

# 施用沼液对紫花苜蓿种植土壤 有机碳、氮组分影响研究

茹丽洋<sup>1</sup>, 常会庆<sup>1,2</sup>

(1.河南科技大学农学院,河南 洛阳 471023; 2.河南新大牧业股份有限公司,河南 郑州 450001)

**摘要:**为明确沼液替代氮肥对种植紫花苜蓿石灰性土壤有机碳、氮组分的影响,开展田间试验,设置不施肥,常规施用化肥氮,基于化肥氮20%用量的沼液+80%化肥氮,基于化肥氮50%用量的沼液+50%化肥氮,基于常规施用化肥氮100%、200%用量的沼液共6个处理,分析比较各处理对土壤有机碳、氮组分影响。结果表明:随沼液配施比例的提高,土壤酸解氨基酸态氮、酸解总氮含量逐渐增加,与单施化肥相比,100%和200%沼液施用处理下土壤氨基酸态氮、酸解总氮含量分别显著提高13.93%~37.21%和8.22%~21.71%;20%~50%沼液施用利于提高土壤非酸解态氮含量;与100%沼液施用相比,200%沼液施用处理土壤酸解未知态氮和全氮含量分别下降9.01%~37.00%和0.89%~7.87%;沼液施用提高了土壤酸解氮组分尤其是酸解氨基酸态氮的比例。全氮与酸解总氮、氨基糖态氮和未知态氮含量呈极显著正相关关系。土壤腐殖酸、富里酸、游离腐殖酸和有机碳含量随沼液配施比例的提高而提高;与单施化肥相比,沼液100%和200%施用处理显著提高富里酸含量,沼液50%施用处理显著提高胡敏酸含量,胡敏酸随沼液施用比例提高呈下降趋势;有机碳与腐殖酸、游离腐殖酸、残渣碳、富里酸含量呈极显著正相关关系。综上所述,本研究条件下基于常规施用化肥氮100%用量的沼液更有利于土壤有机碳、氮组分含量的累积。

**关键词:**沼液;有机碳;有机氮;紫花苜蓿;石灰性土

中图分类号:S551<sup>+</sup>7; S147.5 文献标志码:A

## Effects of biogas slurry application on organic carbon and nitrogen components of alfalfa cultivation soil

RU Liyang<sup>1</sup>, CHANG Huiqing<sup>1,2</sup>

(1. Agricultural College of Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China;

2. Henan Xinda Animal Husbandry Co., Ltd, Zhengzhou, Henan 450001, China)

**Abstract:** A field trial was used to determine the effects of biogas slurry on organic carbon and nitrogen components of calcareous soil planted with alfalfa. The study included treatments of control without fertilizer, conventional fertilizer nitrogen, 20% fertilizer nitrogen content of biogas slurry+80% fertilizer nitrogen, 50% fertilizer nitrogen content of biogas slurry+50% fertilizer nitrogen and biogas slurry based on conventional application of fertilizer nitrogen of 100% and 200%. The results showed that the contents of amino acid nitrogen and total acid hydrolysis nitrogen in soil increased with the increase of the combined application ratio of biogas slurry. Compared with single application, the contents of amino acid nitrogen and total nitrogen were significantly increased by 13.93%~37.21% and 8.22%~21.71%, respectively. Application of 20%~50% biogas slurry was beneficial to the increase of soil non-acidolysis nitrogen. Compared with 100% biogas slurry application, the contents of unknown nitrogen and total nitrogen in 200% biogas slurry application decreased by 9.01%~37.00% and 0.89%~7.87%, respectively. The application of biogas slurry was beneficial to the increase of soil acidolysis nitrogen, especially amino acid nitrogen. Total nitrogen was positively correlated with total nitrogen, amino sugar nitrogen and unknown nitrogen. The

contents of humic acid, fulvic acid, free humic acid and organic carbon in soil increased with the increase of biogas mixture ratio. Compared with single fertilizer application, 100% and 200% application of biogas slurry significantly increased the fulvic acid content, 50% application of biogas slurry significantly increased the humic acid content, and the ratio of humic acid to fulvic acid decreased with the increase of biogas slurry application ratio. Organic carbon was positively correlated with humic acid, free humic acid, residual carbon and fulvic acid. In summary, under the conditions of this study, it is suggested that when the amount of biogas slurry is 100% nitrogen fertilizer, it is more conducive to the accumulation of soil organic carbon and nitrogen components.

**Keywords:** biogas slurry; organic carbon; organic nitrogen; alfalfa; calcareous soil

土壤有机碳、氮组分含量及变化作为支撑农业生态系统生产力和环境变化能力的重要指标,对表观农田生产力、土壤质量及农业生态系统碳、氮循环过程具有重要意义。土壤碳含量与氮养分密切相关,在作物生产过程中对养分循环与利用发挥着重要作用<sup>[1]</sup>。

紫花苜蓿是优质多年生豆科牧草,在提高土壤肥力、改良土壤结构、加强水土保持及修复脆弱生态环境等方面都发挥着积极作用<sup>[2]</sup>。氮是苜蓿生长过程中必需的营养元素,然而过量施氮也会造成土壤酸化、板结和肥力下降等问题<sup>[3]</sup>。有机物料具有养分种类齐全、肥效释放缓慢等特点,将其和化肥配施,不仅可以减少化肥的施用量<sup>[4]</sup>,还有助于耕层土壤微环境的修复。家畜粪尿经发酵而成的沼液肥不仅是土壤氮素和碳素重要的源和库,施入土壤还可以提高土壤固氮速率<sup>[5]</sup>,同时沼液施用在农业可持续发展和环境保护方面也起着重要作用<sup>[6]</sup>。土壤氮素主要包括无机态氮和有机态氮,有机态氮占土壤全氮(TN)含量的90%以上,是土壤氮的重要存在形式<sup>[7]</sup>。沼液施用能够提高土壤有机氮含量。另外,紫花苜蓿可通过根瘤菌将空气中的氮固定到植株中,再向土壤分泌复杂的含氮有机化合物,经生化作用将复杂有机物氨基化成为可溶性有机氮等简单有机氮化合物<sup>[8]</sup>。土壤有机碳、氮含量的提高势必会改善苜蓿的养分供应状况。

