

小麦离体表皮上气孔对若干关键生理因子的应答反应

魏琳^{1,*}, 张卫国^{3,*}, 任柏林¹, 丁博¹, 王俊斌², 李明¹, 陈帅君¹, 程乔林¹, 田秀平¹, 谢晓东^{1,**}

天津农学院¹农学与资源环境学院, ²基础科学学院, 天津300384; ³沈阳农业大学生物技术学院, 沈阳110866

摘要: 构建了气孔分析箱系统, 对离体小麦下表皮进行钾离子、pH值和ABA浓度处理, 观察拥有亚铃形保卫细胞的气孔如何应答不同生理因子, 并与拥有肾形保卫细胞的拟南芥气孔进行了比较。结果表明, 小麦和拟南芥的气孔开度均在钾离子浓度100 mmol·L⁻¹时最大, 在0 mmol·L⁻¹时最小; 小麦在pH值6.2时气孔开度最大, 在pH值5.5时最小, 而拟南芥在pH值5.8时气孔开度最大, 在pH值7.0时最小; ABA处理后, 小麦和拟南芥的气孔开度均随ABA浓度增加而变小。此外, 小麦气孔对上述生理因子的应答幅度明显大于拟南芥, 钾离子导致小麦气孔开度最大值比最小值增加了284.99%, 而拟南芥仅增加35.25%, pH值使得小麦和拟南芥的气孔开度分别增加94.54%和33.30%, 施加ABA后气孔开度则分别减小81.4%和56.78%。

关键词: 小麦; 生理因子; 离体表皮条; 保卫细胞类型

Stomatal Responses to Several Key Physiological Factors Using Epidermal Strips of Wheat

WEI Lin^{1,*}, ZHANG Wei-Guo^{3,*}, REN Bo-Lin¹, DING Bo¹, WANG Jun-Bin², LI Ming¹, CHEN Shuai-Jun¹, CHENG Qiao-Lin¹, TIAN Xiu-Ping¹, XIE Xiao-Dong^{1,**}

¹College of Agriculture, Environment and Resources, ²College of Basic Sciences, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China; ³College of Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China

Abstract: A stomatal bioassay system has been set up to analyze stomatal responses of detached epidermal strips in wheat with dumbbell-shaped guard cells to K⁺, pH and ABA in comparison with those of *Arabidopsis* with kidney-shaped guard cells. The results showed that the stomata of both wheat and *Arabidopsis* open following the application of KCl and approached to the largest level under 100 mmol·L⁻¹. There were slightly different in terms of stomatal responses to pH. Stomatal aperture of wheat reached to the maximal level in pH 6.2 and the minimal stomatal aperture in pH 5.5 while the values in *Arabidopsis* were pH 5.8 and pH 7.0, respectively. Stomata of both wheat and *Arabidopsis* came to close as ABA concentration increased. In addition, alteration range of stomata aperture in wheat was significantly wider than those in *Arabidopsis*. Compared the maximal stomatal aperture with the minimal, K⁺ caused 284.99% and 35.25% of increase in wheat and *Arabidopsis*, respectively. Those values were 94.54% and 33.30% of increase for pH while 81.4% and 56.78% of decrease for ABA.

Key words: wheat; physiological factors; detached epidermal strips; guard cell forms

植物体的表面分布着许多气孔, 他们都由两个保卫细胞围成, 是植物体与周围空气进行气体交换的通道(Hetherington 2001)。CO₂通过气孔被植物体固定, 提供植物体生长发育必需的碳源, 水分通过气孔散失到空气中, 保持水分平衡, 促进溶解水中的营养成分在植物体运输(Bunce 2004), 控制CO₂的吸收和水分的散失, 从而参与植物的抗逆应答等一系列生物学过程。为揭示气孔在不同生理因子下的应答反应, 已构建了气孔开度研究的方法, 包括气孔开度间接检测和直接检测法(Darwin和Pertz 1911; Knight 1915; Lloyd 1908), 两种方法有很好的可比性(Ashby 1931)。离体叶片法是直接测量法中

