根分泌物与禾本科植物对缺铁胁迫的适应机理*

张 福 锁

(北京农业大学植物营养系,100094)

摘 要

本文系统地总结了自然基金重点项目"根分泌物在根际微生态系统中的营养机理"的研究进展和部分主要成果。研究表明,养分专一性根分泌物是植物营养遗传特性控制基因的标记物,它受某一养分缺乏的诱导,是在植物体内合成并可通过主动分泌作用进入根际的代谢产物。它的合成和分泌只受该养分胁迫的专一诱导和控制,只要改善这一营养状况就能抑制或阻止其合成和分泌。当植物缺乏这一养分时,植物体可通过自身的调节能力,合成专一性物质并自根分泌到根际,促进该养分的活化并提高植物对其吸收利用效率,从而达到克服或缓解该营养胁迫的目的。用单基因突变材料进行的研究表明,植物铁载体的生物合成和吸收利用是受单基因控制的过程。这一发现不仅使人类有可能运用生物学研究技术来解决营养缺乏问题,而且也为有效地利用自然资源、降低生产成本、减少环境污染提供了可能性。麦根酸类(mugineic acids)植物铁载体(phytosiderophores)在缺铁禾本科植物体内的生物合成,从植物根内向根际的分泌、在根际环境中对铁的活化及植物对Fe^{3+}—植物铁载体螯合体的吸收四个过程组成了禾本科植物对缺铁胁迫的适应机理。植物铁载体只在早晨日出后2～6h内大量分泌的节律性增加了它们在根际土壤中的相对浓度,减少了它们与土壤颗粒的接触和被吸附;分泌部位集中在微生物尚未侵染的根尖避开了微生物的破坏和分解,同时也增加了它们在土壤微区中的相对浓度。分泌作用和螯合作用不受介质pH值和Ca^{2+}离子浓度影响的特性使该机理在经常出现缺铁现象的石灰性土壤上具有特殊意义。研究结果还表明,缺铁可以诱导激活根细胞原生质膜上可能存在的Fe^{3+}—植物铁载体复合体的专一性吸收和运载蛋白,高pH值和$CaCO_3$对这一蛋白的载体功能只有很小的抑制作用,即使在pH值和$CaCO_3$含量都较高的石灰性土壤上,也能有效地发挥作用。这一结论揭示了小麦等禾本科植物适应铁胁迫的实质及其生态学意义。

关键词 植物铁载体,缺铁,缺锌,小麦,大麦,根分泌物

发掘和利用植物自身的抗逆能力,附之以对其微生态环境的调控,以减少和克服逆境的限制与损伤、降低农业生产成本、合理开发利用有限的资源、保护人类赖以生存的自然环境,达到高产优质高效的农业生产目的,已成为农业科学重要的基础研究和关键性的战略措施,也是当前国内外研究的热点之一。应用分子生物学和基因工程技术进行作物抗逆性的遗传改良,其关键是找出标记这一抗性的控制基因。就植物营养而言,养分专一性根分泌物是植物营养遗传特性控制基因的标记物,它受某一养分缺乏的诱导,是在植物体内合成,并可通过主动分泌作用进

★ 国家自然科学基金项目

人根际的代谢产物。它的合成和分泌只受该养分胁迫的专一诱导和控制，只要改善这一营养状况就能抑制或阻止其合成和分泌。当植物缺乏这一养分时，植物体可通过自身的调节能力，合成专一性的物质并分泌到根际，促进该养分的活化并提高植物对其吸收利用效率，从而达到克服或缓解该营养胁迫的目的。

本世纪80年代后期确定的禾本科植物根际专一性根分泌物—麦根酸类植物铁载体(PS)及其生理和生态学意义，不仅使人类有可能运用生物学研究技术来解决营养缺乏的问题，而且也为有效地利用自然资源、降低生产成本、减少环境污染提供了可能性[1,2,3]。本文系统地总结了本实验室近年来在这一研究方面取得的主要成果，提出了深入进行这一研究的重点。

