

NADPH 氧化酶参与水杨酸诱导的蚕豆气孔关闭过程

何金环¹, 李存法¹, 王朋涛², 宋纯鹏^{2,*}

¹ 郑州牧业工程高等专科学校生物工程系, 郑州 450011; ² 河南大学生命科学学院, 河南开封 475001

摘要: 水杨酸(SA)可以浓度依赖的方式诱导蚕豆叶片的气孔关闭, 1~1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA所诱导的气孔关闭可以再开放, 而 $10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的SA导致的气孔关闭则否。质膜NADPH氧化酶抑制剂二亚苯基碘(DPI)可削弱SA作用的45%~60%。表明SA诱导的气孔关闭可能与 H_2O_2 的产生有关。以 H_2O_2 荧光探针 H_2DCFDA 结合显微注射技术直接检测保卫细胞内产生 H_2O_2 的结果显示, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA可引起保卫细胞内荧光素(DCF)荧光快速增强。在DPI存在的条件下, 经SA处理的保卫细胞, 仅在其叶绿体部位产生 H_2O_2 , 而质膜附近的DCF荧光增强则受到抑制。表明叶绿体可能是保卫细胞内产生 H_2O_2 的主要部位, 质膜NADPH氧化酶也可能参与SA诱导 H_2O_2 的产生。

关键词: 蚕豆; 气孔; 水杨酸; NADPH氧化酶; 显微注射

Involvement of NADPH Oxidase in Stomatal Closure Induced by Salicylic Acid in *Vicia faba* L.

HE Jin-Huan¹, LI Cun-Fa¹, WANG Peng-Tao², SONG Chun-Peng^{2,*}

¹Department of Bioengineering, Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou 450011, China; ²College of Life Sciences, Henan University, Kaifeng, Henan 475001, China

Abstract: Salicylic acid (SA) can induce stomatal closure with a concentration-dependent manner, the closed stomata can open again when the concentration of SA is between 1–1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, but when the concentration of SA is 0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, the change of closed stomata cannot happen. DPI 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ weakened the effect of SA on stomatal apertures by 45%–60%, which indicated that the generation of H_2O_2 might be involved in the stomatal closure induced by SA. We directly examined the production of H_2O_2 by microinjection based on H_2DCFDA . SA 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ by applied externally or microinjection could induce rapid increasing in fluorescence of DCF in guard cells. In the presence of DPI, the guard cells treated with SA 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ showed increase in DCF fluorescence only in the regions of chloroplasts, but the production of H_2O_2 was inhibited in the regions of plasma membrane. These results suggest that the chloroplasts in guard cells might be the main source of H_2O_2 production, meanwhile, plasma membrane NADPH oxidase may also contribute to the H_2O_2 generation in the guard cells, when treated with SA.

Key words: *Vicia faba*; stomata; salicylic acid; NADPH oxidase; microinjection

水杨酸(salicylic acid, SA)在植物体内有多种生理调节作用, 如抑制乙烯的生物合成, 使膜通透性改变, 促进离子吸收, 增强植物的抗病性。有报道认为某些病原菌只能通过开放的气孔才能侵入植物体内, 所以SA诱导气孔关闭有利于提高植物对某些病原菌的抗性(Agrios 1997)。因此, SA诱导气孔关闭的信号转导及其在植物抗病性中的作用机制成了近年来的研究热点。

有实验表明, 外源SA可诱发多种植物积累病程相关蛋白(pathogenesis-related protein, PR), 并产生抗病性(Klessig和Malamy 1994)。还有实验

表明, 施用外源 H_2O_2 也能诱导烟草中PR积累蛋白, 只是其诱导效应低于SA, 而认为SA的作用机制至少部分与 H_2O_2 有关。植物细胞中产生活性氧的途径很多, 但是有关植物氧化猝发过程中活性氧形成的分子机制及其作用位点仍有争议, 多数报道(孙玉和陈珈1997)认为其主要发生于胞外, 由质膜氧化还原系统产生。质膜电子传递系统或

