

张媛华. PTK 与 H_2O_2 在 ABA 诱导气孔关闭中的初步关系[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(5): 77–78, 85.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.05.020

PTK 与 H_2O_2 在 ABA 诱导气孔关闭中的初步关系

张媛华^{1,2}

(1. 渭南师范学院化学与环境学院, 陕西渭南 714099; 2. 陕西省河流湿地生态与环境重点实验室, 陕西渭南 714099)

摘要: 酪氨酸蛋白激酶 (protein tyrosine kinase, PTK) 参与多种植物生理过程, 但在气孔运动中的研究相对较少, 且与过氧化氢 (H_2O_2) 在脱落酸 (abscisic acid, ABA) 诱导气孔关闭中的关系尚不清楚。通过 PTK 激酶的抑制剂和 H_2O_2 的清除剂及合成抑制剂的使用, 初步研究了 PTK 在 ABA 诱导气孔关闭中的作用及与 H_2O_2 的相互关系。酪氨酸蛋白激酶抑制剂木黄酮 (genistein) 和 tyrphostin A23 抑制 ABA 和外源 H_2O_2 诱导的气孔关闭, 且能够促进 ABA 诱导关闭的气孔重新开放。PTK 参与 ABA 诱导的气孔关闭, 且通过调控保卫细胞内 H_2O_2 水平进而调控气孔运动。

关键词: PTK 激酶; ABA; H_2O_2 ; 气孔; 蚕豆

中图分类号: Q945.19 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)05-0077-02

酪氨酸蛋白激酶 (protein tyrosine kinase, PTK) 是一种能有选择性地使不同底物的酪氨酸残基磷酸化的一种酶。正常情况下, 细胞的酪氨酸激酶磷酸化作用是由酪氨酸激酶和酪氨酸磷酸酶拮抗调节维持平衡的。相对于动物细胞中的研究而言, 植物中的蛋白酪氨酸激酶起步较晚, 仅有少量报道^[1-2]。Zi 等证实酪氨酸蛋白磷酸酶抑制剂 PAO 和酪氨酸蛋白激酶抑制剂木黄酮能够抑制花粉萌发和花粉管的生长, 并且导致花粉管不同程度的畸变^[1]。随后 Yemets 等证明, PTKs 抑制剂 (除莠毒素 A、木黄酮及 tyrphostin AG18) 均可能通过影响根毛中的皮质微管结构进而改变根毛的生长和发育^[2]。然而 Ghelis 等的结果提示了 PTKs 抑制 ABA 诱导的气孔关闭, 但是关于其机制却不清楚^[3]。因此, 本试验就 PTK 在脱落酸 (ABA) 诱导气孔关闭中与 H_2O_2 的相互关系进行初步研究。

1 材料与方法

木黄酮、tyrphostin A23、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、DPI (二苯基氯化碘盐, diphenyleneiodonium chloride)、MES [2-(N-吗啉)乙磺酸, 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid] 均购自 Sigma 公司, $H_2DCF-DA$ (2', 7'-二氯荧光素-3', 6'-二乙酸酯, 2,7-dichlorofluorescein diacetate) 购自 Biotium 公司, DMSO (二甲基亚砜, dimethyl sulfoxide) 购自 Amresco 公司, 其他均为国产分析纯试剂。

1.1 材料培养

蚕豆 (*Vicia faba* L.) 种子经消毒、催芽后培养于光照培养箱中。培养箱光—暗周期设定为 14 h—10 h, 光照度为 $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 温度为 $25^\circ\text{C}/18^\circ\text{C}$, 相对湿度 75%。幼苗生长期间浇水 1 次/d。取 4 周龄植株茎顶端完全展开的第

1 对叶片用于试验分析。

1.2 气孔分析

气孔分析参照 McAinsh 等的方法^[4]进行。测量时随机选取 5 个视野, 每个视野随机选取 6 个气孔。每个处理重复 3 次, 所得数据计算平均数和标准误差。

