

# 外源一氧化氮供体硝普钠对红树植物桐花树气孔运动的调控效应\*

肖强<sup>1,2</sup>, 林晓梅<sup>2</sup>, 吴飞华<sup>2</sup>, 陈娟<sup>2</sup>, 郑海雷<sup>2\*\*</sup>

(1 湖北省生物资源保护与利用重点实验室、湖北民族学院, 湖北恩施 445000;

2 厦门大学生命科学学院, 福建厦门 361005)

**摘要:** 探索一种用材简单、操作方便、真实性强的观察红树植物桐花树叶片气孔的制片技术, 并利用该技术研究不同浓度、不同处理时间的一氧化氮 (NO) 供体硝普钠 (sodium nitroprusside, SNP) 对桐花树气孔开闭的影响, 探讨了 NO 调控的气孔运动与外源  $\text{Ca}^{2+}$  的关系以及 NO 与  $\text{H}_2\text{O}_2$  在调节气孔运动过程中的关系。结果表明: 在搅碎法、指甲油印迹法、牛皮胶印迹法三种观察气孔方法中, 牛皮胶印迹法是观察气孔开度变化的最佳方法。NO 能够诱导桐花树气孔快速关闭, 且表现出明显的时间效应与浓度效应。NO 导致的气孔关闭与  $\text{Ca}^{2+}$  的参与有密切关系, NO 与  $\text{H}_2\text{O}_2$  存在明显的协同效应, 可以促进气孔关闭。

**关键词:** 一氧化氮; 桐花树; 气孔; 钙;  $\text{H}_2\text{O}_2$

中图分类号: Q 945.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700 (2009) 02-166-07

## Effect of Exogenous Nitric Oxide Donor Sodium Nitroprusside on Stomatal Movement in Leaves of Mangrove Plant *Aegiceras corniculatum*

XIAO Qiang<sup>1,2</sup>, LIN Xiao-Mei<sup>2</sup>, WU Fei-Hua<sup>2</sup>, CHEN Juan<sup>2</sup>, ZHENG Hai-Lei<sup>2\*\*</sup>

(1 Key Laboratory of Biological Resources Protection and Utilization of Hubei Province, Hubei University for Nationalities,

Enshi 445000, China; 2 School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** The aim of the present paper was to find out a simple and easy-to-go method to observe the stomatal movement of a mangrove plant *Aegiceras corniculatum*. The new method was used to study the following areas, including the effect of exogenous nitric oxide (NO) on the leaf stomatal movement under different concentrations and different treated time, the effect of  $\text{Ca}^{2+}$  in the regulation of stomatal movement induced by exogenous NO, the interactional effect between NO and  $\text{H}_2\text{O}_2$  in the regulation of stomatal movement. The results suggested that the oxhide pastern print was the best way to observe stomatal movement of *A. corniculatum* compared with the blender method and the nail enamel print method. The stomatal closure induced by NO was associated with  $\text{Ca}^{2+}$  in dose dependent manner. It was also proved that a rapid stomatal closure could be co-induced by NO and  $\text{H}_2\text{O}_2$  in *A. corniculatum* guard cells.

**Key words:** Nitric oxide; *Aegiceras corniculatum*; Stomata; Calcium; Hydrogen peroxide

一氧化氮 (nitric oxide, NO) 是植物体内广泛存在的信号分子, 对植物生长发育、胁迫应答等生理过程发挥重要的调控功能 (肖强和郑海雷, 2004)。研究表明, 外源 NO 供体硝普钠 (so-

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (30770192, 30670317); 厦门大学“新世纪优秀人才支持计划”项目 (X07115); 湖北民族学院博士启动基金项目

\*\* 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: zhenghl@xmu.edu.cn

收稿日期: 2008-10-27, 2009-01-15 接受发表

作者简介: 肖强 (1970-) 男, 博士, 研究方向为植物生理生化。Tel: 15971698508, E-mail: xiaoqiang761@tom.com

dium nitroprusside, SNP) 处理可以促进离体小麦叶片气孔关闭, 降低蒸腾速率, 提高保水能力, 减少植物暴露于缺水胁迫下的细胞损伤 (García-Mata and Lamattina, 2001); NO 参与茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 引起的蚕豆气孔关闭 (Xin 等, 2003)。ABA 亦可以诱导豌豆保卫细胞 NO 的迅速合成 (Neill 等, 2002, 2008), 在拟南芥 (Desikan 等, 2002) 和蚕豆 (García-Mata and Lamattina, 2002) 中也发现了同样的现象。但在拟南芥悬浮培养物中, ABA 不能诱导 NO 的合成 (Tun 等, 2001), 表明 ABA 诱导的 NO 合成具有组织特异性。

