

小金海棠和丽江山荆子的缺铁胁迫反应

李 凌¹ 周泽杨² 裴 炎²(¹ 西南农业大学园艺园林学院, 重庆 400716; ² 西南农业大学生物技术中心, 重庆 400716)

摘 要: 小金海棠实生苗在 pH 7.8 的碱性紫色土上生长正常, 丽江山荆子实生苗表现严重的缺铁失绿; 相同土壤上的丽江山荆子砧上的小金海棠叶片会出现明显的缺铁失绿现象, 而小金海棠砧上的丽江山荆子的叶片却没有缺铁症状出现。小金海棠在缺铁培养下, 根系的质子分泌和三价铁螯合物还原酶 (FCR) 活性均被诱导增加, 而且均明显强于同样培养条件下的丽江山荆子; 小金海棠的根系质子分泌部位和 FCR 活性增强的部位重叠。

关键词: 苹果属; 小金海棠; 丽江山荆子; 缺铁胁迫

中图分类号: S 661.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 06-0639-04

山荆子 [*Malus baccata* (L.) Borkh.] 是目前发现的苹果属植物中极易发生缺铁黄叶病的基因型, 丽江山荆子 (*M. rockii* Schneid.) 是山荆子种中的地理亚种, 同样不耐缺铁; 而小金海棠 (*M. xiaoji-nensis* Cheng et Jiang.) 则是目前发现的苹果属植物中最耐缺铁失绿的基因型^[1], 但其能够忍耐缺铁的确切原因至今并不清楚。作者已用拟南芥的三价铁螯合物还原酶 (Ferric Chelate-reductase, FCR) 基因 (*FRO2*)^[2] 作探针进行了胁迫条件下小金海棠和丽江山荆子的组织印迹 Northern 杂交^[3]。本研究将小金海棠和丽江山荆子互为砧木嫁接, 观察它们缺铁症状的变化, 同时研究它们的根系在营养液胁迫条件下 H⁺ 分泌和 FCR 的变化情况, 为进一步弄清小金海棠的耐缺铁的生理机制, 从中克隆耐缺铁基因, 用分子生物学手段创造综合性状优良的耐缺铁的果树砧木奠定基础。

1 材料与方法

小金海棠和丽江山荆子种子 4℃ 层积 70 d 以上, 2000 年春季播种在西南农业大学园艺系苹果种质资源圃中 [紫色土, pH 7.8, 活性铁 0.02%, 总铁 (Fe₂O₃) 3.098%, 管理水平中等]。

剪取小金海棠和丽江山荆子的休眠枝条, 4℃ 储存。2002 年开春后分别芽接在 2 年生的小金海棠和丽江山荆子砧上, 抽梢以后观察、测定、拍照。

取小金海棠和丽江山荆子具 3 片真叶的实生苗, 洗净根部泥土, 蒸馏水培养 3 d, 换全量的 Hoagland 液培养 4 周以后进行缺铁处理。对照溶液的 Fe²⁺ EDTA 为 80 μmol·L⁻¹, 缺铁处理为不加 Fe²⁺ EDTA。人工通气、光照和控温, 培养温度 25℃。4 周换 1 次培养液, 每天通气 2 h。

叶绿素含量的测定: 精确称取叶片, 研成糊状, 80% 丙酮提取, 过滤定容, 适当稀释后比色^[4]。

根系质子分泌的测定: 100 mL 蒸馏水加 1 g 琼脂、13.6 g CaCO₃、6 mg 溴甲酚紫, 加热溶解, 冷却至 50℃, 调 pH 6.2 (暗红色), 根系贴在平皿上, 琼脂倒入平皿, 凝固后室温暗处放置 30 min 以上, 观察、拍照记录^[1]。

根系和叶片 FCR 活力染色定位测定: 用含 5 mmol·L⁻¹ Mes [2- (N-吗啉乙磺酸缓冲液)] (pH 5.5)、0.5 mmol·L⁻¹ CaSO₄、0.1 mmol·L⁻¹ Fe²⁺ EDTA、0.3 mmol·L⁻¹ BPDS (过非绕淋二磺酸)、0.75% 琼脂的溶液加热, 混匀冷却至 50℃ 以下, 将根、叶片平铺在平皿上, 倒入测定液, 凝固后室温放置 30 min 以上^[5], 观察拍照。

