



蚕豆 α 类扩张蛋白 VfEXPA1 参与调节气孔运动

魏鹏程^{①②†}, 陈苏^{①†}, 张秀清^①, 赵萍^①, 熊艳梅^①, 王文龙^③, 陈珈^①, 王学臣^{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 安徽省农业科学院水稻研究所, 合肥 230031;

③ 常德师范大学生命科学院, 常德 415000

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: xcwang@cau.edu.cn

2011-06-20 收稿, 2011-09-01 接受

国家重点基础研究发展计划(2006CB100100, 2003CB114300)和国家自然科学基金(30370129, 30421002)资助

摘要 与其他种类的植物细胞不同, 保卫细胞可以反复地进行扩张收缩运动, 进而达成气孔的开放和关闭. 在这个过程中, 调节保卫细胞细胞壁松弛的机理却不清楚. 从蚕豆表皮条中克隆了一个 α 类扩张蛋白, 并命名为 VfEXPA1. VfEXPA1 的表达受暗处理和水淹处理的影响, 但光照和 ABA 的处理并不改变 VfEXPA1 的表达. 进一步, 在烟草中过表达了 VfEXPA1. VfEXPA1 过表达植株中蒸腾和光合速率显著增加, 且光诱导的气孔开放速度也大大高于野生型. 实验结果表明, 气孔保卫细胞特异表达的扩张蛋白 VfEXPA1 调控了气孔开放过程.

关键词

α 类扩张蛋白
气孔开放
保卫细胞细胞壁
VfEXPA1
蚕豆

对于植物来说, 合理的调节体内和环境之间的水分和气体交换是生存的关键. 这个过程主要由镶嵌在覆盖植物表面的表皮细胞中的气孔调节. 气孔由一对特化的保卫细胞围绕构成, 主要存在于植物的叶片和茎部. 气孔是植物与环境间进行气体交换的门户, 气孔开放允许 CO_2 进入植物体内用于光合作用并散失水分, 而气孔关闭减少了用于光合作用的 CO_2 进入和蒸腾的水分散失. 气孔的启闭程度对植物的蒸腾、光合作用等具有重要的调控作用, 关系到作物的水分消耗和产量形成^[1]. 组成气孔的保卫细胞能非常灵敏地感受水分、光照、 CO_2 及植物激素等各种内外信号变化, 通过 Ca^{2+} , IP_3 , 异聚体 G 蛋白, 蛋白磷酸化与去磷酸化及各种离子通道来调控保卫细胞的膨压, 进而调节气孔的启闭, 控制植物对 CO_2 的吸收和对水分的利用. 保卫细胞已经被作为研究高等植物细胞信号转导的模式细胞而越来越受到研究者的关注^[2]. 因此, 研究气孔运动机理对于深入了解植物对逆境的适应、水分的合理利用和产量形成以及植物体内信息传递和信号转导的机制等都具有重

要的理论意义和潜在的应用前景.

影响气孔开关的因素很多, 昼夜节律、环境因素(光照、湿度、温度等)、激素、第二信使等都可以调节气孔的开关^[2]. 但无论何种调节, 最终都是通过保卫细胞的膨压和体积的变化来影响气孔的孔径. 有证据表明, 保卫细胞的体积和表面积可以在很短的时间内发生巨大改变, 在气孔由关闭到完全张开的过程中, 保卫细胞的体积和表面积要增大近 40%^[3,4], 因此, 保卫细胞体积和表面积的增大必然受到细胞壁的制约. 同时, 有报道指出, 在蚕豆气孔保卫细胞中, 细胞膨压可高达 5 MPa, 这意味着保卫细胞的细胞壁要承受 10 倍于普通细胞壁承受的压力^[3]. 因此, 我们认为, 保卫细胞中存在着一套特殊的机制, 使其细胞壁既坚固又有足够的弹性, 以适应高膨压和长期频繁的往复开关运动.

在与细胞壁松弛相关的酶类中, 人们发现, 扩张蛋白(expansin)起到了重要的作用, 这种蛋白可以催化离体细胞壁的酸生长^[5,6]. 扩张蛋白通常由 175~250 个氨基酸组成^[7], 包含 2 个结构域: 锚定结构域和催

英文版见: Wei P C, Chen S, Zhang X Q, et al. An α -expansin, VfEXPA1, is involved in regulation of stomatal movement in *Vicia faba* L. Chinese Sci Bull, 2011, 56, doi: 10.1007/s11434-011-4817-0

