

用微电极测定水稻根系质外体的 pH 值^{*}

尹晓明 范晓荣 贾莉君 沈其荣[†]

(南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095)

MEASUREMENT OF pH IN THE APOPLASTIC OF RICE ROOTS USING DOUBLE BARRELED H⁺ SELECTIVE MICROELECTRODES

Yin Xiaoming Fan Xiaorong Jia Lijun Shen Qirong[†]

(College of Resources and Environmental Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

关键词 离子选择性微电极;水稻根系;质外体;pH 值
中图分类号 S184 文献标识码 A

质外体是指原生质体以外的所有空间,包括细胞壁、细胞间隙及分化成熟的木质部等。质外体是植物细胞吸收养分离子的必经之路,是养分物质的储存库和缓冲区,对调节细胞内外的物质运输、调节营养平衡有重要作用。张福锁等研究表明,不同基因型植物根质外体 Fe 的积累量不同,可以作为不同基因型植物 Fe 营养效率的生理指标^[1];另一方面,质外体 pH 值的变化还影响着质外体中离子的交换特性,较大程度地影响着许多跨膜转运的过程。NH₄⁺ 和 NO₃⁻ 均是植物可利用的重要氮源,植物吸收 NH₄⁺ 和 NO₃⁻ 必然引起质外体 pH 值的变化,由此引起的质外体 pH 值的变化因植物种类和不同器官而不同。在外界供 NH₄⁺ 条件下,太阳花叶片质外体酸化,NO₃⁻ 则引起碱化^[2]。Sattelmacher 等认为 NO₃⁻ 引起的碱化与木质部中 NO₃⁻ 浓度以及根部硝酸还原酶活性有关,而 NH₄⁺ 对叶片质外体 pH 值影响很小,因为在根部氮浓度较低的情况下,叶片质外体中 NH₄⁺ 的浓度不会受到氮形态的影响^[3]。Harstein 等的研究表明,给雀麦叶片灌入 0.28 mmol L⁻¹ 的 NH₃ 使叶片质外体 pH 值上升了 0.53 个单位,同时用 NH₄⁺ 电极测得质外体中 NH₄⁺ 浓度的升高^[4]。就根来说,氮素形态也影响质外体 pH 值。羽扇豆的根在 10 mmol L⁻¹ NH₄⁺ 条件下,根质外体的 pH 值从处

理前的 5.2 下降到 4.9,在供给相等浓度的 NO₃⁻ 条件下,根质外体的 pH 值从处理前的 5.2 上升到 5.4^[5],但是 Zornoza 等的研究表明,氮素形态对黄爪质外体 pH 值没有影响^[6]。

以上这些研究结果不完全一致,其中原因还需进一步研究。就研究手段来说,可以测定植物质外体 pH 值的方法有离体法如差速离心、抽真空等;活体方法有激光扫描显微镜法、荧光染色等多种,每种方法均有其优点和局限性^[3],虽然离子选择性微电极费时且较难操作,但与其他方法相比却是一种快速直接地测定同一个细胞内不同细胞器中离子活度的良好方法。在国内,目前还很少有这方面研究的相关报道。本文利用双阻离子选择性微电极方法,测定 NO₃⁻ 营养对水稻根系质外体 pH 值的影响,目的是从一个新的角度研究水稻 NO₃⁻ 营养的基因型差异以及质外体对作物吸收 NO₃⁻ 的作用,为今后深入研究水稻对 NO₃⁻ 的转运、吸收和调节机制提供理论依据。

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

^{*} 国家自然科学基金项目(30270790,30390082)资助

[†] 通讯作者, E-mail: shenqirong@njau.edu.cn

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

收稿日期:2005-07-11;收到修改稿日期:2006-03-20

号)和籼稻(扬稻6号)。水稻种子经3% H₂O₂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,然后在蒸馏水中生长7 d以后转移至100 ml烧杯中,加满2 mmol L⁻¹ Ca(NO₃)₂溶液,在恒温光照培养箱中生长,光照14 h,温度30℃,黑暗10 h,温度28℃。每个杯子种6株苗。

1.2 质外体 pH 的测定

1.2.1 H⁺ 选择性双阻微电极的制作方法

双阻微电极的制作方法及其测定原理见文献[7]。所用标定溶液见表1。

pH 电极对 H⁺ 有高度选择性,电极中灌注的是专一性对 H⁺ 选择的试剂(pH sensor),其组成为:35 mg Hydrogen Ionophore II Cocktail A 氢离子扫描剂,16 mg PVC (polyvinyl chloride, 聚氯乙烯),6 mg Nitrocellulos 硝化纤维素,THF (tetrahydrofuran, 四氢呋喃),以上试剂购自 Fluka 公司。

