

红豇豆根缘细胞对铝胁迫的响应

杜幸, 刘鹏*, 徐根娣, 蔡妙珍

(浙江师范大学植物学重点实验室, 浙江金华 321004)

摘要: 以红豇豆 (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis* cv. *chuangfeng*) 为材料, 采用悬空气培法, 研究红豇豆根缘细胞产生的数目、活性及对铝胁迫的响应。结果表明, 红豇豆的边缘细胞数目先随着根的伸长而迅速增加, 到根长为 10mm 时达到最多, 约为 5300 个; 随后, 边缘细胞数目稍有减少, 且较为稳定。边缘细胞的存活率较高, 都大于 85%, 随着红豇豆根长的伸长, 边缘细胞的活性逐渐增高。根冠果胶甲基酯酶(PME)的活性随着根的伸长而减小, 表明边缘细胞游离与根冠 PME 活性有着密切的相关性。离体边缘细胞的存活率随着 Al^{3+} 处理浓度和处理时间的增加而降低。不同浓度 Al^{3+} 液处理对相同根长红豇豆的根冠 PME 酶活性没有显著的影响。

关键词: 红豇豆; 根缘细胞; 存活率; 果胶甲基酯酶(PME); 铝毒

中图分类号: S643.4; X173

文献标识码: A

文章编号: 1008-505X(2006)05-0722-05

Response of root border cell in red cowpea to aluminum stress

DU Xing, LIU Peng*, XU Gen-di, CAI Miao-zhen

(Key Lab. of Botany, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China)

Abstract: Experiments were conducted with red cowpea (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis* cv. *chuangfeng*) as experimental materials to study the numbers, activity and responsiveness of root border cells to Al stress using aeroponic culture. The results indicated that root border cell number of red cowpea increased rapidly with the elongation of root. It reached peak being around 5300 when roots were 10mm, then it decreased slightly and kept rather stable. All root border cells had a high viability, which was higher than 85%. With the extending of root, activities of board cell were promoted stepwise; while pectin methylesterase (PME) activity in root cap was abated indicating that PME activities were closely related with root border cell separation. Root border cell's viability in *intro* decreased with increasing of concentration of Al^{3+} and/or their access time to Al^{3+} . No significant difference on PME activities in root cap was observed between treatments treated under different Al^{3+} concentration when cowpea roots had same length.

Key words: red cowpea (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedali* cv. *chuangfeng*); root border cell; viability; pectin methylesterase (PME); aluminum toxicity

根缘细胞(Root border cell)是从根冠表面脱落下来并聚集在根部周围的一群特化细胞,对植物的生长和发育具有重要意义。根缘细胞也称为边缘细胞或根边缘细胞。过去,根缘细胞被认为是根冠新陈代谢中已经死亡或将要死亡的代谢副产物,只是在根的生长过程中起润滑作用,不具有存活能力^[1]。早在 1919 年,Knudson 就曾指出根缘细胞是有活性的,认为其是死亡或将要死亡的代谢副产物的观点

是错误的^[2],但并未引起人们的注意。近年来,越来越多的证据表明,绝大多数物种的边缘细胞是有活性的,边缘细胞能合成并向外分泌一系列具有生物活性的化学物质,对调节根部环境,提高植物在逆境中的生存率等具有重要意义^[3]。

铝胁迫是酸性土壤中植物生长发育的重要限制因素。铝通常以难溶性硅酸盐或氧化铝的形式存在,在 pH < 5 时的酸性条件下,可溶性的铝(主要

是 Al^{3+}) 对大多数植物都会产生毒害。近年来,随着环境酸化问题的日益严重,尤其是酸雨的频繁沉降和生理酸性肥料的施用,土壤酸化加剧,铝溶出增加,严重制约了植物的生长^[4-5]。在植物的各部分器官中,铝对植物根的毒害效应很快,而根尖是铝毒害的最初位点^[6-7]。根冠和根尖的边缘细胞合成并向外分泌的化学物质能形成保护根尖的黏液层,与 Al^{3+} 结合,降低植物对铝毒的敏感性,提高存活率^[8],因而根缘细胞的研究在植物耐铝毒机理的研究中具有重要意义。目前,有边缘细胞研究工作报道的植物已达 14 科 48 种^[9-13],其中豆科植物有豌豆 (*Pisum sativum*)、田菁 (*Sesbania exaltata*)、苜蓿 (*Medicago sativa*)、大豆 (*Glycine max*) 和菜豆 (*Phaseolus vulgaris*) 等^[10, 14-17]。为弄清铝毒害植物的过程及植物对铝毒的忍耐机理,开展了豇豆边缘细胞生物学特性及其对铝的响应,为提高酸性土壤地区豇豆产量和品质提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试材培养

