

## 外源 IAA 增强丹波黑大豆抗铝性的生理机制

王 平, 陈东杰, 李昆志, 陈丽梅, 陈宣钦, 年洪娟, 陈 奇\*

(昆明理工大学 生物工程技术研究中心, 昆明 650500)

**摘 要:**以铝耐受型丹波黑大豆(RB)幼苗为供试材料,考察了不同浓度铝胁迫下添加外源 IAA 对 RB 根尖内源 IAA、 $H_2O_2$ 、MDA、铝含量、柠檬酸分泌量以及质膜  $H^+$ -ATPase 活性的影响,探讨外源 IAA 增强 RB 抗铝能力的生理机制。结果显示:(1)经 25、50 和 200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{AlCl}_3$  胁迫处理 24 h 后, RB 根尖 IAA 含量、柠檬酸分泌量和质膜  $H^+$ -ATPase 活性均表现为先上升后下降的趋势,而  $H_2O_2$ 、MDA 和根尖铝含量却随着铝处理浓度的增加呈显著上升趋势。(2)与单独 25、50 和 200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{AlCl}_3$  胁迫处理相比,添加 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  外源 IAA 后使得 RB 根尖铝、MDA 和  $H_2O_2$  含量均显著降低,同时使 RB 根尖柠檬酸分泌量分别相应增加到单独处理的 2.39、1.73 和 6.85 倍,且其相应的质膜  $H^+$ -ATPase 活性也增加了 1.09、1.74 和 1.45 倍。研究表明,外源 IAA 能通过增强丹波黑大豆根尖柠檬酸的分泌量和质膜  $H^+$ -ATPase 活性来提高其对铝胁迫的抗性,明显缓解铝毒害作用。

**关键词:**黑大豆;IAA;铝胁迫;柠檬酸;质膜  $H^+$ -ATPase

中图分类号:Q945.78

文献标志码:A

## Physiological Mechanism of Exogenous IAA Increasing Aluminum Resistance of Tamba Black Soybean

WANG Ping, CHEN Dongjie, LI Kunzhi, CHEN Limei, CHEN Xuanqin, NIAN Hongjuan, CHEN Qi\*

(Biotechnology Research Center, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

**Abstract:** In this study, the Tamba Black soybean (RB) was used as the experimental material to analysis the physiological mechanism of exogenous IAA increasing Al resistance by investigation the effect of exogenous IAA on the contents of endogenous IAA,  $H_2O_2$ , MDA, Al, citrate exudation and the activities of the plasma membrane (PM)  $H^+$ -ATPase under Al stress. The results showed that after exposure to 25, 50 and 200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{AlCl}_3$  for 24 h, the contents of endogenous IAA, citrate exudation and the activities of the PM  $H^+$ -ATPase in RB roots were firstly promoted, then decreased. However, the contents of  $H_2O_2$  and MDA were increased significantly with Al concentrations increasing. Additionally, the contents of Al, MDA and  $H_2O_2$  in RB roots were significantly decreased while 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA was added to 25, 50 and 200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Al treatment solutions. Furthermore, the citrate exudation increased approximately 2.39, 1.73 and 6.85-fold and the activities of the PM  $H^+$ -ATPase enhanced approximately 1.09, 1.74 and 1.45-fold than that of only Al treatment in RB roots, respectively. Taken together, our results indicated that exogenous application of IAA significantly enhanced Al resistance of RB by enhancement of citrate exudation and the PM  $H^+$ -ATPase activity under Al stress.

**Key words:** black soybean; IAA; aluminum stress; citric acid; plasma membrane (PM)  $H^+$ -ATPase

铝是酸性土壤中限制植物生长和作物产量的主要因素<sup>[1]</sup>。铝对植物的毒害表现在抑制根的正常生

长和发育上,进而影响根系对水分和养分的吸收,导致植物生物量和作物产量的降低。然而,许多生长

收稿日期:2013-10-17;修改稿收到日期:2013-11-26

基金项目:国家自然科学基金(31360340, 31260297);云南省人培项目(KKSY201326062);昆明理工大学分析测试基金(20130462)

作者简介:王 平(1987—),女,在读硕士研究生,主要从事植物营养基因工程方面的研究。E-mail: way2454@163.com

\* 通信作者:陈 奇,博士,副教授,硕士生导师,主要从事植物生理和分子生物学方面的研究。E-mail: chenq0321@163.com

在酸性土壤区域的植物在长期进化过程中形成了两种抗铝机制,即外部排斥机制和内部耐受机制。外部排斥机制主要指细胞壁多糖对铝的排斥作用和根尖分泌的有机酸(如柠檬酸、苹果酸和草酸等)对胞外铝的螯合等;而内部耐受机制包括:胞质中有机酸、蛋白质及其它有机配体对铝的螯合和液泡的区室化等<sup>[2]</sup>。其中,铝诱导的根系有机酸分泌在植物抗铝中起着重要作用,被认为是植物抗铝的最有效机制之一。如在铝胁迫条件下,小麦和拟南芥根系分泌苹果酸,玉米、高粱和烟草等分泌柠檬酸,而苜蓿和寥草分泌草酸。另外,有些植物根系可以分泌两种有机酸,如小黑麦和油菜等分泌柠檬酸和苹果酸。

