



国家高科技发展计划 (863 计划)

《抗旱、耐盐碱林草新品种选育》课题研究系列丛书

植物碳酸盐



逆境生理及其分子机制的研究

主编 柳参奎

副主编 程玉祥 高野 哲夫



东北林业大学出版社

国家高科技发展计划 (863 计划)

《抗旱、耐盐碱林草新品种选育》课题研究系列丛书

植物碳酸盐逆境生理及其 分子机制的研究

主 编 柳参奎

副主编 程玉祥 高野哲夫

东北林业大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

植物碳酸盐逆境生理及其分子机制的研究/柳参奎主编. —哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2006.6

ISBN 7-81076-897-2

I. 植… II. 柳… III. 碳酸盐—碱性土壤—植物生理学
IV. ①945②S155

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 061662 号

责任编辑: 姜俊清

封面设计: 彭 宇



NEFUP

国家高科技发展计划 (863 计划)

《抗旱、耐盐碱林草新品种选育》课题研究系列丛书

植物碳酸盐逆境生理及其分子机制的研究

Zhiwutansuanyan Nijing Shengli Jiqi Fenzi Jizhi De Yanjiu

主 编 柳参奎

副主编 程玉洋 高野哲夫

东北林业大学出版社出版发行

(哈尔滨市和兴路 26 号)

黑 龙 江 省 教 育 厅 印 刷 厂 印 装

开本 850 × 1168 1/32 印张 5.75 字数 144 千字

2006 年 6 月 第 1 版 2006 年 6 月 第 1 次印刷

印数 1—1 000 册

ISBN 7-81076-897-2

S·447 定价: 20.00 元

内容简介

本书以作者近十年从事植物碳酸盐逆境分子生理研究为基础,系统地介绍了苏打土盐碱地主要成分盐——碳酸盐(NaHCO_3 , Na_2CO_3)胁迫对植物生长发育的影响;分离了与碳酸盐胁迫相关功能基因,如线粒体 ATP 合成酶 6 ku 亚基、碳酸酐酶、热激蛋白 90、NADP-苹果酸、抗坏血酸过氧化物酶、过氧化氢酶等;对分离的新基因功能及其与碳酸盐逆境关系进行了较深入地研究;在此研究结果基础上提出了强化植物细胞内 pH 值调控能力能提高植物细胞耐受性的新学术观点,探讨了植物碳酸盐逆境胁迫的分子生理机制。为下一步从代谢组学上研究盐生植物抗盐碱机制奠定基础,也对今后分子培育抗盐碱植物及农作物具有重大的理论意义。

本书可供植物生理学、植物基因工程、植物抗逆境分子生物学、土壤学等学科领域的师生及研究人员参考。

前 言

我国土地沙漠化、退化严重,农业用地资源形势依然十分严峻。在世界各大洲干旱、半干旱、半湿润地区,土壤盐碱化已成为人类面临的一个世界性生态环境问题,世界各国也都十分关注环境问题。目前,我国每年因荒漠化造成的直接经济损失达540亿元,占全球荒漠化经济损失总额的15.5%。每年沙尘暴的频繁袭击,已经表明了我国生态环境危机的严重性。根据不良土壤所含主要盐分的不同,在我国盐碱地又分多种类型,苏打土盐碱地是其中的一种,大面积集中分布于我国东北地区松嫩平原。苏打土含有大量碳酸盐(Na_2CO_3 , NaHCO_3),由于碳酸盐的水解作用,土壤的pH值在9.0以上,部分严重地区土壤的pH值高达11,在这些严重的盐碱地区仅有几种植物零星地分布,其他植物几乎不能生存。加之过度的放牧,重度盐碱化土地面积每年仍以惊人的速度在增长,许多轻度碱化地区已“碱斑”累累,草木不生,治理重度盐碱地、开发利用盐碱土地资源日益得到人们的关注。

