

THE MOLECULAR MECHANISM
OF SALT AND DROUGHT TOLERANCE
OF *TAMARIX* SPP.



怪柳

耐盐抗旱分子基础研究

杨传平◎著



科学出版社

柞柳耐盐抗旱分子基础研究

杨传平 著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

怪柳是一种抗逆能力优良的木本盐生植物。因此,它是研究林木抗逆机制的理想材料。对怪柳抗逆机制研究和抗逆相关基因的克隆既能完善林木逆境分子生物学基础,又能为利用分子育种技术提高林木耐盐、抗旱能力提供理论依据和物质基础。本书共分5篇,第一篇怪柳及其研究进展,包括:第1章怪柳,第2章怪柳抗逆生理机制,第3章怪柳抗逆分子机制。第二篇怪柳抗逆机制的功能基因组学研究,包括:第4章cDNA文库的构建及EST分析对怪柳叶基因表达研究,第5章cDNA文库构建及EST分析对怪柳根基因表达研究,第6章实时定量RT-PCR技术对怪柳不同基因家族抗逆表达分析。第三篇怪柳抗逆相关调控基因的功能分析,包括:第7章怪柳bZIP转录因子的抗逆功能分析,第8章怪柳ERF转录因子的抗逆功能分析,第9章怪柳DREB转录因子的抗逆功能分析,第10章怪柳*eIF5A*基因的抗逆功能分析,第11章怪柳*eIF1A*基因抗逆功能分析。第四篇怪柳抗逆相关功能基因的耐盐性研究,包括:第12章怪柳*lea*基因的抗逆功能分析,第13章怪柳*MnSOD*基因的抗逆功能分析,第14章怪柳*ThPOD1*基因功能研究,第15章怪柳硫氧还原蛋白过氧化物酶基因(2Cys-Prx)的抗逆功能分析,第16章怪柳冷适应蛋白基因(*cap*)在抗旱、耐盐中的作用,第17章怪柳泛素交联酶基因(*E2s*)的遗传转化及抗逆性分析,第18章怪柳*rd22*基因的克隆及功能验证。第五篇怪柳抗逆功能研究的展望。本书在分析怪柳转录组的基础上,重点研究了怪柳转录调控因子基因调控耐盐和抗旱的机制,阐述了怪柳在耐盐、抗旱分子调控方面的最新研究成果及进展。

该书可作为农学、林学等专业本科生及研究生的辅助教材,也可作为农学、林学及相关抗逆生物学等领域教学人员、科研人员和管理人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

怪柳耐盐抗旱分子基础研究 / 杨传平著. —北京: 科学出版社, 2015.5
ISBN 978-7-03-043722-8

I. ①怪… II. ①杨… III. ①怪柳-耐盐性-研究②怪柳-抗旱性-研究 IV. ①S793.5

中国版本图书馆CIP数据核字(2015)第049869号

责任编辑: 张会格 / 责任校对: 李 影

责任印制: 肖 兴 / 封面设计: 北京铭轩堂广告设计公司

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京京华虎影印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2015年5月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2015年5月第一次印刷 印张: 21 插页: 12

字数: 528 000

定价: 128.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

前 言

怪柳 (*Tamarix* spp.) 属怪柳科怪柳属植物, 灌木或小乔木, 有时也为大乔木, 是优良的防风固沙树种。由于其耐干旱、盐碱、贫瘠、风蚀和沙埋的特点, 广泛分布于砾石戈壁、黏土、砂土、流沙, 并且各种典型的盐碱土上都有不同种分布, 是中亚生态系统中的关键种, 在抗逆研究方面具有重要的研究价值。怪柳在 10g/kg 的苏打土上可以正常生长, 而沙棘、沙枣、杠柳、枸杞、紫穗槐等耐盐较强的树种均不能正常生长, 可见怪柳耐苏打土的能力更强。因此, 怪柳是研究林木耐盐分子机制、分离重要耐盐功能基因的理想物种之一。

有鉴于此, 本书以怪柳为研究对象, 对其抗逆分子机制进行了系统的研究。首先通过功能基因组学技术研究建立了怪柳在逆境胁迫下的基因表达谱, 鉴定出怪柳的盐胁迫响应基因, 并揭示了怪柳的耐盐途径。其次, 对盐胁迫响应基因调控抗逆功能进行了解析, 阐明了基因调控抗逆的分子生物学及生理学途径。最后, 以在抗逆中起关键作用的转录因子为中心, 系统地揭示了逆境胁迫下怪柳的基因表达调控网络。全书共分 5 篇。第一篇怪柳及其研究进展, 包括: 第 1 章怪柳, 第 2 章怪柳抗逆生理机制, 第 3 章怪柳抗逆分子机制。第二篇怪柳抗逆机制的功能基因组学研究, 包括: 第 4 章 cDNA 文库的构建及 EST 分析对怪柳叶基因表达研究, 第 5 章 cDNA 文库构建及 EST 分析对怪柳根基因表达研究, 第 6 章实时定量 RT-PCR 技术对怪柳不同基因家族抗逆表达分析。第三篇怪柳抗逆相关调控基因的功能分析, 包括: 第 7 章怪柳 bZIP 转录因子的抗逆功能分析, 第 8 章怪柳 ERF 转录因子的抗逆功能分析, 第 9 章怪柳 DREB 转录因子的抗逆功能分析, 第 10 章怪柳 *eIF5A* 基因的抗逆功能分析, 第 11 章怪柳 *eIF1A* 基因抗逆功能分析。第四篇怪柳抗逆相关功能基因的耐盐性研究, 包括: 第 12 章怪柳 *lea* 基因的抗逆功能分析, 第 13 章怪柳 *MnSOD* 基因的抗逆功能分析, 第 14 章怪柳 *ThPOD1* 基因功能研究, 第 15 章怪柳硫氧还原蛋白过氧化物酶基因 (*2Cys-Prx*) 的抗逆功能分析, 第 16 章怪柳冷适应蛋白基因 (*cap*) 在抗旱、耐盐中的作用, 第 17 章怪柳泛素交联酶基因 (*E2s*) 的遗传转化及抗逆性分析, 第 18 章怪柳 *rd22* 基因的克隆及功能验证。第五篇怪柳抗逆功能研究的展望。本书在分析怪柳转录组的基础上, 重点研究了怪柳转录调控因子基因调控耐盐和抗旱的功能, 阐述了在怪柳耐盐、抗旱分子调控机制方面的最新研究成果及研究进展。本书可作为农学、林学等专业本科生及研究生的辅助教材, 也可作为农学、林学及抗逆生物学等领域教学人员、科研人员和管理人员的参考书。

