蚕豆气孔保卫细胞中的 NOS 类蛋白定位及其功能分析

刘 新[①②] 王幼群[①] 贾文锁[①] 娄成后[①] 张蜀秋[①*]

(① 中国农业大学生物学院, 植物生理学与生物化学国家重点实验室, 北京 100094; ② 莱阳农学院生命科学学院, 青岛 266109.
* 联系人, E-mail: sqzhang@cau.edu.cn)

摘要 利用免疫荧光显微镜技术和免疫胶体金标记技术确定蚕豆气孔保卫细胞中存在一氧化氮合酶(NOS)类似蛋白, NOS 主要分布在气孔保卫细胞的细胞核、细胞质、叶绿体、线粒体以及细胞壁上. 局部灼伤和外源茉莉酸(JA)都能提高蚕豆叶片和表皮 NOS 活性和一氧化氮(NO)水平, NOS 的活性变化与叶片中的 NO 的变化趋势基本一致; NOS 抑制剂 L-NAME 可抑制 JA 诱导的 NO 水平的增加. 由此推测, NOS 途径是伤胁迫和 JA 诱导形成 NO 的主要途径. 药理学实验表明适当增加 Ca^{2+}浓度能够提高叶片 NOS 的活性和 NO 的水平, 说明蚕豆叶片 NOS 活性和 NO 的分布具有一定的钙依赖性. 保卫细胞中 NOS 及其催化形成的 NO 可能通过对气孔运动的调节参与植物对逆境的响应.

关键词 一氧化氮合酶 分布 气孔保卫细胞 钙依赖性 蚕豆

一氧化氮(nitric oxide, NO)是普遍存在于植物体的内源物质, 参与了多种植物生理过程. 近年来, 对植物体内NO的来源及NO合成途径的研究有所进展[1,2]. 已证明植物体内可能存在 3 种形成NO途径: 依赖于NADPH的硝酸还原酶(NR)或亚硝酸还原酶(NiR)途径[3]; 一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)途径和非酶途径[1,2]. Guo等人[4]在拟南芥根细胞中发现了一个NOS基因*AtNOS1*, 在许多植物体内也已检测出NOS的活性[5,6], 并证明植物体的生长发育、逆境、钙离子、伤害等因子影响NOS的表达及分布[7,8], 同时病原菌[9~11]、钙和钙调素[9]以及动物中NOS抑制剂[4,12]等都可改变其活性大小. 此外, 在过敏性反应和植物毒素产生的过程中都存在由NOS形成的NO[3].

茉莉酸(JA)是植物体内参与伤反应的重要内源物质. 业已证明, JA和NO均参与了低温、高温胁迫、UV照射、伤害、干旱、冷害、激发子和病原菌侵染等生物和非生物胁迫反应, 并且在一些生理效应上NO与JA之间存在着相互联系[13]. 例如, NO参与JA调控气孔运动的信号转导等[14]. Neill等人[15]发现, 脱落酸(abscisic acid, ABA)可提高豌豆气孔保卫细胞NO水平, ABA与NOS的抑制剂L-NAME (N^G-nitro-L-Arg-methyl eater)共处理, 可减弱ABA诱导的NO形成作用. 但目前还未见有关气孔保卫细胞中NOS分布及JA对NOS活性是否产生影响的报道. 为此, 我们以研究气孔的模式植物蚕豆为材料, 用NOS抗体定位, 利用免疫荧光方法结合激光共聚焦显微技术和免疫金标记技术研究了保卫细胞中 NOS 类蛋白的分布, 以及局部灼伤、外源 JA 和外源 Ca^{2+}浓度对其活性及分布的影响.

1 材料与方法

(ⅰ) 实验材料. 蚕豆(*Vicia faba* L)幼苗在光强 200 μmol·m^{-2}·s^{-1}, 相对湿度 60%, 光照时间 14 h/d, 昼夜温差 25℃/18℃条件下培养 3~4 周后备用. 取生长良好的蚕豆幼苗将幼叶叶尖灼伤 0.3 cm; 用 0.1 mmol/L JA 处理 3~4 周龄幼苗插枝, 分别在处理不同时间取叶片, 液氮速冻用于 NOS 活性测定.

