

大豆保护性施氮的研究

I. 氢醌在大豆保护性施氮中的效应

徐凤花 隋文志 英瑞竹 王 鹏 汤树德

(黑龙江八一农垦大学, 158308)

摘 要

本文主要研究在施用尿素条件下,配加氢醌(HQ)来延缓尿素的集中水解,以减少氮挥发并抑制其硝化作用,从而有效地缓解尿素对大豆共生固氮体系产生的严重抑制效应。

结果表明,在一定的浓度范围内,氢醌对纯培养大豆根瘤菌生长、幼苗生长和初生结瘤无不利影响;对离体活性根瘤的呼吸活性和琥珀酸脱氢酶活性具有显著促进。在盆栽或田间条件下,尿素配加 HQ 施用,同无 HQ 等量尿素比较,显著提高了大豆结瘤量和单株固氮总活性(TNA);提高了大豆木质部中酰胺含量及其相对丰度,协调了大豆对根瘤氮和土壤(肥料)氮需求的矛盾,从而获得了显著的增产效果。

关键词 氢醌,大豆,结瘤,固氮,酰胺

随着大豆产量的提高,不仅大豆对其共生固氮的依赖程度有随之提高的趋势,同时也要求提高土壤的供氮水平。因此,施用氮肥,特别是尿素氮肥,既要避免因尿素集中分解后的各无机态氮产物对大豆结瘤固氮的严重危害,又要适时补充大豆固氮不能满足高产需氮的要求。为此,本研究采用脲酶抑制剂——氢醌(HQ)作为大豆保护性施氮(尿素)的手段,协调施氮与固氮的矛盾,达到大豆增产和改善其品质的目的。

一、材料与方 法

(一) 供试土壤

盆栽试验土壤均取自本地前茬小麦耕层土壤,风干后过 1mm 筛。

砂壤土: 有机质 14.6g/kg 土,全氮 0.77g/kg 土,水解氮 50.6mg/kg 土,无机态氮 26.5mg/kg 土,水浸 pH5.58。

白浆土: 有机质 34.3g/kg 土,全氮 1.11g/kg 土,水解氮 89.0mg/kg 土,水浸 pH6.15。

(二) 室内大豆幼苗培养试验

水培: 采用直径 10cm,高 20cm 水培罐,灌注豆科植物无氮营养液,移入已发芽并接种根瘤(USDA 110)的大豆种子,设 HQ 浓度为 0—200 μ g/ml 10 个处理,即: 0、10、20、30、40、50、75、100、150 和 200 μ g/ml。5 次重复,人工光照下培养至第 1 片复叶展开时终止,观察大豆幼苗生长,根系发育和初生结瘤数量。

无菌砂培: 采用直径 3cm,高 20cm 大试管装入灭菌石英砂,灌入灭菌的无氮营养液,按如下处理注入过滤除菌的溶液: (1)空白; (2)尿素 N50 μ g/ml; (3)尿素+脲酶(纯制剂)10 μ g/ml; (4)尿素+

脲酶+HQ 10 μ g/ml; (5) 尿素+脲酶+HQ 30 μ g/ml。5次重复, 自然光照下至大豆植株生长第4节终止。测定植株生长和结瘤数量。

(三) 室外盆栽和田间小区试验

盆栽: 直径24cm, 高32cm 瓦氏盆, 装砂壤土, 6个处理: (1)空白; (2)尿素 N 150mg/kg 土; (3) 尿素+HQ 1.5mg/kg 土; (4) 尿素 + HQ 3.0mg/kg 土; (5) 尿素+ HQ 4.5mg/kg 土; 以上处理施肥深度为0—15cm; (6) 尿素+HQ 3.0mg/kg 土, 施入土壤10—20cm 深度。各处理9次重复, 每盆定苗5株, 人工灌溉, 不施任何化学农药。

