

## 过量表达番茄类囊体膜抗坏血酸过氧化物酶基因(*StAPX*)提高了烟草种苗的抗氧化能力

孙卫红\*, 陈相燕, 杜斌, 宋皖, 周越, 王云

江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江212013

**摘要:** 为了探讨叶绿体类囊体膜抗坏血酸过氧化物酶(tAPX)与其抗氧化性的关系, 从番茄叶片中分离了叶绿体类囊体膜抗坏血酸过氧化物酶基因(*StAPX*)并转入到烟草中。以野生型(WT)、转正义*StAPX*烟草株系T<sub>3</sub>-3和T<sub>3</sub>-6为试材, 测定了外源过氧化氢诱导的氧化胁迫条件下APX酶活性、过氧化氢酶(CAT)活性、过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)含量、叶绿素荧光参数及叶绿素含量等。Northern杂交显示*StAPX*基因的表达受外源H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>氧化胁迫的诱导。氧化胁迫下转基因烟草的APX酶活性和清除H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的能力都显著高于野生型, 并且转基因烟草比野生型具有更高的PSII最大光化学效率及叶绿素含量。结果表明, *StAPX*的过量表达有助于提高外源H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的转基因烟草的抗氧化能力。

**关键词:** 番茄类囊体膜抗坏血酸过氧化物酶基因; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>氧化胁迫; 转基因烟草; 抗氧化能力

## Tobacco Seedlings Overexpressing *StAPX* Enhanced Resistance to Oxidative Stress

SUN Wei-Hong\*, CHEN Xiang-Yan, DU Bin, SONG Wan, ZHOU Yue, WANG Yun

College of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China

**Abstract:** In order to investigate the relationship between thylakoid-bound ascorbate peroxidase (tAPX) and the resistance to oxidative stress, tomato tAPX gene (*StAPX*) was introduced into tobacco. Wild type (WT), sense-transgenic lines (T<sub>3</sub>-3 and T<sub>3</sub>-6) of tobacco were used to measure activities of APX and catalase (CAT), contents of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), contents of chlorophyll and chlorophyll fluorescence parameters under oxidative stress. Northern blot analysis confirmed that the expression of *StAPX* was induced by exterior H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. Activities of APX, the capability for scavenging H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, maximal photochemistry efficiency of PSII and chlorophyll contents of the transgenic tobacco plants were distinctly higher than those of WT after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. These results indicated that overexpression of *StAPX* improved exterior H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated oxidative tolerance in transgenic tobacco plants.

**Key words:** *StAPX*; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidant stress; transgenic tobacco plant; resistance to oxidant stress

需氧生物细胞在其代谢过程中总会产生一些有毒害作用的活性氧(reactive oxygen species, ROS)物质。活性氧可引起蛋白质、膜脂和其他细胞组分的损伤, 进而导致细胞及组织死亡。因此, 植物本身会逐步地产生一些保护机制来清除过多的ROS。包括超氧化物歧化酶、抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、抗坏血酸(ascorbic acid, AsA)等活性和含量的调节。

植物叶绿体是ROS产生和攻击的主要部位, 其中过氧化氢(hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)是叶绿体中光合电子传递和某些酶学反应的天然产物及对植物具有毒害作用的一种活性氧。高等植物中存在两套分解H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的酶系统, 一是细胞质中的CAT和过

氧化物酶, 二是定位于叶绿体中的抗坏血酸-谷胱苷肽循环的酶。在叶绿体中尚未发现CAT的存在, 也未发现清除H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的谷胱甘肽过氧化物酶, 故认为叶绿体中的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>是由APX清除的(Asada 1992)。

提高植物体内抗氧化酶活性及增强抗氧化代谢的水平是提高植物抗逆性的有效途径之一, 多

收稿 2011-04-11 修定 2011-05-17

资助 江苏省自然科学基金面上项目(BK2010344)、江苏大学高级专业人才培养启动基金(09DJG021)、江苏高校优势学科建设工程项目和国家自然科学基金面上项目(30871458)。

