

植物铁吸收机理及其相关基因在果树育种上的应用

刘小丰^{1,2,3}, 许兰珍^{1,2,3}, 何永睿^{1,2,3}, 陈善春^{1,2,3*}

(1.国家柑桔工程技术研究中心, 重庆 400712; 2.国家柑桔品种改良中心, 重庆 400712; 3.中国农业科学院柑桔研究所, 重庆 400712)

摘要 生长在石灰质和碱性土壤中的植物会产生铁胁迫黄化现象。从生理、生化和分子水平上对植物在铁胁迫过程中所发生一系列反应进行了概述, 并对植物铁吸收相关基因在果树育种上的应用进行探讨。

关键词 植物; 铁胁迫; 铁吸收机理; 果树育种

中图分类号 S331 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)14-05876-03

Plant Iron Uptake Mechanism and the Application of the Involved Genes in Fruit Breeding

LIU Xiao-feng et al. (National Center of Citrus Engineering and Technology Research, Chongqing 400712)

Abstract Plants grown in calcareous and alkaline saline soils would suffer from iron stress chlorosis. Response of plants during iron stress was summarized from physiological, biochemic and molecular levels. Application of the relevant genes in fruit breeding was discussed.

Key words Plant; Iron stress; Iron uptake mechanism; Fruit breeding

铁是最早发现的植物必需的微量元素, 早在 1843 年, 法国化学家 Gris 就发现生长在石灰性土壤上的葡萄叶片失绿黄化与缺铁有关。在植物生命活动, 如光合作用、呼吸作用、氮代谢中铁都起着重要作用。铁影响植物叶绿素合成, 在缺铁时植物表现出失绿黄化的症状^[1]。尽管地壳中铁的含量非常丰富, 土壤中铁的含量达到 1%~20%, 平均 3.2%, 但由于受到土壤溶液及氧的影响, 几乎都是以难溶于水的 Fe³⁺ 形式存在。植物所需的铁浓度约为 10⁻⁸ mol/L, 而在石灰性土壤 (pH 7.4~8.5) 中, 可溶性铁的总量不足 10⁻¹⁰ mol/L。因此如果没有主动的调节机制使植物获得充足的铁, 那么大多数植物便会表现出缺铁症状。目前研究认为, 缺铁条件下高等植物分别通过两种独立的机制将根际的铁活化吸收, 即双子叶植物和非禾本科植物采用的机理, 禾本科植物采用的机理。植物机理将 Fe³⁺ 还原成 Fe²⁺ 吸收, 机理植物通过分泌“麦根酸”等 Fe³⁺ 结合蛋白螯合 Fe³⁺ 并吸收^[2]。笔者以机理为主从生理、生化和分子水平上对植物在铁胁迫过程中所发生的一系列反应进行阐述, 并对铁吸收机理在苹果、柑桔等果树育种上的应用进行了探讨。

1 植物铁吸收机理

植物铁吸收机理是在铁胁迫时, 诱导根尖细胞质膜结合蛋白 Fe³⁺ 螯合物还原酶 (Ferric-chelator reductase) 基因的转录, 增强表达 Fe²⁺ 转运蛋白 (ferrous transporter) 吸收根表土壤中的 Fe²⁺, 同时 H⁺-ATPase 活性增加降低根表周围土壤的 pH 值, 另外还伴有有机酸分泌植株体内有机酸浓度增加以及根尖膨大、根毛增多、根表产生转移细胞等生理生化现象^[3] (图 1)。

1.1 H⁺-ATPase 活性增加 植物质膜 H⁺-ATPase 是由一个多基因家庭编码的酶类, 每种质膜 H⁺-ATPase 大多都由两个或两个以上的基因编码的亚基组成, 在信号传导和环境胁迫中都发生作用^[4]。原位杂交研究表明, 在参与离子转动的组织 (包括根尖表皮组织) 的细胞中的 H⁺-ATPase 的活性升