长期以来人们对紫花苜蓿种植管理方面进行了大量研究<sup>[9-10]</sup>,但大多集中在紫花苜蓿植株养分含量及产量方面,针对猪粪沼液配施化肥在苜蓿生长过程中对石灰性土壤有机碳、氮组分影响的研究较少。为此,本研究通过对石灰性土壤施用不同比例沼液,探究其对苜蓿种植土壤有机碳、氮组分变化特征的影响,为沼液在当地土壤的合理施用提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试紫花苜蓿品种为‘5010’;供试肥料为尿素(科密欧化学试剂,分析纯,N 46.67%)、过磷酸钙(大茂化学试剂,实验纯,P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 12.00%)、氯化钾(大茂化学试剂,分析纯,K<sub>2</sub>O 60.00%),沼液取自河南省新大牧业有限公司生猪养殖厂发酵池沼液。试验地土壤为典型石灰性土壤,土壤和沼液基本理化性质如表 1、2 所示。

表 1 施肥前耕层土壤基本养分

Table 1 Basic soil nutrients in the topsoil layer before fertilization

指标 Indicator	数值 Value
全氮 Total nitrogen/(g · kg <sup>-1</sup> )	0.98
全磷 Total phosphorus/(g · kg <sup>-1</sup> )	0.78
全钾 Total potassium/(g · kg <sup>-1</sup> )	1.94
有机质 Organic matter/%	0.85
pH	7.91
速效磷 Available phosphorus/(mg · kg <sup>-1</sup> )	15.00
速效钾 Available potassium/(mg · kg <sup>-1</sup> )	231.00
碱解氮 Alkali-hydrolyzable nitrogen/(mg · kg <sup>-1</sup> )	62.00

表 2 供试沼液基本理化性质

Table 2 Basic physical and chemical properties of biogas slurry

指标 Indicator	数值 Value
全氮 Total nitrogen/(g · L <sup>-1</sup> )	1.04
全磷 Total phosphorus/(g · L <sup>-1</sup> )	0.97
全钾 Total potassium/(g · L <sup>-1</sup> )	0.44
pH	7.63
有机质 Organic matter/(g · L <sup>-1</sup> )	38.08

### 1.2 试验点概况

试验地点位于河南省洛阳市河南科技大学开元校区农场(112.27°E, 34.41°N),属于温带季风气候,年均气温 12.8~15.5℃,无霜期 210 d 以上,年降水量、年日照时数和年均湿度分别为 528~800 mm、2 200~2 300 h 和 60%~70%。

### 1.3 试验设计

试验设置 6 个处理:不施肥(CK)、常规施用化肥氮(100% C)、基于化肥氮 20% 用量的沼液+80% 化肥氮(20% W)、基于化肥氮 50% 用量的沼液+

50% 化肥氮 (50% W)、基于常规施用化肥氮 100% 用量的沼液 (100% W)、基于常规施用化肥氮 200% 用量的沼液 (200% W), 小区面积为  $9 \text{ m}^2$  ( $3 \text{ m} \times 3 \text{ m}$ ), 各小区随机排列, 小区之间采用深埋聚氯乙烯隔板做间隔处理。4 个沼液处理的沼液用量分别为 1 920、4 800、9 600、19 200  $\text{L} \cdot \text{hm}^{-2}$ ; 除 CK 和 200% W 外, 各处理的总施氮量均为  $120 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ , 过磷酸钙为  $\text{P}_2\text{O}_5$   $139 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ , 氯化钾为  $\text{K}_2\text{O}$   $158 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$  (因沼液施用量不同造成的磷、钾不同, 用单质化肥补齐); 不施沼液处理用等体积水替代。磷肥和钾肥均作基肥在苜蓿种植时一次性施入;

40% 氮肥作为基肥施入, 60% 氮肥作为追肥分 2 次施入, 追肥时间分别为 2021 年 6 月 11 日和 9 月 16 日 (当天刈割后施肥)。其余管理措施一致。各处理施肥量见表 3。

紫花苜蓿于 2021 年 3 月 15 日播种, 各小区均匀条播 9 行, 播种量为  $15 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ , 分别于 2022 年 8 月 1 日和 11 月 9 日分两茬进行刈割, 刈割后取各处理地上部分鲜样,  $105^\circ\text{C}$  杀青 30 min 后,  $70^\circ\text{C}$  烘干备用。苜蓿刈割后, 按“五点法”采集土样样品, 混合并剔除杂质, 风干后分别过 0.85 mm 和 0.15 mm 土筛备用, 所有样品重复测定 3 次。

表 3 各处理施肥方案

Table 3 Fertilization scheme of each treatment

处理 Treatment	基肥 Base fertilizer/ $(\text{kg} \cdot \text{hm}^{-2})$				追肥 Top application/ $(\text{kg} \cdot \text{hm}^{-2})$		氮肥总量 Total nitrogen fertilizer / $(\text{kg} \cdot \text{hm}^{-2})$
	N(40%)		$\text{P}_2\text{O}_5$ (100%)	$\text{K}_2\text{O}$ (100%)	N(60%)		
	尿素 Urea	沼液 Biogas slurry			尿素 Urea	沼液 Biogas slurry	
CK	0	0	0	0	0	0	0
100% C	48	0	139	158	72	0	120
20% W	36	12	139	158	54	18	120
50% W	24	24	139	158	36	36	120
100% W	0	48	139	158	0	72	120
200% W	96	96	139	158	0	144	240

## 1.4 测定指标及方法

土壤有机氮组分采用 Bremner 法测定<sup>[11]</sup>; 腐殖酸含量采用焦磷酸钠提取-重铬酸钾容量法测定<sup>[12]</sup>; 游离腐殖酸采用 1% 氢氧化钠-重铬酸钾容量法测定<sup>[13]</sup>; 胡敏酸和富里酸含量采用焦磷酸钠-氢氧化钠提取重铬酸钾氧化容量法测定<sup>[14]</sup>; 残渣碳含量为土壤有机碳与腐殖酸含量的差。有机质含量采用外加温的重铬酸钾容量法测定<sup>[15]</sup>; 全氮含量采用凯氏定氮法测定<sup>[15]</sup>。

## 1.5 数据处理与分析

使用 Microsoft Excel 2019 进行数据整理, SPSS 26.0 进行数据分析, OriginPro 8.5 完成图表绘制。文中数据均以“均值 $\pm$ 标准差”表示, 通过一般线性模型进行单因素方差分析, 并用 Duncan 法对各指标进行多重比较 ( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同沼液处理对土壤有机氮组分的影响

由表 4 可知, 各施肥处理土壤酸解总氮含量显著高于 CK; 随沼液施用量的增加, 土壤酸解总氮含量逐渐增加。当沼液施用量为 100% 和 200% 化肥氮时, 土壤酸解总氮含量显著高于其他处理, 两个茬次的土壤酸解总氮含量较单施化肥分别显著提高 20.81%、21.71% 和 8.22%、13.42%, 较 50% W 处理分别显著提

