

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.01491

NO 与 Ca^{2+} 对蚕豆保卫细胞气孔运动的互作调控

张霖 赵翔 王亚静 张骁*

河南省植物逆境生物学重点实验室 / 河南大学生命科学学院, 河南开封 475004

摘要: 以蚕豆(*Vicia faba* L.)为材料研究 NO 和 Ca^{2+} 对蚕豆气孔运动及质膜 K^+ 通道的影响。结果表明, 10 mmol L⁻¹ Ca^{2+} 和 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ NO 供体 SNP 均有效抑制气孔开放, NO 清除剂 c-PTIO 不能缓解 Ca^{2+} 抑制气孔开放, 相反胞外加入 0.1 mmol L⁻¹ Ca^{2+} 可以明显加强 NO 对气孔开放的抑制程度, 该现象可被 La^{3+} (Ca^{2+} 通道抑制剂)缓解。以膜片钳技术记录全细胞 K^+ 电流发现, 胞外 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 或 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ SNP 均可选择性抑制蚕豆保卫细胞质膜内向 K^+ 通道, 追加 0.1 mmol L⁻¹ Ca^{2+} 可显著激活质膜外向 K^+ 通道, 且可被 La^{3+} 所缓解, 然而 0.1 mmol L⁻¹ Ca^{2+} 单独作用并不影响质膜外向 K^+ 通道活性。10 mmol L⁻¹ Ca^{2+} 单独处理可激活质膜外向 K^+ 通道, 但不能被 c-PTIO 缓解。分别用 Ca^{2+} 和 NO 专一的荧光探针 Fluo-3-AM 和 DAF-2DA 标记蚕豆保卫细胞原生质体, 检测胞内 Ca^{2+} 和 NO 的水平变化发现, 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ SNP 明显诱导胞内 Ca^{2+} 积累, 但 10 mmol L⁻¹ Ca^{2+} 并不能诱导 NO 在细胞内积累。记录保卫细胞质膜 Ca^{2+} 通道电流发现, NO 可明显激活质膜 Ca^{2+} 通道。表明 NO 有效抑制气孔开放, 可能主要通过激活质膜 Ca^{2+} 通道, 提高胞内 Ca^{2+} , 激活质膜外向 K^+ 通道促进 K^+ 外流, 同时, 可选择性抑制内向 K^+ 通道阻止 K^+ 内流, 两种途径共同作用抑制气孔开放。然而, 胞外 10 mmol L⁻¹ Ca^{2+} 对气孔和质膜 K^+ 通道活性的调节并不依赖于 NO。

关键词: 钙离子; 一氧化氮; 保卫细胞; 质膜 K^+ 通道; 信号转导

Crosstalk of NO with Ca^{2+} in Stomatal Movement in *Vicia faba* Guard Cells

ZHANG Lin, ZHAO Xiang, WANG Ya-Jing, and ZHANG Xiao *

Henan Key Laboratory of Plant Stress Biology, School of Life Sciences, Henan University, Kaifeng 475004, China

Abstract: Previous studies suggested that both NO and Ca^{2+} can serve as a signalling intermediate in ABA, H_2O_2 -induced stomatal movement. However, its mechanism(s) of action is not well defined in guard cells and, generally, in higher plants. In this study, extracellular 10 mmol L⁻¹ Ca^{2+} significantly inhibited stomatal opening, which was not alleviated by carboxy PTIO (c-PTIO, a NO scavenger). Sodium nitroprusside (SNP, a NO donor) showed effects of inhibition on stomatal opening at concentration of 10 or 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. However, 0.1 mmol L⁻¹ Ca^{2+} facilitated NO-inhibited stomatal opening, which was alleviated by LaCl_3 (a Ca^{2+} channel inhibitor) at concentration of 1 mmol L⁻¹. To gain further insights into Ca^{2+} function in NO-regulated stomatal movement, we patch-clamped *Vicia faba* guard cell protoplasts in a whole-cell configuration. In the absence of extracellular Ca^{2+} , NO inhibited inward rectifying K^+ current at concentration of 10 or 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, but have little effects on outward rectifying K^+ current. NO significantly activated outward rectifying K^+ current, when CaCl_2 was added to the bath solution, at concentration of 0.1 mmol L⁻¹, which was alleviated by LaCl_3 . In contrast, 0.1 mmol L⁻¹ CaCl_2 alone had little effects on inward or outward rectifying K^+ current. Extracellular Ca^{2+} significantly inhibited inward rectifying K^+ current and activated outward rectifying K^+ current at concentration of 10 mmol L⁻¹, which was not alleviated by c-PTIO. A single-cell analysis of cytosolic Ca^{2+} and NO using Ca^{2+} or NO specific fluorescence probe Fluo-3-AM and DAF-2DA revealed that 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ SNP evidently induced accumulation of Ca^{2+} in the guard cells, which was partially alleviated by LaCl_3 , but 0.1 or 10 mmol L⁻¹ CaCl_2 had few effects on the accumulation of NO in the guard cells. These results indicated that NO promotes influx of Ca^{2+} into cytoplasm through Ca^{2+} channels to activate outward rectifying K^+ channels and promotes K^+ efflux, alternatively, NO inhibits inward rectifying K^+ channels and blocks K^+ influx, thus inhibiting stomatal opening and preventing the excessive loss of water in plants. In addition, extracellular Ca^{2+} at concentration of 10 mmol L⁻¹ modulates stomatal movement and plasma membrane K^+ channels of *Vicia* guard cells in a NO-independent signaling pathway.

Keywords: Calcium; Nitric oxide; Guard cell; Plasma membrane K^+ channels; Signal transduction

本研究由国家自然科学基金项目(30871300)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 张骁, E-mail: xzhang@henu.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: linzhang@henu.edu.cn

Received(收稿日期): 2009-02-20; Accepted(接受日期): 2009-04-22.

