丛枝菌根真菌根外菌丝跨膜H⁺和Ca²⁺流对干旱胁迫的响应

徐丽娇^{1,2} 郝志鹏¹ 谢伟^{1,2} 李芳^{1,2} 陈保冬^{1,2*}

¹中国科学院生态环境研究中心, 城市与区域生态国家重点实验室, 北京 100085; ²中国科学院大学, 北京 100049

摘要 丛枝菌根真菌(AMF)能够和大多数陆地植物形成共生体系, 对于植物生长发育和适应各种逆境胁迫具有重要作用。很多研究表明干旱胁迫下AMF能够促进宿主植物对水分的吸收从而增强植物抗旱能力, 但目前针对AMF根外菌丝响应水分胁迫的生理变化以及AMF与宿主植物逆境信号交流的研究并不多。该研究利用AMF *Rhizophagus irregularis*和胡萝卜(*Daucus carota* var. *sativa*)毛状根双重无菌培养体系获得纯净根外菌丝, 向培养基添加聚乙二醇(PEG)模拟干旱胁迫, 运用场发射扫描电子显微镜(FE-SEM-EDS)观察干旱胁迫对AMF根外菌丝形态的影响, 同时采用非损伤微测技术(NMT)观测根外菌丝跨膜H⁺和Ca²⁺离子流变化。结果发现, PEG处理1 h后菌丝尖端和侧面发生H⁺外流和强烈的Ca²⁺内流, 荧光探针分析也显示菌丝胞内pH值显著上升、Ca²⁺浓度增加; PEG处理24 h后菌丝形态发生明显变化, 培养基pH值降低, P、Ca、Fe等元素在菌丝际积累。这些试验结果表明, 干旱胁迫下AMF根外菌丝跨膜H⁺和Ca²⁺流发生变化, 促进了菌丝与环境之间的物质交换。菌丝酸化生长环境有利于养分吸收, 并促进AMF与宿主植物之间的信号交流以增强植物的耐旱性。

关键词 丛枝菌根真菌; 干旱胁迫; 氢离子; 钙离子; 非损伤微测技术

徐丽娇, 郝志鹏, 谢伟, 李芳, 陈保冬 (2018). 丛枝菌根真菌根外菌丝跨膜H⁺和Ca²⁺流对干旱胁迫的响应. 植物生态学报, 42, 764–773. DOI: 10.17521/cjpe.2018.0089

Transmembrane H⁺ and Ca²⁺ fluxes through extraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi in response to drought stress

XU Li-Jiao^{1,2}, HAO Zhi-Peng¹, XIE Wei^{1,2}, LI Fang^{1,2}, and CHEN Bao-Dong^{1,2*}

¹State Key Laboratory of Urban and Regional Ecology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; and ²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract

Aims Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) can form symbiotic associations with most terrestrial plants to improve plant growth and stress resistance. It has been well demonstrated that AMF can promote plant acquisition of water and enhance plant tolerance to drought. In this study, AMF extraradical hyphae were obtained from *in vitro* culture of AMF *Rhizophagus irregularis* with hairy carrot (*Daucus carota* var. *sativa*) root to investigate the morphological and physiological changes of hyphae in response to drought stress induced by polyethylene glycol (PEG).

Methods The influence of drought stress on the hyphal morphology was observed by using the field emission-scanning electron microscope-energy dispersive X-ray spectroscopy (FE-SEM-EDS), while H⁺ and Ca²⁺ ion fluxes through living hyphae were monitored by non-invasive micro-test technique (NMT).

Important findings The results showed that significant H⁺ efflux and Ca²⁺ influx through the tip and side of the extraradical hyphae were detected in response to drought stress induced by PEG for 1 h. Fluorescence probing confirmed that the intracellular pH value and Ca²⁺ concentration of hyphae significantly increased under PEG treatment. The morphology of hyphae changed and the pH value of the growth medium decreased after treatment with PEG for 24 h. The P, Ca, and Fe elements accumulated at the hyphosphere to enhance the nutrient absorption by hyphae. The study confirmed that AMF regulated the transmembrane H⁺ and Ca²⁺ flux to promote the material exchange between hyphae and environment under drought stress. The acidification of the hyphosphere environment

收稿日期Received: 2018-04-18 接受日期Accepted: 2018-06-09

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项(XDB15030102)和国家自然科学基金项目(41371264和41401281)。Supported by the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (XDB15030102), and the National Natural Science Foundation of China (41371264 and 41401281).

* 通信作者Corresponding author (bdchen@rcees.ac.cn)

potentially promoted the absorption of nutrients and also the signal exchange between AMF and the host plant to enhance plant drought tolerance.

Key words arbuscular mycorrhizal fungi; drought stress; H^+ ; Ca^{2+} ; non-invasive micro-test technology

Xu LJ, Hao ZP, Xie W, Li F, Chen BD (2018). Transmembrane H^+ and Ca^{2+} fluxes through extraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi in response to drought stress. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 42, 764–773. DOI: 10.17521/cjpe.2018.0089

丛枝菌根真菌(AMF)是一类专性共生真菌, 可以与大多数陆地植物形成共生体系, 并通过多种途径促进植物的生长发育, 增强植物对各种逆境胁迫的适应能力(Smith & Read, 2008)。AMF根外菌丝在根系与土壤之间建立起物质传输通道, 将吸收的水分和营养物质快速输送给宿主植物(Chitarra *et al.*, 2016)。由于菌丝直径远小于植物根系, 因此根外菌丝能进入细小的土壤空隙获取养分和水分资源(Liu & Chen, 2007), 这对于植物适应养分缺乏和干旱胁迫具有重要意义。*Rhizophagus irregularis* (原名 *Glomus intraradices*) 是分布最广泛的一种AMF。Tisserant等(2013)通过全基因组测序方法获得了 *R. irregularis* DAOM 197198菌株的基因组数据, 为AMF真菌的生理和分子研究提供了重要基础, 也使得该菌株成为AMF生理研究的模式菌株。干旱情况下接种 *R. irregularis* 的加杨(*Populus × canadensis*)具有更高的水分利用效率和抗氧化酶活性, 此外AMF还上调根系水孔蛋白基因的表达提高植物抗旱性(Liu *et al.*, 2016)。Li等(2013)从 *R. intraradices* 中克隆了两个水通道蛋白基因 *GintAQPF1* 和 *GintAQPF2*, 并通过异源表达验证了水孔蛋白的输水功能, 为干旱胁迫下AMF向宿主植物输送水分, 从而增强植物抗旱性提供了直接的分子证据。

