

SA对蚕豆气孔运动和保卫细胞质膜K⁺通道的影响

何金环¹ 王朋涛² 王文静¹ 宋纯鹏^{2,*}

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

摘要:水杨酸(salicylic acid, SA)作为植物体内一种内源信号分子,具有多种生理功能,尤其与通过诱导气孔关闭提高植物的抗病性密切相关。以蚕豆气孔为材料,利用表皮条生物分析、膜片钳等手段研究表明,SA浓度在1~1 000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 时诱导的气孔关闭具有可逆性,而10 mmol L^{-1} 时导致的气孔关闭不可逆;20 U mL^{-1} 的过氧化氢酶(catalase, CAT)与SA共同处理时可逆转SA诱导气孔关闭作用的83%~90%。以2步酶解法分离蚕豆保卫细胞原生质体并记录在不同处理条件下全细胞内向K⁺电流的变化。胞外100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ SA处理后20 min可抑制内向K⁺电流的70%左右;同样,10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ H₂O₂处理后20 min可抑制K⁺电流的47%。电极液中20 U mL^{-1} 的CAT可逆转SA抑制全细胞内向K⁺电流的52%左右,表明CAT可不同程度地逆转SA对保卫细胞内向K⁺电流的抑制作用,暗示H₂O₂可能通过抑制质膜内向K⁺电流而介导SA诱导的气孔关闭过程。

关键词:水杨酸;蚕豆;气孔;K⁺通道;膜片钳

Effect of Salicylic Acid on Stomatal Movement and K⁺ Channel on Plasma Membrane of Guard Cell in *Vicia faba* L.

HE Jin-Huan¹, WANG Peng-Tao², WANG Wen-Jing¹, and SONG Chun-Peng^{2,*}

(¹ Department of Bioengineering, Zhengzhou College of Animal Husbandry and Engineering, Zhengzhou 450011, Henan; ² Department of Biology, Henan University, Kaifeng 475001, Henan, China)

Abstract: Salicylic acid(SA) is an endogenous signal compound with many functions especially in disease-resistance in plants. Previous studies have suggested that SA can inhibit catalase(CAT), resulting in elevated levels of H₂O₂, which activate defense responses in plants. At present, it is accepted that H₂O₂ may be a new signal performing general functions in plant physiological processes. In this experiment, SA induced stomatal closure with a concentration-dependent manner, the changes in stomata apertures were reversible when the concentration of SA was 1-1 000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, but irreversible when the concentration of SA was 10 mmol L^{-1} . The treatment with SA and CAT of 20 U mL^{-1} reversed the SA-induced stomatal closure by 83% - 90%. The protoplasts of guard cells in *Vicia faba* L were isolated by two-step enzyme digestion. The voltage-dependent K⁺-selective channels in the plasma membrane were recorded by whole-cell configuration. The current recorded should be carried by K⁺ based on the two results below; one was the determination of reversal potential and the other was the whole-cell current which was rapidly blocked by external 1 mmol L^{-1} of Ba²⁺. The whole-cell inward K⁺ currents were inhibited by 70% at 20 min after treated by SA 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Similarly, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ H₂O₂ inhibited inward K⁺ currents by 47% at the same time. But intracellular application of CAT abolished SA-inhibited inward K⁺ current by 52%. This indicated that H₂O₂ mediated SA-induced stomatal closure by inhibiting inward K⁺ channels on plasma membrane.

Keywords: Salicylic acid; *Vicia faba* L.; Stomatal; K⁺ channel; Patch clamp

水杨酸是植物体内普遍存在的一类酚化合物,已经证实它在植物体内有多种生理调节作用,如抑制乙烯的生物合成,改变膜通透性,促进离子吸收,增强植物的抗病性,诱导气孔关闭等,因而 Raskin

等提出应将SA看作一种新的植物激素^[1,2]。已有报道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^[3]。因此,SA诱导气孔关闭的信号转

基金项目: 国家自然科学基金项目(39870372)

作者简介: 何金环(1974-),女,河南驻马店人,讲师,硕士,主要从事植物生理生化学和科研工作。E-mail: hejinhuan@tom.com

* 通讯作者(Corresponding author): 宋纯鹏。Tel: 0378-2855010; E-mail: Songcp@henu.edu.cn

Received (收稿日期): 2006-09-29; Accepted (接受日期): 2007-01-19.

导细节及其在植物抗病性中的作用机制是近年来的研究热点。

有证据表明,外源 SA 可诱发多种植物积累致病相关蛋白(pathogenesis-related protein, PRs),并产生抗病性^[4]。外源 H₂O₂ 也能诱导烟草中 PRs,只是其诱导效应低于 SA,从而提出 SA 的作用机制至少部分与 H₂O₂ 有关,初步认为 SA 首先与 CAT 结合,抑制其活性,使植物体内 H₂O₂ 水平升高,进而诱导和增强植物抗病性。宋泽双等^[5]报道,SA 处理可抑制大麦 CAT 活性,导致 CAT mRNA 水平下降,尤其是当 SA 浓度大于 3.0 mmol L⁻¹ 时作用尤为明显。进一步支持 SA 抑制 CAT 活性,提高 H₂O₂ 水平来增强植物抗病性的理论。

