

外源水杨酸介导 Cu^{2+} 对蚕豆气孔运动的调控研究

陈珍, 陈彤 (台州学院生命科学学院, 浙江临海317000)

摘要 采用表皮条生物分析法, 研究了不同浓度的 Cu^{2+} 、水杨酸以及它们共同处理时对蚕豆叶片气孔运动的影响。结果表明, 低浓度的铜离子对气孔开放有明显的促进作用; 高浓度的铜离子促进气孔关闭, 且呈现时间效应; 不同浓度(0.01、0.1、1 mmol/L)的外源水杨酸单独处理时显著抑制蚕豆表皮气孔开放, 当浓度达到1 mmol/L时, 处理2~3 h后, 气孔几乎完全关闭; 当0.01 mmol/L外源水杨酸加入到含各种浓度铜离子的缓冲液中时, 气孔孔径急剧增大, 随着水杨酸浓度的增加, 缓解作用减弱, 表明一定浓度的水杨酸可缓解高浓度铜离子对气孔开放的抑制效应。

关键词 水杨酸; Cu^{2+} ; 气孔运动

中图分类号 Q945 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)10-02874-02

Regulation on Stomatal Movements in Broad Bean by Interposition Induced by Cu^{2+} with Salicylic Acid

CHEN Zhen et al (College of Life Sciences, Taizhou University, Linhai, Zhejiang 317000)

Abstract The biology analysis on epidermis of broad bean was used to investigate effects of different concentration of Cu^{2+} and salicylic acid (SA) in single or together treatments on stomatal movements. The results showed that the Cu^{2+} at the low concentration of 0.05 ng/L and 0.1 ng/L could obviously promote stomata open. Cu^{2+} at high concentration could inhibit stomata open and the inhibition improved with the time. SA at 0.01, 0.1 and 1 mmol/L in single treatment could obviously inhibit stomata open. The SA at 1 mM for 2~3 h treatment was almost repressed the stomata to open. When SA at 0.01 mmol/L was added to the buffers with different concentration of Cu^{2+} , the stomata size was rapidly increased and the alleviating effect reduced with increase of SA concentration, showing that SA at some concentration could alleviate the inhibition of stomatal movement caused by Cu^{2+} stress.

Key words Salicylic acid; Cu^{2+} ; Stomatal movement

植物叶片表皮上密布的气孔是植物与环境进行水分和气体交换的门户。大量研究表明, 植物对环境刺激的反应, 如缺水、 CO_2 浓度过高、高温等, 是通过调控气孔运动(如开放和关闭)而实现的^[1-3]。研究气孔运动机理对深入探讨植物对环境的适应机理以及植物细胞信号转导具有重要的理论意义和现实意义。近几年来, 国内外对影响气孔运动因子的研究较多, 其中包括一些激素类物质、信号类物质、酶、有机物等^[4-7]。随着重金属污染的日趋严重, 重金属对气孔运动的影响也逐渐成为研究的热点^[8], 但铜离子对气孔运动的影响尚未见报道。水杨酸(Salicylic Acid, SA)是一种普遍存在于高等植物体内的内源生长调节物质。研究表明, 水杨酸能够激活植物过敏反应, 是系统获得性抗性的内源信号分子, 参与调节植物的许多生理过程^[9-11]。最近研究表明, 水杨酸在抗环境胁迫(如冷、热、盐、干旱、重金属等)方面有明显作用^[12]。刘新等研究也表明在植物的抗逆反应中, 水杨酸参与了对植物气孔运动的调节, 且可能是通过NO或 Ca^{2+} 而实现的^[5, 13]。为此, 笔者研究了 Cu^{2+} 和水杨酸共同处理时蚕豆表皮细胞的气孔运动情况, 旨在进一步阐明水杨酸缓解重金属胁迫的机制。

1 材料与试验方法

1.1 试验材料 选取籽粒饱满的蚕豆(*Vicia faba* L.)种子, 经 HgCl_2 灭菌后, 浸种12 h, 25℃催芽2~3 d后种于土中, 保持自然光照、温度10~20℃, 土壤水分为田间持水量的(85±5)%。培养21~28 d后, 取从茎顶端处第2片完全展开的叶片作为试验材料。用镊子撕取叶片下表皮, 置于Tris缓冲液中, 以保持表皮条细胞的活性。缓冲液组成为10 mmol/L Tris, 50 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L CaCl_2 , pH 6.15。

