

## 黑豆根尖边缘细胞对盐胁迫的防护效应

邢承华<sup>1</sup>, 郑寨生<sup>2</sup>, 张尚法<sup>2</sup>, 孔向军<sup>2</sup>

(1. 金华职业技术学院 农业与生物工程学院, 浙江 金华 321007; 2. 金华市农业科学研究院, 浙江 金华 321000)

**摘要:**采用振荡培养(移除根尖边缘细胞)和静置培养(保持边缘细胞附着在根尖)方法,对比研究盐胁迫对黑豆根系生长和根尖边缘细胞发育、根系  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  含量的影响以及根系生理特性的变化。结果显示:100 和 200  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl 处理抑制边缘细胞发育,引起根系相对电导率和 MDA 含量增加。振荡培养去除根尖边缘细胞处理 36 h,黑豆根相对伸长率、根尖  $\text{K}^+$  含量明显低于对应 NaCl 浓度的静置培养处理,同时根尖  $\text{Na}^+$  含量、相对电导率和 MDA 含量在去除边缘细胞后显著增加。说明包裹于根尖的边缘细胞通过调节  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  的吸收和维持较高的细胞膜完整性,以适应盐害环境。

**关键词:**黑豆;边缘细胞;盐胁迫;细胞膜透性

**中图分类号:** Q945.78

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-9841(2012)03-0416-04

## Protective Effect of Root Border Cells on Salt Stress in Black Soybean

XING Cheng-hua<sup>1</sup>, ZHENG Zai-sheng<sup>2</sup>, ZHANG Shang-fa<sup>2</sup>, KONG Xiang-jun<sup>2</sup>

(1. Agricultural and Bioengineering Institute, Jinhua College of Vocation and Technology, Jinhua 321007, Zhejiang; 2. Jinhua Academy of Agricultural Sciences, Jinhua 321007, Zhejiang, China)

**Abstract:** The effects of salt stress on root growth, root border cells(RBCs) development,  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  content and physiological characteristic in black soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] were investigated, with RBCs adhered to root tips using a static cultivation method, or with RBCs removed from root tips using a shaking cultivation method. Salt stress treated with 100 and 200  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl inhibited RBCs development and increased relative electric conductivity and MDA content in roots. Physical removal of RBCs from root tips for 36 h resulted in a more severe inhibition of root elongation and a higher  $\text{Na}^+$  accumulation in the root tips, the relative electric conductivity and MDA content in roots were also significantly increased when RBCs were removed. The results revealed that RBCs adhered to the root tips tended to regulate the uptake of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$ , and maintain cell membrane integrity, thereby increased salt tolerance in black soybean seedlings.

**Key words:** Black soybean; Root border cells; Salt stress; Cell membrane permeability

土壤盐碱化是世界上最严重的环境问题之一。盐胁迫引起植物离子毒害、渗透胁迫和营养失衡<sup>[1]</sup>。植物对盐胁迫的响应主要通过根系进行,根系与土壤相互作用,土壤中盐分过多会降低环境水势,引起植物根系生长速率迅速降低,产生一系列与水分胁迫类似的结果<sup>[2]</sup>。而当盐分在植物体内过量积累,即超出细胞将盐分区域化的能力时,就会造成离子毒害,例如盐分会抑制酶的活力,或影响  $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  等离子的吸收,或累积在细胞壁,使细胞脱水<sup>[3]</sup>。由此可见,根际微环境中离子的分布、迁移以及根系对离子的选择性吸收对于植物适应盐害环境有着重要意义。

边缘细胞(Root border cells, RBCs)是从根冠表皮分离并聚集在根尖周围的特殊细胞群。边缘细胞对病原真菌<sup>[4]</sup>、病原细菌<sup>[5]</sup>、线虫<sup>[6]</sup>和铝毒害<sup>[7-8]</sup>均具有防御作用,当植物在蛋白质合成和 mRNA 表达上发生显著变化时,它会特异性地合成并快速向

外分泌一系列具有生物学活性的化学物质,诱导或控制根际微生物的生长,减轻有毒物质如铝的毒害效应。本研究通过分析黑豆 [*Glycine max* (L.) Merrill] 根尖边缘细胞发育对盐胁迫的响应,盐胁迫对根系生长、 $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  含量及生理特性的影响,探讨盐害胁迫下边缘细胞对根际微生态的调控作用,为农业生产及改良农作物耐盐性提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料及其培养

