

不同铵硝比对菠菜有机酸和淀粉含量的影响

汪建飞^{1,2}, 沈其荣¹, 周毅², 董彩霞¹

(¹南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095; ²安徽科技学院植物科学学院, 安徽凤阳 233100)

摘要:【目的】研究不同铵硝比的氮素营养对于菠菜有机酸和淀粉含量的影响。【方法】采用营养液栽培菠菜的方法, 营养液中的氮素形态设置硝态氮和铵态氮以一定比例(100:0、75:25、50:50、25:75和0:100)配合。【结果】随着铵硝比的下降,(1)菠菜茎叶丙酮酸、柠檬酸、 α -酮戊二酸、琥珀酸、延胡索酸和苹果酸等6种有机酸含量以及淀粉含量都呈上升趋势;同时,有机酸含量与营养液中初始硝态氮浓度之间呈显著的线性正相关关系;(2)菠菜根系丙酮酸、柠檬酸、琥珀酸和苹果酸含量以及淀粉含量也呈上升趋势,但延胡索酸含量的变化不明显;(3)除了柠檬酸外,菠菜根系其它5种有机酸含量与其茎叶中相应有机酸含量的比值都呈现下降的趋势;在全硝营养条件下,根系中只有琥珀酸和延胡索酸的含量低于其在茎叶中的含量;而在全铵营养时,菠菜根系中上述5种有机酸的含量均明显高于茎叶中的相应有机酸的含量。因此,与根系相比,菠菜茎叶中5种有机酸含量随营养液中硝态氮比例增加而增加的幅度更明显。而随着营养液中硝态氮比例的增加,菠菜根系柠檬酸含量与其茎叶柠檬酸含量的比值逐渐升高,则说明根系柠檬酸含量增加的幅度要大于茎叶柠檬酸含量;(4)菠菜的茎叶和根系中的淀粉含量都呈现下降的趋势,且与营养液中硝态氮浓度之间均呈现为显著的负相关关系。【结论】随着营养液中硝态氮比例的增加,菠菜茎叶和根系有机酸代谢均表现为增强的趋势。

关键词: 菠菜; 铵硝比; 有机酸; 淀粉

Effect of Ratio of Ammonium to Nitrate on Organic Acid and Starch Content of Spinach

WANG Jian-fei^{1,2}, SHEN Qi-rong¹, ZHOU Yi², DONG Cai-xia¹

(¹College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095;

²College of Plant Science, Anhui Science and Technological University, Fengyang 233100, Anhui)

Abstract: 【Objective】 Research was carried out to study the effect of ammonium-enhancement nutrition on organic acid and starch content in spinach (*Spinacia oleracea* L.). 【Method】 Hydroponic experiments were conducted in greenhouse, nitrogen form changed by properly increasing ammonium concentration in nutrient solution. 【Result】 Content of pyruvate, citrate, α -ketoglutarate, succinate, fumarate and malate in spinach shoots increased with the decrease of $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ ratio, and which were significantly and positively correlated with nitrate concentration in nutrient solution. The content of pyruvate, citrate, succinate and malate in spinach roots also increased with the decrease of $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ ratio, which didn't significantly affect fumarate content. With the decline of $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ ratios, ratios of pyruvate, α -ketoglutarate, succinate, fumarate and malate content of roots to that of shoots in spinach tended to decrease, while the ratio of citrate content gradually increased. Starch content in both of shoot and root in spinach tended to decrease with the decrease of $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ ratio, and starch content in both of shoots and roots were negatively correlated with the nitrate concentration in nutrient solution. 【Conclusion】 With the increase of proportion of nitrate supply in nutrient solution, metabolism of organic acids in both of shoot and root enhanced to provide enough energy and carbon skeleton for protein synthesis.

Key words: Spinach; Ratio of ammonium to nitrate; Organic acid; Starch

收稿日期: 2007-05-25; 接受日期: 2007-11-20

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(050410105)、国家自然科学基金项目(30270790)和土壤与农业可持续发展国家重点实验室开放基金项目

作者简介: 汪建飞(1969-), 男, 安徽庐江人, 教授, 博士, 研究方向为植物氮素营养与有机酸代谢。Tel: 0550-6733128; E-mail: jykwj@sina.com。

通讯作者沈其荣(1957-), 男, 江苏无锡人, 教授, 研究方向为植物氮素营养。Tel: 025-84395212; E-mail: shenqirong@njau.edu.cn