的代表性方法, 最早由Lloyd (1908)首次采用, 此后在大量研究中被采用, 并且逐渐完善起来。

离体叶片法中较常用的植物材料是双子叶植物蚕豆和单子叶植物鸭跖草(Fischer和Hsiao 1968; Willmer和Mansfield 1969), 随着拟南芥测序工作的

收稿 2015-03-16 修定 2015-04-09

资助 天津市高校创新团队培养计划(TD12-5017)、天津市学科领军人才计划(80103)、天津市131人才工程(80302)、天津市高等学校科技发展基金项目(20130606)、天津市科委应用基础与前沿技术研究计划项目(14JCYBJC30600)和天津市千人计划项目。

* 共同第一作者。

** 通讯作者(E-mail: xiex@tjau.edu.cn; Tel: 022-23798697)。

开展,越来越多的研究以拟南芥为研究材料(Armstrong等1995; Webb和Hetherington 1997)。小麦、玉米和水稻等粮食作物中,气孔开度的变化主要通过测定蒸腾速率或气孔导度等来间接推测(Brag 1972; Raschke 1970; Huang等2009)。较早采用离体叶片法研究的粮食作物是玉米,但是所用的反应体系还不完善(Desai 1937; Raschke和Fellows 1971)。小麦和水稻目前还未见相关的报道。鉴于此,本研究拟采用离体叶片法,直接测量小麦气孔在不同生理因子的开度。研究表明,钾离子在保卫细胞的跨膜流动,会影响细胞的膨压,促进气孔运动(Schroeder等1984);不同类型缓冲液,导致气孔张开的适宜pH值不同,pH值可能通过影响细胞壁的弹性,参与气孔运动的调控(Small和Maxwell 1939; Bittisnich等1987);植物逆境激素脱落酸(ABA)会促进气孔的关闭(Kriedemann等1972; Zhang等1987; Yoshida等2014)。因而,选定在植物气孔运动中起关键作用的生理因子钾离子、pH值和ABA进行处理,并与模式植物拟南芥进行比较,为深入研究小麦气孔的功能提供理论基础。

材料与方法

1 实验材料

采用的植物材料是小麦(*Triticum aestivum* Linn.)品种‘豫18’和拟南芥野生型Col-0。小麦种植环境中光照时间为14 h·d⁻¹,空气相对湿度为50%,温度25 °C。用全Hoagland培养液(3.26 g霍格兰德粉末溶解到2 L蒸馏水中,用3 mol·L⁻¹ KOH将pH调至6.0)水培,长至三叶期(10~18 d)使用。拟南芥种植的环境中光照时间为10 h·d⁻¹,空气相对湿度为75%,温度22 °C。培养4周的植株即可用于实验。

2 气孔生物分析箱

气孔分析箱(图1)由7部分组成:CO₂滤除空气供应系统、气体导流箱、样品托盘、箱体、光学显微镜、电脑及联控软件、光闸。通过气孔分析箱将滤除CO₂的空气吹入装有培育液的培养皿中,促进培养皿中植物叶片下表皮气孔的张开。采用本气孔生物分析箱,小麦和拟南芥下表皮的气孔可在光照下大幅张开(图2)

3 生理实验的准备和施加

100 mmol·L⁻¹ K⁺培育液: 1.066 g MES (10

mmol·L⁻¹)和3.728 g KCl (100 mmol·L⁻¹)溶于无菌水至500 mL,用3 mol·L⁻¹ KOH调至pH 6.2,冷藏保存于4 °C冰箱。

