

## NOXs生成的活性氧对根生长和发育调控的研究进展

景红娟\*, 李翠香, 王俊峰, 郭晓东, 王石雷, 田航宇, 王乐飞

河南工业大学生物工程学院, 郑州450001

**摘要:** 活性氧(reactive oxygen species, ROS)在植物体内作为信号分子调节根生长和发育的研究, 越来越受到人们的关注。文章结合最新的研究进展, 首先介绍了ROS产生关键酶——NADPH氧化酶(NADPH oxidases, NOXs)的结构及其在根生长和发育过程中的功能。根据决定根生长和发育的两个关键因素: 细胞膨胀和细胞分裂, 介绍了NOXs来源的ROS对细胞壁特性和细胞骨架组装的影响。最后, 重点论述了NOXs来源的ROS调控根生长和发育, 尤其是顶端生长的机理。

**关键词:** NADPH氧化酶; 活性氧; 顶端生长; 根; 研究进展

## Research Advances in Regulation of NOXs-derived ROS on Root Growth and Development

JING Hong-Juan\*, LI Cui-Xiang, WANG Jun-Feng, GUO Xiao-Dong, WANG Shi-Lei, TIAN Hang-Yu, WANG Le-Fei

College of Bioengineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China

**Abstract:** More and more researchers are paying close attention to the regulation of reactive oxygen species (ROS), as signal molecule, on the growth and development of roots. Combined with the latest research advances, structure and functions of NADPH oxidases (NOXs, as the key enzymes which produced ROS) in root growth and development were introduced firstly in the present paper. Based on the key factors during root growth and development: cell expansion and cell division, the effects of NOXs-derived ROS on properties of cell wall and reassemble of cell cytoskeleton were discussed in the second part. Finally, mechanism of NOXs-derived ROS in regulation of root growth and development, especially roots tip growth were discussed in detail in the paper.

**Key words:** NADPH oxidase; ROS; tip growth; root; research advance

根是植物吸收水分和营养物质的重要器官, 因此, 根及根毛的生长发育在一定程度上直接决定植物长势的好坏及产量的高低。活性氧(reactive oxygen species, ROS)是植物有氧代谢的副产物, 包括超氧阴离子( $O_2^-$ )、过氧化氢( $H_2O_2$ )、羟自由基( $\cdot OH$ )等。越来越多的研究证明ROS作为第二信使调控各种植物的生长发育、胁迫适应以及程序性细胞死亡(Gechev等2006)。NOXs作为一种跨膜蛋白, 是植物细胞产生ROS的重要酶类, 与根的生长发育密切相关(Jones等2007; Swanson和Gilroy 2010; Causin等2012; Tsukagoshi 2012)。本文结合最新研究进展, 对来源于NOXs的ROS在根生长和发育中的作用进行了系统总结。

### 1 NOXs在根及根毛生长发育中的作用

#### 1.1 NOXs的结构和功能

关于NOXs的首次报道, 是在哺乳动物中性粒细胞中发现的一类与呼吸爆发有关的蛋白质(Se-gal和Abo 1993)。随后, Foreman等(2003)在拟南芥

中发现NOXs参与根毛生长。与哺乳动物细胞中不同的是: 植物NOXs催化亚基的胞质部分含有完整的N-端结构域(含有2个 $Ca^{2+}$ 的结合位点EF-hand), 且不含有胞质催化亚基(p47<sup>phox</sup>、p67<sup>phox</sup>和p40<sup>phox</sup>)和膜蛋白p22<sup>phox</sup>(Oda等2010)。另外, 与动物细胞中的一样, 植物细胞NOXs的胞质部分含有结合NADPH的结构域, 而且是一种含有6个保守性跨膜螺旋(TM)的膜内在蛋白, 其中TM2和TM4通过4个关键的His与2个亚铁血红素相连。该亚铁血红素负责将胞内NADPH上的2个电子传递给胞外分子氧生成 $O_2^-$ (Sagi和Fluhr 2006)。 $O_2^-$ 的寿命极短(半衰期2~4  $\mu s$ ), 只能在生成部位起信号作用, 生成不久即自动歧化或经过氧化物酶催化生成 $H_2O_2$ 。

收稿 2013-02-18 修定 2013-04-08  
资助 河南省教育厅自然科学项目(重点资助项目)(13A180165)和河南工业大学引进人才专项(2009BS006)。

\* 通讯作者(E-mail: hjjing@haut.edu.cn; Tel: 0371-67756513)。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>具有相对较长的寿命(半衰期约2 ms), 可以通过扩散或水通道跨过细胞膜, 在细胞内行使信号分子的功能。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>在二价金属离子存在条件下, 通过Fenton反应生成性质更加活泼的·OH。上述3种ROS均可调节根的生长和发育(Gapper和Dolan 2006)。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中发现10个与动物NOXs同源的组分, 分别命名为AtRBOHA~J, 在拟南芥根中表达的为AtRBOHA~G、I。其中, AtRBOHC在拟南芥根发育过程中起关键作用(Foreman等2003)。

