

MeJA熏蒸叶片对新疆沙冬青根细胞跨膜离子流及抗盐性的影响

刘蕾^{1,2}, 高海波³, 沈应柏^{1,2,*}

北京林业大学¹生物科学与技术学院, ²林木育种国家工程实验室, 北京100083; ³临沂大学生命科学学院, 山东临沂276005

摘要: 土壤盐渍化是植物生长的主要逆境之一。茉莉酸类物质与植物抗逆性密切相关。以国家二级保护植物新疆沙冬青为实验材料, 利用非损伤微测技术, 从动态离子流转运的角度研究了MeJA预处理后NaCl处理对新疆沙冬青根部K⁺、H⁺、Na⁺流的影响。结果表明, MeJA预处理的新疆沙冬青经盐胁迫后根冠区瞬时K⁺外流低于未经MeJA预处理的对照植株, H⁺外流强度大于对照植株; 新疆沙冬青根尖区域(0~3 000 μm)经MeJA和NaCl (50 mmol·L⁻¹, 24 h)预处理, 解除NaCl胁迫后观察到Na⁺外流和H⁺内流, 流速高于对照植株。表明适当浓度MeJA预处理能有效提高新疆沙冬青苗期抗盐性。

关键词: 盐胁迫; H⁺-ATPase; MeJA; 非损伤微测技术

Effects of MeJA Fumigation to Leaves on Ion Flux in Apical Region of *Ammopiptanthus nanus* and Salt Resistance

LIU Lei^{1,2}, GAO Hai-Bo³, SHEN Ying-Bai^{1,2,*}

¹College of Biological Sciences and Technology, ²National Engineering Laboratory for Tree Breeding, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; ³College of Life Sciences, Linyi University, Linyi, Shandong 276005, China

Abstract: Soil salinization is one of serious factors restricting the expansion of agriculture and forestry around the world. Jasmonic acid is closely associated with plants on salt tolerance. Ion fluxes were studied in the roots of *Ammopiptanthus nanus*, a second class national-level protected plant, by using non-invasive micro-test technique. The result showed that the plants with MeJA pretreatment have lower efflux of K⁺ and higher efflux of H⁺ than the plants without pretreatment under the stress of NaCl in the root cap. After short-term salt stress (50 mmol·L⁻¹ NaCl, 24 h), the plants with MeJA pretreatment have higher Na⁺ efflux and H⁺ influx than the plants without pretreatment in root apex. The results indicate that suitable concentration of MeJA pretreatment can increase salt stress resistance of *A. nanus* at seedling stage.

Key words: salt stress; H⁺-ATPase; MeJA; non-invasive micro-test technique

土壤中盐分含量过高会严重影响植物生长, 降低农作物产量。据估计全球土地面积的6%和1/3的水田受到不同程度的土壤盐渍化的影响, NaCl是导致盐渍化的主要盐分之一(Demidchik和Tester 2002; Zhang等2010)。

茉莉酸类物质作为与植物防御反应有关的植物激素和信号分子, 广泛地存在于植物体内, 在植物抵御病虫害、低温、干旱、盐胁迫等方面具有重要作用(Pak等2009)。研究表明外源施用茉莉酸可以诱导植物体内多种防御基因的表达, 积累各种防御物质。茉莉酸甲酯(MeJA)可从植物的气孔进入植物体内, 在胞质中被酯酶水解为茉莉酸, 从而启动防御系统, 诱导与植物抗逆有关的产物(Farmer和Ryan1990; Horbowicz等2011)。植物的耐盐性是一个复杂的过程, 关于MeJA预处理植物后, 是否能提高植物的耐(抗)盐性尚未见报道。

大量研究表明, 植物在盐渍化土壤中能否维持细胞内的离子平衡(尤其是K⁺/Na⁺平衡), 是其能否在盐胁迫条件下生存的关键因素(Kobayashi等2007; Wang等2004; Yue等2012)。Niu等(1995)研究证实, 植物在维持体内K⁺/Na⁺平衡过程中, 质子泵起着重要作用。较高的质子泵活性能够为Na⁺/H⁺逆向运输体提供H⁺电化学势梯度, 降低质膜的去极化程度, 限制K⁺通过DA-KORCs (外向钾离子通道)和DA-NSCCs (外向非选择性阳离子通道)外流(Maathuis 2006; Chen等2010)。MeJA预处理能否通过提高质膜质子泵活性调控胞内K⁺/Na⁺平衡增

