

网络出版时间:2017-03-31 16:08 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2017.05.006  
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20170331.1608.012.html

# 水孔蛋白协助玉米副卫细胞中 $H_2O_2$ 的跨膜转运

王巧艳<sup>1</sup>, 李 思<sup>1</sup>, 张 莉<sup>2</sup>, 姚雅琴<sup>1</sup>

(1 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100; 2 中国科学院 水利部 水土保持研究所, 陕西 杨凌 712100)

**【摘要】**【目的】探索玉米气孔副卫细胞中  $H_2O_2$  的来源, 以阐明禾本科植物气孔运动过程中保卫细胞和副卫细胞协同调节的机理。【方法】采用细胞化学方法对  $H_2O_2$  进行亚细胞荧光定位, 以 *Tubulin* 和 *GAPDH* 为内参基因, 利用 qPCR 技术, 对玉米水孔蛋白基因 *ZmPIP2;4*、*ZmPIP2;5* 和 *ZmPIP2;6* 表达量进行分析, 从而确定水孔蛋白协助玉米副卫细胞中  $H_2O_2$  的跨膜转运。【结果】光暗处理组, 加水孔蛋白抑制剂  $AgNO_3$  与不加  $AgNO_3$  副卫细胞中的  $H_2O_2$  积累相反; 外源  $H_2O_2$  引起副卫细胞中  $H_2O_2$  积累, 先加入水孔蛋白抑制剂  $AgNO_3$  再加外源  $H_2O_2$  处理后副卫细胞中  $H_2O_2$  不积累; 短细胞发生后, 副卫细胞中的  $H_2O_2$  开始积累, 同时 *ZmPIP2;5* 基因的相对表达量上调; 随着水分胁迫程度增加, *ZmPIP2;4*、*ZmPIP2;5*、*ZmPIP2;6* 基因的相对表达量随短细胞发生上调。【结论】水孔蛋白具有转运  $H_2O_2$  的功能, 玉米叶片下表皮副卫细胞中的  $H_2O_2$  是外源的, 其积累和清除可能与水孔蛋白 *ZmPIP2;5* 的转运有关。

**【关键词】** 副卫细胞; 水孔蛋白;  $H_2O_2$ ; 跨膜转运

**【中图分类号】** Q78

**【文献标志码】** A

**【文章编号】** 1671-9387(2017)05-0034-07

## Aquaporin facilitates transmembrane diffusion of $H_2O_2$ in maize subsidiary cells

WANG Qiaoyan<sup>1</sup>, LI Si<sup>1</sup>, ZHANG Li<sup>2</sup>, YAO Yaqin<sup>1</sup>

(1 College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Soil and Water Conservation, CAS & MWR, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** 【Objective】 This study researched the sources of  $H_2O_2$  in maize subsidiary cells to clarify the co-regulation mechanism of guard cells and subsidiary cells in grassy stomatal movement. 【Method】 This study researched the cell localization of  $H_2O_2$  by cytochemical fluorescent probe and analyzed the gene expression of *ZmPIP2;4*, *ZmPIP2;5*, *ZmPIP2;6* by qPCR technology, with *Tubulin* and *GAPDH* as reference genes. Then the fact of aquaporin facilitates transmembrane diffusion of  $H_2O_2$  in maize subsidiary cells was confirmed. 【Result】 Under light and dark treatments, the accumulation of  $H_2O_2$  in subsidiary cells was opposite to the control group supplemented with aquaporin inhibitor  $AgNO_3$ . Exogenous  $H_2O_2$  caused  $H_2O_2$  accumulation in subsidiary cells, but aquaporin inhibitor  $AgNO_3$  added before the addition of exogenous  $H_2O_2$  did not cause  $H_2O_2$  accumulation. After short cells appeared,  $H_2O_2$  started to accumulate in subsidiary cells, at the same time the gene expression of *ZmPIP2;5* was upregulated. After short cells appeared, the expressions of *ZmPIP2;4*, *ZmPIP2;5* and *ZmPIP2;6* were upregulated when increased soil water shortages. 【Conclusion】 Aquaporin can transport  $H_2O_2$  in leaf epidermis of maize and  $H_2O_2$  in subsidiary cells was exogenous, whose accumulation and elimination were possibly mediated by aquaporin

**【收稿日期】** 2016-03-25

**【基金项目】** 国家高技术研究发展计划“863 计划”项目(2011AA100504)

**【作者简介】** 王巧艳(1989-), 女, 陕西耀州区人, 硕士, 主要从事逆境分子细胞生物学研究。E-mail: 1186812449@qq.com

**【通信作者】** 姚雅琴(1957-), 女, 陕西澄城人, 教授, 硕士生导师, 主要从事逆境细胞生物学研究。

E-mail: yaoyaqin@nwsuaf.edu.cn

ZmPIP2;5.

