

高粱在不同氮源处理下分泌生物硝化抑制剂的差异^①

张莹^{1,2}, 张明超², 朱毅勇^{2*}, 王火焰³

(1 江苏省土壤肥料技术指导站, 南京 210036; 2 南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095;

3 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008)

摘要: 高粱根系能分泌抑制土壤亚硝化细菌的物质, 称为生物硝化抑制剂。在铵态氮存在时, 这类物质会大量分泌, 而以硝态氮为氮源时则分泌很少。目前还不清楚, 这是因为不同氮素代谢的差异所引起的, 还是根系吸收铵态氮后根际酸化影响了硝化作用。因此本研究通过砂培试验, 用铵硝营养处理高粱根系, 并且控制 pH, 最后收集根系分泌物, 利用一种荧光标记的亚硝酸细菌来测定高粱分泌的硝化抑制剂活性, 计算其分泌速率。结果发现, 铵态氮是导致根系大量分泌硝化抑制剂的主要原因, 并且在根际 pH<6 时, 硝化抑制剂的活性与分泌速率随着根系分泌氢离子数量的增加而增强。研究表明, 铵态氮营养下高粱根系分泌生物硝化抑制剂高于硝态氮营养可能是高粱根系保护根际铵氧化, 提高氮素利用率的一个重要生理机制。

关键词: 生物硝化抑制剂; 高粱; 氮; pH

中图分类号: S145.9

硝化作用不仅导致农田氮素淋失, 而且还会污染地表与地下水源^[1-3]。我国氮肥施用量居高不下, 而且绝大多数是铵态氮肥, 如果施用硝化抑制剂可降低硝酸盐的淋失和反硝化机率^[4-7]。但是化学硝化抑制剂成本很高, 在生产中并未得到大面积推广。

在自然界中发现一些植物根系能分泌抑制土壤亚硝化细菌的物质, 统称为生物硝化抑制剂 (biological nitrification inhibitors, BNI)^[8-12]。在农作物中, 日本科学家筛选出一种杂交的高粱能够分泌大量的硝化抑制物质^[13]。因此, 种植能够分泌硝化抑制剂的农作物, 通过间作或轮作的方式提高土壤中氮素利用率, 不仅可以降低生产成本, 而且由于作物本身的经济价值, 在农业生产中值得推广。

由于目前对生物硝化抑制剂的研究还不多, 只知道生物硝化抑制剂的分泌受到氮素形态的影响, 相比 NO_3^- , NH_4^+ 为氮源时可刺激生物硝化抑制剂的分泌^[13-14]。但是具体原因还不明确。因此本研究内容就是要探明铵/硝营养对生物硝化抑制剂分泌的影响及其可能的原因。

1 材料与方法

1.1 植物培养

植物材料为高粱 (*Sorghum bicolor* L.), 采用砂培

方法在温室中生长, 温度保证在 30℃ 左右。高粱从第一叶展开时进行全铵或全硝培养, 营养液配方参照文献[13]。氮水平控制在 1 mmol/L, pH 根据试验设计调控。采样时期为拔节期。

1.2 试验设计

将高粱分别用 0.5 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 作为氮源培养, 不调营养液的 pH。采样时将根系从石英砂中取出, 自来水冲洗后再用 0.5 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 或 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液清洗 3 次, 将 6 棵高粱苗为一组, 置于 1 L 上述氮溶液中通气培养一天, 设 4 个重复。相同试验共重复 3 次。

为了测定根系分泌的硝化抑制物质的活性是否与根际 pH 有关, 即是否与根系吸收铵离子后根际 pH 降低有关, 本试验分别在相应的含氮培养液中加入刺激根系细胞分泌氢离子的梭壳菌素 (fusicoocin) 0.5 和 1 $\mu\text{mol/L}$ (分别记为 F-0.5, F-1), 以及抑制根系分泌氢离子的钒酸钠 (vanadate) 0.1 和 0.5 mmol/L^[15] (分别记为 V-0.1, V-0.5)。于次日将上述培养液收集, 称重后分出一半溶液用于测定 pH, 同时, 根系实际分泌的氢离子量用 0.5 mmol/L NaOH 滴定后, 以原培养液作为对照滴定, 两者相减即可计算出根系分泌氢离子的速率。另一半含有根系分泌物的培养液用旋转蒸发仪

