

## 非损伤微测技术及其在植物盐碱胁迫研究中的应用

贾博为<sup>1</sup>，李媛<sup>2</sup>，金军<sup>3</sup>，关永旭<sup>4</sup>，孙晓丽<sup>\*</sup>，孙明哲<sup>\*</sup>

黑龙江八一农垦大学农学院 / 作物逆境分子生物学实验室，大庆 163319

**摘要：**非损伤微测技术（Non-invasive Micro-test Technology, NMT）是基因功能研究中的一种活体检测技术，可在不损伤样品的前提下检测分子 / 离子进出生物活体的流速（流动速率和方向），对于研究植物体生命活动规律以及植物与环境间的相互关系具有重要的生物学意义。因其活体、原位、非损伤测量，实时、动态测量，长时间持续测量等特点，被广泛应用于植物科学、动物医学、微生物学等领域。盐碱胁迫是制约植物生长发育的主要非生物胁迫之一，也是制约农作物生产和生态环境建设的严峻问题。研究作物的耐盐碱机理，对开发和有效利用盐碱地有重要的现实意义。本文总结性阐述了盐碱胁迫对植物的危害，综合论述该技术的应用研究，并分析该技术有待进一步提升优化的空间，展望其在植物盐碱胁迫研究中新的应用方向，以期为非损伤微测技术在该领域的深入应用研究提供参考。

**关键词：**非损伤微测技术；盐碱胁迫；K<sup>+</sup>；

### 前言

土壤盐渍化是农业生产重要的逆境胁迫因子之一，逐渐成为限制作物生长、影响作物产量的主要因素<sup>[1-2]</sup>。目前全世界约有 100 多个国家 57 亿亩土地受盐碱化影响，约占陆地面积的三分之一，且呈不断恶化的趋势<sup>[3-4]</sup>，严重威胁着土地利用率和作物产量。我国盐渍化土地近 1 亿 hm<sup>2</sup>，沿海大面积土壤的盐渍化和内陆干旱、半干旱地区因强烈的地表蒸发造成的土地盐渍化及使用错误灌溉方法造成大面积土壤次生盐渍化，已经成为制约农林业生产和生态环境建设的严峻问题。

土壤盐化与碱化分别以盐度、pH 值升高为主要特点，并非两种相同的非生物胁迫

<sup>[5]</sup>。盐化和碱化常常同时发生，这种现象在很多地区普遍存在。根据数据统计显示，中国东北盐碱侵害的草地面积已达 70%<sup>[6]</sup>，且呈扩大趋势。盐、碱对植物的危害程度从大到小依次是盐碱胁迫、碱胁迫、盐胁迫<sup>[7-8]</sup>。盐碱胁迫会降低土壤渗透势、使离子失衡、打乱生理过程、抑制植物生长、降低作物的质量和产量，严重地区甚至会导致植物死亡。因此培育耐盐碱品种的植物，提高植物的耐盐碱能力是缓解盐碱地对植物影响的有效生物措施，同时还可以产生较好的生态和经济效益，促进农业的可持续发展<sup>[9]</sup>。在人类

收稿日期：2023-03-22

\* 通讯作者 E-mail: ly\_csmbl@163.com

编辑作者 E-mail: yanhan@nmtia.org.cn

社会现代化进程不断加快、人口数量不断增加、耕地面积日趋减少和淡水资源严重不足的巨大压力下，如何开发利用如此大面积的盐碱地已成为世界性问题。

## 1. 植物耐盐研究

土壤盐渍化不同程度地影响植物的正常生长，造成经济和生态效益的巨大损失<sup>[10]</sup>。国内外有关植物对盐胁迫的生理响应以及它们与耐盐能力关系等方面的研究报道很多<sup>[11]</sup>。植物对盐的反应受许多因素的影响：①盐胁迫的强度（轻度、中度、重度）及时间；②物种、品种、植物器官；③植物生长发育的阶段。