红树林为自然分布于热带和亚热带海岸潮间带的木本植物。通常生长在港湾河口地区的淤泥质滩涂上, 是海滩上特有的森林类型。红树林生态系统处于海洋与陆地的动态交界面, 周期性遭受海水浸淹的潮间带环境, 使其在结构和功能上具有既不同于陆地生态系统也不同于海洋生态系统的特性, 作为独特的海陆边缘生态系统在自然生态平衡中起着特殊的作用。在对红树植物气孔的研究中, 国外学者对分布在印度的木榄等 22 种真红树和 7 种伴生植物的气孔特征以及海漆等 5 种真红树植物气孔的发育进行过研究 (Das and Ghose, 1993)。国内对红树林及海岸植物气孔研究较少, 林鹏 (1984) 研究了土壤盐度对桐花树叶片形态结构影响, 认为盐度会引起气孔数目变化; 缪绅裕和王厚麟 (2001) 对分布在广东大亚湾海岸带的红树林及海岸植物叶片气孔特征进行了研究, 结果表明: 大部分植物仅下表皮具气孔; 气孔类型有无规则、平列、环绕、横列和四轮列型; 气孔指数和气孔密度在不同植物间变化较大, 气孔特征及其发育表现出生活于相同海岸带的不同植物既有相似性又有多多样性。红树林湿地是一个典型的还原性环境, 易生成大量的 NO, 因而研究 NO 对红树植物气孔的影响具有重要的意义。但迄今为止, 还未见有关 NO 对红树植物气孔调控的报道。

由于红树植物的叶片具有发达的叶肉组织, 要观察红树植物的气孔比较困难, 本研究旨在探索一种用材简单、操作方便、真实性强的制片技术, 并在此基础上研究不同浓度、不同时间的 SNP 处理对桐花树气孔开闭的影响, 研究 NO 在调控气孔运动中与外源  $\text{Ca}^{2+}$  的关系, 即  $\text{Ca}^{2+}$  在

NO 介导的气孔运动中的作用, 分析 NO 与  $\text{H}_2\text{O}_2$  在调节气孔运动过程中的关系, 为深入了解 NO 对红树植物的生理作用和作用机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

成熟的桐花树 (*Aegiceras corniculatum*) 果实采自福建九龙江口龙海县浮宫镇草埔头村红树林自然保护区, 经消毒清洗后播种于装有厚约 10 cm 的洗净砂子的塑料盆中, 每天浇自来水保持砂基浸没, 自然光照下培养, 第一对真叶展开后每周补充一次 Hoagland 营养液。幼苗长至两对叶片时小心冲去根部砂子, 以 Hoagland 溶液水培, 昼夜温度分别为  $24\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$  和  $18\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ , 光强为  $120\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 每日光照 12 h, 两周后取第一对嫩叶进行相关研究。

### 1.2 材料处理

研究 NO 对气孔关闭过程的影响及 NO 的时间效应时, 首先把叶片用蒸馏水洗净, 浸没于 Mes 缓冲液 (10 mmol/L Mes/KOH, 50 mmol/L KCl, pH 6.15) 中, 光照处理 2 h 使气孔张开, 然后将这些叶片随机分组, 其中一部分转移至用 Mes 缓冲液配置的不同浓度 SNP 溶液中, 余下的仍留在原缓冲液中作为对照组。在光下分别处理 0.5 h、1 h、2 h、3 h 后显微镜下观察气孔开度并拍照记录。

研究 NO 清除剂血红蛋白 (Hb) 对气孔关闭过程的影响时, 操作同上, 只是在用 Mes 缓冲液配置的不同浓度 SNP 溶液中加入 1% 的 Hb 溶液处理 2 h。

研究  $\text{Ca}^{2+}$  与 NO 诱导气孔关闭效应的关系时, 操作同上, 只是在用 Mes 缓冲液配置的不同浓度 SNP 溶液中加入 0.1 mmol/L 和 2 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  溶液处理 2 h。

研究  $\text{H}_2\text{O}_2$  对气孔关闭过程的影响时, 操作同上, 只是在 Mes 缓冲液中加入 0、0.01、0.1 和 1 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液处理 2 h。

研究外源  $\text{Ca}^{2+}$ 、NO 与  $\text{H}_2\text{O}_2$  对气孔运动调节的协同效应时, 先在光下处理叶片使气孔张开, 然后将这些叶片随机分为 6 组, 分别浸没在以下 6 种溶液中, 继续在光下处理 2 h 后显微镜下观察气孔开度并拍照记录。

