

植物耐盐的分子机理研究进展

邱栋梁 林 鹏

(厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 综述了与植物耐盐性密切相关的小分子渗透物质(脯氨酸、甜菜碱、多元醇、多胺、果聚糖)、晚期胚胎发生富集蛋白(LEA)、调渗蛋白(OSM)、水通道蛋白、K⁺通道蛋白和ATPase等的合成及其相关基因的表达。

关键词: 植物; 耐盐性; 分子机理

中图分类号: Q945.78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-3395(2002)03-0281-12

Advances in Molecular Mechanisms of Salt Tolerance in Plants

QIU Dong-liang LIN Peng

(School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: A review is described of the accumulation of small molecule osmotic substance, such as proline, betain, polyol, polyamine, fructan, and macromolecule protein synthesis, such as late embryogenesis abundant protein, osmotin, water channel protein, K⁺ channel protein, ATPase and their related gene expression, which are closely correlated with salt tolerance in plants.

Key words: Plant; Salt tolerance; Molecular mechanism

一些植物在受到盐胁迫后,生长受到抑制,甚至导致死亡,而另一些植物对盐分有很好的适应性。生物学家对植物的耐盐机制进行了大量的研究表明,植物的耐盐机制十分复杂,它与植物合成小分子渗透物质、晚期胚胎发生富集蛋白(LEA)、调渗蛋白(OSM)、水通道蛋白、K⁺通道蛋白和ATPase等的合成及其相关基因的表达有关。

1 小分子渗透物质合成及基因表达

1.1 脯氨酸

脯氨酸是一种小分子的渗透物质,是水溶性最大的氨基酸(162.3 g (100 g)⁻¹水, 25℃),许多植物受到盐渍时积累高水平的脯氨酸。脯氨酸积累可能是植物受到胁迫的一种信号。在植物中,脯氨酸的合成由谷氨酸或鸟氨酸开始的。在渗透等胁迫下谷氨酸途径起主要作用,在高氮摄入时鸟氨酸途径占优势,通过γ-谷氨酰磷酸,谷氨酸半醛(GSA)和吡咯琳-5-羧酸(P5C)形成脯氨酸。但植物中负责前两步合成的酶为P5C合成

收稿日期: 2001-08-20 接受日期: 2001-12-25

基金项目: 中国博士后科学基金资助项目

酶。该酶基因已从 *Mothbean*、拟南芥和水稻中克隆^[1]。负责脯氨酸最后一步合成的酶为 P5C 还原酶。该酶基因已从大豆、豌豆和拟南芥中克隆。在高盐胁迫下 P5C 还原酶转录水平升高,但此步骤并不是脯氨酸合成的限速步骤。将大豆 P5C 还原酶基因转入烟草植株中过量表达后,也得到同样的结论,而脯氨酸合成的早期步骤中 P5C 合成酶才是限速步骤。Kavikishor 等^[2]对吡咯琳-5-羧酸合成酶 (P5CS) 基因进行转基因研究,获得转基因烟草,发现在转基因烟草中脯氨酸含量明显提高,且与对照相比,耐盐性也有所提高。Lin 等^[3]在研究中也发现拟南芥 *sosl* 突变体耐盐性高于野生型,同时脯氨酸含量也高于野生型。另外 Chen 等^[4]也克隆了一个与脯氨酸合成相关的 DNA 片断。除了与脯氨酸合成有关的基因外,脯氨酸的分解代谢的酶类脯氨酸氧化酶基因也已克隆到。

1.2 甜菜碱

甜菜碱属于四甲基铵类化合物,广泛存在于高等植物中,如藜科、锦葵科、禾本科、茄科、旋花科、菊科、苋科等。在枸杞属的 *Lycium ferocissimum*、向日葵、田旋花、千穗谷和尾穗苋 (*Amaranthus caudatus*) 等植物中,甜菜碱含量较高。这些植物在盐害下,可积累甜菜碱,以进行渗透调节,而在烟草、番茄、莴苣、紫花牵牛中含量较低。甜菜碱对三羧酸循环的关键酶具有保护作用,对光合作用也有保护作用。甜菜碱在植物细胞中,主要存在于叶绿体、微粒体和胞浆中^[5]。

甘氨酸甜菜碱 (Glycine betain) 被认为是最有希望的植物渗透调节剂之一,积累甜菜碱的植物比积累脯氨酸的对盐的耐受性高。胆碱单氧化酶 (CMO) 和甜菜碱醛脱氢酶 (BADH) 是甘氨酸甜菜碱合成所需要的两种酶,后者是关键性酶。1989 年 Hanson 等人分离了 BADH 的 mRNA,且成功地体外翻译合成 BADH,并证明在盐胁迫下 BADH 的 mRNA 增加 4 倍。随后又从菠菜和甜菜中克隆到 BADH 的 cDNA,比较二者的同源性,开创了 BADH 基因工程^[6]。Ishitani 等^[7]发现大麦叶和根在高盐环境中 BADH 的 mRNA 水平也分别提高 8 和 2 倍,胁迫解除后 BADH 的 mRNA 水平也随之降低。Wood 等^[8]从高粱中克隆了 BADH 基因。细菌中甜菜碱合成途径与植物相同,催化的酶类为胆碱氧化酶和甜菜碱醛脱氢酶,它们的基因在烟草中被克隆^[9]。

由于甜菜碱合成途径中的酶类基因已经克隆,这就能够应用这些基因来提高植物的耐盐性而进行遗传操作。研究表明,当把细菌的胆碱氧化酶类基因转入烟草和拟南芥后,转基因植物可产生甘氨酸甜菜碱并起到耐盐作用^[10]。刘风华等^[11]将山菠菜 BADH 基因转入烟草和草莓,得到的转化植株的耐盐性明显高于对照。郭岩等^[12]亦将该基因转入水稻中,获得了可在含 5% NaCl 的盐池中生长并结实的转基因植株,而对照则生长受阻并最终枯萎。Rathinasahapathi 等^[13]将 BADH 基因转入烟草中,使其获得了对甜菜醛的解毒能力。水稻幼苗也可将甜菜碱醛转化为甜菜碱并对盐有耐性^[14],而 CMO 的转基因只从菠菜和甜菜中克隆到^[15]。

