

豌豆根尖铝毒的敏感浓度探讨

何丽烂 喻敏* * 王惠珍 刘家友 刘莉莉

广东省佛山科学技术学院园艺系, 佛山 528000

摘要 以不同浓度 Al^{3+} 处理豌豆幼根根尖, 24 h 后通过测定幼根的相对伸长率、不同根段的胼胝质含量、POD 活性同时结合苏木精染色, 探讨不同浓度 Al^{3+} 对豌豆根尖生长的影响。结果表明: 幼根伸长明显受到抑制, 苏木精染色的颜色也随 Al^{3+} 浓度上升而加深; 不同根段的胼胝质含量明显增加, 当 Al^{3+} 浓度大于 $50 \mu\text{mol/L}$ 后, 差异达到显著; 幼根的 POD 活性显著降低。说明 Al^{3+} 抑制豌豆幼根的生长, 其敏感浓度为 $50 \mu\text{mol/L}$ 。

关键词 豌豆; 根尖; Al^{3+} ; 胼胝质; 过氧化物酶

中图分类号 Q 945.12 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)01-0045-03

铝是地壳中含量最丰富的金属元素, 约占总质量的 7%。通常土壤中的铝以硅酸盐或其它沉淀物形式存在, 一般对植物无毒性。然而, 在酸性土壤条件下 ($\text{pH} < 5$), 铝的溶解度会大大增加, 产生对植物有毒性的离子形态 Al^{3+} , 在微摩尔浓度级水平下就可对植物产生毒害^[1]。铝毒是酸性土壤限制作物生长的主要原因^[2], 目前世界上超过 40% 农用耕地受到铝毒的危害, 特别是热带地区。近几年来, 由于工业的迅速发展, 环境污染越来越严重。我国的酸雨覆盖率已占国土的 30% 左右。酸雨降低了土壤的 pH 值, 导致有毒性的 Al^{3+} 逐渐释放出来, 严重危害农作物的产量和品质, 引起了许多学者的广泛关注^[3]。不同浓度 Al^{3+} 对豌豆的毒害情况研究较少, 一般认为植物根尖是铝毒作用部位^[4], 胼胝质的形成是铝毒的敏感标志^[5-6]。本试验以不同浓度 Al^{3+} 处理豌豆根尖后, 比较研究根系伸长率、胼胝质含量并结合苏木精染色, 及过氧化物酶 (POD) 的变化情况, 探讨豌豆铝毒敏感浓度。

材料与amp;方法

豌豆幼苗的培养和 处理

供试的豌豆品种为中豌 5 号, 用 95% 的乙醇浸泡 15 min 后, 用 7.5% 次氯酸钠浸泡 30 min, 去离子水洗净至无次氯酸钠气味为止。在 24 ℃ 的恒温培养箱中浸种 8 h 后, 去掉硬实和有虫眼的种子, 将

饱满一致的种子平铺于无菌的喷雾培养箱 (专利号: ZL200420043545.2) 里的网格上, 用 0.5 mmol/L 的 CaSO_4 喷雾培养, 每 5 min 喷雾 30 s。培养 48 h 后, 将根长一致的幼苗置于盛有不同浓度 Al^{3+} [0 、 10 、 20 、 50 、 100 、 250 、 $500 \mu\text{mol/L}$ AlCl_3 (含 0.5 mmol/L CaSO_4 , $\text{pH} 4.5$)] 的培养箱网格上培养, 每个网孔放 1 根幼苗, 使根与液面充分接触。在黑暗条件下培养 12 ~ 24 h。

根伸长率的测定

选取萌芽程度、根长势较为一致的幼苗, 用直尺测量幼苗长度 (精确到 1 mm)。不同浓度 Al^{3+} 处理 12 h 后, 再次测量幼根的长度, 2 次测量值之差为豌豆幼根的伸长量。处理幼根的伸长量与对照幼根的伸长量之比即为幼根相对伸长率。每个处理共测 20 条幼根。