1.2 试验处理 用表皮条Tris缓冲液配制不同浓度的 Cu^{2+} 、SA和(Cu^{2+} +SA)处理液。 Cu^{2+} 浓度为0.05、0.1、0.25、

0.5、1、5、10、40、100 ng/L; SA浓度为0.01、0.1、1 mmol/L; 不同浓度的(Cu^{2+} +SA)处理液为 Cu^{2+} (0.05、1、40 ng/L)添加SA(0.01、0.1、1 mmol/L)9种组合。

1.3 气孔开度的测定方法 将表皮条置于Tris缓冲液中预处理3 h, 然后转移到处理液中, 光下或暗中分别培养1 min、30 min、2 h、3 h后, 在10×40倍显微镜下用测微尺测定气孔孔径大小。每个处理重复3次, 每个重复选5~8个视野, 每次取30个气孔进行测定。显微镜下气孔表现不同的开度。以2个保卫细胞间可见清晰间隙的, 视为张开; 其余为关闭。数据取平均值, 计算标准偏差。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 Cu^{2+} 对蚕豆离体叶片气孔运动的影响 由图1可知, 暗处理时低浓度 Cu^{2+} (0.05、0.1 ng/L)均能抑制气孔关闭, 且抑制效应随时间的推移而增加, 3 h时气孔孔径达到最大。由图2可知, 光处理时, 低浓度 Cu^{2+} 能促进气孔开放, 在1 min时就起到了明显作用。随光照时间的延长, 气孔保持开放状态, 说明低浓度 Cu^{2+} 能促进蚕豆离体叶片表皮细胞气孔开放。

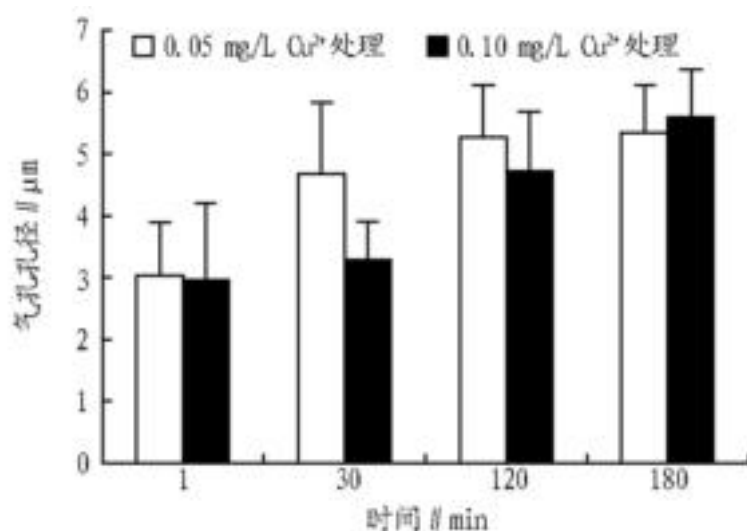


图1 暗处理时低浓度 Cu^{2+} 对气孔运动的影响

由图3可知, 光照处理下, 随着 Cu^{2+} 浓度的增加, 气孔逐渐关闭。 Cu^{2+} 对气孔运动的影响不仅呈现浓度效应, 而且呈现时间效应。 Cu^{2+} 能明显抑制气孔的开放, 且随着时间的延

长,抑制作用加强。当 Cu^{2+} 浓度达到 40 ng/L 以上时,3 h 后气孔开度仅为 $0.54 \mu\text{m}$,但即使 100 ng/L Cu^{2+} 处理也未使气孔完全关闭。

