

ISSN 0564-3929

# Acta Pedologica Sinica 土壤学报

Turang Xuebao



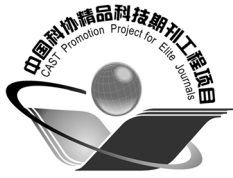
中国土壤学会 主办  
科学出版社 出版

2015

第52卷 第3期

Vol.52 No.3





# 土壤学报

(Turang Xuebao)



第 52 卷 第 3 期 2015 年 5 月

## 目 次

### 综述与评论

- 强还原土壤灭菌防控作物土传病的应用研究····· 蔡祖聪 张金波 黄新琦等 (469)
- 土壤裂隙及其优先流研究进展····· 张中彬 彭新华 (477)

### 研究论文

- 东北典型黑土区农耕土壤团聚体流失特征····· 温磊磊 郑粉莉 沈海鸥等 (489)
- 青藏高原永冻土活动层厚度预测指标集的建立及制图····· 陈吉科 赵玉国 赵 林等 (499)
- 贡嘎山海螺沟冰川退缩区土壤序列矿物组成变化····· 杨子江 邴海健 周 俊等 (507)
- 成都典型区水稻土有机碳组分构成及其影响因素研究····· 廖 丹 于东升 赵永存等 (517)
- 河北省土壤温度与干湿状况的时空变化特征····· 曹祥会 雷秋良 龙怀玉等 (528)
- 喀斯特小流域土壤饱和导水率垂直分布特征····· 付同刚 陈洪松 王克林 (538)
- 大沽河中游地区土壤水与浅层地下水转化关系研究····· 杨玉峥 林 青 王松禄等 (547)
- 化学转化法测定水体中硝酸盐的氮氧同位素比值····· 王 曦 曹亚澄 韩 勇等 (558)
- <sup>13</sup>C脉冲标记定量研究施氮量对光合碳在水稻-土壤系统中分布的影响 ···· 刘 萍 江春玉 李忠佩 (567)
- 垄作免耕对稻田垄埂土壤有机碳累积和作物产量的影响····· 慈 恩 王莲阁 丁长欢等 (576)
- 施入<sup>15</sup>N标记氮肥在长期不同培肥土壤的残留及其利用 ····· 赵 伟 梁 斌 周建斌 (587)
- 长期不同施肥对红壤性水稻土产量及基础地力的影响····· 鲁艳红 廖育林 周 兴等 (597)
- 长期施肥对双季稻产量变化趋势、稳定性和可持续性的影响····· 冀建华 侯红乾 刘益仁等 (607)
- 高粱分泌硝化抑制物对羟基苯丙酸与质子泵的关系研究····· 周金泉 张明超 魏志军等 (620)
- 钝化剂-锌肥降低烟草镉含量长期效果研究 ····· 曹晨亮 王 卫 马义兵等 (628)
- 钾肥和腐殖酸互作对烤烟有机钾盐指数的影响····· 郑东方 许嘉阳 许自成等 (637)
- 桉树取代马尾松对土壤养分和酶活性的影响····· 张 凯 郑 华 陈法霖等 (646)
- 荒漠区生物土壤结皮对土壤酶活性的影响····· 杨航宇 刘艳梅 王廷璞 (654)
- 高量秸秆不同深度还田对黑土有机质组成和酶活性的影响····· 矫丽娜 李志洪 殷程程等 (665)
- 链霉菌JD211对水稻幼苗促生作用及土壤细菌多样性的影响 ····· 王世强 魏赛金 杨陶陶等 (673)

### 研究简报

- 基于最小数据集的塔里木河上游绿洲土壤质量评价····· 贡 璐 张雪妮 冉启洋 (682)
- 铁膜对水稻根表面电化学性质和氮磷钾短期吸收的影响····· 郑芸芸 李忠意 李九玉等 (690)
- 长期不同施肥条件下红壤性水稻土微生物群落结构的变化····· 夏 昕 石 坤 黄欠如等 (697)
- 滨海盐碱地不同造林树种林地土壤盐碱化特征····· 王合云 李红丽 董 智等 (706)

### 信息

- 2015国际土壤年 ····· (696)

封面图片：稻田裂隙二维与三维图像（由张中彬提供）

DOI: 10.11766/trxb201408310438

# 高粱分泌硝化抑制物对羟基苯丙酸与质子泵的关系研究\*

周金泉 张明超 魏志军 胡军 朱毅勇<sup>†</sup>

(南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095)

**摘要** 硝化作用是导致农田氮素损失的一个重要原因, 自然界中一些植物根系能分泌抑制土壤氨氧化细菌的物质, 统称为生物硝化抑制剂。高粱根系分泌的对羟基苯丙酸 (简称MHPP), 具有很好的抑制效果。为了研究MHPP的分泌机制, 本实验用铵态氮与硝态氮两种不同氮素形态水培高粱幼苗, 在一定时间内收集根系分泌物。将根系分泌物通过高效液相色谱法 (HPLC) 测定其中的MHPP含量, 通过微量滴定法测定氢离子含量。同时, 将根系采样后, 用两相法分离根系细胞膜, 测定质子泵活性。结果表明, 在铵态氮营养下, 高粱分泌MHPP的速率在 $3.52 \mu\text{mol g}^{-1} \text{d}^{-1}$ 左右, 而硝态氮营养下几乎不分泌MHPP。在铵态氮营养下, 根系分泌氢离子的速率为 $16.49 \mu\text{mol g}^{-1} \text{d}^{-1}$ , 而硝态氮营养下没有氢离子的分泌。而且, 随着根系分泌物收集液中铵离子浓度的增加, 也促进了根系分泌MHPP和氢离子的速率。因此, 铵态氮营养促进了根系分泌MHPP。进一步研究发现, 虽然在表观上MHPP的分泌受氮素形态影响, 但是在这一过程中MHPP分泌与氢离子的分泌速率是耦合的。而细胞分泌氢离子是由细胞膜上质子泵活性决定的。因此, 本实验结果发现, MHPP的分泌实质上是通过根系细胞膜质子泵活性来调控的: 在没有氮源的情况下, 只要通过壳梭孢菌素 (Fusicoccin) 或钒酸盐 (Vanadate) 改变质子泵活性就可以影响MHPP的分泌。所有实验数据的统计结果发现, MHPP分泌与质子分泌之间的比例大约为1:4, 且相关系数 $r=0.98$ 。因此, 铵态氮营养下高粱根系大量分泌生物硝化抑制剂MHPP在一定程度上是由于铵离子的吸收刺激了质子泵活性提高所引起的, 这也是防止根际铵态氮被氧化、提高氮素利用率的一个重要生理机制。

