

# 苹果砧木 SH<sub>40</sub> 和八棱海棠缺铁胁迫下根系有机酸分泌的差异

李振侠<sup>1,2</sup>, 徐继忠<sup>1\*</sup>, 高 仪<sup>1</sup>, 邵建柱<sup>1</sup>, 张 媛<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>河北农业大学园艺学院, 河北保定 071001; <sup>2</sup>河北科技大学生物科学与工程学院, 石家庄 050018)

**摘 要:** 以苹果砧木 SH<sub>40</sub> 和八棱海棠 (*Malus micromalus*) 的生根试管苗为试材, 采用水培方法, 研究了缺铁胁迫对根系分泌有机酸的种类和数量的影响。结果表明: SH<sub>40</sub> 和八棱海棠根系分泌有机酸种类相同, 主要是草酸、丙二酸、酒石酸、苹果酸和柠檬酸, 但在分泌总量上差异明显, 八棱海棠分泌有机酸总量大于 SH<sub>40</sub>。缺铁胁迫时 SH<sub>40</sub> 草酸分泌量和八棱海棠柠檬酸分泌量大量增加, 且八棱海棠干物质和铁含量明显高于 SH<sub>40</sub>。草酸和柠檬酸分泌量增加可能是 SH<sub>40</sub> 和八棱海棠耐受缺铁胁迫的原因之一。

**关键词:** 缺铁; 苹果砧木; 根系; 有机酸

**中图分类号:** S 661 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 02-0279-04

## Difference of Organic Acid Exudation from Roots of SH<sub>40</sub> and Balenghaitang under Iron-deficiency Stress

LI Zhen-xia<sup>1,2</sup>, XU Ji-zhong<sup>1\*</sup>, GAO Yi<sup>1</sup>, SHAO Jian-zhu<sup>1</sup>, and ZHANG Yuan<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China; <sup>2</sup>College of Bioscience and Bioengineering, Science and Technology University of Hebei, Shijiazhuang 050018, China)

**Abstract:** SH<sub>40</sub> and Balenghaitang (*Malus micromalus*), apple rootstocks, were used as experimental materials to study the organic acid exudation from roots grown hydroponically under iron-deficiency stress. Results showed no difference in types of organic acids between SH<sub>40</sub> and Balenghaitang under iron-deficiency, including oxalate, malonic acid, tartaric acid, citrate acid and malate. The quantity, however, was significantly different. The total amount of organic acid of Balenghaitang, which has higher in iron-deficiency tolerance, was higher than that of SH<sub>40</sub>. On the other hand, oxalate and citrate exuded from SH<sub>40</sub> and Balenghaitang were increased largely under iron-deficiency stress, and dry mass and Fe content of Balenghaitang were significantly higher than that of SH<sub>40</sub>. In summary, significantly increased oxalate and citrate exudation is probably responsible for the tolerance of SH<sub>40</sub> and Balenghaitang to iron-deficiency stress.

**Key words:** Iron-deficiency; Apple rootstocks; Root; Organic acid

SH<sub>40</sub> 是山西省农业科学研究院果树研究所用国光和河南海棠杂交培育的苹果矮化砧木, 其抗寒能力较强, 但容易出现缺铁失绿现象。而八棱海棠 (*Malus micromalus*) 耐缺铁能力较强 (马宝 等, 1999; 李振侠 等, 2004)。

已有的研究表明, 植物在某些逆境因子胁迫下, 根系可通过向根际环境分泌有机酸来减轻胁迫 (Li & Ma, 2000)。其机理是通过改变根际 pH 和氧化还原条件, 或者通过螯合作用和还原作用来增加元素的溶解度和移动性, 进而促进植物根系对这些养分的吸收和利用 (Hoffland, 1992; Jones, 1998)。Olsen 等 (1981) 发现番茄缺铁胁迫下分泌的咖啡酸 (3, 4 - 二羟基肉桂酸, 3, 4-Dihydroxy-

收稿日期: 2006 - 09 - 11; 修回日期: 2007 - 02 - 03

基金项目: 河北省科技厅资助项目

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: xjzhxw@eyou.com)

cinmmic acid) 能将土壤中难溶性的铁溶解出来, 从而提高铁的吸收利用效率。因此研究植物根系分泌物中的有机酸对理解植物抗养分胁迫的机理有重要意义。

本试验以苹果砧木 SH<sub>40</sub>和八棱海棠的生根试管苗为试材, 采用水培的方法对其根系分泌物中有机酸的种类和数量进行比较研究, 以期筛选抗缺铁砧木提供实验和理论依据。

