

# 缺磷白羽扇豆根系分泌物收集方法的比较研究\*

田中民<sup>1</sup>, 秦芳玲<sup>2</sup>, 王 波<sup>1</sup>

(1 西安交通大学 生命科学与技术学院, 陕西 西安 710049; 2 西安石油大学 化学化工系, 陕西 西安 710065)

**[摘 要]** 用高效液相色谱法研究了根系分泌物原位收集法和溶液培养收集法在分析缺磷白羽扇豆(*Lupinus albus* L.) 幼苗根系分泌有机酸时的优劣性, 同时分析了相应根组织、木质部伤流液和韧皮部汁液中有机的种类和数量。结果表明: 2 种收集方法所获得的有机酸种类和数量并不完全相同。原位收集法能获得白羽扇豆不同根段分泌有机酸的状况, 即排根主要分泌苹果酸、柠檬酸和反丁烯二酸, 根尖主要分泌苹果酸、乳酸、反丁烯二酸, 且所反映的有机酸分泌状况与相应根组织以及木质部伤流液中有机的种类和变化趋势基本一致。溶液培养收集法可获得白羽扇豆整个根系分泌有机酸的状况, 在其根系收集液中含有酒石酸、苹果酸、乳酸、顺丁烯二酸、柠檬酸、反丁烯二酸, 但该方法在根系分泌物的收集过程中不可避免地引入了去离子水对根系的胁迫作用, 增加了微生物的污染环节。

**[关键词]** 白羽扇豆; 有机酸; 原位收集法; 溶液培养收集法; 高效液相色谱

**[中图分类号]** S643.01

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2003)04-0154-05

由于根际是一个复杂的微生态环境, 根系分泌物种类繁多, 数量差异大, 既有简单的被动泄漏又有主动的分泌过程, 再加上根系微生物和土壤溶液的作用影响, 所以给根系分泌物的研究带来了极大困难。对根系分泌物的研究已有 100 多年的历史, 微量有机物质的提取、分离和鉴定技术已取得了较大的进展, 但要获得植物根系分泌物的真实情况依然十分困难。Ma 等<sup>[1]</sup>和 Shen<sup>[2]</sup>用收集根洗液的方法分析根系分泌物, 该法能反映整个根系的分泌状况, 但不能反映根系具体部位的分泌特征, 所获得的分泌物成分复杂, 不便于比较研究。Tang<sup>[3]</sup>应用吸附树脂膜的方法研究根系分泌物中的化感物质, 但此方法不适于从土培试验中提取根系分泌物, 也不适于根系分泌物的定位分析。本试验以白羽扇豆为材料, 在液体培养条件下分别采用溶液培养收集法和滤纸片原位收集法获取白羽扇豆根系分泌物, 同时收集其相应根组织及茎伤流液, 通过用高效液相色谱法分析根系分泌物、相应根组织及茎伤流液中有机的种类和数量, 以确定白羽扇豆根系分泌有机酸的真实状况, 并对 2 种收集方法在根系分泌物研究中的优劣性予以比较。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料培养

挑选大小一致的白羽扇豆(*Lupinus albus* L.

cv. Amiga, Suedwestdeutsche Saat-zucht, Rastat, Germany) 种子, 在体积分数 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中浸泡 30 min 进行表面消毒, 而后用清水洗净, 置于用饱和 CaSO<sub>4</sub> 溶液浸泡过的纱布上催芽。待种子露白后, 播入用 CaSO<sub>4</sub> 溶液浸泡过的石英砂中。等到两片叶子完全展开后, 移入通气的营养液中。幼苗分缺磷处理和供磷对照 2 组。在缺磷处理的第 17 天进行根系分泌物的收集。

幼苗在人工培养室中生长, 营养液 pH 为 6.2, 每 3 d 更换 1 次, 生长期维持温度 18~26℃, 光照时间为 14 h/d, 光照强度为 18 000~21 000 lx。营养液组成参见文献[4]。

### 1.2 白羽扇豆根系分泌物的收集及根组织中有机的提取

**1.2.1 原位收集法** 在白羽扇豆缺磷培养的第 17 天, 分别用滤纸片原位收集法收集根尖和排根组织分泌的有机酸, 同时切取相应的根尖(1 cm)和排根组织(0.5 cm)各 0.1 g 在液氮中保存。根尖和根组织样品在测定前加 1 mL 50 mL/L 磷酸溶液匀浆, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 稀释 10 倍后分析有机酸的种类和数量。

