

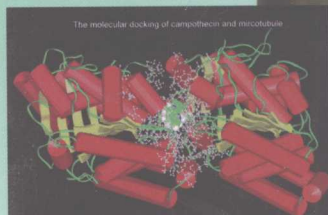
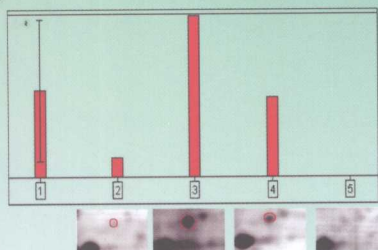
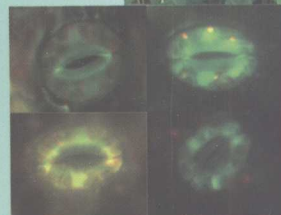


新世纪学术创新团队著作丛书

喜树高温和干旱逆境生态适应的分子机理

丛书主编 祖元刚

著 者 于景华 唐中华 祖元刚



 新世纪学术创新团队著作丛书

喜树高温和干旱逆境生态 适应的分子机理

丛书主编 祖元刚

著 者 于景华 唐中华 祖元刚

国家重点基础研究发展规划项目（项目编号：G19990160）

国家自然科学基金项目（项目编号：30470166）

教育部重点项目（项目编号：03061）

资助

黑龙江省自然科学基金（项目编号：C0233）

科学出版社

北 京

内 容 简 介

以功能蛋白质组为特征的分子生态适应研究是当前分子生态学领域的前沿。本书基于对喜树 (*Camptotheca acuminata* Decne) 幼苗在人工培养条件下进行的高温和干旱胁迫处理, 对其生理代谢差异、次生代谢产物含量动态、蛋白质电泳图谱变化特性及有明确鉴定结果的差异蛋白质斑点功能加以分析, 对高温和干旱逆境胁迫下喜树幼苗的生理生态适应、喜树碱等生物小分子的生态适应及功能蛋白质等生物大分子的生态适应功能进行了研究。全书共分 7 章。阐述了不同逆境条件下喜树碱类次生代谢物质的动态及其生理机理, 以及喜树幼苗应对高温和干旱逆境的功能蛋白质基础, 为喜树野生种群的保护、人工种群的培植提供理论基础。

本书可供植物学、生态学及林学等领域的科研、教学人员和研究生参考。

图书在版编目(CIP)数据

喜树高温和干旱逆境生态适应的分子机理/于景华, 唐中华, 祖元刚著.

—北京: 科学出版社, 2007

(新世纪学术创新团队著作丛书/祖元刚主编)

ISBN 978-7-03-020718-0

I. 喜… II. ①于…②唐…③祖… III. 喜树-植物生理学 IV. S792.990.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 185986 号

责任编辑: 庞在堂 莫结胜 沈晓晶/责任校对: 赵桂芬

责任印制: 钱玉芬/封面设计: 王 浩

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>

新 蕾 印 刷 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2007 年 12 月第 一 版 开本: B5 (720×1000)

2007 年 12 月第一次印刷 印张: 8 1/4 插页: 1

印数: 1—1 000 字数: 150 000

定价: 46.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换(环伟))

丛书序言

自从宇宙大爆炸以来,自然天体即在介观的水平上,以夸克等粒子的随机碰撞为基本能量运动形式,由介观向纳观、微观、中观、宏观、宇观方向,以运动的异质性为自然演化的源泉,以无限性的宇量规模演化成太阳系、地球、生命系统,直至形成具有高度发达大脑的人类。

然而,人类直观认知自然界的视野仅限于宏观水平,对于从介观到宇观无限性宇量规模的认知也只能借助于各类观测工具由局部、定性、可数计量开始逐渐加深对自然界复杂性的认知,其间经历了数万年的发展历程,因而也推动着科学技术由定性研究到定量研究向智能研究,由单一学科到学科交叉向学科融合的方向发展,也规范着科学研究的行为由个体化向群体化方向发展。进入 20 世纪 90 年代,人类开始迅捷共享全球科技资源,科学研究的群体化整合进一步增强了科学家在整体观上全面认知自然界本质的凝聚力,因而酝酿着人类在 21 世纪通过学术团队创新来实现对自然界整体本质认知的重大突破。

我于 1972 年开始接触生命科学研究,1978 年开始从事生命科学研究,在大约 30 年的学术生涯中,逐渐认识到单一学科和个体化研究的局限性,为此,从 1990 年开始,下决心以重点实验室的形式组建学术团队,发挥集体智慧的优势,试图将宏观研究与微观研究结合起来,全面揭示生命系统与环境系统相互作用的内在机理。经过十几年的努力,积累了一些原始创新性的研究成果,现以《新世纪学术创新团队著作丛书》的形式陆续出版,以利于自由探索式学术交流和集成发展。

