

Ca²⁺ 位于H₂O₂上游参与H₂S诱导的拟南芥气孔关闭过程

李洪旺, 车永梅, 侯丽霞, 王兰香, 刘香凝, 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: 以拟南芥为材料, 利用药理学实验, 结合分光光度法和激光共聚焦显微技术, 研究了Ca²⁺在硫化氢(H₂S)诱导拟南芥气孔关闭过程中的作用及其与过氧化氢(H₂O₂)的关系。结果表明: H₂S诱导气孔关闭, Ca²⁺螯合剂EGTA和质膜Ca²⁺通道阻断剂硝苯地平(Nif)能不同程度抑制H₂S诱导的气孔关闭, 而内质网钙泵阻断剂毒胡萝卜素(Thaps)对H₂S的作用无显著影响。由此推测, Ca²⁺参与调节H₂S诱导的拟南芥气孔关闭过程, 且胞质中Ca²⁺来源于胞外Ca²⁺的内流。另外, H₂S诱导拟南芥叶片NADPH氧化酶基因*AtRBOHD*和*AtRBOHF*以及细胞壁过氧化物酶基因*AtPRX34*表达增强, 促进叶片和保卫细胞中H₂O₂积累, EGTA对此起抑制作用, 而外源CaCl₂处理上调*AtRBOHD*、*AtRBOHF*和*AtPRX34*的表达。表明Ca²⁺可能位于H₂O₂上游参与H₂S诱导的拟南芥气孔关闭过程。

关键词: 硫化氢; Ca²⁺; 过氧化氢; 气孔关闭

Ca²⁺ Acts Upstream of H₂O₂ in Mediating H₂S-Induced Stomatal Closure in *Arabidopsis thaliana*

LI Hong-Wang, CHE Yong-Mei, HOU Li-Xia, WANG Lan-Xiang, LIU Xiang-Ning, LIU Xin*

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

Abstract: Using *Arabidopsis thaliana* as material, the effects of Ca²⁺ in hydrogen sulphide (H₂S)-induced guard cell movement and its relationship with hydrogen peroxide (H₂O₂) were investigated through pharmacological test combined with spectrophotography and confocal laser scanning microscopy techniques. The results showed that sodium hydrosulfide (NaHS), a donor of H₂S, caused stomatal closure, and this inductive effects were weakened by addition of Ca²⁺ chelator ethylene glycol-bis-(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA) and plasma membrane Ca²⁺ channel blocker nifedipine (Nif), respectively, however, endoplasmic reticulum calcium pump blocker thapsigargin (Thaps) had no significant effect on stomatal movement induced by H₂S. These observations suggest that Ca²⁺ participates in H₂S-induced stomatal closure, [Ca²⁺]_{cyt} elevation in response to H₂S is mainly due to calcium influx across the plasma membrane. In addition, H₂S up-regulated the expression of NADPH oxidase genes *AtRBOHD*, *AtRBOHF* as well as cell wall peroxidase gene *AtPRX34*, prompted H₂O₂ accumulation in leaves and guard cells, while EGTA inhibited these effects of H₂S. On the other hand, exogenous CaCl₂ promoted the expression of *AtRBOHD*, *AtRBOHF* and *AtPRX34*. Based on above results, it can be concluded that Ca²⁺ acts upstream of H₂O₂ in mediating H₂S-induced stomatal closure in *A. thaliana*.

Key words: H₂S; Ca²⁺; H₂O₂; stomatal closure

气孔是植物体与外界环境进行气体和水分交换的通道, 气孔开闭调节着植物的光合作用、蒸腾作用等重要生理过程, 进而影响植物的生长发育和对环境的适应。植物通过特异的信号转导途径感受不同环境刺激, 调节气孔运动。目前, 有关气孔运动信号转导机制的研究已取得许多重要成果, 发现干旱条件下, 脱落酸(abscisic acid, ABA)含量升高, 通过Ca²⁺依赖途径和非依赖途径诱导气孔关闭(Schachtman和Goodger 2008); 乙烯和茉莉酸

