

胞质 pH 参与 5 - 氨基乙酰丙酸诱导的苹果叶片气孔开放

胡 健, 安玉艳, 蔡长玉, 何莎莎, 汪良驹*

(南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

摘 要: 为了揭示 5 - 氨基乙酰丙酸 (ALA) 调控气孔运动的机制, 以 ‘富士’ 苹果试管苗叶片下表皮为材料, 研究了 ALA 调节气孔运动与胞质 pH 的关系, 发现脱落酸 (ABA) 和苄胺 (弱碱) 可以诱导气孔关闭, 并引起胞质 pH 和活性氧 (ROS) 显著上升; ALA 和丁酸 (弱酸) 可以抑制 ABA 诱导的气孔关闭, 同时抑制胞质 pH 和 ROS 上升。苄胺能减弱 ALA 对 ABA 诱导气孔关闭的抑制效应, 而 ALA 和丁酸则抑制外源 H₂O₂ 和 Ca²⁺ 诱导的气孔关闭。这些结果表明, 胞质 pH 处在 ALA 调节气孔运动信号途径的上游参与气孔调节。qRT-PCR 分析结果显示, ABA 诱导苹果叶片下表皮细胞液泡膜 H⁺-ATPase 编码基因 *Mdvha-c2* 和 *Mdvha-c3* 上调表达, 而 ALA 则抑制这种效应, 说明 ALA 可能通过抑制液泡膜离子泵活性, 减少胞质 H⁺ 向液泡内运输, 导致胞质酸化, 从而促进气孔开放。因此, ALA 对苹果叶片气孔运动的调节效应可能经由胞质 pH 途径实现。

关键词: 苹果; ABA; ALA; Ca²⁺; 胞质 pH; H₂O₂; 气孔运动

中图分类号: S 661.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2019) 10-1869-13

Cytoplasmic pH is Involved in 5-aminolevulinic Acid (ALA) -induced Stomatal Opening in Apple Leaves

HU Jian, AN Yuyan, CAI Changyu, HE Shasha, and WANG Liangju*

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Stomata is the main channel for CO₂ to enter into leaf mesophyll cells, and its aperture plays a key role in photosynthetic rate. Previous studies have shown that 5-aminolevulinic acid (ALA) is involved in stomatal regulation in apple leaves, but the underlying mechanism has not been fully elucidated. In the present work, the effects of ALA on cytoplasmic pH and stomatal movement were studied with the abaxial epidermis of leaves of Fuji apple (*Malus × domestica* Borkh). Results showed that when stomatal closure was induced by ABA and benzylamine, the fluorescence intensity of cytoplasmic pH and reactive oxygen species (ROS) increased significantly. When ALA and butyrate were used to inhibit ABA-induced stomatal closure, they also inhibited ABA-induced increase of cytoplasmic pH and ROS fluorescence intensity. Benzylamine weakened the effect of ALA on the stomatal closure induced by ABA, while ALA and butyrate inhibited stomatal closure induced by exogenous H₂O₂ and

收稿日期: 2019 - 08 - 15; **修回日期:** 2019 - 09 - 27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31401820, 31772253)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: wlj@njau.edu.cn)

Ca²⁺. These results suggest that cytoplasmic pH is involved in stomatal regulation at the upstream of the signal pathway of ALA regulating stomatal movement. Analysis of qRT-PCR showed that ABA induced up-expressions of *Mdvha-c2* and *Mdvha-c3* which encode subunits of tonoplast H⁺-ATPase, whereas ALA inhibited this effect. These suggest that cytosolic acidification induced by ALA may be related to the decrease of ion pump activity in the vacuolar membrane. Based on the above results, the authors conclude that the effect of ALA on stomatal movement in apple leaves is mediated by cytoplasmic pH pathway.

Keywords: apple; ABA; ALA; Ca²⁺; cytoplasmic pH; H₂O₂; stomatal movement

气孔作为植物气体交换的门户,其开度大小与光合积累、水分平衡、生长发育等都有密切关系 (Zeiger, 1983; Blatt, 2000)。然而,气孔开度受到多种因素调节,ABA (Herde et al., 1997; Pei et al., 2000)、CTK (Morsucci et al., 1991; Chen et al., 1996)、IAA (Pemadasa et al., 1982; She & Song, 2006)、MeJA (Munemasa et al., 2007; Yan et al., 2015)等植物激素都能影响气孔开度,保卫细胞内的 H₂O₂ (Murata et al., 2001; Zhang et al., 2001a)、NO (Bright et al., 2006)、Ca²⁺ (Macrobbe et al., 2000)等信号分子也参与气孔运动调节。

5-氨基乙酰丙酸 (ALA) 是所有生物体内卟啉化合物生物合成关键前体。它具有多种生物调节活性 (Akram & Ashraf, 2013),能提高植物耐盐性 (Watanabe et al., 2000; Naeem et al., 2012),耐渗透胁迫 (Niu & Ma, 2018)、耐重金属污染 (Ali et al., 2014)等,并增加生物学产量 (Hotta et al., 1997)。汪良驹等 (2004) 最早发现,ALA 能促进甜瓜叶片气孔开度,增强光合性能。这一效应相继被多位学者 (苏常红 等, 2006; 姚素梅 等, 2006; 徐晓洁 等, 2008; Youssef & Award, 2008; Ali et al., 2013) 证实。陈令会等 (2014) 率先系统研究 ALA 促进苹果叶片气孔开放机理,发现 ALA 通过下调保卫细胞活性氧 (ROS) 和 Ca²⁺ 含量来抑制黑暗/ABA 诱导的气孔关闭。An 等 (2016a) 在拟南芥上验证了这一观点。刘龙博等 (2016) 和 An 等 (2016b) 分别用苹果和拟南芥证明,ALA 诱导保卫细胞内黄酮醇积累,清除 H₂O₂,抑制 ABA 诱导的气孔关闭。Irving 等 (1992) 指出,气孔运动时胞质 pH 很早就改变。后来证实,胞质 pH 参与 ABA、IAA 等调节的气孔运动 (Suhita et al., 2004; Zhu et al., 2014)。但是,胞质 pH 是否参与 ALA 调节的气孔运动尚未见报道。

苹果作为中国最重要的栽培果树,主要分布在温带,特别是西北干旱、半干旱地区 (翟衡 等, 2007)。其气孔开度与光合积累、水分平衡、树体生长、产量品质等都有密切关系 (高晶晶 等, 2013)。研究 ALA 调控苹果叶片气孔运动机制既有理论价值,也有实践指导意义。本研究中以苹果试管苗离体叶片下表皮为材料,通过外源药剂处理、荧光染料染色以及激光共聚焦显微镜 (LSCM) 观察等方法,探究了 ALA 诱导气孔开放过程中胞质 pH 的作用,分析了胞质 pH 与 H₂O₂、Ca²⁺ 的关系,以期揭示 ALA 调控气孔运动机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料及其表皮条制备与药剂处理

试验于 2018 年 6—10 月在南京农业大学进行。材料为‘富士’苹果 (*Malus × domestica* Borkh. ‘Fuji’) 试管苗,由本实验室繁育保存。生长条件为光周期 16 h/8 h (光/暗),温度 25 °C/20 °C,光照强度为 40 μmol · m⁻² · s⁻¹。

选取试管苗上长势良好的完全展开叶片,用镊子撕取其下表皮,避开叶脉,用刀片和毛刷小心

去除粘附其上的叶肉组织,置于 Mes-KCl 缓冲液($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mes, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 , pH 6.5) 中备用。

