

植物体内活性氧的研究及其在植物抗逆方面的应用

薛鑫¹ 张芊² 吴金霞²

(1. 兰州大学草地农业科技学院, 兰州 730070; 2. 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘要: 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 是植物有氧代谢的副产物, 同时环境胁迫也会使植物细胞中积累大量的活性氧。低浓度的活性氧可以作为信号分子存在, 诱导防御基因的表达和植物对环境的适应反应。当逆境胁迫迫使植物细胞中产生大量活性氧时, 就会导致细胞内的大分子物质及其他组分受损, 阻碍植物的正常代谢和生长, 甚至死亡。植物体内存在活性氧清除机制, 可以在一定范围内维持活性氧的平衡。研究表明, 利用植物体内自身的活性氧清除机制可以提高植物的抗逆性。对当前植物活性氧的研究动态进行概述, 同时对植物活性氧清除机制在提高植物抗逆性方面的应用进行探讨。

关键词: 活性氧 植物 抗逆性

Research of Reactive Oxygen Species in Plants and Its Application on Stress Tolerance

Xue Xin¹ Zhang Qian² Wu Jinxia²

(1. College of Pastoral Agriculture Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730070; 2. Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: The ROS (Reactive oxygen species) is a plant byproduct of aerobic metabolism, environmental stress also makes a large amount of a ROS accumulate in plant cells. Low concentrations of ROS can exist as a signaling molecule to induce the expression of defense genes and plant adaptation to the environment reaction. When the stress force in plant cells produce large amounts of reactive oxygen species, it will cause damage to intracellular macromolecules and other components, to impede normal plant metabolism and growth, and even death. Plants existence of active oxygen scavenging mechanism, the balance can be maintained within a certain range of reactive oxygen species. Studies have shown that the plants active oxygen scavenging mechanism can improve the resistance of plants. In this paper, an overview of the current dynamic of Reactive Oxygen Species, at the same time explore the application of plant active oxygen scavenging mechanism in improving plant stress resistance.

Key words: ROS Plant Stress tolerance

氧气 (O_2) 是一切需氧生物维持生命所必需的, 如果在需氧生物利用 O_2 的过程中 O_2 未被完全还原, 就会产生某些氧代谢产物及其衍生物。它们都含有氧原子, 只是比 O_2 具有更活泼的化学性质, 总称为活性氧 (reactive oxygen species, ROS)。ROS 包括超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$)、羟基自由基 ($\cdot OH$)、过氧化氢 (H_2O_2)、单线态氧 (1O_2) 等^[1]。

ROS 不仅是植物有氧代谢的副产物, 而且也是重要的信号分子, 参与调控植物的生长发育以及各种胁迫反应, 如 ROS 控制植物细胞的程序性死亡。

当植物体遭受病毒侵害时, 细胞内 NADPH 氧化酶增加, 细胞壁上会产生 ROS, 这样就能产生高浓度的 H_2O_2 , 它能扩散进入细胞, 进而激活植物体的防御反应。因此当病原菌在植物体内繁殖时, ROS 可作为细胞程序性死亡调节分子和第二信使, 其在很多植物的激素反应中起类似的作用。 H_2O_2 还能作为一种信号分子在介导植物对不同胁迫的响应、根毛的生长、脱落酸 (abscisic acid, ABA)、 Ca^{2+} 通道、气孔的关闭等方面均发挥着重要的调节作用^[2]。

近年来, 拟南芥作为模式植物常被用作植物体

收稿日期: 2013-04-26

作者简介: 薛鑫, 女, 硕士, 研究方向: 植物分子生物学; E-mail: xlzf123@163.com

通讯作者: 吴金霞, 女, 副研究员, 研究方向: 植物功能基因组学; E-mail: jinxia@caas.net.cn

内 ROS 的研究。有报道表明,在拟南芥乙烯受体 *etr1-7* 缺失功能突变体中 H_2O_2 对气孔关闭的调节作用受到了干扰;对拟南芥 *atrbohD/atrbohF* 突变体的研究证明了 ROS 对植物防御细胞信号和气孔关闭的重要作用^[3];在拟南芥保卫细胞中 H_2O_2 是 ABA 信号产生的内源成分,通过质膜钙离子通道的激活诱导气孔关闭^[4]。因此,细胞内 ROS 信号调控细胞内 ROS 并使其处于稳态。植物中的还原型辅酶 II (NADPH) 氧化酶主要作用于植物和病原体相互作用所导致的氧化迸发中^[5]。NADPH 氧化酶能使细胞内 ROS 水平迅速升高,刺激信号从细胞质膜快速传入核内。由于 NADPH 氧化酶具有激活快、失活也快的特点,故其产生的 ROS 可能作为信使分子,在调节细胞相关的信号传导过程中起重要作用^[6]。

