

# 不同水平硝态氮对蚕豆根系质子释放量的影响\*

毛 佳<sup>1,2</sup>, 徐仁扣<sup>1\*\*</sup> 万 青<sup>1,2</sup> 陈荣府<sup>1</sup> 黎星辉<sup>2</sup> 沈仁芳<sup>1</sup>

(1. 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;

2. 南京农业大学茶叶研究所 南京 210095)

**摘要** 为了解豆科植物在加速土壤酸化中的作用及其机制, 通过水培试验和恒 pH 自动电位滴定法研究了 4 个硝态氮供应水平对蚕豆根系质子释放量和介质 pH 的影响, 分析了蚕豆根系释放质子的机制。结果表明, 当不供应外源硝态氮时, 蚕豆根系释放的质子数量最多, 以干根计算培养 10 次的累积释放量可达  $37.5 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ; 此条件下质子释放导致培养液 pH 下降幅度最大, 可达 1.93。随着外源硝态氮供应量的增加, 蚕豆根系释放的质子数量和介质 pH 的下降幅度均减小。当培养液  $\text{NO}_3^-$  浓度为  $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 培养试验前期根系有少量质子释放, 培养试验后期有少量  $\text{OH}^-$  释放。研究表明, 蚕豆生长介质中的质子主要来源于蚕豆根系质子的直接释放, 有机酸对介质质子的贡献可以忽略。蚕豆根系对阴、阳离子的不平衡吸收是根系释放质子的主要原因, 添加硝态氮可以减少蚕豆根系质子释放量。

**关键词** 硝态氮 蚕豆根系 质子释放 介质 pH 土壤酸化

中图分类号: S144 文献标识码: A 文章编号: 1671-3990(2010)05-0950-04

## Effect of nitrate concentration on proton release by faba-bean roots

MAO Jia<sup>1,2</sup>, XU Ren-Kou<sup>1</sup>, WAN Qing<sup>1,2</sup>, CHEN Rong-Fu<sup>1</sup>, LI Xing-Hui<sup>2</sup>, SHEN Ren-Fang<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture; Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2. Institute of Tea Science, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China)

**Abstract** In the effort to understand the mechanisms of enhanced soil acidification by legume plants, the effect of nitrate dose on proton release by the roots of faba-bean under medium pH conditions was analyzed in solution culture experiment and by automatic potentiometric titration at a constant pH. The results show that the roots of faba-bean release the largest amount of protons when no external nitrate source is available, inducing a drastic decline (1.93 units) in medium pH. The cumulative amount of released proton after ten incubations reaches  $37.5 \text{ mmol per gram dry-root}$ . With increasing nitrate concentration, the amount of released protons and change in medium pH decrease. When nitrate concentration increases to  $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , only a small amount of proton is released at the early stage of the culture experiment (in fact, some amount of  $\text{OH}^-$  is released at the later stage of the experiment). When there is no external nitrate or it is available at low levels, legume plants derive N from biological nitrogen fixation, leading to higher cation than anion uptake. Under this condition, plant roots release protons to ensure that the charges are well in balance. Results also indicate that protons in the culture solutions come mainly from direct releases by faba-bean roots. The effect of organic acid on the amounts of proton in the medium is generally negligible. Addition of nitrate can reduce  $\text{H}^+$  release by faba-bean roots.

**Key words** Nitrate, Faba-bean root, Proton release, Medium pH, Soil acidification

(Received Feb. 5, 2010; accepted April 20, 2010)

植物在正常生长发育过程中, 一方面通过根系的呼吸作用释放  $\text{CO}_2$ , 另一方面在对阴、阳离子的主动吸收和根尖细胞伸长过程中分泌质子和有机酸, 从而引起根际 pH 值的变化<sup>[1]</sup>。阴、阳离子吸收不平

衡是造成根际 pH 值改变的主要原因, 而引起阴、阳离子吸收不平衡的因素主要包括施用氮肥的形态、豆科植物的共生固氮、植物的营养状况及植物种类和品种的不同等。以共生固氮提供氮源的豆科植物