本书研究受国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 课题 (G1999016002)、863 计划课题 (2013AA102701)、黑龙江省杰出青年基金课题 (JC003) 和黑龙江省中以合作项

目(WB07N02)等的资助,特此致谢。在本书的编写过程中,王玉成教授和高彩球副教授参与了书稿资料的收集与整理过程;杨桂燕博士参与了书稿的校对和文献整理;王留强博士提供了怪柳照片;徐晨曦、李慧玉、高彩球、及晓宇、郭晓红、杨桂燕、王留强、刘文进、于丽丽、姜波、白爽、赵鑫、于影、李红艳、董京祥、刘甜甜、林士杰等进行了相关试验研究,刘桂丰教授、王玉成教授、姜静教授等参与了实验设计和指导工作,在此一并致谢。

杨传平

2014年11月10日

目 录

前言

第一篇 怪柳及其研究进展	1
第 1 章 怪柳	3
第 2 章 怪柳抗逆生理机制	5
第 3 章 怪柳抗逆分子机制	9
第二篇 怪柳抗逆机制的功能基因组学研究	11
第 4 章 cDNA 文库的构建及 EST 分析对怪柳叶基因表达研究	13
4.1 NaHCO ₃ 胁迫下怪柳叶部 cDNA 文库的构建	13
4.2 NaHCO ₃ 胁迫下怪柳叶部基因表达谱	14
4.3 讨论	26
第 5 章 cDNA 文库构建及 EST 分析对怪柳根基因表达研究	34
5.1 刚毛怪柳根部 cDNA 文库的构建	34
5.2 怪柳根部基因表达谱分析	36
5.3 讨论	47
第 6 章 实时定量 RT-PCR 技术对怪柳不同基因家族抗逆表达分析	57
6.1 过氧化物酶 (ThPOD) 基因家族的克隆与分析	58
6.2 ThPrx 基因家族的克隆与分析	66
6.3 怪柳 ThNAC 基因家族的克隆和分析	71
6.4 讨论	84
第三篇 怪柳抗逆相关调控基因的功能分析	89
第 7 章 怪柳 bZIP 转录因子的抗逆功能分析	91
7.1 ThbZIP1 基因及启动子克隆	91
7.2 ThbZIP1 上游表达调控基因研究	95
7.3 怪柳 ThbZIP 识别的顺式作用元件的研究	100
7.4 过表达 ThbZIP 基因拟南芥抗逆性功能分析	104
7.5 ThbZIP 调控的下游基因的研究	109
7.6 怪柳 ThbZIP 转录因子互作蛋白的研究	119
7.7 讨论	123
第 8 章 怪柳 ERF 转录因子的抗逆功能分析	125
8.1 ERF 家族基因表达模式分析及 ThERF1 的亚细胞定位	125
8.2 转 ThERF1 基因拟南芥的抗逆能力分析	127
8.3 怪柳 ThERF1 基因的互作蛋白研究	134

8.4	柽柳 <i>ThERF1</i> 基因上游调控因子的研究	135
8.5	<i>ThERF1</i> 所识别的元件及调控的下游基因研究	142
8.6	讨论	145
第9章	柽柳 DREB 转录因子的抗逆功能分析	149
9.1	<i>ThDREB</i> 基因时空表达分析	149
9.2	重组酵母 INVSc1-pYES2- <i>ThDREB</i> 抗逆性分析	151
9.3	转 <i>ThDREB</i> 基因烟草的抗逆能力研究	152
9.4	讨论	156
第10章	柽柳 <i>eIF5A</i> 基因的抗逆功能分析	158
10.1	柽柳 <i>eIF5A</i> 基因的表达及亚细胞定位	158
10.2	柽柳 <i>eIF5A</i> 基因的抗逆功能分析	162
10.3	<i>eIF5A</i> 基因的互作蛋白质研究	172
10.4	<i>eIF5A</i> 上游表达调控基因研究	173
10.5	讨论	175
第11章	柽柳 <i>eIF1A</i> 基因抗逆功能分析	178
11.1	<i>TheIF1A</i> 基因及启动子克隆和分析	178
11.2	<i>TheIF1A</i> 基因上游调控因子分析	181
11.3	过表达 <i>TheIF1A</i> 能改善转基因烟草的耐盐及抗甘露醇胁迫能力	184
11.4	转 <i>TheIF1A</i> 烟草中逆境胁迫相关基因的表达分析	187
11.5	瞬时过表达 <i>TheIF1A</i> 柽柳的相关分析	188
11.6	讨论	189
第四篇	柽柳抗逆相关功能基因的耐盐性研究	193
第12章	柽柳 <i>lea</i> 基因的抗逆功能分析	195
12.1	<i>lea</i> 基因的克隆和序列分析	195
12.2	柽柳 <i>lea</i> 基因酵母表达及抗逆性研究	196
12.3	转基因烟草的抗逆能力分析	198
12.4	转基因小黑杨的抗逆能力分析	209
12.5	讨论	218
第13章	柽柳 <i>MnSOD</i> 基因的抗逆功能分析	221
13.1	<i>MnSOD</i> 基因的克隆及序列分析	221
13.2	盐胁迫后的 <i>MnSOD</i> 基因在柽柳中的表达	223
13.3	重组酵母 INVSc1 (pYES2-SOD) 的抗逆性分析	223
13.4	转 <i>MnSOD</i> 基因山新杨抗逆性研究	226
13.5	讨论	230
第14章	柽柳 <i>ThPOD1</i> 基因功能研究	233
14.1	柽柳过氧化物酶基因的序列分析	233
14.2	RT-PCR 检测 <i>ThPOD1</i> 基因的转录表达特性	234
14.3	<i>ThPOD1</i> 基因在 <i>E. coli</i> 中的表达、纯化与特性分析	237