(ⅱ) 保卫细胞 NOS 的免疫荧光定位. 取 3~4 周龄幼苗最上端完全展开的叶片, 撕取其下表皮转入 4%多聚甲醛, 26℃固定 1 h; Pipes 缓冲液(pH 6.9)洗 3 次, 每次 10 min. 用酶解液(含 2%纤维素酶 R10, 0.2%果胶酶 Y-23, 0.1 mmol/L PMSF 和 0.2% BSA)哺育 10~15 min. 然后进行免疫反应, 在 iNOS 单克隆抗体溶液(monoclonal anti-nitric oxide synthase, inducible, clone NOS-in (N-9657, Sigma), 1∶100)中 37℃孵育 1 h, 对照为正常的鼠血清; 用 Pipes 缓冲液冲洗 3 次, 每次 10 min. 在羊抗鼠 IgG-FITC (0.1 mg·ml^{-1})中 37℃孵育 1 h; 洗 3 次, 每次 10 min; 制片. 激光共聚焦显微镜(Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM, Bio-Rad, MRC 1024)下观察、扫描, 激发光波长 488 nm.

(ⅲ) 保卫细胞 NOS 的免疫胶体金定位. 取 3~4 周龄蚕豆最上端完全展开叶片, 将其分割成 1~2 mm ×3 mm 小块并迅速投入含 4%多聚甲醛和 1%戊二醛

的磷酸盐缓冲液(PBS, 0.15 mol/L, pH 7.2)中, 4℃固定 8 h. 经 PBS 充分洗涤后, 用 30%, 50%, 70%, 90%, 95%, 100%酒精系列脱水. 用 100%酒精/包埋剂置换, 4℃下渗透过夜. LR-White resin 包埋, 46℃下聚合成型. 在 LKB 切片机上切 2 μm 厚的半薄切片, 检测到有气孔的平切面. 在 LKB-8800 型超薄切片机上切取 80 nm 厚的连续超薄切片, 置铜网上, 37℃烘干备用.

将载有超薄切片的铜网用 1% BSA 在 37℃下封闭 20 min; 用 iNOS 单克隆抗体(Sigma)(1∶100, 含 1% BSA, 0.05% Tween20)37℃孵育 2 h, 对照用 1∶100 正常鼠血清代替; 用 PBS 冲洗 3 次, 每次 10 min; 胶体金标记的羊抗鼠二抗(1∶50, 10 nm, 中山公司; PBS 稀释, 含 1% BSA, 0.05% Tween20) 37℃孵育 1 h; 用 PBS 冲洗 3 次, 每次 10 min, 再用重蒸馏水冲洗 3 次, 每次 10 min; 用醋酸双氧铀染色 10 min; 用重蒸馏水洗 3 遍, 每次 10 min; 柠檬酸铅染色 10 min; 重蒸馏水冲洗铜网 3 次, 每次 10 min, 自然晾干. 在 JEOL-100CX 型透射电子显微镜下观察, 摄片.

(ⅳ) 蚕豆叶片 NOS 活性的测定. 切取 3~4 周龄蚕豆幼苗最上端完全展开的带柄叶片, 立即放入分别盛有蒸馏水、0.1 mmol/L 的 JA 的溶液中, 处理一定时间后取叶片测定 NOS 活性. 另取蚕豆叶片分别插入蒸馏水, 0.1 mmol/L JA, 2 mmol/L EGTA、0.2 mmol/L $CaCl_2$ 和 1 mmol/L $CaCl_2$ 溶液中处理 2 h. 取 0.1 g 处理过的叶片加 0.9 mL 0.9% NaCl 溶液(含 0.5 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF), 匀浆; 12000×g 4℃离心 10 min, 取上清, 沸水浴 3 min; 12000×g 离心 5 min, 取上清为 NOS 提取液. 在 540 nm 波长下, 测定消光值. 酶活性定义: 每毫克组织蛋白每分钟生成的 1 nmol NO 为一个活性单位(NOS 试剂盒, 晶美生物公司). 对照和每个处理都是 3~5 次重复的平均值和标准误差.

(ⅴ) 保卫细胞NO的免疫荧光定位. 将最上端完全展开叶片下表皮放于表皮条缓冲液中, 加入 DAF-2 DA (diaminofluorescein diacetate, Sigma)使总浓度为 10 mmol/L, 25℃下避光孵育 2 h左右. 取出后用表皮条缓冲液冲洗多次, 除去吸附的染料 [16]. 将处理好的表皮条置于载玻片上, 盖好盖玻片, 用 488 nm蓝光激发, 经激光共聚焦扫描显微镜(Lasersharp MRC-1024, Bio-Rad)扫描, 细胞中NO的静态分布图像在LaserSharp Acquisition 软件包下获得, 分别取得表皮组织的明场照片和处理后的荧光照片.