0 引言

【研究意义】有机酸代谢不仅在细胞水平的能量生产、氨基酸生物合成前体的形成等生化途径中发挥着重要作用^[1]；而且还参与植物体内的酸碱平衡过程。以硝态氮的同化为例，植物叶片中合成的有机酸可以中和其硝态氮同化过程中所产生的等量的、但不能被细胞有效排出的 OH^- ，从而保持了叶片中硝态氮同化部位的 pH 稳定^[2]。【前人研究进展】现有研究表明，有机酸一方面可以刺激植物对硝态氮的吸收，另一方面，又可为硝态氮或铵态氮同化为氨基酸提供碳骨架；因此，硝态氮充当了诱导植物体内碳氮代谢之间协调变化和有机酸合成的信号^[3-5]；并可进一步降低植物根冠比和改变根构型^[6-8]。有时，硝态氮甚至不需要进一步代谢便可在输入后作为信号而调节多种碳水化合物代谢进程如三羧酸（TCA）循环和淀粉代谢^[3-5,9,10]；但 Wang 等^[11]认为，既然硝态氮与其他非代谢离子不同，在植株体内还会进一步转化为亚硝态氮、铵态氮甚至氨基酸，这些代谢产物必然对植物感应硝态氮信号的过程产生显著影响。目前已有研究表明，亚硝态氮和铵态氮都能抑制基因表达^[12,13]，而铵态氮也能诱导编码包括磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（PEPCase）、谷氨酰胺合成酶（GS）、氨基酸转运蛋白 AAP1 和天冬酰胺合成酶（ASN2）的基因表达^[11,14,15]。由此可见，硝态氮和铵态氮均会影响植物体内有机酸和淀粉含量的变化。以番茄作为供试作物的研究已经证实，植株体内的有机酸含量确实随外源供应铵硝比的降低而呈现规律性的变化趋势^[16]。另一方面，进一步的研究表明，在高等植物中，蔗糖及其衍生物也是植物细胞调控基因表达和影响植物生理生化过程的信号分子^[3]。尽管糖和氮信号转导途径可以相互响应，但其信号互动却相当复杂，有推测认为，糖信号可能在多个节点和不同水平上对植物体内氮代谢进行调控^[10]。【本研究切入点】因此，对植物供应铵态氮和硝态氮两种形态的氮素或二者的适当配比，可通过其同化过程的差异，从氮代谢的不同节点引入生理反应水平上实际供氮浓度差异这一因素，进而就可通过监测该过程中菠菜有机酸和淀粉含量的变化趋势，进一步了解其与有机酸合成以及淀粉代谢的关系。【拟解决的关键问题】本文通过测定不同铵硝配比条件下菠菜植株不同部位有机酸以及淀粉含量的变化状况，初步探讨供氮形态、有机酸合成以及淀粉代谢三者之间的关系，为深入了解铵硝比对菠菜碳氮代谢调节的生理生化机制奠定基

础。

1 材料与方法

1.1 试验设计

供试的菠菜品种为银川大圆。将菠菜种子浸泡在 50℃ 的温水中消毒 30 min，用去离子水清洗并浸泡 12 h。然后置于 25℃ 培养箱中恒温催芽 1 周，再播种于苗床。30 d 后移栽至装有 12 L 营养液的塑料周转箱中，每个周转箱中栽植 30 棵苗。采用单因素完全随机试验方案。在供氮水平一致（均为 12 mmol N·L⁻¹）的前提下，设计 5 个不同水平的铵硝比（ $\text{NO}_3^- \text{-N}/\text{NH}_4^+ \text{-N}$ ），分别是 100 : 0、75 : 25、50 : 50、25 : 75 和 0 : 100，每个处理重复 3 次。营养液中大量营养元素的含量分别是 12 mmol N·L⁻¹、1 mmol P·L⁻¹、6 mmol K·L⁻¹、5 mmol Ca·L⁻¹，和 2 mmol Mg·L⁻¹；微量元素的含量分别为 H_3BO_3 (0.50 mg B·L⁻¹)，Fe-EDTA (2.8 mg Fe·L⁻¹)， $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.50 mg Mn·L⁻¹)， $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.05 mg Zn·L⁻¹)， $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.02 mg Cu·L⁻¹) 和 H_2MoO_4 (0.09 mg Mo·L⁻¹)。此外，营养液中均加入 7 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硝化抑制剂 DCD。每天 8: 00 和 16: 00 时均用电动充气泵给营养液通气，每次 30 min。每天测量 1 次营养液的 pH，并用 0.5 mol·L⁻¹ HCl 或 NaOH 调节 pH 至 6.5 左右。营养液每 10 d 更换 1 次。移栽 30 d 后采集样品。

1.2 有机酸含量的测定

参照董彩霞等^[16]的方法，采用高效液相色谱法测定菠菜样品中的有机酸含量。测定所用仪器为美国 Waters 公司的高效液相色谱仪。

(1) 有机酸样品制备。称取 2 g 左右菠菜样品（叶片或根系）于研钵中，加 5 ml 超纯水研磨并无损转移到离心管中，20 000 g×4℃ 离心 20 min，将上清液转入小离心管，于冰箱冷藏，上机前用 0.45 μm 滤膜抽滤。