原位收集法<sup>[5]</sup>具体操作程序: 准备直径为 5 mm 的层析滤纸片若干, 用甲醇清洗 3 次, 再用重蒸水清洗 3 次, 在无菌条件下晾干备用。收集时从缺磷处理

\* [收稿日期] 2003-01-07

[作者简介] 田中民(1967-), 男, 陕西合阳人, 讲师, 博士, 主要从事植物生理生化研究。

和供磷对照中各挑选 5 株生长一致的幼苗, 先将植物根系在去离子水中清洗数次, 以除去表面的营养液, 然后将根系平放于铺有湿滤纸的瓷盘中, 在每个植株上选取生长相近的 5 个二级侧根, 根尖和排根为收集部位, 在有机酸收集部位(根尖、排根组织)的下方垫上 2 cm × 2 cm 的塑料胶片, 然后再在收集部位根组织的上下方各放 1 个预先处理好的层析滤纸片。其余根段用营养液浸湿的滤纸片覆盖。最后用黑塑料布将整个根系罩住, 在光照下收集 2 h。收集完后, 将每个植株不同部位的滤纸片放入 2.5 mL Ependorf 管中, 每 10 个滤纸片加 300 μL 重蒸水放入液氮中保存。测定前将其溶解, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液用以 HPLC 分析。

1.2.2 溶液培养收集法 白羽扇豆在缺磷条件下培养到第 17 天时, 用收集根洗液的方法收集根系分泌物。以盆为单位(5 株/盆), 首先将植株根系在去离子水中漂洗数次, 然后将植株放入盛有 500 mL 蒸馏水(加少量的微生物抑制剂)的小盆中, 所选器皿和 500 mL 蒸馏水可以使水能够浸没整个根系, 植株在光照下收集 2 h。收集完后, 将收集液在旋转蒸发仪上浓缩至干。浓缩温度 30℃。然后用 10 mL 蒸馏水分 3 次冲洗, 每冲洗 1 次, 用超声波振荡使其充分溶解, 从而得到浓缩的根系分泌物收集液。浓缩液在 12 000 r/min 冷冻离心 10 min, 取上清液用以分析有机酸的种类和数量。

### 1.3 白羽扇豆木质部和韧皮部汁液的收集

白羽扇豆在缺磷条件下培养到第 17 天时, 收集木质部伤流液及韧皮部汁液。木质部伤流液的收集采用薛应龙<sup>[6]</sup>的方法, 在早晨 8:00~10:00 收集 2 h。韧皮部汁液收集采用 King 等<sup>[7]</sup>的方法。木质部伤流液和韧皮部汁液在 HPLC 测定前均稀释 10 倍。

### 1.4 有机酸的 HPLC 分析

有机酸分离条件见文献[8]。有机酸标准样品的配制: 分别称取草酸 5.0 mg, 苹果酸 10.0 mg, 乳酸 0.01 mL, 乙酸 0.02 mL, 柠檬酸 10.0 mg, 丁二酸 20.0 mg, 反丁烯二酸 1.0 mg, 顺丁烯二酸 1.0 mg, 用 pH 2.25 的 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲溶液溶解于 100 mL 的容量瓶中。取各自的母液进行混合, 反丁烯二酸和顺丁烯二酸稀释 100 倍, 其余各酸均稀释 10 倍作为有机酸标准溶液。在每次样品测定前, 均用此溶液作标准曲线。每测定 10 个样品加测 1 次标准样品。对于不易确定的有机酸吸收峰, 用以上单个标准样品做内标法鉴定, 或用改变流动相 pH 值和流速

的方法进一步确认。

## 2 结果与分析

### 2.1 溶液培养收集法收集的白羽扇豆根系分泌有机酸的种类和数量

用溶液培养收集法收集白羽扇豆根系分泌有机酸的结果表明: 白羽扇豆根系分泌的有机酸主要为酒石酸、苹果酸、乳酸、顺丁烯二酸、柠檬酸和反丁烯二酸。缺磷处理白羽扇豆的根系除分泌以上几种有机酸外, 还分泌丁二酸。从分泌量来看, 缺磷处理白羽扇豆根系分泌物中乳酸和柠檬酸的量均高于供磷对照(图 1)。

