

植物浸提液对蚕豆保卫细胞气孔运动的影响

陆 敏¹, 沈国明^{2,3}

(1. 浙江省天台平桥镇中学, 浙江 天台 317203; 2. 浙江大学生命科学学院, 浙江 杭州 310058;
3. 武汉生物工程学院, 湖北 武汉 430415)

摘要:用 20 种浙江天台山优势度明显的植物浸提液, 从中筛选得到 6 种对气孔运动效果明显的植物, 即醉鱼草、芒萁、马醉木、革命菜、常春藤和络石, 研究了它们对蚕豆保卫细胞 K^+ 通道和微丝的调控作用。结果表明: 马醉木浸提液可拮抗微丝解聚剂(CD)对微丝的解聚, 芒萁浸提液中可能存在外向 K^+ 通道的激活剂, 络石浸提液和常春藤浸提液可以激活内向 K^+ 通道, 络石可以明显抑制外向 K^+ 通道。而醉鱼草、芒萁、马醉木浸提液对外向 K^+ 通道活化有一定的作用, 但革命菜浸提液的调控效果不明显。

关键词:气孔运动; 浸提液; K^+ 通道; 微丝

中图分类号: S551⁺. 401

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2010)03-0008-04

有研究表明 NO 、 H_2O_2 、 ABA 、 Ca^{2+} 、细胞外钙调素、 pH 、多胺、茉莉酸和聚酰胺等均影响气孔的运动^[1-8], 它们作用的靶分子主要是 K^+ 通道和微丝骨架。植物中含有的非蛋白质氨基酸、多肽、生物碱、酚类及其衍生物和简单有机化合物等能否调控 K^+ 通道和微丝, 国内外未见文献报道, 为了揭示气孔运动调控物质的多样性, 开展了植物浸提液对气孔运动影响的试验。植物中含有的具体化学物质尚未十分清楚, 因此, 该文筛选出对气孔运动有明显作用的 6 种植物, 即醉鱼草(*Buddleja lindleyana*)、芒萁(*Dicranopteris pe-*

data)、马醉木(*Pieris japonica*)、革命菜(*Gynura crepidioides*)、常春藤(*Hedera helix*)和络石(*Trachelospermum jasminoides*)等的全浸提液, 选用蚕豆(*Vicia faba*)叶片为模式材料, 研究了这 6 种植物的全浸提液对其气孔保卫细胞 K^+ 通道和微丝蛋白的调控作用。以便为进一步分离纯化非蛋白质氨基酸、多肽、生物碱、酚类及其衍生物等研究其对 K^+ 通道和微丝蛋白的调控奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

2008 年 10 月中旬, 在浙江天台山采集群落优势度明显的 20 种植物的枝叶带回实验室, 在烘箱中 $150^\circ C$ 杀青 40 min, 然后调温至 $80^\circ C$ 继续烘干至恒重。将干燥后的植物枝叶经粉碎机粉碎后与蒸馏水按质量比 1 : 9 混合放入锥形瓶中, 然后将锥形瓶放入水浴锅, $100^\circ C$ 水浴 12h 充分抽提

收稿日期: 2009-11-16

基金项目: “973”计划资助项目(2007CB109305)

第一作者简介: 陆敏(1976-), 女, 浙江省天台县人, 学士, 中教二级, 现从事中学自然科学教学工作。E-mail: lm5330@yahoo.com.cn。

通讯作者: 沈国明(1975-), 男, 浙江省绍兴市人, 博士, 副教授, 现从事植物逆境生理与分子生物学研究。E-mail: gmshe@yahoo.cn。

Optimize the Condition of Rice Cultivation and Determinate the Change of the Pectinase Activity and the Gray-scale

WANG Xu-da, FENG Ming, LI Jing-peng

(Dalian Biotechnology Institute of Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Dalian, Liaoning 116024)

Abstract: By soaking the rice for the cultivation the molecular conformation changed, and determined the change of the pectinase activity, then determined the best immersion and germination conditions and the gray-scale. The results showed that the best conditions for cultivate was that immersion temperature is $25^\circ C$, immersion mode is 4 hours immersion and 10 hours un-immersion, immersion alkali content is 0.03% $Ca(OH)_2$, immersion time is 2.5 days, germination temperature is $25^\circ C$, germination time is 6 days, the pectinase activity and the gray-scale of the modified starch were best at this time. The pectinase activity and the gray-scale of rice modified starch were determined successfully.

