

# 外源 5-氨基乙酰丙酸促进苹果叶片气孔开放机理的初探

陈令会, 刘龙博, 安玉艳, 张治平, 汪良驹\*

(南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

**摘要:** 以‘富士’苹果离体叶片下表皮组织为材料, 借助药剂处理、光学显微镜和激光扫描共聚焦显微镜(LSCM), 研究了外源 5-氨基乙酰丙酸(5-ALA)促进气孔开放效应及其可能机制。结果表明, 5-ALA 能够促进光、暗条件下苹果叶片气孔开放, 阻止外源 ABA 和  $H_2O_2$  诱导的气孔关闭, 还能逆转  $Ca^{2+}$  诱导的气孔关闭。5-ALA 处理后, 苹果叶片保卫细胞内源  $H_2O_2$  和  $Ca^{2+}$  含量显著下降。根据这些结果推测, 5-ALA 可以通过下调苹果叶片保卫细胞  $H_2O_2$  和  $Ca^{2+}$  含量来促使气孔开放。

**关键词:** 苹果; ABA; 5-ALA; 保卫细胞; 调节机制; 气孔开度

**中图分类号:** S 661.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2014) 10-1965-10

## Preliminary Studies on the Possible Mechanism Underlying 5-aminolevulinic Acid-induced Stomatal Opening in Apple Leaves

CHEN Ling-hui, LIU Long-bo, AN Yu-yan, ZHANG Zhi-ping, and WANG Liang-ju\*

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** A possible mechanism for 5-aminolevulinic acid (5-ALA) to promote stomatal aperture was studied with abaxial epidermis of detached leaves of apple (*Malus × domestica* Korkh. ‘Fuji’) combined with pharmacology, microscopy and laser-scanning confocal microscopy. It was found that 5-ALA promoted stomata opening under both light and dark conditions. It also inhibited the stomata closure induced by exogenous ABA and  $H_2O_2$ , and reversed the closure by  $Ca^{2+}$ . Furthermore, 5-ALA treatment was found to reduce the endogenous  $H_2O_2$  and  $Ca^{2+}$  content in guard cells of apple leaves. Therefore, it can be deduced that 5-ALA induced stomata opening may be the result of down-regulation of  $H_2O_2$  and  $Ca^{2+}$  content in the guard cells of apple leaves.

**Key words:** apple; ABA; 5-ALA; guard cells; regulatory mechanism; stomatal aperture

大量研究表明, 5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid, 5-ALA)作为一种新型植物生长调节物质(Akram & Ashraf, 2013), 其最显著的生理功能是提高逆境条件下植物叶片净光合速率(汪良驹等, 2004; Ali et al., 2013), 因而在提高逆境下作物产量(成学慧等, 2012)与改善产品品质(郭磊等, 2013; Xie et al., 2013)方面有着广阔应用前景(汪良驹等, 2003)。然而, 5-ALA 调

**收稿日期:** 2014-06-03; **修回日期:** 2014-09-16

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(31101505, 31401820); 江苏省自然科学基金项目(BK20140702); 江苏省苏北科技发展规划项目(BN2012035)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: wlj@njau.edu.cn)

控植物光合作用的机理并未完全阐明。目前人们将其归结为以下几个方面：第一，作为叶绿素生物合成的关键前体，可以调节叶绿素合成，并增加光能吸收利用（汪良驹 等，2004；谢荔 等，2013）；第二，作为亚铁血红素生物合成的关键前体，参与光合电子传递（Wang et al., 2010），提高抗氧化酶活性（Nishihara et al., 2003；刘卫琴 等，2006；李翠 等，2012），光合能量转化效率受到显著促进（谢荔 等，2013）；第三，可以诱导 RuBP 羧化酶小亚基编码基因表达上调（Shen et al., 2011），显著提高羧化效应，因而对光合作用调节效应不仅涉及光反应，而且涉及暗反应。除此之外，汪良驹等（2004）曾经观察到，5-ALA 可以增大甜瓜叶片气孔开度，并且认为这是 5-ALA 促进叶片光合效率提高的重要原因。这一现象在番茄（苏常红 等，2006；徐晓洁 等，2008）、小麦（姚素梅 等，2010）和油菜（Ali et al., 2013）等作物上得以证实。然而，迄今为止，有关 5-ALA 促进气孔开放的机理未见专门报道。本试验以苹果离体叶片为材料，研究了外源 5-ALA 对下表皮保卫细胞运动的影响及其与光照以及 ABA、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 Ca<sup>2+</sup> 的相互作用，以期从气孔运动的角度阐明 5-ALA 提高植物光合速率的生理机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料及气孔开度观察

2 年生 ‘富士’ 苹果 (*Malus × domestica* Borkh. ‘Fuji’) 盆栽幼苗 2013 年春季种植在南京农业大学卫岗校区避雨温室内。待新生叶片完全展开后，选取 4 ~ 6 片，洗净后平置于盛有 Mes-KCl 缓冲液（含 KCl 50 mmol · L<sup>-1</sup>，Mes 10 mmol · L<sup>-1</sup>，CaCl<sub>2</sub> 0.1 mmol · L<sup>-1</sup>，pH 6.4）的培养皿（Φ10 cm）内，在 25 °C 光照培养箱（240 μmol · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>）或暗培养箱中悬浮 4 h，然后用镊子轻轻撕下叶片下表皮，用刀片和毛刷小心除去粘附的叶肉细胞，切成条块（0.5 cm × 0.5 cm），重置于含有不同试剂的 Mes-KCl 缓冲液中，在 Nikon TE100 光学显微镜下连续观察气孔开度（400 ×）。利用图像采集系统（MShot Digital Imaging System）拍摄气孔图片，并用测微尺和 Adobe Photoshop 6.0 软件测定数据，获得气孔开度值。每个表皮条块选取 7 ~ 8 个视野，每个视野测量 3 ~ 4 个气孔孔径，即每个数值约为 30 个气孔开度平均值。

### 1.2 药剂处理

光照下 5-ALA 处理：将新鲜制备的下表皮条块置于添有 0.5 mg · L<sup>-1</sup> 5-ALA 的 Mes-KCl 溶液中，以未加 5-ALA 的为对照，在光照培养箱中哺育 1 h 后观察气孔开度。

黑暗下 5-ALA 处理：先将苹果叶片放置于暗培养箱 4 h，再制备表皮条块，然后随机放置于添加了 0、0.005、0.05、0.5 和 5 mg · L<sup>-1</sup> 5-ALA 的 Mes-KCl 溶液中，连续观察黑暗中气孔开度变化。

光照下 5-ALA 与 ABA 同时处理：以光下培养的苹果叶片为材料，制备表皮条块，然后分别置入 Mes-KCl 缓冲液（对照）、添加 10 μmol · L<sup>-1</sup> ABA 的 Mes-KCl 缓冲液、添加 0.005 ~ 5 mg · L<sup>-1</sup> 5-ALA 并含 ABA 的 Mes-KCl 缓冲液，连续观察光下气孔开度变化。

