

水分胁迫诱导的离体蚕豆叶片与保卫细胞脱落酸积累^①

张蜀秋^②

(中国农业大学生物学院)

摘要 研究了蚕豆离体叶片失水10%后,叶片与其气孔保卫细胞脱落酸含量的变化及其与叶龄的关系。未受胁迫叶片脱落酸含量在成熟叶片中高于幼嫩叶片,保卫细胞中脱落酸含量均在很低的水平。在叶片自然失水10%的10 min内,叶片的脱落酸含量几乎无变化,但保卫细胞的脱落酸含量增加5倍以上。4 h后,叶片脱落酸含量也显著增加,从最幼嫩叶片到成熟叶片分别达到处理前的25,26,17,10和6倍。因是离体叶片,排除了脱落酸的其他来源,说明叶片在失去膨压时合成并积累脱落酸;所有保卫细胞脱落酸含量都增加30倍以上,以第2,3片完全展开叶片的保卫细胞最为敏感,其脱落酸含量增加40倍以上。失水处理后保持湿润恢复膨压的叶片和其保卫细胞的脱落酸含量没有增加。分析了在水分胁迫下保卫细胞中增加的脱落酸的可能来源。

关键词 水分胁迫;脱落酸;保卫细胞;蚕豆

分类号 Q945; Q948.3

Water Stress-Induced Abscisic Acid Accumulation in Detached Leaves and Guard Cells of *Vicia faba* L.

Zhang Shuqiu

(College of Biology, CAU)

Abstract Detached *Vicia faba* L. leaflets were water stressed. The ABA contents of leaves and guard cells were assayed in different time. The ABA contents of leaves were age-dependent in the unstressed leaves, the ABA level was higher in the mature leaves than younger leaves. There was a low level ABA in all guard cells. Within stress for 10 min, leaf ABA contents were not changed, but guard-cell ABA contents increased five folds. four hours after stress, ABA contents in leaves increased 25, 26, 17, 10, and 6 times respectively from the youngest leaves to mature leaves. It's suggested that leaves were synthesis ABA when isolated leaves lost their turgor. ABA contents in guard cells increased about 40 times. Four hours after stress relief, the ABA contents of leaves and guard cells were near the prestress value. The sources of increased ABA in the guard cells were discussed.

Key words water stress; abscisic acid; guard cell; *Vicia faba* L.

植物叶片上有规律地分布着成千上万的气孔,它是植物用以调节自身与环境中气体和水分交换的重要机构,组成气孔的保卫细胞膨胀或收缩运动引起它们围成的小孔开放或关闭。气孔保卫细胞对各种内外因子非常敏感,如光照、温度、湿度、CO₂等环境因子和内源植物激素以及外施生长调节物质^[1]。植物对干旱胁迫的快速反应之一是关闭气孔以减少蒸腾、保持体内水分平衡,植物内源激素脱落酸(ABA)作为信使有效地调节气孔关闭,大量实验证明了干旱胁迫下植物根系、导管汁液和叶片ABA含量变化和气孔行为间存在一定的相关关系^[2,3]。但是由于实验方法的限制,对于ABA的靶细胞——气孔保卫细胞——的ABA含量变化了解

收稿日期:1997-09-01

①国家攀登计划资助项目

②张蜀秋,北京圆明园西路2号中国农业大学(西校区),100094

却较少,目前只有少数实验室做了直接测定^[4]。我们用这种超微量的双层固相抗体酶联免疫分析方法测定了在水分胁迫的短时间内离体叶片和保卫细胞中 ABA 含量各自的变化,以了解在排除根源 ABA 的情况下,叶片中 ABA 特别是气孔保卫细胞中 ABA 的动态变化。

1 材料与方法

1.1 植物材料

蚕豆(*Vicia faba* L.)播种在营养土中,在生长箱中培养,温度:白天 22℃/晚上 18℃;相对湿度 50%;光照 14 h/黑暗 10 h;适时浇水。

1.2 实验处理和取样

用水分状态良好的 3 周龄蚕豆幼苗,从最幼嫩叶片开始依次向下取 5 对叶片,每对取 1 小叶为对照立即置液氮中,另 1 小叶离体后置天平上约 10 min,待叶片鲜重减少 10%后立即置液氮中,减少的鲜重被认为是水分丢失,此时的叶片失去一定的膨压;另一些叶片在失水 10%后置塑料袋内于黑暗中,在 22℃下从 30 min 到 4 h 分批取样置液氮中,而一些叶片在失水 10%后用湿滤纸夹住置塑料袋内于黑暗中 4 h 作为复水对照,取出置液氮中。所有样品从液氮中取出后立即在-40℃真空干燥。定量称取叶片或从真空冷冻干燥后的叶片上解剖保卫细胞,加 80%甲醇(含 0.01% BHT),在 4℃黑暗中提取 ABA^[4],待测定。

1.3 ABA 测定

采用双层固相抗体酶联免疫分析加酶循环放大的超微量测定^[4,5],其测定的灵敏度可达到 10^{-15} mol·L⁻¹,因此可准确测定几十个保卫细胞的 ABA 含量。

