

# 乙烯参与 ALA-ABA/黑暗调控的苹果叶片气孔运动

胡 淑, 安玉艳, 汪良驹\*

(南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

**摘 要:** 以‘富士’苹果组培苗离体叶片下表皮为材料, 运用不同试剂结合气相色谱、激光共聚焦扫描显微镜、光学显微镜和 qRT-PCR 等技术, 从气孔开度、乙烯释放、保卫细胞  $H_2O_2$  及黄酮醇水平和基因表达等方面, 研究了乙烯在 5-氨基乙酰丙酸 (ALA) 抑制脱落酸 (ABA) 或黑暗诱导的气孔关闭过程中的作用。结果表明, ALA 促进苹果叶片乙烯释放, 而乙烯生物合成抑制剂氨基乙基乙烯基甘氨酸 (AVG) 及乙烯受体抑制剂 1-甲基环丙烯 (1-MCP) 削弱 ALA 对 ABA 或黑暗诱导气孔关闭的抑制效应。ALA 上调乙烯生物合成及信号转导相关基因的表达。AVG 削弱 ALA 抑制 ABA 或黑暗诱导的  $H_2O_2$  上升效应, 也削弱 ALA 对保卫细胞黄酮醇积累的促进效应。据此认为, 外源 ALA 通过上调基因表达, 促进叶片保卫细胞中乙烯生物合成和信号转导, 诱导黄酮醇积累, 清除 ABA 或黑暗诱导增加的  $H_2O_2$ , 抑制气孔关闭, 从而为光合作用所需的气体交换打开通道。

**关键词:** 苹果; ALA; ABA; 黑暗; 乙烯;  $H_2O_2$ ; 黄酮醇; 气孔运动

**中图分类号:** S 661.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2020) 03-0409-12

## Ethylene is Involved in the Regulation of Stomatal Movement by ALA-ABA/dark in Apple Leaves

HU Shu, AN Yuyan, and WANG Liangju\*

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

**Abstract:** In order to investigate the possible regulatory roles of the gaseous hormone ethylene in the inhibitory effect of ALA on ABA- or dark-induced stomatal closure, the stomatal aperture, ethylene production,  $H_2O_2$  and flavonol levels in guard cells and gene expressions in the abaxial epidermis of detached apple (*Malus × domestica* Borkh. ‘Fuji’) leaves were studied using pharmacology, gas chromatography, laser confocal scanning microscope, optical microscope and qRT-PCR techniques. The results showed that the ALA treatment promoted ethylene release, while both aminoethoxyvinylglycine (AVG), an ethylene biosynthetic inhibitor, and 1-methylcyclopropene (1-MCP), an ethylene receptor inhibitor, repressed the inhibitory effect of ALA on ABA or dark-induced stomatal closure. Exogenous ALA up-regulated expression of the genes related to ethylene biosynthesis and its signal transduction. AVG weakened the inhibition of ALA on ABA- and dark-induced  $H_2O_2$  accumulation, as well as ALA-induced

收稿日期: 2020-01-18; 修回日期: 2020-03-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31772253, 31401820); 江苏省高校优势学科项目

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

flavonol accumulation in guard cells. It can be concluded that ALA up-regulates gene expressions to induce ethylene biosynthesis and signal transduction, which positively regulate the flavonol accumulation to reduce the  $H_2O_2$  content and promote the stomatal opening, benefiting  $CO_2$  entrance during photosynthesis.

**Keywords:** apple; ALA; ABA; dark; ethylene;  $H_2O_2$ ; flavonol; stomatal movement

多种环境因素如干旱、水涝 (Atkinson et al., 2008)、光照 (Baroli et al., 2007) 和黑暗, 植物激素如 IAA、CTK (张蓓 等, 2008)、ABA (权宏 等, 2003) 和乙烯 (Desikan et al., 2006; Ge et al., 2015) 等均参与气孔运动调节, 并影响到植物生长发育。

5-氨基乙酰丙酸 (5-Aminolevulinic acid, ALA) 是叶绿素、血红素及光敏素发色团等四吡咯化合物生物合成的关键前体。ALA 具有植物激素活性 (Bindu & Vivekanandan, 1998; Akram & Ashraf, 2013), 特别是在低温 (Hotta et al., 1998)、盐渍 (Nishihara et al., 2003)、弱光 (汪良驹 等, 2004)、干旱 (Liu et al., 2011)、高温 (Zhang et al., 2012)、水涝 (An et al., 2016b) 和光合午休 (孙新娥 等, 2011) 等条件下, 其能提高植物光合效率 (汪良驹 等, 2003; Wu et al., 2018)。汪良驹等 (2004) 首先发现外源 ALA 显著增大甜瓜叶片气孔开度, 提高光合速率和耐冷性。此后研究者相继发现, ALA 可以降低枣树叶片气孔限制值 (Youssef & Awad, 2008), 增大胡椒 (Korkmaz et al., 2010)、葡萄 (谢荔 等, 2013)、苹果 (高晶晶 等, 2013) 等叶片气孔导度, 说明 ALA 调控气孔开度效应具有普遍意义。陈令会等 (2014) 探讨 ALA 对苹果叶片气孔运动调节机理发现, ALA 能够抑制 ABA 或黑暗诱导的气孔关闭, 并证明其与保卫细胞内  $H_2O_2$  水平和胞质  $Ca^{2+}$  浓度有关。此后刘龙博等 (2016)、An 等 (2016a, 2016b)、熊丽君等 (2018) 和胡健等 (2019) 相继报道了 ALA 拮抗 ABA 或黑暗诱导的苹果、拟南芥叶片气孔关闭过程涉及基因表达、黄酮醇积累、ROS 清除、 $[Ca^{2+}]_{cyt}$  和胞质 pH 下降以及细胞微管骨架聚合等。但是, ALA-ABA/黑暗调节气孔运动过程是否涉及乙烯目前还不清楚。

乙烯调节植物生长发育各个方面 (Kendrick & Chang, 2008), 但是乙烯调控气孔运动效应却存在争议。Pallas 和 Kay (1982) 提出乙烯导致花生叶片气孔关闭, 但 Arve 和 Torre (2015) 却认为乙烯抑制 ABA 诱导的番茄叶片气孔关闭。Tanaka 等 (2005) 提出生长素和细胞分裂素抑制 ABA 诱导的拟南芥叶片气孔关闭需要乙烯的介导。Watkins 等 (2014) 进一步提出乙烯抑制 ABA 诱导气孔关闭与其诱导保卫细胞黄酮醇积累, 进而清除 ROS 有关。在 ALA 调控气孔运动中, 刘龙博等 (2016) 证明, ALA 能够诱导保卫细胞黄酮醇积累, 抑制 ABA 诱导的 ROS 爆发, 进而抑制气孔关闭。据此推测, 乙烯可能参与到 ALA-ABA/黑暗调节叶片气孔运动。

本研究中以苹果离体叶片下表皮为材料, 运用药剂学方法, 结合激光扫描共聚焦显微观察和 qRT-PCR 技术, 分析了乙烯在 ALA 抑制 ABA/黑暗诱导的气孔关闭过程中的作用, 阐明乙烯与  $H_2O_2$ 、黄酮醇的上下游关系, 以期从气孔调节的角度揭示 ALA 提高植物叶片光合速率的生理机制, 为其在农业生产上的应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料及其表皮条制备