1 植物体内 ROS 的产生及分子机制

虽然相比较之下,二价氧不容易发生化学反应,但当其化学价降低时会导致 ROS 的形成。

O_2^- 是 NADPH 氧化酶呼吸反应的一个副产物。 O_2^- 以一定的速率氧化铁硫簇 (Iron-sulfur cluster, Fe-S 簇),且同时释放铁 (Fe)。 O_2^- 可以在体外与硫醇起反应,但是反应速率极低,说明很难在体外发生反应。在大肠杆菌中, O_2^- 浓度极低且浓度变化不大,说明 O_2^- 非常不稳定,它不仅与 Fe-S 簇发生反应,也可以自发的与超氧化物歧化酶 (SOD) 发生反应并歧化 H_2O_2 。由于 O_2^- 不稳定,无法通过膜结构,且所带的负电荷决定了它是一种很弱的信号分子。

$\cdot OH$ 是氧化性最强的 ROS 自由基。在已知的氧化剂中,其电位为 2.80 V,仅次于氟的 2.87 V^[7]。 $\cdot OH$ 的反应活性大、寿命短 (小于 $10^{-4}s$)、存在浓度低^[8, 9]。它是一种非选择性的氧化剂,能有效氧化各种有机物和无机物,氧化效率高,反应速度快。在生物体内,需氧代谢的氧化还原反应所产生的羟自由基,可以引发不饱和脂肪酸发生脂质过氧化,核酸断裂、蛋白质和多糖分解,膜结构损伤及功能丧失^[10]。因此,在环境科学和生命科学等领域,科研工作者已经对 $\cdot OH$ 展开了广泛的研究。 $\cdot OH$ 有很强的活性和毒性,这决定了它可能无法在特定的位点上进行特定反应。尽管如此,它仍然决定着 H_2O_2 的产生,从本质上说 H_2O_2 的毒性是氧化过程

中羟自由基催化作用的结果。

H_2O_2 作为 ROS 家族中的一员,在植物的生长发育和新陈代谢过程中扮演者重要的角色。虽然它不是自由基,但是在过渡金属亚铁离子 (Fe^{2+}) 存在时它具有巨大的潜在的破坏力。大量研究已经证实,在植物遭受胁迫或衰老时, H_2O_2 会对细胞内的大分子物质造成破坏,同时也可以调节植物不同的反应进程。与 H_2O_2 相比, O_2^- 和 $\cdot OH$ 不太稳定,无法穿过生物膜,进而使得它们不适合以信号分子的形式存在。正常情况下, H_2O_2 的半衰期是 1 ms,而 O_2^- 和 1O_2 需要以微妙 (μs) 来计, $\cdot OH$ 需要以纳秒 (ns) 来计。然而, O_2^- 、 1O_2 和 $\cdot OH$ 比 H_2O_2 更具有活性,对植物体的损伤会更大^[11]。

由于 ROS 内在化学性质的不同,每一种 ROS 都有各自不同的首选生物学靶目标。一般来说,ROS 反应越剧烈,积累的量越大,其毒性就越大,信号能力越弱。

2 植物体内 ROS 的清除机制

ROS 对植物体造成的影响取决于它产生的位置和植物体当时所处的生理反应阶段^[12]。植物体内的 H_2O_2 主要来源于叶绿体,当叶绿体积累 ROS 时,其光合电子传递系统可能会异常活跃,造成还原力爆发,阻碍 O_2 向不同 ROS 的转变^[13, 14]。

植物在受到胁迫时,ROS 的产生速率提高^[15]。在包括光呼吸在内的几个关键代谢反应中,过氧化物酶体是过氧化物和 H_2O_2 产生的另一个场所,它对产生 H_2O_2 的细胞起保护作用。在逆境胁迫下,线粒体中的电子传递也是 H_2O_2 的一个主要来源^[16]。ROS 能在质外体膜或者细胞外生成,如 NADPH 氧化酶是一个可以横跨膜的酶,它将电子从细胞质的 NADPH 转移给 O_2 形成 O_2^- ,随后又生成 H_2O_2 和 $\cdot OH$ ^[17, 18]。除了 NADPH 氧化酶,pH 依赖型过氧化物酶 (peroxidase, POD)、类似萌发素的草酸氧化酶、胺氧化酶都被证明是质外体 H_2O_2 的来源^[19]。