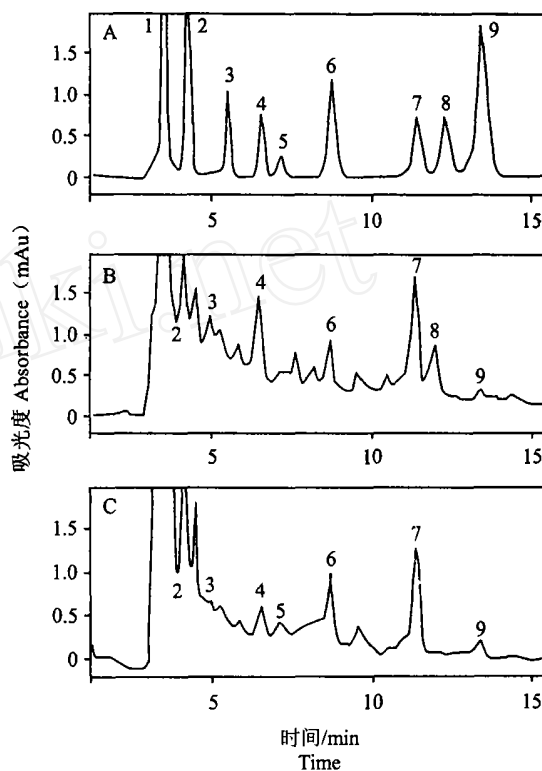


图 1 溶液培养收集法收集的白羽扇豆全根系分泌有机酸的种类和数量

A. 有机酸标准样品; B. 缺磷培养; C. 供磷培养;  
1. 草酸; 2. 酒石酸; 3. 苹果酸; 4. 乳酸; 5. 乙酸;  
6. 顺丁烯二酸; 7. 柠檬酸; 8. 丁二酸; 9. 反丁烯二酸

Fig. 1 The kinds and quantities of organic acids exuded from the whole root system after the white lupine had been stressed by phosphorus deficiency for 17 days

A. The standard sample; B. The sample without P supplied; C. The sample with P supplied  
1. Oxalic acid; 2. Tartaric acid; 3. Malic acid;  
4. Lactic acid; 5. Acetic acid; 6. Maleic acid;  
7. Citric acid; 8. Succinic acid; 9. Fumaric acid