近年来对盐碱地的治理、开发与利用,人们已转向生物学措施,即利用传统的育种方法与近代的生物工程措施培育耐盐植物品种,以及利用先进的生物技术提高植物的抗盐性。这两项措施的理论基础就是植物的抗盐生物学。只有在植物抗盐生理基本了解清楚的前提下,上述两项措施才能较好地完成。作者把近十年从事苏打盐碱土对植物碳酸盐逆境分子生理的研究结果整理编成此书。本书首先系统地介绍了苏打土盐类成分中碳酸盐对植物生长发育的影响;用植物分子生物学手段分离了与碳酸盐胁迫相关的基因,并对分离的新基因功能及其与碳酸盐逆境关系进行了深

入的研究；深入地探讨植物碳酸盐逆境胁迫的分子生理机制，对研究植物抗盐碱机制及植物分子改良具有重大理论意义。

本书是由国家高技术研究发展计划（863计划）“抗旱、耐盐碱林草新品种的选育（编号：2002AA241111）”课题研究系列丛书，由柳参奎任主编，程玉祥（编写6万余字）、高野哲夫任副主编，参编人员还有张欣欣、鲁振强、于耸、刘大丽、阚彬彬、管清杰、金淑梅、罗秋香、夏德习。

由于编者的水平有限，在撰写和整理过程中，难免出现错误与不当之处。敬请同行专家和读者批评指正。

编 者
2006年3月

目 录

1 碳酸盐逆境对植物生长发育的影响.....	(1)
1.1 研究背景.....	(2)
1.1.1 盐渍土的类型.....	(2)
1.1.2 东北碳酸盐苏打盐碱地.....	(3)
1.2 碳酸盐逆境对植物生长发育的影响.....	(4)
1.2.1 碳酸盐对植物种子萌发特性的影响.....	(4)
1.2.2 碳酸盐对植物生长发育的影响.....	(6)
1.2.3 碳酸盐逆境胁迫对植物代谢的影响.....	(12)
1.3 植物对碳酸盐逆境分子生物学研究.....	(13)
1.3.1 水稻与碳酸盐逆境胁迫相关基因的克隆.....	(13)
1.3.2 盐生植物与碳酸盐逆境胁迫相关基因的 分离与鉴定.....	(15)
参考文献.....	(17)
2 与碳酸盐胁迫相关基因的功能解析.....	(19)
2.1 水稻 RMtATP6 基因的功能解析.....	(19)
2.1.1 材料与方法.....	(20)
2.1.2 结果与分析.....	(23)
2.2 水稻碳酸酐酶 (CA) 基因功能解析.....	(28)
2.2.1 材料与方法.....	(30)
2.2.2 结果与分析.....	(34)
2.3 碳酸盐逆境下 rHsp90 基因功能研究.....	(41)
2.3.1 材料与方法.....	(44)
2.3.2 结果与分析.....	(46)
参考文献.....	(51)

3 碳酸盐逆境下活性氧解毒系统的研究	(57)
3.1 植物氧化胁迫与活性氧代谢	(58)
3.1.1 氧化胁迫与活性氧代谢	(58)
3.1.2 活性氧种类	(58)
3.1.3 活性氧产生及相互转化	(59)
3.1.4 活性氧产生的场所	(60)
3.1.5 活性氧检测	(63)
3.1.6 活性氧积极作用及危害	(63)
3.2 植物活性氧清除	(65)
3.2.1 非酶类抗氧化剂	(65)
3.2.2 抗氧化解毒酶	(67)
3.2.3 抗坏血酸过氧化物酶	(68)
3.2.4 过氧化氢酶	(71)
3.3 碳酸盐逆境下植物活性氧解毒系统的研究	(72)
3.3.1 材料与方法	(72)
3.3.2 结果与分析	(74)
参考文献	(82)
4 水稻 NADP-ME 与碳酸盐逆境关系的研究	(90)
4.1 高等植物 NADP-ME 的研究进展	(90)
4.1.1 高等植物 NADP-ME 基因克隆及其转录特性	(91)
4.1.2 高等植物 NADP-ME 定位及功能	(95)
4.1.3 高等植物 NADP-ME 酶学特性	(96)
4.1.4 C_3 植物中表达 C_4 叶绿体型 NADP-ME 的 研究进展	(98)
4.1.5 展望	(99)
4.2 水稻 NADP-ME 与碳酸盐逆境关系的研究	(100)
4.2.1 材料与方法	(100)
4.2.2 结果与分析	(106)
参考文献	(129)

