

李熠凡, 李伏生, 罗维钢, 等. 垄作灌溉和减施氮肥对稻田 CH_4 排放、土壤有机酸含量和酶编码基因表达量的影响 [J]. 华南农业大学学报, 2024, 45(1): 42-51.

LI Yifan, LI Fusheng, LUO Weigang, et al. Effects of ridge irrigation and nitrogen reduction on paddy field CH_4 emission, soil organic acid content and expression of enzyme encoding genes[J]. Journal of South China Agricultural University, 2024, 45(1): 42-51.

垄作灌溉和减施氮肥对稻田 CH_4 排放、土壤有机酸含量和酶编码基因表达量的影响

李熠凡¹, 李伏生¹, 罗维钢², 黄 挺²

(1 广西大学 农学院, 广西南宁 530005; 2 南宁市灌溉试验站, 广西南宁 530001)

摘要:【目的】研究不同垄面宽度的垄作灌溉和不同时期减施氮肥对稻田甲烷 (CH_4) 排放、土壤有机酸含量以及 CH_4 形成和转化相关酶编码基因 (产 CH_4 古菌中甲基辅酶 M 还原酶编码基因 *mcrA* 和 CH_4 氧化菌中 CH_4 单加氧酶编码基因 *sMMO*) 表达量的影响, 揭示土壤有机酸以及 *mcrA* 和 *sMMO* 表达量对稻田 CH_4 通量的影响。【方法】开展 3 种灌溉模式 (淹水灌溉, 垄宽分别为 80、100 cm 的垄作灌溉) 和 3 种施氮处理 (常规施氮: $135 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$, 其中苗肥 $47.25 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 、分蘖肥 $54.00 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 和穗肥 $33.75 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$; 返青期减氮: $110 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$, 其中苗肥 $22.25 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 、分蘖肥 $54.00 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 和穗肥 $33.75 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$; 孕穗期减氮: $110 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$, 其中苗肥 $47.25 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 、分蘖肥 $54.00 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 和穗肥 $8.75 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$) 的田间试验, 测定生育期内稻田 CH_4 通量、土壤有机酸含量以及 *mcrA* 和 *sMMO* 表达量, 分析稻田 CH_4 通量、土壤有机酸含量以及 *mcrA* 和 *sMMO* 表达量之间的相互关系。【结果】相同施氮处理下, 垄作灌溉稻田 CH_4 排放量较淹水灌溉显著降低, 相同灌水模式下, 返青期减氮稻田 CH_4 排放量较常规施氮显著降低。垄宽为 80 cm 的垄作灌溉+常规施氮处理在施肥后 10 d 土壤总有机酸含量较施肥前高 71.7%, 淹水灌溉和常规施氮处理高 28.8%。返青期减氮下, 垄宽为 80 cm 的垄作灌溉土壤 *mcrA* 表达量整体低于淹水灌溉, *sMMO* 表达量除移栽后 25 d 外均高于淹水灌溉。稻田 CH_4 通量与土壤 *mcrA* 表达量和总有机酸含量显著相关 ($P < 0.01$), 相关系数分别为 0.644 和 -0.348, 土壤总有机酸含量与 *mcrA*、*sMMO* 表达量显著相关 ($P < 0.05$), 相关系数分别为 -0.240 和 0.197。【结论】垄宽 80 cm 垄作灌溉+返青期减氮处理降低了稻田 CH_4 通量, 土壤总有机酸含量和 *mcrA* 表达量显著影响稻田 CH_4 通量, *sMMO* 表达量可能间接影响稻田 CH_4 通量。

关键词: 垄作灌溉; 减氮施肥; 有机酸; CH_4 排放; *mcrA* 表达量; *sMMO* 表达量

中图分类号: S36; X511

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2024)01-0042-10

Effects of ridge irrigation and nitrogen reduction on paddy field CH_4 emission, soil organic acid content and expression of enzyme encoding genes

LI Yifan¹, LI Fusheng¹, LUO Weigang², HUANG Ting²

(1 College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530005, China; 2 Nanning Irrigation Experimental Station, Nanning 530001, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the effects of ridge irrigation with different ridge widths and reduced nitrogen fertilizer at different growth stages on methane (CH_4) emissions, soil organic acid content and

收稿日期: 2023-01-01 网络首发时间: 2023-11-17 16:23:47

首发网址: <https://link.cnki.net/urlid/44.1110.S.20231117.0909.002>

作者简介: 李熠凡, 硕士, 主要从事水肥资源利用与环境研究, E-mail: 869203013@qq.com; 通信作者: 李伏生, 教授, 博士, 主要从事水肥资源利用与环境研究, E-mail: 19880066@gxu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (42167035)

expression of enzyme encoding genes related to CH₄ formation and transformation (including methyl coenzyme M reductase gene *mcrA* in methanogenic archaea, and methane monooxygenase gene *sMMO* in methane oxidizing bacteria) in paddy fields, and reveal the effects of soil organic acid content and the expression of *mcrA*, *sMMO* on CH₄ fluxes in paddy fields. 【Method】 A field experiment was conducted with three irrigation modes (flooding irrigation, ridge irrigation with ridge widths of 80, 100 cm) and three nitrogen treatments (conventional nitrogen application: 135 kg·hm⁻², including seedling fertilizer 47.25 kg hm⁻², tillering fertilizer 54.00 kg hm⁻² and booting fertilizer 33.75 kg hm⁻²; Nitrogen reduction at seedling stage: 110 kg·hm⁻², including seedling fertilizer 22.25 kg hm⁻², tillering fertilizer 54.00 kg hm⁻² and booting fertilizer 33.75 kg hm⁻²; Nitrogen reduction at booting stage: 110 kg·hm⁻², including seedling fertilizer 47.25 kg hm⁻², tillering fertilizer 54.00 kg hm⁻² and booting fertilizer 8.75 kg hm⁻²). The paddy field CH₄ fluxes, soil organic acid content and *mcrA*, *sMMO* expression levels in different treatments were measured, and the relationships among them were analyzed. 【Result】 Under the same nitrogen treatment, ridge irrigation significantly reduced CH₄ emission from paddy fields compared with flooding irrigation. Under the same irrigation mode, nitrogen reduction at seedling stage significantly reduced CH₄ emission from paddy field compared with conventional nitrogen application. The total organic acid content of soil in ridge irrigation with ridge width of 80 cm + nitrogen reduction at seedling stage treatment was 71.7% higher than that before fertilization on the 10th day after fertilization, and 28.8% higher in flooding irrigation + conventional nitrogen application treatment. Under the condition of nitrogen reduction at seedling stage, the expression of *mcrA* in ridge irrigation with ridge width of 80 cm soil was overall lower than that in flooding irrigation soil, and the expression of *sMMO* was higher than that in flooding irrigation except 25 days after transplanting. CH₄ fluxes were significantly correlated with *mcrA* expression and total organic acid content in soils ($P<0.01$), with correlation coefficients of 0.644 and -0.348, respectively. There were significant correlations between soil total organic acid content and the expressions of *mcrA* and *sMMO* ($P < 0.05$), with correlation coefficients of -0.240 and 0.197, respectively. 【Conclusion】 The ridge irrigation with the ridge width of 80 cm + nitrogen reduction at seedling stage treatment can reduce CH₄ flux from paddy fields. Soil total organic acid content and *mcrA* expression significantly affect paddy field CH₄ flux, while soil *sMMO* expression may indirectly affect CH₄ flux.

