第3卷 第3期
1997年9月

植物营养与肥料学报
PLANT NUTRITION AND FERTILIZER SCIENCE

Vol.3 No.3
Sep. 1997

我国北方地区几种主要作物氮营养诊断及追肥推荐研究①

Ⅱ 植株硝酸盐快速诊断方法的研究

李志宏② 张福锁 王兴仁

（中国农业大学植物营养系，北京 100094）

摘 要

本文通过田间试验和实验室分析，研究了植物组织中硝酸盐含量的两种快速测定方法：二苯胺和反射仪法以及它们应用于春小麦、冬小麦和夏玉米氮营养诊断时的相关性。结果表明，两种方法都可以作为氮素快速营养诊断方法在实际生产中应用。其中反射仪法测定结果较二苯胺法准确，与流动分析法和色谱法有较好的相关性，在精度要求不高条件下可以作为一种常规测定方法。而二苯胺法测定结果可以反映作物体内硝态氮含量随施肥量变化情况，并且由于其快速、简便的特性，更适于在生产中推广应用。同时，两种方法测定结果对不同作物有相似的相关性，都符合$Y=\frac{X}{a+bX}$的函数。

关键词 硝酸盐 快速测定 二苯胺法 反射仪法

目前，国外应用较广泛的植株体内硝态氮快速测定方法是二苯胺法(Diphenylamine method)和反射仪法(Nitrate test strip)。二苯胺法是根据NO_3^-与二苯胺—硫酸试剂作用形成蓝色的醌型联苯胺，按其显色强度与标准色阶进行对照的半定量方法。而反射仪法是用NO_3^-测试纸来直接测定植株汁液中NO_3^-的定量方法。Whermann等人(1981)[1]采用改良的二苯胺方法测定冬小麦茎基部NO_3^-—N含量，将其作为氮肥需要量的参数，测定值与植株体内NO_3^-浓度有很好的相关性，可以指导冬小麦拔节肥与穗肥的施用。该项技术与一般经验施肥相比，可以在减少施肥总量情况下获得相同产量和品质。并且可以在田间完成氮素诊断工作，大大地缩短了从取样到结果反馈的时间，能及时地指导追施氮肥。Geyer(1990)[2] 提出了用反射仪法诊断田间玉米氮营养状况的指标。该方法还可以用于蔬菜作物如胡萝卜、番茄、马铃薯等的营养诊断[3]。我国在70年代有许多科研单位曾对应用二苯胺法诊断氮营养的可行性进行了研究[4]，但受方法本身及其它环境因素干扰和限制，迄今为止，国内有关二苯胺法作为禾本科作物氮素诊断方法的报导很少。而用反射仪法测定植物体内NO_3^-浓度作为作物氮营养诊断技术，无论在理论研究或应用研究方面都未见报导。本研究的目的就在于比较这两种快速诊断方法和应用范围；反射仪法与连续流动分析法(CFA)和阴离子色谱法这两种常规测定方法的相关性；以及彼此之间的相关性，以作为这两种快速测定方法在小麦、玉米等作物上应用的理论基础。

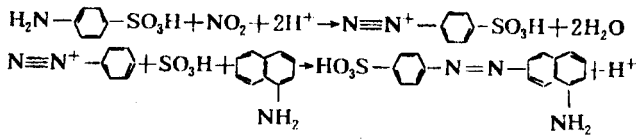
①北京市和国家自然科学基金资助项目
②现工作单位：山西农科院蔬菜所，太原 030031
收稿日期：1996—08—08

一、材料与方法

(一)二苯胺法(Diphenylamine method)

