

富营养化条件下凤眼莲(*Eichhornia crassipes*)对不同氮素形态的生理响应

李卫国, 龚红梅, 常天俊

(河南理工大学 资源与环境学院, 河南 焦作 454003)

摘要:采用水培法研究了在富营养化条件下不同铵态氮与硝态氮比例(100:0、75:25、50:50、25:75、0:100)对外来植物凤眼莲(*Eichhornia crassipes*)生长和生理响应的影响。结果表明,随着培养液中NO₃⁻比例的增加,凤眼莲相对生长速率(RGR)升高,克隆分株数增多,根和叶片的NO₃⁻浓度、硝酸还原酶(NR)活性升高。随NH₄⁺比例的增加,尤其在NH₄⁺:NO₃⁻>1时,叶片NH₄⁺浓度和GS活性变化不显著,而根的NH₄⁺浓度、谷氨酰胺合成酶(GS)活性显著升高。研究结果表明,凤眼莲表现出对硝态氮的偏好性以及对NH₄⁺极强的耐受能力。

关键词:凤眼莲;富营养化;硝态氮;铵态氮;生理响应

中图分类号:X173 文献标识码:A 文章编号:1672-2043(2008)04-1545-05

Effects of Nitrogen Form on Growth and Physiological Responses of an Aquatic Plant *Eichhornia crassipes*

LI Wei-guo, GONG Hong-mei, CHANG Tian-jun

(Institute of Resource and Environment, Henan Polytechnic University, Jiaozuo 454003, China)

Abstract: Increased input of nitrate and ammonium to ecosystems is mainly responsible for eutrophication, and nitrogen removal by means of *Eichhornia crassipes* is available for the restoration of eutrophic water bodies. In order to determine the effects of different nitrogen forms on its growth and physiological responses in eutrophic water, *Eichhornia crassipes* plants were grown for 28 days in 5 mmol·L⁻¹ nitrogen-contained nutrient solutions varying in NH₄⁺:NO₃⁻ ratio (100:0, 75:25, 50:50, 25:75, 0:100) in laboratory. The results showed that the NH₄⁺:NO₃⁻ ratio of nutrient solution dramatically affected the plant performance of *E. crassipes* including relative growth rate, number of generated ramets, nitrate concentration in root and leaf. Furthermore, nitrate reductase activity increased with reduction of NH₄⁺:NO₃⁻ ratio in culture solution demonstrating preferences of N sources as nitrate in *E. crassipes*. However, ammonium concentration and glutamine synthetase activity in leaf did not significantly change, and those in root significantly increased when proportion of NH₄⁺ in nutrient solution increased indicating that *E. crassipes* plants are able to resist ammonium toxicity by regulation of ammonium transport and assimilation. In a word, the results suggested that removal of nitrogen from eutrophic water bodies using *E. crassipes* was not likely to be limited by nitrogen forms.

Keywords: *Eichhornia crassipes*; eutrophication; NO₃⁻-N; NH₄⁺-N; physiological response

由于人类活动干扰的加剧,大量的N、P等营养元素输入水体,水体富营养化已经成为全球性的环境问题。目前在我国湖泊、河流等水体的富营养化也有逐渐加重的趋势,引起了广泛重视。由于高等水生植物生长过程需要吸收大量氮、磷等元素作为营养物质合成自身物质,利用植物的这一生理生化特性,能够

有效地吸收水体中的氮、磷元素,减轻水体的富营养化程度^[1]。近年来,高等水生植物修复技术成为我国控制水体富营养化的主要措施之一。

氮素含量升高是水体富营养化显著特征之一,水体中氮素形态有多种,铵态氮(NH₄⁺-N)与硝态氮(NO₃⁻-N)是两种最主要的氮形态,且两种氮素形态常处于动态的变化之中。植物对二者的吸收、运输、储藏和同化存在很大差异,高浓度的NH₄⁺-N会对植物产生毒害而抑制植物的生长^[2]。水生植物对铵态氮(NH₄⁺-N)与硝态氮(NO₃⁻-N)吸收因种类不同存在很大差异,植

收稿日期:2007-10-25

基金项目:河南理工大学博士基金项目

作者简介:李卫国(1970—),男,博士,讲师,现从事植物生理生态和分子生态学研究。E-mail:wgli@hpu.edu.cn

物对氮素形态的喜爱性以及 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 的浓度及比例决定其对水体不同氮素营养的去除效果^[3]。因此,研究富营养化条件下水生植物对不同氮素形态的生理响应,有助于认识其去除氮素机理,为治理富营养化水体提供理论依据。

