

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21720081152494

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

钙对铝毒胁迫下拟南芥根系影响的差异

蛋白质组学分析

Comparative Proteomic Analysis of *Arabidopsis thaliana*

Root in Response to Calcium under Aluminum Stress

段瑞雪

指导教师姓名: 郑海雷教授

专业名称: 植物学

论文提交日期: 2011年7月25日

论文答辩时间: 2011年9月11日

学位授予日期: 2011年 月 日

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2011年9月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（环境植物学与植物分子生物学）课题（组）的研究成果，获得（国家自然科学基金 30770192, 30670317, 30271065, 30930076、教育部博士点基金 20070384033、留学回国人员科研启动基金 2008—890、厦门大学新世纪优秀人才支持计划 X07115）课题（组）经费或实验室的资助，在（郑海雷 教授）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：段瑞雪

2011年9月14日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：段瑞雪

2011年9月14日

目 录

摘要.....	I
Abstract.....	III
第 1 章 前 言	1
1.1 铝对植物的毒害及植物抗铝毒机理	1
1.1.1 铝的存在形态	1
1.1.2 铝对植物的毒害	1
1.1.3 植物抗铝毒机理	4
1.2 钙缓解铝毒研究进展	7
1.2.1 钙在植物中的作用	7
1.2.2 铝钙相互关系及钙缓解铝毒机制	7
1.3 植物铝胁迫蛋白组学研究进展	9
1.3.1 植物蛋白质组学研究方法	9
1.3.2 植物响应铝胁迫蛋白质组学研究成果	13
1.4 立题依据和研究意义	15
第 2 章 材料与方 法	17
2.1 材料培养与处理	17
2.1.1 拟南芥水培及不同Al、Ca浓度梯度处理	17
2.1.1.1 材料培养.....	17
2.1.1.2 不同浓度梯度Al、Ca处理	17
2.1.2 拟南芥培养皿中培养及处理	18
2.1.2.1 材料培养.....	18
2.1.2.2 Al、Ca处理	18
2.2 主要试剂与仪器设备	19
2.2.1 主要试剂	19
2.2.2 主要仪器设备	19
2.3 不同浓度Al、Ca下拟南芥生长相关指标测定及方法	19
2.3.1 不同Al、Ca浓度梯度下拟南芥叶面积的测定	19
2.3.2 不同Al、Ca浓度梯度下拟南芥叶绿素含量的测定	20

2.3.3 拟南芥主根长的的测定	20
2.3.4 拟南芥根、叶干重的测定	20
2.4 苏木精染色法观察拟南芥根中外源Ca对Al含量的影响	20
2.5 拟南芥根部钙缓解铝胁迫的差异表达蛋白分析方法	21
2.5.1 主要溶液	21
2.5.2 蛋白质的提取	21
2.5.3 双向电泳	22
2.5.3.1 第一向等电聚焦 (IEF)	22
2.5.3.2 第二向SDS-PAGE电泳	23
2.5.4 蛋白质凝胶扫描及图谱分析	24
2.5.5 蛋白质的MALDI-TOF MS分析	24
2.5.5.1 脱色、脱水	24
2.5.5.2 酶解	24
2.5.5.3 肽段提取	24
2.5.5.4 肽段溶解	25
2.5.6 蛋白质肽段质量指纹鉴定与数据库检索	25
第3章 结果与讨论	26
3.1 不同浓度Al对拟南芥生长的影响	26
3.1.1 不同浓度铝胁迫下拟南芥生长表型	26
3.1.2 不同浓度铝胁迫下拟南芥生长指标的测定	27
3.2 不同浓度Ca对拟南芥铝毒的缓解作用	29
3.2.1 不同浓度钙缓解拟南芥铝毒害的表型	29
3.2.2 不同浓度钙缓解拟南芥铝毒害的生长指标测定	30
3.3 苏木精染色法观察拟南芥根中外源Ca对Al含量的影响	32
3.4 钙对铝胁迫影响下拟南芥根差异表达蛋白质的影响分析	33
3.4.1 差异表达全蛋白质图谱的建立与整体分析	33
3.4.2 物质代谢和能量相关蛋白质的变化	55
3.4.2.1 细胞壁组分相关蛋白	55
3.4.2.2 氨基酸代谢相关蛋白	55
3.4.2.3 糖酵解和TCA循环相关蛋白	56