(jasmonic acid, JA)等植物激素均对气孔运动起调节作用(Hossain等2011; 侯智慧等2012), Ca²⁺和过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂)等是气孔信号转导途径的重要信号组分(Xie等2014), 各信号转导途径相互交织形成网络。

收稿 2014-08-13 修定 2014-12-26

资助 国家自然科学基金项目(31170237)。

致谢 山东省泰山学者团队建设工程。

* 通讯作者(E-mail: liuxin6080@126.com; Tel: 0532-88030311)。

硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)是近年来发现的植物内源气体信号分子,参与调控植物的生长发育和对环境的适应(Fang等2014; Lai等2014)。许多研究表明, H₂S也是调节气孔运动的重要信号物质,参与干旱、ABA、JA和乙烯等诱导的气孔关闭过程(García-Mata和Lamattina 2010; Liu等2011; 王兰香等2012; 侯智慧等2011); 外源H₂S供体硫化钠(sodium hydrosulfide, NaHS)亦可引起植物叶片气孔关闭(侯智慧等2011; 叶青等2011),但H₂S调控气孔运动的信号网络尚不清晰。

Ca²⁺和H₂O₂均是气孔运动信号转导过程中的重要信号组分,参与多种刺激诱导的气孔关闭过程,而且两者之间存在相互作用。如低浓度Ca²⁺促进蓝光诱导的气孔开放,而高浓度Ca²⁺介导一氧化氮(nitric oxide, NO)诱导的气孔关闭过程(Zhao等2013); 甲基乙二醛(methylglyoxal, MG)诱导拟南芥保卫细胞胞质Ca²⁺震荡,诱导气孔关闭(Hoque等2012)。胞外ATP通过H₂O₂调控保卫细胞质膜Ca²⁺通道活性诱导蚕豆气孔张开(Wang等2014); NaCl胁迫条件下,外源Ca²⁺通过激活H₂O₂依赖型Ca²⁺通道,增加胞质Ca²⁺,诱导气孔关闭(Zhao等2011)。已有研究表明, H₂O₂参与H₂S诱导的拟南芥气孔关闭(叶青等2011), Ca²⁺与H₂S之间亦存在相互作用,外源H₂S通过促进胞外Ca²⁺进入细胞内以及钙调素(calmodulin, CaM)的参与,提高烟草悬浮细胞的耐热性(Li等2012); 拟南芥H₂S合成酶基因缺失导致Ca²⁺通道基因表达下调(Jin等2013)。但尚不清楚Ca²⁺是否参与H₂S诱导的拟南芥气孔关闭过程,以及在H₂S诱导气孔关闭的信号转导过程中Ca²⁺和H₂O₂的关系等。为此,本文以拟南芥为材料,研究了Ca²⁺在H₂S信号转导过程中的作用及其与H₂O₂的关系。

材料与方 法

1 材料

供试材料拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)野生型(生态型为Col-0)购自美国的拟南芥生物资源中心。将野生型拟南芥种子经10% NaClO灭菌15 min, 无菌水清洗5次后, 点种于无菌MS固体培养基上, 置于4 °C黑暗条件处理2~4 d后, 垂直放置于光照培养箱(光/暗周期16 h/8 h, 温度22 °C)中培养, 10 d后将拟南芥幼苗转移到灭菌的栽培基质(花卉

营养土与蛭石体积比为1:1)中, 在温室(光/暗周期16 h/8 h, 光强120 μmol·m⁻²·s⁻¹, 温度22 °C, 相对湿度70%)中培养。

NaHS、乙二醇-双-(2-氨基乙醚)四乙酸[ethylene glycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, EGTA]、硝苯地平(nifedipine, Nif)、毒胡萝卜素(thapsigargin, Thaps)均购买于Sigma公司(美国), 其他试剂为国产分析纯。NaHS、EGTA、Nif、Thaps和CaCl₂使用浓度分别为0.1 mmol·L⁻¹、0.5 mmol·L⁻¹、1 μmol·L⁻¹、15 μmol·L⁻¹和10 mmol·L⁻¹。