光照下 5-ALA 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 同时处理：将光下叶片表皮条块分别置入 Mes-KCl 缓冲液（对照）、添加 200 μmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 以及添加 0.5 mg · L<sup>-1</sup> 5-ALA 的含 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的 Mes-KCl 缓冲液，在光下连续观察气孔开度变化。

Ca<sup>2+</sup> 处理后再用 5-ALA 处理：将光下叶片表皮条块置于含有 1 mmol · L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> 的 Mes-KCl 缓冲液中，观察气孔开度变化。1.5 h 后，加入 5-ALA 使其最终浓度为 0.5 mg · L<sup>-1</sup>，继续观察气孔开度变化。

### 1.3 保卫细胞 $\text{H}_2\text{O}_2$ 相对含量测定

保卫细胞  $\text{H}_2\text{O}_2$  荧光探针负载：把光下哺育的苹果叶片下表皮条块转移至 5 mL 负载缓冲液（含  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  KCl, pH 6.5）中，然后加入 2,7-二氯氢化荧光素二乙酸酯（ $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ）二甲亚砜（DMSO）母液  $5 \mu\text{L}$ ，使得  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  的最终浓度为  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。轻轻摇匀，避光孵育 30~60 min，以备激光扫描共聚焦显微镜（Laser scanning confocal microscope, LSCM）观测。

LSCM 观测：将载有  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  的苹果叶片下表皮组织用负载缓冲液漂洗 3 次，洗去表面多余探针，转移至小塑料培养皿内，在不同组别中分别加入 ABA 和（或）5-ALA 溶液。5 min 后，把表皮组织放置于载玻片上，盖上盖玻片，在与透光图像相对应的荧光图像中选择特定区域，利用激光共聚焦显微镜（Leica TCS SP2）记录表皮组织保卫细胞荧光变化，使用 TIME-COURSE 软件采集数据，计算相对荧光强度以表示  $\text{H}_2\text{O}_2$  相对含量。LSCM 的工作条件为激发波长 488 nm，发射波长（ $525 \pm 15$ ）nm，激光能量 10%，放大 4 倍，分辨率  $512 \times 512$ 。每组试验至少有 3 次生物学重复，取平均值。

### 1.4 保卫细胞 $\text{Ca}^{2+}$ 相对含量的测定

$\text{Ca}^{2+}$  荧光标记参照 Zhang 和 Rengel（1998）及尚忠林等（2001a, 2001b）的方法进行。取适量暗处理后的下表皮块置于 10 mL Mes-KCl 缓冲液中，加入  $10 \mu\text{L}$  荧光探针 Fluo-3 AM 使其最终浓度为  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。混匀后置  $4^\circ\text{C}$  暗培养 2 h。用 Mes-KCl 缓冲液洗涤 3 次，去除胞外的 Fluo-3 AM。

将标记后的下表皮组织置于含有  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  5-ALA 的 Mes-KCl 缓冲液中处理 5 min，以不含药剂的 Mes-KCl 缓冲液作对照，在激光共聚焦显微镜下扫描观察不同处理保卫细胞  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度随时间变化动态，通过计算机直接采集图像数据，计算相对荧光值以表示  $\text{Ca}^{2+}$  相对含量。

所有数据均重复测定 3 次以上，取平均值，并经方差分析和邓肯氏测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 5-ALA 促进光照条件下苹果叶片气孔开放

如图 1 显示，5-ALA 处理明显增大苹果叶片的气孔开度。在  $240 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  光照条件下培养的苹果叶片（对照）气孔开度平均值为  $3.65 \mu\text{m}$ （图 1, A），而同样条件下经  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  5-ALA 处理 1 h 后叶片气孔开度平均值为  $4.34 \mu\text{m}$ （图 1, B），比对照高出 19%（ $P < 0.05$ ），说明外源 5-ALA 处理可以显著增大光照条件下苹果叶片气孔开度。

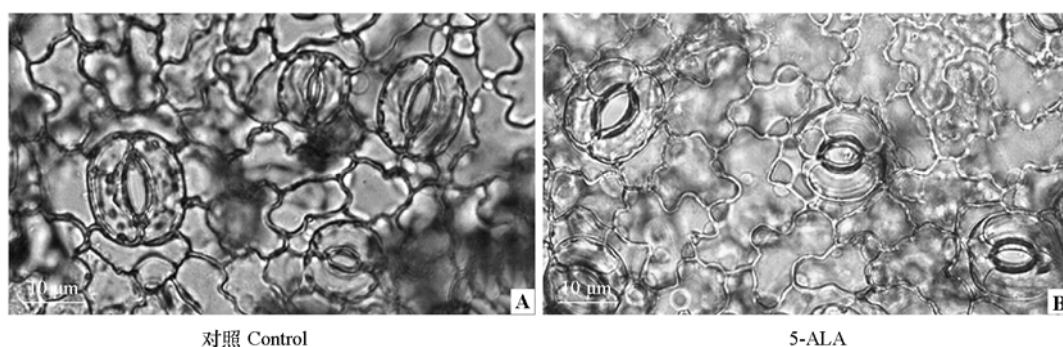


图 1 外源 5-ALA 处理对苹果叶片气孔保卫细胞开度的影响

Fig. 1 Effect of exogenous 5-ALA on stomatal aperture of epidermal guard cells of apple leaves

2.2 5-ALA 促进黑暗条件下苹果叶片气孔开放

表 1 显示, 0.005 ~ 5 mg · L<sup>-1</sup> 5-ALA 处理能够显著增大黑暗条件下苹果下表皮气孔开度 ( $P < 0.05$ )。在试验观察的 2 h 内, 对照叶片气孔开度始终保持在 2.5 μm 左右, 而 5-ALA 处理 1 h 后, 所有处理叶片气孔开度均上升 35% 以上, 其中 0.05 mg · L<sup>-1</sup> 5-ALA 处理效应最明显, 气孔开度为原初值的 1.68 倍, 表明外源 5-ALA 可以诱导黑暗中苹果叶片气孔开放。虽然其后的 1 h 内, 处理叶片气孔开度略有下降, 但仍然显著高于对照叶片。

为了明确 5-ALA 促进气孔开放的时间效应, 利用 0.05 mg · L<sup>-1</sup> 5-ALA 再次试验。结果 (图 2) 表明, 5-ALA 处理 10 min 后气孔开度就显著高于对照; 20 ~ 40 min 间, 促进效应最大; 以后则逐渐下降, 但是 2 h 内仍然显著高于对照, 说明外源 5-ALA 可以快速诱导黑暗条件下苹果叶片保卫细胞气孔开放。

