

张雯,黄益丹,张鹏超,等.甘蓝型油菜耐铝极端品种筛选及耐铝生理机制初步解析[J].华中农业大学学报,2023,42(6):154-163.  
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2023.06.019

## 甘蓝型油菜耐铝极端品种筛选 及耐铝生理机制初步解析

张雯,黄益丹,张鹏超,徐芳森,王创,丁广大

华中农业大学资源与环境学院/微量元素研究中心/农业农村部长江中下游耕地保育重点实验室,武汉 430070

**摘要** 为筛选不同铝敏感性油菜品种并探究油菜对铝毒的耐受机制,以997份甘蓝型油菜自然品种为材料,采用土培初筛和营养液复筛的两步筛选法,以地上部鲜质量和相对根系伸长率为指标筛选获得甘蓝型油菜不同铝敏感性品种,解析油菜耐铝的生理机制。结果显示,997份甘蓝型油菜自然品种苗期在酸性土壤上表现出显著的基因型差异,从中筛选出142个不同铝敏感性极端品种,含77份铝耐受品种和65份铝敏感品种;进一步利用营养液培养体系在加铝和不加铝处理下对142个油菜品种进行复筛,通过聚类分析发现,97个品种在2个培养体系中具有较好的生长一致性;经过多次表型重复试验最终确定2个铝耐受品种(806和985)和2个铝敏感品种(482和811)。在铝毒处理下铝敏感品种(482和811)生物量相比不加铝处理下降约45%,根系生长显著被抑制,而铝耐受品种则无明显差异。进一步分析发现,相比铝敏感品种,铝耐受品种在铝毒条件下根系中积累的铝更少,活性氧含量更低,且根系中抗氧化酶(CAT和POD)的活性相比无铝处理显著增加,这可能是油菜耐铝的重要生理机制之一。

**关键词** 甘蓝型油菜;酸性土壤;铝毒;两步筛选法;极端品种;耐铝

**中图分类号** S565.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2023)06-0154-10

酸性土壤为pH值小于5.5的土壤的总称。酸性土壤对农业生产的危害是一个综合因素,一方面包括因低pH活化土壤中大量铝、铁、锰等金属离子,导致铝、铁、锰等溶入土壤而抑制作物生长;另一方面,酸性土壤中磷、钾、钙、镁、钼和硼等作物必需养分的有效性低,导致作物营养不良,产量品质下降<sup>[1-2]</sup>。铝作为矿物土壤不可缺少的组成部分,几乎存在于所有的生命形式中,土壤中的铝含量非常高,但是铝对植物的影响与其存在形式和化学形态密切相关。高pH条件下,土壤中的铝主要以沉积物的形式存在,不能被植物吸收<sup>[3]</sup>;在低pH条件下,土壤中的铝离子( $Al^{3+}$ )被释放出来,抑制植物的生长。铝对植物的毒害作用最初和最明显的特征是抑制根尖伸长<sup>[3-5]</sup>,主要表现为主根伸长严重受阻,根尖细胞伸长和细胞分裂受到抑制,根短粗并呈现褐色<sup>[6]</sup>。植物地上部铝毒害的症状与缺磷、缺钙和缺铁等的症状类似,主要表现为植株矮小,叶小,深绿,茎、叶和叶

脉变紫,叶尖黄化死亡,幼叶卷曲,生长点坏死等<sup>[7]</sup>。

不同植物或同一植物的不同基因型对铝毒的耐受能力具有显著差异。因此,在耐铝种质资源筛选、品种鉴定和选育工作中,选择简单、高效的鉴定方法尤为重要<sup>[8-9]</sup>。目前,关于作物耐铝品种的鉴定指标有很多种,因材料的培养体系不同而存在差异,主要的筛选体系包括土壤培养体系和营养液培养体系。利用这2种体系开展品种筛选各具特点,土壤培养体系筛选法考虑了铝对植株地上部和根部生长以及营养吸收的持续影响,一般选择株高、茎、地上部和根系的干质量等为简单高效的鉴定指标<sup>[10]</sup>;而短期的营养液培养体系法一般只考虑了铝对细胞伸长和分裂的影响,多数研究以短期铝处理后测定的根长作为判断品种耐铝能力的方法,以相对根系伸长率作为衡量耐铝特性的敏感指标<sup>[11]</sup>。此外,由于物种特性不同,筛选方法也不同。例如,在豌豆耐铝品种筛选中研究人员通过雾培法测定幼苗期和芽期耐铝的

收稿日期:2023-09-27

基金项目:国家重点研发计划项目(2022YFD1900705)

张雯,E-mail:zhangw@webmail.hzau.edu.cn

通信作者:丁广大,E-mail:dgd@mail.hzau.edu.cn

能力来评价各材料的耐铝能力,在大豆耐铝品种筛选中研究人员采用田间试验将地上部相对产量作为主要鉴定指标<sup>[12]</sup>。

为增强对环境的适应性,植物自身进化出一系列耐铝机制,包括外部排斥和内部解毒机制。外部排斥机制主要包括有机酸和酚类化合物等螯合铝、细胞壁解毒机制和碱化根际环境等;内部解毒机制主要包括激素、抗氧化防御系统和液泡区隔化等<sup>[13-15]</sup>。抗氧化防御系统是植物耐铝机制的重要组成部分。铝通过影响植株体内的抗氧化代谢平衡而调节根系的伸长。抗氧化酶包括超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)。SOD可将植物体内的 $O_2^{\cdot-}$ 转化为 $H_2O_2$ ,在各种酶促活性氧清除系统中处于第一道屏障<sup>[16]</sup>。CAT将植物体内存在的 $H_2O_2$ 还原为 $H_2O$ 和 $O_2$ ,POD也是植物体内重要的保护酶类,与CAT协同及时清除细胞内过量的 $H_2O_2$ ,解除活性氧对植物的危害<sup>[17]</sup>。研究表明,铝毒处理提高了大麦<sup>[18]</sup>、大豆<sup>[19-20]</sup>、烟草<sup>[21]</sup>和柑橘<sup>[22]</sup>等作物活性氧清除系统中相关抗氧化酶的活性。

甘蓝型油菜作为我国长江中下游主要的油料作物,提供了1/3的油料来源<sup>[23]</sup>。我国长江中下游地区土壤酸化严重,为减少和防止酸性土壤中铝毒对油菜的危害,最直接有效的方法之一是选育油菜耐铝品种。因此,本研究以997份甘蓝型油菜自然品种为材料,采用土培初筛和营养液复筛的两步筛选法,筛选油菜耐铝优异种质,解析其对铝毒害的响应机制,旨在为选育适应酸性土壤的高产高抗油菜新品种提供理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 自然群体土壤培养试验