收稿 2013-12-06 修定 2014-01-10

资助 国家自然科学基金(31270655和30871727)、国家863计划(2011AA100200)和高等学校博士学科点专项科研基金(20090014110014)。

* 通讯作者(E-mail: ybshen@bjfu.edu.cn; Tel: 010-62336563)。

强抗盐性还是一个未被很好研究的问题。

非损伤微测技术具有较高空间分辨率和测量精度,对样品无损伤(Porterfield等2001)。本实验借助该手段研究了MeJA预处理后,盐胁迫对沙冬青根尖区域 K^+ 、 H^+ 、 Na^+ 离子流的影响,以期从离子跨膜转运的角度来探索MeJA与植物抗盐能力的关系。

材料与方 法

1 实验材料

实验材料为新疆沙冬青[*Ammopiptanthus nanus* (M. Pop.) Cheng f.]的幼苗。取大小均匀的新疆沙冬青种子置于培养皿中进行发芽,25 °C恒温黑暗人工气候箱中生长。待幼根长至0.2 cm左右时,将幼苗转移至无菌的1/2Hoagland培养液中,置于人工气候箱(14 h光照,25 °C;10 h黑暗,22 °C)中培养。待幼根长至0.5 cm左右时,用于活体幼根表面 Na^+ 、 H^+ 和 K^+ 流的测定。

2 实验方法

2.1 实验处理

动态离子流测定前,将新疆沙冬青植株和滴有MeJA(乙醇溶剂的浓度为1%)的脱脂棉球放在同一玻璃罩中进行MeJA熏蒸预处理,避免MeJA直接接触植物材料,容器中MeJA终浓度 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。对照组将MeJA改为1%乙醇溶液熏蒸预处理。熏蒸24 h后取出植株,进行瞬时盐处理下根冠区 K^+ 、 H^+ 流动态变化测量。

稳态离子流测定前,将新疆沙冬青植株和滴有MeJA(乙醇溶剂的浓度为1%)的脱脂棉球放在同一玻璃罩中进行熏蒸预处理,容器中MeJA终浓度 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。对照组同样加1%乙醇溶液于脱脂棉球上,置于相同大小玻璃罩中熏蒸预处理24 h。熏蒸后将植株置于含有 $NaCl$ ($50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)的培养液中进行短期盐处理,24 h后取出并放入新鲜测试液中,检测根尖稳态 Na^+ 、 H^+ 流。

2.2 离子流测量

采用北京林业大学植物生理实验室的离子选择性微电极系统(型号: BIO-001A,美国杨格科技公司)进行离子流的测量。测定 $NaCl$ 瞬时处理及短期处理后根尖 K^+ 、 H^+ 、 Na^+ 离子流的瞬时和稳态变化。 K^+ 及 H^+ 测试液的成分均为: $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} KCl$,

$0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} CaCl_2$, $0.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} MES$ 。 Na^+ 测试液的成分为: $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} NaCl$, $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} KCl$, $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} CaCl_2$, $0.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} MES$ 。pH均调至6.0。

根尖固定在塑料培养皿(生友生物技术公司生产)中,皿底直径为35 mm。根尖固定后,培养皿中加入3 mL测试液平衡30 min后,更换新鲜测试液。然后放入非损伤微测系统平台上,通过系统的运动控制器精确调节电极与测试部位的距离,电极尖端距根尖表面2~5 μm 。采样规则为:离子选择电极沿X轴移动距离30 μm ,采样频率0.2 Hz。动态离子流测定首先进行距根顶端400 μm 根冠区域(朱俊英2007;闫慧等2008)5 min背景电位测量,然后加入3 mL含 $NaCl$ 的测试液进行瞬时处理, $NaCl$ 终浓度为 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,加药后测量30 min;对照加入3 mL测试液,测量过程同上。因高浓度 Na^+ 严重影响 Na^+ 电极的信噪比(Shabala等2006),稳态离子流测定则为,进行MeJA预处理后将新疆沙冬青置于 $NaCl$ $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 溶液中培养,24 h后取出,放入新鲜测试液中,检测2种不同预处理根尖 Na^+ 流和 H^+ 流(距根尖0~3 000 μm 区域内的离子流变化,每300 μm 作为一个测量点,共11个测量点)。每个测量点实时记录2~3 min的离子流为稳定的离子流速。

