植物营养与肥料学报 2005,11(3):390 - 393
Plant Nutrition and Fertilizer Science

铝胁迫对小麦根尖细胞蛋白质及苹果酸分泌的影响

杨建立[1], 俞雪辉[1], 刘 强[1], 郑绍建[1,2*]
(1 浙江大学环境与资源学院农业化学研究所,浙江杭州 310029;
2 中国科学院南京土壤研究所开放实验室,江苏南京 210008)

摘要: 以一对近等位基因小麦品系(ET8 和 ES8)为材料,研究了铝胁迫条件下根系生长情况,根尖铝含量,根尖细胞质蛋白组分以及铝胁迫下两个小麦品系苹果酸分泌的差异。结果表明,小麦品系 ET8 的耐铝性明显高于 ES8; 而 ET8 根尖铝含量则明显低于 ES8; 50 μmol/L 铝处理 24 h 后 ES8 小麦的细胞质蛋白组成受到明显影响,而 ET8 则无明显影响。由于铝胁迫条件下 ET8 分泌的苹果酸的量明显高于 ES8,因此可以认为,分泌的苹果酸一方面与铝结合使其无毒化; 另一方面将铝排斥于根尖细胞外,从而阻止铝进入细胞质内对细胞产生毒害作用。

关键词: 铝毒; 小麦; 有机酸; SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)
中图分类号: Q945.78　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 1008-505X(2005)03-0390-04

Effects of aluminum stress on wheat root tip cytoplasmic proteins and malate efflux

YANG Jian-li[1], YU Xue-hui[1], LIU Qiang[1], ZHENG Shao-jian[1,2*]
(*1 Research Institute of Agrochemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;*
2 Key Laboratory of Material Cycling in Pedosphere, Nanjing Inst. of Soil Sci. Nanjing 210008, China)

Abstract: In the present study, a pair of near iso-genic wheat line, ET8 and ES8, was used to investigate the effects of aluminum (Al) stress on root growth, root tip Al content, root tip cytoplasmic protein, and malate efflux from their roots. Root elongation was decreased with increasing Al concentrations applied, but it was always higher in ET8 than in ES8, indicating high Al tolerance in ET8. Total Al content in root tips was significantly lower in ET8 than in ES8 suggesting the role of Al exclusion mechanism in Al tolerance of ET8. After 50 μmol/L Al exposure for 24 h, SDS-PAGE cytoplasmic protein profiles in root tips were severely affected in ES8 but not in ET8. Furthermore, Al-induced malate efflux was significantly higher in ET8 than in ES8, indicating that exclusion of Al from root tips is due to efflux of malate from wheat roots. Although ET8 was higher in Al tolerance than ES8, the root growth was still inhibited by 50 μmol/L Al exposure for 24 h. We hypothesise that Al may inhibit root elongation apoplastically rather than cytoplasitically.

Key words: aluminum toxicity; wheat; organic acids; SDS-PAGE

全世界约有 39.5×10^8 hm^2 酸性土壤,占世界可耕地土壤的 40%,主要分布在热带、亚热带及温带地区,尤其是发展中国家[1]。我国酸性土壤遍及南方 15 个省区,总面积为 2030×10^4 hm^2,约占全国土地总面积的 21%[2]。铝毒是制约酸性土壤植物生长的最主要的因素之一。铝毒害最明显的症状就是对根伸长生长的快速抑制,且根尖是铝毒害的最初位点[1]。由于铝毒对农业生产的重要影响,因此对植物铝毒和耐性机理的研究就显得十分重要。

植物抗铝毒的生理机制常被分为外部排斥和内部耐受两大类[3]。此两类生理机制的主要差别在于前者对铝的解毒部位为质外体,后者为共质体。外部排斥主要机制包括:细胞壁对铝的固定、质膜对铝的选择透性、诱导产生的根际 pH 屏障、螯合配体及磷酸盐的分泌等。在这些可能的机理中,铝诱导有机酸的分泌从而解除铝毒被广泛报道[4]。而内部耐

收稿日期: 2004-05-13　　**修改稿收到日期**: 2004-08-19
基金项目: 国家自然基金项目(30170548); 教育部优秀青年教师资助计划项目; 霍英东基金; 中国科学院南京土壤研究所开放实验室基金资助。
作者简介: 杨建立(1979—),男,浙江奉化人,硕士研究生,主要从事植物逆境生理研究。 * 通讯作者

受机制包括：胞质中有机酸、蛋白质及其它有机配体对铝的螯合、液泡的区室化、抗铝酶的诱导及酶活性的提高等。虽然在植物耐铝机理上已取得重大进展，但对铝是通过质外体还是共质体毒害植物细胞仍存在争议[1]。