收稿 2007-08-06 修定 2007-09-16

资助 国家自然科学基金(39870372)。

* 通讯作者(E-mail: songcp@henu.edu.cn; Tel: 0378-2855010)。

质膜氧化还原系统(plasma membrane redox system, PMRS)普遍存在于原核生物及所有动植物体内(Rubinstein 和 Luster 1993), 产生 O_2^- 的 NADPH 氧化酶是 PMRS 的一个组分。Henderson 和 Chappel (1996) 的研究表明, NADPH 氧化酶作为哺乳动物细胞中的一种嗜中性氧化酶在有氧代谢的呼吸猝发(respiratory burst)中起作用。现已查明, 植物细胞中也有类似于动物细胞的嗜中性 NADPH 氧化酶, 而且此 NADPH 氧化酶在氧化猝发(oxidative burst, OXB)中的作用已从一些抑制剂的添加实验中得到证实。如作为 NADPH 氧化酶的自杀性底物抑制剂二亚苯基碘(diphenylene iodonium, DPI)可阻止一些由真菌刺激产生的 OXB, 也可抑制事先加入 NADPH 的玫瑰细胞中线粒体膜上 H_2O_2 的产生(Auh 和 Murphy 1995)。Doke 和 Miura (1995) 在研究马铃薯块茎切片过敏反应时发现, 激发子可激活块茎细胞膜上的 NADPH 氧化酶并迅速产生 O_2^- 。 O_2^- 跨膜扩散性较小, 最有可能存在于膜外, 一般认为 H_2O_2 是 OXB 的主要积累产物。玫瑰细胞用 N,N'-二乙基二巯基氨基甲酸酯(SOD 抑制剂)处理后, H_2O_2 的产生即停止, 表明 O_2^- 在膜外产生, 其被 SOD 迅速歧化为 H_2O_2 后, 通过质膜在胞内(或胞间)运输(Allan 和 Fluhr 1997)。本文以蚕豆气孔为材料, 用表皮条生物分析和显微注射技术探讨 NADPH 氧化酶参与 SA 诱导气孔关闭的过程。

材料与方 法

蚕豆(*Vicia faba* L.)种子先用 75% 的乙醇表面消毒 5 min, 在温室(20~25 ℃)下催芽 3~4 d, 播种于培养土(营养土:蛭石为 1:1)中。蚕豆生长的光/暗周期为 14 h/10 h, 光照强度为 0.2~0.3 mmol·m⁻²·s⁻¹, 昼夜温差分别为 25 ± 2 ℃ 和 20 ± 2 ℃, 相对湿度在 70% 左右, 生长期间未受到任何逆境因素。

取 3~4 周龄苗顶端第 1~2 对完全展开的叶片, 用蒸馏水洗净, 撕取下表皮, 洗净叶肉细胞后, 切成约 5 mm 长的表皮条, 置于基本缓冲液(KCl 50 mmol·L⁻¹, Mes 10 mmol·L⁻¹, pH 6.1)中。在促进气孔张开的条件下培养 3 h, 使气孔完全张开, 然后从缓冲液中取出表皮条, 放入不同的处

理液处理。实验记录有 2 种: 一种是处理前观察并记录一次气孔开度, 处理 2 h 后观察并记录处理后的气孔开度, 之后表皮条漂洗后置于新鲜的基本缓冲液中, 2 h 后观察并记录气孔开度恢复情况; 另一种是在处理过程中每隔一定的时间间隔观察并记录一次气孔开度, 连续记录 5 次。均在 10×25 倍倒置显微镜下用测微尺测定。每次观察 3 个表皮条, 随机选取 5 个视野测定记录 50 个气孔的开度。每个实验重复 3~5 次, 统计其平均值和平行实验间的方差。

测定 SA 诱导胞内 H_2O_2 产生时, 预先将 2',7'-二氯二氢荧光素乙酰乙酸盐(2',7'-dichlorofluorescein diacetate, H_2DCFDA)以 50 mmol·L⁻¹ 的二甲亚砜(DMSO)配成母液, 分装冷冻保存。负载时撕取蚕豆叶片下表皮并切成约 10 mm 长的表皮条, 培养在 5 mL 负载缓冲液(KCl 50 mmol·L⁻¹, Mes 10 mmol·L⁻¹, pH 7.2)中, 然后加入 5 μL 的 H_2DCFDA 二甲亚砜母液混匀至终浓度为 50 mmol·L⁻¹, 室温(25 ± 2 ℃)下避光保温 10~15 min。将已引入 H_2DCFDA 的表皮条用新鲜的负载缓冲液漂洗 2 次, 以洗去细胞表层多余的探针, 然后用 2 个附有双面胶的玻璃片将表皮条两端固定在盛有 0.5 mL 缓冲液的塑料培养皿底部, 置于倒置显微镜(Nikon-TE300)载物台上(物镜 40×0.6 Plan Fluor)。用显微拉制仪(PC-10, Narishige Scientific Instruments)将 1 mm×90 mm 有芯玻璃管(GD-1, Narishige Scientific Instruments)拉成尖端直径 < 1 μm 的显微注射针, 然后用负压前端加样法(front-filling of pipette)将待注射的试剂吸入显微注射针的前端。显微注射在显微操作系统下进行(188NE, Narishige Scientific Instruments) [参照 Ma 等(1999)的方法]。为确保细胞活性和实验结果的可靠性, 每次实验后用荧光素二乙酸酯(fluorescein diacetate, FDA)对实验细胞进行染色, 发出绿色荧光的为有活性细胞。