祖元刚

2004 年 1 月于哈尔滨

序 言

喜树 (*Camptotheca acuminata* Decne) 是蓝果树科 (Nyssaceae) 喜树属 (*Camptotheca*) 多年生亚热带落叶阔叶乔木树种, 是我国特有种。1957 年, 美国国家癌症研究所 (National Cancer Institute, NCI) 启动了化合物抗癌活性测试项目, 在最初测试的上千种植物提取物中, 发现喜树提取物对鼠科腺癌模型显示出强大的活性。1966 年, Wall 及其同事将喜树碱描述为“新的白血病和肿瘤生物碱抑制剂”, 并确定了其化学结构 (Wall *et al.* 1966)。1985 年, Hsiang 发现, 喜树碱是通过嵌合抑制 DNA 局部拓扑异构酶 I (Topoisomerase I, Topo I) 的独特作用来发挥其抗癌作用的 (Hsiang *et al.* 1985), 喜树碱的抗癌价值重新引起研究者的兴趣。经过研究获得了 CPT-11 及 Topotecan 等水溶性且包含完整内酯环的喜树碱衍生物, 并且在 1996 年被美国食品药品监督管理局 (U.S. Food and Drug Administration, FDA) 批准上市, 2002 年, 其年销售额达到了 7.5 亿美元 (Oberlies, Kroll 2004)。

由于喜树药用价值的新发现和国际医药主流市场对喜树原料的大量需求, 我国作为喜树特有资源的出产国, 不仅要使喜树天然分布的资源大国, 而且还要做喜树合理利用的经济强国, 这就必须首先解决喜树资源的人工培植问题。

我国喜树资源的人工培植近年发展较快, 但喜树适生区内可利用的耕地和立地条件好的林地数量有限, 喜树的种植地更多选择在高温干旱的石质山上, 或长江以北半干旱地区。在干旱、高温的胁迫条件下培育喜树资源, 必须了解喜树抗旱和抗高温的生态适应特性及其分子机理。

2000 年, 我指导的博士研究生于景华开始研究喜树在高温胁迫条件下的生态适应特征及其分子机理, 完成了以“喜树幼苗对高温胁迫的生理响应和蛋白质适应, 喜树碱类物质在高温逆境下的积累动态及其生态适应意义, 高温逆境下喜树生态适应的分子机理”为主要内容的博士研究论文的撰写, 以及喜树在干旱胁迫条件下的生态适应特征及其分子机理研究。期间, 我的另一位博士研究生唐中华作为团队成员参加了此项研究。此外, 于景华指导的硕士研究生刘士刚和刘丽杰也参加了喜树在干旱胁迫条件下的生态适应特征及其分子机理的部分研究工作。在此基础上, 我们共同对上述研究工作进行了认真的总结、修改和补充, 整理出此专著, 并收录于我主编的《新世纪学术创新团队著作丛书》中, 不足之处, 殷盼指正。

祖元刚

2007 年 2 月于哈尔滨

前 言

我国特有植物喜树 (*Camptotheca acuminata* Decne) 因其植株内含有重要的抗癌次生代谢产物——喜树碱 (camptothecin) 而成为重要的经济树种。由于人为干扰, 我国的喜树野生种群已经处于濒危状态, 且多分布于易受干旱和高温影响的石质山上, 全球气候变暖将加剧喜树幼苗生长环境出现短时间的干旱、高温等不利状态, 并成为野生喜树幼苗最主要的胁迫因素; 将喜树向中原干旱地区引种栽培, 必须解决其耐旱性问题。但是, 目前对喜树逆境生态适应的研究主要集中于长时间干旱胁迫对其生理状态的影响, 并没有深入到分子水平, 对其高温胁迫的生态适应性也未开展研究工作。

从 20 世纪 90 年代起, 我们尊敬的导师祖元刚教授开始致力于植物分子生态学研究, 并作为第一执行主席分别主持了以“分子生态学的形成与发展”为主题的青年科学家论坛第三十六次活动和以“生态适应与进化的分子机理”为主题的第 121 次香山科学会议。他在所撰写的一系列论著中, 提出分子生态学是应用现代分子生物学的原理、技术、方法, 研究生命系统与环境系统相互作用的生态机理及其分子机理的一门学科, 是生态学与分子生物学相互渗透而形成的一门新兴交叉学科, 也是生态学的一门分支学科, 并且提出基因组是生态进化研究的分子基础、蛋白质组是生态适应研究的分子基础、核酸和蛋白质的整合作用是生态适应与生态进化整体综合研究的分子基础等学术观点。

在攻读研究生学位期间, 我们有幸在祖元刚教授的指导下从事以蛋白质和喜树碱等生物分子为对象的植物分子生态学研究, 重点开展了喜树幼苗在高温和干旱胁迫下的生理生态、功能蛋白质组学及喜树碱类物质在上述逆境条件下的动态研究, 在此基础上分析和探讨了喜树幼苗对高温和干旱生态适应的分子基础, 特别是以功能蛋白质为代表的生物大分子的生态适应功能及以喜树碱和 10-羟基喜树碱为代表的生物小分子的生态适应功能。本书是我们历经 5 年共同研究所获得初步成果的总结, 经祖元刚教授认真指导, 修改而成。

