植物营养与肥料学报 2010,16(4):893-898
Plant Nutrition and Fertilizer Science

铝胁迫下黑麦根尖分泌有机酸和钾离子的研究

凌桂芝[1], 石保峰[1], 黄永禄[1], 李耀燕[1], 玉永雄[2], 黎晓峰[1]*
(1 广西大学农学院,广西南宁 530005; 2 西南大学动物科技学院,重庆 400716)

摘要: 采用药理学研究方法,研究了几种抑制剂和脱落酸对铝诱导黑麦根尖分泌有机酸和钾离子的影响。结果表明,在铝(100、200、300 μmol/L $AlCl_3$)胁迫下,根尖分泌柠檬酸、苹果酸和钾离子,且随着铝处理浓度的增加其分泌量显著增加。阴离子通道抑制剂苯甲酰甲醛(0.1、0.2 mmol/L)抑制根尖在铝(200 μmol/L $AlCl_3$)胁迫下分泌有机酸的同时,也抑制根尖分泌钾离子; 钾离子通道抑制剂四乙基铵(20、40 mmol/L)和铯(10、20 mmol/L CsCl)在抑制根尖分泌钾离子的同时,也抑制铝诱导的有机酸分泌。25、50 μmol/L 的 ABA 处理后,铝诱导的有机酸分泌和钾离子的分泌均显著增加。但是,铝诱导的有机酸分泌在受到阴离子通道抑制剂尼氟灭酸(0.4、0.8 mmol/L)处理抑制后,钾离子的分泌并不减少; 铝胁迫下根尖分泌的钾离子在 ATP 酶抑制剂钒酸钠(0.25、0.50、2.00 mmol/L)处理后受阻的同时,有机酸的分泌却显著增加。这些结果说明,钾离子是铝诱导黑麦根尖分泌有机酸的陪伴离子,而并非有机酸分泌的调控因子。

关键词: 铝胁迫; 黑麦; 有机酸; 钾; 分泌
中图分类号: S512.5.01　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 1008-505X(2010)04-0893-06

Secretion of organic acid anions and potassium from root apices under Al stress in *Secale cereale* L.

LING Gui-zhi[1], SHI Bao-feng[1], HUANG Yong-lu[1], LI Yao-yan[1], YU Yong-xiong[2], LI Xiao-feng[1]*
(*1 College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530005, China*;
2 College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: Aluminum(Al)-induced secretion of organic acid anions and potassium from root apices as the effects of several inhibitors and ABA in rye(*Secale cereale* L.) were investigated in the presented study using pharmacological methods. Under Al stress(100, 200 and 300 μmol/L $AlCl_3$), the secretions of citrate, malate and potassium increased with the increase of Al concentration. This secretion was inhibited by the treatment with anion channel inhibitor phenylglyoxal(0.1,0.2 mmol/L PG). Moreover, treatments with potassium channel inhibitors tetraethyl ammonium(20,40 mmol/L) or Cs^+(10,20 mmol/L CsCl) blocked remarkably the secretion of organic acid anions, which was coupled with the inhibition of potassium secretion. In addiction, the secretion of both organic acid anions and potassium was much more robust with the exposure of root apices to Al and ABA(25 or 50 μmol/L). Niflumic acid(0.4 or 0.8 mmol/L NA), an anion channel inhibitor, suppressed remarkably the secretion of organic acids, while the secretion of potassium was not depressed. The potassium secreted under Al stress was depressed after the treatment with ATPase inhibitor, vanadate(0.25,0.50 or 2.00 mmol/L), while the organic acids were increased significantly after the treatment. These results suggest that potassium involves in Al-induced secretion of organic acids in rye as an accompanied cation instead of a regulator factor.