试验在南京农业大学校内进行。材料为‘富士’苹果 (*Malus × domestica* Borkh.) 组培苗, 由

本实验室繁育保存。幼苗生长环境为 16 h/8 h 光/暗周期, 温度 25 °C/20 °C, 光照强度 40  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。  
选取组培苗中长势良好的完全展开叶片, 用镊子夹取, 避开叶脉, 用刀片轻轻刮除叶肉组织, 并用毛刷去除细碎难去除部分, 置于 Mes-KCl(含 10 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$  Mes, 50 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$  KCl, 0.1 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$  CaCl<sub>2</sub>, 并用 Tris 调至 pH 6.4) 缓冲液中培养。

1.2 不同药剂处理对苹果叶片气孔开度的影响试验

为了探讨乙烯在 ALA-ABA/黑暗调节苹果叶片下表皮气孔运动中的作用, 分别设立光照下和黑暗下乙烯合成和信号转导抑制剂试验, 以不添加任何药剂的 Mes-KCl 缓冲液为对照。各药剂浓度为: ALA 0.5 mg  $\cdot \text{L}^{-1}$ ; ABA 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; AVG 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 1-MCP 0.5  $\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$  (AVG 和 1-MCP 浓度经预试验筛选确定)。黑暗下试验先将叶片经光照 (光强 240  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) 3 h, 诱导气孔完全开放后, 所有药剂添加与黑暗处理同步。参照刘龙博等 (2016) 的方法在光照或黑暗条件下每隔 30 min 观察 1 次气孔开度, 并拍照, 以便测定开度大小。每个数据点观测 60 个气孔中央横径, 计算平均值。

1.3 ALA 处理对苹果叶片乙烯释放的影响试验

为了探讨 ALA 对苹果叶片乙烯释放的影响, 将 0.1 g 苹果组培苗离体叶片分别置于盛有 Mes-KCl 缓冲液(对照)或含 0.5 mg  $\cdot \text{L}^{-1}$  ALA 的 Mes-KCl 缓冲液(处理)中光照培养(光强 240  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) 3 h, 然后转移至装有 30 mL Mes-KCl 缓冲液的 50 mL 具胶塞密闭瓶中, 每隔 30 min 用 20 mL 注射器抽取瓶内气体, 用气相色谱仪检测乙烯含量, 计算出样品中乙烯浓度和乙烯生成速率(刘志勇 等, 2006)。乙烯浓度 ( $\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$ ) = (样品峰高/标准乙烯峰高)  $\times$  标样浓度; 乙烯生成速率 ( $\mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) = (乙烯浓度  $\times$  容器体积) / (样品质量  $\times$  密封时间)。每个时间点样品均设 3 次生物学重复, 取平均值。

1.4 苹果叶片下表皮 RNA 的提取及 qRT-PCR 分析

将苹果叶片下表皮条置于 Mes-KCl 缓冲液中光照培养 3 h (光强 240  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), 促使气孔完全开放后, 转移至含有 0.5 mg  $\cdot \text{L}^{-1}$  ALA 的 Mes-KCl 缓冲液中, 以单纯 Mes-KCl 缓冲液为对照, 继续光照培养 1 h, 液氮冻样以备用。

用天根 (TIANGEN) 多糖多酚植物总 RNA 试剂盒提取 RNA, 并反转录为 cDNA, -80 °C 保存备用。用 Primer premier 5.0 软件设计相关基因引物 (表 1), 并进行 qRT-PCR, 以苹果 *MdUBQ* 为内参基因, 利用 2<sup>- $\Delta\Delta\text{CT}$</sup>  (Livak & Schmittgen, 2001) 计算基因的相对表达量。每次测定至少 3 次生物学重复, 取平均值。

表 1 乙烯相关基因 qRT-PCR 引物序列  
Table 1 Primers of genes related to ethylene

基因名称 Primer name	正向引物 (5' - 3') Forward primer	反向引物 (5' - 3') Reverse primer
<i>MdUBQ</i>	CTCCGTGGTGGTTTTAAGT	GGAGGCAGAAACAGTACCAT
<i>MdACS1</i>	TAAGAAGCGTTGGCAGAG	GTGAGTGAGGCATTGGTG
<i>MdACO-4</i>	GGACGGAGAGTGGGTGATG	GGGTTGGTGCTGGGTAGATC
<i>MdETR-2</i>	GAGCTCGTTGATGTTGTCGC	GATTGCCTGCATTGGTGTCC
<i>MdEIN3-1</i>	ATGTGGGCTCTTGGTGTAATC	ACTTTGAGGAGGCTCGAAATC
<i>MdEIN3-2</i>	TCACAGGAACAAGCTCGGAG	ATTGTCAGAAGCGCCACTCA

1.5 保卫细胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 黄酮醇 含量测定

参照陈令会等（2014）的方法，将悬浮培养 3 h 的叶片转至添加不同药剂处理的 Mes-KCl 缓冲液中继续孵育 1 h，取出叶片，制备下表皮，用 ROS 荧光染料 H<sub>2</sub>DCF-DA 进行孵育染色，在激光共聚焦显微镜（LSCM）下观察保卫细胞内的 ROS 荧光强度，以荧光强度计算 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 相对含量。LSCM 观测时激发波长为 488 nm，发射波长为 535 nm。

参照刘龙博等（2016）方法，将悬浮培养 3 h 的叶片转至不同药剂处理的 Mes-KCl 缓冲液中孵育 1 h，取出叶片，制备下表皮，参照 Watkins 等（2014）的方法用黄酮醇荧光染料（二苯基硼酸氨基乙酯，DPBA）染色，在 LSCM 下观察荧光强度，以荧光强度表示黄酮醇相对含量。

1.6 统计分析

所有处理至少设 3 次生物学重复，每个重复随机选取 10 个以上视野，各观测 2~3 个保卫细胞气孔开度或 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量，共测定至少 40 个以上保卫细胞，取平均值。经方差分析和邓肯氏多重比较后，当  $P \leq 0.05$  时差异显著。

2 结果与分析

2.1 乙烯抑制剂对 ALA-ABA 调控的苹果叶片气孔运动的影响

结果（表 2）显示，对照气孔开度在 120 min 内保持稳定，ALA 单独处理气孔开度也无明显变化；ABA 处理导致气孔开度减小，在 30 min 时显著低于对照（ $P < 0.05$ ），且随时间延长气孔愈加减小。到 120 min 时，气孔开度仅为对照的 52%；ALA 和 ABA 共处理削弱 ABA 效应，即 ALA 能够拮抗 ABA 诱导的气孔关闭。

**表 2 乙烯抑制剂 AVG 和 1-MCP 对 ALA-ABA 共同调节苹果叶片气孔运动的效应**  
**Table 2 Effects of ethylene inhibitors AVG and 1-MCP on ALA-ABA co-regulated stomatal movement in apple leaves**