### 1.2 NOXs在根生长和发育中的作用

NOXs抑制剂DPI (diphenylene iodonium)可以抑制根毛的长度和数量, O'Donnell等(1993)首次证明了NOXs来源的ROS在根毛发育中起关键作用。同样, Liskay等(2004)报道了DPI抑制玉米(*Zea mays*)根细胞的膨胀, 说明NOXs生成的ROS参与根毛细胞的膨胀并非是拟南芥特有的。我们的研究结果也证明, 外源植酸通过抑制NOXs活性, 降低O<sub>2</sub><sup>-</sup>而不是H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量, 抑制小麦根尖生长的(Jing等2012)。但是DPI并非是NOXs的特异抑制剂, 它还抑制其他的黄素蛋白酶类, 所以并不能直接证明NOXs在根生长发育中的作用。最直接的证据来自Foreman等(2003)的研究, 发现拟南芥根毛缺陷突变体2 (root hair defective 2, *rhd2*)与野生型拟南芥相比, 根毛数量显著减少且长度缩短20% (图1), 表明该基因与根毛的生长发育密切相关。通过克隆该突变等位基因和序列分析发现, 该突

变基因编码AtRBOHC (respiratory burst oxidase homolog C), 与哺乳动物NOXs的催化亚基gp91<sup>phox</sup>同源。进一步分析*rhd2*突变体, 发现其表皮细胞的侧面能够形成突起, 但是所有根毛的顶端均破裂(burst) (图1), 没能转化为顶端生长(Macpherson等2008)。根毛形成分为根毛起始和生长两个阶段, *rhd2*突变体的根毛能够正常完成起始阶段, 但是却不能进行正常的顶端生长。

尽管所有根伸长区表皮细胞内均表达AtRBOHC, 但是仅在那些能够形成根毛且在根毛分化前表达。虽然发现在根毛起始一侧的细胞膜聚集AtRBOHC, 但是*rhd2*突变体的根毛起始正常, 推测AtRBOHC可能功能失活或与其他ROS生成系统功能冗余(Swanson和Gilroy 2010)。但是, 一旦根毛生长转向顶端生长, 大部分AtRBOHC高度集中在生长根毛的顶端。据报道ROS在生长根尖顶端含量也比其他部位高, 暗示ROS的生成与生长密切相关(Takeda等2008)。因此, NOXs来源的ROS在顶端生长过程中起关键作用。

AtRBOHD和AtRBOHF功能缺乏的双突变体*atrbohhd/atrbohfh*在正常条件下与野生型差别不大, 但是ABA对双突变体根伸长的抑制变弱(Kwak等2003)。假如AtRBOHD和AtRBOHF也参与ABA调控的气孔关闭, 表明来源于AtRBOHD和AtRBOHF的ROS参与ABA信号通路, 并与干旱条件下根的生长有关。因此, 我们推测在拟南芥根生长过程中有两种截然不同的通路, 一条是AtRBOHD和AtRBOHF参与的依赖于ABA信号通路的抑制根生长, 一条是依赖于AtRBOHC的促进根生长(Gapper和Dolan 2006)。

## 2 影响根尖生长发育的因素

根尖组织从顶端开始可以分为根冠区、分生区、伸长区和根毛区。根尖的生长发育与分生区的细胞分裂和伸长区的细胞伸长(膨胀)密切相关。因此, 一切与细胞分裂和细胞膨胀有关的因素均与根尖的生长发育密切相关。

### 2.1 细胞壁

细胞壁在细胞膨胀过程中起重要作用, 细胞壁松弛可以促进细胞膨胀, 反之亦然。有许多证据证明: 在生长组织中, ROS参与细胞壁的松弛(Muller等2009; Liskay等2004); 在停止生长或分化

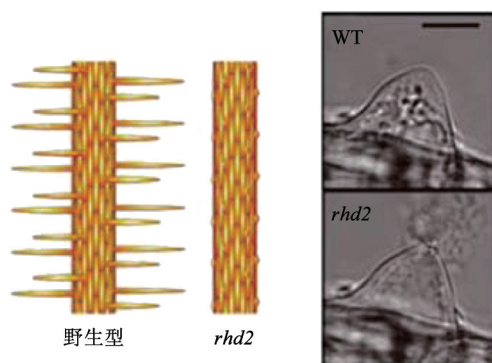


图1 NOXs来源的ROS对根毛生长的作用  
Fig.1 Effects of ROS derived from NOXs on growth of root hairs

参考Swanson和Gilroy (2010)文献并作修改。

组织中, ROS参与细胞壁的交联。由内部细胞膨压驱动根毛顶端生长, 顶端细胞壁不仅必须充分松弛以使其膨胀, 而且还要维持完整性防止细胞破裂。另外, 为了仅仅在顶端形成膨胀, 侧面细胞壁开始永久交联用来防止侧面细胞壁膨胀而引起的均匀生长。因此, 细胞壁与顶端生长亲密相关。

