

董玉兵,董青君,李传哲,等. 氮肥调控对江淮地区冬闲田毛叶苕子固氮特征及固氮酶活性的影响及机制[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(10): 1844-1853.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.10.009

氮肥调控对江淮地区冬闲田毛叶苕子固氮特征及固氮酶活性的影响及机制

董玉兵^{1,2}, 董青君¹, 李传哲¹, 李卫红¹, 张 苗¹, 邵文奇¹, 孙春梅¹, 陈 川¹

(1.江苏徐淮地区淮阴农业科学研究所,江苏 淮安 223001; 2.南京农业大学资源与环境科学学院,江苏 南京 210095)

摘要: 冬闲田种植绿肥作物已经成为提升耕地质量的一种重要措施。为明确不同氮肥水平对毛叶苕子固氮特征的影响,本研究通过 2 年田间定位试验,设置不施氮肥对照(CK)、50 kg/hm²(N1)、100 kg/hm²(N2) 3 个施氮水平,测定毛叶苕子关键生育期的生物量、根瘤生物量、氮吸收量及固氮酶活性等指标,明确氮肥调控措施对毛叶苕子固氮能力的影响及机制。结果表明:与 CK 相比,2 个生长季 N1 处理和 N2 处理毛叶苕子生物量、氮吸收量和共生固氮量都有显著增加。N1 处理的共生固氮率与 CK 无显著差异,而 N2 处理的共生固氮率下降明显。N1 处理的共生固氮量显著高于 N2 处理。随着施氮量的增加,现蕾期和盛花期固氮酶活性呈增加趋势,N2 处理的固氮酶活性比 CK 增加 42.8%~76.1%。3 个处理的根瘤生物量和根瘤固氮酶活性均在盛花期达到最大值。SQRT 模型可较好拟合毛叶苕子固氮酶活性随时间的变化特征,不同处理下拟合方程决定系数(R^2)均 ≥ 0.87 。与 CK 相比,N1 和 N2 处理的固氮酶活性开始时间(D_{min})明显推迟,固氮酶活性峰值出现时间(D_{opt})提前。总之,N1 处理(50 kg/hm²)能够显著增加植株生物量、共生固氮量及氮吸收量,可以作为试验地区冬闲田种植毛叶苕子的推荐施氮量。本研究结果可为江淮地区冬闲田的合理培肥提供依据和支撑。

关键词: 毛叶苕子; 氮肥调控; 固氮酶活性; 模型

中图分类号: S158 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2024)10-1844-10

Effect and mechanisms of nitrogen fertilizer regulation on the nitrogen fixation characteristics and nitrogenase activity of hairy vetch in winter fallow fields of the Yangtze River-Huaihe region

DONG Yubing^{1,2}, DONG Qingjun¹, LI Chuanzhe¹, LI Weihong¹, ZHANG Miao¹, SHAO Wenqi¹, SUN Chunmei¹, CHEN Chuan¹

(1. Huaiyin Institute of Agricultural Sciences of Xuhuai Region in Jiangsu, Huai'an 223001, China; 2. College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

收稿日期: 2023-12-25

基金项目: 淮安市重点研发计划(乡村振兴类)项目(HAN202313); 国家自然科学基金项目(32001213); 淮安市农业科学院科研发展基金(HNY202027)

作者简介: 董玉兵(1992-),男,山东梁山人,博士研究生,助理研究员,主要从事土壤肥料与绿肥研究。(E-mail) dongyubing@jaas.ac.cn

通讯作者: 孙春梅, (E-mail) 20031201@jaas.ac.cn; 陈 川, (E-mail) 19921201@jaas.ac.cn

Abstract: Planting green manure crops in winter fallow field has become an important measure to improve the quality of cultivated land. In order to clarify the effects of different nitrogen levels on the nitrogen fixation characteristics of hairy vetch, a two-year field positioning experiment was conducted to determine the effects of nitrogen regulation measures and mechanism on the nitrogen fixation ability of hairy vetch by setting three nitrogen levels of no nitrogen control (CK), 50 kg/hm² (N1) and 100 kg/hm² (N2), and by

measuring the biomass, root nodule biomass, nitrogen uptake and nitrogenase activity of hairy vetch at the key growth stages. The results showed that compared with CK, the biomass, nitrogen uptake and symbiotic nitrogen fixation of hairy vetch under N1 and N2 treatments were significantly increased in the two growing seasons. The symbiotic nitrogen fixation rate of N1 treatment was not significantly different from that of CK, while the symbiotic nitrogen fixation rate of N2 treatment decreased significantly. The symbiotic nitrogen fixation of N1 treatment was significantly higher than that of N2 treatment. With the increase of nitrogen application rate, the nitrogenase activity in squaring stage and full-bloom stage showed an increasing trend, and the nitrogenase activity of N2 treatment increased by 42.8%–76.1% compared with CK. The nodule biomass and nitrogenase activity of the three treatments reached the maximum at the full-bloom stage. The SQRT model could well fit the variation characteristics of nitrogenase activity of hairy vetch with time, and the determination coefficients (R^2) of the fitting equations under different treatments were all ≥ 0.87 . Compared with CK, the start time (D_{\min}) of nitrogenase activity in N1 and N2 treatments was significantly delayed, and the peak time (D_{opt}) of nitrogenase activity was advanced. In conclusion, N1 treatment (50 kg/hm^2) could significantly increase plant biomass, symbiotic nitrogen fixation and nitrogen uptake, which could be used as the recommended nitrogen application rate for planting hairy vetch in winter fallow fields of the experimental area. The results of this study provide a basis and support for the rational fertilization of winter fallow fields in the Yangtze River-Huaihe region.

