬浮细胞通过 NADPH 氧化酶快速产生活性氧, 提示 NADPH 氧化酶和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可能是植物细胞中 ABA 信号转导途径的重要成分.

**关键词** ABA 烟草悬浮细胞 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> NADPH 氧化酶 *NtrbohD*

超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)和过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)等活性氧(ROS)对植物有毒性, 但它们作为信号分子在调控许多植物生理代谢如病菌侵染、细胞程序性死亡、气孔关闭、光合作用、基因表达和生长发育等过程中起重要作用<sup>[1-3]</sup>. ROS 的快速产生, 即氧化猝发是植物对生物胁迫的早期主要反应. 氧化猝发中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的来源已得到深入研究, 并已证明植株或悬浮细胞受到病菌侵染或激发子处理时, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 主要由与哺乳动物嗜中性粒细胞 gp91<sup>phox</sup> 同源的植物质膜 NADPH 氧化酶产生, NADPH 氧化酶能够将电子从 NADPH 转移到 O<sub>2</sub> 形成 O<sub>2</sub><sup>-</sup>, 后者进一步歧化形成 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>[1,4]</sup>.

脱落酸(ABA)在植物应答许多非生物胁迫包括干旱、盐、冷等反应以及调节发育如营养生长、种子休眠和成熟中起重要作用<sup>[5,6]</sup>. 在拟南芥(*Arabidopsis*

*thaliana*)、蚕豆(*Vicia faba*)和绿豆(*Pisum sativum*)中已经证实, ABA 能够通过质膜 NADPH 氧化酶诱导保卫细胞 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 快速产生, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 介导了 ABA 诱导的气孔关闭过程<sup>[7-10]</sup>. ABA 不仅存在于保卫细胞, 而且存在于其他植物细胞, 但到目前为止, 在除保卫细胞外的其他细胞中, 有关 ABA 诱导氧化猝发以及 ROS 来源的报道很少. 尽管蒋明义等报道, 用 ABA 处理玉米(*Zea mays*)幼苗可激活 NADPH 氧化酶, 导致 ROS 大量产生<sup>[11]</sup>. 但该结果是 ABA 长时间(12 h)处理去根玉米苗后得到的, 而且他们未在分子水平上对 NADPH 氧化酶进行研究. 在一般的植物细胞中, ABA 能否在很短的时间内(几分钟到几十分钟)快速诱导 ROS 产生, 该 ROS 是否与 NADPH 氧化酶有关, 详细的机制是什么还不清楚.

2007-07-26 收稿, 2007-09-20 收修改稿

<sup>\*</sup> 国家重点基础研究发展计划(批准号: G1999011700, 2003CB114300)、国家自然科学基金(批准号: 30170088, 30370120)和教育部博士基金(批准号: 20020019030)资助项目

<sup>\*\*</sup> 通信作者, E-mail: chenja@public.bta.net.cn

©1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

烟草(*Nicotiana tabacum*)中编码 NADPH 氧化酶的基因 *NtrbohD* 已被克隆, 并证实 *NtrbohD* 定位在质膜上且在烟草细胞受到激发子刺激时产生 ROS<sup>[12]</sup>, 然而, *NtrbohD* 是否参与 ABA 诱导的 ROS 快速产生过程还不清楚。

我们研究了烟草 BY-2 悬浮细胞 ABA 诱导 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 快速积累的过程, 试图揭示 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 产生的机制. 结果表明, ABA 能够诱导 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 快速产生, 质膜 NADPH 氧化酶 *NtrbohD* 参与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 快速积累过程。

## 1 材料和方法

### 1.1 化学试剂

2', 7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(H2DCF-DA) 购自 Molecular Probes (Eugene, Oregon USA) 公司; ABA, DPI (Diphenylene iodonium) 和二乙基二硫代氨基甲酸盐 (DDC) 购自 Sigma 公司; XTT (sodium, 3'-[1-[phenylamino-carbonyl]-3, 4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzenesulfonic acid hydrate) 购自 Diagnostic Chemicals (Charlottetown, Prince Edward Island, Canada); NADPH, 牛血清白蛋白和超氧化物歧化酶(SOD) 为 Amresco 公司产品; 其他为国产分析纯, 购自上海生物工程有限公司。