凤眼莲(*Eichhornia crassipes* (Mart) Solms)又名水葫芦,是雨久花科凤眼莲属的多年生漂浮型水生植物,原产于南美洲,主要通过产生克隆分株进行快速的生长,由于其极强对氮、磷等营养的吸收以及重金属富集能力而被广泛用于治理水环境的污染^[4-6]。虽然目前在凤眼莲对水体中的氮素吸收能力等方面进行了广泛研究,但国内外还没有关于不同氮素形态对其生理影响的研究报道。本文通过在静态模拟富营养化水体环境条件下,测定不同形态的氮素营养对外来植物组织凤眼莲的硝态氮、铵态氮含量、硝酸还原酶(NR)、谷氨酰胺合成酶(GS)活性的影响,以期阐明凤眼莲对不同形态氮素的生理响应。

1 材料和方法

1.1 材料

把采集的材料用清水去掉污泥,用0.5%的次氯酸盐溶液消毒0.5 h除去植株的附生生物,以1/4 Hoagland营养液在室内进行预培养。由于高浓度 NH_4^+ 可能会对植物形成毒害,为此将实验预培养材料进行了铵盐为单独氮素的实验,处理浓度分别为0.5、1、3、5、7 mmol·L⁻¹,经7 d培养观察未发现明显的铵盐毒害症状,因此选取长势较好的5 mmol·L⁻¹浓度作为实验处理浓度。

1.2 实验处理

预培养3周后选取大小相似的新生分株转移到10 L容器中(40 cm×25 cm×10 cm,长×宽×高)进行培养,采用改进的1/4 Hoagland营养液培养材料,营养液中总氮保持在5 mmol·L⁻¹,总磷为2 mmol·L⁻¹。根据水体富营养化评价标准,属于极度富营养化水平。两周后选取大小相似的新生分株作为实验材料,根长度不超过1 cm,3~4片叶,进行不同的实验处理。氮素以 NH_4Cl 、 NaNO_3 或 $\text{NH}_4\text{Cl} + \text{NaNO}_3$ 提供,设置培养液中 NH_4Cl 和 NaNO_3 的比例分别为100:0、75:25、50:50、25:75、0:100共5个实验处理,每个处理4次重复,营养液每2 d更换一次。

1.3 测定方法

1.3.1 相对生长速率和克隆分株数

培养28 d后收获,从每一处理中取出4个植物

个体,统计其克隆分株数。用吸水纸吸干水分,于85 °C下烘箱中烘干24 h至恒重后,用感量为0.000 1 g的电子天平称量干重。凤眼莲的相对生长速率(RGR)根据计算其干重净增长量得出,计算公式为:

$$RGR = \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{t}$$

式中: W_1 和 W_2 分别是指初始培养和收获时的样本干重, t 指初始培养和收获时相隔的天数。

1.3.2 组织 NO_3^- 和 NH_4^+ 的测定

根和叶片的 NO_3^- 浓度测定采用水杨酸法^[7], NH_4^+ 测定采用靛酚蓝光度法^[8]。

1.3.3 硝酸还原酶(NR)活性的测定

根和叶片的 NR 活性采用离体法^[9]测定, NR 活性定义为每克鲜重每小时催化生成的 NO_2^- 的微摩尔数, 即 $\mu\text{mol } \text{NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{FW} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

1.3.4 谷氨酰胺合成酶(GS)活性

根和叶片的 GS 酶活性的测定按照周卫等的方法^[10]进行。一个 GS 活性单位定义为每小时 37 °C 催化生成 1 $\mu\text{mol } \gamma\text{-谷氨酰胺异胱氨酸所需要的酶量}$ 。

1.4 数据统计

数据用 One-way ANOVA 分析,以 Tukey 检验进行参数的处理间多重比较,显著水平设置为0.05,数据分析用 SPSS11.5 统计软件完成。

2 结果与分析

2.1 不同比例铵态氮与硝态氮对凤眼莲生长和克隆分株数的影响

培养28 d后,铵态氮和硝态氮比例不同处理对凤眼莲RGR的影响见图1。由图1可以看出,随 $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ 比例的减少,凤眼莲 RGR 逐渐增加。在 $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ 为 100:0 营养条件下凤眼莲 RGR 最低为 $(0.070\ 8 \pm 0.005)\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 为 100% 硝态氮营养条件下 RGR 最高值 [$(0.094\ 5 \pm 0.006)\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$] 的 74.9%。当营养条件 $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^- > 1$ 时凤眼莲 RGR, 与 $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^- < 1$ 实验条件下 RGR 存在显著差异,表明凤眼莲对于 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 有一定的偏好性。