Key words: hairy vetch; nitrogen fertilizer regulation; nitrogenase activity; model

绿肥作为有机肥源,还田后能够缓慢释放养分供后茬作物吸收利用,是解决氮肥过量使用的一种绿色可持续生产肥源^[1-2]。绿肥还田还能够改善土壤理化性质、提高土壤固碳能力和作物产量^[2-4]。因此,冬闲田种植绿肥作物已经成为中国稻田化肥减量和耕地质量提升的一项重要措施^[5-6]。在绿肥作物种植过程中,适量的氮肥投入可以促进根瘤生长发育,提高根瘤固氮能力,但氮肥施用量过多也会对根瘤固氮产生抑制作用^[7-9]。目前氮肥对紫云英、苜蓿等绿肥作物的生长调控和固氮能力的影响已有一些研究^[10-14]。

毛叶苕子(*Vicia villosa* Roth.)具有高效的共生固氮系统,是中国江淮流域稻田常见的冬季豆科绿肥。目前有关毛叶苕子的腐解及养分释放特征、对后茬水稻产量及 N_2O 排放的影响已有一些研究^[2,15],但氮肥调控对毛叶苕子共生固氮和生长影响、固氮酶活性随时间的变化规律等研究较少^[16-17]。因此,为探究氮肥用量对毛叶苕子共生固氮及生长的影响,明确毛叶苕子适宜的氮肥管理措施,本研究通过为期 2 年的田间定位试验,研究不同氮肥用量对毛叶苕子固氮酶活性、共生固氮及生长状况的影响,并对固氮酶活性随时间变化的特征进行模型拟合以明确固氮酶活性的初始时间和终止时间,为冬闲田毛叶苕子栽培调控、冬闲季节耕地培育提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验点概况

试验于 2020 年 11 月至 2021 年 5 月和 2021 年

11 月至 2022 年 5 月在江苏省淮安市清江浦区盐河街道($33^\circ 18' \text{N}$, $119^\circ 29' \text{E}$)开展。试验点处于中国南北地理分界线,属于亚热带季风气候与温带季风气候交汇区,年均气温 14.4°C ,年平均降雨量 956.3 mm ,全年日照时间为 $2\,273.5 \text{ h}$,无霜期 225.0 d ^[13,15]。土壤类型为淹育型水稻土,土壤质地为黏壤土(黏粒 20.4%、砂粒 8.2%、粉粒 71.4%),土壤容重 1.08 g/cm^3 ,pH 值 6.2,有机碳含量 15.1 g/kg ,全氮含量 1.2 g/kg 。试验期间月均气温与降雨量如图 1 所示。

1.2 试验设计

为明确施氮量对毛叶苕子生长和固氮能力的影响,本研究设置 3 个施氮处理,分别为 0(CK)、 50 kg/hm^2 (N1)、 100 kg/hm^2 (N2)。每个处理 3 次重复,各小区面积为 30 m^2 ($5 \text{ m} \times 6 \text{ m}$)。小区之间设 30 cm 深的隔板,并设置独立的灌排水系统。试验田周围设有 3 m 的保护行。

2020–2021 年生长季,2020 年 10 月 31 日施入基肥同时播种毛叶苕子(*Vicia villosa* Roth.),2021 年 3 月 13 日追肥,2021 年 5 月 13 日翻压还田;2021–2022 年生长季,2021 年 11 月 3 日施入基肥同时播种毛叶苕子,2022 年 2 月 27 日追肥,2022 年 5 月 15 日翻压还田。整个冬闲季不行人工灌水。毛叶苕子播种量为 75 kg/hm^2 。所用氮肥均为尿素,按 6:4 的基追肥比分 2 次施入。磷肥按 $60 \text{ kg/hm}^2 \text{ P}_2\text{O}_5$ 的标准施用过磷酸钙,钾肥按 $60 \text{ kg/hm}^2 \text{ K}_2\text{O}$ 的标准施用氯化钾,磷肥和钾肥均作为基肥,在播种前一次性施用。

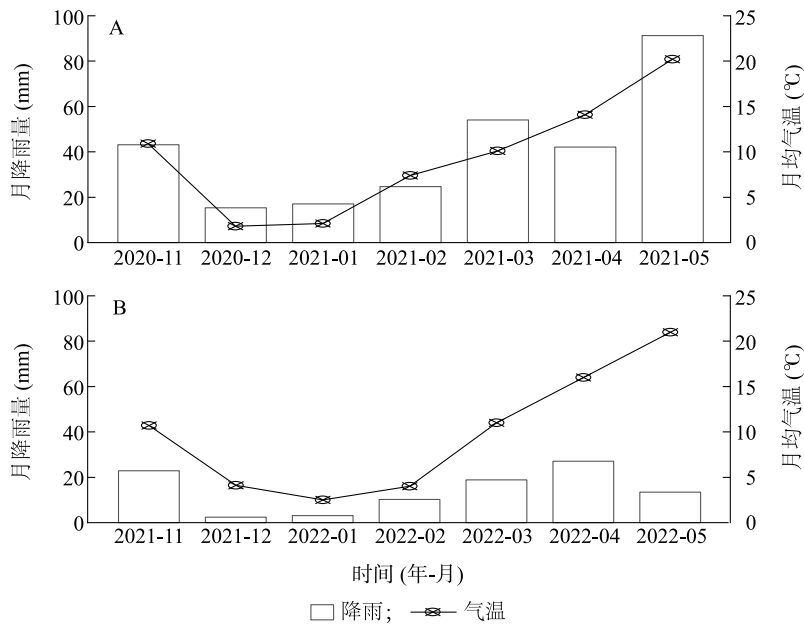


图1 试验期间月降雨量和月均温度

Fig.1 Monthly rainfall and monthly mean temperature during experiment period

为测定毛叶苕子共生固氮水平,设置田间微区试验,在毛叶苕子播种前每小区埋入 1 个直径 25 cm、深度 25 cm 的聚氯乙烯(PVC)圆筒作为微区用于 ^{15}N 标记。每次施肥时同步将丰度 5%的 ^{15}N 标记尿素施入到田间微区。以相同 ^{15}N 丰度标记的小麦作为参比作物。在小区旁边同步开展毛叶苕子的砂培试验,即将毛叶苕子种植于直径 25 cm、高度 25 cm 盛有沙土的塑料盆中,共 6 盆。塑料盆置于透光遮雨棚下,整个生育期均用无氮水灌溉。毛叶苕子出苗后,每个微区或者砂培盆栽进行间苗,均保留长势一致的 8 株毛叶苕子苗。

为明确施 N 量对毛叶苕子固氮酶活性的影响,试验开始前分别在每个小区提前埋入 4 个直径 15 cm、深度 20 cm PVC 圆筒,圆筒周围打孔并用 200 目的尼龙网包裹,以便于将整株根系取出。

