

水稻根系细胞膜 H^+ -ATPase 对缺磷的反应

许征宇, 狄廷均, 朱毅勇*, 沈其荣, 徐国华

(南京农业大学资源与环境科学学院, 江苏南京 210095)

摘要:用两相法分离了供磷(+P)和缺磷(-P)营养下水稻苗期根系的细胞膜,并测定了细胞膜上 H^+ -ATPase 的水解活性,以期阐明水稻根系细胞膜上 H^+ -ATPase 对不同缺磷的反应机制。结果表明,缺磷的水稻根系细胞膜 H^+ -ATPase 的水解活性和 H^+ -ATPase 的 V_{max} , K_m 均低于正常供磷的植物;缺磷的水稻根系细胞膜 H^+ -ATPase 最佳 pH 值为 6.0,而正常供磷植物的为 pH 6.4 左右;Western Blot 结果说明,缺磷水稻根系细胞膜 H^+ -ATPase 酶浓度与正常供磷植物相似。本试验结果还说明,缺磷水稻根系细胞膜 H^+ -ATPase 活性低的原因并不是因为其单位细胞膜上的 H^+ -ATPase 酶分子数量小于正常供磷的植物,而是缺磷水稻根系细胞膜上 H^+ -ATPase 的同工酶的组成与供磷植物相比发生了变化。这很可能是缺磷胁迫下水稻根系细胞膜 H^+ -ATPase 的一种适应机制。

关键词:水稻;细胞膜 H^+ -ATPase;缺磷

中图分类号:Q945.78

文献标识码:A

文章编号:1008-505X(2008)02-0221-06

Response of plasma membrane H^+ -ATPase of rice roots to the P deficiency

XU Zheng-yu, DI Ting-jun, ZHU Yi-yong*, SHEN Qi-rong, XU Guo-hua

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

Abstract: Rice plants (*Oryza sativa* L. Japonica ssp. cv. Wuyujing) were fed with and without phosphate in hydroponics culture experiment. At the seedling stage the plasma membrane vesicles of roots were isolated by two-phase system. The plasma membrane H^+ -ATPase hydrolytic activity was analyzed for elucidating the response of the plasma membrane H^+ -ATPase of rice root to P deficiency. The results showed that: (1) plasma membrane H^+ -ATPase hydrolytic activity and ATPase K_m , V_{max} obtained from P deficient rice root were lower than those from P sufficient rice root; (2) the optimum pH of the plasma membrane H^+ -ATPase of P deficient rice root was 6.2, but was 6.4 for that of P-sufficient root. (3) But the western blot showed that the enzyme concentration of plasma membrane H^+ -ATPase from P deficient rice root was similar to that from P sufficient rice root. The results indicated that the lower activity of H^+ -ATPase from P deficient rice root was not due to the decreased number of H^+ -ATPase units per membrane area. The different H^+ -ATPase isoforms might be induced in the P deficient rice root in comparison with the P sufficient rice root. It could be an adaptation mechanism of plasma membrane H^+ -ATPase of rice root to P deficiency.

Key words: rice; plasma membrane H^+ -ATPase; P deficiency

磷是作物生长所需的重要营养元素之一,但是土壤中有有机磷的含量占了很大的比重。另外由于磷的沉淀和吸附,导致土壤溶液中真正能被植物根系所吸收的有效磷含量很低^[1-2]。为了适应低磷环境,植物根系产生了一系列的适应机制,表现为根系

扩大生长,根毛增多,与真菌共生成菌根^[3],分泌酸性磷酸酶、有机酸、质子^[4]、诱导根系细胞膜上的高亲和性磷酸盐转运蛋白等^[5]。

在植物根系细胞膜上存在着高亲和性与低亲和性的磷酸盐转运系统^[6],并且这两种吸收形式都是

收稿日期:2007-01-11 接受日期:2007-05-21

基金项目:国家自然科学基金项目(30571108);973 基金项目(2005cb120903)资助。

作者简介:许征宇(1983—)男,安徽合肥人,硕士研究生,主要从事植物生理方面研究。Tel:025-84396393, E-mail:2005103103@njau.edu.cn

