

不同铁效率大豆品种叶片和根系超微结构的比较研究

邱强¹, 饶德民², 赵婧¹, 张伟¹, 孟凡钢¹, 于维³, 闫晓艳¹, 张鸣浩¹

(1. 吉林省农业科学院大豆研究所/大豆国家工程研究中心, 吉林 长春 130033; 2. 沈阳农业大学农学院, 辽宁 沈阳 110866; 3. 吉林省种子管理总站, 吉林 长春 130062)

摘要:采用盆栽试验方法研究了施用螯合铁肥(Fe-EDDHA)对不同铁效率大豆V4期叶片及根系超微结构的影响。结果表明:铁敏感品种缺铁处理下植株矮小且叶片发黄,而铁高效品种缺铁条件下植株稍小但叶色差异不大。两种处理下铁高效品种的叶绿素SPDA值无显著差异,铁敏感品种在缺铁条件下叶绿素SPDA值显著小于补铁条件下,也显著小于铁高效品种。铁敏感品种叶肉细胞中叶绿体和线粒体数量在两种处理下差异不大,但铁敏感品种缺铁处理下叶绿体不饱满呈长梭形且其中淀粉颗粒形状扁平,含量较少;铁高效品种在两种处理下线粒体和叶绿体数目差异不大,但总体上在补铁处理下叶肉细胞中淀粉颗粒的含量较高,颗粒较大。铁敏感品种根系细胞缺铁处理下形状不规则,细胞壁严重变形,原生质破裂外流且分布不均,细胞核及大部分细胞器有解体现象,而补铁处理下细胞结构则保持规则完整;铁高效品种在两种处理下根系细胞均规则完整,但补铁处理下原生质体浓厚且内含物较丰富。由此说明:缺铁胁迫对不同铁效率大豆品种植株大小、叶色、细胞超微结构都有影响,只是铁敏感品种受缺铁胁迫影响更大,而铁高效品种可能有较完善的耐低铁机制所以受缺铁胁迫影响较小。

关键词:大豆;超微结构;叶绿体;筛管伴胞复合体

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2017.06.0927

Comparative Study of Leaf and Root Ultrastructure of Different Iron Efficiency Soybean Varieties

QIU Qiang¹, RAO De-min², ZHAO Jing¹, ZHANG Wei¹, MENG Fan-gang¹, YU Wei³, YAN Xiao-yan¹, ZHANG Ming-hao¹

(1. Soybean Research Institute, Jinlin Academy of Agricultural Sciences/ National Engineering Research Center of Soybean, Changchun 136100, China; 2. Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 3. Seed Management Station of Jilin Province, Changchun 130062, China)

Abstract: Pot experiment method was used to study the application of chelate iron fertilizer (Fe - EDDHA) on different iron efficiency soybean varieties. Then the ultrastructure of the leaves and roots of the two varieties were compared. The results showed that the iron-sensitive varieties was small, yellow leaf with no chelate iron fertilizer, however the iron-efficient varieties plant was slightly smaller but their leaf color showed little difference. The chlorophyll SPDA value of iron-efficient varieties had no significant difference under two treatments, the chlorophyll SPDA value of iron-sensitive varieties was significant lower than no chelate iron fertilizer and iron-efficient varieties. The number of mitochondria and chloroplast of iron-sensitive soybean had no difference, but the shape of chloroplast was not full and showed a long spindle, the number of starch granules in the chloroplast was small. The shape of starch granules in the chloroplast showed flat shape. The number of mitochondria and chloroplast of iron-efficient soybean showed little difference, however the number of starch granules in the mesophyll cells was not significantly different and that of the shape of starch granules were bigger under the application of chelating iron fertilizer. The root cells of iron-sensitive soybean under no application of chelate iron fertilizer were with irregular shape, badly distorted cell wall, cellular protoplasm were ruptured and unevenly distributed. The nucleus and most organelles were disintegrating, however the structure of the cells under the treatment of iron was intact. The structure of the cells of iron-efficient soybean was not significantly different under two treatment but the cell inclusions were more abundant under the application of chelate iron fertilizer. The results indicated that: Iron had an effect on the plant size, leaf color, and cell ultrastructure of different iron efficiency soybean varieties, the iron-sensitive soybean had been affected more by iron element, however iron-efficient varieties may have better resistance to low iron mechanism so they were less affected by the iron element.

