科学通报 2026 年 第 71 卷 第 16 期: 3764 ~ 3778
论 文
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS

拟南芥微管结合蛋白MDP60在乙烯诱导气孔关闭中的作用

赵盖晴†, 胡淼†, 孙鹏方, 王梓轩, 于荣*

首都师范大学生命科学学院, 北京 100048

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: yurong@cnu.edu.cn

2025-10-15 收稿, 2025-12-08 修回, 2026-02-24 接受, 2026-02-26 网络版发表

国家自然科学基金(31871351)资助

摘要 气孔通过开闭运动精确调控大气-植物间CO_2和水分交换, 对植物蒸腾与光合作用具有直接影响. 微管骨架在气孔运动中起关键作用, 其动态组装受诸多微管结合蛋白(microtubule associated proteins, MAPs)调控, 但是深入的分子作用机制尚未完全明晰. MDP60(microtubule-destabilizing protein 60)是一种微管结合蛋白, 其启动子可与乙烯信号通路的关键转录因子PIF3(phytochrome-interacting factor 3)直接结合, 从而受乙烯信号调控而上调表达. 本文利用拟南芥微管结合蛋白MDP60突变体*mdp60*、过表达株系*MDP60* OE以及*ProMDP60:GUS*等材料, 从植株叶温、气孔开度、保卫细胞微管骨架动态排布等不同方面, 探究MDP60在乙烯介导的气孔关闭信号转导途径中所发挥的调控作用, 以期进一步阐释气孔运动的调控机制. 结果表明: (1) 与野生型(WT)相比, *mdp60*突变体叶片蒸腾失水减少, 叶片温度相应较高. (2) 气孔开度实验中, *mdp60*突变体对乙烯信号更敏感, 相同条件下气孔关闭程度比WT高; 叠加微管特异药物共同处理发现, 该突变体对两类微管特异性药物的敏感性相对较低. (3) 通过激光共聚焦显微镜观察发现, 在乙烯处理下, *mdp60*突变体保卫细胞的微管骨架稳定性显著降低, 具有辐射状规则排布微管的细胞数量占比由处理前的76.2%骤减为16.7%, 降幅达59.5%, 远大于野生型对照(76.9%→30.7%), 同时, 趋于解聚碎片化微管比例升高. ImageJ软件进一步定量分析, 突变体保卫细胞中微管密度低于WT. (4) 荧光漂白恢复结果表明, *mdp60*突变体保卫细胞中微管解聚和聚合的转换频率升高, 动态重排加快. 以上数据共同说明, 微管结合蛋白MDP60通过调节保卫细胞微管骨架的动态组装过程, 参与乙烯诱导的气孔关闭信息传递途径.

关键词 微管结合蛋白MDP60, 气孔运动, 乙烯, 微管骨架

气孔是陆生植物叶片表面由一对保卫细胞围成的特殊孔隙结构, 最早出现的化石纪录可追溯至约4亿年前. 尽管气孔在叶片表面的占比通常仅为0.3%~0.5%, 但植物与大气间95%的气体交换, 包括吸收CO_2进行光合碳固定以及通过蒸腾作用散失水分, 均通过该结构完成[1]. 由此可见, 气孔开闭的动态调控机制对于全球的碳循环与水循环具有重要影响. 气孔开度的增大虽有助于CO_2的摄入并促进光合作用, 但在干旱、高盐等特定环境下, 也可能导致水分过度蒸腾、病原入侵等不利后果, 甚至引发土壤水分的消耗、植物木质部气穴化栓塞等问题, 从而损害植物的水分传导功能. 因此, 如何协调气孔开闭的利弊, 从而在多变自然环境中提升农业生产的综合收益, 已成为当前植物学研究的热点议题[2~6].

乙烯(C_2H_4)作为一种结构简单的气态植物激素. 不仅参与种子萌发、组织分化、根毛形成、开花及果实

引用格式: 赵盖晴, 胡淼, 孙鹏方, 等. 拟南芥微管结合蛋白MDP60在乙烯诱导气孔关闭中的作用. 科学通报, 2026, 71: 3764–3778
Zhao G, Hu M, Sun P, et al. The microtubule-associated protein MDP60 is involved in the ethylene-induced stomatal movement (in Chinese). Chin Sci Bull, 2026, 71: 3764–3778, doi: 10.1360/CSB-2025-5653

© 2026《中国科学》杂志社

成熟等正常生长发育过程，同时也是植物响应各种生物和非生物胁迫的核心逆境激素信号(stress hormone)，可有效介导植物对病虫害、盐害、干旱、水涝、极端温度及重金属胁迫等多种逆境的适应性反应[7~10]. 乙烯对气孔运动的调节, 已被广泛研究. 保卫细胞在响应乙烯时, 会产生一系列的级联反应, 许多重要的信号分子(Ca^{2+}、K^+、H_2O_2等)及离子通道(阴离子通道、H^+-ATPase等)均参与其中[11~16]. 除此之外, 微管骨架作为植物细胞重要的细胞骨架系统，在气孔运动调控中也展现出关键功能. Fukuda等人[17](1998)的研究发现，蚕豆保卫细胞中微管的排列与气孔运动的昼夜节律密切相关: 上午气孔开放时微管多呈径向规则排列，而下午至夜间气孔关闭时，微管则趋于解聚或片段化；该现象在2001年由Yu等人[18]的研究进一步证实. 有研究表明, 微管骨架可能通过影响细胞壁重构参与气孔运动调控[19]. 2016年Rui和Anderson[20]发现，微管通过调控细胞壁中纤维素微纤丝及其他非纤维素物质的排列模式, 为气孔运动提供力学支撑, 气孔运动时, 保卫细胞壁中的纤维素会发生动态重组: 开放状态时呈分散分布, 而关闭状态时则形成密集束状结构. 2024年Li等人[21]发现, 拟南芥蛋白激酶AtCIPK20正调节干旱/ABA条件下保卫细胞微管的解聚, 介导气孔关闭. 2025年有研究报道，拟南芥*O*-岩藻糖基转移酶SPY(spindly)与微管蛋白TUA1(α-tubulin)互作，调节保卫细胞微管骨架的动态重排, 参与气孔运动[22]. 这些研究共同说明，微管骨架在多种信号通路中均参与气孔运动的调控，但其在乙烯诱导气孔运动的信号传递中是否介入以及其具体调控机制, 仍需进一步阐明.

已知微管结合蛋白(microtubule associated proteins, MAPs)是微管动态转换最直接的调节者. 近年来, 多个微管结合蛋白被证实在气孔运动信号通路中承担关键功能. 例如，席小慧等人[23]研究发现，微管相关蛋白WVD2/WDL(wave-dampened 2-like)家族成员WDL3蛋白通过调控微管组织密度与成束程度，加速微管动态转换, 进而影响保卫细胞内外Ca^{2+}跨膜流动, 从而抑制ABA诱导的气孔关闭并调节植物蒸腾失水. 在此基础上, Dou等人[24]进一步发现, 该家族的另一成员WDL7在ABA信号下被E3泛素连接酶MREL57(microtubule-related E3 ligase 57)识别并发生泛素化修饰, 随后通过蛋白酶体途径降解, 进而促进保卫细胞的微管解聚, 从而诱导气孔关闭，使植物有效响应ABA处理和土壤干燥. Wang等人[25]在2023年证明微管结合蛋白SPR1(spiral1)在ABA的作用下被OST1(open stomata 1)磷酸化, 促进其与微管的解离进而促进微管的解聚，从而正向调节ABA诱导的气孔关闭. Zhong等人在2024年证明拟南芥微管结合蛋白EB1b(end binding1b)能够直接与SNARE蛋白SYP121相互作用，产生由微管生长驱动的囊泡运输，促进K^+通道KAT1重新分布到保卫细胞质膜，进而影响气孔的开闭[26]. 以上研究显示，微管结合蛋白如WDL3、WDL7、SPR1、EB1b等，均在介导气孔运动中微管骨架的动态重排环节发挥至关重要的调控作用. 同时, 我们也发现, 在探究微管骨架及其结合蛋白在气孔运动中的作用研究中，大量文献报道都围绕在响应植物激素ABA信号下的调控机制上展开[21~25,27]. 关于植物激素乙烯调节气孔运动的信号通路中，是否有保卫细胞微管骨架及其结合蛋白的参与, 目前尚不明晰.

MDP60(microtubule-destabilizing protein 60)是一个已被鉴定的微管结合蛋白，体外实验表明MDP60具有解聚微管的功能. 亚细胞定位发现GFP-MDP60主要定位于周质微管. 通过酵母单杂交、染色质免疫共沉淀等实验进一步证实，乙烯信号途径中转录因子-光敏色素互作因子PIF3(phytochrome interacting factor 3)可直接调控*MDP60*的转录水平. 研究人员通过对野生型和*mdp60*突变体外源施加乙烯前体物氨基环丙烷羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC)或水淹胁迫处理发现, 突变体下胚轴微管重排受到明显影响并响应水淹逆境下的乙烯信号通路. 表明MDP60可通过调控周质微管的动态变化，参与乙烯介导的下胚轴伸长过程[28,29]. 结合以上信息, 乙烯及若干MAPs均在气孔运动信息传递中发挥重要作用，MDP60作为一种转录水平受乙烯直接调控的微管结合蛋白, 其在乙烯诱导的气孔关闭过程中是否也具有功能, 这一问题值得深入探讨.

本实验以*mdp60*突变体、*pTUB6::VisGreen*等株系为实验材料，系统探究MDP60在乙烯诱导气孔关闭信号通路中的功能及作用机制，以期深入了解气孔运动中保卫细胞微管动态不稳定性背后的调节机制，补充气孔运动作用机理，为农业生产、绿色生态提供可靠的理论依据.

1 材料方法

1.1 植物材料及培养条件

所用植物材料为拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)，野生型为哥伦比亚生态型(Col-0)，由本实验室自繁保存.