将预先制备的下表皮置于盛有 Mes-KCl 缓冲液的培养皿中,在光照培养箱 ($240 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$) 中悬浮培养 3 h,而后转至含有其他药剂的 Mes-KCl 缓冲液中继续光照哺育培养,2 h 后取出,参照刘龙博等 (2016) 的方法观测气孔开度或 pH 和 ROS 荧光强度。每组处理至少有 3 个生物学重复,每个重复观察 10~15 个气孔开度,计算平均值。

为探讨胞质 pH 在 ALA 调节气孔运动中的作用及胞质 pH 与 ROS、 Ca^{2+} 的关系,分别设立以下处理,以不含任何药剂的 Mes-KCl 缓冲液为对照。

- (1) $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 及其分别与 0.05 、 0.5 、 1 和 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丁酸 (Butyrate, Bu) 处理。
- (2) 0.05 、 0.5 、 1 和 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苄胺 (Benzylamine, Be) 处理。
- (3) $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 及其分别与 0.05 、 0.5 和 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ALA 处理。
- (4) $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ALA、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bu、 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Be 处理,以及 ABA + ALA、ABA + Bu、ABA + ALA + Be 处理。
- (5) 前 60 min 缓冲液不加任何药剂处理;60 min 时加入 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA;120 min 时加入 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ALA。
- (6) $200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ALA 和 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bu 处理,以及 H_2O_2 + ALA、 H_2O_2 + Bu 共处理。
- (7) $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ALA、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bu 和 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ca^{2+} 处理,以及 Ca^{2+} + ALA 和 Ca^{2+} + Bu 共处理。
- (8) $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Be 和 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGTA (Ca^{2+} 螯合剂) 处理,以及 Be + EGTA 处理。

1.2 保卫细胞胞质 pH 和 ROS 相对水平测定

pH 相对水平的测定:参照 Irving 等 (1992) 和 Zhu 等 (2014) 的方法,把叶片下表皮浸没在含 $10 \sim 20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BCECF-AM 和 0.1% Pluronic F-127 的负载缓冲液 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, pH 6.4) 中,暗中孵育 30 min,使用 LSCM 观测 pH 荧光强度。每个处理至少有 3 次生物学重复,测定 20 个以上的保卫细胞,取平均值。

ROS 相对含量测定:参照陈令会等 (2014) 的方法,把叶片下表皮转移至负载缓冲液 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, pH 6.4) 中,加入 2,7-二氯氢化荧光素二乙酸酯 ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$),最终浓度为 $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,轻轻摇匀,避光孵育 30~60 min,用 LSCM 观测荧光强度。每处理至少有 3 次生物学重复,测定 20 个以上保卫细胞,取平均值。

1.3 植物 RNA 的提取及 qRT-PCR 分析

将苹果叶片下表皮置于装有 Mes-KCl 缓冲液的培养皿中光照培养 3 h,诱导气孔完全开放后,分别转移至含有 ALA、ABA 及 ALA + ABA 的 Mes-KCl 缓冲液中,以单纯 Mes-KCl 缓冲液为对照,光照培养 1 h,液氮冷冻备用。试剂盒法提取 RNA,随后反转录为 cDNA, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

用 Primer premier 5.0 软件设计相关基因的引物 (表 1),并进行 qRT-PCR,以苹果 *Ubiquitin* (*UBQ*) 基因为内参,利用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 公式计算基因的相对表达量。每次测定至少 3 次生物学重复,取平均值。

表 1 液泡膜质子泵亚基编码基因 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of genes encoding tonoplast H⁺-ATPase subunits

基因名称 Primer name	正向引物 (5'-3') Forward primer	反向引物 (5'-3') Reverse primer
<i>MdUBQ</i>	CTCCGTGGTGGTTTTAAGT	GGAGGCAGAAACAGTACCAT
<i>Mdvha-C2</i>	AGCTGGTGATGAAGTCGATCGT	GCCACAAGCTAGACCAGAGGAA
<i>Mdvha-C3</i>	ATTGTTCCGGTTTATGGCGG	GAAAGTCCGGCAAGTCCACAAG

1.4 统计分析

所得数据经 SPSS 20.0 软件进行双因素方差分析和 Duncan's 检验。

2 结果与分析

2.1 外源弱酸弱碱对苹果叶片气孔开度的影响

图 1 显示, 外源弱碱苄胺 0.05 ~ 5 mmol · L⁻¹ 处理能显著诱导苹果叶片气孔关闭, 并且浓度越高, 诱导气孔关闭的效应越强 (图 1, A)。在 10 μmol · L⁻¹ ABA 存在时, 外源弱碱丁酸 0.5 ~ 5 mmol · L⁻¹ 处理能显著抑制 ABA 诱导的气孔关闭, 而且浓度越高, 作用越大 (图 1, B)。这些结果说明, 外源弱碱可以诱导苹果叶片气孔关闭, 而外源弱酸可以抑制 ABA 诱导的苹果叶片气孔关闭。两者都存在着明显的浓度效应。

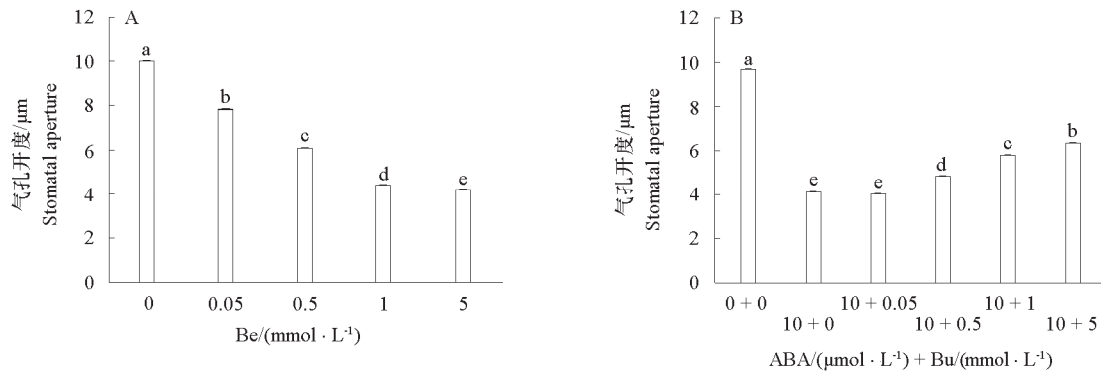


图 1 外源苄胺 (Be) 和丁酸 (Bu) 对苹果叶片气孔开度的影响

相同小写字母表示该处理在 $P=0.05$ 水平上无显著差异。下同。

Fig. 1 Effects of exogenous benzylamine (Be) and butyrate (Bu) on stomatal aperture

The same letters above bars in each figure represent no significant difference at $P=0.05$ level. The same below.

