

氮锌交互作用对白三叶草叶片活性氧代谢和叶绿体超微结构的影响

何忠俊¹, 华 璐²

(1. 云南农业大学资源与环境学院, 云南 昆明 650201; 2. 首都师范大学地理系, 北京 100037)

摘 要:在砂培条件下,研究了不同水平氮锌配施对白三叶草叶片活性氧代谢和叶绿体超微结构的影响。结果表明,在缺锌条件下,随氮水平增加,植株干物重、叶片叶绿素、SOD、类胡萝卜素含量显著下降,MDA 含量则明显增加,即白三叶草叶片光合作用和清除活性氧的能力显著下降,氮锌配施在缺锌条件下表现为拮抗效应。在足量供锌条件下,中量供氮,植株干物重、叶片叶绿素、SOD、胡萝卜素含量高于低量供氮,MDA 含量则相反,氮锌配施表现为协同效应;与中低水平供氮相比,当高水平供氮时,各组分干物重、叶片叶绿素、SOD、类胡萝卜素含量等显著下降,MDA 含量显著增加,氮锌配施表现为拮抗效应。叶片超显微结构表明,低锌条件下,随供氮水平增加,叶绿体结构变差,基粒及基粒片层、基质片层数量下降甚至解体,光合能力显著下降;足量供锌时,以中量供氮叶绿体基粒及基粒片层、基质片层数量最多,内部结构有序性最高,光合能力最强。叶绿体超显微结构变化与叶绿素、SOD、类胡萝卜素含量变化趋势相一致。

关键词:氮; 锌; 交互作用; 白三叶草; 活性氧; 叶绿体超微结构

中图分类号:Q256 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2005)06-1048-06

Effect of the Interaction Between N and Zn on Active Oxygen Metabolism and Chloroplast Ultra-structure of White Clover Leaves

HE Zhong-jun¹, HUA Luo²

(1. Resource and Environmental College, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Department of Geography, Capital Normal University, Beijing 100037, China)

Abstract: Sand culture experiment was carried out to study the effect of interaction between N and Zn on active oxygen metabolism and chloroplast ultrastructure of white clover leaves. The main results indicated that the dry matter weight, the content of chlorophyll, SOD and carotinoid of leaves significantly decreased and MDA content of leaves remarkably increased with the increase of N rate; N and Zn combined application showed antagonism effect in the condition with deficient Zn, while, in the condition with sufficient Zn, the dry matter weight, the content of chlorophyll, SOD and carotinoid of leaves were higher and MDA content of leaves was lower at moderate N rate than those at high and low N rates, suggesting that N and Zn combined application showed synergism effect; at high amount of N supply, the dry matter weight, the content of chlorophyll, SOD and carotinoid of leaves significantly decreased and MDA content of leaves remarkably increased compared with those at moderate and low N rate, implying that N and Zn combined application showed antagonism effect. The chloroplast ultrastructure of mesophyll cell of white clover leaves showed that in the condition of Zn deficiency, with the increasing rate of applied N, the inner structure of chloroplast ruined, in which the number of the grana and grana lamellae as well as stroma lamellae decreased and disintegrated, which resulted in the low photosynthesis capacity of chloroplast. In the condition with sufficient supply of Zn, the numbers of the grana,

收稿日期:2004-11-14

基金项目:国家自然科学基金资助(39870127)

作者简介:何忠俊(1962—),男,博士,副教授,主要从事植物营养生理和土壤污染方面的研究。E-mail:hezongjun@hotmail.com

联系人:华 璐

grana lamellae and stroma lamellae as well as the order of the combination of them in chloroplast were the highest at moderate rate of N application, the volume of chloroplast reduced and the system of lamellae swelled and couldn't form grana at high rate of N application. The change of chloroplast ultrastructure was correspondent with that of chlorophyll, SOD and carotinoid content.