盆栽试验在华中农业大学微肥基地进行。供试土壤为红壤,取自湖北省咸宁市贺胜桥镇(29°49'N, 114°18'E),土壤铝含量526 mg/kg, pH 4.8。土样随机混匀后,除去枝条、石子等杂物。在种植油菜前,将土壤和肥料按照处理混匀后,通过浇水使土壤含水率保持田间最大持水量的70%。肥料施用量为 $(NH_4)_2SO_4$  944 mg/kg,  $KH_2PO_4$  287 mg/kg, KCl 159 mg/kg,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  250 mg/kg,  $H_3BO_3$  2.84 mg/kg,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  1.81 mg/kg,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  0.121 mg/kg,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.221 mg/kg,  $CuSO_4 \cdot$

$5H_2O$  0.08 mg/kg。供试材料为前期收集的997份油菜自然群体,每个品种选取大小一致的种子各30粒,均匀播种于供试土壤,覆土覆膜保水约3 d,揭去覆膜,待各材料生长2周后,取样,测定样品的鲜质量。

### 1.2 自然群体营养液培养试验

在土壤培养初筛的基础上,以土壤培养初步筛选出的142份极端品种为材料进行营养液培养复筛。首先,挑选饱满的油菜种子于4℃黑暗处理2~3 h,温室放置24 h后,将种子播至含0.5 mmol/L  $CaCl_2$ 溶液的育苗盘中,当幼苗主根长至2~3 cm时,将整齐一致的幼苗移栽定植到盛有1/4霍格兰营养液的塑料盆中,利用1 mol/L HCl和1 mol/L KOH调节营养液pH值至4.5。试验设置加铝(300  $\mu$ mol/L  $AlCl_3$ )和不加铝(0  $\mu$ mol/L  $AlCl_3$ )2个处理。每个处理设置5个生物学重复(以单株作为1个重复)。铝毒处理3 d后测量各材料的根长,计算相对根系伸长率:

相对根系伸长率=(铝毒处理下根长-无铝处理下根长)/无铝处理下根长 $\times$ 100%。

### 1.3 极端品种营养液培养试验

通过土壤培养初筛和营养液培养复筛从997份甘蓝型油菜自然品种中筛选得到2个耐铝品种和2个铝敏感品种。对这4个极端品种进行营养液培养试验。试验设置加铝(pH 4.5, 300  $\mu$ mol/L  $AlCl_3$ )和不加铝(pH 4.5, 0  $\mu$ mol/L  $AlCl_3$ )2个处理。营养液pH调节方法同本文“1.2”。光照培养室的光照强度为300~320  $\mu$ mol/( $m^2 \cdot s$ ),光照周期为16 h光照/8 h黑暗,温度24℃,湿度65%~80%。挑选饱满的种子萌发后,转移至含0.5 mmol/L  $CaCl_2$ 的浮板上。育苗5 d后,选取长势一致的幼苗移至黑色聚乙烯塑料盆中正常培养3 d,然后进行正常处理和铝毒处理各12 d,取样。2个处理的营养液中除铝含量不一致外,其余养分含量一致,均为5 mmol/L  $KNO_3$ 、5 mmol/L  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 、2 mmol/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、1 mmol/L  $KH_2PO_4$ 、9.14  $\mu$ mol/L  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 、0.32  $\mu$ mol/L  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、0.77  $\mu$ mol/L  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、46  $\mu$ mol/L  $H_3BO_3$ 、0.5  $\mu$ mol/L  $NaMoO_4 \cdot 4H_2O$ 、50  $\mu$ mol/L Fe-EDTA。

### 1.4 根系过氧化氢( $H_2O_2$ )和超氧阴离子( $O_2^{\cdot-}$ )染色

$CaCl_2$ 中生长5 d的幼苗,置于含有或不含300  $\mu$ mol/L  $AlCl_3$ 的1/4霍格兰营养液中处理3 d,取不同处理下的幼苗各6株,用吸水纸吸干水分后放入装有1.5 mL 10  $\mu$ mol/L的超氧阴离子探针二氢乙锭(dihydroethidium, DHE,  $O_2^{\cdot-}$ )或羟苯基荧光素(hy-

droxyphenyl fluorescein, HPF,  $H_2O_2$ )的2 mL黑色离心管中<sup>[24]</sup>,于37 °C分别孵化10 min和1 h。随后,用10 mmol/L的Tris-HCl溶液(pH 7.4)清洗3次,每次10 min。最后取出置于荧光显微镜下进行观察并拍照。

### 1.5 根系Morin染色

Morin是一种植物性黄酮类化合物,具有较低的抗氧化活性,用于观察铝在细胞中的分布。取在 $CaCl_2$ 溶液中生长5 d的幼苗,在含有或不含200  $\mu\text{mol/L}$   $AlCl_3$ 的1/4霍格兰营养液中处理3 d,将幼苗根尖在超纯水中浸泡冲洗15 min(0~10 mm,6个重复),洗去根尖表面残留的铝及其他杂质。用0.005% Morin染料染色30 min<sup>[25]</sup>,于纯水中浸洗30 s,在倒置荧光显微镜下观察并拍照。

### 1.6 抗氧化酶活性的测定

称取植物组织鲜样约0.1 g于2 mL离心管中,加入1 mL预冷的PBS缓冲液在冰盒中冰浴,将组织磨

碎,提取蛋白,在4 °C 10 000 r/min离心15 min,取上清液;SOD活性采用氮蓝四唑法测定;POD活性通过愈创木酚法测定;CAT活性采用紫外分光光度法测定。