处理 Treatment	不同处理时间气孔开度/ $\mu\text{m}$ Stomatal aperture				
	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
对照 Control	7.89 ± 0.13 a	8.01 ± 0.18 a	8.07 ± 0.14 a	8.00 ± 0.15 a	7.85 ± 0.16 a
ALA (0.5 mg · L <sup>-1</sup> )	8.02 ± 0.11 a	8.14 ± 0.11 a	7.94 ± 0.14 a	7.95 ± 0.17 a	7.94 ± 0.16 a
ABA (10 $\mu\text{mol}$ · L <sup>-1</sup> )	8.00 ± 0.18 a	7.14 ± 0.15 bcd	5.82 ± 0.15 klmn	4.82 ± 0.12 q	4.17 ± 0.10 rs
ALA + ABA	7.95 ± 0.13 a	7.35 ± 0.16 b	6.68 ± 0.15 efghi	6.64 ± 0.12 fghi	6.27 ± 0.14 ijk
AVG (10 $\mu\text{mol}$ · L <sup>-1</sup> )	7.98 ± 0.10 a	7.00 ± 0.13 bcdef	5.85 ± 0.13 klmn	5.31 ± 0.11 op	4.33 ± 0.12 rs
ALA + AVG	8.03 ± 0.18 a	7.24 ± 0.18 bc	6.73 ± 0.13 defgh	5.70 ± 0.13 lmno	5.61 ± 0.14 mnop
ABA + AVG	7.95 ± 0.18 a	6.15 ± 0.19 jk	5.67 ± 0.18 lmnop	3.98 ± 0.19 s	3.33 ± 0.16 t
ALA + ABA + AVG	7.98 ± 0.20 a	6.67 ± 0.15 efghi	6.09 ± 0.11 jkl	4.18 ± 0.11 rs	3.96 ± 0.12 s
1-MCP (0.5 $\mu\text{L}$ · L <sup>-1</sup> )	8.07 ± 0.17 a	6.94 ± 0.16 bcdefg	6.52 ± 0.15 ghij	5.44 ± 0.19 nop	4.52 ± 0.09 qr
ALA + 1-MCP	7.88 ± 0.12 a	7.10 ± 0.14 bcde	6.73 ± 0.09 defgh	6.09 ± 0.11 jkl	6.03 ± 0.11 klm
ABA + 1-MCP	7.98 ± 0.12 a	6.47 ± 0.10 hij	5.24 ± 0.15 p	3.51 ± 0.09 t	3.38 ± 0.10 t
ALA + ABA + 1-MCP	8.03 ± 0.13 a	6.84 ± 0.12 cdefgh	5.54 ± 0.14 nop	4.56 ± 0.13 qr	4.38 ± 0.09 rs

注：表中数据为 60 个气孔开度平均值 ± 标准误，数据后相同字母代表在 0.05 水平上差异不显著。  
Note: The data in the table are means ± SE of 60 stomata apertures. The same letters behind data represent no significant difference at 0.05 level.

另一方面，乙烯抑制剂 AVG 和 1-MCP 处理苹果叶片后，气孔开度逐渐下降，120 min 时，开度分别为对照的 54%和 56%( $P < 0.05$ )，两者间没有差异。AVG/1-MCP + ALA 处理时，AVG 或 1-MCP 抑制 ALA 促进的气孔开放，或者说 ALA 可抑制 AVG 或 1-MCP 诱导的气孔关闭，120 min 时，气

孔开度显著低于单独 ALA 处理, 而高于 AVG 或 1-MCP 单独处理 ( $P < 0.05$ )。相反, AVG/1-MCP + ABA 处理, 除 30 min 外, 所有时间点的气孔开度均低于这 3 个试剂单独处理, 说明 AVG 或 1-MCP 加剧 ABA 诱导的气孔关闭。当 ALA + AVG/1-MCP + ABA 三者共同处理时, 气孔开度显著小于 ALA + ABA 处理, 以及 ALA + AVG/1-MCP 处理, 但显著大于 ABA + AVG/1-MCP 处理 ( $P < 0.05$ )。以上结果说明, ABA、AVG 和 1-MCP 在诱导苹果叶片气孔关闭上具有类似效应, 暗示着乙烯负调控 ABA 诱导的气孔关闭, 而在 ALA 抑制 ABA 诱导的气孔关闭中起到正调控作用。但从另一角度看, ALA 抑制 ABA 诱导的气孔关闭并不完全依赖于乙烯, 因为在 AVG 或 1-MCP 抑制乙烯反应的同时, ALA 仍可以提高 ABA 处理下的气孔开度 (表 2)。因此, 乙烯可能只是 ALA 抑制 ABA 诱导苹果叶片气孔关闭的信号途径之一。

2.2 乙烯抑制剂对 ALA 在黑暗条件下调控的苹果叶片气孔运动的影响

结果 (表 3) 显示, 对照叶片由光下转至黑暗后, 气孔开度逐渐变小, 90 min 降到最低值 (约为初始值的 57%), 之后不再下降; ALA 单独处理叶片转入黑暗后, 气孔开度也呈下降趋势, 但在 120 min 时, 仍然比对照高 44% ( $P < 0.05$ ), 说明 ALA 能延缓黑暗下苹果叶片气孔关闭进程。AVG 或者 1-MCP 单独处理均能加剧从光下转入黑暗中的苹果叶片气孔开度下降幅度。90 min 时, AVG、1-MCP 与对照间没有明显差异; 120 min 时, 对照气孔开度与 90 min 时没有差异, 而 AVG 和 1-MCP 处理的仍然显著下降 ( $P < 0.05$ ), 说明 AVG 或 1-MCP 延长了黑暗下苹果叶片气孔关闭的总进程, 并加剧关闭程度。AVG/1-MCP + ALA 处理, 120 min 时, 气孔开度显著低于 ALA 单独处理, 却显著高于 AVG 或 1-MCP 单独处理 ( $P < 0.05$ ), 说明 AVG 和 1-MCP 均能抑制 ALA 诱导黑暗条件下的气孔开放, 而 ALA 可缓解 AVG 或 1-MCP 对气孔关闭的促进作用。由于乙烯生物合成抑制剂或乙烯受体抑制剂削弱 ALA 维持黑暗下苹果叶片气孔开度, 暗示着乙烯能促进黑暗下苹果叶片气孔开放。

表 3 黑暗条件下乙烯抑制剂 AVG 和 1-MCP 对 ALA 调节苹果叶片气孔运动的效应  
Table 3 Effects of ethylene inhibitor AVG and 1-MCP on ALA regulated stomatal movement in apple leaves under dark

