

## 高粱*SbHKTs*基因的克隆及其在拟南芥中的功能验证

冯雪<sup>1,2,\*</sup>, 王甜甜<sup>2,3,\*</sup>, 郝怀庆<sup>2</sup>, 邹春静<sup>1,\*\*</sup>, 景海春<sup>2,\*\*</sup>

<sup>1</sup>华东师范大学生命科学学院, 上海200062; <sup>2</sup>中国科学院植物研究所北方资源植物重点实验室, 北京100093; <sup>3</sup>东营市园林局, 山东东营257091

**摘要:** 本试验克隆了高粱*HKT* (high affinity potassium transporter)基因家族3个成员*SbHKT1;4*, *SbHKT1;5*和*SbHKT2;1*, 并分析比较了这些基因在拟南芥中转运钠、钾离子的特性以及在抗旱方面的作用。结果表明, 外界高浓度钠胁迫对各转基因植株的生长均有一定的影响, 但这种抑制作用可在外源添加足量钾离子的情况下得到不同程度的缓解。此外, 干旱胁迫下, 转基因植株表现出优于突变体的抗旱性。这些结果表明, 高粱*HKT*基因不仅在作物耐盐方面具有重要作用, 同时在植物抗旱中也具有一定的功能。

**关键词:** 高粱*HKT*基因; 拟南芥; 耐盐性; 抗旱性

## Cloning of Sorghum *HKT* Genes and Their Function Validation in *Arabidopsis*

FENG Xue<sup>1,2,\*</sup>, WANG Tian-Tian<sup>2,3,\*</sup>, HAO Huai-Qing<sup>2</sup>, ZOU Chun-Jing<sup>1,\*\*</sup>, JING Hai-Chun<sup>2,\*\*</sup>

<sup>1</sup>School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200062, China; <sup>2</sup>Key Laboratory of Plant Resources, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; <sup>3</sup>Dongying Landscape and Greening Department, Dongying, Shandong 257091, China

**Abstract:** Three sorghum high affinity potassium transporter genes, *SbHKT1;4*, *SbHKT1;5* and *SbHKT2;1*, were cloned and constitutively expressed in *Arabidopsis hkt1-1* mutant, respectively, and the tolerance to salt and drought of the transgenic lines analyzed. Upon high Na<sup>+</sup> stress, the growth of all transgenic lines was inhibited, and this phenotype could be obviously alleviated when adequate K<sup>+</sup> was added. After water stress, we found that transgenic lines were more tolerant to drought than *athkt1-1* mutant line. These results indicated that *SbHKTs* not only played a role in tolerance to salt stress, but also exerted significant function in the presence of drought-stress.

**Key words:** sorghum *HKT*; *Arabidopsis*; salt resistance; drought tolerance

HKT蛋白家族(high affinity potassium transporter, HKT)是一类高亲和性钾离子转运蛋白家族, 定位在细胞膜上(Waters等2013)。大量研究表明该蛋白在盐胁迫下具有选择性吸收钠、钾离子的功能。模式植物拟南芥中仅有的*HKT*基因家族成员是*AtHKT1;1*, 该基因作用于根部木质部薄壁细胞膜, 高盐胁迫下可卸载根中木质部的钠离子, 限制其往植株地上部的运输, 从而一定程度上缓解地上部钠离子的毒害(Rus等2004)。小麦中*Nax2*位点在盐胁迫中较为重要, 其中的*TmHKT1;5-A*基因是发挥作用的关键基因, 可以减少植株叶片中的钠离子含量(Munns等2012)。*TaHKT1;5-D*是一个钠离子转运体, 可卸载根部木质部导管中的钠离子, 同时限制小麦根部钠离子向地上部的运输。研究发现, *TaHKT1;5-D* RNAi株系地上部叶片中的钠离子含量明显高于正常植株(Byrt等2014)。较其他物

种相比, 水稻(*Oryza sativa*)中拥有较多的*HKT*基因家族成员。粳稻品种‘日本晴’中有*OsHKT1;5*、*OsHKT2;1*和*OsHKT2;2*等9个成员(Garciadeblas等2003; Ren等2005)。Yao等(2010)对*OsHKT2;1*的研究中发现, 在酵母和蛙卵系统中, 外源添加钾离子与钙离子可以使*OsHKT2;1*调控的钠离子吸收能力减弱。总之, *HKT*基因在植物遭受盐胁迫的Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>平衡中具有重要的调控作用。

作为世界第五大栽培作物, 高粱具有生物产量高、光合效率高、耐贫瘠、耐旱、耐盐碱等特

收稿 2015-04-17 修定 2015-08-24

资助 国家科技支撑计划(2013BAD22B01和2015BAD15B03)和青年科学基金项目(31301326)。

\* 共同第一作者。

\*\* 共同通讯作者(E-mail: cjzou@bio.ecnu.edu.cn, Tel: 021-6223359; E-mail: hcjing@ibcas.ac.cn, Tel: 010-62836576)。

性,是一种具有较大发展潜力的优质能源作物(邵艳军2006; Adedayo等2014; Matsakasa等2014; Prashant等2014)。本实验室前期的研究发现,高粱*SbHKT1;4*基因既具有显著的Na<sup>+</sup>转运功能,也具有在Na<sup>+</sup>胁迫下选择性吸收K<sup>+</sup>的特性,参与了细胞内Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>平衡的调节(Wang等2014),这也是植物应对外界盐胁迫的一种自我保护机制。事实上植物响应盐胁迫的过程可分为两个阶段,即初期的渗透胁迫阶段和后期的离子毒害阶段(Zhu等2004; Munns和Tester 2008)。而盐害往往会引起植物的生理干旱,这两种非生物胁迫均与植物对渗透胁迫的响应息息相关。因此,将该基因的耐盐性与抗旱性综合起来评价将更有助于深入了解其生物学功能。

高粱*SbHKT1;4*、*SbHKT1;5*和*SbHKT2;1*基因与拟南芥*AtHKT1;1*具有同源性,因此,本试验将克隆到的基因转入拟南芥突变体*athkt1-1*中进行功能互补,以期进一步解析高粱*HKT*基因的功能。以高粱*HKT*基因家族成员*SbHKT1;4*、*SbHKT1;5*与*SbHKT2;1*的转基因拟南芥株系为材料,比较这些植株在盐胁迫下的生长情况,并对其地上部鲜重与钠、钾离子的含量进行了深入分析,旨在阐明*SbHKT1;4*、*SbHKT1;5*和*SbHKT2;1*的Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>转运特性及其与植物耐盐的关系。同时采用PEG6000模拟干旱的方法,通过测定主要渗透调节物质的含量和抗氧化酶的活性对供试植株的抗旱性进行比较,进而获得该基因在抗旱方面的相关信息,为后续的作物抗逆育种奠定基础。

材料与方法

1 试验材料

供试拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)材料为野生型Col (*gl1*), 突变体*athkt1-1* (*AT4g10310*的T-DNA插入突变株系), 转基因株系*SbHKT1;5/athkt1-1*、*SbHKT1;4/athkt1-1*和*SbHKT2;1/athkt1-1*。

2 供试转基因拟南芥植株的获得

2.1 *SbHKTs*基因的克隆、载体构建以及拟南芥的遗传转化

设计特异性引物(表1), 分别扩增高粱[*Sorghum bicolor* (L.) Moench]的3个*HKT*基因: *SbHKT1;4* (Sb06g027900)、*SbHKT1;5* (Sb03g021590)和*SbHKT2;1* (Sb10g029000)。PCR产物加A反应后连接