\* 国家自然科学基金项目(30821140538, 30872009)资助

\*\* 通讯作者: 徐仁扣(1965~), 男, 博士, 研究员, 主要从事土壤酸化及其调控研究。E-mail: rkxu@issas.ac.cn

毛佳(1983~), 女, 硕士研究生, 主要从事植物与土壤相互作用的研究。E-mail: maojia525@163.com

收稿日期: 2010-02-05 接受日期: 2010-04-20

在生长过程中根系会释放质子, 导致土壤酸化<sup>[2]</sup>。

根系的生长及养分吸收受到多种因素的影响, 根系释放的 H<sup>+</sup>可以活化碱性土壤中矿质养分, 增加其对植物的有效性<sup>[3]</sup>。但对酸性土壤, 根系质子释放会加速土壤酸化。多数植物吸收铵态氮后根系会分泌 H<sup>+</sup>, 使生长介质 pH 下降; 吸收硝态氮后会分泌 OH<sup>-</sup>, 使生长介质 pH 上升<sup>[4-6]</sup>。当植物根系吸收的阳离子多于阴离子时, 为保持植物体内的电荷平衡, 根系会主动释放质子<sup>[7]</sup>。豆科植物既可通过自身固氮获得氮素营养, 当有外源氮供应时, 又可直接吸收外源氮。这两方面因素均可对豆科植物根系质子的释放产生影响, 但两方面影响的相对大小还不清楚。虽然文献中已有豆科植物根系酸化土壤的研究报道, 但过去的研究大多通过观测根际或培养液 pH 变化来考察豆科植物的酸化作用<sup>[6-9]</sup>, 对质子释放量的研究较少。本文以蚕豆幼苗为例, 研究了不同硝态氮供应水平对豆科植物根系质子释放量的影响, 以期为酸性土壤地区种植制度的拟定和土壤酸化控制提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养试验

蚕豆种子购自江苏省南京市种子公司。种子用自来水冲洗干净, 放入垫有滤纸的玻璃培养皿中, 加入适量自来水(以浸没种子为宜)并放入恒温培养箱中催芽 48 h 后播于盛有沙土混合(沙 土=3 7)基质的育苗箱中, 置于日光温室中培养。约 2 周后, 待根部长到 20 cm 时将苗小心移出(避免根部损伤), 用自来水清洗根部, 再用去离子水清洗 3 次。此时肉眼可见根部出现许多根瘤, 挑选植株和根瘤长势基本一致的苗, 每 3 株为 1 组, 放入装有 1/4 营养液的 1 L 塑料桶中培养, 根部避光。营养液组成根据参考文献[10]略作修改( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ): CaCl<sub>2</sub>, 800; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 700; MgSO<sub>4</sub>, 500; FeNaEDTA, 10; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 4; MnCl<sub>2</sub>, 2; ZnSO<sub>4</sub>, 1; CuCl<sub>2</sub>, 1; CoCl<sub>2</sub>, 0.2; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0.1。当苗根部长出新小白根时, 将苗移至 4 个不同硝态氮水平(0、0.25 mmol · L<sup>-1</sup>、0.5 mmol · L<sup>-1</sup> 和 1.0 mmol · L<sup>-1</sup>)的完全营养液中继续培养。培养液的初始 pH 为 6.0。所有处理均设置 3 次重复, 置于人工气候箱中培养。白天(16 h): 25 °C、相对湿度 75%、光照 12 000 lx; 夜晚(8 h): 20 °C、相对湿度 100%。每天上午和下午各通气 3 h。

### 1.2 测定项目

培养两天后, 将苗移入另一新鲜培养液中继续培养, 原培养液用于测定 pH 和质子释放量, 此步骤重复 10 次。待 20 d 培养结束后, 收集部分培养液用

于有机酸测定。将植株收获, 收集根和地上部分, 用去离子水分别清洗干净后在 80 °C 下烘干、粉碎过 60 目筛。分别测定植株地上部和地下部的干重、总氮、K、Na、Ca、Mg 含量。

