

## 盐胁迫下硫化氢调控杨树根系的离子流

朱会朋, 孙健, 赵楠, 马旭君, 张玉红, 沈昕, 陈少良\*

北京林业大学生物科学与技术学院, 北京100083

**摘要:** 本文应用非损伤微测技术(non-invasive micro-test technique, NMT)研究了H<sub>2</sub>S对盐胁迫下耐盐的胡杨和不耐盐的群众杨根部K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>和H<sup>+</sup>流速的影响。结果表明, 两种杨树根系在瞬时(100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl)和短期(24 h, 50 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl)盐胁迫下呈现出K<sup>+</sup>外流, 这种盐诱导的根部K<sup>+</sup>外流能被50 μmol·L<sup>-1</sup> NaHS抑制。此外, H<sub>2</sub>S能增加短期盐胁迫下Na<sup>+</sup>的外排, 而Na<sup>+</sup>的外流被Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运体抑制剂amiloride或者质膜H<sup>+</sup>泵抑制剂sodium orthovanadate有效抑制。盐胁迫下, H<sub>2</sub>S对不耐盐的群众杨根系K<sup>+</sup>外流的抑制作用和对Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运的促进作用高于耐盐的胡杨。据此推测, H<sub>2</sub>S是通过上调杨树根系胞质膜Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运体系(H<sup>+</sup>泵和Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运体), 促进Na<sup>+</sup>和H<sup>+</sup>逆向跨膜转运, 并且, H<sup>+</sup>泵通过抑制去极化激活的离子通道来限制盐诱导的K<sup>+</sup>外流。

**关键词:** 胡杨; 群众杨; K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>平衡; NaHS; 非损伤微测技术

## Hydrogen Sulfide Mediates Ion Fluxes in Root of Poplars under NaCl Stress

ZHU Hui-Peng, SUN Jian, ZHAO Nan, MA Xu-Jun, ZHANG Yu-Hong, SHEN Xin, CHEN Shao-Liang\*

College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

**Abstract:** Using the non-invasive micro-test technique (NMT), the effects of exogenous NaHS (a H<sub>2</sub>S donor) on ion fluxes in roots were investigated in a salt-tolerant species *Populus euphratica* and a salt-sensitive poplar species *Populus popularis* under the instantaneous salt stress (100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl) and short-term salt stress (24 h, 50 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl). Both NaCl stress caused a K<sup>+</sup> flux in roots of the poplar, and the salt-induced K<sup>+</sup> flux was markedly inhibited by 50 μmol·L<sup>-1</sup> NaHS. Moreover, the Na<sup>+</sup> flux increment could be induced by NaHS under short-term salt stress, and also could be effectively inhibited by amiloride (a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter inhibitor) or sodium orthovanadate (a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase inhibitor). The results showed that the effects of H<sub>2</sub>S on the inhibition of K<sup>+</sup> flux and the enhancement of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport were more remarkably in the salt-sensitive *P. popularis*, compared to the salt-resistant *P. euphratica*. These concluded that the beneficial effects of H<sub>2</sub>S were presumably due to the upward regulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport system (H<sup>+</sup> pump and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter), which drove the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange across the PM, and simultaneously restricted the K<sup>+</sup> flux through depolarization-activated channels.

**Key words:** *Populus euphratica*; *Populus popularis*; K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> homeostasis; NaHS; non-invasive micro-test technique

盐渍化会对植物造成各种各样不利的影 响, 例如离子毒害、渗透胁迫、营养元素失衡等, 最终抑制植物的生长(Zhu 2001)。大量的研究表明, 保持K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>平衡对于植物适应高盐环境至关重要(Shabala和Cuin 2008; Chen等2003; Sun等2009a; Wang等2008)。NaCl诱导的K<sup>+</sup>流失主要是通过去极化活化的外向型K<sup>+</sup>通道(depolarization-activated outward rectifying K<sup>+</sup> channels, DA-KORCs)和去极化诱导的非选择性阳离子通道(depolarization-activated nonselective cation channels, DA-NSCCs, Shabala和Cuin 2008; Sun等2009b)。植物细胞利用质膜和液泡膜上Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运体系将Na<sup>+</sup>外排或将Na<sup>+</sup>区隔在液泡中(戴松香等2006; Blumwald等

2000)。Na<sup>+</sup>的跨膜转运主要是依赖于H<sup>+</sup>-ATPase, H<sup>+</sup>泵一方面为Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运提供了质子浓度梯度(Blumwald等2000; Zhu 2003; Sun等2009a, 2009b), 另一方面, H<sup>+</sup>-ATPase可以抑制钠离子通过非电压依赖型的非选择性阳离子通道(voltage-independent nonselective cation channels, VI-NSCCs)

收稿 2013-01-28 修定 2013-04-27

资助 国家自然科学基金(31270654和31170570)、北京市自然科学基金(6112017)、高等学校学科创新引智计划(111项目, B13007)、中央高校基本科研业务费专项资金(JC2011-2)和北京市优秀博士学位论文指导教师专项基金(YB20081002201)。

\* 通讯作者(E-mail: lschen@bjfu.edu.cn; Tel: 010-62338129)。

进入胞内(Maathuis等2006)。研究表明, 诸多的胁迫信使, 如胞外ATP、 $H_2O_2$ 、 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 和NO等, 都能通过调节盐胁迫下 $Na^+/H^+$ 逆向转运体系来维持离子平衡(Sun等2010a, 2010b, 2012; Lu等2012)。