表1 扩增基因所用的引物序列

Table1 Primers of *SbHKT* genes cloning

| 引物名称         | 序列(5'→3')                 | 扩增基因            |
|--------------|---------------------------|-----------------|
| Sb06g027900F | ATGGCCGGAGCGCATAAGTT      | <i>SbHKT1;4</i> |
| Sb06g027900R | CTAACTAAGTTTCCAGGCTTTGCCT | <i>SbHKT1;4</i> |
| Sb03g021590F | ATGAAGTCCATCTCCG TCCCTAG  | <i>SbHKT1;5</i> |
| Sb03g021590R | TTAGCCTAGCTTCCATGCCTGAC   | <i>SbHKT1;5</i> |
| Sb10g029000F | ATGCCTATTCGGTTCCATGTCTTG  | <i>SbHKT2;1</i> |
| Sb10g029000R | TCACCTCTGCG TCGCTGTC      | <i>SbHKT2;1</i> |

到Gateway系统入门载体pCR8/GW/TOPO上, 鉴定无误的重组入门载体, 提质粒用于LR反应, 将连接产物转化大肠杆菌DH5α菌株, 选用pMDC32为植物过表达载体, 卡那霉素抗性, 筛选鉴定阳性单克隆, 提质粒备用。通过农杆菌(GV3101)介导的方法分别将重组质粒转入*athkt1-1*中, 用潮霉素(27 μg·mL<sup>-1</sup>)对转化得到的拟南芥种子进行逐代筛选。

2.2 转基因拟南芥植株的*SbHKTs*基因表达分析

提取转基因植株总RNA, 反转录成cDNA, 取1 μL为模板, 用*Actin*引物以不同转基因株系的cDNA为模板扩增, 循环数28个, 取等量PCR产物电泳。根据电泳条带的亮度调整模板量, 直至亮度一致。分别用高粱*SbHKTs*基因检测引物(表2), 以调整好的模板量进行PCR, 根据琼脂糖凝胶电泳的条带亮度比较*SbHKTs*基因的表达差异。

表2 基因检测引物

Table 2 Primers of *SbHKTs* expression in transgenic *Arabidopsis*

| 引物名称  | 序列(5'→3')              | 检测基因            |
|-------|------------------------|-----------------|
| Sb06F | GGGAGAAGCTGTCCAACG     | <i>SbHKT1;4</i> |
| Sb06R | GAGAAGCCAACATTTCCATAA  | <i>SbHKT1;4</i> |
| Sb03F | ATGGCGTCCTTCAAGTC      | <i>SbHKT1;5</i> |
| Sb03R | CAGCAGGTGGTCGTAGC      | <i>SbHKT1;5</i> |
| Sb10F | TCTCCTCTGCTGCCTGAACTGG | <i>SbHKT2;1</i> |
| Sb10R | CGTCCTGCACCGACAACAAT   | <i>SbHKT2;1</i> |

3 转基因拟南芥植株Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>转运表型分析与离子含量测定

3.1 表型分析

各转基因植株在1/2MS培养基上发芽生长10 d后, 转移至相应表型分析培养基(Mascher等2002; Rus等2004)。

NaCl盐敏感表型分析: 对照(基本培养基)、处理1 (基本培养基+75 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 简称为75Na)、处理2 (基本培养基+75 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl+5 mmol·L<sup>-1</sup> KCl, 简称为75Na+5K)。

缺钾胁迫表型分析: 处理1 (缺钾培养基+20 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 简称为20Na+0K), 处理2 (缺钾培养基+20 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl+5 mmol·L<sup>-1</sup> KCl, 简称为20Na+5K)。

于竖板处理7 d后拍照记录表型。取照后称重记录鲜重, 每个株系至少20株, 每处理3次重复。

3.2 离子含量测定

将各转基因拟南芥种子播种于发芽培养基中生长3周, 挑选整齐一致的植株, 转移至液体基本培养基和液体缺钾培养基中生长2 d。然后将NaCl和KCl母液加入液体培养基中, 使终浓度与竖直板的实验处理组一致(见3.1节)。48 h后取地上部, 105 ℃杀青, 65 ℃烘至恒重, 待测钠、钾离子含量(Wang等2014)。每个株系至少取50株进行测定, 每处理2次重复。

4 干旱胁迫下供试转基因拟南芥植株的相关指标测定

试验采用PEG6000模拟干旱的方法进行。先将消毒后的拟南芥种子置于1/2MS培养基中培养13 d, 稍后移入装有蛭石的育苗盘中, 用1/4Hoagland营养液培养(Wang等2014)。15 d后开始处理幼苗: 设置对照(1/4Hoagland营养液)、10% (10% PEG6000+1/4Hoagland营养液)和20% (20% PEG6000+1/4Hoagland营养液) 3个浓度梯度, 每处理3次重复, 期间量取等体积处理液灌溉幼苗3次。于处理后第14天取样, 分别用于测定可溶性总糖(total solubal sugar, TSS)、游离脯氨酸(free proline, FP)的含量, 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、愈创木酚过氧化物酶(guaiacol peroxidase, GPX)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)的活性。拟南芥培养间的温度为21 ℃, 光周期为16 h/8 h。

TSS含量采用蒽酮法测定(高俊凤2006)。FP含量采用碘基水杨酸法测定(Bates等1973; 张殿忠等1990)。SOD含量采用氮蓝四唑(nitroblue tetrazolium, NBT)光还原法测定(Hwang等1999)。GPX活性采用愈创木酚法测定(Alves等2006), APX活性采用抗坏

血酸法测定(Zhu等2004), CAT活性通过记录单位时间内过氧化氢的减少量来计算(Azevedo等1998)。

实验结果

1 转基因拟南芥植株的获得及基因表达分析

本试验通过PCR克隆得到高粱*HKT*基因*Sb-HKT1;4*、*SbHKT1;5*和*SbHKT2;1*, 片段大小分别为1 692、1 497和1 638 bp。构建拟南芥表达载体, 获得重组质粒35S::pMDC32-*SbHKT*。供试的各转基因植株均为逐代筛选后的T<sub>3</sub>代纯合株系(表3)。进一步利用RT-PCR检测了各转基因株系的基因表达情况, 结果(图1)显示, *HKT*基因在相应的转基因植株中均有表达, 表明转化后的植株可用于后续研究。

表3 转*SbHKT*基因的拟南芥植株统计

Table 3 The number of *SbHKT*s transgenic plants in *Arabidopsis*

| 转基因植株                    | 阳性株系(T <sub>1</sub> ) | 阳性株系(T <sub>2</sub> ) | 纯合株系(T <sub>3</sub> ) |
|--------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>SbHKT1;4/athkt1-1</i> | 11                    | 6                     | 6                     |
| <i>SbHKT1;5/athkt1-1</i> | 9                     | 3                     | 3                     |
| <i>SbHKT2;1/athkt1-1</i> | 6                     | 5                     | 3                     |

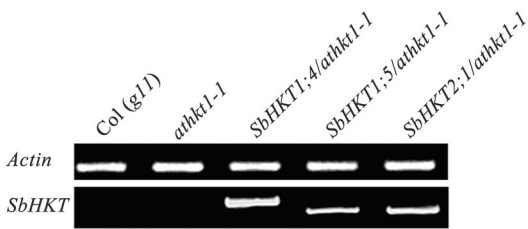


图1 转基因拟南芥植株中*SbHKT*s基因的表达

Fig.1 Expression patterns of *SbHKT* genes in transgenic *Arabidopsis*

2 转基因拟南芥植株的Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>转运特性分析

2.1 转基因拟南芥植株的NaCl敏感性比较

由图2-A可看出, 在对照培养基上, 各供试植株的表型无明显差异。当添加75 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl后, 各植株均受到不同程度的盐胁迫, 地上部鲜重明显降低(图2-B)。钠、钾离子含量测定结果表明, 各植株的地上部钠离子含量较对照有所上升, 而钾离子含量则相应减少, 从而导致整个植株的Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>比显著升高(图2-C~E)。从图2-E可看出, 75 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl处理的*SbHKT1;5/athkt1-1*与*SbHKT2;1/athkt1-1*

