

网络出版时间:2017-11-29 09:23

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2018.01.004

网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.s.20171129.0923.008.html

# 干旱胁迫对油松和柴松钾钙离子流的影响

王树源,王 富,唐佳琪,鲁彦君

(西北农林科技大学 林学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】比较干旱胁迫下,油松与柴松幼苗根、叶对  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  的积累规律及其根尖表皮细胞对  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  的跨膜转运模式,从  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  平衡的角度揭示 2 种松树幼苗对干旱胁迫的响应差异。【方法】以培育 5 个月的油松和柴松幼苗为试验材料,对其分别进行短期(连续 7 d 不浇水)和长期(连续 21 d 不浇水)干旱胁迫处理,以每周浇 2 次水的幼苗为对照,于干旱胁迫结束时采用原子吸收法测定 2 种松树根、叶中  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  含量,采用非损伤微测技术检测根尖离子流速;同时在干旱胁迫结束后,对油松和柴松根尖分别采用 500  $\mu\text{mol/L}$  质膜  $H^+$ -ATP 酶抑制剂原钒酸钠(sodium orthovanadate, Vanadate)预处理 50 min、采用 20 mmol/L 质膜  $K^+$  通道抑制剂氯化四乙胺(tetraethylammonium, TEA)预处理 30 min、采用 1 mmol/L 质膜  $Ca^{2+}$  通道抑制剂三氯化钆(Gadolinium chloride,  $GdCl_3$ )预处理 1 h、采用 5  $\mu\text{mol/L}$  质膜  $Ca^{2+}$ -ATP 酶抑制剂 Eosin yellow(Eosin-Y)预处理 1 h,然后检测根尖  $K^+$  流与  $Ca^{2+}$  流。【结果】与对照相比,短期干旱胁迫对 2 种松树根、叶组织中  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  含量影响不显著,但长期干旱胁迫下 2 种松树根、叶组织中  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  含量显著减少,其中油松对  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  的积累大于柴松。短期干旱胁迫诱导油松根尖  $K^+$  从对照的轻微外排转为内流,长期干旱胁迫则增强  $K^+$  外排流速;与对照相比,柴松在短期与长期干旱胁迫下  $K^+$  外排均加强;对照条件下油松  $Ca^{2+}$  内、外流基本平衡,短期胁迫下  $Ca^{2+}$  内流加强,长期胁迫下在根尖伸长区  $Ca^{2+}$  外排加强;柴松在短期与长期干旱胁迫下较对照不同程度地加强了  $Ca^{2+}$  外排;油松根尖表皮细胞的  $K^+$  和  $Ca^{2+}$  内流速度均大于柴松。TEA 显著抑制 2 种松树  $K^+$  外流,但 Vanadate 显著促进 2 种松树  $K^+$  外流,且其对柴松的影响没有油松显著;Eosin-Y 可有效抑制 2 种松树  $Ca^{2+}$  外排,但  $GdCl_3$  仅显著抑制油松  $Ca^{2+}$  内流,对柴松  $Ca^{2+}$  外流无效。【结论】油松通过较高的  $H^+$ -ATP 酶活性调控依赖去极化激活的离子通道限制  $K^+$  外流,同时通过  $Ca^{2+}$ -ATP 酶与  $Ca^{2+}$  通道调控细胞  $Ca^{2+}$  跨膜转运,在组织与根尖表皮细胞上减少  $K^+$  流失并维持  $Ca^{2+}$  平衡,因而较柴松抗旱性强。

【关键词】 油松;柴松;干旱胁迫; $K^+$  流; $Ca^{2+}$  流

【中图分类号】 S791.254.01

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2018)01-0021-09

## Effect of drought stress on potassium and calcium fluxes in *Pinus tabulaeformis* and *Pinus tabulaeformis* f. *shekanensis*

WANG Shuyuan, WANG Fu, TANG Jiaqi, LU Yanjun

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** 【Objective】The  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  accumulation in roots and leaves and their transportation across plasma membrane of root tip epidermal cells of *Pinus tabulaeformis* and *Pinus tabulaeformis* f. *shekanensis* seedlings under drought stress were comparatively investigated, which would clarify the physiological differences between the two species in  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  homeostasis perspective. 【Method】Using the seedlings of the two species watered twice per week as control, five-month seedlings were treated with short-term (no watering for 7 d) and long-term (no watering for 21 d) drought stresses.  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  contents in

【收稿日期】 2016-11-18

【基金项目】 中央高校基本科研业务费项目(2452015044);西北农林科技大学博士科研启动基金资助项目(2013BSJJ049);“十二五”农村领域国家科技支撑计划项目(2015BAD07B0203)

【作者简介】 王树源(1995—),女,甘肃西和人,主要从事植物生理研究。E-mail:2350566781@qq.com

【通信作者】 鲁彦君(1984—),女,山西忻州人,讲师,主要从事林木抗逆生理与分子生物学研究。E-mail:luyanjun032@126.com

root and leaf were measured by Atomic Absorption Spectrometry and  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  fluxes from root tip were tested by Non-invasive Micro-measurement Technique at the end of drought stress. Besides, the root tips were pretreated with 500  $\mu\text{mol/L}$  sodium orthovanadate (Vanadate) as inhibitor of PM  $H^+$ -ATPase for 50 min, 20 mmol/L tetraethylammonium (TEA) as inhibitor of  $K^+$  channel for 30 min, 1 mmol/L Gadolinium chloride ( $GdCl_3$ ) as blocker of PM  $Ca^{2+}$  channel and 5  $\mu\text{mol/L}$  Eosin yellow (Eosin-Y) as blocker of PM  $Ca^{2+}$ -ATPase for 1 hour before testing  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  fluxes. 【Result】 Compared with the control, the short-term drought stress had no effect on  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  contents in root and leaf of the two species, while the long-term stress induced the decrease of  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  contents significantly with more  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  accumulation in *P. tabulaeformis*. The short-term drought stress changed  $K^+$  in fluxes of *P. tabulaeformis* from slight  $K^+$  efflux under control, while the long-term stress enhanced  $K^+$  effluxes. Compared with the control, the  $K^+$  effluxes of *P. tabulaeformis* f. *shekanensis* were enhanced under both short-term and long-term stresses.  $Ca^{2+}$  fluxes of *P. tabulaeformis* were in balance under control, it increased under short-term stress and only increased in apical elongation zone under long-term stress.  $Ca^{2+}$  effluxes of *P. tabulaeformis* f. *shekanensis* were strengthened differently under short-term stress and long-term stress, compared with the control. Both  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  influxes of *P. tabulaeformis* were larger than that of *P. tabulaeformis* f. *shekanensis*.  $K^+$  effluxes were inhibited by TEA while strengthened by Vanadate in the two pines, and the effects were less significant in *P. tabulaeformis* f. *shekanensis* than *P. tabulaeformis*. The  $Ca^{2+}$  effluxes were inhibited by Eosin-Y in the two pines, and the  $Ca^{2+}$  in fluxes of *P. tabulaeformis* were inhibited by  $GdCl_3$ , which was not effective for *P. tabulaeformis* f. *shekanensis*. 【Conclusion】  $K^+$  efflux was restricted through depolarization-activated  $K^+$  channel activated by higher active  $H^+$ -ATPase and  $Ca^{2+}$  was transported across plasma membrane by  $Ca^{2+}$ -ATPase and  $Ca^{2+}$  channel, which reduced  $K^+$  loss and maintaining  $Ca^{2+}$  homeostasis both in cells and tissue of *P. tabulaeformis*. Therefore, *P. tabulaeformis* had higher drought-resistance than *P. tabulaeformis* f. *shekanensis*.

