

NO 对 He-Ne 激光和增强 UV-B 辐射小麦幼苗 气孔运动的作用机理研究

刘福霞, 程娜娜, 韩榕*

(山西师范大学生命科学学院细胞工程研究所, 山西临汾 041000)

摘要: 为探讨 NO 对 He-Ne 激光和增强 UV-B 辐射小麦 (*Triticum aestivum*) 气孔运动的作用机理, 采用低剂量 ($5 \text{ mW} \cdot \text{mm}^{-2}$) He-Ne 激光和增强 ($10.08 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$) UV-B 辐射并结合药理学实验和激光共聚焦显微技术, 对 ML7113 小麦的叶片及表皮条进行不同的处理, 结果显示: (1) UV-B 辐射既可诱导小麦叶片气孔关闭, 又能够明显增加气孔保卫细胞和叶片的 NO 水平, 且 NO 清除剂明显抑制了 UV-B 辐射诱导的小麦叶片气孔关闭, 同时气孔保卫细胞和叶片内的 NO 含量明显减少。(2) 一氧化氮合酶(NOS)抑制剂 L-NAME 对经 UV-B 辐射诱导的小麦幼苗气孔开度及保卫细胞和叶片内 NO 含量的抑制程度明显大于硝酸还原酶(NR)抑制剂 NaN_3 对其的抑制程度, 说明一氧化氮合酶(NOS)合成途径是小麦叶片经 UV-B 辐射后 NO 的主要产生途径。(3) 就气孔开度而言, $\text{L} > \text{CK} > \text{BL} > \text{B}$ 。就小麦叶片及保卫细胞内 NO 含量而言, $\text{B} > \text{BL} > \text{CK} > \text{L}$ 。就硝酸还原酶(NR)和一氧化氮合酶(NOS)的活性而言, B 组 NR 活性最低, NOS 活性最高, L 组 NR 活性最高, NOS 活性最低。表明经 He-Ne 激光和增强 UV-B 辐射诱导的小麦气孔开度的变化确实与保卫细胞及叶片中 NO 含量的多少有关, 气孔开度的减小及增大对应于 NO 含量的增多或减少, 同时进一步证实了小麦叶片经 He-Ne 激光单独辐照后, NO 的主要合成途径也来源于 NOS 途径。

关键词: 小麦; 一氧化氮; He-Ne 激光; UV-B; 气孔运动

中图分类号: Q25; S512.1

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2013)03-0269-09

Mechanism of Action of Nitric Oxide on Stomatal Movement in Wheat Seedlings Exposed to Enhanced Ultraviolet-B Radiation and Irradiated by He-Ne laser

LIU Fu-Xia, CHENG Na-Na, HAN Rong*

(Institute of Cell Engineering, College of Life Sciences, Shanxi Normal University, Linfen, Shanxi 041000, China)

Abstract: The seedlings of wheat ('ML7113') were exposed to He-Ne laser irradiation (L) with $5 \text{ mW} \cdot \text{mm}^{-2}$ power density after enhanced UV-B radiation ($10.08 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$) to determine the mechanism of the action of nitric oxide on stomatal movement in wheat seedlings. The leaves and epidermal strips of wheat underwent different treatments by experiments for pharmacology and laser scanning confocal microscopy. The results showed that (1) Enhanced UV-B radiation not only induced stomatal closure, but also increased the levels of NO significantly in the guard cells and leaves of wheat. In addition, NO scavenger cPTIO obviously inhibited stomatal closure induced by UV-B radiation and the levels of NO evidently reduced in guard cells and leaves of wheat. (2) There were obvious differences in the effect of

收稿日期: 2012-10-29, 修回日期: 2013-02-26。

基金项目: 国家自然科学基金项目“增强 UV-B 辐射与 He-Ne 激光对小麦细胞分裂影响机制的研究”(30671061); 山西省自然科学基金项目(2008011059-1)。

作者简介: 刘福霞(1985-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为植物细胞学(E-mail: liufuxiahappy@163.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: hhwrsl@yahoo.com.cn)。

nitric oxide synthase (NOS) inhibitor L-NAME on stomatal aperture, NO content in guard cells and leaves of wheat exposed to enhanced UV-B radiation compared with nitrate reductase (NR) inhibitor NaN_3 . This suggested that nitric oxide synthase was the main way to produce NO in wheat leaves by UV-B radiation. (3) For stomatal aperture, $L > CK > BL > B$. For the NO level, $B > BL > CK > L$. For activity of NR and NOS, NR activity in the UV-B radiation treatment group was the lowest and He-Ne laser irradiation treatment group was the highest; however, NOS activity between B and L showed the opposite pattern compared with NR activity. The stomatal opening changes induced by UV-B radiation and He-Ne laser irradiation were associated with high and low NO content in guard cells and leaves of wheat. Decreases and increases in stomatal aperture were consistent with increases and decreases in NO content. Furthermore, NO generation was the same as nitric oxide synthase in wheat leaves by He-Ne laser individual irradiation.