致谢 山东农业大学生命科学学院孟庆伟教授对本研究工作给予了大力支持与资助。

\* 通讯作者(E-mail: weihongsun2009@163.com; Tel: 0511-88797059)。

种植物的APX基因已被克隆并应用于植物转基因研究。研究发现过量表达叶绿体APX基因能够提高植物的耐逆性(Badawi等2004; Ishikawa和Shigeoka 2008)。Murgia等(2004)的研究表明超量表达拟南芥*tAPX*基因能增加由百草枯引起的氧逆境抗性。因此,研究逆境胁迫下叶绿体APX基因与植物抗氧化能力的关系具有重要意义。

在高等植物中,已报道有4种具有不同细胞定位的APX同工酶:微体APX、胞质APX、叶绿体APX和线粒体膜结合APX。定位在叶绿体的APX包括类囊体膜APX(thylakoid-bound APX, tAPX)和基质APX(stroma APX, sAPX)。烟草叶绿体中至少存在50%的tAPX,是叶绿体中清除H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的关键酶。本研究分离了编码番茄叶绿体类囊体膜APX基因(*StAPX*)并转入烟草,研究了氧化剂胁迫条件下*StAPX*基因在RNA水平的表达,分析了转基因烟草种苗的生理生化特性及抗氧化特性等,结果表明转*StAPX*基因烟草提高了APX等抗氧化酶活性,降低了H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量和其对叶绿体的氧化伤害,从而提高了外源H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的氧化抗性。

## 材料与方法

### 1 植物材料及处理

以番茄(*Solanum lycopersicum* L.)品种‘中疏4号’和烟草(*Nicotiana tabacum* L.)品种‘NC89’为试材,番茄种子来源于中科院蔬菜花卉研究所,转基因烟草种子来源于山东农业大学生命科学学院。植物材料种植在江苏大学温室内,温度为(25±5)℃,光照强度为100~800 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,相对湿度75%±5%。种子浸种催芽5 d生根后分别播于塑料盆中,培养土培养,放置于温室中生长。番茄生长至4周时进行H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>喷施处理,根据文献比较选用2 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度,每次处理至少3个重复。处理后取中上部叶片,液氮冷冻,保存于-80℃备用。转基因烟草T<sub>3</sub>代(选取T<sub>3</sub>-3和T<sub>3</sub>-6为代表)和野生型(WT)植株生长至4周进行2 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>喷施处理,取中上部叶片,液氮冷冻,保存于-80℃备用。另外各株系于处理后选取植株上部完全展开叶进行叶绿素荧光参数等测定。

### 2 试验方法

#### 2.1 转*StAPX*基因植株的检测

基因克隆及转化方法见Sun等(2010)。将PCR

验证得到的转基因株系(T<sub>0</sub>代)种植在温室中,常温管理。开花时用透明纸袋封住进行自花授粉,得到T<sub>1</sub>代种子(以上在山东农业大学进行)。将T<sub>1</sub>代种子种在含有50 mg·L<sup>-1</sup>卡那霉素(kanamycin)的MS培养基中,筛选得到T<sub>2</sub>代植株及T<sub>3</sub>代种子。

#### 2.2 Northern杂交验证

用0、0.5、1.0、2.0 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>喷施处理番茄后取样,处理时间为24 h。用2 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>喷施处理番茄后取样,处理时间分别为0、0.5、1.0、2.0、4.0 h。番茄叶片总RNA的提取采用Trizol (Invitrogen)抽提法,按照试剂说明书进行。RNA (20 μg)用甲醛变性凝胶电泳分离,电泳完毕后将RNA转移至尼龙膜上,交联固定RNA。42℃预杂交24 h,以*StAPX*基因3'端为探针(用α[<sup>32</sup>P]dCTP标记)进行Northern杂交36 h (42℃)。洗膜2次后于-80℃下放射自显影,观察杂交结果。

#### 2.3 抗氧化酶活性测定

用2 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>喷施处理烟草种苗后取样,处理时间为24 h。取烟草各株系处理和对照叶片20 g,参照Robinson等(1983)的方法提取叶绿体。tAPX酶活性测定参照Amako等(1994)的方法进行。另称取0.5 g叶片,在预冷的4 mL pH 7.8 (0.05 mol·L<sup>-1</sup>)磷酸缓冲液中冰浴研磨,于4℃下8 000×g离心15 min,取上清液测定酶活。CAT活性测定参照王海华等(2001)的方法进行。

