低磷胁迫下小麦根系反应的基因型差异①

刘国栋

（中国农业科学院山区研究室，北京 100081）

李继云　　李振声

（中国科学院生态环境中心，北京 100085）（中国科学院遗传研究所，北京 100101）

摘 要

本研究采用液培、根际原位显色和离子耗竭技术等方法，探索了小麦不同基因型根际对磷酸三钙的溶解作用，根际分泌酸性磷酸酯酶，根际氧化还原活力以及吸磷动力学的差异。结果表明，磷高效基因型不仅根系发达，而且溶解磷酸三钙的能力、酸性磷酸酯酶的分泌量和活性，对还原态甲烯蓝的氧化作用，对TTC的还原作用和吸磷动力系参数中的Imax等都显著优于磷低效基因型。有机碳分泌量高，对钙的吸收速度快也是磷高效基因型的重要特性。

关键词 小麦 基因型 根系 低磷胁迫

在低磷逆境中，小麦最先感受养分胁迫这一化学信号的器官是根系。对这一逆境信号加工、处理、传递的也是根系。地上部接受根部传递过来的胁迫信号后，整个植物对环境养分缺乏胁迫作出反应，采取相应的拯救磷素饥饿的对策。例如，改变碳同化产物的分配方向和比例，在代谢途径上进行方向和强度的改变，在基因表达上进行时间和空间的调整等等，以活化生存环境中的难溶性无机磷，或分解生长介质中的有机磷。这些对策最终又都是通过根系来表达和实现的。不同磷效率的基因型的差异首先就表现在根系的反应上，李振声和李继云等已证明磷高效小麦根系可使根际pH值降低3.5单位[19]，但有关根系其它生理生化反应的基因型差异报道尚少。为此，本研究旨在比较不同小麦材料根系分泌物，根系氧化还原活性和根系吸收Ca、P等养分离子的基因型差异，以揭示磷高效基因型活化磷素的机理。

一、材料与方法

（一）材料： 选用磷高效基因型洛夫林10号、冀87—4617和85504—3—3—2D—7及磷低效基因型80—55和中国春等。

（二）根系形态和磷酸三钙溶解状况的观察： 将洛夫林10号和中国春催芽成苗后播于20cm×6cm×1cm有机玻璃盒中，按Ponnamperuma的配方配制成除磷外的营养液，加热溶化的琼脂10g/L，搅拌均匀，冷却至45℃后立即倒入盒中，每合加50mL，将幼苗的根系轻轻按入琼脂中，用保鲜膜封口，以免蒸发失水；用铝泊纸包裹，以免根系见光。培养基中加入2g/L过0.1mm直径筛的磷酸三钙，在培养室中培养，每周加1次无磷营养液，每次50

① 博士后科学基金资助项目
1995—10—30

mL，平时视情况及时补充蒸馏水，试验培养3周后，照相记录根系生长情况和磷酸三钙沉淀的溶解状况。

(三)根系分泌物的紫外图谱分析： 将洛夫林10号和中国春等典型基因型在低磷(Ponnamperuma配方的10%的磷强度，其它养分为100%强度)条件下于生长室(光暗各12小时，温度25℃左右，有效光合辐射(PAR)为87.34μ mol/(m^2·s))中培养到五叶期后，以每6株小麦为一组，移入盛有200mL去离子水的烧杯中，进行根系分泌物的收集工作。24小时后，取出植株，用中速滤纸过滤，于50℃[1]烘箱中干燥浓缩至约5mL，用去离子水冲洗烧杯，定容至10mL，用UV2201紫外／可见分光光度计于400～190nm范围内，以光径为1cm的比色皿直接进行扫描测定，照相记录扫描图谱。

(四)根泌酸性磷酸单酯酶的原位显色： 先配制柠檬酸钠－盐酸缓冲液500mL，即将50mmol/L柠檬酸三钠用1mol/L HCl使pH调到5.6，然后用pH5.6的柠檬酸钠－盐酸缓冲液配制成含37.5mmol/L1－萘磷酸钠盐和2.7 mmol/L Fast Garnet GBC(固紫酱GBC)的1%琼脂溶液作为反应介质。而后按(二)的方法分别将对照(+P 100%)磷强度和处理(-P，10%磷强度)条件下培养两周后的幼苗，各取一株于有机玻璃盒中培养3小时和24小时后照相记录反应结果。

