

林善枝
张志毅
著



YANGSHU KANGDONGXING JILI

杨树抗冻性机理 及分子生物学研究

JI FENZI SHENGWUXUE 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

杨树抗冻性机理及分子 生物学研究

林善枝 张志毅 著

中国环境科学出版社·北京

图书在版编目(CIP)数据

杨树抗冻性机理及分子生物学研究/林善枝, 张志毅
著. —北京: 中国环境科学出版社, 2004. 7

(北京林业大学优秀博士论文基金资助丛书)

ISBN 7-80163-845-X

I. 杨… II. ①林…②张… III. ①毛白杨—抗冻
性—机理—研究②毛白杨—分子生物学—研究
IV. S792.117.02

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 038321 号

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.cn>
电子信箱: bjzhouyu@126.com
电话 (传真): 010—67112734

印 刷 北京中科印刷有限公司
经 销 各地新华书店
版 次 2004 年 9 月第一版 2004 年 9 月第一次印刷
印 数 1—3000
开 本 850×1168 1/32
印 张 7.625
字 数 196 千字
定 价 20.00 元

【版权所有, 请勿翻印、转载, 违者必究】

如有缺页、破损、倒装等印装质量问题, 请寄回本社更换

序

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、—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，工作条件艰苦等等。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

沈国舫

2002年8月10日

引 言

毛白杨 (*Populus tomentosa* Carr.) 属杨柳科 (*Salicaceae*) 杨属 (*Populus* L.) 白杨派 (Section *Leuce* Duby) 杨树, 是我国特有的乡土树种, 主要分布在我国华北地区和东北与西北的部分地区, 是我国北方地区重要的造林和平原绿化树种。它具有生长较快、适应性强、材质优良、树干高大通直、树形优美、寿命长等特点, 深受栽植区人民群众的喜爱。北京林业大学从 20 世纪 80 年代初开始对毛白杨进行系统遗传改良, 培育出一批优良毛白杨新品种, 目前已被广泛应用于我国北方地区的林业生态环境建设和工业用材林基地建设之中, 发挥了巨大的生态效益和社会效益, 同时, 也给应用地区带来了显著的经济效益。为了进一步提高毛白杨的生态、经济和社会效益, 扩大毛白杨种植区域, 必须将毛白杨推广栽种到更高纬度的地区, 但这些地区多属寒冷地区, 而且现有优良的毛白杨无性系的抗冻性仍存在一定局限性, 在这些地区难以正常生长, 其优良性能不能充分得到表达。因此低温寒冷和冻害已成为毛白杨向北扩大栽培区域的主要限制因子, 已引起了专家们普遍关注。如何使毛白杨既保持速生优质特点、又具有较强的抗冻特性已成为毛白杨改良的一个新方向。

毛白杨的良种选育研究, 从“六五”开始, 一直被列为国家重点攻关课题, 至今已在种源收集保存、杂交及倍性育种等方面取得了较大的成绩。但是以往的研究多集中在速生性状改良目标上, 抗冻性研究较少, 而且仅仅是一些生理生化指标的测试。因此利用现代技术手段进一步系统深入研究查明毛白杨

抗冻性理化机制及其遗传因素，寻找一种有效的改良方法来提高毛白杨的抗冻性，不仅在培育抗逆性强的树木新品种的基础理论上具有重要意义，而且在解决生产实际问题上也具有广泛的应用价值。

培育抗冻性较强的毛白杨新品种的前提条件就是首先要了解毛白杨自身抗冻特性以及发生冻害的可能机理。为此本研究以现有的毛白杨新品种为试材，主要开展以下三个方面研究：（1）是对毛白杨幼苗抗冻性的低温诱导条件（温度及所需天数）进行了系统研究，目的在于筛选出一个既可有效地诱导最大抗冻性的获得而又不伤害幼苗的最适温度及所需天数。（2）以细胞抗冻性及膜稳定性的相关生理生化指标为依据，系统地研究了它们在适当的低温锻炼与脱锻炼下，体内所发生的各种生理生化变化，以期从物质变化（核酸、蛋白质、酶）、能量（ATP 和 NADPH_2 ）供应，直至膜结构稳定因素等角度，探讨这些相对独立生理生化过程以及它们之间是否存在内在联系，并研究与抗冻性的相关性，从而阐明其抗冻性提高和冻害发生的可能机理。（3）采用 CaCl_2 ，钙离子螯合剂 EGTA，钙离子通道阻断剂 LaCl_3 ，钙调素拮抗剂 CPZ 处理结合低温锻炼的方法，对单纯低温锻炼和四种效应剂处理的低温锻炼的毛白杨幼苗及其在低温胁迫下和回常温恢复生长中 CaM 、 G6PDHase 、 Ca^{2+} -ATPase、膜保护酶（SOD、POD）及抗冻性等动态变化进行了测定，从中探讨 Ca^{2+} 与 CaM 在低温锻炼过程中对提高毛白杨幼苗抗冻性的作用机理，以及幼苗抵御或适应低温逆境的机制。上述这些研究的主要目的是：为今后利用遗传工程技术进行毛白杨抗冻改良育种与解决生产实际问题提供科学的理论依据和相应的生理生化指标。

