

# 外源 NO 诱导的拟南芥保卫细胞胞质 pH 升高先于气孔关闭\*

赵世领 孙立荣 张 换 陆宝石 马丽娅 郝福顺\*\*

河南大学生命科学学院 植物逆境生物学重点实验室, 开封 475004

**摘要** 以 pH 敏感的绿色荧光蛋白拟南芥转基因植物为材料, 研究了保卫细胞胞质 pH 变化与外源一氧化氮(nitric oxide, NO)诱导气孔关闭的关系, 结果发现, 与对照相比, 100 $\mu$ mol/L NO 供体硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)可显著增加胞质的 pH(增加约 0.29 个 pH 单位), 并诱导气孔关闭. NO 清除剂 c-PTIO、弱酸 酸以及质膜 H<sup>+</sup>-ATP 酶的抑制剂钒酸钠均有效抑制了 SNP 诱导的保卫细胞胞质碱化和气孔关闭, 而弱碱苜蓿的作用与 酸相反, 说明保卫细胞胞质碱化介导了外源 NO 诱导的气孔关闭. 另外, 钙离子的螯合剂 EGTA、钙调蛋白激酶抑制剂 ML-7、钙调素的拮抗剂 W7 以及激酶抑制剂 K-252a 均可明显抑制外源 NO 诱导的胞质 pH 升高和气孔关闭, 说明钙离子及磷酸化在 NO 诱导的保卫细胞胞质碱化和气孔关闭中发挥重要作用.

**关键词** 一氧化氮 pH 拟南芥 气孔关闭

一氧化氮(nitric oxide, NO)是植物中重要的信号分子, 不仅调节生长发育、细胞程序性死亡以及植物应答生物胁迫和干旱、盐、冷、紫外辐射、臭氧等非生物胁迫反应<sup>[1-4]</sup>, 而且在脱落酸(ABA)、茉莉酸甲酯(MeJA)、水杨酸、重碳酸盐、NO、病原菌等诱导的气孔关闭以及光诱导的气孔开放中发挥重要作用<sup>[4-12]</sup>. 在 ABA 诱导的气孔关闭中, 保卫细胞中 NO 的积累依赖于质膜 NADPH 氧化酶 AtrbohD 和 AtrbohF 产生的活性氧(ROS)<sup>[13, 14]</sup>, 而且 NO 主要来源于硝酸还原酶(NR)<sup>[15, 16]</sup>. 在蚕豆(*Vicia faba*)中已经证明, NO 能够激活保卫细胞胞质钙库释放 Ca<sup>2+</sup>, 增加胞质 Ca<sup>2+</sup> 浓度, 进而失活质膜内向 K<sup>+</sup> 通道和激活 Cl<sup>-</sup> 通道<sup>[17]</sup>. 研究也表明, 较高浓度的 NO 能抑制保卫细胞 Ca<sup>2+</sup> 不敏感的质膜外向 K<sup>+</sup> 通道, 调节气孔运动<sup>[18]</sup>.

胞质 pH 能够作为信号或信使调节植物许多生理过程, 包括植物适应光强的变化、酸生长、共生

以及植物对干旱、缺氧、向地性生长、病菌侵染以及植物对赤霉素和 ABA 的反应等<sup>[19, 20]</sup>. 另外, ABA 和 MeJA 均能诱导保卫细胞胞质碱化, 激活质膜外向 K<sup>+</sup> 通道导致气孔关闭, 而且胞质碱化先于 ROS 的产生和 NO 的积累<sup>[21-26]</sup>.

证据表明, 在植物气孔运动调节过程中, 保卫细胞中许多信号的作用关系不是线形的, 而是网络状的<sup>[27]</sup>. 例如, 在 ABA 诱导气孔关闭中, 保卫细胞胞质碱化先于 ROS 的产生, 但研究也发现 ROS 能够诱导保卫细胞胞质碱化<sup>[25, 28]</sup>. 另外, 在保卫细胞信号转导中, Ca<sup>2+</sup> 既位于 ROS 的上游又在 ROS 的下游发挥作用<sup>[29, 30]</sup>. 因此, 保卫细胞中可能存在目前尚未发现的其他 NO 信号转导途径.