细胞膜质子泵, 即 H^+ -ATPase 的功能是水解ATP并将 H^+ 泵出细胞(Santi *et al.*, 2003)。 H^+ 通过细胞内外的电化学梯度进出细胞膜, 为包括阳离子、阴离子、氨基酸和糖在内的各种小分子物质的跨膜运输提供驱动力(Gaxiola *et al.*, 2007)。干旱胁迫、盐胁迫、缺磷等环境胁迫会导致质子泵发生改变(Yan *et al.*, 2002; Gévaudant *et al.*, 2007)。细胞膜质子泵活性不仅反映物质跨膜运输的能力, 还在一定程度上反映生长环境对植物生理活性的影响。玉米(*Zea mays*)可以通过提高根系细胞膜质子泵的活性来适应低pH环境, 燕麦(*Avena sativa*)在感受到干旱胁迫的早期就可以激活根系 H^+ -ATPase 来增加渗透物质的合成(Gong *et al.*, 2010)。对AMF H^+ -ATPase 的研究表明, 真菌质子泵在控制共生体营养元素和水分转运

过程中起到重要作用(Ferrol *et al.*, 2000)。Gianinazzi-Pearson等(1991)通过测试ATPases水解作用过程中释放的磷酸对ATP酶进行细胞化学研究, 证明在AMF根内、根外菌丝的质膜上均存在 H^+ -ATPase。

Ca^{2+} 是生物细胞内重要的信号物质, 在植物抵抗干旱胁迫方面具有重要作用(Ma *et al.*, 2005)。胞质内游离 Ca^{2+} 的分布以及跨膜转移是 Ca^{2+} 信号的转移和传导的基本途径, 而 Ca^{2+} 进入和流出细胞速率的变化是产生 Ca^{2+} 振荡的基础(Bunney *et al.*, 2000)。质膜 Ca^{2+} -ATPases 和 H^+ -ATPase 共同实现了质膜 H^+ / Ca^{2+} 的逆向转运和逆境信号的传递(Rudd & Franklin-Tong, 2001)。干旱胁迫可以导致细胞内游离 Ca^{2+} 浓度产生短暂而快速的升高, 胞内 Ca^{2+} 的波动对钙调蛋白、激酶和离子通道等下游调控元件产生影响(Campo *et al.*, 2014)。由钙信号传导的干旱胁迫信息会导致相关基因表达和代谢过程的改变(如渗透调节物质合成和营养元素运输的变化), 从而减轻干旱胁迫对生物机体的损害(Ludwig *et al.*, 2004; Zou *et al.*, 2015)。

细胞膜是生物遭受逆境胁迫以后受损的初始位点, 其结构及功能的改变势必会影响生物体内水分代谢以及各种无机离子的运输, 而无机离子的跨膜运输对维持植物正常生长发育起着至关重要的作用(Yoshida, 1991)。干旱胁迫下细胞会通过特定的调节机制, 改变离子和小分子的跨膜运输来调节离子平衡, 从而维持细胞的渗透压, 以抵御干旱胁迫。因此, 研究关键离子的跨膜转运过程对揭示植物在干旱胁迫下通过自我调节以维持生命活动的机制具有重要意义。Kühtreiber和Jaffe (1990)首次利用非损伤微测技术(non-invasive micro-test technology, NMT)在活体原位条件下测量了 Ca^{2+} 进出细胞的流速和方向, 该方法被广泛应用于生物体逆境应答机制研究。目前, NMT技术可以实时记录活体植物细胞各种离子的跨膜运输, 为研究植物应答环境变化提供了重要技术平台。应用这种技术, Mak等(2014)发现在不同时间长度的干旱胁迫下大豆(*Glycine max*)叶肉细胞 K^+ 、 H^+ 和 Ca^{2+} 转运情况出现显著变化, 而各种离子

的转运能力可作为重要的生理指标来衡量大豆的耐旱性。

很多研究证实菌根化植物在干旱时有更高的蒸腾速率、水分利用效率及抗氧化能力(Porcel & Ruiz-Lozano, 2004; Xiong *et al.*, 2007; Augé *et al.*, 2015)。干旱条件下AMF能够通过多种途径调控植物新陈代谢并调节抗旱相关基因,以增强植物的耐旱性(Augé & Duan, 1991; 李涛等, 2012; Xu *et al.*, 2018),然而目前对AMF自身响应水分胁迫的生理变化以及AMF与宿主植物逆境信号交流的研究却很少。本研究利用AMF-胡萝卜(*Daucus carota* var. *sativa*)毛状根双重无菌培养体系获得纯净AMF根外菌丝,应用聚乙二醇(PEG 6000)模拟干旱胁迫(PEG 6000是一种惰性的非离子型的渗透调节剂,广泛应用于模拟干旱胁迫(Zhou *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2016),结合场发射扫描电子显微镜能谱分析(FE-SEM-EDS)和NMT技术,在原位条件下研究AMF根外菌丝形态和跨膜离子流对干旱胁迫的响应,期望进一步揭示AMF与植物协同抗旱的生理机制。

1 材料和方法

1.1 植物材料

参照St-Arnaud等(1996)的方法,建立AMF-胡萝卜毛状根双重无菌培养体系。供试AMF菌株为*R. irregularis* DAOM 197198,真菌孢子先经过吐温80和氯胺T进行表面消毒,然后再用质量浓度1%的硫酸链霉素和0.5%的硫酸庆大霉素清洗,最后在1.5%的水琼脂上面萌发。将转移Ri T-DNA并且能够连续继代培养的胡萝卜毛状根接种于固体M培养基(Bécard & Fortin, 1988,液体M培养基组分参见表1。液体培养基加入1%的蔗糖和0.4%的植物凝胶即得到固体M培养基),然后在根尖部位接入10–15个萌发的AMF孢子,在25℃下黑暗培养。大概3个月后,菌根生长铺满整个培养皿后转接。