(2) 色谱条件。色谱柱：德国 Merck 公司生产的 Hibar® column RT 250 mm×4.6 mm，填料直径为 5 μm ，柱温：30℃，流动相：0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ (pH 2.5) 缓冲液，使用前用 0.45 μm 滤膜抽滤，流速：1 ml·min⁻¹，紫外检测波长 214 nm 测定有机酸，进样量：20 μl 。

1.3 淀粉含量的测定

采用 Somogyi 法测定菠菜中淀粉的含量^[17]。

2 结果与分析

2.1 不同铵硝比对菠菜生物量的影响

不同铵硝比氮素营养对菠菜的生长影响显著(表1), 不同处理间菠菜的鲜重达到显著差异水平。由表1可以看出, 随着营养液中硝态氮比例的增加, 菠菜地上部分的鲜重也逐渐增加, 在全硝营养条件下, 菠菜产量达到最大值, 平均单株茎叶鲜重可达 6.2 g; 分别是 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^- = 100 : 0$ 、75 : 25、50 : 50、25 : 75

处理的 5.9 倍、3.4 倍、2.6 倍和 1.2 倍。

与鲜重的变化规律相近, 随着营养液中 NO_3^- -N 比例的增加, 菠菜的干物重也呈现出增加的趋势, 但铵硝比为 25 : 75 和 0 : 100 两个处理之间, 菠菜的干物重差异不显著。这表明营养液中 NH_4^+ -N 的比例低于 25% 时, NH_4^+ -N 营养对菠菜的干物质累积没有显著影响。

表 1 不同铵硝比的氮素营养对菠菜生物量的影响

Table 1 Effect of NH_4^+ -N/ NO_3^- -N ratios on spinach biomass (g/plant)

铵硝比 NH_4^+ -N/ NO_3^- -N ratios	鲜重 Fresh weight			干重 Dry weight		
	茎叶 Shoot	根系 Root	全株 Total	茎叶 Shoot	根系 Root	全株 Total
100 : 0	1.05 ± 0.12e	0.25 ± 0.06c	1.30 ± 0.15e	0.22 ± 0.03c	0.05 ± 0.03b	0.27 ± 0.04c
75 : 25	1.83 ± 0.12d	0.61 ± 0.11bc	2.44 ± 0.22d	0.35 ± 0.09c	0.11 ± 0.05b	0.46 ± 0.13c
50 : 50	2.42 ± 0.23c	0.77 ± 0.26b	3.19 ± 0.12c	0.59 ± 0.08b	0.13 ± 0.04b	0.72 ± 0.12b
25 : 75	5.18 ± 0.17b	1.52 ± 0.34a	6.70 ± 0.23b	0.99 ± 0.12a	0.26 ± 0.03a	1.25 ± 0.12a
0 : 100	6.20 ± 0.26a	1.60 ± 0.25a	7.80 ± 0.51a	1.02 ± 0.04a	0.27 ± 0.10a	1.29 ± 0.14a

表中数据为平均数±标准差; 同一列中数据后小写字母不相同者表示处理间的差异达 5% 的显著水平

Data in the table are Mean ± S.D, n=3; Means in a column followed by the different small letters represent significant difference at 5% level

2.2 不同铵硝比对菠菜茎叶中有机酸含量的影响

随着铵硝比的降低, 菠菜茎叶中丙酮酸、柠檬酸、 α -酮戊二酸、琥珀酸、延胡索酸和苹果酸 6 种有机酸的含量都呈现明显上升的趋势(表 2)。说明铵硝比的变化可影响菠菜茎叶中的有机酸含量。其中, 在铵

硝比为 25 : 75 时, 菠菜茎叶中的苹果酸含量最高, 但与铵硝比为 0 : 100 的处理差异不显著 ($P = 0.05$)。全硝营养菠菜茎叶中 6 种有机酸的含量是全铵营养的 2.5 倍以上, 其中相差最大的是延胡索酸, 其次为苹果酸。

表 2 不同铵硝比对菠菜茎叶中有机酸含量的影响

Table 2 Effect of NH_4^+ -N/ NO_3^- -N ratios on content of organic acids in spinach shoots

有机酸 Aminoacids	铵硝比 NH_4^+ -N/ NO_3^- -N ratios				
	100 : 0	75 : 25	50 : 50	25 : 75	0 : 100
丙酮酸 Pyruvate	92.8 ± 13.7e	121.7 ± 21.9d	177.5 ± 12.7c	296.4 ± 14.2b	333.2 ± 17.4a
柠檬酸 Citrate	247.6 ± 31.7e	354.3 ± 17.5d	396.8 ± 16.5c	565.0 ± 31.8b	617.8 ± 20.9a
α -酮戊二酸 α -Oxoglutarate	18.8 ± 2.4d	24.0 ± 1.7c	28.2 ± 2.2c	47.6 ± 2.4b	69.0 ± 2.8a
琥珀酸 Succinate	135.6 ± 16.8d	252.8 ± 12.1c	311.1 ± 16.4b	406.8 ± 14.8a	429.7 ± 17.5a
延胡索酸 Fumarate	17.2 ± 7.5d	34.3 ± 5.6c	68.8 ± 4.0b	112.8 ± 15.7a	148.7 ± 15.6a
苹果酸 Malate	193.6 ± 16.5d	342.6 ± 33.4c	599.9 ± 21.7b	985.3 ± 19.1a	937.9 ± 41.4a