**关键词** 高粱; 生物硝化抑制剂; 细胞膜质子泵

**中图分类号** S143.1+6 **文献标识码** A

我国农业生产中大量施用氮肥以确保产量<sup>[1-2]</sup>, 在增产的同时也导致氮素的大量损失, 其中的一个重要的原因是铵态氮肥在土壤中被氧化为硝态氮而随水淋失<sup>[3]</sup>, 或通过反硝化作用成为氧化亚氮等气体<sup>[4-5]</sup>。因此, 对环境也造成了巨大的负荷<sup>[6]</sup>。

硝化抑制剂可以抑制铵态氮的氧化来提高氮肥利用率<sup>[7-9]</sup>, 如德国巴斯夫公司的3, 4-二甲基吡唑磷酸盐<sup>[10-11]</sup> (3, 4-dimethylpyrazole phosphate DMPP), 美国陶氏化工的伴能 (Nitrapyrin

NP)<sup>[12-13]</sup>等。但是考虑到其本身的高额成本、以及可能对环境潜在的影响, 因此国内外科学家也在寻找天然的由植物合成并分泌的具有抑制土壤中硝化作用的物质, 统称为生物硝化抑制剂 (Biological nitrification inhibitor, BNI)<sup>[14-15]</sup>, 例如一些非饱和自由脂肪酸、亚油酸和 $\alpha$ -亚麻酸等。在农作物中, 高粱根系能分泌高效的抑制硝化作用的物质, 其中一个水溶性的分子经鉴定为3-(4-羟基苯基)丙酸, 别名对羟基苯丙酸, 英文为

\* 国家自然科学基金面上项目 (31172035)、教育部新世纪优秀人才项目 (NCET-11-0672) 和国家大学生创新创业训练计划项目 (201410307023) 资助

<sup>†</sup> 通讯作者: 朱毅勇 (1973—), 博士, 教授, 主要从事植物氮素高效利用机制研究。电话: 86-025-84396552, E-mail: ziyong1973@njau.edu.cn

作者简介: 周金泉 (1988—), 男, 湖南耒阳人, 硕士, 主要从事高粱分泌生物硝化抑制剂的作用机制与效果研究

收稿日期: 2014-08-31; 收到修改稿日期: 2015-02-04

methyl 3-(4-hydroxyphenyl) propionate, 缩写为 MHPP<sup>[16-17]</sup>, 如图1所示。

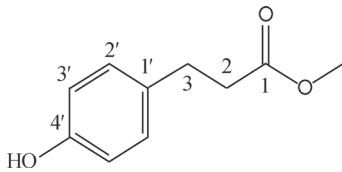


图1 MHPP的分子结构图

Fig. 1 Molecular structure of MHPP

从前期的研究来看, 高粱根系分泌物的粗提物对亚硝化细菌起抑制作用的总活性与铵硝营养以及细胞膜上的质子泵活性有关<sup>[18-19]</sup>。考虑到 MHPP 本身是一种弱的有机酸, 而通常情况下植物细胞质 pH 均在中性偏碱的范围, 因此有机酸在这种 pH 条件下要解离成阴离子<sup>[20]</sup>。而阴离子大都是通过

细胞膜上的离子通道进行运输的, 受细胞膜电位的影响, 而细胞膜电位主要是通过细胞膜上的质子泵将 H<sup>+</sup> 泵出细胞形成的质子浓度梯度建立的<sup>[21]</sup>。因此, 我们认为铵态氮之所以引起 MHPP 的分泌, 而硝态氮却不能产生类似的结果, 可能与两种不同氮素营养的吸收与同化有关。由于铵态氮营养下根系细胞中铵的同化会产生大量的氢离子<sup>[22]</sup>(图 2), 这些氢离子需要被一些生理作用所抵消, 如果无法消耗就要排出细胞, 在这个过程中会引起质子泵活性的升高, 使细胞膜电位超极化, 从而引进一些离子通道的打开, 促进某些阴离子的大量分泌<sup>[23]</sup>。相反, 硝态氮可以直接运输到地上部分后被还原, 而且硝酸还原的过程不会产生氢离子, 并且还要消耗氢离子<sup>[22]</sup>。因此, 铵态氮营养下质子泵活性被诱导升高, 可能是导致 MHPP 大量分泌的主要原因。

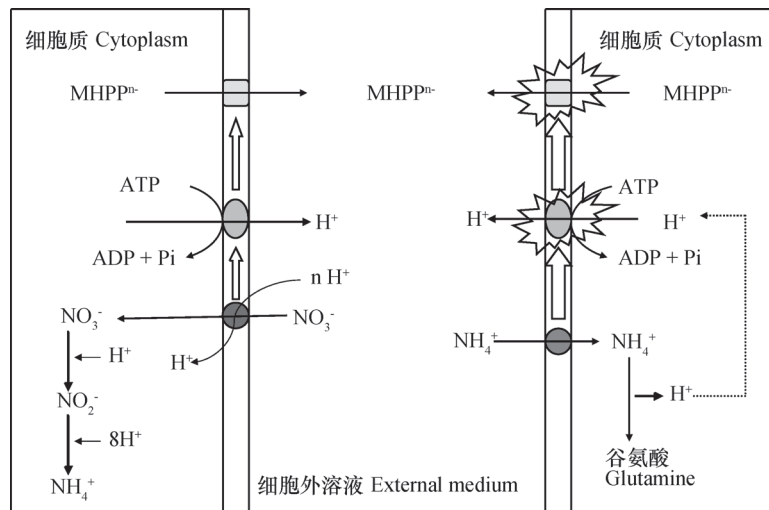


图2 铵硝营养的吸收与同化对质子泵和MHPP分泌影响的示意图

Fig. 2 Schematic description of the effect of ammonium and nitrate uptake and assimilation on plasma membrane H<sup>+</sup> ATPase activity and MHPP exudation from root cells

因此, 本实验对高粱根系细胞膜质子泵(又称H<sup>+</sup>-ATPase)活性进行了测定, 同时分析了高粱根系分泌氢离子和MHPP的速率, 以验证质子泵与MHPP分泌的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物培养

试验所用作物为高粱(*Sorghum bicolor* L.), 首先于30℃发芽, 露白以后在温室中进行栽培。从第一叶展开时, 开始对高粱进行全铵或

全硝培养。营养液配方为(mg L<sup>-1</sup>): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 38.31; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 31.02; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 10.5; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 36.93; Fe-EDTA, 15.1; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.57; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.078; MnSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O, 2.35; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.126; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.220<sup>[16]</sup>。氮源根据实验处理分别用0.5 mmol L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>和Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>。培养3周后, 将根系从营养液中取出, 用相应的收集液冲洗3次, 每6株高粱苗为一组, 在相应的溶液中培养24 h后用于MHPP和氢离子含量的检测, 同时采取根系样品用于分离细胞膜, 测定细胞膜H<sup>+</sup>-ATPase活性。试验