不管是正常情况下还是在逆境胁迫下,植物体都或多或少会受到有氧代谢产生的 ROS 的威胁,植物体内的 ROS 平衡被打破,植物体自身的保护和防御机制也随之不断变化,通过酶促和非酶促抗氧化系统清除 ROS。这两类 ROS 清除系统的活性和含量

并不是一成不变的,它随着外界环境变化而变化,也与植物体内 ROS 积累的量有关,植物体要维持自身正常生理代谢就必须及时清除体内多余的 ROS。

2.1 酶促清除系统

酶促清除系统主要包括超氧化物歧化酶(SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)及过氧化氢酶(CAT)等。

1938年,Keilis^[20]第一次分离得到SOD,但当时它被认为是铜(Cu)贮存蛋白,一直到1969年McCord等^[21]发现它能催化 O_2^- 歧化,才被正式命名为SOD(superoxide dismutase)。SOD可使 O_2^- 和H反应形成 H_2O_2 和 O_2 ,形成抵御 H_2O_2 的第一道屏障,而且存在于所有的亚细胞定位中^[22]。基于金属辅因子的需要,SOD被分为3类:铁超氧化物歧化酶(Fe-SOD)、锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD)和铜-锌超氧化物歧化酶(Cu/Zn-SOD)。Fe-SOD位于叶绿体中;Mn-SOD位于线粒体和过氧化物酶体中;Cu/Zn-SOD位于叶绿体、胞液和质外体空间中。随后,在CAT、APX和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPX)等的作用下将 H_2O_2 转化为水合分子氧从而降低ROS的毒害作用。CAT可以直接作用于 H_2O_2 ,而后者需要抗坏血酸和还原型谷胱甘肽,分别作为电子供体。过氧化物酶体中的CAT对 H_2O_2 没有亲和力,故大部分 H_2O_2 都能被清除。另一方面,APX对 H_2O_2 有很强的亲和力,并被发现存在于叶绿体、线粒体、过氧化物酶体和胞液中。APX被定位于每个生成ROS的位置,能很好地调整细胞内ROS的水平^[22]。

2.2 非酶促清除系统

非酶促清除系统主要是指抗坏血酸盐和还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH),以及维生素E、甘露醇、类胡萝卜素及类黄酮等^[23]抗氧化物质,这些物质可以直接与ROS反应,也可以作为酶的底物出现在ROS的清除机制中。

还原型谷胱甘肽(GSH)是细胞内最重要的抗氧化物,其结构中含有一个活泼的巯基(-SH),易被氧化脱氢,这一特异结构使其成为体内主要的自由基清除剂。如当细胞内生成少量 H_2O_2 时,GSH在GPX的作用下,把 H_2O_2 还原成 H_2O ,其自身被氧化为GSSG(谷胱甘肽的氧化型),GSSG在谷胱甘肽还原酶作用下,接受H还原成GSH,使体内自由基

的清除反应能够持续进行,从而稳定膜结构。GSH所处的环境pH>7和GSH浓度大于1 mmol/L两个条件同时满足时,GSH就能还原脱氢抗坏血酸;基质在光下的pH值约为8,并且GSH的浓度大约是5 mmol/L,因此很容易发生上述非酶促反应^[24]。即便如此,并非单纯提高还原型谷胱甘肽在植物体内的含量就能提高抵抗ROS的能力。试验证明,在通过 γ -谷胱酰半胱氨酸合成酶过表达得到的转基因拟南芥中,谷胱甘肽的量接近野生型的两倍,但转基因植株并没有表现出比野生型更强的耐受性^[25]。