表中数据为平均数±标准差; 有机酸的含量单位是 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{FW}$; 同一行中数据后小写字母不相同者表示处理间的差异达 5% 的显著水平。下表同

Data in the table are Mean ± S.D, n=3; The unit of the content of organic acid is $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{FW}$; Means in a row followed by the different small letters represent significant difference at 5% level. The same as below

进一步的分析表明, 菠菜茎叶中丙酮酸、柠檬酸、 α -酮戊二酸、琥珀酸、延胡索酸和苹果酸 6 种有机酸的含量与营养液中的起始 NO_3^- -N 浓度呈明显的相关关系, 相关系数 r 分别为 0.9764**、0.9841**、0.9475*、0.9801**、0.9811** 和 0.9207* ($n=3$; $r_{0.05}=0.878$;

$r_{0.01}=0.959$; *表示相关关系达 5% 显著水平; **表示相关关系达 1% 显著水平)。

2.3 不同铵硝比对菠菜根系中有机酸含量的影响

营养液中铵硝对比对菠菜根系中的有机酸含量也有一定影响, 但其影响规律除延胡索酸外, 与茎叶中

有机酸含量的变化规律基本相同, 即均是随培养液中硝态氮浓度的增加而增加, 只是增加的幅度相对较小而已。同时, 根系各种有机酸的含量要高于茎叶 (表 3)。与全铵营养相比, 全硝营养菠菜根系中丙酮酸、柠檬酸、琥珀酸和苹果酸的含量分别增加了 1.5、5.1、1.5 和 1.3 倍; α -酮戊二酸增加了 1.2 倍。值得注意的是, 铵硝比对根系延胡索酸的含量影响不大, 5 个不同铵硝比处理菠菜根系延胡索酸的含量之间没有显著差异。

2.3 菠菜根系有机酸含量与其茎叶中相应有机酸含量的比值随外源铵硝比供应的变化

从表 4 可以看出, 随着铵硝比的下降, 除了柠檬酸外, 菠菜根系其它 5 种有机酸含量与其茎叶中相应有机酸含量的比值都呈现下降的趋势; 其中在全硝营养时, 菠菜根系中丙酮酸、 α -酮戊二酸、琥珀酸、延胡索酸和苹果酸的含量分别是其茎叶中含量的 1.6、1.6、0.6、0.9 和 1.6 倍, 说明在全硝营养条件下, 根系中只有琥珀酸和延胡索酸的含量才低于其在茎叶中的含量; 而在全铵营养时, 菠菜根系中上述 5 种有机酸的含量均明显高于茎叶中的相应有机酸的含量。因

此, 随着营养液中硝态氮比例的增加, 根系与茎叶中有机酸含量之间的差异变小, 即与根系相比, 菠菜茎叶中 5 种有机酸含量随营养液中硝态氮比例增加而增加的幅度更明显。而随着营养液中硝态氮比例的增加, 菠菜根系柠檬酸含量与其茎叶柠檬酸含量的比值逐渐升高, 则说明根系柠檬酸含量增加的幅度要大于其茎叶柠檬酸含量。

2.4 不同铵硝比对菠菜淀粉含量的影响

外源氮素形态配比对菠菜体内淀粉含量影响显著。不论在何种铵硝配比条件下, 菠菜茎叶中的淀粉含量均明显高于根系中的淀粉含量 (图); 随着铵硝比的下降, 菠菜茎叶和根系的淀粉含量, 都呈现下降的趋势。其中全铵营养菠菜茎叶和根系中的淀粉含量分别是全硝营养的 2.6 倍和 3.5 倍。由此说明铵态氮的存在有利于菠菜体内的淀粉积累。对菠菜中淀粉含量的测定结果与营养液中硝态氮的浓度进行回归分析, 结果表明, 营养液中硝态氮浓度 (x , $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和菠菜茎叶及根系中淀粉含量 (分别以 Y_S 、 Y_R 表示, $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$) 之间均呈现为显著的负相关关系, 相关方程如下:

表 3 不同铵硝比对菠菜根系有机酸含量的影响

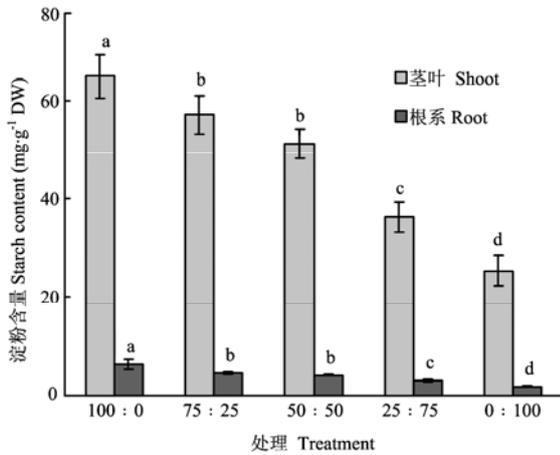
Table 3 Effect of $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ ratios on content of organic acids in spinach roots

有机酸 Aminoacids	铵硝比 $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ ratios				
	100 : 0	75 : 25	50 : 50	25 : 75	0 : 100
丙酮酸 Pyruvate	341.2±24.3d	384.7±9.9c	409.0±16.2c	479.8±15.0b	533.2±17.3a
柠檬酸 Citrate	399.1±12.0e	609.3±77.7d	1139.5±65.1c	1665.7±75.4b	2035.1±147.3a
α -酮戊二酸 α -Oxoglutarate	90.6±4.3c	98.8±2.3b	99.9±3.2b	104.1±3.9ab	108.8±4.9a
琥珀酸 Succinate	176.9±8.6d	183.6±8.8d	204.8±6.7c	237.5±10.0b	274.1±10.8a
延胡索酸 Fumarate	124.0±5.9a	128.3±6.7a	128.9±4.7a	134.6±7.3a	132.3±4.6a
苹果酸 Malate	885.8±24.5d	945.0±23.7cd	985.2±33.2bc	1033.7±52.2b	1173.6±72.0a

表 4 不同铵硝比条件下菠菜根系有机酸含量与其茎叶相应有机酸含量的比值

Table 4 The ratios of total organic acids levels in spinach root to that of in shoot at different $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ ratios

有机酸 Aminoacids	铵硝比 $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ ratios				
	100 : 0	75 : 25	50 : 50	25 : 75	0 : 100
丙酮酸 Pyruvate	3.68	3.16	2.30	1.62	1.60
柠檬酸 Citrate	1.61	1.72	2.87	2.95	3.29
α -酮戊二酸 α -Oxoglutarate	4.82	4.12	3.54	2.19	1.58
琥珀酸 Succinate	1.30	0.73	0.66	0.58	0.64
延胡索酸 Fumarate	7.21	3.74	1.87	1.19	0.89
苹果酸 Malate	3.68	3.16	2.30	1.62	1.60



柱图上的误差线表示标准误差, $n=3$; 柱图上相同字母表示处理间差异不显著 ($P=0.05$)
Data represent means of three replications, and values of organic acid contents marked by the same letter are not significantly different ($P=0.05$)

图 不同铵硝比对菠菜茎叶和根系中淀粉含量的影响

Fig. Effects of $\text{NH}_4^+\text{-N/NO}_3^-\text{-N}$ ratios on the contents of starch in spinach shoot and root

$$Y_S = 66.9780 - 3.3323x \quad r = 0.9748^{**}$$

$$Y_R = 5.9840 - 0.3467x \quad r = 0.9766^{**}$$

2.5 菠菜体内淀粉含量和有机酸含量的相关性分析

进一步建立菠菜体内淀粉含量和丙酮酸等 6 种有机酸之间的回归模型。由表 5 可以看出,除了根系延胡索酸含量与淀粉含量之间的相关系数为 0.8057,其余各种有机酸在菠菜茎叶或根系中的含量,都与其相应部位中的淀粉含量有显著的相关性,相关系数均在 0.8780 以上。此外,所有相关方程的斜率 b 值均为负

数,说明菠菜体内有机酸含量与淀粉含量之间呈现显著的负相关关系,而这种负相关关系很可能是受到植株中硝态氮含量变化的影响。

3 讨论

植物体内的丙酮酸来源于呼吸作用中的糖酵解分解代谢途径。淀粉或己糖经过磷酸化和裂解等过程形成丙酮酸后,在有氧的条件下,进入三羧酸循环途径,再形成柠檬酸、琥珀酸、延胡索酸和苹果酸等^[18]。因此,丙酮酸是合成上述几种有机酸的最初底物。由淀粉和糖转化的有机酸还为氮代谢过程中氨基酸的合成提供了碳骨架。在氮饥饿条件下,植物叶片积累淀粉,而当恢复供氮时,淀粉含量则下降^[11]。在本试验中,随着铵硝比的降低,菠菜茎叶和根系中的丙酮酸含量均呈现显著上升的趋势,由此推测硝态氮营养可能通过增强了菠菜体内的糖酵解途径从而促进了有机酸的合成,这也可由本试验中菠菜茎叶和根系中淀粉含量随营养液中初始硝态氮浓度的增加而降低的趋势得到初步证实。另外,研究表明,当低硝酸还原酶活性的突变体烟草植株生长于高浓度硝酸盐环境时 ($12 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$),烟草植株体内的苹果酸和柠檬酸等有机酸含量会增加 3~10 倍^[4];而在全硝营养条件下,番茄幼苗的柠檬酸、琥珀酸、延胡索酸和苹果酸的含量也最高,说明硝态氮营养可能刺激了植物体内的有机酸合成^[4,5,19,20]。在本试验中,全硝营养菠菜茎叶和根系中丙酮酸、柠檬酸、琥珀酸、 α -酮戊二酸以及苹果酸含量也均明显高于全铵营养的。但 Wang 等^[11]通过给氮饥饿的拟南芥供应不同形态的氮素发现,硝态氮