质子释放量用自动电位滴定仪测定<sup>[11]</sup>, 用 NaOH 将体系 pH 滴定到初始值 6.0, 消耗的碱量即为质子释放量; 植株总氮用碳氮分析仪测定; 将植株灰化, 再用酸溶解灰分<sup>[12]</sup>, 然后取 1 份植株灰化物的酸溶液, 用原子吸收分光光度法测定植株 Ca、Mg 含量, 火焰光度法测定 K、Na 含量<sup>[13]</sup>。当测定培养液的有机酸时, 将收集的营养液依次通过装有 5 mL Amberlite IR-120 型阳离子交换树脂和装有 2 g AG 1-X8 型阴离子交换树脂的离子交换柱, 保留在阴离子交换树脂中的有机酸用 2 mol · L<sup>-1</sup> HCl 洗脱后, 用旋转蒸发仪在 40 °C 下浓缩干燥, 最后用 1 mL 纯水溶解, 用 HPLC(LC-10AT VP, Shimadzu, Tokyo, Japan)测定其中的水溶性有机酸。

### 1.3 数据分析

采用 SPSS 15.0 统计软件对数据进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 水培过程中培养液 pH 的变化

培养试验过程中每两天更换 1 次营养液, 每次更换下来的营养液的 pH 见图 1。0、0.25 mmol · L<sup>-1</sup> 和 0.5 mmol · L<sup>-1</sup> 供氮水平下, 营养液与蚕豆根系作用后其 pH 均有不同程度下降, 硝态氮供应水平越高, pH 下降幅度越小。培养 1 次后硝态氮浓度为 0、0.25 mmol · L<sup>-1</sup> 和 0.5 mmol · L<sup>-1</sup> 时, pH 由 6.00 分别降到 4.31、4.53 和 4.84; 1.0 mmol · L<sup>-1</sup> 硝态氮水平下, 培养液 pH 变化很小。统计分析表明, 硝态氮浓度为 0、0.25 mmol · L<sup>-1</sup>、0.5 mmol · L<sup>-1</sup> 时, 培养液 pH 显著下降( $P<0.05$ ), 硝态氮浓度为 1.0 mmol · L<sup>-1</sup> 时, 培养液 pH 变化不显著。随后更换营养液继续培养过程中, 0.25 mmol · L<sup>-1</sup> 和 0.50 mmol · L<sup>-1</sup> 水平硝态氮处理的 pH 变化趋势相似; 当硝态氮浓度为 1.0 mmol · L<sup>-1</sup> 时, 第 8 次、第 9 次和第 10 次更换营养液后土壤 pH 有所增加, 说明根系释放了 OH<sup>-</sup>; 无外源氮供应培养 10 次时, pH 下降 1.93。

一些豆科植物通过根瘤固定空气中的 N<sub>2</sub>, 将 N<sub>2</sub> 还原成铵态氮后被植物吸收利用, 导致根系对阴离子的吸收量减小, 植物吸收的阴、阳离子不平衡, 根系分泌出较多质子, 降低了根际 pH 值<sup>[14]</sup>。这是图 1 中不供应外源氮时, 培养液 pH 下降幅度最大的原因。随外源硝态氮供应量的增加, 蚕豆对 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>的吸收量增加, 根系对阴、阳离子吸收的不平衡程度减小, 根系释放的质子量减小, 培养液 pH 的下降幅度

