

H⁺ 参与茉莉酸调控蚕豆气孔运动的信号转导

刘新^{1,2}, 李云¹, 孟繁霞¹, 张蜀秋^{1,*}

¹ 中国农业大学生物学院植物生理学与生物化学国家重点实验室, 北京 100094; ² 莱阳农学院生命科学学院, 山东青岛 266109

摘要: 以 BCECF-AM 为 pH 的荧光探针, 结合激光共聚焦扫描显微技术, 研究 H⁺ 可能参与茉莉酸(JA)调控气孔运动信号转导途径的结果表明, 0.1~100 μmol·L⁻¹ 浓度的(-)JA 可诱导蚕豆气孔关闭, 在引起气孔孔径改变之前 (-)JA 能引起蚕豆保卫细胞胞质的碱化; 而(±)JA 可诱导气孔适当开放, 它未引起蚕豆保卫细胞胞质中 pH 的明显改变。药理学实验证明, 质膜上质子泵的抑制剂钒酸钠能减弱(-)JA 诱导气孔关闭的作用; 而质膜上质子泵的激活剂壳梭孢菌素(fusicoccin)基本上未改变(±)JA 的作用趋势。(-)JA 和(±)JA 刺激保卫细胞胞质 Ca²⁺ 变化则表现出不同趋势。说明不同异构体形式的 JA 在调节气孔运动中的作用和信号转导途径有所不同。

关键词: 茉莉酸; 气孔运动; H⁺; Ca²⁺; 信号转导; 蚕豆

H⁺ Involving Signal Transduction in Regulation of *Vicia faba* L. Stomatal Movement by Jasmonic Acid

LIU Xin^{1,2}, LI Yun¹, MENG Fan-Xia¹, ZHANG Shu-Qiu^{1,*}

¹State Key Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China; ²Department of Life Sciences, Laiyang Agricultural College, Qingdao, Shandong 266109, China

Abstract: Using fluorescent probe BCECF-AM and Fluo-3 monitored the changes of pH_i and [Ca²⁺]_{cyt} in guard cells of *Vicia faba* under confocal microscopy. Whether H⁺ was involved in signal transduction in JA regulating stomatal movement was tested. The results showed that (-)JA induced stomatal closure at concentrations of 0.1~100 μmol·L⁻¹ was mediated intracellular alkalization in guard cells. In contrast, (±)JA induced stomatal open without pH_i changes. Pharmacological experiment proved that Na₃VO₄ reduced the effectiveness of (-)JA-induced stomatal closure, while fusicoccin had no effect on (±)JA-induced stomatal opening. Compared changes of [Ca²⁺]_{cyt} induced by (-)JA and (±)JA: (-)JA increased [Ca²⁺]_{cyt} rapidly, while (±)JA induced [Ca²⁺]_{cyt} increasing and decreasing slowly. These results demonstrated that (-)JA and (±)JA had different roles and signal pathways in regulation of stomatal movement.

Key words: jasmonic acid (JA); stomatal movement; H⁺; Ca²⁺; signal transduction; *Vicia faba*

气孔保卫细胞对各种内外因子非常敏感, 能快速调控气孔的运动, 以适应环境变化, 所以, 保卫细胞成为研究植物细胞信号转导的模式系统。气孔保卫细胞内信号转导的第二信使如 Ca²⁺、细胞内 pH (pH_i)、肌醇磷脂系统、cAMP 和 cADPR (cyclic ADP-ribose) 等参与逆境和植物激素等的信号转导都已得到证明(刘新等 2001)。在气孔保卫细胞内 H⁺ 可作为胞内第二信使参与 ABA 和生长素对气孔的调节。在正常状态下, pH_i 维持相对恒定以保证生理功能正常进行, 细胞受到刺激后, pH_i 可能会发生变化进而对许多代谢过程产生影响。例如, ABA 可导致保卫细胞胞质碱化, 保卫细胞 pH_i 的改变可影响 K⁺ 通道的开闭(Blatt 和

Armstrong 1993)。生长素可使兰花细胞 pH_i 降低 (Irving 等 1992)。

茉莉酸(jasmonic acid, JA)作为可移动的伤信号分子, 在植物的防御反应中有至关重要的作用 (Schilmiller 和 Howe 2005)。在伤胁迫下, 气孔运动异常, JA 及其甲酯(methyl jasmonate, Me-JA) 能影响气孔的开闭运动。JA 可诱导兰花等植物气孔关闭, 阻止气孔张开(Gehring 等 1997); Lee 等