Keywords: nitrogen; zinc; interaction; active oxygen; chloroplast ultrastructure ; white clover leaves

在植物营养方面,对氮锌关系早在 20 世纪 30 年代以来就有不同的认识^[1]。一些研究者认为氮锌之间有拮抗效应^[2-7],而另一些研究者则认为氮锌之间存在协同效应^[8-11]。以上研究均是基于对植株干物质产量、氮锌浓度及吸收量的分析得出的结论,关于氮锌交互作用的细胞生物学机理研究甚少^[12]。为此,本文采用砂培试验、生化分析及电子显微技术,研究了氮锌交互作用对植株生长状况、活性氧代谢和叶绿体超微结构的影响,以期阐明氮锌交互作用的细胞生物学机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计与材料

沙培试验于 2001 年 9 至 10 月在中国农业科学院原子能所示踪网室进行,试验 N 设 5、15、30 mmol·L⁻¹ 3 个水平,分别代表低量氮(Hoagland 营养液 N 浓度的 1/3)、中量氮(Hoagland 营养液正常 N 浓度)和高量氮(Hoagland 营养液 N 浓度的 2 倍),以 N₁、N₂、N₃ 表示。Zn 设 0.1、2.0 μmol·L⁻¹ 2 个水平,分别代表缺锌和足量锌(按郑绍建等^[13]磷锌关系研究中的锌浓度确定),以 Zn₁、Zn₂ 表示,共 6 个处理,各处理组合为: N₁Zn₁、N₂Zn₁、N₃Zn₁、N₁Zn₂、N₂Zn₂、N₃Zn₂。N 用 NH₄NO₃, Zn 用 ZnSO₄·7H₂O(皆为分析纯),每处理重复 3 次。植物生长所需的其他营养液以 Hoagland 营养液为基础,以 Arnon 微量元素营养液补充微量元素。供试白三叶草品种为 *Trifolium repens* L, 其种子用 0.1%Hg-Cl₂ 灭菌,用根瘤菌(*Trifolium Rhizobium*-90)接种。8 月 28 日播种,采用 3.5 kg 米氏盆-酸洗石英砂培养,每天淋浇营养液 300 mL, 每 3 d 用蒸馏水淋洗 1 次。每盆留苗 20 株。

1.2 生化测定

生长 40 d 后进行生化测定,10 月 28 日收获后测定生物学产量。叶绿素及类胡萝卜素含量测定用 80%丙酮提取,665、649、470 nm 处比色。SOD、MDA 采用试剂盒法测定(南京建成生物工程研究所提供)。

1.3 叶肉细胞叶绿体超微结构观察

收获前取第 1 片展开叶片中部约 4 mm×4 mm 样品,立即放入含 2.5%戊二醛的 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲

液中(pH7.0)固定数日,再经 1%锇酸缓冲液固定,丙酮系列脱水,Epon812 包埋,切成厚度为 50nm 的超薄切片,再经醋酸铀和柠檬酸铅双染色后,用日立 H-500 型透射电子显微镜观察和摄影,电压 80 kV。

2 结果与分析

2.1 氮锌配施对白三叶草生长和叶绿素含量的影响

图 1 表明,在缺锌条件下,随供氮水平增加,白三叶草全株、地上和根系干物重显著降低(Duncan's SSR 检验达 1%显著水平)。与缺锌处理比较,相同供氮水平下,足量供锌极显著提高了全株、地上和根系干物重(Duncan's SSR 检验达 1%显著水平)。足量供锌条件下,与低量氮相比,中量供氮对地上干物重增加较小,但对根系干物重则有显著增加;高量供氮极显著降低了全株、地上和根系干物重(Duncan's SSR 检验达 1%显著水平)。说明中氮和足锌处理(N₂Zn₂)对白三叶草生长(尤其是根系生长)有显著的促进作用,缺锌或高氮条件下对白三叶草生长有显著抑制作用。

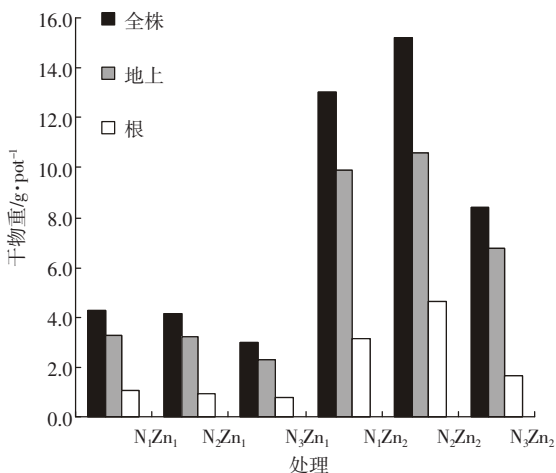


图 1 氮锌配施对白三叶干物重的影响

Figure 1 Effect of N and Zn combined application on the dry matter weight of white clover

