

水杨酸对蚕豆保卫细胞气孔运动及 质膜内向 K^+ 电流的影响

李凤玲, 何金环

(郑州牧业工程高等专科学校 生物工程系, 河南 郑州 450011)

【摘 要】 【目的】研究逆境信号水杨酸(SA)刺激条件下,蚕豆气孔保卫细胞中 H_2O_2 的产生及其对气孔运动的影响。【方法】以蚕豆为材料,利用表皮条生物分析、膜片钳等方法研究 SA 诱导蚕豆气孔关闭过程中质膜内向 K^+ 电流的变化。【结果】SA 可以浓度依赖的方式诱导蚕豆叶片的气孔关闭。质膜 NADPH 氧化酶抑制剂二亚苯基碘(DPI)可削弱 SA 作用的 45%~60%。借助膜片钳手段记录 SA 处理条件下全细胞内向 K^+ 电流的变化,胞外 0.1 mmol/L SA 处理后 20 min 可抑制内向 K^+ 电流的 70%左右。电极液中 10 μ mol/L DPI 作用 20 min 可逆转 SA 抑制全细胞内向 K^+ 电流的 46%左右。【结论】SA 诱导的气孔关闭可能与 H_2O_2 的产生有关,DPI 逆转 SA 对保卫细胞内向 K^+ 电流的抑制作用暗示, H_2O_2 可能通过抑制质膜内向 K^+ 电流而介导 SA 诱导的气孔关闭过程。

【关键词】 蚕豆;水杨酸;NADPH 氧化酶; K^+ 通道;膜片钳

【中图分类号】 Q945

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)07-0191-08

Effect of salicylic acid on stomatal movement and K^+ current on plasma membrane of guard cell in *Vicia faba* L.

LI Feng-ling, HE Jin-huan

(Department of Bioengineering, Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou, Henan 450011, China)

Abstract: 【Objective】 The effect of salicylic acid on stomatal movement and K^+ channel on plasma membrane of guard cell in *Vicia faba* L. was studied. 【Method】 *Vicia faba* L. as the material, epidermal strips bioassay and patch clamp were used to study Changes of K^+ current on plasma membrane in *Vicia* guard cells. 【Result】 Salicylic acid (SA) can induce stomatal closure with a concentration-dependent manner. DPI 10 μ mol/L weakened the effect of SA on stomatal apertures by 45%—60%, which indicated that the generation of H_2O_2 might be involved in the stomatal closure induced by SA. The voltage-dependent K^+ -selective channels in the plasma membrane were recorded by whole-cell configuration by patch clamp. The whole-cell inward K^+ currents were inhibited by 70% after 20 min treatment by SA 100 μ mol/L. But intracellular application of DPI partly abolished SA-inhibited inward K^+ current by 46% after 20 min treatment by SA. 【Conclusion】 This indicated that H_2O_2 mediated SA-induced stomatal closing by targeting inward K^+ channels on plasma membrane.

Key words: *Vicia faba* L.; salicylic acid; NADPH oxidase; K^+ channel; patch clamp

水杨酸(SA)在植物体内有多种生理调节作用,如抑制乙烯的生物合成,改变膜通透性,影响离子吸收,增强植物的抗病性等^[1-2]。有报道认为,某些病

原菌只能通过开放的气孔才能侵入植物体内,所以 SA 诱导气孔关闭有利于提高植物对某些病原菌的抗性^[3]。因此,SA 诱导气孔关闭的信号转导及其在

* [收稿日期] 2008-11-10

[基金项目] 河南省自然科学基金项目(0211031300)

[作者简介] 李凤玲(1963—),女,陕西西安人,副教授,主要从事植物生理生化研究。E-mail: cjxsklfl@163.com

植物抗病性中的作用机制成为近年来的研究热点。

气孔运动依赖于保卫细胞壁的结构及保卫细胞的收缩与膨胀, K^+ 跨膜流动可直接调节细胞的膨压, 导致气孔的开闭。脱落酸 (abscisic acid, ABA)^[4] 和活性氧^[5] 均能抑制质膜内向 K^+ 电流, 促进气孔关闭。植物细胞中产生活性氧的途径很多, 有研究认为其主要发生于胞外, 由质膜氧化还原系统产生^[6-7]。研究证明, 植物细胞中也有类似于动物细胞的嗜中性还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 (nicotinamide adenine dinucleotide oxidase, NADPH), 如作为 NADPH 氧化酶的自杀性底物抑制剂二亚苯基碘 (diphenylene iodonium, DPI), 可阻止一些由真菌刺激产生的氧化猝发 (oxidative burst, OXB), 也可抑制事先加入 NADPH 的玫瑰细胞中线粒体膜上 H_2O_2 的产生^[8]。Doke 等^[9] 在研究马铃薯块茎切片过敏反应时发现, 激发子可激活马铃薯块茎细胞膜上的 NADPH 氧化酶, 并迅速产生 O_2^- 。外源 SA 可诱发多种植物积累病程相关蛋白 (pathogenesis-related protein, PRs), 并产生抗病性^[10]。还有试验表明, 施用外源 H_2O_2 也能诱导烟草中 PR 蛋白, 只是其诱导效应低于 SA^[11]。从而推测 SA 的作用机制可能与 H_2O_2 有关。

为验证这一推测, 本研究利用膜片钳技术, 记录蚕豆保卫细胞原生质体在不同处理条件下的全细胞 K^+ 电流, 研究逆境信号 SA 刺激条件下, 气孔保卫细胞中 H_2O_2 的产生及其对质膜 K^+ 通道的影响, 以期深入理解 SA 的信号转导途径, 及植物抗病性研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

