植物营养与肥料学报 2000,6(1):84～90
Plant Nutrition and Fertilizer Science

氮素形态及 HCO_3^- 对豌豆铁素营养的影响

崔骁勇　曹一平　张福锁
(中国农业大学植物营养系,北京 100094)

摘要:在水培条件下研究了 NO_3-N, NH_4-N 及添加 HCO_3^- 和 HEPES 对豌豆铁营养的影响。与 NO_3-N 相比,供应 NH_4-N 时豌豆根系铁还原力上升较早,铁还原酶活性显著较高,铁向地上部转移较多。供应 NH_4-N 时培养 Sparkle 的营养液 pH 下降较快,而培养 E107 营养液 pH 受氮源形态的影响较小。对根系质外体铁的利用,以 NH_4-N 为氮源时,两种豌豆经过 15 天后都全部利用;供应 NO_3-N 的 E107 能全部利用,Sparkle 也利用了约 3/4;以 HCO_3^- 缓冲时 E107 利用了约 3/4,而 Sparkle 则几乎不能利用。但是生长在 HCO_3^- 缓冲的营养液中的豌豆根系结构完好,转移到低 pH 环境中后铁还原力不仅没有降低,反而比对照有所提高。HCO_3^- 和 HEPES 对豌豆铁营养的影响相似。表明 HCO_3^- 对豌豆铁营养的影响不是破坏了根系的结构和功能,而主要是通过提高根际 pH 值,抑制了根系铁还原酶活性的作用,从而降低了对铁的吸收利用能力。氮素形态对豌豆铁营养的影响主要是通过影响质外体 pH 起作用的。

关键词:豌豆;铁营养;氮素形态;HCO_3^-;高 pH
中图分类号:S643.306.2

石灰性土壤上双子叶植物容易出现缺铁黄化症状,但石灰性土壤全铁含量并不低,有人认为是 $CaCO_3$ 的存在使得土壤中 HCO_3^- 浓度过高,引起 Ca-P 的溶解加强,并在根际及植物体内形成了 Fe-P 沉淀,从而降低了铁的有效性[1]。但更多的人认为是高浓度 HCO_3^- 的直接作用[2],其作用机制包括:(1)降低铁的吸收和叶片中活性铁的含量[3],进而降低新叶叶绿素的含量[4];(2)影响植物对铁和其它矿质元素的运输[5];(3)限制铁由叶脉向叶肉细胞的转移[6];(4)使植物组织碱化和铁在植物体内固定,从而降低植物体内铁的有效性[7];(5)使对高 pH 敏感的有些植物,如羽扇豆,根系生长受到阻碍,根组织,尤其是根表皮细胞破裂,从而影响植物对介质中铁的吸收[8]。但到底谁是主要原因以及如何改善植物的铁营养,至今还没有圆满的答案。

氮是植物吸收量最大的矿质元素之一,它的吸收与利用直接或间接地影响着植物对其它元素的吸收和利用。NO_3-N 和 NH_4-N 是植物可以直接吸收利用的两种氮素形态,它们吸收和同化所引起的变化对植物的其它矿质元素营养的影响不同[9]。植物对铁的吸收和利用不仅与供铁状况有关,而且还与植物根系反应有关。供应不同氮源势必影响到植物根系的性质和铁营养。本文比较了在不同氮源供应和加入不同 pH 缓冲剂时豌豆根系质外体铁的积累和利用以及根系铁还原力的变化,探讨了氮素形态、营养液高 pH 与高浓度 HCO_3^- 对豌豆铁营养的影响机理。

