

○ 王瑞刚 著



YAN YOU DAO YANGHUA XIEPO

盐诱导氧化胁迫 与杨树耐盐性研究

YU YANGSHU NAIYANXING YANJIU

119

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

盐诱导氧化胁迫与杨树耐盐性研究

**Salt-induced Oxidative Stress and the Relevance to Salt
Tolerance in Poplar**

王瑞刚 著

中国环境科学出版社·北京

图书在版编目 (CIP) 数据

盐诱导氧化胁迫与杨树耐盐性研究/王瑞刚著. —北京:
中国环境科学出版社, 2010
(北京林业大学优秀博士论文基金资助丛书)
ISBN 978-7-5111-0163-1

I. 盐… II. 王… III. 胡杨—耐盐性—研究
IV. S792.119

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 009062 号

责任编辑 周 煜
封面设计 龙文视觉

出版发行 中国环境科学出版社
(100062 北京崇文区广渠门内大街 16 号)
网 址: <http://www.cesp.com.cn>
联系电话: 010-67112765 (总编室)
发行热线: 010-67125803

印 刷 北京市联华印刷厂
经 销 各地新华书店
版 次 2010 年 7 月第 1 版
印 次 2010 年 7 月第 1 次印刷
开 本 850×1168 1/32
印 张 5.5
字 数 150 千字
定 价 20.00 元

【版权所有。未经许可请勿翻印、转载，侵权必究】

如有缺页、破损、倒装等印装质量问题，请寄回本社更换

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，还以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备受世人关注。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。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

沈国舫

2002年8月10日

摘 要

胡杨是非常有价值的造林绿化树种。在我国西北干旱盐碱的荒漠和戈壁地带，胡杨是惟一能够形成森林的高大乔木树种。在固定沙丘、农田林网建设方面胡杨更具有不可替代的作用。胡杨具有很强的抗盐性，然而其潜在的应用价值还远没有得到开发利用。近年来从植物生理、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，而关于盐诱导的氧化胁迫与杨树耐盐性的研究却很少，而且也不深入。盐诱导的氧化胁迫在植物抗盐性中的作用越来越受到重视。为此，我们以耐盐的胡杨和不耐盐的群众杨、I-214 杨为材料，对 NaCl 胁迫下根、叶和质外体中的盐离子、活性氧（ROS）、抗氧化酶活性及其同功酶、丙二醛（MDA）和电解质外渗率的变化进行动态分析，揭示了活性氧调控在胡杨耐盐中的作用；并通过短期盐胁迫和抑制剂处理，初步阐明了盐诱导的氧化胁迫信号与树木耐盐性的关系。主要结论如下：

1. 在长期盐胁迫下，群众杨叶片的 CO_2 同化速率严重下降，而胡杨则维持在一个较高且稳定的水平。Pn-Ci 曲线显示，盐胁迫（12 d）降低了两种杨树叶片的 CO_2 的饱和点（CSP）、 CO_2 饱和点的 Pn（CSPn）和羧化效率（CE），却提高了 CO_2 的补偿点（CCP）。相似的是，盐胁迫也降低了两种杨树叶片的光饱和点（LSP）、光饱和点的 Pn（LSPn）和表观量子产率（AQY），但盐胁迫对群众杨叶片光反应的抑制作用显著高于胡杨。叶绿素荧光的数据显示，长期盐胁迫（12d）对群众杨叶片光适应和暗适应的荧光参数有显著的影响：（1）由于盐诱导的初始荧光（ F_0 ）的升

高和最大荧光(Fm)的显著下降导致了 PSII 最大荧光量子产率的下降；(2)在光适应的叶片上，盐胁迫降低了光化学猝灭(qP)，却提高了非光化学猝灭(qN)。相反，胡杨叶片的叶绿素荧光参数则没有相应的变化。说明同样的盐胁迫对胡杨光合作用的抑制明显弱于群众杨。

2. 光合作用受阻与盐离子在叶片中的大量积累造成的膜伤害有关。我们的结果显示，长期盐胁迫下，群众杨叶片中盐离子大量积累，特别是叶绿体中盐离子的积累，是导致叶片光合作用受阻的主要原因。盐离子的积累与电解质外渗率和 MDA 含量的增加成正相关，这可能是由于盐诱导的氧化胁迫造成了膜质过氧化的加剧，膜质过氧化的加剧又导致膜渗透性增加的结果。耐盐的胡杨则不同，由于叶片和叶绿体中积累了较少盐离子，基本没有造成膜质过氧化，从而维持了膜系统的稳定性。