收稿日期: 2003-02-24; 修回日期: 2003-05-12

基金项目: 科技部转基因植物与产业化专项课题 (Joo-A-008-07)

2 结果与分析

2.1 小金海棠和丽江山荆子实生苗在田间的生长状况

连续两年田间观察发现小金海棠实生苗生长正常, 叶色浓绿, 无任何缺铁症状; 而丽江山荆子晚春和夏季萌发的叶片均出现明显的缺铁失绿症, 夏季缺铁严重时叶肉组织呈现白色。

2.2 小金海棠砧和丽江山荆子砧上的苗木生长状况

嫁接苗同样生长在西南农大园艺种质资源圃, 丽江山荆子砧上抽发的小金海棠枝条上的叶片出现清晰可辨的缺铁失绿症; 而同一地点的小金海棠实生苗叶片则保持浓郁的绿色。小金海棠砧上抽发的丽江山荆子新叶一直保持浅绿色, 未观察到明显的网状失绿症出现。同一地点的丽江山荆子实生苗则出现明显且严重的失绿症 (见插页 1 图版, 1)。另外, 丽江山荆子砧上抽发的小金海棠枝条的中下部缺铁症状明显, 枝条顶端新叶的缺铁症状有所减轻。

2.3 小金海棠和丽江山荆子叶片的叶绿素含量

小金海棠和丽江山荆子实生苗和嫁接苗叶片的叶绿素含量和差异显著性见表 1。

方差分析表明, 在可以使丽江山荆子严重缺铁的土壤条件 (pH 7.8) 下, 小金海棠完全可以保持正常生长, 叶绿素含量正常; 以丽江山荆子为砧木的小金海棠接穗新叶叶绿素含量减少, 出现了明显的缺铁症。以小金海棠为砧木的丽江山荆子肉眼可辨的缺铁症消失, 表明小金海棠的高效吸收铁明显改善了丽江山荆子体内的铁供应, 使其缺铁症状得到明显缓解。

尽管小金海棠砧上丽江山荆子可见的缺铁症消失, 但其叶片的叶绿素含量依然显著低于小金海棠实生苗, 说明小金海棠砧虽然改善了丽江山荆子的铁供应状况, 但丽江山荆子对铁の利用效率却始终比小金海棠差。其原因需要进一步分析推测。

2.4 小金海棠和丽江山荆子根系的质子分泌比较

缺铁胁迫 4 d 时小金海棠幼根的质子分泌能力已明显强于对照, 而丽江山荆子幼根分泌能力则弱很多 (见插页 1 图版, 2)。缺铁胁迫 12 周后小金海棠新根的质子分泌能力依然很强 (见插页 1 图版, 3)。

小金海棠幼根分泌质子的范围较广, 随着小金海棠的生长, 根逐渐木栓化, 分泌质子的范围逐渐集中到根尖附近 (见插页 1 图版, 2、3)。

2.5 小金海棠和丽江山荆子根系 FCR 活性

在缺铁胁迫 4 周时, 对照处理的小金海棠根吸收区 (根尖以下 0.5 ~ 2 cm 左右) 会出现微弱的淡红色; 缺铁处理小金海棠根吸收区出现了红色, 范围和颜色均明显强于对照。而缺铁处理的丽江山荆子根周围的淡红色与对照处理的小金海棠没有明显的区别。说明缺铁胁迫刺激了小金海棠根吸收区域 FCR 活性增强 (见插页 1 图版, 4)。

观察发现小金海棠叶柄断口附近的红色区域和颜色都比丽江山荆子强 (见插页 1 图版, 5)。说明它们叶柄内同样存在 FCR 活性, 而且小金海棠叶柄 FCR 活性明显比丽江山荆子强。当然叶柄被切断时, 断口肯定有酚类等分泌, 这类物质可以还原 Fe^{3+} 。由于目前所用 FCR 活性测定法的原理, 使这

表 1 小金海棠和丽江山荆子叶片叶绿素含量及差异显著性

Table 1 The chlorophyll contents of leaves of *M. xiaojinensis* and *M. rockii*

材 料 Materials	叶绿素含量 Chlorophyll content (mg/g)	差异显著性 Difference		
		R ₁	R ₂	S
小金海棠实生苗 <i>M. xiaojinensis</i> seedling	1.29	0.33*	0.7**	1.04**
丽江山荆子实生苗 <i>M. rockii</i> seedling (S)	0.25	0.71**	0.34*	
丽江山荆子砧小金海棠 <i>M. xiaojinensis</i> on <i>M. rockii</i> rootstock (R ₂)	0.59	0.37*		
小金海棠砧丽江山荆子 <i>M. rockii</i> on <i>M. xiaojinensis</i> rootstock (R ₁)	0.96			

*, ** 分别为 0.05 和 0.01 显著水准。

*, **: Level of difference by 0.05 and 0.01 respectively.