化结构域. 扩张蛋白在植物中广泛存在, 扩张蛋白家族分为 4 个亚家族: α -expansin (EXPA), β -expansin (EXPB), expansin-like A (EXLA) 和 expansin-like B (EXLB). 实验证明, α -expansin 和 β -expansin 可以引起细胞壁松弛, 但是 expansin-like A 和 expansin-like B 仅仅是在序列上与 expansin 存在同源性^[8]. 由于不同扩张蛋白定位于植物的不同部位, 对植物生长发育具有多种作用^[9]. 目前, 已知扩张蛋白的作用包括: 多种类型的细胞生长^[10,11]、器官发育^[12-14]、果实成熟^[15,16]、木质部形成、离区形成^[17]、授粉过程^[18]、寄生植物发育等^[6]. 扩张蛋白是一种酶蛋白, 目前还没有证据表明扩张蛋白可以水解细胞壁多糖组分中的任何一种. 扩张蛋白的酶活性依赖于环境的 pH, 在酸性条件下酶活性加强, 而在中性条件下酶活性丧失^[10,11]. 研究表明, 扩张蛋白可能结合在纤维素和多糖聚合物之间, 通过削弱两者之间的非共价键(氢键)联系, 破坏细胞壁的刚性结构, 使其在膨压的作用下, 实现壁的应力松弛作用. 由于扩张蛋白只破坏氢键, 具有快速、低能耗的特点. 同时, 由于扩张蛋白并不具有水解细胞壁多糖组分的活性, 它催化的壁松弛过程不会为细胞壁的结构带来破坏性的改造, 只需要微纤丝的滑动就可以实现壁的伸长. 对于需要快速往复伸缩的保卫细胞壁来说, 扩张蛋白可能是催化壁松弛作用的最为快速、低能耗的一种酶, 因此, 扩张蛋白可能通过调控细胞壁的松弛作用, 在气孔运动中起到重要的调节作用. 在拟南芥保卫细胞中, 就存在着保卫细胞特异表达的扩张蛋白 AtEXPA1^[19]. 我们最近的实验结果表明, AtEXPA1 参与了气孔运动的调控过程^[20]. 但是, 我们并不知道, 保卫细胞扩张蛋白在气孔运动中的调节作用是植物中的普遍作用方式, 还是拟南芥所特有的. 在本研究中, 我们从气孔研究模式植物蚕豆表皮条中克隆了一个 α 扩张蛋白基因, 命名为 *VjEXPA1*. 对 *VjEXPA1* 基因的表达模式和功能分析表明, *VjEXPA1* 在气孔开放的过程中起重要调节作用.

1 材料与方法

(i) 植物材料的准备. 蚕豆种子经 0.1% HgCl_2 浸泡 10 min 消毒, 用水洗净后, 在 25℃ 孵育 2~3 d 萌发. 当萌发种子根长达到 0.5 cm 后, 转至温室中培养. 培养条件为湿度 70%, 12 h 光照, 12 h 黑暗, 光强为 $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 日间培养温度为 22℃, 夜间温度为

17℃. 在成熟叶片上取表皮条用于 RNA 和蛋白的提取. 烟草植株种植于含有营养土的 3 L 培养花盆中. 培养条件为 2 h 光照/12 h 黑暗, 光强为 $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 日间培养温度为 25℃, 夜间温度为 22℃.

(ii) 基因的克隆. 通过与已有扩张蛋白序列比对, 利用共有序列设计保守区段引物为 5'-GTGAT-GCCTCTGGCACAA-3' 和 5'-GGAGGATTACACCA-CCC-3'. 同时, 收集蚕豆成熟叶片下表皮的表皮条, 提取 RNA 并反转录为 cDNA, 作为克隆扩增的模板. 扩增产物与 pGEM-T (Promega, 美国) 连接并用于测序. 进一步, 利用 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (ClonTech, 美国) 试剂盒, 通过两步法 RACE 获得全长基因序列. 按照试剂盒说明书, 利用 5'-CDS primer 和 SMART II Oligonucleotide 将 RNA 反转录为 5'-RACE-Ready cDNA. 利用 *VjEXPA1* 核心序列引物 5GSP1 (5'-ATTGAATGAACATCACCAGC-ACC-3') 和 UPM (Universal Primer A Mix) 进行第一轮 PCR 扩增, 产物作为第二轮扩增的模板. 第二轮扩增使用 *VjEXPA1* 引物 5GSP2 (5'-GCACCACCTTGGA-TCATCGTTGCATC-3') 和 NUP (Nested Universal Primer A), 扩增所得序列克隆进入 pGEM-T 中测序验证. 对于 3'-RACE, 利用 3'-CDS primer 反转录获得 3'-RACE-Ready cDNA, 第一轮 PCR 使用 UPM 和 3GSP1 (5'-CTTCTGGCACAAATGGGTGGGGCATG-3'), 接着利用 NUP 和 3GSP2 (5'-TCCATCAAAGGCTCAAG-AACTTCATGGCAAC-3') 进行第二轮巢式 PCR, 最终获得 3' 端基因序列. 将两端序列拼接设计全长引物, 最终获得 *VjEXPA1* 基因全长序列.

(iii) 载体的构建和植物转化. *VjEXPA1* 全长序列通过 5'-CCTTCTAGAATGACTCAAAAGCTTAG-AATG-3' 和 5'-AATGAGCTCCTAAAATTGAGCTCC-TTGAAAG-3' 从 cDNA 中扩增获得, 利用 *Xba* I 和 *Sac* I 两个限制性酶切位点插入到双元载体 pBI121^[21] 中的 35S 强启动子之后. 载体测序验证后, 导入农杆菌菌株 LBA4404 中, 利用叶盘法转化烟草. 转基因植株通过 Kana 抗性筛选获得, 并通过基因组 PCR 和 Western blot 分析验证.