田间小区: 白浆土, 前作小麦, 秋翻地, 小区面积(1.5 \times 3)m², 每小区播种3行, 行距30cm, 株距5cm, 保菌60株/m², 人工除草, 不施用任何化学农药。各年处理5次重复, 小区随机排列。

(四) 分析方法

土壤脲酶活性测定: 采用对二甲基氨基苯甲醛比色法测定残余尿素^[4]。

土壤中 NH₃ 挥发测定: 在800ml 容积的棕色广口瓶中, 装处理土100g, 维持土壤相对含水量75%, 于胶塞内悬吊一称量瓶, 瓶内注入硼酸溶液吸收挥发氨, 30 $^{\circ}$ C 培养, 于不同时期取出称量瓶, 用0.1 mol/L HCl 滴定。

土壤硝化强度测定: 土壤处理后分装于250ml 三角瓶中, 每瓶装土50克, 维持土壤相对含水量70%, 二层纱布盖瓶口, 37 $^{\circ}$ C 培养。于第1和第2周按醋酸-硝酸试粉比色法测定 NO₃-N。

根瘤固氮活性测定: 采用根系-根瘤乙炔还原法, 上海100型气相色谱仪检测气样, 按峰高比法计算。

琥珀酸脱氢酶活性测定: 在 T. T. C-缓冲液中恒温反应后甲醇提取比色测定。

木质部氮测定: 取大豆茎秆(含叶柄), 热水提取, 按 Vogels 等人方法^[5]测定尿囊素和尿囊酸总量; 酰胺采用异羟肟酸显色后于535nm 比色(主要成分为天门冬酰胺); 硝态氮按常规法。

二、结 果

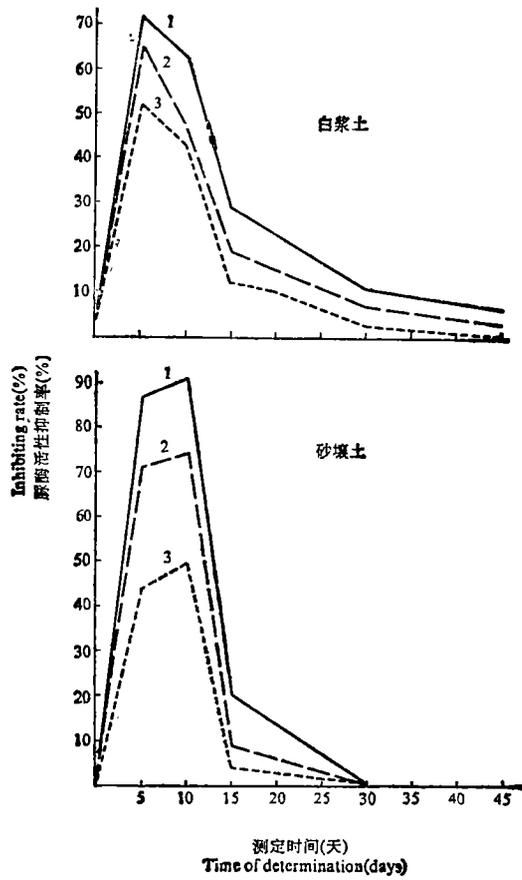
(一) HQ 对土壤脲酶活性, 氨挥发和硝化强度的抑制效应

在施入尿素 N 500 μ g/g 土的砂壤土和白浆土中, 加入 HQ 为 2.5—5.0 μ g/g 土时, 土壤脲酶活性抑制率在5—10天为44—74%; 15天下降至10—20% 左右; 20—30天近乎无抑制效应。HQ 量提高至15 μ g/g 土, 不仅脲酶活性的最大抑制率增至63—91%, 而且, 其抑制时间延长至30—45天(图1)。

由于 HQ 抑制了土壤脲酶活性, 有效地延缓了尿素的急速水解作用, 从而大大减少了尿素水解所造成氨的挥发。如图2所示, 单施尿素于砂壤土中, 10天内共回收挥发的氨态氮占施入尿素氮(230mg/100g土)的38.3%, 当配加 HQ 后, 挥发的氨态氮只占3%, 即减少尿素N的气态损失达92.2%。