黑豆种子用蒸馏浸泡 4 h,接着转移到铺有湿润滤纸的搪瓷盘上,于湿度 90%、25℃ 的人工智能气候培养箱中,黑暗萌发 12 h。此后挑选露白的黑豆种子分 2 种方式培养<sup>[9]</sup>:第 1 组为静置培养,即保留根尖边缘细胞;第 2 组为振荡培养,即移除根尖边缘细胞。盐胁迫设 3 个水平:0、100 和 200  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl。每隔 2 h 喷 NaCl 处理液,不同处

收稿日期:2012-03-20

基金项目:国家自然科学基金项目(31101599, 30800705);浙江省自然科学基金项目(Y3110561)。

第一作者简介:邢承华(1976-),男,博士,副教授,主要从事植物营养和植物环境生态方面的研究。E-mail: xingchenghua@hotmail.com。

理每次所喷的 NaCl 处理液量均相同。NaCl 处理 24 和 36 h 后收集并统计边缘细胞数目。测定静置培养条件下的根尖边缘细胞数目,2 种培养方式下的根相对伸长率、根尖  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  含量、相对电导率和丙二醛(MDA)含量。每个处理重复 3 次。

## 1.2 测定项目与方法

**1.2.1 根尖边缘细胞的数目** 每处理均取根 10 个,剪取根尖 3 mm,放入装有 1.0 mL 蒸馏水的离心管中。用移液枪吸取 20  $\mu\text{L}$  含边缘细胞的悬浮液滴于干净的载玻片上,于显微镜下对边缘细胞计数。计算出 1 000  $\mu\text{L}$  蒸馏水中一个根尖的边缘细胞数目。

**1.2.2 根相对伸长率** NaCl 处理前记录初始根长,NaCl 处理 24 和 36 h 后,每处理组各取 20 个根测定根长。根相对伸长率 = NaCl 胁迫处理组根伸长量/对照组根伸长量  $\times 100\%$ 。

**1.2.3  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  含量** 剪取 NaCl 胁迫处理 24 和 36 h 的黑豆根尖 1 cm 烘干,研磨粉碎后,取 50 mg 粉末放入 15 mL 具塞刻度试管中,加 10 mL 去离子水,于沸水浴中浸提 2 h,定容至 50 mL 容量瓶。过滤后用火焰光度计测定滤液中的  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  含量,用  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  FW 表示。

**1.2.4 根相对电导率** 剪取 10 mm 长的根尖 10 根,用洁净滤纸吸去表面水分,置三角瓶中,抽真空后静置 6 h,利用 DDS2IIA 型电导仪测定电导值( $S_1$ );封口后于 100 $^{\circ}\text{C}$  水浴 3 min,测定电导值( $S_2$ )。相对电导率:  $L = S_1/S_2 \times 100\%$ 。

**1.2.5 MDA 含量** 采用林值芳等<sup>[10]</sup>的方法,用  $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$  FW 表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 盐胁迫下黑豆根尖边缘细胞数目变化

盐胁迫抑制黑豆根尖边缘细胞产生,且胁迫程度越高边缘细胞数目越少(图 1)。处理 24 h 后,100 和 200  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 处理使边缘细胞数目降低了 33.1% 和 37.5%。处理 36 h 后,100 和 200  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 处理使边缘细胞数目降低了 31.1% 和 40.5%。随着培养时间延长,各处理组的边缘细胞数目增加 47.1% ~ 59.1%,36 h 时蒸馏水处理的边缘细胞数目达到最大。

### 2.2 盐胁迫下边缘细胞对黑豆根相对伸长率的影响

盐胁迫显著抑制根伸长,胁迫程度越高和培养时间越长,对根伸长的抑制越明显,差异达显著水平(图 2)。静置和振荡培养 24 h,对应处理的根相对伸长率非常接近,方差分析也显示根尖有边缘细