Key words: germination rice; modified starch; activity of pectinase; gray-scale

后,过滤,得到全浸提液,分装后,放入 4℃ 冰箱中待用。蚕豆种子清洗消毒后浸种 12 h, 25℃ 催芽 24 h,播种于营养土中,在营养土中掺入适量蛭石(2:1)以增强其透水性,生长室(光/暗周期为 10 h/14 h,光强为 200~300 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$;昼/夜温度为 24℃/18℃;相对湿度为 60%,无任何胁迫)中培养 3 周,培养期间保持水分充足。

1.2 浸提液的筛选

20 种植物以全浸提液的浓度记为 100%,分别选取反应终浓度为 0.5%、1.0%、2.0%、5.0% 和 10.0% 五个浓度梯度,以蒸馏水为对照。取 3 周龄蚕豆幼苗的顶端第 2~3 对完全展开叶,蒸馏水洗净后,用镊子撕取下表皮,用毛笔小心刷去叶肉细胞,切成长 5 mm 的表皮条浸入 Mes-KCl 缓冲液(50 mmol \cdot L⁻¹ KCl、10 mmol \cdot L⁻¹ Mes,用 Tris 调 pH 至 6.15)中,在光下处理 3 h,或黑暗处理 3 h 后,以抑制气孔开放或促进气孔开放 50% 以上记为显著(++),然后在显微镜下测量,随机选取 5 个视野,每个视野随机选取 10 个气孔,记录终态孔径,每个处理重复 3 次以上。

1.3 POD 活性的测定

准确称取 1 g 样叶,加入磷酸缓冲液(PBS, pH 7.8),冰浴研磨至匀浆。4℃, 9 000 r \cdot min⁻¹ 离心 20 min 取上清液备用。POD 活性的测定按张志良^[9]的方法。

1.4 K⁺ 通道和微丝对浸提液的敏感性测定

蚕豆表皮条的制备同 1.2。先将新制备的表皮条置于含有不同浓度、不同处理[Ba²⁺、Al³⁺、Ca²⁺ 浓度分别为 10、10、1 mmol \cdot L⁻¹、不同 pH(4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0)、解聚剂 CD (20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和 Phalloidin (100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)]试剂的 Mes-KCl 缓冲液(50 mmol \cdot L⁻¹ KCl、10 mmol \cdot L⁻¹ Mes,用 Tris 调 pH 至 6.15)中,在光下处理 3 h(以鉴定促进气孔关闭组),及光下处理 3 h 后黑暗处理(以鉴定抑制气孔关闭组),对气孔开度的测量同 1.2。

2 结果与分析

2.1 对蚕豆保卫细胞气孔运动作用明显的植物浸提液的筛选

对浙江天台山优势度明显的 20 种植物进行筛选得到 6 种对蚕豆保卫细胞有明显作用的全浸提液(见表 1),其中醉鱼草、芒萁和马醉木对光诱导的气孔开放有明显的抑制作用,而革命菜、常春藤和络石对黑暗诱导的气孔关闭有明显的抑制作用。为了鉴定这 6 种植物浸提液对活性蛋白的影响,选择了植物活性蛋白的代表 POD,以便能准确评价这 6 种植物浸提液对 K⁺ 通道和微丝蛋白的调控作用。

表 1 对蚕豆保卫细胞气孔运动作用明显的植物浸提液的筛选分析

植物名称	植物浸提液浓度/%				
	0.5	1.0	2.0	5.0	10.0
抑制光诱导的气孔开放组					
醉鱼草(<i>Buddleja lindleyana</i>)	—	—	+	+++*	++
芒萁(<i>Dicranopteris pedata</i>)	—	+	+++*	++	++
马醉木(<i>Pieris japonica</i>)	+	+++*	++	++	++
抑制暗诱导的气孔关闭组					
革命菜(<i>Gynura crepidioides</i>)	—	—	+	+	+++*
常春藤(<i>Hedera helix</i>)	—	+	+++*	++	++
络石(<i>Trachelospermum jasminoides</i>)	—	—	+	+++*	++

