

大豆 (*Glycine max* L.)边缘细胞对 铝毒的生理生态响应

李荣峰^{1,2}, 蔡妙珍¹, 刘 鹏^{1,*}, 徐根娣¹, 梁 和², 章月琴¹

(1. 浙江师范大学植物学实验室, 金华 321004 2. 广西大学农学院, 南宁 530005)

摘要 :以大豆浙春 2 号 (铝耐性) 和华春 18 号 (铝敏感) 为材料, 研究了铝胁迫下附着于根尖边缘细胞 (即原位边缘细胞) 的存活率、根伸长抑制率和 PME 活性变化以及 Al^{3+} 对离体后边缘细胞存活率、黏液层厚度的影响。结果表明 :铝胁迫下附着于根尖的边缘细胞比离体边缘细胞有更高的活性, 前者 Al^{3+} 处理 24 h 后, 其成活率仍能达到 74% 以上, 而后者 Al^{3+} 处理 12 h, 浙春 2 号和华春 18 号边缘细胞的活性在 400 $\mu\text{mol/L}$ 时分别只有 44.58% 和 26.16%, 前后两者细胞活性都有随着 Al^{3+} 浓度升高和处理时间的延长, 边缘细胞活性呈越来越低的变化趋势, 而离体边缘细胞 Al^{3+} 处理 6 h 时, 相对于敏感性品种而言, 高浓度 Al^{3+} ($\geq 200 \mu\text{mol/L}$) 有利于铝耐性品种的边缘细胞存活。随 Al^{3+} 浓度的提升, 果胶甲基酯酶 (PME) 活性增加, 根伸长受抑加剧, 敏感品种 PME 活性及铝造成的根伸长抑制均高于耐性品种, 同时, Al^{3+} 对黏液的产生有一定的影响, 黏液层的厚度随 Al^{3+} 浓度成正向变化趋势。不同 Al^{3+} 浓度及处理时间下, 耐性品种都比敏感品种边缘细胞有较高的活性、分泌较多的黏液。以上结果说明 Al^{3+} 对边缘细胞具有一定的毒害效应, 果胶甲基酯化程度、根伸长受抑及边缘细胞黏液的分泌是根冠对 Al 毒胁迫反应的结果。

关键词 :大豆, 边缘细胞, 活性, 铝毒 (Al 毒), 根冠

文章编号 :1000-0933 (2007) 10-4182-09 中图分类号 :Q142, Q948, S154.4 ; S173 文献标识码 :A

Physiological and ecological response of the root border cells to aluminum toxicity in soybean

LI Rong-Feng^{1,2}, CAI Miao-Zhen¹, LIU Peng^{1,*}, XU Gen-Di¹, LIANG He², ZHANG Yue-Qin¹

1 Laboratory of Botany, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China

2 Agricultural College of Guangxi University, Nanning 530005, China

Acta Ecologica Sinica 2007 27 (10) 4182 ~ 4190.

Abstract : Aluminum (Al) toxicity is an important factor in determining the distribution of plant species and ecotypes in the natural habit at crop productivity in the acid soils. However, the mechanism of Al-induced inhibition of root growth and the reasons for the spatial variations in Al sensitivity among the apical root zones are still poorly understood. The root tip is a primary site of Al toxicity in senior plants. The root border cells, which originate from the root cap meristem by mitosis, can separately carry out metabolism and resist adverse stress through a series of distinct responses after being detached from the root tips. Furthermore, the root border cells also play many crucial roles in protecting the root tip from the abiotic stress, which especially can participate in detection and tolerance of aluminum (Al) toxicity. The toxin effects of Al^{3+} on the

基金项目 :国家自然科学基金资助项目 (30540056); 浙江省自然科学基金资助项目 (303461, 304185, 504135)

收稿日期 :2006-08-10; 修订日期 :2007-03-09

作者简介 :李荣峰 (1980 ~), 女, 广西桂林人, 硕士生, 主要从事植物生理生态研究. E-mail :muyedie_afen@263.net

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail :sky79@zjnu.cn

Foundation item :The project was financially supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30540056); the Nature Science Foundation of Zhejiang Province (No. 303461, 304185, 504135)

Received date 2006-08-10; **Accepted date** 2007-03-09

Biography :LI Rong-Feng, Master candidate, mainly engaged in plant physiological ecology. E-mail :muyedie_afen@263.net

border cells and response mechanism of the root border cells to Al^{3+} toxicity were tested by comparing response of soybean varieties Zhechun No. 2 (Al-tolerance) and Huachun No. 18 (Al-sensitive) known to vary in Al resistance at a whole-root level. The response of the root border cells to Al toxicity and its mechanism of resisting Al toxicity clearly were further investigated.

The study shows that the higher viability was found in the root border cells clinging to the root tip than the detached border cells under Al^{3+} stress. After being exposed to Al^{3+} for 24 h, the border cells clinging to the root tip from two varieties significantly reached more than 74% viability, and that of the detached border cells was lower when exposed to Al^{3+} for 12 h. The viability of Zhechun No. 2 and Huachun No. 18 was just 44.58% and 26.16% respectively at 400 $\mu\text{mol/L}$ Al^{3+} . No matter clinging to the root tip or detached, the viability of the soybean border cell became lower and lower with increase of Al^{3+} concentration and treatment time. However, the viability of the detached border cells in Al-tolerance variety had an inflexion at 200 $\mu\text{mol/L}$ Al^{3+} treated for 6 h, i. e., higher concentration Al^{3+} ($\geq 200 \mu\text{mol/L}$) was propitious to the border cells viability. With increase of Al^{3+} concentration, both the PME activity and relative root elongation inhibit rates increased, and those of the Al-sensitive variety were higher than Al-tolerance. At the same time, Al^{3+} concentration was influential on secretion of mucilage and the mucilage layer became much thicker with increase of Al^{3+} concentration. Under different Al^{3+} concentration and treatment time, these results indicated that Al can speed up death of the border cells. The higher penetrative was propitious to the viability of the border cells and the exfoliate cell mortality was correlated with production of mucilage under greater Al^{3+} concentration. Al binding to the cell walls, root elongation inhibited and secretion of mucilage represented an important pathway in the response of the soybean root cap to Al toxicity. Results also suggest that the Al-resistance mechanisms in the border cells levels were consistent with those of the soybean whole plant levels.