## 2.2 原位收集法收集的白羽扇豆根尖和排根分泌有机酸的种类和数量

用原位收集法分别收集白羽扇豆根尖和排根区分泌的有机酸,其分析结果(图 2)表明:缺磷处理白羽扇豆的排根主要分泌柠檬酸、苹果酸和反丁烯二

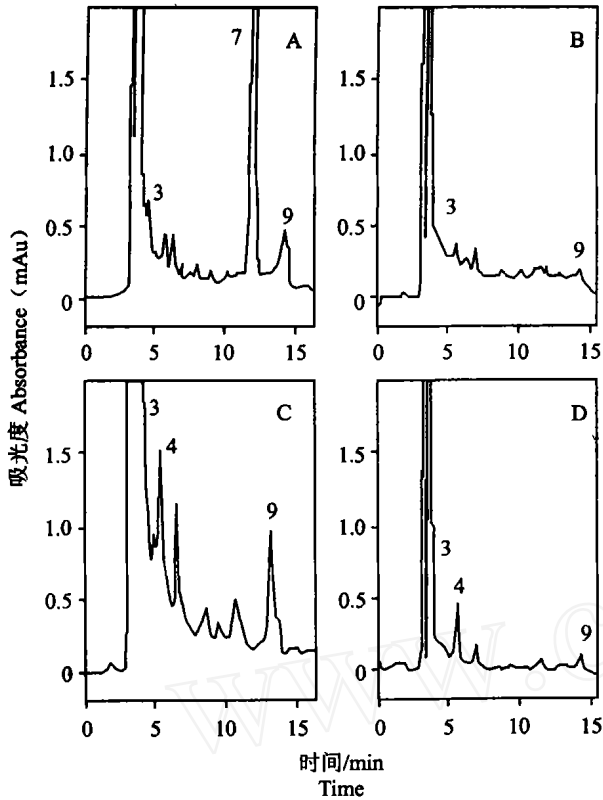


图 2 原位收集法收集的白羽扇豆根尖和排根分泌有机酸的种类和数量

A. 缺磷排根; B. 供磷排根; C. 缺磷根尖; D. 供磷根尖  
3 苹果酸; 4 乳酸; 7 柠檬酸; 9 反丁烯二酸

Fig 2 The kinds and quantities of organic acids exuded from the root tips and the segments of proteoid roots after the white lupine had been stressed by phosphorus deficiency for 17 days

A. The proteoid roots without P supplied;  
B. The proteoid roots with P supplied;  
C. The root tips without P supplied;  
D. The root tips with P supplied  
3 Malic acid; 4 Lactic acid;  
7 Citric acid; 9 Fumaric acid

## 2.3 白羽扇豆根尖和排根组织中有机酸的种类和数量

对白羽扇豆根组织中有机酸的分析结果(图 3)表明,排根组织中的有机酸主要为乳酸、苹果酸、柠檬酸和反丁烯二酸,且缺磷处理的白羽扇豆排根组织中苹果酸和柠檬酸的含量均高于供磷处理。白羽扇豆根尖和排根中有机酸种类基本相同,但缺磷处理白羽扇豆根尖的苹果酸和反丁烯二酸的含量均高

于其供磷对照。且柠檬酸和反丁烯二酸的分泌量明显高于对应供磷植株排根的分泌量。缺磷处理白羽扇豆的根尖主要分泌苹果酸、乳酸、反丁烯二酸,且分泌量均明显高于对应供磷植株根尖相应有机酸的分泌量。

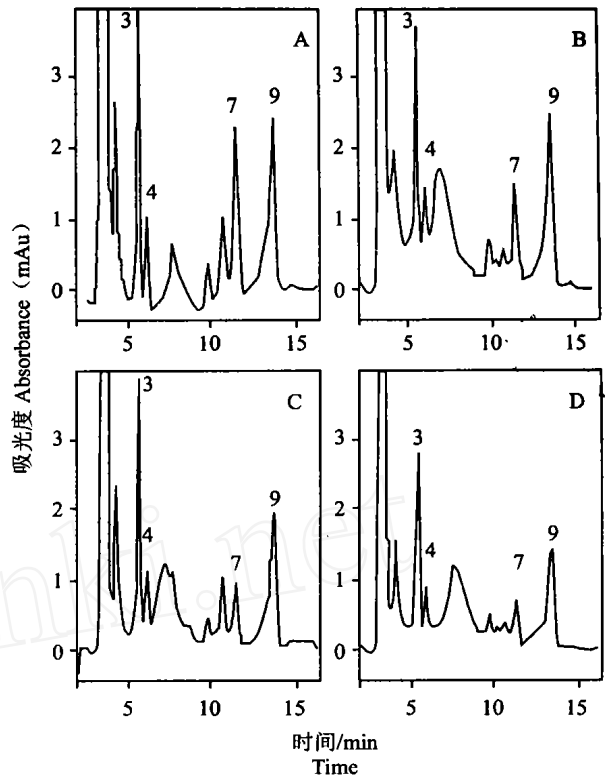


图 3 白羽扇豆培养 17 d 时根系不同组织中有机酸的种类和数量

A. 缺磷排根; B. 供磷排根; C. 缺磷根尖; D. 供磷根尖  
3 苹果酸; 4 乳酸; 7 柠檬酸; 9 反丁烯二酸

Fig 3 The kinds and quantities of organic acids in the root system of the white lupine in deficient phosphorus culture for 17 days

A. The proteoid roots without P supplied;  
B. The proteoid roots with P supplied;  
C. The root tips without P supplied;  
D. The root tips with P supplied  
3 Malic acid; 4 Lactic acid;  
7 Citric acid; 9 Fumaric acid

