

茶多酚抑制红壤稻田脲酶及其对水稻生长的影响*

邱业先¹ 汪金莲¹ 陈尚¹ 卢向阳² 罗泽民²

(1 江西农业大学林学院, 南昌 330045) (2 湖南农业大学, 长沙 410128)

摘要 试验了茶多酚抑制红壤稻田脲酶及其对其它几种酶、水稻根系活力和水稻生长的影响。试验表明茶多酚对红壤稻田脲酶具有较强的抑制作用, 对红壤稻田蛋白酶、过氧化氢酶和纤维素酶抑制作用较弱。茶多酚对水稻根系活力和水稻生长也有较轻微抑制作用。茶多酚较氢醌的脲酶抑活作用强、副作用小, 茶多酚是一种有较好前景的脲酶抑制剂。

关键词 茶多酚, 抑制剂, 脲酶, 稻田

中图分类号 Q556

尿素是目前世界及我国农业生产中应用面积最广, 数量最多的一种氮肥^[1]。但由于尿素表施到土壤中, 经土壤脲酶作用, 被迅速水解成碳酸铵, 容易造成氨挥发, 因而尿素肥料的肥效较低, 水田一般只能达到 30% ~ 50%^[2, 3], 提高尿素肥效已成为当前农业生产上一个迫切需要解决的问题, 人们作出过长期而艰苦的探索, 如发展了大颗粒尿素和包被尿素, 缓释尿素以及尿素深施等技术, 但终因效果不理想或费工费时尚难以在生产上广泛应用。脲酶抑制剂能够抑制脲酶活性, 减缓尿素水解, 是提高尿素肥效的有效途径之一^[4]。自 20 世纪 60 年代以来, 人们进行了大量的脲酶抑制剂筛选工作, 例如有近百种有机、无机化合物作为脲酶抑制剂而获专利^[5]。人们发现含硼化合物、尿素衍生物类、金属盐类、酚类和醌类、磷酸胺类化合物都具有抑制脲酶活性的作用, 其中被认为最好的无机物是银盐和汞盐, 最有效的有机物是酚和醌。研究得最多且高效的有氢醌、*o*-苯基磷酸二胺和 *N*-丁基硫代磷酸三胺^[6]。但是由于各抑制剂或存在成本过高或存在对环境的污染和应用效果不稳定的情况, 目前仍无一抑制剂得到大面积的推广应用。我们在进行植物性脲酶抑制剂的筛选工作中, 发现茶多酚具有较强的抑制脲酶作用^[7]。本研究探明了茶多酚在红壤稻田的应用效果。

1 材料、方法与实验设计

1.1 供试土壤与材料

1.1.1 供试土壤 江西农业大学校区内红壤稻田(红土母质的水耕人为土)。肥田土壤有机质含量 24.5 g kg⁻¹, 全氮 1.36 g kg⁻¹, 水解氮 68.5 mg kg⁻¹; 低肥田土壤有机质含量 20.3 g kg⁻¹, 全氮 1.02 g kg⁻¹, 水解氮 49.2 mg kg⁻¹。

1.1.2 供试作物 水稻(品种为浙 965)。

1.1.3 供试材料 茶多酚为市售金龙公司产品(茶多酚含量为 50%)。

1.2 试验设计与方法

1.2.1 试验设计 试验选择肥力高的和肥力低的两种红壤稻田(红土母质的水耕人为土), 肥田区设五个处理:(1) 尿素 210 kg km⁻²(CK); (2) 尿素 210 kg km⁻²+ 氢醌 0.75 kg km⁻²(T₁); (3) 尿素 210 kg km⁻²+ 茶多酚 0.75 kg km⁻²(T₂); (4) 尿素 210 kg km⁻²+ 茶多酚 0.15 kg km⁻²(T₃); (5) 尿素 210 kg km⁻²+ 茶多酚 0.075 kg km⁻²(T₄)。低肥区设 3 个处理, 同肥田区处理 1, 2 和 3。每处理小区面积为 13.33 m², 设置 3 个重复。在早稻分蘖期(5 月 10 日) 将尿素和抑制剂用 2000 ml H₂O 溶解后一次性泼施。在施用 2, 4, 6,