**Key words:** subsidiary cells; aquaporin; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; transmembrane diffusion

气孔是植物蒸腾过程中水蒸气运输的主要通道,也是光合作用和呼吸作用中植物与外界进行气体交换的通道,其开关与细胞内的离子、激素、pH、信号转导等有关。过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)是植物体内活性氧(ROS)的重要代表之一,是一种多效性分子,在植物响应生物与非生物胁迫过程中起着重要作用。在一定浓度范围内,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作为信号分子转导多种信号途径、调节气孔开关、控制相关基因表达以及生理代谢过程。保卫细胞中,气孔开关过程ROS的代谢机制已经形成了较为成熟的分子调控网络<sup>[1]</sup>,而副卫细胞中仍缺乏相关方面的研究,仅有报道认为副卫细胞积累的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对气孔运动具有调节或协同保卫细胞的功能<sup>[2]</sup>,随着水分胁迫的加剧气孔开度降低,副卫细胞中的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>积累增多<sup>[3]</sup>。因此,研究玉米气孔副卫细胞中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的积累和转运途径,对于深入揭示H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>介导的气孔运动机制具有重要的意义。

水孔蛋白(aquaporin, AQP)是较小(21~34 ku)的膜内在蛋白,含有6个跨膜 $\alpha$ 螺旋,通过5个环(A到E)连接起来,在细胞膜上组成同源或异源四聚物,每个单体都独立行使运输功能<sup>[4-6]</sup>。现已证实,在单子叶植物水稻(*Oryza sativa* L.)和玉米(*Zea mays* L.),双子叶植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、马铃薯(*Capsicum annuum*)和陆地棉(*Gossypium hirsutum* Linn.)中水孔蛋白大量存在。AQP不仅能够运输水分,还可以运输多种不带电的小分子物质,如H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,从而参与植物的水分代谢、营养代谢和信号转导过程<sup>[7]</sup>。研究发现,水孔蛋白AtPIP2;1<sup>[8]</sup>,AtPIP2;2,AtPIP2;4,AtPIP2;5,AtPIP2;7<sup>[9]</sup>,TIP1;1,TIP1;2<sup>[10]</sup>以及TIP2;3<sup>[11]</sup>等可跨膜转运H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。目前仅发现玉米中水孔蛋白ZmPIP2;5具有运输H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的功能<sup>[12]</sup>,水孔蛋白ZmPIP2;4和ZmPIP2;6可运输水分,与ZmPIP2;5均属PIP2s系列。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作为信号分子参与气孔保卫细胞运动的调节,在只有保卫细胞的一类植物中已形成经典信号途径,诱导保卫细胞H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产生主要源于叶绿体和NADPH氧化酶的激活。但对于玉米这类单子叶禾本科植物来说,保卫细胞周围还有1对副卫细胞,但副卫细胞无叶绿体,不能通过主要的活性氧产生途径——米勒反应<sup>[13-14]</sup>产生H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,迄今有关副卫细胞中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的来源、转运途

径和清除机理尚缺乏相关报道。本研究运用细胞化学的方法,对副卫细胞积累的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>来源及其随气孔开、关变换的关系进行了研究;采用实时荧光定量PCR等技术,进一步检测了水孔蛋白基因ZmPIP2;4、ZmPIP2;5和ZmPIP2;6的表达量与玉米副卫细胞中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>积累间的关系,旨在深层次阐释禾本科植物气孔运动过程中保卫细胞和副卫细胞协同调节的机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料 试验在西北农林科技大学中国旱区节水农业研究院的大棚内进行,供试土壤为西北农林科技大学节水灌溉试验站的大田耕层土壤(20~40 cm),与蛭石按体积比1:1混合。试验玉米(*Zea mays* L.)种子为“郑单958”,每盆播入大小一致的饱满籽粒4粒,三叶期视苗情长势每盆定苗2株。试验设定苗期4个水分处理,即对照(CK,田间持水量的75%~85%)、轻度水分胁迫处理(LS,田间持水量的65%~75%)、中度水分胁迫处理(MS,田间持水量的55%~65%)、重度水分胁迫处理(SS,田间持水量的45%~55%),每个处理组6盆,即各有6个重复。胁迫前,各处理组均灌水至对照水平,待玉米幼苗长到三叶期(约播种后14 d)时,每天称量确定灌水量,使CK、LS、MS、SS4个处理保持在相应的水分梯度范围内。播种后8叶期(约播种后40 d)取样进行试验。

1.1.2 试剂 RNA组织样本保存液, Ultrapure RNA Kit超纯RNA提取试剂盒,快速去基因组cDNA第一链合成试剂盒(HiFiScript gDNA Removal cDNA Synthesis Kit)和定量PCR UltraSYBR Mixture试剂,均购自康为试剂公司。荧光指示剂2,7-二氯氢化荧光素二乙酸酯(H<sub>2</sub>DCFDA)、AgNO<sub>3</sub>和Tris-KCL缓冲液(pH=7.2, 10 mmol/L Tris, 50 mmol/L KCl)等常规试剂,均为国产或进口分析纯试剂。