- (1) Mes 缓冲液;
- (2) 含 0.1 mmol/L SNP 的 Mes 缓冲液;
- (3) 含 0.1 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  的 Mes 缓冲液;
- (4) 含 2 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ 、0.1 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  的 Mes 缓冲液;
- (5) 含 0.1 mmol/L SNP 和 0.1 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  的 Mes 缓冲液;
- (6) 含 2 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ 、0.1 mmol/L SNP 和 0.1 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  的 Mes 缓冲液处理。

### 1.3 气孔观察取材玻片制备方法

#### 1.3.1 搅碎法

将桐花树叶片剪碎放入搅拌机中，加入少许蒸馏水搅拌 45~60 s，滤网过滤，将残留在滤网上的碎片轻轻沾在载玻片上，尽量将碎片散开，盖上盖玻片，避免气泡产生。

1.3.2 印迹法

1.3.2.1 牛皮胶印迹法 称取牛皮胶 5~10 g，加水 100 ml，置水浴锅中加热使成溶胶，用干净毛笔在红树叶片下表皮均匀地轻刷一薄层牛皮溶胶，待胶膜干后，用镊子取下凝成的薄膜，置于载玻片上，盖上盖玻片。

1.3.2.2 指甲油印迹法 用指甲油代替牛皮胶溶胶，其余方法同上。

1.4 气孔开度的测定

将载有气孔印迹的玻片置显微镜下用 4×40 倍观察气孔开度的变化，拍照，照片用 SigmaScan Pro 软件测定气孔的宽度和长度，计算宽长比，以表示气孔开度。根据 250~300 个气孔开闭度统计其平均值与标准误 (SE) (Pei 等, 1997; Roelfsema and Prins, 1995)。

1.5 数据分析

数据用 SPSS 软件进行方差分析，以 Origin 软件绘制图表。

2 结果与分析

2.1 不同气孔取样方法的比较

图 1 显示采用搅碎法、指甲油印迹法、牛皮胶印迹法制取玻片观察 0、0.2、1、10、100 和 500  $\mu\text{mol/L}$  SNP 处理 2 h 后桐花树气孔的开闭情况。从中可见搅碎法和牛皮胶印迹法之间所得到的气孔开度值差异不显著，而用指甲油法制样观测的气孔开度则明显偏低。进一步选取 SNP 浓

度为 0 和 100  $\mu\text{mol/L}$  时桐花树叶片气孔开度来评价三种方法，可以明显看出用搅碎法和牛皮胶印迹法并没有差别，而用指甲油印迹法观察 SNP 为 0 处理组中的气孔开度明显偏低 (图 2)，其原因在于印迹时有一部分指甲油扩散渗入到气孔内而产生印膜，扩大了气孔的印迹范围，在压片时，扩展到气孔内的印膜被压平伸展，导致观察时气孔的纵横径和开张面积变小。

为进一步分析三种方法的特点，就制片所需时间、最大取样面积、取样面积占叶面积的百分数、取样定位性、压片清晰度以及气孔真实性等方面对三种不同方法进行进一步分析比较 (表 1)。

一般说来取样面积 (撕下的叶片表皮总面积或印迹总面积) 和取样定位性在研究气孔分布规律时非常重要 (封涛和胡东, 2008)。取样面积占叶片面积的比值越大，说明撕取表皮或印迹的能力越强，在压片时对观察部位的选择余地越大，越有利于叶片气孔的定位观察和研究。从表 1 可以看出：牛皮胶印迹法、指甲油印迹法的取样能力和定位性最好，基本可以达到全叶面任一部位取样；搅碎的方法取样能力和定位性能较差，取样面积一般只占叶片面积的 1%~5%，很难达到定位取样的目的。压片的清晰程度和气孔的真实性对观察和研究结果有重要影响。搅碎法及牛皮胶印迹法观察气孔的真实性和清晰程度高；而用指甲油印迹法制作的切片只能反映气孔的基本轮廓和开闭状态，切片的真实性和清晰程度差。

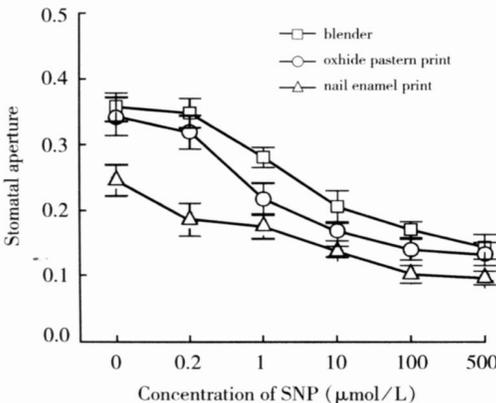


图 1 三种不同气孔取样方法下不同浓度 SNP 处理对气孔开闭的影响

Fig. 1 Effects of different SNP concentration on stomatal aperture by three sampling methods