高 29.61%、30.58% 和 2.04%、6.94%, 表明增施沼液提高土壤酸解总氮含量效果明显。第一茬 20% W 和 50% W 处理土壤非酸解态氮含量较单施化肥分别显著提高 25.45% 和 16.29%, 100% W 和 200% W 处理较单施化肥分别显著下降 43.51% 和 35.37%, 说明适宜比例沼液施用利于土壤非酸解态氮含量提高, 过量施用则产生抑制作用; 第二茬各沼液处理较单施化肥处理的土壤非酸解态氮含量差异不显著。

不同处理土壤酸解氨态氮含量为 76.37~204.76  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 第一茬 100% W 处理含量最高, 较单施化肥提高 76.53%; 第二茬 100% C 处理含量最高, 其中 20% W 和 100% W 较 50% W 处理分别显著下降 42.22% 和 40.34%。各处理土壤酸解氨基酸态氮含量为 228.62~390.97  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 各施肥处理均高于 CK, 且氨基酸态氮含量随沼液配施比例的提高而提高; 与单施化肥相比, 第一茬 100% W 和 200% W 处理土壤酸解氨基酸态氮含量分别显著提高 36.45  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  和 66.27  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 第二茬各沼液处理下均显著提高, 表明沼液施用利于土壤酸解氨基酸态氮含量的累积; 且第二茬各处理土壤酸解氨基酸态氮含量较第一茬均有所提高。各处理土壤酸解氨基糖态氮含量为 8.95~43.74  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 第二茬 200% W 较 100% W 下降 4.97  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 表明过量沼液施用产生抑制作用。各处理土壤酸解未知态氮含量

为156.56~386.00 mg·kg<sup>-1</sup>,第一茬各施肥处理均显著高于CK,第二茬50%W处理显著高于其他处理;与酸解氨基糖态氮变化趋势一致,200%W处理即过量施用沼液对土壤酸解未知态氮含量产生抑制作用。

## 2.2 不同沼液处理对土壤有机氮组分比例的影响

由图1可知,不同处理间土壤有机氮组分含量存在差异,土壤酸解态氮在全氮中占比较大。第一茬各处理酸解有机氮(酸解氨基酸态氮、酸解氨态氮、酸解氨基糖态氮)占全氮的比例为55.96%~80.13%,平均占比68.34%;非酸解态氮占全氮的比例为19.87%~44.04%,平均占比31.96%。酸解有机氮各组分含量表现为:酸解未知态氮>酸解氨基酸态氮>酸解氨态氮>酸解氨基糖态氮,各成分占比分别为27.70%、25.30%、11.50%、2.00%。第二茬酸解有机氮占全氮的比例为59.45%~74.39%,平

均占比67.50%,非酸解态氮占全氮的比例为25.61%~40.55%,平均占比32.50%。酸解有机氮各组分含量表现为:酸解氨基酸态氮>酸解未知态氮>酸解氨态氮>酸解氨基糖态氮,各成分占比分别为30.67%、19.70%、15.33%、2.83%。

第二茬较第一茬不同处理各有机氮组分含量变化不同。CK和100%C处理各酸解态氮组分比例下降,非酸解态氮比例提高;100%W处理非酸解态氮、酸解氨基酸态氮、酸解氨基糖态氮比例提高,酸解未知态氮和酸解氨态氮比例下降;20%W、50%W和200%W处理酸解氨基糖态氮比例不变,酸解氨基酸态氮和酸解氨态氮比例提高,酸解未知态氮和非酸解氮比例下降。综上所述,与单施化肥相比,施用沼液可提高土壤酸解氮组分的占比,尤其提高了酸解氨基酸态氮的占比。

表4 不同处理土壤有机氮组分含量/(mg·kg<sup>-1</sup>)

Table 4 Soil organic nitrogen components content under different treatments

采样时期 Sampling date (y-m-d)	处理 Treatment	酸解氨态氮 Acidolysis ammonia nitrogen	酸解氨基酸态氮 Acidolytic amino acid nitrogen	酸解氨基糖态氮 Acidolytic amino sugar nitrogen	酸解未知态氮 Acid hydrolysis of unknown nitrogen	酸解总氮 Acid hydrolysis of total nitrogen	非酸解态氮 Non-acidolytic nitrogen
2022-08-01	CK	165.83±65.00ab	228.62±16.23c	21.37±0.00b	175.61±31.52c	536.76±14.06c	248.50±25.16c
	100%C	99.57±30.73abc	261.75±24.79bc	8.95±2.03c	298.20±14.63ab	732.25±24.79b	390.64±12.99b
	20%W	96.25±26.09abc	238.56±16.23c	11.43±0.00c	266.72±67.58b	649.41±58.71b	490.04±14.61a
	50%W	76.37±26.09c	241.87±24.79bc	11.43±4.06c	273.35±22.59ab	682.55±46.86b	454.26±4.87a
	100%W	175.77±32.80a	298.20±8.12a	13.92±6.09bc	386.00±33.05a	884.66±35.38a	220.67±20.29c
	200%W	84.66±27.62bc	328.02±42.95a	31.31±4.06a	351.21±86.02ab	891.29±61.45a	252.48±44.64c
2022-11-09	CK	145.12±10.14b	268.38±8.12b	16.40±4.06b	223.65±4.06c	649.41±16.89d	409.86±12.48ab
	100%C	204.76±6.09a	284.95±12.40b	43.73±2.03a	223.65±4.06c	765.38±0.00bc	430.40±43.28ab
	20%W	107.85±4.06c	367.78±16.23a	23.86±6.09b	213.71±0.00c	758.75±9.37c	296.54±88.05bc
	50%W	187.37±12.17a	377.72±21.47a	23.86±2.03b	273.35±4.06a	811.77±36.60bc	347.24±78.50bc
	100%W	117.79±12.17c	384.35±12.40a	43.74±2.03a	248.50±14.20b	828.33±55.24a	514.56±61.86a
	200%W	162.52±16.23b	390.97±16.89a	38.77±2.03a	156.56±16.23d	868.09±12.40a	259.10±63.16bc

注:同列不同小写字母表示同一茬次不同处理间差异显著( $P<0.05$ )。下同。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant differences among different treatments in the same crop ( $P<0.05$ ). The same below.