质膜  $H^+$ -ATPase 是细胞膜上最丰富的蛋白,约占质膜总蛋白的 60%。植物质膜  $H^+$ -ATPase 在应答盐胁迫、冷害胁迫和重金属胁迫中发挥着重要作用。质膜  $H^+$ -ATPase 还参与到铝胁迫和低磷胁迫下对植物根系柠檬酸分泌的调控中。如低磷和铝毒胁迫下白羽扇豆<sup>[3]</sup>、蚕豆<sup>[4]</sup>和丹波黑大豆<sup>[5]</sup>根尖柠檬酸的分泌均受到质膜  $H^+$ -ATPase 的调控,且在拟南芥中过表达大豆的质膜  $H^+$ -ATPase 基因可以明显地增加转基因植物质膜  $H^+$ -ATPase 的活性和柠檬酸的分泌量<sup>[5]</sup>。质膜  $H^+$ -ATPase 是生长素(IAA)调控的主要靶蛋白。如在水稻中,IAA 在根中的积累激活了质膜  $H^+$ -ATPase 活性以增加质子的分泌和对淹水胁迫的抗性<sup>[6]</sup>;添加外源 IAA 能通过增强质膜  $H^+$ -ATPase 的活性而增强低磷胁迫下大豆根系对磷的吸收<sup>[7]</sup>;但添加 IAA 运输抑制剂 TIBA(三碘苯甲酸)后,大豆根质膜  $H^+$ -ATPase 的活性和对磷的吸收量均显著性下降<sup>[7]</sup>。

大豆是中国主要的经济作物,也是研究植物抗逆性的重要模式植物。前期研究发现,添加外源 IAA 可以显著增加丹波黑大豆(RB)的抗铝胁迫能力<sup>[8]</sup>,且铝胁迫下根质膜  $H^+$ -ATPase 对柠檬酸分泌的调控是 RB 抗铝的主要机制<sup>[5]</sup>。因此,推测质膜  $H^+$ -ATPase 和柠檬酸的分泌可能参与到 IAA 增强 RB 抗铝能力过程中。本研究以铝耐受型黑大豆(RB)为研究材料,分析了铝胁迫下添加外源 IAA 对质膜  $H^+$ -ATPase 活性及柠檬酸分泌的影响,以揭示铝诱导有机酸分泌的生理机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料培养

参试丹波黑大豆(RB)种子由日本京都大学提供,首先用常温去离子水清洗 RB 种子,之后平铺于

垫有湿润滤纸的培养皿中,在恒温(25℃)黑暗的培养箱中进行浸种、催芽。种子露白发芽后挑选露白一致的种子播在有针眼孔的薄泡沫板上,置于盛有营养液<sup>[9]</sup>的黑色塑料盆中,于温度 25℃、每天光照( $1\ 200\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )14 h 的培养箱中进行漂浮培养,每隔 1 d 更换 1 次培养液。营养液包含  $6\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{KNO}_3$ 、 $4\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ (\text{CaNO}_3)_2$ 、 $0.1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 $2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{MgSO}_4$ 、 $0.3\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{FeSO}_4$ 、 $2.3\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{H}_3\text{BO}_3$ 、 $0.455\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{MnSO}_4$ 、 $0.6\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{ZnSO}_4$ 、 $0.15\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{CuSO}_4$ 、 $0.10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{NaMoO}_4$ 、 $0.01\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  和  $0.1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,用  $1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{KOH}$  调 pH 至 6.5。

### 1.2 植物材料处理

RB 种子按 1.1 所述方法培养 15 d 后选取长势一致的 RB 幼苗,用  $0.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{CaCl}_2$  (pH 4.2)预处理 12 h 后作为试材进行处理。处理组 I:将预处理后的 RB 置于 CK、 $A_{25}$ 、 $A_{50}$ 、 $A_{200}$  处理液中处理 24 h,各处理液中  $\text{AlCl}_3$  浓度分别为 0、25、50、 $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,均含有  $0.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{CaCl}_2$ ,pH 4.2;处理组 II:将预处理后的 RB 分别置于  $I_{50}$ 、 $I_{50}A_{25}$ 、 $I_{50}A_{50}$ 、 $I_{50}A_{200}$ 、 $I_{50}A_{50}T_{10}$  处理液中处理 24 h,各组合处理液中均含有  $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{IAA}(I_{50})$ 、 $0.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{CaCl}_2$ ,pH 4.2, $T_{10}$  表示含有  $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{TIBA}$ , $A_{25}$ 、 $A_{50}$ 、 $A_{200}$  分别表示含有 25、50、 $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{AlCl}_3$ 。处理结束后取幼苗根,称重后用液氮速冻后置于  $-80\ ^\circ\text{C}$  保存,用于分析 RB 根尖 IAA、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、MDA 含量和质膜  $H^+$ -ATPase 活性,同时收集根系分泌物用于测定柠檬酸分泌量。