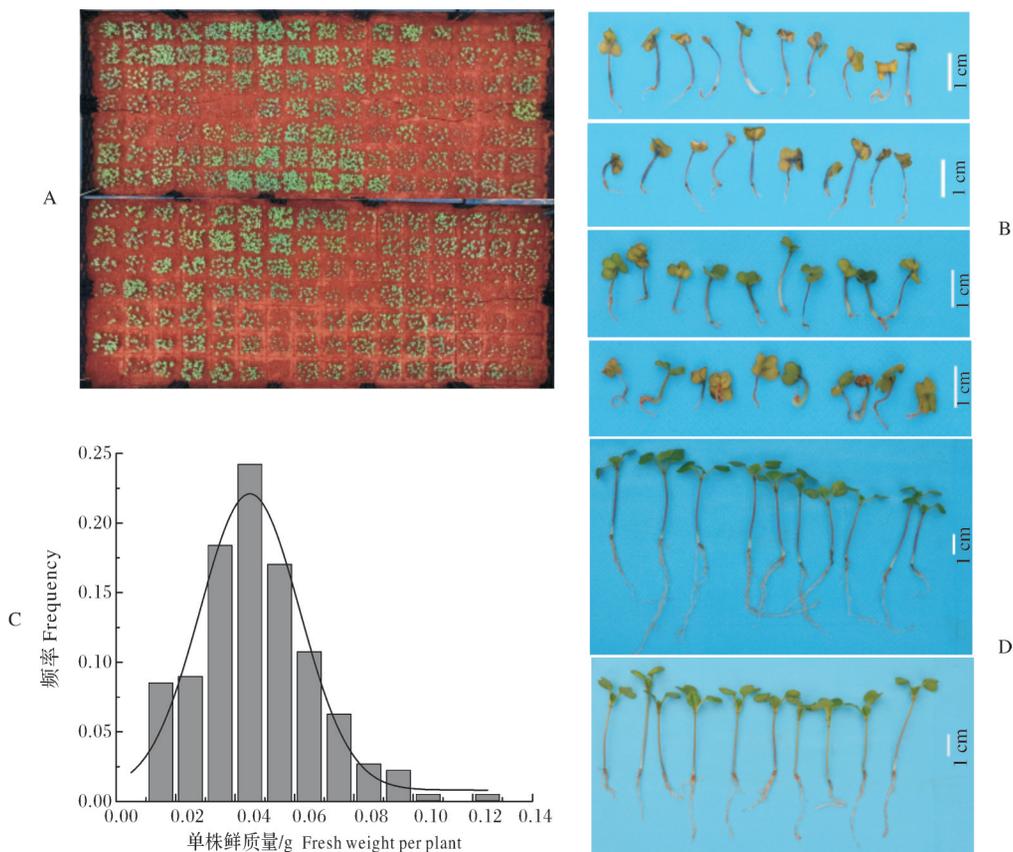
### 1.7 数据统计

采用Microsoft Office Excel 2020处理数据,结合Graphpad制作图表,统计及方差分析采用SPSS 22软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 甘蓝型油菜自然群体耐铝性评价

以997份甘蓝型油菜自然品种为材料,利用高通量的土培盆栽试验(图1A),分析油菜自然群体在铝毒条件下的生长状况。观察发现,在处理14 d后,各材料地上部长势受酸性土壤中铝毒害明显,主要表现为植株矮小、叶片变褐、萎焉,根系生长明显受到抑制,且各材料间表现出显著的基因型差异(图1B)。



A:高通量土培筛选示意图;B:铝敏感品种表型;C:群体鲜质量频次分布直方图;D:铝耐受品种表型。A: Schematic diagram of high-throughput soil culture analysis; B:Phenotype of varieties sensitive to aluminum; C: Histogram of the frequency distribution of fresh weight in the population; D:Phenotype of varieties tolerant to aluminum.

图1 甘蓝型油菜自然群体在酸性土壤上的耐铝性评价

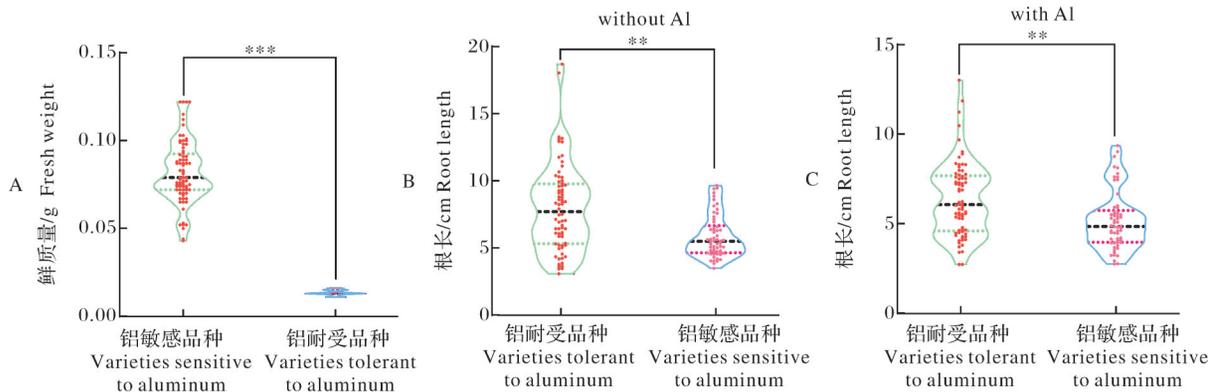
Fig.1 Evaluation of tolerance to aluminum of natural population of *Brassica napus* in acidic soil

选取长势一致的10株油菜幼苗,测定其鲜质量,分析甘蓝型油菜自然群体的整体变化趋势。结果显示,群体单株鲜质量变异幅度较大(0.010~0.122 g/株),变异系数为42.34%,单株鲜质量频率分布直方图呈正态分布(图1C)。敏感品种和耐受品种的表型差异较大(图1B、D),表明该方法适用于高通量评价油菜苗期对酸性土壤的适应能力。

## 2.2 甘蓝型油菜耐铝极端品种筛选

采用土培试验对997份油菜自然品种进行耐铝

性评价,初步筛选出极端品种142份,其中77个为耐受品种,在酸性土壤中具有较大的生物量;65份为敏感品种,在酸性土壤上的长势受到严重抑制,生物量较小(图2A)。为了进一步明确极端品种对铝的耐受能力,利用营养液培养试验对142份极端品种进行复筛。结果显示,正常处理条件下各材料的根长为4~12 cm,而铝毒处理后,各材料的根长为2.7~11.0 cm。与正常处理相比,铝毒显著抑制了油菜根系的伸长,且品种间对铝敏感性表现出显著差异(图2B、C)。



A: 酸性土壤中极端品种的植株鲜质量; B: 营养液培养试验中不加铝处理下极端品种的根长; C: 营养液培养试验中加铝处理下极端品种的根长。\*\*, \*\*\*分别表示在0.01和0.001水平差异显著。A: Fresh weight of varieties with contrasting aluminum sensitivity in acidic soil; B: Root length of varieties with contrasting aluminum sensitivity under no aluminum treatment in the hydroponic trials; C: Root length of varieties with contrasting aluminum sensitivity under aluminum treatment in the hydroponic trials; \*\*, \*\*\* indicate significant difference at 0.01 and 0.001 levels.