5 植物碳酸盐逆境的分子机制探讨	(135)
5.1 植物细胞内 pH 值调控系统是适应逆境的耐性机制	(135)
5.1.1 材料与方法	(139)
5.1.2 结果与分析	(141)
5.2 强化活性氧解毒系统提高植物耐盐碱能力	(152)
5.2.1 材料与方法	(153)
5.2.2 结果与分析	(157)
参考文献	(169)

1 碳酸盐逆境对植物生长发育的影响

我国大约有 1.3 亿 hm^2 的耕地, 而盐碱土壤(盐渍土)作为我国的一项重要的土地资源, 其总额为 9 913 万 hm^2 (王尊亲等, 1993)。碱化土壤是盐类集积土壤的一个种类, 我国北方各地(黑龙江、吉林、辽宁), 从内蒙古呼伦贝尔高原一直到淮河以北的黄淮海平原, 往西直至新疆的准噶尔和塔里木盆地都有分布。面积相对较大的且分布集中的是内蒙古高原的东北部, 东北的松嫩平原, 黄淮海平原, 内蒙古大小黑河流域与山西大同, 阳高盆地, 宁夏、甘肃河西走廊以及新疆的焉耆盆地, 准噶尔和塔里木盆地。我国的碱土和碱化土壤的形成, 大部分与土壤中碳酸盐(Na_2CO_3 , NaHCO_3)的累计有关, 因而碱化度普遍较高(王尊亲等, 1993)。由于土壤中大量碳酸盐(Na_2CO_3 , NaHCO_3)的水解作用, 土壤的 pH 值一般在 9.0 以上, 土壤的物理性质为黏质性、通气性差。在较严重的盐碱地区仅限几个种类的植物零星地分布于这种土壤, 其他植物几乎不能生存, 因此这给当地的农业生产、经济以及生态环境的发展带来了不可估量的影响。

盐碱地的治理(特别是含碳酸盐的苏打土)一直是一个难题, 在此类土壤中草本植物稀疏、矮小、生物产量低下, 植树难以成活。到目前为止, 此类盐碱地的治理还没有一个成型的技术体系。长期以来抗盐常规育种及分子育种的研究一直集中于 NaCl 逆境的研究上, 并已取得了一定的进展。而对于盐碱地的碳酸盐逆境的研究一直十分薄弱, 特别是在分子生物学水平上的报道极少, 因此信息量少、起步较难。

本书把由碳酸盐对植物造成的逆境命名为——碳酸盐逆境

(carbonate stress)。植物耐盐碱的分子生理的研究, 无论对于盐敏感植物还是盐生植物都具有重大的意义。建立了“植物耐盐碱生理”理论平台, 为植物抗旱、耐盐碱的分子改良提供理论依据。因而, 植物对碳酸盐逆境生理的研究, 在基础理论研究与应用研究上有着广阔的研究前景和研究价值。

笔者参照 NaCl 逆境在分子生物学方面的方法、思路及成果, 对盐碱土壤的碳酸盐逆境从分子水平做了大量的前期基础研究工作, 并提出了植物碳酸盐胁迫下耐盐碱机理新的学术观点: 在碳酸盐逆境下强化 pH 值调控系统的调控能力; 强化活性氧解毒系统的解毒能力以及强化细胞内电子传递系统的机能稳定性能够提高植物耐盐碱性。

1.1 研究背景

1.1.1 盐渍土的类型

盐渍土一般把盐土、碱土、盐碱土统称为盐渍土。盐土是指地壳土层中含有大量的可溶性盐的土壤。当表层土壤的中性盐含量超过 0.2% 时, 对大部分的植物即产生不同程度的危害, 这种土壤称为盐化或盐渍化土壤。碱土一般处在干旱与半干旱地区, 是石灰性土壤, 其土层的上层土壤中碳酸盐含量从百分之几到百分之几十。此种土壤的 pH 值大于 8。盐碱土是盐土、盐化土壤以及碱土和碱化土壤的总称 (赵可夫等, 2005; 林栖凤, 2004)。