1. 原理　NO_3^--N在酸性条件下与二苯胺和浓硫酸作用，生成蓝色的醌型联苯胺，其显色的强度与NO_3^--N浓度之间符合朗伯一比尔定律，可以通过比色的方法来确定NO_3^--N浓度。反应方程式如下：

$$NO_3^- + \text{还原剂} \rightarrow NO_2^- + \text{氧化剂}$$



2. 试剂及供试材料　1%(W／V)二苯胺一硫酸试剂、NO_3^--N标准溶液(0～400mgkg^{-1})；标准比色板。

3. 测定步骤　随机采取30个样品，小麦取茎基部0.5cm节间，玉米取功能叶0.5cm叶脉。将样品每10个置于玻璃板上，每个样品上滴2滴二苯胺一硫酸溶液，压上另一块玻璃板，反复挤压出汁，汁液中NO_3^-与试剂作用生成蓝色的联苯胺。其颜色深浅与NO_3^-浓度成正比。参照标准比色板得出植株体内硝态氮含量的级别。其等级划分为：无色一0级；浅蓝色一1级；蓝色一2级；深蓝色一3级。如此反复操作3次，取30个样本色级求加权平均值。

标准NO_3^-溶液测定操作同上。

(二)反射仪法(Nitrate test strip)

1. 原理　根据偶氮反应的原理，NO_3^-在酸性条件下与还原剂作用生成NO_2^-，NO_2^-进一步反应生粉红色的偶氮染料，然后通过比色方法进行测定。

2. 仪器　反射仪，为英国Wolf-Wuppertal公司制造，其主机规格为60mm×90mm×50mm，用9V电池驱动。仪器侧面有一供插入试纸的小门，其中有一5.25mm^{2}由金属弹簧控制的、可以让光线通过的小窗口。仪器采用LED作为光源，其发射的绿光与试纸形成的红紫色染料有很好的互补性。采用的测试纸由德国E.Merck(Darmstadt)公司制造。试纸反应区为(3×5)mm^2，使用的最小溶液量为3.2μ L。当光线到达试纸后，部分光线被试纸吸收，另外部分被反射到一个cds光电池，该电池与其它部件一起组成一个惠斯通电桥，通过微安计来检测电流量，转化为浓度单位后显示在一个液晶显示器上。仪器本身带有一个小时钟和峰鸣器，保证每一个试纸有相似的反应时间和有足够的时间达到稳定。每次开机有一分钟预热时间，仪器在长时间(大约8小时)连续工作中能保持稳定。每次测试前用空白试纸扣除暗电流。

3. 操作步骤　采集植物样品，用压汁钳反复挤压出汁，将挤出的组织汁液稀释约5～10倍。将试纸条插入待测液中，反应约7秒钟，取出后插入反射仪中比色，直接读出NO_3^-浓度(mg/L)。测试前用标准NO_3^-溶液校准仪器。

二、结果与讨论

(一)二苯胺方法的定量研究

用二苯胺法对标准NO_3^--N溶液进行测定，研究不同色阶对应的NO_3^--N浓度。结果如图1所示。当溶液浓度小于30mgkg^{-1}时，二苯胺法检测不出NO_3^--N。随着溶液中NO_3^--N浓度增加，显色强度也逐渐加强，二者成正比关系。当溶液浓度在30～200mgkg^{-1}之间，二苯胺色阶≤2.00，显色强度对溶液中NO_3^--N含量很灵敏，溶液中每增加10个浓度单位，色阶增加0.1单位。在这一浓度范围内，相关系数为0.9509**。当溶液浓度在200～400mgkg^{-1}之间时，测定灵敏度下降，每增加10个浓度单位，二苯胺色阶增加0.023个单位，但相关性仍较好，相关系数为0.9881**。当

标准溶液浓度增至400mgkg^{-1}时，显色强度随NO_3^--N浓度变化趋于平缓，此时，对应的二苯胺色阶为2.50。在有效测定范围内，显色强度与溶液中NO_3 N浓度的相关性很高，r = 0.9294 * *。