收稿 2006-11-11 修定 2007-03-15

资助 国家自然科学基金(30370141)和山东省教育厅基金(J04C13)。

* 通讯作者(E-mail: sqzhang@cau.edu.cn; Tel: 010-62733602)。

(1994)和Suh等(1998)报道,JA的前体物不饱和脂肪酸和花生四烯酸可诱导鸭趾草气孔孔径增大,阻止黑暗诱导的气孔关闭。在植物体内已发现多种异构形式的茉莉酸类化合物(JAs),不同结构JAs的生物活性有所不同,即生理活性有其结构基础(宋平等2002)。细胞对植物激素的响应要经过一系列信号转导,我们观察到气孔保卫细胞对(-)JA和(±)JA有不同的应答,是否是不同的信号组分参与植物体中二者的信号传递?另外,已知Ca²⁺信使参与(-)JA调控气孔运动的信号转导(刘新等2005),但在(±)JA和(-)JA的信号转导过程中是否有H⁺信使参与?为了进一步探讨JA调控气孔运动的机制,了解JA信号转导的可能途径及其特性,特别是H⁺是否作为这一过程中的第二信使,我们以蚕豆幼苗为材料,以酯化的2',7'-二(2-羧甲基)-5(6)-羧基荧光素(BCECF-AM)为pH荧光探针,结合激光共聚焦扫描显微技术,初步观察了外源JA与蚕豆保卫细胞胞质中pH值的关系。并初步比较了(-)JA和(±)JA引起保卫细胞胞质中Ca²⁺变化的趋势,旨在为进一步探索JA的作用机制提供实验基础。

材料与方 法

蚕豆(*Vicia faba* L.)种子经HgCl₂灭菌后,浸种12h,于25℃催芽2~3d后再放在12h·d⁻¹光照、光照度为200 μmol·m⁻²·s⁻¹、昼夜温差为24/18℃、相对湿度为50%的条件下,培养3~4周后作试验用。

测定气孔开度时,取3~4周龄蚕豆幼苗最上端完全展开的叶片,放入盛有蒸馏水的培养皿中,光下或暗中处理2h使气孔开放或关闭。小心撕取其下表皮,并用毛笔刷小心除去表皮条上面粘附的叶肉细胞。用显微测微尺测量气孔的初始孔径,测量时随机选取5个视野,每个视野内随机选取10个气孔。然后,用分别含不同浓度(-)JA和(±)JA、10 μmol·L⁻¹的壳梭孢菌素(fusicoccin, FC)或50 μmol·L⁻¹ 硫酸钠的表皮条缓冲液(10 mmol·L⁻¹ MES/KOH含50 mmol·L⁻¹ K⁺和100 μmol·L⁻¹ Ca²⁺, pH 6.1)在光或暗中处理表皮条3h。记录终态孔径,每个处理重复5次以上。

荧光探针孵育时,将表皮条放于缓冲液中,

加入10~20 μmol·L⁻¹ BCECF-AM(溶于二甲基亚砜)或10~20 μmol·L⁻¹ 钙离子荧光探针Fluo-3-AM(溶于二甲基亚砜)和0.1% Pluronic F-127中,于25℃下避光孵育2h左右,取出后用表皮条缓冲液冲洗多次,除去吸附的染料(Irving 1992;孟繁霞等2001)。然后将冲洗好的表皮条置于载玻片上,盖好盖片,用波长488 nm的蓝光激发,经激光共聚焦扫描显微镜(MRC-1024, Bio-Rad公司)扫描。随着时间变化的荧光图像和数据在时间进程面板下呈现,在Laser Sharp Processing下进行图像处理,数据处理用Excel软件进行,用每3min采集到的Ca²⁺荧光强度数据(F)与开始处理的初始pH或Ca²⁺荧光强度(F₀)的比值(F/F₀)作出时间进程曲线图(Irving等1992;孟繁霞等2001)。

