

DOI: 10.13758/j.cnki.tr.2021.01.004

李祎, 杨顺瑛, 郝东利, 等. 利用 *gs1.1* 和 *gs1.2* 突变体研究外源蔗糖对高铵胁迫拟南芥碳氮代谢的影响. 土壤, 2021, 53(1): 21–29.

利用 *gs1.1* 和 *gs1.2* 突变体研究外源蔗糖对高铵胁迫拟南芥碳氮代谢的影响^①

李 祎^{1,2}, 杨顺瑛¹, 郝东利¹, 苏彦华^{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: 以拟南芥野生型 Col-0、谷氨酰胺合成酶敲除突变体 *gs1.1* 和 *gs1.2* 为实验材料, 采取土培试验, 比较正常培养液(4 mmol/L NH₄⁺)培养(CK)、正常培养液(4 mmol/L NH₄⁺)下外源添加 5% 蔗糖(T1)、高 NH₄⁺ 胁迫(20 mmol/L)(T2)以及高 NH₄⁺ 胁迫(20 mmol/L)下外源添加 5% 蔗糖(T3)对拟南芥各株系各生理指标的影响; 通过测定地上部分的鲜重、叶绿素、游离 NH₄⁺、可溶性糖、可溶性蛋白、谷氨酰胺合成酶(GS)、谷氨酸脱氢酶(GDH)、矿质元素含量等指标, 研究外源蔗糖对 NH₄⁺ 胁迫拟南芥碳氮代谢的影响。结果表明, 高 NH₄⁺ 胁迫下, 拟南芥生长受到严重的抑制, 鲜重、GS、GDH 酶活性降低, 游离 NH₄⁺ 含量、叶绿素含量、可溶性糖和可溶性蛋白含量增加, 植株的 N、P、K、Ca 的含量增加, Mg、Fe 的含量减少, 其中 *gs1.1* 和 *gs1.2* 在高 NH₄⁺ 处理下受到的抑制比 Col-0 更为显著。外源添加 5% 蔗糖显著缓解了高 NH₄⁺ 毒害, 提高了可溶性糖和可溶性蛋白含量, 提高了 GS 和 GDH 的活性, 降低了叶绿素和游离 NH₄⁺ 的含量, 提高了植株体内的 N、P、K、Ca, Mg 的含量, 降低了植株 Fe 的含量, 其中, 外源蔗糖对 *gs1.1* 和 *gs1.2* 高 NH₄⁺ 毒害的缓解更为显著。

关键词: 蔗糖; 高 NH₄⁺ 胁迫; 拟南芥; 碳代谢; 氮代谢

中图分类号: Q945.1 **文献标志码:** A

Effect of Exogenous Sucrose on Nitrogen and Carbon Metabolism of *Arabidopsis* Under High NH₄⁺ Stress Using *gs1.1* and *gs1.2* Mutants

LI Yi^{1,2}, YANG Shunying¹, HAO Dongli¹, SU Yanhua^{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: *Arabidopsis* wild type Col-0, glutamine synthetase knockout mutants *gs1.1* and *gs1.2* were used as experimental materials, pot experiments were conducted to compare the effects of normal culture solution (4 mmol/L NH₄⁺) (CK), the normal culture solution (4 mmol/L NH₄⁺) plus additional 5% sucrose (T1), high NH₄⁺ stress (20 mmol/L) (T2), and high NH₄⁺ stress plus additional 5% sucrose (T3) on physiological indexes of the three *Arabidopsis thaliana* lines. By measuring the fresh weight of the aerial part, chlorophyll, free NH₄⁺, soluble sugar, soluble protein, glutamine synthetase (GS), glutamate dehydrogenase (GDH), and mineral element contents, the effects of exogenous sucrose on carbon and nitrogen metabolism in *Arabidopsis thaliana* under high NH₄⁺ stress were preliminarily studied. The results demonstrated that *Arabidopsis* growth was severely inhibited under high NH₄⁺ stress. The fresh weight, the activities of GS and GDH decreased, while the contents of free NH₄⁺, chlorophyll, soluble sugar and soluble protein increased, the contents of N, P, K and Ca in the plant increased, and the contents of Mg and Fe decreased. The inhibitory effects of *gs1.1* and *gs1.2* mutants under high NH₄⁺ were more significant than the wild type. Exogenous addition of 5% sucrose significantly alleviated high NH₄⁺ toxicity, with increased soluble sugar and protein contents, and enhanced the activities of GS and GDH. The contents of chlorophyll and free NH₄⁺ were reduced. The contents of N, P, K, Ca and Mg in the plant were increased while the content of Fe was reduced. The exogenous sucrose is more significant in alleviation of high NH₄⁺ toxicity of

①基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFD0200100, 2017YFD0200103)和中国科学院南京土壤研究所“一三五”计划和领域前沿项目(ISSASIP1609)资助。

* 通讯作者(yhsu@issas.ac.cn)

作者简介: 李祎(1988—), 女, 江苏扬州人, 博士研究生, 主要从事植物铵吸收同化的分子机制及调控研究。E-mail: liyi@issas.ac.cn

gs1.1 and *gs1.2* than the wild type.

Key words: Sucrose; High NH_4^+ stress; *Arabidopsis thaliana*; Carbon metabolism; Nitrogen metabolism

碳氮代谢是植物最基本的代谢过程^[1]。氮代谢需要依赖碳代谢为其提供碳源和能量,碳代谢也需要氮代谢为其提供酶和光合色素。碳代谢和氮代谢需要共同的还原力、ATP 和碳骨架^[2],因此,两个代谢之间存在着竞争关系。碳氮代谢的平衡对植物碳氮营养的分配起着至关重要的影响^[3-4]。氮素主要通过 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 两种形式进入植株体内^[5-6],已有研究表明,植物优先利用 NH_4^+ ,但是,一旦植物吸收了过多的 NH_4^+ ,就会对植物的生长发育产生铵毒害^[7]。Harada 等^[8]研究发现:植物吸收过量 NH_4^+ 后将在植物体内造成游离铵的过量累积,从而引起植物的生长受到抑制。在高等植物中,谷氨酰胺合成酶(GS)则是 NH_4^+ 同化途径中的限速酶,对植物的生长发育和产量有直接的影响^[9]。在拟南芥中研究发现,拟南芥 *AtGS1;2* 缺陷突变体,植株的子叶氮转化再利用步骤受到抑制,从而导致子叶中游离氮积累,缺陷突变体长势受到阻碍^[10]。

蔗糖不仅仅是光合作用的主要产物之一,还可以作为信号分子参与植物的生长发育过程^[11],如作为信号分子调节拟南芥花青素的积累^[12];此外,蔗糖还可以提高植物的抗氧化能力^[13]。另外糖也能参与到植物氮同化酶的调节,可以促进离体植物叶片中硝酸还原酶(NR)在转录水平上的表达^[14];外源蔗糖还可以显著升高烟草叶片中谷氨酰胺合成酶(GS)的活性^[15]。除此之外,蔗糖还可以缓解植株在高盐胁迫下植株的生命活动。现在已经有报道,外源添加蔗糖可以增强小麦幼苗抗盐性^[16];外源添加蔗糖可以对盐胁迫下荞麦幼苗根系的生长有缓解作用^[17]。