Key Words : soybean ; border cells ; aluminum toxicity ; root cap

土壤酸铝毒害是全世界普遍存在的农业问题,它影响世界 40% 耕地面积的作物生产,巴西、南美安第斯地区、中国、中非、美国和北欧尤其严重。我国南方 15 个省区广泛分布的砖红壤、红壤、赤红壤都属于典型的酸性土壤,约占全国土地面积的 20% [1]。近年来,由于连续施用含氮和氯化物的肥料,工业污染和豆科植物的固氮作用等都加剧了铝毒害,导致酸性土壤面积扩大,铝毒 (Al 毒)成为制约酸性土壤作物产量的主要因子 [2,3]。Al 毒的原初效应是抑制植物的根系伸长,现已有众多学者研究 Al 毒和植物耐 Al 机理 [2~4]。Clarkson [5]就提出 Al 诱导根生长的改变,并指出细胞分裂是铝诱导根生长抑制的主要位点。然而,铝不仅会降低主根的伸长,而且会改变整个根结构,至于在根的发育特征中,铝到底诱导哪个部位改变及与 Al 毒影响的关系,敏感品种根尖细胞壁铝含量为何比耐铝品种多以及铝如何结合到根尖细胞壁上还没完全确定,铝诱导根生长抑制的机理至今还没完全确定 [2,3,6~9]。

边缘细胞 (Root border cells,简称 BC)是从根冠表皮游离出来并聚集在根尖周围的一群特殊细胞,起源于根冠分生组织的有丝分裂,在抵抗环境胁迫造成的根尖伤害中起着多种防御和保护功能。最近的研究表明边缘细胞在植物耐 Al 毒胁迫中起重要作用 [10,11,12],如豌豆 (*Pisum sativum*) [13]、菜豆 (*Snapbean*) [11]等的边缘细胞通过分泌黏液来保护或减轻铝对植物的毒害作用。有关绿豆 (*Vigna radiata*) [14]、水稻 (*Oryza sativa*) [15]、番茄 (*Lycopersicon esculentum*) [16]、红豇豆 (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis*) [17]、黄瓜 (*Cucumis sativa*) [18]等物种边缘细胞的生物学特性、铝的毒害效应已有报道,然而,大豆边缘细胞对 Al 毒的反应及耐铝机制至今国内外少有报道。Schmohl 和 Horst [19]研究了细胞壁果胶含量与玉米悬浮培养细胞对 Al 毒敏感性的关系,显示果胶含量高的细胞对 Al 毒较为敏感,并认为铝与细胞壁果胶的结合对细胞的 Al 毒和耐性表达具有重要的作用,也表明边缘细胞的游离与根冠果胶甲基酯酶 (PME)活性表达有密切的相关性,而对于铝胁迫下附着于根尖的边缘细胞以及其从根尖脱落成为单独的细胞群后,是否还发挥这些特定的功能及其响应机制至今还不

清楚。

大豆是豆科植物中主要的油料作物,植物蛋白质的主要来源,其对 Al 毒害的忍耐能力比水稻、小麦、玉米等其它作物稍强^[20],被认为是酸性土壤改良的先锋作物。本实验以铝耐性的浙春 2 号和铝敏感的华春 18 号为材料,比较研究 Al³⁺ 对附着于根尖边缘细胞的存活率、PME 活性和根伸长抑制率的影响和离体后边缘细胞的活性及黏液层厚度对 Al³⁺ 毒害的反应,以进一步明确边缘细胞在抵抗 Al 毒害中所起的作用,以期为酸性土壤中大豆种植面积的扩大及生产实践中 Al 毒的防治提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

供试材料为前期筛选的对铝耐性的浙春 2 号和对铝敏感的华春 18 号两个大豆 (*Glycine max* L.) 品种^[21,22]。将无病斑、霉点、虫害的大豆种子,用自来水浸泡 4 h,然后用 10% NaClO 表面消毒 20 min,再用无菌 ddH₂O 清洗 6 次,每次停留 5 min,最后用镊子将种子播于铺有无菌湿滤纸(下铺湿脱脂棉)的铁磁盘中,于黑暗 25℃、湿度为 90% 的人工智能气候培养箱中培养。12 h 后选取刚露白的大豆种子,分两部分进行处理。

第 1 部分以附着于根尖的边缘细胞为材料,将露白种子播于底部装有 200 ml 无菌 ddH₂O 的塑料盆中进行悬空气培养^[4,15],每隔 2 h 喷 1 次 Al³⁺ 处理液。Al³⁺ 浓度设为 0、100、200、300、400 μmol/L Al³⁺,均含 200 μmol/L CaCl₂,Al³⁺ 以 AlCl₃ 形式供应。Al³⁺ 处理 24 h 后检测边缘细胞活性、果胶甲基酯酶 (PME) 活性以及根长测定。

第 2 部分以离体边缘细胞为材料,大豆根长为 15 mm 时,收集边缘细胞,每 10 个根尖的边缘细胞洗于 1.5 ml 离心管(内装有 1 ml Al³⁺ 液)中,形成边缘细胞悬浮液。处理 1 h、2 h、4 h、6 h、12 h 后统计边缘细胞数目和存活率,并于 6 h 时取样测定每个边缘细胞黏液层的厚度及摄像。每个处理重复 3 次。