**Key words:** *Pinus tabulaeformis*; *Pinus tabulaeformis* f. *shekanensis*; drought stress;  $K^+$  flux;  $Ca^{2+}$  flux

干旱胁迫是世界性的非生物胁迫类型之一, 常伴随着高温、盐碱、土壤贫瘠等问题, 严重影响植物的生长发育<sup>[1]</sup>。钾( $K$ )是植物体数量次丰富的矿质营养元素, 维持细胞  $K^+$  平衡对于植物抵御各种非生物胁迫非常重要<sup>[1]</sup>。一般逆境胁迫会引起植物细胞  $K^+$  流失, 胞质“ $K^+$  库”迅速下降, 随即关闭下游耗能大的生理生化过程(如结构蛋白合成), 开启耗能相对少的防御反应(如清除活性氧、生成相应分子伴侣等); 若胁迫加剧,  $K^+$  信号将激活分解代谢酶(如类-caspase 蛋白酶、核酸内切酶等), 诱发细胞程序性死亡<sup>[2]</sup>。因此, 细胞  $K^+$  平衡被认为是逆境胁迫刺激植物产生的“调控开关”<sup>[3]</sup>。拟南芥通过保卫细胞质膜 Shaker-去极化激活的外向整流型  $K^+$  通道活性, 来调节气孔运动, 抵御干旱胁迫<sup>[4]</sup>。植物 PM  $H^+$ -ATPase 活性升高能够减少盐胁迫下植物细胞质膜的去极化程度, 从而减少  $K^+$  通过去极化激活的阳离子通道流失<sup>[5]</sup>。但是, 有关植物在干旱胁迫下根系的  $K^+$  转运模式却鲜有报道。在干旱胁迫中,  $Ca^{2+}$  同  $K^+$  一样, 也可有效调节细胞渗透势以

帮助植物吸收水分<sup>[6]</sup>; 此外, 还通过稳定细胞壁结构、激活细胞质膜 ATP 酶为阳离子进入细胞提供驱动力, 通过钙调素调控下游生理生化反应来抵御水分亏缺对植物造成的影响<sup>[7]</sup>。其中, 作为重要第二信使的  $Ca^{2+}$  可将水分亏缺信息从根传导向地上部分<sup>[8]</sup>, 如干旱胁迫诱导  $Ca^{2+}$  通过  $Ca^{2+}$  通道或非选择性阳离子通道由质外体向胞质转运, 诱导气孔关闭减少水分散失<sup>[9]</sup>。但是, 细胞  $Ca^{2+}$  浓度过高会导致蛋白质与核酸降解、沉淀或磷酸化<sup>[10]</sup>, 同时激活  $Ca^{2+}/H^+$  转运体和  $Ca^{2+}$ -ATPase 将胞质  $Ca^{2+}$  转运到细胞壁或其他细胞器, 从而维持胞质  $Ca^{2+}$  处于稳定水平<sup>[7]</sup>。在模式植物中的研究结果显示, 在 PEG 与 Mannitol 胁迫下, 抗旱型大麦品种 XZ5 积累的  $K^+$  浓度大于敏感型品种 ZJU9, 同时不同抗旱型大麦品种根、叶细胞  $Ca^{2+}$  内流明显增加, 且抗旱型品种内流更多<sup>[11]</sup>。对大豆叶肉细胞与气孔  $Ca^{2+}$ 、 $K^+$  流的测试结果也显示, 抗旱型比不抗旱型大豆品种维持  $Ca^{2+}$ 、 $K^+$  平衡的能力强<sup>[12]</sup>。但目前还缺乏干旱胁迫诱导木本植物组织  $Ca^{2+}$ 、 $K^+$  流模式以及平

衡机制的研究。

油松(*Pinus tabulaeformis* Carriere)是黄土高原水土保持、荒山绿化和用材林的主要树种,耐旱性强<sup>[13]</sup>;而柴松(*Pinus tabulaeformis* f. *shekanensis* Yao et Hsu)是新发现的分布于陕西富县大麦秸沟地区及附近的特有分类单元,面积仅 300 多  $\text{hm}^2$ , Liu 等<sup>[14-15]</sup>将其确定为油松变种,其树体高大、干形通直,单株及林分高、径、蓄积生长都高于油松,被誉为黄土高原又一珍贵优良的造林树种且具有重要的保护价值。目前对柴松的研究主要集中在分类地位、群落学特性及遗传多样性上<sup>[14,16-19]</sup>,但其抗旱生理特性研究数据缺乏。因此,本研究以 1 年生油松与柴松幼苗为试验材料,比较研究干旱胁迫对 2 种松树根和叶中  $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  积累及根系表皮细胞  $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  流模式的影响,拟从  $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  平衡的角度揭示 2 种松树幼苗对干旱胁迫的响应差异,并为柴松的培育与造林提供理论指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料培养与胁迫处理

2015 年 1 月初,将采自延安油松基地的油松(*P. tabulaeformis*)与陕西延安桥北林业局和尚塬林场大麦秸沟的柴松(*P. tabulaeformis* f. *shekanensis*)饱满种子置于育苗钵(7 cm×7 cm×5 cm)里促萌,每个育苗钵播种 5 粒种子,基质为 V(河沙):V(蛭石)=1:2。育苗在西北农林科技大学温室内进行,定期浇水以保持土壤湿度,待幼苗发芽生根后,每周浇 2 次 1/2 Hoagland 完全营养液,每营养钵每次浇 20 mL,采用自然光照,温度控制在 23~25℃,空气相对湿度 35%~45%,共培育 5 个月。选长势均一的植株分为 3 组,第 1 组每周浇 2 次水(20 mL/钵)(对照组),第 2 组从第 15 天开始不浇水(短期干旱胁迫),第 3 组从第 1 天开始不浇水(长期干旱胁迫)。参照 Gao 等<sup>[20]</sup>的方法对幼苗进行自然干燥控水处理(06-01—06-22),3 个组均在第 21 日上午 09:00 统一采样。在自然干旱胁迫处理期间,每隔 7 d 分别从 3 个组的育苗钵中各采 5 个土壤基质样品(对于第 1 组和第 2 组,每次土壤基质取样均在浇水后),测定其土壤含水量,结果显示,对照组在试验期间的平均土壤含水量为 34.17%,第 2 组和第 3 组在试验结束时的土壤含水量分别为 22.69%和 10.84%。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 根、叶组织 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 含量测定