2.2 不同浓度 ALA 以及丁酸、苄碱、ABA 对气孔开度和胞质 pH 的影响

2.2.1 不同浓度 ALA 对气孔开度和胞质 pH 的影响

图 2 显示, ABA 单独处理后, 苹果叶片气孔开度显著下降, 胞质 pH 荧光强度显著升高; 添加 0.05 ~ 5 mg · L⁻¹ ALA, 则气孔开度显著增大, 胞质 pH 荧光强度显著低于 ABA 单独处理, 其中 0.5 mg · L⁻¹ ALA 效果最显著; 虽然其胞质 pH 荧光强度仍高于对照, 但与 ABA 单独处理相比, 降低了 48%。这些结果说明, 一定浓度的 ALA 能够抑制 ABA 诱导的气孔关闭, 降低胞质 pH 上升幅度。

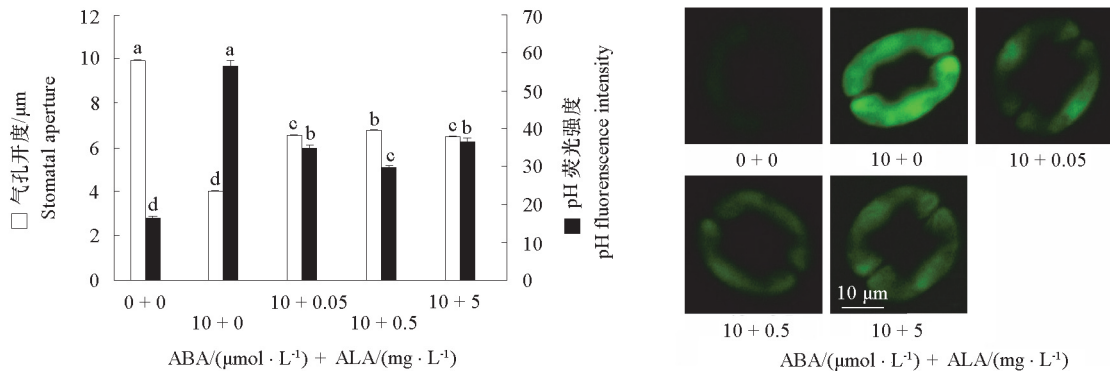


图 2 不同浓度 ALA 对 ABA 诱导的气孔关闭和胞质碱化的效应

Fig. 2 Effect of different concentrations of ALA on ABA-induced stomatal closure and cytoplasmic alkalization

2.2.2 丁酸、苄碱、ABA 以及 ALA 对气孔开度和胞质 pH 的影响

图 3 显示, ALA 和丁酸 (Bu) 单独处理, 苹果叶片气孔开度和胞质 pH 都与对照没有明显差异; ABA 和苄胺 (Be) 单独处理, 则气孔开度均显著下降, 比对照降低 55%~56%, 而胞质 pH 荧光强度比对照高出 2.0~2.3 倍 ($P < 0.01$)。当 ALA 和丁酸分别与 ABA 共处理时, 气孔开度比 ABA 单独处理分别升高 50%和 46%, 胞质 pH 荧光强度仅为 ABA 单独处理的 41%和 42%。当 ALA、ABA 与苄胺三者共处理时, 气孔开度比 ABA 和 ALA 共处理的降低 17%, pH 荧光强度上升 30%。以上结果表明, ABA 和苄胺都能诱导胞质碱化和气孔关闭, 而 ALA 和丁酸都能抑制 ABA 诱导的胞质碱化, 同时抑制气孔关闭; 苄胺能削弱 ALA 抑制 ABA 诱导的胞质碱化, 进而减弱 ALA 对 ABA 诱导的气孔关闭的抑制作用。

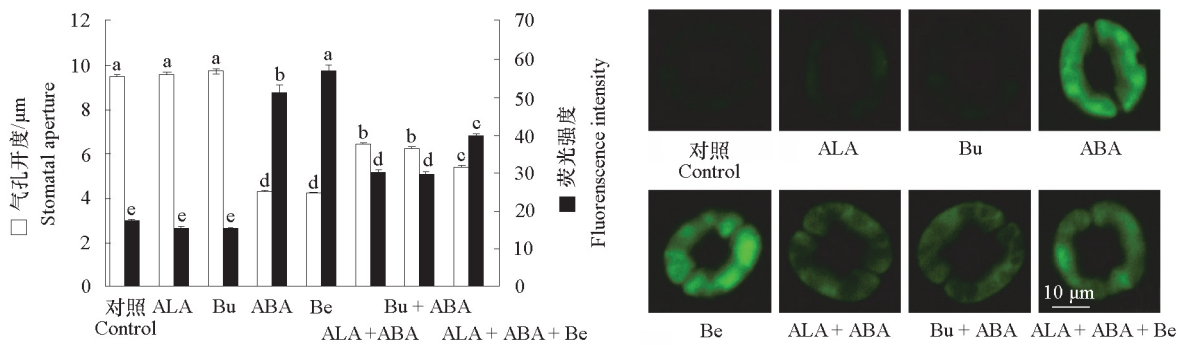


图 3 不同药剂处理对苹果叶片气孔开度及保卫细胞胞质 pH 的影响

ALA 0.5 mg·L⁻¹, 丁酸 1 mmol·L⁻¹, ABA 10 μmol·L⁻¹, 苄胺 1 mmol·L⁻¹。

Fig. 3 Effect of different treatments on the stomatal aperture and cytoplasmic pH of guard cell

0.5 mg·L⁻¹ ALA, 1 mmol·L⁻¹ butyrate, 10 μmol·L⁻¹ ABA, 1 mmol·L⁻¹ benzylamine.

2.3 ALA 诱导气孔开放过程中胞质 pH 与 ROS 的关系

图 4 显示, ALA 和丁酸单独处理的叶片气孔保卫细胞 ROS 荧光强度与对照无显著差异; ABA 和苄胺单独处理的 ROS 荧光强度极显著上升, 分别为对照的 3.4 倍和 3.2 倍。ALA 和丁酸分别与 ABA 共处理后, ROS 荧光强度与 ABA 单独处理分别下降 51%和 45%; ALA、ABA 和苄胺三者共

处理与 ALA 和 ABA 共处理相比, ROS 荧光强度上升 33%。这表明, ABA 和苄胺都能诱导苹果叶片保卫细胞内 ROS 含量显著上升, 而 ALA 和丁酸处理都能显著抑制 ABA 诱导的 ROS 荧光强度上升, 苄胺则显著减弱 ALA 对 ABA 诱导 ROS 积累的抑制作用。

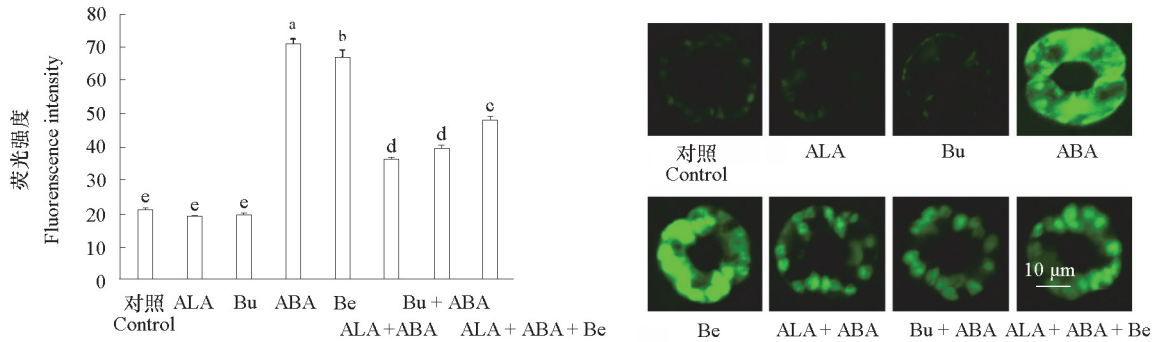


图 4 不同药剂对苹果叶片保卫细胞 ROS 荧光强度的影响

ALA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 丁酸 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, ABA $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 苄胺 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

Fig. 4 Effect of different chemicals on ROS in the guard cells of apple leaves

$0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ALA, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ butyrate, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ benzylamine.

