

铝胁迫下大豆根系脱落酸累积与柠檬酸分泌的关系研究

尤江峰, 侯宁宁, 徐睦芸, 刘宁, 张红梅, 兰图, 杨振明*

(吉林大学植物科学学院, 吉林大学农学部土壤—植物分子遗传学实验室, 吉林长春 130062)

摘要: 为探讨铝(Al)胁迫条件下脱落酸(ABA)调控植物根系有机酸分泌的机制,进行了 ABA 与 Al 诱导大豆根系柠檬酸分泌的关系试验。结果表明: 1) 外源 ABA 和 ABA 合成抑制剂 fluridone 分别提高和降低了 Al 诱导的大豆根尖 ABA 含量的增加,但对根系柠檬酸分泌量均无影响,ABA 对根系内源柠檬酸含量和柠檬酸合成酶的活性也没有影响; 2) 分根试验表明,与 Al 直接接触的根部(Part A)内源 ABA 含量发生变化,且有柠檬酸的分泌,而不与 Al 直接接触的根部(Part B)内源 ABA 含量也发生变化,但没有柠檬酸分泌; 3) Al 胁迫下,大豆耐 Al 基因型柠檬酸分泌量远高于敏感基因型,但二者的内源 ABA 含量却没有差异; 4) 30 $\mu\text{mol AlCl}_3$ 处理,在 0~12 h 柠檬酸分泌速率和内源 ABA 含量随 Al 处理时间增加而增加,去除 Al 胁迫时(12~18 h),柠檬酸分泌速率继续增加,但内源 ABA 含量则迅速下降。综合以上结果,推测 ABA 不是通过提高 Al 诱导柠檬酸分泌来调控大豆耐 Al 性。

关键词: 铝胁迫; 大豆; 柠檬酸; 脱落酸

中图分类号: S565.1.01; Q946.8

文献标识码: A

文章编号: 1008-505X(2010)04-0899-07

Study on the relationship of abscisic acid accumulation and citrate secretion of soybean roots under aluminum stress

YOU Jiang-feng, HOU Ning-ning, XU Mu-yun, LIU Ning, ZHANG Hong-mei, LAN Tu, YANG Zhen-ming*

(College of Plant Science, Jilin University/Laboratory of Soil-Plant Molecular Genetics, Agronomy Division, Jilin University, Changchun, China 130062)

Abstract: Aluminum(Al)-induced organic acid anions secretion is known as one of important Al-resistance mechanisms in plants. Abscisic acid(ABA) plays an important role in mediating some biotic and abiotic stresses. A series of experiments including split-root experiment and time course experiment were carried out to clarify whether ABA is involved in the process of Al-induced secretion of citrate from soybean roots. The results are as follows: 1) ABA accumulation in Al-induced soybean roots is increased under the exogenous ABA application, while ABA accumulation is inhibited under the Fluridone(ABA biosynthesis inhibitor). However, the both applications no effects on either Al induced citrate exudation, or the Al induced increase of citrate content and citrate synthase activity. 2) In the split-root experiment(the whole roots of soybean plant were separated equally to Part A and Part B), endogenous ABA content of root apices is increased in part A, while the content is decreased in part B when roots of part A are exposed to Al(Part A, +Al; Part B, -Al), and Al-induced citrate secretion is only found in part A. 3) The amount of citrate secretion of Al-tolerant cultivar is higher than that of Al-sensitive cultivar, while the ABA contents of roots of both cultivars have no differences under same Al stress. 4) In the time course experiment, both citrate secretion rate and endogenous ABA content are increased with increase of Al treatment time during 0–12 h. During the next 6 h pulse(12–18 h) without Al stress, endogenous ABA is dropped quickly, while citrate secretion rate is increased. The above results suggest that endogenous ABA in soybean roots is not involved in modulating Al-in-

收稿日期: 2009-09-16

接受日期: 2009-12-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(30671241); 教育部博士点新教师基金(20070183163)资助。

作者简介: 尤江峰(1978—),女,内蒙古凉城人,副教授,主要从事植物逆境生理生化研究。Tel: 0431-87835709, E-mail: youjf@jlu.edu.cn

* 通讯作者 Tel: 0431-87836007, E-mail: zmyang@jlu.edu.cn

duced citrate exudation.

Key words: Al stress; soybean; citrate; abscisic acid

铝 (Al) 胁迫条件下植物分泌有机酸是植物重要的耐 Al 机制之一。早在 1991 年, Miyasaka 等^[1]就发现, Al 胁迫下耐 Al 菜豆基因型柠檬酸的分泌量是无 Al 胁迫的 70 倍, 而敏感基因型仅为 10 倍; 1993 年 Delhaize 等^[2]用近等位基因系材料研究发现, Al 胁迫下耐 Al 基因型小麦根尖苹果酸分泌量是敏感基因型的 10 倍。Ma 等^[3]发现, 随外界溶液 Al 浓度增加或 Al 处理时间的延长, 荞麦根系分泌的草酸也逐渐增加; Yang 等^[4]报道了 Al 诱导大豆根系大量分泌柠檬酸的耐 Al 机制。迄今, 在对小麦、荞麦、玉米、大豆、菜豆等植物的研究表明, Al 诱导根系分泌有机酸 (主要是苹果酸、柠檬酸和草酸等 3 种低分子有机酸) 是植物重要的耐 Al 机制之一^[5]。但目前对 Al 是如何诱导植物根系有机酸分泌的问题还不十分清楚, 有机酸分泌的调控因子和信号传导等研究, 已成为当今植物营养、植物生理与分子生物学等领域的热点。