注:“—”表示无明显现象,“+”表示有明显现象,“*”为选择的工作浓度。

2.2 植物浸提液对蚕豆 POD 活性的影响

6 种植物浸提液对蚕豆叶片 POD 的活性都有一定的抑制作用(见图 1),其中以马醉木的抑制效果最为明显。

2.3 植物浸提液对蚕豆保卫细胞气孔运动的调控作用

为了探明这种抑制气孔开放或关闭的因素是

由于作用于 K⁺ 通道还是作用于微丝蛋白,选取了内外 K⁺ 通道阻断剂 Ba²⁺,内向 K⁺ 通道阻断剂 Al³⁺ 和抑制剂 Ca²⁺ 以及影响外向 K⁺ 通道的关键因素 pH;关于对微丝效应,选用了微丝解聚剂 CD 和微丝稳定剂 Phalloidin。浸提液按表 1 的筛选结果,选取醉鱼草 5.0%、芒萁 2.0%、马醉木 1.0%、革命菜 10.0%、常春藤 2.0% 和络石

5.0%。在光照和黑暗处理后将表皮带转入含浸提液的 Mes-KCl 溶液中,进行时间关联分析。结果表明,马醉木浸提液能促进气孔开放(见图 2),表 1 的结果表明,马醉木浸提液抑制光诱导的 K^+ 内流气孔开放,但在 K^+ 通道被 Ba^{2+} 阻遏时,仍表现出对气孔开放的促进作用,且在此处理中加了微丝解聚剂 CD,由此表明,马醉木浸提液可拮抗 CD 对微丝的解聚。芒萁浸提液也抑制光诱导的 K^+ 内流气孔开放,但存在 K^+ 通道阻遏剂 Ba^{2+} 和微丝解聚剂 CD 的情况,其能进一步抑制气孔的开放,由此证明芒萁浸提液中存在外向 K^+ 通道的激活剂。

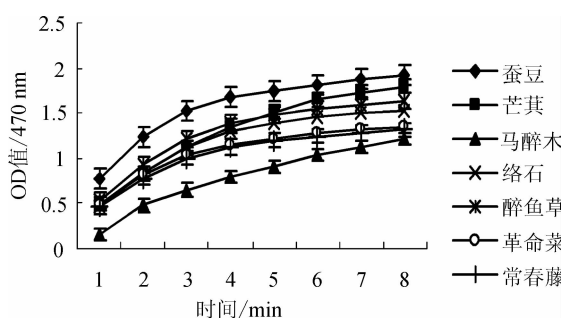


图 1 6 种植物浸提液对蚕豆叶片 POD 活性的影响

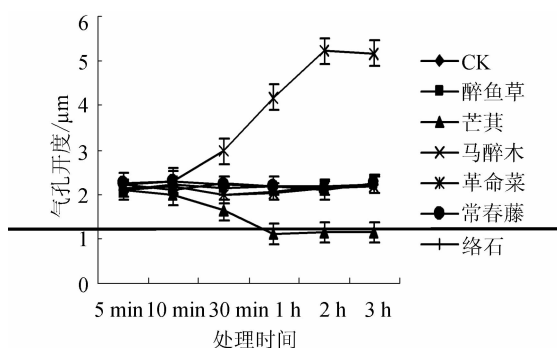


图 2 6 种植物浸提液对蚕豆气孔微丝的调控
缓冲液中含 CD 和 Ba^{2+}

在 Ba^{2+} 与 Phalloidin 组合的处理中(见图 3)进一步表明,马醉木浸提液使微丝的聚合更趋于稳定,因而气孔开得较大,而芒萁仍表现出促进气孔关闭的效应。