叶绿素是光合作用的基本物质,其含量与叶片光合作用强弱密切相关。图 2 表明无论低锌还是足量供锌,叶绿素含量均以高量氮最低,与低锌处理相比,足量供锌极显著地提高了叶绿素含量(Duncan's SSR

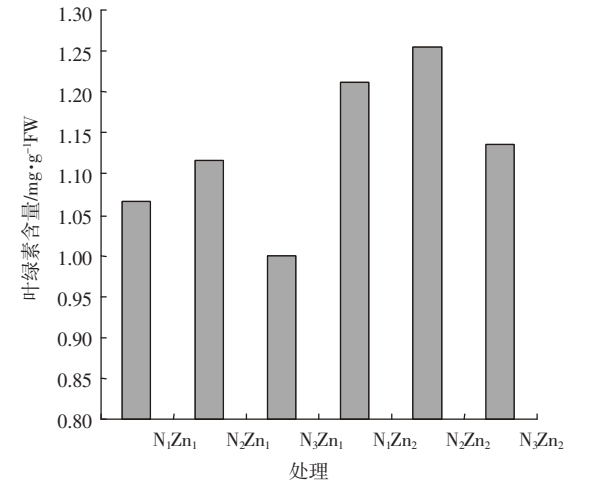


图2 不同水平氮锌配施对白三叶叶绿素含量的影响

Figure 2 Effect of N and Zn combined application on the chlorophyll content in white clover leaves

检测达1%显著水平)。说明足量供锌提高了白三叶草叶片的光合能力。

2.2 氮锌配施对叶片自由基代谢的影响

植物可通过多种途径产生 O₂⁻、OH·、O₂·、H₂O₂ 等自由基,同时细胞内也存在清除这些活性氧的多种途径。细胞为了维持正常生命活动其自由基必须处于较低的状态。植物体内活性氧清除物质有 2 大类:一类为保护酶系统,主要有 SOD(Cu、Zn 超氧化物歧化酶)、POD(过氧化物酶)、CAT(过氧化氢酶);另一类为抗氧化剂系统,主要为一些小分子物质,如维生素 E、抗坏血酸、类胡萝卜素等^[14,15]。丙二醛(MDA)是膜脂过氧化的产物,其含量高低是衡量细胞膜受损伤程度的指标之一。表 1 表明,与缺锌条件相比较,足量供锌显著提高了叶片 SOD 酶活性和类胡萝卜素含量,显著降低了 MDA 含量。说明缺锌植物体清除活性氧的能力下降,细胞结构受损,从而影响了植物生长。此结果和前人研究结论一致^[14,16-17]。但不同氮锌水平下,叶片 SOD、MDA、和类胡萝卜素变化规律不同。在缺锌条件下,叶片 SOD 及类胡萝卜素含量随施氮水平增加而下降,而 MDA 含量呈相反的变化趋势。在足量供锌条件下,叶片以中量供氮 SOD、类胡萝卜素含量最高,MDA 含量最低。

2.3 氮锌配施对叶肉细胞叶绿体超微结构的影响

作物组织结构的变化在一定程度上可以反映作物的营养状况。关于氮或锌单施对小麦、玉米、苹果等叶片超显微结构影响的报道较多^[18-20],但关于氮锌配施对植物叶片超显微结构的影响尚无资料报道。叶片光合主要在栅栏组织细胞的叶绿体中进行,叶绿体是

