

H₂S位于H₂O₂下游参与乙烯诱导拟南芥气孔关闭过程

侯智慧, 车永梅, 王兰香, 侯丽霞, 刘新*

青岛农业大学生命科学院, 山东省高校植物生物技术重点实验室, 山东青岛266109

摘要: H₂O₂和H₂S是植物体内重要的信号分子,二者均参与乙烯诱导的拟南芥气孔关闭过程。以拟南芥野生型及其突变体为材料研究了H₂O₂和H₂S在乙烯诱导拟南芥气孔关闭过程中的相互关系。结果表明,乙烯能够诱导野生型拟南芥叶片H₂S含量及L-/D-半胱氨酸脱硫基酶(L-/D-CDes)活性显著增加,促进气孔关闭,但对H₂O₂合成突变体*AtrbohD*、*AtrbohF*、*Atpao2*和*Atpao4*植株叶片无显著作用;乙烯亦可引起H₂S合成突变体*Atl-cdes*和*Atd-cdes*气孔保卫细胞H₂O₂水平的显著增加,但其气孔运动没有显著作用。此外,H₂O₂清除剂和合成抑制剂均能抑制乙烯诱导的拟南芥叶片H₂S含量和L-/D-CDes活性的增加及气孔开度的减小;而H₂S清除剂和合成抑制剂虽能抑制乙烯诱导的气孔关闭,却不能改变乙烯对拟南芥叶片气孔保卫细胞H₂O₂的作用效应。由此表明H₂S位于H₂O₂下游介导乙烯诱导拟南芥气孔关闭过程。

关键词: 硫化氢;过氧化氢;乙烯;气孔关闭

H₂S Functions Downstream of H₂O₂ in Mediating Ethylene-Induced Stomatal Closure in *Arabidopsis thaliana*

HOU Zhi-Hui, CHE Yong-Mei, WANG Lan-Xiang, HOU Li-Xia, LIU Xin*

Key Lab of Plant Biotechnology in Universities of Shandong Province, College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China

Abstract: Hydrogen sulfide (H₂S) and hydrogen peroxide (H₂O₂) as important plant signaling molecules both participate in ethylene induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*, but the relationship between them is unclear. So we used *A. thaliana* wide type and related mutants as materials to study the interaction between H₂S and H₂O₂ in mediating ethylene induced stomatal closure. The results showed that ethylene triggered raise of H₂S content and L-/D-cysteine desulphydrase (L-/D-CDes) activity as well as stomatal closure in leaves of *A. thaliana* wild type, but not in those of H₂O₂ deficient mutants *AtrbohD*, *AtrbohF*, *Atpao2* and *Atpao4*, ethylene induced increase in H₂O₂ content in H₂S deficient mutants *Atl-cdes* and *Atd-cdes*, but couldn't induce stomatal closure. H₂O₂ scavenger and synthesis inhibitors depressed the inducing effect of ethylene on H₂S content, L-/D-CDes activity as well as stomatal closure in leaves of *A. thaliana*. However, although H₂S scavenger and synthesis inhibitors suppressed ethylene-induced stomatal closure, but had no significant effect on ethylene-induced increase in H₂O₂ content in guard cells of *A. thaliana*. From these data it can be deduced that H₂S acts downstream of H₂O₂ mediating ethylene-induce stomatal closure in *A. thaliana*.

Key words: hydrogen sulfide; hydrogen peroxide; ethylene; stomatal closure

气孔是植物与外界进行气体交换的门户,气孔运动直接影响着植物的光合作用、呼吸作用及蒸腾作用等多种生理过程。气孔对外界刺激非常敏感,能对多种生物、非生物胁迫及ABA和乙烯等植物激素做出反应(李保珠等2012;安国勇等2012;高晶晶等2011)。业已证明,乙烯作为一种重要的植物内源激素介导了多种因素对气孔运动的调控,且作用存在差异。如,在不同氮营养条件下,外源乙烯可以不同程度提高芥末(*Brassica juncea* L.)植株的气孔导度和光合作用,促进植株生长

(Iqbal等2011);细胞分裂素(cytokinin, CTK)和生长素(indole-3-acetic acid, IAA)亦通过调节乙烯合成抑制脱落酸(abscisic acid, ABA)诱导的气孔关闭(Tanaka等2005, 2006);同时亦有报道乙烯通过过

收稿 2012-08-13 修定 2012-10-17

资助 国家自然科学基金(30970228和31170237)、山东省自然科学基金(ZR2010CM024)和植物生理学与生物化学国家重点实验室开放课题(SKLPPBKF11001)。

