

黄瓜根边缘细胞生物学特性及其对铝的响应

周楠 陈文荣 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: 以黄瓜为试验材料, 研究了黄瓜根边缘细胞的生物学特性及其对铝毒的响应。试验结果表明, 在黄瓜种子萌发过程中, 根边缘细胞有很高的活性。当根长度在 25 mm, 根边缘细胞数目达到最高值 5 480 个, 根伸长到 10 mm 时, PME (果胶甲基酯酶) 相对活性达到最高值, 然后随着根的伸长, PME 相对活性逐渐下降。在铝处理的条件下, 黄瓜根长及边缘细胞的存活率会随着铝液浓度的升高依次递减, 说明铝毒对根的发育有明显的抑制作用及危害, 而根冠的 PME 活性却有所提高, 说明了 PME 与植物铝毒胁迫之间存在着相关性。铝毒条件下边缘细胞 PME 活性的提高, 使细胞壁的果胶去甲基化, 增加了 Al^{3+} 的结合位点, 从而避免铝更多地进入细胞内, 造成对植物的毒害。

关键词: 黄瓜; 边缘细胞; 果胶甲基酯酶 (PME); 根冠; 铝毒

中图分类号: S 642.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 05-1117-04

Biological Characteristic and the Response to Aluminum Toxicity of Cucumber Border Cells

Zhou Nan, Chen Wenrong, Liu Peng*, Xu Gendi, and Cai Miaozen

(Key laboratory of Botany, Zhejiang Normal University, Jinhua, Zhejiang 321004, China)

Abstract: Biological characteristic and response to aluminum toxicity of cucumber (*Cucumis sativa*) root border cells have been studied. The experimental result indicated, during the sprout process of cucumber seed, the root border cells had very high viability. When the root length was 25 mm, the number of the root border cell reached its maximum (about 5 480). The relative activity of PME (Pectin methylesterase) reached the maximum at 10 mm root length, then decreased gradually with the root elongating on. With the increasing concentration of Al^{3+} , root length and survival rate of border cells decreased. These results showed that aluminum toxicity had the obvious inhibition and harm to the growth of root and border cell. However, PME activity enhanced with the increasing concentration of Al^{3+} , showing PME was related to the stress of aluminum on plant. Simultaneously, the increase of PME activity under aluminum treatment condition caused demethylation of pectin in cucumber cell wall and increased Al^{3+} union position spots in the cell wall, thus prevented much more aluminum from entering the cell and harming plant.

Key words: Cucumber; Border cell; PME; Root cap; Aluminum toxicity

1 目的、材料与方法

根冠脱落细胞 (Sloughed root cap cells) 被称为根边缘细胞 (Root border cells)^[1], 能够合成并向外分泌一系列具有生物活性的化学物质, 诱导和控制根际微生物的生长, 中和有毒物质, 从而调节根部环境^[2]。边缘细胞的研究是一新兴领域, 可望解决植物病理、植物营养及细胞学研究中很多悬而未决的难题。目前铝毒被认为是一个限制占全球可耕地约 40% 的酸性土壤地区作物产量的主要因素, 微量的 Al^{3+} 即可抑制作物多数品种根的生长^[3]。铝对植物的毒害在于降低了细胞成活率, 增加了死亡率。边缘细胞对铝敏感, 在保护根尖和根冠免于铝毒害方面起到重要作用^[4]。

收稿日期: 2006 - 01 - 04; 修回日期: 2006 - 04 - 13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30540056); 浙江省自然科学基金项目 (405185、303461); 浙江省生态学重点学科经费资助

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: pliu99@163.com)

到目前为止, 已经对 14 个科 39 属 48 种植物边缘细胞的数量及其活性进行了检测^[5~11], 表明离体的大麦 (*Hordeum vulgare*) 边缘细胞在水中只能存活 3 d^[11], 但对黄瓜边缘细胞的生物学特性, 及其边缘细胞对铝毒响应的研究还未见报道。本文主要报告黄瓜边缘细胞的生物学特性及其对铝毒的响应, 为铝对植物的毒害过程和植物耐铝毒机理的研究提供资料。