1.3 测定项目及方法

1.3.1 植株共生固氮量的测定 采用同位素稀释法测定毛叶苕子共生固氮量^[18]。在绿肥翻压前取出微区或砂培试验的整株植株,分别测定地上部和地下部生物量,并采用 Jena Multi N/C 3000 碳氮元素分析仪(德国耶拿分析仪器股份公司产品)和 Elementar Isoprime100 同位素质谱仪(德国元素分析系统公司产品)测定植株氮含量及 ^{15}N 丰度($\delta^{15}\text{N}$)。毛叶苕子的共生固氮率及共生固氮量根据以下公式计算^[17]:

$$\%N_{\text{dfa}} = (\delta^{15}\text{N}_{\text{ref}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{leg}}) / (\delta^{15}\text{N}_{\text{ref}} - B) \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{SNF} = N_{\text{uptake}} \times \%N_{\text{dfa}} \quad (2)$$

式中, $\%N_{\text{dfa}}$ 为植株共生固氮率, $\delta^{15}\text{N}_{\text{leg}}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{ref}}$ 分别为毛叶苕子和小麦的 $\delta^{15}\text{N}$ 值, B 是砂培试验中毛叶苕子的 $\delta^{15}\text{N}$ 值, SNF 为共生固氮量(kg/hm^2), N_{uptake} 为毛叶苕子氮吸收量(kg/hm^2)。

1.3.2 根瘤固氮酶活性和不同时期的植株生物量测定 固氮酶活性是研究豆科作物根瘤固氮能力的重要指标^[19-20]。氮肥量是影响豆科作物根瘤固氮酶活性的重要影响因素之一^[21-24]。本研究采用乙炔还原法测定植株根系固氮酶活性^[25]。在毛叶苕子生长至分枝期、现蕾期、盛花期和结荚期从各小区分别取出 1 个 PVC 圆筒,将植株地上部和根系分开,地上部 70 °C 杀青 30 min 后,置于烘箱于 60 °C 烘干至恒重。植株根系用清水冲洗后用吸水纸吸去多余水分,连带根瘤称量鲜重,然后将根瘤与根系分离。根瘤装入 500 mL 棕色顶空瓶中,盖上盖子进行密封,立即用注射器从顶空瓶中抽取 50 mL 空气,再从乙炔储气袋中抽取 50 mL 乙炔打入顶空瓶中,25 °C 反应 2 h,再用针筒从顶空瓶中抽取 20 mL 气体,采用 Agilent 7890B 气相色谱系统(美国安捷伦科技有限公司产品)测定抽取气体的乙烯和乙炔含量。采用下式计算固氮酶活性:

$$NA = (CC \times V) / (22.4 \times T \times M) \quad (3)$$

式中, NA 为固氮酶活性 [$\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{h})$], CC 为乙烯浓度 ($\mu\text{mol}/\text{mol}$), V 为顶空瓶体积 (L), T 为培养时间 (h), M 为根瘤重量 (g), 22.4 为标准摩尔体积。

固氮酶活性测定后,将根瘤与根系于 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 杀青 30 min 后,分别置于烘箱 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘干至恒重。

1.3.3 收获期植株生物量和氮吸收量的测定 毛叶苕子翻压前,分别在每个小区选取 $1\text{ m} \times 1\text{ m}$ 长势一致的植株,采集地上部植株,称取鲜重,并随机选取 20 株植株 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 杀青 30 min 后, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘干至恒重,测定含水率。将烘干后的植株经粉碎机粉碎后,采用 Jena Multi N/C 3000 碳氮元素分析仪测定植株氮含量。

$$\text{Biomass} = \text{Bio}_{\text{fw}} \times W_{\text{c}} \quad (4)$$

$$N_{\text{uptake}} = \text{Biomass} \times N_{\text{c}} \quad (5)$$

式中, Biomass 为植株地上部生物量 (t/hm^2); Bio_{fw} 为植株地上部鲜重; W_{c} 为植株地上部含水率; N_{uptake} 植株地上部吸氮量 (kg/hm^2); N_{c} 为植株地上部含氮量 (g/kg)。

1.3.4 土壤样品采集与测定 毛叶苕子翻压前,采用直径为 38 mm 的土钻,在每个小区采集 5 份 $0\sim 20\text{ cm}$ 土壤样品,混匀样品,去除植株根系等杂质后,于阴凉处晾干。风干后的样品过筛后测定土壤基本理化性质^[26]。按重量比 $5:1$ 将水和土混合后,采用雷磁 PHS-3C 型 pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司产品)测定土样 pH 值;土壤样品经 H_2SO_4 消煮后,采用 K9840 型凯氏定氮仪(青岛海能未来技术集团股份有限公司产品)测定土壤全氮含量;采用重铬酸钾容量法测定土壤有机碳含量;土样用 0.5 mol/L 碳酸氢钠浸提后,采用靛蓝比色法测定土壤有效磷含量;土样以 1 mol/L 醋酸铵浸提后,采用 AP1200 型火焰光度计(上海傲谱分析仪器有限公司

产品)测定土壤速效钾含量。

1.4 数据分析与处理

参考 Taylor 等^[27] 的 SQRT 模型,并根据毛叶苕子全生育期共生固氮酶活性的变化特征,利用下式拟合固氮酶活性随时间的变化:

$$NA = a \times (x - D_{\text{max}}) \times [1 - e^{b(x - D_{\text{min}})}] \quad (6)$$

式中, NA 为固氮酶活性 [$\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{h})$], x 为播种后天数。利用 Origin lab 软件进行模型参数 a 、 b 、 D_{min} 、 D_{max} 的拟合。其中, D_{min} 、 D_{max} 为拟合方程与 x 轴的交点,分别代表固氮酶活性 >0 的开始时间和结束时间; a 、 b 为模型的修正参数。采用 MATLAB 软件 fminbnd 函数求取拟合方程固氮酶活性峰值出现的时间 (D_{opt})。

采用 Excel 2016 软件进行数据统计;采用 SPSS 22.0 软件及最小显著差异法 (LSD) 进行处理间差异分析;采用 Origin Lab 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 施氮量对毛叶苕子地上部生物量、氮吸收量和共生固氮能力的影响

毛叶苕子翻压时, 2 个生长季 $N1$ 处理毛叶苕子生物量分别比 CK 增加 13.4% 和 64.6% , $N2$ 处理生物量分别比 CK 增加 32.6% 和 70.2% , 但 2 个生长季 $N1$ 处理和 $N2$ 处理毛叶苕子生物量均无显著差异。与 CK 相比, 2 个生长季 $N1$ 处理毛叶苕子氮吸收量分别增加 46.8% 和 55.8% , $N2$ 处理氮吸收量分别增加 56.0% 和 81.6% 。与 CK 相比, 2 个生长季 $N2$ 处理共生固氮率分别显著降低 24.0% 和 31.4% 。 2 个生长季毛叶苕子共生固氮量均以 CK 最低、 $N1$ 处理最高。与 CK 相比, 2 个生长季 $N1$ 处理共生固氮量分别增加 47.4% 和 44.4% , $N2$ 处理分别增加 18.6% 和 24.3% (表 1)。

