外源柠檬酸缓解大豆根系短期铝胁迫的 FTIR 特征分析

金婷婷, 刘 鹏*, 张志祥, 徐根娣, 赵莉莉

浙江师范大学植物学实验室,浙江金华 321004

摘 要 选择耐铝性不同的 2 个大豆品种浙春 2 号(耐铝性)和浙春 3 号(铝敏感)作为实验材料,在设置铝 胁迫的同时添加外源柠檬酸处理,应用傅里叶变换红外光谱法(FTIR)对外源柠檬酸协同铝胁迫下的大豆根 组织干燥粉末进行直接测定,并对其特征吸收峰进行了归属。通过对各图谱的比较分析,铝处理下大豆根的 红外吸收峰形及峰强有所区别,特别是 1 057,1 602,2 927 和 3 297 cm⁻¹左右的吸收峰区别明显,反应出蛋 白质,糖类以及核酸等有机物的含量变化;以 *A* 2 927 cm⁻¹/*A* 3 297 cm⁻¹方横坐标、*A* 1 051 cm⁻¹/*A* 1 602 cm⁻¹ 为纵坐标 而绘制的二维分析图显示,外源柠檬酸的加入使不同处理的红外吸收峰形及峰强差异降低,意味着有机物 等有效成分的变化不显著,且浙春 3 号尤为明显。实验表明 FTIR 在某种程度上能够反映外源柠檬酸对铝胁 迫下大豆根的缓解效应,为该领域的研究工作提供了有益的参考。

关键词 FTIR; 直接测定; 外源柠檬酸; 铝胁迫; 大豆根 中图分类号: S565.1 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)02-0367-05

引 言

2

铝毒是南方酸性土壤中制约农作物生长的重要因子之 一,但是不同植物对铝毒的忍耐能力和积累能力不同,基因 型差异性也很大^[1]。近年来,植物根系分泌物对铝毒的缓解 作用及其生理功能已引起普遍重视,相关研究工作逐渐增 多,众多研究发现植物根系分泌物能够响应外界环境变化而 应激地分泌特殊物质^[2]。Yang等^[3]研究发现耐铝性大豆根 系可通过大量分泌柠檬酸来达到一定程度上缓解铝胁迫的效 果。目前有关外源有机酸对植物养分胁迫的研究也越来越受 到关注。

然而,此类研究大多采用相关植物生理学方法测定根系 生理指标,以及收集根系分泌物再研究分泌物中的成分,二 者结合起来分析。但是此方法复杂且耗时,至今也没有找到 有关根系分泌物的最佳收集方法,以解决最能模拟植物自然 生长状态下的分泌模式。而作为一种准确快速的分析方法, FTIR 越来越受到重视并已开始广泛运用于农业领域,之前 有中药鉴定方面的大量研究报道^[4,5],还包括小麦、玉米、 大豆、稻米、油菜等农作物的质量检测^[610]等,最近在与生 物学结合方面也有突破进展,比如就有航天诱变番茄花粉、 人参皂贰、尖椒叶片叶绿素含量等方面的结合研究^[11-13]。红 外光谱分析法在分析过程中不需要化学试剂和繁琐的前处 理,分析快速,操作简便,可以在1 min 之内同时完成几种 参数的分析,无疑是结合根系变化研究外源柠檬酸缓解铝毒 效果的好方法。

本实验利用 FTIR 对经不同浓度和不同时间铝处理,以 及添加外源柠檬酸相互作用下的大豆根系进行检测,以分析 外源柠檬酸对大豆根铝胁迫的缓解效应,同时也为有机酸缓 解植物铝胁迫领域提供新的参考资料和鉴定方法。

1 实验部分

1.1 实验样品

供试大豆为浙江省农业科学院大豆组提供的优质高产大豆(*Glycine max* Merrill) "浙春3号"(铝敏感)和"浙春2号" (铝耐性)2个品种。

主要仪器有美国 Nicolet 公司的 NEXUS670 型傅里叶变换红外光谱仪, DTGS 检测器, OMNIC E S. P. 5.1 智能操作软件, OMNI采样器。

- 1.2 实验方法
- 1.2.1 植物培养和处理

选择大小一致、圆润饱满的种子,经表面消毒(10% H₂O₂,5 min)后催芽萌发4 d。当幼苗两片叶子展开时,将

收稿日期: 2007-09-28, 修订日期: 2007-12-29

基金项目:国家科技攻关项目(2004BA525B06),国家自然科学基金项目(30540056)和浙江省自然科学基金项目(304186,303461)资助 作者简介:金婷婷,女,1983年生,浙江师范大学植物学实验室硕士研究生 e-mail: 2005210294 @zjnu.net *通讯联系人 e-mail: sky79 @zjnu.cn