脱落酸 (ABA) 主要存在于植物体内根、茎、叶、果实等器官。在逆境条件下, 植物细胞往往会出现 ABA 的积累, 激活植物体内自身的抗逆免疫系统, 诱导植物产生抗旱、抗寒、耐盐、抗病等特性, 提高植物的抗逆性, 所以 ABA 又称为“胁迫激素”^[6]。根系是合成 ABA 的重要器官, 也是 Al 毒的主要发生部位。Al 胁迫诱导大豆^[7]、玉米^[8]及大麦^[9]等植物根系 ABA 含量的提高; 并且, 外源 ABA 能够改善 Al 对大麦^[9-10]和大豆^[7]等根伸长的抑制作用。先前的试验也发现, Al 胁迫下大豆根尖 ABA 的含量提高; 外源 ABA 可以提高大豆的耐 Al 性^[11]。可见, ABA 是调控植物耐 Al 性的重要因子, 但其调控机制问题目前仍不清楚。

Ryan 等^[12]研究发现, Al 激活小麦根尖分泌苹果酸的阴离子通道与保卫细胞原生质体膜上 ABA 调控的 S-型阴离子通道在药理学上的性质是相似的, 据此认为这两类通道在门控性质上具有相似性, 即存在 Al 胁迫提高了内源 ABA 的含量, 而 ABA 又调控了有机酸可通过的阴离子通道的可能性; 但随后的试验证明, ABA 对 Al 诱导小麦根系苹果酸的分泌并无作用^[13]。而 Ma 等^[14]的初步研究表明, 外源 ABA 使荞麦根系草酸分泌量增加, 从而认为 ABA 可能是诱导开启阴离子通道的信号传导物质。Shen 等^[7]的研究发现, 在 Al 胁迫下, ABA 能够提高大豆

根系柠檬酸的分泌。这些结果说明, ABA 是否是通过调控有机酸的分泌而使植物获得耐 Al 性的问题, 目前还没有确切的结论。本研究以耐铝大豆基因型 (吉育 70) 为试材, 从时间、空间及基因型间等方面来研究 Al 胁迫下 ABA 含量变化与有机酸分泌的关系, 旨在为阐明上述科学问题进一步提供证据。

1 材料与方法

1.1 植株培养

采用的试验材料均为吉育 70 (耐 Al 基因型), 另在基因型间差异试验中, 以吉育 62 (Al 敏感基因型) 为对照材料。挑选大小一致的大豆种子, 经 1.0% 次氯酸钠 (NaClO) 消毒 5 min 后, 用自来水反复冲洗, 阴干后均匀播种于高压灭菌的草炭土 (商业草炭土和细沙以体积比 3:1 混合) 中, 于恒温箱内 25℃ 黑暗条件下萌发 3 d。

整根培养: 大豆种子萌发后, 将苗轻轻挖出, 并用自来水冲洗根系除掉表面浮泥。挑选根长整齐一致的幼苗转移到装有完全营养液^[15]的 1.25 L 塑料培养钵中, 每钵 10 株。营养液成分如下 ($\mu\text{mol/L}$): KNO_3 750、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 250、 MgSO_4 325、 KH_2PO_4 10、 Fe-EDTA 20、 H_3BO_3 8、 CuSO_4 0.2、 ZnSO_4 0.2、 MnCl_2 0.2、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 0.2、pH 4.5, 用 1 mol/L HCl 调节。每隔 3 d 更换一次营养液, 采用定时通气装置进行通气。

分根培养: 种子萌发 3 d 后, 剪断根尖, 转移到完全营养液中进行培养, 培养条件同上。培养 10 d 后, 将侧根分成相等的两部分 (Part A 和 Part B), 并置于自制的分根培养钵中进行试验 (图 1)。

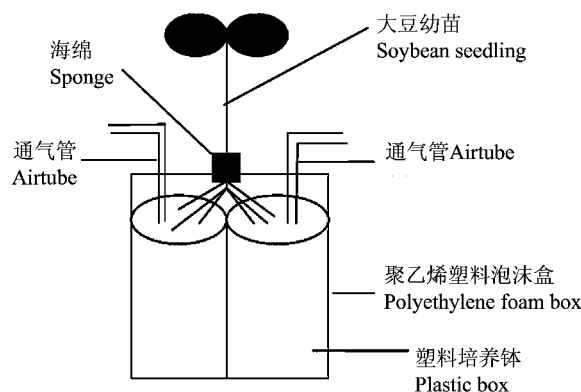


图 1 分根培养示意图

Fig. 1 A sketch map of split-root culture experiment

培养试验在人工气候培养室内进行,昼/夜时间及温度条件分别为 14/10 h 和 25℃/22℃,相对湿度控制在 70%,光强 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。