许多证据表明, NO 能够促进气孔关闭<sup>[16]</sup>, 但保卫细胞胞质 pH 变化是否与 NO 诱导的气孔关闭相关还不清楚. 我们利用 pH 敏感的绿色荧光蛋白(GFP)转基因拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)植物研

2009-05-30 收稿, 2009-07-13 收修改稿

\* 国家自然科学基金(批准号: 30670183)和河南省教育厅基金(批准号: 2007180004)资助项目

\*\* 通信作者, E-mail: haofsh@henu.edu.cn

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

究发现<sup>[31, 32]</sup>, 外源 NO 能够通过增加保卫细胞胞质 pH 诱导气孔关闭。

## 1 材料和方法

### 1.1 药品和试剂

2-(4-carboxyphenyl)-4, 4, 5, 5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (c-PTIO)、苜蓿胺、丁酸、尼日利亚菌素、钒酸钠和硝普钠(SNP)购自 Sigma 公司, 其他试剂均购自 Amresco 公司。

### 1.2 植物材料

pH 敏感的 GFP 转基因拟南芥(Col-0)植物种子(N9561)购自 NASC (the Nottingham Arabidopsis Stock Centre), 种子在 MS 培养基上生长 2 周后移到培养土中培养, 培养条件: 每天光照 16h, 光强  $0.15-0.2 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 相对湿度 70%, 温度  $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。

### 1.3 气孔开度测定

按 Zhang 等<sup>[28]</sup>的方法测定拟南芥叶片表皮条气孔开度。从拟南芥叶片背轴面剥离表皮条, 刷掉叶肉细胞, 将表皮条放在无  $\text{CO}_2$  的 Mes/KCl 缓冲液中( $10 \text{ mmol/L}$  Mes,  $50 \text{ mmol/L}$  KCl,  $100 \mu\text{mol/L}$  CaCl<sub>2</sub>, pH 6.15), 光下( $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $22^\circ\text{C}$ )放置 2.5h 诱导气孔开放, 然后将表皮条转移到含有 NO 供体 SNP (加或不加各种抑制剂)、 $100 \mu\text{mol/L}$  Fe(II)CN 或 Fe(III)CN 的上述 Mes/KCl 缓冲液中。使用抑制剂时, 表皮条先与各种抑制剂( $2 \text{ mmol/L}$  EGTA,  $200 \mu\text{mol/L}$  c-PTIO,  $1 \mu\text{mol/L}$  K252a,  $20 \mu\text{mol/L}$  ML7 或  $10 \mu\text{mol/L}$  W7)温育 30min, 然后再用 SNP 处理。气孔开度用 TE-300 显微镜(Nikon, Japan)照相拍照后测定。实验至少重复 3 次, 每次实验测定约 50 个气孔。

### 1.4 保卫细胞胞质 pH 测定

利用激光扫描共聚焦显微镜(Olympus Fluoview™ FV1000)检测转基因拟南芥 pH 敏感的 GFP 荧光变化, 根据荧光标准曲线确定保卫细胞胞质 pH<sup>[31, 33]</sup>。该方法的原理是, 通过改造 GFP 中某些氨基酸, 使蛋白质对 pH 变化敏感, pH 的变化能导致 GFP 结构改变, 在激发光下, GFP 的荧光强度也发生改变, pH 在 5—8 的范围内, GFP 荧光强

度越大, pH 值越小, pH 与荧光强度呈线性关系<sup>[33]</sup>。测定保卫细胞 pH 时, 将转基因拟南芥表皮条放在 Mes/KCl 缓冲液( $10 \text{ mmol/L}$  Mes,  $50 \text{ mmol/L}$  KCl,  $100 \mu\text{mol/L}$  CaCl<sub>2</sub>, pH 6.15)中照光 2h ( $0.2-0.3 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $22^\circ\text{C}$ )使气孔完全张开, 然后用  $100 \mu\text{mol/L}$  SNP 处理(加或不加各种抑制剂)后, 检测荧光变化。使用抑制剂时, 表皮条先与各种抑制剂( $2 \text{ mmol/L}$  EGTA,  $200 \mu\text{mol/L}$  c-PTIO,  $1 \mu\text{mol/L}$  K252a,  $20 \mu\text{mol/L}$  ML7 或  $10 \mu\text{mol/L}$  W7)温育 15min, 然后再用 SNP 处理。扫描条件: 激发光波长分别为 435 nm 和 488 nm, 发射光波长为 500—540 nm。每次扫描分别记录 435 nm 激发光和 488 nm 激发光下的荧光值, 并计算荧光比率(488 nm/435 nm), 根据 pH 标准校正曲线将获得的荧光值转化为 pH 值。为使不同实验结果可以互相比较, 所有的荧光图像都在相同的设置下获得, 每次实验至少测定 10 个细胞。