AsA含量测定参照Dutilleul等(2003)方法。总AsA含量于256 nm下测定,以每反应0.25个单位的抗坏血酸氧化酶计算。

以上测定每处理重复3次,结果以平均值±标准误差表示。

#### 2.4 活性氧含量测定及膜伤害程度测定

用2 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>喷施处理烟草种苗后取样,处理时间为24 h。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量的测定参照Ferguson等(1983)的方法进行。

丙二醛(MDA)含量测定按照赵世杰等(2002)的方法,将处理叶片提取上清液后测定532、600、450 nm波长下的消光值。

质膜透性以相对电导率(REL)表示。打取直径0.8 cm的叶圆片,放入具塞试管中,用去离子水漂洗3次,加去离子水15 mL置真空泵中抽气30 min,后放振荡器上振荡2 h,取下静置摇匀,测定初电导。然后煮30 min,冷却至室温10 min,测定终电

导。REL (%)=(初电导-空白)×100/(终电导-空白)。

以上测定每处理重复3次, 结果以平均值±标准误差表示。

## 2.5 叶绿素含量测定及最大光化学效率测定

用2 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>喷施处理烟草种苗后取样, 处理时间为24 h。参照Hemavathi等(2009)方法测定叶片的叶绿素含量。

用英国Hansatech公司生产的脉冲调制式便携荧光仪FMS2测定叶绿素荧光参数。将胁迫处理的烟草在800 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>光下适应后, 测定光下荧光参数 $F_s$  (稳态荧光)、 $F_m'$  (饱和光下最大荧光)和 $\Phi_{PSII}$  (PSII实际光化学效率), 再打远红光3 s测定 $F_o'$  (光下最小荧光), 然后暗适应15 min测定 $F_o$  (暗适应下初始荧光)、 $F_m$  (暗适应下最大荧光)、 $F_v/F_m$  (暗适应下PSII最大光化学效率)等参数。每处理重复4次, 每重复测定3株, 结果以平均值±标准误差表示。

## 实验结果

### 1 氧化胁迫诱导*StAPX*的表达

番茄叶片中*StAPX*基因在2 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>胁迫初期(0.5和1.0 h)的表达信号弱于对照, 2.0 h开始表达, 在氧化胁迫处理4.0 h时表达量逐步提高(图1-A)。*StAPX*基因在不同浓度H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>胁迫的表达结果表明胁迫24 h后, 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理的表达量强于1.0 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的表达量, 更强于2.0 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理和对照的表达量(图1-B)。结果

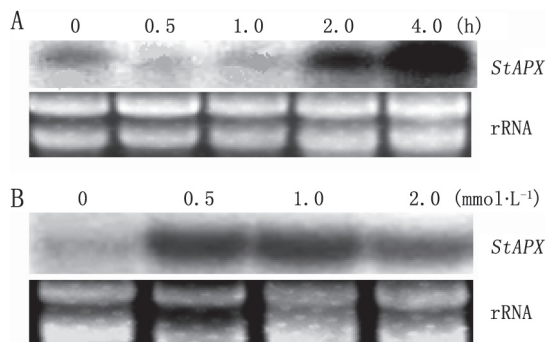


图1 番茄叶片中*StAPX*基因在外源H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>胁迫下在RNA水平的表达分析

Fig. 1 Expression analysis of *StAPX* by gel blot in tomato leaves under exterior H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress conditions

A: *StAPX*基因在2 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>胁迫后的表达分析; B: *StAPX*基因在不同浓度H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>胁迫24 h后的表达分析。

表明*StAPX*基因在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>胁迫下的表达随着处理时间和处理浓度的变化而变化, 说明H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>能够诱导该基因的表达。