### 1.3 测定指标及方法

**1.3.1 根内源 IAA 含量** 取处理后的植物根尖样品 1 g,加入 1 mL 95% 以上的无水乙醇进行研磨,然后加入 4 mL  $0.01\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{PBS}$ (pH 7.4)抽提,充分混匀后离心取上清,再于  $4\ ^\circ\text{C}$  下离心,取上清用酶联免疫法(ELISA)测内源 IAA 含量。

**1.3.2 根尖铬天青 S 染色** 铬天青 S 溶液在 pH 值为 6.5~7.0 情况下,铝可以在聚乙二醇辛基苯醚和溴代十六烷基吡啶存在情况下与铬天青发生反应,生成蓝色胶束,因此被广泛用于铝含量的测定<sup>[10]</sup>。本研究使用铬天青 S 染色的方法定性检测植物根尖铝含量的变化。剪取处理后的 RB 新鲜根尖,置于 2 mL EP 管中,向 EP 管中分别加入 1 mL 铬天青 S 溶液染色 30 min,取出后用去离子水洗根 30 min,后用显微镜观察不同处理下根部的着色

程度。

**1.3.3 MDA 和  $H_2O_2$  含量** 取处理后的 RB 根 0.3 g, 参照张志良等<sup>[11]</sup>的方法测定 MDA 含量, 按 Gay 等<sup>[12]</sup>的方法测定  $H_2O_2$  含量, 单位为  $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

**1.3.4 根尖铝含量** 取处理后新鲜植物根尖 0.5 g 左右, 经过  $60\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 80\text{ }^{\circ}\text{C}$  的烘箱中烘干至恒重。烘干的样品放入数显温控消化炉中, 经  $500\text{ }^{\circ}\text{C}$  高温灰化, 待灰化完全后加 1 mL 硝酸(优级纯)浸提过夜。经电感耦合等离子原子发射光谱法(ICP-AES)测定根中金属铝含量。

**1.3.5 柠檬酸分泌量** 收集植物根系分泌物, 将其真空冷冻干燥后溶解于 1 mL dd $H_2O$  中, 经  $0.45\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的滤器过滤后使用 HPLC 法测定柠檬酸的浓度。HPLC 分析条件为: 使用岛津生产的 LC-20At 色谱仪, 爱尔兰 Waters 生产的色谱柱 XTerra phenyl column( $4.6 \times 250\text{ mm}$ ), 柱温  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 流动相为  $0.8\%$   $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$  (pH 2.8) 缓冲液, 流动相流速为  $0.6\text{ mL/min}$ , 紫外检测波长为  $210\text{ nm}$ , 进样量  $20\text{ }\mu\text{L}$ 。柠檬酸的含量根据标准曲线计算。

**1.3.6 质膜蛋白提取和质膜  $H^+$ -ATPase 活性测定** 质膜  $H^+$ -ATPase 提取和纯化按 Shen 等<sup>[13]</sup>的方法进行。收集  $0.3\text{ g}$   $1 \sim 2\text{ cm}$  根尖样品, 速用液氮冻存, 经液氮研磨呈粉末后加入适量均匀的质膜提取液抽提, 混匀后离心, 取上相上清, 溶于 3 倍体积的悬浮缓冲液中, 再离心, 收集沉淀获得纯化的质膜。

质膜  $H^+$ -ATPase 活性测定在  $0.5\text{ mL}$  的反应体系中进行。反应体系包含  $50\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  BTP/MES,  $5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4$ ,  $50\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  KCl,  $0.02\%$  Brij (W/V),  $50\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{KNO}_3$ ,  $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ ,  $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$ ,  $4\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ATP- $\text{Na}_2$ , 加入  $500\text{ }\mu\text{g}$  质膜蛋白后启动反应。将反应混合物  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴  $30\text{ min}$  后, 加入反应终止液  $1\text{ mL}$  [含  $2\%$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  (V/V),  $5\%$  SDS (W/V) 和  $0.7\%$   $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$  (W/V)] 后, 立即加入  $50\text{ }\mu\text{L}$  Vc 并于室温下放置约  $20\text{ min}$ , 测定波长为  $700\text{ nm}$  处的吸光值。根据所求得的无机磷含量、蛋白含量和反应时间计算质膜  $H^+$ -ATPase 的活性。对于质膜蛋白纯度的测定, 在  $0.5\text{ mL}$  的上述反应体系中加入钒酸钠(VA, 质膜  $H^+$ -ATPase 活性的有效抑制剂)使其终浓度为  $50\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 检测 VA 对质膜  $H^+$ -ATPase 的抑制率。结果表明, VA 对质膜  $H^+$ -ATPase 的抑制率达到  $85\%$  以上, 因此所提到的质膜蛋白样品纯度较高, 满足后续的实验要求。