### 1.5 统计分析

所有实验至少重复 3 次。数据为平均值 ± 标准误, 用 Student's *t* 检验分析处理与对照的差异显著性, *P* 值小于 0.05 认为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 外源 NO 诱导保卫细胞胞质 pH 升高

尼日利亚菌素是一种  $\text{K}^+/\text{H}^+$  交换离子载体, 可以使细胞内外的 pH 达到平衡。将撕好的拟南芥表皮条放在 Mes-KCl 缓冲液中, 充分光照 2h, 使气孔完全张开, 将表皮条置于含有  $10 \mu\text{g/L}$  尼日利亚菌素的 Mes 缓冲液( $10 \text{ mmol/L}$  Mes,  $50 \text{ mmol/L}$  KCl, pH 5.5—8)中, 黑暗中孵育 20min, 使胞内外 pH 达到平衡, 然后通过激光共聚焦成像系统得到不同 pH 值下的荧光比率( $E_x 488/E_x 435$ ), 将荧光比率和相应的 pH 值作图。研究发现, 在 pH 5.5—8 范围内, 所得到的荧光比率与胞质 pH 值呈线性关系(图 1)。

利用人们广泛使用的 SNP 作为 NO 供体, 研究了 NO 对拟南芥保卫细胞胞质 pH 的影响。图 2 所示,  $100 \mu\text{mol/L}$  SNP 处理表皮条约 1min 后, 保卫细胞胞质 pH 开始逐渐升高, 大约 10min 后, pH 达到最大值, 以后逐渐降低, 胞质 pH 升高的最大