(iv) 气孔密度和开度的测量. 从蚕豆或烟草成熟叶片的下表皮撕取表皮条, 用小号软毛刷小心刷净叶肉细胞和表皮细胞. 对同一批表皮条, 取 2~3 个样品通过中性红染色, 确认叶肉细胞和表皮细胞的清除程度. 开始实验前, 首先将表皮条置于含有 50 mmol/L

KCl 和 100 $\mu\text{mol/L}$ CaCl_2 的 10 mmol/L MES (pH 5.8) 溶液中, 黑暗孵育约 0.5 h, 至气孔完全关闭. 随后, 用光强为 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 的冷光源照射诱导气孔开放. 每次测量均随机统计 5 个显微镜视野下各 10 个气孔的开度. 实验重复 3 次, 计算平均值. 利用印记法在显微镜下统计表皮条中的气孔密度^[22].

(v) 光合速率和蒸腾速率的测量. 于早上 9:00~10:00 间, 用手持光合作用测定系统 CI-510 (CID, Camas, 美国) 测量光合速率和蒸腾速率. 实验重复 3 次.

(vi) 原位杂交和免疫组织化学定位. 原位杂交中的样品固定、切片杂交均按标准流程进行. *VfEXPA1* 特异性探针通过 5'-TCCATCAAAGGCTC-AAGAACTTCATGGCAACC-3' 和 5'-CAATCATACT-AATATCAATTGAAAAGA-3', 在基因 3' 非翻译区通过 PCR 扩增并克隆至 pGEM-T 载体中. 利用地高辛试剂盒 (Roche Diagnostics, 德国) 在体外翻译和标记正义和反义探针, 并利用碱性磷酸酶结合的地高辛抗体结合显色检测. 原位杂交实验共重复 3 次^[23].

利用相同的样品切片, 在含有 1% BSA 的 TBST (10 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.05% (v/v) Tween-20, pH 7.5) 溶液中室温封闭 2 h, 洗去封闭液后, 用 1:200 稀释的 Anti-AtEXPA1^[20] 多克隆抗体 37℃ 孵育 2~3 h. 在用 TBST 洗涤 3 次后, 碱性磷酸酶二抗孵育 2 h 后, 洗去非特异结合, 利用 NBT/BCIP 显色^[24].

2 结果

2.1 扩张蛋白在气孔中的分布

由于成熟叶片中细胞伸长活动并不活跃, 成熟叶片中扩张蛋白的功能有待探讨. 为了回答这个问题, 我们利用拟南芥 AtEXPA1 抗体, 对蚕豆成熟叶片中的扩张蛋白进行了免疫组织化学染色定位. 我们发现, 绝大多数的信号都集中在保卫细胞中, 此外, 在维管束附近发现了很少量的颜色反应, 其颜色也远较保卫细胞的颜色浅 (图 1(a), (b)). 在高倍率下仔细观察, 我们注意到, 抗体识别的信号主要集中在保卫细胞的细胞壁上, 且在壁上的信号分布并不均一, 在保卫细胞腹侧的信号强度要低于背侧 (图 1(c), (d)).

2.2 *VfEXPA1* 的克隆和进化分析

为了克隆保卫细胞中的扩张蛋白基因, 我们首

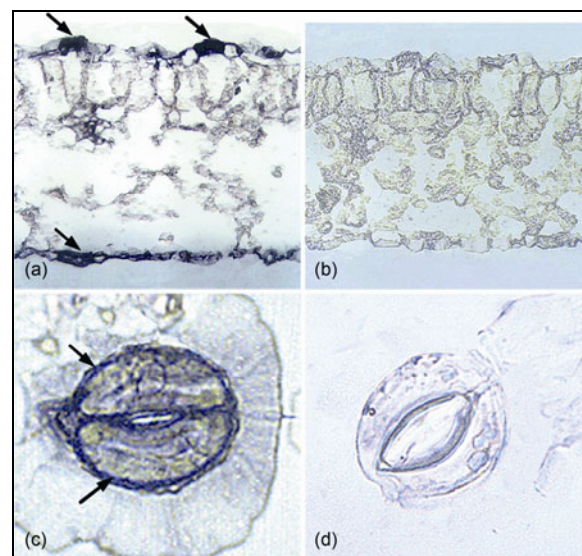


图 1 蚕豆成熟叶片中扩张蛋白的免疫组织化学定位 (a) 和 (c), 利用 AtEXPA1 抗体免疫染色; (b) 和 (d), 未免疫血清对照

先对已知的多种扩张蛋白序列进行比对, 从中选取了在 N 端编码约 90 个氨基酸的高度保守结构的序列, 设计 RT-PCR 引物. 同时, 我们收集了主要成分为保卫细胞的蚕豆成熟叶片表皮条, 用于 RNA 的抽提, 并反转录为 cDNA 作为 RT-PCR 扩增模板. 从中, 我们得到了一段 536 bp 的序列 (GenBank 收录号: AF464953), 通过测序, 证明为蚕豆扩张蛋白基因的一个片段. 进一步, 利用 RACE 技术, 我们获得了该基因的全长 cDNA 序列, 测序结果表明, 该序列编码了一个新的蚕豆扩张蛋白 (GenBank 收录号: EF190969), 我们将该基因命名为 *VfEXPA1*. 序列分析表明, 该基因含有 765 bp 的编码框, 编码一个分子量约为 27.5 kD 的扩张蛋白. 此外, 克隆获得的基因序列中还含有 45 bp 的 5' 非编码区和 318 bp 的 3' 非编码区. SignalP 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) 分析预测, *VfEXPA1* 蛋白在 N 端含有 27 bp 的信号肽, 切除信号肽后的成熟蛋白为 25 kD. 为了进一步解释 *VfEXPA1* 的性质, 我们利用拟南芥扩张蛋白家族序列与 *VfEXPA1* 推测氨基酸序列, 构建了进化树, 结果表明, *VfEXPA1* 属于 α 类扩张蛋白亚家族, 其中 AtEXPA8 与 *VfEXPA1* 在氨基酸序列上相似性最高 (75%). 进一步, 将 *VfEXPA1* 与目前已知多种典型 α 类扩张蛋白序列比对, 同样表明, *VfEXPA1* 是一个 α 类扩张蛋白. *VfEXPA1* 在保守的 HFD (His-Phe-Asp) 结构域之前有一个 α 插入结构, 在 C 端也出现了 4 个