Key words: Wheat; Nitric oxide; He-Ne laser; UV-B; Stomatal movement

一氧化氮(nitric oxide, NO)是植物体内广泛存在的一种信号分子,许多生物和非生物胁迫(如UV辐射、干旱、病原菌侵染、激素等)都能够猝发其形成,NO可以参与植物种子萌发、幼苗生长等多种生理效应的调控^[1-3]。大量研究表明,植物可以通过调节气孔的运动来响应环境胁迫,从而抵御不良环境对其造成的伤害,NO参与了此过程的调控^[4,5]。UV-B辐射是一种重要的非生物胁迫,有研究表明,UV-B辐射参与对气孔运动的调控,并使其气孔开度减小^[6]; Jansen^[7]在蚕豆、鸭跖草和油菜植株中发现,UV-B辐射既能够诱导气孔关闭,也能促进气孔开放,UV-B辐射对气孔的影响趋势依赖其保卫细胞所处的状态;还有研究发现NO参与了乙烯诱导拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)气孔关闭的过程^[8]; Mata和Lamattina^[9]用鸭跖草、蚕豆为材料证明了NO能诱导这些植物的气孔关闭,但是也有NO诱导气孔开放报道,暗示着NO对气孔运动的调节存在着双重效应; She等^[10]在蚕豆保卫细胞内证实了NO参与了光/暗调节的气孔运动,是黑暗诱导气孔关闭中不可缺少的一个重要环节。

以往对气孔的研究中,学者们把研究的重点大多集中在双子叶植物蚕豆、拟南芥和单子叶植物的鸭跖草上,可能的一个原因是这些植物的叶表皮与叶肉细胞粘贴不紧密,较容易撕取,有利于气孔开度的测定。而小麦这种单子叶植物叶表皮和叶肉细胞粘贴紧密,不易于气孔开度的测定。因此,学者

们在禾本科领域对叶表皮气孔的研究少有报道。正因为遇到一系列的难题,研究人员通过实验研究出了专门适合于禾本科单子叶植物叶表皮的取材方法——NaClO 离析法^[11],这种方法得到的植物气孔清晰,开度变化明显。本实验就采用这种方法对不同处理条件下小麦的气孔开度进行了测定,克服了禾本科植物表皮取材、气孔开度测定等一系列难题。

激光在植物研究方面的应用较为广泛,大量前期研究工作表明,适当剂量的 He-Ne 激光辐照可以缓解由 UV-B 辐射对小麦所造成的伤害^[12]。气孔运动是由复杂的信号网络进行调控的,NO与气孔的开闭运动有关,组成气孔的保卫细胞对外界环境条件非常敏感。经 UV-B 和 He-Ne 激光辐照的小麦气孔开度如何变化及变化是否与 NO 有关,目前未见报道。因此,本实验以小麦为实验材料,探讨 NO 在 He-Ne 激光和增强 UV-B 辐射调控的小麦气孔运动中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

供试材料为小麦(*Triticum aestivum*L)品种‘ML7113’,由山西省农业科学院小麦研究所提供。选取籽粒饱满,大小均一的小麦种子,经 0.1% HgCl_2 表面消毒后,蒸馏水冲洗干净,摆放于铺有两层湿纱布的培养皿内,30粒/盘,25℃培养,7d后供试验用。

NO 荧光探针 (DAF-FMDA)、2-(N-吗啡啉)乙烷磺酸(MES)、硝普钠(SNP)、羧基-2-苯-4, 4, 5, 5-四甲基咪唑-1-氧-3-氧化物 (cPTIO)、N^G-硝基-L-精氨酸-甲酯(L-NAME)、NO 试剂盒、NOS 试剂盒均购自碧云天生物技术研究, 叠氮钠(NaN₃)等其余试剂均为国产分析纯。DAF-FMDA 在使用时首先用 DAF-FMDA 稀释液稀释为合适浓度。

1.2 处理方法

1.2.1 整体叶片化学试剂的处理

取生长 7 d 的小麦新鲜叶片, 将叶片进行以下处理: 分别置于盛有 MES/KCl 缓冲液(10 mmol · L⁻¹ MES/KOH, 50 mmol · L⁻¹ KCl, pH 6.15)及含有 0.2 mmol · L⁻¹ cPTIO (一氧化氮清除剂)、0.025 mmol · L⁻¹ L-NAME (一氧化氮合酶抑制剂)、0.1 mmol · L⁻¹ NaN₃ (硝酸还原酶抑制剂) 等的表皮条缓冲液的 6 cm 培养皿内, 使叶片漂浮于缓冲液上, 置于可见光下 3 h 使其气孔充分开放, 然后对照组继续于可见光下处理 3 h, UV-B 辐射组在增补有 10.08 kJ · m⁻² · d⁻¹ UV-B 辐射 (其它条件与对照组相同) 的条件下照射 3 h。处理结束后, 取不同处理组的小麦叶片进行 NO 含量及 NOS、NR 活性的测定, 同时对不同处理组小麦叶片的上表皮进行取材, 将其分割成约 0.5 cm × 0.2 cm 的表皮条, 制成表皮临时装片对其气孔开度进行观察。

1.2.2 整体叶片的辐照处理

露白的小麦种子摆放于培养皿内, 待小麦种子生长 2 d 后对其进行不同的处理。处理 5 d 后, 取其不同处理组小麦的叶片和上表皮条进行相关指标及气孔保卫细胞内 NO 含量的测定。

试验共设正常对照 (CK)、UV-B 处理 (B)、He-Ne 激光处理 (L)、UV-B 和 He-Ne 激光复合处理 (BL)4 个组 (表 1)。

1.2.3 UV-B 辐射处理

UV-B 辐射处理用紫外-B 灯 (广州市医疗器械厂), 其中心波长为 280 ~ 320 nm。灯管产生的 UV-B 辐射照射小麦幼苗或离体表皮条, 灯管悬挂于植株或培养皿的正上方, 通过调整灯管和培养皿的距离, 使照射在植株上或离体表皮条上的 UV-B

表 1 各处理组的设置及处理顺序
Table 1 Establishment and procedure of the different handle groups

处理 Treatment	光照 Illumination (h/d)	UV-B 辐射 UV-B radiation (h/d)	激光辐照 Laser irradiation (min/d)	暗培养 Dark culture (h/d)
CK	8	—	—	16
B	8*	8	—	16
L	8	—	2	16
BL	8*	8	2	16

注: *, 与 UV-B 辐射同时进行; CK, 对照组; B, UV-B 辐射处理组; L, He-Ne 激光辐照处理组; BL, UV-B 辐射和 He-Ne 激光辐照复合处理组。
Notes: *, UV-B radiation is at the same time; CK, Control group; B, UV-B radiation treatment group; L, He-Ne laser irradiation treatment group; BL, UV-B radiation and He-Ne laser irradiation composite treatment group.