越来越多的研究表明, 硫化氢( $H_2S$ )也作为信号分子能够调节复杂的生理过程。已经发现 $H_2S$ 能够调节光合作用(Chen等2011)、气孔运动(Lisjak等2010; García-Mata和Lamattina 2010)、花的衰老(Zhang等2011)、生根(李东波等2010; Zhang等2009a)等。最近,  $H_2S$ 在胁迫下的作用受到了广泛的关注。研究证明,  $H_2S$ 能够缓解植物的重金属毒害, 如铝(Zhang等2010b)、镉(于立旭等2011; Li等2012)、铜(Zhang等2008)等。此外 $H_2S$ 还能缓解植物的渗透和干旱胁迫(Zhang等2009b, 2010a)。最近发现,  $H_2S$ 能增强苜蓿种子在萌发阶段对NaCl的耐受能力, 同时苜蓿根系的 $K^+/Na^+$ 比值有所提高(Wang等2012)。然而,  $H_2S$ 调控 $K^+/Na^+$ 平衡的机制并不清楚。

本文研究了在瞬时和短期盐胁迫条件下,  $H_2S$ 对胡杨(耐盐杨树)和群众杨(盐敏感杨树)根部 $K^+$ 、 $Na^+$ 和 $H^+$ 离子流的影响, 揭示了 $H_2S$ 对于盐胁迫杨树 $K^+/Na^+$ 的调控作用, 并结合抑制剂实验, 探讨了 $H_2S$ 的调控原理。

## 材料与方法

### 1 植物材料

4月份选取来自新疆维吾尔自治区的一年生胡杨(*Populus euphratica* Oliv.)实生苗和北京林业大学苗圃的群众杨(*Populus popularis* 35-44)一年生插条苗, 温室盆栽培养1个月, 基质为壤土:河沙(1:1)。实验开始前, 将培养得到的树苗转移至含有1/4 Hoagland营养液的水培瓶中水培, 备用。

### 2 实验方法

#### 2.1 瞬时盐胁迫与NaHS处理

2种杨树根系用不同浓度(0、25、50、200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) NaHS预处理30 min, 测定分生区稳态 $K^+$ 流10 min所得数据的平均值即为盐胁迫前的 $K^+$ 流情况, 加入NaCl母液(200  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )至终浓度为100  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 连续测试30 min所得数据的平均值即为盐胁迫后的 $K^+$ 流情况。

#### 2.2 短期盐胁迫与NaHS处理

两种杨树的水培苗根系进行4种不同处理: 对照、50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaHS、50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl、50

$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl+50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaHS。处理24 h后, 从根尖顶端距离200~1 200  $\mu\text{m}$ 处, 沿根轴每隔200  $\mu\text{m}$ 测定1个点(分生区: 200~400  $\mu\text{m}$ ; 伸长区: 600~800  $\mu\text{m}$ ; 成熟区: 1 000~1 200  $\mu\text{m}$ ), 每个点测试2 min, 分别测定 $K^+$ 、 $Na^+$ 和 $H^+$ 离子流, 记录数据作图。

#### 2.3 离子转运抑制剂处理

在短期盐胁迫后, 将50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl和50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl+50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaHS处理的杨树根系分别用500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 原钒酸钠(sodium orthovanadate)和50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 阿米洛利(amiloride)预处理30 min, 测试记录 $Na^+$ 流(Sun等2009a, b)。

### 3 离子流测试

利用非损伤微测技术(non-invasive micro-test technique, NMT; NMT-YG-100, Younger USALLC, Amherst, MA01002, USA)测试根系的 $K^+$ 、 $Na^+$ 和 $H^+$ 流(Sun等2009a, b)。

#### 3.1 测试样品准备

取30 mm的根段, 用蒸馏水冲洗干净后, 立即在下列溶液中平衡10 min左右。 $K^+$ 和 $H^+$ 基本测试液: 0.1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl、0.1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $MgCl_2$ 、0.1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $CaCl_2$ 和0.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  KCl, 用HCl和NaOH调节pH至5.7。 $Na^+$ 基本测试液: 0.1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl、0.1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $MgCl_2$ 、0.1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $CaCl_2$ 和0.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  KCl, 用KOH和HCl调节pH至5.7。最后将根段置于含10 mL新鲜测量液的测量池中, 并固定于底部。

#### 3.2 离子选择性电极的制备

离子选择性电极的制备与校准参照Sun等(2009a, b)的方法。

#### 3.3 NMT测试离子流

利用微操将离子选择性电极靠近根的表面(电极尖端距离根表面的距离约为10  $\mu\text{m}$ ), 电极以此为起点, 沿x轴方向(垂直根轴的方向)离开起点进行往返测试, 电极每运动1次的距离为30  $\mu\text{m}$  (从靠近根表面的一端到远离根表面的一端, dx), 电极的运动频率为0.3~0.5 Hz。NMT测量的每个样点, 数据持续采集1~2 min。在本文中, 离子选择性电极从距根尖200  $\mu\text{m}$ 开始沿根轴直到1 200  $\mu\text{m}$ 进行测试(在根部的分生区、伸长区和成熟区分别选择2个部位进行测试)。