3.4.2.4 其他能量相关蛋白.....	58
3.4.3 细胞转运相关蛋白质的变化	59
3.4.4 信号转导及细胞防御相关蛋白质的变化	59
3.4.5 转录、翻译、修饰、辅助相关蛋白质的变化	60
3.4.6 钙缓解铝胁迫的可能机理	61
第 4 章 结论	62
参考文献	64
致谢.....	74

厦门大学博硕士学位论文摘要

Content

Chinese abstract	I
Abstract	III
1. Introduction	1
1.1 Al toxicity and resistance mechanisms in plants	1
1.1.1 Existing forms of Al in soils.....	1
1.1.2 Al toxicity to plants	1
1.1.3 Mechanisms of Al resistance in plants.....	4
1.2 Research progress in Ca ameliorating Al toxicity	7
1.2.1 Role of Ca in plants.....	7
1.2.2 Al-Ca interactions and mechanisms of Ca ameliorating Al toxicity ..	7
1.3 Proteomics research progress in plant Al stress	9
1.3.1 Key research methods in plant proteomics.....	9
1.3.2 Proteomic research in plant response to Al stress.....	13
1.4 Basis and significance of this work	15
2. Materials and methods	17
2.1 Plant culture and treatment	17
2.1.1 <i>Arabidopsis</i> hydroponics and treated with different concentrations of Al and Ca	17
2.1.1.1 Plant culture	17
2.1.1.2 Plant treatment	17
2.1.2 <i>Arabidopsis</i> cultured in petri dishes and treated for proteomics experiment	18
2.1.2.1 Plant culture	18
2.1.2.2 Plant treatment	18
2.2 Main reagents, instruments and equipments	19
2.2.1 Main reagents	19
2.2.2 Main instruments and equipments.....	19
2.3 Measurement and methods of <i>Arabidopsis</i> growth-related indicators under different concentrations of Al and Ca	19
2.3.1 Measurement of <i>Arabidopsis</i> leaf area under different Al and Ca concentrations	19
2.3.2 Measurement of <i>Arabidopsis</i> chlorophyll content under different Al	

and Ca concentrations	20
2.3.3 <i>Arabidopsis</i> taproot length measurement.....	20
2.3.4 <i>Arabidopsis</i> shoot and root dry weight measurement	20
2.4 Effect of Ca on <i>Arabidopsis</i> root tip Al content reflected by hematoxylin staining	20
2.5 Analysis method of differently expressed proteins in <i>Arabidopsis</i> root....	21
2.5.1 Main solution	21
2.5.2 Protein extraction.....	21
2.5.3 2-dimensional gel electrophoresis	22
2.5.3.1 The first dimension-isoelectric focusing (IEF)	22
2.5.3.2 The second dimension-SDS-PAGE.....	23
2.5.4 Gels scan and difference analysis	24
2.5.5 MALDI-TOF mass spectrometry analysis.....	24
2.5.5.1 Decolorization and dehydration.....	24
2.5.5.2 Enzymolysis.....	24
2.5.5.3 Extraction of peptides	24
2.5.5.4 Peptide dissolve	25
2.5.6 Protein identification and database search.....	25
3. Results and discussion	26
3.1 Effect of different concentrations of Al on <i>Arabidopsis</i> growth	26
3.1.1 Effect of different concentrations of Al on <i>Arabidopsis</i> phenotype ...	26
3.1.2 Measurement of growth-related index of <i>Arabidopsis</i> under different Al concentrations	27
3.2 Effect of different concentrations of Ca on alleviating <i>Arabidopsis</i> Al stress	29
3.2.1 Phenotype of different concentrations of Ca alleviating <i>Arabidopsis</i> Al stress.....	29
3.2.2 Growth-related index measurement of different concentrations of Ca alleviating <i>Arabidopsis</i> Al stress	30
3.3 Effect of Ca on <i>Arabidopsis</i> root tip Al content reflected by hematoxylin staining	32
3.4 Comparative analysis of <i>Arabidopsis</i> root proteins related with Ca alleviating Al stress.....	33