Keywords: Soybean; Ultrastructure; Chloroplast; Sieve tube companion cell complex

铁是植物必需的微量元素,植物缺铁失绿已成为全世界普遍关注的问题。铁与叶绿素合成和叶绿体结构的完整有关,当植物缺铁时,叶绿素合成受阻;叶绿体膜、叶绿素-蛋白质复合体、类胡萝卜素、反应中心及与其相联系的电子载体等一系列捕光器的合成也受到影响;叶绿体片层减少,片层垛叠结构消失,基粒少而小,甚至消失^[1]。当前全世界约有40%的土壤缺铁,特别是石灰性土壤,许多

收稿日期:2017-05-18
基金项目:吉林省科技厅自然科学基金(20150101100JC);吉林省重大科技攻关项目(20170201001NY)。
第一作者简介:邱强(1979-),男,硕士,副研究员,主要从事大豆区试与栽培研究。E-mail: qiuqiang051179@yeah.net。
通讯作者:闫晓艳(1960-),女,研究员,主要从事大豆区试与栽培研究。E-mail: yanxy8548@126.com。

农作物常因发生缺铁失绿导致生长不良,产量下降^[2]。全面深入的解析缺铁失绿的机制显得尤为重要,随着新型电镜设备的发明和电镜技术的发展,大豆超微结构观察成为大豆生长发育机理、抗病机制、遗传进化等方面研究的重要内容^[3]。张桂茹等^[4]以不同光合特性类型大豆为材料,利用光学显微镜、扫描电镜和透射电镜等观察到不同光合特性品种在叶片厚度、叶绿体数目、气孔数目和大小以及维管束中木质部的导管数目均存在差异。童朝阳等^[5]通过透射电镜观察发现,大豆连作导致叶绿体基粒片层结构破坏,淀粉粒积累,基粒片层结构出现“空隙区”。杨茂成等^[6]对秋水仙素诱导的野生大豆根尖观察发现细胞中的质体、液泡、内质网在状态、布局 and 数量上发生很大变化,细胞不再具有分生特征而进入分化状态。

本研究以铁高效品种吉育 99 和铁敏感品种吉育 93 为试材,基于透射电镜技术分析不同铁处理下 V4 期叶片和根系的超微结构变化,以期为大豆铁高效品种的耐低铁机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试土壤为典型石灰性土壤,于 2014 年采自吉林省洮南市大豆缺铁黄化严重的地块。土壤基本性状为:土壤有机质 0.98%,pH8.20,速效氮 52.4 mg·kg⁻¹,速效磷 12.4 mg·kg⁻¹,速效钾 55.6 mg·kg⁻¹,速效锌 4.12 mg·kg⁻¹,速效铁 3.55 mg·kg⁻¹。供试大豆品种分别为铁高效品种吉育 99 和铁敏感品种吉育 93。

1.2 试验设计

在本试验前期,进行了螯合铁肥(Fe-EDDHA)用量分别为每盆 0,0.5,1,2,3,4,5 g 的梯度试验,发现在铁肥用量为 2 g 时正好满足铁高效和铁敏感大豆品种的正常生长发育。2015 年在吉林省农业科学院公主岭基地进行盆栽试验,试验用塑料桶,装土时混入毒死蜱,防止线虫干扰。大豆于 5 月 20 日播种,每个品种种 6 盆,每盆播种 3 穴,每穴 4 粒,最后每穴留苗 1 株。大豆子叶期,其中每个品种选 3 盆,施入螯合铁肥(Fe-EDDHA),每盆称 2 g,用等量水溶解后浇入盆中,其余 3 盆即为缺铁处理。V4 期(四节期)分别取全展新叶及根系,浸泡于 2.5% 戊二醛固定液中待测。