1.3 多元醇

多元醇 (Polyol) 包括甘露醇、山梨醇、环状多元醇、肌醇和它的衍生物。多元醇积累与植物对盐分的耐受性有关。

甘露醇是一种糖醇,它广泛存在于细菌、藻类、真菌和 100 多种高等植物中,包括许多作物如芹菜、橄榄和胡萝卜等。植物中甘露醇的生物合成多未能鉴定,在芹菜中甘露醇的合成可能有三种酶的参与,它们是甘露醇-6-磷酸异构酶,甘露醇-6-磷酸还原酶和甘露醇-6-磷酸羧化酶。大肠杆菌编码的甘露醇代谢的关键酶 1-磷酸-甘露醇脱氢酶的基因(*mtlD*)是由 Tarczynski M^[16]从大肠杆菌中克隆到的。随后将该基因转入烟草中,高浓度盐分下,转 *mtlD* 基因的植株能检测到甘露醇,并对高盐有较高的耐受性(如长新根和花),植物鲜重和株高都有所增加^[17]。导入的 1-磷酸-甘露醇脱氢酶基因定位于叶绿体,可使烟草植株抵抗氧化性逆境^[16]。

山梨醇也是一种多元醇,其生物合成的关键酶山梨醇-6-磷酸脱氢酶的基因已从苹果中克隆到^[18]。当把该基因转入烟草后,转基因植物对盐有一定的抗性,但山梨醇含量较高的植株生长缓慢,有失绿的不规则斑点,甚至有不育或不能生根的现象^[19]。

肌醇及其甲基衍生物的合成也是耐盐基因工程的目标。Bohner 等^[20]成功地克隆了冰叶日中花(*Mesembryanthemum crystallinum*)的 1-磷酸肌醇合成酶(Inositol-1-phosphate synthetase)的基因(*Inol*)。负责肌醇向甲基化肌醇转化的酶即肌醇-O-甲基转移酶(Inositol-O-methyltransferase)的基因(*Imtl*),编码该酶的基因已经得到克隆^[21],在冰叶日中花发育的任何阶段都严格受环境控制,只在盐胁迫和低温下被诱导。其转基因植物对盐害和干旱有一定的抗性^[22]。研究者发现,在盐胁迫下转基因植物的光合作用 CO₂ 固定能力受抑制的程度比对照小,而且恢复较快。

1.4 多胺

多胺是生物体中存在的低分子量含氮碱。多胺在植物体内可能有两种作用,一是作为植物生长调节物质对植物的生长发育起调节作用,另一是作为渗透调节物质在植物受到环境胁迫时起作用^[23]。多胺生物合成途径的中心产物是腐胺,由精氨酸通过两条不同路线而形成。第一条路线是精氨酸首先由精氨酸脱羧酶(ADC)催化脱羧,生成鲱精氨,后者再脱去一分子氨和氨甲酰磷酸而产生腐胺。第二条路线是精氨酸先脱去一分子脲产生鸟氨酸,再经鸟氨酸脱羧酶(ODC)催化脱羧,生成腐胺。腐胺经过加入氨丙基残基,生成亚精胺和精胺,而氨丙基的提供是由 S-腺苷蛋氨酸脱羧酶(SAMDC)催化 S-腺苷蛋氨酸(SAM)脱羧而来。这样在多胺合成中,ADC、ODC 和 SAMDC 三个脱羧酶起着关键作用。这三种酶在许多植物中均已得到纯化和鉴定,它们的基因已从多种植物中克隆^[24]。在受到盐胁迫的情况下,水稻耐盐品种积累精胺和亚精胺,腐胺含量不多。而水稻盐敏感品种的腐胺含量则升高,精胺亚精胺含量较低^[25]。Chattopadhyay 等^[26]的研究表明,较长时间盐胁迫下耐盐水稻的 ADC 酶活性和其转录水平均升高,而盐敏感品种此酶活性和转录水平均降低。已有的转基因研究表明,当把异源 SAMDC 基因转入土豆后,叶片外植体中的 SAMDC 转录水平升高,精胺、亚精胺和腐胺的含量升高,但并未对完整植株进行试验,也未对转基因植物进行抗逆性试验^[27]。将反义 SAMDC 基因转入植物中,发现除了 SAMDC 转录降低和多胺含量下降外,还伴有大量的乙烯产生。这证明了多胺和乙烯生物合成途径中对 SAM 的竞争性利用。转基因植物表现出特殊的表型,如生长受抑、节间缩

短、分枝增加、叶子变小^[27]。这些研究表明多胺参与了植物的生长发育。

1.5 果聚糖

果聚糖是植物中的一种贮藏化合物。由于它是细胞中的可溶性组分,因而可参与植物的渗透调节。在盐胁迫下植物体内果聚糖含量也有增加。植物中果聚糖的生物合成可能包括至少 2 种酶,即蔗糖-果糖基转移酶和果聚糖-果糖基转移酶。前一种酶的基因已克隆,当转入甜菜后植物积累高含量的果聚糖^[28]。张慧等^[29]将枯草杆菌的果聚糖转移酶基因转化烟草并进行抗盐性研究,结果表明,转基因烟草植株在 10‰ NaCl 处理后生长良好,而对照出现明显的萎蔫,说明转基因植物耐盐性得到了提高。Garcia 等^[30]发现水稻在盐胁迫下可积累一定量的海藻糖,外加海藻糖可以减少 Na⁺ 积累,防止叶绿素的降解,保护根的完整性并促进生长。