有研究表明，小麦品系 ET8 和 ES8 在耐铝性差异上受单个显性基因（命名为 Alt1）控制[5]。并且推测 Alt1 基因为一编码调节苹果酸分泌的阴离子载体或是调节此载体活性的蛋白。最近 Sasaki 等[6]成功将此基因分离并且克隆，证实了先前的推测。本试验旨在通过研究这两个小麦品系在铝胁迫下细胞质蛋白组分的差异来推测铝是通过质外体还是共质体毒害细胞，并进一步探讨有机酸分泌在耐铝机制中的重要作用。

1　材料与方法

1.1　植物材料和培养条件

供试材料为一对近等位基因小麦品系 ET8 和 ES8（种子由西澳大利亚大学提供）。种子用蒸馏水浸泡过夜，然后在 25℃黑暗条件下催芽。第 2 天，将已经出芽的种子转移到带有网眼的塑料框中，塑料框置于装有 0.5 mmol/L $CaCl_2$（pH 4.5）溶液的塑料容器上，将种子浸于溶液内。每天更换溶液。试验在人工气候室内进行，光照和温度的昼夜循环为 14/10 h 和 25℃/22℃，相对湿度控制在 70%，光源为 Philip 农艺钠灯，光照强度为 150 μmol /(m^2·s)。

1.2　耐铝性鉴定和根尖铝含量测定

取 3 d 苗龄的幼苗进行耐铝性鉴定。挑选主根长为 4.0～5.0 cm 左右的幼苗转移到外面包有 2 层黑色塑料薄膜的 18 mL 玻璃试管中进入隔离培养处理，试管内注入约 17 mL 的处理液，处理液为含 0、5、10、25 和 50 μmol/L $AlCl_3$ 的 0.5 mmol/L $CaCl_2$ 溶液，溶液的 pH 均用 0.1 mol/L HCl 调节至 4.5。选取根长相近的幼苗，用直尺量取处理前的最长的种子根长度，每一试管内移植幼苗一颗。处理 24 h 后，再用直尺量取相应种子根的长度，计算出根系伸长量。相对根系伸长率定义为铝处理后根伸长量与对照根伸长量之比的百分数。

小麦品系中根尖的铝含量根据 Osawa 和 Matsumoto[7]的方法测定。植物按上述的方法处理后，用刀片切取 1 cm 的根尖部分，用 pH 4.5 的 $CaCl_2$ 溶液洗 3 次，然后把根尖放入含 1 mL 2 mol/L HCl 的 1.5 mL 离心管中，浸提 24 h，其间不时进行摇动，取上清液，用 ICP（AIRIS/AP，TJA）测定其铝浓度。

1.3　细胞质蛋白的提取和 SDS-PAGE 分析

小麦用 50 μmol/L $AlCl_3$ 处理 24 h 后，将根尖 0～1 和 1～2 cm 的部分迅速切下，液氮冷冻。用 50 mmol/L Tris-HCl（pH 7.8）提取细胞质蛋白，18500 r/min 离心 5 min 后取上清液，再用 18500 r/min 离心 10 min，取上清液进行 SDS-PAGE 分析，考马斯亮蓝染色后，用凝胶成像分析系统进行分析。

1.4　根系分泌物的收集和有机酸的测定

将 4 d 苗龄的幼苗转移到含有 1 L 1/5 Hoagland 营养液的容器中培养，营养液每 3 d 更换一次。3 周后，将植物根系用含 0 或 50 μmol/L $AlCl_3$ 的 0.5 mmol/L $CaCl_2$ 溶液处理，溶液的 pH 为 4.5。在开始处理后的 3、6、9、12 h 收集分泌物。将收集的根系分泌物首先通过装有阳离子树脂的交换柱，再通过装有阴离子树脂的交换柱。将吸附在阴离子树脂上的有机阴离子用 1 mol/L HCl 洗脱后在 40℃下减压旋转蒸发至干，然后用 1 mL pH 为 2.1 的 $HClO_4$ 溶解，所含有机酸用 HPLC 测定[8]。

2　结果与分析

2.1　铝对小麦根系生长的影响

铝毒的最初症状是对根伸长的抑制[1]。从图 1 可以看出，两个小麦品系的相对根系伸长率都随着铝浓度的升高而降低，但小麦 ET8 的相对根系伸长率在所有供试铝浓度下都明显高于 ES8。ES8 在 5 μmol/L Al 处理 24 h 后，相对根系伸长率仅为 30%，而 ET8 则达 90%；即使用 50 μmol/L Al 处理 24 h 后，ET8 的相对根系伸长率仍有 40%，而 ES8 仅为 5%。这些结果表明小麦 ET8 有较高的抗铝性，而 ES8 对铝非常敏感。

