

水稻根尖细胞原生质膜表面电势对不同氮形态、铝和 pH 的响应^①

王伟^{1,2}, 宋文峰^{1,2}, 赵学强¹, 沈仁芳^{1*}

(1 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008; 2 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 相对于 NO_3^- -N, NH_4^+ -N 可以缓解植物铝毒害, 但其机制还不清楚。铝在细胞膜表面的吸附量受细胞膜表面电势影响, 直接影响到铝毒害。本文采用酶解法提取水稻根尖原生质体, 研究了原生质膜表面 ζ 电势对 NH_4^+ -N、 NO_3^- -N、铝和 pH 的响应。结果表明, 不管是否加铝, NH_4^+ -N 和 NO_3^- -N 本身并不显著影响原生质膜表面 ζ 电势, 但是加铝和降低 pH 均可以去极化原生质膜表面 ζ 电势。水稻吸收 NH_4^+ -N 一般降低生长介质 pH, 吸收 NO_3^- -N 升高生长介质 pH。因此, NH_4^+ -N 缓解水稻铝毒的原因, 不是因为 NH_4^+ -N 本身去极化了细胞膜表面电势, 而是因为水稻吸收 NH_4^+ -N 降低了介质 pH, 去极化了细胞膜表面电势, 从而可能降低了铝在水稻根尖表面的吸附。

关键词: 水稻; 膜电势; pH; 铵态氮; 硝态氮

中图分类号: Q945

酸性土壤面积约占我国土地总面积的 22.7%, 铝毒是酸性土壤限制植物生长的主要因子^[1]。过去 20 年间, 对植物铝毒害和耐铝机制的研究取得了很大进展^[2-3]。利用遗传和分子生物学手段, 已经从不同植物种类中分离和鉴定到十多种与植物铝耐性或毒害相关的基因。这些基因中有些与耐铝基因型差异有关, 有些则是其本身基本的耐铝基因^[4]。这些基因的分离和鉴定, 为通过分子辅助标记育种或基因工程, 提高植物耐铝能力, 提供了有力的支持和推动^[5]。

土壤是一个非常复杂的物理、化学和生物体系。在这个体系中, 各种因子之间存在复杂的相互作用, 这些相互作用对铝毒害有非常重要的影响。通过研究养分对铝毒害影响的机制, 可以指导农业生产过程中的施肥。比如施用石灰可以改善酸性土壤植物生长, 不仅是因为石灰提高了土壤 pH, 而且 Ca^{2+} 也可以缓解植物铝毒害^[6]。另外, 钙镁磷肥、硅肥以及硼肥施用等都可以在一定程度上缓解铝毒害^[7-9], 起到使作物稳产增产的效果。许多研究表明, 相对于 NO_3^- -N, NH_4^+ -N 能够缓解植物铝毒害^[10-15]。尽管如此, 对于 NH_4^+ -N 缓解植物铝毒的机制还不是特别清楚。

根细胞膜表面电势被认为是影响植物铝毒害产

生的一个重要指标, 前期研究发现 Al^{3+} 可以吸附在根尖细胞膜表面, 从而增加膜表面电势; Ca^{2+} 和其他阳离子如 Mg^{2+} 等也可以增加根尖细胞膜表面电势, 从而减少了 Al^{3+} 在膜表面的吸附, 缓解了铝毒害^[6, 16-17]。那么, NH_4^+ -N 缓解植物铝毒是不是因为 NH_4^+ -N 增加了细胞膜表面的电势? 另外, 植物吸收 NH_4^+ -N 和 NO_3^- -N 对生长介质 pH 有很大影响。因此, 本文通过研究根细胞膜表面 ζ 电势对不同氮形态、铝和 pH 变化的响应, 旨在探究 NH_4^+ -N 缓解铝毒害与细胞膜表面电势变化之间的关系。

1 材料与方法

1.1 试验材料与生长条件

试验材料选用水稻品种扬稻 6 号。选择饱满一致的水稻种子, 用 1%(v/v) 的次氯酸钠表面消毒 20 min, 然后用去离子水冲洗干净后, 用去离子水浸泡过夜。将浸泡后的种子置于湿润的滤纸上, 30℃ 避光催芽。催芽 1 天以后, 移于盛有 0.5 mmol/L CaCl_2 (pH 4.5) 溶液的聚乙烯塑料桶的塑料网上培养。先避光培养两天, 每天更换 CaCl_2 培养液, 所有试验均在恒温培养室中进行, 温度为 (25 ± 1)℃/10h 和 (30 ± 1)℃/14h 昼夜

