

基于微电极技术的温室黄瓜氮胁迫早期诊断技术*

胡 静 毛罕平 左志宇 李青林
(江苏大学现代农业装备与技术教育部重点实验室, 镇江 212013)

摘要: 为在氮胁迫症状出现之前实现黄瓜的营养诊断,用微电极技术测量4个不同氮水平处理黄瓜叶片的膜电位、膜电容及膜电位对光激励的响应。通过对膜电位变化的研究发现氮胁迫处理黄瓜叶片的膜电位与正常氮处理的膜电位的差异不大,表明不适合用膜电位实现黄瓜氮胁迫的早期诊断;对膜电容变化的研究发现黄瓜叶片膜电容对氮的缺乏情况敏感,可在肉眼可见胁迫症状出现2 d前实现严重和中等氮缺乏的营养诊断;对光激励的膜电位响应的研究发现黄瓜叶片光激励的膜电位响应对氮过量情况敏感,至少可在胁迫症状出现7 d前实现氮过量的营养诊断;表明用微电极技术对黄瓜氮胁迫进行早期诊断是可行的。
关键词: 黄瓜 氮胁迫 早期诊断 微电极 膜电位 膜电容
中图分类号: Q945.78; S431.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2015)09-0302-06

Early Diagnosis of Cucumber Nitrogen Stress Based on Microelectrode Technique

Hu Jing Mao Hanping Zuo Zhiyu Li Qinglin

(Key Laboratory of Modern Agriculture Equipment and Technology, Ministry of Education, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: To achieve the pre-visual detection on nitrogen(N) stress, the microelectrode technique was used to measure the membrane potential, membrane capacitance and light induced responses of leaf membrane potentials under four different levels of N-treatment, respectively. No obvious difference was found in the membrane potential between N-stress and N-sufficient cucumber leave. It shows that the membrane potentials were not suitable for early diagnosis of N-stress in cucumber plants. The research on the changes of membrane capacitance found that it was sensitive to N-deficiency. The measurement of membrane capacitance could be used for pre-visual diagnosis of severe and moderate N-deficiency 2 d before the appearance of visually morphological changes. The research on the changes of magnitude of leaf membrane potential response to light found that it was sensitive to N-excess. The measurement of the magnitude of leaf membrane potential response to light could be used for pre-visual diagnosis of N-excess at least 7 d before the appearance of visually morphological changes. It shows that the microelectrode technique is suitable for early diagnosis of N-stress in cucumber plants.
Key words: Cucumber Nitrogen stress Early diagnosis Microelectrode Membrane potential Membrane capacitance

引言

尽管氮是地球上最丰富的元素之一,氮胁迫仍

是全世界影响植物最常见的营养问题。氮缺乏叶片出现失绿或黄化现象,过量的氮并不出现可见的颜色变化。在氮胁迫症状清晰可见时,作物已经产生

收稿日期: 2015-01-28 修回日期: 2015-03-03
* 国家自然科学基金资助项目(61233006、31201659、31401286)、“十二五”国家科技支撑计划资助项目(2014BAD08B03)、江苏省普通高校研究生科研创新计划资助项目(CXZZ11-0581)、江苏高校优势学科建设工程资助项目(苏财教(2014)37号)和江苏省高校自然科学基金资助项目(11KJB210001)
作者简介: 胡静,博士生,主要从事作物电信息的营养检测研究,E-mail: hujingyangran@126.com
通讯作者: 毛罕平,教授,博士生导师,主要从事现代农业装备和设施农业环境控制技术研究,E-mail: maohp@ujs.edu.cn

了不可逆的伤害,从而降低了其市场价值^[1]。传统实验室分析花费时间过长并需要破坏性取样,现代计算机视觉和光谱等无损的营养检测方法越来越受到重视^[2-5]。颜色、形态或纹理的图像特征只在作物出现胁迫症状后才变得明显^[6-7]。叶绿素是导致氮素光谱特征差异的主要内在因素^[8],而叶绿素、叶黄素等大分子生化指标的变化需要一个累积的过程,若能在这些变化出现之前诊断出植物的氮胁迫状况,可及时制定正确的施肥方案。鉴于此,迫切需要探索一种在肉眼可见胁迫症状之前的氮营养无损检测方法。