维生素E(Evitamin E)是一种类囊体膜抗氧化物,极易氧化,是良好的脂溶性抗氧化剂,可清除自由基,保护不饱和脂肪酸和生物大分子,维持生物膜完好,延缓植物衰老。Bishop^[26]发现了一种突变体,其体内缺乏维生素E,此突变体除影响维生素E的合成外,还影响叶绿醌和叶绿苯醌的合成。拟南芥和(phytoene desaturation)突变体阻断了维生素E和醌合成的共同途径,致使体内缺乏维生素E和醌^[27]。可见,维生素E在植物体自由基的清除方面的作用仍需更深层次的探索。细胞内ROS产生和清除的平衡是不同细胞区域有效地协调反应维持的,取决于氧化剂和抗氧化的复杂反应,这种平衡会被各种环境胁迫打破。如干旱、低温、水分胁迫等。但植物能够维持或者重建氧化还原平衡的,我们称之为耐胁迫^[28]。除了如脯氨酸和糖类之类的渗透调节物^[29],植物抗氧化剂活性的改变说明对干旱胁迫的响应能力,因此被用于抗旱筛选^[30, 31]。在水分胁迫条件下,利用转基因技术过表达CAT和SOD可以使野生型植株的耐逆性和氧化应激反应能力有所增强^[32]。CAT和APX对ROS灵敏度和亲和力的不同反映出它们对ROS不同的清除能力。在严重干旱胁迫下CAT可以消除过量生成的ROS,降低ROS水平,随后被APX和抗坏血酸谷胱甘肽酶循环清除。

3 利用植物清除ROS机制提高植物抗逆性

随着基因工程的发展,转基因技术已成为植物育种发展的一条重要途径。利用基因工程策略提高这些抗氧化物质在植物体内的代谢水平和活性,是增强植物的抗逆性的一条途径。转基因植株中SOD、

APX 和 CAT 的过量表达可以有效清除植株体内的 ROS, 提高其对氧化胁迫的抗性。

孟慧和赵军等^[32]以玉米 CAT 基因启动子中的 ABA 应答元件 ABRE 为诱饵, 利用酵母单杂交系统筛选玉米 cDNA 文库克隆了系列转录因子基因, 命名为 ABP9^[30]。对其中 ABP9 基因的分析表明, ABP9 蛋白是能够特异结合 ABRE 元件并能在植物细胞中激活报告基因表达的有功能的转录因子。在玉米中 ABP9 基因的表达受 ABA 和逆境诱导。ABP9 基因在拟南芥中过表达可诱导包括抗氧化酶基因在内的一系列抗逆相关基因的表达, 显著降低体内 ROS 含量, 并大幅度提高转基因植物对多种非生物逆境的综合耐受性。利用农杆菌介导法将玉米 ABP9 基因转入紫花苜蓿中, 转录因子 ABP9 在调控 ABA 响应和调节细胞内 ROS 水平等方面发挥重要作用, 得到转化植株, 其抗旱性显著提高。2004 年, Wang 等^[33]在将拟南芥 Mn-SOD 基因转入拟南芥 Columbia 品种植株中, 结果转基因植株在盐胁迫条件下的 Mn-SOD、Cu/Zn-SOD、Fe-SOD、CAT、POD 含量均有所升高, 清除 ROS 的能力增强; Xu 等^[34]在 2008 年将大麦中的 APX1 基因转入拟南芥中, 结果得到转基因植株在盐胁迫下 APX、SOD、CAT 和 GR 含量均有所提高, H₂O₂ 和 MDA 含量有所下降, 植株的抗氧化能力得到提高, 抗逆性增强; Chen 等^[35]在 2005 年将水稻基因 DHAR 转入拟南芥 Wassilewskija 品种中, 结果转基因植株中 DHAR 活性和总抗坏血酸含量增加了, 植株抗氧化能力增强, 抗逆性随之增强; Ezaki^[36, 37]分别在 2000 年和 2001 年将 NtPox parB AtPox 和 NtPox parB 转入拟南芥, 得到转基因植株可以防止铝毒和氧化胁迫; 2006 年, Gaber 等^[38]将 GPX-2 基因转入拟南芥, 得到转基因植株可以抵抗 H₂O₂ 和铁离子 (Fe³⁺) 的毒害, 能在高浓度盐胁迫、低温和干旱胁迫下生存; 2008 年, Ma 等^[39]将 P5CR 基因转入拟南芥, 得到抗盐植株。