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2014CB441000)、中国科学院战略性先导科技专项(XDB15030300)和国家自然科学基金项目(41230855)资助。

* 通讯作者(rfshen@issas.ac.cn)

作者简介: 王伟(1982—), 男, 陕西岐山人, 博士研究生, 主要从事植物适应酸性土壤的机理研究。E-mail: geo.weiwang@gmail.com

循环, 相对湿度为 $65\% \pm 1\%$ 。

1.2 根尖原生质体的提取

上述培养的两夭苗龄幼苗用于根尖原生质体的提取, 提取方法参考文献[18]。具体操作是: 用刀片将根尖 0 ~ 10 mm 切成 0.5 mm 小碎段, 操作过程使用新刀片, 避免对根产生压伤或因刀口老化对根有刮擦。最后将大约 3 g 左右的 0.5 mm 根段在 30 ml 含有 1.5% 纤维素酶 Onozuka RS-10(w/v)、0.75% 离析酶 (w/v)、0.6 mmol/L 甘露糖醇、10.0 mmol/L MES、1.0 mmol/L CaCl_2 、5.0 mmol/L β -巯基乙醇、0.1% 牛血清 (w/v) 中酶解 8 h, 酶解液 pH 调到 5.7。将酶解 8 h 的含有根尖的酶解液通过用 100 μm 细胞筛(BD Falcon, CA, U.S.A.)过滤。将得到的滤液在水平转子离心机以 200 g 离心 5 min。弃去沉淀, 上清液中的原生质体用 10 μm (Millipore, MA, U.S.A.)尼龙网过滤, 接着用 5 ml、pH 5.7 的含有 0.5 mol/L 甘露糖醇、4 mmol/L MES、20 mmol/L KCl 的洗液连续清洗 3 次后, 转移到 50 ml 离心管。用细胞壁计数器计算溶液中的原生体含量, 并在冰浴中保存待测。

1.3 根尖原生体表面电势的测定

测定前, 原生质体液和测试用溶液先在 25 $^{\circ}\text{C}$ 暖孵 1 h。吸取 150 μl 原生质体液后, 悬浮于含有不同铝浓度(2、5、10、15 和 20 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3)和不同 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (NH_4Cl)、 $\text{NO}_3^+\text{-N}$ (NaNO_3)浓度的测试溶液中。同时测定不同 pH(4.5、5.0、5.5、6.0 和 6.5)对根原生质体膜表面 ζ 的影响。所有测试液都含有 0.25 mmol/L CaCl_2 和 0.5 mol/L 甘露糖醇。根原生质体表面 ζ 电势测定使用 NanoBrook Zeta Plus ζ 电势分析仪 (Brookhaven Instruments, Holtsville, NY, U.S.A.)。

1.4 统计分析

所有进行单因素方差分析的数据都先检测其正态性及方差是否齐性。处理间多重比较采用 Duncan 多重比较检验, 显著性水平 $P=0.05$ 。所有分析都使用 SAS 9.1 软件 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 进行分析。

2 结果与分析

2.1 铝处理对原生质膜表面电势的影响

我们通过酶解法提取了水稻根尖 0 ~ 10 mm 原

生质体。如图 1 所示, 提取的原生质体饱满, 这些提取的原生质体用于随后的测定试验。

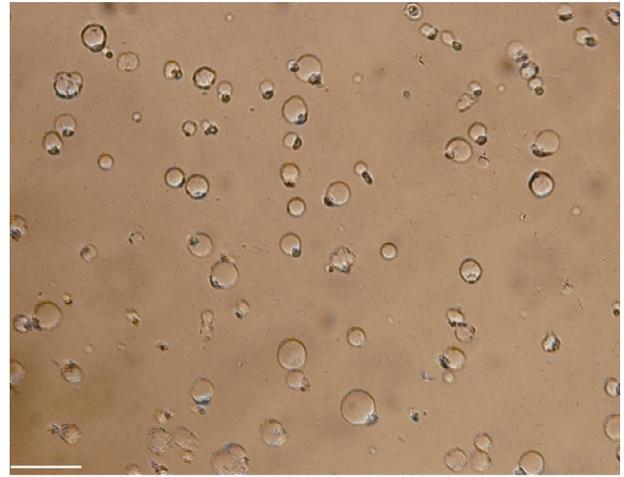


图 1 提取的原生质体显微照相(图中标尺为 50 μm)