(ⅵ) 蚕豆叶片 NO 水平的测定. 用 NO 试剂盒(晶美生物公司)测定. 将 3~4 周龄蚕豆幼苗最上端完全展开的幼叶叶尖灼伤 0.3 cm, 灼伤后分别在一定时间取叶片 0.1 g, 液氮速冻, 加 0.9 mL 0.9% NaCl, 匀浆; 12000×g 离心 10 min, 取上清, 沸水浴 3 min; 12000×g 离心 5 min, 取上清, 稀释 10 倍用于检测. 在 530 nm 波长下, 测定消光值, 按照试剂盒说明, 计算组织中的 NO 水平. 对照和每个处理都是 3~5 次重复的平均值和标准误差.

2 实验结果

2.1 蚕豆保卫细胞 NOS 类蛋白的定位

(ⅰ) 保卫细胞中 NOS 的免疫荧光定位. 免疫荧光定位结果显示, 蚕豆叶片下表皮气孔保卫细胞的胞质和叶绿体中有较强的绿色荧光(图 1(c)和(d)), 说明 NOS 存在于蚕豆叶片下表皮的气孔保卫细胞中. 在同样条件下, 用鼠血清代替 NOS 抗体的对照, 无论气孔处于张开还是关闭状态, 都只是在保卫细胞腹壁上有很弱的荧光(图 1(a)和(b)); 而不加 NOS 抗体的对照中, 基本上没有观察到荧光物质的存在(结果未显示). 由于细胞壁和叶绿体有自发荧光, 免疫荧光定位结果难以说明 NOS 的亚细胞定位, 所以进

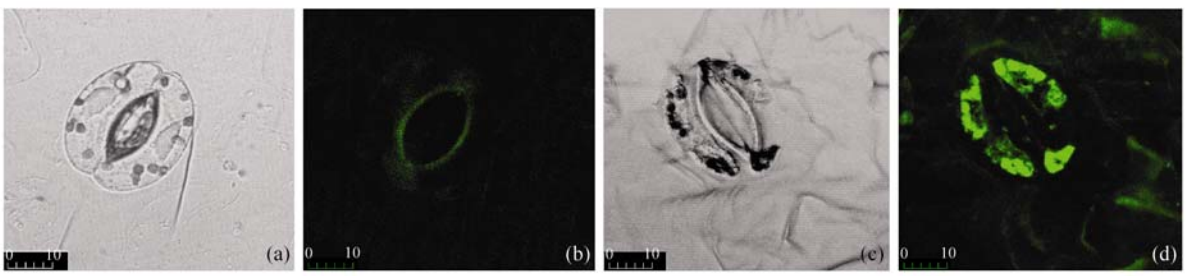

图 1 蚕豆叶片气孔保卫细胞中 NOS 的免疫荧光定位

(a)和(b) 用鼠血清代替一抗的对照, 仅在气孔保卫细胞腹壁上有微弱的荧光. (c)和(d) 在保卫细胞的胞质、叶绿体和细胞核上都发现荧光. 标尺示 10 μm

一步做 NOS 类蛋白的免疫金标定位检测.

(ⅱ) 保卫细胞中 NOS 的免疫胶体金定位. 从免疫胶体金标记结果看, NOS 主要分布在气孔保卫细胞的细胞核、胞质、叶绿体片层、线粒体、保卫细胞的背壁和腹壁上(图 2(e)~(j)); 而以鼠血清作一抗的对照切片上, 金颗粒分布得非常少(图 2(a)~(d)), 说明 NOS 在蚕豆叶片下表皮气孔保卫细胞中普遍分布. 为了了解伤胁迫和 JA 对 NOS 活性和 NO 水平的影响, 做了 NOS 活性和 NO 水平的动态变化的定量检测.

2.2　局部灼伤和外源 JA 对蚕豆叶片 NOS 活性和 NO 水平的影响

蚕豆叶片细胞中存在 NOS, 其活性在检测的 12 h 内基本保持稳定水平(图 3, 对照). 蚕豆幼苗叶片局部灼伤后 10 min 内 NOS 活性明显升高, 灼伤 2 h 后即恢复至对照水平. 当用 0.1 mmol/L JA 处理蚕豆叶片后, 虽然在 10 min 内叶片中的 NOS 活性没有明显变化, 但在处理后 0.5~2 h 叶片 NOS 水平明显升高, 随后逐渐下降至对照的水平(图 3).