含量测定参照 Chen 等<sup>[21]</sup>的方法,将根、叶在 80℃烘箱中烘干后过 1 mm 筛,精确称量 0.1~0.2 g 样品,用浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$ - $\text{H}_2\text{O}_2$  溶解,定容至 50 mL,再用原子吸收分光光度计(Perkin-Elmer 2280, USA)测定组织  $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  含量。

#### 1.2.2 根尖离子流测定

利用非损伤微测技术(non-invasive micro-test technique, NMT; NMT-YG-100, Younger USALLC, Amherst, MA 01002, USA)测试根尖  $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  流。

(1)测试样品准备。取 20 mm 长根段,用蒸馏水冲洗表面后在基本测试液中平衡 20 min。 $\text{K}^+$  基本测试液含 0.1 mmol/L NaCl、0.1 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ 、0.1 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  和 0.5 mmol/L KCl,用 HCl 和 NaOH 调节 pH 至 5.7;  $\text{Ca}^{2+}$  测试液含 0.1 mmol/L NaCl、0.1 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ 、0.2 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  和 0.5 mmol/L KCl,用 HCl 和 KOH 或胆碱调节 pH 至 6.0。离子选择性电极的制备与校准参照 Sun 等<sup>[22]</sup>的方法。

(2)稳态离子流测定。平衡之后,将根段浸于 10 mL 新鲜测试液中,并固定于培养皿底部,用相应的离子选择性微电极沿着根轴测量根尖区域的离子流变化。在离根冠 200~2 000  $\mu\text{m}$  处,每 200  $\mu\text{m}$  设 1 个测量点,共 9 个测量点,每个测量点实时记录离子流时间为 2~3 min,直至获得稳定的离子流速。数据为每个测定位置的离子流速平均值,样品重复 5~7 个。用 ASET 软件(ASET 2.0 Sciencewares, Falmouth, MA 02540, USA)和 iFluxes 软件(Younger USALLC, Amherst, MA 01002, USA)进行数据获取、预处理、电极三维位置控制及显微镜精细聚焦的步进控制。

#### 1.2.3 离子转运抑制剂处理下根尖离子流的测定

在短期与长期干旱胁迫后,对油松和柴松根尖分别采用 500  $\mu\text{mol/L}$  质膜  $\text{H}^+$ -ATP 酶抑制剂原钒酸钠(sodium orthovanadate, Vanadate)预处理 50 min、用 20 mmol/L 质膜  $\text{K}^+$  通道抑制剂氯化四乙胺(tetraethylammonium, TEA)预处理 30 min、用 1 mmol/L 质膜  $\text{Ca}^{2+}$  通道抑制剂三氯化钆(Gadolinium chloride,  $\text{GdCl}_3$ )预处理 1 h、用 5  $\mu\text{mol/L}$  质膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶抑制剂(Eosin-Y)预处理 1 h,之后检测  $\text{K}^+$  流与  $\text{Ca}^{2+}$  流。

### 1.3 数据分析

采用北京旭月公司提供的 MageFlux 软件(<http://xuyue.net/mageflux>)计算离子流的测试数据,其中正值表示阳离子外流,负值表示阳离子内

流,本试验最终测得的离子流速是净离子流速,即内流与外流之和。

试验数据分析采用 SPSS 13.0 统计软件处理,用单因素方差分析(one-way-ANOVA)方法检验不同处理下各指标的差异显著性,用 Duncan’s 法进行差异显著性( $P<0.05$ )多重比较,用 Origin 9 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 干旱胁迫对油松与柴松根、叶组织  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  积累的影响

加强对  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  的吸收、积累与转运能力,被认为是植物抵抗干旱胁迫的有效策略之一<sup>[6]</sup>。表 1

表 1 干旱胁迫对油松与柴松根、叶组织中  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  含量的影响

Table 1 Effect of drought stress on concentrations of  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  in root and leaf tissues of *Pinus tabulaeformis* and *Pinus tabulaeformis* f. *shekanensis*

| 处理<br>Treatment                        | 树种<br>Species                                       | $K^+$ 含量/(mmol·g <sup>-1</sup> )<br>Potassium concentration |               | $Ca^{2+}$ 含量/(mmol·g <sup>-1</sup> )<br>Calcium concentration |               |
|----------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------|---------------------------------------------------------------|---------------|
|                                        |                                                     | 根 Root                                                      | 叶 Leaf        | 根 Root                                                        | 叶 Leaf        |
| 对照(CK)<br>Control                      | 柴松<br><i>P. tabulaeformis</i> f. <i>shekanensis</i> | 0.49±0.009 aA                                               | 0.41±0.022 aA | 0.37±0.025 aA                                                 | 0.31±0.025 aA |
|                                        | 油松<br><i>P. tabulaeformis</i>                       | 0.49±0.021 aA                                               | 0.43±0.019 aA | 0.31±0.016 aB                                                 | 0.33±0.025 aA |
| 短期干旱胁迫<br>Short-term<br>drought stress | 柴松<br><i>P. tabulaeformis</i> f. <i>shekanensis</i> | 0.45±0.028 aA                                               | 0.39±0.032 aA | 0.34±0.027 aA                                                 | 0.30±0.023 aA |
|                                        | 油松<br><i>P. tabulaeformis</i>                       | 0.49±0.022 aA                                               | 0.39±0.020 aA | 0.31±0.019 aA                                                 | 0.30±0.018 aA |
| 长期干旱胁迫<br>Long-term<br>drought stress  | 柴松<br><i>P. tabulaeformis</i> f. <i>shekanensis</i> | 0.28±0.011 bB                                               | 0.18±0.017 bA | 0.14±0.025 bB                                                 | 0.16±0.024 bB |
|                                        | 油松<br><i>P. tabulaeformis</i>                       | 0.35±0.021 bA                                               | 0.20±0.022 bA | 0.22±0.022 bA                                                 | 0.23±0.019 bA |