实验结果

1 (-)JA和(±)JA对蚕豆气孔运动的影响

在光下,(-)JA能明显诱导蚕豆气孔关闭;在0.1~100 μmol·L⁻¹ JA范围内,其诱导效应随着JA的浓度增加而加强,气孔孔径减小到原来的三分之一(图1)。在暗条件下,(±)JA可诱导蚕豆叶片原来关闭的气孔张开,阻止暗诱导的气孔关闭(图2);在0.1~100 μmol·L⁻¹ (±)JA范围内,其诱导气孔张开的效应随浓度增高而加强。其中,10和100 μmol·L⁻¹ (±)JA明显诱导气孔张开,它们分别使气孔孔径增大1和1.5倍。看来,(-)JA和(±)JA调控气孔运动的作用完全不同,其信号转导机制可能也有所不同。

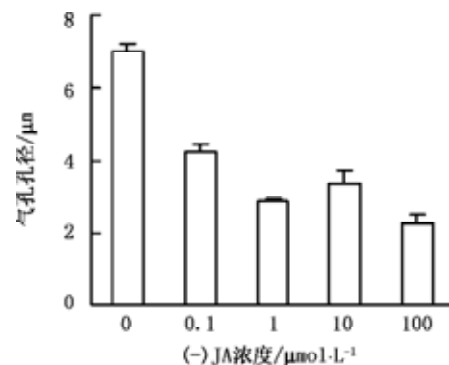


图1 光下不同浓度(-)JA对蚕豆气孔运动的影响
Fig.1 Effects of different concentrations of (-)JA on *V. faba* stomatal movement under light

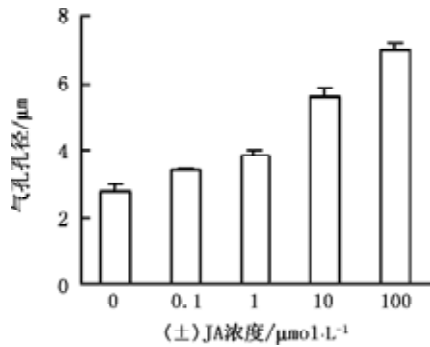


图2 暗中不同浓度(±)JA对蚕豆气孔运动的效应
Fig.2 Effects of different concentrations of (±)JA on *V. faba* stomatal movement in dark

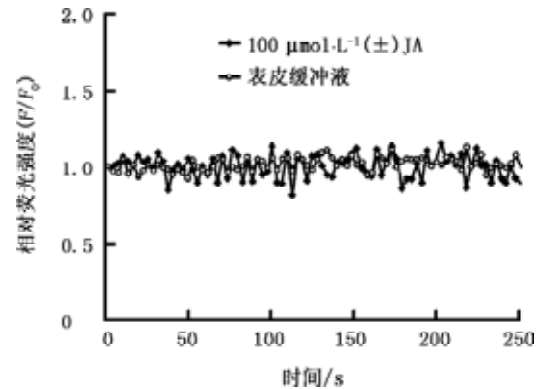


图4 (±)JA影响下的蚕豆保卫细胞中pH_i的动态变化
Fig.4 Dynamic change in pH_i of *V. faba* guard cell effected by (±)JA

2 H⁺信号参与JA调控蚕豆气孔运动的药理学证据

图3和图4显示:(1)在气孔关闭之前,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (-)JA能够引起保卫细胞胞质中pH的快速升高而后下降,而加入缓冲液作为对照的保卫细胞胞质中pH保持稳定(图3)。由此看来,在(-)JA诱导气孔关闭的作用中,可能会有H⁺参与信号转导。但是,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (±)JA未能引起保卫细胞胞质中pH的明显改变(图4)。

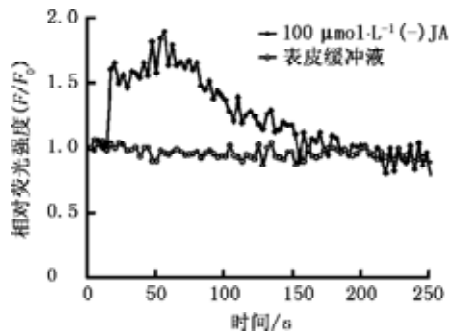


图3 (-)JA影响下的蚕豆保卫细胞中pH_i的动态变化
Fig.3 Dynamic change in pH_i of *V. faba* guard cells effected by (-)JA

