

基于叶片液泡膜电位的黄瓜钾胁迫早期诊断技术*

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: 为在钾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个不同钾水平处理的黄瓜叶片液泡的膜电位。研究发现钾供应不足引起黄瓜叶片液泡膜电位减小,而钾过量引起黄瓜叶片液泡膜电位增加。通过对正常钾处理(K100)与钾胁迫处理之间的黄瓜叶片液泡膜电位差的分段回归分析发现,严重钾缺乏处理(K0)2 d后,黄瓜叶片液泡的膜电位有明显减少,中等钾缺乏处理(K20)4 d后,黄瓜叶片液泡的膜电位也有明显减少,钾过量处理(K200)2 d后,黄瓜叶片液泡的膜电位有明显的增加。黄瓜叶片液泡膜电位的测量方法至少能在肉眼可见的胁迫症状出现的10d前就可实现钾缺乏或过量的营养诊断,表明用液泡膜电位对黄瓜钾胁迫叶片进行早期诊断的方法是可行的。

关键词: 黄瓜 钾胁迫 早期诊断 液泡 膜电位

中图分类号: Q945.78; Q942.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2015)03-0296-06

Early Diagnosis of Cucumber Potassium Stress Based on Vacuolar Membrane Potential

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 potassium (K) stress, the microelectrode technique was used to measure the vacuolar membrane potential of cucumber leaves under four different levels of K-treatment. K-deficiency made the vacuolar membrane potential of cucumber leaves more negative, whereas K-excess made the vacuolar membrane potential less negative. An obvious decrease of vacuolar membrane potential could be observed after 2 d of severe K-deficiency plants. An obvious decrease of the vacuolar membrane potential could be observed after 4 d of moderate K-deficiency plants. Conversely, an obvious increase of the vacuolar membrane potential could be observed after 2 d of K-excess plants. The measurement of vacuolar membrane potential in cucumber leaf could be used for pre-visual detection of K-stress 10 d before the appearance of visually morphological changes. All of these showed that the vacuolar membrane potential measurement may be used as an early diagnosing tool for K-stress in cucumber plants. It should be pointed out that the active transport of K^+ does not contribute to the primary generation of membrane potential but is contingent upon an electrochemical proton gradient to furnish the required energy. Ultimately, the establishment of this gradient by the activity of the plasma membrane H^+ -pumping ATPase is the means by which plant cells become electrically polarized.

Key words: Cucumber Potassium stress Early diagnosis Vacuole Membrane potential

收稿日期: 2014-12-23 修回日期: 2015-01-06

* 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

引言

钾对植物光合作用、促进酶的活性、维持细胞渗透压和离子平衡非常重要,钾缺乏将扰乱这些活动,限制同化^[1-2]。但是钾缺乏的边缘黄化症状并不能立即用肉眼看到,叶片失绿的可见缺乏症状是延迟的,早期缺乏检测能及时缓解症状,挽回损失。传统的实验室分析需要耗费大量的时间、人力和物力,现代光谱和计算机视觉等无损营养测试方法越来越受到重视^[3-5]。光谱研究主要集中在从叶片的反射光谱找到特定波长或植被指数来表征叶绿素或色素的状况^[3,6-7]。视觉图像识别通常是基于植物的颜色、形态和纹理特征,这些特征只在植物出现胁迫症状后才变得明显^[8-10]。Gerardeaux 等^[1]研究显示缺钾严重叶片的钾含量在 20 d 内就下降到了正常叶片的一半,但在第 40 天才发现叶片边缘黄化等症状。可见在钾缺乏很长时间后,才会引起叶绿素含量的减少,并出现失绿症状。由此可见植物在钾缺乏症状变得可区分时,植物的分化早已经完成,产量也提前确定了,因此光谱和图像技术不能用于钾的早期诊断研究。鉴于此,有必要探索一种在胁迫症状出现前检测钾营养的无损方法。