保存液: 1.066 g MES (10 mmol·L⁻¹)溶于无菌水至500 mL,用3 mol·L⁻¹ KOH调至pH 6.2,冷藏保存于4 °C冰箱。

3.1 K⁺浓度对小麦和拟南芥气孔的影响

配制含有不同浓度(0、50、100和150 mmol·L⁻¹)钾离子的培育液各500 mL, MES量同上, pH值调到6.2 (1.066 g MES, 溶于无菌水至500 mL, 用3 mol·L⁻¹ KOH调至pH 6.2, 4 °C冰箱冷藏保存)。做实验前将各浓度培育液取出15 mL分别倒入标好各浓度的培养皿中,放入气孔分析箱中,将种植小麦的第一片叶剪下,切成1 cm左右的叶段,然后剥离其下表皮放入保存液中,使下表皮浮于保存液表面,并展开。提前30 min向不同钾离子浓度的培育液吹入滤除CO₂的空气,然后将表皮条转入,培育3 h (光照强度810 μmol·m⁻²·s⁻¹, 20 °C)促进气孔张开,拟南芥实验方法同小麦。利用尼康NIS Elements软件测量30个气孔的气孔开度(随机挑选不包括D型或有损伤的细胞),通过Sigmaplot软件进行分析和作图。该试验至少重复3次。

3.2 pH值对小麦和拟南芥气孔的影响

配置不同pH值(5.5、5.8、6.2和7.0)的培育缓冲液(1.066 g MES, 无酸水合物, 溶于无菌水至500 mL, 用3 mol·L⁻¹ KOH调pH, 4 °C保存)和与之同pH值的培育液(1.066 g MES, 无酸水合物, 3.728 g KCl溶于无菌水至500 mL (100 mmol·L⁻¹), 用3 mol·L⁻¹ KOH调pH, 4 °C保存)然后进行实验,拟南芥实验方法同小麦。

3.3 ABA浓度对小麦和拟南芥气孔的影响

先利用含100 mmol·L⁻¹ KCl和10 mmol·L⁻¹ MES (pH 6.2)的培育液促进小麦及拟南芥叶片气孔打开,方法同3.1节,然后将表皮条分不同时段转移至对照和ABA处理(0、10和100 μmol·L⁻¹)的培育液中培育2 h (光照强度810 μmol·m⁻²·s⁻¹, 温度20 °C)处理后进行观察,拟南芥实验方法同小麦。

