

唐娇,冯英明,陈醒韵,等.低pH条件下纳米硅矿化沉积对豌豆根尖和根边缘细胞耐铝性的影响[J].华中农业大学学报,2025,44(1):137-147.DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2025.01.015

低pH条件下纳米硅矿化沉积对豌豆根尖和根边缘细胞耐铝性的影响

唐娇,冯英明,陈醒韵,郭依唯,郑雨欣,田晓,李学文,喻敏

佛山大学国际膜生物学与环境研究中心/农业与生物工程学院,佛山 528200

摘要 为探究不同pH铝环境条件下纳米硅矿化对豌豆根尖及根边缘细胞保护机制的影响,通过聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)诱导硅静电吸附形成纳米硅壳进行仿生矿化的方式,解析不同pH(pH 3.5、4.5、5.5)条件下纳米硅对豌豆根尖及根边缘细胞缓解铝毒的生理调控机制。结果显示,各pH的铝处理都降低了根边缘细胞活性,而加硅处理后细胞应对铝毒环境的细胞活性显著提高,加硅处理细胞内的铝含量和活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量低于缺硅处理且加硅后细胞线粒体膜电位上升;铝毒抑制了豌豆根尖伸长,在pH 3.5铝处理条件下加硅缓解根尖抑制作用的效果不明显,但pH 4.5、5.5条件下根尖伸长量显著增加;随着铝处理pH值升高,根尖铝含量降低,且加硅处理后根尖的铝含量都高于缺硅处理;硅使得细胞壁上更多带负电的官能团参与抗铝胁迫,降低了细胞壁各组分(包括果胶、纤维素、半纤维素、蛋白质等)的吸收峰值;pH 4.5和5.5铝环境条件下细胞表面形成纳米硅壳,硅铝在细胞壁上沉积形成铝硅酸盐。结果表明,低pH条件下纳米硅在细胞上的矿化沉积能够缓解铝离子毒害作用。

关键词 豌豆; 铝毒; 纳米硅; 生物硅化; 根边缘细胞

中图分类号 S311 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2025)01-0137-11

我国南方土壤酸化严重,酸性土壤($\text{pH} < 5.5$)中存在多种限制植物生长和作物产量的因素,而铝毒被认为是最主要的限制因素^[1]。铝(Al)是地壳中含量最多的金属元素,当土壤pH值下降至5.5以下时其溶解度增加而形成毒害作物的重金属胁迫因子^[2]。土壤中铝的浓度和化学形态由溶液pH和化学环境决定,在不同酸性土壤环境中铝以 Al^{3+} 、 $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ 、 $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ 的形式溶解,低pH时铝以 Al^{3+} 形式为主对植物生长影响最大,pH 4.5至中性溶液中 $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ 、 $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ 的含量逐渐增加^[3-4]。大部分有关铝毒的报道通常在pH 4.5条件下研究 Al^{3+} 对植物生理生化的影响,羟基铝离子形态的铝对植物的影响却少有研究。

铝毒胁迫影响植物一系列生理响应和代谢水平的变化,最主要的特征是根系伸长受到抑制且根结构被破坏,直接影响根系吸收水分和养分^[5-6],铝离子在根尖细胞壁上与构成细胞壁骨架的果胶、纤维

素和半纤维素等成分相结合,改变了细胞壁的结构特性^[7],同时根细胞内的活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量短时间内迅速增加,严重时ROS含量爆发导致细胞程序性死亡。另外根边缘细胞(root border cells, RBCs)是从根冠游离下来的活性细胞,与土壤之间形成一层生物界面,其细胞壁提供与铝离子结合的位点将其固定在细胞外阻止铝离子进入根尖,保护根尖减轻非生物胁迫和病原体的侵害^[8]。

硅(Si)在土壤中通常以二氧化硅和硅酸盐的形式存在,只有单硅酸盐的形式能被植物吸收进入根和植物体内^[9],通过蒸腾作用到植物的茎和叶中沉积为无定形二氧化硅,硅与细胞壁结合提高了细胞壁刚性强度并增加了植物机械强度^[10],还可以保护植物免受各种非生物胁迫的侵害^[11],大量研究表明外源施加硅肥或二氧化硅能调节作物抵抗胁迫的生理生化过程以提高作物的抗逆性^[12]。除了外源添加硅外,通过生物硅化和模仿生物硅化来提高作物抗逆

收稿日期: 2024-01-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(42077150;31672228)

唐娇, E-mail: 1785859204@qq.com

通信作者: 冯英明, E-mail: fyingming@fosu.edu.cn

性的方法近年来逐渐成为研究热点。在细菌、硅藻、海绵、植物等生命体中广泛存在生物硅化现象^[13-14],通过生命体自身调控特征蛋白精确控制矿化沉积的分层和结构,从硅藻和海绵中提取出来的蛋白质可以在体外沉淀二氧化硅^[15],助力了在体外仿生合成方式的材料和工艺的研究及应用。

借助聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)诱导硅沉积是仿生硅化的方法之一,PEI大分子链上的大量胺基具有改性作用^[16],在酸性环境下表现为带正电荷的聚电解质,对重金属离子有强吸附力^[17]。PEI诱导正硅酸甲酯水解沉积形成纳米硅壳在细胞壁上螯合重金属离子,阻止重金属离子进入植物和细胞以此增强抵抗胁迫的能力。Ma等^[18]研究表明PEI诱导硅在水稻悬浮细胞上有效阻止镉离子进入细胞,用原子力显微镜和X射线光电子能谱等方法测定细胞壁的表面物理和化学性质,表明包覆在细胞上的纳米硅壳提高了细胞壁的机械强度和力学性能。在铝毒环境下,硅与铝在细胞壁上共沉积形成Si-Al络合物,多种光谱分析显示络合物的结构为羟基铝硅酸盐(hydroxyaluminosilicate, HAS),Hodson等^[19]综述了近年来有关Si-Al共沉积的研究进展,表明Si-Al之间是通过静电吸附还是共价键结合仍有待证实。

豌豆在我国湖南、云南、广东等20多个省市均有种植,是我国第一大食用豆类作物^[20]。豌豆根边缘细胞作为自然产生的独立存活单细胞,是研究根际微环境中元素吸收利用和相互关系(如硅铝关系、硼铝关系)的模式细胞^[21]。铝毒是酸性土壤中限制作物生长和产量的重要因素之一,不同pH环境下铝存在形态不同,对植物生长的毒性作用不同。近年来生物硅化被广泛研究并逐步应用到农业生产中抵御逆境造成的伤害以提高作物产量。本研究设置3个pH(pH 3.5、4.5、5.5)铝溶液环境条件,探讨在不同pH铝溶液环境下纳米硅对豌豆根边缘细胞和根尖生理调控的影响及纳米硅与铝在细胞壁上沉积结构的影响,旨在为纳米硅矿化提高豌豆抗铝性以适应南方酸性土壤提供理论和实践依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验豌豆(*Pisum sativum* L.)品种为中豌6号,种子由佛山大学农业与生物工程学院园艺系种质资源库提供。