表 5 菠菜茎叶和根系中有机酸含量与相应部位淀粉含量之间相关方程的参数

Table 5 Parameters of the relationship equations between the levels of organic acids in spinach shoot and root and the content of starch in corresponding organ

有机酸 Aminoacids	茎叶 Shoot			根系 Root		
	a	b	相关系数 Correlation coefficient	a	b	相关系数 Correlation coefficient
丙酮酸 Pyruvate	512.46	-6.56	0.9785 ^{**}	606.07	-45.28	0.9629 ^{**}
柠檬酸 Citrate	880.07	-9.45	0.9793 ^{**}	2729.12	-399.43	0.9282 [*]
α -酮戊二酸 α -Oxoglutarate	97.19	-1.27	0.9656 ^{**}	116.27	-4.05	0.9943 ^{**}
琥珀酸 Succinate	642.80	-7.14	0.9121 [*]	305.18	-23.00	0.8961 [*]
延胡索酸 Fumarate	235.61	-3.39	0.9908 ^{**}	138.16	-2.19	0.8057
苹果酸 Malate	1588.63	-20.79	0.8982 [*]	1250.71	-63.02	0.9272 [*]

相关方程 $y=a+bx$. y 为有机酸含量, x 为菠菜中淀粉含量; *表示相关关系达 5% 显著水平; **表示相关关系达 1% 显著水平

Relationship equation $y=a+bx$. y is organic acid level in spinach shoot ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{FW}$); x is content of starch in spinach ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$); Single star indicates significant relationship at 5% level, and double star indicates significant relationship at 10% level

营养拟南芥叶片淀粉含量下降了 19%，而铵态氮营养拟南芥则下降了 26%。与此矛盾的是，有研究表明，全铵营养菜豆的净呼吸速率明显高于全硝营养^[21]，而本试验中这几种有机酸的合成也主要来自呼吸作用。因此，还不清楚为何在相对较强的呼吸作用下，全铵营养植物体内没有累积相对较多的有机酸？同时也不清楚其淀粉含量也相对较高的原因是什么？有可能是根系生物量下降所引起的浓缩效应。本研究小组的前期试验已经证实，随着营养液中铵态氮浓度的增加，菠菜的全氮含量和氮累积量均有下降趋势，所以，也可能造成植物体内的淀粉含量相对上升，进而造成有机酸合成量的降低；但全铵营养植物有机酸含量相对较低还有可能与其游离氨基酸含量相对较高有关^[22]，即合成这部分氨基酸可能消耗了多余的有机酸。目前，硝态氮营养条件下菠菜体内的有机酸含量升高与硝态氮营养对呼吸速率影响之间的关系还有待深入研究。

由于氮素同化需要大量碳架，生物体必然启动碳的回补反应，一方面合成苹果酸以中和硝态氮在植物叶片同化后产生的等量的 OH^- ，确保细胞内稳定的 pH^[3,23]；另一方面合成 α -酮戊二酸为氨基酸的合成提供碳架^[2,24]。在本试验中，随着铵硝比的下降，菠菜茎叶中有机酸含量增幅最明显的是延胡索酸和苹果酸，这与菠菜对硝态氮的同化主要在其茎叶部位也是一致的^[22]；由于茎叶形成的苹果酸钾随着韧皮部液流运输到根部，在根部发生脱羧反应，同时介质中的硝态氮在 K^+ 的陪伴下重经木质部运输到叶片，如此往复，完成硝态氮的吸收和还原^[2,25]。由此可见，茎叶中延胡索酸和苹果酸含量的增加很可能是为了满足吸收和还原更多硝态氮的需要，而由 PEPcase 催化的回补反应生成的草酰乙酸直接在苹果酸脱氢酶的作用下生成的^[2]；而在菠菜根系中，增幅最明显的是柠檬酸，同时，铵硝比对根系中延胡索酸的含量影响不大，与 Dong 等^[20]在番茄增铵营养试验的结果基本一致；造成这种现象的原因可能是增铵营养促进了 TCA 中苹果酸向柠檬酸的转化， α -酮戊二酸含量升高，从而加速了铵态氮的同化过程^[20]，因此，在铵硝比降低的条件下，就可能会出现根系中柠檬酸相对富裕的情况。而菠菜根系中丙酮酸、 α -酮戊二酸、琥珀酸、延胡索酸和苹果酸的含量和其茎叶相应有机酸含量的比值却随着铵硝比的下降而呈现下降的趋势，则可能是由于随着不同供氮形态比例的变化，吸收的氮的主要同化部位由根系^[26]向茎叶^[26,27]转移所造成的效应。随着铵硝比的降低，菠菜茎叶中的有机酸合成由于其淀粉含