2 材料处理

取培养4~5周生长良好的拟南芥完全展开的莲座叶, 进行以下处理: (1)光诱导使气孔张开, 撕取其下表皮, 置于MES表皮条缓冲液(10 mmol·L⁻¹ Mes/KOH、0.1 mol·L⁻¹ CaCl₂、50 mmol·L⁻¹ KCl、pH 6.1), 以及分别含NaHS、NaHS+EGTA、NaHS+Nif、NaHS+Thaps的MES缓冲液中, 在光下(光强200 μmol·m⁻²·s⁻¹)处理30 min, 记录终态孔径。(2)分别取拟南芥叶片, 置于H₂O、CaCl₂、NaHS、EGTA、NaHS+EGTA共处理液内, 处理0、5、15、30、60、120、240 min时测定H₂O₂的含量及(或) NADPH氧化酶基因*AtRBOHD*、*AtRBOHF*和细胞壁过氧化物酶基因*AtPRX34*的表达量。(3)光诱导使气孔张开, 撕取其下表皮, 分别置于含NaHS、EGTA、NaHS+EGTA的MES缓冲液中30 min, 随后将表皮条转移到装有20 μmol·L⁻¹ H₂DCF-DA溶液中, 25 °C避光孵育处理15 min, 用于检测保卫细胞中H₂O₂的水平。

3 实验方法

参照刘国华等(2009)的方法测定气孔开度, 随机取3个视野, 每个视野内随机取10个气孔。

拟南芥叶片H₂O₂含量的测定参照刘国华等(2009)的方法。气孔保卫细胞胞质H₂O₂的检测参照侯智慧等(2012)的方法。用20 μmol·L⁻¹ H₂DCF-DA避光孵育处理15 min后, 用表皮条缓冲液多次冲洗, 以确保染料完全洗干净。最后用488 nm蓝色光激发, 发射波长为505~530 nm, 经激光共聚焦扫描显微镜(LEICA TCS SP5 II)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。每个处理至少重复3次。

用TriZol试剂盒(Invitrogen, 美国)提取拟南芥

总RNA。以总RNA为模板, Oligo d(T)₁₈为引物, 在逆转录酶M-MLV (TaKaRa, 大连)作用下合成第一链cDNA。荧光实时定量PCR检测*AtRBOHD*、*AtRBOHF*和*AtPRX34*表达量, 从Tair (<http://www.arabidopsis.org>)网站中找到*AtRBOHD*、*AtRBOHF*和*AtPRX34*序列, 根据序列设计定量引物, 内参为*ACTIN*。*AtRBOHD*正向引物: 5'-AGACAGCAG-GATACTTAG-3', 反向引物: 5'-CCAAGCCATAA-CATCATT-3'; *AtRBOHF*正向引物: 5'-GTTCTCT-TATTAGTTGGTCTTG-3', 反向引物: 5'-CTGTGCTGTATTCTGATGA-3'; *AtPRX34*正向引物: 5'-GATATGGACTTTCCTCATCTTCTC-3', 反向引物: 5'-GGTGAGTTGAGCAGCGGAC-3'; *ACTIN*正向引物: 5'-CACTGTGCCAATCTACGAG-GGT-3'; 反向引物: 5'-CACAAACGAGGGCTG-GAACAAG-3'。用熔解曲线法检测实时定量PCR产物的特异性, 采用MyiQ软件进行数据分析。

4 数据统计

所有实验结果均为3次重复的平均值±标准误差。用DPS数据处理系统对测定结果进行方差分析。

实验结果

1 Ca^{2+} 参与 H_2S 诱导的拟南芥气孔关闭过程

EGTA是胞外 Ca^{2+} 螯合剂, Nif是质膜上L型钙离子通道阻断剂, 可以抑制胞外 Ca^{2+} 的内流, 进而抑制胞内 Ca^{2+} 浓度的升高。图1表明, 单独使用一定浓度的EGTA和Nif对气孔开度无显著影响; 当EGTA和Nif分别与 H_2S 的供体NaHS共处理时, 可不同程度阻断 H_2S 诱导的气孔关闭效应($P < 0.05$)。Thaps是内质网钙泵阻断剂, Thaps通过抑制内质网 Ca^{2+} -ATP酶活性, 诱导内质网中 Ca^{2+} 的释放。图1显示, Thaps对 H_2S 的作用无显著影响。由此推测, Ca^{2+} 参与调节 H_2S 诱导的拟南芥气孔关闭过程, 且 Ca^{2+} 主要来源于胞外 Ca^{2+} 的内流。

