

大豆耐铝性品种差异及其与有机酸的关系

刘拥海, 俞乐

(肇庆学院生物系, 广东肇庆 526061)

摘要: 从10个大豆品种中筛选出两个耐铝性差异显著的品种, 研究了其耐铝性与有机酸的关系。经铝处理后, 吴川品种的相对根长为133.5%, 化州只有68.9%, 表明吴川相对耐铝, 化州对铝较敏感。将不同浓度的 AlCl_3 加入营养液中处理大豆10 d, 化州较吴川根长受到较大影响, 进一步证实吴川相对耐铝毒, 而化州对酸铝敏感。机理研究发现大豆在铝胁迫下根系可分泌两种有机酸(草酸、柠檬酸), 其中吴川根系草酸分泌速率提高了74%, 化州几乎没有提高, 表明耐铝性大豆品种的根系草酸分泌速率明显提高, 可增强其缓解酸铝毒性的能力。而二者分泌柠檬酸的速率虽然均有显著提高, 但处理后感抗品种之间差异不大, 表明柠檬酸在缓解铝毒性中的作用不大。铝处理下大豆根系虽然分泌两种有机酸, 但草酸在大豆耐酸铝机制中的作用可能更为重要。

关键词: 大豆; 耐铝; 草酸; 柠檬酸

中图分类号: Q946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2004)06-0554-04

Relationship on the differences of soybean cultivars in Al tolerance and organic acids

LIU Yong-hai, YU Le

(*Department of Biology, Zhaoqing University, Zhaoqing 526061, China*)

Abstract: Two soybean cultivars WUCHUAN, HUAZHOU differing in Al tolerance were screened from 10 soybean cultivars and used to study Al tolerance mechanisms. The results showed that the relative roots length of the Al-resistant cultivars WUCHUAN was 133.5% while the Al-sensitive cultivars HUAZHOU was 68.9%. The resistance of the selected cultivars was further confirmed by treating the plants for 10 d with different concentrations of AlCl_3 in culture solution. Two organic acids were induced to exude by Al toxicity from soybean roots. Oxalate exuded rate of WUCHUAN was increased by 74% in response to Al toxicity, while HUAZHOU had no significant change. It meant the possibility of oxalate detoxifying of the aluminum toxicity in the Al-tolerant soybean cultivars was enhanced. The rate of citrate exuded in the two soybean cultivars both increased in response to Al toxicity stress but no significant difference between them was observed. These results suggested that oxalate might play more important role in the Al tolerance mechanism of soybean than citrate.

Key words: soybean; Al tolerance; oxalate; citrate

酸性土壤占全世界可耕作土地的40%, 占我国耕地面积的21%。铝毒是酸性土壤限制作物生长的主要障碍因子之一。酸性土壤中铝主要危害作物的根部, 造成磷、钾、钙、镁、硼、钼等营养元素的缺乏(Kochian, 1995; 李庆逵, 1983)。大豆是酸性土壤中

的先锋植物, 在酸铝刺激下大豆根系只分泌单一的有机酸——柠檬酸, 并且分泌柠檬酸是其耐铝毒的重要作用机制(Yang等, 2000; 黄鹤等, 2001)。草酸在某些天然耐铝毒型植物(如荞麦、野芋)的耐铝毒机制中起重要作用(Ma等1997a, 1998; Ma和Mi-

收稿日期: 2003-09-09 修订日期: 2004-02-16

作者简介: 刘拥海(1972-), 男(汉族), 湖南邵东人, 植物学专业博士, 副教授, 主要从事植物生理学和细胞生物学教学研究工作。

yasaka, 1998; Zheng 等, 1998a)。用外源草酸处理也能有效缓解铝毒对植物的伤害 (Ginting 等, 1998)。因此进一步研究草酸与大豆耐铝性关系有重要意义。本文从 10 个大豆品种中筛选到两个耐酸铝性有显著差异的品种, 并进一步研究了两者分泌有机酸的差异, 旨在探讨其耐铝毒的机理。

1 材料和方法

1.1 供试材料

大豆 (*Glycine max* L.), 10 个广东本地品种: 广大粒、梅州、五号增城、保黑色豆、廉江大粒黄、象阳春豆、阳春小粒、化州、廉江 30、吴川, 由华南农业大学农学院提供。