2 结果与分析

2.1 ABA 诱导气孔关闭

由图 1 可见, ABA 能明显促进光下的气孔关闭。随 ABA 浓度的增加, 抑制程度增大。与对照相比, 1、5、10、15 $\mu\text{mol/L}$ 分别抑制了 23.5%、35.5%、47.9%、51.5%。考虑到 10 $\mu\text{mol/L}$ 已对气孔产生很好的抑制效果, 随后的试验中均采用此浓度。

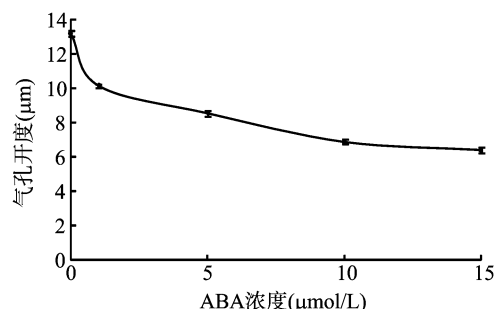


图1 不同浓度 ABA 对气孔关闭的影响

2.2 木黄酮和 tyrphostin A23 抑制 ABA 诱导的气孔关闭

木黄酮和 tyrphostin A23 是 PTK 激酶的专一性抑制剂。图 2 结果表明, 不同浓度的木黄酮 (图 2-a) 和 tyrphostin A23 (图 2-b) 均可明显抑制 ABA 诱导的气孔关闭。与对照相比, 最低浓度 10 $\mu\text{mol/L}$ 的木黄酮和 tyrphostin A23 促进气孔开放分别达 24.1% 和 26.6%。且随浓度升高, 抑制 ABA 的程度呈剂量依赖型增大。至 150 $\mu\text{mol/L}$, 木黄酮和 tyrphostin A23 分别促进程度达 71.3% 和 54.3%。

2.3 木黄酮和 tyrphostin A23 抑制 H_2O_2 诱导的气孔关闭

由图 3 可知, H_2O_2 能明显促进气孔关闭, 其清除剂抗坏

收稿日期: 2015-12-15

基金项目: 陕西省自然科学基金研究计划 (编号: 2011JQ4014)。

作者简介: 张媛华 (1978—), 女, 陕西韩城人, 博士, 副教授, 主要从事植物代谢和信号转导研究。Tel: (0913) 2136930; E-mail: zhangyh5821@163.com。

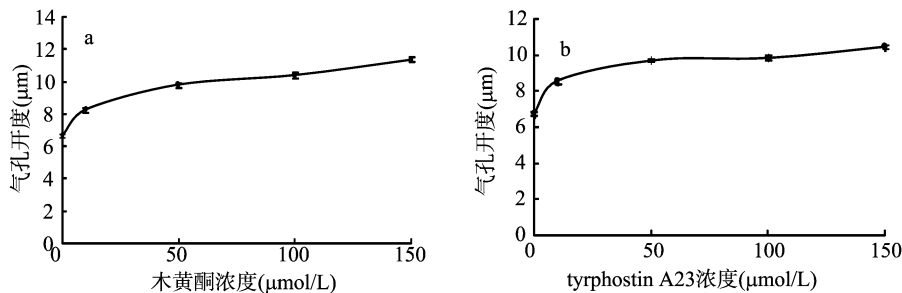
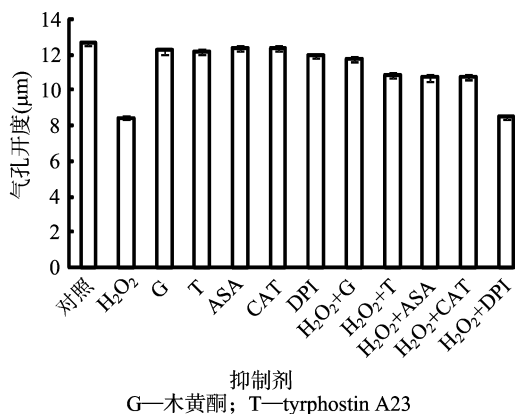