蚕豆 (*Vicia faba* L.) 种子由河南农业科学院提供。蚕豆种子先用体积分数 75% 的乙醇表面消毒 5 min, 在温室 (20~25 °C) 下催芽 3~4 d, 播种于培养土 (m (营养土): m (蛭石)) = 1: 1 中。蚕豆生长的光/暗周期为 14 h/10 h, 光照强度为 0.2~0.3 mmol/($m^2 \cdot s$), 昼夜温差分别为 (25±2) °C 和 (20±2) °C, 相对湿度 70% 左右, 生长期间无任何胁迫。

1.2 蚕豆的表皮条生物分析

取生长 20~30 d 的蚕豆茎顶端第 1~2 对完全展开的叶片, 用蒸馏水洗净, 撕取下表皮, 洗去叶肉细胞后, 切成约 5 mm 长的表皮条, 置基本缓冲液 [KCl 50 mmol/L + 2-N-吗啡啉-乙烷磺酸 (2-N-morpholino ethanesulfonic acid, Mes) 10 mmol/L,

pH 6.1] 中。在促进气孔张开的条件 (23 °C, 光照) 下培养 3 h, 使气孔完全张开后, 从基本缓冲液中取出表皮条, 放入以下不同处理液中处理。

1.2.1 不同浓度 SA 对蚕豆气孔开度的影响 记录置于基本缓冲液中 3 h 的表皮条气孔开度, 随后从基本缓冲液中取出表皮条, 分别采用不同浓度 SA ($0, 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2}$ mol/L) 处理 2 h 后, 观察并记录处理后的气孔开度; 之后将表皮条漂洗后置于新鲜的基本缓冲液中, 2 h 后观察并记录气孔开度恢复情况; 以置于基本缓冲液的表皮条为对照。

1.2.2 DPI 对 SA 诱导蚕豆气孔开度的影响 记录置于基本缓冲液中 3 h 的表皮条气孔开度。随后从基本缓冲液中取出表皮条, 分别置于含 10 μ mol/L DPI、10 μ mol/L DPI + 0.1 mmol/L SA、0.1 mmol/L SA 的缓冲溶液中, 以置于基本缓冲液中的表皮条为对照。处理过程中每隔 30 min 观察并记录 1 次气孔开度, 连续记录 5 次。

上述 2 种气孔开度记录均在 10×25 倍倒置显微镜下用测微尺测定。每观察取 3 个表皮条, 随机选取 5 个视野测定记录 50 个气孔开度。每次处理重复 3~5 次, 统计其平均值和平行试验间的方差。

1.3 蚕豆气孔保卫细胞原生质体的分离

参照 Kruse 等^[12]、Fairley-Grenot 等^[13] 和 Blom-Zandstra 等^[14] 的方法, 用两步酶解法分离气孔保卫细胞原生质体。撕取蚕豆叶片下表皮, 在 10 mL 基本介质 (甘露醇 0.45 mol/L, CaCl₂ 0.5 mmol/L, MgCl₂ 0.5 mmol/L, 抗坏血酸 0.5 mmol/L, KH₂PO₄ 10 μ mol/L, Mes 10 mmol/L, pH 5.5) 中漂洗后, 在 28 °C、160 次/min (振幅 2 cm) 的摇床上用第一酶解液 [纤维素酶 (Cellulysin) 质量分数 0.7%, 聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinyl pyrrolidone-40, PVP-40) 质量分数 0.1%, 牛血清白蛋白质量分数 0.25%, 溶于 45% 的基本介质中] 解离 2 h 左右, 除去表皮上的叶肉细胞等, 在显微镜下清晰地看到附于表皮的气孔保卫细胞, 用 220 μ m 的尼龙网过滤, 水冲洗后在基本介质中漂洗, 然后转入第二酶解液 (纤维素酶质量分数 1%, 果胶酶 Y-23 (Pectolase) 质量分数 0.01%, 牛血清白蛋白质量分数 0.25%, 抗坏血酸 0.5 mmol/L, 溶于 45% 的基本介质中), 在 28 °C、45 次/min (振幅 2 cm) 的摇床上消化, 根据不同消化时间保卫细胞的状态判断消化程度, 一般在 50 min 左右已基本消化完毕。用 30 μ m 尼龙网过滤, 基本介质冲洗后 60 g 离心 7 min, 弃去上清

液,将沉淀用 50%基本介质洗涤 2~3 次,最后将原生质悬浮于悬浮溶液(甘露醇 0.45 mol/L, CaCl₂ 1 mmol/L, MgCl₂ 2 mmol/L, Mes 10 mmol/L, pH 5.5)中,0~2 ℃静置恢复。

1.4 膜片钳记录全细胞 K⁺ 电流

采用室温下常规全细胞记录技术^[15]。保卫细胞原生质体放于含 3 mL 细胞外液(谷氨酸钾 10 mmol/L, MgCl₂ 2 mmol/L, CaCl₂ 1 mmol/L, KOH 1 mmol/L, Mes 10 mmol/L, pH 5.5),用甘露醇调节渗透压为 460 mOmol/kg 的绝缘小培养皿中,于倒置显微镜(Nikon-TE 300)下,静置恢复 30~60 min 使原生质体贴壁,玻璃微电极使用硬质有芯玻璃毛细管(Kimax-51, Klimble Glass, Vineland, NJ, USA),并在拉制仪(PC-10, Narishige)上拉制,试验前用抛光仪(MF-900, Narishige)进行抛光。尖端内径为 1 μm 左右,内充电极液[谷氨酸钾 100 mmol/L, MgCl₂ 2 mmol/L, KOH 4 mmol/L, Mg ATP 1.1 mmol/L, CaCl₂ 0.1 mmol/L, N-2-羧乙基哌嗪-N'-2-乙烷磺酸(N-hydroxyethyl piperazine-N-2-ethane sulfonic acid, Hepes) 10 mmol/L, pH 7.2],用甘露醇调节渗透压为 510 mOmol/kg),电极阻抗约为 20 MΩ。通过显微操作系统将电极在加正压情况下轻微压在细胞上,再加以负压使电极尖端与细胞膜形成高阻封接,破膜后进行全细胞记录。一般情况下,高阻封接在 1~3 GΩ,使用放大器的电容补偿装置对每个细胞的电容进行快慢电容补偿及测定,所用细胞慢电容一般为 4.0~13 pF,刺激电压从-190 mV 逐级去极化到+110 mV,每级为+20 mV,维持时间 3 s,频率为 0.2 Hz。全细