14.4	<i>ThPOD1</i> 基因不同功能区的原核表达及抗逆性分析	239
14.5	柞柳 <i>ThPOD1</i> 基因在山新杨中的表达及抗逆性分析	242
14.6	讨论	246
第 15 章	柞柳硫氧还原蛋白过氧化物酶基因 (<i>2Cys-Prx</i>) 的抗逆功能分析	250
15.1	柞柳 <i>2Cys-Prx</i> 基因的克隆及生物信息学分析	250
15.2	柞柳 <i>2Cys-Prx</i> 基因在不同非生物胁迫下的表达模式	250
15.3	柞柳 <i>2Cys-Prx</i> 基因的酵母转化及抗逆功能分析	252
15.4	柞柳 <i>2Cys-Prx</i> 基因的烟草转化及抗性分析	253
15.5	<i>2Cys-Prx</i> 基因的互作蛋白研究	256
15.6	讨论	262
第 16 章	柞柳冷适应蛋白基因 (<i>cap</i>) 在抗旱、耐盐中的作用	266
16.1	柞柳冷适应蛋白 <i>cap</i> 基因的克隆及序列分析	266
16.2	逆境胁迫下 <i>cap</i> 基因的表达	267
16.3	重组酵母 pYES2- <i>cap</i> 抗逆性分析	267
16.4	过表达 <i>cap</i> 基因山新杨抗逆功能分析	271
16.5	讨论	276
第 17 章	柞柳泛素交联酶基因 (<i>E2s</i>) 的遗传转化及抗逆性分析	278
17.1	<i>E2s</i> 基因的克隆及序列分析	278
17.2	<i>E2s</i> 基因烟草的分子检测	279
17.3	过表达 <i>E2s</i> 基因烟草抗逆功能分析	280
17.4	讨论	287
第 18 章	柞柳 <i>rd22</i> 基因的克隆及功能验证	290
18.1	柞柳 <i>rd22</i> 基因的克隆及序列分析	290
18.2	柞柳 <i>rd22</i> 基因的遗传转化及分子检测	291
18.3	柞柳 <i>rd22</i> 基因的功能验证	292
18.4	讨论	302
第五篇	柞柳抗逆功能研究的展望	305
参考文献		308
彩图		

第一篇 桤柳及其研究进展

第1章 怪 柳

怪柳科 (Tamaricaceae) 植物为灌木、半灌木或乔木。叶小, 多呈鳞片状, 互生, 无托叶, 通常无叶柄, 多具泌盐腺体。花通常集成总状花序或圆锥花序, 稀单生, 通常两性, 整齐; 花萼 4~5, 深裂, 宿存; 花瓣 4~5, 分离, 花后脱落或有时宿存; 下位花盘常肥厚, 蜜腺状; 雄蕊 4、5 或多数, 常分离, 着生在花盘上, 稀基部结合成束, 或连合到中部成筒, 花药 2 室, 纵裂; 雌蕊 1, 由 2~5 心皮构成, 子房上位, 1 室, 侧膜胎座, 稀具隔, 或基底胎座; 胚珠多数, 稀少数, 花柱短, 通常 3~5, 分离, 有时结合。蒴果, 圆锥形, 室背开裂。种子多数, 全面被毛或在顶端具芒柱, 芒柱从基部或从一半开始被柔毛; 有或无内胚乳, 胚直生 (《中国植物志》编委会, 1990)。

该科共 3 属 (但 Baum 认为该科共 4 个属), 约 110 种。主要分布于旧大陆草原和荒漠地区。我国有 3 属 32 种。

怪柳属 (*Tamarix* L.) 是怪柳科 4 个属之一, 世界范围内有 54 个种 (Baum, 1978)。怪柳属植物为灌木和小乔木, 分布于欧洲西部、地中海、非洲北部、亚洲中部、中国北部和印度。在地中海西部区域, 广泛分布的怪柳是非洲怪柳 (*T. africana*) 和红花多枝怪柳 (*T. gallica*) (Prada and Arizpe, 2008)。在中国, 怪柳属植物种类也很多, 张道远等 (2003) 利用 SPSS 聚类分析将怪柳属分为三大类, 类型 I 为分布于流动沙丘, 固定、半固定风沙土生境的强度抗旱种类, 包括沙生怪柳、紫杆怪柳、异花怪柳、莎车怪柳; 类型 II 为分布于河谷、河滩沙砾质新积土生境的中度抗旱、耐盐种类, 包括白花怪柳、多花怪柳、多枝怪柳、密花怪柳、中国怪柳及甘蒙怪柳; 类型 III 为分布于盐渍化重、矿化度高的盐土生境类型, 包括刚毛怪柳 (*T. hispida*)、短穗怪柳、长穗怪柳、细穗怪柳、短毛怪柳及甘肃怪柳。