* 通讯作者(E-mail: liuxin6080@yahoo.com.cn; Tel: 0532-88030224)。

氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)介导UV-B辐射诱导的蚕豆气孔关闭(He等2011),能够诱导拟南芥气孔关闭(Desikan等2006; 刘国华等2009; Liu等2010),且 Ca^{2+} 、一氧化氮(nitric oxide, NO)和 H_2O_2 是乙烯诱导气孔关闭信号转导途径的重要组成部分(Liu等2010; Kolla等2007; 刘国华2009)。乙烯调控气孔运动是个复杂的过程, 探明其调控机制对全面了解乙烯的作用机制, 深入掌握气孔的开闭机制具有重要的意义。

硫化氢(hydrogen sulfide, H_2S)和 H_2O_2 均是普遍存在的信号分子, 植物体内 H_2S 的主要合成酶是L-/D-半胱氨酸脱巯基酶(L-/D-cysteine desulfhydrase, L-/D-CDes), 参与 H_2O_2 形成的主要酶有NADPH氧化酶、细胞壁过氧化物酶和多胺氧化酶。业已证明 H_2S 参与ABA和茉莉酸等诱导的气孔关闭过程(García-Mata和Lamattina 2010; 侯智慧等2011), 干旱通过 H_2O_2 促进 H_2S 积累进而诱导拟南芥气孔关闭(王兰香等2012)。那么在乙烯诱导的气孔关闭信号转导途径中 H_2S 和 H_2O_2 二者之间的联系怎样? 为此, 本实验以拟南芥野生型、 H_2S 和 H_2O_2 合成突变体为材料, 运用植物生理学的技术手段结合药理学实验, 研究 H_2S 和 H_2O_2 在乙烯诱导气孔关闭信号转导过程中的关系, 以期为进一步掌握气孔运动的信号转导机制提供实验证据。

材料与方法

1 实验材料和试剂

以拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)野生型(Col-0)、L-/D-CDes基因的T-DNA插入突变体*Atlc-des* (SALK_041918)和*Atd-cdes* (CS853264) (购自美国的拟南芥生物资源中心)、多胺氧化酶基因的T-DNA插入突变体*Atpao2* (SALK_046281)和*Atpao4* (SALK_020782) (购自美国的拟南芥生物资源中心)、*AtrbohD*和*AtrbohF*突变体(河北师范大学陈玉玲教授惠赠)为材料。将野生型及突变体种子经10% NaClO灭菌15 min, 无菌水冲洗5次后, 点种于无菌MS固体培养基, 4 °C条件下处理2~4 d打破休眠, 转入光照培养箱(22 °C, 16 h/8 h光周期)垂直生长约1周, 转入到培养土(市售花卉营养土)和蛭石(V/V=1:1)的混合培养介质中, 于光/暗周期16 h/8 h、温度18~22 °C、光强120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 和相对

湿度70%下培养。

乙烯利、 H_2S 清除剂次牛磺酸(hypotaurine, HT)、 H_2S 合成抑制剂氨基氧乙酸(aminoxyacetic acid, AOA)、 H_2O_2 清除剂抗坏血酸(ascorbic acid, AsA)、细胞壁过氧化物酶的抑制剂水杨羟肟酸(salicylhydroxamic acid, SHAM)、NADPH氧化酶的抑制剂二苯基碘(diphenylene iodonium, DPI)、多胺氧化酶的抑制剂 β -羟乙基肼(β -hydroxyethylhydrazine, β -HEH)和二氨基十二烷(1,12-diaminododecane, DADD)、L-半胱氨酸和D-半胱氨酸均购于Sigma (美国)公司, 其他药品为国产分析纯。

2 实验材料处理

取培养4~5周生长良好的拟南芥野生型及各突变体完全展开的莲座叶为实验材料, 进行以下处理。

野生型拟南芥表皮条分别用MES缓冲液(10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mes/KOH、0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $CaCl_2$ 、50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, pH 6.1), 以及用MES缓冲液配制的0.004%乙烯利、 H_2S 清除剂(15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HT)、 H_2S 合成抑制剂(0.4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ AOA、0.4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_2OH 、0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $C_3H_3KO_3$ +0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_3)或 H_2O_2 清除剂(0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ AsA)、 H_2O_2 合成抑制剂(0.01 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DPI、0.01 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SHAM、0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DADD和1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -HEH)的处理液处理, 于处理后0.5 h测定气孔开度,

H_2S 合成突变体(*Atlc-des*和*Atd-cdes*)和 H_2O_2 合成突变体(*Atpao2*、*Atpao4*、*AtrbohD*和*AtrbohF*)表皮条分别用MES缓冲液以及用MES缓冲液配制的0.004%乙烯利处理, 于处理后0.5 h测定气孔开度。