1.2 边缘细胞的收集

随机剪取悬空培养的 10 个大豆根的根尖 3 mm,放入预先装有 1000 μl ddH₂O 的离心管中,静置 1~2 min,待边缘细胞在水中展开,同时用微量注射器反复吸取溶液使边缘细胞在水中充分散开,形成边缘细胞悬浮液。

1.3 边缘细胞的存活率测定

方法参照 Pan 等^[23]。将含有边缘细胞的悬浮液与 FDA-PI 染液以体积比 1:1 混合,其中 FDA 为 25 μg/ml 荧光素双醋酸溶液,PI 为 10 μg/ml 碘化丙啶溶液。置于黑暗中室温染色 10 min 后,在荧光显微镜下观察,发绿色荧光的为活细胞,发红色荧光的为死细胞。并统计活细胞数 (M) 和死细胞数 (N),计算存活率:

$$R = [M / (M + N)] \times 100\%$$

1.4 根伸长抑制率的测定

先测定 Al³⁺ 处理前大豆的初根长,然后将其进行 Al³⁺ 处理 24 h 后,再次测定各组大豆的根长,每个处理选 20 个根长取平均值。按根伸长抑制率公式,求出各 Al³⁺ 暴露条件下的根伸长抑制率。公式为:

根伸长抑制率 = (对照组大豆根伸长长度 - Al³⁺ 处理组大豆根伸长长度) / 对照组大豆根伸长长度 × 100%。

1.5 根冠果胶甲基酯酶 (PME) 的提取及其活性检测

PME 的活性测定参照 Richards 等^[24]的方法。分别挑选 Al³⁺ 处理 24 h 后的大豆根 15 个,剪取约 3 mm 长的根尖,置于含有 200 μl PME 提取液 (citric acid 0.1 mol/L、Na₂HPO₄ 0.2 mol/L、NaCl 1 mol/L pH 5.8) 的研钵中,充分研磨后将研磨液置于离心管中充分振荡,冰浴中放置 1 h,每隔 20 min 振荡一次,于 4℃ 下 15000 × g 离心 10 min,收集上清液,于 -20℃ 中保存。取提取的 PME 样品 10 μl,加到 4 ml 底物溶液 [0.5% (0.5g/100ml) citrus pectin (sigma),NaCl 0.2 mol/L、0.15% (0.15g/100ml) methyl red pH 6.8] 中。37℃ 温浴 2 h,在 525 nm 时测定 OD 值。在 PME 的作用下,果胶去甲基化,释放出 H⁺ 使溶液 pH 值下降,甲基红 (methyl red) 由黄色变成红色。这种颜色变化可通过分光光度计检测出来。将 20、25、30、35、40、45、50、55 μl 和 60 μl 0.01 mol/L

的 HCl 分别加到 4 ml 底物溶液中 摇匀后 在 525 nm 下测定 OD 值。将所测 OD 值与 H⁺ 含量 (μmol) 作标准曲线及回归方程 并利用回归方程计算不同 PME 样品的酶活性 PME 活性用 μmol H⁺ / (root cap · h) 表示。

1.6 边缘细胞黏液层厚度的测量

取不同时间不同 Al³⁺ 浓度处理后的边缘细胞悬浮液 按照 20:7 加入墨汁进行染色 从中吸取 10 μl 均匀平铺在载玻片上 在 400 × 显微镜下拍照 并用 LEICA QWIN 软件分别测量每个边缘细胞黏液层厚度相异的 10 处 取平均值作为一个边缘细胞的黏液层厚度 每个处理每个重复选取 10 个反应边缘细胞 最后取 10 个反应边缘细胞黏液层厚度的平均值。

1.7 数据分析

各实验重复 3 次 根据 3 次实验所得数据计算平均值 (Means) 和标准误差 (Standard errors) 利用 SAS 分析软件进行方差和 LSR 分析。

2 结果与分析

2.1 大豆发育过程中 Al³⁺ 对原位边缘细胞存活率、PME 活性和根伸长抑制率的影响

2.1.1 Al³⁺ 对大豆根伸长抑制率的影响

从图 1 可以看出 ,Al³⁺ 处理大豆根 24 h ,铝对根伸长的影响非常明显 ,100 μmol/L 的低浓度 Al³⁺ 已能使根长受抑 其抑制率都超过 5% (分别为 5.74% 和 8.04%)。随着 Al³⁺ 浓度的升高 ,其根相对抑制率快速增大 ,400 μmol/L Al³⁺ 浓度时浙春 2 号和敏感品种华春 18 号根的伸长抑制率分别达到 19.87% 和 25.16%。这些结果表明经过 24 h 的 Al³⁺ 处理能对根伸长造成很大的抑制 暗示根伸长对铝是非常敏感的。

2.1.2 Al³⁺ 对大豆原位边缘细胞存活率的影响

如图 2 所示 ,不同 Al³⁺ 浓度处理两个大豆品种 ,其边缘细胞生物学活性都在 74% 以上 ,与各自的无 Al³⁺ 处理相比 ,Al³⁺ 显著降低两个大豆品种边缘细胞的活性 ($P < 0.05$)。在不同 Al³⁺ 浓度处理间 ,两品种的细胞活性随 Al³⁺ 浓度的变化有所不同 ,其表现为 :在低浓度 (0 ~ 100 μmol/L) Al³⁺ 处理下 ,两品种边缘细胞存活率都随着 Al³⁺ 浓度的升高而显著性的降低 ,但华春 18 号比浙春 2 号下降得更大 ,在 100 μmol/L Al³⁺ 浓度时分别下降了 3.50% 和 3.18%。当 Al³⁺ 浓度超过 100 μmol/L 后 ,Al³⁺ 对两大豆品种的细胞活性影响变化很大 ,浙春 2 号边缘细胞的活性呈现出先快速下降 ,之后变化趋于平缓的趋势 ,而华春 18 号边缘细胞的活性变化较浙春 2 号小。另外 ,在整个实验过程中 ,华春 18 号边缘细胞的活性始终低于浙春 2 号 ,但在低浓度 Al³⁺ 处理时这种作用更为明显 ,而当 Al³⁺ 浓度达到 200 μmol/L 以上 ,两个品种间的差异不明显 ,说明当 Al³⁺ 浓度达到某一个值后 ,两个品种边缘细胞存活率都受到了较大的抑制 ,都降低到了较低的水平 ,因而差异不明显 ,也说明不同品种对铝敏感性的差异是相对的。