气孔运动依赖于保卫细胞壁的结构及保卫细胞的收缩与膨胀,K⁺ 在保卫细胞膨压的调节中起着重要作用,K⁺ 跨膜流动可直接调节细胞的膨压,导致气孔的开闭。ABA^[6] 和活性氧^[7] 均能抑制质膜内向 K⁺ 电流,促进气孔关闭。根据 SA 诱导保卫细胞产生 H₂O₂ 的结果我们推测,SA 可能通过 H₂O₂ 这一中间信号分子作用于保卫细胞质膜 K⁺ 通道而促进气孔关闭。为验证这一推测,本试验利用膜片钳技术记录保卫细胞原生质体在不同处理条件下的全细胞 K⁺ 电流,研究逆境信号 SA 刺激条件下,气孔保卫细胞中 H₂O₂ 的产生及其对质膜 K⁺ 通道的影响。这有助于深入理解 SA 的信号转导途径,并可为植物抗病性研究提供理论依据,具有十分重要的实际意义。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

蚕豆(*Vicia faba* L.) 种子先用 75% 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,昼夜温度为 25℃±2℃ 和 20℃±2℃,相对湿度 70% 左右,生长期间无任何胁迫。

1.2 表皮条生物分析

取 20~30 d 龄茎顶端第 1~2 对对完全展开的叶片,用蒸馏水洗净,撕取下表皮,洗去叶肉细胞后,切成约 5 mm 长的表皮条,置基本缓冲液(KCl 50 mmol L⁻¹、Mes 10 mmol L⁻¹、pH 6.1)中。在促进气孔张开的条件(23℃,光照)下培养 3 h,使气孔完全张开后,从缓冲液中取出表皮条,放入不同的处理液中处理。

试验记录分 2 种,一种是处理前观察并记录 1 次气孔开度,处理 2 h 后观察并记录处理后的气孔开度,之后将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 1 次气孔开度,连续记录 5 次。气孔开度均在 10×25 倍倒置显微镜下用测微尺测定。每次观察取 3 个表皮条,随机选取 5 个视野测定记录 50 个气孔开度。每个实验重复 3~5 次,统计其平均值和平行实验间方差。

1.3 蚕豆气孔保卫细胞原生质体的分离

参照 Kruse 等^[8]、Fairley-Grenot 等^[9] 和 Blom-Zandstra 等^[10] 的方法,略加修改,用两步酶解法游离气孔保卫细胞原生质体。撕取蚕豆叶片下表皮,在 10 mL 基本介质(甘露醇 0.45 mol L⁻¹, CaCl₂ 0.5 mmol L⁻¹, MgCl₂ 0.5 mmol L⁻¹, 抗坏血酸 0.5 mmol L⁻¹, KH₂PO₄ 10 μmol L⁻¹, Mes 10 mmol L⁻¹, pH 5.5) 中漂洗后,在 28℃、160 次 min⁻¹ (振幅 2 cm) 的摇床上用第一酶液(Cellulysin 0.7%、PVP-40 0.1%、牛血清白蛋白 0.25%,溶于 45% 的基本介质中) 解离 2 h 左右,除去表皮上的叶肉细胞等,在显微镜下清晰地看到附于表皮的气孔保卫细胞,用 220 μm 的尼龙网过滤,水冲洗后在基本介质中漂洗,然后转入第二酶液(Cellulase RS 1%, Pectolase Y-23 0.01%,牛血清白蛋白 0.25%,抗坏血酸 0.5 mmol L⁻¹,溶于 45% 的基本介质中),在 28℃、45 次 min⁻¹ (振幅 2 cm) 的摇床上消化,根据不同消化时间的保卫细胞状态判断消化程度,一般在 50 min 左右已基本消化完毕。用 30 μm 尼龙网过滤,基本介质冲洗后 60×g 离心 7 min,弃去上清液,再用 50% 基本介质洗涤 2~3 次,最后将原生质体悬浮于悬浮溶液(甘露醇 0.45 mol L⁻¹, CaCl₂ 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 2 mmol L⁻¹, Mes 10 mmol L⁻¹, pH 5.5) 中,0~2℃ 静置恢复。然后在含有原生质体的悬浮溶液中加入 2 mg mL⁻¹ 的 FDA (fluorescein diacetate) 丙酮溶液,使 FDA 的最终浓度为 0.01%,5 min 后在荧光显微镜(Nikon-TE300) 下观察测定保卫细胞原生质体活力,发绿色荧光的为有活性的保卫细胞。

1.4 膜片钳记录全细胞 K⁺ 电流

实验采用室温下常规全细胞记录技术^[11]。保卫细胞原生质体放于含 3 mL 细胞外液(谷氨酸钾 10 mmol L⁻¹, MgCl₂ 2 mmol L⁻¹, CaCl₂ 1 mmol L⁻¹, KOH 1 mmol L⁻¹, Mes 10 mmol L⁻¹, pH 5.5, 用甘露醇