图 5 显示, 在未加入试验药剂的 60 min 内, 苹果叶片保卫细胞胞质 pH 荧光和 ROS 荧光相对稳定。加入 ABA 后 10 min, 胞质 pH 荧光显著上升 ($P < 0.05$), 至加入后 40 min 时趋于稳定。虽然其后也有少量波动, 但没有显著差异。保卫细胞 ROS 荧光在加入 ABA 后的 20 min 内未出现明显变化; 30 min 时才显著升高, 并在 60 min 时达到最高值。此时添加 ALA, 则胞质 pH 在 10 min 内迅速下降, 30 min 后逐渐平稳; 而保卫细胞 ROS 在加入 ALA 后的 20 min 内没有出现明显变化, 其后开始下降, 30 min 时差异显著, 50 min 后趋于稳定。这些数据表明, 胞质 pH 比 ROS 对 ABA 和 ALA 的反应更为敏感。添加 ABA 或 ALA 后, 都是胞质 pH 先变化, 20 min 后 ROS 才出现变化。

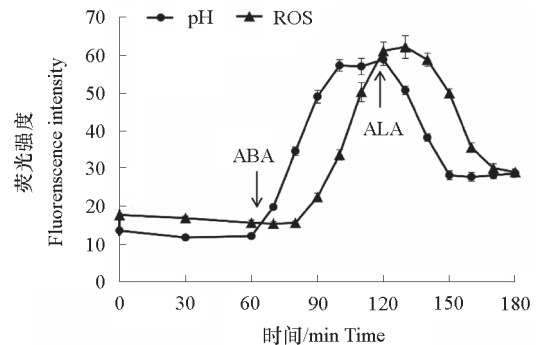


图 5 ABA 和 ALA 对苹果叶片保卫细胞胞质 pH 和 ROS 荧光强度的影响

ABA 和 ALA 浓度分别为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

Fig. 5 Effect of ABA and ALA on the fluorescence of cytoplasmic pH and ROS in the guard cells of apple leaves
The concentrations of ABA and ALA are $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively.

图 6 表明, ALA 和丁酸单独处理, 气孔开度与对照无显著差异; 外源 H_2O_2 处理的气孔开度仅为对照的 41%; ALA 和丁酸分别与 H_2O_2 共处理, 则气孔开度比 H_2O_2 单独处理分别上升 71% 和 65%, 说明 ALA 和丁酸都能抑制 H_2O_2 诱导的气孔关闭, 因此 ALA 可能通过胞质酸化来清除 ROS, 进而引起气孔关闭。

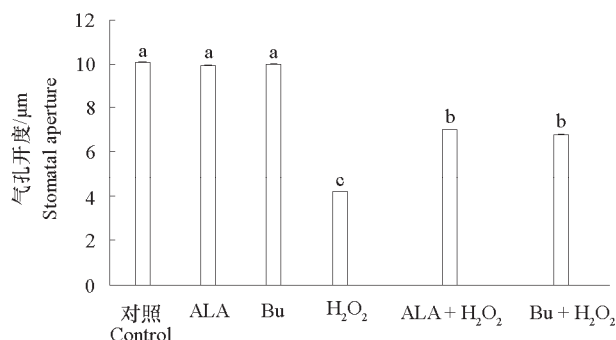


图 6 ALA 和丁酸对 H₂O₂ 引起的苹果叶片气孔关闭的影响

ALA、丁酸和 H₂O₂ 浓度分别为 0.5 mg · L⁻¹、1 mmol · L⁻¹ 和 200 μmol · L⁻¹。

Fig. 6 Effect of ALA and butyrate on stomatal closure of apple leaves induced by H₂O₂

The concentrations of ALA, butyrate and H₂O₂ are 0.5 mg · L⁻¹, 1 mmol · L⁻¹ and 200 μmol · L⁻¹, respectively.

2.4 ALA 调节气孔运动过程中胞质 pH 与 Ca²⁺的关系

图 7 显示, Ca²⁺单独处理使得气孔开度下降 59%, 胞质 pH 荧光强度上升 1.8 倍; ALA 和丁酸分别与 Ca²⁺共处理, 则气孔开度较钙单独处理高出 50%~57%, 胞质 pH 下降 34%~39%, 说明 Ca²⁺诱导苹果叶片气孔关闭与胞质 pH 上升密切相关。

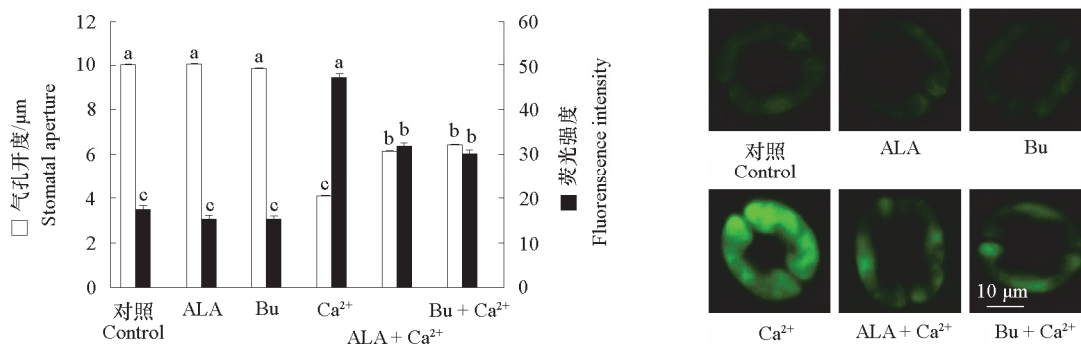


图 7 ALA 和丁酸对钙诱导的苹果气孔关闭和胞质 pH 的影响

ALA、丁酸和钙浓度分别为 0.5 mg · L⁻¹、1 mmol · L⁻¹ 和 1 mmol · L⁻¹。

Fig. 7 Effect of ALA and butyrate on cytoplasmic pH and stomatal closure of apple leaf induced by calcium

The concentrations of ALA, butyrate and Ca²⁺ are 0.5 mg · L⁻¹, 1 mmol · L⁻¹ and 1 mmol · L⁻¹, respectively.

图 8 显示, Ca²⁺螯合剂 EGTA 本身不影响苹果叶片气孔开度, 但它能显著抑制苯胺诱导的气孔关闭。以上结果说明, 外源 Ca²⁺能诱导胞质碱化和气孔关闭, 而 ALA 和丁酸通过抑制 Ca²⁺诱导的胞质碱化来抑制气孔关闭。

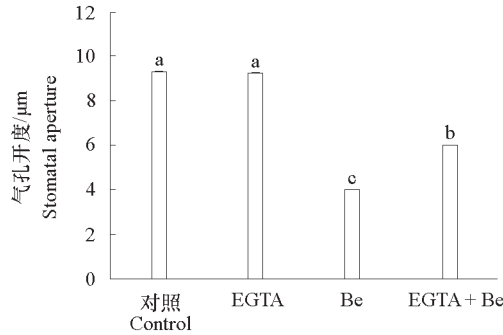


图8 EGTA对苄胺诱导的苹果叶片气孔关闭的影响

EGTA和苄胺浓度分别为0.5和1 mmol·L⁻¹。

Fig. 8 Effect of EGTA on benzylamine-induced stomatal closure of apple leaves.

The concentrations of EGTA and benzylamine are 0.5 and 1 mmol·L⁻¹, respectively.