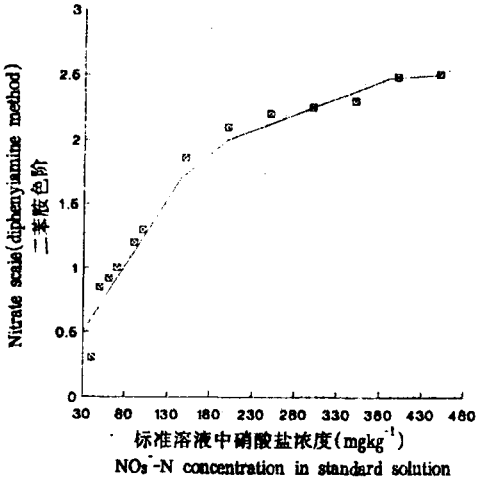


图1 二苯胺法测定值与标准溶液浓度比较

Fig.1 The comparison of nitrate scale (diphenylamine method) with the nitrate concentration in standard solution

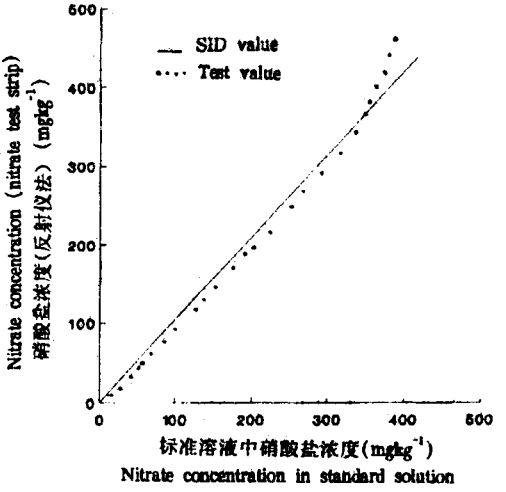


图2 反射仪法测定值和标准溶液中NO_3^-浓度比较

Fig.2 The comparison of nitrate scale (nitrate test strip) with the nitrate concentration in standard solution

研究结果说明，二苯胺法适用于对含氮水平不很高的植株进行营养诊断，这时，无论是灵敏度还是精确度都比较高。因此，该法用于缺氮诊断比较适宜，而对于含氮水平过高的植株，当体内NO_3^--N浓度高于某一极限值时，二苯胺色阶差异用肉眼难以判断，导致方法灵敏度降低。因此，该方法可以指示氮营养过剩，但不适合于对这类植株进行诊断。

(二)反射仪法定量研究

通过用反射仪法测定标准溶液中NO_3^-的含量来研究反射仪法的测量精度及其应用范围。结果表明(图2)，当溶液中NO_3^-浓度较低(<4.5mgkg^{-1})时，反射仪法检测不出NO_3^-的存在。溶液浓度在4.5～150mgkg^{-1}时，检出结果普遍低于溶液中NO_3^-真实浓度。有负偏差；在150～400mgkg^{-1}的浓度范围内，测定结果能很好地符合真值，相对误差4.5%。如果溶液中浓度再升高，超过450mgkg^{-1}结果发生正的偏差，测定值高出真值。因此，反射仪较准确的测定范围是150～400 mgkg^{-1}NO_3^-。在此浓度范围内，该方法是一种较为准确的方法，灵敏度也较高。本法理论检出限为0～500mgkg^{-1}NO_3^-，但在实际应用中，应根据具体情况，尽量将浓度控制在最佳测定范围内，以保证结果的可靠性。在进行田间诊断时，依我们的经验，将压出的植物汁液稀释5～10倍后进行测定，结果比较可靠。

(三)反射仪法与离子色谱法、连续流动分析方法测定结果比较

阴离子色谱法(Chromatography)和连续流动分析法(CFA)是两种常用的、较为准确的测定NO_3^--N(或NO_3^-)的仪器分析方法。用这两种常规方法作为参比方法，研究了反射仪测定值与这两种方法测定结果的相关性。所用待测样品分别为玉米和油菜。玉米在追肥前采集叶鞘样品，用流动分析法测定浸出液中NO_3^-含量，压汁后用反射仪法测定汁液中NO_3。油菜收获期取地上