* 通讯作者 Tel:025-84396393, E-mail: yiyong1973@njau.edu.cn

H_2PO_4^- 在多个 H^+ 陪伴下的主动运输,需要细胞质膜上的 H^+ -ATPase 提供能量与质子^[7-8]。植物细胞质膜上的 H^+ -ATPase(EC 3.6.1.35)通过水解 ATP 产生能量,将细胞质中的 H^+ 泵出细胞从而在细胞膜两侧产生 H^+ 浓度梯度和电化学势,以质子驱动力的形式推动各种离子和小分子代谢产物进行跨膜运输^[9-10]。已有研究认为,大豆、番茄根系细胞膜上的 H^+ -ATPase 在缺磷时活性提高有利于增强根系对磷素的吸收^[11-12];白羽扇豆在缺磷时产生的排根,其细胞膜 H^+ -ATPase 的活性是供磷根系的4倍^[13]。但是,有关在缺磷或是低磷胁迫下植物根系细胞膜 H^+ -ATPase 的研究目前也仅限于对上述3种植物的研究,因此根系细胞膜 H^+ -ATPase 活性提高是否就代表着植物对低磷的一种普遍应激反应还有待商榷。

鉴于上述几种植物都是双子叶植物,而对于单子叶植物根系细胞膜 H^+ -ATPase 在缺磷时的反应的研究在国内外尚未见报道。因此本试验着重研究了水稻苗期缺磷时根系细胞膜上 H^+ -ATPase 的水解活性及其在蛋白水平上的表达差异,旨在揭示水稻根系细胞膜上 H^+ -ATPase 对缺磷的反应机制及可能的原因。

1 材料与方法

1.1 试验方法

供试水稻品种为武育粳(*Oryza sativa* L. spp. Japonica cv. Wuyujing)。

种子用 10% H_2O_2 消毒 30 min,去离子水浸泡后置于 25℃ 恒温光照培养箱中催芽 2 d,待幼苗长至两叶一心时移入 5 L 周转箱中进行溶液培养,周转箱上置 12 穴的塑料板,每穴定植 3 株水稻幼苗。营养液每隔 3 d 更换 1 次。营养液采用国际水稻研究所(IRRI)常规营养液配方,并略作修改。Fe 以 Fe-EDTA 形式配入保持营养液中 Fe 浓度为 2.0 mg/L,并加入 $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 保持营养液中 SiO_2 浓度为 120 mg/L,试验设缺磷处理和供磷对照(P 2 mg/L,以 KH_2PO_4 配制),重复 3 次。

1.2 测定项目与方法

1.2.1 叶片、根系中 P 含量测定 将叶片、根系鲜样烘干、粉碎后,经浓 H_2SO_4 - H_2O_2 消煮,用钼钒黄比色法测定样品中的全磷含量^[14]。

1.2.2 水稻根系细胞膜分离 根系细胞膜分离方法参照 Yan 等^[13]的方法,略加修改。称取极富活力的水稻根系 20 g 左右,加入 4 倍体积(w/v)预冷的研磨缓冲液,其包含 50 mmol/L BTP { 1,3-二[三(羟