1.3 解剖结构测定

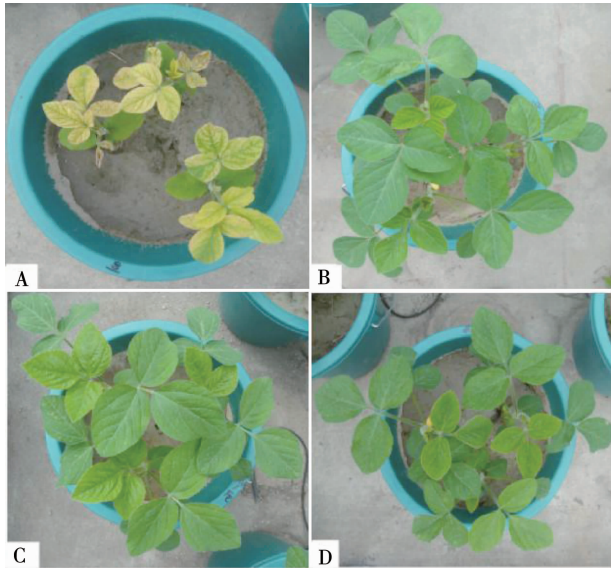
TEM 样品前处理:样品 2.5% 戊二醛 4℃ 固定,PBS 缓冲液冲洗 3 次,每次 10 min。1% 锇酸 4℃ 后固定 2 h。PBS 缓冲液冲洗 3 次,每次 10 min。乙醇

系列梯度脱水,30%、50%、70%、90%、100% 的乙醇每次 10 min,其中 100% 2 次。Epon812 环氧树脂包埋,37℃、45℃、65℃ 温箱依次固化,每级温度 24 h。半薄切片定位。UltracutE 超薄切片机超薄切片。醋酸双氧铀硝酸铅染色。于 TEM 透射电子显微镜下观察。

2 结果与分析

2.1 缺铁和补铁处理下不同铁效率大豆品种苗期的症状表现

由图 1A 和 1B 可看出,铁敏感品种缺铁条件下植株明显矮化且叶片明显发黄,甚至部分叶边缘干枯,只有叶脉和老叶仍保持绿色,而补铁条件下植株长势正常。由图 1C 和 D 可看出,铁高效品种在缺铁条件下叶色稍淡,但植株大小和叶面积相对较大,反而在补铁条件下植株相对较小且小叶较多,只是叶色较浓绿。



A: 吉育 93 缺铁;B: 吉育 93 补铁;C: 吉育 99 缺铁;D: 吉育 99 补铁。
A: Jiyu 93 under iron-deficiency; B: Jiyu 93 under iron supply;
C: Jiyu 99 under iron-deficiency; D: Jiyu 99 under iron supply.

图 1 两种大豆在两种处理下 V4 期的表现症状
Fig. 1 Symptom of the two types of soybean under two treatments at V4 period

2.2 缺铁和补铁处理下不同铁效率大豆幼苗的叶绿素 SPDA 值比较

缺铁条件下吉育 93 叶绿素 SPDA 值(8.0)显著小于补铁条件下,而吉育 99 叶绿素 SPDA 值在两种处理下则无显著变化,缺铁条件下吉育 93 叶绿素 SPDA 值显著小于吉育 99,在补铁条件下两种大豆品种叶绿素 SPDA 值无显著差异(表 1)。

表 1 缺铁和补铁处理下不同铁效率大豆品种苗期
叶绿素 SPDA 值的比较

| Table 1 The comparison of chlorophyll SPDA value of the two types of soybean under different treatments at seedling stage | | |
|---|------------------|------------------|
| 处理 Treatments | 吉育 93 Jiyu 93 | 吉育 99 Jiyu 99 |
| 缺铁 Iron-deficiency | 8.0 b | 34.9 a |
| 补铁 Iron supply | 37.7 a | 37.5 a |