图2 油菜不同铝敏感性极端品种的鲜质量、根长

Fig. 2 Fresh weight and root length of *Brassica napus* varieties with contrasting aluminum sensitivity

为了探究不同培养体系各材料耐铝能力的一致性,我们对各材料在营养液培养体系中测定的根系伸长率和土壤培养体系中测定的鲜质量数据进行聚类分析。结果显示,97个品种(68%)在2个培养体系中能保持较好的一致性,30个品种(21%)在2个培养系统中表现出较大差异(图3),表明酸性土壤对油菜的生长抑制作用并不完全是由铝毒害这一单个因素导致的。对数据进行归一化处理,选取在2个培养体系中均表现出铝耐受性或铝敏感性的品种作为开展下一步研究的候选材料。经多次表型重复验证,最终确定2个品种(编号为806和985)为铝极端耐受品种,另2个品种(编号为482和811)为铝极端敏感品种。

### 2.3 极端品种响应铝毒的表型差异

利用营养液培养试验进一步分析了铝耐受品种(806和985)以及铝敏感品种(482和811)在加铝和

不加铝条件下的表型差异(图4A)。结果显示:在无铝处理条件下,4个品种的单株地上部鲜质量较高,约为0.22 g,品种间无显著差异;在铝毒处理条件下,铝耐受品种的地上部鲜质量与无铝处理相比无显著差异,而铝敏感品种的地上部鲜质量与无铝处理下相比下降约45%(图4B)。4个品种的根长对铝的响应表现出与地上部鲜质量类似的趋势。铝敏感品种482和811的主根系在铝处理条件下显著下降约26%,而铝耐受品种的主根长在2个处理下则无显著差异(图4C)。上述结果表明482和811对铝毒非常敏感,而806和985表现出非常强的铝耐受能力。

此外,对叶片SPAD值测定结果显示,在铝毒处理条件下除482外,其他品种的叶片SPAD值均显著高于不加铝处理(图4E)。除811外,其他品种在铝毒处理下的根冠比均较无铝处理显著增加(图4F)。对各处理条件下4个油菜品种根系进行Morin染色,结果显示在无铝处理下,各材料根系绿色荧光较浅;而在铝处理后,4个品种根系中的绿色荧光信

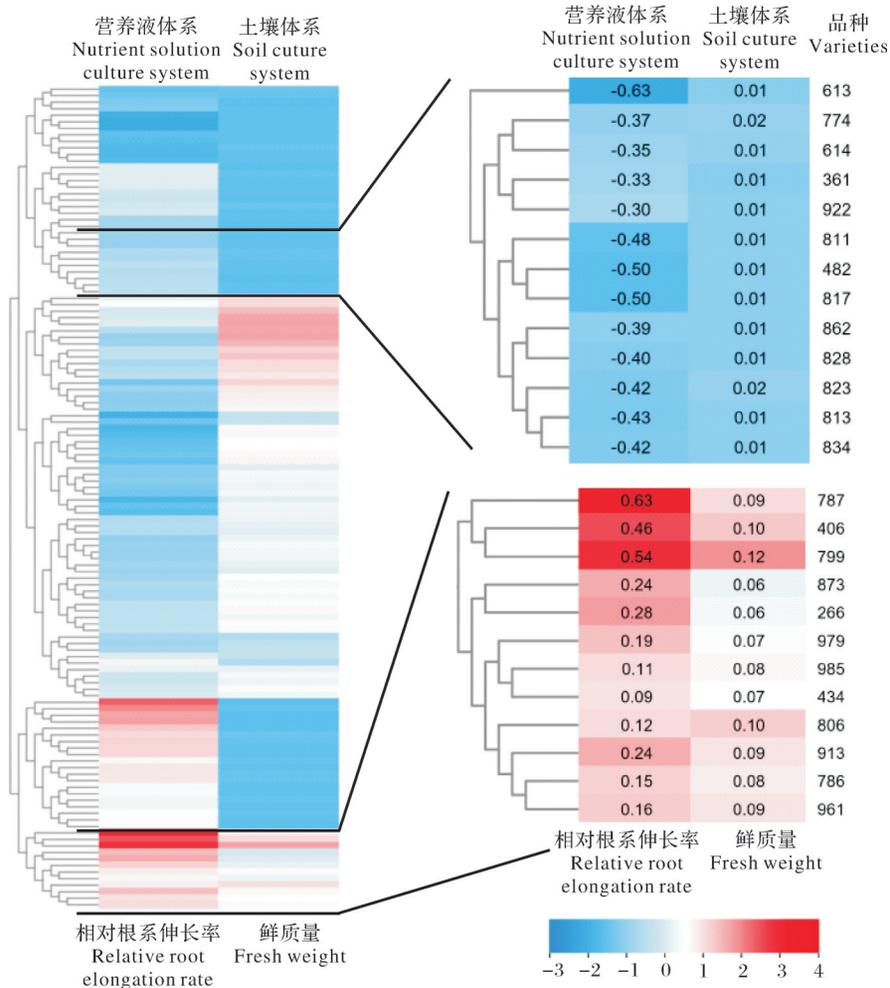


图 3 油菜不同铝敏感性品种在营养液培养中的相对根系伸长率和在土壤培养中的整株鲜质量的聚类热图

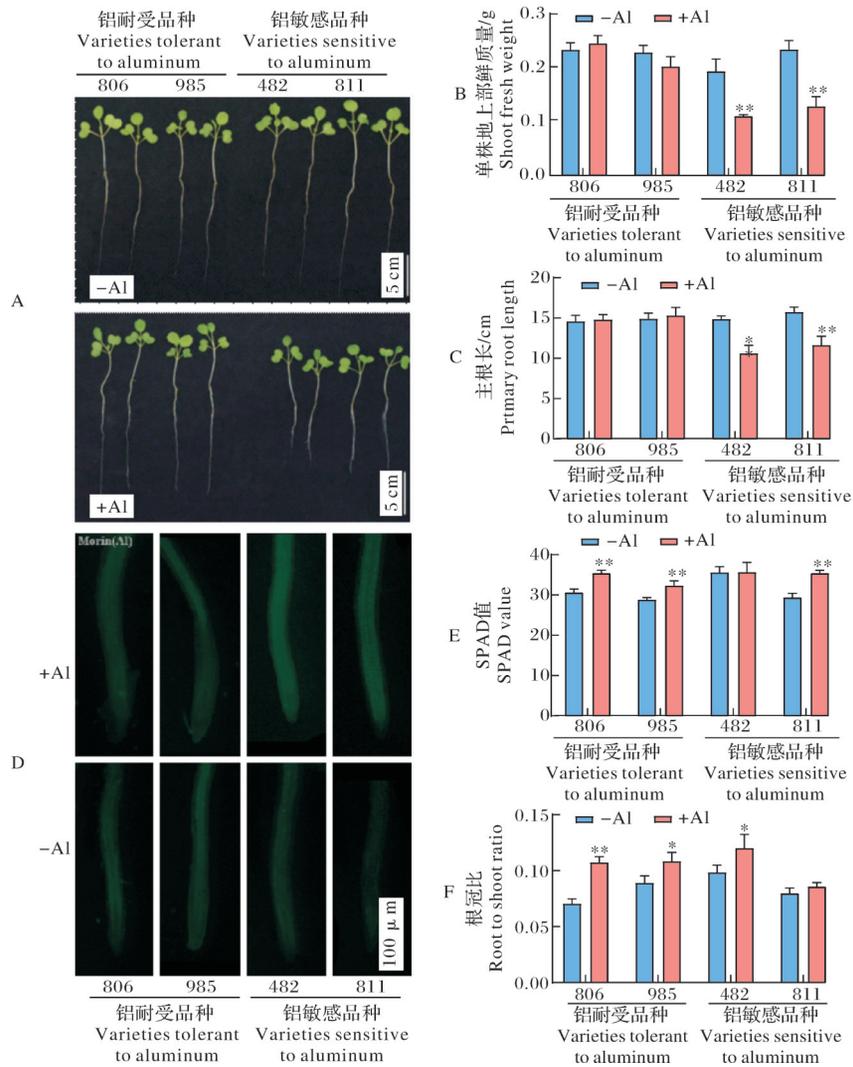
Fig. 3 Clustered heat maps of relative root elongation rate in the hydroponic trial and fresh weight in the pot trial of *Brassica napus* varieties with contrasting aluminum sensitivities

