

磷肥对紫花苜蓿再生过程中根茬组织非结构性碳水化合物利用的影响

姜慧新^{1,2}, 沈益新^{1*}, 翟桂玉², 刘信宝¹, 原培勋²

(1. 南京农业大学动物科技学院, 江苏 南京 210095; 2. 山东省畜牧总站, 山东 济南 250022)

摘要:田间试验研究了施磷肥对紫花苜蓿再生过程中主根、根冠和残茬中非结构性碳水化合物(NSC)贮存量变化的影响。结果表明,紫花苜蓿 NSC 主要贮存在主根和根冠部,主根和根冠中的淀粉是再生过程中被利用最多的 NSC。施磷肥显著提高了刈割时主根和根冠部淀粉的贮存量,270 kg P₂O₅/hm²处理的植株主根和根冠部淀粉贮存量分别比 0 kg P₂O₅/hm²处理的植株高 73.5% 和 31.1%;施磷肥处理提高了主根中 α-淀粉酶的活性,加快了主根和根冠部贮存淀粉在再生早期的降解,提高了主根和根冠部淀粉转化为再生生物量的效率,促进了休眠芽的萌发和新生茎的生长。270 kg P₂O₅/hm²处理的植株刈割后 13 d 的每株再生生物量极显著高于不施磷处理的植株 (P<0.01)。结果说明,紫花苜蓿主根和根冠部贮存的 NSC 是再生的主要营养源;施磷肥通过提高紫花苜蓿根茬组织中 NSC 的贮存量和利用效率,为刈割后的早期再生提供充足的养分,从而加快紫花苜蓿的再生。

关键词:磷肥;紫花苜蓿;根;非结构性碳水化合物;α-淀粉酶

中图分类号:S551+.706;Q945 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-5759(2009)03-0136-06

* 牧草在刈割后,植株失去了进行光合作用的主要器官,再生初期所需的物质和能量主要依赖于残留组织中贮存的碳水化合物。因此,根茬中的碳水化合物含量或总量对再生起重要作用^[1,2]。戎郁萍等^[1]对新麦草(*Pseudostachys perennis*)的研究表明,刈割后的再生速度与分蘖节中的总可溶性糖含量密切相关;对多年生黑麦草(*Lolium perenne*)的研究发现,残茬中水溶性碳水化合物(WSC)含量与再生能力显著正相关^[3];王静等^[4]对冷蒿(*Artemisia frigida*)的研究也表明,冷蒿残留组织中 WSC 总量与再生生长显著相关。一些多年生豆类的研究结果表明,根和茎的贮存碳水化合物对再生具有重要影响。紫花菜豆(*Macroptilium lathyroides*)根部的淀粉含量^[5],白三叶(*Trifolium repens*)匍匐茎中的淀粉含量^[6],以及紫花苜蓿(*Medicago sativa*)主根中的 NSC 含量^[7]均与其刈割后的再生密切相关。

植物体内碳水化合物的贮存和利用受基因、管理及营养等因素的影响。其中,营养因素通过改变植株的生长而影响碳水化合物的贮存。磷是豆科植物最重要的营养元素之一,它组成了植物体内的许多重要化合物,如核酸、辅酶 I (NAD)、辅酶 II (NADP)等。这些化合物在光合作用、碳水化合物与蛋白质合成等生理过程中起着极其重要的作用。一些施磷肥试验的研究表明,充足的磷可以增加紫花苜蓿的叶面积指数,提高叶绿素含量^[9],增强光合作用,并促进返青和刈割后的再生^[8,9],提高每茎干物质质量和单产^[10]。

本研究观测和分析了不同施磷肥量处理下,紫花苜蓿的再生速度与再生初期根茬组织中 NSC 贮存量及利用率间的关系,从紫花苜蓿再生过程中根茬 NSC 利用率的角度,探讨了磷肥在紫花苜蓿再生过程中的作用机理。

