

# 拟南芥幼苗对高 $\text{NH}_4^+$ 响应的特征 及不同生态型间的差异\*

李保海<sup>1,2</sup> 施卫明<sup>1†</sup>

(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 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要** 通过培养基和水培法分析了不同浓度  $\text{NH}_4^+$  处理对苗期拟南芥根系特征的影响, 比较了不同生态型拟南芥苗期根形态及生理的差异。结果表明, 拟南芥苗期的主根长、侧根长、根表面积, 均随  $\text{NH}_4^+$  浓度增高逐渐降低; 而根平均直径随  $\text{NH}_4^+$  浓度增高先变粗后变细。不同生态型拟南芥对高浓度  $\text{NH}_4^+$  的响应差异显著, 而对等浓度  $\text{K}^+$  的响应没有观察到与  $\text{NH}_4^+$  的类似的毒害作用及生态型间的差异。应用差异显著的典型生态型(耐  $\text{NH}_4^+$  型 Col-0 和  $\text{NH}_4^+$  敏感型 JA22) 进一步研究表明,  $\text{NH}_4^+$  毒害对 Col-0 根长的抑制作用显著小于 JA22, 对 Col-0 平均根直径的促进作用也显著小于 JA22, 但对二者的根表面积的抑制没有显著性差异; 30  $\text{mmol L}^{-1}$   $\text{NH}_4^+$  处理, Col-0 的地上部干重显著高于 JA22, 叶绿素含量却显著低于 JA22, 二者的含水量差异不显著; Col-0 对 2  $\text{mmol L}^{-1}$   $\text{NH}_4^+$  的净吸收速率是 JA22 的 3 倍多。因此高浓度  $\text{NH}_4^+$  抑制苗期拟南芥的生长基本上不是根际酸化、缺  $\text{NO}_3^-$ 、高离子强度或对  $\text{NH}_4^+$  的高吸收等因子所致。

**关键词** 拟南芥; 铵毒害; 根形态; 生态型; 生理

**中图分类号** S143.1

**文献标识码** A

$\text{NH}_4^+$  是植物吸收的主要氮源形式之一, 但是大部分植物对  $\text{NH}_4^+$  都比较敏感, 高浓度  $\text{NH}_4^+$  能抑制植物生长, 降低作物产量<sup>[1,2]</sup>。 $\text{NH}_4^+$  中毒现象普遍存在, 它在一些农业和畜牧业密集的地区由于高水平的  $\text{NH}_3$  挥发导致大量的  $\text{NH}_4^+$  沉降显得尤其严重。近年来在欧洲, 由于铵态氮沉降的加剧,  $\text{NH}_4^+$  毒害还被认为是森林面积降低, 物种减少, 甚至一些物种灭绝的因素之一<sup>[3]</sup>。在我国太湖地区, 湿沉降总氮年输入量为 27.0  $\text{kg hm}^{-2}$ , 其中铵态氮占 47.6%, 主要来自当地农田的  $\text{NH}_3$  挥发<sup>[4]</sup>。

目前, 已有多种假说被提出来解释  $\text{NH}_4^+$  对植物的毒害, 如,  $\text{NH}_4^+$  的吸收酸化根际, 诱导植物体内其它阳离子的缺失, 改变细胞内 pH 和影响渗透平衡, 破坏光合磷酸化的电子传递过程, 导致叶片中  $\text{NH}_4^+$  的积累而改变多胺和植物激素的代谢<sup>[1,2]</sup>。最近研究表明<sup>[5]</sup> 大麦对  $\text{NH}_4^+$  敏感是由于根系  $\text{NH}_4^+$  外排产生一个无效的  $\text{NH}_4^+$  循环, 消耗大量的能量。但是这些假说都存在缺陷, 其中这些研究都是以  $\text{NH}_4^+$  为单

一氮源, 进行  $\text{NH}_4^+$  毒害的研究, 忽略了  $\text{NO}_3^-$  除了作为氮源外还起着信号调节等作用<sup>[1]</sup>。Walchr-Liu 等<sup>[6]</sup> 报道 2  $\text{mmol L}^{-1}$   $\text{NH}_4^+$  培养抑制烟草生长主要在于缺  $\text{NO}_3^-$  而非  $\text{NH}_4^+$  毒害, 事实上自然条件下土壤中的  $\text{NH}_4^+$  和  $\text{NO}_3^-$  也是同时存在的。

物种间的自然变异广泛存在于自然界中。土壤中  $\text{NH}_4^+$  浓度随土壤和季节的差异变化很大, 植物在长期适应不同  $\text{NH}_4^+$  浓度土壤环境过程中, 不同物种对  $\text{NH}_4^+$  响应存在很大差异, 对  $\text{NH}_4^+$  敏感的作物主要有烟草、大麦、大豆、番茄等, 耐  $\text{NH}_4^+$  的作物主要有水稻、洋葱、豌豆等<sup>[1]</sup>。同一物种不同生态型间也必然存在自然变异, 如玉米<sup>[7]</sup>, 但其他植物的报道很少。

拟南芥作为科学研究的一种模式植物, 分布世界各地, 形态多样, 能适应各种不同生态环境<sup>[8]</sup>。目前储存中心 ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) 已有不同发育特征和形态的 600 多种生态型。这些资源代表着丰富的未开发的新基因和已知基因的新等位点<sup>[9]</sup>。近年来关于拟南芥对生态环境响应自然变异的研究已有许

\* 中国科学院创新团队国际合作伙伴计划项目 (CXID-2005-4-5) 和中国科学院知识创新重要方向项目 (KZCX3-SW-439) 资助

† 通讯作者, E-mail: [wmshi@issas.ac.cn](mailto:wmshi@issas.ac.cn)