部可食部分，混合后取样，压汁后用反射仪法测定NO_3^-含量。捣碎后用缓冲液浸提，浸提液用离子色谱测定NO_3^-含量，三种方法测定结果的相关性见图3和图4。

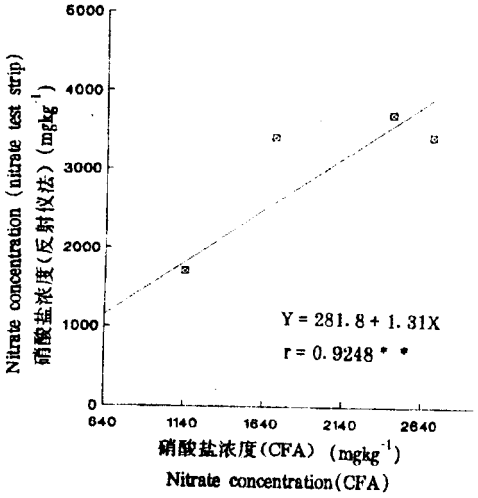


图3 反射仪法和流动分析(CFA)法测定值的相关性

Fig.3 The relationship between the nitrate content measured with nitrate test strip and that measured with CFA method

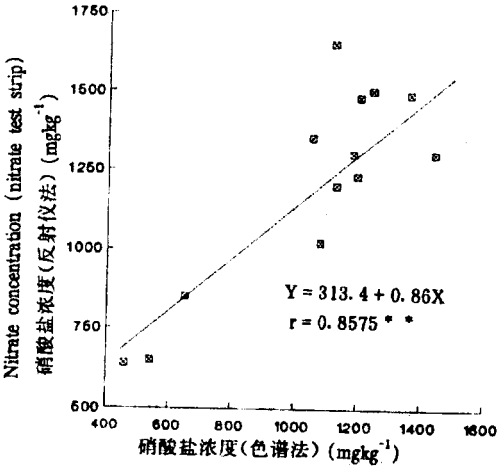


图4 反射仪法和阴离子色谱法测定值的相关性

Fig.4 The relationship between the nitrate content measured with nitrate test strip and that measured with chromatography

结果表明，反射仪法测定结果无论与色谱法，还是与CFA法相比都达到高度相关，相关关系极显著。相关系数分别为0.8575 * * 和0.9248 * * 。该结果和Schaerfer(1986)[5]等人的研究结果非常相似。他们利用向日葵作为供试作物，用反射仪法和离子色谱法同时测定叶柄中NO_3^-含量，两种测定方法的相关系数为0.92。可见只要掌握好测定方法，反射仪法也可作为一种快速常规分析方法，并且具有快速、准确、简便的优点，不需要经过特别的前处理，就可以很方便地进行测定。同时，该仪器体积小，采用电池驱动，稳定性也较好，非常适合于在田间条件下进行氮素诊断。目前该方法的缺陷是，无论是反射仪还是测试纸国内尚无生产，从国外进口费用较高，因而不能够大面积使用，阻碍了该技术的推广。

(四)二苯胺法和反射仪法在几种作物氮营养诊断中的相关性研究

在春小麦、冬小麦及夏玉米拔节前，分别采集小麦茎基部和玉米功能叶叶脉，同时用二苯胺法和反射仪法测定NO_3^-的色阶和浓度。以此来比较这两种方法在不同作物上应用的相关性。试验结果表明，反射仪法可以很好地反映作物体内NO_3^-含量变化，随着施氮量增加，其测定值呈

表 1　两种快速测定方法在不同作物上应用的相关性

Table 1　The comparison of two quick test method in different crops

参数 Parameters	a	b	r	F
春小麦	217.27	0.34	0.9500	64.39
冬小麦	205.30	0.29	0.9319	71.56
夏玉米	142.94	0.27	0.8316	58.04