一、 材料和方法

(一) 植物培养

试验植物为大麦(*Hordeum vulgare L.*)、小麦(*Tritcum aestiuum L.*)和黄瓜(*Cucumis sativus L*)。种子先在饱和$CaSO_4$溶液湿润的石英砂中发芽5天，再用蒸馏水冲洗后，移栽于下列营养液中(mol/L)：K_2SO_4 0.75×10^{-3}；$MgSO_4$ 0.65×10^{-3}；KCl 0.1×10^{-3}；$Ca(NO_3)_2$ 2.0×10^{-3}；KH_2PO_4 0.25×10^{-3}；H_3BO_3 1×10^{-5}；$MnSO_4$ 1×10^{-6}；$CuSO_4$ 1×10^{-7}；$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 5×10^{-9}。对照植物的营养液中加入FeEDTA 1×10^{-4} mol/L或$ZnSO_4$ 1×10^{-6} mol/L(+Fe或+Zn)，缺铁植物的营养液中不含铁(-Fe)、缺锌植物的营养液中不加锌(-Zn)。在每盆2.5L的营养液中，根据试验目的各培养3、60或100株植物。营养液的pH值用KOH或HCl调节到6.0(±0.1)，每两天更换一次营养液。植物生长的人工气候室条件为：白天／晚上的温度25／23℃；相对温度65%～75%；光照强度220 μ E/(m^2 s)；光照时间16h/d。

(二) 植物铁载体的收集、纯化和分离

植物铁载体直接从活体根系的分泌中获得。方法是在早上植物接受光照后2～6h内收集其培养液，再在50℃的水浴上减压蒸发浓缩；然后用专性阳离子交换树脂(Chelite-N and Chelite-P)除去铜、锌、铁和锰等金属离子；接着通过阳离子交换树脂(Ambelite IR-120 H^+型)，用1mol/L NH_4OH 溶液洗脱，洗脱液用Takagi等人的方法[9]进行植物铁载体的分离。

(三) 植物铁载体对难溶性铁和石灰性土壤中微量元素的螯溶能力测定

对难溶性铁的螯溶作用采用Takagi法[8]测定。即将新沉淀的铁的氢氧化物先在pH值5.6的缓冲溶液中同植物铁载体形成可溶性螯合物，过滤后除去沉淀，使滤液中螯合态三价铁在pH值4.7的环境中还原为二价铁；再使其同邻菲罗啉形成红色螯合物，比色测定。

植物铁载体对石灰性土壤中微量元素的螯溶能力用修正的Awad等人的渗透膜法[5]浸提，浸提液用等离子发射光谱仪测定。

(四) 植物对^{59}Fe吸收速率的测定

缺铁或缺锌植物与对照植物同时移入含有^{59}Fe 1×10^{-6} mol/L 的营养液(其它营养成分和浓度同前)中，在如前所述的人工气候室条件下进行4h的吸收试验。吸收试验结束后，植物按地下部和地上部分别收获；再在70℃的烤箱里烘干并测重；然后在550℃灰化；接着将干灰分溶解于HCl，在液体闪烁计数器上直接测定^{59}Fe的放射强度，计算出^{59}Fe吸收率。

二、 结果与讨论

(一) 植物铁载体的作用机理

植物铁载体的作用机理主要由四部分组成，一是铁载体的生物合成；二是铁载体的分泌；三是铁载体对铁的活化；四是植物对铁载体螯合铁的吸收(图1)。用小麦和大麦研究的结果表明(表1)，植物缺铁时的铁载体分泌率明显增加，可高达对照的几十倍以上；对铁的活化能力也远