辐射强度始终维持在 10.08 kJ · m⁻² · d⁻¹。

1.2.4 He-Ne 激光辐照

激光生物辐照仪 (南京激光仪器厂) 波长为 632.8 nm, 选用的辐照剂量为 5 mW · mm⁻², 120 s, 25℃。激光处理安排在夜间进行, 以排除杂光影响。

1.2.5 小麦叶表皮临时装片的制作及气孔开度的测量

采用 50% NaClO 离析法^[11] 制备气孔装片, 利用 Motic 成像系统观察并拍照, 照片用 Motic Images Plus 2.0 软件测定气孔的宽度和长度, 计算宽长比以表示气孔开度。每次处理随机选取 5 个视野, 每个视野随机测量 6 个气孔的开度, 实验至少重复 3 次。

1.2.6 保卫细胞内 NO 的检测

使用 NO 特异性荧光探针 DAF-FMDA 检测保卫细胞内的 NO。取生长良好 1 周龄小麦同一部位的新鲜叶片, 撕取上表皮, 放入不同处理组的表皮条缓冲液中, 光诱导 3 h 使气孔完全张开, 尔后将其置于不同处理组下 (UV-B 辐射、UV-B 辐射分别于 cPTIO、L-NAME、NaN₃ 共处理中) 处理 3 h。处理完毕后, 将不同处理组的表皮条置于用 DAF-FMDA 稀释液稀释的 DAF-FMDA 中, 使其终浓度为 10 μmol · L⁻¹, 37℃下细胞培养箱内避光孵育 20 min, 孵育完毕后, 用 PBS (pH 7.4) 洗涤细胞多次, 以充分除去未进入细胞内的 DAF-FMDA。将处理好的表皮条置于载玻片上, 盖好盖玻片, 用

495 nm 激发波长, 515 nm 发射波长, 经 Olympus 激光共聚焦扫描显微系统进行观察和扫描。物镜镜头使用 60 倍, 图像采集使用 512×512 像素, 每个处理至少 3 次重复。

1.3 样品分析方法

1.3.1 小麦叶片 NO 含量的测定

参考李杰等^[13]的 Griess 法并稍有改进。取小麦幼苗叶片 1 g, 剪碎后用液氮速冻, 置于超低温冰箱中待测。测量时加入 1 mL 40 mmol/L HEPES (pH 7.2) 缓冲研磨, 研磨成匀浆后用 2 层纱布过滤, 用 4 mL 缓冲液冲洗, 在 $5000 \times g$ 离心 10 min, 取上清液。用 NO 测定试剂盒进行测定。0.8 mL 上清液和 0.4 mL 反应液混匀后放置 10 min, 然后 $3500 \sim 4000$ r/min 离心 10 min, 取 0.8 mL 上清液加显色剂 0.4 mL 显色, 混匀, 静置 15 min, 采用蒸馏水调零, 然后用紫外分光光度计在 550 nm 处比色测定 OD 值。

1.3.2 小麦叶片 NOS 活性的测定

参考陈康等^[14]方法对 NOS 的活性进行测定, 但略有改进。取其新鲜的小麦叶片, 剪碎称其重量后用液氮速冻, 置于超低温冰箱中待测, 冷冻样品中加入预冷的 Tris-HCl 提取缓冲液 (pH 7.4), 将其冰浴研磨制成 10% 的匀浆, 然后用两层纱布过滤, 并且用高速冷冻离心机以 8500 r/min 的转速离心 10 min, 最后取其上清液参照 NOS 试剂盒进行测定。

1.3.3 小麦叶片 NR 活性的测定^[15]

酶的提取: 剪取干净的小麦叶片, 用吸水纸吸干叶片表面的水分后将其切成小块。称取 0.5 g 放于冰冻的研钵中冷冻 30 min, 然后加入适量的石英砂和 0.4 mL 提取液, 将其研磨成匀浆, 用两层纱布过滤完匀浆后, 用高速冷冻离心机在 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 、4000 r/min 条件下离心 20 min, 最终得到的上清液即为酶的提取液。

NO_2^- 含量的测定: 吸取酶粗提液 0.2 mL 于一试管中, 加入 0.5 mL KNO_3 溶液, 0.3 mL NADH, 混合后于常温下保温 30 min。保温结束后立即加入 2 mL 磺胺试剂和 2 mL α -萘胺试剂, 将其混合均匀后静置 15 min, 用紫外分光光度计 (520 nm) 进行比色测定, 并且记下 OD 值, 以不

加 NADH 的 (加入 0.2 mL 水) 比色皿作为空白对照。通过标准曲线的回归方程计算出 NO_2^- 的含量, 再进一步计算酶活力, 酶的活力以每克鲜重每小时产生的 NO_2^- (μg) 来表示。

1.4 数据处理

数据通过 Microsoft Excel 软件进行绘图, 采用 SPSS 17.0 统计软件对试验数据进行方差分析和显著性测验。图片的荧光强度采用 Image-Pro Plus 软件对其进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 NO 参与 UV-B 辐射诱导的小麦气孔关闭

