

# 两种形态氮源条件下磷对大豆结瘤固氮的影响<sup>\*</sup>

苗淑杰<sup>1, 2</sup> 乔云发<sup>1</sup> 韩晓增<sup>1</sup>

(1. 中国科学院东北地理与农业生态研究所, 哈尔滨 150040;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要** 用营养液培养大豆 7 周, 研究两种氮源条件下, 磷对大豆结瘤固氮的影响。在本试验的各取样时期, 随营养液中磷水平的增加, 生物固氮植株的根瘤数增加较多, 尤其是处理后第 6 周, 磷对根瘤形成的影响最大。磷对硝态氮处理根瘤数的影响不大, 但本试验条件下, 在  $16\mu\text{mol/L}$  磷水平, 根瘤数较多。硝态氮处理根瘤数远没有生物固氮处理多, 表现出氮素对大豆结瘤的抑制作用, 导致根瘤固定的氮量减少。因此, 硝态氮植株体内含氮量随磷水平的增加而降低, 而生物固氮植株增加。生物固氮处理根中  $\text{N/P}$  与根瘤数之间存在显著的负相关关系,  $r = -0.5816^*$ , 硝态氮处理根中  $\text{N/P}$  与根瘤数之间不相关。

**关键词** 磷; 氮源; 结瘤固氮; 大豆

**中图分类号** S 565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2006)03-0250-04

磷在豆科作物生长发育及与根瘤菌的共生固氮中起着重要的作用<sup>[1]</sup>, 一方面, 磷是构成作物体多种重要有机化合物的组成成分, 另一方面, 磷是固氮酶的结构物质和酶促反应中的能源。作物根以正磷酸盐( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 、 $\text{HPO}_4^{2-}$  和  $\text{PO}_4^{3-}$ ) 形式, 主要是  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  从土壤中吸收磷素营养<sup>[2]</sup>。但是, 世界上绝大多数农业土壤缺磷, 我国农田中约 2/3 的土壤严重缺磷<sup>[3]</sup>。这主要是因为酸性土壤中磷酸盐与铁铝氧化物结合; 碱性条件下与碳酸钙结合形成难溶态磷<sup>[4, 5]</sup>, 植物不能吸收利用, 出现土壤磷素的“遗传学缺乏”现象<sup>[3]</sup>。缺磷成为豆科作物生长发育和结瘤固氮的重要限制因子, 尤其在根瘤的能量代谢过程中, 磷素发挥着非常重要的作用<sup>[6]</sup>, 磷在大豆结瘤固氮中的作用非常复杂, 至今仍是国内外研究磷素营养过程的一个重要而且复杂的难题。

豆科作物-根瘤菌是根际微生态系统中一类特殊的作物-微生物共生体, 豆科作物-根瘤菌的这种共生固氮过程受多种环境因素影响, 其中生长介质中的氮素对生物固氮过程的影响较大。硝态氮是影响豆科作物共生固氮的重要因素, 较高的硝态氮影响根瘤皮层内  $\text{O}_2$  的扩散, 最终导致根瘤呼吸速

率和固氮酶活性降低<sup>[8]</sup>, 同时又会抑制豆科作物结瘤信号物质类黄酮的合成和积累, 从而抑制根瘤菌与豆科作物间的识别和侵染<sup>[9]</sup>。生长介质中不同形态氮源对大豆结瘤固氮的影响和硝态氮对花生结瘤固氮的影响已有报道<sup>[7, 10]</sup>。硝酸根离子抑制共生固氮(Streeter, 1988), 但是很难确定共生固氮的哪一个过程受到影响。生物量在根和根瘤中的分布也受硝酸根的影响, 这方面的报道较多<sup>[11-13]</sup>。本文利用水培技术, 以硝态氮( $\text{NO}_3^- \text{N}$ )和生物固氮( $\text{N}_2$ )为两种形态氮源, 研究大豆结瘤固氮对缺磷的适应性反应机制, 揭示大豆根瘤生长和植株氮磷含量对缺磷的反应。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验设计

供试大豆品种为黑农 35。试验设 2 种形态氮源和 4 个磷水平的 8 个处理, 3 次重复, 随机排列。两种形态氮分别为生物固氮和硝态氮。移栽时生物固氮的处理接种根瘤菌合丰 25, 根瘤菌密度  $105\text{cell/L}$ , 4 天后再接一次根瘤菌悬液, 以后换为无根瘤菌营养液; 硝态氮处理, 移栽后第二周开始加入