2.5 ALA和ABA对苹果叶片下表皮细胞液泡膜H⁺-ATPase基因表达的影响

qRT-PCR结果显示,外源ALA或ABA处理60 min后的苹果叶片下表皮细胞液泡膜H⁺-ATPase大多数编码基因,如编码A、D和E等亚基的基因的表达量没有观察到规律性变化(未列出),只有编码C亚基的*Mdvha-c2*和*Mdvha-c3*表现一定的规律性(图9)。与对照相比,ABA处理使得这两个基因表达量分别上升1.19倍和1.32倍;而ABA和ALA共同处理后,其表达量虽仍高于对照,但显著低于ABA单独处理。表明ABA上调*Mdvha-c2*和*Mdvha-c3*表达可能促进胞质H⁺被泵到液泡,从而诱导胞质碱化,而ALA使其表达下调,不利于H⁺-ATPase活性提高,进而抑制ABA诱导的胞质碱化,从而有利于气孔开放。

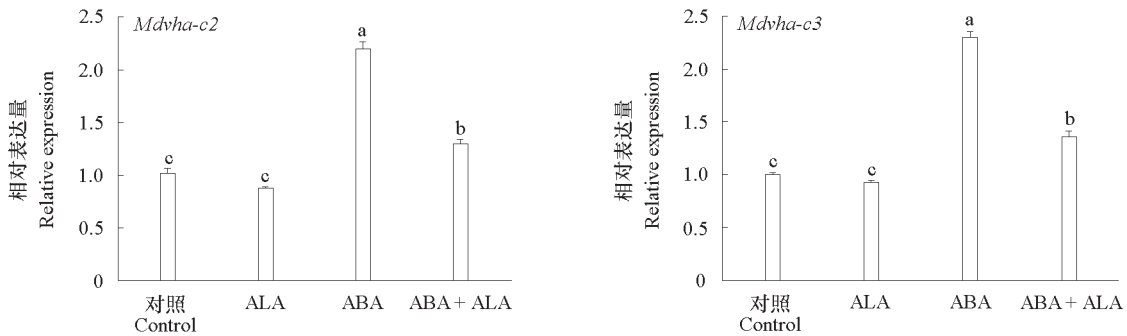


图9 ALA和ABA对苹果叶片下表皮细胞液泡膜H⁺-ATPase亚基编码基因相对表达量的影响

Fig. 9 Effect of ALA and ABA on the gene expression coding tonoplast H⁺-ATPase subunits in the abaxial epidermis of apple leaves

3 讨论

ALA作为一种新型植物生长调节剂,低浓度时能提高作物产量和抗逆性(Akram et al., 2012),高浓度时作为环境友好型天然除草剂(汪良驹等, 2003; Xu et al., 2015)、疏花剂(申明等, 2011)或果实增色剂(Xie et al., 2013),在农业生产上具有广阔应用前景。汪良驹等(2004)最早发现ALA能增大甜瓜叶片气孔开度,提高胞内CO₂浓度,促进光合速率,增强抗低温弱光能力。在高温

(马娜 等, 2015)、弱光(安玉艳 等, 2016)、盐渍(吴雯雯 等, 2017, Wu et al., 2019)等逆境条件下证明, ALA 都能提高植物光合性能, 且与气孔开放有关。在植物光合午休期, ALA 处理叶片光合性能显著高于对照, 其原因之一是气孔开度增大(孙新娥 等, 2011)。An 等(2016a)提出, ALA 在抑制 ABA 诱导的气孔关闭的同时还能增加植株抗旱性。最近, 本课题组用 ALA 溶液浇灌 PEG 处理的草莓, 发现 ALA 处理植株气孔导度增大, 蒸腾作用增强, 但植株水分状态显著好于单纯 PEG 处理。ALA 的这种效应值得深入研究。

有关植物气孔开度调节机理的研究多集中于气孔关闭, 如 ABA (Herde et al., 1997; Pei et al., 2000)、MeJA (Munemasa et al., 2007; Yan et al., 2015)、黑暗 (She et al., 2004) 等, 都会诱导气孔关闭。陈令会等(2014)最先提出 ALA 通过下调保卫细胞 ROS 和 Ca^{2+} 含量来诱导黑暗中的苹果叶片气孔开放或抑制 ABA 诱导的气孔关闭。刘龙博等(2016)进一步证明, ALA 下调苹果保卫细胞内 ROS 含量经由黄酮醇积累来实现。熊丽君(2018)等论证了 ALA 和 ABA 调节气孔运动与保卫细胞微管骨架和 PP1/PP2A 蛋白磷酸酶的关系, 认为 ALA 可能通过促进苹果叶片保卫细胞 PP1/PP2A 蛋白磷酸酶活性, 抑制 ABA 诱导产生 H_2O_2 , 促进微管蛋白基因表达和微管聚合, 起到抑制 ABA 诱导气孔关闭的效应。这一调节过程在拟南芥上得到验证 (An et al., 2019)。本研究则揭示, ALA 促进苹果叶片气孔开放涉及胞质 pH, 也与 ROS 和 Ca^{2+} 含量下降有关。目前获得的证据有: ①弱碱性化合物苜蓿胺与 ABA 一样, 都能诱导苹果叶片气孔关闭, 暗示 ABA 可能通过诱导保卫细胞胞质碱化以促进气孔关闭。这一结果与前人报道相似 (Zhang et al., 2001b; Suhita et al., 2004; Gonugunta et al., 2008; Gonugunta, 2009)。②丁酸与 ALA 一样, 都能促进 ABA 存在条件下叶片气孔开放 (陈令会 等, 2014)。丁酸是一种弱酸, 能以分子形态透过质膜进入保卫细胞, 然后解离出 H^+ , 导致胞质酸化 (Irving et al., 1992)。Huang 等(2013)提出, 丁酸可以酸化蚕豆叶片保卫细胞胞质, 清除或降低 NO 水平, 抑制 ABA 或 SNP 诱导的气孔关闭。本文没有检测苹果叶片保卫细胞 NO 水平, 但本课题组观察到盐胁迫下 ALA 处理显著抑制草莓叶片 NO 含量上升, 因而推测 ALA 诱导苹果叶片气孔开放的作用原理可能与蚕豆 (Huang et al., 2013) 相似。③我们用胞质 pH 特异染料染色结合 LSCM 观察, 发现苜蓿胺和 ABA 诱导苹果叶片保卫细胞胞质 pH 上升, 而 ALA 和丁酸抑制 ABA 诱导的胞质 pH 上升, 而且不同药剂之间存在着清晰的互作效应。它们都与气孔开度密切相关。因此, ALA 抑制 ABA 诱导的苹果叶片气孔关闭涉及到胞质 pH 酸化应该是可信的。④丁酸、苜蓿胺、ALA 和 ABA 参与苹果叶片气孔运动调节时, 都会影响保卫细胞 ROS 水平, 其中苜蓿胺和 ABA 导致 ROS 上升, 而 ALA 和丁酸显著抑制 ABA 诱导的 ROS 上升。在 ALA-ABA 调节气孔运动过程中, 无论是开放还是关闭, 胞质 pH 在处理 10 min 内出现变化, 胞质 ROS 在 30 min 内变化, 两者存在 20 min 时间差。这意味着胞质 pH 信号在通路的上游, ROS 变化在 pH 下游。但 Zhu 等(2014)提出, ROS 对胞质 pH 有反馈调节作用, pH 与 ROS 之间可能存在反馈调节效应, 只是本试验条件下没有观察到。此外, ALA 处理能够提升多种植物在逆境下的抗氧化酶活性, 同时降低叶片 H_2O_2 含量 (Nishihara et al., 2003; 康琅 等, 2006; Li et al., 2011; Akram et al., 2012)。因而, ROS 含量下降可能是经由抗氧化酶活性提高来实现。但是刘龙博等(2016)证明, ALA 下调苹果叶片保卫细胞 ROS 含量与其诱导黄酮醇积累有关。本研究中没有特意观察 ALA 调节苹果叶片保卫细胞胞质 pH 后如何影响 ROS 水平。这一点今后继续探究。⑤ 陈令会等(2014)提出, ALA 诱导气孔开放与其诱导的胞质 Ca^{2+} 浓度下降有关。本研究观察到, 外源 CaCl_2 诱导苹果叶片气孔关闭过程中存在胞质 pH 荧光强度成倍上升。外源 ALA 和丁酸都能抑制 Ca^{2+} 诱导的气孔关闭和胞质 pH 荧光上升, 而外源苜蓿胺诱导的气孔关闭能被 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA 抑制, 说明胞质 pH 调节气孔运动位于 Ca^{2+} 上游。