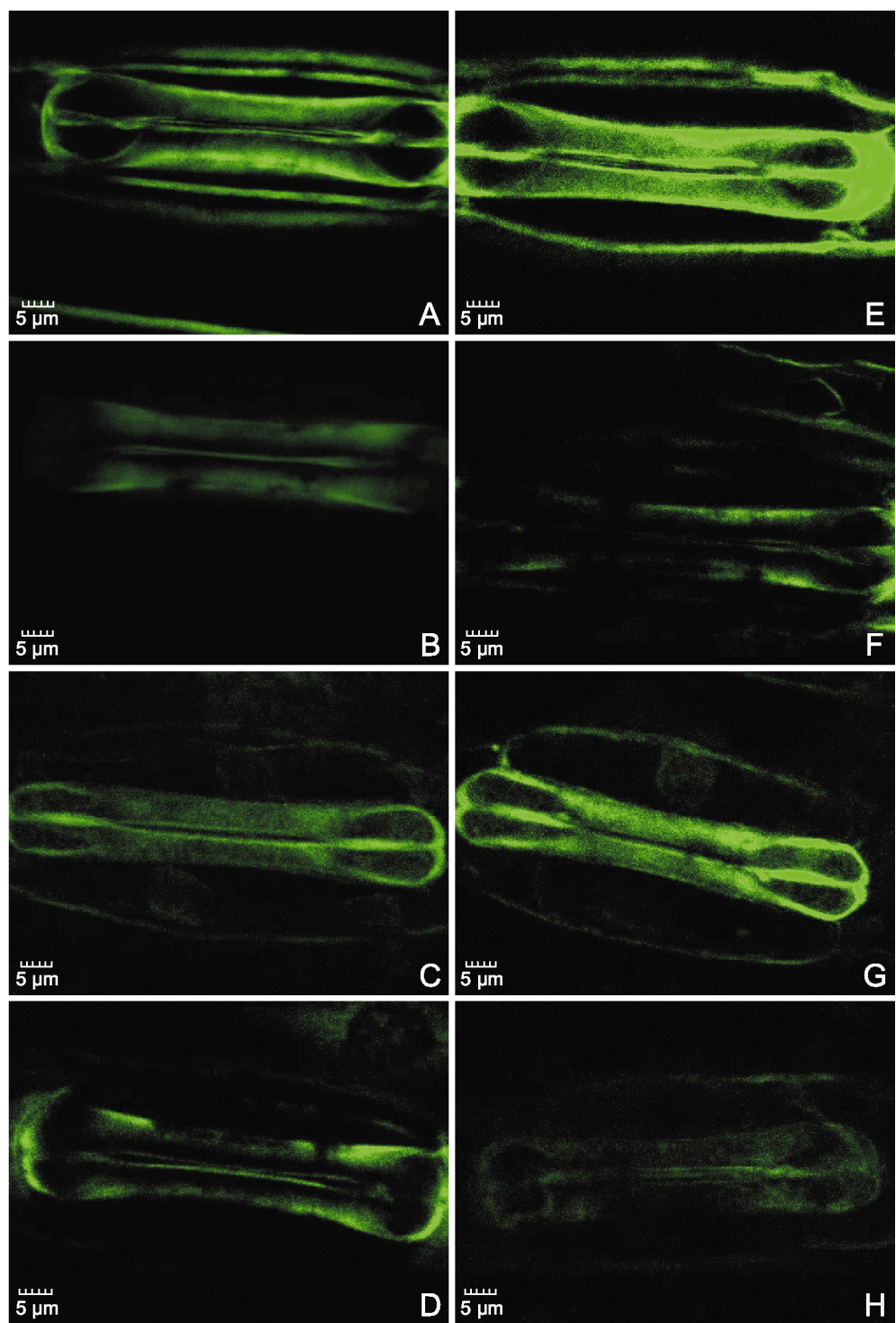
2.1.1 NO 参与 UV-B 辐射诱导的小麦气孔运动

利用 NO 特异性荧光探针 DAF-FMDA 和 NO 试剂盒, 对小麦保卫细胞和叶片中的 NO 含量进行测定。结果显示, 不同处理条件下保卫细胞和叶片中均含有一定量的内源 NO, 经 UV-B 辐射处理后的保卫细胞胞质中匀质绿色荧光强度显著增强 ($p < 0.01$) (图 1), 而副卫细胞胞质中荧光强度很弱或几乎没有荧光存在。说明小麦幼苗经 UV-B 辐射后, 气孔器中的保卫细胞可能是系统型 NO 产生的主要场所。与此同时, 叶片中 NO 含量显著增加 ($p < 0.01$) (图 2: A, 图 3: A), 而经 NO 清除剂 cPTIO 和 UV-B 辐射共处理的小麦保卫细胞胞质和叶片中 NO 的含量显著减少 ($p < 0.01$) (图 1, 图 2: A)。

2.1.2 NO 清除剂和 NO 合成酶抑制剂对 UV-B 辐射调控小麦气孔运动的影响

NO 清除剂 cPTIO 和 NOS 抑制剂 L-NAME 均可以显著缓解 UV-B 辐射诱导小麦气孔关闭的效应 ($p < 0.01$), 而 NR 抑制剂 NaN_3 对其的作用差异不显著 ($p > 0.05$) (图 2: B)。

