

网络出版时间:2016-01-08 10:22

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2016.02.021

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20160108.1022.042.html>

铝对黄瓜和黑籽南瓜 RBCs 生理特性的影响

乔永旭

(唐山师范学院 生命科学系,河北 唐山 063000)

[摘要] 【目的】探究黄瓜和黑籽南瓜幼苗根系边缘细胞(Root border cells, RBCs)对铝毒的应答差异,进一步阐明黑籽南瓜对铝的抗性机制,为黑籽南瓜作为黄瓜的砧木提供依据。【方法】以‘津研四号’黄瓜和云南黑籽南瓜种子为试材,采用悬浮培养法,研究了0(对照,CK),50,100和200 $\mu\text{mol/L}$ Al^{3+} 对2种瓜类根畸形率、根长、根鲜质量及RBCs的黏胶层厚度、数目、活率和凋亡率的影响。【结果】与CK相比,随着 Al^{3+} 浓度的增大,黄瓜根的畸形率也随之增大,而黑籽南瓜根畸形率无显著变化;2种瓜类的根长、根鲜质量整体均呈下降趋势,但黄瓜根长、根鲜质量下降幅度较黑籽南瓜明显。随着 Al^{3+} 浓度的增加,2种瓜类RBCs的数目和活率均明显降低,且黄瓜降低幅度较黑籽南瓜明显;而RBCs凋亡率却随着 Al^{3+} 浓度的增加而增大,该现象在黄瓜中较为明显。与CK相比, Al^{3+} 处理明显增加了2种瓜类RBCs的黏胶层厚度,相同 Al^{3+} 浓度下黑籽南瓜RBCs的黏胶层厚度均大于黄瓜。【结论】RBCs能提高植物根系抵御 Al^{3+} 毒害的能力;黑籽南瓜RBCs因具有数目多、凋亡率低和较厚的黏胶层等特性,故其抵御 Al^{3+} 毒害的能力优于黄瓜。

[关键词] 黄瓜;黑籽南瓜;铝;根系边缘细胞

[中图分类号] S642.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2016)02-0151-05

Effects of aluminum on physiological characteristics of root border cells of cucumber and figleaf gourd

QIAO Yong-xu

(Department of Life Science, Tangshan Normal University, Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: 【Objective】 This study explored the different responses of root border cells (RBCs) of cucumber and figleaf gourd seedlings to aluminum toxicity. 【Method】 Changes in root malformation rate, root length, root flesh quality per plant, thickness of mucilage layer of RBCs, number of RBCs, viability of RBCs and apoptosis rate of RBCs in cucumber and figleaf gourd were investigated using floating culture technique with stress of 0 (CK), 50, 100 and 200 $\mu\text{mol/L}$ Al^{3+} . 【Result】 Malformation rate of root and apoptosis rate of RBCs in cucumber seedlings increased with Al^{3+} concentration while that in figleaf gourd changed insignificantly. Root length, root flesh quality per plant, number of RBCs and viability of RBCs of both cucumber and figleaf gourd were inhibited by Al^{3+} and the inhibition in cucumber was more significant. With the increase of Al^{3+} concentration, thicker RBCs mucilage layer was observed in both species and the thickness of figleaf gourd was larger than that of cucumber. 【Conclusion】 RBCs could enhance the resistance against Al^{3+} toxicity. Figleaf gourd seedlings were better because of more number, lower apoptosis rate of RBCs and thicker mucilage layer of RBCs.

