

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.00695

铝胁迫下大豆根尖细胞铝的微区分布与耐铝性分析

俞慧娜 刘鹏* 徐根娣 蔡妙珍

浙江师范大学植物学实验室, 浙江金华 321004

摘要: 以浙春3号为实验材料, 利用透射电镜(TEM: Transmission Electron Microscope)-X-射线能谱(EDS: Energy Dispersive X-ray), 调查铝胁迫下大豆根尖铝的微区分布及耐铝性。结果表明, Al^{3+} 胁迫导致根尖细胞细胞壁不规则加厚, 线粒体数量增多, 核膜膨胀, 液泡中存在较多的电子致密沉淀物。90 mg L^{-1} Al^{3+} 处理的根尖细胞内含物完全降解消失, 仅剩细胞壁。10 mg L^{-1} Al^{3+} 处理的线粒体、细胞壁和液泡电子致密沉淀物中均检测到Al; 随着 Al^{3+} 处理浓度的增大, 各细胞器中Al的质量和原子数百分比逐渐增大。线粒体在60 mg L^{-1} 和90 mg L^{-1} Al^{3+} 处理下, 液泡电子致密沉淀物在90 mg L^{-1} Al^{3+} 处理下, 均未被检测出Al。在60 mg L^{-1} Al^{3+} 处理下唯一一次在细胞核中检测到Al。 Al^{3+} 抑制了根系生长, 根系细胞中细胞壁的 Al^{3+} 含量受影响最明显。P/Al在细胞壁和线粒体中的相对原子数随 Al^{3+} 浓度的增大而下降。研究结果表明X-射线能谱对铝在亚显微结构上的定位是一种快速、有效的方法。铝最先积累在细胞壁上, 随 Al^{3+} 处理浓度增大逐渐积累于部分细胞器和细胞核中, 且含量在细胞中的分布亦由外向里呈递减趋势。

关键词: 铝胁迫; 大豆; 根尖细胞; 透射电镜-X-射线能谱分析; 根系生长

Distribution of Al^{3+} in Subcellular Structure of Root Tips Cells and Aluminum Tolerance in Soybean

YU Hui-Na, LIU Peng*, XU Gen-Di, and CAI Miao-Zhen

Key Laboratory of Botany, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China

Abstract: Aluminum (Al) toxicity is a major limiting factor for yield and quality in crop production in acid soil. Micromolar concentrations of Al^{3+} may inhibit root elongation and consequently influence water and nutrient uptake, resulting in poor plant growth. The microanalysis of the elements was conducted on Zhechun 3 by using Transmission Electron Microscope (TEM) and Energy Dispersive X-ray (EDS) to examine the distribution of Al^{3+} in root tips and Al resistance of soybean. We found that Al^{3+} stresses resulted in irregularly thickened cell wall, increased number of mitochondria, expanded nuclear membrane, and densified precipitates of vacuole. Under the highest Al^{3+} concentration, the mitochondria and other organelles disappeared but cell wall. We detected Al in cell wall, mitochondria and electron-dense precipitates of vacuole of root tip cell under the 10 mg L^{-1} Al^{3+} stresses by EDS. With the increase of external Al^{3+} concentration treated, the weight and atomic percentage of Al in the organelles increased. The Al^{3+} was found in nuclei when the external Al^{3+} was over 60 mg L^{-1} . And there was no Al^{3+} in mitochondria under 60 mg L^{-1} and 90 mg L^{-1} Al^{3+} treatments and electron-dense precipitates of vacuole under the 90 mg L^{-1} Al^{3+} stresses. The 14 days Al^{3+} stresses significantly inhibited the growth of root system. The content of Al^{3+} in cell wall was most significantly impacted by the external Al^{3+} concentration. The atomic number of P/Al in cell wall and mitochondria decreased with increased Al^{3+} content. EDS can be used to determine the subcellular location of Al^{3+} . As the treatment concentrations of Al^{3+} increased, Al^{3+} primarily accumulated in the cell wall, gradually gathered in part of the organelles and nuclei. The Al^{3+} concentrations also decreased from out layer to insider in the cell.

Keywords: Al^{3+} stresses; Soybean; Root tip cell; Transmission Electron Microscope-Energy Dispersive X-ray Analysis; Root growth

铝毒是酸性土壤中限制作物生长的主要因素, 最终导致作物生长缓慢^[1]。通常认为, 植物对铝毒的铝抑制作物根系的生长从而影响其水分和矿质吸收, 反应首先表现在根系上^[2]。根尖是感受铝毒的最初

本研究由国家“十一五”科技攻关计划项目(2004BA525B06), 国家自然科学基金项目(30540056), 浙江省自然科学基金项目(303461和304185)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 刘鹏, E-mail: sky79@zjnu.cn

第一作者联系方式: E-mail: huina2142004@163.com

Received(收稿日期): 2008-06-07; Accepted(接受日期): 2008-12-15.

部位,且铝在根尖细胞壁上的积累是铝对植物根尖产生毒害的首要条件,是铝毒敏感性的主要特征^[3]。对于植物根尖铝含量的测定已有较多的方法,如苏木精染色、盐酸脱色测定大麦(*Hordeum vulgare* L.)根的铝相对含量^[4],电感耦合高频等离子体原子发射光谱(ICP)测定茶树(*Camellia sinensis*)根中Al的积累^[5],以及利用不同离心速度提取龙眼(*Dimocarpus longana* Lour)根系各个细胞器,测定亚细胞水平上的铝含量^[6]。但这些方法并不能充分提供有关铝在根尖分布的信息。X-射线能谱分析技术是利用样品中的元素原子在受到外源电子束轰击时产生的特征X射线,对样品表面确定区域内存在的元素进行定性和定量分析^[7]。近年来X-射线能谱(EDS: Energy Dispersive X-ray)仪与扫描电镜(SEM: Scanning Electron Microscope)和透射电镜(TEM: Transmission Electron Microscope)结合,对铝在植物体中的微区分布展开了研究。何龙飞等^[8]采用SEM-EDS研究耐Al性不同的小麦(*Triticum aestivum* L.)品种根系中铝、钙、钾在表皮细胞、皮层细胞和中柱细胞壁的分布。也有的采用TEM-EDS结合的方式测定Al³⁺胁迫下玉米(*Zea mays* L.)根尖细胞壁和液泡中的铝含量^[9]。不同于用苏木精、ICP测定根系总铝含量,用差数离心提取各细胞器测定其绝对铝含量和以EDS研究铝及其他元素在细胞中的相对含量,可更好揭示铝在细胞器中的分布规律。本文采用水培法及TEM-EDS技术分析大豆根尖细胞中细胞壁、线粒体、液泡、细胞核等细胞器的相对铝含量,并结合根系细胞器铝含量及根系生长特性研究铝在根尖细胞不同细胞器的分布规律,以期从铝的微区分布丰富大豆的耐铝毒机理。