仔细观察*rhd2*突变体发现, 所有根毛细胞均是在转变为顶端生长时发生破裂(图1), 也从侧面说明细胞壁膨胀和固化的平衡被打破了(Monshausen等2007)。ROS在细胞壁聚合物共价交联时起关键作用, 且有助于阻止根毛侧面膨胀和破裂(Monshausen和Gilroy 2009)。确实, 外源添加H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>可以抑制顶端生长, 而ROS清除剂却促进顶端破裂, 表明ROS在调节细胞壁固化方面起关键作用(Monshausen等2007)。高分辨率生长检测方法检测的根尖生长也呈快速伸长-慢速伸长的周期性变化(Monshausen等2007, 2008)。这种生长脉冲频率在拟南芥中每分钟3次, 其频率与根毛顶端ROS生成和[Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub>周期性变化相同(Monshausen等2008)。具体分析这些震荡之间的相对时间发现, 快速生长后5 s紧接着是[Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub>升高, 2 s后是细胞壁中ROS生成, 推测[Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub>参与ROS诱导的生长调节过程。野生型拟南芥顶端细胞附近有ROS生成, 而*rhd2*突变体根毛细胞质外体中ROS的生成可以通过提高pH来实现, 说明细胞壁中ROS来源除了AtRBOHC外, 还有其他的NOXs、细胞壁结合的过氧化物酶和多胺氧化酶(Cona等2006)。

ROS激活细胞生长的作用是由·OH引起的。活体内生长器官的细胞壁存在·OH (Liszky等2004; Renew等2005)。·OH利用两种方式调节生长: 一是通过剪切木葡聚糖聚合物使细胞拉伸, 二是细胞壁对原生质体膨胀的压力变小。在生物体内, 由于细胞壁中普遍存在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和Cu<sup>2+</sup>, ·OH的来源可能是上述两种物质通过Fenton反应产生的。然而也发现了不依赖于O<sub>2</sub><sup>-</sup>的例子, NADH可直接与非活性O<sub>2</sub>酶促生成·OH (Mojovic等2004)。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>在许多细胞中与导管细胞壁的固化有关。例如, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成伴随着*Zinnia elegans*木质部管状分子细胞壁的木质化, 并且H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>与这些细胞形成的复杂交联桥有关(Ros-Barceló等2002)。同样, 在许多停止生长且开始分化的细胞中, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>通过

增加聚合物的交联诱导细胞壁固化。在棉花(*Gossypium hirsutum*)棉纤维中, 棉花次生细胞壁形成也伴随着H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量升高(Potikha等1999)。将正在发育的棉花纤维浸泡在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>清除剂中, 可以抑制棉纤维分化; 另外, 加入外源H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>可以增加次生壁的形成。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>在细胞壁分化过程中的精确功能未知, 但可能是通过激活纤维素合成酶来实现的(Gapper和Dolan 2006)。

## 2.2 细胞骨架

有丝分裂与细胞骨架密切相关, 因此影响细胞骨架结构和组装的因素也参与调节细胞分裂。Livanos等(2012)的研究表明: 在麦类和拟南芥根尖细胞的间期和有丝分裂期, 体内ROS平衡紊乱影响微管蛋白细胞骨架的结构: ROS降低可以形成巨大管, ROS升高使微管蛋白形成不完全晶体。*rhd2*突变体也是由于ROS降低而形成大量巨大管。说明ROS与间期、早前期和有丝分裂期的微管(microtubule, MT)系统和纺锤体功能有关(Livanos等2012)。非典型性微管(包括巨管和微管蛋白不完全晶体)都具有乙酰化的微管蛋白(Livanos等2012), 且具有乙酰化的微管结构更加稳定(Perdiz等2011)。因此, 非典型性微管具有比野生型更好的稳定性。另外, 体内ROS平衡紊乱可以使正常的微管蛋白减少, *rhd2*突变体根尖细胞中只有10%~20%微管蛋白聚合体(Foreman等2003)。总之, ROS平衡紊乱引起的微管结构和功能紊乱会干扰正常细胞有丝分裂, 推迟细胞周期或形成多核细胞, 从而抑制根的生长和发育。

## 3 ROS调节根生长发育的机理

根毛的生长发育包括两个阶段: 根毛起始和顶端生长。*Rhd2*突变体能够完成正常的根毛起始, 但是顶端生长受阻(Macpherson等2008), 进一步说明NOXs生成的ROS在顶端生长中起关键作用。根毛是研究顶端生长和发育的重要材料之一。顶端生长是细胞膜和细胞壁集中积累在延伸细胞的顶端, 导致管状生长的形式。顶端生长涉及许多因素, 如[Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub>梯度分布、小GTPase、胞外ATP、机械刺激等(图2)。对上述影响顶端生长的关键因素详尽论述如下。

