

利用¹⁵N 标记研究氮素水平对大豆根瘤生长的影响

董守坤, 刘丽君, 孙聪姝, 张冰, 马秀峰, 焦光纯, 马春梅, 龚振平*

(东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 为了明确氮肥对大豆根瘤生长的影响, 以东农 47 为试验材料, 采用¹⁵N 标记和砂培的方法, 进行了氮素营养水平对大豆根瘤生长及与根瘤固氮相关性的研究。结果表明, 随外源氮水平增加, 根瘤干重呈先增加后降低的变化趋势, 当营养液氮浓度为 50 mg/L 时, 有利于根瘤的生长; 根瘤生长需要一定量“启动氮”, “启动氮”的作用维持到第 3 片复叶完全展开时(V₃)对大豆根瘤的生长最有利; 在盛荚期(R₄)和鼓粒始期(R₅)补充外源氮的供给抑制根瘤的生长。根瘤干重与植株中根瘤氮积累量、根瘤氮比例呈极显著正相关, 根瘤干重与植株中氮积累量呈显著正相关。

关键词: 大豆; 氮素; 根瘤干重; 根瘤固氮

中图分类号: S565.1; S154.38⁺¹

文献标识码: A

文章编号: 1008-505X(2011)04-0985-04

Effects of nitrogen levels on nodule growth of soybean using ¹⁵N tracing method

DONG Shou-kun, LIU Li-jun, SUN Cong-shu, ZHANG Bing, MA Xiu-feng, JIAO Guang-chun, MA Chun-mei, GONG Zhen-ping*
(Agronomy College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: In order to definite the effects of soybean nodules growth, ¹⁵N tracing and sand culture were used to study the effects of nitrogen nutrition levels on nodule growth and nodule nitrogen fixation of soybean cultivar, Dongnong 47 (DN 47). The results show that the dry weights of nodules are increased earlier and decreased later when the exogenous-N levels are gradually increased, and the dry weight of nodules is maximum when the nitrogen concentration is 50 mg/L. Nodules growth needs “startup-N”, and the best effect of the “startup-N” on nodule growth is before the third compound leaf expanded (V₃) period. Growth of nodules is inhibited while applying exogenous-N from the full pod to beginning seed (R₄-R₅). There are significant correlations between dry weight of nodules, N-accumulation of nodules, N ratio in nodules and N-accumulation in plants.

Key words: soybean; nitrogen; dry weight of nodule; nodule nitrogen fixation

氮是限制作物生长和产量形成的首要因素^[1-2], 对增加大豆氮素营养及提高产量有重要的作用^[3]。根瘤具有共生固氮作用, 根瘤固氮对大豆结实器官营养作用非常明显^[4], 所固定的氮素占大豆一生需氮量的 50%~60%^[5]。根瘤增重高峰期出现在结荚期^[6], 但豆科作物仅靠共生固氮常难于达到高产目的, 一般仍需要配合施用适量氮肥, 而不同供氮方式影响大豆根瘤的生长及固氮能力^[7-11]。

目前, 关于供氮方式对根瘤的影响研究主要是在土壤条件下进行的。但土壤中氮素来源和形态比较复杂, 营养条件较难控制, 且受环境影响很大。为

了能够更准确地揭示氮素对大豆根瘤生长的影响, 本试验采用了¹⁵N 示踪技术和砂培相结合方法, 在营养条件可控的环境下进行了氮素水平对大豆根瘤生长影响的研究, 为深入认识氮素与根瘤生长的关系以及合理施用氮肥提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计

采用砂培试验在东北农业大学进行, 以(¹⁵NH₄)₂SO₄ 作为氮源(¹⁵N 丰度为 10.2%)。设: 1) 全生育期氮浓度不变, 即施 N 20、50、100、150

