

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2020.04.010

刺槐幼苗对 NaCl 胁迫的生理生化响应

甘红豪, 赵 帅, 杨泽坤, 褚建民*

(国家林业和草原局滨海林业研究中心, 中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业和草原局林木培育重点实验室, 林木遗传育种国家重点实验室, 北京 100091)

摘要: [目的] 研究刺槐幼苗对不同浓度 NaCl 的生理生化响应, 为建立刺槐抗逆性生态生理指标体系提供理论依据。[方法] 以 1 年生刺槐幼苗为材料, 施加不同浓度 NaCl (0、50、100 mmol·L⁻¹), 分析其生长、生理及水通道蛋白和 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因转录表达变化特征。[结果] 在 NaCl 胁迫下, 刺槐生长被抑制, 叶片相对含水量、光合色素含量、光合作用参数降低, 水分利用效率和气孔限制值升高; 根和叶中 MDA 含量、抗氧化酶 (CAT、APX 和 GR) 活性及渗透调节物质 (游离脯氨酸、氨基酸和可溶性蛋白质) 含量升高; NaCl 胁迫改变了刺槐体内 Na⁺、K⁺、Mg²⁺ 的离子平衡状态, 但是对 Ca²⁺ 的含量影响不显著。NaCl 胁迫诱导了刺槐根中水通道蛋白基因 (*TIP1;1*、*PIP1;1* 和 *PIP2;1*)、叶中水通道蛋白基因 (*TIP1;1* 和 *PIP1;1*) 及根和叶中 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因 *NHX1* 的转录表达。[结论] 刺槐通过增加叶片水分利用效率、合成并积累抗氧化酶和渗透调节物质及诱导相关基因转录表达, 增强了盐适应能力。

关键词: 刺槐; 胁迫; 生理代谢; 离子状态; 水通道蛋白

中图分类号: S432.2; S687.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2020)04-0075-08

土壤中过量的盐分会抑制植物光合作用、诱导产生氧化胁迫、渗透胁迫及离子胁迫等, 阻碍植物的正常生长发育进程^[1-2]。植物通过合成积累游离脯氨酸、氨基酸和可溶性蛋白质等渗透调节物质, 并诱导增强植物体内抗氧化酶如过氧化氢酶 (CAT)、抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 和谷胱甘肽还原酶 (GR) 等的活性, 从而增强了植物的耐盐能力^[3-4]。

水分是植物在盐胁迫下维持正常生长的重要条件。液泡膜内在蛋白 (TIPs) 和质膜内在蛋白 (PIPs) 作为植物水通道蛋白 (AQPs) 家族的重要成员^[5], 通过调节植物水分运输, 影响植物逆境应答, 促进盐胁迫下植物生长发育^[4]。盐胁迫下, 转 *TsTIP1;1* 及 *TsPIP1;1* 基因水稻 (*Oryza sativa* L.) 的光合能力显著增强、细胞持水能力明显提高^[5]; 过表达 *PIP2;1* 增强了拟南芥 (*Arabidopsis*

thaliana (L.) Heynh.) 细胞的持水能力^[6]。位于液泡膜上的 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白 NHX1 参与调控植物液泡渗透势, 可以把细胞质内过量的 Na⁺ 隔离到液泡内, 减轻了拟南芥受到的盐胁迫, 从而减弱了盐胁迫对其生长的抑制^[7]。

刺槐 (*Robinia pseudoacacia* L.) 生长迅速、适应性强, 具有耐干旱、耐瘠薄、繁殖快等特点, 是盐碱地区造林的先锋树种, 具有良好的经济和环境效益^[8-9]。近年从逆境生理、品种选育等方面对刺槐的耐盐机理进行了一定研究, 然而, 盐胁迫下各生理指标对刺槐耐盐能力的影响及刺槐体内相关基因转录表达情况的研究较少。本研究以 1 年生刺槐幼苗为试验材料, 综合分析 NaCl 胁迫对刺槐幼苗生长、生理、离子含量及相关基因表达的影响, 初步解析刺槐耐盐机制, 从而为建立刺槐抗逆性生态生理指标体系提供理论依据。

收稿日期: 2020-02-04 修回日期: 2020-04-18

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目 (CAFYBB2017MB003); 国家自然科学基金青年项目 (31800514)

* 通讯作者: 褚建民. E-mail: cjmcaf@163.com

1 材料与方 法

1.1 试验材料及处理方法

以 1 年生刺槐播种苗为试验材料, 在中国林业科学研究院科研温室中进行盆栽 (花盆规格: 盆高×盆口直径=22 cm×20 cm) 培养, 基质为 $V_{珍珠岩} : V_{蛭石} = 3 : 1$ 。培养条件为: 自然光照; 昼夜温度: 25/20°C; 相对湿度: 50%~60%。试验开始前, 每株幼苗每 2 d 浇灌 1/2 Hoagland 营养液 (pH 值 5.5) 100 mL, 待苗高约 20 cm 时, 选取生长一致且健壮的幼苗进行试验。

试验分 3 个处理组, 每个处理组 10 株幼苗, 处理浓度分别为 0、50、100 mmol·L⁻¹ NaCl 溶液。NaCl 处理期间, 为保证 NaCl 浓度的一致性, 每 3 d 用含同等浓度 NaCl 溶液的 1/2 Hoagland 营养液淋洗花盆基质, 处理 27 d 后, 每个处理组选取 6 株长势基本一致的幼苗进行收获。

1.2 测定方法

1.2.1 光合参数测定及材料收获 收获前, 每个处理组随机选取 3 株幼苗, 每株选取 3 片成熟的叶片, 在晴天上午 9: 00—11: 00 用 Li 6400 光合作用测量系统 (LI-Cor, Lincoln, Nebraska, USA) 测定刺槐幼苗叶片的光合作用参数; 同时, 计算刺槐叶片水分利用效率 (WUE) = 净光合速率 (A) / 蒸腾速率 (E)^[10] 和气孔限制值 (Ls) = $1 - C_i/C_a$ (C_i 为胞间 CO₂ 浓度; C_a 为空气中 CO₂ 浓度, 本试验中该值为 400 μmol·mol⁻¹)^[11]。