作者简介: 李保海 (1981~), 男, 福建霞浦人, 博士研究生, 研究方向为植物营养遗传

收稿日期: 2006-01-04; 收到修改稿日期: 2006-05-12

多<sup>[10]</sup>,这些资源也可能为  $\text{NH}_4^+$  毒害研究提供更好的材料。因此本研究的目的是,在考虑到供  $\text{NO}_3^-$  和培养液 pH 不变的条件下,分析苗期拟南芥对  $\text{NH}_4^+$  毒害的响应现象以及不同生态型间的差异,筛选对  $\text{NH}_4^+$  敏感和耐性的生态型,初步比较这些典型拟南芥对  $\text{NH}_4^+$  响应可能存在的形态和生理上的差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基试验

**1.1.1 植物材料和生长条件** 本实验材料为 8 种生态型拟南芥:Col-0、JA22、JA158、JW101、JA145、JA103、JW116、JW135,均来自 The SENDAI Arabidopsis Seed Stock Center ([www.shigen.nig.ac.jp/arabidopsis](http://www.shigen.nig.ac.jp/arabidopsis))。光照培养箱的温度为  $23 \pm 1$ , 24 h 连续光照,光照强度为  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。培养基正常营养成分根据 Cao 等<sup>[11]</sup>修改得:  $10 \text{ mmol L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{NaNO}_3$ ,  $2 \text{ mmol L}^{-1} \text{MgSO}_4$ ,  $1 \text{ mmol L}^{-1} \text{CaCl}_2$ ,  $0.1 \text{ mmol L}^{-1} \text{Fe-EDTA}$ ,  $50 \mu\text{mol L}^{-1} \text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $12 \mu\text{mol L}^{-1} \text{MnSO}_4$ ,  $1 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ZnCl}_2$ ,  $1 \mu\text{mol L}^{-1} \text{CuSO}_4$ ,  $0.2 \mu\text{mol L}^{-1} \text{Na}_2\text{MoO}_4$ ,  $0.5 \text{ g L}^{-1} \text{MES}$ (2-吗啉已磺酸), 1% (w/v) 蔗糖, 0.7% (w/v) 琼脂, pH 5.7。  $\text{NH}_4^+$  用  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  配制。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℃ 低温避光保存 2 d, 然后播种于培养基(12 cm × 12 cm) 上, 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, 5 d 后(根长约 1 cm), 挑选长势一致的苗移植于不同  $\text{NH}_4^+$  浓度处理的培养基上生长。

**1.1.2  $\text{NH}_4^+$  处理对 Col-0 拟南芥苗期根系的影响** 待 Col-0 拟南芥正常生长 5 d 后, 挑选长势一致的苗移植于正常营养液加不同  $\text{NH}_4^+$  浓度处理的培养基上, 培养皿的放置方式如本文 1.1.1 节所述, 处理 5 d, 每天标记每棵苗主根的生长点并用直尺测量其主根的日伸长量。  $\text{NH}_4^+$  处理浓度为 0、5、15、30、40、50、60  $\text{mmol L}^{-1}$ , 每个处理 2 个培养皿, 40 株苗。处理 5 d 后, 用根系扫描分析仪(RHIZO 2004b) 测定根总长、根表面积和根平均直径, 侧根长为根总长减去主根长。5 株为一个分析单位, 每个培养皿取 10 株, 共 2 × 2 次重复。

**1.1.3 不同生态型拟南芥苗期主根长对  $\text{NH}_4^+$  的响应差异** 以上述 8 种生态型拟南芥为材料, 待苗生长 5 d 后, 挑选长势一致的苗移植于正常营养液

加不同  $\text{NH}_4^+$  浓度(5、30、60  $\text{mmol L}^{-1}$ ) 处理的培养基上, 培养皿的放置方式如本文 1.1.1 节所述, 处理 5 d, 每天标记每棵苗主根的生长点并测量其主根的日伸长量。每个处理 2 个培养皿, 20 株苗。另外以等浓度  $\text{K}_2\text{SO}_4$  代替  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  用相同实验方法来验证试验结果。

**1.1.4 典型拟南芥根形态对  $\text{NH}_4^+$  响应的差异** 以 Col-0 和 JA22 为材料, 待苗生长 5 d 后, 挑选长势一致的苗移植于正常营养液加不同  $\text{NH}_4^+$  浓度(5、30、40、60  $\text{mmol L}^{-1}$ ) 处理的培养基上, 每个处理两个培养皿, 20 株苗。培养皿的放置方式如 1.1.1 描述, 处理 5 d 后, 用根系扫描分析仪(RHIZO 2004b) 测定根总长、根表面积和根平均直径, 以单株为分析单位, 每个处理分析 8 株。

### 1.2 水培试验

**1.2.1 植物材料和生长条件** 供试材料为 Col-0 和 JA22 生态型拟南芥。水培方法参考文献[12], 光照培养箱的温度为  $23 \pm 1$ , 24 h 连续光照, 光照强度为  $80 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。水培的正常营养液成分: 将 1.1.1 节所述培养基营养液中的  $10 \text{ mmol L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$  改为  $2 \text{ mmol L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$  和  $0.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{K}_2\text{SO}_4$ , 其它的相同。种子的消毒纯化同本文 1.1.1 节所述, 但消毒过程不需无菌操作。

**1.2.2 拟南芥叶片叶绿素含量、地上部生物量及含水量对  $\text{NH}_4^+$  的响应** 取在正常营养液培养 18 d 的幼苗, 分别测定二种生态型拟南芥叶片的叶绿素含量, 并进行对照  $\text{NH}_4^+$  ( $2 \text{ mmol L}^{-1}$ ) 和高  $\text{NH}_4^+$  ( $30 \text{ mmol L}^{-1}$ ) 处理, 处理液为正常营养液添加  $\text{NH}_4^+$ 、 $0.5 \text{ g L}^{-1} \text{MES}$  和  $5.89 \text{ mg L}^{-1}$  二氰二胺(硝化抑制剂), 7 d 后分别测定各处理的地上部生物量干重和叶绿素含量, 分析  $\text{NH}_4^+$  处理后对二种拟南芥地上部生物量及含水量和叶绿素含量的影响。