野生型拟南芥或 H_2O_2 合成突变体叶片用0.004%乙烯利、 H_2O_2 清除剂或 H_2O_2 合成抑制剂的处理液处理, 于4 h测定 H_2S 含量和L-/D-半胱氨酸脱巯基酶活性。

3 实验方法

3.1 气孔开度的测定

气孔开度的测定参照刘国华等(2009)的方法。取生长良好4~5周龄拟南芥完全展开的莲座叶, 光诱导使气孔张开。撕取其下表皮, 小心刷涂上面粘附的叶肉细胞, 切成0.5 cm \times 0.5 cm的小块, 用显微测微尺测量气孔的初始孔径, 然后置于各

处理液中,在光下(光强200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)处理0.5 h。记录终态孔径。测量时,随机取3个视野,每个视野内随机取10个气孔。

3.2 H₂S含量和L-/D-CDes活性的测定

H₂S含量的测定参照亚甲基蓝法(Sekiya等1982); L-/D-CDes活性测定参照侯智慧等(2011)的方法进行。

3.3 保卫细胞胞内H₂O₂的检测

使用特异性荧光探针H₂DCF-DA检测保卫细胞内的H₂O₂(刘国华等2009)。取生长良好4~5周龄拟南芥完全展开的莲座叶,撕取其下表皮,放入表皮条缓冲液中,光诱导3 h使气孔完全张开,后将其置于各种处理液(乙烯利、乙烯利与H₂S清除剂共处理液、乙烯利与H₂S合成抑制剂共处理液)中处理。处理后加入50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H₂DCF-DA (Sigma, 美国) 25 °C下避光孵育20 min,孵育完毕后用表皮条缓冲液冲洗3次,除去吸附的染料。将处理好的表皮条置于载玻片上,盖好盖片,用488 nm蓝光激发,发射波长在505~530 nm之间,经激光共聚焦扫描显微镜(Zeiss LSM 510 META)扫描,气孔保卫细胞中H₂O₂的静态分布图像在LSM 5 Image Browse软

件包下获得。

3.4 数据统计方法

每个样品每个处理进行3次重复。用DPS数据处理系统作方差分析。

实验结果

1 H₂O₂位于H₂S上游参与乙烯诱导气孔关闭的可能性

1.1 H₂S或H₂O₂清除剂和合成抑制剂对乙烯调控的拟南芥气孔关闭的影响

为证明H₂S和H₂O₂均参与乙烯对气孔运动的调控,检测了H₂S清除剂HT和合成抑制剂AOA、NH₂OH、C₃H₃KO₃+NH₃及H₂O₂清除剂AsA、NADPH氧化酶抑制剂DPI、细胞壁过氧化物酶抑制剂SHAM、多胺氧化酶的抑制剂 β -HEH和DADD对乙烯诱导的气孔关闭的影响。结果表明,H₂S或H₂O₂清除剂和合成抑制剂均能抑制乙烯诱导的拟南芥叶片气孔开度减小效应(图1),说明二者均是乙烯诱导气孔关闭信号转导途径的重要组成部分。其中DPI和SHAM的作用效果要明显大于 β -HEH和DADD,推测NADPH氧化酶和细胞壁过氧化物酶是该过程中H₂O₂的主要来源。