从图2中还可看出, 在麦秸还田土壤中, 由于麦秸分解促进了土壤微生物细胞的急剧增殖, 从而较大地提高了土壤脲酶活性^[2], 因此, HQ 对氨挥发的相对抑制效果也将显著降低。

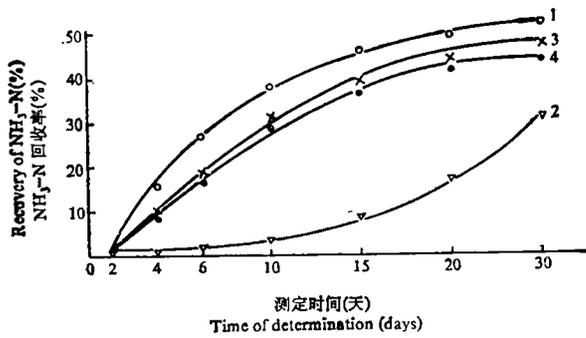
Bundy 等(1974)^[1]对 HQ 等几种脲酶抑制剂的研究表明, 当 HQ 浓度为10 μ g/kg 土时, 很少影响土壤硝化作用; 只有当 HQ 浓度达50 μ g/kg 土时, 才明显抑制土壤硝化作用。我们的实验结果(表1)表明, 在砂壤土中, 施用低量 HQ (5—10 μ g/kg 土), 便可有效抑制铵盐和尿素的硝化作用强度; 当 HQ 浓度达到20 μ g/kg 土时, 培养一周的硝化抑制率



1. HQ 15 $\mu\text{g/g}$ 土, 2. HQ 5 $\mu\text{g/g}$ 土, 3. HQ 2.5 $\mu\text{g/g}$ 土

图 1 HQ 对土壤脲酶活性的抑制动态

Fig. 1 The kinetics of soil urease activity inhibited by HQ



1. Urea (N230mg/100g土), 2. Urea + HQ (5mg/100g土), 3. Urea + wheat straw (1g/100g土), 4. Urea + HQ + wheat straw

图 2 HQ 对土壤尿素氮挥发的抑制动态

Fig. 2 The kinetics of NH_3 volatilization from urea in soil inhibited by HQ

达到 90% 以上。

表 1 HQ 对土壤硝化作用强度的抑制效应

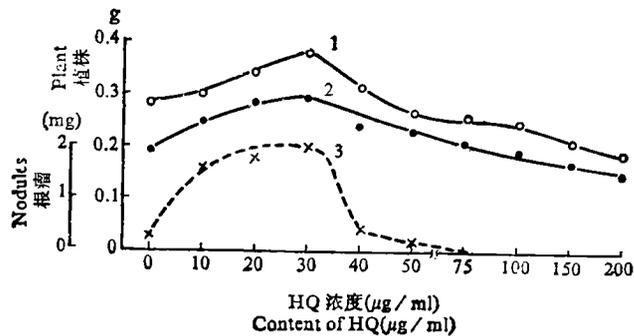
Table 1 The inhibiting effect of HQ on the strength of soil nitrification

