植物营养与肥料学报 2009,15(3):501-508
Plant Nutrition and Fertilizer Science

玉米硝酸盐累积及其在适应持续低氮胁迫中的作用

刘金鑫,田秋英,陈范骏,米国华*
(农业部植物营养学重点实验室,教育部植物-土壤相互作用重点实验室,
中国农业大学资源与环境学院,北京 100193)

摘要:旱地作物吸收氮素的主要形态是硝酸盐,硝酸盐的积累与再利用对植物适应低氮土壤环境具有重要意义。本试验利用两个硝酸盐累积能力不同的玉米自交系478(硝酸盐积累低)和W312(硝酸盐积累高)为研究材料,研究玉米的硝酸盐累积及其在适应持续低氮胁迫中的作用。结果表明,W312的硝酸还原酶活性和NR基因的表达都弱于478,而体内氨基酸含量显著较低。对一个可能与液泡膜硝酸盐转运有关的氯离子通道蛋白基因(*ZmCLC*)的表达分析发现,478的*ZmCLC*表达显著强于W312。说明W312硝酸盐积累能力强主要是由于其较弱的氮同化能力,而不是硝酸盐向液泡的运输能力强。在砂培体系并持续缺氮条件下,W312叶绿素含量(SPAD值)显著高于478,表明植株体内较高硝酸盐累积有助于W312适应持续缺氮的土壤环境。

关键词:硝酸盐;累积;硝酸盐还原酶;氯离子通道;玉米
中图分类号:Q945.78　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1008-505X(2009)03-0501-08

Nitrate accumulation in maize and its role in adaptation to lasting low nitrogen environments

LIU Jin-xin, TIAN Qiu-ying, CHEN Fan-jun, MI Guo-hua*
(*Key Laboratory of Plant Nutrition, MOA/Key Laboratory of Plant-Soil Interaction, MOE/College of Resources and Environmental Science, China Agricultural University, Beijing 100193, China*)

Abstract: Nitrate is the major nitrogen (N) form in aerial soils. Accumulation and subsequent reutilization of nitrate in plants can be important for adaptation to low N environments. Using two maize inbred lines differing in nitrate accumulation ability, nitrate accumulation in maize and its relation to adaptation of low nitrogen environments were investigated. In comparison to inbred 478, inbred W312 accumulated significantly more nitrate in shoot. The activity of nitrate reductase (NR) as well as the expression of two maize NR genes (*ZmNR1* and *ZmNR2*) was lower in W312. Correspondingly, the total amino acids content in W312 was also lower. The putative chloride channel *ZmCLC*, which homolog in *Arabidopsis* was demonstrated to be responsible for nitrate transport into vacuole, was cloned. The expression of *ZmCLC* in W312 was lower than in 478, especially at low N stress conditions. It was concluded that the higher nitrate accumulation in W312 is due to its lower nitrate assimilation ability rather than the activity of nitrate transport toward the vacuoles. At low N conditions in a sand culture system, the chlorophyll content of W312 was much higher than that of 478, suggesting that the higher ability of nitrate accumulation may be beneficial for the adaptation of plants to the lasting low N stress.

Key words: nitrate; accumulation; nitrate reductase; chloride channel; maize

---

收稿日期:2008-04-08　　**接受日期**:2008-11-24
基金项目:国家重点基础研究规划项目(2007CB109302);国家自然科学基金项目(30771289)资助。
作者简介:刘金鑫(1980—),男,新疆克拉玛依人,博士研究生,主要从事植物营养分子遗传工作。
* **通讯作者** E-mail:miguohua@cau.edu.cn

氮素是植物生长所必须的元素，而硝酸盐(NO_3^-)是旱地土壤中氮素的主要形态。为达到作物高产及控制氮素损失的双重目标，提高作物高效吸收利用氮素的能力是一条重要途径。在氮素胁迫条件下，植物为了满足其自身的正常生长，进化出了很多适应性反应；其中包括植物根系的生理和形态可塑性(Plasticity)[1-3]。有关根系硝酸盐吸收系统已经有很多报道。一方面，NO_3^-供应将诱导NO_3^-吸收系统的活性[4-5]；另一方面，氨基酸化合物，特别是谷氨酰胺(Gln)，可以显著下调NO_3^-的内流速率和高亲和力硝酸盐转运蛋白基因的表达[6-8]。说明植株地上部和根系之间循环流动的氨基酸化合物可以作为一种内源信号，在整株水平上调节植株对氮素的需求和NO_3^-的吸收[9-11]。

根系的形态可塑性反应对于植物获取氮素的能力也起到十分重要的作用。例如在玉米中，植株可以通过增加根冠比、总根长、个体轴根伸长、刺激侧根生长、降低轴根数来适应环境中N素的胁迫[9, 12-13]。在模式植物拟南芥[14]和番茄[15]中也发现了同样的现象。在氮素胁迫的环境中，植物侧根的起始和/或伸长将受到硝酸盐富积区域的刺激[3, 16]。