调节渗透压为 460 mOmol kg⁻¹) 的绝绿小培养皿中, 于倒置显微镜 (Nikon-TE 300) 下, 静置恢复 30 ~ 60 min 使原生质体贴壁, 玻璃微电极使用硬质有芯玻璃毛细管 (Kimax-51, Klimble Glass, Vineland, NJ, USA) 并在拉制仪 (PC-10, Narishige) 上控制, 实验前用抛光仪 (MF-900, Narishige) 进行抛光。尖端内径为 1 μm 左右, 内充电极液 (谷氨酸钾 100 mmol L⁻¹, MgCl₂ 2 mmol L⁻¹, KOH 4 mmol L⁻¹, Mg ATP 1.1 mmol L⁻¹, CaCl₂ 0.1 mmol L⁻¹, Hepes 10 mmol L⁻¹, pH 7.2, 用甘露醇调节渗透压为 510 mOmol kg⁻¹), 电极阻抗约为 20 MΩ。通过显微操作系统将电极在加正压情况下轻微压在细胞上, 再加上负压使电极尖端与细胞膜形成高阻封接, 破膜后进行全细胞记录。一般情况下, 高阻封接在 1 ~ 3 GΩ 之间, 使用放大器的电容补偿装置对每个细胞的电容进行快慢电容补偿及测定, 所用细胞慢电容一般在 4.0 ~ 13.0 pF 之间, 刺激电压从 -190 mV 逐级去极化到 +110 mV, 每级为 +20 mV, 维持时间 3 s, 频率为 0.2 Hz。全细胞封接形成 10 min 后采集数据, 使用 EPC-9 膜片钳放大器 (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany) 测定全细胞电流, 使用 PULSE + PULSEFIT 软件采集和分析全细胞电流。在计算全细胞电流-电压关系之前, 首先减去漏电流, 每一实验结果重复 3 ~ 5 次。

2 结果与分析

2.1 SA对蚕豆气孔运动的影响

图1表明, 随SA浓度升高, 其诱导气孔关闭的作用越明显, 1 μmol L⁻¹和100 μmol L⁻¹的SA可分别使气孔开度比对照减小约7%和45%, 而10 mmol L⁻¹的SA诱导气孔关闭达90%左右。SA浓度在1 μmol L⁻¹至1 mmol L⁻¹时其诱导的气孔关闭作用具有可逆性, 当达到10 mmol L⁻¹时气孔的关闭不可逆。细胞活性的FDA检测表明, 当SA浓度在1 μmol L⁻¹至1 mmol L⁻¹时保卫细胞保持良好的活性, 而10 mmol L⁻¹时保卫细胞丧失活性, 表明SA在此浓度时导致的气孔关闭是对细胞伤害的结果。沈文彪等^[1]报道病原菌侵染植物后, 侵染部位和远离侵染部位组织中SA含量分别达到100 ~ 150 μmol L⁻¹和0.5 ~ 9.0 μmol L⁻¹。据此我们认为100 μmol L⁻¹的SA可以作为有效的信号分子在植物抗病性反应中起作用, 并在本文以下的实验中以此作为合适的SA处理浓度。

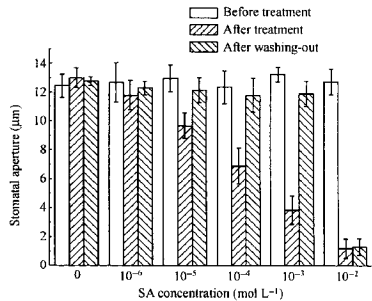


图1 不同浓度SA对气孔开度的影响
Fig.1 Effects of different concentrations of SA on stomatal apertures

2.2 CAT对水杨酸诱导气孔关闭的影响

为探讨H₂O₂是否参与SA诱导的气孔关闭过程, 用H₂O₂的清除酶CAT (20 U mL⁻¹) 和100 μmol L⁻¹的SA同时处理, 结果表明, 20 U mL⁻¹的CAT可明显逆转SA诱导的气孔关闭作用, 在处理后30 ~ 195 min, CAT的逆转作用达83% ~ 90%, 而CAT单独处理时气孔开度比对照增加了5% ~ 9%, 暗示CAT逆转SA诱导的气孔关闭作用可能是由于CAT清除了SA诱导产生的H₂O₂, 而不是由于CAT促进气孔开度增加与SA导致气孔开度减小的简单相加 (图2)。

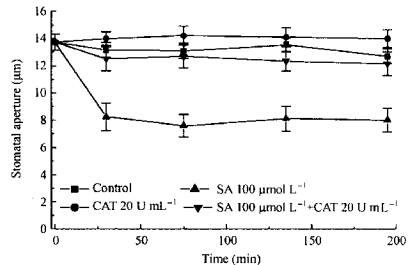


图2 CAT对水杨酸诱导气孔关闭的影响
Fig.2 Effect of CAT on stomatal closure induced by SA

2.3 SA对质膜K⁺通道的影响

2.3.1 保卫细胞原生质体的游离 原生质体的活性状态对封接和记录过程有重要影响。本试验在含牛血清白蛋白、抗坏血酸及适当pH值和渗透压的条件下进行酶解, 减少了酶液对细胞的伤害。由于叶片生长状况、酶试剂批号及操作情况略有不同, 都会影响到原生质体的游离速度, 一般用显微镜观

察酶解情况。撕取的叶片下表皮经第1次酶解后去掉叶肉细胞和表皮细胞。通常在第2次酶解45 min后,原生质体逐渐游离下来,当有大量原生质体出现时停止酶解(图3-A)。得到的原生质体纯度可达