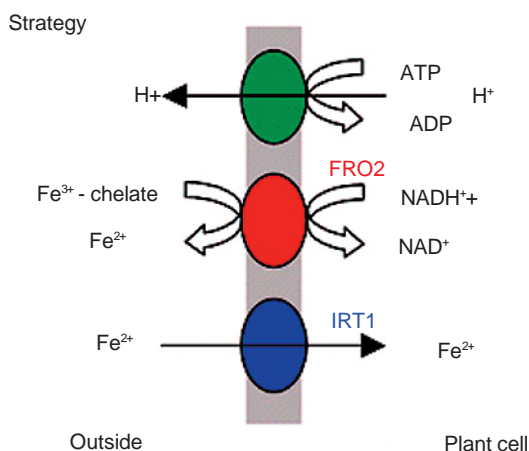


图 1 植物铁吸收机理 模式^[4]

Fig. 1 Mode of absorption mechanism of plant iron

高或 H⁺-ATPase 基因转录增强^[5]。根上的 H⁺-ATPase 位于根尖表皮伸长区细胞的细胞膜中, 植物在缺铁胁迫时, H⁺-ATPase 大量增加并促进质子分泌增强, 根表皮周围被酸化。根际酸化与根系还原三价铁有关, 加入 H⁺-ATPase 活性抑制剂会降低根系对三价铁的还原能力^[6]。H⁺-ATPase 受缺铁诱导, 但不受 ACC、2,4-D 等激素的影响, 分根试验表明, 根尖 H⁺-ATPase 活性是受地上部分调控的^[3]。

1.2 Fe³⁺螯合物还原酶诱导表达 根系对 Fe³⁺ 的还原作用是植物吸收 Fe³⁺ 的前提, 这种还原作用是通过根尖分泌的 Fe³⁺ 螯合物还原酶来完成的。目前已经克隆的 Fe³⁺ 螯合物还原酶基因有 FRO1 (大豆)、FRO2 和 froh (拟南芥)、FRE1 和 FER2 (酵母) 等^[8-12], 它们的蛋白结构是相当保守的, 都具有数个跨膜结构域、组氨酸域、FAD 结合域、NAD 结合域和过氧化物酶信号序列。Fe³⁺ 螯合物还原酶受缺铁诱导, 在根尖表皮细胞中高效表达, 并结合在细胞膜表面, 将螯合态的三价铁还原为二价铁。缺铁时 Fe³⁺ 螯合物还原酶在叶子的叶肉细胞和薄壁组织细胞中也有表达, 但在叶片的表皮细胞中表达, 表明 Fe³⁺ 螯合物还原酶在叶肉细胞中对三价铁的吸收也起作用。

Fe³⁺ 螯合物还原酶的活性直接受根表胞外 pH 值影响, 间接受环境 pH 值影响, 其还原能力随着胞外 pH 值的升高而降低, 推测认为铁高效和不耐缺铁的基因型的差异可能是

基金项目 科技部“973”重大基础研究前期研究专项(2005CCA02900); 重庆市科技攻关重点项目(CSTC 2006AB1009); 重庆市重大科技专项(CSTC 2007AB1040)。

作者简介 刘小丰(1980-)男, 湖北鄂州人, 硕士, 研究实习员, 从事柑桔分子生物学研究。* 通讯作者, 研究员, 硕士生导师。

收稿日期 2008-04-23

指调控质子分泌能力强弱的基因型的差异,但每种植物体内的 Fe^{3+} 螯合物还原酶活性的最佳 pH 值是否一致并不清楚。分根试验表明,根尖 Fe^{3+} 螯合物还原酶的活性是受地上部分调控的^[3]。

