

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.04.005

吴柳杰,张永先,凌桂芝,等. 铝胁迫下黑麦和小麦根尖分泌有机酸的研究[J]. 广西植物,2014,34(4):455–459

Wu LJ,Zhang YX,Ling GZ,et al. Secretion of organic acids from root apices under Al stress in rye and wheat[J]. *Guihaia*,2014,34(4):455–459

铝胁迫下黑麦和小麦根尖分泌有机酸的研究

吴柳杰,张永先,凌桂芝*,黎晓峰

(广西大学农学院,南宁 530005)

摘要: 通过建立的活体根培养及微量根尖分泌物收集系统,对铝胁迫下黑麦和小麦根尖分泌的有机酸进行研究。结果表明:50、100、200、300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AlCl_3 处理后黑麦根尖分泌柠檬酸和苹果酸,而铝仅诱导小麦根尖分泌苹果酸。铝处理 3 h 后,根尖分泌的苹果酸显著增加,并在 9 h 内维持较高的分泌速率。铝诱导黑麦根尖分泌柠檬酸有明显的迟缓期, $\text{Al}(300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ 处理后的最初 3 h,根尖分泌的柠檬酸并不显著增加。在铝溶液中添加的阴离子通道抑制剂 A-9-C(20、60、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 显著抑制根尖分泌有机酸。然而,将黑麦根尖浸泡于含异三聚体 G 蛋白激活剂霍乱毒素(50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 后,根尖分泌的有机酸显著增加。说明建立的微量根尖分泌物收集系统适合于铝诱导根尖分泌有机酸的研究,小麦和黑麦根尖在铝胁迫下以不同模式通过阴离子通道分泌有机酸,而异三聚体 G 蛋白可能介导根尖分泌有机酸。

关键词: 铝; 根尖; 有机酸; 分泌

中图分类号: Q945.78 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2014)04-0455-05

Secretion of organic acids from root apices under Al stress in rye and wheat

WU Liu-Jie, ZHANG Yong-Xian, LING Gui-Zhi*, LI Xiao-Feng

(College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: Secretion of organic acids from roots apices in rye and wheat were investigated by a system for *in vivo* root apex culture and micro-exudates collection, to elucidate the mechanisms for Al-induced secretion of organic acids. The results showed that Al (50, 100, 200, 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AlCl_3) induced secretion of citrate and malate from rye root apices, while wheat root apices secreted malate alone in response to Al treatment. Malate was significantly secreted from root apices of rye and wheat after the treatment with Al for 3 h, and malate was secreted with a high secretion rate within 9 h treatment. There was a lag between the secretion of citrate and Al treatment in rye. At initial 3 h, Al failed to induce significantly secretion of citrate. On the other hand, the addition of anion channel inhibitor A-9-C (20, 60, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) to Al solution, the secretion of organic acids was significantly inhibited. However, the amount of organic acids secreted elevated significantly after the exposure of root apices to Al solution with heterotrimeric G-protein agonist cholera toxin (50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$). These results suggested that our system for *in vivo* root apex culture and micro-exudates collection was a available tool for the studies on Al-induced secretion of organic acids, and organic acids were secreted from root apices of rye and wheat by anion channels in different patterns, while heterotrimeric G-protein may mediate the secretion of organic acids from root apices.

Key words: Aluminum; root apex; organic acids; secretion

收稿日期: 2014-01-28 修回日期: 2014-03-09

基金项目: 国家自然科学基金(30771287, 3126070497)

作者简介: 吴柳杰(1990-), 女(侗族), 广西三江人, 硕士研究生, 研究方向为植物营养与环境生态, (E-mail)526551612@qq.com.

*通讯作者: 凌桂芝, 硕士, 实验师, 从事逆境植物学研究, (E-mail)lgz515@126.com.