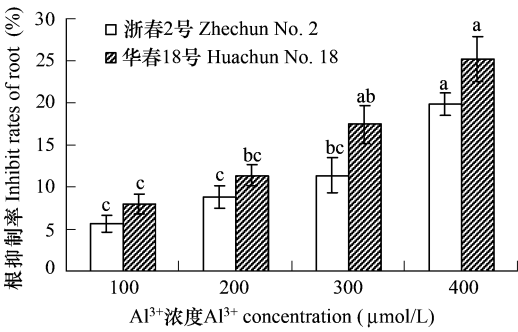


图 1 Al³⁺ 对大豆根伸长抑制率的影响

Fig. 1 Effect of Al³⁺ on the elongation inhibit rates of soybean root
误差线上字母为品种间 LSR 检验结果 ,不同字母间差异达到显著水平 ($P < 0.05$) ,下同

Data in the same column followed by different small letters indicate significant difference at 0.05 probability level by LSR test between two varieties ; the same below

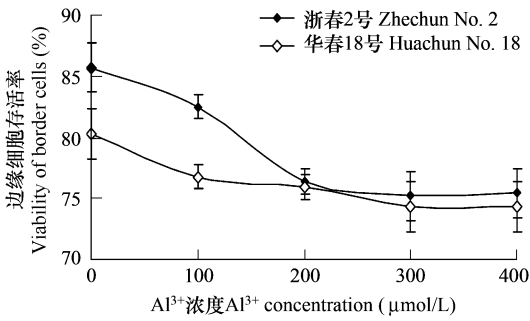


图 2 Al³⁺ 对附着于根尖边缘细胞活性的影响

Fig. 2 Effect of Al³⁺ on the viability of detached border cells in soybean

2.1.3 Al³⁺ 对大豆根尖细胞 PME 酶活性的影响

在 Al³⁺ 处理大豆发育过程中,检测了耐铝品种浙春 2 号和敏感品种华春 18 号的根尖 PME 活性变化,如图 3 所示。从图中可知,两个大豆品种处理 24 h 后,根冠 PME 活性随 Al³⁺ 浓度变化趋势大体一致。在不同浓度的铝溶液 (0、100、200、300、400 μmol/L Al³⁺) 处理下,加 Al³⁺ 和不加 Al³⁺ 处理间的 PME 活性变化差异显著 ($P < 0.05$),各浓度 Al³⁺ 处理都能使大豆根冠 PME 活性较不加 Al³⁺ 处理有显著性的增加。而有 Al³⁺ 处理的各根冠 PME 活性随着 Al³⁺ 浓度的升高,有缓慢的先升高后下降的趋势。同 Al³⁺ 浓度处理条件下,敏感品种的 PME 活性都高于耐性品种。这些结果表明,PME 活性与大豆根尖 Al 毒的敏感性存在一定的相关性,敏感品种根尖 PME 活性对 Al³⁺ 非常敏感,而耐性品种则不敏感。

2.2 Al³⁺ 对大豆离体边缘细胞存活率的影响

大多数植物的边缘细胞从根尖脱离后仍能存活一段时间,通过大豆离体边缘细胞随 Al³⁺ 浓度、处理时间的存活率变化,可以明确 Al³⁺ 对单个边缘细胞的毒害效应 (图 4、图 5)。

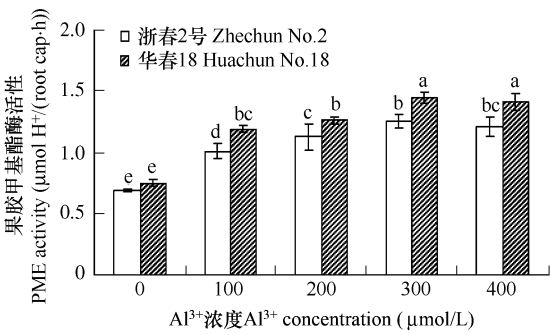


图 3 Al³⁺ 对大豆根尖 PME 活性的影响

Fig. 3 Effect of Al³⁺ on PME activities of soybean root tip

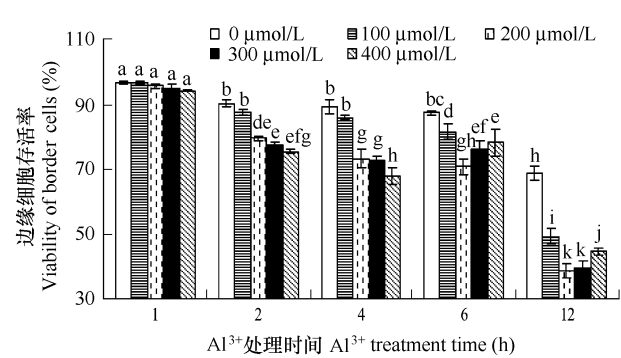


图 4 浙春 2 号离体边缘细胞存活率随 Al³⁺ 浓度、时间的变化规律

Fig. 4 The change of Zhechun No. 2 root border cells in vitro with Al³⁺ concentration and time