图2 不同浓度 PTK 激酶抑制剂对 ABA 诱导关闭的气孔的影响

血酸 ASA 和过氧化氢酶 CAT 能明显抑制该过程,而过氧化氢产生酶 NADPH 氧化酶的抑制剂 DPI 却不能抑制该过程。该结果表明,清除保卫细胞中的 H_2O_2 能够促进气孔开放。而 H_2O_2 诱导的气孔关闭同样被木黄酮和 tyrphostin A23 所抑制,表明木黄酮和 tyrphostin A23 可能通过类似清除的方式促进气孔开放。

图3 PTK 激酶抑制剂对外源 H_2O_2 诱导气孔关闭的影响

2.4 木黄酮和 tyrphostin A23 促进 ABA 诱导关闭的气孔重新开放

研究表明,ABA 能够促进保卫细胞的产生和 H_2O_2 的积累进而诱导气孔关闭^[5]。而图 4 显示,100 $\mu\text{mol/L}$ 木黄酮和 tyrphostin A23 不仅抑制 ABA 诱导的气孔关闭,且能够促进 ABA 已经诱导关闭的气孔重新开放。同样, H_2O_2 的清除剂抗坏血酸 ASA 和过氧化氢酶 CAT 也能逆转 ABA 关闭的气孔重新开放,而 H_2O_2 产生酶 - NADPH 氧化酶的抑制剂 DPI 却不能逆转该过程(图 4)。结果表明,木黄酮、tyrphostin A23 与 H_2O_2 的清除剂 ASA 和 CAT 二者作用结果相似,推测木黄酮、

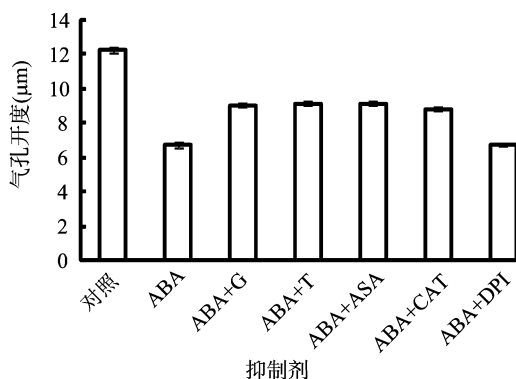


图4 PTK 激酶抑制剂对 ABA 诱导关闭的气孔的影响

tyrphostin A23 可能通过清除保卫细胞内部 H_2O_2 的方式逆转 ABA 诱导关闭的气孔重新开放。

木黄酮和 tyrphostin A23 作为 2 种特异的 PTK 激酶抑制剂,能够有选择地抑制 PTK 激酶的活性^[6-7]。本研究结果显示,ABA 诱导的气孔关闭可被 PTK 激酶的抑制剂木黄酮和 tyrphostin A23 抑制,表明 PTK 激酶参与 ABA 诱导的蚕豆气孔关闭(图 1、图 2)。该结果与 Ghelis 等在拟南芥中的研究结果^[3]一致。

H_2O_2 作为一种重要的信号分子参与多种环境因子和植物激素诱导的气孔关闭^[8-9]。本试验研究结果表明,木黄酮和 tyrphostin A23 是通过类似于 H_2O_2 清除剂 ASA 和 CAT 清除保卫细胞内 H_2O_2 的方式抑制外源过氧化氢诱导的气孔关闭,而不是通过抑制 H_2O_2 生成的方式参与气孔运动(图 3、图 4)。该结果表明,PTK 激酶的活性可能通过促进 H_2O_2 的积累进而参与 ABA 诱导的气孔关闭。此外,木黄酮和 tyrphostin A23 能够逆转 ABA 诱导已关闭的气孔重新开放,效应也同 ASA 和 CAT 相似,异于 DPI(图 4)。该结果不仅进一步证实了上述推测,还表明木黄酮和 tyrphostin A23 可能具有清除细胞内 H_2O_2 的功能,与 PTK 通过磷酸化肌动蛋白参与花粉的萌发和花粉管的伸长机制不同^[1]。