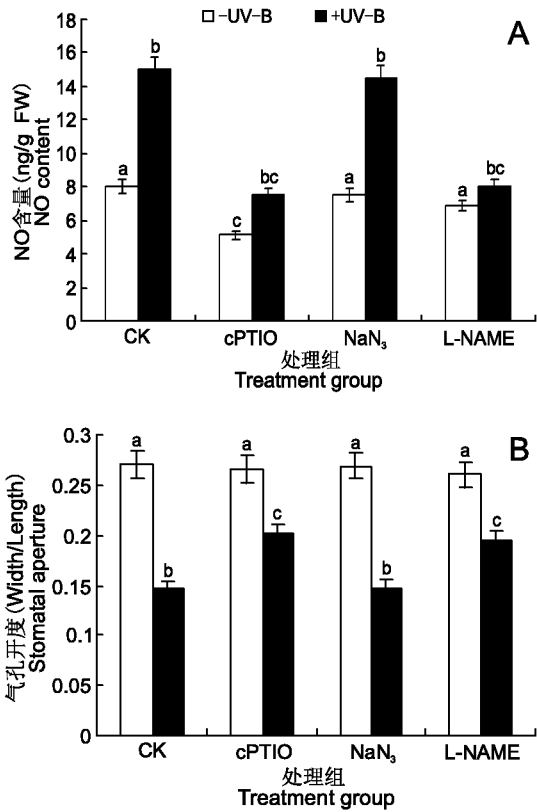
为了进一步研究 UV-B 辐射调控的小麦气孔运动中 NO 的主要合成途径, 对 NO 合成酶的活性进行了测定。结果表明, UV-B 辐射使 NOS 的活性显著提高, 而 NR 的活性显著降低 ($p < 0.01$) (图 3: B, C); NOS 的抑制剂一定程度上明显逆转了 UV-B 辐射引起的小麦叶片及保卫细胞内 NO 含量的增加, 而 NR 抑制剂对其的作用却不明显 (图 1, 图 2: A)。



A~D: 对照组: MES (A)、0.2 mmol/L cPTIO (B)、0.1 mmol/L NaN₃ (C) 和 0.025 mmol/L L-NAME (D) 分别单独处理; E~H: 表皮条经 UV-B 辐射处理 (E) 或分别与 0.2 mmol/L cPTIO (F)、0.1 mmol/L NaN₃ (g) 和 0.025 mmol/L L-NAME (H) 共处理; A~H: FITC 通道。
A~D: Control group, MES (A), 0.2 mmol/L cPTIO (B), 0.1 mmol/L NaN₃ (C) and 0.025 mmol/L L-NAME (D) individual treatment; E~H: Epidermal strips of individual UV-B radiation treatment along with UV-B and 0.2 mmol/L cPTIO (F), 0.1 mmol/L NaN₃ (G), 0.025 mmol/L L-NAME (H) composite treatment; A~H: Channel of FITC.

图 1 NO 清除剂、NO 合成抑制剂对 UV-B 辐射诱导的小麦气孔保卫细胞 NO 的影响

Fig. 1 Effects of NO scavenger and NO biosynthesis inhibitor on the contents of NO in stomata guard cell of wheat leaves under supplemental UV-B radiation



CK: 对照; cPTIO: NO 清除剂; NaN₃: NR 抑制剂; L-NAME: NOS 抑制剂。图中相同字母表示处理间差异不显著 ($p > 0.05$)。
CK: Control; cPTIO: Nitric oxide scavenger; NaN₃: Nitrate reductase inhibitor; L-NAME: Nitric oxide synthase inhibitor. Same letters show insignificant difference ($p > 0.05$).

图 2 增强 UV-B 辐射对不同处理组小麦叶片 NO 含量和气孔开度的影响

Fig. 2 Effects of NO content and stomatal aperture on wheat leaves under different treatments exposed to enhanced UV-B radiation

2.2 He-Ne 激光和增强 UV-B 辐射对小麦叶片 NO 含量的影响

利用 NO 试剂盒和 NO 特异性荧光探针 DAF-FMDA 分别测定了 CK、B、BL、L 4 组小麦叶片及保卫细胞中 NO 的水平。结果显示, B 组小麦叶片及保卫细胞胞质中 NO 的含量最高, L 组最低, BL 组介于 B 和 L 之间, 略高于 CK(图 4, 图 5: b)。

由前文的实验结果得出, 气孔开度的大小与保卫细胞及叶片中 NO 水平的高低有一定的相关性。气孔开度较对照组减小 46.21%, NO 含量则较对照组升高 87.5%(图 2: A, B)。小麦经 He-Ne 激光和 UV-B 照射后是否也符合这个结论呢? 为此,

进一步对 CK、B、BL、L 4 组小麦的气孔开度进行了测定。测定的结果表明, L 组气孔开度较 CK 组增大 11.28% 的同时, 其 NO 含量则较 CK 组减少 12.5%; B 组气孔开度较 CK 组减小 46.21% 的同时, 其 NO 含量则较 CK 组增加 87.5% (图 5: a, b)。由此推测, 气孔开度的大小确实与保卫细胞及叶片中 NO 含量的多少呈负相关。