95%以上(显微镜下检测,计算百分比),而且具有圆滑外型,FDA活性检测表明,所得原生质体具有良好活性(图3-B)。

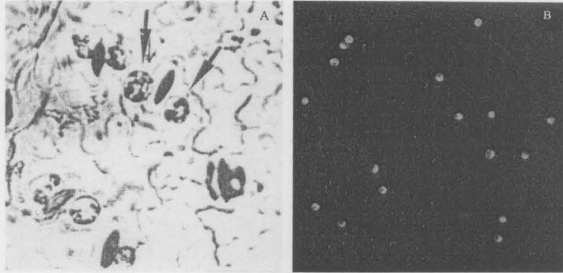


图3 保卫细胞原生质体的游离

Fig.3 Separation of protoplasts from guard cells of *V. faba*

A: 从表皮条分离的原生质体; B: FDA活性检测, 示具良好活性的原生质体。

A: protoplasts were separated from epidermis; B: good viability of protoplasts indicated by FDA.

2.3.2 保卫细胞原生质体全细胞 K^+ 电流特性

本试验用全细胞记录方法记录了蚕豆保卫细胞原生质体全细胞 K^+ 电流。保卫细胞原生质体的细胞外液含 K^+ 10 mmol L^{-1} 、电极液含 K^+ 100 mmol L^{-1} , 当全细胞封装形成后, 电极溶液与细胞质内液达到平

衡时可测得静息膜电位为 $-30 \sim -80 \text{ mV}$ 。图4显示典型电压钳位记录到的整个保卫细胞质膜电流。膜电位钳置在 -52 mV ($V_H = -52 \text{ mV}$), 刺激电压从钳位电压逐渐去极化到 $+110 \text{ mV}$ 时, 激活一定的外向电流, 刺激电压从钳位电压逐步超极化到

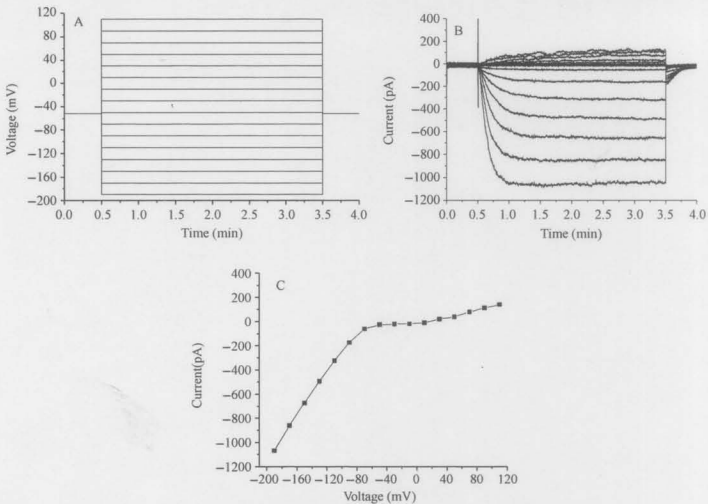


图4 保卫细胞原生质体全细胞 K^+ 电流特性

Fig.4 Characteristic of whole-cell K^+ current of guard cell protoplast

A: 施加给细胞的电压方波; B: 保卫细胞原生质体全细胞电流; C: 在图B中的稳态电压电流曲线。

A: the voltage protocol applied to the cells; B: the whole-cell current of guard-cell protoplasts; C: the steady I-V curve in B.

-190 mV 时, 激活较大的内向全细胞电流(图 4-B), 并根据记录结果对稳态电流作电压-电流(I-V)曲线(图 4-C)。

离子通道尾电流为 0 时的细胞膜电位称为反转电位(E_{rev}), 它和形成该通道电流的离子平衡电位相同。图 5 表明记录到的通道尾电流反转电位为

-60 mV 左右。根据 Nernst 方程对细胞内外液主要离子平衡电位的计算表明, 所记录到的全细胞反转电位接近 K⁺ 的平衡电位(-58 mV)(图 5-B), 而且其全细胞通道电流可被胞外 1 mmol L⁻¹ 的 Ba²⁺ 所抑制(图 6), 因此实验记录到的通道电流是 K⁺ 电流^[12]。

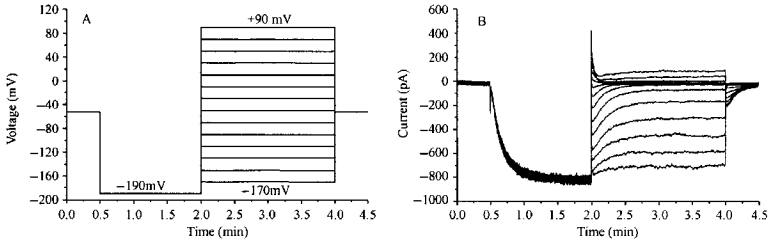


图 5 保卫细胞原生体全细胞尾电流

Fig.5 Characteristic of tail current of guard cell protoplast

A: 施加给细胞的电压方波; B: 原生体全细胞离子通道尾电流。

A: the voltage protocol applied to the cells; B: the tail current of guard-cell protoplasts.