表 1 氮锌配施对叶片 SOD、MDA、类胡萝卜素含量的影响

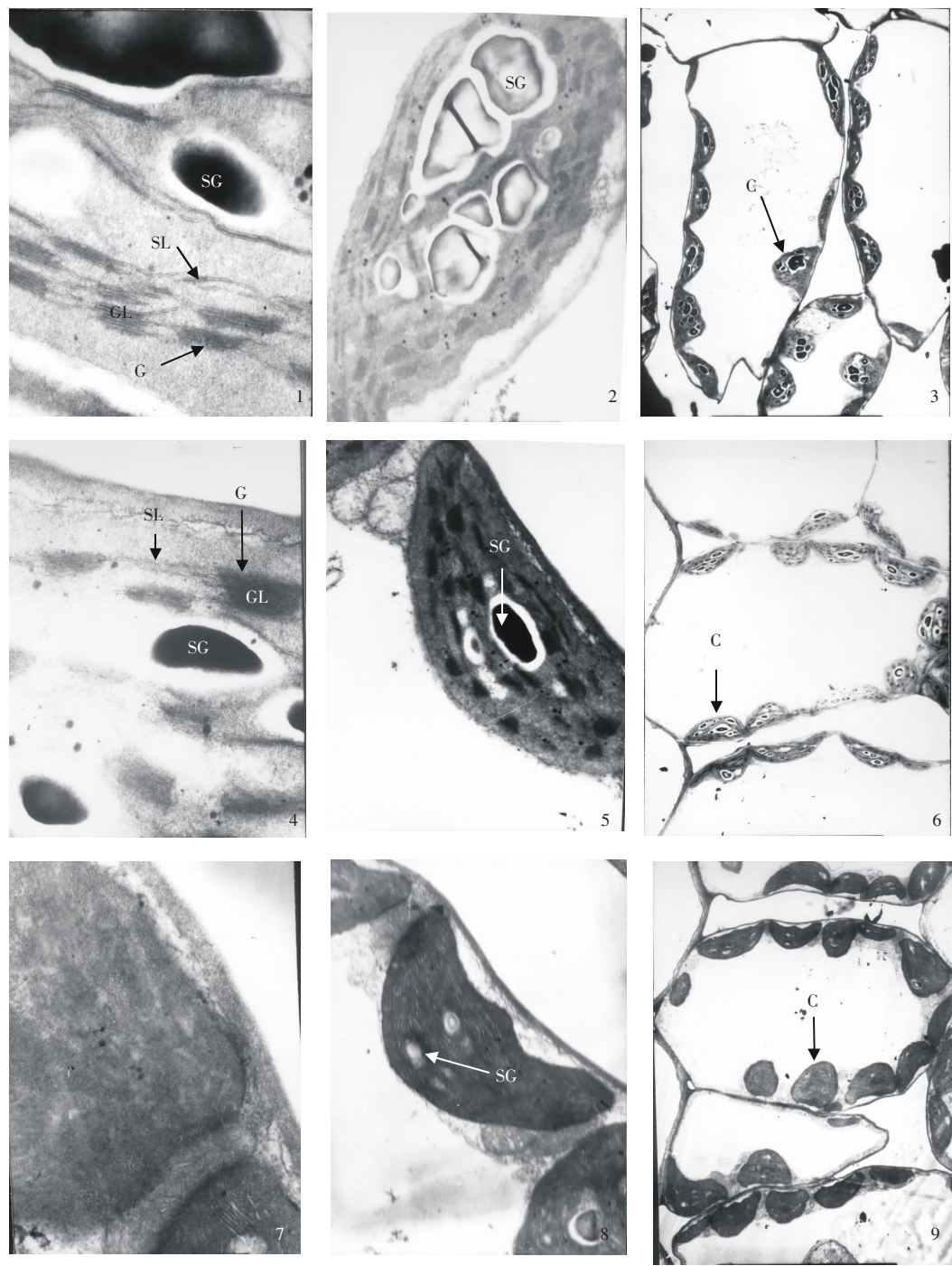
Table 1 Effect of N and Zn combined application on SOD, MDA and carotin content of white clover leaves

处理	SOD /NU · mg ⁻¹	MDA /nmol · mg ⁻¹	类胡萝卜素 /mg · kg ⁻¹
N ₁ Zn ₁	59.19	7.01	157.9
N ₂ Zn ₁	58.78	7.50	139.9
N ₃ Zn ₁	52.25	7.85	143.3
N ₁ Zn ₂	73.39	4.50	173.9
N ₂ Zn ₂	79.03	3.59	186.4
N ₃ Zn ₂	64.41	5.26	180.6
SSR(0.05)	2.84	0.40	8.1

活性氧产生的主要部位,也是光合作用的唯一场所,Cu、Zn-SOD 酶主要存在于叶绿体中^[14]。用透射电镜观察了白三叶栅栏组织细胞叶绿体超显微结构,见图 3、图 4。结果表明:

在缺锌条件下,低氮处理,叶绿体外膜凸凹不平,形状为不规则菱形,叶绿体内淀粉粒较多,表明叶绿体尚能进行光合作用。叶绿体内基粒和基质片层较丰富、清晰,但基粒片层数量较少,一般为 3~6 个,基质片层断裂,表明基粒之间联系较差,见图 3 之 1~3;中量氮处理,叶绿体内基粒及基粒片层较多,但基质片层较少,结构性差,基粒和基质片层模糊、呈解体状态,叶绿体内淀粉粒小,表明叶绿体光合作用能力很弱,见图 3 之 4~6;高氮处理,叶绿体严重畸形,体积变小,叶绿体内无基粒和基质片层分化,内部结构呈混沌状态,叶绿体内淀粉粒很少,表明叶绿体光合作用极弱,见图 3 之 7~9。说明在缺锌条件下,随氮水平增加,叶绿体内部结构变差,光合能力显著下降。

