

DOI: 10.5846/stxb201301310204

邱念伟, 杨翠翠, 卢正珂, 李遵宁, 岳贤军, 程秀秀, 许莹莹, 周峰. 蒺藜适应盐渍环境的 Na^+ 区域化方式和生理特征. 生态学报, 2014, 34(21): 6147-6155.

Qiu N W, Yang C C, Lu Z K, Li Z N, Yue X J, Cheng X X, Xu Y Y, Zhou F. Na^+ compartmentation and physiological characteristics of *Artemisia anethifolia* in adaptation to saline environment. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(21): 6147-6155.

蒺藜适应盐渍环境的 Na^+ 区域化方式和生理特征

邱念伟¹, 杨翠翠¹, 卢正珂¹, 李遵宁¹, 岳贤军¹, 程秀秀¹, 许莹莹¹, 周 峰^{2, *}

(1. 曲阜师范大学生命科学学院, 曲阜 273165; 2. 南京晓庄学院生物化工与环境工程学院, 南京 211171)

摘要:蒺藜是广泛分布在我国北方的一种特殊类型的菊科盐生植物, 阐明蒺藜特殊的耐盐机制和生理特征有助于丰富植物抗盐性研究的内容。用 0、100、200、300、400 mmol/L NaCl 处理蒺藜 7 d 后, 比较蒺藜盐处理植株与对照植株在生长和生理方面的差异, 并详细分析了 Na^+ 在蒺藜体内的积累水平和区域化方式。结果显示: 蒺藜虽然能够耐受 400 mmol/L NaCl, 但盐处理显著抑制了蒺藜的生长, 整株鲜重随着盐处理浓度的升高逐渐减小。在水分生理方面, 随着盐处理浓度的升高, 蒺藜叶片细胞的渗透调节能力逐渐增强, 其叶片肉质化程度却呈逐渐降低的趋势。分析盐处理对光合作用的影响发现, 盐处理后蒺藜叶片光合速率与气孔导度显著下降, 而其 PS II 光化学活性并未受到抑制, 叶绿素含量甚至逐渐增大, 说明盐处理后蒺藜叶片光合速率的降低主要是由于气孔因素造成的, 而不是由于光合结构被破坏。蒺藜体内的 Na^+ 含量随着盐处理浓度的升高显著增加, 400 mmol/L NaCl 条件下叶、茎、根中的 Na^+ 含量分别高达 321.4、242.1 和 182.3 $\mu\text{mol/g}$ 鲜重; 蒺藜体内的 Na^+ 70% 以上积累在叶片内, 而叶片内 98% 左右的 Na^+ 积累在叶片原生质体中, 叶片原生质体中的 Na^+ 平均浓度是质外体 1.2—1.8 倍, 推测其叶片细胞内存在着有效的 Na^+ 区域化机制。盐处理后蒺藜叶片液泡膜 V-H^+ -ATPase 的质子泵活性比对照增加了 30%—50%, 液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运活性则增加至对照的 4—7 倍, 进一步证实蒺藜叶片具有较强的液泡 Na^+ 区域化能力。随着盐处理浓度的升高, Na^+ 在叶片中的分布比例相对减少, V-H^+ -ATPase 的质子泵活性和 Na^+/H^+ 逆向转运活性增幅也减缓。这种 Na^+ 区域化能力使蒺藜获得了较强的耐盐性, 有效保护了其光系统, 降低了细胞汁液渗透势。但是盐处理后这种耐盐方式并不能阻止蒺藜叶片肉质化程度和光合活性下降, 蒺藜生长仍然受盐抑制, 说明 Na^+ 区域化是蒺藜适应盐渍环境的必要条件而非充分条件。

关键词:蒺藜; Na^+ 区域化; 生长; 光合; 适应

Na^+ compartmentation and physiological characteristics of *Artemisia anethifolia* in adaptation to saline environment

QIU Nianwei¹, YANG Cuicui¹, LU Zhengke¹, LI Zunning¹, YUE Xianjun¹, CHENG Xiuxiu¹, XU Yingying¹, ZHOU Feng^{2, *}

1 College of Life Sciences, Qufu Normal University, Qufu, Shandong 273165, China

2 School of Biochemical and Environmental Engineering, Nanjing Xiaozhuang University, Nanjing, Jiangsu 211171, China

Abstract: *Artemisia anethifolia* (Compositae) is a halophyte that is widely distributed in northern areas of China. Studying the mechanisms by which this plant adapts to high levels of salt will increase our understanding of salt adaptation in vascular plants. *A. anethifolia* plants were treated with 0, 100, 200, 300, and 400 mmol/L NaCl for 7 d, respectively. Then, the differences in growth and physiology were compared between salt-treated and control *A. anethifolia* plants. In particular, the Na^+ accumulation levels and Na^+ compartmentation patterns in *A. anethifolia* plants were analyzed in detail. Although the

基金项目:江苏省自然科学基金青年基金项目(BK2012073); 国家重点实验室开放课题(2011KF07)

