

沙枣幼苗根尖离子流对NaCl胁迫的响应

杨升^{1,2*} 张华新² 陈秋夏¹ 杨秀艳²

¹ 浙江省亚热带作物研究所, 浙江温州 325005; ² 国家林业局盐碱地研究中心, 北京 100091

摘要 为了进一步从离子动态运输方面了解沙枣(*Elaeagnus angustifolia*)耐盐机制和揭示沙枣种源间的K⁺/Na⁺平衡调控差异, 该研究利用非损伤微测技术(non-invasive micro-test technology, NMT)测定银川种源(盐敏感型)和阿拉尔种源(耐盐型)沙枣幼苗根系在3种不同NaCl处理方式下的离子流: 1)在150 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫24 h后的Na⁺和K⁺离子流; 2) NaCl瞬时处理后的K⁺和H⁺的动态离子流; 3)先NaCl胁迫24 h, 再用Na⁺/H⁺逆向转运体抑制剂阿米洛利(Amiloride)和K⁺通道抑制剂氯化四乙胺(TEA)处理后的Na⁺和K⁺离子流。结果表明: NaCl胁迫24 h后, 沙枣根系Na⁺和K⁺外排净流量显著增加, 并且银川种源沙枣幼苗根系Na⁺净流量显著低于阿拉尔种源, 净流量分别为720和912 pmol·cm⁻²·s⁻¹, 而K⁺外流净流量显著高于阿拉尔种源。瞬时NaCl处理后, 沙枣根系K⁺的外流迅速增加, 并且银川种源的K⁺外排净流量始终高于阿拉尔种源, 而H⁺由内流转为外排, 阿拉尔种源的H⁺净外流量大于银川种源。NaCl和NaCl + Amiloride处理下, 阿拉尔种源沙枣幼苗Na⁺外流的净流量均大于银川种源, 但K⁺外流的净流量均小于银川种源, 而在对照和NaCl + TEA处理下, Na⁺和K⁺的净流量在两个种源间无明显差异。研究证明NaCl胁迫造成根系Na⁺积累和K⁺外流, 沙枣幼苗为减少Na⁺积累, 通过根系Na⁺/H⁺逆向转运体将Na⁺从体内排出, 并且耐盐型种源沙枣幼苗根系在NaCl胁迫时能更好地维持体内的K⁺/Na⁺平衡, 其原因主要在于具有较强的Na⁺外排能力和较弱的K⁺流失。该研究可以为进一步发掘优良耐盐沙枣种质资源提供理论参考依据。

关键词 沙枣; NaCl胁迫; 离子流; 种源; Na⁺/H⁺逆向转运体; K⁺/Na⁺平衡

引用格式: 杨升, 张华新, 陈秋夏, 杨秀艳 (2017). 沙枣幼苗根尖离子流对NaCl胁迫的响应. 植物生态学报, 41, 489–496. doi: 10.17521/cjpe.2016.0091

Responses of apical ion fluxes to NaCl stress in *Elaeagnus angustifolia* seedlings

YANG Sheng^{1,2*}, ZHANG Hua-Xin², CHEN Qiu-Xia¹, and YANG Xiu-Yan²

¹ Zhejiang Institute of Subtropical Crops, Wenzhou, Zhejiang 325005, China; and ² Research Center of Saline and Alkali Land of State Forestry Administration, Beijing 100091, China

Abstract

Aims *Elaeagnus angustifolia* is one of the most salt-tolerant species. The objective of this study was to understand the mechanisms of ion transpiration in *E. angustifolia* exposed to different salt concentrations through manipulations of K⁺/Na⁺ homeostasis.

Methods Seedlings of two variants of the species, Yinchuan provenance (YC, salt-sensitive type) and the Alaer provenance (ALE, salt-tolerant type), were treated with three different NaCl application modes, and the ion fluxes in the apical regions were measured using non-invasive micro-test technology (NMT). In mode 1, Na⁺ and K⁺ fluxes were measured after 150 mmol·L⁻¹ NaCl stress lasted for 24 h. In mode 2, K⁺ and H⁺ fluxes were quantified with a transient stimulation of NaCl solution. In mode 3, Amiloride (Na⁺/H⁺ antiporters inhibitor) and tetraethylammonium (TEA, K⁺ channel inhibitor) was used to treat apical regions of *E. angustifolia* seedlings after NaCl stress for 24 h, respectively.

Important findings Under NaCl stress for 24 h, net effluxes of Na⁺ and K⁺ were increased significantly. The net Na⁺ effluxes of YC provenance seedlings (720 pmol·cm⁻²·s⁻¹) were lower than that of ALE provenance (912 pmol·cm⁻²·s⁻¹), but the net K⁺ efflux was higher in YC provenance. Under the instantaneous NaCl stimulation, net K⁺ efflux was remarkably increased, with the net K⁺ efflux of YC provenance always higher than that of ALE provenance. Interestingly, H⁺ at the apical regions was found from influx to efflux, with the net H⁺ efflux of ALE provenance greater than that of the YC provenance. Under the NaCl and NaCl + Amiloride treatment, the net Na⁺ efflux of ALE provenance seedlings was higher than that of YC provenance, while the net K⁺ efflux was less in ALE provenance seedlings. On the other hand, the differences in net Na⁺ and K⁺ effluxes were insignificant

收稿日期Received: 2016-03-09 接受日期Accepted: 2016-09-21

* E-mail: yangsheng0072001@sina.com

between the two provenances under the control group and NaCl + TEA treatment. In conclusion, NaCl stress caused Na^+ accumulation and K^+ outflows of *E. angustifolia* seedlings; The *E. angustifolia* seedlings utilize Na^+/H^+ antiporters to reduce Na^+ accumulation by excretion; and the maintenance of K^+/Na^+ homeostasis in salt-tolerant *E. angustifolia* provenance seedlings roots accounted for a greater Na^+ extrusion and a lower K^+ efflux under NaCl stress. Results from this study provide a theoretical basis for further exploring salt-tolerant *E. angustifolia* germplasm resource.