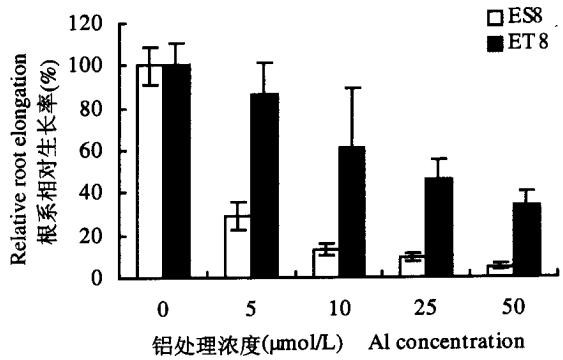

图 1　铝处理对小麦相对根系伸长率的影响

Fig.1　Relative root elongation of ET8 and ES8 after 24 h exposure to different concentrations of $AlCl_3$

2.2 根尖铝含量和耐铝性的相关性

铝的质外体排斥是重要的耐铝机理之一[2]。图2表明,根尖铝含量随着铝处理浓度的增加而增加,但是ET8的根尖铝含量明显低于ES8。ET8在50 μmol/L Al处理24 h后每个根尖铝含量为0.111 μg,而ES8则达到0.270 μg。从根尖铝含量与相对根系伸长率的相关性曲线可以看出,根尖铝含量与相对根系伸长率呈明显的负相关(图3),表明ET8的耐铝性与铝的质外体排斥有关。

2.3 细胞质蛋白组分分析

用50 μmol/L铝处理24 h后,ES8根尖细胞质蛋白组分产生了很大的变化。处理后在0～1 cm根段有27 kD和18 kD条带的消失,29 kD条带的出现,在1～2 cm根段有39 kD、34 kD、31 kD条带的增强和29 kD条带的出现。而小麦ET8的两个根段在铝处理后细胞质蛋白组分均无明显影响(图4)。

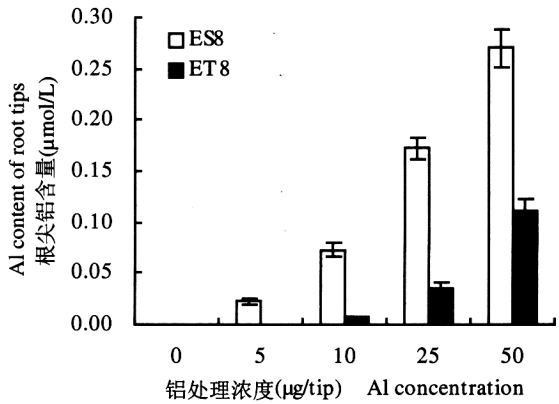

图2 不同浓度铝处理对根尖铝含量的影响

Fig.2 Al contents in root tips of ET8 and ES8 after 24 h exposure to different concentrations of Al

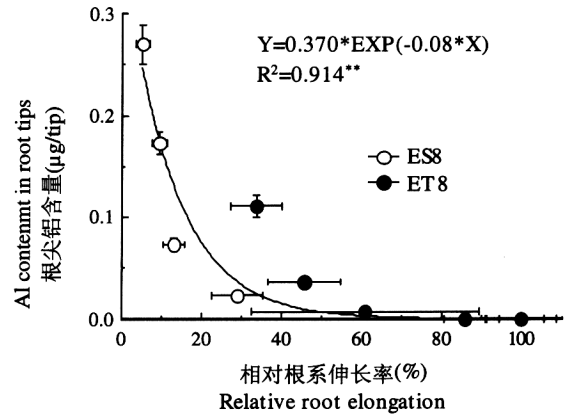

图3 小麦根尖铝含量与相对根系伸长率的相关性

Fig.3 Correlation between root tip Al content and relative root elongation in wheat