植物对外界环境刺激最早产生的响应是电信号^[9-10],例如当植物遭受盐害、酸害、营养以及干旱胁迫时,电信号发生瞬态的变化^[11-14]。微电极技术是一种用尖端直径小于1 μm的电极探针刺入活体细胞(对细胞不造成损伤),测量植物细胞(如表皮或叶肉细胞)的膜电位、膜电容等生物电信号,目前已广泛用于植物生理和代谢研究^[15-18]。前期研究发现,黄瓜叶片膜电容在氮缺乏早期就有明显变化,但过量氮与正常氮处理的膜电容没有明显的区别而无法区分;而过量氮和正常氮处理的黄瓜叶片光激励的膜电位响应在氮过量胁迫早期就有明显的差异,可用于氮过量的营养胁迫诊断。由此看来,基于微电极技术的植物生物电信号测量可用来及早发现氮的胁迫情况。

本文主要研究植物受到氮胁迫时,用微电极技术测量黄瓜叶片的膜电位、膜电容和膜电位对光激励的响应,期望在胁迫症状出现之前实现氮营养的诊断,为氮胁迫的早期诊断提供一种方法。

1 材料与方法

1.1 植物生长和氮胁迫处理

供试黄瓜品种为津优1号,在20~25℃下的湿纱布上催芽黄瓜种子4 d后,把大小一致的苗移栽到盆里,盆的开口直径为22 cm,高度为20 cm,种植基质为珍珠岩。黄瓜苗生长在温室里,保持湿度(70±10)%,利用山崎配方种植黄瓜。黄瓜长到七叶一心时,开始进行氮胁迫处理,一共处理10 d。黄瓜分成4组进行氮胁迫实验:严重氮缺乏处理(N0)、中等氮缺乏处理(N20)、正常氮处理(N100)和氮过量处理(N200)。完整的山崎配方包含3.5 mmol/L Ca(NO₃)₂·4H₂O, 6 mmol/L KNO₃, 1 mmol/L NH₄H₂PO₄和2 mmol/L MgSO₄·7H₂O,加上微量元素,调节pH值为5.8~6.0。缺氮组的营养液去掉Ca(NO₃)₂·4H₂O、KNO₃和NH₄H₂PO₄,去掉的钙、钾和磷分别用CaCl₂、KCl和KH₂PO₄来补

充,氮过量组的营养液加上NaNO₃和NH₄NO₃。

1.2 生物电测量原理

1.2.1 膜电位的测量原理

细胞膜具有电路元件(如电阻器、电容器等)类似的特性^[19],图1所示为细胞膜电位 V_m 测量的原理图。其中 V 为毫伏计的读数, C_m 为膜电容, R_m 为膜电阻, R_p 为电极电阻, R_i 为输入电阻, E_r 为反转电位。

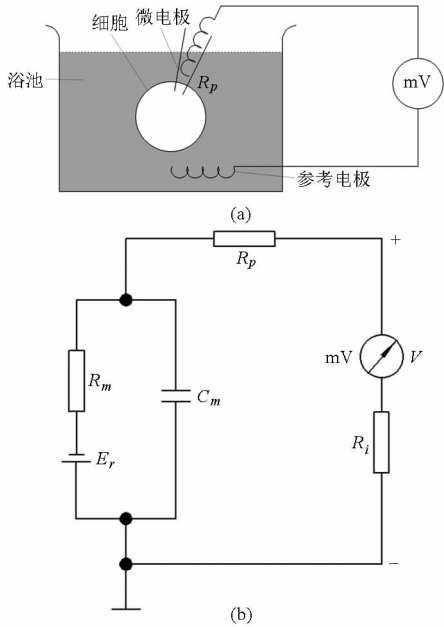


图1 细胞膜电位的测量原理图

Fig. 1 Measurement schematic of cell membrane potentials

(a) 原理电路 (b) 等效电路

用微电极(电阻为 R_p)插入细胞内,与此同时浴池内的参考电极与毫伏计形成回路,要求毫伏计具有极高的输入电阻 R_i 。由于膜电容 C_m 在直流电路中起隔离作用,因而毫伏计读数为 $V = E_r R_i / (R_m + R_p + R_i)$,由于毫伏计的输入电阻 R_i 很高, $R_i \gg (R_m + R_p)$,所以测量结果 $V_m \approx E_r$ 。