Key words *Elaeagnus angustifolia*; NaCl stress; ion fluxes; provenance; Na^+/H^+ antiporters; K^+/Na^+ homeostasis

Citation: Yang S, Zhang HX, Chen QX, Yang XY (2017). Responses of apical ion fluxes to NaCl stress in *Elaeagnus angustifolia* seedlings. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 41, 489–496. doi: 10.17521/cjpe.2016.0091

维持体内 K^+/Na^+ 平衡是植物适应盐胁迫环境的一个关键手段, 利用先进技术手段和转基因技术, 人们对其机制开展了大量有益的探索研究, 发现植物一方面通过限制 Na^+ 的进入和增加 Na^+ 的外排或区隔化, 以减少体内或细胞质中的 Na^+ 浓度, 另一方面限制体内 K^+ 流失, 从而实现体内 K^+/Na^+ 平衡(Chao *et al.*, 2013; Feki *et al.*, 2014)。早期的研究结果显示细胞质中的 Na^+ 外排主要由质膜上的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白(SOS1)负责, 并由 H^+ -ATPase酶负责提供驱动力, 同时引起细胞膜电位重新极化, 减少 Na^+ 的流入(Shi *et al.*, 2000, 2003; Maathuis, 2006)。另外, K^+ 的吸收会受到 Na^+ 的竞争性抑制, 并且诱导通过外向 K^+ 通道而外流的 K^+ 增加(Demidchik & Maathuis, 2007; Britto & Kronzucker, 2008; Shabala & Cuin, 2008)。同时, 有研究显示在盐胁迫下大麦(*Hordeum vulgare*)和小麦(*Triticum aestivum*)耐盐型品种根系的 K^+ 外流量均小于盐敏感型品种(Chen *et al.*, 2005; Cuin *et al.*, 2008)。因此, 了解植物根系区域 Na^+ 和 K^+ 离子流情况, 对于理解植物耐盐能力非常重要。

沙枣(*Elaeagnus angustifolia*)是胡颓子科胡颓子属的落叶小乔木, 主要分布于我国西北五省, 在北京、天津和山东等地也开展了引种栽培, 具有耐旱、耐盐碱和抗风沙的特性, 能提高土壤肥力, 改善土壤环境, 已经被列为半干旱地区和盐土地防护林带的重要树种(郭丽君和王玉涛, 2008; 管文轲和徐娜, 2012; 杨升等, 2014)。大量的研究结果显示, 沙枣幼苗在盐胁迫下, 根、茎和叶片中 Na^+ 含量增加, 而 K^+ 含量减少(张宝泽等, 1992; 刘宝玉, 2007; 刘正祥等, 2014)。前期研究也发现, 沙枣幼苗随着NaCl浓度的增加, 根、茎和叶中的 Na^+ 含量显著增加, 而 K^+ 含量显著减少, 并且阿拉尔种源沙枣幼苗与银川种源幼苗间存在显著性差异, 阿拉尔种源沙枣幼苗能积累更多的 Na^+ 在根中, 而叶片中 Na^+ 含量较少, K^+ 含量

在NaCl胁迫下的降幅也低于银川种源(杨升等, 2014, 2016)。但是这些结果都是植株在试验中积累下来的一个总体含量, 是静态的, 而研究探讨盐胁迫下 Na^+ 和 K^+ 在沙枣体内具有怎样的动态运移机制, 并且比较不同种源间的差异, 有利于进一步理解沙枣的耐盐机制。因此, 本研究选取沙枣银川种源(YC, 盐敏感型)和阿拉尔种源(ALE, 耐盐型)水培苗为试验材料(杨升等, 2015, 2016), 采用非损伤微测技术(non-invasive micro-test technology, NMT)研究: (1) 在150 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫24 h后, 沙枣幼苗根系 Na^+ 和 K^+ 的稳态离子流; (2) 150 mmol·L⁻¹ NaCl瞬时处理, K^+ 和 H^+ 离子流的动态特征; (3) 盐胁迫下, 分别用阿米洛利(Na^+/H^+ 逆向转运体抑制剂, Amiloride)和氯化四乙胺(K^+ 通道抑制剂, TEA)处理后, Na^+ 和 K^+ 的离子流特性, 以期从离子动态转运方面探讨沙枣耐盐机制和沙枣种源间 K^+/Na^+ 平衡的调控差异, 为进一步发掘优良耐盐沙枣种质资源提供理论参考依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

2012年10月下旬, 分别从新疆阿拉尔和宁夏银川采集50株沙枣母树上的成熟果实。处理后, 12月上旬将饱满无虫眼沙枣种子沙藏。次年3月上旬于温室, 采用四分法, 将沙藏后的种子置于塑料盆中, 并用塑料膜遮盖。第二天(萌芽率达70%), 将沙枣种子播种于营养钵(10 cm × 10 cm, 口径×高)中, 基质为蛭石。期间, 浇洒改良的Hoagland营养液, 注意病虫害防治。当幼苗生长到8–10片叶龄、株高约10 cm时, 取长势基本一致的幼苗, 洗净根部蛭石, 置于塑料花盆(40 cm × 35 cm × 15 cm, 长×宽×高)中开展水培, 80株/种源, 花盆中全天通气。在长出新根之前用自来水培养, 2天换一次水, 之后用1/4 Hoagland营养液培养(蒸馏水配制), 3天换一次营养液。

1.2 试验设计

1.2.1 稳态离子流测定

水培20天后, 每个种源各选取24株大小、长势基本一致的苗木, 其中, 每个种源中16株用含 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl的1/4 Hoagland营养液培养24 h, 8株作为对照。然后进行 Na^+ 和 K^+ 的稳态离子流动态变化测定, 测量10 min。

1.2.2 离子动力学测定

水培19天后, 每个种源挑选大小、长势基本一致的沙枣幼苗16株。测量5–6 min后, 加入NaCl溶液(此时测试液中NaCl浓度为 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 然后继续测定沙枣根尖 K^+ 和 H^+ 的动力学离子流30–35 min。