收稿日期:2013-01-31; **网络出版日期:**2014-03-13

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zfibcas@163.com

A. anethifolia plants were able to survive under 400 mmol/L NaCl, salt-treated plants showed lower fresh weight as the NaCl concentration increased, indicating that plant growth was inhibited by salt. The leaves of *A. anethifolia* showed an increased capacity for osmotic adjustment but a decreased degree of leaf succulence with increasing NaCl concentrations. Photosynthetic analyses showed that there was a gradual decline in net photosynthetic rate and stomatal conductance of salt-treated leaves with increasing NaCl concentrations. However, the maximal efficiency of photosystem II photochemistry (F_v/F_m) in *A. anethifolia* leaves was not inhibited by salt, and the chlorophyll content even increased with increasing salt concentrations. These observations suggested that the decreased photosynthetic rate was due to stomatal factors, rather than damage to the components of the photosynthetic machinery. The Na^+ content in *A. anethifolia* plants tended to increase with increasing salt concentrations. The Na^+ content in leaves, stems, and roots of *A. anethifolia* was 321.4, 242.1, and 182.3 $\mu\text{mol/g}$ FW, respectively, in the 400 mmol/L NaCl treatment. More than 70% of the Na^+ absorbed by salt-treated *A. anethifolia* plants accumulated in their leaves, and approximately 98% of the Na^+ that accumulated in leaves was localized in leaf protoplasts. The average Na^+ concentration in protoplasts of *A. anethifolia* leaf tissue was 1.2—1.8 times that in the apoplast. These results indicate that efficient Na^+ compartmentation occurred in *A. anethifolia* leaf cells. The V-H^+ -ATPase proton pump activity of salt-treated leaves was 30%—50% higher than that of control leaves, and the tonoplast Na^+/H^+ antiporter activity of salt-treated leaves was 4—7 times that in leaves of control plants. These findings suggested that *A. anethifolia* plants have a strong ability to compartmentalize Na^+ in the vacuole. As the concentrations of salt increased, the Na^+ distribution ratio in leaves decreased. Likewise, the range of increased V-H^+ -ATPase proton pump activity and tonoplast Na^+/H^+ antiporter activity decreased as the salt concentration increased. Na^+ compartmentation plays an important role in the salt tolerance of *A. anethifolia* plants, because it protects their photosystems and results in lower osmotic potential in the leaf cells. However, Na^+ compartmentation could not prevent the decrease in the degree of leaf succulence and the photosynthetic activity of *A. anethifolia* leaves under highly saline conditions, and so their growth was inhibited by salt. These results suggest that Na^+ compartmentation is necessary but not sufficient for adaptation of *A. anethifolia* to a saline environment.

Key Words: *Artemisia anethifolia*; Na^+ compartmentation; growth; photosynthesis; adaption

蒹蒿 (*Artemisia anethifolia* Mattf) 广泛分布在我国北方盐碱地区, 是一种特殊的菊科盐生植物, 它既不具备真盐生植物的快速生长及稀盐能力, 又不具备泌盐植物的泌盐结构, 也不具备拒盐植物有效的拒盐方式^[1], 却能够在高盐条件下生存并完成生活史。因此蒹蒿的耐盐机制具有特殊性, 但其耐盐机制还未见报道。在盐渍条件下蒹蒿吸收了大量的 Na^+ 并能够使细胞质中的代谢活动不受伤害, 说明其具有非常有效的 Na^+ 区域化方式。本文拟从个体、组织和细胞 3 个水平上分析蒹蒿在盐渍条件下的离子区域化方式和生理特征, 阐述其耐盐机制。

在前人提出的众多耐盐机制中, 最受关注的是 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白, 它广泛存在于生物膜上, 具有调节细胞 pH 值和 Na^+ 平衡的作用^[2-5]。通过转 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白已经使近百种盐敏感植物获得了耐盐性, 充分证实了 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白在植物耐盐

性中的作用^[6-9]。但是这些通过转 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因获得耐盐性的植物虽然耐盐能力提高, 但其仍然不能真正“适应”盐渍环境。“适应”是指植物处于不适宜的环境时, 能够通过自身的形态或生理变化, 将环境的不利影响降到最低, 并最大限度地利用环境的有益因素, 使植物达到最佳的生活状态^[10]。能够真正“适应”盐渍环境的植物叫做真盐生植物, 真盐生植物主要分布在藜科植物中, 如碱蓬属、滨藜属、猪毛菜属和盐穗木属等。这类植物的特征是“喜盐”, 适当的盐度能够促进其生长, 如碱蓬最适盐浓度是 200—300 mmol/L NaCl^[11]。但是, 包括蒹蒿、芦苇、二色补血草在内的很多盐生植物在盐渍环境下生长均受到抑制, 因此它们均不是真盐生植物, 通过转基因获得耐盐性的植物也均没有达到“适盐性”目标^[6-9, 12]。盐渍环境对非真盐生植物来讲仍然是一种胁迫, 而对真盐生植物来讲则是一种

适宜环境, Na⁺是真盐生植物重要的渗透调节物质^[11,13]。以蒺藜蒿为代表植物, 分析其 Na⁺区域化机制和生长特征, 有助于了解这类非适盐植物耐盐但不能“适盐”的主要原因, 为植物耐盐性研究提供新内容。

1 材料与方法

1.1 材料培养

蒺藜蒿 (*Artemisia anethifolia*) 的种子采自黄河三角洲。挑选籽粒饱满的种子播种于装有干净细砂的塑料盆内, 当幼苗长到 4—5 个叶片时, 选取生长一致幼苗进行液体通气培养。水培幼苗适应 2 d 后进行 NaCl 处理, 方法是用含有 NaCl 的完全 Hoagland 营养液 (pH 值 5.9) 每天递增 100 mmol/L NaCl, 同一天达到处理终浓度 (100、200、300、400 mmol/L NaCl), 以防止盐激效应。以 Hoagland 营养液为对照 (实际含有约 2 mmol/L Na⁺)。为保持 NaCl 浓度恒定, 每 2d 更换 1 次营养液。培养温室的昼夜温度为 (30±2)℃/(23±2)℃, 光周期 15/9 h, 白天最大光照强度约为 1500 μmol m⁻² s⁻¹, 相对湿度 40%—60%。NaCl 处理 7 d 后, 测定有关指标。

1.2 测定方法

1.2.1 整株鲜重和叶绿素含量的测定

到达终浓度的当天将整株植物从液体培养盆内取出, 轻轻吸去根部表面的水分, 分别称量叶片、茎和根的鲜重 (FW)。整株鲜重 = 叶鲜重 + 茎鲜重 + 根鲜重, 每个处理做 10 个重复。

选取蒺藜蒿最幼功能叶测定叶绿素含量^[14]。由于蒺藜蒿是羽状深裂叶, 因此以鲜重为单位表示其叶绿素含量。

1.2.2 叶片肉质化程度和细胞汁液渗透势的测定

用叶片肉质化程度表示叶片的含水量: 首先称量叶片鲜重 (FW), 然后将鲜材料放入 105℃ 的烘箱杀青 10 min 后, 80℃ 烘干至恒重, 称量叶片干重 (DW)。

$$\text{叶片肉质化程度} = \text{FW} / \text{DW} \times 100\%$$

每个处理做 5 个重复。

叶片液氮速冻后, 放入注射器内室温下溶冰, 然后挤出细胞汁液。细胞汁液渗透势用蒸汽压渗透压计 (Vapor Pressure Osmometer 5520, Hansatech Instrument Ltd., UK) 测定。每个处理做 5 个重复。