氮素同化可以通过两个途径来调控植物对于硝酸盐的获取能力。首先，通过植株地上部快速生长驱动的高硝酸盐同化活性对于硝酸盐吸收系统有一个正反馈作用，可能通过从地上部到根系的氨基酸运输来起作用[17]。其次，高硝酸盐同化活性可能降低植株地上部硝酸盐的储存，从而产生一个信号来调节植株根冠比。换言之，植株地上部的高硝酸盐浓度将抑制同化产物从地上部向根系分配，导致根冠比的下降[15]。

植物适应低氮生态环境的另一个重要策略是在体内大量储存NO_3^-以满足其持续生长的需要[18-19]。许多生长在低养分环境的慢速生长植物都采用大量累积养分的策略来维持长期的生存[20]。本课题组在前期工作中发现两个玉米自交系478和W312，其中478根系对氮素供应的响应较高，而W312对氮素供应的响应不敏感[21]。后续研究发现W312体内累积NO_3^-的能力显著高于478。本试验以这两个玉米基因型为材料，探索W312植物累积NO_3^-的生理原因，同时考察NO_3^-累积能力在作物适应长期低氮环境中的意义。

1 材料与方法

1.1 溶液培养试验

试验选用两个玉米(*Zea may* L.)自交系，478(氮高效)和W312(氮低效)。玉米种子经10%(v/v)的H_2O_2消毒20 min，用去离子水冲洗干净，再用饱和的$CaSO_4$浸泡6 h后，转到用饱和$CaSO_4$浸湿的吸水纸上，在室温黑暗下催芽。待种子露白后，转入石英砂中。当玉米幼苗生长到1～2片可见叶时，挑选出大小一致的苗子，去掉胚乳后，移到1 L的装有1/2浓度营养液的培养罐中，每罐种3株，第2天换成全营养液。营养液的浓度(mol/L)为：K_2SO_4 7.5×10^{-4}、KCl 1.0×10^{-4}、KH_2PO_4 2.5×10^{-4}、$MgSO_4$ 6.5×10^{-4}、EDTA-Fe (II) 1.3×10^{-4}、$MnSO_4$ 1.0×10^{-6}、$ZnSO_4$ 1.0×10^{-6}、$CuSO_4$ 1.0×10^{-7}、$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 5.0×10^{-9}。

试验时，玉米苗首先在含有0.1 mmol/L NO_3^-的营养液中生长5 d，每2 d换一次营养液。然后分别转移到0.1、0.5、2.5、10 mmol/L NO_3^-处理中，生长7 d后收获，在此期间每1 d换一次营养液。氮以$Ca(NO_3)_2$供应，在低的硝酸盐处理中，用$CaCl_2$(1.8 mol/L)将Ca^{2+}补充到和2.5 mmol/L NO_3^-处理相同的钙水平。用NaOH将营养液的pH调到6.0±0.05。每个处理重复3次。培养室的条件为：光照14 h，冠层光强为250～300 μmol/(m^2·s)，温度22～28℃，相对湿度45%～55%。

1.2 砂培试验

用2 mmol/L HCl将大小在0.5～1 mm之间的石英砂浸泡24 h，然后用水清洗至中性pH值。玉米种子的消毒和萌发同溶液培养试验。将萌发的种子移栽到装1.5 kg石英砂的培养盆中，盆子中覆盖上黑色塑料布以防止藻类生长。待幼苗长出后，留两株生长一致的幼苗，培养条件和营养液同液培试验。植株在1 mmol/L NO_3^-条件下预培养到3叶期，然后将一半的植株进行缺N处理，缺N营养液加入1 mmol/L $CaCl_2$平衡离子浓度，其他的植株依然供应1 mmol/L NO_3^-。每个处理重复4次。当植株生长到5片叶时收获。SPAD值利用Minolta SPAD 502叶绿素仪测定，选取幼苗的第二片展开叶，测定叶中部的SPAD值，重复3株。地上部和根系收获后在70℃烘干，并称重。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 含氮化合物的测定 玉米组织中硝酸盐的

测定采用水杨酸比色法[22];叶片和根中的游离氨基酸采用茚三酮法[23];全氮采用凯氏定氮法测定。

1.3.2　活体硝酸还原酶的测定　参考 Jaworski[24]的方法。称取玉米的完全展开叶 500 mg,剪成 0.5～1.0 cm^2 的小片,放到试管中,加入 9 mL 100 mmol/L 的 pH 7.5 的磷酸钾缓冲液(含有 1%的异丙醇,100 mmol/L 的 KNO_3),然后将所有试管放到真空干燥器中抽气 10 min,将试管再放到黑暗的 30 ℃的恒温箱中保温 30 min,再加 1 mL 的三氯乙酸终止反应,静止 2 min 后,吸取上清夜 2 mL,加入 1%的对氨基苯磺酸和 0.2%的 α-萘胺各 4 mL,生成的粉红色偶氮化合物在 540 nm 下比色测定。