保守的“GWCN”氨基酸残基序列, 这是 2 个典型的 α 类扩张蛋白的结构特征^[25] (图 S1). 同时, 比对分析也发现, VfEXPA1 具有典型的扩张蛋白纤维素结合区和类 family-45 endoglucanase 催化活性区, 这进一步表明, VfEXPA1 具有扩张蛋白的典型结构特征.

2.3 VfEXPA1 的表达模式

为了研究 VfEXPA1 的表达模式, 将生长 20 d 的蚕豆植株的根、茎、叶分别提取 RNA, 用于 Northern blot 分析. 结果显示, VfEXPA1 在成熟叶片中的表达量最高, 在茎中也可以检测到相对较低的表达, 但在根中没有检测到 VfEXPA1 的表达 (图 2(a)). 同时, 我们也检测了 VfEXPA1 在不同环境条件处理下的诱导表达状况. 利用 Northern blot 检测了蚕豆植株在光照、黑暗、ABA 以及水淹处理 2 h 后, VfEXPA1 表达强度的变化. 结果表明, 仅有暗处理和水淹处理可以轻微地上调 VfEXPA1 的表达, 而 ABA 和光诱导均不会改变 VfEXPA1 表达的强度 (图 2(b)).

为了精细确定 VfEXPA1 的表达位置, 设计了基因特异性探针, 利用原位杂交方法在蚕豆成熟叶片中进行了分析. 与前述免疫组织化学结果相似, VfEXPA1 的转录本主要在保卫细胞中富集, 除此之外, 仅在维管束细胞中可以检测到非常微弱的信号 (图 2(c), (d)).

2.4 过表达 VfEXPA1 加快气孔开放

为了探究 VfEXPA1 的功能, 使用 35S 启动子驱动, 在烟草中进行超表达实验. 转基因共获得 60 株抗性植株, 从中随机挑选出 6 株, 用 Western blot 进行超表达实验的分子检测. 在包括野生型对照的所有植株中, 利用 AtEXPA1 抗体均检测出了一条约为 25 kD 的条带, 不同的是, 6 株转基因材料中的免疫条带亮度远远大于野生型 (图 3), 这表明, VfEXPA1 在转基因植株中成功过表达. 将其中的 line2 和 line34 分别命名为 OE1 和 OE2, 进一步进行生理学分析.

为了检测 VfEXPA1 在气孔运动中可能的作用, 我们比较了野生型植株和超表达植株在光诱导下的气孔开放进程. 从材料成熟叶片撕取下表皮, 首先, 黑暗处理使气孔完全关闭, 随后, 用冷光源照射诱导气孔开放, 每隔 60 min 统计气孔开放程度, 绘制运动曲线. 比较两者的运动模式表明, 转基因植株的气孔开放速度远远大于野生型 (图 4(a)), 特别是在

光诱导早期, 这种差别非常明显. 但是, 值得注意的是, 转基因植株气孔的最终开度并没有显著改变 (图 4(a)).

2.5 过表达 VfEXPA1 提高了植物的光合速率和蒸腾速率

既然 VfEXPA1 能够加速气孔张开, 这种特性会为植物的生理活动带来什么影响? 由于光合作用和蒸腾作用与气孔的开放密切相关, 我们测量了在早上光照刚刚恢复后 1 h 的野生型和转基因植株的蒸腾速率和光合速率. 结果表明, 超表达 VfEXPA1 转基因植株的蒸腾速率和光合速率显著高于野生型 (图 4(b), (c)). 气孔的密度和灵敏度都可能影响了光合速率和蒸腾速率, 因此, 首先统计了转基因植物和野生型中的气孔密度. 如表 1 所示, 在 OE1, OE2 和野生型中, 气孔密度基本一致. 但是, 在光照 1 h 后, 转基因植株的气孔开度远远大于野生型 (图 4(d)), 这暗示, 气孔灵敏度的提高是 VfEXPA1 超表达引起蒸腾速率和光合速率提高的原因.