种方法得到的结果中不仅包括酶对 Fe^{3+} 的还原,还应该包括还原性物质的作用。

3 讨论

3.1 FCR 在植物铁吸收中的作用

Chaney 等^[6]的研究已经证实植物只能吸收 Fe^{2+} 。研究发现铁在土壤中多以稳定的三价态形式存在,植物要先将 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} 才能吸收,FCR 的重要性由此可见^[7,8]。Robinson 等克隆了植物 FCR 基因(拟南芥),并把该基因片段导入 FCR 缺陷型的拟南芥突变体中,转基因拟南芥在供应 Fe^{3+} 的培养基中生长良好,而突变体在此种培养基中黄化严重^[2]。

我们的研究发现耐缺铁的小金海棠根系在缺铁胁迫下,FCR 活性增强并明显强于丽江山荆子。我们用拟南芥的 *FRO2* 作探针进行的组织印迹的 Northern 杂交的研究也发现,在缺铁胁迫条件下,小金海棠的根、茎、叶柄、叶片中 FCR 基因转录产物水平明显高于丽江山荆子^[3]。这两个结果证明小金海棠耐缺铁能力明显强于丽江山荆子的原因是缺铁胁迫下小金海棠根及其它营养器官的 FCR 活性明显强于丽江山荆子。

3.2 H^+ 分泌与 FCR

缺铁导致的根际酸化是植物对缺铁胁迫的一个重要反应。用三叶草研究证明在缺铁 30 min 时即可测到 pH 的变化^[7]。本研究发现小金海棠中也有类似现象。虽然没有测定 pH 被激活的时间曲线,但缺铁信号对小金海棠根系质子分泌的激活是肯定的。

从图版,3、4 还可发现小金海棠根遮缺铁胁迫下增强的质子分泌区域与增强的 FCR 活性区域是重叠的。前人的研究发现,在 pH 较低条件下 FCR 活性高^[5,9,10]。我们的观察结果同样表明在缺铁胁迫下,小金海棠根系的质子分泌能力迅速增强,可以使根际 pH 长时间保持低水平,为 FCR 的活动提供一个适宜的 pH 范围。

3.3 砧木对铁吸收的影响

丽江山荆子和小金海棠正反嫁接的试验证明砧木对接穗的铁吸收有明显影响,但接穗中的铁代谢并不完全取决于砧木,还与自身的铁吸收运输能力强弱有关。因为植物从土壤中吸收铁并不是植物利用铁的唯一限制步骤,植物 80% 的铁集中在叶绿体,这 80% 的铁要到达其最终目的地就必须跨越数层生物膜系统^[11]。我们的 Northern 杂交研究已经证实除根以外,高水平的 FCR 基因转录产物在小金海棠的茎、叶柄、叶片的特定组织中都出现,但铁低效植物丽江山荆子在铁胁迫条件下的各个营养器官中均很难检测到转录产物^[3]。因此,小金海棠作为砧木尽管改善了丽江山荆子的缺铁症,但丽江山荆子对铁の利用效率却始终比小金海棠差。原因是丽江山荆子体内的 FCR 基因的表达效率始终很差^[3],导致体内缺乏 FCR 所致。小金海棠接穗萌发时由于丽江山荆子砧的铁供应不足而使小金海棠叶片出现缺铁现象,但小金海棠在受到缺铁胁迫以后 FCR 基因开始表达,酶的合成逐渐增加,因此较后时期抽发的枝条顶端新叶的缺铁现象自然便会减轻。

参考文献:

- 1 韩振海. 从苹果属植物中筛选耐缺铁的基因型: [博士学位论文]. 北京: 中国农业大学, 1988. 66 页
- 2 Robinson N J, Catherine M P, Erin L C, et al. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature*, 1999, 397: 694 ~ 697
- 3 Li Ling, Luo Xiaoying, Zhou Zeyang, et al. Expression of ferric-chelate reductase gene under iron deficiency in fruit rootstocks of four species. *J. Plant Physiol. Molecular Biology*, 2002, 4 (28): 299 ~ 304
- 4 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会编. 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社, 1999. 92
- 5 Claire-Lise Rosenfield, David W Reed, Matthew W Kent. Dependency of iron reduction on development of unique root morphology in *Ficus benjamina* L. *Plant Physiol.*, 1991, 95: 1120 ~ 1124
- 6 Chaney R L, Brown J C, Tiffin L O. Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans. *Plant Physiol.*, 1972, 50: 108 ~ 213
- 7 L C Wei, R H Loeppert, W R Ocumpaugh. Characteristics of Fe-deficiency-induced acidification in subterranean clover. *Physiol. Plant*, 1998,

- 103: 443 ~ 450
- 8 Fox T C, Shaff J E, Grusak M A, et al. Direct measurement of ^{59}Fe labeled Fe^{2+} influx in roots of pea using a chelator buffer system to control free Fe in solution. *Plant Physiol.*, 1996, 112: 93 ~ 100
- 9 Tipton C L, Thowsen J. Fe^{3+} reduction in cell walls of soybean roots. *Plant Physiol.*, 1985, 79: 432 ~ 435
- 10 Harald U Kosegarten, Bernd Hoffmann, Konrad Mengel. Apoplastic pH and Fe^{3+} reduction in intact sunflower leaves. *Plant Physiol.*, 1999, 121: 1069 ~ 1079
- 11 Ajmi L, Fermin M, Ana F M, et al. Technical advance: Reduction of Fe (III) -chelates by mesophyll leaf disks of sugar beet. Multi-component origin and effects of Fe deficiency. *Plant Cell Physiol.*, 2001, 42 (1): 94 ~ 105

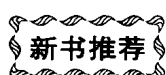
Physiological Reaction on Resistance to Iron Chlorosis in *Malus xiaojinensis* and *M. rockii*

Li Ling¹, Zhou Zeyang², and Pei Yan²

(¹ Horticulture and Garden College, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China; ² Biotechnology Research Center, Southwest Agricultural university, Chongqing 400716, China)

Abstract: *Malus xiaojinensis* seedlings grew normally without any iron chlorosis symptom at soil pH 7.8 and its leaf chlorophyll content was much higher than that of control species *M. rockii*, which showed severe chlorosis under the same pH conditions. Mild but typical iron chlorosis symptom was observed in scion leaves of *M. xiaojinensis* grafted on *M. rockii* rootstock in the field with pH 7.8. Conversely, when *M. rockii* was exploited the scion and grafted on *M. xiaojinensis* rootstock, its iron chlorosis symptom disappeared. The rate of root H^+ excretion and ferric-chelate reductase activity increased in *M. xiaojinensis* and were substantially higher than that of *M. rockii* under iron deficiency. The part of root H^+ excretion overlapped with the functioning region of root FCR. It is hypothesized that the high root H^+ excretion in the absorptive parts in the roots of *M. xiaojinensis* provided an optimum pH environment for root FCR.

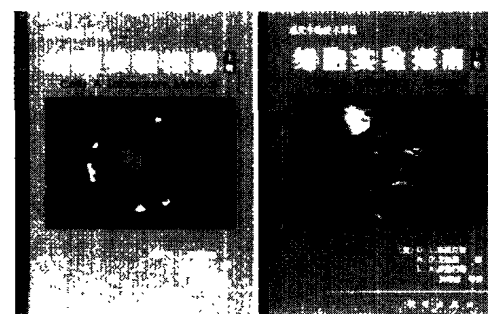
Key words: *Malus*; *Malus xiaojinensis*; *Malus rockii*; Resistance to iron chlorosis



新书推荐

《细胞实验指南》

由美国冷泉港实验室邀请 125 位专家共同研讨和撰稿, 本书汇总了被细胞生物学家们证明行之有效的众多的技术和方法, 它们由三大主体组成: 细胞的培养及其生物化学分析、光学显微镜及细胞结构和基因及其产物的亚细胞定位。本书与备受称赞的冷泉港实验室出版社的《分子克隆实验指南》和《抗体》两本实验指南具有同样的特点, 对即使具有多年工作经验的研究者也极其有用。定价: 244 元 (上、下册, 含邮资)。