### 1.2 植物材料

烟草 Bright Yellow (BY-2) 悬浮细胞按照 Nagata 的方法<sup>[13]</sup> 每周继代培养. 所有的实验均使用继代培养 5 d 的细胞(处于对数生长期)。

### 1.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的荧光测定

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量的测定根据 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 使 H2DCF-DA 转化为 2', 7'-二氯二氢荧光素(H2DCF) 后相对荧光强度(RFU)增加的原理在 Kawano 等方法<sup>[14]</sup> 的基础上有所改动. 烟草悬浮细胞溶液用 40 μm 孔径的筛过滤后, 取 1 g 鲜重细胞重悬于 25 mL 内含 200 mmol/L 蔗糖的新鲜 MS 培养液(pH 6.0)中, 振荡培养 3 h 后, 取 1.5 mL 溶液与 10 μmol/L ABA 及 10 μmol/L H2DCF-DA 分别温育 0, 5, 15, 30 和 60 min (期间不断摇动并保持黑暗)后立即用 F-4500 荧光分光光度计(HITACHI, 日本产)测定上述混合物的荧光强度. 激发光波长为 488 nm, 发射光波长为 525 nm. 用不加 ABA 处理的样品作为对照. 抑

制剂处理方法: 悬浮细胞与抑制剂温育 10 min 后再与 ABA 温育. 所有实验至少重复 5 次. 在 0.05 概率水平上用 Student's *t* 检验计算差异显著性。

### 1.4 质膜囊泡的分离

用两相法分离质膜<sup>[15, 16]</sup>. 烟草悬浮细胞溶液用筛过滤后, 细胞经匀浆、过滤和离心后得到膜微粒体. 将膜微粒体加到两相溶液中分离, 得到质膜囊泡, 立即用该囊泡鉴定质膜的纯度<sup>[11, 15]</sup> 和测定 NADPH 氧化酶活性. 所有步骤均在 4 °C 下进行。

### 1.5 NADPH 氧化酶活性测定

按 Sagi 和 Fluhr 的方法<sup>[16]</sup>, 根据超氧阴离子还原 SOD 抑制的、依赖 NADPH 的 XTT 的量测定质膜囊泡的 NADPH 氧化酶活性. 1 mL 测定液中含 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mmol/L XTT、100 μmol/L NADPH 和 20 μg 膜蛋白. 加入 NADPH 后启动反应, 5 min 后测定 470 nm 的光吸收. 蛋白质含量根据 Bradford<sup>[17]</sup> 的方法测定。

### 1.6 *NtrbohD* 的 RT-PCR 表达分析

用 10 μmol/L ABA 分别处理 BY-2 悬浮细胞 0, 15, 30 和 60 min 后提取总 RNA, 反转录得到 cDNA, 以 *actin* 表达量作为上样对照进行 RT-PCR 反应. 扩增的 *NtrbohD* 片段为 578 bp, 特异引物为:

引物 1: 5'-TGGAGGAAATAATTTCAATCAAGG-3'

引物 2: 5'-GCATCACAACCACAACACTATATATCAAC-3'

对 PCR 产物进行了序列测定, 测序结果正确. PCR 反应条件为: 94 °C, 5 min; 94 °C, 40 s; 55 °C, 40 s, 72 °C, 40 s; 25 个循环. *NtrbohD* 基因的 GenBank 登陆号为: AJ309006.

### 1.7 *NtrbohD* 抗体制备

用 RT-PCR 从烟草 cDNA 3' 保守区扩增约 500 bp 的 *NtrbohD* 片段, 引物如下:

P1: 5'-AAAAGGTACCAACAACATGAAGGCAATGGACG-3'

P2: 5'-AAAAGTCGACGATCCAAGGCGTTGTCTTAGTTC-3'

将扩增到的片段与 pET-30a(+) 构建融合载体, 测序正确后, 将融合载体 pET-*NtrbohD* 转化到大

肠杆菌 JM 109(DE3)中, 在 IPTG 诱导下表达融合蛋白, 回收纯化融合蛋白后在兔中制备抗体, 得到的抗体效价为 1 : 1000.