### 1.1 盐胁迫对植物生理的影响研究

盐分对植物最普遍最显著的效应是抑制生长，影响种子出苗率、成苗率、苗木生长量及嫁接成活率。当植物被转移到盐逆境中，一段时间后生长速率有所下降，其下降程度与根际渗透压成正比。钾元素是植物生长必不可少的营养物质，植物对钾元素的需求量也很大。钾元素对于植物的光合作用，蛋白质合成等许多其他功能有着至关重要的作用，进而影响植物的正常生长。盐碱环境会造成植物外界的渗透压过大，导致植株失水， $K^+$ 也会随之流失<sup>[12]</sup>。耐盐品种会对外界的 $Na^+$ 进行有效的调节， $K^+$ 的外排会减少<sup>[13-14]</sup>。

#### 1.1.1 盐胁迫对植物光合作用的影响

叶绿素含量是反映植物光合作用强度的生理指标。因此，盐胁迫下，对植物光合作

用的影响主要是对植物体中叶绿体的影响。由于盐胁迫下，植物吸收不到足够的水分和矿质营养，造成营养不良，致使叶绿素含量低，影响光合作用。另外，盐分过多使 PEP 羧化酶和 RuBP 羧化酶活性降低，叶绿体趋于分解，叶绿素被破坏。叶绿素和类胡萝卜素的生物合成受阻，气孔关闭，使光合速率下降，影响作物产量。盐胁迫对植物（尤其是盐生植物）的光合作用具有抑制作用，而且随外界盐浓度的提高，被抑制的程度也越大<sup>[15-16]</sup>。在短期盐胁迫下，植物叶片叶绿体膜蛋白含量下降，气孔导度下降；在较长期盐胁迫下，叶肉导度和光合面积下降是植物生长受抑制的主要原因。

#### 1.1.2 盐胁迫对呼吸作用的影响

在盐化条件下，植物为了逆着电化学梯度汲取离子和维持生命，需要更多的能量。这种能量看来是由于呼吸作用的增大，也可能直接通过光和磷酸化来供应。这种呼吸作用的增大和直接来自光合作用的能量与  $O_2$  的固定和整个植株生长的减小有关。在很高的盐度水平上，呼吸作用是减少的。这种效应在对盐敏感的植物中更显著，其结果是在需要能量最大的时候维持此时生命所需能量供应不足。

#### 1.1.3 盐胁迫对生物膜的影响

盐胁迫直接影响细胞的膜脂和膜蛋白，使脂膜透性增大和膜脂过氧化，从而影响膜的正常生理功能。

正常情况下，细胞壁和质膜相互接触，细胞在失水时质膜收缩，由于质膜与细胞壁

的弹性不同，质壁相互“撕扯”变形，产生机械胁迫，引起细胞内游离钙离子浓度增加，诱导植物活性氧迸发。盐胁迫使细胞失水，引起细胞膨压和渗透压变化。“质膜伤害学说”认为盐分胁迫对植物的伤害作用主要是离子胁迫致使植物细胞质膜损伤，使其选择性遭到破坏，胞内大量离子和某些有机物质外渗，外界有毒盐离子进入，导致细胞内的一系列生理生化过程受到干扰。

#### 1.1.4 盐胁迫对酶系统的影响

SOD、CAT、POD 是植物体内的保护酶系统，它们相互协调，共同作用清除活性氧，降低膜脂过氧化所产生的 MDA，从而保护膜系统不受破坏。但植物细胞内许多酶只能在很窄的离子浓度范围才具有活性，在盐胁迫下由于植物摄取了过量的  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Cl}^-$  等离子，导致细胞内离子浓度过高，细胞质中高浓度的阳离子抑制了酶蛋白的合成，植物体内主要的清除酶类 (SOD、POD、CAT) 的含量会明显下降。

#### 1.1.5 阻碍农作物蛋白质的合成

盐分过多对蛋白质代谢影响比较明显，抑制合成促进分解，抑制蛋白质合成的直接原因可能是由于破坏了氨基酸的合成，如蚕豆在盐胁迫下叶内半胱氨酸和蛋氨酸合成减少，从而使蛋白质含量减少。使作物产生有毒物质。盐胁迫使植物体内积累有毒的代谢产物，如蛋白质分解的产物游离的氨基酸、胺、氨等的积累，这些物质对植物有毒害作用，致使植物叶片生长不良，抑制根系生长，组织变黑坏死等。