1.2.3 叶片光合参数的测定

蒺藜蒿幼苗在 20:00 充分暗适应后, 在黑暗条件下用 Handy PEA (Plant Efficiency Analyser; Hansatech Instrument Ltd., UK) 测定其最大光化学效率 (maximal efficiency of PS II photochemistry, F_v/F_m)。每个处理做 5 个重复。

光合速率 (P_n) 和气孔导度 (G_s) 采用英国 PP system 公司的 Ciras-1 型光合测定系统测定。测定条件为: CO₂ 浓度 360 μmol/mol、相对湿度 40%, 光照 1000 μmol m⁻² s⁻¹, 温度 25℃。叶室中蒺藜蒿羽状叶叶面积用 Li-3000A 叶面积仪 (美国 LI-COR) 测定。每个处理做 5 个重复。

1.2.4 根、茎、叶 Na⁺含量的测定

将每株植物分成根、茎、叶 3 部分, 分别烘干、称重。然后取 0.1 g 干重的材料用马弗炉在 500℃ 充分灰化, 用浓硝酸溶解, 然后蒸馏水稀释定容。Na⁺浓度用原子吸收光谱仪 (Z-8000 型, Hitachi, Japan) 测定。各器官中 Na⁺含量用 μmol/g 鲜重表示:

$$\text{各器官中 Na}^+ \text{总量} = \text{Na}^+ \text{含量} \times \text{器官鲜重}$$

每个处理做 5 个重复。

1.2.5 叶片质外体和原生质体 Na⁺含量的测定

质外体液体的收集参照 Tetlow 的方法稍加改动^[15]。取一定数量的完整叶片, 将叶片茎基端向下置于容积为 40 mL 的注射器中, 注射器下端出液口套一容积为 0.5 mL 的 Eppendorff 管, 放入超速冷冻离心机中 4℃、400g 离心 10 min, 避免细胞破裂。质外体液体顺着注射器收集到 Eppendorff 管中, 收集到的质外体 (apoplast) 液体稀释后测定其 Na⁺浓度 (C_a)。方法 1.2.2 中得到的细胞汁液 [其中含有质外体溶液和原生质体 (protoplast) 溶液两部分] 4000g 离心 10 min, 取上清液用于 Na⁺浓度的测定 (C_p)。参照 Flowers 的方法, 假定质外体与原生质体体积比约为 3:97, 可推算原生质体溶液的平均 Na⁺浓度 (C_p)^[16]:

$$C_p = (C_T \times 1 - C_a \times V_a) / V_p$$

式中, $V_a = 1 \times 3\%$, $V_p = 1 \times 97\%$ 。每个处理做 5 个重复。

Na⁺在质外体和原生质体中的分布比例计算公式分别为:

$$P_a = C_a \times V_a / (C_a \times V_a + C_p \times V_p)$$

$$P_p = C_p \times V_p / (C_a \times V_a + C_p \times V_p)$$

1.2.6 液泡膜微囊的制备

液泡膜微囊的提取参考 Ballesteros 等人的方法^[17]。以不同盐浓度处理的莼蒿叶片为材料,用预冷重蒸水冲洗 2—3 次,用吸水纸吸去表面水分后,按材料:匀浆缓冲液 = 1:2 加入预冷匀浆缓冲液,该缓冲液含有 50 mmol/L Tricine-Tris (pH 7.5), 3 mmol/L EGTA, 3 mmol/L MgSO₄, 0.5% PVP, 2 mmol/L DTT, 0.2 mmol/L PMSF, 5% 甘油(Glycerol),并用甘露醇调至与叶片细胞汁液等渗。用匀浆机匀浆 2 次,四层纱布过滤。取滤液 10000 r/min (Beckman, L-80XP) 离心 20 min,一并除去线粒体及没有破碎的细胞和细胞壁碎片。取离心后的上清液小心铺在 18%:24%:30%:45% (质量分数) 不连续蔗糖梯度溶液上(含 5 mmol/L Hepes-Tris pH 值 7.5, 1 mmol/L DTT), 100000g 离心 2h, 小心收集 24% (质量分数) 界面上的膜微囊,来自 24% 界面的微囊富含液泡膜。用稀释液(含有 3 mmol/L MgSO₄, 50 mmol/L Hepes-Tris pH 值 7.5, 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L DTT) 稀释 2—4 倍, 100,000×g 再离心 30 min。离心后的沉淀用尖头细毛笔小心悬浮在贮藏液[含有 40% 甘油 (glycerin), 2 mmol/L DTT, 10 mmol/L Hepes-Tris (pH 值=7.5)] 中,用匀浆器混匀后分装于 Eppendorf 管中,液氮中冷冻后, -80 °C 超低温冰箱保存备用。以上操作均在 0—4 °C 条件下完成。用考马斯亮蓝法测定提取液中蛋白质含量。

1.2.7 液泡膜 H⁺-ATPase 泵活性、Na⁺/H⁺ 逆向转运活性的测定

H⁺-ATPase 泵活性和 Na⁺/H⁺ 逆向转运活性测定均参照 Ballesteros 等人的方法^[17]。质子泵活性的测

定的反应体系为 2 mL,其中含有 33 mmol/L Hepes-tris (pH 值 = 7.5), 50 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L (NH₄)₂MoO₄, 166 mmol/L 甘露醇, 0.05% 牛血清蛋白, 3 mmol/L DTT, 1.5 mmol/L ATP-Na₂, 膜微囊制剂蛋白量 100 μg。25 °C 保温 5 min, 再加入浓度为 1 mol/L 的 MgCl₂ 10 μL 启动反应。用 acridine orange 作荧光染料,反应体系中 acridine orange 的终浓度为 5 μmol/L。测定荧光猝灭的初速度(激发波长为 495 nm, 发射波长为 525 nm)。以单位时间内荧光猝灭值占总荧光量的百分数(% quench/min) 表示。