Key words: cucumber; figleaf gourd; aluminum; RBCs

[收稿日期] 2015-08-09

[基金项目] 河北省自然科学基金项目(C2015105091);唐山师范学院科学研究基金项目(2013D06)

[作者简介] 乔永旭(1978—),男,山西晋城人,副教授,博士,主要从事植物细胞工程和逆境生理研究。

E-mail: qiaoyx123@163.com

近年来,随着环境污染的加重,酸性土壤面积所占比例越来越高,严重影响了植株正常的生长发育,而铝毒是酸性土壤阻碍作物生长的主要原因。 Al^{3+} 对许多种植物具有毒害作用,诸如水稻、拟南芥和香椿等,且微量的 Al^{3+} 便可抑制多种作物根的生长^[1-4]。周楠等^[5]研究发现, Al^{3+} 可明显抑制黄瓜根的生长,延缓了植株正常的发育,最终降低了黄瓜的产量。黄瓜是我国主要的设施蔬菜,选育耐 Al^{3+} 毒害能力强的品种或砧木是今后重要的研究方向。而关于黄瓜的常用砧木黑籽南瓜对 Al^{3+} 抗性机理的报道尚少,研究黄瓜和黑籽南瓜对于 Al^{3+} 的应答差异,对探索以黑籽南瓜为砧木嫁接黄瓜提高其耐 Al^{3+} 性具有重要的意义。

根系边缘细胞(Root border cells,RBCs)又称为根冠脱落细胞,来源于根冠分生组织,能够合成并向外分泌一系列具有生物活性的化学物质,中和有毒物质,减缓有毒物质对根系的毒害^[6]。Miyasaka等^[7]对菜豆的研究中发现,RBCs在植物抗 Al^{3+} 方面有着重要作用,菜豆在一定程度上能通过改变RBCs活性和黏胶层厚度对 Al^{3+} 毒害做出适应性反应。有研究证明,RBCs可通过细胞程序性死亡来保护或减轻 Al^{3+} 对植物的毒害^[8]。RBCs在抗 Al^{3+} 方面的作用越来越受到人们的重视。本试验选用黄瓜及其常用砧木黑籽南瓜作为材料,进行悬浮培养,探讨 Al^{3+} 对 2 者根系生长及RBCs的数目、活率、黏胶层厚度和凋亡率等的影响,以揭示 2 种瓜类作物对 Al^{3+} 的应答差异。

1 材料与方法

1.1 材 料

“津研四号”黄瓜(*Cucumis sativus*)和黑籽南瓜(*Curubita fici folia*)种子,均由中国农业大学农学与生物技术学院提供。

1.2 试验方法

挑选外形饱满、均匀一致的黄瓜和黑籽南瓜种子,用体积分数 70% 的乙醇溶液消毒 60 s,无菌蒸馏水冲洗 3 次,并浸泡在无菌蒸馏水中 3~4 h,之后转移到 28 ℃ 的培养箱内催芽,待种子露白后进行悬浮培养。

在 1 000 mL 的烧杯中放入 150~200 mL 蒸馏水,将铁丝网固定在烧杯中,滤纸穿孔后置于铁丝网上,将露白的种子播于孔中,每个烧杯内 30 粒种子,共播种于 12 个烧杯中,每 3 个烧杯为 1 个处理,分

别用 0(对照,CK),50,100 和 200 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 溶液(含 0.5 mmol/L CaCl_2 ,pH 4.5)喷施,用塑料薄膜和橡皮筋封口,放到 28 ℃ 培养箱中黑暗培养。每隔 1 h 处理 1 次,培养 24 h 后备用^[9]。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 根畸形率、根长和根鲜质量 选取 30 个处理好的根尖,统计根畸形率,根畸形率=畸形根个数/根总数 $\times 100\%$ 。并挑选 9 个均匀一致的根尖浸入盛有 100 μL 蒸馏水的 200 μL 离心管中 60 s,并用软管轻微搅拌以便释放大量的 RBCs,制备细胞悬浮液,并将去除 RBCs 的根尖切下,测量根长和根鲜质量。

1.3.2 RBCs 数目和活率 取 40 μL RBCs 细胞悬浮液于离心管中,加入 4 μL 0.5% 台盼蓝溶液染色,10 min 后取 10 μL 溶液于血细胞计数板上,盖片,在光学显微镜下统计 RBCs 数目和活率。RBCs 活率=活细胞/总的 RBCs $\times 100\%$ 。