Ca^{2+} 已被广泛认为是胞内信使,参与ABA、 H_2O_2 诱导的气孔关闭^[1-2]。诸多生物及非生物胁迫都会引起植物胞质 Ca^{2+} 浓度($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$)的上升^[3-4],植物可以根据 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 变化的差异如位置、幅度、频率及持续的时间解码不同的刺激从而使细胞作出相应的反应^[5]。研究发现胞外 Ca^{2+} 可通过引起保卫细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 振荡以诱导气孔关闭^[6]。盐胁迫下,胞外 Ca^{2+} 浓度($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$)增加可引起 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 上升^[7-8],Schroeder等^[9]报道 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的上升,可有效抑制内向 K^+ 通道、激活外向 K^+ 通道,促使气孔关闭。尽管如此,胞外 Ca^{2+} 影响 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的机制并不清楚。Tang等^[10]研究表明,胞外 Ca^{2+} 作为一种信号与质膜 Ca^{2+} 受体CAS结合,激活磷脂酶C(PLC),产生IP3诱导胞内钙库释放 Ca^{2+} ,以提升胞内 Ca^{2+} ,然而McAinsh等^[11]认为胞外 Ca^{2+} 诱导胞内 Ca^{2+} 升高不需要磷脂酶C,但涉及到 Ca^{2+} 流入。研究酵母发现,胞外 Ca^{2+} 可通过Cchlp and Midlp- Ca^{2+} 运输体系进入细胞提高 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ^[12]。由此可见,生物体对控制体内循环流动的 Ca^{2+} 有着精确的调节机制,以应对周边环境的变化。

NO作为重要的信号分子对调控动物细胞 Ca^{2+} 通道活性和监控胞内 Ca^{2+} 平衡起着重要的作用^[13-14],NO和 Ca^{2+} 信号系统形成重要的网络,共同参与多种生理过程的调控^[15]。植物防御反应中cGMP和cADPR介导了NO信号转导途径^[16],而cGMP和cADPR是触发胞内 Ca^{2+} 信号途径启动的重要成员^[17]。我们前期的研究表明,NO位于 H_2O_2 下游介导ABA诱导的气孔关闭^[18],也可通过诱导质膜 H^+ -ATPase脱磷酸化介导ABA抑制蓝光诱导的气孔开放^[19],Yan等^[20]报道NO也可有效介导ABA和 H_2O_2 抑制的气孔开放。作为逆境信号的ABA和 H_2O_2 ,可通过激活质膜 Ca^{2+} 通道,促使胞外 Ca^{2+} 内流,提升胞内 Ca^{2+} 浓度,以发挥其对气孔运动的调节^[2,21]。那么NO是否通过调节胞内 Ca^{2+} 的平衡,以对气孔运动调节呢?刘新等^[22]利用保卫细胞质膜 Ca^{2+} 通道抑制剂处理蚕豆表皮条可以抑制NO诱导的气孔关闭,初步证明 Ca^{2+} 参与NO的信号转导,但其调节机制并不清楚。Garcia-Mata等^[23]研究发现,NO对蚕豆保卫细胞质膜内向 K^+ 通道的调节依赖于胞内钙库释放 Ca^{2+} 。然而Sokolovski等^[24]报道,NO有效抑制保卫细胞质膜外向 K^+ 通道,但并不依赖于胞内钙库释放 Ca^{2+} 。我们在研究小麦时发现,NO可有效激活小麦根表皮细胞质膜内向 K^+ 通道,促进根细胞对 K^+

的吸收,抵御干旱胁迫^[25]。而外源 Ca^{2+} 是否参与NO对保卫细胞质膜 K^+ 通道和气孔运动的调节以及作用机制等问题并不清楚。

最近,我们研究发现胞外 Ca^{2+} 可有效调节保卫细胞质膜 K^+ 通道,影响气孔运动^[8],同时NO也可以有效调节保卫细胞质膜 K^+ 通道,调节气孔运动^[24-25]。Garcia-Brugger等^[26]报道植物抗病防御反应中,NO的生物合成依赖于胞外 Ca^{2+} 的内流。弄清楚NO和 Ca^{2+} 在气孔运动调节方面的“交谈”(crosstalk)机制,对于理解控制植物水分利用的气孔调节机制具有重要意义。为此,本研究利用药理学、电生理学及细胞生物学的技术和方法,综合探讨NO和 Ca^{2+} 对气孔运动的调控,为深入研究NO及 Ca^{2+} 的细胞及分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

将蚕豆(*Vicia faba* L.)种子用75%乙醇表面消毒5 min,在生化培养箱中催芽3~4 d,播种于培养土(营养土:蛭石为2:1)中。蚕豆生长的光/暗周期为12 h/12 h,光照强度为0.20~0.30 mmol m⁻² s⁻¹,昼夜温度分别为(25±2)°C和(20±2)°C,相对湿度在70%左右,生长期间无胁迫。

1.2 药品和试剂

硝普钠(sodium nitroprusside, SNP); c-PTIO [2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline]; EGTA; 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2DA)和Fluo-3-AM购自Sigma公司,使用前配成50 mmol L⁻¹ DMSO溶液,分成小包装冷冻保存;纤维素酶(cellulase RS)购自日本Yakult Honsha公司;果胶酶(pectolyase Y-23)购自日本Seishin Pharmaceutical公司;其他试剂均为分析纯。

1.3 表皮条的生物分析

参照Zhang等^[27]方法,取3~4周龄蚕豆苗顶端第1~2对完全展开的叶片,用蒸馏水洗净,撕取下表皮,洗去叶肉细胞后,切成5 mm长的表皮条,暗处理2 h诱导气孔关闭。用CO₂-free 10 mmol L⁻¹ MES, 50 mmol L⁻¹ KCl, pH 6.15开放缓冲液为对照,以缓冲液中加入不同浓度的CaCl₂为处理,同时在23°C下,光照(0.20~0.30 mmol m⁻² s⁻¹) 2 h。然后在10×25倍倒置显微镜下用测微尺测定气孔宽长比值。每个处理至少测3个表皮条,每个表皮条中随机测20个气孔开度,每个处理重复5次(不少于300个气孔开度),统计平均值和标准误差。

1.4 蚕豆保卫细胞原生质体的分离及质膜 K^+ 和 Ca^{2+} 通道电流记录

参照 Zhang 等^[28]的方法分离原生质体, 取 3~4 周龄苗顶端第 2 对完全展开叶, 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, 进行酶解提取。酶解液含 1.3% 纤维素酶 RS、0.0075% 果胶酶(Pectolyase Y-23)、0.25% 牛血清蛋白(BSA)、0.5 mmol L^{-1} 抗坏血酸, 用山梨醇调渗透压至 460 mOsmol kg^{-1} , pH 5.5 (KOH)。