### 1.2 方法

1.2.1 气孔中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>荧光定位 细胞化学定位参照Christensen等<sup>[15]</sup>的方法:首先撕取对照组8叶期同一叶位(从基部往上数第7片叶)玉米叶片下表皮(方法同McAinsh等<sup>[16]</sup>并略有改动),分别放入2

mL 负载缓冲液(pH=7.2, 10 mmol MES-KCl 缓冲液)中进行如下处理:①水孔蛋白抑制剂  $\text{AgNO}_3$  光暗处理。光照 3 h 转黑暗 3 h, 光照 3 h 加  $\text{AgNO}_3$  30 min 转黑暗 3 h, 黑暗 3 h 转光照 3 h, 黑暗 3 h 加  $\text{AgNO}_3$  30 min 转光照 3 h。②外源  $\text{H}_2\text{O}_2$  加  $\text{AgNO}_3$  处理。光照 3 h 转黑暗 3 h, 光照 3 h 加  $\text{H}_2\text{O}_2$  继续光照 3 h, 黑暗 3 h 转光照 3 h, 光照 3 h 加  $\text{AgNO}_3$  30 min 加  $\text{H}_2\text{O}_2$  继续光照 3 h。然后在其中加入 1  $\mu\text{L}$  荧光染料 2,7-二氯氢化荧光素二乙酸酯

( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ )使其最终浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$ , 摇匀后常温避光孵育 15~20 min, 再用 MES-KCl 缓冲液漂洗 3 次, 置于载玻片上, 制成临时装片, 用 Olympus-BX51 荧光显微镜观察并拍照, 重复 3 次。

1.2.2 引物设计 本试验中引物选用 Hachez 等<sup>[17]</sup>的 *ZmPIP5* 基因定量分析所使用的特异性引物, 如表 1 所示。引物由上海英潍捷基贸易有限公司合成。

表 1 qPCR 中所用特异性引物  
Table 1 Primers used in real time PCR

基因名称 Gene name	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
<i>ZmPIP2;4</i>	taccggagcaacgcctaag	gaaaacagcagcgagcgga
<i>ZmPIP2;5</i>	tgctgctgctggttgctt	cacaacaatcacactagetggaa
<i>ZmPIP2;6</i>	tttaaggtgaacgagaaggaga	gaaagctactgctgctgtggat
<i>Tubulin</i>	tcttgacaacgaggetatctat	tgtagatcagcctgttcaagtt
<i>GAPDH</i>	agcaggtcgagcatcttcg	ctgtagcccccactcgttgc

1.2.3 实时荧光定量 PCR ①取样及 RNA 提取。撕取对照组玉米 8 叶期第 3、4、5、6、7、8 叶(从基部往上数)下表皮, 不同水分梯度(CK、LS、MS、SS)处理下第 7、8 叶下表皮, 分别收集于装有 RNA 组织样品保存液中, 待收集完毕后, 用滤纸将保存液吸干后液氮保存于 -80  $^{\circ}\text{C}$  备用。RNA 提取过程完全按照 Ultrapure RNA Kit 超纯 RNA 提取试剂盒说明操作。

②反转录合成 cDNA。使用 HiFiScript gDNA Removal cDNA Synthesis Kit 试剂盒反转录 cDNA 作为模板, 试剂配制均在冰上操作。首先去除基因组 DNA, 10  $\mu\text{L}$  反应体系: 10 $\times$ gDNA Eraser Buffer 1  $\mu\text{L}$ , gDNA Eraser 0.5  $\mu\text{L}$ , RNA Template 50 pg~5  $\mu\text{g}$ , 加 RNase-Free Water 至 10  $\mu\text{L}$ 。其次为逆转录反应, 20  $\mu\text{L}$  反应体系: 去除基因组 DNA 反应液 10  $\mu\text{L}$ , HiFiScript (200 U/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 5 $\times$ RT Buffer 4  $\mu\text{L}$ , Primer Mix 1  $\mu\text{L}$ , RNase-Free Water 4  $\mu\text{L}$ 。

③实时荧光定量 PCR。以反转录所得 cDNA 为模板进行 qPCR, 10  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系: 2 $\times$ Ultra-SYBR Mixture 2.2  $\mu\text{L}$ , 正向引物 0.4  $\mu\text{mol/L}$  1  $\mu\text{L}$ , 反向引物 0.4  $\mu\text{mol/L}$  1  $\mu\text{L}$ , 反转录 cDNA 模板 DNA 2  $\mu\text{L}$ , 加 RNase-Free Water 至 10  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火/延伸 1 min, 38 个循环。熔解曲线分析: 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  15 s。通过扩增曲线和熔解曲线确定引物的特异性。

