

大豆在铝胁迫下分泌的柠檬酸与品种的耐酸铝性无关^{*}

黄鹤 赵月春 郭秀兰

(华南农业大学理学院, 广州 510642)

摘要 试验采用 8 个耐酸铝明显不同的大豆品种, 研究了在铝胁迫下大豆有机酸分泌及其与耐性的关系。同时也比较了大豆铝敏感品种 LJ 和小麦耐铝品种 Atlas 在铝胁迫下有机酸分泌的差异。大豆幼苗在含 $10 \mu\text{M}$ AlCl_3 的 0.5 mM CaCl_2 溶液中进行耐酸铝性筛选。结果表明, 大豆品种在耐酸铝方面存在明显的不同。大豆在 $50 \mu\text{M}$ AlCl_3 铝胁迫下可以分泌大量的柠檬酸, 但柠檬酸分泌量与大豆的耐酸铝性没有正相关性。经过铝处理一天的大豆, 恢复一天后再用铝处理, 多数品种分泌的柠檬酸明显减少, 特别是敏感品种柠檬酸分泌大幅减少, 但柠檬酸分泌量与耐酸铝性也没有相关性。进一步试验表明, 大豆铝敏感品种 LJ 分泌的柠檬酸明显高于小麦耐性品种 Atlas 分泌的有机酸总量(柠檬酸和苹果酸)。另外, 大豆主根的铝积累与耐铝性及柠檬酸分泌量没有相关性。因此, 试验结果表明, 铝诱导的有机酸分泌量及根尖的铝含量不能作为筛选大豆耐酸铝种质的筛选指标。

关键词 大豆; 铝毒; 柠檬酸

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2003)03-0218-05

铝毒是酸性土壤限制作物生长的主要因素, 其主要危害作物的根部, 从而影响作物对营养元素和水分的吸收^[1]。目前, 许多学者对植物耐酸铝的机理进行了广泛的研究, 提出了一些耐性机理^[1]。一般认为耐铝品种根部的铝含量往往明显低于敏感品种, 因此耐铝品种对铝的排斥作用被认为是最主要的耐性机制。在铝胁迫下植物根部可以分泌大量的分泌物, 一些分泌物如有机酸对铝有络合作用, 因此有机酸可以在根内部解铝毒或减少根部对铝的吸收, 提高植物的耐铝毒能力。因此, 在铝诱导下的有机酸分泌被认为是一个重要的耐性机理^[1]。例如, 一些研究表明, 耐铝的植物种可以分泌更多的有机酸, 如荞麦在铝诱导下可以分泌大量的草酸^[2]; 在同一种内, 一些作物的耐性品种也可以比敏感品种分泌更多的有机酸, 如小麦、玉米、小黑麦、大豆^[3-6], 但也有研究表明野苎(Taro)耐酸铝品种分泌的有机酸少于敏感品种^[7]。也有研究表明, 在几种植物上, 如高粱、小麦、水稻, 有机酸分泌与耐酸铝

性没有关系^[8]。大豆是酸性土壤上的先锋作物, 特别是近 30 年来在世界酸性土壤地区大豆得到迅猛的发展, 在巴西几乎所有的大豆都种植在酸性低磷土壤上。中国南方有大面积的酸性低磷土壤, 因此研究大豆的耐酸铝机制对于进一步在南方地区发展大豆生产具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 筛选实验

以 8 个不同来源的大豆品种为实验材料, 其中 Bx1, Bx15, Koko 来自巴西; Vege8、Vege13 来自日本、其他品种为广东地方品种。水培筛选采用根长 8 cm 左右的 4 d 大豆幼苗, 在根尖部用 Indian Ink 标记 2 cm 左右, 量标记后的根长, 然后在 2 L 分别含 $0.10 \mu\text{M}$ 铝 (AlCl_3) 的钙/硼溶液中 (0.5 mM CaCl_2 , $0.8 \mu\text{M}$ H_3BO_3 , pH4.5) 处理 24 h。处理后再量根长, 然后计算相对根长(铝处理根的生长量/

