

非损伤微测技术在植物生理学研究中的应用及进展

李静, 韩庆庆, 段丽婕, 王沛, 李惠茹, 王锁民, 张金林*

兰州大学草地农业科技学院, 草地农业生态系统国家重点实验室, 兰州730020

摘要: 非损伤微测技术(NMT)是一种选择性微电极技术,可以在不损伤活体样品的情况下获得进出样品的各种离子或分子浓度、流速及其三维运动方向的信息。该技术具有非损伤性、长时间、多电极、高分辨率、高灵敏度、多角度测量等优点,可获得其他技术难以测到的生理特征和生命活动规律,从而在理论研究和应用领域产生实质性的突破。本文综述了近年来NMT在植物营养调控、抗病性、抗盐碱、抗旱、抗冷、抗重金属毒害等方面的应用及其进展,并展望了NMT在植物生理学研究中的应用前景。

关键词: 非损伤微测技术; 植物营养调控; 生物胁迫; 非生物胁迫

Applications and Advances of Non-Invasive Micro-Test Technique in Plant Physiology Researches

LI Jing, HAN Qing-Qing, DUAN Li-Jie, WANG Pei, LI Hui-Ru, WANG Suo-Min, ZHANG Jin-Lin*

State Key Laboratory of Grassland Agro-ecosystems, College of Pastoral Agriculture Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China

Abstract: Non-invasive micro-test technique (NMT) is a kind of selective microelectrode technique which can get the information on concentration, flux rate and three-dimensional movement of ions or molecules going in or out of the samples without any damages. The technique has the advantages of being non-invasive, long-term, multi-electrodes, high resolution, high sensitivity and multi-angle measurement etc. NMT can aid scientists to obtain physiological characteristics and life activity rules of the tested samples that are difficult to be detected by other techniques. In this paper, the application and development of NMT in plant nutrition regulation, disease resistance, and salt, alkali, drought, cold and heavy metal tolerance etc. are reviewed. Finally, the application of NMT in plant physiology is prospected.

Key words: non-invasive micro-test technique; plant nutrition regulation; biotic stress; abiotic stress

自从1974年美国海洋生物学实验室(Marine Biological Laboratory)的神经科学家Lionel F. Jaffe提出非损伤微测技术(non-invasive micro-test technique, NMT)原初概念,到1990年成功应用于测定细胞Ca²⁺运动方向和流速,该技术已经解决了众多科学问题(Kuhtreiber和Jaffe 1990; Jaffe 2010)。NMT是实时选择性测定进出活体材料离子和小分子流速的技术,是生理功能研究的工具之一。该技术由电脑自动控制离子和分子选择性微电极,在不接触活体样品的情况下,获得进出样品的各种离子和分子浓度、流速及其三维运动方向的信息(丁亚男和许越2007),能够按照研究人员的设定,以手动或编程的方式,从任意角度(相对于样品表面)对样品进行测量(霍翔远等2010)。NMT技术具有以下特点: (1)非损伤活体测量; (2)可长时间进行三维动态和实时测量; (3)多个微电极同时测量; (4)

具有高分辨率和高灵敏度; (5)强大的智能化数据采集、分析及管理软件(丁亚男和许越2007; 吕杰等2013)。NMT的原理是通过微电极和微传感器获取离子和分子的信号,基于Nernst方程和Fick's第一扩散定律计算离子和分子的浓度和流速,能够获得非常细微的信号,流速能够达到10⁻¹² mol·cm⁻²·s⁻¹ (Smith 1995; 丁亚男和许越2007)。目前, NMT可以测量H⁺、Ca²⁺、K⁺、NH₄⁺、Al³⁺、Na⁺、Cd²⁺、NO₃⁻、Cl⁻以及O₂、CO₂、NO、氨基酸等50多种离子和分子,为获得生物样品离子和

收稿 2014-05-04 修定 2014-08-26

资助 国家自然科学基金项目(31222053、31170431和31172256)、教育部长江学者和创新团队发展计划(IRT13019)、新世纪优秀人才支持计划(NCET-11-0217)、中央高校基本科研业务费项目(lzujbky-2013-k08和lzujbky-2013-bt05)。

* 通讯作者(E-mail: jlzhang@lzu.edu.cn; Tel: 0931-8913447)。

分子信息提供了良好的实验平台(丁亚男和许越2007)。被测样品可以是单细胞、细胞层、组织、器官甚至整个生物体,从而获得其他技术难以检测的生理特征和生命活动规律,在理论研究和应用领域方面产生了前所未有的重大突破(梁宇等2004)。随着NMT的快速发展,该技术在诸多领域得到广泛应用,取得了大量的科研成果,在诸多学科领域得到应用,如植物学、动物学、微生物学、医学、环境科学、材料科学等(吕杰等2013)。本文重点综述了NMT在植物营养调控、抗病性、抗盐碱、抗旱、抗冷、抗重金属毒害等方面的应用及其进展(表1)。