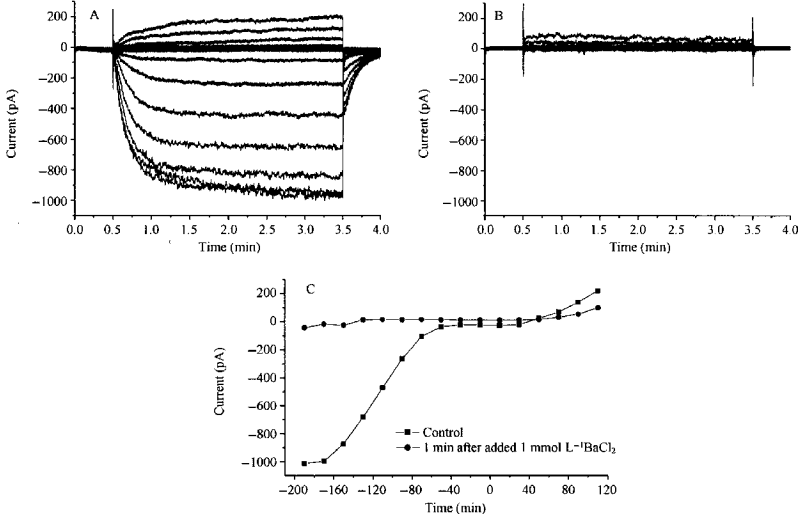


图 6 保卫细胞原生体 K⁺ 通道特性

Fig.6 Characteristic of K⁺-channel of guard cell protoplast

A: 加入 1 mmol L⁻¹ BaCl₂ 前的全细胞电流; B: 加入 1 mmol L⁻¹ BaCl₂ 1 min 后的全细胞电流情况; C: 图 A 和 B 中的稳态电压电流曲线。

A: the whole-cell current before added 1mmol L⁻¹ BaCl₂; B: the whole-cell current 1 min after added 1mmol L⁻¹ of BaCl₂; C: the steady I-V curve in A and B.

2.3.3 SA 对保卫细胞质膜内向 K⁺ 电流的影响
全细胞封接形成后, 静置 10 ~ 15 min 待电流稳定后, 在胞外加入 SA 使其终浓度为 100 μmol L⁻¹, 并

在 SA 处理后跟踪记录全细胞 K⁺ 电流变化情况(记录时间间隔 5 min), 结果表明, SA 处理后 5 min 内向电流开始受到抑制, 并随时间延长抑制程度增加, 20

min时达到最大。电压-电流(I-V)曲线,表明 $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ 的SA可明显抑制质膜内向 K^+ 电流,同时对

照相比在10 min和20 min时抑制程度分别达到37%和70%左右(图7)。

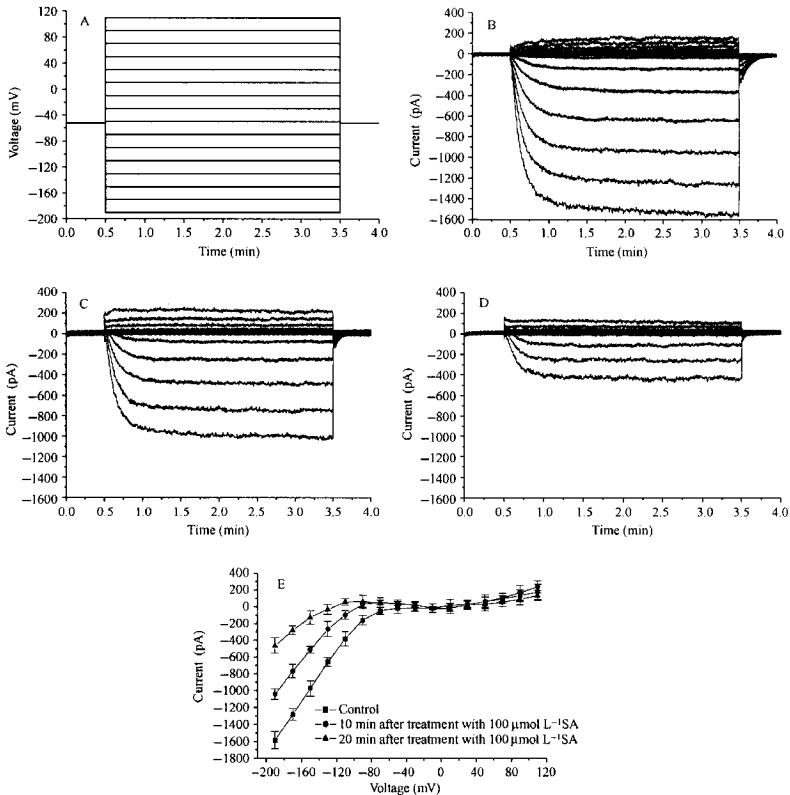


图7 SA对保卫细胞质膜内向 K^+ 电流的影响

Fig.7 Effect of SA on whole-cell K^+ -current of guard cell protoplast

A: 施加给细胞的电压方波; B: 加入外源 $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ SA前的全细胞 K^+ 电流; C, D: 加入外源 $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ SA后10 min和20 min的全细胞 K^+ 电流; E: 图B, C, D中的稳态电压电流曲线($n=5$)。

A: the voltage protocol applied to the cells; B: the whole-cell K^+ current before added exogenous SA $100 \mu\text{mol L}^{-1}$; C and D: the whole-cell K^+ current 10 min and 20 min after added exogenous SA $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively; E: the steady I-V curve in B, C and D. ($n=5$).