Key words: Al stress; rye(*Secale cereale* L.); organic acids; potassium; secretion

收稿日期: 2009-06-30　　**接受日期**: 2010-01-04
基金项目: 国家"973"计划(2007CB108901); 国家自然科学基金(30771287、30363348); 高等学校博士学科点专项科研基金(200805930008)资助。
作者简介: 凌桂芝(1976—),女,广西横县人,讲师,主要从事植物营养逆境生理研究。Tel: 0771-3235314, E-mail: lgz15303@gxu.edu.cn
* 通讯作者 Tel: 0771-3235314, E-mail: lxf@gxu.edu.cn

土壤溶液中的铝离子是酸性土壤中植物生长的主要障碍因子[1]。铝离子的毒性很强,微摩尔级的铝离子对植物的生长便有明显的毒性[1]。然而,在长期的进化过程中,有些植物逐渐形成了适应铝毒环境的机制。研究表明,铝诱导根系分泌有机酸是一些植物抵御铝毒害的主要机制之一[1-2]。有机酸在根际环境中与铝螯合形成毒性较低的有机酸-铝复合物,从而解除铝的毒害。在铝胁迫下根系分泌有机酸的植物包括:小麦(*Triticum aestivum* L.)、菜豆(*Phaseolus vulgaris*)、荞麦(*Fagopyrum esculentum* Moench)、大豆(*Clycine max* L.)、玉米(*Zea mays* L.)、芋(*Colocasia esculenta* L.)、五色梅(*Lantana camara*)、油菜(*Brassica campestris*)、小黑麦(*Triticosecale Wittmack*)等[1,3]。在有机酸分泌过程中常常伴随着钾离子的释放。在保卫细胞、木质部及根系阴离子和氨基酸运输过程中,钾离子的移动发挥很重要的作用。保卫细胞钾离子的分泌可激活阴离子通道并引起阴离子的跨膜转运[4]。在铜胁迫下,拟南芥根尖分泌柠檬酸及在铝胁迫下小麦根尖分泌苹果酸的过程中均伴随有钾离子的释放[5-6]。然而,钾离子在有机酸分泌过程中的作用却尚不清楚。与有机酸分泌相伴进行的钾离子分泌的研究对于阐明铝诱导有机酸分泌的机制是非常有益的[7]。本研究以黑麦为材料,采用药理学研究方法对钾离子在铝诱导根系分泌有机酸过程中的作用进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试的黑麦(*Secale cereale* L.)品种为 King,购自日本大阪 Taki 种子公司。种子经浸种、催芽后,在人工气候室中于 $CaCl_2$ 溶液中培养[8]。5 d 龄幼苗的根尖(10 mm)为供试材料。

1.2 试验处理

1.2.1 铝处理 铝处理浓度为 $AlCl_3$ 0、50、100、300 μmol/L,pH 4.3。将每处理根尖 30 条置于预先恒温至 22℃ 的含 $AlCl_3$ 的 0.5 mmol/L $CaCl_2$ 溶液 1.0 mL 中。在脱色摇床上恒温(22℃)振荡 3 h 后,收集含根分泌物的 $AlCl_3$ 溶液,测定其中的柠檬酸、苹果酸和钾含量。

1.2.2 抑制剂及 ABA 处理 收集从幼苗上切取的根尖,分别在 0.5 mmol/L $CaCl_2$ 溶液中洗涤后,置于含离子通道抑制剂(苯甲酰甲醛、尼氟灭酸)、钾离子通道抑制剂(四乙基氯化铵和氯化铯)、ATP 酶抑制剂(钒酸钠)和脱落酸(ABA)溶液中进行处理(25℃~28℃,下同)。30 min 后,弃去处理溶液。ABA 处理溶液的浓度为 0、25、50、100 μmol/L。抑制剂的处理浓度分别为:苯甲酰甲醛(PG)0、0.1、0.2 mmol/L;尼氟灭酸(NA)0、0.4、0.8 mmol/L;氯化铯(Cs)0、10、20 mmol/L;四乙基氯化铵(TEA)0、20、40 mmol/L;钒酸钠($NaVO_3$)0、0.25、0.5、2.0 mmol/L。抑制剂处理的根尖经 0.5 mmol/L $CaCl_2$ 溶液洗涤后,加 $AlCl_3$ 溶液 200 μmol/L 进行进一步处理。抑制剂、ABA 及铝处理液中均含 0.5 mmol/L $CaCl_2$(pH 4.5)。3 h 后,收集含根分泌物的 $AlCl_3$ 溶液,测定其中的柠檬酸、苹果酸和钾含量。