2.3 5-ALA 抑制 ABA 诱导的气孔关闭

表 2 显示, 光照培养下的苹果叶片 (对照) 气孔开度约为 4.3 μm, 而且在试验的 2 h 内保持稳定。在培养液中添加 10 μmol · L<sup>-1</sup> ABA, 则 1 h 后气孔开度下降 37%, 2 h 后下降 50%, 说明外源 ABA 诱导苹果叶片气孔关闭。然而, 在添加 ABA 的同时添加 0.005 ~ 5 mg · L<sup>-1</sup> 5-ALA, 则 ABA 诱导的苹果叶片气孔关闭效应得到显著缓解。处理 1 h 时, 除了 ABA + 5 mg · L<sup>-1</sup> 5-ALA 处理与单纯 ABA 处理之间差异未达到显著水平外, 其它几个浓度处理的气孔开度均显著高于 ABA 处理 ( $P < 0.05$ ); 处理 2 h 时, 所有添加 5-ALA 的叶片气孔开度显著高于 ABA 处理 (增幅为 25% ~ 50%), 说明 5-ALA 可以显著抑制 ABA 诱导的气孔关闭。另外, 从浓度上看, 0.005 ~ 5 mg · L<sup>-1</sup> 5-ALA 的效应差异较小, 说明 ALA 作用的有效浓度范围相当宽。

表 1 5-ALA 处理对黑暗条件下苹果叶片气孔开度的影响

Table 1 Effect of 5-ALA with different concentrations on stomatal aperture of apple leaves under dark

5-ALA/ (mg · L <sup>-1</sup> )	气孔开度/μm Stomatal aperture		
	0 h	1 h	2 h
0 (对照 Control)	2.63 ± 0.06 fg	2.48 ± 0.12 g	2.42 ± 0.13 g
0.005	2.74 ± 0.02 f	3.93 ± 0.03 b	3.45 ± 0.15 cde
0.05	2.53 ± 0.20 fg	4.25 ± 0.09 a	4.29 ± 0.22 a
0.5	2.59 ± 0.10 fg	3.51 ± 0.01 cd	3.23 ± 0.05 de
5	2.54 ± 0.07 fg	3.55 ± 0.14 c	3.16 ± 0.27 e

注: 表中数据为 30 个左右气孔开度平均值 ± 标准误, 数据后面相同字母代表在  $P = 0.05$  水平上差异不显著。下同。

Note: The data in the table were the means ± standard error of about 30 stomatal apertures, behind which the same letters represent no significant difference at  $P = 0.05$  level. The same below.

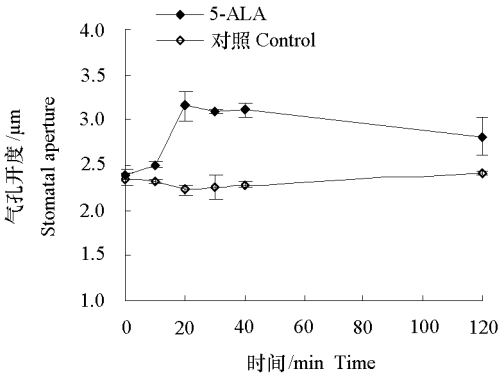


图 2 黑暗条件下 0.05 mg · L<sup>-1</sup> 5-ALA 处理对苹果叶片气孔开度调节的时间效应

Fig. 2 Time course of 0.05 mg · L<sup>-1</sup> 5-ALA regulating stomatal aperture of apple leaves under dark condition

表 2 外源 5-ALA 对 ABA 诱导的苹果叶片气孔关闭的抑制效应

Table 2 The inhibition of exogenous 5-ALA on the stomata closure of apple leaves induced by ABA

处理 Treatment	气孔开度/μm Stomatal aperture		
	0 h	1 h	2 h
对照 Control	4.23 ± 0.18 ab	4.29 ± 0.19 ab	4.28 ± 0.20 ab
10 μmol · L <sup>-1</sup> ABA	4.39 ± 0.20 ab	2.76 ± 0.19 d	2.22 ± 0.17 e
10 μmol · L <sup>-1</sup> ABA + 0.005 mg · L <sup>-1</sup> 5-ALA	4.11 ± 0.19 ab	3.34 ± 0.16 c	2.77 ± 0.19 d
10 μmol · L <sup>-1</sup> ABA + 0.05 mg · L <sup>-1</sup> 5-ALA	3.98 ± 0.17 b	3.48 ± 0.18 c	2.77 ± 0.17 d
10 μmol · L <sup>-1</sup> ABA + 0.5 mg · L <sup>-1</sup> 5-ALA	4.40 ± 0.25 ab	3.31 ± 0.25 c	3.31 ± 0.14 c
10 μmol · L <sup>-1</sup> ABA + 5 mg · L <sup>-1</sup> 5-ALA	4.57 ± 0.22 a	2.99 ± 0.13 cd	3.06 ± 0.19 cd

## 2.4 5-ALA 抑制 $\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导的气孔关闭

表 3 显示, 光照下苹果叶片(对照)气孔开度约为  $3.7 \mu\text{m}$ ; 添加  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$  1 h 后气孔开度下降 30%, 2 h 后下降 39%, 说明  $\text{H}_2\text{O}_2$  能够诱导苹果叶片气孔关闭。然而, 在添加  $\text{H}_2\text{O}_2$  的同时添加  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 5\text{-ALA}$ , 则气孔开度比单纯的  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理约高出 15%, 表明 5-ALA 可以抑制  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的气孔关闭。

## 2.5 5-ALA 逆转 $\text{Ca}^{2+}$ 诱导的气孔关闭

图 3 显示,  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Ca}^{2+}$  能够诱导苹果叶片气孔关闭, 在  $0.5 \sim 1.5 \text{ h}$ , 气孔开度随着时间延长而明显下降。然而, 此时在培养液中添加  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 5\text{-ALA}$ , 则气孔开度迅速恢复, 在  $0.5 \text{ h}$  内达到并且超过未加  $\text{Ca}^{2+}$  时水平 ( $3.7 \mu\text{m}$ ), 说明  $\text{Ca}^{2+}$  诱导苹果叶片气孔关闭, 而 5-ALA 能够逆转  $\text{Ca}^{2+}$  诱导的气孔关闭。

## 2.6 5-ALA 对苹果叶片保卫细胞 $\text{H}_2\text{O}_2$ 相对含量的影响

### 2.6.1 黑暗条件下

激光扫描共聚焦结果(图 4)显示, 黑暗下培养的苹果叶片(对照)下表皮保卫细胞  $\text{H}_2\text{O}_2$  荧光强度(表示  $\text{H}_2\text{O}_2$  相对含量)保持较高水平, 并且在观察的  $30 \text{ min}$  内相当稳定。但是添加  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 5\text{-ALA}$ , 则可在  $15 \text{ min}$  内观察到  $\text{H}_2\text{O}_2$  相对含量显著下降 ( $P < 0.05$ ), 并且在  $20 \text{ min}$  内一直保持着直线下降趋势; 直到  $\text{H}_2\text{O}_2$  荧光强度降低为原初值的 27% 后, 才略稍上升, 但整体上保持在较低水平, 证明 5-ALA 处理促使黑暗中苹果叶片气孔保卫细胞  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量下降。