2.3.4 H_2O_2 对保卫细胞质膜内向 K^+ 电流的影响
为探讨 H_2O_2 是否介导了SA对保卫细胞质膜内向 K^+ 电流的抑制作用,全细胞封接形成后,静置10 min待电流稳定后在细胞外液中加入 H_2O_2 使其浓度为 $10 \mu\text{mol L}^{-1}$,并跟踪记录电流的变化,结果表明与SA类似, $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ 的 H_2O_2 也可抑制内向 K^+ 电流。做电压-电流(I-V)曲线,表明 $10 \mu\text{mol}$

L^{-1} 的 H_2O_2 在处理10 min和20 min时可分别抑制全细胞内向 K^+ 电流33%和47%左右(图8)。

2.3.5 CAT对SA抑制质膜内向 K^+ 电流的影响

以上实验表明SA和 H_2O_2 均可抑制保卫细胞质膜内向 K^+ 电流,但 H_2O_2 是否介导了SA抑制的保卫细胞 K^+ 电流还不清楚。我们在电极液中加入 20U mL^{-1} 的CAT,在封接形成后静置待电流稳定后在

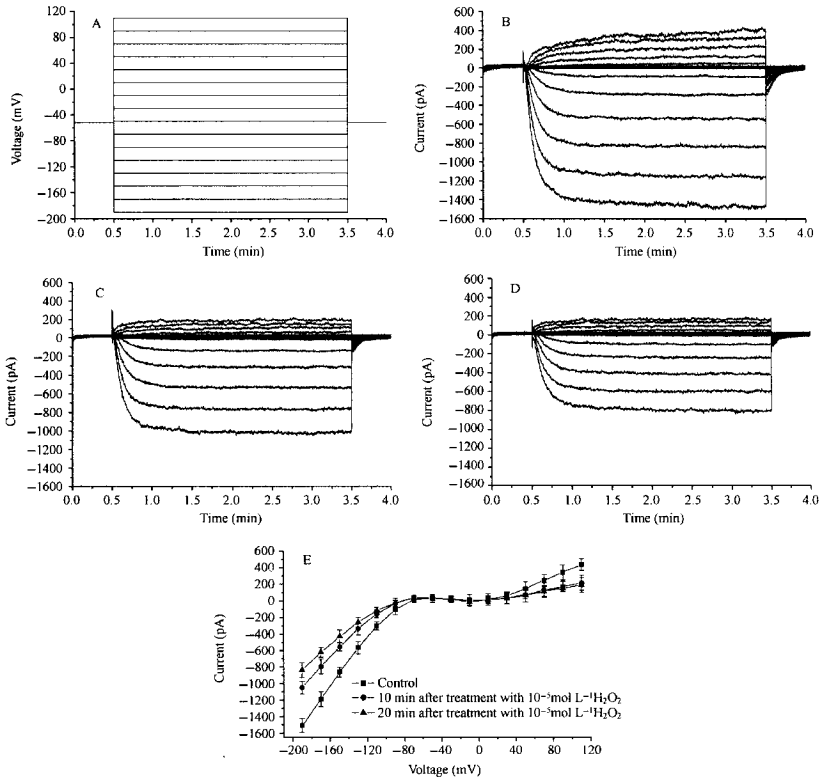


图8 H₂O₂对保卫细胞质膜内向K⁺电流的影响

Fig.8 Effect of H₂O₂ on whole-cell K⁺-current of guard cell protoplast

A:施加给细胞的电压方波;B:加入外源10 μmol L⁻¹ H₂O₂前的全细胞K⁺电流;C、D:加入10 μmol L⁻¹ H₂O₂ 10 min和20 min的全细胞K⁺电流;E:显示B、C、D的稳态电压电流曲线(n=5)。

A: the voltage protocol applied to the cells; B: the whole-cell K⁺ current before added exogenous H₂O₂ 10 μmol L⁻¹; C and D: the whole-cell K⁺ current 10 min and 20 min after added exogenous H₂O₂ 10 μmol L⁻¹, respectively; E: the steady I-V curve in B, C and D (n=4).

胞外溶液中加入SA处理使其终浓度为100 μmol L⁻¹,即在细胞内部存在CAT的情况下观察SA对全细胞K⁺电流的抑制作用。结果表明(图9),CAT可明显逆转SA对全细胞K⁺电流的抑制效应,SA单独处理10 min和20 min后K⁺电流分别被抑制37%和70%左右,而在胞内CAT存在的情况下处理后相同时间时SA仅抑制全细胞内向K⁺电流的13%和33%,而CAT单独存在时对保卫细胞内向K⁺电流无明显影响(结果未列出)。此结果暗示了H₂O₂可能是SA抑制保卫细胞质膜内向K⁺电流的中间介

导成分。

3 讨论

SA是植物体内普遍存在的一种内源信号分子,具有多种生理调节作用。尽管大部分植物病原菌可通过多种途径侵入寄主植物体内,但某些植物病原菌只能通过开放的气孔才能侵染植物。因此,气孔关闭可以限制某些病原体的侵入而有利于植物抗病性的提高^[3]。SA诱导气孔关闭也是其提高植物抗病性的体现之一。大量研究表明,H₂O₂可作为SA