以黄瓜 (*Cucumis sativa*) ‘津优 1 号’为材料, 将种子在 37 ℃ 蒸馏水中水浴 1 h, 然后置于含无菌湿纱布的培养皿 (直径为 15 mm) 中, 于 37 ℃ 保温箱中萌发 1 d, 用悬空气法培养露白种子, 用橡皮筋将纱网固定于 500 mL 小烧杯中, 杯底含有 200 ~ 250 mL 蒸馏水, 将露白种子播于网孔中, 每杯播 10 ~ 15 粒露白种子, 将播好种子的烧杯再放入盛有蒸馏水的 1 000 mL 的大烧杯中 (小烧杯不浮起为宜), 用塑料薄膜和橡皮筋封口于 28 ℃ 保温箱中培养。铝处理时铝盐用无水氯化铝 ($AlCl_3$), 钙盐用无水氯化钙 ($CaCl_2$)。

边缘细胞总数及死活数目检测: 参照戚伟刚等方法^[12], 边缘细胞活性 = 活细胞个数 / 边缘细胞总数 $\times 100\%$ 。

PME (果胶甲基酯酶) 的提取及活性测定: 各剪取 0、5、10、15、20 和 25 mm 长度的 40 个根尖 (1 ~ 2 mm), 置于含 200 μ L 的 PME 提取液 (Citric acid 0.1 mol/L、 Na_3PO_4 0.2 mol/L、NaCl 1 mol/L, pH 5.8) 的研钵中, 充分研磨后, 将材料置于离心管中, 充分振荡后于冰中放置 1 h, 每隔 20 min 振荡 1 次, 4、15 000 $\times g$ 离心 10 min, 收集上清液, 于 -20 ℃ 保存。PME 活性检测方法主要参照 Richard 等^[13]的方法, 单位为 $H^+ \mu mol/h$ 。

不同浓度铝对黄瓜根边缘细胞的影响: 将已发芽 1 mm 左右的黄瓜种子播于网孔中, 然后按悬空气法静置培养。分两组试验: 试验一, 铝处理离体培养。根据不同长度根边缘细胞总数统计试验发现, 在根长为 25 mm 时边缘细胞数目达到最大值。剪取长度约 25 mm 的根尖约 3 mm, 置于盛有不同浓度铝液的 Eppendorf 管中分别培养 1、2、4、16、24 h, 然后计算边缘细胞的存活率。试验二: 铝处理活体培养。在根长至 2 ~ 3 mm 时, 每隔 1 h 喷洒 1 次铝液, 在培养 4、8、12、16、20 h 后, 测量黄瓜的根长及 PME 活性。

各试验均设 4 个铝处理: R1: 25 $\mu mol/L$, R2: 50 $\mu mol/L$, R3: 100 $\mu mol/L$, R4: 200 $\mu mol/L$ 的 $AlCl_3$ 溶液 (pH 4.5, 各铝溶液中均含 200 $\mu mol/L$ $CaCl_2$), 并以 200 $\mu mol/L$ $CaCl_2$ 作为对照, 每个处理 3 次重复。根据 3 次独立试验所得数据计算平均值和标准偏差, 利用 SPSS12.0 分析软件进行方差分析。

2 结果分析与讨论

2.1 黄瓜根边缘细胞的生物学特性

表 1 显示, 黄瓜第 1 个边缘细胞几乎与根尖同时出现。根长 5 mm 时, 已形成近 1 300 个边缘细胞; 在 5 ~ 25 mm, 随着根的伸长边缘细胞逐渐增加, 根长和边缘细胞数目表现出一定的相关性。25 mm 根长时, 边缘细胞总数目达到最高值 (5 480)。之后, 根的伸长不再使边缘细胞数目增加, 并开始降低, 30 mm 根长时, 边缘细胞降为 3 170 个。同时边缘细胞的存活率随着根系的生长也有所不同。在 5 mm 时存活率最低, 而在 10 ~

25 mm 的长度中, 边缘细胞存活率基本保持相对稳定的状态, 这些长度间的存活率没有显著性差异, 说明在黄瓜根系的不同发育时期所形成的边缘细胞具有较一致的生理活性。从我们的试验来看, 黄瓜边缘细胞在悬空气培养法中大约可存活 1 ~ 2 d, 低于马伯军等^[11]所测的大麦边缘细胞最多能存活 3 d