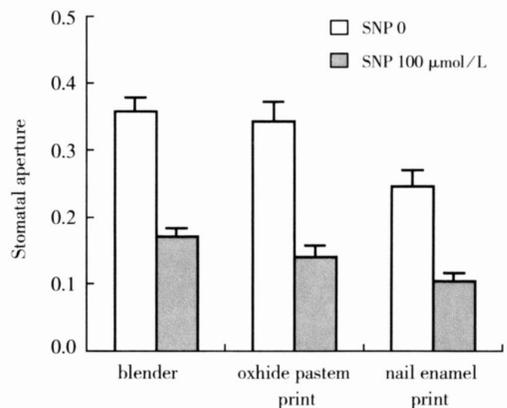


图 2 三种不同气孔取样方法对特定浓度 SNP 处理下气孔开闭的影响

Fig. 2 Effect of different sampling methods to stomatal aperture under specific SNP concentration

表1 不同气孔取样方法的对比分析

Table 1 Comparison of different methods of observing stoma

方法	制片所需时间 (min/张)	最大取样面积 (mm <sup>2</sup> )	取样面积占叶面积 的百分数 (%)	取样定位性	压片清晰度	气孔真实性
搅碎法	10~ 20	约为6	1~ 5	差	高	好
指甲油印迹法	4~ 6	接近叶面积	80~ 100	好	低	差
牛皮胶印迹法	8~ 10	接近叶面积	80~ 100	好	高	较好

综上所述, 我们可以把搅碎法与印迹法的优劣归纳如下:

1、搅碎法虽然能够较真实地反映气孔的真实大小, 但是其取样能力和定位性能差, 观察到的气孔都是随机的, 很难达到定位取样的目的。而且搅碎法比较适用于幼嫩叶片, 对于红树植物这种具有革质且有比较发达叶肉组织的叶片, 要用搅碎法得到单层细胞比较困难。

2、牛皮胶印膜韧性较大, 针挑、镊夹及封片时均不易破碎; 风干后的薄膜均匀平整, 镜检时十分清晰, 但如膜层太厚, 则封片较困难; 此外, 牛皮胶印迹所用胶液成本低, 配制简便, 成膜快慢适中, 且由于是水溶液, 所以不致伤害植物组织, 可在同一组织的表面作连续印膜取样。但是其膜风干所需的时间较长。

3、指甲油印迹法, 由于在印迹时有一部分指甲油扩散渗入到气孔内而产生印膜, 扩大了气孔的印迹范围, 在压片时, 扩展到气孔内的印膜被压平伸展, 导致观察时气孔的纵横径和开张面积变小; 同时, 胶膜的收缩性强, 气孔印迹因胶膜的收缩变形而发生相应的变形, 使气孔的大小和开张度发生变化, 导致结果出现偏差。

综合比较上述三种气孔取样方法, 我们认为牛皮胶印迹法是观察桐花树叶片气孔开度变化的最佳方法。所以, 在下面的实验中均采用牛皮胶印迹法观察气孔。

## 2.2 NO对桐花树叶片气孔运动的影响

从图3中可以看出, 在一定浓度范围(0~1000  $\mu\text{mol/L}$ )内, NO可诱导气孔快速关闭, 且具有明显的浓度和时间效应, 随浓度升高、时间延长, 其诱导气孔关闭的作用越明显。加入SNP 2 h后, SNP浓度为0.2、1、10、100、500和1000  $\mu\text{mol/L}$ 的叶片气孔开度分别较加入SNP 0.5 h时下降3.7%、22.2%、33.7%、30.0%、28.9%和32.1%, 较加入SNP 1 h时下降1.3%、10.3%、

25.0%、24.3%、13.1%和21.0%, 说明NO对气孔的影响具有时间累积的效应。

从图3还可以看出, 加入SNP的前两个小时, 对照组的气孔开度并没有发生显著的变化, 我们可以推测出在这段时间内加入SNP后气孔开度的变化是SNP发挥作用的结果, 而加入SNP 3 h以后, 对照组的气孔开度发生了明显的变化, 并且SNP的浓度效应并不显著, 表明光照、温度等其它环境因素对桐花树气孔开度的变化也产生了影响。

综上所述, 我们可以推测出加入SNP后2 h是观测NO对气孔运动影响的最佳时间。其中SNP浓度为0.2、1、10、100、500和1000  $\mu\text{mol/L}$ 处理的气孔开度分别较对照组下降4.5%、34.9%、49.5%、57.9%、59.9%和65.8%。