远高于对照；其吸收铁载体螯合态铁的能力是对照的近6倍。这些结果充分说明了在没有其它干扰因子的情况下，植物铁载体的作用效率是很高的。

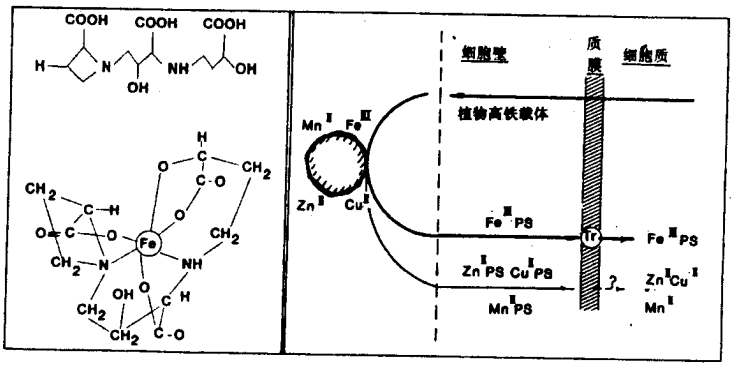

图 1　植物铁载体的结构及其在禾本科植物缺铁适应性中的作用机理图示

Fig. 1　Schematical presentation of PS system of Gremineae and the structure of MA

表 1　铁营养状况对大麦和小麦植物铁载体分泌率、铁活化量和铁吸收量的影响

Table 1　Effect of Fe nutritional status on PS release, Fe mobilization and Fe uptake rate in barley and wheat plants

植　物 plant	处　理 Treatment	植物铁载体分泌率 PS release (μ mol/4h)	土壤铁活化量 Fe mobilization (μ mol/4h)	铁吸收量 Fe uptake (nmol/g h)
大麦	+Fe	0.18	0.05	600
Barley	-Fe	5.44	1.06	3446
小麦	+Fe	0.21	0.06	621
Wheat	-Fe	7.42	1.21	3944

（二）植物铁载体作用机理的专一性

植物铁载体作用机理的专一性不仅决定着这一机理的效率，更重要的是关系到其遗传背景的复杂性。如果其专一性低，它就不可能受某些较简单的遗传机理或由某一基因控制，并因此失去追踪的价值，同时也在长期自然选择中被淘汰。用小麦试验的结果表明，植物铁载体的分泌并非缺铁的专一诱导，缺锌小麦也能分泌出同类植物铁载体(表2)，但缺铜和缺锰则无此影响。植物高铁载体不仅能活化铁，而且能活化铜和锌，对锰也表现出明显的活化能力(表3)。

表 2　铁、锌营养状况对小麦的植物铁载体分泌率的影响

Table 2　Effect of Fe and Zn nutritional status on PS release in wheat plants

处　理 Treatment	植物铁载体分泌率 PS release (μ mol/g 4h)
+Fe+Zn	0.31
-Fe	7.03
-Zn	4.42

用放射性同位素进行多次研究结果都表明，植物对铁载体螯合铁的吸收是专一的，其吸收量可以是其它螯合物的上百到上千倍(表4)。这一特性并未在其它金属的螯合物(包括植物铁载体螯合物)上表现出来。

表 3 植物铁载体对石灰性土壤中铁、铜、锌和锰的活化作用

Table 3 Mobilization of Fe, Cu, Zn and Mn in a calcareous soil by PS

元素 Element	活化量 mobilization (nmol/g 2h)	
	对照 Control	加植物铁载体(10^{-5} mol/L)
Fe	23	115
Cu	8	45
Zn	31	126
Mn	141	267

表 4 铁、锌和锰营养状况对小麦吸收铁的影响

Table 4 Effect of Fe, Zn and Mn nutritional status on Fe uptake from different sources by wheat

铁化合物 Fe form	处理 Treatment	^{59}Fe吸收率 ^{59}Fe uptake rate (nmol/(g root DW.h))
FePS	Control	889
	-Fe	5100
	-Zn	1013
	-Mn	894
FeEDTA	Control	32
	-Fe	20
FeDFOB	Control	4.1
	-Fe	3.6

植物铁载体分泌及其对铁活化能力的非专一性使这一机理的作用效率明显下降，但植物吸收系统的专一性为进行这一适应机理的遗传控制基因研究提供了动力和目标。

(三) 植物铁载体作用机理的生态学意义

在自然界，尤其是在石灰性土壤上，双子叶植物的缺铁黄化现象很普遍，而小麦、大麦等禾本科植物的缺铁黄化现象比较少见。其原因主要是由于在石灰性土壤上这两类植物对缺铁适应性反应的机理及其作用效率完全不同。当土壤pH值高于4.5时，双子叶植物对缺铁的适应性反应效率显著下降(表5)，而禾本科植物的适应性反应效率不仅不受土壤中大量的钙、镁影响，