1 材料与方法

1.1 试验地自然概况

试验在山东省齐河县畜牧科技示范园(北纬 36.76°,东经 116.76°)内进行。该地区年均温 12.9℃,无霜期 197 d,≥10℃的年积温 4 350℃;年均日照 2 660 h。沙壤土,pH 值为 7.99,有机质含量为 3.41 g/kg,全氮 0.62 g/kg,全磷 0.49 g/kg。

* 收稿日期:2008-07-07;改回日期:2008-09-08

基金项目:山东省农业良种产业化项目(2005LZ13-03,2006LZ12-03)资助。

作者简介:姜慧新(1974-),女,浙江金华人,高级畜牧师,在读博士。E-mail: jhx232@sina.com

* 通讯作者。E-mail: yxshen@njau.edu.cn

1.2 试验材料

紫花苜蓿为百绿集团提供的三得利(Sanditi)品种,磷肥为普通过磷酸钙(贵州省龙里龙山产, $P_2O_5 \geq 16\%$)。

1.3 试验设计

田间试验采用完全随机区组设计,设 0, 90, 180 和 270 kg P_2O_5/hm^2 4 个施磷肥处理,分别记为对照、处理 1、处理 2 和处理 3, 3 次重复。磷肥在播种前行间开沟一次性施入。小区面积 4 m \times 2 m;小区间隔 0.5 m。

1.4 播种和田间管理

紫花苜蓿于 2006 年 9 月 23 日 30 cm 行距条播,播种量 22.5 kg/ hm^2 。出苗后常规田间管理。

1.5 取样和实验室分析

2007 年 5 月 3 日初花期第 1 茬刈割,留茬 5 cm。分别于刈割后 0, 2, 5, 9 和 13 d, 每次每小区 1 行连续挖取 10 株,测定新生芽(茎)数和新生芽(茎)干重;并以根茎交界处上下 1 cm 为界,分为残茬(取根冠部以上 4 cm)、根冠和主根(取根冠部以下 4 cm)三部分,液氮快速冷冻, -20 $^{\circ}C$ 保存,用于测定主根、根冠和残茬中淀粉和可溶性糖含量及淀粉酶活性。

淀粉酶原液的提取参照 Gallagher 等^[6]和 Li 等^[11]介绍的方法进行。称取冻样 1 g 左右,剪碎,加石英砂在冰浴中研磨,用 6 mL 0~4 $^{\circ}C$ 的 Tris-HCl 液(内含 0.003 mol/L $CaCl_2$ 和 0.005 mol/L 2-巯基乙醇, pH 值 7.5)提取 4 min;研磨所得匀浆在 4 000 r/min 下离心 10 min,再用 2 层纱棉布过滤;所得滤液用蒸馏水定容到 20 mL,即为酶原液。

淀粉酶活性的测定参照李合生等^[12]和 Li 等^[11]介绍的方法,用当天提取的酶原液测定。

残茬、根冠和主根在 70 $^{\circ}C$ 下烘干 48 h,粉碎,过 1 mm 孔筛。称取 50 mg 样品放入 10 mL 离心管中,加入 4 mL 80%乙醇,80 $^{\circ}C$ 水浴 40 min,离心,收集上清液;残渣再加 2 mL 80%乙醇重复提取 2 次,合并上清液。用 80%的乙醇定容^[11]至 20 mL。蒽酮比色法测定可溶性糖的含量。

淀粉含量测定参照张光辉等^[13]介绍的方法。在上述离心后的沉淀物中加入 2 mL 蒸馏水,80 $^{\circ}C$ 水浴 5 min 蒸干乙醇,沸水浴 10 min 糊化淀粉,冰水浴冷却,加入 9.2 mol/L 高氯酸 2 mL,20 $^{\circ}C$ 酸解 15 min,冷却,4 000 r/min 离心 10 min,将上清液转移到 20 mL 的刻度试管中。向沉淀中加入 4.8 mol/L 高氯酸 2 mL,20 $^{\circ}C$ 酸解 15 min,冷却,4 000 r/min 离心 10 min,将上清液合并到 20 mL 的刻度试管中。残渣用蒸馏水冲洗 3 次并转移到对应的刻度试管中。用 2.5 mol/L NaOH 调 pH 值到 5.4 左右,定容,静置。取上清液,用蒽酮法测定葡萄糖的含量。以葡萄糖含量折算为淀粉含量。