荧光猝灭达到最大且稳定时,加入 15 μmol/L bafilomycin 20 μL 终止 V-H⁺-ATPase 活性, 然后加入 Na⁺ (NaCl), 使体系中 Na⁺ 浓度为 100 mmol/L, 测定荧光恢复的初速度, 以单位时间内荧光恢复值占总荧光量的百分数(% quench/min) 表示 Na⁺/H⁺ 逆向转运活性。每个处理的两种酶活性均做 5 个重复。

2 结果与分析

2.1 盐处理对莼蒿生长状况的影响

盐处理显著抑制了莼蒿的生长,随着盐处理浓度的升高,莼蒿整株鲜重显著下降。100、200、300、400 mmol/L NaCl 条件下的整株鲜重分别为对照的 87.9%、79.0%、72.3%、65.7% (图 1)。地上部鲜重尤其是叶片鲜重下降最为显著,分别为对照的 84.5%、73.0%、64.0%、51.9%。盐处理后,莼蒿的叶片数和叶片大小均显著小于对照,在 300—400 mmol/L NaCl 下,老叶有发黄枯萎现象;但功能叶片的叶绿素含量显著高于对照(图 1),这是叶片生长受抑制后的常见表现。

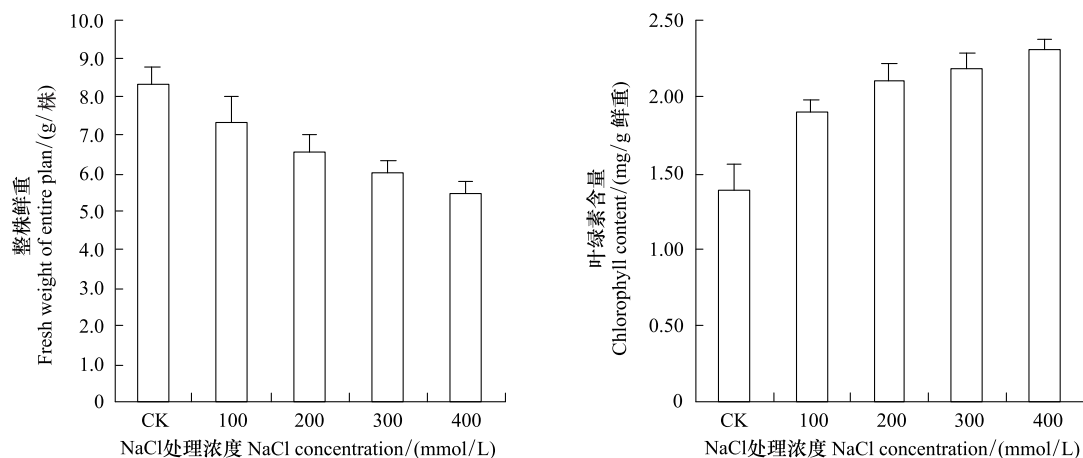


图 1 盐处理对莼蒿整株鲜重(a)和叶绿素含量(b)的影响

Fig.1 Effect of salt-treatment on fresh weight of individual *Artemisia anethifolia* plants (a) and chlorophyll content (b)

2.2 盐处理对蒺藜蒿水分状况的影响

蒺藜蒿地上部分主要为叶片, 叶片的水分状况可以反映其生活状态。为了适应盐渍条件下的低渗环境, 其叶片的细胞汁液渗透势也显著下降, 以提高

其吸水能力(图2)。400 mmol/L NaCl 条件下蒺藜蒿叶片细胞汁液渗透势达到对照的 2.07 倍。蒺藜蒿叶片的肉质化程度却显著下降(图2)。400 mmol/L NaCl 条件下, 蒺藜蒿叶片肉质化程度仅为对照的 69.1%。

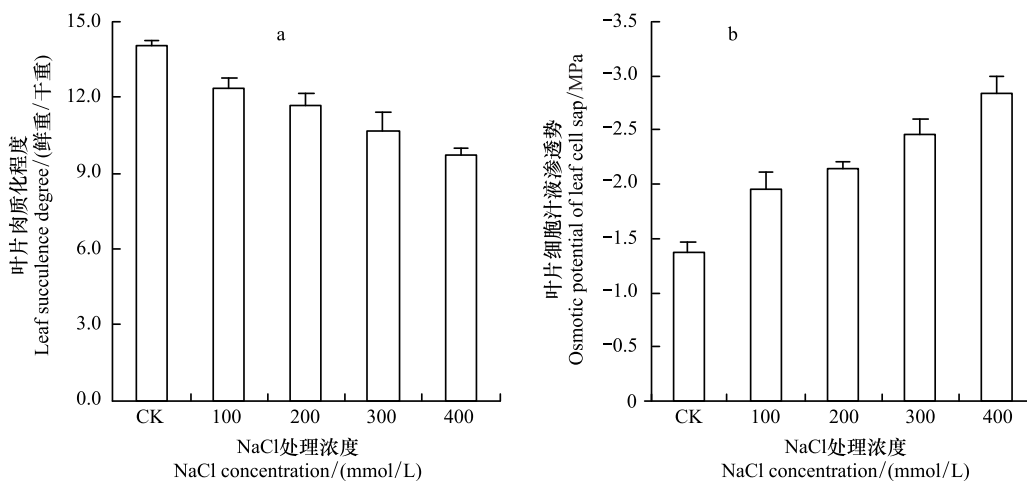


图2 盐处理对蒺藜蒿叶片肉质化程度和细胞汁液渗透势的影响

Fig.2 Effect of salt-treatment on leaf succulence degree and osmotic potential of leaf cell sap of *Artemisia anethifolia* plants

2.3 盐处理对蒺藜蒿叶片光合功能的影响

盐处理后蒺藜蒿叶片的光合功能显著下降(图3), 100、200、300 和 400 mmol/L NaCl 条件下的净光合速率分别为对照的 70.6%、48.7%、40.5% 和 28.1%。气孔导度的下降趋势与净光合速率类似, 而蒺藜蒿叶片的 PS II 最大光化学效率 (F_v/F_m) 不受盐处理影响(图3)。说明盐处理抑制蒺藜蒿的光合功能与气孔因素有密切关系。