过多的铝离子是酸性土壤中植物生长的主要障碍因子(Foy,1988)。根伸长受阻是植物对铝毒害原初反应(Delhaize *et al.*,1993a;Ma,2000)。伴随着根系生长受阻,铝也抑制植物对养分和水分的吸收,进而导致地上部生长受阻,产量下降。在长期的进化过程中一些植物逐渐形成了适应酸性土壤环境的机制。这些机制可分为两种不同的类型,即排铝机制和内部耐铝机制(Taylor,1991;Kochian,1995)。一些耐铝植物种类或品种在铝胁迫下分泌的有机酸能与铝螯合形成毒性较低的有机化合物,从而解除铝的毒害(Ma,2000;Li *et al.*,2000,2009)。因此,铝诱导根尖分泌有机酸被认为是一种重要的排铝机制(Ma,2000;Kochian *et al.*,2005)。这些有机酸是铝胁迫的专一性反应,主要从根尖离子通道蛋白分泌并受有机酸代谢及有机酸转运子基因及转录因子所调控(Delhaize *et al.*,1993b,2012;Ding *et al.*,2014;Li *et al.*,2000,2009;Sun *et al.*,2014;Yang *et al.*,2000)。

有机酸分泌特性及相关机制的研究多采用根系或离体根尖为材料,人们对根尖在铝胁迫下分泌有机酸机制的认识还不充分。因此,本研究自主设计了幼苗培养及活体根尖分泌物收集的微型装置,研究了铝胁迫下黑麦和小麦活体根尖分泌有机酸的特点,旨在为铝诱导根尖有机酸分泌的研究提供理论依据和技术支撑。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

供试的黑麦品种为 King(*Secale cereale* cv. King),小麦品种为 ET-8(*Triticum aestivum*)。

1.2 植株培养

1.2.1 根尖培养及有机酸分泌物收集系统 幼苗培养及活体根尖分泌物收集的微型装置由根尖室(A室,10 mm×50 mm)、隔离室(B室,10 mm×50 mm)和保护室(C室,120 mm×50 mm)组成(图1)。幼根经 A、B、C 室间的卡槽平置于装置中,其中根尖(0~10 mm)置于 A 室,根基端置于 C 室。B 室注 3% 的琼脂(40 ℃),在供试根摆好根尖后注入以固定根系并阻隔 A、C 室溶液。琼脂凝固后,分别在 A、C 加入处理溶液和氯化钙溶液(0.5 mmol·L⁻¹,pH4.5)。在装置上方用湿润的滤纸覆盖以避免处理溶液挥发。

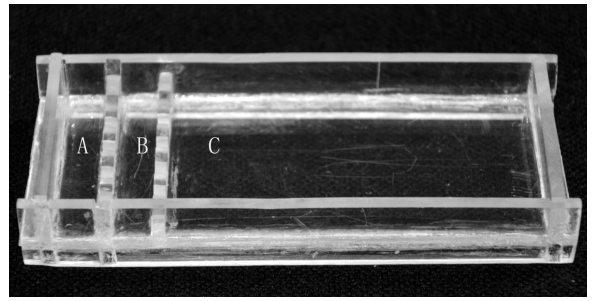


图 1 活体根尖培养及其分泌物微量收集系统
Fig. 1 The system for *in vivo* root apex culture and micro-exudates collection

1.2.2 供试植物培养 参照 Li *et al.*(2000)的方法培养幼苗。每日的光照与黑暗培养时间分别为 10 和 14 h,对应温度分别为 25 ℃ 和 20 ℃。3 日龄幼苗为供试材料。

1.3 根尖分泌物的收集及处理方案

分别将小麦、黑麦根尖置于上述装置中,在 A 室加入含 0.5 mmol·L⁻¹ 氯化钙的处理溶液 1.0 mL。各处理均设 3 个重复。处理结束后,以移液器收集处理溶液于离心管中,在 10 000×g 离心力下离心,取上清液测定其中有机酸。

0、50、100、200、300 μmol·L⁻¹ AlCl₃ 溶液,处理 6 h;0、100 μmol·L⁻¹ AlCl₃ 溶液,处理 9 h,期间每 3 h 收集一次根尖分泌物,每次收集后立刻加入相同处理溶液,直至试验结束;0、20、60、100 μmol·L⁻¹ 9-A-C(阴离子通道抑制剂)溶液(含 100 μmol·L⁻¹ AlCl₃);300 μmol·L⁻¹ AlCl₃(Control),300 μmol·L⁻¹ AlCl₃ 含 50 ng·mL⁻¹ 霍乱毒素(CTX)及 100 μmol·L⁻¹ 9-A-C(CTX+9-A-C)。