3 结论

PTK 激酶可能通过调节 H_2O_2 水平参与 ABA 诱导的气孔关闭。木黄酮和 tyrphostin A23 通过清除细胞内 H_2O_2 的方式不仅能抑制外源 H_2O_2 诱导的气孔关闭,还能逆转 ABA 诱导关闭的气孔重新开放。

参考文献:

- [1] Zi H J, Xiang Y, Li M, et al. Reversible protein tyrosine phosphorylation affects pollen germination and pollen tube growth via the actin cytoskeleton[J]. Protoplasma, 2007, 230(3-4): 183-191.
- [2] Yemets A, Sheremet Y, Vissenberg K, et al. Effects of tyrosine kinase and phosphatase inhibitors on microtubules in *Arabidopsis* root cells[J]. Cell Biology International, 2008, 32(6): 630-637.
- [3] Ghelis T, Bolbach G, Clodic G, et al. Protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases are involved in abscisic acid-dependent processes in *Arabidopsis* seeds and suspension cells[J]. Plant Physiology, 2008, 148(3): 1668-1680.
- [4] McAinsh M R, Clayton H, Mansfield T A, et al. Changes in stomatal behavior and guard cell cytosolic free calcium in response to oxidative stress[J]. Plant Physiology, 1996, 111(4): 1031-1042.

10N 的处理下最高,15N 的处理下次之;P 累积量在施用氮肥 10N 的处理下最高,15N 的处理下次之;K 累积量在施用氮肥 10N 的处理下最高,15N 的处理下次之。此时期的养分吸收量为:钾含量>氮含量>磷含量。

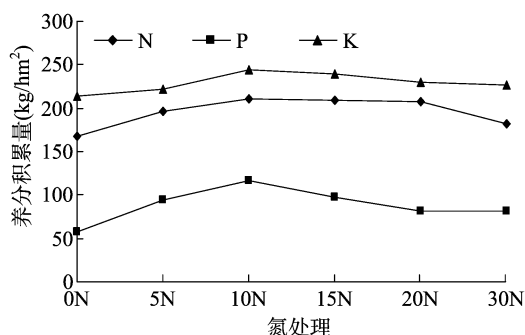


图6 播种后 133 d 养分累积量

2.7 高粱最佳施氮量的确定

通过上述分析可知,适当的施氮量可以促进高粱对氮、磷、钾养分的吸收。不施氮肥或施氮肥较少的高粱植株养分积累量最低,而较低的养分积累量不利于高粱产量的形成,高施氮量也不能使高粱植株体内获得较高的养分积累量,过多的氮肥不仅不能被植株吸收利用,反而容易造成浪费和环境的污染,在施氮量为 150 kg/hm² 的中等水平可以明显提高植株体内的养分积累量,并获得最高的产量为 6 529.5 kg/hm²。

3 结论与讨论

(1)在高粱的整个生长发育过程中,不同处理高粱植株氮素积累量的变化趋势基本一致,均表现为苗期积累量小,拔节期迅速增大,孕穗期达到高峰,抽穗期有所降低。高粱苗期由于根系不发达,营养体弱小,苗期的氮吸收能力弱,表现为不同处理的苗期植株氮养分含量均较低。从播种后 77 d 的拔节期,高粱进入营养生长和生殖生长并进时期,氮素的迅速增加为后期的孕穗提供了充足的养料,也为高粱获得高产打下了物质基础。

(2)植物体内磷素的积累十分重要,植物吸磷量与根系总长度之间存在正相关关系^[9-10],并且磷素能增强作物对不利因素的抵抗能力。高粱植株各处理磷素的积累量总的变化趋势与氮素积累量基本一致,但是在施氮量相同条件下,不同生育时期,其磷积累含量变化不大。

(3)植物体内钾素含量总的变化趋势与氮、磷积累基本一致,但是在整个生育期中,钾素的积累量比氮、磷要多,说明高粱是喜钾作物。而钾元素可以提高作物的抗旱抗寒性,是获得高产的必要条件。