我国幅员广大, 自然环境复杂, 气候差异较大。我国的盐渍土因受自然条件及气候差异的影响, 其类型也较复杂。滨海一带的盐渍土, 因其生成主要是受海水的影响及海潮侵袭所致, 土壤中含有较多的盐分, 且以氯化钠 (NaCl) 为主, 属于氯化物盐土。西北干旱地区的盐渍土, 因受干旱气候和成土母质的影响, 土壤中富含硫酸盐, 属硫酸盐盐土。华北平原地区的盐渍土土壤

中多含氯化物和硫酸盐。另外,在西北、华北及东北地区还存在有不同类型的苏打盐土和碱土。因此,可将我国各地盐渍土大致分为五大类型:氯化物盐土、硫酸盐氯化物盐土、硫酸盐盐土、氯化物硫酸盐盐土、苏打盐土及碱化土壤(赵可夫等,2001;徐恒刚,2004)。

1.1.2 东北碳酸盐苏打盐碱地

东北地区盐碱地主要包括:东部三江平原、北部平原、南部平原的北部与大兴安岭西麓狭长地带的黑土区,以及内蒙古自治区东北部的栗土区。黑土区域的盐碱地属于苏打盐碱土,苏打土表面有薄层盐结皮,可溶性盐分含量不高,表土盐分含量约为0.3%。其中阴离子以重碳酸根(CO_3^{2-})与碳酸根(HCO_3^{2-})为主,重碳酸根约占阴离子总量的70%,碳酸根占总量的20%,硫酸根次之,氯根最少。阳离子以钠为主,占阳离子总量的70%左右。pH值较高,约在9以上。

黑龙江三江平原苏打盐碱土的pH值在9以上,土壤中可溶性盐含量表土层约为0.3%,局部地区在1%以上。盐分中以重碳酸盐与碳酸盐为主,阳离子以钠含量占绝对优势。分布在黑龙江省安达地区的苏打盐碱土,各层土壤的含盐量均在0.3%~1.5%,土壤的pH值在10左右,土壤中可溶性盐分以重碳酸盐与碳酸盐为主。

在以 Na^+ 、 HCO_3^- 、 CO_3^{2-} 为主的盐碱土中,春季干旱时,土壤表层出现白色的盐结皮,俗称“瓦碱”,或形成盐结块。除了这些显著的特征外,土壤的团粒结构和孔隙度也有变化。一般情况微粒相对密度加大,土壤易于板结;孔隙度减小,透水透气性变差,易发生地表径流和水土流失。土壤物理性状的改变也影响着其化学性状的稳定。土壤溶液中离子浓度增大,pH值升高,电导率与可交换性Na比率提高,C、N的矿化度下降,土壤中酶的活性受到抑制,影响土壤微生物的活动和有机质的转化,因而

使土壤养分利用率下降, 有机质含量降, 土壤肥力下降(张建锋等, 2002; 王春娜等, 2004)。

1.2 碳酸盐逆境对植物生长发育的影响

1.2.1 碳酸盐对植物种子萌发特性的影响

用不耐盐碱水稻(品种: *Oryza sativa* L.) 做盐碱土壤、盐渍土壤中主要的两种不同类型成分盐—— NaHCO_3 (碳酸盐) 与 NaCl 对水稻种子处理后萌发特性影响的研究(图 1-1)。两种盐 NaHCO_3 与 NaCl 处理的种子与对照相比, 种子的发芽速率受到明显的抑制, 随种子被处理的盐溶液浓度升高发芽速率逐渐降低, 根基本长不出来。最重要的是, 图 1-1 结果表明相同浓度 NaHCO_3 与 NaCl 对种子的萌发影响的程度不同, 相同浓度的 Na^+ , NaHCO_3 影响明显高于 NaCl 。当处理盐 (NaHCO_3 与 NaCl) 浓度达到 80 mmol/L 时, 两者对种子萌发影响的差异较为明显(图 1-1D、图 1-1E、图 1-1F、图 1-1H)。这就表明 NaHCO_3 对水稻种子萌发生理影响与 NaCl 对水稻种子萌发生理影响是不同的; 与 NaCl 相比, NaHCO_3 对水稻种子萌发生理影响要大。这可能是碳酸盐逆境对植物的危害主要来自于 HCO_3^- 、 CO_3^{2-} 及高 pH 值。

