

## 研究报告 Original Papers

## 酪氨酸蛋白磷酸酶参与脱氢抗坏血酸的信号途径

范邓鹏<sup>1</sup>, 石永春<sup>1,2</sup>, 刘卫群<sup>1,2,\*</sup>河南农业大学<sup>1</sup>国家烟草栽培生理生化重点实验室, <sup>2</sup>生命科学学院, 郑州 450002

**摘要:** 研究酪氨酸蛋白磷酸酶(PTPase)的抑制剂氧化苯胂(PAO)、NaVO<sub>3</sub>和Zn<sup>2+</sup>在脱氢抗坏血酸(DHA)调控烟草气孔运动中的作用。结果表明, 0.01 mmol·L<sup>-1</sup> PAO、1 mmol·L<sup>-1</sup> NaVO<sub>3</sub>和2 mmol·L<sup>-1</sup> Zn<sup>2+</sup>抑制黑暗和DHA诱导的气孔关闭, 而对光诱导的烟草气孔开度的影响不大。据此推测PTPase参与DHA诱导的气孔关闭信号途径。

**关键词:** 烟草; 酪氨酸蛋白磷酸酶; 脱氢抗坏血酸; 气孔运动; 信号转导

## Involvement of Protein Tyrosine Phosphatase in Signal Pathway of Dehydroascorbate

FAN Deng-Peng<sup>1</sup>, SHI Yong-Chun<sup>1,2</sup>, LIU Wei-Qun<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>National Key Laboratory of Tobacco Planting and Physiology and Biochemistry, <sup>2</sup>College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

**Abstract:** The effects of protein tyrosine phosphatase (PTPase) inhibitor, phenylarsine oxide (PAO), NaVO<sub>3</sub> and Zn<sup>2+</sup> on the stomatal movement regulated by dehydroascorbate (DHA) were investigated in *Nicotiana tabacum*. The results indicated that 0.01 mmol·L<sup>-1</sup> PAO, 1 mmol·L<sup>-1</sup> NaVO<sub>3</sub> and 2 mmol·L<sup>-1</sup> Zn<sup>2+</sup> had no effects on stomatal aperture induced by light, but inhibited the stomatal closure induced by darkness and DHA, suggesting that PTPase might be involved in the signal pathway of stomatal closure induced by DHA.

**Key words:** *Nicotiana tabacum*; protein tyrosine phosphatase; dehydroascorbate; stomatal movement; signal transduction

气孔运动是植物适应周围环境的一种方式, 而植物对气孔运动的调控机制则是植物适应逆境机制中的组成部分。已有的报道认为, 黑暗、ABA、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、NO、水杨酸(SA)等信号分子都能导致气孔的关闭(Gray 2005; Hetherington 2001; Desikan等 2003; Liu 等 2003)。近年来的研究表明, 脱氢抗坏血酸(dehydroascorbate, DHA)也能够诱导植物气孔关闭(Fotopoulos 等 2008)。DHA 是抗坏血酸(ascorbic acid, AsA)的氧化态, 与 AsA 共同调控细胞的氧化还原状态(Pastori 和 Foyer 2002), 影响细胞的分裂和分化(Pinto 和 Gara 2004)、开花时间和衰老(Barth 等 2006; Chen 和 Gallie 2006)。在烟草中过表达脱氢抗坏血酸还原酶(dehydroascorbate reductase, DHAR)减少DHA含量, 增大气孔开度; 而 DHAR 反义表达则增加 DHA 含量, 减小气孔开度(Chen 和 Gallie 2004)。Fotopoulos 等(2008)认为烟草中的抗坏血酸氧化酶(ascorbate oxidase, AO)过表达会导致转基因植株中DHA和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量的升高,

气孔导度降低; 表皮条用 1 mmol·L<sup>-1</sup> DHA 或 100 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后, 野生型烟草的气孔即快速关闭, 而转基因烟草的气孔开度变化较小, 证明 DHA 是诱导气孔关闭的; 因此认为植物中存在DHA信号途径, 并推测 DHA 诱导的气孔关闭是通过H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 信号途径的。