钾的转运对植物细胞质膜电势差的平衡调节非常重要。质膜对细胞外钾离子的增加产生快速的去极化(膜电位变得越来越少负)响应,而对细胞外钾离子浓度的减少产生快速的超极化(膜电位变得越来越多负)响应^[11-13]。因此细胞外钾浓度的变化直接影响植物细胞的膜电位。由此看来,膜电位测量可用来及时发现钾不足或过量。

本文主要研究在植物受到钾胁迫时,用微电极技术测量黄瓜叶片的液泡细胞膜电位的变化,以期在胁迫症状出现之前实现钾营养的检测,为钾胁迫的早期诊断提供一种方法。

1 材料与方法

1.1 植物生长和钾胁迫处理

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)%,用山崎配方种植黄瓜。黄瓜生长到四叶一心时为实验开始的第 1 天,此时黄瓜先进行正常的营养液管理,当黄瓜长到七叶一心时(第 7 天),开始进行钾胁迫处理。黄瓜分成 4 组进行钾胁迫实验:严重钾缺乏处理(K0)、中等钾缺乏处理(K20)、正常钾处理(K100)和钾过量处理(K200)。完全的

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。缺钾组的营养液去掉 KNO₃,去掉的氮用 NaNO₃来补上。

黄瓜长到四叶一心时,每天测定正三叶(从基部开始标记为正一叶、正二叶、……,往上叶片以此类推)叶片的叶面积,一共测定 20 d。分别测定其叶片长度 *L* 和叶片宽度 *W*,根据 Cho 等^[14]关于黄瓜叶长 *L*、叶宽 *W* 与叶面积 *L_A* 的关系计算叶面积,即 *L_A* = -210.61 + 13.358*W* + 0.5356*LW*。

1.2 膜电位测量

如图 1 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 1.00 mm,内径 0.58 mm,壁厚 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 型编程多管控制仪(MicroData 仪器公司,美国)控制微电极,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。从黄瓜四叶一心时开始,每天测定黄瓜正三叶叶片的膜电位,一共测定 20 d。

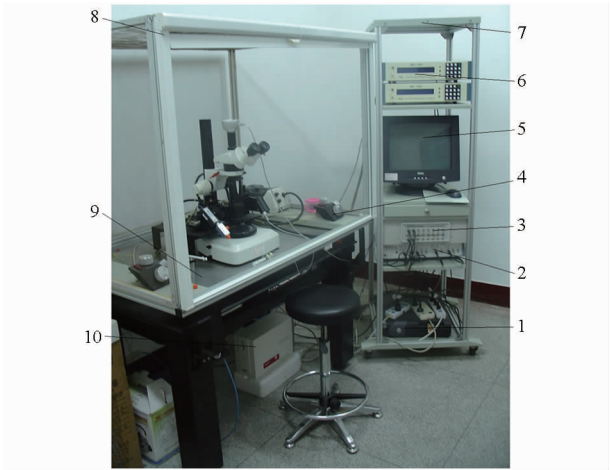


图 1 植物生物电测量系统

Fig. 1 Measuring system of bioelectricity in plants

- 1. 计算机 2. 放大器 3. 模数/数模转换器 4. 微操纵器 5. 显示器 6. 微操纵器的程序控制器 7. 仪器架 8. 屏蔽罩 9. 防震工作台 10. 稳压电源

黄瓜叶片膜电位的测量如图 2 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(也是由表面覆盖有 AgCl 的银丝与 100 mmol/L KCl 溶液构成),盐桥采用在直径 1 mm 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)^[15], 细胞内测量由 MultiClamp 700B 型放大器和 Digidata 1322 型数模转换器 (Axon Instruments, 美国) 获得, 采样频率为 10 Hz。用 pClamp 9.2 软件 (Axon Instruments, 美国) 来采集数据, Origin 8.0 软件进行数据分析。