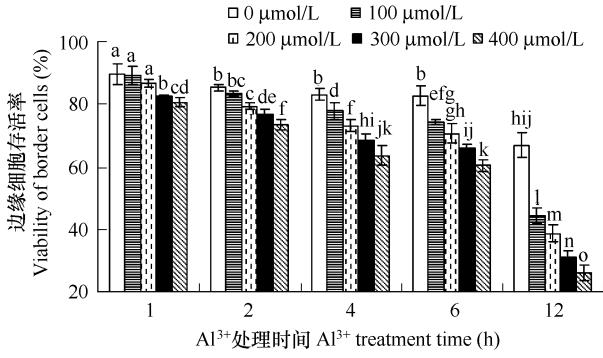


图 5 华春 18 号离体边缘细胞存活率随 Al³⁺ 浓度、时间的变化规律

Fig. 5 The change of Huachun No. 18 root border cells in vitro with Al³⁺ concentration and time

从图中可以看出,随着 Al³⁺ 处理时间的延长,边缘细胞的存活率均有下降的趋势。Al³⁺ 处理前 1~6 h,边缘细胞存活率缓慢下降,12 h 后则下降非常明显,都下降了 43% 以上 (对照无 Al³⁺ 处理为下降 28% 左右)。不同 Al³⁺ 浓度对大豆离体边缘细胞存活率的影响也较为明显,主要表现为:与对照相比,各 Al³⁺ 浓度在处理 1 h (除 300、400 μmol/L Al³⁺ 处理敏感的华春 18 号外)时变化不大,在 100 μmol/L 的 Al³⁺ 中,处理 2、4、6 h 时也变化较缓慢,直到处理 12 h 后活性下降出现极显著水平 ($P < 0.01$),活性只有 45% 左右,而 200 μmol/L 以上浓度的 Al³⁺ 处理仅 2 h 边缘细胞的活性就有很大的变化,并随着 Al³⁺ 浓度的升高,其活性也相应地升高或下降,当 400 μmol/L Al³⁺ 处理 12 h,浙春 2 号和华春 18 号边缘细胞的活性分别只有 44.58% 和 26.16%。说明 Al³⁺ 浓度与离体边缘细胞的活性相关。

就品种间而言,浙春 2 号在 Al³⁺ 处理前 4 h,随着 Al³⁺ 浓度的升高其活性降低,培养 6 h 及之后 0~200 μmol/L Al³⁺ 浓度时活性与 Al³⁺ 浓度保持呈负向变化,而 200~400 μmol/L 时则活性与 Al³⁺ 浓度呈正向变化,原因可能是边缘细胞对 200 μmol/L 之后的 Al³⁺ 浓度作用做出了响应,如分泌或新合成更多的黏液以抵抗 Al

毒。在整个处理时间段内,华春 18 号离体边缘细胞活性都随着 Al^{3+} 浓度的升高而降低。同处理浓度和时间下,浙春 2 号离体边缘细胞的存活率普遍稍高于华春 18 号。

2.3 对边缘细胞黏液层厚度的影响

很多研究表明,边缘细胞具有多种抗 Al 毒机制,而其分泌黏液抵抗 Al 毒是最重要的机理之一^[12,13],为研究大豆离体边缘细胞对 Al 毒的响应,通过墨汁染色后对黏液层厚度随时间变化的比较研究,观察了 Al^{3+} 处理离体边缘细胞 6 h 后黏液层厚度的变化情况(图 6 ~ 图 8)。从图中可看出边缘细胞外围有一层明显的黏液层,其厚度在不同的 Al^{3+} 浓度处理下变化较大。与无 Al^{3+} 处理相比,100 $\mu\text{mol/L}$ 的 Al^{3+} 浓度就足以刺激边缘细胞分泌较多的黏液,增厚差异显著($P < 0.05$)。两个大豆品种离体边缘细胞黏液层厚度都随着 Al^{3+} 浓度的增加而成正向增厚,即 400 $\mu\text{mol/L}$ Al^{3+} 处理时黏液层厚度达到最大值(图 8)。铝敏感的华春 18 号在有 Al^{3+} 和无 Al^{3+} 处理间差异性显著,而在低 Al^{3+} 浓度时,即 100 ~ 300 $\mu\text{mol/L}$ Al^{3+} 处理间无显著差异($P > 0.05$)。相比较而言,铝耐性的浙春 2 号加 Al^{3+} 与不加 Al^{3+} 处理的黏液层厚度差异在 6 h 后达到了极显著水平($P < 0.01$)。2 个品种间的差异在较大 Al^{3+} 浓度(300、400 $\mu\text{mol/L}$)时差异也极为明显。表明离体边缘细胞在 Al^{3+} 处理后能做出应激性反应,通过分泌较多的黏液来整合 Al^{3+} ,保护根尖免受 Al 毒害。

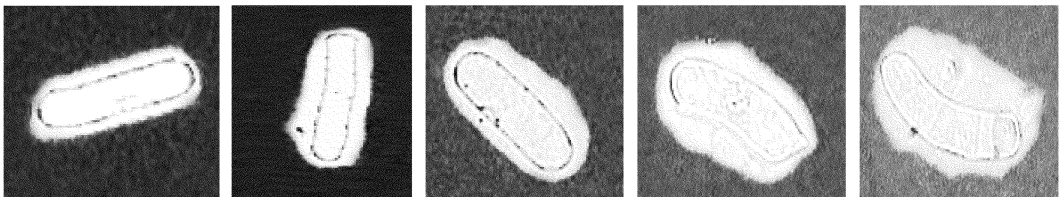


图 6 浙春 2 号离体边缘细胞在不同 Al^{3+} 浓度(0、100、200、300、400 $\mu\text{mol/L}$)下处理 6 h 后的黏液层厚度
Fig. 6 Exudation of mucilage around detached Zhuchun No. 2 border cells exposed to 0, 100, 200, 300, 400 $\mu\text{mol/L}$ Al^{3+}