表 1 施氮量对毛叶苕子地上部生物量、氮吸收量和共生固氮能力的影响

Table 1 Effects of nitrogen application rate on aboveground biomass, nitrogen uptake and symbiotic nitrogen fixation ability of hairy vetch

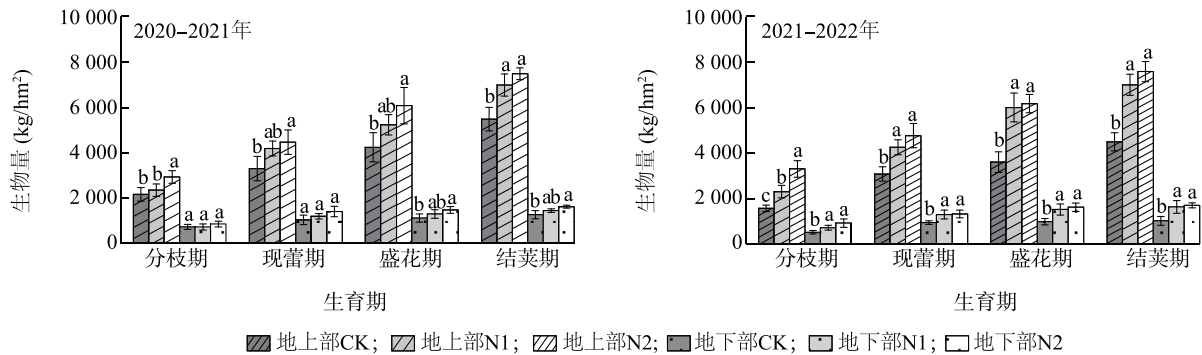
生长季	处理	生物量 (t/hm^2)	氮吸收量 (kg/hm^2)	共生固氮率 (%)	共生固氮量 (kg/hm^2)
2020-2021 年	CK	$6.29 \pm 0.54\text{b}$	$154.88 \pm 14.65\text{b}$	$79.6 \pm 5.0\text{a}$	$123.15 \pm 12.74\text{c}$
	N1	$7.13 \pm 0.27\text{a}$	$227.42 \pm 14.16\text{a}$	$79.9 \pm 1.6\text{a}$	$181.56 \pm 9.14\text{a}$
	N2	$8.34 \pm 0.87\text{a}$	$241.58 \pm 32.18\text{a}$	$60.5 \pm 0.8\text{b}$	$146.10 \pm 9.35\text{b}$
2021-2022 年	CK	$4.97 \pm 0.43\text{b}$	$146.80 \pm 7.58\text{c}$	$84.9 \pm 3.7\text{a}$	$124.62 \pm 8.20\text{c}$
	N1	$8.18 \pm 0.82\text{a}$	$228.73 \pm 14.38\text{b}$	$78.8 \pm 3.4\text{a}$	$179.93 \pm 3.87\text{a}$
	N2	$8.46 \pm 0.43\text{a}$	$266.54 \pm 14.83\text{a}$	$58.2 \pm 2.5\text{b}$	$154.87 \pm 2.69\text{b}$

CK、N1、N2 分别为施肥量 $0\text{ kg}/\text{hm}^2$ 、 $50\text{ kg}/\text{hm}^2$ 和 $100\text{ kg}/\text{hm}^2$ 的处理。相同生长季同列数据后的不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

2.2 施氮量对毛叶苕子不同时期地上部和地下部生物量的影响

施氮量对毛叶苕子不同时期地上部和地下部生物量的影响如图 2 所示。从图中可以看出,从分枝期至结荚期,3 个施 N 处理地上部和地下部生物量均逐渐增加。随着施 N 量的增加,2 个生长季 4 个时期地上部和地下部生物量总体上亦呈增加趋势。2 个生长季毛叶苕子现蕾期、盛花期和结荚期,N1

处理和 N2 处理地上部生物量均无显著差异,但盛花期和结荚期 2 个处理地上部生物量整体上显著高于 CK。2020–2021 年生长季,3 个处理生长初期(分枝期和现蕾期)地下部生物量无显著差异,而生长后期(盛花期和结荚期)N2 处理的地下部生物量显著高于 CK;而 2021–2022 年生长季,4 个时期 N1 处理和 N2 处理的地下部生物量无显著差异,但均显著高于 CK。



CK、N1、N2 见表 1 注。同一时期柱上不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

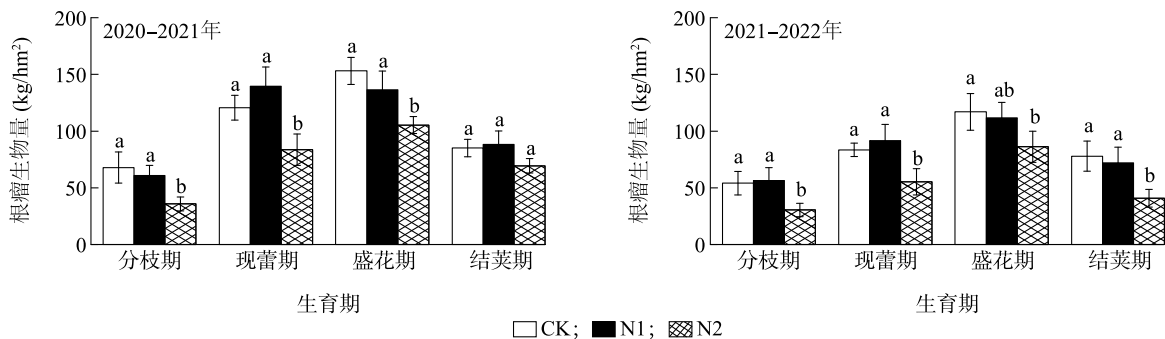
图 2 施氮量对毛叶苕子不同时期地上部和地下部生物量的影响

Fig.2 Effect of nitrogen application rate on aboveground and underground biomass of hairy vetch in different periods