1 材料与方法

1.1 材料和处理

以铝敏感大豆[*Glycine max* (L.) Merrill]品种浙春3号^[10]为材料进行水培。选大小一致、健康饱满的种子植入消毒过的沙土中进行萌发。当幼苗长至第1片真叶完全展开时,将其移入5 L的不透光的塑料水桶中,用1/2 Hoagland营养液,加分析纯AlCl₃·6H₂O配制的铝溶液胁迫培养,用羊毛铬青R比色法^[11]测定溶液中的Al³⁺含量,使Al³⁺浓度分别为10、30、60、90 mg L⁻¹^[10,12],用不含AlCl₃的1/2 Hoagland营养液为对照(CK)。培养过程中每5 d更换一次营养液,用NaOH和HCl每天2次调节pH,

使其控制在5.0,用气泵每天2次通气,每次2 h。每个Al³⁺处理重复3次。Al³⁺处理14 d时进行TEM-EDS微区成分分析及根系相关指标的测定。

1.2 TEM-EDS微区成分分析

将大豆根系洗净、擦干,取根尖0.5 cm,用2.5%的戊二醛(用0.1 mol L⁻¹ pH 7.2的磷酸缓冲液稀释而成)进行前固定,0.1 mol L⁻¹ pH 7.0磷酸缓冲液冲洗,用1%的锇酸后固定,酒精系列脱水、渗透,Epon 812环氧树脂包埋,用钻石刀在超薄切片机上切成120 nm的薄片,展开于不锈钢网(含有铁、铬)。通过JEM-2010(HR)透射电镜寻找样品细胞中电子云密度小体的分布位点,以EDS(Oxford-INCA)能谱仪分析样品中的铝等元素的亚细胞分布。以附带标样程序的计算机判断各峰值代表的元素种类,并自动计算出峰值中C、O、P、Al等元素分别占细胞中相对质量和原子数的百分数。

能谱仪的加速电压为200 kV,最小光斑直径(Spotsize)为80 nm,样品台倾角为35°,保持每秒所读信息量(CPS)为350左右,收录时间为100 s,分辨率MnK α 为133 eV,最小微区为5 nm。

1.3 根系细胞器铝含量的测定

参照潘根生等^[13]法提取根系细胞器,消化后,用羊毛铬青R法测定铝含量,用单位鲜根所含的铝含量($\mu\text{g g}^{-1}$)表示。

1.4 根系干重

取大豆根系,用去离子水冲洗干净,放在称量瓶中,在105°C下杀青0.5~2.0 h之后于75°C恒温处理48 h,用1/10000电子天平称其干重。

1.5 根系分析

采用STD 1600+型根系分析仪对大豆根系进行扫描,用图像分析软件Win RHIZO分析根系总长度、根系总体积。

2 结果与分析

2.1 铝对大豆根尖亚细胞结构的影响

在对照中(图1),大豆根尖细胞结构清晰,细胞核完整,核膜核仁清晰。线粒体结构正常,呈圆形或肾形,分布在细胞中。液泡散在于整个细胞,内含电子致密沉淀物。用10 mg L⁻¹ Al³⁺处理后(图2),根尖细胞线粒体数目增多,双层膜完好。液泡中存在较多的电子致密沉淀物。核膜膨胀,模糊不清,不如对照清晰。细胞壁不规则加厚,受损小。用30 mg L⁻¹ Al³⁺处理后(图3),大豆根尖细胞间隙变大,质膜部分向内

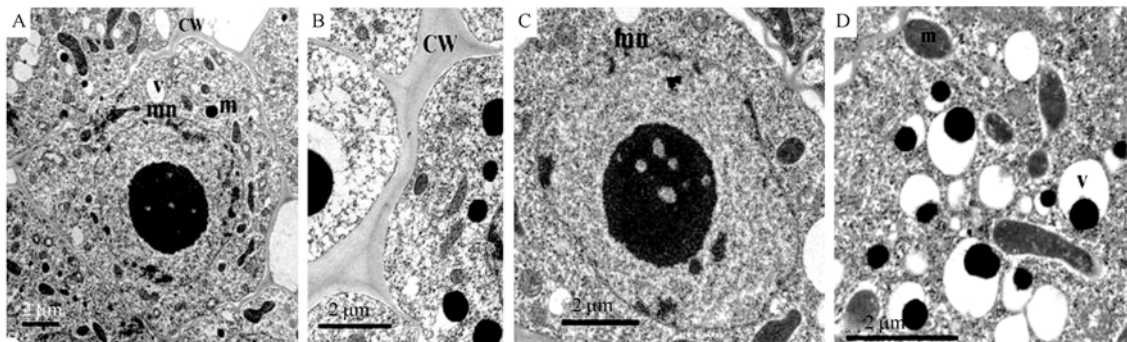


图 1 正常培养后大豆根尖细胞的亚显微结构图

Fig. 1 Image of the ultrastructure of root tip cells under normal culture

A: 根尖细胞的完整结构图; B: 细胞壁的正常结构; C: 细胞核的正常结构; D: 线粒体和液泡的正常结构。

cw: 细胞壁; m: 线粒体; mn: 核膜; n: 细胞核; v: 液泡; 放大倍数 2 μm。

A: complete structure of root tip cell; B: natural structure of cell wall; C: natural structure of nucleus; D: natural structure of mitochondrion and vacuoles. Scale bar is 2 μm; cw: cell wall; m: mitochondrion; mn: external membrane of nucleus; n: nucleus; v: vacuole; TEM: transmission electron microscopy.

