

外源 NO、H₂O₂ 和 ABA 对鸡蛋花花冠裂片上气孔关闭的影响

姜兆玉, 王永飞*

暨南大学生物工程学系, 广州 510632

摘要: 以鸡蛋花花冠裂片下表皮为材料, 研究不同浓度及不同处理时间的外源 NO、H₂O₂ 和 ABA 对鸡蛋花花冠裂片下表皮上气孔关闭的影响, 以及 NO、H₂O₂ 和 ABA 在调节花冠上气孔关闭中的相互作用。结果表明: 单独施用 NO、H₂O₂ 和 ABA 明显诱导气孔关闭, 并有浓度效应和时间效应; NO、H₂O₂ 和 ABA 两两混合或三者混合施用所诱导气孔关闭的效应大于其单独施用的。说明在诱导气孔关闭时, NO、H₂O₂ 和 ABA 之间可能有协同效应。

关键词: NO; H₂O₂; ABA; 气孔关闭; 鸡蛋花; 花冠裂片

Effects of Exogenous Nitric Oxide, Hydrogen Peroxide and Abscisic Acid on Stomatal Closure in the Corolla Lobe of *Plumeria rubra* L.

JIANG Zhao-Yu, WANG Yong-Fei*

Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: Using the abaxial surface of corolla lobe of *Plumeria rubra* as the experimental material, the effects of exogenous NO, H₂O₂ and ABA with different concentrations and different treated periods on stomatal closure and their interactional effects were studied. The results indicated that NO, H₂O₂ and ABA could induce stomatal closure dose- and time-dependently. The effects of the mixed solution of NO, H₂O₂ or ABA were greater than those of the individual processing.

Key words: NO; H₂O₂; ABA; stomatal closure; *Plumeria rubra*; corolla lobe

气孔一般位于植物地上部分初生结构的表面, 它通常由 2 个保卫细胞围绕形成。它是 CO₂、O₂ 和水蒸气等气体进出的通道。组成气孔的保卫细胞对外部环境非常敏感, 强光、高温、干旱、盐胁迫、机械胁迫和一定量的外源 ABA、乙烯、H₂O₂、赤霉素和 NO 等物质均能诱导气孔关闭。植物体的光合作用、呼吸作用、水分代谢、离子吸收、特定基因的表达以及免疫反应(Melotto 等 2006) 等都受气孔运动的影响。前人关于气孔运动的研究主要集中在植物的叶上, 但目前已发现植物的非光合器官如花冠(Azad 等 2007)、果实(Peschel 等 2003)和种子(Paiva 等 2006)的表皮上也有气孔分布。这些发现拓宽了气孔的分布范围, 为观察和研究气孔运动提供了新的材料。

鸡蛋花是夹竹桃科(Apocynaceae)植物。花聚生于枝顶, 花冠呈筒状, 径约 5~6 cm, 5 裂; 5 片花瓣轮叠而生, 外面呈乳白色, 中心呈鲜黄色, 极似蛋白包裹着蛋黄, 因此得名。我们前期的研究表明(王永飞和何华柱 2010), 鸡蛋花的花冠裂片的上表皮未见到有气孔分布, 而其下表皮则有气孔分布。

Hew 等(1980)指出, 兰花花瓣表皮上的气孔不能进行光合作用, 也不能调节水分蒸发。而 Azad 等(2007)则指出, 郁金香花瓣表皮气孔随着温度的变化而张开或关闭, 以保持花瓣中的水分平衡; 并发现 NO 可促进郁金香花瓣上表皮的气孔关闭。外源 NO、H₂O₂ 和 ABA 是否也促进鸡蛋花花瓣下表皮气孔的关闭的研究尚未见报道。本文用不同浓度的硝普钠(sodium nitroprusside, SNP, NO 供体)、H₂O₂和 ABA 对鸡蛋花的花冠裂片下表皮进行不同时间的处理, 观察气孔孔径的变化, 以探讨 NO、H₂O₂和 ABA 对鸡蛋花花瓣下表皮气孔关闭的影响, 为深入了解这 3 种物质对鸡蛋花花器官的生理作用和作用机制建立基础。

材料与方法

实验材料为取自本校校园内栽培的新鲜的鸡蛋花(*Plumeria rubra* L.)。在 7 月下旬开花时取花

收稿 2009-12-21 修定 2010-02-02

* 通讯作者(E-mail: wyfmsm@163.com; Tel: 020-38897606)。

冠裂片长为3.5 cm的鸡蛋花, 用去离子水洗净后, 撕取下表皮, 用毛笔小心刷除黏附的叶肉细胞, 切成长10 mm、宽5 mm的表皮条, 放入盛有表皮条缓冲液($10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MES/KOH, $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 , pH 6.20)的培养皿中, 置于 25°C 和可见光($\text{PAR } 300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)下保温3 h以促使气孔处于开放状态。