①基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (NSFC31172035)、教育部新世纪优秀人才项目 (NCET-11-0672) 和江苏省科技支撑计划项目 (BE2011821) 资助。

* 通讯作者 (yiyong1973@njau.edu.cn)

作者简介: 张莹 (1973—), 女, 河北定州人, 硕士, 高级农艺师, 主要研究方向为土壤与植物营养。E-mail: zhy@jsagri.gov.cn

浓缩蒸干后用 20 ml 甲醇提取,利用一种带有荧光标记的重组亚硝化单胞细菌 (*Nitrosomonas europaea*) 亚硝酸细菌,通过测定根系分泌物对其荧光的淬灭值来计算硝化抑制能力大小^[16-17]。根系取样后烘干称重。

为分析铵、硝营养与 pH 共同作用下硝化抑制剂的分泌差异及原因,将高粱用 0.5 mmol/L (NH₄)₂SO₄ 或 Ca(NO₃)₂ 培养,同时将营养液淹没石英砂 2 cm,同时用 pH 自动调节设置 (NPH-660 NDE, Nissin, Japan) 把营养液的 pH 值一直控制在 3 或 7,分别通过 0.1 mmol/L NaOH 或 0.05 mmol/L H₂SO₄ 实时滴定来调节。同时,在收集根系分泌物时将铵、硝培养的高粱也分别都用含有铵、硝的培养液收集,各种收集与测定方法同上。

2 结果与分析

2.1 pH 对铵态氮营养下的高粱分泌硝化抑制剂的影响

从表 1 中可知,当用全铵 (0.5 mmol/L (NH₄)₂SO₄)

溶液处理高粱根系一天以后, pH 值从原溶液 5 下降到 3.66,这说明铵态氮的吸收导致根际 pH 值降低,这与文献中的报导是一致的^[14, 18]。相比之下,用氢离子分泌促进剂 0.5 μmol/L fusicocin 处理后,溶液的 pH 值与对照相比并没有显著的变化,只有当 fusicocin 浓度达到 1 μmol/L 时, pH 值才有所降低。此外,用氢离子分泌抑制剂 vanadate 处理后,在 0.1 mmol/L 时, pH 值仅仅比对照高出 0.24 个单位,但是当浓度提高到 0.5 mmol/L 时, pH 值升高到 7.16,比对照提高了 3.5 个单位。因此,在下面的试验中,分别选用 1 μmol/L fusicocin 和 0.5 mmol/L vanadate 来处理根系。

将溶液用碱滴定后发现(图 1),在铵态氮处理下,高粱根系以 1 g 计,在一天之内分泌出大约 250 μmol 的氢离子,用 fusicocin 处理后,则分泌出两倍以上

表 1 铵态氮处理下根系分泌液的 pH 值
Table 1 pH of root exudation cultivated under NH₄⁺-N

处理	CK	F-0.5	F-1	V-0.1	V-0.5
pH 值	3.66 ± 0.13	3.93 ± 0.98	3.11 ± 0.03	3.90 ± 0.17	7.16 ± 0.09

注: F-0.5、F-1 分别表示加入 fusicocin 0.5 和 1 μmol/L; V-0.1、V-0.5 分别表示加入 vanadate 0.1 和 0.5 mmol/L,下同。