《基因工程原理》(第二版) 上、下册 吴乃虎著译

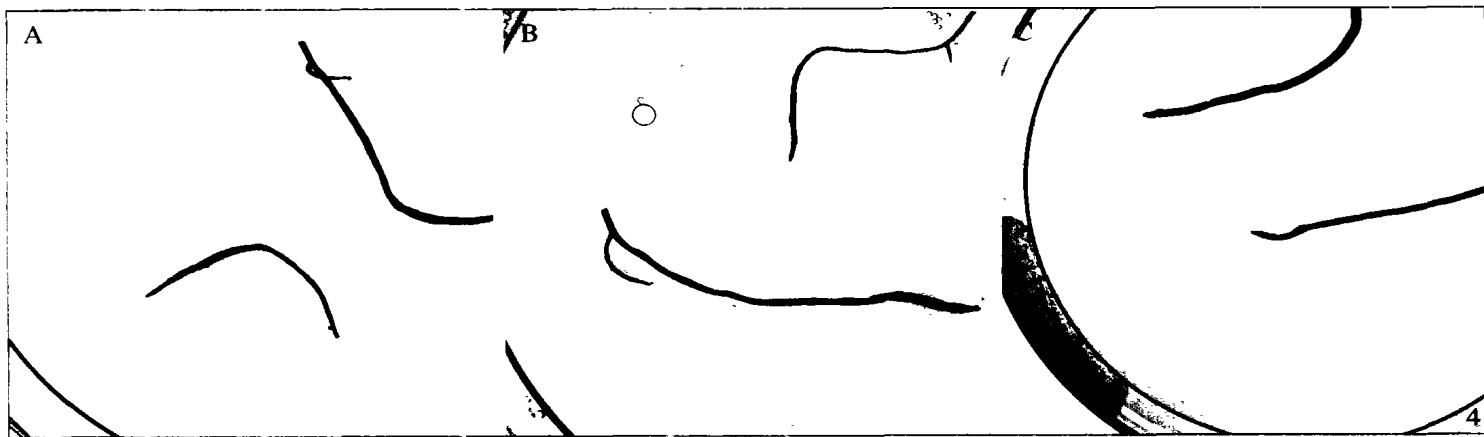
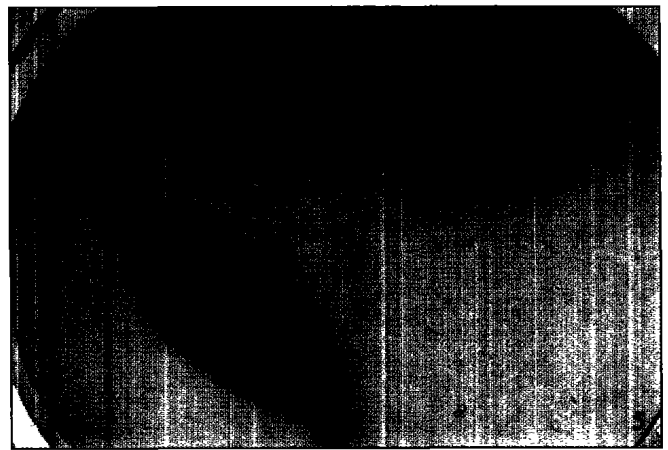
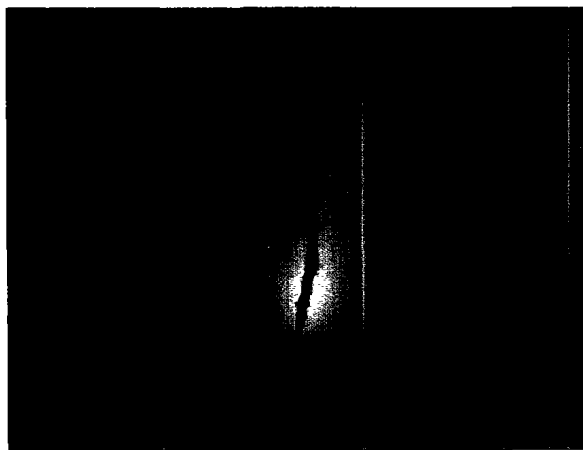
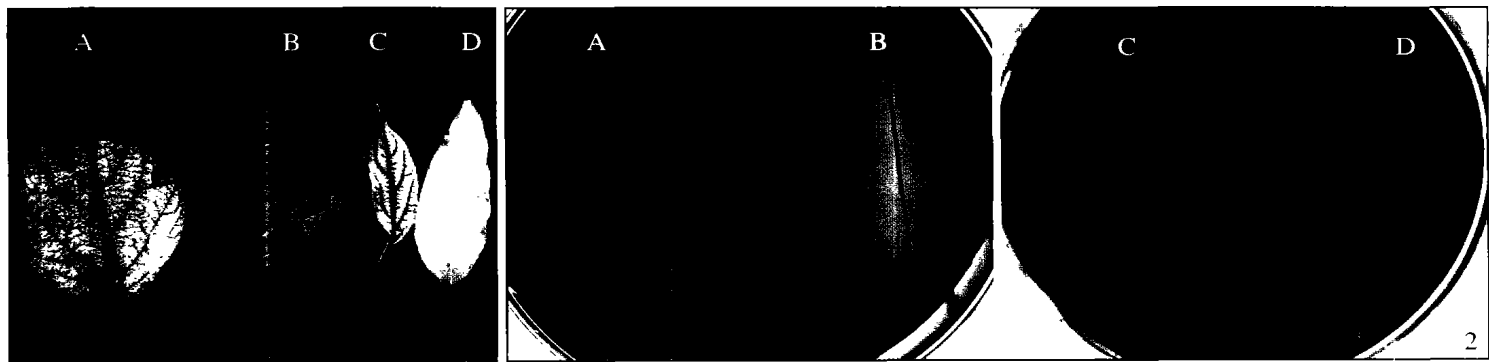
本书由科学出版社出版。全书共十二章, 分上下两册, 书末附有基因工程名词术语解释及索引。

