

氮形态对水稻植株氮损失的影响*

王巧兰^{1,2} 吴礼树¹ 赵竹青^{1**} 黄利民²

1. 华中农业大学资源与环境学院, 武汉 430070; 2. 军事经济学院军需系, 武汉 430035

摘要 在溶液培养条件下, 利用¹⁵N 示踪法研究了不同形态氮对水稻植株氮损失的影响, 并分析了影响氮损失的因素。水稻幼苗先在以¹⁵N 为氮源的营养液中生长 2 周, 然后转入供给不同氮形态的营养液中培养 10 d。结果表明: 供给 NH₄⁺-N 的水稻长势最好, 收获时地上部和根部生物量均高于其他氮形态处理, 但其氮损失量也最大, 损失率达到了 17.06%; 供给复合氮源 NH₄NO₃ 的水稻生物量和供给 NH₄⁺-N 的相差不大, 然而其氮损失率却显著下降, 仅为 9.96%, 说明供给复合氮源可在不影响水稻生长的条件下, 降低植株氮损失, 提高其氮肥利用率。此外, 供给 NH₄⁺-N 的水稻叶片中 NH₄⁺ 含量、谷草转氨酶活性及叶片组织 pH 值均高于其他氮形态处理, 表明植物体内 NH₄⁺ 浓度增加而引起的氨挥发可能是导致植物氮损失的原因之一。

关键词 水稻; 氮形态; 植株氮损失

中图分类号 S 143.1 : S 511.2⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)03-0312-05

氮是影响作物生长最主要的营养元素之一, 通常被认为是作物产量的限制因子。然而大量研究表明, 氮肥可通过土壤中的氨挥发、氮的硝化和反硝化及硝酸盐的淋溶等途径损失到环境中, 致使作物的氮肥利用率大多低于 50%^[1]。近年来发现植物地上部氮损失现象也普遍存在, 已成为提高氮肥利用率的重要限制因子之一。其损失形式有 NH₃、NO_x (NO、N₂O、NO₂)、HCN、N₂ 和 R-(NH₂)_n 等, 其中以氨挥发损失的数量最多, 被认为是植物体氮损失的主要途径^[2]。影响植物氮损失的因素有植物种类及其生育期、施肥措施、温度、光照等。水稻是明显的喜铵作物, 王巧兰等^[3] 最近采用¹⁵N 差值法, 研究发现缺氮与过量供氮均使植株氮的损失率增加, 而适量供氮则能显著提高氮肥利用率。此外, 氮形态影响植物光合作用的光反应和碳氮代谢酶活性, 进而影响其产量, 且效应因作物而异^[4-7]。有研究发现, 同时供应 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 能增加水稻的氮素积累, 并促进叶片叶绿素含量和光合速率升高^[8]。然而关于氮形态对水稻氮损失的影响目前尚无报道。鉴于此, 本研究采用¹⁵N 示踪法, 探讨供给不同形态氮肥对水稻氮损失的影响, 旨在为指导水稻合理施肥、提高水稻氮肥利用率提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试水稻 (*Oryza sativa*) 品种为珍汕 97 (ZS97)。种子经消毒后, 浸种 3 d, 在 35 °C 催芽 2 d, 将种子播于含 1/10 国际水稻所营养液的石英砂中培育秧苗。25 d 后, 将水稻幼苗转移到含 1/2 国际水稻所营养液中培养, 1 周后转入全量营养液, 并将氮源改为 (¹⁵NH₄)₂SO₄ (80 mg/L)。每日用 NaOH 或 HCl 溶液调节 pH 至 6.0, 营养液每周更换 1 次, 移栽后 21 d 进行试验处理。本试验中水稻植株的培养在华中农业大学资源与环境学院温室内进行。

1.2 试验设计

选择 1.1 中生长一致的水稻幼苗, 转移至不同供氮形态的 5 L 营养液的聚乙烯塑料盆中进行培养。试验设 4 个处理: (1) 停止供氮处理 (-N); (2) 供应 NO₃⁻-N; (3) 供应 NH₄⁺-N; (4) 供应 NH₄NO₃。供氮水平相同, 均为 80 mg/L, 以处理前水稻植株作为对照 (CK), 各处理 4 次重复, 每盆 4 株。营养液管理同 1.1, 培养 10 d。在试验处理前后分别取植株样, 测其地上部和根系生物量、全 N 及¹⁵N 丰度, 通过计算处理期间¹⁵N 的损失量来估算