铵态氮和硝态氮比例不同的培养液对凤眼莲克隆分株的影响见图2,凤眼莲产生克隆分株随培养液中 $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ 的增加而减少。在 $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ 为 0:100 营养条件下凤眼莲克隆分株数最高为 6.75 ± 0.96 , 显著高于培养液 $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ 为 100:0 和 75:25 时的克隆分株数, 分别增加了 68.8% 和 58.8%。与不同氮素形态对凤眼莲相对生长速率的影响相似, NO_3^- 比例的增加促进了凤眼莲的克隆生长。

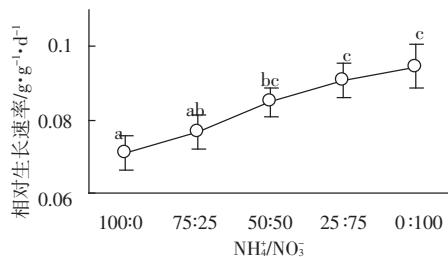


图 1 不同比例铵态氮与硝态氮营养条件下凤眼莲的相对生长速率
Figure 1 Relative growth rate of *Eichhornia crassipes* under different NH₄⁺/NO₃⁻ ratio conditions

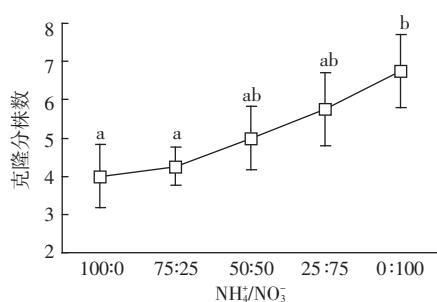


图 2 不同比例铵态氮与硝态氮培养液中凤眼莲的克隆分株数
Figure 2 Number of generated ramets in *Eichhornia crassipes* under different NH₄⁺/NO₃⁻ ratio conditions

2.2 不同比例铵态氮与硝态氮对凤眼莲组织 NO₃⁻ 和 NH₄⁺ 浓度的影响

由图 3 可见, 不同氮素形态营养条件下凤眼莲根和叶片的 NO₃⁻ 浓度均随培养液中硝态氮比例的增加而显著增加, 培养液中 NH₄⁺:NO₃⁻ 为 0:100 时, 根和叶片的 NO₃⁻ 浓度最高可达 (174.28±13.89) 和 (267.43±19.82) μmol·g⁻¹ DW, 分别为 100% 铵态氮营养条件下根和叶片的 NO₃⁻ 浓度的 6.74 和 7.10 倍。

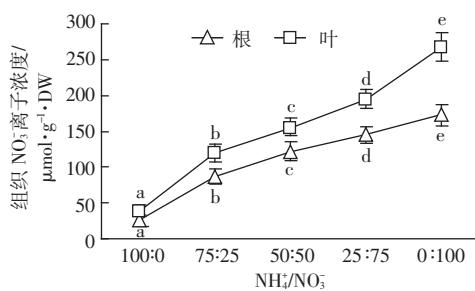


图 3 不同比例铵态氮与硝态氮培养液中凤眼莲根和叶片的硝酸根离子浓度
Figure 3 Nitrate content in root and leaf of *Eichhornia crassipes* under different NH₄⁺/NO₃⁻ ratio conditions

由图 4 可见, 不同氮素形态营养条件下凤眼莲根和叶片的 NH₄⁺ 浓度均随培养液中铵态氮组分的增加而升高。培养液中 NH₄⁺:NO₃⁻ 为 0:100 时, 根和叶片的 NH₄⁺ 浓度最低仅为 (0.50±0.03) 和 (0.76±0.12) μmol·g⁻¹ FW, 分别为 100% 铵态氮营养条件下根和叶片的 NH₄⁺ 浓度的 25.5% 和 33.3%。根的 NH₄⁺ 浓度随培养液中的 NH₄⁺ 组分增加而显著上升, 叶片的 NH₄⁺ 浓度在 NH₄⁺:NO₃⁻ 为 0:100、25:75、50:50 营养下, 随 NH₄⁺ 增加呈显著上升, 当 NH₄⁺:NO₃⁻>1 时, 上升不显著。