## 2 结果与分析

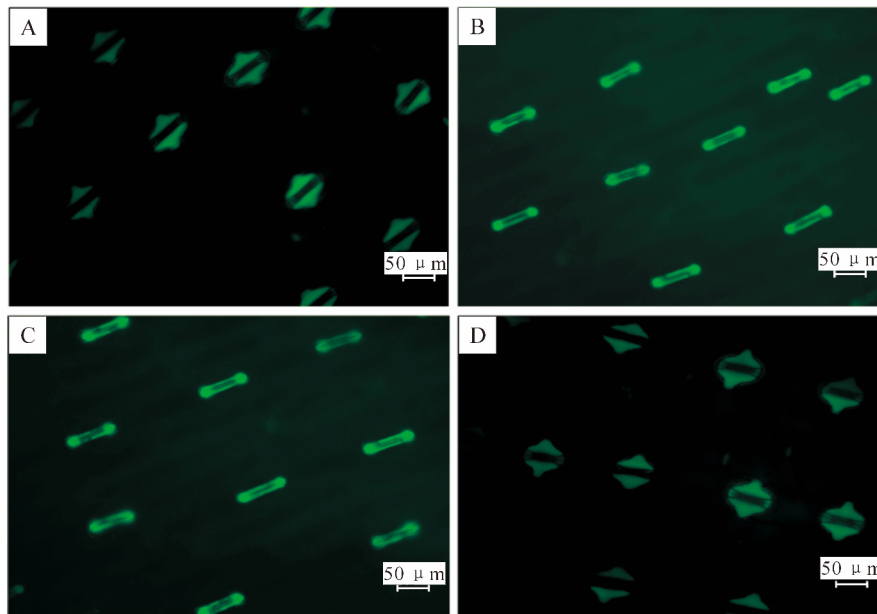
### 2.1 $\text{AgNO}_3$ 光暗处理后气孔中 $\text{H}_2\text{O}_2$ 分布的变化

用水孔蛋白抑制剂  $\text{AgNO}_3$  对玉米表皮进行光暗处理后气孔中  $\text{H}_2\text{O}_2$  分布情况如图 1 所示, 光照 3 h 转黑暗处理的对照组, 副卫细胞中  $\text{H}_2\text{O}_2$  分布明显较多(图 1-A), 光照 3 h 加水孔蛋白抑制剂  $\text{AgNO}_3$  后转黑暗处理, 副卫细胞中几乎没有  $\text{H}_2\text{O}_2$  分布(图 1-B), 说明水孔蛋白抑制剂  $\text{AgNO}_3$  抑制水孔蛋白的活性后,  $\text{H}_2\text{O}_2$  无法被运入副卫细胞, 副卫细胞中无  $\text{H}_2\text{O}_2$  积累。黑暗处理 3 h 转光照处理的对照组, 副卫细胞中几乎没有  $\text{H}_2\text{O}_2$  分布(图 1-C), 黑暗 3 h 加入  $\text{AgNO}_3$  转光照处理, 副卫细胞中  $\text{H}_2\text{O}_2$  分布明显较多(图 1-D), 说明水孔蛋白活性被抑制后,  $\text{H}_2\text{O}_2$  无法被运出副卫细胞, 副卫细胞中出现  $\text{H}_2\text{O}_2$  积累。

### 2.2 $\text{AgNO}_3$ 处理后加外源 $\text{H}_2\text{O}_2$ 气孔中 $\text{H}_2\text{O}_2$ 分布的变化

加水孔蛋白抑制剂  $\text{AgNO}_3$  后, 用外源  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理玉米表皮进行光暗处理, 气孔中  $\text{H}_2\text{O}_2$  分布如图 2 所示。由图 2 可以看出, 光照处理 3 h 后  $\text{H}_2\text{O}_2$  只在保卫细胞中分布, 而黑暗处理 3 h 后副卫细胞中的  $\text{H}_2\text{O}_2$  明显增多; 光照处理 3 h 后加入外源  $\text{H}_2\text{O}_2$  继续光照, 保卫细胞和副卫细胞中的  $\text{H}_2\text{O}_2$  均明显增多, 光照 3 h 加水孔蛋白抑制剂  $\text{AgNO}_3$  处理后再加  $\text{H}_2\text{O}_2$  继续光照, 此时副卫细胞中并未有  $\text{H}_2\text{O}_2$  分布。说明外源  $\text{H}_2\text{O}_2$  可引起副卫细胞  $\text{H}_2\text{O}_2$  的积累, 当水孔蛋白的活性被抑制后, 外源  $\text{H}_2\text{O}_2$  无法引