1.2 材料培养及处理方法

取适量豌豆用7.5%次氯酸钠溶液消毒30 min后用超纯水反复冲洗,去除破皮、肿胀和发育不良的种子,冲洗至无刺激性味道。加入1 mmol/L CaCl_2 溶液浸泡12 h后将豌豆转至雾培箱中均匀铺在雾培网上培养48 h。

1)根边缘细胞的收集。豌豆雾培后,在烧杯中加入少量1 mmol/L CaCl_2 溶液,剪取0.5~1 cm长的根尖浸泡在溶液中。剪完后轻轻搅拌用移液枪吸取细胞悬液至离心管,离心2 min弃上清,即得到根边缘细胞(RBCs)。根据试验需求进行后续处理。

2)根边缘细胞预处理。共设6个处理组,缺硅(-Si)和加硅(+Si)处理组各3个,+Si处理组的离心管加入PEI处理液(0.005 g/L, pH 7.0),-Si处理组加入Hepes缓冲液(50 mmol/L, pH 7.0),分别培养10 min后离心弃上清再用Hepes缓冲液洗涤2遍;+Si处理组的离心管再加入四甲氧基硅烷配制的Si溶液(1 mmol/L, pH 7.0),-Si处理组加入Hepes缓冲液,分别培养20 min后离心弃上清再用Hepes缓冲液洗涤2遍;纳米硅预处理后分别加入pH值3.5、4.5、5.5的铝溶液(100 $\mu\text{mol/L}$)处理1 h。

3)水培处理。雾培后的豌豆幼苗挑出长势良好、根长相对一致的幼苗转移至黑色水培桶中(装有1/4 Hogland 营养液, pH 6.0)。幼苗主根长到一定长度后剪去主根并更换营养液,待全部侧根基本长出后做加硅预处理,+Si组先用PEI(0.003 g/L, pH 6.0)处理4 h后换Si溶液(10 mmol/L, pH 6.0)处理8 h,-Si组则用 CaCl_2 溶液(0.5 mmol/L, pH 6.0)处理相应的时间,硅预处理完成换对应pH值3.5、4.5、5.5铝处理液(100 $\mu\text{mol/L}$)处理24 h。

1.3 根边缘细胞活性测定

铝处理后的细胞洗涤2次、离心后加入适量Hepes缓冲液重悬备用,将细胞液与台盼蓝染液以1:1染色3 min后吸取1 μL 混合液在玻片上划细线,通过正置显微镜观察、拍照用于后续分析活细胞与死细胞比值,每个处理重复至少5次。

1.4 根边缘细胞活性铝含量测定

将细胞液与Morin染液1:1染色25 min后离心弃上清,洗涤2次细胞将染液洗去后加入Hepes缓冲液吸取10 μL 至玻片上,通过激光共聚焦拍照。

1.5 根边缘细胞活性氧含量测定

从重悬后的细胞液吸取一部分至1.5 mL离心

管,离心后弃上清加入ROS染液染色25 min后离心、弃上清,洗涤2次细胞将染液洗去后加入Hepes缓冲液吸取10 μ L至玻片,通过激光共聚焦拍照。

1.6 根边缘细胞线粒体膜电位测定

从重悬后的细胞液吸取一部分至1.5 mL离心管离心、弃上清加入JC-1染液染色25 min后离心、弃上清,洗涤2次细胞将染液洗去后加入Hepes缓冲液吸取10 μ L至玻片,通过激光共聚焦拍照。

1.7 根尖相对伸长量测定

加硅预处理完后对每组豌豆根尖拍照,加入本文“1.2”铝处理溶液处理24 h后再次拍照,用imageJ软件测量每个豌豆铝处理前后的根长,每个处理组至少6株豌豆。

1.8 根尖活性铝含量测定

铝处理完成后每个处理组的豌豆取侧根至1.5 mL离心管洗涤2遍,吸去多余水分加入1 mL Morin染液染色20 min后洗去染液,放至玻片上用体式显微镜对根尖荧光拍照。

1.9 傅里叶红外光谱技术(FTIR)对细胞组分结构的分析

细胞预处理后放入冷冻干燥机真空干燥24 h得到干燥样品,利用傅里叶显微红外光谱仪获得光谱图,光谱扫描范围为4 000~500 cm^{-1} ,分辨率为4 cm^{-1} ,累计扫描32次。测定样品前均对背景进行扫描,扫描时扣除 H_2O 、 CO_2 的干扰。

1.10 X射线光电子能谱(XPS)对细胞硅铝结构的分析

取冷冻干燥后的样品在真空条件下用X射线光电子能谱(XPS)测试,背景压力 5×10^{-9} mb,扫描的分辨率0.05 eV,用40 eV的通电能量和0.05 eV的能量步长记录 Al_{2p} 和 Si_{2p} 的高分辨光谱。

1.11 数据统计及分析

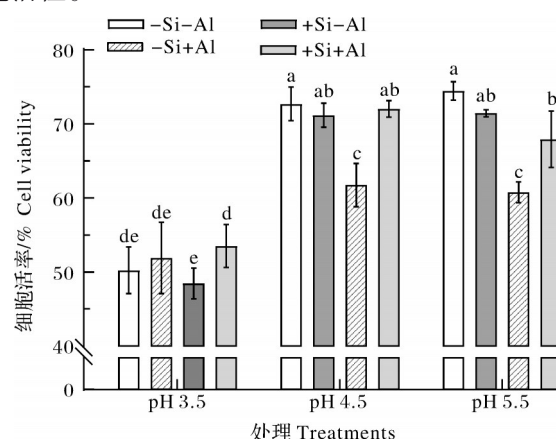
共聚焦数据由imageJ处理得出荧光值,采用Excel 2019和IBM SPSS Statistics 26进行数据整理和单因素方差分析,并检验不同处理之间的差异显著性,用GraphPad Prism 9进行作图。FTIR测试数据用OMNIC 32进行基线校正,用Origin 2021软件绘制FTIR图。XPS测试数据用Thermo Advantage进行荷电校正和分峰拟合后用Origin 2021软件绘制谱图。

2 结果与分析

2.1 不同pH铝处理对根边缘细胞的影响

由图1可见,在pH 3.5、4.5、5.5这3种环境中,

pH 4.5、5.5下CK组(—Si—Al组)的细胞活性分别为72.69%、74.45%,加硅后+Si—Al组的细胞活性分别为71.17%、71.45%,与CK组无显著差异;而pH 3.5的环境条件下过低的pH环境严重影响了细胞的正常代谢,CK组细胞活性降至50.23%;做加硅处理后,不同pH铝处理后—Si+Al组相较于各pH值CK组的细胞活性分别下降了1.77%、10.94%、13.68%,pH 5.5环境—Si+Al组细胞活性下降得最为显著;+Si+Al组各细胞活性相较于—Si+Al组细胞活性分别提高了5.05%、10.27%、7.15%,加硅后显著提高了各pH铝毒环境下的细胞活性。