2.4 不同浓度盐处理条件下蒺藜蒿各器官中 Na⁺ 的含量与分布

盐处理后, 蒺藜蒿幼苗的各个器官中的 Na⁺ 含量均显著增加, 但地上部的 Na⁺ 含量均显著高于根部, 其中叶片的 Na⁺ 含量最高(表1), 说明蒺藜蒿并不阻止 Na⁺ 运往地上部。随着盐处理浓度的增加, 叶片 Na⁺ 含量增加幅度显著小于根和茎, 如 400 mmol/L NaCl 条件下叶、茎、根中 Na⁺ 含量分别为 100 mmol/L NaCl 条件下的 2.04、3.16 和 2.66 倍。因此, 在高盐浓度下, 蒺藜蒿相对减缓了叶片 Na⁺ 积累幅度。各器官中的 Na⁺ 总量结果则显示(表2), 在不同盐渍条件

表1 不同盐处理条件下蒺藜蒿各器官中 Na⁺ 含量 (μmol/g 鲜重)

Table 1 Na⁺ contents in *Artemisia anethifolia* organs under different concentrations of NaCl

器官 Organ	NaCl 处理浓度/NaCl concentrations (mmol/L)				
	CK	100	200	300	400
叶 Leaf	26.6±2.2	157.2±9.4	206.5±18.4	285.4±18.0	321.4±19.5
茎 Stem	9.4±0.3	76.7±5.1	130.5±5.3	191.6±10.6	242.1±15.2
根 Root	7.5±1.3	68.5±6.1	119.1±3.6	154.1±11.7	182.3±8.8

表2 不同盐处理条件下蒺藜蒿各器官 Na⁺ 总量 (μmol) 与分布比例

Table 2 Total Na⁺ content (μmol) and distribution ratio in different organs of *Artemisia anethifolia* plants under different concentrations of NaCl

器官 Organ	NaCl 处理浓度/NaCl concentrations (mmol/L)				
	CK	100	200	300	400
叶 Leaf	154.5±16.8 (88.9)	940.8±30.7 (82.8)	1019.5±43.6 (76.3)	1147.0±53.8 (75.0)	1260.9±53.6 (72.9)
茎 Stem	2.7±0.4 (1.7)	28.4±2.5 (2.5)	45.0±4.3 (3.4)	57.9±5.6 (3.8)	71.9±8.1 (4.8)
根 Root	16.6±1.0 (9.4)	167.3±16.7 (14.7)	270.4±23.9 (20.3)	323.5±21.6 (21.2)	331.1±28.9 (22.3)

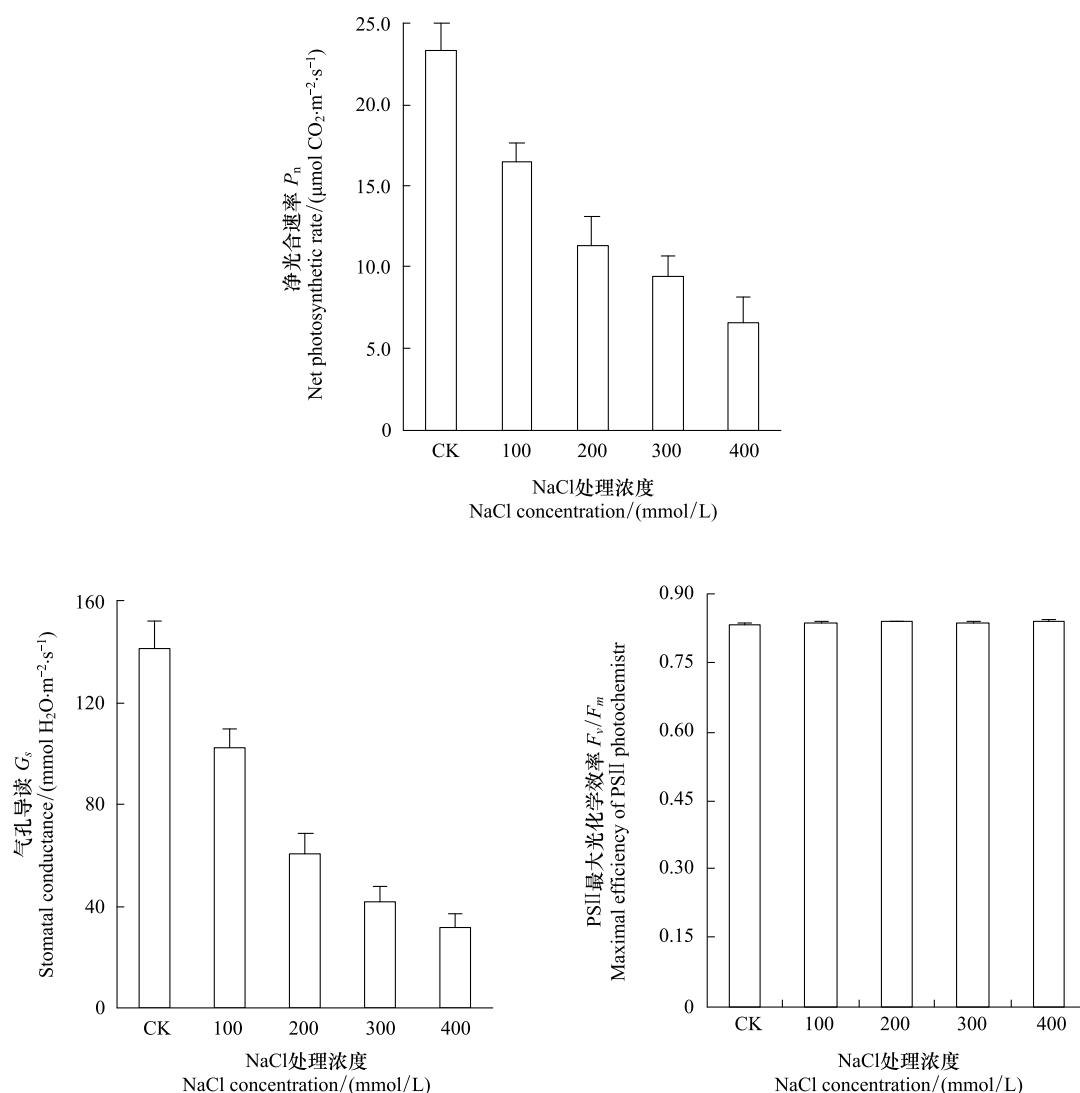


图3 盐处理对蒹蒿叶片光合功能的影响

Fig.3 Effect of salt-treatment on photosynthetic function of *Artemisia anethifolia* leaf