2 Ca^{2+} 位于 H_2O_2 上游参与 H_2S 诱导的拟南芥气孔关闭

2.1 EGTA对 H_2S 诱导的拟南芥气孔保卫细胞和叶片中 H_2O_2 含量的影响

由图2和图3可以看出, H_2S 的供体NaHS可以诱导拟南芥气孔保卫细胞(图2)和叶片(图3)中 H_2O_2 含量增加, 处理后30 min达最高值。EGTA单独使用对叶片和保卫细胞 H_2O_2 含量无显著影响, EGTA

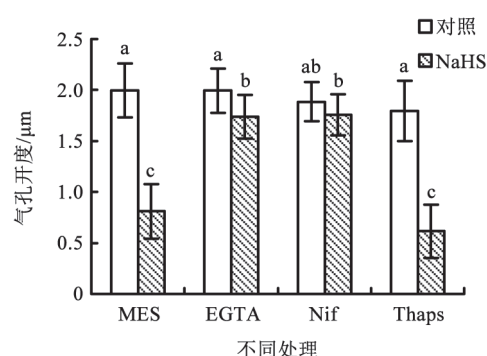


图1 EGTA、Nif及Thaps对 H_2S 诱导的拟南芥气孔运动的影响

Fig.1 Effects of EGTA, Nif and Thaps on H_2S -induced stomatal movement in *Arabidopsis*

不同小写字母表示同一处理时间下不同处理间差异显著 ($P < 0.05$); 图3~6同此。

与NaHS共处理显著抑制 H_2S 对 H_2O_2 和气孔运动的诱导作用(图2、图3), 由此证明 Ca^{2+} 位于 H_2O_2 上游参与 H_2S 诱导的拟南芥气孔关闭过程。

2.2 EGTA对 H_2S 诱导的拟南芥叶片*AtRBOHD*和*AtRBOHF*相对表达量的影响

NADPH氧化酶和细胞壁过氧化物酶是植物体内 H_2O_2 产生的重要途径, 为了进一步研究钙信使与保卫细胞 H_2O_2 产生的关系, 我们检测了钙离子螯合剂EGTA对 H_2S 诱导的拟南芥叶片NADPH氧化酶基因*AtRBOHD*和*AtRBOHF*以及细胞壁过氧化物酶基因*AtPRX34*相对表达量的影响。结果表明, H_2S 上调*AtRBOHD*和*AtRBOHF*的表达, EGTA在一定程度上减弱 H_2S 对*AtRBOHD*和*AtRBOHF*表达的诱导效应(图4) ($P < 0.05$)。

2.3 EGTA对 H_2S 诱导的拟南芥叶片细胞壁*AtPRX34*相对表达量的影响

图5表明, NaHS处理15 min后, 拟南芥叶片中细胞壁*AtPRX34*表达量明显增加, 30 min时到最大值, 而EGTA显著抑制NaHS对*AtPRX34*的诱导效应。

2.4 CaCl_2 处理对拟南芥叶片*AtRBOHD*、*AtRBOHF*和*AtPRX34*相对表达量的影响

为了进一步说明 Ca^{2+} 位于 H_2O_2 的上游参与 H_2S 诱导的气孔关闭过程, 我们检测了外源 Ca^{2+} 对 H_2O_2 合成酶基因表达的影响。图6显示, 外源 CaCl_2 处理后30 min亦能上调*AtRBOHD*、*AtRBOHF*及*AtPRX34*表达。综合图3~6结果可以推测, H_2S 可能