1.6 统计分析

以小区为单位,采用 SAS 软件(SAS System for Windows Ver. 8.0)进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 再生强度

2.1.1 休眠芽的萌发 紫花苜蓿刈割后根冠和残茬上的休眠芽迅速萌发,每株新萌芽数在刈割后 5 d 达到最大值,其后随着新枝条的生长,新萌芽数逐渐减少(图 1)。其中,刈割后 2~5 d 休眠芽萌发比较集中,平均每株新萌芽数由 3.1 个上升到 10.2 个。

施磷肥处理可促进休眠芽的萌发。刈割后 5 d,施用磷肥处理的植株新萌芽数比对照增加 50%。随着施磷量的增加,每株新萌芽数有升高的趋势,但不同处理间差异不显著($P > 0.05$)。

2.1.2 新生茎的生长 每茎干重和每株再生生物量自刈割 5 d 后迅速增长,至 13 d 时分别达到 0.28 和 2.07 g(图 2)。施磷处理促进了新生茎的生长。刈割

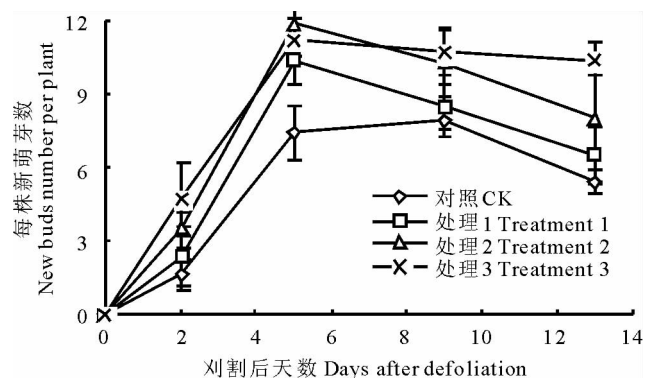


图 1 施磷肥对休眠芽萌发的影响

Fig. 1 Effects of phosphorus on emergence of buds in dormancy after defoliation

后 13 d, 施磷处理植株每茎干重比对照增加 36.4%, 270 kg P₂O₅/hm² 处理的植株每株再生生物量极显著高于对照 ($P < 0.01$), 相关分析结果表明, 每株再生生物量与刈割后 5 d 时的新萌芽数极显著正相关 ($R^2 = 0.36, P < 0.01$). 表明施用磷肥提高植株的再生生物量是通过促进根茬上休眠芽的萌动和新生茎生长来实现的。