本试验以拟南芥的谷氨酰胺合成酶相关基因的 T-DNA 突变体和野生型为材料。在高 NH_4^+ 胁迫下,通过外源添加蔗糖对谷氨酰胺合成酶的 T-DNA 缺陷体和野生型的碳氮代谢相关基因、酶活性进行研究,探索高 NH_4^+ 胁迫下,如何维持拟南芥的碳氮代谢平衡、为减轻 NH_4^+ 胁迫对作物的毒害作用提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana* Columbia)为本实验室保存(下文简称 Col-0)。GS 家族 T-DNA 插入突变体购自 ABRC(www.arabidopsis.org),CS721512(下文简称 *gs1.1*)和 Salk-003343C(下文简称 *gs1.2*)。

2Mix rTaq、RNAiso Plus 和 PrimeScriptTM RT 试剂盒以及 TaKaRa Ex Taq 购自宝生物工程(大连)有限公司。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。其他生化试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 培养方法

1.2.1 培养基培养 培养方法参考文献[18],光照培养箱的温度为 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$,光周期为 16 h 光照、8 h 黑暗,光照强度为 $100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。营养液成分根据 Yuan 等^[19]修改得:2 mmol/L NH_4NO_3 , 1 mmol/L KH_2PO_4 , 1 mmol/L MgSO_4 , 250 $\mu\text{mol}/\text{L}$ K_2SO_4 , 250 $\mu\text{mol}/\text{L}$ CaCl_2 , 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Na-Fe-EDTA, 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ KCl, 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H_3BO_3 , 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ MnSO_4 , 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ZnSO_4 , 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ CuSO_4 , 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Na_2MoO_4 , 1 mmol/L MES-KOH(2-吗啉已磺酸),1% (w/V) 蔗糖,0.8% (w/V) 琼脂, pH 5.7。纯合体拟南芥种子先用 10% 的次氯酸钠 (V/V) 和 0.1% (w/V) SDS 消毒 5 min,然后用灭菌水清洗干净 (5 次),置 4°C 低温避光保存 48 h,然后播种于培养基 (10 cm \times 10 cm),密封好。将培养皿直立地置于光照培养箱中,让根沿琼脂表面向下生长。

1.2.2 高 NH_4^+ 胁迫下外源添加蔗糖培养 在培养基生长 7 d 后,挑选长势一致的植株幼苗移植到泥炭土:蛭石:石英砂=3:3:1 的土培培养基中接着生长,土培培养基在用于生长前用清水漂洗,尽可能地除去里面所含有的营养物质。土培培养时所用光照强度同前文培养基生长,培养液配方也参照前文培养基配方,但是不含有蔗糖和琼脂,每周每组浇灌 1 L 培养液。等苗龄 21 d 后,分为 3 组,将培养液配方中 NH_4NO_3 更换为 NH_4Cl ,其余成分与之前培养液一致,具体处理方法如表 1。

1.3 试验方法

1.3.1 *gs1.1* 和 *gs1.2* 突变体纯合体鉴定 *gs1.1* 和 *gs1.2* 的基因名称及引物序列见表 2。

采用蔗糖法^[20-21]提取拟南芥基因组 DNA,随后进行 PCR 反应,PCR 所用引物序列如表 2。

反应体系如下:模板 DNA 1 μl ,正向引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)0.4 μl ,反向引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)0.4 μl , 2 \times Mix rTaq10 μl ,双蒸水 8.2 μl ,总体积 20 μl ,混匀后进行 PCR 反应。PCR 反应条件为: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 30 s, 60°C 退火 45 s, 72°C 延伸 90 s, 30 次循环;最后 72°C 延伸 10 min。PCR 产物利用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,所用的电泳缓冲溶液为 $1 \times$ TBE,电泳电压为 120 V。

表 1 试验设计
Table 1 Experiment design

处理	处理方法	用法用量	喷施时间
CK	常规营养液(4 mmol/L NH ₄ ⁺)	采用灌溉, 每次灌溉 1 L,	每周浇灌 1 次,
T1	常规培养液(4 mmol/L NH ₄ ⁺)+ 5% 蔗糖	将培养基充分浸湿	共计浇灌 4 次
T2	NH ₄ ⁺ 胁迫(20 mmol/L NH ₄ ⁺)+清水		
T3	NH ₄ ⁺ 胁迫(20 mmol/L NH ₄ ⁺)+ 5% 蔗糖		

表 2 拟南芥 T-DNA 突变体株系及引物序列
Table 2 *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant and primer sequences

基因名称	Salk 编号	引物序列(5'-3')
<i>At5g37600</i>	CS721512	TATCACGTCCTACTCGGATCGCAAGGATCCTTCCGTAGAGG
<i>At1g66200</i>	Salk-003343C	GAGAGTCTGCAGGCAACAACTGGGTTGAAGGTCTATTTTGTC
<i>LBb1</i>		ATAATAACGCTGCGGACATCTACATTT

利用 TaKaRa 的 RNAiso Plus 试剂提取拟南芥野生型与待检测 T-DNA 插入株系叶片的 RNA。用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计测定 RNA 的浓度。利用 Prime-Script TMII^{RT} 试剂盒进行 cDNA 合成。利用 *At5g37600* 基因的特异引物 *At5g37600*-F(5'-CATCAACCTTAACCTCTCAGACTCCA-3') 和 *At5g37600*-R(5'-GGTTTGGCCATCAGAATCG-3') 进行 RT-PCR 检测 *At5g37600* 的表达; 利用 *At1g66200* 基因的特异引物 *At1g66200*-F(5'-CATCAACCTTAACCTCTCAGACTCCA-3') 和 *At1g66200*-R(5'-GGTTTGGCCATCAGAATCG-3') 进行 RT-PCR 检测 *At1g66200* 的表达。ACTIN1 基因作为内参, ACTIN1 引物序列为 ACTIN1-F: 5'-ACACCAGACATAGTAGCAGAAATCAAG-3', ACTIN1-R: 5'-GAGCCTTACAACGCTACTCTGTCTGTC-3'。PCR 扩增条件: 94 °C 3 min; 94 °C 3 min, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 25 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

1.3.2 外源蔗糖对高 NH₄⁺ 胁迫下植株生理生化的影响 将外源添加蔗糖处理 4 周的拟南芥植株收样, 并测定其鲜重。参照文献[22-23]测定叶绿素含量; 采用蒽酮比色法测定可溶性糖含量; 采用考马斯亮蓝 G-250 染色法测定可溶性蛋白含量; 采用靛酚蓝比色法测定游离 NH₄⁺ 含量。每个处理重复 3 次, 计算平均值。

1.3.3 外源蔗糖对高 NH₄⁺ 胁迫下拟南芥植株的 GS 和 GDH 酶的影响 称取 0.2 g 鲜样叶片, 放入预冷的研钵中, 加入 1.5 ml 预冷的提取缓冲液, 添加少量石英砂在冰上研磨, 匀浆收集至 2.0 ml 离心管中, 4 °C, 16 000 g 离心 20 min。将上清液转移到新