MDP60 CRISPR/Cas 9编辑突变体(*mdp60-2*、*mdp60-3*)、*MDP60*过表达株系(*MDP60* OE#1、*MDP60* OE#2)、Pro_{MDP60}:*GUS*由中国农业大学毛同林教授赠予. *pTUB6::VisGreen-TUB6*由中国科学院微生物研究所孔照胜教授赠予. 拟南芥种子经70%乙醇溶液、25%次氯酸钠溶液消毒后, 播种于1/2 MS培养基上, 4℃春化3 d, 随后转入光照培养箱(光照强度120 μmol/m^{2}s, 光周期16 h/22℃、暗周期8 h/18℃, 相对湿度75%), 待幼苗在培养基上生长7 d后将其移栽至营养土中继续培养3周后开展后续实验.

1.2 植物材料的鉴定

对于*mdp60*突变体的鉴定, 在CRISPR/Cas 9编辑位点上下游分别设计引物MDP60 DNA F(5′-TCTTCTTGTGTTGCGGTATA-3′)、MDP60 DNA R(5′-CTCCATTCCGACATTCGAGC-3′), 以基因组DNA模板扩增, 将产物测序后与*MDP60*基因突变后的序列比对, 正确的即为突变体; 对于*MDP60*过表达植株的鉴定, 提取植株总RNA反转录cDNA, 以cDNA为模板设计引物MDP60 qRT-F(5′-CGAGCAATACAAAACAGAAAGAGAA-3′)、MDP60 qRT-R(5′-ATCTTATCTTCTTGTGTTGCGGTAT-3′), 进行qRT-PCR检测. 与野生型的*MDP60*基因表达量进行对比, 选取表达量较高的两个株系扩繁后进行后续表型实验.

1.3 表皮条缓冲液配制

1.1 gMES, 5 mL 100 μmol L^{-1} $CaCl_2$, 50 μL 50 mmol L^{-1} KCl, 10 mol L^{-1} KOH调pH 6.1, 补水至500 mL; 0.04%乙烯利(ethrel, ETH)由表皮条缓冲液配制, 0.04 g乙烯利粉末加入100 mL表皮条缓冲液; 微管特异性药物Taxol、oryzalin使用时分别由表皮条缓冲液稀释至30、10 μmol L^{-1}.

1.4 离体叶片失水率

参考王未等人[30](2017)方法, 待植株生长至4周龄时, 取不同基因型实验材料生长一致、叶位相同的12片莲座叶, 置于通风橱内自然失水, 每隔30 min对叶片进行称重, 以叶片离体时的初始鲜重为基准计算各时间点的叶片失水率.

1.5 叶片温度测量

使用红外仪热成像相机(VarioCAM HD head 880)对植株进行图像采集, 使用IRBIS3 Professional分析软件对采集到的热成像数据进行处理, 以实现叶片温度的定量统计分析. 本部分实验委托北京雅世恒源科技发展有限公司完成.

1.6 GUS化学组织染色

GUS染液配制: 取750 μL 20 mg mL^{-1} X-Glu, 5 mL 0.2 mol L^{-1}磷酸钠溶液, 50 μL 100 mmol L^{-1}亚铁氰化钾, 50 μL 100 mmol L^{-1}铁氰化钾, 加双蒸水定容至10 mL. 随后叶片置于预冷的90%丙酮中固定20 min. 取出叶片用去离子水漂洗干净后转入GUS染液中, 于37℃黑暗条件下孵育12 h. 染色后用无水乙醇浸泡脱色直至叶片背景透明后显微镜拍照.

1.7 气孔开度测量

选取生长4周左右、生长状态一致且形态相似的拟南芥莲座叶, 剪下后浸泡于表皮条缓冲液(MES)中, 在光强为300 μmol m^{-2} s^{-1}的冷光源下照光2 h. 随后转移至不同药物处理液中继续处理2 h, 最后使用倒置显微镜(ZEISS Axiovert 200M)观察并采用ImageJ软件完成气孔开度的测量.

1.8 激光共聚焦显微镜观察微管排布及微管骨架相关参数测定

利用*pTUB6::VisGreen-TUB6*与*mdp60-2*突变体杂交获得材料, 分别取该杂交株系与*pTUB6::VisGreen-TUB6*对照株系叶片, 经表皮条缓冲液、0.04%乙烯利处理后, 采用ZEISS 780激光共聚焦显微镜(63倍油镜, 480 nm激发光)观察保卫细胞微管骨架排布. 参照Higaki等人[31]的方法, 利用ImageJ软件定量分析微管密度、微管成束程度等参数, 首先将共聚焦显微镜下的原始扫镜图像使用ImageJ菜单“Image-Type-8-bit”转换为黑白图像, 后使用“Image-Adjust-Threshold”对图像“骨骼化”处理. 将“骨骼化”后的保卫细胞周质微管(microtubules, MTs)的像素量(N_{MT})占整个细胞区域的像素量(N_{cell})的百分比(100%×N_{MT}/N_{cell}), 即绿色荧光信号(标记微管)的占有率来表示微管的密度. 同样, 使用ImageJ软件中“Plugins-Macros-hig_skewness”插件(北京师范大学李杰婕教授赠)对保卫细胞的荧光标记微管分布不对称度(偏度)进行统计测量, 该数值是微管成束能力的重要参数. 测量保卫细胞数量n≥30.

1.9 荧光漂白恢复

采用Leica SP8 X共聚焦显微镜的荧光漂白恢复模块，对保卫细胞微管束进行局部荧光漂白处理并观察其荧光恢复过程，使用LAS X软件对微管荧光恢复强度进行分析与统计.

2 结果与讨论

2.1 叶片蒸腾失水表型分析

植物体内超过90%的水分会通过叶片气孔蒸腾散失[32]. 基于这一生理特性, 本研究进行了叶片失水率检测. 实验选取生长4周左右的野生型、突变体(图S1(a))和过表达(图S1(b))植株，分别取位置相同、生长状态一致的轮状叶12片，置于通风橱内自然失水，每30 min称重一次并计算失水率. 干燥处理180 min后, 如图1(a)所示, 各材料叶片均出现边缘卷缩, 组织萎蔫等失水现象，但相较于野生型，*mdp60*突变体失水程度整体相对较轻, *MDP60*过表达叶片则失水更为明显. 统计结果显示，野生型植株的叶片失水率已达到43.1%，而两个平行突变体仅分别为39.0%和38.6%，均低于野生型. 相反，两个*MDP60*过表达植株(OE#1、OE#2)的叶片失水率均高于野生型，在相同时间内分别达到49.9%和49.4%(图1(b)). 以上结果表明, 微管结合蛋白编码基因*MDP60*的表达水平变化能够影响拟南芥叶片的蒸腾失水过程. 叶片温度是反映叶片蒸腾失水的另一指标, 蒸腾作用越强，水分散失越多，叶片温度则越低[24,33]. 结合已有研究中*MDP60*基因启动子可与乙烯信号通路转录因子直接结合的结论[28]，本研究进一步对四周龄植株进行乙烯处理，室温静置120 min后，利用红外相机拍照记录叶片温度(图1(c)), 并通过IRBIS3 professional软件完成叶温的量化分析. 在相同处理下，两个*mdp60*突变体的平均叶温分别为22.1℃和22.0℃，显著高于野生型(21.8℃); 而两个过表达植株(OE#1、OE#2)的平均叶温则均低于野生型(图1(d)). 统计学分析表明，野生型、突变体与过表达植株三者间差异显著，具统计学意义. 上述结果表明, *MDP60*基因功能缺失后，叶片蒸腾作用减弱，水分散失减少，叶片温度相应升高. 过表达植株则表现为蒸腾失水增强, 叶温下降.

2.2 *MDP60*基因在保卫细胞中存在表达

基于叶片蒸腾失水及叶片温度表型结果，本研究进一步探究该微管结合蛋白在气孔运动机制中的作用. 作为机制研究的基础，首先需确认*MDP60*基因是否在保卫细胞中转录表达. 为此，我们利用*MDP60*自身启动子驱动*GUS*报告基因的Pro_{MDP60}:*GUS*转基因材料[28], 生长25天后对其保卫细胞进行GUS组织化学染色. 结果如图2所示, 同样染色条件下, 野生型无明显着色, 而Pro_{MDP60}:*GUS*植株保卫细胞呈现清晰的蓝色标记，着色明显, 表明*MDP60*基因在保卫细胞中存在表达.

2.3 气孔开度测量

已有报道证明，乙烯信号通路下游的关键转录因子PIF3可直接与*MDP60*启动子结合并促进其转录[28]. 同时, 乙烯作为植物响应逆境的关键激素信号, 在气孔运动的调控过程中发挥重要作用[34,35]. 基于上述研究背景，本研究聚焦于MDP60在乙烯诱导拟南芥气孔关闭信号通路中的功能解析. 如图3(a, b)所示，0.04%乙烯利(ETH)处理下，野生型、突变体、过表达三种植物材料的气孔开度均呈现不同程度的缩小. 处理120 min后, 两个*mdp60*突变体株系的平均气孔开度较处理前分别下降了约25.3%和24.9%，其关闭程度显著高于野生型；相反，两个*MDP60*过表达株系(OE#1、OE#2)相同时间内的气孔关闭幅度仅为11.8%和12.1%，差异显著, 具统计学意义. 类似的气孔关闭响应模式也在乙烯合成前体物ACC处理中得以验证(图S2)，该结果与失水率数据一致. 上述结果表明，MDP60参与乙烯诱导的气孔关闭过程，其功能缺失会影响气孔对乙烯信号的正常响应. 鉴于ETH与ACC两种乙烯相关试剂对诱导气孔运动方面效果一致，后续实验将主要选取ETH作为乙烯信号开展研究实验. 此外, 综合叶片失水率、叶温及气孔开度的检测结果，可初步确认微管结合蛋白MDP60在气孔运动中具有潜在调控功能，同时也验证了本研究所用材料可靠. 基于此，后续研究将以*mdp60*突变体为主体开展.