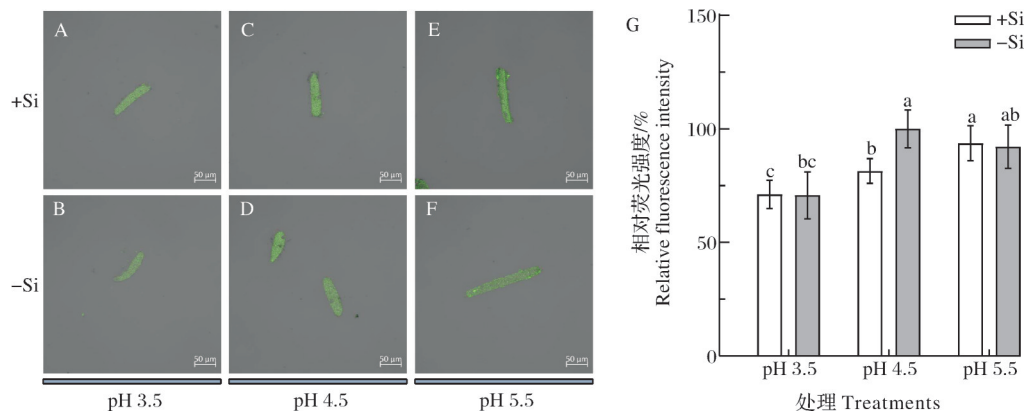
不同小写字母表示同一时期不同处理组间差异显著($P < 0.05$)。Different lowercase letters indicate significant differences between different treatment groups in the same period ($P < 0.05$).

图1 pH 3.5、4.5、5.5铝溶液环境(100 $\mu\text{mol/L}$)下豌豆根边缘细胞活性

Fig.1 The viability of pea root border cells under pH 3.5, 4.5, and 5.5 aluminum solution environments (100 $\mu\text{mol/L}$)

2.2 不同pH铝处理对根边缘细胞活性铝含量的影响

通过共聚焦激光显微镜对细胞内活性铝含量的相对荧光强度进行半定量测定,以pH 4.5 —Si组(图2)平均荧光值为基准,pH 3.5、4.5、5.5铝处理下RBCs细胞内相对荧光强度分别为70.77%、100%、92.23%;经PEI诱导纳米硅沉积后RBCs细胞内的相对荧光强度分别为71.19%、81.47%、93.72%。pH 3.5环境下细胞荧光强度最低且+Si和—Si组之间无显著差异,pH 5.5环境下细胞内荧光强度较高但加硅后细胞内铝含量没有减少,pH 4.5环境—Si组细胞内荧光强度最强,加硅后细胞内相对荧光强度下降18.53%,+Si组相对荧光强度显著低于—Si组。



A: pH 3.5 + Si + Al; B: pH 3.5 - Si + Al; C: pH 4.5 + Si + Al; D: pH 4.5 - Si + Al; E: pH 5.5 + Si + Al; F: pH 5.5 - Si + Al; G: Morin 染色后各个处理的相对荧光强度, 每次独立测试包含大于 20 个细胞的测试。不同小写字母表示处理间存在显著差异 ($P < 0.05$)。Relative fluorescence intensity of individual treatments after Morin staining for each independent test containing greater than twenty cells. Different lowercase letters indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$).

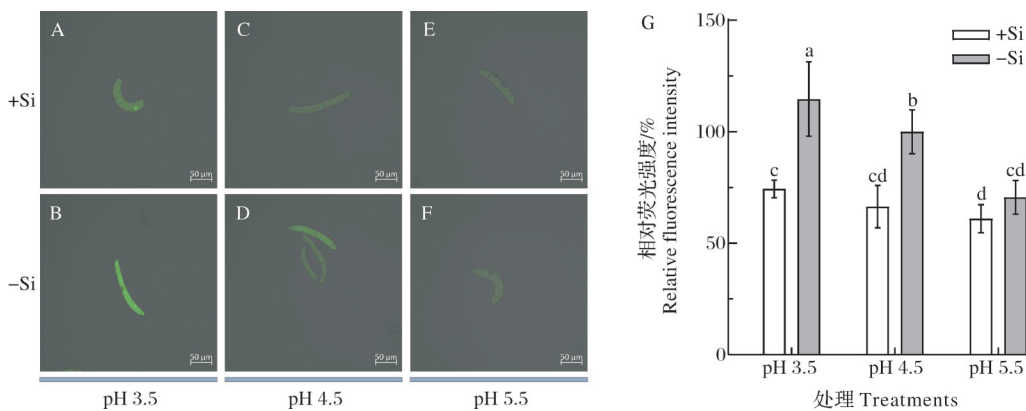
图2 pH 3.5、4.5、5.5 铝溶液环境(100 $\mu\text{mol/L}$)下豌豆根边缘细胞铝含量

Fig.2 Effect of pH 3.5, 4.5, and 5.5 aluminum solution environments (100 $\mu\text{mol/L}$) on the aluminum content of pea root border cells

2.3 不同 pH 铝处理对根边缘细胞活性氧含量的影响

在 pH 3.5、4.5、5.5 铝环境下一 Si 组的相对荧光强度分别为 114.70%、100%、70.62%，随铝处理 pH 值上升而减弱, 细胞内活性氧 (reactive oxygen spe-

cies, ROS) 含量随之减少, +Si 组相较于各 pH 环境下一 Si 组的相对荧光强度分别下降了 40.32、33.53、9.61 百分点 (图 3), 这表明加硅后在很大程度上缓解了细胞内活性氧爆发。



A—F 同图 2; G: ROS 染色后各个处理的相对荧光强度。A—F are same as Fig.2; G: Relative fluorescence intensity of each treatment after ROS staining.

图3 pH 3.5、4.5、5.5 铝溶液环境(100 $\mu\text{mol/L}$)下豌豆根边缘细胞活性氧含量

Fig.3 Effects of pH 3.5, 4.5, and 5.5 aluminum solution environments (100 $\mu\text{mol/L}$) on the reactive oxygen species content of pea root border cells

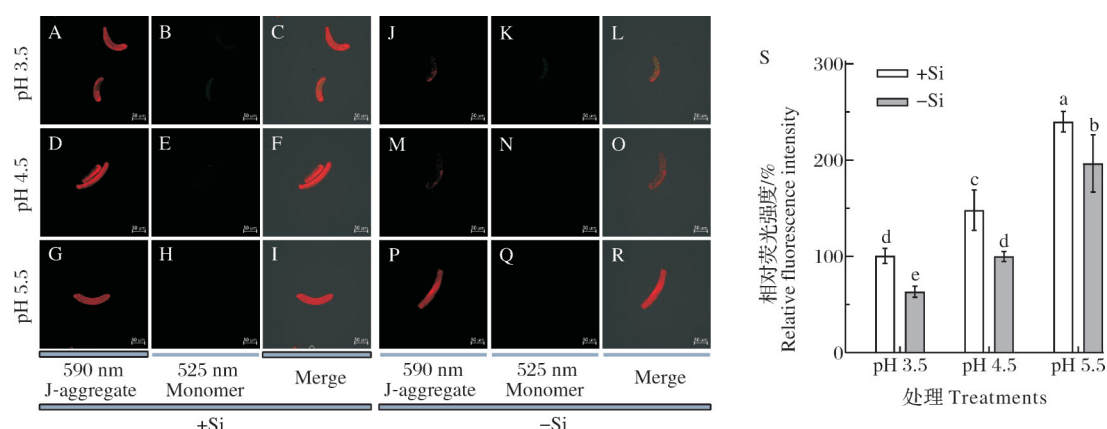
2.4 不同 pH 铝处理对根边缘细胞线粒体膜电位的影响

在 pH 3.5、4.5、5.5 铝环境下一 Si 组的相对荧光强度分别为 63.40%、100%、196.63%，随铝处理 pH 值上升红色荧光变强而绿色荧光减弱, 细胞内线粒体电位随之增高; +Si 组相较于各 pH 环境下一 Si 组的相对荧光强度分别增加了 37.20、48.11、43.28 百分点, +Si