2 晚期胚胎发生富集蛋白(LEA 蛋白)及其基因表达

1981 年 Dure 等人首次从棉花种子发育晚期胚胎中发现大量积累的一类蛋白质。随后 LEA 蛋白家族的其它蛋白也陆续从不同种类的植物中获得,以它们普遍存在的氨基酸序列为基础,LEA 蛋白被分为 6 组。LEA 蛋白家族之一的 group3 (D-7family)LEA 蛋白有一保守的氨基酸基元 TAQAALAGE,在蛋白质结构中重复 13 次。这个基元形成一个两性的 α -螺旋,亲水的一面形成双聚体,外面带电荷的一面在细胞处于缺水状态下中和浓度过高的离子。Group5 (D-29family)LEA 蛋白在结构和功能上相似于 group3 LEA 蛋白,有一 11 氨基酸重复序列,具有中和离子的功能。Group1 (D-19family) LEA 蛋白有较多带电荷氨基酸,可提高水的亲和力。Group4 (D-113family) LEA 蛋白 N 端有保守的 α -螺旋,能保护细胞膜的功能。Group2 LEA 蛋白 C 端有 15 个氨基酸保守序列 EEKKGIMDKIKELPG,可能起到通道蛋白的作用。根据 LEA 蛋白自身的结构,推测 Group3 (D-7family) LEA 蛋白功能可能是在种子成熟,干燥过程中和渗透胁迫条件下保护细胞免受水势降低的损伤。编码这类蛋白的基因称为 *Lea* 基因,普遍存在于高等植物中。从大麦、小麦、水稻、棉花、油菜、玉米、大豆等作物中都已克隆到相应的 *Lea* 基因,包括大麦的 *HVA1* 基因,小麦的 *PMA 2005*、*PMA 1959*、*PMA 1949* 基因,胡萝卜的 *Dc3* 和 *Dc8* 基因,大豆的 *GmPM2*,葡萄种子的 *PLEA 76* 基因,棉花的 *D-7*、*D-113*、*D-29*、*D-19*、*D-34* 基因。原始的 *Lea* 基因虽然是在种子的成熟和发育阶段特异表达的基因,但也可在植物受到干旱、低温和盐渍等环境胁迫后造成脱水的营养组织中表达^[31]。Xu 等^[32]用大麦的 *HVA1* 基因进行转基因水稻的研究,转基因水稻获得高的耐盐性,在逆境下受害症状出现较迟,且容易恢复,可维持较高的生长速率;而且耐盐性与 *HVA1* 蛋白积累呈正相关,所以 *HVA1* 可能在逆境下对植物起保护作用。因此,*Lea* 基因可作为一种抗胁迫遗传工程的潜在分子工具。

3 渗透蛋白(Osmotin)及其基因表达

20 世纪 80 年代初,首次报道了盐适应烟草存在盐适应基因后,不断引起人们的重

视。这方面工作通常是比较胁迫与非胁迫或适应与非适应植株之间的蛋白电泳图谱,从而找出与胁迫有关的某种抗盐蛋白或多肽,通过分析盐胁迫诱导出现的特异蛋白的情况,了解植物与抗盐基因表达有关的某些特性。

已有一些证据表明,植物在受到盐逆境胁迫时会合成特异的蛋白质以提高抗性。1983年Singh等人首次发现培养的烟草细胞在含NaCl的培养基生长时,有一特异蛋白的表达。Singh等^[33, 34]报道,在筛选出的NaCl适应型的烟草细胞系中,存在58、37、35.5、34、26、21、19.5、18.5 kD的盐适应蛋白,其中26 kD蛋白积累最多,可达总蛋白量的12%。Ramagopal^[35]报道,生长在含NaCl培养基上的玉米愈伤组织,合成了26.2、28.5和74 kD的盐适应蛋白。Staple等报道,番茄幼苗的根在盐处理6 h后,出现盐适应蛋白^[36]。Ramagopal^[35]报道,大麦幼苗的根受盐处理4 h后出现盐适应蛋白,而一旦除去盐胁迫,其盐适应蛋白含量便回到对照水平。马焕成报道,盐胁迫7 h后胡杨根组织产生了3条新的蛋白谱带^[37]。张平宇等^[38]报道大米草经盐胁迫后,出现27、75 kD的特异性蛋白谱带。Sugihara等^[39]报道盐胁迫下诱导木榄产生33 kD蛋白,并获得了cDNA片断。郭房庆等^[40]也报道小麦突变体在72 h盐胁迫下,88 kD蛋白带随盐浓度增加而减弱,而56 kD蛋白带表达量却随盐浓度的增高而逐渐增加。野生型与突变体明显不同,胁迫下88 kD蛋白带保持稳定,而56 kD蛋白带随盐浓度的增加而逐渐消失。除此之外,突变体还有两条特异的蛋白带,其中76 kD蛋白带表达量在盐胁迫下保持稳定,而29 kD蛋白带随盐浓度增加表达增强。

LaRosa^[41]把NaCl诱导下烟草细胞出现的谱带中26 kD蛋白称为渗透蛋白,随后获得了该蛋白的cDNA克隆。目前已得到由农杆菌介导的将渗透蛋白启动子和葡萄糖苷酶报告基因嵌合在一起的转基因烟草,其在盐渍条件下渗透蛋白基因转录水平和转基因植物的抗性比对照有明显的提高。渗透蛋白基因表达受转录后水平的调节,脱落酸诱导编码渗透蛋白mRNA的合成并使其稳定,但是只有渗透胁迫才能导致渗透蛋白的积累。

