

酪氨酸蛋白磷酸酶(PTPase)参与水杨酸调控蚕豆气孔运动的信号转导

杨国辉¹, 车永梅¹, 石武良², 刘新^{1,*}

¹莱阳农学院生命科学学院, 山东青岛 266109; ²中国科学院植物研究所光合作用与环境分子生理学重点实验室, 北京 100093

摘要: 研究酪氨酸蛋白磷酸酶(PTPase)的抑制剂氧化苯胂(PAO)、钒酸钠(NaVO_3)和 Zn^{2+} 对水杨酸(SA)调控蚕豆气孔运动影响的结果表明, $0\sim 1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PAO、 $0\sim 4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaVO_3 和 $0\sim 4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Zn^{2+} 对光诱导蚕豆气孔开度变化的影响不大, 但都可以抑制黑暗或SA诱导的气孔关闭, 据此推测, PTPase可能参与SA诱导气孔关闭的信号转导过程。

关键词: 蚕豆; 酪氨酸蛋白磷酸酶; 水杨酸; 气孔运动; 信号转导

Involvement of Protein Tyrosine Phosphatase in Signal Transduction of Salicylic Acid Regulated Stomatal Movement of *Vicia faba* L.

YANG Guo-Hui¹, CHE Yong-Mei¹, SHI Wu-Liang², LIU Xin^{1,*}

¹College of Life Sciences, Laiyang Agricultural College, Qingdao, Shandong 266109, China; ²Key Laboratory of Photosynthesis and Environmental Molecular Physiology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

Abstract: The effects of protein tyrosine phosphatase (PTPase) inhibitor phenylarsine oxide (PAO), sodium vanadate (NaVO_3) and Zn^{2+} on salicylic acid (SA) regulated *Vicia faba* stomatal movement were studied. The results showed that PAO ($0\sim 1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), NaVO_3 ($0\sim 4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) and Zn^{2+} ($0\sim 4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) had no effects on light induced stomatal opening, but inhibited the darkness or SA induced stomatal closure. It suggested that PTPase maybe participated in the signal transduction of SA regulated *V. faba* stomatal closure.

Key words: *Vicia faba*; protein tyrosine phosphatase; salicylic acid; stomatal movement; signal transduction

水杨酸(salicylic acid, SA)是近些年比较引人注意的一种植物信号分子, 参与调节植物体内多种生理生化过程, 如植物开花、产热、种子萌发、气孔关闭、膜通透性及离子吸收等, 特别是与植物抗逆性关系密切(王利军等2002; 赵会杰和薛延丰2005)。关于SA调控气孔运动的效应及其信号转导过程已有一些报道, 认为SA可以引起植物的气孔关闭(Manthe等1992; 刘新等1999), 钙和一氧化氮参与SA诱导蚕豆气孔运动的信号转导(Liu等2003; 刘新等2003)。另外, 蛋白质可逆磷酸化是真核生物细胞内功能调节的一种最普遍的作用机制, 这一可逆化过程分别由蛋白激酶和蛋白磷酸酶催化完成, 蛋白激酶催化底物上的氨基酸残基磷酸化, 而蛋白磷酸酶则催化磷酸化的蛋白质脱磷酸化。根据底物的不同, 这些酶分为两大类: 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine kinase)和丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶(serine/threonine phosphatase)、酪氨酸蛋白激酶(protein

tyrosine kinase, PTK)和酪氨酸蛋白磷酸酶(protein tyrosine phosphatase, PTPase) (石武良和张蜀秋2004)。有报道提出, 蛋白质的磷酸化和去磷酸化参与SA诱导的抗逆胁迫过程。在渗透胁迫下, 植物SA诱导的蛋白激酶活性迅速升高(Mikolajczyk等2000); SA诱导的 *PR-1* 基因表达需蛋白质磷酸化和去磷酸化反应的参与(康国章等2004)。MacRobbie (2002)报道, PTPase参与渗透胁迫下保卫细胞的信号转导。但它是否参与SA诱导气孔关闭的信号转导, 尚未见报道。本文以蚕豆保卫细胞为材料, 探讨PTPase是否参与SA信号途径的调节。