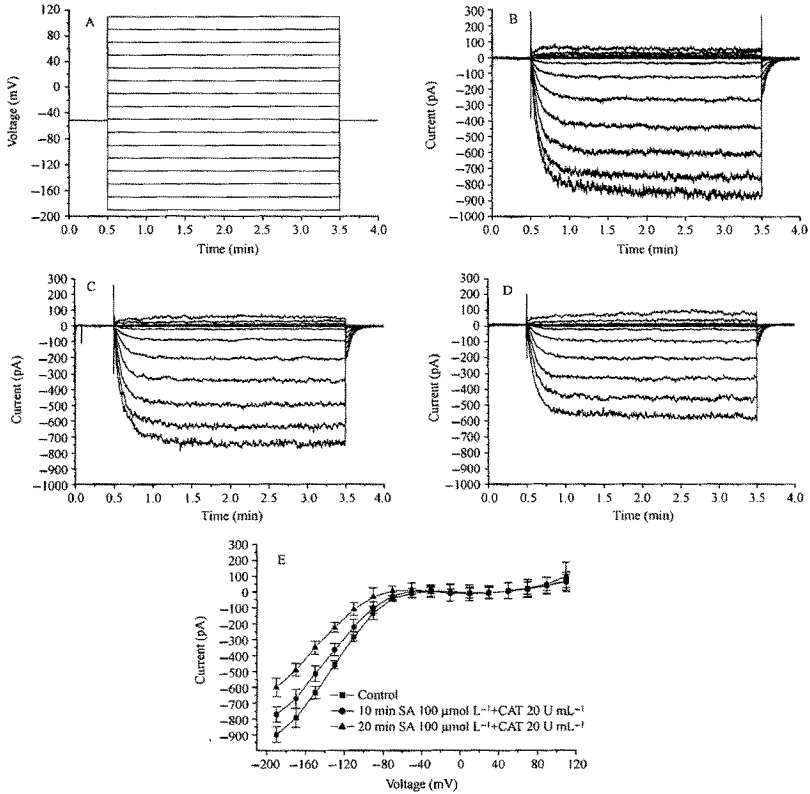


图9 CAT对SA抑制质膜内向K⁺电流的影响

Fig.9 Effect of CAT on whole-cell K⁺ current inhibited by SA

A: 施加给细胞的电压方波; B: 在 20 U mL⁻¹ CAT 作用下, 加入 100 μmol L⁻¹ SA 前的全细胞 K⁺ 电流; C、D: 20 U mL⁻¹ CAT 作用下, 加入 100 μmol L⁻¹ SA 后 10 min、20 min 的全细胞 K⁺ 电流; E: B、C、D 中的稳态电压电流曲线 (n = 5)。

A: the voltage protocol applied to the cells; B: the whole-cell K⁺ current in the presence of CAT 20 U mL⁻¹, internal before added exogenous 100 μmol L⁻¹ SA; C and D: the whole-cell K⁺ current 10 min and 20 min in B after added exogenous 100 μmol L⁻¹ SA, respectively; E: the steady I-V curve in B, C and D (n = 3)。

的下游信号分子在植物的抗病反应中起重要作用^[12], 本文也得到同样结果, 用 20 U mL⁻¹ 的 CAT 与 SA 共同处理气孔表皮条时, CAT 几乎完全 (83% ~ 90%) 逆转了 SA 诱导的气孔关闭作用, 而 CAT 单独处理时气孔开度与对照相比仅增加了 5% ~ 10% 左右, 表明 SA 与 CAT 共同处理时气孔开度并非 SA 和 CAT 单独作用时的简单相加。虽然 Chen 等^[13-15] 提出 SA 可结合过氧化氢酶并抑制其活性, 导致植物体内 H₂O₂ 水平升高, 然而有许多实验表明 SA 在

低浓度时并不与 CAT 结合, 只有在较高浓度时才与 CAT 结合而抑制其活性, 如宋泽双等^[5] 研究发现只有当 SA 浓度高于 3.0 mol L⁻¹ 时过氧化氢酶活性才显著下降。我们推测 CAT 逆转 SA 导致的气孔关闭可能是由于 CAT 清除了 SA 诱导产生的 H₂O₂。

表皮条生物分析表明, SA 在低浓度 (1 ~ 1000 μmol L⁻¹) 时诱导的气孔关闭具有可逆性, 而在高浓度 (10 mmol L⁻¹) 时导致气孔的不可逆关闭是由于高浓度造成了对细胞的伤害。已有报道在被 TMV 感

染的烟草叶片组织中,SA水平可升高10~100倍,达到7~150 $\mu\text{mol}^{[16]}$ 。另外Durner等^[17]也报道被病原菌感染的植物叶片中典型的SA浓度大约为100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 。因此,100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 的SA可明显诱导气孔关闭而且不会造成细胞的伤害。

K⁺跨膜流动可直接调节细胞的膨压,导致气孔关闭。那么在SA作用下,H₂O₂、K⁺通道和气孔关闭在信号转导中的位置和时空关系如何?本文借助膜片钳技术记录了保卫细胞原生质体在不同处理条件下的全细胞K⁺电流。与表皮条分析的结果相一致,SA和H₂O₂均可不同程度地抑制保卫细胞内向K⁺电流(图7,图8),同时说明SA可能通过H₂O₂这个中间成分的介导而抑制保卫细胞内向K⁺电流而使细胞膨压下降,细胞失水最终导致气孔关闭。关于SA作为信号分子参与活性氧代谢的信号转导的细节有待于进一步研究。