## 1 材料与方法

试验于 2002~2003年在河北农业大学园艺学院生物技术实验室进行。供试材料为 SH<sub>40</sub>和八棱海棠的生根试管苗 (苗龄 90 d)。

选择生长一致的生根试管苗培养于 1/2剂量的 Hoagland营养液中, 每天 14 h光照, 光强 45.67  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 温度白天为 22~28℃, 夜间为 17~21℃, 相对湿度为 60%~90%, 持续供氧。每盆 5株苗, 营养盆容积为 1 000 mL。

培养 2周后再转入正常营养液 (Fe-EDTA 为 40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 中培养 2周, 然后进行缺铁 (0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 处理, 对照为 Fe-EDTA 40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。处理 5 d后采用原位收集法 (田中民等, 2003) 对其根系分泌物进行收集。

根系分泌物收集及有机酸测定: 准备直径为 5 mm的层析滤纸片, 用甲醇清洗 3次后再用重蒸水清洗 3次, 在无菌条件下晾干备用。收集时先将正常供铁和缺铁的幼苗根系在去离子水中清洗数次, 以除去根表的营养液, 然后将根系平放于铺有湿滤纸片的磁盘中。在收集分泌物的根组织下方垫上 2 cm  $\times$  2 cm的塑料胶片, 然后在收集部位根组织的上下方各放一个预先处理好的层析滤纸片, 其余根组织部分用湿滤纸片覆盖。最后用黑塑料布将整个根系盖住, 在光照下收集 4 h, 各处理重复 3次。收集结束后将滤纸片放入 2.5 mL离心管中, 每 10个滤纸片加 300  $\mu\text{L}$ 重蒸水, 经 12 000  $\times g$ 离心 10 min后取上清液备用。取根系分泌物的上清液 1 mL过 0.45  $\mu\text{m}$ 滤膜, 用毛细管电泳 (HPCE) 测定其中的有机酸含量。色谱柱为直径 75  $\mu\text{m}$ 、长 46.4 cm的石英毛细管柱, pH 1.81的 50 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸缓冲液 (0.2 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$  CTAB), 紫外检测波长 195 nm, 柱温 25℃, 分离电压 15 kV, 压力进样 20 Pa  $\cdot \text{s}^{-1}$ 。有机酸标样为 Sigma公司产品。

地上部干质量测定: 收集地上部分, 用蒸馏水将样品洗净后放入烘箱内, 105℃杀青 15 min, 80℃烘干至恒重。

地上部分铁含量测定: 将烘好的样品粉碎, 称取一定质量放入坩埚内, 在 550℃的马弗炉中灰化 7~8 h, 冷却后加入 1:1的盐酸 1 mL溶解残渣, 定容至 25 mL容量瓶中过滤。用德国产 PERKN-EL-MER M2100型原子吸收分光光度计测定铁含量, 重复 3次。

采用 SPSS软件进行方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 缺铁胁迫对苹果砧木地上部干质量和铁含量的影响

缺铁胁迫降低了 SH<sub>40</sub>和八棱海棠地上部干物质的积累 (图 1)。与对照相比, SH<sub>40</sub>地上部干物质积累量降低了 17.50%, 八棱海棠降低了 12.75%, 两者差异显著, 缺铁胁迫对 SH<sub>40</sub>的抑制作用较大。

由图 2可以看出, 缺铁胁迫降低了 SH<sub>40</sub>和八棱海棠地上部的铁含量。与对照相比, SH<sub>40</sub>降低了 43.84%, 八棱海棠降低了 22.31%, 差异均达 0.05的显著水平; SH<sub>40</sub>的降幅大于八棱海棠。说明在缺铁胁迫前, 正常营养液培养条件下, 八棱海棠有较高的铁吸收能力, 因此在随后的低铁胁迫条件下, 八棱海棠比 SH<sub>40</sub>更耐缺铁胁迫。

本研究中, 在缺铁胁迫下, 八棱海棠的干物质和铁积累量都高于 SH<sub>40</sub>, 砧木类型间差异显著,

说明八棱海棠对溶液中铁的吸收能力较高，耐受缺铁能力较强。

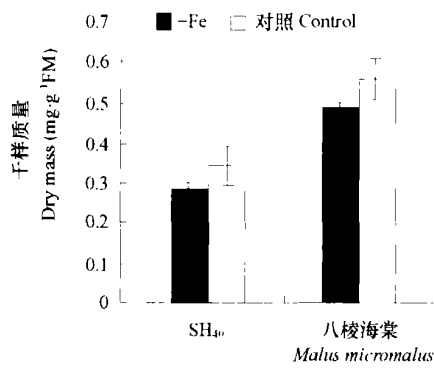


图 1 缺铁胁迫对苹果砧木地上部干质量的影响  
Fig 1 Effect of iron-deficiency stress on shoot dry mass of apple rootstocks