注:同列数据后标不同小写字母表示同种幼苗不同处理间差异显著( $P<0.05$ ),标不同大写字母表示不同种幼苗在相同处理中差异显著( $P<0.05$ )。

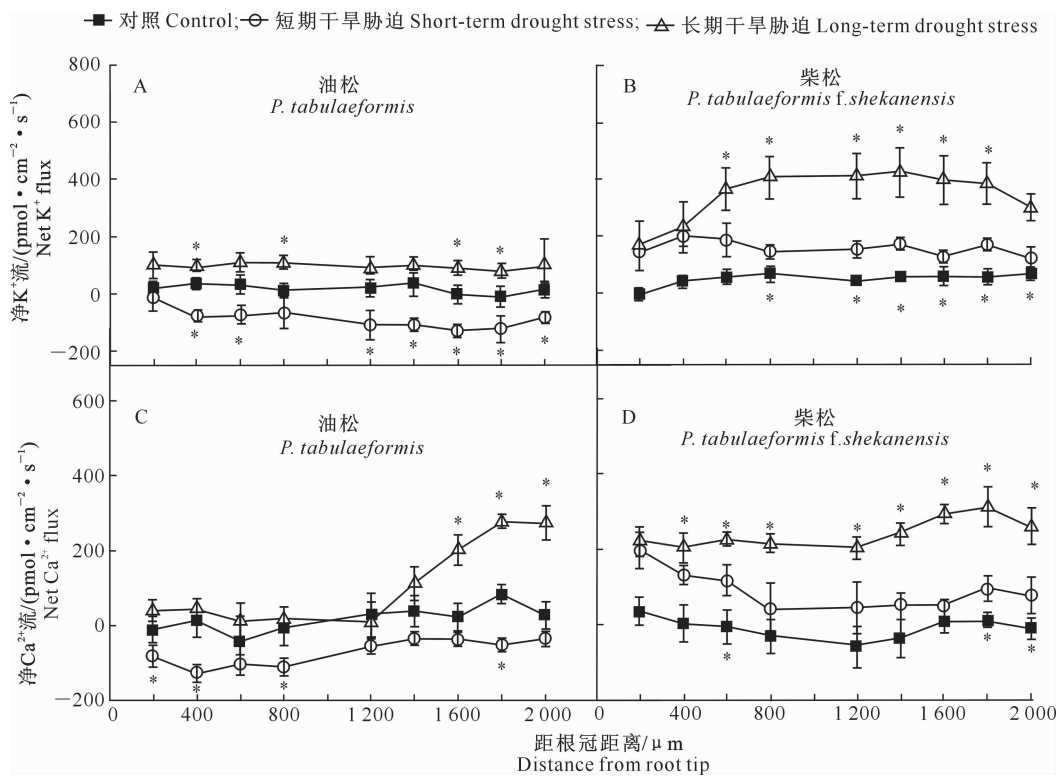
Note: Lowercase letters in each column represent significant difference among treatments ( $P<0.05$ ), while capital letters represent significant difference among species in same treatment ( $P<0.05$ ).

2.2 干旱胁迫对油松与柴松根尖  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  流的影响

维持胞质足够的  $K^+$  浓度对植物抵抗干旱胁迫很重要<sup>[23]</sup>。采用非损伤微测技术检测 2 种松树根尖表皮细胞的  $K^+$  流速,结果(图 1)显示,在对照条件下,油松根尖的平均流速为 17.18 pmol/(cm<sup>2</sup>·s);短期干旱胁迫诱导  $K^+$  从对照的轻微外排转为内流,平均流速是对照的 5.01 倍(图 1-A);长期干旱胁迫则增强  $K^+$  外排流速,尤其在距离根冠 400, 800, 1 600 与 1 800 μm 处显著增加,总平均流速是对照的 5.59 倍(图 1-A)。柴松在对照条件下,  $K^+$  总平均流速为 50.67 pmol/(cm<sup>2</sup>·s),短期与长期干旱胁迫下,  $K^+$  外排均加强,分别是对照的 3.13 与 6.78 倍(图 1-B)。可见,无论在短期还是长期干旱

显示,在未进行干旱胁迫处理的对照条件下,油松与柴松根、叶组织中的  $K^+$  含量和叶中  $Ca^{2+}$  含量无显著差异;短期干旱胁迫处理对 2 种松树根、叶组织的  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  含量影响不显著;但是经过长期干旱胁迫处理后,2 种松树根、叶组织的  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  含量较对照和短期干旱胁迫处理显著减少,且柴松减少幅度较油松更大,油松根、叶中  $K^+$  含量为对照的 71.4%和 45.8%,柴松为对照的 57.1%和 42.2%;油松根、叶中  $Ca^{2+}$  含量为对照的 71.0%和 69.7%,柴松为对照的 37.8%和 51.6%。上述结果表明,在长时间干旱胁迫下,油松对  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  的积累能力明显大于柴松,尤其是根。

胁迫下,油松的  $K^+$  内流程度始终大于柴松。  
干旱胁迫对 2 种松树  $Ca^{2+}$  流的影响也不同(图 1-C,D),在对照条件下,油松  $Ca^{2+}$  内、外流基本平衡,总平均流速为 17.65 pmol/(cm<sup>2</sup>·s);在短期干旱胁迫下,  $Ca^{2+}$  内流加强,在距离根尖 200~400, 800 和 1 800 μm 处与对照差异显著,总平均流速为 -70.43 pmol/(cm<sup>2</sup>·s);在长期干旱胁迫下,根尖伸长区(距离根冠 1 600~2 000 μm 处)显示强烈  $Ca^{2+}$  外排,平均流速是对照的 4.98 倍(图 1-C)。柴松在对照条件下,总平均流速为 -9.82 pmol/(cm<sup>2</sup>·s),短期与长期干旱胁迫不同程度地加强了  $Ca^{2+}$  外排,总平均流速分别是对照的 9.09 倍与 24.52 倍(图 1-D)。因此,短期与长期干旱胁迫对柴松根尖  $Ca^{2+}$  外排的诱导均显著大于油松。



\* 表示处理与对照间差异显著 ( $P < 0.05$ )。图 2 与 3 同

\* represents significant difference between treatments and the control ( $P < 0.05$ ). The same for Fig. 2 and Fig. 3

图 1 短期与长期干旱胁迫对油松和柴松根尖 K<sup>+</sup> 流与 Ca<sup>2+</sup> 流的影响

Fig. 1 Effect of short-term and long-term drought stresses on K<sup>+</sup> fluxes and Ca<sup>2+</sup> fluxes of