### 3.1 钙通道和Ser/Thr激酶

在顶端细胞极性分泌过程中, 胞内Ca<sup>2+</sup>的梯度

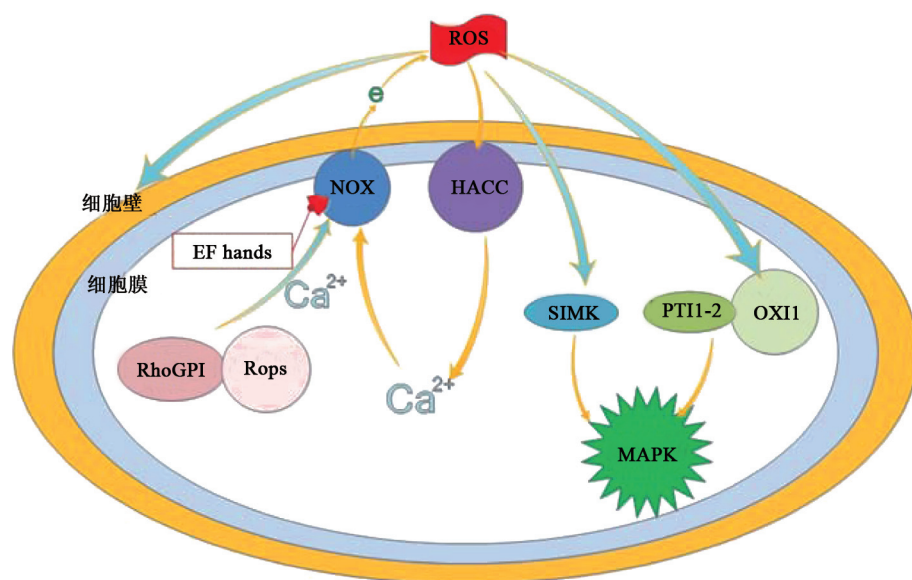


图2 NOXs来源的ROS对根生长发育调控的机理

Fig.2 Mechanism of ROS derived from NOXs on roots growth and development

分布起重要作用。顶端生长的细胞 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高与极性分泌、细胞骨架的组装及细胞组分的高度定位密切相关(Swanson和Gilroy 2010),该极性结构被认为支持极性分泌和极性生长。

胞内ROS可能通过调节离子通道的活性改变 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 。野生型拟南芥生长根尖的顶端细胞聚集来自RHD2/AtRBOHC的ROS,且存在 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 梯度,而*rhb2*突变体则不存在 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 梯度(Wymer等1997),表明RHD2/AtRBOHC生成的ROS介导根尖细胞 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 梯度的形成。 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 梯度的形成是由于超极化激活的钙离子通道(hyperpolarization activated calcium channel, HACC)激活,且外源ROS可以使*rhb2*突变体的根尖细胞 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高(Very和Davies 2000; Foreman等2003)。因此,NOXs来源的ROS可能通过激活HACC,使根尖细胞 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高,从而促进根的生长。根细胞膜上不同的钙离子通道对不同ROS如 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的敏感性也是不同的(Demidchik等2007)。

生长根尖顶端细胞内ROS在调节HACC活性时有一个复杂的反馈环路,即胞内ROS的自我催化。具体内容是NOXs可以通过胞内的EF-hands结合 $\text{Ca}^{2+}$ ,然后再被 $\text{Ca}^{2+}$ 依赖的蛋白激酶激活(Ogasawara等2008; Takeda等2008)。最新的结果表明,NOXs磷酸化是 $\text{Ca}^{2+}$ 非依赖的,而蛋白激酶抑制剂

则抑制 $\text{Ca}^{2+}$ 依赖的AtRBOHD和AtRBOHF激活,表明蛋白质磷酸化是 $\text{Ca}^{2+}$ 依赖的AtRBOH激活生成ROS的先决条件(Kimura等2012)。无论如何,在根毛顶端生长过程中起关键作用的 $\text{Ca}^{2+}$ 依赖的AtRBOH激活是正向反馈。 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高可以正向反馈调节ROS升高,最终调节 $\text{Ca}^{2+}$ 内流。有趣的是,培养基中的 $\text{CaCl}_2$ 可以增加花粉管细胞内的ROS浓度,进一步证明了 $\text{Ca}^{2+}$ 内流和ROS生成之间的正向反馈关系(Potocky等2007)。

ROS能够激活一系列细胞反应,包括促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)级联反应(Pitzschke等2009)。Livanos等(2012)的研究表明ROS参与MAPK级联反应介导的根毛生长、钙通道激活和F-肌动蛋白动力组装。SIMK作为拟南芥中Map激酶6的 $\alpha$ 同源物,在根毛生长中起重要作用(Livanos等2012)。根毛生长过程中ROS的另一目标是OXI1 (oxidative burst inducible 1)激酶(Rentel等2004),外源ROS处理可以使拟南芥中OXI1 mRNA表达量增加。OXI1是一种Ser/Thr激酶,功能缺失突变体根毛变短。AtRBOHC来源的ROS通过OXI1激活MAPK级联反应。OXI1的激活可能与HAAC有关,也可能无关。OXI1可以被另一种蛋白激酶PDK1激活,该激酶通过结合磷脂酸进行活性调节(Anthony等2006)。第3个蛋白激酶PTI1-2,

与OXI1相互作用且是其下游分子。因此认为ROS通过PDK1非依赖的途径将OXI1信号传给PTI1-2。相反,作用于PTI1-2的脂信号则是通过PDK1/OXI1级联放大实现的(Anthony等2006)。最新研究表明,磷脂酶C(phospholipase C, PLC)和PLD参与微管的聚合组装(Andreeva等2010),而且PLD生成的磷脂酸伴随着ROS生成;ROS生成某种程度上是PLC依赖的(Coelho等2008),推测ROS通过脂信号调节细胞骨架的组装并最终影响细胞分裂的。因此,许多研究表明脂信号对顶端生长调节的复杂性,ROS与这些脂信号之间的相互作用可能为该研究提供关键线索。