供试豇豆购自金华市种子公司的创丰牌春秋红豇豆 (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis* cv. *chuangfeng*)。

取饱满的红豇豆种子,自来水浸种 4~6h,置于 28℃ 恒温培养箱暗培养(预试验表明该条件适合红豇豆的发芽和根的生长),待种子露白后,播种于下层铺有脱脂棉,上层为滤纸的湿润培养皿中培养待用。

1.2 测定项目与方法

1.2.1 根缘细胞数目和存活率的测定 随机剪取根长为 5、10、15、20、25mm 的根尖,将其浸入 20μL 蒸馏水中,轻轻搅动 15~30s,将根缘细胞洗脱在水中,滴加 20μL FDA-PI (Fluorescein diacetate-pro pidium iodide) 染液 (FDA 25 μg/mL、PI 10 μg/mL) (边缘细胞溶液与染液以 1:1 混合),用移液枪轻轻吹吸几次,混匀溶液,黑暗放置 15min 染色,形成 40μL 染色的根缘细胞溶液。取 10μL,用血球计数板计数。荧光显微镜下显绿色荧光的为活细胞,显红色荧光的为死细胞。重复 5 次,得到豇豆各个根长的根缘细胞数目和存活率。

1.2.2 根冠 PME 酶(果胶甲基酯酶)活性的测定 参照 Richard 等的方法^[18]。取根长为 2、5、10、15、20、25mm 的根各 40 个,分别剪取 2~3 mm 的根尖,置于放有 200μL PME 酶提取液 (Citric acid 0.1

mol/L、 Na_2HPO_4 0.2 mol/L、NaCl 1 mol/L, pH 5.8) 的研钵中,研磨完全,研磨液装入离心管,在冰浴中放置 1h,每隔 20min 振荡一次。1h 后,于 4℃,15000 r/min,离心 10min,取上清液,即为 PME 酶提取液。-20℃ 下保存待用。

底物溶液配制 [0.5% (W/V) Citrus ectin (Sigma)、NaCl 0.2 mol/L、0.15% (W/V) Methyl red, pH 6.8]。分别取 20、40、60、80、100、120μL 0.01 mol/L 的盐酸加入 4mL 底物溶液,525nm 下测分光光度值,测绘出关于 H^+ 值和 OD 值的标准曲线。

将 10 μL PME 酶提取液加入 4mL 底物溶液中,充分混匀,37℃ 水浴 2h,525nm 分光光度测 OD 值,根据标准曲线即可得出不同长度豇豆根的根冠 PME 酶的活性。重复 3 次。PME 酶活性用 Root H^+ nmol / (cap·h) 表示。

1.2.3 Al^{3+} 对离体根缘细胞的存活率测定 将根尖根缘细胞轻轻洗脱在 100 μL Al^{3+} 液中 (Al^{3+} 液浓度为 0、50、100、200、400 μmol/L, Ca^{2+} 0.5mmol/L, pH 6.8), 28℃ 恒温培养,4、8、12、24 h 后,按照 1.2.1 的方法,测根缘细胞的存活率,重复 5 次。

1.3 数据处理

所得的各组数据用 SPSS 11.5 软件进行方差分析和显著性(单因素或二因素多重 Tukey 比较)检验。

2 结果与分析

2.1 红豇豆根缘细胞的发育及存活率

根缘细胞和根尖几乎同时出现,随着红豇豆根的伸长,根尖根缘细胞数目迅速增加,在根长 2mm 时只有 200 个左右,5mm 时就达到了 3500 个左右,到根长 10mm 时,根尖的根缘细胞数目达到最多,有 5300 个左右,随后,根缘细胞的数目稍有减少,但基本较为稳定,15mm,20mm 时为 4800 个左右,25mm 时为 4500 个左右(表 1)。

表 1 还看出,在正常状况下,红豇豆边缘细胞的存活率较高,都大于 85%。随着豇豆根长的伸长,红豇豆根缘细胞的存活率逐渐增高,当根长达到 20mm 时,红豇豆根缘细胞的活性开始保持稳定,25mm 与 20mm 长根的活性大体相似,在 93.5%~95.3% 之间。