*Pinus tabulaeformis* and *Pinus tabulaeformis* f. *shekanensis*

### 2.3 离子转运抑制剂对干旱胁迫诱导的 2 种松树根尖 K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup> 流的作用

离子转运抑制剂处理试验可间接揭示干旱胁迫引起的 K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup> 跨膜转运机制<sup>[24]</sup>。图 2 显示, TEA 可有效抑制干旱胁迫诱导的 2 种松树 K<sup>+</sup> 的外排, 抑制作用在分生区(距离根冠 200~600 μm)与伸长区(距离根冠 600~1 400 μm)与对照相比均差异显著, 对油松的平均抑制程度达 96.22%(长期干旱胁迫), 对柴松的平均抑制程度达 65.73%(短期干旱胁迫)和 44.28%(长期干旱胁迫)。短期干旱胁迫下, 油松显示 K<sup>+</sup> 内流, 平均流速为 -87.32 pmol/(cm<sup>2</sup> · s), TEA 处理并未显著改变 K<sup>+</sup> 流速 (-109.14 pmol/(cm<sup>2</sup> · s))(图 2-A)。

Vanadate 可加强 2 种松树在短期与长期干旱胁迫下的 K<sup>+</sup> 外排流速(图 2), 说明 K<sup>+</sup> 外排可能是由去极化激活的 K<sup>+</sup> 通道(DA-KORCs)或非选择性阳离子通道(DA-NSCCs)介导<sup>[25]</sup>, 而外向 K<sup>+</sup> 通道活性受 H<sup>+</sup>-ATP 酶活性调控。采用同样剂量的 Vanadate 处理使油松根尖 K<sup>+</sup> 外排幅度大于柴松, 其中油松外排幅度是对照的 179.61%(短期干旱胁迫)

图 2-A)和 256.82%(长期干旱胁迫, 图 2-B), 柴松外排幅度是对照的 51.03%(短期干旱胁迫, 图 2-C)和 19.48%(长期干旱胁迫, 图 2-D), 由此推测, 干旱胁迫诱导的油松根尖表皮细胞质膜 H<sup>+</sup>-ATP 酶活性大于柴松。

质膜 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶的作用是将胞质钙转运到内膜系统与质外体, 终止钙信号来维持 Ca<sup>2+</sup> 平衡<sup>[26]</sup>, 这一过程与多种逆境胁迫密切相关<sup>[27]</sup>。如图 3 所示, 对于油松, Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶抑制剂(Eosin-Y)对短期干旱胁迫诱导的 Ca<sup>2+</sup> 内流影响不显著(图 3-A), 对长期干旱胁迫诱导的 Ca<sup>2+</sup> 外排有抑制作用(距离根冠 1 400~2 000 μm), 抑制程度是对照的 16.43%(图 3-B); 对于柴松, Eosin-Y 有效抑制了干旱胁迫诱导的 Ca<sup>2+</sup> 外排, Eosin-Y 处理后的 Ca<sup>2+</sup> 外排流速为对照的 21.2%(短期干旱胁迫, 图 3-C)与 73.89%(长期干旱胁迫, 图 3-D); 说明干旱胁迫激活了 2 种松树质膜的 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶, 引起胞质 Ca<sup>2+</sup> 向质外体转运。此外, 质膜 Ca<sup>2+</sup> 通道抑制剂 GdCl<sub>3</sub> 可以促进长期干旱胁迫诱导的油松根尖 Ca<sup>2+</sup> 外排, 并逆转短期干旱胁迫诱导的 Ca<sup>2+</sup> 内流(距离根冠 200~800

$\mu\text{m}$ ),但  $\text{GdCl}_3$  对干旱胁迫诱导柴松的  $\text{Ca}^{2+}$  流影响 并不显著。

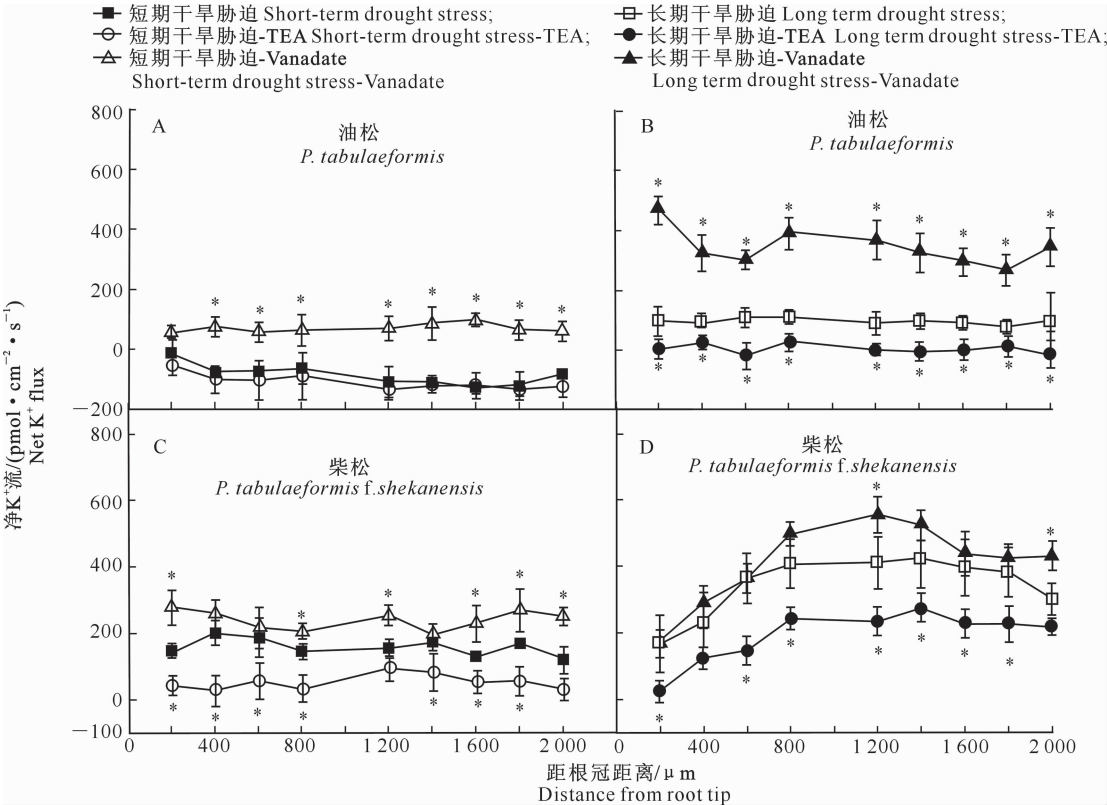


图 2 氯化四乙胺与原钒酸钠对短期与长期干旱胁迫下油松和柴松根尖  $\text{K}^+$  流的影响

Fig. 2 Effect of TEA and Sodium orthovanadium on  $\text{K}^+$  fluxes of *Pinus tabulaeformis* and *Pinus tabulaeformis* f. *shekanensis* in short-term and long-term drought stresses