1.2.3 离子流药理学测定

水培20天后, 每个种源选取大小、长势基本一致的沙枣幼苗32株, 其中, 每个种源中24株用含 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl的1/4 Hoagland营养液培养24 h, 8株作为对照。分别用 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Amiloride (Kong *et al.*, 2012)和 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ TEA (Wegner *et al.*, 2011)处理NaCl胁迫24 h后的根系30 min, 再测定根尖的 Na^+ 和 K^+ 的离子流。

1.3 试验方法

1.3.1 离子流测定的前期准备

在美国扬格(旭月北京)测试中心利用NMT (NMT100 Series, Younger USA LLC, Amherst, USA)测定盐胁迫下根尖 Na^+ 、 K^+ 和 H^+ 的离子流特性(孙健, 2011; Kong *et al.*, 2012)。所用测试液: $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 , $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2SO_4 , $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2-N-吗啉代乙烷磺酸二水(MES), pH 6.0。前期试验确定了沙枣幼苗根系的最佳扫描位置距根尖顶端为 $600 \mu\text{m}$ (对照)和 $450 \mu\text{m}$ ($150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl)(刘正祥, 2013)。

1.3.2 离子流测定的实验方案

稳态离子流测定(孙健, 2011; 刘正祥, 2013): 选取大小、部位基本一致的嫩根, 剪取3–4 cm的完整根尖, 先用去离子水冲洗干净, 再在测试液中平衡30 min。然后, 固定在培养皿中, 定点测量根尖 Na^+ 和 K^+ 的离子流, 待离子流基本稳定后, 测量10 min, 每处理水平测量6条根尖(即6次重复)。

离子动力学测定(孙健, 2011; 刘正祥, 2013): 剪取3–4 cm的完整根尖, 先用去离子水冲洗干净, 再在测试液中平衡30 min。然后, 固定在培养皿中,

测量 K^+ 和 H^+ 的离子流, 待稳定测量5–6 min后, 加入一定量的NaCl溶液(pH 6.0), 使测试液中NaCl浓度为 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 再定点测量 K^+ 和 H^+ 的离子流30–35 min, 每个种源测量6条根尖。由于扩散效应, 加入NaCl后的前3 min数据给予剔除。

离子流药理学(Kong *et al.*, 2012): 选取大小、部位基本一致的嫩根, 剪取3–4 cm的完整根尖。先冲洗干净, 然后, 对照和盐胁迫离子流测定用基本测试液平衡30 min, 而用于药理学离子流测定的根尖用含Amiloride或TEA的基本测试液平衡30 min。平衡后, 固定在培养皿中, 测定根尖相应位置(对照为 $600 \mu\text{m}$, NaCl处理为 $450 \mu\text{m}$) Na^+ 和 K^+ 的离子流, 持续测定10 min。

1.4 数据处理与分析

测得的离子流数据先导入Excel表格中, 剔除异常数据, 然后利用Magedflux软件计算离子流速。用Microsoft Excel 2003软件整理数据和制图, 运用SPSS 16.0软件进行单因素方差分析和最小显著性差异法多重比较($p < 0.05$)。

2 结果和分析

2.1 NaCl胁迫对沙枣幼苗根系稳态离子流的影响

2.1.1 稳态 Na^+ 流

从图1可以看出, 在对照条件下, 两个种源沙枣幼苗根系的 Na^+ 流均为外流, 其净流量均低于 $200 \text{ pmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 两个种源间无显著性差异, 而在

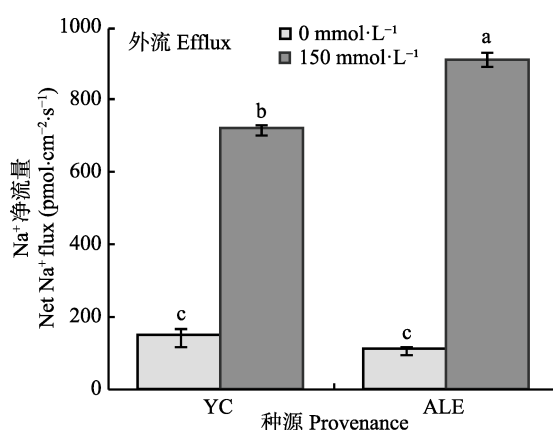


图1 NaCl胁迫对两个种源沙枣幼苗根系稳态 Na^+ 流的影响(平均值±标准误差, $n = 4$)。ALE, 阿拉尔; YC, 银川。不同小写字母表示不同处理和种源间差异显著($p < 0.05$)。

Fig. 1 Effects of NaCl stress on steady-state Na^+ flux at apical regions of two provenances of *Elaeagnus angustifolia* (mean \pm SE, $n = 4$). ALE, Alaer; YC, Yinchuan. Different lowercase letters indicate significant differences between different treatments and provenances ($p < 0.05$).

150 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫处理24 h后, 与对照相比, 沙枣根系的Na⁺外流的净流量显著增加, 并且两个种源间差异明显。NaCl胁迫下, 阿拉尔种源根系Na⁺外流的净流量显著高于银川种源, 分别为912和720 pmol·cm⁻²·s⁻¹。由此说明, 盐胁迫下, 沙枣幼苗根系Na⁺的外排能力显著提高, 并且与银川种源相比, 阿拉尔种源沙枣幼苗表现出更强的排Na⁺能力。

2.1.2 稳态K⁺流

K⁺是植物代谢过程中的重要物质, 限制体内Na⁺积累, 减少体内K⁺流失, 可以提高植物耐盐性 (Gouiaa *et al.*, 2012)。如图2所示, 在对照条件下, 银川和阿拉尔两个种源沙枣根系在对照条件下K⁺外流的净流量仅分别为180和159 pmol·cm⁻²·s⁻¹, 而在

