

小麦接种联合固氮菌增产原因分析

刘荣昌 李凤汀 郝正然 汪文燕 杨则瑗 张春莉

(河北省科学院微生物研究所,保定 071051)

摘 要 在自然条件下,小麦接种联合固氮菌(土生克雷伯氏菌)43 菌株,获得了显著增产效果。本研究表明,其增产的主要原因是菌株与小麦根系结合,在根毛细胞、表皮细胞、皮层细胞的间隙及输导组织中存在大量的菌体细胞。在小麦抽穗期固氮酶活性达到 $148.8 \text{ n mol C}_2\text{H}_4 \text{ 株}^{-1} \text{ h}^{-1}$, ^{15}N 稀释法测定固氮量占植株总氮量的 15.3%~22.1%。由于菌株产酸,在砂培条件下,速效磷增加 16.1%~39.7%,提高了植株磷素营养水平。同时菌株代谢物中存在生长素、赤霉素和细胞分裂素,可刺激植株生长发育。显然,小麦接种 43 菌株增产是因菌株固氮、解磷和产生多种激素综合作用的结果。

关键词 小麦 联合固氮 土生克雷伯氏菌 产量

自本世纪七十年代巴西学者 Dobereiner 发现某些固氮微生物与禾本科植物营联合固氮作用之后,现已从室内研究逐渐进入田间应用阶段,据报道^[2]以固氮螺菌(*Azospirillum*)为接种物,可增产玉米 10%~33%、水稻 11%~21%、小麦 9%~27%、高粱 63%,且能提高籽粒蛋白质含量。但对其增产原因尚无统一认识,有些研究者认为,它在土壤环境里不固氮或固氮量极少,主要是产生激素刺激植物生长发育。也有人认为存在不可忽视的固氮作用,固氮量占植株总氮量的 33.8%^[2]。小麦接种土生克雷伯氏菌(*Klebsiella terrigena*)43 菌株,已在我国 17 省区数千万亩小麦进行接种试验、示范和推广,平均增产率为 13%左右,获得了显著的经济和社会效益。本文报道关于小麦接种土生克雷伯氏菌 43 菌株增产的研究结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与小麦品种 土生克雷伯氏菌 43 菌株,由作者筛选。小麦品种 7320-4,由河北省植保所提供。

1.1.2 培养基和生长条件 培养基组成如下(g/L):苹果酸氢钠 4.3,葡萄糖 5.0,蔗糖 5.0, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.4, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, NaCl 0.1, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02, FeCl_3 0.01, Na_2MnO_4 0.004,酵母汁 0.2,蒸馏水 1000ml, pH 6.5~7.0。固体培养时加 17.0g 琼脂,液体培养于旋转式摇床(190r/min),培养温度 28~30℃。

1.2 方法

1.2.1 菌株与根系结合检测 取接菌小麦根系经 0.1%酸性 HgCl_2 消毒,四氮唑染色,徒手

切片后,光学显微镜镜检。电子显微观察采用戊二醛和锇酸固定,EPON812包埋,超薄切片后在JEM-100ASX电镜观察。同时采用酶联免疫法(ELISA)测定菌株对根系结合作用^[-1]。

1.2.2 菌株固氮作用测定 采用乙炔还原法测定根系固氮酶活性,以 $\text{nmolC}_2\text{H}_4 \text{株}^{-1}\text{h}^{-1}$ 表示。 ^{15}N 稀释法测定小麦接菌后固氮作用^[3],标记氮肥为 $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,丰度30%(上海工业研究院生产)。

1.2.3 菌株代谢物测定 菌株培养液经15000rpm/min离心30min,去菌体细胞,低压浓缩至原体积的1/5,纸层析测有机酸组分。同时调pH值后,分别用乙酸乙酯、正丁醇萃取,萃取液经浓缩结晶后溶到甲醇液中,在HITACHI655型液相色谱仪和Bacman Du7紫外光谱测定生理活性物质。以标准有机酸、吲哚乙酸、赤霉素(GA_3)和6-咪喃氨基嘌呤作对照或作内标物。

1.2.4 菌株活化磷测定 培养基中除去磷源,加1%无水溶性磷的磷矿粉,作液体和细砂纯培养,10d后取其离心液和滤液作钼兰比色测速效磷含量。另作谷子砂培,加1%无水溶性磷的磷矿粉作磷源,接菌后自然光照培育30d,钼兰比色法测砂中速效磷含量。以上试验均以不接菌为对照。