号均强于无铝处理。相比铝耐受品种,铝敏感品种根系中的绿色荧光信号更强,表明在铝处理条件下敏感品种根系中的铝含量较铝耐受品种更高(图4D)。

### 2.4 极端品种在不同铝处理条件下的活性氧含量及抗氧化酶活性

分别使用DHE和HPF荧光染料检测油菜不同耐铝性极端品种在加铝和不加铝处理下根系中 $O_2^{\cdot-}$ 和 $H_2O_2$ 的变化。结果显示,不加铝处理下各材料的根系具有微弱的荧光,在铝处理后各材料根系的荧光强度明显增加。在加铝处理下,铝敏感品种根系中DHE和HPF的荧光信号显著高于铝耐受品种(图5),表明铝处理后敏感品种根系中积累了更多的 $H_2O_2$ 和 $O_2^{\cdot-}$ ,因此其损伤程度可能相比铝耐受品种更重。

各材料根系和地上部抗氧化相关酶的活性测定结果显示,与不加铝处理相比,铝毒显著增加了敏感品种482和811根系中SOD的活性,分别由276.31和413.11 U/g增加到566.96和515.99 U/g(图6A),但铝耐受品种根系中SOD的活性在不同铝处理下无显著变化(图6B)。铝毒处理显著增加了铝耐受品种806和985地上部和根系中CAT的活性,但对铝敏感品种的影响不大,其中铝耐受品种806根系中的CAT活性变化最大,增长幅度达到3.09倍(图6C、D)。与不加铝处理相比,铝毒处理下铝敏感品种和铝耐受品种地上部POD的活性均显著下降,品种间无显著差异(图6E)。然而,铝耐受品种806和985根系中POD的活性在铝毒处理下显著增加,增幅分别为1.56倍和1.99倍,而铝敏感品种在2个铝处理条件下则无显著差异(图6F)。



A: 生长表型; B: 地上部鲜质量; C: 主根长; D: Morin 染色; E: SPAD 值; F: 根冠比。A: Growth phenotype; B: Shoot fresh weight; C: Primary root length; D: Morin staining; E: SPAD value; F: Root to shoot ratio.

图 4 油菜不同铝敏感性极端品种在加铝和不加铝处理下的表型差异

Fig. 4 Phenotypic differences among *Brassica napus* varieties with contrasting aluminum sensitivities under with Al and without Al treatments

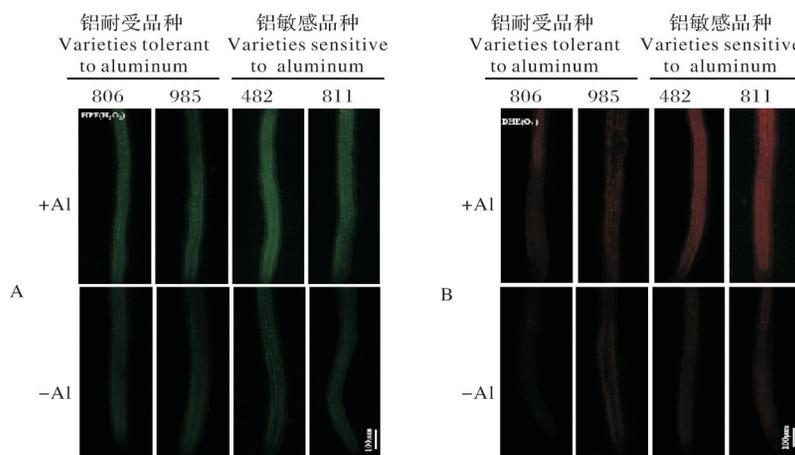
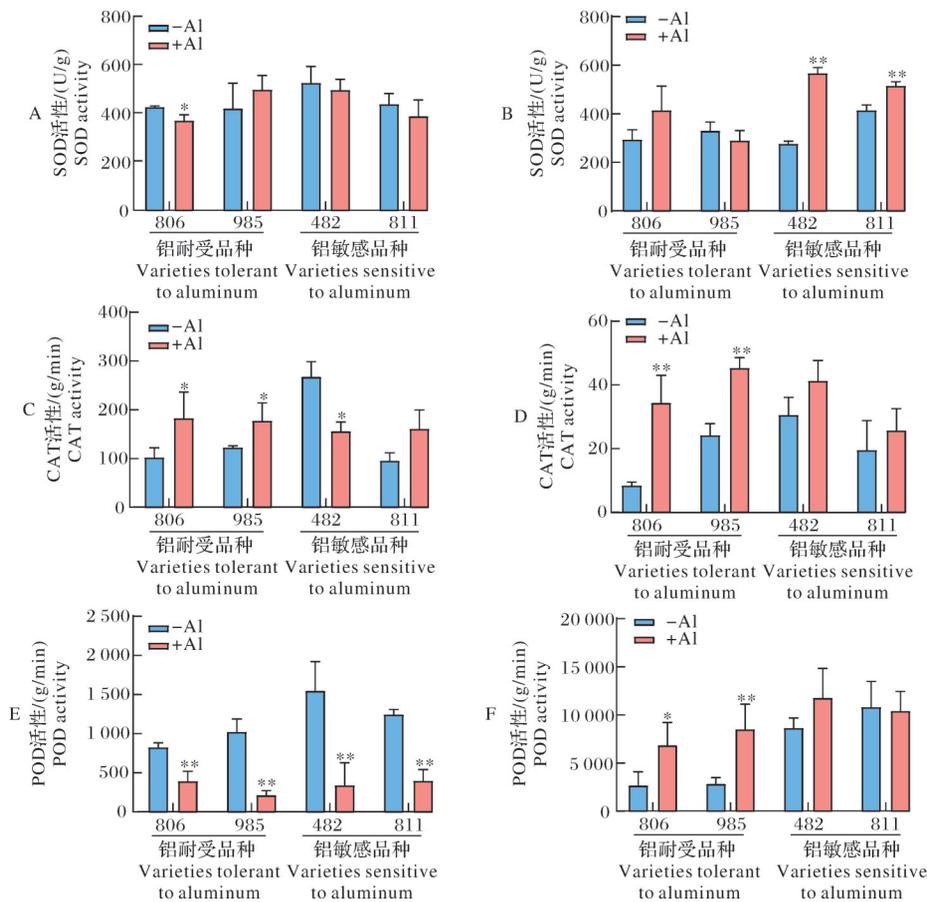