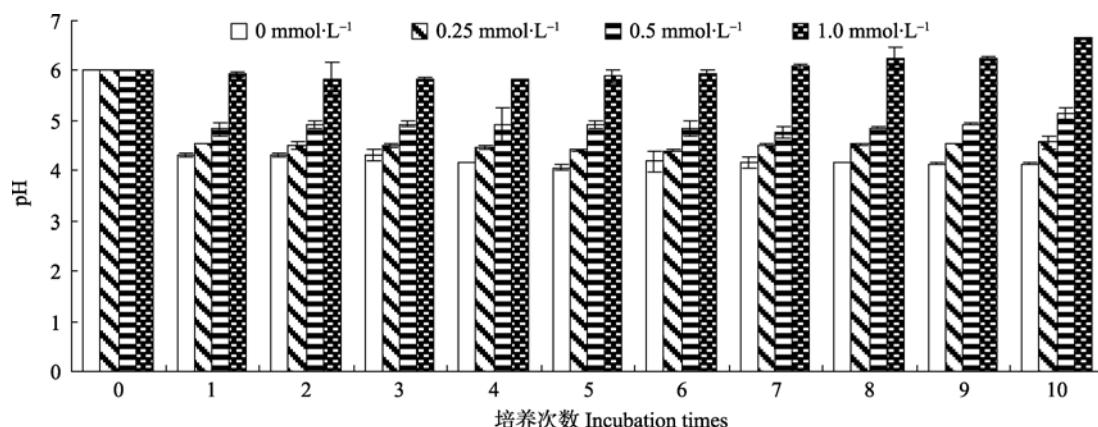


图 1 不同硝态氮水平下蚕豆营养液 pH 随培养次数的变化

Fig. 1 pH changes of nutrient solution for faba-bean with incubation times under different  $\text{NO}_3^-$  levels

减小。在培养试验后期, 蚕豆地上部分和地下部分生物量增加, 固氮能力增强, 根系释放的质子量增大, 培养液 pH 下降幅度增加。

## 2.2 水培试验中质子释放量的变化

培养试验中蚕豆根系质子累积释放量见图 2, 结果表明外源  $\text{NO}_3^-$  的供应水平对蚕豆根系的质子释放量有显著影响。不供应外源氮时, 蚕豆根系释放的质子量最高, 培养结束时的累积释放量为  $37.5 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ (根重)。随着外源  $\text{NO}_3^-$  浓度增加, 蚕豆根系质子释放量减少, 当培养液  $\text{NO}_3^-$  浓度分别为  $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 培养结束时质子的累积释放量分别为  $29.7 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ (根重) 和  $22.7 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ (根重)。当培养液  $\text{NO}_3^-$  浓度为  $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 培养试验前期有少量质子释放, 但培养试验后期有  $\text{OH}^-$  释放, 培养试验结束时累积结果为  $\text{OH}^-$  释放(图中负值表示  $\text{OH}^-$  释放量)。统计分析表明, 不同硝态氮处理蚕豆根系质子释放量之间存在显著差异( $P<0.01$ )。

本研究中测定的培养液中的质子量, 既可以是根系直接释放的质子, 也可能是蚕豆根系释放的有

机酸解离出的质子。为区分 2 种机制对质子释放量的贡献, 用高效液相色谱法测定了培养试验结束后培养液中的有机酸含量。试验结果表明, 4 种硝态氮水平处理培养液中均未检测出有机酸(试验数据未列出)。说明本试验中, 培养液中的质子主要来源于植物根系直接释放的质子, 蚕豆根系通过释放有机酸对培养液中质子的贡献可以忽略。

## 2.3 培养结束后植株地上部分和地下部分性状

培养试验结束后蚕豆植株地上部和地下部生物量及总氮含量见表 1。结果表明, 蚕豆地上部和地下部生物量均随硝态氮供应量的增加而增加。蚕豆地上部总氮含量也呈相似变化趋势, 说明外源氮供应有利于豆科植物生长和氮素积累。当有外源氮供应时, 蚕豆地下部总氮含量也随硝态氮供应量的增加而增加, 但无外源氮供应时, 蚕豆地下部总氮含量高于  $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  硝态氮处理, 与  $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的硝态氮处理相似。比较植株地上部和地下部总氮含量发现, 有外源氮供应时两者之间差别不大, 但无外源氮供应时, 蚕豆地下部总氮含量比地上部高得多。这些结果说明, 当无外源氮供应时, 蚕豆主要利用根部根瘤的生物固氮获取氮素营养。