1.2 材料培养以及感抗品种筛选

挑选饱满、大小一致的种子, 30% 的双氧水表面消毒 10 min, 饱和 CaSO_4 溶液浸泡 30 min, 用蒸馏水冲净后铺在湿润滤纸上, 置于 25 °C 恒温箱中避光催芽至根长出 1~2 cm。将发芽一致的种子点播于塑料盆的尼龙网上, 用含 0.5 mmol/L CaCl_2 , 25 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 , pH 4.5 的溶液进行处理 (对照不加 AlCl_3), 整个装置置于 25 °C 恒温箱中 (避光) 进行筛选, 气泵间歇供气, 24 h 后测量根长, 计算相对根长 (铝处理根的生长量/对照处理根的生长量 \times 100%), 以此进行酸铝感抗品种的筛选。

1.3 耐铝性指标的测定与铝处理的浓度

铝离子对植物的毒害主要表现在抑制根的生长, 因此以主根长作为耐铝性的指标 (Alam, 1981)。为进一步确认所筛选大豆品种耐酸铝性差异, 将不同浓度的 AlCl_3 加入到培养液中实施长时间胁迫处理: 感抗品种种子按上述方法消毒后, 用蒸馏水冲净, 播于蛭石中, 在网室自然光下浇灌自来水培养至子叶出土并充分展开后移栽进行处理。材料移栽 (移栽前量主根长) 至盛有 1 L 1/5 Hoagland (pH 4.5) 营养液的瓦钵中 (每盆 15 株, 用气泵间歇供气并每隔 5 d 更换 1 次营养液), 设 4 个不同的铝浓度 (0、200、400、1 000 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3) 进行处理, 10 d 后, 计算根伸长抑制百分数。

1.4 根系分泌物的收集与有机酸含量的测定

分泌物的收集: 在 Zheng 等 (1998a) 方法的基础上加以改进。1 000 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 处理后第 11 天早上 9:00 开始收集分泌物: 用蒸馏水将植株的根冲洗干净后, 轻轻甩干水分, 将根放入 150 mL 含

有 0.5 mmol/L CaCl_2 、pH 4.5 的溶液中进行避光收集 6 h。将收集液经一层纱布过滤, 滤液转入 200 mL 烧杯中, 60 °C 恒温水浴浓缩, 用 2 mL 0.5 mol/L HCl 、8 mL 蒸馏水先后将浓缩物溶解, 溶解液经小漏斗过滤, 滤液直接过阳离子交换柱 (Amberlite IR-120 PLUS), 接着用 5 mL 蒸馏水洗柱, 浓缩管收集流出液, 流出液真空浓缩至干后, 用 1 mL 流动相将浓缩物溶解, 溶解液转入 1 mL 指形管, 12 000 \times g 离心 10 min, 上清液作为待测样品。

有机酸含量测定: 参照俞乐等 (2002) 的方法。

1.5 仪器色谱条件

仪器: Waters 高效液相色谱 (510 型)。色谱条件: 紫外检测器: Shmadzu (SPD-6A); 固定相: C_{18} 柱 (5 μm 、4.6 mm \times 250 mm); 流动相: 0.5% KH_2PO_4 , 0.5 mmol/L TBA, pH 2.0; 检测波长: 220 nm; 进样量: 5~10 μL ; 流速: 1 mL/min。

表 1 铝处理对不同大豆品种相对根长的影响
Table 1 Effect of aluminum on relative root length of different soybean cultivars

品种 Cultivars	相对根长 Relative root length
广大粒 Guangdali	89.8
梅州 Meizhou	84.8
五号增城 Wuhaozengcheng	76.9
保黑色豆 Baoheisedou	72.4
廉江大粒黄 Liangjiangdali Huang	84.0
象阳春豆 Xiangyangchundou	114.7
阳春小粒 Yangchunxiaoli	82.9
化州 Huazhou	68.9
廉江 30 Lianjiang 30	89.8
吴川 Wuchuan	133.5

2 结果与分析

2.1 大豆的感抗品种

用 25 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 的 CaCl_2 溶液进行处理植株 24 h 后测量其主根长 (对照不加 AlCl_3), 并计算相对根长, 以此进行大豆对酸铝感抗品种的筛选。结果显示 (表 1): 不同大豆品种之间对酸铝的敏感性存在显著差别, 化州和吴川其相对根长分别为 133.5%、68.9%, 其它几个品种处于这二者之间, 表明吴川最耐铝毒, 化州对铝最为敏感。