作者简介:崔骁勇,博士,现在中国林业科学院森林生态环境与保护研究所工作。
收稿日期:1998-01-09

1 材料与方法

1.1 植物培养

豌豆 E107(E)和 Sparkle(SP)的种子经过表面消毒 30min 后在 25℃ 下发芽。当植株的第 1 片真叶展开时转移到营养液中。营养液组成如下：1.5mmol/L KNO_3，0.8mmol/L $Ca(NO_3)_2$，0.3mmol/L KH_2PO_4，0.2mmol/L $MgSO_4$，25μmol/L $CaCl_2$，25μmol/L H_3BO_3，2μmol/L $MnSO_4$，2μmol/L $ZnSO_4$，0.5μmol/L $CuSO_4$，0.5μmol/L Na_2MoO_4。植株种植在 2L 黑色塑料盆中，每盆 10 株。植株生长在人工培养室里，光照为 14 h/d，在 250W 生物灯下生长，生长期昼夜温度约为 20/15℃。

1.2 试验处理

1.2.1　Sparkle 移苗后即进行供铁(20μmol/L)和不供铁处理。每个铁水平下包括加 10mmol/L HCO_3^- ($KHCO_3$)或 5mmol/L HEPES(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethyanesulfonic acid)和不加缓冲剂处理。第 12 天和第 15 天取各处理植株在以 5mmol/L MES(4-morpholine-ethanesulfonic acid)缓冲液缓冲的反应液中测定根系铁还原活力。

1.2.2　E107 和 Sparkle 植株供应 100μmol/L Fe(III)EDTA 一周后停止供铁，同时做如下处理：NH_4-N；NO_3-N；NO_3-N + HCO_3^-。NH_4-N 处理是将上述营养液的大量元素改为 1.2mmol/L KCl，2.3mmol/L $(NH_4)_2SO_4$，0.3mmol/L KH_2PO_4，0.2mmol/L $MgSO_4$。处理前及收获时分别测定根系的质外体铁含量。

1.2.3　E107 和 Sparkle 移苗后即进行 NH_4-N − Fe，NO_3-N − Fe，NO_3-N + Fe 3 种处理，− Fe 为营养液不加铁，+ Fe 为供应 100μmol/L Fe(Ⅲ) − EDTA。1 周(测定根系质外体铁的植株为供铁 2 周)后终止供铁，同时将氮源改为 NO_3 − N 或 NH_4 − N 2 种处理。处理前及收获时分别测定根系铁还原力和质外体铁含量。

1.3 测定方法

溶液 pH 监测　每天上午 10 时用手持式 pH 计测定营养液 pH 值。质外体铁的测定根据 Bienfait 等[10]的方法；根系铁还原力的测定见参考文献[11]。

叶片质外体 pH 观测　根据 Edwards 等[12]的方法。在荧光显微镜下用 400～440nm 滤光片观察照像。当 pH 较低时，荧光为暗淡的蓝色；随着 pH 的升高，荧光转为绿色直至黄色，且亮度增强。

2 结果与分析

2.1 缺铁时不同氮源处理的豌豆培养液 pH 变化

如图 1 所示，溶液 − Fe 时，两基因型豌豆培养液都会出现酸化现象。Sparkle 在供应 NO_3-N 时，介质 pH 下降速率较慢，生长 1～3 天后营养液 pH 仅降低了约 0.8 个单位，3～6 天降低了约 0.3 个单位，远低于供应 NH_4-N 时 pH 的降幅。质子分泌能力强是 E107 的特性，无论供应何种氮源，其溶液 pH 都迅速下降，两种氮源的降低幅度相差不大。

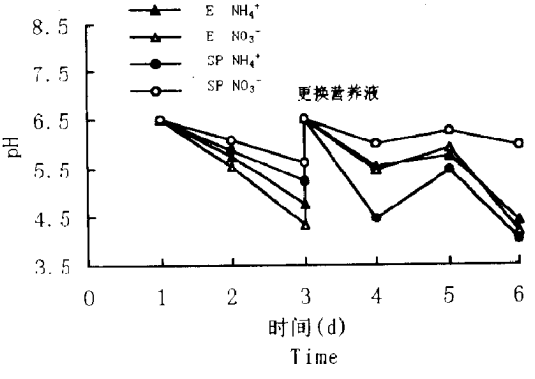

图 1　不同氮源对缺铁豌豆培养液 pH 的影响

Fig.1　Effect of NH_4-N and NO_3-N supply on solution pH of peas under − Fe treatment