采用 Hamill 等^[29]常规全细胞记录技术记录质膜 K^+ 电流。无钙细胞外液含 10 mmol L^{-1} 谷氨酸钾、2 mmol L^{-1} MgCl_2 、1 mmol L^{-1} KOH 和 10 mmol L^{-1} Mes; 含钙细胞外液含 10 mmol L^{-1} 谷氨酸钾、2 mmol L^{-1} MgCl_2 、1 mmol L^{-1} KOH、10 mmol L^{-1} Mes 和 0.1 mmol L^{-1} CaCl_2 , 上述两种细胞外液均用山梨醇调渗透压至 460 mOsmol kg^{-1} , 并调 pH 至 5.5 (KOH)。电极液均包含 100 mmol L^{-1} 谷氨酸钾、2 mmol L^{-1} MgCl_2 、4 mmol L^{-1} KOH、1.1 mmol L^{-1} Mg-ATP 、10 mmol L^{-1} HEPES, 山梨醇调渗透压为 510 mOsmol kg^{-1} , pH 7.2 (KOH)。使用 EPC-9 膜片钳放大器(HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany)测定全细胞电流, 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 10~15 min 后采集数据, 以连续两次稳定的值作为对照电流, 不同浓度 SNP 或 SNP+ La^{3+} 等(图注)处理 10 min 后采集处理数据。使用 PULSE+PULSEFIT 软件采集和分析全细胞电流, 每一实验重复 6~8 次。

采用 Miao 等^[30]全细胞记录技术记录质膜 Ca^{2+} 电流。细胞外液含 100 mmol L^{-1} CaCl_2 、0.1 mmol L^{-1} DTT, 10 mmol L^{-1} MES-Tris (除其他提及诸如 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ SNP 或者 1 mmol L^{-1} LaCl_3 等用作处理外), 用山梨醇调渗透压至 490 mOsmol kg^{-1} , pH 调至 5.6; 电极液均包含 10 mmol L^{-1} BaCl_2 、0.1 mmol L^{-1} DTT, 4 mmol L^{-1} EGTA, 和 10 mmol L^{-1} HEPES-Tris, 用山梨醇调渗透压至 510 mOsmol kg^{-1} , pH 调至 7.2。使用 EPC-9 膜片钳放大器(HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany)测定全细胞电流, 刺激电压从 -190 mV 逐级去极化到 +30 mV。全细胞封接形成 10~15 min 后采集数据, 以连续两次稳定的值作为对照电流, 不同浓度 SNP 或 SNP+ La^{3+} 等(图注)处理 10 min 后采集处理数据。使用 PULSE+PULSEFIT 软件采集和分析全细胞电流, 每一实验重复 8~10 次。

1.5 荧光探针的负载及荧光图像的记录

参照 Zhang 等^[31]的方法负载 Ca^{2+} 荧光探针, 原生质体的分离同上, 将分离好的原生质体放在 5 mL 负载缓冲液 [10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Fluo 3-AM, 0.2% (V/V) pluronic F-127, 5 mmol L^{-1} MES, pH 5.0] 用山梨醇调渗透压至 500 mOsmol kg^{-1} , 暗处 4℃, 负载 1.5 h。

参照 Lü 等^[18]的方法负载 NO 荧光探针, 将分离好的原生质体放在 5 mL 负载缓冲液(10 mmol L^{-1} MES, 50 mmol L^{-1} KCl, pH 6.15)中, 然后将 NO 荧光探针加入盛有原生质体的负载缓冲液中混匀, 使 DAF-2DA 终浓度为 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 负载温度控制在 25℃, 负载 20 min。

将负载 DAF-2DA 和 Fluo-3-AM 的原生质体用漂洗缓冲液(10 mmol L^{-1} MES, 50 mmol L^{-1} KCl, 1 mmol L^{-1} CaCl_2 , 用山梨醇调渗透压至 500 mOsmol kg^{-1} , 并调 pH 至 6.0)中漂洗两次, 以洗去细胞表层多余的探针, 然后用盖玻片迅速将原生质体固定在显微镜载物台上, 用激光共聚焦扫描显微镜(FV 1000, Olympus)观察。LCSM 的工作条件为 $E_x=488$ nm, $E_m=500\sim550$ nm, Power 2%, Zoom 3~5, 中速扫描, Frame 512×512 pixel, 对每个细胞荧光变化做适时记录。每个实验至少重复 5 次, 当结果一致时, 取其中一个细胞用 FV10ASW1.6 软件分析荧光强度。

2 结果与分析

2.1 NO 和 Ca^{2+} 对气孔运动的调节

图 1 所示, 胞外 0.1 mmol L^{-1} CaCl_2 可促进气孔开放, 而 10 mmol L^{-1} CaCl_2 处理可明显抑制气孔开放, 使气孔开度下降 62.0%, 追加 c-PTIO (NO 的清除剂)并不影响胞外 Ca^{2+} 对气孔运动的调节作用。此外, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 和 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ NO 供体 SNP 均可不同程度地抑制气孔开放。有趣的是, 胞外追加 0.1 mmol L^{-1} CaCl_2 , 显著增强了 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ SNP 处理对气孔开度的抑制作用, 且该现象可被 Ca^{2+} 通道抑制剂 La^{3+} 缓解。该结果表明, NO 可能主要通过调节质膜 Ca^{2+} 通道, 促进胞外 Ca^{2+} 的内流, 以抑制气孔开放; 然而胞外 10 mmol L^{-1} Ca^{2+} 对气孔开度的抑制并不依赖于 NO。

2.2 NO 与 Ca^{2+} 对蚕豆保卫细胞质膜 K^+ 通道的调节

胞外液存在 0.1 mmol L^{-1} CaCl_2 的条件下, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ SNP 可有效抑制质膜内向 K^+ 通道电流, 但对质膜外向 K^+ 通道电流影响较小; 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$

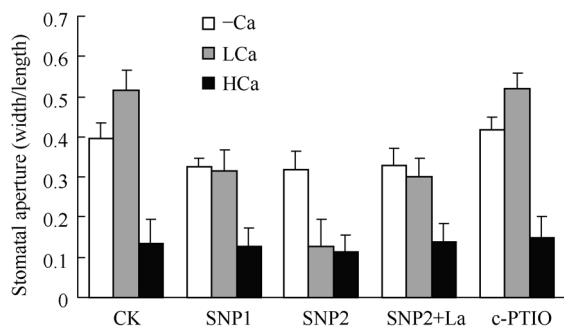


图1 外源 NO 和 Ca^{2+} 对蚕豆气孔运动的调节

Fig. 1 Regulation of exogenous NO and Ca^{2+} on stomatal movement in *Vicia faba*

CK: 对照; $-\text{Ca} = 0 \text{ mmol L}^{-1}$, $\text{LCa} = 0.1 \text{ mmol L}^{-1}$, $\text{HCa} = 10 \text{ mmol L}^{-1}$ 为 Ca^{2+} 梯度处理; $\text{SNP1} = 10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, $\text{SNP2} = 100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ 为 SNP 梯度处理; $\text{SNP2+La} = 100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ SNP + 1 mmol L^{-1} LaCl_3 ; c-PTIO 浓度为 $200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, 图中每个值来自于 300 个测量结果的平均值 ($n=6$)。

The concentrations of CaCl_2 used are 0 mmol L^{-1} for $-\text{Ca}$, 0.1 mmol L^{-1} for LCa and 10 mmol L^{-1} for HCa ; The concentrations of SNP used are $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ for SNP1 , $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ for SNP2 ; SNP2+La for $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ SNP + 1 mmol L^{-1} LaCl_3 ; c-PTIO for $200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Each value is the mean of 300 measurements $\pm \text{SE}$ ($n=6$).