假如不是这样，即 Ca^{2+} 处在 pH 调节上游，那么苯胺诱导气孔关闭就不应该被 EGTA 抑制。但 Ca^{2+} 作为细胞第二信使 (Blatt, 2000)，具有多种调节功能。本研究不能完全排除钙信号反馈调节胞质 pH 的可能性。⑥ALA 为何能影响植物叶片气孔保卫细胞胞质 pH？这一问题以前从未被试验阐明。前文提到的 Irving 等 (1992) 关于弱酸弱碱以分子形态进入细胞然后参与胞质 pH 调节。但是，测定不同药剂溶液 pH 后获知，缓冲液 pH 6.50，添加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ALA 或 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 不改变 pH，而添加 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丁酸或苯胺，缓冲液 pH 变为 6.29 和 6.70。因而，ALA 或 ABA 对气孔开度的作用不是自身溶液 pH 的直接效应，而是一系列信号转导后的间接效应。Barkla 等 (1999) 提出，ABA 处理激活松叶菊液泡膜 H^+ -ATPase 活性，从而使更多的 H^+ 泵入液泡，导致胞质碱化。本研究中利用 qRT-PCR 技术分析不同处理后苹果叶片下表皮细胞液泡膜 H^+ -ATPase 编码基因 *MdAHA1*、*MdAHA4*、*MdAHA9* 和 *MdAHA11* 表达特性，没有观察到有规律性变化(数据未列出)，但在检测液泡膜 H^+ -ATPase 编码基因表达时则观察到 ABA 处理上调 *Mdvha-c2* 和 *Mdvha-c3* 表达量，而 ALA 处理则抑制 ABA 的诱导效应。这暗示，ALA 可能通过下调叶片下表皮细胞液泡 H^+ -ATPase 基因表达，降低质子泵活性，减少胞质 H^+ 运往液泡，导致胞质 pH 酸化，进而促进气孔开放。这一观点还需要更多证据支持。

综上所述，本研究以苹果叶片下表皮细胞为材料，证明 ALA 能够降低保卫细胞胞质 pH，抑制外源 Ca^{2+} 和 ABA 诱导的气孔关闭，其中，胞质酸化和 ROS 含量下降是 ALA 抑制 ABA 诱导气孔关闭的前提条件。结合本研究结果以及前人的报道，我们把 ALA 参与苹果叶片气孔调节的可能过程汇总为图 10。这些结果可以丰富 ALA 提高植物光合效率理论，并为其在农业增产增效上的应用提供理论依据。

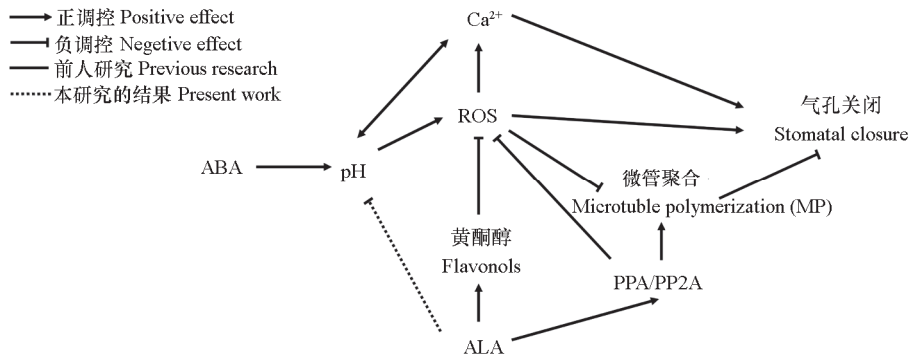


图 10 ALA 调节气孔运动过程中的信号通路

Fig. 10 The signal pathway during stomatal movement regulated by ALA

References

- Akram N A, Ashraf M. 2013. Regulation in plant stress tolerance by a potential plant growth regulator, 5-aminolevulinic acid. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32 (3): 663 - 679.
- Akram N A, Ashraf M, Al Qurainy F. 2012. Aminolevulinic acid-induced regulation in some key physiological attributes and activities of antioxidant enzymes in sunflower (*Helianthus annuus L.*) under saline regimes. *Scientia Horticulturae*, 142: 143 - 148.
- Ali B, Wang B, Ali S, Ghani M A, Hayat M T, Yang C, Xu L, Zhou W J. 2013. 5-Aminolevulinic acid ameliorates the growth, photosynthetic gas exchange capacity, and ultrastructural changes under cadmium stress in *Brassica napus L.* *Journal of Plant Growth Regulation*, 32 (3): 604 - 614.
- Ali B, Xu x, Gill R A, Yang S, Ali S, Tahir M, Zhou W J. 2014. Promotive role of 5-aminolevulinic acid on mineral nutrients and antioxidative defense system under lead toxicity in *Brassica napus*. *Industrial Crops and Products*, 52: 617 - 626.