2.2 不同氮源及 pH 缓冲液对豌豆根系铁还原力的影响

两个豌豆品种的根系铁还原力受氮源形态影响，Sparkle 的表现尤为明显。供应 NH_4-N 时，Sparkle 根系铁还原力上升早，铁还原酶活性高。移苗后 6 天(图 2 中的第 1 天)根系铁还原力已经有所提高，而供应 NO_3-N 的植株尚检测不出，直到第 7 天才逐渐出现。以后供应 NO_3-N 的植株根系铁还原酶都保持较低水平，而供应 NH_4-N 的植株则呈现明显的上升趋势。E107 在供应 NH_4-N 时，根系铁还原力一直显著高于供应 NO_3-N 的植株。

供应 100μmol/L Fe(Ⅲ)-EDTA 后终止供铁，第 4 天(图 3)测定时发现，两种豌豆都是供应 NH_4-N 的植株根系铁还原力较高。供 NH_4-N 的 E107 植株根系(鲜体)铁还原力已达 430nmol/(g·h)，而供 NO_3-N 时仅为约 30nmol/(g·h)左右。此时 Sparkle 的根系铁还原力水平很低。

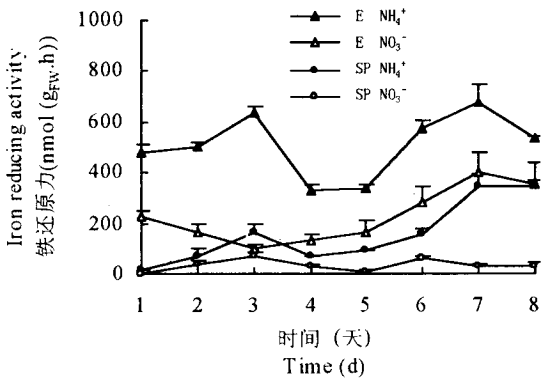

图 2 不同氮源对缺铁豌豆根系铁还原力的影响

Fig.2 Effects of NH_4-N and NO_3-N supply on ironreducing activities of root in Fe-deficient pea plants

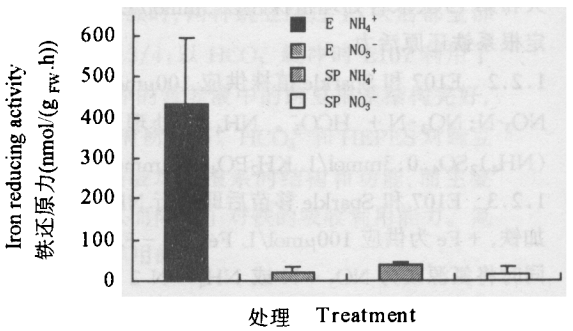

图 3 终止供铁后氮源对豌豆根系铁还原力的影响

Fig.3 Effects of NH_4-N and NO_3-N on iron reducingactivities 0f pea roots after iron supply suspended

图 4 是在未加缓冲剂的缺铁营养液中生长了 6 天的 Sparkle 豌豆根系铁还原力，在 3 种缓冲液中测定的结果是：MES 缓冲(pH5.5)的根系铁还原力显著高于用 HEPES 或 HCO_3^- 缓冲 (pH 值分别为 7.60，8.90)时的结果。虽然 HEPES 与 HCO_3^- 缓冲时反应液 pH 值相差 1.3 个单位，但是两者对豌豆根系铁还原酶活性的抑制效果相当。这表明 HCO_3^- 和 HEPES 可能都是使介质 pH 超出了根系铁还原酶作用的最适 pH 范围，从而抑制了该酶的活性。