收稿日期: 2010-09-23 接受日期: 2011-02-25

基金项目: 黑龙江省科技攻关计划(GA09B103, GA09B104); 黑龙江省教育厅科研项目(10531010); 东北农业大学博士启动基金资助。

作者简介: 董守坤(1978—), 男, 黑龙江人, 博士, 主要从事大豆栽培生理研究。E-mail: dongshoukun@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Tel: 0451-55190134, E-mail: gzpyx2004@163.com

mg/L 4 个处理(分别以 N20、N50、N100、N150 表示)。2)为研究生育前期施氮对根瘤的影响,设第 3 片复叶完全展开时(V₃ 期)以前施 N 150 mg/L、以后施 N 20 mg/L;在 R₁ 期(初花期)以前施 N 150 mg/L,以后施 N 20 mg/L;在 R₂ 期(盛花期)以前施 N 150 mg/L,以后施 N 20 mg/L 3 个处理(分别以 N150-V₃-20、N150-R₁-20、N150-R₂-20 表示)。3)对于生育后期施氮对根瘤的影响,设 2 个处理:在盛荚期(R₄ 期)以前施 N 20 mg/L、以后施 N 150 mg/L;在鼓粒始期(R₅ 期)以前施 N 20 mg/L、以后施 N 150 mg/L(分别以 N20-R₄-150、N20-R₅-150 表示)。共 9 个处理,每处理 4 次重复。

供试用桶直径 0.30 m、高 0.28 m,桶底钻 1 cm 直径孔,装江砂 20 kg,装桶前将江砂洗净,置于玻璃防雨棚内,防止雨水淋入。在大豆 2 片复叶时接种根瘤菌,方法是取上年冷冻保存的大豆根瘤,研碎后加入到营养液中,每升营养液中约含 5 g 根瘤,连续淋浇 5 d。

供试大豆(*Glycine max*)品种为东农 47。5 月 14 日播种,播种至出苗前每日淋浇 1 次自来水,每次 500 mL。从出苗开始每日淋浇 1 次配制的营养液,每次 500 mL;初花期以后每日淋浇 2 次,每次 500 mL;为防止砂培中盐分积累,每隔 3 d 用清水淋洗 1 次。营养液中,除氮素外,其他成分采用 Hoagland 营养液成分配制(mg/L):KH₂PO₄ 136.00、MgSO₄ 240.00、CaCl₂ 220.00、Na₂MoO₄·H₂O 0.03、CuSO₄·5H₂O 0.08、ZnSO₄·7H₂O 0.22、MnCl₂·4H₂O 4.90、H₃BO₃ 2.86、Fe-EDTA(将 5.57 g FeSO₄·7H₂O 和 7.45 g Na₂EDTA 分别溶解定容至

1 L,使用时每升营养液加 1 mL 储备液)^[12]。

1.2 测定项目与方法

氮素含量采用凯氏定氮法^[13]测定。

¹⁵N 丰度采用 MAT2251 型质谱仪测定^[14]:样品首先经凯氏法消化,测定液浓缩,置于高真空条件下,用质谱仪进行测定。自然界¹⁵N 丰度为 0.336%。

外源氮(%)=[测定样品¹⁵N 丰度(%) - 自然界¹⁵N 丰度(%)]/10.2%;

根瘤固氮(%)=100% - 外源氮%;

数据采用 SPSS16.0 软件统计分析。

2 结果与分析

2.1 氮素水平对大豆根瘤生长的影响

氮素水平对根瘤的生长影响很大。表 1 表明,N50 处理各时期根瘤干重均较高,但与 N20 处理无显著差异;当营养液中氮素水平大于 50 mg/L 时,随氮素水平增加,根瘤干重显著降低,说明根瘤的生长明显受到抑制。生育前期高氮,后期转为低氮处理,随高氮处理的时间延后,根瘤干重显著降低,其顺序为:N150-V₃-20 > N150-R₁-20 > N150-R₂-20。在生育前期保持较低的氮素水平,于 R₄ 或 R₅ 增加氮素水平,根瘤干重显著降低,高氮处理的时间越长根瘤干重越小。

表 1 还看出,在盛荚至鼓粒始期(R₄-R₅ 阶段),N50 处理根瘤干重增加幅度显著大于 N20、N100、N150 处理,在鼓粒始期至鼓粒满期(R₅-R₆ 阶段)根瘤干重增加量则明显小于 N20 处理;N150 处理在 R₄-R₅ 期阶段、N100 在 R₅-R₆ 阶段出现负

表 1 不同氮素水平下根瘤干重及阶段积累量(g/pot, DW)

Table 1 Dry weight and accumulation of nodule under different N levels at different stages