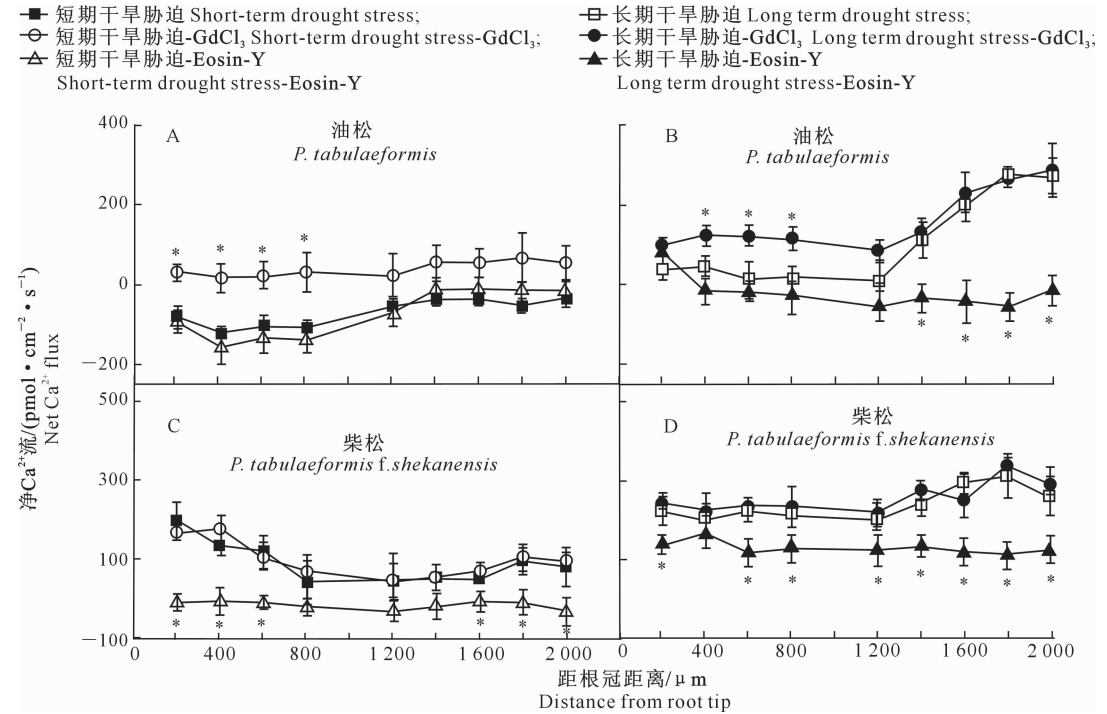


图 3 氯化钆与 Eosin yellow 对短期与长期干旱胁迫下油松和柴松根尖  $\text{Ca}^{2+}$  流的影响

Fig. 3 Effect of Gadolinium chloride and Eosin yellow on  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes of *Pinus tabulaeformis* and *Pinus tabulaeformis* f. *shekanensis* in short-term and long-term drought stresses

### 3 讨论

本试验结果显示,2种松树根、叶组织  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  含量在长期干旱胁迫下有不同程度下降,但柴松下降幅明显大于油松,尤其是根。水分亏缺会引起植物各器官  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  浓度下降并限制木质部与韧皮部的  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  运输,影响光合、呼吸与各种酶活性的代谢过程<sup>[6]</sup>,随着胁迫程度加剧,植物需积累更多  $K^+$  以维持光合作用,避免引起叶绿体的氧化损伤<sup>[28]</sup>。由此分析,油松根、叶对  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  的高积累有助于其更好地抵御干旱胁迫。

植物组织离子积累能力依赖于根系对离子的吸收与转运,干旱胁迫一方面限制土壤  $K^+$  向根系转移,降低根系对  $K^+$  的吸收,另一方面还影响水分吸收<sup>[13,24]</sup>。本试验结果显示,长期干旱胁迫诱导2种松树  $K^+$  明显外排(尤其是柴松),且  $K^+$  外排可被 TEA 抑制,但可被原钒酸钠加强。由此可见,2种松树在干旱胁迫下对  $K^+$  的吸收能力降低(柴松降低程度更大),可能造成了其组织  $K^+$  积累的降低;并且推测  $K^+$  外排由外向整流型  $K^+$  通道和非选择性阳离子通道介导,且由  $H^+$ -ATPase 调控。一般逆境胁迫容易引起根尖表皮细胞质膜去极化,增强依赖去极化激活的质膜外向整流型  $K^+$  通道和非选择性阳离子通道活性介导  $K^+$  外排<sup>[25]</sup>,但  $H^+$ -ATPase 活性的提高有助于恢复膜电位<sup>[22,24]</sup>,降低外向  $K^+$  通道与非选择性阳离子通道(KORCs 或 NSCCs)的活性,从而减少  $K^+$  外流<sup>[29]</sup>。由于油松质膜  $H^+$ -ATP 酶活性大于柴松,故依赖于去极化激活的外向  $K^+$  通道活性小于柴松,从而限制  $K^+$  外流,故柴松  $K^+$  外流大于油松。 $K^+$  持续外排可激活分解代谢酶(如类-caspase 蛋白酶、核酸内切酶等),最终诱发细胞程序性死亡<sup>[24,29]</sup>,因此维持一定的细胞  $K^+$  浓度对于植物抵御干旱胁迫非常重要<sup>[26]</sup>。但值得注意的是,短期干旱胁迫下,油松  $K^+$  显著内流,但柴松却显示  $K^+$  轻微外流。草本植物大麦在 PEG 与 Mannitol 胁迫下,抗旱型品种 Z25、ZJU9 的根尖  $K^+$  内流大于水分敏感型品种 Tamor,推测干旱胁迫可激活内向整流型  $K^+$  通道(KIR)与 HAK/KUP/KT 转运蛋白活性,并限制质膜外向整流型  $K^+$  通道(KOR)活性,从而引起  $K^+$  内流<sup>[11]</sup>。植物在渗透胁迫下通常先积累  $K^+$ (耗能较小)调节渗透势维持细胞膨压,之后才合成有机渗透物质(耗能较大)进行渗透调节<sup>[26]</sup>。由此说明油松在短期干旱胁迫下可通过根尖吸收  $K^+$  进行渗透调节,而柴松在短期干