通过浸提液对 K^+ 通道的调控研究,首先选择了内向 K^+ 通道阻断剂 Al^{3+} ,在存在微丝解聚剂 CD 的情况下(见图 4),发现络石浸提液和常春藤浸提液可促进气孔开放,且可抑制暗诱导的气孔关闭(见表 1),由此证明它们可激活内向 K^+ 通道。而芒萁和醉鱼草浸提液则抑制气孔开放,由

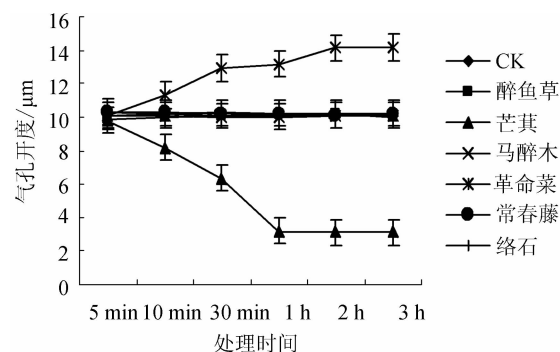


图 3 6 种植物浸提液对蚕豆气孔运动微丝的调控
缓冲液中含 Phalloidin 和 Ba^{2+}

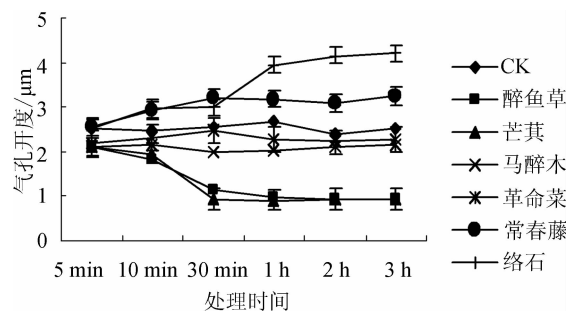


图 4 6 种植物浸提液对蚕豆气孔运动内向 K^+ 通道的调控
缓冲液中含 CD 和 Al^{3+}

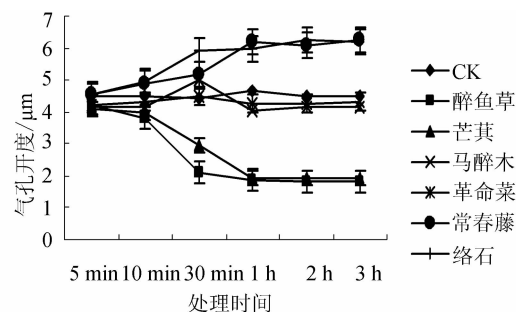


图 5 6 种植物浸提液对蚕豆气孔运动内向 K^+ 通道的调控
缓冲液中含 Phalloidin 和 Ca^{2+}

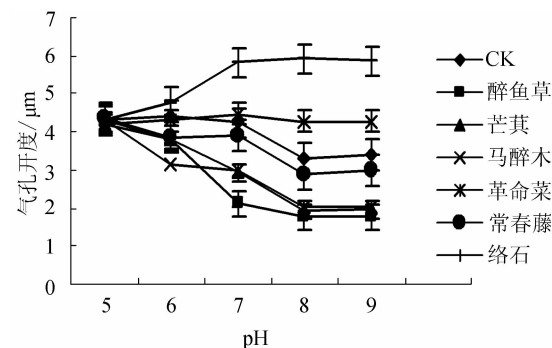


图 6 6 种植物浸提液对蚕豆气孔运动外向 K^+ 通道的调控
此得出,它们的浸提液中存在内向 K^+ 通道的抑制剂。在内向 K^+ 通道抑制剂 Ca^{2+} 与微丝解聚剂 CD 共存的实验中(见图 5),也有有力地证明了这一

点,络石和常春藤浸提液促进气孔开放,芒萁和醉鱼草促进气孔关闭。

浸提液如何调控外向 K^+ 通道,结果表明,络石可以明显抑制外向 K^+ 通道,而醉鱼草、芒萁、马醉木浸提液对外向 K^+ 通道活化有一定的作用(见图 6)。在这些分析中未检测到革命菜浸提液对 K^+ 通道和微丝的调控作用。Michael^[10] 报道 pH 直接影响外向 K^+ 通道的活性,高 pH 激活,低 pH 抑制。