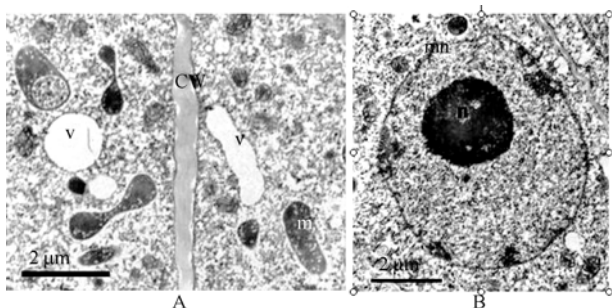


图 2 10 mg L⁻¹ Al³⁺处理大豆根尖细胞的亚显微结构图

Fig. 2 Image of the ultrastructure of root tip cells with 10 mg L⁻¹ Al³⁺ treatment by TEM

A: 细胞壁加厚; B: 细胞核结构图, 核膜膨胀。cw: 细胞壁; m: 线粒体; mn: 核膜; n: 细胞核; v: 液泡; 放大倍数 2 μm。

A: thickened cell wall; B: integrity structure of nucleus, external membrane of nucleus was swollen. Scale bar is 2 μm; cw: cell wall; m: mitochondrion; mn: external membrane of nucleus; n: nucleus; v: vacuole; TEM: transmission electron microscopy.

波折。液泡中的电子致密沉淀物较对照少, 细胞核核仁解体, 核膜结构仍完整。线粒体内膜逐渐解体, 外膜部分出现损伤。TEM 观察发现 60 mg L⁻¹ Al³⁺处理的大豆根尖(图 4-A), 细胞结构不完整, 发生严重的质壁分离, 细胞质降解, 细胞核开始解体, 线粒体等细胞器消失。用 90 mg L⁻¹ Al³⁺处理后(图 4-B), 细胞结构不完整, 细胞内容物完全降解消失, 细胞呈空泡化, 仅剩细胞壁且不完整。

2.2 铝在大豆根尖的微区分布特点

表 1 和表 2 表明, 采用 EDS 法均未检测到对照大豆根尖各细胞器中的 Al 分布。10 mg L⁻¹ Al³⁺处理下, 用 EDS 检测到细胞壁上、线粒体和液泡电子致密沉淀物中有 Al 存在, 但在各细胞器中 Al 的质量和原子数百分比均较小。随着 Al³⁺处理浓度的增加,

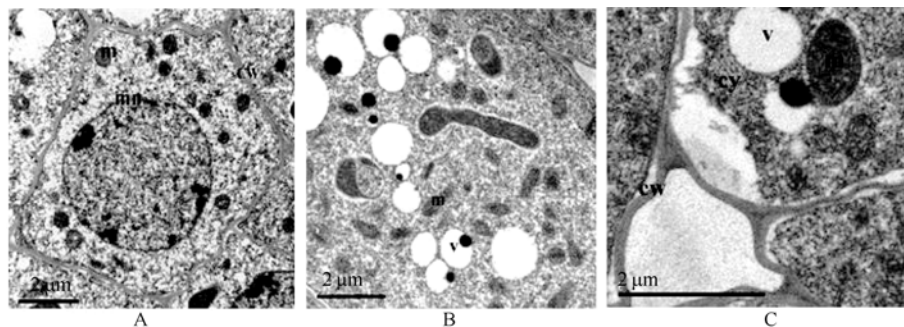


图 3 30 mg L⁻¹ Al³⁺处理大豆根尖细胞的亚显微结构图

Fig. 3 Image of the ultrastructure of root tip cells with 30 mg L⁻¹ Al³⁺ treatment by TEM

A: 细胞核仁开始解体; B: 线粒体解体; C: 细胞间隙变大。cw: 细胞壁; cy: 细胞质; mn: 核膜; m: 线粒体; v: 液泡; 放大倍数 2 μm。
A: disorganized nucleus; B: disorganized mitochondrion; C: widened intercellular space. Scale bar is 2 μm; cw: cell wall; cy: cytoplasm; mn: external membrane of nucleus; m: mitochondrion; v: vacuole; TEM: transmission electron microscopy.

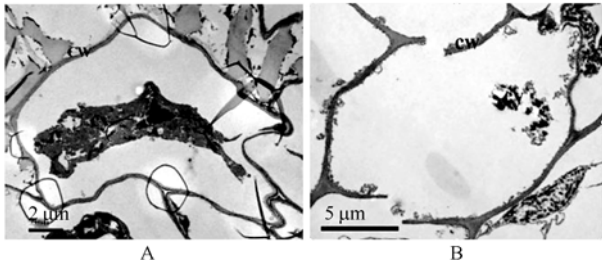


图 4 60 mg L⁻¹ 和 90 mg L⁻¹ Al³⁺处理大豆根尖细胞的亚显微结构图

Fig. 4 Image of the ultrastructure of root tip cells with 60 and 90 mg L⁻¹ Al³⁺ treatment by TEM

A: 60 mg L⁻¹ Al³⁺处理, 细胞严重质壁分离, 细胞质降解, 细胞核解体, 线粒体消失; B: 90 mg L⁻¹ Al³⁺处理, 细胞内容物降解, 细胞呈空泡化。cw: 细胞壁; cy: 细胞质; 放大倍数: A = 2 μm; B = 5 μm。

A: 60 mg L⁻¹ Al treatment, showing cell plasmolysis, degraded cytoplasm, disintegrated nucleus, disappeared mitochondrion; B: 90 mg L⁻¹ Al³⁺ treatment, showing degraded cellular content and vacuolization. Scale bars are 2 μm for A and 5 μm for B; cw: cell wall; cy: cytoplasm; TEM: transmission electron microscopy.

细胞壁、线粒体和液泡电子致密沉淀物上 Al 的质量和原子数百分比逐渐增大, 例如线粒体的该参数在 30 mg L⁻¹ Al³⁺处理中约为 10 mg L⁻¹ Al³⁺处理的 3 倍(图 5-B)。在 60 mg L⁻¹ Al³⁺处理下, 开始解体的细胞

核中检测到 Al, 这是本实验中唯一一次在细胞核中检测到 Al 的存在(图 5-D), Al 的质量和原子数百分比分别为 0.10%和 0.67%。在此处理中, 液泡电子致密沉淀物中的 Al 的质量和原子百分比达到最大(图 5-C)。在 60 和 90 mg L⁻¹ Al³⁺处理中, 细胞质开始解体, 线粒体消失, 因此也无法检测线粒体中是否有 Al 的存在。且 90 mg L⁻¹ Al³⁺, 残存细胞壁中的 Al 原子数百分比达到最大(图 5-A)。从空间上看, Al 的亚细胞分布由外向里呈递减趋势, 即细胞壁>线粒体>液泡中的电子致密沉淀物>细胞核。