为了解决植物抗冻性问题，近几年一些研究者开始热衷于研究植物抗冻蛋白（Antifreeze proteins, AFPs）。尽管许多研究者在冬小麦、燕麦、冬黑麦、黑麦草、欧白英、胡萝卜、沙冬青、桃树、唐古特红景天等至少 30 多种高等植物中检测到具有

热滞活性的 AFPs, 但已研究过的植物材料绝大多数为草本植物或模式植物, 木本植物仅有沙冬青、桃树、唐古特红景天等少数几种; 真正被分离纯化出来的 AFPs 并不多, 即使已分离出来的植物 AFPs 其热滞活性和含量也明显低于鱼类和昆虫。而且对已分离纯化的植物 AFPs 的分子结构、功能及其相互关系, 以及表达调控等方面的研究仍是初步的。特别是关于植物中是否存在着像极区鱼类那样高活性的抗冻蛋白(AFPs), 植物 AFPs 是如何提高植物体的抗冻能力的等问题还一直困惑着许多研究者。另外, 现已被成功地导入植物体内的为数不多的抗冻蛋白基因大多数是来源于北极鱼类、昆虫或草本植物的单一基因, 并不一定是关键基因, 而且这些抗冻基因的导入很难达到植物抗冻性遗传改良的目的。因此, 为了研究上述这些问题, 尤其是基于毛白杨抗冻性的分子遗传改良, 有必要加强从木本植物, 尤其是从高纬度地区、耐极端低温的木本材料分离纯化出具有高热滞活性的 AFPs 及其相关抗冻基因, 并进行重组模拟试验和表达鉴定研究。

甜杨 (*Populus suaveolens*) 属青杨派的高大乔木, 抗冻抗旱能力相对较强, 主要分布于我国内蒙古东部及黑龙江大兴安岭, 其生存区的年平均气温为 -3.8°C , 极端最低气温为 -46.9°C , 冬季气温为 $-27.4\sim-40.5^{\circ}\text{C}$, 年平均降雨量为 493.4 mm, 无霜期为 93 天。因此, 甜杨是一种研究杨树抗冻性的较好材料。本研究拟以甜杨为试材, 利用现有的蛋白质电泳检测及纯化技术分离鉴定出经低温诱导产生的特异性抗冻蛋白, 并分析其理化性质及氨基酸序列, 鉴定其天然功能; 进而根据所获得的抗冻蛋白氨基酸序列合成特异性探针, 进而克隆出相关的抗冻基因, 并对其进行鉴定。另外, 以从 -20°C 低温锻炼的甜杨幼苗中分离纯化的 G6PDH 为研究对象, 研究了还原型二硫苏糖醇 (DTT_{red})、pH 值、代谢物及金属离子对 G6PDH 活性的影响, 并对该酶催化反应特性进行分析, 进而探讨 G6PDH 与抗冻性的关系; 在此基础

上, 根据已有植物的 G6PDH 基因的保守区域序列设计引物通过 RT-PCR 从中扩增出的 G6PDH 基因。上述研究的最终目的是为了不久将来能通过基因工程来提高农作物和林木的抗冻性能。