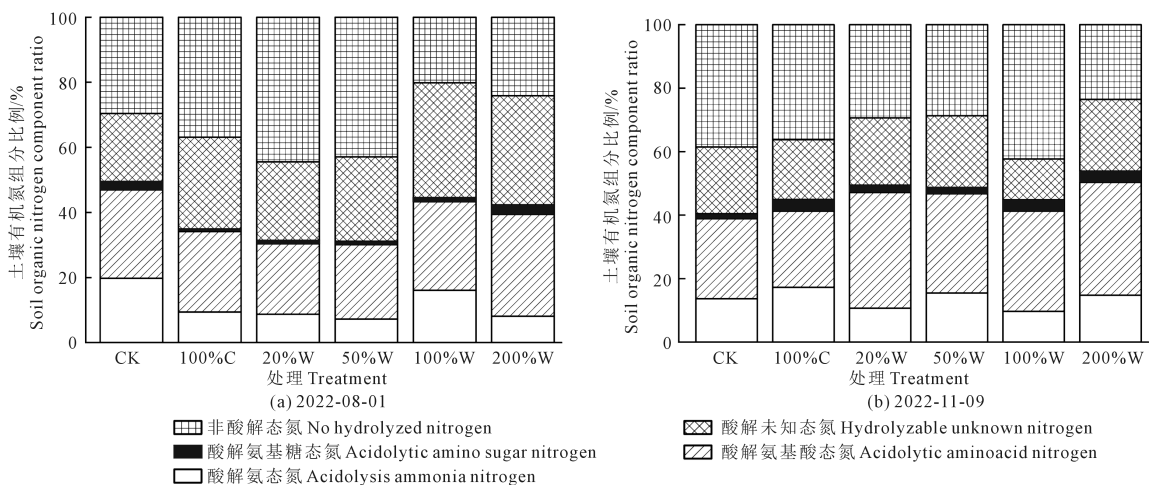


图1 不同时期不同处理有机氮组分比例

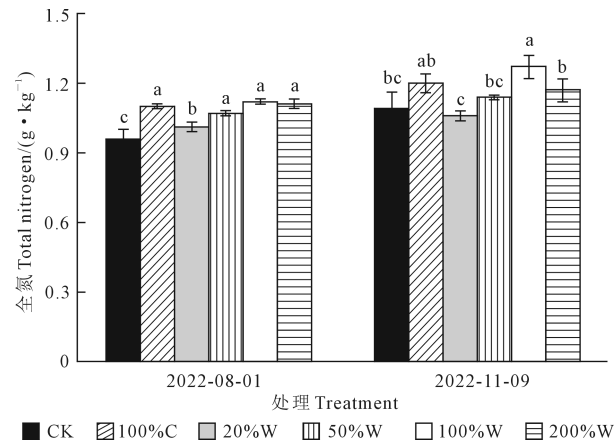
Fig.1 Proportion of organic nitrogen components in different periods

### 2.3 不同沼液处理对土壤全氮含量的影响

由图2可知,相较于CK,各施肥处理土壤全氮含量均显著提高,沼液配施比例低于100%时,土壤全氮含量随沼液配施比例的提高而提高;200%W土壤全氮含量低于100%W,在第二茬时显著下降7.87%,表明过量施用沼液降低了土壤全氮含量;与单施化肥相比,20%W处理土壤全氮含量在两个时期分别显著下降8.18%和11.67%。

### 2.4 不同沼液处理对土壤胡敏酸与富里酸的影响

各处理两次刈割时土壤胡敏酸与富里酸含量见表5。与单施化肥相比,第一茬50%W、100%W、200%W处理和第二茬50%W处理的土壤胡敏酸含量分别显著提高0.10、0.52、0.23、0.05  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。两茬各处理土壤富里酸含量为0.26~0.88  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,随沼液配施比例的提高,各处理土壤富里酸含量不断增加,两个茬次100%W和200%W处理较单施化肥分别显著提高0.14、0.23  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和0.17、0.45  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。土壤胡富比(HA/FA)整体上表现为随沼液配施比例的提高而下降;与CK相比,第一茬各施肥处理土壤胡富比降幅为15.71%~49.05%。综上可知,



注:图中不同小写字母表示同一采样日期下处理间差异显著( $P<0.05$ )。

Note: Different lowercase letters in the figure indicated significant differences between treatments on the same sampling date ( $P<0.05$ ).

图2 不同处理土壤全氮含量

Fig.2 Soil total nitrogen content under different treatments

沼液的施用能够有效抑制胡敏酸向富里酸的转化,有利于维系腐殖质品质。

### 2.5 不同沼液处理对土壤有机碳、腐殖酸及残渣碳的影响

各处理土壤腐殖酸、游离腐殖酸及残渣碳含量见表6。各施肥处理土壤有机碳含量均显著高于CK,增幅为15.09%~40.33%,沼液配施比例的提高有利于土壤有机碳含量增加;200%W处理的土壤有机碳含量均显著高于其他处理,表明增施沼液对提高土壤有机碳含量作用明显;此外,第二茬各处理土壤有机碳含量较第一茬有所提高。各施肥处理土壤腐殖酸含量较CK有不同程度提高,增幅为9.64%~96.59%,同时土壤腐殖酸含量随沼液配施比例的增加而逐渐增加;与单施化肥相比,第一茬100%W、200%W和第二茬200%W处理腐殖酸含量分别显著提高0.55、0.59、0.34  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。各处理土壤游离腐殖酸含量变化趋势与腐殖酸含量一致,随沼液配施比例的提高而提高。各处理土壤残渣碳占有机碳的比例达78.26%~89.90%,高于腐殖酸和游离腐殖酸。

### 2.6 不同沼液处理土壤有机氮组分与全氮含量的相关性分析

如表7所示,土壤全氮与有机氮组分相关分析表明,土壤全氮与氨基糖态氮、酸解总氮呈显著正相关关系,相关系数分别为0.911和0.914;全氮与酸解未知态氮呈极显著正相关关系,相关系数为0.923;酸解氨态氮、氨基酸态氮、非酸解态氮与全氮含量间无明显相关性。各有机氮组分之间,酸解氨态氮与非酸解态氮含量呈显著正相关关系,相关系数为0.841;氨基酸态氮与氨基糖态氮、酸解未知态氮含量呈显著正相关关系,相关系数分别为0.910和0.849,氨基酸态氮与酸解总氮含量呈极显著正相关关系,相关系数为0.944;氨基糖态氮与酸解未知态氮与酸解总氮含量呈极显著正相关关系,相关系数分别为0.963和0.981;酸解未知态氮与酸解总氮含量呈极显著正相关关系,相关系数为0.974。

表5 不同处理土壤胡敏酸(HA)与富里酸(FA)含量

Table 5 Soil humic acid(HA) and fulvic acid(FA) content under different treatments