(五)分析测定方法

1. 有机碳分泌总量的测定　将植株分别于CK和无P条件下在玻璃温室中培养2个月后，取单株并分蘖一起，按(二)方法收集分泌物后，用中速滤纸过滤，于50℃下烘至25mL左右，用$K_2Cr_2O_7$容量法进行测定和计算[7]。

2. 根系脱氢酶活性的测定　用红四氮唑(TTC)法[8]进行。

3. 根际氧化力的测定　用非损伤琼脂技术[9]进行根际原位显色的定性测定。定量方法：在含24mg/L甲烯蓝的水溶液中加入200mg/L保险粉(Sodium dithionite: $Na_2S_2O_4$)使之还原变成无色。取10mL加入试管中，立即将小麦幼苗的根系浸入试管中，加一滴液体石腊油，以免进氧，试管全部用锡泊纸包裹，以免进光。在培养室培养24小时后，立即取样，于660nm下比色测定，计算单株氧化还原态甲烯蓝的量。

4. Ca^{2+}吸收的测定　用离子耗竭技术[10]进行。在盛有100mL 1.0mmol/L $Ca(NO_3)_2\cdot 4H_2O$和0.2mmol/L Na_2SO_4水溶液的烧杯，置6株小麦幼苗，按(三)所述条件的生长室中培养5小时，取出幼苗，用0.01mol/L的Na_2EDTA标准溶液滴定烧杯中余下的Ca^{2+}量，测定前后的差值即为植株吸钙量。

5. NO_3^-吸收的测定　用紫外比色法进行。在盛有10mL含170μ mol/L$Ca(NO_3)_2\cdot 4H_2O$和0.2mmol/LNa_2SO_4水溶液试管中，置一株小麦幼苗，在按测定方法4所述条件下，培养5小时，用UV2201紫外／可见分光光度计直接比色测定，吸收前后的差值即为植株的NO_3^-吸收量。

6. 磷的吸收测定　在盛有100mL含5mg/kg $^{-}$P和0.2mmol/L $CaSO_4$水溶液的烧杯中，置入6株小麦幼苗，按测定方法4所述条件下培养，每小时取样1mL，连续取样8次，每次取样后都加入等体积浓度大致相同的含磷溶液，以保持溶液体积为100mL。磷的测定用钼锑抗比色法[11]进行。

所有测定都重复3～4次。

二、结果与分析

(一)根系形成和磷酸三钙溶程度

由于遗传背景的不同，在以磷酸三钙为唯一磷源的低磷条件下，洛夫林10号和中国春根系形态的差异极为显著，分枝根的数量前者较后者多3倍以上。磷酸三钙难溶于水，其过0.1mm筛的细颗粒与琼脂混匀后，培养基呈均匀的白色不透明状态。小麦在生长过程中因需要磷素而分泌根酸或有机碳化物，促使磷酸三钙溶解，培养3周后，洛夫林10号的培养基透明程度比中国春强得多。说明洛夫林10号根系对低磷逆境的形态自适应能力和对非水溶性磷酸三钙的活化溶解能力比中国春强得多。

(二)根系分泌物的紫外光谱

图1表明，不同基因型分泌有机碳化物的强度差异十分明显，其中洛夫林10号根分泌物的量为中国春的4倍以上，冀87－4617的分泌强度虽比洛夫林10号低，但显著强于80－55，这表明根

系分泌物紫外光谱的吸收强度正好与小麦不同基因型耐低磷能力呈正相关。

不同基因型的根系分泌物虽然吸收谱线的强度差异非常显著，但其吸收特征却是非常一致的，各曲线三个明显的吸收峰。由光谱化学可知，这些吸收具有K带(π →π * 跃迁吸收带)和B带(苯型谱带)的吸收特征[2]。说明这些根系分泌物具有共轭双键和O、N等杂原子，即根分泌物中可能含有芳香酸以及氨基酸[3]等。它们既能酸化环境，又能螯合金属离子或降低根际环境的氧化还原电位。因此，这些物质分泌得越多，紫外光谱的吸收强度越大，其活化磷的能力也就越强。

