

刘群录
王沙生
蒋湘宁
著



HUYANG NAIYAN SHENGLI JIZHI JI

胡杨耐盐生理机制及 分子基础研究

FENZI JICHU YANJIU



北京林业大学优秀博士论文基金资助丛书

中国环境科学出版社

北京林业大学优秀博士论文基金资助丛书

胡杨耐盐生理机制及 分子基础研究

刘群录 王沙生 蒋湘宁 著

中国环境科学出版社·北京

图书在版编目(CIP)数据

胡杨耐盐生理机制及分子基础研究/刘群录等著. —北京:中国环境科学出版社, 2002.10

(北京林业大学优秀博士论文基金资助丛书)

ISBN 7-80163-406-3

I. 胡… II. 刘… III. ①胡杨-耐盐性-生理机制-研究②胡杨-细胞-耐盐性-分子生物学-研究 IV. S792.119.01

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 073835 号

出 版 中国环境科学出版社

(100036 北京海淀区紫竹院路 14 号)

网 址: <http://www.cesp.com.cn>

电子邮箱: cesp@96477.com

印 刷 北京联华印刷厂

经 销 各地新华书店

版 次 2002 年 10 月第一版 2002 年 10 月第一次印刷

印 数 1—2,000

开 本 850×1168 1/32

印 张 5.625 彩插 2

字 数 144 千字

定 价 15.00 元



作者简介

刘群录，男，河北深泽人，1970年1月生。1989年9月考入河北林学院。1993年7月毕业，获农学学士学位。毕业后在河北林学院做科研工作。1995年9月考入北京林业大学，师从蒋湘宁教授攻读硕士学位。1998年转为博士研究生，从事植物分子生物学方向的研究。1999年9月应邀参加了在法国举行的第二届国际杨树会议，并做了大会发言。2000年7月毕业，获理学博士学位。



蒋湘宁，男，1958年生。北京林业大学教授、博士生导师，生物学院副院长、国家林业局重点开放实验室主任、中国林学会第九届、第十届理事。在树木分子生物学、生物信息学和环境化学等领域从事木材基因工程定向改良、树木抗逆性提高和计算机模拟基础研究、技术开发和高学位人才培养，培养硕士研究生6名、博士研究生6名，发表学术论文70余篇，获多项国家和省部级科技进步奖。



第一辑

- 1 水源保护树种耗水特性研究与应用
- 2 胡杨耐盐生理机制及分子基础研究
- 3 森林水文：过程与机制
- 4 种子介电分选机理及介电分选技术研究
- 5 毛白杨细胞遗传与三倍体选育
- 6 白皮松生物学及种子生理生态

北京林业大学优秀博士论文基金资助丛书

编辑委员会

主 任 朱金兆

副主任 尹伟伦 马履一

委 员 (按姓氏笔画)

王礼先 王向荣 任恒祺 张启翔 李凤兰 孟宪宇

罗菊春 赵广杰 顾正平 续九如 翟明普 贾黎明

秘 书 钟 艳

序 言

科学技术水平是知识经济时代评价一个国家国力的重要标准。科技水平高则国力强盛，无论在政治、经济、文化、信息、军事诸方面均会占据优势；而科技水平低则国力弱，就赶不上时代的步伐，就会在竞争日趋激烈的国际大舞台上处于劣势。江泽民同志在庆祝北大建校 100 周年大会上也强调指出：“当今世界，科学技术突飞猛进，知识经济已见端倪，国力竞争日益激烈。”因此，提高科学技术水平，提高科技创新能力已为世界各国寻求高速发展时所共识。我国将“科教兴国”作为国策也表明了政府对提高科技水平的决心。博士研究生朝气蓬勃，正处于创新思维能力最为活跃的黄金年龄，同时也是我国许多重要科研项目中的中坚力量，他们科研成果水平的高低在一定程度上影响着—所高校、一个科研院所乃至我国科研的整体水平。国务院学位委员会每年一度的“全国百篇优秀博士论文”评选工作是对我国博士研究生科研水平的集体检阅，已被看作是博士研究生的最高荣誉，对激励博士勇攀科技高峰起到了重要的促进作用。北京林业大学不仅积极参加“全国百篇优秀博士论文”的推荐工作，还依此为契机每年评选出三篇校级优秀博士论文并设立专项基金全额资助论文以丛书形式出版，这是一项非常有意义的工作，对推动学校科研水平的提高将发挥重要作用。