的离心管中用于测定相关酶活性。提取缓冲液成分: 50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5), 10 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L 苯甲脒, 1 mmol/L ε-氨基乙酸和 10 μmol/L 亮抑酶肽。采用 Migge 等^[24]方法测定谷氨酰胺合成酶(GS)和谷氨酸脱氢酶(GDH)酶活性

1.3.4 外源蔗糖对高 NH₄⁺ 胁迫下拟南芥植株矿质元素的影响 用天平称量拟南芥地上部鲜重; 参照文献[23], 采用凯氏定氮法测定全氮; 采用 H₂SO₄-H₂O₂-钒钼黄比色法测定全磷含量; 采用 H₂SO₄-H₂O₂火焰原子吸收分光光度法测定全钾含量。采用干灰化-稀 HCl 溶解-火焰原子吸收分光光度法, 测定钙、镁、铁含量。

1.3.5 数据分析 采用 Microsoft Excel 2010 软件和 SPSS13.0 软件进行试验数据的统计和相关性分析, 采用 Duncan's 检验法进行显著性差异分析。

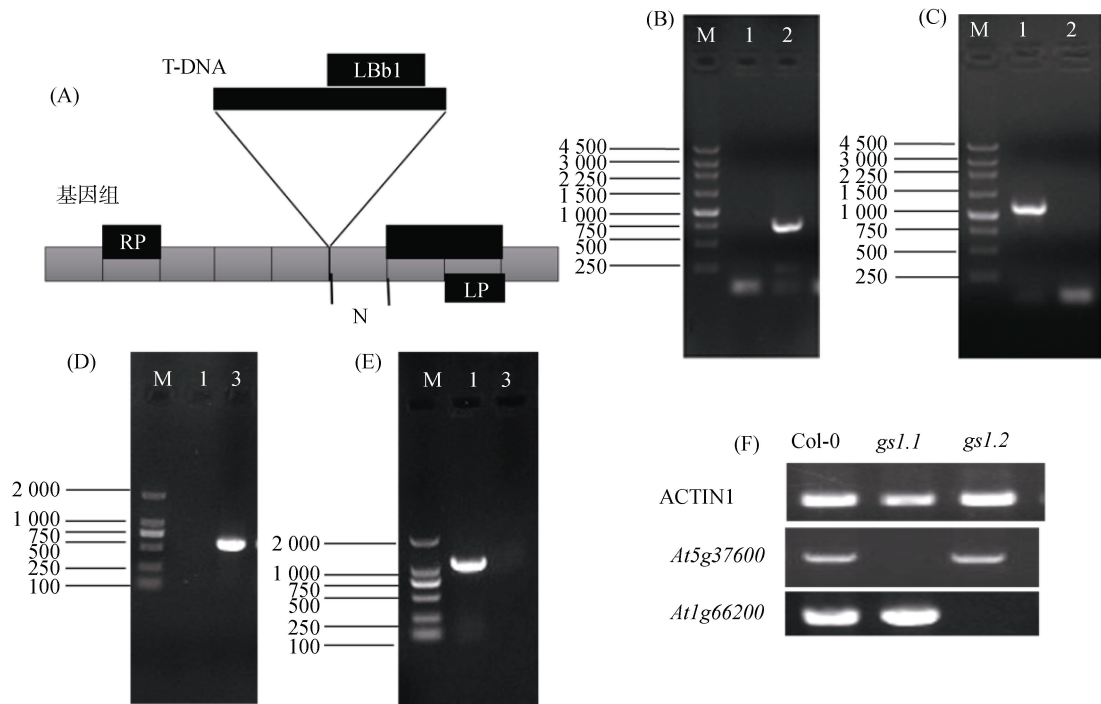
2 结果与分析

2.1 *gs1.1* 和 *gs1.2* 插入纯合体的鉴定

对拟南芥 *gs1.1* 和 *gs1.2* 株系鉴定结果如图 1B、1D, 结果显示该 *gs1.1* 和 *gs1.2* 突变体有非常清晰的插入特异性扩增条带, 产物大约为 700 bp。然后, 对两个株系 DNA 样品利用 T-DNA 插入两端的 LP 和 RP 引物进行了 PCR 扩增, 其结果如图 1C、1E, 野生型样品有预测的 1 057 bp 和 1 105 bp 大小的特异 PCR 产物, 而 *gs1.1* 和 *gs1.2* 株系样品并没有扩增条带, 说明 *gs1.1* 和 *gs1.2* 为纯合的 T-DNA 插入。对其进行 RT-PCR 发现, 在 *gs1.1* 株系中, 几乎检测不到 *At5g37600*, 表明 *gs1.1* 株系在 T-DNA 插入的作用下, *At5g37600* 基因完全被敲除。在 *gs1.2* 株系中,

几乎检测不到 *At1g66200*, 表明 *gs1.2* 株系在 T-DNA

插入的作用下, *At1g66200* 基因完全被敲除。



(A: T-DNA 突变体插入片段 PCR 鉴定模式图; B: Col-0 和 *gs1.1* 的 LBb1 和 LP 引物扩增结果; C: Col-0 和 *gs1.1* 的 RP 和 LP 引物扩增结果(M 为 Takara 250 bp DNA Marker, 1 为 Col-0, 2 是 *gs1.1*); D: Col-0 和 *gs1.2* 的 LBb1 和 LP 引物扩增结果; E: Col-0 和 *gs1.2* 的 RP 和 LP 引物扩增结果(M 为 Takara DL2000 DNA Marker, 1 为 Col-0, 3 是 *gs1.2*); F: Col-0, *gs1.1* 和 *gs1.2* 株系在 *At5g37600* 和 *At1g66200* 的表达结果(ACTIN1 为内参))

图 1 *gs1.1* 和 *gs1.2* 纯合体鉴定

Fig. 1 Identification of homozygous *gs1.1* and *gs1.2* mutants

2.2 外源蔗糖对高 NH_4^+ 胁迫下拟南芥植株鲜重的影响

从表 3 可以看出, CK 处理, Col-0 和 *gs1.1*、*gs1.2* 3 个株系的鲜重并没有显著差异。T1 处理下, 和 CK 相比较, 3 个株系的鲜重都略有增加, 分别增加了 2.3%、2.3% 和 3.5%, 并未达到显著差异; T2 处理下, 3 个拟南芥植株的鲜重出现降低, 和 CK 相比分别降低了 14.6%、24.0% 和 23.0%, 其中 Col-0 的降低幅度最小, 远低于 *gs1.1* 和 *gs1.2*; T3 处理下, 3 个株系植株的鲜重和 T2 处理相比, 有所增加, 其增加的幅度依次为 6.7%、10.9% 和 10.5%, 其中, *gs1.1* 和 *gs1.2* 的增加幅度要大于 Col-0; T3 处理下和 CK 相比, 3 个株系的鲜重分别降低了 6.8%、13.7% 和 11.9%, 其中, Col-0 降低的幅度最小; 表明蔗糖可以缓解高 NH_4^+ 胁迫对拟南芥生长的抑制, 但是缓解作用有限, 并不能完全缓解高 NH_4^+ 胁迫作用, 其中外源添加蔗糖对 *gs1.1* 和 *gs1.2* 的效果更为明显。