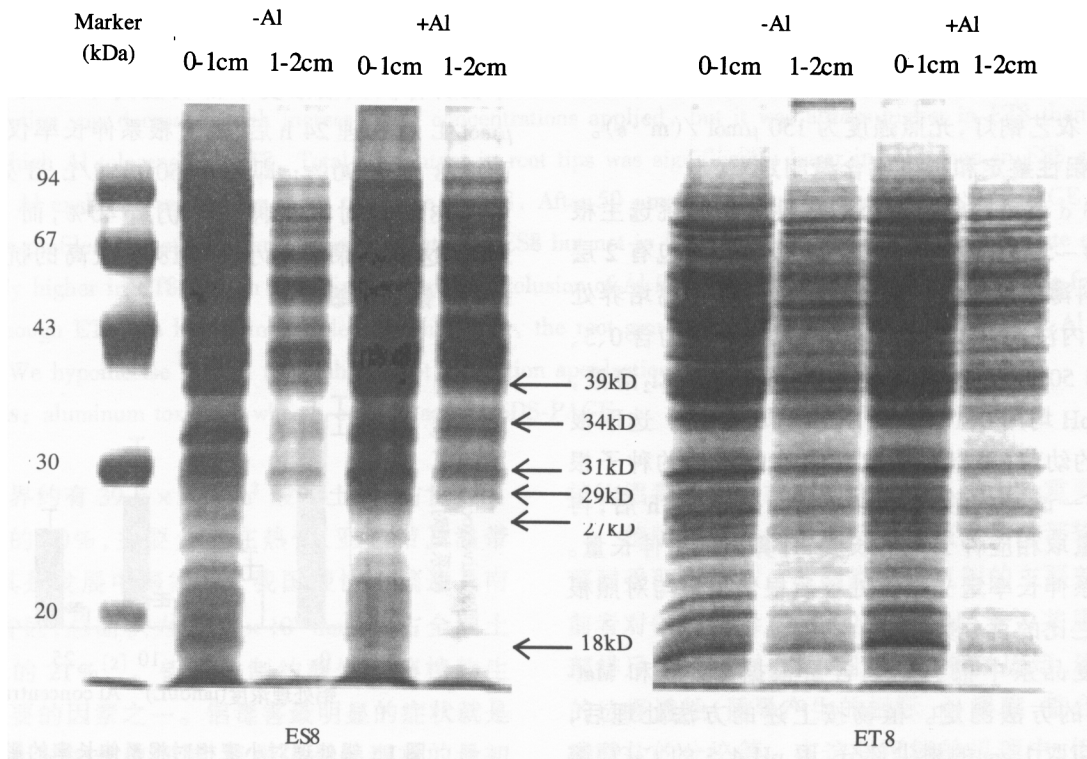

图4 小麦ET8和ES8 50 μmol/L Al处理24h后不同根段细胞质蛋白组分的SDS-PAGE电泳图谱

Fig.4 SDS-PAGE of different sections of wheat root tips after 24 h exposure to 50 μmol/L $AlCl_3$

2.4 铝诱导有机酸分泌

铝处理可极大地刺激小麦 ET8 根系分泌苹果酸，而 ES8 在铝胁迫下分泌的苹果酸的量明显少于 ET8(图 5)。

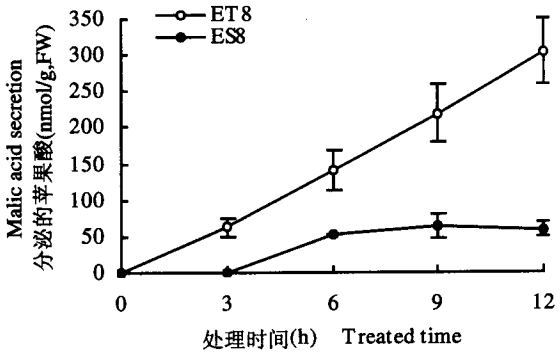

图 5　铝诱导小麦根系苹果酸分泌

Fig.5　Al-induced malate efflux from wheat roots

3 讨论

5 至 10 μmol/L $AlCl_3$ 溶液处理 24 h 后，铝明显地抑制了小麦根的伸长(图 1)。当铝的处理浓度相同时，小麦品系 ET8 根伸长受到的抑制程度小于 ES8。表明 ET8 的耐铝性明显高于 ES8。这与以往的报道结果一致[5]。

根尖是铝的最初毒害部位[1]。用不同浓度铝溶液处理 24 h 后，小麦品系 ET8 根尖所积累的铝的含量明显少于 ES8(图 2)。从根尖铝含量和相对根系伸长量之间的相关性上可以看出这两者呈明显的负相关(图 3)。说明小麦的耐铝性与根尖铝的排除有关。

在铝的外部排斥机理中，铝诱导有机酸分泌并且螯合铝离子使之无毒化是一种被普遍接受的假说[4]。在铝胁迫条件下，小麦、荞麦等植物能迅速对之作出反应，在短至 20min 内介质中即可检测到有机酸的分泌[5,8]。本研究也发现在铝胁迫条件下 ET8 分泌了大量的苹果酸，而 ES8 在铝胁迫条件下分泌出来的苹果酸的量则明显少于 ET8(图 5)。说明耐铝小麦品系是通过苹果酸的大量分泌从而将根尖的铝排除在体外，保护根尖不受铝的毒害。这与前面的假说完全一致。