(2)作为质膜上质子泵抑制剂的钒酸钠,在50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度下能削弱低浓度(1和10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)(-)JA诱导气孔关闭的作用(图5)。进一步说明,在(-)JA诱导气孔关闭的作用中有H⁺信号的参与。作为质膜上质子泵激活剂的FC,在光下能诱导气孔孔径增大,(±)JA也可诱导气孔张开,但FC基本上没有改变(±)JA的作用趋势(图6)。由此推测,

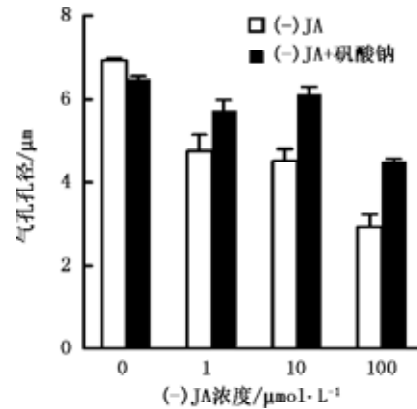


图5 钒酸钠对(-)JA诱导蚕豆气孔关闭的影响
Fig.5 Effect of Na₃VO₄ on *V. faba* stomatal closure induced by (-)JA

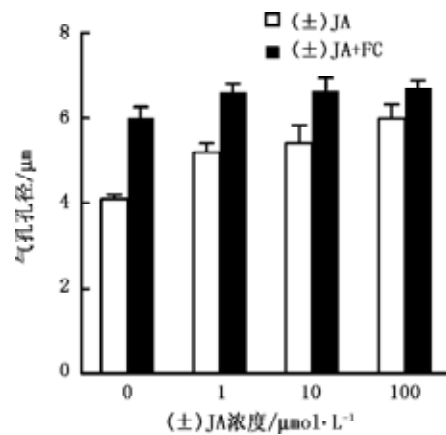


图6 FC对(±)JA诱导蚕豆气孔张开的的影响
Fig.6 Effect of FC on *V. faba* stomatal opening induced by (±)JA

(±)JA 调控的气孔运动与质子泵的关系不甚密切。

3 (-)JA 和(±)JA 的 Ca^{2+} 信号特异性

为进一步了解气孔保卫细胞对(-)JA 和(±)JA 反应不同的原因,结合我们已经观察过的(-)JA 引起的保卫细胞胞质 Ca^{2+} 的变化,比较二者诱导 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 变化的结果(图7)显示:(-)JA 引起保卫细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的快速上升和下降;而(±)JA 引起的保卫细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 表现出升高时间较晚,但维持高水平的时间长,再后缓慢下降。虽然(-)JA 和(±)JA 都引起 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的变化,但二者各有明显的特异性。

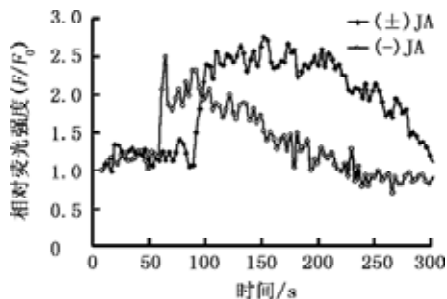


图7 (-)JA 和(±)JA 刺激下的蚕豆保卫细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 动态变化的比较

Fig.7 Comparison of dynamic changes in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ of *V. faba* guard cell stimulated by (-)JA and (±)JA

讨 论

JA是普遍存在于植物体内的一种内源的生长调节物质,与抵抗病原侵染也有关系,是植物对外界伤害(机械伤害、食草动物、昆虫、病原菌浸染)做出反应而诱导抗性基因表达的的信号分子(刘新和张蜀秋 2000)。Kenton 等(1999)业已证明, Ca^{2+} 和蛋白磷酸化参与JA的信号转导过程。JA可促进兰花叶片气孔关闭,在JA诱导气孔关闭之前发生胞质碱化现象(Gehring 等 1997)。而且JAs的碱化作用的程度和幅度与兰花(Irving等 1992)和蚕豆(Blatt 和 Armstrong 1993)对ABA的应答非常相似。因此推测,JA引起的胞内pH升高可能是气孔保卫细胞信号转导的一个组分。

在植物体内,存在多种形式的茉莉酸类物质,其生理活性与结构差异有关。本文结果表明(-)JA 和(±)JA 对气孔运动的生理效应不同(图1和2),其信号转导机制也存在差异。在(-)JA 诱