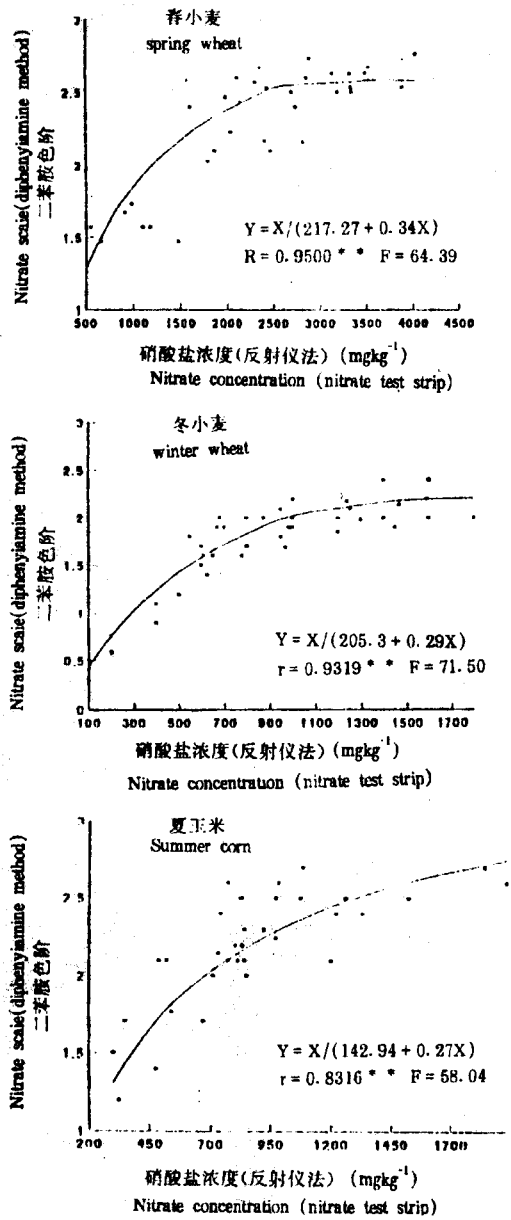


图5 二苯胺法和反射法在作物氮营养诊断中相关性研究

Fig.5 The correlationship of nitrate diagnosis value measured by diphenylamine method and nitrate test strip in spring wheat, winter wheat and summer corm

增加趋势。而二苯胺测试值随施肥量增加至一个临界值后，增加趋势减弱，并且逐渐趋于平缓。这个结果和前述在标准溶液中结果相同。两种方法的相关性在对三种作物测定中都表现出相似的趋势(图5)。不同作物，因累积NO_3^-能力不同，二苯胺法测定值的变化规律略有不同，其变化曲线趋于平缓的转折点也不同。冬小麦因有一个越冬过程，经过冬前生长和返青后一段时间消耗，茎基部累积的NO_3^-相对较少，其转折点为二苯胺测定值2.00或反射仪测定值 1500 $mgkg^{-1}NO_3^-$。春小麦由于拔节期距离底肥施用时间短，在此之前又在分蘖期施过一次肥，因此，茎基部NO_3^-累积较高，转折点分别为2.60～2.70(二苯胺色阶)和2500$mgkg^{-1}NO_3^-$(反射仪法)。夏玉米因在冬小麦收获后播种，两个茬口间隔很短，因此在生产中夏玉米一般不施底肥，只将磷肥作为种肥施入土壤，只有在磷酸二胺作种肥时会有少部分氮被带入土壤中，因此，夏玉米测定曲线的转折点也不很高，其体内累积的NO_3^-浓度介于春小麦和冬小麦之间，为二苯胺测定值2.60和反射仪测定值1400$mgkg^{-1}NO_3^-$。对两种方法测定结果经非线性拟合(NLIN)[6]，符合倒数Ⅱ型关系，即$Y=\frac{X}{a+bX}$。对于三种不同作物，春小麦、冬小麦、夏玉米其相关系数分别为0.9500 * *、0.9319 * *、0.8216 * *均达到极显著高度相关。三种作物拟合结果见表1。

从表1中系数可以看出，对于不同作物，两种测定方法的结果有相同的趋势，特别是麦类作物，由于体内物质组成相似，因此参数也比较接近。对三种作物，当反射仪法测定值相同时，对应的二苯胺法测定值春小麦最小，冬小麦居中，夏玉米最大。试验结果还表明，当春小麦体内硝态氮含量比较高时，两种方法测定结果不协调，即反射仪测定值较大时，二苯胺法测定值并不很大。如使用反射仪法测定春小麦中NO_3^-浓度达到2600$mgkg^{-1}$时，该值已经超过二苯胺法的最高检出限(1700$mgkg^{-1}$)。这可能是由于二苯胺法本身缺陷，它用肉眼比色，在接近转折点时分辨率