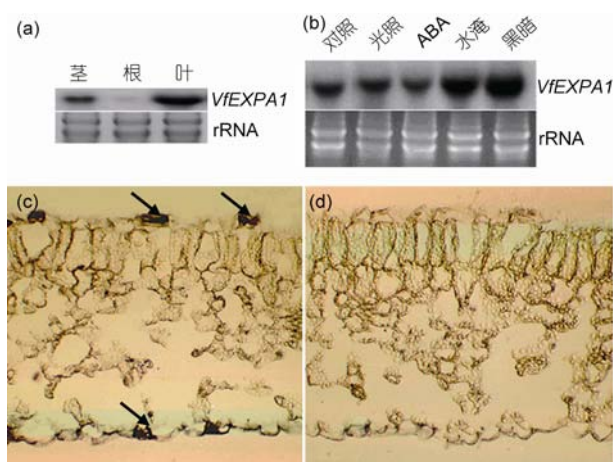


图 2 VfEXPA1 的表达模式分析
(a)和(b), Northern blot 分析; (c)和(d), 原位杂交定位, 其中(c)为反义探针检测, (d)为使用正义探针作为阴性对照

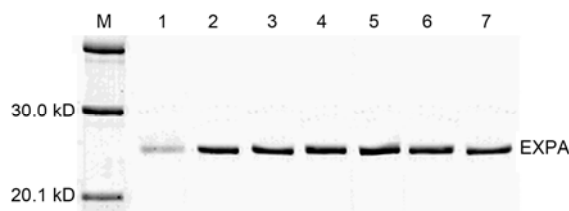


图 3 过表达烟草的 Western blot 检测

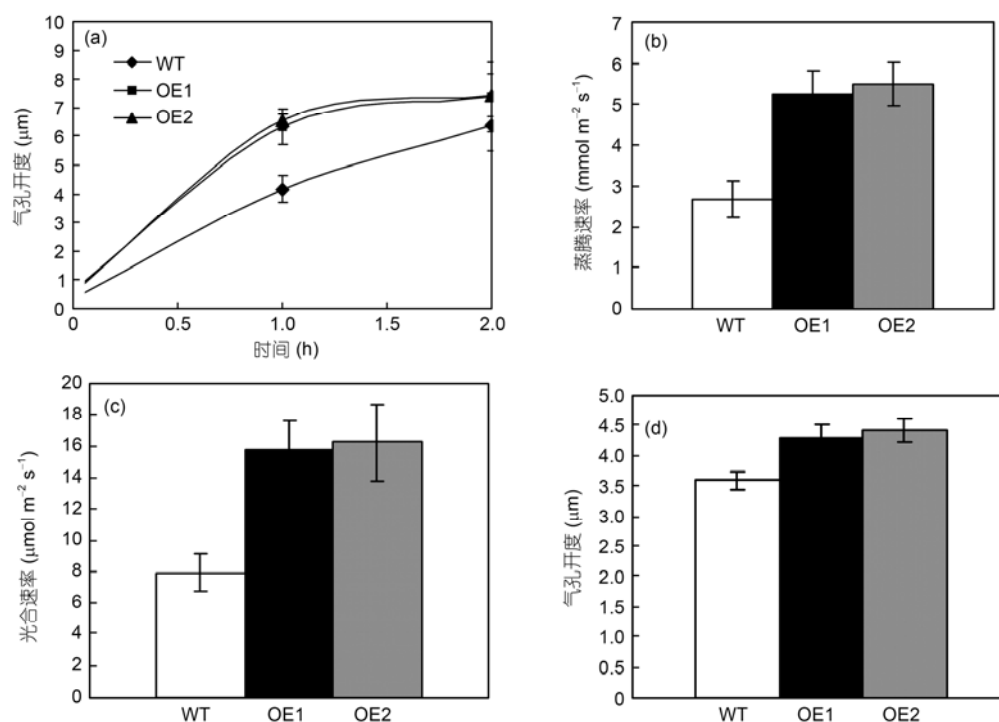


图4 VEXPA1 过表达植株中的光合速率、呼吸速率和气孔运动的检测

表1 野生型和超表达植株中的气孔密度

样品	野生型	OE1	OE2
上表皮	58.6±2.9	60.3±1.8	56.7±3.8
下表皮	139.6±4.5	137.8±3.2	135.2±6.1

3 讨论

通常, 扩张蛋白在生长旺盛的部位功能活跃^[26]. 叶片中含有多种具有活性的扩张蛋白^[27,28]. 前人的研究发现, 叶片形态发生或伸长区是绝大多数叶片扩张蛋白分布的区域, 在这些部位, 扩张蛋白参与了细胞壁的松弛, 调节了细胞伸长过程^[14,28]. 但是, 最近有一些报道认为, 成熟叶片中也存在扩张蛋白^[29,30]. 在本实验中, 我们也发现了一个成熟叶片表达的扩张蛋白. 此外, 我们利用 AtEXPA1 抗体, 在椿树、桃树、向日葵和小麦等多种植物成熟叶片中也检测出了扩张蛋白的存在(图S2). 研究这些蛋白在成熟叶片中表达的具体部位, 会对理解该类基因的功能有很大帮助. 在本研究中, 我们利用免疫组织化学染色, 对蚕豆成熟叶片扩张蛋白进行了具体表达部位的分析. 尽管我们使用的 AtEXPA1 抗体的特异性在蚕豆中是未知的, 但是对于多种植物成熟叶片蛋白 Western blot 分析显示的单一条带表明, 该种抗体对此类成熟

叶片表达的 25 kD 蛋白有较高的特异性. 免疫染色的结果表明, 大部分信号在保卫细胞中富集, 这也暗示着该类扩张蛋白主要存在于气孔保卫细胞中. 根据这个线索, 我们从蚕豆成熟叶片表皮条中克隆了一个扩张蛋白 VfEXPA1. 表皮中的活细胞主要为保卫细胞, 因此, VfEXPA1 可能是一个保卫细胞表达的扩张蛋白基因. 进一步, 我们利用原位杂交分析验证了这一推论. 综合我们最近重复验证的拟南芥保卫细胞特异扩张蛋白基因 AtEXPA1^[20], 这些结果暗示, 成熟叶片中的扩张蛋白主要在气孔保卫细胞中起作用.