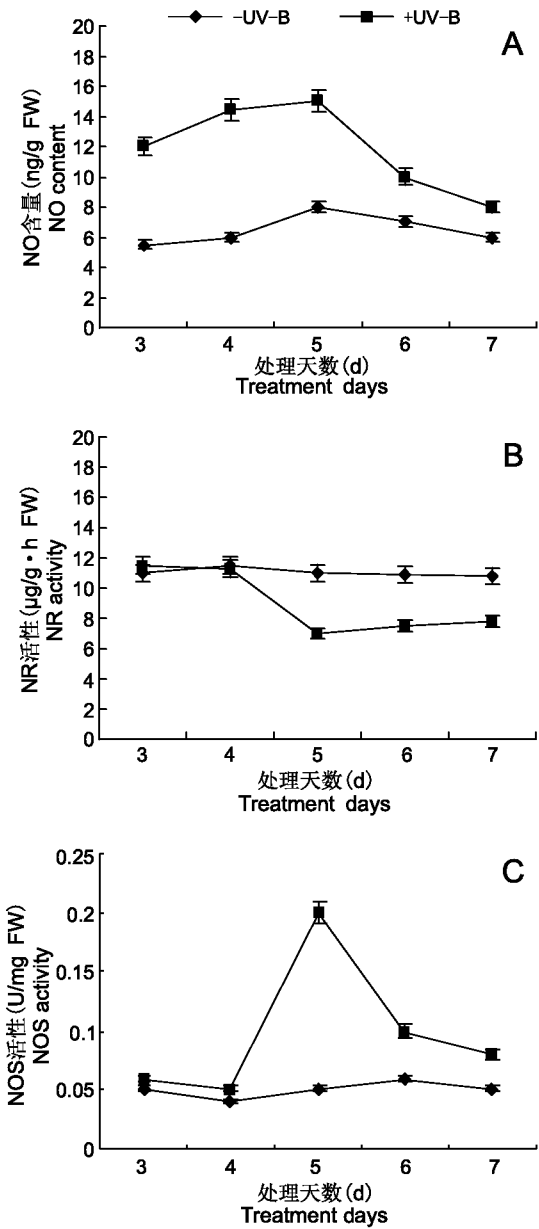
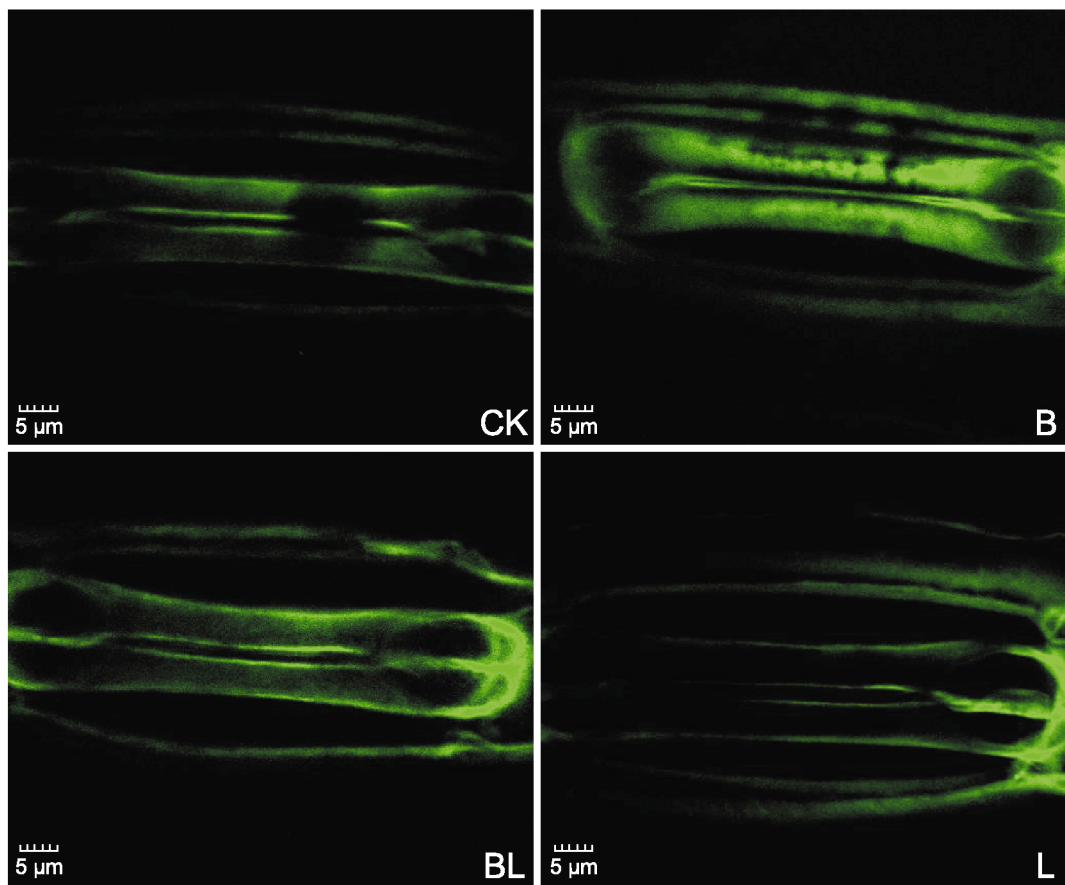


图 3 增强 UV-B 辐射对小麦叶片 NO 含量、NR 和 NOS 活性的影响

Fig. 3 Effects of NO content and NR, NOS activity on wheat leaves under supplemental UV-B radiation



CK：对照组；B：UV-B 辐射处理；BL：UV-B 和 He-Ne 激光复合处理；L：He-Ne 激光辐射处理；图 CK、B、BL、L：FITC 通道。
CK；Control group；B：UV-B radiation treatment；BL：UV-B and He-Ne laser composite treatment；L：He-Ne laser radiation treatment；Fig. CK,B,BL,L：Channel of FITC.

图 4 不同处理对小麦叶片气孔保卫细胞 NO 的影响

Fig. 4 Effects of NO content on stomata guard cells in wheat leaves under different treatments