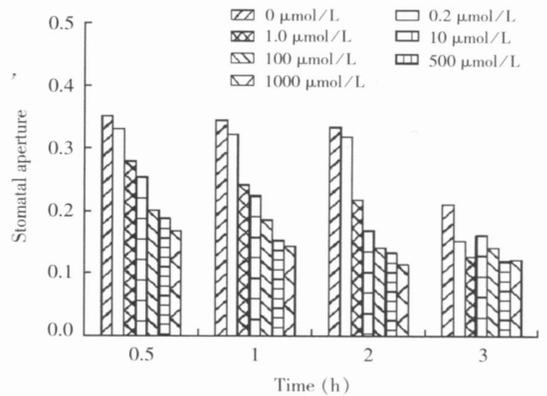


图3 不同浓度NO对桐花树叶片气孔关闭的诱导

Fig. 3 Stomatal closure induced by different concentration of NO in *A. carnialutum* leaves

## 2.3 NO清除剂Hb对桐花树叶片气孔运动的影响

从图4中可以看出, 在MES缓冲液中同时加入不同浓度的SNP及1%血红蛋白(Hb)处理2 h后, 几乎能够完全抵消NO诱导气孔关闭效应; 同时加入NO和Hb后, 桐花树气孔能够基本恢复到对照水平, 进一步说明NO具有诱导气孔关闭的作用。

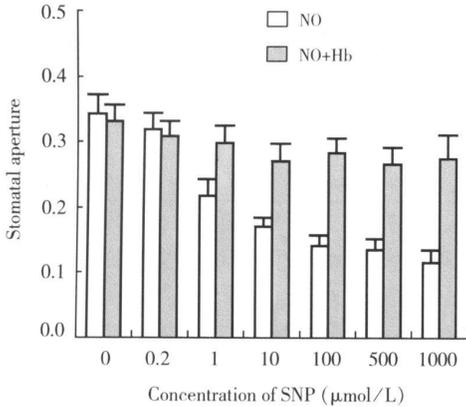
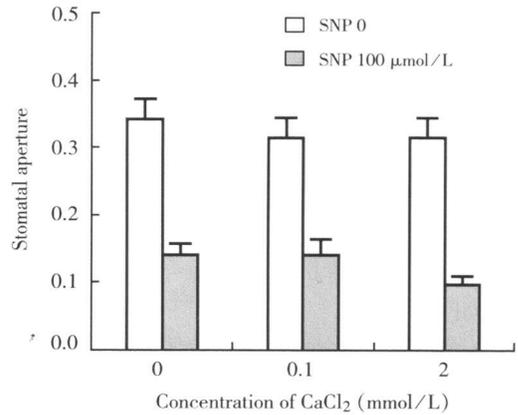


图4 NO及Hb对桐花树气孔关闭的诱导

Fig. 4 Stomatal closure induced by NO and Hb

图5 Ca<sup>2+</sup>对NO诱导气孔关闭的影响Fig. 5 Effect of Ca<sup>2+</sup> on stomatal closure induced by NO

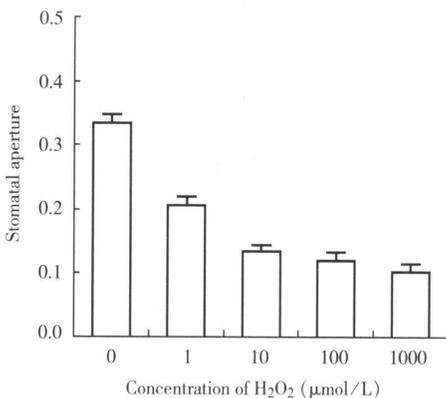
## 2.4 Ca<sup>2+</sup>对NO诱导气孔关闭的影响

已有报道指出Ca<sup>2+</sup>在NO调控气孔运动中发挥重要作用, Ca<sup>2+</sup>可能是NO信号途径的主要成员(García-Mata等, 2003)。图5显示在无外源Ca<sup>2+</sup>的缓冲液中, NO具有诱导气孔关闭效应, 在含有0.1 mmol/L Ca<sup>2+</sup>的缓冲液中, NO诱导气孔关闭效应略为加强; 当Ca<sup>2+</sup>浓度增加到2 mmol/L时, 气孔开度更加减小, 表明一定浓度Ca<sup>2+</sup>可以增强NO诱导气孔关闭效应。