降低，在高浓度区反应不敏感；而用反射仪比色时所用的植株汁液带色，其中某些成分对成色有干扰，使检测值偏高[6]。另外反射仪法的测定原理是NO_2^-与试剂作用发生偶氮反应，因此植株汁液中许多含氮化合物，例如一些硝基化合物，其结构上的$-NO_2$或类似基团也可能与试剂作用，增加显色强度，使测定值偏高。尽管如此，反射仪法和其它常规检测方法相关性较好，可以保证其检测精度。

综上所述，作为氮素诊断的快速测定方法，反射仪法相对较准确一些，可以获得植株诊断部位较为真实的NO_3^-含量；而二苯胺法则由于其操作简单，价格低廉，更适合于在基层生产单位推广应用。

三、小　结

1. 二苯胺方法和反射仪法都可以作为一种氮素快速营养诊断方法在实际生产中应用。

2. 反射仪法测定结果较二苯胺准确，在精度要求不高的条件下，可以作为一种常规的测定方法；二苯胺法能够反映出作物体内NO_3^-随施肥的变化情况，并且由于其快速、简便、宜于在生产实践中推广应用。

3. 对不同作物，两种检测方法具有相同的相关趋势，都符合倒数Ⅱ型关系。但由于作物及其品种之间的差异，对具体作物其测定值在换算关系上存在差异。

参 考 文 献

1 Wehrmann et al. Determination of nitrogen fertilizer requirement by nitrate analysis of the soil and of the plant. (in) Plant Nutrition, 9th International Colloquium on Plant Nutrition, 1981, 202～208.

2 Geryer B und Marschner H. Charakerisierung des Stickstoffrersorgungsgrades bei Mais mit Hilfe des nitrat-schnelltests. Z. Pflanzenernahr Bodenk, 1990, 153:341～348.

3 Prasad M and Spiers TM. Evalution of a rapid method of plant sap nitrate analysis. Commun. Soil Sci. Plant Anal., 1984, 15:673～679.

4 中国科学院南京土壤研究所土壤地理研究室分析室编著.《土壤肥料与作物养分简易测定》,江苏科学技术出版社,1978.

5 Schaefer NL. Evalution of a hand held refletormemter for rapid quantitative determination of nitrate, Commun. Soil Sci. Plant Anal., 1986,17:937～951.

6 高惠璇,栾世武,耿直.SAS系统使用手册(三),SAS／STAT软件.北京大学出版社,1993,64～75.

NITROGEN NUTRITIONAL DIAGNOSIS AND RECOMMENDATION AS TOPDRESSING FERTILIZER N FOR SEVERAL CROPS IN NORTH CHINA

Ⅱ. DIAGNOSIS NITRATE IN PLANT TISSUE BY QUICK TEST METHOD

Li Zhihong Zhang Fusuo Wang Xingren
(Department of Plant Nutrition CAU, Beijing 100094)

Summary

Two quick test methods(diphenylamine method and nitrate test strip) for test nitrate-N in plant tissue and the relationship for two method used in spring wheat, winter wheat and corn were studied in field and laboratory. The results suggested that both of two methods could be used as nitrogen quick test methods in practice. The test value measured by the nitrate test strip was more accaracy than that of diphenylamine method, and had a good relationship with that of continue flow analysisa(CFA) and chromatography method. So the nitrate test strip could be used as a common test method with the quick and simple character. The diphenylamine method could indicate the nitrogen status in plant which changed with the different rate of nitrogen fertilizer application. it is more suitable to be used in the practice. The results also indicated that the test vlaue measured by two methods had a similar relationship: $Y=\frac{X}{a+bX}$ for different crops.

Key words Nitrate Quick test Diphenylamine method Nitrate test strip