表 5 介质pH值对缺铁黄瓜和小麦吸收^{59}Fe的影响

Table 5 Effect of medium pH on ^{59}Fe uptake by cucumber and wheat plants

作物 plant	铁形态 Fe form	介质pH值 medium pH	^{59}Fe吸收率 ^{59}Fe uptke (nmol ^{59}Fe/(g.4h))
黄瓜 Cucumber	FeEDDHA	5.0	624
		7.5	108
小麦 Wheat	FePS	5.0	3862
		7.5	3419

而且远比双子叶植物受到pH的影响小得多(表6和表7)。这就解释了禾本科植物比双子叶植物对缺铁适应能力更强，在同一石灰性土壤条件下较少出现缺铁黄化的现象。

表 6　介质pH值对缺铁小麦根分泌植物铁载体能力的影响

Table 6　Effect of medium pH on release of PS by Fe deficient wheat

介质pH值 medium pH	植物铁载体分泌率 PS release (μ mol/(g 4h))	相对值(%) Relative value
4	8.5	118
5	7.5	104
6	7.2	100
7	7.3	102
8	7.9	109

表 7　介质Ca^{2+}离子浓度对植物铁载体活化难溶性铁能力的影响(PS 浓度为500μ mol)

Table 7　Effect of Ca^{2+} on Fe mobilization from springly soluble Fe oxide by PS

介质Ca^{2+}浓度 Ca^{2+} concertration (μ mol)	铁活化率 Fe mobilization(μ mol)	相对值(%) Relative value(%)
0	500	100
50	508	102
500	512	102
2000	540	108
2500	532	106

上述结果不难看出，麦根酸类(MA)植物载体(PS)在缺铁禾本科植物体内的生物合成、从植物根内向根际的分泌、在根际环境中对铁的活化以及植物对Fe^{3+}—植物铁载体螯合体的吸收四个过程组成了禾本科植物对缺铁胁迫的适应机理。植物铁载体只在早晨日出后2～6h内大量分泌的节律性增加了它们在根际土壤中的相对浓度[10]，减少了它们与土壤颗粒的接触和被吸附；分泌部位集中在微生物尚未侵染的根尖避开了微生物的破坏和分解[6]，同时也增加了它们在土壤微区中的相对浓度；分泌作用和螯合作用不受介质pH值和Ca^{2+}离子浓度影响的特性使该机理在经常出现缺铁现象的石灰性土壤上具有特殊意义[2,11]。

研究结果还表明，缺铁可以诱导激活根细胞原生质膜上可能存在的Fe^{3+}—植物铁载体复合体的专一性吸收和运载蛋白[7]，高pH值和$CaCO_3$对这一蛋白的载体功能只有很小的抑制作用[2]，即使在pH值和$CaCO_3$含量都较高的石灰性土壤上，也能有效地发挥作用。这一结论揭示了小麦等禾本科植物适应铁胁迫的实质及其生态学意义。

(四) 植物铁载体作用机理的遗传特征

既然禾本科植物能通过专一性根分泌物—植物铁载体对缺铁条件有特别的适应能力，那么，这一能力是否是由较简单的遗传背景控制的？能否找到其控制基因并使之转移到非抗性植物体中而得到新的抗性品种？这些都是研究者极其关心的问题。我们用美国的玉米单基因突变体ys1/ys1试验的结果表明(表8)，ys1/ys1突变体的单基因突变正好失去了该亲本对缺铁适应性机理的控制基因，致使突变体不仅不能在缺铁环境中分泌植物铁载体，而且也失去了缺铁诱

导的专一性吸收系统。这一发现为进一步进行基因定位、克隆和转化提供了新的途径和依据。

表 8 玉米单基因突变体ys1/ys1与常规玉米品种对缺铁反应特点的比较

Table 8 Comprison of Fe deficiency reaction between Fe efficient maize cultivar BA60 and Fe-inefficient ys1/ys1