目 录

1 文献综述	1
1.1 植物抗冻性研究进展	1
1.1.1 细胞膜体系与植物抗冻性的关系	1
1.1.2 植物抗冻性的细胞及分子机制	2
1.1.3 低温锻炼过程中体内代谢的变化	3
1.1.4 低温逆境信息与应答机制的研究	7
1.1.5 植物低温诱导蛋白与植物抗冻蛋白	9
1.1.6 植物低温诱导表达基因与植物抗冻蛋白基因	14
1.1.7 提高植物抗冻性的基因工程	17
1.1.8 存在问题、发展趋势及近期研究热点	21
1.2 杨树抗冻性生理生化及育种的研究进展	24
1.2.1 杨树抗冻性生理生化的研究	24
1.2.2 抗冻天然杂种杨树的选择	26
1.2.3 抗冻杨树人工杂交育种	27
1.2.4 毛白杨抗冻性研究意义与遗传改良思路	28
2 毛白杨抗冻性低温诱导条件研究	31
2.1 材料与方法	32
2.1.1 材料及处理	32
2.1.2 幼苗存活率及抗冻性测定	32
2.2 实验结果与分析	33
2.2.1 不同低温处理下毛白杨幼苗的受冻情况	33
2.2.2 不同低温锻炼对毛白杨存活率及抗冻性的效应	34

2.2.3 -3℃锻炼期间光照条件对毛白杨抗冻性的影响	35
2.3 讨论与小结	36
3 低温诱导毛白杨抗冻性机理研究	38
3.1 材料与方法	39
3.1.1 材料及处理	39
3.1.2 方法	40
3.2 结果与分析	43
3.2.1 低温锻炼对毛白杨幼苗存活率和抗冻性的影响	43
3.2.2 低温锻炼对钙调蛋白 (CaM) 含量的影响	45
3.2.3 低温锻炼对毛白杨幼苗 G6PDH 活性的影响	46
3.2.4 低温锻炼对毛白杨幼苗质膜和线粒体 Ca^{2+} -ATPase 活性的影响	47
3.2.5 低温锻炼对毛白杨幼苗可溶性蛋白质含量的影响	50
3.2.6 低温锻炼对毛白杨幼苗核酸含量与 RNase 活性的 影响	53
3.2.7 低温锻炼对毛白杨幼苗 SOD 和 POD 活性的影响	56
3.2.8 低温锻炼对毛白杨幼苗 MDA 含量的影响	58
3.2.9 低温锻炼对毛白杨幼苗可溶性糖含量的影响	59
3.3 讨论与小结	61
3.3.1 核酸及可溶性蛋白含量变化与抗冻性的关系	61
3.3.2 质膜 Ca^{2+} -ATPase 与抗冻性的关系	64
3.3.3 线粒体 Ca^{2+} -ATPase 及 ATP 与抗冻性的关系	65
3.3.4 G6PDH 及 NADPH ₂ 与抗冻性的关系	66
3.3.5 膜保护性酶及 MDA 与抗冻性的关系	67
3.3.6 可溶性糖与抗冻性的关系	69
4 低温诱导毛白杨抗冻性中钙的效应	72
4.1 材料与方法	73

4.1.1 材料及处理	73
4.1.2 测定方法	74
4.2 结果与分析	75
4.2.1 不同浓度 CaCl_2 处理对毛白杨幼苗抗冻性的影响	75
4.2.2 在低温锻炼中各种效应剂处理对毛白杨幼苗抗冻性的影响	76
4.2.3 在低温锻炼中各种效应剂处理对毛白杨幼苗 CaM 含量的影响	78
4.2.4 在低温锻炼中各种效应剂处理对毛白杨幼苗可溶性蛋白质含量的影响	82
4.2.5 在低温锻炼中各种效应剂处理对毛白杨幼苗核酸含量与 RNase 活性的影响	87
4.2.6 在低温锻炼中各种效应剂处理对毛白杨幼苗 G6PDH 活性的影响	93
4.2.7 在低温锻炼中各种效应剂处理对毛白杨幼苗质膜和线粒体 Ca^{2+} -ATPase 活性的影响	96
4.2.8 在低温锻炼中各种效应剂处理对毛白杨幼苗 SOD 和 POD 活性的影响	100
4.2.9 在低温锻炼中各种效应剂处理对毛白杨幼苗 MDA 含量的影响	104
4.3 讨论与小结	107
4.3.1 Ca^{2+} 在植物抗冻性诱导过程中的可能作用	107
4.3.2 Ca^{2+} 与 CaM 水平及其可能调节酶类活性的关系	114
5 甜杨抗冻蛋白及其相关基因研究	119
5.1 材料和方法	123
5.1.1 材料及处理	123
5.1.2 方法	124