将上述表皮条转移到含有不同物质的MES-KCl缓冲液内, 继续保温3 h。各处理缓冲液如下: (1)外源NO刺激使用1、10、100和 $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP; (2)外源 H_2O_2 刺激使用1、10、100和 $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 ; (3)外源ABA刺激使用1、10、100和 $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA; 协同刺激采用以下几种组合, (4) $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP+ $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 ; (5) $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP+ $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA; (6) $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA+ $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 和(7) $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP+ $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA。每小时测量1次气孔孔径并拍照记录。每个实验处理观察5个表皮条, 重复3次。用Nikon YS100显微镜, 在40倍物镜下, 测量60个气孔的孔径, 取平均值。数据用SPSS软件进行方差分析。

结果与讨论

1 外源NO对鸡蛋花花瓣下表皮上气孔关闭的影响

NO作为植物体中胞间和胞内的信号分子, 能够调节植物体的生长、发育和各种胁迫反应。NO常温下不稳定, 通常用SNP作为NO的外源供体。从图1可以看出, 在 $1\sim 500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP范围内, SNP可显著诱导气孔关闭($P<0.05$), 且具有明显的浓度效应和时间效应, 随着SNP浓度的升高和处理时间的延长, 其诱导气孔关闭的作用更加明显。这一结果与Desikan等(2004)的报道基本上一致。NO诱导鸡蛋花花瓣下表皮气孔关闭的机制尚不清楚, 但有实验表明, NO通过激活胞内钙库释放 Ca^{2+} , 致使胞质 Ca^{2+} 浓度升高, 进而激活下游的蛋白激酶或对 Ca^{2+} 敏感的离子通道, 调控气孔运动(Desikan等2004)。

2 外源 H_2O_2 对鸡蛋花花瓣下表皮上气孔关闭的影响

H_2O_2 是生物体内重要的活性氧(reactive oxygen species, ROS)分子。 H_2O_2 对气孔运动的影响早在1996年就已有过相关报道(McAinsh等1996)。图

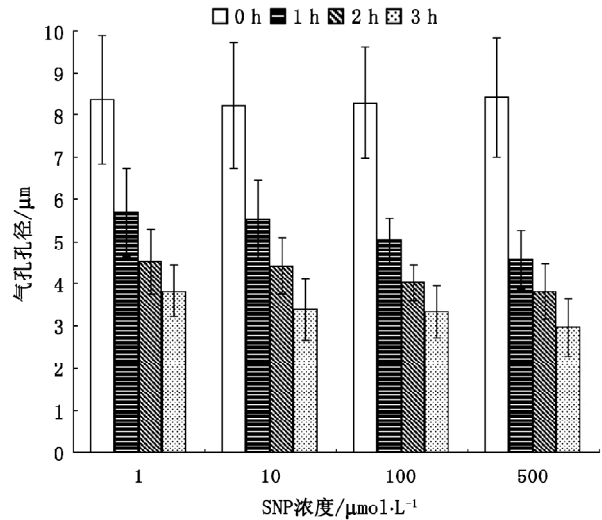


图1 不同浓度和不同处理时间的SNP对鸡蛋花花冠裂片上气孔关闭的影响

Fig.1 Effect of SNP on the stomatal closure in the corolla lobe of *Plumeria rubra* with different concentrations and different treated periods

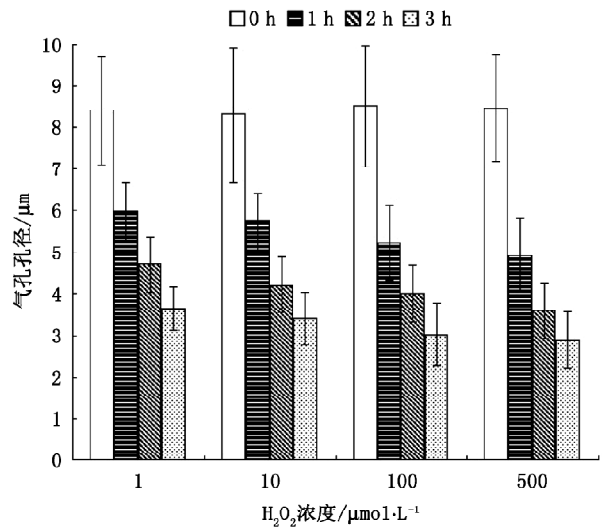


图2 不同浓度和不同处理时间的 H_2O_2 对鸡蛋花花冠裂片上气孔关闭的影响

Fig.2 Effect of H_2O_2 on the stomatal closure in the corolla lobe of *Plumeria rubra* with different concentrations and different treated periods