1.4 有机酸的测定

根尖分泌的苹果酸和柠檬酸采用酶动力学-分光光度法测定(Li *et al.*,2000)。

1.5 数据处理与分析

试验数据采用 Duncan 新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

采用本研究建立的系统,成功收集黑麦和小麦在铝胁迫下根尖分泌的有机酸(图 2、图 3)。虽然铝并不能诱导小麦根尖分泌柠檬酸,但铝胁迫下根尖分泌的苹果酸显著增加。50 μmol·L⁻¹ AlCl₃ 处理 6

h 后, 小麦根尖分泌的苹果酸为 $(0.17 \pm 0.03) \text{ nmol} \cdot \text{apex}^{-1}$, 是对照处理 $[0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{AlCl}_3, (0.10 \pm 0.03) \text{ nmol} \cdot \text{apex}^{-1}]$ 的 1.7 倍。当 AlCl_3 处理浓度增加至 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 苹果酸分泌量达到 $(0.69 \pm 0.12) \text{ nmol} \cdot \text{apex}^{-1}$, 是对照处理的 6.9 倍。然而, 铝处理浓度高于 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 小麦根尖分泌的苹果酸并不进一步增加。

铝能诱导黑麦根尖分泌苹果酸和柠檬酸(图 3)。铝胁迫下黑麦根尖大量分泌苹果酸, 且分泌量随着铝处理浓度的升高而升高。50、100、200、300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AlCl_3 处理后, 苹果酸的分泌量分别为 $\text{Al}(0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{AlCl}_3, \text{对照})$ 处理的 5.6、8.9、46.3、74.2 倍。50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{AlCl}_3$ 的处理黑麦根尖即显著分泌柠檬酸, 其分泌量是对照的 2.8 倍。但铝浓度高于 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的处理柠檬酸分泌量的增加不显著。

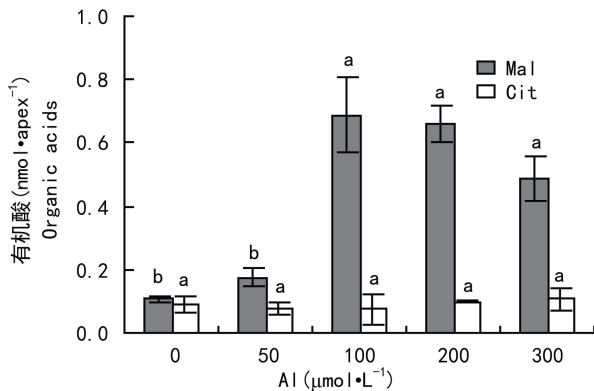


图 2 铝(Al)诱导小麦根尖分泌有机酸 误差线代表±标准误, 同种有机酸的小写字母表示差异显著, $P < 0.05$, 下同。
Fig. 2 Al-induced organic acids secretion from wheat root apices Vertical bars represent \pm SD ($n=3$). Lowercase letters mean significant difference, $P < 0.05$. The same below.

不同铝处理时间小麦根尖苹果酸分泌率有明显差异(图 4)。铝处理后的最初 3 h, 小麦根尖苹果酸分泌速率达对照的 8 倍。随着铝处理时间的延长, 苹果酸分泌率呈上升趋势, 但 9 h 后分泌速率明显放缓, 但在铝处理后的 6~9 h, 苹果酸的分泌速率依然达 0~3 h 的 4.4 倍。在铝处理后的 9~18 h, 苹果酸持续分泌。这些结果说明小麦根尖以模式 I 分泌有机酸。

铝对黑麦根尖分泌柠檬酸和苹果酸的诱导过程明显不同(图 5)。与小麦根尖苹果酸分泌模式相似, 在铝处理后最初 3 h, 根尖分泌的苹果酸约为对照的 7 倍。但是, 在开始铝处理的前 3 h, 柠檬酸分