组细胞内线粒体电位都显著高于一 Si 组 (图 4)。

2.5 不同 pH 铝处理对豌豆根伸长的影响

由图 5 可见, 不同 pH 铝处理都明显抑制了根系伸长, 而加硅处理能显著缓解铝毒对根尖的伤害。pH 3.5 条件下, -Si - Al、+Si - Al、-Si + Al、+Si + Al 4 个处理组 24 h 内相对根伸长无显著差异, 这与环境 pH 过低加硅处理对根伸长的促进作用不明显有



A、B、C: pH 3.5 +Si+Al; J、K、L: pH 3.5 -Si+Al; D、E、F: pH 4.5 +Si+Al; M、N、O: pH 4.5 -Si+Al; G、H、I: pH 5.5 +Si+Al; P、Q、R: pH 5.5 -Si+Al; S: JC-1 染色后各个处理的相对荧光强度 The ratio of red and green fluorescence of each treatment after JC-1 staining. A、D、G、J、M、P: 聚合物通道 Polymer channels; B、E、H、K、N、Q: 单体通道 Monomeric channels; C、F、I、L、O、R: 复合通道 Composite channels.

图4 pH 3.5、4.5、5.5 铝溶液环境(100 $\mu\text{mol/L}$)下豌豆根边缘细胞线粒体膜电位

Fig.4 Effects of pH 3.5, 4.5, and 5.5 aluminum solution environments (100 $\mu\text{mol/L}$) on mitochondrial membrane potential in pea root marginal cells

关,但-Si处理组的根尖比+Si处理组出现较多软化发白的现象。pH 4.5和5.5条件下,-Si-Al、+Si-Al处理组的相对根伸长量在2.4~2.8 cm,-Si+Al组的相对根伸长量分别是0.89和1.67 cm,各pH条件下CK组的根伸长量分别减少了2.13和0.77 cm;+Si+Al组的相对根伸长量分别是1.17和2.06 cm,相比于-Si+Al组的相对根伸长量分别增长了0.28和0.38 cm。

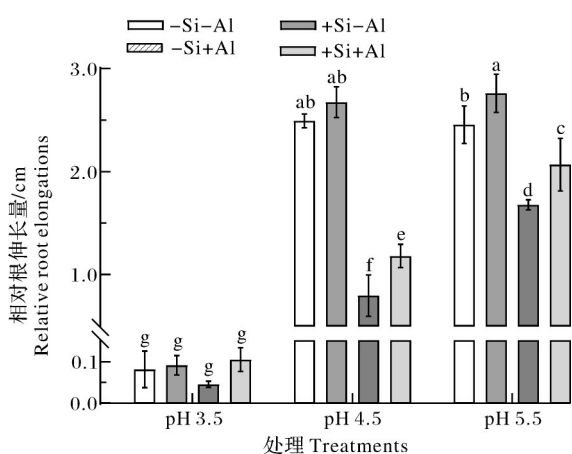


图5 pH 3.5、4.5、5.5 铝溶液环境(100 $\mu\text{mol/L}$)下豌豆侧根相对伸长量

Fig.5 Lateral relative root elongation of pea under pH 3.5, 4.5, and 5.5 aluminum solution environments (100 $\mu\text{mol/L}$)

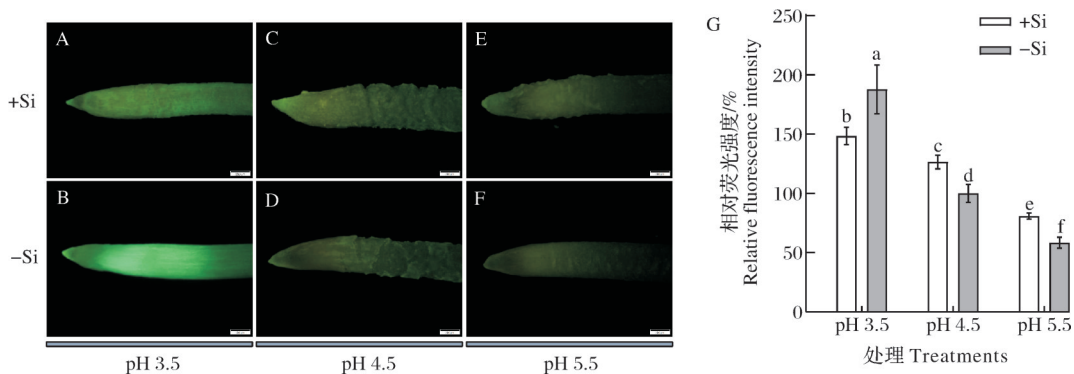
2.6 不同 pH 铝处理对豌豆根尖活性铝含量的影响

根尖活性铝积累情况与细胞不同,pH 3.5条件

下-Si组根尖铝含量最高,相对荧光强度为186.31%,+Si组相对荧光相比于-Si组下降了36.05百分点。在pH 4.5和5.5条件下-Si组根尖相对荧光强度分别为100%和58.42%,pH 5.5相对荧光强度下降了41.58百分点;而+Si组相较于-Si组的相对荧光强度分别增加了28.41和23.40百分点,根尖内活性铝含量显著增加(图6)。

2.7 不同 pH 铝处理对细胞组分的影响

FTIR 光谱可以表征羧基、羟基、氨基等可电离基团在金属吸附过程中的作用,FTIR 光谱显示,在4000~500 cm^{-1} 范围内,3种pH铝处理在3380、2930、1730、1660、1540、1390、1170、1050 cm^{-1} 处都观察到明显的特征峰,3380 cm^{-1} 处特征峰表征蛋白质纤维素和半纤维素等碳水化合物的O-H和N-H键的伸缩振动,2930 cm^{-1} 这一特征峰是甲基化C-H伸缩重叠谱峰。波长1730和1660 cm^{-1} 处为高度甲酯化的酯化果胶的C=O和-COOR,1540 cm^{-1} 的吸收峰表示蛋白质酰胺 II 带的N-H弯曲振动和C-N伸缩振动,1390和1170 cm^{-1} 处峰值则代表纤维素的C-H弯曲振动和C-O-C伸缩振动,1050 cm^{-1} 处的吸收峰代表多糖区域-CH变形或C-C,C-O拉伸的特征^[22]。在pH 3.5和4.5铝处理下,在3380和2930 cm^{-1} 波长处加硅处理和缺硅处理的吸收峰强度一致,波长1730、1540、1390、1050 cm^{-1} 处pH 3.5铝处理下加硅处理略微降低了吸收峰强度,而



A—F 同图 2;G:Morin 染色后各个处理的相对荧光强度。A-F are same as Fig.2;G:Relative fluorescence intensity of each treatment after Morin staining.