收稿 2006-11-13 修定 2007-01-08

资助 国家自然科学基金(30370141)、山东省教育厅基金(J04C13)和莱阳农学院人才基金(630318)。

致谢 中国农业大学生物学院张蜀秋先生对本实验给予了帮助。
*通讯作者(E-mail: liuxin6080@yahoo.com.cn; Tel: 0532-88030224)。

材料与amp;方法

蚕豆 (*Vicia faba* L.) 种子消毒后浸泡24 h, 然后在25 °C培养箱中催芽2~3 d, 胚根长至0.5 cm时, 培养在营养土(营养土:蛭石=2:1)中。放在光/暗周期为12 h/12 h, 光照强度为200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 温度为22 °C/17 °C, 相对湿度为70%的温室条件下培养。取生长3~4周幼苗顶端完全展开的叶子进行实验。氧化苯胂(phenylarsine oxide, PAO)、钒酸钠(NaVO_3)、2-[N-吗啉]乙磺酸(2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid, MES)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)等均为Sigma公司产品。用表皮条缓冲液(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 6.1)配制 NaVO_3 、 ZnCl_2 、 CaCl_2 , 使其浓度分别为10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaVO_3 、20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ZnCl_2 、100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 的母液。PAO用DMSO配成20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液。

测定气孔开度时, 取三至四周龄蚕豆幼苗顶端完全展开的叶片, 于光下或暗处诱导使气孔完全张开或关闭。撕取其下表皮, 小心刷除上面粘附的叶肉细胞, 切成0.5 mm \times 0.5 mm的小块。处理3 h后, 观察不同处理气孔运动情况。用显微测微尺测量气孔孔径, 测量时随机选取5个视野, 每个视野内随机选取10个气孔。记录终态孔径, 每个处理重复3次以上。

实验结果

1 SA、PAO和 Zn^{2+} 对蚕豆气孔运动的影响

图1~3显示: (1) SA具有诱导蚕豆气孔关闭的效应, 蚕豆气孔开度随着SA浓度的提高而逐渐

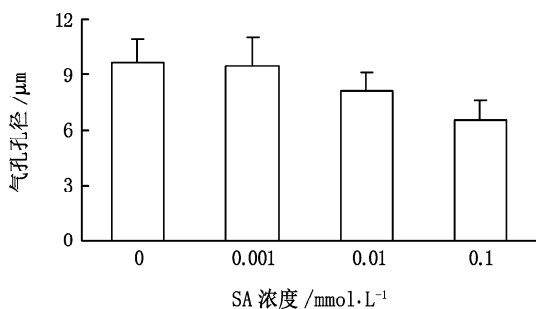


图1 SA对蚕豆气孔运动的影响

Fig. 1 Effects of SA on stomatal movement of *V. faba*

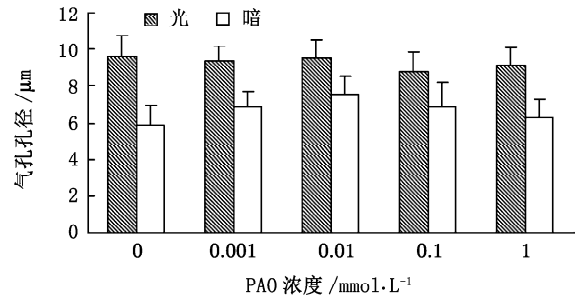


图2 PAO对光/暗诱导蚕豆气孔运动的影响

Fig. 2 Effects of PAO on light/darkness induced stomatal movement of *V. faba*

减小, $P < 0.05$ (图1); (2)不同浓度的PAO (PTPase的专一性抑制剂)对光诱导的气孔张开没有影响, 但可以抑制黑暗诱导的气孔关闭, 其中, 以0.01 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的PAO效果最为明显($P < 0.05$) (图2); (3)在0.02~4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Zn^{2+} 范围内, Zn^{2+} 对光诱导的气孔张开没有影响, 但可以抑制黑暗诱导的气孔关闭, 其中, 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Zn^{2+} 的抑制效果较为显著($P < 0.05$) (图3)。