2.2 红豇豆根冠果胶甲基酯酶(PME)活性的变化

从红豇豆根冠 PME 酶的活性变化(表 1)可以看出,随着根的伸长,根冠 PME 酶的活性逐渐降低,根长为 2mm 时最大,根长为 25mm 时最小,与 5 至 15mm

表 1 红豇豆的根长与根缘细胞数目、边缘细胞活性和 PME 酶活性间的关系

Table 1 The relationship of root length and root border cell number, border cell activity, and PME activity of red cowpea

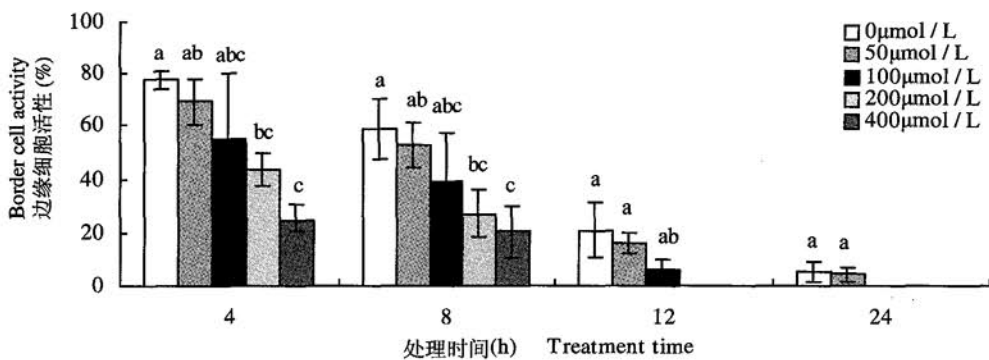
根长 Root length (mm)	边缘细胞数目 Border cell number (No.)	边缘细胞活性 Border cell activity (%)	PME 酶活性 PME activity [Root H ⁺ nmol/(cap·h)]
2	175.3 ± 64.67 a	—	482.38 ± 11.55 a
5	3520.0 ± 411.60 b	87.13 ± 2.84 a	443.88 ± 9.50 b
10	5336.7 ± 133.33 c	90.70 ± 3.64 ab	417.30 ± 6.36 b
15	4800.0 ± 391.27 cd	92.38 ± 3.45 ab	417.20 ± 6.25 b
20	4806.7 ± 533.33 cd	93.87 ± 1.96 b	364.47 ± 6.36 c
25	4833.3 ± 266.67 d	95.20 ± 3.13 b	264.27 ± 10.22 d

根长的根冠 PME 酶的活性差异都达到了显著水平 ($P < 0.05$), 而 5 至 15mm 根长根冠 PME 酶的活性较为稳定, 各处理间没有显著差异 ($P > 0.05$)。

2.3 Al^{3+} 对红豇豆离体根缘细胞存活率的影响

离体根缘细胞的存活率随着 Al^{3+} 处理液浓度和处理时间的增加而降低 (图 1), Al^{3+} 浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对离体根缘细胞的活性影响极大, 培养

4h 时, 存活率就只有 25% 左右。 Al^{3+} 浓度为 200 和 400 $\mu\text{mol/L}$ 时, 培养 12h 时, 根缘细胞全部死亡, 而 Al^{3+} 浓度为 0、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 处理的根缘细胞活性分别为 20.67%、16.00% 和 6.00%。当处理时间达到 24h 时, 100 $\mu\text{mol/L}$ Al^{3+} 处理的根缘细胞活性降至 0; 0 和 50 $\mu\text{mol/L}$ Al^{3+} 处理的根边缘细胞活性分别只有 5.33% 和 4.33%。

图 1 Al^{3+} 对红豇豆离体根缘细胞活性的影响Fig.1 The effect of different Al^{3+} concentration on root border cell activity of red cowpea in vitro

2.4 Al^{3+} 对红豇豆根缘细胞根冠 PME 酶活性的影响

从图 2 可知, 不同浓度 Al^{3+} 处理对相同根长红豇豆的根冠 PME 酶活性没有明显的影响。随着铝浓度的增加, 根缘细胞根冠 PME 酶活性稍有下降, 除 Al^{3+} 浓度为 200 和 400 $\mu\text{mol/L}$ 处理的 25mm 根长的根缘细胞根冠 PME 酶活和其它处理的根缘细胞根冠 PME 酶活性达到了显著差异 ($P < 0.05$), 其它各根长不同处理间的根缘细胞根冠 PME 酶活性差异都没有达到显著水平 ($P > 0.05$)。相同铝浓度处理的不同根长的根缘细胞根冠 PME 酶活性, 随着根长的增加而降低, 这与 2.2 的结果相一致。