从人才培养的角度来看，如何提高博士研究生的创新思维能力和综合素质，高质量地向社会输送人才倍受世人关注。提高培养质量的措施很多，但在培养中引入激励机制，评选优秀博士论文并资助出版，不失为一种好方法。博士生和导师可据此证明自

己的学术能力，确立自己的学术地位；也可激励新入学的研究生尽早树立目标，从而在培养的全过程严格要求自己，提高自身的素质。

因学科的特殊性，要想出色完成林业大学的博士论文有许多其他学科所不会遇到的困难，如研究周期长，野外条件难于严格控制，工作条件难苦等等。非常欣慰的是北京林业大学的博士生们不仅克服困难完成了学业，而且已经有人中选“全国百篇优秀博士论文”。而该丛书资助出版的“校级优秀博士论文”所涉及的研究领域、研究成果的水平也属博士论文中的佼佼者，令我欣喜。对这些博士生所取得的成果我表示祝贺，同时也希望他们以及今后的同学们再接再厉，取得更好的成绩报效祖国。

中国工程院副院长、院士 沈国防

2002年8月10日

引 言

胡杨(*Populus euphratica* Oliv.)在分类学上属于杨柳科(Salicaceae),杨属(*Populus*),胡杨派(Section *Turanga* Bge),是杨属中最古老的一个种。胡杨主要分布在荒漠和半荒漠地区,那里干旱少雨,年降雨量一般在 50mm 以下,而蒸发量可达降水量的几十倍;年温差及日温差变化极大,夏季气温可高达 $39.2\sim 44.1^{\circ}\text{C}$,而冬季低温可至 $-20.5\sim -39.8^{\circ}\text{C}$;多风沙,5、6 月间常有沙尘暴;土壤含盐量高,据调查,胡杨幼林中,0~30cm 的表土层中含盐量一般为 $0.15\%\sim 4.53\%$,成年胡杨林中,0~100cm 的土层平均含盐量为 $0.11\%\sim 16.38\%$ (魏庆莒 1990)。就是在这样恶劣的自然条件下,胡杨以其惊人的生命力在这里生存繁衍。在荒漠和半荒漠地区,胡杨是唯一可形成森林的乔木树种,成为风沙前沿的一道绿色屏障(王世绩等人,1995),被当地人民誉为“沙漠英雄树”。因此胡杨对于维持荒漠地区的生态平衡,保护当地的农牧业生产,具有不可替代的重要作用。此外,胡杨还可为当地人民提供木材、饲料、能源以及手工业原料。

胡杨在我国历史上就有大面积的分布。清代宋伯鲁在其咏胡杨的诗中曾描写到:“君不见额林之北古道旁,胡桐万树连天长。交柯接叶方灵藏,掀天掉地纷低昂。矮如龙蛇欲变化,蹲如熊虎踞高岗,嬉如神狐掉九尾,矜如药叉牙爪张!”但是由于近代人口增加、毁林开荒、滥伐滥牧,造成胡杨林大面积减少。目前胡杨林面积不足建国初期的一半。与此同时,我国“三北”地区生态环境不断恶化,据 2000 年 4 月 7 日的《北京日报》报道,我国特大沙尘暴在 60 年代发生了 6 次,70 年代 13 次,80 年代 14 次,90 年代至今

共发生了 20 多次。而 2000 年 3 月到 4 月间,在我国西北东部、东北西南部、华北北部等地区先后共出现 10 多次大规模的沙尘暴。这与内蒙古地区胡杨林的大面积减少不无关系。正是由于胡杨在生态环境中所起的重要作用,以及胡杨资源所面临的严重破坏,联合国粮农组织(FAO)林木基因资源专家组,将胡杨确定为全世界最急需优先保护的林木基因资源之一(王世绩等人,1995)。

现在我国政府号召西部大开发,但西部地区的自然环境恶劣,我国 90% 以上的荒漠化土地分布在这一地区,这严重阻碍了西部地区的发展。胡杨具有很强的抗逆能力,在治理西部的水土流失,改善西部生态环境中可起到重要作用。因而对胡杨的研究更具有实际意义。