2显示, 在 $1\sim 500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 范围内, H_2O_2 可显著诱导气孔关闭($P<0.05$), 也有明显的浓度效应和时间效应, 随着 H_2O_2 浓度的升高和处理时间的延长, 其诱导气孔关闭的作用更加明显。 H_2O_2 诱导鸡蛋花花瓣下表皮上气孔关闭的具体机制尚待进一步证

实。已有的报道认为, H_2O_2 能够激活保卫细胞膜上以及胞内的 Ca^{2+} 通道, 以致胞质游离 Ca^{2+} 的浓度升高, 激活外向 K^+ 通道和阴离子通道, 抑制内向 K^+ 通道的活性, K^+ 、 Cl^- 离子外流, 以及苹果酸一类渗透调节物质的水平下降, 保卫细胞失水收缩, 最终导致气孔关闭(Köhler 等 2003)。

3 外源ABA对鸡蛋花花瓣下表皮上气孔关闭的影响

ABA有促进植物器官脱落, 抑制生长, 维持种子休眠等作用。ABA 是一种抗蒸腾剂, 在水分亏缺情况下, 植物体产生的 ABA, 可以促进叶片气孔关闭和降低水分蒸腾, 因而植物的抗旱能力提高(Desikan 等 2004)。图 3 显示, 在 $1\sim 500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 范围内, ABA 可显著诱导气孔关闭($P<0.05$), 且同样也有明显的浓度效应和时间效应, 随着 ABA 浓度的升高和处理时间的延长, 其诱导气孔关闭的作用更加明显。此种诱导效应的确切机制还有待进一步研究。已有的研究显示, ABA 与保卫细胞质膜上的跨膜受体结合后, 诱导产生的 H_2O_2 和 NO 可激活 G 蛋白并随后引发肌醇三磷酸(inositol triphosphate, IP3)的释放, 进而引起胞内 Ca^{2+} 浓度增加, K^+ 和阴离子水平下降, 于是保卫细胞失水和气孔关闭(匡逢春等 2003)。

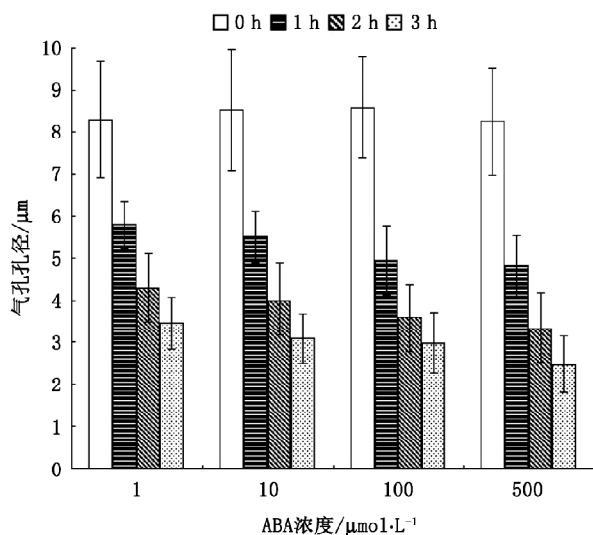


图3 不同浓度和不同处理时间的 ABA 对鸡蛋花花冠裂片上气孔关闭的影响

Fig.3 Effect of ABA on the stomatal closure in the corolla lobe of *Plumeria rubra* with different concentrations and different treated periods

4 外源 NO、 H_2O_2 和 ABA 对气孔关闭的协同效应

有研究表明, NO 和 H_2O_2 可作为 ABA 的信号链成员参与其诱导气孔关闭的信号转导。在 ABA 诱导拟南芥、蚕豆和豌豆气孔关闭的研究中发现, ABA 能促进保卫细胞内 H_2O_2 的快速产生进而导致气孔关闭; 加入 NO 的清除剂 2- 苯基 -4,4,5,5- 四甲基咪唑啉 -1- 氧 -3- 氧化物(2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide, PTIO), 可部分抑制 ABA 诱导的气孔关闭, 表明 NO 参与 ABA 诱导气孔关闭的过程(Desikan 等 2004)。NO 和 H_2O_2 在植物体内相互作用(於丙军等 2004), 一定浓度的 NO 可以促进 H_2O_2 的合成, 而 H_2O_2 也可通过促进 NO 的合成诱导气孔关闭(Neill 等 2008)。为了进一步了解外源 NO、 H_2O_2 和 ABA 对气孔运动是否有协同效应, 我们对鸡蛋花花瓣下表皮作了不同的处理, 如图 4 所示, 处理 3 h 后, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 都显著促进气孔关闭($P<0.05$), 用这 3 种物质中的 2 种共同处理鸡蛋花花冠裂片下表皮时, 其诱导气孔关闭的效应进一步增强。 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP、 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2