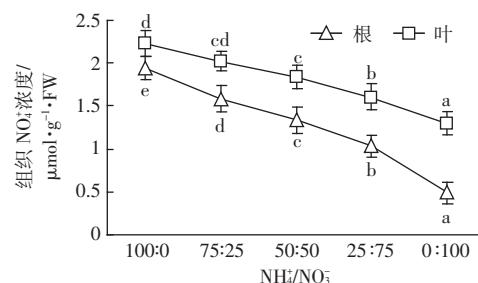


图 4 不同比例铵态氮与硝态氮培养液中凤眼莲根和叶片的铵离子浓度
Figure 4 Ammonium content in root and leaf of *Eichhornia crassipes* under different NH₄⁺/NO₃⁻ ratio conditions

2.3 不同比例铵态氮与硝态氮对凤眼莲 NR 活性的影响

不同氮素形态营养条件下凤眼莲根和叶片的 NR 酶活性见图 5。从图 5 可以看出, 根和叶片的 NR 酶活性随培养液 NO₃⁻ 组分的增加显著升高。叶片 NR 活性在 100% 硝态氮营养下达到最高为 (2.79±0.19) μmol NO₃⁻·g⁻¹ FW·h⁻¹, 是 100% 铵态氮营养下 NR 活性 [(0.74±0.09) μmol NO₃⁻·g⁻¹ FW·h⁻¹] 的 3.77 倍。根的 NR 活性在培养液中 NO₃⁻ 比例低于 75% 时随 NO₃⁻ 增加显著上升, 而在高比例 NO₃⁻ 营养条件下 (NH₄⁺:NO₃⁻ 为 25:75、0:100) 差异不显著。

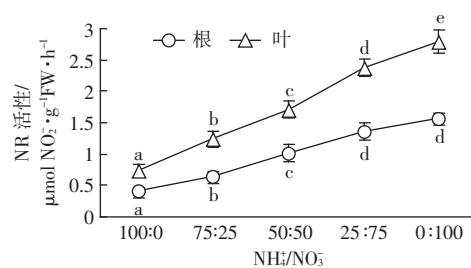


图 5 不同比例铵态氮与硝态氮培养液中凤眼莲根和叶片的硝酸还原酶活性
Figure 5 Nitrate reductase activity in root and leaf of *Eichhornia crassipes* under different NH₄⁺/NO₃⁻ ratio conditions

Figure 3 Nitrate content in root and leaf of *Eichhornia crassipes* under different NH₄⁺/NO₃⁻ ratio conditions

2.4 不同比例铵态氮与硝态氮对凤眼莲GS活性的影响

不同氮素形态营养条件下凤眼莲根和叶片的GS酶活性见图6。从图6可以看出,根和叶片的GS酶活性均随培养液NH₄⁺减少而下降。根的GS酶活性在NH₄⁺:NO₃⁻为100:0、75:25、50:50随培养液中NH₄⁺组分的减少而显著降低,NH₄⁺:NO₃⁻为50:50、25:75、0:100时随培养液中NH₄⁺组分的减少其下降不显著。叶片的GS酶活性在NH₄⁺:NO₃⁻为100:0时最高为(183.48±11.59)μmol·g⁻¹FW,与NH₄⁺:NO₃⁻为75:25、50:50时叶片GS酶活性差异不显著。当培养液中NH₄⁺组分减少至NH₄⁺:NO₃⁻为25:75、0:100,与最高值相比呈显著下降。

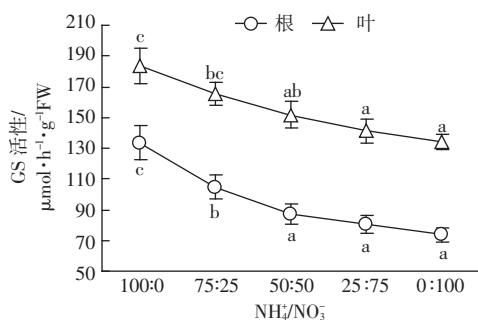


图6 不同比例铵态氮与硝态氮培养液中凤眼莲根和叶片的谷氨酰胺合成酶活性

Figure 6 Glutamine synthetase activity in root and leaf of *Eichhornia crassipes* under different NH₄⁺:NO₃⁻ ratio conditions