### 1.8 蛋白免疫印迹分析

从对照和 ABA 处理 30 min 的烟草悬浮细胞中提取质膜, 从质膜得到膜蛋白<sup>[19]</sup>, 用蛋白免疫印迹检测 *NtrbohD* 的表达. 一抗为抗 *NtrbohD* 的兔抗体, 二抗为碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG.

## 2 结果

### 2.1 ABA 诱导 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 积累

首先研究了 ABA 对 BY-2 细胞 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 积累的影响. 如图 1 所示, 用 10 $\mu$ mol/L ABA 处理烟草悬浮细胞 15 min 后显著增加了显示 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水平的 RFU, 30 min 时 RFU 达到最大值, 以后下降. ABA 处理 30 min 时 RFU 比对照增加约 42%. 这些数据表明, ABA 诱导了烟草悬浮细胞 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的快速积累; 而整个过程中, 对照的 RFU 没有明显变化.

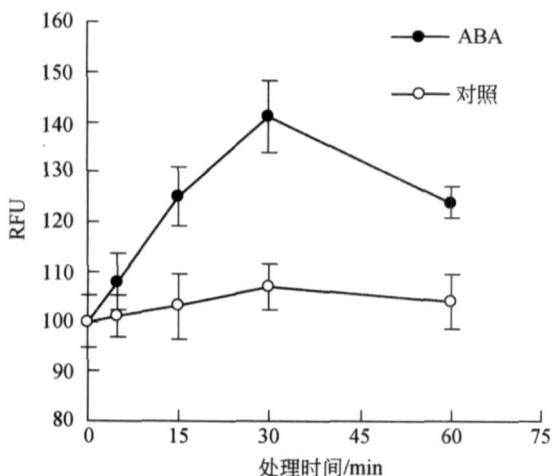


图 1 ABA 对烟草悬浮细胞 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 积累的影响

### 2.2 快速积累的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 来自 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的歧化

检测了 SOD 和 SOD 抑制剂 DDC<sup>[18]</sup> 对 ABA 诱导 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 形成的影响. 见表 1. SOD 明显增加了 ABA 诱导的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 积累, 而 DDC 则显著降低了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 积累, 结果说明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 主要是由 SOD 催化 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 形成的.

### 2.3 质膜 NADPH 氧化酶参与 ABA 诱导的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 形成

为进一步确定 NADPH 氧化酶是否参与 ABA

诱导 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 产生过程, 我们研究了 ABA 对质膜 NADPH 氧化酶活性的影响. 首先分离烟草悬浮细胞质膜, 然后通过测定几种不同标志酶的活性检测了质膜的纯度, 标志酶包括对钒酸盐敏感的质膜 ATP 酶、对叠氮化钠敏感的线粒体膜 ATP 酶和对硝酸根离子敏感的液泡膜 ATP 酶. 结果表明, 从粗提微囊(MIC)到最终的膜成分(U<sub>3</sub>), 对钒酸盐敏感的 ATP 酶活性增加了约 8 倍, 说明 U<sub>3</sub> 中所含的主要为质膜, 其他内膜成分很少(表 2).

表 1 SOD 和 DDC 对 ABA 诱导 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 产生的影响

	对照	ABA 处理
SOD <sup>-</sup> DDC <sup>-</sup>	72±6.0	100.0
SOD <sup>+</sup>	84±3.9	122±2.8
DDC <sup>+</sup>	27±2.5	43±4.1
SOD <sup>+</sup> DDC <sup>+</sup>	55±4.4	79±6.8

存在 SOD(20U/ml)或 DDC(1mmol/L)的情况下, 用 10 $\mu$ mol/L ABA 处理烟草悬浮细胞 30 min. SOD 和 DDC 在加入 ABA 10 min 前加入. 将 ABA 处理悬浮细胞后的 RFU 设为 100