叶绿素测定方法<sup>[13]</sup>: 取约 0.02 g 鲜叶放入 5 mL 离心管中, 加入 5 ml 95% 的乙醇, 避光静置至叶片组织变白(过夜即可), 提取液在波长 665 nm 和 649 nm 下测定吸光度, 最后根据公式计算出叶绿素的含量。

**1.2.3 苗期拟南芥对  $\text{NH}_4^+$  的净吸收速率** 取正常营养液预培养 23 d 苗龄的植株, 进行缺氮饥饿 2 d, 然后采用离体根方法测  $\text{NH}_4^+$  吸收<sup>[14]</sup>, 吸收液中氮为  $2 \text{ mmol L}^{-1} \text{NH}_4^+$ , 含  $0.5 \text{ g L}^{-1} \text{MES}$  和  $5.89 \text{ mg L}^{-1}$  二氰二胺, 其他同完全营养液, 每个处理重复 4 次, 每个重复的根鲜重约为 50 mg, 吸收液体积为 5 ml, 避光吸收 3 h。溶液中  $\text{NH}_4^+$  浓度用靛酚蓝比色法测

定<sup>[15]</sup>,根据吸收前后溶液中  $\text{NH}_4^+$  浓度的变化值,吸收液体积不变,计算单位根干重在单位时间内的 N 净吸收量,即根系对  $\text{NH}_4^+$  的净吸收速率。

### 1.3 数据分析

数据的处理分析采用 SPSS13.0,图表应用 excel 2003 制作。

## 2 结果分析

### 2.1 $\text{NH}_4^+$ 处理对 Col-0 拟南芥苗期根系的影响

在培养基试验中, $\text{NH}_4^+$  能抑制拟南芥根系的生长, $\text{NH}_4^+$  浓度越高,对拟南芥主根生长抑制作用越强(图 1)。与对照( $0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NH}_4^+$ )相比, $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NH}_4^+$  处理 5 d 就能显著抑制主根伸长,但  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  和  $15 \text{ mmol L}^{-1}$  处理间没有差异,而当  $\text{NH}_4^+$  大于  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  时每个处理间都有显著性差异,至  $60 \text{ mmol L}^{-1}$  时主根随时间的生长曲线基本上趋于水平。不同浓度  $\text{NH}_4^+$  处理对拟南芥的抑制效果,随处理时间的延长,差异逐渐显著,处理后第 5 d 就能清楚观察到处理间的差异。

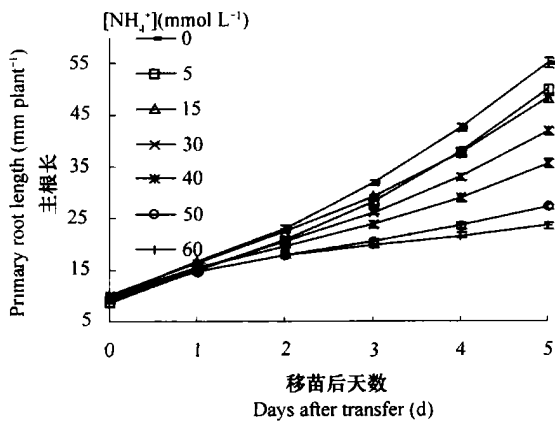


图 1 不同  $\text{NH}_4^+$  浓度对 Col-0 拟南芥苗期主根伸长的影响(误差线代表 SE,  $n = 30$ )

Fig. 1 Effect of  $\text{NH}_4^+$  on elongation of primary root of Col-0 at its seedling stage (Vertical bars represent SE,  $n = 30$ )

$\text{NH}_4^+$  处理 5 d 后,苗期拟南芥的侧根长、根表面积随着  $\text{NH}_4^+$  浓度增高而降低,而根平均直径随  $\text{NH}_4^+$  浓度增高先变粗后变细(表 1)。 $\text{NH}_4^+$  介于  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  和  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  时,似乎是这些根系参数变化的关键浓度,当  $\text{NH}_4^+$  大于  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  时, $\text{NH}_4^+$  就能显著地抑制拟南芥侧根的伸长和根表面积的大小;在此浓度拟南芥平均根直径也达到最大。而当  $\text{NH}_4^+$  大于  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  时,侧根长似乎已不伸长、根表面积也

急剧下降,根平均直径变细。但侧根长和根表面积似乎没有主根长得敏感,这也可能是苗龄太小侧根还未完全伸长的原因。

表 1  $\text{NH}_4^+$  对 Col-0 拟南芥苗期根形态的影响

Table 1 Effects of  $\text{NH}_4^+$  on root parameters of Col-0 at its seedling stage

[ $\text{NH}_4^+$ ] ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	侧根长度	根表面积	根平均直径
	Lateral root length ( $\text{cm plant}^{-1}$ )	Surface area ( $\text{cm}^2 \text{ plant}^{-1}$ )	Average diameter ( $\text{mm plant}^{-1}$ )
0	4.20 $\pm$ 0.30a	0.46 $\pm$ 0.01a	0.15 $\pm$ 0.01b
5	3.93 $\pm$ 1.00a	0.38 $\pm$ 0.04ab	0.14 $\pm$ 0.02b
15	3.84 $\pm$ 0.82a	0.39 $\pm$ 0.10ab	0.14 $\pm$ 0.03b
30	2.94 $\pm$ 1.72ab	0.41 $\pm$ 0.09ab	0.19 $\pm$ 0.01a
40	2.17 $\pm$ 0.60b	0.34 $\pm$ 0.05b	0.19 $\pm$ 0.03a
50	0.47 $\pm$ 0.31c	0.13 $\pm$ 0.03c	0.13 $\pm$ 0.02b
60	0.28 $\pm$ 0.29c	0.10 $\pm$ 0.02c	0.12 $\pm$ 0.01b

注:表中的值为平均值  $\pm$ SD,  $n = 4$ ;同一列数据后面有不同字母的表示差异显著 ( $p < 0.05$ , Duncan) Note: The data were reported as mean  $\pm$ SD,  $n = 4$ ; Different letters following the data in the same column mean significant difference at  $p < 0.05$  by Duncan multiple comparison