1.2 试验处理

试验在分室培养系统(分为菌根室和菌丝室)中进行(图1)。先在菌根室加入30 mL固体M培养基,然后在其中接入已被AMF侵染的胡萝卜毛状根,在25℃下黑暗倒置培养8周,待根系铺满菌根室后正置培养,并在菌丝室加入15 mL液体M培养基。继续培养4–6周直到菌丝长满菌丝室,挑选菌丝量大致相同的培养皿进行后续试验。

菌丝室中干旱处理的培养基由液体M培养基加入15%的PEG制成,对照为正常液体M培养基。处理前调节培养基pH值至6.0,每个菌丝室加入15 mL处理液,分别处理1 h和24 h,总共有4组样品:对照1 h(CK1h)、PEG处理1 h(PEG1h)、对照24 h(CK24h)和PEG处理24 h(PEG24h)。每组处理有12个培养皿(试验重复),其中6个培养皿收获菌丝作为扫描电子显微镜和荧光光谱分析的样品,同时收集液体培养基测定pH值,另外6个培养皿用于离子流分析。

1.3 培养基pH测定

将菌丝室的液体培养基收集到15 mL离心管中保存,pH值测定采用PHS-3C型酸度计(雷克斯仪器厂,上海)进行,每个样品重复测量3次。

表1 M培养基成分
Table 1 Formulation of the M medium

离子/化合物 Ion/Compound	含量 Content (mg·L ⁻¹)	离子/化合物 Ion/Compound	含量 Content (mg·L ⁻¹)
Mg ²⁺	70.8	Fe ²⁺	0.1
SO ₄ ²⁻	280.1	Mn ²⁺	1.6
K ⁺	61	Zn ²⁺	0.6
NO ₃ ⁻	230	BO ₃ ³⁻	0.24
Cl ⁻	37.2	甘氨酸 Glycine	3
H ₂ PO ₄ ⁻	4.8	维生素B ₁ Vitamin B ₁	0.1
Ca ²⁺	49	维生素B ₆ Vitamin B ₆	0.1
I ⁻	0.58	烟酸 Nicotinic acid	0.5
Na ⁺	0.43	肌醇 Inositol	50

图1 丛枝菌根真菌-胡萝卜毛状根分室培养系统示意图。左边是菌根室(mycorrhizal compartment),右边是菌丝室(hyphal compartment)。菌根室中加入用质量浓度0.4%的植物凝胶固化后的M培养基,并接入菌根化的转移Ri T-DNA胡萝卜毛状根;菌丝室加入液体M培养基,以供根外菌丝生长(参考St-Arnaud *et al.*, 1996)。
Fig. 1 Diagram of the two-compartments *in vitro* culture system of arbuscular mycorrhizal fungi with hairy carrot root. Mycorrhizal compartment was filled with solid M medium gelled with 0.4% phytagel, allowing development of mycorrhizal roots; extraradical mycelium ramified into hyphal compartment filled with liquid M medium without sucrose and phytagel, and the roots that crossed the central wall were trimmed to prevent their growth in hyphal compartment (referred to St-Arnaud *et al.*, 1996).

1.4 场发射扫描电子显微镜(FE-SEM-EDS)分析

新鲜菌丝收获后, 取适量的样品用超纯水清洗3次去除处理液, 然后置入2.5%戊二醛(溶解于pH值7.2的PIPES缓冲液中)中于4℃过夜固定, 再用相同的PIPES缓冲液清洗3次, 每次15–30 min。固定后的样品分别用30%、50%、70%、80%、90%、95%、100%的乙醇清洗(每一级浓度梯度清洗2次, 每次停留15–30 min)。将脱水后的样品放在乙酸异戊酯中过夜以置换样品中的脱水剂(Wu *et al.*, 2015)。而后再将样品置于临界点干燥仪(HC P-2, Hitachi, Tokyo, Japan)中, 通入 CO_2 进行干燥。将干燥后的菌丝粘在导电胶布上经自然干燥后, 喷金粉50 s, 然后在连接有能谱分析仪的场发射扫描电子显微镜(FE-SEM-EDS, SU-8020, Hitachi, Tokyo, Japan)下观察分析。

1.5 菌丝内 H^+ 和 Ca^{2+} 荧光光谱分析

采用pH荧光探针(BCECF AM, 碧云天, 上海)或 Ca^{2+} 荧光探针(Fluo-4 AM, 碧云天, 上海)在原位条件下分别染色菌丝室中的根外菌丝, 将菌丝置于含有 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 染料的PBS工作液中, 37℃黑暗孵育60 min进行荧光探针装载, 随后用PBS洗涤3次, 再孵育20 min保证荧光探针在菌丝内完全转化。使用激光扫描共聚焦显微镜(Leica TCS SP5II, Wetzlar, Germany)扫描样品获取荧光图像(激发波长488 nm, 发射波长512–520 nm)。

1.6 离子流测定

利用北京旭月公司的NMT测试平台(BIO-001A, YOUNGER, Barnstable, USA)测定菌丝尖端和侧面的 H^+ 和 Ca^{2+} 离子流。用石英片轻轻压住待测菌丝防止测量时电极震动使菌丝飘动。通过电脑控制将选择性离子电极尖端直接伸到菌丝室中菌丝附近且在电极尖端不触碰菌丝的情况下尽量靠近菌丝进行测定。

选择性离子电极沿x轴垂直菌丝方向进行往返测试。电极运动一次间距(从近菌丝表面一端到远菌丝表面一端)为30 μm , 运动频率为0.3–0.5 Hz。供NMT数据采集的每个测量点需测试10 min。利用ASET 2.0软件进行数据显示、图像获取、数据的预处理、电极三维位置调试和显微镜精细聚焦的步进控制等操作。

1.7 数据分析

测试离子流速可通过Fick's扩散法则计算得出,

公式如下:

$$J = -D(dc/dx)$$

式中: J 为 x 方向的离子流, D 为在特定介质中离子或分子扩散常数, dc/dx 为离子浓度梯度。离子流数据根据北京旭月公司提供的JCal V3.0软件计算得出。本试验中阳离子外流表示为正值, 内流为负值, 且所得数据是净离子流速, 即内流与外流相抵消后的离子流速。