旱胁迫下却开始损失少部分  $K^+$ ,表明其抗旱性不及油松。

$Ca^{2+}$  是植物体内最普遍的胁迫信使,本试验结果显示,长期干旱胁迫诱导2种松树根尖  $Ca^{2+}$  外排,且柴松外排趋势大于油松。Mak 等<sup>[12]</sup>监测抗旱型与水分亏缺敏感型大豆叶肉细胞  $Ca^{2+}$  流发现,敏感型大豆  $Ca^{2+}$  外排强烈;Feng 等<sup>[11]</sup>也发现,敏感型大麦根系  $Ca^{2+}$  外排明显大于抗旱型大麦,均与本试验结果相似。 $Ca^{2+}$  的大量外排不利于钙信号转导,影响植物对逆境的正常响应<sup>[11]</sup>。本试验中,油松在短期干旱胁迫下呈现显著  $Ca^{2+}$  内流,推测干旱胁迫迅速诱导油松产生钙信号,可有效对下游信号与生理响应过程进行调控。但植物细胞钙浓度持续升高对植物正常细胞也有害,一般钙信号产生后,植物细胞将迅速通过膜  $Ca^{2+}$ -ATP 酶以及  $Ca^{2+}/H^+$  转运体将细胞内多余的  $Ca^{2+}$  转移向质外体或内膜系统,以维持胞质  $Ca^{2+}$  平衡<sup>[26-27]</sup>。本试验结果还显示, $Ca^{2+}$ -ATP 酶抑制剂 Eosin-Y 可有效抑制2种松树的  $Ca^{2+}$  外排,但对短期干旱胁迫下油松的  $Ca^{2+}$  内流影响不明显,而质膜  $Ca^{2+}$  通道抑制剂  $GdCl_3$  可以促进长期干旱胁迫诱导的油松根尖  $Ca^{2+}$  外排,并逆转短期干旱胁迫诱导的  $Ca^{2+}$  内流,但对柴松的  $Ca^{2+}$  外流影响并不显著,说明短期干旱胁迫诱导油松  $Ca^{2+}$  内流由  $Ca^{2+}$  通道介导,而长期干旱胁迫诱导2种松树的  $Ca^{2+}$  外排是由  $Ca^{2+}$ -ATP 酶被激活引起的。柴松  $Ca^{2+}$  转运系统在调节胞内  $Ca^{2+}$  浓度时与油松存在一定差异,持续的  $Ca^{2+}$  外排不利于柴松响应干旱胁迫,柴松在短期与长期干旱胁迫下显示持续  $Ca^{2+}$  外排,一方面是由  $Ca^{2+}$ -ATP 酶活性增强引起,另一方面还可能启动了其他  $Ca^{2+}$  转运系统,这有待深入探讨。

综上,相较柴松,油松在响应干旱胁迫时诱导了较强的质膜  $H^+$ -ATP 酶活性,恢复膜电位来降低依赖去极化激活的外向  $K^+$  通道与非选择性阳离子通道活性,减少  $K^+$  损失;同时激活质膜  $Ca^{2+}$  通道介导  $Ca^{2+}$  内流产生钙信号响应干旱胁迫,并通过质膜  $Ca^{2+}$ -ATP 酶将过量胞质  $Ca^{2+}$  向外转运以维持细胞  $Ca^{2+}$  平衡。降低细胞  $K^+$  损失并建立细胞  $Ca^{2+}$  平衡可能促进油松根、叶组织  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  积累,促进渗透调节以及其他代谢过程,因而油松比柴松具有更强的抗旱性。柴松虽生长于黄土高原,但其集中分布区(陕西省富县大麦桔沟地区以及附近的松树沟、大南沟)水分条件良好,为柴松幼苗的生长发育提供了适宜的更新条件,因此柴松在水分亏缺状态下显示



了较弱的离子积累能力与  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  平衡能力。

## [参考文献]

- [1] Wilkinson S, Davies W J. Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community [J]. *Plant Cell and Environment*, 2009, 33(4): 510-525.
- [2] Anschütz U, Becker D, Shabala S. Going beyond nutrition: regulation of potassium homeostasis as a common denominator of plant adaptive responses to environment [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2014, 171(9): 670-687.
- [3] Shabala S, Pottosin I. Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: implications for abiotic and biotic stress tolerance [J]. *Physiologia Plantarum*, 2014, 151(3): 257-279.
- [4] Hosy E, Vavasseur A, Mouline K, et al. The *Arabidopsis* outward  $K^+$  channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(9): 5549-5554.
- [5] Chen Z, Pottosin I I, Cuin T A, et al. Root plasma membrane transporters controlling  $K^+/Na^+$  homeostasis in salt stressed barley [J]. *Plant Physiology*, 2007, 145(4): 1714-1725.
- [6] Kusvuran S. Influence of drought stress on growth, ion accumulation and antioxidative enzymes in Okra genotypes [J]. *International Journal of Biochemistry*, 2012, 14(3): 401-406.
- [7] Bose J, Pottosin I I, Shabala S S, et al. Calcium efflux systems in stress signaling and adaptation in plants [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2011, 2(12): 85.
- [8] Schachtman D P, Goodger J Q D. Chemical root to shoot signaling under drought [J]. *Trends in Plant Science*, 2008, 13(6): 281-287.
- [9] Blatt M R. Cellular signaling and volume control in stomatal movements in plants [J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2000, 16(4): 221-241.
- [10] Case R M, Eisner D, Gurney A, et al. Evolution of calcium homeostasis: from birth of the first cell to an omnipresent signalling system [J]. *Cell Calcium*, 2007, 42(4/5): 345-350.
- [11] Feng X, Liu W, Zeng F, et al.  $K^+$  uptake,  $H^+$ -atpase pumping activity and  $Ca^{2+}$  efflux mechanism are involved in drought tolerance of barley [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2015, 129: 57-66.
- [12] Mak M, Babla M, Xu S C, et al. Leaf mesophyll  $K^+$ ,  $H^+$ , and  $Ca^{2+}$  fluxes are involved in drought-induced decrease in photosynthesis and stomatal closure in soybean [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2014, 98(98): 1-12.
- [13] 王凯, 郭晶晶, 刘爽, 等. 樟子松和油松根叶对春季干旱胁迫的响应 [J]. *生态学杂志*, 2015, 34(11): 3132-3138.  
Wang K, Guo J J, Liu S, et al. Responses of roots and needles of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* and *Pinus tabulaeformis* to spring drought stress [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2015, 34(11): 3132-3138.
- [14] Liu Z H, Xie Q, Li Z Q. Genetic diversity and taxonomic status of *Pinus tabulaeformis* f. *shekanensis* revealed by ISSR markers [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(1): 1034-1043.
- [15] 刘志红. 基于分子标记与微形态的柴松分类地位研究 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2014.  
Liu Z H. A taxonomic study on *Pinus tabulaeformis* f. *shekanensis* using molecular markers and micromorphological traits [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2014.
- [16] 李龙. 柴松与油松形态解剖学和细胞学比较研究 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2013.  
Li L. Comparison in morphology anatomy and karyotype between *Pinus tabulaeformis* f. *shekanensis* and *P. abulaeformis* [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2013.
- [17] 刘政鸿. 黄土高原天然柴松林群落学特性的初步研究 [J]. *西北植物学报*, 2003, 23(9): 1486-1490.  
Liu Z H. A preliminary study on community characteristics of *Pinus tabulaeformis* f. *shekanensis* on Loess Plateau [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2003, 23(9): 1486-1490.
- [18] 韦兰英, 上官周平. 黄土高原子午岭天然柴松林细根垂直分布特征 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2005, 35(7): 69-74.  
Wei L Y, Shangguan Z P. Vertical distribution of the fine root of the natural *Pinus tabulaeformis* f. *shekanensis* forest in Ziwuling Loess Plateau [J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2005, 35(7): 69-74.
- [19] 解庆, 刘志红, 李周岐. 柴松遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. *西北林学院学报*, 2011, 26(4): 112-116.  
Xie Q, Liu Z H, Li Z Q, et al. Analysis of genetic diversity of *Pinus tabulaeformis* f. *shekanensis* by RAPD [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2011, 26(4): 112-116.
- [20] Gao D, Qian G, Xu H Y, et al. Physiological responses to gradual drought stress in the diploid hybrid *Pinus densata* and its two parental species [J]. *Trees-structure and Function*, 2009, 23(4): 717-728.
- [21] Chen S, Li J, Wang S, et al. Salt, nutrient uptake and transport, and ABA of *Populus euphratica* hybrid in response to increasing soil NaCl [J]. *Trees-structure and Function*, 2001, 15(3): 186-194.
- [22] Sun J, Wang M J, Ding M Q, et al.  $H_2O_2$  and cytosolic  $Ca^{2+}$  signals triggered by the PM  $H^+$ -coupled transport system mediate  $K^+/Na^+$  homeostasis in NaCl-stressed *Populus euphratica* [J]. *Plant Cell and Environment*, 2010, 33(6): 943-958.
- [23] Demidchik V, Cuin T D, Smith S J, et al. *Arabidopsis* root  $K^+$ -efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death [J]. *Journal of Cell Science*, 2010, 123(9): 1468-1479.
- [24] Sun J, Dai S, Wang R, et al. Calcium mediates root  $K^+/Na^+$  homeostasis in poplar species differing in salt tolerance [J]. *Tree Physiol*, 2009, 29(9): 1175-1186.