甲基)甲氨基丙烷}-MES(2-吗啉乙磺酸)(Sigma, pH 7.8)、2 mmol/L EGTA(乙二醇 2-氨基乙基)四乙酸 }、0.5%(w/v) BSA(牛血清蛋白)、0.25 mmol/L KI、250 mmol/L 蔗糖、0.6%(w/v) PVP(聚乙烯吡咯烷酮 K-30)、10%(v/v)甘油、5 mmol/L 2-巯基乙醇、2 mmol/L DTT(二硫苏糖醇)、1 mmol/L PMSF(苯甲基磺酰氟),冰浴中研磨,匀浆用 4 层纱布过滤后,11500 × g 离心 10 min,弃沉淀;上清液于 87000 × g 下离心 35 min,弃去上清液。用 6 mL 磷酸缓冲液 [含 5 mmol/L KH_2PO_4 (pH 7.8)、100 mmol/L KCl、250 mmol/L 蔗糖] 悬浮沉淀后,加入由右旋糖苷(Dextran) T-500(Sigma)和聚乙二醇(PEG) 3350(Sigma)的水溶液组成的两相分离系统 [含 6.1%(w/w) Dextran T-500 和 PEG-3350、5 mmol/L KH_2PO_4 (pH 7.8)、100 mmol/L KCl、250 mmol/L 蔗糖] 来回摇动 30 次以混匀。4℃ 720 × g 离心,每次离心结束将分层后的上相转移到新的两相系统中,离心时间依次为 23、15、10、5 min,最后将上相中收集到的膜蛋白用磷酸缓冲液稀释 6 倍,151200 × g 下离心 40 min。将沉淀用 BTP 缓冲液 [含 5 mmol/L BTP/MES (pH 7.8)、250 mmol/L 蔗糖、3 mmol/L KCl] 溶解后再次在 151200 × g 下离心 40 min,收集到的膜蛋白用 1~2 mL BTP 缓冲液溶解后分装,液氮速冻,置于 -80℃ 中保存。以上所有操作过程均在 0~4℃ 下进行。所用离心机为 BECKMAN COULTER Optimum™ L-80 XP,转头为 SW32 Ti。

1.2.3 蛋白质含量测定 用 Bradford(G250)染色法^[15]测定。BSA(牛血清蛋白)为标准蛋白。

1.2.4 细胞膜 H^+ -ATPase 水解活性的测定 测定 H^+ -ATPase 水解活性时,反应体系建立参照 Yan 等^[13]的方法,显色过程参照 Ohnishi 等^[16]的方法。反应体系体积为 0.50 mL,含有 30 mmol BTP/MES 缓冲液、5 mmol/L MgSO_4 、50 mmol/L KCl、50 mmol/L KNO_3 、1 mmol/L Na_2MoO_4 、1 mmol/L NaN_3 、0.02%(w/v) Brij 58(Sigma)、5 mmol/L $\text{Na}_2\text{-ATP}$ 。加入 30 μL 膜蛋白(蛋白含量 1~2 μg)启动反应,30℃ 下保温 30 min;然后加入中止液 2.50 mL 2 min 后再加入 0.50 mL 30℃ 下再保温 30 min 后比色,波长 720 nm。在相同的条件下,以测定煮沸 30 min 后失去活性的膜蛋白作为空白。水解活性根据单位时间内每毫克膜蛋白释放的磷含量减去空白值计算所得。

1.2.5 细胞膜蛋白凝胶电泳和免疫印迹试验 参照陈熙^[17]的方法,用 4% 浓缩胶和 10% 分离胶的 SDS-PAGE 分离细胞膜蛋白(15 μg 膜蛋白质上样

量),然后用 Bio-Rad minitrans-blot electrophoretic transfer cell 将分离的蛋白质电转移到 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST(150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris·HCl, pH 7.0) 0.05% Tween 20℃ 室温封闭 1 h,加入一抗(丹麦皇家兽医与农业大学 Palmgren 教授赠送的植物细胞膜 H^+ -ATPase 多克隆抗体),4℃ 过夜,经 TBST 清洗后用辣根过氧化物酶标记的 IgG 二抗(Sigma 公司)室温孵育 1.5 h,最后用 TBST 清洗,ECL 试剂盒(KPL 公司)检测。

所有数据采用 SAS 软件中 LSD($P < 0.05$) 进行处理间双重比较分析。结果数据为 3 次独立试验的平均值。

2 结果与分析

2.1 叶片和根系中 P 含量

水稻长到四至五叶一心时(20 d 左右),取样测定水稻叶片和根系中全磷含量(图 1),结果说明,缺磷造成根系与叶片中全磷含量明显下降。

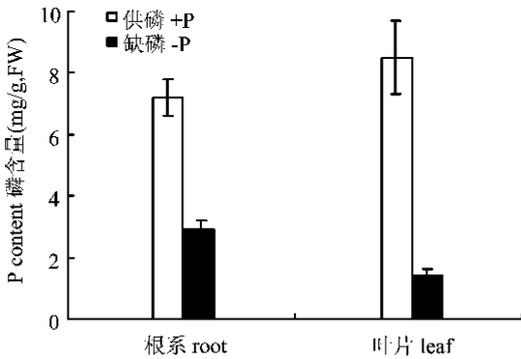


图 1 缺磷与供磷营养下水稻叶片和根系中磷含量比较

Fig.1 The comparison of P content in rice leaf and root between P deficient and sufficient conditions