1.3 高亲和性 Fe^{2+} 运转载体增强 Fe^{3+} 螯合物还原酶将根尖表皮外的 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} 后,通过 Fe^{2+} 转运蛋白跨膜转入根尖细胞内。二价铁运转载体可分为低亲和性的载体和高亲和性的载体,低亲和性载体的基因目前仅在酵母中克隆得到,但在植物中也有发现。植物的 Fe^{2+} 运转载体包括 ZIP 和 NRA 两个基因家族,目前已经克隆到的 IRT1、IRT2 等属于 ZIP 基因家族,而 ArNramp1、ArNramp3、ArNramp4 等则属于 NRAMP 基因家族^[14-17]。ZIP 基因家族的共同特点是有 8 个疏水的跨膜结构域,在 3 和 4 结构域之间是一个金属结合区,而植物 NRAMP 蛋白含有 12 个跨膜结构域^[15,17]。

在植物缺铁时诱导高亲和性载体的表达,在供铁后其表达水平迅速下降^[14]。 Fe^{2+} 运转载体在缺铁植物的根表皮细胞的细胞膜上表达,在未授粉的拟南芥的花粉柱上也有表达,且与植株是否缺铁无关。目前在拟南芥中克隆到的 IRT1 和 IRT2 中,研究认为 IRT1 是拟南芥缺铁时主要的二价铁运转载体,IRT2 的详细作用方式还不是太清楚,推测 IRT2 位于细胞内膜上,其作用是在细胞内膜上作为 IRT1 的替代品,通过区室化细胞中的铁浓度防止产生毒害^[14]。

1.4 transfer cell 大量形成 植物在缺铁胁迫时,transfer cell 在根尖的表皮中大量形成,其作用通常被认为是增加细胞的表面积来增强对周围物质的吸收。在缺铁和用 ACC、2,4-D 等激素处理时,transfer cell 会大量增加,但在正常供铁的非酸化区并不存在^[3]。研究表明,transfer cell 的数量增加并不一定导致根表皮酸化加强,而增加 H^+ -ATPase 在表皮细胞中的密度则引起质子分泌增加,导致根尖区域的酸化^[18]。在分根试验中,缺铁的那一半根表皮的 transfer cell 的数量比代铁的那一半高出数倍,却未能引起缺铁那一半根的酸化,说明 transfer cell 的数量增加并不一定导致根表皮酸化加强^[3]。

1.5 有机酸浓度增加 在缺铁时,有机酸通常在植物的根、茎、叶中分泌增强,这些有机酸主要是柠檬酸盐(citrate)和苹果酸盐(malate)。在缺铁胁迫时,在根、茎的溢出物、叶片中都表现出有机酸含量增加。特别是在根中,机理 植物和机理 植物在缺铁时都表现出有机酸浓度的增加。在叶中,缺铁对有机酸的分泌表现不同。在芥菜中,缺铁时 citrate 和 malate 的浓度降低,并表现为 citrate/malate 的值升高^[19]。而在后来的一些研究中,表现为 citrate 的浓度升高,如大豆、芥菜、澳大利亚坚果和苹果。malate 的浓度在澳大利亚坚果和苹果的叶中升高,而在大豆和芥菜的叶中下降。在甜菜中,缺铁黄化叶中 citrate 和 malate 的浓度较对照分别提高了 12 倍和 7 倍,在梨树中,缺铁黄化叶中 citrate 的浓度较对照提高了 15 倍,而 malate 的浓度则降低了 1.3 倍^[20]。在根中,缺铁时, citrate 和 malate 的浓度通常都表现为升高,但 citrate 升高的幅度较 malate 大。在大麦、高粱和玉米中还发现了 aconitate 和 succinate 浓度的上升。另外,根中有机酸的浓度还与植物的基因型有关,铁高效植物中有机酸含量较铁低效植物高。通常在机理 中,缺铁会促进根中有机酸含量增加,并使 ATP 酶和 Fe^{3+} 螯合物还原酶活性增强,但有机