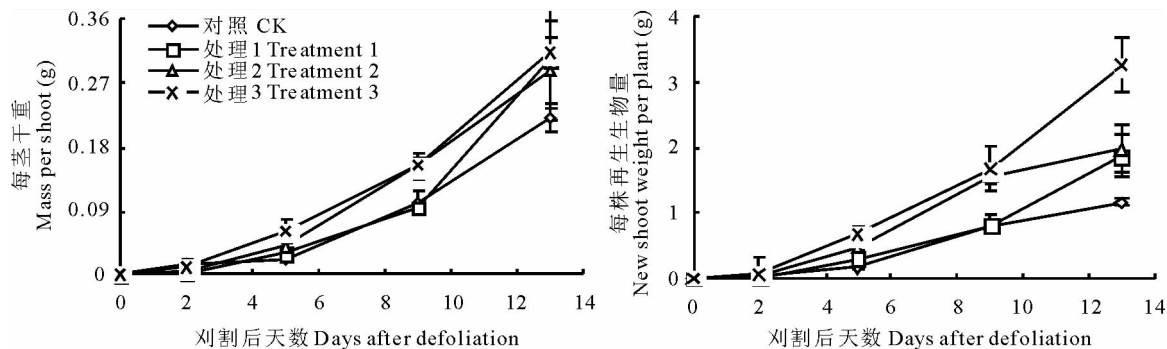


图 2 施磷肥对新生茎生长的影响

Fig. 2 Effects of phosphorus on growth of new shoot after defoliation

2.2 根茬组织 NSC 贮存量

刈割时, 根茬组织中 NSC 的贮存量以主根中最高, 根冠部次之, 残茬中最低 (图 3)。这表明, 主根和根冠部是紫花苜蓿根茬 NSC 的主要贮存部位。主根中淀粉贮存量是水溶性糖的 2 倍以上, 表明紫花苜蓿在生长过程中, 贮存在主根中的 NSC 以淀粉为主。而根冠部和残茬中淀粉贮存量和水溶性碳水化合物贮存量大致相当。

2.2.1 淀粉贮存量的变化 随着休眠芽的萌发和新生茎的生长, 主根和根冠部淀粉贮存量快速下降 (图 3)。主根和根冠部淀粉贮存量由刈割当天的每株 24.88 和 10.90 mg 下降到刈割后 13 d 时的 1.39 和 0.85 mg, 分别下降了 94.4% 和 92.2%。其中, 刈割后 9 d 内下降速度最快, 分别下降了 89.3% 和 87.9%。结果显示 (图 1, 2), 0 ~ 9 d 是休眠芽萌发和新生茎最初生长的阶段。表明休眠芽的萌发和新生茎的生长主要依靠根部和根冠部贮存的大量淀粉提供养分和能量。残茬中淀粉贮存量少, 且刈割后短期内有增加倾向, 刈割后 13 d 时与刈割当天的水平接近。表明再生初期残茬中淀粉很少被利用。