2.2 根系细胞质膜纯度检验

根系样品经葡聚糖两相分离系统分离后获得细胞膜的微囊体,通过测定得到细胞膜囊体中各种生物膜的 ATPase 水解活性。从表 1 结果看出,50 mmol/L KNO_3 对 H^+ -ATPase 活性影响为 0%(+P)和 1%左右(-P),1 mmol/L NaN_3 对 H^+ -ATPase 活性的影响为 1%左右(+P)和 2%左右(-P),表明膜微囊体中几乎没有液泡膜、线粒体膜的污染。1 mmol/L Na_2MoO_4 影响有 9%(+P)和 14%(-P),说明膜微囊体中含有一定程度的酸性磷酸酶,而且缺磷植物的膜微囊体中酸性磷酸酶的比例有所增加,这很可能是缺磷所造成的。0.1 mmol/L Na_3VO_4 对 H^+ -AT-

Pase 活性的影响程度分别达到 95%(+P)和 98%(-P)左右,说明在膜微囊体中主要是以细胞膜为主。为了避免线粒体膜、液泡膜上 H^+ -ATPase 以及酸性磷酸酶可能带来的影响,在测定细胞膜 H^+ -ATPase 水解活性的各种指标中均加入 50 mmol/L KNO_3 、1 mmol/L NaN_3 和 1 mmol/L Na_2MoO_4 以保证测定结果的可靠性。

表 1 缺磷与供磷营养下水稻根系细胞膜微囊体中对不同抑制剂敏感的 H^+ -ATPase 活性(pH 6.5 时测定)

Table 1 Inhibitor-sensitive ATPase activity associated with rootplasma membrane from P deficient and sufficient rice roots (tested at pH 6.5)

处理 Treatments	ATP 酶活性 ATPase activity [Pi μ mol/(mg·min)]	
	供磷 +P	缺磷 -P
对照 CK	0.666 ± 0.05(100%)	0.510 ± 0.02(100%)
50 mmol/L KNO_3	0.666 ± 0.05(0%)	0.507 ± 0.02(1%)
1 mmol/L NaN_3	0.662 ± 0.06(1%)	0.499 ± 0.04(2%)
1 mmol/L Na_2MoO_4	0.605 ± 0.05(9%)	0.437 ± 0.03(14%)
0.1 mmol/L Na_3VO_4	0.034 ± 0.01(95%)	0.010 ± 0.00(98%)

2.3 缺磷与供磷营养下根系细胞膜 H^+ -ATPase 水解活性的比较

为了进一步检测 H^+ -ATPase 的特征,本试验测定了 H^+ -ATPase 的水解活性。在 pH 值为 6.4~6.8 的范围内,供磷的水稻根系细胞膜上 H^+ -ATPase 活性都显著高于缺磷根系细胞膜 H^+ -ATPase(图 2),但

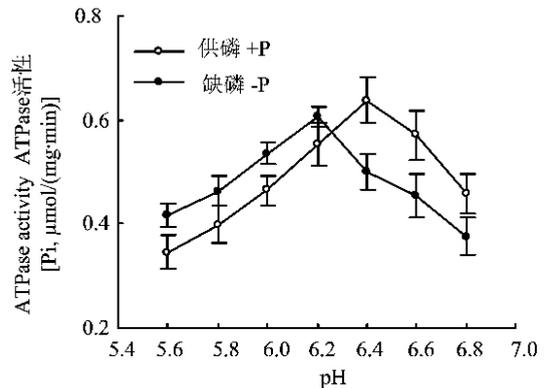


图 2 在不同 pH 值时,缺磷与供磷水稻根系细胞膜上 H^+ -ATPase 活性的比较

Fig.2 Comparison of root plasma membrane H^+ -ATPase activities of P deficient and sufficient rice roots under different pH conditions