### 2 过量表达*StAPX*基因提高了烟草抗氧化酶活性并降低了活性氧积累

2 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>胁迫处理24 h时, 野生型的tAPX活性下降到了对照的50%, 而T<sub>3</sub>-3和T<sub>3</sub>-6的tAPX活性却略高于对照(图2-A), 这说明氧化胁迫下转基因植株H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>清除酶tAPX活性显著高于野生型植株。如图2-B所示, 转基因植株氧化胁迫4 h后, CAT活性开始下降。在相同胁迫下, 转基因植株的tAPX活性升高程度比CAT更明显。氧化胁迫12 h后, T<sub>3</sub>-3、T<sub>3</sub>-6和野生型的AsA含量分别下降到了对照的38.2%、41.8%和27.3% (图2-C)。同时DHA (脱氢抗坏血酸)含量都有所增加, 且转基因植株AsA/DHA显著高于野生型, 说明转基因植株虽然有更多的AsA参与和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>反应, 但同时植株能够提高AsA的还原状态, 更有利于保持较高的tAPX活性。

与对照相比, 氧化胁迫导致转基因和野生型植株叶片中的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量明显增加。2 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>胁迫处理24 h时, T<sub>3</sub>-3、T<sub>3</sub>-6和野生型的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量分别上升到了对照的2.52、2.4和4.29倍(图2-D)。

### 3 过量表达*StAPX*基因降低了烟草叶片膜伤害程度

MDA是膜系统受伤害的重要标志之一。烟草植株受到氧化剂胁迫后, MDA含量迅速升高, 而转基因植株后代MDA含量均低于野生型(图3-A), 说明其膜脂过氧化程度较轻。同时, 氧化胁迫期间烟草叶片相对电导率均有升高, 至24 h时, T<sub>3</sub>-3、T<sub>3</sub>-6和野生型的相对电导率比对照分别增加了2.32、2.58和3.58倍(图3-B)。上述结果表明与野生型相比, 转基因植株后代相对电导率增加缓慢, 其细胞膜透性变化较慢, 受伤害程度较轻。

### 4 过量表达*StAPX*基因减轻了植株的光抑制程度

$F_v/F_m$ 表示当所有反应中心开放时PSII的最大光化学效率, 可以衡量PSII的光抑制程度。氧化胁迫下, 转基因和野生型植株变化趋势相同, 但转基因植株后代最大光化学效率比野生型要高。2 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理24 h, T<sub>3</sub>-3、T<sub>3</sub>-6和野生型的 $F_v/F_m$

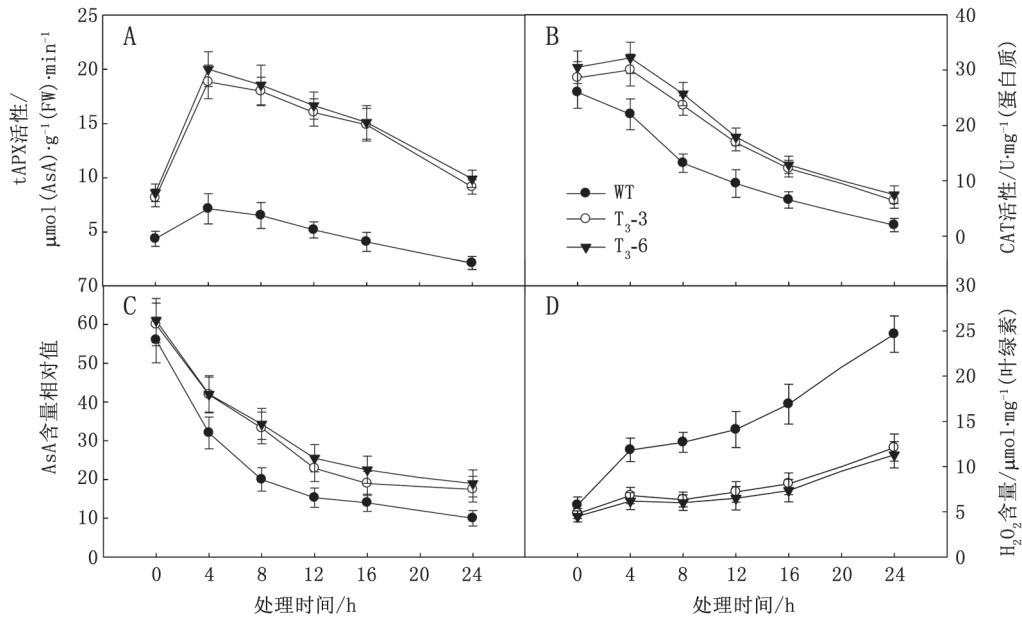


图2 外源 $H_2O_2$ 氧化胁迫下烟草tAPX酶活性(A)、CAT酶活性(B)、AsA含量(C)和 $H_2O_2$ 含量(D)  
Fig.2 Changes of tAPX activity (A), CAT activity (B), AsA content (C) and  $H_2O_2$  content (D)  
in tobacco leaves under exterior  $H_2O_2$  stress