\* 收稿日期: 2005-09-26

项目来源: 中科院知识创新项目(KZCX1-SW-19-2)和中科院百人计划项目

作者简介: 苗淑杰(1976-), 女, 中科院在读博士, 主要从事植物营养方面研究。E-mail: miaoshujie@126.com

通讯作者: 韩晓增研究员, 电话: 0451-86602940 E-mail: xzhan@cern.ac.cn

1 mmol/L  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 。以  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  为磷源, 4 个磷水平分别为 1, 4, 16 和 50  $\mu\text{mol/L}$ 。

## 1.2 大豆培养

大豆种子用 70% 乙醇灭菌, 以无菌水冲洗 7~8 次, 放入带有 5~7 mm 孔径的塑料板上, 然后放入盛有 1 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  和 5  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , pH 为 5.0~5.5 的塑料桶中, 桶中液面恰好浸没种子一半。25~30  $^\circ\text{C}$  条件下, 避光催芽, 待主根长 4~5 cm, 须根尚未长出时, 移栽, 6 株/盆, 用脱脂棉将豆苗固定住, 24 小时连续通气供氧。整个试验过程都用蒸馏水。将 5L 蒸馏水放入 5L 盆中。一定容积的营养液加入单个盆中, 营养液组成 ( $\mu\text{mol/L}$ ),  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 600;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 200;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 600;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 5;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.75;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1;  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.2;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.2;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.03;  $\text{Fe} - \text{NaEDTA}$ , 10。移栽后每周更换营养液 2 次, 每天用 0.01 mol/L  $\text{HCl}$  或 0.01 mol/L  $\text{NaOH}$  调营养液 pH 为 5.0~6.0。

## 1.3 分析测定方法

磷处理后第 4 周开始取样, 每隔 7 天取样一次, 直到第 7 周。每次取样时, 将整株大豆用 0.1 mol/L 的  $\text{HCl}$  蘸洗一次, 再用蒸馏水洗两次。然后, 将植株分为地上、根和根瘤三部分, 分别测定鲜重、干重、根瘤数。再将所有的部分在 105  $^\circ\text{C}$  杀青 30 min, 调至 80  $^\circ\text{C}$  烘干, 备用氮磷分析。全氮用凯氏定氮仪测定, 磷用钼锑抗比色法测定(鲁如坤, 2000)<sup>[14]</sup>。

# 2 结果与分析

## 2.1 根瘤数

生物固氮的处理, 处理后第 4 周, 磷对根瘤数的影响较小(图 1)。从第 5 周开始, 磷对大豆结瘤的促进作用增大, 尤其是处理后的第 6 周, 根瘤数在 P3 水平达到最大, P3 比 P2 处理根瘤数增加了 64.7%。处理后第 7 周, 根瘤数与磷水平呈显著正相关( $r=0.9771^{**}$ ), 根瘤数在 P4 水平比 P1 增加了 88.7%, 但仍不如第 6 周 P3 处理根瘤数多。可见, 本试验的磷水平条件下, 50  $\mu\text{mol/L}$  P 仍未满足大豆根瘤形成对磷的需求。硝态氮处理, 4 次取样的结果均表现出, P3 水平根瘤数最多。在 4 个取样时期, P3 处理比 P1、P2 和 P4 处理根瘤数分别增加了 537.5%、264.3%、30.8%; 66.7%、61.8%、71.9%; 96.6%、159.1%、29.5% 和 134.8%、92.9%、41.9%。表明, 在硝态氮处理中, P3 水平已

满足大豆结瘤对磷素的需求, 磷水平再增加, 对大豆结瘤反而有抑制作用。各个取样时期, 生物固氮处理的根瘤数明显比硝态氮处理多, 最大根瘤数相差 95 个/株。本试验的结果充分体现了硝态氮对结瘤的抑制作用, 且磷水平越高抑制作用越大。