5.2 结果与分析	130
5.2.1 不同低温处理对甜杨幼苗抗冻性的诱导效应	130
5.2.2 不同低温处理对甜杨幼苗可溶性蛋白质含量效应 ..	130
5.2.3 甜杨幼苗热稳定蛋白的 SDS-PAGE 分析	134
5.2.4 甜杨幼苗的热稳定蛋白热滞活性 (THA) 分析	135
5.2.5 新产生的热稳定抗冻蛋白与甜杨幼苗抗冻性关系 ..	136
5.2.6 不同浓度的甜杨幼苗枝条 60 kD 热稳定抗冻蛋白 溶液的 THA 分析	137
5.2.7 60 kD 特异性抗冻蛋白对蛋白酶 K 的敏感性分析 ..	137
5.2.8 60 kD 特异性抗冻蛋白的热稳定性分析	138
5.2.9 60 kD 特异性抗冻蛋白氨基酸组分及其含量分析 ...	138
5.2.10 60 kD 特异性抗冻蛋白氨基酸序列分析	140
5.2.11 不同方法提取甜杨总 RNA 的比较	142
5.2.12 甜杨抗冻基因的 RT-PCR 扩增、克隆及其鉴定	143
5.2.13 基因同源性分析	146
5.3 讨论与小结	146
5.3.1 甜杨抗冻蛋白是一种具有热稳定的抗冻蛋白	146
5.3.2 甜杨抗冻蛋白可能是一类新型的抗冻蛋白	147
5.3.3 60 kD 抗冻蛋白可能是维持甜杨抗冻性的 重要物质	149
5.3.4 甜杨抗冻蛋白基因可能是一种新的 植物抗冻基因	150
6 甜杨 G6PDH 特性及相关基因研究	151
6.1 材料和方法	152
6.1.1 材料	152
6.1.2 方法	152
6.2 结果与分析	154
6.2.1 低温锻炼对 LT_{50} 、G6PDH 和 MDA 的影响	154

6.2.2 pH 对 G6PDH 活性的影响	157
6.2.3 还原型二硫苏糖醇处理对 G6PDH 活性影响	157
6.2.4 不同代谢物和金属离子对 G6PDH 活性的影响	158
6.2.5 G6PDH 动力学参数的分析	159
6.2.6 甜杨 G6PDH 基因的 RT-PCR 扩增、克隆及鉴定 ..	160
6.2.7 G6PDH 基因及其氨基酸序列的同源性分析	163
6.3 讨论与小结	173
 7 结 论	 179
参考文献	186
主要缩写词	224
后记	225

1 文献综述

1.1 植物抗冻性研究进展

温度是植物生长的必要条件，对植物某些生长发育过程起着决定性作用。然而低温是限制地球上植物分布与生长的重要因素，低温伤害是世界范围内普遍存在的问题，也是全世界农业和林木生产中损失巨大的一种严重自然灾害。全球每年因低温伤害造成农作物的损失高达数千亿美元（邓江明和简令成 2001），加上生态环境破坏的日益加剧，致使这一问题显得更加突出，引起人们的普遍关注。为此，各国政府及有关研究部门一直把植物低温适应性问题作为一个重要的研究课题。自 1830 年 Gopper 开始低温抗性研究至今已有 170 多年历史，期间许多学者从植物生理学、形态解剖学、细胞生物学、生物物理学、生物化学、遗传育种学及分子生物学等多角度对植物冻害的成因、抗冻锻炼过程中代谢途径及细胞结构变化等方面进行了广泛的研究，大多数探索与研究多少涉及到植物抗冻性，但迄今还没有查明植物抗冻性与冻害的理化机制。因此，研究与查明植物抗冻的理化机制及其遗传因素，寻找提高植物抗冻性的有效措施，不仅在基础理论上具有重要意义，在解决生产实际问题上也具有广泛的应用价值。

1.1.1 细胞膜体系与植物抗冻性的关系

近年来的报道指出，细胞膜系（质膜、叶绿体膜、线粒体膜及液泡膜等）的稳定性与植物抗冻性成正相关，细胞膜系形态变化和成分改变在抗冻机制上起关键作用（简令成 1990 和 1992，

