

## 杨树叶中 Na<sup>+</sup> 的积累与其耐盐能力的关系

杨迎霞<sup>1</sup>, 郝艳红<sup>2</sup>, 聂莉莉<sup>2</sup>, 张越<sup>2</sup>, 陈受宜<sup>3</sup>, 王景安<sup>1,\*</sup>, 刘仲齐<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>天津师范大学化学与生命科学学院, 天津 300384; <sup>2</sup>天津市农业生物技术研究中心, 天津 300192; <sup>3</sup>中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101

**摘要:** 以受体杨树品种‘107号’和转基因杨树‘18-1’的一年生枝条为材料, 采用Hoagland营养液水培方法, 检测二者植株生长以及根、茎、叶中 Na<sup>+</sup> 和 K<sup>+</sup> 含量变化的结果表明, 在含 100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 的 Hoagland 营养液中, 二者的生长速度都受到明显抑制, 但后者的受抑程度较小; 叶中 Na<sup>+</sup> 含量呈持续增加趋势, 9 d 后其叶中的 Na<sup>+</sup> 含量显著高于前者。在二者叶片枯萎程度相同的情况下, ‘18-1’ 叶中的 Na<sup>+</sup> 含量是 ‘107号’ 的 1.6 倍左右。在 4 mol·L<sup>-1</sup> NaCl 溶液中, 它们的表皮细胞死亡率分别为 42% 和 97%。说明后者比前者有更高的耐盐能力。

**关键词:** 杨树; 耐盐; *NTHK1*; Na<sup>+</sup>; K<sup>+</sup>

## Relationship between Accumulation of Na<sup>+</sup> in Leaves and Salt Tolerance of Different *Populus* Genotypes

YANG Ying-Xia<sup>1</sup>, JIA Yan-Hong<sup>2</sup>, NIE Li-Li<sup>2</sup>, ZHANG Yue<sup>2</sup>, CHEN Shou-Yi<sup>3</sup>, WANG Jing-An<sup>1,\*</sup>, LIU Zhong-Qi<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Chemistry and Biology, Tianjin Normal University, Tianjin 300384, China; <sup>2</sup>Tianjin Research Center of Agricultural Biotechnology, Tianjin 300192, China; <sup>3</sup>Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract:** Plant growth and changes of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> concentrations in leaves, stems or roots were investigated in 1-year-old cuttings from receptor poplar ‘107’ (*Populus × euramericana* ‘Neva’) and transgenic poplar ‘18-1’, which were exposed to salt stress in Hoagland solution. It was shown that the growth of both poplars were markedly inhibited in Hoagland with 100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl addition, while ‘18-1’ was less inhibited than ‘107’. The concentration of Na<sup>+</sup> in leaves was keeping increasing, and after 9 day culture Na<sup>+</sup> concentration in the leaves of ‘18-1’ was greatly higher than that of ‘107’. The accumulation amount of Na<sup>+</sup> in ‘18-1’ leaves was about 1.6 times higher than that in ‘107’ when their leaves displayed same necrosis degree under NaCl stress. The death ratio of epidermal cells was about 42% and 97% in ‘18-1’ and ‘107’ in distilled water with 4 mol·L<sup>-1</sup> NaCl addition, respectively. These results indicated that salt tolerance of the transgenic poplar ‘18-1’ was much higher than that of receptor poplar ‘107’.

**Key words:** poplar; salt tolerance; *NTHK1*; Na<sup>+</sup>; K<sup>+</sup>

杨树是我国中北部地区主要的栽培树种,也是林木植物最早开展基因工程研究的树种。以一些功能基因转入杨树细胞基因组中以提高杨树的耐盐能力(刘凤华等 2000; 孙仲序等 2002; 徐文君 2007; Li 等 2009), 有人通过愈伤组织进行盐分锻炼的方法也曾获得了小胡杨、河北杨、群众杨、加拿大杨以及其他杨树品种的耐盐突变体(李玲和韩一凡 1990; 李金花等 1997; 陶晶等 2000)。

组氨酸激酶(histidine kinase, HK)是激活丝裂原活化蛋白激酶途径(mitogen-activated protein kinase, MAPK)的一类传感器,与干旱和盐胁迫有一定的关系(Urao 等 1999; Voet-van-Vormizeele 等 2008)。Zhang 等(1999)从烟草中克隆了烟草乙烯受体基因