2.2 大豆感抗品种对铝浓度的敏感性

进一步检测了吴川和化州对铝的敏感性差异。将不同浓度的 AlCl_3 加入到培养液中实施长时间胁迫

迫处理,结果(图1)显示,吴川在铝浓度1 000 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 范围内其根生长均未受到抑制,而化州在400 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围内没有受到明显抑制,但当铝浓度达到1 000 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 时,其根生长受到严重抑

制,高达50%。表明吴川和化州在 AlCl_3 浓度为1 000 $\mu\text{mol/L}$ 左右时表现出对铝的敏感性有显著差异,这与用种子直接筛选的结果(表1)基本是一致的,前后两个实验的铝处理浓度差异主要在于后者是加

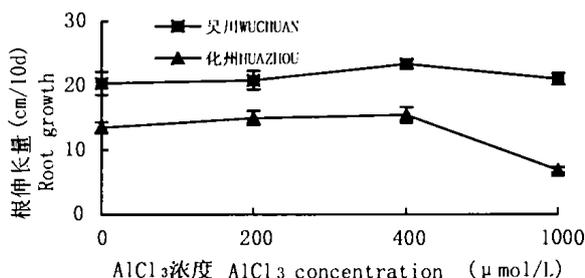


图1 不同铝浓度对不同大豆品种根生长的影响(误差线代表 S. ±E)

Fig. 1 Effect of different Al concentration on the root growth of different soybean cultivars (Error bars stand for S. ±E)

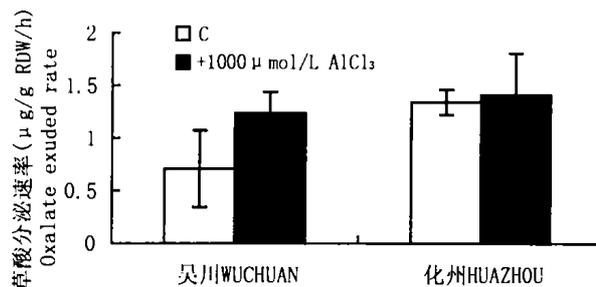


图2 铝毒胁迫条件下不同大豆品种根系草酸的分泌速率(误差线代表 S. ±E)

Fig. 2 Oxalate exuded rate in roots of different soybean cultivars in response to Al toxicity (Error bars stand for S. ±E)

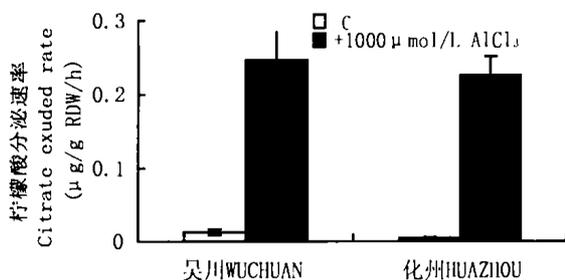


图3 铝毒胁迫条件下不同大豆品种根系柠檬酸的分泌速率(误差线代表 S. ±E)

Fig. 3 Citrate exuded rate in roots of different soybean cultivars in response to Al toxicity (Error bars stand for S. ±E)

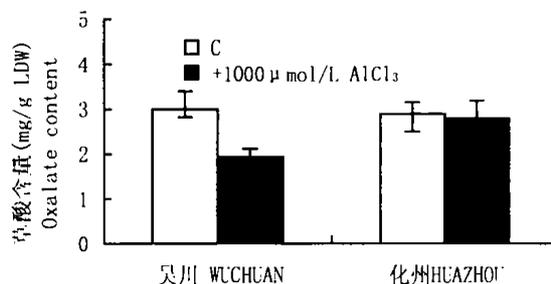


图4 铝毒胁迫条件下不同大豆品种叶片草酸含量变化(误差线代表 S. ±E)

Fig. 4 Oxalate content in leaves of different soybean cultivars in response to Al toxicity (Error bars stand for S. ±E)