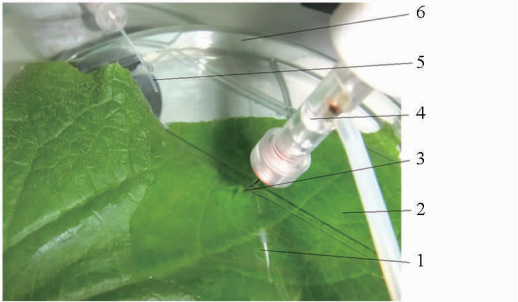


图 2 黄瓜叶片膜电位测量
Fig.2 Diagram of membrane potential measurement in cucumber leaves

1. 基础溶液 2. 载玻片 3. 测量电极 4. 电极夹持器 5. 参比电极 6. 培养皿

1.3 数据处理方法

本文研究目的之一是找到一种检测黄瓜早期钾胁迫的方法,即用双分段回归分析找出钾处理组和钾对照组出现变化的时间点^[16]。为了找出这个变化点 (拐点),检查两组参数之间的差异

$$y(t_i) = \mu_c(t_i) - \mu_T(t_i) \tag{1}$$

式中 $\mu_c(t_i)$ ——对照组在 t_i 时的平均值
 $\mu_T(t_i)$ ——处理组在 t_i 时的平均值

处理组的数值在某一时间点开始与对照组不同,用分段回归分析确定胁迫现象的开始。在该方法中,自变量 (时间) 被划分为段落区间,用线性回归进行分段拟合。两段回归方程的变化点 t_c 也就是拐点,有

$$\begin{cases} y = \beta_0 + \beta_1 t & (t < t_c) \\ y = \alpha_0 + \alpha_1 t & (t \geq t_c) \end{cases} \tag{2}$$

用最小二乘法分别对这两条回归线进行拟合。

2 结果与讨论

2.1 黄瓜叶片的颜色变化

生长在钾胁迫营养液中的黄瓜叶片与生长在正常营养液中的黄瓜叶片相比较,在整个实验期间,也就是钾胁迫处理的 14 d 内还没有观察到明显可见的钾胁迫症状。这和棉花、甜菜等的缺钾情况相类似^[1,17],可见不能用叶片颜色对钾胁迫作早期诊断。

2.2 黄瓜叶片的膜电位测定

在细胞中钾有分室化现象,钾以离子形态分别存在于细胞质和液泡中。外界供钾充足时,植物可以奢侈吸收,并贮藏在液泡中,外界供钾不足时,可以通过动用液泡中贮存的钾来维持细胞质中钾浓度的恒定^[18]。Cuin 等^[13] 研究也表明只有液泡中的钾浓度降到 25 mmol/L 以下时,细胞质中的钾浓度才会下降。细胞质内钾保持在最适水平是出于生理上的需要,目前已知有多种酶的活性取决于细胞质内钾离子的浓度,稳定的钾离子含量是细胞进行正常代谢的保证。液泡是钾的储存场所,是细胞质中钾的补给者。由上可知,外界钾浓度发生变化时,植物液泡中的钾含量比细胞质中的钾含量更早发生变化,且当液泡中的钾含量下降到非常低的数值时,才会调用细胞质中的钾。因此在本文中所需要测定的主要是液泡而不是细胞质的膜电位。

图 3 所示为黄瓜七叶一心时的完全展开叶 (正三叶) 的细胞质 (D 处) 和液泡 (E 处) 的膜电位。通过微操纵器操作电极进入基础溶液后,在放大器面板上对失调电位进行调零 (A 处),调节微操纵器刺入黄瓜表皮细胞,当电极接触到黄瓜叶片时,电位急剧下降 (B 处),然后电极快速通过质外体 (C 处) 进入细胞质 (D 处),在几十秒或几分钟内慢慢达到稳定的细胞质膜电位值 -197 mV 左右,大约 3 min 后,电极向细胞内部推入,进入液泡 (E 处),液泡膜电位稳定在 -167 mV 左右。跨液泡膜电势差为细胞质膜电位与液泡膜电位的差值,由此可见,黄瓜七叶一心时的完全展开叶 (正三叶) 的跨液泡膜电势差为 30 mV。Miller 等测得的拟南芥叶片细胞的跨液泡膜电势差也为 30 mV^[15],高于长寿花叶片的 25 mV^[19] 和大麦根细胞的 12 mV^[20]。因此,可以通过细胞质和液泡膜电位的显著差异来判断电极尖端是位于细胞质还是液泡中,从而可知测的是细胞质还是液泡的膜电位。本文实验中所用膜电位为黄瓜叶片液泡的膜电位。