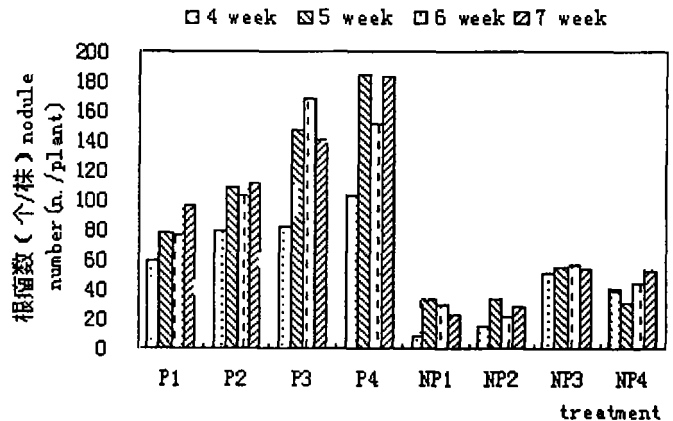


图 1 磷对根瘤数的影响

Fig. 1 The effect of P on nodule number

## 2.2 磷对含氮量的影响

磷处理后第 4 周, 生物固氮处理植株地上部含氮量随磷水平的增加逐渐增加(图 2), 从 P1 到 P3 水平, 增加了 44.6%。5 周后, 大豆地上部含氮量受磷的影响较小。处理后第 7 周, 增加 P 促进大豆根瘤生长, 固氮能力增强, 因此, 高磷水平时, 地上部含氮量略有增加, 地上部生长随之加快。比较而言, 在所有取样时期, 随磷水平的增加, 硝态氮处理植株含氮量都逐渐降低。处理后第 4 周, 地上部含氮量降低的程度最大, 从 P1 到 P3 水平, 含氮量降低了 26.9%。表明, 硝态氮处理由于有充足的氮素供应, 随 P 水平的增加, 促进植株生长, 消耗体内氮素导致前期含氮量降低得较明显, 而在后期, 由于植株生长需氮量增加, 营养液中供给的氮量并没有增加, 生长受到限制, 体内含氮量降低的程度变小。

## 2.3 磷对氮磷比的影响

从图 3 和图 4 可看出, 大豆地上部和根中的 N/P 具有明显的规律性。在所有取样时期, 生物固氮处理地上部和根中的 N/P 都随着磷水平的增加而降低, 而硝态氮处理地上部 N/P 在 P2 水平达到最大, 根中 N/P 在 P1 水平达最大。比较而言, 生物固氮处理植株体内的 N/P 随时间变化没有明显的规律性, 而硝态氮处理随时间延长 N/P 增加, 地上部和根中的最大 N/P 分别比第一周增加了 90.8%、94.9% 和 167.7%; 245%、212% 和 211%。