抑制剂实验中,钾通道抑制剂四乙胺(tetraethylammonium, TEA)处理的浓度为 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, H^+ -ATPase抑制剂原钒酸钠(sodium orthovanadate)处理的浓度为 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。由于原钒酸盐溶液对电极具有较大影响,预处理30 min后,在测试前将预处理的根段多次清洗,去除残留原钒酸盐对电极的影响。TEA对 K^+ 电极的能斯特斜率没有显著的影响,因此,预处理的根段直接进行瞬时盐处理。

3 数据处理与分析

利用美国杨格科技公司与旭月科技有限公司联合开发的数据分析软件MAGEFLUX进行实验数据的处理;负值代表离子流入细胞,正值代表离子流出细胞。为了消除加入溶液对电极电位的影响,数据分析时,舍去瞬时处理后最初记录的2 min的电信号数(高海波和沈应柏2011)。每个处理进行4~5次重复的独立测量,计算标准误(SE)。

实验结果

1 MeJA预处理后NaCl诱导的根冠区K⁺流的实时动态变化

如图1所示, 与对照相比, 未经MeJA处理的植株, 加入100 mmol·L⁻¹ NaCl处理后, 新疆沙冬青根冠区的K⁺迅速外流, 5 min后K⁺外流速度逐渐稳定在大约600 pmol·cm⁻²·s⁻¹; 而经MeJA预处理后, 再加入100 mmol·L⁻¹ NaCl, 诱导的K⁺外流速度明显低于未经MeJA处理植株。钾通道抑制剂TEA显著降低了NaCl诱导的根冠区的K⁺外流速度, 而用质膜质子泵专一性抑制剂原钒酸钠预处理后再加入100 mmol·L⁻¹ NaCl, 显著促进了K⁺外流的速度(图2)。

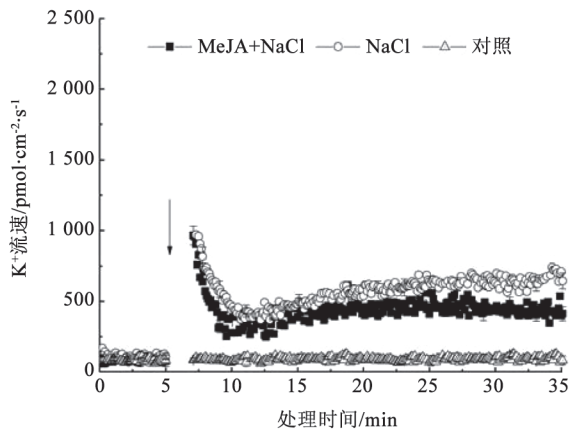


图1 不同预处理后NaCl诱导的新疆沙冬青根冠区瞬时K⁺流的动态变化

Fig.1 Effects of salt shock on transient K⁺ kinetics in the root cap of *A. nanus* with different pretreatments

箭头表示实验组加入含NaCl(终浓度100 mmol·L⁻¹)测试液; 对照组加入空白测试液。图2~4同。

2 MeJA预处理后NaCl诱导的根冠区H⁺流的实时动态变化

实验结果表明, 未经盐处理前新疆沙冬青根冠区呈现轻微的H⁺外流(图3)。MeJA熏蒸预处理后, 再加入NaCl迅速诱导新疆沙冬青根冠区H⁺外流速度增强, 约20 min后达到峰值, 然后H⁺外流速度又有所降低, 但始终高于对照植株。未经MeJA熏蒸预处理的植株加入100 mmol·L⁻¹ NaCl后, H⁺外流速度上升, 约25 min后达到稳定的流速, 但流速明显低于经过MeJA预处理的植株。专一性质膜质子泵抑制剂原钒酸钠预处理新疆沙冬青根系后, 瞬