胞封接形成 10 min 后采集数据,使用 EPC-9 膜片钳放大器(HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany)测定全细胞电流,使用 PULSE+PULSEFit 软件采集和分析全细胞电流。在计算全细胞电流-电压关系之前,首先减去漏电流,试验重复 3~5 次。

1.4.1 SA 对蚕豆保卫细胞质膜内向 K⁺ 电流的影响 将保卫细胞原生质体放于含 3 mL 细胞外液置于倒置显微镜下,静置使原生质体贴壁,微电极内充满电极液,当全细胞封接形成后静置 10~15 min,即电流稳定后,在胞外加入 SA 使其终浓度为 0.1 mmol/L,并在 SA 处理后跟踪记录全细胞 K⁺ 电流变化情况(记录时间间隔为 5 min)。

1.4.2 DPI 对 SA 抑制蚕豆质膜内向 K⁺ 电流的影响 将保卫细胞原生质体放于含 3 mL 细胞外液置于倒置显微镜下,静置使原生质体贴壁,电极内充满含 10 μmol/L DPI 的电极液,当全细胞封接形成后静置 10~15 min,即电流稳定后,在胞外加入 SA 使其终浓度为 0.1 mmol/L,并在 SA 处理后跟踪记录全细胞 K⁺ 电流变化情况(记录时间间隔为 5 min)。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 SA 对蚕豆气孔开度的影响

由图 1 可见,SA 可以浓度依赖的方式诱导气孔关闭,并且随着 SA 浓度的升高,其诱导气孔关闭的作用越明显。10⁻⁶~10⁻³ mol/L SA 所诱导的气孔关闭具有可逆性;0.01 mol/L SA 所诱导的气孔关闭则不可逆,表明 SA 在此浓度时诱导的气孔关闭可能是其伤害细胞的结果。故本试验均采用 0.1 mmol/L SA 进行后续研究。

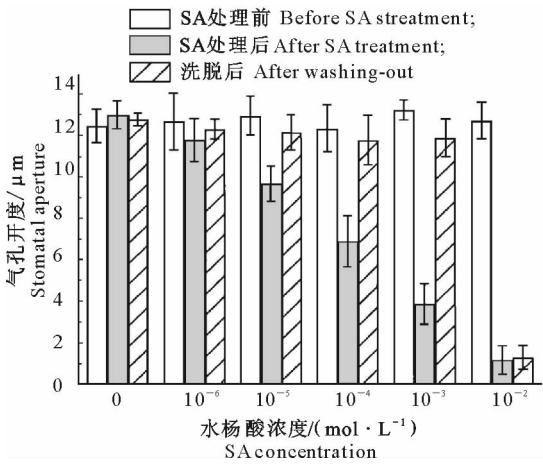


图 1 不同浓度 SA 对蚕豆气孔开度的影响

Fig. 1 Effects of different concentrations of SA on stomatal apertures of *Vicia fabal* L.

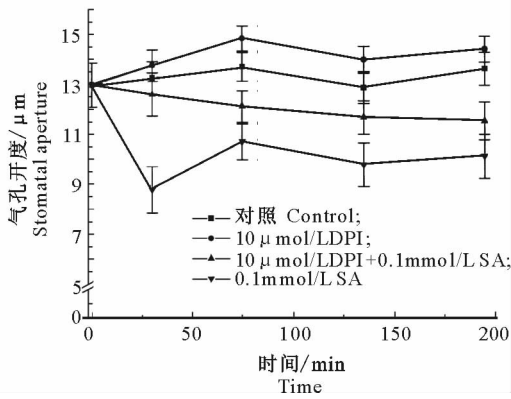


图 2 DPI 对 SA 诱导蚕豆气孔关闭的影响

Fig. 2 Effect of DPI on stomatal closure induced by SA of *Vicia fabal* L.

2.2 DPI 对 SA 诱导蚕豆气孔关闭的影响

图 2 显示,10 $\mu\text{mol/L}$ DPI 与 0.1 mmol/L SA 共同处理时,DPI 削弱了 SA 诱导蚕豆气孔关闭的作用,处理后 30~195 min,DPI 的削弱作用达 45%~60%,而 DPI 单独处理时,蚕豆气孔开度仅较未用 DPI 处理的增加 2%~5%,表明 DPI 削弱 SA 诱导的气孔关闭作用可能是由于,DPI 抑制了 SA 刺激的质膜 NADPH 氧化酶产生 H_2O_2 [16],而不是由于 DPI 促进气孔开度增加与 SA 诱导气孔关闭作用的简单叠加。同时也表明,保卫细胞质膜 NADPH 氧化酶在正常生理状态下其活性非常低,在 SA 处理时此酶也可能参与 SA 诱导的 H_2O_2 产生。