于其供磷对照。

## 2.4 白羽扇豆木质部伤流液及韧皮部汁液中有机酸的种类和数量

在缺磷处理到第 17 天时,白羽扇豆木质部伤流液中含有大量的苹果酸、柠檬酸和反丁烯二酸,且其含量均明显高于供磷处理。白羽扇豆韧皮部汁液中检测出 6 种未知物,但除苹果酸外,其余 5 种均为未知(图 4)。

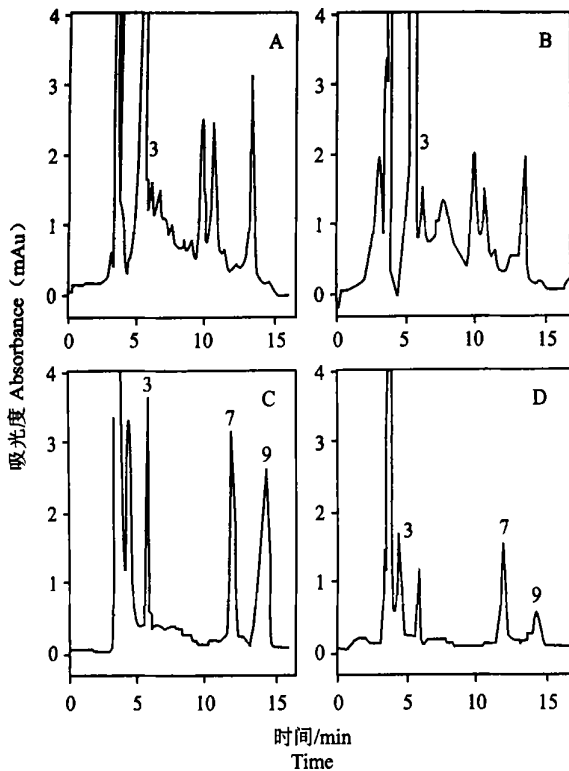


图4 白羽扇豆韧皮部汁液和木质部  
伤流液中有机酸的种类和数量  
A. 缺磷韧皮部汁液; B. 供磷韧皮部汁液;  
C. 缺磷木质部汁液; D. 供磷木质部汁液  
3 苹果酸; 7. 柠檬酸; 9 反丁烯二酸

Fig 4 The kinds and quantities of organic acids  
in white lupine xylem exudates and phloem sap

- A. The phloem sap without P supplied;  
B. The phloem sap with P supplied;  
C. The xylem exudates without P supplied;  
D. The xylem exudates with P supplied  
3 Malic acid; 7. Citric acid; 9. Fumaric acid

### 3 讨论

本研究结果表明,用原位收集法和溶液培养收集法所收集的缺磷白羽扇豆根系所分泌的有机酸种类差别很大。用溶液培养收集法所收集的有机酸主要为乳酸、顺丁烯二酸、柠檬酸和丁二酸,而用原位收集法所收集的白羽扇豆根尖、排根分泌的有机酸

则以苹果酸、柠檬酸和反丁烯二酸为主。就根系分泌物中有机酸的来源讲,根外分泌的有机酸主要来自根细胞内三羧酸循环中形成的有机酸。Keith等<sup>[9]</sup>证明,光合作用所固定的碳0.1%~10%在24h内以根系分泌物的形式释放到根际。Prikryl等<sup>[10]</sup>认为,小麦根系分泌物的释放和根的生长状况密切相关,一旦根系停止生长,几乎没有根系分泌物的产生。根系分泌物量的多少还与植物的代谢强弱密切相关,白天光合作用强,代谢旺盛,根系分泌物的量也多。因此,根系分泌物中的有机酸也应该能在相应的根组织细胞中检测到。本研究结果表明,在白羽扇豆的排根组织和根尖细胞中含有苹果酸、柠檬酸、乳酸和反丁烯二酸,不含有酒石酸、顺丁烯二酸和丁二酸。由此可见,用原位收集法收集的有机酸种类与根组织中的有机酸基本相同。另外,由于植物根系在向根外分泌有机酸的同时,根组织中的部分有机酸会随蒸腾进入木质部。所以,根系分泌的有机酸种类应与木质部伤流液中有机酸的种类相一致。本试验中白羽扇豆木质部伤流液中有机酸为苹果酸、柠檬酸和反丁烯二酸,与原位收集法收集的有机酸种类相一致。以上两个方面说明原位收集法能准确反映白羽扇豆不同根段分泌有机酸的真实情况,即缺磷条件下白羽扇豆根系分泌的有机酸为苹果酸、柠檬酸和反丁烯二酸。