SNP 明显抑制保卫细胞质膜内向 K^+ 通道电流, 显著激活其外向 K^+ 通道电流, 然而当 1 mmol L^{-1} La^{3+} (质膜 Ca^{2+} 通道抑制剂) 与 $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ SNP 共同处理时, 发现 NO 对保卫细胞质膜外向 K^+ 通道电

流的激活作用被抑制(图 2)。进一步说明 NO 对气孔开度的抑制, 可能主要通过调节质膜 Ca^{2+} 通道, 促进胞外 Ca^{2+} 的内流, 进而影响质膜 K^+ 通道活性, 导致大量 K^+ 外流, 气孔关闭。

为排除胞外 0.1 mmol L^{-1} Ca^{2+} 本身对保卫细胞质膜 K^+ 通道的影响, 如图 3 所示, 人为去除胞外 Ca^{2+} , 并记录全细胞 K^+ 通道电流, 结果发现 K^+ 通道电流并没有明显变化(图 2 和图 3 中 CK), 因此排除了 0.1 mmol L^{-1} Ca^{2+} 本身对质膜 K^+ 通道调控。然而, 无胞外 Ca^{2+} 下, NO 供体 SNP 处理同样能够抑制保卫细胞质膜内向 K^+ 通道电流, 但并不激活其外向 K^+ 通道电流。只有胞外追加 0.1 mmol L^{-1} CaCl_2 时, 方可显著激活保卫细胞质膜外向 K^+ 通道电流。该结果进一步证实胞外 Ca^{2+} 介导 NO 对保卫细胞质膜 K^+ 通道调控。

胞外 10 mmol L^{-1} Ca^{2+} 也可明显抑制气孔开放(图 1)。检测其对保卫细胞质膜 K^+ 通道电流的影响发现, 10 mmol L^{-1} CaCl_2 处理几乎完全抑制保卫细胞质膜内向 K^+ 通道电流, 显著激活其外向 K^+ 通道电流, 该现象并不能被 $200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ c-PTIO 缓解(图 4)。结果表明, 胞外 10 mmol L^{-1} Ca^{2+} 对保卫细胞质膜 K^+ 通道的调节并不依赖于 NO。

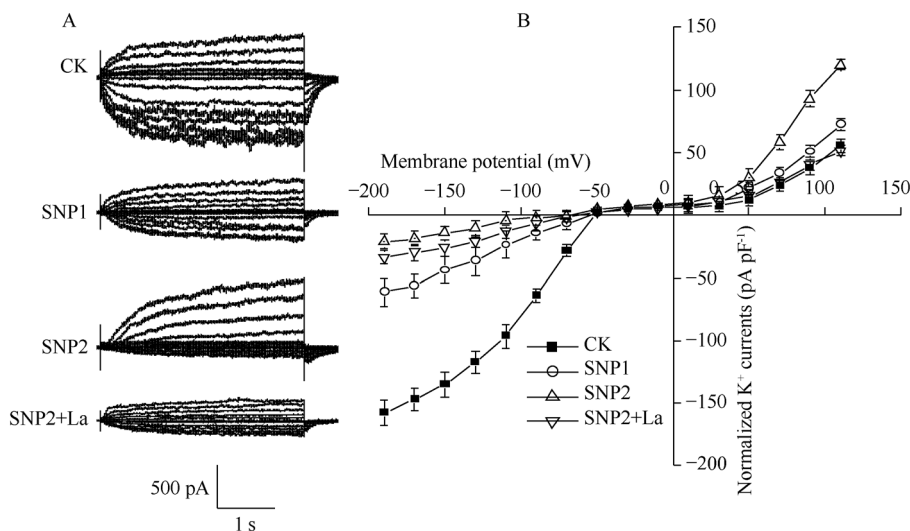


图2 外源 NO 在低浓度的胞外 Ca^{2+} 条件下对蚕豆保卫细胞质膜内向及外向 K^+ 通道的调节

Fig. 2 Regulation of exogenous NO on inward-rectifying and outward-rectifying K^+ channel current from protoplasts in *Vicia faba* guard cells in response to 0.1 mmol L^{-1} CaCl_2

A: 不同处理对电压依赖的蚕豆保卫细胞内向及外向 K^+ 通道电流的影响; B: 全细胞跨膜 K^+ 电流(pA)与跨膜电势(mV)的关系; CK: 对照; SNP1 : $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ SNP; SNP2 : $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ SNP; SNP2+La : $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ SNP 和 1 mmol L^{-1} LaCl_3 共同处理。B 中每个数据均来自 6 个独立重复试验的平均值 \pm 标准误。

A: effects of different treatments on Voltage-dependent *Vicia faba* guard cell inward-rectifying and outward-rectifying K^+ channel current; B: relationship between the whole cell K^+ current (pA) and membrane potential (mV); CK: control; SNP1 : $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ SNP; SNP2 : $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ SNP; SNP2+La : $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ SNP + 1 mmol L^{-1} LaCl_3 treatments. Each value in B is the mean current (current) from six independent experiments and the error bar denotes the standard error.