Fig. 1 The isolated protoplasts

随着铝处理浓度的升高, 原生质膜表面 ζ 电势逐渐从铝处理浓度 2 $\mu\text{mol/L}$ 时的 -20.05 mV 升至 20 $\mu\text{mol/L}$ 时的 -18.03 mV(图 2), 表明铝提高了原生质膜表面 ζ 电势。对其去极化程度分析表明, 铝明显地去极化原生质膜表面 ζ 电势(表 1)。通过非线性方程拟合得到的方程中的系数为 1.35(图 2), 说明铝浓度升高与原生质膜表面 ζ 电势呈正比, 即加铝处理去极化了原生质体表面 ζ 电势。同时拟合的曲线 $R^2=0.98$ (图 2), 说明拟合所得到的方程可以很好地反映加铝处理对原生质膜表面 ζ 电势去极化的剂量效应过程。

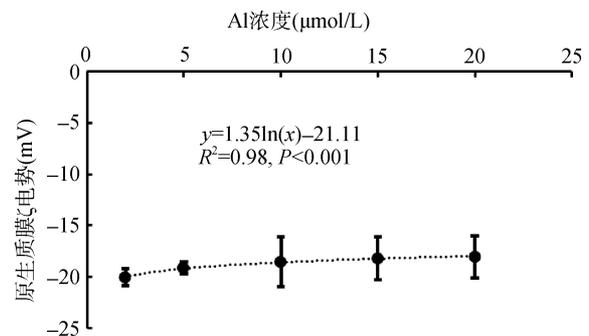


图 2 不同浓度铝对原生质膜 ζ 电势的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of Al on ζ potential at root protoplast membrane

表 1 不同浓度铝对水稻原生质膜产生的去极化
Table 1 Depolarization of rice protoplast exposed to different Al concentrations

Al 处理浓度($\mu\text{mol/L}$)	2	5	10	15	20
去极化程度	0.74 ± 0.8 b	1.68 ± 0.9 ab	2.26 ± 1.5 a	2.58 ± 0.7 a	2.75 ± 0.6 a

注: 表中数据小写字母不同表示差异显著($P<0.05$), 下表同。

2.2 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 对铝胁迫下原生质膜表面 ζ 电势的影响

结果表明,在不加铝的条件下,原生质膜表面 ζ 电势从 10 μmol/L NO₃⁻-N 和 NH₄⁺-N 时的 -20.79 mV 和 -20.13 mV,分别变化至 500 μmol/L 时的 -19.69 mV 和 -19.59 mV,表现出一定的去极化作用,但效果不明显(图 3)。在加铝条件下,10 μmol/L NO₃⁻-N 和 NH₄⁺-N 的原生质膜表面 ζ 电势分别为 -19.95 mV 和 -18.92 mV,较不加铝时有所提高,说明加铝对原生质膜表面 ζ 电势有一定的去极化作用(图 4)。加铝条件下,随着氮处理浓度升高,原生质膜表面 ζ 电势保持稳定,即使在 500 μmol/L NO₃⁻-N 和 NH₄⁺-N 时,膜表面 ζ 电势也分别保持在 -19.50 mV 和 -19.04 mV (图 4)。不管是否加铝, NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 之间膜表面 ζ 电势均没有显著差异(图 3、图 4)。

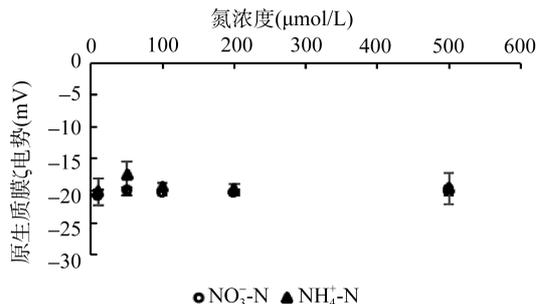


图 3 不同浓度 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 对原生质膜 ζ 电势的影响
Fig. 3 Effects of different concentrations of ammonium and nitrate on ζ potential at root protoplast membrane