1.3.3　NADH 硝酸还原酶基因和可能的氯离子通道蛋白基因的表达　应用半定量 RT-PCR 方法测定,分析 NADH 硝酸还原酶活性和植株累积硝酸盐的能力。玉米幼苗首先在含有 1 mmol/L NO_3^- 的营养液中生长 5 d,每 2 d 换一次营养液,然后转移到 0.05 mmol/L NO_3^- 的营养液,分别在 0、1、3、5 d 取植株根系样品。样品总 RNA 用 TRIzol 总 RNA 提取试剂盒(Invitrogen)提取。cDNA 第一链合成利用 M-MLV RT 试剂盒(Invitrogen)。为了分析基因的表达,根据这些基因的 mRNA 和相关的 EST 序列设计基因特异性引物。半定量 RT-PCR 所用 *ZmTubulin*(X63178)作为内标。所用的引物见表 1。PCR 扩增条件如下:95℃ 4 min;95℃ 30 s、60℃ 40 s、72℃ 50 s,25～41 个循环;72℃ 10 min。

表 1　半定量 RT-PCR 所用引物

Table 1　The primers for semi-quantitative RT-PCR

基因 Gene	登录号 Accession number	功能 Function	引物序列 Primer sequences
ZmCLC	AY236970	可能的氯离子通道蛋白 Putative chloride channel	5'-AAGGGCGTGAAGGTGAAGCTGTGCTA-3' 5'-ACCAATGAATCAGCAACGACAGCCACTC-3'
ZmNR1	M27821	NADH 硝酸还原酶 NADH-nitrate reductase	5'-ACATCTTCGTCTGCGCCAGCATTGA -3' 5'-GCATCTCACGAATTAGCACTGACAAGTC-3'
ZmNR2	M77792	NADH 硝酸还原酶 NADH-nitrate reductase	5'-AGTATCCGTACAGGCTCAAGGTGT-3' 5'-GCTCTAGTCTGGTAATTCTAGGCTAG-3'
Tubulin	X63178	微管蛋白 Tubulin	5'-ACCAACTTGAACAGGCTGATCTCACA-3' 5'-GCTTGGCGTACATAAGGTCAAACTTGT-3'

2　结果与分析

2.1　地上部和根系中 NO_3^- 浓度和含量

与 478 相比,W312 能够在叶片和根中累积更多的硝酸盐(图 1),W312 高的硝酸盐积累不是由于"浓缩作用"的结果,因为它的地上部 NO_3^- 的总量也比 478 高(图 1)。在根中,W312 的硝酸盐浓度也显著高于 478,但二者的硝酸盐总量相似。随着外界 NO_3^- 水平的增加,叶片和根中的硝酸盐含量增加。外界 NO_3^- 为 10 mmol/L 时,W312 和 478 叶片中的硝酸盐浓度达最大;在根中,W312 在 NO_3^- 为 2.5 mmol/L 时 NO_3^- 浓度达最大,而 478 在外界 NO_3^- 为 10 mmol/L 时浓度才达最大。

2.2　地上部和根系中氨基酸浓度

当外界 NO_3^- 水平从 0.1 mmol/L 增加到 0.5 mmol/L 时,两个玉米基因型地上部的氨基酸浓度增加(图 2),与 NO_3^- 含量差异相反,两个基因型比较,478 地上部的氨基酸浓度显著高于 W312。不同氮处理条件下,两个基因型根中氨基酸浓度均变化很小,且没有显著差异。

2.3　硝酸还原酶活性(NRA)和硝酸还原酶(NR)基因表达

478 叶片中的硝酸还原酶活性(NRA)显著高于 W312,而根中两个基因型玉米的 NRA 没有显著差异,除了 0.5 mmol/L NO_3^- 处理外。随着外界供氮水平的增加,叶片和根中的 NRA 增加,当 NO_3^- 浓度为 0.5 mmol/L 时,NRA 达最大,再增加 NO_3^-(0.5～10 mmol/L)浓度,叶片和根中的 NRA 下降(图 3A)。

将玉米幼苗从高氮(1 mmol/L NO_3^-)转移到低氮(0.05 mmol/L NO_3^-)供应后,两个基因型硝酸还原酶基因 *NR1* 和 *NR2* 的表达都下调(图 3B)。478 地上部和根中 *NR1* 的表达都远高于 W312。在地上部,缺氮 0～3 d 内,478 内 *NR2* 表达强于 W312,到 5 d 时两个基因型间没有显著差异。在根中,两个基因型 *NR2* 表达没有显著差异。