### 2.6.2 ABA 处理下

图 5 显示, 光照下苹果叶片(对照)保卫细胞  $\text{H}_2\text{O}_2$  荧光强度相对稳定, 在观察的  $40 \text{ min}$  内, 基本没有变化。在培养液中添加  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ABA}$ , 则在处理后  $22 \text{ min}$  左右保卫细胞  $\text{H}_2\text{O}_2$  荧光强度极显著增加 ( $P < 0.01$ ),  $40 \text{ min}$  时大约高出原初 1 倍左右, 说明外源 ABA 处理能够诱导保卫细胞  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量迅速上升。然而, 在添加 ABA 同时添加  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 5\text{-ALA}$ , 则 ABA 诱导的  $\text{H}_2\text{O}_2$  荧光强度上升效应完全消失, 而且保卫细胞  $\text{H}_2\text{O}_2$  荧光强度呈持续下降趋势, 并在处理  $30 \text{ min}$  后显著低于对照 ( $P < 0.05$ ), 最低值只有原初荧光强度的 21%, 说明 ALA 能够完全消除 ABA 诱导的  $\text{H}_2\text{O}_2$  积累, 并且导致保卫细胞  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量显著低于对照。

## 2.7 5-ALA 对暗培养中苹果叶片保卫细胞 $\text{Ca}^{2+}$ 含量的影响

图 6 显示, 暗培养中苹果叶片(对照)保卫细胞  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度在观察的  $40 \text{ min}$  内保持相对稳定的较高水平; 在培养液中添加  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  外源 5-ALA,  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度迅速下降; 从作用时间上看,  $10 \sim 28 \text{ min}$  内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度呈下降趋势, 此时,  $\text{Ca}^{2+}$  仅为原初值的 40%。以后虽有小幅上升, 但整体上只有原初值的一半, 说明 5-ALA 处理可以显著降低黑暗中苹果叶片保卫细胞  $\text{Ca}^{2+}$  含量。

表 3 外源 5-ALA 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的苹果叶片气孔关闭的抑制效应

Table 3 The inhibition of exogenous 5-ALA on the stomatal closure of apple leaves induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$

处理 Treatment	气孔开度/ $\mu\text{m}$ Stomatal aperture		
	0 h	1 h	2 h
对照 Control	$3.64 \pm 0.17 \text{ a}$	$3.84 \pm 0.18 \text{ a}$	$3.61 \pm 0.13 \text{ a}$
$200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$	$3.69 \pm 0.13 \text{ a}$	$2.59 \pm 0.13 \text{ bc}$	$2.27 \pm 0.08 \text{ c}$
$200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2 + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ALA}$	$3.77 \pm 0.12 \text{ a}$	$2.98 \pm 0.12 \text{ b}$	$2.58 \pm 0.09 \text{ bc}$

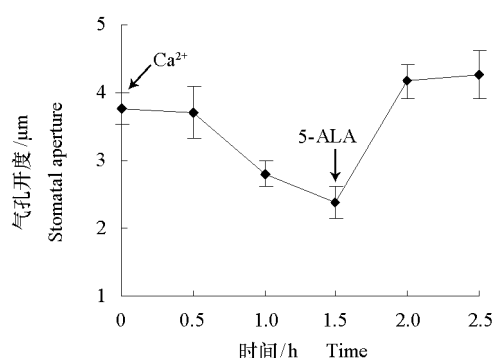


图 3 外源 5-ALA 对  $\text{Ca}^{2+}$  诱导的苹果叶片气孔关闭的逆转效应

Fig. 3 The reversion of exogenous 5-ALA on stomata closure of apple leaves induced by  $\text{Ca}^{2+}$

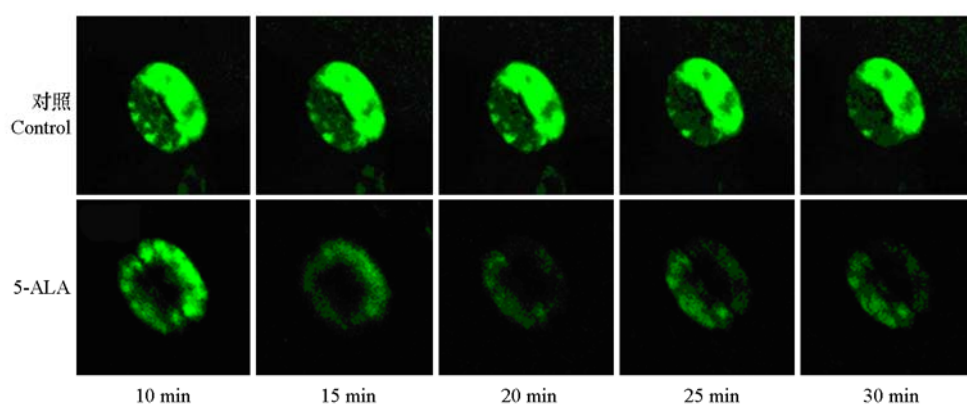


图 4 5-ALA 对暗培养苹果叶片气孔保卫细胞  $\text{H}_2\text{O}_2$  荧光强度的影响

Fig. 4 The effect of 5-ALA on fluorescence intensity of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in guard cells of dark-cultured apple leaves

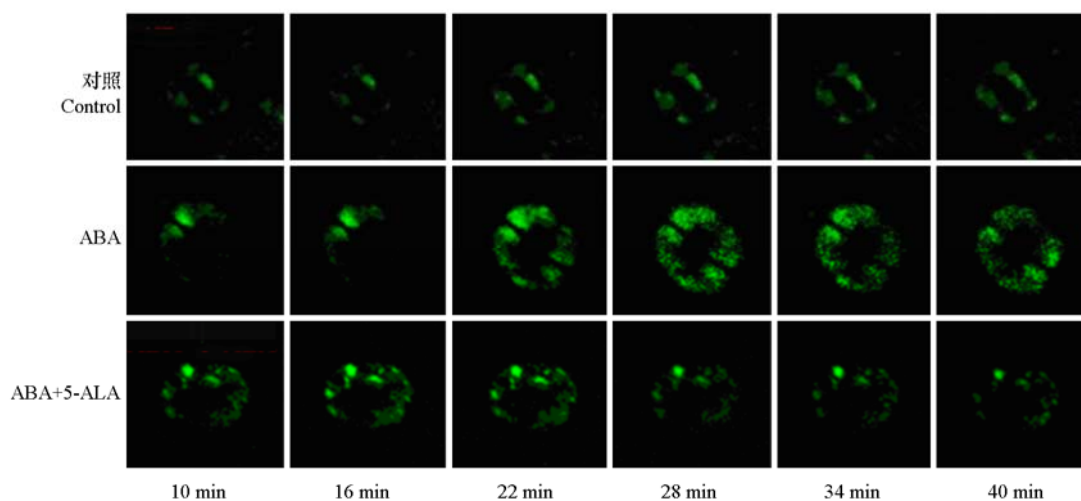


图 5 5-ALA 对 ABA 诱导苹果叶片保卫细胞  $\text{H}_2\text{O}_2$  荧光强度的影响

Fig. 5 The effect of 5-ALA on fluorescence intensity of ABA-induced  $\text{H}_2\text{O}_2$  in guard cells of apple leaves