1 在植物营养调控研究中的应用

在复杂的生长发育过程中,植物需要从周围环境大量吸收N、P和K等营养元素,这些营养元素常常以 NH_4^+ 、 NO_3^- 和 K^+ 等离子形式流入到根内,为保证植物正常吸收营养离子, Ca^{2+} 、 H^+ 等离子往往要流入或流出根部进行调节(Shabala和Newman 2000)。因此,离子流的检测能够在微观尺度上研究植物吸收营养这一动态过程(Yang等2010a)。同时,NMT也是植物营养研究与检测的新系统,它可以研究作物营养吸收的机理和规律以及调控机理,寻找调节营养吸收的物质,能够采集植物生长过程中 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 K^+ 、 Ca^{2+} 及 H^+ 等离子流的变化情况,绘制营养吸收曲线,筛选优良的作物品种,评价肥料的效果,指导合理施肥,这是对植物营养吸收过程最直接反映,为评价作物的营养供应提供了非常可靠的证据(Li等2010)。Hawkins等(2008)采用NMT研究表明, NO_3^- 、 NH_4^+ 和 H^+ 的净吸收速率在花旗松(*Pseudotsuga menziesii*)和扭叶松(*Pinus contorta*)之间存在很大差异;根不同区域的营养吸收有很大差别,离子流状况受根的生长和成熟速率的影响,并为每个物种的起源收集了数据,这种离子流的图谱为认识品种间差异提供了直观的数据。Hawkins和Robbins(2010)采用NMT比较了两种针叶树(花旗松和扭叶松)和大豆(*Glycine max*)根部 NH_4^+ 和 NO_3^- 在pH影响下的吸收过程,发现在大豆和扭叶松中,pH值为7时质子外流,但是pH为4时质子内流;花旗松根尖以后都出现质子外流,且能够在低pH下保持 NH_4^+ 的吸收,可能与保持质子的外流相关,这种质子外

流使植物能更好地适应酸性土壤。Li等(2010)使用NMT研究了高铵毒害的机理,发现限制跨膜的 NH_4^+ 流和GMPase的功能能够显著降低 NH_4^+ 对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的毒害,这项工作为植物的铵盐毒害提供了理论解释。Ding等(2011)把丛枝菌根真菌(*Glomus mosseae*, GM)和慢生大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*, BJ)注射到大豆苗中,通过NMT研究发现,GM把根瘤的 H^+ 外流提高了3倍,BJ把接近根瘤部位侧根的 H^+ 外流提高了8倍。植物磷含量的增加与根瘤和菌丝的 H^+ 外流呈显著的线性正相关,研究认为丛枝菌根真菌诱导了固氮酶的活性,增加了根瘤的 H^+ 外流(冯固等2000)。孙清斌等(2008)发现磷可以提高铝的耐性,磷和 Al^{3+} 可以发生相互作用,最后通过NMT研究 H^+ 的流速解释了这一现象。ten Hoopen等(2010)使用NMT测定大麦(*Hordeum vulgare*)和拟南芥根部的 NH_4^+ 、 K^+ 的积累以及 NH_4^+ 、 K^+ 和 H^+ 的流速,结果表明,植物的 K^+ 转运体和通道能够转运 NH_4^+ ,通过转运体调控的 NH_4^+ 吸收可能是由于在低 K^+ 水平 NH_4^+ 毒性的作用结果,从而解释了 NH_4^+ 的毒性可以通过更多的 K^+ 得到缓解的假说。小麦(*Triticum aestivum*)根部营养吸收的节律性是Shabala和Knowles(2002)运用NMT发现的,他们的研究结果显示,小麦根部对 K^+ 、 H^+ 和 Ca^{2+} 的吸收呈现一定规律的正弦曲线。Fang等(2007)研究发现合理的施肥能够促进作物吸收更多的 NH_4^+ 和 NO_3^- ,外界 NH_4NO_3 浓度升高有助于吸收更多的 NO_3^- ,但是减少了对 NH_4^+ 的吸收,说明合理的施肥对于氮素的吸收具有重要的调节意义。Luo等(2013)研究表明 H^+ 流与 NH_4^+ 和 NO_3^- 的吸收具有负相关性,因此,可以通过调节土壤的pH来促进植物对氮素的吸收。Xu等(2012b)使用NMT测定了拟南芥根部的 H^+ 流速,发现14-3-3蛋白(tomato 14-3-3 protein, TFT)超表达的植物在低磷胁迫下增加 H^+ 的流速和质膜(plasma membrane, PM) H^+ -ATPase的活性,进一步从基因到蛋白,再到生理功能的一系列工作,清晰地阐明了该基因的功能。

2 在植物抗病性研究中的应用

Ramos等(2009)使用NMT研究了芽管菌丝发育时期菌丝中的 H^+ 流,发现胞外的pH在宿主植物玉米(*Zea mays*)和菌根真菌(*Gigaspora margarita*)和

表1 NMT在植物适应非生物逆境研究中的应用

Table 1 Application of NMT in the studies on plant responding to various abiotic stresses