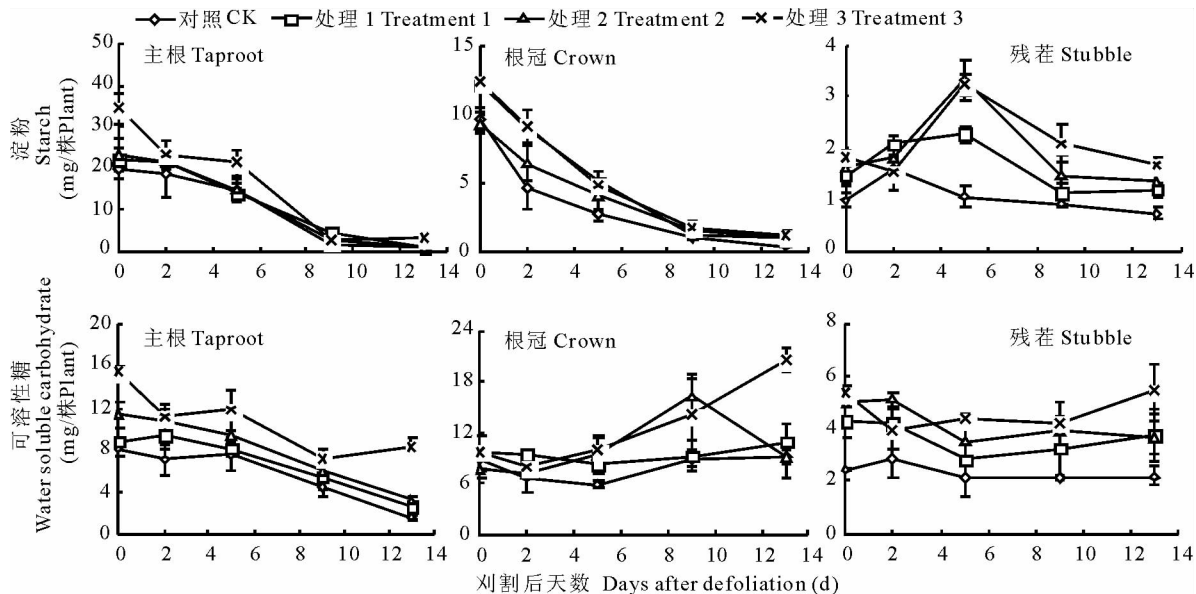


图 3 施磷肥对非结构性碳水化合物贮存量的影响

Fig. 3 NSC reserves per plant as influenced by phosphorus

施磷处理增加了刈割当天主根和根冠中淀粉的贮存量。施磷肥 270 kg P₂O₅/hm²处理的植株主根和根冠部淀粉的贮存量分别比对照高 73.5% 和 30.0%。施磷肥处理加快了紫花苜蓿刈割后主根和根冠中淀粉的利用。刈割后 5 d 内主根和根冠中淀粉总消耗量随施磷量的增加而增大,淀粉转化为再生生物量的利用效率也随之提高(表 1)。表明生长在磷肥充足环境中的植株为休眠芽的萌发和生长提供了更多的养分。

表 1 刈割后 5 d 主根和根冠中淀粉的消耗量和利用效率

Table 1 Starch depletion and conversion efficiency in taproot and crown during first 5 days after defoliation

项目 Item	磷肥处理 Phosphorus treatment (kg P ₂ O ₅ /hm ²)			
	0	90	180	270
5 d 再生生物量 Mass (g/株 Plant)	0.17±0.03 Aa	0.30±0.04 Aa	0.47±0.05 AaBb	0.68±0.14 Bb
主根淀粉消耗量 Taproot starch depletion (mg/株 Plant)	5.05±1.50 a	8.22±2.02 a	8.43±3.10 a	12.92±3.60 a
根冠淀粉消耗量 Crown starch depletion (mg/株 Plant)	6.94±1.20 a	7.01±0.55 a	5.22±1.53 a	7.41±0.14 a
总淀粉消耗量 Total starch depletion (mg/株 Plant)	11.99±2.70 a	15.23±3.14 a	13.65±3.07 a	20.33±4.81 a
淀粉转化效率 Starch conversion rate (%)	14.2	19.7	34.4	33.4

注:淀粉消耗量=刈割时淀粉贮存量-刈割后 5 d 时淀粉贮存量。淀粉转化效率=刈割后 5 d 内再生生物量/总淀粉消耗量。同行中数字后小写和大写字母不同者分别表示差异达到显著($P<0.05$)和极显著水平($P<0.01$)。

Note: Starch depletion=Starch reserves of 0 day—Starch reserves of 5 day. Starch conversion rate=New shoot weight of 5 day/Total starch depletion. Data within a line followed by the different small or capital letter show the difference at $P<0.05$ or $P<0.01$ level, respectively.

2.2.2 可溶性糖贮存量的变化 刈割后主根中可溶性糖贮存量持续下降(图 3),根冠中 5 d 后出现上升趋势(图 3),而残茬中则变化不明显(图 3)。表明休眠芽的萌发和生长在消耗主根和根冠部淀粉的同时,也消耗了主根中贮存的可溶性糖。刈割 5 d 后根冠中可溶性糖含量提高,可能与新生茎光合作用的逐渐增大,部分光合产物被运输到根冠部有关。

施磷肥处理促进了主根中可溶性糖的贮存,270 kg P₂O₅/hm²处理的植株刈割当天主根中可溶性糖贮存量极显著高于对照($P<0.01$)。施磷肥也加快了刈割后主根中可溶性糖的消耗。刈割后 5 d 内施磷植株的主根可溶性糖的消耗量为对照的 342.9%;但刈割后 13 d 时,270 kg P₂O₅/hm²处理的植株主根和根冠部可溶性糖贮存量均极显著高于对照($P<0.01$),可能是磷肥促进了主根和根冠部贮存淀粉的分解和再生后光合作用的恢复两者共同作用的结果。残茬中可溶性糖的贮存量在刈割后 13 d 内基本保持平稳,表明再生初期残茬中可溶性糖也很少被消耗。