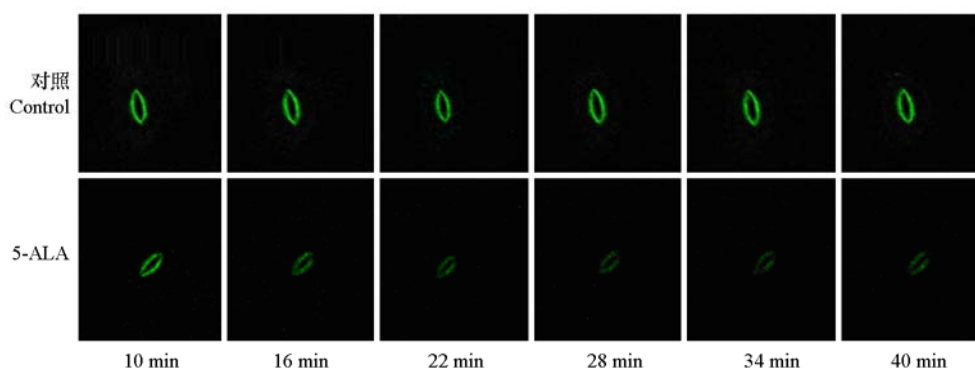


图 6 5-ALA 对暗培养苹果叶片保卫细胞  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度的影响

Fig. 6 The effect of 5-ALA on fluorescence intensity of  $\text{Ca}^{2+}$  in guard cells of apple leaves cultured under darkness

### 3 讨论

汪良驹等曾于 2004 年观察到外源 5-ALA 可以提高甜瓜叶片气孔开度 (汪良驹 等, 2004)。其后证实, 5-ALA 处理可以提高多种植物叶片气孔导度 (苏常红 等, 2006; 徐晓洁 等, 2008; Youssef & Award, 2008; 姚素梅 等, 2010; Ali et al., 2013)。张治平等 (2008) 发现, 过量合成 5-ALA 的转基因烟草叶片气孔导度显著高于野生型, 证明无论是外源还是内源 5-ALA 均可以诱导叶片气孔开放, 有利于  $\text{CO}_2$  进入叶肉细胞, 从而提高植物叶片净光合速率。本研究中利用离体苹果叶片下表皮组织为材料, 研究了外源 5-ALA 对气孔运动的影响, 发现  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  5-ALA 可以显著增大光培养下气孔开度 (图 1),  $0.005 \sim 5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  5-ALA 可以诱导黑暗下苹果叶片气孔开度增大 (表 1), 抑制 ABA 和  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的苹果叶片气孔关闭 (表 2, 表 3), 还可以逆转和  $\text{Ca}^{2+}$  诱导的气孔关闭 (图 3)。因而, 第 1 次用试验数据证明外源 5-ALA 具有诱导植物叶片气孔开放效应。这可能是 5-ALA 促进植物叶片光合速率增加的重要原因之一 (汪良驹 等, 2004)。

植物气孔运动是一个高度复杂却受调控的生理过程。黑暗、ABA、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  等因素均能诱导气孔关闭。其根本原因是它们都能刺激保卫细胞质膜  $\text{K}^+$  外流通道和阴离子通道活性, 电解质外流, 细胞渗透势下降, 水分外流, 膨压下降, 气孔关闭 (李保珠 等, 2012)。就目前研究而言, 黑暗是导致气孔关闭最重要的外因之一, ABA 处在调控的上游。它与 ABA 受体结合诱导质膜 NADPH 氧化酶产生超氧阴离子, 后者经 SOD 歧化生产  $\text{H}_2\text{O}_2$  (董发才 等, 2002), 启动依赖于  $\text{Ca}^{2+}$  或不依赖于  $\text{Ca}^{2+}$  的信号通道来调节气孔运动 (McAinsh et al., 1996; 苗雨晨, 2002; 权宏 等, 2003; 杨金华和杜克久, 2011)。但是, 黑暗是否导致 ABA 含量上升却很少见报道 (张媛华, 2012)。鉴于高等植物 ABA 生物合成仅发生在叶绿体内, 并且主要累积其中, 汪良驹和周燮 (1989) 提出, 植物遇到逆境时, 叶绿体基质酸化, 离子态 ABA $^-$  转化为分子态 ABAH, 后者透过叶绿体膜扩散到胞质中。这样, 一方面增加胞质 ABA 含量, 另一方面, 反馈调节 ABA 从头合成。因而可以推测, 黑暗中光合作用停止, 光合磷酸化和 NADPH 生成受阻, 即使没有从头合成, ABA 自动重新分配, 也会导致胞质 ABA 含量迅速增加 (黄荣峰和王学臣, 1996)。因而, 黑暗导致气孔关闭可以简单地归纳为: 黑暗 $\rightarrow$ 胞质 ABA 上升 $\rightarrow$ ABA 受体激活 $\rightarrow$ NADPH 氧化酶上升 $\rightarrow$ 产生  $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow [\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  上升 $\rightarrow \text{K}^+_{\text{out}}$  和阴离子通道活化 $\rightarrow$ 电解质外流 $\rightarrow$ 水分外流 $\rightarrow$ 膨压下降 $\rightarrow$ 气孔关闭。本研究结果显示, 5-ALA 可以促使黑暗或 ABA 诱导的苹果叶片气孔保卫细胞  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量下降 (图 4, 图 5), 也能促使黑暗条件下气孔保卫细胞  $\text{Ca}^{2+}$  含量下降 (图 6), 因而, 5-ALA 调控苹果叶片气孔运动的位点应该在  $\text{H}_2\text{O}_2$  生成之前。再则, 黑暗中保卫细胞  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量保持较高水平, 5-ALA 处理 10 min 后,  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量直线下降 (图 4), 说明 5-ALA 不是抑制  $\text{H}_2\text{O}_2$  生成, 而是促使其分解。类似地, 光照下外源 ABA 处理 20 min 后, 保卫细胞  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量急剧上升, 而 5-ALA 处理叶片  $\text{H}_2\text{O}_2$  水平始终保持较低水平, 而且在处理 30 min 后显著低于对照 (图 5), 也说明 5-ALA 处理促使光下外源 ABA 诱导的  $\text{H}_2\text{O}_2$  降解。对于这一现象, 作者认为, 5-ALA 作为亚铁血红素生物合成的关键前体, 可以诱导植物叶片抗氧化酶系统中 SOD、POD、CAT 和 APX 等活性上升 (Nishihara et al., 2003; 康琅 等, 2006), 因而, 5-ALA 调控苹果叶片气孔开度时, 抗氧化酶活性提高是  $\text{H}_2\text{O}_2$  水平下降的原因。另外, 比较图 4 和图 6 的时间进程发现, 5-ALA 显著降低黑暗中叶片保卫细胞  $\text{H}_2\text{O}_2$  的时间在处理 15 min, 效应最大时间为 20 min, 而显著降低  $\text{Ca}^{2+}$  的时间约为处理后 16 min, 效应最大时间约为 28 min。这暗示着 5-ALA 先作用于  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 而后再影响到细胞质  $\text{Ca}^{2+}$  浓度。这与前人报道的  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导保卫细胞游离  $\text{Ca}^{2+}$  浓度增加的研究结果 (McAinsh et al., 1996) 吻合。然而, 图 6 表明, 5-ALA 处理快速降低黑暗中苹果叶表皮保卫细胞胞质  $\text{Ca}^{2+}$  浓度。这暗示着, 5-ALA 未必需要经过  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 它也可能作用于质膜