(*Nicotiana tabacum histidine kinase-1, NTHK1*), 该基因的超量表达可以显著提高烟草和苜蓿转基因植株的耐盐性(周华林 2006; 邓程君 2006)。何锬洁等(2004)将 *NTHK1* 基因转化到受体杨树品种‘107号’中, 并获得耐盐性显著提高的新品系。本文采用水培方法, 研究 NaCl 溶液中转 *NTHK1* 基因杨树的生长量以及根、茎、叶中 Na<sup>+</sup> 和 K<sup>+</sup> 含量的变化,

收稿 2009-08-12 修定 2009-10-21

资助 国家重点基础研究发展计划(2006CB100102)和“十一五”国家科技支撑计划(2007BAD67B02)。

\* 通讯作者(E-mail: zqliu733@yahoo.com.cn, jinganwang899@126.com; Tel: 022-3733857)。

并观察其间的关系。

## 材料与amp;方法

材料为转入了 *NTHK1* 基因的杨树‘18-1’及其受体杨树‘107号’(*Populus×euramericana* ‘Neva’)

2009年4月3日,分别选取受体杨树‘107号’和转基因杨树‘18-1’一年生枝条截成15~20 cm的插条,在Hoagland营养液中1个月后,2009年5月5日选用生长叶片数及株高相近的植株,采取随机分组的方法设有2个处理:(1)Hoagland营养液(对照);(2)含有0.6% NaCl的Hoagland营养液。每个处理重复3次,每个重复15株,每7 d换一次营养液。分别于试验开始和结束时测量所有植株的枝条长度(从最长的腋芽的生长锥到枝条的基部),并于处理后的第0、3、6、9、12、15、18天分别取各处理的老叶和新叶(枝条的上部1/3定义为新叶,下部1/3定义为老叶),第0、6、12、18天分别取各处理的茎和根(杨树‘107号’在第12天已经全部死亡)于105℃下杀青,80℃中烘干至恒重并研磨,精确称取0.1 g的样品置于坩埚中后放入马弗炉中,200℃下1 h和550℃下4 h进行灰化,然后用浓硝酸硝化,定容至25 mL。用PE-640火焰光度计测定Na<sup>+</sup>和K<sup>+</sup>含量。胁迫开始前,取10株杨树(即所有处理的起始对照),进行同样的分析,重复3次,胁迫后的第0、3、6、9、12、15、18天统计叶片数目。试验结束后将苗株从NaCl胁迫液中小心移出,用去离子水冲洗3遍,于105℃下杀青,80℃中烘至恒重,分老叶、新叶、茎和根4部分测定干重。整个试验均在天津市农业生物技术研究中心人工气候室中进行,实验时的平均温度白天为28℃,夜间为22℃,光照周期为14 h/10 h,光照强度为37.5 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,平均湿度为65%。

杨树叶片表皮细胞在NaCl胁迫下的死亡鉴定方法参照张宪政等(1989)书中的方法,分别撕取不同叶龄(杨树一年生扦插株系从下到上取第1、4、7、11片叶,每个基因型重复3次)的杨树叶片上表皮和下表皮,分别在0、1、2、3、4 mol·L<sup>-1</sup> NaCl溶液中胁迫10 min后,以中性红(活细胞的液泡在中性红染料中染成樱桃红色,死细胞不着色)染色10 min,于显微镜下统计相同面积内的细胞死亡率。

所有试验数据用SPSS13.0软件进行统计分析。

## 结果与amp;讨论

### 1 NaCl胁迫下的叶片脱落

处理3 d后,杨树品种‘107号’的老叶片开始因盐害而出现下部叶片脱落,中上部叶片边缘变褐、变黑且干枯,叶脉间变褐等盐害症状,大量脱落,到第12天已经减少近95%;而‘18-1’在盐处理6 d前没有观察到明显的盐胁迫症状,第7天下部叶片开始脱落,中部或上部叶片边缘变褐,或出现黄绿相间的褐斑;‘107号’和‘18-1’在Hoagland营养液中的生长良好,叶片数呈增加趋势(图1)。