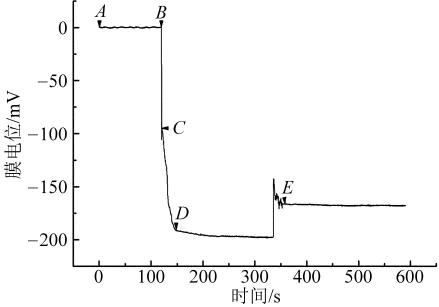


图 3 黄瓜叶片细胞质和液泡的膜电位
Fig.3 Cytoplasm and vacuole membrane potential in cucumber leaves

2.3 膜电位研究

图4所示为正常钾黄瓜正三叶叶片的液泡膜电位和叶面积。正常钾处理植物(K100)在幼苗期的四叶一心时(第1天),正三叶的液泡膜电位为-133 mV左右,叶面积为120 cm²。随着植物的生长,正三叶的叶面积快速增长,开花期(第7天)前后的增长速率最快,液泡膜电位从幼苗期开始到开花期也有大幅度的增加。10 d后,正常钾植物叶面积的增长速率大幅下降,此后叶面积增加比较缓慢,与此同时正常钾植物的液泡膜电位保持相对稳定的-167 mV左右。可能的原因是随着植物叶片的快速生长,植物细胞内各种离子的含量也在迅速增加,而植物生长到一定程度后,叶片面积变化不大,此时叶片细胞内外各种离子的含量也维持在一个相对稳

定的数值,导致植物的膜电位保持相对稳定的数值。

图5、6分别表示钾胁迫处理与正常钾处理的黄瓜正三叶叶片液泡膜电位的比较,以及利用二者之间差值的分段回归来确定钾胁迫起始时间的示意图。随着钾缺乏处理时间的延长,钾缺乏植物的液泡膜电位变得越来越小,且严重钾缺乏植物(K0)的液泡膜电位比中等钾缺乏植物(K20)的液泡膜电位更小(图5a、5b)。从图6a可知,液泡膜电位拐点在7.04 d,从整数上来看拐点就是第8天,说明从第9天开始,严重钾缺乏植物(K0)的液泡膜电位有了明显的减少,而植物的钾胁迫实验处理是从第7天开始,也就是说在严重钾缺乏处理的2 d后,与正常钾植物(K100)相比,K0植物叶片的液泡膜电位有明显的超级化(膜电位变得更多负),此时K0植物的液泡膜电位减少了8 mV。在实验最后即钾处理的14 d后,K0植物的液泡膜电位为-221 mV,与正常钾植物(K100)相比,减少量高达57 mV(图5a、6a)。

从图6b可知,中等钾缺乏处理的植物(K20)的液泡膜电位拐点在9.94 d,从整数上来看拐点就是第10天,说明从第11天开始,中等钾缺乏植物(K20)的液泡膜电位有了明显的减少,而植物的钾胁迫实验处理是从第7天开始,也就是说在严重钾缺乏处理的4 d后,与正常钾植物(K100)相比,K20植物叶片的液泡膜电位有明显的超级化(膜电位变得更多负),此时K20植物的液泡膜电位减少了

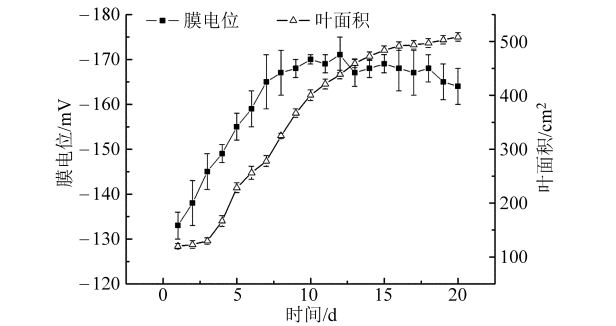


图4 正常钾黄瓜正三叶叶片液泡的膜电位和叶面积
Fig.4 Vacuole membrane potential and leaf area of the 3rd fully expanded leaf of cucumber in optimal K treatments