孕育期阶段遭遇低温胁迫会导致水稻雄性不育。Sato 等^[40]利用 APX 基因过表达, 提高水稻对低温胁迫的抵抗力。试验结果显示在 12℃ 处理 6 h 后野生型植株体内的 H₂O₂ 和 MDA 含量分别比处理前增加了 1.5 倍和 2 倍, 而转基因植株逆境胁迫前后 H₂O₂ 和 MDA 含量变化不大, 同时转基因植株中

APX 酶活性明显增强。因此表明提高 APX 酶活性, 可以提高植株对 ROS 的清除能力, 从而减少 ROS 对幼穗的伤害, 提高水稻低温胁迫下的产量。

2002 年, Matsumura 等^[41]将小麦 CAT 基因转入水稻中, 提高转基因植株的耐低温能力; 2008 年, Prashanth 等^[42]将白骨壤 Cu/Zn SOD 基因转化水稻品种印度香米, 得到转基因植株耐受中等电压介导的氧化胁迫、盐胁迫和干旱胁迫; 2006 年, Zhao 等^[43]将盐地碱蓬 GST 基因转入水稻中华 11 号, 由于植株体内 GST、CAT 和 SOD 活性的提高, 植株对盐胁迫和百草枯的耐受性增强。本实验室利用 T-DNA 插入技术获得了水稻 OsAPX2 缺失突变体。OsAPX2 突变体植株表现矮化、叶片拟病斑及雄性不育。OsAPX2 突变体内 APX 活性明显下降, 植株表现对多种逆境胁迫敏感。同时 OsAPX2 过量表达植株表型正常, 体内 APX 活性明显增强, 植株对盐、旱和低温胁迫抗性增加^[44]。此外, 将水稻 OsAPX2 转入紫花苜蓿野生型植株中同样可以提高植株 APX 的活性, 并且转基因紫花苜蓿表现良好的抗盐特性。

McKersie 等^[45]将烟草中的 Mn-SOD cDNA 转入苜蓿线粒体中使其过表达, 增强转基因植株体内 SOD 的活性, 经过大田试验, 结果证实转基因苜蓿的地上生物量、成活率都有大幅度提高, 这为抗逆苜蓿新品种的培育提供了一条快速有效的途径。Samis 和韩利芳等^[46, 47]先后转 Mn-SOD 基因到不同品种的紫花苜蓿中, 结果转基因苜蓿的抗寒性都有所提高。2000 年, Aquilante 等^[48]将只存在于原核生物中的 Fe-SOD 基因转入苜蓿中, 经过两轮大田试验的筛选鉴定, 转基因植株的越冬率显著增强。Rubio 等^[49]在 2002 年将烟草和拟南芥中的 Mn-SOD 基因和 Fe-SOD 基因转入紫花苜蓿, 提高了光合活性, 使转基因植株耐受轻度水分胁迫。LEA 基因可作为 ABA 应答基因的一种, 王瑛等^[46]利用基因枪轰击法将来源于大麦的 LEA3 基因导入紫花苜蓿“中苜一号”中, 获得的转基因植株在高浓度盐胁迫下具有较高存活率, 耐盐能力约为原品种的 4 倍, 表明 LEA3 基因可运用到苜蓿抗旱耐盐育种中去。

4 结语

活性氧是植物细胞各种代谢的产物, 然而各种

胁迫都会引起活性氧的过量产生,导致氧化胁迫反应。植物细胞利用系统的抗氧化防御机制来消除活性氧的不利作用,包括非酶促清除机制和酶促清除机制。同时活性氧可以作为重要的信号调节分子,自由基可以相互作用并于防御机制发生反应。调控的结果有正面的,也有负面的。活性氧的这种双面调控作用最初在发病机制中得到证明。目前已在各种非生物胁迫中得到证实。因此,对活性氧产生及清除机制中各种组分的功能研究将有助于更好的控制细胞中活性氧的浓度。大量的研究表明,诱导细胞内抗氧化机制可以增加植物抗活性氧的能力。SOD、APX、CAT、GR、DHAR、GST 和 GPX 的过量表达可以有效清除植株体内的 ROS,提高多种作物对非生物胁迫的抗性。因此,调控植物活性氧的水平和防御机制对于提高作物的抗逆性具有良好的应用前景。