实验结果

1 小麦和拟南芥气孔开度对K⁺的应答

实验结果表明小麦与拟南芥的下表皮气孔开

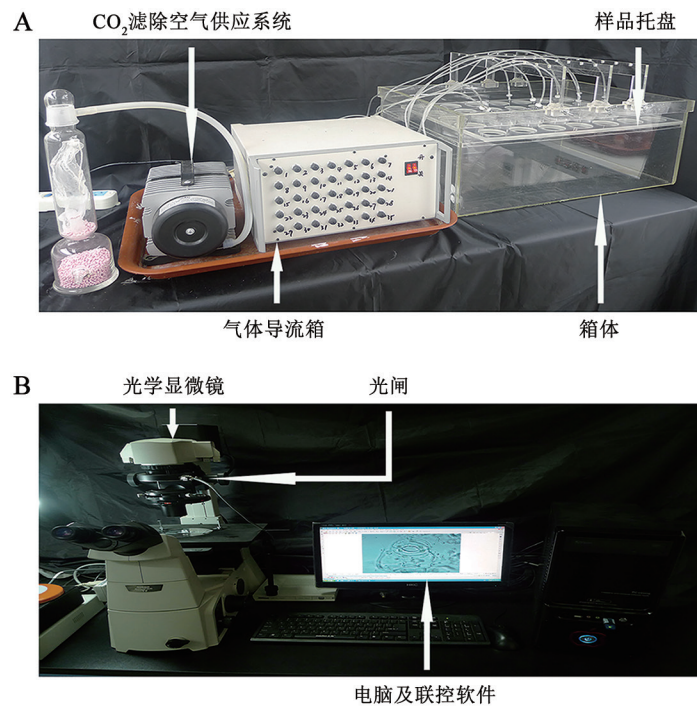


图1 气孔生物分析箱系统组件
Fig.1 Components of stomatal bioassay system

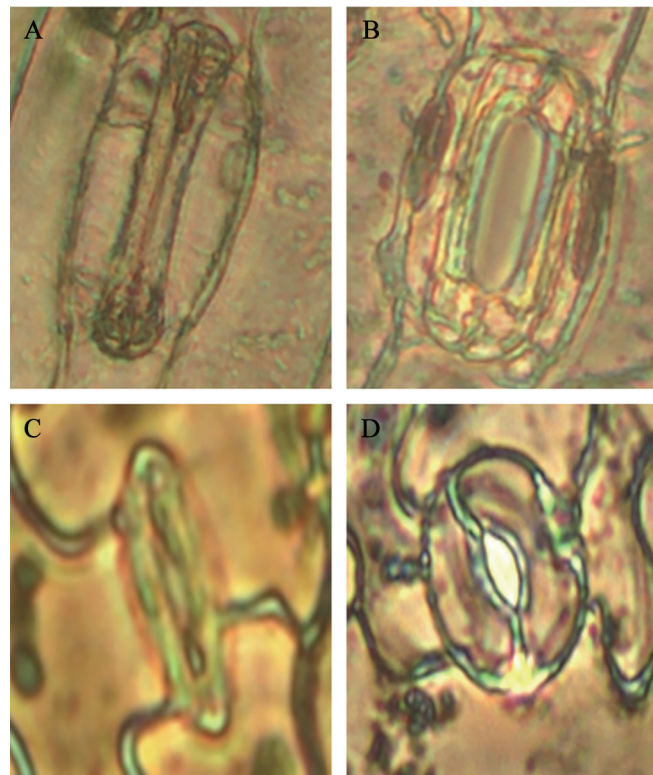


图2 小麦和拟南芥的气孔开闭
Fig.2 Open and closed stomata in wheat and *Arabidopsis*
A、B: 小麦; C、D: 拟南芥。

度对不同的 K^+ 浓度的应答趋势相近(图3)。 K^+ 浓度从0升到 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,小麦与拟南芥气孔平均开度分别增加213.56%与26.64%; K^+ 浓度从 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 升到 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时小麦和拟南芥气孔开度分别增加22.78%和6.80%; K^+ 浓度从 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 升到 $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,小麦和拟南芥气孔开度分别减少22.84%和14.3%;当 K^+ 浓度处于 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,拟南芥和小麦气孔开度都呈现最大,与 $0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 相比,气孔开度分别增加284.99%和35.25%,此时拟南芥气孔开度小于小麦气孔开度。因而,尽管小麦与拟南芥气孔对 K^+ 的应答趋势相近,小麦的气孔开度变化幅度明显高于拟南芥。

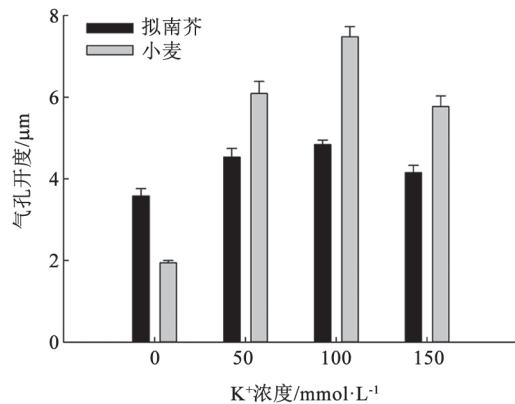


图3 K^+ 浓度对小麦和拟南芥气孔开度的影响
Fig.3 Effects of K^+ on the stomatal aperture in wheat and *Arabidopsis*