处理 Treatment	胡敏酸(HA) Humic acid/( $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )		富里酸(FA) Fulvic acid/( $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )		HA/FA/%	
	2022-08-01	2022-11-09	2022-08-01	2022-11-09	2022-08-01	2022-11-09
CK	0.59±0.02d	0.41±0.00f	0.26±0.04d	0.34±0.02c	2.10±0.08a	1.14±0.00e
100%C	0.57±0.00d	0.83±0.14b	0.53±0.05b	0.43±0.06c	1.07±0.01d	1.79±0.07c
20%W	0.57±0.04d	0.67±0.00d	0.34±0.02cd	0.34±0.05c	1.77±0.05b	2.16±0.00a
50%W	0.67±0.04c	0.88±0.00a	0.45±0.06bc	0.41±0.04c	1.50±0.02c	2.01±0.10b
100%W	1.09±0.04a	0.72±0.00c	0.67±0.07a	0.60±0.05b	1.36±0.06c	1.27±0.00d
200%W	0.80±0.02b	0.60±0.02e	0.76±0.06a	0.88±0.08a	1.07±0.12d	0.74±0.02f

表 6 不同处理土壤有机碳、腐殖酸及残渣碳含量

Table 6 Soil organic carbon, humic acid and residue carbon content under different treatments

处理 Treatment	有机碳 Organic carbon /(g·kg <sup>-1</sup> )		腐殖酸 Humic acid /(g·kg <sup>-1</sup> )		游离腐殖酸 Free humic acid /(g·kg <sup>-1</sup> )	
	2022-08-01	2022-11-09	2022-08-01	2022-11-09	2022-08-01	2022-11-09
CK	7.29±0.23d	7.45±0.31c	0.88±0.04d	0.83±0.07c	0.18±0.04b	0.15±0.02c
100% C	8.84±0.30bc	9.35±0.19b	1.14±0.00b	1.19±0.07b	0.26±0.04ab	0.27±0.05b
20% W	8.39±0.06c	9.05±0.06b	0.97±0.11cd	0.91±0.10c	0.20±0.02b	0.20±0.06bc
50% W	8.67±0.06c	9.09±0.52b	1.07±0.02bc	1.17±0.18b	0.25±0.09ab	0.23±0.04bc
100% W	9.41±0.47b	9.54±0.42b	1.69±0.02a	1.29±0.00b	0.27±0.02ab	0.30±0.06b
200% W	10.23±0.42a	10.36±0.15a	1.73±0.12a	1.53±0.14a	0.37±0.06a	0.44±0.00a

处理 Treatment	游离腐殖酸/腐殖酸 Free humic acid/humic acid/%		残渣碳 Residue carbon /(g·kg <sup>-1</sup> )		残渣碳/有机碳 Residue carbon/organic carbon/%	
	2022-08-01	2022-11-09	2022-08-01	2022-11-09	2022-08-01	2022-11-09
CK	22.79±1.80b	16.67±0.00cd	6.41±0.27c	6.39±0.04d	87.91±0.01a	85.94±0.03ab
100% C	25.00±0.00b	19.23±1.00bc	7.70±0.30b	8.16±0.16b	87.12±0.00a	87.29±0.01ab
20% W	17.54±0.72c	26.14±2.29a	7.43±0.07b	8.13±0.14b	88.51±0.01a	89.90±0.01a
50% W	29.35±2.58a	15.95±1.11d	7.57±0.05b	7.58±0.17c	87.63±0.00a	83.78±0.06ab
100% W	14.91±1.04c	20.00±1.63b	7.36±0.12b	8.53±0.10a	78.26±0.03b	89.62±0.04ab
200% W	23.90±0.24b	26.99±0.35a	8.21±0.21a	8.63±0.03a	80.33±0.01b	83.30±0.01b

表 7 土壤全氮和有机氮组分相关分析

Table 7 Correlation analysis of soil total nitrogen and organic nitrogen components

指标 Index	TN	AN	AAN	ASN	HUN	NHN	TAHN
TN	1.000	0.221	0.782	0.911 *	0.923 **	0.147	0.914 *
AN		1.000	0.037	0.093	0.057	0.841 *	0.067
AAN			1.000	0.910 *	0.849 *	0.429	0.944 **
ASN				1.000	0.963 **	0.458	0.981 **
HUN					1.000	0.240	0.974 **
NHN						1.000	0.323
TAHN							1.000

注: TN: 全氮; AN: 酸解氨态氮; AAN: 氨基酸态氮; ASN: 氨基糖态氮; HUN: 酸解未知态氮; NHN: 非酸解态氮; TAHN: 酸解总氮。\* 和 \*\* 分别表示显著相关 ( $P < 0.05$ ) 和极显著相关 ( $P < 0.01$ ), 下同。

Note: TN: Total nitrogen; AN: Hydrolyzable ammonium nitrogen; AAN: Amino acid nitrogen; ASN: Amino sugar nitrogen; HUN: Hydrolyzable unknown nitrogen; NHN: No hydrolyzed nitrogen; TAHN: Acid hydrolysis of total nitrogen. \* and \*\* indicate a significant ( $P < 0.05$ ) and very significant correlation ( $P < 0.01$ ), respectively, the same below.

### 2.7 不同沼液处理土壤有机碳组分与有机碳含量的相关性分析

如表 8 所示, 将土壤有机碳与其组分进行相关分析发现, 有机碳与腐殖酸、游离腐殖酸、残渣碳、富里酸均呈极显著正相关关系, 相关系数分别为 0.772、0.762、0.872、0.695; 腐殖酸与游离腐殖酸、残渣碳、富里酸均呈极显著正相关关系, 相关关系分别为 0.758、0.655、0.805; 游离腐殖酸与残渣碳、富里酸呈极显著正相关关系, 相关系数分别为 0.708、0.873; 残渣碳与胡敏酸呈显著正相关关系, 相关系数为 0.486, 与富里酸呈极显著正相关关系, 相关系数为 0.628。可见土壤有机碳、氮之间存在一定的相关性。

## 3 讨论

土壤碳、氮联系密切, 腐殖酸的羟基、羧基等酸性官能团能够与氮元素反应, 形成稳定络合物, 这些络合物在土壤中存留较久, 氮元素得以缓慢释放, 从而减少氮的损失, 提高氮肥利用率<sup>[16]</sup>; 沼液配施对土壤中的易矿化有机氮库有重要影响, 既能提高土壤氮素的供应强度, 又可以提高土壤氮素的供应容量<sup>[17]</sup>, 但由于苜蓿种植年限、土层深度、样品测定状态及研究区域土壤条件、气候和田间管理方式等差异, 导致沼液配施下草田土壤碳、氮变化的结论并不一致<sup>[18]</sup>。本研究发现, 土壤富里酸含量随沼液配施比例的提高而提高, 基于常规施用化肥氮 100%~200% 用量的沼液处理可以显著提高土壤富里酸含量; 沼液施用比例为 50%~100% 时胡敏酸含量最高, 这与 Fan 等<sup>[19]</sup> 研究结果一致。腐殖酸按照存在形态分为游离腐殖酸和(钙、镁)结合态腐殖酸, 结合态腐殖酸生物活性较低, 在农业等领域无法直接应用, 只有游离腐殖酸才具有固氮、解磷、释钾的作用<sup>[20]</sup>, 因此提高土壤腐殖酸中水溶性游离腐殖酸含量意义重大。本研究中, 游离腐殖酸含量随沼液配施比例的提高而提高, 平均占比 21.86%, 其中沼液 20%~50% 替代化肥氮处理对游离腐殖酸含量的提高效果较好。