(细胞膜 H^+ -ATPase 活性是在加入 1 mmol/L NaN_3 、1 mmol/L Na_2MoO_4 和 50 mmol/L KNO_3 , 30℃ 时测定。

Plasma membrane H^+ -ATPase activity was analyzed in the presence of 1 mmol/L NaN_3 , 1 mmol/L Na_2MoO_4 and 50 mmol/L KNO_3 , 30℃)

是在 pH 值为 5.6~6.2 的范围内,缺磷水稻根系细胞膜上 H^+ -ATPase 活性虽高于供磷根系的细胞膜 H^+ -ATPase 活性,但差异不显著。测定结果表明,供磷营养下水稻根系细胞膜 H^+ -ATPase 的最适 pH 值在 6.4,而缺磷水稻根系细胞膜 H^+ -ATPase 的最佳 pH 在 6.2。

2.4 缺磷与供磷营养水稻根系细胞膜 H^+ -ATPase 的 V_{max} 与 K_m 比较

为了研究 H^+ -ATPase 的动力学特征,测定了 H^+ -ATPase 在底物 ATP 浓度为 0~4000 $\mu\text{mol/L}$ 范围内水解活性的变化。当底物浓度不断升高时,水稻根系细胞膜 H^+ -ATPase 活性接近饱和(图 3A),将数据根据 Eadie-Hofstee 方程加以转化后,在 ATPase 活性与相应的 ATP 浓度比之间存在着很好的线性

关系($r = 0.99$) (图 3B),表明 H^+ -ATPase 符合典型的米氏动力学特征。

最大反应速度 V_{max} 和 K_m 通过计算截距和斜率获得(表 2)。在 30 °C 时,缺磷营养和供磷营养水稻根系细胞膜 H^+ -ATPase 的 K_m 分别为 0.258 和 0.342 mmol/L; V_{max} 分别为 0.498 和 0.691 Pi $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ 。缺磷水稻根系细胞膜 H^+ -ATPase 的 V_{max} 值显著低于供磷对照,说明缺磷导致水稻根系细胞膜 H^+ -ATPase 活性下降。缺磷水稻根系细胞膜 H^+ -ATPase 的 K_m 小于供磷营养,说明缺磷水稻根系细胞膜 H^+ -ATPase 对底物 ATP 的亲合性要高于供磷水稻。这也意味着缺磷和供磷营养水稻根系细胞膜 H^+ -ATPase 的酶学性质有所不同。

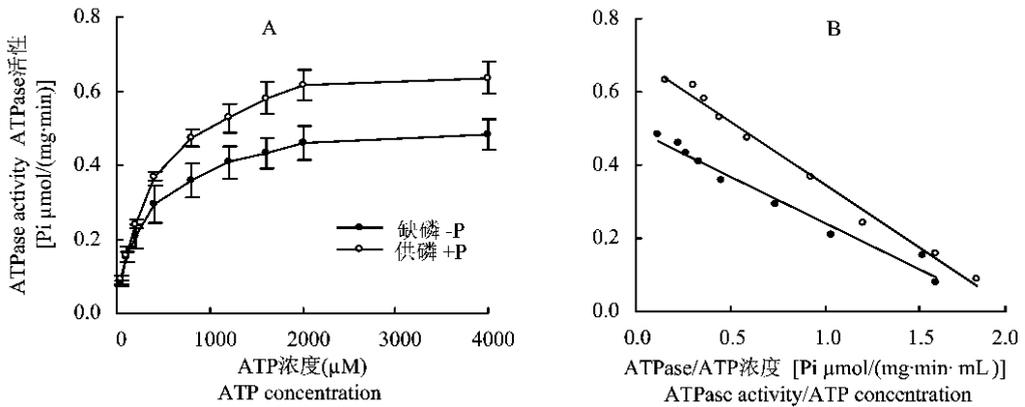


图 3 缺磷与供磷营养水稻根系细胞膜 H^+ -ATPase 在 30°C 时的动力学特征比较

Fig. 3 Comparison of the kinetic characteristics of root plasma membrane H^+ -ATPase of P deficient and sufficient rice at 30°C