非模式植物的功能蛋白质组研究由于受其遗传背景限制, 还属于探索性的工作, 同时限于作者的水平, 本书尚存在诸多缺点和疏漏, 恳请学术同行提出批评和建议。

于景华 唐中华

2007 年 1 月于哈尔滨

目 录

丛书序言

序言

前言

第 1 章 绪论	1
1.1 分子生态学的概念及其内涵	1
1.2 生态适应及其分子基础研究概述	2
1.2.1 生物的生态适应表现于从基因型到表现型等多个水平	2
1.2.2 生态适应的分子生态学本质是基因表达调控及其对环境的响应	5
1.2.3 生态适应的分子生态学特征体现于功能蛋白质组的差异	6
1.3 喜树及喜树碱类衍生物研究进展	9
1.3.1 喜树的分类地位、资源现状及野生种群分布区的环境特点	9
1.3.2 喜树碱及其衍生物研究进展	11
1.4 喜树逆境生理生态适应研究进展	17
1.5 本项研究的目的、意义	17
参考文献	18
第 2 章 喜树幼苗对高温胁迫的生理响应	24
2.1 引言	24
2.2 材料与方法	25
2.2.1 实验材料	25
2.2.2 高温胁迫介质和温度梯度及处理设备的选择	25
2.2.3 喜树幼苗高温胁迫处理体系	26
2.2.4 光合速率、蒸腾速率、胞间 CO_2 浓度、气孔导度及光响应曲线测定	26
2.2.5 叶绿素含量测定	27
2.2.6 丙二醛含量测定	27
2.2.7 细胞膜差别透性测定	28
2.3 气候箱高温胁迫下喜树幼苗叶片的形态变化	28
2.4 气候箱高温胁迫下喜树幼苗成熟叶片的生理生态响应	29
2.4.1 光响应曲线	29
2.4.2 气体交换及气孔与非气孔限制	30
2.4.3 光合色素含量和组成对高温胁迫的响应	32

2.4.4 丙二醛含量动态	33
2.5 水浴高温胁迫下喜树幼苗成熟叶片的生理生态响应	33
2.5.1 光合色素含量和组成对水浴高温胁迫的响应	33
2.5.2 丙二醛含量动态	34
2.5.3 细胞膜差别透性的变化	34
2.6 本章小结	37
参考文献	38
第3章 喜树幼苗对干旱胁迫的生理响应	40
3.1 引言	40
3.2 材料与方法	42
3.2.1 实验材料	42
3.2.2 干旱胁迫处理体系	43
3.2.3 光合速率、蒸腾速率、胞间 CO ₂ 浓度、气孔导度测定	43
3.2.4 土壤体积含水量测定	44
3.2.5 相对含水量测定	44
3.2.6 丙二醛含量测定	44
3.2.7 游离脯氨酸含量测定	44
3.2.8 数据统计分析	45
3.3 自然干旱胁迫下土壤体积含水量动态	45
3.4 干旱胁迫下喜树幼苗叶片相对含水量动态	46
3.4.1 自然干旱胁迫下喜树幼苗叶片相对含水量的变化	46
3.4.2 PEG 模拟干旱胁迫下喜树幼苗叶片相对含水量的变化	46
3.5 自然干旱胁迫下喜树幼苗叶片丙二醛和游离脯氨酸的含量动态	47
3.5.1 丙二醛含量动态	47
3.5.2 游离脯氨酸含量动态	48
3.6 干旱胁迫下喜树幼苗成熟叶片的生理生态响应	49
3.6.1 自然干旱胁迫下喜树幼苗成熟叶片的生理生态响应	49
3.6.2 PEG 模拟干旱胁迫下喜树幼苗成熟叶片的生理生态响应	51
3.7 本章小结	53
参考文献	53
第4章 喜树碱类物质在高温和干旱逆境下的积累动态及其生态适应意义	57
4.1 引言	57
4.2 材料与方法	59
4.2.1 实验材料与胁迫处理	59
4.2.2 外源喜树碱喷施实验方法	59