2 结果与讨论

2.1 菌株对根系结合侵染

小麦接菌后,取根样作光学显微镜观察发现,根系呈浅黄色,粗壮,根毛密集,每厘米根段根毛数比不接菌多4.6倍,达576条,且根毛顶端多有分枝,这无疑将扩大对土壤水分和养分的吸收。更重要的是发现接入的菌体细胞聚集在根系周围,多与根毛垂直存在,并穿过胞壁进入根毛内部,不受液流的影响而向表皮细胞运动。表皮细胞内菌体可能沿脱落细胞或伤痕侵入皮层细胞间隙或木质部的输导组织中。未发现有特殊构造的侵入线。四氮唑染色的根系镜检时也观察到根系粘液层、细胞间隙和输导组织中有大量被染成红色的菌体细胞,对根组织无破坏作用,但细胞壁有增厚的趋势。小麦根系结合性状与固氮螺菌有相似之处^[4]。电镜观察也证实菌株可侵染根组织(图1)。

采用酶联免疫法检测43菌株对根系侵染,即以菌株作抗原(Ag)制备抗血清(Ab),以冻干辣根酶标记羊抗兔IgG结合物作酶标结合物,以接种43菌株麦根(表面消毒)为待测抗原。利用抗体1:800,酶标结合物1:200浓度时,测定大量根系样本。结果不接菌的根系酶标光度计吸收值(E)上限为0.32,而接菌根系样本吸收值为0.50。根据超过对照标本吸收值上限为阳性判读标准,接种43菌株的根系样本为阳性,证明菌株确实侵入根组织内部营联合共生。

2.2 菌株固氮作用

小麦接种43菌株,出苗后7d测定固氮酶活性,结果接菌的为 $20.8 \text{nmolC}_2\text{H}_4 \text{株}^{-1}\text{h}^{-1}$,比不接菌的高25倍。小麦全生育期中以抽穗期固氮酶活性最高,达到 $148.8 \text{nmolC}_2\text{H}_4 \text{株}^{-1}\text{h}^{-1}$ 。



图1 根组织内菌体细胞($\times 17000$)

h⁻¹,而不接菌的麦根几乎测不到活性。

¹⁵N 稀 释 法 测 定 43 菌 株 固 氮 作 用 是 在 盆 栽 条 件 下 完 成 的,土 壤 基 础 肥 力 含 有 机 质 2.17%,全 氮 0.08%,全 磷 (P₂O₅) 0.16%,速 效 钾 (K₂O) 336×10⁻⁶。在 这 样 条 件 下 播 种 小 麦 作 接 菌 和 不 接 菌 处 理,幼 苗 三 叶 期 追 施 标 记 (¹⁵NH₄)₂SO₄ 25mg/盆,自 然 光 照 培 育 70d 收 获。据 调 查 接 菌 与 不 接 菌 幼 苗 相 比,株 高 增 加 不 明 显,但 每 盆 总 茎 数 和 绿 色 叶 片 数 分 别 增 加 3.7 株 和 13.3 片,干 物 重 增 加 0.46g/盆,总 氮 量 增 加 7mg/盆。质 谱 法 测 定 株 植 ¹⁵N 丰 度 与 氮 素 养 分 来 源 见 表 1。

表 1 小麦植株 ¹⁵N 丰度与氮素来源

重 复	¹⁵ N 丰 度				氮 素 来 源 %				
	接 菌		不接菌		接 菌			不接菌	
	茎	根	茎	根	空气 N	土壤 N	肥料 N	土壤 N	肥料 N
R ₁	1.116	1.094	1.271	1.129	22.1	72.92	4.98	94.32	5.68
R ₂	1.149	1.072	1.209	1.153	15.3	79.68	5.02	94.53	5.47
R ₃	1.157	1.053	1.264	1.111	21.7	73.31	4.99	94.41	5.59
平均	1.141	1.072	1.248	1.125	19.7	75.30	5.00	94.42	5.58

¹⁵N 丰度 $t_{0.05}=7.885>$ 理论 $t_{0.05}=4.303$ 差异显著

从表 1 可见接菌植株茎和根中 ¹⁵N 丰度比不接菌低 9.4% 和 4.9%,表明接菌植株中 ¹⁵N 丰度被从空气中固定的 ¹⁴N 所稀释。小麦植株氮素主要来源于空气氮、土壤中原有氮和肥料氮。接菌后植株从空气、土壤、标记肥料吸收氮素依据所占百分比的计算公式计算^[3],结果是菌株为小麦提供氮素营养占吸收总氮量的 15.3%~22.1%,据此计算出每盆实际固氮量 11.5~16.5mg。

2.3 菌株代谢物中存有生物活性物质

菌株培养液经离心去菌体后,加蒸馏水稀释 5~10 倍,处理劈开的碗豆胚轴和燕麦芽鞘,有明显地促进弯曲和伸长作用,表明存在生物活性物质。利用高压液相色谱仪测定乙酸乙酯和正丁醇萃取液中生物活性物质结果见图 2。