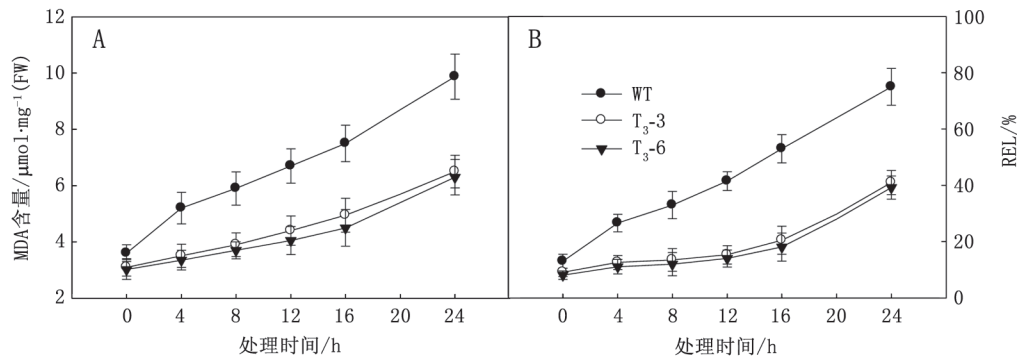


图3 外源 $H_2O_2$ 氧化胁迫下烟草叶片MDA含量(A)和相对电导率(B)  
Fig.3 Change of MDA content (A) and relative electric conductivity (B) in tobacco leaves under exterior  $H_2O_2$  stress

$F_m$ 分别降低了52.8%、46.1%和73.5% (图4-A);  $T_3-3$ 、 $T_3-6$ 和野生型的 $\Phi_{PSII}$ 分别降低了58.5%、51.5%和76.3% (图4-B)。这说明氧化胁迫下转正义基因植株后代PSII光抑制程度较轻。氧化胁迫下 $\Phi_{PSII}$ 变化趋势与 $F_v/F_m$ 相似,但降幅比 $F_v/F_m$ 大,表明通过PSII的电子流传递效率受到的氧化损伤更显著。

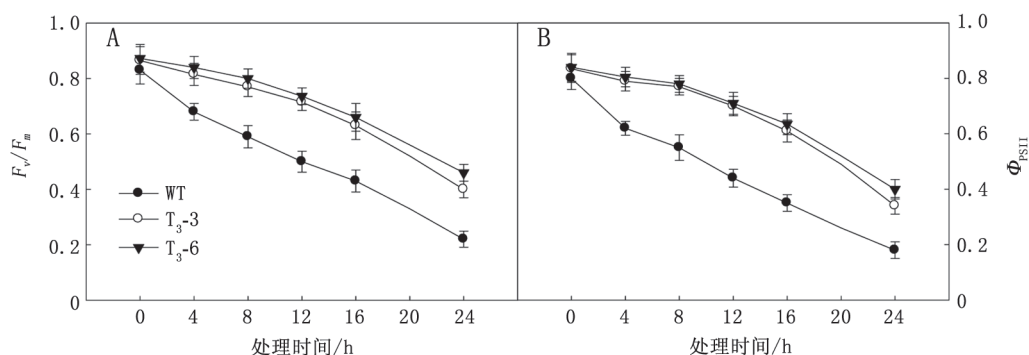
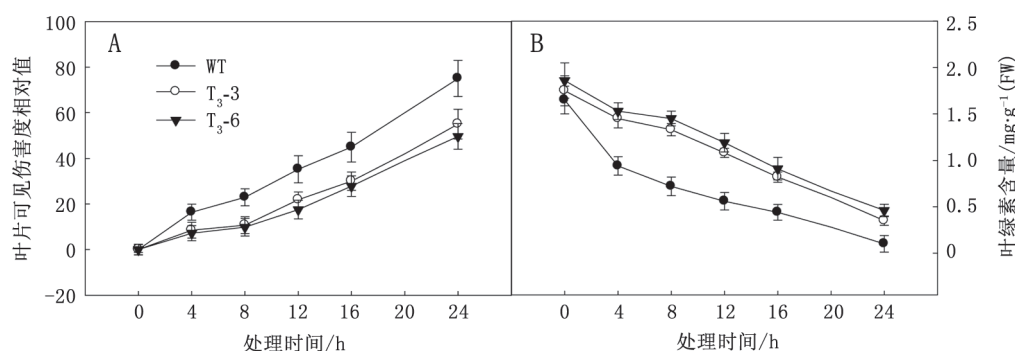
### 5 过量表达 $StAPX$ 基因降低了叶片可见伤害程度和叶绿素降解速度