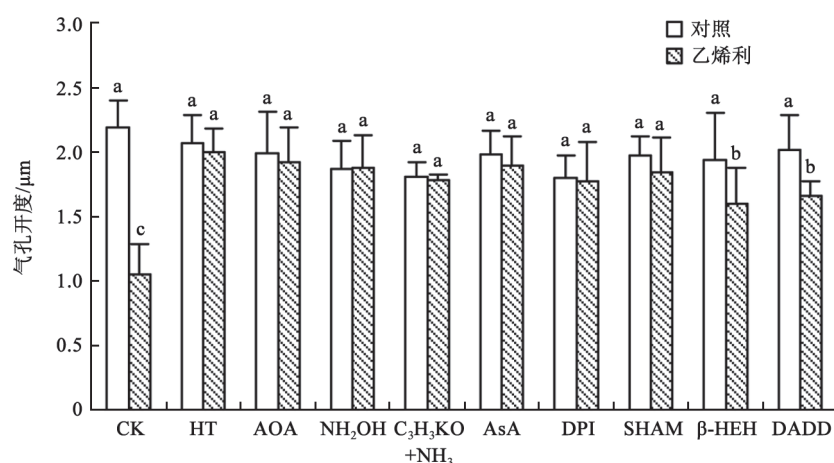


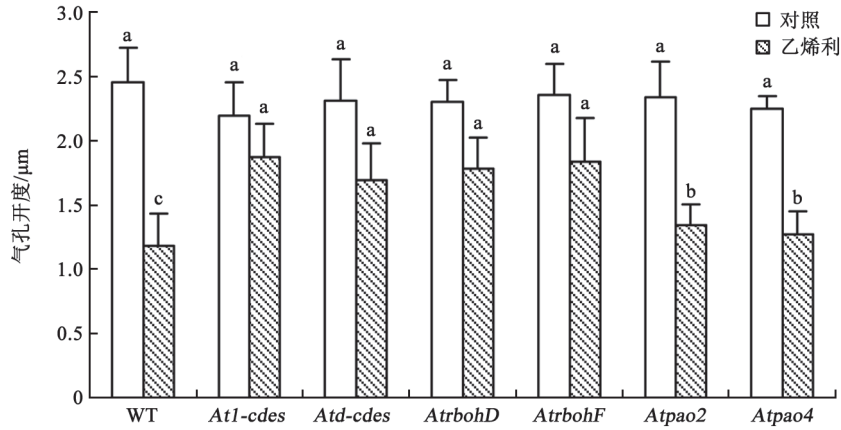
图1 H₂S或H₂O₂清除剂和合成抑制剂对乙烯调控拟南芥气孔运动的影响

Fig.1 Effects of H₂S or H₂O₂ scavengers and synthesis inhibitors on ethylene-induced stomatal closure in *Arabidopsis*
小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。下图同。

1.2 乙烯对H₂S或H₂O₂合成突变体叶片气孔运动的影响

由图2可以看出, H₂S或H₂O₂合成突变体叶片

气孔对乙烯的敏感程度下降,其中乙烯对H₂S合成突变体*Atl-cdes*、*Atd-cdes*和NADPH氧化酶突变体*AtbohF*和*AtbohD*几乎不起作用,进一步证明H₂S

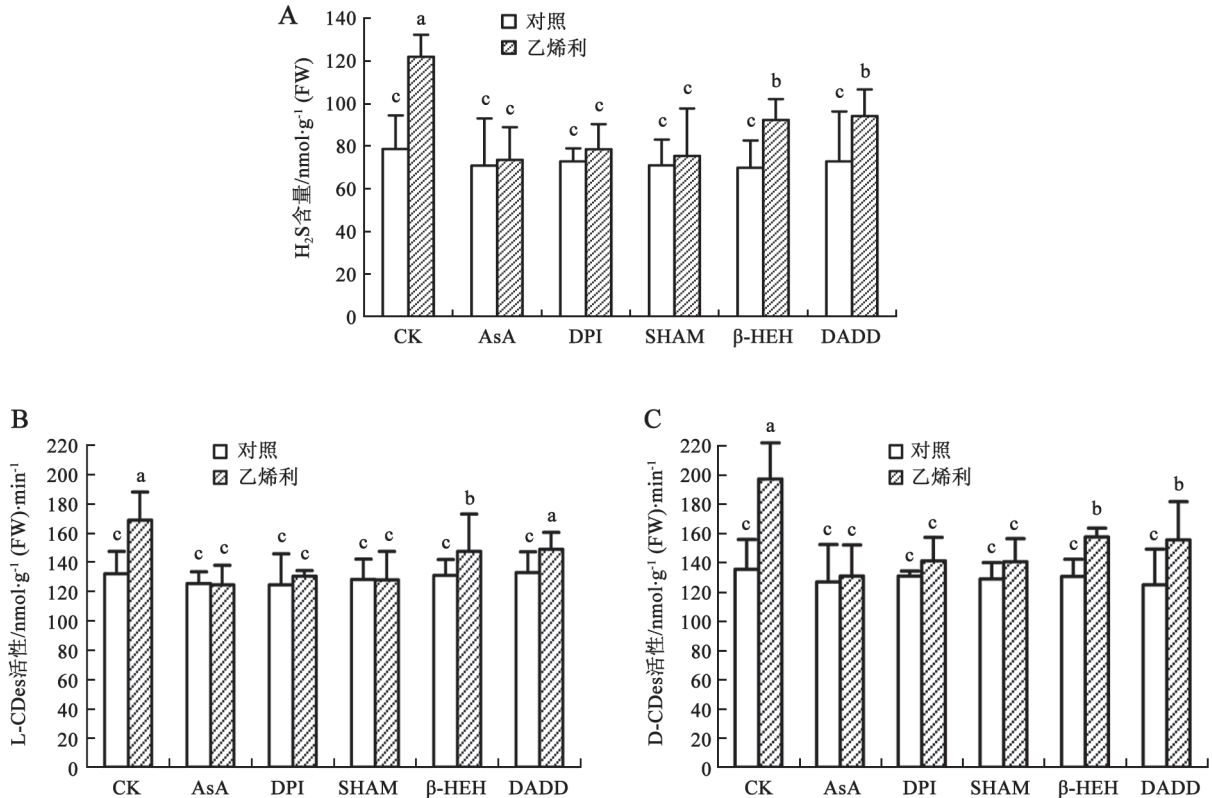
图2 乙烯对H₂S或H₂O₂合成突变体叶片气孔运动的影响Fig.2 Effect of ethylene on stomatal movement in H₂S or H₂O₂ deficient mutants