收稿日期: 2009-11-11; 修回日期: 2010-03-11

* 国家科技支撑计划项目 (2008BADA4B08-02) 资助

** 通讯作者. E-mail: zzq@mail.hzau.edu.cn

王巧兰, 女, 1965 年生, 在职博士研究生, 副教授. 研究方向: 植物营养. E-mail: whqiaolan@263.net

植物氮损失率。以处理前的相关数值为对照(CK)。

植株¹⁵N量=(植株地上部氮含量×地上部干质量×¹⁵N丰度)+(植株地下部氮含量×地下部干质量×¹⁵N丰度);

植株¹⁵N损失量=处理前植株¹⁵N量-处理后植株¹⁵N量;

植株氮损失率/%=(植株¹⁵N损失量/处理前植株¹⁵N量)×100。

1.3 测定方法

1)全N的测定。采用H₂SO₄-H₂O₂消化:称取植物样品0.3~0.5 g(称准至0.000 2 g)装入100 mL凯氏瓶或消煮管的底部,加浓H₂SO₄ 5 mL,摇匀,在电炉或消煮炉上先小火加热,待H₂SO₄发白烟后再升高温度,当溶液呈均匀的棕黑色时取下。稍冷后加10滴H₂O₂,再加热至微沸,消煮约7~10 min,稍冷后重复加H₂O₂,再消煮。如此重复数次,每次添加的H₂O₂应逐次减少,消煮至溶液呈无色或清亮后,再加热10 min,除去剩余的H₂O₂。取下冷却后,用水将消煮液无损地转移入100 mL容量瓶中,冷却至室温后定容,然后用流动注射分析仪测定,质谱仪分析¹⁵N丰度。

2)NO₃⁻-N的测定。参照宋海星等^[9]的方法,采用1%醋酸研磨提取,加入锌粉还原成亚硝态氮后比色测定。

3)NH₄⁺-N的测定。参照Searle^[10]的方法加以改进。称取新鲜水稻植株1.0 g,于研钵中加水研磨提取,将匀浆移至干燥的三角烧瓶中,加水定容至20 mL,振荡1~3 min,放置澄清后,取上清液2 mL,转移至20 mL刻度试管,加入pH 5.0柠檬酸缓冲液和水合茚三酮乙醇溶液各1 mL,充分摇匀,置于80℃水浴中保持30 min,取出冷却后,用pH 5.0柠檬酸缓冲液定容至10 mL后摇匀,测其光密度值。

4)谷草转氨酶(GOT)活性测定。参照Wu等^[11]的方法加以改进,称取水稻叶片1.0 g放入0.05 mol/L Tris-HCl缓冲液中(pH 7.2),冰浴匀浆,0℃12 000 r/min离心20 min,取上清液0.2 mL与2.8 mL GOT反应液混合,其中GOT反应液包括0.2 mL NADH(3 mg/mL),0.5 mL dl-天冬氨酸盐(0.2 mL/L),0.1 mL 苹果酸脱氢酶(2 000 U),0.2 mL α-酮戊二酸(0.05 mol/L),1.8 mL去离子水。混匀后于波长340 nm处测其吸光值,同时以不加天冬氨酸盐的反应液为对照。工作

曲线绘制:取10 mL试管5支,各管加0.1 mol/L磷酸盐缓冲液0.1 mL,分别加GOT底物液0.50、0.45、0.40、0.35、0.30 mL,丙酮酸标准液0.00(对照管)、0.05、0.10、0.15、0.20 mL。置37℃水浴5 min,各管加0.5 mL 2,4-二硝基苯胍液终止反应,此时对照管补加0.5 mL GOT底物液。再将各管置37℃水浴中20 min,取出后各管加5.0 mL 0.4 mol/L NaOH,混匀,10 min后用分光光度计比色,波长500 nm,读取各管光密度值。各管光密度值分别减去对照管光密度值,以各管丙酮酸体积为横座标,以相应的光密度值差值为纵座标绘制工作曲线。