$\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, 直接将  $\text{Ca}^{2+}$  泵到胞质外, 从而引起气孔开放。段春慧 (2013) 观察到, 5-ALA 提高在梨花粉管  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性, 直接降低胞质  $\text{Ca}^{2+}$  浓度。这种机制可能也存在于苹果叶片保卫细胞运动调节。

已有报道 5-ALA 是一种多功能植物生长调节物质 (汪良驹 等, 2003; Akram & Ashraf, 2013), 在组织培养中可以同时诱导愈伤组织形成不定根和不定芽, 兼有 IAA 和 CTK 活性 (Roy & Vivekanandan, 1998)。最近, Xie 等 (2013) 系统报道了它诱导苹果果实着色效应, 并被中国农业部批准登记为一种新型全天然植物调节剂。但其调控机理还远未阐明, 甚至连它是分子自身还是转化后再参与生理调节的都不清楚。Wang 等 (2005) 发现, 5-ALA 提高白菜耐盐性效应依赖于其转化为亚铁血红素。本研究中虽然没有用试验研判它是直接还是间接作用, 但是 5-ALA 可以在 10~20 min 内诱导黑暗中苹果气孔开度增大 (图 2)。如果这不是一种直接作用, 至少暗示着它可以在黑暗中迅速转化为代谢产物 (如亚铁血红素), 并且快速诱导新的生理效应。

5-ALA 能够提高植物多种抗逆性, 包括抗寒、抗高温、耐盐、耐弱光 (Akram & Ashraf, 2013)、耐缺氮 (Wei et al., 2012) 等, 它也能提高植物抗旱性 (Al-Thabet, 2006; 程菊娥 等, 2007)。这看上去很矛盾, 因为 ABA 是一种抗蒸腾剂, 而 5-ALA 抑制 ABA 诱导的气孔关闭, 那么它就不应该与抗旱性有关。但实际上, 5-ALA 确实可以提高植物抗旱性。本实验室于 2013 年 7 月 12 日利用 5-ALA 溶液处理无花果幼苗, 8 月份遇到创记录的晴热高温干旱天气, 处理植株叶片出现严重萎蔫症状, 但幼苗出圃时却发现, 与对照区相比, 处理区不仅出苗量大, 而且根系发达, 枝条健壮, 说明一定阶段的叶片萎蔫更有利于后期补偿性生长。另外, 本实验室还观察到拟南芥幼苗控水 30 d 将导致幼苗严重失水, 一旦复水, 5-ALA 预处理植株可以迅速恢复生长, 明显超过对照, 表明植株耐旱能力显著增强。据此看来, 5-ALA 作为一种新的植物生长调节物质, 不仅促进光合作用和呼吸作用 (Wang et al., 2005), 而且促进蒸腾作用。由于蒸腾拉力与植物根系吸收能力有关, 因而, 5-ALA 处理有可能涉及到植物对土壤养分吸收运输和利用等营养生理。5-ALA 具有如此多的调节功能, 这是其它植物生长调节剂很少见的, 值得深入研究。

综上所述, 本试验证明了 5-ALA 能够促进苹果叶片气孔开放。这是其提高光合速率的重要方面, 但不损害植株抗旱性, 甚至更有利于抗旱性提高。其中原因还有待于进一步阐明。

## References

- Akram N A, Ashraf M. 2013. Regulation in plant stress tolerance by a potential plant growth regulator, 5-aminolevulinic acid. *J Plant Growth Regul*, 32: 663 – 679.
- Ali B, Wang B, Ali S, Ghani M A, Hayat M T, Yang C, Xu L, Zhou W J. 2013. 5-aminolevulinic acid ameliorates the growth, photosynthetic gas exchange capacity, and ultrastructural changes under cadmium stress in *Brassica napus*. *J Plant Growth Regul*, 32: 604 – 614.
- Al-Thabet S S. 2006. Promotive effect of 5-aminolevulinic acid on growth and yield of wheat grown under dry conditions. *J Agron*, 5: 45 – 49.
- Cheng Ju-e, Xiao Qi-ming, Cheng Fei-xue, Liu Yong. 2007. 5-aminolevulinic acid to promote the effect on photosynthesis and stress tolerance of greenhouse tobacco. *Hunan Agric Sci*, (4): 58 – 60. (in Chinese)
- 程菊娥, 肖启明, 成飞雪, 刘 勇. 2007. 5-氨基乙酰丙酸对温室烟草的光合作用及抗逆性的促进效应. *湖南农业科学*, (4): 58 – 60.
- Cheng Xue-hui, Feng Xin-xin, Zhang Zhi-ping, Shen Ming, Wang Liang-ju. 2012. Effects of “Alstrong” amino-acid fertilizer on photosynthetic efficiency and yield of strawberry in plastic tunnels. *J Fruit Sci*, 29 (5): 883 – 889. (in Chinese)
- 成学慧, 冯新新, 张治平, 申 明, 汪良驹. 2012. “爱乐壮”氨基酸肥料对大棚草莓叶片光合效率和产量的影响. *果树学报*, 29 (5): 883 – 889.
- Dong Fa-cai, Zhou Yun, Yang Ye, An Guo-yong, Song Chun-peng. 2002. The roles of ABA and  $\text{H}_2\text{O}_2$  in NaCl-induced stomatal closure in *Arabidopsis* guard cells. *J Henan Univ: Natural Sci*, 32 (3): 29 – 32. (in Chinese)
- 董发才, 周 云, 杨 叶, 安国勇, 宋纯鹏. 2002. ABA 和  $\text{H}_2\text{O}_2$  在 NaCl 诱导的气孔关闭中的作用. *河南大学学报: 自然科学版*, 32 (3):



29 - 32.