## 2.5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对气孔运动的影响

图6显示H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>能够诱导气孔关闭, 在这一过程中, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的作用表现出明显的浓度剂量效应, 在0~1000 μmol/L浓度范围内, 随浓度的升高对气孔关闭诱导效应增强。

## 2.6 Ca<sup>2+</sup>、NO和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对气孔运动的协同作用

图6 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对气孔运动的影响Fig. 6 Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on stomatal aperture

有报道指出, 在ABA诱导气孔关闭过程中, 保卫细胞的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量上升(苗雨晨等, 2000; Neill等, 2008), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>可能是通过抑制保卫细胞质膜的K<sup>+</sup>通道, 减少K<sup>+</sup>进入保卫细胞, 或者加强K<sup>+</sup>流出保卫细胞来促进气孔关闭(安国勇等, 2000)。研究还发现H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>能引起保卫细胞中游离Ca<sup>2+</sup>增加, 而且EGTA能消除H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对气孔开放的抑制作用, 这些暗示Ca<sup>2+</sup>可能也参与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>促进气孔关闭的过程(安国勇等, 2000)。

为了进一步了解Ca<sup>2+</sup>、NO和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对气孔运动的协同作用, 对桐花树叶片作组合处理, 如图7所示, 100 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理显著诱导了桐花树气孔关闭, 100 μmol/L SNP处理也可以显著诱导气孔关闭, 当两者共同作用于桐花树叶片时, 其诱导气孔关闭效应进一步增强。外加2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>时, 可以增强100 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理诱导的气孔关闭; 同样, 外加2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>也可以增强100 μmol/L SNP处理诱导的气孔关闭效应; 2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>、100 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和100 μmol/L SNP联合作用时, 气孔开度抑制效应达到最大。这些结果暗示, 在对桐花树叶片气孔运动调控中, NO作用和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>以及Ca<sup>2+</sup>之间存在复杂联系。

## 3 讨论

气孔是蒸腾过程中水份从体内排到体外的主要通路, 也是光合作用和呼吸作用与外界气体交换的门户, 影响着蒸腾、光合、呼吸等一系列生理过程。气孔运动与各种环境因素有关, 如光照

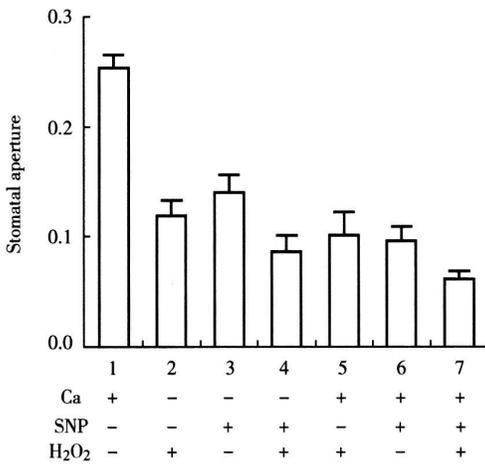


图 7 不同处理对气孔开闭的影响

Fig. 7 Effect of different treatment on stomatal aperture

(1: 2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>; 2: 100 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 3: 100 μmol/L SNP; 4: 100 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 100 μmol/L SNP; 5: 2 mmol/L CaCl<sub>2</sub> + 100 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 6: 2 mmol/L CaCl<sub>2</sub> + 100 μmol/L SNP; 7: 2 mmol/L CaCl<sub>2</sub> + 100 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 100 μmol/L SNP)

水势、CO<sub>2</sub> 浓度等, 也与细胞内的离子、pH、激素、细胞信号传递等代谢调控有关。植物通过多种适应机制来避免渗透胁迫造成的伤害, 一些小分子信号物质在这些过程中起着关键的调节作用。研究表明, NO 能够诱导桐花树气孔的快速关闭, 在这一过程中, NO 的作用表现出明显的时间效应与浓度剂量效应; 与此同时, NO 诱导的气孔关闭与一定浓度 Ca<sup>2+</sup> 的参与有密切关系, 其可能的机理是 NO 诱导了胞外 Ca<sup>2+</sup> 内流或者胞内钙库中 Ca<sup>2+</sup> 的释放; NO 与另一气孔运动调节分子 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在明显的协同效应, 可以进一步促进气孔关闭。