设置4个重复组, 试验重复3次进行。

### 1.2 实验设计

处理一: 分别用 $0.5 \text{ mmol L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 作为氮源培养高粱, 不调营养液的pH。处理时将根系置于 $1 \text{ L } 0.5 \text{ mmol L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 或 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液中通气培养一天, 收集根系分泌物, 溶液收集后先用NaOH滴定, 测定氢离子分泌量, 然后将所有溶液浓缩蒸干后用高效液相色谱法(HPLC)测定其中MHPP含量。根系称取一部分用于细胞膜分离, 测定细胞膜 $\text{H}^+$ -ATPase活性。

处理二: 高粱用 $0.5 \text{ mmol L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 培养后, 将根系分别置于 $1 \text{ L}$ 不同浓度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液中, 氮浓度为 $0$ 、 $0.1$ 、 $0.5$ 、 $1.0 \text{ mmol L}^{-1}$ , 培养一天后用于测定上述指标。

处理三: 高粱用 $0.5 \text{ mmol L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 培养, 处理时将根系置于 $1 \text{ L } 0.5 \text{ mmol L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液中作为对照, 其他处理分别加入刺激根系细胞分泌氢离子的壳梭孢菌素(Fusicoccin)  $0.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ 和 $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ , 以及抑制根系分泌氢离子的钒酸盐(Vanadate)  $0.1 \text{ mmol L}^{-1}$ 和 $0.5 \text{ mmol L}^{-1}$  [23]。培养一天后用于测定上述指标。

### 1.3 分析方法

将上述收集到的根系分泌物溶液先用 $1 \text{ mmol L}^{-1}$  NaOH滴定至pH7, 空白收集液为对照, 两者消耗的 $\text{OH}^-$ 之差即为根系分泌的氢离子总量。滴定后的溶液在 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 经旋转蒸发浓缩后, 溶解于 $20 \text{ ml}$ 甲醇, 再次于 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 旋转蒸发后, 用 $2 \text{ ml}$ 乙腈溶解, 经微孔滤膜过滤后, HPLC进行分析,  $\text{C}^{18}$ 柱,  $10\% \sim 30\%$ 线性梯度流动相乙腈进行洗脱, 检测波长为 $280 \text{ nm}$ 。3-(4-羟苯基)丙酸标准品propionate 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid由Sigma公司购买。

高粱根系细胞膜分离方法参照Yan等[24]的方法。根系加入4倍体积研磨液, 在冰浴中研磨后过滤,  $11\ 500 \times g$ 下离心 $10 \text{ min}$ , 弃沉淀。上清液于 $87\ 000 \times g$ 下离心 $35 \text{ min}$ , 弃上清液, 沉淀用 $6 \text{ ml}$  BTP缓冲液悬浮后加入右旋糖酐(DextranT500, Sigma)和聚乙二醇(PEG23350, Sigma)的水溶液中混匀。 $720 \times g$ 下依次离心 $23$ 、 $15 \text{ min}$ , 每次离心结束将上相转移到新的两相系统中混匀, 再离心, 最后用BTP缓冲液稀释6倍,  $151\ 200 \times g$ 下离心 $40 \text{ min}$ 收集膜蛋白, 用 $1 \sim 2 \text{ ml}$  BTP缓冲液溶解,  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 以下保存。所用离心机为BECKMAN

COUL-TER OptimaTM L-80 XP, 转头为SW32 Ti。

测定 $\text{H}^+$ -ATPase水解活性参照Yan等[24]的方法。在相同条件下, 以失活的膜蛋白为空白, 根据单位时间内每 $1 \text{ mg}$ 膜蛋白水解产生的无机磷的量作为活性单位。

## 2 结果

### 2.1 铵硝营养对高粱根系分泌MHPP和氢离子及细胞膜质子泵活性的影响

将高粱在不同的氮源下培养后发现, 铵态氮营养下的高粱根系大量分泌生物硝化抑制物MHPP, 而硝态氮营养下的高粱根系几乎没有分泌MHPP(图3A)。同时, 测定根系分泌氢离子速率时也发现, 铵态氮营养下高粱根系分泌氢离子, 而硝态氮营养下的高粱根系并未分泌氢离子(图3B)。通过分离不同氮素营养下的高粱根系细胞膜, 并测定质子泵活性可以看出, 铵态氮营养下的根系细胞膜质子泵活性是硝态氮营养下的3倍左右(图3C)。由图3可知, 根系分泌MHPP在不同氮素形态营养下与质子的分泌情况相似(图3A、图3B)。虽然质膜质子泵活性在硝态氮培养下较铵态氮培养下要低得多(图3C), 但是说明根系实际上还是分泌氢离子的, 由于硝态氮吸收时要有质子陪伴进入细胞, 因此在实际测定中无法测定到质子的净分泌量(图3B)。从上述结果可以看出, 高粱根系细胞膜质子泵的活性决定了质子分泌的多少, 同时也与根系分泌MHPP有着一定的相关性。

### 2.2 不同浓度铵态氮对高粱根系质子泵活性及根系分泌物MHPP的影响

为了进一步揭示质子泵活性在铵态氮营养下与根系分泌MHPP之间的相互关系, 本实验将高粱分别置于不同铵态氮浓度的培养液中, 一天之后发现, 随着溶液中铵离子浓度的升高, 质子泵的活性也不断增强(图4A), 同时氢离子的分泌速率也不断增加(图4B), 与此相一致, MHPP的分泌速率也随着铵离子浓度的升高而增加(图4C)。这说明, 质子泵的活性在铵态氮营养下受到诱导而升高, 进而促进了MHPP的分泌。