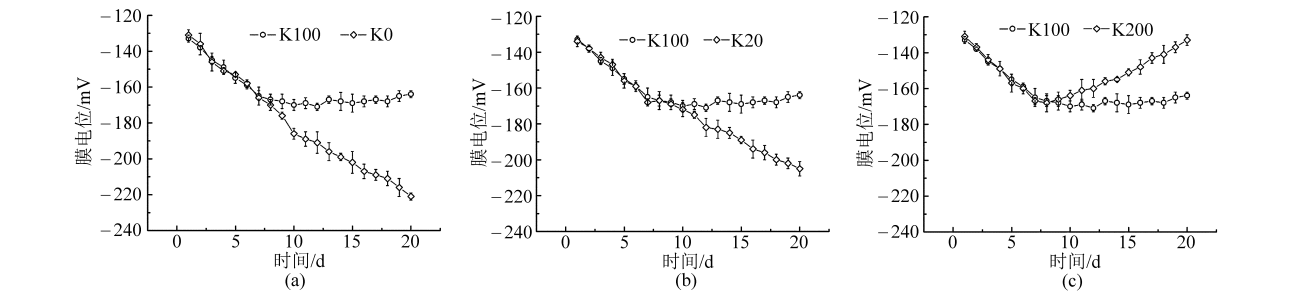


图5 钾胁迫处理与正常钾处理的黄瓜正三叶叶片液泡膜电位的比较
Fig.5 Comparison of vacuole membrane potential of the 3rd fully expanded leaf of cucumber between K-stress and optimal K treatments
(a) K0 与 K100 (b) K20 与 K100 (c) K200 与 K100

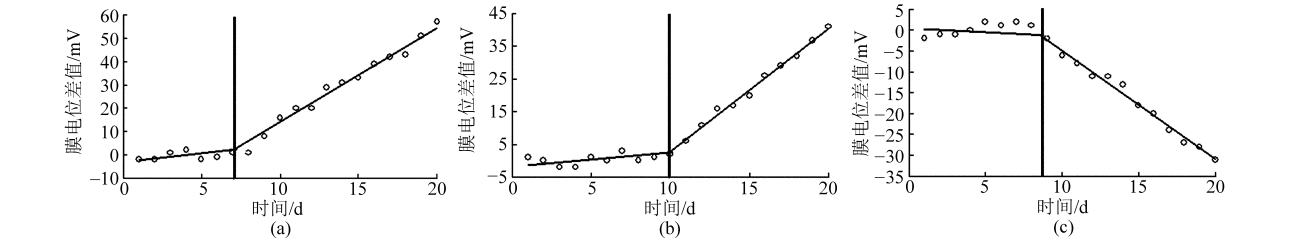


图6 用膜电位的差值曲线和分段回归结果识别黄瓜叶片钾胁迫起始时间的示意图
Fig.6 Difference profile and segmented regression results for four levels of K treatment for identification of onset of stress induced by K-stress on cucumber plants
(a) K0 与 K100 (b) K20 与 K100 (c) K200 与 K100