1.2.2 电极的标定

为保证测定结果的准确性,测定前后都要对电极进行标定。标定溶液 pH 值及成分见表1。

表1 H⁺ 选择性微电极标定溶液的组成

pH	组成 (mmol L ⁻¹)					
	KCl	TAPS ¹⁾	MOPS ²⁾	MES ³⁾	KHC ₈ H ₄ O ₄	Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O
8.5	12	20	—	—	—	10
7.0	12	—	20	—	—	10
6.0	12	—	—	20	—	10
4.0	12	—	—	—	20	10

1) TAPS: [(2-羟基-1,1-二[羟甲基]乙基)氨基]-1-丙磺酸;

2) MOPS: 3-氮-吗啉丙磺酸; 3) MES: 2-氮-吗啉乙磺酸

标定后,由软件得到三个参数 P₁、P₂和 P₃,P₁为微电极参比电位,P₂为电位差对-log₁₀(aH⁺)作图所得曲线的斜率,即标定溶液中 H⁺ 活度每改变一个数量级,所产生的电位的差值;P₃为电极对 H⁺ 离子的检出限浓度。一般来说,响应较好的电极 P₂值在40~59 mV 之间,P₃值在 10⁻⁸~10⁻⁹。

1.2.3 水稻根质外体 pH 值的测定

选取生长一致、健康幼嫩的水稻根,分别测定 Ca(NO₃)₂ 培养前后根质外体 pH 的值。由于培养条件对质外体 pH 值影响较大,所以两个品种用相同 pH 的 Ca(NO₃)₂ (pH 4.7) 溶液在相同条件下培养。每个品种分别用不同的根重复3次以上。测定方法参见文献[8],即先将电极插入根细胞内(此时膜电位一般小于-50 mV),然后将电极推入第二层细胞,此时膜电位变化到-30~-40 mV 左右,而 pH 信号从较碱或

较酸(细胞质或液泡)变为微酸,即为质外体中的记录。根据公式 $E = P_1 - P_2 \times (-\log_{10}(aH^+)) + P_3$ 计算 H⁺ 活度 $pH = -\log_{10}(aH^+)$,可计算出 pH 值,所得数据用 Sigmaplot 作图软件绘图。测定后应对电极进行标定,一个质量较好的电极在测定前与测定后应有相近的标定值,并对 pH 值有良好的敏感性。如图1。