从图 2 可见菌株代谢物存在 4 条吸收峰,出峰时间分别为 1.39、1.56、2.04、2.89min,前三条峰出峰时间恰好与赤霉素(GA₃)、吲哚乙酸、6-吡喃氨基嘌呤标准样出峰时间一致。采用内标法检验仍然出 4 条吸收峰,只是前面三条峰峰面积增加了。因此可以断定 43 菌株代谢物中存有赤霉素(GA₃)、吲哚乙酸和 6-吡喃氨基嘌呤,其中以吲哚乙酸含量最多,其次为赤霉素,6-吡喃氨基嘌呤含量最少。2.89min 出现的收峰应属何物质有待以后深入研究。紫外光谱测定也证实 43 菌株代谢物中存在 6-吡喃氨基嘌呤。

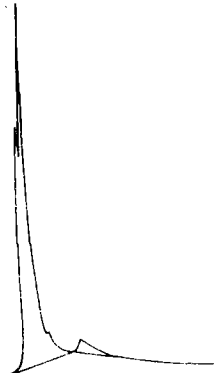


图 2 43 菌株产生生长激素的液相色谱图

2.4 菌株活化磷素作用

菌株在纯培养和砂培谷子时表现出明显的解磷作用,以表 2 可见接菌处理无论是纯培养还是砂培谷子可溶性的磷(P₂O₅)含量均比对照增加 16.1%~55.2%,尤其砂培谷子后砂中有效磷增加 39.7%,对增补农业生产上磷肥不足有重要意义。根据 Sperber 研究微生物分解

磷矿粉强度时发现与微生物产酸有关系,一般说酸度愈高,解磷也愈多。据测定43菌株每消耗1g糖可产生1.3~4.8meH⁺/100ml酸,产酸类型主要为乳酸。因此可以判断活化磷素与菌株产酸有直接关系。

表2 43菌株活化磷素作用

处 理	菌 株 纯 培 养						砂 培 谷 子		
	液体 P ₂ O ₅ %			砂培 P ₂ O ₅ %			砂中 P ₂ O ₅ %		
	P ₂ O ₅	±P ₂ O ₅	±%	P ₂ O ₅	±P ₂ O ₅	±%	P ₂ O ₅	±P ₂ O ₅	±%
接 菌	0.1291	0.0459	55.2	1.6617	0.1305	16.1	0.2922	0.0831	39.7
对 照	0.0832	—	—	1.4312	—	—	0.2091	—	—

综上所述,土生克雷伯氏菌43菌株与小麦根系结合,并侵入根组织内部,这种现象的出现可能与根系分泌物诱导有关^[5]。菌株在根表、根内生命活动中,具有固定大气中分子态氮、产生赤霉素、吲哚乙酸和6-吡喃氨基嘌呤等多种生物活性物质的作用,这与固氮螺菌代谢物质极为相似^[6]。同时产生以乳酸为主的有机酸,活化土壤中无效磷。因此,小麦接种43菌株后,表现出苗早、根系发达、分蘖多、增穗增粒、提高单位面积产量、培肥地力的作用。这是菌株与根系结合、固氮、解磷、产生多种生物活性物质综合作用的结果。

参 考 文 献

- 1 程知义,周佳敏.微生物快速诊断新技术.上海:上海科学技术文献出版社,1984
- 2 Kielo Haahtela, Kirsti Kari. Plant and Soil, 1986(90): 245~254
- 3 Rennie RJ et al. Canadian J Microbiol, 1985(29): 1022~1035
- 4 Subba Rao NS. Advances in Agricultural Microbiol. London: Butter Worth Scientific, 1982
- 5 Heinrich D and Hess D. Can J Microbiol. 1985(31): 26~30
- 6 Tien MT et al. Applied and Environmental Microbiol, 1979(37): 1016~1024

Analysis on High Yield Reason of Wheat Inoculated with Associative Nitrogen – fixing Bacteria

Liu Rongchang Li Fengting Hao Zhengran Wang Wenyan

Yang Zeyuan Zhang Chunli

(Microbiology Research Institute, Hebei Academy of Sciences, Baoding)

Abstract The wheat inoculated with strain 43 of associative nitroge – fixing bacteria (*Klebsiella terrigena*) had significantly shown high – yield result under natural conditions. The research results indicated that the reason of yield increace was the combination of the strain with the wheat root system and the presence of the bacteria cells in spaces of the root hair cells, epidermal cells an within the transportation tissues. In the heading period the nitroge – nase activity was as high as $148.8 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{plant}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, and the fixed nitrogen amount was 15.3–22.1% of the total nitrogen amount in the plant. Since the strain might release acides, the activate phosphorus content could increase by 16.1–39.7% under sand culture condition, so that the phosphorus nutrition status of the plant could be improved. In addition some hormones such as auxin, gibberellin and cytokinin existing in metabolic products of the strain could stimulate the plant to grow. It is quite evident that the reason why the wheat inoculated with the strain increases the yield is that the strain can fixe nitrogen, resolve phosphorus and produce many sorts of hormones.

Key words: Wheat; Associative nitrogen fixation; *Klebsiella terrigena*; Yield