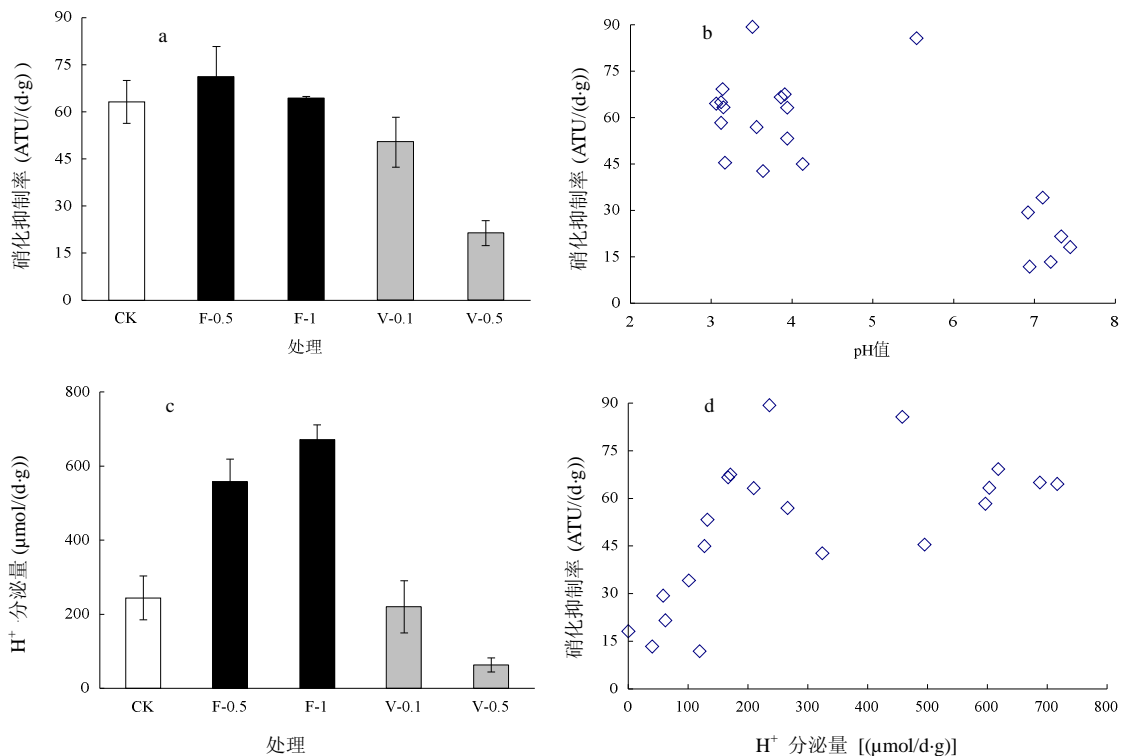


图 1 铵态氮培养的高粱分泌硝化抑制剂与 pH、根系分泌氢离子之间的关系

Fig. 1 Relationship between pH, BNI and H⁺ release by sorghum roots cultivated under NH₄⁺-N

fusicoccin 和 vanadate 分别促进和抑制了根系氢离子分泌。从图 1 和表 1 的结果可知, 由于根系分泌液可能具有一定的缓冲能力, 因此仅仅根据溶液的 pH 不能正确估算出根系分泌氢离子的量, 必须通过滴定的方法才能正确测定。

从图 1 中还发现, 高粱根系分泌物中具有硝化抑制作用的物质的总活性在 $\text{pH} < 6$ 时要普遍高于 $\text{pH} > 6$, 而且在 $\text{pH} < 6$ 时, 硝化抑制剂的活性并不是随着 pH 的变化而变化 (图 1b), 相反, 根系分泌硝化抑制剂很可能与氢离子的分泌之间有一定的相关性, 即, 硝化抑制剂的活性随着根系分泌氢离子的增加而增加 (图 1d)。由于根系分泌的氢离子主要是通过细胞膜质子泵的作用产生的, 因此 fusicoccin 和 vanadate 分别通过促进和抑制质子泵活性, 改变了根系细胞分泌质子的量 (图 1c)。目前已经鉴定到的一种高粱分泌的硝化抑制物质为 MHPP^[13], 学名是 4-羟基苯-3-甲基丙酸, 其他物质还不明确。但是已有的研究表明, 生物硝化抑制物质 (BNI) 很可能是一类有机阴离子 (未发表数据), 因此 BNI 本身并不是导致根际 pH 变化的原因。而质子泵的活性决定着氢离子的分泌, 也是改变细胞膜电位的重要因子, 因此很可能是促进 BNI 通过细胞膜上阴离子通道进行分泌的一个原因, 但是这方