人到营养液中,而营养液中成分比较复杂,可能对铝的处理效果有干扰作用,比如形成磷酸铝沉淀等,从而减轻了酸铝毒性,故后者需要的浓度较大。

2.3 铝处理后大豆感抗品种根系分泌有机酸的变化

植株用1 000 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 处理后,在第11天早上9:00开始进行避光收集6h,将收集到的分泌物进行一系列的处理,最后用高压液相色谱法进行分析。结果如图2、3:吴川根系分泌草酸的速率有明显提高,增加了74%,而化州几乎没有变化。大豆感抗品种根系分泌柠檬酸速率均有显著提高,但铝处理后两者分泌速率差异不大,吴川和化州分别为 $0.246 \pm 0.038 \mu\text{g/g}$ 根干重/h、 $0.225 \pm 0.025 \mu\text{g/g}$ 根干重/h。

2.4 铝处理后大豆感抗品种内源有机酸的变化

铝处理后,在化州和吴川两个大豆品种的叶片、根中均检测到有草酸含量下降,其中吴川叶片草酸含量下降了35%,化州只下降3.5%;吴川根中草酸含量降低了39%,化州却降低了63%(图4、5)。此外,两个品种中叶片柠檬酸含量只有轻微下降,但感抗品种间处理前后的差异不大(图6);在根中均未能检测到柠檬酸。研究表明,铝处理后耐酸铝品种吴川叶片中草酸含量下降比根中下降得更多。

3 讨论

在非酸性土壤溶液中,铝通常以难溶性硅酸盐

和氧化物的形式存在,对植物没有毒害,但在酸性条件下($\text{pH}<5$),可溶性的铝(主要是 Al^{3+})对大多数植物都会产生毒害(Kochian,1995)。植物对铝胁迫一般有两种忍耐机制:外部排斥机制和内部解毒机制,有机酸在上述机制中均起重要作用(Taylor,1991)。耐酸铝植物在铝胁迫下,其分泌的有机酸能与铝以螯合物的形式从植物根中渗出,这种螯合物对植物的毒害性远远弱于 Al^{3+} ,如菜豆、玉米、决明分泌柠檬酸(Miyasaka 等,1991;Pellet 等,1995;Ma

等,1997b);小麦分泌苹果酸;菜籽、萝卜、燕麦等分泌柠檬酸和苹果酸(Ma 等,2000);荞麦分泌草酸(Ma 等,1997a;Zheng 等,1998a)。而在一些铝积累型植物体内,有机酸能与铝以一定的比例结合,形成毒性小且稳定的化合物,通过这种机制也能有效缓解铝对植物的毒害,如绣球花中 2/3 的铝与柠檬酸以 1:1 的比例结合成无毒化合物(Ma 等,1997c),荞麦中的铝与草酸以 1:3 的比例结合为一具有稳定五环结构的无毒化合物(Ma 等,1998)。

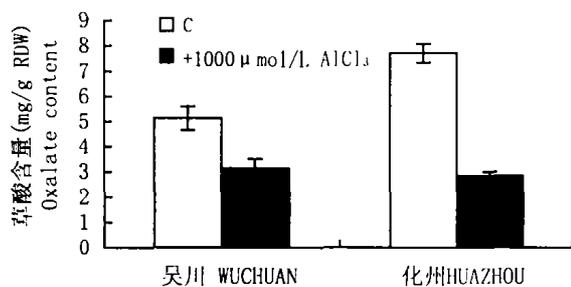


图 5 铝毒胁迫条件下不同大豆品种根的草酸含量(误差线代表 $S. \pm E$)

Fig. 5 Oxalate content in roots of different soybean cultivars in response to Al toxicity (Error bars stand for $S. \pm E$)

耐酸铝的植物种通常能分泌更多的有机酸,如草酸积累型植物荞麦在铝诱导下常常分泌大量的草酸(Zheng 等,1998a)。在同一植物种内,耐酸铝品种比铝敏感品种也常分泌更多的有机酸,如大豆、菜豆、小麦、玉米等植物(Yang 等,2000;黄鹤等,2001;Miyasaka 等,1991;Pellet 等,1995;Delhaize 等,1993)。但也有例外,耐酸铝植物野苧在铝处理下根系虽然也分泌草酸,但在分泌量上耐酸铝品种并没有比敏感品种分泌得更多(Ma 和 Miyasaka,1998)。在非草酸积累型植物的根分泌物中很难检测到草酸(Miyasaka 等,1991;Pellet 等,1995;Ma 等,1997b,1997c;Zheng 等,1998b;Delhaize 等,1993)。非草酸积累型植物大豆在酸铝胁迫下只分泌单一的有机酸——柠檬酸(Yang 等,2000;黄鹤等,2001)。从图 2、3 显示,大豆在铝胁迫下根系可分泌草酸和柠檬酸,其中耐酸铝品种草酸分泌速率明显提高,铝敏感性品种几乎没有变化,耐酸铝品种草酸分泌速率的明显提高,可增强其解铝毒的功能。大豆感抗品种柠檬酸分泌速率虽然均有显著提高,但处理后感抗品种间差异不大,说明柠檬酸的分泌在解铝毒中的作用有限。因此铝处理下大豆根系虽然分泌两种有机酸,但