### 3.2 小GTPases

改变方向后的根能够重新感受重力方向并且向重力性生长,也是其顶端生长的一个重要因素。关于重力感受器的分子机制一直备受争议,但是生长素在根尖两侧分布不均造成根两侧的生长不均,并最终引起根的向重力性生长却是不争的事实。与上述观点一致的是,生长素能够利用磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)激活NOXs生成ROS(Joo等2005)。另外,在拟南芥和玉米根(Joo等2005)及叶枕中(Clore等2008),向重力性也与ROS相关。ROS在方向改变后30 min内(非对称性生长已经开始)在下皮层中的分布较多,随后即对称性分布。ROS清除剂N-乙酰半胱氨酸(NAC)能抑制弯曲而不影响生长速率。因为向重力性一般是下侧的生长受抑制,与观察到的下侧ROS含量增加一致,说明ROS抑制生长。

既然ROS与生长密切相关,那么ROS生成的空间调节在决定器官形状(形态建成)中起重要作用。在生长根毛尖端,ROS的局部聚集在决定细胞形状方面起重要作用(Foreman等2003; Carol等2005)。外源添加·OH导致细胞等方向均匀生长而不是尖端生长(Foreman等2003)。根毛顶端生长和ROS定位与Rho类单体G-蛋白(Rho class monomeric G-proteins, Rops)密切相关。Rho类的GTPases位于生长根毛尖端并且与顶端生长相关(Lee和Yang 2008)。例如,组成型激活*Rops 2、4和6*突变体,能够增加根毛长度。假如AtRBOHC在根尖生长过程中起关键作用,而小GTPase也在该过程起作用。推测Rop可以定向激活NOXs,从而使来源于此的

ROS分布发生定位,并最终导致定向生长。确实,如果在根毛中过表达Rop2, AtRBOHC来源的ROS则升高(Jones等2007)。Wong等(2007)也证明单体G-蛋白OsRac1,在水稻体内以Ca<sup>2+</sup>依赖的方式直接结合水稻NOXs;并且组成型激活OsRac1可以增加水稻NOXs蛋白的表达,说明G-蛋白可以直接调节ROS生成。

与Rops关系密切且参与ROS定位分布的另一个主要成分是RhoGDIs(Rho GTPase GDP-dissociation inhibitors),其通过增加GDP的滞留从而使G蛋白处于“关闭”状态。RhoGDIs功能受损的拟南芥*supercentipede 1 (scn1)*突变体,一个表皮细胞上生长多个根毛(Carol等2005; Takeda等2008),同时也解除了ROS聚集的空间限制,而且AtRBOHC和Rop2也是相互分离的(Takeda等2008)。说明RhoGDIs通过Rops和NOXs的空间定位参与ROS生成的定位。另外,NOXs定位与微丝(而不是微管)结构紧密相关(Takeda等2008)。根尖细胞顶端的肌动蛋白定位与Rop紧密相关(Lee和Yang 2008),提供了ROS生成定位的另一种机制。

### 3.3 胞外ATP和根的生长

胞外ATP(eATP)在动物细胞中作为调节剂,通过与离子通道或G-蛋白偶联的嘌呤受体(P2 receptor, P2Y)调节细胞功能(Burnstock和Verkhatsky 2009)。eATP使拟南芥幼苗[Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub>升高,哺乳动物P2Y拮抗剂抑制上述过程。到目前为止,除几种藻类外,仍没有关于微管植物P2Y序列的报道。不完全水解的核苷酸ATP<sub>γ</sub>S和ADP<sub>β</sub>S与eATP一样,也可以作为受体的激活剂起作用(Clark等2010)。

另外,eATP不仅诱导[Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub>升高,而且其他信号分子如ROS和NO也发生改变(Clark等2010)。eATP可以浓度依赖的诱导拟南芥根中ROS升高。最新的研究表明,eATP诱导拟南芥表皮细胞中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和[Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub>升高(Demidchik等2009)。根据上面提到的ROS与[Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub>之间的正向调控关系,eATP诱导拟南芥表皮[Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub>升高,而胞内Ca<sup>2+</sup>可以进一步引起ROS升高。目前还没有发现ROS激活的钙通道分子,因此不能确定ROS具体如何激活钙通道。eATP可以增加丹参(*Salvia miltiorrhiza*)培养根毛中的NO含量(Wu和Wu 2008),eATP、NO和O<sub>2</sub><sup>-</sup>也调节拟南芥黄化下胚轴的生长(Tonón等2010),在

拟南芥由氧化还原介导的根毛起始过程中, eATP和NO起关键作用(Terrile等2010)。

在信号通路中通过催化水解eATP和eADP而调节核苷酸浓度的酶为胞外腺苷三磷酸双磷酸酶(ectoapyrases)。利用化学和遗传方法, 在拟南芥中发现两个参与组织正常发育的ectoapyrases基因*AtAPY1*和*AtAPY2*。一个没有根毛的水稻突变体*rth1*, 是由于三磷酸腺苷双磷酸酶(apyrase)突变引起的, 说明其在根毛生长过程中起关键作用(Yuo等2009)。