2 小麦和拟南芥气孔开度对pH值的应答

小麦与拟南芥气孔开度对不同的pH值的应答趋势不尽相同(图4),小麦气孔开度对不同pH值的反应仍然比拟南芥显示的更剧烈,在4个不同的pH值中,从5.5到5.8时小麦和拟南芥气孔开度呈上升趋势,分别增加56.89%和10.82%;从5.8到6.2时,小麦气孔开度增加24.00%,而拟南芥气孔开度开始呈现下降趋势,减小3.56%;从6.2到7.0时,小麦和拟南芥气孔开度呈下降趋势,分别减少33.34%和22.22%。小麦气孔开度在pH 6.2时最大,pH 5.5时最小,而拟南芥气孔开度在pH 5.8时最大,pH 7.0时最小。pH值导致小麦和拟南芥气孔开度的最大变化幅度分别为94.54%和33.30%。

3 小麦和拟南芥气孔开度对ABA的应答

小麦和拟南芥气孔开度对ABA应答的趋势非

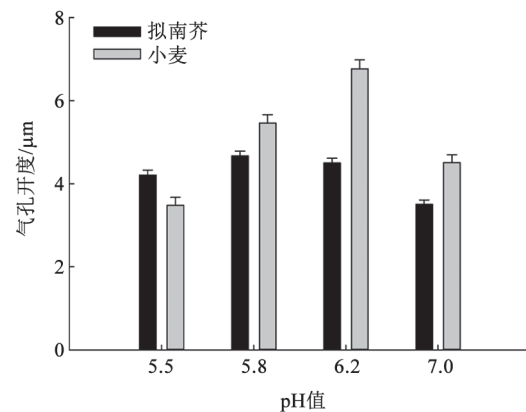


图4 pH值对小麦和拟南芥气孔开度的影响
Fig.4 Effects of pH on the stomatal aperture in wheat and *Arabidopsis*

常接近(图5)。研究表明,ABA浓度从0增加到 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,小麦和拟南芥气孔开度分别减少54.85%和34.34%;ABA浓度从 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 增加到 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,小麦和拟南芥的气孔开度分别减少58.19%和34.18%,对比未加ABA时最大的气孔开度到施加 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA时的最小平均开度,小麦和拟南芥叶片下表皮气孔开度分别减小81.4%和56.78%。上述结果表明,随着ABA浓度的增大,拟南芥气孔开度和小麦气孔开度均呈现下降趋势。但小麦气孔比拟南芥气孔对ABA的应答幅度更大。

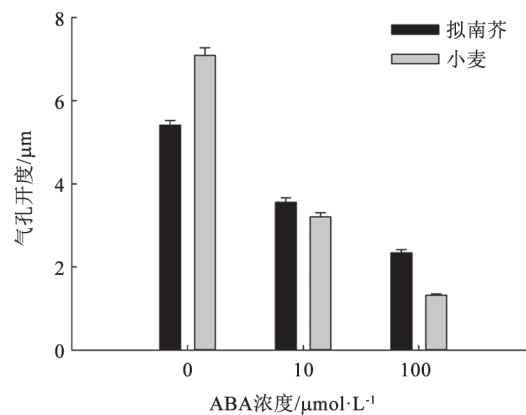


图5 ABA浓度对小麦和拟南芥气孔开度的影响
Fig.5 Effects of ABA on the stomatal aperture in wheat and *Arabidopsis*

讨 论

气孔是植物与周围环境进行气体交流的通道,

由两个保卫细胞围成, 气孔的开度大小由保卫细胞所处的内外环境信号共同决定, 决定植物在不同环境条件下的生长发育状态(Fairley-Grenot和Assmann 1993)。各种环境因子会在保卫细胞外形成不同的生理条件, 影响保卫细胞的膨压, 乃至气孔开度(钱宝云和李霞2013)。不同物种的气孔复合体结构不同, 小麦保卫细胞呈哑铃型, 而拟南芥保卫细胞呈肾形(图2)。目前对拥有肾型保卫细胞的拟南芥气孔ABA信号通路的研究较深入: 发现细胞质中的ABA受体PYR1/RCAR结合ABA, 形成ABA-PYR/RCARs-PP2C复合体(Ma等2009; Merilo等2013), 降低了PP2C磷酸酶对OST1蛋白激酶的抑制(Yoshida等2006; Vlad等2009; Lee和Luan 2012), OST1蛋白激酶通过磷酸化级联反应, 导致保卫细胞失水, 气孔开度变小(Vahisalu等2010; Lee等2009)。而小麦等拥有哑铃型保卫细胞的植物的相关研究进展缓慢。