2.3 蚕豆保卫细胞原生质体全细胞 K^+ 电流特性

本试验用全细胞记录方法记录蚕豆保卫细胞原生质体全细胞 K^+ 电流。在细胞外液含 10 mmol/L K^+ 、电极液含 100 mmol/L K^+ ,及当全细胞封接形成后保卫细胞原生质体、电极溶液与细胞质内液达

到平衡时,可测得静息膜电位为 $-30\sim-80\text{ mV}$ 。膜电位钳置 -52 mV ($V_H=-52\text{ mV}$),刺激电压从钳位电压逐渐去极化到 $+110\text{ mV}$ 时,激活一定的外向电流,刺激电压从钳位电压逐步超极化到 -190 mV 时,激活较大的内向全细胞电流(图 3-B),并根据记录结果对稳态电流作电压-电流(I-V)曲线(图 3-C)。

离子通道尾电流为 0 pA 时的细胞膜电位称为反转电位(E_{rev}),反转电位的大小与形成该通道电流的离子平衡电位相同。图 4 表明,记录到的通道尾电流反转电位为 -60 mV 左右。根据 Nernst 方程 [17] 计算细胞内外液主要离子平衡电位的结果表明,所记录到的全细胞反转电位接近 K^+ 的平衡电位(-58 mV)(图 4-B),而且其全细胞通道电流可被胞外 1 mmol/L Ba^{2+} 所抑制(图 5),因此本试验记录到的通道电流是 K^+ 电流 [18]。

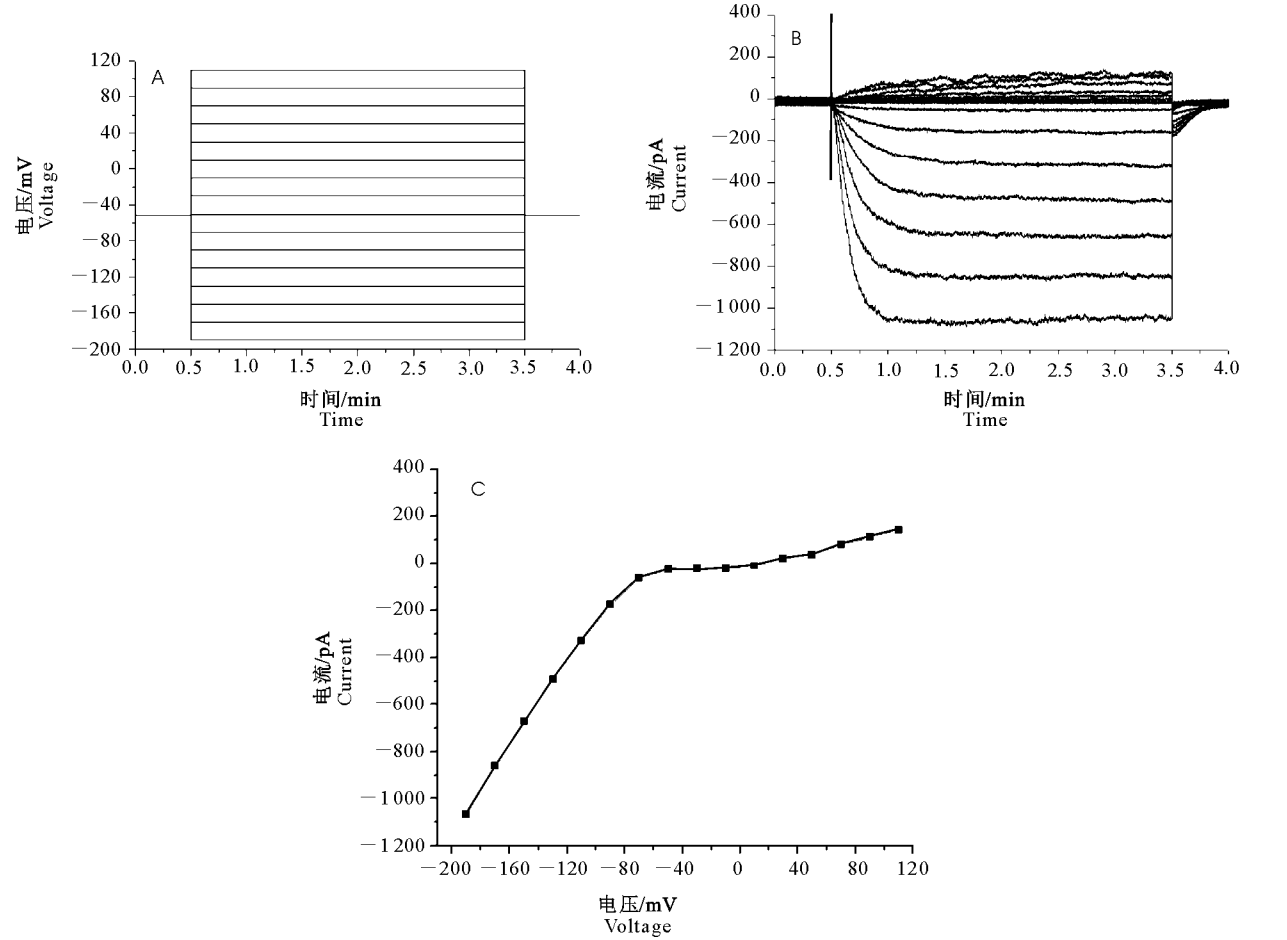


图 3 蚕豆保卫细胞原生质体的全细胞 K^+ 电流特性

A. 施加给细胞的电压方波;B. 保卫细胞原生质体全细胞电流;C. 在图 B 中的稳态电压-电流曲线

Fig. 3 Characteristic of whole-cell K^+ -current of guard cell protoplast

A. The voltage protocol applied to the cells;B. The whole-cell current of guard-cell protoplasts;C. The steady state I-V curve in B.