用ASET软件(ASET 2.0 Sciencewares, Falmouth, MA 02540, USA)和iFluxes软件(Younger

USA, LLC, Amherst, MA 01002, USA)进行数据和图像的获取、数据预处理、电极三维位置的控制、显微镜精细聚焦的步进控制。

#### 4 数据分析

离子的流速可以通过Fick's扩散法则计算公式如下:

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

式中,  $J$ 代表 $x$ 方向的离子流,  $D$ 是在特定的介质中离子的扩散常数,  $dc/dx$ 表示离子浓度梯度。利用旭月公司提供的MageFlux软件(<http://xuyue.net/mageflux>)计算离子流数据。在本文中, 阳离子外流表示为正值, 内流为负值, 并且本实验测得的数据是净的离子流速(即内流与外流相互抵消之后的离子流速)。

### 结果与讨论

#### 1 NaHS对瞬时盐胁迫下杨树根系 $K^+$ 流的影响

盐胁迫能引起植物细胞 $K^+$ 的流失, 因此, 维持细胞内 $K^+$ 的浓度对于植物适应高盐环境非常重要(Chen等2005)。从瞬时盐胁迫前后的 $K^+$ 流变化可以看出, 胡杨和群众杨根系 $K^+$ 外流均升高, 胡杨根部分生区的 $K^+$ 外流从 $40 \text{ pmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 增大到 $170 \text{ pmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 群众杨从 $90 \text{ pmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 增大到 $150 \text{ pmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (图1)。

在盐胁迫前, 分别用 $25$ 、 $50$ 和 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NaHS预处理胡杨和群众杨的根系 $30 \text{ min}$ , 能不同程度地降低 $K^+$ 外流甚至促进其内流(图1)。但两种杨树的反应略有不同, 胡杨用 $25$ 和 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度NaHS预处理的效果最明显; 而群众杨用 $50$ 和 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度NaHS预处理的效果显著。与对照相比,  $3$ 种浓度的NaHS均能有效抑制杨树在瞬时盐胁迫下的 $K^+$ 外流。 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaHS处理的胡杨 $K^+$ 流降低为 $2\sim 3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 与盐胁迫前的相差约 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 群众杨 $K^+$ 流降低为 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 与处理前相比变化不大。 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaHS处理两种杨树时, 胡杨 $K^+$ 流降低到大约 $70 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 群众杨为 $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右。 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaHS处理时, 两种树种均表现出 $K^+$ 流的降低, 流速大约都在 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。从图1中可以看出, 盐胁迫前后,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaHS对于两种杨树的 $K^+$ 流抑制效果最显著。

由于盐胁迫后测试液中含有的高浓度 $\text{Na}^+$ 离

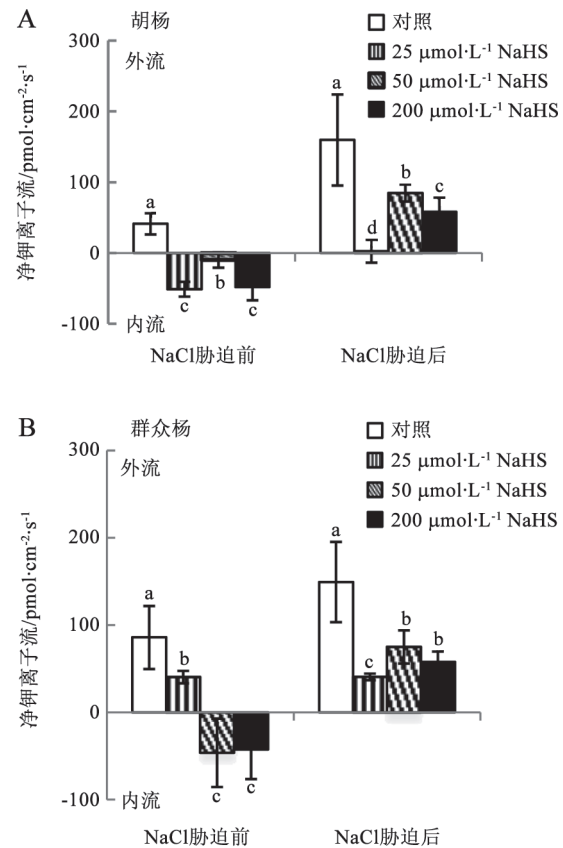


图1 不同浓度NaHS对盐胁迫前后杨树根系 $K^+$ 流变化的影响  
Fig.1 Effect of different concentrations of NaHS on  $K^+$  flux of the poplar roots before and after salt stress

柱状图表示5~6株植物的均值(根系分生区测试2~3个点, 每个点2 min), 不同字母表示差异显著。

子, 降低了 $\text{Na}^+$ 离子选择电极的灵敏度(Sun等2009a), 因此, 本文未对 $\text{Na}^+$ 流进行瞬时测试。

#### 2 NaHS对短期盐胁迫下杨树根系离子流的影响

如图2所示, 通过测定两种杨树分生区、伸长区和成熟区的离子流, 发现对照均表现为微弱的净 $K^+$ 外流。 $24 \text{ h}$ 盐胁迫下, 两种杨树根部 $K^+$ 的净外流提高, 在分生区, 群众杨 $K^+$ 外流( $350 \text{ pmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )明显高于胡杨( $50 \text{ pmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), 在伸长区和成熟区也是如此, 只是流速持续降低(图2)。NaHS处理对两种杨树根系的离子流都有影响。在非盐胁迫下, NaHS处理可有效抑制两种杨树 $K^+$ 的外流并且导致胡杨 $K^+$ 内流(图2)。在盐胁迫下, NaHS处理能够明显降低 $K^+$ 的外流, 胡杨的分生区、伸长区和成熟区表现出微弱的内流(图2-A); 群众杨的 $K^+$ 外流降低约75% (分生区)和50% (伸长区), 而成熟区