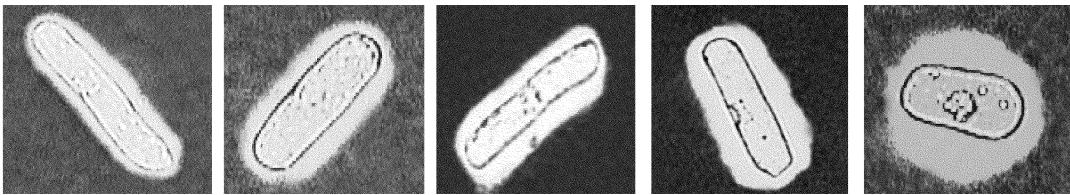


图 7 华春 18 号离体边缘细胞在不同 Al^{3+} 浓度(0、100、200、300、400 $\mu\text{mol/L}$)下处理 6 h 后的黏液层厚度
Fig. 7 Exudation of mucilage around detached Huachun No. 18 border cells exposed to 0, 100, 200, 300, 400 $\mu\text{mol/L}$ Al^{3+}

5 讨论

边缘细胞的释放是由于根冠周围细胞间的相互联结破坏,产生具完整细胞壁的单细胞,其在水溶性粘胶层中松散地与根冠相连,直到由于水的轻轻搅动或机械性磨擦而脱离下来^[25,26]。边缘细胞从根尖脱离后,能够自主进行新陈代谢,在遭受逆境(如 Al 毒、病害等)时做出反应,形成一个独立的胞际空间^[10,11]。通过 Al^{3+} 对附着于大豆根尖边缘细胞的存活率、PME 活性和根伸长抑制率随 Al^{3+} 浓度的变化以及离体后的边缘细胞存活率、单个细胞黏液层厚度的变化研究,得出大豆边缘细胞对 Al 毒的反应表现在以下几个方面:第一是不同 Al^{3+} 浓度及作用时间对边缘细胞活性影响不同。边缘细胞与 Al^{3+} 液共培养时,随着 Al^{3+} 浓度和处

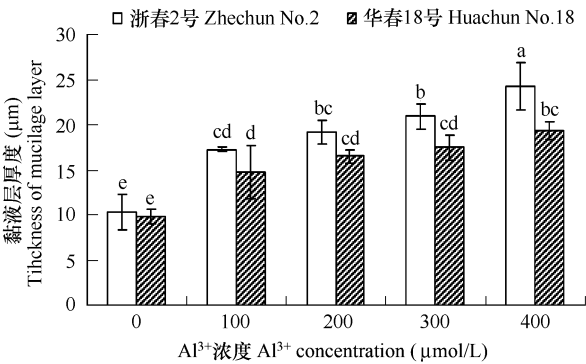


图 8 不同 Al^{3+} 浓度对浙春 2 号和华春 18 号边缘细胞黏液层厚度的影响
Fig. 8 Influence of Al^{3+} on thickness of mucilage around detached root border cells of Zhechun No. 2 and Huachun No. 18

理时间的延长活性越来越低。而不同 Al^{3+} 浓度对耐性品种浙春 2 号离体边缘细胞的毒害,处理 6 h 后,高浓度 Al^{3+} ($\geq 200 \mu\text{mol/L}$ Al^{3+})有利于边缘细胞的存活,可能是边缘细胞对 $200 \mu\text{mol/L}$ 之后的 Al^{3+} 浓度作用作出了响应,如分泌或新合成更多的黏液以抵抗 Al 毒,同时也说明 Al 毒对边缘细胞有致死效应,而这种致死效应在一定范围内是属于剂量依数性变化的。

其次,当 Al^{3+} 处理原位边缘细胞 24 h 后,在不同 Al^{3+} 浓度下其成活率都能达到 74% 以上,而离体培养的边缘细胞 Al^{3+} 处理 12 h 其活性已较低,在 $400 \mu\text{mol/L}$ 时浙春 2 号和华春 18 号分别只有 44.58% 和 26.16% 的细胞存活。这有几种可能的解释:(1)由于离开根尖后,边缘细胞周围的黏液很容易被稀释,其中和 Al 毒的作用力下降,边缘细胞易受到铝的毒害^[10,23,27],而附着于根尖的边缘细胞受到了高浓度黏液的保护,黏液中和了 Al 毒,保护了根尖和附着在其上的边缘细胞。(2)较高的渗透压有利于保持边缘细胞的活性^[27]。在溶液中,由于渗透压极低,离体收集的边缘细胞易失去活性,而附着在根尖的边缘细胞,由于黏液层高度浓缩,使其具有更高的渗透压,有利于边缘细胞的存活。

另外,Al 毒可以促进大豆根冠细胞 PME 活性。目前大多认为铝最主要的结合位点是细胞壁上的果胶层,只有少量结合于细胞壁的其他成份。研究表明,附着于根尖的边缘细胞可以影响边缘细胞 PME 基因 1 (*rcpme1*)等编码 PME 酶的基因表达,其在调控根冠细胞分裂、细胞壁松弛、根冠的扩大及降解方面起着很重要的作用^[28,29~32]。本试验中 PME 活性检测表明, Al^{3+} 可以提高大豆根尖细胞 PME 活性,用各浓度 Al^{3+} 处理 24 h 时都能使两个品种的 PME 活性较对照有显著性的增加,并随着 Al^{3+} 浓度的增大,PME 活性先升高后又有所下降。推测其可能的原因是:低浓度铝使边缘细胞微团化,不能从根尖脱落,高浓度铝则使边缘细胞聚集成团并紧紧黏附在根尖上,这影响了 *rcpme1* 的转录活性。*rcpme1* 表达,果胶甲基酯酶(PME)活性增加,果胶去甲基,释放出更多的 H^+ ,增加了铝结合位点,从而产生 Al 毒害,并最终导致根伸长被抑制。正如本实验中根伸长抑制率检测结果, $100 \mu\text{mol/L}$ Al^{3+} 处理 24 h 已对大豆根系伸长产生显著的抑制作用,并随着铝浓度的升高抑制程度加剧。另一方面,由于果胶去甲基,细胞壁的果胶层降解,边缘细胞及其黏液增多,能够阻止铝结合到根冠、根边缘细胞和根部黏液上。果胶的甲基化程度越高,细胞对 Al 毒的耐性越强^[9],Schmol 等^[33]研究采用果胶甲基酯酶处理玉米悬浮细胞时,降低了细胞壁果胶甲基酯化程度,而导致细胞壁对铝吸附总量和交换性铝含量以及细胞对铝的敏感性提高。在本实验中,敏感性品种的 PME 活性始终高于耐性品种,这正说明了根尖细胞壁 PME 活性越高,果胶甲基化程度越低,铝积累越多^[33]。也暗示了 PME 活性在植物 Al 毒敏感性中具有十分重要的作用。