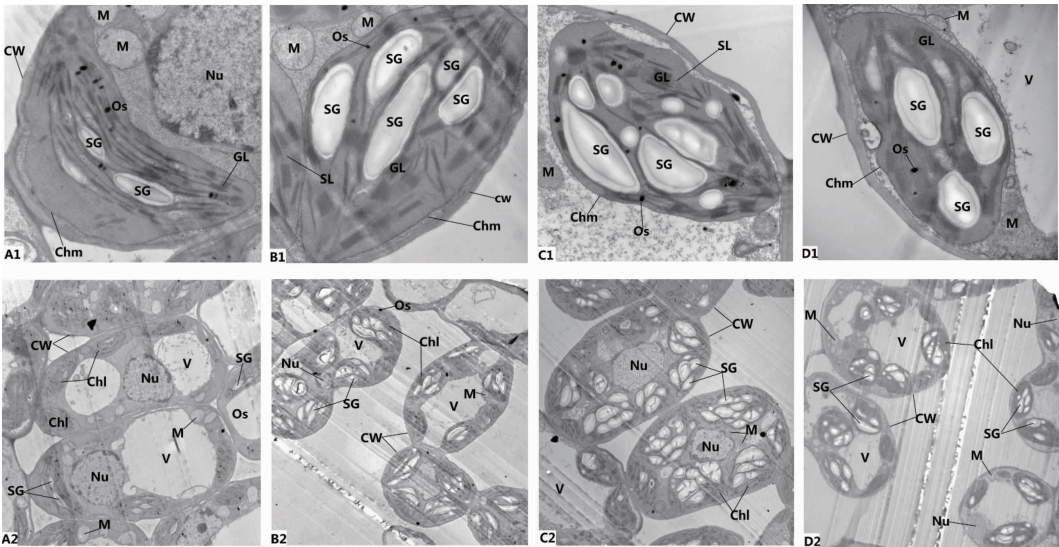
同列不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。
Different lowercase in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$).

2.3 铁高效和铁敏感品种在缺铁和补铁处理下 V4 期叶绿体及叶片超微结构比较

2.3.1 铁敏感品种叶绿体及叶肉细胞的超微结构
缺铁条件下铁敏感品种叶绿体呈长梭形紧贴细胞膜两端有轻微解体现象,基粒片层和基质片层数均较少且排布规则紧密,淀粉颗粒数目较少且不饱满,嗜饿颗粒除个别电子密度较强,大多较弱,但数量较多;而补铁条件下叶绿体为椭圆形或类圆形不完全贴壁且被摸清晰无解体现象,基粒片层和基质片层数均较多但排布散乱不规则,淀粉颗粒数目多

且饱满,嗜饿颗粒数目较少(图 2A1、B1)。缺铁条件下叶肉细胞中线粒体和叶绿体数量与补铁条件下差异不大,但细胞核扩张形状类圆形,液泡较大形状同样类圆形,出现轻微的质壁分离现象,且叶肉细胞中平均淀粉颗粒含量较少,而补铁条件下细胞核偏小,液泡较小且不规则,没有质壁分离现象,而且叶肉细胞中平均淀粉颗粒含量明显较多(图 2A2、B2)。

2.3.2 铁高效品种叶绿体及叶肉细胞的超微结构
两种处理条件铁高效品种下叶绿体均呈椭圆或长椭圆形且紧贴细胞边缘,被膜清晰都未出现解体现象,基粒片层和基质片层数无明显差异且排布散乱无规则,但嗜饿颗粒数目在缺铁条件下相对较高,淀粉颗粒数在缺铁条件下相对较多,饱满程度无明显差异(图 2C1、D1)。两种处理条件下铁高效品种叶肉细胞内细胞核均呈圆形但缺铁条件下细胞核较大,线粒体数量无较大差异均围绕叶绿体分布,细胞中叶绿体数量相差不大,但缺铁条件下叶绿体相对较大,细胞均没有质壁分离现象,液泡在缺铁条件下形状不规则且较小,而在补铁处理下形状同样不规则但相对较大,叶肉细胞中淀粉颗粒数目在缺铁条件下明显多于补铁条件下(图 2C2、D2)。



A₁、B₁、C₁、D₁: 叶绿体超微结构 (×20 000); A₂、B₂、C₂、D₂: 细胞超微结构 (×5 000); A₁ 和 A₂: 吉育 93 缺铁; B₁ 和 B₂: 吉育 93 补铁; C₁ 和 C₂: 吉育 99 缺铁; D₁ 和 D₂: 吉育 99 补铁; Chl: 叶绿体; Chm: 叶绿体被膜; GL: 基粒片层; SL: 基质片层; SG: 淀粉粒; Nu: 细胞核; CW: 细胞壁; Os: 嗜饿体; M: 线粒体; V: 液泡。

A₁, B₁, C₁, D₁: Ultrastructure of chloroplast (×20 000); A₂, B₂, C₂, D₂: Cell ultrastructure (×5 000); A₁ and A₂: JiYu 93 Iron-deficiency; B₁ and B₂: JiYu 93 iron supply; C₁ and C₂: JiYu 99 Iron-deficiency; D₁ and D₂: JiYu 99 iron supply; Chl: Chloroplast; Chm: Chloroplast envelope membrane; GL: Grana lamella; SL: Stroma lamella; SG: Starch grain; Nu: Nucleus; CW: Cell wall; Os: Osmiophilic globules; M: Mitochondria; V: Vacuole.