4 水通道蛋白及其基因表达

九十年代以来,人们发现细胞膜上有一族蛋白质,这类蛋白质可以协助水分子从一细胞进入到另一细胞中,但离子和代谢产物不能通过。Yamaguchi-shinozaki等^[42]用差别杂交的方法从缺水诱导的拟南芥菜中分离到9个cDNA克隆,称为RD基因。对它们的表达进行研究证实,脱落酸能诱导RD22和RD29基因的表达,而不诱导RD19、RD21、RD28基因的表达,表明RD基因存在几个不同的单一转录途径。Yamada等^[43]从冰叶日中花根的cDNA文库中分离了水通道蛋白(aquaporin)基因,分别命名为MipA、MipB、MipC。其中MipA、MipB是全长序列,分别有1 272 bp和1 267 bp, MipC是部分序列。MipA、MipC在根叶中表达, MipB在根中表达。在盐胁迫刚开始时, MipA、MipB、MipC表达水平很低,叶子膨压低是其表征之一;随后又恢复到以前水平。

5 K⁺通道蛋白及其基因表达

一般情况下,植物细胞积累K⁺而排出Na⁺, K⁺的选择性吸收对于贫瘠的盐碱地区

的作物生长更加重要^[44]。 Na^+ 可与 K^+ 竞争膜上的运输通道和一些酶上的结合位点,从而使植物生长受到抑制。 K^+ 首先通过细胞膜被根的表皮或皮层细胞吸收,然后经过径向运输至木质部并向上运至地上部分,这个过程中, K^+ 从根的共质体排入木质部的导管,然后在叶子蒸腾流的带动下向地上部分运输,到达叶子的质外体后, K^+ 通过质膜进入细胞质。此后, K^+ 可以通过韧皮部的运输进行再分配。另外, K^+ 还须在细胞质与液泡间进行分配,从而在气孔开关中起作用。目前一些与 K^+ 运输有关的基因或其产物已经得到分离和鉴定。大致可分为两大类:一类为高亲和力的载体或转运蛋白,一类为低亲和力的通道。植物中已鉴定了多种 K^+ 的高亲和及低亲和系统蛋白。如拟南芥中的 *KATI* 基因,可编码 667 个氨基酸,分子量为 79 kD,而 *AKTI* 则可编码 856 个氨基酸,分子量为 97 kD。其氨基酸序列有 6 个跨膜区域。在植物体内,*KATI* 主要在保卫细胞中表达,根中也有少量表达。*AKTI* 主要在成熟根周围细胞中表达,叶组织的细胞中则很少表达^[45,46]。Zimmermann 等^[47]报道了马铃薯中的 K^+ 通道蛋白并在昆虫细胞中表达。最近, Kim 等^[48]以及 Fu 等^[49]同时报道了一个拟南芥中 K^+ 转运蛋白基因 *AtKUPI*。该基因主要在根中表达。因此, *AtKUPI* 可在不同 K^+ 含量的土壤中作为 K^+ 转运蛋白行使功能。

虽然一些研究者认为植物对盐敏感的重要原因是 Na^+ 的毒害作用,但最近的报道指出,在渗透胁迫下 K^+ 营养不足是造成植物对盐敏感的关键因素。Zhu 等^[50]报道使用 50 mmol/L 或 75 mmol/L NaCl 筛选得到了 42 株拟南芥盐敏感突变体,其中 32 株是 *SOS1* 基因突变,9 株是 *SOS2* 基因突变体,1 株是 *SOS3* 基因突变。遗传分析表明,突变表型是由于隐性主效基因突变造成的。三种拟南芥突变体及野生型拟南芥在含有 50 mmol/L NaCl 的培养基中生长,*SOS3* 突变体细胞内 Na^+ 浓度高于野生型拟南芥,而 *SOS1* 突变体细胞内 Na^+ 却低于野生型拟南芥,但三种突变体细胞内的 K^+ 均低于野生型的拟南芥;Ishitani 等^[51]也得到类似结果。研究认为在 NaCl 胁迫下,造成突变体对盐敏感的主要原因是 K^+ 的吸收不足,而不是 Na^+ 毒害。在盐胁迫下,高浓度的 Na^+ 造成根系对 K^+ 吸收的竞争性抑制。

6 ATPase 及其基因表达

植物受到盐胁迫时,ATPase 起着建立和维护离子平衡的作用。 H^+ -ATPase 存在于植物细胞的质膜和各种内膜系统中。按结构可分三类:位于线粒体的内膜和叶绿体的类囊体膜上的 F 型,位于质膜上的 P 型和位于液泡膜上的 V 型。从功能上可分为两类:一类是利用跨膜的质子电化学势合成 ATP, F 型属此类;另一类是利用水解 ATP 产生的能量来建立跨膜的质子电化学势,包括 P 型和 V 型。从结构上看, V 型更接近于 ATP 合成的 F 型,都是有“头-柄”状结构的多亚基蛋白复合体。目前,已经发现 V 型的亚基有 10 多种,其中 A、B、c 亚基存在于所有的实验材料中。V 型 H^+ -ATPase 全酶包括两部分,其中膜的外周伸向细胞质的头状结构为 V1 部分,与膜整合的为 V0 部分。V1 包括 3 个 A 亚基(70 kD,催化亚基)、三个 B 亚基(60 kD)和一个 C、D、E 亚基;V0 包括 6 个 c 亚基(16 kD,蛋白脂),可能还有 1-3 个未鉴定功能的亚基。V 型 H^+ -ATPase 的基本功能是将细胞质中