1.2.2 膜电容的测量原理

如图2所示,根据膜电容测量的曲线下面积(膜电容电荷量 Q_i)来计算 C_m ^[20]。

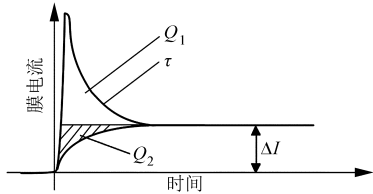


图2 细胞膜电容的测量示意图

Fig. 2 Measurement of cell membrane capacitance

暂态过程中,总电荷量

$$Q_t = Q_1 + Q_2 \tag{1}$$

其中

$$Q_1 = \int I dt \quad Q_2 = \Delta I \tau$$

式中 Q_1 ——稳态电流上方的暂态过程充电电荷
 Q_2 ——修正因子
 ΔI ——稳态膜电流
 τ ——时间常数

可得
$$C_m = \frac{Q_t}{\Delta V} \tag{2}$$

式中 ΔV ——测试脉冲幅度

1.3 生物电测量

如图 3 所示,用植物生物电测量系统测量黄瓜叶片的膜电位。所用的单孔玻璃微管外径为 1.00 mm,内径为 0.58 mm,壁厚为 0.21 mm,内壁上粘有直径 0.133 mm 的纤维丝(Hilgenberg 公司,德国),可以使电解质溶液能顺利地填满电极尖部。用 PMP-107 型编程多管拉制仪(MicroData 仪器公司,美国)拉制微电极,电极呈细针状,尖端直径约 1 μm ,然后灌入 100 mmol/L KCl 即可使用。从黄瓜七叶一心时开始,每天测定黄瓜正三叶叶片的膜电位以及膜电位对光激励的响应,一共测定 10 d。

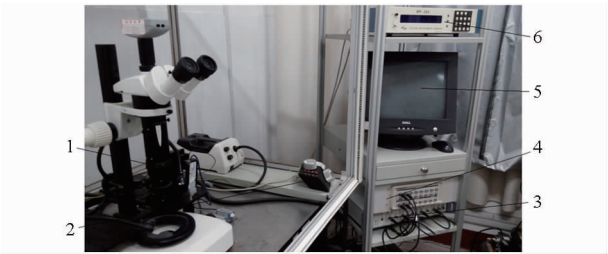


图 3 植物生物电测量系统

Fig. 3 Measuring system of bioelectricity in plants

1. 探头 2. 微操纵器 3. 放大器 4. 模数/数模转换器 5. 计算机 6. 微操纵器的程序控制器

黄瓜叶片微电极测量如图 4 所示。在进行黄瓜叶片的细胞内测定时,将叶片用载玻片固定在直径为 150 mm 的培养皿中,在测定时将培养皿内充灌基础溶液(pH 值为 6.0 的 1 mmol/L KCl、1 mmol/L NaCl、0.25 mmol/L CaCl₂和 0.25 mmol/L MgCl₂的混合溶液),通过盐桥连接基础溶液和参比电极(也由表面覆盖有 AgCl 的银丝与 100 mmol/L KCl 溶液构成),盐桥采用直径 1 mm 的塑料管内灌充以 100 mmol/L KCl 和 质量分数 2% 琼脂制成。借助 MP-285 型微操纵器(Sutter Instruments,美国)轻轻将电极靠近叶片,微电极与叶片呈 70°夹角插入叶片尖部细胞内(插入部位距离叶边缘 3~5 cm)^[21],用 pClamp 9.2 软件(Axon Instruments,美国)来采集膜电位和膜电容数据,然后光激励处理 6 min。光源采用蓝色发光二极管(LED),蓝光中心波长为 450 nm,光强为 800 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,细胞内测量由 MultiClamp 700B 型放大器和 Digidata 1322 型数模