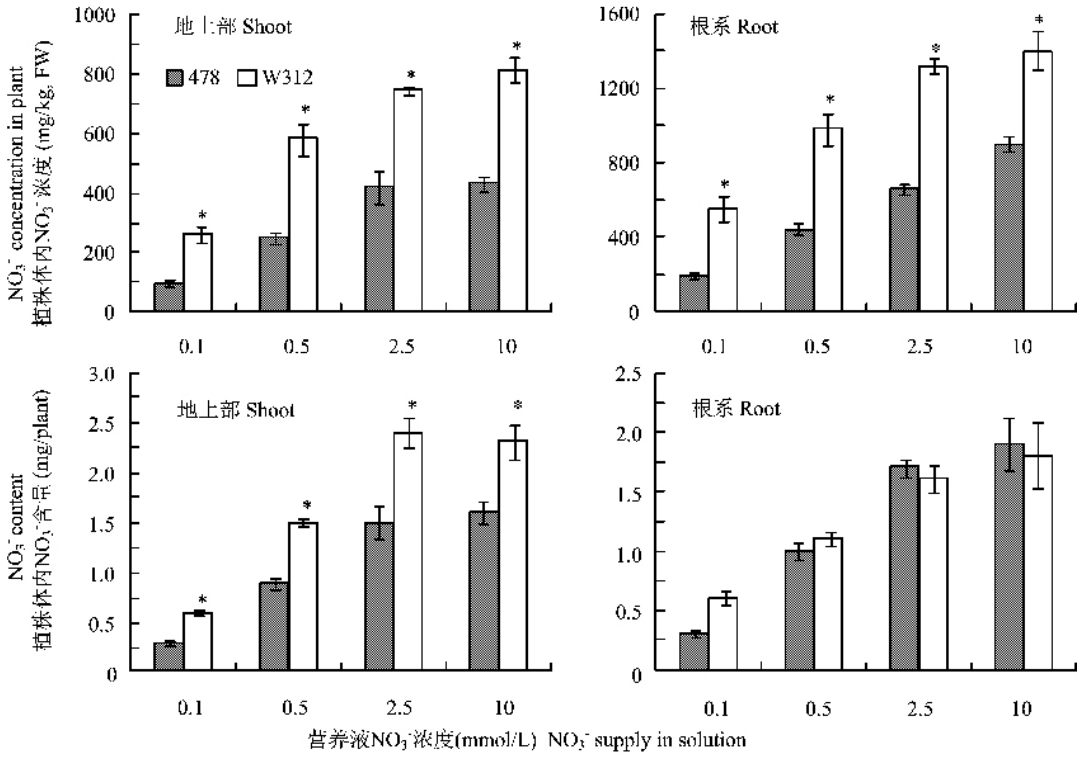

图1 两个玉米基因型地上部和根系的 NO_3^- 浓度和含量

Fig.1 NO_3^- concentration and accumulation in shoots and roots of two maize genotypes

(在 0.1 mmol/L NO_3^- 中预培养 5 d 的幼苗,被转入图中所示的 NO_3^- 浓度生长 7 d。"*"表示两个基因型之间存在 $P \leqslant 0.05$ 显著差异;图 2 同。

Seedlings were transferred from the nutrient solution of 0.1 mmol/L NO_3^- to the indicated NO_3^- concentration and let to grow for 7 days;

Data with"*"indicate significant difference at $P \leqslant 0.05$ between the two genotypes;Same as Fig.2.)

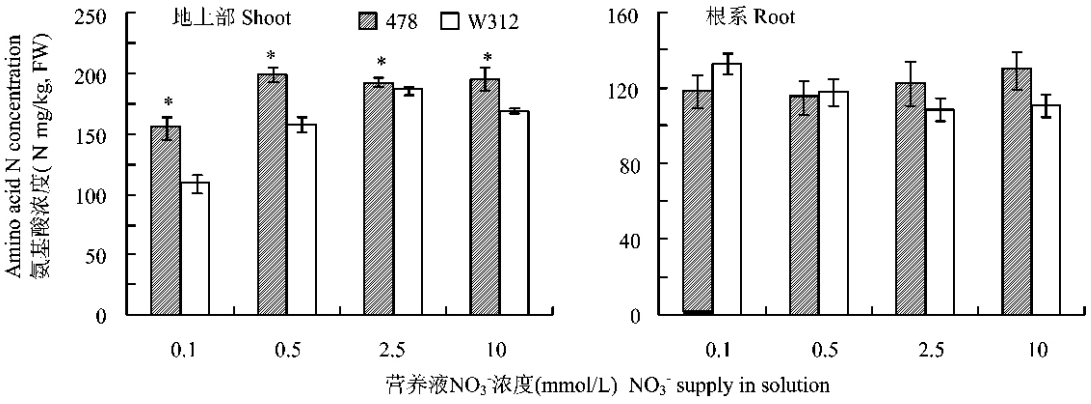

图2 氮素处理对两个玉米基因型植株地上部和根系氨基酸浓度的影响

Fig.2 Amino acid concentration in shoots and roots of two maize genotypes as affected by N treatments