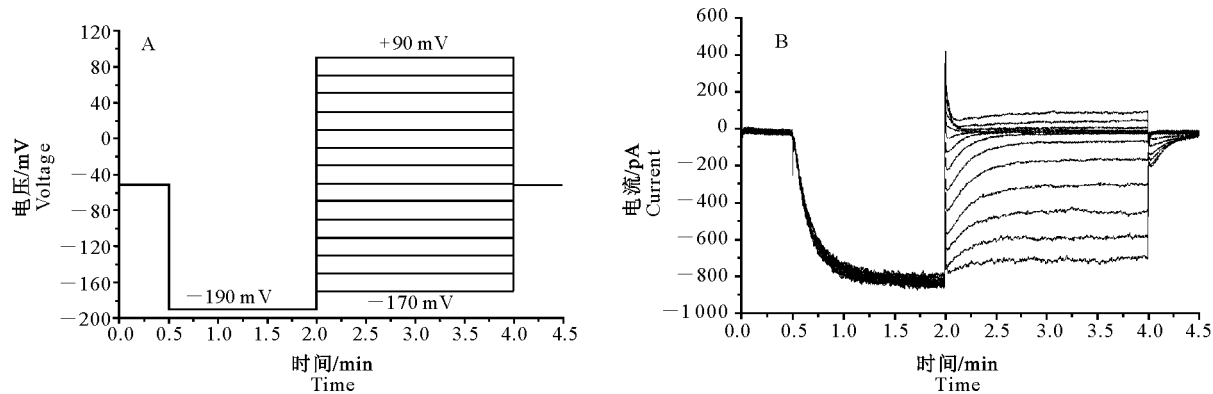


图 4 蚕豆保卫细胞原生质体全细胞尾电流

A. 施加给细胞的电压方波; B. 原生质体全细胞离子通道尾电流

Fig. 4 Characteristic of tail current of guard cell protoplast

A. Voltage protocol applied to the cells; B. The tail current of guard-cell protoplasts

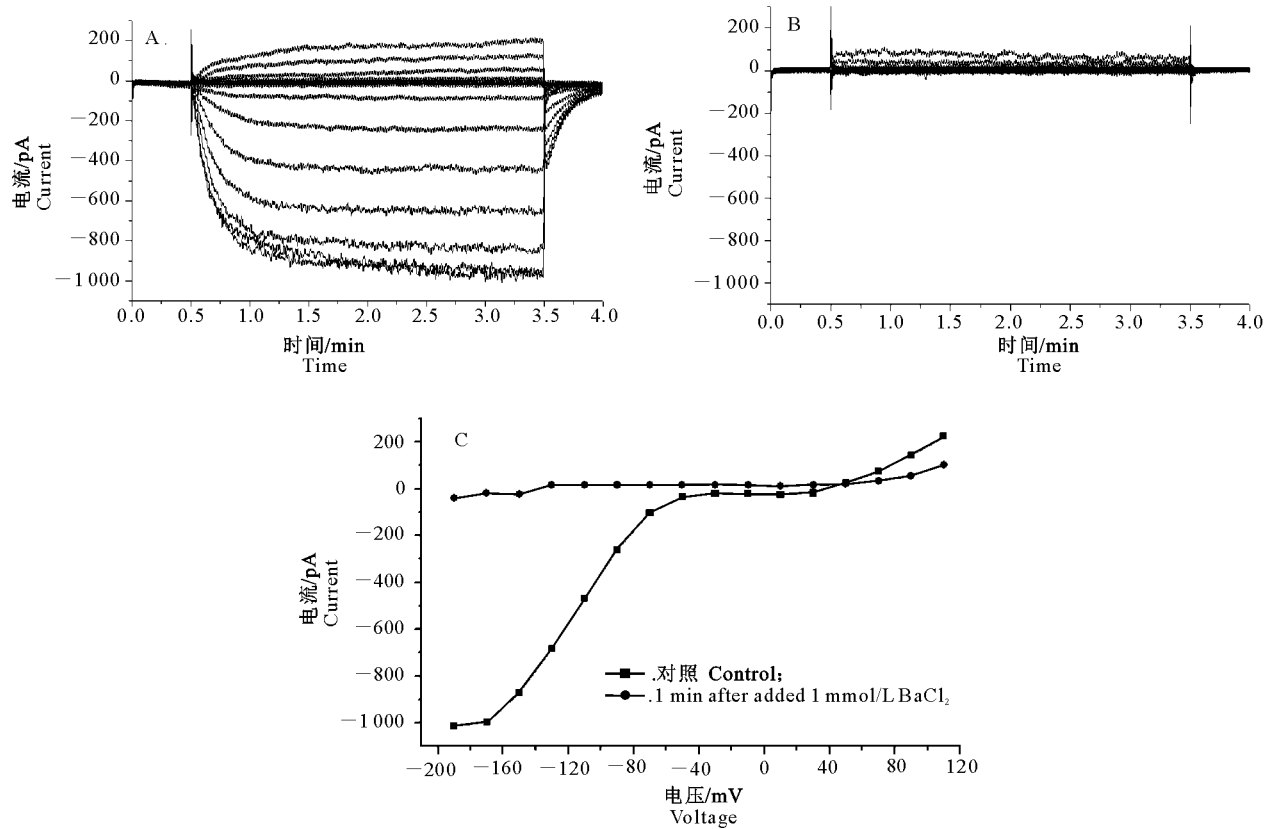


图 5 蚕豆保卫细胞原生质体 K^+ 通道特性

A. 加入 1 mmol/L BaCl₂ 前的全细胞电流; B. 加入 1 mmol/L BaCl₂ 1 min 后的全细胞电流情况; C. 图 A、B 中的稳态电压-电流曲线

Fig. 5 Characteristic of K^+ -channel of guard cell protoplast

A. The whole-cell current before added 1 mmol/L BaCl₂; B. The whole-cell current 1 min after added 1 mmol/L of BaCl₂;

C. The steady state I-V curve in A and B

2.4 SA 对蚕豆保卫细胞质膜内向 K^+ 电流的影响

全细胞封接形成后,静置 10~15 min 待电流稳定后,在胞外加入 SA 使其终浓度为 0.1 mmol/L,并在 SA 处理后跟踪记录全细胞 K^+ 电流变化情况(记录时间间隔为 5 min),结果表明,SA 处理后 K^+