结果与讨论

1 不同浓度 SA 对气孔开度的影响

为找到一个既可诱导气孔关闭又不会对气孔保卫细胞造成伤害, 而且在此浓度下植物受到病原菌感染时其体内的 SA 仍处于正常生理浓度范围

内的SA浓度。我们用不同浓度SA处理蚕豆气孔保卫细胞并用荧光素二乙酸酯(FDA)检测处理后细胞活性的结果(图1)表明, SA可以浓度依赖的方式诱导气孔关闭, 并且随着SA浓度的升高, 其诱导气孔关闭的作用越明显。浓度在 1×10^{-6} 至 $0.001 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的SA所诱导的气孔关闭具有可逆性, 而当浓度达到 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的SA所诱导的气孔关闭则不可逆。检测细胞活性的FDA表明, 当SA浓度在 $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 至 $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 保卫细胞可保持良好的活性, 而当SA浓度为 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 保卫细胞的活性即丧失, 表明SA在此浓度时诱导的气孔关闭可能是其伤害细胞的结果。本文以下的实验均采用 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 这一SA浓度。

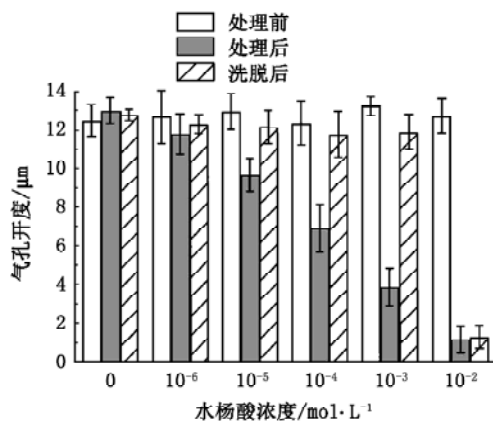


图1 不同浓度SA对蚕豆气孔开度的影响
Fig.1 Effects of different concentrations of SA on stomatal apertures of *V. faba*

2 DPI对水杨酸诱导气孔关闭的影响

图2显示 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的DPI与 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的SA共同处理时, DPI部分削弱SA诱导的气孔关闭的作用, 处理后30~195 min DPI的削弱作用达45%~60%, 而DPI单独处理时气孔开度仅比未做DPI处理的增加2%~5%, 这暗示DPI削弱SA诱导的气孔关闭作用可能是由于DPI抑制了SA刺激的质膜NADPH氧化酶产生 H_2O_2 , 而不是由于DPI促进气孔开度增加与SA诱导气孔关闭作用的简单叠加。同时也暗示保卫细胞质膜NADPH氧化酶在正常生理状态下活性非常低, 在SA处理时此酶也可能参与SA诱导的 H_2O_2 产生。也有人认为SA可

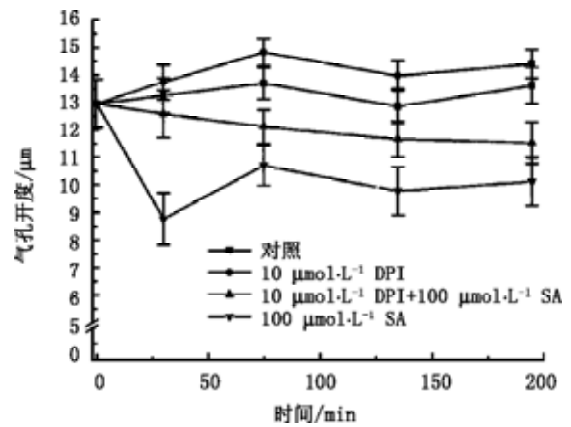


图2 DPI对水杨酸诱导蚕豆气孔关闭的影响
Fig.2 Effect of DPI on stomatal closure induced by SA of *V. faba*