Key words: Ridge irrigation; Reduced nitrogen fertilizer application; Organic acid; CH₄ emission; *mcrA* expression; *sMMO* expression

甲烷 (CH₄) 是仅次于二氧化碳 (CO₂) 的第二大温室气体, 其增温效应对全球温室效应的贡献率高达 17%^[1]。稻田系统是农田土壤 CH₄ 的重要排放源, 而合理灌溉方式和施肥管理是降低稻田温室气体排放和温室效应的主要措施。水稻淹水栽培模式不仅耗水量较大, 还导致稻田产生大量 CH₄^[2-3], 是 CH₄ 的主要人为排放源。垄作灌溉是稻田在平作基础上, 经起垄, 利用垄沟中储存的自然降雨以及灌溉水, 在水稻生长过程中进行浸润灌溉^[4]。垄作灌溉在减少灌水量的同时可降低稻田 CH₄ 累积排放量^[5]。与淹水灌溉相比, 垄宽为 80 cm 的垄作灌溉稻田 CH₄ 排放量减少 45.6%~70.3%^[6]。

过量施入氮肥会导致氮素利用效率降低, 土壤污染加重, 硝态氮淋溶增强, 对土壤环境造成极大威胁^[7]。胡敏杰等^[8]认为较高氮肥用量会增加根系和地上生物量, 使土壤碳氮比提高, 为产 CH₄ 菌提供更多的有机底物, 同时短期内刺激土壤微生物活性, 促进土壤有机质分解, 从而促进 CH₄ 排放。姜珊珊等^[9]研究发现, 减施氮肥可以减少稻麦农田温室气体排放, 实现减排。适宜的施氮量改善 CH₄ 氧化菌的氮缺乏状态, 有利于 CH₄ 氧化菌的生长繁殖, 提高 CH₄ 排放氧化能力, 从而降低 CH₄ 排放。适宜的施氮量可以降低稻田 CH₄ 排放^[10-11], 因此在保证产量的同时, 寻找合理的减氮量对稻田 CH₄ 减排很有必要。

根系分泌有机酸总量、苹果酸和琥珀酸含量与土壤供氮量呈正效应^[12]。稻田 CH₄ 排放与土壤有机酸含量有一定关系。目前已知 CH₄ 产生途径之一

是产 CH_4 菌在厌氧条件下将土壤有机物分解转化为乙酸、 H_2 和 CO_2 等^[13]。与淹水灌溉相比,干湿交替灌溉对稻田土壤中的产 CH_4 古菌种群丰度没有显著影响,但却显著改变了土壤中产 CH_4 菌的群落结构^[14]。产 CH_4 古菌中甲基辅酶 M 还原酶 (Methyl coenzyme M reductase, MCR) 是 CH_4 形成的关键酶,其编码基因为 *mcrA*^[15],而甲烷单加氧酶 (Methane monooxygenase, MMO) 是 CH_4 氧化的关键酶^[16],有 sMMO 和 pMMO 2 种形式,编码基因分别为 *sMMO* 和 *pMMO*,是产 CH_4 菌和 CH_4 氧化菌丰度估算的分子标记。Yuan 等^[17] 结合高通量测序和 qPCR 等技术,通过 CH_4 合成和氧化过程中的关键酶编码基因表达量估算产 CH_4 菌及 CH_4 氧化菌丰度,发现还原途径的乙酸裂解途径的甲烷鬃菌属 *Methanosaeta* 为稻田产 CH_4 核心菌群,其群落组成与土壤草酸、乙酸和琥珀酸等有机酸密切相关。

目前有关垄作灌溉对稻田 CH_4 通量、土壤有机酸和 CH_4 形成和转化相关酶编码基因表达量的影响以及相互关系研究较少,前人在研究减施氮肥对稻田 CH_4 排放的影响上,取得的结论也尚不一致,有待进一步探讨。为探索垄作灌溉与减施氮肥结合下稻田 CH_4 排放、土壤有机酸和 CH_4 形成和转化相关酶编码基因表达量之间的相互关系,通过田间试验,研究不同垄面宽度的垄作灌溉与水稻返青期和孕穗期减施氮肥对稻田土壤 CH_4 排放、土壤有机酸与 CH_4 形成和转化相关酶编码基因表达量的影响,分析不同垄作灌溉模式与施氮处理下土壤有机酸和酶编码基因表达量对稻田 CH_4 排放的影响。

1 材料与方法

1.1 试验地点和材料

大田试验于 2020 年 8 月在南宁市灌溉试验站 (N22°52'58.33"、E108°17'38.86") 进行。返青期 (移栽后 0—7 d)、分蘖期 (移栽后 8—38 d)、拔节孕穗期 (移栽后 38—57 d)、抽穗期 (移栽后 57—70 d) 和成熟期 (移栽后 71—95 d) 降水量分别为 74.0、45.0、70.5、56.5 和 13.5 mm。试验土壤为第四纪红色黏土发育的水稻土,主要理化性质如下:pH 7.069(水、土质量比 2.5:1.0, pH 计法);有机碳 16.58 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (重铬酸钾容量法-外加加热法);全氮 1.35 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (半微量开氏法);碱解氮 100.6 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 碱解扩散法);速效磷 55.38 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (0.5

$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaHCO_3 浸提-钼兰法);速效钾 116.65 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NH_4OAc 浸提-火焰光度法)^[18]。供试水稻品种选用当地推广的‘甬优 4949’,属三系粳杂交中稻品种。

1.2 试验方法

试验设 3 种灌溉模式——淹水灌溉、垄宽 80 cm 的垄作灌溉 (垄灌 80)、垄宽 100 cm 的垄作灌溉 (垄灌 100),和 3 种施氮处理——常规施氮、返青期减氮、孕穗期减氮,共 9 个处理,每个处理设 3 个小区,各小区面积 25 m^2 。淹水灌溉在水稻整个生育期内保持 20~40 mm 水层。垄作灌溉是在移栽前起垄,形成需要的垄面和垄沟,垄沟宽度和深度分别为 20 和 15 cm,根据生育期沟内灌水水层要求,插秧前将沟内水灌溉到高出垄面 10 mm,然后插秧,此后生育期内,垄面水层在 0~10 mm 循环,实现垄作灌溉。分蘖后期将沟内水灌至与垄面齐平,保持沟内至少有 1/4 水层,拔节孕穗期到成熟期垄面保持 10 mm 水层,成熟期将沟内水灌至与垄面齐平,等沟内降至 1/4 水层时,再将沟内水灌至与垄面齐平,如此循环,实现垄作灌溉,具体灌溉方式参照 Zeng 等^[6] 的方式。降雨时田面和垄沟水层可以增加 10~30 mm。3 种施氮处理纯氮用量分别为常规施氮:135 $\text{kg} \cdot \text{hm}^{-2}$,其中苗肥 47.25 $\text{kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 、分蘖肥 54.00 $\text{kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 和穗肥 33.75 $\text{kg} \cdot \text{hm}^{-2}$;返青期减氮:110 $\text{kg} \cdot \text{hm}^{-2}$,其中苗肥 22.25 $\text{kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 、分蘖肥 54.00 $\text{kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 和穗肥 33.75 $\text{kg} \cdot \text{hm}^{-2}$;孕穗期减氮:110 $\text{kg} \cdot \text{hm}^{-2}$,其中苗肥 47.25 $\text{kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 、分蘖肥 54.00 $\text{kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 和穗肥 8.75 $\text{kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 。试验氮、磷、钾肥分别使用尿素 [w(N)46%]、过磷酸钙 [w(P_2O_5)14%]、氧化钾 [w(K_2O)60%]。各处理 P_2O_5 用量均为 60 $\text{kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ (100% 基肥), K_2O 用量均为 120 $\text{kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ (60% 苗肥、40% 穗肥)。为防止试验小区间水分侧渗、保证各小区独立排水,小区间用水泥墙隔离分开,各小区均用水管引入固定水源、安装水表并计量灌水量。