表 1 黄瓜根边缘细胞数、活性和根冠 PME 活性的变化

Table 1 Changes of border cell number, activity and PME activity of cucumber

根长 Root length (mm)	根边缘细胞数 Number of border cell	根边缘细胞活性 Border cell activity (%)	PME 活性 PME activity ($H^+ \mu mol/h$)
5	1 300 $\pm 148c$	53.4 $\pm 2.3b$	0.1305 $\pm 0.0035a$
10	3 833 $\pm 156b$	66.2 $\pm 5.0a$	0.1420 $\pm 0.0038a$
15	4 013 $\pm 309b$	65.4 $\pm 1.5a$	0.1160 $\pm 0.0040b$
20	4 127 $\pm 143b$	62.0 $\pm 8.6a$	0.0840 $\pm 0.0036c$
25	5 480 $\pm 252a$	62.9 $\pm 6.9a$	0.0565 $\pm 0.0039d$

的结果,说明不同物种之间存在着差异性。黄瓜属的哈密瓜最高边缘细胞数目 2 800个,活性 81% ~ 89%,丝瓜属的丝瓜最高边缘细胞数目 2 800个,活性 91% ~ 99%,与本试验黄瓜有所差异,说明同科不同属物种或同属不同种间存在着差异^[7]。

从表 1还可以看出,黄瓜种子刚刚露白时,根冠 PME相对活性已达到了较高的水平,根长 10 mm时,PME相对活性达到最高值。之后,随着根的伸长,PME相对活性逐渐下降,根长 15、20和 25 mm时 PME活性都与根长 10 mm时的差异达到显著水平 ($P < 0.05$)。目前普遍认为,PME是促进边缘细胞脱离根系表面的主要因素^[10],这可能是根长 0 ~ 5 mm时就已经有大量边缘细胞存在的原因所在。

2.2 黄瓜根边缘细胞对铝毒的响应

表 2表明,同一时间内随铝液浓度的增加,边缘细胞存活率有依次递减的趋势,说明铝浓度的升高对边缘细胞的伤害作用增强。随着铝处理时间的延长,在同一铝液浓度下,存活率也依次递减,说明铝胁迫时间也会明显影响边缘细胞的活性,胁迫时间的增加会加大植物根边缘细胞所受到的抑制作用。

Hawes等研究表明^[9],铝中毒的前 2 h内,豌豆边缘细胞的死亡率与铝浓度呈线性关系,以后随着毒害时间的延长,死亡的边缘细胞逐渐增多,与本试验结果相似。

表 2 铝液对黄瓜根边缘细胞发育的影响

Table 2 Effect of aluminum on border cell development in cucumber

Al ³⁺ 浓度 Concentration of Al ³⁺ ($\mu\text{mol/L}$)	边缘细胞存活率 Survival rate of border cell (%)				
	1 h	2 h	4 h	16 h	24 h
0	0.72 \pm 0.01a	0.69 \pm 0.03a	0.67 \pm 0.03a	0.64 \pm 0.04a	0.37 \pm 0.01a
25	0.70 \pm 0.03b	0.65 \pm 0.02b	0.52 \pm 0.03c	0.43 \pm 0.02b	0.33 \pm 0.02b
50	0.67 \pm 0.01c	0.62 \pm 0.03d	0.53 \pm 0.05b	0.27 \pm 0.02d	0.21 \pm 0.03c
100	0.65 \pm 0.02d	0.63 \pm 0.02c	0.43 \pm 0.04d	0.32 \pm 0.02c	0.11 \pm 0.02d
200	0.42 \pm 0.03e	0.25 \pm 0.03e	0.23 \pm 0.02e	0.18 \pm 0.04e	0.05 \pm 0.02e

多数研究表明,铝毒能在短时间内抑制根的伸长,并把根系伸长作为测定铝毒的重要指标^[3]。从表 3可以看出,相同处理时间下,随着铝处理浓度的增加,根的长度都明显下降。在相同的铝浓度处理下,随着时间的延长,黄瓜根仍继续伸长。表 3的结果还显示,在相同处理时间下,各个铝液浓度对黄瓜根冠 PME活性都有促进作用,尤其是当铝处理为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,PME活性明显高于其它浓度铝处理,说明了 PME与植物抗铝毒之间存在着相关性。Stephenson等^[14]对豌豆边缘细胞的研究表明,根冠中编码 PME的 mRNA的增加先于 PME的增加,Zhu^[15]研究表明,边缘细胞 PME基因 1 (*rcpm1*)表达以后,PME的活性增加,由此可推测,100 $\mu\text{mol/L}$ 的 Al³⁺对黄瓜而言诱导 *rcpm1*基因表达量达到最大,当 Al³⁺浓度增至 200 $\mu\text{mol/L}$ 时,已超过植物组织所能承受的极限,使整个代谢系统紊乱,导致 PME活性也迅速下降。