从图 4 可知, 蚕豆叶片含有一定水平的内源 NO, 其含量在处理时间内(12 h)基本保持稳定. 对蚕豆幼苗叶片进行局部灼伤, 灼伤后 10 min 其 NO 水平就出现明显升高, 灼伤 2 h 后恢复至对照水平. 当用 0.1 mmol/L JA 处理蚕豆叶片后, 在 10 min 内没有明显改变叶片中的 NO 水平, 但在处理后 0.5~2 h 叶片 NO 水平明显升高, 随后逐渐下降至对照的水平(图 4). NO 的变化与 NOS 活性的变化基本一致. 由此推测,

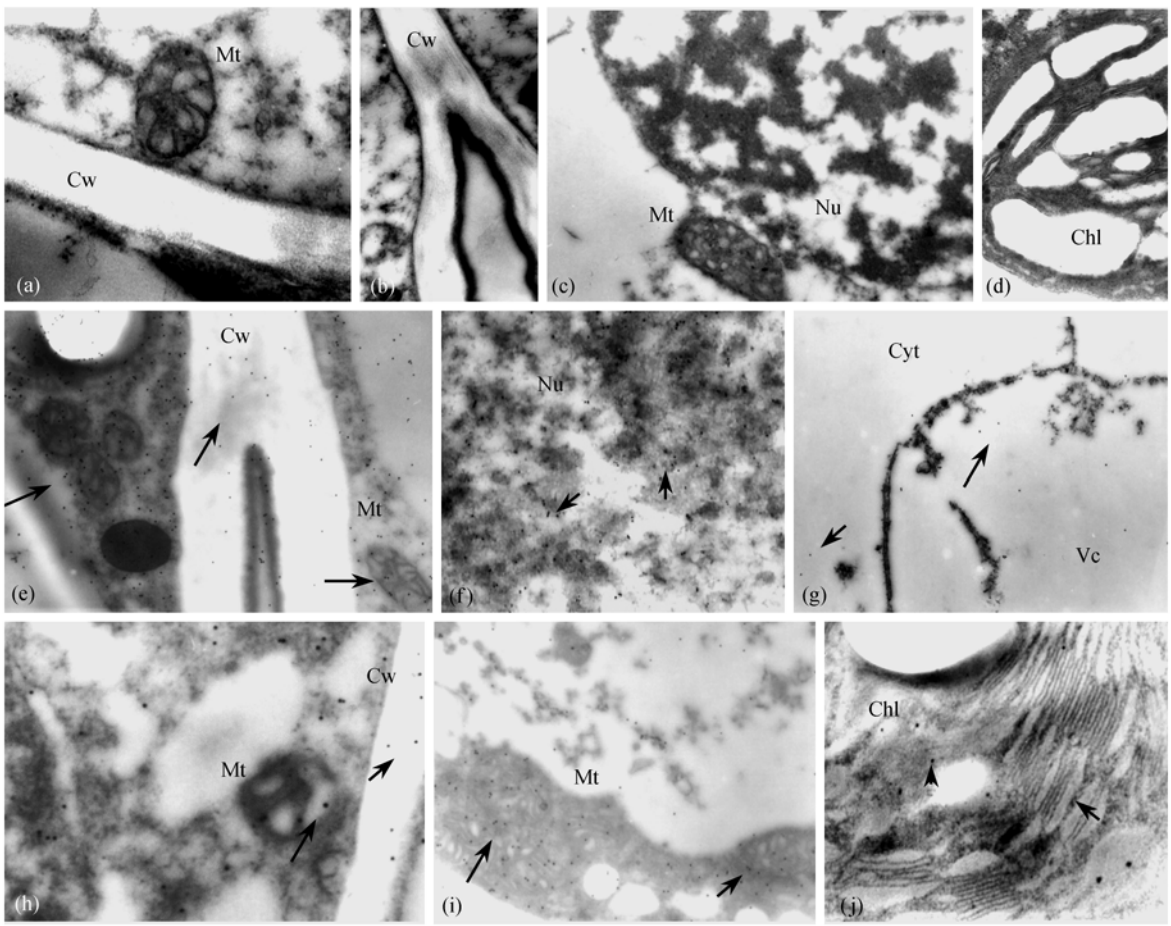

图 2　NOS 在蚕豆叶片下表皮气孔保卫细胞中的分布

(a) 用鼠血清代替一抗的对照, 在蚕豆气孔保卫细胞的背壁、胞质和线粒体上没有金颗粒的存在(×25000); (b) 对照, 在蚕豆气孔保卫细胞的腹壁上未见金颗粒的存在 (×15000); (c) 对照, 在蚕豆气孔保卫细胞的细胞核和线粒体上几乎没有金颗粒的存在(×25000); (d) 对照, 在蚕豆气孔保卫细胞的叶绿体上未见金颗粒的存在(×25000); (e) 在蚕豆气孔保卫细胞的腹壁上存在金颗粒(×21000); (f) 在蚕豆气孔保卫细胞的细胞核上存在金颗粒(×21000); (g) 蚕豆气孔保卫细胞的液泡和胞质有金颗粒存在(×21000); (h) 蚕豆气孔保卫细胞背壁、线粒体上有金颗粒存在(×21000); (i) 蚕豆气孔保卫细胞的线粒体上有金颗粒存在(×25000); (j) 在蚕豆气孔保卫细胞的叶绿体上有少量金颗粒存在(×30000). Chl, 叶绿体; Cw, 细胞壁; Cyt, 细胞质; GC, 保卫细胞; Mt, 线粒体; Nu, 细胞核; Vc,液泡. 箭头所示为金颗粒