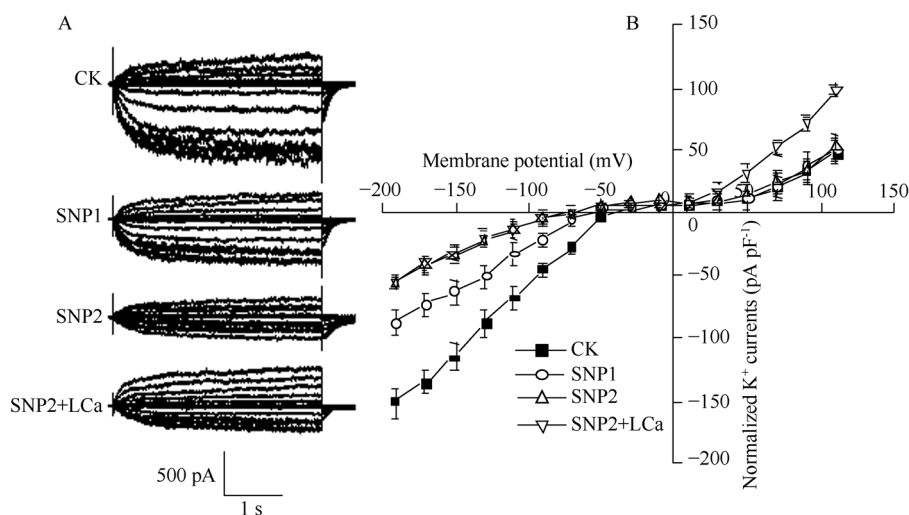


图 3 外源 NO 在无胞外 Ca^{2+} 条件下对蚕豆保卫细胞质膜内向及外向 K^+ 通道的调节

Fig. 3 Regulation of exogenous NO on inward-rectifying and outward-rectifying K^+ channel current from protoplasts in *Vicia faba* guard cells

A: 不同处理对电压依赖的蚕豆保卫细胞内向及外向 K^+ 通道电流的影响; B: 全细胞跨膜 K^+ 电流(pA)与跨膜电势(mV)的关系; CK: 对照; SNP1: 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ SNP; SNP2: 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ SNP; SNP2+LCa: 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ SNP 和 0.1 mmol L^{-1} CaCl_2 共同处理。B 中每个数据均来自 6 个独立重复试验的平均值 \pm 标准误。

A: effects of different treatments on Voltage-dependent *Vicia faba* guard cell inward-rectifying and outward-rectifying K^+ channel current; B: relationship between the whole cell K^+ current (pA) and membrane potential (mV); CK: control; SNP1: 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ SNP; SNP2: 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ SNP; SNP2+LCa: 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ SNP+0.1 mmol L^{-1} CaCl_2 treatments. Each value in B is the mean current (current) from six independent experiments and the error bar denotes the standard error.

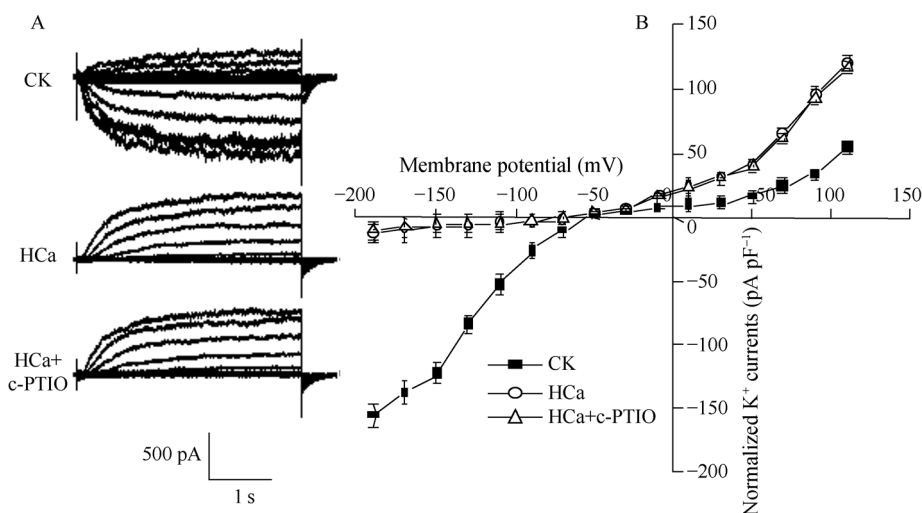


图 4 外源 Ca^{2+} 对蚕豆保卫细胞质膜内向及外向 K^+ 通道的调节

Fig. 4 Regulation of exogenous Ca^{2+} on inward-rectifying and outward-rectifying K^+ channel current from protoplasts in *Vicia faba* guard cells

图中 A 和 B 处理同图 2; CK: 对照; HCa: 10 mmol L^{-1} CaCl_2 ; HCa +c-PTIO: 10 mmol L^{-1} CaCl_2 和 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ c-PTIO 共同处理。B 中每个数据均来自 6 个独立重复试验的平均值 \pm 标准误。

The treatments of A and B are the same as in Fig. 2. CK: control; HCa: 10 mmol L^{-1} CaCl_2 ; HCa +c-PTIO: 10 mmol L^{-1} CaCl_2 +200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ c-PTIO treatments. Each value in B is the mean current (current) from six independent experiments and the error bar denotes the standard error.

2.3 NO 对蚕豆保卫细胞内 Ca^{2+} 水平的影响

用 Ca^{2+} 专一的荧光探针 Fluo-3-AM 标记蚕豆保卫细胞原生质体检测胞内 Ca^{2+} 的水平变化。结果显示, 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ SNP 处理保卫细胞原生质体 2 min

后即可促进 Ca^{2+} 内流, 处理 10 min 后显著诱导 Ca^{2+} 在保卫细胞中积累, La^{3+} 的加入可部分缓解 SNP 诱导胞内 Ca^{2+} 积累(图 5)。进一步证明了胞外 Ca^{2+} 介导 NO 对保卫细胞质膜 K^+ 通道和气孔运动的调节主

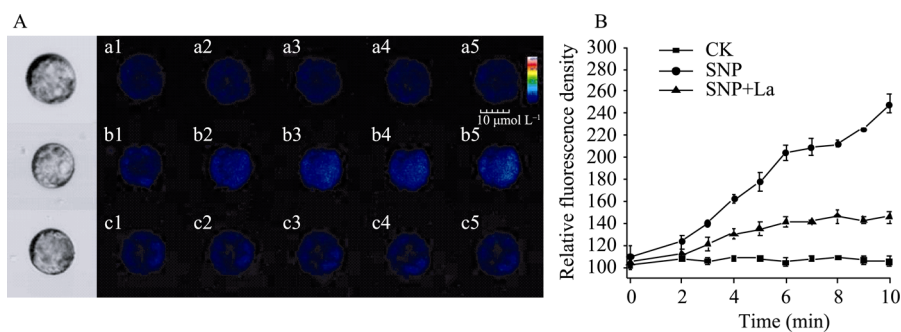


图 5 NO 诱导的胞内 Ca^{2+} (以 Fluo-3-AM 荧光显示) 产生和变化的过程

Fig. 5 Levels of Ca^{2+} generation from guard cells after exogenous NO was added

A: 不同处理后保卫细胞原生质体内 Fluo-3-AM 的荧光变化过程; a1~a5: 对照的保卫细胞中 Fluo-3-AM 的荧光变化; b1~b5: $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ SNP 处理后保卫细胞中 Fluo-3-AM 荧光变化图; c1~c5: $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ SNP 和 1 mmol L^{-1} LaCl_3 共同处理后保卫细胞内 Fluo-3-AM 荧光变化图; 时间顺序如下: a1、b1 和 c1 为处理前对照, a2~a5、b2~b5 和 c2~c5 分别表示处理后 2、4、6、8 min 时荧光图。B: 不同处理后保卫细胞原生质体内 Fluo-3-AM 的荧光变化统计分析。

A: effects of different treatments on levels of Ca^{2+} generation from guard cells; a1~a5: Fluo-3-AM fluorescence picture of control; b1~b5: fluorescence picture after adding SNP $100 \mu\text{mol L}^{-1}$; c1~c5: fluorescence picture after adding SNP $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ with 1 mmol L^{-1} La^{3+} ; a1, b1, c1: images before treatment; a2~a5, b2~b5, and c2~c5 show the time course of fluorescence changes at in different treatments respectively.

