

NH₄⁺ 的吸收对水稻根系细胞膜电位的影响

尹晓明, 范晓荣, 贾莉君, 曹云, 沈其荣*
(南京农业大学资源与环境科学学院, 江苏南京 210095)

摘要: 利用微电极技术分别测定了 2 个水稻品种即武育梗 3 号(粳稻)和扬稻 6 号(籼稻)幼苗根尖细胞在吸收不同 NH₄⁺ 浓度(0.025、0.05、0.1、0.5、1.0 和 1.5 mmol/L)下膜电位的变化特征。结果表明,水稻根系吸收 NH₄⁺ 引起膜的去极化,去极化到一定程度出现部分复极化,有一小部分根系还有超极化现象。去极化大小随外界处理液中 NH₄⁺ 浓度的增加而加强,达到一定程度以后趋于平稳,吸收进程符合 Michaelis - Menten 动力学特征。两个品种产生的去极化程度不同,武育梗 3 号产生的去极化大小平均为 16.5 mV,扬稻 6 号产生的去极化大小平均为 22.6 mV。在低浓度 NH₄⁺ (<1.0 mmol/L)处理下,扬稻 6 号对 NH₄⁺ 较敏感,产生的去极化大小平均为 17.5 mV,高于武育梗 3 号(去极化大小平均为 10.9 mV),两个品种产生的去极化大小差异显著(p<0.05)。研究结果表明,扬稻 6 号吸收 NH₄⁺ 的能力比武育梗 3 号强,这与吸收动力学的结果是一致的。

关键词: 微电极; 水稻根系; NH₄⁺ 浓度; 膜电位

中图分类号: S511.01 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-505X(2005)06-0769-05

Effects of ammonium uptake on the changes of plasma membrane potential of rice roots

YIN Xiao-ming, FAN Xiao-rong, JIA Li-jun, CAO Yun, SHEN Qi-rong*
(College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Changes of the plasma membrane potential on root tips of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars, i.e., Wuyujing 3 (Japonica) and Yangdao 6 (Indica) were monitored using microelectrodes under different concentrations of NH₄⁺ (0.025, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 and 1.5 mmol/L). The results were as follows: NH₄⁺ uptake by the roots made plasma membrane potential depolarized; however, depolarization to the certain degree, it appeared the partial repolarization and hyperpolarization in some parts of rice roots during the absorption of NH₄⁺. The magnitude of depolarization increased with the increasing of NH₄⁺ concentrations until a stable state. The course of NH₄⁺ uptake process conformed to Michaelis-Menten kinetics. The two rice cultivars had different depolarization modes in which the average values depolarized were 16.5 mV (Wuyujing3) and 22.6mV (Yangdao 6). Under low concentration of NH₄⁺ (<1mmol/L), with its higher average level of depolarization(17.5mV), Yangdao 6 was more sensitive to NH₄⁺ being higher compared to Wuyujing 3 (10.7 mV), and there existed a significant difference in the size of depolarization between these two cultivars (p<0.05). This suggested that Yangdao 6 had the stronger capability to take up NH₄⁺ than Wuyujing 3. The results obtained in this experiment were consistent with those of kinetics of NH₄⁺ influx.

Key words: microelectrodes; rice roots; NH₄⁺ concentration; membrane potential

膜电位是养分离子跨膜运输的动力,当外界带正电荷的养分离子进入细胞内时就会引起膜电位的去极化。细胞膜去极化水平一定程度地反映了细胞膜上特异转运蛋白的活性;也反映了不同作物吸收

收稿日期: 2004-11-26 修改稿收到日期: 2005-03-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(30270790,30390082)资助。

作者简介: 尹晓明(1970—),女,安徽阜阳人,硕士,助理研究员,主要从事植物营养生理方面的研究。* 通讯作者

养分离子的特征和差异。而微电极能快速测定活体植物细胞膜电位和细胞内的特定离子活度,是研究植物对养分离子的吸收及跨膜转运机制比较理想的方法^[1]。Glass 等^[2]人的研究表明,大麦根系吸收 NO_3^- 引起细胞膜的去极化且与外界 NO_3^- 浓度紧密相关; McClure 等^[3]对玉米的研究表明,根系吸收 NO_3^- 引起膜的去极化进而超级化,超级化大小依赖于外界 NO_3^- 浓度。Wang 等^[4]研究了不同 NH_4^+ 浓度培养条件下水稻幼苗根系对外界 NH_4^+ 的响应特征,结果表明,根系吸收 NH_4^+ 使细胞膜去极化,去极化水平与根系对 NH_4^+ 的吸收呈明显线性相关并表现为两个阶段,即:根系对低浓度 NH_4^+ (小于 1.0 mmol/L) 的吸收主要通过高亲和系统(HATS),对高浓度 NH_4^+ 的吸收(大于 1.0 mmol/L)主要通过低亲和系统(LATS),吸收进程符合 Michaelis - Menten 动力学特征。