作者对怪柳耐盐研究选择的主要对象是刚毛怪柳。刚毛怪柳为灌木或小乔木状, 高 1.5~4 (~6) m, 老枝树皮红棕色, 或浅红黄灰色, 幼枝淡红或赭灰色, 全体密被单细胞短直毛。木质化生长枝上的叶卵状披针形或狭披针形, 渐尖, 基部宽而钝圆, 背面向外隆起, 耳发达, 抱茎达一半, 淡灰黄色, 绿色营养枝上的叶阔心状卵形至阔卵状披针形, 长 0.8~2.2mm, 宽 0.5~0.7mm, 渐尖, 具短尖头, 向内弯, 背面向外隆起, 基部具耳, 半抱茎, 被密柔毛。总状花序长 2~7 (~17) cm, 宽 3~5mm, 夏秋生当年枝顶, 集成顶生大型紧缩圆锥花序; 苞片狭三角状披针形, 渐尖, 全缘, 基部背面圆丘状隆起, 基部之上变宽, 向尖端则为狭披针形, 长 1~1.5mm, 几等于、有时略长于花萼 (包括花梗); 花梗短, 长 0.5~0.7mm, 比花萼短或几相等; 花 5 数, 花萼 5 深裂, 长约为花瓣的 1/3, 萼片卵圆形, 长 0.7~1mm, 宽 0.5mm, 稍钝或近尖, 边缘膜质半透明, 具细牙齿, 特别是顶端的齿更细密, 外面两片急尖, 背面微有龙骨状隆起; 花瓣 5, 紫红色或鲜红色, 通常倒卵形至长圆状椭圆形, 长 1.5~2mm, 宽 0.6~1mm, 开张, 上半部向外反折, 早落;

花盘 5 裂, 渐变为扩展的花丝的基部; 雄蕊 5, 对萼, 伸出花冠之外, 花丝基部变粗, 有蜜腺, 花药心形, 顶端钝, 常具小尖头; 子房下粗上细, 长瓶状, 花柱 3, 长约为子房的 1/3, 柱头极短。蒴果狭长锥形瓶状, 长 4~5 (~7) mm, 宽 1mm, 比萼片长 4~5 倍甚至以上, 壁薄, 颜色有金黄色、淡红色、鲜红色及紫色, 含种子约 15 粒。花期 7~9 月 (李锡文, 1990)。

产新疆、青海 (柴达木)、甘肃 (河西)、宁夏 (北部) 和内蒙古 (西部至磴口) 等地。生于荒漠区域河漫滩冲积、淤积平原和湖盆边缘的潮湿和松陷盐土上, 盐碱化草甸和砂丘间, 亦集成数米高的风植砂堆, 在次生盐渍化的灌溉田地上有时也有生长。原苏联 (中亚)、伊朗、阿富汗和蒙古也有分布。刚毛怪柳秋季开花, 极美丽, 适于荒漠地区低湿盐碱沙化地固沙、绿化造林之用, 并作薪柴用。

自 19 世纪以来, 怪柳属几个种被引入了北美, 并快速蔓延, 严重影响河滨地带 (Gaskin and Schaal, 2002; Sexton et al., 2006; Stromberg et al., 2009)。因此, 在美国等一些国家, 怪柳被作为一种入侵灌木或乔木物种。很多学者认为怪柳叶部分泌的盐分可能导致土壤表面的盐碱化, 从而导致本土树种不能生长 (Imada et al., 2012; Ladenburger et al., 2006)。例如, 怪柳在美国西部蔓延速度非常快, 从 1920 年估测的 4000hm², 到 20 世纪 60 年代中期, 就已经超过 500 000hm², 广泛分布于泛滥平原、河滨区域、湿地和湖滨 (Stohlgren et al., 1998)。怪柳在这些潮湿、开放的基质上, 同时又缺乏有效的种间竞争者, 因此迅速生长变成优势种, 阻止了其他物种的建成 (Sher et al., 2002)。为了控制怪柳的快速发展, 一些物理的、化学的和生物的方法陆续形成 (O'Meara et al., 2010)。例如, 一些学者试图通过从中国引入怪柳叶甲 (*Diorhabda* spp.) 对怪柳种群进行控制 (Lewis et al., 2003; Bateman et al., 2013)。但这些方法也会对河滨区域和野生生物物种产生影响 (Bateman et al., 2008)。

由于怪柳生长速度快和高度耐盐能力, 在沙漠和沿海区域, 怪柳可作为防风固沙植物, 同时一些研究者也分析了干热地带盐水灌溉后, 怪柳的生物量积累情况 (Waisel et al., 2010; Zilberstein et al., 2010; Eshel et al., 2010, 2011)。