此外, 酪氨酸蛋白磷酸酶(protein tyrosine phosphatase, PTPase)和酪氨酸蛋白激酶(protein tyrosine kinases)分别催化蛋白质的去磷酸化和磷酸化, 在调节动物的细胞生长和分化的过程中起作用(Xu 等 1998)。但到目前为止, 植物中仅发现 PTPase 的存在, 而对其所参与的信号途径还没有充分了解(杨国辉等 2007)。有报道认为, PTPase 在

收稿 2009-04-30 修定 2009-08-19

资助 河南省自然科学基金(2007210015)和国家烟草栽培重点实验室科技支撑项目(TCKL06006)。

\* 通讯作者(E-mail: liuweiqun2004@126.com; Tel: 0371-63558722)。

植物中参与渗透胁迫和黑暗(MacRobbie 2002)、ABA 和  $H_2O_2$  (石武良和张蜀秋 2004)、水杨酸(杨国辉等 2007)诱导气孔关闭的信号途径, 但 PTPase 是否与 DHA 诱导的气孔关闭有关, 还未见报道。本文以烟草叶片下表皮为材料, 采用 PTPase 的抑制剂氧化苯胂(phenylarsine oxide, PAO)、 $NaVO_3$  和  $ZnCl_2$  探讨 PTPase 是否与 DHA 诱导的气孔关闭有关。

## 材料与方法

烟草(*Nicotiana tabacum* L. cv. K326)种子放在湿润的滤纸上催芽后播于烟草专用基质(由国家烟草栽培生理生化重点实验室提供)上。光/暗周期为 16 h/8 h, 光照强度为  $350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 昼夜温度均为  $28^\circ\text{C}$ , 相对湿度 55% 左右。生长至十叶期时, 选取完全展开叶进行处理。生长期间无胁迫。PAO 购自 Sigma 公司,  $NaVO_3$  购自 Solarbio 公司, 其他试剂购自科密欧化学试剂有限公司。所有药品和试剂均为分析纯。DHA 按照 Horemens 等(2003)文中的方法用 AsA 配制母液, 而后直接加入有植物材料的基本缓冲液( $30 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  KCl、 $10 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Mes, pH 6.0)中制得 DHA 处理液。

取十叶期烟苗的第 7 片完全展开叶(自下而上), 用蒸馏水洗净, 去除主脉和叶缘部分, 将叶片切为  $5 \text{mm}\times 5 \text{mm}$  大小, 放入上述基本缓冲液和  $0.01$ 、 $0.1$ 、 $1 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 DHA 处理液中分别处理 4 h。或撕取叶片下表皮, 用毛笔轻轻刷去叶肉细胞, 而后切为  $5 \text{mm}\times 5 \text{mm}$  大小的表皮条, 置于上述基本缓冲液中, 在促进气孔张开的条件( $25^\circ\text{C}$ 、光照强度同前)下培养 3 h, 促使气孔完全张开。然后取出表皮条, 放入不同处理液(基本缓冲液中分别加入不同试剂配成母液, 而后用基本缓冲液稀释至  $0.01$ 、 $0.1$ 、 $1 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  DHA,  $0.001$ 、 $0.01$ 、 $0.1$ 、 $1 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  PAO,  $0.1$ 、 $1$ 、 $2 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $NaVO_3$ ,  $0.02$ 、 $0.2$ 、 $2$ 、 $4 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $ZnCl_2$ )中处理 4 h。处理期间光照、温度及湿度与植株的培养条件相同。

处理后表皮条于 Olympus BX51 显微镜下用测微尺测定气孔开度。每个处理至少用 3 个表皮条, 每个表皮条随机测 20 个气孔, 每个处理重复 5 次(不少于 300 个气孔), 统计平均值和标准误差。

