

玉米根际联合共生固氮体系的研究

蒋有铨 张美庆 周枫 周薇

(北京市农业科学院土壤肥料研究所, 北京)

周慧玲

(中国科学院微生物研究所, 北京)

近几年来, 在一些牧草和禾谷类作物根际发现了若干种能固氮的细菌。它们既依赖根际环境生活, 又对作物的生长发育产生一定影响, 固氮细菌和作物两者之间形成了不紧密的联合共生关系。据文献报道, 目前从玉米根际已分离到的固氮细菌有巴西固氮螺菌(*Azospirillum brasilense*)^[1-3]、阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)^[4]和粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*)^[5]。

本文报道从玉米根表分离得到的一株固氮酶活性较强的肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)的鉴定结果、固氮酶活性, 以及用它对玉米进行盆栽回接的效果。

材料和 方法

(一) 培养基

用 Döbereiner 无氮培养基^[1] (碳源改用葡萄糖酸钠) 作为基本培养基进行固氮细菌的分离。固氮酶活性用 2% 琼脂的固体斜面接种后测定。

(二) 分离方法

在贫瘠土壤中种 30 个不同品种及杂交组合的玉米种子, 抽期选生长健壮的植株挖出根系洗净, 用 2% 升汞液消毒后剪成小段, 插入半固体 Döbereiner 无氮培养基小瓶中 30℃ 保温培养。待菌落长出后, 转管、纯化并测定固氮酶活性。

(三) 固氮酶活性测定

用上海 103 型气相层析仪测定乙炔和乙烯峰值, 计算乙烯的生成量。

(四) 糖和氮的测定

用薄层层析法测定玉米根系浸出物中糖的种类。在 0.02 M 醋酸钠溶液中制备硅胶粘浆, 涂布后不活化, 标准糖液与根系浸出物点样后, 用正丁醇: 丙酮: 水 = 7:2:1 或氯仿: 丙酮: 乙醇: 水 = 37:37:23:3 作展开剂, 上行展开后, 用苯胺显色

剂喷雾, 100℃ 显色 30 分钟, 根据 12 种标准糖样的位置和 R_f 值确定根样中糖的种类。

玉米植株、珍珠岩和土壤中的含氮量用丹麦 FOSS 自动氮素测定仪测定。

(五) 泌氨试验

用下列两种方法测定菌株的泌氨能力:

1. 将大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的 24 小时培养物制成菌悬液, 离心洗涤 2 次, 稀释至适当倍数, 混入 YMA 培养基 [组分 (%): 葡萄糖酸钠 1, 碳酸钙 0.3, 磷酸氢二钾 0.05, 硫酸镁 0.02, 氯化钠 0.02, 琼脂糖 1.5, 重蒸馏水配制] 中, 使每个培养皿中含大肠杆菌约 4,000 个, 培养基凝固后接入菌株 549 菌液 3 滴, 30℃ 保温培养, 观察在菌落周围是否有大肠杆菌生长。

2. 将对数期生长的培养物接入无氮培养液中, 30℃ 振荡培养 24 小时, 离心 2 次, 测定上清液中是否有氨离子存在。

(六) 盆栽回接试验

1980 年的盆栽试验是用 2000 ml 的搪瓷盆装 280 g 珍珠岩, 经高压灭菌后播种。玉米品种为京单 403。种子表面消毒, 洗净后播种。苗期接种菌液, 设不接种对照, 重复 3 次。生长期间浇灭菌的无氮营养液。原位固氮酶活性测定方法为: 将一个与盆径相适合的玻璃筒罩在盆上, 用橡皮泥密封, 从筒上一个装有反口橡皮塞的小口内注入占筒体积 1/10 的乙炔, 24 小时后抽取气样测定。

1981 年的盆栽用直径 25 cm、高 35 cm 的涂釉陶土盆, 每盆装土 13 kg, 玉米品种京单 403, 苗期接种菌液, 设不接种对照, 重复 5 次。全生育期不施肥, 成熟后收获, 测产量, 并分析植株和土壤含氮量。