1.3.3 RBCs 黏胶层厚度 取上述制备的 RBCs 细胞悬浮液 10 μL 于载玻片上,再取等体积的墨水混合,盖片,置于光学显微镜下观测。测量 3 个不同位置的黏胶层厚度,取其平均值^[10]。

1.3.4 RBCs 凋亡率 将获得的 RBCs 悬浮液静止 2 h,弃去蒸馏水,加入少许体积分数 95% 乙醇,再用 pH 6.0 的磷酸缓冲液冲洗 2~3 次。取细胞悬浮液与 Hoechst-33258 染液(10 $\mu\text{g/mL}$)以 1:1 体积比混合,5 min 后用荧光显微镜(OLYMPUS BX51)统计 RBCs 凋亡率。RBCs 凋亡率=凋亡的 RBCs/总的 RBCs $\times 100\%$ ^[10]。

1.4 数据统计及分析

所有数据均重复 3 次,采用“平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)”表示,试验中的数据均经过 $P=5\%$ 水平上的 Tukey 检验,应用 Microsoft Excel 2010 进行图表绘制。

2 结果与分析

2.1 Al^{3+} 对黄瓜和黑籽南瓜根畸形率的影响

由图 1 可知,高浓度 Al^{3+} 能增加 2 种瓜类根系的畸形率,黄瓜根畸形率的增加幅度明显大于黑籽南瓜。与 CK 相比,50 $\mu\text{mol/L}$ Al^{3+} 处理后,黄瓜根畸形率增加不显著;100 和 200 $\mu\text{mol/L}$ Al^{3+} 处理后,黄瓜的根畸形率分别增加了 42.3% 和 61.1%,且与 CK 差异显著。随着 Al^{3+} 浓度的增加,黑籽南瓜根畸形率略有增加,但与 CK 无显著差异。

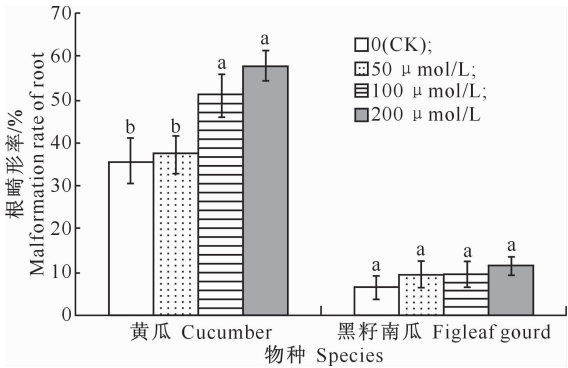


图 1 Al^{3+} 对黄瓜和黑籽南瓜根畸形率的影响
图柱上标不同小写字母表示同一物种不同
处理间差异显著($P<0.05$)。下图同

Fig. 1 Effects of Al^{3+} on malformation rate of
root in cucumber and figleaf gourd seedlings
Different small letters above column mean significant
difference between treatments($P<0.05$). The same below

2.2 Al^{3+} 对黄瓜和黑籽南瓜根长及根鲜质量的影响

由图 2 可知,与 CK 相比,50 和 100 $\mu\text{mol/L}$

Al^{3+} 对 2 种瓜类根长和根鲜质量的抑制程度不显著;200 $\mu\text{mol/L}$ Al^{3+} 处理后,黄瓜的根长和根鲜质量分别显著降低了 24.5% 和 28.8%,黑籽南瓜则无显著变化。可知高浓度 Al^{3+} 更能抑制黄瓜根长和根鲜质量,黑籽南瓜受到的抑制不明显。