2.3 铝在大豆根系的亚细胞分布特点

图 6 表明, 根细胞细胞壁和各细胞器 Al 含量为细胞壁>线粒体>细胞核。随着 Al³⁺浓度的增大, 各细胞器的 Al 含量均有所增加。在 90 mg L⁻¹ Al³⁺浓度下, 细胞壁达到 18.2 μg g⁻¹, 为对照的 13.8 倍; 线粒体达到 5.5 μg g⁻¹, 为对照的 7.4 倍; 细胞核达到 4.9 μg g⁻¹, 为对照的 5.8 倍。由此可见细胞壁的含 Al 量受 Al³⁺浓度的影响最明显, 细胞核的含 Al 量相对稳定, 线粒体铝含量的变化比细胞核明显, 各处理与对照的差异均显著(P<0.05)。

表 1 不同铝浓度下大豆根尖细胞器的部分元素质量百分比

Table 1 Weight percentage for some elements in the organelles of root tip cells in soybean under different Al³⁺ stresses (%)

| 铝浓度 Al ³⁺ concentration | 细胞壁 Cell wall | | | | 细胞核 Nucleus | | | | 线粒体 Mitochondrion | | | | 液泡电子致密沉淀物 Electron-dense precipitates of vacuole | | | |
|--|------------------|------|------|------|----------------|------|------|------|----------------------|------|------|------|---|------|------|------|
| | C | O | P | Al | C | O | P | Al | C | O | P | Al | C | O | P | Al |
| 0 mg L ⁻¹ (CK) | 1.05 | 0.57 | 0.26 | - | 0.77 | 0.44 | 0.70 | - | 1.38 | 0.76 | 0.40 | - | 0.63 | 0.32 | 0.15 | - |
| 10 mg L ⁻¹ | 0.52 | 0.34 | 0.15 | 0.09 | 0.68 | 0.35 | 0.40 | - | 1.50 | 0.57 | 0.42 | 0.02 | 0.31 | 0.18 | 0.07 | 0.05 |
| 30 mg L ⁻¹ | 0.75 | 0.56 | 0.21 | 0.15 | 0.76 | 0.37 | 0.18 | - | 0.44 | 0.22 | 0.07 | 0.06 | 0.82 | 0.44 | 0.20 | 0.11 |
| 60 mg L ⁻¹ | 0.84 | 0.67 | 0.29 | 0.19 | 0.55 | 0.21 | 0.20 | 0.10 | - | - | - | - | 0.61 | 0.29 | 0.23 | 0.12 |
| 90 mg L ⁻¹ | 0.59 | 0.44 | 0.21 | 0.18 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

-: 在细胞壁、部分细胞器和细胞核中没有发现。 -: not detected in the cell wall, organelles, and nucleus.

表 2 不同铝浓度下大豆根尖细胞器的部分元素原子数百分比

Table 2 Atomicity percentage for some elements in the organelles of root tip cells in soybean under different Al³⁺ stresses (%)

| 铝浓度 Al ³⁺ concentration | 细胞壁 Cell wall | | | | 细胞核 Nucleus | | | | 线粒体 Mitochondrion | | | | 液泡电子致密沉淀物 Electron-dense precipitates of vacuole | | | |
|--|------------------|------|------|------|----------------|------|------|------|----------------------|------|------|------|---|------|------|------|
| | C | O | P | Al | C | O | P | Al | C | O | P | Al | C | O | P | Al |
| 0 mg L ⁻¹ (CK) | 93.73 | 3.20 | 0.16 | - | 93.76 | 3.01 | 0.22 | - | 89.38 | 5.83 | 0.45 | - | 92.97 | 2.90 | 0.18 | - |
| 10 mg L ⁻¹ | 94.86 | 2.82 | 0.20 | 0.15 | 89.38 | 5.93 | 0.45 | - | 85.85 | 2.74 | 0.65 | 0.04 | 95.25 | 2.18 | 0.06 | 0.03 |
| 30 mg L ⁻¹ | 92.79 | 5.15 | 0.28 | 0.21 | 92.31 | 2.04 | 0.37 | - | 89.11 | 4.15 | 0.21 | 0.11 | 93.98 | 2.89 | 0.18 | 0.10 |
| 60 mg L ⁻¹ | 92.15 | 6.11 | 0.46 | 0.41 | 90.38 | 3.40 | 1.66 | 0.67 | - | - | - | - | 77.16 | 7.14 | 2.39 | 1.08 |
| 90 mg L ⁻¹ | 86.70 | 8.23 | 1.59 | 1.74 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

-: 在细胞壁、部分细胞器和细胞核中没有发现。 -: not detected in the cell wall, organelles, and nucleus.