过氧化物酶 活性的测定

取不同浓度 Al^{3+} 处理 24 h 的幼根 2 g, 加 50 mmol/L 磷酸钠缓冲溶液 ($\text{pH} 7.8$) 2 mL, 冰水浴研磨匀浆, 于 $4 \sim 8000 \text{ r/min}$ 离心 10 min, 吸取上清液备用。过氧化物酶 (POD) 活性测定采用愈创木酚法^[7], 吸取酶液 20 μL , 加 2 mL 磷酸钠缓冲溶液 ($\text{pH} 7.8$), 摇匀, 加 1 mL 愈创木酚反应 1 min, 用 722 分光光度计于 436 nm 测定吸光值。用单位质量新鲜样品 1 min 的光密度变化 $D_{470 \text{ nm}}$ 表示 1 个酶活性单位 (U), 计算幼根的 POD 活性。

收稿日期: 2009-01-16; 修回日期: 2009-03-12

* 国家自然科学基金项目 (30471035) 和广东省自然科学基金项目 (06029443) 资助

* * 通讯作者。E-mail: yumin@fosu.edu.cn

何丽烂, 女, 1973 年生, 高级实验师。研究方向: 植物学。E-mail: hll-5501986@163.com

豌豆幼根苏木精染色

不同浓度 Al^{3+} 处理 24 h 的幼根在去离子水中浸洗 5 min, 洗去根尖表面残留的 Al^{3+} 后于苏木精染色液 (含 0.1% 苏木精、0.01% KIO_3 和 0.2 mmol/L NaOH) 中染色 30 min, 染色后的根尖置于去离子水中浸洗 15 min^[5], 用数码相机拍照。

幼根根段的胼胝质测定

取经不同浓度 Al^{3+} 处理的幼根各 40 根, 分成 2 段: 根段 1 (根尖顶端起 0~5 mm) 和根段 2 (根尖顶端起 5~10 mm)。根段用 4 mL 的 1 mol/L NaOH 研磨匀浆后, 转移 10 mL 离心管, 80 °C 水浴 20 min, 5 000 r/min 离心 10 min 取上清液待测。

每管分别取上清液进行样品荧光及背景值测定, 重复 2 次, 50 °C 水浴 20 min 后, 冷却至室温, 用 960CRT 荧光分光光度计, 采用 400 nm 滤光片, 在

485 nm 测定荧光值, 计算根段胼胝质含量^[6]。

结果与分析

对豌豆幼根伸长和过氧化物酶的影响
根尖是铝毒的最初作用部位, 铝毒最典型症状表现为根伸长受到抑制。从表 1 可以看出, 豌豆幼根经大于 20 $\mu\text{mol/L}$ Al^{3+} (pH 为 4.5) 溶液处理 12 h 后, 主根相对伸长率均低于对照 (0 mol/L Al^{3+} , pH 4.5), 且随 Al^{3+} 浓度升高, 根相对伸长率越低, 根系伸长受到铝毒的抑制作用越严重, 到 Al^{3+} 浓度为 250 和 500 $\mu\text{mol/L}$ 时根系相对伸长率显著降低。

POD 活性的变化是感应外界环境胁迫的最敏感指标之一。由表 1 可知, 豌豆幼根经不同浓度 Al^{3+} 处理后, POD 活性均显著降低 ($P < 0.05$), 且随 Al^{3+} 浓度增加呈下降趋势。

表 1 不同浓度 Al^{3+} 对豌豆幼根相对伸长率和 POD 活性的影响¹⁾

Table 1 Influences of different Al^{3+} concentrations on root elongation and on activity of POD of pea

项目 Item	Al^{3+} 浓度 Al^{3+} concentration/ ($\mu\text{mol/L}$)						
	0	10	20	50	100	250	500
根相对伸长率 Relative root elongation / %	105 ±12 a	100 ±17 a	82 ±15 ab	75 ±14 ab	82 ±15 ab	54 ±8 b	45 ±4 b
POD 活性 POD activities/ U	391.8 ±7.7 a	293.3 ±7.8 b	268.2 ±3.3 b	254.1 ±5.7 b	250.6 ±6.4 b	315.3 ±5.6 b	275 ±8.4 b

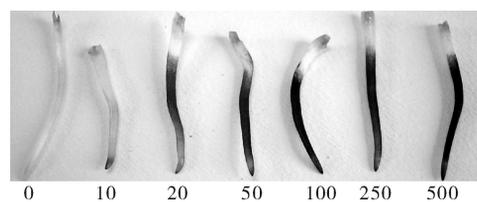
1) 不同小写字母表示处理间差异达显著水平, 下同。The different lowercase letter indicated significant differences at 0.05 level. The same in the following table.