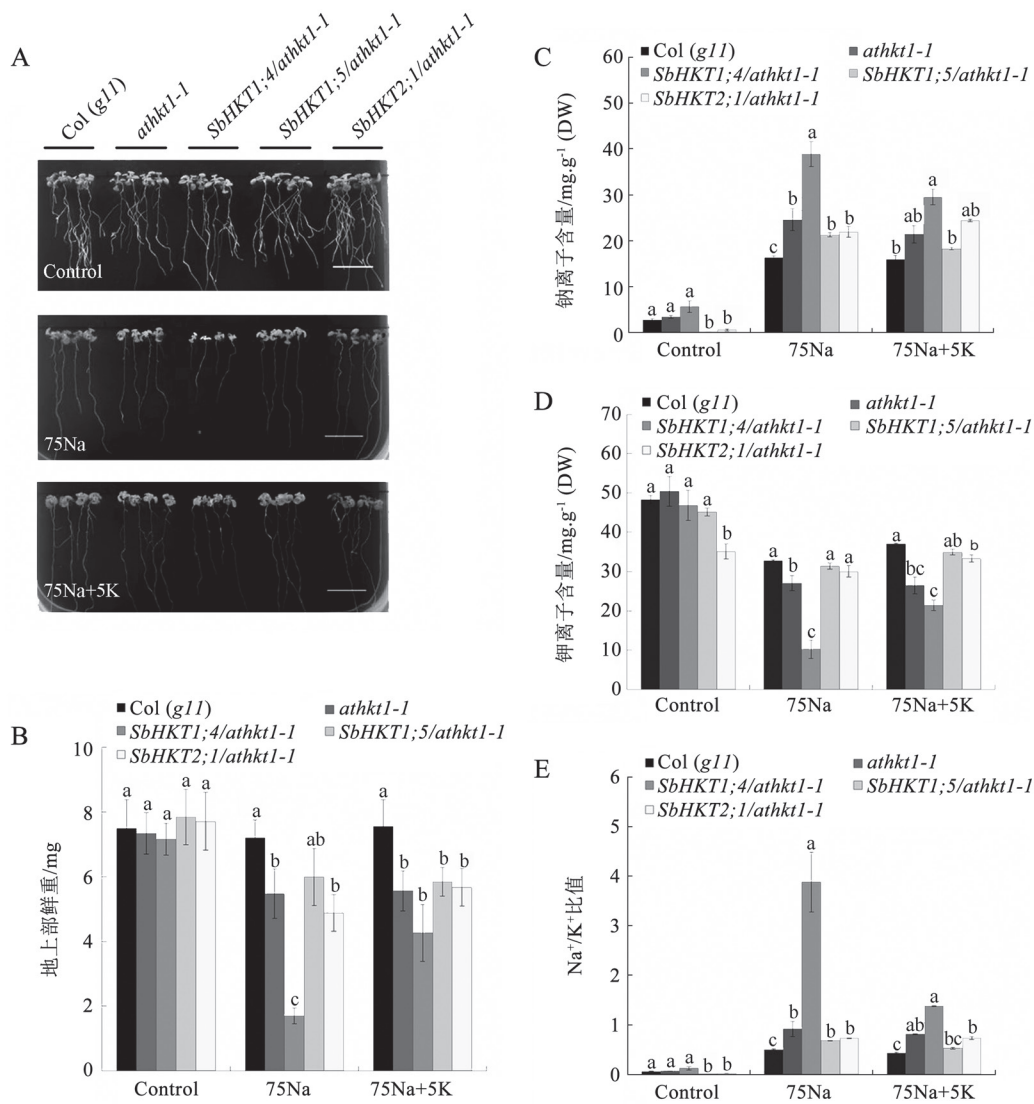


图2 转基因拟南芥植株的钠敏感表型分析

Fig.2 Analysis of Na sensitive phenotype of *SbHKTs* transgenic lines

标尺代表1 cm; 小写字母代表同一处理不同拟南芥植株的差异显著( $P<0.05$ )。下图同此。

的 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ 比显著低于*SbHKT1;4/athkt1-1* ( $P<0.05$ )。在75 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl+5 mmol·L<sup>-1</sup> KCl处理中发现, 各植株的盐胁迫表型有所恢复, 其 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ 比也相应降低, 但*SbHKT1;5/athkt1-1*与*SbHKT2;1/athkt1-1*的变化不及*SbHKT1;4/athkt1-1*明显。

以上结果表明, 高粱*SbHKTs*转基因拟南芥植株对钠离子的敏感性不同。与*SbHKT1;5*和*SbHKT2;1*相比, *SbHKT1;4*表现出明显的钾离子依赖的钠离子敏感表型。

2.2 转基因拟南芥植株的缺钾胁迫表型分析

为了进一步分析*SbHKTs*在植株体内钾离子平

衡中的作用, 本试验对供试植株进行了缺钾胁迫处理。在缺少钾离子并添加20 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl的培养基中, 各供试植株表现出不同程度的盐胁迫表型, 其敏感性由强到弱依次为*SbHKT1;4/athkt1-1*、*SbHKT2;1/athkt1-1*、*SbHKT1;5/athkt1-1*。*SbHKT2;1/athkt1-1*与*SbHKT1;5/athkt1-1*的地上部鲜重显著高于相同处理下的*SbHKT1;4/athkt1-1* (图3-A和B)。对处理后植株的离子含量进行分析发现(图3-C~E), *SbHKT2;1/athkt1-1*与*SbHKT1;5/athkt1-1*的钠离子含量明显低于*SbHKT1;4/athkt1-1*, 钾离子含量较高, 表现出较低的 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ 比。当添加