- Duan Chun-hui. 2013. Regulation of 5-aminolevulinic acid (ALA) on thinning of pear [M. D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Agricultural University. (in Chinese)
- 段春慧. 2013. 5-氨基乙酰丙酸在梨树上的疏花效应及其机理研究 [硕士学位论文]. 南京: 南京农业大学.
- Guo Lei, Cai Zhi-xiang, Zhang Bin-bin, Xu Jian-lan, Song Hong-feng, Ma Rui-juan. 2013. The mechanism analysis of anthocyanin accumulation in peach accelerated by ALA. *Acta Horticulturae Sinica*, 40 (6): 1043 - 1050. (in Chinese)
- 郭磊, 蔡志翔, 张斌斌, 许建兰, 宋宏峰, 马瑞娟. 2013. 5-氨基乙酰丙酸促进桃果皮提前着色机制研究. *园艺学报*, 40 (6): 1043 - 1050.
- Huang Rong-feng, Wang Xue-chen. 1996. Advances in mechanism of stomatal movements. *Chin J Appl Envi Biol*, 2 (3): 320 - 326. (in Chinese)
- 黄荣峰, 王学臣. 1996. 气孔运动机理研究进展. *应用与环境生物学报*, 2 (3): 320 - 326.
- Kang Lang, Cheng Yun, Wang Liang-ju. 2006. Effects of 5-aminolevulinic acid (ALA) on the photosynthesis and antioxidative enzyme activities of the leaves of greenhouse watermelon in summer and winter. *Acta Bot Bor-Occid Sin*, 26 (1): 2297 - 2301. (in Chinese)
- 康琅, 程云, 汪良驹. 2006. 5-氨基乙酰丙酸对秋冬季大棚西瓜叶片光合作用及抗氧化酶活性的影响. *西北植物学报*, 26 (1): 2297 - 2301.
- Li Bao-zhu, An Guo-yong, Han Shuan. 2012. Function and signaling of plant hormone ABA under water stress. *Acta Phytophysiol Sin*, 48 (1): 11 - 18. (in Chinese)
- 李保珠, 安国勇, 韩栓. 2012. 植物激素 ABA 在水分胁迫下的功能及信号途径. *植物生理学报*, 48 (1): 11 - 18.
- Li Cui, Feng Xin-xin, Zhang Zhi-ping, Sun Xin-e, Wang Liang-ju. 2012. Studies on salt tolerance in tomato plants by transformation of *YHem1*. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (10): 1937 - 1948. (in Chinese)
- 李翠, 冯新新, 张治平, 孙新娥, 汪良驹. 2012. 转 *YHem1* 番茄植株耐盐性的研究. *园艺学报*, 39 (10): 1937 - 1948.
- Liu Wei-qin, Kang Lang, Wang Liang-ju. 2006. Effects on strawberry photosynthesis and relations to antioxidant enzymes of ALA. *Acta Bot Bor-Occid Sin*, 26 (1): 57 - 62. (in Chinese)
- 刘卫琴, 康琅, 汪良驹. 2006. ALA 对草莓光合作用的影响及其与抗氧化酶的关系. *西北植物学报*, 26 (1): 57 - 62.
- McAinsh M R, Clayton H, Mansfield T A, Hetherington A M. 1996. Changes in stomatal behavior and guard cell cytosolic free calcium in response to oxidative stress. *Plant Physiol*, 1114: 1031 - 1042.
- Miao Yu-chen. 2002. Study of hydrogen peroxide and calcium signaling in ABA-induced stomatal movement in *Vicia faba* [M. D. Dissertation]. Zhengzhou: Henan University. (in Chinese)
- 苗雨晨. 2002. ABA 诱导蚕豆气孔运动中  $H_2O_2$  和  $Ca^{2+}$  信号转导机制研究 [硕士学位论文]. 郑州: 河南大学.
- Nishihara E, Kondo K, Parvez M M, Takahashi K, Watanabe K, Tanaka K. 2003. Role of 5-aminolevulinic acid (ALA) on active oxygen-scavenging system in NaCl-treated spinach (*Spinacia oleracea*). *J Plant Physiol*, 160 (9): 1085 - 1091.
- Quan Hong, Shi He-ping, Li Ling. 2003. Signal transduction of ABA inducing stomatal closure. *Chin Bull Bot*, 20 (6): 664 - 670. (in Chinese)
- 权宏, 施和平, 李玲. 2003. 脱落酸诱导气孔关闭的信号转导研究. *植物学通报*, 20 (6): 664 - 670.
- Roy C B, Vivekanandan M. 1998. Hormonal activities of 5-aminolevulinic acid in callus induction and micropropagation. *Plant Growth Regul*, 26: 15 - 18.
- Shang Zhong-lin, Ma Li-geng, Wang Xue-chen, Sun Da-ye. 2001a. Effects of extracellular calmodulin on the cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration in lily pollen grain. *Acta Bot Sin*, 43 (1): 12 - 17. (in Chinese)
- 尚忠林, 马力耕, 王学臣, 孙大业. 2001a. 细胞外钙调素对百合花粉细胞内钙离子浓度的影响. *植物学报*, 43 (1): 12 - 17.
- Shang Zhong-lin, Wang Yong-fei, Qian Hong, Ma Li-geng, Sun Da-ye. 2001b. The measurement of calcium fluorescence in lily pollen cells. *Plant Physiol Commun*, 37 (4): 319 - 322. (in Chinese)
- 尚忠林, 王永飞, 钱洪, 马力耕, 孙大业. 2001b. 百合花粉细胞中钙离子的荧光测定法. *植物生理学通讯*, 37 (4): 319 - 322.
- Shen M, Zhang Z P, Wang L J. 2011. Effect of 5-aminolevulinic acid (ALA) on leaf diurnal photosynthetic characteristics and antioxidant activity in pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) // Najafpour M M. Artificial photosynthesis. InTech: 239 - 265.
- Su Chang-hong, Zhong Xiu-li, Wang Dao-long, Li Mao-song. 2006. Effects of different chemicals on resistance of tomato seedling to chilling under low light. *J Nat Disasters*, 15 (6): 312 - 317. (in Chinese)
- 苏常红, 钟秀丽, 王道龙, 李茂松. 2006. 几种化学物质对番茄幼苗耐低温弱光能力的影响. *自然灾害学报*, 15 (6): 312 - 317.
- Wang L J, Jiang W B, Liu H, Liu W Q, Kang L, Hou X L. 2005. Promotion by 5-aminolevulinic acid of germination of pakchoi (*Brassica campestris*