2.3 外源蔗糖对高 NH_4^+ 胁迫下拟南芥植株游离 NH_4^+ 和叶绿素含量的影响

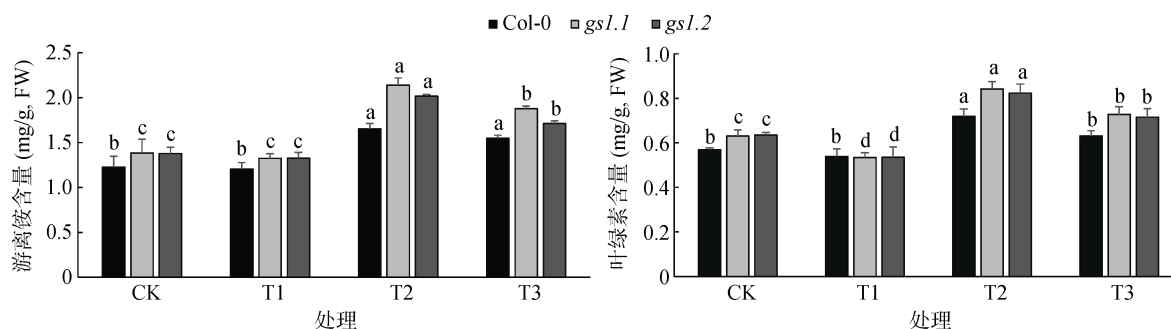
从图 2 中可以看出, 和 CK 相比, T1 处理下,

Col-0、*gs1.1* 和 *gs1.2* 植株体内的游离 NH_4^+ 含量分别降低了 1.7%、4.4% 和 3.7%; T2 处理下, 和 CK 相比, 3 个株系的游离 NH_4^+ 含量分别增加了 35.0%、54.3% 和 46.4%, 其中, *gs1.1* 的游离 NH_4^+ 含量增加最为明显, 其次为 *gs1.2*, Col-0 的增加最少; 和 T2 相比, T3 处理下, 游离 NH_4^+ 含量分别降低了 6.5%、12.2% 和 15.1%。外源添加蔗糖可以在一定程度上减少植物体内游离 NH_4^+ 含量, 对高 NH_4^+ 处理下植株更为明显, 相较而言, 外源添加蔗糖对高 NH_4^+ 胁迫下的 *gs1.1* 和 *gs1.2* 的缓解能力更强。

表 3 外源蔗糖对高 NH_4^+ 胁迫下拟南芥鲜重影响(g/株)
Table 3 Effects of exogenous sucrose on fresh weights of *Arabidopsis thaliana* under high NH_4^+ stress

处理	Col-0	<i>gs1.1</i>	<i>gs1.2</i>
CK	0.429 ± 0.030 a	0.423 ± 0.017 a	0.419 ± 0.009 a
T1	0.439 ± 0.023 a	0.433 ± 0.012 a	0.434 ± 0.012 a
T2	0.375 ± 0.013 b	0.329 ± 0.010 c	0.334 ± 0.023 c
T3	0.400 ± 0.023 b	0.365 ± 0.004 b	0.369 ± 0.006 b

注: 表中同列小写字母不同表示不同处理下同一株系间差异达 $P < 0.05$ 显著水平。



(图中小写字母不同表示不同处理下同一株系间差异达 $P < 0.05$ 显著水平, 下图同)

图 2 外源蔗糖对高 NH_4^+ 胁迫下拟南芥植株的游离 NH_4^+ 和叶绿素含量的影响

Fig. 2 Effects of exogenous sucrose on contents of free ammonium and chlorophyll of *Arabidopsis thaliana* under high NH_4^+ stress

叶绿素含量也是反映植物体中 N 含量的一个重要因素, 从图 2 可以看出, 和 CK 相比, T1 处理植物体内的叶绿素含量分别降低了 5.2%、15.3% 和 15.7%, 其中, *gs1.1* 和 *gs1.2* 的叶绿素含量变化更为显著, 降低幅度大于 Col-0; T2 处理下, 植株体内的叶绿素含量分别增加了 26.3%、33.4% 和 29.6%, 其中 *gs1.1* 的叶绿素增加最为显著。T3 处理下, 和 T2 相比, 3 个株系植株体内叶绿素含量分别减少了 9.5%、13.6% 和 13.1%, 其中, *gs1.1* 和 *gs1.2* 变化幅度高于 Col-0。可以看出, 外源添加蔗糖, 可以在一定程度上缓解高 NH_4^+ 对拟南芥植株的胁迫, 其中, 对 *gs1.1* 和 *gs1.2* 的影响更为明显。

2.4 外源蔗糖对高 NH_4^+ 胁迫下拟南芥植株可溶性糖和可溶性蛋白含量的影响

植物中碳水化合物是重要的渗透调节物质, 由图 3 可知, T1 处理下, 与 CK 相比, 3 个株系可溶性糖含量分别增加了 1.6%、1.3% 和 3.1%, 在 CK 处理

和 T1 处理下, 3 个株系之间无显著性差异; T2 处理下, 和 CK 相比, 3 个株系可溶性糖含量分别增加 18.9%、8.4% 和 10.6%, 其中 Col-0 的增加幅度明显高于 *gs1.1* 和 *gs1.2*, Col-0 和 *gs1.1*、*gs1.2* 之间达到显著性差异; 和 T2 处理相比, T3 处理下, Col-0、*gs1.1* 和 *gs1.2* 的可溶性糖含量分别增加 5.0%、16.4% 和 17.1%, *gs1.1* 和 *gs1.2* 的增幅更为显著, Col-0 和 *gs1.1* 和 *gs1.2* 间没有达到显著性差异。

和 CK 相比, T1 处理下, Col-0、*gs1.1* 和 *gs1.2* 的可溶性蛋白含量均增加, 分别增加 5.5%、6.5% 和 5.5%, 在 CK 处理和 T1 处理下, 3 个株系之间并无显著性差异; T2 处理下, 和 CK 相比, 3 个株系的可溶性蛋白含量分别增加了 19.3%、14.7% 和 14.1%, Col-0 和 *gs1.1*、*gs1.2* 之间并没有达到显著性差异。和 T2 处理相比, T3 处理下, Col-0、*gs1.1* 和 *gs1.2* 的可溶性蛋白含量分别增加 14.7%、16.9% 和 19.3%, *gs1.1* 和 *gs1.2* 的增幅更为明显, Col-0 和 *gs1.1*、*gs1.2* 都未达到显著性差异。