### 2.3 质子泵活性变化对高粱根系分泌物MHPP的影响

为了排除氮素营养对其他生理反应的诱导而引起的对MHPP分泌的影响, 本实验在培养液中



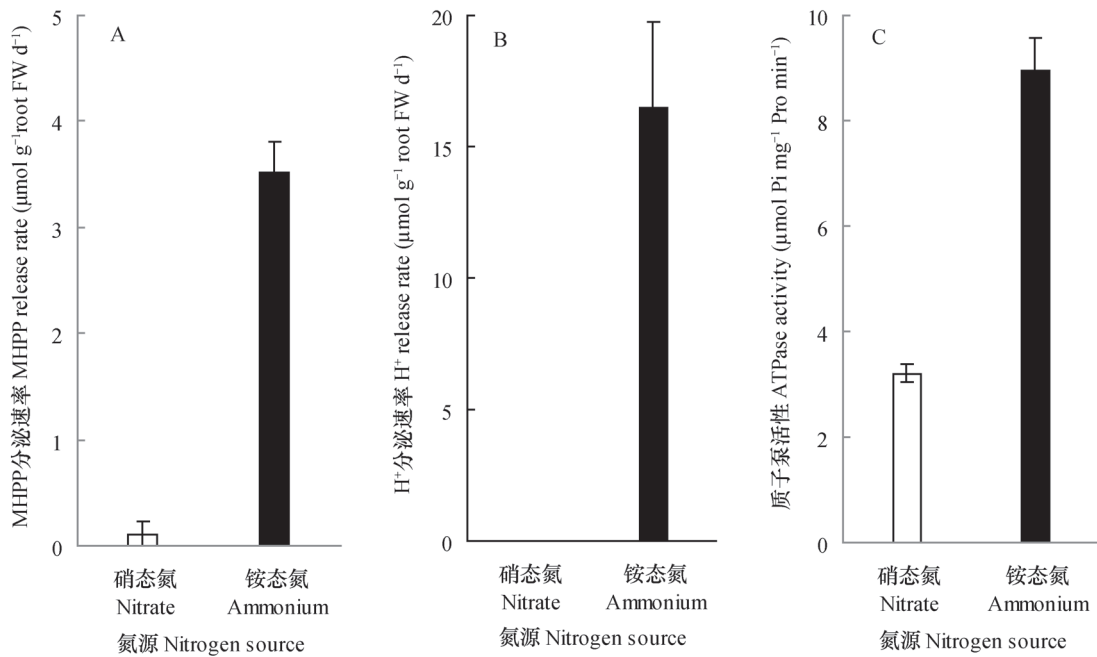


图3 铵硝营养对高粱根系分泌MHPP (A) 和氢离子 (B) 及细胞膜质子泵活性 (C) 的影响

Fig. 3 Effects of ammonium and nitrate N on release of MHPP (A) and H<sup>+</sup> (B) and PM H<sup>+</sup>-ATPase activity (C)

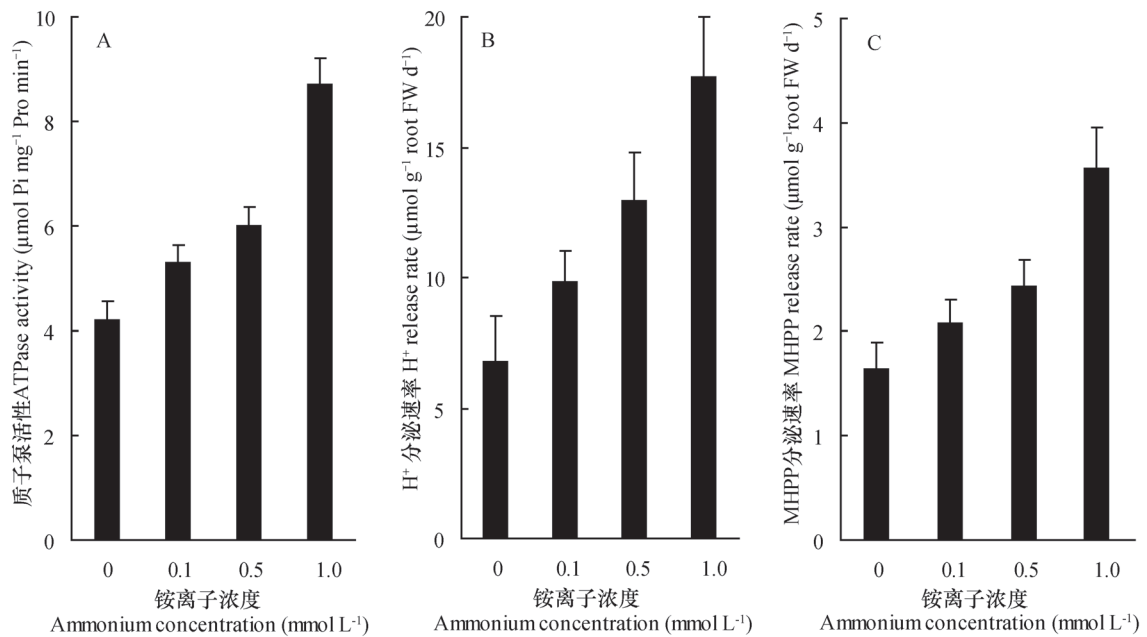


图4 不同浓度铵态氮对高粱根系细胞膜质子泵活性 (A)、氢离子 (B) 和MHPP分泌速率 (C) 的影响

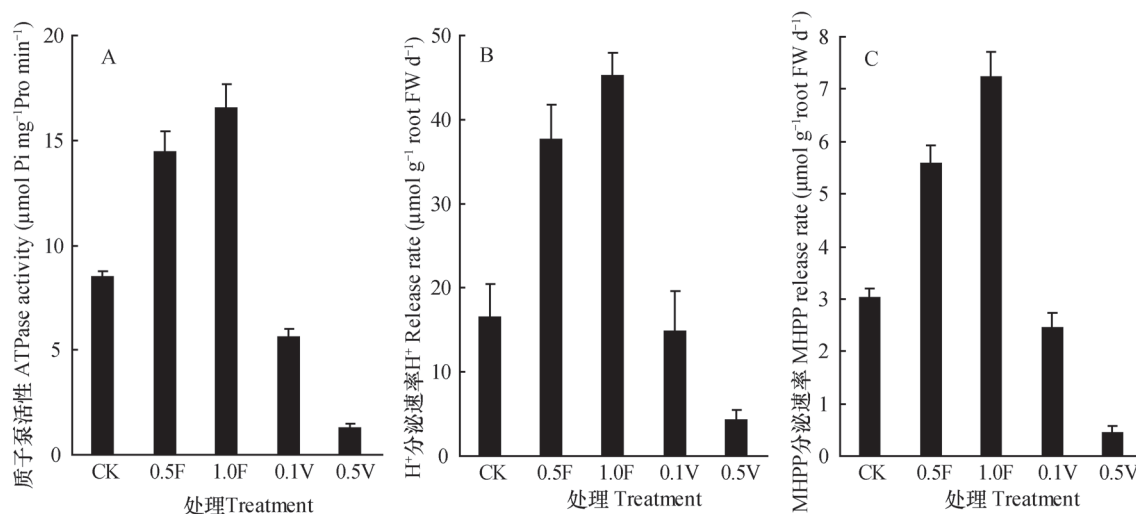
Fig. 4 Effect of ammonium N on PM H<sup>+</sup>-ATPase activity (A), and release rate of H<sup>+</sup> (B) and MHPP (C) relative to concentration