Each value in B is the levels of Ca^{2+} in guard cells from six independent experiments and the error bar denotes the standard error.

要通过质膜 Ca^{2+} 通道从胞外进入胞内实现。

用 NO 专一的荧光探针 DAF-2DA 检测保卫细胞内 NO 水平的变化。如图 6 所示, 外源单独施加 1 mmol L^{-1} CaCl_2 或 10 mmol L^{-1} CaCl_2 处理时均不能引起蚕豆保卫细胞内 NO 积累。说明胞外 10 mmol L^{-1} Ca^{2+} 对保卫细胞质膜 K^+ 通道和气孔运动的调节并不依赖于 NO。

2.4 NO 对蚕豆保卫细胞质膜 Ca^{2+} 通道调节

如图 7 所示, 细胞质膜超极化并不能激活质膜 Ca^{2+} 通道 ($n=15$), 胞外追加 $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ SNP 后, 绝大部分细胞的全细胞 Ca^{2+} 通道电流在超极化下被激活 ($n=12$), 1 mmol L^{-1} La^{3+} 的加入可明显抑制 NO 激

活的质膜 Ca^{2+} 电流。表明外源 Ca^{2+} 介导 NO 对保卫细胞质膜 K^+ 通道的调节, 主要通过质膜 Ca^{2+} 通道进入胞内实现。

3 讨论

在干旱胁迫条件下, 植物调整合适的气孔开度以防止水分的过度散失, 并确保二氧化碳的吸收以保证光合作用的进行, 这对植物的生长发育至关重要。表皮生物分析显示, 胞外 0.1 mmol L^{-1} Ca^{2+} 可促进气孔开放, 10 mmol L^{-1} Ca^{2+} 处理明显抑制气孔开放, 使气孔开度下降 62.0% (图 1), 这与 McAinsh 等^[11]的研究结果相似, 即较高浓度的胞外 Ca^{2+} 可以诱导气孔

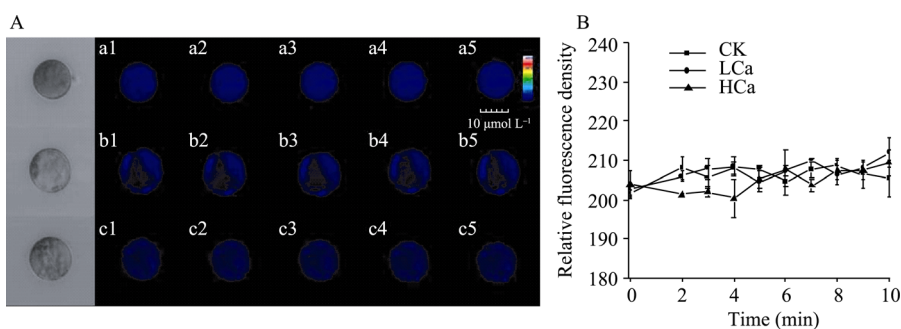


图 6 外源 Ca^{2+} 诱导的胞内 NO (以 DAF-2DA 荧光显示) 产生和变化的过程

Fig. 6 Levels of NO generation from guard cells after exogenous Ca^{2+} was added

图中 A 和 B 处理同图 5; a1~a5 为对照处理保卫细胞中 DAF-2DA 的荧光变化; b1~b5: 0.1 mmol L^{-1} CaCl_2 处理后保卫细胞中 DAF-2DA 荧光变化图; c1~c5: 10 mmol L^{-1} CaCl_2 处理后保卫细胞内 Fluo-3-AM 荧光变化图; 时间顺序如下: a1、b1 和 c1 为处理前对照, a2~a5、b2~b5 和 c2~c5 分别表示处理后 2、4、6、8 min 时荧光图。

The treatments of A and B are the same as in Fig. 5. a1~a5: DAF-2DA fluorescence picture of control; b1~b5: fluorescence picture after adding CaCl_2 1 mmol L^{-1} ; c1~c5: fluorescence picture after adding CaCl_2 10 mmol L^{-1} . a1, b1, c1: images before treatment; a2~a5, b2~b5, and c2~c5 show the time course of fluorescence changes in different treatments respectively. Each value in B is the levels of NO in guard cells from six independent experiments and the error bar denotes the standard error.

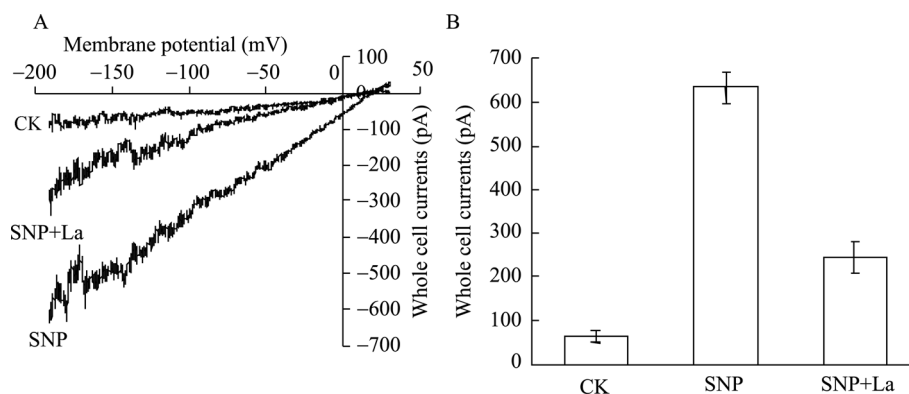


图 7 外源 NO 对蚕豆保卫细胞质膜 Ca^{2+} 通道的调节

Fig. 7 Regulation of exogenous NO on Ca^{2+} channel current from protoplasts in *Vicia faba* guard cells

A: 不同处理对蚕豆保卫细胞质膜 Ca^{2+} 通道电流的影响; B: 全细胞电流在 -190 mV 下变化统计。CK: 对照; SNP: $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ SNP; SNP+La: $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ SNP 和 1 mmol L^{-1} LaCl_3 共同处理。B 中每个数据均来自 12 个独立重复试验的平均值 \pm 标准误。

A: effects of different treatments on Ca^{2+} channel current from protoplasts in *Vicia faba* guard cells; B: whole cell Ca^{2+} channel current in response to membrane potential of -190 mV ; CK: control; SNP: $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ SNP; SNP+La: $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ SNP + 1 mmol L^{-1} LaCl_3 treatments. Each trace was plotted with the mean value of 12 recordings from 12 different cells, respectively.