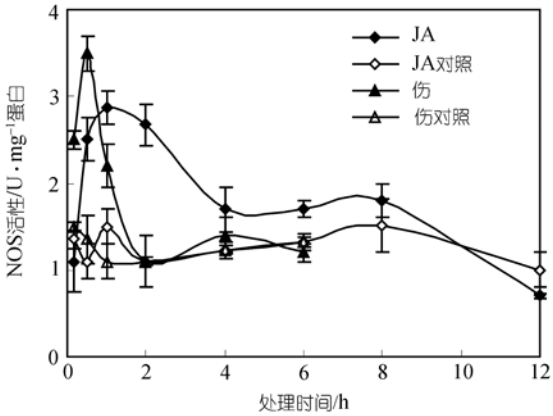

图 3 局部灼伤和外源 JA 对蚕豆叶片 NOS 活性的影响

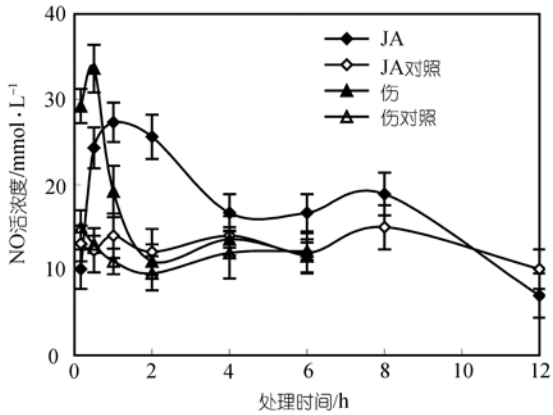

图 4 局部灼伤和 JA 对蚕豆叶片 NO 水平的影响

在蚕豆中, NOS 途径可能是伤胁迫和 JA 诱导形成 NO 的主要途径.

为进一步了解 JA 对叶片和叶片下表皮 NO 水平的影响, 我们用 NOS 抑制剂 L-NAME 处理蚕豆叶片. 由图 5 可知, 蚕豆叶片和下表皮中都存在一定水平的 NO, L-NAME 可以减少蚕豆叶片中的 NO 含量, 表明植物体内存在由 NOS 途径形成的 NO. 当用 0.1 mmol/L JA 处理蚕豆叶片和下表皮时, 其 NO 水平增加 1 倍以上, 并且增加的 NO 可以被 NOS 抑制剂所减弱. 而 NR 抑制剂 NaN_3 对叶片和表皮的 NO 含量没有明显改变(结果未显示). 由此也可进一步推测, JA 诱导形成的 NO, 有相当一部分来源于 NOS 合成途径.

2.3 外源钙对蚕豆叶片 NOS 活性和 NO 水平的影响

为了解蚕豆 NOS 对钙的依赖性, 我们测定了不同浓度外源 Ca^{2+}对蚕豆叶片 NOS 活性和 NO 含量的影响. 结果表明, 适当浓度的 Ca^{2+}能够提高叶片 NOS 的活性和 NO 的水平(图 6). 但当 Ca^{2+}浓度增加到一