参考文献

- [1] 方允中,李文杰. 自由基与酶: 基础理论及其在生物学和医学中的应用 [M]. 北京: 科学出版社, 1989: 147.
- [2] Rizhsky L, Liang H, Mittler R. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco [J]. *Plant Physiology*, 2002, 130 (3): 1143-1151.
- [3] Leung J, Giraudat J. Absciscic acid signal transduction [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 1998, 49 (1): 199-222.
- [4] Pei ZM, Murata Y, Benning G, et al. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells [J]. *Nature*, 2000, 406 (6797): 731-734.
- [5] Bowler C, Montagu M, Inze D. Superoxide dismutase and stress tolerance [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 1992, 43 (1): 83-116.
- [6] 邱嵘, 郑荣梁. 活性氧信号传导作用的研究进展 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2001, 28 (3): 287-288.
- [7] 钱易. 水体颗粒物和难降解有机物的特性与控制技术原理 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2000: 6.
- [8] 朱琳娜, 吴超, 何争光. Fenton 试剂法处理难生物降解有机废水最新进展 [J]. *能源技术与管理*, 2006 (2): 59-62.
- [9] 李金莲, 金永峰, 钱慧娟. Fenton 试剂在水处理中的应用研究 [J]. *化工科技市场*, 2006, 29 (6): 28-33.
- [10] 陈琳, 杜瑛, 雷乐成. UV/H₂O₂ 光化学氧化降解对氯苯酚废水的反应动力学 [J]. *环境科学*, 2003, 24 (5): 106-109.
- [11] Liskay A, van der Zalm E, Schopfer P. Production of reactive oxygen intermediates (O₂⁻, H₂O₂ and ·OH) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth [J]. *Plant Physiol*, 2004, 136: 3114-3123.
- [12] Cruz de Carvalho MH. Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling [J]. *Plant Signal Behav*, 2008, 3: 156-165.
- [13] Foyer CH, Descourvières P, Kunert KJ. Protection against oxygen radicals: An important defence mechanism studied in transgenic plants [J]. *Plant Cell Environ*, 1994, 17: 507-523.
- [14] Foyer CH, Noctor G. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria [J]. *Physiol Plant*, 2003, 119: 355-364.
- [15] Dat J, et al. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57: 779-795.
- [16] Elstner EF. Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells [J]. *Current Topics in Plant Physiology*, 1991, 6: 13-25.
- [17] Torres MA, Dangl JL. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2005, 8 (4): 397-403.
- [18] Carol RJ, Dolan L. The role of reactive oxygen species in cell growth: lessons from root hairs [J]. *J Exp Bot*, 2006, 57: 1829-1834.
- [19] Bolwell GP, Wojtaszek P. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defense broad perspective [J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1997, 51: 347-366.
- [20] Keilis-Borok VI, Knopoff L, Rotwain IM, et al. Intermediate-term prediction of occurrence times of strong earthquakes [J]. *Nature*, 1988, 335 (6192): 690-694.
- [21] McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein) [J]. *J Biol Chem*, 1969, 244 (22): 6049-6055.
- [22] Alscher RG, Erturk N, Heath LS. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants [J]. *J Exp Bot*, 2002, 53: 1331-1341.
- [23] 杜秀敏, 殷文璇, 赵彦修, 等. 植物中活性氧的产生及清除机制 [J]. *生物工程学*, 2001, 17 (2): 121-125.
- [24] Joo JH, Bae YS, Lee JS. Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism [J]. *Plant Physiol*, 2001, 126: 1055-