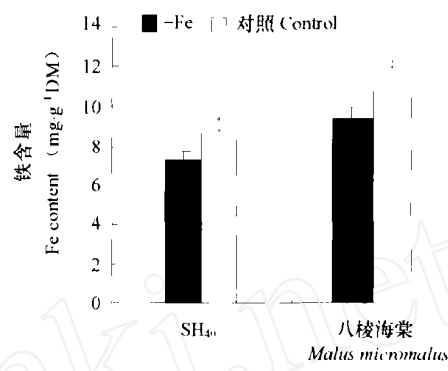


图 2 缺铁胁迫对苹果砧木叶片铁含量的影响  
Fig 2 Effect of iron-deficiency stress on Fe content in leaf of apple rootstocks

2.2 缺铁胁迫下苹果砧木根系有机酸分泌的差异

由表 1 可以看出，从两砧木根系分泌物中至少检测出 5 种有机酸，经标样鉴定，分别为草酸、酒石酸、丙二酸、苹果酸和柠檬酸，但分泌量不同。在其它作物中也发现类似的低分子量有机酸的分泌 (Baziramakenga et al，1995; 董淑富 等，1997; Cie et al，1998)。

表 1 缺铁胁迫对苹果砧木根系有机酸的影响

Table 1 Effect of iron deficiency stress on exudation of organic acid in apple rootstocks (μg·cm <sup>-1</sup> root)							
处理 Treatment	砧木 Rootstock	草酸 Oxalate	丙二酸 Malonic acid	酒石酸 Tartaric acid	柠檬酸 Citrate	苹果酸 Malate	总量 Total
- Fe	SH <sub>40</sub>	67.90a	11.33a	1.42a	25.69b	13.80a	120.16b
	八棱海棠 ( <i>Malus micromalus</i> )	23.29b	6.42b	0.78a	117.19a	11.36a	159.07a
对照 Control	SH <sub>40</sub>	36.18a	9.31b	-	16.27b	24.87b	86.64b
	八棱海棠 ( <i>Malus micromalus</i> )	32.91a	49.38a	-	27.27a	36.96a	146.52a

注：-，未检出。Note：-，not determined; =0.05.

缺铁胁迫下，两砧木有机酸分泌种类相同，但在分泌总量上存在差异，八棱海棠分泌的有机酸总量显著高于 SH<sub>40</sub>。缺铁胁迫下，SH<sub>40</sub>草酸分泌量大量增加，是对照的 1.88 倍，是八棱海棠的 2.92 倍；八棱海棠柠檬酸分泌量大量增加，是对照的 4.30 倍，是 SH<sub>40</sub>的 4.56 倍。在对照（供铁）条件下，两砧木除未检测到酒石酸的分泌外，其余分泌有机酸的种类与缺铁胁迫时相同，但有机酸总量差异显著。

3 讨论

已有的研究表明：基因型不同，分泌特定的有机酸也不同，如油菜主要分泌柠檬酸和苹果酸 (Marschner et al，1986)；籽粒苋富钾基因型根系分泌物中的苹果酸、柠檬酸和草酸含量显著高于一般基因型 (李廷轩 等，2005)。本试验揭示，在缺铁胁迫时，SH<sub>40</sub>草酸分泌量明显高于八棱海棠，占有机酸总量的 56.50%；而八棱海棠草酸分泌量仅占有机酸总量的 14.64%；八棱海棠的柠檬酸分泌量占有机酸总量的 73.67%，但 SH<sub>40</sub>的柠檬酸分泌量仅占总量的 21.38%，两者差异显著。因此缺铁胁迫时 SH<sub>40</sub>增加的主要是草酸，八棱海棠增加的主要是柠檬酸，且柠檬酸增加的量远高于草酸。

曾清如等 (2001) 的研究表明，有机酸种类不同，对土壤中 Fe、Mn、Cu、Zn 的活化能力不同，其中柠檬酸的活化能力最强，草酸次之。

Ma等 (1997) 的研究表明, 铝胁迫也可诱导决明子专一性分泌柠檬酸, 柠檬酸分泌是决明子抵御铝毒害的主动性机理。因此我们推测, 草酸是  $\text{SH}_{40}$  受到缺铁胁迫时对铁吸收起主要作用的酸, 而八棱海棠是柠檬酸, 草酸和柠檬酸含量增加可能是它们耐受缺铁胁迫能力不同的原因之一, 当然有机酸分泌增加是否直接促进铁的吸收还需要更深入的研究以提供更有力和直接的证据。