分析  $H_2O_2$  含量时, 将不同浓度 DHA 处理后

的烟草叶片分别加丙酮后研磨为匀浆, 而后以  $10\,000\times g$  于  $4^\circ\text{C}$  下离心 10 min, 取上清液按照 Ichise (1999) 文中的方法测定  $H_2O_2$ 。

## 结果与讨论

### 1 DHA 对气孔开度和叶片中 $H_2O_2$ 含量的影响

从图 1 可见, 光照条件下用 DHA 处理表皮条或叶片, 气孔开度随着 DHA 浓度的升高而降低,  $H_2O_2$  含量随着 DHA 浓度的升高而增加。说明 DHA 能够导致气孔关闭, 且这种关闭与  $H_2O_2$  含量呈正相关。

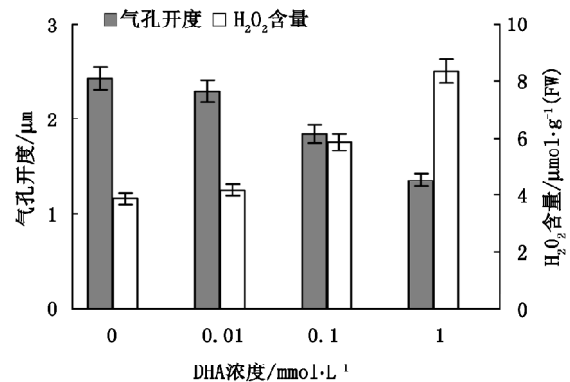


图 1 DHA 对烟草叶片的气孔开度和  $H_2O_2$  含量的影响  
Fig.1 Effects of DHA on the stomatal aperture and  $H_2O_2$  content of tobacco leaves

### 2 PAO、 $NaVO_3$ 和 $ZnCl_2$ 对黑暗诱导气孔关闭的影响

黑暗可诱导气孔关闭, PTPase 的抑制剂 PAO、 $NaVO_3$  和  $ZnCl_2$  可以抑制这一现象(杨国辉等 2007)。为了选择适用于烟草气孔的 PAO、 $NaVO_3$  和  $ZnCl_2$  浓度, 我们又检测了黑暗条件下不同浓度的 PAO、 $NaVO_3$  和  $ZnCl_2$  对烟草气孔开度的影响。结果(图 2)表明, 三者都能抑制黑暗诱导的气孔关闭, 但并不影响光照条件下的气孔开度。

### 3 PAO、 $NaVO_3$ 和 $ZnCl_2$ 对 DHA 诱导气孔关闭的影响

为明确 PTPase 是否参与 DHA 诱导的气孔关闭, 分别在 DHA 处理液中添加  $0.01 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  PAO、 $1 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $NaVO_3$  和  $2 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $ZnCl_2$ , 处理后检测结果(图 3)表明, 添加 PAO、 $NaVO_3$  或  $ZnCl_2$  均能部分抑制 DHA 诱导的气孔关闭, 说明 PTPase 参与 DHA 诱导的气孔关闭。但三者的抑制效应略有不同。