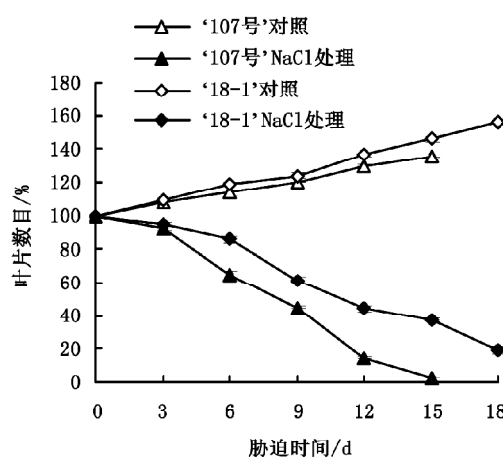


图1 NaCl胁迫下转基因杨树‘18-1’和受体‘107号’的叶片数目变化

Fig.1 Changes of leaf numbers in transgenic line ‘18-1’ and wild type ‘107’ of poplar under NaCl stress

### 2 NaCl胁迫下的植株生长变化

在100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl胁迫下,两种杨树的株高生长受到明显抑制,受抑制的程度在杨树‘18-1’和‘107号’之间差异显著(表1)。在0.6% NaCl溶液中生长2周后,‘18-1’叶片干重和总干重分别比‘107号’高59.75%、52.12%;但茎干重和根冠比在两者之间没有显著差异。

### 3 NaCl胁迫下杨树体内Na<sup>+</sup>和K<sup>+</sup>的积累

NaCl胁迫下Na<sup>+</sup>在两种基因型的各个部位随着盐胁迫时间的延长都呈上升趋势,K<sup>+</sup>则呈下降趋势(品种‘18-1’根中的K<sup>+</sup>含量除外)。在老叶中,‘107号’在NaCl胁迫3 d后Na<sup>+</sup>含量显著升高,第6天Na<sup>+</sup>积累到22.75 mg·g<sup>-1</sup> (DW)时叶片开始死亡,以后Na<sup>+</sup>保持在一定的稳定状态,叶片继续死亡;而‘18-1’在盐胁迫9 d的Na<sup>+</sup>含量才显著升高,第12

天  $\text{Na}^+$  含量达到  $33.13 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (DW) 时, 叶片开始死亡, 之后叶中  $\text{Na}^+$  仍然持续积累, 第18天积累到  $41.69 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (DW), 达到最高值。从  $\text{Na}^+$  积累的速率来看, ‘107号’和‘18-1’没有明显差别, 每天以约  $1.2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (DW) 的速率增加, 但是‘107号’增加到  $24.91 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (DW) 时即不增加, 且叶片大量死亡, 而‘18-

1’则持续增加, 而且叶片大量死亡时的  $\text{Na}^+$  含量远远高于‘107号’。胁迫开始后‘107号’中  $\text{K}^+$  含量快速下降, 而‘18-1’在盐胁迫3d后才出现快速下降, 二者都是在第6天下降到显著水平。新叶和老叶有相同的变化趋势(资料未列出)。

杨树‘107号’的茎和根中  $\text{Na}^+$  虽然呈上升趋势,

表1 NaCl胁迫对杨树生物量、叶片干重、茎干重以及根干重的影响

Table 1 Influence of NaCl stress on biomass, dry leaf weight, dry stem weight and dry root weight of poplar

基因型	株高/cm·株 <sup>-1</sup>	总干重/g·株 <sup>-1</sup>	叶片干重/g·株 <sup>-1</sup>	茎干重/g·株 <sup>-1</sup>	根干重/g·株 <sup>-1</sup>	根冠比
‘107号’	$2.07\pm 0.15^*$	$3.30\pm 0.27^*$	$1.64\pm 0.76^{**}$	$1.12\pm 0.15$	$0.55\pm 0.20^*$	$0.20\pm 0.27$
‘18-1’	$3.90\pm 0.21$	$5.02\pm 0.38$	$2.62\pm 0.15$	$1.51\pm 0.13$	$0.89\pm 0.09$	$0.21\pm 0.41$

实验中的 NaCl 浓度为  $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。\* 差异显著 ( $P<0.05$ ), \*\* 差异极显著 ( $P<0.01$ )。