5)硝酸还原酶活性测定。参照Kaliser等^[12]的方法加以改进。取水稻叶片1.0 g剪碎,置于5 mL离心管中,加入1 mL KNO₃,13 000 r/min离心5 min,然后在30℃下水浴保温30 min,再加入2 mL磺胺试剂及2 mL α-萘胺试剂,30℃水浴再保温30 min,在波长520 nm处测其吸光值。根据光密度值及标准曲线计算酶活。

6)水稻叶片pH测定。取水稻新鲜叶片1 g,剪碎,加0.5 mol/L KCl溶液20 mL,震荡30 min,测定其pH值。

2 结果与分析

2.1 不同氮形态对水稻生长的影响

从表1可以看出,在前期供氮80 mg/L的情况下,将水稻转入供给不同氮形态的营养液培养10 d后,供给NH₄⁺-N的水稻植株地上部和根部生物量增加最多,分别比处理前(CK)增加34.27%和75.00%,且显著高于停止供氮处理(-N),分别较之增加7.17%和9.70%。供给复合氮源NH₄NO₃的水稻地上部生物量仅次于供给NH₄⁺-N的处理,但二者差异不是很明显。供给NO₃⁻-N的水稻地

表1 不同氮形态对水稻植株生物量的影响

Table 1 Effects of different N form on rice biomass g

氮处理 N treatment	每盆植株地上部生物量 Biomass of plant shoot per pot	每盆植株根生物量 Biomass of plant root per pot
-N	8.92±0.25 c	2.68±0.07 cd
NO ₃ ⁻ -N	9.12±0.28 bc	2.83±0.06 ab
NH ₄ ⁺ -N	9.56±0.27 a	2.94±0.08 a
NH ₄ NO ₃	9.34±0.20 ab	2.78±0.07 bc
CK	7.12±0.11 d	1.68±0.06 d

1)表中同行数据右侧不同字母表示差异5%显著(P<0.05),下同。Different letters beside the date in the same line are significantly different(P<0.05),the same as below.

上部生物量低于 NH_4^+-N 和 NH_4NO_3 处理,说明水稻是喜铵作物,氮素以 NH_4^+-N 形式供给更有助于其生长。

2.2 不同氮形态对水稻全氮含量及氮损失的影响

植物氮损失与植物体内的氮含量密切相关。表 2 显示,不同处理的水稻地上部和根部的全氮含量均比处理前有所降低,特别是停止供氮处理(-N),下降幅度最大,分别为处理前的 63.89% 和 49.29%。不同氮形态处理间相比,供给复合氮源 NH_4NO_3 的水稻地上部和根部全氮含量下降幅度均为最小,分别为 2.22% 和 3.93%。这一结果可能是由于水稻快速生长产生的稀释效应所致。考察不同

处理根和地上部的 ^{15}N 丰度,发现停止供氮的水稻地上部和根的 ^{15}N 丰度没有改变,但不同氮形态处理的则显著降低,其中供给 NH_4^+-N 的水稻 ^{15}N 丰度最低,地上部和根中分别比处理前下降 32.03% 和 46.88%,其 ^{15}N 损失量也基本高于其它氮形态处理。供给复合氮源 NH_4NO_3 的水稻地上部和根部 ^{15}N 丰度和其他氮形态处理无显著差异,但其 ^{15}N 损失量及 ^{15}N 损失率却最低,分别比供给 NH_4^+-N 处理下降 41.59% 和 41.79%。该结果说明,氮肥以 NH_4^+-N 形式施用更容易造成植物氮损失,而以复合氮源 NH_4NO_3 施用则能一定程度提高植株全氮含量,减少其氮损失。

表 2 不同氮形态对水稻全氮含量及氮损失的影响

Table 2 Effects of different N form on the contents and loss of total N in rice

处理 Treatment	地上部 Shoots		根 Root		每盆 ^{15}N 损失量/mg ^{15}N loss amount per pot	^{15}N 损失率/% ^{15}N loss ratio
	全氮含量/% Total N content	^{15}N 丰度/% ^{15}N atom abundance	全氮含量/% Total N content	^{15}N 丰度/% ^{15}N atom abundance		
-N	2.30 c	6.35 a	1.38 c	6.37 a	40.22 a	20.73 a
NO_3^--N	3.11 b	4.80 b	2.42 b	4.40 b	27.78 b	14.31 bc
NH_4^+-N	3.25 ab	4.35 b	2.58 ab	3.40 c	33.11 b	17.06 ab
NH_4NO_3	3.52 a	4.45 b	2.69 ab	3.80 bc	19.34 c	9.96 c
CK	3.60 a	6.40 a	2.80 a	6.38 a		

