

## 固氮螺菌 CWV-22 突变株与玉米、 小麦联合体的固氮作用\*

罗孝扬 蒋亚平 蔡金芝 杨宝玉

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

严家骥

(武汉大学, 武汉)

陈华葵

(华中农学院, 武汉)

应用乙炔还原法和同位素  $^{15}\text{N}$  示踪技术证明固氮螺菌 CWV-22 是具有耐高铵、泌铵能力的突变株。它在含有  $50\text{mM NH}_4^+$  浓度的纯培养固氮试验中, 吸收  $^{15}\text{N}$  量为  $135\mu\text{g}/\text{mg}$  蛋白, 不接种的对照吸收  $^{15}\text{N}$  量为零, 接种 Sp7 的只有  $1\mu\text{g}/\text{mg}$  蛋白, 在测试允许误差之内, 证明 Sp7 的固氮作用是不耐铵的。

在密闭培育装置中, 用  $^{15}\text{N}$  示踪植物试验: 1. 种植玉米或小麦, 接种不耐铵的 Sp7 或耐铵的 CWV-22 菌株, 不论在有或无  $\text{NH}_4\text{Ac}$  的条件下, 植物吸收的生物固定  $^{15}\text{N}$  量均远远高于不接种细菌的对照植物, 达 4.5—9.0 倍; 2. 接种耐铵 CWV-22 菌株不受  $\text{NH}_4\text{Ac}$  存在的抑制, 接种不耐铵 Sp7 菌株则受到显著的抑制, 但仍有一定的固氮作用, 并将固定的  $^{15}\text{N}$  输送到植物根、茎、叶里。经检测, 在有  $\text{NH}_4\text{Ac}$  条件下, 根际砂中含  $\text{NH}_4^+$  量降低到 1—2mM (远离根际的砂中含  $\text{NH}_4^+$  为 29.1mM), 低于对 Sp7 菌株的抑制浓度, 可能是 Sp7 仍有固氮活性。

关键词 固氮螺菌; 玉米; 小麦

固氮螺菌 CWV-22 突变株是由固氮螺菌 Sp7 经诱变、筛选获得的耐高铵固氮螺菌突变株<sup>[1]</sup>。它在有固定态氮的环境中能否泌铵, 在和玉米、小麦形成联合体时, 植物能否从它在耐铵条件下固定的氮得到氮素营养, 本文报道了这方面的试验结果。Stephen 和 Brill 等<sup>[2]</sup>用  $^{15}\text{N}$  示踪试验指出, 从玉米根际分离的固氮菌能固定  $^{15}\text{N}_2$  气体被转化的  $^{15}\text{N}$  量只能滞留在玉米植株的根系上。我们采用同位素  $^{15}\text{N}$  示踪法考查了 CWV-22 与接种的植物玉米和小麦——细菌联合体的固氮作用和植物吸收、运输作用。

### 材 料 和 方 法

#### (一) 供试菌株和植物

1. 菌株: (1) 固氮螺菌 Sp7 菌株 (ATCC 29145), 不耐铵, 在  $>3\text{mM NH}_4^+$  条件下无固氮能力, (2) 中国科学院武汉病毒研究所固氮螺菌耐铵泌铵突变株 22 (简称 CWV-22) 由本实验室从 Sp7 菌株诱变筛选获得<sup>[1]</sup>。

2. 植物: 玉米品种为予农 704, 小麦品种为苏麦 2 号。种子表面灭菌处理, 按常规方法进行。

#### (二) $^{15}\text{N}_2$ 混合气体的制备

本文于 1985 年 10 月 7 日收到。

\* 系中国科学院科学基金资助项目。

$^{15}\text{N}_2$  气体的制备参照尤崇杓等的制  $^{15}\text{N}_2$  方法<sup>[5]</sup>, 在制备  $^{15}\text{N}_2$  气体前, 将装置的各个磨口部位用真空脂或真空泥密封。装置的各个部分抽至 760mm Hg 柱。所用  $^{15}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的  $^{15}\text{N}$  原子丰度为 11.59%。制备的  $^{15}\text{N}_2$  气体, 再按比例加入  $\text{O}_2$  和  $\text{CO}_2$ , 制成  $^{15}\text{N}_2$  混合气体, 体积比为  $^{15}\text{N}_2$  80%,  $\text{O}_2$  19.8%,  $\text{CO}_2$  0.2%, 用排水集气法搜集于贮气瓶中, 备用。

### (三) 纯培养物 $^{15}\text{N}$ 示踪试验

1. 在 Döbereiner 半固体培养基<sup>[3]</sup>中, 分别进行如下处理:

- (1) 无  $\text{NH}_4\text{Ac}$  + Sp7 菌株;
- (2) 无  $\text{NH}_4\text{Ac}$  + CWV-22 菌株;
- (3) 50mM $\text{NH}_4\text{Ac}$  + CWV-22 菌株;
- (4) 50mM $\text{NH}_4\text{Ac}$  + Sp7 菌株;
- (5) 对照: 无  $\text{NH}_4\text{Ac}$ , 不接种;
- (6) 对照: 50mM $\text{NH}_4\text{Ac}$ , 不接种。