胁迫类型	植物材料	所测离子及部位	结论	参考文献
盐碱	大麦	根部K ⁺ 和H ⁺ 流速	K ⁺ 外流与抗盐性呈负相关	Chen等2005
	小麦	根细胞质膜K ⁺ 和Ca ²⁺ 净离子流	Ca ²⁺ 流速与K ⁺ 通道的激活没有相关性	Gilliam等2006
	大麦	根部的Na ⁺ 和K ⁺ 流速	大麦耐盐的主要机制并不是木质部Na ⁺ 的外排, 而是耐盐型品种能更有效地将Na ⁺ 区隔化到叶片中, 且能维持木质部更高的K ⁺ /Na ⁺ 比	Chen等2007
	烟草	叶肉细胞质膜上Na ⁺ 和K ⁺ 流速	<i>CED-9</i> (抗凋亡基因)表达能显著降低氧化应激引起的K ⁺ 外流	Shabala等2007b
	拟南芥	<i>pks5</i> 突变体根中H ⁺ 和Ca ²⁺ 净流量的变化情况	<i>pks5</i> 突变体植株把质子排出胞外, 因而能够忍耐外部更高的pH	Fuglsang等2007
	大麦	根部的Na ⁺ 和K ⁺ 流速	大麦抗盐品种对盐胁迫的响应通过累加效应产生作用	Chen等2008
	破囊壶菌	盐胁迫下Na ⁺ 、Cl ⁻ 和K ⁺ 流速	破囊壶菌细胞在没有Na ⁺ 的环境中也能够正常生长	Shabala等2009
	胡杨和群众杨	根部和根原生质体在盐胁迫下的Na ⁺ 、H ⁺ 和Cl ⁻ 流的变化情况	胡杨抗盐的机制在于其根部质膜上具有高活性的Na ⁺ /H ⁺ 逆向蛋白和较强的离子转运能力	Sun等2009
	大麦	木质部的Na ⁺ 和K ⁺ 流速	木质部装载K ⁺ 可能是SKOR将K ⁺ 排到木质部的结果	Shabala等2010
	拟南芥	质膜H ⁺ 流速	质膜H ⁺ -ATPase的磷酸化状态对拟南芥应对环境刺激非常重要	Yang等2010b
	海榄雌	根部的Na ⁺ 流速	NO调节的质膜H ⁺ -ATPase和液泡膜Na ⁺ /H ⁺ 反向转运体的活性与盐忍耐密切相关	Chen等2010
	小麦	根部的Na ⁺ 流速	小麦的抗盐性受Na ⁺ /H ⁺ 逆向转运蛋白驱动	Cuin等2011
	藜科植物	叶片Na ⁺ 和K ⁺ 离子和渗透的关系	藜科植物昆诺阿藜木质部有非常强烈的Na ⁺ 控制能力和有效地把Na ⁺ 从叶片移除的能力	Hariad等2011
	杨树	接种外生菌根(EM)真菌的杨树根部Na ⁺ 、K ⁺ 和Ca ²⁺ 离子流	EM增加共生期间根部的Ca ²⁺ , Ca ²⁺ 调节盐胁迫下的K ⁺ 、Na ⁺ 稳态平衡	Li等2012
	拟南芥	根部的H ⁺ 流速	碱胁迫增加了野生型拟南芥根尖生长素的转运和PIN2的表达	Xu等2012a
二色补血草	盐腺的Na ⁺ 分泌速率	Na-K-Cl共转运体可能参与盐腺分泌Na ⁺	杨剑超等2012	
胡杨和群众杨	根的Na ⁺ 、H ⁺ 和K ⁺ 流速	H ₂ S通过上调杨树根系细胞质膜Na ⁺ /H ⁺ 逆向转运体系, 促进Na ⁺ 和H ⁺ 逆向跨膜转运, 并且限制盐诱导的K ⁺ 外流	朱会朋等2013	
红树	根的Na ⁺ 、H ⁺ 、K ⁺ 和Ca ²⁺ 流速	外源H ₂ O ₂ 、NO和Ca ²⁺ 调节NaCl胁迫下两种红树根的离子流	Lu等2013	
拟南芥	根部在盐处理后Na ⁺ 外流	<i>TaST</i> 基因过表达的拟南芥幼苗根部在盐处理后Na ⁺ 呈现明显的外流	Huang等2012	
烟草	根尖伸长区表皮细胞的Ca ²⁺ 流信息	甜菜碱和盐分(NaCl)能够共同影响Ca ²⁺ 的跨膜流动	Li等2014	
干旱	水稻和拟南芥	根尖ABA积累、生长素运输和质膜H ⁺ 流速	中度水胁迫增加根尖ABA的积累和生长素的运输, ABA参与根尖生长素运输的调控, 生长素激活质膜H ⁺ -ATPase	Xu等2013
低温	豌豆和蚕豆、黄瓜和南瓜、玉米	根部的H ⁺ 流速	冷敏感品种的临界温度更高, 这种临界温度的差异可能与细胞膜的相变引起的离子转运有关	Shabala和Newman 1997
重金属	烟草	根部Cd ²⁺ 的流速	NO通过调节Cd ²⁺ 的吸收和促进Cd ²⁺ 在BY-2细胞的积累导致Cd ²⁺ 诱导的PCD中扮演着正调控的作用	Ma等2010
	拟南芥	根毛Ca ²⁺ 流速	Cd ²⁺ 引起Ca ²⁺ 外流, 破坏Ca ²⁺ 梯度	Fan等2011
	水稻	根毛K ⁺ 流速	外源施用CdCl ₂ 能明显造成水稻根毛细胞膜的去极化, 诱导外向K ⁺ 通道开放, 导致根系内K ⁺ 外渗	李隼等2011
	东南景天	根部和叶片Cd ²⁺ 的流速	Cd ²⁺ 超积累生态型表现出较高的根系Cd ²⁺ 内流和叶柄Cd ²⁺ 外流	Sun等2013a
	胡杨	细胞质膜和液泡膜的Cd ²⁺ 流速	H ₂ S能通过调控液泡对Cd ²⁺ 的富集与隔离来减轻Cd ²⁺ 的毒性	Sun等2013b
缺氧	玉米	根尖NO流速	NO释放与氧气消耗自动调控的环路是有效适应缺氧条件的重要因素	Mugnai等2012

Glomus clarum)间的离子交换以及菌根真菌在宿主植物生长中的重要作用,菌丝的 H^+ 流振荡与芽管菌丝的生长存在相互关系,菌丝的 H^+ 流和生长被根系分泌物所调控,此项工作对于认识真菌的生长发育及其响应外源物质的机理提供了全新的思路,即 H^+ 是真菌发育的关键标签。Nemchinov等(2008)采用NMT检测了经丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)处理的烟草(*Nicotiana benthamiana*)根 Ca^{2+} 流的变化情况,发现 Ca^{2+} 内外流与细菌处理的时期有关,通过 Ca^{2+} 流的转变认识到了细胞防御反应中的关键成分,建立了细胞死亡与防御过程中的离子流模型,推断在植物的病原超敏反应中,质膜 Ca^{2+} -ATP泵是超敏反应的关键。因此,通过研究离子流可以发现植物和真菌相互作用过程中发生的变化,这种变化可能是不同真菌的特异性所致,从而可建立植物和真菌相互作用的信号转导途径。