表 2 悬浮细胞膜微囊(MIC)和质膜囊泡(U<sub>3</sub>)中标志酶的活性/(nmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>)蛋白

标志酶活性	MIC	U <sub>3</sub>	U <sub>3</sub> /MIC
对钒酸盐敏感的 ATP 酶	50.2±3.1	402.1±20.0	8.01
细胞色素 c 氧化酶	198.3±20.6	45.5±4.5	0.23
对硝酸根离子敏感的 ATP 酶	14.8±1.2	2.9±0.5	0.20

表中的数据为 3 次重复的平均数±标准误

实验发现, 10 $\mu$ mol/L ABA 不仅以时间依赖的方式显著增加了 RFU 值, 而且显著增加了质膜 NADPH 氧化酶活性, 它们增加的规律也非常相似. 另外, 用两个 NADPH 氧化酶抑制剂 DPI 和咪唑预处理烟草悬浮细胞后显著抑制了 ABA 诱导的质膜 NADPH 氧化酶活性和 RFU 增加(图 2). DPI 的这种抑制作用非常明显, 2 $\mu$ mol/L 的 DPI 几乎全部抑制了质膜 NADPH 氧化酶活性和 RFU 的增加. 结果暗示, 质膜 NADPH 氧化酶参与 ABA 诱导 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 快速产生过程.

### 2.4 *NtrbohD* 的表达

烟草 NADPH 氧化酶基因 *NtrbohD* 已被克隆. 有研究证实当烟草细胞受到真菌激发子作用时, *NtrbohD* 能够产生 ROS<sup>[12]</sup>. 为了进一步确定 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 是否由 ABA 通过 *NtrbohD* 诱导产生, 我们利用 RT-PCR 分析了 BY-2 细胞中 *NtrbohD* 的转录表达

情况. 与预料的结果相同, 在 ABA 未处理的 BY-2 细胞中, *NtrbohD* 的表达水平较低, 但当 ABA 处理细胞 30 min 后, *NtrbohD* 表达水平明显升高, 60 min 后又降低(图 3), 说明 *NtrbohD* 参与 ABA 诱导  $H_2O_2$  产生过程.

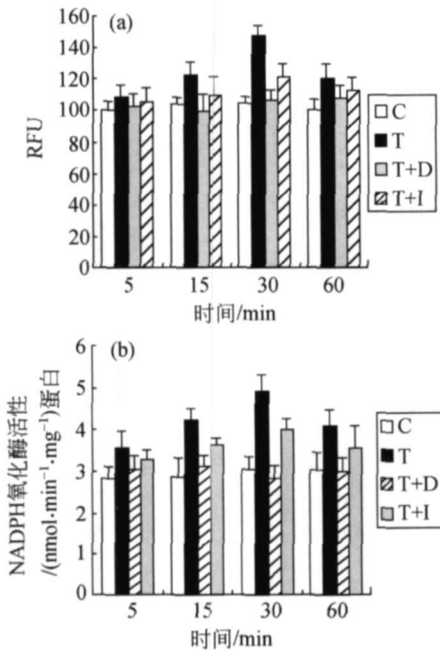


图 2 NADPH 氧化酶抑制剂 DPI 和咪唑对 ABA 诱导 RFU (a) 和质膜 NADPH 氧化酶活性 (b) 的影响  
C, 对照; T, 10  $\mu mol/L$  ABA 处理烟草细胞; T+D 和 T+I 分别代表先用 2  $\mu mol/L$  DPI 或 20  $mmol/L$  咪唑预处理烟草细胞 10 min 后再用 10  $\mu mol/L$  ABA 处理. 所得到的数值分别为 5 次 (a) 或 3 次 (b) 重复的平均数  $\pm$  标准误

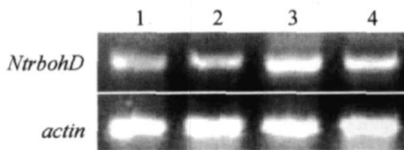


图 3 ABA 处理烟草悬浮细胞后 *NtrbohD* 基因的表达  
1—4 表示烟草细胞分别用 10  $\mu mol/L$  ABA 处理 0, 15, 30 和 60 min

### 2.5 *NtrbohD* 的蛋白印迹分析

我们分离了烟草悬浮培养细胞的质膜蛋白并用抗 *NtrbohD* 的抗体进行了蛋白质印迹分析, 印迹分析检测出了 1 条约 110 ku 的带, 来自对照 BY-2 细胞质膜的带较弱, 而来自 ABA 处理细胞的带较强(图 4), 这与图 3 RT-PCR 的实验结果一致.