4.2.3 喜树碱类物质含量测定方法	59
4.2.4 微管蛋白荧光免疫分析	61
4.2.5 喜树碱与微管蛋白的分子对接	61
4.3 水浴高温胁迫下喜树碱类物质的含量动态	62
4.3.1 喜树碱类物质对不同水浴胁迫温度的响应	62
4.3.2 不同组织中喜树碱类物质对不同水浴温度胁迫时间的响应	63
4.4 气候箱高温胁迫处理下喜树碱类物质的含量动态	65
4.5 PEG 模拟干旱胁迫下喜树幼苗喜树碱含量的变化	66
4.6 自然干旱胁迫下喜树幼苗喜树碱类物质含量的变化	68
4.7 逆境下喜树碱类物质动态积累与初生代谢网络向次生代谢网络转变的关系探讨	69
4.8 喜树幼苗中喜树碱干旱逆境生态适应的机理探讨	71
4.8.1 外源喜树碱对喜树幼苗叶片气孔运动的影响	71
4.8.2 喜树碱与微管蛋白相互作用的分子模拟	73
4.8.3 喜树碱影响气孔运动及自毒作用防御的机理	75
4.9 本章小结	75
参考文献	76
第 5 章 喜树幼苗对高温胁迫的蛋白质适应	81
5.1 引言	81
5.2 材料与方法	81
5.2.1 喜树幼苗高温胁迫处理体系	81
5.2.2 喜树叶片蛋白质的提取	82
5.2.3 喜树叶片蛋白质 SDS-PAGE 电泳	83
5.2.4 喜树叶片蛋白质双向电泳	84
5.2.5 胶内酶切及质谱分析	85
5.2.6 差异点肽质量指纹数据库查询	85
5.3 水浴高温胁迫对喜树叶片蛋白质分子质量变化的影响	86
5.4 气候箱高温胁迫对喜树叶片蛋白质分子质量变化的影响	87
5.5 气候箱高温胁迫对喜树叶片双向电泳图谱的影响及差异点质谱解析	89
5.6 三种鉴定蛋白相对含量增加的高温逆境生态适应意义	91
5.6.1 ATP 合成酶 β 亚基降解产物含量增加	91
5.6.2 不可逆 3-磷酸甘油醛脱氢酶相对含量增加	92
5.6.3 多聚半乳糖醛酸酶相对含量增加	92
5.7 本章小结	93
参考文献	94

第 6 章 喜树幼苗对干旱胁迫的蛋白质适应	96
6.1 引言	96
6.2 材料与方法	96
6.2.1 实验材料与干旱胁迫处理体系	96
6.2.2 喜树叶片蛋白质提取及电泳、质谱鉴定、数据库检索	96
6.2.3 蛋白质测序	97
6.3 PEG 胁迫下喜树叶片蛋白质分子质量变化	97
6.4 PEG 胁迫对喜树叶片双向电泳图谱的影响及差异点质谱解析	98
6.4.1 15%PEG 处理 30min 时 9 个被鉴定点的相对含量特点	100
6.4.2 15%PEG 处理 3h 时 9 个被鉴定点的相对含量特点	100
6.4.3 15%PEG 处理 5h 时 9 个被鉴定点的相对含量特点	101
6.5 严重干旱胁迫下喜树幼苗蛋白质组成变化及其生态适应意义	101
6.6 各种已鉴定蛋白质在严重干旱胁迫下的生态适应意义	101
6.6.1 Hsp70	101
6.6.2 LEA 蛋白	102
6.6.3 GTPase	103
6.6.4 Rubisco 活化酶	103
6.6.5 微管蛋白降解产物	104
6.6.6 Rubisco 大亚基降解产物	105
6.7 本章小结	107
参考文献	108
第 7 章 高温和干旱逆境下喜树生态适应的分子机理	114
7.1 高温逆境下喜树生态适应的分子机理	114
7.2 干旱逆境下喜树生态适应的分子机理	116
参考文献	117

图版

第 1 章

绪 论

1.1 分子生态学的概念及其内涵

群体遗传学的发展为分子生态学的产生奠定了坚实的遗传学理论基础,生态学和分子生物学的发展与结合为分子生态学的产生找到了合适的生长点,而遗传生态学的产生和发展进一步推动了分子生态学的产生和发展。1992年, *Molecular Ecology* 杂志正式出版,分子生态学成为一门世界瞩目的新兴交叉学科,这之前几十年来的许多学者在类似方面的研究工作对分子生态学的诞生起到了极大的推动作用(祖元刚等 1999; 祖元刚和唐中华 2004)。

分子生态学学科诞生以来,国内外学者对分子生态学概念的讨论很多,多数学者倾向于“以分子生物学技术研究生态学问题”。我们认为,分子生态学中的“分子”特指核酸、蛋白质等生物大分子,而生物大分子所处的直接环境应该是胞内或核内环境,且它们与生物体内环境以及生物所处的宏观环境之间关系十分密切,这一点可以形成共识,所以分子生态学中的环境包括影响生物大分子的所有不同层次的环境。另外,生物大分子直接接触的环境与传统意义上的环境有一定区别,其中包括了生物大分子之间的相互作用、生物小分子如激素等在信号传导过程中对生物大分子的作用等。