培养基pH值、菌丝离子流、菌丝元素能谱分析结果等数据采用SPSS 18.0软件进行统计分析(SPSS, Chicago, USA)。培养基pH值采用双因素方差分析检验PEG处理、处理时间及其交互作用的显著性。元素能谱分析、离子流结果采用三因素方差分析检验PEG处理、处理时间和不同菌丝部位及其交互作用的显著性。Duncan's多重比较检验各处理之间的差异显著性($p < 0.05$; Duncan, 1955)。柱形图由Microsoft Excel 2010生成。

2 结果

2.1 PEG处理下菌丝室培养基的pH值

菌丝室添加PEG处理1 h后, 菌丝室培养基pH值显著下降至4.39 ($p < 0.05$), 而对照组没有发生明显变化。PEG处理24 h后, 菌丝室培养基pH为4.13, 而对照组pH值仍无明显变化(图2)。

2.2 PEG处理对菌丝形态及元素含量变化

在扫描电子显微镜下可以看到对照处理的菌丝

图2 PEG处理下菌丝室培养基的pH值(平均值±标准偏差, $n = 6$)。不同小写字母表示处理间差异显著 (Duncan's多重比较, $p < 0.05$)。

Fig. 2 The pH value of culture medium in hyphal compartment after treatment by PEG (mean $\pm$ SD, $n = 6$). Different lowercase letters indicate significant difference between treatments (Duncan's multiple range test, $p < 0.05$).

尖端完整, 粗细均匀, 菌丝饱满且光滑。PEG处理1 h后, 菌丝尖端出现了损伤, 在细胞壁上分布有微小的不规则孔洞, 并且尖端发生扭曲折叠; 菌丝出现脱水状萎缩, 并伴有点状损伤。在PEG处理24 h后, 菌丝形态发生了显著变化, 菌丝尖端出现较大的损伤, 细胞壁破损, 形成大小不一的凸起, 粗细

变得不均匀, 呈结状分布; 同时, 菌丝出现明显皱缩, 有突起的褶皱和损伤(图3)。

与对照相比, PEG处理菌丝表面P的原子百分比(at.%)增加, 且处理24 h显著高于处理1 h ($p < 0.05$), 而菌丝尖端和侧面两个部位之间P的at.%值无明显差异(图3; 表2)。类似地, PEG处理菌丝尖端P的质量

图3 PEG处理1 h (PEG 1 h)和24 h (PEG 24 h)后从枝菌根真菌根外菌丝FE-SEM图像和能谱分析图。CK 1 h和CK 24 h为空白对照。

Fig. 3 FE-SEM images and selective elemental analysis (by EDS) of arbuscular mycorrhizal fungi hyphae after treatment by PEG for 1 h (PEG 1 h) and 24 h (PEG 24 h). CK 1 h and CK 24 h are corresponding controls.

表2 PEG处理1 h和24 h后从枝菌根真菌菌丝尖端和侧面P、Ca和Fe的浓度值(能谱分析结果)(平均值±标准偏差, $n = 6$)

Table 2 Concentrations of P, Ca and Fe at the tip and side of arbuscular mycorrhizal fungi hyphae after treatment by PEG for 1 h and 24 h (determined by energy-dispersive X-ray spectroscopy) (mean $\pm$ SD, $n = 6$)

				P		Ca		Fe	
				原子百分比 Atom percentage content (%)	质量分数 Mass percentage content (%)	原子百分比 Atom percentage content (%)	质量分数 Mass percentage content (%)	原子百分比 Atom percentage content (%)	质量分数 Mass percentage content (%)
尖端 Tip	CK	1 h		29.53 $\pm$ 2.03 ^{cd}	30.03 $\pm$ 0.52 ^d	5.97 $\pm$ 0.68 ^c	6.14 $\pm$ 0.72 ^c	15.86 $\pm$ 0.26 ^c	24.64 $\pm$ 2.07 ^{cd}
		24 h		31.34 $\pm$ 2.34 ^c	32.85 $\pm$ 0.61 ^d	4.49 $\pm$ 0.86 ^c	5.39 $\pm$ 1.27 ^c	14.60 $\pm$ 1.26 ^c	26.53 $\pm$ 1.91 ^c
	PEG	1 h		38.80 $\pm$ 1.07 ^b	39.62 $\pm$ 0.41 ^c	16.15 $\pm$ 0.84 ^a	18.00 $\pm$ 0.87 ^a	37.15 $\pm$ 0.69 ^a	37.44 $\pm$ 1.13 ^b
		24 h		51.49 $\pm$ 1.63 ^a	50.46 $\pm$ 0.39 ^a	5.32 $\pm$ 1.45 ^c	4.91 $\pm$ 0.66 ^c	32.48 $\pm$ 1.70 ^{ab}	52.43 $\pm$ 0.49 ^a
侧面 Side	CK	1 h		23.51 $\pm$ 1.12 ^d	39.01 $\pm$ 0.34 ^c	7.83 $\pm$ 1.3 ^{bc}	7.88 $\pm$ 1.40 ^{bc}	12.03 $\pm$ 1.11 ^d	19.51 $\pm$ 1.39 ^d
		24 h		28.00 $\pm$ 1.67 ^{cd}	43.47 $\pm$ 1.07 ^{bc}	9.84 $\pm$ 0.83 ^b	10.32 $\pm$ 0.92 ^b	12.07 $\pm$ 0.78 ^d	19.17 $\pm$ 0.87 ^d
	PEG	1 h		37.69 $\pm$ 0.84 ^b	37.51 $\pm$ 1.43 ^c	10.34 $\pm$ 1.12 ^b	12.03 $\pm$ 0.75 ^b	28.54 $\pm$ 0.76 ^b	33.28 $\pm$ 1.13 ^b
		24 h		56.12 $\pm$ 2.21 ^a	45.04 $\pm$ 0.47 ^b	14.99 $\pm$ 0.73 ^a	16.21 $\pm$ 0.40 ^a	35.09 $\pm$ 1.43 ^a	41.70 $\pm$ 0.60 ^{ab}

同列不同小写字母表示处理间差异显著(Duncan's多重比较, $p < 0.05$)。

Different lowercase letters in the same column indicate significant difference between treatments (Duncan's multiple range test, $p < 0.05$).