* 国家自然科学基金项目(39760037)、江西省自然科学基金项目(0030038)资助

收稿日期: 2001-08-30; 收到修改稿日期: 2002-02-05

15、30 d 后分别用五点取样法取土样进行土壤脲酶、过氧化氢酶、蛋白酶、纤维素酶分析。并在施肥 4、6、15、30 d 后取根系样品分析稻根脲酶活性和根系活力, 在施肥后 15、30 d 取植株样品测定水稻地上部和下部的干物质积累量。

1.2.2 研究方法 (1) 脲酶测定。用比色法^[8]。(2) 蛋白酶检测。称取 2 g 风干土两份, 分别置试管中, 加入 0.5 ml 甲苯, 摇匀后旋转 15 min。将其中一试管加 10 ml 1% 白明胶, 另一管则加 10 ml H₂O。置 30℃ 恒温箱中培养 24 h。然后, 将试管中悬液滤至另一试管中。吸取滤液 5 ml, 加 0.5 ml 0.05 mol L⁻¹ H₂SO₄ 和 3 ml 1.4 mol L⁻¹ Na₂SO₄ 沉淀蛋白质并过滤。取滤液 2 ml 加 1 ml 0.125 mol L⁻¹ 茚三酮溶液在沸水浴上加热 10 min, 将显色液稀释至 50 ml。以甘氨酸作标准曲线计算蛋白酶活性。(3) 过氧化氢酶活性测定^[9]。称取 5 g 过 1 mm 筛的风干土样, 置于 150 ml 三角瓶中, 注入 40 ml H₂O 和 5 ml 0.088 mol L⁻¹ H₂O₂。设置不加土样的对照。放于 120 min⁻¹ 往复式摇床上, 振荡 30 min。然后加入 5 ml 6 mol L⁻¹ H₂SO₄ 以终止反应, 用致密滤纸过滤。再取滤液 25 ml, 用 0.1 mol L⁻¹ KMnO₄ 溶液滴定至微红色。以单位土重的 0.1 mol L⁻¹ KMnO₄ ml 数表示酶活性。(4) 纤维素酶活性测定^[8]。称取风干土样 10 g 两份, 分别置 50 ml 容量瓶中, 加入 1.5 ml 甲苯摇匀后放置 15 min。另取一个 50 ml 容量瓶不加土样和甲苯作为无土对照。在一个土样瓶和对照瓶中加入 5 ml 羧甲基纤维素溶液。另一土样瓶则加 5 ml 去离子水。再在三个容量瓶中加入 5 ml 醋酸盐缓冲液 (pH 5.5), 混匀后塞紧, 置 35℃ 恒温箱培养 72 h。培养结束后置沸水浴终止反应。然后加入 0.3 mg 铝钼钾沉淀剂沉淀纤维素。立即用滤纸过滤至 50 ml 容量瓶中, 用去离子水定容至刻度。吸取滤液 2 ml 至耐热试管中, 加入 5 ml 0.103 mol L⁻¹ 蒽酮试剂, 置沸水浴加热 10 min, 并设置以蒸馏水代替反应液的对照。于 551 nm 波长处测定光吸收, 以葡萄糖作标准曲线。计算每 g 土样 72 h 内释放的葡萄糖 mg 数。(5) α-萘胺法测定根系活力^[10]。将待测根系洗净吸干附着水称取 1 g 放入 100 ml 三角瓶中, 加 40 mg kg⁻¹ 的 α-萘胺溶液和 0.2 mol L⁻¹ pH 7 的磷酸缓冲液各 25 ml, 混匀。静置 5 ~ 10 min 后, 从瓶中取 2 ml 溶液置 20 ml 刻度试管。将其余的溶液塞好瓶塞后, 放在振荡器上, 在 25℃ 下振荡 3~6 h。反应完毕后, 取 2 ml 溶液放入另一刻度试管。在上述两次及空白试验所吸取的 2 ml 待测液中, 各加入 10 ml 去离子水, 混匀后再加入 0.058 mol L⁻¹ 对氨基苯磺酸 1 ml 和 100 mg kg⁻¹ 的 NaNO₂ 溶液 1 ml, 混匀, 置于室温下 5 min 使之显色, 定容至 20 ml, 在 510 nm 波长进行比色, 由 α-萘胺标准曲线查出 α-萘胺含量, 以单位时间每 g 根样所耗 α-萘胺的 μg 数表示根系活力。