基因型 Genotype	植物铁载体分泌状况 * PS release		^{59}Fe-植物铁载体吸收率 ^{59}FePS uptake (nmol/(g 4h))	
	+Fe	-Fe	+Fe	-Fe
BA60	-	++	886	3241
ys1/ys1	-	-	92	106

*: -表示不分泌 +表示分泌

总之，人们对有关植铁载体与禾本科植物对缺铁胁迫的适应性的关系已作了许多有意义的探索，有了很多新的认识，但尚有许多工作有待深入。特别是植物铁载体的合成途径和遗传控制机制的研究，不仅在理论上将有新的突破，而且在生产实际的应用中也会有广阔的前景。

参 考 文 献

[1] 张福锁，1991：麦类作物适应缺铁营养条件机理的专一性研究。北京农业大学学报 17(1)： 29－33

[2] 张福锁，1993：植物铁载体在小麦适应缺铁石灰性土壤条件中的作用。北京农业大学学报 19(1)： 11－15

[3] 张福锁，1992：不同基因型植物对铁的活化和吸收机理。《土壤与植物营养研究新动态(第一卷)》 张福锁主编 北京农业大学出版社 p. 83-93

[4] 张福锁、陈 清、张西科，1993：植物矿质营养的生理和遗传特性研究进展。《植物营养生态生理学和遗传学》，张福锁主编，中国科学技术出版社。

[5] Awad, F., Romheld, V. and Marschner, H., 1988: Mobilization of feffic iron from a calcareous soil by plant-borne chelators (Phytosiderophores). J. Plant Nutr. 11:701-713

[6] Marschner, H. Romheld, V. and Kissel, M., 1987: Localization of phytosiderophore release and iron uptake along intact barley roots. Physiol. Plant. 71: 157-162

[7] Romheld, V. and Marschner, H., 1986 Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. Plant Physiol. 80: 175-180

[8] Takagi, S.. 1976: Naturally occurring iron-chelating compounds in oat-and rice-root washings. Soil Sci. Plant Nutr. 22: 423-433

[9] Takagi. S. Nomoto, K. and Takmoto, T., 1984: Physiological aspect of mugineic acid, a possible phytoisderophore of graminaceous plants. J. Plant Nutr. 7: 469-477

[10] Zhang, F.S., Treeby, M. Romheld, V. and Marschner, H., 1991: Mobilization of iron by phytosiderophores as affected by othe F.S., Treeby, M. Romheld, V. and Marschner, H., 1991: Mobilization of iron by phytosiderophores as affected by other micronutrients. Plant Soil 130: 173-178

[11] Zhang, F. S. Romheld, V. and Marschner, H., 1991: Diurnal pattern in release of phytosiderophores and uptake rate of zinc in iron deficient and iron sufficient wheat. Soil Sci. Plant Nutr. 37:671-681

ROOT EXUDATES AND THEIR ROLE IN ADAPTATION TO Fe DEFICIENCY IN GRAMINACEOUS PLANTS

Zhang Fusuo

(*Department of Plant Nutrition, Beijing Agricultural University, 100094*)

Summary

The role of root exudates in the adaptation to Fe deficiency in graminaccous plants was studied in nutrient solution and model experiments under controlled environmental conditions. The results demostrated that the specific root exudates were most important marks of the genetic control of the mineral nutrition in plants. The enhancement or inhibition of biosynthesis and release of specific root exudate was controlled by specific nutrient stress. The efficiency of this mechanism was dependent on both element and plant specificity.

The results indicated that the release of phytosiderphores are not a specific reaction to iron deficiency, but also to zinc deficiency. The phytosiderophores were able to mobilze not only iron, but also zinc, copper and manganese from calcareous soil. The uptake of phytosiderophore chelated Fe (Ⅲ) was specific to iron deficiency in comprison to zinc and manganese deficiency. The higher efficiency of Fe (Ⅲ) uptake by phytosiderophore chelate compared with synthetic and microbial chelates indicated a specific transport mechanism of phytosiderophore chelated Fe(Ⅲ) in graminaceous plants.

Key words Phytosiderophore, Fe deficiency, Zinc deficiency, Wheat, Barley, Root exudates