张慧丽等(2001) 做了在 NaHCO_3 条件下小麦种子萌发特性的研究, 结果表明 NaHCO_3 对小麦种子萌发有明显的抑制作用。 NaHCO_3 浓度为 0.3 mol/L 时, 萌发抑制率为 54%; 0.4 mol/L 时, 抑制萌发率在 90% 以上; 当 NaHCO_3 浓度达到 0.5 mol/L 时, 可完全抑制麦种的萌发。 NaHCO_3 对小麦胚根的抑制高于对胚芽的抑制, 胚芽生长为对照长度的 0~36%, 而胚根生长只为对照长度的 0~17%。处理后 96 h, 对照发根数已经具有 5 条, 而

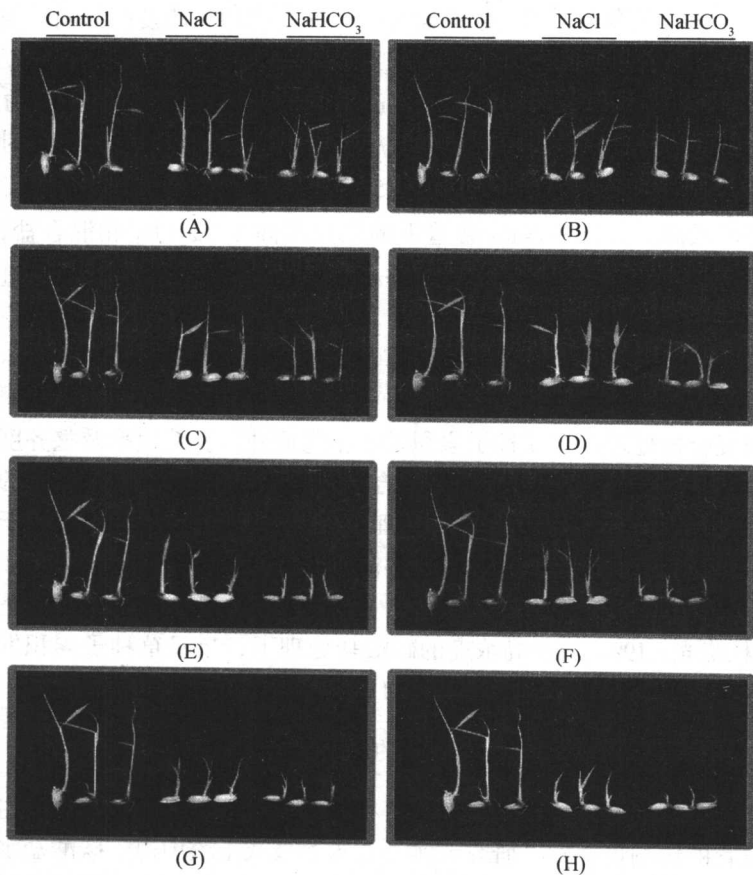


图 1-1 不同浓度盐 NaHCO_3 、 NaCl 处理的水稻种子萌发特性

两种盐 NaHCO_3 、 NaCl 的处理浓度分别为：20 mmol/L (A)、40 mmol/L (B)、60 mmol/L (C)、80 mmol/L (D)、100 mmol/L (E)、120 mmol/L (F)、140 mmol/L (G)、160 mmol/L (H)