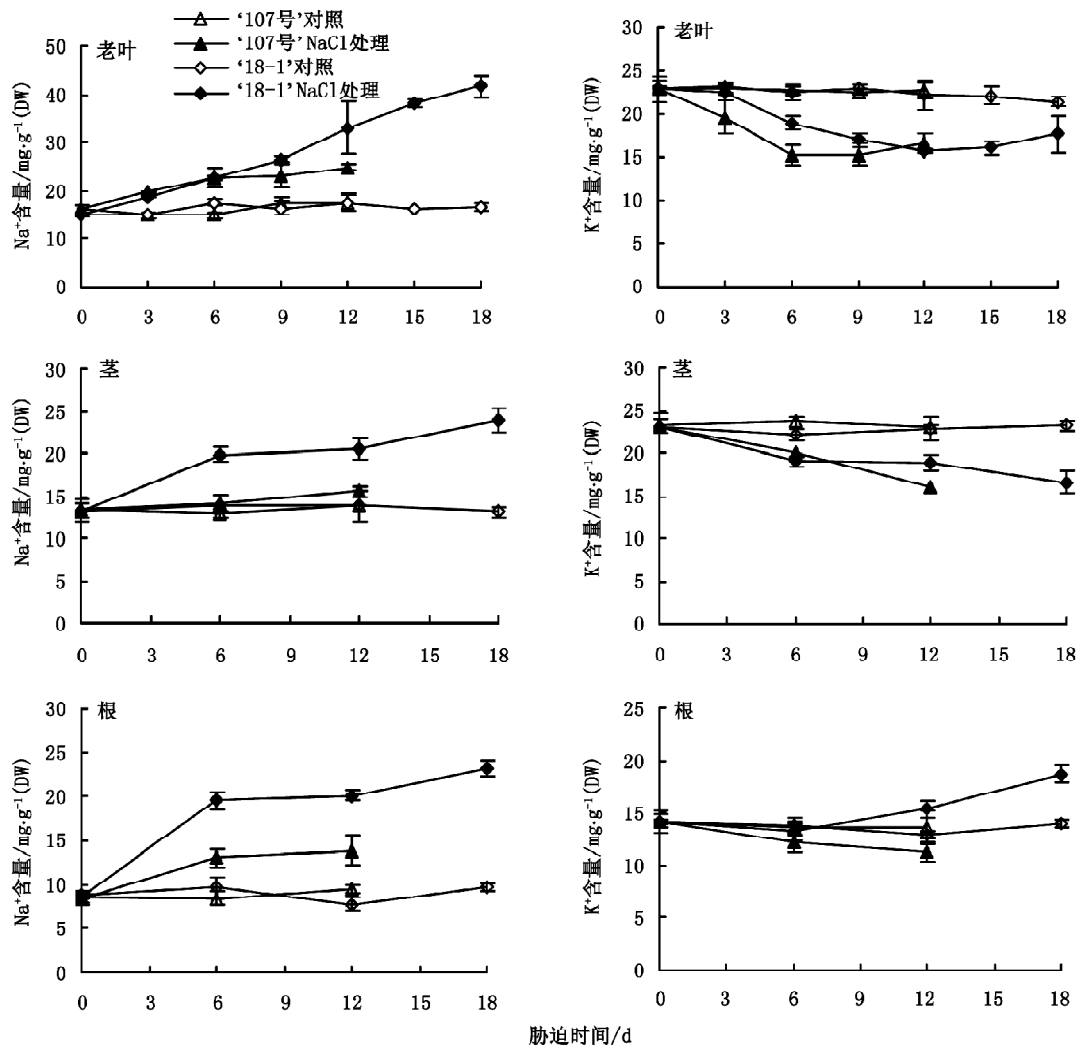


图2 NaCl胁迫下杨树‘107号’和‘18-1’叶、茎和根中的  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  含量变化

Fig.2 Changes of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  concentrations in leaves, stems and roots from poplars in ‘107’ and ‘18-1’ under NaCl stress

但是上升的程度并不显著。‘18-1’茎和根中的 $\text{Na}^+$  6 d内急剧升高到极显著水平, 达到最大值, 然后保持在较高的水平, 呈现两个阶段的上升模式, 即置于NaCl胁迫中 $\text{Na}^+$ 含量先明显升高, 接着 $\text{Na}^+$ 水平保持在一定的稳定状态, 然后又急剧上升; ‘107号’和‘18-1’茎中的 $\text{K}^+$ 都呈下降趋势, ‘18-1’的 $\text{K}^+$ 含量下降幅度较小; ‘18-1’根中的 $\text{K}^+$ 呈上升趋势, 但是上升幅度不显著(图2)。