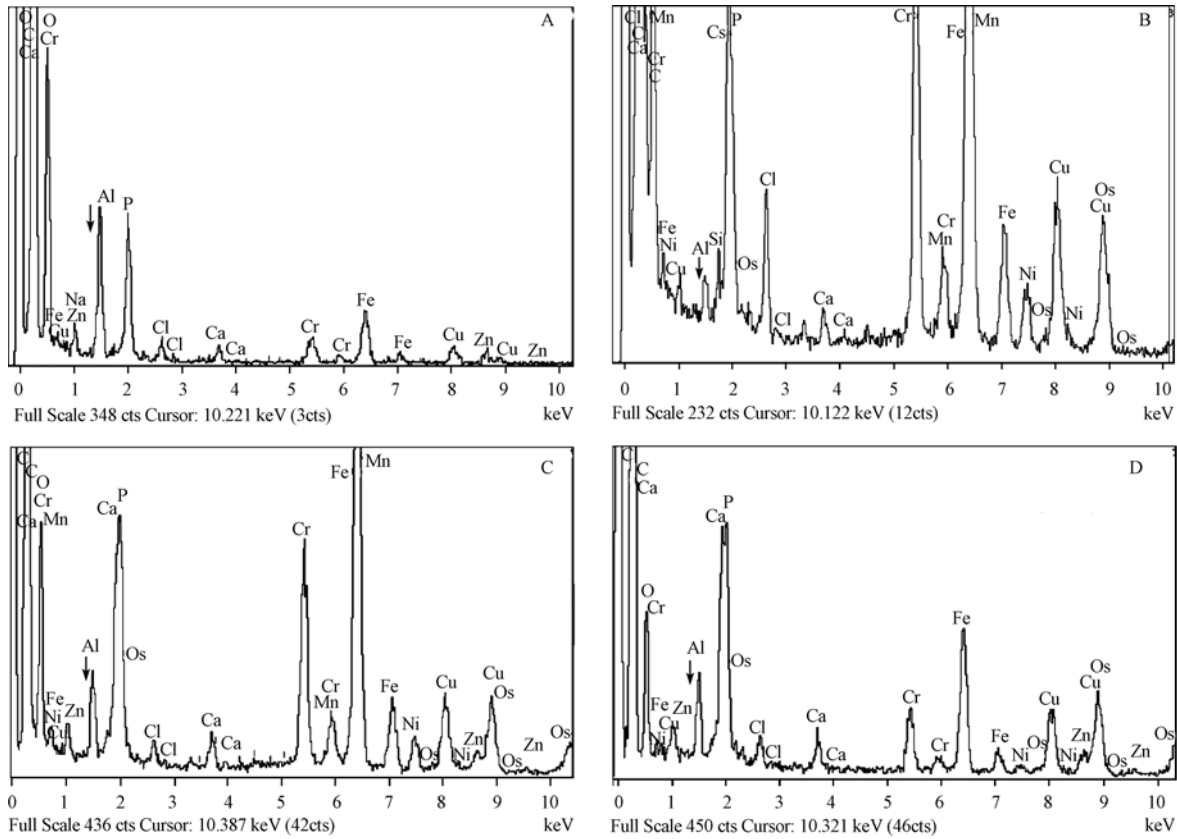


图 5 大豆根尖细胞细胞器的 EDS 谱图

Fig. 5 EDS spectrogram in cell organelles of root tip cells of soybean under different Al³⁺ stresses

A: 在 90 mg L⁻¹ Al³⁺ 处理中的细胞壁 EDS 谱图; B: 在 30 mg L⁻¹ Al³⁺ 处理中的线粒体 EDS 谱图; C: 在 60 mg L⁻¹ Al³⁺ 处理中的液泡电子致密沉淀物 EDS 谱图; D: 在 60 mg L⁻¹ Al³⁺ 处理中的细胞核 EDS 谱图。图中标注的铜(Cu)、铁(Fe)和锇(Os)为样品制备过程中引入的金属元素。图中箭处指 EDS 谱图中 Al 的位置。

A: cell wall under 90 mg L⁻¹ Al³⁺ treatment; B: mitochondrion under 30 mg L⁻¹ Al³⁺ treatment; C: electron-dense precipitates of vacuole under 60 mg L⁻¹ Al³⁺ treatment; D: nucleus under 60 mg L⁻¹ Al³⁺ treatment. The metal elements such as copper(Cu), iron(Fe), and osmic(Os) acid were adhibited with the processes of sample preparation. The arrow represented the position of Al in the EDS spectrogram.

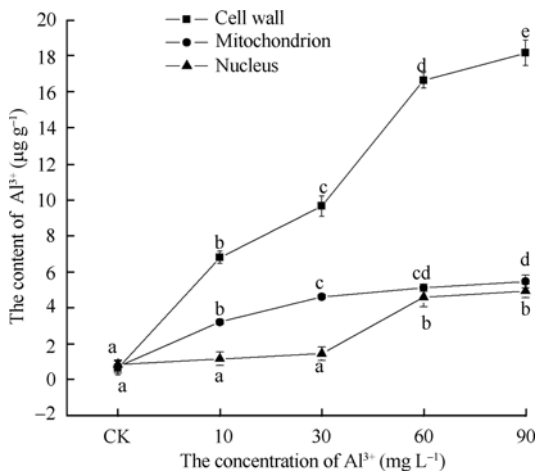


图 6 不同铝浓度下大豆根系亚细胞铝含量的变化

Fig. 6 Change of Al³⁺ content in the root subcellular structures in soybean under different Al³⁺ stresses

图中不同字母表示差异达显著水平(P<0.05)。

Letters indicate statistical significance for the content of Al³⁺.

The Al³⁺ contents with a different letter are significantly different (P<0.05).

2.4 铝与其他元素微区分布间的关系

由表 1 和表 2 可见, 只有 P 的原子数百分比在细胞壁中随着 Al³⁺浓度的增加而增大, 其余的变化规律均不明显。进一步研究 C、O、P 相对于 Al 的质量和原子数比值(表 3 和表 4)表明, C/Al 在细胞壁和线粒体中有下降的趋势, O/Al 在线粒体中随着 Al³⁺浓度的增加而降低, 在细胞壁中 10 mg L⁻¹ 和 30 mg L⁻¹ Al³⁺处理的 P/Al 基本一致, 随着 Al³⁺浓度的增加而下降, 线粒体中 P/Al 也随 Al³⁺浓度的增加而下降, 而液泡黑色内含物的 P/Al 随着 Al³⁺浓度的增加变化不明显。

2.5 铝对大豆根系生长的影响

铝对浙春 3 号根系生长的影响主要体现在其根系干重、根系总长度和根系总体积上(表 5)。随着 Al³⁺处理浓度的增加根系干重明显减小, 在 Al³⁺浓度为 90 mg L⁻¹ 下达到最小值, 与对照相比, 减幅达 67.98%。Al³⁺胁迫下大豆根系的伸长受抑制程度加

表 3 不同铝浓度下大豆根尖细胞细胞器部分元素相对铝的质量比值

Table 3 Weight ratio for Al and partial elements in the organelles of root tip cells in soybean under different Al³⁺ stresses

| 铝浓度 Al ³⁺ concentration | 细胞壁 Cell wall | | | 细胞核 Nucleus | | | 线粒体 Mitochondrion | | | 液泡电子致密沉淀物 Electron-dense precipitates of vacuole | | |
|---------------------------------------|------------------|------|------|----------------|------|------|----------------------|-------|-------|---|------|------|
| | C/Al | O/Al | P/Al | C/Al | O/Al | P/Al | C/Al | O/Al | P/Al | C/Al | O/Al | P/Al |
| 0 mg L ⁻¹ (CK) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 10 mg L ⁻¹ | 5.78 | 3.78 | 1.67 | - | - | - | 75.00 | 28.50 | 21.00 | 6.20 | 3.60 | 1.40 |
| 30 mg L ⁻¹ | 5.00 | 3.73 | 1.40 | - | - | - | 7.33 | 3.67 | 1.17 | 7.45 | 4.00 | 1.82 |
| 60 mg L ⁻¹ | 4.42 | 3.53 | 1.53 | 5.50 | 2.10 | 2.00 | - | - | - | 5.08 | 2.64 | 1.92 |
| 90 mg L ⁻¹ | 3.28 | 2.44 | 1.17 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

- : 在细胞壁、部分细胞器和细胞核中没有发现。- : not detected in the cell wall, organelles and nucleus.