NH_4^+ 是水稻可利用的重要氮源之一。其研究方法常见的有吸收动力学方法、同位素标记法、核磁共振法等。而从细胞膜电位角度研究水稻对 NH_4^+ 的吸收特点国内至今还没有相关报道。因此,本实验运用微电极方法(单电极)比较不同水稻品种根系吸收 NH_4^+ 过程中细胞膜电位的变化特征以及它们吸收 NH_4^+ 能力的差异,旨在为研究水稻吸收 NH_4^+ 的生理机制提供依据,为研究不同水稻品种吸收 NH_4^+ 的基因型差异提供电生理基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验选取 2 个水稻品种,分别为粳稻(武育粳 3 号)和籼稻(扬稻 6 号)。水稻种子经 3% H_2O_2 消毒 30 min,蒸馏水洗净后放入培养箱(37℃),出芽后转入光照培养箱,在蒸馏水中生长 5~6d 后转移到含 0.1 mmol/L NH_4NO_3 的营养液(国际水稻所常规营养液)中生长 2 周,营养液每天更换 2 次。

1.2 膜电位的测定方法

单孔玻璃毛细管(含硼硅酸盐,外径 1.0 mm,内径 0.58 mm)由电极制作仪(PE-21 型,日本产)加工成微电极,电极成细针状,针头直径约 0.5 μm ,然后灌入 0.1 mol/L KCl 即可使用。测定方法:选择健康幼嫩的根固定在透明玻璃槽内,在显微镜下借助微操纵仪轻轻将电极靠近根,小心将微电极垂直插入根细胞内(插入部位距离根尖 1~2 cm),当水稻根在缓冲液(Basic solution 组成为: Mes 5 mmol/L、

CaSO_4 0.5 mmol/L、KCl 0.05 mmol/L, pH 5.94)中的膜电位平稳以后将槽内缓冲液用输液管分别替换为 0.0125 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Basic solution、0.025 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Basic solution、0.05 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Basic solution、0.25 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Basic solution、0.5 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Basic solution 及 0.75 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Basic solution,记录膜电位的变化。在实验中,为了避免处理液中 CaSO_4 对膜电位的影响,处理前将 Basic solution 中 CaSO_4 浓度调节到与处理液相同,每个品种每个处理浓度分别用不同的根重复 5 次以上。

2 结果与分析

2.1 水稻幼苗根系吸收以后 NH_4^+ 引起细胞膜电位的去极化和部分复极化

水稻根系吸收 NH_4^+ 速度很快,在加入 NH_4^+ 后约 1~2min 左右根系细胞膜电位即开始去极化,几分钟后便达到最大值(图 1、图 2)。去极化到一定程度以后部分复极化,水稻吸收 NH_4^+ 以后细胞膜电位变化的这种特征与前人的研究结果基本一致^[4]。Higinbotham 等人^[5]的研究表明, SO_4^{2-} 离子对细胞膜电位影响较小,Wang 等人^[4]用等浓度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 与 NH_4Cl 处理水稻根,两者几乎产生相同的去极化大小。虽然其他离子也影响膜电位,但是处理前后其浓度是保持不变的,只存在 NH_4^+ 的差异,膜电位产生了相对变化主要是根吸收了 NH_4^+ 所致。因此,本实验中 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 处理水稻根使细胞膜电位去极化,主要是因为根系吸收了 NH_4^+ 。根系吸收 NH_4^+ 引起膜电位去极化的大小随外界处理液中 NH_4^+ 的浓度的增大而不断升高,但是两个品种产生的去极化程度不同,扬稻 6 号产生的平均去极化大小(为 22.6 mV)高于武育粳 3 号(为 16.5 mV),在小于 1.5 mmol/L NH_4^+ 处理下,两个品种产生的去极化大小差异显著($p < 0.05$),当浓度为 1.5 mmol/L NH_4^+ 时,差异不显著,说明在高浓度下根对 NH_4^+ 的吸收可能已经饱和。两个品种的根吸收不同浓度 NH_4^+ 产生的去极化值比较见表 1。