表 1 表明, 培养结束后植株 K、Ca、Mg 等盐基性养分含量基本随外源硝态氮供应量的增加而增加, 说明植物根系对阴、阳离子的吸收具有相互促进作用, 因为阴、阳离子的同时吸收, 容易保持植物体内的电荷平衡, 达到电中性状态。即使在没有外源氮供应的情况下, 蚕豆植株也积累了大量 K、Ca 和 Mg 等盐基性养分离子。此时, 一方面蚕豆利用根瘤固氮获得氮素营养, 对阴离子的吸收减少; 另一方面, 吸收大量 K、Ca、Mg 等阳离子, 导致蚕豆根系对阴、阳离子的吸收不平衡, 为保持体内的电荷平衡, 蚕豆根系向生长介质中释放大量  $\text{H}^+$ , 导致介质 pH 下降。

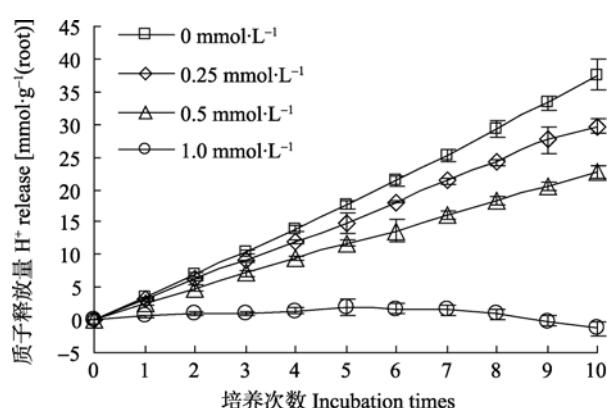


图 2 培养过程中不同硝态氮水平下蚕豆根系质子累积释放量

Fig. 2 Cumulative amount of released proton from faba-bean roots under different  $\text{NO}_3^-$  levels

表1 培养结束后蚕豆地上部分和地下部分生物量、Ca、Mg、K及总氮含量  
Tab. 1 Biomass, and contents of Ca, Mg, K and N of shoots and roots of faba-bean after incubation

$\text{NO}_3^-$ 浓度 $\text{NO}_3^-$ concentration ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	地上部分 Shoots					地下部分 Roots				
	生物量 Biomass (g)	Ca ( $\text{cmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	Mg ( $\text{cmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	K ( $\text{cmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	总氮 Total N ( $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	生物量 Biomass (g)	Ca ( $\text{cmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	Mg ( $\text{cmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	K ( $\text{cmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	总氮 Total N ( $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )
0	4.22	29.6	12.6	73.6	25.2	3.20	13.4	5.2	65.3	34.5
0.25	5.09	34.9	13.6	74.0	30.3	3.28	12.7	6.1	67.0	31.1
0.5	5.32	36.5	13.7	95.8	34.6	3.40	18.2	6.1	68.1	35.1
1.0	5.59	42.1	15.8	97.2	40.0	3.79	17.3	6.7	73.3	40.9

### 3 讨论

根系作为蚕豆重要的吸收器官和代谢器官,与地上部关系密切,根系生长状况直接控制着蚕豆根系吸收水分和养分的能力,还制约着蚕豆地上部生长和发育<sup>[15]</sup>;另一方面,植物生长过程中通过根系分泌向生长介质释放有机和无机物,并对介质的理化性质产生重要影响。硝态氮促进植物根系的生长和发育,且豆科植物对硝态氮和盐基性养分离子的同时吸收,能够维持体内电荷平衡,满足正常生长对细胞pH值的要求。在这一条件下,植物根系向介质释放的 $\text{H}^+$ 或 $\text{OH}^-$ 数量很小,对介质酸碱性的影响不大。当外源硝态氮贡献很少或不贡献外源硝态氮时,蚕豆利用生物固氮获取氮素营养,这时由于根系对阴、阳离子的不平衡吸收,导致大量 $\text{H}^+$ 的释放,使介质pH下降,介质酸度增加。有人认为,根系分泌有机酸是导致生长介质酸化的主要原因<sup>[16]</sup>。本研究表明,在酸性条件下蚕豆根系直接释放质子是介质pH降低的主要原因,有机酸对介质酸化的贡献可以忽略。