3 讨论

铝对红豇豆的根缘细胞的发育有明显影响。红豇豆的根尖根缘细胞数目先随着根的伸长而迅速增加, 到根长为 10mm 时达到最多, 约为 5300 个。目前报道的豆科植物根缘细胞, 苜蓿为 2700 个^[15], 菜豆为 4400 个^[16], 田菁为 3900 个^[10], 碗豆为 4000 个^[14], 大豆为 3800^[10] 和 5300^[17]。有研究指出^[10,19], 根缘细胞的产生在同科植物间差异较小, 同一种不同品种间的差异更小; 本试验结果表明, 红豇豆的根缘细胞的数目几乎为苜蓿的 2 倍。马伯军等^[17]观察的大豆根缘细胞数目比 Hawes 和 Pueppke^[10]观察到

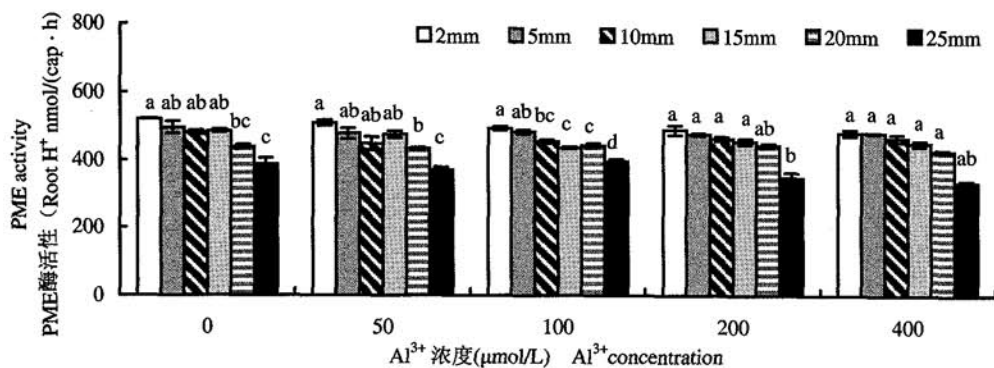


图2 Al^{3+} 对红豇豆不同根长根冠 PME 酶活性的影响

Fig.2 The effect of Al^{3+} concentrations on PME activity in root caps with different root length of red cowpea

的数目多 65.8%。可见,同一个科不同的植物,同一种植物不同品种间根缘细胞的数目可以有较大的差别,可能与根缘细胞的产生是一个受内外信号调控的诱导型表达过程^[9,19],与外界(实验的条件)密切相关。因此,同科不同的植物或同种植物不同的品种的根缘细胞数目随着外界影响的不同而有较大的差异,不同的环境条件下同一种类的根缘细胞数目也可能会有所差异。

目前有关植物根缘细胞产生的时间有二种模式,一种是根缘细胞几乎与根尖同时出现,如大麦^[21]和大豆^[17],一种当初生根长到一定的长度,才有根缘细胞产生,如豌豆^[14, 22],当初生根达到 5mm 时,才出现第一个根缘细胞。我们的研究表明,红豇豆的根缘细胞与根的出现几乎是同步的,当根长为 2mm 时,红豇豆的根缘细胞数目已达 200 个。说明同一科不同植物间根缘细胞的启动也是有特异性的,其差异可能与其发育相关的基因特异表达有关^[3, 9]。

多数研究认为^[4, 23-26],铝对植物的最初毒害主要是对根的影响,根尖可能是铝毒害的初始作用部位。

根尖在植物对铝毒的响应中起着非常重要的作用。Zhu 等^[27]发现,铝胁迫明显抑制了小麦根缘细胞的产生和发育,铝胁迫也大大降低了小麦离体根缘细胞的存活率;随着铝处理后时间的增加,根缘细胞的存活率大大降低。我们的试验表明,离体边缘细胞的存活率随着 Al^{3+} 处理浓度的增加而降低,随着时间的延长也明显下降。离体根缘细胞在 Al^{3+} 浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$ 时,培养 4h,存活率就只有 25% 左右,而在 Al^{3+} 液浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 时,培养到 12h,存活率才降到 25% 左右。可见高浓度铝短时间处理和低浓度铝较长时间处理对红豇豆根缘细胞