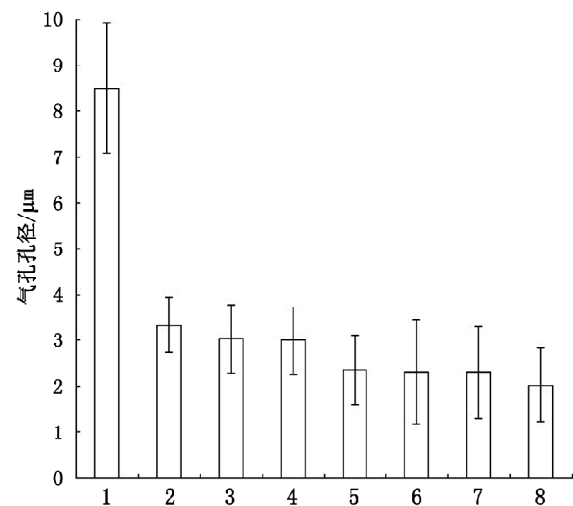


图4 SNP、 H_2O_2 和 ABA 不同组合对鸡蛋花花冠裂片上气孔关闭的影响

Fig.4 Effect of different compounding of SNP, H_2O_2 and ABA on the stomatal closure in the corolla lobe of *Plumeria rubra* with different concentrations and different treated periods

1: 0 h; 2: $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP; 3: $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 ; 4: $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA; 5: $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP+ $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 ; 6: $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP+ $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA; 7: $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA+ $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 ; 8: $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP+ $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA.

和 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA三者一起作用的诱导气孔关闭的效应最强, 气孔孔径也最小。这些结果表明, 在对鸡蛋花花瓣上气孔运动的调控过程中, NO、 H_2O_2 和 ABA 之间可能有协同效应。

参考文献

- 匡逢春, 萧浪涛, 夏石头(2003). 脱落酸对植物气孔运动的调控作用. 植物生理学通讯, 39 (3): 262~266
- 王永飞, 何华柱(2010). 鸡蛋花(夹竹桃科)花表皮气孔的初步研究. 广西植物, 30 (1): 60~63
- 於丙军, 丁义, 陈宣钦(2004). 几种信号类物质对蚕豆气孔运动的效应. 植物生理学通讯, 40 (3): 285~288
- Azad AK, Sawa Y, Ishikawa T, Shibata H (2007). Temperature-dependent stomatal movement in tulip petals controls water transpiration during flower opening and closing. *Ann Appl Biol*, 150 (1): 81~87
- Desikan R, Cheung MK, Bright J, Henson D, Hancock JT, Neill SJ (2004). ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *J Exp Bot*, 55 (395): 205~212
- Hew CS, Lee GL, Wong SC (1980). Occurrence of non-functional stomata in the flowers of tropical orchids. *Ann Bot*, 46 (2): 195~201
- Köhler B, Hills A, Blatt MR (2003). Control of guard cell ion channels by hydrogen peroxide and abscisic acid indicates their action through alternate signaling pathways. *Plant Physiol*, 131 (2): 385~388
- McAinsh MR, Clayton H, Mansfield TA, Hetherington AM (1996). Changes in stomatal behaviour and guard cell cytosolic free calcium in response to oxidative stress. *Plant Physiol*, 111 (4): 1031~1042
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*, 126 (17): 969~980
- Neill S, Barros R, Bright J, Desikan R, Hancock J, Harrison J, Morris P, Ribeiro D, Wilson L (2008). Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *J Exp Bot*, 59 (2): 165~176
- Paiva EAS, Lemos-Filho JP, Oliveira DMT (2006). Imbibition of *Swietenia macrophylla* (Meliaceae) seeds: the role of stomata. *Ann Bot*, 98 (1): 213~217
- Peschel S, Beyer M, Knoche M (2003). Surface characteristics of sweet cherry fruit: stomata-number, distribution, functionality and surface wetting. *Sci Hort*, 97 (3-4): 265~278