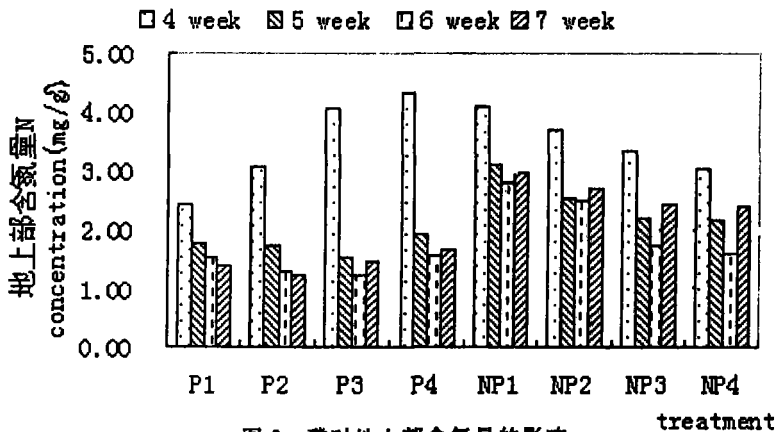


图 2 磷对地上部含氮量的影响  
Fig. 2 The effect of P on N concentration P on shoot

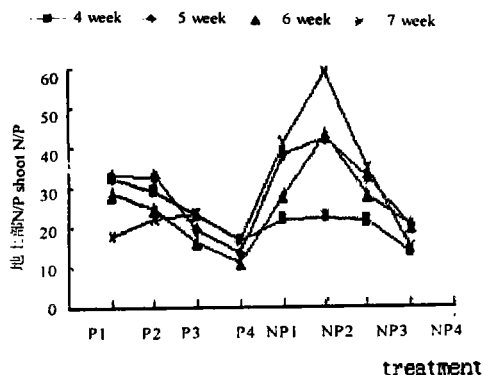


图 3 磷对地上部 N/P 的影响  
Fig. 3 Effects of on N/P in shoot

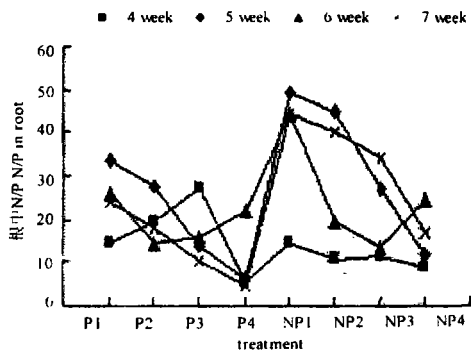


图 4 磷对根中 N/P 的影响  
Fig. 4 Effects of P on N/P in root

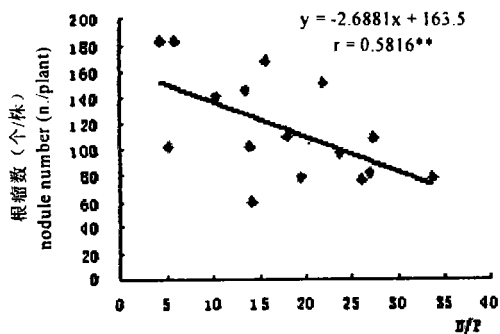


图 5 生物固氮处理根中 N/P 与根瘤数的关系  
Fig. 5 The relationship between nodule number and N/P in  $N_2$ -fixtion treatment

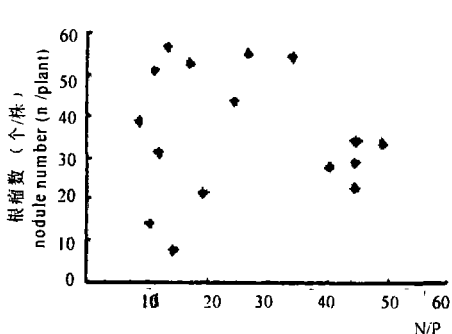


图 6 硝态氮处理根中 N/P 与根瘤数的关系  
Fig. 6 The relationship between nodule number and N/P in nitrate treatment

2.4 根中 N/P 与结瘤的关系

生物固氮处理根中的 N/P 与根瘤数间存在显著的负相关关系,  $r = 0.5816^*$  (图 5), 而硝态氮处理根中的 N/P 与根瘤数之间没有明显的关系 (图 6)。该结果表明, 对大豆 - 根瘤菌的共生体系, 根中的 N/P 直接影响着根瘤的形成, 而硝态氮处理根中的 N/P 对根瘤形成的影响不大。

3 讨论

磷元素可以刺激根瘤菌繁殖, 促使根瘤菌鞭毛运动, 有利于根瘤菌接近和侵入根毛, 形成根瘤<sup>[15]</sup>。因此, 本试验条件下, 高磷处理的根瘤数明显较高 (图 1)。而磷供应不足会导致氮素缺乏, 出现缺氮

症状, 本试验的生物固氮处理比硝态氮处理叶色黄, 但随着生物固氮处理根瘤的形成、发育和具有了固氮活性, 叶色逐渐恢复。磷的另外一个作用是促进大豆体内蛋白质的合成, 在高磷水平, 生物固氮处理的含氮量并不比低磷处理的高, 这是因为根瘤固定的氮一部分被宿主吸收利用合成了蛋白质, 防止了可溶性氮化合物积累, 同时使固氮过程处于活跃状态, 保证了稳定的固氮能力。如果植株体内的含氮量过高将抑制固氮过程, 所以, 生物固氮处理根中的 N/P 与根瘤数存在显著的负相关关系, 进而影响固氮能力。但硝态氮处理的根瘤数明显比生物固氮处理的少, 增加营养液中磷水平, 对根瘤形成的影响并不十分明显, 根中的 N/P 也与根瘤数不相关。硝酸根离子抑制共生固氮<sup>[16]</sup>, 但是很难确定共生固氮的那一个过程受到影响。可能是固氮酶活性, 或作物生长, 或保持根瘤的生长过程受到影响。而且, 硝态氮还原的中间产物  $\text{NO}_2^-$  对根瘤的着生和膨大不利, 并且对固氮酶呈现不可逆的抑制<sup>[17]</sup>。