2.4 可能的液泡膜硝酸盐转运有关的氯离子通道蛋白基因表达

液泡是植物细胞内储存 NO_3^- 的主要场所。最近的研究证实,拟南芥中的氯离子通道蛋白(AtCLCa)调控 NO_3^- 在植物液泡中的累积[25]。我们利用 Blast 程序在 NCBI 中查找到一条玉米的氯离子通道全长 cDNA 序列,缩写为 *ZmCLC*,经过与 AtCLCa 的蛋白序列比对发现,两者的同源性达到 71%。通过半定量 RT-PCR 检测此基因在两个基因型中的表达。在地上部,幼苗从 1 mmol/L NO_3^- 转移到 0.05 mmol/L NO_3^- 3 d 后,478 的 *CLC* 表达明显强于 W312;而在根中,478 的 *CLC* 表达始终强于 W312(图 4)。

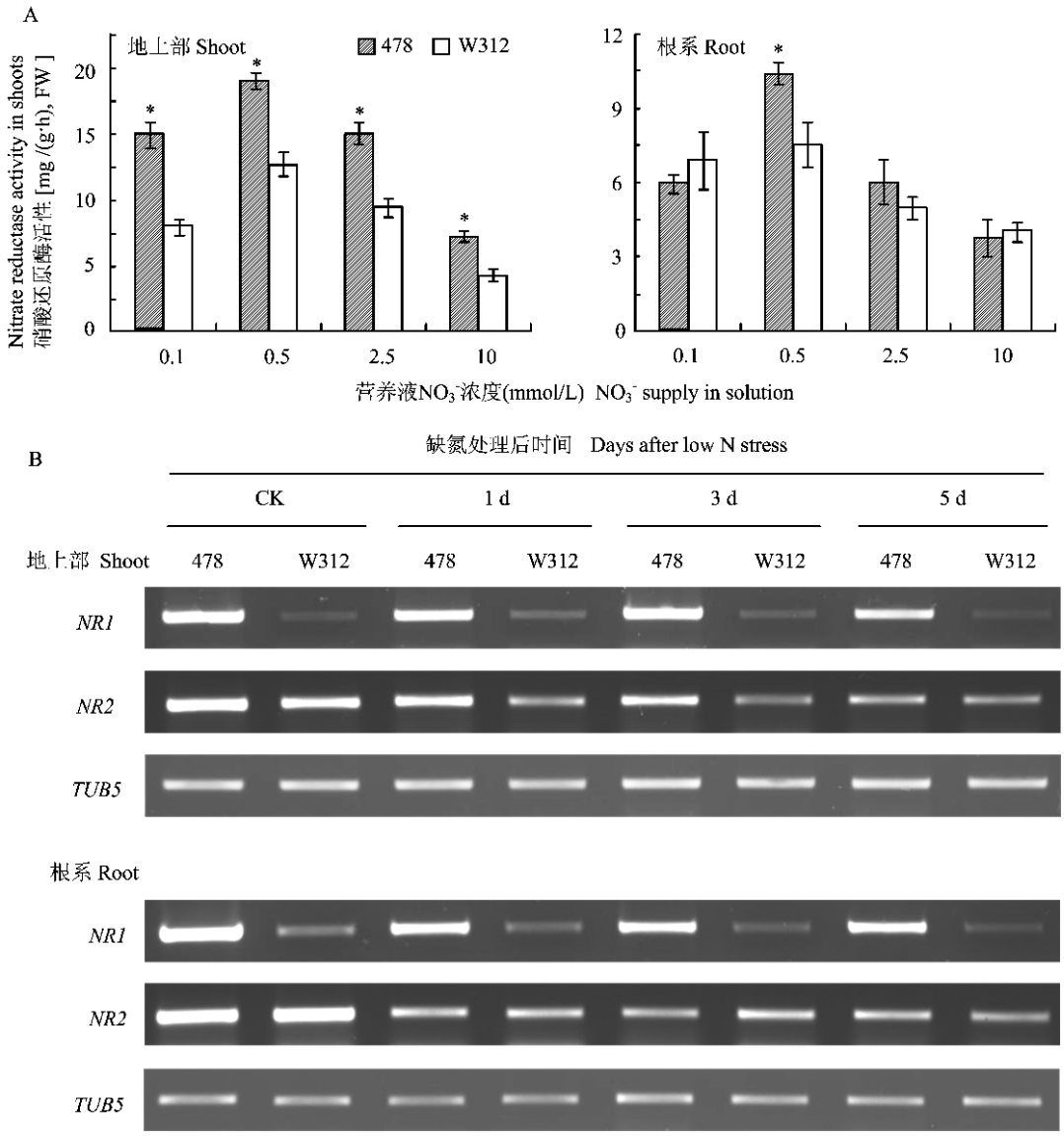

图 3　两个基因型的硝酸还原酶活性(A)及硝酸还原酶基因表达(B)

Fig.3　NR activity (A) and NR gene expression (B) of two maize genotypes

(“ * ”表示两个基因型之间存在 $P \leqslant 0.05$ 显著差异. Data with“ * ”indicate significant difference at $P \leqslant 0.05$ between the two genotypes.)