在中国, 对怪柳的研究更多地集中在对其抗旱耐盐等能力的利用方面。例如, Zhang 和 Zhao (1989) 指出甘蒙怪柳 (*Tamarix austromongolica*) 可用于阻止风沙侵蚀, 控制沙漠化。张立宾等 (2008) 在东营盐生植物园的盐池对怪柳进行了盆栽和田间耐盐试验, 测定了怪柳生长 50d 后的平均株高、地径、分枝数和死亡率。证实怪柳的耐盐能力在 25g/kg 左右, 耐盐极限为 35g/kg 左右; 怪柳能够有效地降低土壤表层含盐量, 增加土壤有机质含量, 提高土壤中 N、P、K 的含量。其认为怪柳是一种耐盐能力很强的盐生植物, 对滨海盐渍土具有明显的改良作用。Yin 等 (2009) 报道了在怪柳堆内的盐分水平高于堆间, 但是堆间的养分因子如钾、有机质和磷也高于堆内。总体来说, 怪柳堆对于盐碱土的恢复起积极作用。此外, 怪柳作为医药、木材、薪柴和动物饲料也被广泛研究 (Orabi et al., 2010)。

第2章 柽柳抗逆生理机制

柽柳具有很强的抗旱能力,张道远等(2003)从生物生态学特性、水分生理状况及水分胁迫的生理机制3个方面系统地探讨了柽柳属植物抗旱机制。Al-Mefarrei(2013)研究显示,干旱胁迫明显影响了一年生柽柳的生物量和一些木材特征。植物与水分的关系是干旱区植物生态研究的热点。根系是植物水分和养分吸收的最主要器官,在水分受限的生态系统中,水分和养分的可利用性又取决于植物所处的环境条件、根系的大小、形态及根系竞争力(Schenk and Jackson, 2002)。例如,无叶柽柳(*T. aphylla*)垂直根系最大可达到地下30m,侧根可侧向水平延伸50m;柽柳(*T. jordanis*)根系可以达到16m深;多枝柽柳(*T. ramosissima*)幼苗阶段与地表水有明显联系(Lipp et al., 1996; Yang et al, 1996; 司建华等, 2006)。王同顺等(2013)以一年生甘蒙柽柳(*T. austromongolica*)幼苗为对象,采用人工壕沟挖掘法,对柽柳幼苗在不同水分处理条件下(干旱处理、适度灌溉、充分灌溉)根系生态学特征的季节变化进行了研究。发现不同水分处理对柽柳幼苗根系生长影响显著,垂直根扎根深度和生长速率随着灌溉量的减小而增加。地面灌溉量的增加会导致根系分布的浅表化和根系消弱系数的减小,根系生物量与土壤深度呈显著负对数关系。不同水分处理条件下,7~10月的根冠比平均值分别为0.43、0.60、0.90、1.12,其根、冠间存在典型的异速生长关系。根冠比随土壤水分的减小而增加,且生长季后期大于初期。10月柽柳幼苗扎根深度达到最大值,干旱处理、适度灌溉、充分灌溉柽柳幼苗扎根深度分别为139.63cm、119.28cm、92.54cm。随着灌溉量的增加,柽柳幼苗扎根深度逐渐减小,说明干旱处理有助于柽柳幼苗的根系向土壤深处生长。不同水分处理条件下,柽柳幼苗垂直根生长对土壤水分响应显著。垂直根扎根深度和垂直根生长速率随灌溉量的减小而增加。增加垂直根系在深层土壤的分布使柽柳幼苗更加有利于根系吸收、利用深层土壤水分,促进地上部分的生长,这也是柽柳幼苗应对土壤干旱的方式之一。减少土壤水分可以促进柽柳幼苗垂直根系的扎根深度和垂直根生长速度,说明干旱可以促进垂直根系的生长。增加垂直根生长可以明显地增加水分吸收,同时,在夏季可以有效地利用深层土壤水,有利于苗木在干早期利用地下水资源维持其成活和生长。不同水分处理条件下,柽柳幼苗根系生物量与土壤深度呈显著负对数关系,增加灌溉量会导致柽柳幼苗根系分布的浅表化。植物幼苗为适应微环境条件的变化,可能形成不同的根冠比。根冠比的增加提高了植物对水分和养分的吸收量,增强了植物的抗旱和抗瘠薄能力,对植物适应外界极端环境有重要作用。如果根冠比大,将会有更多的同化产物分配到根系,这对于根系的快速扩张是有利的(刘莹等, 2003)。不同水分处理条件下,柽柳根冠比随灌溉量的减小而增加,随着生长季的推移,柽柳幼苗的根冠比也相应增加,幼苗通过根系生长不断扩大自己的营养空间。

Wang等(2011)调查了不同的盐和水分条件下柽柳(*T. chinensis*)苗木的生物量积累和光合响应。结果显示,柽柳苗木在土壤含盐16~20g/kg条件下会死亡。NaCl含量为0~16g/kg,总生物量、根生物量、茎生物量和叶生物量分别减少63.3%、56.3%、70.6%

和 62.4%。土壤湿度 (FC) 为 20%~60%，总生物量、根生物量、茎生物量和叶生物量分别减少 37.9%、25.3%、48.4% 和 37.9%。水分胁迫 (FC 为 60%~20%) 导致一天中的净光合速率 (net photosynthetic rate, PN) 峰值提前, 相对电子传递速率 (relative rate of electron transport, ETR) 减少, 但光合系统 II 的 Fv/Fm 没有明显改变 ($P < 0.05$)。土壤中的盐分明显减少了 PN 和蒸腾速率 (transpiration rate, E), 当土壤湿度为 40% 或 20% 时, ETR 和 Fv/Fm 也减少。增加土壤盐含量对柽柳苗木的生物量富集没有明显影响 ($P > 0.05$), 但水分胁迫明显影响了柽柳根生物量的富集。在 FC 为 20% 时, 柽柳苗木可以维持较高的叶气体交换率, 但水分利用效率 (water use efficiency, WUE) 降低, 有效的水分补充能增强柽柳在盐土上的存活。