微管结合蛋白在调控保卫细胞中微管的动态重排及参与气孔开闭过程中发挥着重要作用[23,24]. 因此，作为微管结合蛋白的MDP60，其在乙烯诱导气孔关闭中的作用或许与其调节保卫细胞内微管动态不稳定性密切相关. 为验证这一假设, 我们利用微管特异性药物对气孔开度进行了药理学实验分析. 结果如图4所示，乙烯利(ETH)与微管稳定剂Taxol共同处理120 min，气孔关闭受到明显抑制. 与单独使用ETH处理相比, 野生型植株的气孔孔径缩小程度减少约13.4%，而两个平行突变体的抑制程度仅为3.1%和5.9%，并且Taxol处理前后

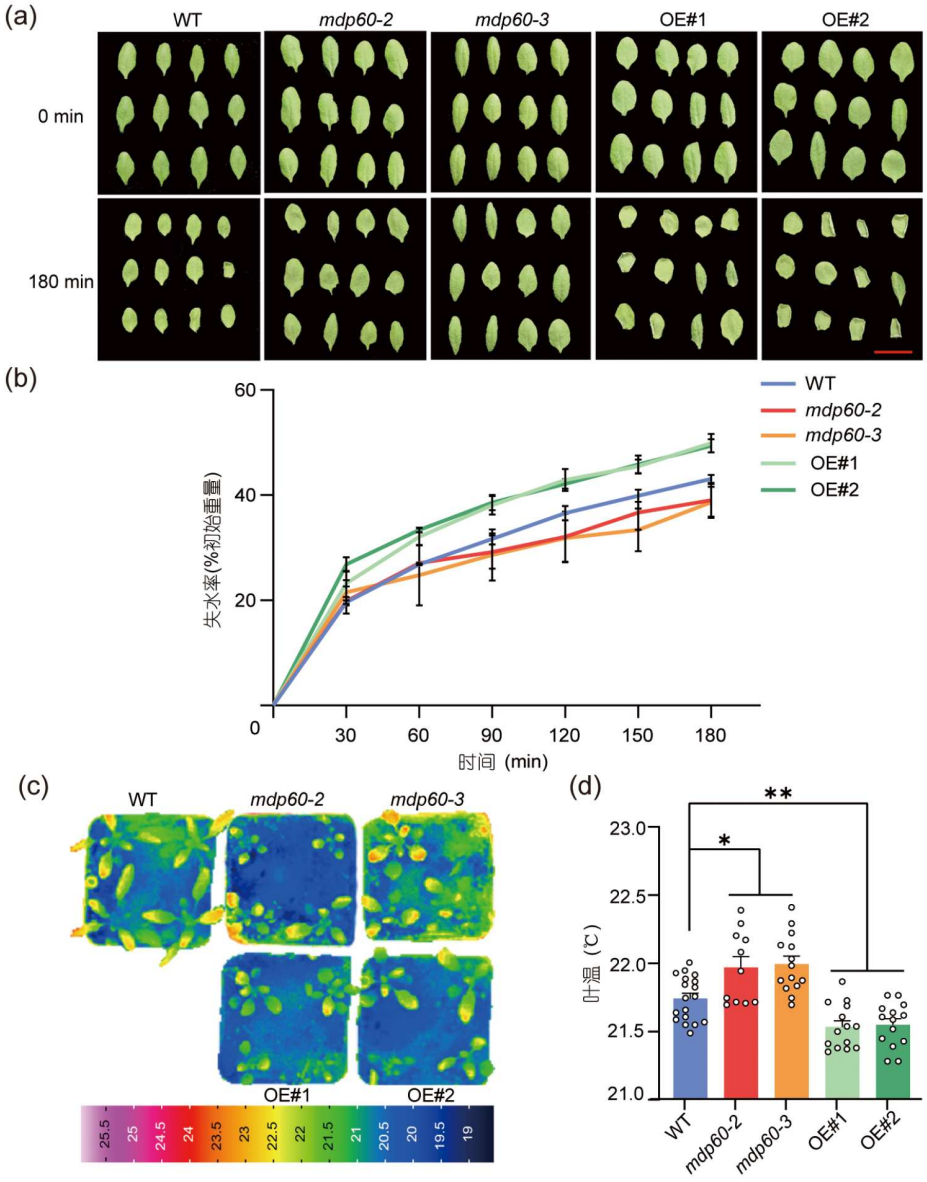


图 1 MDP60影响拟南芥叶片蒸腾失水. (a) 4周龄野生型与转基因材料(*mdp60-2*、*mdp60-3*、OE#1、OE#2)的莲座叶离体后, 自然失水180 min的表型观察结果. 比例尺, 1 cm. (b) 野生型与转基因材料离体莲座叶片鲜重每30 min测定一次, 持续3 h, 用于评估叶片失水率的统计分析. 实验设置至少3组独立重复, 累计统计叶片数量不少于36片; 数据表示平均值±标准误. (c) 4周龄土培植株的红外成像图. (d) 野生型、*mdp60*突变体和过表达植株叶片平均温度统计三次独立生物学重复, 样本量不少于15盆拟南芥幼苗, 数据表示平均值±标准误. *P<0.05,**P<0.01(双尾t-test)

Figure 1 MDP60 affects transpirational water loss. (a) The wilty phenotypes of the detached rosette leaves from 4-week-old WT, *mdp60-2*, *mdp60-3*, OE#1, and OE#2. Scale bar, 1 cm. (b) Fresh weights of detached leaves for 180 min dehydration of seedlings from wild-type and transgenic materials were measured every 30 min for a total of 3 h. The experiment was performed with at least three independent replicates, with a total of no fewer than 36 leaves analyzed; values represent mean±SEM. (c) Infrared thermography of 4-week-old soil-grown plants. (d) Leaf temperature from different seedlings including WT, *mdp60* mutants and overexpressing lines was quantified using infrared camera software. Three independent biological replicates were performed, with a minimum of 15 pots of seedlings per replicate; the data represent mean±SEM. *P<0.05, **P<0.01 (two-tailed t-test)

变化不大, 与野生型反应差异显著. 相反, 当ETH与微管解聚剂oryzalin同时处理时, 乙烯诱导的气孔关闭进一步加剧. ETH和oryzalin共同处理120 min后, 野生型气孔开度较单独使用ETH处理又减少了13.6%, 而两个平行突变体仅减少了2.7%和3.7%, 对oryzalin的反应明显迟钝, 与野生型存在显著的统计学差异. 以上结果表明, *MDP60*基因突变可能削弱了保卫细胞微管的动态转换能力, 使其对微管稳定或解聚类药物反应不敏感,

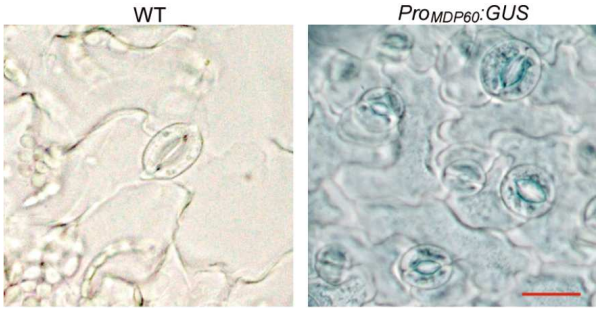


图 2 GUS组织化学染色显示*MDP60*基因在保卫细胞中存在表达. 取野生型(WT)及*Pro*$_{MDP60}$*:GUS*转基因植株的莲座叶进行GUS染色, 撕取其下表皮并在倒置显微镜下观察. 比例尺, 20 μm

Figure 2 GUS staining showed that the *MDP60* transcript is clearly expressed in guard cells in *Pro*$_{MDP60}$*:GUS* transgenic seedlings. The epidermal strips were peeled from the rosette leaves of WT and *Pro*$_{MDP60}$*:GUS* transgenic plants after GUS staining and observed under an inverted microscope. Scale bar, 20 μm

从而影响乙烯信号介导的气孔正常关闭过程.

2.4 保卫细胞中微管骨架组织排布观察及定量分析

利用*mdp60-2*/*pTUB6::VisGreen-TUB6*的植株, 我们对乙烯信号诱导下保卫细胞内微管骨架的组织重排过程进行了直观观察. 如图5(a)所示, 在气孔从开放到关闭的整个过程中, 保卫细胞内的微管主要呈现三种典型的排布类型, 开放状态下的整齐辐射状(Type I)、过渡阶段的交错网状(Type II)以及关闭状态下的解聚或片段化形态(Type III)[23]. 经过乙烯处理120 min后, 如图5(b)所示, 野生型保卫细胞中辐射状(Type I)微管的比例由76.9%急剧下降到30.7%, 降幅达46.2%; 与此同时, 呈解聚状(Type III)的比例上升了约15%. 相比之下, *mdp60*突变体表现出更为剧烈的微管动态重排反应. 在相同条件下, 突变体中解聚片段化(Type III)微管的保卫细胞比例从0.3%激增至26.7%, 上升约26.4%, 显著高于野生型的变化幅度(15%). 与此同时, 辐射状微管(Type I)的比例急剧下降至16.7%, 降幅达59.5%, 也显著超过野生型. 以上结果表明, *MDP60*基因突变显著加速了乙烯诱导下保卫细胞内微管的动态重排过程, 使得呈解聚或片断化微管的保卫细胞数量明显增加, 暗示该基因在维持微管结构稳定性中发挥关键调控作用.

使用ImageJ软件, 我们从多个特征参数对保卫细胞中微管骨架的组织行为进行了更为细致的定量分析, 包括可识别的微管数量(GFP荧光强度>50)、微管密度以及微管成束程度等指标[23,36,37].