保卫细胞的背侧和腹侧不同厚度的细胞壁, 以及构成两侧细胞壁的微纤丝走向的不同, 使得保卫细胞在膨压上升时撑开, 露出气孔, 当膨压下降, 细胞收缩, 气孔关闭. 植物细胞的初生壁是由包埋在半纤维素和果胶中的纤维素微纤丝网络构成的^[31]. 纤维素是细胞壁的支架, 提供了壁的坚固性, 纤维素酶可以通过水解纤维素提供延展性, 但是这个过程缓慢且不可逆, 实验证明, 用纤维素水解酶类处理保卫细胞, 短期内并不会引起气孔运动的显著变化^[32]. 交连微纤丝的半纤维素糖类, 如葡糖醛酸阿拉伯木聚糖和木葡聚糖, 在很大程度上决定了细胞壁的延展性, 但是果胶在细胞扩张中的作用还不清楚^[33].

实验证明,保卫细胞壁中木葡聚糖和果胶的构成与普通细胞不同^[34],暗示了这两种物质可能与保卫细胞特有的可逆伸缩过程有关.有报道称,阿拉伯糖苷酶(一种果胶酶)可以抑制气孔运动,另一种果胶酶类,多聚果胶聚半乳糖醛酸酶和果胶甲酯酶同时处理保卫细胞,可以扩大气孔开度^[35].这些实验说明,对果胶的作用能够引起气孔运动的变化,但是,果胶酶的作用是水解作用,它是一个相对缓慢、耗能且不可逆的过程^[36],对于气孔运动中的细胞壁快速伸缩过程来说,它的速度不够,而且在能量上是不经济的.事实上,多聚果胶聚半乳糖醛酸酶和果胶甲酯酶的处理并不能改变气孔的关闭过程,所以,很可能果胶酶决定着气孔张开的大小而不是气孔运动的速度.

扩张蛋白在体内和体外均被报道具有诱导细胞伸展的活性^[6,37].扩张蛋白可以快速打开纤维素和半纤维素之间的氢键连接^[38,39],它在壁松弛过程中快

速催化和对壁结构的非破坏性作用是符合气孔运动中对壁快速往复伸缩的要求的,因此,扩张蛋白可能是气孔开放过程中细胞壁松弛的调节因子.本实验的数据表明,成熟叶片扩张蛋白定位于保卫细胞中,也暗示着扩张蛋白可能在气孔运动中的细胞壁伸缩过程起作用.为了验证这个假设,我们在烟草中超表达了蚕豆扩张蛋白特异基因 *VfEXPA1*,发现离体表皮条中超表达扩张蛋白可提高气孔灵敏度,加速光诱导的气孔开放.在这个实验中,虽然 35S 启动子驱动的组成型表达会在其他表皮细胞中同样引起扩张蛋白含量的提高,但是在检测表皮条气孔前已基本将表皮细胞完全破坏,因此可以认为,气孔灵敏度的提高是由 *VfEXPA1* 在保卫细胞内表达水平的提高所引起的.超表达植株气孔运动的体外实验结果和体内生理指标都显示气孔对光诱导开放灵敏度的提高,这表明 *VfEXPA1* 参与调节了气孔的运动过程.

参考文献

- Schroeder J I, Allen G J, Hugouvieux V, et al. Guard cell signal transduction. *Ann Rev Plant Physiol Plant Molec Biol*, 2001, 52: 627–658
- Assmann S M. Signal transduction in guard cells. *Annu Rev Cell Biol*, 1993, 9: 345–375
- Franks P J, Buckley T N, Shope J C, et al. Guard cell volume and pressure measured concurrently by confocal microscopy and the cell pressure probe. *Plant Physiol*, 2001, 125: 1577–1584
- Raschke K, Dickerson M. Changes in shape and volume of guard cells during stomatal movement. *Plant Res*, 1973, 1972: 149–153
- Cosgrove D J. Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6: 850–861
- McQueen-Mason S, Durachko D M, Cosgrove D J. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell*, 1992, 4: 1425–1433
- Cosgrove D. Characterization of long-term extension of isolated cell walls from growing cucumber hypocotyls. *Planta*, 1989, 177: 121–130
- Sampedro J, Cosgrove D J. The expansin superfamily. *Genome Biol*, 2005, 6: Article 242
- Li L C, Bedinger P A, Volk C, et al. Purification and characterization of four {beta}-expansins (zea m 1 isoforms) from maize pollen. *Plant Physiol*, 2003, 132: 2073–2085
- McQueen-Mason S J, Cosgrove D J. Expansin mode of action on cell walls (analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding). *Plant Physiol*, 1995, 107: 87–100
- McQueen-Mason S, Cosgrove D J. Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 6574–6578
- Lee D K, Ahn J H, Song S K, et al. Expression of an expansin gene is correlated with root elongation in soybean. *Plant Physiol*, 2003, 131: 985–997
- Choi D, Lee Y, Cho H-T, et al. Regulation of expansin gene expression affects growth and development in transgenic rice plants. *Plant Cell*, 2003, 15: 1386–1398
- Pien S, Wyrzykowska J, McQueen-Mason S, et al. From the cover: Local expression of expansin induces the entire process of leaf development and modifies leaf shape. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 11812–11817
- Kalamaki M S, Powell A L T, Struijs K, et al. Transgenic overexpression of expansin influences particle size distribution and improves viscosity of tomato juice and paste. *J Agric Food Chem*, 2003, 51: 7465–7471
- Brummell D A, Harpster M H, Civello P M, et al. Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *Plant Cell*, 1999, 11: 2203–2216