以上的结果是用全浸提液得出的,具体是什么物质在起作用,有待对这些植物浸提液进行成分分析,并结合气相-液相色谱连用和核磁共振等方法分离纯化有效物质,进而细化 6 种植物浸提液中对 K^+ 通道和微丝的调控有明显作用的物质。

参考文献:

- [1] 余小平,宋喜贵,贺军民. NO 和 H_2O_2 在光/暗调控蚕豆气孔运动中的作用及其相互关系[J]. 植物学报, 2004, 46(11):1292-1300.
- [2] 付士磊,周永斌,王森,等. 外源 NO 和 ABA 对杨树气孔运动和 SOD 及 POD 活性的影响[J]. 沈阳农业大学学报, 2004, 35(1):29-32.
- [3] Tallman G. Are diurnal patterns of stomatal movement the

result of alternating metabolism of endogenous guard cell ABA and accumulation of ABA delivered to the apoplast around guard cells by transpiration [J]. Journal of Experimental Botany, 2004, 55 (405):1963-1976.

- [4] 王恒彬,张蜀秋,王学臣,等. Ca^{2+} /CaM 参与乙酰胆碱调控气孔运动的信号转导[J]. 科学通报, 2003, 48(2): 154-156.
- [5] 肖玉梅,陈玉玲,黄荣峰,等. 拟南芥保卫细胞微丝骨架的解聚可能参与了细胞外钙调素诱导的气孔关闭[J]. 中国科学, 2004, 34(2):129-135.
- [6] 薛绍武,杨频,裴真明. 植物保卫细胞离子通道在气孔运动中的作用[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(4):489-495.
- [7] 刘新,张蜀秋,孟繁霞. 不同条件下水杨酸对蚕豆气孔开度的影响[J]. 应用与环境生物学报, 1999, 5(6):638-639.
- [8] Liu K, Fu H H, Bei Q X, et al. Inward Potassium Channel in Guard Cells As a Target for Polyamine Regulation of Stomatal Movements [J]. Plant Physiology, 2000, 124: 1315-1325.
- [9] 张志良. 植物生理学实验指导 [M]. 2 版. 北京:中国高等教育出版社, 1990:154-155.
- [10] Blatt M R. K^+ channels of stomatal guard cells[J]. The Journal of General Physiology, 1992, 99:615-644.

The Effect of Several Plant Extraction Solutions on Guard Cell Stomatal Movements in *Vicia faba*

LU Min¹, SHEN Guo-ming²

(1. Tiantai Pingqiao Junior High School in Zhejiang Province, Tiantai, Zhejiang 317203; 2. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058; 3. Wuhan Bioengineering Institute, Wuhan, Hubei 430415)

Abstract: Used the extracted solution of 20 plant population dominate species from Tiantai mount in Zhejiang province, and selected 6 plant species which apparently affected *Vicia faba* guard cell stomatal movements, namely *Buddleja lindleyana*, *Dicranopteris pedata*, *Pieris japonica*, *Gynura crepidioides*, *Hedera helix* and *Trachelospermum jasminoides*. The assay focused on how these 6 plant extracted solutions regulated K^+ channels and microfilament in *Vicia faba* guard cell stomatal movements. The results indicated that *Pieris japonica* extracted solution could anti-cytochalasin D in filament diffusion, *Dicranopteris pedata* extracted solution might existed outward K^+ channel activator, inward K^+ channels could be activated by *Trachelospermum jasminoides* and *Hedera helix* extracted solutions, outward K^+ channel could be inhabited by *Trachelospermum jasminoides* extracted solution apparently, and *Buddleja lindleyana*, *Dicranopteris pedata*, *Pieris japonica* took part in outward K^+ channel activated, but it was failed to identify the function of *Gynura crepidioides* extracted solution in regulating K^+ channels and microfilament.

Key words: stomatal movement; extracted solution; K^+ channel; microfilament