- An Y, Feng X, Liu L, Xiong L, Wang L. 2016a. ALA-induced flavonols accumulation in guard cells is involved in scavenging H₂O₂ and inhibiting stomatal closure in *Arabidopsis* cotyledons. *Frontiers in Plant Science*, 7: 482.
- An Y, Liu L, Chen L, Wang L. 2016b. ALA inhibits ABA-induced stomatal closure via reducing H₂O₂ and Ca²⁺ levels in guard cells. *Frontiers in Plant Science*, 7: 121.
- An Y, Xiong L, Hu S, Wang L. 2019. PP2A and microtubules function in 5-aminolevulinic acid mediated H₂O₂ signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Physiologia Plantarum*, 168: 10.1111/ppl.13016.
- An Yu-yan, Zhang Li-ying, Feng Xin-xin, Tian Fan, Li Jie, Wang Liang-ju. 2016. Effect of 5-aminolevulinic acid on low light tolerance of apple leaves. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 36 (5): 987 - 995. (in Chinese)
- 安玉艳, 张丽颖, 冯新新, 田 凡, 李 洁, 汪良驹. 2016. 5-氨基乙酰丙酸对苹果叶片耐弱光能力的影响. *西北植物学报*, 36 (5): 987 - 995.
- Barkla B J, Vera-Estrella R, Maldonado-Gama M, Pantoja O. 1999. Abscisic acid induction of vacuolar H⁺-ATPase activity in *Mesembryanthemum crystallinum* is developmentally regulated. *Plant Physiology*, 120: 811 - 819.
- Blatt M R. 2000. Cellular signaling and volume control in stomatal movements in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16 (4): 221 - 241.
- Bright J, Desikan R, Hancock J T, Weir I S, Neill S J. 2006. ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant Journal*, 45 (1): 113 - 122.
- Chen Ling-hui, Liu Long-bo, An Yu-yan, Zhang Zhi-ping, Wang Liang-ju. 2014. Preliminary studies on the possible mechanism underlying 5-aminolevulinic acid-induced stomatal opening in apple leaves. *Acta Horticulturae Sinica*, 41 (10): 1965 - 1974. (in Chinese)
- 陈令会, 刘龙博, 安玉艳, 张治平, 汪良驹. 2014. 外源 5-氨基乙酰丙酸促进苹果叶片气孔开放机理的初探. *园艺学报*, 41 (10): 1965 - 1974.
- Chen S L, Wang S S, Arie A, Aloys H. 1996. Cytokinins: moderators of stomatal movement in poplar genotypes. *Journal of Beijing Forestry University (English Ed)*, (5): 9 - 22.
- Gao Jing-jing, Feng Xin-xin, Duan Chun-hui, Li Jian-hua, Shi Zhong-xuan, Gao Fu-yong, Wang Liang-ju. 2013. Effects of 5-aminolevulinic acid (ALA) on leaf photosynthesis and fruit quality of apples. *Journal of Fruit Science*, 30 (6): 944 - 951. (in Chinese)
- 高晶晶, 冯新新, 段春慧, 李健花, 师忠轩, 高付永, 汪良驹. 2013. ALA 提高苹果叶片光合性能与果实品质的效应. *果树学报*, 30 (6): 944 - 951.
- Gonugunta V K. 2009. Cytosolic alkalinization is a common and early messenger preceding the production of ROS and NO during stomatal closure by variable signals, including abscisic acid, methyl jasmonate and chitosan. *Plant Signaling & Behavior*, 4 (6): 561 - 564.
- Gonugunta V K, Srivastava N, Puli M R, Raghavendra A S. 2008. Nitric oxide production occurs after cytosolic alkalinization during stomatal closure induced by abscisic acid. *Plant Cell & Environment*, 31: 1717 - 1724.
- Herde O, Peña-Cortés H, Willmitzer L, Fisahn J. 1997. Stomatal responses to jasmonic acid, linolenic acid and abscisic acid in wild-type and ABA-deficient tomato plants. *Plant Cell & Environment*, 20 (1): 136 - 141.
- Hotta Y, Tanaka T, Takaoka H, Takeuchi Y, Konnai M. 1997. Promotive effects of 5-aminolevulinic acid on the yield of several crops. *Plant Growth Regulation*, 22 (2): 109 - 114.
- Huang A X, She X P, Zhang Y Y, Zhao J L. 2013. Acidification precedes nitric oxide removal during inhibition of ABA induced stomatal closure by Fusicoccin. *Russian Journal of Plant Physiology*, 60 (1): 60 - 68.
- Irving H R, Gehring C A, Parish R W. 1992. Changes in cytosolic pH and calcium of guard cells precede stomatal movements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89 (5): 1790 - 1794.
- Kang Lang, Cheng Yun, Wang Liang-ju. 2006. Effects of 5-aminolevulinic acid (ALA) on the photosynthesis and antioxidative enzyme activities of the leaves of greenhouse watermelon in summer and winter. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 26 (1): 2297 - 2301. (in Chinese)
- 康 琅, 程 云, 汪良驹. 2006. 5-氨基乙酰丙酸对秋冬季大棚西瓜叶片光合作用及抗氧化酶活性的影响. *西北植物学报*, 26 (1): 2297 - 2301.
- Li D M, Zhang J, Sun W J, Li Q, Dai A H, Bai J G. 2011. 5-Aminolevulinic acid pretreatment mitigates drought stress of cucumber leaves through altering antioxidant enzyme activity. *Scientia Horticulturae*, 130: 820 - 828.
- Liu Long-bo, An Yu-yan, Xiong Li-jun, Wang Liang-ju. 2016. Flavonols induced by 5-aminolevulinic acid are involved in regulation of stomatal opening in apple leaves. *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (5): 817 - 828. (in Chinese)
- 刘龙博, 安玉艳, 熊丽君, 汪良驹. 2016. 5-ALA 诱导的黄酮醇积累参与调节苹果叶片气孔开度. *园艺学报*, 43 (5): 817 - 828.
- Ma Na, Qi Lin, Gao Jingjing, Chao Kechang, Hu Qiaofang, Jiang Hongguo, Wang Liang ju. 2015. Effect of 5-aminolevulinic acid on cutting growth

- under high temperature condition and leaf chlorophyll fast fluorescence characteristics of *Ficus carica* L. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 38 (4): 546 - 553. (in Chinese)
- 马娜, 齐琳, 高晶晶, 巢克昌, 胡巧芳, 蒋红国, 汪良驹. 2015. 5-ALA 对高温下无花果扦插幼苗的生长及叶片叶绿素荧光特性的影响. *南京农业大学学报*, 38 (4): 546 - 553.
- MacRobbie E A C. 2000. ABA activates multiple Ca^{2+} fluxes in stomatal guard cells, triggering vacuolar $K^+(Rb^+)$ release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (22): 12361 - 12368.
- Morsucci R, Curvetto N, Delmastro S. 1991. Involvement of cytokinins and adenosine 3,5-cyclic monophosphate in stomatal movement in *Vicia faba*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 29: 537 - 547.
- Munemasa S, Oda K, Watanabe-Sugimoto M, Nakamura Y, Shimoishi Y, Murata Y. 2007. The *coronatine-insensitive 1* mutation reveals the hormonal signaling interaction between abscisic acid and methyl jasmonate in *Arabidopsis* guard cells. Specific impairment of ion channel activation and second messenger production. *Plant Physiology*, 143 (3): 1398 - 1407.
- Murata Y, Pei Z M, Mori I C, Schroeder J. 2001. Abscisic 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*, 13 (11): 2513 - 2523.
- Naeem M S, Warusawitharana H, Liu H B, Liu D, Ahmad R, Waraich E A, Xu L, Zhou W J. 2012. 5-Aminolevulinic acid alleviates the salinity-induced changes in *Brassica napus* as revealed by the ultrastructural study of chloroplast. *Plant Physiology and Biochemistry*, 57: 84 - 92.
- Nishihara E, Kondo K, Parvez M M, Takahashi K, Watanabe K, Tanaka K. 2003. Role of 5-aminolevulinic acid (ALA) on active oxygen-scavenging system in NaCl-treated spinach (*Spinacia oleracea*). *Journal of Plant Physiology*, 160: 1085 - 1091.
- Niu K J, Ma H L. 2018. The positive effects of exogenous 5-aminolevulinic acid on the chlorophyll biosynthesis, photosystem and calvin cycle of Kentucky bluegrass seedlings in response to osmotic stress. *Environmental and Experimental Botany*, 155: 260 - 271
- Pei Z M, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klüsener B, Allen G J, Grill E, Schroeder J I. 2000. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*, 406 (6797): 731 - 734.
- Pemadasa M A. 1982. Differential abaxial and adaxial stomatal responses to indole-3-acetic acid in *Commelina communis* L. *New Phytologist*, 90 (2): 209 - 219.
- She X P, Song X G. 2006. Cytokinin- and auxin-induced stomatal opening is related to the change of nitric oxide levels in guard cells in broad bean. *Physiologia Plantarum*, 128 (3): 569 - 579.
- She X P, Song X G, He J. 2004. Role and relationship of nitric oxide and hydrogen peroxide in light/dark-regulated stomatal movement in *Vicia faba*. *Acta Botanica Sinica*, 46 (11): 1292 - 1300.
- Shen Ming, Duan Chun-hui, Zhang Zhi-ping, Cheng Yun, Wang Liang-ju, Li Bai-jian. 2011. Effects of exogenous ALA on thinning and fruit quality in 'Hosui' pear (*Pyrus pyrifolia*). *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (8): 1515 - 1522. (in Chinese)
- 申明, 段春慧, 张治平, 程云, 汪良驹, 李百健. 2011. 外源 ALA 处理对 '丰水' 梨疏花与果实品质的影响. *园艺学报*, 38 (8): 1515 - 1522.
- Su Chang-hong, Zhong Xiu-li, Wang Dao-long, Li Mao-song. 2006. Effects of different chemicals on resistance of tomato seedling to chilling under low light. *Journal of Natural Disasters*, 15 (6): 312 - 317. (in Chinese)
- 苏常红, 钟秀丽, 王道龙, 李茂松. 2006. 几种化学物质对番茄幼苗耐低温弱光能力的影响. *自然灾害学报*, 15 (6): 312 - 317.
- Suhita D, Raghavendra A S, Kwak J M, Vavasseur A. 2004. Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiology*, 134 (4): 1536.
- Sun Xine, Shen Ming, Wang Zhonghua, Li Cui, Zhang Zhi ping, Wang Liang ju. 2011. Effects of two leaf fertilizers on photosynthesis and fruit quality of kidney bean in solar greenhouse. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 34 (3): 37 - 42. (in Chinese)
- 孙新娥, 申明, 王中华, 李翠, 张治平, 汪良驹. 2011. 两种叶面肥对日光温室芸豆叶片光合作用和果实品质的影响. *南京农业大学学报*, 34 (3): 37 - 42.
- Wang Liang-ju, Jiang Wei-bing, Huang Bao-jian. 2004. Promotion of photosynthesis by 5-aminolevulinic acid (ALA) during and after chilling stress in melon seedlings grown under low light condition. *Acta Horticulturae Sinica*, 31 (3): 321 - 326. (in Chinese)