和H₂O₂参与乙烯诱导气孔关闭过程。

1.3 H₂O₂清除剂和合成抑制剂对乙烯调控的H₂S含量及L-/D-CDes活性的影响

为探明在乙烯诱导气孔关闭过程中H₂S与H₂O₂的相互关系,检测了H₂O₂清除剂和合成抑制

剂对乙烯诱导的H₂S含量及L-/D-CDes活性变化的影响。结果表明, H₂O₂的清除剂和合成抑制剂均能抑制乙烯诱导的H₂S含量和L-/D-CDes活性的增加(图3)。由此推测, H₂O₂通过作用于下游的H₂S参与乙烯诱导的拟南芥气孔关闭。

图3 H₂O₂清除剂及合成抑制剂对乙烯调控的拟南芥叶片H₂S含量(A)、L-CDes活性(B)和D-CDes活性(C)的影响Fig.3 Effects of H₂O₂ scavenger and synthesis inhibitors on ethylene-induced H₂S content (A), L-CDes activity (B) and D-CDes activity (C) in *Arabidopsis* leaves

1.4 乙烯对H₂O₂合成突变体H₂S水平和L-/D-CDes活性的影响

图4显示, 乙烯可诱导野生型拟南芥叶片H₂S含量和L-/D-CDes活性升高(图4), 但对*AtrbohD*、

AtrbohF、*Atpao2*和*Atpao4*的诱导作用均有不同程度减弱, 其中对*AtrbohD*和*AtrbohF*的诱导作用略低于*Atpao2*和*Atpao4*。进一步推测H₂O₂通过作用于下游的H₂S参与乙烯诱导的拟南芥气孔关闭。