1.2 试验设计

1.2.1 ABA 和 ABA 合成抑制剂 fluridone (FLU) 对 Al 胁迫下大豆根系内源 ABA 含量、柠檬酸分泌速率、柠檬酸含量和柠檬酸合成酶活性的影响 将全营养液培养 10 d 后的大豆幼苗,转移至 0.5 mmol/L CaCl_2 溶液 (pH 4.5) 中,12 h 后分别进行以下 6 个处理: CK; ABA (5 $\mu\text{mol}/\text{L}$); FLU (1 $\mu\text{mol}/\text{L}$); + Al (30 $\mu\text{mol}/\text{L}$ AlCl_3); + Al + ABA (30 $\mu\text{mol}/\text{L}$ AlCl_3 和 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ABA); + Al + FLU (30 $\mu\text{mol}/\text{L}$ AlCl_3 和 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ FLU),所有处理均于 0.5 mmol/L CaCl_2 溶液 (pH 4.5) 中进行。处理 9 h 后,收集根系分泌物处理液以测定大豆根系柠檬酸分泌量,同时切取 0~1 cm 根尖,测定大豆根尖 ABA 含量、柠檬酸含量及柠檬酸合成酶活性。

1.2.2 Al 对大豆根系柠檬酸分泌的影响 (分根实验) 切去主根的大豆幼苗于全营养液中培养 10 d 后,将其侧根分成相等两部分 (Part A 和 Part B) 并同时置于 0.5 mmol/L CaCl_2 溶液 (pH 4.5) 中 12 h,而后对 Part A/Part B 两部分分别进行如下处理: - Al/-Al, + Al/-Al, + Al/+Al。处理液为含 0 或 30 $\mu\text{mol}/\text{L}$ AlCl_3 的 0.5 mmol/L CaCl_2 溶液 (pH 4.5)。处理 9 h 后,分别收集含根系分泌物的处理液以测定有机酸分泌量,同时切取 0~1 cm 根尖以测定内源 ABA 含量。

1.2.3 Al 胁迫下两种基因型根系柠檬酸分泌量与内源 ABA 含量的关系 Al 敏感基因型大豆品种吉育 62 和耐 Al 大豆品种吉育 70 于全营养液中培养 10 d,经 12 h 0.5 mmol/L CaCl_2 (pH 4.5) 洗根后,分别置于含 AlCl_3 (0, 30 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 及 ABA (0, 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 的简单营养液 (0.5 mmol/L CaCl_2 , pH 4.5) 中。处理 9 h 后,收集含根系分泌物的处理液以测定有机酸的分泌量,同时切取 0~1 cm 根尖以测定根尖内源 ABA 含量。

1.2.4 不同时间 Al 处理柠檬酸分泌量及内源 ABA 含量的变化 全营养液培养 10 d 后的大豆幼苗,转移至 0.5 mmol/L CaCl_2 (pH 4.5) 溶液中,12 h 后进行 Al 胁迫处理 (30 $\mu\text{mol}/\text{L}$ AlCl_3)。其中一组试验分别于 6 h 和 12 h 收集处理液,同时切取 0~1 cm 根尖;另一组试验在处理 12 h 后,解除 Al 胁迫并于 18 h 和 24 h 收集处理液,同时切取 0~1 cm 根尖。处理液用于测定根系柠檬酸分泌量,根尖用于测定

内源 ABA 含量。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 根系分泌柠檬酸的收集、纯化和测定 柠檬酸的收集: 将含根系分泌物的各处理液先通过内装 5g H^+ 型阳离子交换树脂 (Amberlite IR-120B 型) 的阳离子交换柱 (16 mm $\times$ 14 mm, 美国 Bio-Rad 公司),再通过内装 2.5g AG 1-X8 型阴离子交换树脂 (100-200 目,甲酸型) 的阴离子交换柱 (16 mm $\times$ 14 mm, 美国 Bio-Rad 公司),控制流速使过柱时间约为 3 h,以达到完全吸附的目的。用 1 mol/L HCl (10 mL) 分 3 次洗脱阴离子树脂并收集洗脱液于蒸馏瓶中,洗脱液在 40℃ 条件下利用旋转蒸发仪减压浓缩至干,用 1.0 mL Milli-Q 溶解后,转移至 1.5 mL 离心管中直接测定或冷冻保存。

利用反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 测定有机酸,测定条件为: 紫外检测波长 214 nm,流动相为 0.5% (NH_4) H_2PO_4 缓冲液 (H_3PO_4 调节 pH 至 2.75),流动相流速 0.8 mL/min,柱温为 27℃,进样量 10 μL 。以保留时间进行定性,用峰面积进行定量。