### 2.2 不同生态型苗期拟南芥对 $\text{NH}_4^+$ 的响应差异

根据实验结果,主根长的变化程度能较好的反映  $\text{NH}_4^+$  对拟南芥的毒害程度,而且处理后第 5 d 是一个比较好的观察点。因此本研究以  $\text{NH}_4^+$  处理 5 d 的拟南芥主根净伸长量为指标来比较不同生态型拟南芥对  $\text{NH}_4^+$  响应的差异。

不同生态型拟南芥对  $\text{NH}_4^+$  响应的差异显著(图 2)。与各自对照( $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NH}_4^+$ )相比, $30 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NH}_4^+$  处理 5 d,不同生态型拟南芥主根净伸长量为对照的 81.14% ~ 62.66%,也可以看出 JA22, JA103 对  $\text{NH}_4^+$  相对其他生态型拟南芥敏感; $60 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NH}_4^+$  处理 5 d,拟南芥主根净伸长量为对照的 38.6% ~ 16.76%, JW101、Col-0 生态型拟南芥相对其他生态型耐  $\text{NH}_4^+$  毒害。

但是这种差异和毒害也可能是  $\text{NH}_4^+$  的高离子强度引起的,因此采用了等浓度  $\text{K}_2\text{SO}_4$  代替  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  来验证上述结果。从图 3 可以看出, $30 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}^+$  处理 5 天,不同生态型拟南芥主根净伸长量为对照 ( $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}^+$ ) 的 91.61% ~ 75.18%,  $60 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}^+$  处理 5 d 的净伸长量为对照 ( $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}^+$ ) 的 67.36% ~ 50.64%,都显著的高于相同浓度  $\text{NH}_4^+$  处理下的净伸长量。有趣的是对  $\text{NH}_4^+$  敏感的 JA22 拟南芥对同等浓度的  $\text{K}^+$  表现耐性,而耐  $\text{NH}_4^+$  毒害的 Col-0 拟南芥对  $\text{K}^+$  反而敏感。

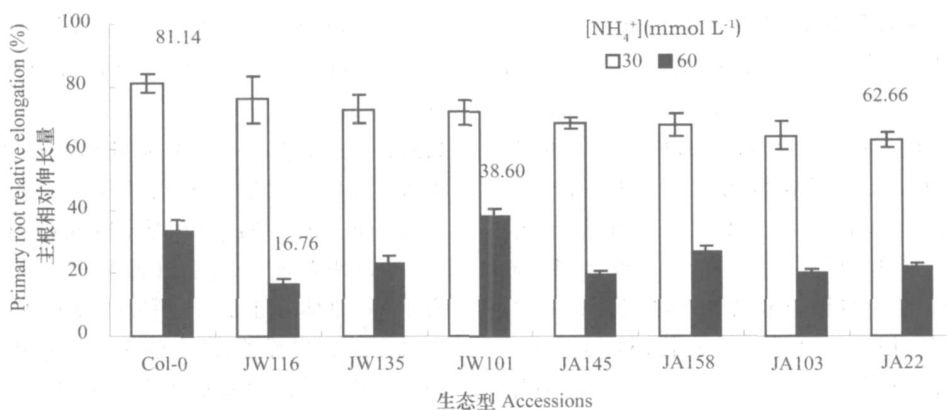


图2 不同生态型拟南芥主根伸长量对  $\text{NH}_4^+$  的响应(对照为  $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NH}_4^+$  处理,为 100%,误差线代表 SE,  $n=10$ )

Fig.2 Effect of  $\text{NH}_4^+$  on elongation of the primary root of various Arabidopsis accessions (with CK,  $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NH}_4^+$ , as 100%. Vertical bars represent SE,  $n=10$ )

故  $\text{NH}_4^+$  对拟南芥的毒害是存在的,不同生态型拟南芥对  $\text{NH}_4^+$  毒害的响应具有显著性差异,而且这种毒害和生态型间的差异不是  $\text{NH}_4^+$  的离子强度引

起的。考虑到不同生态型拟南芥的生物量差异等因素,在试验中选用 Col-0 和 JA22 分别作为拟南芥对  $\text{NH}_4^+$  耐性和敏感性的典型生态型。

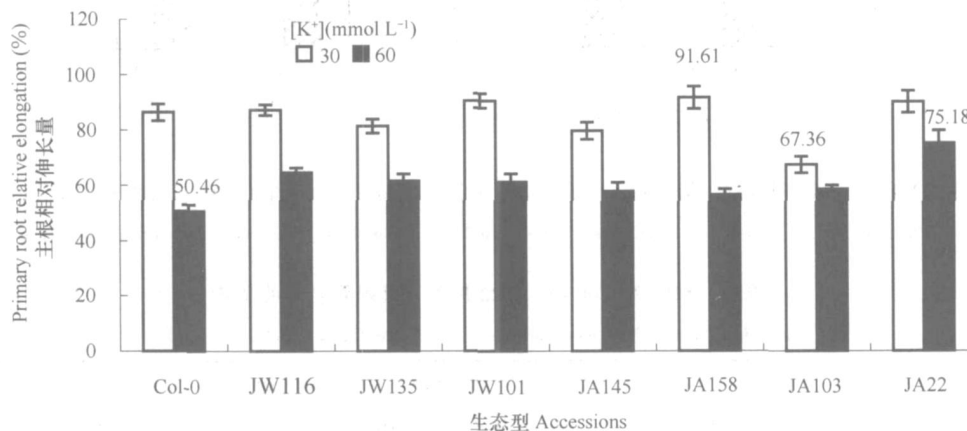


图3 不同生态型拟南芥主根伸长量对  $\text{K}^+$  的响应(对照为  $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}^+$  处理,为 100%,误差线代表 SE,  $n=10$ )

Fig.3 Effect of  $\text{K}^+$  on elongation of the primary root of various Arabidopsis accessions (with CK,  $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}^+$ , as 100%. Vertical bars represent SE,  $n=10$ )