2 结果与分析

2.1 不同叶龄叶片对失水的反应

3 周龄的蚕豆幼苗共有 6~7 对叶片,第 1 对是最幼嫩的尚未展开叶片,表皮上的气孔正在分化,包括保卫细胞母细胞和正分化的小气孔,不易失水;第 2,3,4 叶是正在展开和完全展开的功能叶片,光合作用和蒸腾作用强烈,表皮上的保卫细胞对湿度反应非常敏感,气孔运动调节灵敏;第 5 对以下的叶片开始衰老,气孔运动的调节反应逐渐迟钝(表 1)。

表 1 叶片叶龄与其失水与气孔孔径的关系

项 目	叶 序(自上而下)				
	1	2	3	4	5
叶长 <i>l</i> /cm	3.5	5.5	6.2	7.0	7.2
鲜重 <i>m</i> /g	0.11	0.35	0.45	0.62	0.85
失水 10%后气孔关闭程度 φ /%	60	80	90	80	50

2.2 失水对不同叶龄叶片 ABA 含量的影响

在胁迫处理前,从最幼嫩叶片到成熟叶片,ABA 含量逐渐增多,未展开叶 ABA 含量低而成熟叶片含量较高,第 5 对叶片是第 1 对叶片的 6.5 倍(表 2 中对照)。一般认为 ABA 可在成熟叶片的叶绿体中大量合成,在正常水分状况下也贮存一定量的 ABA。未展开叶一方面由于叶绿体发育尚不完善,一方面气孔保卫细胞也处于正在分化时期,而且其原生质浓厚不易失水,合成和代谢 ABA 的能力较低,其 ABA 含量相对较少。

表 2 失水前后不同叶龄叶片的 ABA 含量 $w/\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}, n=3$

处 理	t/min	叶 序(自上而下)				
		1	2	3	4	5
对 照		0.17±0.02	0.33±0.12	0.49±0.07	1.02±0.18	1.11±0.09
失水 10%	10	0.19±0.01	1.18±0.06	1.21±0.10	1.04±0.06	1.16±0.22
失水后	30	0.23±0.05	2.89±0.15	2.51±0.52	1.63±0.17	1.76±0.08
	60	1.28±0.12	3.19±0.33	3.18±0.77	2.61±0.42	2.08±0.15
	120	2.26±0.09	6.55±0.81	5.44±0.56	5.73±1.12	4.22±1.31
	180	3.53±0.34	7.02±1.16	6.31±0.29	7.36±1.09	6.92±0.67
	240	4.33±0.78	8.54±0.95	8.18±1.02	9.77±0.88	5.98±1.47
失水后保湿	240	0.31±0.11	0.78±0.24	0.83±0.35	1.05±0.07	0.84±0.18

在最初胁迫的 10 min, 第 2, 3 叶片中 ABA 含量略有增加, 但其余叶片则几乎不变; 随胁迫后叶片置于暗中的时间延长, 所有叶片中 ABA 含量都逐渐增加, 至 4 h 后分别是对照的 25, 26, 17, 10, 6 倍; 其中第 2, 3, 4 正展开叶 ABA 含量达到 8~10 $\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ (FW)。因为是离体叶片排除了从外运入 ABA 的可能性, 说明在叶片失水、膨压下降后的一段时间中, 叶片自身在合成或转化 ABA, 较幼嫩叶片更为敏感, 而较老的第 5 叶片在正常情况下虽然含 ABA 最多, 在失水后 ABA 的增加倍数却最少。而失水后在保湿条件下, 叶片恢复膨压, 其中 ABA 含量不增加, 和失水 10 min 时相当(表 2)。

2.3 失水对不同叶龄叶片气孔保卫细胞 ABA 含量的影响

在有充足水分供应时, 叶片保持一定的膨压, 所有保卫细胞中 ABA 含量都很低, 随叶龄增加仅略有增加; 失水 10 min, 保卫细胞中 ABA 水平即显著上升, 可达对照的 5 倍左右; 置暗中 30 min, 第 2, 3 叶片保卫细胞 ABA 含量已达到对照的 8~10 倍; 随叶片在暗中时间加长, 保卫细胞 ABA 含量也逐渐增加, 在 4 h 后, 各叶片保卫细胞中的 ABA 含量均增加 30 倍以上, 尤其是第 2, 3 叶片, 达到 40 倍以上; 而在湿滤纸中 4 h, 比失水 10 min 时还略有下降(表 3)。

表 3 不同叶龄叶片失水前后每个保卫细胞对的 ABA 含量 $m/\text{fg}, n=2$

处 理	t/min	叶 序(自上而下)			
		1	2	3	4
对 照		0.41	0.55	0.57	0.68
失水 10%	10	1.36	3.51	3.78	3.27
失水后	30	2.75	4.52	5.78	4.30
	60	4.62	7.30	9.45	7.41
	120	8.54	14.41	20.21	17.30
	240	14.01	23.44	25.10	24.32
失水后保湿	240	1.02	2.11	2.73	2.02