面的研究还有待从植物生理学的角度进行深入的试验。

2.2 pH 对硝态氮营养下的高粱分泌硝化抑制剂活性的影响

在硝态氮营养下的高粱培养一天后, 其溶液中的 pH 值从 5 上升为 6.57 (表 2), 这说明硝态氮的吸收导致了根际 pH 上升, 同时发现, 用 $1 \mu\text{mol/L}$ fusicoccin 处理后, 溶液中的 pH 与对照相比也仅仅出现了微弱降低, 而用 0.5 mmol/L vanadate 处理后则上升了一个单位。由于 3 个处理的 pH 值都已经超过 6, 因此无法再用碱来滴定, 所以氢离子的净分泌量可以认为是零。

表 2 硝态氮处理下根系分泌液的 pH 值

Table 2 pH of root exudation cultivated under $\text{NO}_3^- \text{-N}$

处理	CK	F-1	V-0.5
pH	6.57 ± 0.20	6.27 ± 0.12	7.62 ± 0.08

在硝态氮营养下, 硝化抑制剂的活性普遍较低 (图 2), 并且与图 1 相比后发现, 尽管铵、硝营养下高粱分泌硝化抑制剂确实存在着明显的差异, 但是一个共同的特征是, 当溶液 $\text{pH} > 6$ 时, 硝化抑制剂的分泌都受到了严重的影响。

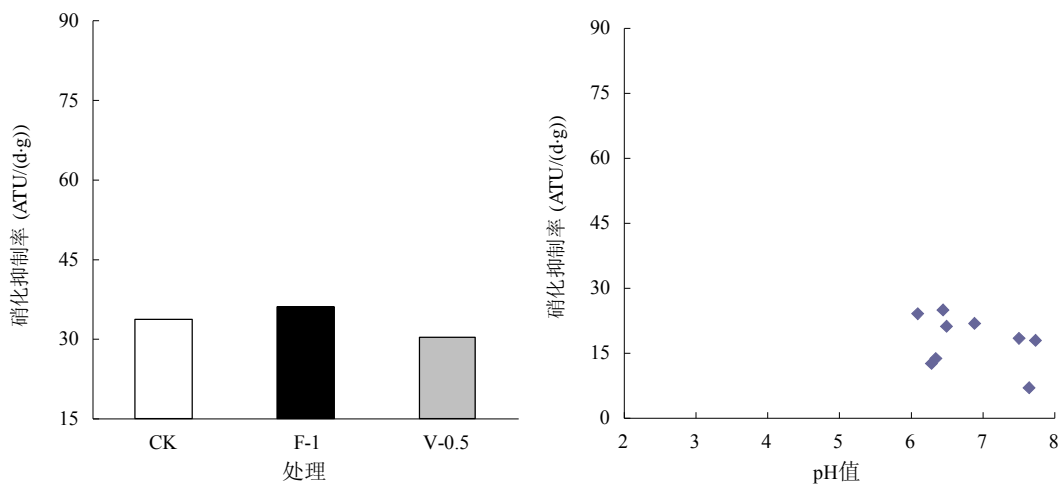


图 2 硝态氮培养的高粱分泌硝化抑制剂与 pH 之间的关系

Fig. 2 Relationship between pH and BNI release by sorghum roots cultivated under $\text{NO}_3^- \text{-N}$

2.3 pH 与不同氮素形态同时作用下对高粱分泌硝化抑制剂活性的影响

由于铵态氮与硝态氮的吸收分别会导致根际 pH 降低和升高, 因此为了搞清楚究竟是哪种原因导致其分泌硝化抑制剂产生了差异, 本试验利用 pH 自动调控系统在 pH 3 和 pH 7 的砂培营养液中分别用铵、硝培养

高粱幼苗。结果表明 (图 3), 在硝态氮 (pH 7) 条件下培养的高粱分泌的硝化抑制剂的速率要明显低于在铵态氮 (pH 3) 条件下的高粱, 但是如果在收集时换用铵态氮或硝态氮, 则发现, 硝态氮 (pH 7) 培养的高粱在铵态氮处理下, 分泌硝化抑制剂的速率会提高, 而铵态氮 (pH 3) 培养的高粱在硝态氮处理下却没有