Schroeder and Hagiwara (1989) 采用膜片钳技术研究了大豆保卫细胞气孔运动, 证实 Ca<sup>2+</sup> 浓度上升促进气孔关闭而抑制其张开, 其机制在于胞质中 Ca<sup>2+</sup> 浓度升高时, K<sup>+</sup> 内流通道受阻, K<sup>+</sup> 的内流也随之受阻, 导致胞质中 K<sup>+</sup> 浓度不能升高, 从而抑制气孔张开。进一步研究表明, 胞质 Ca<sup>2+</sup> 浓度的瞬时变化引起保卫细胞质膜的膜电位改变, 而膜上的 K<sup>+</sup> 通道是电压门控的, 外向 K<sup>+</sup> 通道打开, 胞内 K<sup>+</sup> 外流, 引起气孔关闭。Vandelle 等 (2006) 证实: 在 grapevine 细胞中, 激发子 BcPG1 激活 Ca<sup>2+</sup> 从质外体内流, 引起胞

内自由钙浓度上升, 通过蛋白激酶途径促进 NO 产生, 而 NO 通过激活胞内钙库释放 Ca<sup>2+</sup> 以及调节钙通过质膜外流来维持胞内钙平衡。进一步研究表明, NO 引起的胞内钙释放受到蛋白磷酸化的调控 (Sokolovski 等, 2005)。在本研究中, 无外源 Ca<sup>2+</sup> 的缓冲液中 NO 仍可明显诱导气孔关闭, 暗示可能此时胞内钙库中 Ca<sup>2+</sup> 释放到细胞质中促使胞质中 Ca<sup>2+</sup> 浓度升高从而诱导气孔的关闭; 在含有 0.1 mmol/L Ca<sup>2+</sup> 的缓冲液中, NO 对气孔的抑制作用并没有显著地增强, 推测是由于 NO 通过调节胞内钙平衡维持气孔开闭状态; 而当 Ca<sup>2+</sup> 浓度增加到 2 mmol/L 时, 气孔开度明显减小, 说明一定浓度的外源 Ca<sup>2+</sup> 对 NO 诱导气孔关闭具有较强的促进作用。

在植物中, NO 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的相互作用已得到证实 (Neill 等, 2002; Desikan 等, 2002)。Delledonne 等 (1998) 揭示在蚕豆悬浮细胞中诱导细胞过敏反应 (hypersensitive response, HR) 需要 NO 和 ROS 两者之间达到某种平衡。Lum 等 (2002) 发现绿豆保卫细胞中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作为上游信号, 可以诱导 NO 产生, 进一步研究证实 ABA 诱导的 NO 产生是经由 Ca<sup>2+</sup> 介导的。Bright 等 (2006) 研究也表明: 在拟南芥中, ABA 诱导的 NO 合成和气孔关闭是依赖于 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 合成的。进一步研究证实: 在调控气孔运动上 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 NO 之间存在互为因果的关系, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可通过促进 NO 的形成进而诱导气孔关闭, 同时, 一定浓度的 NO 又可引起 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水平提高 (刘新等, 2003; Neill 等, 2008)。

在我们的研究中, NO 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 之间存在明显的协同效应, 可以进一步促进气孔关闭, 而一定浓度 Ca<sup>2+</sup> 的参与也和 NO 诱导的气孔关闭存在密切联系。Murata 等 (2001) 和 Desikan 等 (2002) 的研究结果表明: 在 ABA 信号转导途径中, NO 的作用位置可能位于 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的上游, 磷酸酶和 Ca<sup>2+</sup> 也参与了这一信号转导过程。但也有研究证实, 在 ABA 诱导气孔关闭过程中, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可能在 NO 的上游起作用并受 NO 的负反馈调节 (吕东等, 2005); 由此可见, 各种信号分子在气孔保卫细胞信号转导中存在广泛联系, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 NO 的信号交叉以及气孔运动过程中 NO 和 Ca<sup>2+</sup> 的信号交叉也存在于红树植物。

## 4 小结

1、探索了一种用材简单、操作方便、真实性强的观察红树植物桐花树叶片气孔的制片技术,证明在搅碎法、指甲油印迹法、牛皮胶印迹法三种观察气孔方法中,牛皮胶印迹法是观察气孔开度变化的最佳方法。

2、基于上述技术对桐花树气孔运动的研究表明: NO 能够诱导桐花树气孔的快速关闭,并且 NO 的作用表现出明显的时间效应与浓度效应; NO 诱导的气孔关闭与一定浓度  $\text{Ca}^{2+}$  的参与有密切关系;进一步, NO 与  $\text{H}_2\text{O}_2$  之间也存在明显的协同效应,可以促进气孔关闭。