3 讨论

植物受到水分胁迫时, ABA 含量增加, 气孔关闭, 但是, Davies 和 Zhang^[2]等发现叶片中 ABA 含量变化和气孔孔径间的关系有时不明确, 而木质部汁液中 ABA 含量的增加和气孔关闭有高度的相关性, 说明在根中合成的 ABA 经导管随蒸腾流上运到达气孔保卫细胞, 传达干旱信息, 引起气孔关闭。Slovik 等^[6]则认为成熟叶片中存在 ABA 库, 在一定条件下对发生 ABA 的再分配起重要的调控作用。本实验用离体叶片, 排除了根源 ABA, 在叶片失去膨压的

一定时间内,叶片 ABA 含量逐渐增加,也说明在这种情况下,叶片自身在合成或转化 ABA。

从实验结果可知,在叶片失水的 10~30 min 内,叶片 ABA 含量没有明显增加时,保卫细胞的 ABA 含量已经增加了 10 倍。目前对保卫细胞快速增加的 ABA 的来源有几种分析:①叶肉细胞中合成并贮存大量 ABA,在不同的条件下,按各部分的透性和 pH 值分配和再分配,植物接收到干旱胁迫信号时,ABA 向气孔保卫细胞再分配^[6,7]。②保卫细胞周围表皮细胞或质外体作为 ABA 库,可方便有效地和保卫细胞进行交流^[8~10]。③保卫细胞自身是否具有合成和代谢 ABA 的能力? Cornish 等^[11]用渗透剂胁迫蚕豆和豌豆表皮条,ABA 含量增加了 3 倍,因预先经超声波处理破碎表皮细胞,所以认为是保卫细胞合成了 ABA。实际情况究竟怎样,还需做更细致的研究。

在干旱胁迫时,由于保卫细胞是接收 ABA 信号的靶细胞,所以了解保卫细胞 ABA 含量的变化是认识气孔对环境反应中的信号转导的关键之一。测定保卫细胞 ABA 含量的关键技术是如何得到纯的保卫细胞,现在国际上所采用的有分离保卫细胞原生质体或用超声波破碎表皮细胞而保留保卫细胞^[11],这 2 种方法使 ABA 有所损失。本实验采用液氮快速冷冻叶片,使保卫细胞保持取样时的状态,在真空冷冻干燥后,将保卫细胞从叶片上切割下来,用双层固相抗体酶联免疫分析加酶循环放大的超微量分析来测定保卫细胞的 ABA 含量^[4,5],提高了测定的准确度和稳定性。

感谢美国佛罗里达州立大学生物系教授 W. H. Outlaw Jr. 提供真空冷冻干燥的实验材料并赠送酶联免疫分析所用的单克隆抗体。

参 考 文 献

- 1 Keayns E V, Assmann S A. The guard cells-environment connection. *Plant Physiol*, 1993, 102: 711~715
- 2 Davies W J, Zhang J H. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1991, 42: 55~76
- 3 王学臣,任海云,娄成后. 干旱胁迫下植物根与地上部间的信息传递. *植物生理学通讯*, 1992, 28 (6): 397~402
- 4 Harris M J, Outlaw W H Jr. Histochemical technique: a low-volume, enzyme-amplified immunoassay with sub-fmol sensitivity: Application to measurement of abscisic acid in stomatal guard cells. *Physiol Plant*, 1990, 78: 495~500
- 5 Zhang S Q, Hite D R C, Outlaw W H Jr. Modification required for abscisic acid microassay (enzyme-amplified ELISA). *Physiol Plant*, 1991, 83: 304~306
- 6 Slovik S, Hartung W. Compartmental distribution and redistribution of abscisic acid in intact leaves. *Planta*, 1992, 187: 15~47
- 7 Cowan I R, Raven J A, Hartung W, Farquhar G D. A possible role for abscisic acid in coupling stomatal conductance and photosynthetic carbon metabolism in leaves. *Aust J Plant Physiol*, 1982, 9: 489~498
- 8 Cornish K, Zeevaart J A D. Movement of abscisic acid into the apoplast in response to water stress in *Xanthium strumarium* L. *Plant Physiol*, 1985, 78: 623~626
- 9 Radin J W, Hendrix D L. The apoplast pool of abscisic acid in cotton leaves in relation to stomatal closure. *Planta*, 1988, 174: 180~186
- 10 Daeter W, Hartung W. Stress-dependent redistribution of abscisic acid (ABA) in *Hordeum Vulgare* L. leaves: The role of epidermal ABA metabolism, tonoplastic transport and the cuticle. *Plant Cell Envir*, 1995, 18: 1367~1376
- 11 Cornish K, Zeevaart J A D. Abscisic acid accumulation by in situ and isolated guard cells of *Pisum sativum* L. and *Vicia faba* L. in relation to water stress. *Plant Physiol*, 1986, 81: 1017~1021