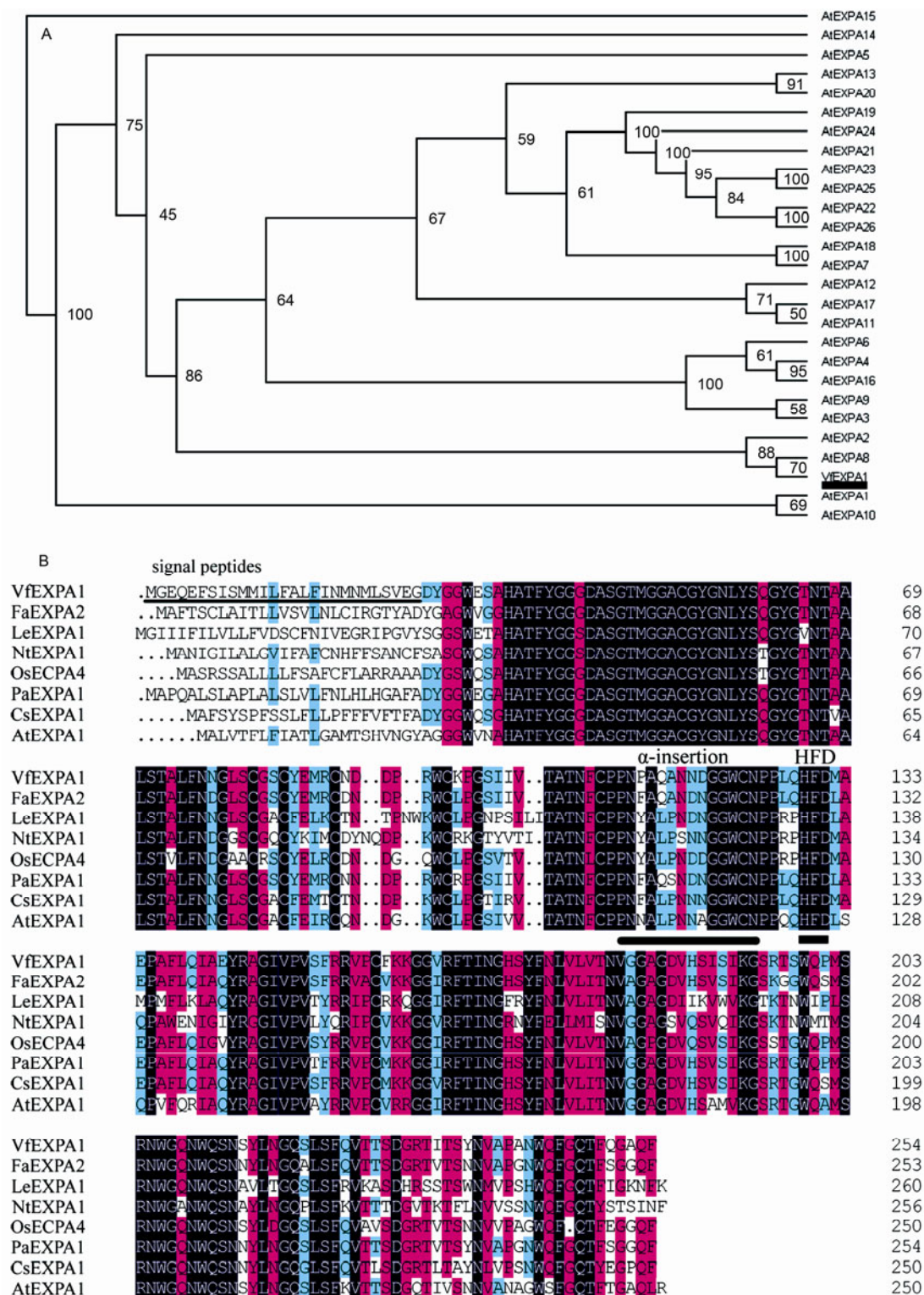
- 17 Cho H-T, Cosgrove D J. From the cover: Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 9783–9788
- 18 Cosgrove D J, Bedinger P, Durachko D M. Group I allergens of grass pollen as cell wall-loosening agents. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 6559–6564
- 19 Cosgrove D. New genes and new biological roles for expansins. *Curr Opin Plant Biol*, 2000, 3: 73–78
- 20 Zhang X Q, Wei P C, Xiong Y M, et al. Overexpression of the *Arabidopsis* α -expansin gene atexpa accelerates stomatal opening by decreasing the volumetric elastic modulus. *Plant Cell Rep*, 2010, 30: 27–36
- 21 Jefferson R, Kavanaugh T, Bevan M. Gus fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, 1987, 6: 901–903
- 22 Berger D, Altmann T. A subtilisin-like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev*, 2000, 14: 1119–1131
- 23 Cho H T, Kende H. Tissue localization of expansins in deepwater rice. *Plant J*, 1998, 15: 805–812
- 24 Cho H T, Kende H. Expression of expansin genes is correlated with growth in deepwater rice. *Plant Cell*, 1997, 9: 1661–1671
- 25 Li Y, Darley C P, Ongaro V, et al. Plant expansins are a complex multigene family with an ancient evolutionary origin. *Plant Physiol*, 2002, 128: 854–864
- 26 Lee Y, Choi D, Kende H. Expansins: Ever-expanding numbers and functions. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4: 527–532
- 27 Lee Y, Kende H. Expression of alpha-expansin and expansin-like genes in deepwater rice. *Plant Physiol*, 2002, 130: 1396–1405
- 28 Reidy B, McQueen-Mason S, Nosberger J, et al. Differential expression of α - and β -expansin genes in the elongating leaf of *Festuca pratensis*. *Plant Mol Biol*, 2001, 46: 491–504
- 29 Muller B, Bourdais G, Reidy B, et al. Association of specific expansins with growth in maize leaves is maintained under environmental, genetic, and developmental sources of variation. *Plant Physiol*, 2007, 143: 278–290
- 30 Boudart G, Jamet E, Rossignol M, et al. Cell wall proteins in apoplastic fluids of *Arabidopsis thaliana* rosettes: Identification by mass spectrometry and bioinformatics. *Proteomics*, 2005, 5: 212–221
- 31 Darley C P, Forrester A M, McQueen-Mason S J. The molecular basis of plant cell wall extension. *Plant Mol Biol*, 2001, 47: 179–195
- 32 Jones L, Milne J L, Ashford D, et al. From the cover: Cell wall arabinan is essential for guard cell function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 11783–11788
- 33 Atkinson R G, Schroder R, Hallett I C, et al. Overexpression of polygalacturonase in transgenic apple trees leads to a range of novel phenotypes involving changes in cell adhesion. *Plant Physiol*, 2002, 129: 122–133
- 34 Majewska-Sawka A, Munster A, Rodriguez-Garcia M I. Guard cell wall: Immunocytochemical detection of polysaccharide components. *J Exp Bot*, 2002, 53: 1067–1079
- 35 Jones L, Milne J L, Ashford D, et al. A conserved functional role of pectic polymers in stomatal guard cells from a range of plant species. *Planta*, 2005, 221: 255–264
- 36 Whitney S E C, Gothard M G E, Mitchell J T, et al. Roles of cellulose and xyloglucan in determining the mechanical properties of primary plant cell walls. *Plant Physiol*, 1999, 121: 657–664
- 37 Fleming A J, McQueen-Mason S, Mandel T, et al. Induction of leaf primordia by the cell wall protein expansin. *Science*, 1997, 276: 1415–1418
- 38 Whitney S E C, Gidley M J, McQueen-Mason S J. Probing expansin action using cellulose/hemicellulose composites. *Plant J*, 2000, 22: 327–334
- 39 Cosgrove D J. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*, 2000, 407: 321–326