3 在植物抗盐碱研究中的应用

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,从而严重制约农业生产;大量的研究表明,保持 K^+/Na^+ 平衡对于植物适应高盐环境至关重要(Zhang等2010; Zhang和Shi 2013)。北京林业大学陈少良研究组使用NMT研究了抗盐的胡杨(*Populus euphratica*)和盐敏感的群众杨(*P. popularis*)根部和根原生质体在盐胁迫下的 Na^+ 、 H^+ 和 Cl^- 流的变化情况,发现胡杨抗盐的机制在于其根部质膜上具有高活性的 Na^+/H^+ 逆向蛋白和较强的离子转运能力(Sun等2009)。Li等(2012)测定了卷边网褶菌(*Paxillus involutus*)菌株MAJ和NAU影响下的白杨树盐敏感杂交种(*Populus × canescens*)根部和外生菌根真菌的 H^+ 、 Na^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+} 的离子图谱,发现外生菌根真菌改变了植物在盐胁迫下的 Ca^{2+} 流速,减少 K^+ 外流,促进 H^+ 吸收和 Na^+ 排出,从而调节盐敏感杨树的 K^+/Na^+ 稳态平衡。澳大利亚科学家使用NMT研究了藜科(*Chenopodiaceae*)植物昆诺阿藜(*Chenopodium quinoa*)离子和渗透的关系,发现盐生植物木质部有非常强烈的 Na^+ 控制能力或有效地把 Na^+ 从叶片移除的能力(Hariad等2011)。近年来的研究表明,植物把吸收的 Na^+ 排出体外和保持 K^+ 的能力是抗盐的重

要性状(Shabala等2007a; Zhang等2010; Li等2012; Zhang和Shi 2013)。Gilliam等(2006)应用NMT检测出小麦根细胞质膜 K^+ 和 Ca^{2+} 净离子流速,并与膜片钳技术测得的电流强度比较后发现, K^+ 流速/强度的比值变化反映了质膜上外整流 K^+ 通道的不同分布,而且 Ca^{2+} 流速与 K^+ 通道的激活并没有相关性。为了了解抗盐性状的遗传行为,并建立新的抗盐评价标准,澳大利亚科学家Shabala的研究小组使用NMT测定了不同抗盐能力大麦的 K^+ 流速,发现 K^+ 外流与抗盐性呈负相关, K^+ 和 H^+ 流作为盐胁迫的早期事件,不仅能够研究调控机理,而且还能用来快速筛选耐盐碱植物(Chen等2005)。Chen等(2007)研究表明,大麦耐盐的主要机制并不是木质部 Na^+ 的外排,而是耐盐型大麦品种能更有效地将 Na^+ 区隔化到叶片中,且能维持木质部更高的 K^+/Na^+ 比,其木质部对 K^+ 的装载能力更强,这一过程也可能是液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白控制的。大麦抗盐品种对盐胁迫的响应主要是通过累加效应产生作用,与抗性位基因有关,而且部分表现出显性遗传(Chen等2008)。Shabala等(2010)将NMT与膜片钳技术结合使用,发现大麦木质部装载 K^+ 可能是中柱细胞质膜上的外整流钾通道(stelar K^+ outward rectifying channel, SKOR)将 K^+ 排到木质部的结果。同时Cuin等(2011)研究表明,不同小麦品种的 Na^+ 内流速相当,耐盐品种‘Kharchia 65’的净 Na^+ 外流速显著高于其他盐敏感小麦,可能受质膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白驱动。这一系列研究为快速评价麦类作物的抗盐性建立了新的标准,也有望在其他物种中进行尝试。我们使用NMT测定了不同 K^+ 、 Na^+ 条件下盐生植物小花碱茅(*Puccinellia tenuiflora*)根部 Na^+ 、 H^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+} 的流速,结果表明提高 Na^+ 的外排和 K^+ 的内流是小花碱茅适应高盐(300 mmol·L⁻¹ NaCl)和钾饥饿生境的重要策略; Na^+ 的外排受 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白(salt overly sensitive 1, SOS1)的介导,且由 H^+ 跨膜梯度来驱动;在高盐胁迫初期 Ca^{2+} 的大量内流可能在SOS系统信号转导过程中发挥关键作用,从而激活了SOS1(未发表资料)。