量随铵硝比的下降而降低可能也呈现增强趋势，但其下降幅度和数量很明显低于根系。因此，随着硝态氮供应比例的提高，可能出现两种情况：（1）菠菜茎叶中有机酸的合成随着硝态氮同化需要的增大而增强；（2）根系中合成的有机酸向地上部的运输量相对增加，尚有待进一步证实。而铵态氮主要在菠菜的根系中同化^[22]推测可能也是其根系较茎叶有机酸含量高的原因之一。

在番茄的不同铵硝配比试验中，丙酮酸和 α -酮戊二酸含量是在铵硝比为 25 : 75 时含量最高^[20]，与本试验中只有苹果酸在铵硝比为 25 : 75 时最高的结果不尽一致，这可能与采用的植物种类不同有关。因为从糖到形成丙酮酸的糖酵解过程，虽然在生物界都是相似的，但丙酮酸以后的途径却可能随着植物机体所处的条件和发生在何种植物体中而各不相同^[28]。另外，因此，即使是针对喜铵硝特性相近的植物种类，其体内的有机酸代谢等过程对不同铵硝比的响应与响应程度也不完全一致，有待系统研究其间的共性与差异。

4 结论

不同铵硝比处理显著影响菠菜茎叶和根中的有机酸和淀粉含量。营养液中硝态氮浓度的增加促使菠菜茎叶和根系丙酮酸、柠檬酸、 α -酮戊二酸、琥珀酸和苹果酸等 5 种有机酸的含量都呈现上升趋势；但与根系相比，茎叶中 5 种有机酸含量增加的幅度更明显。此外，营养液中硝态氮浓度的增加还造成菠菜茎叶及根系中淀粉含量出现下降趋势，可能是为上述菠菜茎叶和根系中不同程度得到增强的有机酸代谢提供底物所致。

References

- [1] López-Bucio J, Nieto-Jacobo M F, Ramírez-Rodríguez V, Herrera-Estrella L. Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Science*, 2000, 160: 1-13.
- [2] Touraine B, Grignon N, Grignon C. Charge balance in NO_3^- -Fed soybean. Estimation of K^+ and carboxylate recirculation. *Plant Physiology*, 1988, 88: 605-612.
- [3] Scheurwater I, Koren M, Lambers H, Atkin O K. The contribution of roots and shoots to whole plant nitrate reduction in fast- and slow-growing grass species. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(374): 1635-1642.