2.5　长期缺氮条件下两个基因型的生长状况

在砂培条件下将两个玉米基因型培养到 3 叶期,然后进行缺 N 处理。到 5 叶期时,478 的老叶明显出现缺氮黄化症状,叶片叶绿素含量(SPAD 值)显著下降(图 5A);但在 W312 中没有表现出显著的缺氮和叶绿素减少情况。缺 N 处理下,478 的根冠比显著增加(图 5B),其原因主要是地上部生长受到显著抑制(图 5C),而根的生物量几乎没有变化(图 5D)。在处理期间,W312 的根冠比、地上部干重及根重均没有显著变化(图 5B – D)。

3　讨论

植物拥有很强的生理和形态可塑性来适应其生长环境的变化[26]。为了适应不同自然环境的需要,快速生长和慢速生长植物对于硝酸盐缺乏和富积区域有显著不同的反应方式[18]。Fitter 和 Hay[27] 指出,低养分环境条件不适应快速生长型植物的正常生长。低磷适应性的高山草(*Chionochloa. crassiuscula*)相对于适应在高磷环境生长的另一种草(*Chionochloa. pallens*)有更高的 Pi 吸收速率和体内 Pi 浓度,但是由于 *C. crassiuscula* 的生长速率低导致其 Pi 的利用效率低于 *C. pallens*[20]。本次试验中,与 478 相比,W312 的硝酸还原酶活性较低(图 3);同时 W312 的 NR 基因表达远弱于 478,而它的氨基酸态氮浓度也比 478 低(图 2)。这些结果显示,它的氮同化能力低,因此随着 NO_3^- 供应的增加,

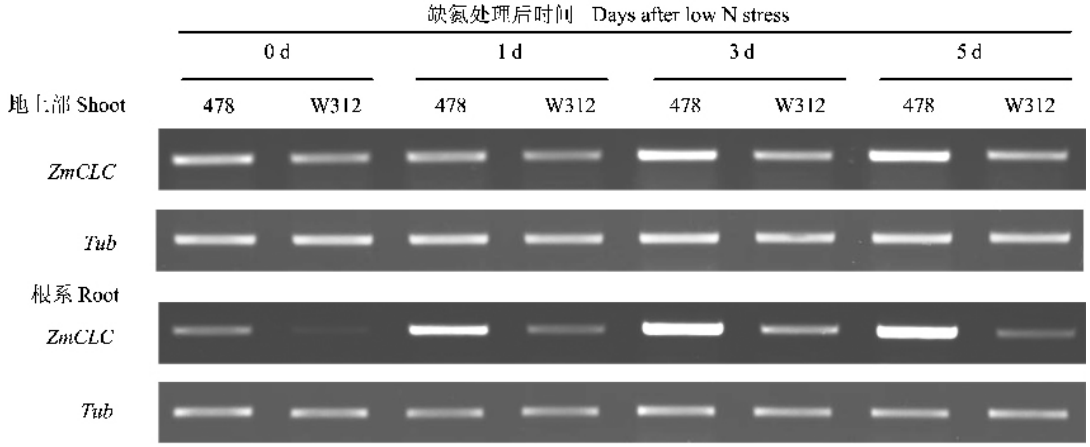

图4 在478和W312中的 *ZmCLC* 基因表达

Fig.4 The transcript level of putative chloride channel gene (*ZmCLC*) in the root of two maize genotypes 478 and W312 after transferring from 1 mmol/L to 0.05 mmol/L NO_3^- solution for the indicated times