6 mV。在实验最后, K20 植物的液泡膜电位为 -205 mV , 与正常钾植物 (K100) 相比, 减少了 41 mV (图 5b、6b)。许多研究已经证实, 外部钾浓度的减少使得质膜产生明显的超极化 (膜电位变得更多负)。同样地, Maathuis^[21] 和 Nieves 等^[22] 的研究也显示早在钾浓度下降的几分钟内, 就检测到钾缺乏引起了细胞质膜电位的超极化。应当指出的是, 钾的流动并不是质膜极化的主要原因, 只是为电化学梯度的形成提供所需的能量, 最终电化学梯度的形成是由于质膜 H^+ -ATPase 活性的变化, 使得植物细胞变得有电极化现象。超极化和细胞外酸化主要是由 H^+ -ATPase 活性的变化产生的^[12]。除了引起超极化, 外部低浓度的钾也引起了 H^+ 离子的排出, 导致细胞外的酸化。而质膜的超极化可能激发并提高了内向钾离子通道的活性, 使得更多的钾进入细胞内部, 因此外部钾不足诱导的质膜超极化和细胞外酸化可能帮助植物吸收更多的钾离子进入细胞内, 以此来弥补自身的钾短缺。与钾缺乏相反的是, 外部钾离子浓度的增加使得质膜产生了去极化 (膜电位变得少负) 现象。随着钾过量处理时间的延长, 膜电位变得越来越少负。从图 6c 可知, 钾过量处理的植物 (K200) 的液泡膜电位拐点在 7.14 d, 从整数上来看拐点就是第 8 天, 说明从第 9 天开始, 过量钾处理植物 (K200) 的液泡膜电位有了明显的增加, 而植物的钾胁迫实验处理是从第 7 天开始, 也就是说在钾过量处理的 2 d 后, 与正常钾植物 (K100) 相比, K200 植物叶片的液泡膜电位呈明显的去极化 (膜电位变得少负), 此时 K200 植物的液泡膜电位增加了 2 mV 。在实验最后, K200 植物的

膜电位为 -133 mV , 与正常钾植物 (K100) 相比, 增加了 31 mV (图 5c、6c)。同样地, Fernando 等^[23] 研究显示, 液泡中的钾浓度从 21 mmol/L 升高到 85 mmol/L 时, 根细胞的膜电位有 24 mV 的去极化。细胞质中的钾浓度水平较低, 且十分稳定, 过量的钾几乎全部转移到液泡中, 引起了液泡膜电位严重的去极化现象。而质膜的去极化激活了外向钾离子通道, 帮助植物把过量的钾离子排出细胞外。需要指出的是, 膜电位形成的本质是由于膜两侧离子分布的不均匀造成的, 这归因于膜上的离子泵和交换体, 它们对维持这种不均匀的离子分布起重要作用。在这里外部钾浓度的改变使得 H^+ -ATPase (质子泵) 活性产生了变化, 这才是植物细胞产生极化现象的根本原因。

3 结束语

对正常钾处理与钾胁迫处理之间的黄瓜叶片液泡膜电位差的分段回归分析表明, 黄瓜叶片液泡膜电位的测量方法至少能在肉眼可见的胁迫症状出现的 10 d 前就可识别出不同的钾营养状况。直到实验结束, 也没在黄瓜叶片上观察到明显的钾胁迫症状, 钾胁迫的可见症状是非常滞后的, 而钾胁迫植物的膜电位的响应是非常快的。在钾严重缺乏处理 2 d 后, 可观察到明显的液泡膜电位的减少, 在钾中等缺乏处理 4 d 后, 可观察到明显的液泡膜电位的减少, 而在钾过量处理 2 d 后, 可观察到明显的液泡膜电位的增加。可见, 植物液泡的膜电位测量不仅能在症状出现之前对钾的胁迫进行诊断, 还能把钾缺乏和过量的胁迫情况区分开。

参 考 文 献

- Gerardeaux E, Meille L J, Constantin J, et al. Changes in plant morphology and dry matter partitioning caused by potassium deficiency in *Gossypium hirsutum* L. [J]. Environmental and Experimental Botany, 2010, 67(3): 451–459.
- Kanai S, Moghaieb R E, El-Shemy H A, et al. Potassium deficiency affects water status and photosynthetic rate of the vegetative sink in green house tomato prior to its effects on source activity [J]. Plant Science, 2011, 180(2): 368–374.
- 杨昊谕, 于海业, 张蕾, 等. 基于激光诱导荧光光谱分析的黄瓜叶片叶绿素含量检测 [J]. 农业机械学报, 2009, 40(10): 169–172.
Yang Haoyu, Yu Haiye, Zhang Lei, et al. Detecting of chlorophyll content of cucumber leaves based on laser-induced fluorescence spectrum analysis technique [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2009, 40(10): 169–172. (in Chinese)
- 丁永前, 朱艳, 李杨, 等. 基于主动光源的作物冠层反射光谱测量方法 [J]. 农业机械学报, 2013, 44(12): 209–214.
Ding Yongqian, Zhu Yan, Li Yang, et al. A method for measuring reflection spectrum of crop canopy based on active light source [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2013, 44(12): 209–214. (in Chinese)
- 孙俊, 卫爱国, 毛罕平, 等. 基于高光谱图像及 ELM 的生菜叶片氮素水平定性分析 [J]. 农业机械学报, 2014, 45(7): 272–277.
Sun Jun, Wei Aiguo, Mao Hanping, et al. Discrimination of lettuce leaves' nitrogen status based on hyperspectral imaging technology and ELM [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2014, 45(7): 272–277. (in Chinese)
- 邹小波, 陈正伟, 石吉勇, 等. 基于近红外高光谱图像的黄瓜叶片色素含量快速检测 [J]. 农业机械学报, 2012, 43(5): 152–156.