酸的积累并不一定总伴随着后两者活性的增强。

木质部在缺铁时有有机酸浓度也会增加。在大豆中最早发现铁在木质部中的转运是以苹果酸铁的形式,后来的研究发现 citrate 也与铁在茎中的转运有关。在向日葵中,木质部分泌液中 citrate 在缺铁时的浓度比补铁到正常水平后高 30 倍。植物缺铁时体内有机酸的积累和质子分泌对铁的吸收都是有利的,也为 Fe^{3+} 螯合物还原酶提供了足够的还原能力。但如果不能获得铁的补充,大量有机酸积累对植物其他的生理代谢过程是有害的,如过高的 citrate/Fe 会影响叶肉细胞对 Fe 的吸收^[21]。

2 植物铁吸收相关基因在果树作物上的应用

果树缺铁黄化是非常普遍的现象。生长在石灰性土壤和碱性紫色土壤上的柑桔就会因为受到 HCO_3^- 和过高的 pH 胁迫而缺铁黄化,苹果、梨、桃等果树因为缺铁而黄化的现象也十分严重。目前防治果树缺铁的方法主要有喷施叶面肥、树干注射、改良土壤等,这些方法需要花费大量的人力、物力,并不适合大面积推广应用。

使用铁高效砧木也是常用的解决果树缺铁黄化的方法。目前,在苹果、柑桔等果树材料中,都筛选到了一些铁高效基因型,如作为苹果砧木的 Luo2、小金海棠、Luo1 为铁高效基因型^[22],柑桔砧木如香橙也是铁高效的^[23],但砧木都有一定的缺陷,如生长势不好、不抗病虫害等。

为了更好地解决缺铁对果树生长的影响,人们对铁高效果树材料在缺铁时的一些特异表现,如根系有机酸的分泌、铁螯合物还原酶的活性等进行了详细地研究,研究认为,铁高效果树材料根系在铁胁迫时根系较不耐缺铁材料有机酸分泌量增加,铁螯合物还原活性增强,质子分泌更快^[24-25]。并利用分子生物学手段筛选和分离果树铁吸收相关基因,如应用同源克隆、抑制消减杂交、蛋白质谱分析等方法,从铁高效果树材料上分离到 Nramp、MxSAMS 等铁吸收相关基因片段和其他的一些在缺铁时特异表达的 EST 序列^[26-27]。

随着果树转基因技术的成熟,为改造不耐缺铁的果树材料提供了有力手段。八棱海棠是目前中国应用最广泛的苹果砧木之一,但其铁吸收能力较弱^[28]。用番茄的铁载体基因(LelIRT2)转化八棱海棠,结果表明,在低铁水培条件下,根系表现出较强的耐铁胁迫能力,叶片叶绿素含量和净光合速率、根系的质子分泌、铁螯合物还原酶活性均高于非转基因八棱海棠,电镜结果显示根系吸收区和根毛区表现结构皱折增多,表面积增大^[29]。用拟南芥铁螯合物还原酶基因 FRO2 转化八棱海棠表明,在正常含铁条件和缺铁时,转基因八棱海棠叶片有效铁含量显著高于非转基因八棱海棠,在缺铁培养基中,转基因八棱海棠植株生长良好,叶片正常绿色,说明在转 FRO2 基因的八棱海棠在缺铁胁迫时根系 FRO2 基因表达量增加,铁吸收能力和叶片中有效铁含量增加,使植株叶片避免或减轻缺铁黄化^[29]。在柑桔和其他一些果树作物上通过转基因手段改造其铁吸收能力的研究也在进行中。

3 结语

目前,人们对植物缺铁机理已经作了比较深入的研究,也克隆了一些铁吸收的功能基因,但植物吸收铁是一个综合作用的结果,涉及多种基因的表达和生理结构的变化,这些变化是受缺铁间接调控的,直接调控这些变化的调控因

子并不清楚。转入功能基因虽然能直接改造不耐缺铁的植物材料,但对其正常生长和发育带来一些可见和不可见的影响。因此,寻找控制铁吸收基因的调控因子,找到更安全可靠的改造植物铁吸收效率的方法,仍然是值得深入研究的。

参考文献

[1] 潘瑞炽.植物生理学[M].4版.北京:高等教育出版社,2001.