图 6 pH 3.5、4.5、5.5 铝溶液环境(100 $\mu\text{mol/L}$)下豌豆根尖铝含量

Fig.6 Aluminum content in pea root tips under pH 3.5, 4.5, and 5.5 aluminum solution environments (100 $\mu\text{mol/L}$)
pH 4.5 铝处理下加硅处理吸收峰强度显著下降。 pH 处理组,且加硅处理后各特征峰的吸收峰强度都
pH 5.5 铝处理下,整体光谱的透光率高于另外 2 个 略微降低(图 7)。

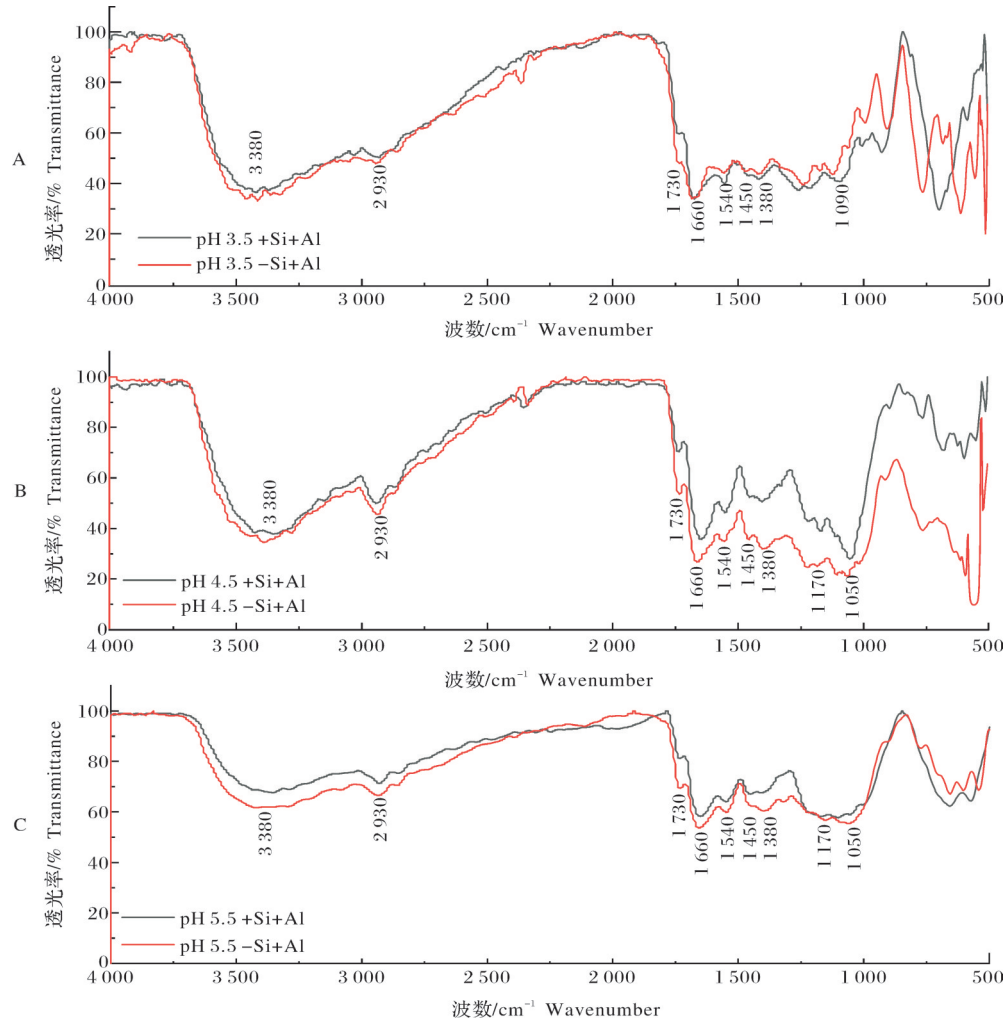


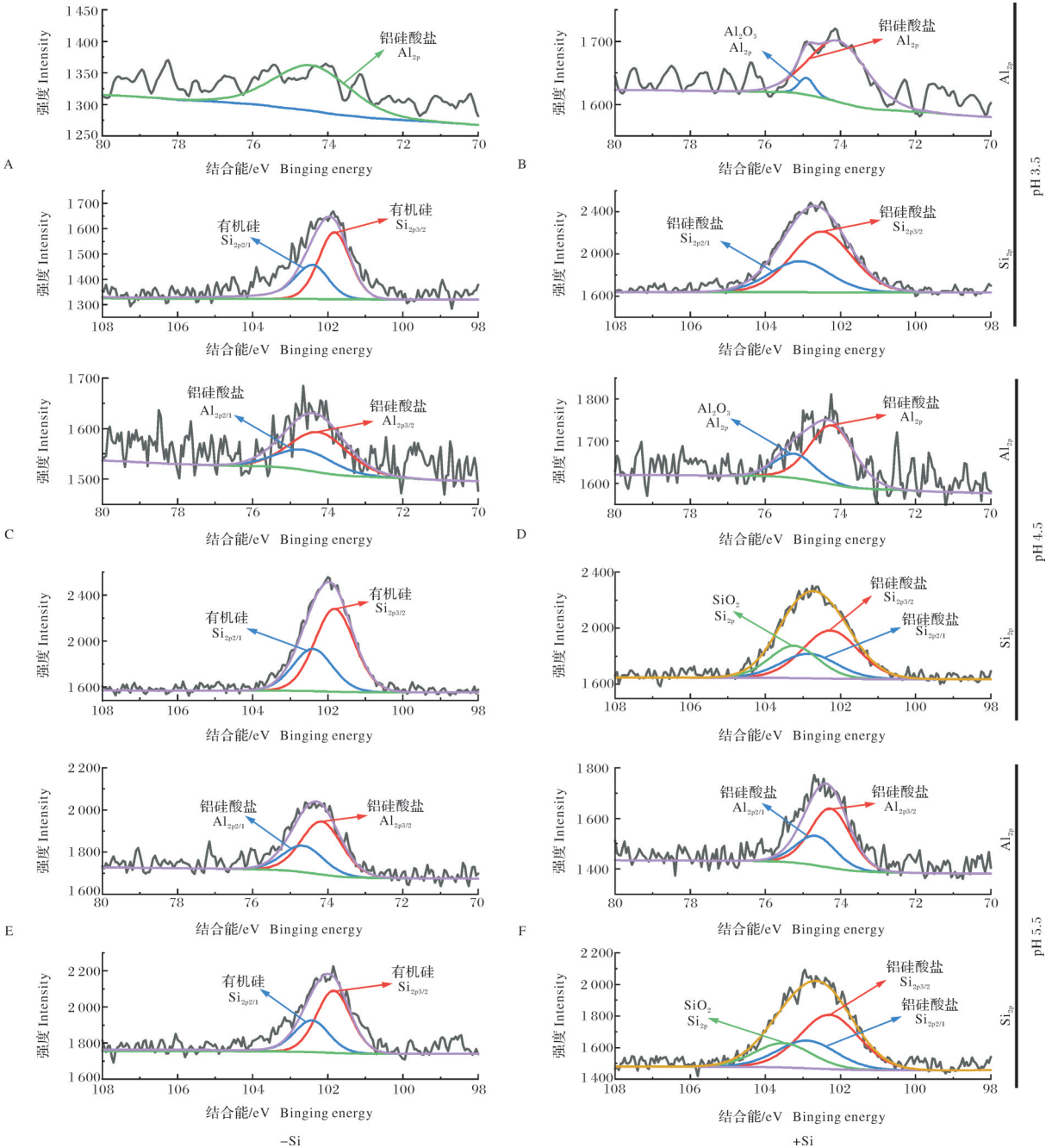
图 7 pH 3.5、4.5、5.5 铝溶液环境(100 $\mu\text{mol/L}$)下豌豆根边缘细胞硅组分(4 000~500 cm^{-1})