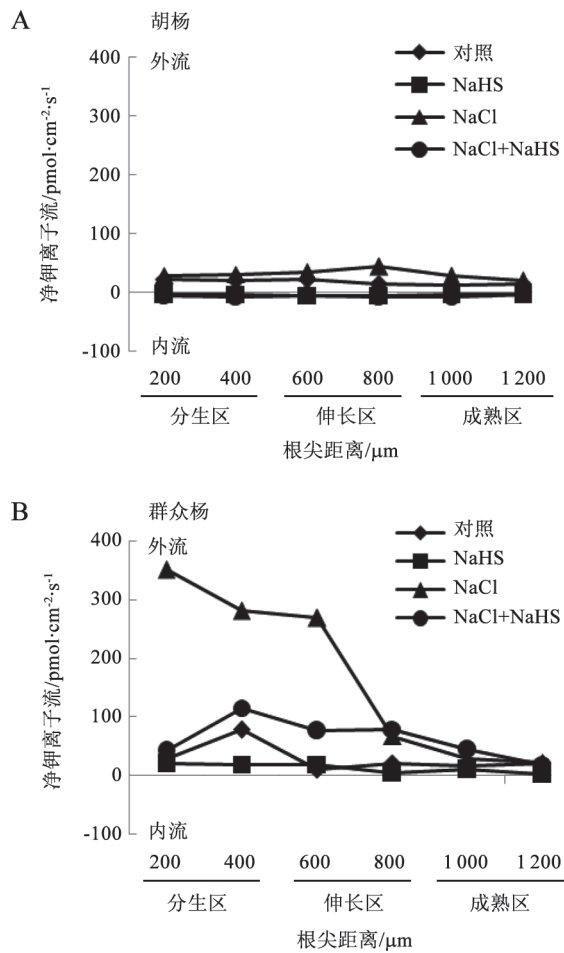


图2 NaHS对24 h盐胁迫下杨树根系 $K^+$ 流的影响  
Fig.2 Effect of NaHS on  $K^+$  fluxes of the poplar roots under the 24 h salt stress

$K^+$ 流变化不明显(图2-B)。图2中可以看出,  $H_2S$ 能够降低盐胁迫诱导的两种杨树的 $K^+$ 外流, 尤其在盐敏感的群众杨中表现显著, 特别是在分生区。 $H_2S$ 在盐胁迫下抑制 $K^+$ 外流有益于植物对高盐环境的适应(Chen等2005)。

$Na^+$ 外排是避免 $Na^+$ 在细胞质中积累的一种直接途径。高盐环境下植物将 $Na^+$ 排出细胞外时需逆着电化学势梯度, 这是一个主动运输的过程。在高等植物中,  $Na^+$ 的外排是通过质膜上的 $Na^+/H^+$ 逆向转运蛋白实现的。质膜 $H^+$ -ATPase水解ATP产生能量将 $H^+$ 从细胞质中泵出, 从而产生跨质膜的 $H^+$ 电化学势梯度, 驱动质膜 $Na^+/H^+$ 逆向转运蛋白进行离子转运:  $H^+$ 顺着电化学势梯度进入细胞的同时,  $Na^+$ 逆着电化学势梯度被排出细胞(Zhu 2001, 2003)。

图3所示, 对照的 $Na^+$ 流均为外流, 胡杨的平均流速约为 $120 \text{ pmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 群众杨的平均流速约为 $80 \text{ pmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。胡杨根系的 $Na^+$ 流高于群众杨, 应是其内源高水平的 $Na^+$ 所致。由于胡杨取自新疆, 生长于该地区盐碱土壤中的胡杨苗木会积累 $Na^+$ 离子(Chen等2003; Wang等2008)。非盐胁迫下, NaHS处理能增加两种杨树 $Na^+$ 的外流, 这种现象在胡杨中尤其显著, 胡杨根系分生区和伸长区的 $Na^+$ 流增加约1.5倍, 而成熟区则不明显(图3-A), 而群众杨 $Na^+$ 外流没有增加并有些降低(图3-B)。在短期盐胁迫下, NaHS能提高了两种杨树根系整体的 $Na^+$ 的外流, 而在不同区域反应有所不同, 群众杨的分生区、伸长区和成熟区 $Na^+$ 外流的增加值分别为170、90和50  $\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 依次降低; 胡杨与