## 1.2 NMT 在植物盐胁迫下生理过程中 $\text{K}^+$ 稳态情况

①实验目的：通过盐胁迫方式展现植物生理过程中  $\text{K}^+$  的变化。

②材料用具及仪器药品

检测样品：拟南芥（大豆、水稻、绿萝等植物均可）

检测仪器：非损伤微测系统（教学版）或非损伤微测系统（科研平台）或非损伤微测系统（研发平台）

使用耗材：NMT 专用固体  $\text{K}^+$  流速传感器

所需药品：0.1mM  $\text{CaCl}_2$ 、0.1mM  $\text{KCl}$ 、pH6.0

用具：培养皿、滤纸、样品固定专用树脂块、锡箔纸

③原理：钾元素是植物生长必不可少的营养物质，植物对钾元素的需求量也很大。钾元素对于植物的光合作用，蛋白质合成等许多其他功能有着至关重要的作用。进而影响植物的正常生长。盐碱环境会造成植物外界的渗透压过大，导致植株失水， $\text{K}^+$  也会随之流失，

④方法步骤

a. 将拟南芥（大豆、水稻、绿萝等植物均可）放入 0mM/100mM  $\text{NaCl}$  溶液中

b. 分别处理 24 小时。

c. 分别剪取一段盐处理和未盐处理拟南芥根（大豆、水稻、绿萝等植物均可），使用滤纸条和树脂块将样品进行固定，加入 5 毫升的测试液浸泡 30min。

d. 将测试液吸出，重新加入 5 毫升的测试液。

e. 将样品放入 NMT 系统中检测根部分生区表面  $\text{K}^+$  流速。

⑤实验报告：根据实验结果，解释盐处理和正常样品  $K^+$  的变化情况。

⑥预期结果：盐处理的样品  $K^+$  外排增大。

## 2 非损伤微测技术

非损伤微测技术 (Non-invasive Micro-test Technology, NMT) 及其命名, 是前美国航空航天局高级研究院、美国扬格公司和北京旭月公司创始人许越教授, 在匡廷云院士、杨福愉院士、林克椿教授的启发和帮助下, 以美国科学家 Lionel F. Jaffe 离子振荡电极技术为理论基础, 经过 20 多年的不懈努力, 经过模块化、自动化、专业化、智能化、标准化的技术创新, 商品化、商业化、产业化、国产化、国际化的应用创新, 以及‘活体功能组学’提出的理论创新, 成功创建自主知识产权的 NMT 技术, 并于 2021 年通过科技部‘世界领先’评审。NMT 是一种超高灵敏度, 非接触方式、以流速为单位, 检测材料外部离子分子浓度及其梯度的技术。

### 2.1 中国应用现状

2007 年, 美国扬格 (旭月北京) 非损伤技术测试中心开始向中国科研学者提供 NMT 服务, 自此拉开了 NMT 在中国的蓬勃发展之路。2009 年, 北京林业大学陈少良教授利用非损伤微测技术在胡杨抗盐机制中的研究成果, 于《Plant Physiology》上发表。这不仅是北京林业大学当时少有的高水平研究成果, 难能可贵的是, 研究通篇只使用了 NMT 这一种技术, 引得学术界纷纷侧目。2015 年, 中科院植物所种康教授利用

NMT 研究了水稻抗旱机制, 研究成果作为当期封面文章发表在了《Cell》上。这标志着中国学者应用 NMT 达到了世界先进水平。截至今日, 国内已有 27 个省、直辖市、自治区, 近 200 家高校院所的 300 多个实验室利用 NMT 进行科学研究。2009-2016 年的七年间, 共发表 SCI 文章 161 篇, 累计影响因子为 661。研究成果主要集中在植物科学、医学生理学、微生物学、环境科学、材料科学, 其中尤以逆境研究最为突出。

### 2.2 NMT 在中国的发展

旭月公司成立后, 在与美国扬格公司的共同努力下, 顺利完成了非损伤微测技术及系统的商业化, 并且建立了完善的售后服务体系。随后, 为了降低设备价格, 双方又联手推出了在中国组装的非损伤微测系统, 继续不遗余力的推动非损伤微测技术在中国的应用和普及。