每个处理重复三次

2. 纯培养物  $^{15}\text{N}$  示踪固氮试验方法:

在容积为 130—135ml 的刻度血清瓶中, 装入不同处理的 45ml Döbereiner 半固体培养基, 接种对数生长期的菌液 5ml, 培养 18—20 小时, 将棉塞换成翻口橡皮塞, 抽真空, 导入贮气瓶中的  $^{15}\text{N}_2$  混合气体, 继续培养 72—96 小时后, 加入 2ml 浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$  待蒸馏。

### (四) 密闭培养装置和 $^{15}\text{N}$ 示踪植物试验

1. 密闭培养装置构造, 见图 1。

2. 密闭培养装置中的植物-细菌联合体固氮试验处理:

砂培试验营养液成份为(单位 g/L):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5,  $\text{MgSO}_4$  0.5,  $\text{NaCl}$  0.6,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  0.26,  $\text{MnSO}_4$  0.01,  $\text{NaMoO}_4$  0.01,  $\text{FeCl}_3$  0.01,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.01, 苹果酸钠 1.0, pH7.0,  $\text{H}_2\text{O}$  1,000ml。

在上述营养液中分别进行五种不同处理:

- (1) 无  $\text{NH}_4\text{Ac}$  +  $^{15}\text{N}_2$  混合气体 + 植物 + Sp7;
- (2) 无  $\text{NH}_4\text{Ac}$  +  $^{15}\text{N}_2$  混合气体 + 植物 + CWV-22 菌株;
- (3)  $\text{NH}_4\text{Ac}$  +  $^{15}\text{N}_2$  混合气体 + 植物 + Sp7;
- (4)  $\text{NH}_4\text{Ac}$  +  $^{15}\text{N}_2$  混合气体 + 植物 + CWV-22;
- (5) 无  $\text{NH}_4\text{Ac}$  +  $^{15}\text{N}_2$  混合气体 + 植物, 不接种。

营养液  $\text{NH}_4\text{Ac}$  处理浓度, 玉米试验为 40mM, 小麦试验为 30mM。

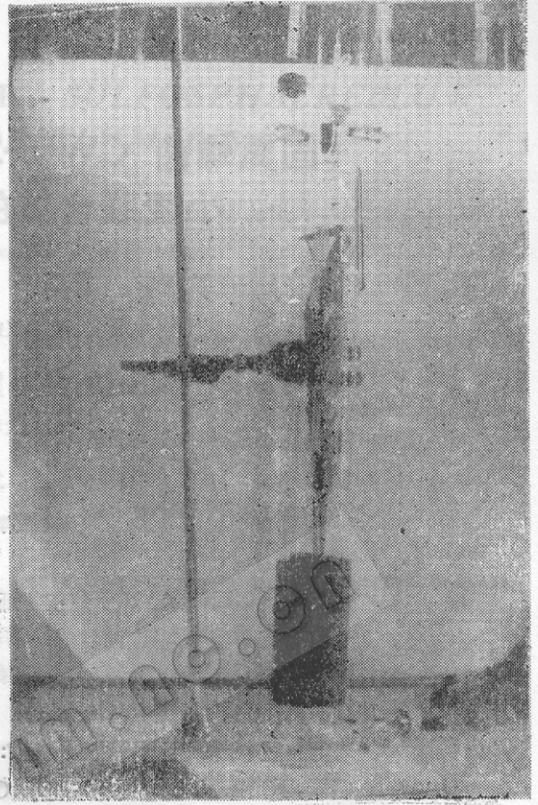


图 1 密闭培育装置

Fig. 1 The hermitic cultivation-equipment

密闭培养装置试验中的器皿、砂、营养液均经灭菌和除氮处理。每个装置装入砂 300g, 营养液 62—65ml。种子经表面灭菌后, 催芽, 露白后播种, 每个装置中放玉米种 4 粒, 小麦种 8—10 粒, 细菌接种两次: 一次在播种前将露白种子浸于菌液中; 一次在幼苗长出了 3—4 片真叶时, 加入菌液 5ml。追施菌液后 24 小时, 将密闭培养装置抽真空处理(用高频火花测验器测真空度, 达到实验要求)。在温室中培养, 自然光照, 温室温度为 26—28℃, 用黑布包裹装置的装砂部位, 并在夹层中通自来水。

5 月 27 日播种, 6 月 6 日进行第二次接种菌液, 7 日导入  $^{15}\text{N}_2$  混合气体, 保持 1 个大气压。再经 4—5 天后收获。取出植株, 洗净, 烘干(80℃), 称重, 保存待测试。

(五) 用乙炔还原法测定培养物和密闭培养装置中联合体固氮活性的原位测定

1. 纯培养物的固氮酶活性测定参考文献<sup>[3]</sup>。处理见表 1, 每个处理 5 次重复。

2. 密闭培育装置中, 固氮活性的原位测定培育方法同(四), 处理见表 2。

当玉米植株高达 13—15cm 时, 抽出装置中部分气体, 同时注入等体积的乙炔, 经 24 小时后, 取气体样, 测乙烯生成量。测定仪器为 102G 型气相色谱仪。

