植物营养与肥料学报 2007,13(1): 77 - 80
Plant Nutrition and Fertilizer Science

不同 pH 和不同氮素形态对小麦根中钙分布的影响

杨丽琴, 封 克*, 夏小燕, 司江英
(扬州大学江苏省作物遗传生理重点实验室,江苏扬州 225009)

摘要: 利用电镜技术研究了不同 pH(4.0 和 6.0)和氮形态(NH_4^+ - N 和 NO_3^- - N)对小麦根系超微结构及根中 Ca^{2+} 分布的影响。结果表明,1)pH 4.0 处理下细胞结构中 Ca^{2+} 明显少于 pH 6.0 处理; 2)低 pH 造成质壁分离; 3)铵态氮源处理下细胞结构中 Ca^{2+} 明显少于硝态氮源处理,尤其体现在细胞间质、细胞壁、细胞膜上; 4)铵态氮源处理也会导致细胞出现质壁分离,细胞结构松散,胞质外流; 低 pH 加重这些现象。

关键词: 氮素形态; pH; 小麦; 钙分布; 根超微结构
中图分类号: S512.01　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 1008-505X(2007)01-0077-04

Effects of pH and N forms on the distribution of Ca^{2+} in wheat root

YANG Li-qin, FENG Ke, XIA Xiao-yan, SI Jiang-ying
(*Jiangsu Provincial Key Laboratory of Crop Genetics and Physiology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China*)

Abstract: Transmission electron microscopy was used to observe effects of two pH levels(4.0 and 6.0)and nitrogen forms (NH_4^+ - N, NO_3^- - N) on the root ultrastructure and Ca^{2+} distribution in wheat root. Results obtained were the following: 1) Ca^{2+} content in wheat root cells at the pH 4.0 was lower than that at pH 6.0; 2) Low pH could induce plasmolysis of wheat root cells; 3) Ca^{2+} in wheat root cells, especially in intercellular substances, cell wall and cell membrane, with NH_4^+ - N as nitrogen source was significant lower than NO_3^- - N; and 4) Ammonium nitrogen was also able to induce plasmolysis, structure loss and cytoplasm outflow of wheat root cells. Low pH could exacerbate these symptoms.

Key words: nitrogen form; pH; wheat; Ca^{2+} distribution; root ultrastructure

在植物细胞中,Ca^{2+} 不仅是细胞结构的重要组成部分,而且细胞许多功能的实现也需要 Ca^{2+} 的参与[1]。Ca^{2+} 与细胞壁上的果胶 $R\cdot COO^-$ 结合可增加细胞壁的稳定性[2],在生物膜的许多极性区域通过钙桥来稳定膜的结构[3]。Ca^{2+} 主要被吸附在膜脂中带负电的磷酸根组分上,并通过这种方式限制膜对水溶性溶质的渗透[4]。一旦 Ca^{2+} 从这些位置上移走,膜即破裂解体,一些无机物和有机物将从细胞内渗漏出来,形成伤害[5]。因此,影响 Ca^{2+} 在细胞膜上分布的因素一直是众多研究的焦点。对于 H^+ 和 Al^{3+} 通过取代 Ca^{2+} 而造成对膜的破坏方面的研究,前人做了大量工作,但对低 pH 下 NH_4^+ 是否也参与了与细胞膜上 Ca^{2+} 的交换还未看到明确的报道。Murtadha[6]研究表明,外界较高的 NH_4^+ 浓度可以使吸附在细胞壁阴离子位点上的 Ca^{2+} 得以释放,因此可以推测,在较高的 NH_4^+ 浓度条件下,NH_4^+ 很可能将细胞膜上的 Ca^{2+} 同时取代下来,破坏膜结构。本试验在两种 pH(4.0 和 6.0)条件下,分别以 NH_4^+ - N 和 NO_3^- - N 为氮源,利用焦锑酸钾沉淀技术在电镜下观察了 Ca^{2+} 在小麦根超微结构中的分布情况,试图研究低 pH 下 NH_4^+ 对细胞膜上 Ca^{2+} 分布的影响,进一步探讨低 pH 下铵对植物毒害的机理,为作物钙营养的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料及培养