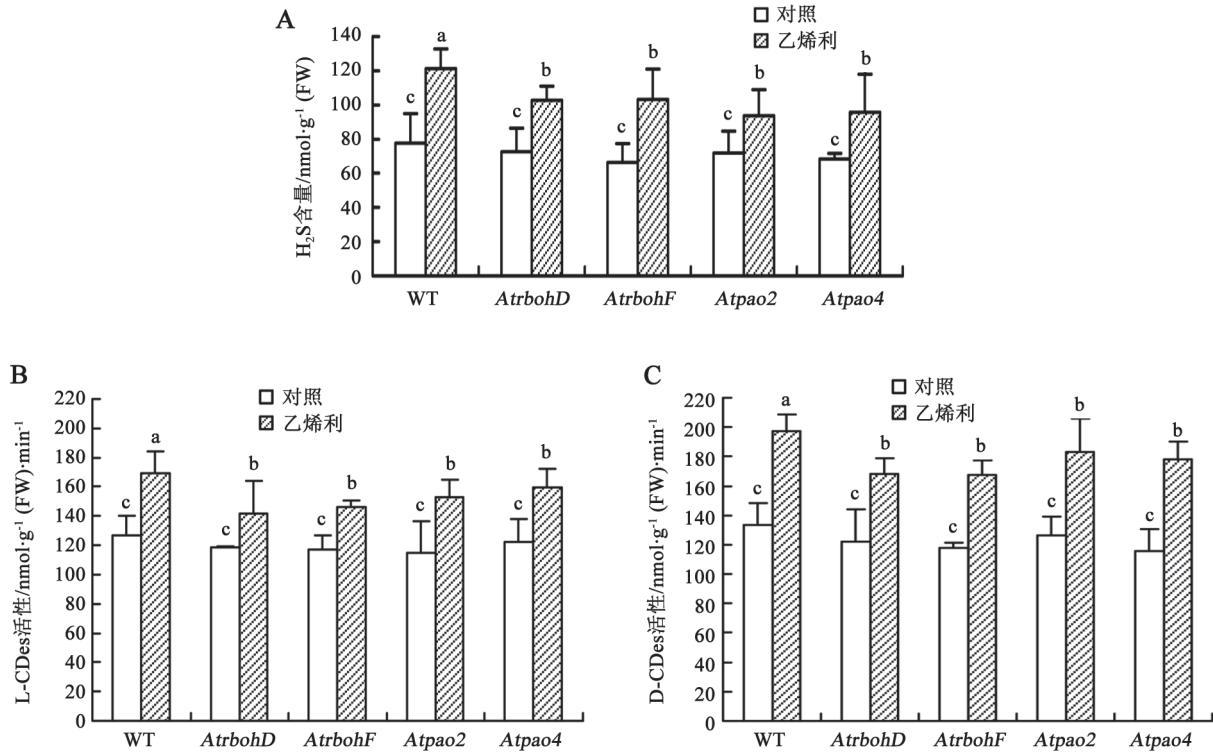


图4 乙烯对拟南芥野生型、H₂O₂合成突变体叶片H₂S含量(A)、L-CDes活性(B)和D-CDes活性(C)的影响

Fig.4 Effects of ethylene on H₂S content (A), L-CDes activity (B) and D-CDes activity (C) in leaves of *Arabidopsis* wild type and H₂O₂ deficient mutants

2 H₂O₂位于H₂S下游参与烯诱导气孔关闭的可能性

2.1 H₂S清除剂和合成抑制剂对乙烯诱导保卫细胞H₂O₂水平的影响

为进一步探明乙烯诱导气孔关闭过程中H₂S和H₂O₂的关系, 研究了H₂S清除剂HT及合成酶抑制剂AOA、NH₂OH和C₃H₃KO₃+NH₃对乙烯调控保卫细胞H₂O₂水平的影响。结果表明, HT、AOA、NH₂OH以及C₃H₃KO₃+NH₃对乙烯诱导的拟南芥保卫细胞中H₂O₂水平的增加没有显著影响(图5-A)。

2.2 乙烯对拟南芥野生型、*Atl-cdes*和*Atd-cdes*突变体叶片保卫细胞中H₂O₂水平的影响

由图5-B可知, 与野生型类似, 乙烯同样诱导*Atl-cdes*和*Atd-cdes*突变体气孔保卫细胞H₂O₂水平的升高。综合本实验的结果可以推断, 在乙烯诱

导气孔关闭过程中H₂S是H₂O₂的下游组分。

讨论

气孔是植物与外界进行气体和水分交换的主要通道, 气孔开度的及时适度调节对于植物生存至关重要。本实验室前期研究表明, 乙烯可以诱导拟南芥气孔关闭, NO、H₂O₂和H₂S是这一过程中重要的信号传递组分(侯智慧等2011; 刘菁等2011), 并推测在乙烯诱导气孔关闭的信号链中NO位于H₂O₂的下游和H₂S的上游起作用, 但尚未提供H₂O₂和H₂S二者在乙烯诱导气孔关闭中的作用关系的直接实验证据。本文利用拟南芥野生型及H₂S合成突变体*Atl-cdes*和*Atd-cdes*以及H₂O₂合成突变体*AtrbohD*、*AtrbohF*、*Atpao2*和*Atpao4*为材料,