长势一致的大豆幼苗用海绵包住茎,移栽到盖上有小孔的水 培箱中,培养液用 Hoagland 完全培养液。2~3 d 换一次营 养液,每天通气 2 次,每次 4 h。大豆幼苗于全营养液中分别 培养 30 d 后,取大豆植株,转移到钙溶液(0.5 mmol ·L⁻¹ CaCl₂, p H 4.5)中黑暗条件下适应 12 h,然后转移至含有不 同浓度的 Al³⁺溶液中处理 6 h。不同铝处理时间的实验中铝 浓度为 100 μ mol ·L⁻¹ Al³⁺。在设置铝浓度和处理时间的同 时,加入 200 μ mol ·L⁻¹外源柠檬酸,以不加柠檬酸为参比, 其他条件和前述一致。

1.2.2 植株烘干

取每个处理的大豆植株 10 株, 晾干到一定程度后, 放入 50 烘箱中烘至恒重。

1.2.3 红外检测

将干燥后不同处理植株的根剪下至研钵中,研磨至粉末 状,分别用近红外光谱仪检测,光谱范围 4 000~650 cm⁻¹, 分辨率 4 cm⁻¹,扫描累加次数 32 次,应用 OMNI采样器直 接测定红外光谱,OMNIC E S P. 5.1 同步智能软件采用 ATR 校正,每个样品测定前均对背景进行扫描,得到的红外 光谱进行基线校正,确定峰值和吸光度。

1.2.4 数据分析

-7

通过测定得到 2 个大豆品种在不同处理条件下的根系 FTIR 分析图谱 52 个,并根据吸收峰的吸光度值的特点筛选 出比较典型的吸收峰,以 A_{2 927 cm⁻¹}/A_{3 297 cm⁻¹}为横坐标、 A_{1 051 cm⁻¹}/A_{1 602 cm⁻¹}为纵坐标,用相关软件 ORIGIN 7.0 作 出二维分析图,考察外源柠檬酸对铝胁迫下大豆根系红外吸 收光谱的影响。

2 结果与讨论

2.1 不同铝浓度和不同处理时间胁迫下大豆根系的 FTIR 图谱分析

图 1 和图 2 的 FTIR 谱图是不同处理下浙春 2 号和浙春 3号大豆根各主要化学成分的综合反应,可以根据所含化学 成分的官能团特征找到相应红外光谱吸收峰的归属。1 200 ~950 cm⁻¹范围内主要是多糖的吸收区,其中1051 cm⁻¹左 右的吸收主要是蛋白质,低聚糖等分子中 C---O 键的伸缩振 动,比较此处的吸收峰可知大豆根中所含蛋白质,低聚糖等 有机物的含量。1750~1500 cm⁻¹主要是酰胺和脂类羧基振 动,其中1602 cm⁻¹处的吸收峰归属于羧酸根的 C=O, C-O键的伸缩振动。2 927 cm⁻¹ 处的吸收峰归属于 --CH2 --基团的 C ----H 键的不对称伸缩振动。3 292 cm⁻¹左 右强而宽的谱带是典型的缔合 OH 伸缩振动吸收,以及氨基 酸,核酸,维生素等物质分子中 N — H 键的伸缩振动吸收的 叠加,主要反映大豆根所含的核酸等在光谱中的贡献^[14]。这 些峰形和峰强是大豆所含成分所决定的,不同大豆品种以及 经过不同处理的大豆根含有蛋白质、糖类、核酸等物质含量 有差异会有不同的吸收峰形。经过各种处理下的大豆根系成 分有所不同,其含量不同的成分主要是蛋白质、糖类、核酸 等有机物,这3类物质对应的特征峰主要为1051,1602, 2 927和3 292 cm⁻¹。我们将对 1 051, 1 602, 2 927 和3 292 cm⁻¹所对应的特征峰分别进行分析,来探索外源柠檬酸缓解 大豆根铝胁迫的 FTIR 特征。