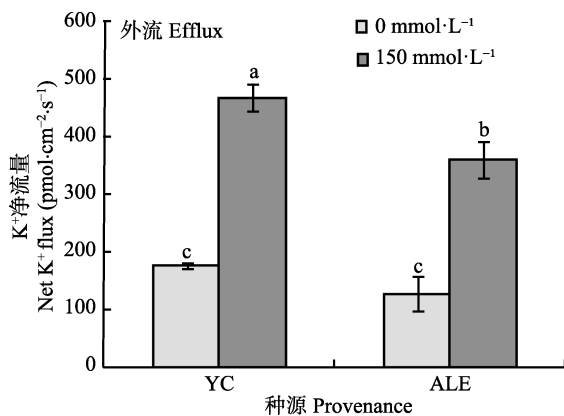


图2 NaCl胁迫对两个种源沙枣幼苗根系稳态K⁺流的影响 (平均值±标准误差, $n = 4$)。ALE, 阿拉尔; YC, 银川。不同小写字母表示不同处理和种源间差异显著 ($p < 0.05$)。

Fig. 2 Effects of NaCl stress on steady-state K⁺ flux at apical regions of two provenances of *Elaeagnus angustifolia* (mean ± SE, $n = 4$). ALE, Alaer; YC, Yinchuan. Different lowercase letters indicate significant differences between different treatments and provenances ($p < 0.05$).

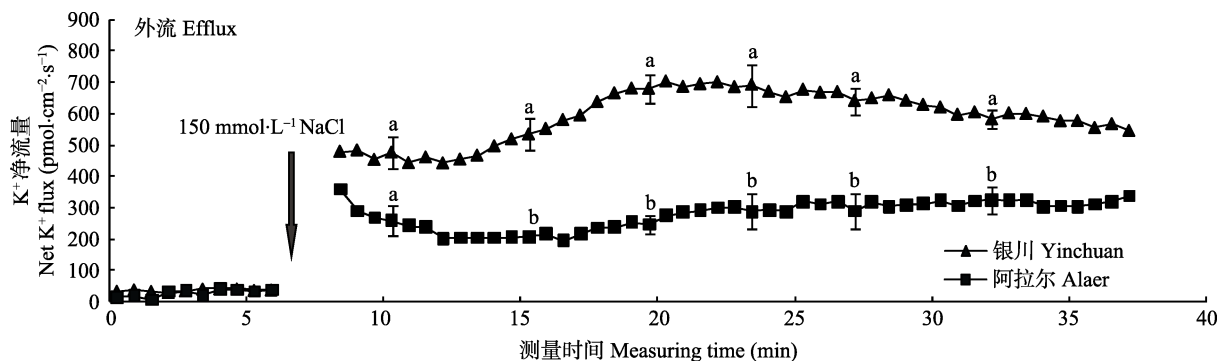


图3 NaCl胁迫诱导两个种源沙枣幼苗根系瞬时K⁺流的动态差异 (平均值±标准误差, $n = 4$)。不同小写字母表示同一时间点种源间差异显著 ($p < 0.05$)。

Fig. 3 Differences of NaCl stress on transient K⁺ kinetics at apical regions of two provenances of *Elaeagnus angustifolia* (mean ± SE, $n = 4$). Different lowercase letters indicate significant differences between provenances at the same time ($p < 0.05$).

150 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫下, 两个种源沙枣根系K⁺外流的净流量显著增大, 分别为469和360 pmol·cm⁻²·s⁻¹, 并且银川种源沙枣幼苗K⁺外流净流量明显高于阿拉尔种源, 这表明NaCl胁迫能够激发沙枣根系中K⁺外流, 并且银川种源沙枣幼苗根系保留K⁺能力弱于阿拉尔种源。

2.2 NaCl胁迫对不同种源沙枣幼苗根系离子流动力学的影响

2.2.1 瞬时K⁺流的动态特性

由图3可知, NaCl胁迫前, 两个种源沙枣幼苗根系K⁺流表现出平稳的轻微外流。在瞬时加入NaCl (150 mmol·L⁻¹)后, 沙枣幼苗根系K⁺的外流立刻显著增加, 但是外排强度和变化趋势种源间存在差异。加入NaCl后, 银川种源沙枣幼苗根系的K⁺外排始终高于阿拉尔种源, 并且在10–17 min间, 银川种源K⁺的外流逐渐增加, 其最大值为701 pmol·cm⁻²·s⁻¹, 随后呈缓慢下降趋势, 而NaCl诱导阿拉尔种源K⁺外排在前5 min内呈现出下降趋势, 最终维持在200–320 pmol·cm⁻²·s⁻¹。这说明在受到NaCl刺激后, 沙枣幼苗根系的K⁺外流立刻显著增加, 引起K⁺损失, 并且阿拉尔种源沙枣幼苗根系的保留K⁺能力强于银川种源。

2.2.2 瞬时H⁺流动态特性

由图4可知, 两个种源沙枣幼苗根系的H⁺净流量在NaCl胁迫前呈现出轻微的内流, 但NaCl胁迫诱导后, H⁺流马上由内流转为外流, 并且阿拉尔种源的H⁺外流大于银川种源。随着时间的延长, 沙枣幼苗根系的H⁺净流量逐渐下降, 大约胁迫15 min后,

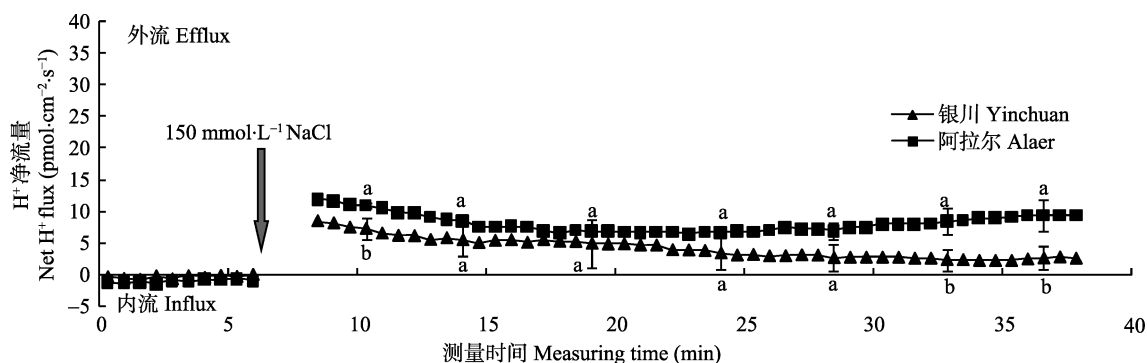


图4 NaCl胁迫诱导两个种源沙枣幼苗根系瞬时H⁺流的动态差异(平均值±标准误差, $n = 4$)。不同小写字母表示同一时间点种源间差异显著($p < 0.05$)。