- 1060.
- [25] Yu H, Chen X, Hong YY, et al. Activated expression of an Arabidopsis HD-START protein confers drought tolerance with improved root system and reduced stomatal density [J]. The Plant Cell, 2008, 20 (4) : 1134-1151.
- [26] Bishop NI, Urbig T, Senger H. Complete separation of the β , ϵ - and β , β -carotenoid biosynthetic pathways by a unique mutation of the lycopene cyclase in the green alga, *Scenedesmus obliquus* [J]. FEBS Letters, 1995, 367 (2) : 158-162.
- [27] Norris SR, Shen X, Della PD. Complementation of the *Arabidopsis* pds1 mutation with the gene encoding p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase [J]. Plant Physiology, 1998, 117 (4) : 1317-1323.
- [28] Quan LJ, Zhang B, Shi WW, et al. Hydrogen peroxide in plants : a versatile molecule of the reactive oxygen species network [J]. J Integr Plant Biol, 2008, 50 : 2-18.
- [29] Sinhababu A, Kar RK. Response of four fuel-wood yielding seedlings to water stress [J]. Plant Physiol, 2002, 7 : 88-91.
- [30] Sinhababu A, Kar RK. Comparative responses of three fuel-wood yielding plants to PEG-induced water stress at seedling stage [J]. Acta Physiol Plant, 2003, 25 : 403-409.
- [31] Sinhababu A, Banerjee A, Kar RK. Assessment of tolerance to water stress at seedling stage of four fuel wood yielding legumes [J]. Theoret Exp Biol, 2004, 1 : 10-16.
- [32] 孟慧, 张霞, 等. 转录因子 ABP9 基因过表达对植物生长发育的影响分析 [J]. 中国农学通报, 2007, 23 (6) : 94-98.
- [33] Wang X. Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses [J]. Plant Physiology, 2005, 139 (2) : 566-573.
- [34] Pérez-Torres E, Paredes M, Polanco V, et al. Gene expression analysis : a way to study tolerance to abiotic stresses in crops species [J]. Chilean J Agric Res, 2009, 69 : 260-269.
- [35] Wang BC, et al. Identification and quantitative analysis of significantly accumulated proteins during the *Arabidopsis* seedling Deetiolation process [J]. J Integrative Plant Biol, 2006, 48 : 104-113.
- [36] Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Tanemura K, et al. Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice [J]. Diabetes, 2000, 49 (9) : 1534-1542.
- [37] Yamauchi T, Kamon J, Waki H, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity [J]. Nat Med, 2001, 7 (8) : 941-946.
- [38] Abdel-Gaber AM, Abd-El-Nabey BA, Sidahmed IM, et al. Inhibitive action of some plant extracts on the corrosion of steel in acidic media [J]. Corrosion Science, 2006, 48 (9) : 2765-2779.
- [39] Solimando DA, Jr BS, Pharm MA. Drug information handbook for oncology [M]. 7th edition. Canada : Lexi-Comp, Inc., 2008.
- [40] Sato Y, Murakami T, Funatsuki H, et al. Heat shock-mediated APX gene expression and protection against chilling injury in rice seedlings [J]. J Exp Bot, 2001, 52 (354) : 145-151.
- [41] Matsumura T, Tabayashi N, Kamagata Y, et al. Wheat catalase expressed in transgenic rice can improve tolerance against low temperature stress [J]. Physiolo Plant, 2002, 116 (3) : 317-327.
- [42] Prashanth SR, Sadhasivam V, Parida A. Over expression of cytosolic copper/zinc superoxide dismutase from a mangrove plant *Avicennia marina* in *indica* rice var Pusa Basmati-1 confers abiotic stress tolerance [J]. Transgenic Res, 2008, 17 (2) : 281-291.
- [43] Zhao F, Zhang H. Salt and paraquat stress tolerance results from co-expression of the *Suaeda salsa* glutathione S-transferase and catalase in transgenic rice [J]. Plant Cell, 2006, 86 : 349-358.
- [44] Zhang Z, Zhang Q, Wu J, et al. Gene knockout study reveals that cytosolic ascorbate peroxidase 2 (OsAPX2) plays a critical role in growth and reproduction in rice under drought, salt and cold stresses [J]. PloS One, 2013, 8 (2) : e57472.
- [45] McKersie BD, Chen Y, De BM, et al. Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa(*Medicago sativa* L.) [J]. Plant Physiology, 1993, 103 (4) : 1155-1163.
- [46] Samis K, Bowley S, McKersie B. Pyramiding Mn-superoxide dismutase transgenes to improve persistence and biomass production in alfalfa [J]. J Exp Bot, 2002, 53 (372) : 1343-1350.
- [47] 韩利芳, 张玉发. 烟草 Mn SOD 基因在保定苜蓿中的转化 [J]. 生物技术通报, 2004 (1) : 39-46.
- [48] Aquilante C, Leternt SP, et al. Increased brain P-glycoprotein in morphine tolerant rats [J]. Pharmacol Let, 2000, 66 : 47-51.
- [49] Rubio MC, Gonzalez EM, Minchin FR, et al. Effects of water stress on antioxidant enzymes of leaves and nodules of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutases [J]. Physiologia Plantarum, 2002, 115 (4) : 531-540.
- [50] 王瑛, 朱宝成, 孙毅, 等. 外源 lea3 基因转化紫花苜蓿的研究 [J]. 核农学报, 2007, 21 (3) : 249-252.