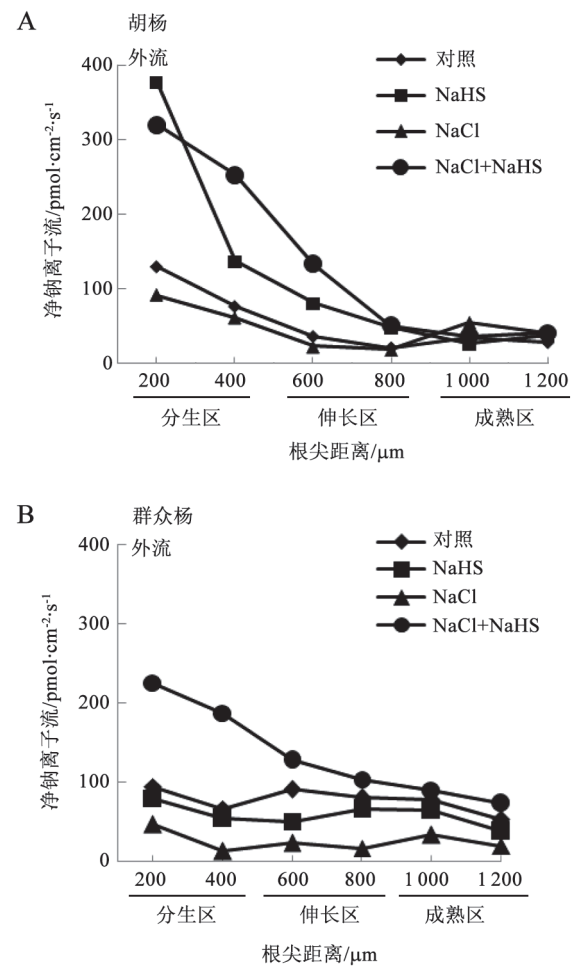


图3 NaHS对24 h盐胁迫下杨树根系 $Na^+$ 流的影响  
Fig.3 Effect of NaHS on  $Na^+$  fluxes of the poplar roots under the 24 h salt stress

群众杨的趋势一致, 但只有分生区和伸长区 $\text{Na}^+$ 的外流增加。因此, 说明 $\text{H}_2\text{S}$ 在盐胁迫下能促进杨树 $\text{Na}^+$ 的外排, 减少 $\text{Na}^+$ 离子在细胞内的积累, 避免盐毒害作用。

图4显示, 胡杨的对照苗木表现出 $\text{H}^+$ 外流, 而群众杨根为内流。盐胁迫24 h后, 胡杨 $\text{H}^+$ 外流增加, 而群众杨中 $\text{H}^+$ 内流与对照持平。非盐胁迫下,  $\text{NaHS}$ 处理能增强两种杨树根系 $\text{H}^+$ 内流, 从而使胡杨 $\text{H}^+$ 的外流降低, 群众杨 $\text{H}^+$ 的外流增强(图4); 在盐胁迫下,  $\text{NaHS}$ 对两种杨树根系 $\text{H}^+$ 内流的增强作用更加明显, 胡杨根部分生区的 $\text{H}^+$ 转变为内流, 群众杨 $\text{H}^+$ 内流进一步提高。实验结果表明,  $\text{H}_2\text{S}$ 在盐胁迫下能促进杨树根细胞 $\text{H}^+$ 内流。结合 $\text{Na}^+$ 外流的提高(图3和4), 我们推断 $\text{H}_2\text{S}$ 促进了跨质膜的 $\text{Na}^+$ / $\text{H}^+$ 逆向转运。

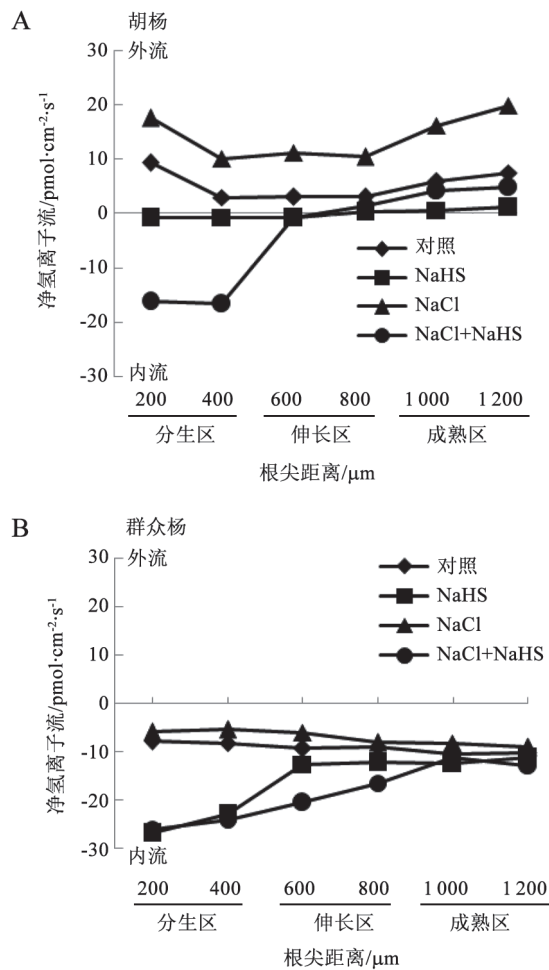


图4 NaHS对24 h盐胁迫下胡杨根系 $\text{H}^+$ 流的影响  
Fig.4 Effect of NaHS on  $\text{H}^+$  fluxes of the poplar roots under the 24 h salt stress

### 3 离子转运抑制剂对盐胁迫下杨树根系 $\text{Na}^+$ 流的影响

如图5所示,  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的原钒酸钠能显著抑制 $\text{NaCl}+\text{NaHS}$ 处理的 $\text{Na}^+$ 外流, 这种抑制作用在杨树的分生区附近( $200\sim 400 \mu\text{m}$ )最为显著, 抑制幅度达到 $40\%\sim 60\%$ , 而原钒酸钠对于盐胁迫下杨树根系 $\text{Na}^+$ 外流的抑制作用随着距离根尖越远效果越不明显。