因此,分子生态学是应用现代分子生物学的原理、技术和方法,研究生命系统与环境系统相互作用的生态机理及其分子机理的一门学科,是生态学与分子生物学相互渗透而形成的一门新兴交叉学科,也是生态学的一门分支学科(祖元刚等 1999)。这一定义已经得到越来越多的认可(黄勇平等 2003; 阮成江等 2004)。其内涵包括以下几个方面:

- (1) 分子生态学的主要研究手段是分子生物学方法;
- (2) 分子生态学的研究对象是生命系统和环境系统的相互作用,而其中生命系统包括的不仅仅是生态学中个体以上的水平,还包括中观的生理水平和微观的分子水平,环境系统也包括相应的层次;
- (3) 分子生态学研究的重点在于阐述生命系统与环境系统相互作用的生态机理及其分子机理,即不仅借助于分子生物学手段解释生态学现象的分子机理,也包括运用生态学的思想解释分子水平的活动;

(4) 分子生态学不仅仅是分子生物学向生态学的单方面渗入, 也包括了生态学思想向分子生物学理论研究的渗入, 因此, 分子生态学是两个学科的相互交叉和渗透。

当前, 分子生态学的热点是研究生物种群空间分布差异的分子基础和生态学类型的分子生态学机理, 以及生态进化与生态适应的分子机理和在逆境条件下生物在分子水平上的反应及其调控机理(李文华 2004)。分子生态学当前研究的主流, 仍然是在分子水平上研究种群与环境的相互作用, 例如种群基因型与表现型的分子基础、种群遗传结构和遗传多样性的分子基础, 以及种群生态进化(ecological evolution)的分子基础等, 这些研究工作以核酸为对象的分子标记技术为主(祖元刚等 2004)。以功能蛋白质组技术为基础的种群和个体生态适应分子基础的研究在近年得到迅速发展。

1.2 生态适应及其分子基础研究概述

生命系统与环境系统通过信息关系相互作用形成复杂的网络结构, 物质构成了生命系统与环境系统相互作用的宏观和微观结构, 能量是维持生命系统与环境系统相互作用的动力来源, 信息则推动着生命系统与环境系统相互作用过程中的“生态适应”(ecological adaptation)和“生态进化”(ecological evolution)。生命系统与环境系统之间的信息传递表现出以自我调节为特征的生态适应, 而生命系统与环境系统之间的信息积累则表现出以有序度和组织程度提高为特点的生态进化。

生态适应与生态进化的过程不仅受宏观环境因子的影响, 也受微观环境因子的影响。生物种群或个体的所有外界环境都可以最后简化为生物大分子所处体内微环境的改变。例如, 外界热胁迫不仅直接影响到细胞液的温度状况, 还会影响到细胞液的 pH 值, 从而改变了生物大分子所处的微环境并影响其活性。因此, 生态适应与生态进化的过程是宏观环境与微观环境共同影响的结果。生态适应与生态进化都与宏观外部环境和微观体内环境有关。环境不仅影响蛋白质, 也影响核酸。如基因突变受体内环境的影响, 酶的合成也受体内外环境的影响。所以, 生态适应与生态进化在生物大分子水平上表现出一定的分子基础, 分子生态学成为生态适应与生态进化分子机理研究的必然途径(祖元刚等 2000)。

1.2.1 生物的生态适应表现于从基因型到表现型等多个水平

基因型(genotype)又称遗传型, 它反映生物体的遗传构成, 即从双亲获得的全部基因的总和。遗传学中具体使用的基因型往往是指某一性状的基因型, 因此, 基因型是从亲代获得的、可能发育为某种性状的遗传基础。表现型(phenotype)

是指具有特定基因型的生物个体,在一定环境条件下,所表现出来的性状特征的总和,包括基因的产物(如蛋白质和酶)、各种形态特征和生理特性以及生物的习性和行为等。

基因型与表现型不等同,其中掺杂着环境的影响,即表现型=基因型+环境。生态适应最终表现于其表现型对环境的适应或不适应性状。根据分子生态学思想,表现型是基因型与内外环境相互作用并通过蛋白质差异表达体现出的结果。基因型是决定表现型的遗传基础,但受到环境的调节。表现型的差异受基因型的影响,是基因与环境之间相互作用的结果,或者说是环境信息流对遗传信息流修饰的结果(于景华等 2000; 王亚馥等 2002)。

广义的生态适应非线性地(Peccoud *et al.* 2005)表现于进化适应(基因型或生态进化)、生理和代谢适应、形态适应和行为适应等多个水平,但这只是人为的划分方法,不同生态适应水平或层次之间有着复杂的联系(图 1-1)。