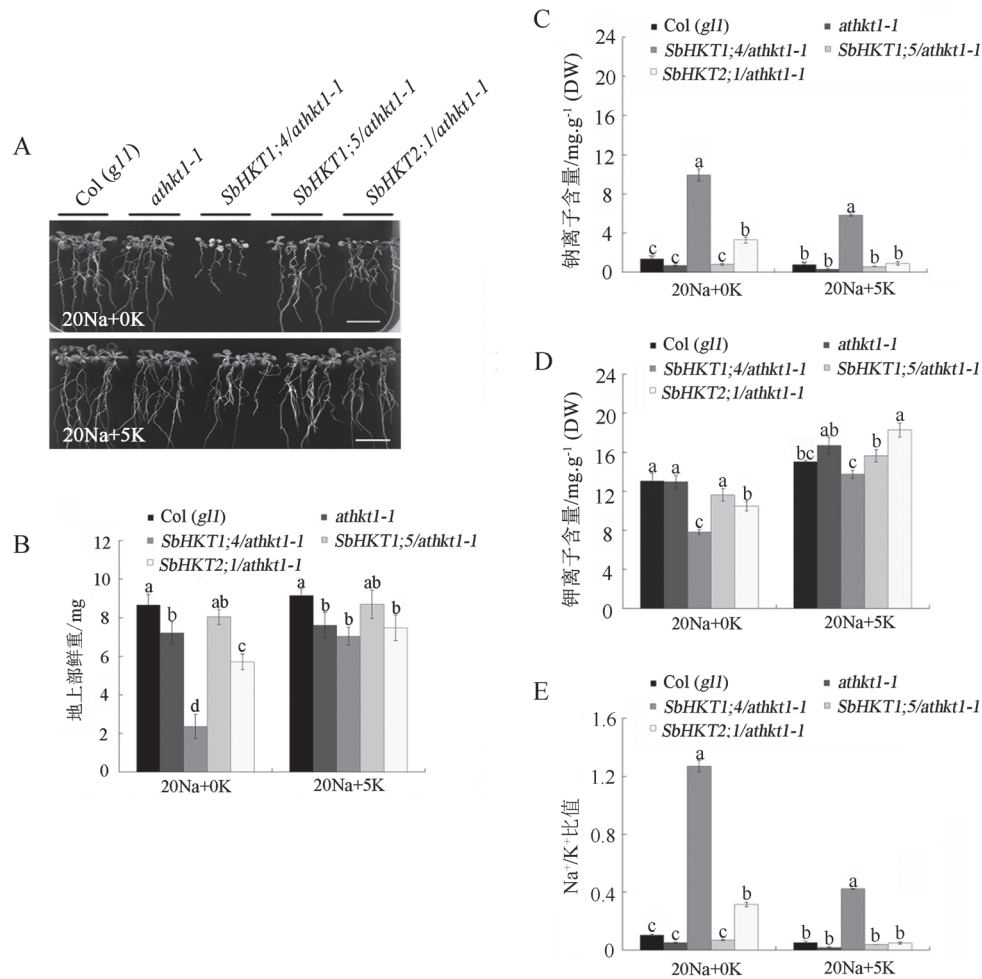


图3 转基因拟南芥植株的缺钾胁迫表型分析

Fig.3 Analysis of K sensitive phenotype of *SbHKTs* transgenic lines

5 mmol·L<sup>-1</sup> KCl后, 各植株的盐胁迫表型均有所缓解, 钠离子含量降低, 钾离子含量升高, *SbHKT2;1/athkt1-1*与*SbHKT1;5/athkt1-1*呈现出低于*SbHKT1;4/athkt1-1*的Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>比。

上述试验结果表明, 当培养基中缺少钾离子时, 各转基因植株受到不同程度的钠离子胁迫。此时, 该基因可吸收外界环境中的钠离子, 为钠离子转运载体; 在添加足量的钾离子后, 各转基因植株所受胁迫症状有所减轻。此时, 该基因由Na<sup>+</sup>转运体转变为Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>共转运体, 从而保证了植株体内的Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>平衡。

### 3 转基因拟南芥植株的抗旱性分析

#### 3.1 干旱胁迫对转基因拟南芥植株渗透调节物质及活性氧代谢的影响

干旱胁迫下, 在植株的耐受范围内, 与植株抗

旱性成正相关的各项指标值均呈现增长趋势(李洁 2014), 一旦所受胁迫超出其耐受范围, 相应含量就会降低或增长率减慢。由图4和5可以看出, 干旱处理后, 各指标测定值较对照相比均有较明显的增加。

植物遭受干旱胁迫时, 游离脯氨酸、可溶性总糖、甜菜碱等渗透调节物质在植株体内发挥重要调节作用(Jones等1980; Ashraf和Iram 2005)。本文测定了在不同程度干旱处理的各转基因拟南芥植株体内FP与TSS的变化。结果(图4)表明, 随着PEG胁迫浓度的增加, FP与TSS的含量均呈现先增加后降低的趋势。20% PEG处理下, *SbHKT1;4/athkt1-1*、*SbHKT1;5/athkt1-1*与*SbHKT2;1/athkt1-1*的TSS含量均高于*athkt1-1*。各植株的FP含量在20% PEG处理下的差异显著, 呈现出*SbHKT2;1/*

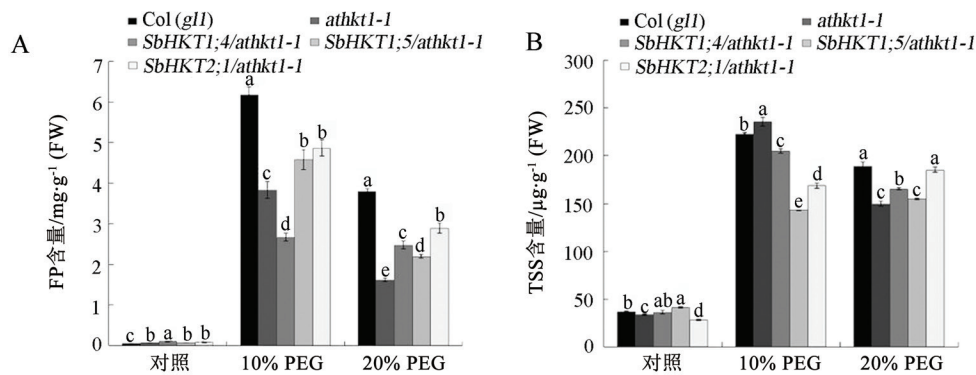


图4 不同干旱胁迫对供试转基因拟南芥植株渗透调节物质的影响

Fig.4 Effects of different drought stress on osmotic regulation substances in transgenic lines

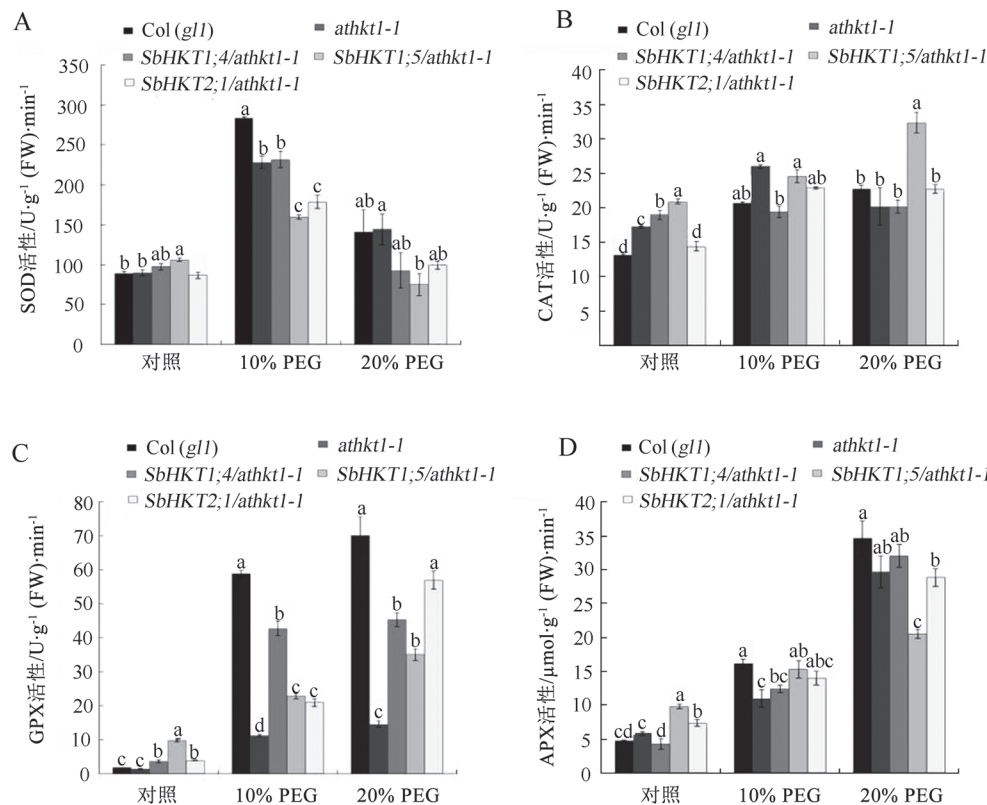


图5 不同干旱胁迫对转基因拟南芥植株活性氧代谢的影响

Fig.5 Effects of different drought stress on reactive oxygen metabolism in transgenic lines