试验于 2020 年 8 月 9 日进行大田移栽 (选取长势均匀的秧苗单株栽培,株行距为 20 cm×20 cm),8 月 16 日施苗肥 (移栽后 6 d),9 月 3 日施分蘖肥 (移栽后 21 d),9 月 24 日复水后施穗肥 (移栽后 42 d),11 月 14 日水稻收割。整个试验大田生育期为 95 d。

1.3 CH_4 气体采集和测定

用静态封闭箱法在田间采集稻田土壤及稻株共同排放的 CH_4 气体^[19]。静态箱箱体为无底圆柱

体, 由厚 5 mm 的亚克力板制成, 箱体直径 25 cm、高 80 cm, 顶部封闭留采气孔, 底部开口端为锯齿状, 静态箱内部安装可充电风扇。取样时静态箱垂直插入土壤中不留空隙, 保证箱内气体与外部大气不交换。采样前将箱体内风扇打开, 均匀混合气体, 再用注射器采集气体样品。不同时期稻田 CH₄ 通量的变化从水稻移栽后开始采样, 根据水分变化情况每隔 5~7 d 采样 1 次, 在施用氮肥后 7 d 内连续采样 3 次。采样时刻为 09:00—12:00, 同时记录箱温和采样器高度。每个采样点在盖箱后 0、10、20 和 30 min 时用注射器采样, 每次样品量为 20 mL。

CH₄ 通量采用气相色谱仪 Agilent 7890A 手动进样测定, 采用 FID 检测器, 检测温度为 350 ℃, 柱温 60 ℃, H₂ 发生器制备的 H₂ (流速为 40 mL·min⁻¹) 与空气混合点火, 载气为高纯 N₂。CH₄ 通量计算公式^[20] 如下:

$$F = H \times \frac{M \times P}{R \times (273 + \theta)} \times \frac{dc}{dt}, \tag{1}$$

式中, F 为 CH₄ 通量, mg·m⁻²·h⁻¹; H 为实测箱体高度, cm; M 为 CH₄ 的摩尔质量分数, 16 g·mol⁻¹; P 为标准大气压, 1.013×10⁵ Pa; R 为气体常数, 8.314 J·mol⁻¹·kg⁻¹; θ 是采样 30 min 箱体内的平均温度, ℃; dc/dt 为 CH₄ 排放速率, mL·m⁻³·h⁻¹。

CH₄ 累积排放量计算公式^[21] 如下:

$$\text{SUM} = \sum_{i=1}^n (F_{i+1} + F_i) / 2 \times (t_{i+1} - t_i) \times 24 \times 10^{-2}, \tag{2}$$

式中, SUM 为 CH₄ 累积排放量, kg·hm⁻²; i 为气体采样次数; $t_{i+1} - t_i$ 表示 2 个相邻测定日期的间隔时间, n 为 CH₄ 累积排放量观测时间内总测定次数。

1.4 土壤采集和测定

在水稻移栽后 20、25、30、43、45、46 和 71 d 采集 CH₄ 的同时, 用采土器采集每小区 0~20 cm 土层的非根际土壤。将新鲜土壤 (约 100 g) 放入提前灭菌过的离心管中, 用冷冻干燥机干燥 2 d, 保存在-80 ℃ 超低温冰箱, 用于土壤有机酸和 CH₄ 形成和转化相关酶编码基因表达量的测定。

采用外标法测定土壤有机酸含量^[22-23], 将土壤样品从-80 ℃ 冰箱取出, 用冷冻干燥机在-40 ℃ 对土壤样品进行冷冻干燥。干燥完毕后, 放入小钢珠密封离心管研磨、粉碎土样。在土壤样品中加入 0.5 mol·L⁻¹ NaHCO₃ 缓冲液, 经研磨仪震荡、静置后离心, 取上清液, 用水相针式过滤器过滤至 2 mL 进样瓶, 得到待测样品, 采用上海伍丰液相色谱仪

LC100(进样针设置取 20 μL) 进行测定。配制不同浓度的有机酸标准母液, 上机, 根据不同浓度有机酸的峰面积绘制每种有机酸的标准曲线, 稀释有机酸标准母液得到有机酸标准混合液, 上机测定得到有机酸标准色谱图, 以标准色谱图作为对照, 根据保留时间确定土壤样品中的各种有机酸, 并根据标准曲线计算土壤样品中的有机酸含量。总有机酸含量为草酸、酒石酸、苹果酸、丙二酸、乳酸、乙酸、柠檬酸和富马酸含量的总和。

酶编码基因表达量: 采用 qPCR 分别在水稻不同生长时期测定稻田 CH₄ 产生与转化相关酶编码基因的表达量。通过 SDS、CTAB、苯酚-氯仿-异戊醇和异丙醇试剂震荡离心后提取 RNA。采用 TaKaRa 反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Master Mix 得到 cDNA, 采用 TaKaRa 试剂盒 TB Green® Premix Ex Taq™ I 进行 qPCR, 仪器为 Roche LC 480, 由系统完成熔解曲线及荧光检测, 并由系统自带软件 (SDS 2.3) 完成所测定样品的 C_p 值计算^[24-25]。

将产 CH₄ 古菌的酶编码基因 *mcrA* 和 *sMMO* 进行 qPCR, 通过 Abs Quant/Fit Points 分析得出 C_p 值, 分别与内参基因古菌 A16sRNA 和细菌 U16sRNA 的 C_p 值相比, 可看出酶编码基因 *mcrA* 和 *sMMO* 的相对表达量。

1.5 统计方法

本研究用 Excel 2021 对试验数据进行整理作图。本研究仅对稻田 CH₄ 累积排放量进行了方差分析。不同处理间稻田 CH₄ 累积排放量和土壤总有机酸含量的多重比较用 Duncan's 法, 差异显著性水平为 $P < 0.05$ 。用 Pearson 相关系数表示稻田 CH₄ 通量、土壤总有机酸含量和酶编码基因表达量之间的相关性。方差分析、多重比较和 Pearson 相关性用 SPSS 23.0 软件分析。

2 结果与分析

2.1 垄作灌溉与减施氮肥下稻田土壤总有机酸含量的变化规律

由图 1 可知, 不同处理土壤总有机酸含量为 80.4~133.6 mol·kg⁻¹。其中垄灌 80+常规施氮处理在施肥后 10 d 土壤总有机酸含量较施肥前高 71.7%, 淹水灌溉+常规施氮处理高 28.8%。返青期减氮下, 垄灌 80 和垄灌 100 土壤总有机酸含量整体低于淹水灌溉, 其中移栽后 30 d 垄作灌溉土壤总有机酸含量较淹水灌溉分别低 13.1% 和 5.8%。常规施氮下, 移栽后 20、25 d 垄作灌溉土壤总有机酸含量较淹水灌溉低, 而移栽后 30 d 高。孕穗期减氮下, 移栽后 45