处理 Treatment	不同处理时间气孔开度/ $\mu\text{m}$ Stomatal aperture				
	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
对照 Control	7.91 $\pm$ 0.18 a	6.37 $\pm$ 0.18 cdef	5.19 $\pm$ 0.13 gh	4.48 $\pm$ 0.13 ijkl	4.25 $\pm$ 0.10 kl
ALA (0.5 mg $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	7.89 $\pm$ 0.16 a	6.95 $\pm$ 0.14 b	6.75 $\pm$ 0.12 bc	6.54 $\pm$ 0.17 bcde	6.13 $\pm$ 0.10 ef
AVG (10 $\mu\text{mol} \cdot$ L <sup>-1</sup> )	8.01 $\pm$ 0.16 a	6.05 $\pm$ 0.13 f	4.64 $\pm$ 0.16 ijk	4.27 $\pm$ 0.15 kl	3.73 $\pm$ 0.17 m
ALA + AVG	8.02 $\pm$ 0.12 a	6.31 $\pm$ 0.17 cdef	5.22 $\pm$ 0.17 gh	4.76 $\pm$ 0.15 ij	4.60 $\pm$ 0.11 ijkl
1-MCP (0.5 $\mu\text{L} \cdot$ L <sup>-1</sup> )	8.01 $\pm$ 0.17 a	6.16 $\pm$ 0.12 def	4.90 $\pm$ 0.12 hi	4.17 $\pm$ 0.13 l	3.50 $\pm$ 0.12 m
ALA + 1-MCP	8.02 $\pm$ 0.18 a	6.59 $\pm$ 0.11 bcd	5.37 $\pm$ 0.13 g	4.36 $\pm$ 0.13 jkl	4.36 $\pm$ 0.11 jkl

注: 表中数据为 60 个气孔开度平均值  $\pm$  标准误, 数据后相同字母代表在 0.05 水平上差异不显著。  
Note: The data in the table were means  $\pm$  SE of 60 stomata apertures. The same letters behind data represent no significant difference at 0.05 level.

但是, ALA 抑制黑暗条件下气孔关闭并不完全依赖于乙烯, 因为在 AVG 或 1-MCP 抑制乙烯反应的同时, ALA 仍可以促进黑暗下的气孔开放。因此, 乙烯调节可能是 ALA 抑制黑暗条件下苹果叶片气孔关闭的多条途径之一。

2.3 ALA 对苹果叶片乙烯释放速率的影响

如图 1 所示, 苹果离体叶片刚转入密封瓶时, 检测不出乙烯, 但随着处理时间延长, 乙烯释放

速率迅速增加, 而且 ALA 处理显著高于对照。对照叶片乙烯释放速率在处理 30 min 时已较高, 30 ~ 60 min 无明显变化, 60 min 后逐渐降低; ALA 处理叶片的乙烯释放速率在 0 ~ 60 min 间迅速增加, 60 min 时达峰值, 之后逐渐下降。除了初始值外, 其他几个时间点的 ALA 处理叶片乙烯释放速率均高于对照, 总平均值提高 76%。

## 2.4 ALA 对苹果叶片乙烯合成和信号转导相关基因表达的影响

qRT-PCR 结果 (图 2) 表明, 外源 ALA 处理 60 min 后, 苹果叶片下表皮中与乙烯合成及信号转导相关的部分基因表达量高于对照, 其中 *ACS1* (乙烯合成前体 *ACC* 合成酶基因)、*ACO4* (*ACC* 氧化酶基因)、和 *EIN3-1* (乙烯信号转导过程的转录因子) 的表达量分别是对照的 6.1 倍、3.6 倍和 4.8 倍, *ETR2* (乙烯受体基因) 和 *EIN3-2* 表达量稍低, 但也达到了对照的 1.6 倍和 2.0 倍, 差异均达到显著水平。据此推测, ALA 处理能在基因表达水平上诱导乙烯合成增加, 信号传递增强, 从而参与到 ALA 对 ABA/暗诱导的气孔关闭的调控过程。

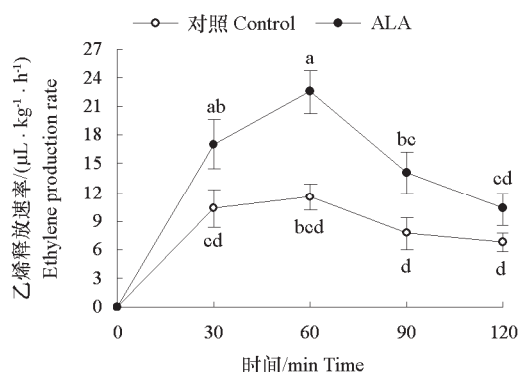


图 1 ALA 处理对苹果离体叶片乙烯释放速率的影响  
相同小写字母表示在 0.05 水平上差异不显著。下同。

Fig. 1 Effect of ALA treatment on ethylene release in detached leaves of apple

The same letters represent no significant difference at 0.05 level. The same below.

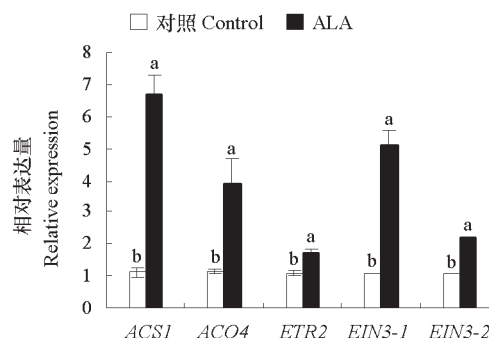


图 2 ALA 处理 60 min 的苹果叶片下表皮乙烯相关基因相对表达量

Fig. 2 Relative expressions of genes related with ethylene in the abaxial epidermis of apple leaves after ALA treatment for 60 min

## 2.5 乙烯与 $H_2O_2$ 在 ALA-ABA/黑暗调控苹果叶片气孔运动中的上、下游关系

### 2.5.1 在 ALA-ABA 调控中

业已证实, ALA-ABA 通过  $H_2O_2$ - $Ca^{2+}$  这一路径来调节苹果叶片气孔运动 (An et al., 2016b), 但尚不清楚乙烯参与 ALA-ABA 调节苹果叶片气孔运动是否也经由  $H_2O_2$ 。于是, 在利用乙烯抑制剂 AVG 抑制乙烯合成的同时, 通过荧光染色法和激光共聚焦扫描显微镜观察不同处理下保卫细胞内  $H_2O_2$  含量。结果 (图 3) 表明, 对照和 ALA 单独处理的保卫细胞 ROS 荧光强度 ( $H_2O_2$  含量) 较低, 无明显差异, 而 ABA 处理的保卫细胞 ROS 荧光明显增强, 即  $H_2O_2$  含量显著提高 ( $P < 0.05$ ), 说明 ABA 促进保卫细胞中  $H_2O_2$  生成。ALA + ABA 处理, 荧光强度高于 ALA 单独处理, 但低于 ABA 单独处理, 说明 ALA 能削弱 ABA 诱导的  $H_2O_2$  含量增加。AVG 单独处理时, 荧光强度与 ABA 处理相似, 显著高于对照, 但与 ALA + AVG 处理无显著差异, 说明 ALA 对 AVG 诱导的  $H_2O_2$  含量增



加的抑制效应未达到显著水平。在所有处理中, ABA + AVG 处理的  $H_2O_2$  含量最高, 比 ABA 或 AVG 单独处理高出 30% ~ 40%, 说明 AVG 与 ABA 在保卫细胞  $H_2O_2$  生成上有加成效应, 也暗示着 ABA 与乙烯之间有拮抗效应。AVG + ALA + ABA 处理荧光强度高于 ALA + ABA 处理。以上结果说明, 乙烯在  $H_2O_2$  上游, 负调控  $H_2O_2$  生成, 参与 ALA-ABA 调控的苹果叶片气孔运动。