光合测定结束后, 收获植株。收获时, 根、茎、叶分别收获并记录各部分的生物量。所有材料保存在液氮中, 并在液氮中使用球磨机 (NM400, Retsch, Haan, Germany) 将其研成粉末, 于 -80°C 保存备用。称取各处理组刺槐根、茎和叶片鲜样 60 mg, 于 65°C 烘干, 计算样品干湿比及干质量。

1.2.2 叶片相对含水量和叶绿素含量测定 采用烘干称重法测定各处理组刺槐幼苗叶片相对含水量 (RWC)。参照 Wellburn^[12] 提出的方法测定刺槐幼苗叶片中叶绿素含量。

1.2.3 丙二醛 (MDA) 含量测定 根据 Hodges 等^[13] 提出的方法测定刺槐样品中丙二醛 (MDA) 的含量。

1.2.4 游离脯氨酸、氨基酸、可溶性蛋白质含量测定 根据 Tamás 等^[14] 的方法测定样品游离脯氨酸

含量。使用氨基酸 (AA) 含量检测试剂盒 (索莱宝, 北京) 测定样品中氨基酸含量。样品中可溶性蛋白含量参照 Luo 等^[15] 的方法测定。

1.2.5 酶活性测定 参照 Polle 等^[16] 的方法测定 CAT 和 APX 的活性; 参照 Gamble 等^[17] 的方法测定 GR 的活性。

1.2.6 离子含量分析 将烘干的根和叶片样品研磨粉碎后, 过 0.5 mm 筛, 称取 0.2~0.3 g 样品 (精确至 0.001 g), 置于消煮管中, 加入 8 mL 浓硝酸, 摇匀后过夜, 并做空白对照。消解前加入 2 mL H₂O₂, 静置 20 min, 随后使用 Mars 高压微波消解仪 (Mars-6, CEM Corp., USA) 消解, 之后加热赶酸, 待消解液剩余约 2 mL 时停止加热, 冷却后过滤到 50 mL 容量瓶中并定容、摇匀。静置 20 min, 吸取上清液 10 mL 至离心管中, 使用等离子体发射光谱仪 iCAP 6300 (Thermo Scientific, USA) 测定 Na⁺、K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺ 含量, 并计算 Na⁺/K⁺、Na⁺/Ca²⁺、Na⁺/Mg²⁺ 比值。

1.2.7 水通道蛋白及 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因表达分析 使用植物 RNA 提取试剂盒 (DP432, 天根) 提取刺槐根和叶样品中总 RNA, 并进行浓度及纯度检测。使用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (RR047B, TaKaRa) 将纯化后的 RNA 进行反转录, 获得 cDNA, 然后使用荧光定量 PCR 仪 (ABI7500, Applied Biosystems, USA) 进行相对荧光定量 (qPCR) 分析。引物由北京 Invitrogen 公司合成, 具体信息见表 1, 内参基因为 *Actin*^[18]。

表 1 qRT-PCR 引物信息

Table 1 Primers used for qRT-PCR

基因名称 Gene name	引物序列 Primers	扩增效率/% PCR efficiency
<i>TIP 1;1</i>	F: 5'-GCCTCCTTGCTCCTCCTCT-3'	92
	R: 5'-ACAATAGCAGGTCCGAATGATAC-3'	
<i>PIP 1;1</i>	F: 5'-TGTCCTCACAAGAGCCCTAT-3'	96
	R: 5'-GCATCAGTGGCGGAGAAGA-3'	
<i>PIP 2;1</i>	F: 5'-AAAGACTACCAAGACCCACCTC-3'	103
	R: 5'-GGAACAACCCAAATGTCCACAG-3'	
<i>NHX 1</i>	F: 5'-TTTGACAGGCTACTTAGTGCGT-3'	102
	R: 5'-CAGAATGCCACTCAGATAGTT-3'	
<i>Actin</i>	F: 5'-TTGCCTGGATTATGAACA-3'	97
	R: 5'-GATGGCTGGAACAGAACTT-3'	

1.3 数据统计分析

采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法获得 qPCR 的差异表达倍数。对本试验获得的所有数据使用 Statgraphics Centurion XVI.I (STN, St, Louis, MO, USA) 软件进行分析。数据分析之前, 对其进行正态分布检验。所有数据采用单因素进行分析, 以 NaCl 作为自变量因素。采用 LSD 法进行数据间差异显著性分析, 当 F 检验的 P -Value < 0.05 时, 认为数据间的差异显著。

2 结果与分析

2.1 NaCl 处理对刺槐幼苗生长和光合能力的影响

在 NaCl 处理下, 刺槐幼苗根、茎和叶的干质量均出现不同程度的下降, 根冠比增加 (表 2), 说明 NaCl 处理影响了刺槐的正常生长发育。随 NaCl 浓度的升高, 刺槐幼苗叶片相对含水量显著降低, 与 $0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 处理组相比, 50 、 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 处理组刺槐幼苗叶片的相对含水量

分别减少了 7.0% 和 18.2% 。

NaCl 处理使刺槐幼苗叶中叶绿素 a (Chl a)、叶绿素 b (Chl b) 和类胡萝卜素 (Car) 均呈下降趋势 (表 3)。与 $0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 处理组相比, $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 处理使刺槐幼苗叶片 Chl a、Chl b 和 Car 含量分别降低了 29.8% 、 30.5% 和 36.6% 。刺槐净光合速率 (A)、气孔导度 (G_s)、胞间 CO_2 浓度 (C_i) 和蒸腾速率 (E) 均随着 NaCl 浓度增加显著减少, 而水分利用效率 (WUE) 和气孔限制值 (L_s) 出现不同程度的增加 (表 4)。 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 处理组刺槐的 A 、 G_s 、 C_i 和 E 仅为 $0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 处理组刺槐的 42.3% 、 40.0% 、 84.7% 和 31.1% 。 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 处理对刺槐幼苗叶片的 WUE 和 L_s 无显著影响; 而 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 处理组刺槐幼苗叶片的 WUE 和 L_s 分别比 $0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 处理组刺槐升高了 39.3% 和 25.0% 。