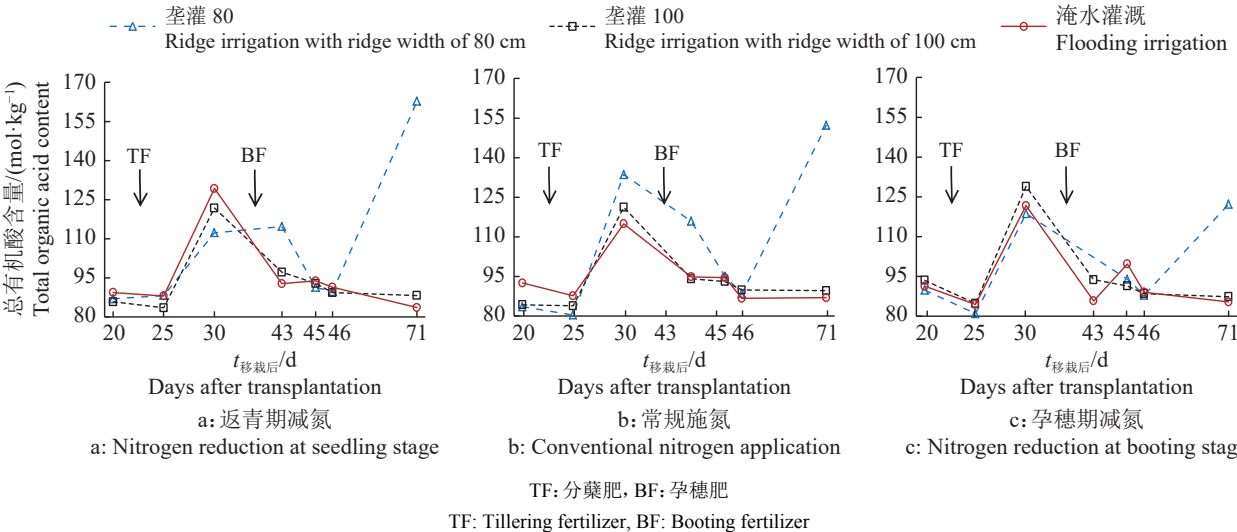


图 1 垄作灌溉与不同时期减施氮肥下稻田土壤总有机酸含量的变化

Fig. 1 Changes of total organic acid content in paddy soil under ridge irrigation and nitrogen reduction at different growth stages

d 垄作灌溉土壤总有机酸含量较淹水灌溉低。垄灌 80 和淹水灌溉下,在移栽后 25 d 返青期减氮土壤总有机酸含量高于常规施氮,垄作灌溉下,孕穗期减氮土壤总有机酸含量在施孕穗肥后整体低于常规施氮。

2.2 垄作灌溉与减施氮肥下稻田酶编码基因表达量的变化规律

图 2 是垄作灌溉和不同时期减施氮肥下稻田土壤产 CH₄ 古菌中 MCR 编码基因 *mcrA* 的表达结果。除移栽后 71 d 土壤 *mcrA* 表达量未测出外,其余天数不同处理土壤 *mcrA* 相对表达量在 0.09~0.76。由图 2 可知:各处理土壤 *mcrA* 表达量总体呈现为分蘖后期增加后降低,随后拔节孕穗期又增加的趋势,3 种施氮处理土壤 *mcrA* 表达量均在移

栽后 45 d(拔节孕穗期) 最低。由图 2a 可知,返青期减氮下,垄灌 80 和淹水灌溉土壤 *mcrA* 表达量在移栽后 25 d 达到峰值,而垄灌 100 土壤 *mcrA* 表达量在移栽后 30 d 最高。3 种灌溉模式下土壤 *mcrA* 表达量均在移栽后 46 d 出现第 2 个小高峰。移栽后 45 d 土壤 *mcrA* 表达量降低,随后上升;推测可能是因为分蘖末期至孕穗期晒田,土壤氧气条件充足,抑制了产 CH₄ 菌活性,从而降低土壤 *mcrA* 表达量。返青期减氮下,垄灌 80 土壤 *mcrA* 表达量均低于淹水灌溉,其中移栽后 20 d 垄灌 80 土壤 *mcrA* 表达量较淹水灌溉低 12%。常规施氮下,移栽后 20、25 d 垄作灌溉土壤 *mcrA* 表达量较淹水灌溉低,而移栽后 30 d 高。孕穗期减氮下,移栽后 45、46 d,垄作灌溉土壤 *mcrA* 表达量均较淹水灌溉低。垄灌 80 下,

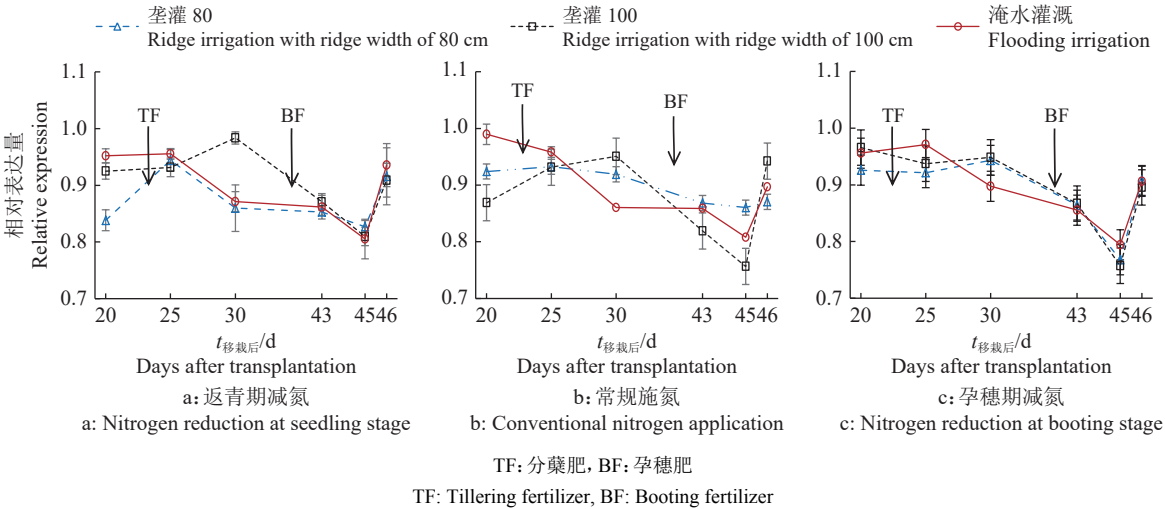


图 2 垄作灌溉和不同时期减施氮肥下稻田土壤甲基辅酶 M 还原酶编码基因 *mcrA* 表达量

Fig. 2 Methyl coenzyme M reductase encoding gene *mcrA* expression level in paddy soil under ridge irrigation and nitrogen reduction at different growth stages

在移栽后 20、30、43 和 45 d, 返青期减氮土壤 *mcrA* 表达量均低于常规施氮。

图 3 是垄作灌溉和不同时期减氮下稻田土壤 CH₄ 氧化菌中 MMO 编码基因 *sMMO* 表达量结果, 不同处理土壤 *sMMO* 相对表达量为 0.59~1.16。由图 3 可知, 返青期减氮下, 垄灌 100 和淹水灌溉土壤 *sMMO* 表达量在移栽后 25 d 达到峰值, 垄灌 80 土壤 *sMMO* 表达量除移栽后 25 d 外均高于淹水灌溉, 移栽后 25 d 垄灌 80 土壤 *sMMO* 表达量较淹水灌溉低 18%。常规施氮下, 垄灌 100 和淹水灌溉土壤 *sMMO* 表达量均在施分蘖肥后开始上升随后