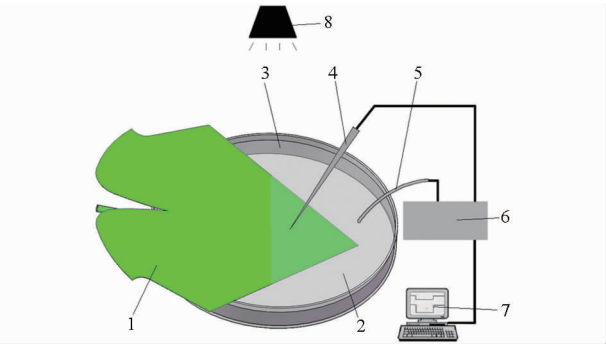


图 4 黄瓜叶片微电极测量示意图

Fig. 4 Diagrammatic representation of microelectrode measurements on cucumber leaves

1. 叶片 2. 基础溶液 3. 培养皿 4. 测量电极 5. 参比电极 6. 放大器及数据采集器 7. 计算机 8. 光源

转换器(Axon Instruments, 美国)获得,采样频率为 10 Hz。用 Origin 8.0 软件进行数据分析。

2 结果与讨论

2.1 黄瓜叶片的颜色变化

图 5 从上至下依次为第 5 天到第 9 天氮胁迫黄瓜正三叶叶片的颜色变化。第 5 天前,各处理的黄瓜正三叶叶片均未出现胁迫症状,第 6 天,在严重氮缺乏处理黄瓜正三叶叶片上观察到叶片的轻微黄化,中等氮缺乏和氮过量处理的黄瓜叶片没有显示任何胁迫处理症状。第 8 天,中等氮缺乏处理的黄瓜正三叶叶片也出现轻微的黄化症状。随着氮胁迫处理时间的延长,黄瓜叶片受胁迫的症状表现越来越明显,并从下位叶到上位叶逐渐黄化。但是直到实验结束,即氮胁迫处理 10 d 后,正常氮和氮过量处理的黄瓜叶片上均未观察到明显的颜色差异,因此很难用肉眼区分正常氮处理和氮过量处理黄瓜叶片。

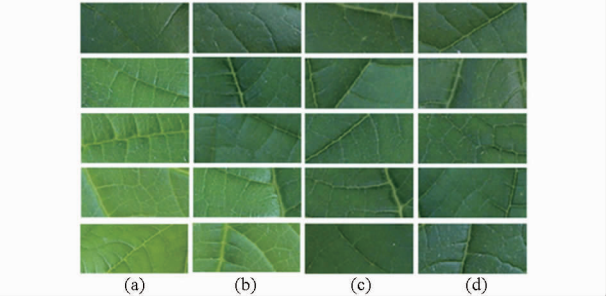


图 5 氮胁迫黄瓜正三叶叶片的颜色变化

Fig. 5 Change of nitrogen stress symptoms on the 3rd leaf of cucumber

(a) N0 (b) N20 (c) N100 (d) N200

2.2 黄瓜叶片膜电位、膜电容测定及变化研究

2.2.1 膜电位及膜电容测定

图 6a 所示为黄瓜叶片的细胞膜电位变化曲线。

当微电极位于基础溶液中,电位调零,电极刺入黄瓜叶片的表皮细胞时,记录电位陡然下降,然后在几十秒或更长的时间内慢慢达到稳定的电位值。正常氮处理黄瓜叶片在七叶一心时的正三叶膜电位维持在 -167 mV 左右。图 6b 所示为黄瓜叶片的膜电容变化曲线。细胞膜的脂质双分子层是电的不良导体,

因而由细胞外液-脂质双分子层-细胞内液就构成了细胞膜电容,膜电容与细胞膜表面积(包括内陷折叠部分)呈正比,与脂质双分子层的厚度呈反比。一般植物的膜电容为十几或几十皮法(pF),正常氮处理黄瓜叶片在七叶一心时正三叶的膜电容大约为 40 pF 。

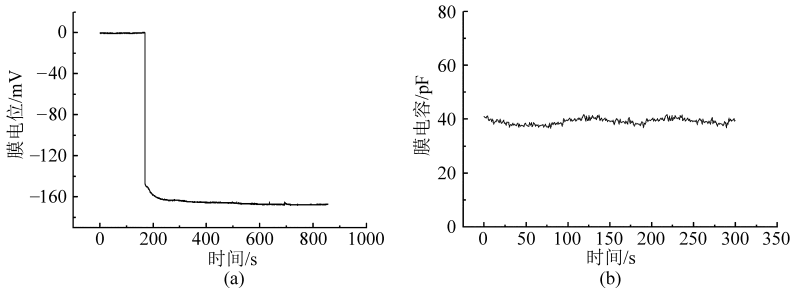


图 6 黄瓜叶片膜电位及膜电容的变化曲线
Fig. 6 Change curves of membrane potential and membrane capacitance on cucumber leaves