下,叶片均是蒹蒿 Na^+ 分布的主要器官,分布比例在 70% 以上。但随着盐浓度的升高,叶片 Na^+ 总量所占的比例逐渐降低,而根和茎中 Na^+ 总量所占的比例逐渐升高。

2.5 不同浓度盐处理条件下蒹蒿叶片质外体和原生质体 Na^+ 浓度与分布

由于叶片是蒹蒿积累 Na^+ 的主要器官,因此重点分析了叶片组织质外体和原生质体 Na^+ 浓度与分布(图 4)。随着盐处理浓度的增加,质外体和原生质体中的 Na^+ 浓度均显著上升。但无论对照还是盐处理条件下,原生质体中的 Na^+ 平均浓度均显著高于质外体,CK、100、200、300 和 400 mmol/L NaCl 条件下原生质体 Na^+ 浓度分别为质外体的 1.8、1.7、1.5、1.3 和 1.2 倍(图 4),说明叶肉细胞可以主动吸收和

积累 Na^+ ,但随着盐处理浓度的升高,原生质体中的 Na^+ 相对浓度逐渐减小。

叶片积累的 Na^+ 主要分布在原生质体中,在不同盐浓度处理下,原生质体的 Na^+ 总量均占叶片组织 Na^+ 总量的 98% 左右。CK、100、200、300 和 400 mmol/L NaCl 条件下质外体的 Na^+ 总量分别占叶片组织 Na^+ 总量 1.7%、1.8%、2.1%、2.3% 和 2.4%(图 4),从这组数据也可以看出在高盐浓度下,质外体积累 Na^+ 的数量相对增加。

2.6 不同浓度盐处理条件下蒹蒿叶片液泡膜 V-H^+ -ATPase 与 Na^+/H^+ 逆向转运活性

盐处理蒹蒿叶片的液泡膜 V-H^+ -ATPase 质子泵活性均显著大于对照,100、200、300 和 400 mmol/L NaCl 处理的 V-H^+ -ATPase 质子泵活性分别为对照

的 1.3、1.3、1.4 和 1.5 倍。但随着盐处理浓度的升高, V-H^+ -ATPase 质子泵活性的增加幅度放缓。如 200、300、400 mmol/L NaCl 条件下 V-H^+ -ATPase 质子泵活性分别为 100 mmol/L NaCl 的 1.07、1.15、1.17 倍。300—400 mmol/L NaCl 条件下, V-H^+ -ATPase 质子泵活性几乎不再增加(图 5)。

蒺藜蒿叶片的液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运活性的

特点是在对照条件下活性较低, 盐处理后活性迅速增大, 约为对照的 4—7 倍。同样, 随着盐处理浓度的升高, Na^+/H^+ 逆向转运活性的增加幅度放缓。如 200、300、400 mmol/L NaCl 条件下的 Na^+/H^+ 逆向转运活性分别为 100 mmol/L NaCl 的 1.22、1.34、1.38 倍。300—400 mmol/L NaCl 条件下, Na^+/H^+ 逆向转运活性也几乎不再增加(图 5)。

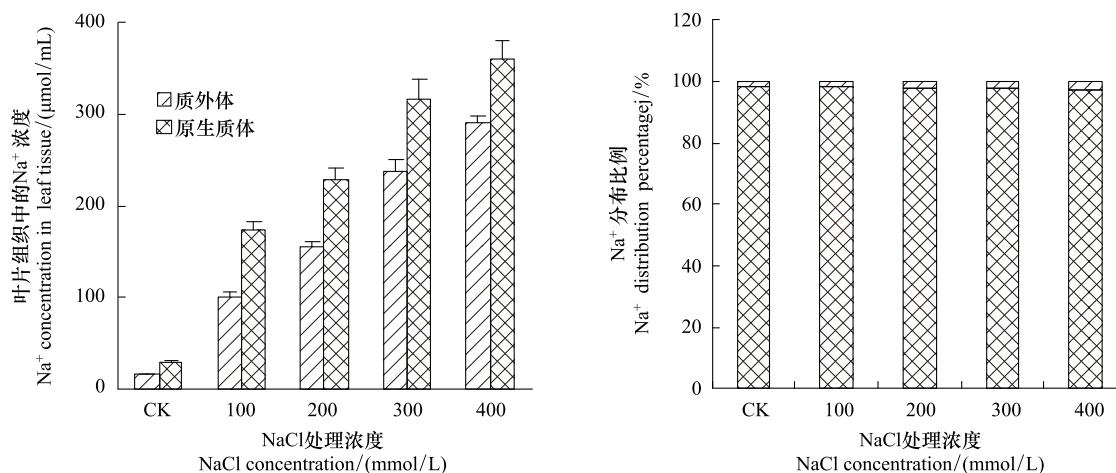


图 4 不同盐处理条件下蒺藜蒿叶片质外体和原生质体平均 Na^+ 浓度 ($\mu\text{mol/mL}$) 与分布比例

Fig.4 Na^+ concentration and distribution percentage in apoplast and protoplasts of *Artemisia anethifolia* leaf tissue under different concentrations of NaCl