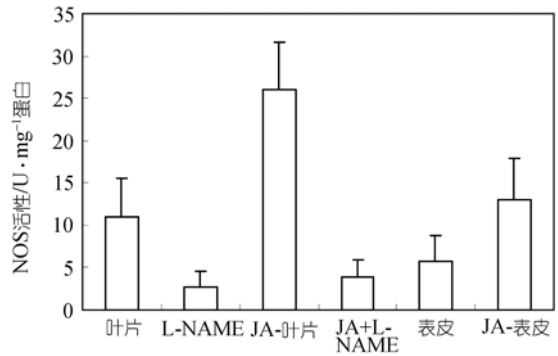

图 5 外源 JA 对蚕豆叶片和下表皮 NO 的影响

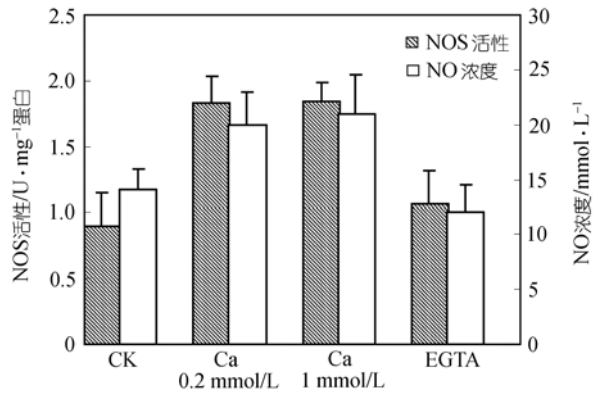

图 6 不同 Ca^{2+}浓度对蚕豆叶片 NOS 活性和 NO 水平的影响

定程度(1 mmol/L), NOS 活性和 NO 水平不再提高; 用钙螯合剂可消除钙的作用. 说明蚕豆叶片中的 NOS 活性可能具有一定的钙依赖性.

利用可透膜的 NO 荧光指示剂 DAF-2DA 结合激光共聚焦扫描显微技术观察了 Ca^{2+}和 EGTA 对保卫细胞中 NO 的影响. 结果显示, 在存在正常 $CaCl_2$ 浓度(0.1 mmol/L)下, 表皮细胞中含有一定量的 NO, 在保卫细胞胞质和腹壁上有绿色荧光, 叶绿体和细胞核中没有明显荧光; 用 EGTA 将钙螯合后, 气孔开度增大, 保卫细胞胞质的荧光强度减弱, 保卫细胞腹壁上仍存在荧光, 叶绿体中出现明亮的绿色荧光(图 7(c)和(d)), 这可能有部分是细胞壁和叶绿体的自发荧光. 进一步证明保卫细胞中来自 NOS 途径的 NO 与钙有一定的关系.

3 讨论

越来越多的实验证据表明, 植物体内有 NOS 的存在, 如 NOS 的抑制剂 NAME 能够降低伽蓝菜(*Kalanchoë daigrenothtiana*)和红豆杉(*Taxus brevifolia*)叶片薄壁细胞、保卫细胞和表皮细胞的 NO 水平, 能