土壤 Soil	处 理 Treatment	1 周 1 week		2 周 2 weeks	
		NO ₃ -N ($\mu\text{g/g}\pm$)	硝化抑制率 Inhibiting rate (%)	NO ₃ -N ($\mu\text{g/g}\pm$)	硝化抑制率 Inhibiting rate (%)
砂 壤 土	(NH ₄) ₂ SO ₄ (N50mg/100g \pm)	120.0	0	158.0	0
	(NH ₄) ₂ SO ₄ + HQ5 $\mu\text{g/g}\pm$	44.0	63.3	103.0	34.8
	(NH ₄) ₂ SO ₄ + HQ10 $\mu\text{g/g}\pm$	31.0	74.2	92.0	41.8
	(NH ₄) ₂ SO ₄ + HQ20 $\mu\text{g/g}\pm$	9.0	92.5	34.0	78.5
	Urea(N50mg/100g \pm) + HQ20 $\mu\text{g/g}\pm$	9.5	92.1	25.0	84.1
白 浆 土	Urea(N50mg/100g \pm)	49.3	0	102.3	0
	Urea + HQ50 $\mu\text{g/g}\pm$	39.4	20.1	15.2	85.1
	Urea + HQ100 $\mu\text{g/g}\pm$	23.7	51.9	5.4	94.7
	Urea + wheat-staw	28.5	42.2	24.2	76.3
	Urea + wheat-staw + HQ50 $\mu\text{g/g}\pm$	10.7	78.3	14.3	86.0
	Urea + wheat-staw + HQ100 $\mu\text{g/g}\pm$	14.3	71.2	9.8	90.4

表 1 中资料还表明, 在施用麦秸的土壤中, 由于麦秸分解过程对 NO₃-N 的固定及 HQ 抑制硝化过程的共同作用, 使该处理的硝化抑制率在第一个周内显著高于未施麦秸的处理。

(二) HQ 对大豆幼苗生长和初生结瘤的影响

在无氮营养液中加入不同浓度 HQ, 移入已发芽并接种大豆根瘤菌 (USDA110) 的大豆种子, 于第一片复叶展开后进行观察, 结果表明, HQ 浓度在 40 $\mu\text{g/ml}$ 以内, 对大豆幼苗生长, 根系发育和初生结瘤量均有明显促进作用; 当 HQ 浓度高达 50 $\mu\text{g/ml}$ 以上时, 完全抑制其结瘤, 并阻止幼苗和根系生长(图 3)。



1. 地上干重(克/株), 2. 根干重(克/株), 3. 根瘤干重 (mg/株)

图 3 无氮营养液中 HQ 对大豆幼苗和初生结瘤的影响

Fig. 3 The effect of HQ on soybean seedlings and primary nodulation in nitrogen-free nutrient solution

为了直接验证由于尿素水解产物对大豆初生结瘤的抑制, 以及 HQ 抑制脲酶活性而缓解其抑制效应, 通过无氮营养液中加入尿素和脲酶(纯制剂)进行无菌砂培试验, 结果

表明,加入 $10\mu\text{g/ml}$ 脲酶后,单株根瘤个数和根瘤干重分别减少 58.3% 和 68.5%;加入脲酶同时添加 HQ $10\mu\text{g/ml}$,便可完全解除这一抑制效应,并对大豆幼苗生长表现一定程度的有利影响。

通过对大豆根瘤菌 (USDA110) 进行液体纯培养,观察 HQ 对根瘤菌数量增殖的影响也表明, HQ 浓度在 $10\mu\text{g/ml}$ 以内,对大豆根瘤菌的增殖无明显影响;当 HQ 浓度为 $20\text{--}40\mu\text{g/ml}$ 时才表现对根瘤菌细胞增殖产生抑制,其抑制率为 30—40%; HQ 浓度高达 $50\text{--}80\mu\text{g/ml}$ 时,其抑制率可达 90—100%。

(三) HQ 对大豆根瘤固氮活性和植株溶质氮形态的影响

由于尿素在土壤中水解产生的铵及随后氧化形成的亚硝酸和硝酸盐,可强烈地抑制大豆根瘤菌的侵入、结瘤和固氮全过程,致使单株根瘤固氮总活性 (TNA) 大幅度下降^[3]。如前所述,加入 HQ 后,由于抑制了土壤脲酶活性,缓解了尿素的集中分解,同时又阻滞了硝酸盐的大量产生,不仅使大豆结瘤量迅速回升,同时也提高了根瘤固氮比活性 (SNA),故单株根瘤固氮总活性 (TNA) 也迅速上升,乃至超出对照植株(表 2)。