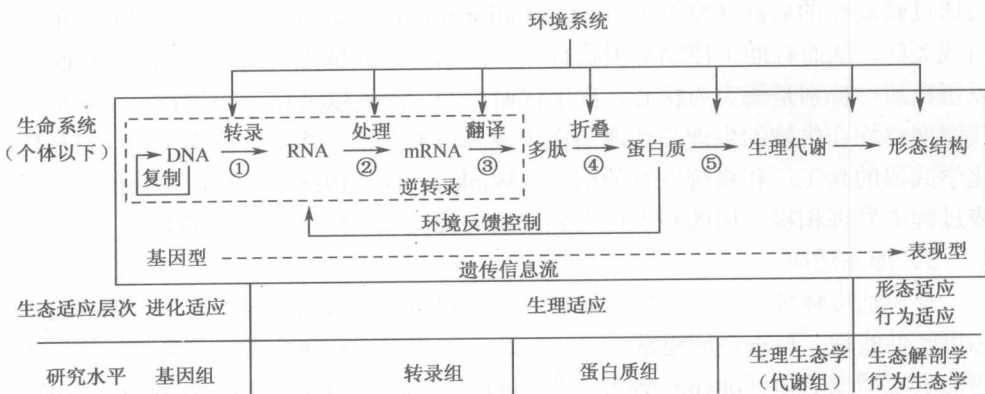


图 1-1 从基因型到表现型的不同适应层次及遗传信息流动[部分据文献(Banks *et al.* 2000)]

①转录调节; ②转录后调节, 如选择性拼接、选择性多聚腺苷酸化、RNA 编辑; ③翻译和降解调节, 移码调节; ④分子伴侣协助的多肽折叠调节; ⑤活性调节, 如翻译后修饰(超过 200 种, 如磷酸化、糖基化等)、降解、区隔化

狭义的生态适应更多地反映个体的适应能力, 关心其当前适合度, 强调个体的生理调节能力和生态的适应幅度以及对极端环境的耐受能力, 进化适应则更强调基因在世代间的延续与传递。生态适应与进化适应相辅相成, 最终通过提高有机体的功能适应性而使物种能够从环境当中获得更多的资源, 经受生物史中各种生物或非生物环境压力, 留下更多能达到性成熟并替代自身的个体, 物种也不断向前发展(王崇云 2004)。因此, 狭义的生态适应的时间尺度相对较小, 其不包含进化适应, 并以转录组及功能蛋白质组为其分子基础, 而进化适应则以基因组为其分子基础。

1) 进化适应

进化适应是生态适应的本质, 体现在生物的基因组组成。进化适应是自然界

对生物中广泛存在的变异进行选择的结果。自然选择使生物具有与环境相适应的外表形态结构,并且把它自己所携带的基因传给后代,这些基因进一步繁殖,使适应环境的种群扩大并巩固下来。经选择而存留的生物,常伴有明显的形态变化,其变化幅度大而且巩固,是物种形成的基础,也是其他层次生态适应现象的基础。

2) 生理和代谢适应

生理和代谢适应是生态适应的主要表现,蛋白质组学和生理生态学是其核心研究手段。生理适应可区别为常规防御(constitutive defense)和诱导反应(induced response)等不同形式(阎凤鸣 2003),常规防御是进化适应的体现,与短期的逆境无关;诱导反应是生理和代谢适应的主要研究内容。根据生理反应及其代谢产物含量和功能的持续时间可人为地将诱导反应分为两种形式,即快速生理生态适应和长期生理生态适应。一般认为,蛋白质是个体生理功能的体现者。事实上,蛋白质也是基因表达水平的重要调节者(图 1-1),例如,转录因子 Ets-1 蛋白通过磷酸化的后翻译修饰(post-translational modification)调节实现对基因的开启或关闭,从而有助于控制基因执行其功能的时间和位置(Pufall *et al.* 2005)。以蛋白质,特别是酶类为核心,次生代谢产物、激素以及糖类生物分子构成的代谢网络均在生物的生理和代谢适应中发挥重要作用。例如,植物生物碱是植物化学武器的兵工厂和系统发育的信使(Wink *et al.* 1998),其在植物的生态适应过程中发挥积极作用的观点已得到普遍接受(唐中华等 2003)。

3) 形态适应

形态适应体现在生物个体的外形、器官和组织的形态解剖特征,主要通过形态可塑性实现。形态适应通常是由进化适应和生理适应决定的,其典型特征是生物的表现型或表型(phenotype)。生物的表现型包括了生理和形态解剖两个方面,但通常以形态解剖特征为主要研究内容。单一基因型可在不同环境下表现为不同的表现型,即表型可塑性(Sultan 2000),其突出表现于生物量资源在不同环境下的差异分配,例如,在营养匮乏的土壤中增加根系生物量,而在低光环境中增大叶面积(Schlichting 1986; Sultan 1987; Bradshaw *et al.* 1989; Gedroc *et al.* 1996),以在资源紧张的环境下部分地弥补功能的损失(Sultan 2000)。表型可塑性可能受遗传控制但遗传上并不固定(Schlichting 1986; Bradshaw *et al.* 1989),并且表型值与平均适合度频率之间有良好的数学关系(Price *et al.* 2003)。