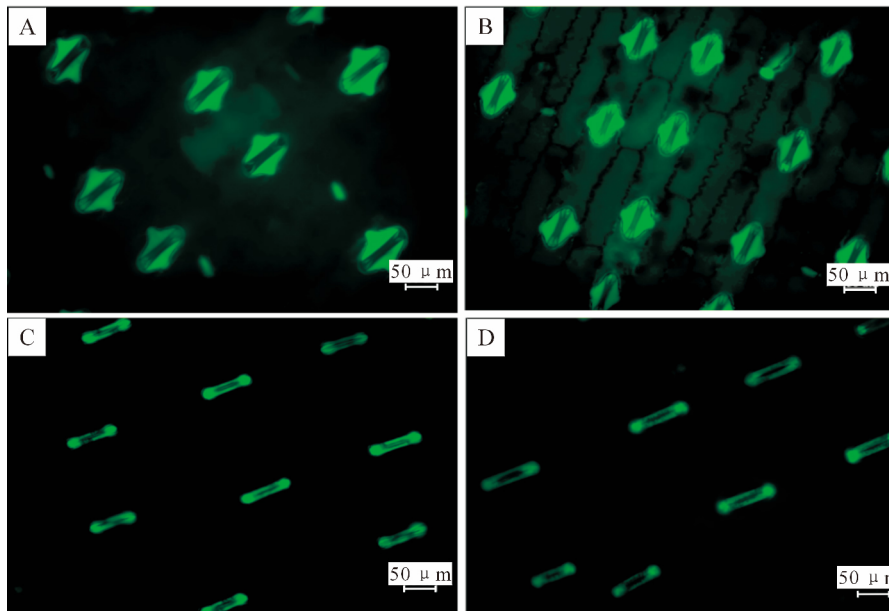
起副卫细胞中  $H_2O_2$  的积累。



A. 光照处理转黑暗处理对照; B. 光照处理后加  $AgNO_3$  转黑暗处理;  
 C. 黑暗处理转光照处理对照; D. 黑暗处理后加  $AgNO_3$  转光照处理  
 A. Light then dark treatment; B. Light with  $AgNO_3$  then dark treatment;  
 C. Dark then light treatment; D. Dark with  $AgNO_3$  then light treatment

图 1  $AgNO_3$  光暗处理对气孔中  $H_2O_2$  分布的影响

Fig. 1 Effect of  $AgNO_3$  on distribution of  $H_2O_2$



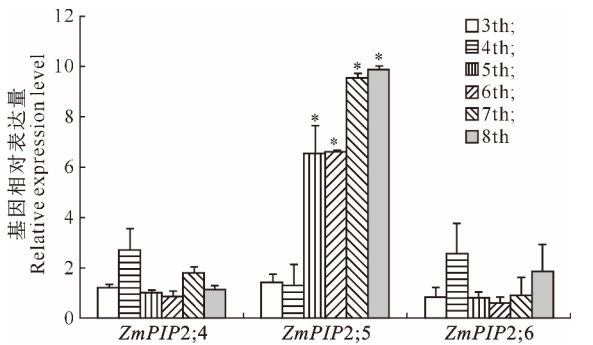
A. 光照处理转黑暗处理对照; B. 光照处理后加外源  $H_2O_2$  继续光照处理;  
 C. 黑暗处理转光照处理对照; D. 光照处理加  $AgNO_3$  再加外源  $H_2O_2$  继续光照处理  
 A. Light turn dark treatment; B. Light treatment then add exogenous  $H_2O_2$ ;  
 C. Dark turn light treatment; D. Light treatment then add  $AgNO_3$  and then add exogenous  $H_2O_2$

图 2 外源  $H_2O_2$  处理对气孔中  $H_2O_2$  分布的影响

Fig. 2 Effect of exogenous  $H_2O_2$  on distribution of  $H_2O_2$

### 2.3 *ZmPIP2;4*、*ZmPIP2;5* 和 *ZmPIP2;6* 基因的相对表达量

2.3.1 不同叶位 *ZmPIP2;4*、*ZmPIP2;5*、*ZmPIP2;6* 基因的相对表达量 分别撕取对照组玉米第 3、4、5、6、7、8 叶下表皮后,以 *Tubulin* 和 *GAPDH* 为内参基因进行实时荧光定量 PCR 分析,结果如图 3 所示。由图 3 可以看出,*ZmPIP2;4*、*ZmPIP2;6* 基因在不同叶位的相对表达量无显著差异;而 *ZmPIP2;5* 基因的相对表达量在不同叶位间差异显著,与无短细胞发生的第 3、4 叶相比,短细胞半发生的第 5、6 叶和完全发生的第 7、8 叶,*ZmPIP2;5* 基因的相对表达量显著上调。说明伴随短细胞的发生玉米叶片下表皮水孔蛋白基因 *ZmPIP2;5* 的表达量显著提高,与副卫细胞中  $H_2O_2$  的分布变化吻合。由此可知,副卫细胞中  $H_2O_2$  的变化与水孔蛋白 *ZmPIP2;5* 有关。



3th~8th 分别表示玉米第 3 叶至第 8 叶(从基部往上数)下表皮;  
\* 表示表达量差异显著。下同

3th—8th are maize leaves epidermis 3 to 8, respectively;