2.3 淀粉酶活性的变化

2.3.1 α -淀粉酶活性 刈割后 9 d 内对照植株主根内 α -淀粉酶活性维持在 5.76~8.24 $\mu\text{g}/(\text{min} \cdot \text{g FW})$ 范围内,施磷 180 和 270 kg P₂O₅/hm²处理的植株主根和根冠中 α -淀粉酶活性有高于不施磷和低磷处理的倾向(图 4)。表明施磷肥具有提高主根和根冠部 α -淀粉酶活性的趋势。刈割后 5 d 内残茬中 α -淀粉酶活性在各处理间的差异不明显(图 4)。 α -淀粉酶活性提高,可加快贮存淀粉的降解,为休眠芽萌发和生长提供更多的可利用养分。

2.3.2 β -淀粉酶活性 刈割后 9 d 内主根和根冠中 β -淀粉酶活性下降,残茬中 β -淀粉酶活性变化不明显(图 4)。施磷肥处理加快了主根和根冠中 β -淀粉酶活性的下降。刈割后 5 d 时 270 kg P₂O₅/hm²处理的植株主根中 β -淀粉酶活性降到最低,比对照低 0.16 $\mu\text{g}/(\text{min} \cdot \text{mg FW})$ 。刈割后 9 d 内主根和根冠部淀粉贮存量急剧下降,而这些部位的 β -淀粉酶活性反而也出现下降,表明 β -淀粉酶活性的变化与紫花苜蓿主根和根冠部贮存淀粉的迅速减少关系不大。

3 讨论

3.1 紫花苜蓿根茬组织中的贮存碳水化合物形态

牧草再生初期的物质和能量主要来自根茬中贮存的有机物^[1,2,7]。TA 等^[14]用¹⁴C 标记研究发现,刈割后 14 d 内 12% 的贮存¹⁴C 被转移到再生组织。Johansson^[15]报道,刈割后 15 d 内,草地羊茅(*Festuca pratensis*)根和根