的 H^+ 泵入液泡,维持细胞质的 pH 值的稳态平衡和建立跨膜的质子电化学梯度。胞质的 pH 稳态平衡是细胞生理活动正常进行的必要条件,而跨膜的电化学梯度是一系列离子运输的驱动力,对于胞内离子平衡和离子区域化分布有重要意义^[52]。在植物处于逆境条件下,V型 H^+ -ATPase 可以改变结构以适应环境的变化,从而使植物得以存活。冰叶日中花在盐胁迫下,可由 C_3 光合途径转为 CAM 代谢途径。然而在转型发生之前,V型 H^+ -ATPase 在膜上的密度明显增加,其 c 亚基在 RNA 转录水平和蛋白质水平均有增加^[53]。c 亚基在 mRNA 水平上还存在着昼夜节律的变化。在胁迫下 c 亚基的 mRNA 立即增加,而蛋白水平则增加缓慢。V型 H^+ -ATPase 的另外两个重要亚基 A 和 B 的 mRNA 水平,在幼嫩叶中有轻微的节律变化但幅度较小,在成熟叶中表现无节律性变化。胁迫下 A 亚基无变化,而 B 亚基变化也很小^[54]。在根中,3种亚基均无昼夜节律性变化,但盐胁迫使它们的转录水平升高。以上研究表明,c亚基对发育和环境的变化最为敏感,而且各亚基的转录调控具有种属和器官的特异性。烟草悬浮细胞在 NaCl 处理下,V型 H^+ -ATPase 的 A 亚基转录增高。番茄和甜橙的盐胁迫实验也证明了 A 亚基的转录水平上升^[55],但大麦在盐胁迫下其 V型 H^+ -ATPase 的增加并不显著。这说明不同植物对盐的敏感性和适应性不同。

质膜 H^+ -ATPase 在植物的许多生理过程中起着重要作用^[54]。如调控胞内的 pH 值,提供细胞生长所需的营养物质和离子运输的动力等。质膜 H^+ -ATPase 分子包括蛋白激酶与磷酸酶的活性部位。其多肽链卷曲呈 α -螺旋状,再环成 9 个圈,通过外表面非极性残基插埋在磷脂膜中。酶的大部分亲水区域在膜的原生质侧,N 端构成 H^+ 入口的门,其余部分依次为磷酸酶活性区、转导区与蛋白酶区。暴露在膜外侧的 C 端构成离子通道出口。当细胞面临环境胁迫或内部信号需进行渗透调节时,必然导致离子的跨膜运输,而 H^+ -ATPase 是跨膜运输动力的生产者。Braun 等^[56]以大洋洲滨藜(*Atriplex nummularia*)为材料,观察到经盐锻炼后,其根的质膜 H^+ -ATPase 活力大大提高,并认为盐处理使 H^+ -ATPase 活力的增加可加速膜电位的极化,产生 $\Delta \mu H^+$ 以加速 Na^{2+} 向外运输。Ben-Hayyin 等^[57]将耐盐和不耐盐品种柑橘胚珠的愈伤组织培养在 200 mmol/L NaCl 培养基上,观察到 NaCl 对质膜 H^+ -ATPase 活性的影响是依赖于反应液中的 ATP 浓度,当 ATP 浓度大于 3 mmol/L 时,活性几乎不受影响。因此提出 ATPase 与底物结合的位点不止一个。当盐存在时,这些位点的相互结合使活力下降;无盐时,则位点为非结合态,从而保持 ATPase 的活力。Niu 等^[58]以盐生植物滨藜和甜土植物烟草为材料,比较了两者在盐胁迫下的质膜 H^+ -ATPase 表达特性,发现质膜 H^+ -ATPase 的转录是在根和完全展开的叶子中被诱导的,而在未完全展开的叶子或茎中不能被诱导。盐生植物的根在盐胁迫下积累 H^+ -ATPase mRNA 的能力要比甜土植物的能力大。在滨藜根中,盐诱导的转录主要集中在伸长区,在分化区也有增加。在完全展开的叶子和根中 NaCl 诱导质膜 H^+ -ATPase 转录,表明这些器官需要增加 H^+ 电化学梯度以维持植物的离子平衡。Niu 等^[59]采用 RNA 原位杂交技术,证明了盐可以诱导滨藜根和叶子质膜上 H^+ -ATPase 基因的表达,确定盐诱导下 H^+ -ATPase 基因在根尖的表皮层,根伸长区和分化区的内皮层,以及叶子的维管

束鞘细胞;根尖的表皮是由根冠下的一些最初的分生细胞组成,根冠在盐胁迫下对离子平衡的调节将保护这些分生细胞的生理和遗传的完整性;在伸长区和分化区内皮层细胞中质膜 H^+ -ATPase 增加表明植物严格调控从共质体进入内皮层细胞的离子,从而控制其向木质部的运输和向地上部的转运。在未处理的植物中,完全展开的叶子中几乎监测不到 H^+ -ATPase mRNA 的转录。然而当用 400 mmol/L NaCl 处理后,其 mRNA 在叶维管束鞘细胞中极为丰富。由于这些鞘细胞与根中转来的木质部中的离子直接接触,因而可以减少叶子质外体中 Na^+ 和 Cl^- 的大量涌入从而控制离子平衡。在叶肉细胞中 H^+ -ATPase 的转录也有增加。因为叶肉细胞是 Na^+ 和 Cl^- 库,可进一步将其分送至液泡和叶子表面或其它腺细胞等。当外界环境 Na^+ 浓度提高(相对于细胞质),通过 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白将 Na^+ 转运到液泡中,实现区域化,减少细胞质中 Na^+ 浓度,在盐生杜氏藻 (*Dunaliella salina*) 和滨藜中 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白活性是被 NaCl 诱导^[60]。

有研究认为 Ca^{2+} 可能作为第二信使起作用。在植物中,胞质 Ca^{2+} 浓度的少许变化可导致光敏色素的反应。 Ca^{2+} 活跃的运输是由具有高亲和力的 Ca^{2+} -ATPase 完成的。 Ca^{2+} -ATPase 主要存在于质膜和内质网上。在液泡上还存在低亲和力的 Ca^{2+}/H^+ 的反向转运。植物中的质膜和内质网膜 Ca^{2+} -ATPase 可被钒酸盐抑制,需要 Mg^{2+} ,对 Mg^{2+} -ATP 有高亲和力。尽管有许多生理生化的研究,但目前只克隆到一种植物 Ca^{2+} -ATPase 基因,即番茄的 *LCA* 基因^[61]。该基因编码内质网型 Ca^{2+} -ATPase,有 1 024 个氨基酸残基,分子量为 116 kD。对 Ca^{2+} -ATPase 的转录进行研究,发现在低盐条件下(1×Hoagland 溶液),番茄幼苗根中有三条杂交带,而叶中只有一条较弱的杂交带。这说明根中可能有多种 RNA 拼接方式。当番茄幼苗用 50 mmol/L NaCl 处理 1 d 后,叶中 *LCA* mRNA 含量升高了 3 倍,根中升高约 1.8 倍;而质膜 H^+ -ATPase 却变化不大。这些说明盐害可干扰胞内 Ca^{2+} -ATPase 水平,而 Ca^{2+} -ATPase 基因表达的提高可增加植物对 Ca^{2+} 的调控能力以适应盐胁迫。对该基因的转基因研究将能进一步了解植物的盐适应性反应。