表 2 NaCl 对刺槐幼苗生物量、根冠比及叶片相对含水量的影响

Table 2 The effects of NaCl concentrations on biomass, root to shoot ratio and leaf relative water content of *R. pseudoacacia*

NaCl浓度/ ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	根 Root/g	茎 Shoot/g	叶 Leaf/g	根冠比 Root to shoot ratio	叶片相对含水量 RWC/%
0	$0.94 \pm 0.06 \text{ a}$	$2.26 \pm 0.07 \text{ a}$	$3.75 \pm 0.13 \text{ a}$	$0.16 \pm 0.007 \text{ b}$	$0.907 \pm 0.005 \text{ a}$
50	$0.73 \pm 0.06 \text{ b}$	$1.75 \pm 0.16 \text{ b}$	$2.65 \pm 0.18 \text{ b}$	$0.17 \pm 0.004 \text{ b}$	$0.844 \pm 0.010 \text{ b}$
100	$0.69 \pm 0.05 \text{ b}$	$1.68 \pm 0.08 \text{ b}$	$1.91 \pm 0.07 \text{ c}$	$0.20 \pm 0.007 \text{ a}$	$0.742 \pm 0.014 \text{ c}$
<i>P</i> -Value	*	**	**	**	**

注: 数据为平均值 \pm 标准误($n=6$), 同列不同字母代表差异显著($P \leq 0.05$); *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$ 。下同。

Notes: The data is the average \pm SE ($n=6$), different letters in the same column mean significant different in $P \leq 0.05$ level; **: $P \leq 0.01$. The same below.

表 3 NaCl 对刺槐幼苗光合色素含量及光合作用参数的影响

Table 3 The effects of NaCl concentrations on photosynthetic pigment content of *R. pseudoacacia*

NaCl浓度/ ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	叶绿素a Chl a/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	叶绿素b Chl b/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	类胡萝卜素 Car/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	叶绿素a+b Chl a+b/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
0	$9.26 \pm 0.80 \text{ a}$	$2.69 \pm 0.21 \text{ a}$	$2.02 \pm 0.18 \text{ a}$	$11.95 \pm 1.02 \text{ a}$
50	$7.92 \pm 0.05 \text{ ab}$	$2.27 \pm 0.10 \text{ ab}$	$1.48 \pm 0.04 \text{ b}$	$10.19 \pm 0.15 \text{ ab}$
100	$6.50 \pm 0.05 \text{ b}$	$1.87 \pm 0.05 \text{ b}$	$1.28 \pm 0.05 \text{ b}$	$8.38 \pm 0.11 \text{ b}$
<i>P</i> -Value	*	*	**	*

表 4 NaCl 对刺槐幼苗光合作用参数、水分利用效率及气孔限制的影响

Table 4 The effects of NaCl concentrations on photosynthetic parameters, WUE and L_s of *R. pseudoacacia*

NaCl浓度/ ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	净光合速率 A /($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	气孔导度 G_s /($\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	胞间 CO_2 浓度 C_i /($\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$)	蒸腾速率 E /($\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	水分利用效率 WUE /($\mu\text{mol}\cdot\text{mmol}^{-1}$)	气孔限制值 L_s
0	$9.7 \pm 0.16 \text{ a}$	$0.10 \pm 0.008 \text{ a}$	$252.5 \pm 6.3 \text{ a}$	$1.64 \pm 0.12 \text{ a}$	$5.98 \pm 0.28 \text{ b}$	$0.36 \pm 0.03 \text{ b}$
50	$6.0 \pm 0.27 \text{ b}$	$0.07 \pm 0.006 \text{ b}$	$221.8 \pm 13.8 \text{ b}$	$1.06 \pm 0.08 \text{ b}$	$6.14 \pm 0.30 \text{ b}$	$0.43 \pm 0.03 \text{ ab}$
100	$4.1 \pm 0.26 \text{ c}$	$0.04 \pm 0.004 \text{ c}$	$213.8 \pm 7.7 \text{ b}$	$0.51 \pm 0.05 \text{ c}$	$8.33 \pm 0.41 \text{ a}$	$0.45 \pm 0.02 \text{ a}$
<i>P</i> -Value	**	**	**	**	**	*

2.2 NaCl 处理对刺槐幼苗丙二醛 (MDA) 含量的影响

表 5 表明: 在 50 mmol·L⁻¹ NaCl 处理下, 刺槐根和叶中 MDA 含量均是 0 mmol·L⁻¹ NaCl 处理组的 1.2 倍; 与 0 mmol·L⁻¹ NaCl 处理相比, 100 mmol·L⁻¹ NaCl 处理组刺槐幼苗根和叶中 MDA 含量虽然出现一定程度增加, 但差异不显著。

2.3 NaCl 处理对刺槐幼苗 CAT、APX 和 GR 活性的影响

表 5 表明: 随 NaCl 浓度的增加, CAT、APX

和 GR 的活性变化不同; 在根中, 与 0 mmol·L⁻¹ NaCl 处理组刺槐相比, 50 mmol·L⁻¹ NaCl 处理对 CAT 和 GR 活性无显著影响, 但使 APX 活性显著升高; 100 mmol·L⁻¹ NaCl 处理使 CAT、APX 和 GR 活性显著升高。在叶中, 50 mmol·L⁻¹ NaCl 处理使 CAT 活性显著升高, 但对 APX 和 GR 活性无显著影响; 100 mmol·L⁻¹ NaCl 处理组刺槐 CAT、APX 和 GR 活性分别是 0 mmol·L⁻¹ NaCl 处理组的 3.0、1.8、1.7 倍。