研究中所有处理均设 3 次以上的重复,各试验均至少做 2 次重复。

1.3 有机酸及钾的测定

分别采用酶动力学-分光光度法(岛津 UVmini-1240)测定铝处理溶液中柠檬酸、苹果酸[9],原子吸收分光光度法(上分 3510)测定钾浓度。

试验数据均采用 DPS 统计软件进行差异性分析和多重比较(新复极差法)。

2 结果与分析

2.1 铝诱导黑麦根系分泌有机酸和钾离子

100、200、300 μmol/L $AlCl_3$ 处理后,黑麦根尖分泌大量的柠檬酸和苹果酸,且分泌量随着铝处理浓度的增加而增加(图 1A),说明铝能诱导黑麦根尖分泌有机酸。100、200、300 μmol/L $AlCl_3$ 处理后溶液中钾离子也显著增加,分别为 0.69、1.22 和 2.28 nmol/apex,相当于对照的 32.8、58.0 和 108.8 倍(图 1B),说明在有机酸分泌的同时铝也诱导黑麦根尖分泌钾离子。

2.2 阴离子通道抑制剂对铝胁迫下黑麦根尖分泌有机酸及钾离子的影响

阴离子通道抑制剂 NA 和 PG 已广泛应用于动植物细胞膜上的阴离子的跨膜运输的研究。0.1、0.2 mmol/L PG 和 0.4、0.8 mmol/L 的 NA 均显著抑制铝诱导的有机酸分泌(图 2)。PG 还显著抑制铝诱导的钾离子的分泌。$AlCl_3$ 200 μmol/L 处理 3 h 后,根尖分泌的钾达到 0.82 ± 0.04 nmol/apex(图 3A),而 0.1、0.2 mmol/L PG 处理后根尖分泌的钾仅为 0.66 ± 0.04 和 0.47 ± 0.03 nmol/apex。虽然 NA 显著抑制铝诱导的有机酸分泌(图 2),但 0.4~0.8 mmol/L NA 处理后,根尖分泌的钾却显著增加,且有随着 NA 处理浓度的增加而增加的趋势(图 3B)。

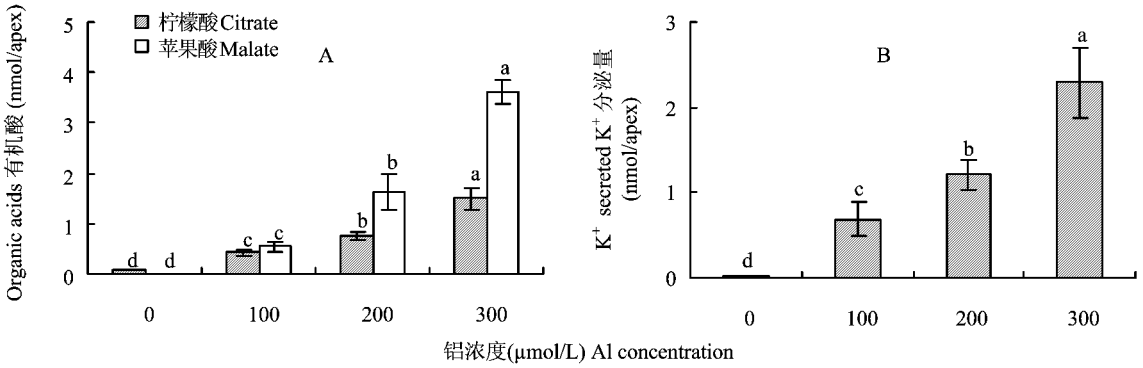

图 1　铝诱导黑麦根尖分泌柠檬酸、苹果酸和钾

Fig. 1　Al-induced secretion of citrate, malate and potassium

[注(Note): 柱上不同字母表示处理间在 $P<0.05$ 水平差异显著

Different letters above the bars indicate significant difference among treatments ($P<0.05$).]