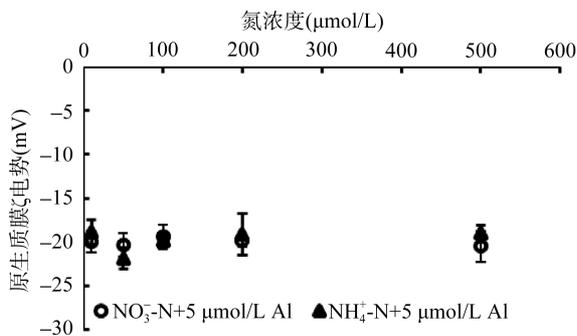


图 4 不同浓度 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 加铝对原生质膜 ζ 电势的影响
Fig. 4 Effects of different concentrations of ammonium and nitrate with addition of Al on ζ potential at root protoplast membrane

2.3 pH 对原生质膜表面 ζ 电势的影响

随着 pH 的升高,在 pH 4.5、5.5 及 6.5 时原生质膜表面 ζ 电势分别是 -20.52、-21.89 和 -23.50 mV,说明随 pH 升高使得原生质膜表面 ζ 电势趋向带更多负电荷(图 5)。对其去极化程度分析后发现 pH 升高显著超极化了原生质膜表面 ζ 电势(表 2)。通过非线性

性方程拟合得到的方程中的系数为 -7.43,说明 pH 升高与原生质体表面 ζ 电势成反比,pH 升高,原生质膜表面 ζ 电势变得更负,且拟合曲线 $R^2 = 0.96$,说明拟合所得到的方程可以很好反映 pH 变化对原生质膜表面 ζ 电势的影响(图 5)。

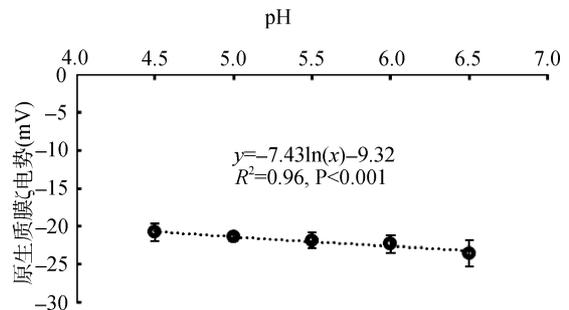


图 5 不同 pH 对原生质膜 ζ 电势的影响
Fig. 5 Effects of different pH on ζ potential at root protoplast membrane

表 2 不同 pH 对水稻原生质膜产生的去极化
Table 2 Depolarization of rice protoplast exposed to different pH

pH	5.0	5.5	6.0	6.5
去极化程度	-0.62 ± 0.5b	-1.05 ± 1.0 ab	-1.52 ± 1.15 ab	-2.72 ± 1.8 a

3 讨论

铝在根尖细胞膜表面的吸附被认为是铝毒害产生的机制之一,而细胞膜表面电势在这个过程中起重要作用^[6]。原生质膜 ζ 电势是紧接于膜表面约几微米滑动面的电势值,能较好地反映膜表面电势^[19]。本文结果表明铝可以明显地去极化细胞膜表面电势,这与之前的研究结果一致^[16-17]。铝对含氧基团的细胞膜表面具有极高的亲和力^[20],细胞膜表面电势的去极化可能是由于铝在细胞膜表面的吸附引起。铝吸附在细胞膜表面可能会有多种效应:通过信号途径影响根伸长,同时也影响营养元素的吸收;铝通过离子通道进入细胞,与核酸或 ATP 等结合影响细胞代谢;铝堵塞离子通道如 Ca²⁺、K⁺ 通道,影响细胞的信号传导^[21]。