[25]

Shabala S,Shabala L, Van V E, et al. Effect of divalent cations on ion fluxes and leaf photochemistry in salinized barley leaves [J]. Journal of Experimental Botany, 2005, 56 (415): 1369-1378.

[26]

Yu Y, Li X, Sun J, et al. Heat shock responses in *Populus euphratica*, cell cultures; important role of crosstalk among hydrogen peroxide, calcium and potassium [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2016, 125(2): 1-16.

[27]

Huda K M K, Banu M S A, Garg B, et al. OsACA6, a P-type IIB  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase promotes salinity and drought stress toler-

ance in tobacco by ROS scavenging and enhancing the expres-

sion of stress-responsive genes [J]. The Plant Journal, 2013,

76(6):997-1015.

[28]

Cakmak I. The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants [J]. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 2005, 168(4): 521-530.

[29]

Cuin T A, Shabala S. Amino acids regulate salinity-induced po-

tassium efflux in barley root epidermis [J]. Planta, 2007, 225

(3): 753-761.

(上接第 20 页)

[16]

刘保光,刘建华,吴 华,等.舒巴坦钠和 EDTA 使产 ESBLs 鸡大肠杆菌恢复对抗菌药物敏感性 [J]. 湖南农业大学学报 (自然科学版), 2010, 32(2): 242-248.

Liu B G, Liu J H, Wu H, et al. Recovery of antibacterial sensi-

tivity of ESBLs-producing fowl *E. coli* by sulbactam and ED-

TA [J]. Journal of Hunan Agricultural University (Nat Sci),

2010, 32(2): 242-248.

[17]

Yuan L, Liu J H, Hu G Z, et al. Molecular characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* i-

solates from chickens in Henan Province, China [J]. Journal

of Medical Microbiology, 2009, 58(11): 1449-1453.

[18]

Paterson D L, Bonomo R A. Extended-spectrum beta-lactama-

ses: a clinical update [J]. Clinical Microbiology Reviews,

2005, 18(4): 657-686.

[19]

Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Laesripa C, et al. Molecular

characterization and epidemiology of extended-spectrum- $\beta$ -lac-

tamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*

isolates causing health care-associated infection in Thailand,

where the CTX-M family is endemic [J]. Antimicrobial A-

gents and Chemotherapy, 2008, 52(8): 2818-2824.

[20]

Ahmed A M, Shimabukuro H, Shimamoto T. Isolation and mo-

lecular characterization of multidrug-resistant strains of *Esch-*

*erichia coli* and *Salmonella* from retail chicken meat in Japan

[J]. Journal of Food Science, 2009, 74(7): 405-410.

[21]

苑 丽,刘建华,胡功政,等.鸡大肠杆菌 TEM 和 CTX-M 型

超广谱  $\beta$ -内酰胺酶基因分型研究 [J]. 中国农业科学, 2010,

43(20): 4310-4316.

Yuan L, Liu J H, Hu G Z, et al. Genotypes of TEM-type and

CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases produced by

*Escherichia coli* isolated from the fowl [J]. Scientia Agricul-

tura Sinica, 2010, 43(20): 4310-4316.

[22]

Zhao W H, Hu Z Q. Epidemiology and genetics of CTX-M ex-

tended-spectrum  $\beta$ -lactamases in gram-negative bacteria [J].

Critical Reviews in Microbiology, 2013, 39(1): 79-101.

[23]

Lahlaur H, Ben Haj Khalifa A, Ben Moussa M. Epidemiology

of enterobacteriaceae producing CTX-M type extended spec-

trum  $\beta$ -lactamase(ESBLs) [J]. Medecine et Maladies Infec-

tieuses, 2014, 44(9): 400-404.

[24]

苑 丽,莫 娟,胡功政,等.49 株鸡大肠杆菌 OXA 型  $\beta$ -内酰

胺酶的检测 [J]. 江西农业学报, 2009, 21(8): 1-3.

Yuan L, Mo J, Hu G Z, et al. Detection of OXA-type  $\beta$ -lacta-

mases among 49 strains of *Escherichia coli* isolated from

chickens [J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2009, 21(8): 1-3.