## 〔参 考 文 献〕

- 林鹏, 1984. 红树林 [M]. 北京: 海洋出版社, 26—34
- An GY (安国勇), Song CP (宋纯鹏), Zhang X (张骁) *et al.*, 2000. Effect of peroxide generation on stomatal movement and  $\text{K}^+$  channel on plasma membrane in *Vicia faba* guard cell [J]. *Acta Phytophysiologica Sinica* (植物生理学报), **26** (5): 458—464
- Bright J, Desikan R, Hancock JF *et al.*, 2006. ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on  $\text{H}_2\text{O}_2$  synthesis [J]. *Plant Journal*, **45** (1): 113—122
- Das S, Ghose M, 1993. Morphology of stomata and leaf hair of some halophytes from Sundarbans, West Bengal [J]. *Phytomorphology*, **43** (1-2): 59—70
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA *et al.*, 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance [J]. *Nature*, **394**: 585—588
- Desikan R, Griffiths R, Hancock J *et al.*, 2002. A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**: 16314—16318
- Feng T (封涛), Hu D (胡东), 2008. An improving method for observation of the stomata on monocotyledon [J]. *Bulletin of Botanical Research* (植物研究), **28** (1): 82—84
- García-Mata C, Gay R, Sokolovski S *et al.*, 2003. Nitric oxide regulates  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$  channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100** (19): 11116—11121
- García-Mata C, Lamattina L, 2001. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress [J]. *Plant Physiology*, **126**: 1196—1204
- García-Mata C, Lamattina L, 2002. Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells [J]. *Plant Physiology*, **128**: 790—792
- Liu X (刘新), Zhang SQ (张蜀秋), Lou CH (娄成后), 2003. Signal pathway cross of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and NO in controlling stomatal movement [J]. *Progress in Natural Science* (自然科学进展), **4**: 355—359
- Lum HK, Butt YK, Lo SC, 2002. Hydrogen peroxide induces a rapid production of nitric oxide in mung bean (*Phaseolus aureus*) [J]. *Nitric Oxide*, **2**: 205—213
- Lv D (吕东), Zhang X (张骁), Jiang J (江静) *et al.*, 2005. NO may function in the downstream of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in ABA-induced stomatal closure in *Vicia faba* L. [J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* (植物生理与分子生物学学报), **31** (1): 62—70
- Miao SY (缪绅裕), Wang HL (王厚麟), 2001. Stomatal characteristics and its development of leaves in mangroves and coastal plants at Daya Bay [J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait* (台湾海峡), **20** (2): 251—258
- Miao YC (苗雨晨), Song CP (宋纯鹏), Dong FC (董发才) *et al.*, 2000. ABA induced hydrogen peroxide generation in guard cells of *Vicia faba* [J]. *Acta Phytophysiologica Sinica* (植物生理学报), **26** (1): 53—58
- Murat A Y, Pei ZM, Mori IC *et al.*, 2001. Abscisic acid activation of plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants [J]. *Plant Cell*, **13**: 2513—2523
- Neill SJ, Barros R, Bright J *et al.*, 2008. Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress [J]. *Journal of Experimental Botany*, **59**: 165—176
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A *et al.*, 2002. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signalling in stomatal guard cells [J]. *Plant Physiology*, **128**: 13—16
- Pei ZM, Kuchitsu K, Ward JM *et al.*, 1997. Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in *Arabidopsis* wild-type and *abi1* and *abi2* mutants [J]. *Plant Cell*, **9**: 409—423
- Roelofsma MRC, Prins HBA, 1995. Effect of abscisic acid on stomatal opening in isolated epidermal strips of *abi* mutants of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Physiologia Plantarum*, **95**: 373—378
- Schroeder JI, Hagiwara S, 1989. Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells [J]. *Nature*, **338**: 427—430
- Sokolovski S, Hills A, Gay R *et al.*, 2005. Protein phosphorylation is a prerequisite for intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release and ion channel control by nitric oxide and abscisic acid in guard cells [J]. *Plant Journal*, **43**: 520—529
- Tun NN, Holk A, Scherer GFE, 2001. Rapid increase of NO release in plant cell cultures induced by cytokinin [J]. *FEBS Letters*, **509**: 174—176
- Vandelle E, Poinssot B, Wendehenne D *et al.*, 2006. Integrated signaling network involving calcium, nitric oxide, active oxygen species but not mitogen-activated protein kinases in BcPG1-elicited grapevine defenses [J]. *Molecular Plant Microbe Interaction*, **19**: 429—440
- Xiao Q (肖强), Zheng HL (郑海雷), 2004. Nitric oxide and plant stress response [J]. *Plant Physiology Communications* (植物生理学通讯), **40** (3): 379—384
- Xin L, Shi WL, Zhang SQ *et al.*, 2003. Nitric oxide involved in signal transduction of jasmonic acid-induced stomatal closure of *Vicia faba* L. [J]. *Chinese Science Bulletin*, **50** (6): 520—525