2.2.2 黄瓜叶片细胞膜电位变化研究

如图 7 所示,随着氮胁迫处理时间的延长,氮缺乏植物的膜电位有轻微增加,氮过量植物的膜电位有轻微减少,在实验处理的 10 d 内,氮胁迫处理与正常氮处理植物的膜电位差异都不大。汪晓丽^[22]对大麦根的研究也显示在氮缺乏 10 d 后,液泡膜电位只有轻微的增加。

与正常氮植物相比,直到第 7 天才在严重氮缺乏处理植物上观察到膜电位显著增加,而在第 6 天就已在严重氮缺乏处理黄瓜叶片上观察到轻微的黄化现象(图 5);直到实验结束,即氮缺乏处理 10 d 后,也没有观察到中等氮缺乏处理与正常氮处理植物膜电位的显著差异,而在第 8 天就已在中等氮缺乏黄瓜叶片上观察到轻微的失绿现象(图 5);与正常氮植物相比,直到第 10 天才在氮过量植物上观察到膜电位的显著减少(图 7)。从上面的分析可知,不论是氮缺乏还是氮过量植物的膜电位都不能在胁迫症状出现之前实现氮营养的诊断,不适合用膜电位对植物的氮营养胁迫进行诊断。

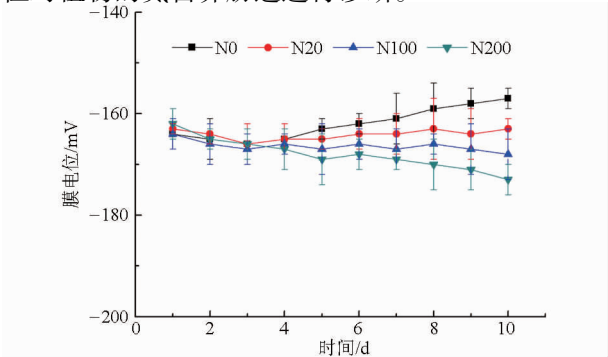


图 7 氮胁迫处理下黄瓜叶片膜电位的变化曲线
Fig. 7 Change curves of membrane potential of cucumber leaves under nitrogen stress condition

2.2.3 黄瓜叶片细胞膜电容变化研究

图 8 所示为黄瓜叶片细胞膜电容的变化,随着氮胁迫处理时间的延长,所有黄瓜叶片的膜电容都有缓慢的增加。与其他氮处理相比,第 4 天就可在氮严重缺乏处理植物上观察到膜电容的明显减少,可见黄瓜叶片膜电容测量可在氮严重缺乏叶片肉眼可见症状出现的 2 d 前实现氮的营养诊断;第 6 天就可观察到氮中等缺乏与其他处理植物叶片膜电容的明显差异,可见黄瓜叶片膜电容测量也可在氮中等缺乏叶片肉眼可见症状出现的 2 d 前实现氮的营养诊断;由以上的分析可知,植物叶片膜电容可以用于实现黄瓜氮缺乏的早期营养诊断。而黄瓜叶片的膜电容直到第 10 天才在氮过量与正常氮处理植物上看到明显的区别,此时植物已遭受过量氮胁迫长达 9 d,造成了不可逆的伤害,可见植物的膜电容不能把过量和正常氮处理植物在氮胁迫早期区分开。

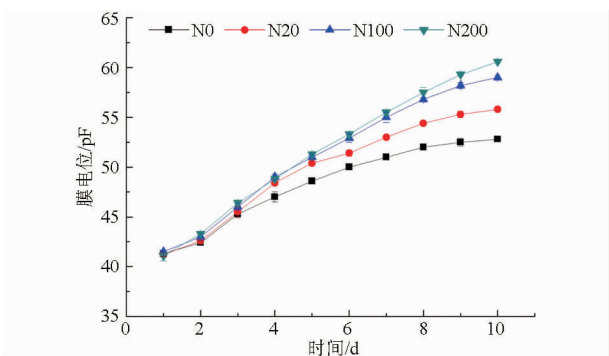


图 8 氮胁迫处理下黄瓜叶片膜电容的变化曲线
Fig. 8 Change curves of membrane capacitance of cucumber leaves under nitrogen stress condition