胞附着与去除边缘细胞对根相对伸长率无显著影响。培养 36 h,振荡培养的根相对伸长率明显低于对应 NaCl 浓度的静置培养处理。

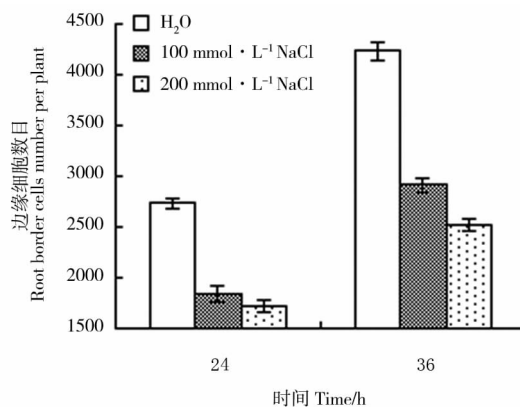


图 1 盐胁迫对黑豆根尖边缘细胞数目的影响

Fig. 1 Effect of salt stress on root border cells number in black soybean

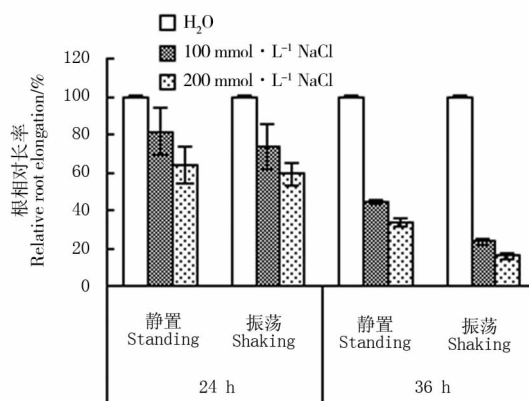


图 2 盐胁迫下边缘细胞对黑豆根相对长率的影响

Fig. 2 Effects of salt stress on relative root elongation in black soybean

### 2.3 盐胁迫下边缘细胞对根尖 $\text{Na}^+$ 和 $\text{K}^+$ 含量的影响

盐胁迫下,黑豆根尖  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  含量差异明显(图 3)。100  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 处理导致黑豆根尖  $\text{Na}^+$  含量显著增加,与对照相比增加了 428.3% ~ 1 168.5%,200  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 处理比对照增加了 884.1% ~ 1 317.7%。振荡培养下  $\text{Na}^+$  的含量比静置培养高 18.8% ~ 127.2%。

盐胁迫抑制黑豆根系对  $\text{K}^+$  的吸收,NaCl 处理浓度越高、处理时间越长根尖  $\text{K}^+$  含量越低。振荡培养下, $\text{K}^+$  含量显著低于相同处理的静置培养。以上结果显示培养方式和盐胁迫处理显著影响黑豆根尖对  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  的吸收。

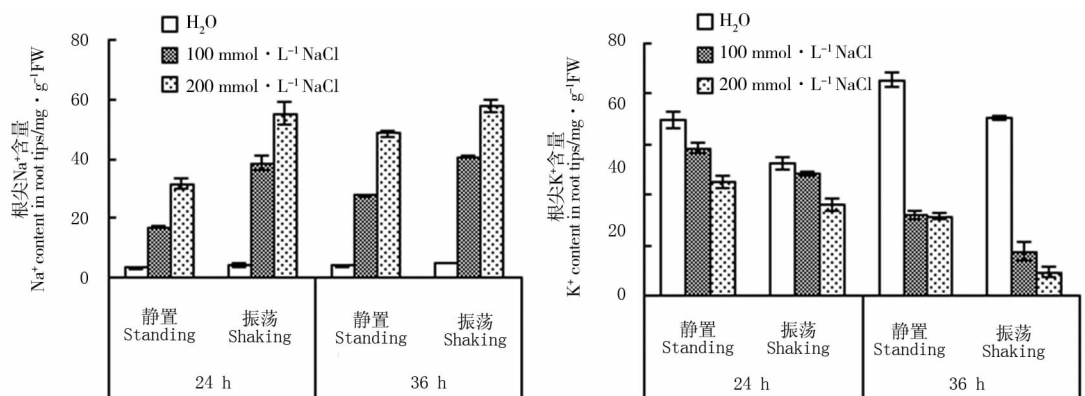


图3 盐胁迫下边缘细胞对根尖  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  含量的影响

Fig. 3 Effects of salt stress on  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  content in root tips of black soybean

## 2.4 盐胁迫下边缘细胞对根尖生理特性的影响

**2.4.1 根尖相对电导率** 盐胁迫下黑豆根尖相对电导率显著高于对照组,24 h 和 36 h 后分别增加了 62.4% ~ 139.2% 和 69.1% ~ 140.4%。振荡培养下的根相对电导率增幅要高于静置培养,NaCl 浓度升高引起相对电导率的增加,且 NaCl 处理引起了黑豆根尖相对电导率的极显著差异 ( $P < 0.01$ )。说明振荡培养下细胞质膜外渗率增加,即除去边缘细胞后黑豆根尖受到的损伤更加严重。