表 3 铝液对黄瓜根长及对根冠 PME活性的影响

Table 3 Effect of aluminum on root length and activity of PME in root cap of cucumber

Al ³⁺ 浓度 Concentration of Al ³⁺ ($\mu\text{mol/L}$)	4 h		8 h		12 h		16 h		20 h	
	根长 Length of root (mm)	PME (H ⁺ $\mu\text{mol/h}$)	根长 Length of root (mm)	PME (H ⁺ $\mu\text{mol/h}$)	根长 Length of root (mm)	PME (H ⁺ $\mu\text{mol/h}$)	根长 Length of root (mm)	PME (H ⁺ $\mu\text{mol/h}$)	根长 Length of root (mm)	PME (H ⁺ $\mu\text{mol/h}$)
0	10.6 \pm 0.84a	0.150 \pm 0.030d	16.9 \pm 0.99a	0.151 \pm 0.029d	20.1 \pm 0.74a	0.141 \pm 0.025c	24.5 \pm 0.50a	0.142 \pm 0.026c	28.5 \pm 0.97a	0.104 \pm 0.030d
25	7.0 \pm 0.67b	0.179 \pm 0.039c	9.6 \pm 0.70b	0.149 \pm 0.040d	13.1 \pm 1.30b	0.116 \pm 0.040d	14.6 \pm 1.20b	0.157 \pm 0.036d	21.6 \pm 1.80b	0.135 \pm 0.040c
50	6.1 \pm 0.88b	0.226 \pm 0.040b	5.7 \pm 0.82c	0.182 \pm 0.037c	7.4 \pm 0.52c	0.174 \pm 0.036b	10.7 \pm 0.90c	0.165 \pm 0.038b	12.1 \pm 1.40c	0.146 \pm 0.040b
100	4.7 \pm 0.48c	0.311 \pm 0.040a	3.9 \pm 0.57d	0.231 \pm 0.038a	3.8 \pm 0.63d	0.218 \pm 0.035a	7.0 \pm 0.63d	0.190 \pm 0.040b	7.0 \pm 0.67d	0.153 \pm 0.036a
200	3.6 \pm 0.52c	0.180 \pm 0.037c	3.1 \pm 0.32d	0.193 \pm 0.040b	2.6 \pm 0.52d	0.093 \pm 0.040e	3.4 \pm 0.92e	0.204 \pm 0.038a	3.3 \pm 1.60e	0.099 \pm 0.038d

边缘细胞及其细胞壁外的果胶层是植物抗铝毒胁迫的一个重要机制之一^[15]。细胞壁所富含的果胶是 Al^{3+} 的主要结合位点^[16]，铝处理使 PME 的活性显著提高，促使果胶去甲基化形成更多的羧基，结果使更多的 Al^{3+} 结合于细胞壁上的带负电位点，最终使 Al^{3+} 禁锢于根尖表面并丧失对根尖的毒害作用。我们的试验再次显示了各个铝液浓度对黄瓜根冠 PME 酶活性都有促进作用。另一方面，PME 活性在边缘细胞游离过程中起着重要作用，Zhu 等^[15] 的研究表明，大麦在铝处理初期，PME 活性显著增加，使根表面带负电位点，使其结合的 Al^{3+} 增加，之后 PME 活性大幅下降，致使边缘细胞的产生数量迅速下降。边缘细胞及其外裹的果胶层主要分布于根尖及根冠分裂组织周围，不仅减少根系伸长过程中与土壤的磨擦作用，而且可以减少铝进入根尖、根冠分裂组织以保护植物根系免受铝毒伤害^[2]。本研究与大麦有不同的变化趋势，黄瓜根系 PME 活性在各种铝浓度处理下均维持在较高水平，致使边缘细胞数目也持续增长，显示出黄瓜对铝毒有较大的适应能力。