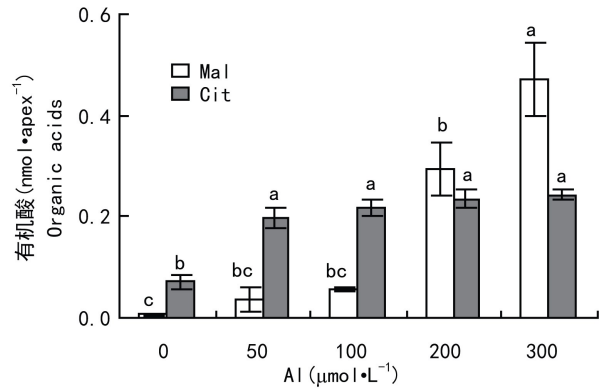


图 3 铝诱导黑麦根尖分泌有机酸
Fig. 3 Al-induced organic acids secretion from rye root apices

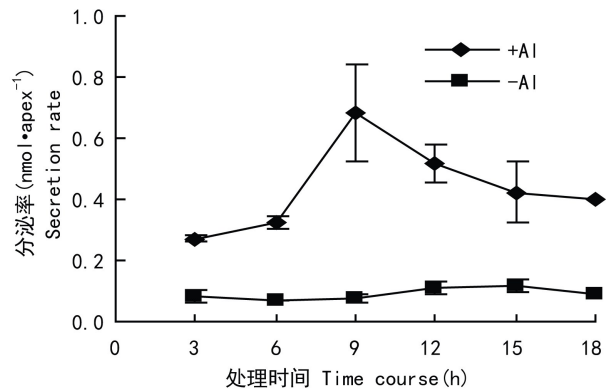


图 4 小麦根尖分泌苹果酸的历程
Fig. 4 Time course of malate secretion from wheat root apices under Al treatment

泌率与对照处理间的差异不显著。但随着铝处理时间的延长, 柠檬酸分泌量均呈上升趋势。这些结果说明黑麦根尖以模式 II 分泌柠檬酸。

A-9-C 为阴离子通道抑制剂。采用 20、60、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A-9-C 处理后, 小麦根尖分泌的苹果酸被显著抑制(图 6)。虽然 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A-9-C 对铝诱导黑麦根尖柠檬酸分泌的抑制不显著, 但显著抑制苹果酸分泌。A-9-C 处理浓度增至 60、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后, 黑麦根尖柠檬酸和苹果酸分泌量分别相当于对照处理的 46%、30% 和 33% 和 34%。这说明阴离子通道是根尖分泌有机酸的有效途径。

霍乱毒素(CTX)是异三聚体 G 蛋白的激活剂。在铝处理溶液中加入 50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 CTX 后, 黑麦根尖有机酸分泌量显著增加($P < 0.05$)(图 7)。然而, 在溶液中添加 A-9-C 后, 有机酸的分泌显著受阻, 说明阴离子通道也介导铝胁迫下 CTX 诱导的有机酸分泌。

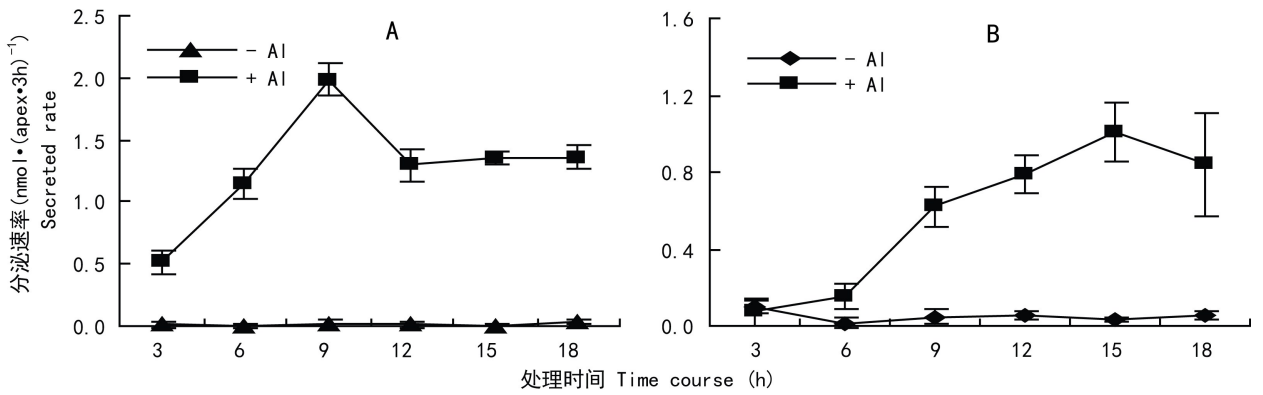


图5 黑麦根尖分泌有机酸的历程

Fig. 5 Time course of malate (A) and citrate (B) secretion from wheat root apices under Al treatment