内向电流开始受到抑制,并随时间延长抑制程度增加(图 6-C 和图 6-D),20 min 时达到最大。表明 0.1 mmol/L 的 SA 可明显抑制质膜内向 K^+ 电流,与对照(图 6-B)相比,在 10 和 20 min 时抑制程度分别达到 37%和 70%左右。

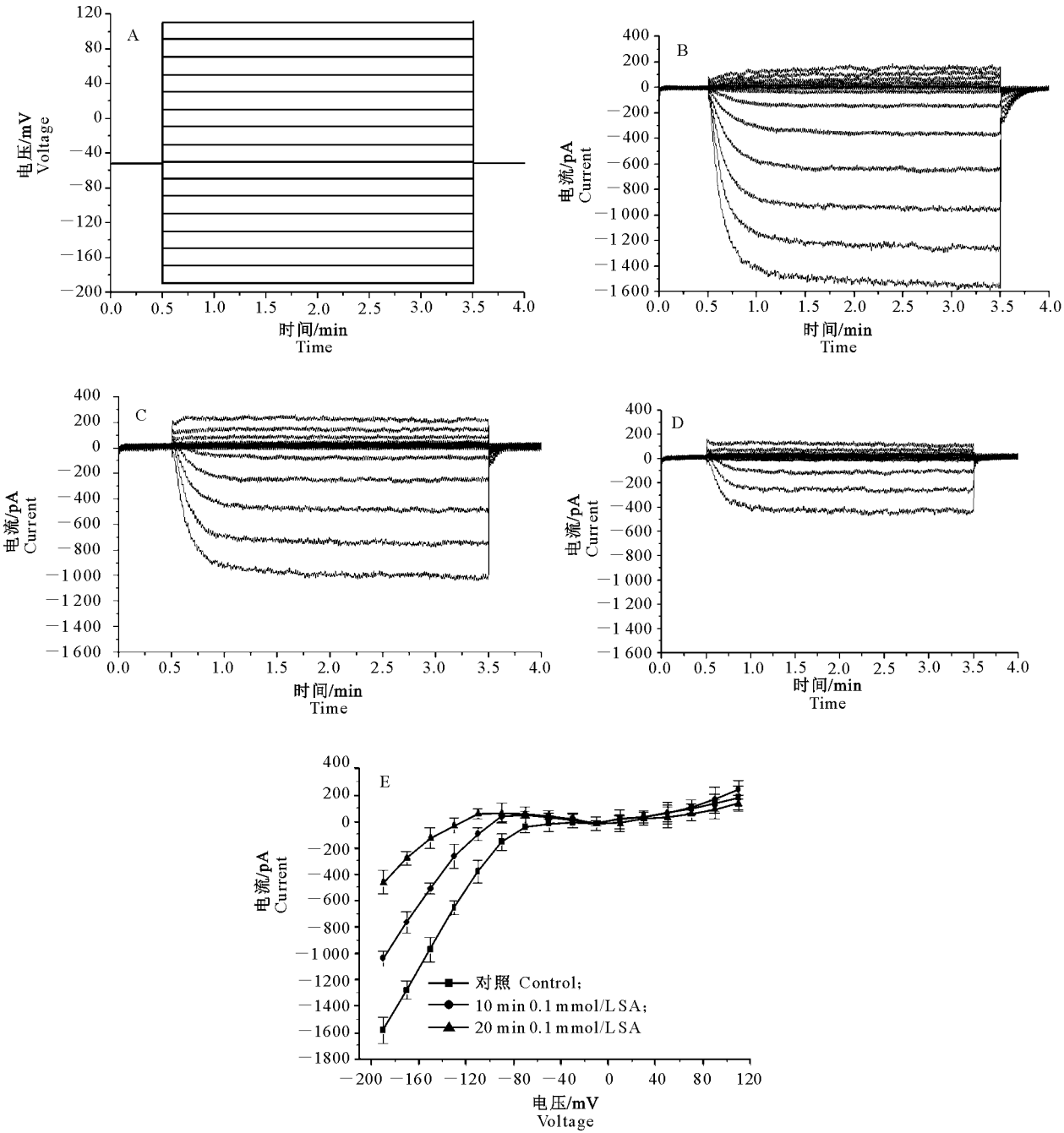


图 6 SA 对蚕豆保卫细胞质膜内向 K^+ 电流的影响

A. 施加给细胞的电压方波;B. 加入外源 0.1 mmol/L SA 前的全细胞 K^+ 电流;C、D. 加入外源 0.1 mmol/L SA 后 10 和 20 min 的全细胞 K^+ 电流;E. 图 B、C、D 中的稳态电压电流曲线 ($n=5$)

Fig. 6 Effect of SA on whole-cell K^+ -current of guard cell protoplast

A. The voltage protocol applied to the cells;B. The whole-cell K^+ current before added exogenous SA 0.1 mmol/L;C and D. The whole-cell K^+ current 10 and 20 min after added exogenous SA 0.1 mmol/L, respectively;E. The steady I-V curve in B,C and D ($n=5$)