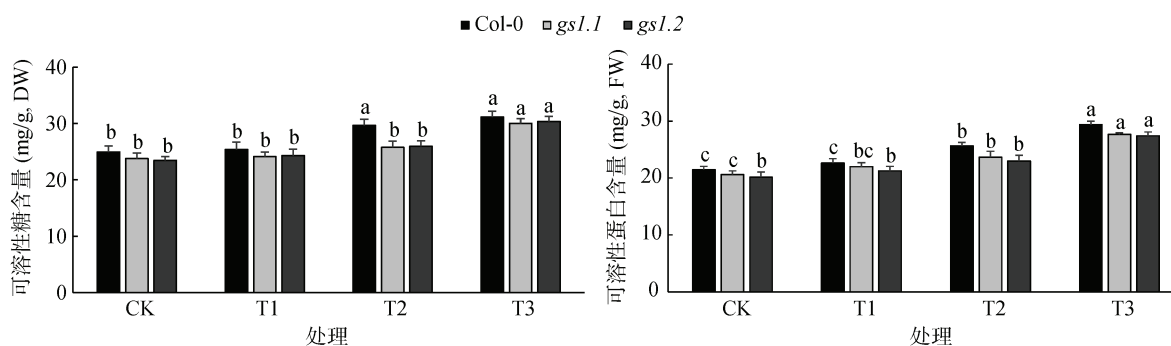


图 3 外源蔗糖对高 NH_4^+ 胁迫下拟南芥植株的可溶性糖和可溶性蛋白含量的影响

Fig. 3 Effects of exogenous sucrose on contents of soluble sugar and protein of *Arabidopsis* under high NH_4^+ stress

高 NH_4^+ 胁迫下, 拟南芥植株的可溶性糖和可溶性蛋白含量增加, 添加外源蔗糖在一定程度上增加了植株体内可溶性糖和可溶性蛋白含量, 从而增加植株碳水化合物的含量, 维持细胞内渗透压的平衡, 提高植物的

抗逆性, 同时为氮代谢提供碳源, 维持碳氮代谢。

2.5 外源蔗糖对高 NH_4^+ 胁迫下拟南芥植株 GS 和 GDH 活性的影响

GS、GDH 是氮代谢中的关键酶, GS 是无机氮

转化为有机氮的关键酶, GDH 是连接碳、氮代谢的关键点。从图 4 可知, T1 处理下, 和 CK 相比, 植株叶片中 GS 的活性增加, Col-0、*gs1.1* 和 *gs1.2* 分别增加了 6.1%、5.2 和 1.9%, Col-0 和 *gs1.1*、*gs1.2* 的 GS 酶活性存在显著性差异; T2 处理和 CK 相比, 3 个株系 GS 活性分别降低了 15.9%、16.5% 和 18.8%, 说明高 NH_4^+ 胁迫降低了 GS 的活性, 3 个株系的降低幅度差异并不大; T3 处理下, 和 T2 处理相比, 3 个株系的 GS 酶活出现不同程度的增加, 分别提高了 4.7%、19.7% 和 19.5%, 添加外源蔗糖对 *gs1.1* 和 *gs1.2* 的 GS 酶活提高更显著。添加外源蔗糖可以提高植株中 GS 的活性, 促进植物中无机氮转化为有机氮的过程。

与 CK 相比, T1 处理中, Col-0、*gs1.1* 和 *gs1.2* 的 GDH 酶活分别增加了 2.9%、3.6% 和 3.2%, 3 个株系之间并没有显著差异; T2 处理下和 CK 相比, 3 个株系分别降低了 30.6%、11.5% 和 10.6%, 其中, Col-0 的降低幅度最为显著, 3 个株系之间差异显著;

T3 处理下提高了植物的 GDH 活性, 和 T2 处理相比, Col-0、*gs1.1* 和 *gs1.2* 分别增加了 20.8%、19.7% 和 19.5%, 表明外源添加蔗糖在一定程度上可以提高植物中 GDH 酶活。

2.6 外源添加蔗糖对高 NH_4^+ 胁迫下植株矿质元素含量的影响

表 4 是外源添加蔗糖后, 植物体内矿质元素的含量。从表 4 中可知, 3 个株系中的 N、P、K、Ca 的含量都呈现出 T3>T2>T1>CK 的趋势。与 CK 相比, T1 处理下, 拟南芥中的 N 含量增加, 3 个株系分别增加了 5.5%、8.8% 和 15.2%; T2 处理下, 3 个株系的 N 含量分别增加了 32.2%、36.3% 和 36.9%, 与 T2 相比, T3 处理下, N 含量显著增加了 26.7%、28.6% 和 27.5%。植株体内 P 含量, 在 T1 处理下比 CK 增加了 4.4%、5.0% 和 3.6%; T2 处理下增加了 42.8%、30.4% 和 39.6%; 和 T2 处理相比, T3 处理下分别增加了 24.3%、36.3% 和 32.8%。植株体内的 K 含量, 与 CK 相比, T1 处理下 Col-0、*gs1.1* 和 *gs1.2* 分别增

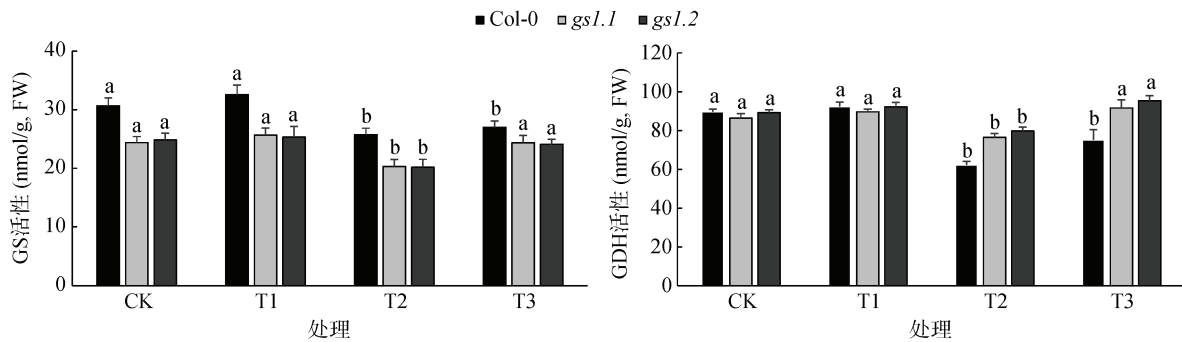


图 4 外源蔗糖对高 NH_4^+ 胁迫下拟南芥植株的 GS 和 GDH 酶活的影响

Fig. 4 Effects of exogenous sucrose on activities of GS and GDH of *Arabidopsis* under high NH_4^+ stress

表 4 外源添加蔗糖对高 NH_4^+ 胁迫下拟南芥植株矿质元素含量的影响(mg/g, FW)

Table 4 Effects of exogenous sucrose on mineral element contents of *Arabidopsis* under high NH_4^+ stress