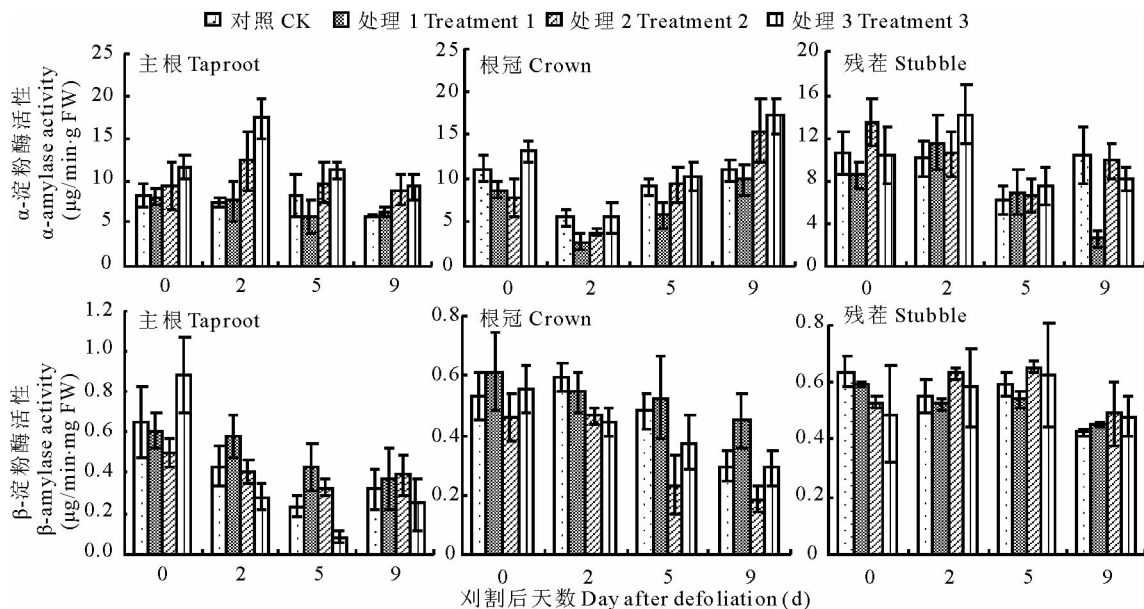


图4 施磷肥对淀粉酶活性的影响

Fig. 4 Amylase activity as influenced by phosphorus

冠部有 21% 的¹⁴C 被转移到茎中。¹³C 标记试验也显示, 多年生黑麦草刈割后 2 d 内, 其再生草各器官中的碳水化合物主要来源于残茬^[16]。本试验结果显示, 刈割后 9 d 内紫花苜蓿根茬组织中 NSC 贮存量迅速下降, 表明根茬组织中的 NSC 是紫花苜蓿再生初期的主要营养源。紫花苜蓿主根和根冠部淀粉的贮存量最多, 再生初期消耗量最大, 表明光合产物在紫花苜蓿根茬中主要以淀粉的形式贮存在根和根冠部, 是再生初期利用的主要 NSC。

3.2 磷肥对紫花苜蓿根茬组织中碳水化合物贮存和利用的影响

磷是植物生长所必需的重要营养元素, 植物缺乏磷会影响到光合作用。郭程瑾等^[17]对小麦(*Triticum aestivum*)的研究发现, 缺磷后不同品种小麦的叶绿素含量较低, 减弱了叶片对光能的捕获能力。李贤勇等^[18]对再生稻(*Oryza sativa*)的研究发现, 施用磷肥, 提高了头季稻后期绿叶面积, 加快光合速率, 使稻秆中贮藏养分增加。本试验结果表明, 施磷处理增加了刈割时主根和根冠中 NSC 的贮存量。其原因可能是施磷肥后紫花苜蓿植株有效根瘤数增多^[8], 植株根瘤固氮能力提高, 叶绿素含量上升, 光合作用增强, 使地上和地下部贮存的养分增加。

贮藏淀粉需要降解后才能被再生利用。白三叶^[6]、紫花菜豆^[5]、紫花苜蓿^[7, 11]等豆科植物的研究结果显示, α -淀粉酶活性和贮存器官淀粉的降解相关。本试验结果也显示, 在再生期间主根和根冠部淀粉含量下降的同时, α -淀粉酶活性上升。说明在再生初期 α -淀粉酶活性与养分供给速度以及再生速度有关, 施磷肥可能通过提高 α -淀粉酶活性, 显著提高主根和根冠部贮存 NSC 的运转和再生利用效率, 从而促进休眠芽萌发和新生茎生长。

参考文献:

- [1] 戎郁萍, 韩建国, 王培, 等. 刈割强度对新麦草产草量和贮藏碳水化合物及含氮化合物影响的研究[J]. 中国草地, 2000, (2): 28-34.
- [2] Donaghy D J, Fulkerson W J. Priority for allocation of water-soluble carbohydrate reserves during regrowth of *Lolium perenne*[J]. Grass Forage Science, 1998, 53: 211-218.
- [3] Gonzalez B, Boucaud J, Salette J, et al. Changes in stubble carbohydrate content during regrowth of defoliated perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) on two nitrogen levels[J]. Grass and Forage Science, 1989, 44: 411-415.
- [4] 王静, 杨持, 王铁娟, 等. 不同刈割强度下冷蒿再生生长与可溶性碳水化合物相关分析[J]. 内蒙古大学学报, 2004, 35(2): 177-182.
- [5] Yoki A, Manabu T, Masataka S, et al. Amylase activities and carbohydrate content in stems and roots of phasey bean (*Macroptilium lathyroides* (L.) Urb) after defoliation[J]. Grassland Science, 2003, 49(1): 16-22.