3.4.1 Construction and analysis of full protein 2-DE gels	33
3.4.2 Metabolism and energy related proteins	55
3.4.2.1 Cell wall components related proteins	55
3.4.2.2 Amino acid metabolism related proteins	55
3.4.2.3 Glucolysis and TCA circle related proteins	56
3.4.2.4 Other energy related proteins	58
3.4.3 Cellular transport related proteins.....	59
3.4.4 Signal transduction and cell rescue related proteins	59
3.4.5 Transcription, translation, modification, cofactor related proteins ..	60
3.4.6 The possible mechanism of Ca ameliorating Al stress.....	61
4. Conclusions	62
References	64
Acknowledgements	74

摘要

近年来，酸雨已成为世界重大环境问题，它加速了土壤酸化，使土壤铝会以各种离子型态释放进入土壤溶液，对植物产生毒害。如今，铝毒已经成为一个世界性的限制酸性土壤上植物生长的主要因子。

钙对植物的生长具有重要的意义。许多的研究表明，钙能够缓解铝胁迫，但缓解的机制尚不清楚。目前对钙缓解铝胁迫机制的研究主要集中在 Ca 和 Al 的竞争性取代以及生理水平，但蛋白分子水平的研究几为空白。本实验以模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 为材料运用差异蛋白组学的方法第一次从蛋白水平上全面地研究在钙的作用下受到铝胁迫的拟南芥蛋白的差异表达情况，初步探讨钙缓解铝毒害的机制。主要研究结果如下：

(1) 随着铝浓度的升高，处理 14 天的拟南芥幼苗的叶面积、叶绿素含量、根长、地上部分及根干重都呈下降趋势，说明铝对拟南芥生长具有明显的抑制作用。随着钙浓度的升高，铝胁迫得到缓解，CaCl₂浓度大于 5 mM 时对铝胁迫的缓解作用比较明显。

(2) 用苏木精染色法定性观察钙对根中铝含量的影响，结果表明：Al+Ca 处理下与 Al 处理相比根尖颜色明显变淡。说明根结合 Al 减少，Ca 能竞争性抑制 Al 与根细胞的结合。

(3) 在 CK、Ca、Al、Al+Ca 四个处理组 2-DE 胶上总共检测出约 2500 个点，分别进行以下比较：CK&Al、Al+Ca&Al、Al+Ca 与 Ca 比较抑制表达，得到 133 个表达量变化显著 (>2 倍) 的蛋白点，通过质谱分析及数据检索，鉴定出 86 个 (65%)。根据这些蛋白质的生理生化功能，大致将它们分为 8 个类别，这些蛋白主要是与代谢、能量及物质运输相关的，细胞防御、转录、蛋白合成、折叠和修饰等相关的蛋白也占了比较大的比例，另外还有些蛋白跟信号转导、辅助功能相关。

(4) 与物质代谢和能量相关蛋白质主要包括肉桂醇脱氢酶、UDP-葡萄糖焦磷酸化酶、 β -糖苷酶、UDP-D-木糖合酶、谷氨酸胺合成酶、精氨酸琥珀酸裂解酶、5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase

(ATMS1)、果糖二磷酸醛缩酶、磷酸丙酮酸水合酶、柠檬酸合酶、NADP-依赖型异柠檬酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶 2 (IDH2)、顺乌头酸酶、类柠檬酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、琥珀酸脱氢酶、ATP 合成酶 α 亚基、线粒体 F1-ATP 合成酶 β 亚基；与细胞转运相关的蛋白质包括液泡 ATP 合成酶 A 亚基 (VHA-A)；与信号转导及细胞防御相关的蛋白质主要包括 TTL1、热休克蛋白 70 (HSP70)、ethylene-insensitive3 (EIN3)、谷胱甘肽转移酶 6、19；与转录、翻译、修饰、辅助相关的蛋白质包括翻译延长因子、亮氨酸氨基肽酶 1、BIGYIN 等。

(5) 根据鉴定出的蛋白的功能和表达量变化，我们对钙缓解铝毒害的机理进行推测。首先，钙通过改变细胞壁组分纤维素、半纤维素、木质素合成相关酶表达量的变化来改变细胞壁的性质，缓解Al引起的植物生长抑制；大量与有机酸生成相关的蛋白被鉴定出来，包括TCA循环、糖酵解及氨基酸代谢过程中的一些酶，说明有机酸的分泌在缓解铝胁迫中具有重要作用；钙还有可能通过谷氨酸-门控Ca通道及VHA-A来调节胞质自由Ca²⁺浓度，调节Ca²⁺作为信号转导第二信使的作用；我们还发现与ABA及乙烯作用相关的一些蛋白表达量发生变化，说明ABA和乙烯也可能参与了钙缓解铝胁迫的信号转导。