NaCl胁迫下两种基因型叶片的枯萎程度随着 $\text{Na}^+$ 含量的增加愈来愈严重。在叶片枯萎程度一致的情况下, 杨树‘18-1’的 $\text{Na}^+$ 含量要显著高于‘107号’, 当‘107号’老叶中 $\text{Na}^+$ 含量于第6天积累到 $22.75 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (DW), ‘18-1’老叶中 $\text{Na}^+$ 浓度于第15天积累到 $38.13 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (DW)时, 二者老叶的枯萎程度都达到50%, ‘18-1’是‘107号’的1.6倍; 新叶中 $\text{Na}^+$ 积累和叶片枯萎情况与老叶的相似(图3)。可见, 耐盐性较强的杨树‘18-1’叶片较盐敏感‘107号’可以耐受更高浓度的 $\text{Na}^+$ , 这可能与耐钠能力强的植物将所吸收的大量 $\text{Na}^+$ 运到地上部或叶细胞的液泡中累积起来减少对细胞质的伤害(Blumwald 2000)有关。据Lv等(2008)报道, 耐盐的转基因棉花比盐敏感的野生型的叶片积累了更多的 $\text{Na}^+$ , 本文结果与此相似。

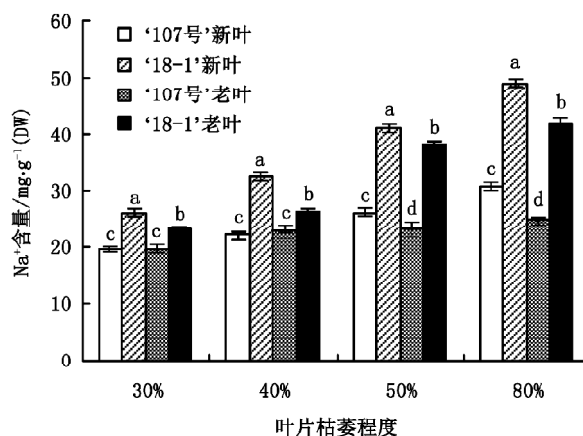


图3 NaCl胁迫下杨树‘107号’和‘18-1’不同枯萎程度叶片中 $\text{Na}^+$ 的积累

Fig.3 Accumulation amount of  $\text{Na}^+$  in leaves with different necrosis degrees from poplars ‘107’ and ‘18-1’ under NaCl stress

不同小写字母表示经LSD检测在0.05水平上差异显著。

#### 4 NaCl胁迫下杨树叶表皮细胞的死亡

在未进行NaCl胁迫处理时, 杨树‘107号’和‘18-1’的上下表皮均为正常活细胞, ‘107号’在 $4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl胁迫下, 其细胞死亡率达到97%, 而‘18-1’在 $4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl胁迫下的细胞死亡率仅为42% (图4), ‘18-1’细胞的死亡率远远低于‘107号’,