2.3 施氮量对毛叶苕子根瘤生物量的影响

施氮量对毛叶苕子根瘤生物量的影响如图 3 所示。从图中可以看出,3 个施氮量处理下分枝期至结荚期根瘤生物量均呈先升高后降低的趋势,根瘤生物量均在盛花期时达到最大值。2020–2021 年生长季,CK、N1 和 N2 处理结荚期根瘤生物量分别比盛花期降低 44.4%、35.5% 和 34.1%;2021–2022 年生

长季,CK、N1 和 N2 处理结荚期根瘤生物量分别比盛花期降低 33.4%、35.3% 和 52.7%。2 个生长季 4 个发育期 N2 处理的根瘤生物量均为最低。与 CK 相比,4 个生育期 N2 处理的根瘤生物量降低 18.4%~47.6%。4 个生育期 N1 处理和 CK 的根瘤生物量差异均不显著。



CK、N1、N2 见表 1 注。同一时期柱上不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

图 3 施氮量对毛叶苕子根瘤生物量的影响

Fig.3 Effect of nitrogen application rate on nodule biomass of hairy vetch

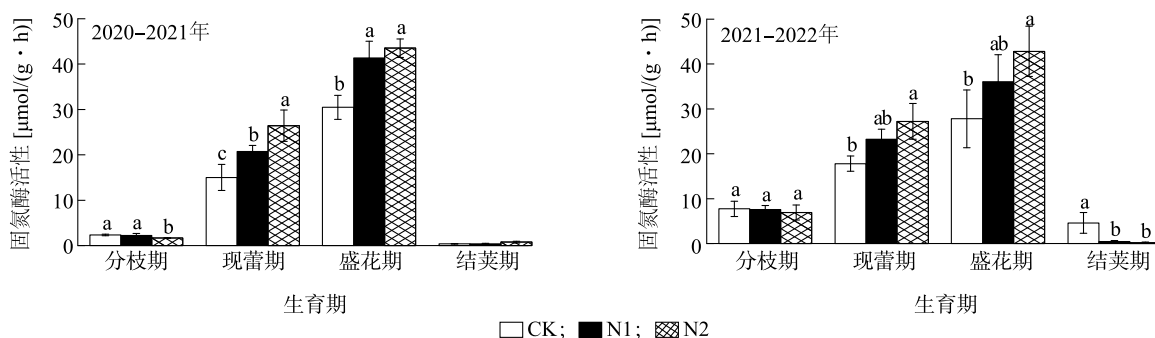
2.4 施氮量对毛叶苕子根瘤固氮酶活性的影响

施氮量对毛叶苕子根瘤固氮酶活性的影响如图

4 所示。从图中可以看出,2 个生长季不同处理下固氮酶活性具有相似的变化规律。3 个施氮处理下,

从分枝期至盛花期固氮酶活性逐渐增大,而从盛花期至结荚期固氮酶活性迅速降低,盛花期时固氮酶活性均达到最大值。随着施氮量的增加,现蕾期和

盛花期固氮酶活性呈增加趋势,N₂处理的固氮酶活性比CK增加42.8%~76.1%。



CK、N₁、N₂见表1注。同一发育期柱上不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)。

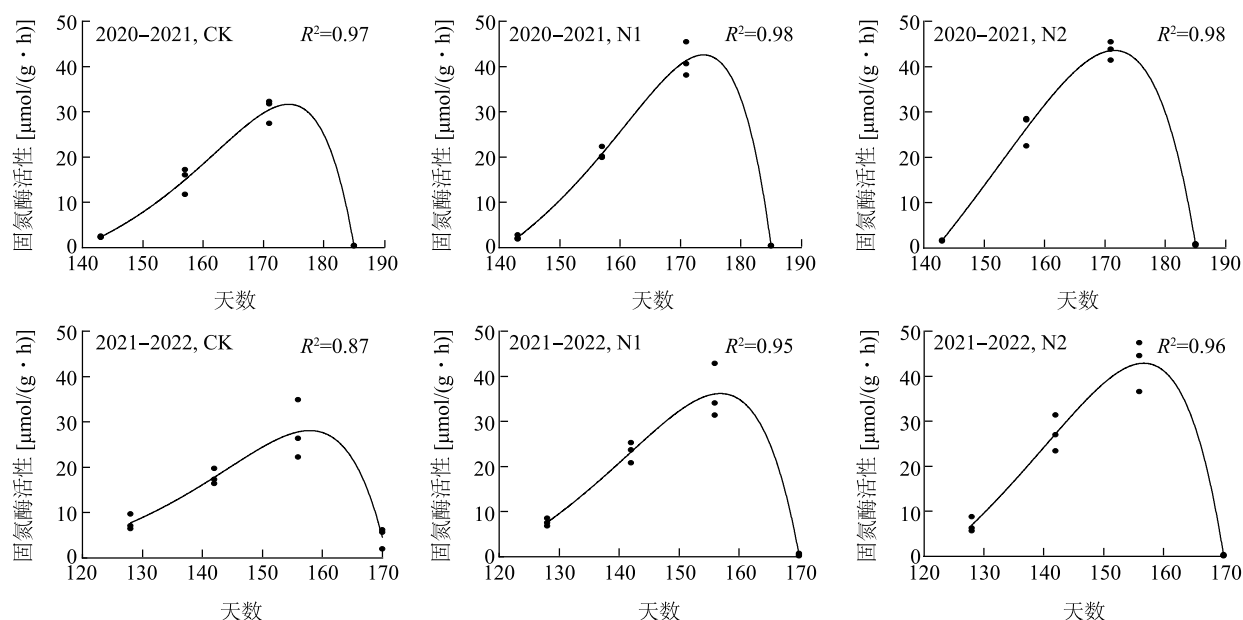
图4 施氮量对毛叶苕子根瘤固氮酶活性的影响

Fig.4 Effect of nitrogen application rate on nitrogenase activity in nodules of hairy vetch

2.5 固氮酶活性拟合方程参数变化特征

2个生长季,各处理下固氮酶活性的拟合结果如图5所示。从图中可以看出,2个生长季所有处理拟合方程的决定系数(R^2)均 ≥ 0.87 。在2个生长季,随着施氮N的增加,方程拟合系数(D_{\min})呈增加趋势, D_{\max} 差异不大,而 D_{opt} 呈减少趋势。虽然处理间 D_{\max} 差异不大,但2个生长季 D_{\max} 差异较大,2020-2021年生长季为185.0~185.1 d,2021-2022