1.3.2 根尖内源 ABA 含量测定 称取大豆根尖 0.2~0.3 g,用液氮速冻后保存在 -20℃ 的低温冰箱中,分 2 次加入预冷的 80% 甲醇共 4 mL,在弱光下冰浴研磨成匀浆。将匀浆液倒入离心管中,于 4℃ 下提取 4 h,离心 (1000 $\times g$) 10 min。倒出上清液,沉淀中加 1 mL 80% 甲醇,置 4℃ 下再提取 1 h,离心,合并上清液。用 C-18 固相萃取柱过柱去除色素。具体步骤是: 80% 甲醇 (1 mL) 平衡柱 $\rightarrow$ 上样 $\rightarrow$ 收集样品 $\rightarrow$ 移开样品后用 100% 甲醇 (5 mL) 洗柱 $\rightarrow$ 100% 乙醚 (5 mL) 洗柱 $\rightarrow$ 100% 甲醇 (5 mL) 洗柱 $\rightarrow$ 循环。将过柱后的样品进行旋转蒸发,除去提取液中的甲醇,用磷酸盐缓冲液 (PBS) 定容。按照 ABA 酶联免疫试剂盒 (中国农业大学) 推荐的程序进行 ABA 含量的测定。

1.3.3 根尖柠檬酸含量的测定 根据 Yang 等^[16] 的方法提取柠檬酸。将 0~1 cm 根尖置入研钵,加入 2 mL 80% 的乙醇研磨,匀浆在 70℃ 水浴中保持 15 min,于 4℃ 下离心 (2000 $\times g$) 20 min 后,收集上清液。残渣继续用 2 mL 80% 乙醇溶解,再次提取,离心。合并两次上清液,于 40℃ 下减压浓缩至干,用 1.0 mL Milli-Q 溶解残渣, HPLC 测定有机酸。

1.3.4 根尖柠檬酸合成酶活性的测定 0~1 cm 大豆根尖加入至预冷的 50 mmol/L HEPES-NaOH 缓冲液 (pH 7.5) [包含 5 mmol/L MgCl_2 、5 mmol/L

EDTA、10% (v/v) 甘油和 0.1% (v/v) Triton X-100] 中,研磨,匀浆于高速冷冻离心机冷冻离心 ($<4^{\circ}\text{C}$, $20000 \times g$) 5 min,上清液作为酶活性测定的酶粗提液。在室温条件下通过紫外分光光度计测定 412 nm 处乙酰辅酶 A 的减少值,计算根尖柠檬酸合成酶的活性。反应时间为 4 min,反应液包括: 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0), 5 mmol/L MgCl_2 , 100 mmol/L 5,5-二硫代双-2-硝基苯甲酸, 0.3 mmol/L 乙酰辅酶 A, 0.5 mmol/L 草酰乙酸。

2 结果与分析

2.1 外源 ABA、ABA 生物合成抑制剂 (FLU) 对 Al 胁迫下大豆根系柠檬酸的分泌、根尖柠檬酸含量及柠檬酸合成酶活性的影响

外源 ABA、+ Al 处理都提高了大豆根尖内源 ABA 含量,而 ABA 生物合成抑制剂 (FLU) 则降低了其含量; ABA、FLU 与 Al 共处理与单独 Al 处理相比,前者提高了根尖内源 ABA 的含量而后者则降低了其含量 (图 2A)。ABA 及 FLU 本身均不能诱导柠檬酸分泌,也不影响 Al 诱导根系柠檬酸的分泌量 (图 2B)。进一步研究表明,与不进行任何处理的对照 (CK) 相比,ABA 和 FLU 并不影响大豆根尖柠檬酸含量 (图 2C),也不影响根尖柠檬酸合成酶的活性 (图 2D)。Al 单独处理可使大豆根尖柠檬酸含量增加,柠檬酸合成酶的活性提高,而 ABA、FLU 与 Al 共处理则均不影响 Al 所诱导的柠檬酸含量的提高 (图 2C) 及柠檬酸合成酶的活性 (图 2D)。

2.2 分根试验中 Al 对大豆根系柠檬酸分泌和内源 ABA 的影响

为了进一步研究 Al 胁迫和大豆柠檬酸分泌的关系,进行了分根试验。当对 A、B 两部分根系都进行 -Al 处理 (CK) 时,两部分根系皆无柠檬酸分泌;当对 A、B 两部分根系都进行 +Al 处理时,两部分根系皆有柠檬酸分泌;而对 Part A/Part B 进行 +Al/-Al 处理时,只有 Part A 的根系分泌了柠檬酸,而 Part B 部分则没有分泌柠檬酸 (图 3A),反之亦然。由此表明,对于同一株大豆,只有与 Al 直接接触的根系才分泌柠檬酸,而不与 Al 直接接触的根系是不分泌柠檬酸的。当对 A、B 两部分根系都进行 +Al 处理时,与对照相比,两部分根尖内源 ABA 含量都明显增加。当对 Part A/Part B 进行 +Al/-Al 处理时,Part A 的根尖内源 ABA 含量与对照相比明显增加,而 Part B 却显著降低 (图 3B)。