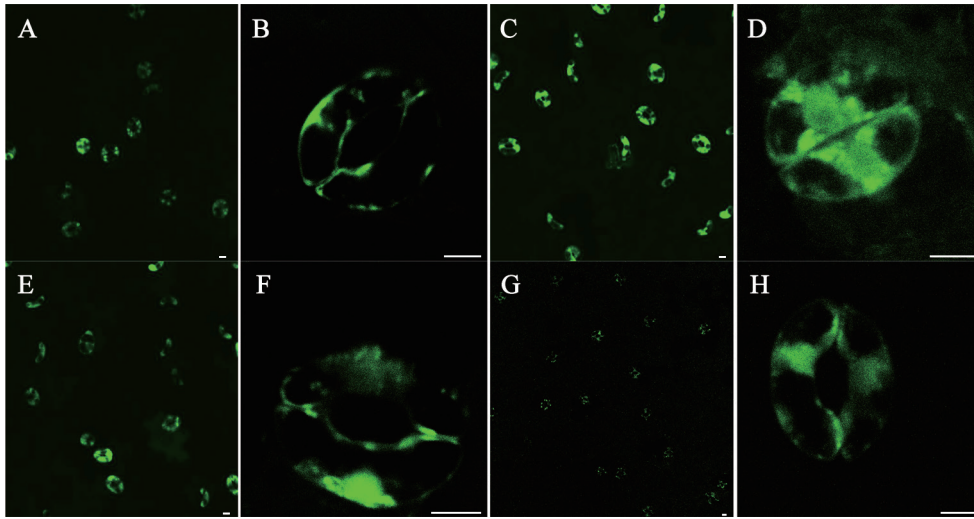


图2 EGTA对H₂S诱导的拟南芥保卫细胞胞质H₂O₂含量升高的影响

Fig.2 Effects of EGTA on H₂S-induced increase in H₂O₂ level in cytoplasm of *Arabidopsis* guard cells
A和B: MES; C和D: NaHS; E和F: EGTA; G和H: EGTA+NaHS。标尺=5 μm。

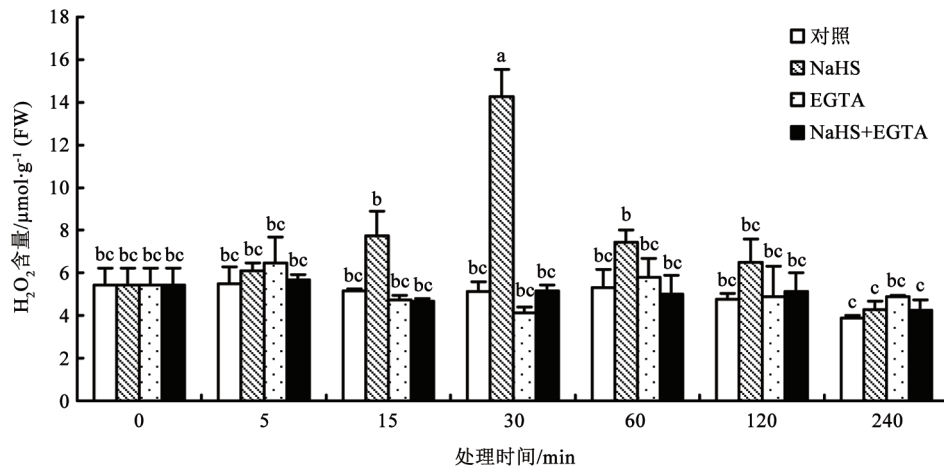


图3 EGTA对H₂S诱导的拟南芥叶片H₂O₂含量升高的影响

Fig.3 Effects of EGTA on H₂S-induced increase in H₂O₂ level in leaves of *Arabidopsis*