7 其它与盐胁迫相关的功能性蛋白

在盐胁迫和其它一些逆境下,植物产生活性氧(包括过氧化物自由基,羟基自由基,过氧化氢)。这些活性氧自由基对植物细胞的各部分特别是叶绿体有很大的损伤。植物自身对活性氧的清除也是一种重要的抗逆机制。植物活性氧清除酶系统的基因在胁迫下都受到激活^[62],这些活性氧清除酶包括过氧化氢酶,超氧化物歧化酶,谷胱甘肽还原酶,抗坏血酸氧化酶。在冰叶日中花中,CAM 代谢途径中的关键酶磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因的转录水平在盐胁迫下也升高。丙酮酸正磷酸双激酶(PPDK; EC2.7.9.1)负责磷酸烯醇式丙酮酸的合成。该酶一般只在 C_4 植物和 CAM 植物中存在。Moons 等^[63]从 C_3 植物水稻中克隆了 *PPDK* 基因,在高盐处理下,水稻幼苗根中 *PPDK* 升高。但在绿色幼苗中该酶无诱导性。Locy 等^[64]应用盐适应过的烟草悬浮细胞及其再生植株,研究了盐处理下与光合作用有关的基因的表达情况,结果表明,盐适应细胞在盐胁迫下其光系统 I 和光系统 II 的蛋白含量均升高。*Rubisco* 的含量也有较大的增加,而对照检测不到 *Rubisco*,这

表明盐适应细胞获得了耐盐的光合作用能力,其再生植株也表现出更加耐盐的CO₂固定、氧气释放及光合磷酸化能力。盐胁迫下,Rubisco 转录水平增强的现象在水稻幼苗中也可观察到^[65]。但这些基因的表达变化的意义尚不清楚。

8 结语

植物的抗盐性状是一个由多基因控制的数量性状^[66],很难用转基因的方法将如此多的外源基因同时转入到一种植物中进行表达调控,而且很多与抗盐相关的基因未被发现。这就决定了植物耐盐机制的复杂性。由于抗盐相关基因是受盐胁迫产生的信号调节。盐胁迫产生的信号可能作用于某些共同的调控因子,再由这些调控因子来控制受盐胁迫诱导的基因表达。转录调控因子如 DREB1A 和 DRE (dehydration response element) 能与受盐胁迫诱导基因的启动子相结合,这些调控因子将会是调控基因表达的热点^[67]。DRE 是调控许多对干旱、盐胁迫和低温等胁迫敏感基因启动子的顺式作用成分。转基因方法使 DREB1A 基因在植物中过量表达,许多与抗这些胁迫相关的基因在正常生长条件下获得诱导表达,与对照相比,植物对这些胁迫的抵御力也相应增强^[68, 69]。

磷酸基团通过各种级联放大系统转移并激活转录因子,从而得到最终的基因表达和系列生理反应^[70]。在植物中,有关最初的信号感受和传递过程的研究尚未见报道。尽管植物中有些激素信号感受与传递过程可能有两组分信号系统参与,但在盐胁迫下,有无此类系统参与信号感受和传递尚不清楚。从植物中克隆的许多 MAPK 级联系统基因的产物之间的相互作用和信号传递尚待进一步研究。对于该系统的上游和下游组分及其相互作用也应是研究的目标。

此外,自然界存在着许多天然的耐盐植物如红树、滨藜、碱蓬、圣柳、大米草等在漫长的进化过程中积累了丰富的耐盐基因,形成了一套完善的耐盐机制。我们可以用它作为模型植物,用分子生物学的方法进一步研究其耐盐机制。

参考文献:

- [1] Igarashi Y, Yoshida Y, Sanada Y, et al. Characterization of the gene for Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and correlation between the expression of the gene and salt tolerance in *Oryza sativa* L. [J] *Plant Mol Biol*, 1997, 33:857-865.
- [2] Kavikishor P B, Hong Z, Miao G H, et al. Overexpression of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plant [J]. *Plant Physiol*, 1995, 108:1387-1394.
- [3] Lin J P, Zhu J K. Proline accumulation and saltstress induced gene expression in a salt hypersensitive mutant of *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 1997, 114:591-596.
- [4] Chen S Y, Wang G, Lao W D. Cloning and identification of gene fragments related to proline biosynthesis in rye and rice [J]. *Sci Sin (B Series)*, 1991, 2:139-145.
- [5] Rhodes D, Hanson A D. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1993, 44:357-384.
- [6] McCue K F, Hanson A D. Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression [J]. *Plant Mol Biol*, 1992, 18:1-11.
- [7] Ishitani M, Nakamura T, Handeung Y, et al. Expression of the betainaldehyde dehydrogenase gene in barley in response