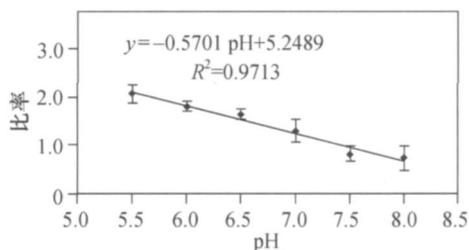


图 1 保卫细胞 pH 敏感的 GFP 荧光标准曲线图  
荧光强度比值是至少 5 个值的平均值, 每个值代表保卫细胞 1 个区域平均荧光强度的比值

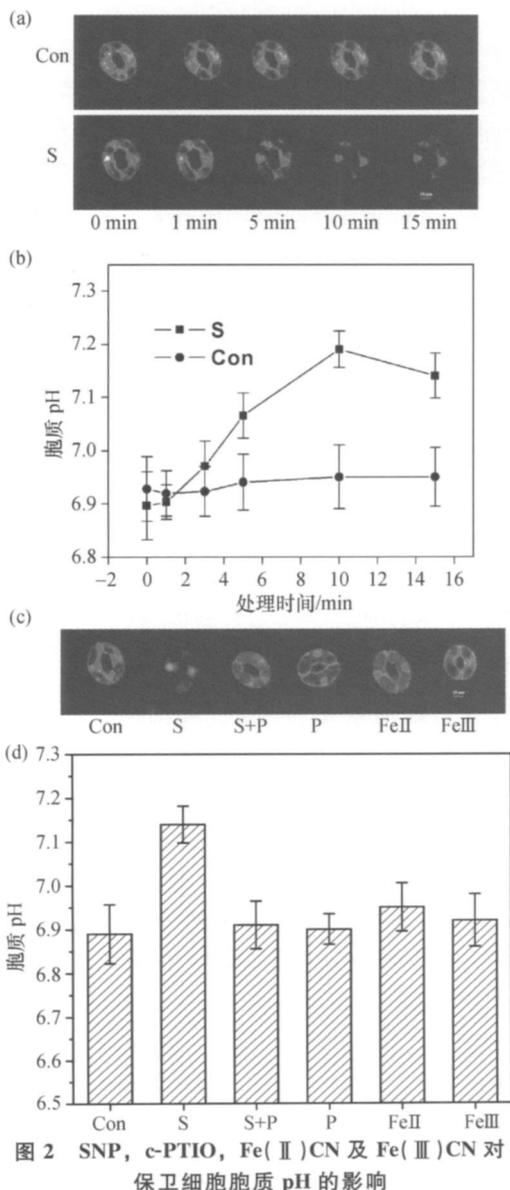


图 2 SNP, c-PTIO, Fe(II)CN 及 Fe(III)CN 对保卫细胞胞质 pH 的影响

(a) 不同处理时间 pH 变化荧光图; (b) pH 随时间变化曲线图; (c) 处理 15 min 时 pH 荧光图; (d) 处理 15 min 后胞质 pH 大小. Con, 对照; S, 100  $\mu\text{mol/L}$  SNP 处理; S+P, 100  $\mu\text{mol/L}$  SNP 与 200  $\mu\text{mol/L}$  c-PTIO 处理; P, 200  $\mu\text{mol/L}$  c-PTIO 处理; FeII, 100  $\mu\text{mol/L}$  Fe(II)CN 处理; FeIII, 100  $\mu\text{mol/L}$  Fe(III)CN 处理.

约为 0.29 个单位(从 6.93 到 7.22). 在 pH 升高的过程中可看到有小的脉冲峰出现, 但脉冲的发生没有明显规律. 在 SNP 处理期间, 保卫细胞胞质 pH 以时间依赖的方式增加. SNP 处理也导致保卫细胞周围表皮细胞的胞质 pH 增加, 这与 ABA 影响保卫细胞胞质 pH 的情况类似. 用 100  $\mu\text{mol/L}$  SNP 和 200  $\mu\text{mol/L}$  NO 清除剂 c-PTIO 共同处理表皮条, 发现清除剂显著抑制了 SNP 导致的胞质 pH 升高(图 2).

SNP 除产生 NO 外, 也产生氰化物, 因此我们利用不产生 NO 的 SNP 结构类似物 Fe(II)CN 和 Fe(III)CN 作为负对照进行研究<sup>[34]</sup>, 结果发现, 100  $\mu\text{mol/L}$  Fe(II)CN 和 Fe(III)CN 不能诱导胞质 pH 升高, 说明是 NO 而不是氰化物增加了保卫细胞胞质 pH(图 2). 以上结果说明外源 NO 能够增加保卫细胞胞质 pH.

## 2.2 丁酸、钒酸钠和苄胺对 NO 诱导保卫细胞胞质 pH 变化的影响

为了进一步确定外源 NO 对保卫细胞胞质 pH 的影响, 我们研究了可透过膜的弱酸丁酸<sup>[25, 28]</sup>、质膜 H<sup>+</sup>-ATP 酶抑制剂钒酸钠(钒酸钠可阻止保卫细胞质膜向胞外泵出质子)和可透过膜的弱碱苄胺对 SNP 诱导胞质 pH 变化的影响, 结果发现, 10 mmol/L 丁酸及 50  $\mu\text{mol/L}$  钒酸钠预处理表皮条均能有效抑制 SNP 诱导的胞质 pH 升高, 而苄胺预处理则促进了 SNP 诱导的胞质 pH 升高, 说明外源 NO 能够诱导保卫细胞胞质碱化(图 3).

## 2.3 保卫细胞胞质碱化介导了外源 NO 诱导的气孔关闭

为了进一步确定胞质碱化是否参与外源 NO 诱导的气孔关闭, 我们研究了气孔对 SNP、丁酸、钒酸钠和苄胺等的反应, 如图 4 所示, 100  $\mu\text{mol/L}$  SNP 可诱导拟南芥气孔关闭, 10 mmol/L 苄胺能明显促进 SNP 诱导的气孔关闭, 而 100  $\mu\text{mol/L}$  Fe(II)CN 和 Fe(III)CN 处理表皮条后, 气孔开度与对照没有显著差异. 与苄胺的作用不同, 10 mmol/L 丁酸处理表皮条轻微促进了气孔开放, 但 10 mmol/L 丁酸部分抑制了 SNP 诱导的拟南芥气孔关闭. 用钒酸钠预处理拟南芥叶片表皮条, SNP 诱导的气孔关闭也受到明显抑制. 这些结果表明, 保卫细胞胞质碱化介导了拟南芥外源 NO 诱导的气孔关闭.