去除了氮素营养，直接利用对质子泵具有激活作用的壳梭孢菌素 (Fusicoccin) 和抑制剂钒酸盐 (Vanadate) 来处理高粱根系。结果发现，0.5 μmol L<sup>-1</sup>和1.0 μmol L<sup>-1</sup>壳梭孢菌素能提高质子泵的活性达到2倍左右，而0.1 mmol L<sup>-1</sup>和0.5 mmol L<sup>-1</sup>钒酸盐则导致质子泵活性降低了50%左右 (图

5A)。相应的，质子的分泌 (图5B) 和MHPP的分泌 (图5C) 也产生了类似的变化。

#### 2.4 质子泵活性与高粱根系分泌质子和MHPP的关系

将以上所有数据进行统计后做图，可以看出氢离子分泌与MHPP分泌之间存在着显著的线性相



注: CK: 空白对照, 0.5F:  $0.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ 壳梭孢菌素, 1.0F:  $1.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ 壳梭孢菌素, 0.1V:  $0.1 \text{mmol L}^{-1}$ 钒酸盐, 0.5V:  $0.5 \text{mmol L}^{-1}$ 钒酸盐 Note: CK: Control, 0.5F:  $0.5 \mu\text{mol L}^{-1}$  Fusicoccin, 1.0F:  $1.0 \mu\text{mol L}^{-1}$  Fusicoccin, 0.1V:  $0.1 \text{mmol L}^{-1}$  Vanadate, 0.5V:  $0.5 \text{mmol L}^{-1}$  Vanadate

图5 改变质子泵活性 (A) 对高粱根系分泌氢离子 (B) 和MHPP (C) 的影响

Fig. 5 Effect of PM  $\text{H}^+$ -ATPase activity (A) on release of  $\text{H}^+$  (B) and MHPP (C) from sorghum roots

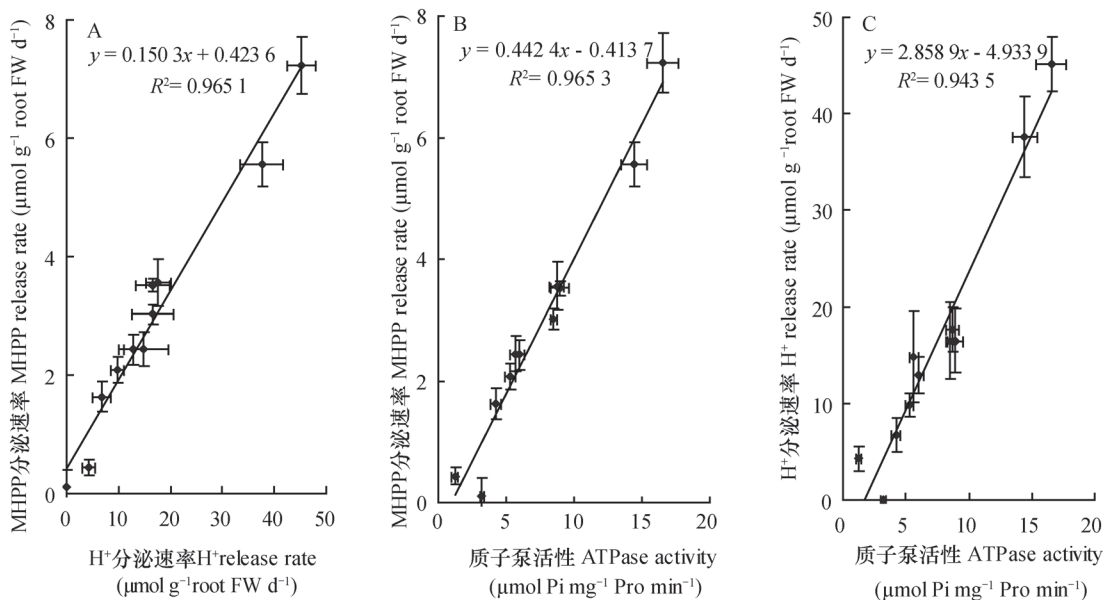


图6 氢离子分泌与MHPP分泌 (A)、质子泵活性与MHPP分泌 (B) 及氢离子分泌 (C) 的关系

Fig. 6 Relationships of  $\text{H}^+$  release with MHPP exudation (A), and of PM  $\text{H}^+$ -ATPase activity with MHPP exudation (B) and  $\text{H}^+$  release (C)

关性, 说明MHPP的分泌与氢离子的分泌是相伴随的, 氢离子很可能是这种有机酸阴离子分泌时的伴随阳离子, 以维持跨膜运输过程中的电荷平衡。进一步分析表明, 质子泵活性不仅直接与氢离子的分泌相关 (图6C), 同时也与MHPP的分泌具有相关性 (图6B)。

### 3 讨论

有关生物硝化抑制剂的研究在十多年前就有报道<sup>[25]</sup>, 并且还发现在铵态氮营养下能够刺激根系分泌大量的生物硝化抑制物<sup>[26]</sup>。我们的前期研究也测定到, 质子泵的活性变化与根系分泌的总的生

物硝化抑制物活性之间存在着一定的联系,但是由于测定总的硝化抑制物的过程是通过抑制土壤硝化细菌的培养试验进行的,因此无法证明两者之间的直接关系<sup>[18]</sup>。本实验通过直接测定具有硝化抑制功能的物质MHPP的分泌量,并结合根系分泌的氢离子量来验证,保证了测定结果之间在数量上的相关性。

从实验结果来看,质子泵的活性在铵态氮营养下要明显高于硝态氮,这与铵和硝态氮的吸收方式有关(图2),同时也与这两种氮素形态在细胞内的同化过程有关(图2)。因此,在铵态氮营养下根系质子泵提高是一种必然的现象,这在其他作物中也有发现<sup>[27-28]</sup>。在铵态氮营养下,质子泵活性的提高,可以促进一些阴离子的分泌,从本实验的结果来看,MHPP的分泌在铵态氮营养下明显较硝态氮营养下要多(图3),而且当铵态氮的浓度提高后,高粱根系分泌的MHPP的量也提高(图4)。这就意味着,铵态氮的吸收提高了质子泵的活性,进而促进了MHPP的分泌(图3,图4)。本实验还发现,即使没有氮素营养,通过一系列化学促进剂(如壳梭孢菌素)和抑制剂(如钒酸盐)可以改变质子泵的活性,也会改变根系分泌MHPP的量(图5),这就直接证明了质子泵是调控MHPP的主要原因。