- to osmotic stress and abscisic acid [J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 27:307-310.
- [8] Wood A J, Saneoka H, Rhodes D, et al. Betaine aldehyde dehydrogenase in sorghum molecular cloning and expression of two related genes [J]. *Plant Physiol*, 1996, 110:1301-1308.
- [9] 梁峥, 马德钦, 汤岚, 等. 菠菜甜菜碱醛脱氢酶基因在烟草中的表达[J]. *生物工程学报*, 1997, 13(3):236-240.
- [10] Hayashi H, Alia Mustardy L, Deshniun P, et al. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the codA gene for choline oxidase, accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress [J]. *Plant J*, 1997, 12:132-142.
- [11] 刘凤华, 郭岩, 谷东梅, 等. 转甜菜碱醛脱氢酶基因植物的耐盐性研究 [J]. *遗传学报*, 1997, 24:54-58.
- [12] 郭岩, 张莉, 肖岗, 等. 甜菜碱醛脱氢酶基因在水稻中的表达及转基因植株的耐盐性研究 [J]. *中国科学(C 辑)*, 1997, 27:151-155.
- [13] Rathinasabapathi B, McMue K F, Gage D A, et al. Metabolic engineering of glycine betaine synthesis: plant betaine aldehyde dehydrogenases lacking typical transit peptides are targeted to tobacco chloroplasts where they confer betaine aldehyde resistance [J]. *Planta*, 1994, 193:155-162.
- [14] Nakamura T, Yokota S, Muramoto Y, et al. Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycinebetaine nonaccumulator, and possible localization of its protein peroxisomes [J]. *Plant J*, 1997, 11:1115-1120.
- [15] Russell B L, Rathinasabapathi B, Hanson A D. Osmotic stress induces expression of choline monooxygenase in sugar beet and amaranth [J]. *Plant Physiol*, 1998, 116:859-865.
- [16] Tarczynski M C, Jense R G, Bohnert H J. Stress protection of transgenic tobacco by production of osmolyte mannitol [J]. *Sci*, 1993, 259:508-510.
- [17] Shen B, Jensen R G, Bohner H J. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts[J]. *Plant Physiol*, 1997, 113:1177-1183.
- [18] Kanayama Y, Mori H, Imaseki H, et al. Nucleotide sequence of a cDNA encoding NADP-sorbitol-6-phosphate dehydrogenase from apple [J]. *Plant Physiol*, 1992, 100:1607-1608.
- [19] Sheveleva E V, Marquez S, Chamar W, et al. Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase expression in transgenic tobacco [J]. *Plant Physiol*, 1998, 117:831-839.
- [20] Bohner H J. Biochemistry and molecular biology of CAM [A]. In: Wary J L. *Inducible Plant Protein* [M]. London: Cambridge University Press, 1994. 113-137.
- [21] Vernon D M, Tarczynske M C, Jensen R G et al. Cyclitol production in transgenic tobacco [J]. *Plant J*, 1993, 4:199-205.
- [22] Sheveleva E, Chmara W, Bohner H J, et al. Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* L. [J] *Plant Physiol*, 1997, 115:1211-1219.
- [23] 汪沛洪. 植物多胺代谢的酶类与胁迫反应 [J]. *植物生理学通讯*, 1990, (1):1-7.
- [24] Waden R, Cordeiro A, Tiburcio A F. Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development [J]. *Plant Physiol*, 1997, 113:1009-1013.
- [25] Krishnamurthy R, Bhagwat K A. Polyamines as modulators of salt tolerance in rice cultivars [J]. *Plant Physiol*, 1989, 91:500-504.
- [26] Chattopadhyay M K, Gupta S, Sengupta D N, et al. Expression of arginine decarboxylase in seedlings of indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars as affected by salinity stress [J]. *Plant Mol Biol*, 1997, 34:477-483.
- [27] Kumar A, Taylor M, MadAriff S A, et al. Potato plant expressing antisense and sense S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) transgenes show altered levels of polyamines and ethylene: antisense plants display abnormal phenotype [J]. *Plant J*, 1996, 9:147-158.
- [28] Van der Meer I M, Koop A J, et al. Cloning of the fructan biosynthesis pathways of Jerusalem artichoke [J]. *Plant J*, 1998, 15:489-500.

- [29] 张慧, 董伟, 周峻马, 等. 果聚糖蔗糖转移酶基因的克隆及耐盐转基因烟草的培育 [J]. 生物工程学报, 1998, 14:741-745.
- [30] Garcia A B, Engler J A, Iyer S, et al. Effects of osmoprotectants on NaCl stress in rice [J]. Plant Physiol, 1997, 115: 159-169.
- [31] 卢青. 植物耐盐性的分子生物学研究进展 [J]. 生物学杂志, 2000, 17(4):9-11.
- [32] Xu D P, Duan X, Wang B, et al. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice [J]. Plant Physiol, 1996, 110:249-257.
- [33] Singh N K, Handa A K, Hasegawa P M, et al. Proteins associated with adaptation of cultured tobacco cell to NaCl [J]. Plant physiol, 1985, 79:126-137.
- [34] Singh N K, Bracker C A, Hasegawa P M, et al. Characterization of osmotin: a thaumatin-like protein associated with osmotic adaptation in plant cell [J]. Plant Physiol, 1987, 85:529-536.
- [35] Ramagopal S. Salinity stress induced tissue-specific in barley seedling [J]. Plant physiol, 1987, 84(2):324-331.
- [36] 李艳华, 杨敏生, 王海英, 等. 树木抗盐生理研究进展 [J]. 河北林果研究, 2000, 15(6):189-198.
- [37] 马焕成, 王沙生. 胡杨膜系统的盐稳定性及盐胁迫下的代谢调节 [J]. 西南林学院学报, 1998, 18(1):15-23.
- [38] 张平宇, 王颖, 卢青, 等. 大米草盐胁迫蛋白的表达及 cDNA 文库的构建 [J]. 草业学报, 1998, 7:67-74.
- [39] Sugihara L, Hanagata N, Dubinsky Z, et al. Molecular characterization of cDNA encoding oxygen evolving enhancer protein I increased by salt treatment in the mangrove *Bruguiera gymnorrhiza* [J]. Plant Cell Physiol, 2000, 41:1279-1285.
- [40] 郭房庆, 汤章城. NaCl 胁迫下小麦突变体和野生型叶片中的一些有机质累积和基因表达差异 [J]. 植物生理学报, 1999, 25:263-268.
- [41] LaRosa P R, Hasegawa P M, Rhodes D, et al. Abscisic acid simulated osmotic adjustment and its involvement in adaptation of tobacco cell to NaCl [J]. Plant Physiol, 1987, 85:174-185.
- [42] Yamaguchi-Shinozaki K, Koizumi K, Urao S, et al. Molecular cloning and characterization of 9cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: sequence analysis of one cDNA clone encodes a putative transmembrane channel protein [J]. Plant Cell Physiol, 1992, 33:217-224.
- [43] Yamada S M, Karsuhara M W, Lelley W, et al. A family of transcripts encoding water channel protein: tissue specific expression in the common ice plant [J]. Plant Cell, 1995, 7:1129-1142.
- [44] Epstein E. How calcium enhances plant salt tolerance [J]. Sci, 1998, 280:1906-1907.
- [45] Anderson J A, Huprikar S S, Kochian L V, et al. Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89:3736-3740.
- [46] Sentenac H, Bonneaud N, Minet M, et al. Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system [J]. Sci, 1992, 256:663-665.
- [47] Zimmermann S, Talke I, Ehrhardt T, et al. Characterization of *SKT1*, an inwardly rectifying potassium channel from potato, by heterologous expression in insect cell [J]. Plant Physiol, 1998, 116:879-890.
- [48] Kim E, Kwak J M, Uozumi N, et al. *AtKUPI*: an *Arabidopsis* gene encoding high-affinity potassium transport activity [J]. Plant Cell, 1998, 10:51-62.
- [49] Fu H H, Luan S. *AtKUPI*: a dual-affinity K⁺ transport from *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 1998, 10:63-73.
- [50] Zhu J K, Liu J P, Xiong L M. Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*: evidence for a critical role of potassium nutrition [J]. Plant Cell, 1998, 10:1181-1191.
- [51] Ishitani M, Liu J P, Halfter U, et al. *SOS3* function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding [J]. Plant Cell, 2000, 12:1667-1677.
- [52] 夏朝晖, 陈珈. 胁迫反应中的液泡膜 H⁺-ATPase [J]. 植物生理学通讯, 1998, 34:168-174.
- [53] Low R, Rockel B, Kirsch M, et al. Early salt stress effects on the differential expression of vacuolar H⁺-ATPase genes