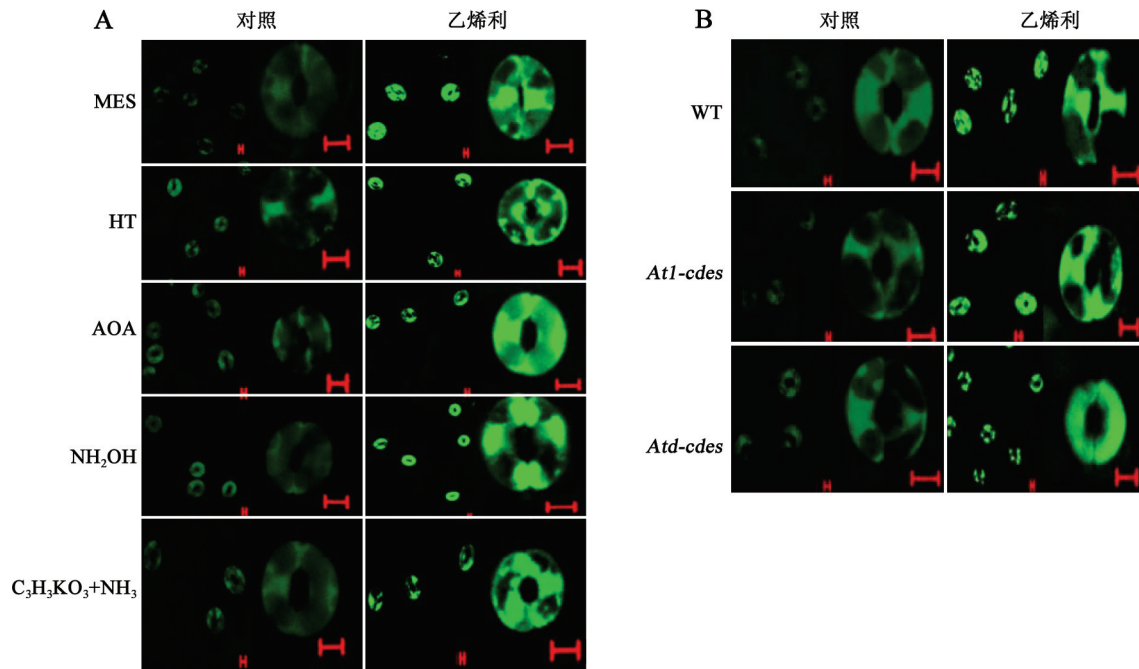


图5 H₂S清除剂和合成抑制剂对乙烯调控的拟南芥叶片保卫细胞H₂O₂水平(A)及乙烯对拟南芥野生型、H₂S合成突变体叶片保卫细胞H₂O₂水平(B)的影响

Fig.5 Effects of H₂S scavenger and synthesis inhibitors on ethylene-induced H₂O₂ content in *Arabidopsis* guard cells (A) as well as effects of ethylene on H₂O₂ content in guard cells of *Arabidopsis* wild type and H₂S deficient mutants (B)

图上标尺均为5 μm。

进一步研究表明, H₂S和H₂O₂均参与乙烯诱导气孔关闭过程(图1); 乙烯可诱导野生型拟南芥叶片H₂S含量和L-/D-CDes活性升高, 但对*AtrbohD*、*AtrbohF*、*Atpao2*和*Atpao4*的诱导作用均不同程度的减弱(图4), H₂O₂的清除剂和合成酶抑制剂均可抑制乙烯诱导的拟南芥叶片H₂S含量和L-/D-CDes活性升高(图2); 乙烯诱导拟南芥野生型与H₂S合成突变体*Atl-cdes*和*Atd-cdes*叶片气孔保卫细胞H₂O₂水平显著增加(图5-B), 并且H₂S清除剂和合成抑制剂不能减弱乙烯诱导的拟南芥叶片气孔保卫细胞H₂O₂水平的升高(图5-A), 这为进一步证实H₂S位于H₂O₂下游参与乙烯诱导的拟南芥气孔关闭提供了直接证据, 完善了乙烯诱导气孔关闭过程的信号链(图6)。

气孔运动与K⁺和Cl⁻等溶质进出保卫细胞有关, 在动物中, H₂S可以影响膜对K⁺和Cl⁻等离子子的通透性(Pouokam等2011), 在介导乙烯诱导的气孔关闭过程中, H₂S是否通过影响保卫细胞膜对K⁺等的通透性起作用? 有研究表明ABC转运体(ATP-binding cassette transporter)参与气孔运动的调节

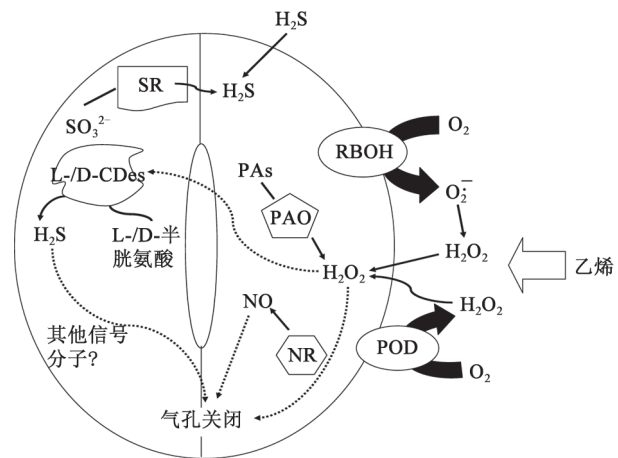


图6 H₂O₂与H₂S参与乙烯诱导拟南芥叶片气孔关闭
Fig.6 H₂O₂ and H₂S involvement in ethylene-induced stomatal closure of *Arabidopsis*

H₂S: hydrogen sulfide, 硫化氢; L-/D-CDes: L-/D-cysteine desulfhydrase, L-/D-半胱氨酸脱巯基酶; NO: nitric oxide, 一氧化氮; NR: nitrate reductase, 硝酸还原酶; PAO: polyamine oxidases, 多胺氧化酶; POD: peroxidase, 过氧化物酶; PAs: polyamines, 多胺; RBOH: respiratory burst oxidase homologue, 呼吸爆发氧化酶, 又称NADPH氧化酶(NADPH oxidase); SR: sulfite reductase, 亚硫酸盐还原酶。