2.3 Al^{3+} 对黄瓜和黑籽南瓜 RBCs 数目及存活率的影响

由图 3 可知,随着 Al^{3+} 浓度的增加,黄瓜和黑籽南瓜 RBCs 的数目和活率均呈下降趋势,其中黄瓜 RBCs 数目和活率受到的抑制程度高于黑籽南瓜。与 CK 相比,低浓度(50 $\mu\text{mol/L}$) Al^{3+} 对黄瓜的 RBCs 数目和活率抑制作用不显著;100 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 Al^{3+} 处理后,黄瓜 RBCs 的数目和活率显著降低。与 CK 相比,50~200 $\mu\text{mol/L}$ Al^{3+} 处理后黑籽南瓜 RBCs 的数目无显著变化。与 CK 相比,50~100 $\mu\text{mol/L}$ Al^{3+} 处理后,黑籽南瓜 RBCs 活率无显著变化;200 $\mu\text{mol/L}$ Al^{3+} 处理后 RBCs 活率显著降低。

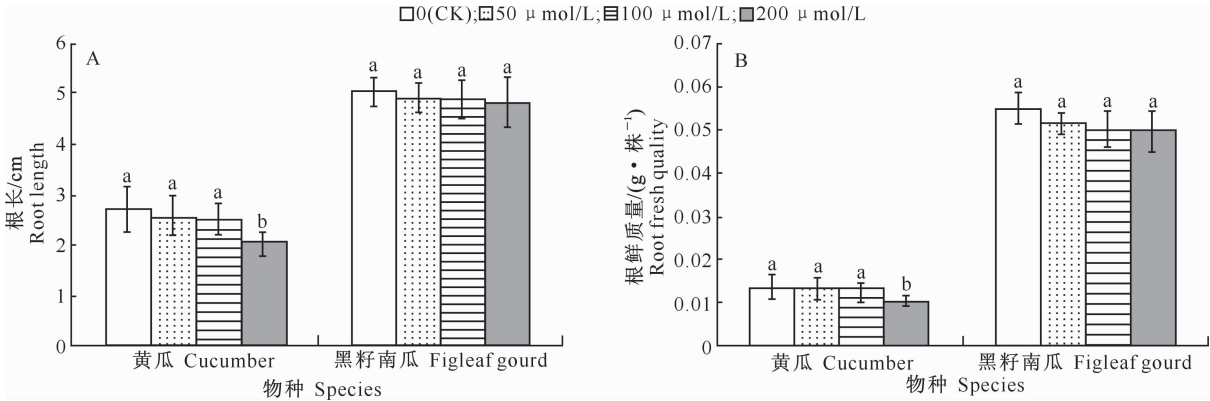


图 2 Al^{3+} 对黄瓜和黑籽南瓜根长(A)和根鲜质量(B)的影响

Fig. 2 Effects of Al^{3+} on root length (A) and root fresh quality (B) in cucumber and figleaf gourd seedlings

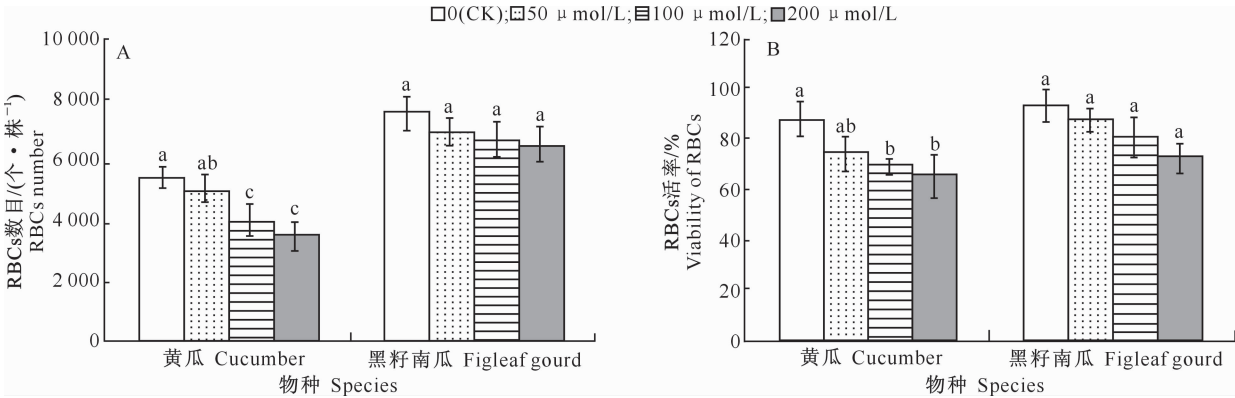


图 3 Al^{3+} 对黄瓜和黑籽南瓜 RBCs 数目(A)和活率(B)的影响

Fig. 3 Effects of Al^{3+} on the number (A) and viability of RBCs (B) in
cucumber and figleaf gourd seedlings