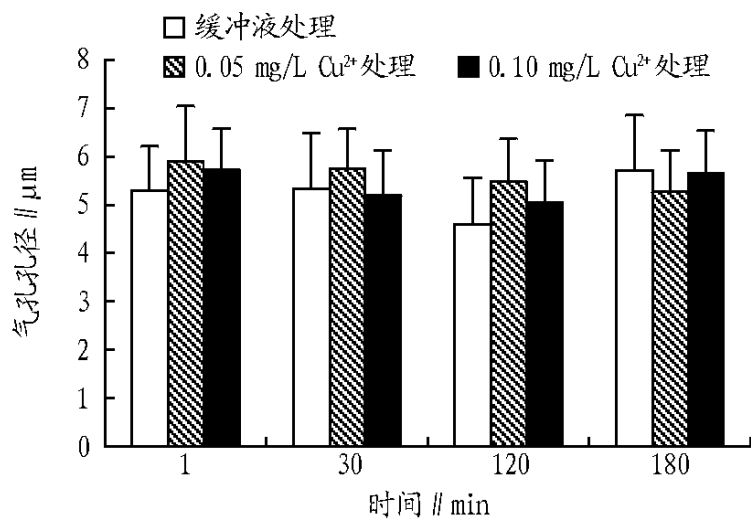


图2 光处理时低浓度 Cu^{2+} 对气孔运动的影响

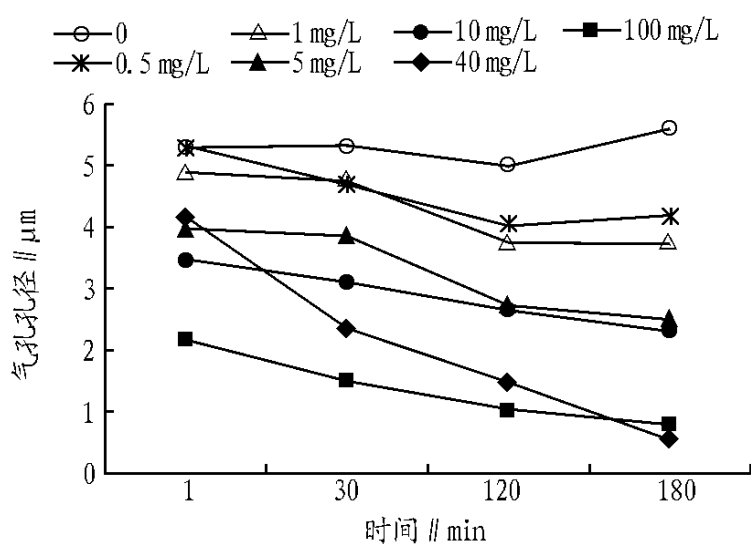


图3 光处理时 Cu^{2+} 浓度对蚕豆气孔运动的影响

2.2 不同浓度水杨酸对蚕豆离体叶片气孔运动的影响 由表1可知,在浓度为 $0.01 \sim 1.0 \text{ mmol/L}$ 范围内,外源水杨酸在光照处理时 0.05 水平显著抑制蚕豆叶片表皮细胞气孔开放,而且抑制作用随着时间的延长而增强;当外源水杨酸浓度达到 1 mmol/L 时,处理 $2 \sim 3 \text{ h}$ 后,气孔几乎完全关闭。

表1 不同浓度水杨酸对气孔运动的影响 μm

| 处理时间 min | 水杨酸浓度 mmol/L | | | |
|-------------|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 0 | 0.01 | 0.1 | 1 |
| 1 | 5.29 ± 0.93 | 3.38 ± 0.51 | 3.42 ± 0.85 | 1.96 ± 1.02 |
| 30 | 5.33 ± 1.16 | 2.38 ± 0.77 | 2.32 ± 0.88 | 2.58 ± 0.79 |
| 120 | 4.59 ± 0.97 | 1.63 ± 0.93 | 2.75 ± 0.92 | 0 |
| 180 | 5.70 ± 1.16 | 1.54 ± 1.40 | 2.44 ± 1.14 | 0 |

2.3 Cu^{2+} 和水杨酸共同处理对蚕豆离体叶片气孔运动的影响 由表2可知,虽然外源水杨酸处理能抑制气孔开放,但当 0.01 mmol/L 水杨酸加入到含各种浓度 Cu^{2+} 缓冲液中时,气孔孔径急剧增大,1 min 时就达到了对照水平,且随着时间的延长气孔孔径保持最大开度。这表明 0.01 mmol/L 水杨酸处理能缓解高浓度 Cu^{2+} 对气孔开放的抑制作用,两者的共同处理促进了气孔的开放。由表3可知,随着水杨酸浓度的增加,这种缓解作用减弱。由表4可知, 1 mmol/L 水杨酸添加到含铜离子的缓冲液时,2 种物质的共同处理几乎完全抑制了气孔开放。

3 讨论

铜是植物体内必需的微量元素,也是铜- 锌SOD 的组成成分^[14]。研究已证实,重金属在高浓度时会引起植物膜损

表2 0.01 mmol/L 水杨酸对气孔运动的影响 μm

| 处理时间 min | Cu^{2+} 浓度 mg/L | | |
|-------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------|
| | 0.05 | 1.00 | 40 |
| 1 | 5.36 ± 0.77 | 5.21 ± 0.79 | 5.06 ± 0.77 |
| 30 | 4.92 ± 0.63 | 6.23 ± 0.77 | 4.46 ± 0.90 |
| 120 | 5.98 ± 0.81 | 5.97 ± 0.62 | 5.65 ± 0.84 |
| 180 | 6.00 ± 0.82 | 6.42 ± 0.80 | 6.06 ± 0.99 |