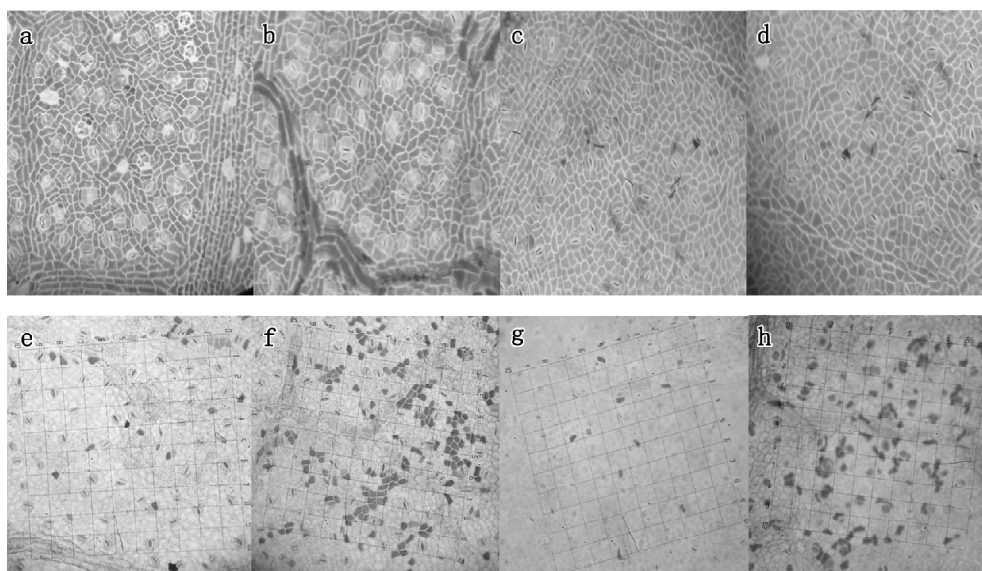


图4 NaCl胁迫下杨树叶表皮细胞的死亡

Fig.4 The death of poplar epidermis of leaf under NaCl stress

a: 杨树‘107号’上表皮对照; b: 杨树‘18-1’上表皮对照; c: 杨树‘107号’下表皮对照; d: 杨树‘18-1’下表皮对照; e: 杨树‘107号’上表皮 $4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl处理; f: 杨树‘18-1’上表皮 $4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl处理; g: 杨树‘107号’下表皮 $4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl处理; h: 杨树‘18-1’下表皮 $4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl处理。

但在1、2、3 mol·L<sup>-1</sup> NaCl胁迫下‘107号’和‘18-1’杨树的上下表皮细胞死亡率没有明显的差异。叶表皮细胞的死亡率在不同叶龄的杨树叶片之间和上下表皮之间都没有显著差异。由此看来,任何一张叶片表皮细胞的死亡率都能准确地反映该枝条的耐盐能力。

### 参考文献

- 邓程君(2006). 农杆菌介导的 *NTHK1* 基因转化苜蓿增大叶片及提高耐盐性的研究[硕士学位论文]. 北京: 中国农业大学
- 何锬洁, 张劲松, 陈受宜(2004). *NTHK1* 基因在杨树中的转化及耐盐性研究. 第四届全国植物分子育种学术研讨会, 海南, 2004
- 李金花, 苏晓华, 张绮文, 归复, 穆屡钦(1997). 细胞工程育种——林木耐盐体细胞突变育种研究进展. 世界林业研究, (6): 15~21
- 李玲, 韩一凡(1990). 杨树耐盐突变体的筛选. 林业科学, 26 (4): 359~362
- 刘风华, 孙仲序, 崔德才, 杜保兴, 王春荣, 陈受宜(2000). 细菌 *mtl2D* 基因的克隆及在转基因八里庄杨中的表达. 遗传学报, 27 (5): 428~433
- 孙仲序, 杨红花, 崔德才, 赵春芝, 赵淑萍(2002). 转基因杨树的抗盐性分析. 生物工程学报, 18 (4): 481~485
- 陶晶, 秦彩云, 姚露贤(2000). 杨树耐盐突变体育种研究进展. 吉林林业科技, 29 (2): 5~8, 50
- 徐文君(2007). 转 *AtNHX1* 基因杨树的培育及其耐盐性的鉴定[硕士学位论文]. 南京: 南京农业大学
- 张宪政, 陈凤玉, 王荣富(1989). 植物生理学实验技术. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1~3
- 周华林(2006). I. 乙烯受体 *NTHK1* 结构域的功能研究. II. 水稻矮化突变体 *glu* 的基因克隆[博士学位论文]. 北京: 中国科学院
- Blumwald E (2000). Sodium transport and salt tolerance in plants. *Curr Opin Cell Biol*, 12: 431~434
- Li YL, Su XH, Zhang BY, Huang QJ, Zhang XH, Huang RF (2009). Expression of jasmonic ethylene responsive factor gene in transgenic poplar tree leads to increased salt tolerance. *Tree Physiol*, 29: 273~279
- Lv SL, Zhang KW, GAO Q, Lian LJ, Song YJ, Zhang JR (2008). Overexpression of an H<sup>+</sup>-PPase gene from *Thellungiella halophila* in cotton enhances salt tolerance and improves growth and photosynthetic performance. *Plant Cell Physiol*, 49 (8): 1150~1164
- Urao T, Yakubov B, Satoh R, Shinozaki KY, Soki M, Hirayama T, Shinozaki K (1999). A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell*, 11: 1743~1754
- Voet-van-Vormizeele J, Groth G (2008). Ethylene controls autophosphorylation of the histidine kinase domain in ethylene receptor ETR1. *Mol Plant*, 1 (2): 380~387
- Zhang JS, Xie C, Liu F, Liu FH, Chen SY (1999). A novel tobacco gene coding for a product similar to bacterial two-component regulators. *Chin Sci Bull*, 44: 1025~1029