*athkt1-1* > *SbHKT1;4/athkt1-1* > *SbHKT1;5/athkt1-1* > *athkt1-1* 的趋势。各供试植株的变化表明, 体内TSS和FP含量的增加是其应对干旱的重要策略之一。

植物遭受干旱刺激时另一个重要的变化就是体内活性氧自由基(reactive oxygen specise, ROS)的增加, 普遍认为植株体内抗氧化酶活性的增加有助于清除大量产生的ROS, 减轻细胞受到的伤害

(Mascher等2002)。本试验测定了在该过程中起重要作用的SOD、GPX、APX和CAT的活性。结果(图5)表明, 随处理浓度增长, 供试植株的SOD活性呈现先增加后降低的趋势, 而CAT、GPX和APX活性基本呈现增长的状态。这些结果表明, 遭遇干旱胁迫时, SOD、GPX、APX和CAT活性不同程度的增加有利于植株抵御干旱。

3.2 转基因拟南芥植株各指标的方差分析及相关分析

对供试转基因拟南芥的不同测定指标进行方差分析, 由表4可以看出, 在处理间、品种间及其交互间, TSS、FP、SOD、GPX、CAT和APX的含量或活性均存在极显著差异( $P<0.01$ )。对供试转

基因拟南芥的6个生理指标进行相关分析, 得到其相关系数矩阵(表5)。TSS分别同SOD、FP、GPX存在极显著相关性( $P<0.01$ ), 与APX、CAT的相关性显著( $P<0.05$ ), SOD与FP, FP与GPX, GPX与APX之间相关性极显著( $P<0.01$ )。由此可见, 各指标之间存在不同程度的相关性。

表4 干旱胁迫条件下转基因拟南芥植株不同指标的方差分析F值

Table 4 F values of variance analysis of different parameters in trasgenic lines under drought stress

| 变异来源  | TSS         | SOD      | FP          | GPX       | APX       | CAT      |
|-------|-------------|----------|-------------|-----------|-----------|----------|
| 处理    | 4 725.610** | 98.303** | 1 524.189** | 459.719** | 638.961** | 75.860** |
| 株系    | 71.966**    | 5.453**  | 72.982**    | 94.869**  | 4.210**   | 26.176** |
| 处理与株系 | 68.995**    | 4.282**  | 33.367**    | 36.065**  | 15.176**  | 10.663** |

\*\*代表 $P<0.01$ 显著性水平。

表5 转基因拟南芥植株各指标的相关系数矩阵

Table 5 Correlation coefficient matrix of different indexes in transgenic lines

| 指标  | TSS    | SOD    | FP     | GPX    | APX  | CAT  |
|-----|--------|--------|--------|--------|------|------|
| TSS | 1.00   |        |        |        |      |      |
| SOD | 0.70** | 1.00   |        |        |      |      |
| FP  | 0.91** | 0.82** | 1.00   |        |      |      |
| GPX | 0.73** | 0.34   | 0.71** | 1.00   |      |      |
| APX | 0.58*  | -0.01  | 0.38   | 0.75** | 1.00 |      |
| CAT | 0.59*  | 0.15   | 0.46   | 0.38   | 0.39 | 1.00 |

\*和\*代表各指标之间相关性的显著性水平( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ )。

3.3 转基因拟南芥植株各指标的主成分分析

为了明晰不同转基因株系与处理组合的抗旱性, 本试验进一步采用了主成分分析法对数据进行解析。其中, 主成分1与主成分2对总体变异的解释度分别为62.29%、20.84%。总体来说, 二者的解释度达到83.13% (表6), 能够很好地反映各因素之间的关系。主成分1主要解释了TSS、FP和GPX对总体变异的影响, 主成分2则重点解释了SOD与APX对总体变异的贡献。两主成分均与植株的耐旱性成正相关。由图6-A可以看出, GPX、

CAT、APX三者具有较高的相关性, TSS、FP与SOD之间的相关性较高。所有处理与植株的组合可归类为三组(图6-B), 即“0-c”组(红色)、“1-c”组(蓝色)和“2-c”组(绿色)。“0-c”组处于图形的左边部分, 结合图6-A可知, 与“1-c”组和“2-c”组相比, 所测定指标对“0-c”组的解释度弱一些。APX与GPX能够很好的反映图中“2-c”组的情况, 而TSS、FP与SOD能够较好的反映图中“1-c”组的情况。主成分1与主成分2皆是抗旱性组分, 由此可见, “2-c”组在整个处理过程中表现出了较强的抗旱性, 具有代表性, 故将其作为后续评价的依据(Dorostkar等2015)。

3.4 转基因拟南芥植株各指标隶属函数值分析

植物的耐旱性是一个由多种因素控制的综合性状(Huang等2009; Zhu 2002; Miller等2008)。本试验采用隶属函数值法对各植株的抗旱性做了综合评价。通过计算转基因拟南芥植株在模拟干旱条件下的TSS与FP含量, SOD、GPX、CAT和APX活性的隶属函数值, 获得平均隶属值并对其进行排序(表7), 由此对各株系的抗旱性做出综合评价(张卫星等2007)。结果表明, 所有转基因植株的抗旱性均大于*athkt1-1*, 其中*SbHKT2;1/athkt1-1*和

表6 转基因拟南芥植株各指标的主成分贡献率及系数矩阵

Table 6 Principle component loading for measured parameters of transgenic lines

| 主成分  | 变化比例/% | 累计贡献率 | TSS    | SOD    | FP     | GPX    | APX    | CAT    |
|------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 主成分1 | 62.29  | 62.29 | -0.501 | -0.342 | -0.480 | -0.435 | -0.336 | -0.315 |
| 主成分2 | 20.84  | 83.13 |        | 0.648  | 0.281  | -0.268 | -0.603 | -0.244 |

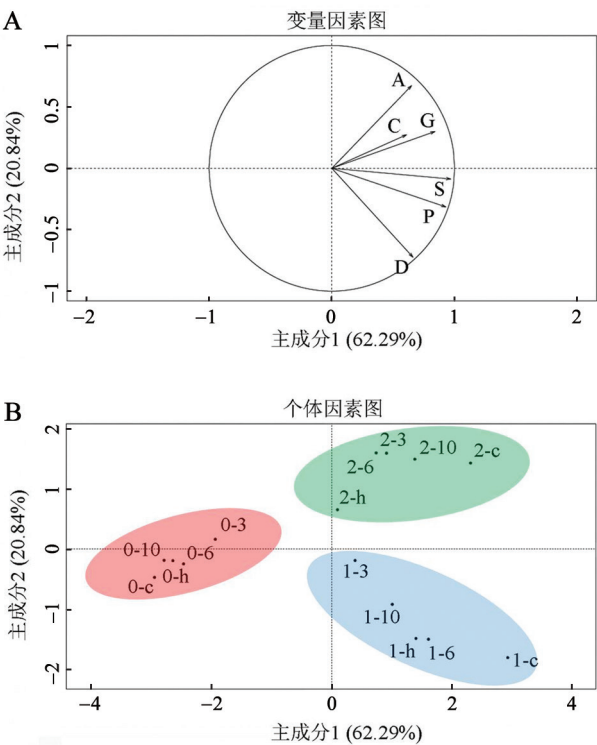


图6 转基因拟南芥植株各指标主成分分析结果  
Fig.6 Biplot for measured parameters of transgenic lines  
A: 变量因素图, D: SOD; S: TSS; C: CAT; G: GPX; P: FP; A: APX. B: 个体因素图, 0: 对照组; 1: 10% PEG处理组; 2: 20% PEG处理组; c: Col (*gll*); h: *athkt1-1*; 3: *SbHKT1;5/athkt1-1*; 6: *SbHKT1;4/athkt1-1*; 10: *SbHKT2;1/athkt1-1*.