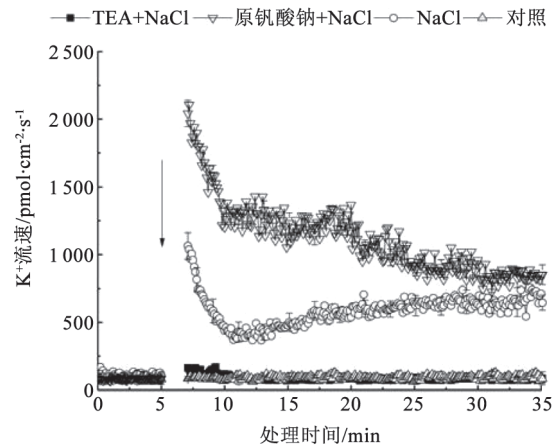


图2 TEA、原钒酸钠预处理后NaCl诱导的新疆沙冬青根冠区瞬时K⁺流的动态变化

Fig.2 Effects of TEA, sodium orthovanadate on transient K⁺ kinetics that were induced by NaCl shock in the root cap of *A. nanus*

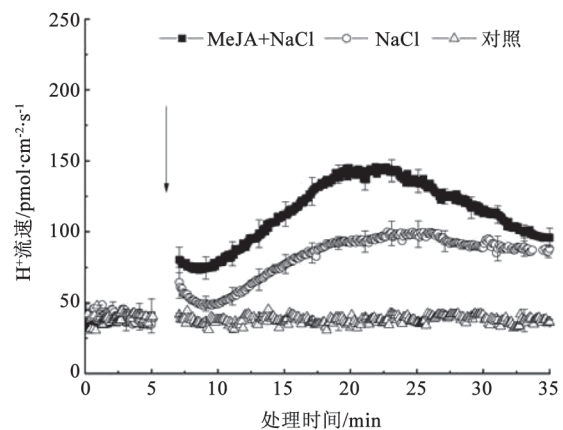


图3 不同预处理后NaCl诱导的新疆沙冬青根冠区瞬时H⁺流的动态变化

Fig.3 Effects of salt shock on transient H⁺ kinetics in the root cap of *A. nanus* with different pretreatments

时NaCl诱导的根冠区H⁺外流受到严重抑制(图4)。

3 MeJA预处理后NaCl诱导的根尖稳态Na⁺和H⁺流变化

图5表明, 经MeJA预处理的新疆沙冬青植株, 短期盐胁迫解除后根尖区域内(0~3 000 μm) Na⁺明显外流, 最高流速可至约750 pmol·cm⁻²·s⁻¹。而未经MeJA处理的植株, 大部分区域Na⁺外流速度低于经MeJA预处理植株。短期盐胁迫条件下, 经MeJA预处理的新疆沙冬青根尖(0~900 μm)区域H⁺内流, 且H⁺内流速度高于未经MeJA预处理植株(图6)。

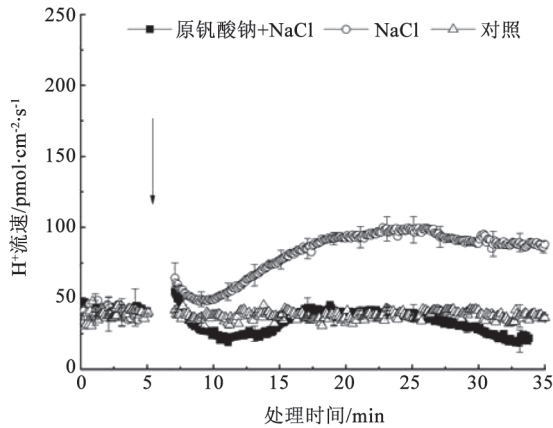


图4 原钒酸钠预处理后NaCl诱导的新疆沙冬青根冠区瞬时H⁺流的动态变化

Fig.4 Effects of sodium orthovanadate on transient H⁺ kinetics that were induced by NaCl shock in the root cap of *A. nanus*