NaHCO_3 不同处理的发根只有 0 到 4 条。随着 NaHCO_3 浓度的增加，主胚根长度、胚芽长度、发根数和 α -淀粉酶活性均呈下降趋势。

一些研究者还做了碳酸盐对耐盐碱植物种子萌发的影响。周婵等(2004)对羊草种子在 NaCl 、 Na_2CO_3 和混合盐胁迫下的发芽率进行测定。在 12.5 ~ 600 mmol/L NaCl , 12.5 ~ 150 mmol/L Na_2CO_3 和混合盐 37.5 ~ 250 mmol/L 条件下羊草的发芽率均高于对照, 在 NaCl 、 Na_2CO_3 浓度为 12.5 mmol/L, 混合盐 75 mmol/L 时发芽率最高, 并且在 NaCl 胁迫下的发芽率高于 Na_2CO_3 和混合盐, 实验结果表明适宜的盐碱能促进种子发芽, 中性盐更有助于促进种子发芽。

阎秀峰等(2000)也研究了耐盐碱植物星星草种子在 NaCl 、 NaHCO_3 (Na_2CO_3) 和混合盐三种逆境条件下萌发特性。结果表明混合盐处理除了使种子累积发芽率降低外, 发芽速率及整齐度也下降。 NaCl 处理的结果与混合盐结果相似。然而, 低浓度的碳酸盐 (NaHCO_3 、 Na_2CO_3) 处理发芽率不仅不降低, 反而高于无盐处理的, 这一现象在另一些耐盐植物的研究中也出现过, 如耐盐牧草碱茅(沈禹颖, 1991)、草木樨(牟新待, 1987)、碱蓬(杜晓光, 1994)。在高浓度的碳酸盐处理下, 星星草种子累积发芽率、发芽速率及发芽整齐度均下降(阎秀峰等, 2000)。

1.2.2 碳酸盐对植物生长发育的影响

碳酸盐对植物的影响, 除了种子萌发特性, 对植物的生长与发育的影响也得到了研究证实。在水溶液或土壤中由于碳酸盐水解而呈现碱性, 为了试图找出碳酸盐对植物生长、发育影响的因素所在, 以水稻作为研究对象, 以生长发育到三叶期的同一时期幼苗进行碳酸盐 (NaHCO_3 、 Na_2CO_3) 及 NaCl 加碱模拟盐碱环境同时胁迫处理。盐浓度同为 80 mmol/L, 处理分对照(未胁迫)、 NaHCO_3 及调 pH 值为 8.5 的 NaCl ; 另一组处理为对照(未胁迫)、 Na_2CO_3 及调 pH 值 11.5 的 NaCl , 实验观察 1 ~ 6 d, 结果如图 1-2。在第一组中与对照相比, NaHCO_3 及调 pH 值为 8.5 的 NaCl 胁

胁迫处理，两者都明显地影响水稻幼苗的生长与发育。 NaHCO_3 胁迫处理的第 6 天苗出现枯黄、死亡，这表明 NaHCO_3 胁迫对水稻生长与发育的危害程度明显高于 NaCl 胁迫（pH 值 8.5）。相同 Na^+ （80 mmol/L）及相同 pH 值（pH 值 8.5）中性盐 NaCl 对水稻幼苗生长、发育的影响较小，而 NaHCO_3 对水稻生长与发育胁迫的危害程度要大，这就表明 NaHCO_3 对水稻生长与发育胁迫危害的一个重要因素是 HCO_3^- ， HCO_3^- 可能导致了水稻幼苗生长与发育的正常生理改变。