为了了解在极端干旱地带, 中国西北塔里木河 (Tarim River Basin) 控制多枝柽柳 (*T. ramosissima*) 存活的因素, Ayup 等 (2012) 调查了干旱胁迫和复水处理对多枝柽柳水力特征的影响。这些因子包括初始液压电导率 [initial hydraulic specific conductivity, $K_{s(\text{init})}$]、最大液压电导率 [maximum hydraulic specific conductivity, $K_{s(\text{max})}$] 和侧根、主茎及嫩枝自然栓塞 (PLC, %), 以及二年生多枝柽柳苗木的侧根和嫩枝的木质部解剖结构。结果显示, 干旱和复水处理明显影响了侧根的 $K_{s(\text{max})}$ 、所有组织的 $K_{s(\text{init})}$ 和自然栓塞程度 ($P < 0.01$)。严重干旱胁迫处理引起所有组织的 $K_{s(\text{init})}$ 显著降低 ($P < 0.05$), 但侧根的 $K_{s(\text{max})}$ 明显增加 ($P < 0.01$)。随着土壤干旱胁迫的增加, 所有组织的自然栓塞程度增加。短期的复水仅仅显著影响侧根的栓塞恢复 ($P < 0.01$), 与严重水分胁迫苗木相比, 栓塞恢复 20%。与嫩枝相比, 侧根的平均导管内径 (d_{mean} , d_h) 更大, 导管密度 (VD) 更低。它们的 $K_{s(\text{max})}$ 与木质部导管内径强烈相关。

柽柳除具有抗旱性能外, 还普遍具有耐盐性, 是典型的泌盐性盐生植物。盐胁迫 (如 NaCl) 通过减少植物叶部气体交换、抑制植物生长、渗透胁迫影响和产生活性氧等而影响植物生理过程 (Parida and Das, 2005)。在长期的进化过程中, 植物为了适应盐胁迫, 形成了耐盐生化 and 分子机制 (Parida and Das, 2005), 如离子外排、离子区隔化和可溶性物质的合成 (Tester and Davenport, 2003)。目前, 开展的有关柽柳属植物耐盐机制相关研究主要集中在其光合 (曾杰等, 2008)、水势 (曾杰等, 2008)、离子分布 (马海燕等, 2010)、种子萌发 (王磊等, 2008)、分布格局 (武志博等, 2013) 和渗透调节物质 (鲁艳等, 2014) 等方面。

潘婷婷等 (2011) 以盐生植物刚毛柽柳为材料, 对其进行了不同水平的盐分和水分胁迫处理, 并用电感耦合等离子发射仪 (ICP-AES) 测定了样品内的 Na^+ 含量。刚毛柽柳植株中 Na^+ 的积累顺序为叶 > 根 > 茎。叶是 Na^+ 累积的主要部位。茎只是一个 Na^+ 传输通道, 不存在累积过程; 盐胁迫下刚毛柽柳体内 Na^+ 含量随 NaCl 浓度的增加而逐渐升高, 随胁迫时间的延长而增加; 水分胁迫下刚毛柽柳体内 Na^+ 含量随灌溉量的减少而增加, 降低了根系的渗透势, 并使根系在外界高 NaCl 浓度下保持水分, 随着胁迫时间的延长, 根和茎中的 Na^+ 含量逐渐升高。但叶中则是先升高后降低。盐胁迫下刚毛柽柳叶中 Na^+ 含量高于根和茎, 说明刚毛柽柳叶的耐盐性大于根和茎。根系中的 Na^+ 含量高于茎, 主要是盐胁迫下 Na^+ 的增加降低了根系的渗透势, 并使根系在外界高盐浓度下保持水分; 另外, 植物根系对 Na^+ 的截留限制了 Na^+ 向地上部的运输, 使叶片光合器官免受伤害, 同

时也避免了因叶片积累过多的 Na^+ 而造成的离子毒害。这是植物对盐胁迫的一种适应性和耐盐机制。刚毛柽柳 Na^+ 在水分胁迫条件下的积累可能是由以下两个原因造成的：一是植物细胞渗透势降低，参与渗透调节，使得 Na^+ 积累；二是在水分胁迫严重的情况下，柽柳泌盐腺被破坏，泌盐功能不能正常发挥，吸收的多余 Na^+ 不能及时排出，只能在细胞内积累。刚毛柽柳除具有典型盐生植物的渗透调节特性外，在干旱条件下也能通过离子的进一步吸收进行渗透调节，促进水分的吸收，保持正常的生长。由于刚毛柽柳对离子的吸收受盐分和干旱的影响，在适度盐分条件下，吸收适度的盐分有利于渗透调节，但在极度干旱的高盐环境下，植株过高的盐分积累受干旱影响可能导致离子毒害，抑制其生长。随着水分胁迫时间的推迟，叶中的 Na^+ 含量呈先升高后降低的趋势，这可能与刚毛柽柳是一种泌盐植物有关，由于其盐腺主要分布在鳞状叶上。通过盐腺排出由蒸腾流带入体内的过剩盐分，降低叶组织含盐量，从而对盐生境产生一定的适应性。

Rong 等 (2015) 研究了盐胁迫对柽柳叶中 C、N 和 P 的影响。叶中 P 的含量和土壤盐含量呈明显的负相关。而叶 C/P 和 N/P 与盐含量呈明显的正相关。Jaoude 等 (2013) 分析了两种意大利起源 (Simeto and Baratz) 的非洲柽柳 (*T. africanat*) 响应新鲜和盐水 (200mm) 两种洪涝处理 (45d) 后的光合响应。两种起源的非洲柽柳完全能忍受新鲜水洪涝处理，其光合参数不受影响。而盐水处理后，两种起源的非洲柽柳耐受性不同。盐水处理对两者的嫩枝形成影响不同。不同的盐水条件对柽柳 (*T. chinensis*) 个体分布也产生了明显影响。柽柳 (*T. chinensis*) 主要分布在适度的地表水深和土壤盐分条件下，水分补给能增加柽柳在高盐条件下的生存能力 (Cui et al., 2010)。