综上所述, 小麦与拟南芥对生理因子的应答反应相似, 但小麦因具有哑铃形的保卫细胞, 在不同生理因子处理下, 气孔开度的变化幅度较大, 表明小麦气孔的调控更加精细和有效。由于气孔结构对植物生长发育的重要性, 哑铃形保卫细胞出现有可能是小麦进化史上一个重要过程。本研究中建立了气孔应答生理因子的研究体系, 对小麦和拟南芥的气孔开度随生理因子的变化进行了分析。发现两种类型的气孔在不同 K^+ 浓度、pH值、ABA浓度处理下响应规律相近, 但也有不同之处。拟南芥和小麦叶片下表皮气孔对不同梯度 K^+ 浓度有相似的应答反应, 气孔开度表现为先增大后减小, K^+ 浓度大于 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 后, 气孔开度减小(图3), 这与Fischer等(1968)在蚕豆上的研究结果相一致; 拟南芥叶片的气孔较小麦叶片气孔更适宜在偏酸性的环境下打开, 而小麦叶片气孔则适合偏中性环境下打开(图4), 表明导致最大气孔开度的pH值在不同物种间相差较大, 这与Small和Maxwell (1939)的结果相近; ABA是植物应答逆境胁迫而合成的逆境激素, 本研究中小麦和拟南芥气孔开度在ABA处理后均减少, 但小麦气孔开度的变化幅度更大(图5)。

本研究结果表明, 与拥有肾形保卫细胞的拟南芥相比, 拥有哑铃形保卫细胞的小麦在应答生理因子时变化幅度更大, 气孔的调控更精细, 这可

能与哑铃形气孔复合体中副卫细胞的功能密切相关(Raschke和Fellows 1971; Edwards等1976)。从进化的角度来看, 气孔发生于4亿年前(Raven 2002), 哑铃形和肾形保卫细胞的形态差异是如何进化, 保卫细胞的形状在进化上的意义有待探讨。此外, 本研究采用的方法也适用于对其他生理因子, 例如, 钙离子、过氧化氢和一氧化氮(NO)等的气孔应答研究, 对于水稻和高粱等粮食作物的相关研究也有很好的借鉴意义, 因而有广阔的应用前景。

参考文献

- 钱宝云, 李霞(2013). 植物气孔运动调节的新进展, 植物研究, 33 (1): 120~128
- Armstrong F, Leung J, Grabov A, Brearley J, Giraudat J, Blatt MR (1995). Sensitivity to abscisic acid of guard-cell K^+ channels is suppressed by *abil-1*, a mutant *Arabidopsis* gene encoding a putative protein phosphatase. Proc Natl Acad Sci USA, 92: 9520~9524
- Ashby E (1931). Comparison of two methods of measuring stomatal aperture. Plant Physiol, 6 (4): 715~719
- Bittisnich DJ, Entwisle LO, Neales TF (1987). Acid-induced stomatal opening in *Vicia faba* L. and the role of guard cell wall elasticity. Plant Physiol, 85 (2): 554~557
- Brag H (1972). The influence of potassium on the transpiration rate and stomatal opening in *Triticum aestivum* and *Pisum sativum*. Physiol Plant, 26 (2): 250~257
- Bunce JA (2004). Carbon dioxide effects on stomatal responses to the environment and water use by crops under field conditions. Oecologia, 140: 1~10
- Darwin F, Pertz DFM (1911). On a new method of estimating the aperture of stomata. Proc Roy Soc Lond, 84: 136~153
- Desai MC (1937). Effect of certain nutrient deficiencies on stomatal behavior. Plant Physiol, 12 (2): 253~283
- Edwards M, Meidner H, Sheriff DW (1976). Direct measurements of turgor pressure potentials of guard cells. J Exp Bot, 27: 163~171
- Fischer RA, Hsiao TC (1968). Stomatal opening in isolated epidermal strips of *Vicia faba*. II. Responses to KCl concentration and the role of potassium absorption. Plant Physiol, 43: 1953~1958
- Fairley-Grenot KA, Assmann SM (1993). Comparison of K^+ -channel activation and deactivation in guard cells from a dicotyledon (*Vicia faba* L.) and a graminaceous monocotyledon (*Zea mays*). Planta, 189: 410~419
- Hetherington AM (2001). Guard cell signaling. Cell, 107: 711~714
- Huang XY, Chao DY, Gao JP, Zhu MZ, Shi M, Lin HX (2009). A previously unknown zinc finger protein, DST, regulates drought and salt tolerance in rice via stomatal aperture control. Genes, 23: 1805~1817
- Knight RC (1915). A convenient modification of the porometer. New Phytol, 14: 212~216
- Kriedemann PE, Loveys BR, Fuller GL, Leopold AC (1972). Abscisic acid and stomatal regulation. Plant Physiol, 49: 842~847