香港中文大学张建华实验室证实了生长素转运蛋白PIN2在通过质膜 H^+ -ATPase引起的质子分泌调控植物根适应碱胁迫的过程中起到重要作用

的假说,发现碱胁迫增加了野生型拟南芥根尖生长素的转运和PIN2的表达,证实了PIN2在适应碱胁迫中是必需的因子之一,它通过调节根尖的质子分泌维持初生根的伸长进而应对碱胁迫的不利影响(Xu等2012a)。Fuglsang等(2007)检测了不同pH条件下拟南芥 $pks5$ 突变体根中净 H^+ 流量的变化情况,发现在根尖处 $pks5$ 突变体较野生型保持了更高的质膜 H^+ -ATPase活性,从而具有更强忍耐高pH的能力,说明PKS5是新的 Ca^{2+} 信号途径的调控者,参与控制质膜 H^+ -ATPase的活性和胞外的酸化。Chen等(2010)通过测定 Na^+ 流速揭示了NO提高植物抗盐的机理,提供了NO调控盐腺 Na^+ 外流的直接证据,发现NO通过增加HAI和SOS1基因的表达、盐分泌和 Na^+ 外流来增强海榄雌(*Avicennia marina*)对盐的忍耐,NO调节的质膜 H^+ -ATPase和液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运体的活性与盐忍耐密切相关。Ordoñez等(2014)研究发现, H_2O_2 引起拟南芥根部快速的 K^+ 外流和 Ca^{2+} 内流。 H_2O_2 指纹可能操控高等植物细胞中除细胞质钙指纹以外的信号转导系统(Bose等2014)。Yang等(2010b)使用NMT研究发现,拟南芥分子伴侣蛋白J3可以和PKS5相互作用且抑制PKS5激酶活性。Huang等(2012)发现过表达小麦TaST基因的拟南芥幼苗在盐处理后根部 Na^+ 呈现明显的外流(而作为对照的野生型拟南芥则呈现较多的 Na^+ 内流),从而证实了TaST基因能增强植物的排盐能力进而达到抗盐的目的。Li等(2014)以烟草为材料,发现甜菜碱和盐分(NaCl)能够共同影响 Ca^{2+} 的跨膜流动, Ca^{2+} -CaM信号转导途径对热休克蛋白(heat shock protein, HSP)的激活具有重要作用,从而提高烟草的耐盐性。这项研究建立了新的 Ca^{2+} -CaM信号转导模式。Shabala等(2007b)研究表明CED-9(抗凋亡基因)控制叶肉细胞质膜上的两种 K^+ 通道:外整流 K^+ 通道(K^+ outward rectifying channel, KOR)和非选择性阳离子通道(non-selective cation channel, NSCC),阻止NaCl引起的叶片 K^+ 外流,CED-9基因表达能显著降低氧化应激引起的 K^+ 外流,维持胞内离子平衡,以减少氧化应激带来的短期和长期损害。Shabala等(2009)采用NMT揭示了海洋原生物破囊壶菌(*Thraustochytrium roseum*)渗透调节的离子机制,发现低渗引起破囊壶菌显著的 Na^+ 、 Cl^- 和 K^+ 外流,胁迫初始的30 min

内完成了渗透调节,这项作为细菌如何进行渗透调节提供了证据,发现破囊壶菌细胞在没有 Na^+ 的环境中也能够正常生长,证明细胞的渗透/膨压也能通过其他方式进行调节以及调节的机制。Lu等(2013)使用NMT测定了红树(*Bruguiera gymnorhiza*和*Kandelia candel*)根的 Na^+ 、 H^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+} 流速,发现外源 H_2O_2 、NO和 Ca^{2+} 调节NaCl胁迫下两种红树根的离子流。

4 在植物抗旱研究中的应用

植物在适应土壤干旱的过程中,维持根的生长非常重要。Xu等(2013)通过NMT等多种方法证实了植物为了保持根在中度水分胁迫下的生长,需要生长素激活根尖质子的分泌,进而调节脱落酸(abscisic acid, ABA)介导的植物适应干旱的过程以达到抗旱的目的。使用水稻(*Oryza sativa*)和拟南芥为材料,用渗透势为-0.47 MPa的聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)进行模拟干旱胁迫处理后,检测了根尖的ABA积累,生长素运输和质膜 H^+ -ATPase的活性(H^+ 流速或称质子流速),以及初生根的长度和根毛的密度。结果表明,中度干旱胁迫增加了根尖ABA的积累和生长素的运输,ABA参与了根尖生长素运输的调控,生长素激活了质膜 H^+ -ATPase,使更多的质子释放用来适应水胁迫,而根尖的质子分泌对保持和促进初生根的伸长和根毛的发育是必需的过程。这项研究从ABA调节干旱的作用入手,发现生长素参与了干旱的调节,最终通过促进质子的分泌来维持水胁迫下根的生长,进一步说明激素之间的相互激活对适应环境胁迫具有重要意义。

5 在植物抗冷研究中的应用

Shabala和Newman(1997)使用NMT测定了抗冷的豌豆(*Pisum sativum*)和蚕豆(*Vicia faba*)、冷敏感的黄瓜(*Cucumis sativus*)和南瓜(*Cucurbita pepo*)、中间型冷忍耐的玉米根部的 H^+ 流速,发现了3个明显的临界温度,冷敏感品种的临界温度更高,这种临界温度的差异可能与细胞膜的相变引起的离子转运有关。通过NMT测定临界温度为植物育种提供了快速和可靠的筛选抗冷品种的手段。

6 在植物抗重金属毒害研究中的应用

重金属是一类重要的环境污染物,植物受重金属胁迫后细胞的膜透性、光合代谢、呼吸代

谢、酶代谢、遗传效应发生改变,植物的耐性机制表现在耐金属生态型的产生、重金属结合多肽的形成、重金属离子的区域化以及活性氧自由基清除系统的活化(杨世勇等2004)。Cd²⁺强烈抑制植物的生长和发育,是有害的重金属之一。NO是一种重要的生物活性气体和功能分子,在植物遭受生物和非生物胁迫下NO作为信号分子对提高植物的抗逆性发挥重要作用(Neill 2007)。Ma等(2010)发现,烟草Cd²⁺诱导细胞程序化死亡(programmed cell death, PCD)出现时伴随着NO含量的显著增加,施加NO释放剂——硝普酸钠(sodium nitroprusside, SNP)可以加速PCD,也可以促进Cd²⁺的内流,导致胞内Cd²⁺的更多积累;而NO合成酶抑制剂——硝基-L-精氨酸甲酯(nitro-L-arginine methylester, L-NAME)和NO特异清除剂——2-(4-羧基苯)-4,4,5,5-四甲基咪唑-1-氧-3-氧化物[2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide, cPTIO]可缓解Cd²⁺引起的毒性,降低Cd²⁺进入细胞的速率,减少胞内Cd²⁺的累积,甚至是导致Cd²⁺外流。基于这些研究结果,认为NO通过调节Cd²⁺的吸收和促进Cd²⁺在BY-2细胞的积累导致Cd²⁺诱导的PCD中扮演正调控的作用。Fan等(2011)通过研究Cd²⁺对细胞极性和Ca²⁺流速的影响,发现Cd²⁺引起Ca²⁺外流,破坏Ca²⁺梯度,进而改变囊泡运输,导致细胞壁解聚,尖端生长受到破坏,这为CdCl₂影响拟南芥的细胞生物学机制提供了证据。Sun等(2013a)研究表明东南景天(*Sedum alfredii*) Cd²⁺超积累生态型表现出较高的根系Cd²⁺内流和叶柄Cd²⁺外流。Sun等(2013b)发现H₂S可以显著缓解Cd²⁺诱导的胡杨PCD,能通过调控液泡对Cd²⁺的富集与隔离来减轻Cd²⁺的毒性,为应对重金属污染提供了新的研究思路。