在低浓度 NH_4^+ 处理下(< 1.0 mmol/L),两个品种对 NH_4^+ 敏感程度不同,产生的去极化大小也不同(图 1),当根吸收 0.05 mmol/L NH_4^+ 时,扬稻 6 号对 NH_4^+ 更敏感,很快产生去极化且去极化水平较高(图 1b),这表明扬稻 6 号对外界低 NH_4^+ 浓度较敏感,对 NH_4^+ 吸收能力更强;在高浓度 NH_4^+ 处理下

(>1 mmol/L),两个品种对 NH_4^+ 处理的响应都快,区别在于去极化程度不同(图2),扬稻6号产生的去极化大小平均为33 mV,而武育梗3号产生的去极化大小平均为27.1 mV。因此,扬稻6号对外

界低 NH_4^+ 浓度比较敏感,并且在相同浓度的 NH_4^+ 处理下细胞膜去极化程度大于武育梗3号,这说明扬稻6号对 NH_4^+ 的吸收能力更强。这与张亚丽等人所做的吸收动力学的结果是一致的^[6-7]。

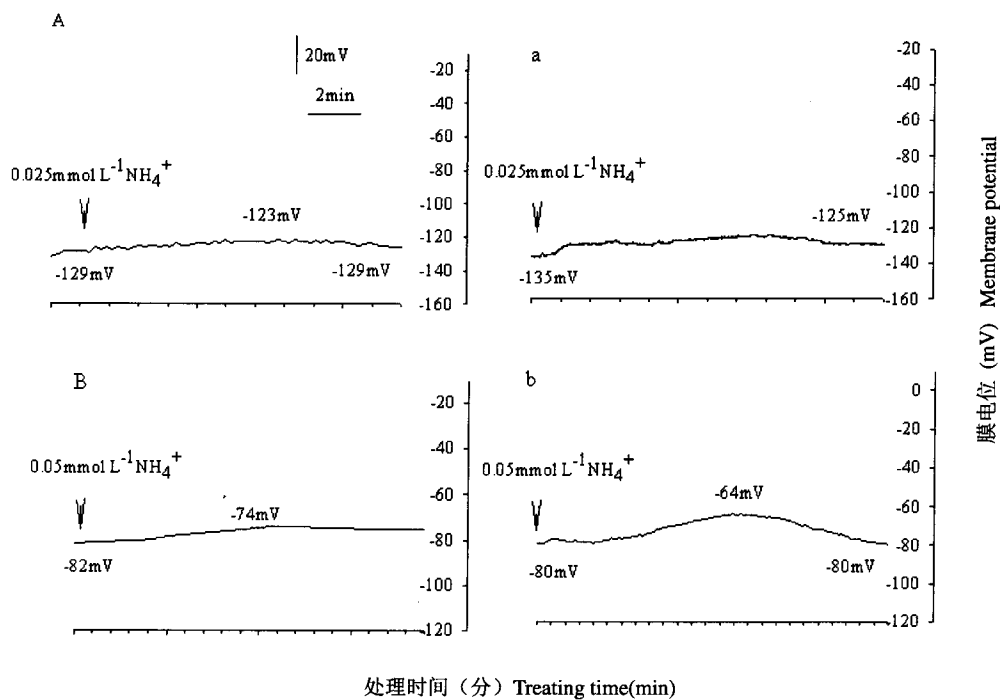


图1 两个水稻品种根在低浓度 NH_4^+ 处理下产生的去极化和复极化

Fig.1 Depolarization and repolarization patterns at low NH_4^+ concentration in roots of two rice cultivars
(A,B: 武育梗3号 Wuyujing3; a,b: 扬稻6号 Yangdao 6)

表1 2个水稻品种根吸收不同浓度 NH_4^+ 产生的去极化大小

品种 Cultivars	NH ₄ ⁺ 浓度 NH ₄ ⁺ concentration (mmol/L)					
	0.025	0.05	0.1	0.5	1.0	1.5
武育梗3号 Wuyujing 3	5.2 ± 0.4 a	8.5 ± 2.4 a	13.7 ± 2.1a	16.0 ± 6.2 a	24.3 ± 9.2 a	31.0 ± 9.6 a
扬稻6号 Yangdao 6	9.2 ± 2.3 b	15.0 ± 4.7 b	20.2 ± 4.1b	25.4 ± 8.9 b	31.3 ± 14.3b	34.6 ± 9.2 a

注:表中数据为5个重复的平均值,不同字母表示差异达5%显著水平,下同。
Note: Each value was the average of five replicates. Different letters mean significant at 5% level, same as follows.