2 结果

2.1 不同浓度茶多酚抑制红壤脲酶活性研究

在早稻分蘖期, 用不同浓度 (0.75 kg km⁻²、0.15 kg km⁻²、0.075 kg km⁻²) 的茶多酚和尿素混施于红壤稻田, 分别在施用 2、4、6、15、30 d 后取土样测定脲酶活性 (表 1)。表 1 结果表明, 茶多酚对红壤稻田脲酶有较强的抑制作用。在所试验的浓度范围内, 随着茶多酚浓度的增大, 抑制作用增强。其抑制效果随

表 1 茶多酚对红壤稻田脲酶活性的抑制动态

Table 1 The inhibition trends of tea polyphenol on urease activity in paddy soil derived from red soil

处 理 Treatment	脲酶活性/脲酶活性抑制百分率 Urease activity/Inhibition rate of urease activity (NH ₃ -N μg g ⁻¹) / (%)									
	2d		4d		6d		15d		30d	
CK	638/0	d D	815/0	d D	845/0	d C	806/0	d D	360/0	a A
T ₁	389/39.0	c C	429/47.4	ab AB	465/45.0	bc B	452/43.9	b BC	423/0	b B
T ₂	167.3/74.3	a A	407/50.1	a A	416/50.7	a A	407/49.5	a A	382/0	a A
T ₃	338/47.0	b B	443/45.6	b BC	452/46.5	b B	435/46	b AB	42.5/0	b B
T ₄	361/43.4	b BC	470/42.3	c C	485/42.6	c B	484/39.9	c C	450/0	c B

注: A, B, C, D 表示处理间差异极显著 (p < 0.01); a, b, c, d 表示处理间差异显著 (p < 0.05); 任一一对处理间在同一显著水平字母相同表示差异不显著 (邓肯法); 各处理重复间经方差分析差异不显著。表中只列脲酶活性平均数

施用时间增加而减弱,用后 30 d,抑制作用消失。试验还表明,在茶多酚和氢醌同样用量(均为 0.75 kg km^{-2})的情况下,茶多酚的抑制效能优于氢醌。尤其是在施用 2 d 内,茶多酚的抑制作用较氢醌要高出 35%。其结果经方差分析表明,处理间差异达极显著水平($p < 0.01$),天数间差异达显著水平($p < 0.05$)。进一步采用 Duncon 氏新复极差测验法,对处理间进行多重比较。结果显示,在 2 d 内施用茶多酚与氢醌处理间达极显著水平,但随着使用时间延长,差异消失;高浓度茶多酚和低浓度茶多酚处理间差异达极显著水平。

2.2 茶多酚对不同肥力红壤稻田脲酶抑制作用研究

试验了茶多酚对不同肥力红壤稻田脲酶活性的抑制作用(表 2)。结果表明,茶多酚对不同肥力红壤稻田脲酶活性均具抑制作用,且抑制效能均随施用时间增加而减弱;其不同肥力土壤中抑制脲酶活性的效果以在高肥力田较低肥力田的抑制效果为佳。经方差分析与新复极差多重比较分析,处理与 CK 间差异达极显著($\alpha = 0.01$)。

表 2 茶多酚对不同肥力红壤稻田脲酶抑制作用比较

Table 2 Comparison of tea-polyphenol on urease inhibition in different type of paddy soils derived from red soils

处 理 Treatment		脲酶活性/脲酶活性抑制百分率 Urease activity/Inhibition rate of urease activity($\text{NH}_3\text{-N } \mu\text{g g}^{-1}$)/(%)				
		2 d				
		2 d	4 d	6 d	15 d	30 d
CK	肥 田	638/0	815/0	845/0	806/0	360/0
	低肥田	354/0	705/0	710/0	596/0	331/0
T_2	肥 田	164/74.2	407/50.1	416/50.8	407/49.5	382/0
	低肥田	192/45.7	356/49.5	484/32.53	448/24.83	405/0

2.3 茶多酚对红壤稻田蛋白酶、过氧化氢酶和纤维素酶活性的影响

为了判断作为脲酶抑制剂的茶多酚的专一性,试验了施用茶多酚对红壤稻田蛋白酶、过氧化氢酶和纤维素酶的影响(表 3)。结果表明,茶多酚对红壤稻田蛋白酶也具有抑制作用。但与其对脲酶活性的抑