如图6(a)所示, 即使在相同的辐射状(Type I)排布

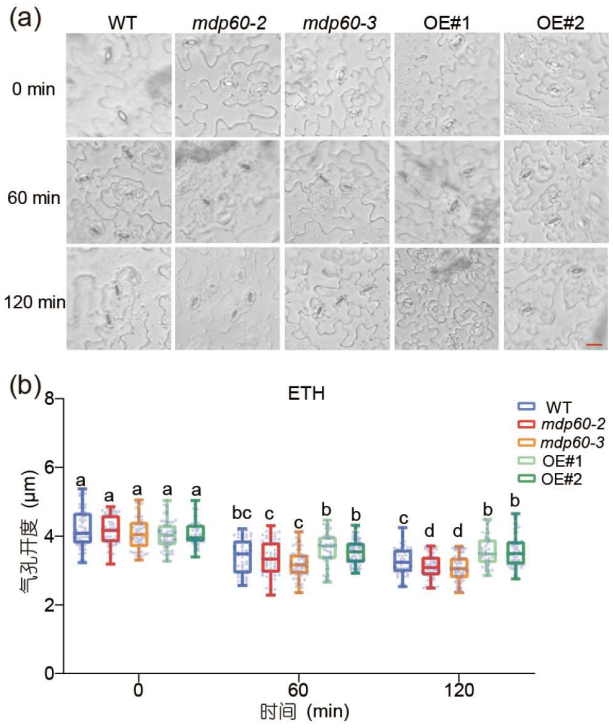


图 3 MDP60参与乙烯信号下的气孔关闭. (a) 野生型、*mdp60*突变体以及*MDP60*过表达株系乙烯处理前后, 保卫细胞气孔开度表型. 比例尺, 20 μm. (b) 对应图(a)的气孔孔径测量统计结果. 每组测量气孔不少于60个. 不同字母代表差异显著(*P*<0.05, 单因素方差分析)

Figure 3 MDP60 is involved in ethylene-induced stomatal closure. (a) Representative images of stomatal aperture in wild-type, *mdp60* mutants, and overexpression lines before and after ETH treatment. Scale bar, 20 μm. (b) Measurement of stomatal aperture (a). A minimum of 60 stomatal pores were measured per assay. Different letters indicate significant differences (*P*<0.05, one-way ANOVA)

下, 野生型与*mdp60*突变体保卫细胞的微管组织方式仍存在明显差异. 野生型保卫细胞中微管排列更加致密、结构更粗大, 平均荧光强度高于50的微管数量为14条, 明显多于突变体的9条, 差异具有统计学意义(图6(b)). 再将保卫细胞的微管图像进行骨骼化(skeletonized)处理后(图6(c)), 我们进一步计算了微管的占有率(occupancy)/密度, 结果如图6(d)所示, 加入乙烯利(ETH)后, 无论是野生型还是突变体, 保卫细胞中微管密度总体均呈下降趋势, 且突变体在三种排布类型(Type I/II/III)下的微管密度均显著低于野生型. 整体来看(图6(e)), 野生型微管密度较未处理样本(-ETH)下降约5.2%, 而*mdp60*突变体则下降约8.3%, 二者差异明显. 此外, 我们还分析了反映微管成束能力(bundling)的参数-偏度(skewness)值(图6(f)). 结果显示, 在乙烯处理之前, 同为辐射状(Type I)排布时, *mdp60*突变体保卫细胞中微管

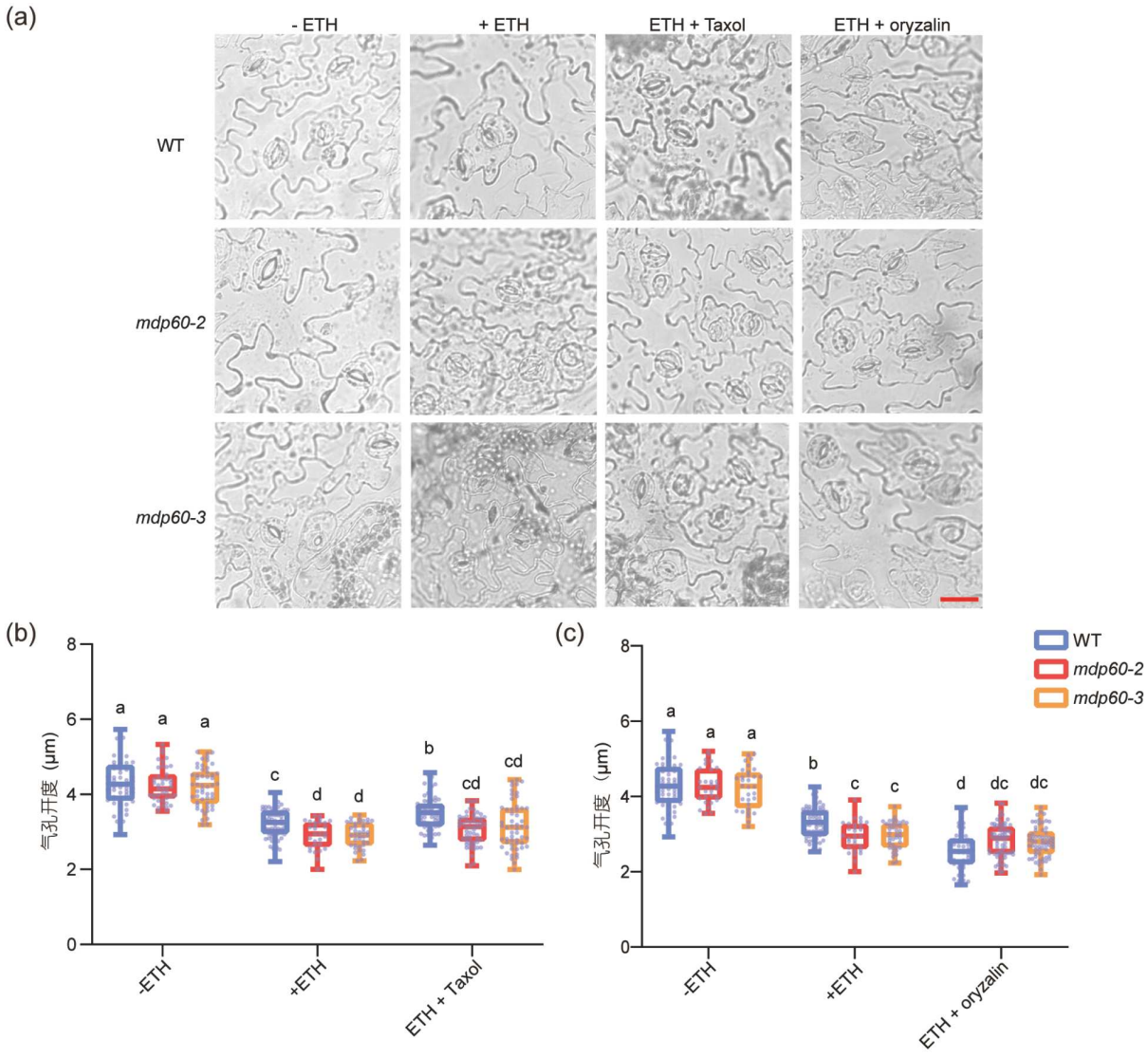


图 4 (网络版彩色)*mdp60*突变体对微管特异性药物不敏感. (a) 乙烯分别与微管特异性药物(微管稳定剂Taxol及微管解聚剂oryzalin)共同处理后的保卫细胞气孔开度表型. 比例尺, 20 μm. (b, c) 对应图(a)中Taxol与乙烯共处理组(b)或oryzalin与乙烯共处理组(c)的气孔开度统计分析. 每次实验至少测量60个气孔. 不同字母代表显著差异(P<0.05, 单因素方差分析)

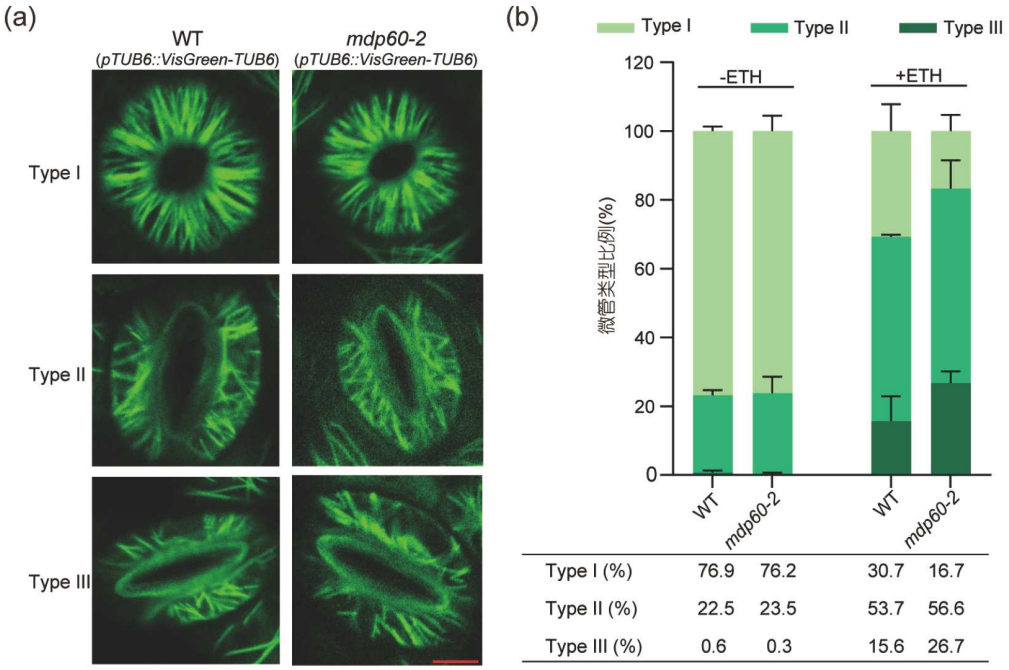
Figure 4 (Color online) Cortical microtubules are insensitive to microtubule-drug treatment in *mdp60*. (a) Pharmacological stomata bioassays with microtubule-specific drugs (microtubule-stabilizing drug Taxol and microtubule-depolymerizing drug oryzalin) in ETH-induced stomatal movement. Scale bar, 20 μm. (b, c) Measurement of stomatal aperture corresponding to the Taxol plus ETH treatment (b) or the oryzalin plus ETH treatment (c) shown in (a). A minimum of 60 stomatal pores was measured per assay. Different letters indicate significant differences (P<0.05, one-way ANOVA)

的成束程度远高于野生型, 表现为更多的微管聚集成束. 该趋势在乙烯信号作用后依旧存在, 在以聚合态微管为主的辐射状(Type I)和网状(Type II)结构中, *mdp60*突变体的微管成束能力依然显著强于野生型, 其偏度值整体高于野生型 (图6(g)).