水稻根系吸收 NH_4^+ 以后先去极化,然后部分复极化(图2),只有当处理液中的 NH_4^+ 被不断洗去以后缓慢地出现完全复极化。但是作者发现,在低浓度如0.025 mmol/L NH_4^+ 处理下,两个品种均出现完全复极化;在0.05 mmol/L NH_4^+ 处理下扬稻6号出现完全复极化(图1A,b)。这与水稻对低浓度0.1 mmol/L NO_3^- 处理膜电位完全复极化的情况类似(待发表资料)。而Wang等^[4]对水稻的研究结果表

明,无论用低浓度还是高浓度 NH_4^+ 处理根系,只有当处理液中的 NH_4^+ 被不断洗去以后才出现完全复极化;Zhou等^[8]通过对非洲爪蟾卵母细胞硝酸盐运输蛋白的研究认为,细胞膜电位的复极化与质子泵活力有关,当质子泵活性被抑制时,不会出现细胞膜电位的复极化。但是,细胞膜电位是否复极化,以及质子泵活力与膜电位变化之间的关系等问题还需作进一步研究。

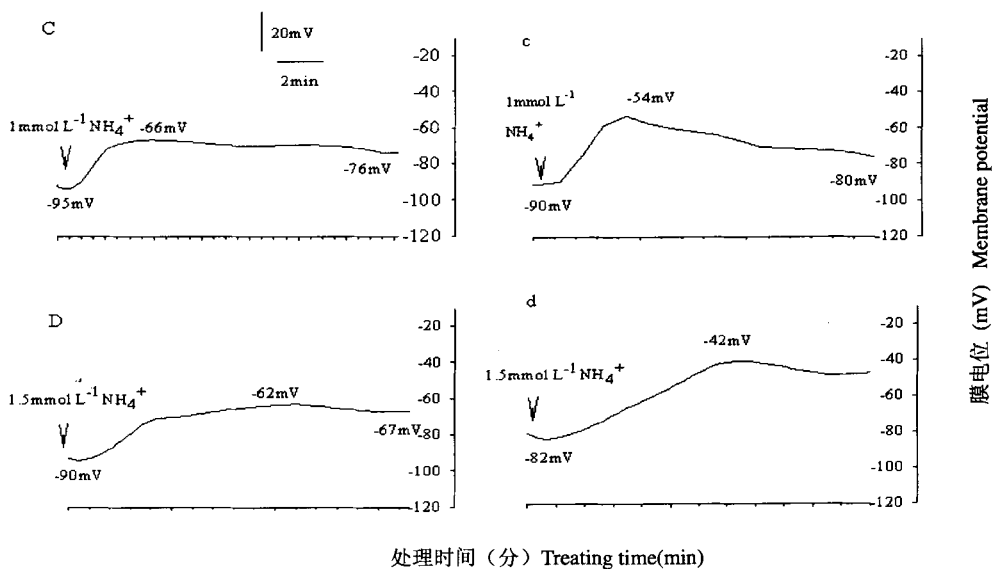


图 2 两个水稻品种根在高浓度 NH_4^+ 处理下产生的去极化和复极化
Fig.2 Depolarization and repolarization patterns at high NH_4^+ concentration in roots of two rice cultivars
(C,D: 武育梗 3 号 Wuyujing 3; c,d: 扬稻 6 号 Yangdao 6)

2.2 水稻根系吸收 NH_4^+ 以后产生超极化现象

超极化即膜电位变得比极化时更负的现象。本实验发现,两个品种都有一小部分根系吸收 NH_4^+ 以后产生超极化反应,它与外界 NH_4^+ 浓度无明显关系,其表现方式有两种(如图 3 所示扬稻 6 号根产生的超极化):一是根系吸收 NH_4^+ 以后只产生超极化;另一种是膜电位先去极化然后超极化,这种反