处理 Treatment	根瘤干重 Dry weight of nodule			根瘤积累量 Accumulation of nodule		
	R ₄	R ₅	R ₆	VE~R ₄	R ₄ ~R ₅	R ₅ ~R ₆
N20	4.16 a	5.67 b	6.81 b	4.16 a	1.51 b	1.14 c
N50	4.39 a	6.35 a	6.97 b	4.39 a	1.96 a	0.62 e
N100	2.43 c	2.85 e	2.64 e	2.43 c	0.42 d	-0.21 f
N150	1.578 e	1.47 g	1.11 f	1.57 e	-0.09 f	-0.37 f
N150-V ₃ -20	3.56 b	5.32 c	7.71 a	3.56 b	1.77 ab	2.38 a
N150-R ₁ -20	2.04 d	2.98 e	4.96 c	2.04 d	0.94 c	1.98 b
N150-R ₂ -20	1.849 d	2.02 f	2.97 d	1.84 d	0.18 e	0.95 d
N20-R ₄ -150		3.88 d	2.88 de		-0.28 g	-1.01 h
N20-R ₅ -150			5.10 c			-0.57 g

注(Notes): VE—出苗期 Emergence; R₄—盛荚期 Full pod; R₅—鼓粒始期 Beginning seed; R₆—鼓粒满期 Full seed. 同一时期不同字母表示差异达 5% 显著水平 Different letters in the same period mean significant at 5% level.

增长。在 $R_4 \sim R_5$ 、 $R_5 \sim R_6$ 阶段根瘤干重增加量表现为: $N150 - V_3 - 20 > N150 - R_1 - 20 > N150 - R_2 - 20$, 差异达到显著水平; 而 $N20 - R_4 - 150$ 、 $N20 - R_5 - 150$ 分别在 R_4 、 R_5 以后根瘤干重出现负增长。说明 $N50$ 处理在 R_5 期之前可以促进大豆根瘤生长, 但在 R_5 期以后对根瘤的生长已开始产生一定的抑制作用, 而 $N150$ 、 $N20 - R_4 - 150$ 和 $N100$ 、 $N20 - R_5 - 150$ 由于氮素浓度过高或后期补充氮素浓度过高, 根瘤过早 (R_4 或 R_5 期) 开始死亡, 致使根瘤重量出现负增长。在第 3 片复叶完全展开时 (V_3 期) 以前高浓度的氮素水平促进了根瘤的生长。

2.2 根瘤生长与根瘤固氮的相关性

砂培条件下, 大豆氮素一是来自营养液中的外源氮, 另一来自根瘤固氮。¹⁵N 示踪技术测定了外源氮吸收量, 并计算出根瘤固氮量和其所占比例。图 1 和表 2 看出, 根瘤干重与植株根瘤固氮积累量和植株中根瘤氮比例呈极显著正相关 ($r = 0.912^{**}$ 和 0.842^{**}); 根瘤干重与大豆植株中氮积累量呈显著正相关 ($r = 0.666^*$)。说明根瘤固氮在大豆氮素积累中具有相当重要的作用。根瘤生长发育健壮, 其干重大, 植株中根瘤氮积累量和所占比例高, 植株氮素积累量也大, 对产量的形成有利。

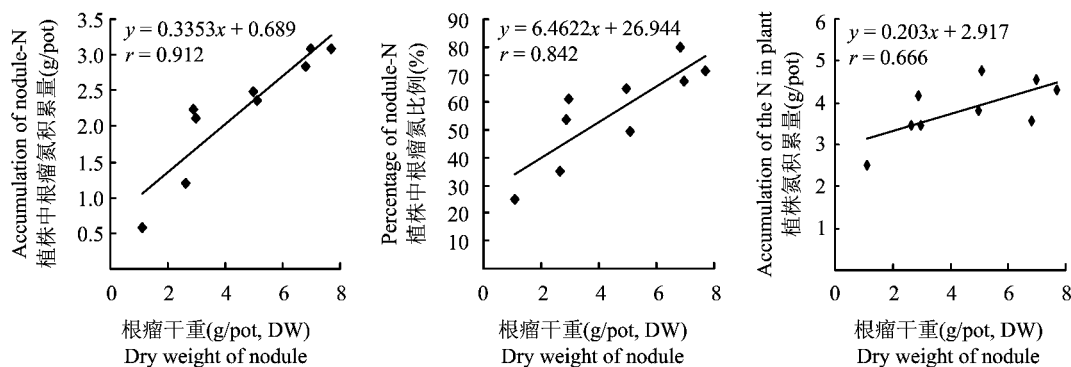


图 1 大豆根瘤干重与植株中根瘤氮积累量、植株中根瘤氮比例和植株氮积累量的相关性

Fig. 1 Correlations of dry weight of nodule with accumulation of nodule-N, percentage of nodule-N in plants and accumulation of N in plants