图 5 油菜不同铝敏感性极端品种在加铝和不加铝处理下的根系 DHE(A) 和 HPF(B) 染色观察  
Fig. 5 Root DHE (A) and HPF (B) staining of *Brassica napus* varieties with contrasting aluminum sensitivities under with Al and without Al treatments



A: 地上部 SOD 活性; B: 根系 SOD 活性; C: 地上部 CAT 活性; D: 根系 CAT 活性; E: 地上部 POD 活性; F: 根系 POD 活性。A: Shoot SOD activity; B: Root SOD activity; C: Shoot CAT activity; D: Root CAT activity; E: Shoot POD activity; F: Root POD activity.

图6 油菜不同铝敏感性极端品种在加铝和不加铝处理下地上部和根系中的抗氧化酶活性

Fig. 6 Antioxidant enzyme activity in the shoot and root of *Brassica napus* varieties with contrasting aluminum sensitivities under with Al and with out Al treatments

### 3 讨论

铝毒是酸性土壤中影响植物生长发育的主要限制因子之一<sup>[26]</sup>。我国长江以南地区是甘蓝型油菜主要种植区域,该地区土壤酸化严重,pH值较低,对油菜的生长影响较大<sup>[27]</sup>。通过评价油菜不同品种对铝的耐受性,筛选出对铝毒害具有较强抗性的油菜品种,揭示其耐酸抗铝的生理与分子机制,有助于培育耐酸抗铝的油菜新品种,对提高油菜在酸性土壤的适应性具有重要意义<sup>[28]</sup>。目前关于铝毒影响植物生长的报道较多,大部分以单一的土壤培养或营养液培养筛选为主<sup>[29-30]</sup>,本研究结合土壤培养和营养液培养2种体系,采用两步筛选法在油菜苗期高通量地鉴定出不同耐铝能力的油菜品种。2种筛选体系的一致性达到68%,说明采用上述2种不同体系的不同指标均能在一定程度上反映不同品种的耐铝程度,均可作为甘蓝型油菜耐铝程度筛选的指标之一。营

养液培养体系采用根系相对伸长率作为指标,不仅可以消除基因型间固有的根系伸长的差异,而且能灵敏、可靠地反映不同品种的耐铝性差异,是一种理想的筛选指标<sup>[8-9,12]</sup>,但营养液培养法的营养液浓度、 $Al^{3+}$ 浓度和pH变动较大,不同油菜品种同一处理或重复的培养条件也难以控制到完全一致,这些因素会影响试验的结果<sup>[11]</sup>。土壤是植物生长的主要介质,土壤培养是研究植物响应铝毒比较接近田间实际情况的方法<sup>[10]</sup>,同时土壤培养体系具有环境复杂、不确定性因素多、周期长等缺点。本研究将2种培养体系相结合,能够准确地筛选出不同铝敏感性极端品种,具有高通量、鉴定快速、实用性强等特点。

大量研究表明,植物根系最先遭受铝毒害,根尖被认为是铝诱导根系生长抑制的最初作用靶点,根尖中积累的铝及其所产生的损伤远超根的其他部位<sup>[4-7]</sup>。本研究通过营养液培养法测定了加铝和不加铝条件下油菜自然群体的根系长度,发现不同品

种根系对铝毒的响应差异较大,在铝毒条件下大部分品种的根系生长受阻,这一结果与前人研究一致<sup>[11]</sup>。此外,本研究发现30个品种(约占21%)在土壤培养和营养液培养2个系统中的表现不一致。导致这种差异的原因可能是酸性土壤中植物生长的抑制因子不仅有铝毒,还可能存在着铁毒和锰毒等其他重金属毒害以及磷、钾、钙、镁、铝和硼等作物必需元素的缺乏等问题<sup>[4-7]</sup>。出现土培和营养液培表型不一致的原因还有待进一步深入探究。

植物在遭受铝毒时,主根伸长受阻,根粗短而呈褐色,根冠脱落,根系出现坏死,侧根变短变粗,侧根减少,根系长度下降,呈珊瑚状<sup>[5-6]</sup>。在铝毒条件下,油菜的生长、生理和代谢过程同样受到不同程度的影响。本研究筛选到2个铝耐受品种和2个铝敏感品种,在铝毒条件下铝敏感品种的整体长势均显著弱于不加铝处理,而铝耐受品种在铝处理前后无显著差异,表现出较强的铝毒抗性。铝胁迫下敏感品种根系的长度显著下降。Morin染色显示,敏感品种在铝处理条件下根系中的荧光强度显著强于耐受品种,表明在铝毒条件下铝敏感品种相比铝耐受品种根系中积累了更多的铝,进而抑制根系伸长<sup>[31]</sup>。这可能是不同品种对铝耐受性不同的主要原因之一。这一结果在其他作物中也有类似报道<sup>[32]</sup>。

在植物遭受胁迫时,会产生大量活性氧,引起细胞膜的氧化损伤<sup>[33]</sup>。在铝毒害条件下,植物体内同样会产生大量的活性氧,其抗氧化酶活性发生改变,影响植物正常的生长发育,这一现象在柑橘<sup>[34]</sup>、水稻<sup>[35]</sup>和大豆<sup>[36]</sup>等作物中均有报道。本研究利用DHE和HPF荧光染料检测了油菜不同铝敏感性品种根系中 $O_2^{\cdot-}$ 和 $H_2O_2$ 的含量,结果发现铝毒处理后油菜铝敏感品种根系中DHE和HPF荧光显著增强,且高于铝耐受品种,表明铝诱导活性氧在油菜根系中大量积累,且铝耐性品种根系积累的活性氧更高。进一步分析不同品种根系中抗氧化酶活性的变化,发现铝毒处理下铝敏感品种根系中SOD的活性显著增加,促进 $O_2^{\cdot-}$ 转化为 $H_2O_2$ 。然而,清除 $H_2O_2$ 的重要酶(CAT和POD)的活性在铝敏感品种根系中在不同处理下则无显著差异,表明铝敏感品种中积累的 $H_2O_2$ 没有通过CAT和POD清除,导致 $H_2O_2$ 在植物体内的大量积累,进而抑制植株生长。与之相反,在铝耐受品种中,处理前后根系中的SOD活性差异不大,CAT和POD的活性则显著增加,表明在铝毒处理后铝耐受品种更好地启动了防御系统清除体内