虽然很多研究表明,相对于 NO₃⁻-N, NH₄⁺-N 能减轻植物铝毒害,但是该文结果表明 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 本身对原生质膜表面电势去极化程度不明显。这与之前采用非损伤技术测定的 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 对根表面电势的研究结果一致,去极化的原因可能与植物吸收 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 的过程有关,即吸收蛋白或质子泵^[22-23]。这些结果表明,本研究所设一定浓度的 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 其本身并不能改变原生质膜表面电势。

虽然 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 本身不能影响细胞表面电势,但是植物吸收 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 会引起根际 pH

的变化,即 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 降低生长介质 pH, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 升高介质 pH^[24-25]。因此本文研究了 pH 对原生质膜表面电势的影响。结果表明, pH 升高超极化原生质膜表面 ζ 电势,反之, pH 降低去极化细胞膜表面 ζ 电势。因此, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 引起的 pH 变化影响了细胞膜表面电势从而影响铝毒害。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 处理降低 pH, 去极化细胞膜表面电势,减少铝在细胞膜表面吸附,缓解铝毒害;反之, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 处理增加 pH, 超极化细胞膜表面,增加铝在细胞膜表面吸附,加重铝毒害。相关的研究结果也表明,低 pH 时引起细胞膜表面较低的负电势,可能减轻铝毒害,而较高 pH 5.0 左右时,加重铝毒害^[26], 本文的结果与此一致。

参考文献:

- [1] 沈仁芳. 铝在土壤-植物中的行为及植物的适应机制[M]. 北京: 科学出版社, 2008
- [2] Delhaize E, Ma JF, Ryan PR. Transcriptional regulation of aluminium tolerance genes[J]. Trends in Plant Science, 2012, 17(6): 341-348
- [3] Ma JF, Chen ZC, Shen RF. Molecular mechanisms of Al tolerance in gramineous plants[J]. Plant and Soil, 2014, 381(1-2): 1-12
- [4] Xia JX, Yamaji N, Che J, Shen RF, Ma JF. Differential expression of *Nrat1* is responsible for Al-tolerance QTL on chromosome 2 in rice[J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(15): 4 297-4 304
- [5] Ryan PR, Tyerman SD, Sasaki T, Furuichi T, Yamamoto Y, Zhang WH, Delhaize E. The identification of aluminium-resistance genes provides opportunities for enhancing crop production on acid soils[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(1): 9-20
- [6] Kinraide TB. Three mechanisms for the calcium alleviation of mineral toxicities[J]. Plant Physiology, 1998, 118(2): 513-520
- [7] Bose J, Babourina O, Rengel Z. Role of magnesium in alleviation of aluminium toxicity in plants[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(7): 2 251-2 264
- [8] Wang YX, Stass A, Horst WJ. Apoplastic binding of aluminum is involved in silicon-induced amelioration of aluminum toxicity in maize[J]. Plant Physiology, 2004, 136(3): 3 762-3 770
- [9] Yu M, Shen RF, Xiao HD, Xu MM, Wang HZ, Wang HY, Zeng QL, Bian JF. Boron alleviates aluminum toxicity in pea (*Pisum sativum*) [J]. Plant and Soil, 2009, 314(1-2): 87-98
- [10] Zhao XQ, Shen RF, Sun QB. Ammonium under solution culture alleviates aluminum toxicity in rice and reduces aluminum accumulation in roots compared with nitrate[J]. Plant and Soil, 2009, 315(1): 107-121
- [11] Zhao XQ, Guo SW, Shinmachi F, Sunairi M, Noguchi A, Hasegawa I, Shen RF. Aluminium tolerance in rice is antagonistic with nitrate preference and synergistic with ammonium preference[J]. Annals of Botany, 2013, 111(1): 69-77
- [12] Zhao XQ, Shen RF. Interactive regulation of nitrogen and aluminum in rice[J]. Plant Signaling and Behavior, 2013, 8(6): e24355
- [13] Chen ZC, Zhao XQ, Shen RF. The alleviating effect of ammonium on aluminum toxicity in *Lespedeza bicolor* results in decreased aluminum-induced malate secretion from roots compared with nitrate[J]. Plant and Soil, 2010, 337(1-2): 389-398
- [14] 张启明, 赵学强, 陈荣府, 董晓英, 沈仁芳. 铵态氮/硝态氮对水稻铝毒害的影响[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(5): 976-981
- [15] 张启明, 赵学强, 陈荣府, 董晓英, 沈仁芳. 铵态氮/硝态氮对水稻铝吸收的影响及其机制研究[J]. 土壤, 2011, 43(1): 26-31
- [16] Kinraide TB, Ryan PR, Kochian LV. $\text{Al}^{3+}\text{-Ca}^{2+}$ interactions in aluminum rhizotoxicity ii. Evaluating the Ca^{2+} -displacement hypothesis[J]. Planta, 1993, 192(1): 104-109
- [17] Kinraide TB, Ryan PR, Kochian LV. Interactive effects of Al^{3+} , H^+ , and other cations on root elongation considered in terms of cell-surface electrical potential[J]. Plant Physiology, 1992, 99(4): 1 461-1 468
- [18] Sheen J. Metabolic repression of transcription in higher plants[J]. The Plant Cell, 1990, 2(10): 1 027-1 038
- [19] Wang P, Zhou DM, Kinraide TB, Luo XS, Li LZ, Li DD, Zhang HL. Cell membrane surface potential (ψ_0^o) plays a dominant role in the phytotoxicity of copper and arsenate[J]. Plant Physiology, 2008, 148(4): 2 134-2 143
- [20] Yang JL, Zhu XF, Peng YX, Zheng C, Li GX, Liu Y, Shi YZ, Zheng SJ. Cell wall hemicellulose contributes significantly to aluminum adsorption and root growth in Arabidopsis[J]. Plant Physiology, 2011, 155(4): 1 885-1 892
- [21] Kochian LV, Piñeros MA, Hoekenga OA. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity[J]. Plant and Soil, 2005, 274(1): 175-195
- [22] 尹晓明, 范晓荣, 贾莉君, 曹云, 沈其荣. NH_4^+ 的吸收对水稻根系细胞膜电位的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2005(6): 63-67
- [23] 尹晓明, 范晓荣, 贾莉君, 沈其荣. 不同水稻品种根尖吸收 NO_3^- 过程中表皮细胞膜电位变化特征[J]. 土壤学报, 2005(2): 278-285
- [24] Mistrik I, Ultrich CI. Mechanism of anion uptake in plant roots: Quantitative evaluation of H^+/NO_3^- and $\text{H}^+/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ stoichiometries[M]. Paris, France: Elsevier, 1996
- [25] Wang MY, Siddiqi MY, Ruth TJ, Glass ADM. Ammonium uptake by rice roots (ii. Kinetics of $^{13}\text{NH}_4^+$ influx across the plasmalemma) [J]. Plant Physiology, 1993, 103(4): 1 259-1 267
- [26] Kobayashi Y, Kobayashi Y, Watanabe T, Shaff JE, Ohta H, Kochian LV, Wagatsuma T, Kinraide TB, Koyama H. Molecular and physiological analysis of Al^{3+} and H^+ rhizotoxicities at moderately acidic conditions[J]. Plant Physiology, 2013, 163(1): 180-192