4) 行为适应

行为适应体现在生物行为在其生境下的存活度、适合度以及进化意义(尚玉昌 1991; 张树义等 2000),对植物而言,也可以描述为生活史适应及植物智能,而且植物的行为适应通常是由基因和蛋白质等生物大分子与环境共同控制的。例如,植物能够通过 *Constans* 基因的蛋白质产物积累量感知白昼的长短和日光的波长,在适宜的时期开花,在这个过程中还有其他蛋白质(如 FKF1 F-box

蛋白)的参与 (Imaizumi *et al.* 2003; Imaizumi *et al.* 2005)。

根据对逆境的适应特点,以及对植物抗逆性形式的划分(利容千等 2002; 赵福庚等 2004),植物非生物逆境生态适应也可分为规避适应、防御适应和忍耐适应三种形式。其中,规避适应主要通过植物的行为适应或生活史适应实现。防御适应通过形态适应,即特定的形态结构使胁迫因子不进入组织,其体内不发生环境适应性反应。忍耐适应在表观上主要通过生理和代谢适应完成,即通过生理和代谢反应阻止、降低或修复由逆境造成的损伤,从而在一定程度上保持其正常的生理活动。

1.2.2 生态适应的分子生态学本质是基因表达调控及其对环境的响应

生物能够适应环境变化改变自身的基因表达以利于生存,因此,基因表达调控是生命本质特征之一。根据受环境影响其表达程度的不同,可以将基因划分为组成性表达和适应性表达两类。生态适应的分子生态学本质是环境对基因表达的调控作用,这种调控作用导致了功能蛋白质的差异表达和代谢水平的变化。

基因表达调控可以在复制、扩增、基因激活、转录、转录后、翻译和翻译后等多级水平上进行(图 1-1)。不同水平的基因表达调控均受到环境(包括体内分子环境和体外环境)的调控,并构成了生态适应的分子生态学本质。

mRNA 转录起始是基因表达调控的基本控制点,其实质是 DNA-RNA/DNA-蛋白质/蛋白质和蛋白质间的相互作用对 RNA 聚合酶活性的影响。研究表明,被 DNA 链紧密缠绕的组蛋白甲基化或去甲基化使一些基因打开或关闭,其甲基化或去甲基化过程受到酶的调节 (Shi *et al.* 2004),从而间接受到环境的影响。在此研究实例中,DNA-蛋白质以及蛋白质和蛋白质之间的相互作用调节基因的表达。有些垃圾 DNA (RNA 基因)不编码蛋白质,但却可以转录成 RNA 并发挥作用,即通过 DNA-RNA 之间的相互作用进行基因的表达调控。因此,核酸、蛋白质等生物大分子之间的分子整合作用是生物生态适应和生态进化的本质基础。

例如,同卵双胞胎拥有同一套遗传物质,其长相不应有明显区别,在幼年时也确实让人难以区分,但是随着年龄增长,外界影响导致基因组表达水平发生差异(基因表达噪声, noise in gene expression),其形貌随着生活习惯会发生明显变化 (Fraga *et al.* 2005)。具有同一套基因组的植物细胞的分化也受到时间和空间以及环境的调控,不同功能的细胞其基因表达水平存在差异以使生物整体适应其所处的生态环境。

又如,由于细胞形态、发育阶段以及生理状态和环境的影响程度不同,由同一基因转录而成的 mRNA 前体,通过 RNA 剪接可以产生两种以上的 mRNA,进而产生各自相应的蛋白质,此即可变 RNA 剪接现象,这是由内含子序列的不确定性或多义性造成的,更多情况下则是由环境通过蛋白因子调控的(洪满贤

1999; Cech 2000)。在核糖体上合成出来的多肽链(即新生肽),必须经过一系列的化学的加工才能形成特定的由一级结构决定的三维结构,并获得特有的生物活性,成熟为功能蛋白质分子,这个过程需要细胞内已经存在的其他蛋白质、分子伴侣和折叠酶的帮助才能完成(王志珍 1996),这导致一种基因有时并非对应一种特定的蛋白质,而基因表达后究竟形成何种功能的蛋白质,也与生物所处的环境有关,例如受到热激蛋白(heat shock protein, HSP)的调节。

基因表达调控的实质是遗传信息流被环境信息修饰的结果,其不仅可导致特定蛋白的表达量的改变,而且可导致同一基因在不同条件下形成不同的蛋白质。因此,在蛋白质水平研究生物生态适应的分子机理更加直观,信息量更丰富。

1.2.3 生态适应的分子生态学特征体现于功能蛋白质组的差异

1. 蛋白质组学的概念及其发展

由于生物功能的主要体现者是蛋白质,而蛋白质有其自身特有的活动规律,即使 mRNA 水平的研究成果也无法准确解释生物功能的分子机理,蛋白质组学(proteomics)以及功能蛋白质组学等新的学科工具应运而生。