土壤有机氮是土壤氮素的主要存在形态, 其含量变化可影响土壤肥力, 决定土壤潜在保氮供氮能力<sup>[21]</sup>, 其中酸解氮对可矿化氮的影响较大, 非酸解氮结构较为稳定, 酸解氮分配比例的增加可以提高土壤氮素的固持能力<sup>[22]</sup>。沼液配施对不同形态有机

表8 土壤有机碳组分相关分析

Table 8 Correlation analysis of soil organic carbon components

指标 Index	有机碳 Organic carbon	腐殖酸 Humic acid	游离腐殖酸 Free humic acid	残渣碳 Residue carbon	胡敏酸 Humic acid	富里酸 Fulvic acid
有机碳 Organic carbon	1.000	0.772 **	0.762 **	0.872 **	0.454	0.695 **
腐殖酸 Humic acid		1.000	0.758 **	0.655 **	0.294	0.805 **
游离腐殖酸 Free humic acid			1.000	0.708 **	0.157	0.873 **
残渣碳 Residue carbon				1.000	0.486 *	0.628 **
胡敏酸 Humic acid					1.000	0.060
富里酸 Fulvic acid						1.000

氮组分影响存在差异。肖伟伟等<sup>[23]</sup>研究表明,长期配施有机肥可显著提高土壤酸解性氮含量;贾倩等<sup>[24]</sup>研究发现,施用氮肥能够显著提高土壤酸解总氮含量。本研究发现,沼液配施显著提高了土壤酸解总氮和酸解氨基酸态氮含量,酸解总氮的平均含量为  $754.89 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,占土壤总氮的 67.99%,而氨基糖态氮在有机氮组分中含量最低,与前人研究结果相似<sup>[25-26]</sup>,这可能是因为因为氨基糖是土壤微生物细胞壁残留物,主要成分为氨基葡萄糖、氨基半乳糖和胞壁酸,在土壤中较为稳定;氨基酸态氮作为土壤氮最主要的矿化源,与土壤微生物代谢活动联系紧密<sup>[27]</sup>,施入的氮素肥料可能更多地被微生物利用并以氨基酸态氮的形式存在于土壤中。李世清等<sup>[28]</sup>研究发现,长期施用有机肥可显著增加氨基酸态氮含量(平均增加  $\text{N } 148.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。本研究也发现沼液配施较单施化肥可显著提高土壤酸解氨基酸态氮含量,但酸解氨态氮含量在整个试验期变化不显著;这与张玉树等<sup>[29]</sup>和王克鹏等<sup>[30]</sup>的研究结果相同,原因在于酸解氨态氮是土壤氮素的临时库,氮肥施入土壤后,可以快速固定于酸解氨态氮中,酸解氨态氮作为土壤中主要的有效态氮,可以直接被当季作物吸收利用,因此能达到一个基本平衡的状态。酸解未知态氮的形态和性质均较复杂,对土壤矿质态氮的贡献仅次于氨基酸态氮,其含量占土壤酸解总氮的 27.70%,由杂环态氮(N-苯氧基氨基酸氮、非 $\alpha$ -氨基酸氮和嘧啶、嘌呤等)、土壤腐殖质化过程的产物和部分酸解未释放的固定态氮等生物有效性较低的物质组成,是土壤酸解有机氮库中较难矿化的组分,因此容易在土壤中积累<sup>[31-32]</sup>。

前人研究表明,施肥会改变土壤各酸解态氮的分布比例,其中对氨基酸态氮分布比例的提升最

大<sup>[33]</sup>。氨基酸态氮和酸解氨态氮作为土壤中重要的有机氮,决定了土壤氮素的矿化潜力,常被用来表征土壤供氮潜能;酸解未知态氮具有较高的活性,对植物生长起着至关重要的作用<sup>[24]</sup>。总体而言,本研究中土壤有机氮各组分质量分数占比由大到小依次为:酸解未知态氮、氨基酸态氮、氨态氮、氨基糖态氮,这与马欣等<sup>[34]</sup>的研究结果一致,表明土壤有机氮组分的分布特征具有一定的共性。已有研究表明土壤有机氮组分与全氮之间存在一定的相关性<sup>[35]</sup>。本研究也发现全氮与酸解总氮、氨基糖态氮和未知态氮均存在显著正相关关系,但与氨基酸态氮和氨态氮未表现出显著相关性。

## 4 结论

沼液配施可以提高土壤酸解氨基酸态氮、酸解总氮含量。随沼液配施比例的提高,腐殖酸、富里酸、游离腐殖酸和有机碳含量增加,胡敏酸与富里酸比值下降。与单施化肥相比,沼液 100%和 200%代替氮肥处理的土壤酸解总氮和酸解氨基酸态氮分别显著提高 8.22%~21.71%和 13.93%~37.21%,土壤富里酸分别显著提高  $0.14 \sim 0.23 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  和  $0.17 \sim 0.45 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。与 100%沼液代替氮肥施用处理相比,200%沼液代替氮肥施用处理的土壤氨基糖态氮、未知态氮和全氮含量分别下降  $4.97 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $34.79 \sim 91.94 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  和  $0.01 \sim 0.10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ;沼液施用可提高酸解氮组分占比,尤其是酸解氨基酸态氮。相关性分析结果表明,全氮与酸解总氮、氨基糖态氮、未知态氮和有机碳与腐殖酸、游离腐殖酸、残渣碳、富里酸含量间呈极显著正相关关系。从替代氮肥和改善土壤养分状况方面考虑,苜蓿生产上可以采用 100%沼液代替氮肥处理的施肥方案。