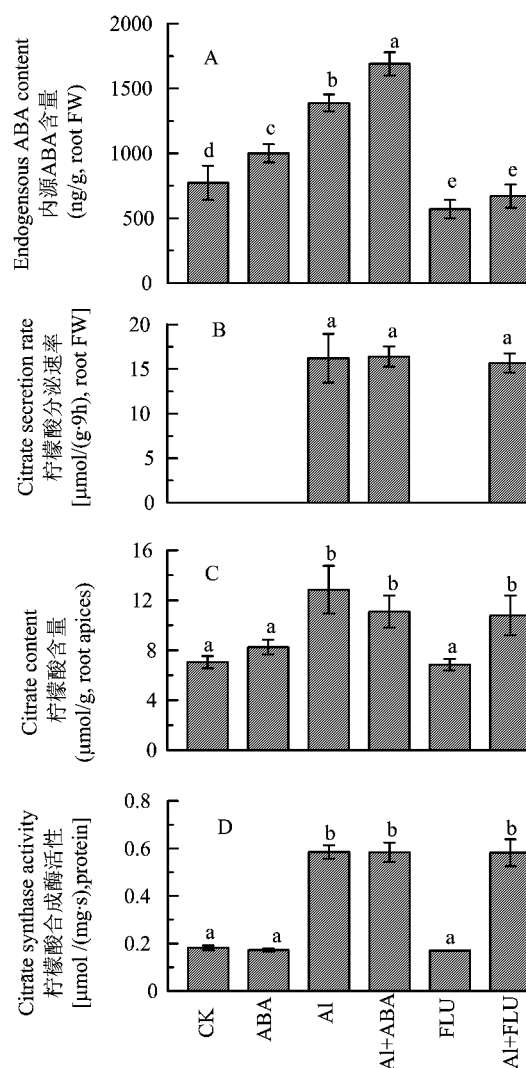


图 2 外源 ABA、FLU 对 Al 胁迫下大豆根尖 ABA 积累 (A)、柠檬酸分泌速率 (B)、柠檬酸含量 (C) 和柠檬酸合成酶活性 (D) 的影响

Fig. 2 Effects of ABA and FLU on the endogenous ABA content (A), citrate secretion (B), citrate content (C) and the activity of citrate synthase (D) in root apices of soybean under Al stress

[注 (Note): 图柱上不同字母表示差异达 5% 显著水平
Different letters in column indicated significant difference at 5% level.]

2.3 Al 胁迫下两种大豆基因型根系柠檬酸分泌和内源 ABA 含量变化

采用大豆敏感基因型吉育 62 与耐 Al 基因型吉育 70 两种大豆材料的研究表明,在相同 Al 胁迫 ($30 \mu\text{mol/L AlCl}_3$) 条件下,耐 Al 基因型较敏感基因型分泌更多的柠檬酸 (图 4A),但两种基因型根尖内源 ABA 含量却没有变化 (图 4B)。说明 Al 诱导根系柠檬酸的分泌与 Al 诱导内源 ABA 含量增加之间不存在联系。

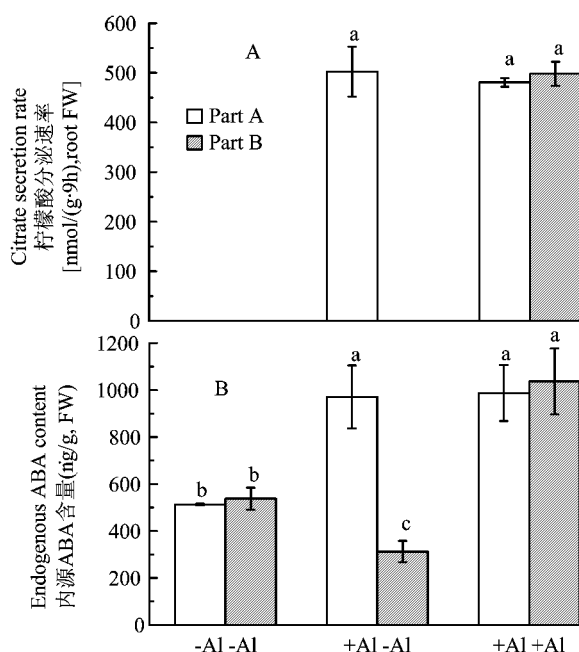


图3 Al胁迫对大豆根系柠檬酸分泌(A)和柠檬酸分泌(B)、内源ABA(B)含量的影响(分根试验)

Fig. 3 Effects of Al stress on citrate secretion rate (A) and endogenous ABA content (B) in soybean root (split-root experiment)

[注(Note): 图柱上不同字母表示差异达5%显著水平]

Different letters in column indicated significant difference at 5% level.]

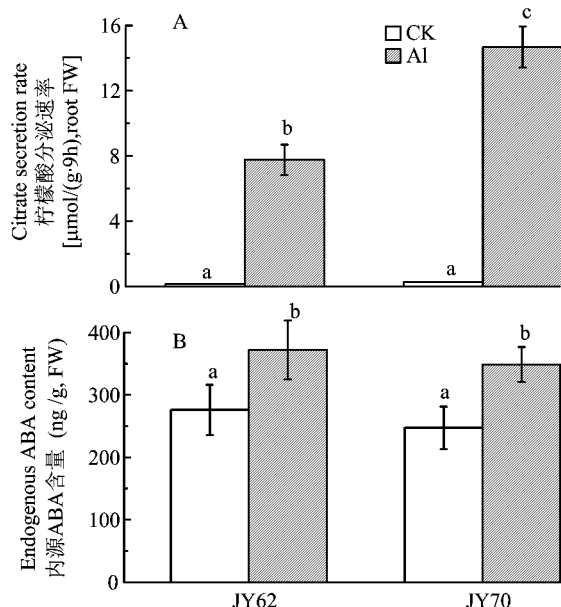


图4 Al诱导两种基因型大豆柠檬酸分泌量(A)及内源ABA的含量(B)变化

Fig. 4 Comparison of Al-induced citrate secretion (A) and endogenous ABA (B) of two soybean cultivars

[注(Note): 图柱上不同字母表示差异达5%显著水平]

Different letters in column indicated significant difference at 5% level.]