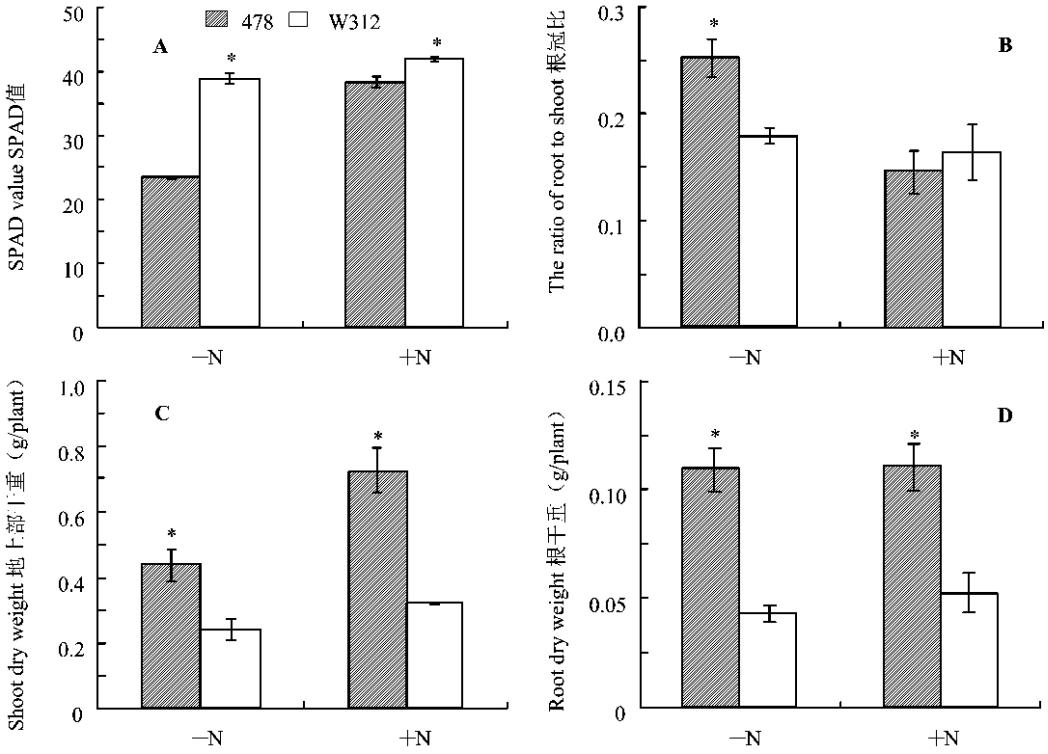

图5 砂培条件下氮素胁迫对两个玉米基因型生长的影响

Fig.5 Growth of two maize genotypes as affected by low N stress in sand culture system

[砂培植株供应1 mmol/L NO_3^- 到3叶期;然后一半植株缺N处理;植株5叶期时测定数据。

Seedlings grown in sand were supplied with 1 mmol/L NO_3^- until 3-leaf stage. Then half of plants were deprived of N; Data were collected at 5-leaf stage. "*"表示两个基因型间差异显著 $P \leqslant 0.05$. Data with "*" indicate significant difference between the two genotypes at $P \leqslant 0.05$.]

能够在植物体内部累积较多的硝酸盐(图1)。对可能的液泡膜硝酸盐转运基因 *CLC* 在两个基因型中的表达分析发现,478的 *CLC* 表达强于W312,尤其是在根系中的表达。Angeli等[11]的研究已经确定,拟南芥的 *AtCLCa* 的功能是调节硝酸盐在液泡中的累积。*AtCLCa* 的表达是受 NO_3 诱导上调的[28],而另一个可能调节植物硝酸盐累积的基因 *AtCLC-c* 的表达是受 NO_3^- 抑制的[29]。我们发现,W312其 *ZmCLC* 表达比478弱,这从反面证明,玉米478可能比W312具有更强的液泡内运输 NO_3^- 的潜力,它体内

的硝酸盐含量低，是由于氮同化速率较高，大量的硝酸盐被转化为氨基酸。在缺氮条件下，478 的 *ZmCLC* 表达显著增强，很可能是其液泡内硝酸盐含量较低所产生的反馈调节结果。

从农学角度来看，W312 低硝酸盐同化能力和高硝酸盐累积的生理特性可能并不适合作物高产的目标。但是从生态学的角度分析，W312 低氮同化能力和高硝酸盐累积的生理特性可能有助于其在氮素极其缺乏的环境下存活。为了验证这个假设，我们将这个两个玉米基因型培养在砂培系统中进行长期的缺氮处理。结果看出，尽管缺氮条件下两个基因型的根系都没有明显变化（图 5），但 478 的地上部生长明显受到抑制，导致 478 的根冠比显著增加（图 5 B），老叶出现明显的缺 N 黄化症状。而缺氮处理的 W312 地上生物量变化较小，叶片氮素营养状况没有受到严重影响。因此，W312 所具有的高硝酸盐累积能力，对于适应长期持续的低氮环境是一种优势。相反，478 的氮同化能力较强，根系对低氮反应强烈的特点，可能更适于其在短期或中等程度的低氮条件下高效吸收利用氮素。这与 Quaggiotti 等[30] 试验结果有相同之处，他们发现低氮适应性玉米基因型地上部的硝酸盐累积量要高于高氮适应性的基因型。

综上所述，低生长速率的玉米基因型通过降低氮素同化速率及根系对低氮的可塑性反应，使体内硝酸盐累积较多，这有利于其应对持续的低氮胁迫，完成生活周期，但可能难以获得较高的生物量和产量。相反，氮高效品种具有较强的氮素同化能力，根系对低氮有强烈的适应性反应，在中度缺氮的条件下，这一特征有利于其获取土壤中潜在的氮素资源，从而可能达到较高的产量。如果能增加氮高效品种植株体内的硝酸盐累积能力，并使这些累积的硝酸盐用于后期子粒生长所需，可能是进一步提高玉米氮效率的生理途径之一。

参 考 文 献：

[1] Gregory P. Plant roots：growth, activity and interaction with soils [M]. Oxford, UK：Blackwell Publishing, 2006.

[2] Fitter A H, Hay R K. Environmental physiology of plants [M]. San Diego, USA：Academic Press, 2002. 74–130.

[3] Hodge A. The plastic plant：root responses to heterogeneous supplies of nutrients[J]. New Phytol., 2004, 162：9–24.

[4] Forde B G, Clarkson D T. Nitrate and ammonium nutrition of plants：Physiological and molecular perspectives [J]. Adv. Bot. Res., 1999, 30：1–90 .