以 5mmol/L HEPES 和 10mmol/L $KHCO_3$ 缓冲可保持营养液 pH 值在较小的区间内变化。图 5 表示 Sparkle 植株一直生长在上述三种不同 pH 值的营养液中，转移到低 pH(5.5)的 MES 缓冲液中测定的根系铁还原力。两次测定时，一直生长在较低 pH 环境中的豌豆根系(鲜体)铁还原力已经下降到很低的水平，而一直生长在高 pH 环境中的豌豆转移到低 pH 后根系铁还原力比前者高得多，约 500nmol/(g·h)；而且供铁与不供铁处理间的差异不明显。两次测定的结果都表明，5mmol/L HEPES 与 10mmol/L $KHCO_3$ 缓冲的效果相当。

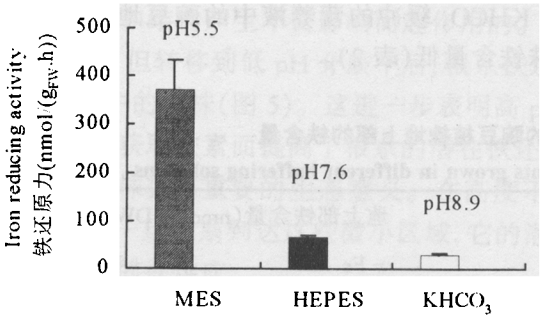

图 4　不同 pH 缓冲液中测定的豌豆根系铁还原力

Fig.4　Iron reducing activities of pea roots determined in different pH buffering solutions

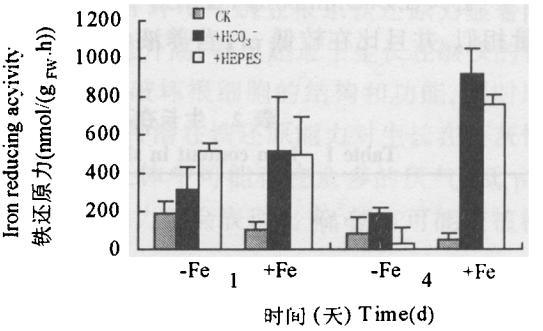

图 5　生长在不同 pH 营养液中的豌豆根系铁还原力

Fig.5　Changes of iron reducing activities of roots in pea plants grown in different pH buffering solutions

2.3　不同氮源及高 pH 供应时豌豆植株体内铁的分布

－Fe 处理 15 天后,不同氮源供应的两种豌豆地上、地下部铁的浓度都很低(表 1)。供应 100μmol/L Fe(Ⅲ)－EDTA 1 周后缺铁(表 1 中的＋Fe),第 3 天测定的结果显示,不同氮源对 Sparkle 的铁含量影响较小,但 E107 供应 NH_4-N 的植株根系铁含量仅为供应 NO_3-N 的 1/6 左右,表明有大量的铁运到了地上部;其地上部铁含量较低的原因是老叶枯死脱落带走了很多铁。表 1 还显示,E107 累积铁的能力远大于 Sparkle,供铁时其地上部铁含量为 Sparkle 的 4 倍多。

表 1　不同氮素形态对豌豆植株地上部和根系铁含量的影响

Table 1　Effect of NH_4-N and NO_3-N on iron content in shoot and root of Sparkle and E107(μg/g, DW)

铁处理	氮　源	Sparkle		E107	
		地上部	根	地上部	根
－Fe	NH_4-N	113.1	145.0	113.7	93.9
	NO_3-N	116.2	120.4	129.2	123.9
＋Fe	NH_4-N	292.3	520.9	1200.4	231.6
	NO_3-N	348.9	612.1	1593.2	1345.4