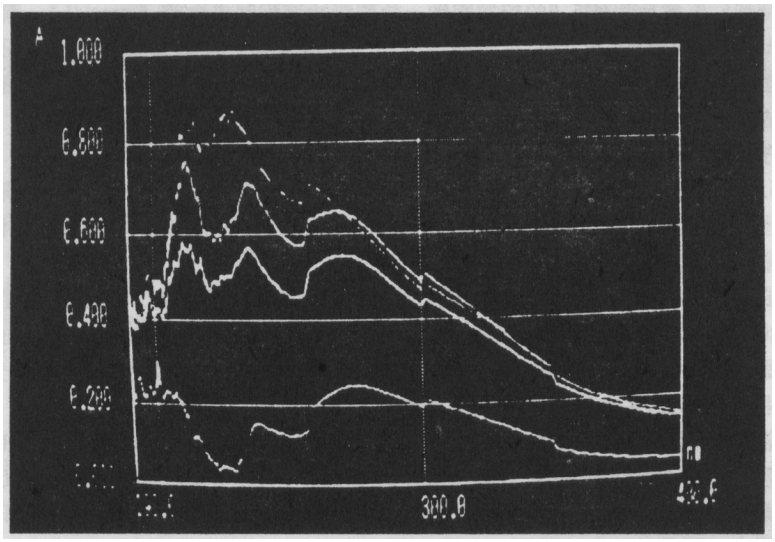

图1 小麦根系分泌物紫外图谱的基因型差异

自上而下分别为： 洛夫林10号 冀87—4617， 80—55， 中国春

Fig.1 The Genotypic differenes in ultraviolet spectrum of wheat root exudates

From top to bottom are Lovrin10, Ji87-4617, 80-55, Chinese spring, respectively.

(三)根泌酸性磷酸单脂酶

1—萘磷酸的钠盐在pH5.6下，经酸性磷酸单酯酶催化水解为1—萘酚和无机磷酸。前者在常温下与Fast Garnet GBC反应形成不溶于水的红色物质，这就是酸性磷酸单酯酶原位显色的基本原理。小麦冀87—4617和中国春的根系与反应介质作用3小时后，两种基因型便出现明显的“根纹”(root print)，且经磷饥饿处理后，两个材料的根纹都明显加深，但磷高效基因型冀87—4617的根纹加深程度更为显著。在对照条件下培养的小麦幼苗，虽然根纹颜色有深浅之别，但明显地没有缺P条件下差别大。说明经磷饥饿后，根系酸性磷酸单酯酶的表达和分泌都受到了显著的促进作用，而磷高效基因型的这种表现更为突出，对低磷环境的自适应能力更强。经磷饥饿后，磷高效基因型根系形态学适应能力比磷低效基因型要强得多。

(四)有机碳分泌总量

在充足磷条件下，小麦不同基因型分泌的有机碳量相差无几，但经磷饥饿处理后，磷低效基因型中国春的有机碳分泌总量仅增加约5%，而磷高效基因型则增加25%以上(图2)。经低磷培养后，磷高效基因型分泌的有机碳量比磷低效基因型高27%以上。这正好与根分泌物的紫外图谱分析结果相一致。

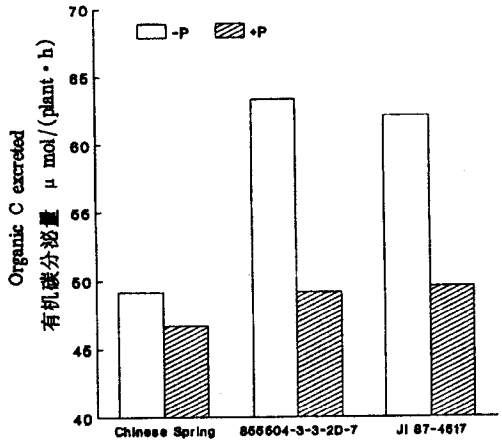

图2 不同小麦基因型根系有机碳分泌量的差异

Fig.2 Genotypic differences in organic carbon excreted by roots of wheat seedling