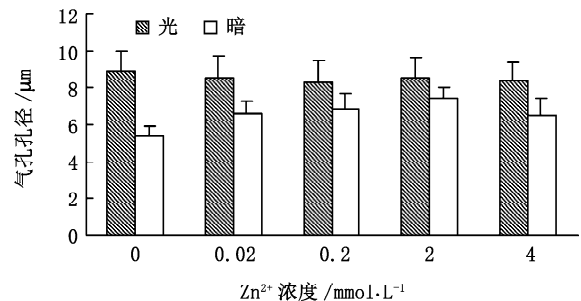


图3 Zn^{2+} 对光/暗诱导蚕豆气孔关闭的影响

Fig. 3 Effects of Zn^{2+} on light/darkness induced stomatal closure of *V. faba*

2 NaVO_3 对暗诱导气孔关闭的影响

NaVO_3 不仅能够抑制黑暗诱导的气孔关闭, 而且还有明显的浓度效应, 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaVO_3 的效果最为明显($P < 0.05$) (图4)。

3 PAO、 Zn^{2+} 和 NaVO_3 对SA诱导气孔关闭的影响

在光照条件下, 用0.01 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PAO分别与不同浓度(0.001、0.01、0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) SA共处理已诱导气孔张开的蚕豆表皮条3 h, 观察PAO对SA诱导气孔关闭的效应。结果表明, 0.01 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PAO可以减弱SA诱导气孔关闭的效应,

SA 浓度为 0.01 和 0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, PAO 的抑制作用分别为 80.01% 和 35.70% ($P < 0.05$) (图 5)。

SA 与 Zn^{2+} 同时作用时, Zn^{2+} 可以减少 SA 诱导气孔关闭的效应, Zn^{2+} 对浓度为 0.01 和 0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA 的抑制作用更显著 ($P < 0.05$) (图 6)。

光照条件下, NaVO_3 能抑制 SA 诱导的气孔关

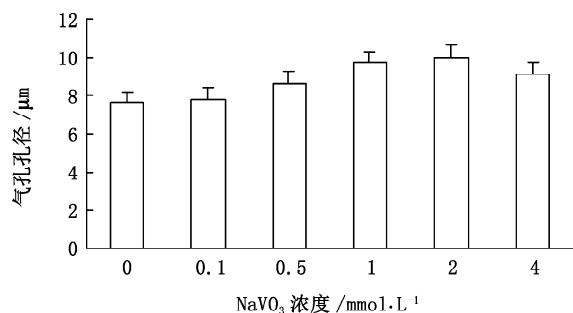


图4 NaVO_3 对暗诱导蚕豆气孔关闭的影响
Fig. 4 Effects of NaVO_3 on darkness induced stomatal closure of *V. faba*

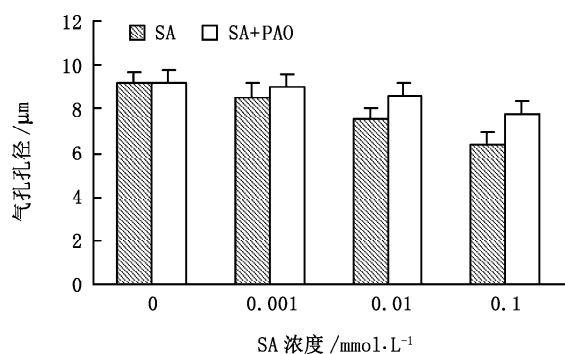


图5 0.01 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PAO 对 SA 诱导蚕豆气孔关闭的影响
Fig. 5 Effects of 0.01 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PAO on SA induced stomatal closure of *V. faba*