## 参 考 文 献

- 1 Carrol P, Vance. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource[ J ]. *New Phytologist*, 2003, 157: 423 – 447.
- 2 Raghothama K G. Phosphate acquisition[ J ]. *Annual Review of plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1999, 50: 665 – 693.
- 3 吴平, 印莉萍, 张立平, 等. 植物营养分子生理学[ M ]. 北京: 科学出版社, 2001, 103 – 105.
- 4 Matar A, Tonent J, Ryan J. Soil and fertilizer phosphorus and crop responses in the dryland Mediterranean zone[ J ]. *Advances in Soil Science*, 1992, 18: 81 – 146.
- 5 Comerford N B. Soil phosphorus bioavailability[ M ]. In: Lynch JP Deikman J, eds. *Phosphorus in plant biology: regulatory*

- roles in molecular, cellular, organic and ecosystem processes [ J ]. Rockville, MD, USA: American Society of Plant Physiology, 1998, 136 – 147.
- 6 Tong Min Sa, Israel D W. Energy Status and Functioning of phosphorus deficient soybean nodules[ J ]. *Plant Physiol*, 1997, 97: 928 – 935.
- 7 左元梅, 刘永秀, 张福所.  $\text{NO}_3^-$  态氮对花生结瘤与固氮作用的影响[ J ]. *生态学报*, 2003, 4: 21 – 26.
- 8 Vadez V, Rodier F, Payre H, Drevon J J. Nodule permeability to  $\text{O}_2$  and nitrogenase – linked respiration in bean genotypes varying in the tolerance of  $\text{N}_2$  fixation to P deficiency[ J ]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 1996, 34: 871 – 878.
- 9 Dakora D F. A functional relationship between leghaemoglobin and nitrogenase based on novel measurements of the proteins in legume root nodule[ J ]. *Annal of Botany Canpany*, 1995, 15: 49 – 54.
- 10 刘莉, 周俊初, 陈华葵. 不同形态的氮对大豆结瘤和固氮的影响[ J ]. *中国农业科学*, 1998, 31(4): 87 – 89.
- 11 Atkins C A, Pate J S, Griffiths G J, White S T. Economy of carbon and nitrogen in nodulated and nonnodulated (  $\text{NO}_3^-$  grown ) cowpea ( *Vigna unguiculata* L. Walp)[ J ]. *Plant Physiology*, 1980, 66: 978 – 983.
- 12 Pate J S, Layzell D B, Atkins C A. Economy of carbon and nitrogen in a nodulated and non nodulated (  $\text{NO}_3^-$  grown ) legume[ J ]. *Plant Physiology*, 1979, 64: 1083 – 1088.
- 13 Ryle G J A, Powell C E, Gordon A J. The respiratory costs of nitrogen fixation in soybean, cowpea and white clover. II. Comparison of nitrogen fixation and the utilization of combined nitrogen[ J ]. *Journal of Experimental Botany*, 1979b, 30: 145 – 153.
- 14 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, 312 – 314.
- 15 董钻. 大豆产量生理[ M ]. 北京: 中国农业出版社, 1999, 97 – 98.
- 16 Streeter J. Inhibition of legume nodule function and  $\text{N}_2$  fixation by nitrate[ J ]. *CRC Crit Rev Plant Sci*, 1988, 7: 1 – 23.
- 17 Francesco G, Keratin H. Local and systemic effects of phosphorus and nitrogen on nodulation and nodule function in *Alnus incana* [ J ]. *Journal of Experimental Botany*, 2003, 54: 2757 – 2767.