[A: ATPase 对 ATP 的依赖性 Dependence of ATPase activity on ATP concentration;

B: Eadie-Hofstee 线性方程 Eadie-Hofstee equation ($r = 0.99, -P$; $r = 0.99, +P$)]

表 2 缺磷与供磷营养下水稻根系细胞膜 H^+ -ATPase 的动力学参数

Table 2 The kinetic characteristics of root plasma membrane H^+ -ATPase of P deficient and sufficient rice roots

动力学参数	供磷	缺磷
Kinetic characteristic	+ P	- P
K_m (mmol/L)	0.342 ± 0.008 a	0.258 ± 0.013 b
V_{max} [Pi $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$]	0.691 ± 0.055 a	0.498 ± 0.031 b

注:数据后的小写字母表示两者在 $P < 0.05$ 水平上的显著性差异。

Note: Different letters in a row represent significant difference at the 0.05 probability level.

2.5 缺磷与供磷营养水稻根系细胞膜 H^+ -ATPase 的免疫印迹

为了研究细胞膜 H^+ -ATPase 水解活性的差异是否是由于其单位膜蛋白中 H^+ -ATPase 数量的差异所致,细胞膜蛋白(15 μg)经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离后,转到 PVDF 膜上后与 H^+ -ATPase 的多克隆抗体发生反应。从 Western Blot 的结果(图 4)可以看出,缺磷与供磷营养的水稻根系细胞膜 H^+ -ATPase 的免疫印迹的深度差异不明显,说明单位膜蛋白中,缺磷并没有造成 H^+ -ATPase 酶浓度降低,即缺磷与不缺磷情况下,单位膜蛋白中 H^+ -ATPase 的数量差异不大。

3 讨论

本试验采用两相法提取细胞膜,细胞膜纯度达到 95% 以上,从而保证了细胞膜 H^+ -ATPase 活性测

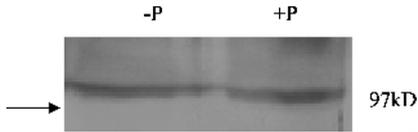


图4 细胞膜 H^+ -ATPase 的 Western blot 免疫分析

Fig.4 Immunodetection of plasma membrane H^+ -ATPase by Western-blot

定的准确性。通过比较水稻根系细胞膜上 H^+ -ATPase 的活性可知,缺磷营养下水稻根系细胞膜上 H^+ -ATPase 活性明显低于供磷营养(表1),尤其在测定 pH 高于 6.2 的范围内(图1)。一般来说,细胞膜上 H^+ -ATPase 活性差异的原因取决于两方面:一方面是通过改变单位面积细胞膜上的 ATP 酶的数量;另一方面就是细胞膜上 H^+ -ATPase 本身的性质发生了改变,即出现了一种或几种水解效率不同的同工酶,或是两种情况同时发生^[18]。Western-blot 的结果(图4)显示,缺磷与供磷营养下水稻根系细胞膜上 H^+ -ATPase 的免疫印迹差异不大,因此 H^+ -ATPase 活性的变化并不是由于 ATPase 酶蛋白浓度变化造成的。由此可知,缺磷并没有引起单位面积细胞膜上 ATP 酶数量的显著改变。

但是,酶动力学的研究结果看出,缺磷营养下水稻根系细胞膜上 H^+ -ATPase 的 K_m 值明显小于供磷对照(图3,表2),并且 H^+ -ATPase 活性在 pH 6.0 时活性最高;而供磷营养的 H^+ -ATPase 活性的最佳 pH 是 6.4(图2)。根据酶学的特点可知,各种同工酶之间在酶动力学特征、pH 最佳点等方面都是不同的。因此,缺磷很可能诱导水稻根系中一个或是几个 H^+ -ATPase 的同工酶发生了变化。由于细胞膜 H^+ -ATPase 是由一个多基因家族编码的,在水稻中有 10 个 H^+ -ATPase 基因,模式植物拟南芥和烟草中也分别有 11 个和 9 个 H^+ -ATPase 基因^[19-20];并且在转录水平上,其表达受外界环境的诱导,如玉米在硝酸盐的诱导下出现 *MAHI* 的特异性表达^[21],番茄根系在菌根侵染时,根系细胞膜 H^+ -ATPase 发生改变^[22]。因此,缺磷究竟诱导了水稻根系细胞膜哪些 H^+ -ATPase 基因的表达发生了变化,还需要通过分子生物学技术加以鉴定。