关闭。Gethyn 等^[6]报道胞外 Ca^{2+} 可引起保卫细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 振荡以诱导气孔关闭。我们前期研究发现, 胞外 Ca^{2+} 浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$) 增加可引起 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 上升^[8], 而 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高可有效抑制气孔开放^[9]。由此, 推测胞外 Ca^{2+} 可能主要通过诱导胞内 Ca^{2+} 的增加以影响气孔运动。但 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ 对 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 及气孔运动调节的机制仍不清楚。

众所周知, NO 与 Ca^{2+} 信号系统交联, 调控植物细胞诸多生理过程^[15]。本研究发现, 10 mmol L^{-1} Ca^{2+} 和 100 mol L^{-1} NO 供体 SNP 均有效抑制气孔开放, 0.1 mmol L^{-1} CaCl_2 明显增强 NO 对气孔开度的抑制效应, 该现象可被质膜 Ca^{2+} 通道抑制剂 La^{3+} 有效阻止 (图 1), 这与刘新等^[22]的研究结果相似。尽管有证据表明 La^{3+} 可以进入植物细胞^[32], 胞内 Ca^{2+} 通道也可被 La^{3+} 所抑制^[33], 但是胞外 La^{3+} 的加入和胞外 Ca^{2+} 的去除对 NO 调节气孔运动作用的相似性 (图 1), 表明 La^{3+} 主要是抑制了胞外 Ca^{2+} 的内流, 而非抑制胞内 Ca^{2+} 库的释放。因此初步推测 Ca^{2+} 有效促进 NO 对气孔开放的抑制效应, 可能主要通过激活质膜 Ca^{2+} 通道, 进而促进胞外 Ca^{2+} 的内流实现。

气孔运动依赖于保卫细胞的收缩与膨胀, K^{+} 跨膜流动可直接调节细胞的膨压, 导致气孔的开闭。Schroeder 等^[9]报道 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高可以抑制内向 K^{+} 通道、激活外向 K^{+} 通道, 抑制气孔开放。本实验发现, 胞外液存在 0.1 mmol L^{-1} CaCl_2 的条件下, SNP 可有效抑制质膜内向 K^{+} 通道电流, 其中 $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ SNP 还显著激活其外向 K^{+} 通道电流。但胞外无 Ca^{2+} 并不影响质膜 K^{+} 通道电流 (图 2 和图 3), 因

此排除了 0.1 mmol L^{-1} Ca^{2+} 本身对质膜 K^{+} 通道的调控。有趣的是, 去除胞外 Ca^{2+} , NO 供体 SNP 处理依然能够抑制保卫细胞质膜内向 K^{+} 通道电流, 但并不能激活其外向 K^{+} 通道电流, 只有胞外追加 0.1 mmol L^{-1} CaCl_2 时, 方可显著激活保卫细胞质膜外向 K^{+} 通道电流。该结果证实了 Ca^{2+} 参与 NO 对保卫细胞质膜 K^{+} 通道调节, 同时也表明 NO 调节质膜 K^{+} 通道的复杂性。

NO 对气孔运动及质膜 K^{+} 通道的调节依赖胞外 Ca^{2+} 的存在。胞外 Ca^{2+} 可能通过 NO 激活的钙通道进入保卫细胞以调节质膜 K^{+} 通道。为证实这一推测, 我们研究了 NO 对保卫细胞质膜 Ca^{2+} 通道及胞内 Ca^{2+} 积累的影响, 发现 NO 可有效激活质膜 Ca^{2+} 通道 (图 7), 增加胞内 Ca^{2+} 积累 (图 5)。同时发现 La^{3+} 的加入可缓解 NO 诱导胞内 Ca^{2+} 积累 (图 5), 进一步证实 NO 诱导胞内 Ca^{2+} 的积累, 可能主要是通过激活质膜 Ca^{2+} 通道, 促使胞外 Ca^{2+} 的内流实现。

值得注意的是, 10 mmol L^{-1} CaCl_2 处理几乎完全抑制保卫细胞质膜内向 K^{+} 通道电流, 显著激活其外向 K^{+} 通道电流 (图 4), 抑制气孔开放 (图 1), 这与我们以前研究的结果一致^[8]。然而胞外 Ca^{2+} 影响气孔运动的机制并不清楚。NO 可有效激活保卫细胞质膜 Ca^{2+} 通道 (图 7), 调节质膜 K^{+} 通道 (图 2 和图 3), 影响气孔运动 (图 1)。那么 NO 是否参与胞外 Ca^{2+} 调节的气孔运动? 为此我们在实验中加入 $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ c-PTIO (NO 的清除剂), 结果发现, c-PTIO 并不能缓解胞外 10 mmol L^{-1} Ca^{2+} 对保卫细胞质膜 K^{+} 通道和气孔运动的调节效应。该结果表明 NO 可

能并不介导 $10 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$ 对保卫细胞质膜 K^{+} 通道的调节。使用 NO 专一的荧光探针 DAF-2DA 检测保卫细胞内 NO 的水平变化发现, 外源单独施加 $1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ 或 $10 \text{ mmol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ 处理时均不能引起蚕豆保卫细胞内 NO 积累(图 6)。进一步证实 $10 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$ 对保卫细胞质膜 K^{+} 通道和气孔运动的调节, 并不依赖于 NO。

4 结论

NO 有效抑制气孔开放, 可能主要通过激活质膜 Ca^{2+} 通道促进胞外 Ca^{2+} 的内流, 提高胞内 Ca^{2+} , 以有效激活质膜外向 K^{+} 通道促进 K^{+} 外流, 并且可选择性抑制内向 K^{+} 通道阻止 K^{+} 内流, 两种途径共同作用抑制气孔开放, 以防止植物水分的过度散失。然而高浓度的胞外 Ca^{2+} 对气孔运动和质膜 K^{+} 通道活性的调节并不依赖于 NO。