2.3 He-Ne 激光和增强 UV-B 辐射对小麦叶片 NR 和 NOS 活性的影响

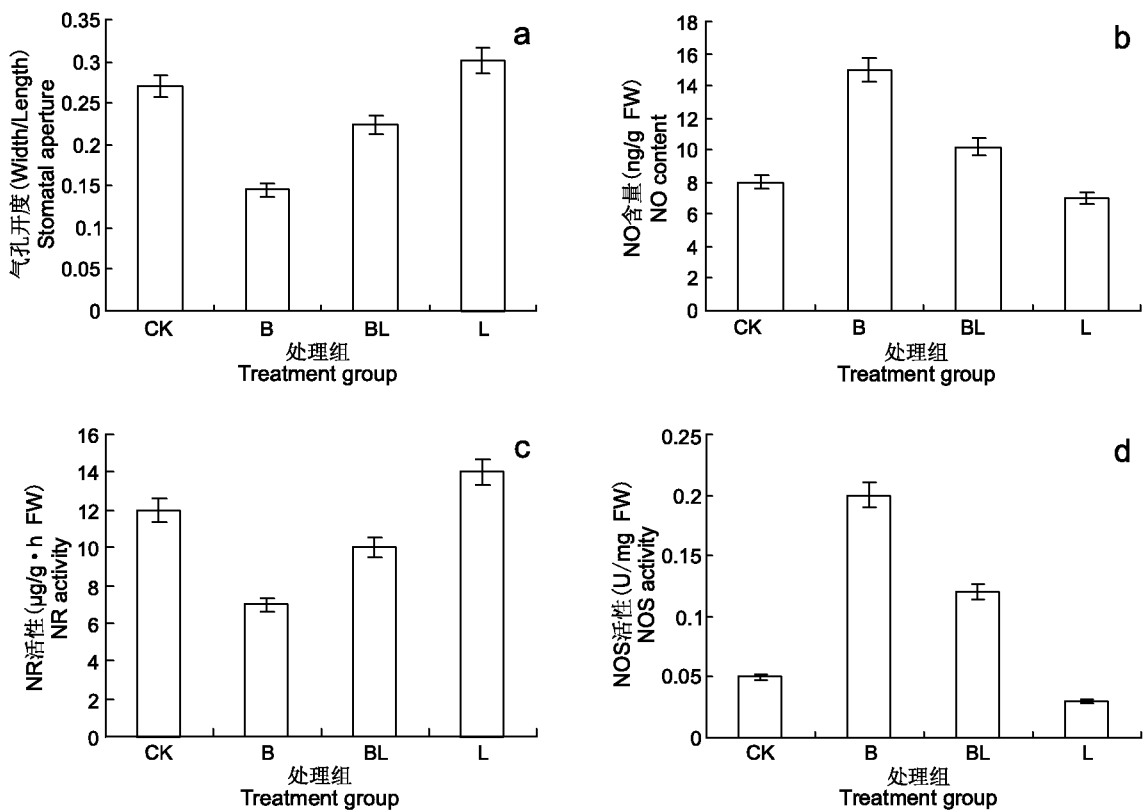
NR 和 NOS 途径是植物体内合成 NO 的两条主要途径。因此，为了探明经 He-Ne 激光辐照后的小麦幼苗中 NO 含量减少的内部酶促机制，对 CK、B、BL、L 4 组小麦叶片的 NR 和 NOS 的活性进行了进一步的测定。结果显示，L 组小麦 NR 活性最强，NOS 活性最弱(图 5：c，d)；同时 L 组小麦的 NO 含量最低(图 5：b)。

3 讨论

植物在逆境条件下往往会通过气孔的开闭运动来适应多变的环境。现已证明，UV-B 辐射可以减小植物的气孔开度^[6]；但也有研究认为 UV-B 辐射既能诱导气孔关闭，也能促进气孔开放^[7]。本实

验结果表明，UV-B 辐射可诱导小麦叶片气孔开度减小，这与李永峰等^[12]的实验结果相一致。由此推测 UV-B 辐射对植物气孔开度影响的不同可能与所研究植物材料的种类及生理状态有关。

NO 作为一个重要的信号分子，在植物对逆境胁迫的响应、生长、发育及气孔运动等过程中有着广泛的调节作用^[16,17]。本实验结果显示 UV-B 辐射可以明显提高小麦叶片(图 2：A，图 3：A)及气孔保卫细胞胞质(图 1)中 NO 的水平；NO 清除剂 cPTIO 能够抑制 UV-B 辐射诱导的气孔关闭(图 2：B)及 NO 含量的增加(图 1，图 2：A)。暗示 NO 可能是 UV-B 辐射诱导小麦气孔关闭过程中的重要信号分子之一。那么 UV-B 辐射诱导小麦气孔关闭过程中 NO 的具体合成途径又是怎样的呢？本研究结果显示，UV-B 辐射可明显提高小麦叶片 NOS 活



a: 气孔开度; b: NO 含量; c: NR 活性; d: NOS 活性。
CK: 对照组; B: UV-B 辐射处理; BL: UV-B 和 He-Ne 激光复合处理; L: He-Ne 激光辐射处理。
a: Stomatal aperture; b: NO content; c: NR activity; d: NOS activity.
CK: Control group; B: UV-B radiation treatment; BL: UV-B and He-Ne laser composite treatment; L: He-Ne laser radiation treatment.

图 5 不同处理对小麦叶片气孔开度、NO 含量、NR 和 NOS 活性的影响

Fig. 5 Effects of stomatal aperture, NO content, NR and NOS activity on wheat leaves under different treatments

性，其变化趋势与 NO 含量变化趋势基本一致(图 3: A, C); NOS 抑制剂 L-NAME 可抑制 UV-B 辐射诱导的气孔关闭及 NO 含量的上升，而 NR 抑制剂 NaN_3 对其没有明显影响(图 2: A, B)。说明 NOS 介导 UV-B 辐射调控小麦气孔运动过程中 NO 的生成。不同的植物经不同的胁迫因子处理后，保卫细胞及叶片中 NO 的产生途径不同。本研究结果显示，小麦幼苗经 UV-B 胁迫处理后 NO 的主要合成途径是 NOS 途径，而非 NR 途径。据此推测不同植物 NO 合成途径的差异可能是由于不同的环境刺激作用于不同的植物组织，从而导致了 NO 产生的调控机制不同。