Fig. 4 Differences of NaCl stress on transient H⁺ kinetics at apical regions of two provenances of *Elaeagnus angustifolia* (mean ± SE, $n = 4$). Different lowercase letters indicate significant differences between provenances at the same time ($p < 0.05$).

H⁺净流量趋于平稳, 但阿拉尔种源根系维持在6.38–9.41 pmol·cm⁻²·s⁻¹之间, 高于银川种源(2.21–5.50 pmol·cm⁻²·s⁻¹), 并且随着时间延长, 差异越来越明显。由此说明, NaCl胁迫能够诱导沙枣根系的H⁺外流, 并且耐盐型沙枣种源的外流量大于盐敏感型种源, 进而表明耐盐型沙枣种源根系具有更强的质子泵活性, 由此抑制膜电位去极化, 减少K⁺流失。

2.3 NaCl胁迫下两个种源沙枣幼苗根系离子流的药理学特性

2.3.1 两个种源沙枣幼苗根系在不同处理下的Na⁺流

如图5所示, 银川种源和阿拉尔种源沙枣幼苗根系在各处理下, Na⁺净流量均为外流, 在对照条件下, 外流量最小, 而NaCl胁迫下最大。在TEA和Amiloride处理后, Na⁺的净流量均显著减少。同时, Amiloride作为Na⁺/H⁺逆向转运蛋白抑制剂, 对Na⁺外流的限制作用比K⁺通道蛋白抑制剂TEA显著。在NaCl胁迫下, 阿拉尔种源的Na⁺净流量处于1 000–1 200 pmol·cm⁻²·s⁻¹之间, 而银川种源则维持在800–1 000 pmol·cm⁻²·s⁻¹。在NaCl + Amiloride处理后, 银川种源的Na⁺净外流量仍然显著低于阿拉尔种源, 与仅NaCl处理相比, 分别下降了449 pmol·cm⁻²·s⁻¹和429 pmol·cm⁻²·s⁻¹。在NaCl + TEA处理后, 沙枣幼苗根系的Na⁺净流量在阿拉尔和银川种源间差异不明显, 分别为775和727 pmol·cm⁻²·s⁻¹。进一步说明在NaCl胁迫下, 阿拉尔种源沙枣幼苗质膜Na⁺外排能力强于银川种源。

2.3.2 两个种源沙枣幼苗根系在不同处理下的K⁺流

如图6所示, 在各处理下, 银川和阿拉尔种源沙枣幼苗根系的K⁺净流量均呈现出外流, K⁺净流量在对

照条件下分别仅为117和87 pmol·cm⁻²·s⁻¹, 当NaCl胁迫24 h后, 分别增加到859和560 pmol·cm⁻²·s⁻¹。当加入抑制剂处理后, K⁺的外流均显著减少, 而Amiloride的抑制效果弱于TEA。在NaCl和NaCl+Amiloride处理条件下, 银川种源沙枣幼苗根尖的K⁺净流量均明显高于阿拉尔种源, 而在CK和NaCl+TEA处理下, 两个种源间无明显差异。表明NaCl胁迫环境可以引起沙枣体内K⁺的流失, 银川种源沙枣幼苗根系保留K⁺的能力弱于阿拉尔种源, 并且K⁺通道蛋白和Na⁺/H⁺逆向转运体活性能影响质膜上的K⁺运移。

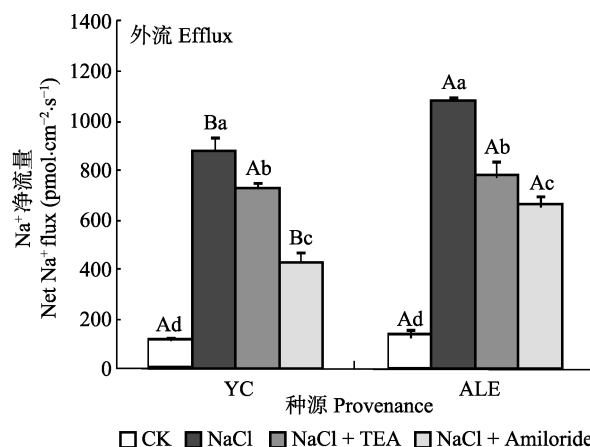


图5 两种抑制剂对NaCl胁迫后两个种源沙枣根系Na⁺流的影响(平均值±标准误差, $n = 4$)。ALE, 阿拉尔; YC, 银川。不同小写字母表示同一种源不同处理间差异显著($p < 0.05$); 不同大写字母表示相同处理不同种源间差异显著($p < 0.05$)。

Fig. 5 Effects of two kinds of inhibitors on net Na⁺ flux at apical regions of two provenances of *Elaeagnus angustifolia* treated by NaCl stress (mean ± SE, $n = 4$). ALE, Alaer; YC, Yinchuan. Different lowercase letters indicate significant differences among different treatments in the same provenance ($p < 0.05$), While different capital letters indicate significant difference between provenances at the same treatment ($p < 0.05$).