处理	拟南芥株系	N	P	K	Ca	Mg	Fe
CK	Col-0	2.832 ± 0.127 d	0.659 ± 0.024 c	0.720 ± 0.046 b	1.025 ± 0.076 a	0.615 ± 0.034 a	0.029 ± 0.002 b
	<i>gs1.1</i>	2.492 ± 0.176 d	0.584 ± 0.034 c	0.869 ± 0.101 b	0.718 ± 0.031 a	0.256 ± 0.031 ab	0.027 ± 0.001 b
	<i>gs1.2</i>	2.548 ± 0.08 d	0.589 ± 0.02 c	0.844 ± 0.196 b	0.877 ± 0.034 a	0.334 ± 0.029 a	0.026 ± 0.003 b
T1	Col-0	3.130 ± 0.034 c	0.689 ± 0.034 c	0.767 ± 0.032 b	1.035 ± 0.045 a	0.633 ± 0.034 a	0.025 ± 0.002 b
	<i>gs1.1</i>	2.713 ± 0.046 c	0.613 ± 0.034 c	0.917 ± 0.048 b	0.738 ± 0.029 a	0.272 ± 0.004 a	0.024 ± 0.002 b
	<i>gs1.2</i>	2.937 ± 0.004 c	0.610 ± 0.007 c	0.889 ± 0.09 a	0.889 ± 0.015 a	0.349 ± 0.006 a	0.024 ± 0.003 b
T2	Col-0	3.746 ± 0.120 b	0.942 ± 0.031 b	0.841 ± 0.059 ab	1.037 ± 0.034 a	0.451 ± 0.031 b	0.040 ± 0.003 a
	<i>gs1.1</i>	3.398 ± 0.066 b	0.762 ± 0.045 b	0.99 ± 0.076 a	0.743 ± 0.020 a	0.237 ± 0.017 a	0.043 ± 0.001 a
	<i>gs1.2</i>	3.489 ± 0.157 b	0.823 ± 0.108 b	0.913 ± 0.034 a	0.906 ± 0.08 a	0.276 ± 0.02 c	0.042 ± 0.004 a
T3	Col-0	4.750 ± 0.059 a	1.172 ± 0.027 a	0.902 ± 0.101 a	1.04 ± 0.031 a	0.501 ± 0.029 b	0.029 ± 0.002 a
	<i>gs1.1</i>	4.372 ± 0.059 a	1.039 ± 0.01 a	1.103 ± 0.031 a	0.762 ± 0.015 a	0.246 ± 0.007 ab	0.031 ± 0.001 a
	<i>gs1.2</i>	4.451 ± 0.038 a	1.093 ± 0.018 a	0.984 ± 0.018 a	0.937 ± 0.101 a	0.295 ± 0.014 b	0.031 ± 0.001 a

注: 表中同列小写字母不同表示不同处理下同一株系间差异达 $P < 0.05$ 显著水平。

加了 6.6%、5.4% 和 5.3%; T2 处理下 K 含量增加 16.9%、14.3% 和 8.1%; 和 T2 处理相比, T3 处理下分别增加了 7.1%、10.8% 和 7.8%。植物中 Ca 含量, 变化幅度和其他元素相比较低, 与 CK 相比, T1 处理下 3 个株系增加了 0.06%、2.7% 和 1.2%; T2 处理和 CK 相比提高了 1.2%、3.5% 和 3.1%; T3 处理和 T2 相比, 增加了 0.3%、2.4% 和 3.4%。高 NH_4^+ 胁迫下, 植株的 N、P、K、Ca 含量都表现出不同程度的增加, 外源添加蔗糖后, N、P、K、Ca 的含量继续不同幅度提高。

3 个株系植株 Mg 含量都呈现出 T1>CK>T3>T2 的趋势, 与 CK 相比, T1 处理分别增加了 2.9%、6.0% 和 4.1%, T2 处理下降了 28.7%、12.8% 和 20.8%; T3 处理和 T2 相比, 分别提高了 10.8%、4.1% 和 7.8%, 高 NH_4^+ 胁迫下植株中 Mg 含量减少, 外源添加蔗糖在一定程度上提高了植株的 Mg 含量。3 个株系植株 Fe 含量呈现出 T2>T3>CK>T1 的趋势, 和 CK 相比, T1 处理下植株的 Fe 含量分别降低 7.0%、9.5% 和 9.5%, T2 处理下分别增加 38.1%、63.1% 和 57.9%; T3 处理下和 T2 相比减少了 27.5%、29.0% 和 26.6%。高 NH_4^+ 胁迫下植株的 Fe 含量增加, 外源添加蔗糖在一定程度上减少植株的 Fe 含量。

3 讨论

氮是植物生长发育所必需的营养元素^[25-26], 而 NH_4^+ 是植物重要的氮素之一, 但是高 NH_4^+ 胁迫对植物的生长发育会有严重的抑制, 而且和植株体内的碳、氮代谢之间存在着复杂的联系^[27]。一般来说, 高 NH_4^+ 毒害产生的首要原因, 是植物体内积累了较多的自由 NH_4^+ , 远远超出了植物自身同化量^[28]。有研究认为 GS 是 NH_4^+ 高效利用植物的绿色组织中 NH_4^+ 解毒和代谢中的一个关键因子^[29]。因此, 缺乏 *AtGS1;1* 或者 *AtGS1;2* 基因, 植株的铵同化能力受到部分抑制。而植物的鲜重可直观地反映植株生长状况^[24, 30], 叶绿素含量也是反映植株体内含 N 量的一个重要因素。李保海和施卫明^[31]在研究中发现, 拟南芥叶绿素含量随着外界 NH_4^+ 的增加而增加, 其中对 NH_4^+ 敏感的株系含量增加更明显。Raab 和 Terry^[32]报道高 NH_4^+ 能抑制甜菜叶面积的生长, 增加叶绿素含量, 但是单位面积的光合速率不变。罗金葵等^[33]也报道, 随着 NH_4^+ 浓度的增加, 小白菜植株叶绿素含量升高, 叶面积减少, 但是光合速率并不受影响。因此初步猜测高 NH_4^+ 下植株叶绿素含量增加是因为植物为了保持光合速率的不变, 在叶面积减少的情况

下, 增加叶绿素含量用来维持光合速率。本文试验结果也与之符合, 高 NH_4^+ 胁迫下拟南芥植株的鲜重减少, 体内游离 NH_4^+ 积累量增多, 叶绿素含量增加, *gs1.1*、*gs1.2* 和 Col-0 相比, 受到高 NH_4^+ 毒害更为严重, 可能是因为 *gs1.1* 和 *gs1.2* 缺陷突变体缺乏 *AtGS1;1* 和 *AtGS1;2* 基因, 植株本身的同化能力就受到一定程度的抑制, 因此体内游离 NH_4^+ 不能及时同化, 导致积累过多, 从而对植株生长产生毒害。