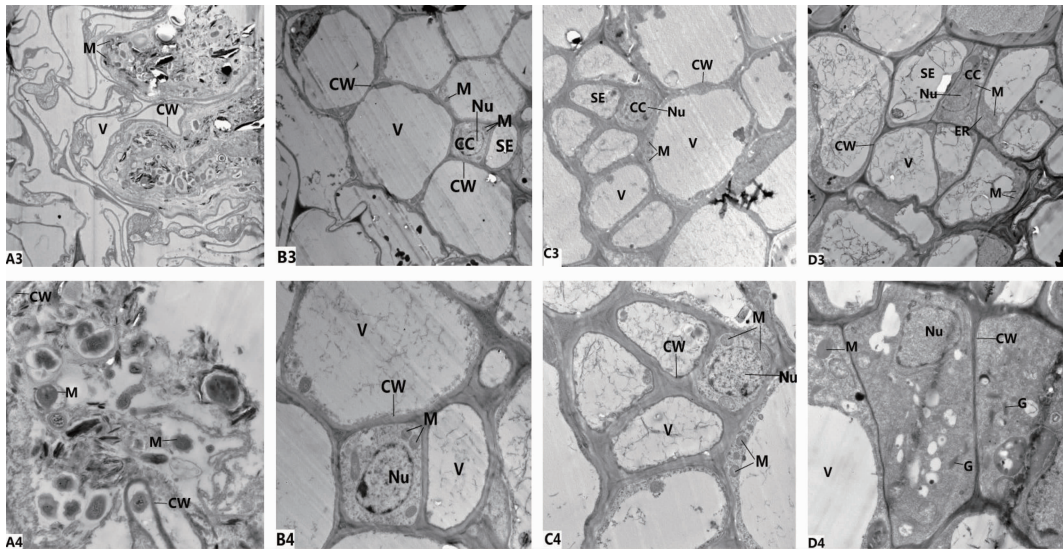
图 2 两种大豆在两种处理下 V4 期叶绿体和叶肉细胞的超微结构图
Fig. 2 The chloroplasts and mesophyll cell ultrastructure of two types of soybean under two treatments at V4 stage

2.4 铁高效和铁敏感品种在缺铁和补铁处理下 V4 期根系超微结构比较

2.4.1 铁敏感品种的根系超微结构 铁敏感品种缺铁条件下,细胞形状不规则,细胞壁严重变形,原生质破裂外流且分布不均,线粒体内嵴消失膜结构模糊不清趋向解体,液泡严重变形且膜消失,核完全失去完整性、核膜破裂、核质扩散,养分输导组织发育不完善(图3A3、A4)。铁敏感品种在补铁处理相对于缺铁处理差异明显,细胞排列紧密形状呈圆形,细胞壁无角状突起没有断裂,液泡较大液泡膜几乎紧贴细胞壁,细胞核结构完整,线粒体边缘轮廓及内脊清晰可见,另外可以看到正在发育的筛

管伴胞复合体(图3B3、B4)。

2.4.2 铁高效品种的根系超微结构 铁高效品种在缺铁和补铁处理下细胞结构完整性无明显差异,只是在补铁条件下细胞排列更紧密,细胞壁较厚,另外由于细胞相互挤压所以形状显得不规则,都可以观察到正在发育的筛管伴胞复合体但是补铁条件下相对较大,细胞核结构均完整且核膜清晰,线粒体边缘轮廓及内脊均清晰可见,但是补铁处理下细胞的原生质体较缺铁处理下丰富且细胞内的内质网及高尔基体数量也较缺铁处理下丰富,另外补铁处理下细胞中的内含物也较缺铁处理丰富(图3C3、C4、D3、D4)。