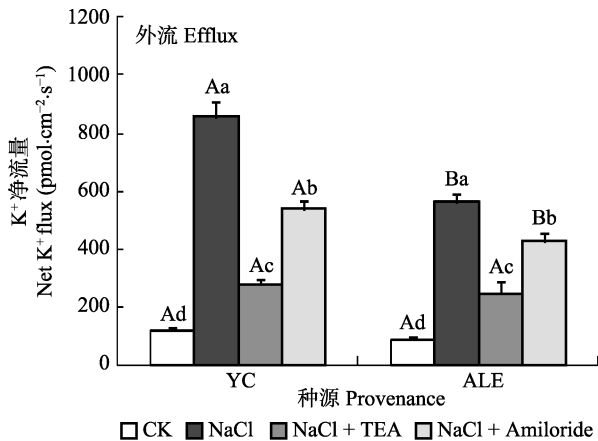


图6 两种抑制剂对NaCl胁迫后两个种源沙枣根系K⁺流的影响(平均值±标准误差, $n = 4$)。ALE, 阿拉尔; YC, 银川。不同小写字母表示同一种源不同处理间差异显著($p < 0.05$); 不同大写字母表示相同处理不同种源间差异显著($p < 0.05$)。Fig. 6 Effects of two kinds of inhibitors on net K⁺ flux at apical regions of two provenances of *Elaeagnus angustifolia* treated by NaCl stress (mean ± SE, $n = 4$). ALE, Alaer; YC, Yinchuan. Different lowercase letters indicate significant differences among different treatments in the same provenance ($p < 0.05$), While different capital letters indicate significant difference between provenances at the same treatment ($p < 0.05$).

3 讨论

植物维持细胞溶质中较高的K⁺/Na⁺是评判植物耐盐性的一个重要因素,植物主要通过限制Na⁺吸收,增加Na⁺外排和区隔化,以及控制K⁺外流量来实现较高的K⁺/Na⁺ (Maathuis & Amtmann, 1999; Chen *et al.*, 2007a; Cuin *et al.*, 2012)。有研究发现,耐盐性较强的品种在盐胁迫下具有更强的外排Na⁺能力或保留K⁺能力(Chen *et al.*, 2007b, 2008; Cuin *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2009)。但是也有研究显示K⁺外流不能预测不同基因型水稻(*Oryza sativa*)的耐盐性(Coskun *et al.*, 2013)。在本试验中,NaCl胁迫后,沙枣幼苗根系的稳态Na⁺和K⁺外流量均显著增加,并且耐盐型沙枣种源的Na⁺净流量明显大于盐敏感型种源,而K⁺外流的净流量小于盐敏感型种源。这表明NaCl胁迫引起沙枣幼苗Na⁺积累而K⁺流失,但耐盐型沙枣种源幼苗根系具有更好的Na⁺外排能力和保留K⁺能力。

在高等植物中,质膜Na⁺/H⁺逆向转运蛋白除了负责调节根部Na⁺外排和体内Na⁺长距离运输外,还可以调控细胞内的K⁺平衡、pH值和Ca²⁺信号转导(马清等, 2011; 孙健, 2011)。质膜Na⁺/H⁺逆向转运体在盐胁迫下被诱导合成或者激活,进而将Na⁺从细胞质外排到细胞外,但是排Na⁺需要质膜两侧产生

的H⁺电化学势梯度来完成,而质膜H⁺-ATPase利用水解ATP产生的能量将H⁺泵出细胞质能形成H⁺电化学势梯度(Rausch *et al.*, 1996; 陈观平等, 2006; 马清等, 2011)。同时, Olias等(2009)对番茄(*Solanum lycopersicum*)研究发现质膜Na⁺/H⁺逆向转运体(SISOS1)不仅在NaCl胁迫下维持离子平衡起重要作用,而且对于Na⁺在各器官间的区隔化也发挥关键作用。Cuin等(2011)研究认为Na⁺/H⁺逆向转运体可以作为小麦耐盐性筛选的一个量化指标。大量转基因试验证实质膜Na⁺/H⁺逆向转运体的转基因植物也都表现出更强的耐盐能力(Yang *et al.*, 2009; Yue *et al.*, 2012; Feki *et al.*, 2014)。在本试验中,NaCl胁迫下,沙枣幼苗根系Na⁺外排显著增加,耐盐型沙枣种源的Na⁺外流速率大于盐敏感型种源,并且瞬时盐胁迫下, H⁺由内流变为外流,耐盐型种源沙枣幼苗根系的H⁺外流量明显大于盐敏感型种源,说明耐盐型种源沙枣幼苗在盐胁迫下具有更强的Na⁺/H⁺逆向转运体和质膜H⁺-ATPase活性。本研究的药理学试验显示, Na⁺/H⁺逆向转运体抑制剂Amiloride显著减少Na⁺的外排,并且阿拉尔种源在NaCl和NaCl+Amiloride处理下Na⁺净外排量均显著高于银川种源,这进一步表明质膜Na⁺/H⁺逆向转运蛋白在沙枣根尖外排Na⁺过程中起着非常重要的作用,但是两个种源在抑制量间无显著差异(449 pmol·cm⁻²·s⁻¹和429 pmol·cm⁻²·s⁻¹),并且在NaCl + TEA处理后两个种源根尖的Na⁺净流量也无明显差异,这可能与抑制剂浓度,处理时间和试验材料有关,也可能沙枣的排Na⁺机制有其未知的特殊性,有待进一步研究探讨。

另外,在NaCl胁迫下,细胞去极化程度会加强,由此促使通过外向K⁺通道和非选择性阳离子通道外流的K⁺增加(Chen *et al.*, 2007a; Shabala & Cuin, 2008; Sun *et al.*, 2009)。在本试验中,在NaCl胁迫24 h和瞬时NaCl胁迫后, K⁺外流量显著增加,但受到K⁺通道抑制剂TEA的限制,这与对大麦(Chen *et al.*, 2007a)的研究结论相同。另外,在TEA处理后,两个种源间的K⁺外流差异不明显,由此推测两个种源的K⁺外流在其他通道途径间无差异,经K⁺通道而发生的K⁺外流是引起种源间K⁺外流和保持K⁺/Na⁺平衡能力差异的一个主要原因。