用 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $H_2O_2$ 处理24 h后,所有叶片表现出不同程度的失绿,但与野生型相比,转正义基因

植株叶片失绿程度较轻,且与之相对应的是其维持有较高的叶绿素含量(图5)。

## 讨 论

$H_2O_2$ 在一定浓度范围内能够作为一种信号分子,引起相关基因的表达变化。通常起信号作用的 $H_2O_2$ 在细胞内的浓度为 $1\sim 700\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (Stone 2004),这可能是本实验中 $StAPX$ 基因在 $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $H_2O_2$ 处理的表达量最强的原因(图1)。我们选用 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $H_2O_2$ 浓度作为能产生外源氧化胁迫效果的氧化剂进行试验测定。

图4 外源H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>氧化胁迫下转基因和野生型烟草叶绿素荧光参数Fig.4 Changes of chlorophyll fluorescence parameter in transgenic plants and WT tobacco under exterior H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress conditions图5 外源H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>氧化胁迫下烟草植株叶片可见伤害度(A)和叶绿素含量(B)Fig.5 Phenotypic differences (A) and changes of chlorophyll content (B) in tobacco plants under exterior H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress conditions

在氧化胁迫过程中, 转基因植株CAT活性增加没有tAPX活性增加明显, 而tAPX活性与叶绿体H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量呈负相关(图2), 这是因为CAT不存在于叶绿体中, 且在烟草植物中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>通过膜通道蛋白在植物体内跨膜运输的能力(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>穿越补偿清除机制)有限(Danna等2003)。这说明了不同抗氧化基因在植物各细胞器中存在特异表达, 同时导致了各细胞器中氧化抗性的区别, 在逆境胁迫下, 植物叶绿体内的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>主要是由tAPX清除的(Giacomelli等2007)。试验结果表明当植物受到逆境胁迫后, tAPX基因迅速表达, tAPX酶最大限度地抵抗逆境伤害, 当植物对逆境适应之后或者膜蛋白等遭受严重逆境损伤, 该酶表达量即开始下降(图2)。

普遍观点认为, 逆境引起的损伤是膜脂过氧化水平增高和保护酶系统活性下降的结果。本试验结果表明, 在氧化剂H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理前期, 由于是直接急剧增加了H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 造成植物体内活性氧的迅速积累, 但同时, 植物抗氧化防御体系启动, 膜保护酶

tAPX和CAT活性逐渐增强, 从而对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的产生起到了一定程度的抑制, 减弱了膜脂过氧化作用。但随着胁迫时间的延长, 烟草体内H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水平持续增加, 抑制了tAPX等酶活性, 降低了植物清除活性氧的能力, 从而MDA含量增加及相对电导率增加, 膜脂过氧化程度加剧。但转正义基因株系后代叶绿体中tAPX活性比野生型相对升高, 能够降低H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的积累和MDA的增加, 从而可以减轻活性氧对膜的伤害(图2、3)。

由于活性氧的积累会破坏与光合电子传递有关的色素蛋白复合体、类囊体膜上的脂类以及卡尔文循环中的某些酶等(Halliwel和Gutteridge 1999), 因此活性氧代谢涉及光抑制及其防御机理, 氧化胁迫可以诱导PSII光抑制。实验结果证实逆境胁迫下光合作用的降低、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的积累、膜伤害程度的变化都与APX酶活性呈显著相关(图2~4), 说明逆境胁迫下由活性氧的氧化作用引起活性氧清除酶活性变化、PSII部分损伤和气孔部分关闭,