2.4 Al³⁺对黄瓜和黑籽南瓜 RBCs 黏胶层厚度的影响

由图 4 和图 5 可知,50 μmol/L Al³⁺ 处理后,2 种瓜类 RBCs 的黏胶层厚度较 CK 增加不显著;100 和 200 μmol/L Al³⁺ 处理后,黄瓜 RBCs 的黏胶层厚

度分别增加了 27.1%和 47.4%,黑籽南瓜 RBCs 黏胶层厚度增加幅度较黄瓜更明显,分别达到了 29.1%和 58.6%。表明高浓度(100~200 μmol/L) Al³⁺ 更能增加 RBCs 黏胶层厚度,黑籽南瓜 RBCs 黏胶层厚度的增加幅度高于黄瓜。

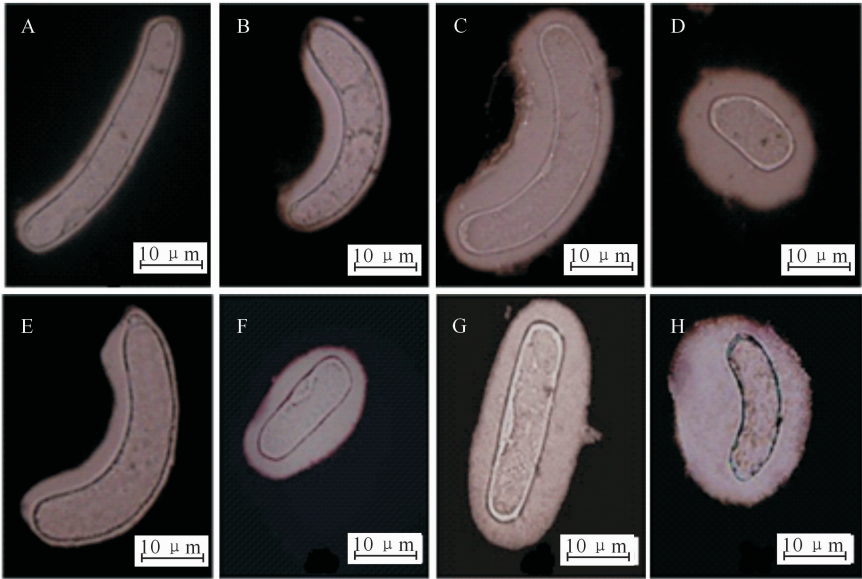


图 4 Al³⁺ 处理后黄瓜和黑籽南瓜 RBCs 的黏胶层
A~D. 黄瓜;E~H. 黑籽南瓜;A、E. 0 μmol/L Al³⁺;B、F. 50 μmol/L Al³⁺;
C、G. 100 μmol/L Al³⁺;D、H. 200 μmol/L Al³⁺
Fig. 4 Mucilage layer of RBCs in cucumber and figleaf gourd seedlings treated with Al³⁺
A~D. Cucumber;E~H. Figleaf gourd;A、E. 0 μmol/L Al³⁺;B、F. 50 μmol/L Al³⁺;
C、G. 100 μmol/L Al³⁺; D、H. 200 μmol/L Al³⁺