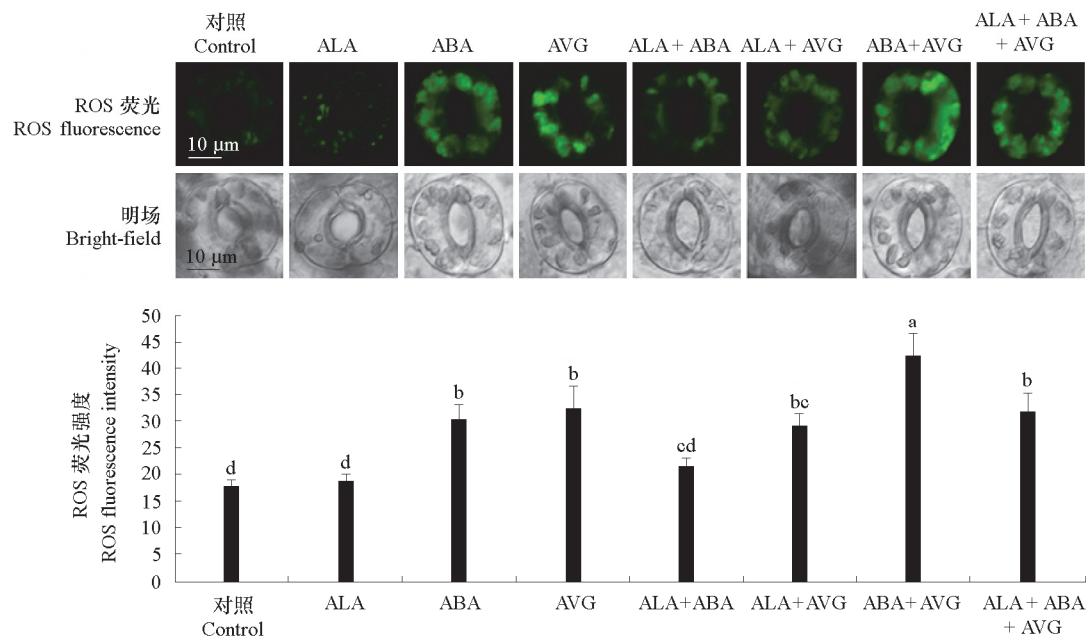


图 3 乙烯生物合成抑制剂 AVG 对 ALA-ABA 调控苹果叶片气孔运动过程中保卫细胞 ROS 荧光强度的影响  
Fig. 3 Effects of ethylene biosynthetic inhibitor AVG on ROS fluorescence intensity in the guard cells during ALA-ABA regulating stomatal movement in apple leaves

2.5.2 在 ALA - 黑暗调控中

黑暗条件下, ALA 单独处理的叶片保卫细胞 ROS 荧光强度只有对照的 53.7% (图 4), 而 AVG 单独处理的比对照高 22.1%; AVG + ALA 处理为 AVG 单独处理的 76.3%, 比 ALA 单独处理高 73.5%,

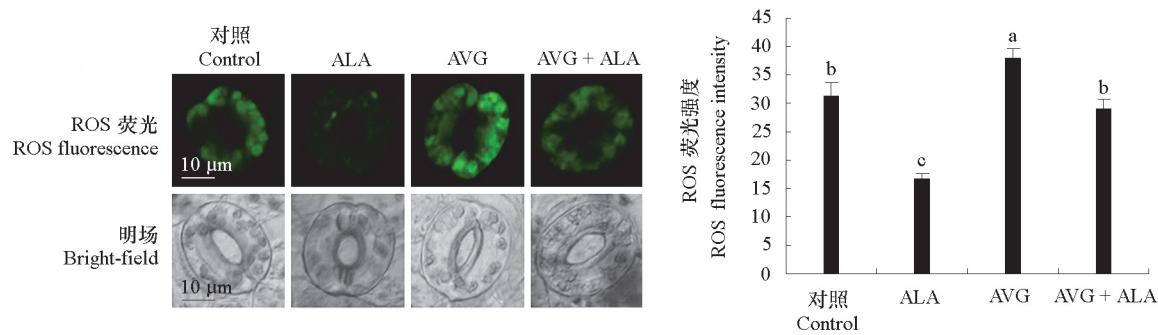


图 4 乙烯生物合成抑制剂 AVG 对 ALA 调控黑暗下苹果叶片气孔运动中保卫细胞 ROS 荧光强度的影响  
Fig. 4 Effects of ethylene biosynthetic inhibitor AVG on ROS fluorescence intensity in the guard cells during ALA regulating stomatal movement in apple leaves under dark

与对照无显著差异。这些结果表明, ALA 降低黑暗下苹果叶片保卫细胞  $H_2O_2$  含量; 乙烯合成受抑时, 黑暗导致的  $H_2O_2$  积累进一步增加, 而且 ALA 对黑暗诱导产生  $H_2O_2$  的抑制效应被削弱。再次证明, 乙烯通过降低  $H_2O_2$  的产生来促进黑暗条件下 ALA 诱导的气孔开放。

## 2.6 乙烯与黄酮醇在 ALA-ABA/黑暗调控苹果叶片气孔运动中的上、下游关系

### 2.6.1 在 ALA-ABA 调控中

图 5 显示, 与对照相比, ALA 处理叶片保卫细胞中黄酮醇荧光染料 DPBA 荧光强度(代表黄酮醇相对含量)提高 79%, 而 ABA 单独处理则与对照无显著差异( $P < 0.05$ )。ALA + ABA 处理与 ALA 单独处理无显著差异, 但显著高于 ABA 单独处理, 说明 ABA 不能阻碍 ALA 促进黄酮醇积累效应。AVG 单独处理约为对照的 68%。ABA + AVG、单独 AVG、ALA + ABA + AVG 处理相当。以上结果说明, ALA 能够促进保卫细胞黄酮醇积累, ABA 没有抑制效应, 而乙烯合成抑制剂 AVG (无论有无 ALA 存在) 有明显的抑制效应。因而, 乙烯位于黄酮醇积累上游, 参与 ALA-ABA 调控的苹果叶片气孔运动。