在足量供锌条件下,低氮处理,叶绿体为规则菱形,与缺锌处理相比较,单个细胞内叶绿体数量增多,叶绿体变大,叶绿体内淀粉粒大且多,表明叶绿体光合能力增强,叶绿体内基粒及基粒片层丰富,见图 4 之 1~3;中量氮处理,叶绿体为规则菱形,叶绿体体积大,叶绿体内淀粉粒较低氮处理大且多,叶绿体内基粒及基粒片层丰富,基粒和基质片层排列有序化程度较低氮处理高,表明叶绿体光合能力很强,见图 4 之 4~6;高氮处理,叶绿体为弯月型,与中氮和低氮处理相比,叶绿体体积变小,单个细胞内叶绿体数量减少,叶绿体片层系统肿胀,不能堆叠成基粒,叶绿体内淀粉粒小而少,表明叶绿体光合能力下降,见图 4 之 7~9。说明足量供锌条件下,中量氮叶绿体结构性最好,低量氮次之,高氮最差。与缺锌处理相比较,相同氮水平下,足量供锌显著增加了叶绿体的基粒、基粒片层



说明:从上到下分别为 N_1Zn_1 、 N_2Zn_1 、 N_3Zn_1 ,从左到右分别显示相同处理叶绿体内部结构(3.0 万倍)、单个叶绿体结构(1.0 万倍)和叶肉细胞结构(1 500~2 000 倍)

G-grana 基粒;GL-grana lamellae 基粒片层;SL-stroma lamellae 基质片层;SG-starch grain 淀粉粒;C-chloroplast 叶绿体。