最后通过将上述实验中的测定结果进行统计,进一步发现了质子泵及其分泌的氢离子与MHPP之间的线性关系(图6),从而证明了质子泵调控MHPP的直接作用。

当然,也需要注意到,高粱分泌的对羟基苯丙酸(MHPP)在植物体内合成前体为L-苯丙氨酸,而L-苯丙氨酸解氨酶在这一过程中需要发挥重要的作用<sup>[29]</sup>。植株体内氨或铵的含量对L-苯丙氨酸解氨酶也起着一定的调节作用<sup>[30-31]</sup>,因此在铵态氮营养下,高粱可以合成大量的生物硝化抑制剂,这也是其分泌一个必要条件。但是在铵硝营养下相关的生理机理还不清楚,因此在这方面还需要进行更加深入的研究。

## 4 结 论

综上所述,高粱分泌生物硝化抑制剂——对羟基苯丙酸(MHPP)在不同铵硝营养下的差异主要

是通过铵硝营养改变了根系质子泵活性后导致的,这也是高粱根系防止根际铵态氮氧化、提高氮素利用率的一个重要生理机制。

致 谢 感谢日本国际农林水产研究中心 Subbarao 研究员提供的测试方法。

## 参 考 文 献

- [1] 朱兆良. 中国土壤氮素研究. 土壤学报, 2008, 45(5): 778—783. Zhu Z L. Research on soil nitrogen in China (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2008, 45(5): 778—783
- [2] 张福锁, 王激清, 张卫峰, 等. 中国主要粮食作物肥料利用率现状与提高途径. 土壤学报, 2008, 45(5): 915—924. Zhang F S, Wang J Q, Zhang W F, et al. Nutrient use efficiencies of major cereal crops in China and measures for improvement (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2008, 45(5): 915—924
- [3] 胡克林, 李保国, 黄元仿, 等. 农田尺度下土体硝酸盐淋失的随机模拟及其风险性评价. 土壤学报, 2005, 42(6): 909—915. Hu K L, Li B G, Huang Y F, et al. Stochastic simulation and risk assessment of nitrate leaching at field scale (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2005, 42(6): 909—915
- [4] Zhu X, Martin B, Timothy A. Ammonia oxidation pathways and nitrifier denitrification are significant sources of N<sub>2</sub>O and NO under low oxygen availability. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, 110(16): 6328—6333
- [5] Shan L, Javed I, Hu R G, et al. Nitrous oxide emissions from yellow brown soil as affected by incorporation of crop residues with different carbon-to-nitrogen ratios: A case study in central China. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2013, 65: 183—192
- [6] 曹仁林, 贾晓葵. 我国集约化农业中氮污染问题及防治对策. 土壤肥料, 2001(3): 3—6. Cao R L, Jia X K. The problems and control countermeasures of nitrogen pollution in agriculture of China (In Chinese). Soil and Fertilizer, 2001(3): 3—6
- [7] 武志杰, 史云峰, 陈利军. 硝化抑制作用机理研究进展. 土壤通报, 2008, 39(4): 962—970. Wu Z J, Shi Y F, Chen L J. Research progress of the mechanisms of nitrification inhibition (In Chinese). Chinese Journal of Soil Science, 2008, 39(4): 962—970
- [8] 闫湘, 金继运, 何萍, 等. 提高肥料利用率技术研究



- 进展. 中国农业科学, 2008, 41 (2): 450—459. Yan X, Jin J Y, He P, et al. Recent advances in technology of increasing fertilizer use efficiency (In Chinese). *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41 (2): 450—459
- [ 9 ] Lan T, Han Y, Marco R, et al. Effects of the nitrification inhibitor dicyandiamide (DCD) on gross N transformation rates and mitigating N<sub>2</sub>O emission in paddy soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 2013, 67: 174—182
- [ 10 ] Ferisman T, Gero B, Johannes C G O. Evaluation of ecological doses of the nitrification inhibitors 3, 4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) and 4-chloromethylpyrazole (ClMP) in comparison to dicyandiamide (DCD) in their effects on dehydrogenase and dimethyl sulfoxide reductase activity in soils. *Biology and Fertility of Soils*, 2012, 48: 643—650
- [ 11 ] Barth G, Tucher S, Schmidhalter U. Effectiveness of 3, 4-dimethylpyrazole-phosphate as nitrification inhibitor in soil as influenced by inhibitor concentration, application form, and soil matrix potential. *Pedosphere*, 2008, 18 (3): 378—385
- [ 12 ] Burzaco J P, Ciampitti I A, Vyn T J. Nitrapyrin impacts on maize yield and nitrogen use efficiency with spring-applied nitrogen: field studies vs. meta-analysis comparison. *Agronomy Journal*, 2014, 106 (2): 753—760
- [ 13 ] Owens L B. Effects of nitrapyrin on nitrate movement in soil columns. *Journal of Environment Quality*, 2001, 10 (3): 308—310
- [ 14 ] 曾后清, 朱毅勇, 王火焰, 等. 生物硝化抑制剂——一种控制农田氮素流失的新策略. 土壤学报, 2012, 49 (2): 382—388. Zeng H Q, Zhu Y Y, Wang H Y, et al. Biological nitrification inhibitor-A new strategy for controlling nitrogen loss from farmland (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2012, 49 (2): 382—388
- [ 15 ] Subbarao G V, Nakahara K, Hurtado M P. Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106: 17302—17307
- [ 16 ] Zakir H A K M, Subbarao G V, Pearse S J, et al. Detection, isolation and characterization of a root-exuded compound, methyl 3-(4-hydroxyphenyl) propionate, responsible for biological nitrification inhibition by sorghum (*Sorghum bicolor*). *New Phytologist*, 2008, 180: 442—451
- [ 17 ] Subbarao G V, Nakahara K, Ishikawa T, et al. Biological nitrification inhibition (BNI) activity in sorghum and its characterization. *Plant and Soil*, 2012, 366 (1/2): 243—259
- [ 18 ] Zhu Y, Zeng H, Shen Q, et al. Interplay among NH<sub>4</sub><sup>+</sup> uptake, rhizosphere pH and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase determine the release of BNIs in sorghum roots-Possible mechanisms and underlying hypothesis. *Plant and Soil*, 2012, 358 (1/2): 131—141
- [ 19 ] 张莹, 张明超, 朱毅勇, 等. 高粱在不同氮源处理下分泌生物硝化抑制剂的差异. 土壤, 2012, 44 (6): 982—986. Zhang Y, Zhang M C, Zhu Y Y, et al. The mechanism of biological nitrification inhibitor released by sorghum under different nitrogen sources (In Chinese). *Soils*, 2012, 44 (6): 982—986
- [ 20 ] Yan F, Zhu Y, Mueller C, et al. Adaptation of H<sup>+</sup>-pumping and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency. *Plant Physiology*, 2002, 129: 50—63
- [ 21 ] Robert A G, Michael G P, Karin S. Plant proton pumps. *FEBS Letters*, 2007, 581: 2204—2214
- [ 22 ] Miller A J, Cramer M D. Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant and Soil*, 2004, 274: 1—36
- [ 23 ] Zhu Y Y, Yan F, Zörb C, et al. A link between citrate and proton release by proteoid roots of white lupin (*Lupinus albus* L.) grown under phosphorus-deficient conditions? *Plant and Cell Physiology*, 2005, 46: 892—901
- [ 24 ] Yan F, Feuerle R, Schaffer S, et al. Adaptation of active proton pumping and plasmalemma ATPase activity of corn roots to low root medium pH. *Plant Physiology*, 1998, 117 (1): 311—319
- [ 25 ] Bending G D, Lincoln S D. Inhibition of soil nitrifying bacteria communities and their activities by glucosinolate hydrolysis products. *Soil Biology & Biochemistry*, 2000, 32 (8/9): 1261—1269
- [ 26 ] Subbarao G V, Wang H Y, Ito O. NH<sub>4</sub><sup>+</sup> triggers the synthesis and release of biological nitrification inhibition compounds in *Brachiaria humidicola* roots. *Plant and Soil*, 2007, 290: 245—257
- [ 27 ] Yamashita K, Kasai M, Ezaki B, et al. Stimulation of H<sup>+</sup> extrusion and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity of barley roots by ammonium-treatment. *Soil Science and Plant Nutrition*, 1995, 41 (1): 133—140
- [ 28 ] Zhu Y, Di T, Xu G, et al. Adaptation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase of rice roots to low pH as related to ammonium nutrition. *Plant, Cell & Environment*, 2009, 32: 1428—1440
- [ 29 ] Jozef K, Klejdus B, Martin B, et al. Phenylalanine ammonialyase activity and phenolic compounds