7 在其他研究中的应用

Antoine等(2000, 2001)应用NMT和激光共聚焦技术同时检测了玉米卵细胞与配子融合过程中卵细胞内外Ca²⁺的变化情况,发现在融合一瞬间,胞外Ca²⁺有一个非常明显的内流,而此时激光共聚焦技术发现胞内Ca²⁺显著增加,说明卵细胞和配子融合过程中胞外的Ca²⁺参与了重要的生命过程。Mugnai等(2012)使用NMT等方法研究发现玉米根尖过渡区在感受和适应根部缺氧中起着重要

作用,根尖细胞暴露在缺氧环境中促使整个根部适应缺氧,缺氧引起的NO外流与过渡区密切相关并且对整个根部适应缺氧十分重要。Chen等(2009)采用NMT分析了钙调素(calmodulin, CaM)的功能和蛋白表达模式,发现抑制Ca²⁺-CaM时快速诱导了胞外Ca²⁺的内流,导致胞内Ca²⁺浓度的急剧增加和花粉管超微结构的异常,随后肌动蛋白丝解聚,内吞和胞外分泌紊乱,细胞壁结构改变,最后导致花粉管生长混乱。Wu等(2008)利用显微注射、荧光能量共振转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)和NMT等技术证明了白皮松(*Pinus bungeana*)花粉管发育过程中胞外CaM在与其胞外结合点结合后,可以引起胞内第二信使Ca²⁺信号的增强,说明植物胞外CaM可以通过介导跨膜信号而发挥其信号肽的功能。Wang等(2010)发现来自红海棉(*Latrunculia magnifica*)的高毒大环内酯(latrunculin-B, Lat-B)或来自海棉(*Jaspis johnstoni*)的天然产物大环肽(jasplakinolide, Jas)能够引起肌动蛋白丝的分解,导致线粒体中的Ca²⁺释放到胞质中,随之改变胞质中的Ca²⁺浓度。

8 展望

NMT已被应用于诸多领域,作为一个开放性的实验平台,正以其独特的优势发挥更大的作用。在基因组学、蛋白质组学和代谢组学发展的过程中,越来越多的科学家认识到研究结构和功能的重要性,而新的研究中需要新的技术去探索活细胞的生物功能。NMT是一个综合性较强的电生理技术,将成为迎接这一挑战的理想工具,有望将离子组学和分子组学从静态研究推进到动态研究水平,从而将二者与生物体生理生化变化建立直接联系。国内外的科学家已经开始使用NMT开展基因功能的研究。相信在不久的将来,该技术必将会得到更加广泛的使用,从而推动植物生理学及相关学科快速发展。

参考文献

- 丁亚男, 许越(2007). 非损伤微测技术及其在生物医学研究中的应用. 物理, 36 (7): 548-558
- 冯固, 李晓林, 张福锁, 李生秀(2000). 盐胁迫下丛枝菌根真菌对玉米水分和养分状况的影响. 应用生态学报, 11 (4): 595-598
- 霍翔远, 季宏兵, 朱毅(2010). Cd胁迫对受驯菜茵衣藻影响的非损伤微测初步研究. 现代农业科技, 11 (12): 235-237
- 李隼, 黄胜东, 赵福庚(2011). 重金属镉对水稻根毛细胞钾离子吸收