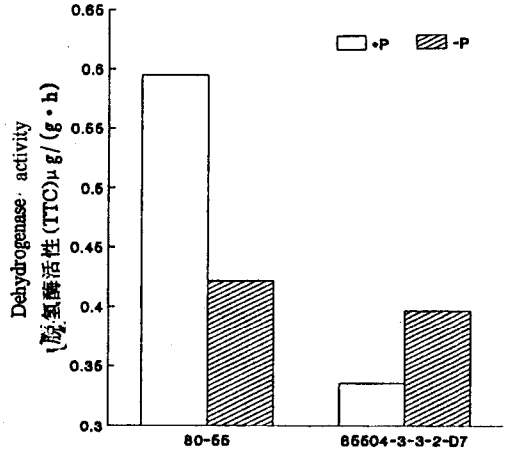

图3 小麦根系活力的基因型差异

Fig.3 Geotypic differences of dehydrogenase activity in wheat root

(五)根系氧化还原能力

根系脱氢酶活性的水平以及氧化力的强弱是植物根系活力的表征。红四氮唑(TTC)本为无色物质，但经脱氢酶还原成为还原态红四氮唑(TTCH)后便变成红色。小麦不同基因型在磷源丰富的条件下(CK)，根系的还原能力都很强，因而都呈红色。在磷源液相控制释放系统这样一种低磷逆境中，虽然所有供试基因型的营养体都变小，但磷高效基因型的根系仍呈红色，表明其还原能力仍较强，而磷低效基因型则不但生长受到极显著的抑制，而且几乎没有什么还原能力。对两类基因型的幼苗根系还原力进行定量分析表明，磷高效基因型经低磷培养10天后，还原活性比对照增加18.22%，而磷低效基因型则下降近30%(图3)。说明两类基因型根系脱氢酶的活性在不同磷营养条件下刚好呈现出相反的变化。

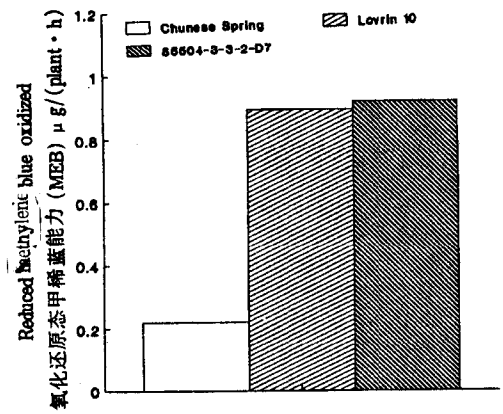

图4 小麦根系氧化还原态甲烯蓝的基因型差异

Fig.4 Genotypic differences in reduced methylene blue oxidized by roots of wheat seelings

不同磷效率小麦基因型幼苗根系的氧化力同样差异极为显著。甲烯蓝(methylene blue)染料经保险粉还原为无色物质后，在氧化条件下又会变为蓝色。根系氧化力的原位显色表明，磷高效基因型85504－3－3－2D－7根系的氧化力比磷低效基因型中国春强得多。在660nm处进行比色分析同样表明，前者的氧化力比后者高3倍以上(图4)。

(六)对NO_3^-和Ca^{2+}的吸收

磷是生物体内活跃化学能载体的组分,因而缺磷时常导致植物内NO_3^-的还原受阻。同时NO_3^-的吸收本身就是一个耗能过程,缺磷时,植物对NO_3^-的吸收既受直接影响,又受间接影响。因此,磷低效基因型中国春在低磷下,NO_3^-的吸收下降13.4%,而磷高效基因型洛夫林10号则不但没有下降,反而还上升了9.0%(图5)。这可能与其能更有效地调动液泡中贮藏的磷有密切关系,因植物吸收的磷有88.0%左右贮藏在液泡中(吴兆明,1994)。

小麦幼苗对Ca^{2+}的吸收也同样表明,磷高效基因型有明显的优势,洛夫林10号和冀87—4617的吸钙速率比中国春和80—55高30%~50%(图6),这便是洛夫林10号和冀87—4617活化利用非水溶态磷的能力强的重要原因。

(七)对磷素的吸收

两类不同基因型在两种磷营养状态下的吸磷曲线,都可用指数函数:$Y = Ae^{-BX}$进行拟合[12]。其中Y为测定介质中的磷浓度,X为吸收时间(小时),B为吸收速率常数,A为磷的起始浓度。在对照条件下,两种不同基因型的吸收速率相差无几,所以其速率常数很接近,分别为0.1828和0.1743。在低磷条件下培养的幼苗,两类基因型吸磷能力都显著提高。吸磷曲线服从指数递减规律,吸收速率常数B值越大,其吸收速率便越快。由其拟合函数的速率常数可以看出,80—55经低磷处理后,其吸收速率提高41.19%,而85504-3-3-2D-7则提高了56.73%,这可能是由于植物对磷的吸收也同样存在着变构调节作用(allosteric regulation)所致。同时,也可认为这是小麦对磷饥饿的一种生理适应反应,饥饿的植株一遇到有效态磷素,便立即全力吸收。在这方面的表现,磷高效基因型85504—3—3—2D—7有着明显的优势,其吸收速率常数提高的幅度较磷低效基因型80—55高37.7%。从测定介质中磷的减半期$T_{1/2}$(植株吸收一半磷所需的时间)也同样可以看出,在低磷条件下,85504—3—3—2D—7比对照短1.37小时,而80—55则只短1.16小时。前者较后者高18.10%。其平均吸磷速率的差异也表现出同样的趋势(表1)。