\*. The expression level is significantly different. The same Fig. 4

图 3 不同叶位 *ZmPIP2;4*、*ZmPIP2;5*、*ZmPIP2;6* 基因相对表达量的变化

Fig. 3 Expressions of *ZmPIP2;4*、*ZmPIP2;5* and *ZmPIP2;6* in different leaf-positions

2.3.2 不同水分梯度下 *ZmPIP2;4*、*ZmPIP2;5*、*ZmPIP2;6* 基因的相对表达量 以 *Tubulin* 和 *GAPDH* 为内参基因,不同水分梯度(CK、LS、MS、SS)处理下玉米第 7、8 叶(短细胞发生后)下表皮的实时荧光定量 PCR 结果见图 4。图 4 显示,短细胞发生后,随着水分胁迫程度的增加,*ZmPIP2;4*、*ZmPIP2;5*、*ZmPIP2;6* 基因的相对表达量均呈增加趋势。*ZmPIP2;5* 基因的相对表达量均显著增加,*ZmPIP2;4* 基因的相对表达量在重度水分胁迫下显著增加,*ZmPIP2;6* 基因的相对表达量在中度和重度水分胁迫时显著上调。

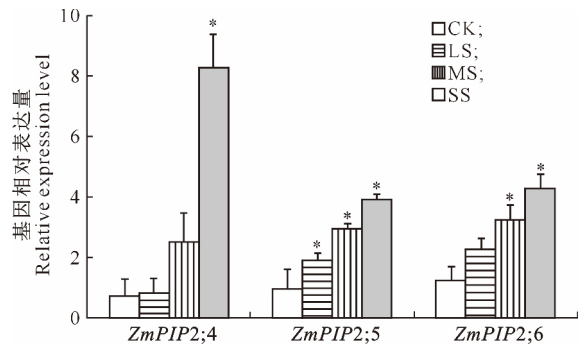


图 4 短细胞发生后不同水分梯度下 *ZmPIP2;4*、*ZmPIP2;5*、*ZmPIP2;6* 基因的相对表达量  
Fig. 4 Effects of different soil water contents on expressions of three maize aquaporins (*ZmPIP2;4*、*ZmPIP2;5*、*ZmPIP2;6*) after short cells

## 3 讨论

$H_2O_2$  在玉米气孔开关过程中发挥着重要的信号作用。目前研究普遍认为,气孔关闭时保卫细胞的  $H_2O_2$  大量积累<sup>[18-19]</sup>,而近期研究发现,在单子叶植物玉米中,不仅保卫细胞中  $H_2O_2$  对气孔的运动有调节作用,副卫细胞中  $H_2O_2$  也有作用,但调节机理不完全相同<sup>[2]</sup>。气孔张开时,保卫细胞有少量  $H_2O_2$  积累,而副卫细胞没有;当气孔关闭时,保卫细胞和副卫细胞中  $H_2O_2$  均积累,且副卫细胞中积累更显著。但副卫细胞中  $H_2O_2$  如何积累尚未见详细报道。

$HgCl_2$  是水孔蛋白抑制剂,通过与位于孔区域的 Cys 残基的巯基结合,致使水孔蛋白构象发生变化,通道关闭,但毒性较强可能会对植物造成胁迫<sup>[20]</sup>。而  $Ag^+$  作为植物水孔蛋白的抑制剂,可抑制的底物较少,作为水孔蛋白抑制剂具有更高的特异性<sup>[21-22]</sup>,且对植物毒性较弱。经研究对比后,本研究选取  $AgNO_3$  作为水孔蛋白抑制剂,对玉米表皮进行光暗处理后加入抑制剂  $AgNO_3$ ,发现玉米气孔中  $H_2O_2$  分布与对照组不同,即当 AQP 活性受到抑制后,副卫细胞中  $H_2O_2$  无法正常转运,从而出现与对照组相反的积累方式,由此推断副卫细胞中的  $H_2O_2$  为外源,AQP 具有转运  $H_2O_2$  的功能。加入外源  $H_2O_2$  后,副卫细胞中的  $H_2O_2$  积累,而先加入水孔蛋白抑制剂  $AgNO_3$  后再加外源  $H_2O_2$  处理的表皮副卫细胞中未出现  $H_2O_2$  的积累,即水孔蛋白参与了副卫细胞中  $H_2O_2$  的积累与清除。综上所述,玉米叶片下表皮气孔中水孔蛋白活性被抑制后,副卫细胞中  $H_2O_2$  无法正常转运,不能正常的清除

和积累,说明副卫细胞中的  $H_2O_2$  是外源的,可能由水孔蛋白转运而来,通过水孔蛋白活性的变化改变气孔中  $H_2O_2$  的含量及分布变化,从而参与气孔开关、水分代谢等信号调节过程。据报道,ROS、 $Ca^{2+}$ 、电子、RBOHD、ATP 等通过信号整合,在细胞之间可通过一定的信号途径将 ROS 从一个细胞转运给另一个细胞,正是水孔蛋白协助 ROS 的转运<sup>[23]</sup>。本研究也证明副卫细胞中的  $H_2O_2$  是外源的,水孔蛋白协助其跨膜转运。