* 收稿日期: 2003-01-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(批准号: 3970086); 农业部 948 资助项目(991023)

作者简介: 黄鹤(1960-), 女, 实验师, 主要从事大豆耐酸铝及低磷机理研究。

对照处理根的生长量 $\times 100\%$)。同时取 1cm 长的根尖用于测定铝含量。实验在人工气候箱中进行, 10 h (暗)/14 h (光), 昼夜温度分别为 25 和 20 $^{\circ}\text{C}$ 度。此方法为国际上通用的快速筛选方法^[4]。

1.2 有机酸分析及铝含量测定

5 d 苗龄的大豆幼苗在正常营养液中(pH 4.5)培养 10 d, 营养液定时通气, 2 d 换一次营养液。实验在人工气候室中进行, 10 h (暗)/14 h (光), 昼夜温度分别为 25 $^{\circ}\text{C}$ 和 20 $^{\circ}\text{C}$ 度, 其他条件详见参考文献^[6]。铝处理前在钙溶液中洗根 12 h, 然后在铝浓度分别为 0、50 μM 的 0.5 mM 钙溶液(CaCl_2)中处理 24 h (pH 4.5), 然后搜集根分泌物, 用于测定有机酸, 并切取主根 1 cm 长的根尖, 用于测定铝含量; 恢复实验, 品种在 50 μM AlCl_3 的钙溶液中处理 24 h, 然后在正常营养液中恢复一天, 再在钙溶液中洗根 12 h, 然后用 50 μM AlCl_3 下处理 24 h。本试验同时测定了大豆敏感品种 LJ 和小麦耐性品种 Atlas 的 15 天幼苗在 50 μM AlCl_3 胁迫下分泌的有机酸。由于 15 天的大豆幼苗根系较大, 所以用 50 μM AlCl_3 (24 h) 处理大豆根部, 此浓度的危害与幼根在 10–15 μM 的危害相当; 另外, Yang 等^[4] 的试验结果也表明, 此浓度比较合适, 可以明显区分大豆有机酸分泌上的差异。在铝处理后收集含有根分泌物的溶液。含有根分泌物的溶液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 的冷室中过阳离子和阴离子树脂柱。然后用盐酸对阴离子柱中的有机酸进行交换, 再旋转蒸发, 最后用 pH 2.1 Milli-Q 水定容^[6]。有机酸测定采用高压液相色谱法^[6, 9]。铝含量用原子吸收方法测定^[6]。柠檬酸浓度为 nmol g^{-1} RFW (根鲜重), 铝浓度为 nmol / 根尖 。

2 结果与分析

2.1 耐铝筛选

由于铝毒主要危害大豆根部, 因此大豆在铝胁迫下的相对根长($\text{Al/no Al} \times 100\%$)可以作为耐铝的筛选指标。本筛选结果表明, Bx1、Bx15、Koko、N8 的相对根长明显高于其他品种, 表明这些品种耐性较强; 而 Jhai 和 LJ 相对根长较短, 是敏感品种 (图 1)。

2.2 铝胁迫下的有机酸分泌

大豆品种在铝胁迫下都能分泌大量的柠檬酸, 品种在分泌量上存在明显的差异, 敏感品种 LJ 分

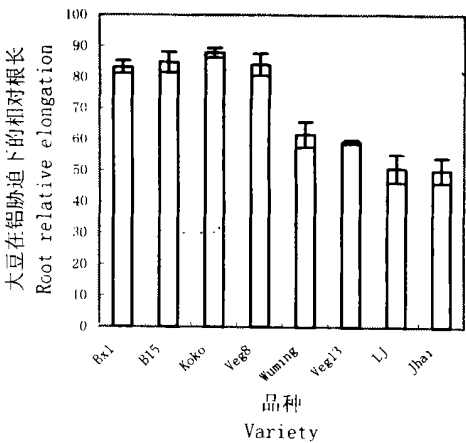


图 1 大豆在 10 μM AlCl_3 (24 h) 的相对根长

Fig. 1 Relative root elongation (% of control) of soybeans under 10 μM AlCl_3 stress for 24 h