表2 拟南芥(Col-0 和 JA22) 苗期根系参数对  $\text{NH}_4^+$  处理 5 d 响应的差异

Table 2 Root characteristics of Col-0 and JA22 treated with  $\text{NH}_4^+$  for 5 days at the seedling stage

$[\text{NH}_4^+]$ ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	生态型 Accessions	根总长 Length ( $\text{cm plant}^{-1}$ )	根表面积 Surface area ( $\text{cm}^2 \text{ plant}^{-1}$ )	平均根直径 Average diameter ( $\text{mm plant}^{-1}$ )
5	Col-0	9.06 $\pm$ 2.29	0.83 $\pm$ 0.18	0.30 $\pm$ 0.03
	JA22	7.79 $\pm$ 1.36	0.71 $\pm$ 0.15	0.29 $\pm$ 0.04
30	Col-0	6.10 $\pm$ 0.83 *	0.61 $\pm$ 0.08	0.32 $\pm$ 0.03
	JA22	5.26 $\pm$ 0.59	0.64 $\pm$ 0.05	0.39 $\pm$ 0.04 **
40	Col-0	5.79 $\pm$ 0.54 **	0.60 $\pm$ 0.08	0.33 $\pm$ 0.04
	JA22	4.67 $\pm$ 0.55	0.57 $\pm$ 0.08	0.39 $\pm$ 0.06 *
60	Col-0	3.02 $\pm$ 0.55	0.31 $\pm$ 0.06	0.33 $\pm$ 0.02
	JA22	2.54 $\pm$ 0.49	0.30 $\pm$ 0.08	0.37 $\pm$ 0.04 *

注:表中的值为平均值  $\pm$ SD,  $n=8$ ; \*表示 T 检验在  $p=0.05$  水平上差异显著, \*\*表示 T 检验在  $p=0.01$  水平上差异显著 Note: The data were reported as mean  $\pm$ SD,  $n=8$ ; \* represents significant difference in the same treatment at  $p=0.05$  by T-test, \*\* represent significant difference in the same treatment at  $p=0.01$  by T-test

### 2.3 典型拟南芥对高 $\text{NH}_4^+$ 响应差异的比较

**2.3.1 苗期根形态** 在培养基生长条件下,  $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{NH}_4^+$  处理 5 d, Col-0 与 JA22 的根形态没有显著性差异, 随  $\text{NH}_4^+$  浓度的增加, 两者的根形态差异先变大后减小, 不同参数表现不一样 (表 2)。  $30 \text{ mmol L}^{-1} \text{NH}_4^+$  处理, 两者的根总长差异显著, 根表面积差异不显著, 根平均直径差异极显著;  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  处理, 两者的根总长差异达极显著, 根表面积差异不显著, 根平均直径差异显著;  $60 \text{ mmol L}^{-1} \text{NH}_4^+$  处理, 两者的根总长和根表面积差异都不显著, 根平均直径差异仍显著。总体上, 根总长是耐

$\text{NH}_4^+$  型 Col-0 大于敏感型 JA22, 而根直径是耐  $\text{NH}_4^+$  型 Col-0 小于敏感型 JA22, 根表面积两者差异不显著。

**2.3.2 地上部干重、含水量和叶绿素含量** 拟南芥 Col-0 和 JA22 在水培条件下生长 18 d 后, 与对照 ( $2 \text{ mmol L}^{-1} \text{NH}_4^+$ ) 相比,  $30 \text{ mmol L}^{-1} \text{NH}_4^+$  处理 7 d 导致两者地上部干重都显著下降, 含水量只略有下降, 总体是 JA22 的下降程度比 Col-0 大, 两者地上部干重差异显著, 两者的含水量差异不显著 (图 4)。说明  $\text{NH}_4^+$  对拟南芥地上部的毒害主要是减少其干物质的生成, 而对其含水量影响很小。

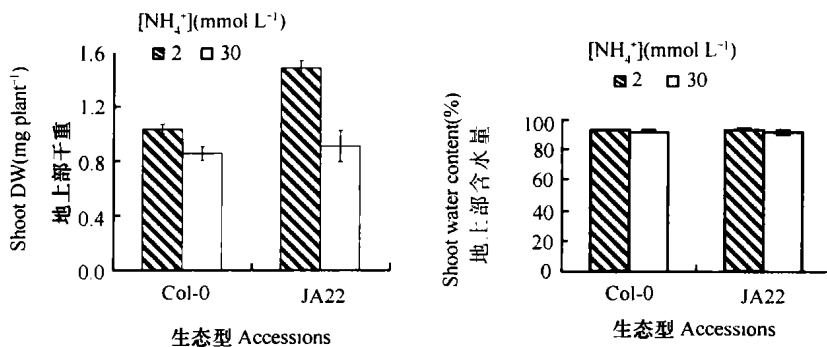


图 4  $\text{NH}_4^+$  对 Col-0 和 JA22 拟南芥地上部生物量及含水量的影响 (柱图上的误差线代表 SD,  $n=3$ )

Fig. 4 Effects of  $\text{NH}_4^+$  on biomass and water content of the ground parts of Col-0 and JA22 (Vertical bars represent SD,  $n=3$ )

表 3  $\text{NH}_4^+$  对 Col-0 和 JA22 拟南芥叶绿素含量的影响

Table 3 Effects of  $\text{NH}_4^+$  on chlorophyll content in the leaves of Col-0 and JA22

生态型 Accessions	叶绿素含量 Chlorophyll content ( $\text{mg g}^{-1}$ )		
	处理前 Treatment beginning	$2 \text{ mmol L}^{-1} \text{NH}_4^+$	$30 \text{ mmol L}^{-1} \text{NH}_4^+$
Col-0	$1.99 \pm 0.11^*$	$2.01 \pm 0.08 (1.0\%)$	$2.64 \pm 0.08 (32.7\%)$
JA22	$1.73 \pm 0.07$	$1.87 \pm 0.08 (8.1\%)$	$2.88 \pm 0.02 (66.5\%)^*$