有报道发现,玉米叶片下表皮所有植株第7新生叶,极少数植株第5叶、大部分植株第6叶从叶基部同时开始发生短细胞,1~4叶无短细胞发生;短细胞发生前,无论何种条件下,副卫细胞中均无  $H_2O_2$  的积累,而短细胞发生后,暗处理即气孔关闭时,副卫细胞开始出现  $H_2O_2$  积累<sup>[24]</sup>。本研究发现,与未发生短细胞的叶位相比,发生短细胞的叶位水孔蛋白基因 *ZmPIP2;5* 的相对表达量显著上调,与此同时 *ZmPIP2;4*、*ZmPIP2;6* 的相对表达量在发生与不发生短细胞的叶位无显著差异。即短细胞发生后,气孔关闭时副卫细胞中  $H_2O_2$  开始积累与短细胞发生后水孔蛋白基因 *ZmPIP2;5* 的相对表达量显著上调是一致的。研究发现,*ZmPIP2;5* 突变体不能跨膜转运  $H_2O_2$ ,而野生型可以跨膜转运  $H_2O_2$ <sup>[12]</sup>,细胞膜上的水孔蛋白决定了细胞间  $H_2O_2$  跨膜转运的效率<sup>[25]</sup>。由此可知,水孔蛋白 *ZmPIP2;5* 可能参与了玉米叶片下表皮气孔副卫细胞中  $H_2O_2$  的转运,调节  $H_2O_2$  在副卫细胞中的积累与清除,从而协助保卫细胞调节气孔的开关。

李真真等<sup>[3]</sup>报道,随着水分胁迫程度的加大,保卫细胞中  $H_2O_2$  的积累增多,而且副卫细胞中  $H_2O_2$  积累变化也很大,即随着水分胁迫的不断加大,副卫细胞中  $H_2O_2$  的积累也不断增多。本研究表明,随着水分胁迫的加剧,水孔蛋白基因 *ZmPIP2;4*、*ZmPIP2;5*、*ZmPIP2;6* 的相对表达量在完全发生短细胞的第7、8叶显著上调,*ZmPIP2;5* 基因的上调与副卫细胞中  $H_2O_2$  的积累一致,进一步表明玉米副卫细胞中  $H_2O_2$  积累与 *ZmPIP2;5* 的转运有关。

综上所述,玉米叶片下表皮副卫细胞中的  $H_2O_2$  是外源的,其积累和清除可能由水孔蛋白 *ZmPIP2;5* 跨膜转运。光暗处理条件下,副卫细胞中  $H_2O_2$  的积累与清除,短细胞发生后气孔开关时副卫细胞中  $H_2O_2$  的积累与清除,以及水分胁迫下副卫细胞中  $H_2O_2$  的积累,均与水孔蛋白 *ZmPIP2;5*

的跨膜转运相关,但具体的转运机制有待进一步的研究证实。

## 4 结 论

玉米水孔蛋白具有跨膜转运  $H_2O_2$  的功能,玉米气孔副卫细胞中的  $H_2O_2$  是外源的,其积累和清除可能依赖于水孔蛋白 *ZmPIP2;5* 的跨膜转运。

### [参考文献]

- [1] Song Y W, Miao Y C, Song C P. Behind the scenes: the roles of reactive oxygen species in guard cells [J]. *New Phytologist*, 2014, 201: 1121-1140.
- [2] Yao Y Q, Liu X P, Li Z Z, et al. Drought-induced  $H_2O_2$  accumulation in subsidiary cells is involved in regulatory signaling of stomatal closure in maize leaves [J]. *Planta*, 2013, 238(1): 217-227.
- [3] 李真真, 张莉, 姚雅琴, 等. 玉米叶片气孔及花环和维管束结构对水分胁迫的响应 [J]. *应用生态学报*, 2014, 25(10): 2944-2950.  
Li Z Z, Zhang L, Yao Y Q, et al. Responses of stomata and kranz anatomy of maize leaves to soil water shortages [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25(10): 2944-2950.
- [4] Distefano A M, Scuffi D, Garcia-Mate C, et al. Phospholipase D delta is involved in nitric oxide-induced stomatal closure [J]. *Planta*, 2012, 236(6): 1899-1907.
- [5] Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, et al. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1 [J]. *Nature*, 2000, 407: 599-605.
- [6] Fetter K, Van Wilder V, Moshelion M, et al. Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity [J]. *Plant Cell*, 2004, 16: 215-228.
- [7] Bienert G P, Cavez D, Bessener A, et al. A conserved cysteine residue is involved in disulfide bond formation between plant plasma membrane aquaporin monomers [J]. *Biochemical Journal*, 2012, 445: 101-111.
- [8] Yue X, Zhao X Y, Fei Y K, et al. Correlation of aquaporins and transmembrane solute transporters revealed by genome-wide analysis in developing maize leaf [J]. *Comparative and Functional Genomics*, 2012, 2012: 1-14.
- [9] Dynowski M, Schaaf G, Loque D, et al. Plant plasma membrane water channels conduct the signalling molecule  $H_2O_2$  [J]. *Biochemical Journal*, 2008, 414: 53-61.
- [10] Hooijmaijers C, Rhee J Y, Kwak K J, et al. Hydrogen peroxide permeability of plasma membrane aquaporins of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Plant Research*, 2012, 125(1): 147-153.
- [11] Bienert G P, Moller A L, Kristiansen K A, et al. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282: 1183-1192.
- [12] Bienert G P, Heinen R B, Berny M C, et al. Maize plasma mem-