注: (a) ~ (d) 分别表示不同铝浓度处理下、外源柠檬酸协同不同铝浓度作用下、不同铝处理时间处理下以及外源柠檬酸协同不同铝处理时间 作用下的浙春 2 号根系红外光谱图。(a) 和(b) 中 *a*~*g* 分别表示 0 µmol ·L⁻¹ Al³⁺, 30 µmol ·L⁻¹ Al³⁺, 50 µmol ·L⁻¹ Al³⁺, 70 µmol ·L⁻¹ Al³⁺, 100 µmol ·L⁻¹ Al³⁺, 200 µmol ·L⁻¹ Al³⁺, 500 µmol ·L⁻¹ Al³⁺; (c) 和(d) 中 *a*~*g* 分别表示 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h。



注: 如图 1 注所示

图中还显示,各种处理下并没有出现新的典型的特征 峰,而是在1051,1602,2927和3292 cm⁻¹位置出现一定 程度的峰强变化,这表明实验设置的胁迫处理下,2个品种 大豆根系的主要化学成分没有明显改变,只是在含量上发生 变化。从图1(a)中可以看出,随铝浓度的增大,浙春2号根 系在1051 cm⁻¹左右的吸收峰强度有逐渐减弱的趋势,而 图1(c)中显示,随铝处理时间的延长,1051 cm⁻¹左右的吸 收峰强度却有逐渐增强的趋势,3292 cm⁻¹吸收峰无明显变 化。比较图1和图2可知,浙春3号根系在1051 cm⁻¹左右 的吸收峰普遍要比浙春2号弱,表明铝处理下,大豆根系的 蛋白质和低聚糖势必发生一定变化,而核酸类物质变化不显 著。蛋白质和低聚糖是生命活动的重要物质,由此看来此类 物质的变化可能和大豆耐铝性相关,其变化过程与大豆自身 缓解铝毒机制和铝胁迫机制都有所关联,而核酸等与遗传形 状相关的物质相对保持稳定。

2.2 外源柠檬酸协同铝胁迫下大豆根系的 FTIR 图谱分析

从图 3 可以发现, 浙春 2 号在 100 µmol ·L⁻¹ Al³⁺处理 6 h下, 1 051 和 1 602 cm⁻¹的特征吸收峰强普遍高于浙春 3 号, 这个应该和大豆品种的耐铝性有关。然而添加外源柠檬 酸处理后, 浙春 2 号和浙春 3 号在 1 051 cm⁻¹的吸收峰较单 纯铝处理下, 峰强均有所增大, 尤其是浙春 3 号。这表明经 过外源柠檬酸作用下的浙春 2 号和浙春 3 号大豆较单纯铝溶 液处理, 其根所含蛋白质、糖类等有机物的含量均有所增 多, 一定程度上体现了外源柠檬酸对大豆根系铝胁迫的缓 解, 这个结论符合前期研究结果¹¹⁵。而 1 602 cm⁻¹的特征吸 收峰二者变化虽然不大, 但是变化不一致, 浙春 3 号的吸收 峰有所下降, 而浙春 2 号有所上升。

将 2 927 与 3 297 cm⁻¹ 波数处峰面积的比值 A 2 927 cm⁻¹/



Fig 3 Comparison of FTIR spectra between Zhechum No 2 and Zhechun No 3 soybean roots Al³⁺均为 100µmol ·L⁻¹, 处理时间均为 6 h; (+)表示外源柠檬酸处理组

A_{3 297 cm⁻¹}为横坐标,1 051 与 1 602 cm⁻¹ 波数处峰面积的比 值 A_{1 051 cm⁻¹} / A_{1 602 cm⁻¹} 为纵坐标,采用软件绘制二维分析 图。结果得到图 4 和图 5。