*SbHKT1;5/athkt1-1*为中抗(middle resistance, MR), *SbHKT1;4/athkt1-1*为弱抗性(little resistance, LR), 而*athkt1-1*则为不抗(no resistance, NR), Col (*gll*)的抗性高于其他株系(高抗, high resistance, HR)。该结果进一步验证了图6-B的结果。

讨 论

1 高粱*SbHKTs*在高盐胁迫下具有调节植株体内Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>平衡的功能

在外界高盐浓度下选择性吸收钾离子, 维持体内的Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>平衡, 这是植物耐盐机制的一个重要内容。在盐芥(*Thellungiella halophila*)中*TsHKT1;2*可以通过高钠条件下选择性吸收钾离子来维持体内的Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>平衡(Ali等2012)。小花碱茅(*Puccinellia tenuiflora*)中的*PutHKT2;1*为Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>共转运体, 可以在低钾及高钠条件下介导钾离子的吸收(Ardie等2009)。研究者从赤桉中分离得到2个*HKT*家族成员: *EcHKT1;1*和*EcHKT1;2*。在异源系统非洲爪蟾卵母细胞的表达中发现, 该基因的钾离子吸收能力可在外界有钠离子存在时增强, 在外界无钠离子的情况下, 也可以选择性吸收钾离子(Liu等2001)。研究表明, 水稻*No-OsHKT2;2/1*基因同样具有高Na<sup>+</sup>条件下吸收K<sup>+</sup>的特性(Oomen等2012)。

表7 转基因拟南芥植株不同指标的隶属函数值及耐旱性评价

Table 7 Subordinate function (SF) values of different transgenic lines

| 株系                       | TSS     | SOD     | FP      | GPX     | APX     | CAT     | 平均隶属值  | 抗旱性 |
|--------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|-----|
| <i>SbHKT1;4/athkt1-1</i> | 0.40907 | 0.29804 | 0.27375 | 0.47183 | 0.65898 | 0.25060 | 0.3937 | LR  |
| <i>SbHKT1;5/athkt1-1</i> | 0.22257 | 0.46597 | 0.38685 | 0.32308 | 0.15107 | 0.93148 | 0.4135 | MR  |
| <i>SbHKT2;1/athkt1-1</i> | 0.77190 | 0.33514 | 0.55473 | 0.64000 | 0.51760 | 0.39506 | 0.5357 | MR  |
| <i>athkt1-1</i>          | 0.12737 | 0.58794 | 0.04115 | 0.02738 | 0.55418 | 0.25358 | 0.2653 | NR  |
| Col ( <i>gll</i> )       | 0.83186 | 0.57203 | 0.91878 | 0.82827 | 0.77444 | 0.39590 | 0.7202 | HR  |

本试验发现, 供试的各转基因拟南芥植株的生长在盐胁迫下均受到不同程度的影响, 其钠离子敏感性依次为: *SbHKT1;4/athkt1-1*>*SbHKT2;1/athkt1-1*>*SbHKT1;5/athkt1-1*, 且此敏感性可随着足量钾离子的添加而得到缓解, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>比值趋于正常, 从而维持植株的正常代谢水平。这与前人关于*HKT*的Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>转运特性的研究结果一致(Ali等2012; Oomen等2012), 也很有可能是高粱相比其他植物更为耐盐的一个重要原因(Wang 等2014)。

2 高粱*SbHKTs*具有提高植株抗旱性的功能

2.1 干旱胁迫下植物体内渗透调节物质的响应

普遍认为, 逆境胁迫时, 植物体内渗透调节物质的增加可以降低细胞的渗透势使其正常吸水(Pinheiro等2001; Kavi等2005)。除此之外, 渗透物质的积累还可以调节植物体内的氧化还原反应以及糖的信号转导(Hare等1998)。大量研究表明, 可溶性总糖、游离脯氨酸、甜菜碱等渗透调节物质在植物遭遇干旱胁迫时发挥重要作用(Jones等

1980; Ashraf和Iram 2005)。作为植物体内的渗透调节物质之一, 游离脯氨酸的含量在正常情况下很低, 但当受到如干旱、低温等逆境刺激时, 其含量会显著升高以抵御外界胁迫。因此, 干旱胁迫下植物体内游离脯氨酸的积累量可以作为植物抗旱性比较的一个重要衡量指标(Rhodes等1986; De-launey和Verma 1993)。贾根良等(2008)认为干旱胁迫显著增加了糜子体内的游离脯氨酸含量, 提高了其抗逆性。在利用PEG6000模拟干旱的条件下, 胡桃地上部和地下部的脯氨酸含量均有显著升高, 相关分析结果表明, 游离脯氨酸含量与胡桃抗旱性关系密切, 可将其作为筛选抗旱性胡桃的重要分子标记(Lotfi等2009)。本试验结果表明干旱处理后供试拟南芥植株的脯氨酸含量显著升高(较对照), 这与前人的研究结果一致(Ashraf和Iram 2005; 赵春桥等2015)。

可溶性总糖可以在一定范围内维持植物体内的渗透压。逆境胁迫下, 其含量的高低在一定程度上也可以反映植物的抗逆能力。Kameli和Losel (1995)在对小麦的研究中发现, 干旱显著提高了叶片的可溶性糖含量。有研究表明, 糖信号与ABA代谢途径的相互作用, 可能是植物受到干旱胁迫时延缓衰老的重要原因(Paul 2007; Wingler和Roitsch 2008)。干旱亦可使高粱胚和胚乳中的葡萄糖和蔗糖浓度提高(Gill等2003)。本试验研究发现各供试转基因拟南芥植株的可溶性总糖含量在干旱处理后显著升高, 说明高浓度的可溶性糖有利于植物应对干旱胁迫, 这与Sanchez等(1998)对不同品种豌豆抗旱性比较的结果一致。

## 2.2 干旱胁迫下植物体内活性氧代谢的变化

SOD、GPX、APX与CAT是植物体内重要的保护性酶。正常情况下, 这些酶类与植物体内产生的自由基处于平衡状态(Zhang和Krikham 1994)。但当受到逆境胁迫时, 植物体内会产生大量的ROS, 原有的平衡被打破, 此时, 这些抗氧化酶便发挥各自的功能, 清除ROS, 从而确保植物能顺利度过逆境(Mascher等2002)。

研究者对不同花生品种的抗旱性比较后发现, SOD和CAT是花生适应干旱环境的主要抗氧化酶(张智猛等2013)。Ghahfarokhi等(2014)比较了6个玉米杂交种的抗旱性认为, 干旱胁迫增加了各品种的CAT活性, 复水后, 相应含量降低。Gao等

(2009)的研究表明, 干旱胁迫后, 二倍体杂种高山松的SOD、CAT、GPX、APX活性均显著高于两亲本, 抗旱性强于双亲, 从而证明了杂种优势的存在。干旱胁迫下, 增加体内的过氧化酶活性以抵御逆境是植物适应干旱的方式之一(Mascher等2002)。由此可见, 将各种抗氧化酶活性的高低作为评价植物抗旱性的方法之一是可行且可信的。本试验结果表明, 干旱处理后, 各供试材料的SOD、CAT、GPX、APX活性均存在不同程度的升高, 这与前人的报道一致, 是植物应对干旱胁迫的一个重要策略(Gao等2009; Mascher等2002)。