小麦种子经 10 ml/L NaClO 溶液消毒 30 min 后,用自来水冲洗干净,在 0.2 mmol/L $CaSO_4$ 溶液中浸

收稿日期: 2005-10-11　　**修改稿收到日期**: 2006-02-13
基金项目: 国家自然科学基金项目(30270783)资助。
作者简介: 杨丽琴(1981-),女,江苏吴江人,硕士研究生,主要从事植物根系形态结构与营养吸收研究。
* 通讯作者 Tel: 0514-7979588, E-mail: fengke@yzau.edu.cn

泡 24 h,进行催芽。种子露白后播在石英砂上,用 0.2 mmol/L $CaSO_4$ 溶液保持种子湿润,置于 25℃ LRH-250-G 光温培养箱中培养。7 d 后将幼苗移入营养液中生长。营养液盛在长 45 cm,宽 33 cm,高 20 cm 的塑料培养箱中。培养箱上覆穿孔塑料板,孔直径 3 cm,每孔相隔 5 cm 等距离排列。每孔定植一株幼苗,用海绵包茎以固定植株。营养液 pH 分设 4.0 和 6.0 两个水平,氮源分设 NH_4^+-N 和 NO_3^--N 两个处理,即处理Ⅰ: pH 4.0, NH_4^+-N; 处理Ⅱ: pH 4.0, NO_3^--N; 处理Ⅲ: pH 6.0, NH_4^+-N; 处理Ⅳ: pH 6.0, NO_3^--N。培养期间,温度为 25 ℃,每天光照 12 h,通气 2 h,光强为 4000 lx,每天早晚用稀 NaOH 和稀 HCl 溶液调节营养液 pH 值至 4.0 和 6.0,每隔 3 d 更换一次营养液。幼苗生长至 15 d 时,将植株取出,洗净的根系待取材制片。

硝态氮处理营养液配方为(g/L): K_2SO_4 0.1307, $MgSO_4$ 0.1602 , KCl 7.455×10^{-4}, $Ca(NO_3)_2$ 0.4723, $FeSO_4\cdot7H_2O$ 2.78×10^{-3}, Na_2EDTA 3.72×10^{-3},再加入 Arnon 微量元素混合液。配制铵态氮营养液时用 $(NH_4)_2SO_4$ 和 $CaSO_4$ 代替原有的 $Ca(NO_3)_2$,使营养液中氮的浓度均为 4 mmol/L。

1.2 Ca^{2+} 分布的电镜观察方法

参照 Slocum[7] 的焦锑酸钾沉淀技术略作修改,即距小麦根尖连续取 3 段,每段约 0.5 cm(即距根尖 0.5 cm, 0.5~1.0 cm, 1.0~1.5 cm),迅速投入初固定液中。初固定液为含有 2% 焦锑酸钾的 0.1 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH7.8)配制的 3% 戊二醛,经注射器抽气后,4℃固定 4 h 以上。然后用含有 2% 焦锑酸钾的 0.1 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH7.8)配制的 1% 锇酸,4℃固定过夜,经丙酮系列脱水、Epon 树脂包埋,在 Ultracut-E 型超薄切片机上切片,先经醋酸铀染色,再经柠檬酸铅后染,Philip TECNALL 12 型电子显微镜观察,Gatan792 型图像处理器拍照,电压 120kV。切片经 0.1 mol/L 的 EGTA(pH8.0)在 37℃下处理 1.5 h,再染色观察,若发现黑色沉淀颗粒消失,说明所观察的黑色颗粒是 Ca^{2+} 沉淀。