### 3.4 机械刺激

机械刺激对生物体功能的研究一直以来是一个被忽略的因素, 但是, 随着研究的深入, 越来越多的研究证明机械刺激在植物生长发育过程中起关键作用。次生根在老根(侧根)或嫩茎(不定根)中重新生成, 次生根必须穿过内层细胞和外层细胞(保护器官的物理屏障), 才能完成生长。拟南芥次生根必须穿破内皮层、皮层和表皮(Péret等2009)。因此, 拟南芥内皮层、皮层和表皮细胞的死亡是形成次生根的前提条件。Steffens等(2012)的研究表明: 洪水淹没后水稻不定根生长可以产生大约60 mN朝向表皮细胞的力量, 然而只有机械力是不足以诱导根原基上面表皮细胞死亡的。DPI抑制由机械力诱导的表皮细胞死亡, 说明NOXs生成的ROS是该过程的先决条件。

机械刺激可以诱导eATP释放(Weerasinghe等2009), 与ROS生成和 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 密切相关(Monshausen和Gilroy 2009), 表明围绕生长、ROS生成和 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 有一个非常保守的模式。ROS不仅作为细胞内调节剂, 也与胞外细胞壁pH改变以调节生长相关。通过机械刺激诱导 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 改变, 引起ROS和细胞壁pH改变(Monshausen等2009)。

### 3.5 其他因素

许多其他因素也参与调节根毛的顶端生长, 但却与ROS无关。值得注意的是, 最近许多文献报道NO参与根毛生长的正向调控(Swanson和Gilroy 2010)。NO调控根毛形成的功能肯定与生长素的反应途径有关。而ROS和NO可以相互作用调节NO含量(Wilson等2008), 提供了一个ROS生成与顶端生长调控的新思路。

调节顶端生长的另一个因素是细胞壁pH, 增

加细胞壁pH可以使细胞壁硬化限制生长。前面也提到, 根毛顶端pH周期性变化紧随生长和 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 周期性变化(Monshausen等2007)。Ca<sup>2+</sup>、pH和生长的周期性变化在花粉管中也有报道(Messerli和Robinson 2007), 推测可能存在高度保守的生长调控模式。有趣的是, 增加培养基的pH可以使*rhd2*突变体形成正常的根毛而且维持顶端 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 梯度, 但是根尖细胞内ROS含量减少且缺乏周期性变化(Monshausen等2007)。这些观察表明, 细胞壁ROS和pH存在相互作用, 一个因素可以弥补另一个因素在控制细胞壁动力学和维持生长方面的功能。升高pH能够弥补AtRBOHC缺乏时的顶端生长, 说明其他来源的ROS参与根尖的顶端生长(Monshausen等2007)。

## 4 研究展望

具有顶端生长特性的根及根毛, 是研究ROS与NOXs参与植物生长发育的优良材料。此外, 来源于NOXs的质外体ROS作为信号分子, 还参与棉纤维中次生细胞壁的形成(Potikha等1999)、玉米叶片的生长(Rodriguez等2007)和不定根的形成(Lanteri等2008; Li等2009)。进一步界定这些组分之间的时间和空间关系、参与的ROS种类以及每个成分对下游的调控, 有助于我们理解ROS在调节植物形态和功能中的多样性和复杂性。因此, ROS作为核心成分调节适应环境的发育过程和形态建成。

## 参考文献

- Andreeva Z, Barton D, Armour WJ, Li MY, Liao L-F, McKellar HL, Pethybridge KA, Marc J (2010). Inhibition of phospholipase C disrupts cytoskeletal organization and gravitropic growth in *Arabidopsis* roots. *Planta*, 232 (5): 1263~1279
- Anthony RG, Khan S, Costa J, Pais MS, Bogre L (2006). The *Arabidopsis* protein kinase PTII-2 is activated by convergent phosphatidic acid and oxidative stress signaling pathways downstream of PDK1 and OXII. *J Biol Chem*, 281: 37536~37546
- Burnstock G, Verkhatsky A (2009). Evolutionary origins of the purinergic signalling system. *Acta Physiol (Oxf)*, 195: 415~447
- Carol RJ, Takeda S, Linstead P, Durrant MC, Kakesova H, Derbyshire P, Drea S, Zarsky V, Dolan L (2005). A RhoGDP dissociation inhibitor spatially regulates growth in root hair cells. *Nature*, 438: 1013~1016
- Causin HF, Roqueiro G, Petrillo E, Láinez V, Pena LB, Marchetti CF, Gallego SM, Maldonado SI (2012). The control of root growth by reactive oxygen species in *Salix nigra* Marsh. seedlings. *Plant Sci*, 183: 197~205