3. 实验结果显示，膜质过氧化的加剧与 ROS 的调控有关。在盐胁迫的前期，胡杨一方面可以通过诱导下部叶片变黄脱落来减少盐诱导的水分胁迫，从而延缓盐离子的根冠运输，而叶片脱落与超氧阴离子自由基(O_2^-)增加促进乙烯合成有关；另一方面胡杨能及时地提高上部叶片抗氧化酶的活性(抗坏血酸过氧化物酶(APX)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽还原酶(GR))，有效地控制了 O_2^- 和 H_2O_2 的积累，避免了氧化伤害，保护了膜系统的稳定性。而群众杨则不能很快地感知盐胁迫并作出相应的反应。随着盐胁迫的进行，群众杨叶片中盐离子大量积累，光合受阻，并诱导了 ROS(O_2^- 和 H_2O_2)大量积累，尽管抗氧化酶的活性也明显的升高，但都不足以有效的控制 ROS 的伤害，从而使叶片出现了伤害症状，随着叶片中伤害面积的增加，其超氧化物歧化酶(SOD)和 POD 活性显著下降，加剧了膜质过氧化和膜透性的增加。而胡杨则不同，尽管也有盐离子在叶片中大量积累，但其能够通过及时地提高抗氧化酶的活性，有效地控制盐诱导的 ROS 的积累，从而有效地避免了氧化

损伤,维持了膜的稳定性。值得注意的是,与群众杨和 I-214 杨相比,胡杨在盐胁迫初始阶段就能大幅度上调 SOD、POD 活性,迅速阻止叶片中活性氧的积累,避免其对膜的伤害,这是典型的植物抗逆的预警机制。

4. 通过对长期盐胁迫下根组织中 ROS 和抗氧化酶活性变化的研究,结果显示,胡杨根组织能迅速感知盐胁迫,并上调抗氧化酶的活性来减少盐诱导的氧化损伤,长期盐胁迫下又能保持高水平的抗氧化酶系统,很好地控制了 ROS 的水平,避免了氧化损伤,维持膜的稳定性,从而减少了盐离子的吸收运输。而群众杨在盐胁迫初期不能迅速上调抗氧化酶的活性,长期盐胁迫下,抗氧化酶活性又降低,造成了氧化损伤,破化了膜系统,更促使了盐离子的积累。

5. 利用压力室的方法获取质外体溶液和 H_2O_2 的细胞化学染色,进一步研究了质外体中 ROS 和抗氧化酶活性的变化。结果显示,随着盐胁迫的进行,群众杨质外体中盐离子大量积累,诱导了 ROS (O_2^- 和 H_2O_2) 大量积累,尽管抗氧化酶的活性也明显的升高,但仍不足以有效地控制 ROS 的伤害,从而使叶片出现了伤害症状。而胡杨则不同,尽管也有盐离子在叶片中积累,但其能通过及时提高抗氧化酶的活性,控制盐诱导的 ROS 的积累,从而有效地避免了氧化损伤,维持了膜的稳定性。这些结果都表明抗氧化胁迫在两种杨树的耐盐性中起了重要的作用。

6. 通过低盐短期胁迫和抑制剂实验,我们发现,盐诱导的 ABA 信号转导途径与树木耐盐性密切相关,耐盐的胡杨能快速的感知盐胁迫,提高 ABA 的含量,诱导气孔关闭,既缓和了盐诱导的渗透胁迫,又减少了盐离子的吸收和根冠运输,而在此过程中 ROS 起到中间环节作用,并且 ROS 诱导的抗氧化防御的上调能有效地避免盐诱导的氧化损伤。不耐盐的群众杨对盐胁迫反应迟钝,不能很快适应环境,可能是其不耐盐的主要原因之一。

总之,胡杨耐盐性的获得可能是由于提高了抗氧化胁迫能

力。一方面，在长期盐胁迫下，胡杨不仅能通过诱导 O_2^- 上调，促进乙烯的合成，诱导落叶来减少蒸腾；而且能有效控制叶组织、根组织和质外体中 ROS 水平，避免氧化损伤，维持膜系统的稳定性。另一方面，盐诱导的氧化胁迫信号在胡杨耐盐性中起重要作用，既能诱导气孔关闭，减少蒸腾，又能减少氧化损伤。

Salt-induced oxidative stress and the relevance to salt tolerance in Poplar

Doctor Candidate: Wang Ruigang

(Botany)

Directed by Prof. Chen Shaoliang

ABSTRACT

Populus euphratica Oliv. is a valuable tree species used for afforestation on saline and alkaline desert sits, and plays very important roles in stabilizing sand dunes, and in agriculture shelter belt construction in north-west China. *P. euphratica* has a higher capacity to tolerate salinity, but it's potential application value is not developed abundantly. Recently, physiological, biochemical and molecular mechanisms of salt tolerance have been investigated in *P. euphratica*, but the relationship between salt-induced oxidative stress and salt-tolerance is less known. Moreover, salt-induced oxidative stress has received much attention. In order to elucidate mechanism of reactive oxygen species (ROS) regulation and the relevance to salt-tolerance in woody plants, we used salt-tolerant *P. euphratica* and salt-sensitive *P. popularis* and *P. cv I-214* to investigate the effects of increasing NaCl on tissue salt concentration, ROS, anti-oxidative enzymes, malondialdehyde (MDA) and membrane permeability (MP) in leaves, roots and the apoplast. In addition, we designed

experiments to clarify the correlation between salt-induced oxidative stress signal and salt-tolerance in poplars.