2.5 DPI 对 SA 抑制蚕豆质膜内向 K^+ 电流的影响

气孔表皮条生物分析表明,质膜 NADPH 氧化酶的专一性抑制剂 DPI 可部分逆转 SA 诱导的气孔关闭作用,暗示了 SA 可能刺激质膜 NADPH 氧化酶产生 H_2O_2 并导致气孔关闭。为进一步验证这一结果,本试验在电极液中加入 10 μ mol/L DPI。全

细胞封接形成后,在细胞外液中加入 SA 使其终浓度为 0.1 mmol/L 进行处理。图 7 表明,10 μ mol/L 的 DPI 可部分逆转 SA 抑制的保卫细胞内向 K^+ 电流,在 SA 处理后 10 和 20 min 全细胞内向 K^+ 电流同处理前相比分别被抑制 27% 和 46% 左右。

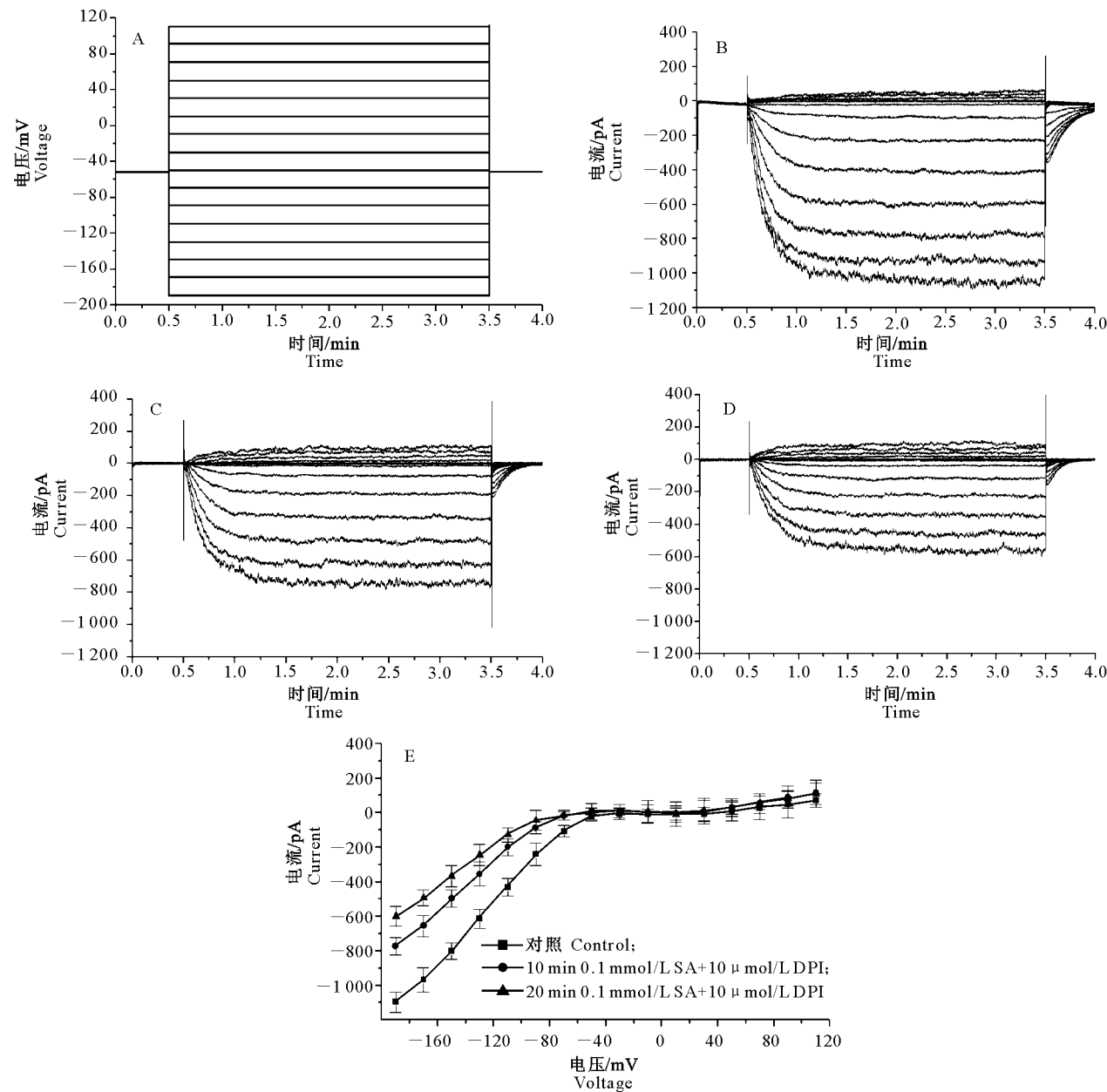


图 7 DPI 对 SA 抑制蚕豆质膜内向 K⁺ 电流的影响

A. 施加给细胞的电压方波;B. 在 10 μmol/L DPI 作用下,加入 0.1 mmol/L SA 前的全细胞 K⁺ 电流;C、D. 10 μmol/L DPI 作用下,加入 0.1 mmol/L SA 后 10 和 20 min 的全细胞 K⁺ 电流;E. B、C、D 中的稳态电压-电流曲线($n=4$)

Fig. 7 Effect of DPI on whole-cell K⁺-current inhibited by SA

A. Voltage protocol applied to the cells;B. The whole-cell K⁺ current in the presence of DPI 10 μmol/L internal before added exogenous SA 0.1 mmol/L;C and D. The whole-cell K⁺ current 10 min and 20 min in B after added exogenous SA 0.1 mmol/L, respectively; E. The steady I-V curve in B,C and D ($n=4$)