最后,边缘细胞离体后能向外分泌黏液形成一层较厚的黏液层,并使边缘细胞聚集成团,有 Al^{3+} 与无 Al^{3+} 处理在两个品种间的差异都达到显著性水平 ($P < 0.05$)。同时, Al^{3+} 液浓度越高,黏液层越厚,黏液层的厚度与 Al^{3+} 的剂量成正向变化,说明 Al^{3+} 能诱导、刺激离体的边缘细胞黏液的产生与分泌,通过分泌的黏液来固定 Al^{3+} ,并将 Al^{3+} 阻止在根外,从而减少铝对根系的毒害作用^[34,35]。根边缘细胞黏液层厚度不同,中和 Al 毒的能力也不同。这与 Miyasaka 等^[10]、Zhu 等^[11]和冯英明等^[13]的研究结果相一致。Iijima 等^[36,37]的研究也报道了边缘细胞及其分泌的黏液层不仅能够减少根在土壤中生长的阻力,而且也是某些物种中的一种抗 Al 毒机制。本实验进一步确证了黏液层在保护和减轻边缘细胞 Al 毒害中的作用。

综上所述, Al^{3+} 对大豆边缘细胞的影响较大,能抑制细胞分裂、伸长,引起细胞畸变,还会使细胞活性下降,PME 活性升高,根伸长严重受抑。同时 Al^{3+} 胁迫下边缘细胞能通过黏液的产生与分泌来抵御 Al 毒害。因此,可以通过根边缘细胞和各种根际微生物以及有毒物质(如 Al 毒)间的相互作用,来探讨根际的变化,从而运用于实际生产中。

References :

[1] Zhou R. A progress of studies on Al tolerance and genetic modification of peanut. J. Peanut Sci., 2003, 32 (sup): 144—148.
[2] Kochian L V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 1995, 46: 237—

260.

[3] Matsumoto H. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* ,2000 ,200 :41 —46.

[4] Samac D A ,Tesfaye M. Plant improvement for tolerance to aluminum in acid soils-a review. *Plant Cell Tiss. Org.* ,2003 ,75 :189 —207.

[5] Clarkson D T. Aluminum tolerance in species within the genus *Agnostics*. *J. Ecol.* ,1966 ,54 :167 —178.

[6] Barceló J ,Poschenrieder C ,Vázquez M D ,*et al.* Aluminium phytotoxicity :a challenge for plant scientists. *Fertil. Res.* ,1996 ,43 :217 —223.

[7] Barceló J ,Poschenrieder C. Fast root growth responses ,root exudates ,and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminum toxicity and resistance :a review. *Environ. Exp. Bot.* ,2002 ,48 :75 —92.

[8] Kochian L V ,Hoeckenga O A ,Piñeros M A. How do crop plants tolerate acid soils ?Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorus efficiency. *Annu. Rev. Plant Biol.* ,2004 ,55 :459 —493.

[9] Yamamoto Y ,Kobayashi Y ,Matsumoto H. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum ,but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiol.* ,2001 ,125 :199 —208.

[10] Miyasaka S C ,Hawes M C. Possible role of root border cells in detection and avoidance of aluminum toxicity. *Plant Physiol.* ,2001 ,125 :1978 —1987.

[11] Zhu M Y ,Ahn S ,Matsumoto H. Inhibition of growth and development of root border cells in wheat by Al. *Physiol. Plant* ,2003 ,117 :359 —367.

[12] Hawes M C ,Gunawardena U ,Miyasaka S C ,*et al.* The role of root border cells in plant defense. *Trends Plant Sci.* ,2000 ,5 (3) :128 —133.

[13] Feng Y M ,Yu M ,Wen H Y ,*et al.* Influence of Al on cell viability and mucilage of root border cells of pea (*Pisum sativum*). *Ecol. Environ.* ,2005 ,14 (5) :695 —699.

[14] Cai W C ,Liu P ,Xu G D ,*et al.* Effect of aluminum stress on root border cells of Mung Bean. *Hubei Agr. Sci.* ,2006 ,45 (2) :180 —182.

[15] Qi W G ,Liu P ,Xu G D ,*et al.* Aluminum toxicity to root border cells of rice. *Henan Agr. Sci.* ,2006 ,45 (2) :180 —182.

[16] Sun D L ,Cui J C ,Xu G D ,*et al.* Biological characters of tomato root border cell and effect of aluminum on its activity. *Subtropical Plant Sci.* ,2006 ,35 (2) :1 —4.

[17] Du X ,Liu P ,Xu G D ,*et al.* Response of root border cell in red cowpea to aluminum stress. *Plant Nutr Fert Sci* ,2006 ,12 (5) :722 —726

[18] Zhou ,Chen W R ,Liu P ,*et al.* Biological characteristic and the response to aluminum toxicity of cucumber border cells. *Acta Hort Sin* ,2006 ,33 (5) :1117 —1120

[19] Schmohl N ,Horst W J. Cell wall pectin content modulates aluminum sensitivity of *Zea mays* (L.) cells grown in suspension culture. *Plan Cell Environ.* ,2000 ,23 :735 —742.