A3、B3、C3、D3(×4 000);A4、B4、C4、D4(×15 000);A3和A4:吉育93缺铁;B3和B4:吉育93补铁;C3和C4:吉育99缺铁;D3和D4:吉育99补铁;CC:伴胞;SE:筛管;G:高尔基体。
A3、B3、C3、D3(×4 000);A4、B4、C4、D4(×15 000);A3 and A4:Jiyu93 iron-deficiency;B3 and B4:Jiyu93 iron supply;C3 and C4:Jiyu99 iron-deficiency;D3 and D4:Jiyu99 iron supply;CC:Companion cell;SE:Sieve tube;G:Golgi apparatus.

图3 两种大豆在两种处理下 V4 期根系的超微结构图

Fig.3 The root cell ultrastructure of two types of soybean under two treatments at V4 stage

3 讨论

国内外已有各方面关于大豆叶片及根系超微结构的报道,但关于铁高效和铁敏感大豆品种在缺铁处理下叶片和根系超微结构变化的比较研究较少。铁是形成原叶绿素酸酯的必需元素,无铁时Mg-原卟啉IX及Mg-原卟啉IX甲酯积累,不能形成原叶绿素酸酯,即不能形成叶绿素^[8]。所以本研究以两个对铁敏感程度不同的品种为试材,既能比较相同品种两种处理下叶片及根系超微结构的变化,又能比较同一处理不同品种叶片及根系超微结构的差异。

铁敏感品种缺铁处理相对于补铁处理植株矮小叶片明显发黄,只有叶脉和老叶保持绿色。这主

要是由于铁在植物中的移动性较弱,植物新生长的部分不能依赖于从老组织中输出铁,而必须依赖于经由木质部转运或从外部施用得到铁^[9]。缺铁条件下吉育93叶绿素SPDA值显著小于补铁条件下,而吉育99叶绿素SPDA值在两种处理下则无显著变化,缺铁条件下吉育93叶绿素SPDA值显著小于吉育99,在补铁条件下两种大豆品种叶绿素SPDA值无显著差异,说明铁元素在叶绿素合成过程中起到重要作用,这与前人研究一致。

铁敏感品种缺铁条件下叶肉细胞中线粒体和叶绿体数量与补铁条件下差异不大,但细胞核扩张形状类圆形,液泡较大形状同样类圆形,出现轻微的质壁分离现象,且叶肉细胞中平均淀粉颗粒含量较少,叶绿体呈长梭形紧贴细胞膜两端有轻微解体

现象,基粒片层和基质片层数均较少且排布规则紧密,淀粉颗粒数目较少且不饱满。铁高效品种在两种处理条件下细胞核差异较大但完整性均较好,线粒体数量无较大差异均围绕叶绿体分布,液泡形状大小有较大差异,缺铁条件下叶肉细胞中淀粉颗粒数目较多,叶绿体形状结构无明显差异,被膜完整,基粒片层和基质片层数无明显差异且排布均散乱无规则,但嗜饿颗粒数目在缺铁条件下相对较高,淀粉颗粒数在缺铁条件下相对较多,饱满程度无明显差异。总的来说铁敏感品种在缺铁和补铁条件下主要差异是:淀粉颗粒数目及其饱满程度不同,这主要是由于缺铁导致参与催化叶绿素合成过程中的铁氧还原蛋白合成受阻,从而影响叶绿体中淀粉积累;叶绿体中基粒片层及基质片层排列规则与否,这主要是由于叶绿体中淀粉淀粉积累较少且不饱满呈棱形因而对其中基粒片层排布影响较小,反之则由于淀粉颗粒大且数量多挤压基粒片层从而使排布散乱且不规则;液泡形状和大小差异,对于缺铁处理由于细胞中大部分叶绿体中淀粉颗粒小含量少,且叶绿体呈棱形紧贴细胞边缘,因此对液泡的挤压作用不如淀粉颗粒含量多的叶绿体明显,所以液泡较大且形状似圆。