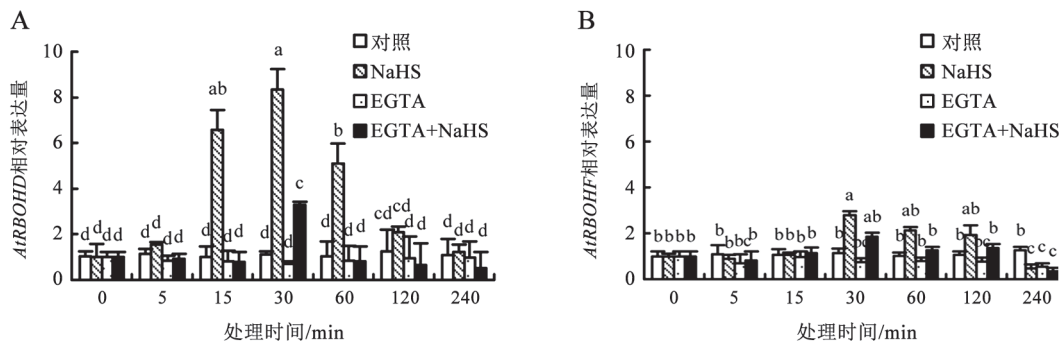
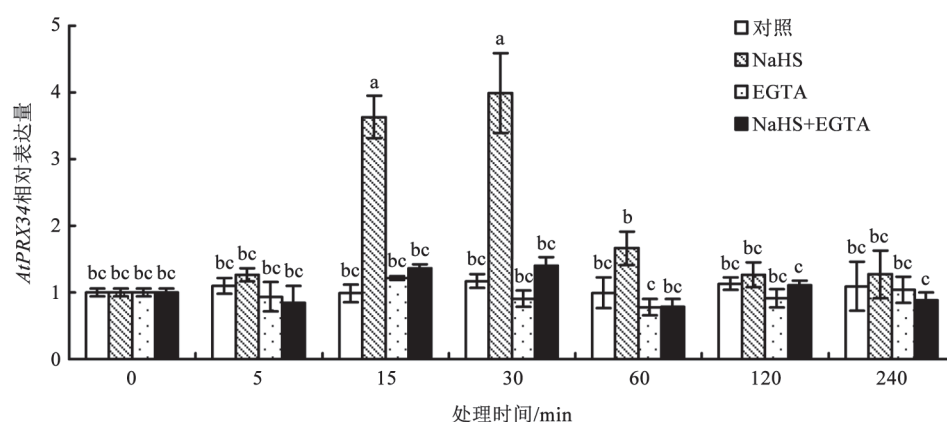
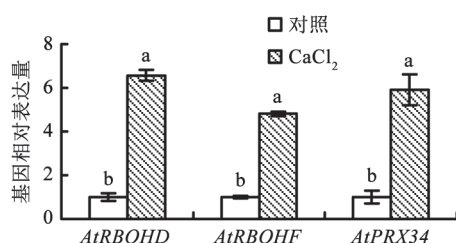


图4 EGTA对H₂S诱导的拟南芥叶片*AtRBOHD*和*AtRBOHF*相对表达量的影响

Fig.4 Effects of EGTA on H₂S-induced *AtRBOHD* and *AtRBOHF* relative expression levels in leaves of *Arabidopsis*

图5 EGTA对 H_2S 诱导的拟南芥叶片 AtPRX34 相对表达量的影响Fig.5 Effects of EGTA on H_2S -induced AtPRX34 relative expression level in *Arabidopsis* leaves图6 CaCl_2 处理对拟南芥叶片 AtRBOHD 、 AtRBOHF 和 AtPRX34 相对表达量的影响Fig.6 Effects of CaCl_2 on AtRBOHD 、 AtRBOHF and AtPRX34 relative expression levels in leaves of *Arabidopsis*

通过钙信使促进NADPH氧化酶和细胞壁过氧化物酶基因表达,诱导 H_2O_2 产生,进而调控植物气孔的运动。

讨 论

H_2S 是近年发现的植物内源气体信号分子,参与气孔运动的调控,外源 H_2S 供体NaHS亦可通过 H_2O_2 引起植物叶片气孔关闭(侯智慧等2011;叶青等2011)。 Ca^{2+} 是气孔运动信号转导过程中的主要组分,并与其他信号分子存在相互作用。 Ca^{2+} 是否参与 H_2S 诱导的拟南芥气孔关闭?其与 H_2O_2 介导的信号途径是否存在联系?本文利用胞外 Ca^{2+} 螯合剂EGTA、质膜L型钙离子通道阻断剂Nif以及内质网钙泵阻断剂Thaps研究发现,EGTA和Nif能够不同程度抑制 H_2S 诱导的气孔关闭,而Thaps对 H_2S 的效应无显著影响,表明 Ca^{2+} 参与 H_2S 诱导的拟南芥气孔关闭过程,该过程中 Ca^{2+} 主要来源于胞外 Ca^{2+}