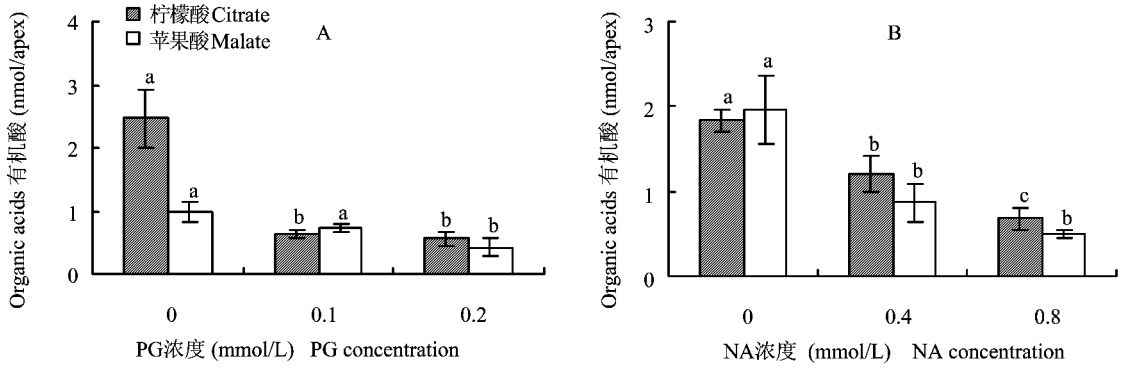

图 2　阴离子通道抑制剂 PG 和 NA 对铝胁迫下根尖有机酸分泌的影响

Fig. 2　Effect of anion-channel inhibitors PG and NA on the secretion of organic acids from root apex under Al stress

[注(Note): 柱上不同字母表示处理间在 $P<0.05$ 水平差异显著

Different letters above the bars indicate significant difference among treatments ($P<0.05$).]

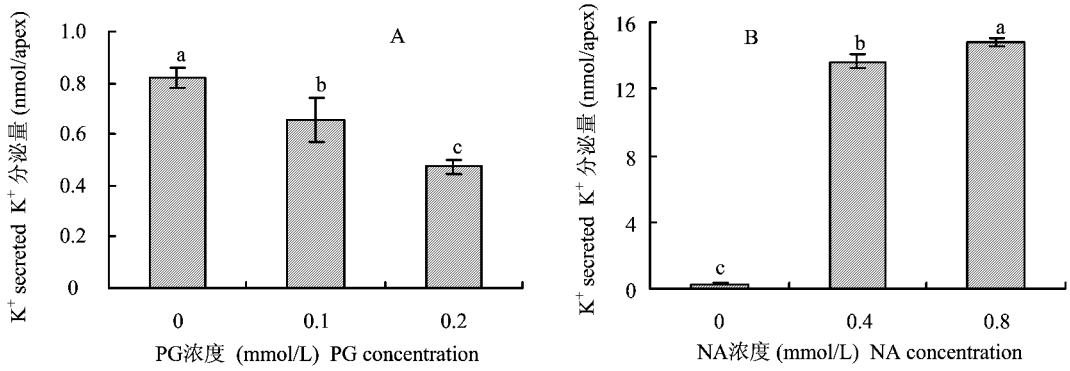

图 3　PG 和 NA 对铝胁迫下根尖释出钾离子的影响

Fig. 3　Effect of PG and NA on potassium release from root apex under Al stress

[注(Note): 柱上不同字母表示处理间在 $P<0.05$ 水平差异显著

Different letters above the bars indicate significant difference among treatments ($P<0.05$).]