表3 0.1 mmol/L 水杨酸对气孔运动的影响 μm

| 处理时间 min | Cu^{2+} 浓度 mg/L | | |
|-------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------|
| | 0.05 | 1.00 | 40 |
| 1 | 1.71 ± 0.76 | 3.30 ± 0.62 | 4.25 ± 0.62 |
| 30 | 3.4 ± 0.77 | 3.98 ± 1.28 | 4.03 ± 0.62 |
| 120 | 2.65 ± 0.76 | 3.63 ± 0.82 | 3.90 ± 0.53 |
| 180 | 3.38 ± 0.68 | 5.40 ± 0.93 | 2.92 ± 1.30 |

表4 1.0 mmol/L 水杨酸对气孔运动的影响 μm

| 处理时间 min | Cu^{2+} 浓度 mg/L | | |
|-------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------|
| | 0.05 | 1.00 | 40 |
| 1 | 5.31 ± 0.92 | 5.03 ± 0.75 | 5.82 ± 0.80 |
| 30 | 0 | 2.36 ± 0.77 | 2.85 ± 1.10 |
| 120 | 0 | 0 | 0 |
| 180 | 0 | 0 | 0 |

伤而致死或半致死^[15-16]。高浓度 Cu^{2+} 对植物的毒害主要是通过影响酶促生理活动,进而对植物光呼吸代谢功能产生不良影响^[17]。最近研究发现, Cu^{2+} 对植物的生长存在着低促高抑的现象,但其真正的作用机制目前仍不是很清楚^[17-18]。

有人研究了重金属对气孔运动的效应机制,但其机理尚不清楚。於丙军等认为,稀土离子镧对气孔运动的影响是通过 Ca^{2+} 通道的阻断而起作用^[6]。有研究表明, Cd 强烈抑制气孔开放可能与 Cd 强烈干扰 K^+ 、 Ca^{2+} 及保卫细胞中脱落酸的代谢有关^[19]。Yang 等认为,不同重金属可能以不同方式影响蚕豆保卫细胞气孔运动, Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Zn^{2+} 通过抑制水通道而影响气孔运动,而 La^{3+} 则可能通过抑制离子通道起作用^[7-8]。Mathe 等研究表明, 0.01 mmol/L 水杨酸可使蚕豆气孔开度降低 50% , 0.1 和 1.0 mmol/L 水杨酸诱导气孔完全关闭^[20]。这和该试验结果一致。水杨酸在抗环境胁迫方面的正负效应可能与其诱导的过氧化氢水平有关。低浓度的水杨酸可能诱导适度 H_2O_2 的积累,进而诱导防卫反应的产生;而高浓度的水杨酸或细胞内高水平的水杨酸均可诱导细胞内高水平的 H_2O_2 积累,产生重度氧化胁迫,加剧了环境胁迫伤害^[6,9]。水杨酸通过诱导 H_2O_2 的积累而引发胞内 Ca^{2+} 水平上升,由于钙离子的升高会阻断钾离子流入通道,从而抑制气孔开放。Kavano 等以烟草悬浮细胞培养液为材料,表明在诱导产生超氧阴离子之前,水杨酸引发 Ca^{2+} 浓度瞬间增加,并证明增加的 Ca^{2+} 来自外源 Ca^{2+} ^[21]。张丽平等发现外液中加入氯化铜后,在低浓度时可促进通道电流,而在高浓度时则抑制通道电流,并且抑制率随浓度增大而增大。 Cu^{2+} 和 Ca^{2+} 都属二价阳离子,因此当外源铜离子存在时,低浓度水杨酸引发的外源钙离子的内流可能受到干扰,抑制了胞内钙离子浓度的升高,从而缓解了气孔关闭效应;当水杨酸浓

(上接第2875页)

度升高,诱导高水平的 H_2O_2 积累,引发生物膜的破坏,抑制气孔开放,也抑制了低浓度铜对气孔开放的促进效应。不少研究表明,水杨酸可以缓解重金属对植物的毒害作用,但是其缓解机制还有待进一步研究。试验表明,虽然外源水杨酸处理能抑制气孔开放,但当 0.01 mmol/L 水杨酸加入到含各种浓度铜离子的缓冲液中时,能明显促进气孔开放,而且在一定时间内持续最大开放状态。这可在较大程度上缓解高浓度铜离子的毒害作用。