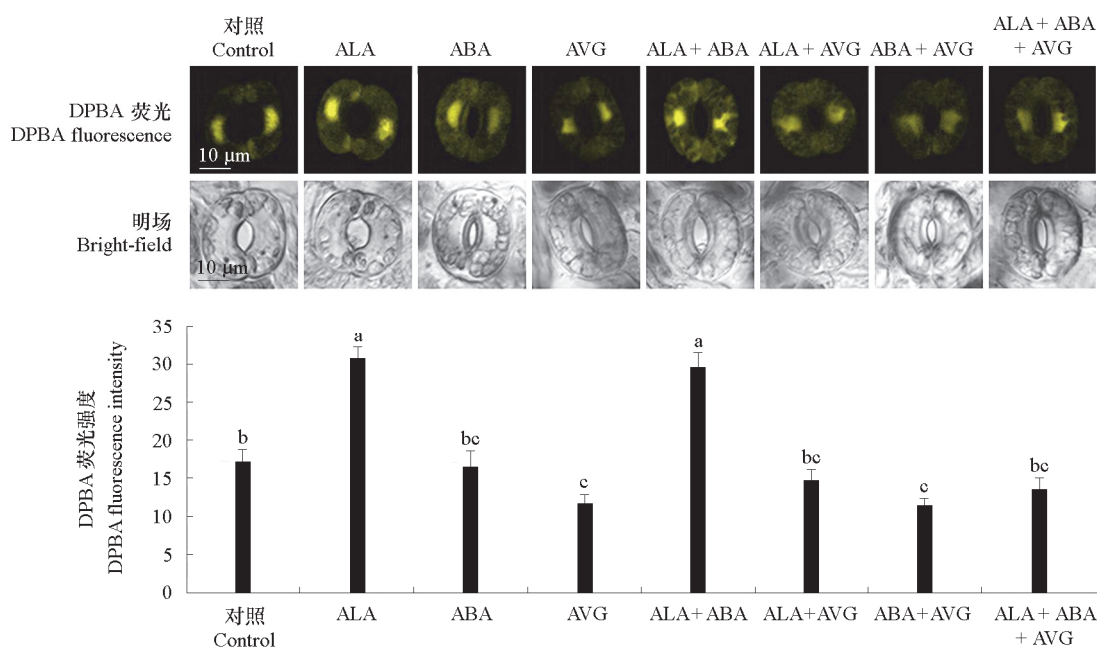


图 5 乙烯生物合成抑制剂 AVG 对 ALA-ABA 调控苹果叶片气孔运动中保卫细胞 DPBA 荧光强度的影响

Fig. 5 Effects of ethylene biosynthetic inhibitor AVG on DPBA fluorescence intensity in the guard cells during ALA-ABA regulating stomatal movement of apple leaves

### 2.6.2 在 ALA - 黑暗调控中

如图 6 所示, ALA 诱导黑暗条件下苹果叶片保卫细胞 DPBA 荧光强度(黄酮醇含量)增加 47%, 而 AVG 处理只有对照的 65% ( $P < 0.05$ )。ALA + AVG 处理介于 AVG 单独处理与对照之间。以上结果表明, ALA 显著促进黑暗条件下保卫细胞黄酮醇积累; 当使用 AVG 抑制乙烯生成时, 保卫细胞 DPBA 荧光强度显著下降。这暗示着, ALA 部分逆转 AVG 的抑制作用, 或者说 AVG 显著削弱 ALA 对黄酮醇的促进作用。因而证明, 乙烯通过上调黄酮醇积累来参与 ALA 诱导黑暗条件下气孔开放过程。



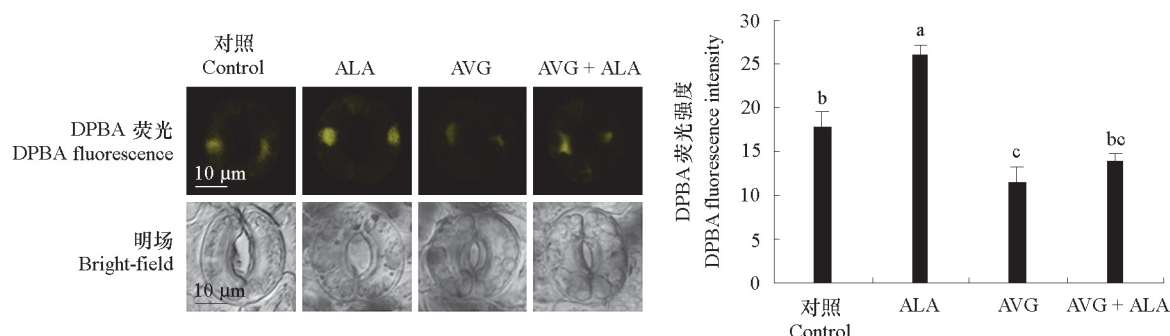


图 6 乙烯生物合成抑制剂 AVG 对 ALA 调控黑暗条件下苹果叶片气孔运动过程中保卫细胞 DPBA 荧光强度的影响  
 Fig. 6 Effects of ethylene biosynthetic inhibitor AVG on DPBA fluorescence intensity in the guard cells during ALA regulating stomatal movement of apple leaves under dark

### 3 讨论

本研究中首次发现 ALA 处理诱导苹果叶片乙烯释放速率显著增加, 而用乙烯生物合成抑制剂 AVG 或乙烯受体抑制剂 1-MCP 处理, 则 ABA 或黑暗诱导的气孔关闭幅度增大, ALA 诱导 ABA 处理或黑暗下气孔开放效应受抑制, 表明乙烯参与 ALA 对 ABA/黑暗诱导气孔运动调节。基因表达分析表明, ALA 处理诱导苹果叶片乙烯生物合成关键基因 *ACS1* 和 *ACO4* 以及乙烯信号转导基因 *ETR2*、*EIN3-1* 和 *EIN3-2* 表达上调。这印证了 ALA 诱导苹果叶片乙烯释放速率上升, 证明乙烯信号参与 ALA 抑制 ABA 或黑暗诱导的气孔关闭的作用。

刘龙博等 (2016) 提出, ALA 通过诱导苹果叶片与黄酮醇合成相关基因表达, 促进保卫细胞黄酮醇积累, 从而清除  $H_2O_2$ , 抑制 ABA 诱导的气孔关闭。拟南芥上也有相同效应 (An et al., 2016a, 2016b)。在拟南芥上, Watkins 等 (2014) 证明, 乙烯通过诱导保卫细胞积累黄酮醇以清除  $H_2O_2$ , 抑制 ABA 诱导的叶片气孔关闭。这一效应也存在于番茄 (Watkins et al., 2017)。本研究中首次提出, ALA 诱导的乙烯信号能够诱导苹果叶片保卫细胞黄酮醇积累, 后者清除  $H_2O_2$ , 促进 ABA 或黑暗条件下苹果叶片气孔开放。在此过程中, 乙烯处于 ROS 信号通路的上游。ALA 对光照下苹果叶片保卫细胞  $H_2O_2$  含量没有明显影响, 但显著抑制 ABA 诱导的  $H_2O_2$  积累, 却不能抑制 AVG 引起的  $H_2O_2$  积累。ALA 显著削弱 AVG 诱导黑暗下苹果叶片气孔保卫细胞 ROS 荧光强度上升。结果说明, ALA 诱导乙烯合成, 抑制 ABA 或黑暗诱导的  $H_2O_2$  积累, 从而维持气孔开放。AVG 抑制乙烯合成, 阻断 ALA—乙烯— $H_2O_2$  信号通路, 导致 ABA/黑暗下气孔保卫细胞内  $H_2O_2$  积累。在这过程中, ALA 诱导苹果叶片气孔保卫细胞黄酮醇积累, 而 AVG 消除 ALA 的效应, 说明 ALA 抑制 ABA/黑暗诱导的苹果叶片气孔关闭主要通过促进乙烯生成, 诱导黄酮醇积累, 清除保卫细胞 ROS 来实现。