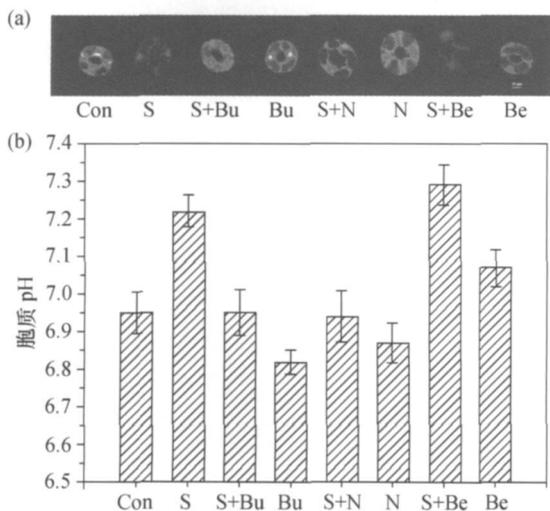


图 3 丁酸、钒酸钠和苜蓿胺对外源 NO 诱导保卫细胞胞质 pH 的影响

(a) 处理 15 min 后的荧光图; (b) 处理 15 min 后的胞质 pH 大小. Con, 对照; S, 100  $\mu\text{mol/L}$  SNP 处理; S+Bu, 100  $\mu\text{mol/L}$  SNP 与 10 mmol/L 丁酸处理; Bu, 10 mmol/L 丁酸处理; S+N, 100  $\mu\text{mol/L}$  SNP 与 50  $\mu\text{mol/L}$  钒酸钠处理; N, 50  $\mu\text{mol/L}$  钒酸钠处理; S+Be, 100  $\mu\text{mol/L}$  SNP 与 10 mmol/L 苜蓿胺处理; Be, 10 mmol/L 苜蓿胺处理

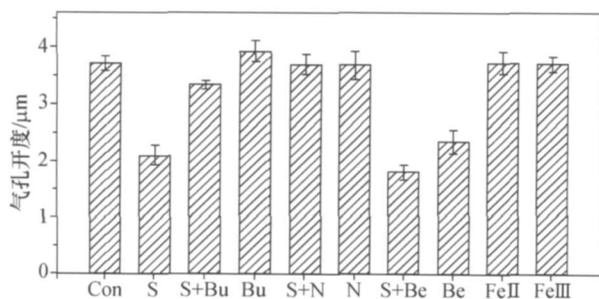


图 4 丁酸、苜蓿胺和钒酸钠等对外源 NO 诱导气孔关闭的影响

Con, 对照; S, 100  $\mu\text{mol/L}$  SNP 处理; S+Bu, 100  $\mu\text{mol/L}$  SNP 与 10 mmol/L 丁酸处理; S+Be, 100  $\mu\text{mol/L}$  SNP 与 10 mmol/L 苜蓿胺处理; Bu, 丁酸处理; Be, 苜蓿胺处理; S+N, 100  $\mu\text{mol/L}$  SNP 与 50  $\mu\text{mol/L}$  钒酸钠处理; N, 钒酸钠处理; FeII, 100  $\mu\text{mol/L}$  Fe(II)CN 处理; FeIII, 100  $\mu\text{mol/L}$  Fe(III)CN 处理

## 2.4 钙和磷酸化参与外源 NO 诱导的保卫细胞胞质碱化和气孔关闭

许多研究表明, 钙和磷酸化在调控气孔关闭中发挥重要作用, 因此我们利用药理学方法研究了钙和磷酸化对外源 NO 诱导保卫细胞胞质碱化和气孔

关闭的影响, 结果发现, 2 mmol/L 钙离子的整合剂 EGTA、10  $\mu\text{mol/L}$  钙调蛋白激酶抑制剂 ML-7、20  $\mu\text{mol/L}$  钙调素拮抗剂 W7 均能明显抑制外源 NO 诱导的胞质 pH 升高和气孔关闭. 另外, 1  $\mu\text{mol/L}$  激酶抑制剂 K252a 也有效抑制了 SNP 诱导的保卫细胞胞质碱化和气孔关闭, 暗示钙和激酶在外源 NO 诱导的胞质碱化和气孔关闭中发挥重要作用.