关键词：铝胁迫；差异蛋白质组学；钙；拟南芥根；缓解

Abstract

Recent years, acid rain has become a major worldwide environmental issue. It accelerates the acidification of soils, and then makes Aluminum dissolve into soil in various ionic forms, toxic to plants. Now, Aluminum has been a major factor limiting plant growth in acid soils worldwide.

Calcium plays a vital role in plant growth. Many studies show that Calcium can ameliorate the Aluminum toxicity, but the mechanism is still unknown. Many researches had concentrated on the displacement mechanism of Calcium and Aluminum, as well as the physiological aspects, but in protein and molecular field it's almost blank. This experiment is aimed to get the comprehensive differently expressed proteins to study the Calcium ameliorating mechanism in *Arabidopsis thaliana* root under Aluminum stress using comparative proteomic methods. The main results are shown as follows:

(1) As the Aluminum concentration increases, all the index: leaf area, chlorophyll content, root length, dry weight of shoot and root decrease to some extent. These results showed that Aluminum inhibited the growth of *Arabidopsis* seedling. As the Calcium concentration increases, the Aluminum-induced toxicity is ameliorated. The proper concentration of CaCl_2 is more than 5 mM.

(2) The roots stained with hematoxylin showed that Calcium could displace Aluminum to bind with root cell.

(3) A total of 2500 spots were detected in four gels: CK, Ca, Al, Al+Ca, and then after the following comparison: Al&CK, Al+Ca&Al, suppressed in Al+Ca compared with Ca, 133 differently expressed spots were detected, 86 out of them (65%) were identified. These 96 identified proteins were classified as 8 categories based on their biochemical functions. A majority of these proteins were metabolism, energy and transport, followed by cell rescue, transcription, protein synthesis, folding and modification related proteins, a large portion was also represented by transduction and cofactor.

(4) Metabolism and energy related proteins mainly included cinnamyl-alcohol dehydrogenase, UDP-glucose pyrophosphorylase, beta-glucosidase, UDP-D-xylose synthase, 2,5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase

(ATMS1), glutamate-ammonia ligase, argininosuccinate lyase, fructose-bisphosphate aldolase, phosphopyruvate hydratase, citrate synthase, similar to NADP-specific isocitrate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase subunit 2 (IDH2), aconitase C-terminal domain-containing protein, isocitrate dehydrogenase-like protein, malate dehydrogenase, succinate dehydrogenase, ATP synthase subunit alpha, mitochondrial F1 ATP synthase beta subunit; transport related proteins mainly included vacuolar ATP synthase subunit A (VHA-A); transduction and cell rescue related proteins mainly included TTL1, heat shock cognate protein 70-1 (HSP70), ethylene-insensitive 3 (EIN3), Glutathione S-Transferase 6, 19 (GST6, 19); transcription, translation, modification and cofactor related proteins mainly included elongation factor 1B-gamma, leucine aminopeptidase 1, BIGYIN.

(5) Our comparative proteomic analysis of the function and volume change of identified proteins revealed a preliminary Calcium ameliorating Aluminum stress mechanism in *Arabidopsis*. First, Calcium regulated cell wall components, cellulose, hemicellulose and lignin, related enzymes differently expressed, thus alleviates the Al-induced plant growth inhibition; a large-scaled organic acid biosynthesis related proteins involved in TCA, glycolysis, amino acid metabolism were identified, suggesting that exudation of organic acid plays a vital role in ameliorating Aluminum stress; it's also possible that Calcium modulates the concentration of cytosolic free Ca^{2+} through glutamate-gated Ca channel and VHA-A; ABA and ethylene related proteins were also identified, implying they may participate in the transduction pathway of Ca alleviating Al stress.