本文于 1983 年 6 月 9 日收到。

结果和讨论

从几个玉米品种及杂交组合的根表和根内, 分离初筛得到固氮酶活性较高的 5 株菌 (编号为 403, 508, 549, 605, 901)。为了测定这 5 株菌对玉米根际环境的适应力, 先经薄层层析, 得知玉米根系内主要是葡萄糖和蔗糖。再进一步测定 5 株菌对这两种糖的利用能力。结果表明 5 株菌中, 菌株 549 在以葡萄糖或蔗糖为唯一碳源的无氮培养基上生长最旺盛。菌株 605 生长最差。5 株菌对蔗糖的利用能力都优于葡萄糖。因此, 确定菌株 549 为研究菌株。

菌株 549 系从京白 107 品种玉米根表分得, 经鉴定为肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)^[1]。其形态和生化特性虽然与肺炎克雷伯氏菌相同, 但少数细胞具有极生鞭毛。克雷伯氏菌属应为不运动无鞭毛菌。据此, 暂将此菌归为克雷伯氏菌。

在含有不同碳源的无氮培养液中接种菌液,

30℃ 振荡培养 3 天后, 用 72 型分光光度计测定光密度, 结果看出菌株 549 在 12 种糖的无氮培养液中都能生长。说明它能利用多种糖作为碳源, 包括单糖, 双糖和多糖。

在不同碳源培养基上生长的 549 菌株固氮酶活性测定结果 (表 1) 说明: 菌株 549 在分别以这 12 种糖为唯一碳源的培养基上都有固氮酶活性, 也证明它对碳源要求并不严格。

将培养 2 天的试管斜面调节成不同氧压 (抽出空气, 补充氩气), 连续 5 天测定固氮酶活性, 得到 5 天内每天的实际固氮值及 5 天平均值 (表 2)。从表 2 看出, 菌株 549 在正常氧压 (0.2) 下, 固氮酶活性最高。随着氧压降低, 固氮酶活性相应减弱, 说明它主要在好气条件下固氮而不要求低的氧压。这可能因为它的荚膜对固氮酶有保护作用。

泌氮能力测定结果, 平皿上未见有大肠杆菌生长 (方法 1)。方法 2 的上清液中也无氨离子存在, 初步认为菌株 549 无泌氮能力。

表 1 不同碳源条件下, 菌株 549 的固氮酶活性

Table 1 Effects of various carbon sources on nitrogenase activity of strain 549

碳 源 Carbon sources	固氮活性 (nmol 乙炔/ 管/天) Nitrogenase activity (nmol C ₂ H ₄ /tube/day)	碳 源 Carbon sources	固氮活性 (nmol 乙炔/ 管/天) Nitrogenase activity (nmol C ₂ H ₄ /tube/day)
甘露糖 mannose	148.1	阿拉伯糖 arabinose	95.2
木糖 xylose	85.7	山梨糖 sorbose	95.6
棉子糖 raffinose	162.3	蔗糖 sucrose	101.0
半乳糖 galactose	120.5	鼠李糖 rhamnose	56.1
葡萄糖 glucose	122.6	乳糖 lactose	89.9
果糖 fructose	92.1	麦芽糖 maltose	90.9

表 2 氧压对菌株 549 固氮酶活性的影响 (乙炔毫微克分子/管/天)

Table 2 Effect of O₂ concentration on nitrogenase activity of strain 549 (nmol C₂H₄/tube/day)

天 数 Day	氧压 O ₂ Concentration			
	0.02(大气压) Atmospheric pressure	0.04(大气压) Atmospheric pressure	0.1 (大气压) Atmospheric pressure	0.2 (大气压) Atmospheric pressure
1	111.48	96.82	119.10	148.44
2	74.51	53.98	85.07	85.66
3	100.32	87.42	110.30	136.70
4	53.98	38.72	65.71	80.38
5	0	13.32	19.36	20.54
天平均 Average/day	68.05	57.73	79.73	94.34

表3 接种菌株 549 对玉米幼苗的影响

Table 3 Effect of inoculation with strain 549 on corn seedlings

处 理 Treatment	株高 (cm) Plant height	干重 (g/株) Dry weight(g/plant)	固氮酶活性 (nmolC ₂ H ₄ /hr) Nitrogenase activity
Inoculation with 549	93.7	15.30	12
对照 Control	83.0	11.86	0