表 2 HQ 对大豆结瘤量和根瘤固氮活性的影响

Table 2 Effects of HQ on the amount and nitrogen fixation activity of soybean nodules

处 理 Treatment	第 4 节期 (V ₄ period)		开花始期 (R ₁ period)	
	根瘤干重 Dry weight of nodules (mg/plant)	SNA ³⁾ TNA ⁴⁾ (C ₂ H ₄ μmol/h)	根瘤干重 Dry weight of nodules (mg/plant)	SNA TNA (C ₂ H ₄ μmol/h)
CK	16.3	100 1.63	99.6	27.5 2.75
Urea ¹⁾	4.1	178.0 0.73	56.2	12.1 0.68
Urea + HQ ²⁾ (0—15cm)	6.6	174.2 1.15	99.5	15.0 1.48
Urea + HQ(10—20cm)	11.1	372.0 4.13	100.2	21.5 2.16

1) Urea-N: 4.5g/m^2 ; 2) HQ: 225mg/m^2 ; 3) 根瘤菌氮比活性; 4) 根瘤固氮总活性。

HQ 同尿素施入 10—20cm 土层的效果好于施入耕层 0—15cm 土壤中,这可能与尿素在深层土壤中分解缓慢有关。

为了查明 HQ 可能直接通过成熟根瘤的表皮组织进入类菌体组织细胞中而影响其固氮活性。我们通过对大豆花期离体活性根瘤投入含 HQ $10\mu\text{g/ml}$ 和 $50\mu\text{g/ml}$ 的水溶液中浸泡 30 分钟,同用蒸馏水浸泡的根瘤比较,结果表明,提取的类菌体悬液的吸氧量(在瓦勃氏呼吸计上测定)提高了 80—90%; 琥珀酸脱氢酶活性提高了 138—152%。说明 HQ 进入根瘤组织细胞中,可能通过促进类菌体的呼吸作用和固氮能量代谢而有利于固氮活性的提高。

在大豆整个生育过程中,根瘤固定的氮和土壤氮同时作为大豆氮源,两种氮源在大豆植株体内的运输形态和作用都有着本质的差别。业已表明,土壤氮多以硝酸盐和酰胺(天门冬酰胺和谷酰胺)的形态成为木质部中运输的主要氮形态,大部分硝酸盐在叶片中经还原后参与蛋白质合成,促进其营养生长;而根瘤氮则以酰胺(包含尿囊素和尿囊酸)形态从根部随蒸腾流送至地上部储存成为籽实蛋白质合成的主要氮源^[6,7]。因此,测定大豆木质

部中的溶质氮的形态便可判断大豆对根瘤氮和土壤氮源的依赖程度, 并以酰胺氮的相对丰度作为大豆固氮活性的间接指标^[6]。

我们获得的资料表明(表 3), 由于单施尿素强烈地抑制了根瘤固氮总活性, 所以作为根瘤固氮产物——酰胺的含量及其相对丰度便急剧降低(分别下降 70.9% 和 58.5%); 而酰胺氮和硝态氮则相应提高 20.8% 和 79.7%。这说明, 单施尿素情况下, 大豆植株的氮素营养主要依赖于对土壤中氮的同化作用, 所以就降低了固氮效果。然而, 在等氮量尿素中添加氮量 3% 的 HQ 施用后, 由于有效地缓解了尿素水解产物及其氧化产物对大豆结

表 3 HQ 对大豆植株溶质氮形态的影响

Table 3 Effect of HQ on various form of soluble nitrogen in the soybean plant

处 理 Treatment	NO ₃ -N (mg/100g dry matter)	酰胺N Amide-N (mg/100g dry matter)	酰胺N Ureide-N (mg/100g dry matter)	酰胺N 相对丰度 Relative abundance of ureide-N (%)
CK	43.2	117.1	29.0	72.8
Urea (0—15cm)	77.6	141.5	8.4	30.2
Urea + HQ(0—15cm)	38.2	88.3	9.4	49.5
Urea + HQ(10—20cm)	25.7	62.6	15.3	70.5