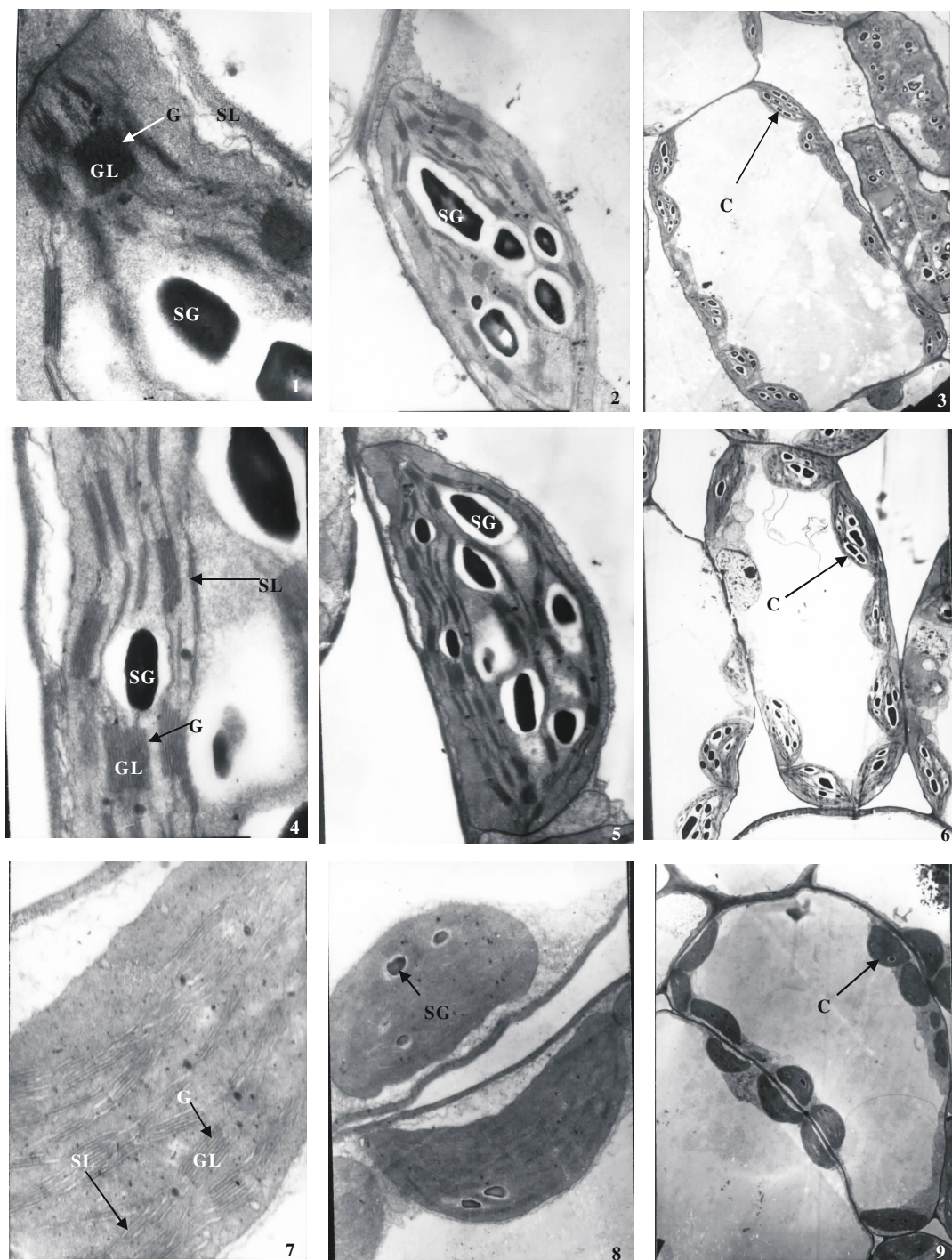
图 3 缺锌条件下,不同氮水平对叶绿体超显微结构的影响

Figure 3 Effect of different N levels on chloroplast ultrastructure of mesophyll cells of white clover under Zn deficiency

和基质片层数量,增大了叶绿体体积,提高了叶绿体内部结构的有序性,从而提高了叶片的光合能力。

根据何忠俊等^[21]在相同试验中对白三叶草根瘤

发育和超微结构的研究发现,与其他处理相比,低氮足锌处理(N_1Zn_2)根瘤数量、单瘤重、根瘤固氮酶活性、根瘤细胞内类菌体数量最大,类菌体周膜空间最



说明:从上到下分别为 N_1Zn_2 、 N_2Zn_2 、 N_3Zn_2 , 从左到右分别显示相同处理叶绿体内部结构(3.0 万倍)、单个叶绿体结构(1.0 万倍)和叶肉细胞结构(1 500~2 000 倍)。

G-grana 基粒;GL-grana lamellae 基粒片层;SL-stroma lamellae 基质片层;SG-starch grain 淀粉粒;C-chloroplast 叶绿体。

图 4 足量供锌条件下,不同氮水平对叶绿体超显微结构的影响

Figure 4 Effect of different N levels on chloroplast ultrastructure of mesophyll cells of white clover under Zn sufficient supply

小,细胞壁、细胞膜和类菌体周膜完整性和均匀性最高。而本文中中以中氮足锌处理(N_2Zn_2)植株干物重、叶片叶绿素、SOD、胡萝卜素含量最高,叶绿体基粒及基

粒片层、基质片层数量最多,内部结构有序性最高,光合能力最强。说明中量供氮抑制了根瘤发育和根瘤的固氮能力,但不影响白三叶草的正常生长,高量供氮

显著抑制了白三叶草的正常生长。因为本试验盆栽时间短，根瘤从形成到具有固氮能力需要一定的时间，所以本试验中白三叶草生长所需的大部分氮素主要由营养液提供。

3 小结

(1)在不同氮锌水平下,氮锌配施对白三叶草生长和活性氧代谢的影响不同。在缺锌条件下,随供氮水平增加,全株、地上、根系的干物重、叶片叶绿素、SOD、类胡萝卜素含量呈下降趋势,MDA 含量则明显增加。表明缺锌条件下,随施氮水平增加,白三叶草叶片光合及清除活性氧能力下降,氮锌配施在缺锌条件下表现为拮抗效应。在足量供锌条件下,中量供氮,各组分干物重、叶片叶绿素、SOD、类胡萝卜素含量高于低量供氮,MDA 则相反,氮锌配施表现为协同效应;当高水平供氮时,各组分干物重、叶片叶绿素、SOD、类胡萝卜素含量等显著下降,MDA 含量则增加,氮锌配施表现为拮抗效应。

(2)白三叶草叶片超显微结构表明,低锌条件下,随供氮水平增加,叶绿体结构变差,基粒及基粒片层、基质片层数量下降甚至解体,光合能力显著下降。足量供锌时,以中量供氮叶绿体基粒及基粒片层、基质片层数量最多,内部结构有序性最高。叶绿体超显微结构变化与叶绿素、SOD、类胡萝卜素变化趋势相一致。

参考文献:

[1] Chapman H D. Relation between nitrogen and Zinc in crop nutrition[J]. *J Agr Res*, 1937, 55:365–379.