泌量最高, 其次是敏感品种 Jhai 这两个品种明显高于其它品种, 耐性品种中 Koko 的分泌量较高, 而耐性品种 Bx1 和 N8 分泌的较少。这表明, 大豆的耐铝性与铝诱导的有机酸分泌量没有正相关性。进一步相关分析结果表明, 二者存在一个不显著的负相关关系($r = -0.63$)。因此敏感品种分泌大量柠檬酸可能是铝毒害的结果。此结果与 Yang 等^[6] 的结果不同, 在他们的试验中只采用了两个大豆品种, 因此不排除试验结果的偶然性。

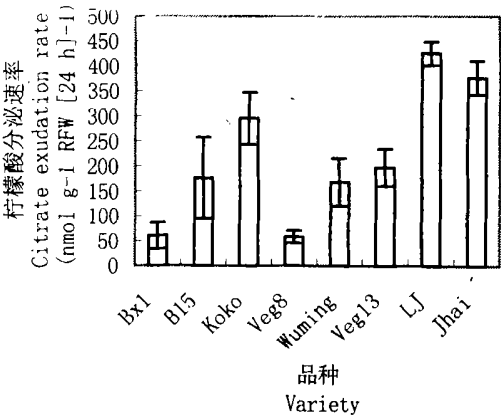


图 2 大豆在 50 μM AlCl_3 (24 h) 胁迫下的柠檬酸分泌速率

Fig. 2 Citrate exudation rates under 50 μM AlCl_3 (24 h) stress

2.3 恢复试验

图 4 的结果表明, 大豆在持续铝胁迫下一些品种柠檬酸分泌明显较少, 不同耐性的品种分泌量差异不明显。敏感品种 LJ、Jhai 减少的幅度较大, 而一些耐性品种如 Bx1 和 Veg8 减少的幅度很少, 说明这两个耐性品种虽然分泌量不高, 但可以持续地分泌有机酸。而另两个耐性品种 B15 和 Koko 分泌的有机酸也减少较多, 说明在铝毒胁迫下一些耐性

和不耐品种都不能以高速率持续地分泌有机酸。

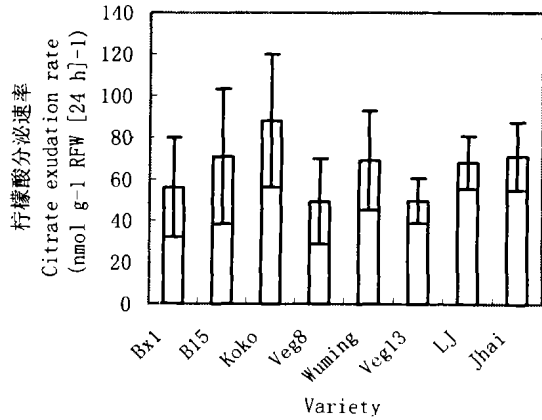


图3 铝预处理[50 μ M AlCl_3 (24 h)] 后恢复一天的大豆在 50 μ M AlCl_3 (24 h) 铝胁迫下的柠檬酸分泌

Fig. 3 Al^{3+} -induced [50 μ M AlCl_3 (24 h)] citrate exudation from soybean roots recovered for 1 day from 50 μ M AlCl_3 (24 h) pre-treatment

2.4 铝敏感大豆品种 LJ 和耐铝小麦品种 Atlas 的有机酸分泌比较

许多研究表明, 小麦品种 Atlas 是一个强耐铝品种。在铝诱导下小麦耐铝品种分泌大量的苹果酸, 但敏感品种往往分泌很少有机酸^[3,9]。本试验结果表明, 大豆敏感品种分泌大量的柠檬酸, 而小麦耐性品种 Atlas 分泌的有机酸总量却明显低于大豆敏感品种。由于柠檬酸对铝的络合能力明显高于苹果酸, 大豆可能比小麦对酸铝土壤有更好的适应性。但此结果也可能说明了有机酸可能在作物耐酸铝方面作用较小, 这和 Ishikawa 等^[8]的结果是一致的。