## EFFECTS OF P DEFICIENCY ON NODULATION AND FUNCTION IN SOYBEAN UNDER TWO DIFFERENT N SOURCES

Miao Shujie<sup>1,2</sup> Qiao Yunfa<sup>1</sup> Han Xiaozeng<sup>1</sup>

(1. *Northeast Institute of Geography and Agricultural Ecology, CAS, Harbin 150040;*  
2. *Graduate College, CAS, Beijing, 100049*)

**Abstract** Soybean, grown in solution culture for 7 weeks, had been used to study the effect of P on nodulation under two nitrogen sources. At all harvest time, nodule number of nitrogen fixation increased with P supply in solution further increased, especially, at 6th week, nodule number reached a maximum. In contrast, that of nitrate treatment was less than that of nitrogen fixation treatment, but (下转第 258 页)

究得出以下结论:使豆浆变质的主要腐败微生物为三种细菌,未检出酵母和霉菌,其中,三种细菌均为革兰氏阴性菌;对三种细菌所产生的腐败气味进行感官评定发现,2号细菌是变质豆浆产生酸败味的主要原因。对最难被121℃高温灭菌杀灭及最难被Nisin抑制的1号细菌研究表明,该细菌的杀灭效果受灭菌时间和Nisin添加量的影响,其中灭菌时间的影响大于Nisin添加量,121℃灭菌30min,并且添加300mg/kg可使该细菌在豆浆中37℃下被抑制30d,但不能超过45d。

为了优化工业化豆浆的保质方法,降低规模化生产豆浆的成本,同时尽可能多地保留豆浆中的营养成分,需要对所分离的腐败细菌进行鉴定,并研究它们在豆浆中的生理生化特性,本研究小组的下一阶段应尝试利用分子生物学手段快速、准确地鉴定所本次实验所分离的腐败细菌,并进一步改进杀灭这些细菌的杀菌方式。

## 参 考 文 献

- 1 周显青.食用豆类加工与利用[M].北京:化学工业出版社,2003,2-6.
- 2 国家食物与营养咨询委员会科技部.大豆产业最新动态与大豆行动计划[M].北京:中国科学技术出版社,2000,9-10.
- 3 李博,李里特,辰巳英三,等.豆腐(豆浆)中屎肠球菌生长的温度预测模型[J].中国农业大学学报,2003,8(2):49-54.
- 4 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001,205-207.
- 5 中华人民共和国卫生部卫生监督中心卫生标准处.中华人民共和国国家标准.食品卫生国家标准汇编(6)[S].北京:中国标准出版社,2004,256-266.
- 6 吴有炜.试验设计与数据处理[M].江苏:苏州大学出版社,2002:27-31.
- 7 Kwok K C, Liang H H, Niranjana K. Optimizing conditions for thermal process of soy milk[J]. J Agri Food Chem., 2002, 50(17): 4834-4838.
- 8 Gandhi N R, Hackbarth H R, Manxiang C. Soy protein containing imitation dairy compositions and methods of making[P]. US 6984409, 2004.
- 9 刘喜荣,回九珍. Nisin在延长豆奶保质期方面的研究[J]. 食品科学, 2001, 22(9): 82-83.
- 10 曹阳,查思辉,富春江,等.乳酸链球菌素在鲜奶中的应用[J]. 饮料工业, 2004, 7(2): 8-10.

## RESEARCH ON SEPARATION AND STERILIZATION CONDITION OF PUTRID MICROORGANISMS IN TRANSMUTATIVE SOY MILK

Wang Liping Chen Yourong Qi Fenlan

(College of Food Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090)

**Abstract** In this paper, putrid microorganisms were separated from five transmutative commercial soy milk samples. The result indicated that putrid microorganism were mainly consisted of three bacteria, no yeast and mould were detected. With re-sterilized soy milk as medium, by means of  $L_9(3^2)$  orthogonal experiment, sterilization condition for the strongest capacity strain of the three separated bacteria was determined: 121℃ for 30min, 300mg/kg Nisin. With the determined sterilization method, when soy milk stored for 30 days under 37℃, no bacterium was detected, but the amount of bacterium exceeded 100 cfu/mL on the 45th day.

**Key words** Soy milk; Putrid microorganism; Orthogonal experiment; Sterilization condition

(上接第253页)

nodule number reach a maximum at  $16\mu\text{mol/L}$  P. These suggested that nitrate inhibited soybean nodulation so that nitrogen fixed decreased. Therefore, nitrogen concentration of plant in nitrate treatment decreased with P further increased, but that of nitrogen fixation is opposite. The ration of N and P in roots of nitrogen fixation treatment had a significant relationship,  $r = -0.5816^*$ , but that of nitrate treatment was not correlated.

**Key words** Phosphorus; Nitrogen; Nodulation; Soybean