Responses of *Zeta* Potential of Protoplast Membrane Isolated from Rice Root Tips to Ammonium, Nitrate, Aluminum and pH

WANG Wei^{1,2}, SONG Wen-feng^{1,2}, ZHAO Xue-qiang¹, SHEN Ren-fang^{1*}

(1 *State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture (Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences), Nanjing 210008, China*; 2 *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

Abstract: The phytotoxicity of aluminum ions to rice (*Oryza sativa*) can be alleviated by ammonium compared with nitrate. However, the exact mechanisms underlying this phenomenon are poorly understood. The membrane surface *zeta* () potential plays an important role in aluminum adsorption on plant roots and consequently affects aluminum toxicity. Here, the responses of membrane surface potential of isolated protoplasts from rice root tips to ammonium, nitrate, aluminum and pH were examined. It was shown that, ammonium and nitrate themselves did not change the membrane surface potential regardless of Al stress or not. However, both low pH and more Al could significantly depolarize membrane surface potential. Because ammonium could decrease but nitrate could increase medium pH, we concluded that the decreased medium pH induced by ammonium uptake by rice roots depolarized the membrane surface potential and thereby alleviated rice Al toxicity compared with nitrate.

Key words: Rice; Membrane surface potential; pH; Ammonium; Nitrate