- [4] Scheible W R, González-Fontes A, Lauerer M, Müller-Röber B, Caboche M, Stitt M. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *The Plant Cell*, 1997, 9: 783-798.
- [5] Scheible W R, Lauerer M, Schulze E D, Caboche M, Stitt M. Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *The Plant Journal*, 1997, 11(4): 671-691.
- [6] Scheible W R, Krapp A, Stitt M. Reciprocal diurnal changes of phosphoenolpyruvate carboxylase expression and cytosolic pyruvate kinase, citrate synthase and NADP-isocitrate dehydrogenase expression regulate organic acid metabolism during nitrate assimilation in tobacco leaves. *Plant, Cell and Environment*, 2000, 23: 1155-1167.
- [7] Stitt M, Feil R. Lateral root frequency decreases when nitrate accumulates in tobacco transformants with low nitrate reductase activity: consequences for the regulation of biomass partitioning between shoots and roots. *Plant and Soil*, 1999, 215: 143-153.
- [8] 郭亚芬, 米国华, 陈范骏, 张福锁. 硝酸盐供应对玉米侧根生长的影响. *植物生理与分子生物学学报*, 2005, 31(1): 90-96.
Guo Y F, Mi G H, Chen F J, Zhang F S. Effect of NO_3^- supply on lateral root growth in maize plants. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2005, 31(1): 90-96. (in Chinese)
- [9] Forde B G. The role of long-distance signalling in plant responses to nitrate and other nutrients. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(366): 39-43.
- [10] 谢祝捷, 姜东, 戴廷波, 曹卫星. 植物的糖信号及其对碳氮代谢基因的调控. *植物生理学通讯*, 2002, 38(4): 399-405.
Xie Z J, Jiang D, Dai T B, Cao W X. Sugar signal and its regulation on C/N metabolism gene in plant. *Plant Physiology Bulletin*, 2002, 38(4): 399-405. (in Chinese)
- [11] Wang R C, Tischner R, Gutiérrez R A, Hoffman M, Xing X J, Chen M S, Coruzzi G, Crawford N M. Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 2004, 136: 2512-2522.
- [12] Krapp A, Fraiser V, Scheible W R, Quesada A, Gojon A, Stitt M, Caboche M, Daniel-Vedele F. Expression studies of *Nrt2:1Np*, a putative high-affinity nitrate transporter: evidence for its role in nitrate uptake. *The Plant Journal*, 1998, 14(6): 723-731.
- [13] Zhuo D G, Okamoto M, Vidmar J J, Glass A D M. Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (*Nrt2:1At*) in roots of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 1999, 17(5): 563-568.
- [14] Hirose N, Hayakawa T, Yamaya T. Inducible accumulation of mRNA for NADH-dependent glutamate synthase in rice roots in response to ammonium ions. *Plant and Cell Physiology*, 1997, 38(11): 1295-1297.
- [15] Wong H K, Chan H K, Coruzzi G M, Lam H M. Correlation of *ASN2* gene expression with ammonium metabolism in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 2004, 134(1): 332-338.
- [16] 董彩霞, 董园园, 王健, 沈其荣, 王格. 同一流动相测定植物体内 12 种有机酸和维生素 C 的高效液相色谱法. *土壤学报*, 2005, 42(2): 331-335.
Dong C X, Dong Y Y, Wang J, Shen Q R, Wang G. Determination of the contents of twelve organic acids and vitamin C in plants with one mobile phase by HPLC. *Acta Pedologica Sinica*, 2005, 42(2): 331-335. (in Chinese)
- [17] 张志良. 植物生理学实验指导(第二版). 北京: 高等教育出版社, 1990: 164-171.
Zhang Z L. *Plant Physiology Experiment Manual* (2 ed). Beijing: Higher Education Press, 1990: 164-171. (in Chinese)
- [18] 潘瑞炽. 植物生理学(第五版). 北京: 高等教育出版社, 2004: 103.
Pang R C. *Plant Physiology* (5 ed). Beijing: Higher Education Press, 2004: 103. (in Chinese)
- [19] Dong C X, Shen Q R, Wang G. Tomato growth and organic acid changes in response to partial replacement of NO_3^- -N by NH_4^+ -N. *Pedosphere*, 2004, 14(2): 159-164.
- [20] Stitt M, Müller C, Matt P, Gibon Y, Carillo P, Morcuende R, Scheible W R, Krapp A. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(370): 959-970.
- [21] Guo S W, Schinner K, Sattelmacher B, Hansen U P. Different apparent CO_2 compensation points in nitrate- and ammonium-grown *Phaseolus vulgaris* and the relationship to non-photorespiratory CO_2 evolution. *Physiologia Plantarum*, 2005, 123: 288-301.
- [22] 汪建飞, 董彩霞, 谢越, 沈其荣. 铵硝比和磷素营养对菠菜生长、氮素吸收和相关酶活性的影响. *土壤学报*, 2006, 43(6): 954-960.
Wang J F, Dong C X, Xie Y, Shen Q R. Effects of NH_4^+ -N/ NO_3^- -N ratio and phosphorus levels on growth, nitrogen uptake and relevant enzymes activity of spinach (*Spinacia Oleracea* L.). *Acta Pedologica Sinica*, 2006, 43(6): 954-960. (in Chinese)
- [23] Häusler R E, Hirsch H J, Kreuzaler F, Peterhänsel C. Overexpression of C_4 -cycle enzymes in transgenic C_3 plants: a biotechnological approach to improve C_3 -photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(369): 591-607.
- [24] Hodges M. Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in plant ammonium assimilation. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(370): 905-916.

- [25] Touraine B, Muller B, Grignon C. Effect of phloem-translocated malate on NO_3^- uptake by roots of intact soybean plants. *Plant Physiology*, 1992, 99(3): 1118-1123.
- [26] Fan X H, Tang C, Rengel Z. Nitrate uptake, nitrate reductase distribution and their relation to proton release in five nodulated grain legumes. *Annals of Botany*, 2002, 90: 315-323.
- [27] 段英华, 张亚丽, 王松伟, 沈其荣. 不同氮效率水稻全生育期内对增硝营养的响应及其生理机制. *生态学报*, 2007, 27(3): 1086-1092.
Duan Y H, Zhang Y L, Wang S W, Shen Q R. Enhancement effect by nitrate on rice plant during the whole growth period and its physiological mechanisms. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(3): 1086-1092. (in Chinese)
- [28] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学(第三版, 下册). 北京: 高等教育出版社, 2002: 81.
Wang J Y, Zhu S G, Xu C F. *Biochemistry* (3 ed, Final volume). Beijing: Higher Education Press, 2002: 81. (in Chinese)

(责任编辑 李云霞)