2.3　钾离子通道抑制剂对铝胁迫下黑麦根尖分泌有机酸及钾离子的影响

TEA 和 Cs^+ 是钾离子通道抑制剂。20、40 mmol/L TEA 处理 30 min 后,铝胁迫下黑麦根尖分泌钾离子受到显著抑制,并随 TEA 处理浓度的增加钾离子分泌量显著减少; 10、20 mmol/L Cs^+ 也显著

抑制铝胁迫下黑麦根尖钾离子的分泌,但 20 与 10 mmol/L Cs^+ 的抑制程度没有差异(图 4)。在铝胁迫下,根尖分泌的有机酸也受到 TEA 和 Cs^+ 的抑制。当 TEA 浓度达到 40 mmol/L 时,柠檬酸的分泌受到显著抑制,而 TEA 浓度达到 20 mmol/L 时,苹果酸的分泌受到显著抑制。Cs^+ 对黑麦根尖分泌的柠檬酸和苹果酸的影响也不尽一致,10 mmol/L 的 Cs^+ 即可显著抑制柠檬酸的分泌,而对于苹果酸的分泌则是在 Cs^+ 预处理浓度达到 20 mmol/L 时才有显著的抑制作用(图 5)。

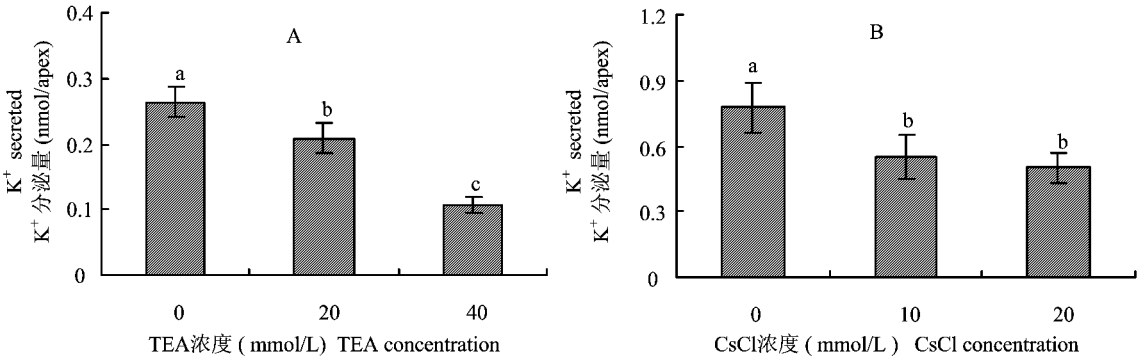

图 4 钾离子通道抑制剂 TEA 和 CsCl 对铝胁迫下钾离子分泌的影响

Fig. 4 Potassium release as the effect of potassium ion channel inhibitors TEA and CsCl under Al stress

[注(Note):柱上不同字母表示处理间在 $P<0.05$ 水平差异显著

Different letters above the bars indicate significant difference among treatments ($P<0.05$).]

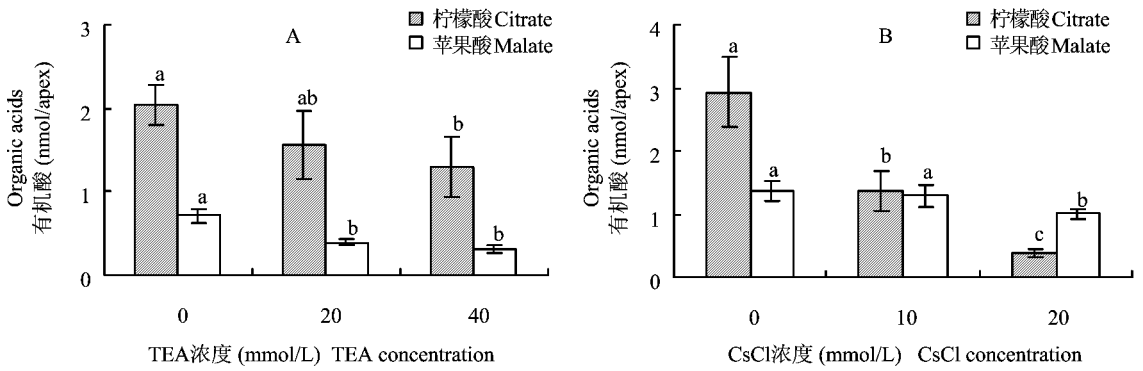

图 5 TEA 和 CsCl 对铝诱导的有机酸分泌的影响

Fig. 5 Al-induced secretion of organic acids as the effect of TEA and CsCl

[注(Note):柱上不同字母表示处理间在 $P<0.05$ 水平差异显著

Different letters above the bars indicate significant difference among treatments ($P<0.05$).]