1. In a longer-term of salinity, CO_2 assimilation in *P. popularis* was severely reduced whereas stressed *P. euphratica* maintained a relatively higher and constant level of Pn. Pn-Ci curves showed that salt stress (12 days) reduced CO_2 saturation point (CSP), CO_2 saturated Pn(CSP_n), and carboxylation efficiency(CE), but increased CO_2 compensation point (CCP) in the two genotypes. Similarly, salinity lowered light saturation point (LSP), light saturated Pn (LSP_n), and apparent quantum yield(AQY) in both genotypes but the inhibitory effect of NaCl on light reaction was more pronounced in *P. popularis*, as compared to *P. euphratica*. Chlorophyll *a* fluorescence data indicated that a longer-term of salt stress (12 days) exhibited a marked influence on fluorescence parameters of *P. popularis* in both dark- and light-adapted states: (i) NaCl inhibited the maximal efficiency of PSII photochemistry (Fv/Fm) due to the salt-induced increase of Fo (the minimal fluorescence) and the marked decline of Fm(the maximal fluorescence); (ii) salinity decreased coefficient of photochemical quenching (qP) but markedly elevated coefficient of nonphotochemical quenching (qN) in the light-adapted state. In contrast, there were no corresponding changes of chlorophyll *a* fluorescence in salinised *P. euphratica*. This indicated less effect of same salt stress on photosynthesis in *P. euphratica* is than *P. popularis*.

2. Inhibition of leaf photosynthesis is related to membrane damage caused by salt build-up in the long-term salt stress. Results show that salt ion accumulation in leaves, especially in chloroplast, inhibited photosynthesis of *P. popularis*. The increase of MP and MDA was resulted from a salt buildup in leaves, which leads to

membrane peroxide and in ion leakage. In contrast, *P. euphratica* maintained stability of membrane system under salt stress and salinity did not cause membrane peroxidation since less salt ion accumulated in *P. euphratica* leaves.

3. Results show that the acceleration of membrane peroxidation was associated with ROS regulation. At the beginning of salinity, *P. euphratica* can alleviated NaCl-induced water stress and limited shoot-to-root transport of salt ion by inducing abscission of yellow leaves in lower shoot, Moreover leaf abscission was associated with a increase of ethylene synthesis induced by superoxide radical (O_2^-) upregulation. *P. euphratica* significantly increased anti-oxidative enzymes (ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT) and glutathione reductase (GR) in leaves of lower shoot to control levels of O_2^- and H_2O_2 , thus avoiding oxidative damage and maintaining integrality of membrane system. In contrast, *P. popularis* is not able to sense salt stress and make corresponding changes for salt adaptation. After exposure to salt stress, a great buildup of Na^+ and Cl^- restraining photosynthesis induced a significant increase of ROS in leaves and xylem sap of *P. popularis* despite a notable increase of anti-oxidative enzymes, which resulted in leaf-injury ultimately. Unlike *P. popularis*, *P. euphratica* could effectively prevent salt-induced ROS accumulation by up-regulating anti-oxidative enzymes although there was a great buildup of salt ion in leaves and xylem (especially Na), which is favorable to avoid oxidative damage and maintain membrane integrity. Accordingly, that the capacity for anti-oxidative stress plays a important part in salt tolerance in poplars.

4. We investigated the effect of a long-term salt stress on ROS and anti-oxidative enzymes activities in roots. Results show that *P. euphratica* root could rapidly sense the initial salinity and reduce salt-

induced oxidative damage by up-regulating anti-oxidative enzymes; while in a long-term salt stress, *P. euphratica* could effectively control ROS levels by maintaining higher level anti-oxidative enzymes system, which is benefit to avoid oxidative damage and maintain membrane stability, the salt ion absorption and transport were consequently reduced. However, *P. popularis* was not able to up-regulate anti-oxidative enzymes after the onset of salt stress. The salt-induced decline of anti-oxidative enzymes in *P. popularis*, leads to oxidative injury of membrane system, which causing salt ion accumulation.