2.5 保卫细胞中单根微管动态转换的检测

保卫细胞内微管纤维解聚和聚合速率也是影响其整体动态重排的关键因素之一. 为进一步探究这一过程, 我们选用*mdp60-2*/*pTUB6::VisGreen-TUB6*植株材料, 采用荧光漂白恢复技术(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP), 对单根微管的组装与动态变化进行了更直观的共聚焦显微观察及定量分析.

在实验中, 我们选定保卫细胞内特定区域, 对其中的一束微管进行定点激光漂白, 然后停止照射, 观察其在一段时间内的荧光恢复过程(图7(a)). 统计结果如图7



	-ETH		+ETH	
	WT	mdp60-2	WT	mdp60-2
Type I (%)	76.9	76.2	30.7	16.7
Type II (%)	22.5	23.5	53.7	56.6
Type III (%)	0.6	0.3	15.6	26.7

图 5 (网络版彩色)乙烯信号作用下，*mdp60*突变体保卫细胞中微管组织重排程度增强. (a) 野生型(*pTUB6::VisGreen-TUB6*)与*mdp60-2*突变体(*pTUB6::VisGreen-TUB6*)在0.04% ETH处理前后保卫细胞中微管排布的共聚焦显微镜观察结果. 比例尺, 5 μm. (b) 各类微管排布的比例统计. 实验设置至少3组独立重复, 共测量保卫细胞不少于200个, 数据以平均值±标准误表示

Figure 5 (Color online) Ethylene-induced microtubule reorganization is enhanced in *mdp60* guard cells. (a) Confocal images showing cortical microtubule organization in guard cells of WT (*pTUB6::VisGreen-TUB6*) and *mdp60-2* (*pTUB6::VisGreen-TUB6*) plants before and after treatment with 0.04% ETH. Scale bar, 5 μm. (b) Quantitative analysis of different microtubule arrangement types in guard cells. Three independent biological replicates were performed, and a minimum of 200 stomatal pores were measured per assay. Data represent mean±SEM values

(b)所示，漂白后恢复10 s时，在相应区域内野生型与*mdp60-2*突变体在荧光恢复水平上差异不显著. 恢复60 s时，*mdp60-2*突变体区域的平均荧光强度可恢复至原始水平的12.9%，而野生型仅恢复至10.8%，二者存在显著差异. 继续恢复至180 s时, 仪器检测到漂白区域的最大荧光恢复值，突变体达到18.6%，野生型为16.1%, 突变体恢复程度显著高于野生型, 推测, *mdp60*突变体中, 保卫细胞微管解聚和聚合的动态转换加快.

3 讨论与展望

植物无法像动物一样通过迁徙逃避逆境，只能通过自身调节适应环境. 随着气候变化加剧, 干旱等非生物胁迫频发，深入探究植物在逆境条件下的分子响应机制，对于提升植物的抗逆性与生存能力具有重要的理论与实践意义[38].

拟南芥微管结合蛋白MDP60属于TPX2(targeting protein for Xklp2)家族成员. 前期研究发现其受乙烯信号通路转录因子PIF3调控，并通过重组下胚轴表皮细胞的微管排布，正向调节水淹胁迫下植株的下胚轴伸长[28,29]. 鉴于全球淡水资源日益紧张, 干旱已成为植物生长中更为常见且严峻的胁迫因素，因此本研究进一步探究了MDP60在干旱响应中可能具备的功能. 通过叶片失水率、叶温及气孔开度实验发现：与野生型相比，*mdp60*突变体的离体叶片失水率较低，叶片温度相应升高；而*MDP60*过表达植株的离体叶片失水率较高，且其叶温明显低于野生型. 这一结果证实了MDP60参与植物干旱逆境信息传递. 已知目前对于MDP60的研究仅见于其在下胚轴自然伸长生长及水淹胁迫下的作用[28,29]，我们的实验结果进一步拓展了该蛋白除水淹外的其他非生物胁迫(如干旱)中的生理功能.

我们对四周龄Pro_{MDP60}:*GUS*拟南芥转基因材料进行GUS化学组织染色，结果显示保卫细胞中呈现出明显的蓝色信号，表明保卫细胞中表达*MDP60*. *MDP60*关于GUS染色的组织表达模式，在2018年的一篇文章中出现对培养基培养14天的拟南芥幼苗地上部分的整体观察[28]，本研究进一步对土壤生长25天的拟南芥植株的成熟保卫细胞进行了特定细胞水平定位. 为探究该基因在保卫细胞的作用提供了佐证. 在此基础之上,

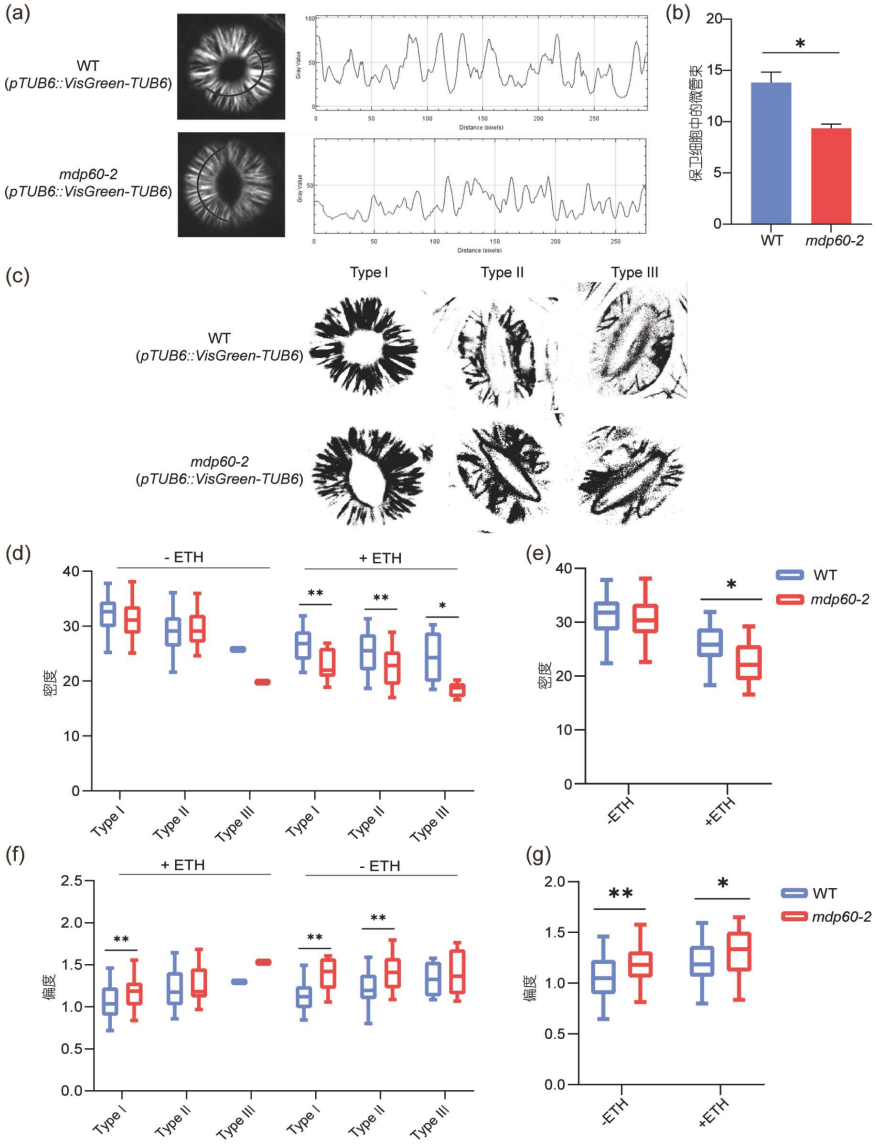


图 6 (网络版彩色)MDP60调节保卫细胞微管骨架的组织重排方式. (a) 野生型和*mdp60-2*突变体的保卫细胞中辐射状微管的荧光信号分布. 黑色弧线表示选定区域内GFP信号的连续强度变化及荧光强度高于50的峰值示意图. (b) 图(a)所示微管束中荧光强度大于50的峰值数量统计. 实验设置至少3组独立重复, $n\geq60$. 数据为平均值±标准差, *$P<0.05$(双尾t-test). (c) 经ImageJ软件骨骼化处理后的野生型和*mdp60-2*突变体保卫细胞图像. (d, e) 0.04% ETH处理前后保卫细胞中微管密度的变化情况. 其中, (d) 为不同微管排布类型(Type I/II/III)的微管密度变化, (e) 为保卫细胞内微管总体密度变化. 实验设置至少3组独立重复, $n\geq100$, 数据为平均值±标准差, 双尾t-test, *$P<0.05$. (f, g) 0.04% ETH处理前后保卫细胞中微管成束能力的变化情况. 微管成束能力通过荧光强度分布的偏度值进行评估, 其中(f)为不同微管排布类型(Type I/II/III)的成束能力变化, (g) 为保卫细胞内微管总体成束能力变化. 实验设置至少3组独立重复, $n\geq100$, 数据为平均值±标准差, 双尾t-test, *$P<0.05$

Figure 6 (Color online) MDP60 regulates microtubule organization and rearrangement in guard cells. (a) Distribution of GFP fluorescence signals of radial microtubules in guard cells of WT and *mdp60-2* plants. Black arcs indicate the selected regions used to analyze the continuous changes in GFP fluorescence intensity, and representative peaks with fluorescence intensity values greater than 50 are shown. (b) Quantification of peaks with GFP-tubulin intensity >50 in the microtubule bundles shown in (a). At least three independent biological replicates were performed, $n\geq60$. The data represent mean±SD. *$P<0.05$ (two-tailed t-test). (c) Skeletonized images of microtubule networks in WT and *mdp60-2* guard cells were generated using ImageJ software. (d, e) Changes in microtubule occupancy (density) in guard cells before or after 0.04% ETH treatment. Specifically, (d) shows the comparison of the occupancy of three microtubule arrangement types (Type I/II/III), and (e) shows the overall microtubule occupancy in guard cells. At least three independent biological replicates were performed, $n\geq100$. The data represent mean±SD. *$P<0.05$ (two-tailed t-test). (f, g) Changes in microtubule bundling capacity in guard cells before or after ETH treatment. The bundling capacity was evaluated by skewness values of fluorescence intensity distribution. Specifically, (f) shows the skewness values representing the bundling degree of the three microtubule arrangement types (Type I/II/III), and (g) shows the overall skewness of microtubules in guard cells. At least three independent biological replicates were performed, $n\geq100$. The data represent mean±SD. *$P<0.05$ (two-tailed t-test)