2.4 外源 ABA 和 ATP 酶抑制剂对黑麦根尖分泌有机酸和钾离子的影响

25、50 μmol/L ABA 处理后,根尖在铝胁迫下分泌的钾离子显著增加。但是,ABA 处理浓度进一步增加后,根尖分泌的钾离子却有下降的趋势(图 6A)。与钾离子分泌的趋势类似,ABA 处理后根尖在铝胁迫下分泌的柠檬酸也有随着 ABA 处理浓度的增加而增加,但 ABA 的浓度超过 50 μmol/L 后,柠檬酸的分泌并不进一步增加;ABA 对苹果酸的影响在 25 μmol/L 时达到最大值,随后随着浓度增加苹果酸的分泌有所减少,但与对照相比均没有显著差别(图 6B)。

钒酸钠是 ATP 酶的专一性抑制剂。0.25、0.5、2.0 mmol/L 钒酸钠处理后,铝胁迫下根尖分泌 K^+ 显著减少(图 7A),但 0.25、0.5 mmol/L 钒酸钠处理后,根尖分泌的柠檬酸却显著增加,而苹果酸的分泌在钒酸钠浓度达到 0.5 mmol/L 时显著增加,并随其浓度增加而增加(图 7B)。

3 讨论

黑麦是耐铝性最强的作物。前期研究发现,黑麦的根系在铝胁迫下能分泌大量的有机酸[8-9]。本研究也表明,在铝胁迫下黑麦的离体根尖能够分泌柠檬酸和苹果酸。铝胁迫下,小麦、玉米、大豆等多

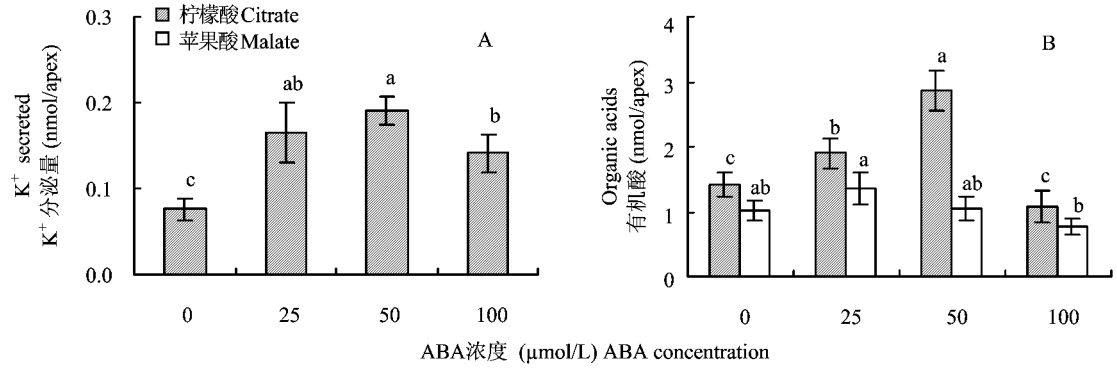

图 6　ABA 对铝胁迫下钾离子和有机酸分泌的影响

Fig. 6　The secretion of K and organic acids from root apex under Al stress as the effect of ABA

[注(Note): 柱上不同字母表示处理间在 $P<0.05$ 水平差异显著

Different letters above the bars indicate significant difference among treatments ($P<0.05$).]