供铁一段时间后,E107 的铁主要累积在老叶中,终止供铁 14 天后,老叶(干物)铁含量仍然达到 1800～2000μg/g,这可能与老叶因铁中毒而迅速枯死,累积的铁难以转移出去有关。此时 E107 根系铁已经基本运到了地上部,铁含量已下降到与 Sparkle 相当的水平,而且与氮源形态无关。新叶铁含量也是 E107 明显高于 Sparkle,供应 NH_4-N 明显高于 NO_3-

N;茎部铁含量各处理都较低,且变化不大。

生长在以 5mmol/L HEPES 与 10mmol/L $KHCO_3$ 缓冲的营养液中的豌豆地上部铁含量相似,并且比在较低 pH 营养液中生长的植株铁含量低(表 2)。

表 2 生长在不同缓冲液中的豌豆植株地上部的铁含量

Table 1 Iron content in shoot of pea plants grown in different buffering solutions

缓冲剂	pH	地上部铁含量(nmol/g DW)	
		-Fe	+Fe
CK	3.80~6.50	174.2	231.6
5 mmol/L HEPES	7.60	143.8	158.3
10 mmol/L $KHCO_3$	8.90	145.0	142.5

2.4 不同氮源及高 pH 对豌豆根系质外体铁利用的影响

不同氮源及 HCO_3^- 处理时植株对质外体铁的利用能力出现了显著的差异(图 6)。试验 2 中停止供铁 15 天后,无论何种氮源供应 E107 都耗尽了根中的质外体铁;供应 NH_4-N 的 Sparkle 质外体铁也被全部利用,供 NO_3-N 的尚存约 1/4。加入 HCO_3^- 提高营养液 pH 以后,E107 根系只剩余约 1/4 的质外体铁,Sparkle 根系质外体铁就几乎没有被利用。试验 3 也有同样的结果,供应 100μmol/L Fe(Ⅲ)-EDTA 两周后(图 7 中的第 0 天),E107 根系累积的质外体铁低于 Sparkle 植株。终止供铁 5 天后,供应 NO_3-N 的植株根系质外体铁含量比供应 NH_4-N 的同一基因型植株(鲜体)高 230 nmol/g 以上。

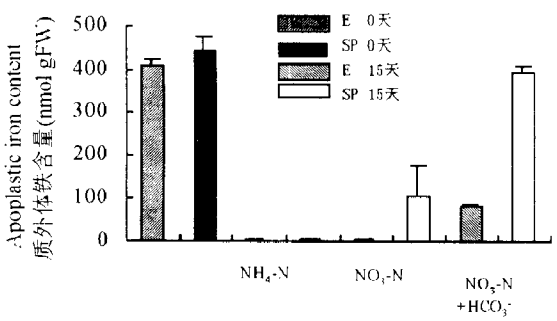

图 6 氮源及 HCO_3^- 对根系质外体铁利用的影响

Fig.6 Consumption of iron in root apoplast by peas with different types of nitrogen supply

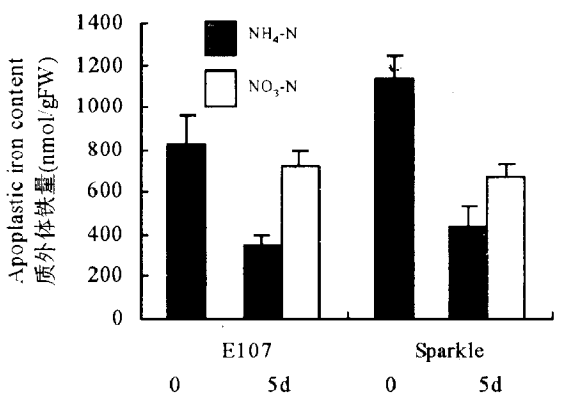

图 7 不同氮源对豌豆根系质外体铁利用的影响

Fig.7 Depletion of apoplastic iron in pea roots with different types of nitrogen supply