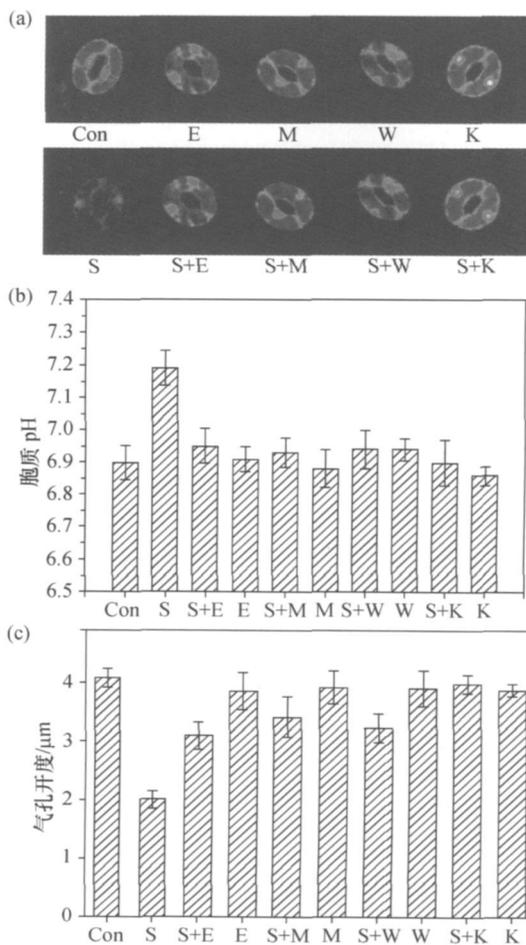


图 5 钙离子整合剂和激酶抑制剂对 NO 诱导胞质 pH 变化和和气孔关闭的影响

(a) 抑制剂对 NO 诱导胞质 pH 变化的影响; (b) 抑制剂对 NO 诱导胞质 pH 变化的影响; (c) 抑制剂对 NO 诱导气孔关闭的影响. Con, 对照; S, 100  $\mu\text{mol/L}$  SNP 处理; S+E, 100  $\mu\text{mol/L}$  SNP 与 2 mmol/L EGTA 处理; E, 2 mmol/L EGTA 处理; S+M, 100  $\mu\text{mol/L}$  SNP 与 20  $\mu\text{mol/L}$  ML7 处理; M, 20  $\mu\text{mol/L}$  ML7 处理; S+W, 100  $\mu\text{mol/L}$  SNP 与 10  $\mu\text{mol/L}$  W7 处理; W, 10  $\mu\text{mol/L}$  W7 处理; S+K, 100  $\mu\text{mol/L}$  SNP 与 1  $\mu\text{mol/L}$  K252a 处理; K, 1  $\mu\text{mol/L}$  K252a 处理

### 3 讨论

NO 在调控植物气孔运动过程中发挥重要作用, 它主要通过影响  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  和  $\text{K}^+$  通道活性调节气孔开闭<sup>[16-18]</sup>. 证据表明, 保卫细胞胞质 pH 变化与气孔运动密切相关, 在 ABA, MeJA 和  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的气孔关闭中, 胞质 pH 升高是关键步骤之一<sup>[25, 28]</sup>, 但保卫细胞胞质 pH 变化是否与 NO 诱导的气孔关闭相关还未见报道. 本研究中, 我们发现外源 NO 能明显增加保卫细胞胞质 pH, 增加的幅度随 SNP 处理浓度的增高而增大, 用丁酸或钒酸钠抑制胞质 pH 升高后, NO 诱导的气孔关闭也受到抑制, 说明保卫细胞胞质 pH 变化介导了 NO 诱导的气孔关闭, 该结果结合胞质 pH 在 ABA, MeJA 和  $\text{H}_2\text{O}_2$  信号中的作用, 说明保卫细胞胞质 pH 变化可能是气孔关闭前的一个普遍信号. Zhang 等<sup>[28]</sup>报道,  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导蚕豆保卫细胞胞质 pH 升高的同时, 液泡中 pH 降低, 推测气孔关闭前质子从胞质进入了液泡, 但我们未观察到 SNP 诱导保卫细胞液泡 pH 降低的现象. 我们也利用 pH 荧光探针研究了外源 NO 对蚕豆保卫细胞液泡 pH 的影响, 但未发现液泡 pH 明显降低(待发表). 推测可能的原因有两个, 一是液泡溶液的缓冲能力强, SNP 诱导进入液泡的质子不足以引起液泡 pH 的明显降低; 二是 SNP 诱导的保卫细胞胞质中的质子可能未进入液泡或进入液泡的较少. 气孔关闭前保卫细胞质子的另一个去向可能是胞外, 因为质膜上存在许多  $\text{H}^+$  转运体, NO 可能激活或抑制某些  $\text{H}^+$  转运体活性, 导致保卫细胞胞质 pH 升高. 另外, NO 也可能作用于调节胞质 pH 平衡的代谢物或代谢过程导致保卫细胞胞质碱化<sup>[20]</sup>, 其具体的机制有待于今后深入研究.