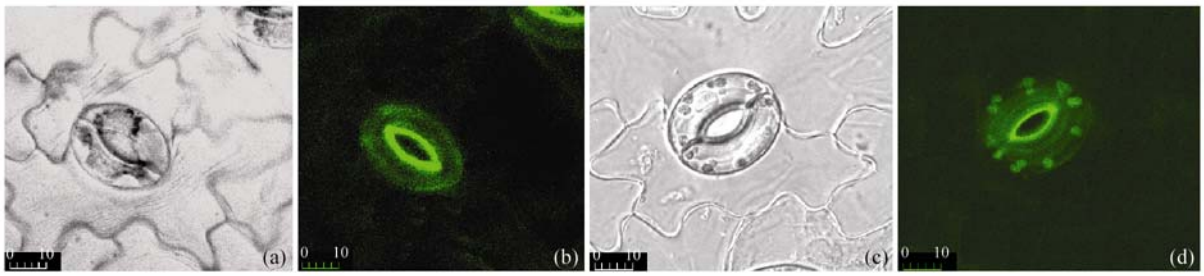

图 7 $CaCl_2$ 和 EGTA 对保卫细胞胞内 NO 的影响

标尺示 10 μm

够显著减少伤诱导(离心细胞)的NO合成及NO引起的编程性死亡 [7]. 在烟草、玉米和豌豆的过氧化物酶体、叶绿体和细胞核中都曾发现NOS类似蛋白 [5,11,17]. 不同植物, 不同细胞中NOS的分布情况不同. Corpas等人 [8]发现, 在豌豆植株中, NO存在于维管组织、表皮细胞、叶肉细胞和保卫细胞中, 并在亚细胞水平上证明NO是叶片过氧化物酶体的内源代谢物, 并检测到NOS类蛋白活性, 在衰老叶片中, 其活性下调约72%. 本研究免疫荧光和免疫胶体金实验结果表明, 在蚕豆叶片下表皮气孔保卫细胞的细胞壁、胞质、叶绿体、线粒体和细胞核中都存在NOS类蛋白(图 1 和 2). 据报道, NOS的分布常常与外界刺激和植物的生长发育阶段密切相关. 例如, Ribeiro等人 [17]报道, 玉米根尖分生区中的NOS类似蛋白存在于胞质中, 在伸长区NOS转移到细胞核中; 顶端组织和分裂组织下方的组织中的NOS广泛存在于胞质. 据此他们认为, 发育过程中NOS可从胞质向细胞核转移, 很可能是因为NOS参与了细胞核转录因子活化, 进而促进伸长区的快速生长, 即NO参与了细胞生长的信号转导过程. Guo等人 [4]在拟南芥中发现了NOS1 的基因, 并用*nos1* 突变体证明线粒体是ROS的重要来源; 在突变体中, H_2O_2、超氧离子、氧化脂类和氧化蛋白的水平也比较高. 由此提出, AtNOS1 在线粒体内具有清除ROS, 抗氧化胁迫和抗衰老的作用 [18]. 因为叶绿体也是活性氧产生的主要部位, 我们分析蚕豆气孔保卫细胞中的NOS在叶绿体内参与逆境诱导的NO的合成, 清除活性氧以起到抗逆的作用. 细胞核中的NOS可能与伤诱导基因的表达调控相关. 气孔保卫细胞对环境变化非常敏感, 其细胞壁是一个重要的信号转导部位, NOS类蛋白在细胞壁的存在应该与逆境响应有关, 亦是非常值得注意的. 有研究表明, NOS抑制剂可以阻断机械损伤引起的拟南芥NO的合成 [19]. 我们亦证明, 外施JA和局部灼伤能够提高叶片或叶片下表皮的NO水平和NOS活性(图 3 和 4). NOS抑制剂L-NAME可以减少局部灼伤和外源JA对蚕豆叶片NO合成的促进作用(图 5), 推测局部灼伤和JA可能主要是通过提高NOS的活性, 进而诱导NO的合成. 或许在伤反应中NOS途径是NO形成的主要途径. 当然, 仅从本研究结果还不能排除经其他途径产生NO的可能性.

研究表明, Ca^{2+}与NO的生理效应和NOS活性有密切联系. 例如, 羽扇豆根中NOS同动物中的系统型NOS一样是钙依赖性的 [20]; 病原菌侵染形成的NOS和大豆细胞提取物中NOS[9]及豌豆叶片的perNOS[5]都是钙依赖性的. Ribeiro等人 [17]在玉米幼苗幼叶和根尖中得到一个 166 kD的NOS类似蛋白, EGTA可以完全阻断其活性. 本研究证明, Ca^{2+}影响蚕豆叶片NOS活性, 适当增加Ca^{2+}浓度能够提高叶片NOS的活性和NO的水平(图6和7). 这一结果与Modolo等人 [21]的报道基本一致. 他们发现大豆子叶中存在组织型NOS, 其NOS活性大小是Ca^{2+}和NADPH依赖性的. 我们推测蚕豆叶片中的NOS活性及其表达具有一定的钙依赖性, 钙通过作用于NOS而影响NO的形成, NO含量及其分布又与气孔的开闭运动密切相关.

目前NO在植物体中的作用研究还处于初步阶段, 已证明NO在植物体内起重要作用, 但对产生NO的条件及其调节机制了解甚少. 不同刺激催化不同的部位形成NO的途径可能会有所不同, 确定不同区域NO的合成途径及其调控机制, 研究NO生理效应及产生NO的各条途径之间的关系, 了解NO与JA和其他信号分子之间的关系, 会加深人们对NO在植物体中的功能和分子机制的了解. NOS途径可能是植物NO的重要来源之一, 拟南芥中的AtNOS1 在植物生长、繁殖和激素信号转导中起着重要作用 [4,18,22,23]. 在植物器官和幼苗生长的不同阶段, NOS活性不同. 植物NOS基因分离或克隆会使人们深入了解NO形成与其

他信号分子之间的相互关系. 利用分子生物学技术研究外源JA对NOS基因及其蛋白的影响, 以了解植物体内NOS的种类和特性.