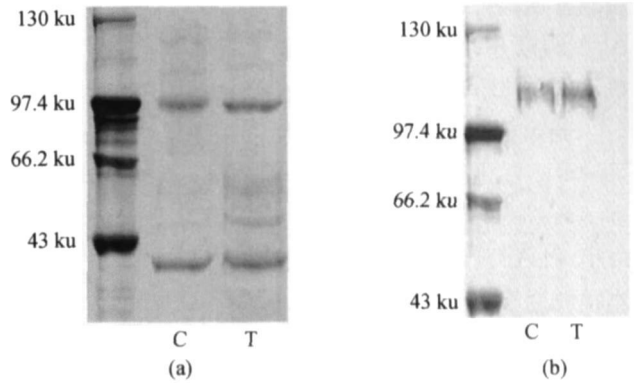


图 4 *NtrbohD* 的蛋白印迹分析

质膜蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离(每泳道 20  $\mu g$  蛋白)后, 用抗 *NtrbohD* 的抗体进行免疫印迹. (a) 为考马斯亮蓝染色图, (b) 为免疫印迹图. C 和 T 分别为对照和烟草细胞用 10  $\mu mol/L$  ABA 处理 30 min 得到的带

### 3 讨论

研究证明, ROS 作为第二信使参与许多植物胁迫反应有关的信号转导过程<sup>[3]</sup>. 因此植物在生物或非生物胁迫下 ROS 的来源成为人们研究的焦点. 已有报道表明, 植物胁迫反应激素 ABA 在拟南芥、蚕豆和绿豆保卫细胞中能够诱导 ROS 产生<sup>[7-10, 19, 20]</sup>, 另外, 用 ABA 长时间处理玉米幼苗也能导致 ROS 的显著增加<sup>[11]</sup>, 但在除保卫细胞外的其他植物细胞中, ABA 是否能诱导 ROS 快速产生、哪些蛋白或酶参与 ROS 的产生过程还不清楚. 尽管 Köhler 等认为在保卫细胞中,  $H_2O_2$  和 ABA 可能通过不同的信号途径起作用<sup>[21]</sup>, 但本研究发现, 用 10  $\mu mol/L$  ABA 处理烟草悬浮细胞 30 min 就导致了  $H_2O_2$  产生的快速增加(图 1), 这说明在除保卫细胞的其他植物细胞中, ABA 诱导 ROS 产生可能是一个普遍现象, ROS 可能是 ABA 信号中的重要中间成分<sup>[9, 11]</sup>.

在植物细胞表面, 过氧化物酶、多胺氧化酶和 NADPH 氧化酶等都能够产生  $H_2O_2$ <sup>[3]</sup>. 已经证明, 质膜 NADPH 氧化酶在 ABA 诱导拟南芥气孔关闭过程中<sup>[9]</sup> 以及在 ABA 长时间处理玉米幼苗中参与 ROS 的产生过程<sup>[16]</sup>. 我们也发现用 ABA 处理烟草悬浮细胞能够显著增加质膜 NADPH 氧化酶活性和  $H_2O_2$  快速积累. 这两种增加的效应可被 NADPH 氧化酶抑制剂 DPI 和咪唑显著抑制, DPI 能够通过结合到氧化酶的两个氧化还原元件上抑制其活性<sup>[22]</sup>, 这种抑制作

用非常明显,说明NADPH氧化酶参与烟草悬浮细胞ABA诱导ROS快速产生.但以上结果不能排除其他酶也可能在ABA诱导H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>快速产生过程中起作用.