表 5 NaCl 对刺槐幼苗根和叶丙二醛含量, 过氧化氢酶、抗坏血酸过氧化物酶和谷胱甘肽还原酶活性的影响

Table 5 The effects of NaCl on MDA content, CAT, APX and GR activities in roots and leaves of *R. pseudoacacia*

NaCl 浓度/ (mmol·L ⁻¹)	丙二醛 MDA/(nmol·g ⁻¹)		过氧化氢酶 CAT/nKat		抗坏血酸过氧化物酶 APX/nKat		谷胱甘肽还原酶 GR/nKat	
	根 Root	叶 Leaf	根 Root	叶 Leaf	根 Root	叶 Leaf	根 Root	叶 Leaf
0	51.8 ± 3.9 b	86.7 ± 0.7 b	208.0 ± 35.0 b	241.6 ± 19.9 c	182.5 ± 21.0 c	269.8 ± 26.0 b	61.6 ± 9.4 b	76.8 ± 10.3 b
50	62.2 ± 2.1 a	102.8 ± 1.7 a	229.2 ± 32.7 b	399.3 ± 34.4 b	265.9 ± 21.1 b	325.4 ± 14.3 b	46.4 ± 1.8 b	79.0 ± 8.5 b
100	57.3 ± 1.3 ab	93.7 ± 5.2 ab	383.5 ± 35.6 a	721.5 ± 7.0 a	373.0 ± 17.3 a	482.1 ± 17.2 a	145.6 ± 5.4 a	130.0 ± 5.4 a
P-Value	ns	*	*	**	**	**	**	**

2.4 NaCl 处理对刺槐幼苗游离脯氨酸、氨基酸及可溶性蛋白质的影响

NaCl 处理导致刺槐幼苗根和叶中游离脯氨酸、氨基酸和可溶性蛋白质出现不同程度升高 (表 6)。在根中, 与 0 mmol·L⁻¹ NaCl 处理组相比, 50 mmol·L⁻¹ NaCl 处理使刺槐幼苗游离脯氨酸、氨基酸和可溶性蛋白质分别升高了 72.1%、86.4% 和

63.2%; 100 mmol·L⁻¹ NaCl 处理使刺槐幼苗游离脯氨酸升高了 74.4%, 可溶性蛋白质升高了 156.7%, 但对氨基酸含量影响不显著。在叶中, 与 0 mmol·L⁻¹ NaCl 处理组相比, 50 mmol·L⁻¹ NaCl 处理使刺槐幼苗游离脯氨酸和可溶性蛋白质分别升高了 136.4% 和 64.3%; 100 mmol·L⁻¹ NaCl 处理使刺槐幼苗游离脯氨酸升高了 381.8%, 氨基酸升高了 21.3%。

表 6 NaCl 对刺槐幼苗根和叶中游离脯氨酸、氨基酸及可溶性蛋白质含量的影响

Table 6 The effects of NaCl on free proline, amino acid and soluble protein contents in roots and leaves of *R. pseudoacacia*

NaCl 浓度/ (mmol·L ⁻¹)	游离脯氨酸 Free proline/(mg·g ⁻¹)		氨基酸 Amino acid/(μmol·g ⁻¹)		可溶性蛋白质 Soluble protein/(mg·g ⁻¹)	
	根 Root	叶 Leaf	根 Root	叶 Leaf	根 Root	叶 Leaf
0	0.43 ± 0.01 b	0.11 ± 0.03 c	702.4 ± 57.5 b	762.5 ± 64.0 b	17.1 ± 3.4 c	66.1 ± 4.5 b
50	0.74 ± 0.08 a	0.26 ± 0.02 b	1309.6 ± 79.5 a	800.1 ± 25.6 ab	27.9 ± 2.8 b	108.6 ± 7.5 a
100	0.75 ± 0.03 a	0.53 ± 0.03 a	908.8 ± 59.8 b	924.7 ± 38.0 a	43.9 ± 1.5 a	81.0 ± 2.2 b
P-Value	**	**	**	ns	**	**

2.5 NaCl 处理对刺槐幼苗 Na⁺、K⁺、Mg²⁺ 和 Ca²⁺ 含量及离子含量比值的影响

表 7 表明: 随 NaCl 浓度的增加, 刺槐幼苗根和叶中 Na⁺ 含量显著升高, 50 mmol·L⁻¹ NaCl 处理组刺槐根和叶中 Na⁺ 是 0 mmol·L⁻¹ NaCl 处理组的 2.5 和 3.1 倍, 100 mmol·L⁻¹ NaCl 处理组刺槐根和

叶中 Na⁺ 是 0 mmol·L⁻¹ NaCl 处理组的 4.6 和 5.6 倍, 且根中 Na⁺ 含量高于叶中含量。50、100 mmol·L⁻¹ NaCl 处理使刺槐幼苗根中 K⁺ 含量比 0 mmol·L⁻¹ NaCl 处理组分别降低了 16.3% 和 11.1%, 但对叶中 K⁺ 含量影响不显著。NaCl 处理使刺槐幼苗根中 Mg²⁺ 含量逐渐升高, 而叶中 Mg²⁺ 含量逐渐降

低, 与 0 mmol·L⁻¹ NaCl 处理组相比, 100 mmol·L⁻¹ NaCl 处理使根中 Mg²⁺ 含量升高了 29.7%, 使叶中

Mg²⁺ 含量下降了 28.2%。NaCl 处理对刺槐幼苗根和叶中 Ca²⁺ 含量影响不显著。

表 7 NaCl 对刺槐幼苗根和叶中离子含量的影响

Table 7 The effects of NaCl on ion contents in roots and leaves of *R. pseudoacacia*