综上所述,在NaCl胁迫环境下,沙枣幼苗为了降低体内Na⁺的积累,通过质膜Na⁺/H⁺逆向转运体将Na⁺排到细胞外,同时,NaCl胁迫会使细胞去极化

程度加强, 增加 K^+ 外流。阿拉尔种源的沙枣幼苗根系表现出更强的 Na^+/H^+ 逆向转运体活性, 更多的 Na^+ 外排, 从而减少 Na^+ 向叶片组织的运输, 并减少NaCl胁迫下根系细胞中的 K^+ 外排, 进而更好地保持细胞质中 K^+/Na^+ 平衡, 由此表现出更强的耐盐能力。

基金项目 国家“十二五”科技支撑计划(2011BAD38B0102)和中央公益科研院所基本科研业务费专项资金(CAFYBB2012009)。

致谢 感谢温州市森林生态科技创新团队项目(C20150002)资助。

参考文献

- Britto DT, Kronzucker HJ (2008). Cellular mechanisms of potassium transport in plants. *Physiologia Plantarum*, 133, 637–650.
- Chao DY, Dilkes B, Luo H, Douglas A, Yakubova E, Lahner B, Salt DE (2013). Polyploids exhibit higher potassium uptake and salinity tolerance in *Arabidopsis*. *Science*, 341, 658–659.
- Chen GP, Wang HZ, Shi NN, Chen SY (2006). Na^+/H^+ antiporter and its relationship with plant salt tolerance. *China Biotechnology*, 26(5), 101–106. (in Chinese with English abstract) [陈观平, 王慧中, 施农农, 陈受宜 (2006). Na^+/H^+ 逆向转运蛋白与植物耐盐性的关系研究进展. 中国生物工程杂志, 26(5), 101–106.]
- Chen Z, Newman I, Zhou M, Mendham N, Zhang G, Shabala S (2005). Screening plants for salt tolerance by measuring K^+ flux: A case study for barley. *Plant, Cell & Environment*, 28, 1230–1246.
- Chen Z, Pottosin II, Cuin TA, Fuglsang AT, Tester M, Jha D, Zepeda-Jazo I, Zhou M, Palmgren MG, Newman IA, Shabala S (2007a). Root plasma membrane transporters controlling K^+/Na^+ homeostasis in salt-stressed barley. *Plant Physiology*, 145, 1714–1725.
- Chen Z, Shabala S, Mendham N, Newman I, Zhang GP, Zhou MX (2008). Combining ability of salinity tolerance on the basis of NaCl-induced K flux from roots of barley. *Crop Science*, 48, 1382–1388.
- Chen Z, Zhou M, Newman IA, Mendham NJ, Zhang GP, Shabala S (2007b). Potassium and sodium relations in salinised barley tissues as a basis of differential salt tolerance. *Functional Plant Biology*, 34, 150–162.
- Coskun D, Britto DT, Jean YK, Kabir I, Tolay I, Torun AA, Kronzucker HJ (2013). K^+ efflux and retention in response to NaCl stress do not predict salt tolerance in contrasting genotypes of rice (*Oryza sativa* L.). *PLOS ONE*, 8(2), e57767. doi: 10.1371/journal.pone.0057767.
- Cuin TA, Betts SA, Chalmandrier R, Shabala S (2008). A root's ability to retain K^+ correlates with salt tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 59, 2697–2706.
- Cuin TA, Bose J, Stefano G, Jha D, Tester M, Mancuso S, Shabala S (2011). Assessing the role of root plasma membrane and tonoplast Na^+/H^+ exchangers in salinity tolerance in wheat: In planta quantification methods. *Plant, Cell & Environment*, 34, 947–961.
- Cuin TA, Zhou M, Parsons D, Shabala S (2012). Genetic behaviour of physiological traits conferring cytosolic K^+/Na^+ homeostasis in wheat. *Plant Biology*, 14, 438–446.
- Demidchik V, Maathuis FJM (2007). Physiological roles of nonselective cation channels in plants: From salt stress to signaling and development. *New Phytologist*, 175, 384–404.
- Feki K, Quintero FJ, Khoudi H, Leidi EO, Masmoudi K, Pardo JM, Brini F (2014). A constitutively active form of a durum wheat Na^+/H^+ antiporter SOS1 confers high salt tolerance to transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports*, 33, 277–288.
- Gouiaa S, Khoudi H, Leidi EO, Pardo JM, Masmoudi K (2012). Expression of wheat Na^+/H^+ antiporter TNHXS1 and H^+ -pyrophosphatase TVP1 genes in tobacco from a bicistronic transcriptional unit improves salt tolerance. *Plant Molecular Biology*, 79, 137–155.
- Guan WK, Xu N (2012). Research situation and resources utilization of *Elaeagnus angustifolia*. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 18(19), 119–121. (in Chinese with English abstract) [管文轲, 徐娜 (2012). 沙枣资源利用研究与开发现状述评. 安徽农学通报, 18(19), 119–121.]
- Guo LJ, Wang YT (2008). Conservation research and prospects of *Elaeagnus* germplasm resources and utilization values. *Chinese Wild Plant Resources*, 27(5), 32–34. (in Chinese with English abstract) [郭丽君, 王玉涛 (2008). 沙枣种质资源特性及利用价值. 中国野生植物资源, 27(5), 32–34.]
- Kong X, Luo Z, Dong H, Eneji AE, Li W (2012). Effects of non-uniform root zone salinity on water use, Na^+ recirculation, and Na^+ and H^+ flux in cotton. *Journal of Experimental Botany*, 63, 2105–2116.
- Liu BY (2007). *Study on Ecophysiological Response and Ion Distribution of Elaeagnus angustifolia to Salt Stress*. Master degree dissertation, Tianjin Normal University, Tianjin. 27–53. (in Chinese with English abstract) [刘宝玉 (2007). 盐胁迫下沙枣生理生态响应与离子分配研究. 硕士学位论文, 天津师范大学, 天津. 27–53.]
- Liu ZX (2013). *Physiological Mechanism of Heterogeneous Responses of Elaeagnus angustifolia to NaCl and Na₂SO₄ Stress*. PhD dissertation, Chinese Academy of Forestry, Beijing. 100–104. (in Chinese with English abstract) [刘正祥 (2013). 沙枣对氯化钠和硫酸钠胁迫异质性响应的生理机制. 博士学位论文, 中国林业科学研究院, 北京. 100–104.]