参考文献

- [1] BLAIT MR. Ca^{2+} signaling and control of guard cell volume in stomatal movements[J]. *Can J Bot*, 2000, 3(3): 196-204.
- [2] NETTING A G. pH, abscisic acid and the integration of metabolism in plants under stressed and nonstressed conditions: cellular responses to stress and their implication for plant water relations[J]. *J Exp Bot*, 2000, 51:147-158.
- [3] SCHROEDER J I, ALLEN G J, HUGOUMEUX V, et al. Guard cell signal transduction[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2001, 52:627-658.
- [4] 权宏,施和平,李玲.脱落酸诱导气孔关闭的信号转导研究[J]. *植物学通报*,2003,20(6):664-670.
- [5] 刘新,张蜀秋,姜成后. Ca^{2+} 参与NO对蚕豆气孔运动的调控[J]. *植物生理与分子生物学学报*,2003,29(4):342-346.
- [6] 於丙军,丁义,陈宣钦,等.几种信号类物质对蚕豆气孔运动的效应[J]. *植物生理学通讯*,2004,40(3):285-288.
- [7] YANG S J, HUANG C L, WU Z Y, et al. Stomatal movement in response to long distance communicated signals initiated by heat shock in partial roots of *Conium maculatum* L[J]. *Science in China: Series C Life Sciences*, 2006, 49(1):18-25.
- [8] YANG H M, ZHANG X Y, WANG G X. Effects of heavy metals on stomatal movements in broad bean leaves[J]. *Russ J Plant Physiol*, 2004, 51(4):464-468.
- [9] 李兆亮,原永兵,刘连成.水杨酸在黄瓜细胞中信号传导的研究[J]. *植物学报*,1998,40(5):430-436.
- [10] 王利军,战吉成,黄卫东.水杨酸与植物抗逆性[J]. *植物生理学通讯*,2002,38(6):619-622.
- [11] 王松华,储卫红,周正义,等.水杨酸对小麦镉毒害的缓解效应[J]. *种子*,2005,24(10):15-17.
- [12] 唐国章,孙谷,王正询.水杨酸在植物抗环境胁迫中的作用[J]. *广西植物*,2004,24(2):178-183.
- [13] 刘新,孟繁霞,张蜀秋,等. Ca^{2+} 参与水杨酸诱导蚕豆气孔运动时的信号转导[J]. *植物生理与分子生物学学报*,2003,29(1):59-64.
- [14] 邵邻相,黄伯钟,丁淑静.锌、锰、铁和铜离子对水稻幼苗生长及SOD活性的影响[J]. *种子*,2001(6):16-17.
- [15] MARIÑEZ G M J, MORENO G S, MARIÑEZ G J J, et al. Distribution of the metals lead, cadmium, copper, and zinc in the top soil of Catagena, Spain[J]. *Water, Air, Soil Pollut*, 2001, 131(1/4):329-347.
- [16] ZHANG Z Q, SHU W S, LAN C Y, et al. Uptake and translocation of heavy metals in dominant plants of soil seed banks introduced to a lead/zinc mine tailings pond[J]. *Acta Phytoced Sinica*, 2001, 25(3):306-311.
- [17] 储玲,刘登义,王右保,等.铜污染对三叶草幼苗生长及活性氧代谢影响的研究[J]. *应用生态学报*,2004,15(1):119-122.
- [18] 王艳,鄂巍,吴丹.铜、铅污染对翦股颖和高羊茅生理的影响[J]. *沈阳师范大学学报:自然科学版*,2005,23(1):74-77.
- [19] BARCELO J, POSCHENRIEDER C. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review[J]. *J Plant Nutr*,1990,13:31-37.
- [20] MATHE B, SCHULZ M, SCHNABL H. Effects of salicylic acid on growth and stomatal movements of *Vicia faba* L: evidence for salicylic acid metabolism[J]. *J Chem Ecol*, 1992,18:1525-1539.
- [21] KAWANO T, SAHASHI N, TAKAHASHI K, et al. Salicylic acid induces extracellular superoxide generation followed by an increase in calcium ion in tobacco suspension culture: the earliest events in salicylic acid signal transduction[J]. *Plant Cell Physiol*, 1998,39:721-730.