NaCl 浓度/ (mmol·L ⁻¹)	Na ⁺ /(mg·g ⁻¹)		K ⁺ /(mg·g ⁻¹)		Mg ²⁺ /(mg·g ⁻¹)		Ca ²⁺ /(mg·g ⁻¹)	
	根 Root	叶 Leaf	根 Root	叶 Leaf	根 Root	叶 Leaf	根 Root	叶 Leaf
0	1.99 ± 0.17 c	0.18 ± 0.02 c	16.52 ± 0.09 a	25.93 ± 0.71 a	2.59 ± 0.08 b	5.03 ± 0.30 a	4.69 ± 0.11 a	23.31 ± 0.62 a
50	5.04 ± 0.42 b	0.55 ± 0.12 b	13.82 ± 0.85 b	26.42 ± 0.39 a	3.08 ± 0.26 ab	4.45 ± 0.36 ab	4.79 ± 0.12 a	21.77 ± 1.01 a
100	9.11 ± 0.95 a	1.00 ± 0.07 a	14.69 ± 0.07 b	26.05 ± 0.15 a	3.36 ± 0.07 a	3.61 ± 0.38 b	4.42 ± 0.11 a	22.39 ± 2.02 a
<i>P</i> -Value	**	**	*	ns	*	ns	ns	ns

NaCl 处理下, 刺槐幼苗根和叶中 Na⁺/K⁺、Na⁺/Mg²⁺ 和 Na⁺/Ca²⁺ 显著升高, 且 NaCl 浓度越高, 比值越大 (表 8)。50 mmol·L⁻¹ NaCl 处理使根中 Na⁺/K⁺、Na⁺/Mg²⁺ 和 Na⁺/Ca²⁺ 分别升高了 200.0%、110.3% 和 150.0%, 使叶中 Na⁺/K⁺、Na⁺/Mg²⁺ 和

Na⁺/Ca²⁺ 分别升高了 100.0%、200.0% 和 100.0%。与 0 mmol·L⁻¹ NaCl 处理组刺槐相比, 100 mmol·L⁻¹ NaCl 处理组刺槐根中 Na⁺/K⁺、Na⁺/Mg²⁺ 和 Na⁺/Ca²⁺ 分别升高了 4.2、2.5 和 3.9 倍, 叶中 Na⁺/K⁺、Na⁺/Mg²⁺ 和 Na⁺/Ca²⁺ 分别升高了 3.0、6.0 和 3.0 倍。

表 8 NaCl 对刺槐幼苗根和叶中 Na⁺/K⁺、Na⁺/Mg²⁺ 和 Na⁺/Ca²⁺ 的影响

Table 8 The effects of NaCl on Na⁺/K⁺, Na⁺/Mg²⁺ and Na⁺/Ca²⁺ in roots and leaves of *R. pseudoacacia*

NaCl 浓度/ (mmol·L ⁻¹)	Na ⁺ /K ⁺		Na ⁺ /Mg ²⁺		Na ⁺ /Ca ²⁺	
	根 Root	叶 Leaf	根 Root	叶 Leaf	根 Root	叶 Leaf
0	0.12 ± 0.01 c	0.01 ± 0.001 c	0.78 ± 0.09 c	0.04 ± 0.004 c	0.42 ± 0.03 c	0.01 ± 0.001 c
50	0.36 ± 0.01 b	0.02 ± 0.005 b	1.64 ± 0.01 b	0.12 ± 0.017 b	1.05 ± 0.06 b	0.02 ± 0.004 b
100	0.62 ± 0.07 a	0.04 ± 0.003 a	2.70 ± 0.23 a	0.28 ± 0.019 a	2.07 ± 0.27 a	0.04 ± 0.001 a
<i>P</i> -Value	**	**	**	**	**	**

2.6 NaCl 处理对刺槐幼苗水通道蛋白及 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因表达的影响

对刺槐幼苗根和叶中编码水通道蛋白 (TIP1;1, PIP1;1 和 PIP2;1) 及 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白 (NHX1) 的 mRNA 的表达水平进行分析, 结果 (表 9) 表明: 在刺槐幼苗根中, 50 和 100 mmol·L⁻¹ NaCl 处理使 TIP1;1、PIP1;1、PIP2;1 和 NHX1 基因的 mRNA 表达水平显著升高, 分别是 0 mmol·L⁻¹ NaCl

处理组的 6.4、11.1、28.6、6.4 倍和 5.6、6.1、14.6、3.2 倍; 在叶中, 与 0 mmol·L⁻¹ NaCl 处理组刺槐幼苗相比, 50 mmol·L⁻¹ NaCl 处理对 TIP1;1、PIP1;1 和 NHX1 基因的 mRNA 表达水平影响不显著, 100 mmol·L⁻¹ NaCl 处理使 TIP1;1、PIP1;1 和 NHX1 基因的 mRNA 表达水平增加了 3.7、1.6 和 1.3 倍, 但 NaCl 处理使 PIP2;1 基因的 mRNA 表达水平显著降低。

表 9 NaCl 处理对刺槐幼苗根和叶中相关基因表达分析

Table 9 The expression of aquaporin and Na⁺/H⁺ reverse transporter genes in roots and leaves of *R. pseudoacacia* under NaCl treatments.