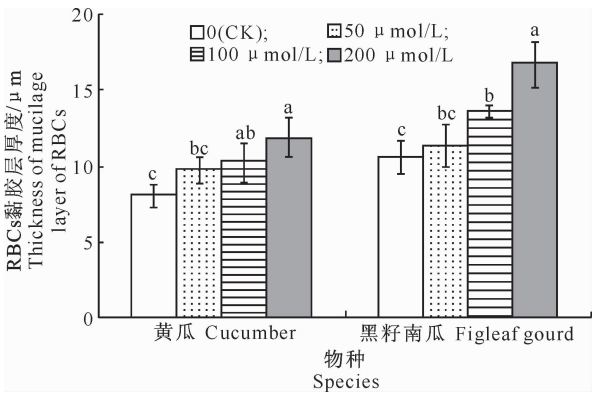


图 5 Al³⁺对黄瓜和黑籽南瓜 RBCs 黏胶层厚度的影响

Fig. 5 Effects of Al³⁺ on thickness of mucilage layer of RBCs in cucumber and figleaf gourd seedlings

2.5 Al³⁺对黄瓜和黑籽南瓜 RBCs 凋亡率的影响

由图 6 可知,正常 RBCs 的细胞核外形较小,轮廓较圆,且质地一致,呈现蓝色的点状;凋亡 RBCs 的细胞核则呈现出弥散现象,外形变大,轮廓不清晰,质地明暗交替,降解为蓝色的凋亡片段。

由图 7 可知,50 μmol/L Al³⁺ 处理后,2 种瓜类 RBCs 凋亡率较 CK 均无显著变化,100 μmol/L Al³⁺ 显著增加了黄瓜 RBCs 凋亡率,但对黑籽南瓜 RBCs 凋亡率影响不显著;200 μmol/L Al³⁺ 则显著增加了 2 种瓜类 RBCs 的凋亡率。表明高浓度 Al³⁺ 更能增加 RBCs 的凋亡率,同等浓度的 Al³⁺ 诱导黄瓜 RBCs 的凋亡率高于黑籽南瓜。

3 讨论

在高度风化的酸性土壤中,Al³⁺ 是限制作物生长和矿质元素吸收而导致减产的一个主要胁迫因子,它可以抑制植物细胞的分裂、伸长,引起细胞畸变,致使细胞活性下降甚至死亡^[11-13]。Radmer 等^[11]研究发现,Al³⁺ 能在短时间内抑制燕麦根的伸长,可将根长作为测定 Al³⁺ 伤害的重要指标。Cai 等^[1]认为,作物品种之间对 Al³⁺ 的耐受性存在差异,本试验也证实了该现象。本试验发现,200 μmol/L Al³⁺ 显著抑制黄瓜的根长和根鲜质量,增

加了根畸形率,但 Al^{3+} 对黑籽南瓜根系生长的影响不显著。 Al^{3+} 对不同物种毒害的差异性,与物种的特性有关。由此推测,在富含 Al^{3+} 的土壤中,以黑籽南瓜为砧木嫁接黄瓜,能减轻 Al^{3+} 对黄瓜的毒害,有助于保持黄瓜的产量和品质。关于植株耐 Al^{3+} 的机制有诸多报道,周楠等^[5]发现,RBCs 具有减缓 Al^{3+} 毒害黄瓜植株的能力, Al^{3+} 胁迫下黄瓜 RBCs 的果胶甲基酯酶活性提高,使细胞壁的果胶去甲基化,增加了 Al^{3+} 的结合位点,从而避免更多的 Al^{3+} 进入细胞内,造成对植株的伤害。Wen 等^[14]和 Hawes 等^[15]认为,自从根尖分离后 RBCs 向外分泌一系列糖类、小分子蛋白、过氧化物酶等化学物质,这些物质包围在 RBCs 周围形成一层具有