2.3 光激励的膜电位响应对氮的早期营养诊断研究

2.3.1 光激励的膜电位响应原理

从上面的分析可知,膜电位不能对氮胁迫进行

早期的营养诊断,膜电容能够实现氮缺乏的早期营养诊断,但不能对氮过量情况进行早期的营养诊断。因此,需要寻找能把氮过量和正常氮处理及早区分开的指标。已有广泛报道植物细胞膜参与细胞生长和代谢的每个方面,包括对环境胁迫的适应性响应,因此叶片的氮胁迫状况可在质膜的转运体(H^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+})上有所体现^[23]。蓝光是植物最主要的吸收光之一,本文用蓝光激励叶片膜电位的改变来研究氮胁迫对质膜转运体的影响。初步研究发现,光激励的膜电位响应不能把氮中等缺乏处理与氮过量处理植物区分开,但可把过量氮处理和正常氮处理植物区分开,为氮的过量营养诊断提供新的指标。

黄瓜叶片膜电位对光激励产生瞬态的强烈的多段响应。图9所示为典型黄瓜叶片膜电位对光激励产生的幅值、时间和形状响应。膜电位由暗处理到光处理开始产生快速小的去极化(膜电位变得少负)响应,接着产生更大的去极化响应,去极化结束后开始复极化(膜电位回复到静息膜电位)。叶片光激励的膜电位响应幅值指最大去极化时的峰值(图9中A点)与静息膜电位(图9中B点)的差值。

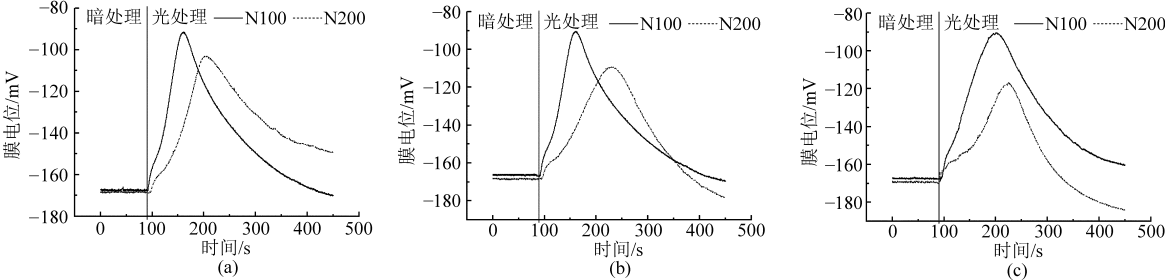


图10 不同氮素水平下的黄瓜正三叶膜电位对光激励的响应

Fig. 10 Light-induced responses of membrane potentials from the 3rd leaf of cucumber plants with different levels of nitrogen (a) 第3天 (b) 第4天 (c) 第7天

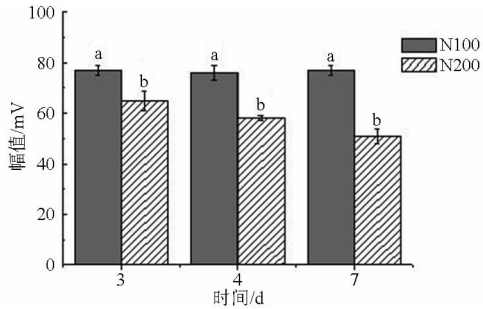


图11 光激励的黄瓜正三叶膜电位的瞬态响应幅值
Fig. 11 Magnitude of membrane potentials from the 3rd leaf of cucumber plants response to light