如图6所示,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的阿米洛利能显著抑制 $\text{NaCl}+\text{NaHS}$ 处理的 $\text{Na}^+$ 外流, 这种抑制作用在两种杨树的分生区附近( $200\sim 400 \mu\text{m}$ )最为显著, 抑制幅度达到 $50\%\sim 90\%$ , 与原钒酸钠作用趋势相同, 阿米洛利对于盐胁迫下杨树根系 $\text{Na}^+$ 外流的抑制作用在根系的成熟区不明显。

在高盐环境下维持 $\text{K}^+/\text{Na}^+$ 平衡对于杨树适应盐胁迫环境至关重要(Chen等2003), 对于盐胁迫下

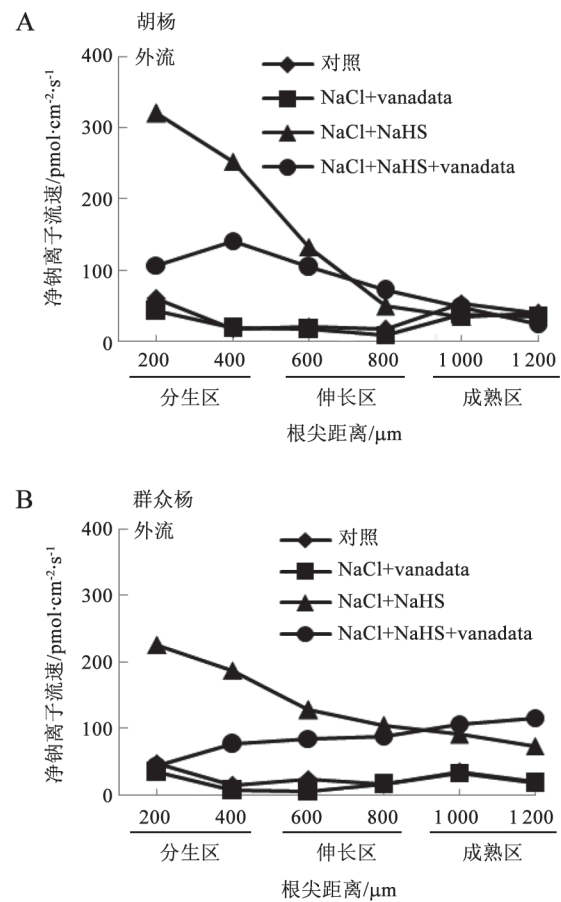


图5 原钒酸钠对盐胁迫下杨树根 $\text{Na}^+$ 离子流的影响  
Fig.5 Effects of sodium orthovanadate on  $\text{Na}^+$  fluxes of the poplar roots under salt stress

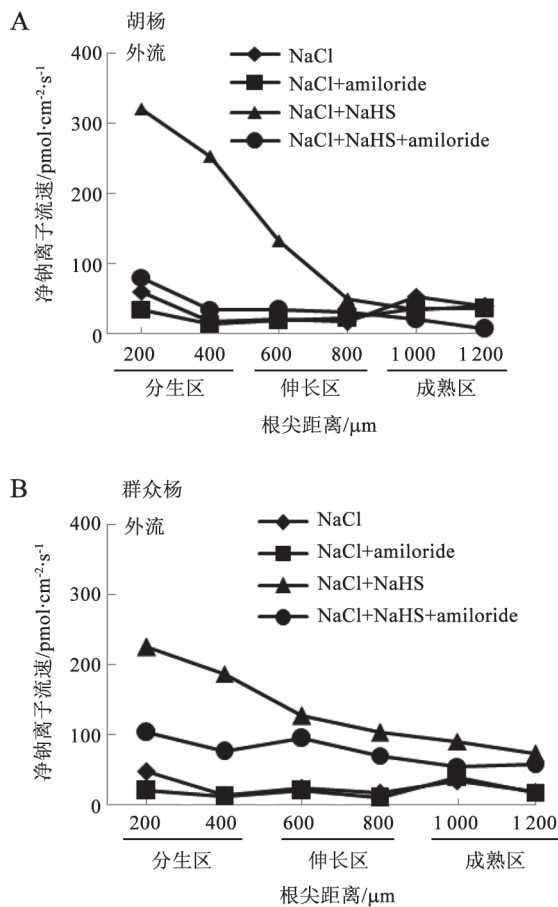


图6 阿米洛利对盐胁迫下杨树根 $\text{Na}^+$ 离子流的影响  
Fig.6 Effects of amiloride on  $\text{Na}^+$  fluxes of the poplar roots under salt stress

细胞质内 $\text{K}^+/\text{Na}^+$ 平衡的维持,植物一方面可以通过限制 $\text{Na}^+$ 在细胞质中的积累来完成,另一方面可以通过限制 $\text{K}^+$ 的流失来实现。已有研究表明,耐盐的胡杨主要通过两种方式调节盐胁迫组织和细胞的 $\text{K}^+/\text{Na}^+$ 平衡:提高 $\text{Na}^+$ 的外排和限制 $\text{K}^+$ 的外流(Wang等2012)。本实验发现 $\text{H}_2\text{S}$ 能够提高2种杨树根部的 $\text{Na}^+$ 外流(图3),并能同时减弱 $\text{K}^+$ 外流(图1和2),据此推测, $\text{H}_2\text{S}$ 具有调节杨树根系 $\text{K}^+/\text{Na}^+$ 平衡的能力。