应与玉米^[3]及水稻(待发表资料)吸收 NO_3^- 的膜电位变化类似。Ulrich 等^[9]认为,超极化由于是质子泵的被激活,而 Thibaud 等^[10]认为,玉米的超极化是 NO_3^- 运输蛋白在起作用。为什么根系吸收 NO_3^- 和 NH_4^+ 都会有超极化现象,超极化产生的原因究竟为何,及其与 NO_3^- 、 NH_4^+ 浓度之间的关系等问题目前还不清楚。

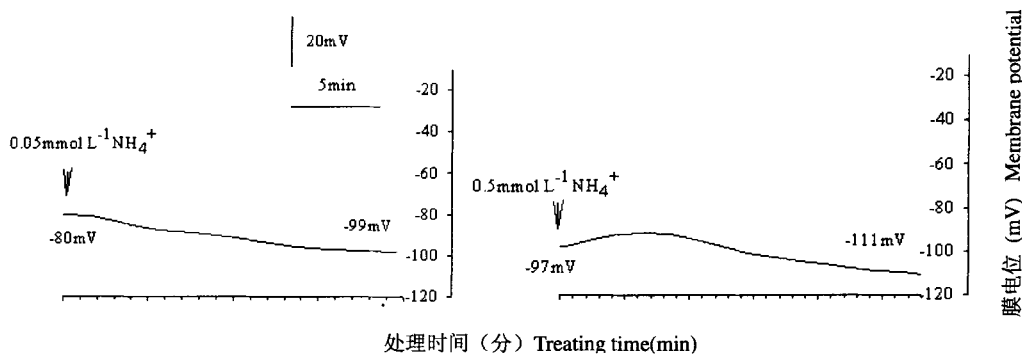


图 3 水稻幼苗根系吸收 NH_4^+ 产生的超极化反应
Fig.3 Hyperpolarization patterns in roots of rice seedling treated with ammonium

2.3 水稻幼苗根系吸收 NH_4^+ 以后细胞膜电位去极化的进程符合 Michaelis - Menten 动力学

水稻根系吸收 NH_4^+ 产生细胞膜电位的去极化大小随外界处理液中 NH_4^+ 的浓度的增大而不断升高,这说明水稻根系吸收 NH_4^+ 同吸收 NO_3^- 一样也

是借助于低亲和系统(LATS)和高亲和系统(HATS)。在用 $1.5 \text{ mmol/L NH}_4^+$ 处理根系时去极化基本达到最高峰(表 1 及图 2),但是当外界 NH_4^+ 浓度超过 $1.5 \text{ mmol/L NH}_4^+$ 以后,去极化幅度相对来说变化不大并且还有下降的趋势(资料未显示)。Ulrich 等^[9]

用浮萍所做的结果表明,当外界 NH_4^+ 浓度在 0.2 ~ 1.0 mmol/L 时,细胞膜电位没有随 NH_4^+ 浓度的升高而进一步去极化;而 Wang 等^[4]则发现, NH_4^+ 浓度在 0.002 ~ 40 mmol/L 时,水稻根细胞膜电位随 NH_4^+ 浓度的升高而不断去极化,出现这些不同,其原因除了物种的差别之外,细胞膜电位去极化可能与培养条件中 NH_4^+ 浓度不同有关。从膜电位去极化的趋势看,膜去极化的进程符合 Michaelis - Menten 动力学(图 4)。武育梗 3 号和扬稻 6 号动力学参数分别为: $K_m = 0.151$ mmol/L 和 0.103 mmol/L;而段英华等^[7]用吸收动力学所做的结果为 0.199 mmol/L 和 0.189 mmol/L,最大去极化(相当于最大吸收速率 $V_{\max}$)为 34.4 mV 和 37.3 mV。两个品种的最大去极化值与 Wang 等^[4]用水稻(0.1 mmol/L NH_4^+ 培养)所做的结果,即最大去极化为 34.3 mV 基本一致,但是却低于用 0.002 mmol/L NH_4^+ 培养水稻所做的结果即最大去极化为 50.6 mV。此外,两个品种的 K_m 值都低于用吸收动力学所做的结果;Wang 等^[4]用水稻以及 Ulrich 等^[9]用浮萍所做的结果也出现类似情况,其主要原因可能是膜电位的去极化反映了根系对离子的净吸收^[4]。