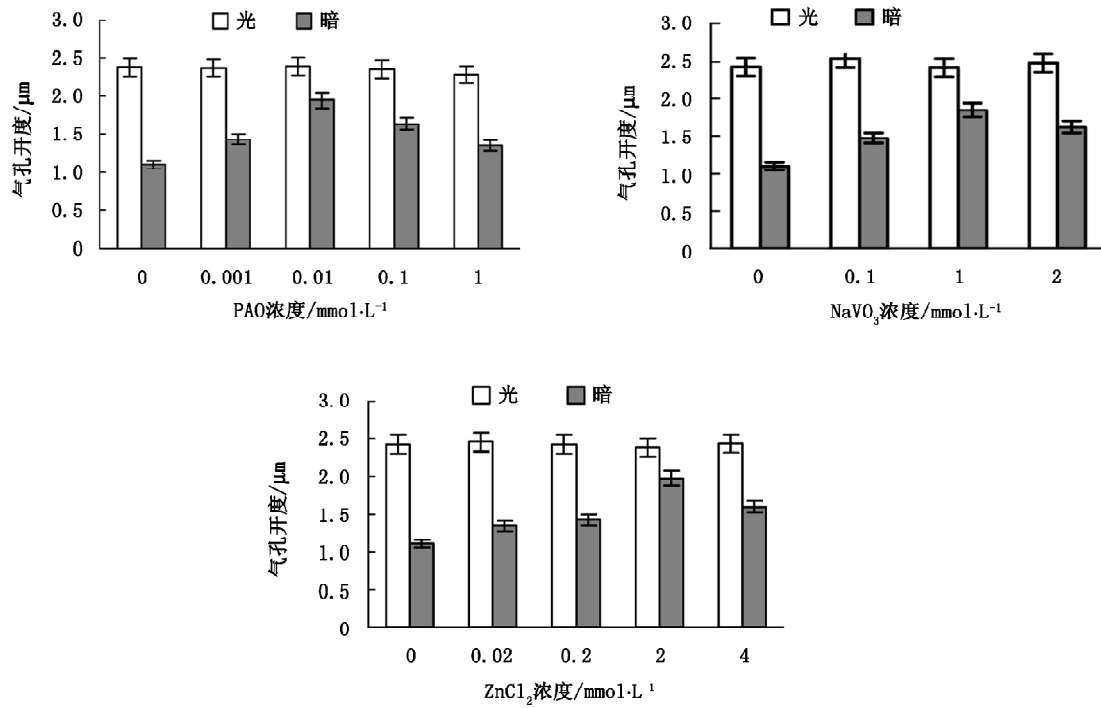


图2 PAO、NaVO<sub>3</sub> 和 ZnCl<sub>2</sub> 对烟草叶片气孔开度的影响  
Fig.2 Effects of PAO, NaVO<sub>3</sub> and ZnCl<sub>2</sub> on the stomatal aperture of tobacco leaves