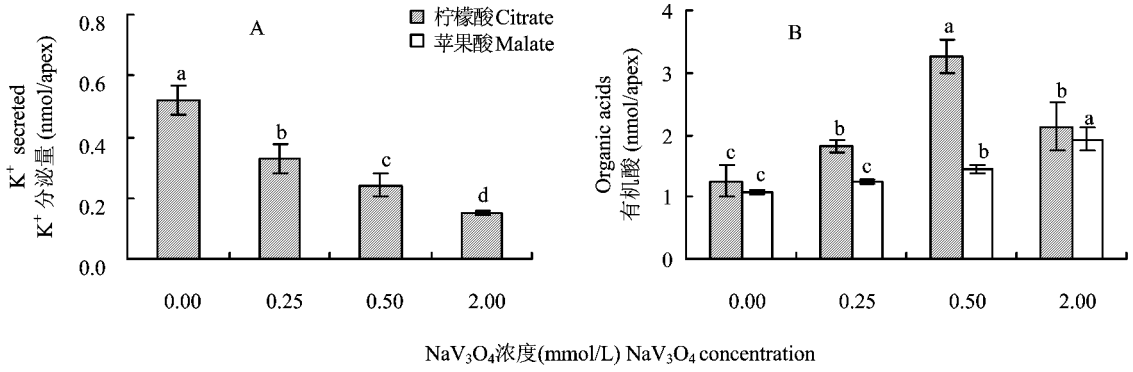

图 7　钒酸盐对铝胁迫下钾离子和有机酸分泌的影响

Fig. 7　The secretion of K and organic acids from root apex under Al stress as the effect of vanadate

[注(Note): 柱上不同字母表示处理间在 $P<0.05$ 水平差异显著

Different letters above the bars indicate significant difference among treatments ($P<0.05$).]

种作物的根系也能分泌有机酸,这些有机酸能与根尖周围的铝离子络合形成无毒的有机酸-铝复合物[10]。因此,铝诱导根尖分泌有机酸被视为重要的植物耐铝机制[1,3]。

铝调控有机酸分泌的机制尚不清楚。多种因素可能参与铝胁迫下有机酸分泌的调控[1,8]。这些因素包括铝对植物体内有机酸代谢的改变、铝调控的基因诱导及细胞第二信使等[1]。Li 等[8]报道,铝通过促进有机酸的合成而抑制有机酸分解代谢等途径调控有机酸的分泌。铝激活的苹果酸载体的基因 *AtALMT*1 已被成功克隆[11]; MATE 及 ALS 基因也可能是分泌有机酸的载体基因[3]。膜片钳分析等研究结果表明,根尖细胞膜上的阴离子通道介导铝诱导根尖分泌有机酸[12]。在本研究中,阴离子通道抑制剂 NA 和 PG 均抑制黑麦根尖分泌有机酸。铝胁迫下 NA 和 PG 对根尖分泌有机酸的影响的差异性显示,黑麦根尖可能通过几种不同类型的离子通道分泌柠檬酸和苹果酸,这些通道对不同离子通道抑制剂的敏感性不同。这些结果表明,阴离子通道可能是铝胁迫下黑麦根尖分泌柠檬酸和苹果酸的主要途径。

本试验表明,铝胁迫下伴随着有机酸的分泌,黑麦根尖分泌大量的钾离子,并且钾离子的分泌量随着铝处理浓度的增加而增加。Ryan 等[13]也指出,在铝胁迫下小麦根尖分泌苹果酸伴随着钾离子的分泌。而铜也诱导拟南芥根系协同分泌柠檬酸和钾离子[5]。

在有机酸分泌过程中钾离子可能作为有机酸分泌的调控因子,诱发膜的去极化。钾离子也有可能仅仅作为有机酸分泌的陪伴离子,维持细胞内外的电位平衡。保卫细胞钾离子的分泌能够通过调控膜的去极化而激活电压门控的阴离子通道[4]。由于钾离子的分泌会增加膜的负电性,钾离子有可能作为一种信号因子,通过对阴离子通道的超极化而开