下降, 移栽后 20 d, 垄灌 80 和垄灌 100 土壤 *sMMO* 表达量较淹水灌溉分别增加 24.8% 和 7.0%, 而移栽后 25 d, 垄灌 80 和垄灌 100 较淹水灌溉分别低 30.0% 和 11.8%。孕穗期减氮下, 3 种灌溉模式土壤 *sMMO* 表达量均在施分蘖肥、孕穗肥后上升随后下降, 移栽后 46 d 垄作灌溉土壤 *sMMO* 表达量均较淹水灌溉高。垄灌 80 下, 移栽后 20、25 和 45 d, 返青期减氮土壤 *sMMO* 表达量均高于常规施氮。淹水灌溉下, 在移栽后 25、45 和 46 d, 孕穗期减氮土壤 *sMMO* 表达量整体低于常规施氮。

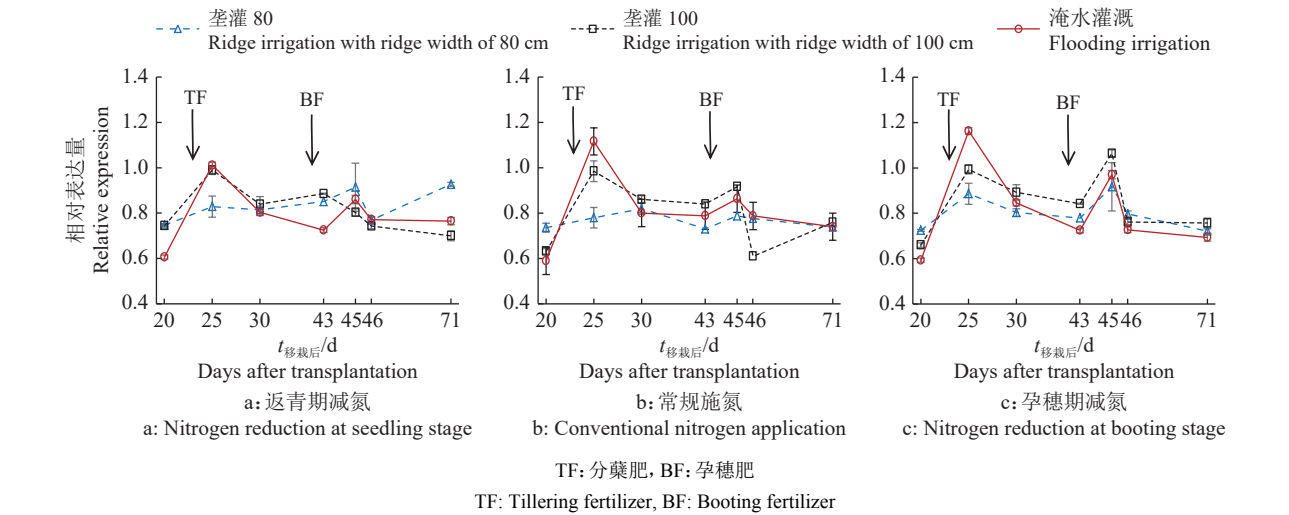


图 3 垄作灌溉与不同时期减施氮肥下土壤 CH₄ 单加氧酶编码基因 *sMMO* 表达量

Fig. 3 CH₄ monooxygenase encoding gene *sMMO* expression level in paddy soil under ridge irrigation and nitrogen reduction at different growth stages

2.3 垄作灌溉与减施氮肥稻田 CH₄ 排放特征

图 4 是垄作灌溉和不同时期减施氮肥下稻田 CH₄ 通量的变化情况, 整体呈下降趋势。返青期减

氮下, 垄作灌溉稻田 CH₄ 通量均在施分蘖肥后有增加趋势, 垄灌 100 稻田 CH₄ 通量受施肥影响较大, 在移栽后 30 d 最高, 淹水灌溉稻田 CH₄ 通量在移

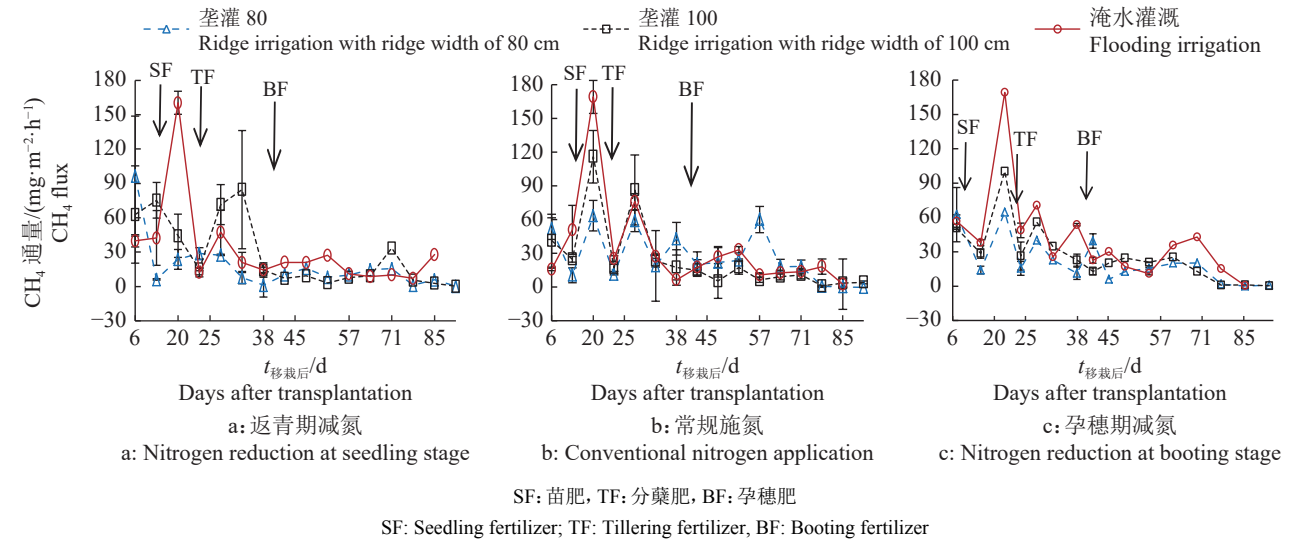


图 4 垄作灌溉和不同时期减施氮肥下稻田 CH₄ 通量的变化情况

Fig. 4 Changes of CH₄ flux in paddy field under ridge irrigation and nitrogen reduction at different growth stages

栽后 20 d 最高。常规施氮下, 3 种灌溉模式稻田 CH₄ 通量均在移栽后 20 d 最高, 随后稻田 CH₄ 通量降低; 移栽后 20、25 和 30 d, 垄作灌溉稻田 CH₄ 通量整体低于淹水灌溉。孕穗期减氮下, 除移栽后 25 d 外, 垄作灌溉稻田 CH₄ 通量总体低于淹水灌溉。垄作灌溉下, 返青期减氮稻田 CH₄ 通量整体低于常规施氮。

稻田 CH₄ 的排放主要集中在返青期与分蘖期, 在分蘖期达到排放高峰, 于拔节孕穗期降低, 在抽穗期短暂升高后下降 (表 1)。灌溉模式、施氮处理和两者的交互作用对稻田 CH₄ 的排放有显著影响, 在分蘖前期、分蘖后期、抽穗期和成熟期, 各处理稻田 CH₄ 累积排放量差异显著。返青期减氮、常规施氮和孕穗期减氮下垄灌 80 和垄灌 100 稻田全生育