- 过程的影响. 植物生理学报, 47 (5): 481~487
- 梁宇, 荆玉祥, 沈世华(2004). 植物蛋白质组学研究进展. 植物生态学报, 28 (1): 114~125
- 吕杰, 苗璐, 蔡蕊, 武慧, 徐洪伟, 周晓霞(2013). 非损伤微测技术在植物根系生长发育研究中的应用. 生物技术, 23 (1): 89~94
- 孙清斌, 沈仁芳, 尹春芹, 赵学强(2008). 铝毒胁迫下植物的响应机制. 土壤, 40 (5): 691~697
- 杨剑超, 丁烽, 吴蕊蕊, 袁芳, 王宝山(2012). 不同阴离子对二色补血草盐腺Na⁺分泌速率的影响. 植物生理学报, 48 (4): 397~402
- 杨世勇, 王方, 谢建春(2004). 重金属对植物的毒害及植物的耐性机制. 自然科学, 27 (1): 29~34
- 朱会朋, 孙健, 赵楠, 马旭君, 张玉红, 沈昕, 陈少良(2013). 盐胁迫下硫化氢调控杨树根系的离子流. 植物生理学报, 49 (6): 561~567
- Antoine AF, Faure JE, Cordeiro S, Dumas C, Rougier M, Feijó JA (2000). A calcium influx is triggered and propagates in the zygote as a wavefront during *in vitro* fertilization of flowering plants. Proc Natl Acad Sci USA, 97: 10643~10648
- Antoine AF, Faure JE, Dumas C, Feijó JA (2001). Differential contribution of cytoplasmic Ca²⁺ and Ca²⁺ influx to gamete fusion and egg activation in maize. Nat Cell Biol, 3: 1120~1123
- Bose J, Rodrigo-Moreno A, Shabala S (2014). ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. J Exp Bot, 65: 1241~1257
- 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: 1570~1585
- Chen T, WuX, Chen Y, Li X, Huang M, Zheng M, Baluska F, Samaj J, Lin J (2009). Combined proteomic and cytological analysis of Ca²⁺-calmodulin regulation in *Picea meyeri* pollen tube growth. Plant Physiol, 149: 1111~1126
- Chen ZH, 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
- Chen ZH, Pottosin II, Cuin TA, Fuglsang AT, Tester M, Jha D, Zepeda-Jazo I, Zhou M, Palmgren MG, Newman IA et al (2007). Root plasma membrane transporters controlling K⁺/Na⁺ homeostasis in salt-stressed barley. Plant Physiol, 145: 1714~1725
- Chen ZH, 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 Sci, 48: 1382~1388
- 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 Environ, 34: 947~961
- Ding X, Sui X, Wang F, Gao J, He X, Zhang F, Yang J, Feng G (2011). Synergistic interactions between *Glomus mosseae* and *Bradyrhizobium japonicum* in enhancing proton release from nodules and hyphae. Mycorrhiza, 22: 51~58
- Fan JL, Wei XZ, Wan LC, Zhang LY, Zhao XQ, Liu WZ, Hao HQ, Zhang HY (2011). Disarrangement of actin filaments and Ca²⁺ gradient by CdCl₂ alters cell wall construction in *Arabidopsis thaliana* root hairs by inhibiting vesicular trafficking. J Plant Physiol, 168: 1157~1167
- Fang YY, Babourina O, Rengel Z, Yang XE, Pu PM (2007). Ammonium and nitrate uptake by the floating plant *Landoltia punctata*. Ann Bot, 99: 365~370
- Fuglsang AT, Guo Y, Cuin TA, Qiu Q, Song C, Kristiansen KA, Bych K, Schulz A, Shabala S, Schumaker KS et al (2007). *Arabidopsis* protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H⁺-ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein. Plant Cell, 19: 1617~1634
- Gilliham M, Sullivan W, Tester M, Tyerman SD (2006). Simultaneous flux and current measurement from single plant protoplasts reveals a strong link between K⁺ fluxes and current, but no link between Ca²⁺ fluxes and current. Plant J, 46: 134~144
- Hariadi Y, Marandon K, Tian Y, Jacobsen SE, Shabala S (2011). Ionic and osmotic relations in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) plants grown at various salinity levels. J Exp Bot, 62: 185~193
- Hawkins BJ, Boukcim H, Plassard C (2008). A comparison of ammonium, nitrate and proton net fluxes along seedling roots of Douglas-fir and lodgepole pine grown and measured with different inorganic nitrogen sources. Plant Cell Environ, 31: 278~287
- Hawkins BJ, Robbins S (2010). pH affects ammonium, nitrate and proton fluxes in the apical region of conifer and soybean roots. Physiol Plant, 138: 238~247
- Huang X, Wang G, Shen Y, Huang Z (2012). The wheat gene *TaST* can increase the salt tolerance of transgenic *Arabidopsis*. Plant Cell Rep, 31: 339~347
- Jaffe LF (2010). Fast calcium waves. Cell Calcium, 48: 102~113
- Kuhtreiber WM, Jaffe LF (1990). Detection of extracellular calcium gradients with a calcium-specific vibrating electrode. J Cell Biol, 110: 1565~1573
- Li J, Bao S, Zhang Y, Ma X, Mishra-Knyrim M, Sun J, Sa G, Shen X, Polle A, Chen S (2012). *Paxillus involutus* strains MAJ and NAU mediate K⁺/Na⁺ homeostasis in ectomycorrhizal *Populus × canescens* under sodium chloride stress. Plant Physiol, 159: 1771~1786
- Li M, Guo S, Xu Y, Meng Q, Li G, Yang X (2014). Glycine betaine-mediated potentiation of HSP gene expression involves calcium signaling pathways in tobacco exposed to NaCl stress. Physiol Plant, 150: 63~75
- Li Q, Li BH, Kronzucker HJ, Shi WM (2010). Root growth inhibition by NH₄⁺ in *Arabidopsis* is mediated by the root tip and is linked to NH₄⁺ efflux and GMPase activity. Plant Cell Environ, 33: 1529~1542
- Lu Y, Li N, Sun J, Hou P, Jing X, Zhu H, Deng S, Han Y, Huang X, Ma X et al (2013). Exogenous hydrogen peroxide, nitric oxide and calcium mediate root ion fluxes in two non-secretor mangrove species subjected to NaCl stress. Tree Physiol, 33: 81~95
- Luo J, Qin J, He F, Li H, Liu T, Polle A, Peng C, Luo Z (2013). Net fluxes of ammonium and nitrate in association with H⁺ fluxes in fine roots of *Populus popularis*. Planta, 237: 919~931
- Ma W, Xu W, Xu H, Chen Y, He Z, Ma M (2010). Nitric oxide modulates cadmium flux during cadmium-induced programmed cell