植物叶水平的过程如蒸腾、光合和气孔关闭对盐胁迫非常敏感 (Parida and Das, 2005)。Kleinkopf 和 Wallace (1974) 发现增加盐胁迫对叶水平的气体交换影响较小，增加水分胁迫会减少叶水平的气体交换。此外， Na^+ 具有高的毒性，能破坏酶的功能从而降低叶水平的光合作用 (Parida and Das, 2005)。而相对于其他物种来说，柽柳在极度炎热和干燥的条件下 (高蒸汽压差 high vapor pressure deficit、高温和低土壤可利用水) 能维持相对高的气体交换率 (Horton et al., 2001)。Carter 和 Nippert (2012) 对盐胁迫后多枝柽柳 (*T. ramosissima*) 一些叶水平的响应因素进行了测量，也发现土壤表层盐含量从 0.5mmhos/cm 增加到 17.65mmhos/cm 时，光合、气孔导度 (stomatal conductance to water, g_s)、胞间 CO_2 浓度 (C_i) 和叶 $\delta^{13}\text{C}$ 的变化都很小。这种叶水平光合响应变化小，表明多枝柽柳在一个广泛范围的土壤盐分条件下，都具有健康的功能。

植物在盐和干旱逆境条件下，通过提高细胞液浓度，降低渗透势，使植物保持水分以适应盐和干旱胁迫的过程称为渗透调节。一般渗透调节物质主要包括可溶性糖、脯氨酸、丙二醛及无机离子等。渗透调节物质在植物适应盐分和干旱逆境中发挥着重要作用，主要是植物通过生理代谢活动增加细胞溶质，降低细胞渗透势，维持膨压，使植物体内与膨压有关的生理活动正常进行。在盐和干旱胁迫条件下，细胞内的可溶性糖、脯氨酸和无机离子的大量积累，提高了细胞液浓度，维持了正常的细胞膨压，防止了原生质过度失水，增强了植物的抗逆适应性。朱金方等 (2013) 以二年生柽柳幼苗为试验材料，采用盆栽模拟试验研究了不同盐分和干旱胁迫对其叶片中渗透调节物质的影响，以探讨柽柳幼苗对盐和干旱交叉胁迫的适应性。其结果表明，随盐旱胁迫的不断加剧，幼苗叶

片中可溶性糖含量呈先升高后降低的趋势,且中度和重度盐旱胁迫下均显著高于对照。幼苗叶片中脯氨酸含量在不同盐旱胁迫下均呈逐渐上升的趋势,但在重度盐分和中度、重度干旱交叉胁迫下显著高于对照。幼苗叶片中 Na^+ 、 Cl^- 含量在不同干旱胁迫下,随盐胁迫的加剧呈不同的变化规律,盐旱胁迫的各个处理水平下均显著高于对照,而 K^+ 、 Ca^{2+} 、 SO_4^{2-} 含量在轻度和重度干旱胁迫下随盐胁迫增强不断降低。在中度盐旱胁迫下, K^+ 、 Ca^{2+} 、 SO_4^{2-} 含量与对照无明显差异。表明怪柳幼苗中渗透调节物质在其抗旱耐盐性方面具有积极的调节作用;怪柳幼苗在盐旱胁迫下表现出一定的交叉适应性,适度的干旱胁迫能增强怪柳幼苗对盐分胁迫的耐受能力。

多枝怪柳 (*T. ramosissima*) 的耐盐机制也可能是合成可溶性物质保护酶的活性和维持细胞渗透压 (Ding et al., 2009)。Solomon 等 (1994) 研究表明, *T. jordanis* 在高盐胁迫下合成 *N*-甲基-L-脯氨酸 (*N*-methyl-L-proline, MP) 和 *N*-甲基-4-羟基-L-脯氨酸 (*N*-methyltrans-4-hydroxy-L-proline, MHP)。这两种物质有效地维持了 *T. jordanis* 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶 (Rubisco) 羧化活性。对新疆塔里木河沿岸的研究显示,多枝怪柳可能通过富集可溶性糖增加对高盐环境的适应 (Ruan et al., 2009)。

鲁艳等 (2014) 以一年生多枝怪柳为材料,研究了不同浓度 NaCl 溶液处理下其生长、叶片 H_2O_2 和丙二醛 (MDA) 含量、抗氧化酶活性和渗透调节物质含量的变化。结果显示,低浓度 ($<100\text{mmol/L}$) 的 NaCl 处理对多枝怪柳株高、冠幅面积、分枝数和叶干重、枝干重具有促进效应;高浓度 ($>200\text{mmol/L}$) 的 NaCl 处理抑制了多枝怪柳生长,对侧根干重的抑制作用大于冠幅面积、分枝数、叶干重、枝干重及株高的抑制。 H_2O_2 和 MDA 含量在低浓度 ($<100\text{mmol/L}$) 的 NaCl 处理下较对照位出现积累现象,随 NaCl 浓度升高 ($>200\text{mmol/L}$) 二者含量较对照出现显著积累。低浓度 ($<100\text{mmol/L}$) 的 NaCl 处理下,多枝怪柳叶片 SOD、POD、CAT 和 APX 活性较对照均有所提高,高浓度的 NaCl 处理下 SOD 和 POD 活性开始降低。多枝怪柳叶片水势随 NaCl 处理浓度升高呈显著下降趋势。低浓度 ($<100\text{mmol/L}$) 的 NaCl 处理下脯氨酸和可溶性糖含量较对照呈上升趋势。