实验数据显示,图 4(a)中的 $A_{2\,927\,\text{cm}^{-1}}/A_{3\,297\,\text{cm}^{-1}}$ 在 0.68 ~0.79之间, $A_{1\,051\,\text{cm}^{-1}}/A_{1\,602\,\text{cm}^{-1}}$ 在 1.60~2.50之间;图 4 (b)的 $A_{2\,927\,\text{cm}^{-1}}/A_{3\,297\,\text{cm}^{-1}}$ 在 0.42~0.78, $A_{1\,051\,\text{cm}^{-1}}/A_{1\,602\,\text{cm}^{-1}}$ 在 1.40~2.30之间;图 4(c)的 $A_{2\,927\,\text{cm}^{-1}}/A_{3\,297\,\text{cm}^{-1}}$ 在 0.64~0.70之间, $A_{1\,051\,\text{cm}^{-1}}/A_{1\,602\,\text{cm}^{-1}}$ 在 1.40~2.70之间;图 (d)的 $A_{2\,927\,\text{cm}^{-1}}/A_{3\,297\,\text{cm}^{-1}}$ 在 0.42~0.71之间, $A_{1\,051\,\text{cm}^{-1}}/A_{1\,602\,\text{cm}^{-1}}$ 在 1.40~2.50之间。图 5(a)的横坐标在 0.55~0.65之间,纵坐标在 1.26~2.00之间;图 5(b)的横坐标在 0.47~0.72之间,纵坐标在 1.40~2.10之间;图 5(c)的横坐标在 0.50~0.61之间,纵坐标在 1.10~1.50 之间;图 5(d)的横坐标在 0.51~0.86 之间,纵坐标在 1.10 ~1.70 之间。结果表明,经过不同铝浓度处理下、外源柠檬 酸协同不同铝浓度作用下、不同铝处理时间作用下以及外源 柠檬酸协同不同铝处理时间作用下的浙春 2 号和浙春 3 号根 系样品,样品信息点均没有交叉,在分析图上有各自不同的 分布区域,区分较为明显。只经过单纯铝处理下,浙春 2 号 和浙春 3 号的聚类点比较松散;而经外源柠檬酸和铝协同处 理下的样品聚集点都比较集中,说明差异大大降低,体现了 外源柠檬酸对缓解大豆根铝胁迫的缓解效应。

3 结 论

(1) 从各处理下二个大豆品种根系的红外光谱可以看出,



Fig 4 Two dimensional analysis of Zhechun No 2 roots (a) ~ (d) 分别表示外源柠檬酸协同不同铝浓度作用下、不同铝浓度 处理下、外源柠檬酸协同不同铝处理时间作用下以及不同铝处理时 间处理下的浙春 2 号根系聚类图。(a) 和(b) 中各点分别表示 0 µmol ·L⁻¹ Al³⁺, 30 µmol ·L⁻¹ Al³⁺, 50 µmol ·L⁻¹ Al³⁺, 70 µmol · L⁻¹ Al³⁺, 100 µmol ·L⁻¹ Al³⁺, 200 µmol ·L⁻¹ Al³⁺, 500 µmol · L⁻¹ Al³⁺; (c) 和(d) 中各点分别表示 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h



Fig 5 Two dimensional analysis of Zhechun No 3 roots 注:如上图 4 注解所示

铝处理浓度和处理时间影响下,耐铝性和铝敏感性大豆品种 的根系红外吸收基本相同,吸收峰所对应的波数相对固定, 但各吸收峰的吸收强度有所变化,说明大豆根系的一些化学 成分基本相同,但含量有所差异。

(2)峰强分析表明,大豆根系主要化学成分含量和大豆 耐铝性密切相关,主要体现在蛋白质和糖类等物质上,而核 酸等遗传相关性物质保持稳定,说明在植物接触铝的初期 (24 h内),植物根系细胞的遗传物质不会因为铝胁迫而迅速 改变。

(3) 实验结果还表明,外源柠檬酸的加入在一定程度上 缓解大豆根系的铝胁迫,且对浙春3号的缓解效应尤为显 著,与生理方法的结果显示一致。

(4)利用傅里叶变换红外光谱法,借助于 OMNI 直接测 定植物样品的红外光谱,省略烦琐的生理实验步骤,降低由 于实验操作造成的实验误差,首次从直观角度反映了外源有 机酸与植物解铝毒的相互关系,这将为植物营养生理学的环 境胁迫方面提供便捷的鉴定途径,具有无限的应用潜能。