Fig.7 Cellular fractions of pea root border cells (4 000-500 cm^{-1}) under pH 3.5, 4.5, and 5.5 aluminum solution environments (100 $\mu\text{mol/L}$)

2.8 不同 pH 铝处理对细胞壁上硅铝沉积结构的影响

利用 XPS 技术分析不同 pH 铝处理条件下豌豆根边缘细胞壁上铝和硅的元素特征。如图 8 所示, 缺硅处理组细胞壁中的硅以单质硅的形态存在, 结合能为 102 eV, 不同 pH 铝处理下细胞壁中的铝都以铝硅酸盐的形态存在, 结合能在 74.4 eV 左右。加硅处

理的细胞壁中硅主要是硅铝酸盐, 结合能升高到 102.7 eV, pH 4.5 和 5.5 铝处理条件下增加了 SiO₂ 形态, 结合能分别为 103.2 和 103.5 eV, 而细胞壁上的铝在 pH 3.5 和 4.5 铝处理条件下增加了 Al₂O₃ 形态, 结合能分别为 74.9 和 75.2 eV, 各 pH 铝处理下铝硅酸盐的结合能都为 74.2 eV。



A: pH 3.5 -Si+Al; B: pH 3.5 +Si+Al; C: pH 4.5 -Si+Al; D: pH 4.5 +Si+Al; E: pH 5.5 -Si+Al; F: pH 5.5 +Si+Al.

图 8 pH 3.5、4.5、5.5 铝溶液环境(100 μmol/L)下纳米硅对根边缘细胞壁硅铝结构分析的影响
Fig.8 Silica-aluminum structural analysis of root border cell wall by nanosilica in pH 3.5, 4.5, and 5.5 aluminum solution environments (100 μmol/L)

3 讨 论

根尖是铝毒破坏植物根部的主要位点,铝毒环境下最显著的表现就是根伸长受到抑制,所以阻止铝进入植物内部减少植株体内总铝含量或降低铝的有效毒性对缓解植物应对铝毒胁迫有重要意义^[23]。Jaskowiak等^[24]研究了在pH、铝浓度及持续处理时间等因素下铝毒胁迫对大麦的影响,在pH 4环境下几十微摩尔铝就能显著抑制大麦根系伸长。研究表明,植物对铝的耐受性与根边缘细胞的活力密切相关^[25],去除根尖根边缘细胞缓解了铝诱导的根系伸长抑制,同时增加了铝在根中的积累量^[26],根尖周围包围着的根边缘细胞和黏液在保护根尖免受胁迫和根系健康发育方面发挥了重要作用。

本研究结果显示,不同pH铝溶液环境下豌豆根边缘细胞的细胞活性降低(图1),豌豆根系伸长受到抑制(图5),在100 $\mu\text{mol/L}$ pH 4.5铝处理24 h后与pH 3.5条件下的CK处理组相比根尖相对根伸长量显著减少了近60%,这与Yang等^[27]和Xiao^[28]等研究结果一致;pH 3.5环境条件严重影响了植物生长发育,24 h内根相对伸长量几乎不变且根尖处出现发白软化的现象,铝处理1 h后细胞活性降至50%以下;通常认为只有 Al^{3+} 才会对植物产生毒害,而在本研究中pH 5.5铝处理对豌豆根尖伸长产生了显著抑制作用(图5),在细胞活性方面表现更加明显,pH 4.5—Si+Al和pH 5.5—Si+Al这2组之间的细胞活性无显著差异(图1),随pH上升铝溶液中的 Al^{3+} 含量减少, Al^{3+} 转换成 $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ 、 $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ 的形式同样能显著影响植物生长代谢。

不同pH铝溶液环境下硅缓解铝毒情况存在差异。在pH 4.5和5.5铝胁迫下加硅处理会维持细胞活性并减轻铝毒引起的根系伸长抑制(图5),这与Xiao等^[28]研究中pH 4.5条件下硅显著增加了铝处理下水稻根系伸长率和细胞活性的结果一致,但与他们研究中加硅降低了根尖中的铝含量不同。本研究中pH 4.5和5.5条件下加硅增加了根尖的铝含量(图2),我们推测这一结果与Xiao等^[28]的研究结果不一致的原因可能是硅处理方法不同,Xiao等^[28]是通过单硅酸与铝对水稻共培养,硅占据了铝与细胞壁的结合位点,与细胞壁共价键合,减少了铝离子与细胞壁结合和进入根尖的含量;本研究通过PEI静电吸附的方法,更容易将铝吸附在纳米硅壳上,减少铝离子进入根尖而在细胞壁上积累。pH 3.5铝胁迫下硅缓解铝毒的作用不明显,但pH 3.5铝处理条件下加硅

处理的根尖铝含量低于缺硅处理(图6),这可能是pH 3.5接近二氧化硅的零电荷点值,硅的表面电荷量低,导致PEI与硅之间的吸附力降低的同时减少了对铝的吸附^[29]。同时,pH 3.5铝处理下细胞中加硅与缺硅处理之间铝含量没有差异且显著低于另外2个pH处理(图2),细胞壁上果胶、纤维素和半纤维素等组分官能团吸收峰的峰值差异不明显(图7),且加硅处理的边缘细胞壁上的硅仅以铝硅酸盐形态存在而没有形成二氧化硅(图8),一方面是因为PEI与硅的吸附力使得在细胞壁上没有形成纳米硅壳;另一方面则是由于细胞不像根尖有复杂的抵御机制,过低的pH环境导致细胞膜透性增加,导致Morin染色的准确性降低或者细胞内铝离子流失。pH 4.5铝处理下纳米硅壳有效阻挡了铝离子进入细胞,pH 5.5铝处理下纳米硅壳没有显著降低细胞内的铝含量,Kopittke等^[30]报道硅没有降低根尖的铝含量,但它可以形成Si—Al复合物(如HAS)来降低铝的可用性,从而减轻高粱中的铝毒性。