缺铁时植物能够被诱导产生一系列响应机制来适应低铁环境,包括改变根部构型、增大吸收面积、诱导大量铁相关基因的表达等^[10],现已发现多个定位于液泡膜的铁转运蛋白^[11]。当植物遭遇到缺铁胁迫时,除了激活铁吸收系统以提高根系吸收外源铁的能力,同时会激活内源铁再利用系统,将体内储存的铁活化并优先运输到生长旺盛组织,从而有效降低缺铁胁迫对植物生长的损害。铁敏感品种缺铁处理相对于补铁处理细胞形状不规则,细胞壁严重变形,原生质破裂外流且分布不均,无筛管伴胞复合体形成。铁高效品种在缺铁和补铁处理下细胞结构完整性无明显差异,但是细胞排列紧密程度、筛管伴胞复合体发育程度及细胞中内含物丰富度有较大差异。

4 结 论

缺铁胁迫对不同铁效率大豆品种植株大小、叶色、细胞超微结构都有影响,只是铁敏感品种受铁元素影响更大,抵御缺铁胁迫的能力较弱,尤其是叶片中叶绿体及淀粉含量对缺铁胁迫表现的最明显,根系则表现在对细胞形态结构及内含物的丰富度及细胞器的完整性的影响;而铁高效品种可能有

较完善的耐低铁机制所以受铁元素影响较小,有研究发现可能由于铁高效品种液泡对铁的贮存和释放能力较强,因而在抵抗过量铁毒害和缺铁胁迫中起到的作用较大。因此保证大豆生长发育所必须的铁营养也是大豆高产的前提条件。

参考文献

[1] 杨茂成,丛斌,赵建华,等.秋水仙素诱导的野生大豆根尖细胞超微结构变化[J].武汉植物学研究,1997,15(1):15-18. (Yang M C, Cong B, Zhao J H, et al. The ultrastructural changes of wild soybean root tip cells induced by colchicine[J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 1997, 15(1): 15-18.)

[2] 童朝阳,韩丽梅,鞠会艳,等.大豆专用肥对轮作、连作大豆叶片超微结构的影响[J].大豆科学,1998,17(4):358-362. (Dong Z Y, Han L M, Ju H Y, et al. The influence of soybean specific fertilizer on soybean leaf ultrastructure under the mode of rotation and continuous cropping[J]. Soybean Science, 1998, 17(4): 358-362.)

[3] Kabir A H, Paltridge N G, Able A J, et al. Natural variation for Fe-efficiency is associated with up regulation of Strategy I mechanisms and enhanced citrate and ethylene synthesis in *Pisum sativum* L. [J]. Planta, 2012, 235: 1409-1419.

[4] James D W. General summary of the second international symposium on iron nutrition and interactions in plants[J]. Journal of Plant Nutrition, 1984, 7(1-5): 859-864.

[5] 刘杰,刘丽君,吴俊江,等.大豆超微结构的研究进展及展望[J].大豆科学,2004,23(3):228-231. (Liu J, Liu L J, Wu J J, et al. Progress and prospect of research on soybean ultrastructures[J]. Soybean Science, 2004, 23(3): 228-231.)

[6] 张桂茹,杜维广,满为群,等.不同光合特性大豆叶的比较解剖研究[J].植物学通报,2002,19(2):208-214. (Zhang G R, Du W G, Man W Q, et al. Study on leaf comparative anatomy of different genotypes of soybean[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2002, 19(2): 208-214.)

[7] 邹邦基,何雪晖.植物的营养[M].北京:农业出版社,1985:216-217. (Zou B J, He X H. The nutrition of plants[M]. Beijing: Agricultural Publishing Press, 1985: 216-217.)

[8] Nagata N, Taraka R, Satoh S, et al. Identification of a vinyl reductase gene for chlorophyll synthesis in *Arabidopsis thaliana* and implications for the evolution of *Prochlorococcus* species[J]. The Plant Cell, 2005, 17(1): 233-240.

[9] Römheld V, Marschner H. Iron deficiency stress induced morphological and physiological changes in root tips of sunflower[J]. Physiologia Plantarum, 1981, 53(3): 354-360.

[10] Ivanov R, Brumbarova T, Bauer P. Fitting into the harsh reality: Regulation of iron-deficiency responses in dicotyledonous plants[J]. Molecular Plant, 2012, 5: 27-42.

[11] Lanquar V, Lelièvre F, Bolte S, et al. Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron[J]. The EMBO Journal, 2005, 24(23): 4041-4051.