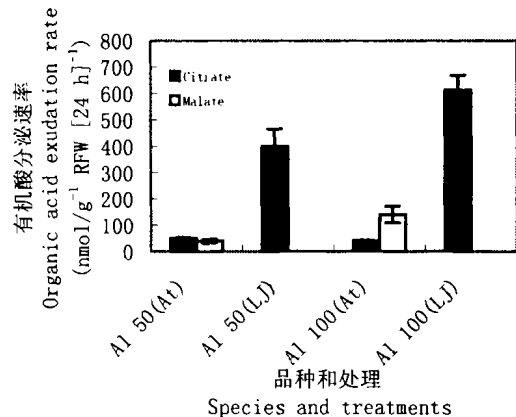


图4 大豆敏感品种 LJ 和小麦耐性品种 Atlas (At) 在 50 μ M AlCl_3 (24 h) 胁迫下分泌有机酸的比较

Fig. 4 Comparison of organic acid exudation induced by 50 μ M AlCl_3 (24 h) in Al^{3+} -sensitive soybean LJ and Al^{3+} -tolerant wheat Atlas (At)

2.5 铝在根尖的积累

大豆铝处理(50 μ M AlCl_3)24 小时后, 我们切取

了 1 cm 根尖, 根尖在盐酸中消化 7 天, 然后测定根尖的铝含量。结果表明, 不同品种根尖的铝含量存在明显的不同, Bx1 和 Veg13 明显低于其他品种。铝含量与柠檬酸分泌及耐性都没有相关性, 这说明铝在大豆根尖的积累也不能作为耐酸铝筛选的指标。

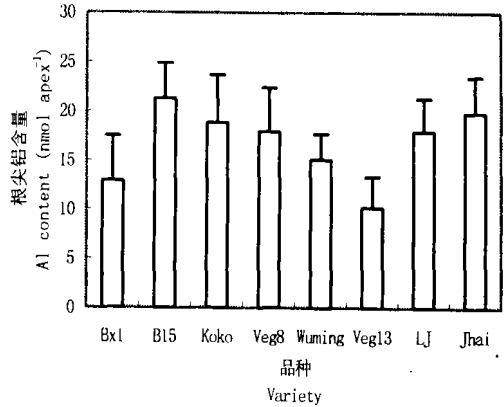


图5 大豆在 50 μ M AlCl_3 (24 h) 处理下根尖的铝含量

Fig. 5 Al^{3+} contents in soybean root tips exposed to 50 μ M AlCl_3 (24 h)

3 讨论

对于作物的耐酸铝性有几种不同的筛选方法, 包括大田筛选、土壤盆栽筛选、营养液筛选、及水培筛选^[16]。对这几种筛选方法的研究表明, 一般水培筛选的结果与土壤盆栽及营养液筛选结果比较一致, 因此水培筛选得到广泛应用。由于铝毒主要危害植物根部, 一般都以根部的相对生长量为指标。但由于大豆可能存在不同耐性机理, 因此, 一些品种在不同筛选条件下也可能结果不同。特别是在土壤中筛选时, 由于可能存在其他胁迫, 如低磷。因此, 植物可能由于耐低磷而间接提高了耐酸铝性。一般认为铝积累与耐性存在相关, 耐性品种往往积累较少的铝。但也有结果表明, 耐性的品种积累更多的铝, 这可能与取样长度、取样方法以及样品处理方法有关系^[11, 12], 因此, 根部铝含量测定还不能作为耐酸铝的筛选指标, 而根部生长量是目前最可靠的耐酸铝筛选指标。但在选育作物品种过程中, 以地上部生物量及产量作为筛选指标的田间筛选应该是最有实际意义的筛选方法。