表4 接种菌株 549 对全盆含氮量的影响

Table 4 Effect of inoculation with strain 549 on nitrogen content of whole pot

处 理 Treatment	地上部(g/盆) Shoot (g/pot)	根系 (g/盆) Root (g/pot)	珍珠岩(g/盆) Perlite (g/pot)	全盆 (g/盆) Whole pot (g/pot)
Inoculation with 549	0.0878	0.0143	0.0255	0.1276
对照 Control	0.0624	0.0116	0.0218	0.0958

表5 接种菌株 549 对盆栽玉米产量的影响

Table 5 Effect of inoculation on yield of corn with strain 549

处 理 Treatment	全株干重*(g) Total plant dry weight	每穗粒重** (g) Seed weight of each ear	每穗粒数 Seed amount of each ear	百粒重(g) Weight of 100 seeds	穗长(cm) Ear length
Inoculation with 549	273.0	97.7	393	24.9	16.8
对照 Control	269.3	90.8	399	22.7	16.2

* Sd = 7.84 t = 0.45 查 t 表自由度 4 时, $t_{0.05} = 2.78$ 故差异不显著。

** Sd = 9.48 t = 0.72 查 t 表自由度 4 时, $t_{0.05} = 2.78$ 故差异不显著。

1980 年回接试验结果表明,玉米接种 549 菌液后,株高和干重都比对照盆高。抽穗期能测出固氮酶活性(表 3)。全盆含氮量也高于对照盆(表 4)。初步认为,菌株 549 虽然不能泌氮,但它能固氮,并对玉米苗期植株的生长有一定影响。但在这一联合共生体系中,细菌固定的氮如何供给植物利用尚不清楚,有待进一步研究。

1981 年接种试验的结果(表 5)可以看出,玉米接种菌株 549 后全株干重和穗粒重都高于对照,但经差异显著性测定,两者差异并不显著。看来菌株 549 对玉米的生长,特别是前期生长有一定促进作用,但对籽粒产量有无影响,尚未确证。

目前,尚未见到用克雷伯氏菌(*Klebsiella* spp.)接种玉米的报道,而用固氮螺菌(*Azospirillum* spp.)接种玉米的报道较多。一些文献认为接种

固氮螺菌的玉米,固氮酶活性增加,植株干重和含氮量也有所提高,但并不增产^[1,9]。另一些文献则认为,接种固氮螺菌能提高玉米的籽粒和茎秆的产量,增加单株果穗数和果穗重^[10,11]。固氮螺菌和克雷伯氏菌虽然不同属,但均为能固氮,在根际广泛存在的细菌类群。对两者进行比较研究,深入了解联合共生固氮体系的实质是很有意义的。现已知固氮螺菌能产生吲哚乙酸,2,4-D、激动素等几种生长刺激素^[12],促进植物生长。克雷伯氏菌是否能产生刺激素,它在联合共生体系中的重要作用,固氮量及供氮机制等问题有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Döbereiner, J. and J. M. Day: In "Pro-

- ceedings of the 1st. International Symposium on Nitrogen Fixation" (Newton, W. E. and C. J. Nyman eds.), Washington State Univ. Press, Pullman, Washington, pp. 518—538, 1976.
- [2] 湖北省微生物研究所生物固氮组: 微生物学报, 19(2): 160—165, 1979。
- [3] Tarrand, J. J. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 24: 967—980, 1978.
- [4] 袁长芳等: 微生物学报, 22(2): 160—164, 1982。
- [5] 丘元盛等: 微生物学报, 21(4): 468—472, 1981。
- [6] 上海植物生理研究所生物固氮室: 植物学报, 16: 382—384, 1974。
- [7] Buchanan, R. E. et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.
- [8] Albrecht, S. L. et al.: *Plant Physiology*, 60(4): 528—531, 1977.
- [9] Barber, L. E. et al.: *App. Environ. Microbiol.*, 32: 108—113, 1976.
- [10] Kapulinik, Y. et al.: *Expl. Agric.*, 17: 179—187, 1981.
- [11] Okon, Y. et al.: *The Fourth International Symposium on Nitrogen Fixation*, Canberra Australia, p. 166, 1981.
- [12] Tien, T. M. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 37: 1016—1024, 1979.