因此抑制了植物光合作用。同时, 活性氧可直接破坏叶绿素分子, 对光合作用造成非气孔限制。如图5所示, 在氧化胁迫下植株叶片叶绿素含量与坏死程度呈负相关, 而转正义基因植株叶片具有较高的叶绿素含量。结果表明, 过量表达*StAPX*基因的烟草种苗能快速地清除活性氧, 降低氧化损伤, 具有一定的光合器官抗氧化保护能力, 因此过量表达*StAPX*的转基因烟草后代在光合上比野生型具有明显优势。

总之, 植物对逆境胁迫的忍耐和抵御能力与活性氧的累积呈负相关, 而植物体内保护酶活性的高低在一定程度上决定着植物的耐逆性。导入高效表达的外源基因能够引起植物逆境胁迫保护机制的改观(Mittler和Blumwald 2010)。本研究结果也证明在烟草中过量表达*StAPX*基因能够有效清除 $H_2O_2$ , 从而提高植物的抗氧化胁迫能力。

### 参考文献

- 王海华, 康健, 曾富华, 蒋明义(2001). 高浓度镍对水稻幼苗生长及酶活性的影响. 作物学报, 27: 953~957
- 赵世杰, 史国安, 董新纯(2002). 植物生理学实验指导. 北京: 中国农业科学技术出版社, 142~143
- Amako K, Chen GX, Asada K (1994). Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant Cell Physiol*, 35: 497~504
- Asada K (1992). Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant*, 85: 235~241
- Badawi GH, Kawano N, Yamauchi Y, Shimada E, Sasali R, Kubo A, Tanaka K (2004). Overexpression of ascorbate peroxidase in tobacco chloroplasts enhances the tolerance to salt stress and water deficit. *Physiol Plant*, 121: 231~238
- Danna CH, Bartoli CG, Sacco F, Ingala LR, Santa-Maria GE, Guiamet JJ, Ugalde RA (2003). Thylakoid-bound ascorbate peroxidase mutant exhibits impaired electron transport and photosynthetic activity. *Plant Physiol*, 132: 2116~2125
- Dutilleul CT, Garmier M, Noctor G, Mathieu C, Chetrit P, Foyer CH, de Paepe R (2003). Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. *Plant Cell*, 15: 1212~1226
- Ferguson IB, Watkins CB, Harman JE (1983). Inhibition by calcium of senescence of detached cucumber cotyledons. *Plant Physiol*, 71: 182~186
- Giacomelli L, Masi A, Ripoll DR, Lee MJ, van Wijk Klaas J (2007). *Arabidopsis thaliana* deficient in two chloroplast ascorbate peroxidase shows accelerated light-induced necrosis when levels of cellular ascorbate are low. *Plant Mol Biol*, 65: 627~644
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine* (3<sup>rd</sup> edn). London: Oxford University Press, 939
- Hemavathi, Upadhyaya CP, Akula N, Young KE, Chun SC, Kim DH, Park SW (2009). Enhanced ascorbic acid accumulation in transgenic potato confers tolerance to various abiotic stresses. *Biotechnol Lett*, 32: 321~330
- Ishikawa T, Shigeoka S (2008). Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organisms. *Biosci Biotechnol Biochem*, 72: 1143~1154
- Mittler R, Blumwald E (2010). Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. *Annu Rev Plant Biol*, 61: 443~462
- Murgia I, Tarantino D, Vnanini C, Bracale M, Carravieri S, Soave C (2004). *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to paraquat-induced photooxidative stress and to nitric oxide-induced cell death. *Plant J*, 38: 940~953
- Robinson SP, Downton WJS, Millhouse JA (1983). Photosynthesis and ion content of leaves and chloroplasts of salt stressed spinach. *Plant Physiol*, 73: 238~242
- Stone JR (2004). An assessment of proposed mechanism for sensing hydrogen peroxide in mammalian systems. *Arch Biochem Biophys*, 422: 119~124
- Sun WH, Duan M, Shu DF, Yang S, Meng QW (2010). Over-expression of *StAPX* in tobacco improves seed germination and increases early seedling tolerance to salinity and osmotic stresses. *Plant Cell Rep*, 29: 917~926