刘鸿先等 1991, 李荣富等 1996, 李美茹等 2000)。大量研究结果表明, 低温首先损伤了细胞的膜体系, 从而导致体内生理生化过程的破坏, 低温引起细胞各种膜结构的破坏是造成植物冻害损伤和死亡的根本原因, 而质膜可能是这种破坏的原初部位; 伤害性低温不仅会引起膜脂的相变, 而且主要是引起膜蛋白的变化, 包括膜蛋白的构型变化以及膜蛋白和膜脂相互关系的变化, 引起膜蛋白的迁移运动, 一些膜蛋白从质膜上脱离下来, 造成质膜内表面的无颗粒区及一些膜束缚酶的活性发生变化 (简令成 1990 和 1992, 余叔文 1992)。由此可见, 探讨提高膜的低温稳定性的因素是增强植物抗冻性的根本途径 (简令成等 1994)。

另外, 现在普遍认为低温逆境会引起植物体内自由基的积累, 从而引发或加剧膜脂过氧化作用, 而膜脂过氧化的最终产物丙二醛 (MDA) 可与膜蛋白发生交联并引起膜蛋白的变性与膜脂流动性的降低, 最终导致膜透性增大和膜结构破坏 (Senaratne 等 1985, 王宝山 1988, 陈少裕 1991, 曾韶西和王以柔 1987, 曾韶西等 1994)。因此, 许多研究者认为: 膜的性质、结构和相变可能是冻害的原初反应的重要指标, 而在遗传基因控制范围内, 膜脂成分的不饱和度以及细胞质黏度和流动性可作为抗冻性强弱的重要生理指标, 增加膜结构的稳定性是提高植物抗冻性的关键 (简令成 1992, 沈漫等 1997)。

1.1.2 植物抗冻性的细胞及分子机制

业已查明, 避免细胞内结冰以及提高细胞膜结构和核蛋白等生命物质的低温稳定性是植物抗冻性的两个根本要素。植物避免细胞内结冰的方法有 4 种: 一是提高细胞液的浓度, 降低冰点; 二是使细胞内的水流到细胞外结冰; 三是细胞液的过冷却; 四是水的玻璃态化。其中细胞外结冰和细胞液的过冷却是植物避免细胞内结冰伤害的最主要和最普遍的两种适应机制。在抗冻锻炼中, 质膜发生内陷弯曲, 增加细胞排水的总面积; 部分脂质从质

膜上脱离下来,提高膜的透水性;质膜内陷与液泡相连接,形成排水渠道;细胞间隙周围的细胞表面形成丰富的糖蛋白层,起着接受和传递温度降低的信息及阻止冰晶侵入胞内的作用。这4种因素的共同作用,可能是使水迅速流到细胞外结冰,避免细胞内结冰的主要机制。而在抗冻锻炼中所发生的液泡的内吞作用,能将细胞质中的蛋白质、RNA等大分子物质转入液泡,可能是形成液泡过冷却状态的重要分子机制(简令成 1992,李荣富等 1996)。

1.1.3 低温锻炼过程中体内代谢的变化

植物抗冻性是植物对低温逆境长期适应而形成的一种遗传特性。抗冻力的发展过程是一个从基因→蛋白质(酶)→代谢→生理功能的过程。植物抗冻力提高的过程一般称之为低温锻炼或低温驯化。在低温锻炼过程中,植物体内发生了一系列适应性的物质及能量代谢变化,包括蛋白质、糖、渗透调节物质(甜菜碱和脯氨酸等)的增加,膜结构与组成的改变和一些新酶的出现等等,进而形成一种能够抗冻、能够避免低温伤害的稳定的细胞体系(Guy 1990,刘鸿先等 1991)。

1.1.3.1 代谢途径及能量的变化

Sagisaka 等(1974 和 1985)曾报道,在早秋杨树枝条内的 6-磷酸葡萄糖代谢改变为戊糖磷酸循环,到了春季又恢复到 6-磷酸葡萄糖代谢,这种戊糖磷酸循环为许多重要的细胞生理生化反应提供各种反应底物和 NADPH_2 。随后一些研究表明,植物在低温锻炼中其叶片 6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性提高和丙酮酸激酶催化性质发生显著变化(Walker 和 Edwards 1986, Simon 1987, Angelopoulos 和 Gavalas 1988)。现已在香蕉、豌豆、苜蓿、杨树等几种植物的低温锻炼中均发现 ATP 含量的显著增加和 NADPH_2 水平的提高,这种高水平的 ATP 和 NADPH_2 由用于植物生长而