过量处理10 d也没有可见的胁迫症状出现,可见植物光激励的膜电位响应对氮过量胁迫非常敏感,至少可在肉眼可见胁迫症状出现的7 d前实现氮过量植物的营养诊断。

Lewis等^[24]的研究指出,蓝光激励细胞膜产生

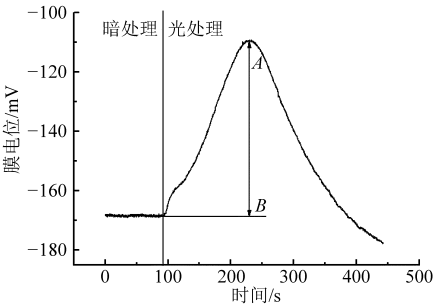


图9 黄瓜叶片液泡膜电位对光激励的响应

Fig. 9 Light-induced responses of vacuole membrane potential on cucumber leaves

2.3.2 光激励的膜电位响应对氮过量的早期营养诊断研究

图10、11所示分别为受到光激励的黄瓜正三叶片膜电位的瞬态动力学响应及其幅值。正常氮处理黄瓜叶片光激励的膜电位响应幅值在77 mV左右,氮过量处理明显抑制光激励的膜电位响应幅值。与正常氮处理植物相比,氮过量处理植物光激励的膜电位响应幅值在第3天就有显著的减少,且随着氮过量胁迫时间的延长,黄瓜叶片光激励的膜电位响应幅值呈逐渐下降的趋势(图10b、10c、11),而氮

的去极化(膜电位变得少负)响应与 H^+ -ATPase(质子泵)和阴离子通道的激活有关,表明不同水平氮的利用性(从缺乏到过量)对 H^+ -ATPase活性和阴离子通道选择性的影响是膜电位对光激励响应的幅值产生差异的主要原因。

3 结束语

通过对不同氮营养水平下的黄瓜叶片的膜电位、膜电容及光激励的膜电位响应研究表明,膜电位不能在肉眼可见胁迫症状出现之前实现黄瓜叶片氮营养诊断;膜电容可在肉眼可见胁迫症状出现的2 d前实现严重和中等氮缺乏的营养诊断;但直到实验结束,也没在黄瓜叶片上观察到明显的氮过量症状,因为氮过量的胁迫症状是非常滞后的。然而氮过量植物的光激励的膜电位响应是非常快的,黄瓜叶片

光激励的膜电位响应至少可在肉眼可见胁迫症状出现的7 d 前实现氮过量的营养诊断。膜电容与光激励膜电位响应相结合的方法可在肉眼可见胁迫症状出现之前实现黄瓜氮胁迫的早期诊断。

参 考 文 献

1 Story D, Kacira M, Kubota C, et al. Lettuce calcium deficiency detection with machine vision computed plant features in controlled environments[J]. Computers and Electronics in Agriculture, 2010, 74: 238 – 243.

2 朱咏莉,李萍萍,毛罕平,等. 生菜叶片光谱红边参数对氮营养的响应特征分析[J]. 农业机械学报,2011,42(11):174 – 177.

Zhu Yongli, Li Pingping, Mao Hanping, et al. Response features of red edge parameters for lettuce leaf spectra under different nitrogen levels[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2011, 42(11): 174 – 177. (in Chinese)

3 梁亮,杨敏华,张连蓬,等. 基于 SVR 算法的小麦冠层叶绿素含量高光谱反演[J]. 农业工程学报,2012,28(20):162 – 171.

Liang Liang, Yang Minhua, Zhang Lianpeng, et al. Chlorophyll content inversion with hyperspectral technology for wheat canopy based on support vector regression algorithm[J]. Transactions of the CSAE, 2012, 28(20): 162 – 171. (in Chinese)

4 冀荣华,郑立华,邓小蕾,等. 基于反射光谱的苹果叶片叶绿素和含水率预测模型[J]. 农业机械学报,2014,45(8):269 – 275.

Ji Ronghua, Zheng Lihua, Deng Xiaolei, et al. Forecasting chlorophyll content different tree growth period and moisture of apple leaves in based on spectral reflectance[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2014, 45(8): 269 – 275. (in Chinese)

5 叶晓青,邹勇,余志虹,等. 烤烟冠层光谱参数与氮素垂直分布相关性研究[J]. 农业机械学报,2013,44(5):219 – 225.

Ye Xiaqing, Zou Yong, Yu Zhihong, et al. Correlation between nitrogen vertical distribution and spectral characteristics of flue-cured tobacco[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2013, 44(5): 219 – 225. (in Chinese)

6 Fernandez-Pacheco D G, Escarabajal-Henarejos D, Ruiz-Canales A, et al. A digital image processing based method for determining the crop coefficient of lettuce crops in the southeast of Spain[J]. Biosystems Engineering, 2014, 117: 23 – 34.