- brane aquaporin ZmPIP2; 5, but not ZmPIP1; 2, facilitates transmembrane diffusion of hydrogen peroxide [J]. *Biochimica Biophysica Acta-Biomembranes*, 2014, 1838: 216-222.
- [13] Asada K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions [J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(2): 391-396.
- [14] Asada K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons [J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1999, 50: 601-639.
- [15] Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, et al. Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction [J]. *Plant Journal*, 1997, 11: 1187-1194.
- [16] 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: 1031-1042.
- [17] Hachez C, Moshelion M, Zelazny E, et al. Localization and quantification of plasma membrane aquaporin expression in maize primary root: a clue to understanding their role as cellular plumbers [J]. *Plant Molecular Biology*, 2006, 62: 305-323.
- [18] Zhang X, Zhang L, Song C P, et al. Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid induced stomatal closure *Vicia faba* [J]. *Plant Physiology*, 2001, 126: 1438-1448.
- [19] She X P, Song X G, He J M. Role and relationship of nitric oxide and hydrogen peroxide in light/dark-regulated stomatal movement in *Vicia faba* [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2004, 46: 1292-1300.
- [20] Henzler T, Steudle E. Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> across water channels [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2000, 51: 2053-2066.
- [21] Niemietz C M, Tyerman S D. New potent inhibitors of aquaporins: silver and gold compounds inhibit aquaporins of plant and human origin [J]. *FEBS Letters*, 2002, 531(3): 443-447.
- [22] Sadok W, Sinclair T R. Transpiration response of "slow-wilting" and commercial soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) genotypes to three aquaporin inhibitors [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61: 821-829.
- [23] Gilroy S, Suzuki N, Miller G, et al. A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling [J]. *Trends in Plant Science*, 2014, 19(10): 623-630.
- [24] 董鹤, 李思, 姚雅琴, 等. 玉米叶表皮短细胞发育过程的形态特征及栓质细胞作用研究 [J]. *西北植物学报*, 2015, 35(9): 1781-1790.  
Dong H, Li S, Yao Y Q, et al. Morphological characteristics related to the development process of short cells and the function of cork cells in epidermis of maize [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2015, 35(9): 1781-1790.
- [25] Dynowski M, Schaaf G, Loque D, et al. Plant plasma membrane water channels conduct the signalling molecule H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [J]. *Biochemical Journal*, 2008, 414: 53-61.

.....

(上接第 33 页)

- [21] 王金香, 蒋明义, 马芳芳, 等. 玉米促分裂原激活蛋白激酶 *ZmMPK7* 基因的表达特性及功能分析 [J]. *南京农业大学学报*, 2011, 34(1): 68-73.  
Wang J X, Jiang M Y, Ma F F, et al. Expression characterization and function analysis of *ZmMPK7* from *Zea mays* seedlings [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2011, 34(1): 68-73.
- [22] Pitzschke A, Hirt H. Disentangling the complexity of mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling [J]. *Plant Physiology*, 2009, 149(2): 606-615.
- [23] 王娟, 张腾国, 张艳, 等. 油菜 MAPK 激酶基因 *BnMAPK6* 基因的克隆及表达分析 [J]. *兰州大学学报(自然科学版)*, 2012, 48(3): 64-69.  
Wang J, Zhang T G, Zhang Y, et al. Molecular cloning and expression analysis of a novel MAP kinase gene *BnMPK6* in *Brassica napus* [J]. *Journal of Lanzhou University(Natural Science)*, 2012, 48(3): 64-69.
- [24] Shi J, An H L, Zhang L, et al. GhMPK7, a novel multiple stress-responsive cotton group C MAPK gene, has a role in broad spectrum disease resistance and plant development [J]. *Plant Molecular Biology*, 2010, 74(1): 1-17.
- [25] Zhang L, Xi D, Li S, et al. A cotton group C MAP kinase gene, GhMPK2, positively regulates salt and drought tolerance in tobacco [J]. *Plant Molecular Biology*, 2011, 77(1/2): 17-31.