- Clark G, Wu M, Wat N, Onyirimba J, Pham T, Herz N, Ogoti J, Gomez D, Canales AA, Aranda G et al (2010). Both the stimulation and inhibition of root hair growth induced by extracellular nucleotides in *Arabidopsis* are mediated by nitric oxide and reactive oxygen species. *Plant Mol Biol*, 74: 423~435
- Clore AM, Doore SM, Tinnirello MN (2008). Increased levels of reactive oxygen species and expression of a cytoplasmic aconitase/iron regulatory protein 1 homolog during the early response of maize pulvini to gravistimulation. *Plant Cell Environ*, 31: 144~158
- Coelho SMB, Brownlee C, Bothwell JHF (2008). A tip-high,  $\text{Ca}^{2+}$ -interdependent, reactive oxygen species gradient is associated with polarized growth in *Fucus serratus* zygotes. *Planta*, 227 (5): 1037~1046
- Cona A, Rea G, Angelini R, Federico R, Tavladoraki P (2006). Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends Plant Sci*, 11: 80~88
- Demidchik V, Shabala SN, Davies JM (2007). Spatial variation in  $\text{H}_2\text{O}_2$  response of *Arabidopsis thaliana* root epidermal  $\text{Ca}^{2+}$  flux and plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Plant J*, 49: 377~386
- Demidchik V, Shang Z, Shin R, Thompson E, Rubio L, Laohavisit A, Mortimer J, Chivasa S, Slabas A, Glover B et al (2009). Plant extracellular ATP signaling by plasma membrane NADPH oxidase and  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Plant J*, 58: 903~913
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JDG et al (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, 422: 442~446
- Gapper C, Dolan L (2006). Control of plant development by reactive oxygen species. *Plant Physiol*, 41: 341~345
- Gechev TS, Van Breusegem F, Stone JM, Denev I, Laloi C (2006). Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays*, 28: 1091~1101
- Jing HJ, Zhang L, Li HQ, Shao KJ, Wu H, Wang YH, He GY, Tan XR (2012). Exogenous phytic acid inhibits early growth of wheat seedling (*Triticum aestivum* L.) by decreasing superoxide anion derived from NADPH oxidase. *Aust J Crop Sci*, 6 (8): 1221~1227
- Jones MA, Raymond MJ, Yang Z, Smirnov N (2007). NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species formation required for root hair growth depends on ROP GTPase. *J Exp Bot*, 58: 1261~1270
- Joo JH, Yoo HJ, Hwang I, Lee JS, Nam KH, Bae YS (2005). Auxin-induced reactive oxygen species production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *FEBS Lett*, 579: 1243~1248
- Kimura S, Kaya H, Kawarazaki T, Hiraoka G, Senzaki E, Michikawa M, Kuchitsu K (2012). Protein phosphorylation is a prerequisite for the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent activation of *Arabidopsis* NADPH oxidases and may function as a trigger for the positive feedback regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  and reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*, 1823: 398~405
- Kwak JM, Mori IC, Pei ZM, Leonhardt N, Torres MA, Dangl JL, Bloom RE, Bodde S, Jones JD, Schroeder JI (2003). NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J*, 22: 2623~2633
- Lanteri ML, Laxalt AM, Lamattina L (2008). Nitric oxide triggers phosphatidic acid accumulation via phospholipase D during auxin-induced adventitious root formation in cucumber. *Plant Physiol*, 147: 188~198
- Lee YJ, Yang Z (2008). Tip growth: signaling in the apical dome. *Curr Opin Plant Biol*, 11: 662~671
- Li SW, Xue LG, Xu SJ, Feng HY, An LZ (2009). Hydrogen peroxide acts as a signal molecule in the adventitious root formation of mung bean seedlings. *Environ Exp Bot*, 65: 63~71
- Liszkay A, van der Zalm E, Schopfer P (2004). Production of reactive oxygen intermediates  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , and  $\cdot\text{OH}$  by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiol*, 136: 3114~3123
- Livanos P, Galatis B, Quader H, Apostolakis P (2012). Disturbance of reactive oxygen species homeostasis induces atypical tubulin polymer formation and affects mitosis in root-tip cells of *Triticum turgidum* and *Arabidopsis thaliana*. *Cytoskeleton*, 69: 1~21
- Macpherson N, Takeda S, Shang Z, Dark A, Mortimer JC, Brownlee C, Dolan L, Davies JM (2008). NADPH oxidase involvement in cellular integrity. *Planta*, 227: 1415~1418
- Messerli MA, Robinson KR (2007). MS channels in tip-growing systems: mechanosensitive ion channels. *Curr Topic Membr*, 58: 393~412
- Mojovic M, Vuletic M, Baic GG, Vuinic Z (2004). Oxygen radicals produced by plant plasma membranes: an EPR spin-trap study. *J Exp Bot*, 55: 2523~2531
- Monshausen GB, Bibikova TN, Messerli MA, Shi C, Gilroy S (2007). Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of *Arabidopsis* root hairs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 20996~21001
- Monshausen GB, Bibikova TN, Weisenseel MH, Gilroy S (2009).  $\text{Ca}^{2+}$  regulates reactive oxygen species production and pH during mechanosensing in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell*, 21: 2341~2356
- Monshausen GB, Gilroy S (2009). Feeling green: mechanosensing in plants. *Trends Cell Biol*, 19: 228~235
- Monshausen GB, Messerli MA, Gilroy S (2008). Imaging of the Yellow Cameleon 3.6 indicator reveals that elevations in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  follow oscillating increases in growth in root hairs of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 147: 1690~1698
- Muller K, Linkies A, Vreeburg RA, Fry SC, Krieger-Liszkay A, Leubner-Metzger G (2009). *In vivo* cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth. *Plant Physiol*, 150: 1855~1865
- Oda T, Hashimoto H, Kuwabara N, Akashi S, Hayashi K, Kojima C, Wong HL, Kawasaki T, Shimamoto K, Sato M, Shimizu T (2010). Structure of the N-terminal regulatory domain of a plant NADPH oxidase and its functional implications. *J Biol Chem*, 285 (2): 1435~1445
- O'Donnell BV, Tew DG, Jones OT, England PJ (1993). Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. *Biochem J*, 290: 41~49
- Ogasawara Y, Kaya H, Hiraoka G, Yumoto F, Kimura S, Kadota Y,