## References

- Baziramakenga R, Simard R R, Leroux G D. 1995. Determination of organic acids in soil extracts by ion chromatography. *Soil Biol Biochem*, 27: 349 - 356.
- Cie li ski G, van Rees K C J, Sznigielska A M, Krishnamurti G S R, Huang P M. 1998. Low-molecular-weight organic acids in rhizosphere soils of durum wheat and their effect on cadmium bioaccumulation. *Plant and Soil*, 20 (1): 3: 109 - 117.
- Dong Shu-fu, Tang Fang, Shu Huai-rui. 1997. Exudation of organic acids by the roots of apple rootstock seedlings. *Acta Horticulturae Sinica*, 24 (4): 391 - 392. (in Chinese)
- 董淑富, 唐 芳, 束怀瑞. 1997. 苹果砧木实生苗根系有机酸的研究. *园艺学报*, 24 (4): 391 - 392.
- Hoffland E. 1992. Quantitative evaluation of the role of organic acid exudation in the mobilization of rock phosphate by rape. *Plant and Soil*, 140: 279 - 291.
- Jones D L. 1998. Organic acids in the rhizosphere: a critical review. *Plant and Soil*, 205: 25 - 44.
- Li Ting-xuan, Ma Guo-rui, Zhang Xi-zhou, Wang Chang-quan. 2005. Change characteristics of organic acid and amino acid in root exudates in different grain amaranth genotypes. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 11 (5): 647 - 653. (in Chinese)
- 李廷轩, 马国瑞, 张锡洲, 王昌全. 2005. 籽粒苋不同富钾基因型根系分泌物中有机酸和氨基酸的变化特点. *植物营养与肥料学报*, 11 (5): 647 - 653.
- Li X F, Ma J F, Matsumoto H. 2000. Pattern of aluminum-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. *Plant Physiol*, 123: 1537 - 1543.
- Li Zhen-xia, Xu Ji-zhong, Gao Yi, Zhang Yu-mei. 2004. Effect of the different iron concentration on  $\text{Fe}^{3+}$  reductase activity of apple rootstocks. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 27 (1): 48 - 51. (in Chinese)
- 李振侠, 徐继忠, 高 仪, 张玉梅. 2004. 不同铁浓度对苹果砧木  $\text{Fe}^{3+}$  还原酶活性的影响. *河北农业大学学报*, 27 (1): 48 - 51.
- Ma Bao-kun, Xu Ji-zhong, Luo De-xin, Chen Hai-jiang. 1999. Study on the relationship between water contents in apple shoots during winter and shoots shrivelling with Red Fuji apple grafted on different dwarf interstocks. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 22 (4): 34 - 37. (in Chinese)
- 马宝 , 徐继忠, 骆德新, 陈海江. 1999. 不同矮化中间砧红富士苹果越冬期间枝条内水分变化与抽条的关系. *河北农业大学学报*, 22 (4): 34 - 37.
- Ma J F, Zheng S J, Matsumoto H. 1997. Specific secretion of citric acid induced by Al stress in *Cassia tora*. *Plant Cell Physiol*, 38 (9): 1019 - 1025.
- Marschner H, Romheld V, Host W J. 1986. Root-induced changes in the rhizosphere: importance for the mineral nutrition of plant. *Z Pflanzenernaehr Bodenkd*, 149: 441 - 456.
- Olsen R A, Bennett J H, Blume D, Brown J C. 1981. Chemical aspects of Fe stress response mechanism in tomatoes. *Journal of Plant Nutrition*, 3: 905 - 921.
- Tian Zhong-min, Qin Fang-ling, Wang Ba. 2003. Comparative studies on methods of collecting root exudates from phosphorus deficient white lupin. *Journal of Northwest Science-Technology University of Agriculture (Nature Science Ed)*, 31 (4): 154 - 158. (in Chinese)
- 田中民, 秦芳玲, 王 波. 2003. 缺磷白羽扇豆根系分泌物收集方法的比较研究. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, 31 (4): 154 - 158.
- Zeng Qing-ru, Zhou Xi-hong, Liao Bai-han, Yang Ren-bin, Tie Bai-qing. 2001. Activation effects of low molecularweight organic acids on Al, F, P, Cu, Zn, Fe and Mn in soils of tea garden. *Journal of Tea Science*, 21 (1): 48 - 52. (in Chinese)
- 曾清如, 周细红, 廖柏寒, 杨仁斌, 铁柏青. 2001. 低分子有机酸对茶园土壤中 Al、F、P、Cu、Zn、Fe、Mn 的活化效应. *茶叶科学*, 21 (1): 48 - 52.