所有的生理生化指标分析设置  $5 \sim 12$  次重复。

## 1.4 数据统计及分析

数据统计用 SPSS 11.5 软件进行, 用 LSD 法检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 铝胁迫对 RB 根尖内源 IAA 含量的影响

如图 1 所示, 与未经铝胁迫的对照(CK)相比,  $A_{25}$  和  $A_{50}$  处理 RB 根尖 IAA 含量分别显著增加了  $20.1\%$  和  $54.2\%$  ( $P < 0.05$ ), 而高浓度的  $A_{200}$  处理 RB 根尖 IAA 含量却显著下降了  $54\%$  ( $P < 0.05$ )。由此可见, 在 RB 可接受的铝毒害浓度范围内, 根尖 IAA 浓度随着铝处理浓度的增加而提高; 而高浓度的铝可能对 RB 根尖造成了很大的损伤, 使得其 IAA 浓度显著性下降。

### 2.2 铝胁迫下添加外源 IAA 对 RB 根系柠檬酸分泌的影响

作者前期研究发现, 添加外源 IAA 可以显著增加 RB 的抗铝能力<sup>[8]</sup>, 且铝胁迫下 RB 根系柠檬酸的分泌是其抗铝的重要机制<sup>[5]</sup>。因此, 本实验检测了铝胁迫下 IAA 对 RB 根系柠檬酸分泌量的影响。研究结果表明(图 2), 在无铝胁迫条件下(CK 和  $I_{50}$ ), RB 根系未检测到柠檬酸的分泌; 然而在  $A_{25}$ 、 $A_{50}$  和  $A_{200}$  处理中, RB 根尖柠檬酸分泌量分别为  $21.88$ 、 $42.22$  和  $7.82\text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ , 这与 RB 根尖内源 IAA 含量的变化趋势(图 1)是相似的。由此可见, RB 根系柠檬酸的分泌是受铝胁迫诱导的过程, IAA 可能参与到铝胁迫下 RB 根尖柠檬酸分泌的调

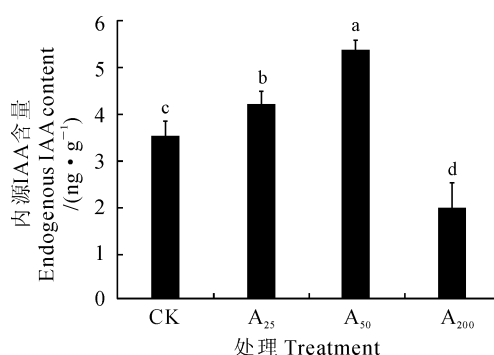


图 1 铝胁迫下 RB 根尖 IAA 含量的变化  
CK、 $A_{25}$ 、 $A_{50}$ 、 $A_{200}$  分别表示处理的  $\text{AlCl}_3$  浓度分别为  $0.25$ 、 $50$ 、 $200\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 不同字母代表不同处理间在  $0.05$  水平的显著性差异; 下同

Fig. 1 Effect of Al on IAA contents in RB root  
CK,  $A_{25}$ ,  $A_{50}$ ,  $A_{200}$  stand for treatment concentration of  $\text{AlCl}_3$  are  $0.25$ ,  $50$ ,  $200\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively; The different normal letters indicate significant difference among different treatments at  $0.05$  level; The same as below

控过程中。因此,在铝处理液中添加外源 IAA 进一步分析其对铝胁迫下 RB 根尖柠檬酸分泌的调控机制。如图 2 所示,在不同浓度铝处理液中添加外源  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA( $I_{50}$ )后, $I_{50} A_{25}$ 、 $I_{50} A_{50}$  和  $I_{50} A_{200}$  处理 RB 根尖柠檬酸的分泌量分别是  $A_{25}$ 、 $A_{50}$  和  $A_{200}$  的 2.39、1.73 和 6.85 倍;而在  $I_{50} A_{50}$  处理液中添加  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TIBA( $I_{50} A_{50} T_{10}$ )后,其根尖柠檬酸的分泌量比  $I_{50} A_{50}$  大幅显著降低 73%。以上结果表明,铝胁迫下添加外源 IAA 可以显著地增强铝诱导的 RB 根系柠檬酸的分泌量。