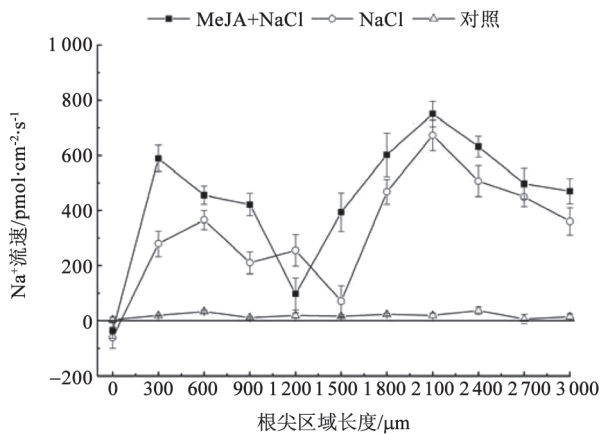


图5 短期NaCl处理对不同预处理新疆沙冬青根尖稳态Na⁺流的影响

Fig.5 Effects of short-term salinity on net Na⁺ fluxes in root apex of *A. nanus* with different pretreatments

讨 论

目前众多研究已证实, 茉莉酸类物质是与植物抗性密切相关的植物生长物质, 它作为内源信号分子参与植物在盐胁迫、机械伤害、虫害、干旱、低温等条件下的抗逆反应(Farmer 2007)。当植物受到伤害时, 植物体内茉莉酸及其衍生物的含量显著增加, 进而诱导一系列与抗逆有关的基因表达, 如合成蛋白酶抑制剂、硫蛋白和苯丙氨酸转氨酶, 提高酯氧合酶活性, 并导致生物碱以及酚酸类次生物质的积累, 从而增强植物的抗性

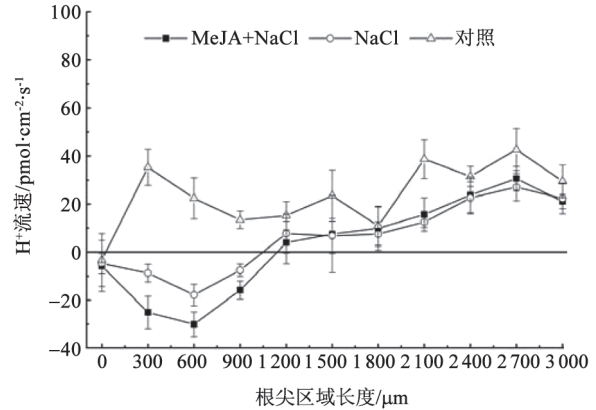


图6 短期NaCl处理对不同预处理新疆沙冬青根尖稳态H⁺流的影响

Fig.6 Effects of short-term salinity on net H⁺ fluxes in root apex of *A. nanus* with different pretreatments

(Kozłowski等1999; Wasternack和Parthier 1997)。

邹清成等(2011)研究表明, 在低温、干旱和极端高温的非生物胁迫条件下, 喷施较高的浓度MeJA, 蝴蝶兰幼苗抗逆境能力显著提高。Fedina和Tsonev (1997)研究发现, 预先施加MeJA可以使盐渍条件下的植株气孔开度减小、降低蒸腾及增加脯氨酸含量以抵御盐胁迫对其生长的不利影响(侯振安等2000)。胡杨悬浮培养细胞进行盐处理(100 mmol·L⁻¹ NaCl)可导致细胞发生质壁分离, 外源施加MeJA后, NaCl处理的胡杨细胞很少发生质壁分离, MeJA具有缓解植物渗透胁迫的作用(袁书艳等2002)。茉莉酸的这些作用与细胞离子的跨膜转运密切相关。