3 讨论

水生植物修复富营养化水体的效果与植物物种有关,不同的植物,生长速率不同,对营养物质的需求、吸收、同化利用能力不同,因而净化水体的能力也各不相同。本研究中,在模拟的富营养条件下,凤眼莲随培养液中NH₄⁺组分的增加,凤眼莲相对生长速率逐渐降低且产生克隆分株数略有减少,表明凤眼莲对硝态氮的偏好性。而且随着营养液中NO₃⁻比例增加,凤眼莲根和叶片中NO₃⁻同化限速酶NR活性均显著增加,表明其对NO₃⁻有很强的同化效率。朱增银等^[10]在研究水生植物苦草(*Vallisneria natans*)时发现,在高NH₄⁺:NO₃⁻营养条件下,苦草相对生长率显著下降,表现出对硝态氮很强的偏好性,与本研究结果相一致。王珺等^[12]研究轮叶黑藻(*Hydrilla verticillata*)也有相似的结果。尽管高NH₄⁺:NO₃⁻对凤眼莲生长有抑制作用,但不同NH₄⁺:NO₃⁻处理间的相对生长速率和克隆分株数差异不显著,与苦草和轮叶黑藻存在很大不同。因

此,从本研究可以看出,凤眼莲对NH₄⁺表现出较强的耐受能力,对不同氮素形态营养均表现出很强的同化利用效率。

大多数植物能够耐受高浓度NO₃⁻而不表现出毒害症状,而对于高浓度NH₄⁺植物物种之间的耐受能力则存在明显的差异。有研究表明对于耐受能力较强的植物而言,除了调节NH₄⁺的吸收外,根部细胞将其多余的细胞质的NH₄⁺转运到液泡中或者以同化方式减少在细胞质中的浓度,避免NH₄⁺积累对植物造成的毒害^[13,14]。在本研究中,在不同的NH₄⁺:NO₃⁻条件下凤眼莲根NH₄⁺浓度随NH₄⁺:NO₃⁻增加始终呈显著上升趋势,而叶片在高比例NH₄⁺:NO₃⁻条件下则变化不明显,表明在根部细胞液胞的聚集NH₄⁺以减少其在地上部分的积累是凤眼莲对NH₄⁺耐受性强的主要原因。最近的研究表明,植物对NH₄⁺的耐受能力与其NH₄⁺同化能力有着更为密切的关系^[14]。GS是NH₄⁺同化的关键酶之一,它可以把无机态氮转化为有机氮,从而避免NH₄⁺在细胞中的过多积累而造成对细胞的伤害,因此,根的高GS活性被认为是耐受NH₄⁺毒害的一种生理机制。凤眼莲随着NH₄⁺:NO₃⁻增加,尤其是NH₄⁺:NO₃⁻>1时,其根的NH₄⁺浓度和谷氨酰胺合成酶(GS)活性显著升高,说明GS对NH₄⁺的同化在其抵御高浓度NH₄⁺胁迫中也起着重要作用。与GS活性不同,随着NH₄⁺:NO₃⁻的增加而有明显的下降,由于NR是一种底物诱导酶,其活性的高低与细胞内可利用NO₃⁻浓度有密切的关系^[15]。凤眼莲根和叶片的NR在不同NH₄⁺:NO₃⁻条件下表现与其组织NO₃⁻浓度相一致的变化趋势,因此,凤眼莲NR活性随NH₄⁺:NO₃⁻升高而逐渐降低是由于组织可利用NO₃⁻浓度的下降所致。

4 结论

(1)在总氮浓度为5 mmol·L⁻¹条件下,外来植物凤眼莲无论是在NO₃⁻还是NH₄⁺营养环境下,都能快速生长和进行有效的克隆繁殖,表现出对NO₃⁻-N的偏好性及对NH₄⁺-N的耐受能力。

(2)凤眼莲对NO₃⁻-N和NH₄⁺-N两种氮素形态均表现出高的氮素同化效率,随着NO₃⁻-N的增加,氮代谢限速酶NR活性显著增加,而在高比例NH₄⁺的环境下,也能通过其细胞中液胞NH₄⁺积累、GS活性变化等生理调节方式缓解NH₄⁺对植物体带来的毒害,从而表现出较强的耐受能力。

(3)当前水体富营养化日益加剧使得植物可利用氮素增加,凤眼莲能够有效利用各种氮素形态的资

源,表现出对各种形态氮素资源利用的优势,是利用其修复富营养化水体的生理基础。由于凤眼莲是一种繁殖能力极强的外来植物,应注意结合生态安全综合考虑。因此需要在后期管理中加强对生态安全的检测,适度打捞控制其密度,防止其造成生态入侵的严重后果。

参考文献:

- [1] 童昌华,杨肖娥,濮培民.富营养化水体的水生植物净化试验[J].应用生态学报,2004,15(8):1447-1450.
TONG Chang-hua, YANG Xiao-e, PU Pei-min. Purification of eutrophicated water by aquatic plants[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2004, 15(8): 1447-1450.
- [2] Britto D T, Kronzucker H J. NH₄⁺ toxicity in higher plants:a critical review[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2002, 159: 567-584.
- [3] 成小英,王国祥,濮培民,等.冬季富营养化湖泊中水生植物的恢复及净化作用[J].湖泊科学,2002,14(2):139-144.
CHENG Xiao-ying, WANG Guo-xiang, PU Pei-min, et al. Restoration and purification of macrophytes in an eutrophic lake during autumn and winter[J]. *Journal of Lake Sciences*, 2002, 14(2): 139-144.
- [4] Skinner E, Wright N, Porter-Goff E. Mercury uptake and accumulation by four species of aquatic plants[J]. *Environmental Pollution*, 2007, 145: 234-237.
- [5] 葛 澄,王晓月,常 杰.不同程度富营养化水中植物净化能力比较研究[J].环境科学学报,1999,19 (6) :690-692.
GE Ying, WANG Xiao-yue, CHANG Jie. Comparative studies on the purification ability of plants in different degree eutrophic water[J]. *Acta Scientiae Circumstance*, 1999, 19(6): 690-692.
- [6] Maine M A Suñé N, Hadad H, et al. Nutrient and metal removal in a constructed wetland for wastewater treatment from a metallurgic industry [J]. *Ecological Engineer*, 2006, 26: 341-347.
- [7] 中国科学院上海植物生理研究所.现代植物生理学实验指南[M].北京:科学出版社,1999.
Shanghai Institute of Plant Physiology, Chinese Academy of Sciences. *Guide to Experiment of Modern Plant Physiology*[M]. Beijing: Scientific Press, 1999.
- [8] 马兴华,于振文,梁晓芳,等.施氮量和底施追施比例对土壤硝态氮和铵态氮含量时空变化的影响 [J].应用生态学报,2006, 17(4): 630-634.
MA Xing-hua, YU Zhen-wen, LIANG Xiao-fang, et al. Effects of nitrogen application rate and its basal-/top-dressing ratio on spatio-temporal variation of soil NO₃⁻-N and NH₄⁺-N contents [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2006, 17(4): 630-634.
- [9] Kaiser W M, Huber S C. Correlation between apparent activation state of nitrate reductase (NR), NR hysteresis and degradation of NR protein[J]. *Journal of Experimental Botany*, 1997, 48: 1 367-1 374.
- [10] 周 卫,马敬坤,王志强,等.等渗水分和盐胁迫对水稻幼叶叶片氮同化的影响[J].武汉大学学报(理学版),2005, 51(4):521-524.
ZHOU Wei, MA Jing-kun, WANG Zhi-qiang, et al. Effect of water and salt iso-osmotic stress on ammonium assimilation in the leaves of rice (*Oryza sativa L.*)Seedlings[J]. *Journal of Wuhan University (Nat. Sci. Ed)*, 2005, 51(4):521-524.
- [11] 朱增银,陈 灿,贾海霞,等.不同氮源对苦草(*Vallisneria natans*)生长及生理指标的影响[J].植物资源与环境学报,2006, 15(4):48-51.
ZHU Zeng-yin, CHEN Can, JIA Hai-xia, et al. Effects of different nitrogen forms on growth and physiological indexes of *Vallisneria natans*[J]. *Journal of Plant Resource and Environment*, 2006, 15(4):48-51.
- [12] 王 裙,顾宇飞,朱增银,等.不同营养状态下金鱼藻的生理响应[J].应用生态学报,2005, 16(2):337-340.
WANG Jun, GU Yu-fei, ZHU Zeng-yin, et al. Physiological responses of *Ceratophyllum demersum* under different nutritional condition [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2005, 16(2):337-340.
- [13] Loqué D, Von Wirén N. Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55: 1 293-1 305.
- [14] Cruz C, Bio A F M, Dominguez-Valdivia M D, et al. How does glutamine synthetase activity determine plant tolerance to ammonium? [J]. *Planta*, 2006, 223: 1 068-1 080.
- [15] CHEN B M, WANG Z H, LI S X, et al. Effects of nitrate supply on plant growth, nitrate accumulation, metabolic nitrate concentration and nitrate reductase activity in three leaf vegetables [J]. *Plant Science*, 2004, 167: 635-643.