2.3 不同氮形态对水稻叶片 NO_3^--N 和 NH_4^+-N 含量的影响

植物组织中氮的存在形态直接影响氮的损失^[2]。从图 1 可以看出,不同氮形态处理的水稻叶片 NO_3^--N 和 NH_4^+-N 含量也存在明显的差异,供给 NO_3^--N 和复合氮源 NH_4NO_3 的水稻叶片中 2 种形态氮含量和停止供氮处理差异相对较小,但供给 NH_4^+-N 的水稻叶片中 2 种形态氮含量均高于其他处理,为停止供氮处理(-N)的 1.23 倍和 1.29 倍,这可能是氮肥以 NH_4^+-N 形式施用更容易造成

较高植物氮损失的一个重要原因。

2.4 不同氮形态对水稻叶片汁液 pH 值的影响

氮挥发是植物氮损失的重要途径,并受其环境 pH 影响,较高的 pH 值能加速氮的挥发,同时 NH_4^+-N 含量又直接影响环境 pH 值^[2]。从表 3 可以看出,不同氮形态处理的水稻叶片汁液 pH 值也存在显著的差异,其中供给 NH_4^+-N 的 pH 值最高,比停止供氮处理(-N)增加 0.27,其次是供给复合氮源 NH_4NO_3 的处理,pH 值也增加 0.23,供给 NO_3^--N 的水稻叶片汁液的 pH 值相对较低,但也略高于停止供氮处理。可见不同的供氮处理,直接影响水稻叶片汁液的 pH,进而可能影响其氮的损失。

表 3 氮素形态对水稻叶片汁液 pH 值和相关酶活性的影响

Table 3 Effects of different N form on pH value and enzyme activity in juice of rice leaves

处理 Treatment	pH	硝酸还原酶活性/ ($\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$) NRase activity	转氨酶活性/ ($\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$) GOT activity
-N	6.25 ± 0.04 c	32.50 ± 3.41 d	18.49 ± 1.94 cd
NO_3^--N	6.35 ± 0.05 b	48.92 ± 5.49 a	20.81 ± 2.58 bc
NH_4^+-N	6.52 ± 0.03 a	39.51 ± 4.58 bc	24.50 ± 2.91 a
NH_4NO_3	6.48 ± 0.05 a	44.58 ± 5.10 ab	22.61 ± 2.73 ab

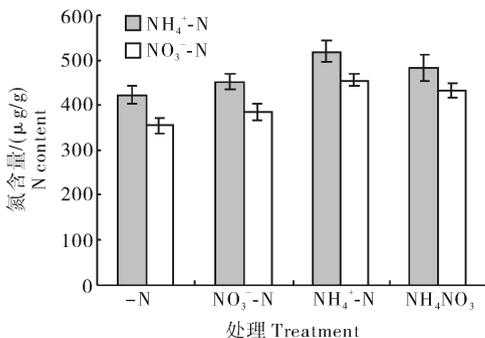


图 1 不同氮素形态对水稻叶片硝态氮和铵态氮含量的影响

Fig. 1 Effects of different N form on the contents of nitrate and ammonium in rice leaves

2.5 不同氮形态对水稻叶片硝酸还原酶活性的影响

植物吸收氮的形态包括 NH_4^+-N 与 NO_3^--N , 吸收的 NO_3^--N 必须被同化为 NH_4^+-N 后才能为植物组织所利用。硝酸还原酶是植物氮还原的限速酶, 其活性高低直接反映植物氮同化速率的快慢^[13]。从表3可以看出, 不同处理的水稻硝酸还原酶活性可能与其供氮形式有关。在所有氮形态处理中, 供给 NO_3^--N 的水稻叶片硝酸还原酶活性最高, 为停止供氮处理(-N)的1.50倍, 而供给 NH_4^+-N 的硝酸还原酶活性则最低, 仅比停止供氮处理(-N)高21.54%, 充分证明了硝酸还原酶为诱导酶。同时说明供给水稻 NO_3^--N 可以诱导硝酸还原酶活性, 提高水稻氮同化能力, 可能是水稻氮损失减少的生理基础。