2.4 不同时间Al处理大豆根系柠檬酸分泌和内源ABA含量的关系

在Al胁迫的最初12 h内,随处理时间的增加,Al诱导的根系柠檬酸分泌量不断提高(图5A),且根系内源ABA含量也增加(图5B)。而在去除Al胁迫后的6 h内(12~18 h),柠檬酸分泌速率仍然持续升高,但内源ABA含量却迅速降低至对照水平(图5B)。说明大豆根系柠檬酸的分泌与内源ABA水平变化在时间上的响应也不一致。

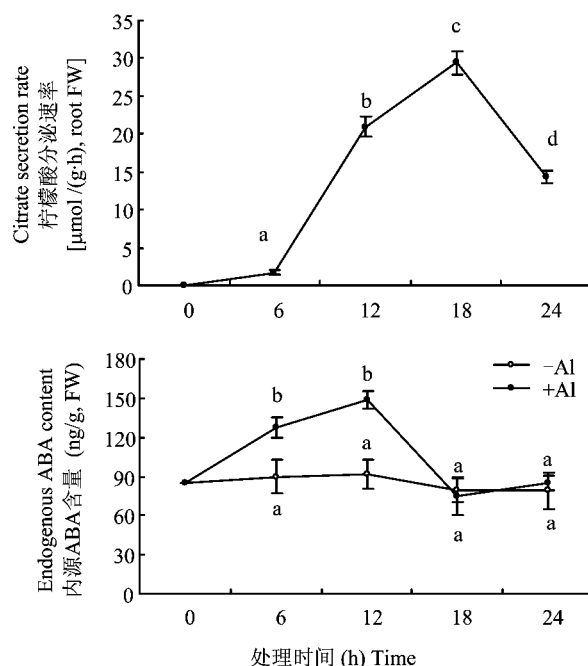


图5 不同时间Al处理大豆根系柠檬酸分泌(A)和内源ABA含量(B)的关系

Fig. 5 Time course of Al-induced citrate secretion (A) and endogenous ABA (B)

[注(Note): 图中不同字母表示差异达5%显著水平]

Different letters indicated significant difference at 5% level.]

3 讨论

ABA在植物抗逆适应性反应中起着关键作用,通过逆境信号的转导,启动植物体内的应激反应,从而提高植物抗御各种逆境因子胁迫的能力。业已证实,ABA能提高植物对干旱^[17]、低温^[18]、盐渍^[19]和重金属^[20]胁迫的适应能力。ABA作为重要的信号物质在调节气孔开闭时引发了一系列信号传导过程,其中S-型阴离子通道的激活起到主导地位,该通道的激活位于信号传导过程中较下游位置^[21]。在大麦^[9]、玉米^[8]及大豆^[7]上的研究表明,ABA对植物耐Al性也起到重要调控作用。Al诱导植物根

系分泌有机酸是植物重要的耐 Al 机制之一^[5]。通过一系列的药理学及电生理试验证明, Al 是通过激活根系细胞膜上的阴离子通道而分泌有机酸的^[12,22-23], 但 ABA 是否对 Al 诱导植物根系有机酸的分泌具有调控作用, 目前还没有一致的结论。无论耐性基因型还是敏感基因型, Al 诱导有机酸的分泌均是植物重要的耐 Al 机制, 所以在本研究中, 除基因型差异试验中均只采用了耐 Al 大豆基因型吉育 70 为试材。在本试验中, 外源 ABA 使 Al 胁迫下根系内源 ABA 的含量增加, 而 ABA 生物合成抑制剂 FLU 则降低了其含量, 但二者却对根系柠檬酸分泌、柠檬酸含量及柠檬酸合成酶活性均无影响(图 2); 在分根试验的 Part A 根部进行 Al 处理时, 改变了 Part B 根部 ABA 的含量, 却不能引起 Part B 根部柠檬酸的分泌(图 3)。Al 诱导耐 Al 及敏感基因型根系柠檬酸的分泌量与二者内源 ABA 含量变化不一致(图 4), 且 Al 诱导大豆根系柠檬酸的分泌与内源 ABA 水平变化在时间上的响应也不一致(图 5)。这些结果说明, ABA 对 Al 诱导大豆根系柠檬酸的分泌并无调控作用。