虽然根尖作为铝毒的最初毒害部位已得到了一致公认，但是关于铝是通过质外体还是共质体而毒害植物细胞的至今仍存在很大的争议[1]。对细胞质蛋白组分的研究发现，铝胁迫对 ET8 根尖细胞质蛋白没有明显的影响，而 ES8 在铝处理后细胞质蛋白组分发生明显变化(图 4)。说明耐铝小麦品系 ET8 可能是通过苹果酸的分泌将铝排斥在共质体外，保护细胞质内组分免受铝毒害而增强了耐铝性。由于没有进一步对蛋白组分进行深入分析，如分离效率更高的 2D-PAGE 的应用，因此关于铝诱导蛋白的变化在小麦铝毒和耐性中的作用还有待进一步证实。

作为植物防御不良环境影响的第一道屏障，越来越多证据表明，细胞壁在植物铝毒抗性中起着重要作用[9]。Zheng 等[10]以耐铝小麦品种 Atlas 根系细胞壁为材料，证实了产生细胞壁带负电荷点的主成分果胶及在铝胁迫下分泌的苹果酸在铝吸持中的作用。虽然 ET8 在铝胁迫条件下能从根系分泌出大量苹果酸(图 5)，但其根尖仍有相当量的铝(图 2)，说明分泌的苹果酸无法使其完全不吸持铝，导致了根伸长的抑制(图 1)。

Kenzhebaeva 等[11]研究发现，用 20 μmol/L $AlCl_3$ 处理 24 h 后，ET8 根尖中的铝大约有 50% 可被柠檬酸解吸，说明还是有相当的铝进入了细胞内；同时他们也证实了这两个小麦品系铝处理后细胞壁伸展蛋白的变化与他们的耐铝性有关。结合我们的研究结果，即铝处理后 ET8 细胞质蛋白几乎不受影响而 ET8 却受到明显影响，推测铝有可能是通过影响细胞壁组分如伸展蛋白从而抑制根系伸长。

总之，从本试验所得的结果可以认为，耐铝小麦可通过苹果酸的分泌防止更多的铝进入细胞共质体，从而提高了对铝的耐性；铝对植物的毒害，在短时间内可能是从质外体开始的。

参 考 文 献：

[1] Kochian L V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants[J]. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 1995, 46: 237-260.

[2] 张福锁. 植物营养、生态学和遗传学[M]. 北京，中国科学技术出版社. 1993.
Zhang F S. Ecological physiology and genetics of plant nutrition[M]. Beijing: China Science and Technology Press. 1993.

[3] Taylor G J. Current views of the aluminum stress response: The physiological basis of tolerance[J]. Curr. Top. Plant Biochem. Physiol., 1991, 10: 57-93.

[4] Ryan P R, Delhaize E, Jones D L. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots[J]. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 2001, 52: 527-560.

[5] Delhaize E, Craig S, Beaton C D *et al*. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). Part I. Uptake and distribution of aluminum in root apices[J]. Plant Physiol., 1993, 103: 685-693.

(下转第 411 页)

[上接第 393 页]

[6] Sasaki T, Yamamoto Y, Ezaki B *et al*. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter[J]. Plant J., 2004, 37: 645-653.

[7] Osawa H, Matsumot H. Possible involvement of protein phosphorylation in aluminum-responsive malate efflux from wheat root apex[J]. Plant Physiol., 2001, 126: 411-420.

[8] Zheng S J, Ma J F, Matsumoto H. High Aluminum resistance in buckwheat: I. Al-induced special secretion of oxalic acid from root tips [J]. Plant Physiol., 1998, 117: 745-751.

[9] Horst W J. The role of the apoplast in aluminium toxicity and resistance of higher plants: a review[J]. Z. Pflanzenernähr. Bodenk., 1995, 158: 419-428.

[10] Zheng S J, Lin X Y, Yang J L *et al*. The kinetics of aluminum adsorption and desorption by root cell walls of an aluminum resistant wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar[J]. Plant Soil, 2004, 261: 85-90.

[11] Kenzhebaeva S S, Yamamoto Y, Matsumoto H. Aluminum-induced changes in cell-wall glycoproteins in the root tips of Al-tolerant and Al-sensitive wheat lines[J]. Russ. J. Plant Physiol., 2001, 48: 441-447.