- Hishinuma H, Senzaki E, Yamagoe S, Nagata K et al (2008). Synergistic activation of the *Arabidopsis* NADPH oxidase AtrbohD by  $\text{Ca}^{2+}$  and phosphorylation. *J Biol Chem*, 283: 8885~8892
- Perdiz D, Mackeh R, Pouüs C, Baillet A (2011). The ins and outs of tubulin acetylation: more than just a post-translational modification? *Cell Signal*, 23 (5): 763~771
- Péret B, Lariou A, Bennett MJ (2009). Lateral root emergence: a difficult birth. *J Exp Bot*, 60: 3637~3643
- Pitzschke A, Djamei A, Bitton F, Hirt H (2009). A major role of the MEK1-MKK1/2-MPK4 pathway in ROS signalling. *Mol Plant*, 2: 120~137
- Potikha TS, Collins CC, Johnson DI, Delmer DP, Levine A (1999). The involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of secondary walls in cotton fibers. *Plant Physiol*, 119: 849~858
- Potocky M, Jones MA, Bezvoda R, Smirnov N, Zarsky V (2007). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth. *New Phytol*, 174: 742~751
- Renew S, Heyno E, Schopfer P, Liskay A (2005). Sensitive detection and localization of hydroxyl radical production in cucumber roots and *Arabidopsis* seedlings by spin trapping electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Plant J*, 44: 342~347
- Rentel MC, Lecourieux D, Ouaked F, Usher SL, Petersen L, Okamoto H, Knight H, Peck SC, Grierson CS, Hirt H et al (2004). OX11 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. *Nature*, 427: 858~861
- Rodriguez AA, Ramiro Lascano H, Bustos D, Taleisnik E (2007). Salinity-induced decrease in NADPH oxidase activity in the maize leaf blade elongation zone. *J Plant Physiol*, 164: 223~230
- Ros-Barceló A, Pomar F, López-Serrano M, Martínez P, Pedreño MA (2002). Developmental regulation of the  $\text{H}_2\text{O}_2$ -producing system and of a basic peroxidase isoenzyme in the *Zinnia elegans* lignifying xylem. *Plant Physiol Biochem*, 40 (4): 325~332
- Sagi M, Fluhr R (2006). Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiol*, 141: 336~340
- Segal AW, Abo A (1993). The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *Trends Biochem Sci*, 18: 43~47
- Steffens B, Kovalev A, Gorb SN, Sauter M (2012). Emerging roots alter epidermal cell fate through mechanical and reactive oxygen species signaling. *Plant Cell*, 24: 3296~3306
- Swanson S, Gilroy S (2010). ROS in plant development. *Physiol Plant*, 138: 384~392
- Takeda S, Gapper C, Kaya H, Bell E, Kuchitsu K, Dolan L (2008). Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. *Science*, 319: 1241~1244
- Terrile MC, Tonón CV, Iglesias MJ, Lamattina L, Casalongué CA (2010). Extracellular ATP and nitric oxide signaling pathways regulate redox-dependent responses associated to root hair growth in etiolated *Arabidopsis* seedlings. *Plant Signal Behav*, 5: 1~4
- Tonón C, Terrile MC, Iglesias MJ, Lamattina L, Casalongué C (2010). Extracellular ATP, nitric oxide and superoxide act coordinately to regulate hypocotyl growth in etiolated *Arabidopsis* seedlings. *J Plant Physiol*, 167: 540~546
- Tsukagoshi H (2012). Defective root growth triggered by oxidative stress is controlled through the expression of cell cycle-related genes. *Plant Sci*, 197: 30~39
- Very AA, Davies JM (2000). Hyperpolarization-activated calcium channels at the tip of *Arabidopsis* root hairs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 9801~9806
- Weerasinghe RR, Swanson SJ, Okada SF, Garrett MB, Kim SY, Stacey G, Boucher RC, Gilroy S, Jones AM (2009). Touch induces ATP release in *Arabidopsis* roots that is modulated by the heterotrimeric G-protein complex. *FEBS Lett*, 583: 2521~2526
- Wilson ID, Neill SJ, Hancock JT (2008). Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell Environ*, 31: 622~631
- Wong HL, Pinontoan R, Hayashi K, Tabata R, Yaeno T, Hasegawa K, Kojima C, Yoshioka H, Iba K, Kawasaki T et al (2007). Regulation of rice NADPH oxidase by binding of Rac GTPase to its N-terminal extension. *Plant Cell*, 19: 4022~4034
- Wu S, Wu J (2008). Extracellular ATP-induced NO production and its dependence on membrane  $\text{Ca}^{2+}$  flux in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *J Exp Bot*, 59: 4007~4016
- Wymer CL, Bibikova TN, Gilroy S (1997). Cytoplasmic free calcium distributions during the development of root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 12: 427~439
- Yuo T, Toyota M, Ichii M, Taketa S (2009). Molecular cloning of a root hairless gene *rth1* in rice. *Breed Sci*, 59: 13~20