ABA 合成于多个植物器官, 包括种子、根系和叶片。植物根系具备合成 ABA 的所有酶与前体, 胡萝卜素或类胡萝卜素是植物激素 ABA 合成的前体, Furidone(氟啉草酮、氟啉酮) 由于可抑制类胡萝卜素合成中八氢蕃红素转变为六氢蕃红素, 从而抑制光合色素如类胡萝卜素、叶绿素等的合成, 造成色素体膜的光氧化破裂^[24-25]。本研究中, 外源 FLU 有效抑制了大豆根尖 ABA 的含量(图 2A); ABA 根系也能够从根际吸收 ABA。外源施用 ABA 能促进根尖 ABA 的积累(图 2A)。Al 胁迫诱导有机酸分泌的位点为根尖, Delhaize 等^[2]研究表明 Al 诱导小麦根系苹果酸的分泌定位于离根尖 1~2 mm 区域内; Zheng 等^[26]对荞麦的研究表明, 草酸的分泌位于根尖 10 mm 的区域内。根尖同时是 Al 毒的作用位点和 Al 的积累区域, 因而在空间上有机酸便于与 Al 进行螯合作用^[27]。Al 胁迫可促进大豆根尖 ABA 的积累, 提高柠檬酸含量及柠檬酸合成酶的活性, 并诱导大豆根系柠檬酸的分泌(图 2); 而外源 ABA 和 FLU 则可分别进一步提高和降低根尖 ABA 含量, 但对柠檬酸含量、柠檬酸合成酶的活性及根系柠檬酸的分泌均无作用。说明 Al 诱导根系柠檬酸合成酶活性的提高、柠檬酸的积累及柠檬酸的分泌与内源 ABA 含量没有直接关系。

ABA 是一种倍半萜羧酸, 呈非极性, 主要以游

离态形式在植物体内通过木质部和韧皮部运输。在分根试验中, 当 Part A 根部进行 Al 处理时, Part B 根部的内源 ABA 含量也发生变化(图 3A), 说明 ABA 在两部分根系中进行了再分配。通过同位素技术, Hou 等^[11]也证明了 Al 胁迫下 ABA 在大豆根和叶中的再分配。但 Part A 根部进行 Al 处理时不能引起 Part B 根部柠檬酸的分泌(图 3B), 因此单纯的 ABA 变化不能导致柠檬酸的分泌。

Ma^[27]根据 Al 诱导有机酸分泌在响应时间上的不同, 将植物有机酸分泌分为两种模式, 即模式 I: 有机酸分泌与 Al 胁迫间没有明显的时间上的延迟, Al 处理后根系会迅速地大量分泌有机酸, 如小麦^[12]、荞麦^[26]等; 模式 II: 有机酸分泌与 Al 胁迫间存在明显的滞后期, 即 Al 处理数小时后根系才会大量分泌有机酸, 如黑麦^[28]、决明^[29]及大豆^[16]等。两种模式中 Al 诱导有机酸分泌的过程可能不同。根据 Ma^[27]的推测, 在模式 I 中, Al 胁迫下有机酸的分泌可能没有基因诱导的参与, 只是 Al 激活了根部阴离子通道, 从而使有机酸迅速向外分泌; 而在模式 II 中, 植物有机酸的分泌可能需基因诱导的参与, 而诱导的基因可能与有机酸的代谢、细胞膜或液泡膜上离子通道的开闭、线粒体膜上有机酸的运输等过程相关联。在本研究中, Al 处理的 0~6 h 内, 柠檬酸的分泌量很少, 6~12 h 内柠檬酸的分泌量增大, 而在去除 Al 处理的 6 h 内, 柠檬酸分泌量继续增加(图 5), 表明基因诱导可能参与 Al 诱导大豆柠檬酸的分泌过程中。无论是模式 I 植物, 还是模式 II 植物, Al 均需激活细胞膜上的阴离子通道而分泌有机酸。小麦和荞麦同属模式 I 植物, ABA 能促进 Al 胁迫下荞麦根系草酸的分泌, 却对小麦根系苹果酸的分泌不起作用。大豆属于模式 II 植物, ABA 不能促进大豆根系柠檬酸的分泌(图 2)。Al 引起 ABA 的变化与柠檬酸分泌量在基因型间(图 4)及时间响应上(图 5)都不一致, 所以我们认为 ABA 并不能调控 Al 胁迫下大豆柠檬酸的分泌。但 Shen 等^[7]的研究认为, ABA 可以促进 Al 诱导大豆根系分泌柠檬酸。两种不同的结论可能源自: 1) 所采用的试验材料不同 Shen 等采用的为菜豆(Suzunari 和 Shishio), 而本研究采用的是普通大豆(吉育 70 和吉育 62); 2) 研究方法上的区别 Shen 等采用的是离体根试验, 而本试验采用的是整体根试验。这也说明, 关于 ABA 与 Al 诱导植物根系有机酸分泌的关系问题, 还有许多方面需要更深入细致的研究。

参 考 文 献:

- [1] Miyasaka S C, Buta J G, Howell R K *et al.* Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans: root exudation of citric acid[J]. *Plant Physiol.*, 1991, 96: 737–743.
- [2] Delhaize E, Ryan P R, Randall P J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L). II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices[J]. *Plant Physiol.*, 1993, 103: 695–702.
- [3] Ma J F, Zheng S J, Matsumoto H. Detoxifying aluminum with buckwheat[J]. *Nature*, 1997, 390: 569–570.
- [4] Yang Z M, Sivaguru M, Horst W J *et al.* Aluminium tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (*Glycine max*) [J]. *Physiol. Plant.*, 2000, 110: 72–77.
- [5] Kochian L V, Hoekenga O A, Piñeros M A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency[J]. *Annal. Rev. Plant. Biol.*, 2004, 55: 459–493.
- [6] Davies W J, Zhang J H. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil[J]. *Anal. Rev. Plant. Physiol.*, 1991, 42: 55–76.
- [7] Shen H, Ligaba A, Yamaguchi M *et al.* Effect of K-252a and abscisic acid on the efflux of citrate from soybean roots[J]. *J. Exp. Bot.*, 2004, 55: 663–671.
- [8] Klimashevskii E L. Identification of plant resistance to soil acidity[J]. *Sov. Agric. Sci.*, 1983, 9: 1–5.
- [9] Kasai M, Sasaki M, Tanakamaru S *et al.* Possible involvement of abscisic acid in increases in activities of two vacuolar H⁺-Pumps in barley roots under aluminum stress[J]. *Plant Cell Physiol.*, 1993, 34: 1335–1338.
- [10] Matsumoto H, Senoo Y, Kasai M *et al.* Response of the plant root to aluminum stress: analysis of the inhibition of the root elongation and changes in membrane function[J]. *J. Plant Res.*, 1996, 109: 99–105.
- [11] Hou N N, You J F, Pang J D *et al.* The accumulation and transport of abscisic acid soybean (*Glycine max* L.) under aluminum stress[J]. *Plant Soil*, 2010, 330: 127–137.
- [12] Ryan P R, Skerrett M, Findlay G P *et al.* Aluminum activates an anion channel in the apical cells of wheat roots[J]. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1997, 94: 6547–6552.
- [13] Ryan P R, Dong B, Watt M *et al.* Strategies to isolate transporters that facilitate organic anion efflux from plant roots[J]. *Plant Soil*, 2003, 248: 61–69.
- [14] Ma J F, Zhang W, Zhao Z. Regulatory mechanisms of Al-induced secretion of organic acids anions-Involvement of ABA in the Al-induced secretion of oxalate in buckwheat[A]. Horst W J *et al.* (Eds.). *Plant nutrition-food security and sustainability of agro-ecosystems*[M]. Netherlands: Kluwer Academy Publishers, 2001. 486–487.
- [15] Horst W J, Asher C J, Cakmak I *et al.* Short-term responses of soybean roots to aluminium[J]. *J. Plant Physiol.*, 1992, 140: 174–178.
- [16] Yang Z M, Nian H, Sivaguru M *et al.* Characterization of aluminum-induced citrate secretion in aluminum-tolerant soybean (*Glycine max* L.) plants[J]. *Physiol. Plant.*, 2001, 113: 64–71.
- [17] Verslues P E, Bray E A. Role of abscisic acid (ABA) and Arabidopsis thaliana ABA in sensitive loci in low water potential-induced ABA and proline accumulation[J]. *J. Exp. Bot.*, 2006, 57: 201–212.
- [18] Rikin A, Atsmon D, Gitter G. Chilling injury in cotton (*Gossypium* L.): Prevention by abscisic acid[J]. *Plant Cell Physiol.*, 1983, 20: 1537–1546.
- [19] Montero E, Cbot C, Poschenrieder C H *et al.* Relative importance of osmotic-stress and ion-specific effects on ABA-mediated inhibition of leaf expansion growth in *Phaseolus vulgaris* [J]. *Plant Cell Environ.*, 1998, 21: 54–62.
- [20] Hsu Y T, Kao C H. Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves[J]. *Plant Grow. Regul.*, 2004, 42: 222–238.
- [21] Schmidt C, Schroeder C. Anion selectivity of slow anion channels in the plasma membrane of guard cells[J]. *Plant Physiol.*, 1994, 106: 383–391.
- [22] Kollmeier M, Kietrich P, Bauer C S. Aluminum activates a citrate-permeable anion channel in the aluminum-sensitive zone of the maize root apex: A comparison between an aluminum-sensitive and an aluminum-resistant cultivar [J]. *Plant Physiol.*, 2001, 126: 397–410.
- [23] 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, 1258: 1459–1472.
- [24] Fong F, Smith J D, Koehler D E. Early events in maize seed development[J]. *Plant Physiol.*, 1983, 73: 899–901.
- [25] Moore R, Smith J D. Growth. Gravid responsiveness and abscisic acid content of *Zea mays* seedlings treated with fluridone[J]. *Planta*, 1984, 162: 342–344.
- [26] Zheng S J, Ma J F, Matsumoto H. High aluminum resistance in buckwheat I. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips[J]. *Plant Physiol.*, 1998, 117: 745–751.
- [27] Ma J F. Role of organic acid in detoxification of aluminum in higher plants[J]. *Plant Cell Physiol.*, 2000, 41(4): 383–390.
- [28] Li X F, Ma J F, Matsumoto H. Pattern of aluminum induced secretion of organic acid differs between rye and wheat[J]. *Plant Physiol.*, 2000, 123: 1537–1544.
- [29] Yang Z M, Wang J, Wang S H *et al.* Salicylic acid-induced aluminum tolerance by modulation of citrate efflux from roots of *Cassia tora* L [J]. *Planta*, 2003, 217: 168–174.