上册: 一至六章 (基因与基因工程、基因操作的主要技术原理、基因克隆的酶学基础、基因克隆的质粒载体、噬菌体载体和柯斯载体、基因的分离与鉴定)。定价 58 元 (含邮费)。

下册: 七至十二章 (基因的表达与调节、真核基因在大肠杆菌中的表达、植物基因工程、哺乳动物基因工程、重组 DNA 与现代生物技术、重组 DNA 与医学研究)。定价 78 元 (含邮费)。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。

李 凌等：小金海棠和丽江山荆子的缺铁胁迫反应

Li Ling, et al: Physiological Reaction on Resistance to Iron Chlorosis in *Malus xiaojinensis* and *M. rockii*

图版说明：1. 叶片 (A. 山荆子砧上的小金海棠, B. 小金海棠实生苗, C. 山荆子实生苗, D. 小金海棠砧上的山荆子); 2. 缺铁 4 d 根系的 H^+ 分泌 (A. 加铁小金海棠, B. 缺铁小金海棠, C. 加铁山荆子, D. 缺铁山荆子); 3. 缺铁12周小金海棠根系的质子分泌; 4. 根系FCR活性 (A. 加铁小金海棠, B. 缺铁小金海棠, C. 缺铁丽江山荆子); 5. 叶片FCR活性 (左: 山荆子; 右: 小金海棠)。

Explanation of plates: 1. Leaves (A. The leaf of *M. xiaojinensis* on *M. rockii*; B. The leaf of *M. xiaojinensis* seedling; C. The leaf of *M. rockii* seedling; D. The leaf of *M. rockii* on *M. xiaojinensis*); 2. Root H^+ excretion under iron deficiency 4 days (A. *M. xiaojinensis* under iron sufficiency; B. *M. xiaojinensis* under iron deficiency; C. *M. rockii* under iron sufficiency; D. *M. rockii* under iron deficiency); 3. Root H^+ excretion of *M. xiaojinensis* under iron deficiency 12 weeks; 4. Root FCR activities (A. *M. xiaojinensis* under iron sufficiency; B. *M. xiaojinensis* under iron deficiency; C. *M. rockii* under iron deficiency); 5. FCR activity of leaves (Left: *M. rockii*; Right: *M. xiaojinensis*).