Desikan等人 [24]初步证明, 在拟南芥气孔保卫细胞中由硝酸还原酶(NR)催化合成的NO介导了ABA诱导拟南芥气孔关闭的过程. 新近的证据表明多胺可诱导NO形成 [22,25]. 本研究证实, 在JA诱导蚕豆气孔关闭的过程中有NO的参与, 并与NOS途径密切相关. 但是否也存在NO合成的NR途径, 可以用NR突变体进一步研究JA与NO的关系, 明确其NO的来源. 此外, 是否不同植物或响应不同刺激时产生NO的途径不同, 也是有待于进一步证明的问题.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号: 30370141)资助项目.

参 考 文 献

1 Crawford N M, Guo F Q. New insights into nitric oxide metabolism and regulatory function. Trends Plant Sci, 2005, 10(4): 195—200[DOI]

2 Crawford N M. Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. J Exp Bot, 2006, 57(3): 471—478[DOI]

3 Yamasaki H, Sakihama Y, Takahhashi S. An alternative pathway for nitric oxide production in plants: New features of an old enzyme. Trends Plant Sci, 1999, 4(4): 128—129 [DOI]

4 Guo F Q, Okamoto M, Crawford N M et al. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. Science, 2003, 302(5642): 100—103[DOI]

5 Barroso J B, Corpas F J, Carteras A, et al. Localization of nitric-oxide synthase in plant peroxisomes. J Biol Chem, 1999, 274(51): 36729—36733 [DOI]

6 Ninneman H, Maier J. Indications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants and the involvement in phtotconidiation of *Neurospora crassa*. Photochem Photobiol, 1996, 64: 393—398

7 Pedroso M C, Magalhaes J R, Durzan D. Nitric oxide induces cell death in *Taxus* cells. Plant Sci, 2000, 157(2): 173—180 [DOI]

8 Corpas F J, Barroso J B, Carreras A, et al. Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. Plant Physil, 2004, 136: 2722—2733[DOI]

9 Delledonne M, Xia Y, Dixon R A, et al. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. Nature, 1998, 394: 585—588[DOI]

10 Durner J, Wendehenne D, Klessig D F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(17): 10328—10333 [DOI]

11 Huang J S, Knopp J A. Involvement of nitric oxide in *Ralstonia solanacearum*-induced hypersensitive reaction on tobacco. In: Prior P, Elphinstone J, Allen C, eds. Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects. Berlin: INRA and Springer Edition, 1998. 218—224

12 Wojtaszek P. Nitric oxide in plants -To NO or not to NO. Phytochemistry, 2000, 54(1): 1—4 [DOI]

13 Huang X., Stettmaier K, Michel C, et al. Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. Planta, 2004, 218: 938—946 [DOI]

14 刘新, 石武良, 张蜀秋, 等. 一氧化氮参与茉莉酸诱导蚕豆气孔关闭的信号转导. 科学通报, 2005, 50(5): 453—458

15 Neill S J, Desikan R, Clarke A, et al. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. Plant Physiol, 2002, 128(1): 13—16 [DOI]

16 Foissner I, Wendehenne D, Langebartels C, et al. *In vivo* imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. Plant J, 2000, 23: 817—824[DOI]

17 Ribeiro Jr E A, Cunha F Q, Tamashiro W M S C, et al. Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. FEBS Lett, 1999, 445: 283—286 [DOI]

18 Guo F Q, Crawford N M. *Arabidopsis* nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. Plant Cell, 2005; 17(12): 3436—3450[DOI]

19 Garces H, Durzan D, Petroso M C. Mechanical stress elicits nitric oxide formation and DNA fragmentation in *Arabidopsis thaliana*. Ann Bot, 2001, 87(5): 567—574[DOI]

20 Cetuo M, Hernandez-Perera O, Martin R, et al. Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. FEBS Lett, 1996, 398(2-3): 159—164[DOI]

21 Modolo L V, Cunha F Q, Braga M R, et al. Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum f. sp.* meridionalis elicitor. Plant Physiol, 2002, 130(3): 1288—1297

22 Corpas F J, Barroso J B, Carreras A, et al. Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. Planta, 2006, 6: 1—9

23 He Y, Tang R H, Stevens R D, et al. Nitric oxide represses the floral transition. Science, 2004, 305: 1968—1971[DOI]

24 Desikan R, Reynolds A, Hancock J T, et al. Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defense gene expression in *Arabiodopsis* suspension cultures. Biochem J, 1998, 330: 115—120

25 Tun N N, Santa-Catarina C, Begum T S et al. Polyamines Induce Rapid Biosynthesis of Nitric Oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* Seedlings. Plant Cell Physiol, 2006, 47(3): 346—354[DOI]

(2006-06-13 收稿, 2006-09-21 接受)