表 4 不同铝浓度下大豆根尖细胞细胞器部分元素相对铝的原子数比值

Table 4 Atomicity ratio of partial elements to Al in the organelles of root tip cells in soybean under different Al³⁺ stresses

| 铝浓度 Al ³⁺ concentration | 细胞壁 Cell wall | | | 细胞核 Nucleus | | | 线粒体 Mitochondrion | | | 液泡电子致密沉淀物 Electron-dense precipitates of vacuole | | |
|---------------------------------------|------------------|-------|------|----------------|------|------|----------------------|-------|-------|---|-------|------|
| | C/Al | O/Al | P/Al | C/Al | O/Al | P/Al | C/Al | O/Al | P/Al | C/Al | O/Al | P/Al |
| 0 mg L ⁻¹ (CK) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 10 mg L ⁻¹ | 632.40 | 18.80 | 1.33 | - | - | - | 2146.25 | 68.50 | 16.25 | 3175.00 | 72.67 | 2.00 |
| 30 mg L ⁻¹ | 441.86 | 34.33 | 1.33 | - | - | - | 810.10 | 37.73 | 1.91 | 939.80 | 28.90 | 1.80 |
| 60 mg L ⁻¹ | 224.76 | 14.90 | 1.12 | 134.90 | 5.07 | 2.48 | - | - | - | 71.44 | 6.61 | 2.21 |
| 90 mg L ⁻¹ | 49.83 | 4.73 | 0.91 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

- : 在细胞壁、部分细胞器和细胞核中没有发现。- : not detected in the cell wall, organelles and nucleus.

表 5 不同的铝浓度对大豆根系生长的影响

Table 5 Root growth in soybean under different Al³⁺ stresses

| 性状 Trait | 铝浓度 Al ³⁺ concentration | | | | |
|---|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 0 mg L ⁻¹ (CK) | 10 mg L ⁻¹ | 30 mg L ⁻¹ | 60 mg L ⁻¹ | 90 mg L ⁻¹ |
| 根系干重 Dry matter of root system (mg) | 63.40±3.50 a | 42.80±1.20 b | 34.60±3.50 c | 24.60±3.10 d | 20.30±4.00 d |
| 根系总长度 Total length of roots (cm) | 622.10±8.45 a | 528.10±10.65 b | 377.10±22.39 c | 115.00±6.01 d | 85.95±8.83 e |
| 根系总体积 Total volume of roots (cm ³) | 1.26±0.18 a | 0.98±0.07 b | 0.63±0.03 c | 0.44±0.03 cd | 0.28±0.03 d |

表中不同字母表示差异达显著水平($P < 0.05$)。

Values for an indicate followed by a different letter are significantly different ($P < 0.05$).

剧, 对根系总长度的抑制明显, 与对照均存在显著差异($P < 0.05$)。根系总体积在 90 mg L⁻¹ Al³⁺下达到最小, 仅为对照的 22.05%。根系干重与细胞壁铝含量($n = 14$, $r = -0.960$)和线粒体铝含量($n = 14$, $r = -0.961$)均极显著负相关, 根系总长度($n = 14$, $r = -0.980$)和根系总体积($n = 14$, $r = -0.943$)均与细胞壁铝含量极显著负相关。

3 讨论

铝的毒害作用是铝在植物体, 尤其是在根中积累的结果。Ryan 等^[14]研究表明, 将玉米根顶端 2~3 mm(包括根冠、分生组织和伸长区)暴露在 Al³⁺溶液

中, 即可引起根生长的抑制, 而将除根尖外的其他部位暴露到 Al³⁺溶液中, 根生长不受到影响。Delhaize 等^[1]研究表明, 根尖积累的 Al 及其产生的物理损伤远远超过根的其他部位。因此根尖被认为是植物受 Al 毒胁迫的首要位点^[14]。

本研究表明, 在铝毒胁迫下根尖细胞的亚显微结构受到影响。10 mg L⁻¹ Al³⁺处理下线粒体数目增加, 可能是因为植物增加了呼吸作用, 保持了植物维持正常生理功能所需要的能量^[15]。在 30 mg L⁻¹ Al³⁺处理中细胞间隙增大, 是大豆对外界条件的一种反应, 这在先前研究中均有报道^[16-17]。液泡是植物细胞内的一个多功能细胞器, 尤其是根细胞内的

液泡,具有一定的储藏功能。有研究表明,在重力作用下的大豆根尖细胞,液泡数目增多^[16]; Zaalishvili等^[18]研究表明,硝基苯作用下的大豆根部液泡内有电子致密沉淀物。本研究显示在 $10\text{ mg L}^{-1}\text{ Al}^{3+}$ 处理中液泡的电子致密沉淀物数量要比对照多,但是随着 Al^{3+} 浓度的增加,电子致密沉淀物数目又有所减少。推测电子致密沉淀物的多少可能与根系生长有关^[18]。至于电子致密沉淀物中除了Al等一些基本元素外,还有什么物质,需要进一步的研究。

细胞壁作为植物防御不良环境的第一道屏障,在植物抗铝毒机理中的作用备受关注。铝能在细胞壁上积累已经早有报道。早在1967年,Clarkson^[19]发现,进入大麦根系的Al有85%~90%以上存在于细胞壁中,进入黄秋葵(*Abelmoschus esculentus*)胚轴细胞的Al也有95%结合于细胞壁上^[20],在珊瑚轮藻(*Chara corallina*)中甚至有99.99%的Al结合在细胞壁上^[21]。但铝能否跨质膜进入细胞质一直是令人感兴趣的问题,也是解决铝毒害机理的前提。Marienfeld等^[22]和Mariedfeled等^[23]发现在燕麦(*Avena sativa* Linn)根尖细胞的细胞壁上有大量Al积累,但在细胞内部没有Al的存在。Delhaize等^[24]用X-射线微区分析对小麦根的Al分布进行了初步研究,推断短时间的 Al^{3+} 处理(8 h和24 h)后,Al可能进入细胞质,但缺乏直接的证据。Lazof等^[25]用次生离子质谱法测定 Al^{3+} 处理大豆根距根顶端不同距离处的 Al^{3+} 含量,也认为Al能进入细胞质。 $20\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}\text{ Al}^{3+}$ 处理4 h,在玉米根尖细胞的细胞壁和液泡内的沉积物中有Al被检测到^[9]。何龙飞等^[8]测定 Al^{3+} 处理后小麦根不同组织细胞壁和细胞质的元素分布,表明Al能够进入表皮和皮层的细胞质。本实验表明Al最先积累在细胞壁上,随后相继在线粒体、液泡电子致密沉淀物和细胞核中被检测到。Al在细胞壁上积累量最多,与前人的研究结果基本一致。铝在细胞壁上大量积累,对有效阻止铝进入细胞内部起了非常重要的作用,增加了铝耐性,为铝的外部解毒机理提供了又一佐证。由于细胞壁、细胞器和细胞核结合、积累铝的能力有差异,X-射线能谱可以快速、有效地对铝在亚显微结构上的定位进行分析。