研究怪柳的分布格局对种群结构与动态变化的影响,对阐明怪柳林生态系统的形成与维持种群的稳定性、种群的生态特征和更新等具有极为重要的意义。武志博等 (2013) 通过对额济纳绿洲中荒漠河岸林的主要树种多枝怪柳进行连续样方调查,用 χ^2 检验和方差分析法对多枝怪柳的格局规模进行分析。研究结果表明,多枝怪柳分布类型为集群分布,格局规模为 $8\text{m} \times 8\text{m}$,格局强度随着尺度的增加而减小,多枝怪柳呈现集群分布,但集群强度不高,集群强度依赖于种群密度。额济纳绿洲多枝怪柳为集群分布,但集群强度不高。种群格局的形成,一方面取决于种自身的特性,另一方面与种群环境密切相关。种群环境包括生物因子和非生物因子,生物因子包括竞争等。一般来讲,在种群优势种形成的斑块中,其他种就难以形成自己的斑块。这是因为优势种具有较强的竞争力。额济纳绿洲之所以能形成单一的多枝怪柳种群,与怪柳的自身生物学特性密切相关,怪柳具有耐干旱耐盐碱的特性,故在绿洲地区特别是盐碱化严重的地域具有更强的适应性和竞争能力。怪柳种群在额济纳绿洲呈集群分布,但集群强度不高,是由怪柳的生物学特性与环境因素共同决定的,之所以呈集群分布是因为怪柳的繁殖主要为种子繁殖,所以容易形成以母株为中心的实生子代,而集群强度不高可能是由环境因子决定的。

第3章 柽柳抗逆分子机制

柽柳具有优良的抗旱耐盐碱特性。在生理结构方面,柽柳具有拒盐能力,可通过根的低透性来拒绝过度盐离子的伤害。以刚毛柽柳为例,刚毛柽柳的根对盐离子的通透性很低,随着根际盐分浓度从 50mmol/L 增加到 200mmol/L,被柽柳排斥在根外的盐分从 89.9%增加到 96.8%。少量被刚毛柽柳根系吸收的 Na^+ 主要通过泌盐腺分泌出去。一天当中有 64%~77% 的 Na^+ 被分泌排出体外,其余的累积在植物叶当中,这些存留的离子在夜间、蒸腾低或湿度高时被分泌出去(李芊,2002)。刚毛柽柳泌盐腺深陷于表皮之下,单位面积数目多。泌盐腺的分泌细胞含许多小的液泡,可主动将积累的盐分储存在液泡中而实现区隔化,维持细胞液中正常的渗透势。

但刚毛柽柳的抗性绝不仅仅取决于其生理结构,还与其体内具有的一系列抗逆反应有关,它可通过渗透调节、脱水保护、代谢调整等多种途径来抵抗水分胁迫。在整个干旱胁迫过程中,柽柳主动累积有机溶质脯氨酸、可溶性糖和无机离子 K^+ 、 Na^+ ,降低体内渗透势,维持膨压,为干旱逆境条件下维持正常生命活动创造条件(王霞等,1999;贾晓红等,2001)。柽柳在水分胁迫条件下,一方面,主动积累脯氨酸、可溶性糖类等相容性溶质,通过降低水势、维持膨压来抵抗体内水分散失;另一方面,调控 K^+ 运输系统,主动积累 K^+ , Na^+ 也可通过高亲和性 K^+ 运输通道进入细胞, K^+ 、 Na^+ 共同参与调节渗透压,从而达到在水分胁迫条件下维持正常的生理功能。

由此可见,在长期的历史进程中,柽柳形成了一系列适应干旱和盐碱环境的优良特性,积累了大量的抗逆基因,成为了研究植物耐盐机制、克隆抗逆基因的理想材料。然而对柽柳抗逆性研究大多集中于形态、解剖及水分生理层面,分子水平的抗渗透胁迫机制研究较少,而且对其抗逆基因及分子抗逆机制的研究主要集中在林木遗传育种国家重点实验室(东北林业大学)。其他单位也有一些关于柽柳基因克隆及分子标记方面的报道。例如,Zhang 等(2014)从白花柽柳(*Tamarix albiflorum*)中克隆获得了 *TaMnSOD* 基因,并将该基因通过农杆菌介导法转入棉花(*Gossypium hirsutum*)中。证实该基因能明显提高转基因棉花的抗旱能力。

2000~2015 年,东北林业大学林木遗传育种国家重点实验室在柽柳抗旱耐盐胁迫分子机制方面进行了大量的研究。例如,刘桂丰等(2005)构建了干旱胁迫下多枝柽柳消减文库,通过对文库阳性克隆的随机测序,获得了如 *MnSOD*、*MYB* 相关蛋白、锌指蛋白等 17 种与干旱胁迫相关的基因,参与植物的渗透调节、信号传递、转录调控、活性氧清除等。由此也证实,柽柳中具有很多抗逆相关基因,因此以柽柳为材料进行系统深入的分子水平的耐盐机制研究,既能为植物耐盐性的改良提供新的基因资源,又可为不同物种间耐盐性的比较基因组学、盐胁迫下植物代谢途径的进一步阐明奠定基础。

刘文进等(2013)证实白花柽柳微小染色体维系蛋白 3(*TaMCM3*)特异性识别 W-box 元件。真核生物翻译起始因子 5A(eukaryotic translation initiation factor 5A, eIF5A)是