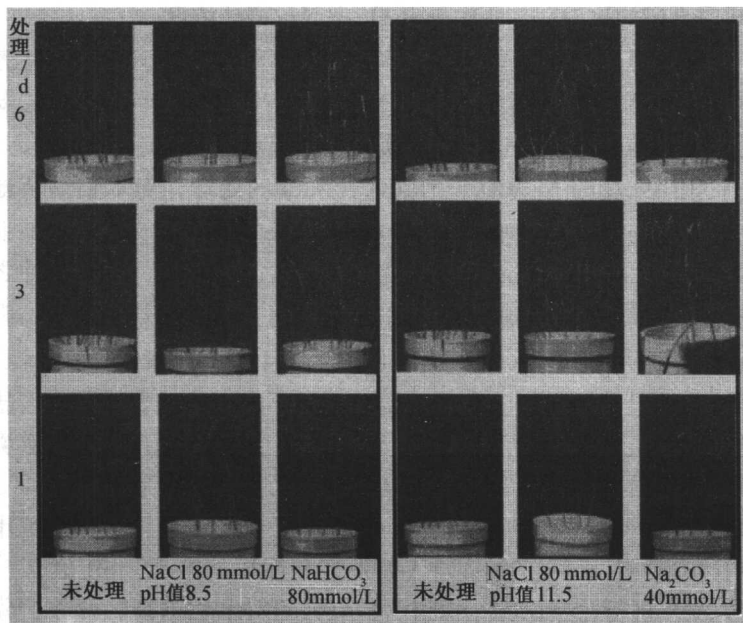


图 1-2 NaHCO_3 、 NaCl 、碱性 pH 值处理对水稻生长发育的影响

在另一组处理中， Na_2CO_3 及调 pH 值 11.5 的 NaCl 胁迫处理，两者都明显地影响水稻幼苗的生长与发育，并且 Na_2CO_3 及 NaCl （pH 值 11.5）胁迫处理的苗从第 3 d 开始出现枯黄、死亡。与第

一组相比,表明高 pH 值对水稻幼苗胁迫产生了生长与发育危害。另外,与 80 mmol/L NaHCO_3 相比,40 mmol/L Na_2CO_3 危害程度要大,这也表明 CO_3^{2-} 或高 pH 值是碳酸盐胁迫危害水稻生长与发育的重要因素。

在笔者的实验结果中,NaCl 加碱模拟盐碱环境对水稻幼苗生长、发育的影响次之,都没有碳酸盐对水稻幼苗生育、发育的影响大。这就说明:碳酸盐逆境对植物的危害与 NaCl 有很大的不同,碳酸盐逆境对植物的危害主要由 3 个因素造成:(1) 高 pH 值;(2) HCO_3^- , CO_3^{2-} ; (3) 高 Na^+ 离子浓度。

为了进一步量化碳酸盐对水稻幼苗生长、发育的影响,笔者做了不同浓度梯度的碳酸盐 (NaHCO_3 , Na_2CO_3) 对同一生长期的水稻幼苗分不同胁迫时间的实验,结果如图 1-3、图 1-4。

相同浓度的 NaHCO_3 , Na_2CO_3 , NaCl 的处理,对水稻幼苗地上部生长与根生长影响有差异,对根生长的抑制用明显大于地上部(图 1-4A、图 1-4B)。比较 NaHCO_3 , Na_2CO_3 , NaCl 3 种之间对水稻幼苗生长影响的差异,结果表明:对水稻幼苗根生长影响的强度为 $\text{Na}_2\text{CO}_3 > \text{NaHCO}_3 > \text{NaCl}$ (图 1-4B),而 3 种盐对水稻幼苗地上部生长影响在低浓度时差异不大。这就表明了碳酸盐对植物的逆境是不同于植物的 NaCl 盐逆境,暗示了碳酸盐逆境对植物的危害主要来自 $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 、高 pH 值及 Na^+ 3 个因素。

还有一些研究者做碳酸盐对植物生长、发育的影响。梁正伟等(2004)对水稻 7 个品种(品系)和苏打盐碱土(pH 值 6.51~9.81)进行盆栽试验,探讨了盐碱胁迫对水稻株高、秆长、分蘖期和抽穗期等主要生长发育性状的影响。结果表明,盐碱胁迫使水稻株高降低、秆长缩短,且盐碱度越大,降低幅度越大;盐碱胁迫使水稻单株分蘖力明显下降,使分蘖高峰明显推迟或不出现分蘖高峰;水稻抽穗期随着盐碱度的提高,其延长的天数越长,并且发现不耐盐碱的早熟品种比耐盐碱的中晚熟品种抽穗