启铝依赖的有机酸阴离子通道[7]。在拟南芥根系，当钾离子分泌受阻时铜诱导的柠檬酸分泌受到影响，说明柠檬酸的分泌依赖于钾离子的分泌[5]。在本研究中发现，在铝胁迫下黑麦分泌的柠檬酸和苹果酸受到阴离子通道抑制剂 PG 的抑制时，钾离子的分泌也受到抑制。相反，在钾离子的分泌受到钾离子抑制剂 TEA 和 Cs^+ 的抑制时，铝胁迫下根尖分泌的有机酸也随之受阻。在铝胁迫下，镧等钾离子通道抑制剂等也抑制钾离子和铝胁迫下的有机酸分泌[14]。另一方面，适量的外源 ABA 促进铝诱导有机酸的分泌，这与大麦根尖分泌有机酸的特性相似。与有机酸的分泌相似，黑麦根尖分泌的钾离子也受到 ABA 处理的促进。然而，在铝胁迫条件下虽然阴离子通道抑制剂 NA 也显著抑制黑麦根尖分泌柠檬酸和苹果酸，但是 NA 并不抑制钾离子的分泌。并且，虽然钒酸盐也显著抑制钾离子的分泌却并不抑制铝胁迫下黑麦根尖分泌有机酸。可见，在铝胁迫下有机酸分泌并非以钾离子的分泌为前提，而有机酸分泌的受阻也不影响钾离子的分泌。这些结果说明，钾离子和有机酸分泌是相互独立的两个过程，钾离子并不能调控黑麦根尖在铝胁迫下分泌有机酸。

在铝胁迫下 NA 处理后根尖 pH 增加。在有机酸分泌过程中，胞质中有机酸的质子化并产生 OH^- 从而增加胞质的 pH。当然，在有机酸分泌过程中陪伴着钾离子分泌可以补偿由于有机酸分泌引起的细胞内的碱化和负电性以维持细胞的电化学平衡[6]。可见，钾可能是铝诱导有机酸分泌的陪伴离子。

参考文献：

[1] Ma J F. Role of organic acids in detoxification of aluminum in high plants[J]. Plant Cell Physiol. ,2000,41: 383-390.

[2] Kochian L V, Piñeros M A, Hoekenga O A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity[J]. Plant Soil,2005,274: 175-195.

[3] Delhaize E, Gruber B D, Ryan P R. The roles of organic anion permeases in aluminum resistance and mineral nutrition[J]. FEBS Lett,2007,581: 2255-2262.

[4] Grabov A, Blatt M R. Coordination of signaling elements in guard cell ion channel control[J]. J. Exp. Bot. ,1998,49: 351-360.

[5] Murphy A S, Eisinger W R, Shaff J E *et al*. Early copper-induced leakage of K^+ from Arabidopsis seedlings is mediated by ion channels and coupled to citrate efflux[J]. Plant Physiol. ,1999,121: 1375-1382.

[6] Osawa H, Matsumoto H. Aluminum triggers malate-dependent potassium release via ion channels from the root apex in wheat[J]. Planta,2002,215: 405-412.

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

[8] Li X F, Ma J F, Matsumoto H. Pattern of aluminum-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat[J]. Plant Physiol. ,2000,123: 1537-1543.

[9] Li X F, Ma J F, Matsumoto H. Aluminum-induced secretion of both citrate and malate in rye[J]. Plant Soil,2002,242: 235-243.

[10] 黎晓峰. 铝诱导黑麦的根尖分泌有机酸[J]. 广西农业生物科学,2002,21(2): 78-82.
Li X F. Aluminum induced secretion of organic acids from root apices in *Secale cereale* L.[J]. J. Guangxi Agric. Biol. Sci. , 2002,21(2): 78-82.

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

[12] Zhang W H, Ryan P R, Tyerman S D. Malate-permeable channels and cation channels activated by aluminum in the apical cells of wheat roots[J]. Plant Physiol. ,2001,125: 1459-1472.

[13] Ryan P R, Delhaize E, Randall P J. Characterisation of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots[J]. Planta,1995,196: 103-110.

[14] Kataoka T, Stekelenburg A, Nakanishi T M *et al*. Several lanthanides activate malate efflux from roots of aluminum-tolerant wheat[J]. Plant Cell Environ. ,2002,25: 453-460.