2.6 不同氮形态对水稻叶片转氨酶活性的影响

GOT是在植物体内调控氮从其载体谷氨酸向组成蛋白质和含氮次生代谢产物合成前体的其他氨基酸转移的关键酶, 能促进铵的同化, 减少游离氨基的毒害^[14]。表3显示, 在所有的氮形态处理中, 供给 NH_4^+-N 的水稻叶片GOT活性最高, 为停止供氮处理(-N)的1.32倍。供给 NO_3^--N 的GOT活性相对最低, 仅比停止供氮处理(-N)高12.43%。说明水稻可通过提高自身的GOT活性来加快氮的同化, 从而降低外施 NH_4^+-N 引起内源 NH_4^+-N 含量上升而带来的毒害和损失。

3 讨论

近年来, 氮损失途径及主要影响因子一直是国内外氮循环研究的热点。笔者采用¹⁵N标记的方法, 研究了不同氮形态对水稻氮损失的影响, 并分析了影响氮损失的因素。结果表明, 氮以 NH_4^+-N 形式供给最有利于水稻的生长, 但同时引起的氮损失也较大。Husted等^[15]报道, 供给 NH_4^+-N 的大麦和油菜氮挥发量显著高于供给 NO_3^--N 时的氮挥发量, 当供给 NO_3^--N 时大麦氮挥发量几乎为零, 转而对其供给 NH_4^+-N , 3 d后氮挥发量增加到0.9~1.3 nmol/(m²·s)。Mattsson等^[16]的研究结果也显示, 供氮量相同时, 供给 NH_4^+-N 的2种草(*Lolium perenne* 和 *Bromus* sp.)的氮挥发速率比供给 NO_3^--N 的氮挥发速率高1倍以上, 本试验结果与其类似。Mattsson等^[17]对大麦的试验发现, 氮挥发速率与叶片 NH_4^+ 浓度和pH值有明显的正

相关关系。本试验中, 供给 NH_4^+-N 的水稻叶片 NH_4^+ 含量和汁液pH值也均有所上升, 证实了上述的观点。过量的 NH_4^+-N 在植物体内积累, 势必会对植物生长发育造成一定的毒害, 转氨酶可促进 NH_4^+-N 向蛋白质等转化, 减少 NH_4^+-N 在植物组织中的累积。本试验中, 供给 NH_4^+-N 的水稻叶片GOT活性显著增强(表3), 这可能是其自身产生的适应机制之一。

此外, 本试验还显示, 供给复合氮源和供给 NH_4^+-N 处理的水稻生长无显著差异, 但其氮损失却显著降低。晏枫霞等^[6]研究发现, 随着 NO_3^--N 施入比例的增加, 菘蓝叶片中NR和GS活性呈现先升后降的抛物线变化规律, 说明适当的施入 NO_3^--N 能促进植物氮的同化, Kronzucker等^[18]也有类似报道。本试验中, 与单施 NH_4^+-N 相比, 供给复合氮源的水稻叶片中NR活性显著增强, 叶片pH值和氮素损失率均显著下降(表3), 从而也佐证了上述观点。