### 2.3 铝胁迫下添加外源 IAA 对 RB 根尖质膜 $\text{H}^{+}$ -ATPase 活性的影响

有关研究表明质膜  $\text{H}^{+}$ -ATPase 是 IAA 作用的主要靶蛋白,且作者前期研究结果也表明质膜  $\text{H}^{+}$ -ATPase 参与到 RB 根系柠檬酸分泌的调控过程中<sup>[5]</sup>,因此本实验检测了铝胁迫下添加外源 IAA 对 RB 根质膜  $\text{H}^{+}$ -ATPase 活性的影响。结果表明, $A_{25}$ 、 $A_{50}$  和  $A_{200}$  处理 24 h 后, RB 根尖质膜  $\text{H}^{+}$ -ATPase 的活性也表现为先上升后下降的趋势(图 3),这与铝胁迫下 RB 根中内源 IAA 的含量(图 1)与根尖柠檬酸分泌量(图 2)的变化趋势是相似的。此外,在  $I_{50} A_{25}$ 、 $I_{50} A_{50}$  和  $I_{50} A_{200}$  处理 24 h 后, RB 根尖质膜  $\text{H}^{+}$ -ATPase 的活性分别是  $A_{25}$ 、 $A_{50}$  和  $A_{200}$  处理下的 1.09、1.74 和 1.45 倍,其中的  $I_{50} A_{50}$  对 RB 根尖质膜  $\text{H}^{+}$ -ATPase 的活性刺激作用最为显著;然而,  $I_{50} A_{50} T_{10}$  处理下的 RB 根尖质膜  $\text{H}^{+}$ -AT-

Pase 活性比未添加 TIBA 处理  $I_{50} A_{50}$  显著降低 59% (图 3)。由此可见,铝胁迫下添加外源 IAA 能通过增加质膜  $\text{H}^{+}$ -ATPase 的活性而诱导其根尖柠檬酸的分泌。

### 2.4 铝胁迫下添加外源 IAA 对 RB 根尖 MDA 和 $\text{H}_2\text{O}_2$ 含量的影响

MDA 含量能够反映植物经胁迫后质膜的氧化程度,  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量能够反映植物经胁迫后细胞内活性氧的积累量,因此,两者含量的变化通常被用来衡量植物受到的胁迫程度。图 4, A 显示,  $I_{50}$  处理的 RB 根中 MDA 含量与 CK 并没有显著差异,然而铝胁迫后 RB 根中 MDA 的含量随着铝浓度的增加而增加,且在  $A_{200}$  处理下比 CK 显著增加;在不同浓度铝胁迫下添加  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  外源 IAA 共同处理后,根系 MDA 含量比相应单独铝处理下不同程度地减少,  $I_{50} A_{25}$ 、 $I_{50} A_{50}$ 、 $I_{50} A_{200}$  处理比相应的  $A_{25}$ 、 $A_{50}$ 、 $A_{200}$  处理分别降低了 4.17%、15.01%、18.84%,表现出随 Al 浓度增大而降低幅度越大的趋势。

同时,根尖  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量的测定结果表明(图 4, B),与 CK 相比较,随着铝浓度增加 RB 根尖  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量均有不同程度增加,并以  $A_{50}$  处理含量最高,  $A_{200}$  处理次之,且两者均显著高于对照;在不同浓度铝胁迫下添加  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  外源 IAA 后,根尖  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量比相应单独铝胁迫处理都有所下降,但  $I_{50} A_{50}$  处理仍显著高于对照。其中,  $I_{50} A_{25}$ 、 $I_{50} A_{50}$ 、 $I_{50} A_{200}$  处理比相应的  $A_{25}$ 、 $A_{50}$ 、 $A_{200}$  处理分别降低了 18.78%、24.91%、44.01%,也表现出随 Al 浓度增加而降低幅度越大的趋势。这说明在铝胁迫下添加外源 IAA 能够显著降低 RB 细胞内  $\text{H}_2\text{O}_2$  的积累和 MDA 产生,减轻其受氧化胁迫的影响,即铝胁迫下添加外源 IAA 可以使 RB 通过降低 MDA 的产生以

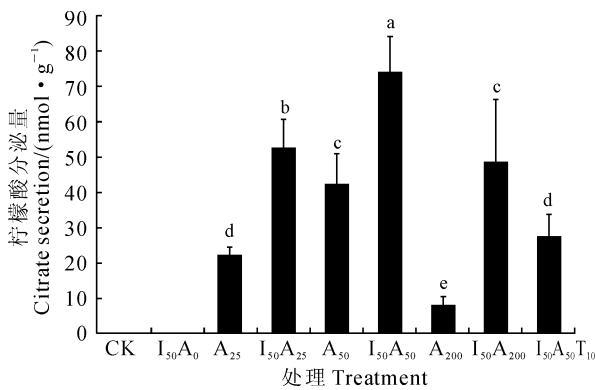


图 2 铝胁迫下添加外源 IAA 对 RB 根尖柠檬酸分泌的影响

$I_{50}$ 、 $T_{10}$  表示处理液中分别含有  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA 和  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TIBA;下同