的内流(图1、图2-A)。Alexandre等(1990)报道,ABA可通过三磷酸肌醇(inositol 1,4,5-triphosphate, IP_3)引起胞内钙库释放 Ca^{2+} ,在 H_2S 诱导气孔关闭过程中,通过什么方式引起质膜 Ca^{2+} 通道开放,导致胞外 Ca^{2+} 内流?利用膜片钳技术结合药理学实验进一步探究这些问题,有助于深入理解 H_2S 诱导气孔关闭的信号转导机制。

H_2O_2 作为植物体内的第二信使,其在调控气孔运动中作用机理的研究取得了很大的进展,研究表明,植物体内主要来源于NADPH氧化酶、细胞壁过氧化物酶、多胺氧化酶和草酸盐氧化酶等途径。本实验室前期工作显示,来源于NADPH氧化酶、细胞壁过氧化物酶和多胺氧化酶途径的 H_2O_2 参与 H_2S 诱导的拟南芥气孔关闭(叶青等2011);本实验进一步证明 H_2S 可以促进 AtRBOHD 和 AtRBOHF 以及 AtPRX34 的表达(图4、图5),提高拟南芥叶片和保卫细胞 H_2O_2 含量(图3、图2-B),而EGTA抑制 AtRBOHD 和 AtRBOHF 以及 AtPRX34 的表达(图4、图5),抑制 H_2S 诱导的拟南芥叶片及保卫细胞 H_2O_2 含量的增加(图3、图2-B),而外源 CaCl_2 处理上调 AtRBOHD 、 AtRBOHF 和 AtPRX34 的表达(图6),表明 Ca^{2+} 可能位于 H_2O_2 上游参与 H_2S 诱导的拟南芥气孔关闭。

本文研究结果表明, H_2S 通过促进胞外 Ca^{2+} 内流及胞内钙库释放 Ca^{2+} 诱导保卫细胞胞质 Ca^{2+} 浓度升高,从而促进 H_2O_2 产生,诱导气孔关闭,进一步完善了 H_2S 诱导气孔关闭的信号转导网络。Zhang等(2009)的研究发现在 RBOHD 启动子区域存在磷

脂酸的结合位点, 在*AtRBOHD*、*AtRBOHF*以及*At-PRX34*的启动子区域是否存在Ca²⁺信号的响应元件? Dubiella等(2013)在拟南芥中分离到钙依赖型蛋白激酶CPK5可以响应病原菌相关分子模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)磷酸化RBOHD蛋白, Kawarazaki等(2013)利用酵母双杂交技术从拟南芥中分离到低温诱导蛋白AtSRC2, 可以与AtRBOHF的N端相互作用, 促进Ca²⁺依赖型H₂O₂形成。那么, 在介导H₂S诱导的气孔关闭过程中, 在Ca²⁺的下游是否存在特异的Ca²⁺受体蛋白对AtRBOHD、AtRBOHF以及AtPRX34活性起调节作用? 利用分子生物学技术对这些问题深入研究, 将有助于H₂S诱导气孔关闭机制的完善。