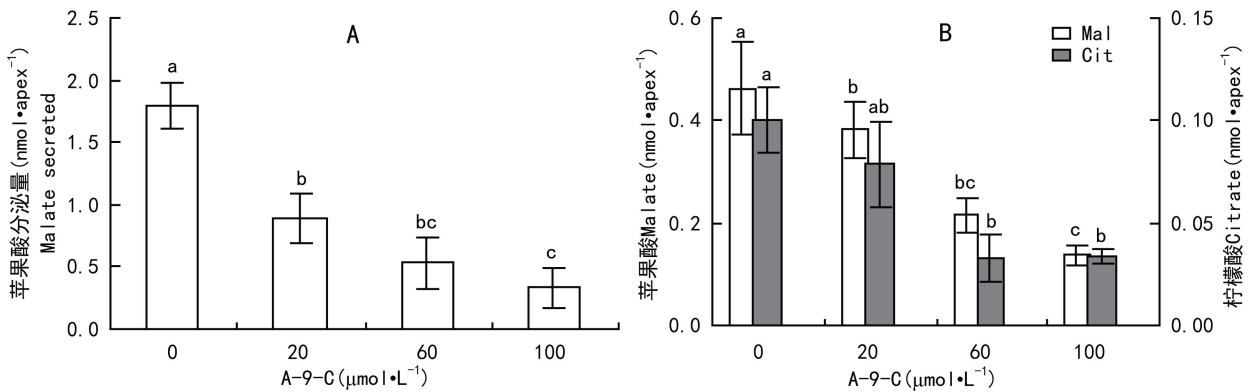


图6 A-9-C对铝诱导的小麦(A)和黑麦(B)根尖有机酸分泌的影响

Fig. 6 Effect of A-9-C on Al-induced organic acids secretion from root apices of wheat(A) and rye (B)

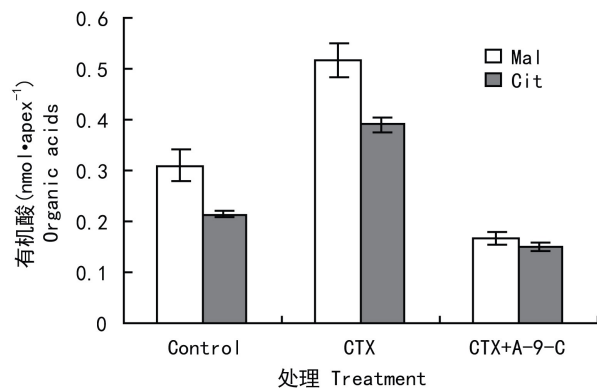


图7 霍乱毒素对铝诱导黑麦根尖分泌有机酸的影响

Fig. 7 Effect of cholera toxin on Al-induced secretion of organic acids from root apices of rye

域,分泌物的收集是开展相关研究的前提。铝胁迫下根系分泌物的研究方法主要采用根系收集法和离体根收集法。根系收集法采用大容量(1~5 L)培养杯培养植株,形成大量根系后进行铝处理并收集根系分泌物进行研究。该方法有明显不足处,包括①操作步骤繁多,培养时间长(12~20 d),培养条件较难控制,研究结果的重现性较差;②只适合于根系分泌物的研究,难以开展根尖分泌物的研究;③处理液体积大,研究成本高,药品用量大,不适用价格昂贵的药理学研究。离体根尖收集法虽然可收集根尖分泌物,但供试材料为离体根尖,活性较低,研究结果不一定反映活体植株的真实状况,且切口渗液也干扰研究结果。

本研究建立了基于活体根尖分泌物研究的植株培养及微量有机酸分泌物收集系统。采用本系统进行的有机酸分泌的研究结果表明,黑麦和小麦根尖在铝胁迫下分别分泌柠檬酸、苹果酸两种有机酸和苹果酸。有机酸的分泌与铝的处理浓度和处理时间

3 讨论

分泌物的分泌特性是根系生物学研究的重要领

有关。小麦和黑麦分泌有机酸的模式不同。阴离子通道是铝胁迫下有机酸的分泌主要通道。这些特点与采用根系收集法开展的根系有机酸分泌结果一致(Li *et al.*, 2000, 2009; Yang *et al.*, 2000; Delhaize *et al.*, 1993b)。这些结果说明, 本研究建立的植株培养及有机酸分泌物收集微型系统适合于铝胁迫下根尖分泌有机酸的研究。

采用根系为材料(Li *et al.*, 2000)的研究发现, 铝诱导小麦和黑麦根系苹果酸分泌速率分别在开始铝处理后的 2 h 和 10 h 左右达最高。本研究中, 铝对黑麦根尖分泌有机酸的诱导过程与根系分泌的诱导过程相似(Li *et al.*, 2000)。然而, 小麦根尖分泌苹果酸的诱导过程与根系的过程不同。铝处理 9 h 后, 苹果酸的分泌速率方达高峰。由于在小麦根系中次生根的数量远高于种子根的数量, 本研究结果说明小麦次生根与种子根在铝胁迫下苹果酸分泌效率方面可能有所差异。可见, 本研究建立的系统能更详尽的反映铝诱导根尖分泌有机酸的信息。