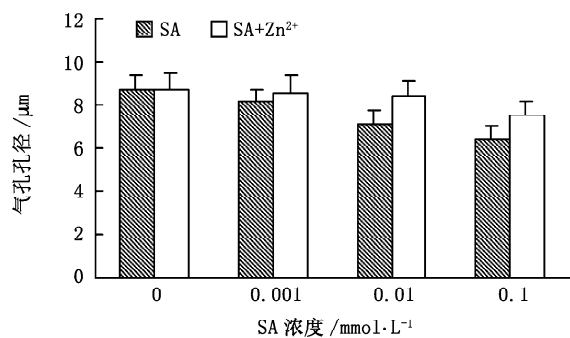


图6 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Zn^{2+} 对 SA 诱导蚕豆气孔关闭的影响
Fig. 6 Effects of 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Zn^{2+} on SA induced stomatal closure of *V. faba*

闭效应, 0.01 和 0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA 存在时, NaVO_3 的抑制作用分别为 61.94% 和 48.06% ($P < 0.05$) (图 7)。

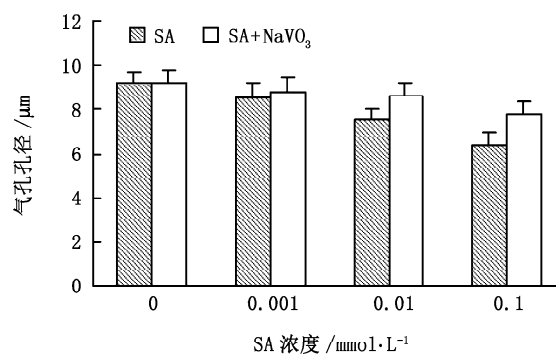


图7 NaVO_3 对 SA 诱导蚕豆气孔关闭的影响
Fig. 7 Effects of NaVO_3 on SA induced stomatal closure of *V. faba*

讨 论

SA 作为一种信号分子, 调节植物生长发育的许多方面。有关 SA 的信号转导过程已有许多研究。有报道认为 SA 可以导致胞内 H_2O_2 浓度上升, H_2O_2 作为第二信使, 诱导一些防卫基因的激活或表达 (Chen 等 1993; Sánchez-Casas 和 Klessig 1994)。李兆亮等 (1998) 报道, SA 能够激活磷脂酶 C (PLC), 促进磷脂酰肌醇降解, 导致第二信使肌醇三磷酸 (IP_3) 和双脂酰甘油 (DAG) 含量增加, SA 的生理功能尤其在诱导植物抗病性中的作用很可能是通过肌醇磷脂系统介导的。刘新等 (2003) 的研究表明, SA 可引起胞质 Ca^{2+} 增加, Ca^{2+} 螯合剂 BAPTA [1, 2-bis(2-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$] 几乎可以完全抑制 SA 诱导气孔开度减小的作用; 胞外 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA (2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、质膜 Ca^{2+} 通道抑制剂尼群地平 (nifedipine, NIF, 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 LaCl_3 (1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 可不同程度地减弱 SA 诱导气孔关闭的效应, 表明 Ca^{2+} 可能参与 SA 诱导气孔运动的信号转导。又有报道指出, 蛋白质的磷酸化和去磷酸化也参与 SA 介导的生理反应 (Kumar 和 Klessig 2000; Ning 等 2006)。PTPase 是引起蛋白质去磷酸化的重要酶, MacRobbie (2002) 证明 PTPase 可以通过控制保卫细胞液泡中离子的释放来调节气孔的关闭过程。PTPase 是否也参与 SA 诱导的信号