参考文献

- 侯智慧, 车永梅, 王兰香, 侯丽霞, 刘新(2012). H₂S位于H₂O₂下游参与乙烯诱导拟南芥气孔关闭过程. 植物生理学报, 48 (12): 1193~1199
- 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
- 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 (8): 841~851
- 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
- 叶青, 侯智慧, 刘菁, 刘瑞清, 刘新(2011). H₂O₂介导H₂S诱导的拟南芥气孔关闭. 植物生理学报, 47 (12): 1195~1200
- Alexandre J, Lassalles JP, Kado RT (1990). Opening of Ca²⁺ channels in isolated red beet root vacuole membrane by inositol 1,4,5-trisphosphate. Nature, 343: 567~570
- Dubiella U, Seybold H, Durian G, Komander E, Lassig R, Witte CP, Schulze WX, Romeis T (2013). Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. Proc Natl Acad Sci USA, 110 (21): 8744~8749
- Fang T, Cao Z, Li J, Shen W, Huang L (2014). Auxin-induced hydrogen sulfide generation is involved in lateral root formation in tomato. Plant Physiol Biochem, 76: 44~51
- García-Mata C, Lamattina L (2010). Hydrogen sulphide, a novel gas-transmitter involved in guard cell signaling. New Phytol, 188 (4): 977~984
- Hoque TS, Uraji M, Ye W, Hossain MA, Nakamura Y, Murata Y (2012). Methylglyoxal-induced stomatal closure accompanied by peroxidase-mediated ROS production in *Arabidopsis*. J Plant Physiol, 169 (10): 979~986
- Hossain MA, Munemasa S, Uraji M, Nakamura Y, Mori IC, Murata Y (2011). Involvement of endogenous abscisic acid in methyl jasmonate-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 156 (1): 430~438
- Jin ZP, Xue SW, Luo YN, Tian BH, Fang HH, Li H, Pei YX (2013). Hydrogen sulfide interacting with abscisic acid in stomatal regulation responses to drought stress in *Arabidopsis*. Plant Physiol Biochem, 62: 41~46
- Kawarazaki T, Kimura S, Iizuka A, Hanamata S, Nibori H, Michikawa M, Imai A, Abe M, Kaya H, Kuchitsu K (2013). A low temperature-inducible protein AtSRC2 enhances the ROS-producing activity of NADPH oxidase AtRbohF. Biochim Biophys Acta, 1833 (12): 2775~2780
- Lai D, Mao Y, Zhou H, Li F, Wu M, Zhang J, He Z, Cui W, Xie Y (2014). Endogenous hydrogen sulfide enhances salt tolerance by coupling the reestablishment of redox homeostasis and preventing salt-induced K⁺ loss in seedlings of *Medicago sativa*. Plant Sci, 225: 117~129
- Li ZG, Gong M, Xie H, Yang L, Li J (2012). Hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide-induced heat tolerance in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) suspension cultured cells and involvement of Ca²⁺ and calmodulin. Plant Sci, 185~186: 185~189
- Liu J, Hou LX, Liu GH, Liu X, Wang XC (2011). Hydrogen sulfide induced by nitric oxide mediates ethylene-induced stomatal closure of *Arabidopsis thaliana*. Chin Sci Bull, 56 (33): 3547~3553
- Schachtman DP, Goodger JQ (2008). Chemical root to shoot signaling under drought. Trends Plant Sci, 13 (6): 281~287
- Wang F, Jia J, Wang Y, Wang W, Chen Y, Liu T, Shang Z (2014). Hyperpolarization-activated Ca²⁺ channels in guard cell plasma membrane are involved in extracellular ATP-promoted stomatal opening in *Vicia faba*. J Plant Physiol, 171 (14): 1241~1247
- Xie Y, Mao Y, Zhang W, Lai D, Wang Q, Shen W (2014). Reactive oxygen species-dependent nitric oxide production contributes to hydrogen-promoted stomatal closure in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 165 (2): 759~773
- Zhang Y, Zhu H, Zhang Q, Li M, Yan M, Wang R, Wang L, Welti R, Zhang W, Wang X (2009). Phospholipase Dα1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in *Arabidopsis*. Plant Cell, 21 (8): 2357~2377
- Zhao X, Li YY, Xiao HL, Xu CS, Zhang X (2013). Nitric oxide blocks blue light-induced K⁺ influx by elevating the cytosolic Ca²⁺ concentration in *Vicia faba* L. guard cells. J Integr Plant Biol, 55 (6): 527~536
- Zhao X, Wang YJ, Wang YL, Wang XL, Zhang X (2011). Extracellular Ca²⁺ alleviates NaCl-induced stomatal opening through a pathway involving H₂O₂-blocked Na⁺ influx in *Vicia* guard cells. J Plant Physiol, 168 (9): 903~910