- Lee SC, Luan S (2012). ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. *Plant Cell Environ*, 35: 53~60
- Lee SC, Lan W, Buchanan BB, Luan S (2009). A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 21419~21424
- Lloyd FE (1908). *The Physiology of Stomata*. Washington: Carnegie Institution of Washington, 62~63
- Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science*, 324: 1064~1068
- Merilo E, Laanemets K, Hu H, Xue S, Jakobson L, Tulva I, Gonzalez-Guzman M, Rodriguez PL, Schroeder JI, Brosché M, Kollist H (2013). PYR/RCAR receptors contribute to ozone-, reduced air humidity-, darkness-, and CO₂-induced stomatal regulation. *Plant Physiol*, 162 (3): 1652~1668
- Raschke K (1970). Stomatal responses to pressure changes and interruptions in the water supply of detached leaves of *Zea mays* L. *Plant Physiol*, 45: 415~423
- Raschke K, Fellows MP (1971). Stomatal movement in *Zea mays*: shuttle of potassium and chloride between guard cells and subsidiary cells. *Planta*, 101 (4): 296~316
- Raven JA (2002). Selection pressures on stomatal evolution. *New Phytol*, 153: 371~386
- Schroeder JI, Hedrich R, Fernandez LM (1984). Potassium-selective single channels in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature*, 312: 361~362
- Small J, Maxwell KM (1939). pH phenomena in relation to stomatal opening. *Protoplasma*, 32 (1): 272~288
- Vlad F, Rubio S, Rodrigues A, Sirichandra C, Belin C, Robert N, Leung J, Rodriguez PL, Laurière C, Merlot S (2009). Protein phosphatases 2C regulate the activation of the Snf1-related kinase OST1 by abscisic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21: 3170~3184
- Vahisalu T, Puzõrjova I, Brosché M, Valk E, Lepiku M, Moldau H, Pechter P, Wang YS, Lindgren O, Salojärvi J et al (2010). Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1. *Plant J*, 62: 442~453
- Webb AAR, Hetherington AM (1997). Convergence of the abscisic acid, CO₂, and extracellular calcium signal transduction pathways in stomatal guard cells. *Plant Physiol*, 114 (4): 1557~1560
- Willmer CM, Mansfield TA (1969). A critical examination of the use of detached epidermis in studies of stomatal physiology. *New Phytol*, 68: 363~375
- Yoshida T, Mogami J, Yamaguchi-Shinozaki K (2014). ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 21: 133~139
- Yoshida R, Umezawa T, Mizoguchi T, Takahashi S, Takahashi F, Shinozaki K (2006). The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 281: 5310~5318
- Zhang J, Schurr U, Davies WJ (1987). Control of stomatal behaviour by abscisic acid which apparently originates in the roots. *J Exp Bot*, 38: 1174~1181