[5] Glass A D M. Nitrogen use efficiency of crop plants：physiological constraints upon nitrogen absorption [J]. Crit. Rev. Plant. Sci., 2003, 33：1–18.

[6] Lejay L, Tillard P, Lepetit M *et al*. Molecular and functional regulation of two NO_3^- uptake systems by N– and C– status of Arabidopsis plants [J]. Plant J., 1999, 18：509–519.

[7] Vidmar J J, Zhuo D, Siddiqi M Y *et al*. Regulation of high-affinity nitrate transporter genes and high-affinity nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley [J]. Plant Physiol., 2000, 123：307–318.

[8] Nazoa P, Vidmar J J, Tranbarger T J *et al*. Regulation of the nitrate transporter gene AtNRT2.1 in *Arabidopsis thaliana*：response to nitrate, amino acids and developmental stage [J]. Plant Mol. Biol., 2003, 52：689–703.

[9] Feil B, Thiraporn R, Geisler G, Stamp P. Root traits of maize seedlings-indicators of nitrogen efficiency？[J]. Plant Soil, 1990, 123：155–159.

[10] Imsande J, Touraine B. N demand and the regulation of nitrate uptake [J]. Plant Physiol., 1994, 105：3–7.

[11] Glass A D M, Brito D, Kaiser B *et al*. Nitrogen transport in plants, with an emphasis on the regulation of fluxes to match plant demand [J]. J. Plant Nutr. Soil Sci., 2001, 164：199–207.

[12] Eghball B, Maranville J W. Root development and nitrogen influx of corn genotypes grown under combined drought and N stress [J]. Agron. J., 1993, 85：147–152.

[13] Chun L, Mi G H, Li J *et al*. Genetic analysis of maize root characteristics in response to low nitrogen stress [J]. Plant Soil, 2005, 276：369–382.

[14] Linkohr B I, Williamson L C, Fitter A H, Leyser H M O. Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis* [J]. Plant J., 2002, 29：751–760.

[15] Scheible W R, Lauerer M, Schulze E D *et al*. Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco [J]. Plant J., 1997, 11：671–691.

[16] Drew M C. Comparison of the effects of a localized supply of phosphate, nitrate, ammonium and potassium on the growth of the seminal root system, and the shoot, in barley [J]. New Phytol., 1975, 75：479–490.

[17] Cooper H D, Clarkson D T. Cycling of amino-nitrogen and other nutrients between shoots and roots in cereals – A possible mechanism integrating shoot and root in the regulation of nutrient uptake [J]. J. Exp. Bot., 1989, 40：753–762.

[18] Aerts R, Chapin F S III. The mineral nutrition of wild plants revisited：A re-evaluation of processes and patterns [J]. Adv. Ecol. Res., 2000, 30：1–67.

[19] Chapin F S III. The ecology and economics of storage in plants [J]. Ann. Rev. Ecol. Sys., 1990, 21：423–447.

[20] Chapin F S, Follett J M, O'Connor K F. Growth phosphate absorption and phosphorus chemical fractions in two *Chionochloa* species [J]. J. Ecol., 1982, 70：305–321.

[21] Wang Y, Mi G H, Chen F J *et al*. Response of root morphology to nitrate supply and its contribution to nitrogen accumulation in maize

[J]. J. Plant Nutr., 2004. 27:2189-2202.

[22] Cataldo D A, Haroon M, Schrader L E, Youngs V L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid [J]. Comm. Soil Sci. Plant Anal., 1975, 6:71-80.

[23] Moore S, Stein W H. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids [J]. J. Biol. Chem., 1948, 176:376-381.

[24] Jaworski E G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues [J]. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1971, 43:1274-1279.

[25] Angeli A D, Monachello D, Ephritikhine G *et al*. The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles [J]. Nature, 2006, 442:939-942.

[26] Valladares F, Gianoli E, Gomez J M. Ecological limits to plant phenotypic plasticity [J]. New Phytol, 2007, 176:749-763.

[27] Fitter A H, Hay R K. Mineral nutrient A. Environmental physiology of plants [M]. San Diego, USA:Academic Press, 1987. 65-120.

[28] Geelen D, Lurin C, Bouchez D *et al*. Disruption of putative anion channel gene *AtCLC-a* in *Arabidopsis* suggests a role in the regulation of nitrate content [J]. Plant J., 2000, 21:259-267.

[29] Harada H, Kuromori T, Hirayama T *et al*. Quantitative trait loci analysis of nitrate storage in *Arabidopsis* leading to an investigation of the contribution of the anion channel gene, *AtCLC - c*, to variation in nitrate levels [J]. J. Exp. Bot., 2004, 55:2005-2014.

[30] Quaggiott S, Ruperti B, Borsa P *et al*. Expression of a putative high-affinity NO_3^- transporter and of an H^+ - ATPase in relation to whole plant nitrate transport physiology in two maize genotypes differently responsive to low nitrogen availability [J]. J. Exp. Bot., 2003, 54:1023-1031.