表 3 茶多酚对红壤稻田蛋白酶、过氧化氢酶、纤维素酶的抑制动态

Table 3 The inhibition trends of tea-polyphenol on proteinase, catalase and cellulase activity in paddy soil derived from red soil

处 理 Treatment	时 间 Time(d)				
	2	4	6	15	30
蛋白酶活性[甘氨酸(mg g^{-1}) 24 h 酶促反应/蛋白酶活性抑制率(%)] Proteinase activity[Gly mg g^{-1} 24 h catalysis/Inhibition rate of proteinase activity]					
CK	1.60/0	2.56/0	3.25/0	1.82/0	1.35/0
T_1	1.49/6.8	2.00/21.8	1.82/44	1.50/17.5	1.61/0
T_2	1.48/7.5	1.99/22.3	2.50/23.1	1.62/10.9	1.35/0
过氧化氢酶活性[高锰酸钾(ml g^{-1})/过氧化氢酶抑制率(%)] Catalase activity[$\text{KMnO}_4 \text{ ml g}^{-1}$ /Inhibition rate of catalase activity]					
CK	6.88/0	8.83/0	9.21/0	10.62/0	7.89/0
T_1	6.70/2.6	8.25/6.5	4.2	9.97/6.1	8.78/0
T_2	6.30/8.4	7.95/9.9	8.54/7.2	9.69/8.7	8.66/0
纤维素酶活性[葡萄糖(mg g^{-1}) 72 h/纤维素酶抑制率(%)] Cellulase activity[Glucose mg g^{-1} 72 h/Inhibition rate of cellulase activity]					
CK	0.45/0	0.32/0	0.50/0	0.33/0	0.35/0
T_1	0.13/71.1	0.26/20.5	0.18/64.3	0.39/0	0.38/0
T_2	0.28/36.2	0.29/9.3	0.28/43.4	0.44/0	0.35/0

制作用相比较,其抑制百分率要小得多,且抑制高峰不是出现在施用后第 2 d,而是出现在第 6 d。与氢醌相比较,两者均对蛋白酶活性有一定抑制作用,两者的抑制效果差异不显著,但是,趋势是茶多酚对蛋白酶的抑制效能稍弱。结果还表明,茶多酚和氢醌对红壤稻田过氧化氢酶的抑制均在 10% 以内。

由表 3 可知,茶多酚和氢醌对纤维素酶活性均有较强的抑制作用,前者的抑制效果明显,且抑制作用时间较短,只有 6 d。经方差分析,表 3 各处理与 CK 间差异不显著($\alpha = 0.05$)。

2.4 茶多酚对水稻根系活力的影响

一个优良的脲酶抑制剂,不仅要求有效地抑制脲酶活性,而且还应对植物生长及代谢无太大不良影响。为此,研究了施用茶多酚后,水稻根系活力的变化(表 4)。结果表明,茶多酚对水稻根系活力有一定的抑制作用,达 10% 左右,其对根系活力的抑制与氢醌的比较相近。经方差分析,处理与 CK 间差异不显著($\alpha = 0.05$)。

表 4 茶多酚对水稻根系活力的影响

Table 4 Effect of tea-polyphenol on vitality of rice root system

处 理 Treatment	根系活力: α -萘胺生物氧化量/根系活力抑制百分率 Roots' vitality (biological oxidation quantity of naphthalene aceficacid ($\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$) / Inhibition rate of roots' vitality) (%)				
	2 d	4 d	6 d	15 d	30 d
	CK	11.0/0	16.1/0	13.2/0	19.6/0
T ₁	10.0/9.1	13.6/15.5	12.5/5.3	8.7/9.3	18.2/0
T ₂	9.7/11.8	13.9/13.6	11.8/10.6	8.5/11.4	17.8/0

2.5 茶多酚对水稻生长的影响

在施用茶多酚后的第 15 d 和第 30 d, 取样测定了水稻地上部和地下部干物重(表 5)。结果表明,茶多酚施用初期对水稻地上部和地下部的生长均有一定影响,但影响均很小,施用时间较长后,其抑制作用消失。茶多酚抑制水稻生长的作用与氢醌大致相似。