分数显著高于对照, 且处理24 h高于处理1 h的情况。

PEG处理1 h菌丝尖端Ca的at.%和质量分数均显著高于对照($p < 0.05$), 但是菌丝侧面的Ca信号没有明显变化; 处理24 h后菌丝尖端的Ca没有明显变化, 而菌丝侧面Ca的at.%和质量分数均显著高于对照($p < 0.05$)(图3; 表2)。

PEG处理菌丝尖端和侧面Fe的at.%显著增高($p < 0.05$), 而1 h菌丝尖端和侧面两个部位之间Fe的at.%差异显著(图3; 表2); PEG处理菌丝尖端Fe的质量分数显著高于对照, 而处理24 h菌丝尖端的质量分数值高于处理1 h的值($p < 0.05$)。

2.3 PEG处理对菌丝胞内pH、 Ca^{2+} 荧光光谱的影响

利用LSCM进行荧光光谱分析, 发现PEG处理引起了AMF菌丝胞内pH值变化。与对照相比, PEG处理1 h的菌丝尖端荧光信号亮度明显增强, 而菌丝侧面的胞内荧光亮度急剧增强, 菌丝内呈现明亮的绿色荧光, 表明胞内pH值显著升高。PEG处理24 h后菌丝尖端和侧面细胞内荧光信号亮度高于对照组, 但弱于PEG处理1 h后胞内的荧光强度(图4)。

对照组中, 菌丝内 Ca^{2+} 荧光信号较弱, 无论是尖端还是侧面细胞内均只能观察到不连续的微弱荧光。PEG处理1 h后菌丝尖端的 Ca^{2+} 荧光信号强度显著高于对照, 菌丝侧面细胞内呈现了强烈的绿色荧光; PEG处理24 h后菌丝尖端 Ca^{2+} 荧光信号强度减弱, 而菌丝侧面荧光信号减弱到与对照组基本相同的程度(图5)。

2.4 PEG处理对菌丝跨膜 H^+ 和 Ca^{2+} 离子流的影响

对照处理菌丝尖端 H^+ 表现为微弱外流, PEG处理1 h后 H^+ 加速外流(流速为 $0.813 \text{ pmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)、24 h后 H^+ 流速达到 $2.53 \text{ pmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (是处理1 h的3.1倍)。对照处理菌丝侧面的 H^+ 外流速度为 $1.27 \text{ pmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, PEG处理1 h后菌丝侧面 H^+ 流速达到 $3.32 \text{ pmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, PEG处理24 h后 H^+ 仍然保持强烈的外流状态(图6A)。对照处理菌丝尖端和侧面的 Ca^{2+} 表现为外流, 且尖端的流速高于侧面。PEG处理1 h后菌丝尖端和侧面的 Ca^{2+} 变为强烈的内流, 而PEG处理24 h后菌丝尖端 Ca^{2+} 内流的强度减弱(流速为 $-12.45 \text{ pmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), 菌丝侧面表现为 Ca^{2+} 外流(流速为 $27.21 \text{ pmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)(图6B)。

3 讨论

本研究利用AMF-胡萝卜毛状根双重无菌培养

体系, 在菌丝室获得纯净AMF根外菌丝, 排除了根系分泌物以及复杂土壤环境的影响。采用PEG模拟干旱胁迫, 在菌丝非离体条件下利用NMT技术测试菌丝跨膜离子流变化情况, 结合荧光探针检测和FE-SEM-EDS分析, 探讨干旱胁迫对菌丝离子吸收的影响。结果表明, 干旱胁迫下AMF菌丝 H^+ 外流速率增大, 而 Ca^{2+} 迅速内流, 培养介质中pH值降低, AMF响应干旱胁迫而增加了对水分和养分的吸收。

PEG处理后菌丝的形态发生了明显变化, 并随着胁迫时间的延长出现了不同程度的萎蔫状态。菌丝室培养基的pH值显著下降, 而对照处理没有明显变化, 表明干旱胁迫促进了菌丝中的 H^+ 外排, 使培养基酸化。干旱处理很可能激活了AMF质膜上的质子泵, 使菌丝内 H^+ 持续外排, 使培养基维持了较低的pH值。有研究表明, 干旱胁迫下植物根际和非根际土壤的pH值上升, 降低了土壤无机离子的活性, 影响根系对无机离子的吸收(杨培志, 2012)。干旱条件下菌丝中质子泵的激活改变了根际微环境, 使更多的无机离子溶解于土壤溶液中。无机离子被菌丝吸收并进一步传输到植物中, 从而增强植物的抗旱性(Sun *et al.*, 1999)。

pH值变化是生物对环境变化的最初响应, 该变化直接引起菌丝质膜的信号传导, 激活下游受体的信号识别过程(Ayling *et al.*, 2000)。本试验利用LSCM观察了PEG处理对菌丝胞内pH的影响, 结果表明PEG处理1 h后菌丝尖端和侧面的荧光信号亮度明显增强。pH荧光探针在pH越高的环境中荧光强度越高, 因此该现象说明PEG处理使胞内pH值升高, 细胞环境碱化。真菌胞内的碱化与胁迫信号的长距离传递有关, pH变化可能引起真菌-植物之间的信号传递发生改变(Harrison, 2005)。离子动力学研究表明, 真菌和植物的信号交流与细胞跨膜 H^+ 离子梯度的调节有关, 该过程受到细胞膜上P型 H^+ -ATPases的调控(Ramos *et al.*, 2008a)。为了进一步验证PEG模拟水分胁迫下菌丝 H^+ 的跨膜运输过程, 利用NMT技术验证了菌丝尖端和侧面两个部位 H^+ 的流动情况。对照处理下, 两个部位的 H^+ 都呈现微弱外流的趋势, 而且菌丝侧面的 H^+ 外流流速大于尖端。该结果与前人研究结果相似, Ramos等(2008b)证明从菌丝尖端到菌丝侧面不同位置上 H^+ 流动规律不同, 而且菌丝侧面的 H^+ 外流速率大于尖端。该现象可能和真菌的信号识别机制以及菌丝尖端生长有关

图4 PEG处理1 h和24 h对丛枝菌根真菌菌丝尖端和侧面细胞内pH值的影响。荧光图像显示激发波长为488 nm条件下菌丝内pH值变化。

Fig. 4 The effect of PEG treatment for 1 h and 24 h on the pH value at the tip and side of arbuscular mycorrhizal fungi hypha. Fluorescence image at 488 nm excitation shows the pH variation in the hyphal cell.