- Zou Xiaobo, Chen Zhengwei, Shi Jiyong, et al. Rapid detection of cucumber leaves pigments based on near infrared hyper-spectral image technology[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2012, 43(5): 152 – 156. (in Chinese)
- 7 Li B Q, Liew O W, Asundi A K. Pre-visual detection of iron and phosphorus deficiency by transformed reflectance spectra[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2006, 85(2): 131 – 139.
- 8 Li G L, Ma Z H, Wang H G. Image recognition of grape downy mildew and grape powdery mildew based on support vector machine [C]//Computer and Computing Technologies in Agriculture V, IFIP Advances in Information and Communication Technology, 2012, 370: 151 – 162.
- 9 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)
- 10 袁媛,李森,陈晟,等. 复杂背景黄瓜叶部病害图像分割方法[J]. 农业机械学报,2013,44(10):233 – 237.
- Yuan Yuan, Li Miao, Chen Sheng, et al. Segmentation of cucumber leaf disease images with complex background [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2013, 44(10): 233 – 237. (in Chinese)
- 11 Wang Y, Wu W H. Plant sensing and signaling in response to K^{+} -deficiency[J]. Molecular Plant, 2010, 3(2): 280 – 287.
- 12 Britto D T, Kronzucker H J. Cellular mechanisms of potassium transport in plants[J]. Physiologia Plantarum, 2008, 133(4): 637 – 650.
- 13 Cuin T A, Miller A J, Laurie S A, et al. Potassium activities in cell compartments of salt-grown barley leaves[J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 54(383): 657 – 661.
- 14 Cho Y Y, Oh S B, Oh M M, et al. Estimation of individual leaf area, fresh weight, and dry weight of hydroponically grown cucumbers (*Cucumis sativus* L.)[J]. Scientia Horticulturae, 2007, 111(4): 330 – 334.
- 15 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, 52(356): 541 – 549.
- 16 Muggeo V M R. Estimating regression models with unknown break-points[J]. Statistics in Medicine, 2003, 22(19): 3055 – 3071.
- 17 Terry N, Ulrich A. Effects of potassium deficiency on the photosynthesis and respiration of leaves of sugar beet[J]. Plant Physiology, 1973, 51(4): 783 – 786.
- 18 李春俭. 高级植物营养学[M]. 北京:中国农业大学出版社,2008.
- 19 Rona J P, Pitman M G, Luttge U, et al. Electrochemical data on compartmentation into cell wall, cytoplasm and vacuole of leaf cells in the CAM genus *Kalanchoë*[J]. Journal of Membrane Biology, 1980, 57(1): 25 – 35.
- 20 Miller A J, Smith S J. The mechanism of nitrate transport across the tonoplast of barley root cells[J]. Planta, 1992, 187(4): 554 – 557.
- 21 Maathuis F J M, Sanders D. Energization of potassium uptake in *Arabidopsis thaliana*[J]. Planta, 1993, 191(3): 302 – 307.
- 22 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: 521 – 532.
- 23 Fernando M, Mehroke J, Glass A D M. De novo synthesis of plasma membrane and tonoplast polypeptides of barley roots during short-term K^{+} deprivation[J]. Plant Physiology, 1992, 100(3): 1269 – 1276.