蛋白质组(proteome)最初被定义为基因组所表达的全部蛋白质(Wasinger *et al.* 1995; Wilkins *et al.* 1996)或细胞内包含的全部蛋白质,而蛋白质组学即“定量检测蛋白质水平上的基因表达,从而揭示生物学行为(如:疾病过程和药物效应)以及基因表达调控的机理”(Anderson N L *et al.* 1998)的学科。

mRNA 与相应表达的蛋白质的量之间相关系数仅为 0.48 (Anderson L *et al.* 1997),即蛋白质具有多样性和可变性,受到多种因素的调控,并且对全部蛋白质的研究是非常困难的。为此,我国学者又提出了“功能蛋白质组学”(functional proteomics)的概念,其位于对个别蛋白质的传统蛋白质研究和以全部蛋白质为研究对象的蛋白质组研究之间的层次,并注重于从局部入手,根据要研究的功能特点和所用的研究手段,把目标定位在可能涉及特定功能机理的、可大可小的蛋白质群体上(李伯良 1998; 李伯良等 1999)。

功能蛋白质组学的研究从理论和技术手段上使以“全部蛋白质”为研究对象的蛋白质组学这一抽象概念具体化,使研究者更容易从时间、空间、量效方面动态、整体、深入地研究同一组织细胞在不同发育阶段或同一组织细胞在不同个体间或同一基因组在不同组织细胞间,以及相同或不同组织细胞、发育阶段在不同生态环境下的蛋白质表达模式和功能模式变化(目前主要集中在蛋白质组的表达模式方面),因而成为植物生态适应分子机理研究的重要工具。

2. 蛋白质组学的技术方法概述

蛋白质组表达模式研究的主要技术包括三个方面,一是蛋白质的分离及表达

差异鉴别,主要依赖于双向电泳技术;二是通过蛋白质鉴定技术获得蛋白质特定的、可用于鉴定的信息,包括微量蛋白质氨基酸组成分析技术(获得蛋白质和多肽中各种氨基酸在整个分子中所占的比例,即摩尔百分含量)、蛋白质序列测定技术(获得蛋白质N端氨基酸序列信息)以及基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术[MALDI-TOF,获得肽质量指纹谱(PMF)信息或C端、N端序列信息]、电喷雾质谱技术(ESI-TOF,获得组成蛋白质的部分多肽的序列信息)、串联质谱技术(MALDI-TOF-TOF,获得组成蛋白质的部分或全部多肽的序列信息)等生物质谱技术,其支撑技术是生物质谱技术;三是生物信息学分析和鉴定技术,即构建和分析双向凝胶电泳图谱、构建与检索数据库,最终鉴定目标蛋白质的归属及其表达模式。

3. 植物非生物逆境生态适应的功能蛋白质组学特征

植物对非生物逆境的生态适应非常复杂(图1-1),初生胁迫(primary stress)如干旱、盐碱、极端温度(高温、低温)以及化学污染常常相互关联,它们导致细胞受损以及氧化胁迫和渗透胁迫等次生胁迫(secondary stress),最初的逆境信号(如渗透势改变和离子效应、温度、膜脂流动性改变等)引发下游信号过程和转录调控以激活完整的分子和生理响应机理,从而通过生理反应重建体内微环境的动态平衡并且修复被损伤的蛋白质和膜系统(Wang *et al.* 2003; Vinocur *et al.* 2005),此即弹性应变(elastic strain)。一些逆境响应蛋白(包括逆境应激蛋白和逆境诱导蛋白)对此起着尤为重要的作用,一些执行光合、呼吸等正常代谢功能的蛋白质也发生相应的改变,这些蛋白质在双向电泳凝胶图谱上表现为含量的动态变化。

生态适应的一个重要方面是不适应逆境。上述分子和生理响应机理自身的不足或者是某些步骤的缺失,或者逆境过于强烈或时间较长,将导致细胞环境动态平衡无法恢复或无法形成新的动态平衡,蛋白质和膜系统结构、功能不可逆地被损坏,细胞将最终死亡(Wang *et al.* 2003; Vinocur *et al.* 2005)。在此过程中,逆境响应蛋白和执行光合、呼吸等正常代谢功能的蛋白质也将发生相应改变并可以在双向电泳凝胶电泳图谱上表现出其动态变化。

因此,植物逆境生态适应的蛋白质组学特征集中体现于一些应对逆境的适应性蛋白质含量提高,部分不同功能的蛋白质发生降解,其他一些调节蛋白含量也有不同表现。这些特征使蛋白质组学,特别是功能蛋白质组学成为植物逆境生态适应分子基础研究的有力工具(Salekdeh *et al.* 2002a),其有助于深入了解植物适应逆境或不适应逆境的分子生态学机理。

功能蛋白质组学应用于植物逆境生态适应的分子生态学机理研究已经获得一些成果,特别是干旱逆境生态适应和高温逆境生态适应方面。