补充材料

图 S1 VfEXPA1 与其他典型 α 类扩张蛋白的氨基酸序列的同源性比对

图 S2 在不同植物成熟叶片中都含有扩张蛋白

本文的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。

图 S1 VfEXPA1 与其他典型 α 类扩张蛋白的氨基酸序列的同源性比对

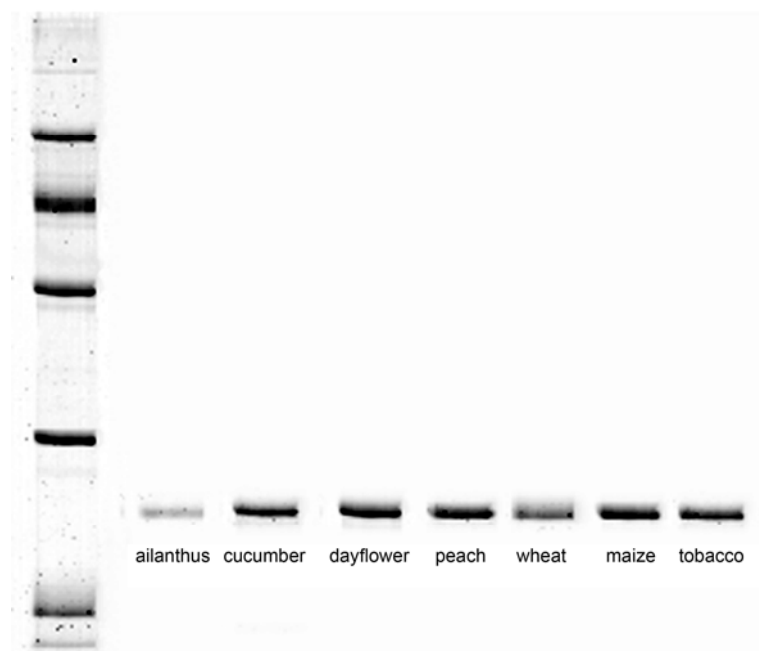


图 S2 在不同植物成熟叶片中都含有扩张蛋白