表 5 茶多酚对水稻生长的影响

Table 5 Effect of tea-polyphenol on the growth of rice

处 理 Treatment	15 d		30 d	
	地上部干重/抑制 生长百分率 Dry matter content of aerial parts (g) / Inhibition growth rate (%)	地上部干重/抑制 生长百分率 Dry matter content of underground parts (g) / Inhibition growth rate (%)	地上部干重/抑制 生长百分率 Dry matter content of aerial parts (g) / Inhibition growth rate (%)	地上部干重/抑制 生长百分率 Dry matter content of underground part (g) / Inhibition growth rate (%)
	CK	130.44/0	54.38/0	189.93/0
T ₁	128.72/1.3	51.80/4.7	197.99/0	46.47/0
T ₂	126.53/2.9	53.06/2.4	193.53/0	47.39/0

3 结 论

1. 田间试验证明,茶多酚具有较强的抑制脲酶作用,并且随浓度增大,抑制作用增强,茶多酚的抑制有效期在 15 d 以上。

2. 茶多酚除了抑制脲酶活性外,对土壤的蛋白酶、过氧化氢酶和纤维素酶均有一定程度的抑制。由此说明,其专一性不强。但试验结果表明,茶多酚对红壤稻田蛋白酶、过氧化氢酶和纤维素酶的抑制

作用明显小于对脲酶的抑制作用,尤其是对纤维素酶的抑制为时仅 6 d 左右。

3. 茶多酚对水稻根系活力和水稻生长也有一定的抑制作用,但抑制作用较弱,并且恢复较快。

4. 与目前公认的三种最好的脲酶抑制剂之一氢醌比较,茶多酚对脲酶的抑制效能更强,而对土壤蛋白酶、过氧化氢酶、纤维素酶的抑制接近或略低于氢醌;而对水稻根系活力和水稻生长的抑制作用两者比较相近。说明茶多酚作为一种脲酶抑制剂有较好前景。

参考文献

1. Martinez A, Diamond R B. Nitrogen in Crop Production. USA: Madison Wisconsin, 1984. 3~ 21
2. Fillery I R P, De Datta S K. Ammonia volatilization from nitrogen sources applied to rice field 1. Methodology, ammonia flux and nitrogen-15 loss. Soil Sci. Soc. Am. J., 1986, 50: 80~ 86
3. Simpson J R, Freney J R, Muirhead W A, *et al.* Effects of phenylphosphorodiamidate and dicyandiamide on nitrogen loss from flooded rice. Soil Sci. Soc. Am. J., 1985, 49: 1 426~ 1 431
4. Vlek P L G, Stumpe J M, Byrnes B H. Urease activity and inhibition in flooded soil systems. Fertilizer Research, 1980, 15(1): 191~ 202
5. 陈举鸣编译. 国外脲酶抑制剂研究动态. 国外农学—土壤肥料, 1985, (3): 1~ 2
6. 赵晓燕. 土壤脲酶抑制剂研究进展. 土壤学进展, 1988, 16(5): 6~ 13
7. 邱业先, 汪金莲, 等. 茶多酚对土壤脲酶抑制作用研究. 中国学术期刊文摘(科技快报), 2000, 6(10): 1 286~ 1 288
8. 李阜棣, 喻事牛, 等. 农业微生物实验技术. 北京: 中国农业出版社, 1996. 136~ 137
9. 中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究法. 北京: 科学出版社, 1985. 263~ 264, 271~ 273
10. 张宪政. 作物生理研究法. 北京: 农业出版社, 1992. 140~ 142

TEA-POLYPHENOL INHIBITION TO UREASE OF PADDY SOIL DERIVED FROM RED SOIL AND ITS EFFECTS ON THE GROWTH OF RICE

Qiu Ye-xian¹ Wang Jin-lian¹ Chen Shang-xing¹ Lu Xiang-yang² Luo Ze-min²

(1 College of Forestry, Jiangxi Agriculture University, Nanchang 330045, China)

(2 Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China)

Summary

The authors used tea-polyphenol as inhibitor and studied its effects on the urease and some other enzymes in paddy soil derived from red soil, as well as the vitality of rice roots and the growth of rice. The results show that its inhibition to urease of the paddy soil derived from red soil was fairly strong, whereas the inhibition to protein enzyme, catalase and cellulase in the soil was relatively weak. The tea-polyphenol also had a comparatively faint inhibition to the vitality of rice roots and the growth of rice. Compared with hydroquinone, the tea-polyphenol's side effects of inhibition was weaker, hence it is a better inhibitor.

Key words Tea-polyphenol, Inhibitor, Urease, Paddy fields