有相同的毒害效果。

根冠 PME 酶在根缘细胞的产生和发育中有重要的作用^[28-31],它可以使果胶去甲基化,果胶酸分解;可诱导其它果胶酶基因表达,果胶层降解,最终导致根缘细胞从根冠分离。我们在红豇豆中的试验结果与豌豆^[14]和大豆^[17]中的结果相似,即根冠 PME 酶的活性随着根的伸长而逐渐下降。另一方面,我们在试验中发现,不同浓度的 Al^{3+} 处理时,根冠 PME 酶的活性仍然大致遵循随着根长的伸长而逐渐下降的规律;而当根长相同时,不同浓度的 Al^{3+} 处理对根冠 PME 酶活性没有明显的影响。Stephenson 和 Hawes^[29]认为,边缘细胞游离与根冠 PME 活性有着密切的相关性,当根冠 PME 酶活性相同时,游离的边缘细胞数目也大致相同;Miyasaka 和 Hawes^[16]的结果表明,铝毒处理对边缘细胞的最大数目没有明显影响。因而可以认为,不同浓度的 Al^{3+} 处理时,相同根长的红豇豆根尖游离的边缘细胞数目大致相同,对根冠 PME 酶活性没有明显影响。

参考文献:

- [1] Kundson L. Viability of detached root cap cells[J]. Am. J. Bot., 1919(6): 309-310.
- [2] Rogers H T, Pearson R W, Pierre W H. The source and phosphatase activity of exoenzyme systems of corn and tomato roots[J]. Soil Sci., 1942, 54: 353-365.
- [3] Hawes M C, Gunawardena U, Miyasaka S C, Zhao X. The role of root border cells in plant defense[J]. Trends in Plant Sci., 2000, 5: 128-133.
- [4] 应小芳,刘鹏. 铝胁迫对大豆叶片光合特性的影响[J]. 应用生态学报, 2005, 16(1): 166-170.
Ying X F, Liu P. Effects of aluminum stress on photosynthetic characters of soybean[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2005, 16(1): 166-170.
- [5] 杨建立,俞雪辉,刘强,郑绍建. 铝胁迫对小麦根尖细胞蛋白质