3 讨论

本试验观察到,以 5mmol/L HEPES 或 10mmol/L $KHCO_3$ 缓冲的豌豆植株根系发育良

好。在显微镜下也看到根表皮细胞结构完整,这说明高 pH、高浓度 HCO_3^- 不是通过对豌豆根系生长和结构产生不良影响而起作用的。虽然在高 pH 环境中豌豆根系铁还原力显著降低(图 4),但转移到低 pH 介质中后,根系铁还原能力迅速升高,甚至超过了生长在缺铁的低 pH 环境中的植株(图 5)。这进一步表明高 pH 值并没有破坏根细胞的结构和功能,同时暗示植物为获取铁素而提高了根系的潜在铁还原能力。这种潜在铁还原能力对生长在石灰性土壤的植株具有重要的生态意义。在高度不均一性的土体中可能存在众多的厌气、低 pH 微域[13],一旦根系到达这些微小区域,它的潜在铁还原能力就会表现出来,就有可能使植株获得更多的铁供应。

HCO_3^- 和 HEPES 对豌豆根系铁还原能力的影响是相当的。这表明石灰性土壤上双子叶植物缺铁黄化的主要原因是高浓度 HCO_3^- 造成根际 pH 升高,超出了铁还原酶的最适 pH,使其活性下降,对铁的吸收利用能力减弱。Marschner 等[14]的试验看到介质 pH 为 8.5 时,花生根系的铁还原能力降低了 2 倍左右,而铁的吸收速率下降了 6～8 倍。本试验中豌豆根系铁还原能力受高 pH 的影响更大。因此介质 pH 值高时豌豆从外界吸收铁的能力将急剧下降。不同 pH 下 Sparkle 对根系质外体铁的利用速率不同即证明了这一点。

氮素形态对植物吸收铁的过程影响较大。供应 NH_4-N 时豌豆对根系质外体铁的利用较快(图 6)。氮素形态对铁吸收影响的差异主要是由于它们对根际 pH 的影响不同造成的。虽然在缺铁时供应 NO_3-N 的植株根际 pH 也会下降,但是与供应 NH_4-N 相比 pH 降低较慢,幅度较小。尤其是在刚刚出现潜在性缺铁时,供应 NO_3－N 的植株根际 pH 往往还没有出现明显的下降,而供应 NH_4-N 时,pH 降低却很明显。根际 pH 高低直接决定了根际微区铁的溶解性[15],同时又通过影响根细胞质膜铁还原酶活性[16]而影响植物对铁的吸收。本试验中看到,培养液中加入 10mmol/L $KHCO_3$ 以保持根际高 pH 值时,经过 11 天的缺铁处理,Sparkle 植株质外体铁含量只降低了约 6%;E107 也仅下降了约 38%(图 7)。氮素形态对根际 pH 的不同作用造成了植株对根系质外体铁和土壤铁素的利用能力不同。

氮素形态对铁在植物体内的分配与再利用也有不同的作用。试验发现,供应 NH_4-N 时豌豆植株根系铁含量较低,新叶铁含量较高,表明铁向地上部运输较快,终止供铁后根系铁的消耗速度更快,根系更容易缺铁,这也是供应 NH_4-N 时根系缺铁反应上升较早的一个原因。采用荧光指示剂在显微镜下看到,供应 NO_3-N 的 Sparkle 植株叶片质外体 pH 较高。因此供应 NO_3-N 时铁就被大量沉淀在质外体中,难以活化利用。

参考文献

1 Booss A, Kolesch H and Hofner W. Chlorose-Ursachen bei Reben(*Vitis binifera* L.) am naturlichen standort. Z. Pflanzenernahr Bodenk, 1982, 145:246～260.

2 Mengel K. Iron availability in plant tissues-iron chlorosis on calcareous soils. Plant Soil, 1994, 165:275～283.

3 Mengel K, Breininger MT and Bubl W. Bicarbonate, the most important factor inducing iron chlorosis in vine grapes on calcareous soil. Plant Physiol., 1984, 81:333～344.