由于植物耐酸铝土壤筛选的复杂性, 人们期望找到可靠的生理生化指标进行筛选。在小麦上, 铝胁迫可以分泌苹果酸, 几乎所有耐性品种都分泌大量苹果酸, 而敏感品种分泌极少^[3,9]。这表明, 在小

麦上有机酸分泌量可以作为筛选指标。本试验的一个目的就是探讨有机酸分泌是否可以在大豆上用做耐酸铝筛选的指标, 因为有报道表明, 大豆耐酸铝品种比敏感品种分泌更多的柠檬酸。然而, 本试验结果表明, 大豆敏感品种也可以分泌大量柠檬酸, 而且耐性与柠檬酸分泌存在不显著的负相关(图 1、2), 这与小麦完全不同。在其它植物上也有有机酸分泌与耐性无关的报道。例如, 耐酸铝的 Taro (野芋) 比敏感品种分泌的柠檬酸要少^[7]; 一些作物耐性和敏感的各两个对照基因型也没有出现耐性与有机酸分泌的相关性, 种之间也同样没有相关性^[8]。因此, 虽然有机酸会在根部络合铝, 或通过分泌到根外解铝毒, 从而可能提高植物对铝胁迫的耐性, 但有机酸分泌的解毒机理还有待于进一步的研究。由于植物要长期生长在酸性铝毒土壤, 因此长时间持续地分泌有机酸, 可能比短时间大量分泌更有意义。虽然在恢复试验中, Bx1 和 Vege8 分泌的柠檬酸相对没有大量降低, 但由于总量较少也不能说明持续分泌有机酸在耐酸铝中的作用(图 4)。由于大豆耐酸铝是几个基因控制的性状^[13], 同时又可能存在不同胁迫因素的互作, 因此, 大豆的耐酸铝性可能存在不同的机制。另外, 大豆在铝胁迫下的有机酸分泌受其它营养元素(如 P、Mg) 的影响^[14、15], 这也使有机酸分泌与耐酸铝性的关系变得更加复杂。

参 考 文 献

1 Matsumoto, H. Cell biology of aluminium toxicity and tolerance in higher plants. *Int Rev Cytol.* 2000, 200: 1—46.
2 Ma J. F., Zheng S. J., Matsumoto H. Detoxifying aluminium with buckwheat [J]. *Nature*, 1997, 390: 569—570.
3 Delhaize, E., Ryan, P. R., Randall, P. J. Aluminium tolerance in wheat [*Triticum aestivum* L.] II. Aluminium—stimulated excretion of malic acid from root apices [J]. *Plant Physiol.* 1993, 103: 695—702.

4 Pellet, D. M., Grunes D. L., Kochian, L. V. Organic acid exudation as an aluminium—tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.) [J]. *Planta*, 1995, 196: 788—795.
5 Ma J. F., Taketa, S. Yang, Z., M. Aluminium tolerance genes on the short arm of chromosome 3R are linked to organic acid release in triticale [J]. *Plant physiol.* 2000, 122: 687—694.
6 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* L. Merr.) [J]. *Physiol Plant*, 2000, 110: 72—77.
7 Ma Z., Miyasaka S. C. Oxalate exudation by taro in response to Al [J]. *Plant Physiol.* 1998, 118: 861—865.
8 Ishikawa Wagatsuma S., T., Sasaki R., et al. Comparison of the amount of citric and Malic acids in Al media of seven plant species and two cultivars each in five plant species [J]. *Soil Sci. Plant Nutr.* 2000, 46(3): 751—758.
9 Yang, Z. M., Nian, H., Sivaguru, M., et al. Characterization of aluminium—induced citrate secretion in aluminium—tolerant soybean (*Glycine max* L.) plants [J]. *Physiol Plant*, 2001, 113 (1).
10 Nian, H., Yang, Z. M., Ahn, S. J., et al. A comparative study on aluminum— and copper—induced organic acids from wheat roots [J]. *Physiol. Plant*, 2002 116 (3): 328—335.
11 Delhaize E, Ryan, P. R., Randall, P. J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) I. Uptake and distribution of Aluminum in root apices [J]. *Plant Physiol.* 1993, 103: 685—693.
12 Zhang, G., Taylor G. T. Effect of aluminum on growth and distribution of aluminum in tolerant and sensitive cultivars of triticum aestivum L [J]. *Commun Soil Sci. Plant Anal* 1988, 19: 1195—1205.
13 Bianchi—Hall C. M., Carter, T. E., Ruffy, T. W., et al. Heritability and resource allocation of aluminum tolerance derived from soybean PI 416937 [J]. *Crop Sci* 1998, 38: 513—522.
14 Nian, H., Ahn, S. J., Yang, Z. M., et al. Effect of phosphorus deficiency on aluminum—induced citrate exudation in soybean (*Glycine*, Max. L. Merr.) [J]. *Physiol. Plant*, 2003, 117 (1).
15 Silva, I. R., Smyth, T. J., Israel, D. W., et al. Magnesium ameliorates aluminum rhizotoxicity in soybean by increasing citric acid production and exudation by roots [J]. *Plant and Cell Physiol.* 2001, 42: 546—554.
16 年海, 卢永根. 大豆耐酸铝种质筛选概况 [J]. 华南理工大学学报 1996, 24: (自然科学版, 增刊) 138—143.