7 杨玮,李民赞,孙红,等. 温室黄瓜叶片近红外图像消噪算法与含氮量快速检测[J]. 农业机械学报,2013,40(7):216 – 221.

Yang Wei, Li Minzan, Sun Hong, et al. De-noising algorithm of multispectral images and nonlinear estimation of nitrogen content of cucumber leaves in greenhouse[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2013, 40(7): 216 – 221. (in Chinese)

8 王珂,沈掌泉,王人潮. 植物营养胁迫与光谱特性[J]. 国土资源遥感,1999(1):9 – 14.

Wang Ke, Shen Zhangquan, Wang Renchao. Vegetation nutrient condition and spectral feature[J]. Remote Sensing for Land & Resources, 1999(1):9 – 14. (in Chinese)

9 Fromm J, Lautner S. Electrical signals and their physiological significance in plants[J]. Plant, Cell and Environment, 2007, 30(3): 249 – 257.

10 Yan X F, Wang Z Y, Hang L, et al. Research progress on electrical signals in higher plants[J]. Progress in Natural Science, 2009, 19(5):531 – 541.

11 Shabala S, Shabala L, van Volkenburgh E. Effect of calcium on root development and root ion fluxes in salinised barley seedlings [J]. Functional Plant Biology, 2003, 30(5): 507 – 514.

12 Babourina O B, Hawkins B, Lew R R, et al. K⁺ transport by *Arabidopsis* root hairs at low pH[J]. Australian Journal of Plant Physiology, 2001, 28(7): 635 – 641.

13 di Tomaso J M, Brown P H, Stowe A E, et al. Effect of diclofop and diclofop-methyl on membrane potentials in roots of intact oat, maize, and pea seedlings[J]. Plant Physiology, 1991, 95: 1063 – 1069.

14 Hedrich R S, Neimanis S, Savchenko G, et al. Changes in apoplastic pH and membrane potential in leaves in relation to stomatal responses to CO₂, malate, abscisic acid or interruption of water supply[J]. Planta, 2001, 213: 594 – 601.

15 Nieves C M, Miller A J, Aleman F, et al. A putative role for the plasma membrane potential in the control of the expression of the gene encoding the tomato high-affinity potassium transporter HAK5[J]. Plant Molecular Biology, 2008, 68(6): 521 – 532.

16 Krol E, Dziubinska H, Trebacz K. Low-temperature induced transmembrane potential changes in the liverwort *Conocephalum conicum*[J]. Plant & Cell Physiology, 2003,44(5):527 – 533.

17 Hamilton D W A, Hills A, Kohler B, et al. Ca²⁺ channels at the plasma membrane of stomatal guard cells are activated by hyperpolarization and abscisic acid[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences,2000,97(9):4967 – 4972.

18 Carpaneto A, Ivashikina N, Levchenko V, et al. Cold transiently activates calcium-permeable channels in arabidopsis mesophyll cells[J]. Plant Physiology,2007,143:487 – 494.

19 康华光. 膜片钳技术及其应用[M]. 北京:科学出版社,2003.

20 刘振伟. 实用膜片钳技术[M]. 北京:军事医学科学出版社,2006.

21 Miller A J, Cookson S J, Smith S J, et al. The use of microelectrodes to investigate compartmentation and the transport of metabolized inorganic ions in plants[J]. Journal of Experimental Botany,2001, 356(52): 541 – 549.

22 汪晓丽. 小麦幼苗根系对 NO₃⁻ 的吸收及细胞内 NO₃⁻ 的分布与调节机制研究[D]. 扬州:扬州大学,2010.

Wang Xiaoli. Nitrate uptake by roots of wheat seedlings, nitrate intracellular compartmentation and its regulation[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2010. (in Chinese)

23 Hariadi Y, Shabala S. Screening broad beans (*vicia faba*) for magnesium deficiency. II. photosynthetic performance and leaf bioelectrical responses[J]. Functional Plant Biology,2004,31(5):539 – 549.

24 Lewis B D, Prins H B, Neumann G K, et al. Ca²⁺-activated anion channels and membrane depolarizations induced by blue light and cold in arabidopsis seedlings[J]. Plant Physiology,1997,114:1327 – 1334.