## 3 简述授课老师的授课内容

3.1 干旱胁迫下 ABA 介导保卫细胞离子对大麦气孔运动的调控机制, 王耀生

3.2 茶树氮吸收效率的早期鉴定技术研究, 阮丽

氮是植物生长的重要营养元素, 在茶树栽培过程中常需施用大量氮肥, 不仅消耗大量的资源, 施用不当还会造成一系列环境问题。培育氮肥高效利用的茶树品种是解决这一问题的重要途径, 而建立快速筛选高效株系的早期鉴定方法对于缩短育种茶树育种年限具有重要意义。该研究分析龙井 43 (LJ43)

和中茶 108 (ZC108) 两个茶树品种在不同氮素水平下对氨态氮和硝态氮的吸收与利用数据, 通过与  $^{15}\text{N}$  同位素标记技术的对比, 验证非损伤微测技术 (NMT) 和实时荧光定量 (qRT-PCR) 技术在早期鉴定茶树株系氮素吸收利用能力方面的可行性与实用性, 以期建立茶树氮吸收效率的室内早期鉴定技术。试验结果表明,  $^{15}\text{N}$  同位素标记技术的稳定性和可重复性分别为 89.51%、99.26%, 而 NMT 的稳定性、可重复性分别为 95.22%、96.76%; 两种方法测定结果均显示茶树具有明显的喜铵特性; 硝酸根转运蛋白基因 CsNRT3.2 和 CsNRT2.4 在两个品种中均表现出诱导上调表达效应, 相比中茶 108, 龙井 43 中 CsNRT2.4 和 CsNRT3.2 具有更高的表达量, 表明 LJ43 对外界氮源的响应高于 ZC108。综上所述, 认为 NMT 技术可在短时间内处理并测得茶树的瞬时吸收速率, 且试验材料损耗少, 可以用于茶树氮瞬时吸收速率的早期鉴定; CsNRT2.4 和 CsNRT3.2 的表达量一定程度上反映了茶树对硝态氮吸收的能力。该研究可为氮高效茶树品种的早期鉴定技术建立提供依据

3.3 伴矿景天镉富集关键基因筛选与功能分析, 卓仁英

3.5 NMT 在植物纳米生物学中的应用, 孙健

## 参考文献

[1] 刘友良, 汪良驹. 植物对盐胁迫的反应和耐盐性 [J]. 余叔文, 汤章城. 植物生理与分子生物学. 北京: 科学技术出版社, 1998.752~

769.

[2] 刘友良、毛才良、汪良驹. 植物耐盐性研究进展 [J], 植物生理学通讯, 1987, (4): 1~7.

[3] 刘祖祺, 张石诚. 植物抗性生理学 [M]. 中国农业出版社, 1994

[4] 金美芳, 朱晓清. NaCl 胁迫对油菜种子萌发和幼苗生长的影响 [J]. 种子 2009,28(9): 76-79.

[5] 杨劲松. 中国盐渍土研究的发展历程与展望 [J]. 土壤学报, 2008,45(5):837-845.

[6] 奚天雪, 杨磊, 袁玫, 李梦琦, 张景华, 周安琪, 高霞莉, 温洪宇. NaCl 胁迫对甘蓝、白菜和油菜种子萌发的影响 [J]. 种子, 2016,35(06):32-35.

[7] 吕铭. 不同品种水稻幼苗对短期盐胁迫的生理响应 [D]. 扬州大学, 2021.

[8] 王晓冬, 侯佩臣, 侯瑞锋, 于春花, 高权, 陈泉, 王成. NaCl 胁迫对不同品种小麦发芽及根际  $\text{K}^+$  离子流的影响 [C]//Proceedings of 2011 International Conference on Biomedicine and Engineering (ISBE 2011 V1)., 2011:288-294.

[9] 王晓冬, 王成, 马智宏, 侯瑞锋, 高权, 陈泉. 短期 NaCl 胁迫对不同小麦品种幼苗  $\text{K}^+$  吸收和  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  积累的影响 [J]. 生态学报, 2011,31(10):2822-2830.