图5 PEG处理1 h和24 h对丛枝菌根真菌菌丝尖端和侧面细胞内Ca²⁺浓度的影响。荧光图像显示激发波长为488 nm条件下菌丝内Ca²⁺浓度变化。

Fig. 5 The effect of PEG treatment for 1 h and 24 h on the Ca²⁺ concentration at the tip and side of arbuscular mycorrhizal fungi hypha. Fluorescence image at 488 nm excitation shows the Ca²⁺ variation in the hyphal cell.

(Bartnicki-Garcia *et al.*, 2000)。在PEG处理下, 菌丝H⁺显著外流。随着处理时间的延长, 菌丝尖端H⁺外流强度增大, 外流的H⁺使菌丝际环境酸化。该结论与液体培养基的pH值变化结果相符, 表明在模拟干旱处理1 h后, 菌丝对于外部环境的pH值进行了调

节。菌丝尖端的H⁺外流调节了真菌对营养物质(如蔗糖、氨基酸和P)的吸收和交换(Requena *et al.*, 2003)。能谱分析显示, PEG处理增加了菌丝表面P信号强度, 说明在干旱处理下更多的P积累到菌丝界面。Hijikata等(2010)研究证实, 干旱情况下根外菌丝的

图6 PEG处理1 h和24 h对菌丝尖端和侧面 H^+ (A), 和 Ca^{2+} (B)离子流的影响(平均值 $\pm$ 标准偏差, $n = 6$)。tip表示菌丝尖端, side表示菌丝侧面。柱形上方标示不同字母代表相应处理之间有显著性差异(Duncan's多重比较, $p < 0.05$)。

Fig. 6 The effects of PEG treatment on H^+ (A) and Ca^{2+} (B) flux at the tip and side of arbuscular mycorrhizal hyphae (mean $\pm$ SD, $n = 6$). tip stands for hyphal tip, and side stands for lateral hypha. Columns marked by different letters are significantly different according to Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

磷转运蛋白活性提高, 将更多的P从土壤中通过菌丝吸收运输到植物中, 而AMF提高植物的营养元素吸收是提高植物耐旱性的重要机制(Zhao *et al.*, 2015a)。

质膜 H^+ 外流不仅是营养物质吸收的动力, 还作为信号传导的中间体, 促进逆境信号的传导和响应元件的激活(Fromm & Lautner, 2007)。 H^+ 的外流可以促进 Ca^{2+} 、 K^+ 等阳离子的跨膜运输, 提高胞内的离子浓度(Isfort *et al.*, 1993)。本研究中, PEG处理1 h后, 菌丝尖端和表面的 Ca^{2+} 表现了强烈的内流现象。当生物受到干旱胁迫的时候, 细胞内 Ca^{2+} 瞬时产生快速的增高, 引发钙振荡(Zhao *et al.*, 2015b)。 Ca^{2+} 作为第二信使, 在胁迫信号的传递过程中起到重要作用, 胞内游离 Ca^{2+} 的分布与转移是 Ca^{2+} 信号产生和传递的基础。使用LSCM观测菌丝细胞内 Ca^{2+} 浓度的结果与离子流测定结果相符, PEG处理1 h后菌丝尖端与侧面均呈现强烈的绿色荧光, 说明菌丝内 Ca^{2+} 浓度显著上升。干旱胁迫诱导的胞内 Ca^{2+} 浓度增加能够激活下游的逆境信号响应元件, Ca依赖的蛋白激酶(CDPK)等, 而CDPK可以通过磷酸化质膜水通道蛋白促进细胞膜对水分的吸收和扩散(Azad *et al.*, 2004)。Li等(2013)证实, 干旱胁迫情况下AMF中两个水通道蛋白基因*GintaQPF1*和*GintaQPF2*的表达量会显著上调, 为植物输送水分以缓解干旱胁迫。

干旱条件下水分由根外菌丝向根内菌丝运输, 微量元素、氨基酸和其他低分子量的代谢产物也被AMF菌丝选择吸收并运送到植物中, 由此增强植物

的耐旱性(Querejeta *et al.*, 2003; van Hees *et al.*, 2006)。菌丝中元素能谱分析显示, PEG处理促进了菌丝表面P、Ca和Fe的积累。各种元素在菌丝表面的增多很可能是由于PEG诱导激活了质子泵, 而细胞对离子的吸收通常依赖于 H^+ 外流产生的电位梯度, 质膜 H^+ -ATPase产生的质子动势为营养物质的吸收和转运提供了能量(Riquelme & Bartnicki-Garcia, 2004)。干旱情况下AMF根外菌丝能够将更多的P和Ca等矿质养分从土壤中通过菌丝通道运输到植物中, 同时调控相关基因的表达以促进根系对水分的吸收, 使植物具有较强的耐旱性。Bárcana等(2012)的研究表明在充分供水和干旱胁迫下, AMF能够调控植物物质外体和细胞间水分运输的途径。AMF这种调节植物水分吸收和运输的能力, 可以帮助植物更灵活地适应水分胁迫(Sánchez-Romera *et al.*, 2016), 但AMF这一功能的生理和分子机制还需要系统深入的研究。

4 结论

干旱胁迫下, AMF根外菌丝感知水势的变化, 激活质膜质子泵引起 H^+ 外流和 Ca^{2+} 迅速内流, 从而引起钙振荡和信号传导。一方面菌丝通过胞间通信促进水分的运输和重新分配, 另一方面菌丝际pH值的降低促进了菌丝P、Ca和Fe等营养元素的吸收, 并将这些物质通过菌丝通道运输到植物根细胞中。本研究证实菌丝通过调节 H^+ 和 Ca^{2+} 的跨膜运输应答干旱胁迫, 不仅增强了菌丝与环境之间的物质交换, 同时也加强了AMF与宿主之间的信号交流, 从而增