## 参考文献:

- [1] ZHOU Z C, ZHANG X Y, GAN Z T. Changes in soil organic carbon and nitrogen after 26 years of farmland management on the Loess Plateau of China[J]. Journal of Arid Land, 2015, 7(6): 806-813.
- [2] 海龙, 姚拓, 张文明, 等. 黄土丘陵沟壑区不同种植年限苜蓿草地土壤团聚体及其有机碳分布特征[J]. 草原与草坪, 2020, 40(4): 16-21.
- HAI L, YAO T, ZHANG W M, et al. Distribution characteristics of soil aggregates and its organic carbon of alfalfa grassland with different growth years in Loess hilly-gully region[J]. Grassland and Turf, 2020, 40(4): 16-21.
- [3] 余庆柱. 不同氮肥施用量对辣椒品质 and 经济效益的影响[J]. 现代农业科技, 2022, (5): 42-44.
- YU Q Z. Effects of different nitrogen fertilizer application rates on quality and economic benefits of pepper[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2022, (5): 42-44.
- [4] ZHU X K, GUO W S, DING J F, et al. Enhancing nitrogen use efficiency by combinations of nitrogen application amount and time in wheat[J]. Journal of Plant Nutrition, 2011, 34(12): 1747-1761.
- [5] 隋鑫, 霍海南, 鲍雪莲, 等. 覆盖作物的种植现状及其对下茬作物生长和土壤环境影响的研究进展[J]. 应用生态学报, 2021, 32(8): 2666-2674.
- SUI X, HUO H N, BAO X L, et al. Research advances on cover crop plantation and its effects on subsequent crop and soil environment[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2021, 32(8): 2666-2674.
- [6] 王碧胜, 于维水, 武雪萍, 等. 不同耕作措施下添加秸秆对土壤有机碳及其相关因素的影响[J]. 中国农业科学, 2021, 54(6): 1176-1187.
- WANG B S, YU W S, WU X P, et al. Effects of straw addition on soil organic carbon and related factors under different tillage practices[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2021, 54(6): 1176-1187.
- [7] 李瑞, 张巡, 杨阳, 等. 沼液替代化学氮肥对滨海稻田土壤有机氮和细菌群落的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2022, 28(8): 1364-1375.
- LI R, ZHANG X, YANG Y, et al. Effects of substituting biogas slurry for chemical nitrogen fertilizer on soil organic nitrogen and bacterial communities in coastal paddy fields[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2022, 28(8): 1364-1375.
- [8] OFOSU-BUDU K G, FUJITA K, GAMO T, et al. Dinitrogen fixation and nitrogen release from roots of soybean cultivar bragg and its mutants Nts1116 and Nts1007[J]. Soil Science and Plant Nutrition, 1993, 39(3): 497-506.
- [9] 孙启忠, 桂荣. 影响苜蓿草产量和品质诸因素研究进展[J]. 中国草地, 2000, (1): 57-63.
- SUN Q Z, GUI R. Factors affecting alfalfa forage yield and quality[J]. Chinese Journal of Grassland, 2000, (1): 57-63.
- [10] 李玉山. 苜蓿生产力动态及其水分生态环境效应[J]. 土壤学报, 2002, 39(3): 404-411.
- LI Y S. Productivity dynamic of alfalfa and its effects on water environment[J]. Acta Pedologica Sinica, 2002, 39(3): 404-411.
- [11] 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: 152-156.
- LU R K. Methods for agricultural chemical analysis of soil[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000: 152-156.
- [12] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 1981: 30-34.
- BAO S D. Soil and agricultural chemistry analysis[M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press, 1981: 30-34.
- [13] SITTHINOI P, LERTMONGKOL S, CHANPRASERT W, et al. Allelopathic effects of jungle rice (*Echinochloa colona* (L.) Link) extract on seed germination and seedling growth of rice[J]. Agriculture and Natural Resources, 2017, 51(2): 74-78.
- [14] LI H Y, ZHOU X G, WU F Z. Effects of root exudates from potato onion on *Verticillium dahliae*[J]. Allelopathy Journal, 2018, 43(2): 217-222.
- [15] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2000: 42-49.
- BAO S D. Soil and agricultural chemistry analysis[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 42-49.
- [16] WANG X J, WANG Z Q, LI S G. The effect of humic acids on the availability of phosphorus fertilizers in alkaline soils[J]. Soil Use and Management, 1995, 11(2): 99-102.
- [17] NGUYEN T H, SHINDO H. Effects of different levels of compost application on amounts and distribution of organic nitrogen forms in soil particle size fractions subjected mainly to double cropping[J]. Agricultural Sciences, 2011, 2(3): 213-219.
- [18] 王振, 王子煜, 韩清芳, 等. 黄土高原苜蓿草地土壤碳、氮变化特征研究[J]. 草地学报, 2013, 21(6): 1073-1079.
- WANG Z, WANG ZI Y, HAN Q F, et al. Soil carbon and nitrogen variation characteristics of alfalfa grassland in loess plateau area[J]. Acta Agrestis Sinica, 2013, 21(6): 1073-1079.
- [19] FAN W, WU J, LI J, et al. Comparative effects of different maize straw returning modes on soil humus composition and humic acid structural characteristics in Northeast China [J]. Chemistry & Ecology, 2018, 34(4): 355-370.
- [20] 王洪富, 高进华, 李昆仑, 等. 腐植酸活化原料指标评价研究[J]. 磷肥与复肥, 2019, 34(6): 28-30.
- WANG H F, GAO J H, LI K L, et al. Study on evaluation index system of activated humic acid raw materials [J]. Phosphate & Compound Fertilizer, 2019, 34(6): 28-30.
- [21] 董姝含, 吕慧捷, 周锋, 等. 玉米土壤有机氮组分的生长季动态变化及其对当季和长期秸秆还田的响应[J]. 生态学杂志, 2022, 41(1): 73-80.
- DONG S H, LV H J, ZHOU F, et al. Variation of soil organic nitrogen fractions in maize field during growing season and its response to current year and long-term straw returning[J]. Chinese Journal of Ecology, 2022, 41(1): 73-80.
- [22] LÜ H, HE H B, ZHAO J S, et al. Dynamics of fertilizer-derived organic nitrogen fractions in an arable soil during a growing season[J]. Plant and soil, 2013, 373(1): 595-607.
- [23] 肖伟伟, 范晓晖, 杨林章, 等. 长期定位施肥对潮土有机氮组分和有机碳的影响[J]. 土壤学报, 2009, 46(2): 274-280.
- XIAO W W, FAN X H, YANG L Z, et al. Effects of long-term fertilization on organic nitrogen fractions and organic carbon in fluvo-aquic soil[J]. Acta Pedologica Sinica, 2009, 46(2): 274-280.
- [24] 贾倩, 廖世鹏, 卜容燕, 等. 不同轮作模式下氮肥用量对土壤有机氮组分的影响[J]. 土壤学报, 2017, 54(6): 1547-1558.
- JIA Q, LIAO S P, BU R Y, et al. Effects of nitrogen application rate on fractionation of soil organic nitrogen relative to crop rotation mode [J]. Acta Pedologica Sinica, 2017, 54(6): 1547-1558.
- [25] 丁咸庆, 马慧静, 朱晓龙, 等. 大围山典型森林土壤有机氮垂直