(4)无论是在前期还是后期,高粱植株体内的 K 含量最高,N 含量次之,P 含量最少,这与董二伟等的研究结果^[11]一致。随着生育进程的增加,其氮、磷、钾积累量均在增加。增施氮肥有利于植株对氮、磷、钾养分的吸收,与尹新华等对夏高粱的研究结果^[12]一致,本试验研究显示,氮、磷、钾吸收总量随施氮量增加先增加后减少,在 10N 处理下达到产量和 N、P、K 积累量达到最大,说明适宜的 N、P、K 肥配比,有助于糯高粱黔高 8 号提高肥料利用率。

参考文献:

- [1] Xin Z, Aiken R, Bruke J. Genetic diversity of transpiration efficiency in sorghum [J]. Field Crops Research, 2009, 111 (1/2): 74-80.
- [2] 程 黔. 我国杂粮产业的新动向及发展趋势 [J]. 农业展望, 2008, 4 (8): 17-21.
- [3] 邹剑秋. 中国高粱生产与前景展望 [M]//柴 岩, 万福世. 中国小杂粮发展报告. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2007: 44-51.
- [4] 周开芳, 范贵国. 氮磷钾不同配比对高粱产量的影响 [J]. 贵州农业科学, 2003, 31 (增刊 1): 65-67.
- [5] 朱美容, 刘厚宪, 石宗益, 等. 酿酒高粱氮、磷、钾肥平衡施肥研究 [J]. 耕作与栽培, 2004 (3): 26-28.
- [6] 杨苞梅, 姚丽贤, 李国良, 等. 不同养分组合对高粱吸收氮磷钾养分的影响 [J]. 中国农学通报, 2008, 24 (4): 282-290.
- [7] 曹昌林, 宋旭东, 董良利, 等. 旱地高粱吸肥规律的研究 [J]. 山东农业科学, 2010 (7): 53-55.
- [8] 鲍士旦. 土壤农化分析 [M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2000: 30-177.
- [9] Barber S A, Mackey A D. Root growth and post assimilation uptake by two corn genotypes in the field [J]. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 1986, 10 (3): 217-223.
- [10] Newman E J, Andrews R E. Uptake of phosphorus in relation to root growth and root densing [J]. Plant and soil, 1982, 3 (8): 49-69.
- [11] 董二伟, 王劲松, 韩鹏远, 等. 施肥对高粱生长、干物质积累与养分吸收分配的影响 [J]. 山西农业科学, 2012, 40 (6): 645-650.
- [12] 尹新华, 曹翠玉, 史瑞和. 氮肥对夏高粱养分吸收及产质影响的研究 [J]. 土壤通报, 1992, 23 (4): 171-173.

(上接第 78 页)

- [5] Li J H, Liu Y Q, Lv P, et al. A signaling pathway linking nitric oxide production to heterotrimeric G protein and hydrogen peroxide regulates extracellular calmodulin induction of stomatal closure in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2009, 150 (1): 114-124.
- [6] Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, et al. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases [J]. Journal of Biological Chemistry, 1987, 262 (12): 5592-5595.
- [7] Smail J B, Palmer B D, Rewcastle G W, et al. Tyrosine kinase inhibitors. 15: 4-(phenylamino) quinazoline and 4-(phenylami-

no) pyrido[d]pyrimidine acrylamides as irreversible inhibitors of the ATP binding site of the epidermal growth factor receptor [J]. J Med Chem, 1999, 42 (10): 1803-1815.

- [8] Desikan R, Cheung M K, Clarke A, et al. Hydrogen peroxide is a common signal for darkness- and ABA-induced stomatal closure in *Pisum sativum* [J]. Functional Plant Biology, 2004, 31 (9): 913-920.
- [9] Song X G, She X P, He J M, et al. Cytokine- and auxin-induced stomatal opening involves a decrease in levels of hydrogen peroxide in guard cells of *Vicia faba* [J]. Functional Plant Biology, 2006, 33 (6): 573-583.