- 及苹果酸分泌的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2005, 11(3): 390-393.
- Yang J L, Yu X H, Liu Q, Zheng S J. Effects of aluminum stress on wheat root tip cytoplasmic proteins and malate efflux[J]. Plant Nutrition Fertilizer Science, 2005, 11(3): 390-393.
- [6] 杨建立, 何云峰, 郑绍建. 植物耐铝机理研究进展[J]. 植物营养与肥料学报, 2005, 11(6): 836-845.
- Yang J L, He Y F, Zheng S J. Research progresses in aluminum tolerance mechanisms in plants[J]. Plant Nutrition Fertilizer Science, 2005, 11(6): 836-845.
- [7] Bennet R J, Breen C M. The aluminum signal: New dimensions to mechanisms of aluminum tolerance[J]. Plant Soil, 1991, 134: 153-166.
- [8] Horst W J, Wagner A, Marschner H. Mucilage protects root from aluminum injury[J]. Z. Pflanzenphysiol., 1982, 105: 435-444.
- [9] Pan J W, Zhu M Y, Peng H Z, Wang L L. Developmental regulation and biological functions of root border cells in higher plants[J]. Acta Bot Sin, 2002, 44 (1): 1-8.
- [10] Hawes M C, Pueppke S G. Sloughed peripheral root cap cells: Yield from different species and callus formation from single cells[J]. Am. J. Bot., 1986, 73: 1466-1473.
- [11] Hawes M C, Bengough G, Cassab G, Ponce G. Root caps and rhizosphere[J]. J. Plant Growth Regul., 2003, 21: 352-367.
- [12] Arriola L, Niemira B A, Safir G R. Border cells and arbuscular mycorrhizae in four Amaranthaceae species[J]. Phytopathology, 1997, 87: 1240-1242.
- [13] Weather P J, Kim Y J. Transformed roots of *Artemisia annua* exhibit an unusual pattern of border cell release[J]. In Vitro Cellular and Development Biology-Plant, 2001, 37(4): 440-445.
- [14] Hawes M C, Lin H J. Correlation of pectolytic enzyme activity with the programmed release of cells from root caps of pea (*Pisum sativum*) [J]. Plant Physiol., 1990, 94: 1855-1859.
- [15] Woo H H, Orbach M J, Hirsch A M, Hawes M C. Meristem localized inducible expression of a USP glycosyltransferase gene is essential for growth and development in pea and alfalfa[J]. Plant Cell, 1999, 11: 2303-2315.
- [16] Miyasaka S C, Hawes M C. Possible role of root border cells in detection and avoidance of aluminum toxicity[J]. Plant Physiol., 2001, 125: 1978-1987.
- [17] 马伯军, 潘建伟, 傅昭娟, 等. 大豆根边缘细胞的发育及其影响因素[J]. 作物学报, 2005, 31(2): 165-169.
- Ma B J, Pan J W, Fu Z J *et al.* Development and influencing factors of soybean root border cell[J]. Acta Agronomica Sinica, 2005, 31 (2): 165-169.
- [18] Richard L, Qin L X, Gadal P, Goldberg R. Molecular cloning and characterization of a putative pectin ethylesterase cDNA in *Arabidopsis thaliana* L.[J]. FEBS Letters, 1994, 355: 135-139.
- [19] Brigham L A, Woo H H, Hawes M C. Root border cells as tools in plant cell studies[J]. Methods Cell Biol., 1995, 49: 377-387.
- [20] 徐根娣, 刘鹏, 周志华. 植物边缘细胞发育和功能的研究进展[J]. 中国农学通报, 2004, 20: 28-32.
- Xu G D, Liu P, Zhou Z H. A progress of studies on development and function of border cell[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2004, 20: 28-32.
- [21] 马伯军, 潘建伟, 顾青, 等. 大麦根边缘细胞发育的生物学特性[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2003, 29(2): 159-164.
- Ma B J, Pan J W, Gu Q *et al.* Biological characters of root border cell development in barley[J]. J. of Plant Physiol. and Molecular Biol., 2003, 29(2): 159-164.
- [22] Zhao X, Misaghi I J, Hawes M C. Stimulation of border cell production in response to increased carbon dioxide levels[J]. Plant Physiol., 2000, 122: 181-188.
- [23] 应小芳, 刘鹏, 徐根娣. 土壤中的铝及其植物效应的研究进展[J]. 生态环境, 2003, 12(2): 237-239.
- Ying X F, Liu P, Xu G D. The advance in the research of aluminum in soil and its influence on plant[J]. Ecology and Environment, 2003, 12 (2): 237-239.
- [24] Sivaguru M, Horst W T. The distal part of the transition zone is the most aluminum sensitive apical root zone of maize[J]. Plant Physiol., 1998, 116: 155-163.
- [25] 禹艳红, 宾金华. 根缘细胞的发生和生物学作用[J]. 植物学通报, 2002, 19(6): 756-762.
- Yu Y H, Bin J H. Production and biological role of root border cells[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2002, 19(6): 756-762.
- [26] 喻敏, 崔志新, 温海洋, 等. 根际新发现的一类活细胞群—根边缘细胞[J]. 华中农业大学报, 2004, 23(2): 275-280.
- Yu M, Cui Z X, Wen H X *et al.* Root border cells—A recently defined population of alive cells in rhizosphere[J]. J. of Huazhong Agric. Univ., 2004, 23(2): 275-280.
- [27] Zhu M Y, Ahn S J, Matsumoto H. Inhibition of growth and development of root border cells in wheat by Al[J]. Physiol. Plant., 2003, 117: 359-367.
- [28] Wen F, Zhu Y, Hawes M C. Effect of pectin methylesterase gene expression on pea root development[J]. Plant Cell, 1999, 11: 1129-1140.
- [29] Stephenson M B, Hawes M C. Correlation of pectinmethylesterase activity in root caps of pea with root border cell separation[J]. Plant Physiol., 1994, 106: 739-745.
- [30] Goldberg R, Pierron M, Durand L, Mutaftshiev S. *In vitro* and *in situ* properties of cell wall pectinmethylesterases from mung bean hypocotyls[J]. J. Exp. Bot., 1992, 43: 41-46.
- [31] McMillan G P, Barrett A M, Perombelon M C M. An isoelectric focusing study of the methyl esterified pectic substances on the production of extracellular pectin isoenzymes by soft rot *Erwinia* ssp[J]. J. Appl. Bacteriol., 1994, 77: 175-184.