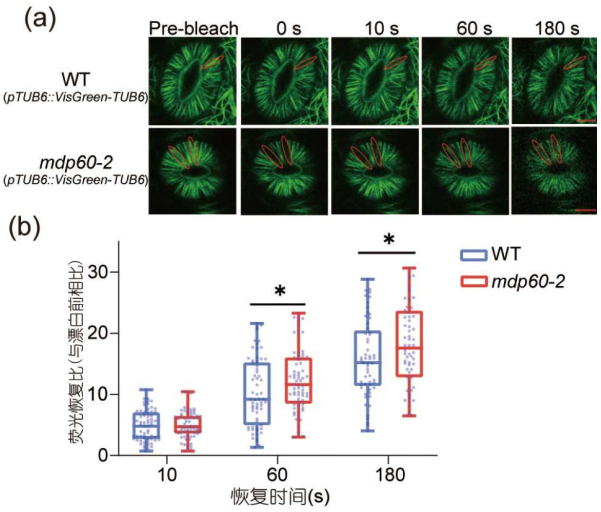


图 7 (网络版彩色)*mdp60*突变体保卫细胞中微管的动态转换速率加快. (a) 保卫细胞中荧光漂白恢复过程的时间序列图像. 比例尺, 5 μm. (b) 漂白区域内微管荧光信号强度的恢复比率统计结果. 实验设置至少7组独立重复, $n \geq 55$, $^*P<0.05$(双尾*t*-test)

Figure 7 (Color online) Accelerated microtubule dynamics in *mdp60* mutant guard cells. (a) Representative time-lapse image showing fluorescence recovery after photobleaching in guard cells. Scale bar, 5 μm. (b) Quantitative analysis of fluorescence signal recovery rates in bleached regions of guard cells. At least seven independent biological replicates were performed, $n \geq 55$, $^*P<0.05$ (two-tailed *t*-test)

我们进行了乙烯的气孔开度药理学实验. 经0.04%乙烯利处理两小时后, WT、*mdp60*突变体和*MDP60*过表达植株的气孔开度均出现下降, 证实乙烯能够诱导气孔关闭, 这与已有报道结果一致[11,16]. 其中, *mdp60*突变体的气孔孔径关闭幅度远大于野生型, 表明该突变体对乙烯信号更为敏感; 与之相反, 过表达株系(OE#1、OE#2)的气孔关闭程度显著低于野生型. 上述差异说明, 保卫细胞中*MDP60*表达水平变化可影响保卫细胞对乙烯信号的正常响应, 即MDP60对气孔运动过程发挥负调控作用. 值得关注的是, 先前研究显示, 乙烯处理条件下, *mdp60*突变体的下胚轴伸长速度较慢, 说明MDP60在水淹胁迫下对下胚轴伸长具有正调控功能[28]. 这一现象暗示, MDP60在拟南芥的不同组织器官中, 对乙烯信号的响应及调节模式可能存在差异. 鉴于MDP60属于微管结合蛋白, 本研究进一步通过外源施加微管特异性药物探究其对气孔开度的影响. 与单独ETH处理相比, ETH和微管解聚剂oryzalin共同处理后, 野生型和*mdp60*突变体的气孔开度均进一步下降, 但*mdp60*突变体对微管解聚剂敏感性低于野生型; 与之相对应, 在ETH与微管稳定剂Taxol共处理条件下, 气孔关闭均受到抑制, 但突变体气孔关闭的抑制程度弱于野生型, 说明*mdp60*突变体对微管稳定剂同样不敏感. 这些结果提示, *MDP60*功能缺失后, 可能通过影响保卫细胞微管骨架的正常动态转换, 进而调控气孔运动过程. 基于以上发现, 我们利用激光共聚焦显微镜对保卫细胞内微管骨架的动态转换进行直接观察与分析. ETH处理后, *mdp60*突变体中Type III排布的保卫细胞比例显著高于野生型, 说明MDP60功能缺失会导致微管难以维持辐射状(Type I)排布, 该现象与已有报道中MDP60通过维持下胚轴中的周质微管的横向排布以促进下胚轴伸长的作用机制相似[28]. ImageJ软件对保卫细胞微管的定量分析显示, ETH处理前, 野生型与*mdp60*突变体的微管密度无显著差异, 但野生型保卫细胞内的微管数量多于突变体; 在ETH处理后, 突变体保卫细胞微管密度远低于野生型, 处于解聚状态的微管增多. 从微管成束能力来看, ETH处理后突变体保卫细胞的微管成束能力增强并高于野生型, 这一结果表明MDP60具有解聚微管的功能, 该结果与Ma等人[28](2018)报道的MDP60在体外可解聚微管的结论一致, 微管发生解聚后会呈现碎片化分布, 进而导致整体密度的下降. 为更直观观察活细胞中微管的动态变化, 本研究在常规的密度和偏度指标分析之外, 进一步运用荧光漂白恢复(FRAP)技术分析野生型与突变体保卫细胞内微管的动态转换速率差异. 结果显示, *mdp60*突变体的微管转换速率快于野生型, 在荧光漂白后的3 min内, 突变体保卫细胞内微管的荧光强度恢复率可达18.6%, 而野生型只有16.1%. 微管骨架的快速转换使突变体保卫细胞中的微管能更迅速地从辐射状转变为解聚状, 这一动态特性也体现在微管排布类型的统计中: 乙烯处理下, *mdp60*突变体保卫细胞内解聚状微管数量的增幅较野生型高出11.4%. 该实验方法在2024年一项关于光诱导气孔开放过程中质膜蛋白重新分布的研究中亦被采用[26], 证明了该方法在气孔研究中的合理性与可靠性. 此外我们注意到, 在未经乙烯处理的情况下, 野生型和*mdp60*突变体保卫细胞中辐射状排布的微管也存在差异, 野生型的微管骨架更为粗壮, 推测这可能是导致野生型微管骨架转换速率低于*mdp60*突变体的内在原因之一. 目前, 有关微管结合蛋白(如MREL57[24]、SPIRAL1[25], 以及EB1[26]等)在气孔运动中的功能研究, 主要集中于ABA信号通路的作用机制. 然而, 除ABA之外, 乙烯作为另一种重要的植物激素, 也在气孔关闭过程中发挥关键调控作用[39]. 已有证据表明, 在气孔关闭的信号网络中, 乙烯与ABA之间存在互作, 共同调节气

孔的运动行为[40,41]. 但是, 与ABA相比, 乙烯调控气孔运动的具体分子机制尚不明晰. 已有研究表明, 乙烯不仅能够诱导气孔关闭, 还可介导微管骨架的重排过程[42]. 那么, 乙烯是否能够通过调控微管结合蛋白MDP60, 影响微管骨架的动态重排, 进而参与对气孔运动的调节呢? 为深入解析乙烯介导的气孔运动调控机制, 本研究重点探讨乙烯信号条件下微管结合蛋白MDP60在气孔运动中的功能. 通过我们的研究发现, *MDP60*在保卫细胞内表达, 其能够调节微管的动态转换速率, 从而影响乙烯信号诱导下微管的重排过程, 负调控乙烯诱导的气孔关闭, 影响蒸腾失水, 最终表现为调节拟南芥耐旱能力(作用模式图如图8所示).

此外, 也有越来越多的研究表明, 在乙烯参与调控气孔运动的信号网络中, 质膜上的NADPH氧化酶通过生成H_2O_2发挥着关键作用, 这一过程被认为是乙烯介导气孔反应的重要信号环节之一[3,43]. H_2O_2是一种活性氧(reactive oxygen species, ROS), 拟南芥中编码NADPH氧化酶的基因*RBOHD*和*RBOHF*发生突变后, 植株在H_2O_2生成及气孔关闭诱导方面均表现出明显受阻, 说明NADPH氧化酶在介导H_2O_2的产生和促进气孔关闭过程中具有关键作用[44,45]. 植物在响应乙烯信号时, 质膜上的NADPH氧化酶会催化生成胞外H_2O_2. 随后, H_2O_2可激活超极化激活钙离子通道HACCs(hyperpolarization-activated Ca^{2+} channels), 使得Ca^{2+}流入[46]. 同时, 胞外产生的H_2O_2可经由水通道蛋白进入细胞内部, 进一步激活超极化激活型钙离子通道HACCs. 细胞质中的H_2O_2随后通过包括内质网膜上的乙烯受体ETR1在内的多种信号蛋白传递信号, 最终诱导气孔关闭[12]. 基于上述机制, 推测在乙烯通过MDP60调控气孔运动的过程中, 可能也存在H_2O_2的参与, 我们采用ROS特异性荧光染料H_2DCF-DA对H_2O_2进行标记检测[2], 初步结果显示, 在乙烯信号作用下, *mdp60-2*突变体的保卫细胞中H_2O_2积累量高出野生型约30.5%(图S3), 即MDP60功能异常也影响保卫细胞中H_2O_2水平, 但具体作用还有待进一步探讨.

乙烯和ABA作为调节气孔运动的两个重要激素信号, 一方面有报道, 在乙烯缺乏的ACC合成酶突变体中ABA诱导气孔关闭的效果低于野生型, 表明ABA信号传递对乙烯的需求[41]. 但另一方面, 也有研究显示, 乙烯或乙烯前体物ACC抑制ABA诱导的气孔关闭[47,48]; 乙烯增加抑制ABA和茉莉酸诱导的气孔关闭, 阻碍干旱脱水下气孔关闭[43]. 以及近期发现, 乙烯通过经典的EIN2-EIN3信号通路上调表达ABI1和ABI2 (ABA-insensitive1/2), 增强蛋白磷酸酶PP2C的活性, 抑制ABA引起的气孔关闭[16]. 由此可见, 这两个激素信号在气孔运动的不同条件下, 既有相互协同又存在拮抗的复杂关系, 那么, 后续研究中, MDP60在脱落酸ABA激素信号下的表现也值得探索.