强植物的抗旱能力。

参考文献

- Augé RM, Duan X (1991). Mycorrhizal fungi and nonhydraulic root signals of soil drying. *Plant Physiology*, 97, 821–824.
- Augé RM, Toler HD, Saxton AM (2015). Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: A meta-analysis. *Mycorrhiza*, 25, 13–24.
- Ayling SM, Smith SE, Smith FA (2000). Transmembrane electric potential difference of germ tubes of arbuscular mycorrhizal fungi responds to external stimuli. *New Phytologist*, 147, 631–639.
- Azad AK, Sawa Y, Ishikawa T, Shibata H (2004). Phosphorylation of plasma membrane aquaporin regulates temperature-dependent opening of tulip petals. *Plant and Cell Physiology*, 45, 608–617.
- Bárcana G, Aroca R, Paz JA, Chaumont F, Martínez-Ballesta MC, Carvajal M, Ruiz-Lozano JM (2012). Arbuscular mycorrhizal symbiosis increases relative apoplastic water flow in roots of the host plant under both well-watered and drought stress conditions. *Annals of Botany*, 109, 1009–1017.
- Bartnicki-Garcia S, Bracker CE, Gierz G, López-Franco R, Lu H (2000). Mapping the growth of fungal hyphae: Orthogonal cell wall expansion during tip growth and the role of turgor. *Biophysical Journal*, 79, 2382–2390.
- Bécard G, Fortin JA (1988). Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist*, 108, 211–218.
- Bunney TD, Shaw PJ, Watkins PA, Taylor JP, Beven AF, Wells B, Calder GM, Drøbak BK (2000). ATP-dependent regulation of nuclear Ca^{2+} levels in plant cells. *FEBS Letters*, 476, 145–149.
- Campo S, Baldrich P, Messegue J, Lalanne E, Coca M, San Segundo B (2014). Overexpression of a calcium-dependent protein kinase confers salt and drought tolerance in rice by preventing membrane lipid peroxidation. *Plant Physiology*, 165, 688–704.
- Chitarra W, Pagliarini C, Maserti B, Lumini E, Siciliano I, Cascone P, Schubert A, Gambino G, Balestrini R, Guerrieri E (2016). Insights on the impact of arbuscular mycorrhizal symbiosis on tomato tolerance to water stress. *Plant Physiology*, 171, 1009–1023.
- Duncan DB (1955). Multiple range and multiple *F* tests. *Biometrics*, 11, 1–42.
- Ferrol N, Barea JM, Azcón-Aguilar C (2000). The plasma membrane H^+ -ATPase gene family in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Current Genetics*, 37, 112–118.
- Fromm J, Lautner S (2007). Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant, Cell & Environment*, 30, 249–257.
- Gaxiola RA, Palmgren MG, Schumacher K (2007). Plant proton pumps. *FEBS Letters*, 581, 2204–2214.
- Gévaudant F, Duby G, von Stedingk E, Zhao R, Morsomme P, Boutry M (2007). Expression of a constitutively activated plasma membrane H^+ -ATPase alters plant development and increases salt tolerance. *Plant Physiology*, 144, 1763–1776.
- Gianinazzi-Pearson V, Smith SE, Gianinazzi S, Smith FA (1991). Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytologist*, 117, 61–74.
- Gong DS, Xiong YC, Ma BL, Wang TM, Ge JP, Qin XL, Li PF, Kong HY, Li ZZ, Li FM (2010). Early activation of plasma membrane H^+ -ATPase and its relation to drought adaptation in two contrasting oat (*Avena sativa* L.) genotypes. *Environmental and Experimental Botany*, 69, 1–8.
- Harrison MJ (2005). Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review Microbiology*, 59, 19–42.
- Hijikata N, Murase M, Tani C, Ohtomo R, Osaki M, Ezawa T (2010). Polyphosphate has a central role in the rapid and massive accumulation of phosphorus in extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist*, 186, 285–289.
- Isfort RJ, Cody DB, Asquith TN, Ridder GM, Stuard SB, Leboeuf RA (1993). Induction of protein phosphorylation, protein synthesis, immediate-early-gene expression and cellular proliferation by intracellular pH modulation. *FEBS Journal*, 213, 349–357.
- Kühnreiter WM, Jaffe LF (1990). Detection of extracellular calcium gradients with a calcium-specific vibrating electrode. *The Journal of Cell Biology*, 110, 1565–1573.
- Li T, Du J, Hao ZP, Zhang X, Chen BD (2012). Molecular basis for enhancement of plant drought tolerance by arbuscular mycorrhizal symbiosis: A mini-review. *Acta Ecologica Sinica*, 32, 7169–7176. [李涛, 杜娟, 郝志鹏, 张莘, 陈保冬 (2012). 丛枝菌根提高宿主植物抗旱性分子机制研究进展. *生态学报*, 32, 7169–7176.]
- Li T, Hu YJ, Hao ZP, Li H, Wang YS, Chen BD (2013). First cloning and characterization of two functional aquaporin genes from an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist*, 197, 617–630.
- Liu T, Li Z, Hui C, Tang M, Zhang H (2016). Effect of *Rhizophagus irregularis* on osmotic adjustment, antioxidation and aquaporin PIP genes expression of *Populus × canadensis* ‘Neva’ under drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38, 191. DOI: 10.1007/s11738-016-2207-6.
- Liu RJ, Chen YL (2007). *Mycorrhizology*. Science Press, Beijing. 447–448.
- Ludwig AA, Romeis T, Jones JD (2004). CDPK-mediated signalling pathways: Specificity and cross-talk. *Journal of Experimental Botany*, 55, 181–188.
- Ma R, Zhang M, Li B, Du G, Wang J, Chen J (2005). The effects of exogenous Ca^{2+} on endogenous polyamine levels and drought-resistant traits of spring wheat grown under arid conditions. *Journal of Arid Environments*, 63, 177–190.
- Mak M, Babla M, Xu SC, O’Carrigan A, Liu XH, Gong YM, Holford P, Chen ZH (2014). Leaf mesophyll K^+ , H^+ and Ca^{2+} fluxes are involved in drought-induced decrease in photosynthesis and stomatal closure in soybean. *Environmental and Experimental Botany*, 98, 1–12.
- Porcel R, Ruiz-Lozano JM (2004). Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 55, 1743–1750.