3 结 论

表皮条生物分析表明,SA 在低浓度($10^{-6} \sim 10^{-3}$ mol/L)时诱导的气孔关闭具有可逆性,而在高浓度(10^{-2} mol/L)时导致气孔的不可逆关闭是由于高浓度造成了对细胞的伤害。已有报道,在被 TMV 感染的烟草叶片组织中 SA 水平可升高 10~

100 倍,达到 7~150 μmol/L^[19]。另外 Durner 等^[20]也报道被病原菌感染的植物叶片中典型的 SA 浓度约为 0.1 mmol/L。因此,0.1 mmol/L 的 SA 可明显诱导气孔关闭,而且不会造成细胞伤害。

本研究采用膜片钳技术记录了保卫细胞原生质体在不同处理条件下的全细胞 K⁺ 电流,结果发现,SA 诱导的气孔关闭过程中可能有 H₂O₂ 的产生;

SA 可抑制气孔保卫细胞原生质体全细胞内向 K^+ 电流;NADPH 酶的抑制剂 DPI 可以逆转 SA 的抑制作用,说明 SA 可能通过 H_2O_2 这个中间成分的介导而抑制保卫细胞内向 K^+ 电流,使细胞膨压下降,细胞失水最终导致气孔关闭。关于 SA 作为信号分子参与活性氧代谢的信号转导还有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] Raskin I. Role of salicylic acid in plants [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol,1992a,43:439-463.

[2] Raskin I. Salicylate, a new plant hormone [J]. Plant Physiol, 1992b,99:799-803.

[3] Agrios G N. Plant pathology [M]. 4th ed. San Diego:Academic Press,1997:46-52.

[4] Schwartz A, Wu W H, Taucker E B, et al. Inhibition of inward K^+ channels and stomatal response by abscisic acid; an intracellular locus of phytohormone action [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1994,91:4019-4023.

[5] Torsethaugen G, Pell R J, Assmann S M. Ozone inhibits guard cell K^+ channels implicated in stomatal opening [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1999,96:13577-13582.

[6] 余小平,贺军民,张 键,等. 水杨酸对盐胁迫下黄瓜幼苗生长抑制的缓解效应 [J]. 西北植物学报,2002,22(2):401-405.
She X P, He J M, Zhang J, et al. Mitigative effect of salicylic acid on salt stress-induced growth inhibition in cucumber seedling [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2002, 22 (2):401-405. (in Chinese)

[7] 郝福顺,陈 珈. 植物细胞膜 NADPH 氧化酶的研究进展 [J]. 植物学通报,2005,22(增刊):1-10.
Hao F S, Chen J. Research advances in NADPH oxidative enzymes in the plasma membrane of plant cells [J]. Chinese Bulletin of Botany,2005,22(Sup.):1-10. (in Chinese)

[8] Auh C K, Murphy T M. Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of O_2^- and H_2O_2 by Phytophthora elicitor-stimulated rose cells [J]. Plant Physiol, 1995, 107: 1241-1247 .

[9] Doke N, Miura Y. In vito activation of NADPH dependent O_2^- generating systems in a plasma membrane-rich fraction of potato tuber tissues by treatment with an elicitor from Phytophthora infestans or with digitonin [J]. Physiol Mol Plant Pathol, 1995,46:17-28.

[10] Klessig D F, Malamy J. The salicylic acid signal in plants [J]. Plant Mol Biol,1991,204(26):1439-1458.

[11] 宋泽双,江国英,卢迎春,等. 水杨酸处理导致过氧化氢酶基因 mRNA 水平的下降 [J]. 科学通报,1998,43:422-425.
Song Z S, Jiang G Y, Lu Y C, et al. The descent of mRNA gene of catalase by salicylic acid [J]. Acta Agron Sin,1998, 43:422-425. (in Chinese)

[12] Kruse T, Tallman G, Zeiger E. Isolation of guard cell protoplasts from mechanically prepared epidermis of *Vicia faba* leaves [J]. Plant Physiol,1989,90:1382-1386.

[13] Fairley-Grenot K A, Assmann S M. Whole-cell K^+ current across the plasma membrane of guard cells from a grass; *Zea mays* [J]. Planta,1992,186:282-293.

[14] Blom-Zandstra M, Koot H T M, Van Hattum J, et al. Isolation of protoplasts for patch-clamp experiments: an improved method requiring minimal amounts of adult leaf or root tissue from monocotyledonous or dicotyledonous plants [J]. Protoplasma,1995,185:1-3.

[15] Hamil O P, Marty A, Neher E, et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches [J]. Pflugers Archiv,1981,391: 85-100.

[16] Shirasu K, Nakajima H, Rajasekhar V K, et al. Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms [J]. Plant Cell,1997,9:261-270.

[17] Schroeder J I, Raschke K, Neher E. Voltage dependence of K^+ channels in guard-cell protoplasts [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1987,84:4108-4112.

[18] 安国勇,宋纯鹏,张 骁,等. 过氧化氢对蚕豆气孔运动和质膜 K^+ 通道的影响[J]. 植物生理学报,2000,26(5):458-464.
An G Y, Song C P, Zhang X, et al. Effect of peroxide generation on stomatal movement and K^+ channel on plasma membrane in vicia faba guard cell [J]. Acta Phytophysiol Sin, 2000,26(5):458-464. (in Chinese)

[19] Conrath U, Chen Z X, Ricigliano J R, et al. Two inducers of plant defense responses, 2,6-dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1995,92:7143-7147.

[20] Durner J, Klessig D F. Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense response [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92:11312-11316.