保护作用的黏胶层,从而减缓有毒物质对根尖组织的伤害。本试验也证实了 RBCs 具有缓解 Al^{3+} 毒害植株根系的能力,并且随着 Al^{3+} 浓度的增加,2 种瓜类 RBCs 的数目和活率均降低,其中黄瓜降低幅度更明显,可能是由于 RBCs 受到了 Al^{3+} 的直接毒害,导致细胞分裂受阻和部分细胞死亡,从而减缓了 Al^{3+} 对根尖的直接伤害;此外 2 种瓜类 RBCs 的黏胶层厚度却在 Al^{3+} 毒害下均有明显增加,其中黑籽南瓜的增加幅度更明显,因为黏胶层是保护细胞的结构物质,黑籽南瓜的 RBCs 抵御 Al^{3+} 毒害的能力强于黄瓜,由此也进一步解释了 Al^{3+} 对黑籽南瓜根系生长的影响小于黄瓜的原因。

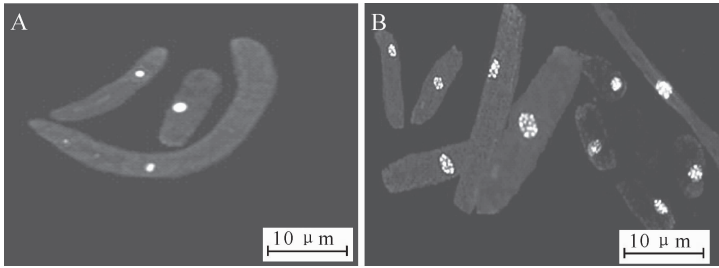


图 6 Hoechst-33258 染色的正常(A)和凋亡(B)的 RBCs
Fig. 6 Normal (A) and apoptosis (B) RBCs dyed by hoechst-33258

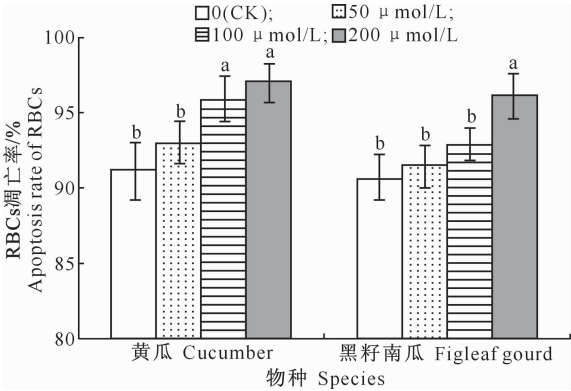


图 7 Al^{3+} 对黄瓜和黑籽南瓜 RBCs 凋亡率的影响
Fig. 7 Effects of Al^{3+} on apoptosis rate of RBCs in cucumber and figleaf gourd seedlings

冯英明等^[16]研究表明, Al^{3+} 毒害对豌豆 RBCs 有致死效应,但致死的生理机制不清楚,本试验中 Al^{3+} 毒害引起了黄瓜和黑籽南瓜 RBCs 的细胞核出现弥散现象,RBCs 凋亡率增加,最终引起了 RBCs 的死亡。由于黑籽南瓜 RBCs 的黏胶层较厚,抵御 Al^{3+} 毒害的能力较强,其 RBCs 的凋亡率低于黄瓜,RBCs 的致死率自然低于黄瓜。黑籽南瓜抵御 Al^{3+} 毒害的能力优于黄瓜,为在富集 Al^{3+} 的土壤中以黑

籽南瓜为砧木推广嫁接黄瓜提供了理论依据。

[参考文献]

[1] Cai M Z,Zhang S N,Xing C H,et al. Developmental characteristics and aluminum resistance of root border cells in rice seedlings [J]. Plant Science,2011,180:702-708.
[2] Rehmus A,Bigalke M,Valarezo C,et al. Aluminum toxicity to tropical montane forest tree seedlings in southern Ecuador;Response of nutrient status to elevated Al concentrations [J]. Plant Soil,2015,388:87-97.
[3] Ruiz-Herrera L F,López-Bucio J. Aluminum induces low phosphate adaptive responses and modulates primary and lateral root growth by differentially affecting auxin signaling in *Arabidopsis* seedlings [J]. Plant Soil,2013,371:593-609.
[4] Arunakumara K K I U,Walpole B C,Yoon M H. Aluminum toxicity and tolerance mechanism in cereals and legumes:A review [J]. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry,2013,56:1-9.
[5] 周楠,陈文荣,刘鹏,等. 黄瓜根边缘细胞特性及其对铝的响应 [J]. 园艺学报,2006,33(5):1117-1120.
Zhou N,Chen W R,Liu P,et al. Biological characteristic and the response to aluminum toxicity of cucumber border cells [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2006, 33 (5): 1117-1120. (in Chinese)

[25]

Hajibabaei M,Janzen D H,Burns J M,et al. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2006,103(4):968-971.