植物离子流的变化是反应逆境胁迫后最初快速信号。本实验中, 瞬时NaCl处理引起沙冬青根冠区H⁺的显著外流, 经MeJA预处理后H⁺外流量显著大于未经MeJA预处理植株(图3)。NaCl瞬时处理引起的新疆沙冬青根冠区H⁺外流可由质膜专一性抑制剂原钒酸钠所抑制(图4), 说明MeJA预处理后提高了新疆沙冬青根细胞质子泵活性的活性。有研究证明, 一定浓度茉莉酸甲酯对H⁺-ATPase活性有促进作用, 50 μmol·L⁻¹ MeJA处理7 h绿豆下胚轴质膜的H⁺-ATPase酶活性提高30% (文彬等2006)。

盐胁迫下植物减少钾的流失对维持细胞内离子平衡起着非常重要的作用(Kobayashi等2007)。

Cuin等(2008)研究证实, 抗盐的大麦和小麦品种在盐处理后 K^+ 外流的幅度远小于盐敏感的品系。盐诱导的瞬时 K^+ 外流被 K^+ 通道抑制剂TEA所抑制, 但是 K^+ 外流却被质膜质子泵专一性抑制剂原钒酸钠显著提高(图2)。这些结果说明, 盐诱导 K^+ 的外流是由去极化激活的离子通道介导的, 如去极化激活的DA-KORCs和DA-NSCCs (Shabala和Cuin 2007)。活性较高的 H^+ -ATPase降低了质膜的去极化程度, 能够限制 K^+ 通过DA-KORCs和DA-NSCCs外流(Maathuis 2006)。MeJA预处理后, NaCl诱导的新疆沙冬青根冠区瞬时 K^+ 外流幅度小于未经MeJA预处理植株(图1), 说明预处理植株根冠区具有较高的质子泵活性, 限制了 K^+ 外流。经MeJA预处理和未经MeJA预处理的新疆沙冬青植株, 在盐胁迫后根冠区 K^+ 、 H^+ 流幅度显著不同, 可能是由于在盐胁迫下质子泵活性和细胞质膜的去极化程度不同所造成的(Chen等2007)。且短期盐胁迫下, 经MeJA预处理的新疆沙冬青 Na^+ 外流要明显高于未经MeJA预处理植株(图5), 显现出较强的 Na^+/H^+ 逆向交换能力, 也暗示经预处理根细胞可能具有较强的质子泵活性, 能维持 H^+ 的电化学梯度以利于驱动 Na^+/H^+ 逆向交换(Zhu 2003)。这些结果说明MeJA处理过的根细胞在盐胁迫下具有比较强的质子泵活性, 从而降低了经 K^+ 通过去极化激活通道(DA-KORCs和DA-NSCCs)的 K^+ 流失, 维持植物体内 K^+/Na^+ 平衡, 更好的适应盐胁迫环境。