4 结论

(1)间接的试验证据验证,SA诱导的气孔关闭过程中可能有H₂O₂的产生。(2)直接实验证据表明,SA可抑制气孔保卫细胞原生质体全细胞内向K⁺电流。(3)H₂O₂可能作为SA抑制保卫细胞质膜内向K⁺电流的中间信号组分。以上结论可简单表示为:SA→保卫细胞内H₂O₂产生→抑制质膜内向K⁺通道→气孔关闭。

References

[1] Raskin I. Role of salicylic acid in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1992, 43 (6): 439-463

[2] Raskin I. Salicylate, a new plant hormone. *Plant Physiol*, 1992, 99: 799-803

[3] Agrios G N. *Plant Pathology*, 4th edn. San Diego: Academic Press, 1997. pp 46-52

[4] Klessig D F, Malamy J. The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol Biol*, 1991, 204 (26): 1439-1458

[5] Song Z-S(宋泽双), Jiang C-Y(江国英), Lu Y-C(卢迎春), Zhu Y-X(朱玉贤). The descent of mRNA gene of catalase by salicylic acid. *Chin Sci Bull(科学通报)*, 1998, 43(4): 422-425

[6] Schwartz A, Wu W H, Tauecker E B, Assmann S M. Inhibition of inward K⁺ channels and stomatal response by abscisic acid: an intracellular locus of phytohormone action. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 4019-4023

[7] Torsethaugen G, Pell R J, Assmann S M. Ozone inhibits guard cell K⁺ channels implicated in stomatal opening. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 13577-13582

[8] Kruse T, Tallman G, Zeiger E. Isolation of guard cell protoplasts from mechanically prepared epidermis of *Vicia faba* leaves. *Plant Physiol*, 1989, 90: 1382-1386

[9] Fairley-Grenet K A, Assmann S M. Whole-cell K⁺ current across the plasma membrane of guard cells from a grass: *Zea mays*. *Planta*, 1992, 186: 282-293

[10] Blom-Zandstra M, Koot H T M, Van Hattum J, Vogelzang S A. Isolation of protoplasts for patch-clamp experiments: an improved method requiring minimal amounts of adult leaf or root tissue from monocotyledonous or dicotyledonous plants. *Protoplasma*, 1995, 185: 1-3

[11] Hamil O P, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth F J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv*, 1981, 391: 85-100

[12] Shen W-B(沈文威), Xu L-L(徐崇莱), Ye M-B(叶茂炳). New progress in plant disease resistance induced by salicylic acid. *Prog Biochem Biophys(生物化学与生物物理进展)*, 1999, 26(3): 237-240 (in Chinese with English abstract)

[13] An G-Y(安国勇), Song C-P(宋纯鹏), Zhang X(张晓), Jing Y-C(荆艳彩), Yang D-M(阳冬梅), Huang M-J(黄美娟), Zhou P-A(周培发), Wu C-H(吴才宏). Effect of peroxide generation on stomatal movement and K⁺ channel on plasma membrane in *Vicia faba* guard cell. *Acta Phytophysiol Sin(植物生理学报)*, 2000, 26: 458-464 (in Chinese with English abstract)

[14] Chen Z X, Klessig D F. Identification of a soluble salicylic acid-binding protein that may function in signal transduction in the plant disease resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 8179-8183

[15] Chen Z X, Malamy J, Henning J. Induction, modification and transduction of the salicylic acid signal in plant defense responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 4134-4137

[16] Conrath U, Chen Z X, Ricigliano J R, Klessig D F. Two inducers of plant defense responses, 2, 6-dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 7143-7147

[17] Durner J, Klessig D F. Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2, 6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 11312-11316

[18] Duke N. The oxidative burst: roles in signal transduction and plant stress. In: Scandalios J G eds. *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. pp 785-813

[19] Lee S, Choi H, Suh S, Doo I S, Oh K Y, Choi E J, Taylor A S, Low P S, Lee Y. Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. *Plant Physiol*, 1999, 121: 147-152

[20] Levine A, Tenhaken R, Dixon R A, Lamb C. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive response. *Cell*, 1994, 79: 583-593

[21] Kawano T, Sahashi N, Takahashi K, Uozumi N, Muto S. Salicylic acid induces extracellular superoxide generation followed by an increase in cytosolic calcium ion in tobacco suspension culture: the earliest events in salicylic acid signal transduction. *Planta Cell Physiol*, 1998, 39: 721-730

[22] Leon J, Lawton M A, Raskin I. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol*, 1995, 108: 1673-1678

[23] Manthe B, Schulz M, Schnabl H. Effects of salicylic acid on growth and stomatal movements of *Vicia faba* L.: evidence for salicylic acid metabolism. *J Chem Ecol*, 1992, 18: 1525-1539

[24] Rao M V, Paliyath G, Ormrod D P, Murr D P, Watkins C B. Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress and H₂O₂-metabolizing enzymes. *Plant Physiol*, 1997, 115: 137-149