大量研究表明，低剂量($5 \text{ mW} \cdot \text{mm}^{-2}$) He-Ne 激光辐照可以明显促进植物的生长发育，并且可以对经 UV-B 辐射后的小麦幼苗起到促进修复的作用^[18-20]。本实验结果表明，NO 参与了 He-Ne 激

光和增强 UV-B 辐射对小麦气孔运动的调控。小麦幼苗经 He-Ne 激光辐照处理后，保卫细胞和叶片中 NO 含量显著减少(图 4，图 5: b)，NOS 活性显著降低(图 5: d)，NR 活性显著升高(图 5: c)。推测 He-Ne 激光辐照造成小麦叶片 NO 含量减少的原因可能是 He-Ne 激光辐照减弱了 NOS 基因的表达。经 He-Ne 激光辐照处理后气孔开度增大(图 5: a)的原因之一可能是 He-Ne 激光诱导了一些与气孔开度增大有关基因的表达；其二可能是因为小麦在 He-Ne 激光的辐照刺激下，自身体内的一些防护机制被启动，为了维持处于 UV-B 辐射下小麦幼苗的正常生长发育，通过调整其气孔开度来确保 CO_2 的吸收，以保证光合作用的顺利进行^[21]。

气孔的运动是一个主动调控的生理过程，是由复杂的信号转导链组成的。NO 对 He-Ne 激光

和增强 UV-B 辐射后小麦幼苗气孔运动的作用机制, 以及 He-Ne 激光在防御逆境胁迫对植物造成伤害方面的具体信号转导机制还有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 汤绍虎, 周启贵, 孙敏, 毛薇. 外源 NO 对渗透胁迫下黄瓜种子萌发、幼苗生长和生理特性的影响[J]. 中国农业科学, 2007, 40(2): 419–425.
- [2] 张华, 沈文飏, 徐朗莱. 一氧化氮对渗透胁迫下小麦种子萌发及其活性氧代谢的影响[J]. 植物学报, 2003, 45(8): 901–905.
- [3] 樊怀福, 郭世荣, 焦彦生, 张润花, 李娟. 外源一氧化氮对 NaCl 胁迫下黄瓜幼苗生长、活性氧代谢和光合特性的影响[J]. 生态学报, 2007, 27(2): 546–553.
- [4] 付士磊, 周永斌, 何兴元, 陈玮. 一氧化氮对不同耐旱性杨树幼苗抗旱性的影响[J]. 生态学杂志, 2007, 26(7): 967–971.
- [5] 王森, 李秋荣, 付士磊, 董百丽. 外源一氧化氮对干旱胁迫下杨树光合作用的影响[J]. 应用生态学报, 2005, 16(2): 218–222.
- [6] 冯虎元, 徐世健. UV-B 辐射和其它环境因子对植物的影响[J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(6): 557–562.
- [7] Jansen M A K, Noort R E V D. Ultraviolet-B radiation induces complex alterations in stomatal behaviour[J]. *Physiol Plant*, 2000, 110: 189–194.
- [8] 刘国华, 侯丽霞, 刘菁, 刘新, 王学臣. H_2O_2 介导的 NO 合成参与乙烯诱导的拟南芥叶片气孔关闭[J]. 自然科学进展, 2009, 19(8): 841–851.
- [9] Garcia-Mara C, lamattina L. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress[J]. *Plant physiol*, 2001, 126: 1196–1204.
- [10] She X P, Song X G, HE J M. Role and relation of Nitric oxide and Hydrogen peroxide in light/dark-regulated stomatal movement in *Vicia faba* [J]. 植物学报, 2004, 46(11), 1292–1300.
- [11] 师长海, 李玉欣, 董宝娣, 乔匀周, 刘孟雨. 禾本科植物叶片表皮气孔观察的样品制备方法改良[J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(4): 395–398.
- [12] 李永峰, 韩榕. He-Ne 激光对增强 UV-B 辐射小麦叶片显微结构及光合特性的影响[J]. 西北植物学报, 2008, 28(8): 1643–1648.
- [13] 李杰, 陈康, 唐静, 赵方贵, 刘新. NaCl 胁迫下玉米幼苗中一氧化氮与茉莉酸积累的关系[J]. 2008, 28(8): 1621–1636.
- [14] 陈康, 李杰, 唐静. 一氧化氮参与调节盐胁迫诱导的玉米幼苗脱落酸积累[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2006, 32(5): 577–582.
- [15] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理学实验指导[M]. 第3版. 北京: 高等教育出版社, 2003: 268–270.
- [16] 郑春芳, 姜东, 戴廷波, 荆奇, 曹卫星. 外源一氧化氮供体硝普钠浸种对盐胁迫下小麦幼苗碳氮代谢及抗氧化系统的影响[J]. 生态学报, 2010, 30(5): 1174–1183.
- [17] 王森, 李秋荣, 付士磊. 外源一氧化氮对干旱胁迫下杨树光合作用的影响[J]. 应用生态学报, 2005, 16(2): 218–222.
- [18] 高丽美, 李永峰, 韩榕. He-Ne 激光对增强 UV-B 辐射后小麦幼苗光合作用的影响[J]. 广西植物, 2011, 31(1): 117–123.
- [19] 张美萍, 陕永杰, 王小花, 武娟, 韩榕. He-Ne 激光对增强紫外线-B 辐射小麦叶片胞质 ATP 酶活性的影响[J]. 中国激光, 2009, 36(9): 2455–2459.
- [20] 郝金花, 马晓丽, 王小花, 韩榕. He-Ne 激光对 UV-B 辐射小麦幼苗抗氧化系统的影响[J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(4): 350–355.
- [21] 张霖, 赵翔, 王亚静, 张骁. NO 与 Ca^{2+} 对蚕豆保卫细胞气孔运动的互作调控[J]. 作物学报, 2009, 35(8): 1491–1499.