表 2 大豆植株氮素积累量

Table 2 The nitrogen accumulation in plants of soybean

处理 Treatment	根瘤干重 (g/pot) Dry wt. of nodule	植株氮 (g/pot) N in plant	根瘤固氮 Fixed N by nodule	
			(g/pot)	(%)
N20	6.81 b	3.55 de	2.84 b	79.9 a
N50	6.97 b	4.57 ab	3.09 a	67.6 c
N100	2.64 e	3.46 e	1.21 e	35.0 g
N150	1.11 f	2.10 f	0.58 f	25.1 h
N150- V_3 -20	7.71 a	4.32 bc	3.09 a	71.4 b
N150- R_1 -20	4.96 c	3.82 d	2.48 c	65.0 c
N150- R_2 -20	2.97 d	3.46 e	2.12 d	61.2 d
N20- R_4 -150	2.88 de	4.15 c	2.23 d	53.7 e
N20- R_5 -150	5.10 c	4.77 a	2.37 d	49.5 f

注 (Note): 同一时期不同字母表示差异达 5% 显著水平 Different letters in the same period mean significant at 5% level.

3 讨论

本试验采用¹⁵N 示踪技术和砂培相结合的方法, 在营养条件可控的环境下研究氮素对根瘤的影响。结果表明, 根瘤的生长受外源氮素的影响很大, 适当提高氮素水平可以促进根瘤的生长, 但是当外

源氮水平较高时, 随氮素水平的增加, 根瘤生长受到的抑制增强, 并使根瘤干重提前达到最大值 (盛荚期~鼓粒始期), 这 Otieno 观点^[15] 有所不同。在大豆第 3 片复叶完全展开 (V_3) 之前保持较高的外源氮水平能够明显促进根瘤的形成和生长, 说明根瘤生长需要一定量“启动氮”, 这与大豆植株生长需要

一定量“启动氮”的观点^[16-18]一致。但 V₃ 期以后外源氮水平过高则明显抑制根瘤的生长。试验还表明,在盛荚期(R₄)和鼓粒始期(R₅)补充外源氮的供给明显抑制根瘤的生长。但是,大豆结荚期和鼓粒期提高外源氮又能够增加大豆植株氮素的积累和产量的提高^[18],这是因为在结荚期以后大豆植株生长发育需要大量的氮素,仅靠根瘤固氮不能完全满足其需要,同样需要施入适量的氮肥。根瘤生长与外源氮肥之间的关系既是相辅相成,又存在一定矛盾,大豆生长需要充分发挥根瘤固氮和外源氮的综合作用,适时适量的施用氮肥,满足大豆对根瘤固氮和外源氮素的需求才能获得较高的产量。

总之,施氮对大豆根瘤的生长有显著的影响。根瘤干重与植株中根瘤氮积累量、根瘤氮比例呈极显著正相关,根瘤干重与植株中氮积累量呈显著正相关,根瘤的生长能够促进植株的生长和氮素的积累。

参 考 文 献:

- [1] Kumar S, Narula A, Abdin M Z *et al.* Enhancement in biomass and berberine concentration by neem cake and nitrogen (urea) and sulphur nutrients in *Tinospora cordifolia* Miers [J]. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 2004, 10: 243-251.
- [2] Zhou X J, Liang Y, Chen H *et al.* Effects of rhizobia inoculation and nitrogen fertilization on photosynthetic physiology of soybean [J]. *Photosyn.*, 2006, 44(4): 530-535.
- [3] 关兴照,李成泰,张朝清,石桂芳. 大豆施氮肥接种根瘤菌效果研究[J]. *黑龙江农业科学*, 2000, (4): 20-21.
Guan X Z, Li C T, Zhang C Q, Shi G F. Study on effect of application of nitrogen and rhizobium on soybean [J]. *Heilongjiang Agric. Sci.*, 2000, (4): 20-21.
- [4] 郭海龙,马春梅,董守坤,等. 春大豆生长中对不同氮源的吸收利用[J]. *核农学报*, 2008, 22(3): 338-342.
Guo H L, Ma C M, Dong S K *et al.* Absorption and utilization of different nitrogen sources during the growth of soybean plant [J]. *J. Nucl. Agric. Sci.*, 2008, 22(3): 338-342.
- [5] Ohwakiy, Sugaharap. Active extrusion of protons and exudation of carboxylic acids in response to iron deficiency by roots of chickpea (*Cicer arietinum* L.) [J]. *Plant Soil*, 1997, 189: 49-55.
- [6] 刘秀红,杜天庆,苗果园. 不同施肥处理对大豆植株根系及产量的影响[J]. *山西农业大学学报*, 2008, 28(1): 7-10.
Liu X H, Du T Q, Miao G Y. Effects of different fertilizer treatments on the root system and the yield of soybean [J]. *J. Shanxi Agric. Univ.*, 2008, 28(1): 7-10.
- [7] 才艳,郑殿峰,冯乃杰,等. 氮肥施用量对大豆生长动态及干物质积累的影响[J]. *黑龙江八一农垦大学学报*, 2007, 19(2): 13-16.
Cai Y, Zheng D F, Feng N J *et al.* Effect of nitrogen fertilizer on growth tendency, dry matter accumulation and distribution in soybean [J]. *J. Heilongjiang August First Land Recl. Univ.*, 2007, 19(2): 13-16.
- [8] 丁洪,郭庆元. 氮肥对不同品种大豆氮积累和产量品质的影响[J]. *土壤通报*, 1995, 26(1): 18-21.
Ding H, Guo Q Y. Effect of nitrogenous fertilizer on yield and N accumulation of different varieties of soybeans [J]. *Chin. J. Soil Sci.*, 1995, 26(1): 18-21.
- [9] 杜天庆,苗果园. 氮肥施用量对生土地大豆生物性状和产量的影响[J]. *山西农业科学*, 2006, 34(3): 53-55.
Du T Q, Miao G Y. Effects of the nitrogen fertilize application rates on biological characters and yields of raw soil soybean [J]. *J. Shanxi Agric. Sci.*, 2006, 34(3): 53-55.
- [10] 甘银波,陈静,邱正明. 不同阶段施用氮肥对大豆氮吸收及固氮的影响[J]. *中国油料作物学报*, 1996, 18(4): 45-48.
Gan Y B, Chen J, Qiu Z M. Effects of N fertilizer application at different growth stages on N uptake and N-fixation of soybeans [J]. *Chin. J. oil Crop Sci.*, 1996, 18(4): 45-48.
- [11] 田艳洪,刘元英,张文钊,罗盛国. 不同时期施用氮肥对大豆根瘤固氮酶活性及产量的影响[J]. *东北农业大学学报*, 2008, 39(5): 15-19.
Tian Y H, Liu Y Y, Zhang W Z, Luo S G. Effect of N fertilization at different stage on nitrogenase activity and yield of soybean [J]. *J. Northeast Agric. Univ.*, 2008, 39(5): 15-19.
- [12] Smakman G, Hofstra J J. Energy metabolism of *Plantago lanceolata* as affected by changes in root temperature [J]. *Physiol. Plant*, 1982, 56: 33-37.
- [13] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000. 25-58.
Bao S D. *Agricultural analysis of soil* [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2000. 25-58.
- [14] 金喜军,马春梅,龚振平,等. 大豆鼓粒期对肥料氮的吸收与分配研究[J]. *植物营养与肥料学报*, 2010, 16(2): 395-399.
Jin X J, Ma C M, Gong G P *et al.* Study on fertilizer-N absorption and distribution of soybean (*Glycine max* L.) during the seed-filling period [J]. *Plant Nutr. Fert. Sci.*, 2010, 16(2): 395-399.
- [15] Otieno P E, Muthomi J W, Cheminingwa G N, Nderitu J H. Effect of rhizobia inoculation farm yard manure and nitrogen fertilizer on nodulation and yield of food grain legumes [J]. *J. Biol. Sci.*, 2009, 9(4): 326-332.
- [16] 董钻. 大豆产量生理[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000. 75-102.
Dong Z. *The physiology of soybean yield* [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2000. 75-102.
- [17] Marschner H. *Mineral nutrition of higher plant* [M]. London Inc., UK: Academy Press, 1986. 674-681.
- [18] 董守坤,龚振平,祖伟. 氮素营养水平对大豆氮素积累及产量的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2010, 16(1): 65-70.
Dong S K, Gong Z P, Zu W. Effect of nitrogen nutrition level on N-accumulation and yields of soybean [J]. *Plant Nutr. Fert. Sci.*, 2010, 16(1): 65-70.