- accumulation in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* leaf rosettes. *Plant Science*, 2007, 172: 393—399
- [ 30 ] Razal R A, Ellis S, Singh S, et al. Nitrogen recycling in phenylpropanoid metabolism. *Phytochemistry*, 1996, 41: 31—35
- [ 31 ] Maldonado A M, Doerner P, Dixon R A, et al. A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature*, 2002, 419 ( 6905 ) : 399—403

## RELATIONSHIP BETWEEN EXUDATION OF NITRIFICATION INHIBITOR MHPP AND PLASMA MEMBRANE PROTON PUMP OF SORGHUM ROOT

Zhou Jinquan Zhang Mingchao Wei Zhijun Hu Jun Zhu Yiyong<sup>†</sup>

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

**Abstract** Nitrification is an important biochemical process in the soil, and a cause of soil nitrogen loss. In nature, some plant species can exude from their roots some substances that may inhibit the activity of soil ammonia oxidizing bacteria. This kind of nitrification inhibitory substances is generally referred to as biological nitrification inhibitor ( BNI ). Sorghum is such a plant species that exudes from its roots methyl hydroxy phenyl propionate ( MHPP ), which has great inhibitory effect on soil nitrification. To explore underlying mechanism of sorghum roots exuding MHPP, sorghum seedlings were cultivated in hydroponic systems using ammonium and nitrate, separately. Root exudates were collected after a given period of time for analysis of MHPP content with a High Performance Liquid Chromatograph ( HPLC ) and hydron content with the micro-titration method. After the collection of root exudates, Sorghum roots were also collected for isolation of plasma membrane of root cells with the two phase method for determination of H<sup>+</sup> ATPase activity. Results show that in the hydroponic system with ammonium sorghum roots exuded MHPP at a rate of about 3.52 μ mol g<sup>-1</sup> root FW d<sup>-1</sup> and proton at a rate of 16.49 μ mol g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, while in the other, they did almost zero. And in the former, sorghum roots exuded, while in the latter they did almost neither. Moreover, with increasing concentration of ammonium in the hydroponic medium, roots exudation of MHPP and proton increased in rate, too. So, it is obvious that ammonium nitrogen promotes release of MHPP from sorghum roots. However, it was found in further study that although apparently the release of MHPP from sorghum roots was affected by form of nitrogen, the exudation of MHPP was always correlated to that of hydrons in the process, and root cells exuding proton depended on activity of the plasma membrane H<sup>+</sup> pump. It was also found in the study that MHPP release from sorghum roots was actually regulated by plasma membrane H<sup>+</sup> ATPase activity. In the absence of nitrogen sources, it is feasible to use fusicoccin or vanadate to affect proton pump activity and hence release of MHPP from sorghum roots. Statistic analysis of all the data acquired in the experiment shows that the release of MHPP and proton was nearly at a ratio of 1 : 4 and their correlation coefficient *r* was 0.98. Therefore, it can be held that in the hydroponic system using ammonium nitrogen the secretion of a large volume of MHPP from sorghum roots is to a certain extent induced by enhanced plasma membrane H<sup>+</sup> ATPase activity resulting from absorption of ammonium ion, which can be deemed as an important physiological mechanism that can be used to prevent ammonium oxidation in rhizosphere and improve nitrogen utilization efficiency.

**Key words** Sorghum; Nitrification inhibitor; Plasma membrane H<sup>+</sup> ATPase

( 责任编辑：陈德明 )

CONTENTS

**Reviews and Comments**

- Application of reductive soil disinfection to suppress soil-borne pathogens ..... Cai Zucong, Zhang Jinbo, Huang Xinqi, et al. ( 475 )  
 A review of researches on soil cracks and their impacts on preferential flow...Zhang Zhongbin, Peng Xinhua ( 488 )