认识到胡杨研究的重要意义,自 1995 年以来王沙生教授和蒋湘宁教授陆续提出了“胡杨抗盐性和生理基础研究”、“胡杨抗盐生理基础与杨树分子改良”、“提高中国速生杨树在逆境条件下的生产力”和“胡杨对渗透胁迫和离子胁迫的感知和耐盐机理研究”等研究课题,并分别得到了国家自然科学基金、国家教委优秀青年教师基金和德国-以色列农业研究协定项目的支持,从植物生理、生化和分子生物学等方面对胡杨的耐盐机理进行了较为系统的研究。马焕成博士发现胡杨苗在膜稳定性、抗氧化和渗透调节方面具有较强的耐盐能力(马焕成,1998)。胡杨在受到盐胁迫后,28kD 和 66kD 蛋白的含量增加。同时发现,这两种蛋白可受 ABA 诱导(Gü, 1998),说明盐胁迫可通过 ABA 诱导胡杨某些基因表达。白根本博士通过差减杂交技术和差示显示技术,在胡杨中分离了 3 个受盐胁迫诱导的基因片段和 2 个受盐胁迫抑制的基因片段。白根本还通过 PCR 研究了胡杨不同种源的遗传多态性(白根本,1999)。胡杨耐盐机理的研究还处于起步阶段,对胡杨的耐盐性还只是有一个很概括的认识,其深层的机理尚需进一步的研究。

为了深入研究胡杨的耐盐机制,我们建立了胡杨细胞的悬浮培养体系,并研究了胡杨在细胞水平的耐盐性;通过 X-射线微区

分析系统分析了胡杨细胞的分室渗透调节的耐盐机制;利用蔗糖密度梯度离心分离胡杨液泡膜微囊,并且系统研究了胡杨液泡膜 $H^+ - ATPase$ 的生化性质以及与胡杨离子区隔化的关系;通过 DPH 荧光标记和气相色谱,研究了胡杨液泡膜和质膜流动性及膜脂不饱和度在盐胁迫中的变化,并探讨了这些变化与胡杨耐盐性的关系。这一系列的研究从细胞水平和生物化学的角度较为深入地阐明了胡杨细胞的耐盐机制。

目 录

1 文献综述	(1)
1.1 植物耐盐机理及耐盐基因工程研究进展	(1)
1.1.1 盐胁迫对植物的危害	(2)
1.1.1.1 盐胁迫效应的多重性	(2)
1.1.1.2 盐胁迫的渗透胁迫效应	(3)
1.1.1.3 盐胁迫的离子毒害效应	(3)
1.1.1.4 植物在盐胁迫下的“双相生长”	(6)
1.1.2 植物的耐盐机制	(7)
1.1.2.1 植物的耐盐性	(7)
1.1.2.2 植物的耐盐机制	(8)
1.1.3 植物耐盐基因工程	(10)
1.1.3.1 渗透保护物质及渗透胁迫相关蛋白	(10)
1.1.3.2 抗氧化胁迫基因工程	(30)
1.1.3.3 离子平衡	(32)
1.1.3.4 信号分子	(38)
1.2 囊泡型 H^+ -ATPase 的结构、功能和对逆境胁迫的反应	(41)
1.2.1 F 型、V 型和 P 型 H^+ -ATPase 的性质	(41)
1.2.2 囊泡型 H^+ -ATPase 的结构及亚基组成	(46)
1.2.2.1 囊泡型 H^+ -ATPase 头部亚基组成	(49)
1.2.2.2 囊泡型 H^+ -ATPase 柄部亚基组成	(51)
1.2.2.3 囊泡型 H^+ -ATPase 膜区亚基组成	(53)
1.2.3 囊泡型 H^+ -ATPase 的功能、调节和对逆境	