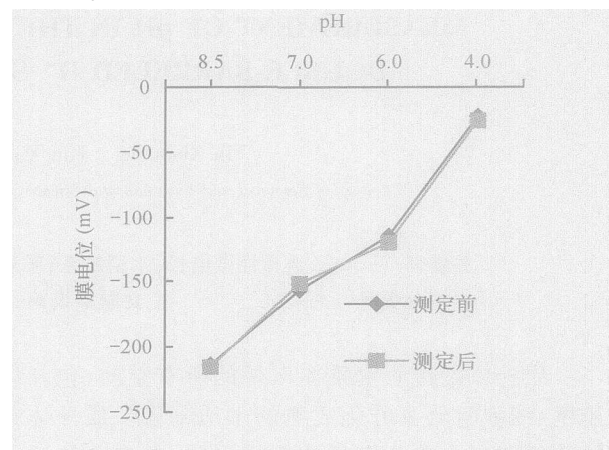


图1 双阻 pH 选择微电极的标定曲线

2 结果与讨论

2.1 Ca(NO₃)₂ 溶液培养使水稻根质外体 pH 值上升

Ca(NO₃)₂ 溶液培养对细胞内的 pH 值几乎没有影响,Reid 等对轮藻的研究表明,在外界 pH 4.5~8.5 范围内,其细胞质内的 pH 值只有微小的改变,且这种变化在几分钟内即可完成^[9],这说明细胞本身具有调控能力,使内部的 pH 值基本保持稳定。本文实验结果表明:Ca(NO₃)₂ 培养前后水稻根系细胞质和液泡的 pH 值分别维持在 7.3 和 5.6 左右(具体数据未显示),但却对质外体的 pH 值产生影响。2 mmol L⁻¹ Ca(NO₃)₂ 溶液培养水稻 4 d 后,根系质外体 pH 值上升,但是两个品种上升幅度不同。水稻在供给 Ca(NO₃)₂ 之前(在去离子水中生长,水的 pH 值 5.2),两个水稻根系质外体 pH 值均在 5.8 左右,Felle 等测得正常生长的玉米根质外体 pH 值在 5.1~5.6^[4]。2 mmol L⁻¹ Ca(NO₃)₂ 溶液(pH 4.7) 培养水稻 4 d 以后,扬稻 6 号根系质外体 pH 值只有微小的上升,上升了 0.15 个单位,武育粳 3 号根系质外体 pH 值上升幅度较大,约上升了 0.8 个单位(见表 2)。方差分析表明,两个水稻品种根系质外体的 pH 值差异显著($p < 0.05$)。由于 NO₃⁻ 以 2H⁺/NO₃⁻

共转运的形式进入细胞内,为了保持电荷平衡, OH^- 被排出到细胞外的质外体中,所以两个水稻品种吸收 NO_3^- 以后根系质外体的 pH 值均有所上升,这与前人的研究结果基本一致^[5]。

2.2 质外体 pH 值对离子跨膜转运的影响

质外体是细胞与外界环境联系的通道,根际 pH 值可能因为细胞生命活动而发生变化。本实验分别测定了 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 培养 4 d 后溶液的 pH 值,测得扬稻 6 号溶液的 pH 值从 4.7 上升到 6.90,而武育粳 3 号溶液的 pH 值上升到 6.66。这说明两个品种对根系吸收 NO_3^- 使质外体的 pH 值发生变化有着不同的调节能力。扬稻 6 号吸收 NO_3^- 的能力较强^[10],在相同培养条件下,较武育粳 3 号吸收更多的 NO_3^- ,而使培养液的 pH 值有较大的上升,但是质外体 pH 值变化相对较小,也就是说它通过使培养液的 pH 有较大的升高来缓冲因吸收较多的 NO_3^- 而导致的质外体 pH 的升高,质外体 pH 的相对稳定对养分离子的跨膜转运以及细胞正常的生理代谢是十分重要的。

0.1 mmol L⁻¹ 增加到 10 mmol L⁻¹ 时质外体 pH 值下降了 0.3 个单位,在低浓度的 KCl 存在条件下,当外界 Ca^{2+} 浓度从 0.1 mmol L⁻¹ 上升到 10 mmol L⁻¹ 时使质外体酸化。但是高浓度的 KCl 又使质外体碱化。 Ca^{2+} 通道的抑制剂 LaCl_3 明显地使质外体碱化。可见 K^+ 、 Ca^{2+} 在质外体 pH 值的调节过程中也起到重要作用。在本实验中, NO_3^- 以 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 形式供给根系, Ca^{2+} 对水稻根系质外体的影响还有待于下一步的研究。就叶片质外体的调节作用来说,Peuke 等认为供给根系的氮素形态很少影响叶片质外体 pH 值的变化^[11],Kronzucker 等认为叶片质外体 pH 值受光呼吸和其他生理过程的精细调节^[12]。

扬稻 6 号吸收 NO_3^- 的能力较强,可能与它的根系具有较强的质外体 pH 的调控能力有关。但是,质子泵和运输蛋白(离子通道)是如何分工协调,控制着质外体 pH 的变化进而影响离子的跨膜转运?外界环境条件如何影响这种调控作用?质外体 pH 的变化对培养液 pH 的变化有何影响等等,这些问题还有待于作进一步地研究。

表 2 NO_3^- 对水稻根系质外体 pH 值的影响

品种	质外体 pH 值 ¹⁾	
	处理前	处理后
武育粳 3 号	5.83 ± 0.86 a	6.64 ± 0.53 b
扬稻 6 号	5.85 ± 0.33 a	6.0 ± 0.27 bc