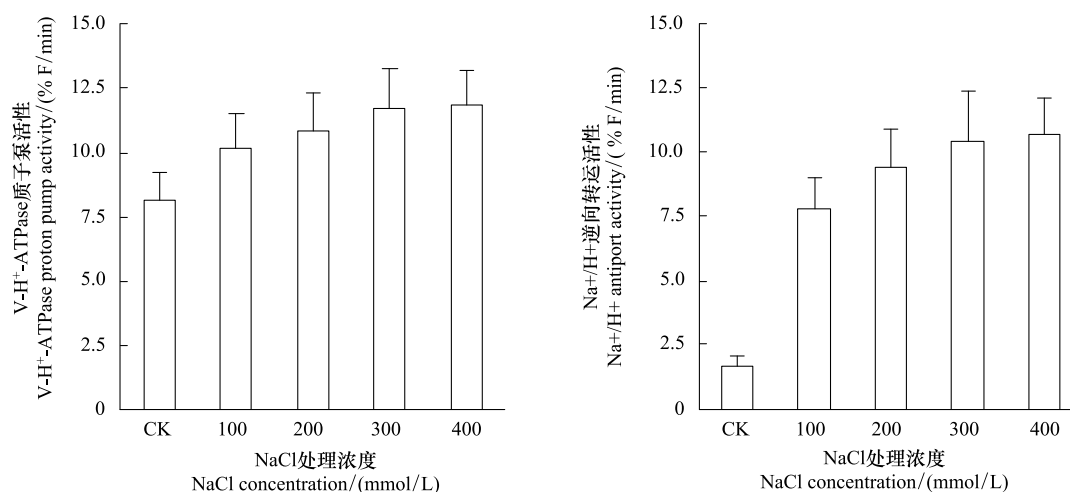


图 5 不同盐处理条件下蒺藜蒿液泡膜 V-H^+ -ATPase 质子泵活性和 Na^+/H^+ 逆向转运活性的变化

Fig.5 Changes in V-H^+ -ATPase proton pump activity and Na^+/H^+ antiporter activity of *Artemisia anethifolia* leaves under different concentrations of NaCl

3 讨论

蒺藜蒿具有较强的耐盐能力, 能够在 400 mmol/L NaCl 条件下存活并生长。但其生长量随着盐处理浓度的升高而逐渐减小(图 1), 其主要原因可能与叶

片的光合速率迅速下降有关。由于植物光合系统中所有的酶均对 Na^+ 非常敏感^[8,18], 而蒺藜蒿叶片的 PS II 光化学活性未受到高盐伤害(图 3), 叶绿素含量还显著增加(图 1), 说明蒺藜蒿能够对其光系统进行有效地保护。伴随着光合速率的下降, 蒺藜蒿

叶片的气孔导度也显著下降(图3),因此推测盐处理抑制苜蓿的净光合速率主要是由于气孔因素引起的。

盐生植物保护细胞质免受伤害的共同机制是减少 Na^+ 在细胞质中的积累,避免 Na^+ 毒害^[19-20]。避免细胞质 Na^+ 毒害的方式主要有3种:拒盐、泌盐和稀盐。苜蓿既没有把盐分阻隔在地下部,也不能通过大量吸水和快速生长稀释盐分。因此,苜蓿既不是拒盐植物,也不是喜盐植物,也没有泌盐结构,它的耐盐机制还未见报道。从本文结果可以看出,苜蓿的耐盐机制是将吸收到体内的盐分主要积累在地上部尤其是叶片中,叶片中的 Na^+ 含量占整株植物的70%以上(表2),也是 Na^+ 含量最高的器官(表1)。叶片中的盐分则97%以上 Na^+ 均积累在原生质体中(图4),由于细胞质中的酶对 Na^+ 敏感,所以细胞质中的 Na^+ 浓度一般不超过 10 mmol/L ^[5,20],因此苜蓿叶片中的 Na^+ 应该主要积累在叶片细胞的液泡中^[19,21]。苜蓿原生质体中的 Na^+ 浓度高于质外体也证明苜蓿区域化 Na^+ 的方式不是由细胞质外排到质外体,而是区域化到液泡内。

Na^+ 区域化是植物耐盐的共同机制,其中 Na^+ 在液泡中的区域化最受关注^[21]。液泡膜上两种重要的酶参与了 Na^+ 在液泡内的区域化: $\text{V-H}^+-\text{ATPase}$ 和 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白,其中 $\text{V-H}^+-\text{ATPase}$ 为 Na^+ 逆向转运建立跨液泡膜的质子能量梯度, Na^+/H^+ 逆向转运蛋白是 Na^+ 区域化到液泡的载体^[2-5]。经测定,盐处理后二者的活性协同上调(图5),说明盐处理后苜蓿增强了 Na^+ 区域化到液泡的能力,两种酶活性的增加可能是由于蛋白质的表达增加引起的^[22-23]。不过,当盐处理浓度达到 $300\text{--}400 \text{ mmol/L}$ NaCl 时,两种酶的活性均不再增加,说明此时苜蓿的 Na^+ 区域化能力已经达到了极限。在此浓度下,苜蓿的基部老叶出现明显枯萎现象,是由于盐分优先积累在老叶,保护幼叶所致。图5的结果显示苜蓿的 Na^+/H^+ 逆向转运活性均是组成性表达的,这一特征与真盐生植物类似^[24],耐盐甜土植物的 Na^+/H^+ 逆向转运活性往往是盐诱导表达的^[21]。

由于 Na^+ 是通过蒸腾流进入植物体的,苜蓿为了减少 Na^+ 的吸收所采取的方式是关闭气孔(图3),降低蒸腾。但这一方式不可避免地影响了植物光合作用的气体交换,从而抑制了自身的生长速度。降

低蒸腾是植物在盐渍渗透胁迫条件下的普遍反应。但真盐生植物如盐地碱蓬(*Suaeda salsa* Linn.)在盐渍条件下能够利用 Na^+ 降低细胞汁液渗透势^[11],且能大量吸收水分,快速生长而稀释盐分^[13]。苜蓿也能利用 Na^+ 降低细胞汁液渗透势(图2)。但其叶片含水量却随着盐处理浓度的升高而下降,这可能是苜蓿与真盐生植物的主要区别。有文献认为真盐生植物的吸水快速生长机制与盐诱导增加水孔蛋白表达有关^[25]。苜蓿叶片盐处理后含水量下降很可能是因为其缺乏诱导质膜水孔蛋白大量表达的机制。分子生物学实验证明水孔蛋白活性增加可以提高植物光合能力和生物产量^[26],因此水孔蛋白可能在真盐生植物的耐盐性及快速生长机制中具有重要作用。

总之,众多实验已经证明 Na^+ 区域化可以赋予植物耐盐性,是耐盐植物的共同特征。但是 Na^+ 区域化并不能使苜蓿避免盐抑制生长现象,并未具备类似真盐生植物适应盐渍环境而快速生长的能力。所以 Na^+/H^+ 逆向转运活性是植物适应盐渍环境的必需条件而不是充分条件。