参考文献

- [1] Pellet D M. Plant Physiology, 1996, 112: 591.
- [2] ZHANGLi-mei, HELi-yuan, LIJian-sheng(张丽梅, 贺立源, 李建生). Guizhou Agricultural Science(贵州农业科学), 2005, 33(3): 88.
- [3] Yang Z M, Nian H, Sivaguru M, et al. Physiologi Plantarum, 2001, 113(1): 64.
- [4] HONG Qing-hong, CHENG Ze-feng, CHENG Cun-gui(洪庆红,成则丰,程存归). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(9): 1610.
- [5] ZHANG Chang-jiang, LI Dar-ting, LIAN GJiu-zhen, et al (张长江,李丹婷, 梁久祯,等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与 光谱分析), 2007, 27(1): 50.
- [6] WANG Xiurrong, LIAO Hong, YAN Xiao-long(王秀荣,廖 红, 严小龙). Soybean Science(大豆科学), 2005, 24(3): 199.
- [7] ZHENG Yong mei, WANG Fang rong, ZHANGJun, et al (郑咏梅, 王芳荣, 张 军, 等). Journal of Jilin University, Information Science Edition (吉林大学学报,信息科学版), 2002, 20(3): 4.
- [8] ZHAO Huarong, WANG Xiao-yan, CHEN Guan-hua, et al(赵花容, 王晓燕, 陈冠华, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学 与光谱分析), 2004, 24(11): 1338.
- [9] BIJing-cui, ZHANG Wen-wei, XIAO Ying-hui, et al (毕京翠,张文伟,肖应辉,等). Acta Agronomica Sinica (作物学报), 2006, 32(5): 709.
- [10] FANG Yan, WANG Hamming(方 彦, 王汉宁). Journal of Cansu Agricultural University(甘肃农业大学学报), 2004, 39(1): 32.
- [11] WANG Yi-lin, YANG Qun, YANG De, et al (王怡林,杨 群,杨 德,等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析),

2006, 26(12): 2207.

- [12] LU Yong-jun, QU Yan-ling, FENG Zhi-ging, et al (芦永军, 曲艳玲, 冯志庆, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(3): 490.
- [13] JIANG Huan-yu, YING Y-bin(蒋焕煜, 应义斌). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(3): 499.
- [14] HONG Qing-hong, LI Dan-ting, HAO Chao-yun(洪庆红,李丹婷,郝朝运). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(8): 1246.
- [15] JIN Ting-ting, LIU Peng, XU Gen-di, et al (金婷婷, 刘 鹏, 徐根娣, 等). Chinese Journal of Oil Crop Sciences (中国油料作物学报), 2006, 28(3): 302.

Analysis of Roots of Soybean (Glycine max Merrill) Treated with Exogenous Citric Acid Plus Short-Time Aluminum Stress by Direct Determination of FTIR Spectrum

J IN Ting-ting, L IU Peng^{*}, ZHANG Zhi-xiang, XU Gen-di, ZHAO Li-li Key Laboratory of Botany, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China

Abstract In the present study, 19 soybean (Glycine max L.) cultivars were analyzed and found to differ considerably in aluminum (Al) resistance. The cultivars Zhechun No. 2 (Al-resistant) and Zhechun No. 3 (Al-sensitive) were selected for further analysis. Experiments were performed with plants grown in full nutrient solution for 30 days. Fourier transform infrared spectrometry (FTIR) with OMNF sampler was applied to the direct determination of different varieties of soybean root tissues, treated with aluminum in a dose-and time-dependent manner plus exogenous citric acid. Then the characteristic absorption peaks of spectra were analyzed and some differences in the FTIR spectra among samples were found from the comparison of the spectra. Results showed that the intensity and the shape of absorption peaks of their FTIR spectra exhibited some differences between different kinds of soybean and different treatment, especially around 1 057, 1 602, 2 927 and 3 292 cm⁻¹, which mainly reflected the content variety of protein, glucide, nucleic acid and so on. Thus it could be concluded that the effect of aluminum stress and existence of exogenous citric acid did not change the component of chemical substance in soybean roots, although the content of certain substance varied. The two dimensional discriminates analysis chart was drawn by the ratio of area at 2 927 cm⁻¹ to that at $3\ 297\ \text{cm}^{-1}$ as the abscissa vs the ratio of area at $1\ 057\ \text{cm}^{-1}$ to that at $1\ 602\ \text{cm}^{-1}$ as the vertical, to discover the difference between the treatment of aluminum plus exogenous citric acid and that of single aluminum. Result indicates that the difference in the shape of absorption peaks of FTIR spectra became smaller and that presumed the content variety with different treatment was not remarkable under the condition of exogenous citric acid, especially in Zhechun No 3. From all mentioned above it is made clear that exogenous citric acid could really ameliorate distinctly the effect of aluminum on soybean roots which was detected by direct determination of FTIR spectrum, giving the fact that FTIR could reflect the ameliorating effect of exogenous organic acid on plant tissue under aluminum stress.

Keywords FTIR; Direct determination; Exogenous citric acid; Aluminum stress; Root of soybean

(Received Sep. 28, 2007; accepted Dec. 29, 2007)

* Corresponding author