从研究结果可以推论,当豆科植物利用生物固氮获取氮源时,它对土壤有很高的酸化能力,对提高碱性土壤中难溶性矿质养分的生物有效性、改良盐碱土十分有益<sup>[17]</sup>;但对酸性土壤,这一过程将加速土壤的进一步酸化,对植物生长和生态环境带来不利影响。一项长期田间定位试验的研究结果表明,羽扇豆-小麦轮作比小麦-小麦轮作对土壤酸化的加速作用更大<sup>[18]</sup>,与本研究结果一致。因此,在酸性土壤上种植豆科植物时,适当施用硝态氮肥可以降低植物根系释放质子的数量,减缓其对土壤的酸化作用。当然,这也有待下一步盆栽试验和田间试验的进一步验证。

### 参考文献

- [1] 张福锁. 植物根引起的根际pH值改变的原因及效应[J]. 土壤通报, 1993, 24(1): 43-45
- [2] Robson A D. Soil acidity and plant growth[M]. Sydney, Australia: Academic Press, 1989: 61-101
- [3] 乔云发, 苗淑杰, 韩晓增. 氮素形态对大豆根系形态性状及释放 $\text{H}^+$ 的影响[J]. 大豆科学, 2006, 25(3): 265-269
- [4] 孙亚卿, 邵金旺, 王莹, 等. 氮素形态对燕麦生长和根际pH值的影响[J]. 华北农学报, 2004, 19(3): 59-61
- [5] Hinsinger P, Plassard C, Tang C, et al. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review[J]. Plant and Soil, 2003, 248: 43-59
- [6] Raven J A, Smith F A. Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation[J]. New Phytologist, 1976, 76: 415-431
- [7] Gjsman A J. Rhizosphere pH along different root zones of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) as affected by source of nitrogen[J]. Plant and Soil, 1990, 124: 161-167
- [8] Javis S C, Robson A D. A comparison of the cation/anion balance of ten cultivars of *Trifolium subterraneum* L. and their effects on soil acidity[J]. Plant and Soil, 1983, 75: 235-243
- [9] Liu W C, Lund L J, Page A L. Acidity produced by leguminous plants through symbiotic dinitrogen fixation[J]. Journal of Environmental Quality, 1989, 18: 529-534
- [10] Sas L, Rengel Z, Tang C. Excess cation uptake, and extrusion of protons and organic acid anions by *Lupinus albus* under phosphorus deficiency[J]. Plant Science, 2001, 160: 1191-1198
- [11] Tang C, Drevon J J, Jaillard B, et al. Proton release of two genotypes of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by N nutrition and P deficiency[J]. Plant and Soil, 2004, 260: 59-68
- [12] Slattery W J, Ridley A M, Windsor S M. Ash alkalinity of animal and plant products[J]. Australian Journal of Experimental Agriculture, 1991, 31: 321-324
- [13] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000
- [14] Tang C, McLay C D A, Barton L. A comparison of proton excretion of twelve pasture legumes grown in nutrient solution[J]. Australian Journal of Experimental Agriculture, 1997, 37: 563-570
- [15] 马新明, 王志强, 王小纯, 等. 氮素形态对不同专用型小麦根系及氮素利用率影响的研究[J]. 应用生态学报, 2004, 15(4): 655-658
- [16] 王兴祥, 李清曼, 曹慧, 等. 关于植物对红壤的酸化作用及其致酸机理[J]. 土壤通报, 2004, 35(1): 73-77
- [17] Qadir M, Steffens D, Yan F, et al. Proton release by  $\text{N}_2$ -fixing plant roots: A possible contribution to phytoremediation of calcareous sodic soils[J]. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 2007, 166: 14-22
- [18] Xu R K, Coventry D R, Farhoodi A, et al. Soil acidification as influenced by crop rotations, stubble management and application of nitrogenous fertilizer, Tarlee, South Australia[J]. Australian Journal of Soil Research, 2003, 40: 483-496