2 结果与分析

2.1 pH 对根细胞中 Ca^{2+} 分布的影响

比较图版Ⅰ和图版Ⅲ后可以发现,在以铵态氮为氮源时,pH 4.0 处理下小麦根组织中 Ca^{2+} 含量明显少于 pH 6.0 的处理,钙离子在胞间隙、细胞壁、细胞膜上都很少,主要分布在胞质中;而在 pH 6.0 时,胞质中有大量 Ca^{2+} 分布着。两种 pH 条件都会使小麦根细胞发生质壁分离现象,且在低 pH 条件下,质壁分离发生较早(pH 4.0 条件下质壁分离出现在距根尖 0.5 cm, pH 6.0 条件下在距根尖 1.0 cm 处才开始出现),而在 pH 6.0 时质壁分离后的细胞壁和膜之间出现相对较高的 Ca^{2+} 颗粒密度(图版Ⅰ-1; Ⅲ-2);同时都观察到细胞器溶解,胞质外流现象,在低 pH 处理下细胞形态不规则(图版Ⅰ-2),细胞破碎严重,胞质大量外流(图版Ⅰ-3),在 pH 6.0 条件下有细胞器外流现象,但细胞壁相对完好(图版Ⅲ-3)。

在以硝态氮为氮源时(图版Ⅱ,Ⅳ),不同 pH 处理造成的差异主要表现在: pH 4.0 条件下,小麦根组织中各部位尤其是胞间 Ca^{2+} 颗粒密度都小于 pH 6.0 处理;在 pH 4.0 条件下出现质壁分离(图版Ⅱ-3),但无胞质外流现象,这与低 pH 条件下铵态氮的情况有所不同,即硝态氮有助于减少低 pH 下细胞质的外流。