Keywords: Aluminum stress; Comparative Proteomics; Calcium; *Arabidopsis thaliana* root; Alleviation

第1章 前言

1.1 铝对植物的毒害及植物抗铝毒机理

1.1.1 铝的存在形态

铝是地壳中含量最高、分布最广的金属元素，约占地壳元素总重的7%^[1]。通常条件下，土壤铝主要以铝硅酸盐矿物和氧化物等形态存在于土壤固相部分，对植物的生长是无毒性的。近年来，随着世界工业化的发展，酸雨已成为世界重大环境问题之一，酸雨的频繁沉降，加速了土壤酸化。当土壤发生酸化时，土壤铝会从固相释放进入土壤溶液或以交换性铝吸附于土壤表面的阳离子交换位上，对植物产生毒害^[2]。

在土壤中铝的存在形式是多种多样的，随着环境条件的不同而发生变化。在酸性条件下(pH<5)，铝在土壤溶液中主要以 Al^{3+} 形式存在；随pH的逐渐升高，逐渐形成 $Al(OH)^{2+}$ 、 $Al(OH)_2^+$ ，在中性土壤溶液中(pH=7)，铝主要以不溶性的硅酸盐和氧化物形式存在，主要是 $Al(OH)_3$ 沉淀；当受到强碱中和时，会产生毒性较大的存在形式-聚合羟基铝 $Al(OH)_4^-$ 。不同形态的铝对植物都有毒害作用，但研究发现不同形态铝的毒性大小对于不同类型植物是不一样的。对双子叶植物如荞麦、大豆、萝卜、油菜等而言， $Al(OH)^{2+}$ 、 $Al(OH)_2^+$ 的毒害性比 Al^{3+} 强得多，而单子叶植物如大麦、玉米、小麦、黑麦等则对 Al^{3+} 更为敏感。由于铝毒一般在酸性条件下才得以实现，因此一般称 Al^{3+} 、 $Al(OH)^{2+}$ 和 $Al(OH)_2^+$ 为高活性铝，对植物的毒害很大^[3,4]。

1.1.2 铝对植物的毒害

铝对植物毒害的症状最初和最明显的是抑制植物根尖（根冠、分生组织和伸长区）的伸长，这也是用来测定植物铝毒害最常用的指标^[5]。铝毒害有短期反应（铝处理几分钟，甚至几秒钟即可发生）和长期反应。短期反应对植物体没有明显影响，但是已经表现出根毛伸长受到抑制；长期反应则表现为根系发育不正常，主根伸长严重受到抑制，根粗短，脆弱，褐色，根尖膨大，根毛减少甚至消失，

根冠脱落^[5, 6]。有研究表明, 铝毒下植物的侧根会变多、密、短而且脆弱, 也会变褐色^[7, 8]。但也有不同研究发现, 肖祥希等^[6]认为铝毒下植物的侧根会变少甚至消失。铝对根的毒害影响了水分和矿物质的吸收。

铝被植物吸收后, 大部分积累在根部, 部分运输到地上, 对地上部分产生毒害。地上部分铝毒害的症状与缺磷、缺钙和缺铁症状类似, 主要表现在植株矮小、叶片小、深绿、晚熟; 茎、叶和叶脉变紫; 叶尖黄化和死亡; 幼叶卷曲, 生长点坏死^[2]。

铝是多价阳离子, 可强烈地吸附在根细胞质外体的杜南自由空间的负电荷上, 负电荷多数是果胶物质上的自由羧基。根吸收的铝 85%到 99.9%都是存在于包括细胞壁和细胞间隙在内的质外体中, 只有一少部分通过细胞膜进入根细胞, 存在于细胞的共质体中^[9]。对铝最敏感的是位于细胞分裂活跃带和细胞快速伸长带之间的过渡带^[10], 铝不仅抑制对根顶端的细胞伸长, 而且在几分钟内就抑制细胞的分裂^[11]。

由于铝的活性很高, 对植物体的很多方面产生伤害, 包括: 细胞壁、质膜、细胞骨架、信号转导和养分的吸收、细胞分裂、代谢和激素平衡等。

细胞壁:

X-射线和二次离子质谱分析表明, 根中相当一部分铝跟质外体结合位点有关, 主要是根外层细胞的细胞壁中^[12]。细胞壁上所带负电荷决定了细胞壁的阳离子交换能力 (cation exchange capacity, CEC), CEC越强, 铝结合到壁上越多, 在细胞壁的各种组分中, 果胶是铝结合到细胞壁上的主要位点^[13]。铝取代了其他对细胞壁稳定性起重要作用的离子 (例如, Ca^{2+})^[14], 从而影响了细胞壁的结构和物理特性, 使之弹性降低, 延展性下降, 抑制根细胞伸长。Tabuchi和Matsumoto^[14, 15]认为铝导致多糖 (β -葡聚糖、半纤维素多聚糖) 的积累, Sasaki等^[16]认为铝导致木质素的沉积, 这些都影响细胞壁的延展性。

质膜:

Al^{3+} 能强烈地与带负电荷的质膜结合, 比 Ca^{2+} 与质膜的亲和力高 500 倍, 它能取代磷脂双分子层上起桥梁作用的离子 (如, Ca^{2+})^[17], 进而影响磷脂的流动性。 Al^{3+} 与质膜的结合还引起质膜表面负电荷被中和, 改变质膜表面附近其他离子的活性^[5]。低pH或 AlCl_3 处理会导致液泡膜出现强烈的去极化作用^[18], 这种作用可能是由于许多不同的离子运输通道的直接或间接的作用引起的^[19]。

铝毒害的早期症状之一是胼胝质的产生，胼胝质的产生需要 Ca^{2+} 的参与， Al^{3+} 取代了膜表面的 Ca^{2+} 可能引起质外体中 Ca^{2+} 含量的上升，刺激胼胝质的生成。铝胁迫下，细胞外的胼胝质累积在胞间连丝上可以有效地阻止植物的共质体运输和传递，造成进一步的伤害^[20]。

何龙飞等^[21]发现 Al^{3+} 能使小麦液泡膜 H^+ -ATP酶和 Ca^{2+} -ATP酶活性迅速下降。铝胁迫可抑制钙调素所激发的膜联ATP酶的活性，膜联ATP酶的活性调节穿过质膜的 H^+ 的流动，保持跨膜电势，跨膜 H^+ 梯度为离子运输过程提供动力。因此， Al^{3+} 对 H^+ 梯度的影响间接改变根细胞离子稳态。

细胞骨架:

细胞骨架主要由微管和微丝组成，在许多细胞功能如细胞分裂、细胞增大、细胞壁的合成、细胞器的移动以及根的形态建成等方面起着重要作用^[22]。扰乱细胞骨架正常功能的物质会抑制根的生长并导致根尖膨大，与肉眼可见的 Al^{3+} 对根尖的毒害症状相似^[23]。铝可通过直接作用于细胞骨架的成分（如，微管和肌丝）或间接通过钙信号系统来改变细胞骨架系统。Grabski和Schindler发现^[24]， Al^{3+} 会诱导大豆根悬浮细胞肌动蛋白网硬化。为了确定 Al^{3+} 导致的肌动蛋白网硬化是否依赖于磷酸酶和激酶，Grabski等^[25]又研究了在磷酸酶抑制剂和激酶抑制剂存在时的铝毒害，他们发现，钙调蛋白抑制剂以及钙依赖型蛋白激酶抑制剂降低 Al^{3+} 诱导的大豆根悬浮细胞肌动蛋白网硬化，表明这些酶在调节细胞骨架稳定性方面起着重要的作用。

养分的吸收和信号转导:

因为铝离子的特殊化学性质， Al^{3+} 可与果胶质结合，竞争 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^+ 、 NH_4^+ 、 Cu^{2+} 等在根细胞膜上的吸附位点，抑制水分和离子的吸收和转运，诱导缺铁症，还可在根表或质外体与磷发生沉淀，使磷吸收受阻^[2]。 Al^{3+} 能竞争膜上的多种离子转运蛋白上的结合位点（如， K^+ 和 Ca^{2+} ），阻碍离子的吸收。另外，细胞外的铝能通过改变膜电位的改变而影响膜上转运载体的活性。比如，铝诱导的膜去极化能间接影响电压门控 Ca^{2+} 通道的转运^[26]。铝影响细胞中钙参与的信号转导，在后面会有详细描述。

细胞分裂:

铝主要与DNA的磷酸基结合，增加DNA双螺旋的刚性，铝聚合物束缚了染色质的双螺旋，导致了解链的困难，降低模板的活性^[27]。

代谢和激素平衡:

铝毒抑制根系生长,对根系产生损害,植物因此不能吸收充足的水分,油菜花生中毒严重时根系、地上部分含水量都明显下降^[28]。

铝胁迫能使水稻、玉米、松树叶片中叶绿素a和b的比率下降,叶绿素总量下降,从而导致总光合作用以及光合速率都明显降低^[29]。但是,杨振德等^[30]对桉树幼苗的研究表明,桉树幼苗受铝毒后,叶绿素含量没有多大变化,但叶绿素a和b的比率升高,比率升高对光合作用有利,这可能是桉树对铝毒的一种抗逆性反应。

铝胁迫还影响植物的激素平衡,生长素(IAA)、细胞分裂素和脱落酸(ABA)含量的变化都有发现^[31-33]。

1.1.3 植物抗铝毒机理

植物抗铝毒机制可概括为外部排斥和内部解毒两方面。此两类机制的主要差别在于前者铝的解毒部位为质外体,后者为共质体。外部排斥机制是指铝的细胞外螯合和排除,使其不能进入植物细胞。绝大多数植物抵御铝毒害的方式是外部排斥。Taylor^[34]认为铝的外部排斥机制可包括:能螯合铝的配体(有机酸及磷酸盐)的分泌、细胞壁对铝的固定、诱导产生的根系pH屏障、 Al^{3+} 被主动输出细胞外等。内部解毒指将吸收的铝以无毒或毒性较小的化合物形式贮存起来,以达到解铝毒的目的。其机理有:细胞内溶物质(有机酸及酚类物质等)的螯合作用;液泡的分隔化;形成铝结合蛋白;诱导耐铝酶系的形成等。通常铝累积(Al accumulator)植物具有这种能力^[2]。

外部排斥机制:

有机酸的分泌被认为是植物最重要的一个耐铝机理。Kitagawa等^[35]首次报道铝处理诱导了小麦根系苹果酸的分泌,且抗铝毒强的小麦Atlas66比敏感小麦Brevor分泌的量高。Miyasaka等^[36]研究发现,耐铝菜豆品种(*Phaseolus vulgaris*)铝胁迫下根分泌的柠檬酸是铝敏感品种的8倍。Delhaize等^[37,38]对一对近等位基因小麦的研究也发现,铝敏感小麦品系根尖积累的铝为耐性品系的3~8倍,而苹果酸的分泌量耐性品系比敏感品系高出10倍,表明有机酸分泌在铝排斥中的重要作用。Ma^[39]将有机酸分泌分为两类模式:第一类以小麦、荞麦为代表,此类植物可快速对铝胁迫作出反应,在几十分钟内向介质中释放有机酸;第二类以决

明、玉米、小黑麦为代表,这类植物对铝胁迫的反应有一明显滞后期,一般需铝处理数小时后才会有明显的有机酸分泌。研究发现, Al^{3+} 能够激活小麦质膜阴离子通道^[40],而且阴离子通道抑制剂能抑制铝胁迫下植物根系有机酸的快速分泌^[41],由此推测第一类有机酸的分泌模式可能与质膜阴离子通道被激活有关,第二类分泌模式与耐性基因的诱导有关。铝胁迫下分泌的有机酸主要是苹果酸、草酸和柠檬酸,不同植物分泌的有机酸种类不同,这可以认为是由植物根系质膜上负责有机酸阴离子分泌的通道蛋白的特性所决定的^[42]。

细胞壁作为植物抵御不良环境的第一道屏障,在植物耐铝机制中的作用也非常重要。在质外体中,二价阳离子是与细胞壁的带负电荷基团结合,如羧基、羟基等,根阳离子交换能力(CEC)即是由细胞壁中这些带负电荷基团决定。主要起作用的细胞壁组分是果胶质、细胞骨架、酶及磷酸根。铝毒害作用可能与CEC相关,从而提出了CEC假说。CEC假说认为品种的耐铝性与根系的CEC高低有关^[4]。Blamey等^[43]报道,耐铝的牛解花属(*Lotus*)品种CEC较低,而敏感品种CEC较高。解释认为低CEC的耐性品种需较高铝活度以沉淀甲基化程度相对较高的果胶质。相反,高CEC的敏感品种沉淀果胶质的铝活度相对较低,因而根系组织中的铝浓度高,削弱了果胶的保护作用,这在棉花、黑麦草、大麦、小麦中均有报道^[44]。然而,所报道的结果并非完全一致,且没有强有力的模式机制来支持此假说。因此,对于根系CEC在铝排斥机理中的作用目前还存在一定的分歧。