Fig. 2 Effect of exogenous IAA on citrate secretion in RB roots under Al stress

$I_{50}$ 、 $T_{10}$  stand for treatment solution contain  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA and  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TIBA, respectively; The same as below

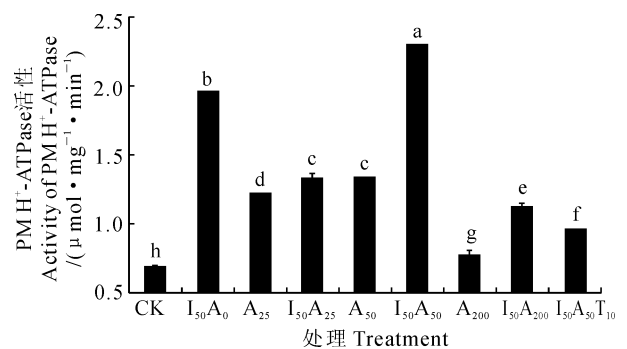


图 3 铝胁迫下添加外源 IAA 对 RB 根尖质膜  $\text{H}^{+}$ -ATPase 活性的影响

Fig. 3 Effect of exogenous IAA on plasma membrane  $\text{H}^{+}$ -ATPase activity in RB roots under Al stress

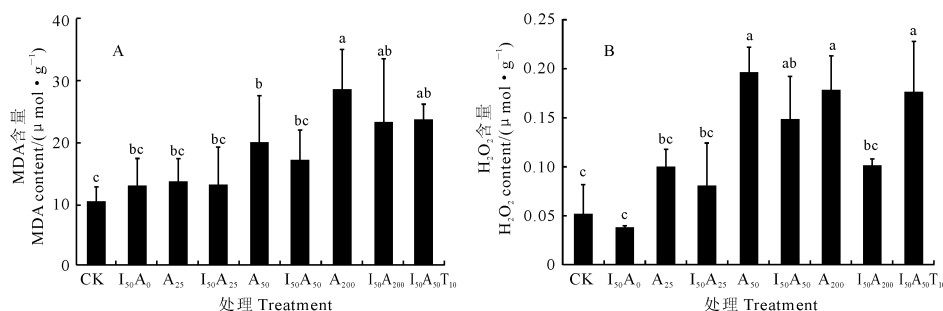
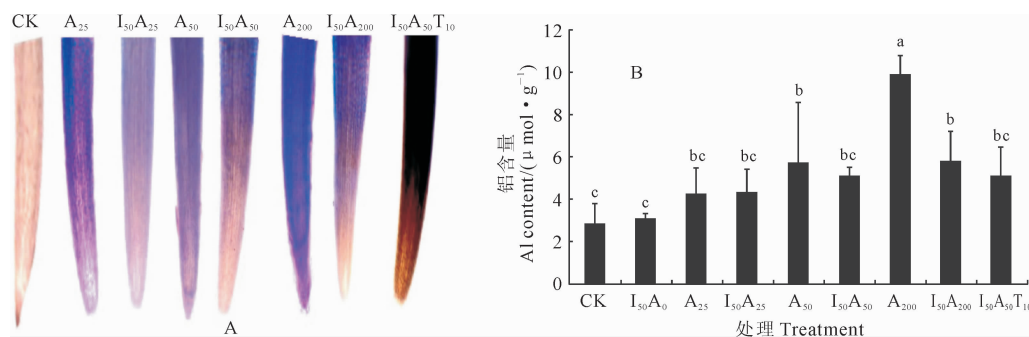
图4 铝胁迫下添加外源 IAA 对 RB 根尖 MDA(A)和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B)含量的影响Fig. 4 Effect of exogenous application of IAA on MDA(A) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B) contents in RB root under Al stress

图5 铝胁迫下添加外源 IAA 对 RB 根尖铝含量的影响

A. RB 根尖的铬天青 S 染色; B. RB 根尖铝含量

Fig. 5 Effect of exogenous application of IAA on Al content in RB roots under Al stress

A. Chrome azurol S staining of RB roots; B. Al content of RB roots

及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的积累来减轻铝胁迫对质膜的氧化和 ROS(活性氧)对细胞的毒害。另外,与 I<sub>50</sub>A<sub>50</sub> 处理相比较, I<sub>50</sub>A<sub>50</sub>T<sub>10</sub> 处理根尖的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 MDA 含量均不同程度地增加,且均显著高于对照,即 TIBA 一定程度上抵消了外源 IAA 的作用,使细胞所受活性氧毒害加重。