由铝毒产生的活性氧,以更好地适应逆境环境<sup>[5-7, 33]</sup>。

本研究通过土壤培养法和营养液培养法的两步筛选法从997份油菜自然品种中筛选获得了2个铝耐受品种(806和985)和2个铝敏感品种(482和811)。通过设置加铝和不加铝处理初步分析了油菜耐铝的生理机制:铝毒显著抑制油菜地上部和根系的生长;与铝敏感品种相比,耐铝品种在铝毒处理下根系中积累的铝和活性氧更少,根系中活性氧清除系统的关键酶活性相比无铝处理显著增加,因此,其根系遭受的氧化损伤程度更低。这可能是油菜耐铝的重要生理机制之一。

## 参考文献 References

- [1] GUO J H, LIU X J, ZHANG Y, et al. Significant acidification in major Chinese croplands [J]. *Science*, 2010, 327 (5968): 1008-1010.
- [2] ZHAO X, CHEN R, SHEN R. Coadaptation of plants to multiple stresses in acidic soils [J]. *Soil science*, 2014, 179: 503-513.
- [3] LI W, JOHNSON C E. Relationships among pH, aluminum solubility and aluminum complexation with organic matter in acid forest soils of the Northeastern United States [J]. *Geoderma*, 2016, 271: 234-242.
- [4] POSCHENRIEDER C, GUNSE B, CORRALES I, et al. A glance into aluminum toxicity and resistance in plants [J]. *The science of the total environment*, 2008, 400(1/2/3): 356-368.
- [5] KOCHIAN L V, PINEROS M A, HOEKENGA O A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity [J]. *Plant and soil*, 2005, 274 (1): 175-195.
- [6] RAHMAN R, UPADHYAYA H. Aluminium toxicity and its tolerance in plant: a review [J]. *Journal of plant biology*, 2021, 64(2): 101-121.
- [7] CHAUHAN D K, YADAV V, VACULÍK M, et al. Aluminium toxicity and aluminum stress-induced physiological tolerance responses in higher plants [J]. *Critical reviews in biotechnology*, 2021, 41(5): 715-730.
- [8] 林威永, 章永松, 罗安程. 不同小麦基因型耐铝性的差异及筛选方法的研究 [J]. *植物营养与肥料学报*, 2001, 7(1): 64-70. LIN X Y, ZHANG Y S, LUO A C. Differences of aluminum tolerance on wheat genotypes and its screening techniques [J]. *Plant nutrition and fertilizer science*, 2001, 7 (1): 64-70 (in Chinese with English abstract).
- [9] 刘莹, 盖钧镒. 大豆耐铝毒的鉴定和相关根系性状的遗传分析 [J]. *大豆科学*, 2004, 23 (3): 164-168. LIU Y, GAI J Y. Identification of tolerance to aluminum toxin and inheritance of related root traits in soybeans (*Glycine max* (L) Merr.) [J]. *Soybean science*, 2004, 23(3): 164-168 (in Chinese with Eng-

- lish abstract).
- [10] 熊洁,邹小云,陈伦林,等.油菜苗期耐铝基因型筛选和鉴定指标的研究[J].中国农业科学,2015,48(16):3112-3120. XIONG J,ZOU X Y,CHEN L L, et al.Screening of rapeseed genotypes with aluminum tolerance at seedling stage and evaluation of selecting indices[J].Scientia agricultura sinica, 2015, 48(16):3112-3120 (in Chinese with English abstract).
- [11] 鲍学敏,赵学强,肖作义,等.铝对不同耐铝水稻品种根系生长和养分吸收的影响[J].植物生理学报,2015,51(12):2157-2162. BAO X M,ZHAO X Q,XIAO Z Y, et al.Effects of aluminum on the root growth and nutrient uptake of two rice varieties with different aluminum tolerances[J].Plant physiology journal, 2015, 51(12):2157-2162 (in Chinese with English abstract).
- [12] 李学文.豌豆不同品种耐铝性与细胞壁特性的关系[D].武汉:华中农业大学,2016. LI X W. Aluminum tolerance in cultivars of pea (*Pisum sativum*) and its relationship with cell wall properties [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016 (in Chinese with English abstract).
- [13] MATSUMOTO H. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants [J]. International review of cytology, 2000, 200: 1-46.
- [14] TANDZI L N, MUTENGWA C, NGONKEU E, et al. Breeding maize for tolerance to acidic soils: a review [J/OL]. Agronomy, 2018, 8(6): 84 [2023-09-27]. <https://doi.org/10.3390/agronomy8060084>.
- [15] 李晶,谢成建,王永雄,等.植物耐铝机制研究进展[J].江苏农业科学,2016,44(12):16-21. LI J, XIE C J, YU Y X, et al. Research progress on aluminum tolerance mechanism of plants [J]. Jiangsu agricultural sciences, 2016, 44(12): 16-21 (in Chinese).
- [16] SREENIVASULU N, GRIMM B, WOBUS U, et al. Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*) [J]. Physiologia plantarum, 2000, 109: 435-442.
- [17] FORMAN H J. On Biological effects of the superoxide radical by Irwin Fridovich [J/OL]. Archives of biochemistry and biophysics, 2022, 726: 109117 [2023-09-27]. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2022.109117>.
- [18] CHEN J, WANG W H, WU F H, et al. Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity in barley seedlings [J]. Plant and soil, 2013, 362(1): 301-318.
- [19] LIU J G, WANG X T, WANG N, et al. Comparative analyses reveal peroxidases play important roles in soybean tolerance to aluminum toxicity [J/OL]. Agronomy, 2021, 11: 670 [2023-09-27]. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040670>.
- [20] 刘鹏,徐根娣,姜雪梅,等.铝对大豆幼苗膜脂过氧化和体内保护系统的影响[J].农业环境科学学报,2004,23(1):51-54. LIU P, XU G D, JIANG X M, et al. Effects of aluminum on membrane lipid peroxidation and endogenous protective systems of soybean seedling [J]. Journal of agro-environmental science, 2004, 23(1): 51-54 (in Chinese with English abstract).
- [21] HIROKI I, YURIKO K, YAMAMOTO YOSHIHARU Y, et al. Characterization of NtSTOP1-regulating genes in tobacco under aluminum stress [J]. Soil science and plant nutrition, 2019, 65(3): 251-258.
- [22] YAN L, RIAZ M, CHENG J, et al. Boron-deficiency and aluminum toxicity activate antioxidant defense and disorganize the cell wall composition and architecture in trifoliate orange leaf [J/OL]. Scientia horticulturae, 2022, 297: 110961 [2023-09-27]. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.110961>.
- [23] 王汉中.我国油菜产需形势分析及产业发展对策[J].中国油料作物学报,2007,29(1):101-105. WANG H Z. Strategy for rapeseed industry development based on the analysis of rapeseed production and demand in China [J]. Chinese journal of oil crop sciences, 2007, 29(1): 101-105 (in Chinese with English abstract).
- [24] KOLBERT Z, PETŐ A, LEHOTAI N, et al. *In vivo* and *in vitro* studies on fluorophore-specificity [J]. Acta Biol Szeged, 2012, 56: 37-41.
- [25] ZHU X F, LEI G J, WANG Z W, et al. Coordination between apoplastic and symplastic detoxification confers plant aluminum resistance [J]. Plant physiology, 2013, 162(4): 1947-1955.
- [26] 沈仁芳.铝在土壤-植物中的行为及植物的适应机制[M].北京:科学出版社,2008. SHEN R F. Behavior of aluminum in soil-plant and adaptive mechanism of plants [M]. Beijing: Science Press, 2008 (in Chinese).
- [27] 熊洁,邹小云,陈伦林,等.油菜苗期耐铝基因型筛选和鉴定指标的研究[J].中国农业科学,2015,48(16):3112-3120. XIONG J,ZOU X Y,CHEN L L, et al.Screening of rapeseed genotypes with aluminum tolerance at seedling stage and evaluation of selecting indices[J].Scientia agricultura sinica, 2015, 48(16):3112-3120 (in Chinese with English abstract).
- [28] 熊洁,丁戈,陈伦林,等.不同基因型油菜耐铝性及其根系形态对铝胁迫的响应[J].中国油料作物学报,2021,43(4):673-682. XIONG J, DING G, CHEN L L, et al. Aluminum tolerance and root morphology response from different rapeseed cultivars under aluminum stress [J]. Chinese journal of oil crop sciences, 2021, 43(4): 673-682 (in Chinese with English abstract).
- [29] 韩德鹏,刘星月,王馨悦,等.铝胁迫对油菜根系形态和生理指标的影响[J].核农学报,2019,33(9):1824-1832. HAN D P, LIU X Y, WANG X Y, et al. Effects of aluminum stress on morphology parameters of roots and physiological indexes in *Brassica napus* L. [J]. Journal of nuclear agricultural sciences, 2019, 33(9): 1824-1832 (in Chinese with English abstract).
- [30] ZHAO W R, LI J Y, DENG K Y, et al. Effects of crop straw biochars on aluminum species in soil solution as related with the growth and yield of canola (*Brassica napus* L.) in an acidic Ultisol under field condition [J]. Environmental science and pollution research international, 2020, 27(24): 30178-30189.