- in roots and leaves of *Mesembryanthemum crystallinum* [J]. *Plant Physiol*, 1996, 110:259–265.
- [54] Brauer D, Conner De N, Tu S I. Effects of pH on proton transport by vacuolar pumps from maize roots [J]. *Physiol Plant*, 1992, 86:63–70.
- [55] Banuls J, Ratajczak R, Lutge U. NaCl-stress enhances proteolytic turnover of the tonoplast H⁺-ATPase of *Citrus sinensis*: appearance of a 35 kDa polypeptide still exhibiting ATP-hydrolysis activity [J]. *Plant Cell Environ*, 1995, 18:1341–1344.
- [56] Braun Y, Hassidim M, Lerner H R, et al. Studies on H⁺-translocation ATPase in plants of varying resistance to salinity [J]. *Plant Physiol*, 1986, 81:1050–1056.
- [57] Ben-Hayyin G, Ran U. Salt-induced cooperativity in ATPase activity of plasma membrane-enriched fractions from cultured citrus cells: kinetics and evidence [J]. *Physiol Plant*, 1990, 80:210.
- [58] Niu X, Narasimhan M L, Salzman R A, et al. NaCl regulation of plasma membrane H⁺-ATPase gene expression in a glycophyte and a halophyte [J]. *Plant Physiol*, 1993, 103:713–718.
- [59] Niu X M, Damsz B, Kononowicz A K, et al. NaCl-induced alternation in both cell structure and tissue specific plasma membrane H⁺-ATPase gene expression [J]. *Plant Physiol*, 1996, 111:679–689.
- [60] Dopont F M. Salt-induced changes in ion transport: Regulation of primary pumps and secondary transporters [A]. In: Clarkson D T. *Transport and Receptor Protein of Plant Membranes* [M]. New York: Plenum Press, 1992. 91–100.
- [61] Wimmers L E, Ewing N N, Bennett A B. Higher plant Ca²⁺-ATPase: primary structure and regulation of mRNA abundance by salt [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89:9205–9209.
- [62] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene expression and signal transduction in water-stress response [J]. *Plant Physiol*, 1997, 115:327–334.
- [63] Moons A, Bauw G, Prinsen E, et al. Molecular and physiological responses to abscisic acid and salts in roots of salt-sensitive and salt-tolerant Indica rice varieties [J]. *Plant Physiol*, 1995, 107:177–186.
- [64] Locy R D, Chang C C, Nielsen B L, et al. Photosynthesis in salt-adapted heterotrophic tobacco cells and regenerated plants [J]. *Plant Physiol*, 1996, 110:321–328.
- [65] Zhang J S, Gu J, Liu F H, et al. A gene encoding a truncated large subunit of Rubisco is transcribed and salt-inducible in rice [J]. *Theor Appl Genet*, 1995, 91:361–366.
- [66] Foodlad M R, Jone R A. Mapping salt-tolerance genes in tomato using trait-based marker analysis [J]. *Theor Appl Genet*, 1993, 87:184–192.
- [67] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene expression and signal transduction in water-stress response [J]. *Plant Physiol*, 1997, 115:327–334.
- [68] 刘强, 张贵友, 蒋五玲, 等. DREB 转录因子在提高植物抗逆性中的作用 [A]. 吴平, 陈昆松. *植物分子生理学进展* [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2000. 216–222.
- [69] 许祥明, 叶和春, 李国凤. 植物抗盐机理的研究进展 [J]. *应用与环境生物学报*, 2000, 6(4):379–387.
- [70] 张劲松, 陈受宜. 植物耐盐耐旱的分子机制及其基因工程 [A]. 吴平, 陈昆松. *植物分子生理学进展* [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2000. 223–243.