植物铝毒害最容易识别的症状就是根的生长受到抑制,肉眼可见的铝毒症状包括根伸长生长的抑制^[1]、根尖膨大^[26]、表皮脱落^[27]等。目前有关研究表明,水培条件下, $100\text{ mg L}^{-1}\text{ Al}^{3+}$ 即抑制大豆的根系生长,主根长、根生物量均下降^[28]。沙培条件下,

低 Al^{3+} 促进大豆的根系长度、体积和表面积的增长,高 Al^{3+} 则明显抑制根系的生长,不利于大豆的生长^[29]。本试验在低 Al^{3+} 浓度下的研究结果与先前的有所差异,随着 Al^{3+} 浓度的增大,根系生长受到显著抑制,这一方面是因为沙子具有吸附作用,使得 Al^{3+} 浓度降低,而水培法能更好地体现植物的Al毒害,另一方面是因为 Al^{3+} 对大豆的胁迫时间过长,根系破坏明显,在低浓度下就已得到充分体现。但其生长的变化是否与根系Al含量存在着关系,需要做进一步的探讨。相关分析表明,根系生长指标包括根系干重、根系总长度和根系总体积均与根尖细胞壁的Al含量极显著负相关,也表明细胞壁Al含量与根系生长密切相关。根系生长慢,根尖细胞壁上Al含量则增加。

磷(P)是植物生长和发育所需的一种重要的营养元素,显著影响着植株的生长和代谢^[30]。磷能够缓解或消除铝的毒害作用被认为是植物耐铝毒的重要机制之一。 Al^{3+} 胁迫下,花生^[31]、小麦^[8]幼苗对P的吸收与 Al^{3+} 胁迫浓度呈极显著负相关; Al^{3+} 处理10 d后,随着 Al^{3+} 浓度的增加,荞麦根中P含量相应增大^[32]。P的加入会提高大豆的Al耐性^[33],且玉米根组织受到P胁迫后,Al耐性与根中固定的Al有关^[34]。本实验结果发现细胞壁和线粒体中的P/Al随着 Al^{3+} 浓度增大而下降。细胞壁中P的原子数百分比随着 Al^{3+} 浓度增加而上升,而在其他细胞器上没有发现类似的结果。细胞壁作为Al在根尖细胞中的主要积累部位,随着外界 Al^{3+} 浓度的增加,积累在细胞壁上的Al增多,植物为了抵抗Al毒害,使细胞壁中的P含量也有所增加。这在一定程度上缓解了植物的Al毒害,但P含量的增加幅度不及Al,最终导致P/Al下降。固定在根中的铝可能与磷结合,在细胞壁上形成铝-磷交互物,如 $\text{Al}_4(\text{PO}_4)_3$,以不溶的形式对铝进入细胞质有阻碍作用。在一定程度上可能对大豆的铝毒害起到缓解作用^[32]。

4 结论

Al^{3+} 胁迫首先反映在大豆根上,表现为根系生长受到显著抑制;根尖细胞的亚显微结构受到影响, 90 mg L^{-1} 的 Al^{3+} 处理下,细胞结构不完整,呈空泡化,仅剩细胞壁且不完整;Al最先积累在细胞壁上,随后进入细胞内部,在线粒体、液泡电子致密沉淀物和细胞核中被检测到;Al可在细胞壁上大量积累,有效地阻止了Al进入细胞内,增加了铝耐性,为铝

的外部解毒机理提供了又一佐证; 由于细胞壁、细胞器和细胞核结合、积累铝的能力有差异, X-射线能谱可以快速、有效地对在亚显微结构上的定位进行分析。磷能缓解或消除铝的毒害作用是植物耐铝毒的重要机制, 本实验表明, 固定在根中的铝可与磷结合, 在细胞壁上形成铝-磷交互物, 以不溶的形式阻碍铝进入细胞质。