期 CH₄ 累积排放量较淹水灌溉分别低 44.2% 和 10.7%、20.9% 和 30.7%、43.9% 和 32.5%。垄灌 80 下返青期减氮和孕穗期减氮稻田 CH₄ 累积排放量较常规施氮分别低 35.5% 和 18.8%, 而垄灌 100 下较常规施氮分别高 17.9% 和 11.7%, 淹水灌溉下返青期减氮较常规施氮低 8.5%, 而孕穗期减氮较常规施氮高 15%。全部处理中, 以垄灌 80+返青期减氮处理稻田全生育期 CH₄ 累积排放量最低。

2.4 稻田 CH₄ 通量、土壤总有机酸和酶编码基因表达量之间的相关性

由表 2 可知, 稻田 CH₄ 通量与土壤 MCR 编码基因 *mcrA* 表达量呈显著正相关关系 ($r=0.644$ 、 $P<0.01$), 而与总有机酸含量呈显著负相关关系 ($r=-0.348$ 、 $P<0.01$)。土壤总有机酸含量与土壤

表 1 垄作灌溉和不同时期减施氮肥下稻田 CH₄ 累积排放量 (E)¹⁾
Table 1 Cumulative CH₄ emission (E) in paddy field under ridge irrigation and nitrogen reduction at different growth stages

项目 Item	处理 Treatment	返青期 Regreening stage	分蘖前期 Early tillering stage	分蘖后期 Late tillering stage	拔节孕穗期 Jointing-booting stage	抽穗期 Heading stage	成熟期 Maturing stage	合计 Total
<i>E</i> /(kg·hm ⁻²)	YNC	128.2±0.5a	240.6±32.1b	144.9±7.9b	40.2±9.6g	77.3±13c	68.0±16.5d	699.1±2.9b
	L1NC	57.1±6.5d	114.5±12.8f	89.8±26.3g	68.4±9.2b	176.3±50.2a	47.3±15.4g	553.4±8.2e
	L2NC	57.9±4.1d	173.6±10.1d	135.1±11d	36.9±3.4h	44.4±50.3e	36.7±3.8h	484.6±2.6f
	YNS	100.8±3.9b	239.3±30.5b	103.9±19.4f	45.7±20.3e	67.1±11.5d	83.1±7.5b	640.0±5.6c
	L1NS	78.7±1.1c	111.3±13.5	53.9±7.0i	18.2±3.6i	44.7±5.6e	50.3±12.8f	357.1±1.5h
	L2NS	66.8±3.3cd	216.4±19c	139.0±9.9c	42.0±12.5f	28.9±15.2f	78.2±1.6c	571.4±2.6d
	YNB	107.7±6.6b	253.6±30.5a	153.0±25.5a	83.1±13.8a	76.1±42.8c	128.1±53.5a	801.6±9.0a
	L1NB	68.2±1.6cd	130.4±21.7e	76.9±3.2h	51.8±6.4c	67.5±25.8d	54.7±9.0e	449.5±3.2g
	L2NB	58.5±7.5d	174.6±9.9d	114.4±22.7c	48.4±9.0d	98.7±7.0b	46.4±8.9g	541.1±8.7e
<i>P</i>	IM	0.443	<0.001	<0.001	0.720	0.530	<0.05	<0.05
	NT	<0.05	0.784	0.926	0.106	0.243	0.446	0.181
	IM×NT	0.667	<0.001	<0.001	0.243	<0.001	<0.05	<0.05

1) 同列数据后不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著 (Duncan's 法); Y: 淹水灌溉, L1: 垄灌 80, L2: 垄灌 100; NC: 常规施氮, NS: 返青期减氮, NB: 孕穗期减氮; IM: 灌溉模式, NT: 施氮处理

1) Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at $P<0.05$ level (Duncan's method); Y: Flooding irrigation, L1: Ridge irrigation with ridge width of 80 cm, L2: Ridge irrigation with ridge width of 100 cm; NC: Conventional nitrogen application, NS: Nitrogen reduction at seedling stage, NB: Nitrogen reduction at booting stage; IM: Irrigation mode, NT: Nitrogen treatment

表 2 稻田 CH₄ 通量与土壤总有机酸含量和酶编码基因表达量的相互关系¹⁾
Table 2 Correlation among CH₄ flux from paddy field, total organic acid content and encoding gene expression level in paddy soil

指标 Index	<i>mcrA</i> 表达量 <i>mcrA</i> expression level	<i>sMMO</i> 表达量 <i>sMMO</i> expression level	总有机酸含量 Total organic acid content
CH ₄ 通量 CH ₄ flux	0.644**	-0.111	-0.348**
<i>mcrA</i> 表达量 <i>mcrA</i> expression level		-0.150	-0.240*
<i>sMMO</i> 表达量 <i>sMMO</i> expression level			0.197*

1) “*” “**” 分别表示在 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 水平显著相关 (Pearson 法)
1) “*” and “**” indicate significant correlations at $P<0.05$ and $P<0.01$ levels respectively (Pearson method)

MCR 编码基因 *mcrA* 表达量呈显著负相关关系 ($r=-0.240$ 、 $P<0.05$), 而与土壤 MMO 编码基因 *sMMO* 表达量呈显著正相关关系 ($r=0.197$ 、 $P<0.05$)。

3 讨论

3.1 垄作灌溉与减施氮肥对土壤总有机酸含量的影响

灌溉方式影响水稻根系有机酸的分泌, 较淹水灌溉节水灌溉可促进根系分泌有机酸^[26]。本研究发 现, 各处理在施分蘖肥后 10 d 内总有机酸含量均升高, 其中垄灌 80+常规施氮处理在施肥后 10 d 土壤总有机酸含量较施肥前高 71.7%, 淹水灌溉+常规施氮处理高 28.8%。

施氮水平也影响土壤有机酸含量^[27], 不施氮肥和施氮肥 360 kg hm⁻² 均会抑制水稻根系分泌有机酸, 而适宜的施氮水平会提高土壤有机酸含量, 有机酸能平衡植物内部的阴阳离子, 硝态氮作为植物吸收无机氮的主要形态, 进入细胞内部被转化为 NH₄⁺再参与氨基酸的生物合成, 故植物每吸收 1 个 NO₃⁻的同时会吸收 2 个 H⁺, 植物为其内部酸碱平衡而释放出酸性物质^[28], 提高土壤有机酸含量。本研究垄灌 100 和淹水灌溉下返青期减氮土壤总有机酸含量较常规施氮高, 表明返青期减氮较常规施氮促进植物根系有机酸的分泌, 从而提高土壤有机酸含量。

3.2 垄作灌溉与减施氮肥对 CH₄ 形成和转化相关酶编码基因表达量的影响

稻田 CH₄ 的排放与微生物种类与数量相关。本研究表明, 返青期减氮下垄作灌溉分蘖期稻田土壤产 CH₄ 菌中 MCR 编码基因 *mcrA* 表达量较淹水灌溉模式均低, 而常规施氮下只有垄灌 80 土壤 *mcrA* 表达量较淹水灌溉低。垄作灌溉土壤 *mcrA* 表达量较淹水灌溉低, 可能原因是垄作灌溉水层较薄、氧气相对较充足, 使厌氧的产 CH₄ 菌生长区域深度与产 CH₄ 菌活性降低, 从而导致土壤 *mcrA* 表达量减少。返青期减氮下垄灌 80 土壤 *mcrA* 表达量较垄灌 100 低, 说明垄面宽度 100 cm 较垄面宽度 80 cm 更利于产 CH₄ 菌生长, 垄面宽度增加使其活性增强, 土壤 *mcrA* 表达量增加^[29]。本试验各处理土壤 *mcrA* 表达量总体呈现为分蘖期和拔节孕穗期增加的趋势, 可能是因为氮肥的施入, 施入氮肥短期内可以刺激土壤微生物活性, 促进土壤有机质的分解, 为产 CH₄ 菌提供良好的微生物环境, 使得土壤 *mcrA* 表达量在分蘖期与拔节孕穗期增加, 从