[10] 王晓冬, 侯佩臣, 侯瑞锋, 于春花, 高权, 陈泉, 王成. NaCl 胁迫对不同品种小麦发芽及根际  $\text{K}^+$  离子流的影响 [C]//Proceedings of 2010 First International Conference on Cellular, Molecular Biology, Biophysics and Bioengineering (Volume 4). Proceedings

of 2010 First International Conference on Cellular,2010:298-303.

[11] 朱志明,毛桂莲,许兴,王盛,郑蕊,杨淑娟. 盐胁迫下宁夏枸杞根系  $\text{Na}^{+}$ 、 $\text{K}^{+}$  平衡及抑制剂对其影响的研究 [J]. 干旱地区农业研究,2017,35(06):140-145.

[12] 边兰星,梁丽琨,颜坤,宿红艳,李丽霞,董小燕,梅惠敏. 木霉对盐胁迫下枸杞根与叶内离子平衡和光系统 II 的影响 [J]. 中国农业科学,2022,55(12):2413-2424.

[13] 胡肖. 盐胁迫状态下中心圆筛藻离子转运系统、光合系统及抗氧化系统的响应机制 [D]. 厦门大学,2014.

[14] 董彬彬. 盐胁迫对钝顶螺旋藻生长、离子响应及代谢产物的影响研究 [D]. 南京农业大学,2019.

[15] 郎涛. 盐胁迫下泌盐与非泌盐红树离子平衡调控信号网络研究 [D]. 北京林业大学,2014.

[16] 周和平,张立新,禹锋,等. 我国盐碱地改良技术综述及展望 [J]. 现代农业科技,2007(11):159-164.

[17] 许越,宋瑾,丁亚男,陈涤非,Joseph G.Kunkel. 拟南芥根部传导重力变化信号的  $\text{H}^{+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  的偶联运输 [C]//2007 中国植物生理学会全国学术会议论文摘要汇编.,2007:187.

[18] 吕杰,苗璐,蔡蕊,武慧,徐洪伟,周晓馥. 非损伤微测技术在植物根系生长发育研究中的应用 [J]. 生物技术,2013,23(01):89-93.

[19] 贾代东,刘爱琴,李惠通,于洋洋,魏志超,王俊男,周丽丽. 非损伤微测技术在植物生理生态学研究中的应用进展 [J]. 应用与

环境生物学报,2017,23(01):175-182.

[20] 李静,韩庆庆,段丽婕,王沛,李惠茹,王锁民,张金林. 非损伤微测技术在植物生理学研究中的应用及进展 [J]. 植物生理学报,2014,50(10):1445-1452.

[21] 刘滨硕,康春莉,王鑫,包国章. 羊草对盐碱胁迫的生理生化响应特征. 农业工程学报,2014,30(23):166-173. 1002-6819.2014.23.021

[22] 郭楠楠,陈学林,张继,陈金元,朱愿军,丁映童. 柽柳组培苗抗氧化酶及渗透调节物质对  $\text{NaCl}$  胁迫的响应. 西北植物学报,2015,35(8):1620-1625.

[23] 王鑫,朱悦,刘滨硕,包国章. 盐碱胁迫下羊草抗氧化酶活性的变化. 江苏农业科学,2015,43(5):209-211.

[24] 蔡西栗. 龙须菜对温度和盐度逆境胁迫的生理响应 [D]. 浙江:宁波大学,2012.

[25] 张云鹤,高大鹏,王晓蕾,邵玺文,郭丽颖,黄金睿,耿艳秋. 盐碱胁迫对水稻苗期光系统 II 性能的影响 [J]. 灌溉排水学报,2022,41(09):52-60+92.2022002.

[26] 孙羽,王麒,宋秋来,曾宪楠,冯延江,李柱刚,刘凯,来永才. 寒地水稻对盐碱胁迫的响应及耐盐碱生理机制研究进展 [J]. 黑龙江农业科学,2022(08):57-61.

[27] 许越. 非损伤微测技术—2022[J].NMT 通讯,2022(01):11-17.

(责任编辑:李雪霏)