注: 表中的值为平均值  $\pm$ SD,  $n=3$ ; \* 表示 T 检验在  $p=0.05$  水平上差异显著, 括号内的百分数为处理后的增加量 Note: The data were reported as mean  $\pm$ SD,  $n=3$ ; \* represents a significant difference at  $p=0.05$  by T-test, & the percentage in the bracket represents increase by  $\text{NH}_4^+$  treatment

$2 \text{ mmol L}^{-1} \text{NH}_4^+$  处理 7 d, 两者的叶绿素含量略有升高, 但两者差异不显著;  $30 \text{ mmol L}^{-1} \text{NH}_4^+$  处理 7 d, 两者叶绿素含量显著升高, 而且两者差异显著, Col-0 叶绿素含量比处理前升高 32.7%, JA22 升高 66.5% (表 3)。说明  $\text{NH}_4^+$  毒害没有降低拟南芥叶绿素含量, 反而提高了叶绿素含量, 而且敏感生态型对其响应变化大于耐  $\text{NH}_4^+$  生态型。

**2.3.3 对  $\text{NH}_4^+$  的吸收速率** 高等植物对外源  $\text{NH}_4^+$  吸收分为高亲和转运系统 ( $\text{NH}_4^+$  小于  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) 和低亲和转运系统 ( $\text{NH}_4^+$  大于  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) [16], 而本研究关注的主要是拟南芥对高  $\text{NH}_4^+$  的响应情况, 因

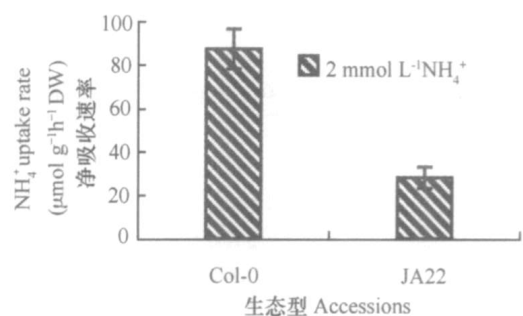


图 5 Col-0 和 JA22 对  $\text{NH}_4^+$  的净吸收速率 (误差线代表 SD,  $n=4$ )

Fig. 5  $\text{NH}_4^+$  net uptake rate of Col-0 and JA22 (Vertical bars represent SD,  $n=4$ )

此比较了典型拟南芥 Col-0 和 JA22 低亲和转运系统对  $\text{NH}_4^+$  吸收速率。在外源  $\text{NH}_4^+$  为  $2 \text{ mmol L}^{-1}$ , 溶液 pH 为 5.7 时, 拟南芥 Col-0 对  $\text{NH}_4^+$  的净吸收速率是拟南芥 JA22 的 3 倍多, 说明拟南 JA22 对  $\text{NH}_4^+$  敏感不是由于吸收过多的  $\text{NH}_4^+$  而引起的。

### 3 讨 论

植物根系对养分有效性及分布具有很强的响应能力, 通常硝酸根、磷酸根、硫酸根和铁离子作为一种外界信号能影响植物根系的细胞分裂和分化过程, 而改变根系形态作为对外界环境的响应影响<sup>[17]</sup>。在本实验中, 随  $\text{NH}_4^+$  浓度 ( $5 \sim 60 \text{ mmol L}^{-1}$ ) 增加,  $\text{NH}_4^+$  能明显的影响拟南芥根系生长, 当浓度大于  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  时, 拟南芥的主根长、侧根长和根表面积都显著的下降, 而且主根长比侧根长和根表面积表现的敏感。Cao 等<sup>[11]</sup>也报道过低  $\text{K}^+$  时  $\text{NH}_4^+$  能抑制拟南芥的生长, 而且发现拟南芥植物激素抗性突变体 (aux1, axr1 和 axr2) 能解除  $\text{NH}_4^+$  的抑制。这与  $\text{NO}_3^-$  的影响有所不同, Zhang 等<sup>[18]</sup>认为随  $\text{NO}_3^-$  浓度 ( $0.01 \sim 100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) 增加,  $\text{NO}_3^-$  不影响主根的生长, 但能明显抑制拟南芥侧根的伸长。与磷的情况也不同, Williamson 等<sup>[19]</sup>发现低磷促进拟南芥侧根的伸长, 抑制主根的伸长, 但是 Linkohr 等<sup>[20]</sup>研究表明磷大于  $0.164 \text{ mmol L}^{-1}$  能明显促进拟南芥主根的伸长, 抑制侧根的伸长。本实验还发现拟南芥平均根直径随  $\text{NH}_4^+$  浓度升高先变粗后变细。Boukcim 等<sup>[21]</sup>研究发现中等浓度  $\text{NH}_4^+$  促进雪松根尖直径的变粗, 但是 Bloom 等<sup>[22]</sup>报道低浓度  $\text{NH}_4^+$  使植物根系变长变细。

通过典型拟南芥 Col-0 和 JA22 的研究表明, 不同生态型拟南芥的主根长, 总根长和根平均直径对  $\text{NH}_4^+$  响应存在显著性差异。培养基条件下  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  或  $40 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{NH}_4^+$  处理, 耐  $\text{NH}_4^+$  型拟南芥的主根长和总根长都要比敏感型拟南芥的长, 而根直径要比敏感型拟南芥的小, 但根表面积两者差异不显著。因此根长和根平均直径对  $\text{NH}_4^+$  的响应能力比较强, 能反映不同生态型拟南芥对  $\text{NH}_4^+$  的敏感度。

水培条件下  $30 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{NH}_4^+$  处理, 不同生态型拟南芥地上部干重和叶绿素含量差异显著, Col-0 的地上部干重显著高于 JA22, 而含水量差异不明显, 故主要是抑制了干物质合成, 但 JA22 的叶绿素含量却显著高于 Col-0。因而可能是  $\text{NH}_4^+$  毒害抑制