References

- [1] Delhaize E, Ryan P R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol*, 1995, 107: 315–321
- [2] Juan B, Charlotte P. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminum toxicity and resistance: A review. *Environ Exp Bot*, 2002, 48: 75–92
- [3] Yan H(阎华), Shen X-R(沈秀荣). The mechanism of aluminum toxicity and anti aluminum in plant. *J Anhui Agric Sci (安徽农业科学)*, 2006, 34(20): 5201–5202, 5204(in Chinese with English abstract)
- [4] Ladislav T, Jana H, Igor M, Marta S, Beata S. Aluminum-induced drought and oxidative stress in barley roots. *J Plant Physiol*, 2006, 163: 781–784
- [5] Li H-S(李海生), Zhang Z-Q(张志权). The absorption and accumulation of aluminum and mineral nutrient in tea (*Camellia sinensis*) under different Al levels. *Ecol Environ (生态环境)*, 2007, 16(1): 186–190(in Chinese with English abstract)
- [6] Xiao X-X(肖祥希). Characteristics of aluminum absorption by Longan (*Dimocarpus longan*) seedlings. *Sci Silv Sin (林业科学)*, 2005, 41(3): 43–47 (in Chinese with English abstract)
- [7] Lin Y-M(林玉满). Qualitative and quantitative determination of trace elements in fruits of *Dictyophora indusiata* with SEM and EDAX. *Anal Instrum (分析仪器)*, 1996, (2): 52–54 (in Chinese with English abstract)
- [8] He L-F(何龙飞), Liu Y-L(刘友良), Shen Z-G(沈振国), Wang A-Q(王爱勤), Li Y-R(李扬瑞). Effect of aluminum on the absorption and distribution of nutrient element of wheat seedling. *J Chin Electron Microsc Soc (电子显微学报)*, 2000, 19(5): 685–694(in Chinese with English abstract)
- [9] Vázquez M D, Poschenrieder C, Corrales I, Barceló J. Change in apoplastic aluminum during the initial growth response to aluminum by roots of a tolerant maize variety. *Plant Physiol*, 1999, 119: 435–444
- [10] Yu H-N(俞慧娜), Liu P(刘鹏), Xu G-D(徐根娣). Responses of growth and chlorophyll fluorescence characteristics of soybean to aluminum. *Chin J Oil Crop Sci (中国油料作物学报)*, 2007, 29(3): 257–265(in Chinese with English abstract)
- [11] Li C-S(李朝苏), Liu P(刘鹏), Xu G-D(徐根娣), Zhang X-Y(张晓燕), He W-B(何文彬), Zhou D-Y(周迪莹). Ameliorating effects of exogenous organic acids on aluminum toxicity in buckwheat seedlings. *Acta Agron Sin (作物学报)*, 2006, 32(4): 532–539(in Chinese with English abstract)
- [12] Yu H-N(俞慧娜), Liu P(刘鹏), Xu G-D(徐根娣), Chen W-R(陈文荣), Zhou J(周菁), Li C-Y(李传勇). Comparative study on root growth and chlorophyll fluorescence characteristics of soybean with aluminum responses. *J Shanghai Jiaotong Univ (Agric Sci)(上海交通大学学报·农业科学版)*, 2007, 25(2): 138–146(in Chinese with English abstract)
- [13] Pan G-S(潘根生), Masaki T, Shigeki K(小西茂毅). Isolation of cell organelles from the lip-root cells of tea and their distribution of aluminum. *Acta Agric Univ Zhejiangensis (浙江农业大学学报)*, 1991, 17(3): 255–258 (in Chinese with English abstract)
- [14] Ryan P R, Ditomaso J M, Kochian L V. Aluminum toxicity in roots: An investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *J Exp Bot*, 1993, 44: 437–446
- [15] Wang J-S(王金胜), Ji M-X(冀满祥), Zhao R-Y(赵如意), Cheng Y-X(程玉香). Protective effect of cerium on mitochondria wheat under salinity stress. *J Chin Rare Earth Soc (中国稀土学报)*, 1999, 17(2): 187–190 (in Chinese with English abstract)
- [16] Klymchuk D O, Kordyum E L, Vorobyova T V, Chapman D K, Brown C S. Changes in vacuolation in the root apex cells of soybean seedling in microgravity. *Adv Space Res*, 2003, 31: 2283–2288
- [17] Chen Y X, He Y F, Yang Y, Yu Y L, Zheng S J, Tian G M, Luo Y M, Wong M H. Effect of cadmium on nodulation and N₂-fixation of soybean in the contaminated soils. *Chemosphere*, 2003, 50: 781–787
- [18] Zaalishvili G, Sadumishvili T, Scalla R, Laurent F, Kvestadze G. Electron microscopic investigation of nitrobenzene distribution and effect on plant root tip cell ultrastructure. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2002, 52: 190–197
- [19] Clarkson D T. Interaction between aluminum and phosphorus on root surfaces and cell wall material. *Plant Soil*, 1967, 27: 347–356
- [20] Ma J F, Yamamoto R, Nevins D J, Matsumoto H, Brown P H. Al binding in the epidermis cell wall inhibits cell elongation of *Okra hypocotyl*. *Plant Cell Physiol*, 1999, 40: 549–556
- [21] Taylor G J, McDonald-Stephens J L, Hunter D B. Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cell of *Characorallina*. *Plant Physiol*, 2000, 123: 987–996
- [22] Marienfeld S, Stelzer R. X-ray microanalyses in Al-treated *Avena sativa* plants. *J Plant Physiol*, 1993, 141: 569–573
- [23] Marienfeld S, Lehmann H, Stelzer R. Ultrastructural investigations and EDX-analyses of Al treated oat (*Avena sativa*) roots. *Plant Soil*, 1995, 171: 167–173
- [24] Delhaize E, Craig S, Beaton C D, Bennet R J, Jagadish V C, Randall P J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.): I. Uptake and distribution of aluminum in root apices. *Plant Physiol*, 1993, 103: 685–693
- [25] Lazof D B, Goldsmith J G, Rufty T W, Linton R W. Rapid uptake of aluminum into cells of intact soybean root tips: A microanalytical study using secondary ion mass spectrometry. *Plant Physiol*, 1994, 106: 1107–1114

- [26] Jones D L, Kochian L V. Aluminum inhibition of 1,4,5-trisphosphate signal transduction pathway in wheat roots: A role in aluminum toxicity? *Plant Cell*, 1995, 7: 1913–1922
- [27] Larsen P B, Degenhardt J, Tai C Y, Stenzler L M, Howell S H, Kochian L V. Aluminum-resistant Arabidopsis mutants that exhibit altered patterns of aluminum accumulation and organic acid release from roots. *Plant Physiol*, 1998, 117: 9–17
- [28] Hu L(胡蕾), Ying X-F(应小芳), Liu P(刘鹏), Xu G-D(徐根娣), Zhu S-L(朱申龙). The effect of agriculture characters of soybean to aluminum. *J Zhejiang Agric Sci* (浙江农业科学), 2004, (3): 148–150 (in Chinese with English abstract)
- [29] Liu P(刘鹏), Yang Y-S(杨悦锁), Xu G-D(徐根娣), Zhu S-L(朱申龙). The effect of aluminum stress on morphological and physiological characteristics of soybean root of seedling. *Chin J Oil Crop Sci* (中国油料作物学报), 2004, 26(4): 49–54(in Chinese with English abstract)
- [30] Liao H(廖红), Yan X-L(严小龙). Adaptive change and genotypic variation for root architecture of common bean in response to phosphorus deficiency. *Acta Bot Sin* (植物学报), 2000, 42(2): 158–163 (in Chinese with English abstract)
- [31] Yang Q(杨庆), Jin H-B(金华斌). The effect of aluminum stress on N, P and Ca absorption of peanut varieties. *Chin J Oil Crop Sci* (中国油料作物学报), 2000, 22(2): 68–73 (in Chinese with English abstract)
- [32] Zheng S J, Yang J L, He Y F, Yu X H, Zhang L, You J F, Shen R F, Matsumoto H. Immobilization of aluminum with phosphorus in roots is associated with high aluminum resistance in buckwheat. *Plant Physiol*, 2005, 138: 297–303
- [33] Liao H, Wan H Y, Shaff J, Wang X R, Yan X L, Kochian L V. Phosphorus and aluminum interactions in soybean in relation to aluminum tolerance. Exudation of specific organic acids from different regions of the intact root system. *Plant Physiol*, 2006, 141: 674–684
- [34] Gaume A, Machler F, Frossard E. Aluminum resistance in two cultivars of *Zea mays* L.: Root exudation of organic acids and influence of phosphorous nutrition. *Plant Soil*, 2001, 234: 73–81