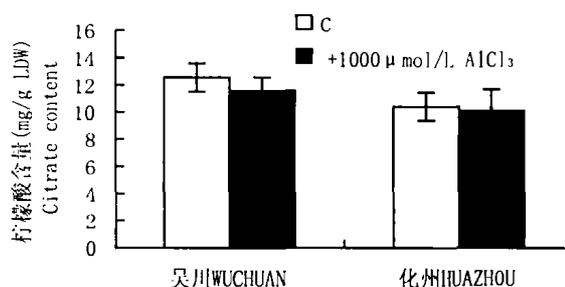


图 6 铝毒胁迫条件下不同大豆品种叶片的柠檬酸含量(误差线代表 $S. \pm E$)

Fig. 6 Citrate content in leaves of different soybean cultivars in response to Al toxicity (Error bars stand for $S. \pm E$)

草酸在大豆耐酸铝机制中的作用可能更为重要。

参考文献:

- 李庆远. 1983. 中国红壤[M]. 北京: 科学出版社, 74-193.
- Alam SM. 1981. Influence of aluminum on plant growth and mineral nutrition of barley[J]. *Commun Soil Sci Pl Anal*, **12**: 121-138.
- Delhaize E, Craig S, Beaton CD, et al. 1993. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) I. Uptake and distribution of aluminum in root apices[J]. *Plant Physiol*, **103**: 685-693.
- Ginting S, Johnson BB, Wilkens S. 1998. Alleviation of phytotoxicity on soybean growth by organic anions in nutrient solutions[J]. *Aust J Plant Physiol*, **25**: 901-908.
- Huang H(黄鹤), Nian H(年海). 2001. Characteristics of Al-induce citrate exudation and Al accumulation in vegetable soybean(菜用大豆在铝诱导下的柠檬酸分泌及铝积累特性)[J]. *J South China Agric Univ(华南农业大学学报)*, **22**(4): 19-21.
- Kochian LV. 1995. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plant[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **46**: 237-260.
- Ma JF, Hiradate S, Matsumoto H. 1998a. High aluminum resistance in buckwheat. II Oxalic acid detoxifies aluminum internally[J]. *Plant Physiol*, **117**: 753-759.
- Ma JF, Hiradate S, Nomoto K, et al. 1997c. Internal detoxification mechanism of Al in hydrangea. Identification of Al form (下转第 549 页 Continue on page 549)

能是以幼果中的二糖甙作为前体, 经历一个复杂的生源途径形成的。其中包含了在植物体内的糖基转移酶(Glycyltransferase)作用下, 葡萄糖残基逐步地转移, 依次形成呈强甜味的四糖甙、五糖甙过程。

(3) 授粉后 70 d 的果实, 外观仍呈绿色, 虽已积累有五糖甙, 但甜味强度较低的三糖甙、四糖甙仍是主要成分, 甚至还含部分呈苦味的二糖甙。罗汉果授粉后 85 d, 五糖甙积累达到高峰, 果实外观开始黄熟, 甜味最强。传统罗汉果主要烘烤加工成干果出售, 以授粉后 65~70 d 作为罗汉果的采收期, 此时的罗汉果在烘烤过程中不易出现破裂现象, 使成品果保持较好的外观品质。目前大量用于加工提取甜味剂的罗汉果鲜果, 其采收期仍与加工干果的采收期相同, 根据本研究, 其果龄应在 85 d 以上, 不应是目前沿用的 65~70 d。因此在开展罗汉果规范种植同时, 必须制定严格科学的采收标准, 以保证罗汉果的质量。

(4) 根据上述罗汉果甙类成分的变化规律, 值得进一步探索利用果实内本身存在的酶系, 将葡萄糖残基数较少, 甜度较低的甙类成分(如二糖甙、三糖甙), 充分转化生成高甜度的罗汉果五糖甙的罗汉果采后处理技术, 这对有效提高罗汉果及其提取物的品质及商品价值意义重大。