表 1 不同基因吸磷速率与吸磷动态曲线模拟函数的系数

Table 1 Mean rate of phosphorus influx and coefficients of functions fitting dynamic curves of phosphorus influx by wheat genotypes

基因型 Genotypes	磷状态 P states	平均速率 Mena rate (μ mol plant^{-1}.h^{-1})	A	B	r	$T_{1/2}$ (h)
85504-3-3-2D-7	+P	0.285	0.4517	-0.1828	-0.9825	3.79
	-P	0.327	0.4571	-0.2865	-0.9846	2.42
80-55	+P	0.282	0.4293	-0.1743	-0.9758	3.98
	-P	0.319	0.4595	-0.2461	-0.9787	2.82

磷吸收动力学参数(表2)表明,两类不同基因型在两种磷营养状态下,Km基本相差无几,但Imax则差异极为显著,同一基因型在磷饥饿状态下,最大吸收速率提高50%以上。说明经磷饥饿后,两类基因型根系主管磷素吸收的运转蛋白的表达量显著增加了,但其结构特性,即运转蛋白的性质并没有发生什么变化。在同一磷营养状况下,不同基因型的Imax差异也很明显,在+P条件下,85504—3—3—2D—7比80—55高10%以上,在—P下则高16.02%。表明在吸收特征上,磷高效基因型的自适应或自拯救能力都比磷低效基因型强。Chapin曾指出,植物的吸收磷

能力在耐低磷方面没有什么意义[21]。本研究结果表明，吸收能力在耐低磷方面是有一定意义的，因吸磷能力强对非水溶态磷的溶解和活化具有积极作用。

表 2　小麦幼苗吸磷的动力学参数

Table 2　Parameters of kinetics on P influx by wheat seedlings

基因型 Genotypes	Km(μ mol · L^{-1})		-P/+P (%)	Imax(μ mol $plant^{-1}$ · h^{-1})		-P/+P (%)
	-P	+P		-P	+P	
85504-3-3-2D-7	73.22	72.87	100.48	0.7048	0.4442	158.67
80-55	74.09	69.26	106.97	0.6075	0.4031	150.71