以往的研究发现,缺磷的双子叶植物,如番茄、大豆的根系,以及白羽扇豆排根的细胞膜 H^+ -ATPase 的活性升高^[11-13]。但是,也有研究认为,在单子叶植物中,如小麦在缺磷时并不分泌氢离子^[23],玉米在缺乏营养元素的情况下氢离子的分泌也比对

照要低^[24]。由于细胞膜 H^+ -ATPase 的主要作用就是排出氢离子,可以推测,在缺磷的情况下这些植物的根系细胞膜 H^+ -ATPase 的活性可能也有所下降。通常 H^+ -ATPase 活性的升高是与某种物质的大量运输相联系,对于白羽扇豆的排根以及大豆的根系而言,在缺磷时,这些根系能大量分泌有机酸^[13,25],因此, H^+ -ATPase 活性的增强很可能是与有机酸的分泌相关^[26],而不是与磷素的吸收相关。因为在缺磷状态下,外界的磷素很少或是几乎没有,在这种情况下,植物根系细胞膜 H^+ -ATPase 活性提高来用于吸收磷素显然是徒劳的。

在缺磷情况下,植物通过一系列的生理改变,以有效地利用植物体内有限的磷素^[27],而水稻根系在缺磷胁迫下 H^+ -ATPase 活性降低,同时与底物 ATP 的亲合性增加,即 K_m 减小,可以减小 ATP 的用量,这很可能是水稻对缺磷的一种适应机制。

参考文献:

- [1] Richardson A E. Soil microorganisms and phosphorus availability[A]. Pankhurst C E, Double B E, Gupta V V S R *et al*(Eds.). Soil biota: management in sustainable farming system[M]. CSIRO: Melbourne, 1994, 50-62.
- [2] Holford I C R. Soil phosphorus: Its measurement, and its uptake by plants[J]. Aust. J. Soil Res., 1997, 35: 227-239.
- [3] 赵华,徐芳森,石磊,王运华. 植物根系形态对低磷胁迫应答的研究进展[J]. 植物学通报, 2006, 23(4): 409-417. Zhao H, Xu F S, Shi L, Wang Y H. Advances in plant root morphology adaptability to phosphorus deficiency stress[J]. Chin. Bull. Bot., 2006, 23(4): 409-417.
- [4] 聂艳丽,郑毅,林克惠. 根分泌物对土壤中磷活化的影响[J]. 云南农业大学学报, 2002, 17(3): 281-286. Nie Y L, Zheng Y, Lin K H. Effect of root exudates on activation of phosphates in soil[J]. J. Yunnan Agric. Univ., 2002, 17(3): 281-286.
- [5] Raghothama K G. Phosphate acquisition[J]. Ann. Rev. Plant Physiol., 1999, 50: 665-693.
- [6] Furihata T, Suzuki M, Sakurai H. Kinetic characterization of two phosphate uptake systems with different affinities in suspension cultured *Catharanthus roseus* protoplasts[J]. Plant Cell Physiol., 1992, 33: 1151-1157.
- [7] Ullrich-Ebenrius C I, Novachy A, Fischer E *et al.*, Relationship between energy-dependent phosphate uptake and the electric membrane potential in *Lemna gibba* GI[J]. Plant Physiol., 1981, 67: 797-801.
- [8] Sakano K. Proton/Phosphate stoichiometry in uptake of inorganic phosphate by culture cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cells[J]. Plant Physiol., 1995, 108: 295-302.
- [9] Sze H, Li X H, Palmgren M G. Energization of plant cell membranes by H^+ -pumping ATPases: Regulation and biosynthesis[J]. Plant