苏木精染色法是一种用于鉴定植物含 Al^{3+} 量及 Al^{3+} 伤害的简单、易行的方法。从图 1 可清楚地看到, 经 10 $\mu\text{mol/L}$ Al^{3+} 溶液处理 24 h 后的幼根, 幼根根尖分生区被染成淡紫色。经 20 $\mu\text{mol/L}$ Al^{3+} 处理 24 h 后的幼根, 幼根根尖伸长区被染成淡紫色。经 50 $\mu\text{mol/L}$ Al^{3+} 处理 24 h 后的幼根, 整条幼根染成明显的紫色。经 100 $\mu\text{mol/L}$ Al^{3+} 处理 24 h 后的幼根, 整条幼根染成深紫色。经 100 $\mu\text{mol/L}$ 以上 Al^{3+} 处理 24 h 后的幼根, 整条幼根染成紫黑色。表明 Al^{3+} 浓度在 50 $\mu\text{mol/L}$ 时, 已给植物造成较大毒害, 50 $\mu\text{mol/L}$ 以上毒害极深。

对不同根段胼胝质的影响

Al^{3+} 对植物毒害的敏感指标是胼胝质的形成。 Al^{3+} 对植物根尖的伤害越大, 植物根尖细胞产生的胼胝质就越多。从表 2 可以看出, 豌豆根尖经 Al^{3+}

(0、10、20、50、100、250、500 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h 后, 0.0~0.5 cm 根段及 0.5~1.0 cm 根段胼胝质含量: 当 Al^{3+} 浓度为 10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 胼胝质含量与对照相比均无显著差异 ($P > 0.05$); 当 Al^{3+} 浓度大于 50 $\mu\text{mol/L}$ 时, 胼胝质含量显著上升, 均与对照相比差异显著 ($P < 0.05$), 但 Al^{3+} 浓度为 250 $\mu\text{mol/L}$ 时, 胼胝质含量上升的幅度低于 100 和 500 $\mu\text{mol/L}$,



Al^{3+} 浓度 Al^{3+} concentration/ ($\mu\text{mol/L}$)

图 1 不同浓度 Al^{3+} 处理后苏木精染色的豌豆根尖

Fig. 1 Hematoxylin stain of root apices after treated by Al^{3+}

表 2 不同浓度 Al^{3+} 对豌豆各个根段胼胝质含量的影响

Table 2 Influences of different Al^{3+} concentrations on callose content in each root segment of pea

胼胝质含量 Callose content	Al^{3+} 浓度 Al^{3+} concentration/ ($\mu\text{mol/L}$)							μg
	0	10	20	50	100	250	500	
根段 1 Root segment 1	0.30 ±0.06 c	0.88 ±0.16 c	0.70 ±0.24 c	3.43 ±0.15 a	3.58 ±0.03 a	1.79 ±0.19 b	3.90 ±0.65 a	
根段 2 Root segment 2	0.40 ±0.09 c	0.60 ±0.15 c	0.68 ±0.20 c	2.92 ±0.20 b	4.08 ±0.06 a	2.48 ±0.25 b	3.95 ±0.58 a	

有待进一步研究。结果表明 Al^{3+} 浓度越大,植物幼根细胞形成的胼胝质就越多,植物受伤害愈严重,然而超过一定极限浓度后,胼胝质含量不再增加,表明 $50 \mu\text{mol/L}$ 是豌豆根系最敏感铝毒浓度。

讨 论

铝毒主要作用于根尖,引起植物根系生理生化和形态学变化^[8]。植物受到铝毒时根系伸长迅速受到抑制,因而根伸长抑制率常用于评价铝毒及植物耐 Al^{3+} 性差异。对豌豆进行不同浓度 Al^{3+} 处理,根系伸长受抑制程度与 Al^{3+} 浓度存在明显剂量效应, Al^{3+} 浓度越高,根相对伸长率越低。胼胝质的形成是铝毒的敏感标记^[5]。胼胝质是植物在特殊的组织、特殊的发育时期或特殊的生理条件下产生的一种功能复杂的细胞壁(-1,3-glucans)^[9]。环境胁迫也可诱导植物细胞合成胼胝质,胼胝质的形成是铝毒的敏感标记^[10-11]。