促进质膜NADPH氧化酶产生 H_2O_2 (Shirasu等1997)。

3 显微注射SA诱导保卫细胞 H_2O_2 的产生

如图3所示, 左侧保卫细胞经显微注射引入 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA后, 其DCF荧光明显增强, 而另一侧未注射SA的保卫细胞荧光产生明显滞后, 而且十分微弱, 这可能是一侧注入保卫细胞中的SA有一部分扩散入另一侧未注射SA的细胞中, 并在一定程度可能诱导 H_2O_2 的产生, 或者是由于前者保卫细胞中产生的 H_2O_2 扩散进入后者的细胞中, 导致部分 H_2DCF 的氧化产生一定的荧光, 也可能是显微注射SA后上述2种情况同时存在的。

从图3还可以看到, 在SA处理后, 保卫细胞内DCF荧光增强首先表现在叶绿体部位, 其他胞质区域如质膜附近和非叶绿体存在的胞质区域的荧光上升稍有滞后。由于保卫细胞与其他表皮细胞不同, 它含有叶绿体, 可进行光反应, 释放 O_2 并产生化学能ATP和NADPH, 作为产生活性氧的驱动力。

4 DPI预处理对SA诱导保卫细胞 H_2O_2 产生的影响

图2和图3显示的质膜NADPH氧化酶可能是保卫细胞中除叶绿体外 H_2O_2 的另一重要来源。从图4可以看出, SA处理前预先加入 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的DPI可明显抑制质膜部位荧光增强。这可能是DPI抑制了质膜NADPH氧化酶, 从而阻止质膜上 H_2O_2 产生的结果, 但叶绿体中 H_2O_2 的产生几乎不受

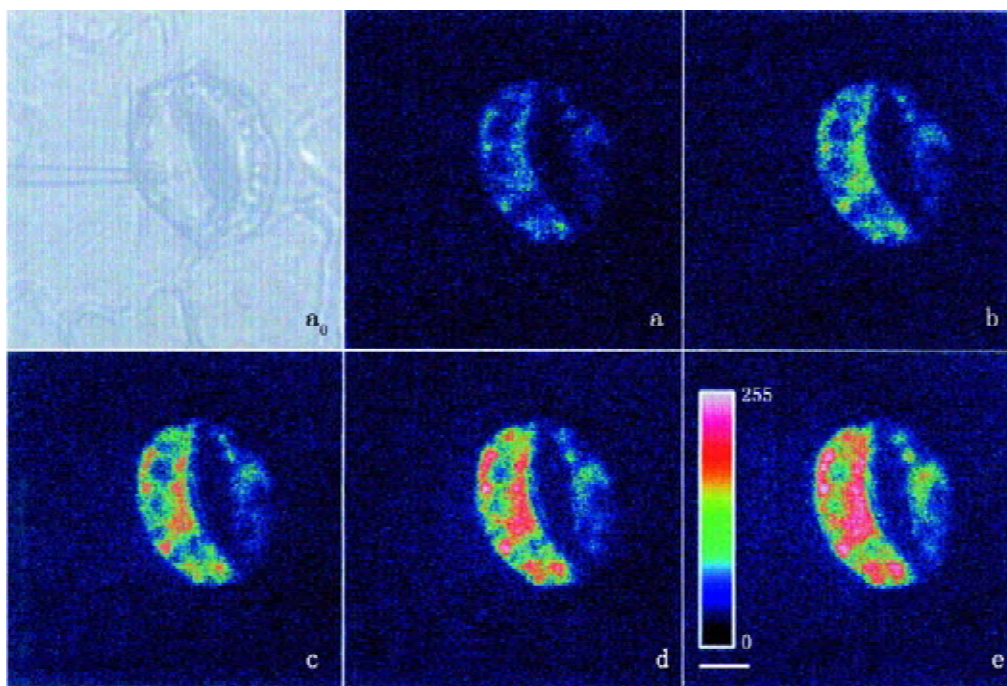


图3 显微注射 SA 诱导蚕豆叶片保卫细胞中 H_2O_2 的产生

Fig.3 Production of H_2O_2 induced by microinjection of SA into guard cells of *V. faba*

a_0 表示显微注射 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA 入保卫细胞； a、b、c、d、e 分别表示同一保卫细胞在注射 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA 后 10、20、100、200 和 300 s 的荧光强度。e 的彩色图标表示荧光强度(0~255)；标尺：10 μm 。