(Klein等2003; Suh等2007), H₂S通过ABC转运体参与ABA诱导的气孔关闭(García-Mata和Lamattina 2010), 在介导乙烯诱导的气孔关闭过程中是否有ABC转运体的参与? 这一系列问题的深入研究将有助于气孔运动信号转导链的完善及运动机制的进一步阐明。

参考文献

- 安国勇, 李保珠, 武桂丽, 宋纯鹏(2012). H₂O₂作为根源信号介导盐胁迫诱导的蚕豆气孔关闭反应. 植物生理学报, 48 (3): 265~271
- 高晶晶, 王瑞斌, 贺军民(2011). 乙烯对UV-B辐射诱导蚕豆气孔关闭的调控效应. 西北植物学报, 31 (4): 690~696
- 侯智慧, 刘菁, 侯丽霞, 李希东, 刘新(2011). H₂S可能作为H₂O₂的下游信号介导茉莉酸诱导的蚕豆气孔关闭. 植物学报, 46 (4): 396~406
- 李保珠, 安国勇, 韩桂(2012). 植物激素ABA在水分胁迫下的功能及信号途径. 植物生理学报, 48 (1): 11~18
- 刘国华, 侯丽霞, 刘菁, 刘新, 王学臣(2009). H₂O₂介导的NO合成参与乙烯诱导的拟南芥叶片气孔关闭. 自然科学进展, 19 (7): 8~18
- 刘菁, 侯丽霞, 刘国华, 刘新, 王学臣(2011). NO介导的H₂S合成参与乙烯诱导的拟南芥气孔关闭. 科学通报, 56 (30): 2515~2522
- 王兰香, 侯智慧, 侯丽霞, 赵方贵, 刘新(2012). H₂O₂介导的H₂S产生参与干旱诱导的拟南芥气孔关闭. 植物学报, 47 (3): 217~225
- Desikan R, Last K, Harrett-Williams R, Tagliavia C, Harter K, Hooley R, Hancock JT, Neill SJ (2006). Ethylene-induced stomatal closure in *Arabidopsis* occurs via AtrbohF-mediated hydrogen peroxide synthesis. *Plant J*, 6: 907~916
- García-Mata C, Lamattina L (2010). Hydrogen sulphide, a novel gasotransmitter involved in guard cell signaling. *New Phytol*, 188 (4): 977~984
- He J, Yue X, Wang R, Zhang Y (2011). Ethylene mediates UV-B-induced stomatal closure via peroxidase-dependent hydrogen peroxide synthesis in *Vicia faba* L. *J Exp Bot*, 62: 2657~2666
- Klein M, Perfus-Barbeoch L, Frelet A, Gaedeke N, Reinhardt D, Mueller-Roeber B, Martinoia E, Forestier C (2003). The plant multidrug resistance ABC transporter AtMRP5 is involved in guard cell hormonal signalling and water use. *Plant J*, 33: 119~129
- Kolla VA, Vavasseur A, Raghavendra AS (2007). Hydrogen peroxide production is an early event during bicarbonate induced stomatal closure in abaxial epidermis of *Arabidopsis*. *Planta*, 225: 1421~1429
- Iqbal N, Nazar R, Syeed S, Masood A, Khan NA (2011). Exogenously-sourced ethylene increases stomatal conductance, photosynthesis, and growth under optimal and deficient nitrogen fertilization in mustard. *J Exp Bot*, 62 (14): 4955~4963
- Liu J, Liu GH, Hou LX, Liu X (2010). Ethylene-induced nitric oxide production and stomatal closure in *Arabidopsis thaliana* depending on changes in cytosolic pH. *Chin Sci Bull*, 55: 2403~2409
- Pouokam E, Steidle J, Diener M (2011). Regulation of colonic ion transport by gasotransmitters. *Biol Pharm Bull*, 34 (6): 789~793
- Sekiya J, Schmid TA, Wilson LG, Filer P (1982). Emission of hydrogen sulfide by leaf tissue in response to L-cysteine. *Plant Physiol*, 70: 430~436
- Suh SJ, Wang YF, Frelet A, Leonhardt N, Klein M, Forestier C, Mueller-Roeber B, Cho MH, Martinoia E, Schroeder JI (2007). The ATP binding cassette transporter AtMRP5 modulates anion and calcium channel activities in *Arabidopsis* guard cells. *J Biol Chem*, 282: 1916~1924
- Tanaka Y, Sano T, Tamaoki M, Nakajima N, Kondo N, Hasezawa S (2005). Ethylene inhibits abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 138: 2337~2343
- Tanaka Y, Sano T, Tamaoki M, Nakajima N, Kondo N, Hasezawa S (2006). Cytokinin and auxin inhibit abscisic acid-induced stomatal closure by enhancing ethylene production in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 57: 2259~2266