本试验中, 高 NH_4^+ 胁迫下外源添加蔗糖可以在一定程度上缓解高 NH_4^+ 对植物的毒害^[31, 33-34]。CK 和 T1 处理相比, 植株的鲜重、游离 NH_4^+ 含量等数值差异并不显著, 基本排除了外源添加蔗糖缓解高 NH_4^+ 胁迫是因为蔗糖提供营养的可能性。植株在逆境条件下会通过渗透调节来适应环境, 而可溶性糖和可溶性蛋白一般会作为植株体内重要的渗透调节物质, 充当衡量植物抗逆性的指标。闫素芳等^[16]报道, 外源蔗糖可以通过提高小麦的可溶性糖含量来提高小麦幼苗的耐盐性; 常丽丽等^[35]报道外源蔗糖可以缓解高 NO_3^- 胁迫对叶用莴苣生长的抑制, 提高叶用莴苣的可溶性糖含量, 降低 NH_4^+ 含量。本文研究结果表明, 在高 NH_4^+ 处理下, 拟南芥的可溶性糖和可溶性蛋白含量都出现增加, 猜测是因为植物为了通过渗透调节缓解高 NH_4^+ 胁迫, 高 NH_4^+ 条件下外源添加蔗糖, 可以增加拟南芥植株的可溶性糖和可溶性蛋白含量, 进一步帮助植株提高渗透调节缓解高 NH_4^+ 胁迫, 说明外源添加蔗糖可以增加植株体内的碳水化合物含量, 从而维持细胞的渗透压平衡, 提高植株的抗逆性; 另外, 外源添加蔗糖还可为氮代谢提供碳源, 维持植株体内的碳、氮平衡。

GS 酶是植株体内 NH_4^+ 同化过程中的一个关键酶^[36], 在高等植物中, 95% 的 NH_4^+ 是通过 GS/GOGAT 循环同化的。 NH_4^+ 对植物 GS 基因表达的调节会因为植物种类、 NH_4^+ 浓度及器官的不同而不同。有研究表明, 外源的 NH_4^+ 可以提高水稻的 GS 活性^[37], 而在菜豆植物体及根瘤的 GS 活性则会随着外界 NH_4^+ 浓度的增加而降低^[38]。本试验中, GS 酶活性随着外界 NH_4^+ 的增加而降低, 抑制了 NH_4^+ 同化过程, 外源添加蔗糖可以提高 GS 酶活性, 在一定程度上缓解了 NH_4^+ 胁迫对氮代谢的抑制。GDH 是连接碳、氮代谢的关键酶, 现在认为 GDH 在解除氨毒过程中起主要作用^[39]。在本研究结果中, *gs1.1* 和 *gs1.2* 在高 NH_4^+ 胁迫下 GDH 酶活性高于 Col-0, 可能是因为 *gs1.1* 和 *gs1.2* 在高 NH_4^+ 处理下受到的抑制更大, 此时 GDH 酶活性提高可以在一定程度上缓解 NH_4^+ 毒害。外源

添加蔗糖可以增加植株体内的 GDH 酶活性, 猜测外源蔗糖通过提高植株的 GDH 酶活性, 来缓解高 NH_4^+ 毒害, 减少游离 NH_4^+ 含量, 从而提高植株对 N 的利用率。

NH_4^+ 的吸收会影响到其他阳离子的吸收, 因此, 高 NH_4^+ 胁迫对植物的毒害症状还有可能和植物体内的矿质元素的不足相关。有研究表明, 供应 NH_4^+ -N 会显著改善缺铁植物的铁营养^[40]。氮素形态、供应量及时间影响作物对土壤中钾的固定与释放, 以及对钾的吸收、转运、循环和重新利用^[41]。Zacheo 等^[42] 研究认为, NH_4^+ 能够促进向日葵根际的 Ca^{2+} 的移动, 当然也可能与阴离子的吸收有关; 与 NO_3^- -N 的处理相比, NH_4^+ -N 培养的植株中的 P 含量较高, NH_4^+ 可能促进植物 P 元素的吸收^[43]。陈沂岭等^[44] 研究发现 NH_4^+ 增加了水稻地上部 P 和 Fe 含量。本研究结果表明, 高 NH_4^+ 处理下, 添加外源蔗糖后, 拟南芥植株的 N、P、K、Ca、Mg 含量都增加, 其中 N、P、K 含量增加比较显著, N 含量增加, 表明植株利用 N 的能力增强, 加快植株对 N 的吸收利用, 一定程度上缓解了高 NH_4^+ 毒害。但外源添加蔗糖不能提高植株中 Fe 的含量。已有文献报道^[35], 高 NH_4^+ 胁迫会降低植株的含 K 量, 本文中随着 NH_4^+ 浓度的增加, 含 K 量也随之增加, 猜测可能是因为本文测定的是植株鲜重的含 K 量, 高 NH_4^+ 降低了植株的含水量, 因此植株鲜重的含 K 量增加。高 NH_4^+ 胁迫显著抑制了拟南芥的生长, 影响了矿质元素在植株中的含量, 外源添加蔗糖可缓解高 NH_4^+ 胁迫对拟南芥生长的抑制作用, 并提高了各矿质元素的含量, 说明外源添加蔗糖可通过影响矿质元素的吸收积累, 维持离子之间的平衡, 减轻高 NH_4^+ 胁迫对拟南芥的毒害作用。

综上所述, NH_4^+ 胁迫显著抑制了拟南芥植株的生长, 外源添加蔗糖可以缓解高 NH_4^+ 胁迫的抑制, 这可能是由于外源蔗糖可以提高植株体内碳水化合物的含量, 维持细胞内渗透压平衡, 从而提高植株的抗逆性; 另外, 外源蔗糖处理提高了 GS 和 GDH 的酶活性, 加速氨同化作用, 减少植株体内游离 NH_4^+ 含量; 外源添加蔗糖处理还可以通过对矿质元素的吸收积累, 减轻高 NH_4^+ 胁迫对拟南芥的毒害作用。

参考文献:

[1] 宋建民, 田纪春. 植物光合碳和氮代谢之间的关系及其调节[J]. 植物生理学通讯, 1998, 34(3): 230-238.
[2] 隋方功, 吕银燕, 稻永醇二. 氮素营养对甜椒果实生长发育的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2004, 10(5): 499-503.