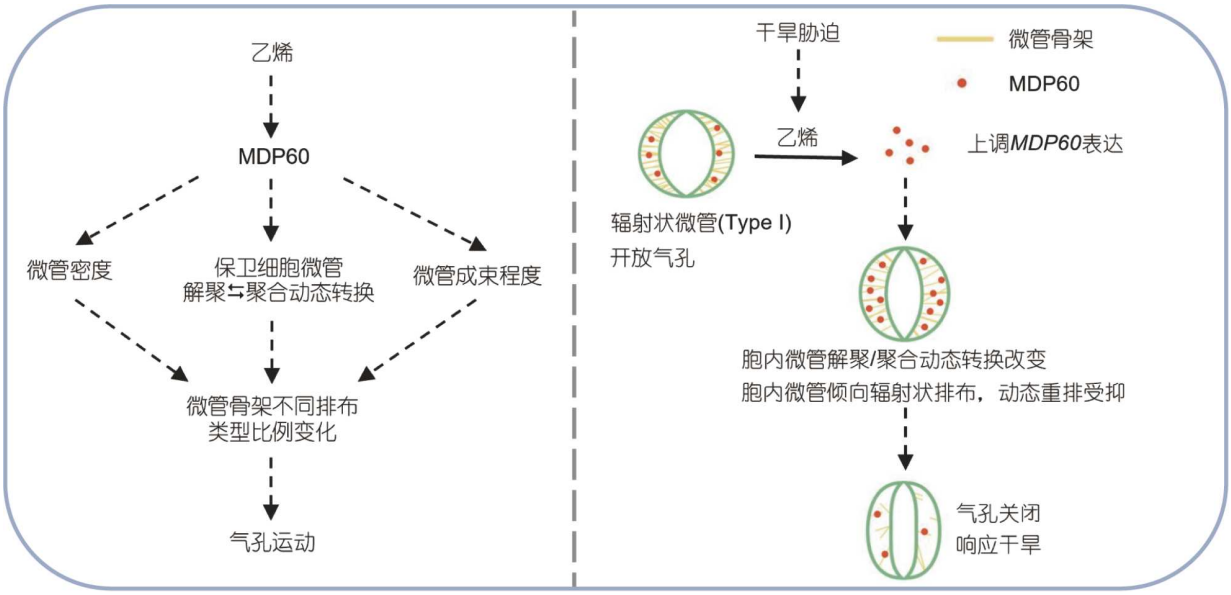


图 8 (网络版彩色)MDP60在乙烯诱导的气孔关闭中的作用模式图

Figure 8 (Color online) Function model of MDP60 mediating ethylene-induced stomatal closure

近年来, 随着全球生态环境问题日趋严峻, 极端气候事件频发, 气孔作为连接植物体内与外界环境的关键通道, 如何通过精准调控植物气孔运动, 实现二氧化碳吸收效率的提升, 从而促进光合作用并提高作物产量, 同时又能有效减少水分蒸腾损失、降低病原微生物和害虫入侵风险, 进而在兼顾作物生长效率与农业资源利用效益的基础上, 实现农业生产的最优平衡与可持续提升, 已成为越来越多学者重视的科学问题[3,5,49~51]. 目前, 该领域已取得重要进展. 一方面, 基于最优气孔行为理论构建的气体交换模型, 能够更准确地预测气孔响应策略, 为改进全球碳循环模型提供了新途径[50]. 另外, 气孔表型测量技术的突破, 如StoManager1等工具[51], 实现了对气孔与保卫细胞的自动化检测, 使得对植物生长和适应环境压力与气候变化的气孔调控的大规模研究成为可能, 这对全球总初级生产力(GPP)建模和估算具有重要意义, 为预测气候变化下植物生长和资源利用提供了关键数据支撑. 2025年, 研究者利用保卫细胞特异性启动子*pGC1*过表达ABA受体, 如RCAR6、RCAR10等, 与野生型相比, 干旱条件下, 这些转基因株系在未影响植物生物量积累的同时, 表现出更高的水分利用效率(water use efficiency, WUE)[52]. 以上为基于保卫细胞信息传递调控机制改造发展不损害植物光合碳同化的节水作物提供新的思路. 本文研究发现的微管结合蛋白MDP60同样参与气孔运动的调节, 未来有望作为生物工程技术改造的一个切入点.

因此, 深入研究气孔运动的分子机制, 揭示其调控网络与信号转导途径, 对发展可持续农业、推动生态修复以及制定气候变化应对策略具有重要的科学价值与应用前景. 本研究围绕微管结合蛋白MDP60在乙烯诱导气孔关闭过程中的功能展开, 旨在进一步揭示其在气孔运动调控中的作用机制, 完善对气孔动态调节网络的认识. 同时, 本研究的结果也有助于拓展微管结合蛋白MDP60在植物生理过程中的功能定位, 为作物的生产调控及其逆境适应等提供新的可靠理论支撑.

致谢 感谢中国农业大学毛同林教授提供的MDP60 CRISPR/Cas9编辑突变体(*mdp60-2*、*mdp60-3*)、MDP60过表达株系(*MDP60* OE#1、*MDP60* OE#2)和*ProMDP60:GUS*种子. 感谢中国科学院微生物研究所孔照胜教授提供的*pTUB6::VisGreen-TUB6*种子. 感谢清华大学黄善金教授和中国农业大学毛同林教授对本研究的指导与建议.

参考文献

1 Lawson T, Matthews J. Guard cell metabolism and stomatal function. Annu Rev Plant Biol, 2020, 71: 273–302
2 Wang H Q, Sun L P, Wang L X, et al. Ethylene mediates salicylic-acid-induced stomatal closure by controlling reactive oxygen species and nitric oxide production in *Arabidopsis*. Plant Sci, 2020, 294: 110464
3 Zhang J, Chen X, Song Y, et al. Integrative regulatory mechanisms of stomatal movements under changing climate. J Integr Plant Biol, 2024, 66: 368–393
4 Chen G, Qin Y, Wang J, et al. Stomatal evolution and plant adaptation to future climate. Plant Cell Environ, 2024, 47: 3299–3315
5 Trugman A T, Morgan B, Vargas G G, et al. The impacts of compounding droughts: scaling from stomatal responses to ecosystem dynamics. Tree Physiol, 2025, 45: tpae172
6 Zhu L, Wang X, Fu Y, et al. Plant cytoskeleton and stomatal movement (in Chinese). Chin Sci Bull, 2025, 70: 4350–4359 [朱蕾, 王向锋, 傅缨, 等. 植物细胞骨架与气孔运动. 科学通报, 2025, 70: 4350–4359]
7 Depaepe T, Hendrix S, Janse van Rensburg H C, et al. At the crossroads of survival and death: the reactive oxygen species-ethylene-sugar triad and the unfolded protein response. Trends Plant Sci, 2021, 26: 338–351
8 Binder B M. Ethylene signaling in plants. J Biol Chem, 2020, 295: 7710–7725
9 Fu S F, Chen P Y, Nguyen Q T T, et al. Transcriptome profiling of genes and pathways associated with arsenic toxicity and tolerance in *Arabidopsis*. BMC Plant Biol, 2014, 14: 94–119
10 Kendrick M D, Chang C. Ethylene signaling: new levels of complexity and regulation. Curr Opin Plant Biol, 2008, 11: 479–485
11 Agurla S, Gahir S, Munemasa S, et al. Mechanism of stomatal closure in plants exposed to drought and cold stress. Adv Exp Med Biol, 2018, 1081: 215–232
12 Desikan R, Last K, Harrett-Williams R, et al. Ethylene-induced stomatal closure in *Arabidopsis* occurs via *AtrbohF*-mediated hydrogen peroxide synthesis. Plant J, 2006, 47: 907–916