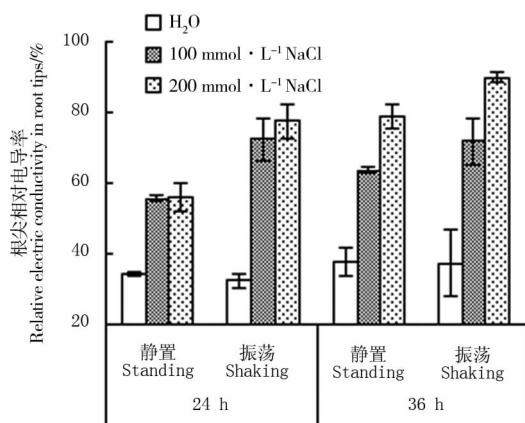


图4 盐胁迫下边缘细胞对黑豆根尖相对电导率的影响

Fig. 4 Effects of salt stress on relative electric conductivity in root tips of black soybean

**2.4.2 根尖 MDA 含量** 盐胁迫处理下根尖 MDA 含量显著高于对照(图 5)。振荡培养组的 MDA 含量高于相同处理的静置培养组,增幅达 17.7% ~ 44.7%。这与根尖电导率的变化规律一致。

## 3 讨论

高浓度  $\text{Na}^+$  对植物的毒害作用是植物不能在盐渍化土壤上生长的主要原因之一<sup>[11]</sup>。本实验中盐胁迫引起黑豆根尖边缘细胞数目减少、根尖  $\text{Na}^+$

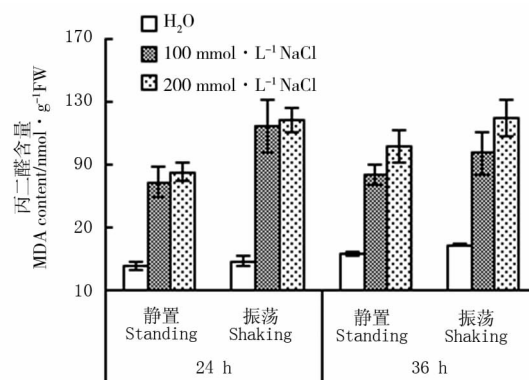


图5 盐胁迫下边缘细胞对根尖 MDA 含量的影响

Fig. 5 Effects of salt stress on MDA content in root tips of black soybean

含量、电导率和 MDA 含量增加。

绝大多数物种的根尖边缘细胞脱落后是有活性的,边缘细胞及其分泌的黏胶层能形成一个根系的外围环境,在这个区域内可暂时保证根尖及顶端分生区不受外界胁迫的伤害,同时能够增加根际土壤结构的稳定性,在耐逆境胁迫中起作用。该试验中保留边缘细胞根尖的相对电导率、MDA 和  $\text{Na}^+$  含量均低于移除边缘细胞的根尖, $\text{K}^+$  含量则是前者高于后者。说明根尖附着边缘细胞有利于根系抵抗  $\text{Na}^+$  过高造成的不利影响。根尖感知  $\text{Al}^{[8,12]}$ 、 $\text{Fe}^{[13]}$  和  $\text{Cu}^{[14]}$  等毒害刺激后,能快速合成并向外分泌一系列具有生物活性的化学物质,其中黏液中的酸性多糖能与根质外体的多种金属离子结合并使其固定在根质外体,阻止其进入细胞内部。由此推测黑豆根尖抵抗盐胁迫可能是通过黏液结合  $\text{Na}^+$ ,对其进入根尖起到一定的抵抗作用,从而缓解  $\text{Na}^+$  的过量积累。

细胞膜结构和功能的完整性是控制离子运输和分配的主导因素,同时也是植物在逆境中受伤害的主要部位。在逆境胁迫中,细胞膜透性的变化引起植物根部对离子(如  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  等)吸收的变化<sup>[15]</sup>。MDA 是膜质过氧化的最终产物,其含量的高低代表

膜质过氧化程度,是衡量膜质过氧化作用强弱的常用指标<sup>[16]</sup>,而电导率常用于衡量细胞膜的完整性。本实验中盐胁迫导致黑豆根尖的 MDA 含量和根尖电导率大幅度增加,尤其除去边缘细胞后 MDA 增加量高于保留边缘细胞组,证实除去边缘细胞后黑豆根尖质膜受到的破坏程度更高。进一步证明边缘细胞在植物根系抗盐胁迫中有重要作用,即根尖保留边缘细胞有利于根系维持较高的细胞膜完整性,提高离子选择性,进而增强黑豆的抗盐胁迫能力。

综上所述,盐胁迫降低了黑豆根尖边缘细胞数目。而根尖边缘细胞的存在,显著提高了盐胁迫下根系的  $K^+$  含量,减少了细胞膜损伤和  $Na^+$  吸收,有助于根系生长,从而提高黑豆的抗盐害能力。