## 2.3 高粱*SbHKTs*转基因拟南芥植株抗旱性评价

干旱胁迫对植物的影响是多方面的, 因此, 很难用某个单一指标来评价植物的抗旱性, 本试验采用模糊数学中的隶属函数值法对同一处理各品种的抗旱性进行了比较。该法通过计算各指标的平均隶属值对植株某一特性进行排序, 避免单一指标评价的片面性, 目前已普遍应用于玉米、花椒、胡枝子、蓖麻等的抗旱性研究中(席万鹏等2004; 张卫星等2007; 何雪银等2008; 王昌禄等2009; 王志泰等2013)。已有报道表明, 运用隶属函数值法可将21个甘蔗品种依据不同的抗寒性分为3种类型: 高抗、中抗、低抗(Zhang等2015)。依据对镉的抵抗性不同, Xie等(2014)通过此法将不同狗牙根品种分为两类, 即耐镉型及镉敏感型。本试验根据抗旱性不同将转基因植株进行分类, *SbHKT1;5/athkt1-1*与*SbHKT2;1/athkt1-1*为中抗, *SbHKT1;4/athkt1-1*为低抗, *athkt1-1*为不抗, Col(*gll*)为高抗。转基因植株抗旱性强于突变体, 说明*SbHKTs*具有提高拟南芥抗旱性的作用。但是由于植物抗旱是一个数量性状, 其响应逆境胁迫是一个复杂的过程(Zhu 2002; Davletova等2005; Tran等2007), 因此, 对于*SbHKTs*在植物抗旱方面的具体功能还需要进一步的深入研究。

## 2.4 结论

以往对于植物体中*HKT*基因的研究多集中在其离子转运方面的作用(Rubio等1995; Pardo和Quintero 2002; Lunde等2007)。本试验对*SbHKTs*转运 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ 的特性进行了分析, 同时对其抗旱性也做了深入研究。结果表明, 在外界高钠条件下, 高粱*HKT*基因可选择性的吸收钾离子, 从而维持植株体内的 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ 比值在正常代谢水平, 这种作用机制在

作物耐盐方面意义重大。此外, *SbHKTs*在一定程度上还提高了供试转基因拟南芥植株的抗旱性, 其抗旱性由大到小依次为*SbHKT2;1/athkt1-1*、*SbHKT1;5/athkt1-1*、*SbHKT1;4/athkt1-1*、*athkt1-1*。转基因植株的抗旱性强于突变体, 说明高粱*HKT*基因在植株抗旱方面也发挥着一定的重要作用。由此可见, 高粱*HKT*基因不仅在植物耐盐中发挥作用, 在干旱应答中也行使重要功能。该结果为后续的作物抗逆育种提供了一个新的思路。

### 参考文献

- 高俊凤(2006). 植物生理学实验指导. 第1版. 北京: 高等教育出版社, 144~147
- 何雪银, 文仁来, 吴翠荣, 周锦国(2008). 模糊隶属函数法对玉米苗期抗旱性的分析. 西南农业学报, 21: 52~56
- 贾根良, 代惠萍, 冯佰利, 张社奇, 张嵩午(2008). PEG模拟干旱胁迫对糜子幼苗生理特性的影响. 西北植物学报, 28: 2073~2079
- 李洁(2014). 植物干旱胁迫适应机制研究进展. 广东农业科学, 19: 154~159
- 邵艳军, 山仑, 李广敏(2006). 干旱胁迫与复水条件下高粱、玉米苗期渗透调节与抗氧化比较研究. 中国生态农业学报, 14: 68~70
- 王昌禄, 毕滔滔, 王玉荣, 陈勉华, 李凤娟, 吴勃(2009). 用隶属函数法评价10个蓖麻品种抗旱性. 河南农业科学, 11: 44~47
- 王志泰, 马瑞, 马彦军, 李毅(2013). 利用隶属函数法分析胡枝子抗旱性. 干旱区资源与环境, 27: 119~123
- 席万鹏, 王友科, 孙飞鹏(2004). 利用隶属函数法综合评价花椒的抗旱性. 甘肃林业科技, 29: 5~6
- 张殿忠, 汪沛洪, 赵会贤(1990). 测定小麦叶片游离脯氨酸含量的方法. 植物生理学通讯, 4: 62~65
- 张卫星, 赵致, 柏光晓, 付芳婧(2007). 不同基因型玉米自交系的抗旱性研究与评价. 玉米科学, 15: 6~11
- 张智猛, 戴良香, 宋文武, 丁红, 慈敦伟, 康涛, 宁堂原, 万书波(2013). 干旱处理对花生品种叶片保护酶活性和渗透物质含量的影响. 作物学报, 39: 133~141
- 赵春桥, 陈敏, 侯新村, 朱毅, 武菊英, 范希峰(2015). 干旱胁迫对柳枝稷生长与生理特性的影响. 干旱区资源与环境, 3: 126~130
- Adedayo OA, Ganiyu O, Oluwaseun JA, Boligon AA, Athayde ML (2014). Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] leaf sheath dye protects against cisplatin-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. J Med Food, 17: 1332~1338
- Ali Z, Park HC, Ali A, Oh DH, Aman R, Kropornicka A, Hong H, Choi W, Chung WS, Kim WY et al (2012). *TsHKT1;2*, a *HKT1* homolog from the extremophile *Arabidopsis* relative *Thellungiella salsuginea* shows K<sup>+</sup> specificity in the presence of NaCl. Plant Physiol, 158: 1463~1474
- Alves DR, Guerreiro-Filho O, Paulo M (2006). Phenol contents, oxidase activities, and the resistance of coffee to the leaf miner *Leucoptera coffeella*. J Chem Ecol, 32: 1977~1988
- Ardie SW, Xie LN, Takahashi R, Liu S, Takano T (2009). Cloning of a high-affinity K<sup>+</sup> transporter gene *PutHKT2;1* from *Puccinellia tenuiflora* and its functional comparison with *OsHKT2;1* from rice in yeast and *Arabidopsis*. J Exp Bot, 60: 3491~3502
- Ashraf M, Iram A (2005). Drought stress induced changes in some organic substances in nodules and other plant parts of two potential legumes differing in salt tolerance. Flora, 200: 535~546
- Azevedo RA, Alas RM, Smith RJ, Lea PJ (1998). Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. Physiol Plant, 104: 280~292
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant Soil, 39: 205~207
- Byrt CS, Xu B, Krishnan M, Lightfoot DJ, Athman A, Jacobs AK, Watson-Haigh NS, Plett D, Munns R, Tester M et al (2014). The Na<sup>+</sup> transporter, *TaHKT1;5-D*, limits shoot Na<sup>+</sup> accumulation in bread wheat. Plant J, 80: 516~526
- Davletova S, Schlauch K, Coutu J, Mittler R (2005). The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 139: 847~856
- Delauney AJ, Verma DPS (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. Plant J, 4: 215~223
- Dorostkar S, Dadkhodaie A, Heidari B (2015). Evaluation of grain yield indices in hexaploid wheat genotypes in response to drought stress. Arch Agron Soil Sci, 61: 397~413
- Gao DH, Gao Q, Xu HY, Ma F, Zhao CM, Liu JQ (2009). Physiological responses to gradual drought stress in the diploid hybrid *Pinus densata* and its two parental species. Trees, 23: 717~728
- Garcia-deblas B, Senn ME, Banuelos MA, Rodriguez-Navarro A (2003). Sodium transport and *HKT* transporters: the rice model. Plant J, 34: 788~801
- Ghahfarokhi MG, Mansurifar S, Taghizadeh-Mehrjardi R, Saeidi M, Jamshidi AM, Ghasemi E (2014). Effects of drought stress and rewatering on antioxidant systems and relative water content in different growth stages of maize (*Zea mays* L.) hybrids. Arch Agron Soil Sci, 61: 493~506
- Gill PD, Sharma AD, Singh P, Bhullar SS (2003). Changes in germination, growth and soluble sugar contents of *Sorghum bicolor* (L.) Moench seeds under various abiotic stresses. Plant Growth Regul, 40: 157~162
- Hare PD, Cress WA, Van SJ (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. Plant Cell Environ, 21: 535~553
- Huang XY, Chao DY, Gao JP, Zhu MZ, Shi M, Lin HX (2009). A previously unknown zinc finger protein, *DST*, regulates drought and salt tolerance in rice via stomatal aperture control. Gene Dev, 23: 1805~1817
- Hwang SY, Lin HW, Chern RH, Lo HF, Li L (1999). Reduced susceptibility to waterlogging together with high-light stress is related to increases in superoxide dismutase and catalase activities in sweet potato. Plant Growth Regul, 27: 167~172
- Jones MM, Osmond CB, Turner NC (1980). Accumulation of solutes in leaves of sorghum and sunflower in response to water deficit. Aust J Plant Physiol, 7: 193~205
- Kameli A, Losel DM (1995). Contribution of carbohydrates and other solutes to osmotic adjustment in wheat leaves under water-stress. Plant Physiol, 145: 363~366
- Kavi K, Sangam S, Amrutha RN, Laxmi P, Naidu K, Rao K, Rao S, Reddy KJ, Theriappan P, Sreenivasulu N (2005). Regulation of proline biosynthesis degradation, uptake and transport in higher

- plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr Sci India*, 88: 424~438
- Liu WH, Fairbairn DJ, Reid RJ, Schachtman DP (2001). Characterization of two *HKT1* homologues from *Eucalyptus camaldulensis* that display intrinsic osmosensing capability. *Plant Physiol*, 127: 283~294
- Lotfi N, Vahdati K, Kholdebarin B, Amiri R (2009). Soluble sugars and proline accumulation play a role as effective indices for drought tolerance screening in Persian walnut (*Juglans regia* L.) during germination. *Fruits*, 65: 97~112
- Lunde C, Drew PD, Jacobs AK, Tester M (2007). Exclusion of  $\text{Na}^+$  via sodium ATPase (*PpENA1*) ensures normal growth of *Physcomitrella patens* under moderate salt stress. *Plant Physiol*, 144: 1786~1796
- Mascher R, Lippmann B, Holzinger S, Bergmann H (2002). Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. *Plant Sci*, 163: 961~969
- Matsakasa L, Aikaterini-Aithra S, Rova U, Christakopoulos P (2014). Use of dried sweet sorghum for the efficient production of lipids by the yeast *Lipomyces starkeyi* CBS 1807. *Ind Crop Prod*, 62: 367~372
- Miller G, Shulaev V, Mittler R (2008). Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiol Plant*, 133: 481~489
- Munns R, James RA, Xu B, Athman A, Conn SJ, Jordans C, Byrt CS, Hare RA, Tyerman SD, Tester M et al (2012). Wheat grain yield on saline soils is improved by an ancestral  $\text{Na}^+$  transporter gene. *Nat biotechnol*, 30: 360~366
- Munns R, Tester M (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol*, 59: 651~681
- Oomen RJFJ, Benito B, Sentenac H, Rodriguez-Navarro A, Talon M, Very AA, Domingo C (2012). *HKT2;2/1*, a  $\text{K}^+$ -permeable transporter identified in a salt-tolerant rice cultivar through surveys of natural genetic polymorphism. *Plant J*, 71: 750~762
- Pardo JM, Quintero FJ (2002). Plants and sodium ions: keeping company with the enemy. *Genome Biol*, 3: 1017~1021
- Paul M (2007). Trehalose 6-phosphate. *Curr Opin Plant Biol*, 10: 303~309
- Pinheiro C, Chaves MM, Ricardo CP (2001). Alterations in carbon and nitrogen metabolism induced by water deficit in the stems and leaves of *Lupinus albus* L. *J Exp Bot*, 52: 1063~1070
- Prashant A, Jason W, James WM, Frank MH (2014). Balancing bio-energy and soil productivity returns for sustainable biomass Sorghum [*Sorghum bicolor* (L). Moench.] production. *Bioenerg Res*, 7: 1144~1154
- Ren ZH, Gao JP, Li LG, Cai XL, Huang W, Chao DY, Zhu MZ, Wang ZY, Luan S, Lin HX (2005). A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nat Genet*, 37: 1141~1146
- Rhodes D, Handa S, Bressan RA (1986). Metabolic changes associated with adaptation of plant-cells to water-stress. *Plant Physiol*, 82: 890~903
- Rubio F, Gassmann W, Schroeder JI (1995). Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter *HKT1* and mutations conferring salt tolerance. *Science*, 270: 1660~1663
- Rus A, Lee BH, Munoz-Mayor A, Sharkhuu A, Miura K, Zhu JK, Bressan RA, Hasegawa PM (2004). *AtHKT1* facilitates  $\text{Na}^+$  homeostasis and  $\text{K}^+$  nutrition in planta. *Plant Physiol*, 136: 2500~2511
- Sanchez FJ, Manzanares M, de Andres EF, Tenorio JL, Ayerbe L (1998). Turgor maintenance, osmotic adjustment and soluble sugar and proline accumulation in 49 pea cultivars in response to water stress. *Field Crop Res*, 59: 225~235
- Tran LSP, Urao T, Qin F, Maruyama K, Kakimoto T, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007). Functional analysis of *AHK1/ATHK1* and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 20623~20628
- Wang TT, Ren ZJ, Liu ZQ, Feng X, Guo RQ, Li BG, Li LG, Jing HC (2014). *SbHKT1;4*, a member of the high-affinity potassium transporter gene family from *Sorghum bicolor*, functions to maintain optimal  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  balance under  $\text{Na}^+$  stress. *J Integr Plant Biol*, 56: 315~332
- Waters S, Gillilham M, Hrmova M (2013). Plant high-affinity potassium (*HKT*) transporters involved in salinity tolerance: structural insights to probe differences in ion selectivity. *Int J Mol Sci*, 14: 7660~7680
- Wingler A, Roitsch T (2008). Metabolic regulation of leaf senescence: interactions of sugar signalling with biotic and abiotic stress responses. *Plant Biol*, 10: 50~52
- Xie Y, Luo HJ, Hu LX, Sun X, Lou Y, Fu J (2014). Classification of genetic variation for cadmium tolerance in Bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] using physiological traits and molecular markers. *Ecotoxicology*, 23: 1030~1043
- Yao X, Horie T, Xue SW, Leung HY, Katsuhara M, Brodsky DE, Wu Y, Schroeder JI (2010). Differential sodium and potassium transport selectivities of the rice *OsHKT2;1* and *OsHKT2;2* transporters in plant cells. *Plant Physiol*, 152: 341~355
- Zhang BQ, Yang LT, Li YR (2015). Physiological and biochemical characteristics related to cold resistance in sugarcane. *Sugar Tech*, 17: 49~58
- Zhang JX, Krikham MB (1994). Drought-stress-induced changes in activities of superoxide-dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. *Plant Cell Physiol*, 35: 785~791
- Zhu JK (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 53: 247~273
- Zhu ZJ, Wei GQ, Li J, Qian QQ, Yu JQ (2004). Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Sci*, 167: 527~533