而增加 CH₄ 排放。

本研究发现, 在分蘖期, 返青期减氮下垄作灌溉土壤 *sMMO* 表达量较淹水灌溉低, 其他时期较淹水灌溉高, 这是因为稻田 CH₄ 排放主要集中在分蘖期, 因此分蘖期垄作灌溉土壤 *sMMO* 表达量低于淹水灌溉。但是整体上垄作灌溉土壤 *sMMO* 表达量较淹水灌溉高, 可能原因是垄作灌溉土壤氧气相对较充足, 好氧的 CH₄ 氧化菌活性增加, 从而使稻田土壤 *sMMO* 表达量增加。

适宜施氮量有利于 CH₄ 氧化菌的生长繁殖, 减少 CH₄ 的排放^[30]。NH₄⁺与 CH₄ 竞争 CH₄ 氧化菌中 MMO 的相同活性结合位点, 适宜的 NH₄⁺可以使 CH₄ 与 MMO 结合量变少。本试验垄灌 80 下, 除移栽后 20 d, 返青期减氮土壤 *sMMO* 表达量均较常规施氮高, 可能原因是垄灌 80 下, 返青期减氮处理的施氮量较常规施氮更有利于 CH₄ 氧化菌的生长, 使其活性提高和 CH₄ 氧化增强, 减少 CH₄ 排放。

3.3 垄作灌溉与减施氮肥对稻田 CH₄ 排放的影响

垄作灌溉通过改变不同时期稻田土壤水分状况, 从而改变稻田 CH₄ 的排放^[31]。本研究表明, 分蘖期 CH₄ 排放量整体偏高, 可能是因为分蘖期处于根系发育阶段, 能产生更多的根系分泌物, 分解转化为乙酸、H₂ 和 CO₂ 等, 为 CH₄ 的产生提供较多的基质。分蘖后期到孕穗期进行了晒田, 使得土壤氧气充足, 产 CH₄ 菌活性降低, 从孕穗期到乳熟期产 CH₄ 菌活性处于恢复状态。成熟期垄作灌溉的水管理处于波动状态, 土壤通气性强, 产 CH₄ 菌活性降低, 致使稻田 CH₄ 排放降低^[32]。Bodelier 等^[10]认为, 植物可以通过吸收与氮肥相关的亚硝酸盐毒性或盐使 CH₄ 氧化作用减弱, 因而施用氮肥量与 CH₄ 排放量显著正相关。本试验垄灌 100 下的减氮处理稻田 CH₄ 排放通量没有降低, 可能是因为垄灌 80 模式的垄宽较垄灌 100 模式窄, 垄沟内的水分能够很好地浸润到整个垄上, 使得垄灌 80 模式土壤水分含量较垄灌 100 模式高, 垄灌 100 模式相对垄灌 80 与淹水灌溉田间水分含量低, 对亚硝酸盐毒性或盐的吸收缺失, 使 NH₄⁺对 CH₄ 氧化产生了抑制作用, 降低 CH₄ 氧化菌活性, 导致施用氮肥量与 CH₄ 通量相关性不显著。

氮肥的施用可以同时影响产 CH₄ 菌和 CH₄ 氧化菌的活性, 而产 CH₄ 菌和 CH₄ 氧化菌活性孰强孰弱决定 CH₄ 的排放情况。总体来说, 在相同灌溉方式下, 返青期减氮稻田 CH₄ 通量较常规施氮低, 而孕穗期减氮无明显效应, 可能因为稻田 CH₄ 排放主要集中在分蘖期前后, 返青期减氮处理的低氮水

平抑制了产 CH_4 菌的生长环境, 导致返青期减氮稻田 CH_4 通量较常规施氮降低, 孕穗期减氮相对于返青期减氮影响较小^[9]。本研究的前期工作发现, 与淹水灌溉相比, 垄灌 80 模式稻田 CH_4 排放量减少 45.6%~70.3%, 晚稻产量增加 17.6%^[6]。本试验在垄灌 80 模式基础下, 继续探索减施氮肥后稻田 CH_4 累积排放量, 发现垄灌 80 下返青期减氮稻田 CH_4 累积排放量较常规施氮低 35.5%。且水氮管理结合下, 全生育期稻田 CH_4 累积排放量以垄灌 80+返青期减氮处理最低。本试验未测产, 由前期研究可知, 垄灌 80 模式增产, 但垄灌 80 与减施氮肥结合的水氮管理稻田产量是否增加或保持不变尚不明确, 是本试验不足之处, 后续将进一步探究垄作灌溉与减施氮肥结合的水氮管理对产量的影响, 在不减产基础上寻求合理的稻田 CH_4 减排模式。

3.4 稻田 CH_4 通量与土壤总有机酸含量和酶编码基因表达量的关系

通过相关性分析, 本研究发现稻田 CH_4 通量与土壤 MCR 酶编码基因 *mcrA* 表达量极显著正相关, 而土壤 MMO 酶编码基因 *sMMO* 表达量与 CH_4 通量相关性不显著, 但与土壤总有机酸含量显著相关, 而土壤总有机酸含量与 MMO 酶编码基因 *sMMO* 表达量极显著负相关。表明 MMO 酶编码基因 *sMMO* 表达量虽然不直接影响稻田 CH_4 排放, 但通过土壤总有机酸间接影响稻田 CH_4 通量。可能是因为高氮抑制 MMO 酶编码基因 *sMMO* 的表达量^[33], 且抑制植物根系分泌有机酸^[27], 抑制 CH_4 氧化菌的活性, 增加稻田 CH_4 排放。

与连续淹水相比, 间歇灌溉使乙酸产 CH_4 途径的相对贡献率降低了 8%~10%; 最后 H_2/CO_2 还原途径相对贡献率再次增大; 在 25 和 35 $^{\circ}\text{C}$ 时, CH_4 通过乙酸盐和 H_2/CO_2 还原 2 种途径产生, 温度升高至 45 $^{\circ}\text{C}$ 时, 产 CH_4 菌仅通过 H_2/CO_2 还原途径产生 CH_4 ^[34-36]。本研究表明, 稻田 CH_4 与土壤乙酸含量相关性不显著, 这可能是因为垄作灌溉和不同时期减施氮肥下稻田 CH_4 的产生不是通过乙酸裂解途径, 而是 H_2/CO_2 还原途径; 且所种植的晚稻直到 9 月下旬, 都处于相对较高的温度, 也可能是该阶段产 CH_4 菌主要通过 H_2/CO_2 还原途径产生 CH_4 的原因。

4 结论

本试验相同施氮处理下, 垄作灌溉稻田 CH_4 排放较淹水灌溉显著降低, 相同灌水模式下, 返青期减氮稻田 CH_4 排放较常规施氮显著降低。水氮管

理结合下, 稻田全生育期 CH_4 累积排放量以垄宽 80 cm 的垄作灌溉+返青期减施氮肥 25.0 $\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 处理最低, 是本试验稻田土壤 CH_4 减排的最合理水氮管理模式。返青期减氮土壤有机酸含量和 *sMMO* 表达量较常规施氮高。返青期减氮下, 垄宽 80 和 100 cm 的垄作灌溉土壤 *mcrA* 表达量较常规灌溉低。稻田 CH_4 通量受到土壤总有机酸含量和 *mcrA* 表达量的影响, 且土壤 *sMMO* 表达量会间接影响稻田 CH_4 通量。

参考文献:

[1] IPCC. Climate change 2014: Synthesis report[R]// PACHAURI R K, MEYER L A. Contribution of working groups I, II and III to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Geneva, Switzerland, 2014: 87.