- 汪良驹, 姜卫兵, 黄保健. 2004. 5 - 氨基乙酰丙酸对弱光下甜瓜幼苗光合作用和抗冷性的促进效应. 园艺学报, 31 (3): 321 - 326.
- Wang Liang-ju, Jiang Wei-bing, Zhang Zhen, Yao Quan-hong, Matsui Hiroyuki, Ohara Hitoshi. 2003. Biosynthesis and physiological activities of 5-aminolevulinic acid (ALA) and its potential application in agriculture. *Plant Physiological Communications*, 39 (3): 185 - 192. (in Chinese)
- 汪良驹, 姜卫兵, 章 镇, 姚泉洪, 松井弘之, 小原均. 2003. 5 - 氨基乙酰丙酸的生物合成和生理活性及其在农业中的潜在应用. 植物生理学通讯, 39 (3): 185 - 192.
- Watanabe K, Tanaka T, Hotta Y, Kuramochi H, Takeuchi Y. 2000. Improving salt tolerance of cotton seedlings with 5-aminolevulinic acid. *Plant Growth Regulation*, 32 (1): 97 - 101.
- Wu W, He S, An Y, Cao R, Sun Y, Tang Q, Wang L. 2019. Hydrogen peroxide as a mediator of 5-aminolevulinic acid-induced Na^+ retention in roots for improving salt tolerance of strawberries. *Physiologia Plantarum*, 167: 5 - 20
- Wu Wen-wen, An Yu-yan, Wang Liang-ju. 2017. Study on time effects of exogenous 5-aminolevulinic acid treatment on alleviating salinity injury in 'Benihoppe' strawberry. *Acta Horticulturae Sinica*, 44 (6): 1038 - 1048. (in Chinese)
- 吴雯雯, 安玉艳, 汪良驹. 2017. 5 - 氨基乙酰丙酸缓解 '红颜' 草莓盐胁迫伤害的时间效应研究. 园艺学报, 44 (6): 1038 - 1048.
- Xie L, Wang Z H, Cheng X H, Gao J J, Zhang Z P, Wang L J. 2013. 5-aminolevulinic acid promotes anthocyanin accumulation in Fuji apples. *Plant Growth Regulation*, 69: 295 - 303.
- Xiong Lijun, An Yuyan, Wang Liangju. 2018. The role of microtubule skeleton and PP1/PP2A protein phosphatase in ALA-ABA regulating stomatal movement in apple leaves. *Acta Horticulturae Sinica*, 45 (11): 2073 - 2088. (in Chinese)
- 熊丽君, 安玉艳, 汪良驹. 2018. 微管骨架和 PP1/PP2A 蛋白磷酸酶在 ALA-ABA 调控苹果叶片气孔运动中的作用. 园艺学报, 45 (11): 2073 - 2088.
- Xu L, Zhang W F, Ali B, Islam F, Zhu J W, Zhou W J. 2015. Synergism of herbicide toxicity by 5-aminolevulinic acid is related to physiological and ultra-structural disorders in crickweed (*Malachium aquaticum* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 125: 53 - 61.
- Xu Xiao-jie, Zou Zhi-rong, Qiao Fei, Wang Wei, Zhang Bing-kai, Qi Xiang-ling. 2008. Effects of ALA on tomato in photosynthesis, activity of protective enzymes and yield under NaCl stress. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 26 (4): 131 - 135. (in Chinese)
- 徐晓洁, 邹志荣, 乔 飞, 王 魏, 张丙凯, 祁向玲. 2008. ALA 对 NaCl 胁迫下不同品种番茄植株光合作用、保护酶活性及果实产量的影响. 干旱地区农业研究, 26 (4): 131 - 135.
- Yan S, Luo S, Dong S, Zhang T, Sun J, Wang N, Yao H, Shen Y. 2015. Heterotrimeric G-proteins involved in the MeJA regulated ion flux and stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology*, 42 (2): 126.
- Yao Su-mei, Wang Wei-jin, Chen Guo-xing. 2006. Effects of 5-aminolevulinic acid on phosphate absorption and distribution in rice using ^{32}P tracer method. *Plant Nutrition & Fertilizer Science*, (12): 70 - 75. (in Chinese)
- 姚素梅, 王维金, 陈国兴. 2006. 5 - 氨基酮戊酸对水稻植株中 ^{32}P 吸收与分配的影响. 植物营养与肥料学报, (12): 70 - 75.
- Youssef T, Awad M A. 2008. Mechanisms of enhancing photosynthetic gas exchange in date palm seedlings (*Phoenix dactylifera* L.) under salinity stress by a 5-aminolevulinic acid-based fertilizer. *Journal of Plant Growth Regulation*, 27 (1): 1 - 9.
- Zeiger E. 1983. The biology of stomatal guard cells. *Annual Review of Plant Physiology*, 34: 441 - 475.
- Zhai Heng, Shi Da-chuan, Shu Huai-rui. 2007. Current status and developing trend of apple industry in China. *Journal of Fruit Science*, 24 (3): 355 - 360. (in Chinese)
- 翟 衡, 史大川, 束怀瑞. 2007. 我国苹果产业发展现状与趋势. 果树学报, 24 (3): 355 - 360.
- Zhang X, Dong F C, Gao J F, Song C P. 2001a. Hydrogen peroxide-induced changes in intracellular pH of guard cells precede stomatal closure. *Cell Research*, 11: 37 - 43.
- Zhang X, Zhang L, Dong F, Gao J, Galbraith D W, Song C P. 2001b. Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Physiology*, 126 (4): 1438 - 1448.
- Zhu Y, Ge X, Wu M, Li X, He J. 2014. The role and interactions of cytosolic alkalization and hydrogen peroxide in ultraviolet B-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 215 - 216 (3): 84 - 90.