拟南芥叶面积的生长减少光合产物或增强光呼吸消耗。Raab 和 Terry<sup>[23]</sup>报道  $\text{NH}_4^+$  能减少甜菜叶面积的生长, 增加叶绿素含量, 单位面积上的光合速率不降低。罗金葵<sup>[24]</sup>也报道适当增加  $\text{NH}_4^+$  会提高小白菜的叶绿素含量, 促进叶面积的生长, 随  $\text{NH}_4^+$  浓度升高叶绿素含量逐渐变高, 但叶面积变小, 而光合速率不受  $\text{NH}_4^+$  浓度影响。Zhu 等<sup>[25]</sup>观察到  $\text{NH}_4^+$  毒害会提高大豆光呼吸速率。

另外 Col-0 和 JA22 对  $\text{NH}_4^+$  的净吸收速率也存在显著性差异, Col-0 对  $\text{NH}_4^+$  的净吸收速率要比 JA22 高 3 倍多, 故 JA22 对  $\text{NH}_4^+$  的敏感并不是由于吸收的  $\text{NH}_4^+$  比 Col-0 多。Britto 等<sup>[5]</sup>在高  $\text{NH}_4^+$  水平对水稻 (耐  $\text{NH}_4^+$ ) 和大麦 ( $\text{NH}_4^+$  敏感) 研究表明, 大麦和水稻对  $\text{NH}_4^+$  的净吸收并无差异, 但是大麦对  $\text{NH}_4^+$  的外排量是吸收量的 76%, 而水稻对  $\text{NH}_4^+$  的外排量是吸收量的 53%,  $\text{NH}_4^+$  的这个无用循环是个高耗能过程, 从而导致大麦生物量的下降, 而在低  $\text{NH}_4^+$  水平, 两者的外排量都很小。因而 JA22 比 Col-0 敏感是否也是由于其根系对  $\text{NH}_4^+$  吸收消耗更多的能量有关, 对此值得进一步研究。

植物体内  $\text{NH}_4^+$  代谢酶活性的差异也可能是拟南芥对  $\text{NH}_4^+$  响应差异的一个重要的原因。Magalhaes 等<sup>[26]</sup>研究认为谷氨酸合酶 (GS) 是水稻耐  $\text{NH}_4^+$  毒害的关键因素, 因为水稻的 GS 含量无论在根中还是地上部均比西红柿 ( $\text{NH}_4^+$  敏感) 的要高, 含自由  $\text{NH}_4^+$  含量均比西红柿的低。Lasa 等<sup>[27]</sup>认为谷氨酸脱氢酶 (GDH) 是豌豆比菠菜耐  $\text{NH}_4^+$  毒害的重要因素。

作者推测  $\text{NH}_4^+$  对拟南芥的毒害可能与地上部  $\text{NH}_4^+$  含量密切相关, 而拟南芥忍受  $\text{NH}_4^+$  毒害可能有两途径, 一是减少  $\text{NH}_4^+$  向地上部运输而尽可能将吸收的  $\text{NH}_4^+$  存储在根部, 二是增强  $\text{NH}_4^+$  的代谢途径。

总之, 从本实验的培养条件来分析,  $\text{NH}_4^+$  对拟南芥毒害不是由于培养液的 pH 酸化或缺少  $\text{NO}_3^-$  引起的, 缓冲根际 pH 或  $\text{NH}_4^+ - \text{NO}_3^-$  共培养减轻  $\text{NH}_4^+$  毒害可能只是缓解了低 pH 和缺  $\text{NO}_3^-$  对植物生长的影响, 而非真正减轻  $\text{NH}_4^+$  毒害作用。高浓度  $\text{NH}_4^+$  对拟南芥的毒害也不是高离子强度引起的, 与拟南芥对  $\text{NH}_4^+$  吸收量的相关性也很小。

### 参 考 文 献

[ 1 ] Britto D T, Konzucker H J.  $\text{NH}_4^+$  toxicity in higher plants: A criti-