胁迫的反应	(57)
1.2.4 囊泡型 $H^+ - ATPase$ 与信号传导	(61)
1.2.5 展望	(63)
2 胡杨细胞的悬浮培养及其耐盐性的研究	(64)
2.1 不同类型的胡杨愈伤组织在液体培养中的生长表现 ..	(65)
2.2 不同初始接种量对胡杨细胞生长的影响	(65)
2.3 胡杨悬浮培养细胞对培养基中碳源的利用	(68)
2.4 胡杨细胞悬浮培养过程中培养基 pH 值的变化 ..	(70)
2.5 盐胁迫对胡杨细胞生长及其可溶性蛋白含量的影响 ..	(71)
2.6 讨论	(75)
3 盐胁迫下胡杨细胞的渗透调节	(77)
3.1 盐胁迫对胡杨和毛白杨细胞壁中离子浓度的影响	(79)
3.2 盐胁迫对胡杨和毛白杨细胞质中离子浓度的影响 ..	(83)
3.3 盐胁迫对胡杨和毛白杨液泡中离子浓度的影响 ..	(86)
3.4 盐胁迫对细胞质中脯氨酸含量的影响	(91)
3.5 讨论	(92)
4 盐胁迫对胡杨液泡膜 $H^+ - ATPase$ 活性的影响	(96)
4.1 $H^+ - ATPase$ 的水解活性及其对专一性抑制剂的敏感性	(97)
4.2 胡杨液泡膜焦磷酸酶质子转运活性	(98)
4.3 各种细胞破碎方法对纯化胡杨液泡膜的影响	(99)
4.4 吖啶橙荧光的激发和发射光谱图	(101)
4.5 胡杨液泡膜上依赖于 ATP 的 $H^+ - ATPase$ 质子转运活性及其表现米氏常数	(102)
4.6 膜蛋白用量对吖啶橙荧光淬灭的影响	(104)

4.7 最适温度和最适 pH 值	(105)
4.8 二价阳离子对质子泵活性的影响	(106)
4.9 一价阴离子对质子泵的激活作用	(107)
4.10 氯离子对质子泵的激活作用	(108)
4.11 各种抑制剂对质子泵活性的抑制作用	(110)
4.12 ABA 和 IAA 对胡杨液泡膜 $H^+ - ATPase$ 质子 转运活性的影响	(112)
4.13 盐胁迫对胡杨液泡膜 $H^+ - ATPase$ 水解活 性的影响	(113)
4.14 盐胁迫对胡杨液泡膜 $H^+ - ATPase$ 质子转运 活性的影响	(115)
4.15 胡杨液泡膜 $H^+ - ATPase$ 的质子转运活性 与胡杨细胞离子区隔化的关系	(118)
4.16 盐胁迫对胡杨液泡膜 $H^+ - ATPase$ 表观米氏 常数的影响	(119)
4.17 对照及盐胁迫处理的胡杨液泡膜 $H^+ - ATPase$ 对各种抑制剂的敏感性	(120)
4.18 讨论	(123)
5 盐胁迫对胡杨膜脂脂肪酸组成及膜流动性的影响	(131)
5.1 盐胁迫对膜脂脂肪酸含量的影响	(131)
5.2 盐胁迫对膜脂流动性的影响	(134)
5.3 讨论	(135)
6 总结	(136)
参考文献	(141)
缩写词	(164)
致谢	(166)

1 文献综述

1.1 植物耐盐机理及耐盐基因工程研究进展

土地荒漠化是威胁人类生存与发展的一个世界性的生态灾难。盐渍化是造成土地荒漠化的主要原因之一。在世界范围内约有 9.6 亿 km^2 的盐碱地(刘祖祺 等, 1994); 约 1/3 的灌溉区受到盐碱化的影响, 而在干旱和半干地区情况则更为严重, 过度盐碱化的灌溉区面积达到了 50% 左右(Epstein et al, 1980)。而来自联合国粮农组织和联合国教科文组织的调查结果则表明, 全世界约一半的灌溉区都不同程度地受到次生盐碱化和水涝的影响(Szabolcs, 1994)。

我国是当今世界受荒漠化危害最为严重的国家之一。据报道, 目前全国大约 1/4 以上的国土受到荒漠化的影响, 每年因荒漠化造成的直接经济损失达 540 亿元, 平均每天近 1.5 亿元。风蚀、水蚀和盐碱化, 是造成我国荒漠化的三大主要原因。盐渍荒漠化地区主要分布在我国的西北、华北等重要的粮食主产区, 盐渍地约 23.3 万 km^2 (慈龙骏 1997)。而且由于人为因素及自然因素的影响, 盐碱地面积仍在不断地增加。

土地盐碱化给人类带来了巨大的损失。在历史上也曾有过人类文明毁于土地过度盐碱化的惨痛教训(Maynard, 1987)。根据对美国八种主要农作物进行的统计, 70% 的年均减产量是由非生物因素所造成的(Dhariwal, 1998)。而我国有 1.7 亿人口受到土地过度盐碱化和荒漠化的威胁, 由此造成的直接经济损失约 20~