在本研究建立的微量有机酸分泌物收集和分析系统中, 根尖处理溶液的体积可少至 1.0 mL, 因此可以最大限度地减少研究费用。霍乱毒素(CTX)是异三聚体 G 蛋白激活剂, 它催化异三聚体 G 蛋白 ADP 核糖基化使异三聚体 G 蛋白 α 亚基处于活性状态(Simon *et al.*, 1991)。CTX 是探测异三聚体 G 蛋白介导的细胞信号的重要工具, 广泛应用于异三聚体 G 蛋白介导的细胞信号研究中(Ma *et al.*, 1999)。本研究采用微量有机酸分泌物收集和分析系统, 研究 CTX 对黑麦根尖在铝胁迫条件下有机酸分泌的效应, CTX 用量仅为常规根系分泌物分析系统(以 1 L 体积计)的千分之一。CTX 处理后黑麦根尖在铝胁迫下分泌的柠檬酸和苹果酸增加(图 7), 暗示异三聚体 G 蛋白可能介导铝诱导有机酸的分泌。

总之, 本研究建立的根尖培养及微量分泌物收集系统是经济有效的有机酸分泌物研究系统, 可应用于铝胁迫下有机酸分泌机制的研究; 铝胁迫下黑麦和小麦根尖可以不同模式通过阴离子通道分泌有机酸, 而异三聚体 G 蛋白可能会介导铝诱导有机酸

的分泌。

参考文献:

- Delhaize E, Craig S, Beaton CD, *et al.* 1993a. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) I. uptake and distribution of aluminum in root apices[J]. *Plant Physio*, **103**: 685—693
- Delhaize E, Ma JF, Ryan PR. 2012. Transcriptional of aluminium tolerance genes[J]. *Trends Plant Sci*, **17**(6): 342—348
- Delhaize E, Ryan PR, Randall PJ. 1993b. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices[J]. *Plant Physio*, **103**: 695—702
- Ding HY, Wen DN, Fu ZW, *et al.* 2014. The secretion of organic is also regulated by factors other than aluminum [J]. *Environ Monit Assess*, **186**: 1 123—1 131
- Foy CD. 1988. Plant adaptation to acid, aluminum-toxic soils[J]. *Commun Soil Scie Plant Ann*, **15**: 957—987
- Kochian LV. 1995. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants[J]. *Annu Rev Plant Physio Plant Mol Biol*, **46**: 237—260
- Kochian LV, Miguel A, Hoekenga OA. 2005. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity[J]. *Plant Soil*, **274**: 175—195
- Li XF, Ma JF, Matsumoto H. 2000. Pattern of aluminum-induced secretion of organic acid differs between rye and wheat [J]. *Plant Physio*, **123**: 1 537—1 543
- Li XF, Zuo FH, Ling GZ, *et al.* 2009. Secretion of citrate from roots in response low phosphorus and aluminum stresses in *Stylosanthes* [J]. *Plant Soil*, **325**: 219—229
- Ma JF. 2000. Role of organic acids in detoxification of aluminum in high plants [J]. *Plant Cell Physio*, **41**: 383—390
- Ma LG, Xu XD, Cui SJ, *et al.* 1999. The present of a heterotrimeric G protein and role in signal transduction of extracellular calmodulin pollen germination and tube growth [J]. *Plant Cell*, **11**: 1 351—1 363
- Simon MI, Stzathmann MP, Gautam N. 1991. Diversity of G proteins in signal transduction [J]. *Sci*, **252**: 802—808
- Sun LL, Liang CY, Chen ZJ, *et al.* 2014. Superior aluminium (Al) tolerance of *Stylosanthes* is achieved mainly by malate synthesis through an Al-enhanced malic enzyme, SgME1 [J]. *New Phytolo*, **202**(1): 209—219
- Taylor GJ. 1991. Current views of the aluminum stress response: the physiological basis of tolerance [M]//Randall DD, Blevins DG, Miles CD (eds). Current topics in plant biochemistry and physiology. Columbia, MO; University of Missouri: 57—93
- Yang ZM, Mayandi S, Horst WJ, *et al.* 2000. Aluminum tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (*Glycine max*) [J]. *Physio Plant*, **110**: 72—77