在 Al^{3+} 浓度为 $0 \sim 100 \mu\text{mol/L}$,随 Al^{3+} 浓度升高,胼胝质含量升高,其中 Al^{3+} 浓度从 $20 \mu\text{mol/L}$ 升高到 $50 \mu\text{mol/L}$ 时,胼胝质变化最明显。这与苏木精染色显示的 Al^{3+} 含量的变化相近,随着处理溶液 Al^{3+} 浓度升高,苏木精染色逐渐加深,在 Al^{3+} 浓度为 $50 \mu\text{mol/L}$ 时整个根尖都明显着色。胼胝质变化和苏木精染色结果均表明 $50 \mu\text{mol/L}$ 为豌豆根尖最敏感的 Al^{3+} 浓度。铝毒也引起植物酶活性的变化,通过对 POD 活性的测定,发现 $10 \sim 500$

$\mu\text{mol/L}$ Al^{3+} 均引起 POD 酶活性显著下降,表明铝毒可能引起活性氧代谢紊乱。

参 考 文 献

- [1] 杨建立,何云峰,郑绍建,等.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.
- [2] 赵会娥,贺立源,章爱群,等.铝胁迫对植物光合作用的影响及其机理的研究进展[J].华中农业大学学报,2008,27(1):155-160.
- [3] 冯英明,喻敏,王昌全,等.铝毒诱导植物细胞反应研究进展[J].华中农业大学学报,2004,24(6):320-324.
- [4] 甄畅迪,喻敏,萧洪东,等.铝硼对豌豆原位根边缘细胞粘胶层厚度的影响[J].华中农业大学学报,2009,28(1):35-38.
- [5] 黎晓峰,秦丽凤,李耀燕,等.不同木豆品种耐铝性的基因型差异及其机理研究[J].生态环境,2005,14(5):690-694.
- [6] KöhLE H,JEHLICK W,POTEN F,et al. Chitosan-elicited callose synthesis in soybean cells as a Ca^{2+} -dependent process[J]. Plant Physiol,1985,77:544-551.
- [7] 张志良.植物生理学实验指导[M].2版.北京:高等教育出版社,1993.
- [8] 李德华,黄升谋,贺立源,等.不同基因型玉米根系对铝胁迫反应的差异研究[J].华中农业大学学报,2003,22(4):365-369.
- [9] 李兆勇,王亚男.黑麦小孢子母细胞形成和发育过程中细胞胼胝质壁合成的变化[J].西北植物学报,2001,21(4):700-705.
- [10] SIVAGURU M,HORST W J. The distal part of the transition zone is the most aluminium sensitive apical root zone of *Zea mays* L. [J]. Plant Physiol,1998,116:155-163.
- [11] HORST W J,P SCHEL A K,SCHMOHL N. Induction of callose formation is a sensitive marker for genotypic aluminium sensitivity in maize[J]. Plant and Soil,1997,192:23-30.

Sensitive Concentration of Al^{3+} to Root Tip of Pea (*Pisum sativum*)

HE Li-lan YU Min WANG Hui-zhen LIU Jia-you LIU Li-li

Department of Horticulture, Foshan University, Guangdong Province, Foshan 528000, China

Abstract Influences of different concentration of Al^{3+} on the roots of pea (*Pisum sativum*) were studied by determining root elongation,callose production,activity of peroxide(POD) and hematoxylin stain of root apices after treated by Al^{3+} for 24 h. The results showed that root elongation was obviously inhibited and activity of POD decreased with the increase of Al^{3+} concentration. Callose content increased with the increase of Al^{3+} concentration and significantly increased at Al^{3+} concentration over $50 \mu\text{mol/L}$ accompanied with heavy hematoxylin stain. These results indicated that Al^{3+} inhibited root growth and the sensitive concentration of Al^{3+} to root tip of pea is $50 \mu\text{mol/L}$.

Key words pea (*Pisum sativum*); root tip; Al^{3+} ; callose; peroxide

(责任编辑:张志钰)