- cal review. *J. Plant Physiol.*, 2002, 159: 567 ~ 584
- [ 2 ] Gerendas J, Zhu Z, Bendixen R. Physiological and biochemical processes related to ammonium toxicity in higher plants. *Z. Pflanzenernahr. Bodenkd.*, 1997, 160: 239 ~ 251
- [ 3 ] Krupa S V. Effects of atmospheric ammonia (NH<sub>3</sub>) on terrestrial vegetation: a review. *Environmental Pollution*, 2003, 124: 179 ~ 221
- [ 4 ] 王小治, 朱建国, 高人, 等. 太湖地区氮素湿沉降动态及生态学意义: 以常熟生态站为例. *应用生态学报*, 2004, 15(9): 1 616 ~ 1 620. Wang X Z, Zhu J G, Gao R, *et al.* Dynamics and ecological significance of nitrogen wet-deposition in Taihu Lake region—Taking Changshu agro-ecological experiment station as an example (In Chinese). *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2004, 15(9): 1 616 ~ 1 620
- [ 5 ] Britto D T, Siddiqi M Y, Glass D M. Futile transmembrane NH<sub>4</sub><sup>+</sup> cycling: A cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, 98: 4 255 ~ 4 258
- [ 6 ] Walchr-Liu P, Neumann G, Fritz B, *et al.* Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco. *Journal of Experimental Botany*, 2000, 51(343): 227 ~ 237
- [ 7 ] Schortemeyer M, Stamp P, Feil B. Ammonium tolerance and carbohydrate status in maize cultivars. *Annals of Botany*, 1997, 79: 25 ~ 30
- [ 8 ] Karlsson B H, Silis G R, Niehuis J. Effects of photoperiod and vernalization on the number of leavers at flowering in 32 *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*) ecotypes. *American Journal of Botany*, 1993, 80: 646 ~ 648
- [ 9 ] Alonso-Blanco C, Koornneef M. Naturally occurring variation in *Arabidopsis*: An underexploited resource for plant genetics. *Trend in Plant Science*, 2000, 5: 22 ~ 29
- [ 10 ] Weigel D, Nordborg M. Natural variation in *Arabidopsis*. How do we find the causal genes? *Plant Physiol.*, 2005, 138: 567 ~ 568
- [ 11 ] Cao Y, Glass D M, Crawford N M. Ammonium inhibition of *Arabidopsis* root growth can be reversed by potassium and by auxin resistance mutations *aux7*, *aux7*, and *aux2*. *Plant Physiol.*, 1993, 102: 983 ~ 989
- [ 12 ] 刘峰, 施卫明. 拟南芥室内水培方法的改进. *土壤*, 2006, 38(1): 102 ~ 105. Liu F, Shi W M. An improved method for indoor hydroponic culture of *Arabidopsis thaliana* (In Chinese). *Soils*, 2006, 38(1): 102 ~ 105
- [ 13 ] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 2000. 134 ~ 137. Li H S. Principles and Techniques of Plant Physiological and Biochemical Experiment (In Chinese). Beijing: Higher Education Press, 2000. 134 ~ 137
- [ 14 ] Zhang L H, Shi W M, Wang X C. Difference in selenium accumulation in shoots of two rice cultivars. *Pedosphere*, 2006, 16(5): 646 ~ 653
- [ 15 ] 鲁如坤编. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 2000. 129 ~ 130. Lu R K. ed. Analytical of Methods Soil and Agro-Chemistry (In Chinese). Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000. 129 ~ 130
- [ 16 ] Wang M Y, Yaeesh Siddiqi M, Ruth T J. Ammonium uptake by rice roots. Kinetics of <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> influx across the plasmalemma. *Plant Physiol.*, 1993, 103: 1 259 ~ 1 267
- [ 17 ] Lopez-Bucio J, Cruz-Ramirez A, Herrera-Estrella L. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology*, 2003, 6: 280 ~ 287
- [ 18 ] Zhang H, Forde B G. An *Arabidopsis* MADA box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science*, 1998, 279: 407 ~ 409
- [ 19 ] Williamson L C, Ribrioux S P C P, Fitter A H, *et al.* Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 2001, 126: 875 ~ 882
- [ 20 ] Linkohr B I, Williamson L C, Fitter A H, *et al.* Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *Plant J.*, 2002, 29(6): 751 ~ 760
- [ 21 ] Boukcim H, Pages P, Mbusain D. Local NO<sub>3</sub><sup>-</sup> or NH<sub>4</sub><sup>+</sup> supply modifies the root system architecture of *Cedrus atlantica* seedlings grown in a split-root device. *J. Plant Physiol.*, 2006, 163(12): 1 293 ~ 1 304
- [ 22 ] Bloom A J, Meyerhoff P A, Taylor A R, *et al.* Root development and absorption of ammonium and nitrate from the rhizosphere. *J. Plant Growth Regul.*, 2003, 21: 416 ~ 431
- [ 23 ] Raab T K, Terry N. Nitrogen source regulation of growth and photosynthesis in *Beta vulgaris* L. *Plant Physiol.*, 1994, 105: 1 159 ~ 1 166
- [ 24 ] 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. *土壤学报*, 2005, 42(4): 614 ~ 618. Luo J K, Chen W, Zhang P W, *et al.* Effects on enhanced ammonium on the growth and chlorophyll content of Chinese cabbage (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2005, 42(4): 614 ~ 618
- [ 25 ] Zhu Z, Gerendás J, Bendixen R. Different tolerance to light stress in NO<sub>3</sub><sup>-</sup>- and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-grown *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Biol.*, 2000, 5: 558 ~ 570
- [ 26 ] Magalhaes J R, Huber D M. Ammonium assimilation in different plant species as affected by nitrogen form and pH control in solution culture. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 1989, 21(1): 1 ~ 6
- [ 27 ] Lasa B, Frechilla S, Aparicio-Tejo P M, *et al.* Role of glutamate dehydrogenase and phosphoenolpyruvate carboxylase activity in ammonium nutrition tolerance in roots. *Plant Physiol. Biochem.*, 2002, 40: 969 ~ 976

## EFFECTS OF ELEVATED $\text{NH}_4^+$ ON ARABIDOPSIS SEEDLINGS DIFFERENT IN ACCESSIONS

Li Baohai<sup>1,2</sup> Shi Weiming<sup>1†</sup>

(1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

(2 Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract** The aims of the work were to investigate effect of  $\text{NH}_4^+$  on *Arabidopsis* seedlings of different accessions growing in agar medium or hydroponics in root characteristics, morphology and physiology. Results indicate primary root length, lateral root length and root surface area of *Arabidopsis* all decreased with increasing  $\text{NH}_4^+$ , but root average diameter went up first and then down with increasing  $\text{NH}_4^+$ . Difference between ecotypes of *Arabidopsis* in response to elevated  $\text{NH}_4^+$  was obvious, but no similar phenomenon was found when the seedlings were exposed to the same concentration of  $\text{K}^+$ . Further study on two significantly different accessions of *Arabidopsis* (Col-0 tolerant to  $\text{NH}_4^+$  and JA22 sensitive to  $\text{NH}_4^+$ ) show that the effect of  $\text{NH}_4^+$  was significantly lower on Col-0 than on JA22 in inhibiting root length, and so was it in promoting root average diameter, but no much difference was observed between them. Treated with  $30 \text{ mmol L}^{-1} \text{NH}_4^+$ , Col-0 was significantly higher than JA22 in biomass of the shoots, but much lower in chlorophyll content, and they are more or less the same in water content. And in terms of  $\text{NH}_4^+$  uptake rate, Col-0 was at least 3 times higher than JA22. Therefore, it could be concluded that the *Arabidopsis* growth inhibited by  $\text{NH}_4^+$  was not attributed to rhizosphere acidification, absence of  $\text{NO}_3^-$ , high ion intensity or high availability of  $\text{NH}_4^+$  to plants.

**Key words** *Arabidopsis thaliana*; Ammonium toxicity; Root structure; Accessions; Physiology