References:

- [1] Zhao K F, Li F Z. The halophytes in China. Beijing: Science Publishing House, 1999: 289-292.
- [2] Maeshima M. Tonoplast transporters: Organization and function. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 2001, 52(1): 469-497.
- [3] Mansour M M F, Salama K H A, Al-Mutawa M M. Transport proteins and salt tolerance in plants. Plant Science, 2003, 164(6): 891-900.
- [4] Hunte C, Screpanti E, Venturi M, Rimon A, Padan E, Michel H. Structure of a Na^+/H^+ antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH. Nature, 2005, 435(7046): 1197-1202.
- [5] Sun J, Chen S L, Dai S X, Wang R G, Li N Y, Shen X, Zhou X Y, Lu C F, Zheng X J, Hu Z M, Zhang Z K, Song J, Xu Y. Ion flux profiles and plant ion homeostasis control under salt stress. Plant Signaling Behavior, 2009, 4(4): 261-264.
- [6] Ohta M, Hayashi Y, Nakashima A, Hamada A, Tanaka A, Nakamura T, Hayakawa T. Introduction of a Na^+/H^+ antiporter gene from *Atriplex gmelini* confers salt tolerance to rice. FEBS Letters, 2002, 532(3): 279-282.
- [7] Chinnusamy V, Jagendorf A, Zhu J K. Understanding and improving salt tolerance in plants. Crop Science, 2005, 45(2): 437-448.

- [8] Yang Q, Chen Z, Zhou X, Yin H, Li X, Xin X, Hong X, Zhu J K, Gong Z. Overexpression of SOS (Salt Overly Sensitive) genes increases salt tolerance in transgenic Arabidopsis. *Molecular Plant*, 2009, 2(1): 22-31.
- [9] Oh D H, Lee S Y, Bressan R A, Yun D J, Bohnert H J. Intracellular consequences of SOS1 deficiency during salt stress. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61(4): 1205-1213.
- [10] Daines R J, Gould A R. The cellular basis of salt tolerance studied with tissue cultures of the halophytic grass *Distichlis spicata*. *Journal of Plant Physiology*, 1985, 119(3): 269-280.
- [11] Qiu N W, Chen M, Guo J R, Bao H Y, Ma X L, Wang B S. Coordinate up-regulation of V-H^+ -ATPase and vacuolar Na^+/H^+ antiporter as a response to NaCl treatment in a C_3 halophyte *Suaeda salsa*. *Plant Science*, 2007, 172(6): 1218-1225.
- [12] Zhao F Y, Guo S L, Zhang H, Zhao Y X. Expression of yeast *SOD2* in transgenic rice results in increased salt tolerance. *Plant Science*, 2006, 170(2): 216-224.
- [13] Li W Q, Liu X J, Zhao K F, Liu H L. Growth, development and ions distribution of three halophytes under salt stress. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2006, 14(2): 49-52.
- [14] Zhang Q D. Several methods of determination of chlorophyll. *Chinese Bulletin of Botany*, 1985, 3(5): 60-64.
- [15] Tetlow I J, Farrar J F. Apoplastic sugar concentration and pH in barley leaves infected with brown rust. *Journal of Experimental Botany*, 1993, 44(5): 929-936.
- [16] Flowers T J, Yeo A R. Ion relations of plants under drought and salinity. *Australian Journal of Plant Physiology*, 1986, 13(1): 75-91.
- [17] Ballesteros E, Blumwald E, Donaire J P, Belver A. Na^+/H^+ antiport activity in tonoplast vesicles isolated from sunflower roots induced by NaCl stress. *Physiologia Plantarum*, 1997, 99(2): 328-334.
- [18] Zhang L R, Xing D. Rapid determination of the damage to photosynthesis caused by salt and osmotic stresses using delayed fluorescence of chloroplasts. *Photochemistry and Photobiology Science*, 2008, 7(3): 352-360.
- [19] Munns R, Tester M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59(1): 651-681.
- [20] Zhu J K. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 2003, 6(5): 441-445.
- [21] Qiu N W, Yang H B, Wang B S. The Na^+/H^+ antiporter and its relation to salt tolerance in plants. *Plant Physiology Communications*, 2001, 37(3): 260-264.
- [22] Han N, Shao Q, Lu C M, Wang B S. The leaf tonoplast V-H^+ -ATPase activity of a C_3 halophyte *Suaeda salsa* is enhanced by salt stress in a Ca-Dependent mode. *Journal of Plant Physiology*, 2005, 162(3): 267-274.
- [23] Queirós F, Fontes N, Silva P, Almeida D, Maeshima M, Gerós H, Fidalgo F. Activity of tonoplast proton pumps and Na^+/H^+ exchange in potato cell cultures is modulated by salt. *The Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(4): 1363-1374.
- [24] Hasegawa P M, Bressan R A, Zhu J K, Bohnert H J. Plant cellular molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 2000, 51(1): 463-499.
- [25] Qi C H, Chen M, Song J, Wang B S. Increase in aquaporin activity is involved in leaf succulence of the euhalophyte *Suaeda salsa* under salinity. *Plant Science*, 2009, 176(2): 200-205.
- [26] Uehlein N, Lovisolo C, Siefritz F, Kalenhoff R. The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO_2 pore with physiological functions. *Nature*, 2003, 425(6959): 734-737.

参考文献:

- [1] 赵可夫, 李法曾. 中国盐生植物. 北京: 科学出版社, 1999: 289-292.
- [13] 李伟强, 刘小京, 赵可夫, 刘海亮. NaCl 胁迫下 3 种盐生植物生长发育及离子在不同器官分布特性研究. *中国生态农业学报*, 2006, 14(2): 49-52.
- [14] 张其德. 测定叶绿素的几种方法. *植物学通报*, 1985, 3(5): 60-64.
- [21] 邱念伟, 杨洪兵, 王宝山. Na^+/H^+ 逆向转运蛋白及其与植物耐盐性的关系. *植物生理学通讯*, 2001, 37(3): 260-264.