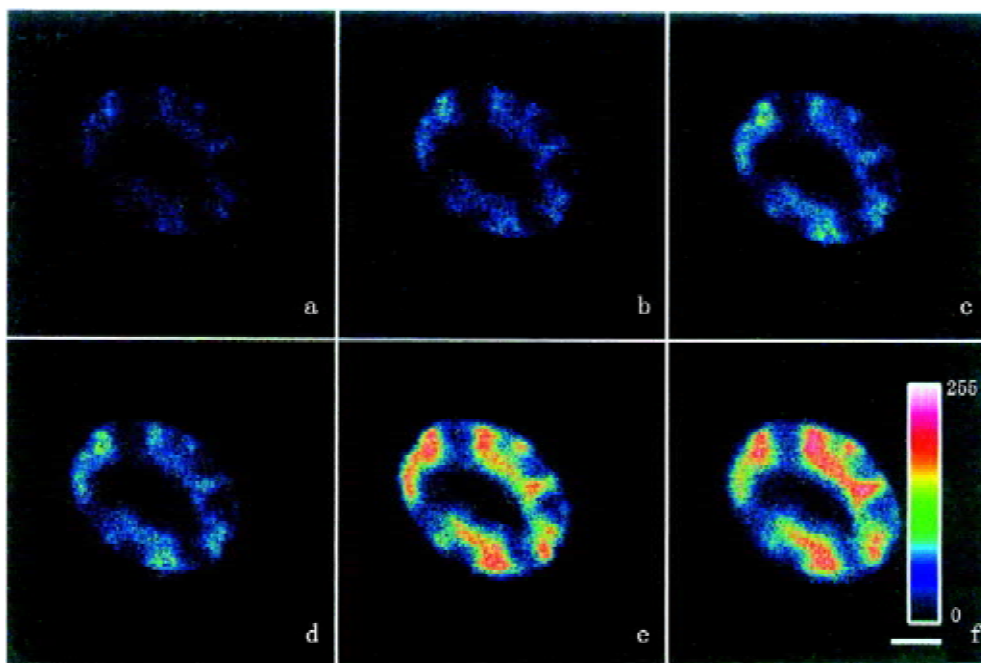


图4 DPI 预处理对 SA 诱导蚕豆保卫细胞 H_2O_2 产生的影响

Fig.4 Effect of DPI pretreatment on the production of H_2O_2 induced by SA in guard cells of *V. faba*

a 表示已保温的荧光探针 H_2DCFDA 和 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DPI 预处理、未加入 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA 的保卫细胞荧光强度； b、c、d、e、f 分别显示同一保卫细胞在加入 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA 后 10、20、100、200、300 s 的荧光强度。f 的彩色图标表示荧光强度(0~255)；标尺：10 μm 。

DPI的影响, 这进一步说明胞内叶绿体可能是SA诱导保卫细胞产生H₂O₂的主要来源。

参考文献

- 孙玉, 陈珈(1997). 植物细胞质膜氧化还原系统与信号转导. 植物生理学通讯, 33: 161~167
- Agrios GN (1997). Plant Pathology (4th ed). San Diego: Academic Press, 46~52
- Allan AC, Fluhr R (1997). Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. Plant Cell, 9: 1559~1572
- Auh CK, Murphy TM (1995). Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of O₂⁻ and H₂O₂ by *Phytophthora* elicitor-stimulated rose cells. Plant Physiol, 107: 1241~1247
- Doke N, Miura Y (1995). *In vitro* activation of NADPH-dependent O₂⁻ generating systems in a plasma membrane-rich fraction of potato tuber tissues by treatment with an elicitor from *Phytophthora infestans* or with digitonin. Physiol Mol Plant Pathol, 46: 17~28
- Henderson LM, Chappel JB (1996). NADPH oxidase of neutrophils. Biochim Biophys Acta, 1273: 87~101
- Klessig DF, Malamy J (1994). The salicylic acid signal in plants. Plant Mol Biol, 26: 1439~1458
- Ma LG, Xu XD, Cui SJ, Sun DY (1999). The presence of a heterotrimeric G protein and its role in signal transduction of extracellular calmodulin in pollen germination and tube growth. Plant Cell, 11: 1351~1363
- Rubinstein B, Luster DG (1993). Plasma membrane redox activity: components and role in plant processes. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 44: 131~155
- Shirasu K, Nakajima H, Rajasekhar VK, Dixon RA, Lamb C (1997). Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. Plant Cell, 9: 261~270