年生长季为170.0~170.9 d。对比发现,2个生长季固氮酶活性大于0的持续时间($D_{\max} - D_{\min}$)存在一定的差异,2020-2021年生长季固氮酶活性开始时间(D_{\min})和结束时间(D_{\max})均比2021-2022年生长季迟;2020-2021年生长季固氮酶活性大于0的持续时间为43.1~45.8 d,明显低于2021-2022年生长季的47.7~62.8 d(表2)。



CK、N₁、N₂见表1注。

图5 各处理固氮酶活性动态变化拟合曲线

Fig.5 Fitting curve of dynamic change of nitrogenase activity in each treatment

表 2 固氮酶活性变化动态拟合方程参数特征

Table 2 Dynamic fitting equation parameter characteristics of nitrogenase activity change

生长季	处理	D_{\min} (d)	D_{\max} (d)	D_{opt} (d)	a	b
2020–2021 年	CK	139.3	185.1	174.21	0.143	0.088
	N1	140.7	185.0	173.77	0.257	0.083
	N2	142.0	185.1	171.55	0.612	0.062
2021–2022 年	CK	108.1	170.9	157.83	0.052	0.075
	N1	119.0	170.1	156.93	0.202	0.071
	N2	122.3	170.0	156.73	0.346	0.068

CK、N1、N2 见表 1 注。 D_{\min} 、 D_{\max} 分别表示固氮酶活性 >0 的开始时间和结束时间, D_{opt} 表示固氮酶活性峰值出现的时间, a 、 b 为修订参数。

2.6 施 N 量对土壤基本理化性质的影响

不同施 N 处理后,土壤理化性质的差异如表 3 所示。从表中可以看出,随着施 N 量的增加,种植毛叶苕子后土壤全氮含量呈增加趋势,2021–2022

生长季 N1 和 N2 处理的土壤全氮含量分别比 CK 增加 11.2% 和 13.3%,差异显著;土壤 pH 呈下降趋势。同一生长季,3 个处理的土壤有机碳含量、有效磷含量和速效钾含量无显著差异。

表 3 施氮量对土壤基本理化性质的影响

Table 3 Effect of nitrogen application rate on basic physical and chemical properties of soil

生长季	处理	全氮含量 (g/kg)	有机碳含量 (g/kg)	有效磷含量 (mg/kg)	速效钾含量 (mg/kg)	pH
2020–2021 年	CK	1.29±0.06a	14.59±1.02a	48.67±4.32a	206.21±18.35a	6.04±0.06a
	N1	1.40±0.07a	14.84±0.46a	48.74±2.59a	206.57±9.80a	5.92±0.10a
	N2	1.42±0.07a	16.31±0.81a	56.51±2.78a	214.54±20.36a	5.72±0.11b
2021–2022 年	CK	1.43±0.07b	14.52±1.10a	47.70±7.18a	182.77±15.45a	6.11±0.10a
	N1	1.59±0.07a	14.86±0.46a	47.91±6.03a	181.52±6.63a	5.96±0.11a
	N2	1.62±0.04a	14.94±0.48a	45.21±1.99a	173.14±11.77a	5.75±0.10a

CK、N1、N2 见表 1 注。同一生长季同列数据后的不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 毛叶苕子生物量、根瘤生物量及固氮酶活性对氮肥调控的响应

本研究结果表明,施氮量增加能显著提高毛叶苕子生物量。但 N1 处理和 N2 处理的生物量没有显著差异,这符合植物对氮肥的需求曲线^[28]。施用氮肥一方面能促进毛叶苕子植株的生长,另一方面还能提高根系固氮水平,进而导致植株氮吸收量的显著增加。施氮后土壤全氮含量有增加趋势,其中 2021–2022 生长季,N1 和 N2 处理较 CK 增加显著,这说明氮肥施用后,能加强根系共生固氮能力,显著增加毛叶苕子的氮吸收累积量,进而提高农田土壤的全氮含量。即长期种植毛叶苕子可以改善土壤质量,这与前人的研究结果一致^[11,29–30]。

本研究结果表明,高氮处理能显著降低根瘤生物量,这与前人研究结果^[9,19]一致。其原因在于高氮处理能增加土壤无机氮浓度,抑制根系结瘤;另

外,由于根系结瘤和固氮都需要大量的能量作为支撑,豆科作物会优先利用土壤中的氮素,其次才是结瘤固氮^[22]。然而,本研究 N2 处理在前期可以为植株供应充足的养分,减弱了植株对固氮的需求,进而减弱了植株根系的结瘤信号^[9],降低了根瘤生物量。与不施 N 对照相比,N2 处理虽然导致根瘤生物量的降低,但是并未减少共生固氮量,其原因主要在于 N2 处理能提高现蕾期和盛花期的根瘤固氮酶活性。本研究中 N1 处理具有最高的共生固氮量,主要是因为 N1 处理能在不影响根系结瘤的情况下,显著增加根瘤固氮酶活性。这说明根瘤固氮酶活性也是豆科作物共生固氮的重要指标^[19]。本研究中的 2 个氮肥用量均能增加共生固氮量,但 N2 处理下,共生固氮量和共生固氮率均低于 N1 处理,这说明高氮处理会抑制植株的共生固氮能力。

本研究结果显示,施用氮肥能显著增加毛叶苕子现蕾期和盛花期的固氮酶活性,这与前人的研究结果^[8,31]一致。刘晓静等^[24]研究发现施氮处理的紫花

苜蓿固氮酶活性显著高于不施氮对照。杨建波等^[8]研究发现,低氮处理能显著提高甘蔗固氮酶活性。冯博政等^[32]同样发现少量施氮能显著增加紫花苜蓿根瘤固氮酶活性。而高氮处理对植物固氮酶活性的抑制亦得到许多证实^[9,32]。针对高氮抑制豆科作物结瘤固氮的原因,柯丹霞等^[9]提出了高氮的亚硝酸盐毒性假说和碳饥饿假说。本研究中 N1 处理和 N2 处理均能显著增加现蕾期和盛花期固氮酶活性,并未观测到高氮对该时期固氮酶活性抑制的现象,这可能是由于本研究的氮肥水平相对较低。本研究中随着氮肥施用量增加,固氮酶活性显著增加,这可能是因为随着氮肥用量的增加,植株光合产物增加,这给根瘤共生固氮提供直接的能量来源^[33]。Taylor 等^[31,33]研究发现,光合产物的多少能调控豆科作物根瘤固氮酶活性,进而影响到共生固氮量。本研究中,与不施 N 对照相比,N2 处理根瘤生物量较低,但植株生物量较高,进而使得单位重量的根瘤可获得更多的光合产物,从而提高根瘤固氮酶活性,这与 Taylor 等^[31]的研究结果一致。