导蚕豆气孔关闭的过程中有 H^+ 信号的参与(图3和5):外源(-)JA 能够引起蚕豆保卫细胞胞质的碱化,并且胞质碱化发生在气孔孔径改变之前,这与Lee等(1994)报道的JA的前体物质亚麻酸可调控 K^+ 通道,激活质膜 H^+ -ATPase,进而影响气孔运动的结果类似。而(±)JA 促进气孔张开的过程中似乎没有 H^+ 信号参与(图4和6)。由此看来,不同异构体形式JA 的作用不同,可能与它们的信号转导途径不同有关。即使都是诱导气孔关闭的生长调节物质如茉莉酸甲酯和脱落酸,却经由不同的信号转导途径来识别不同的刺激(Suhita 等 2003)。

保卫细胞内存在多种信号转导成员,其中的 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 和 pH_i 这2种信使既有相对的独立性,又存在着复杂的相互交叉(cross talk)(刘新等 2001)。本文结果表明,在(-)JA 诱导蚕豆气孔关闭中,既有 Ca^{2+} 信号又有质子信号参与,对于这2者之间的关系值得探讨。至于(-)JA 和(±)JA 引起 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 动态变化的特异性(图7),则正体现出气孔保卫细胞可通过胞质中 Ca^{2+} 变化的时间、幅度等异质性而导致不同的下游信号转导途径来精确识别不同的刺激,进而表现出不同的应答(McAinsh 等 1997)。因此更应深入探讨JAs调控气孔运动信号转导途径的细节。

参考文献

- 刘新, 孟繁霞, 张蜀秋, 姜成后(2001). 气孔保卫细胞信号转导中的第二信使. 植物生理学通讯, 37 (6): 556~561
- 刘新, 石武良, 张蜀秋, 姜成后(2005). Ca^{2+} 参与茉莉酸诱导蚕豆气孔关闭的信号转导. 实验生物学报, 38 (4): 297~302
- 刘新, 张蜀秋(2000). 茉莉酸类物质在伤信号转导中的作用机制. 植物生理学通讯, 36 (1): 76~81
- 孟繁霞, 苗龙, 冷强, 张蜀秋(2001). 测定蚕豆保卫细胞胞质中游离 Ca^{2+} 的荧光染料孵育法. 植物生理学通讯, 37 (5): 429~432
- 宋平, 夏凯, 曹显祖(2002). 茉莉酸类化合物结构与活性之间的关系及参与茉莉酸生物合成的酶. 植物生理学通讯, 38 (1): 72~77
- Blatt MR, Armstrong F (1993). K^+ channels of stomatal guard cells: abscisic-acid-evoked control of the outward rectifier mediated by cytoplasmic pH. Planta, 191 (3): 330~341
- Gehring CA, Irving HR, McConchie R, Parish RW (1997). Jasmonates induce intracellular alkalization and closure of *Paphiopedilum* guard cells. Ann Bot, 80: 485~489

- Irving HR, Gehring CA, Parish RW (1992). Changes in cytosolic pH and calcium of guard cells precede stomatal movements. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 1790~1794
- Kenton P, Mur L, Draper J (1999). A requirement for calcium and protein phosphatase in the jasmonate-induced increase in tobacco leaf phosphatase specific activity. *J Exp Bot*, 50 (337): 1331~1341
- Lee Y, Lee HJ, Crain RC, Lee A, Korn SJ (1994). Polyunsaturated fatty acids modulates stomatal aperture and two distinct K⁺ channel currents in guard cells. *Cell Signal*, 6: 181~186
- McAinsh MR, Brownlee C, Hetherington AM (1997). Calcium ions as second messengers in guard cell signal transduction. *Physiol Plant*, 100: 16~29
- Schilmiller AL, Howe GA (2005). Systemic signaling in the wound response. *Curr Opin Plant Biol*, 8: 369~377
- Suh SJ, Park JG, Lee Y (1998). Possible involvement of phospholipase A₂ in light signal transduction of guard cells of *Commelina communis*. *Physiol Plant*, 104 (3): 306~310
- Suhita D, Kolla VA, Vavasseur A, Raghavendra AS (2003). Different signaling pathways involved during the suppression of stomatal opening by methyl jasmonate or abscisic acid. *Plant Sci*, 164: 481~488