[20] Wagatsuma T ,Ezoe Y. Effect of pH on ionic species of aluminum in medium and on aluminum toxicity under solution culture. *Soil sci. plant nutr.* ,1985 ,31 (4) :547 —561.

[21] Hu L ,Ying X F ,Liu P ,*et al.* Effects of aluminum toxicity on agronomic traits in three soybean cultures. *Zhejiang Agr. Sci.* ,2004 ,3 :148 —150.

[22] Ying X F ,Liu P ,Xu G D ,*et al.* Screening of soybean genotypes with tolerance to aluminum toxicity and study of the screening indices. *Chinese J. Oil Crop Sci.* ,27 (1) :46 —51.

[23] Pan J W ,Zhu M Y ,Chen H. Aluminum induced cell death in root tips of barley. *Environ. Exp. Bot.* ,2001 ,46 :71 —79.

[24] Richards C K ,Qin L K ,Gadal P ,*et al.* Molecular cloning and characterization of a putative pectin methylesterase cDNA in *Arabidopsis thaliana* (L.). *FEBS Letters* ,1994 ,355 :135 —139.

[25] Hawes M C ,Brigham L A. Impact of root border cells on microbial populations in the rhizosphere. *Adv.Plant Pathol.* ,1992 ,8 :119 —148.

[26] Brigham L A ,Woo H H ,Hawes M C. Differential expression of proteins and mRNAs from border cells and root tips of pea. *Plant Physiol.* ,1995 ,109 :457 —463.

[27] Pan J W ,Zhu M Y ,Chen H ,*et al.* Inhibition of cell growth caused by aluminum toxicity results from aluminum-induced cell death in barley suspension cells. *Plant Nutr* ,2002 ,25 (5) :1063 —1073.

[28] Stephenson M ,Hawes M C. Correlation of pectin methylesterase activity in root caps of pea with root border cell separation. *Plant Physiol.* ,1994 ,106 :739 —745.

[29] Woo H H ,Hawes M C. Cloning of genes whose expression is correlate with mitosis and localized in dividing cells in root cap of *Pisum sativum* L.

Plant Mol Biol. ,1997 ,35 :1045 — 1051.

[30] Woo H H. Meristem-localized inducible expression of a UDP-glycosyltransferase gene is essential for plant growth and development in pea and alfalfa. Plant Cell ,1999 ,11 :2303 — 2315.

[31] Brigham L A. Meristem-specific suppression of mitosis and a global switch in gene expression in the root cap of pea by endogenous signals. Plant Physiol. ,1998 ,118 :1223 — 1231.

[32] Wen F S ,Zhu Y M ,Hawes M C. Effect of pectin methylesterase gene expression on pea root development. Plant Cell ,1999 ,11 :1129 — 1140.

[33] Schmohl N ,Pilling J ,Fisahn J ,Horst W J. Pectin methylesterase modulates aluminum sensitivity in *Zea mays* and *Solanum tuberosum*. Physiol. Plant. ,2000 ,109 :419 — 427.

[34] Travis S W ,Harsh P B ,Erich G ,et al. Root exudation and rhizosphere biology. Plant Physiol. ,2003 ,132 :44 — 51.

[35] Brigham L A ,Hawes M C ,Miyasaka S C. Avoidance of aluminium toxicity :Roles of root border cells. In :Horst W J ,et al. Plant Nutrition :Food security and sustainability of agro-ecosystems through basic and applied research-proceeding of the 14th International Plant Nutrition Colloquium , July 28th to August 3rd ,Hannover ,Germany. Kluwer Academic Publishers ,Dordrecht ,The Netherlands ,2001. 452 — 453.

[36] Iijima M ,Higuchi T ,Barlow B W ,et al. Root cap removal increases root penetration resistance in maize (*Zea mays*). J. Exp. Bot. ,2003 ,54 :2105 — 2109.

[37] Iijima M ,Higuchi T ,Barlow P W. Contribution of root cap mucilage and presence of an intact root cap in maize (*Zea mays*) to the reduction of soil mechanical impedance. Ann. Bot-London ,2004 ,94 :473 — 477.

参考文献：

[1] 周蓉. 花生耐铝性及遗传改良研究进展. 花生学报 ,2003 ,32 (增刊) :144 ~ 148.

[13] 冯英明,喻敏,温海洋,等. Al^{3+} 对豌豆根边缘细胞存活率和粘胶层厚度的影响. 生态环境 ,2005 ,14 (5) :695 ~ 699.

[14] 蔡文春,刘鹏,徐根娣,等. 铝胁迫对绿豆根边缘细胞的影响. 湖北农业科学 ,2006 ,45 (2) :180 ~ 182.

[15] 戚伟刚,刘鹏,徐根娣,等. 铝毒对水稻边缘细胞的影响. 河南农业科学 ,2006 , (3) :22 ~ 24.

[16] 孙达丽,崔洁晨,徐根娣,等. 番茄根边缘细胞生物学特性及铝对其活性的影响. 亚热带植物科学 ,2006 ,35 (2) :1 ~ 4.

[17] 杜幸,刘鹏,徐根娣,等. 红豇豆根边缘细胞对铝胁迫的响应. 植物营养与肥料学报 ,2006 ,12 (5) :722 ~ 726

[18] 周楠,陈文荣,刘鹏,等. 黄瓜边缘细胞生物学特性及其对铝的响应. 园艺学报 ,2006 ,33 (5) :1117 ~ 1120

[21] 胡蕾,应小芳,刘鹏,等. 铝毒对大豆农艺性状的影响. 浙江农业科学 ,2004 ,3 :148 ~ 150.

[22] 应小芳,刘鹏,徐根娣,等. 大豆耐铝毒基因型筛选及筛选指标的研究. 中国油料作物学报 ,2005 ,27 (1) :46 ~ 51.