盐胁迫24 h后, $\text{H}_2\text{S}$ 显著增强了耐盐的胡杨和盐敏感的群众杨根部分生区的 $\text{Na}^+$ 外流(图3),另外在 $\text{NaHS}$ 处理时表现出净的 $\text{H}^+$ 内流,尤其在杨树的分生区表现明显(图4),即 $\text{H}_2\text{S}$ 引起的 $\text{H}^+$ 的内流与 $\text{Na}^+$ 的外流相对应。药理学实验也证明, $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 逆向转运蛋白抑制剂阿米洛利和 $\text{H}^+/\text{ATPase}$ 专一性抑制剂原钒酸钠能够降低由 $\text{H}_2\text{S}$ 引起的 $\text{Na}^+$ 外流(图5

和6)。据此,我们推断 $\text{H}_2\text{S}$ 促进了跨质膜的 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 逆向转运。已有研究证实,耐盐植物 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 逆向转运蛋白活性与质子泵活性是相偶联的, $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 逆向转运蛋白依靠膜上的质子泵— $\text{H}^+/\text{ATPase}$ 产生的 $\text{H}^+$ 电化学势梯度来驱动。质膜 $\text{H}^+/\text{ATPase}$ 泵能够维持 $\text{H}^+$ 电化学梯度,从而促进了 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 的逆向转运(Blumwald等2000; Zhu 2003)。由此推测,盐胁迫下 $\text{H}_2\text{S}$ 促进了杨树根细胞质膜 $\text{H}^+/\text{ATPase}$ 和 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 逆向转运蛋白的活性,从而促进了 $\text{Na}^+$ 的外排。 $\text{H}^+$ 的净流速低于 $\text{Na}^+$ ,主要是由于 $\text{H}^+/\text{ATPase}$ 活性提高促进了 $\text{H}^+$ 的外流,从而部分抵消了 $\text{H}^+$ 的内流的总量。

$\text{H}_2\text{S}$ 对于盐胁迫下的两种杨树根系 $\text{K}^+$ 的平衡也起重要的作用,在瞬时和短期盐胁迫下, $\text{H}_2\text{S}$ 能够降低盐诱导的 $\text{K}^+$ 外流(图1和2),我们以前的研究表明, $\text{K}^+$ 的外流是通过外向型 $\text{K}^+$ 通道和非选择性阳离子通道(Sun等2009a, b)进行的。抑制剂实验(图5和6)的结果说明, $\text{H}_2\text{S}$ 能够激活质膜 $\text{H}^+/\text{ATPase}$ ,从而使盐诱导质膜电化学势去极化的程度降低,由此, $\text{H}_2\text{S}$ 就能抑制 $\text{K}^+$ 通过DA-KORCs和DA-NSCCs的流失(Shabala和Cuin 2008)。

综上, $\text{H}_2\text{S}$ 能够抑制盐诱导的 $\text{K}^+$ 的外流和增强 $\text{Na}^+$ 的外排,从而使杨树在高盐环境下维持 $\text{K}^+/\text{Na}^+$ 平衡。这很可能是通过上调质膜 $\text{H}^+$ 泵而实现的:质膜 $\text{H}^+$ 泵活性提高,一方面为 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 跨膜逆向转运提供质子浓度梯度,另一方面,通过降低质膜的去极化而限制 $\text{K}^+$ 的外流。

## 参考文献

- 戴松香, 陈少良, Fritz E, Olbrich A, Kettner C, Polle A, Hüttermann A (2006). 盐胁迫下胡杨和毛白杨叶细胞中的离子区隔化. 北京林业大学学报, 28 (增刊2): 1~5
- 李东波, 肖朝霞, 刘灵霞, 王金成, 宋国力, 毕玉蓉(2010). 外源硫化氢对豌豆根尖及其边缘细胞的影响. 植物学报, 45: 354~362
- 于立旭, 尚宏芹, 张存家, 王秀峰, 魏珉, 杨凤娟, 史庆华(2011). 外源硫化氢对镉胁迫下黄瓜胚轴和胚根生理生化特性的影响, 园艺学报, 38 (11): 2131~2139
- Blumwald E, Aharon GS, Apse MP (2000). Sodium transport in plant cells. *Biochim Biophys Acta*, 1465: 140~151
- Chen J, Wu FH, Wang WH, Zheng CJ, Lin GH, Dong XJ, He JX, Pei ZM, Zheng HL (2011). Hydrogen sulphide enhances photosynthesis through promoting chloroplast biogenesis, photosynthetic enzyme expression, and thiol redox modification in *Spinaciaoleracea* seedlings. *J Exp Bot*, 62 (13): 4481~4493
- Chen S, Li J, Wang S, Fritz E, Hüttermann A, Altman A (2003). Effects of  $\text{NaCl}$  on shoot growth, transpiration, ion compartmenta-