## 参考文献

- [1] 陈莎莎,兰海燕. 植物对盐胁迫响应的信号转导途径[J]. 植物生理学报,2011,47(2):119-128. (Chen S S, Lan H Y. Signal transduction pathways in response to salt stress in plants[J]. Plant Physiology Journal,2011,47(2):119-128. )
- [2] 孙洪刚,陈益泰. 沿海防护林四个树种根系分布对盐胁迫的响应[J]. 生态学杂志,2010,29(12):2365-2372. (Sun H G, Chen Y T. Root growth patterns of four coastal shelter forest tree species in response to salt stress[J]. Chinese Journal of Ecology,2010,29(12):2365-2372. )
- [3] Sekmen A H, Turkan I, Tanyolac Z O, et al. Different antioxidant defense responses to salt stress during germination and vegetative stages of endemic halophyte *Gypsophila oblongeolata* Bark[J]. Environmental and Experimental Botany,2012,77:63-76.
- [4] Gunawardena U, Rodriguez M, Straney D, et al. Tissue-specific localization of pea root infection by *Nectria haematococca*. Mechanisms and consequences [J]. Plant Physiology, 2005, 137 (4) : 1363-1374.
- [5] Jaroszuk-scise1 J, Kurek E, Rodzik B, et al. Interactions between rye(*Secale cereale*) root border cells(RBCs) and pathogenic and nonpathogenic rhizosphere strains of *Fusarium culmorum*[J]. Mycological Research,2009,113(10):1053-1061.
- [6] Wuyts N, Maung Z T Z, Swennen R, et al. Banana rhizodeposition: characterization of root border cell production and effects on chemotaxis and motility of the parasitic nematode *Radopholus similis* [J]. Plant and Soil,2006,283(1-2):217-228.
- [7] Cai M Z, Wang F M, Li R F, et al. Response and tolerance of root border cells to aluminum toxicity in soybean seedlings[J]. Journal of Inorganic Biochemistry,2011,105(7):966-971.
- [8] Yu M, Shen R F, Liu J Y, et al. The role of root border cells in aluminum resistance of pea (*Pisum sativum*) grown in mist culture [J]. Journal of Plant Nutrition and Soil Science,2009,172(4):528-534.
- [9] 邢承华,张淑娜,吴坤,等. 边缘细胞对水稻生长和细胞壁组分的影响及其与耐铝性的关系[J]. 作物学报,2012,38(4):1-7. (Xing C H, Zhang S N, Wu K, et al. Effects of root border cells on root growth and cell wall polysaccharide contents in rice seedlings and their relation to aluminum tolerance[J]. Acta Agronomica Sinica,2012,38(4):1-7. )
- [10] 林植芳,李双顺,林桂珠,等. 水稻叶片的衰老与超氧化物歧化酶活性及脂质过氧化作用的关系[J]. 植物学报,1984,26(6):605-615. (Lin Z F, Li S S, Lin G Z, et al. Superoxide dismutase activity and lipid peroxidation in relation to senescence of rice leaves[J]. Acta Botanica Sinica,1984,26(6):605-615. )
- [11] 贺莉,徐晓腾,刘菲,等. NaCl 胁迫下野生大豆生理生态反应的研究[J]. 大豆科学,2011,30(2):242-245. (He L, Xu X T, Liu F, et al. Effects of NaCl stress on physio-ecological responses of *Glycine soja*[J]. Soybean Science,2011,30(2):242-245. )
- [12] Miyasaka S C, Hawes M C. Possible role of root border cells in detection and avoidance of aluminum toxicity [J]. Plant Physiology, 2001,125(4):1978-1987.
- [13] Xing C H, Zhu M H, Cai M Z, et al. Developmental characteristics and response to iron toxicity of root border cells in rice seedlings [J]. Journal of Zhejiang University-Science B, 2008, 9 (3) : 261-264.
- [14] Llugany M, Lombini A, Poschenrieder C, et al. Different mechanisms account for enhanced copper resistance in *Silene armeria* ecotypes from mine spoil and serpentine sites[J]. Plant Soil,2003,251(1):55-63.
- [15] Kong X, Luo Z, Dong H, et al. Effects of non-uniform root zone salinity on water use,  $Na^+$  recirculation, and  $Na^+$  and  $H^+$  flux in cotton [J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63 (5) : 2105-2116.
- [16] Asensi-Fabado M A, Cela J, Müller M, et al. Enhanced oxidative stress in the ethylene-insensitive (*ein3-1*) mutant of *Arabidopsis thaliana* posed to salt stress [J]. Journal of Plant Physiology, 2012,169(4):360-368.