## 2.5 铝胁迫下添加 IAA 后 RB 根尖铝含量的变化

RB 根尖铬天青 S 染色结果显示,随着铝处理浓度的增加,RB 根尖的着色程度随之加深,铝浓度达到 200 μmol·L<sup>-1</sup> 时 RB 根尖受到了明显的损伤;然而在铝胁迫下添加 50 μmol·L<sup>-1</sup> 外源 IAA 后,相比未添加 IAA 的 RB 根尖着色程度明显变浅,但 I<sub>50</sub>A<sub>50</sub>T<sub>10</sub> 处理却比 I<sub>50</sub>A<sub>50</sub> 明显加深,甚至深于 I<sub>50</sub>A<sub>200</sub> 处理,说明在铝胁迫下添加 50 μmol·L<sup>-1</sup> 外源 IAA 使根中铝离子含量明显降低,但 TIBA 消弱了这种作用(图 5, A),进而表明添加外源 IAA 可以缓解铝对 RB 的胁迫伤害。图 5, B 同时显示,随着铝浓度的增加 RB 根尖铝含量也随之增加;与 CK 相比, A<sub>50</sub>、A<sub>200</sub> 处理 RB 根尖铝含量分别增加了 1.01 和 2.49 倍,而 I<sub>50</sub>A<sub>50</sub>、I<sub>50</sub>A<sub>200</sub> 处理根尖铝含量则分别增加了 0.80 和 1.05 倍。可见,铝胁迫下添加外源

IAA 可以明显降低 RB 根系对铝的吸收和铝对 RB 根系的毒害作用。

## 3 讨论

生长素(IAA)是人类最早发现的一类植物激素,在植物的正常生长发育和抵抗多种胁迫中发挥着重要的作用。如 Ouzounidou 等<sup>[14]</sup>对向日葵的研究表明,100 μmol·L<sup>-1</sup> IAA 可以显著缓解 80 μmol·L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> 对其根生长的抑制作用,IAA 可以显著减轻 Cu<sup>2+</sup> 毒害对向日葵主根生长的抑制作用,并促进侧根生长<sup>[14]</sup>。与之相似的是,前期研究也发现铝胁迫下添加外源 IAA 能有效缓解 Al<sup>3+</sup> 对其主根的抑制作用,并显著促进侧根的生长<sup>[8]</sup>。有关研究表明,铝胁迫可以诱导植物体内产生大量的活性氧,使膜脂、核酸和蛋白质等生物大分子过氧化而受损害。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 是植物体内最主要的活性氧,它的含量变化可反映植物体内氧化胁迫的水平。MDA 是植物细胞膜脂过氧化的产物,是氧化胁迫对植物伤害的重要生理指标之一。Wu 等<sup>[15]</sup>的研究发现,在铝敏感型黑豆叶和根中,MDA 含量随着铝胁迫时间的增加而增加,其氧化胁迫和膜脂过氧化程度逐渐

升高。此外,在盐胁迫下外源施加 IAA 可以明显降低大豆膜脂的过氧化程度及质膜透性,增强对盐渍环境抵抗能力<sup>[16]</sup>。与之相似的是,在本研究中也发现随着铝处理浓度的增加 RB 根中 MDA 和  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量也不断上升,且铝胁迫下添加外源 IAA 后的 RB 根尖 MDA 和  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量显著降低。这表明外源 IAA 有效缓解了铝毒害诱导的氧化胁迫对 RB 造成的氧化损伤,这进一步证实了添加外源 IAA 可以有效地增强 RB 对铝的抗性。

铝胁迫可以诱导植物根系分泌多种有机酸以螯合胞外的铝从而提高植物抗铝能力,这一方法被认为是最有效的外部抗铝毒机制<sup>[17-18]</sup>。质膜  $\text{H}^+$ -ATPase 是细胞膜上最丰富的蛋白,在应答多种胁迫中发挥着重要作用。最近有关研究表明,质膜  $\text{H}^+$ -ATPase 对铝胁迫下植物根系柠檬酸的分泌起重要调控作用。如在蚕豆<sup>[4]</sup>和丹波黑大豆(RB)<sup>[5]</sup>根中,

铝诱导的柠檬酸分泌与质膜  $\text{H}^+$ -ATPase 活性呈显著性正相关。且铝胁迫下,添加外源质膜  $\text{H}^+$ -ATPase 抑制剂钒酸盐(VA)后,蚕豆和大豆根柠檬酸的分泌显著性下降。此外,质膜  $\text{H}^+$ -ATPase 也是 IAA 调控的靶蛋白。最近,Yang 等<sup>[19-20]</sup>的研究表明,铝胁迫诱导了小麦根系 IAA 含量的增加,且添加外源 IAA 可以有效地增强铝胁迫下小麦根系苹果酸的分泌。本研究中也发现铝胁迫诱导了 RB 根系 IAA 的积累;且与仅有铝胁迫的处理相比,不同浓度铝胁迫下添加  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  外源 IAA 同步显著性增强了 RB 根尖质膜  $\text{H}^+$ -ATPase 活性和柠檬酸分泌量;而添加外源 TIBA 显著降低了 RB 根尖质膜  $\text{H}^+$ -ATPase 活性的同时,柠檬酸的分泌也被抑制。综上所述,铝胁迫下添加外源 IAA 主要通过调节质膜  $\text{H}^+$ -ATPase 的活性进而影响柠檬酸的分泌,这可能是 IAA 增强 RB 抗铝的主要生理机制。