本研究中不同施氮处理下,根瘤固氮酶活性均在盛花期时达到最大值,而盛花期至结荚期根瘤固氮酶活性迅速降低,这与前人研究结果^[34-35]一致。盛花期时,植株营养生长最为旺盛,植株对氮素的需求亦最为强烈^[36],因此,此时期固氮酶活性达到最大值。而结荚时,植株开始由营养生长阶段向生殖生长阶段转变,植株对氮素需求降低,植株根、茎、叶的养分向荚部转移,造成根瘤的死亡和菌体自溶^[37-38]。本研究中 3 个施 N 量处理下,结荚期的根瘤生物量均低于盛花期,这也说明结荚过程中,根瘤组织存在死亡和菌体自溶现象。

3.2 固氮酶活性对氮肥调控的响应

为明确施 N 量对固氮酶活性的影响,本研究首次提出了固氮酶活性动态变化模型,取得了较好的拟合效果,模型可直观地体现固氮酶活性随时间变化特征。总体来说,3 个施 N 处理的固氮酶活性随着时间均先缓慢升高,至盛花期时达到最大值,而盛花期至结荚期固氮酶活性快速下降,这一特征与前人研究结果^[34-35]一致。模型拟合参数显示,2 个生长季(2020-2021 年、2021-2022 年)的拟合参数存在着一定的差异,这可能与年际之间的气象要素变化导致毛叶苕子的生育进程差异有关。由于本研究中拟合模型参数时仅用 4 个时间点的测定数据,导致模型可能不能精确体现毛叶苕子固氮酶活性动态

变化。此外,由于气象要素的年际变化,2 个生长季毛叶苕子的发育进程存在一定的差异,本研究中利用播种后天数为时间指标进行固氮酶活性动态拟合,会导致 2 个生长季的拟合参数差异较大。在后续的研究中一方面要增加固氮酶活性的测定次数,另一方面要利用定量化的生育期指标来进行拟合。

前人研究中虽然推断出固氮酶活性开始于越冬后的返青期,结束于结荚期和成熟期左右^[39-40],但并未具体量化固氮酶活性开始时间和结束时间。本研究结果还显示,施用氮肥能推迟固氮酶活性开始时间,这可能是由于施氮处理能保证毛叶苕子生长前期充足的养分供应,使得毛叶苕子前期并非迫切需要根瘤共生固氮提供养分。Dovrat 等^[22]提出,由于共生固氮需要消耗大量能量,因此豆科作物会优先吸收土壤中可利用氮,只有可利用氮不能满足自身需求时,才进行自身的共生固氮。本研究还发现施用氮肥会导致最优固氮酶活性最大值出现时间提前,这可能是由于氮肥的施用能增加土壤养分供应和毛叶苕子生物量,植株的氮素需求更容易得到满足^[20,41],从而更早地减少植株对共生固氮的依赖,进而导致固氮酶活性峰值出现时间提前。这与田艳洪等^[40]的研究结果一致。

4 结论

施用 50 kg/hm² (N1) 和 100 kg/hm² (N2) 的氮肥能显著增加毛叶苕子植株生物量和氮吸收量。施用 100 kg/hm² 氮肥虽然会降低毛叶苕子根瘤生物量,但能提高固氮酶活性,因而植株共生固氮量并未降低;施用 50 kg/hm² 氮肥处理根瘤生物量与不施 N 对照无显著差异,但能显著提高固氮酶活性,进而能显著增加共生固氮量,维持共生固氮率。施用 50 kg/hm² (N1) 和 100 kg/hm² (N2) 的氮肥均能显著提高固氮酶活性,其中增加较显著的时期在现蕾期和盛花期。固氮酶活性随时间变化的拟合模型显示,施用氮肥能导致固氮酶活性开始时间推迟,固氮酶活性峰值出现时间提前,但对固氮酶活性结束时间影响不明显。综上,少量施用氮肥(50 kg/hm²)既能提高毛叶苕子的植株生物量和氮吸收量,又可以显著提高共生固氮量,维持共生固氮率,是较为合理的氮肥用量运筹方案。

参考文献:

- [1] LIANG H, LI S, ZHANG L, et al. Long-term green manuring en-

- hances crop N uptake and reduces N losses in rice production system[J]. *Soil and Tillage Research*, 2022, 220: 105369.
- [2] 张成兰, 刘春增, 李本银, 等. 不同施肥条件下毛叶苕子的腐解及养分释放特征[J]. *应用生态学报*, 2019, 30(7): 2275-2283.
- [3] HUANG S, ZENG Y J, WU J F, et al. Effect of crop residue retention on rice yield in China: a meta-analysis[J]. *Field Crops Research*, 2013, 154: 188-194.
- [4] LIU C, LU M, CUI J, et al. Effects of straw carbon input on carbon dynamics in agricultural soils: a meta-analysis[J]. *Global Change Biology*, 2014, 20(5): 1366-1381.
- [5] ZHANG D B, YAO P W, ZHAO N, et al. Contribution of green manure legumes to nitrogen dynamics in traditional winter wheat cropping system in the Loess Plateau of China[J]. *European Journal of Agronomy*, 2016, 72: 47-55.
- [6] 陈静蕊, 秦文婧, 王少先, 等. 化肥减量配合紫云英还田对双季稻产量及氮肥利用率的影响[J]. *水土保持学报*, 2019, 33(6): 280-287.
- [7] GUO K, YANG J, YU N, et al. Biological nitrogen fixation in cereal crops: progress, strategies, and perspectives[J]. *Plant Communications*, 2023, 4(2): 100499.
- [8] 杨建波, 彭东海, 覃刘东, 等. 低氮条件下间作大豆对宿根蔗内生固氮菌固氮酶活性、氮素积累及产量的影响[J]. *南方农业学报*, 2015, 46(2): 210-215.
- [9] 柯丹霞, 徐勤朕, 杨娜, 等. 高氮抑制豆科植物结瘤固氮机制研究进展[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(10): 40-45.
- [10] 常单娜, 刘春增, 李本银, 等. 翻压紫云英对稻田土壤还原物质变化特征及温室气体排放的影响[J]. *草业学报*, 2018, 27(12): 133-144.
- [11] 高嵩涓, 周国朋, 曹卫东. 南方稻田紫云英作冬绿肥的增产节肥效应与机制[J]. *植物营养与肥料学报*, 2020, 26(12): 2115-2126.
- [12] 韩可, 孙彦, 张昆, 等. 接种不同根瘤菌对紫花苜蓿生产力的影响[J]. *草地学报*, 2018, 26(3): 639-644.
- [13] 张军倩, 董玉兵, 焦颖, 等. 氮肥调控对紫云英-水稻轮作系统结瘤固氮特征及生产力的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2024, 30(1): 1-11.
- [14] 高丽敏, 苏晶, 田倩, 等. 施氮对不同水分条件下紫花苜蓿氮素吸收及根系固氮酶活性的影响[J]. *草业学报*, 2020, 29(3): 130-136.
- [15] DONG Y, ZHANG J, XU X, et al. Symbiotic nitrogen fixation enhanced crop production and mitigated nitrous oxide emissions from paddy crops[J]. *Field Crops Research*, 2024, 307: 109261.
- [16] 刘蕊, 常单娜, 高嵩涓, 等. 西北小麦与豆科绿肥间作体系箭筈豌豆和毛叶苕子生物固氮效率及氮素转移特性[J]. *植物营养与肥料学报*, 2020, 26(12): 2184-2194.
- [17] 张久东, 包兴国, 曹卫东, 等. 长期施用绿肥减施化肥对毛叶苕子产草量和土壤肥力的影响[J]. *中国土壤与肥料*, 2017(6): 66-70.
- [18] CHALK P M, HE J, PEOPLES M B, et al. $^{15}\text{N}_2$ as a tracer of biological N_2 fixation: a 75-year retrospective[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 106: 36-50.
- [19] BELLENGER J P, DARNAJOUX R, ZHANG X, et al. Biological nitrogen fixation by alternative nitrogenases in terrestrial ecosystems: a review[J]. *Biogeochemistry*, 2020, 149(1): 53-73.
- [20] FAN X, YUAN G, LIU W. Response strategies of N-fixation by epiphytic bryophytes to water change in a subtropical montane cloud forest[J]. *Ecological Indicators*, 2022, 135: 108527.
- [21] BAHULIKAR R A, CHALUVADI S R, TORRES-JEREZ I, et al. Nitrogen fertilization reduces nitrogen fixation activity of diverse diazotrophs in switchgrass roots[J]. *Phytobiomes Journal*, 2019, 5(1): 80-87.
- [22] DOVRAT G, BAKHSHIAN H, MASCI T, et al. The nitrogen economic spectrum of legume stoichiometry and fixation strategy[J]. *New Phytologist*, 2020, 227(2): 365-375.
- [23] 黄晓财, 胡浩南, 李欣欣, 等. 氮、磷、钾胁迫对甘蔗生长及固氮酶活性的影响[J]. *甘蔗糖业*, 2019(3): 23-29.
- [24] 刘晓静, 蒯佳林, 李文卿, 等. 硝态氮与铵态氮对紫花苜蓿根系生长及结瘤固氮的影响[J]. *甘肃农业大学学报*, 2011, 46(5): 106-110.
- [25] 夏玄. 氮素营养对大豆结瘤固氮及相关调控物质影响的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2018.
- [26] 鲍士旦, 江荣风, 杨超光, 等. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [27] TAYLOR A E, GIGUERE A T, ZOEBELEIN C M, et al. Modeling of soil nitrification responses to temperature reveals thermodynamic differences between ammonia-oxidizing activity of archaea and bacteria[J]. *ISME J*, 2017, 11(4): 896-908.
- [28] 巨晓棠. 理论施氮量的改进及验证——兼论确定作物氮肥推荐量的方法[J]. *土壤学报*, 2015, 52(2): 249-261.
- [29] 程会丹, 鲁艳红, 聂军, 等. 减量化肥配施紫云英对稻田土壤碳、氮的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2020, 39(6): 1259-1270.
- [30] 刘春增, 常单娜, 李本银, 等. 种植翻压紫云英配施化肥对稻田土壤活性有机碳氮的影响[J]. *土壤学报*, 2017, 54(3): 657-669.
- [31] TAYLOR B N, MENGE D N L. Light, nitrogen supply, and neighboring plants dictate costs and benefits of nitrogen fixation for seedlings of a tropical nitrogen-fixing tree[J]. *New Phytologist*, 2021, 231(5): 1758-1769.
- [32] 冯博政, 刘晓静, 郝凤, 等. 外源氮对紫花苜蓿固氮酶活性和酰脲含量的影响及其相关关系研究[J]. *草地学报*, 2016, 24(2): 351-357.
- [33] TAYLOR B N, MENGE D N L. Light regulates tropical symbiotic nitrogen fixation more strongly than soil nitrogen[J]. *Nature Plants*, 2018, 4(9): 655-661.
- [34] 王晶, 许修宏. 不同根瘤菌、大豆品种、土壤类型对固氮酶活性的影响[J]. *东北农业大学学报*, 2008, 39(9): 36-39.
- [35] 于晓波, 苏本营, 龚万灼, 等. 玉米-大豆带状套作对大豆根瘤性状和固氮能力的影响[J]. *中国农业科学*, 2014, 47(9): 1743-1753.

- [36] 刘春增,吕玉虎,李本银,等. 不同播期对紫云英“信紫1号”生长状况、产量及养分积累的影响[J]. 中国土壤与肥料,2018(1):127-133.
- [37] DOVRAT G, MASCI T, BAKHSHIAN H, et al. Drought-adapted plants dramatically downregulate dinitrogen fixation:evidences from Mediterranean legume shrubs[J]. Journal of Ecology, 2018, 106(4):1534-1544.
- [38] 焦银山. 苦参根瘤菌多样性及苦参与各种根瘤菌共生关系混杂性的分子机制研究[D]. 北京:中国农业大学,2018.
- [39] NIEWIADOMSKA A, SULEWSKA H, WOLNA-MARUWKA A, et al. The influence of biostimulants and foliar fertilisers on the process of biological nitrogen fixation and the level of soil biochemical activity in soybean (*Glycine max* L.) cultivation[J]. Applied Ecology and Environmental Research,2019,17(5):12649-12666.
- [40] 田艳洪,刘元英,张文钊,等. 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.
- [41] MCCULLOCH L A, PORDER S. Light fuels while nitrogen suppresses symbiotic nitrogen fixation hotspots in neotropical canopy gap seedlings[J]. New Phytologist,2021,231(5):1734-1745.

(责任编辑:石春林)