[2] RMHELD V,MARSCHNER H.Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses [J].Plant Physiol,1986,80(1):175-180.

[3] SCHMIDT W,MICHALKE W,SCHIKORA A.Proton pumping by tomato roots.Effect of Fe deficiency and hormones on the activity and distribution of plasma membrane H⁺-ATPase in rhizodermal cells [J].Cell and Environment 2003,26:361-370.

[4] HELL R,STEPHAN U W.Iron uptake,trafficking and homeostasis in plants[J].Planta 2003,216: 541-551.

[5] MICHELET B,LUKASZEWICZ M,DUPRIEZ V et al.A plant plasma membrane proton-ATPase gene is regulated by development and environment and shows signs of a translational regulation [J]. Plant Cell,1994,6:1375-1389.

[6] PARETS-SOLER A,PARDO J M,SERRANO S.Immunocytochemical localization of plasma membrane H⁺-ATPase [J].Plant physiology,1990,93: 1654-1658.

[7] 刘书娟,张福锁,毛达如.缺铁敏感度不同的大豆品种对缺铁适应机制[J].植物生理学报,1996,22(1): 1-5.

[8] ROBINSON N J,PROCTER C M,CONNOLLY E L et al.A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils [J].Nature,1999,397: 694-697.

[9] ROBINSON N J,SADJUDA T,GROOM Q J.The froh gene family from Arabidopsis thaliana: putative iron-chelate reductases [J].Plant and Soil,1997,196: 245-248.

[10] WATER B M,BLEVINS D G,EIDE D J.Characterization of FRO1,a pea ferric-chelate reductase involved in root iron acquisition[J].Plant Physiology,2002,129:85-94.

[11] SHATWELL K P,DANCIS A,CROSS A R et al.The FRE1 ferric reductase of saccharomyces cerevisiae is a cytochrome b similar to that of NADPH oxidase[J].The Journal of Biological Chemistry, 1996,271(24):14240-14244.

[12] MARTINS L J,JENSEN L T,SIMON J R et al.Metalloregulation of FRE1 and FRE2 homologs in Saccharomyces cerevisiae [J].J Biol Chem,1998,273(37): 16-21.

[13] KOSEGARTEN H,HOFFMANN B,ROCO E et al.Apoplastic pH

and FeII reduction in young sunflower (Helianthus annuus)roots [J].Physiol Plant,2004,122:95-106.

[14] VERT G,BRIAT J F,CURIE C.Arabidopsis IRT2 gene encodes a root-periphery iron transporter [J].The Plant Journal 2001,26(2): 181-189.

[15] EIDE D,BRODERIUS M,FETT J et al.A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast [J].Proc Natl Acad Sci,1996,93:5624-5628.

[16] VERT G,GROTZ N,DEDALDECHAMP F et al.IRT1 an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth[J].The Plant Cell,2002,14:1223-1233.

[17] CURIE C,ALONSO J M,JEAN M L et al.Involvement of NRAMP1 from Arabidopsis thaliana in iron transport [J].Biochem J,2002,347:749-755.

[18] HASEGAWA P M,BRESSAN R A,ZHU J K et al.Plant cellular and molecular responses to high salinity [J].Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,2000,51:463-499.

[19] DE KOCK P C,MORRISON R I.The metabolism of chlorotic leaves.2.Organic acids [J].Biochem J,1958,70:272-277.

[20] ABADIA J,LÓPEZ-MILLÁN A F,ROMBOLA A et al.Organic acids and Fe deficiency: a review[J].Plant and Soil,2002,241:75-86.

[21] BIENFAIT F H,SCHEFFERS M R.Some properties of ferric citrate relevant to the iron nutrition of plants [J].Plant Soil, 1992,143:141-144.

[22] 张凌云,翟衡,张宪法,等.苹果砧木铁高效基因型筛选[J].中国农业科学,2002,35(1): 68-71.