- [31] SCHMITT M, WATANABE T, JANSEN S. The effects of aluminium on plant growth in a temperate and deciduous aluminium accumulating species [J/OL]. *AoB plants*, 2015, 8: plw065 [2023-09-27]. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plw065>.
- [32] HUANG J J, HAN R Z, JI F, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and abscisic acid mediate programmed cell death induced by aluminum toxicity in soybean root tips [J/OL]. *Journal of hazardous materials*, 2022, 425: 127964 [2023-09-27]. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127964>.
- [33] RAHMAN R, UPADHYAYA H. Aluminium toxicity and its tolerance in plant: a review [J]. *Journal of plant biology*, 2021, 64(2): 101-121.
- [34] YAN L, RIAZ M, DU C Q, et al. Ameliorative role of boron to toxicity of aluminum in trifoliolate orange roots [J]. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2019, 179: 212-221.
- [35] MERIGA B, KRISHNA REDDY B, RAJENDER RAO K, et al. Aluminium-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*) [J]. *Journal of plant physiology*, 2004, 161(1): 63-68.
- [36] DOS REIS A R, LISBOA L A M, REIS H P G, et al. Depicting the physiological and ultrastructural responses of soybean plants to Al stress conditions [J]. *Plant physiology and biochemistry*, 2018, 130: 377-390.

## Screening extreme varieties with aluminum tolerance and analyzing physiological mechanisms of aluminum tolerance in *Brassica napus*

ZHANG Wen, HUANG Yidan, ZHANG Pengchao, XU Fangsen, WANG Chuang, DING Guangda

*College of Resources and Environment/Microelement Research Center/  
Ministry of Agriculture and Rural Affairs Key Laboratory of Arable Land Conservation  
in the Middle and Lower Reaches of Yangtze River, Huazhong Agricultural University,  
Wuhan 430070, China*

**Abstract** 997 natural *Brassica napus* varieties were used to screen rapeseed varieties sensitive to aluminum (Al) and study the tolerance mechanism of rapeseed to Al toxicity. The two-step screening method of soil culture initial screening and nutrient solution culture re-screening was conducted. The aboveground fresh mass and relative root elongation were used as indicators to screen *Brassica napus* varieties sensitive to aluminum. The physiological mechanism of aluminum tolerance in rapeseed was analyzed. The results showed that 997 natural *Brassica napus* varieties had significant genotypic differences at the stage of seedling in acidic soil. 142 extreme varieties with different aluminum sensitivity including 77 varieties tolerant to aluminum and 65 varieties sensitive to aluminum were screened. A nutrient solution culture system was used to re-screen the 142 rapeseed varieties under aluminum and no aluminum. The results of cluster analysis showed that 97 varieties exhibited good consistency of growth in two cultivation systems. Two aluminum varieties (806 and 985) tolerant to aluminum and two varieties (482 and 811) sensitive to aluminum were finally determined after multiple repeated phenotypic experiments. The biomass of varieties (482 and 811) sensitive to aluminum under aluminum toxicity decreased by about 45% compared to that under non-aluminum treatment, and root growth was significantly inhibited, while varieties tolerant to aluminum had no significant difference. Compared to varieties sensitive to aluminum, varieties tolerant to aluminum accumulated less aluminum in their roots under aluminum toxicity, had lower levels of reactive oxygen species, and significantly increased the activity of antioxidant enzymes including CAT and POD in their roots compared to that under no aluminum, indicating that it may be one of the important physiological mechanisms of aluminum tolerance in rapeseed.

**Keywords** *Brassica napus*; acidic soil; aluminum toxicity; two-step screening; extreme varieties; aluminum tolerance

(责任编辑:张志钰)