转导过程, 尚未见报道。

本文以蚕豆为材料, 采用PTPase的几种抑制剂PAO、NaVO₃和Zn²⁺来确定PTPase是否参与SA调控气孔运动的信号转导, 结果表明, 0.01和0.1 mmol·L⁻¹ SA具有显著诱导蚕豆气孔关闭的效应; PAO、Zn²⁺和NaVO₃均可抑制SA诱导的气孔关闭, 据此推测PTPase参与SA调控蚕豆气孔运动的信号转导过程; PAO、Zn²⁺和NaVO₃不能完全抑制SA的作用, 尤其SA浓度较高(0.1 mmol·L⁻¹)时, 表明这一过程可能还存在其他信使的作用。SA如何调控气孔运动过程中PTPase活性? 已知Ca²⁺参与SA诱导蚕豆气孔运动的信号转导(刘新等2003), Ca²⁺可以影响蛋白质的磷酸化和去磷酸化, SA是否通过Ca²⁺信使影响PTPase活性? 还是通过类似NO的作用机制, 即先通过影响蛋白磷酸化然后引起胞内钙的释放, 进而调控内向钾和氯离子通道, 从而引起气孔运动的改变(Sokolovski等2005)? 另外, 还有哪些成分参与SA诱导气孔关闭的信号转导过程? 这些信号传递途径之间的关系是什么? 尚需进一步研究。

参考文献

- 康国章, 孙谷畴, 王正询(2004). 水杨酸在植物抗环境胁迫中的作用. 广西植物, 24 (2): 178~183
- 李兆亮, 原永兵, 刘成连, 曹宗翼(1998). 黄瓜细胞中水杨酸的信号传递研究. 植物学报, 40 (5): 430~436
- 刘新, 孟繁霞, 张蜀秋, 姜成后(2003). Ca²⁺参与水杨酸诱导蚕豆气孔运动时的信号转导. 植物生理与分子生物学学报, 29 (1): 59~64
- 刘新, 张蜀秋, 孟繁霞(1999). 不同条件下水杨酸对蚕豆气孔开度的影响. 应用与环境生物学报, 5: 638~640
- 石武良, 张蜀秋(2004). 高等植物体内酪氨酸蛋白磷酸酶及其功能. 植物生理学通讯, 40 (4): 495~499
- 王利军, 战吉成, 黄卫东(2002). 水杨酸与植物抗逆性. 植物生理学通讯, 38 (6): 619~625
- 赵会杰, 薛延丰(2005). 外源水杨酸对光抑制条件下小麦叶片光合作用的影响. 植物生理学通讯, 41 (5): 613~615
- Chen Z, Silva H, Klessig DF (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. Science, 262: 1883~1886
- Kumar D, Klessig DF (2000). Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene, and jasmonic acid. Mol Plant Microbe Interact, 13 (3): 347~351
- Liu X, Zhang SQ, Lou CH (2003). Involvement of nitric oxide in the signal transduction of salicylic acid regulating stomatal movement. Chin Sci Bull, 48 (5): 449~452
- MacRobbie EAC (2002). Evidence for a role for protein tyrosine phosphatase in the control of ion release from the guard cell vacuole in stomatal closure. Proc Natl Acad Sci USA, 99: 11963~11968
- Manthe B, Schulz M, Schnabl H (1992). Effects of salicylic acid on growth and stomatal movements of *Vicia faba* L.: evidence for salicylic acid metabolism. J Chem Ecol, 18: 1525~1539
- Mikolajczyk M, Awotunde OS, Muszyńska G, Klessig DF, Dobrowolska G (2000). Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. Plant Cell, 12: 165~178
- Ning J, Yuan B, Xie KB, Hu HH, Wu CQ, Xiong LZ (2006). Isolation and identification of SA and JA inducible protein kinase gene *OsSJM1* in rice. Acta Gene Sin, 33 (7): 625~633
- Sánchez-Casas P, Klessig DF (1994). A salicylic acid-binding activity and a salicylic acid-inhibitable catalase activity are present in a variety of plant species. Plant Physiol, 106: 1675~1679
- Sokolovski S, Hills A, Gay R, Garcia-Mata C, Lamattina L, Blatt MR (2005). Protein phosphorylation is a prerequisite for intracellular Ca²⁺ release and ion channel control by nitric oxide and abscisic acid in guard cells. Plant J, 43 (4): 520~529