[2] SMITH P, MARTINO D, CAI Z, et al. Policy and technological constraints to implementation of greenhouse gas mitigation options in agriculture[J]. Agriculture Ecosystems and Environment, 2007, 118(1/2/3/4): 6-28.

[3] 刘英烈. 不同氮肥水平集约化栽培模式双季稻生态系统温室气体收支的田间观测[D]. 南京: 南京农业大学, 2016.

[4] 张自常, 李鸿伟, 陈婷婷, 等. 畦沟灌溉和干湿交替灌溉对水稻产量与品质的影响[J]. 中国农业科学, 2011, 44(24): 4988-4998.

[5] 马微微, 陈灿, 黄璜, 等. 垄作稻鱼鸡共生对稻田土壤养分含量及水稻产量的影响[J]. 河南农业科学, 2021, 50(8): 9-17.

[6] ZENG Y, LI F S. Ridge irrigation reduced greenhouse gas emission in double-cropping rice field[J]. Archives of Agronomy and Soil Science, 2021, 67(8): 1003-1016.

[7] 曹开勋, 赵坤, 金王飞飞, 等. 水氮互作对稻田温室气体排放的影响[J]. 土壤学报, 2022, 59(5): 1386-1396.

[8] 胡敏杰, 全川, 邹芳芳. 氮输入对土壤甲烷产生、氧化和传输过程的影响及其机制[J]. 草业学报, 2015, 24(6): 204-212.

[9] 姜珊珊. 氮肥减量及不同品种肥料配施对稻麦农田 CH_4 和 N_2O (直接和间接) 排放的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2017.

[10] BODELIER P L, ROSLEV P, HENCKEL T, et al. Stimulation by ammonium-based fertilizers of methane oxidation in soil around rice roots[J]. Nature, 2000, 403(6768): 421-424.

[11] 江瑜, 朱相成, 钱浩宇, 等. 水稻丰产与稻田甲烷减排协同的研究展望[J]. 南京农业大学学报, 2022, 45(5): 839-847.

[12] 董艳, 杨智仙, 董坤, 等. 供氮水平对小麦生长特性及根系分泌有机酸的影响[C]//中国土壤学会. 面向未来的土壤科学(上册): 中国土壤学会第十二次全国会员代表大会暨第九届海峡两岸土壤肥料学术交流研讨会论文集. 成都: 电子科技大学出版社, 2012: 481-485.

[13] 蒋娜, 陈紫娟, 曹轶, 等. 低温湿地甲烷古菌及其介导的

- 甲烷产生途径[J]. 微生物学通报, 2013, 40(1): 137-145.
- [14] 余锋, 李思宇, 邱园园, 等. 稻田甲烷排放的微生物学机理及节水栽培对甲烷排放的影响[J]. 中国水稻科学, 2022, 36(1): 1-12.
- [15] AWASTHI M K, WAINAINA S, MAHBOUBI A, et al. Methanogen and nitrifying genes dynamics in immersed membrane bioreactors during anaerobic co-digestion of different organic loading rates food waste[J]. *Biore-source Technology*, 2021, 342: 125920. doi: 10.1016/j.bior tech.2021.125920.
- [16] JODTS R J, ROSS M O, KOO C W, et al. Coordination of the copper centers in particulate methane monooxygenase: Comparison between methanotrophs and characterization of the Cu_C site by EPR and ENDOR spectroscopies[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2021, 143(37): 15358-15368.
- [17] YUAN J, YUAN Y, ZHU Y, et al. Effects of different fertilizers on methane emissions and methanogenic community structures in paddy rhizosphere soil[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 627: 770-781.
- [18] 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.
- [19] QIAN L, CHEN L, JOSEPH S, et al. Biochar compound fertilizer as an option to reach high productivity but low carbon intensity in rice agriculture of China[J]. *Carbon Management*, 2014, 5(2): 145-154.
- [20] TAN S D, CHEN B, ZHENG H B, et al. Effects of cultivation techniques on CH₄ emissions, net ecosystem production, and rice yield in a paddy ecosystem[J]. *Atmospheric Pollution Research*, 2018, 10(1): 274-282.
- [21] 马艳婷, 赵志远, 冯天宇, 等. 有机肥配施对苹果园温室气体排放的影响[J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(9): 2039-2048.
- [22] SCHERER R, RYBKA A C P, BALLUS C A, et al. Validation of a HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices[J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(1): 150-154.
- [23] 马倩倩, 吴翠云, 蒲小秋, 等. 高效液相色谱法同时测定枣果实中的有机酸和 VC 含量[J]. *食品科学*, 2016, 37(14): 149-153.
- [24] HAN J I, SEMRAU J D. Quantification of gene expression in methanotrophs by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction[J]. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(4): 388-399.
- [25] ZHU Y, LI Y, ZHENG N, et al. Similar but not identical resuscitation trajectories of the soil microbial community based on either DNA or RNA after flooding[J]. *Agro-nomy*, 2020, 10(4): 502. doi: 10.3390/agronomy1004 0502.
- [26] HENRY A, DOUCETTE W, NORTON J, et al. Changes in crested wheatgrass root exudation caused by flood, drought, and nutrient stress[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2007, 36(3): 904-912.
- [27] 徐国伟, 孙会忠, 陆大克, 等. 不同水氮条件下水稻根系超微结构及根系活力差异[J]. 植物营养与肥料学报, 2017, 23(3): 811-820.
- [28] 戢林, 李廷轩, 张锡洲, 等. 水稻氮高效基因型根系分泌物中有机酸和氨基酸的变化特征[J]. 植物营养与肥料学报, 2012, 18(5): 1046-1055.
- [29] 王钧美, 张莉, 徐桃元, 等. 不同灌溉稻田产甲烷菌与甲烷产生率的变化规律[J]. 灌溉排水学报, 2014, 33(Z1): 360-363.
- [30] 王智平, 胡春胜, 杨居荣. 无机氮对土壤甲烷氧化作用的影响[J]. *应用生态学报*, 2003(2): 305-309.
- [31] 熊浩, 张保成, 李建柱, 等. 灌水量对冬小麦农田土壤 N₂O 与 CO₂ 排放的影响[J]. 灌溉排水学报, 2020, 39(9): 41-50.
- [32] 马艳芹, 钱晨晨, 孙丹平, 等. 施氮水平对稻田土壤温室气体排放的影响[J]. 农业工程学报, 2016, 32(S2): 128-134.
- [33] 范玉婧, 姚惠娇, 高志岭, 等. 氮源对甲烷氧化混合菌群甲烷氧化和氧化亚氮排放的影响[J]. 河北农业大学学报, 2021, 44(3): 54-61.
- [34] 丁维新, 蔡祖聪. 温度对甲烷产生和氧化的影响[J]. 应用生态学报, 2003(4): 604-608.
- [35] SINGH A, SINGH R S, UPADHYAY S N, et al. Community structure of methanogenic archaea and methane production associated with compost-treated tropical rice-field soil[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 82(1): 118-134.
- [36] LIU P, KLOSE M, CONRAD R. Temperature effects on structure and function of the methanogenic microbial communities in two paddy soils and one desert soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 124: 236-244.

【责任编辑 李庆玲】