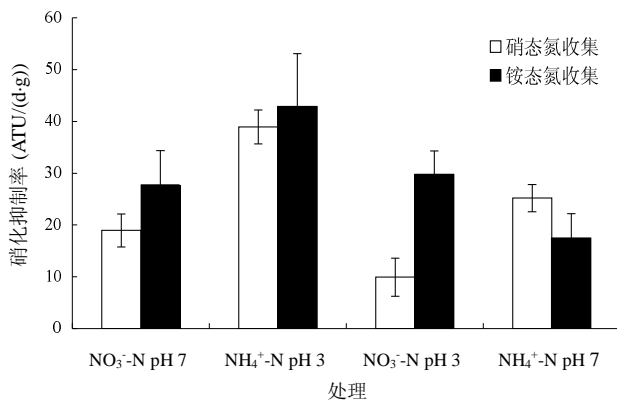


图3 不同pH下用铵态氮、硝态氮培养的高粱分泌硝化抑制剂的差异

Fig. 3 Difference between BNI release by sorghum roots cultivated under NH₄⁺-N and NO₃⁻-N with pH

明显降低硝化抑制剂的分泌。这个结果说明，铵、硝营养本身是决定高粱分泌硝化抑制剂的主要原因。此外，当高粱在硝态氮（pH 3）培养后，如果仍然用含有硝态氮的溶液来收集根系分泌物，其中的硝化抑制剂分泌的速率还是很低的，但是换用铵态氮溶液来收集根系分泌物，则硝化抑制剂分泌的速率就会提高，这也说明铵态氮促进了硝化抑制剂的分泌，而且从某种程度上来看，这种作用似乎与pH没有关系。但是对于在铵态氮（pH 7）培养下的高粱来说，其分泌硝化抑制剂的速率要低于铵态氮（pH 3）培养下的高粱，这说明，对于铵态氮营养下的高粱，其分泌硝化抑制剂的能力还受到pH的影响，但是这种影响相对于铵、硝营养本身来说要小得多。已有的研究认为，高粱分泌的主要硝化抑制物质：4-羟基苯-3-甲基丙酸，其在植物体内的合成过程需要前体，这个前体就是苯丙氨酸，这一步骤又需要L-苯丙氨酸解氨酶的作用，众所周知，植物体内铵离子或氨分子在调节L-苯丙氨酸解氨酶活性时起着重要的调节作用^[13]。因此，铵态氮可能是促进4-羟基苯-3-甲基丙酸，或是其他生物硝化抑制物质（BNI）合成的一个重要因素。有关方面的研究还需要进一步深入。

3 结论

高粱分泌生物硝化抑制剂的能力主要受土壤中不同形态氮素的影响，相对于硝态氮，铵态氮明显地促进了硝化抑制剂的分泌，同时pH也影响了生物硝化抑制剂的分泌，在pH<6时，硝化抑制剂的活性随着根系分泌氢离子的增加而增强，这很可能是高粱在铵态氮营养下防止铵被氧化的一种重要的适应机制，也是

植物提高氮素利用的一种重要机制^[19]。

致谢：感谢日本 JIRCAS 研究员 Subbarao GV 提供的试验材料。

参考文献：

- [1] 朱兆良. 农田中氮肥的损失与对策. 土壤与环境, 2000, 9(1): 1-6
- [2] 胡克林, 李保国, 黄元仿, 陈德立, White RE. 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
- [3] 汪涛, 朱波, 罗专溪, 张剑. 紫色土坡耕地硝酸盐流失过程与特征研究. 土壤学报, 2010, 47(5): 962-970
- [4] 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
- [5] 刘涛, 梁永超, 褚贵新, 马丹, 刘倩, 王健. 三种硝化抑制剂在石灰性土壤中的应用效果比较. 土壤, 2011, 43(5): 751-757
- [6] McCarty GW. Modes of action of nitrification inhibitors. Biol. Fertil. Soils, 1999, 29: 1-9
- [7] Di HJ, Cameron KC. The use of a nitrification inhibitor, dicyandiamide (DCD) to decrease nitrate leaching and nitrous oxide emissions in a simulated grazed and irrigated grassland. Soil Use Manage., 2002, 18: 395-403
- [8] Gopalakrishnan S, Subbarao GV, Nakahara K, Yoshihashi T, Ito O, Maeda I, Ono H, Yoshida M. Nitrification inhibitors from the root tissues of *Brachiaria humidicola*, a tropical grass. J. Agric. Food Chem., 2007, 55: 1385-1388
- [9] Castaldi S, Carfora A, Fiorentino A, Natale A, Messere A, Miglietta F, Cotrufo MF. Inhibition of net nitrification activity in a Mediterranean woodland: Possible role of chemicals produced by *Arbutus unedo*. Plant Soil, 2009, 315: 273-283
- [10] Bending GD, Lincoln SD. Inhibition of soil nitrifying bacteria communities and their activities by glucosinolate hydrolysis products. Soil Biol. Biochem., 2000, 32: 1261-1269
- [11] Subbarao GV, Nakahara K, Ishikawa T. Free fatty acids from the pasture grass *Brachiaria humidicola* and one of their methyl esters as indicators of nitrification. Plant Soil, 2008, 313: 89-99
- [12] Subbarao GV, Nakahara K, Hurtado MP. Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. Proc. Nat. Acad. Sci., (USA), 2009, 106: 17302-17307
- [13] Zakir HAKM, Subbarao GV, Pearse SJ. Detection, isolation and characterization of a root-exuded compound, methyl 3-(4-hydroxyphenyl) propionate, responsible for biological nitrification inhibition by sorghum (*Sorghum bicolor*). New Phytol., 2008, 180: 442-451