**Research Articles**

- Characteristics of soil aggregate loss in croplands in the typical black soil region of Northeast China ..... Wen Leilei, Zheng Fenli, Shen Haiou, et al. ( 498 )  
 Construction of an index set for predicting thickness of active layer of permafrost in Qinghai-Tibet Plateau and for mapping ..... Chen Jike, Zhao Yuguo, Zhao Lin, et al. ( 506 )  
 Variation of mineral composition along the soil chronosequence at the Hailuoguo Glacier foreland of Gongga Mountain ..... Yang Zijiang, Bing Haijian, Zhou Jun, et al. ( 515 )  
 Composition of organic carbon in paddy soil in typical area of Chengdu and its influencing factors ..... Liao Dan, Yu Dongsheng, ZhaoYongcun, et al. ( 526 )  
 Spatio-temporal variation of soil temperature and soil moisture regime in Hebei Province ..... Cao Xianghui, Lei Qiuliang, Long Huaiyu, et al. ( 536 )  
 Vertical distribution of soil saturated hydraulic conductivity in a small karst catchment ..... Fu Tonggang, Chen Hongsong, Wang Kelin ( 546 )  
 Transformation between soil water and shallow groundwater in the middle reaches of the Dagu River ..... Yang Yuzheng, Lin Qing, Wang Songlu, et al. ( 556 )  
 Determination of nitrogen and oxygen isotope ratio of nitrate in water with a chemical conversion method ..... Wang Xi, Cao Yacheng, Han Yong, et al. ( 565 )  
 Quantitative research on effects of nitrogen application rate on distribution of photosynthetic carbon in rice-soil system using <sup>13</sup>C pulse labeling technique ..... Liu Ping, Jiang Chunyu, Li Zhongpei ( 574 )  
 Effects of no-tillage ridge-cultivation on soil organic carbon accumulation in ridges and crop yields in paddy fields ..... Ci En, Wang Liange, Ding Changhuan, et al. ( 585 )  
 Residual of applied <sup>15</sup>N fertilizer in soils under long-term different patterns of fertilization and its utilization ..... Zhao Wei, Liang Bin, Zhou Jianbin ( 595 )  
 Effect of long-term fertilization on rice yield and basic soil productivity in red paddy soil under double-rice system ..... Lu Yanhong, Liao Yulin, Zhou Xing, et al. ( 605 )  
 Effects of long-term fertilization on yield variation trend, yield stability and sustainability in the double cropping rice system ..... Ji Jianhua, Hou Hongqian, Liu Yiren, et al. ( 618 )  
 Relationship between exudation of nitrification inhibitor MHPP and plasma membrane proton pump of sorghum root ..... Zhou Jinquan, Zhang Mingchao, Wei Zhijun, et al. ( 527 )  
 Effects of long-term amendment with passivant and zinc fertilizer on cadmium reduction in tobacco growing in a Cd contaminated field ..... Cao Chenliang, Wang Wei, Ma Yibing, et al. ( 635 )  
 Effects of interaction between potassium and humic acid on index of organic potassium salt in flue-cured tobacco ..... Zheng Dongfang, Xu Jiayang, Xu Zicheng, et al. ( 645 )  
 Impacts of replacement of *Pinus* with *Eucalyptus* on soil nutrients and enzyme activities ..... Zhang Kai, Zheng Hua, Chen Falin, et al. ( 653 )  
 Effects of biological soil crusts on soil enzyme activities in desert areas ..... Yang Hangyu, Liu Yanmei, Wang Tingpu ( 663 )  
 Effect of incorporation of crop straw on composition of soil organic matter and enzyme activity in black soil relative to depth and rate of the incorporation ..... Jiao Lina, Li Zhihong, Yin Chengcheng, et al. ( 671 )  
 Effect of *Streptomyces* JD211 promoting growth of rice seedlings and diversity of soil bacteria ..... Wang Shiqiang, Wei Saijin, Yang Taotao, et al. ( 681 )
- Research Notes**
- Quality assessment of oasis soil in the upper reaches of Tarim River based on minimum data set ..... Gong Lu, Zhang Xueni, Ran Qiyang ( 689 )  
 Effect of iron plaque on surface electrochemical properties and short-term N, P and K uptake by rice roots .....Zheng Yunyun, Li Zhongyi, Li Jiuyu, et al. ( 695 )  
 The changes of microbial community structure in red paddy soil under long-term fertilization ..... Xia Xin, Shi Kun, Huang Qianru, et al. ( 705 )  
 Salinization characteristics of afforested coastal saline soil as affected by species of trees used in afforestation ..... Wang Heyun, Li Hongli, Dong Zhi, et al. ( 712 )
- Cover Picture:** Two dimensional and three dimensional images of soil cracks in paddy field ( by Zhang Zhongbin )



# 《土壤学报》编辑委员会

主 编: 史学正

执行编委: (按姓氏笔画为序)

丁维新	巨晓棠	王敬国	王朝辉	史 舟	宇万太	朱永官
李永涛	李芳柏	李保国	李 航	吴金水	沈其荣	张玉龙
张甘霖	张福锁	陈德明	邵明安	杨劲松	杨明义	杨林章
林先贵	依艳丽	周东美	周健民	金继运	逢焕成	胡 锋
施卫明	骆永明	赵小敏	贾仲君	徐国华	徐明岗	徐建明
崔中利	常志州	黄巧云	章明奎	蒋 新	彭新华	雷 梅
窦 森	廖宗文	蔡祖聪	蔡崇法	潘根兴	魏朝富	

编辑部主任: 陈德明

责任编辑: 汪枳生 卢 萍 檀满枝

## 土 壤 学 报

### Turang Xuebao

(双月刊, 1948年创刊)

第 52 卷 第 3 期 2015 年 5 月

## ACTA PEDOLOGICA SINICA

(Bimonthly, Started in 1948)

Vol. 52 No. 3 May, 2015

编 辑 《土壤学报》编辑委员会  
地址: 南京市北京东路 71 号 邮政编码: 210008  
电话: 025 - 86881237  
E-mail: actapedo@issas.ac.cn

Edited by Editorial Board of Acta Pedologica Sinica  
Add: 71 East Beijing Road, Nanjing 210008, China  
Tel: 025 - 86881237  
E-mail: actapedo@issas.ac.cn

主 编 史 学 正  
主 管 中 国 科 学 院  
主 办 中 国 土 壤 学 会  
承 办 中国科学院南京土壤研究所

Editor-in-Chief Shi Xuezheng  
Superintended by Chinese Academy of Sciences  
Sponsored by Soil Science Society of China  
Undertaken by Institute of Soil Science,  
Chinese Academy of Sciences

出 版 科 学 出 版 社  
地址: 北京东黄城根北街 16 号 邮政编码: 100717

Published by Science Press  
Add: 16 Donghuangchenggen North Street,  
Beijing 100717, China

印刷装订 北京中科印刷有限公司  
总发行 科 学 出 版 社  
地址: 北京东黄城根北街 16 号 邮政编码: 100717  
电话: 010 - 64017032  
E-mail: journal@mail.sciencep.com

Printed by Beijing Zhongke Printing Limited Company  
Distributed by Science Press  
Add: 16 Donghuangchenggen North Street,  
Beijing 100717, China  
Tel: 010 - 64017032  
E-mail: journal@mail.sciencep.com

国外发行 中国国际图书贸易总公司  
地址: 北京 399 信箱 邮政编码: 100044

Foreign China International Book Trading Corporation  
Add: P. O. Box 399, Beijing 100044, China

国内统一刊号: CN 32-1119/P

国内邮发代号: 2-560

国外发行代号: BM45

定价: 60.00 元

国 内 外 公 开 发 行



ISSN 0564-3929