参 考 文 献

- [1] 黄见良, 邹应斌, 彭少兵. 水稻对氮素的吸收、分配及其在组织中的挥发损失[J]. 植物营养与肥料学报, 2004, 10(6): 579-583.
- [2] 吕婷婷. 新疆棉花植株氮素挥发损失及氮素吸收利用特征研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学图书馆, 2009.
- [3] 王巧兰, 吴礼树, 赵竹青, 等. 氮水平对水稻植株氮素损失的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2009, 16(1): 14-19.
- [4] 汪建飞, 董彩霞, 沈其荣. 氮素不同形态配比对菠菜体内游离氨基酸含量和相关酶活性的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2007, 13(4): 664-670.
- [5] 徐加林, 别之龙, 张盛林. 不同氮形态配比对生菜生长、品质和保护酶活性的影响[J]. 华中农业大学学报, 2005, 24(3): 290-294.
- [6] 晏枫霞, 王康猜, 罗庆云, 等. 氮素形态对菘蓝氮代谢、光合作用及生长的影响[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(16): 2039-2042.
- [7] 郭和蓉, 吴淑龙, 卢小良, 等. 氮形态对兰引3号结缕草(*Zoysia japonica* cv. lanyin No. 3)生长及草坪质量的影响[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(1): 59-64.
- [8] 李素梅, 施卫明. 不同氮形态对两种基因型水稻根系形态及氮吸收效率的影响[J]. 土壤, 2007, 39(4): 589-593.
- [9] 宋海星, 王学立, 王开运. 不同节位玉米叶片硝态氮含量及硝酸还原酶活性[J]. 陕西农业科学, 2005(3): 72-74.
- [10] SEARLE P L. The berthelot or indophenol reaction and its use in the analytical chemistry of nitrogen[J]. Analyst, 1984, 109: 549-568.
- [11] WU L C, JIANG S H, TAO Q A. Colorimetric determination

- of GOT and GPT activity and its application[J]. Chinese J Soil Sci. 1998, 29: 136-138.
- [12] KAISER J J, LEWIS O A H. Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in leaves and roots of nitrate fed *Helianthus annuus* L. [J]. Plant and Soil, 1984, 70: 127-130.
- [13] 刘辉, 赵竹青, 叶志娟, 等. 水稻 T-DNA 插入氮营养缺陷型突变体氮营养特征研究[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(4): 438-441.
- [14] 曹翠玲, 李生秀. 氮素形态对作物生理特性及生长的影响[J]. 华中农业大学学报, 2004, 23(5): 581-586.
- [15] HUSTED S, SEHJOERRING J K, NIELSEN K H. Stomatal compensation points for ammonia in oilseed rape plants under field conditions [J]. Agricultural and Forest Meteorology, 2000, 105(4): 371-383.
- [16] MATSSON M, HAUSLER R, ROCHARD C. Leaf-atmosphere NH_3 exchange in barley mutants with reduced activities of glutamine synthetase[J]. Plant Physiology, 1997, 114(4): 1307-1312.
- [17] MATSSON M, SCHJOERRING J K. Dynamic and steady-state responses of inorganic nitrogen pools and NH_3 exchange in leaves of *lolium perenne* and *B nom us erectus* to changes in root nitrogen supply[J]. Plant Physiology, 2002, 128(2): 742-750.
- [18] KRONZUCKER H J, SIDDIQI M Y, CLASS A D M, et al. Nitrate-ammonium synergism in rice: a sub cellular flux analysis [J]. Plant Physiology, 1999, 119: 1041-1045.

Effects of Nitrogen Form on Nitrogen Loss of Rice Plant

WANG Qiao-lan^{1,2} WU Li-shu¹ ZHAO Zhu-qing¹ HUANG Li-min²

1. College of Resources and Environment, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Department of Quarter-master, Military Economic Academy, Wuhan 430035, China

Abstract ^{15}N tracer method was adopted to study the effects of different nitrogen forms ($\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ and NH_4NO_3) on the N loss of rice plant under the solution culture, and the factors affecting the N loss were analyzed. Firstly, rice seedlings were cultured in nutrient solution and fed with ^{15}N (abundance 10%) for two weeks, and then transferred to the nutrient solution culture with different nitrogen forms for 10 d. The results showed that the rice with application $\text{NH}_4^+\text{-N}$ had the highest biomass and the largest amount of N loss with the N loss rate of 17.06% compared with other nitrogen forms. The rice supplied the complex nitrogen source (NH_4NO_3) had no significant differences in biomass compared with that of $\text{NH}_4^+\text{-N}$, but the N loss rate decreased significantly with only 9.96%. The results indicated that the application of NH_4NO_3 decreased N loss of rice plant, and improved the nitrogen utilization efficiency without affecting the rice growth. In addition, NH_4^+ content, GOT activity and pH values of rice leaves applied with $\text{NH}_4^+\text{-N}$ were higher than other nitrogen forms, indicating that ammonia volatilization resulted from the increase of NH_4^+ content of plant may be the main cause of the N loss of the plant.

Key words *Oryza sativa*; nitrogen forms; N loss of the plant

(责任编辑: 张志钰)