有关乙烯对气孔运动的作用目前尚存争议。一些学者认为, 乙烯诱导拟南芥 (Desikan et al., 2006)、蚕豆 (刘国华 等, 2009)、番茄和康乃馨气孔关闭, 但对斑豆和景天科植物气孔没有影响 (Madhavan et al., 1983); 另一些学者认为, 乙烯抑制 ABA 和暗诱导气孔关闭, 而且这一过程与其降低保卫细胞  $H_2O_2$  和 NO 有关 (王娟 等, 2009; Song et al., 2011; She & Song, 2012)。笔者推测, 导致乙烯效应矛盾的原因可能与其浓度有关。在芥菜上,  $100 \sim 200 \mu L \cdot L^{-1}$  乙烯利促进气孔开放 (Iqbal et al., 2011); 在拟南芥上,  $14.45 mL \cdot L^{-1}$  乙烯利诱导气孔关闭 (Desikan et al., 2006)。显然, 高浓度乙烯导致气孔关闭, 而低浓度乙烯诱导气孔开放。本研究中没有施用外源乙烯, 但是,

陈令会等 (2014) 比较了不同浓度 ALA 的效应, 认为高浓度的 ALA 对苹果气孔开度的促进效应不如较低浓度。因而, 无论是 ALA 还是乙烯, 对气孔运动的调节作用都存在着浓度效应。适宜浓度乙烯提高植物叶片气孔导度, 促进光合作用, 促进植株生长 (Iqbal et al., 2011)。在番茄上, 乙烯促进高湿度下叶片气孔开度 (Arve & Torre, 2015); 在蚕豆上, 乙烯抑制剂抑制生长素诱导的气孔开放 (Merritt et al., 2001), 即生长素对蚕豆下表皮气孔的促进开放过程中有乙烯参与。本试验发现, 乙烯生物合成抑制剂 AVG 或乙烯受体抑制剂 1-MCP 均能削弱 ALA 对 ABA/黑暗诱导气孔关闭的抑制作用, 说明乙烯参与 ALA 抑制 ABA 及黑暗诱导的苹果叶片气孔关闭调节。

根据本结果, 结合熊丽君等 (2018) 和胡健等 (2019) 的报道, 将 ALA 抑制 ABA 诱导植物叶片气孔关闭的可能机制归纳于图 7。ABA 通过诱导胞质 pH 碱化, 引起 ROS 积累和  $\text{Ca}^{2+}$  浓度上升, 导致气孔关闭; ALA 处理则诱导乙烯释放量上升, 诱导黄酮醇积累, 清除 ROS, 降低胞质  $\text{Ca}^{2+}$  浓度, 抑制气孔关闭; 或者, ALA 提高 PP1/PP2A 磷酸酶活性, 维持微管聚合, 抑制气孔关闭。在此过程中, ROS 将导致微管解聚。这些初步的假说有利于 ALA 作为一种新型农业生长调节剂在农业生产上的应用。

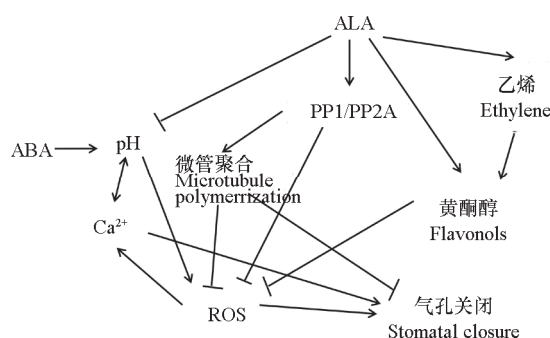


图 7 ALA 抑制 ABA 诱导苹果叶片气孔关闭的可能机制

→ 表示正调控, —| 表示负调控。

Fig. 7 Hypothesis of ALA in inhibiting stomatal closure induced by ABA in apple leaves

→ represents positive regulation and —| represents negative regulation.

## 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.
- An Y, Feng X, Liu L, Xiong L, Wang L. 2016a. ALA-induced flavonols accumulation in guard cells is involved in scavenging  $\text{H}_2\text{O}_2$  and inhibiting stomatal closure in *Arabidopsis* cotyledons. *Front Plant Sci*, 7: 1713.
- An Y, Liu L, Chen L, Wang L. 2016b. ALA inhibits ABA-induced stomatal closure via reducing  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{Ca}^{2+}$  levels in guard cells. *Front Plant Sci*, 7: 482.
- Arve L E, Torre S. 2015. Ethylene is involved in high air humidity promoted stomatal opening of tomato (*Lycopersicon esculentum*) leaves. *Funct Plant Biol*, 42: 376.
- Atkinson C J, Harrison-Murray R S, Taylor J M. 2008. Rapid flood-induced stomatal closure accompanies xylem sap transportation of root-derived acetaldehyde and ethanol in *Forsythia*. *Environ Exp Bot*, 64: 196 – 205.
- Baroli I, Price, G D, Badger M R, von Caemmerer S. 2007. The contribution of photosynthesis to the red light response of stomatal conductance. *Plant Physiol*, 146: 737 – 747.
- Bindu R C, Vivekanandan M. 1998. Hormonal activities of 5-aminolevulinic acid in callus induction and micropropagation. *Plant Growth Regul*, 26: 15 – 18.