- 分布特征[J]. 环境科学, 2015, 36(10): 3809-3815.
- DING X Q, MA H J, ZHU X L, et al. Vertical distribution characteristics of typical forest soil organic nitrogen in Dawei mountain [J]. Environmental Science, 2015, 36(10): 3809-3815.
- [26] 郝晓晖, 肖宏宇, 苏以荣, 等. 长期不同施肥稻田土壤的氮素形态及矿化作用特征[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2007, 33(5): 544-550.
- HAO X H, XIAO H Y, SU Y R, et al. Characteristics of nitrogen forms and mineralization in paddy soils of long-term fertilization experiment[J]. Journal of Zhejiang University(Agriculture & Life Sciences), 2007, 33(5): 544-550.
- [27] 郭永盛, 李俊华, 李鲁华, 等. 施氮肥对荒漠草原土壤微生物种群及微生物量的影响[J]. 新疆农业科学, 2011, 48(1): 79-85.
- GUO Y S, LI J H, LI L H, et al. Effects of nitrogen fertilization on desert grassland soil microbial population and microbial biomass [J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2011, 48(1): 79-85.
- [28] 李世清, 李生秀, 邵明安, 等. 半干旱农田生态系统长期施肥对土壤有机氮组分和微生物体氮的影响[J]. 中国农业科学, 2004, 37(6): 859-864.
- LI S Q, LI S X, SHAO M A, et al. Effects of long-term application of fertilizers on soil organic nitrogen components and microbial biomass nitrogen in semiarid farmland ecological system[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2004, 37(6): 859-864.
- [29] 张玉树, 张金波, 朱同彬, 等. 不同种植年限果园土壤有机氮组分变化特征[J]. 生态学杂志, 2015, 34(5): 1229-1233.
- ZHANG Y S, ZHANG J B, ZHU T B, et al. Characteristics of soil organic nitrogen components of orchards with different planting ages [J]. Chinese Journal of Ecology, 2015, 34(5): 1229-1233.
- [30] 王克鹏, 张仁陟, 索东让. 长期施肥对河西灌漠土有机氮组分及剖面分布的影响[J]. 土壤通报, 2009, 40(5): 1092-1097.
- WANG K P, ZHANG R Z, SUO D R. Effects of long-term fertilization on organic nitrogen components and profile distribution of irrigated desert soil in Hexi [J]. Chinese Journal of soil Science, 2009, 40(5): 1092-1097.
- [31] 吴汉卿, 张玉龙, 张玉玲, 等. 土壤有机氮组分研究进展[J]. 土壤通报, 2018, 49(5): 1240-1246.
- WU H Q, ZHANG Y L, ZHANG Y L, et al. Soil organic nitrogen fractions: a review [J]. Chinese Journal of Soil Science, 2018, 49(5): 1240-1246.
- [32] 彭令发, 郝明德, 来璐. 长期施肥对土壤有机氮影响研究[氮肥及其配施下土壤有机氮组分变化[J]. 水土保持研究, 2003, 10(1): 53-54.
- PENG L F, HAO M D, LAI L. Studies of long-term fertilization on Soil organic N components I. The variation of soil organic N components of N fertilizer and its mixture [J]. Research of Soil and Water Conservation, 2003, 10(1): 53-54.
- [33] DURANI ASMATULLAH, BRAR B, DHERI G S. Soil nitrogen fractions in relation to rice-wheat productivity: effects of long-term application of mineral fertilizers and organic manures [J]. Journal of Crop Improvement, 2016, 30(4): 399-420.
- [34] 马欣, 谢泽宇, 罗珠珠, 等. 陇中地区多年种植苜蓿后不同后茬作物的土壤有机氮特征[J]. 中国土壤与肥料, 2020, (2): 17-23.
- MA X, XIE Z Y, LUO Z Z, et al. Characterization of soil organic nitrogen component in different succeeding crops of lucerne on the loess plateau of central Gansu [J]. Soils and Fertilizers Sciences in China, 2020, (2): 17-23.
- [35] 郝小雨, 马星竹, 高中超, 等. 长期施肥下黑土活性氮和有机氮组分变化特征[J]. 中国农业科学, 2015, 48(23): 4707-4716.
- HAO X Y, MA X Z, GAO Z C, et al. Variation characteristics of fractions of active nitrogen and organic nitrogen under different long-term fertilization practices in black soil [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2015, 48(23): 4707-4716.

(上接第 67 页)

- [26] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [27] ZHOU X, ZHENG W, LI Y, et al. I-TASSER-MTD: a deep-learning-based platform for multi-domain protein structure and function prediction [J]. Nature Protocols, 2022, 17(10): 2326-2353.
- [28] MÜLLER-SCHÜSSELE S J, WANG R, GÜTLE D D, et al. Chloroplasts require glutathione reductase to balance reactive oxygen species and maintain efficient photosynthesis [J]. The Plant Journal, 2020, 103(3): 1140-1154.
- [29] TRIVEDI D K, GILL S S, YADAV S, et al. Genome-wide analysis of glutathione reductase (GR) genes from rice and *Arabidopsis* [J]. Plant Signaling & Behavior, 2013, 8(2): e23021.
- [30] WANG B P, DING H Y, CHEN Q Q, et al. Enhanced tolerance to methyl viologen-mediated oxidative stress via AtGR2 expression from chloroplast genome [J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 1178.
- [31] WANG Q L, PU Y N, YANG D N, et al. Molecular cloning and characterization of the glutathione reductase gene from *Stipa purpurea* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018, 495(2): 1851-1857.
- [32] HYDE G E, CRAWFORD N M, CAMPBELL W H. The sequence of squash NADH: nitrate reductase and its relationship to the sequences of other flavoprotein oxidoreductases. A family of flavoprotein pyridine nucleotide cytochrome reductases [J]. Journal of Biological Chemistry, 1991, 266(35): 23542-23547.
- [33] SENDA T, YAMADA T, SAKURAI N, et al. Crystal structure of NADH-dependent ferredoxin reductase component in biphenyl dioxygenase [J]. Journal of Molecular Biology, 2000, 304(3): 397-410.
- [34] NOCEK B, JANG S B, JEONG M S, et al. Structural basis for CO<sub>2</sub> fixation by a novel member of the disulfide oxidoreductase family of enzymes, 2-ketopropyl-coenzyme M oxidoreductase/carboxylase [J]. Biochemistry, 2002, 41(43): 12907-12913.
- [35] MUSTACICH D, POWIS G. Thioredoxin reductase [J]. Biochemical Journal, 2000, 346 (Pt 1): 1-8.
- [36] ARNÉR E S, HOLMGREN A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase [J]. European Journal of Biochemistry, 2000, 267(20): 6102-6109.