ALUMINUM—INDUCED CITRATE EXUDATION SHOWS NO POSITIVE RELATION WITH AL TOLERANCE IN SOYBEAN

Huang He Zhao Yuechun Guo Xiulan

(*College of Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou, 510642*)

Abstract The varietal differences in Al—induced citrate exudation and its relation to Al tolerance were investigated, and a comparative study of differences in organic acid secretion between Al—sensitive soybean LJ and Al
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

—tolerant wheat Atlas was conducted. Soybeans were exposed to the 0.5 mM Ca solution containing 0 and 10 μ M AlCl_3 to identify differences in Al tolerance. Based on relative root elongation (% of control), soybeans exhibited a range of difference in Al tolerance. Citrate secretion under 50 mM AlCl_3 (24 h) stress differed among the 8 varieties used, but no relation between the Al tolerance and Al—induced citrate secretion was observed. Al—induced citrate secretions from most of the varieties was greatly reduced by pre—treatment with 50 AlCl_3 mM for 24 h. Sensitive soybean LJ exuded more organic acid (citrate only) than did Al—tolerant wheat Atlas, which secreted both citrate and malate. Al accumulation in root tips was not related to Al tolerance and Al—induced citrate secretion. Thus, this experiment suggests that Al—induced citrate exudation and Al accumulation in root tips can not be used as standards for screening Al—tolerant soybeans.

Key words Soybean; Al tolerance; Citrate exudation

欢迎订阅 2004 年《大豆科学》

《大豆科学》是由黑龙江省农科院主办的学术性期刊。国内外公开发行,季刊,16开本,每期12万字左右。国内每期订价:7.00元,全年28.00元,邮发代号:14—95。国外每期订价:10.00美元(包括邮资),全年40美元。国外总发行由中国国际图书贸易总公司,北京399信箱。国外代号:Q5587。

《大豆科学》是中国自然科学核心期刊,中国科学引文数据库来源期刊。主要刊登有关大豆遗传育种,品种资源,生理生态,耕作栽培、病、虫、杂草防治,营养施肥,生物技术及食品加工等方面的科研报告,学术论文,国内外研究进展评述,研究简报,学术活动简讯、新品种介绍等。

《大豆科学》主要面向从事大豆科学研究的科技工作者,农业院校师生、国营农场、各级农业技术推广部门的技术人员和民营企业科技人员。

本刊热忱欢迎广大科研单位及有关企业在我刊刊登广告,广告经营许可证号:2301004010071。

订阅办法:全国各地邮局,如在邮局漏订,可到编辑部补订。通过邮局汇款至哈尔滨市学府路368号《大豆科学》编辑部。邮政编码:150086,联系电话:(0451)86668735。

网址: <http://ddkx.chinajournal.net.cn> E. mail: dadoukx@sina.com