- Querejeta J, Egerton-Warburton LM, Allen MF (2003). Direct nocturnal water transfer from oaks to their mycorrhizal symbionts during severe soil drying. *Oecologia*, 134, 55–64.
- Ramos AC, Façanha AR, Feijó JA (2008a). Ion dynamics during the polarized growth of arbuscular mycorrhizal fungi: From presymbiosis to symbiosis. In: Varma A ed. *Mycorrhiza*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Ramos AC, Façanha AR, Feijó JA (2008b). Proton (H^+) flux signature for the presymbiotic development of the arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 178, 177–188.
- Requena N, Breuninger M, Franken P, Ocón A (2003). Symbiotic status, phosphate, and sucrose regulate the expression of two plasma membrane H^+ -ATPase genes from the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant Physiology*, 132, 1540–1549.
- Riquelme M, Bartnicki-Garcia S (2004). Key differences between lateral and apical branching in hyphae of *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 41, 842–851.
- Rudd JJ, Franklin-Tong VE (2001). Unravelling response-specificity in Ca^{2+} signalling pathways in plant cells. *New Phytologist*, 151, 7–33.
- Sánchez-Romera B, Ruiz-Lozano JM, Zamarreño ÁM, García-Mina JM, Aroca R (2016). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and methyl jasmonate avoid the inhibition of root hydraulic conductivity caused by drought. *Mycorrhiza*, 26, 111–122.
- Santi S, Locci G, Monte R, Pinton R, Varanini Z (2003). Induction of nitrate uptake in maize roots: Expression of a putative high-affinity nitrate transporter and plasma membrane H^+ -ATPase isoforms. *Journal of Experimental Botany*, 54, 1851–1864.
- Shi Y, Zhang Y, Han W, Feng R, Hu Y, Guo J, Gong H (2016). Silicon enhances water stress tolerance by improving root hydraulic conductance in *Solanum lycopersicum* L. *Frontiers in Plant Science*, 7, 196. DOI: 10.3389/fpls.2016.00196.
- Smith S, Read D (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, New York.
- St-Arnaud M, Hamel C, Vimard B, Caron M, Fortin JA (1996). Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots. *Mycological Research*, 100, 328–332.
- Sun YP, Unestam T, Lucas SD, Johanson KJ, Kenne L, Finlay R (1999). Exudation-reabsorption in a mycorrhizal fungus, the dynamic interface for interaction with soil and soil microorganisms. *Mycorrhiza*, 9, 137–144.
- Tisserant E, Malbreil M, Kuo A, Kohler A, Symeonidi A, Balestrini R, Charron P, Duensing N, Frey NF, Gianinazzi-Pearson V, Gilbert LB, Handa Y, Herr JR, Hijri M, Koul R, Kawaguchi M, Krajinski F, Lammers PJ, Masclaux FG, Murat C, Morin E, Ndikumana S, Pagni M, Petitpierre D, Requena N, Rosikiewicz P, Riley R, Saito K, Clemente HS, Shapiro H, van Tuinen D, Bécard G, Bonfante P, Paszkowski U, Shachar-Hill YY, Tuskan GA, Young JW, Sanders IR, Henrissat B, Rensing SA, Grigoriev IV, Corradi N, Roux C, Martin F (2013). Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 20117–20122.
- van Hees PA, Rosling A, Essén S, Godbold DL, Jones DL, Finlay RD (2006). Oxalate and ferricrocin exudation by the extramatrical mycelium of an ectomycorrhizal fungus in symbiosis with *Pinus sylvestris*. *New Phytologist*, 169, 367–378.
- Wu S, Zhang X, Sun Y, Wu Z, Li T, Hu Y, Su D, Lü J, Li G, Zhang Z, Zheng L, Zhang J, Chen B (2015). Transformation and immobilization of chromium by arbuscular mycorrhizal fungi as revealed by SEM-EDS, TEM-EDS, and XAFS. *Environmental Science & Technology*, 49, 14036–14047.
- Xiong YC, Li FM, Zhang T, Xia C (2007). Evolution mechanism of non-hydraulic root-to-shoot signal during the anti-drought genetic breeding of spring wheat. *Environmental and Experimental Botany*, 59, 193–205.
- Xu L, Li T, Wu Z, Feng H, Yu M, Zhang X, Chen B (2018). Arbuscular mycorrhiza enhances drought tolerance of tomato plants by regulating the 14-3-3 genes in the ABA signaling pathway. *Applied Soil Ecology*, 125, 213–221.
- Yan F, Zhu Y, Müller C, Zörb C, Schubert S (2002). Adaptation of H^+ -pumping and plasma membrane H^+ -ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency. *Plant Physiology*, 129, 50–63.
- Yang PZ (2012). *Mechanism Involved in Drought/Salt Tolerance Improvement in Alfalfa Due to Symbiotic Interaction with Rhizobium*. PhD dissertation, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi. 4–6. [杨培志 (2012). 紫花苜蓿根瘤菌共生对干旱及盐胁迫的响应机制研究. 博士学位论文, 西北农林科技大学, 陕西杨凌. 4–6.]
- Yoshida S (1991). Chilling-induced inactivation and its recovery of tonoplast H^+ -ATPase in mung bean cell suspension cultures. *Plant Physiology*, 95, 456–460.
- Zhao R, Guo W, Bi N, Guo J, Wang L, Zhao J, Zhang J (2015a). Arbuscular mycorrhizal fungi affect the growth, nutrient uptake and water status of maize (*Zea mays* L.) grown in two types of coal mine spoils under drought stress. *Applied Soil Ecology*, 88, 41–49.
- Zhao X, Xu M, Wei R, Liu Y (2015b). Expression of *OsCAS* (calcium-sensing receptor) in an *Arabidopsis* mutant increases drought tolerance. *PLOS ONE*, 10, e0131272. DOI: 10.1371/journal.pone.0131272.
- Zou JJ, Li XD, Ratnasekera D, Wang C, Liu WX, Song LF, Zhang WZ, Wu WH (2015). *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase 8 and catalase 3 function in abscisic acid-mediated signaling and H_2O_2 homeostasis in stomatal guard cells under drought stress. *The Plant Cell*, 27, 1445–1460.
- Zhou S, Han YY, Chen Y, Kong X, Wang W (2015). The involvement of expansins in response to water stress during leaf development in wheat. *Journal of Plant Physiology*, 183, 64–74.

扫码加入读者圈
听语音, 看问答

责任编辑: 郭良栋 责任编辑: 李 敏

DOI: 10.17521/cjpe.2018.0089