[23] 李学柱,罗泽民,邓烈.6种柑桔砧木苗对土壤 pH 适应性的初步研究[J].西南农业大学学报,1991,13(1):79-81.

[24] 李振侠,徐继忠,高仪,等.苹果砧木 SH40 和八棱海棠缺铁胁迫下根系有机酸分泌的差异[J].园艺学报,2007,34(2):279-282.

[25] LI L,LUO X Y,ZHOU Z Y et al.Expression of Ferric-chelate Reductase gene under iron deficiency in fruit rootstocks of four species [J].Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2002,28(4):299-304.

[26] 戚金亮,韩振海,印莉萍,等.小金海棠抗缺铁相关基因-Nramp 基因片段的克隆[J].园艺学报,2004,31(3):360-362.

[27] 张玉刚,许雪峰,李天忠,等.抑制性消减杂交分离苹果缺铁诱导的相关基因[J].园艺学报,2007,34(3):555-560.

[28] 渠慎春,张君毅,陶建敏,等.转番茄铁载体基因(LelRT2)八棱海棠对缺铁胁迫的响应[J].中国农业科学,2005,38(5):1024-1028.

[29] 李建科,邱苗苗,杨静慧,等.转基因八棱海棠抗黄化鉴定研究[J].中国果树,2007(2):13-15.

(上接第 5853 页)

“一村一品”的发展步伐。

3.4 企业带动型 企业带动型农村是指以该村或所属村镇的基础条件为出发点,以发展工业企业为契机,通过工业企业的发展壮大带动农村政治、经济、设施、教育、文化、卫生等事业的综合发展,同时,村镇在土地、劳动力等资源整合的基础上又进一步促进工业企业的发展,使得工业企业与村镇融为一体,和谐发展。这种品型的农村需要有发展工业企业的基本要素,如土地、资源、信息、技术、资金和较强的人才资源。环洞庭湖区根据比较优势原则,重点发展优质稻生产与加工、淡水养殖与加工、棉麻与轻纺、林纸一体化 4 项产业,重点建设一批特色农产品生产和加工基地。如湖南省常德市金健米业、洞庭水产、广源麻业、金果果蔬、荣祺食品、双佳农牧、来得富榨菜等,已成为该市农业参与国内国际市场竞争的重要力量。这批龙头企业带活了“一村一品”的发展,如湖南省常德市安乡县 2003 年引进的来得富食品有限公司,年加工榨菜 4 万 t,年创产值 7 000 多万元,转移农村劳动力 200 多人,新增 56 个榨菜生产专业村,发展榨菜基地 5 333 hm²。龙头企业是发展“一村一品”的重要带动力量,企业带动模式需要注意几点:一是需要政策扶

持。市政府财政每年需安排一定的产业化专项引导资金和龙头企业贷款贴息资金,着力发展一批产业联系紧密、产品级次高、带动能力强的规模型龙头企业和重点项目,同时,各区县也要给予相应配套支持;二是需要加强招商引资。项目和资金的引进,能壮大当地的龙头企业,同时也能带活农村“一村一品”的发展,解决农村人口本地就业问题,留住本土人才;三是优化“一村一品”成长环境。要把创造新环境、培育新农民作为“一村一品”建设的重要内容,抓好各级干部依法行政,加大农业执法力度,为龙头企业发展和“一村一品”建设提供良好的成长环境。

参考文献

[1] 李清泽.日本大分县的一村一品运动发展情况[J].世界农业,2006(3):35-36.

[2] 周江梅.台湾农村建设动向[J].福建农业,2007(1):36.

[3] 李乾文.日本的“一村一品”运动及其启示[J].世界农业,2005(1):32-35.

[4] 郑文凯.发展“一村一品”促进强村富民[J].中国农村科技,2006(12):48-49.

[5] 陈炜华.“一村一品”富江西[J].国际人才交流,2006(9):47-49.

[6] 王伟光.建设社会主义新农村的理论与实践[M].北京:中共中央党校出版社,2006.