瘤和固氮活性的抑制效应, 导致大豆植株中酰胺氮及其相对丰度迅速回升, 而硝态氮和酰胺氮含量便相应下降。这也说明尿素与 HQ 配合施用不致降低大豆植株对根瘤氮源同化的依赖程度。

表 3 结果还表明, 尿素配合 HQ 施入较深层土壤中, 将有利于提高大豆对根瘤氮的同化。

(四) HQ 对大豆生育和产量的影响

除了在大豆幼苗时期应用高浓度 HQ 对大豆根系发育表现出明显的抑制症状外(图 3), 应用一般浓度 HQ, 无论在盆栽或田间条件下, 皆未发现不良影响(表 4、5)。

由于尿素配合 HQ 的施用, 保护了大豆共生固氮体系正常发育的同时, 提高了土壤的供氮水平, 从而加强了大豆植株的氮同化强度, 以及促进了籽实蛋白质的合成(表 7)。说明 HQ 具有提高大豆对尿素氮的利用率和改善大豆品质的双重效果。

表 4 HQ 对盆栽大豆干物质积累的影响

Table 4 The effect of HQ on soybean dry matter accumulation in the pot experiment

Treatment 处 理	第 4 节期 (V ₄ Period)		开花盛期 (R ₂ Period)		鼓粒盛期 (R ₄ Period)	
	地上干重 D. W. of aerial part (g/pot)	根干重 D. W. of roots (g/pot)	地上干重 D. W. of aerial part (g/pot)	根干重 D. W. of roots (g/pot)	地上干重 D. W. of aerial part (g/pot)	根干重 D. W. of roots (g/pot)
CK	7.25	2.20	34.63	8.50	78.13	15.68
Urea (N150mg/kg±)	8.68	2.88	45.89	9.43	90.13	15.90
Urea + HQ(1.5mg/kg±)	7.71	2.23	51.60	10.26	71.71	11.85
Urea+HQ(3.0mg/kg±)	7.18	2.04	54.99	11.90	79.93	13.01
Urea+HQ(4.5mg/kg±)	7.31	3.32	53.84	10.83	95.86	13.42

表 5 HQ 对田间大豆干物质累积的影响

Table 5 The effect of HQ on soybean dry matter accumulation in the field experiment

处 理 Treatment	开花始期 R ₁ period		结荚始期 R ₃ period		鼓粒盛期 R ₆ period	
	地上干重 D. W. of aerial part (g/plant)	根干重 D. W. of roots (g/plant)	地上干重 D. W. of aerial part (g/plant)	根干重 D. W. of roots (g/plant)	地上干重 D. W. of aerial part (g/plant)	根干重 D. W. of root (g/plant)
CK	1.10	0.23	6.15	1.11	12.98	1.06
Urea (N4.5g/m ²)	1.16	0.27	7.10	1.19	14.21	0.97
Urea + HQ45mg/m ²	1.25	0.24	6.32	1.28	13.98	0.95
Urea + HQ135mg/m ²	1.19	0.25	6.63	1.14	12.40	0.92

表 6 HQ 对盆栽大豆含氮量的影响

Table 6 The effect of HQ on the content of N of soybean in the pot experiment

处 理 Treatment	茎 秆 Stem			种 子 Seed		
	干重 D. W. (g/plant)	含N量 Content of N (%)	全N量 Total N (mg/plant)	干重 D. W. (g/plant)	含N量 Content of N (%)	全N量 Total N (mg/plant)
CK	6.94	0.988	68.57	7.48	7.590	567.81
Urea (0—15cm)	7.68	0.961	73.81	7.39	7.736	571.69
Urea + HQ (0—15cm)	8.16	1.211	98.82	8.18	7.977	652.52
Urea + HQ (10—20cm)	8.96	1.188	106.45	8.33	8.087	673.65