参考文献

- 高海波, 沈应柏(2011). 瞬时渗透胁迫对沙冬青细胞离子流的影响. 西北林学院学报, 26 (6): 35~39
- 侯振安, 李品芳, 龚元石(2000). 激素对植物耐盐性影响的研究现状与展望. 石河子大学学报, 4 (3): 239~245
- 文彬, 宾金华, 王小菁(2006). 茉莉酸甲酯和脱落酸对绿豆下胚轴质膜 H^+ -ATPase水解活性的影响. 植物生理学通讯, 42 (5): 855~858
- 闫慧, 夏新莉, 高荣孚, 尹伟伦(2008). 盐胁迫下沙冬青和绿豆根冠细胞膜电位的原初响应研究. 北京林业大学学报, 30 (6): 16~21
- 袁书艳, 胡青, 陈雪梅, 李悦, 蒋湘宁(2002). 茉莉酸在胡杨细胞耐盐性中的作用. 北京林业大学学报, 24 (3): 65~69
- 朱俊英(2007). 沙冬青耐盐性的原初响应研究[博士论文]. 北京: 北京林业大学
- 邹清成, 朱开元, 刘慧春, 周江华, 马广莹(2011). 外源茉莉酸甲酯对非生物胁迫下蝴蝶兰幼苗叶绿素荧光和抗氧化指标的影响. 植物生理学报, 47 (9): 913~917
- Chen J, Xiao Q, WU F, Dong X, He J, Pei Z, Zheng H (2010). Nitric oxide enhances salt secretion and Na^+ sequestration in a mangrove plant, *Avicennia marina*, through increasing the expression of H^+ -ATPase and Na^+/H^+ antiporter under high salinity. *Tree Physiol*, 30 (12): 1570~1585
- Chen Z, Pottosin II, Cuin TA, Fuglsang AT, Tester M, Jha D, Zepeda-Jazo I, Zhou M, Palmgren MG, Newman IA, Shabala S (2007). Root plasma membrane transporters controlling K^+/Na^+ homeostasis in salt-stressed barley. *Plant Physiol*, 145 (4): 1714~1725
- Cuin TA, Betts SA, Chalmandrier R, Shabala S (2008). A root's ability to retain K^+ correlates with salt tolerance in wheat. *J Exp Bot*, 59 (10): 2697~2706
- Demidchik V, Tester M (2002). Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol*, 128 (2): 379~387
- Farmer EE (2007). Plant biology: jasmonate perception machines. *Nature*, 448 (7154): 659~660
- Farmer EE, Ryan CA (1990). Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87 (7): 7713~7716
- Fedina IS, Tsonev TD (1997). Effect of pretreatment with methyl jasmonate on the response of *Pisum sativum* to salt stress. *J Plant Physiol*, 151 (6): 735~740
- Horbowicz M, Kosson R, Wiczowski W, Koczkodaj D, Mitrus J (2011). The effect of methyl jasmonate on accumulation of 2-phenylethylamine and putrescine in seedlings of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Acta Physiol Plant*, 33 (3): 897~903
- Kobayashi H, Masaoka Y, Takahashi Y, Ide Y, Sato S (2007). Ability of salt glands in Rhodes grass (*Chloris gayana* Kunth) to secrete Na^+ and K^+ . *J Plant Nutr Soil Sci*, 53 (6): 764~771
- Kozłowski G, Buchala A, Metraux JP (1999). Methyl jasmonate protects Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] seedlings against *Pythium ultimum* Trow. *Physiol Mol Plant Pathol*, 55 (1): 53~58
- Maathuis FJM (2006). The role of monovalent cation transporters in plant responses to salinity. *J Exp Bot*, 57 (5): 1137~1147
- Niu X, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM (1995). Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol*, 109 (3): 735~742
- Pak H, Guo Y, Chen M, Chen K, Li Y, Hua S, Shamsi I, Meng H, Shi C, Jiang L (2009). The effect of exogenous methyl jasmonate on the flowering time, floral organ morphology, and transcript levels of a group of genes implicated in the development of oilseed rape

- flowers (*Brassica napus* L.). *Planta*, 231 (1): 79~91
- Porterfield DM, Laskin JD, Jung SK, Malchow RP, Billack B, Smith PJ, Heck DE (2001). Proteins and lipids define the diffusional field of nitric oxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 281 (4): L904~L912
- Shabala S, Cuin TA (2007). Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiol Plant*, 133 (4): 651~669
- Shabala S, Demidchik V, Shabala L, Cuin TA, Smith SJ, Miller AJ, Davies JM, Newman IA (2006). Extracellular Ca^{2+} ameliorates NaCl-induced K^+ loss from *Arabidopsis* root and leaf cells by controlling plasma membrane K^+ -permeable channels. *Plant Physiol*, 141 (4): 1653~1665
- Wang S, Wan C, Wang Y, Chen H, Zhou Z, Fu H, Sosebee RE (2004). The characteristics of Na^+ , K^+ and free proline distribution in several drought-resistant plants of the Alxa Desert, China. *J Arid Environ*, 56 (3): 525~539
- Wasternack C, Parthier B (1997). Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends Plant Sci*, 2 (8): 302~309
- 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. *J Plant Physiol*, 169 (3): 255~261
- Zhang JL, Flowers TJ, Wang SM (2010). Mechanisms of sodium uptake by roots of higher plant. *Plant Soil*, 326 (1-2): 45~60
- Zhu JK (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr Opin Plant Biol*, 6 (5): 441~445