参考文献：

- Knudson L. Viability of detached root cap cells. *American Journal of Botany*, 1919, 6: 309 ~ 310
- 徐根娣, 刘 鹏, 周志华. 植物边缘细胞发育和功能的研究进展. *中国农学通报*, 2004, 20 (5): 28 ~ 32
Xu G D, Liu P, Zhou Z H. A progress of studies on development and functions of border cells. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2004, 20 (5): 28 ~ 32 (in Chinese)
- Ma J F, Jun F. Recent progress in the research of external Al detoxification in higher plants: a minireview. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2003, 97: 46 ~ 51
- Archambault D J, Zhang G, Taylor G J. Accumulation of Al in root mucilage of an Al tolerant and an Al-sensitive cultivar of wheat. *Plant Physiology*, 1996, 112: 1471 ~ 1478
- 孙达丽, 崔洁晨, 徐根娣, 刘 鹏. 番茄根边缘细胞生物学特性及铝对其活性的影响. *亚热带植物科学*, 2006, 35 (2): 1 ~ 4
Sun D L, Cui J C, Xu G D, Liu P. Biological characters of tomato root border cell and effect of aluminum on its activity. *Subtropical Plant Science*, 2006, 35 (2): 1 ~ 4 (in Chinese)
- 蔡妙珍, 刘 鹏, 徐根娣, 刘海华. Al^{3+} 对荞麦离体边缘细胞的作用. *江苏大学学报 (自然科学版)*, 2006, 27 (4): 293 ~ 298
Cai M Z, Liu P, Xu G D, Liu H H. Effect of Al^{3+} toxicity on root border cells in vitro of buckwheat. *Journal of Jiangsu University (Natural Science Edition)*, 2006, 27 (4): 293 ~ 298 (in Chinese)
- Hawes M C, Pueppke S G. Sloughed peripheral root cap cells: yield from different species and callus formation from single cells. *American Journal of Botany*, 1986, 73: 1466 ~ 1473
- Hawes M C, Bengough G, Cassab G, Ponce G. Root caps and rhizosphere. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2003, 21: 352 ~ 367
- Hawes M C, Lin H J. Correlation of pectolytic enzyme activity with the programmed release of cells from root caps of pea (*Pisum sativum*). *Plant Physiology*, 1990, 94: 1855 ~ 1859
- Wen F, Zhu Y, Hawes M C. Effect of pectin methylesterase gene expression on pea root development. *Plant Cell*, 1999, 11: 1129 ~ 1140
- 马伯军, 潘建伟, 顾 青, 郑 科, 叶 丹, 华 靖, 朱睦元. 大麦根边缘细胞发育的生物学特性. *植物生理和分子生物学报*, 2003, 29 (2): 159 ~ 164
Ma B J, Pan J W, Gu Q, Zheng K, Ye D, Hua J, Zhu M Y. Biological characters of root border cell development in barley. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2003, 29 (2): 159 ~ 164 (in Chinese)
- 戚伟刚, 刘 鹏, 徐根娣, 蔡妙珍. 铝毒对水稻边缘细胞的影响. *河南农业科学*, 2006 (3): 22 ~ 24
Qi W G, Liu P, Xu G D, Cai M Z. Aluminum toxicity to root border cells of rice. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2006 (3): 22 ~ 24 (in Chinese)
- Richard L, Qin L X, Gadal P, Goldberg R. Molecular cloning and characterization of a putative pectin methylesterase cDNA in *Arabidopsis thaliana* L. *FEBS letters*, 1994, 355: 133 ~ 139
- Stephenson M B, Hawes M C. Correlation of pectin methylesterase activity in root caps of pea with root border cell separation. *Plant Physiology*, 1994, 106: 739 ~ 745
- Zhu M Y, Ahn S, Matsumoto H. Inhibition of growth and development of root border cells in wheat by Al. *Plant Physiology*, 2003, 117: 359 ~ 367
- Schmohl N, Piling J, Fisahn J, Horst W J. Pectin methylesterase modulates aluminum sensitivity in *Zea mays* and *Solanum tuberosum*. *Physiologia plantarum*, 2000, 109: 419 ~ 427