植物面临生物和非生物胁迫时会诱导体内产生过量的ROS,ROS是引发程序性死亡的重要信号分子^[31]。细胞内线粒体电子传递链产生的活性氧可以直接与线粒体的蛋白质和脂质发生反应,使蛋白质和脂质失活,导致线粒体内膜电位下降^[32],研究表明硅能刺激酶类和非酶类抗氧化物质增加以降低植物抗逆境胁迫时的应激反应。本研究中加硅后不同pH铝处理组都减少了细胞内ROS含量(图3),使线粒体膜电位上升(图4),降低了各个特征峰的吸收峰值(图7),不同pH铝处理下纳米硅影响了细胞壁相关组分包括蛋白质、果胶、纤维素、半纤维素和多糖等官能团的伸缩振动。果胶作为初生细胞壁的主要多糖成分,其结构稳定有助于增强细胞壁刚性和弹性,而细胞壁的果胶甲酯化程度影响着植物耐铝性。pH对果胶酶活性至关重要,而果胶酶在细胞壁扩展过程中发挥作用,在低pH条件下细胞壁基质聚合物(如木聚糖和果胶聚合物)加速降解^[33]。在FTIR谱图(图7)中各pH铝处理下在波长 $1\,730\text{ cm}^{-1}$ 处硅显著降低了代表酯化果胶中酯基的吸收峰,说明硅缓解了铝毒对细胞壁果胶的损害。Wang等^[34]研究了pH 3.5、4.5、5.5对细胞壁组分的影响,发现pH 3.5时果胶和半纤维素含量低于pH 5.5处理,表明pH 3.5条件下细胞壁结合铝的能力低于pH 5.5处理。pH 5.5铝处理下加硅与缺硅处理在波长 $3\,380\text{ cm}^{-1}$ 处的透光率高于pH 3.5和4.5铝处理,这可能是pH 5.5条

件下铝以羟基铝形式存在,羟基与细胞壁组分结合,降低了一OH吸收峰强度,加硅处理下细胞壁上的纳米硅与羟基结合进一步降低了吸收峰强度。通过XPS分析各pH铝处理加硅处理与缺硅处理细胞壁上硅形态的区别(图8),pH 4.5和5.5铝胁迫下加硅处理组增加了二氧化硅形态,表明在根边缘细胞壁上形成了纳米硅壳,进一步增强了细胞的刚性和弹性,但由于傅里叶红外光谱和X射线光电子能谱的技术限制未能明确硅铝共沉积形成的铝硅酸盐具体为 $\text{Al}/(-\text{CH}_2\text{CH}(\text{C}(\text{O})\text{OH})-)$ 或是 $\text{NaAl-Si}_2\text{O}_6\cdot\text{H}_2\text{O}$ ^[35]。

综上,本研究结果表明,低pH条件下铝处理都降低了根边缘细胞活性和抑制了根系生长,PEI诱导纳米硅沉积后对豌豆根尖和根边缘细胞起到了不同程度的保护作用。具体表现为:(1)低pH条件下铝处理都降低了根边缘细胞活性,而加硅处理后细胞活性显著提高,细胞内的铝含量降低,细胞线粒体膜电位上升和ROS含量降低;(2)铝毒抑制了豌豆根尖伸长,而加硅处理后不同pH条件下表现不同,在pH 3.5铝处理条件下加硅缓解根尖抑制作用的效果不明显,但pH 4.5、5.5条件下根尖伸长量显著增加,另外随着铝处理pH值升高,根尖铝含量降低,且加硅处理后根尖的铝含量都高于缺硅处理;(3)铝胁迫下,纳米硅结合细胞壁中更多带负电的官能团抵抗胁迫,pH 4.5和5.5条件下硅在根边缘细胞壁上形成纳米硅壳,与铝在细胞壁上共沉积形成铝硅酸盐,以此增强耐铝性。后续还需要利用蛋白质组学、代谢组学和转录组学等技术,深入研究纳米硅对铝在细胞或组织分子水平上的信号途径和耐受机制,进一步阐释根尖和根边缘细胞的生物矿化保护机制,以期植物适应南方酸性土壤提供理论和实践依据。

参考文献 References

- [1] 沈仁芳,赵学强.酸性土壤可持续利用[J].农学学报,2019,9(3):16-20.SHEN R F,ZHAO X Q.The sustainable use of acid soils[J].Journal of agriculture,2019,9(3):16-20 (in Chinese with English abstract).
- [2] OFOE R,THOMAS R H,ASIEDU S K,et al.Aluminum in plant: benefits, toxicity and tolerance mechanisms [J/OL].Frontiers in plant science,2023,13: 1085998 [2024-01-19].https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1085998.
- [3] SINGH S,TRIPATHI D K,SINGH S,et al.Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism;a review [J].Environmental and experimental botany,2017,137: 177-193.
- [4] RAHMAN M A,LEE S H,JI H C,et al.Importance of mineral nutrition for mitigating aluminum toxicity in plants on acidic soils: current status and opportunities [J/OL].International journal of molecular sciences,2018,19(10):3073 [2024-01-19].https://doi.org/10.3390/ijms19103073.
- [5] CHAUHAN D K,YADAV V,VACULÍK M,et al.Aluminum toxicity and aluminum stress-induced physiological tolerance responses in higher plants[J].Critical reviews in biotechnology,2021,41(5):715-730.
- [6] HAJIBOLAND R,PANDA C K,LASTOCHKINA O,et al.Aluminum toxicity in plants:present and future[J].Journal of plant growth regulation,2023,42(7):3967-3999.
- [7] MATSUMOTO H,MOTODA H.Aluminum toxicity recovery processes in root apices:possible association with oxidative stress[J].Plant science,2012,185/186:1-8.
- [8] HAWES M,ALLEN C,TURGEON B G,et al.Root border cells and their role in plant defense[J].Annual review of phytopathology,2016,54:143-161.
- [9] GUNTZER F,KELLER C,MEUNIER J D.Benefits of plant silicon for crops:a review[J].Agronomy for sustainable development,2012,32(1):201-213.
- [10] GUERRIERO G,HAUSMAN J F,LEGAY S.Silicon and the plant extracellular matrix [J/OL].Frontiers in plant science,2016,7: 463 [2024-01-19].https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00463.
- [11] LIANG Y C,SUN W C,ZHU Y G,et al.Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants:a review[J].Environmental pollution,2007,147(2):422-428.
- [12] WANG S H,WANG F Y,GAO S C,et al.Heavy metal accumulation in different rice cultivars as influenced by foliar application of nano-silicon [J/OL].Water, air, & soil pollution,2016,227(7):228 [2024-01-19].https://doi.org/10.1007/s11270-016-2928-6.
- [13] LEI Q,GUO J M,KONG F H,et al.Bioinspired cell silicification:from extracellular to intracellular[J].Journal of the American Chemical Society,2021,143(17):6305-6322.
- [14] REID A,BUCHANAN F,JULIUS M,et al.A review on diatom biosilicification and their adaptive ability to uptake other metals into their frustules for potential application in bone repair[J].Journal of materials chemistry.B,2021,9(34):6728-6737.
- [15] PATWARDHAN S V,CLARSON S J.Bioinspired silica synthesis [M/OL]//ABD-EL-AZIZ A S,CARRAHER C E,PITTMAN C U,et al.Macromolecules containing metal and metal-like elements.1st ed.[S.l.]:John Wiley & Sons, Inc.,2005:203-223.
- [16] HYDE E D E,MORENO-ATANASIO R,MILLNER P A,et al.Surface charge control through the reversible adsorption of a biomimetic polymer on silica particles[J].The journal of