1) 不同字母表示差异显著

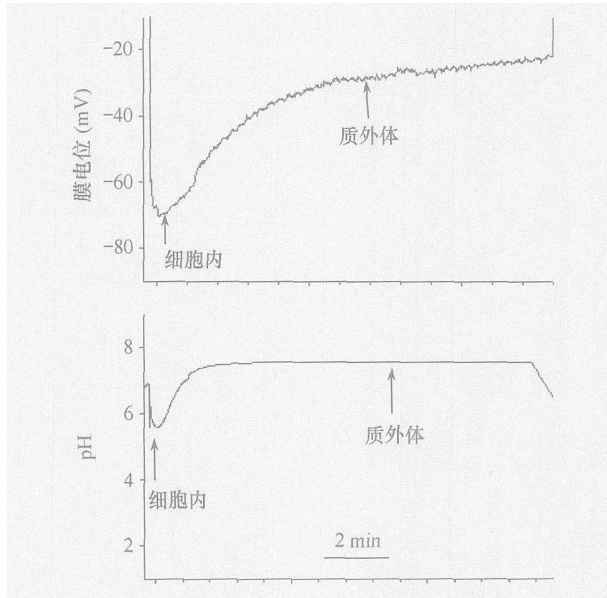


图 2 武育粳 3 号根系细胞膜电位,细胞内外的 pH 值
箭头表示电极从细胞内(液泡)移动到质外体中。测得膜电位为 -70.6 mV,液泡 pH 为 5.8;质外体膜电位为 -34 mV,pH 为 7.1

Harstein 等对玉米根系的研究表明,根质外体 pH 的调节主要包括两方面的因素^[4]。一是原生质膜上质子泵的活性,另一个是阳离子通道。质子泵的激活剂 fusicoicin 使玉米根系质外体的 pH 值从 5.6 下降至 4.8,而质子泵的抑制剂 cyanide 使质外体 pH 值从 5.6 上升到 6.2; KCl 浓度从

3 小 结

本文介绍了 pH 微电极的制作、标定以及用于测定水稻吸收 NO_3^- 前后质外体 pH 值的方法。研究表明,2 mmol L⁻¹ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 培养使水稻幼苗根系质外体的 pH 值上升。吸收能力较强的品种可能通过使培养液的 pH 有较大的升高来缓冲因吸收较多的 NO_3^- 而导致的质外体 pH 的升高,但是质外体的 pH 变化受细胞诸多代谢因素的调控。本文用 pH 微电极测定水稻根系吸收 NO_3^- 前后质外体 pH 值的改变有助于了解质外体在作物吸收 NO_3^- 中的作用。

参 考 文 献

- [1] 张福锁,刘书娟,毛达如. 苹果抗缺铁基因型差异的生理生化指标研究. 园艺学报, 1995(22): 1~5
- [2] Hoffmann B, Plenker R, Mengel K. Measurements of pH in the

- apoplast of sunflower leaves by means of fluorescence. *Physiologia Plantarum*, 1992, 84:146 ~ 153
- [3] Sarttelmacher B. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytologist*, 2001, 149:167 ~ 192
- [4] Harstein S, Felle H. The influence of atmospheric NH_3 on the apoplastic pH of green leaves: a non-invasive approach with pH-sensitive microelectrodes. *New Phytologist*, 1999, 143:333 ~ 338
- [5] Yu Q, Kuo J, Tang C. Using confocal laser scanning microscopy to measure apoplastic pH changes in roots of *Lupinus angustifolius* L. in response to high pH. *Annals of Botany*, 2001, 87:47 ~ 52
- [6] Pand Z, Carpena O. Study on ammonium tolerance of cucumber plants. *Journal of Plant Nutrition*, 1992, 15:2 417 ~ 2 426
- [7] 贾莉君, 范晓荣, 尹晓明, 等. 双阻离子选择性微电极测定活体不结球小白菜叶片细胞中硝酸根离子的活度. *土壤学报*, 2005, 42(3):447 ~ 452
- [8] Felle H. The apoplastic pH of the *Zea mays* root cortex as measured with pH-sensitive microelectrodes: Aspects of regulation. *Journal of Experimental Botany*, 1998, 49:987 ~ 995
- [9] Reld R J, Smith F A. Measurements of the cytoplasmic pH of *Chara corallina* using double-barrelled pH micro-electrodes. *Journal of Experimental Botany*, 1998, 39:1 421 ~ 1 432
- [10] 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. *土壤学报*, 2004, 41(5):803 ~ 809
- [11] Peuke A D, Jeschke W D, Dietz K J. Foliar application of nitrate or ammonium as sole nitrogen supply in *Ricinus communis*. I. Carbon and nitrogen uptake and inflows. *New Phytologist*, 1998, 138:657 ~ 687
- [12] Kronzucker H J, Schioerring J K, Emer Y. Dynamic interactions between root NH_4^+ influx and long-distance N translocation in rice: insights into feedback processes. *Plant and Cell Physiology*, 1998, 39:1 287 ~ 1 293