从溶液培养收集法的整个收集过程来看,具有操作简单方便,能反映整个根系有机酸的变化状况等优点。不足之处在于不能作局部取样分析,收集时间较长,影响有机酸成分的环节较多,在浓缩过程中大分子质量的有机酸可能分解,小分子质量的有机酸可能挥发。另外,收集时间长使微生物的分解作用增强。而原位收集法则可以作局部收集,收集时间短,污染环节少。因此,从有机酸的分析结果来看,原位收集法的分析结果更接近于根系分泌的真实情况,不足之处在于扰动了根系原有的生长状态。

### [参考文献]

- [1] Ma J F, Zheng S J, Matsumoto H. Specific secretion of citric acid induced by Al stress in *Cassia tora* L. [J]. *Plant Cell Physiol*, 1997, 38: 1019- 1025  
[2] Shen H. Isolation and identification of specific root exudates in elephant grass (*Pennisium* L.) in response to aluminum- and iron-bound phosphates [J]. *J of Plant Nutrition*, 2001, 24(7): 1131- 1144  
[3] Tang C S. Collection and identification of allelopathic compounds from the undisturbed root system of Bigalga limpograss (*Hemarthria altissima*) [J]. *Plant Physiol*, 1982, (69): 155- 160  
[4] 田中民, 李春俭, 王晨, 等. 缺磷白羽扇豆排根与非排根根区根尖分泌的有机酸的比较[J]. *植物生理学报*, 2000, (4): 317- 322  
[5] Neumann G, Massonneau A, Martinioia E. Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in White

- Lupin[J]. *Planta*, 1999, 208: 373- 382
- [6] 薛应龙 植物生理学实验手册[M]. 上海: 上海科技出版社, 1985 65- 66
- [7] King R W, Zeevaart J A D. Enhancement of phloem exudation from cut petioles by chelating agents[J]. *Plant Physiol*, 1974, 53: 96- 103
- [8] 田中民, 李春俭, 王 晨. 子叶磷在白羽扇豆缺磷适应性反应中的作用[J]. *西北植物学报*, 2001, 21(1): 317- 322
- [9] Keith H, Oades J M, Martin J K. Input of carbon to soil from wheat plants [J]. *Soil Biology and Biochem*, 1986, 18(4): 445- 449
- [10] Prikryl Z, Vancura V. Root exudates of plants 4 Wheat root exudation as dependent on growth, contraction gradient of exudates and the presence of bacteria[J]. *Plant Soil*, 1980, (57): 69- 83

## Comparative studies on methods of collecting root exudates from phosphorus deficient white lupin

TIAN Zhong-min<sup>1</sup>, QIN Fang-ling<sup>2</sup>, WANG Bo<sup>1</sup>

(1 School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710049, China;

2 Department of Chemistry and Chemical Engineering, Xi'an Shiyou University, Xi'an, Shaanxi 710065, China)

**Abstract:** The advantages of different root exudates collecting methods were investigated via analysis of HPLC. The seedlings of white lupin were cultured in the phosphorus deficient nutrient solution and the organic acids in the corresponding root tissue were also investigated when root exudates were collected in order to determine the real kinds and quantities of organic acids in the root exudates. The results showed the kinds and quantities of organic acids collected by the two methods were not identical. The methods of localized collection of root exudation can acquire the real kinds and quantities of organic acids excreted from the root and can determine the real site where the organic acids were excreted. The organic acids excreted from the proteoid were malic acid, citric acid and fumaric acid, and the root tips excreted malic acid, lactic acid and fumaric acid. The kinds and tendency of organic acids in the root exudates accord with those in the xylem exudation and corresponding root tissues. The method of bathing root system is advantageous to determine the total quantities of organic acids, which include tartaric acid, malic acid, lactic acid, maleic acid, citric acid, succinic acid, fumaric acid, but it can not avoid the stress of collecting solution and rhizosphere micro-organism pollution.

**Key words:** *Lupinus albus* L.; organic acids; localized collection; bathing root system; HPLC