## 参考文献:

- [1] WANG X H(王新海),BI Y F(毕玉芬),KUI J X(奎嘉祥). Progress of the research on alfalfa with acidity tolerance[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2005, 5: 705—709(in Chinese).
- [2] YI J X(易杰祥),LÜ L X(吕亮雪),LIU G D(刘国道). Research on soil acidification and acidic soil's melioration[J]. *Journal of South China University of Tropical Agriculture*, 2006, 12(1): 23—28(in Chinese).
- [3] KIM Y S, PARK W, NIAN H, et al. Aluminum tolerance associated with enhancement of plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase in the root apex of soybean[J]. *Soil Science & Plant Nutrition*, 2010, 56: 140—149.
- [4] CHEN Q, WU K H, ZHANG Y N, et al. Physiological and molecular responses of broad bean (*Vicia faba* L.) to aluminum stress[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2012, 34: 251—263.
- [5] GUO C L, CHEN Q, ZHAO L W, et al. Al-enhanced expression and interaction of 14-3-3 protein and plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase is related to Al-induced citrate secretion in an Al-resistant black soybean[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2013, 31: 1012—1024.
- [6] XU W F, JIA L G, SHI W M, et al. Abscissic acid accumulation modulates auxin transport in the root tip to enhance proton secretion for maintaining root growth under moderate water stress[J]. *New Phytol.*, 2013, 197: 139—150.
- [7] SHEN H, CHEN J, WANG Z, et al. Root plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase is involved in the adaptation of soybean to phosphorus starvation[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57: 1353—1362.
- [8] WANG P(王 平), CHEN Q(陈 奇), CHEN D J(陈东杰), et al. Effect of exogenous IAA on root growth of black soybean under aluminum stress[J]. *Soybean Science*, 2013, 32(5): 650—654(in Chinese).
- [9] LIPTON D S, BLANCHARD R W, BLEVINS D G. Citrate, malate, and succinate concentration in exudates from P-sufficient and P-stressed *Medicago sativa* L. seedlings[J]. *Plant Physiology*, 1987, 85: 315—317.
- [10] CHEN Q, ZHANG X D, WANG S S, et al. Transcriptional and physiological changes of alfalfa in response to aluminum stress[J]. *Journal of Agricultural Science*, 2011, 149: 737—751.
- [11] 张志良, 翟伟菁. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 274—277.
- [12] GAY C A, GEBICKI J M. Measurement of carbohydrates in plant extracts by anthrone[J]. *Biochem. J.*, 1954, 57(3): 508—514.
- [13] SHEN H, HE L F, SASAKI T, et al. Citrate secretion coupled with the modulation of soybean root tip under aluminum stress. Up-regulation of transcription, translation, and threonine-oriented phosphorylation of plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase[J]. *Plant Physiology*, 2005, 138: 287—296.
- [14] OUZOUNIDOU G, ILIAS I. Hormone-induced protection of sunflower photosynthetic apparatus against copper toxicity[J]. *Biologia Plantarum*, 2005, 49(2): 223—228.
- [15] WU K H, XIAO S Q, CHEN Q, et al. Changes in the activity and transcription of antioxidant enzymes in response to Al stress in black soybeans[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2013, 31(1): 141—150.
- [16] WEI A L(魏爱丽), CHEN Y ZH(陈云昭). Effect of IAA on soybean seedlings membrane injury and salt resistance[J]. *Acta Bot. Boreo-Occident. Sin.* (西北植物学报), 2000, 20(3): 410—414(in Chinese).
- [17] MA J F, FURUKAWA J. Recent progress in the research of external Al detoxification in higher plants: a mini review[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2003, 97: 46—51.
- [18] CHEN M(陈 梅), CHEN Y H(陈亚华), SHEN ZH G(沈振国), et al. Alleviation of aluminum toxicity in wheat seedlings exogenous organic acids[J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2003, 29(4): 281—288(in Chinese).
- [19] YANG Y, WANG Q L, GENG M J, et al. Effect of indole-3-acetic acid on aluminum-induced efflux of malic acid from wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. *Plant Soil*, 2011, 346: 215—230.
- [20] YANG Y, WANG Q L, GENG M J, et al. Effect of auxin on Al-induced malic acid efflux in wheat with differential Al tolerance[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(10): 2016—2022.