[26]

Aliabadian M,Kaboli M,Nijman V,et al. Molecular identification of birds;Performance of distance-based DNA barcoding in three genes to delimit parapatric species [J]. PLoS One,2009,4(1):e4119.

[27]

Hebert P D N,Stoeckle M Y,Zemlak T S,et al. Identification of birds through DNA barcodes [J]. PLoS Biology,2004b,2(10):e312.

[28]

朱振华,叶 辉,张智英. 基于 mtDNA Cytb 的六种果实蝇的分子鉴定 [J]. 昆虫学报,2005,48(3):386-390.
Zhu Z H,Ye H,Zhang Z Y. Molecular identification of six *Bactrocera* species (Diptera: Tephritidae) based on mtDNA [J]. Acta Entomologica Sinica,2005,48(3):386-390. (in Chinese)

(上接第 155 页)

[6]

Cai M Z,Wang N,Xing C H,et al. Immobilization of aluminum with mucilage secreted by root cap and root border cells is related to aluminum resistance in *Glycine max* L. [J]. Environmental Science and Pollution Research,2013,20:8924-8933.

[7]

Miyasaka S C,Hawes M C. Possible role of root border cells in detection and avoidance of aluminum toxicity [J]. Plant Physiology,2001,125:1978-1987.

[8]

Hassan H A,Kim S J,Jung A Y,et al. Biosorptive capacity of Cd(Ⅱ) and Cu(Ⅱ) by lyophilized cells of *Pseudomonas stutzeri* [J]. Journal of General and Applied Microbiology,2009,55:27-34.

[9]

Qiao Y X,Zhang Y P,Zhang H X,et al. Developmental characteristics and cinnamic acid resistance of root border cells in cucumber and figleaf gourd seedlings [J]. Journal of Intergrative Agriculture,2013,12(11):2065-2073.

[10]

乔永旭. 黄瓜和黑籽南瓜幼苗根系边缘细胞对肉桂酸胁迫的应答差异 [J]. 园艺学报,2015,42(5):890-896.
Qiao Y X. Studies on different response of cinnamic acid to root border cells in cucumber and figleaf gourd seedlings [J]. Acta Horticulturae Sinica,2015,42(5):890-896. (in Chinese)

[11]

Radmer L,Tesfaye M,Somers D A,et al. Aluminum resistance mechanisms in oat (*Avena sativa* L.) [J]. Plant Soil,2012,351:121-134.

[12]

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,2011,105:966-971.

[13]

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-Zeitschrift fur Pflanzenernahru,2009,172:528-534.

[14]

Wen F,VanEtten H D,Tsapraillis G,et al. Extracellular proteins in pea root tip and border cell exudates [J]. Plant Physiology,2007,143:773-783.

[15]

Hawes M C,Curlango-Rivera G,Xiong Z G,et al. Roles of root border cells in plant defense and regulation of rhizosphere microbial populations by extracellular DNA ‘trapping’ [J]. Plant Soil,2012,355:1-16.

[16]

冯英明,喻 敏,温海洋,等. 铝对豌豆根边缘细胞存活率和黏胶层厚度的影响 [J]. 生态环境,2005,14(5):695-699.
Feng Y M,Yu M,Wen H Y,et al. Influence of Al on cell viability and mucilage of root border cells of pea (*Pisum sativum*) [J]. Ecology and Environment,2005,14(5):695-699. (in Chinese)