- death in tobacco BY-2 cells. *Planta*, 232: 325~335
- Mugnai S, Azzarello E, Baluska F, Mancuso S (2012). Local root apex hypoxia induces NO-mediated hypoxic acclimation of the entire root. *Plant Cell Physiol*, 53: 912~920
- Neill S (2007). Interactions between abscisic acid, hydrogen peroxide and nitric oxide mediate survival responses during water stress. *New Phytol*, 175: 4~6
- Nemchinov LG, Shabala L, Shabala S (2008). Calcium efflux as a component of the hypersensitive response of *Nicotiana benthamiana* to *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell Physiol*, 49: 40~46
- Ordoñez NM, Maronedze C, Thomas L, Pasqualini S, Shabala L, Shabala S, Gehring C (2014). Cyclic mononucleotides modulate potassium and calcium flux responses to H₂O₂ in *Arabidopsis* roots. *FEBS Lett*, 588: 1008~1015
- Ramos AC, Martins MA, Okorokova-Façanha AL, Olivares FL, Okorokov LA, Sepúlveda N, Feijó JA, Façanha AR (2009). Arbuscular mycorrhizal fungi induce differential activation of the plasma membrane and vacuolar H⁺ pumps in maize roots. *Mycorrhiza*, 19: 69~80
- Shabala L, McMeekin T, Shabala S (2009). Osmotic adjustment and requirement for sodium in marine protist thraustochytrid. *Environ Microbiol*, 11: 1835~1843
- Shabala S, Cuin TA, Pang J, Percey W, Chen Z, Conn S, Eing C, Wegner LH (2010). Xylem ionic relations and salinity tolerance in barley. *Plant J*, 61: 839~853
- Shabala S, Cuin TA, Pottosin I (2007a). Polyamines prevent NaCl-induced K⁺ efflux from pea mesophyll by blocking non-selective cation channels. *FEBS Lett*, 581: 1993~1999
- Shabala S, Cuin TA, Prissall L, Nemchinov LG (2007b). Expression of animal *CED-9* anti-apoptotic gene in tobacco modifies plasma membrane ion fluxes in response to salinity and oxidative stress. *Planta*, 227: 189~197
- Shabala S, Knowles A (2002). Rhythmic patterns of nutrient acquisition by wheat roots. *Funct Plant Biol*, 29: 595~605
- Shabala S, Newman I (2000). Salinity effects on the activity of plasma membrane H⁺ and Ca²⁺ transporters in bean leaf mesophyll: masking role of the cell wall. *Ann Bot*, 85: 681~686
- Shabala SN, Newman IA (1997). H⁺ flux kinetics around plant roots after short-term exposure to low temperature: identifying critical temperatures for plant chilling tolerance. *Plant Cell Environ*, 20: 1401~1410
- Smith PJS (1995). Non-invasive ion probes—tools for measuring transmembrane ion flux. *Nature*, 378: 645~646
- Sun J, Chen S, Dai S, Wang R, Li N, Shen X, Zhou X, Lu C, Zheng X, Hu Z et al (2009). 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, Wang R, Liu Z, Ding Y, Li T (2013a). Non-invasive microelectrode cadmium flux measurements reveal the spatial characteristics and real-time kinetics of cadmium transport in hyperaccumulator and nonhyperaccumulator ecotypes of *Sedum alfredii*. *J Plant Physiol*, 170: 355~359
- Sun J, Wang R, Zhang X, Yu Y, Zhao R, Li Z, Chen S (2013b). Hydrogen sulfide alleviates cadmium toxicity through regulations of cadmium transport across the plasma and vacuolar membranes in *Populus euphratica* cells. *Plant Physiol Biochem*, 65: 67~74
- ten Hoopen F, Cuin TA, Pedas P, Hegelund JN, Shabala S, Schjoerring JK, Jahn TP (2010). Competition between uptake of ammonium and potassium in barley and *Arabidopsis* roots: molecular mechanisms and physiological consequences. *J Exp Bot*, 61: 2303~2315
- Wang Y, Zhu Y, Ling Y, Zhang H, Liu P, Baluska F, Samaj J, Lin J, Wang Q (2010). Disruption of actin filaments induces mitochondrial Ca²⁺ release to the cytoplasm and [Ca²⁺]_c changes in *Arabidopsis* root hairs. *BMC Plant Biol*, 10: 53
- Wu X, Chen T, Zheng M, Chen Y, Teng N, Samaj J, Baluska F, Lin J (2008). Integrative proteomic and cytological analysis of the effects of extracellular Ca²⁺ influx on *Pinus bungeana* pollen tube development. *J Proteome Res*, 7: 4299~4312
- Xu W, Jia L, Baluška F, Ding G, Shi W, Ye N, Zhang J (2012a). PIN2 is required for the adaptation of *Arabidopsis* roots to alkaline stress by modulating proton secretion. *J Exp Bot*, 63: 6105~6114
- Xu W, Jia L, Shi W, Liang J, Zhou F, Li Q, Zhang J (2013). Abscisic acid accumulation modulates auxin transport in the root tip to enhance proton secretion for maintaining root growth under moderate water stress. *New Phytol*, 197: 139~150
- Xu W, Shi W, Jia L, Liang J, Zhang J (2012b). *TFT6* and *TFT7*, two different members of tomato 14-3-3 gene family, play distinct roles in plant adaption to low phosphorus stress. *Plant Cell Environ*, 35: 1393~1406
- Yang H, Shi G, Wang H, Xu Q (2010a). Involvement of polyamines in adaptation of *Potamogeton crispus* L. to cadmium stress. *Aquat Toxicol*, 100: 282~288
- Yang Y, Qin Y, Xie C, Zhao F, Zhao J, Liu D, Chen S, Fuglsang AT, Palmgren MG, Schumaker KS et al (2010b). The *Arabidopsis* chaperone J3 regulates the plasma membrane H⁺-ATPase through interaction with the PKS5 kinase. *Plant Cell*, 22: 1313~1332
- Zhang JL, Flowers TJ, Wang SM (2010). Mechanisms of sodium uptake by roots of higher plant. *Plant Soil*, 326: 45~60
- Zhang JL, Shi HZ (2013). Physiological and molecular mechanisms of plant salt tolerance. *Photosynth Res*, 115: 1~22