NaCl 浓度/ (mmol·L ⁻¹)	TIP1;1		PIP1;1		PIP2;1		NHX1	
	根 Root	叶 Leaf	根 Root	叶 Leaf	根 Root	叶 Leaf	根 Root	叶 Leaf
0	0.98 ± 0.02 b	0.95 ± 0.10 b	1.25 ± 0.19 c	1.61 ± 0.31 b	1.01 ± 0.01 c	0.85 ± 0.11 a	0.97 ± 0.06 c	1.42 ± 0.25 b
50	6.31 ± 0.38 a	1.11 ± 0.11 b	13.88 ± 1.52 a	2.46 ± 0.23 b	28.88 ± 1.60 a	0.34 ± 0.11 b	6.22 ± 0.78 a	2.29 ± 0.30 ab
100	5.45 ± 0.75 a	4.45 ± 0.31 a	7.60 ± 1.00 b	4.15 ± 0.71 a	14.75 ± 1.57 b	0.16 ± 0.07 b	3.12 ± 0.58 b	3.24 ± 0.71 a
<i>P</i> -Value	**	**	**	*	**	**	**	ns

3 讨论

盐胁迫是限制植物生长发育的主要非生物逆境之一^[2]。本研究中, NaCl 处理显著抑制了刺槐幼苗的生长发育, 致使刺槐幼苗根、茎和叶的干质量减少, 根冠比增加, 表明刺槐幼苗在受到 NaCl 胁迫后, 会通过抑制地上部分生长、扩大根冠比, 从而增强根系对土壤中水和营养元素的吸收, 以此来适应逆境条件^[19-20]。相对含水量作为衡量植株水分状况的指标之一, 常用来指示植物的逆境胁迫程度。本研究发现, NaCl 处理使刺槐叶片相对含水量下降, 这可能与盐胁迫降低了植物根系向地上部分运输水分的能力有关^[21]。

叶绿素是植物进行光合作用的主要色素, 其含量对植物的耐盐能力具有重要影响^[22]。本研究中, 在 NaCl 处理下, 刺槐幼苗叶片的 Chl a、Chl b、Chl a+b 及 Car 含量均出现不同程度降低。这是由于过量的 NaCl 破坏了植物的叶绿体结构、提高了相关叶绿素酶的活性, 导致叶绿体色素合成受阻或者分解加快^[22]。刺槐幼苗叶片净光合速率 (A) 在受到 NaCl 胁迫后下降, 光合能力减弱。一般认为, NaCl 胁迫影响植物光合作用的因素主要分为气孔因素和非气孔因素, 前者表现为 G_s 和 C_i 同时下降、 L_s 升高, 后者主要表现为 A 降低而 C_i 升高^[11]。本研究中, 随 NaCl 浓度增加, 刺槐幼苗叶片 A 、 G_s 、 C_i 和 E 均显著减少, L_s 升高, 说明 NaCl 胁迫对刺槐幼苗光合能力的限制主要由气孔因素导致。水分利用效率 (WUE) 反映了植物对环境适应能力的强弱, NaCl 处理使刺槐叶片的 WUE 升高, 说明在一定浓度范围内, NaCl 胁迫能够提高刺槐的 WUE , 这可能是由于 NaCl 胁迫诱导刺槐幼苗叶片 G_s 和 E 降低减少了蒸腾耗水引起的^[23]。

研究表明, 在一定盐浓度范围内, 白榆 (*Ulmus pumila* L.)^[24]、中国柽柳 (*Tamarix chinensis* Lour.)^[25] 等体内抗氧化酶活性均随着盐浓度的升高而增大。本研究同样发现, NaCl 胁迫诱导刺槐幼苗根和叶中 CAT、APX 和 GR 活性增强, 从而加快清除植株体内过量的活性氧。在 NaCl 胁迫下, 刺槐幼苗通过合成并积累游离脯氨酸、氨基酸和可溶性蛋白质, 从而调节渗透势、维持细胞含水量, 提高刺槐抗氧化能力, 增强了对 NaCl 胁迫的适应能力, 这与在茶树 (*Camellia sinensis* L.)^[26] 中得到的结果相似。NaCl 处理导致刺槐幼苗根和

叶中丙二醛 (MDA) 含量升高, 并且 100 mmol·L⁻¹ NaCl 处理组刺槐 MDA 含量低于 50 mmol·L⁻¹ NaCl 处理组, 这可能是在较高浓度 NaCl 胁迫下, 刺槐体内抗氧化系统活性较高, 能够较快的清除活性氧物质, 减轻了其对刺槐细胞膜系统的损伤。

本研究中, NaCl 处理使刺槐幼苗根和叶中 Na⁺ 积累量显著升高, 且 Na⁺ 在刺槐幼苗根中的积累量远大于在叶中的积累量。在多数植物中, Na⁺ 的主要毒性部位是叶片^[2], 因此, 植物根系对 Na⁺ 的留存能力可以减轻 Na⁺ 对地上部分的伤害; 同时, 植物也可以利用根中积累的 Na⁺ 进行渗透调节, 降低植物水势^[19]。随着 NaCl 浓度升高, 刺槐幼苗根中 K⁺ 含量显著减少, Na⁺/K⁺ 显著增加, 这可能是由于在盐胁迫下, 根系对 Na⁺ 的吸收会与对 K⁺ 的吸收产生竞争, 导致根中 K⁺ 含量显著减少所致^[3, 27]; 然而, NaCl 对刺槐幼苗叶中 K⁺ 含量无显著影响, 但 Na⁺/K⁺ 却显著升高, 这可能是由于地上部分在 NaCl 胁迫下生长减弱, 引起 K⁺ 在刺槐根和叶中重新分配所致^[27]。Mg²⁺ 作为组成植物叶绿素分子的元素之一, 本研究发现, NaCl 胁迫导致刺槐幼苗根中 Mg²⁺ 含量上升, 叶中 Mg²⁺ 含量降低, 同时根和叶中 Na⁺/Mg²⁺ 显著升高, 刺槐通过在根中积累 Mg²⁺, 提高了渗透调节能力, 维持了刺槐幼苗根中质子跨膜运输浓度梯度^[28]。研究发现, 在较低浓度 NaCl 胁迫下, 胀果甘草 (*Glycyrrhiza inflata* Batal.)^[28] 及酸枣 (*Ziziphus jujuba* var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chow)^[29] 的根系通过积累 Ca²⁺ 提高细胞渗透调节能力, 缓解 Na⁺ 毒害。本研究中, 50 和 100 mmol·L⁻¹ NaCl 处理对刺槐幼苗根和叶中 Ca²⁺ 含量无显著影响, 从而维持 NaCl 胁迫下刺槐体内细胞膜结构的稳定、调控细胞生长及胞内酶的活性。