- ssp. *chinensis* var. *communis* Tsen et Lee) seeds under salt stress. *J Integrative Plant Biol*, 47: 1084 – 1091.
- Wang L J, Sun Y P, Zhang Z P, Kang L. 2010. Effects of 5-aminolevulinic acid (ALA) on photosynthesis and chlorophyll fluorescence of watermelon seedlings grown under low light and low temperature conditions. *Acta Hort*, (856): 159 – 166.
- Wang Liang-ju, Jiang Wei-bing, Huang Bao-jian. 2004. Promotion of photosynthesis by 5-aminolevulinic acid (ALA) during and after chilling stress in melon seedlings grown under low light condition. *Acta Horticulturae Sinica*, 31 (3): 321 – 326. (in Chinese)
- 汪良驹, 姜卫兵, 黄保健. 2004. 5-氨基乙酰丙酸对弱光下甜瓜幼苗光合作用和抗冷性的促进效应. *园艺学报*, 31 (3): 321 – 326.
- Wang Liang-ju, Jiang Wei-bing, Zhang Zhen, Yao Quan-hong, Matsui Hiroyuki, Ohara Hitoshi. 2003. Biosynthesis and physiological activities of 5-aminolevulinic acid (ALA) and its potential application in agriculture. *Plant Physiol Comm*, 39 (3): 185 – 192. (in Chinese)
- 汪良驹, 姜卫兵, 章 镇, 姚泉洪, 松井弘之, 小原均. 2003. 5-氨基乙酰丙酸的生物合成和生理活性及其在农业中的潜在应用. *植物生理学通讯*, 39 (3): 185 – 192.
- Wang Liang-ju, Zhou Xie. 1989. Biosynthesis and regulation of abscisic acid in higher plants. *Plant Physiol Comm*, (2): 7 – 12. (in Chinese)
- 汪良驹, 周 燮. 1989. 高等植物脱落酸生物合成及其调节. *植物生理学通讯*, (2): 7 – 12.
- Wei Z Y, Zhang Z P, Lee M R, Sun Y P, Wang L J. 2012. Effect of 5-aminolevulinic acid on leaf senescence and nitrogen metabolism of pakchoi under different nitrate levels. *J Plant Nutri*, 35: 49 – 63.
- Xie L, Wang Z H, Cheng X H, Gao J J, Zhang Z P, Wang L J. 2013. 5-aminolevulinic acid promotes anthocyanin accumulation in Fuji apples. *Plant Growth Regul*, 69: 295 – 303.
- Xie Li, Cheng Xue-hui, Feng Xin-xin, Yang Tao, Zhang Zhi-ping, Wang Liang-ju. 2013. Effects of an amino acid fertilizer on the leaf photosynthesis and fruit quality of ‘Summer Black’ grape. *J Nanjing Agric Univ*, 36 (2): 31 – 37. (in Chinese)
- 谢 荔, 成学慧, 冯新新, 杨 涛, 张治平, 汪良驹. 2013. 氨基酸肥料对‘夏黑’葡萄叶片光合特性与果实品质的影响. *南京农业大学学报*, 36 (2): 31 – 37.
- Xu Xiao-jie, Zou Zhi-rong, Qiao Fei, Wang Wei, Zhang Bing-kai, Qi Xiang-ling. 2008. Effects of ALA on tomato in photosynthesis, activity of protective enzymes and yield under NaCl stress. *Agric Res Arid Areas*, 26 (4): 131 – 135. (in Chinese)
- 徐晓洁, 邹志荣, 乔 飞, 王 魏, 张丙凯, 祁向玲. 2008. ALA 对 NaCl 胁迫下不同品种番茄植株光合作用、保护酶活性及果实产量的影响. *干旱地区农业研究*, 26 (4): 131 – 135.
- Yang Jin-hua, Du Ke-jiu. 2011. Research progress on stomatal movement mechanism. *Hebei J Fores Orchard Res*, 26 (1): 47 – 53. (in Chinese)
- 杨金华, 杜克久. 2011. 植物叶片气孔运动机制研究进展. *河北林果研究*, 26 (1): 47 – 53.
- Yao Su-mei, Liu Ming-jiu, Ru Zhen-gang, Yang Wen-ping, Feng Su-wei. 2010. Effects of 5-aminolevulinic acid on leaf gas exchange and water use efficiency in winter wheat. *Plant Nutri Ferti Sci*, 16 (1): 242 – 246. (in Chinese)
- 姚素梅, 刘明久, 茹振钢, 杨文平, 冯素伟. 2010. ALA 对冬小麦叶片气体交换和水分利用效率的影响. *植物营养与肥料学报*, 16 (1): 242 – 246.
- Youssef T, Awad M A. 2008. Mechanisms of enhancing photosynthetic gas exchange in date palm seedlings (*Phoenix dactylifera* L.) under salinity stress by a 5-aminolevulinic acid-based fertilizer. *J Plant Growth Regul*, 27: 1 – 9.
- Zhang W H, Rengel Z. 1998. Determination of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in cells of intact wheat root: Loading of acetoxymethyl ester of fluo-3 under low temperature. *Plant J*, 15 (1): 147 – 161.
- Zhang Yuan-hua, Song Xi-gui, She Xiao-ping. 2005. Effect of exogenous hydrogen peroxide on stomatal movement in *Vicia faba*. *J Shanxi Normal Univ: Natural Sci*, 33 (2): 94 – 97. (in Chinese)
- 张媛华, 宋喜贵, 余小平. 2005. 外源过氧化氢对蚕豆气孔运动的影响. *陕西师范大学学报: 自然科学版*, 33 (2): 94 – 97.
- Zhang Yuan-hua. 2012. Signal transduction in dark-regulated stomatal closure. *J Anhui Agric Sci*, 40: 8855, 9023. (in Chinese)
- 张媛华. 2012. 暗诱导气孔关闭中的信号转导. *安徽农业科学*, 40: 8855, 9023.
- Zhang Zhi-ping, Wang Liang-ju, Yao Quan-hong. 2008. Study on leaf photosynthesis and chlorophyll fluorescence of transgenic tobacco over-producing 5-aminolevulinic acid (ALA). *Acta Bot Bor-Occid Sin*, 28 (6): 1196 – 1202. (in Chinese)
- 张治平, 汪良驹, 姚泉洪. 2008. 过量合成 ALA 转基因烟草叶片光合与叶绿素荧光特性的研究. *西北植物学报*, 28 (6): 1196 – 1202.