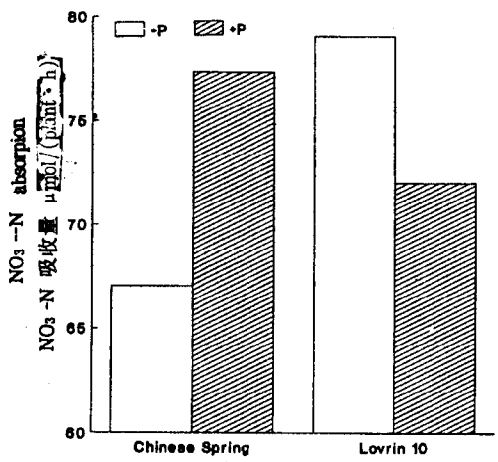

图5 小麦幼苗吸收硝态氮的基因型差异

Fig.5 Genotypic differences in rate of nitrate influx by wheat seedlings

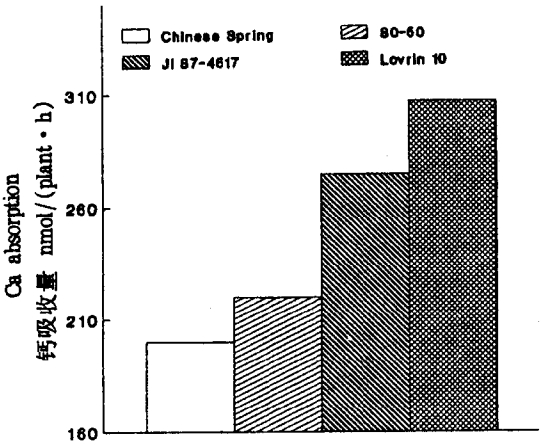

图6 小麦幼苗吸收钙素的基因型差异

Fig.6　Genotypic differences in rate of calcium influx by wheat seedlings

参 考 文 献

1　刘国栋，1993；水稻基因型与钾素营养。中国农业科学院研究生院博士学位论文，1～95。

2　刘国栋，李继云，李振声，1995；植物高效活化土壤磷素的机理。生命科学研究进展(中国科协第二届青年学术年会执委会编)。中国科学技术出版社，472～480。

3　李酉开主编，1983；土壤农业化学常规分析方法。科学出版社，272～273。

4　张福锁主编，1993；植物营养生态生理学和遗传学。中国科学技术出版社，1～3，138～149。

5　南京土壤所主编，1978；土壤理化分析。上海科学技术出版社，105～108。

6　袁晓华，杨中汉主编，1983；植物生理生化实验。高等教育出版社，128～133。

7　傅建熙主编，1991；有机化学。天则出版社，326～330。

8　彭克明，裴保义主编，1980；农业化学。农业出版社，112～114。

9　Mengel K. 1983；外籍学者讲学材料之四十一：植物营养与施肥原理。农业部教育司和西北农学院，54。

10　Jean Armstrong, William Armsrong and Peter M Beckett,. 1992: Phragmites australis: Venturi-and humidity induced pressure flows enhance rhizome aeration and rhizosphere oxidation. New Phytol., 12:197～207.

11 Bieleski R L, 1973: Phosphate pools, phosphate transport and phosphate availability. Ann Rev Plant Physiol., 24:225～252.
12 Bieleski R L. and Ferguson I B, 1983: Physiology and metabolism of phosphate and its compounds, In: Encyelopedi of Plnt Physiology, New Series Volume 15A, Inorgnic Plnat Nutrition, Edited by A Lauchli and R L Bieleske, Springer Verlg Berlin-Heidelborg, 422～449.
13 F S Chapin Ⅲ, 1983: Adaptation of selected trees and grasses to low availability of phosphorus. In: Genetic Aspects of Plant Nutrition. M R Saric and B C Loughman ed. Martinus Nijhoff/Dr W Jund Publishers, The Hague, 217～221.
14 Classen N, Barber S A, 1974. A method for charaeterizing the relation between nutrient concentration and flux into roots of intact plant. Plant Physiology, 54:564～568.
15 Dinkelaker B, G Hahn, V Romheld, G A Wolf and H Marschner, 1993: Non-destructive methods for demonstrting chemicl chnges in Plnt Nutrition-from Genetic Engineering to Field Practice. Kiuwer Acdemic Publishers. 71～74.
16 DInkelaker B, G Hahn and H Marschner, 1993: Non-destructive methods for demonstrating chemical changes in the rhizosphere. Ⅱ. Application of method. ibid, 25～78.
17 Dinkelaker B and H Marschner, 1992: In vivo demonstration of acid phosphatase activity in the rhizosphere of soil-grown plants. Plant and Soil, 144:199～205.
18 Frederick R, Troeh and Louis M Ghompson, 1993: Soils and Soil Fertility. Oxford University Press, 224.
19 Fusuo Zhang, Volker Romheld and Horst Marschner, 1991: Release of zinc mobilizing root exudates in different plant species as affected by zinc nutritional sttus. Journl of Plant Nutrition. 14(7): 675～686.
20 Rosen C J and Carlson R M. 1984. Potassium uptake characteristics of prunus rootstocks: Influence of solution Ca/Mg ratios and solution nickel. J. Plant Nutrition. 7:865～885.

THE GENOTYPIC DIFFERENCES IN RESPONSE OF WHEAT ROOT SYSTEM TO LOW-PHOSPHORUS STRESS

Liu Guodong
(Upland Res. Center CAAS, Beijing 100081)

Li Jiyun
(Res. Center for Eco-Envirenmetal Sci Academid Sinica, Beijing 100085)

Li Zhensheng
(Inst. of Genetics Academia Sinica, Beijing 100101)

Summary

Wheat genotypic differences were studied in solving tricalcium phosphatase, excreting acid phosphatase and redox activity in rhizosphere in hydroponics, *in situ* visualization. Phosphorus influx kinetics was genotypically compared as well in ion depletion technique. The efficient genotypes such as Lovrin 10 won a marked advantage over the inefficient ones such as Chinese Spring not only in root morphology but also in physiology and biochemistry: amount of solving tricalcium phosphate, excretion and activity of acid phophatase, oxygenation capacity of reduced methylene blue (MEB), reducing ability to 2,3,4-triphenyl tetrzolium chloride (TTC), Imax among P influx parameters etc. Moreover, 25%～30% higher in excretion of organic carbon from the root and 97.41%～151.10% quicker rate of Ca influx were both very important characters of effcient genotypes.

Key words Wheat Genotypes Root system Low-phophorus stress.