在植物适应盐胁迫的过程中, 植物水通道蛋白 (AQPs) 通过调控植物细胞渗透压及蒸腾作用, 调控植物逆境应答, 促进植物生长发育^[5]。研究发现, NaCl 处理导致水稻根中 *OsTIP1;1*、*TsPIP1;1* 及 *TsTIP1;1* 表达水平显著上调^[30-31]。本研究中, NaCl 处理后, 刺槐幼苗根中水通道蛋白基因 *TIP1;1*、*PIP1;1* 及 *PIP2;1* 转录被诱导。TIP1;1 作为定位在液泡膜上的水通道蛋白, 参与植物细胞渗透调节; 而 PIP1;1 和 PIP2;1 均定位在质膜上, 前者主要用于调节植物渗透势, 后者主要负责跨膜水

分运输。因此,刺槐通过诱导上述3种基因的合成表达,并与渗透调节物质共同作用,调节细胞的渗透势,增强了刺槐根系的吸水及持水能力,增强了刺槐的耐盐能力。在叶中,*TIP1;1*和*PIP1;1*转录水平在低浓度NaCl处理下变化不显著,但在较高浓度NaCl处理下显著升高,这可能是由于在较高浓度NaCl下,叶片通过诱导它们的转录表达,增强叶片细胞的渗透调节能力,并抑制*PIP2;1*的转录表达,减弱了叶片失水速率,减缓了盐胁迫引起的净光合速率的下降速度,从而增强了刺槐的耐盐能力^[6]。然而,在玉米中,NaCl胁迫抑制了*PIPs*和*TIPs*的表达^[32],这可能是与AQPs基因在逆境条件下表达存在组织、器官以及时间上的特异性有关^[33]。*NHX1*是定位于液泡膜上的Na⁺/H⁺逆向转运蛋白,参与调控植物液泡渗透势^[3]。本研究,NaCl处理后,刺槐幼苗根和叶中*NHX1*的表达水平显著升高。刺槐通过增强*NHX1*基因的转录表达,将根和叶中过量的Na⁺从细胞质转运到液泡中,减缓了细胞质的受损程度,重建细胞中的离子平衡,并且将Na⁺转化为渗透调节物质,增强了自身的耐盐能力^[34]。

4 结论

NaCl胁迫抑制了刺槐幼苗的生长以及光合作用能力,同时诱导刺槐体内产生氧化胁迫和离子失衡。为应对NaCl胁迫造成的不利影响,刺槐通过增强叶片水分利用效率、合成并积累抗氧化酶(CAT、APX和GR)和渗透调节物质(游离脯氨酸、氨基酸和可溶性蛋白质)并诱导相关基因(*TIP1;1*、*PIP1;1*、*PIP2;1*及*NHX1*)的转录表达,增强了自身的盐胁迫适应能力。然而,植物对盐胁迫的适应机制非常复杂,还需进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 王宁,周晓星,刘俊祥,等.盐胁迫对柳树无性系SH31离子含量及光合作用的影响[J].林业科学研究,2015,28(4):565-569.
- [2] Munns R, Tester M. Mechanisms of salinity tolerance[J]. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59: 651-681.
- [3] Parida A K and Das A B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2005, 60(3): 324-349.
- [4] Zhu J K. Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants[J]. Cell, 2016, 167(2): 313-324.
- [5] 李伟,韩娇,黄升财,等.小盐芥*TsPIP1;1*与*TsTIP1;1*基因增强转基因水稻耐盐性[J].植物营养与肥料学报,2017,23(4):957-963.
- [6] 胡景铭,颜培玲,张文娥,等.过表达毛葡萄*PIP2;1*基因对转基因拟南芥幼苗生长的影响[J].分子植物育种,2018,16(20):169-177.
- [7] 边晨凯,龙定沛,刘雪琴,等.桑树Na⁺/H⁺逆向转运蛋白基因(*MnNHX1*)的克隆与耐盐力表达[J].林业科学,2015,51(8):16-25.
- [8] Luo Y J, Yuan Y F, Wang R Q, et al. Functional traits contributed to the superior performance of the exotic species *Robinia pseudoacacia*: a comparison with the native tree *Sophora japonica*[J]. Tree Physiology, 2016, 36(3): 345-355.
- [9] Kou M, Garcia-Fayos P, Hu S, et al. The effect of *Robinia pseudoacacia* afforestation on soil and vegetation properties in the Loess Plateau (China): A chronosequence approach[J]. Forest Ecology and Management, 2016, 375: 146-158.
- [10] Guy R D, Reid D M, Krouse H R. Factors affecting ¹³C/¹²C ratios of inland halophytes. II. Ecophysiological interpretations of patterns in the field[J]. Canadian Journal of Botany, 1986, 64(11): 2700-2707.
- [11] Farquhar G D, Sharkey T D. Stomatal Conductance and Photosynthesis[J]. Annual Review of Plant Biology, 1982, 33(1): 317-345.
- [12] Wellburn A R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution[J]. Journal of Plant Physiology, 1994, 144(3): 307-313.
- [13] Hodges D M, Delong J M, Prange F R K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds[J]. Planta, 1999, 207(4): 604-611.
- [14] Tamás L, Dudíková J, Durceková K, et al. Alterations of the gene expression, lipid peroxidation, proline and thiol content along the barley root exposed to cadmium[J]. Journal of plant physiology, 2008, 165(11): 1193-1203.
- [15] Luo Z B, Calfapietra C, Scarascia-Mugnozza G, et al. Carbon-based secondary metabolites and internal nitrogen pools in *Populus nigra* under Free Air CO₂ Enrichment (FACE) and nitrogen fertilisation[J]. Plant and Soil, 2008, 304(1-2): 45-57.
- [16] Polle A, Chakrabarti K, Schurmann W, et al. Composition and Properties of Hydrogen Peroxide Decomposing Systems in Extracellular and Total Extracts from Needles of Norway Spruce (*Picea abies* L., Karst.)[J]. Plant Physiology, 1990, 94(1): 312-319.
- [17] Gamble P E, Burke J J. Effect of Water Stress on the Chloroplast Antioxidant System: I. Alterations in Glutathione Reductase Activity[J]. Plant Physiology, 1984, 76(3): 615-621.
- [18] 王金星,张利军,廖资亿,等.刺槐实时定量PCR分析中内参基因的选择[J].林业科学,2014,50(9):167-172.
- [19] 曹帮华,郁万文,吴丽云,等.盐胁迫对刺槐无性系生长和离子吸收、运输、分配的影响[J].山东农业大学学报:自然科学版,2005,36(3):353-358.
- [20] Kawa D, Magdalena J, Hector M S, et al. Phosphate-dependent root system architecture responses to salt stress[J]. Plant Physiology, 2016, 172(2): 690-706.
- [21] Rodríguez A A, Córdoba A R, Ortega L, et al. Decreased reactive oxygen species concentration in the elongation zone contributes to the