- Chen Ling-hui, Liu Long-bo, An Yu-yan, Zhang Zhi-ping, Wang Liang-ju. 2014. Preliminary studies on the possible mechanism underlying 5-aminolevulinic acid-induced stomatal opening in apple leaves. *Acta Horticulturae Sinica*, 41 (10): 1965 – 1974. (in Chinese)
- 陈令会, 刘龙博, 安玉艳, 张治平, 汪良驹. 2014. 外源 5 - 氨基乙酰丙酸促进苹果叶片气孔开放机理的初探. *园艺学报*, 41 (10): 1965 – 1974.
- Desikan R, Last K, Harrett-Williams R, Tagliavia C, Harter K, Hooley R, Hancock J T, Neill S J. 2006. Ethylene-induced stomatal closure in *Arabidopsis* occurs via AtrbohF-mediated hydrogen peroxide synthesis. *Plant J*, 47: 907 – 916.
- Gao Jing-jing, Feng Xin-xin, Duan Chuu-hui, Li Jian-hua, Shi Zhong-xuan, Gao Fu-yong, Wang Liang-ju. 2013. Effects of ALA on photosynthesis and fruit quality in apple leaf. *J Fruit Sci*, (6): 944 – 951. (in Chinese)
- 高晶晶, 冯新新, 段春慧, 李健花, 师忠轩, 高付永, 汪良驹. 2013. ALA 提高苹果叶片光合性能与果实品质的效应. *果树学报*, (6): 944 – 951.
- Ge X, Cai H, Lei X, Zhou X, Yue M, He J. 2015. Heterotrimeric G protein mediates ethylene-induced stomatal closure via hydrogen peroxide synthesis in *Arabidopsis*. *Plant J*, 82: 138 – 150.
- Hotta Y, Tanaka T, Bingshan L, Takeuchi Y, Konnai M. 1998. Improvement of cold resistance in rice seedlings by 5-aminolevulinic acid. *Nippon Noyaku Gakkaishi*, 23: 29 – 33.
- Hu Jian, An Yu-yan, Cai Chang-yu, He Sha-sha, Wang Liang-ju. 2019. Cytoplasmic pH is involved in 5-aminolevulinic acid(ALA)-induced stomatal opening in apple leaves. *Acta Horticulturae Sinica*, 46 (10): 1869 – 1881. (in Chinese)
- 胡 健, 安玉艳, 蔡长玉, 何莎莎, 汪良驹. 2019. 胞质 pH 参与 5 - 氨基乙酰丙酸诱导的苹果叶片气孔开放. *园艺学报*, 46 (10): 1869 – 1881.
- Iqbal N, Nazar R, Syeed S, Masood A, Khan N A. 2011. Exogenously-sourced ethylene increases stomatal conductance, photosynthesis, and growth under optimal and deficient nitrogen fertilization in mustard. *J Exp Bot*, 62: 4955 – 4963.
- Kendrick M D, Chang C. 2008. Ethylene signaling: new levels of complexity and regulation. *Curr Opin Plant Biol*, 11: 479 – 485.
- Korkmaz A, Korkmaz Y, Demirkiran A R. 2010. Enhancing chilling stress tolerance of pepper seedlings by exogenous application of 5-amino-levulinic acid. *Environ Exp Bot*, 67: 495 – 501.
- Liu D, Pei Z F, Naeem M S, Ming D F, Liu H B, Khan F, Zhou W J. 2011. 5-Aminolevulinic acid activates antioxidative defence system and seedling growth in *Brassica napus* L. under water-deficit stress. *J Agron Crop Sci*, 197: 284 – 295.
- Liu Guo-hua, Liu Jing, Hou Li-xia, Tang Jing, Liu Xin. 2009. NO may mediate ethylene-induced *Vicia faba* stomatal closure as a downstream signal of  $Ca^{2+}$ . *J Mol Cell Biol*, 42 (2): 145 – 155. (in Chinese)
- 刘国华, 刘 菁, 侯丽霞, 唐 静, 刘 新. 2009. NO 可能作为  $Ca^{2+}$  的下游信号介导乙烯诱导的蚕豆气孔关闭. *分子细胞生物学报*, 42 (2): 145 – 155.
- Liu Long-bo, An Yu-yan, Xiong Li-jun, Wang Liang-ju. 2016. Flavonols induced by 5-aminolevulinic acid are involved in regulation of stomatal opening in apple leaves. *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (5): 817 – 828. (in Chinese)
- 刘龙博, 安玉艳, 熊丽君, 汪良驹. 2016. 5-ALA 诱导的黄酮醇积累参与调节苹果叶片气孔开度. *园艺学报*, 43 (5): 817 – 828.
- Liu Zhi-yong, Shen Chun-zhang, Dong Yuan-yan. 2006. Rapid determination of ethylene release in rapeseed by gas chromatography. *Chem Bioeng*, 23 (2): 55 – 56. (in Chinese)
- 刘志勇, 沈春章, 董元彦. 2006. 气相色谱法速测油菜中的乙烯释放量. *化学与生物工程*, 23 (2): 55 – 56.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25: 402 – 408.
- Madhavan S, Chrominski A, Smith B N. 1983. Effect of ethylene on stomatal opening in tomato and carnation leaves. *Plant Cell Physiol*, 24 (3): e20915.
- Merritt F, Kempe A, Tallman G. 2001. Inhibitors of ethylene synthesis inhibit auxin-induced stomatal opening in epidermis detached from leaves of *Vicia faba* L. *Plant Cell Physiol*, 42: 223 – 230.
- 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: 1085 – 1091.
- Pallas J E, Kays S J. 1982. Inhibition of photosynthesis by ethylene-a stomatal effect. *Plant Physiol*, 70: 598 – 601.

- Quan Hong, Shi He-Ping, Li Ling. 2003. Signal transduction of ABA inducing stomatal closure. *Chin Bot Bull*, 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.
- She X, Song X. 2012. Ethylene inhibits abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba* via reducing nitric oxide levels in guard cells. *New Zeal J Bot*, 50, 203 – 216.
- Song X, She X, Wang J, Sun Y. 2011. Ethylene inhibits darkness-induced stomatal closure by scavenging nitric oxide in guard cells of *Vicia faba*. *Funct Plant Biol*, 38: 767.
- Sun Xin-e, Shen Ming, Wang Zhong-hua, Li Cui, Zhang Zhi-ping, Wang Liang-ju. 2011. Effects of two leaf fertilizers on photosynthesis and fruit quality of kidney bean in solar greenhouse. *J Nanjing Agri Univ*, 34 (3): 37 – 42. (in Chinese)
- 孙新娥, 申 明, 王中华, 李 翠, 张治平, 汪良驹. 2011. 两种叶面肥对日光温室芸豆叶片光合作用和果实品质的影响. *南京农业大学学报*, 34 (3): 37 – 42.
- Tanaka Y, Sano T, Tamaoki M, Nakajima N, Kondo N, Hasezawa S. 2005. Ethylene inhibits abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 138: 2337 – 2343.
- Wang Juan, She Xiao-ping, Guo Jing. 2009. Roles of ethylene and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in light/dark-regulated stomatal movement. *J Shaanxi Nor Univ (Nat Sci Ed)*, (5): 80 – 83. (in Chinese)
- 王 娟, 余小平, 郭 静. 2009. 乙烯和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在光/暗调控气孔运动中的作用. *陕西师范大学学报 (自然科学版)*, (5): 80 – 83.
- 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 Quanhong, Matsui H, Ohara H. 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.
- Watkins J M, Hechler P J, Muday G K. 2014. Ethylene-induced flavonol accumulation in guard cells suppresses reactive oxygen species and moderates stomatal aperture. *Plant Physiol*, 164: 1707 – 1717.
- Watkins J M, Chapman J M, Muday G K. 2017. Abscisic acid-induced reactive oxygen species are modulated by flavonols to control stomata aperture. *Plant Physiol*, 175: 1807 – 1825.
- Wu Y, Jin X, Liao W B, Hu L L, Dawuda M M, Zhao X J, Tang Z Q, Gong T Y, Yu J H. 2018. 5-Aminolevulinic acid (ALA) alleviated salinity stress in cucumber seedlings by enhancing chlorophyll synthesis pathway. *Front Plant Sci*, 9: 635.
- 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.
- Xiong Li-jun, An Yu-yan, Wang Liang-ju. 2018. Mechanism research of microtubules and protein phosphatase are involved in ALA-ABA regulating stomatal movement of apple leaves. *Acta Horticulturae Sinica*, 45 (11): 2073 – 2088. (in Chinese)
- 熊丽君, 安玉艳, 汪良驹. 2018. 微管骨架和 PP1/PP2A 蛋白磷酸酶在 ALA-ABA 调控苹果叶片气孔运动中的作用. *园艺学报*, 45 (11): 2073 – 2088.
- 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 Bei, She Xiao-ping, Zhang Guang-bin, Meng Zao-ni, Song Xi-gui. 2008. The inhibitory effects of auxin and cytokinin on dark- and ABA-induced stomatal closure in broad bean. *Acta Agron Sin*, 34 (6): 1034 – 1041. (in Chinese)
- 张 蓓, 余小平, 张广斌, 孟朝妮, 宋喜贵. 2008. 生长素、细胞分裂素对黑暗和 ABA 诱导蚕豆气孔关闭的抑制效应. *作物学报*, 34 (6): 1034 – 1041.
- Zhang J, Li D M, Gao Y, Yu B, Xia C X, Bai J G. 2012. Pretreatment with 5-aminolevulinic acid mitigates heat stress of cucumber leaves. *Biol Plant*, 56: 780 – 784.