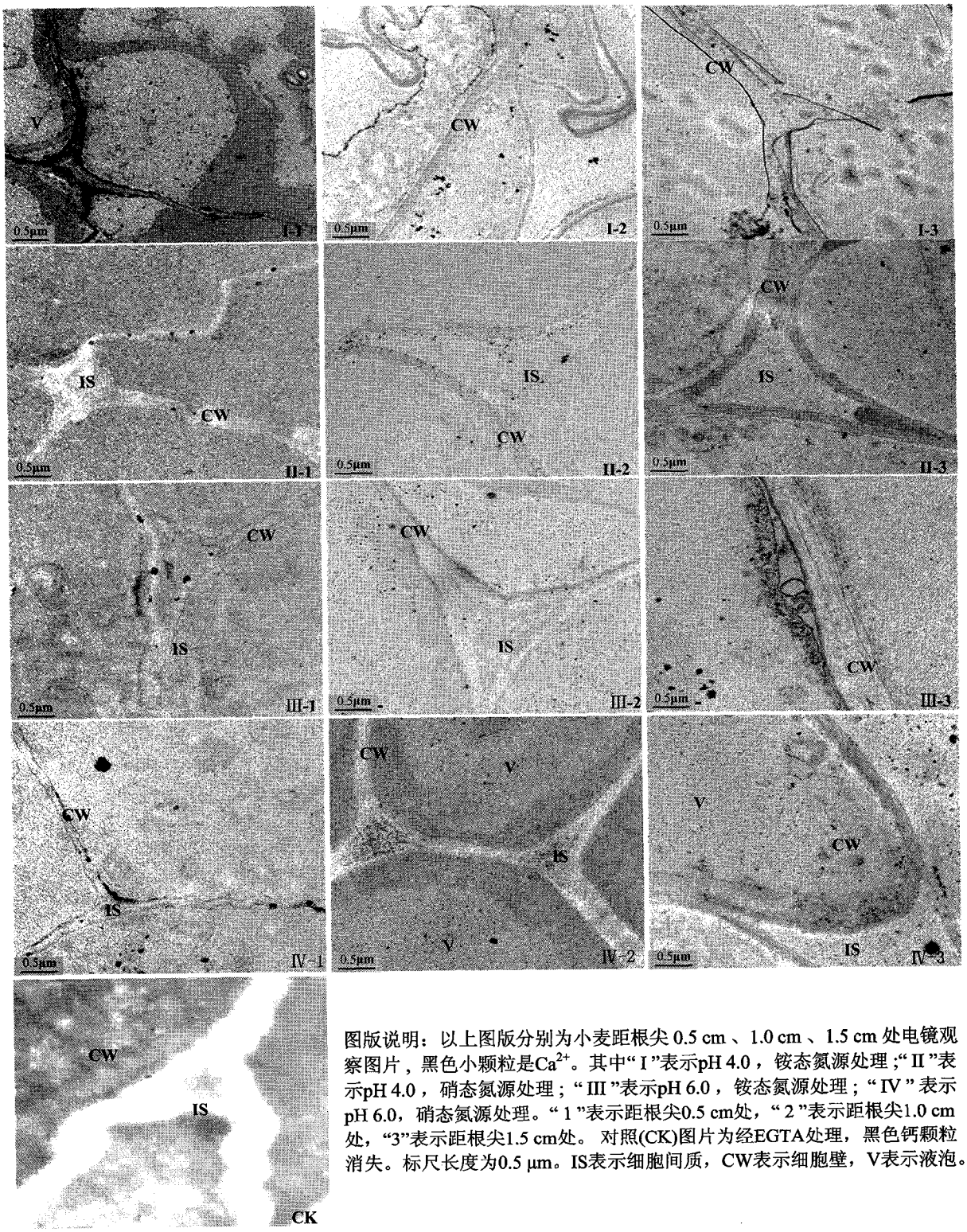
2.2 氮素形态对根细胞中 Ca^{2+} 分布的影响

在 pH 4.0 条件下,不同氮源处理对小麦根组织中 Ca^{2+} 分布的影响主要体现在:铵态氮造成根尖 0.5 cm 处就出现质壁分离(Ⅰ-1),相对于硝态氮处理在距根尖 1.5 cm 出现质壁分离要早(Ⅱ-3);细胞结构散乱(Ⅰ-2),细胞壁破裂,胞质外流(Ⅰ-3);在胞间隙、细胞壁和细胞膜上的 Ca^{2+} 明显少于以硝态氮为氮源的处理(Ⅱ-2, 3)。

在 pH 6.0 条件下,铵态氮处理的小麦根细胞中 Ca^{2+} 在细胞间隙、细胞壁、细胞膜、细胞质中的含量均小于硝态氮处理。此外,铵态氮处理的小麦在距根尖 1.0 cm 处细胞出现了质壁分离(Ⅲ-2)和胞质外流(Ⅲ-3)现象,但未见细胞壁的破裂。

3 讨论

研究表明,低 pH 条件下,植物以铵态氮为唯一氮源时根系生长受到强烈抑制,根尖受损严重[8-9]。对此有解释认为,pH 的变化可能使细胞膜上的铵载体蛋白结构发生了变化,有效转移位点减少[10];也有人认为,低 pH 条件下, NH_4^+ 抑制了植物根的发育,阻碍了植株的代谢过程[11-12]。究竟是低 pH 还是 NH_4^+-N 或者是两者共同作用的结果,目前并无定论。在本试验中,低 pH 条件下,铵态氮为氮源时小麦根细胞出现质壁分离和胞质外流现象,细胞结构受到了严重损伤,同时 Ca^{2+} 在小麦根细胞中的细胞壁和细胞膜上分布都很少。我们推测,低 pH 条件下 NH_4^+ 可能取代了细胞壁和细胞膜上的 Ca^{2+},



图版说明：以上图版分别为小麦距根尖 0.5 cm 、1.0 cm 、1.5 cm 处电镜观察图片，黑色小颗粒是Ca^{2+}。其中“Ⅰ”表示pH 4.0，铵态氮源处理；“Ⅱ”表示pH 4.0，硝态氮源处理；“Ⅲ”表示pH 6.0，铵态氮源处理；“Ⅳ”表示pH 6.0，硝态氮源处理。“1”表示距根尖0.5 cm处，“2”表示距根尖1.0 cm处，“3”表示距根尖1.5 cm处。对照(CK)图片为经EGTA处理，黑色钙颗粒消失。标尺长度为0.5 μm。IS表示细胞间质，CW表示细胞壁，V表示液泡。

Explanation of plates: Plates above were electron micrographs of 0.5 cm, 1.0 cm and 1.5 cm from wheat root tips. Black particles were Ca^{2+} deposits. I: pH4.0, NH_4^+ -N as sole nitrogen source; II: pH4.0, NO_3^- -N as sole nitrogen source; III: pH6.0, NH_4^+ -N as sole nitrogen source; IV: pH6.0, NO_3^- -N as sole nitrogen source. "1, 2, 3" respectively indicated 0.5 cm, 1.0 cm and 1.5 cm from root tips. Contrast picture (CK) was treated with EGTA, Ca^{2+} deposits disappeared. The bar was 0.5μm. IS, CW and V expressed intercellular space, cell wall and vacuole, respectively.