[2] 陈保生,崔 微. 锌氮比例对蕃茄生长的影响与氮代谢的关系[J]. 植物生理学报, 1966, 3(1):25–33.

[3] Valle B L, Galdes A. The metallo–biochemistry of Zinc enzymes[J]. *Adv Enzymol*, 1984, 56:284–430.

[4] Singh B K, Singh R P. Zinc deficiency symptoms in lowland rice as induced by modified–urea materials applied at different rates of nitrogen in calcareous soil[J]. *Plant and Soil*, 1985, 87:439–440.

[5] kumar V, Ahlawat V S, Antil R S. Interactions of nitrogen and Zinc in

pearl millet: 1. Effect of nitrogen and Zinc levels on dry matter yield and concentration and uptake of nitrogen and zinc in pearl millet [J]. *Soil Science*, 1985, 139(4):351–356.

[6] Ozanne P G. The effect of nitrogen on Zinc deficiency in subterranean clover[J]. *Aust J: Biol Sci*, 1955, 8:47–55.

[7] Abdul M, Saeed A S. Nitrogen response of barley plants to nitrogen and zinc fertilization in calcareous soils[J]. *Agrochimca*, 1979, 23(3–4):288–293.

[8] Soliman M F, Solima N F, Farah M A. Response of barley plants to nitrogen and zinc fertilization in calcareous soils[J]. *Agrochimca*, 1979, 23(3–4), 288–293.

[9] Karimian N. Effect of nitrogen and phosphorous on zinc nutrition of corn in a calcareous soil[J]. *J of Plant Nutrition*, 1995, 18(10) 2261–2271.

[10] Langin E J, War R C, Olsen R S. Factors responsible for poor response of corn and grain sorghum to phosphorus fertilization. II. Lime and phosphorus placement effect on phosphorus–zinc relations[J]. *Soil Sci Soc Am Proc*, 1962, 26:574–575.

[11] Singh D V. Effect of soil applied zinc on nitrogen and phosphorus nutrition of wheat[J]. *Balwant Vidyapeeth Journal of Agricultural and Scientific Research*, 1974, 16:2, 125–128.

[12] 何忠俊,华 珞,白玲玉,等. 土壤–植物系统中氮锌交互作用研究进展[J].土壤与环境, 2001, 12(2), 133–137.

[13] 郑绍建,杨志敏,胡嵩堂.玉米、小麦细胞、磷锌营养及交互作用的研究[J].植物营养与肥料学报, 1999, 5(2): 150–155.

[14] 张福锁.环境胁迫与植物营养[M]. 北京:北京农业大学出版社, 1993.83–100.

[15] 徐竹生,刘道友. 水稻叶片衰老的研究[J]. 华中农业大学学报, 1986, 15(1)33–39.

[16] Cakmak I, Ekiz H, Yilmaz A. Torun B, Koleli. Diferential response of rye, triticale, bread and durum wheats to zinc deficiency in calcareous soils[J]. *Plant and Soil*, 1997a, 188(1):1–10.

[17] Cakmak I, Ozturk L, Eker S. Concentration of zinc and activity of copper/zinc–superoxide dismutase in leaves of rye and cultivars differing in sensitivity to deficiency[J]. *J Plant Physiol*, 1997b, 151:91–95.

[18] 王振林,沈成国,余松烈. 小麦供锌状况对叶片结构和叶绿体超微结构的影响[J]. 作物学报, 1993, 19(6), 559–559.

[19] 曲桂敏,黄天栋,顾曼如. 锌与苹果叶片的显微结构及其超微分布[J]. 园艺学报, 1993, 20(4)339–342.

[20] 左宝玉. 玉米不同层次叶片叶绿体的超微结构和叶绿素含量变化[J]. 作物学报, 12(3): 213–216.

[21] 何忠俊,梁社往,华 珞. 氮锌复合作用对白三叶草根瘤超显微结构的影响[J].云南农业大学学报, 20(2): 209–213.