- Liu ZX, Zhang HX, Yang XY, Liu T, Di WB (2014). Growth, and cationic absorption, transportation and allocation of *Elaeagnus angustifolia* seedlings under NaCl stress. *Acta Ecologica Sinica*, 34, 326–336. (in Chinese with English abstract) [刘正祥, 张华新, 杨秀艳, 刘涛, 狄文彬 (2014). NaCl胁迫下沙枣幼苗生长和阳离子吸收、运输与分配特性. 生态学报, 34, 326–336.]
- Ma Q, Bao AK, Wu GQ, Wang SM (2011). Plasma membrane Na^+/H^+ antiporter is involved in plant salt tolerance. *Chinese Bulletin of Botany*, 46, 206–215. (in Chinese with English abstract) [马清, 包爱科, 伍国强, 王锁民 (2011). 质膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白与植物耐盐性. 植物学报, 46, 206–215.]
- Maathuis FJM (2006). The role of monovalent cation transporters in plant responses to salinity. *Journal of Experimental Botany*, 57, 1137–1147.
- Maathuis FJM, Amtmann A (1999). K^+ nutrition and Na^+ toxicity: The basis of cellular K^+/Na^+ ratios. *Annals of Botany*, 84, 123–133.
- Olias R, Eljakaoui Z, Li JU, Morales PD, Marin-manzano MC, Pardo JM, Belver A (2009). The plasma membrane Na^+/H^+ antiporter SOS1 is essential for salt tolerance in tomato and affects the partitioning of Na^+ between plant organs. *Plant, Cell & Environment*, 32, 904–916.
- Rausch T, Kirsch M, Löw R, Lehr A, Viereck R, An ZG (1996). Salt stress responses of higher plants: The role of proton pumps and Na^+/H^+ -antiporters. *Journal of Plant Physiology*, 148, 425–433.
- Shabala S, Cuin TA (2008). Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum*, 133, 651–669.
- Shi HZ, Lee B, Wu SJ, Zhu JK (2003). Overexpression of a plasma membrane Na^+/H^+ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology*, 21, 81–85.
- Shi HZ, Ishitani M, Kim C, Zhu JK (2000). The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na^+/H^+ antiporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 6896–6901.
- Sun J (2011). *Signaling Network in the Perception of Salt Stress and Ionic Homeostasis Regulation in Populus euphratica*. PhD dissertation, Beijing Forestry University, Beijing. 26–28. (in Chinese with English abstract) [孙健 (2011). 胡杨响应盐胁迫与离子平衡调控信号网络研究. 博士学位论文, 北京林业大学, 北京. 26–28.]
- Sun J, Chen S, Dai S, Wang R, Li N, Shen X, Zhou X, Lu C, Zheng X, Hu Z, Zhang Z, Song J, Xu Y (2009). NaCl-induced alternations of cellular and tissue ion fluxes in roots of salt-resistant and salt-sensitive poplar species. *Plant Physiology*, 149, 1141–1153.
- Wegner LH, Stefano G, Shabala L, Rossi M, Mancuso M, Shabala S (2011). Sequential depolarization of root cortical and stelar cells induced by an acute salt shock—Implications for Na^+ and K^+ transport into xylem vessels. *Plant, Cell & Environment*, 34, 859–869.
- Yang Q, Chen ZZ, Zhou XF, Yin HB, Li X, Xin XF, Hong XH, Zhu JK, Gong Z (2009). Overexpression of SOS (salt overly sensitive) genes increases salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 2, 22–31.
- Yang S, Liu T, Zhang HX, Li HY, Zhang L (2014). Growth and physiological characteristics of *Elaeagnus angustifolia* L. under salt stress. *Journal of Fujian College of Forestry*, 34(1), 64–70. (in Chinese with English abstract) [杨升, 刘涛, 张华新, 李焕勇, 张丽 (2014). 盐胁迫下沙枣幼苗的生长表现和生理特性. 福建林学院学报, 34(1), 64–70.]
- Yang S, Zhang HX, Liu T, Wu HW, Yang XY, Ni JW, Chen QX (2016). Study on ion metabolism characteristics of *Elaeagnus angustifolia* L. seedlings under NaCl stress. *Forest Research*, 29(1), 140–146. (in Chinese with English abstract) [杨升, 张华新, 刘涛, 武海雯, 杨秀艳, 倪建伟, 陈秋夏 (2016). NaCl胁迫下沙枣幼苗的离子代谢特性. 林业科学研究, 29(1), 140–146.]
- Yang S, Zhang HX, Yang XY, Chen QX, Wu HW (2015). Differential growth performance of *Elaeagnus angustifolia* L. provenances under NaCl stress. *Scientia Silvae Sinicae*, 51(9), 51–58. (in Chinese with English abstract) [杨升, 张华新, 杨秀艳, 陈秋夏, 武海雯 (2015). NaCl胁迫下不同种源沙枣的生长表现差异. 林业科学, 51(9), 51–58.]
- Yue Y, Zhang M, Zhang J, Duan L, Li Z (2012). *SOS1* gene overexpression increased salt tolerance in transgenic tobacco by maintaining a higher K^+/Na^+ ratio. *Journal of Plant Physiology*, 169, 255–261.
- Zhang BZ, Cao ZY, Zhao KF (1992). A study on some physiological properties of *Elaeagnus angustifolia* under salt stress condition. *Scientia Silvae Sinicae*, 28(2), 187–189. (in Chinese with English abstract) [张宝泽, 曹子谊, 赵可夫 (1992). 盐分胁迫下沙枣某些生理特性的研究. 林业科学, 28(2), 187–189.]

责任编辑: 李彦 责任编辑: 李敏



扫码向作者提问