[3] 崔秀敏, 王秀峰. 基质供水状况对番茄穴盘苗碳氮代谢及生长发育的影响[J]. 园艺学报, 2004, 31(4): 477-481.
[4] 隋方功, 吕银燕, 王运华, 等. 不同施氮量对甜椒碳、氮营养分配的影响[J]. 园艺学报, 2004, 31(4): 472-476.
[5] 李宝珍, 范晓荣, 徐国华. 植物吸收利用铵态氮和硝态氮的分子调控[J]. 植物生理学通讯, 2009(1): 80-88.
[6] 陈琪, 刘之广, 张民, 等. 包膜磷酸二铵配施黄腐酸提高小麦产量及土壤养分供应强度[J]. 土壤学报, 2018, 55(6): 1472-1484.
[7] Serna M D, Borrás R, Legaz F, et al. The influence of nitrogen concentration and ammonium/nitrate ratio on N-uptake, mineral composition and yield of citrus[J]. Plant and Soil, 1992, 147(1): 13-23.
[8] Harada T, Takaki H, Yamada Y. Effect of nitrogen sources on the chemical components in young plants[J]. Soil Science and Plant Nutrition, 1968, 14(2): 47-55.
[9] Kusano M, Tabuchi M, Fukushima A, et al. Metabolomics data reveal a crucial role of cytosolic glutamine synthetase 1;1 in coordinating metabolic balance in rice[J]. The Plant Journal, 2011, 66(3): 456-466.
[10] Guan M, Møller I S, Schjoerring J K. Two cytosolic glutamine synthetase isoforms play specific roles for seed germination and seed yield structure in Arabidopsis[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(1): 203-212.
[11] Ho S L, Chao Y C, Tong W F, et al. Sugar coordinately and differentially regulates growth- and stress-related gene expression via a complex signal transduction network and multiple control mechanisms[J]. Plant Physiology, 2001, 125(2): 877-890.
[12] 杨少华, 王丽, 穆春, 等. 蔗糖调节拟南芥花青素的生物合成[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, 27(4): 364-369.
[13] Cao Y Y, Yang M T, Chen S Y, et al. Exogenous sucrose influences antioxidant enzyme activities and reduces lipid peroxidation in water-stressed cucumber leaves[J]. Biologia Plantarum, 2015, 59(1): 147-153.
[14] Vincentz M, Moureaux T, Leydecker M T, et al. Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana glauca* leaves by nitrogen and carbon metabolites[J]. The Plant Journal, 1993, 3(2): 315-324.
[15] Morcuende R, Krapp A, Hurry V, et al. Sucrose-feeding leads to increased rates of nitrate assimilation, increased rates of α -oxoglutarate synthesis, and increased synthesis of a wide spectrum of amino acids in tobacco leaves[J]. Planta, 1998, 206(3): 394-409.
[16] 闫素芳, 于洋, 葛青, 等. 外源蔗糖对小麦幼苗耐盐性的影响[J]. 中国生态农业学报, 2012, 20(2): 225-230.
[17] 刘丽萍, 臧小云, 袁巧云, 等. 外源蔗糖对盐胁迫荞麦幼苗根系生长的缓解效应[J]. 植物生理学通讯, 2006(5): 847-850.
[18] 刘峰, 施卫明. 拟南芥室内水培方法的改进[J]. 土壤, 2006, 38(1): 102-105.
[19] Yuan L X, Loqué D, Ye F H, et al. Nitrogen-dependent posttranscriptional regulation of the ammonium transporter AtAMT1;1[J]. Plant Physiology, 2007, 143(2): 732-744.

- [20] Takakura K I, Nishio T. Safer DNA extraction from plant tissues using sucrose buffer and glass fiber filter[J]. *Journal of Plant Research*, 2012, 125(6): 805–807.
- [21] Smith D S, Maxwell P W, de Boer S H. Comparison of several methods for the extraction of DNA from potatoes and potato-derived products[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(26): 9848–9859.
- [22] 李合生. 植物生理生化实验原理与技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2010.
- [23] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- [24] Migge A, Carrayol E, Kunz C, et al. The expression of the tobacco genes encoding plastidic glutamine synthetase or ferredoxin-dependent glutamate synthase does not depend on the rate of nitrate reduction, and is unaffected by suppression of photorespiration[J]. *Journal of Experimental Botany*, 1997, 48(6): 1175–1184.
- [25] 程谊, 张金波, 蔡祖聪. 气候-土壤-作物之间氮形态契合在氮肥管理中的关键作用[J]. *土壤学报*, 2019, 56(3): 507–515.
- [26] 孙海军, 闵炬, 施卫明, 等. 硝化抑制剂影响小麦产量、 N_2O 与 NH_3 排放的研究[J]. *土壤*, 2017, 49(5): 876–881.
- [27] Guo S, Bruck H, Sattelmacher B. Effects of supplied nitrogen form on growth and water uptake of Frenchbean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants[J]. *Plant and soil*, 2002, 219: 267–275.
- [28] 李春顺. 高铵胁迫对小麦幼苗生长的影响及其生理基础[D]. 南京: 南京农业大学, 2013.
- [29] Cruz C, Bio A F M, Domínguez-Valdivia M D, et al. How does glutamine synthetase activity determine plant tolerance to ammonium?[J]. *Planta*, 2006, 223(5): 1068–1080.
- [30] Ni L Y. Growth of *potamogeton maackianus* under low-light stress in eutrophic water[J]. *Journal of Freshwater Ecology*, 2001, 16(2): 249–256.
- [31] 李保海, 施卫明. 拟南芥幼苗对高 NH_4^+ 响应的特征及不同生态型间的差异[J]. *土壤学报*, 2007, 44(3): 508–515.
- [32] Raab T K, Terry N. Nitrogen source regulation of growth and photosynthesis in *Beta vulgaris* L[J]. *Plant Physiology*, 1994, 105(4): 1159–1166.
- [33] 罗金葵, 陈巍, 张攀伟, 等. 增铵对小白菜生长和叶绿素含量的影响[J]. *土壤学报*, 2005, 42(4): 614–618.
- [34] 匡艺, 李廷轩, 余海英. 氮素对不同氮效率小黑麦基因型叶片保护酶活性和膜脂过氧化的影响[J]. *草业学报*, 2011, 20(6): 93–100.BB
- [35] 常丽丽, 廖宗文, 陈日远, 等. 外源蔗糖对 NO_3^- 胁迫下叶用莴苣碳氮代谢的影响[J]. *北方园艺*, 2016(1): 10–15.
- [36] Mifflin B J, Lea P J. Ammonia assimilation[M]// *Amino Acids and Derivatives*. Amsterdam: Elsevier, 1980: 169–202.
- [37] Hayakawa T, Kamachi K, Oikawa M, et al. Response of glutamine synthetase and glutamate synthase isoforms to nitrogen sources in rice cell cultures[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1990, 31(8): 1071–1077.
- [38] Chen W J. Expression of glutamine synthetase genes from *Phaseolus vulgaris* L. in transgenic plants[D]. PhD Thesis of Imperial College of Science and Technology, University of London, 1990.
- [39] Melo-Oliveira R, Oliveira I C, Coruzzi G M. Arabidopsis mutant analysis and gene regulation define a nonredundant role for glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(10): 4718–4723.
- [40] 邹春琴, 范晓云, 石荣丽. 铵态氮和硝态氮对旱稻、水稻生长及铁营养状况的影响[J]. *中国农业大学学报*, 2007, 12(4): 45–49.
- [41] Zhang F S, Niu J F, Zhang W F, et al. Potassium nutrition of crops under varied regimes of nitrogen supply[J]. *Plant and Soil*, 2010, 335(1/2): 21–34.
- [42] Zaccheo P, Crippa L, di Muzio Pasta V. Ammonium nutrition as a strategy for cadmium mobilisation in the rhizosphere of sunflower[J]. *Plant and Soil*, 2007, 301(1/2): 325.
- [43] Schittenhelm S, Menge-Hartmann U. Yield formation and plant metabolism of spring barley in response to locally injected ammonium[J]. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 2006, 192(6): 434–444.
- [44] 陈沂岭, 赵学强, 张玲玉, 等. 铵硝营养对水稻氮效率和矿质养分吸收的影响[J]. *土壤*, 2019, 51(2): 243–250.