另外,植物还可通过提高根际介质pH以降低单体铝在介质中的主导地位^[45];产生根边缘细胞和粘胶层在根尖或边缘细胞外围形成厚厚的鞘套作为铝进入根尖的屏障等来缓解铝的毒害^[46, 47]。

酚类代表包括生物碱、类黄酮、萜类化合物和配糖类在内的一大类植物化合物,不仅对铝有螯合作用,同时在植物非生物胁迫响应中起到强抗氧化剂的作用,因此这类物质在植物耐铝中的作用开始得到关注^[2]。

内部忍耐机制:

铝通过质外体进入植物细胞内以后,在植物体内形成无毒或有毒的复合物,这是植物能够忍耐体内高浓度铝的先决条件。在能够与铝形成稳定络合物的配体中,有机酸阴离子、酚类化合物和硅可能在植物地上部组织解铝毒中起重要作用^[2]。这个结果来自于对铝累积植物地上部的研究^[48],绣球花(*Hydrangea macrophylla*)是一种观赏植物,当土壤酸化时,花萼的颜色由红变蓝,这种变化

是由于铝累积在花萼中，与翠雀色素（delphinidin-3-glucoside）和氯原酸（3-caffeoylquinic acid）形成一种蓝色的复合物引起的。Ma等^[49]研究表明，绣球花（*Hydrangea macrophylla*）叶子中累积的铝可以超过 $3000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$ ，叶子中的铝主要以Al-citrate（1:1）复合物的形式存在。在共质体内的pH接近中性条件下，Al-citrate（1:1）的稳定常数比较高，有效地降低了细胞液中铝的活性，阻止了铝与敏感的细胞化合物的结合，达到解毒的目的。Ma等^[41]还研究了另外一种铝累积植物荞麦（*Fagopyrum esculentum*）。荞麦的耐铝一部分是由于根尖分泌草酸，但是叶子中也累积很高水平的铝，当生长于酸性土壤中时，叶子中铝的含量达到 $15\ 000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$ ^[50]。根和叶子中的铝大部分是以Al-oxalate（1:3）复合物存在^[51]。接着，他们研究发现，在通过木质部从根向地上部分运输的过程中是Al-citrate（1:1）而不是Al-oxalate（1:3）^[52]。这表明在运输到木质部的时候Al的配体先从oxalate转化为citrate，进入叶子的时候又再转回oxalate。

Shen等^[53]通过直接分离和纯化原生质体和液泡，首次报道了铝在铝累积植物叶片中的分室现象，为植物耐铝机制提供了有力证据：荞麦叶片中铝的亚细胞分布表明80%的叶片总铝是以1:3的Al-oxalate形态储存在液泡中。这些结果表明荞麦叶片中铝的内部解毒机制是通过与草酸络合及液泡的分室作用而实现的。Schulz和Kolukisaoglu^[54]发现，植物中的ABC transporters有将一些有毒的有机、无机的物质分室在液泡中的功能，可能参与调控 Al^{3+} 与有机酸络合后运输或储存在液泡中。

此外，对植物耐铝的机制也有一些蛋白、分子水平的研究，例如运用蛋白质组、基因组的手段获得一些相关蛋白、基因。Richard等^[55]用拟南芥作材料，分离出一系列铝诱导表达基因，这些基因编码过氧化物酶、谷胱甘肽-S-转移酶、蓝铜蛋白、网状番茄碱/氧化还原酶同源蛋白、SOD、Bowman-Birk蛋白酶抑制剂等。关于耐铝酶形成和活性的研究有很多，主要包括抗氧化酶系统、三羧酸循环（TCA）过程中有机酸合成相关的酶等。Hamilton等^[56]研究发现，小麦耐铝品种中的液泡ATP酶和线粒体 F_1F_0 -ATP酶活性由铝诱导，并且这些酶的诱导产生具有剂量效应，表明这些酶的诱导可能是小麦耐铝的一种适应性状，该ATP酶在铝胁迫下的特定诱导合成是为了提供铝胁迫下的ATP，以保证细胞内的能量平衡。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库