5. We obtained xylem sap by pressure chamber to investigate salt-induced change of ROS and anti-oxidative enzymes in the apoplast. Cellular H_2O_2 location was determined by cytochemistry staining. Results showed that the salt ion accumulation in the apoplast of *P. popularis* induced ROS (O_2^- and H_2O_2) buildup in a long-term salt stress. The increased anti-oxidative enzymes was not able to remove ROS injury, leading to salt damage in *P. popularis* leaves. Although salt ion buildup took place in *P. euphratica* leaves, activities of anti-oxidative enzymes were increased correspondingly to prevent salt-induced excess ROS accumulation and avoid oxidative injury, which contributing to membrane stability maintenance.

6. Using ABA synthesis inhibitor, we founded that salt induced ABA signal transduction was associated with salt tolerance in *P. euphratica*. Salt-tolerant *P. euphratica* could sense the initial salt stress, increase ABA content in leaves and induced stomata close, which alleviates salt-induced osmotic stress and limit salt absorption and the root-to-shoot transport. Moreover, ROS participated in ABA-induced stomata close and up-regulation of anti-oxidative capacity. In contrast, salt-sensitive *P. popularis* could not make rapid

adaptations to saline conditions.

In conclusion , salt tolerance of *P. euphratica* may be a consequence of salt-induced anti-oxidative stress. *P. euphratica* induced leaves abscission to reduce water loss at the beginning of salt tolerance. In the long term of salt stress, *P. euphratica* limited ROS level in leaves, roots and apoplast to avoided oxidative injury, which is benefit to membrane system stability. Noteworthy, salt-induced oxidative stress signal played an important role in salt-tolerance of *P. euphratica*, which caused stomata closure and reduced transpiration and oxidative injury.

目 录

1 文献综述	1
1.1 胡杨抗盐性研究进展.....	1
1.2 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 调控机制 与植物的抗盐性	16
1.3 盐诱导的氧化胁迫信号转导与树木耐盐性的研究.....	28
2 不同种类杨树的抗盐性差异.....	34
2.1 材料和方法	34
2.2 实验结果	38
2.3 讨论	44
2.4 小结	46
3 盐离子的积累、膜透性和膜质过氧化.....	47
3.1 材料和方法	48
3.2 实验结果	51
3.3 讨论	57
3.4 小结	58
4 叶中活性氧 (ROS) 调控与杨树耐盐性研究.....	60
4.1 材料和方法	61
4.2 实验结果	67
4.3 讨论	81
4.4 小结	86

5 根中活性氧 (ROS) 调控与杨树耐盐性研究.....	87
5.1 材料和方法	88
5.2 实验结果	89
5.3 讨论	99
5.4 小结	100
6 质外体中活性氧 (ROS) 调控与杨树耐盐性研究.....	102
6.1 材料和方法	103
6.2 实验结果	106
6.3 讨论	110
6.4 小结	112
7 盐诱导的氧化胁迫信号转导与杨树耐盐性	113
7.1 材料和方法	114
7.2 实验结果	116
7.3 讨论	126
7.4 小结	128
8 结论	129
参考文献	131
博士学位在读期间获得成果目录	152
致 谢	156

1 文献综述

1.1 胡杨抗盐性研究进展

胡杨是非常有价值的造林绿化树种。在我国西北干旱盐碱的荒漠和戈壁地带，胡杨是唯一能够形成森林的高大乔木树种。在固定沙丘、农田林网建设方面胡杨更具有不可替代的作用。胡杨具有很强的抗盐性，然而其潜在的应用价值还远没有得到开发利用，主要原因在于人们对它抗盐的生理基础知之甚少。为深入揭示胡杨抗盐机制，指导林木的抗性育种工作，在国际合作科研项目的资助下[德国—以色列农业研究协定（GIARA）研究项目“提高中国速生树种在逆境下的生产力”]，从1993年开始对胡杨抗盐机制进行系统研究，至今已有十几年的历史，研究的内容涉及植物抗盐机制的各个层面。通过这些年的不懈努力，使胡杨抗盐生理机制各个方面的研究都取得了很大进展。已经报道的有关结果，在国内以及国际学术界均产生了一定的影响。现将胡杨的抗盐生理的研究现状总结如下。

1.1.1 生长

Chen 等以不耐盐的群众杨、I-214 杨的一年生扦插苗（Chen *et al.*, 2002a）和毛白杨组培苗（Chen *et al.*, 2003a）为对照，研究了长期盐胁迫下胡杨一年生实生苗和组培苗的高生长、整株叶片数、叶面积的变化。实验结果显示，胡杨的抗盐性明显高于其它杨树，在同样的盐胁迫条件下：①生长所受的影响小。②叶片