以前的研究表明, 在 ABA 诱导的气孔关闭中, 胞质碱化先于 NO 的积累<sup>[29]</sup>, 而我们的研究证明 NO 能够诱导保卫细胞胞质碱化, 这说明在保卫细胞中, 胞质碱化既可位于 NO 信号的上游又可在 NO 信号的下游发挥作用.

钙和 pH 在 ABA 及 MeJA 诱导的气孔关闭中起重要作用<sup>[25]</sup>. 在保卫细胞中,  $\text{Ca}^{2+}$  与 pH 信号是否相互影响一直存在争议, 有人认为二者诱导气孔关闭的机制不相同, 原因有两个, 一是 pH 的变化

不能明显改变胞质中  $\text{Ca}^{2+}$  的浓度; 二是 pH 对  $\text{K}^+$  电流的影响是电压不依赖的, 而胞质  $\text{Ca}^{2+}$  的作用对电压显著敏感<sup>[20, 35]</sup>. 但也有人认为二者存在相互作用, 因为降低保卫细胞胞质 pH 能够增加胞质  $\text{Ca}^{2+}$  浓度<sup>[20]</sup>. 我们研究发现,  $\text{Ca}^{2+}$  的螯合剂 EGTA 明显抑制外源 NO 诱导的保卫细胞胞质 pH 升高和气孔关闭(图 5), 说明  $\text{Ca}^{2+}$  参与 NO 对胞质 pH 的调控.

钙调蛋白和激酶在 ABA 及 MeJA 诱导的气孔关闭中起重要作用<sup>[25]</sup>, 因此我们研究了这些成分对外源 NO 诱导胞质碱化和气孔关闭的影响, 发现激酶抑制剂和钙调素拮抗剂均能有效抑制 NO 引起的胞质 pH 升高和气孔关闭, 说明磷酸化作用在 NO 诱导的保卫细胞胞质 pH 升高和气孔关闭中发挥重要作用. 这与 Suhita 等<sup>[25]</sup> 在研究 ABA 和 MeJA 诱导气孔关闭时得到的结果类似, 其详细的机理有待于深入研究.

致谢 感谢德国 Kiel 大学 Christoph Plieth 教授提供 pH 敏感的 GFP 转基因载体及转基因拟南芥种子信息.

### 参 考 文 献

- Lamattina L, Garçá-Mata C, Graziano M, et al. Nitric oxide: The versatility of an extensive signal molecule. *Annu Rev Plant Biol*. 2003, 54: 109-136
- Neill SJ, Desikan R, Hancock JT. Nitric oxide signalling in plants. *New Phyt*. 2003, 159: 11-35
- Delledonne M. NO news is good news for plants. *Curr Opin Plant Biol*. 2005, 8: 390-396
- 刘维仲, 张润杰, 裴真明, 等. 一氧化氮在植物中的信号分子功能研究: 进展和展望. *自然科学进展*, 2008, 18(1): 10-24
- Liu X, Zhang SQ, Lou CH. Involvement of nitric oxide in the signal transduction of salicylic acid regulating stomatal movement. *Chin Sci Bull*. 2003, 48: 449-452
- Liu X, Shi WL, Zhang SQ, et al. Nitric oxide involved in signal transduction of jasmonic acid-induced stomatal closure of *Vicia faba* L. *Chin Sci Bull*. 2005, 50: 520-525
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, et al. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. 2006. *Cell*, 126: 969-980
- García-Mata C, Lamattina L. Abscisic acid (ABA) inhibits light-induced stomatal opening through calcium- and nitric oxide-mediated signaling pathways. *Nitric Oxide*. 2007, 17: 143-151