参考文献:

- 中华人民共和国卫生部药典委员会. 1977, 1985, 1990. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 348, 181, 184.
- 竹本常松, 在原重信, 中岛正, 等. 1983. 罗汉果成分研究(I)[J]. 药学杂志(日), 103: 151.
- Kasai R, Nie Ruiliu, Nashi K, *et al.* 1989. Sweet cucurbitane glycosides from fruits of *Siraitia siamensis* (chi-zi Luo-han-guo) a Chinese folk medicine[J]. *Agric Biol Chem*, 53(12): 3374.
- Matsumoto K, Kasai R, Ohtani k, *et al.* 1990. Minor cucurbitane glycosides from fruits of *Siraitia grosvenorii*(Cucurbitanaceae)[J]. *Chem Pharm Bull*, 38(7): 2030.
- Si JY(斯建勇), Chen DH(陈迪华), Chang Q(常琪), *et al.* 1996. Isolation and determination of cucurbitane-glycosides from fresh fruits of *Siraitia grosvenorii*(罗汉果中三萜甙的分离和结构测定)[J]. *Acta Botanica Sinica*(植物学报), 38(6): 489-494.
- Wang YP(王亚平), Chen JY(陈建裕). 1992. Studies on chemical constituents of *Siraitia grosvenorii*(罗汉果化学成分的研究)[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*(中草药), 23(2): 61-62.
- Xu WK(徐位坤), Mong LSH(孟丽珊), Li ZY(李仲瑶). 1992. Isolation and identification of a bitter constituent from Luo-han-guo, sunripe fruits(罗汉果嫩果中一个苦味成分的分离和鉴定)[J]. *Guihaia*(广西植物), 12(2): 136-138.

(上接第 557 页 Continue from page 557)

- in the leaves[J]. *Plant Physiol*, 13: 1033-1039.
- Ma JF, Zheng SJ, Hiradate S, *et al.* 1997a. Oxalic acid secretion by buckwheat roots and ^{27}Al -NMR of Al-oxalate complex[J]. *Nature*, 390: 569-570.
- Ma JF, Zheng SJ, Matsumoto H. 1997b. Specific secretion of citric acid induced by Al stress in cassia tora L[J]. *Plant Cell Physiol*, 38(9): 1019-1025.
- Ma JF, Taketa S, Yang ZM. 2000. Aluminum tolerance genes on the short arm of chromosome 3R are linked to organic acid release in Trticale[J]. *Plant Physiol*, 122: 687-694.
- Ma Zhong, Miyasaka SC. 1998. Oxalate exudation by taro in response to Al[J]. *Plant Physiol*, 118: 861-865.
- Miyasaka SC, Buta JG, Howell RK, *et al.* 1991. Mechanism of aluminum tolerance in snapbean, root exudation of citric acid[J]. *Plant Physiol*, 96: 737-743.
- Pellet DM, Grunes DL, Kochian GL. 1995. Organic acid exudation as an aluminum tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.)[J]. *Planta*, 196: 788-795.
- Taylor GJ. 1991. Current views of the aluminum stress response: the physiological basis of tolerance[J]. *Curr Top Plant Biochem Physiol*, 10: 57-93.
- Yang ZM, Sivaguru M, Horst WJ, *et al.* 2000. Aluminum tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (*Glycine max* L Merr)[J]. *Physiol Plant*, 110: 72-77.
- Yu L(俞乐), Peng XX(彭新湘), Yang C(杨崇), *et al.* 2002. Determination of oxalic acid in plant tissue and root exudates by reversed phase high performance liquid chromatography(反相高效液相色谱法测定植物组织及根分泌物中草酸)[J]. *Chin J of Anal Chem*, 30(9): 1119-1122 (in Chinese).
- Zheng SJ, Ma JF, Matsumoto H. 1998a. High aluminum resistance in buckwheat. I Aluminum-induced specific secretion of oxalic acid from root tips[J]. *Plant Physiol*, 117: 745-751.
- Zheng SJ, Ma JF, Matsumoto H. 1998b. Continuous secretion of organic acid is related to aluminum resistance during relatively long-term exposure to aluminum stress[J]. *Physiol plant*, 103: 209-214.