- [6] Gallagher J A, Volenec J J, Turner L B, *et al.* Starch hydrolytic enzyme activities following defoliation of white clover[J]. *Crop Science*, 1997, 37: 1812-1818.
- [7] Jeffrey J, Volence J J, Patricia J, *et al.* Carbohydrate metabolism in taproots of *Medicago sativa* L. during winter adaptation and spring regrowth[J]. *Plant Physiology*, 1991, 96: 786-793.
- [8] 李富宽,翟桂玉,沈益新,等. 施磷和接种根瘤菌对黄河三角洲紫花苜蓿生长及品质的影响[J]. *草业学报*, 2005, 14(3): 87-93.
- [9] Matt A S, Ronald M J. Stand dynamics and yield components of alfalfa as affected by phosphorus fertility[J]. *Agronomy Journal*, 1993, 85: 241-246.
- [10] Berg W K, Cunningham S M, Brouder S M, *et al.* Influence of phosphorus and potassium on alfalfa yield and yield components[J]. *Crop Science*, 2005, 45: 297-304.
- [11] Li R, Volence J J, Joern B C, *et al.* Effects of phosphorus nutrition on carbohydrate and protein metabolism in alfalfa roots[J]. *Journal of Plant Nutrition*, 1998, 21(3): 459-474.
- [12] 李合生. 植物生理生化原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000. 169-172.
- [13] 张光辉,李增嘉,潘庆民,等. 内蒙古典型草原羊草和大针茅地下器官中碳水化合物含量的季节性变化[J]. *草业学报*, 2006, 15(3): 42-49.
- [14] TA T C, Macdowall F D, Faris M A. Utilization of carbon and nitrogen reserves of alfalfa roots in supporting N_2 -fixation and shoot regrowth[J]. *Plant and Soil*, 1990, 127: 231-236.
- [15] Johansson G. Carbon distribution in grass (*Festuca pratensis* L.) during regrowth after cutting-utilization of stored and newly assimilated carbon[J]. *Plant and Soil*, 1993, 151: 11-20.
- [16] 干友民, Schnyder H, Vianden H, 等. 多年生黑麦草刈后再生草碳水化合物及氮素的变化[J]. *草业学报*, 1999, 8(4): 65-70.
- [17] 郭程瑾,李宾兴,王斌,等. 不同磷效率小麦品种的光合特性及其生理机制[J]. *作物学报*, 2006, 32(8): 1209-1217.
- [18] 李贤勇,任天举,邹亚兰. 不同时期施磷钾肥对杂交中稻一再生稻的影响研究[J]. *再生稻*, 1995, (1): 30-35.

**Effects of phosphate fertilizer on utilization of non-structural carbohydrate
in resident tissue of *Medicago sativa* during the early regrowth stage**

JIANG Hui-xin^{1,2}, SHEN Yi-xin¹, ZHAI Gui-yu², LIU Xin-bao¹, YUAN Pei-xun²

(1. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. General Station of Animal Husbandry of Shandong Province, Ji'nan 250022, China)

Abstract: A field experiment was conducted to study the effects of phosphate fertilizer on utilization of non-structural carbohydrate (NSC) stored in the main root, crown, and stubble of alfalfa (*Medicago sativa*) during early regrowth after defoliation. NSC is mainly stored in the root and crown. A great deal of starch, the major component of stored NSC, was utilized during early regrowth. With increasing rates of phosphate fertilizer, starch reserves increased in the main root and crown and at 270 kg P_2O_5 /ha starch reserves were 73.5% and 31.1% higher respectively than those in the control. Phosphate fertilizer improved the activity of α -amylase and accelerated the hydrolysis of starch in the main root and crown, thus promoting regrowth by enhancing mobilization of starch reserves for emergence of dormant buds and new shoots after defoliation. The dry weight of plants treated with 270 kg P_2O_5 /ha was significantly ($P < 0.01$) greater than the control 13 days after defoliation. NSC in the main root and crown of alfalfa is the main source of nutrients during early regrowth and phosphate fertilizer improved the storage and conversion efficiency of NSC thus accelerated regrowth of alfalfa after defoliation.

Key words: phosphorus; *Medicago sativa*; root; non-structural carbohydrate; α -amylase