图版：小麦根尖电镜观察图片

Plate: Electron micrographs of wheat root tips

破坏了膜结构,造成细胞壁松散,从而引起根系外部形态的伤害。Murtadha[6]认为,较高浓度的 NH_4^+ 会导致细胞壁上某些钙离子释放。但对于 pH 的变化是否也对细胞结构的改变产生影响还需进一步的试验证明。

值得注意的是:在以硝态氮为氮源时,尽管在低 pH 条件下,小麦根组织中各部位 Ca^{2+} 的颗粒密度都小于 pH 6.0 的处理,且也可能出现质壁分离(图版Ⅱ-3),但却无胞质外流现象,这与铵态氮的情况不一样,后者无论在高 pH 还是低 pH 时均可导致细胞质的外流,从而对根细胞造成较大的伤害,说明硝态氮有助于减少低 pH 下细胞质的外流,对细胞具有一定的保护作用。

参考文献:

[1] 王建波,李阳生,利容千. 铝胁迫下小麦根尖分生细胞分布变化[J]. 生态学报,2001,21(8): 1246-1250.
Wang J B, Li Y S, Li R Q. Changes of distribution in root apical meristematic cells of wheat under aluminum stress [J]. Acta Ecol. Sin., 2001, 21(8): 1246-1250.

[2] 周卫,林葆. 植物钙素营养机理研究进展[J]. 土壤学进展, 1995,23(2): 12-25.
Zhou W, Lin B. Research progress of calcium nutrition mechanism in plant[J]. Prog. Soil Sci., 1995, 23(2): 12-25.

[3] Minoesky P V. An heuristic hypothesis of chilling injury in plants: A role for calcium as the primary phyiologial transducer of injury [J]. Plant, Cell Environ., 1985, 8: 75-94.

[4] Caldwell C R, Haug A. Divalent cation inhabition of barley root plasma membrane - bound Ca^{2+}-ATPase activity and its reversal by monovalent cation[J]. Physiol. Plant, 1982, 54:112-118.

[5] McLauglin S B, Wimmer R. Calcium physiology and terrestrial ecosystem processes [J]. New Phytol., 1999, 142: 373-417.

[6] Murtadha H M. Calcium deficiency in sorghum grown in controlled environments in relation to nitrate/ammonium ratio and nitrogen source [J]. Agron. J., 1988, 80(1): 125-130.

[7] Slocum R D, Roux S J. An improved method for the subcellular localization of calcium using a modification of the antimonite precipitation technique [J]. J. Histochem Cytochem., 1982, 30(7): 617-629.

[8] Zhang H M, Forde Brain G. Regulation of arabidops is root development by nitrate availabitity[J]. J. Exper. Bot., 2000, 51(342): 51-59.

[9] 曹翠玲,李生秀. 氮素形态对玉米幼苗碳水化合物及养分积累的影响[J]. 华中农业大学学报,2003,22(5): 457-461.
Cao C L, Li S X. Effect of N form on the accumulation of carbohydrate and nutrients of corn seedlings [J]. J. Huazhong Agric. Univ., 2003, 22(5): 457-461.

[10] Dyhr - Jensenl K, Brix H. Effects of pH on ammonium uptake by *Typha latifolia* L [J]. Plant Cell Environ., 1996, 19(12): 1431-1436.

[11] Karim A Q M B, Vlamis J. Comparative study of the effect of ammonium and nitrate nitrogen in the nutrition of rice [J]. Plant Soil, 1962, 16(1): 32-41.

[12] Malavolta E. Studies on the nitrogenous nutrition of rice [J]. Plant Physiol., 1954, 29: 98-99.