4 邹春琴.提高玉米和菜豆铁营养效率的途径及其机理.博士论文,北京农业大学 1995.

5 Goss HC. A comparison effects of the bicarbonate ion with other anions on the uptake of some radioisotopes by *Phaeseolus vulgaris and Horedeum vulgare* plants. Ph D. thesis. University of California, Los Angeles, 1957.

6 Mengel K and Mallissiovas N. Bicarbonae als auslosender Faktor der Eisenahlorose bei der Weinrebe(*Vitis vinifera*). Vitis, 1981, 20:235～243.

7 Warnock WE. The iron content of some plants as influenced by conditions associated with lime-induced chlorosis. MS Thesis. Utah State University, Logan, Utah, 1952.

8 Tang C et al. High pH cause disintegration of the root surface in *Lupinus angustifolius* L. Ann. Bot., 1993, 71:201～207.

9 Alloush GA et al. Mineral nutrition of chickpea plants supplied with NO_3^--N or NH_4^+-N I. Ionic balance in relation to iron stress. J. Plant Nutr., 1990, 13:1575～1590.

10 Bienfait HF, van der Briel W and Mesland-Mul NT. Free space iron pools in roots: generation and mobilization. Plant Physiol., 1985, 78:596～600.

11 崔骁勇. 双子叶植物根系对缺铁的适应机理. 中国农业大学博士学位论文, 1997.

12 Edwards MC, Smith GN, Bowling DJF. Guard cells extrude protons prior to stomatal opening—A study using fluorescence microscopy and pH microelectrodes. J. Exp. Bot., 1988, 39:1541～1547.

13 Chaney RL. Translocation of iron from plant roots to shoots. International symposium on iron nutrition. Jerusalem, Israel, 1989.

14 Marschner H, Treeby M and Romheld V. Role of root-induced changes in the rhizosphere for iron acquisition in higher plants. Z. Pflanzenernaehr Bodenkd, 1989, 152:197～204.

15 Yi Y, Saleeba JA and Guerinot ML. Iron uptake in *Arabidopsis thaliana*. *In*: Manthey J, Luster D and Crowley DE (eds.). Biochemistry of metal micronutrients in the rhizosphere. Lewis publishers, Chelsea, 1994, 295～307.

16 Rubinstein. R, Stern AI and Stout RG. Redox activity of oat root cells. Plant Physiol., 1984, 76:386～391.

EFFECT OF NITROGEN FORMS AND HCO_3^- ON IRON NUTRITION OF PEA

Cui Xiaoyong Cao Yiping Zhang Fusuo

(*Department of Plant Nutrition, China Agricultural University, Beijing* 100094)

Abstract: The effects of nitrogen types, HCO_3^- and HEPES on iron nutrition of pea genotypes, Sparkle and E107, were studied by solution culture under controlled conditions. Compared with NO_3-N, NH_4-N application resulted in earlier and significantly higher iron reducing activities, stronger utilization of apoplastic iron in roots, and more iron transported to shoot for both genotypes. The pH of solutions of Sparkle plants decreased more quickly when supplied NH_4-N, however, there was no difference in solution pH in the two nitrogen types for E107.

Apoplastic iron accumulated in roots was used up in low pH condition, but it could not be exploited by plants in 10mmol/L HCO_3^- buffering solution. However, plant roots in high pH condition were structurally and functionally undamaged, their iron reducing activities were higher than those grew in low pH solutions. The effect of HCO_3^- was similar with that of 5mmol/L HEPES. The results suggested that the effects of nitrogen types on iron nutrition were through changes of pH in rhizosphere and apoplast in plant, and the inhibition of iron nutrition of pea by HCO_3^- was not due to damage of root construction but the depression of iron reducing activity under high pH induced by HCO_3^-.

Key words: pea(*Pisum sativum* L.); iron nutrition; nitrogen types; HCO_3^-; high pH