- physical chemistry.B, 2015, 119(4):1726-1735.
- [17] BUCATARIU F, GHIORGHITA C A, ZAHARIA M M, et al. Removal and separation of heavy metal ions from multicomponent simulated waters using silica/polyethyleneimine composite microparticles [J]. ACS applied materials & interfaces, 2020, 12(33):37585-37596.
- [18] MA J, ZHANG X Q, ZHANG W J, et al. Multifunctionality of silicified nanoshells at cell interfaces of *Oryza sativa* [J]. ACS sustainable chemistry & engineering, 2016, 4(12):6792-6799.
- [19] HODSON M J, EVANS D E. Aluminium-silicon interactions in higher plants: an update [J]. Journal of experimental botany, 2020, 71(21):6719-6729.
- [20] 仪登霞, 庞永珍. 我国豌豆生产和育种的现状与问题 [J]. 中国草地学报, 2022, 44(1):104-113. YI D X, PANG Y Z. Current situation and problems of pea production and breeding in China [J]. Chinese journal of grassland, 2022, 44(1):104-113 (in Chinese with English abstract).
- [21] 冯英明, 罗功荣, 曲梅, 等. 硼对豌豆根尖细胞壁组分对铝吸附解吸的影响 [J]. 植物营养与肥料学报, 2022, 28(10):1893-1900. FENG Y M, LUO G R, QU M, et al. Effects of boron on aluminum adsorption and desorption of cell wall components of pea root tips [J]. Journal of plant nutrition and fertilizers, 2022, 28(10):1893-1900 (in Chinese with English abstract).
- [22] LI Z G, HUANG F, HU B W, et al. Detoxification of aluminum by Ca and Si is associated to modified root cell wall properties [J]. Theoretical and experimental plant physiology, 2022, 34(2):131-142.
- [23] FU X L, CHEN W D, ZHONG S Z, et al. Regulation responses on rice root formation and elongation by low pH and aluminum stress in South China [J]. Journal of agricultural science and technology, 2013, 15(3):135-142.
- [24] JASKOWIAK J, TKACZYK O, SLOTA M, et al. Analysis of aluminum toxicity in *Hordeum vulgare* roots with an emphasis on DNA integrity and cell cycle [J/OL]. PLoS One, 2018, 13(2):e0193156 [2024-01-19]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193156>.
- [25] CAI M Z, WANG F M, LI R F, et al. Response and tolerance of root border cells to aluminum toxicity in soybean seedlings [J]. Journal of inorganic biochemistry, 2011, 105(7):966-971.
- [26] XIAO Z X, LIANG Y C. Silicon prevents aluminum from entering root tip by promoting formation of root border cells in rice [J]. Plant physiology and biochemistry, 2022, 175:12-22.
- [27] YANG G, QU M, XU G L, et al. pH-dependent mitigation of aluminum toxicity in pea (*Pisum sativum*) roots by boron [J/OL]. Plant science, 2022, 318:111208 [2024-01-19]. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111208>.
- [28] XIAO Z X, YAN G C, YE M J, et al. Silicon relieves aluminum-induced inhibition of cell elongation in rice root apex by reducing the deposition of aluminum in the cell wall [J]. Plant and soil, 2021, 462(1):189-205.
- [29] MÉSZÁROS R, VARGA I, GILÁNYI T. Adsorption of poly(ethyleneimine) on silica surfaces: effect of pH on the reversibility of adsorption [J]. Langmuir, 2004, 20(12):5026-5029.
- [30] KOPITTKÉ P M, GIANONCELLI A, KOUROUSIAS G, et al. Alleviation of Al toxicity by Si is associated with the formation of Al-Si complexes in root tissues of sorghum [J/OL]. Frontiers in plant science, 2017, 8:2189 [2024-01-19]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02189>.
- [31] LIU S G, ZHU D Z, CHEN G H, et al. Disrupted actin dynamics trigger an increment in the reactive oxygen species levels in the *Arabidopsis* root under salt stress [J]. Plant cell reports, 2012, 31(7):1219-1226.
- [32] HUANG W J, YANG X D, YAO S C, et al. Reactive oxygen species burst induced by aluminum stress triggers mitochondria-dependent programmed cell death in peanut root tip cells [J]. Plant physiology and biochemistry, 2014, 82:76-84.
- [33] BATES G W, RAY P M. pH-dependent interactions between pea cell wall polymers possibly involved in wall deposition and growth [J]. Plant physiology, 1981, 68(1):158-164.
- [34] WANG P, CAO H R, QUAN S X, et al. Nitrate improves aluminium resistance through SLAH-mediated citrate exudation from roots [J]. Plant, cell & environment, 2023, 46(11):3518-3541.
- [35] WAGNER C D, PASSOJA D E, HILLERY H F, et al. Auger and photoelectron line energy relationships in aluminum-oxygen and silicon-oxygen compounds [J]. Journal of vacuum science and technology, 1982, 21(4):933-944.

Effects of mineralization and deposition of nano silicon under low pH on aluminum tolerance in root tip and root border cells of pea

TANG Jiao, FENG Yingming, CHEN Xingyun, GUO Yiwei,
ZHENG Yuxin, TIAN Xiao, LI Xuewen, YU Min

*International Research Centre for Environmental Membrane Biology /Department of Horticulture,
School of Agricultural and Billogical Engineering, Foshan University, Foshan 528200, China*

Abstract The mechanism of nano silicon physiologically regulating the alleviation of aluminum toxicity in the root tip and root edge cells of pea under low pH including pH 3.5, pH 4.5, and pH 5.5 was analyzed by PEI - induced silica electrostatic adsorption to form nano-silica shells for biomimetic mineralization to study the effects of the mineralization of nano silicon on the protective mechanism of the root tip and root border cells of pea under different pH and aluminum environments. The results showed that the treatment of Aluminum at various levels of pH decreased the activity of root border cells, while the treatment of silicon significantly increased the activity of cell in response to aluminum toxicity. The content of aluminum and ROS in silicon treated cells were lower than that in silicon deficient cells, and the mitochondrial membrane potential of the cells increased after the addition of silicon. Aluminum toxicity inhibited the elongation of root tip in peas. The effect of adding silicon to alleviate the root tip inhibition under pH 3.5 with the treatment of aluminum was not significant, but the elongation of root tip was significantly increased under pH 4.5 and pH 5.5. As the pH of aluminum treatment increased, the content of aluminum in root tips decreased, and the content of aluminum in root tips after the treatment of adding silicon was higher than that after the treatment of silicon deficiency. Silicon enabled more negatively charged functional groups on the cell wall to participate in the resistance to aluminum stress, reducing the absorption peak of various components of the cell wall including pectin, cellulose, hemicellulose, proteins, etc. Nano silica shells were formed on the cell surface under pH 4.5 and pH 5.5 of aluminum environment, and silicon aluminum deposited on the cell wall to form aluminosilicates. It is indicated that the mineralization and deposition of nano silicon on cells under low pH can alleviate the toxic effects of aluminum ions.

Keywords peas; aluminum toxicity; nano silicon; bio-silicification; root border cells

(责任编辑:张志钰)