注: Urea-N: 150mg/kg土; HQ: 3mg/kg土。

表 7 HQ 对田间大豆产量的影响

Table 7 The effect of HQ on the yield of soybean in the field experiment

年份 Year	处 理 treatment	产量 Yield (kg/ha)	相对值 Relative value	尿素N增产比值 Urea-N: yield increas
1988	CK	3808.5 b	100.0	
	Urea-N 4.5g/m ²	3811.5 b	100.1	1:0.07
	Urea + HQ 45mg/m ² (0—15cm)	3894.0 b	102.3	1:1.9
	Urea + HQ 45mg/m ² (15—20cm)	4267.5 a	112.1	1:10.2
1989	CK	3558.0 b	100.0	
	Urea-N4.0g/m ²	3660.0 b	102.9	1:2.6
	Urea + HQ 20mg/m ²	4086.0 a	114.8	1:13.2
1990	CK	3829.5 b	100.0	
	Urea N 3.75g/m ²	4105.5 b	107.2	1:7.4
	Urea + HQ 37.5mg/m ²	4177.5 ab	109.1	1:93
	Urea + HQ 75mg/m ²	4695.0 a	122.6	1:23.1

大豆产量的田间小区试验结果表明(表 7),在播种前施用配加 HQ 的长效尿素,特别在深施条件下,可获得较施用等氮量无 HQ 的尿素区增产 10% 以上的效果,并且其增产比值较常规的施氮的效果要大得多。

参 考 文 献

1. 周礼恺,1984: 土壤脲酶活性与尿素肥料在土壤中的转化。土壤学进展,第 1 期,第 1 页。
2. 汤树德,1980: 作物秸秆直接还田的土壤生物学效应。土壤学报,第 17 卷 2 期,第 172 页。
3. 汤树德等,1985: 大豆根瘤固氮活性动态的研究。黑龙江八一农垦大学学报,第 1 期,第 39 页。
4. 关松荫等,1986: 土壤酶及其研究方法。第 299 页,农业出版社。
5. 徐志伟等,1986: 豆科植物中酰胺含量的测定。植物生理学通讯,第 4 期,第 60 页。

STUDIES PROTECTIVE NITROGEN FERTILIZATION IN SOYBEAN:

I. EFFECT OF HYDROQUINONE APPLICATION

Xu Fenghua, Sui Wenshi, Ying Ruizhu

Wang Peng, Tang Shude

(Heilongjiang Eight-one Agricultural University, Mishan, 158300)

Summary

Under the condition of urea fertilization, the hydroquinone (HQ), as a urease inhibitor, was applied to postpone the hydrolysis of urea for decreasing the volatilization of ammonia and restraining its nitrification. As a protective measure of urea fertilization, HQ was very effective in alleviating the inhibition effect of urea fertilizer on the symbiotic nitrogen fixation system of soybean.

HQ was found to have no unfavourable effect on the growing of the pure-cultured soybean rhizobia, the growing of the seedlings of soybean and primary forming of the nodules at an applied levels of HQ. Furthermore, the respiratory activity of isolated-cultured active root nodule and the activity of succinic dehydrogenase were promoted remarkably. Under pot and field conditions, fertilizing urea with HQ, compared with check (no HQ), could notably raise the nodule quantity and increase the total nitrogen fixation activity of single plant and enhance the content and relative abundance of ureide nitrogen in plant hadromestome of soybean. Therefore, fertilizing urea with HQ could improve the development of the soybean symbiotic nitrogen fixation system and coordinate the supply of the nitrogen sourced from nodule or soil (fertilizer) needed by soybean. Thereby, the rich nitrogen could be provided for synthesizing protein of seed. For this reason, fertilizing urea with HQ could increase soybean yield very remarkably.

Key words Hydroquinone, Soybean, Nodulation, Nitrogen fixation, Ureide