13 Kollist H, Nuhkat M, Roelfsema M R G. Closing gaps: linking elements that control stomatal movement. New Phytol, 2014, 203: 44–62
14 Hedrich R, Geiger D. Biology of SLAC 1-type anion channels-from nutrient uptake to stomatal closure. New Phytol, 2017, 216: 46–61
15 Jezek M, Blatt M R. The membrane transport system of the guard cell and its integration for stomatal dynamics. Plant Physiol, 2017, 174: 487–519
16 Zhang T, Li Z, Zhao Y, et al. Ethylene-induced stomatal closure is mediated via MKK1/3–MPK3/6 cascade to EIN2 and EIN3. JIPB, 2021, 63: 1324–1340
17 Fukuda M, Hasezawa S, Nakajima N, et al. Changes in tubulin protein expression in guard cells of *Vicia faba* L. accompanied with dynamic organization of microtubules during the diurnal cycle. Plant Cell Physiol, 2000, 41: 600–607
18 Yu R, Huang R F, Wang X C, et al. Microtubule dynamics are involved in stomatal movement of *Vicia faba* L. Protoplasma, 2001, 216: 113–118
19 Lian N, Wang X, Jing Y, et al. Regulation of cytoskeleton-associated protein activities: linking cellular signals to plant cytoskeletal function. JIPB, 2021, 63: 241–250
20 Rui Y, Anderson C T. Functional analysis of cellulose and xyloglucan in the walls of stomatal guard cells of *Arabidopsis*. Plant Physiol, 2016, 170: 1398–1419
21 Li T, Zhou X, Wang Y, et al. *AtCIPK20* regulates microtubule stability to mediate stomatal closure under drought stress in *Arabidopsis*. Plant Cell Environ, 2024, 47: 5297–5314
22 Liu T, Wang P, Wang Z, et al. SPY interacts with tubulin and regulates abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. Plant Direct, 2025, 9: e70063
23 Xi X, Wang P, Wang Z, et al. The microtubule-associated protein WDL3 mediates ABA-induced stomatal closure in *Arabidopsis* (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 95–106 [席小慧, 王攀, 王朝阳, 等. 拟南芥微管结合蛋白WDL3参与ABA诱导的气孔关闭过程. 科学通报, 2019, 64: 95–106]
24 Dou L, He K, Peng J, et al. The E3 ligase MREL57 modulates microtubule stability and stomatal closure in response to ABA. Nat Commun, 2021, 12: 2181–2195
25 Wang P, Qi S, Wang X, et al. The OPEN STOMATA1–SPIRAL1 module regulates microtubule stability during abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. Plant Cell, 2023, 35: 260–278
26 Zhong H, Wang S, Huang Y, et al. Endomembrane trafficking driven by microtubule growth regulates stomatal movement in *Arabidopsis*. Nat Commun, 2024, 15: 7967
27 An Y, Zhang J, Sun Z, et al. Ethylene antagonizes ABA responses in stomatal movement and seed germination by upregulating ABI1 and ABI2 at both the transcript and protein levels. Plant J, 2025, 123: e70423
28 Ma Q, Wang X, Sun J, et al. Coordinated regulation of hypocotyl cell elongation by light and ethylene through a microtubule destabilizing protein. Plant Physiol, 2018, 176: 678–690
29 Wang X, Ma Q, Wang R, et al. Submergence stress-induced hypocotyl elongation through ethylene signaling-mediated regulation of cortical microtubules in *Arabidopsis*. J Exp Bot, 2020, 71: 1067
30 Wang W, Zhao S S, Wang P, et al. Microtubules and heterotrimeric G-protein regulate ABA-induced stomatal movement synergistically (in Chinese). Chin Sci Bull, 2017, 62: 3757–3767 [王未, 赵思爽, 王攀, 等. 微管骨架与异三聚体G蛋白协同参与ABA诱导的气孔运动. 科学通报, 2017, 62: 3757–3767]
31 Higaki T, Kutsuna N, Sano T, et al. Quantification and cluster analysis of actin cytoskeletal structures in plant cells: role of actin bundling in stomatal movement during diurnal cycles in *Arabidopsis* guard cells. Plant J, 2010, 61: 156–165
32 Blatt M R, Brodribb T J, Torii K U. Small pores with a big impact. Plant Physiol, 2017, 174: 467–469
33 Jiang K, Sorefan K, Deeks M J, et al. The ARP2/3 complex mediates guard cell actin reorganization and stomatal movement in *Arabidopsis*. Plant Cell, 2012, 24: 2031–2040
34 Zhao H, Yin C, Ma B, et al. Ethylene signaling in rice and *Arabidopsis*: new regulators and mechanisms. JIPB, 2021, 63: 102–125
35 Munemasa S, Hirao Y, Tanami K, et al. Ethylene inhibits methyl jasmonate-induced stomatal closure by modulating guard cell slow-type anion channel activity via the OPEN STOMATA 1/SnRK2.6 kinase-independent pathway in *Arabidopsis*. Plant Cell Physiol, 2019, 60: 2263–2271
36 Li X, Li J, Wang W, et al. ARP 2/3 complex-mediated actin dynamics is required for hydrogen peroxide-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. Plant Cell Environ, 2014, 37: 1548–1560
37 Zou M, Guo M, Zhou Z, et al. MPK3-and MPK6-mediated VLN3 phosphorylation regulates actin dynamics during stomatal immunity in *Arabidopsis*. Nat Commun, 2021, 12: 6474–6487
38 She M, Zheng D, Zhang S, et al. Functional analysis of maize GRAS transcription factor gene ZmGRAS72 in response to drought and salt stresses. Agr Commun, 2024, 2: 100054
39 Wilkinson S, Davies W J. Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. Plant Cell Environ, 2010, 33: 510–525
40 Nazareno A L, Hernandez B S, Araujo W L. A mathematical model of the interaction of abscisic acid, ethylene and methyl jasmonate on stomatal closure in plants. PLoS One, 2017, 12: e0171065

41 Azoulay-Shemer T, Schulze S, Nissan-Roda D, et al. A role for ethylene signaling and biosynthesis in regulating and accelerating CO_2- and abscisic acid-mediated stomatal movements in *Arabidopsis*. New Phytol, 2023, 238: 2460–2475
42 Wang Y, Ji Y, Fu Y, et al. Ethylene-induced microtubule reorientation is essential for fast inhibition of root elongation in *Arabidopsis*. J Integr Plant Biol, 2018, 60: 864–877
43 Hasan M M, Liu X D, Yao G Q, et al. Ethylene-mediated stomatal responses to dehydration and rehydration in seed plants. J Exp Bot, 2024, 75: 6719–6732
44 Kwak J M. NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. EMBO J, 2003, 22: 2623–2633
45 Chater C, Peng K, Movahedi M, et al. Elevated CO_2-induced responses in stomata require ABA and ABA signaling. Curr Biol, 2015, 25: 2709–2716
46 Bienert G P, Møller A L B, Kristiansen K A, et al. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. J Biol Chem, 2007, 282: 1183–1192
47 Tanaka Y, Sano T, Tamaoki M, et al. Ethylene inhibits abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 2005, 138: 2337–2343
48 Chen L, Dodd I C, Davies W J, et al. Ethylene limits abscisic acid-or soil drying-induced stomatal closure in aged wheat leaves. Plant Cell Environ, 2013, 36: 1850–1859
49 Singh N, Giri M K, Chattopadhyay D, et al. Lighting the path: how light signaling regulates stomatal movement and plant immunity. J Exp Bot, 2025, 76: 769–786
50 Wang Y, Sperry J S, Anderegg W R L, et al. A theoretical and empirical assessment of stomatal optimization modeling. New Phytol, 2020, 227: 311–325
51 Wang J, Renninger H J, Ma Q, et al. Measuring stomatal and guard cell metrics for plant physiology and growth using StoManager1. Plant Physiol, 2024, 195: 378–394
52 Liu J, Schäufele R, Christmann A, et al. Guard-cell expression of abscisic acid receptors for engineering water-use-efficient plants without trade-offs in growth. New Phytol, 2025, 248: 690–705

补充材料

图S1 植物材料鉴定
图S2 MDP60参与乙烯信号下的气孔运动
图S3 乙烯信号下, *mdp60*突变体保卫细胞内H_2O_2含量升高

本文以上补充材料见网络版csb.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

Summary for “拟南芥微管结合蛋白MDP60在乙烯诱导气孔关闭中的作用”

The microtubule-associated protein MDP60 is involved in the ethylene-induced stomatal movement

Gaiqing Zhao†, Miao Hu†, Pengfang Sun, Zixuan Wang & Rong Yu*

College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100048, China
† Equally contributed to this work
* Corresponding author, E-mail: yurong@cnu.edu.cn

Stomata are specialized pore structures surrounded by a pair of guard cells and exert considerable effects on global carbon and water cycles by mediating gas exchange and water vapor between plants and the atmosphere. Therefore, to optimize CO_2 assimilation for photosynthesis and minimize water losses through transpiration, the stomatal movement must be tightly controlled in response to the changing climate. The underlying regulation of stomatal aperture involves a sophisticated signaling network, with the cytoskeleton (including microtubules in guard cells) playing a pivotal role. The dynamic reorganization of microtubules is orchestrated by various microtubule-associated proteins (MAPs). However, the precise molecular mechanisms by which specific MAPs integrate upstream signals to modulate microtubule dynamics and stomatal function remain an active area of investigation. Microtubule-Destabilizing Protein 60 (MDP60) is a previously identified *Arabidopsis* MAP whose gene promoter is a direct target of Phytochrome-Interacting Factor 3 (PIF3), a key transcription factor in ethylene signaling. This connection positions MDP60 as a potential link between ethylene perception and cytoskeletal rearrangement in guard cells, since the gaseous hormone ethylene is also an important regulator of stomatal physiology.

In this study, we focused on the coordination between MDP60 and microtubules during ethylene-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. Using *mdp60* loss-of-function mutants, *MDP60*-overexpressing lines (*MDP60 OE*), and a Pro_{MDP60}*::GUS* reporter line, we examined water loss rates of detached leaves from different seedlings, leaf temperatures, stomatal apertures, and confocal laser scanning microscopy for microtubule configuration in guard cells. Our results show that: (1) the *mdp60* mutant exhibits reduced transpirational water loss, concomitant with a significant increase in leaf temperature relative to the wild-type (WT). (2) Stomatal aperture assays revealed that the *mdp60* mutant displayed hypersensitivity to ethylene, closing more pronouncedly than WT. When co-treated with the microtubule-specific drugs (stabilizing or destabilizing agents, such as Taxol or oryzalin), the *mdp60* stomatal movement triggered by ethylene also showed attenuated responses to pharmacological agents, indicating an altered intrinsic microtubule stability. (3) Confocal microscopy revealed that ethylene treatment triggered more severe microtubule disassembly in *mdp60* guard cells. The proportion of *mdp60* cells with radial microtubule arrays dropped dramatically from 76.2% to 16.7% (a 59.5% decrease), a more substantial decline than that observed in WT controls (only from 76.9% to 30.7%). Consequently, the percentage of cells with fragmented and disassembled microtubules increased markedly in the mutant. Quantitative imaging analysis using ImageJ software confirmed that the overall microtubule density in *mdp60* guard cells was lower than in WT after ethylene application. (4) Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) experiments provided direct evidence for altered microtubule dynamics in *mdp60* with an enhanced recovery rate, indicating a higher depolymerization-polymerization turnover rate and faster cytoskeletal rearrangement than in WT.

Collectively, our findings provide insights into the microtubule-associated protein MDP60 as a regulator in ethylene-induced stomatal closure. It functions by modulating the dynamic assembly and stability of the microtubule cytoskeleton in guard cells. This work establishes a connection between MDP60 and the ethylene signaling pathway during stomatal movement and broadens our understanding of MDP60 function in plants beyond its established roles in hypocotyl cell elongation.

microtubule-destabilizing protein MDP60, stomatal movement, ethylene, microtubule

doi: 10.1360/CSB-2025-5653