到目前为止,在拟南芥基因组中已发现了10个NADPH氧化酶基因(*AtrbohA-J*),其中,*AtrbohD*和*AtrbohF*被证实在植物抵抗细菌等病原菌感染反应<sup>[23]</sup>和ABA诱导气孔关闭中起重要作用<sup>[9,10]</sup>.而且当植物受到光胁迫时,*AtrbohD*具有放大ROS信号的作用<sup>[24]</sup>.烟草NADPH氧化酶*NtrbohD*与*AtrbohD*在氨基酸序列上具有很高的同源性(72%相同),并且*NtrbohD*在烟草细胞受到真菌激发子Cryptogein作用时能够产生ROS<sup>[12]</sup>.它是否在ABA信号中起作用还不清楚.本研究发现,*NtrbohD*在mRNA和蛋白水平受到ABA的上调,说明*NtrbohD*参与烟草悬浮细胞ABA诱导H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的积累过程.但ABA调控*NtrbohD*活性的详细机制还需要进一步深入研究.

### 参 考 文 献

- Lamb C, Dixon RA. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Biol*, 1997, 48: 251-275
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants. *J Exp Bot*, 2002, 53: 1237-1247
- Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55: 373-399
- Torres MA, Dangl JL. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8: 397-403
- Finkelstein RR, Gampala SS, Rock CD. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell*, 2002, 14: S15-S45
- Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK. Cell signaling during cold, drought, and salt stresses. *Plant Cell*, 2002, 14: S165-S183
- Pei ZM, Murata Y, Benning G, et al. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*, 2000, 406: 731-734
- Zhang X, Zhang L, Dong F, et al. Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Physiol*, 2001, 126: 1438-1448
- Kwak JM, Mori IC, Pei ZM, et al. NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J*, 2003, 22: 2623-2633
- Desikan R, Cheung MK, Clarke A, et al. Hydrogen peroxide is a common signal for darkness- and ABA-induced stomatal closure in *Pisum sativum*. *Funct Plant Biol*, 2004, 31: 913-920
- Jiang MY, Zhang JH. Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in abscisic acid- and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Planta*, 2002, 215: 1022-1030
- Simon-Plas F, Elmayan T, Blein JP. The plasma membrane oxidase *NtrbohD* is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J*, 2002, 31: 137-147
- Nagata T, Nemoto Y, Hasezawa S. Tobacco BY-2 cell line as the 'HeLa' cell in cell biology of higher plants. *Int Rev Cytol*, 1992, 132: 1-30
- Kawano T, Pinontoan R, Uozumi N, et al. Aromatic monoamine-induced immediate oxidative burst leading to an increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration in tobacco suspension culture. *Plant Cell Physiol*, 2000, 41: 1251-1258
- 朱美君, 陈珈, 朱庆鸿等. 两相分配法制备玉米根质膜及其纯度鉴定. *中国生物化学与分子生物学报*, 1997, 13(6): 686-690
- 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
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254
- Papadakis AK, Roubelakis Angelakis KA. The generation of active oxygen species differs in tobacco and grapevine mesophyll protoplasts. *Plant Physiol*, 1999, 121: 197-205
- Murata Y, Pei ZM, Mori IC, 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 *abil-1* and *ab2-1* protein phosphatase 2C mutants. *Plant Cell*, 2001, 13: 2513-2523
- Desikan R, Cheung MK, Bright J, et al. ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *J Exp Bot*, 2004, 55: 205-212
- Köhler B, Hills A, Blatt MR. Control of guard cell ion channels by hydrogen peroxide and abscisic acid indicates their action through alternate signaling pathways. *Plant Physiol*, 2003, 131: 385-388
- Doussiere J, Gaillard J, Vignais PV. The heme component of the neutrophil NADPH oxidase complex is a target for arylidonium compounds. *Biochem*, 1999, 38: 3694-3703
- Torres MA, Dangl JL, Jones JDG. A *rabidopsis* gp91<sup>phox</sup> homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 517-522
- Davletova S, Rizhsky L, Liang H, et al. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2005, 17: 268-281