- reduction in maize leaf growth under salinity[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(401): 1383-1390.
- [22] 高明远, 甘红豪, 李清河, 等. 外源水杨酸对盐胁迫下白榆生理特性的影响[J]. *林业科学研究*, 2018, 31(6): 138-143.
- [23] 王 文. 唐古特白刺对NaCl胁迫的生理响应机制研究[D]. 甘肃: 甘肃农业大学, 2013.
- [24] 苏 丹, 李红丽, 董 智, 等. 盐胁迫对白榆无性系抗氧化酶活性及丙二醛的影响[J]. *中国水土保持科学*, 2016, 14(2): 9-16.
- [25] 朱金方, 刘京涛, 陆兆华, 等. 盐胁迫对中国柽柳幼苗生理特性的影响[J]. *生态学报*, 2015, 35(15): 5140-5146.
- [26] 周 旋, 申 璐, 金 媛, 等. 外源水杨酸对盐胁迫下茶树生长及主要生理特性的影响[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2015, 43(7): 161-167.
- [27] Chen S L, Li J K, Wang S S, *et al.* Effects of NaCl on shoot growth, transpiration, ion compartmentation, and transport in regenerated plants of *Populus euphratica* and *Populus tomentosa*[J]. *Canadian Journal of Forest Research*, 2003, 33(6): 967-975.
- [28] 陆嘉惠, 吕 新, 梁永超, 等. 新疆胀果甘草幼苗耐盐性及对NaCl胁迫的离子响应[J]. *植物生态学报*, 2013, 37(9): 839-850.
- [29] 靳 娟, 王 依, 鲁晓燕, 等. NaCl胁迫对酸枣幼苗离子吸收与分配的影响[J]. *园艺学报*, 2015, 42(5): 853-862.
- [30] Li G W, Peng Y H, Yu X, *et al.* Transport functions and expression analysis of vacuolar membrane aquaporins in response to various stresses in rice[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2008, 165(18): 1879-1888.
- [31] Guo L, Wang Z Y, Lin H, *et al.* Expression and functional analysis of the rice plasma-membrane intrinsic protein gene family[J]. *Cell Research*, 2006, 16(3): 277-286.
- [32] Zhu C F, Schraut D, Hartung W, *et al.* Differential responses of maize MIP genes to salt stress and ABA[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(421): 2971-2981.
- [33] 王文斌, 崔克辉. 非生物逆境对植物水孔蛋白表达调控的研究进展[J]. *植物生理学报*, 2016, 52(4): 423-430.
- [34] 刘 岩, 张 薇, 计东风, 等. NaCl胁迫对桑树种子萌发和Na⁺/H⁺逆向转运蛋白基因表达的影响[J]. *蚕业科学*, 2013, 39(5): 851-857.

Physiological and Biochemical Responses of *Robinia pseudoacacia* Seedlings to NaCl Stress

GAN Hong-hao, ZHAO Shuai, YANG Ze-kun, CHU Jian-min

(Coastal forestry Research Center, National Forestry and Grassland Administration; Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry; Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, National Forestry and Grassland Administration; State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Beijing 100091, China)

Abstract: [Objective] To study the physiological and biochemical responses of *Robinia pseudoacacia* seedlings to NaCl stress, and provide a theoretical basis for establishing an ecological physiological index system of *R. pseudoacacia* resistance. [Method] One-year-old *R. pseudoacacia* seedlings were used to observe the effects of different NaCl concentrations (0, 50, 100 mmol·L⁻¹) on the growth, photosynthetic rate, antioxidant enzyme activities, osmoregulatory substances, ion distribution, the transcriptional expression of aquaporins and Na⁺/H⁺ reverse transporters. [Result] The growth of *R. pseudoacacia* was inhibited under NaCl stress, with the decreases of relative water content, photosynthetic pigment content and photosynthesis parameters of leaves, and the increase of the water use efficiency and stomatal limit value. The MDA content, antioxidant enzyme activities (CAT, APX and GR) and osmotic regulatory substance (free proline, amino acids and soluble protein) increased in roots and leaves of *R. pseudoacacia* under NaCl stress. Also, the ion equilibrium of Na⁺, K⁺ and Mg²⁺ in roots and leaves of *R. pseudoacacia* changed, but there was no significant difference in the content of Ca²⁺ in roots and leaves under different NaCl concentrations. NaCl stress induced the transcription and expression of the aquaporin gene (*TIP1;1*, *PIP1;1* and *PIP2;1*) in roots, aquaporin gene (*TIP1;1* and *PIP1;1*) in leaves and Na⁺/H⁺ antiporter gene *NHX1* in roots and leaves of *R. pseudoacacia*. [Conclusion] *R. pseudoacacia* can improve the salt adaptability by increasing leaf water use efficiency, synthesizing and accumulating antioxidant enzymes and osmotic adjustment substances, and inducing transcriptional expression of related genes.

Keywords: *Robinia pseudoacacia*; stress; physiological metabolism; ionic state; aquaporins