30 亿美元(中国二十一世纪议程编制领导小组,1994)。我国幅员辽阔,但是人口众多,人均土地面积仅为 0.777hm^2 (11.65 亩),仅相当于世界平均水平的 $1/3$;人均耕地面积 0.106hm^2 (1.59 亩),不足世界人均数的 43%,并且由于种种原因,耕地面积仍在逐年减少。因此充分开发和利用低生产力土地是我国面临的一个迫在眉睫的问题。对盐碱地的治理也是其中一个重要课题。

目前治理盐碱地主要有两种途径:一种是通过淡水灌溉、洗盐等水利工程措施减轻盐碱危害;或通过施用石灰和有机肥等方法改良土壤。这需要大量的人力、物力和财力,因而这种方法在实施中受到一定的限制。另一种方法是选育耐盐植物,提高植物对高盐环境的适应能力,从而减轻盐碱对农林业生产的影响。这一途径具有耗资少、见效快等优点。我国又是一个人多地少,淡水资源和土地资源相对匮乏,并且有大面积盐碱荒地的国家。因而从我国国情出发,后一种方法更为切实可行。为了减少育种过程中的盲目性,需要对植物的耐盐机制有一定的了解和认识。近年来在耐盐植物的选育和植物耐盐机理的研究中取得了一定的进展;同时在植物耐盐基因工程等方面也已取得了一定的成就。

下面就盐胁迫对植物的危害,植物的耐盐机理及植物耐盐基因工程等方面分别加以概述。

1.1.1 盐胁迫对植物的危害

1.1.1.1 盐胁迫效应的多重性

盐胁迫对植物的危害具有多重效应,从不同角度出發,可将其分为不同的类型。Jevitt(1980)将盐胁迫分为原生胁迫(primary stress)和次生胁迫(secondary stress);而 James 等人(1993)将盐胁迫分为:渗透胁迫、专性离子胁迫和盐胁迫对植物能量代谢的干扰等三个方面;刘岩(1997a)认为盐胁迫对植物的危害包括:离子毒

害、水分胁迫、养分离子不平衡和氧化胁迫四个方面。盐胁迫对植物的危害是多方面的,涉及到植物许多生理代谢过程,但盐胁迫对植物的危害可分为最基本的两个方面:渗透胁迫和离子毒害(刘友良等,1987)。

1.1.1.2 盐胁迫的渗透胁迫效应

当环境中盐分浓度过高时,介质的水势下降,水分的有效性降低,造成植物吸水困难,对植物形成渗透胁迫。在盐胁迫下,植物新叶的生长速率减慢,减慢的程度与介质的渗透势成正比。由NaCl和相同渗透势的其它盐分(Termatt et al. 1986)或非离子型的渗透物质(Neumann, 1993)对植物生长产生相同的影响。当胁迫程度较小时,去除盐胁迫后,植物的生长可很快得到恢复。以提高植物抗旱能力为目的的基因工程研究表明:转基因植株在提高了抗旱能力的同时,耐盐能力也得以提高(Kavi Kishor, 1995),表明盐胁迫对植物可产生渗透胁迫效应。

1.1.1.3 盐胁迫的离子毒害效应

在高盐环境中生长一段时间后,植物体内会积累一定浓度的盐分。当盐分超过一定限度,将会对植物产生毒害作用。植物的膜系统(尤其是细胞膜)是盐害的原初作用部位和主要作用部位。在电子显微镜下可观察到盐胁迫下大麦和小麦膜系统崩溃的全过程。盐胁迫对植物细胞膜系统的破坏主要包括两个方面:一是由于氧自由基的破坏作用;再就是 Na^+ 对膜上 Ca^{2+} 的取代。

氧自由基对膜的破坏作用

氧分子还原时按量子化学的原理逐个吸收电子,在此过程中产生大量不稳定的高能中间产物—氧自由基。这些氧自由基性质非常活跃,具有很强的氧化能力。氧自由基可引起膜脂的过氧化,使膜脂不饱和度下降、膜流动性降低、透性增加,并使膜蛋白发生聚合、交联,破坏生物膜的结构和功能。氧自由基还可攻击伤害生