- [14] Subbarao GV, Wang HY, Ito O. NH_4^+ triggers the synthesis and release of biological nitrification inhibition compounds in *Brachiaria humidicola* roots. *Plant Soil*, 2007, 290: 245–257
- [15] Toyomasu T, Tsukahara M, Kaneko A. Fusicoccins are biosynthesized by an unusual chimera diterpene synthase in fungi. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 2007, 104: 3 084–3 088
- [16] Subbarao GV, Ishikawa T, Ito O, Nakahara K, Wang HY, Berry WL. A bioluminescence assay to detect nitrification inhibitors released from plant roots: A case study with *Brachiaria humidicola*. *Plant Soil*, 2006, 288: 101–112
- [17] Iizumi T, Mizumoto M, Nakamura K. A bioluminescence assay using *Nitrosomonas europaea* for rapid and sensitive detection of nitrification inhibitors. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64: 3 656–3 662
- [18] Zhu Y, Di T, Xu G, Chen X, Zeng H, Yan F, She Q. Adaptation of plasma membrane H^+ -ATPase of rice roots to low pH as related to ammonium nutrition. *Plant Cell Environ.*, 2009, 32: 1 428–1 440
- [19] Subbarao GV, Rondon M, Ito O, Ishikawa T, Rao LM, Nakahara K, Lascano C, Berry WL. Biological nitrification inhibition (BNI) – Is it a widespread phenomenon? *Plant Soil*, 2007, 294: 5–18

The Mechanism of Biological Nitrification Inhibitor Released by Sorghum Under Different Nitrogen Sources

ZHANG Ying^{1,2}, ZHANG Ming-chao², ZHU Yi-yong², WANG Huo-yan³

(1 *Technology Instructions Station of Soil and Fertilizer, Nanjing 210036, China*; 2 *College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China*; 3 *State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture (Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences), Nanjing 210008, China*)

Abstract: The ability to suppress soil nitrification through the release of nitrification inhibitors from sorghum roots is termed “biological nitrification inhibitor” (BNI). It was reported that the release of BNI from sorghum roots under ammonium nutrition was much more than under nitrate nutrition. It is not understood whether the nitrogen metabolism or the rhizosphere pH in relation to the uptake of ammonium and nitrate is the effect on the release of BNI. In this study, sorghum plants were cultivated in sands with ammonium or nitrate. The root medium pH was controlled by pH-stat system and root exudation was collected to test the BNI activity and release rate by gene modified *Nitrosomonas* with florescence. The results showed that nitrogen form was the major factor which affected the release of BNI. Moreover, under the pH 6.0, the release of BNI was related to the release of proton by sorghum roots. Our study indicated the release of BNI by sorghum roots under ammonium nutrition rather than under nitrate nutrition might be a potential to suppress ammonium oxidation in soil, which could improve nitrogen use efficiency (NUE).

Key words: Biological nitrification inhibitor, Sorghum, Nitrogen, pH