- tion, and transport in regenerated plants of *Populus euphratica* and *Populus tomentosa*. *Can J For Res*, 33: 967~975
- 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 Environ*, 28: 1230~1246
- García-Mata C, Lamattina L (2010). Hydrogen sulphide, a novel gas-transmitter involved in guard cell signalling. *New Phytol*, 188: 977~984
- Li L, Wang Y, Shen W (2012). Roles of hydrogen sulfide and nitric oxide in the alleviation of cadmium-induced oxidative damage in alfalfa seedling roots. *Biometals*, 25: 617~631
- Lisjak M, Srivastava N, Teklic T, Civalo L, Lewandowski K, Wilson I, Wood ME, Whiteman M, Hancock JT (2010). A novel hydrogen sulfide donor causes stomatal opening and reduces nitric oxide accumulation. *Plant Physiol Biochem*, 48: 931~935
- Lu Y, Li N, Sun J, Hou P, Jing X, Zhu H, Deng S, Han Y, Huang X, Ma X et al (2012). Exogenous hydrogen peroxide, nitric oxide and calcium mediate root ion fluxes in two non-secretor mangrove species subjected to NaCl stress. *Tree Physiol*, doi:10.1093/treephys/tps119
- Maathuis FJM (2006). The role of monovalent cation transporters in plant responses to salinity. *J Exp Bot*, 57: 1137~1147
- Shabala S, Cuin TA (2008). Cellular mechanisms of potassium transport in plants. *Physiol Plant*, 133: 651~669
- Sun J, Chen SL, Dai SX, Wang RG, Li NY, Shen X, Zhou XY, Lu CF, Zheng XJ, Hu ZM et al (2009a). NaCl-induced alternations of cellular and tissue ion fluxes in roots of salt-resistant and salt-sensitive poplar species. *Plant Physiol*, 149: 1141~1153
- Sun J, Dai SX, Wang RG, Chen SL, Li NY, Zhou XY, Lu CF, Zheng XJ, Hu ZM, Zhang ZK et al (2009b). Calcium mediates root  $K^+$ / $Na^+$  homeostasis in poplar species differing in salt tolerance. *Tree Physiol*, 29: 1175~1186
- Sun J, Li L, Liu M, Wang M, Ding M, Deng S, Lu C, Zhou X, Shen X, Zheng X et al (2010a). Hydrogen peroxide and nitric oxide mediate  $K^+$ / $Na^+$  homeostasis and antioxidant defense in NaCl-stressed callus cells of two contrasting poplars. *PCTOC*, 103: 205~215
- Sun J, Wang MJ, Ding MQ, Deng SR, Liu MQ, Lu CF, Zhou XY, Shen X, Zheng XJ, Zhang ZK et al (2010b).  $H_2O_2$  and cytosolic  $Ca^{2+}$  signals triggered by the PM  $H^+$ -coupled transport system mediate  $K^+$ / $Na^+$  homeostasis in NaCl-stressed *Populus euphratica* cells. *Plant Cell Environ*, 33: 943~958
- Sun J, Zhang X, Deng S, Zhang C, Wang M, Ding M, Zhao R, Shen X, Chen S (2012). Extracellular ATP signaling is mediated by  $H_2O_2$  and cytosolic  $Ca^{2+}$  in the salt response of *Populus euphratica* cells. *PLoS ONE*, 7 (12): e53136 (1~15)
- Wang R, Chen S, Zhou X, Shen X, Deng L, Zhu H, Shao J, Shi Y, Dai S, Fritz E et al (2008). Ionic homeostasis and reactive oxygen species control in leaves and xylem sap of two poplars subjected to NaCl stress. *Tree Physiol*, 28: 947~957
- Wang YQ, Li L, Cui WT, Xu S, Shen WB, Wang R (2012). Hydrogen sulfide enhances alfalfa (*Medicago sativa*) tolerance against salinity during seed germination by nitric oxide pathway. *Plant Soil*, 351: 107~119
- Zhang H, Hu LY, Hu KD, He YD, Wang SH, Luo JP (2008). Hydrogen sulfide promotes wheat seed germination and alleviates oxidative damage against copper stress. *J Integr Plant Biol*, 50: 1518~1529
- Zhang H, Hu SL, Zhang ZJ, Hu LY, Jiang CX, Wei ZJ, Liu J, Wang HL, Jiang ST (2011). Hydrogen sulfide acts as a regulator of flower senescence in plants. *Postharvest Biol Technol*, 60: 251~257
- Zhang H, Jiao H, Jiang CX, Wang SH, Wei ZJ, Luo JP, Jones RL (2010a). Hydrogen sulfide protects soybean seedlings against drought-induced oxidative stress. *Acta Physiol Plant*, 32: 849~857
- Zhang H, Tan ZQ, Hu LY, Wang SH, Luo JP, Jones RL (2010b). Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity in germinating wheat seedlings. *J Integr Plant Biol*, 52: 556~567
- Zhang H, Tang J, Liu XP, Wang Y, Yu W, Peng WY, Fang F, Ma DF, Wei ZJ, Hu LY (2009a). Hydrogen sulfide promotes root organogenesis in *Ipomoea batatas*, *Salix matsudana* and *Glycine max*. *J Integr Plant Biol*, 51: 1086~1094
- Zhang H, Ye YK, Wang SH, Luo JP, Tang J, Ma DF (2009b). Hydrogen sulfide counteracts chlorophyll loss in sweetpotato seedling leaves and alleviates oxidative damage against osmotic stress. *Plant Growth Regul*, 58: 243~250
- Zhu JK (2001). Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci*, 6: 66~71
- Zhu JK (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr Opin Plant Biol*, 6: 1~5