References

- [1] Mcainsh M R, Brownlee C, Hetherington A M. Absciscic acid-induced elevation of guard cell cytoplasmic Ca^{2+} precedes stomatal closure. *Nature*, 1990, 343: 186–188
- [2] Pei Z M, Murata Y, Benning G, Thomine S, Kluesener B, Allen G J, Grill E, Schroeder J I. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate absciscic acid signaling in guard cells. *Nature*, 2000, 406: 731–734
- [3] Hetherington A M, Brownlee C. The generation of Ca^{2+} signals in plants. *Ann Rev Plant Biol*, 2004, 55: 401–427
- [4] Knight H, Knight M R. Abiotic stress signalling pathways: Specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci*, 2001, 6: 262–267
- [5] McClung C R. Plant circadian rhythms. *Plant Cell*, 2006, 18: 792–803
- [6] Gethyn J A, Kuchitsu K, Sarah P C, Murata Y, Schroeder J I. Arabidopsis *abi1-1* and *abi2-1* phosphatase mutations reduce absciscic acid-induced cytoplasmic calcium rises in guard cells. *Plant Cell*, 1999, 11: 1785–1798
- [7] Knight H, Trewavas A J, Knight M R. Calcium signaling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J*, 1997, 12: 1067–1078
- [8] Zhao X(赵翔), Wang Y-L(汪延良), Wang Y-J(王亚静), Wang X-L(王西丽), Zhang X(张骁). Effects of exogenous Ca^{2+} on stomatal movement and plasma membrane K^{+} channels of *Vicia faba* guard cell under salt stress. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2008, 34(11): 1970–1976 (in Chinese with English abstract)
- [9] Schroeder J I, Hagiwara S. Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Nature*, 1989, 338: 427–430
- [10] Tang R H, Han S C, Zheng H L, Cook C W, Choi C S, Woerner T E, Jackson R B, Pei Z M. Coupling diurnal cytosolic Ca^{2+} oscillations to the CAS-IP3 pathway in Arabidopsis. *Science*, 2007, 315: 1423–1426
- [11] McAinsh M R, Webb A A R, Taylor J E, Hetherington A M. Stimulus-induced oscillations in guard cell cytoplasmic free calcium. *Plant Cell*, 1995, 7: 1207–1219
- [12] Matsumoto T K, Ellsmore A J, Cessna S G, Low P S, Pardo J M, Bressan R A, Hasegawa P M. An osmotically induced cytosolic Ca^{2+} transient activates calcineurin signaling to mediate ion homeostasis and salt tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2002, 277: 33075–33080
- [13] Besson-Barda A L, Courtoisa C, Gauthiera A, Dahana J, Dobrowolska G, Jeandrozc S, Pugina A, Wendehenne D. Nitric oxide in plants: Production and cross-talk with Ca^{2+} signaling. *Mol Plant*, 2008, 1: 218–228
- [14] Berridge M J, Lipp P, Bootman M D. The versatility and universality of calcium signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000, 1: 11–21
- [15] Durner J, Wendehenne D, Klessig D F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP2 ribose. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 10328–10333
- [16] Lee H C. Physiological functions of cyclic ADP ribose and NAAP as calcium messengers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001, 41: 317–345
- [17] Lü D(吕东), Zhang X(张骁), Jiang J(江静), An G-Y(安国勇), Zhang L-R(张玲瑞), Song C-P(宋纯鹏). NO may function in the downstream of H_2O_2 in ABA-induced stomatal closure in *Vicia faba* L. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理与分子生物学报), 2005, 31(1): 62–70(in Chinese with English abstract)
- [18] Zhang X, Takemiya A, Kinoshita T, Shimazaki K. Nitric oxide inhibits blue light-specific stomatal opening via absciscic acid signaling pathways in *Vicia* guard cells. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48: 715–723
- [19] Yan J P, Tsuichihara N, Etoh T, Iwai S. Reactive oxygen species and nitric oxide are involved in ABA inhibition of stomatal opening. *Plant Cell Environ*, 2007, 30: 1320–1325
- [20] Murata Y, Pei Z M, Mori I C, Schroeder J I. Absciscic acid activation of plasma membrane 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. *Plant Cell*, 2001, 13: 2513–2523
- [21] Liu X(刘新), Zhang S-Q(张蜀秋), Lou C-H(娄成后). Involvement of Ca^{2+} in stomatal movements of *Vicia faba* L. regulated by nitric oxide. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理与分子生物学报), 2003, 29(4): 342–346 (in Chinese with English abstract)
- [22] Garcia-Mata C, Gay R, Sokolovski S, Hills A, Lamattina L, Blatt M R. Nitric oxide regulate K^{+} and Cl^{-} channels in guard cells through a subset of absciscic acid-evoked signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 1116–1121
- [23] Sokolovski S, Blatt M R. Nitric oxide block of outward-rectifying K^{+} channels indicates direct control by protein nitrosylation in guard cells. *Plant Physiol*, 2004, 136: 4275–4284

- [24] Wen Y(闻玉), Zhao X(赵翔), Zhang X(张骁). Effects of nitric oxide on root growth and absorption in wheat seedlings in response to water stress. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2008, 34(2): 344–348 (in Chinese with English abstract)
- [25] Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecou-rieux D, Poinssot B, Wendehenne D, Pugin A. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2006, 19: 711–724
- [26] Zhang X, Zhang L, Dong F C, Gao J F, Galbraith D W, Song C P. Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Physiol*, 2001, 126: 1438–1448
- [27] Zhang X, Miao Y C, An G Y, Zhou Y, Shanguan Z P, Gao J F, Song C P. K^+ channels inhibited by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells. *Cell Res*, 2001, 11: 195–202
- [28] Hamill 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. *Pflüger's Archiv*, 1981, 391: 85–100
- [29] Miao Y C, Lü D, Wang P C, Wang X C, Chen J, Miao C, Song C P. An Arabidopsis glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses. *Plant Cell*, 2006, 18: 2749–2766
- [30] Zhang W, Fan L M, Wu W H. Osmo-sensitive and stretch-activated calcium-permeable channels in *Vicia faba* guard cells are regulated by actin dynamics. *Plant Physiol*, 2007, 143: 1140–1151
- [31] Quiquampoix H, Ratcliffe R G, Ratkovic S, Vucinic Z. ^1H and ^{31}P NMR investigation of gadolinium uptake in maize roots. *J Inorg Biochem*, 1990, 38: 265–275
- [32] Gelli A, Blumwald E. Calcium retrieval from vacuolar pools. *Plant Physiol*, 1993, 102: 1139–1146