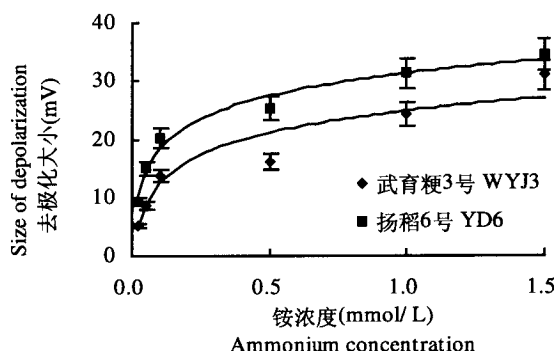


图 4 水稻根系吸收 NH_4^+ 与膜电位去极化的关系

Fig.4 The relationship between $\Delta\Psi$ depolarization and the uptake of different $[\text{NH}_4^+]$ in rice roots

3 小结

水稻幼苗根系吸收 NH_4^+ 以后产生细胞膜电位的去极化和部分复极化,还有小部分出现超极化。在一定浓度范围内,膜电位的去极化随外界 NH_4^+ 浓度的升高而增大,根系吸收不同浓度的 NH_4^+ 而使膜

电位去极化的进程符合 Michaelis - Menten 动力学。在小于 1.0 mmol/L NH_4^+ 处理条件下,两个水稻品种产生的去极化大小差异显著,反映了品种间吸收 NH_4^+ 能力的差异。扬稻 6 号对低浓度 NH_4^+ 处理相对比较敏感,产生的去极化水平高于武育梗 3 号,表明扬稻 6 号对 NH_4^+ 亲和力比武育梗 3 号高;在高浓度 NH_4^+ 处理下,扬稻 6 号产生的去极化水平也高于武育梗 3 号,这说明两个品种有着不同的吸收 NH_4^+ 的生理机制。总之,本文实验结果表明扬稻 6 号吸收 NH_4^+ 能力比武育梗 3 号强,这与吸收动力学的结果是一致的。

参考文献:

- [1] Miller A J, Smis J S, Cookson S J. The use of microelectrodes to investigate compartmentation and the transport of metabolized inorganic ions in plants [J]. Journal of Experiment Botany, 2001, 52: 541-5496.
- [2] Glass A D M, Jon E S, Leon V K. Studies of the uptake of nitrate in barley [J]. Plant Physiol., 1992, 99: 456-463.
- [3] McClure P R, Kochian L V, Spanswick R M. Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots [J]. Plant Physiol., 1990, 93: 281-2894.
- [4] Wang M Y, Glass A D M, Shaff J E *et al.* Ammonium uptake by rice roots [J]. Plant Physiol., 1994, 104: 899-906.
- [5] Higinbotham N, Etherton B, Foster R J. Effect of external K, NH_4^+ , Na, Ca, Mg and H ions on the cell transmembrane electropotential of Avena Coleoptile [J]. Plant Physiol., 1964, 39: 196-203.
- [6] 张亚丽,董园园,沈其荣. 不同水稻品种对铵态氮和硝态氮吸收特性的研究[J]. 土壤学报, 2004, 41(4): 571-576.
Zhang Y L, Dong Y Y, Shen Q R. Characteristics of NH_4^+ and NO_3^- uptake by rice of different genotypes [J]. Acta Pedologica Sinica, 2004, 41(4): 571-576.
- [7] 段英华,张亚丽,沈其荣. 增硝营养对不同基因型水稻吸收利用铵的影响[J]. 土壤学报, 2004, 41(5): 803-809.
Duan Y H, Zhang Y L, Shen Q R. Effect of nitrate on the ammonium uptake and growth of different genotypes of rice (*Oryza sativa*) at the seedling stage [J]. Acta Pedologica Sinica, 2005, 41(5): 803-809.
- [8] Zhou J J, Theodoulou F L, Muldin I *et al.* Cloning and functional characterization of a Brassicanapus transporter which is able to transport nitrate nitrate and histidine [J]. J. of Biol. Chem., 1998, 273: 12017-12033.
- [9] Ullrich W R, Novacky A. Nitrate-depentent membrane potential changes and their induction in Lemna gibba [J]. Plant Sci. Lett., 1981, 22: 211-217.
- [10] Thibaud J B, Grignon C. Mechanism of nitrate uptake in corn roots [J]. Plant Sci. Lett., 1981. 22: 279-289.