- Cell, 1999, 11: 677-689.
- [10] Palmgren M G. Plant plasma membrane H^+ -ATPases: Powerhouses for nutrient uptake[J]. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 2001, 52: 817-845.
- [11] Shen H, Chen J, Yang Z *et al.* Root plasma membrane H^+ -ATPase is involved in the adaptation of soybean to phosphorus starvation[J]. J. Exp. Bot., 2006, 57(6): 1353-1362.
- [12] Song K M, Jiao X Z, Li L *et al.* The relationship between phosphate uptake and changes in plasmalemma H^+ -ATPase activities from the roots of tomato seedlings during phosphate starvation[J]. Acta Phyto-phys. Sin., 2001, 27(1): 87-93.
- [13] Yan F, Zhu Y, Müeller C *et al.* Adaptation of H^+ -pumping and plasma membrane H^+ ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency[J]. Plant Physiol., 2002, 129: 50-63.
- [14] 鲍士旦. 土壤农化分析(第三版) [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
Bao S. Analysis of agricultural biochemistry(3rd Ed.) [M]. Bei-
jing: Chin. Agric. Press, 2000.
- [15] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding[J]. Anal. Biochem., 1976, 72: 248-254.
- [16] Ohnishi T, Gall R S, Mayer M L. An improved assay of inorganic phosphate in the presence of extralabile phosphate compounds: Appli-
cation to the ATPase assay in the presence of phosphocreatine[J].
Anal. Biochem., 1975, 69: 261-267.
- [17] 陈熙, 崔香菊, Zhao Y X, 张伟. 低叶绿素 b 水稻突变体类囊体膜的比较蛋白质组学[J]. 生物化学与生物物理进展, 2006, 33(7): 653-659.
Chen X, Cui Y S, Zhao Y X, Zhang W. Comparatvie proteomics of
thylakoid membrane from a low chlorophyll b rice and its wild type
[J]. Progr. Biochem. Biophysiol., 2006, 33(7): 653-659.
- [18] Yan F, Feuerle R, Schäffer S *et al.* Adaptation of active proton pumping and plasmalemma ATPase activity of corn roots to low root medium pH[J]. Plant Physiol., 1998, 117: 311-319.
- [19] Oufattole M, Arango M, Boutry M. Identification and expression of three new *Nicotiana plumbaginifolia* genes which encode isoforms of a plasma - membrane H^+ -ATPase, and one of which is induced by me-
chanical stress[J]. Planta, 2000, 210(5): 715-722.
- [20] Arango M, Gévaudant F, Oufattole M *et al.* The plasma membrane proton pump ATPase: The significance of gene subfamilies[J]. Plan-
ta, 2003, 216: 355-365.
- [21] Santi S, Locci G, Pinton R *et al.* Plasma membrane H^+ -ATPase in maize roots induced for NO_3^- uptake[J]. Plant Physiol., 1995, 109: 1277-1283.
- [22] Benabdellah K, Azcon - Aguilar C, Ferrol N. Plasma membrane AT-
Pase and H^+ transport activities in microsomal membranes from myc-
orrhizal tomato roots[J]. J. Exp. Bot., 1999, 50(337): 1343-
1349.
- [23] Neumann G, Römheld V. Root excretion of carboxylic acids and pro-
tons in phosphorus - deficient plants[J]. Plant Soil, 1999, 211: 121
-130.
- [24] Schuber S, Yan F. Changes in net proton release by roots of intact
maize plants after local nutrient supply in a split root system[J]. J.
Plant Nutr. Soil Sci., 1999, 162: 577-582.
- [25] 王美丽, 严小龙. 大豆根形态和根分泌物特性与磷效率[J].
华南农业大学学报, 2001, 22(3): 1-4.
Wang M L, Yan X L. Characteristics on root morphology and root ex-
udation of soybean in relation to phosphorus efficiency[J]. J South
China Agric. Univ., 2001, 22(3): 1-4.
- [26] Zhu Y, Yan F, Zoerb C *et al.* A link between citrate and proton re-
lease by proteoid roots of white lupin(*Lupinus albus* L.) grown under
phosphorus - deficient conditions? [J] Plant Cell Physiol., 2005,
46(6): 892-901.
- [27] Vance C P, Uhde - Stone C, Allan D L. Phosphorus acquisition and
use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable re-
source[J]. 2003, 157: 423-447.