- 9 Kolla VA, Raghavendra AS. Nitric oxide as an intermediate in bicarbonate-induced stomatal closure in *Pisum sativum*. *Physiol Plant*, 2007, 130: 91—98
- 10 Munemasa S, Oda K, Watanabe-Sugimoto M, et al. The coronatine-insensitive 1 mutation reveals the hormone signaling interaction between abscisic acid and methyl jasmonate in *Arabidopsis* guard cells. Specific impairment of ion channel activation and second messenger production. *Plant Physiol*, 2007, 143: 1398—1407
- 11 Zhang X, Takemiya A, Kinoshita T, et al. Nitric oxide inhibits blue light-specific stomatal opening via abscisic acid signaling pathways in *Vicia* guard cells. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48: 715—723
- 12 Song XG, She XP, Zhang B. Carbon monoxide-induced stomatal closure in *Vicia faba* is dependent on nitric oxide synthesis. *Physiol Plant*, 2008, 132: 514—525
- 13 吕东, 张骁, 江静, 等. NO可能作为H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的下游信号介导ABA诱导的蚕豆气孔关闭. *植物生理与分子生物学学报*, 2005, 31(1): 62—70
- 14 Bright J, Desikan R, Hancock JT, et al. ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis. *Plant J*, 2006, 45: 113—122
- 15 Desikan R, Griffiths R, Hancock J, et al. A new role for an old enzyme: Nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 16314—16318
- 16 Neill S, Barros R, Bright J, et al. Nitric oxide, stomatal closure and abiotic stress. *J Exp Bot*, 2008, 59: 165—176
- 17 Garcia-Mata C, Gay R, Sokolovski S, et al. Nitric oxide regulates K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 11116—11121
- 18 Sokolovski S, Blatt MR. Nitric oxide block of outward-rectifying K<sup>+</sup> channels indicates direct control by protein nitrosylation in guard cells. *Plant Physiol*, 2004, 136: 4275—4284
- 19 Wilkinson S. pH as a stress signal. *Plant Growth Regul*, 1999, 29: 87—99
- 20 Felle HH. pH: Signal and messenger in plant cells. *Plant Biol*, 2001, 3: 577—591
- 21 Irving HR, Gehring CA, Parish RW. Changes in cytosolic pH and calcium of guard cells precede stomatal movements. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 1790—1794
- 22 Blatt MR, Armstrong F. K<sup>+</sup> channels of stomatal guard cells: Abscisic acid-evoked control of the outward rectifier mediated by cytoplasmic pH. *Planta*, 1993, 191: 330—341
- 23 Gehring CA, Irving HR, McConchie R, et al. Jasmonates induce intracellular alkalization and closure of *Paphiopedilum* guard cell. *Ann Bot*, 1997, 80: 485—489
- 24 Grabov A, Blatt MR. Parallel control of the inward rectifier K<sup>+</sup> channel by cytosolic free Ca<sup>2+</sup> and pH in *Vicia* guard cells. *Planta*, 1997, 201: 84—95
- 25 Suhita D, Raghavendra AS, Kwak JM, et al. Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiol*, 2004, 134: 1536—1545
- 26 Gonugunta VK, Srivastava N, Puli MR, et al. Nitric oxide production occurs after cytosolic alkalization during stomatal closure induced by abscisic acid. *Plant Cell Environ*, 2008, 31: 1717—1724
- 27 Li S, Assmann SM, Albert R. Predicting essential components of signal transduction networks: A dynamic model of guard cell abscisic acid signaling. *PLoS Biol*, 2006, 4: 1732—1747
- 28 Zhang X, Dong FC, Gao JF, et al. Hydrogen peroxide-induced changes in intracellular pH of guard cells precede stomatal closure. *Cell Res*, 2001, 11: 37—43
- 29 Kwak JM, Mori IC, Pei ZM, et al. NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J*, 2003, 22: 2623—2633
- 30 Torres MA, Dangl JL. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8: 397—403
- 31 Gao DJ, Knight MR, Trewavas AJ, et al. Self-reporting *Arabidopsis* expressing pH and [Ca<sup>2+</sup>] indicators unveil ion dynamics in the cytoplasm and in the apoplast under abiotic stress. *Plant Physiol*, 2004, 134: 898—908
- 32 Schulte A, Lorenzen I, Boettcher M, et al. A novel fluorescent pH probe for expression in plants. *Plant Methods*, 2006, 2: 7
- 33 Moseyko N, Feldman LJ. Expression of pH-sensitive green fluorescent protein in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ*, 2001, 24(5): 557—563
- 34 Bethke PC, Libourel IGL, Reinöhl V, et al. Sodium nitroprusside, cyanide, nitrite and nitrate break *Arabidopsis* seed dormancy in a nitric oxide-dependent manner. *Planta*, 2006, 223: 805—812
- 35 Blatt MR. Cellular signaling and volume control in stomatal movements in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000, 16: 221—241