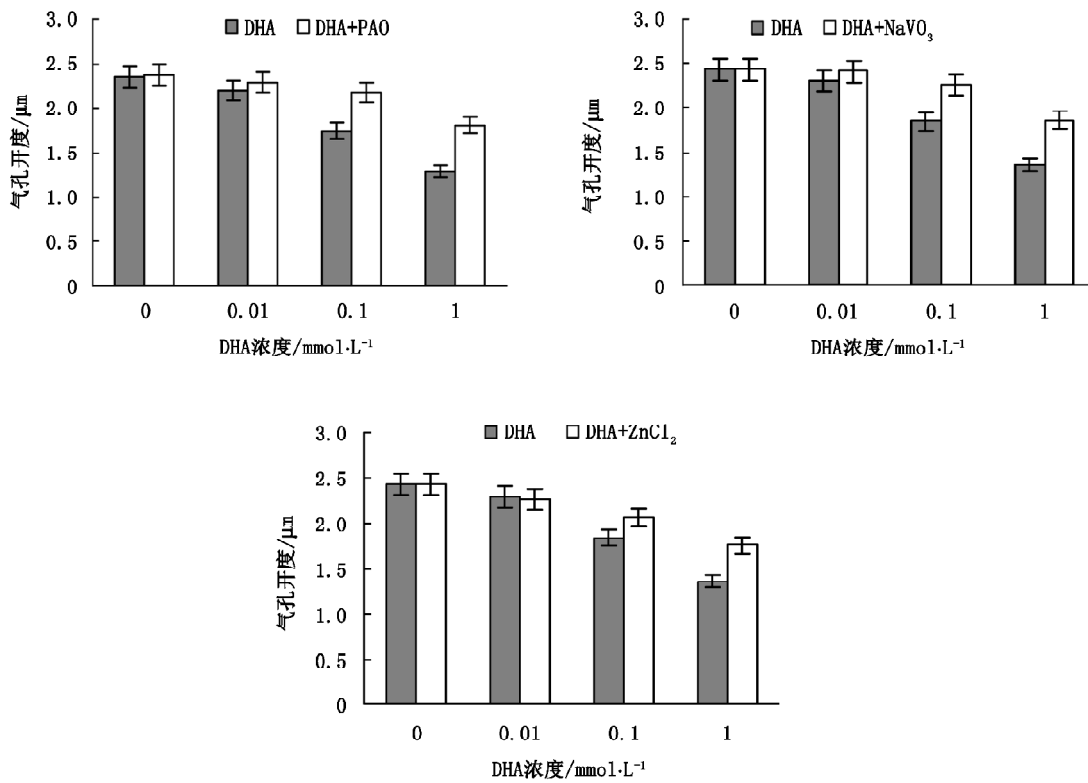


图3 PAO、NaVO<sub>3</sub> 和 ZnCl<sub>2</sub> 对 DHA 诱导下气孔开度的影响  
Fig.3 Effects of PAO, NaVO<sub>3</sub> and ZnCl<sub>2</sub> on the stomatal aperture of tobacco leaves induced by DHA

同, DHA 浓度较低时,  $\text{NaVO}_3$  比 PAO 或  $\text{ZnCl}_2$  具有较强的逆转效应; 而当 DHA 浓度较高时, PAO 的逆转效应较强。

### 参考文献

- 石武良, 张蜀秋(2004). 高等植物体内酪氨酸蛋白磷酸酶及其功能. 植物生理学通讯, 40 (4): 495~499
- 杨国辉, 车永梅, 石武良, 刘新(2007). 酪氨酸蛋白磷酸酶(PTPase)参与水杨酸调控蚕豆气孔运动的信号转导. 植物生理学通讯, 43 (1): 81~84
- Barth C, Tullio MD, Conklin PL (2006). The role of ascorbic acid in the control of flowering time and the onset of senescence. *J Exp Bot*, 57 (8): 1657~1665
- Chen Z, Gallie DR (2004). The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *Plant Cell*, 16: 1143~1162
- Chen Z, Gallie DR (2006). Dehydroascorbate reductase affects leaf growth, development, and function. *Plant Physiol*, 142: 775~787
- de Pinto MC, De Gara L (2004). Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation. *J Exp Bot*, 55 (408): 2559~2569
- Desikan R, Cheung MK, Bright J, Henson D, Hancock JT, Neill SJ (2003). ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *J Exp Bot*, 55 (395): 205~212
- Fotopoulos V, Tullio MCD, Barnes J, Kanellis AK (2008). Altered stomatal dynamics in ascorbate oxidase over-expressing tobacco plants suggest a role for dehydroascorbate signalling. *J Exp Bot*, 59 (4): 729~737
- Gray J (2005). Guard Cells: transcription factors regulate stomatal movements. *Curr Biol*, 15 (15): 593~595
- Hetherington AM (2001). Guard cell signaling. *Cell*, 107 (6): 711~714
- Horemans N, Potters G, De Wilde L, Caubergs RJ (2003). Dehydroascorbate uptake activity correlates with cell growth and cell division of tobacco Bright Yellow-2 cell cultures. *Plant Physiol*, 133: 361~376
- Ichise N, Morita N, Hoshino T, Kawasaki K, Yumoto I, Okuyama H (1999). A mechanism of resistance to hydrogen peroxide in *Vibrio rumoiensis* S-1. *App Environ Microbiol*, 65 (1): 73~79
- Liu X, Zhang S, Lou C (2003). Involvement of nitric oxide in the signal transduction of salicylic acid regulating stomatal movement. *Chin Sci Bull*, 48 (5): 449~452
- MacRobbie EAC (2002). Evidence for a role for protein tyrosine phosphatase in the control of ion release from the guard cell vacuole in stomatal closure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99 (18): 11963~11968
- Pastori GM, Foyer CH (2002). Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "redox" and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiol*, 129: 460~468
- Xu Q, Fu HH, Gupta R, Luan S (1998). Molecular characterization of a tyrosine-specific protein phosphatase encoded by a stress-response gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10 (5): 849~857