#### (六) 植物中 $^{15}\text{N}$ 原子%的测定

将浓缩到 2—3ml 的液体样品, 送中国科学院南京土壤研究所质谱组 (ZHT-1301 质谱计, 参比标准 0.003 $^{15}\text{N}\%$ ) 进行  $^{15}\text{N}$  原子%的测定。

#### (七) 总氮量测定

采用克氏法<sup>[7]</sup>。

#### (八) 菌体蛋白的测定

表 1 培养物固氮酶活性比较\*

Table 1 Comparison of the nitrogenase activities of *Azospirillum* Sp 7 and its mutant CWV-22 in the presence or absence of ammonium ions

| 菌号<br>Strain | 处理<br>Treatment         | 固氮酶活性 (n mol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /mg 蛋白·小时)<br>Nitrogenase activity (n mol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /mg protein/h) |
|--------------|-------------------------|---|
| Sp7          | -NH <sub>4</sub> Ac     | 669.75±0.19   |
| CWV-22       | -NH <sub>4</sub> Ac     | 503.77±0.89   |
| Sp7          | 50mM NH <sub>4</sub> Ac | 0   |
| CWV-22       | 50mM NH <sub>4</sub> Ac | 204.53±0.26   |

\* 新发生的 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 测不出 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 含量。

Freshly prepared acetylene, no ethylene was detected.

表 2 密闭培育装置中玉米植株分别同 Sp7 菌株及 CWV-22 菌株联合体固氮酶活性原位测定

Table 2 Determination in situ of the nitrogenase activities of combinants of maize plant with *Azospirillum* Sp7 and its mutant CWV-22 respectively in hermetic cultivation apparatuses

| 菌号<br>Strain     | 处理<br>Treatment  | 固氮酶活性 (n mol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /mg 蛋白·小时)<br>Nitrogenase activity (n mol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /mg protein/h) |
|------------------|--|---|
| Sp7              | 玉米+35mM NH <sub>4</sub> Ac<br>maize + 35mM NH <sub>4</sub> Ac  | 0   |
| CWV-22           | 玉米+35 mM NH <sub>4</sub> Ac<br>maize + 35mM NH <sub>4</sub> Ac | 331.68  |
| 不接种对照<br>Control | 玉米+35mM NH <sub>4</sub> Ac<br>maize + 35mM NH <sub>4</sub> Ac  | 0   |

采用 Lowry 等人<sup>[4]</sup>的 Folin-phenol 试剂法测定。

## 结 果

### (一) 菌株 Sp7 和 CWV-22 的固氮酶活性比较

#### 1. 培养物的固氮酶活性比较:

试验结果(表 1)表明, 在无 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 存在时, CWV-22 菌株的固氮酶活性是 Sp7 菌株的 75%; 有 50mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 存在时, 由于 CWV-22 菌株固氮酶活性不受抑制, 其固氮酶活性为 204.53 n mol 乙烯/mg 蛋白·小时; 而 Sp7 菌株的固氮酶活性被 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 抑制, 数值为零。

#### 2. 密闭培育装置中联合体的乙炔还原活性的原位测定:

结果见表 2。在含 35mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 的营养液中, Sp7 菌株无乙炔还原活性, 而 CWV-22 菌株的乙炔还原活性达到 331.68 n mol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/mg 蛋白·小时。以上培养试验和玉米、细菌联合体试验, 结果均表明: CWV-22 菌株的固氮作用是耐铵的, Sp7 菌株不耐铵性。

### (二) 有或无 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 对纯培养物固氮作用的 $^{15}\text{N}$ 示踪测定

试验结果(表 3)表明, 当培养基中无 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 存在时, Sp7 菌株吸收固定  $^{15}\text{N}$  量为 CWV-22 菌株的 1.5 倍; 50mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 存在时, Sp7 菌株吸收固定  $^{15}\text{N}$  量只有 1μg/mg 蛋白, 处于质谱分析的允许误差范围内, 而 CWV-22 菌株则为 135μg/mg 蛋白。 $^{15}\text{N}$  示踪证明, CWV-22 菌株在有或无 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 存在时, 均有固氮作用, 而 Sp7 菌株只在无 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 或微量 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 存在时才有固氮作用。

### (三) 有或无 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 在密闭培育装置中联合体固氮作用的 $^{15}\text{N}$ 示踪测定

表 4 与表 5 的结果表明, 当营养液中无或有 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 存在时, 与不接种对照相比,

表 3 有或无  $\text{NH}_4^+$  对纯培养物吸收固定  $^{15}\text{N}$  的影响Table 3 The effect of the presence or absence of ammonium ions on the absorption and fixation of  $^{15}\text{N}$  by pure cultures

| 菌号<br>Strain     | 菌体细胞 mg 蛋白<br>Protein of<br>bacterial cells | 总 N 量 (mg)<br>Total amount<br>of nitrogen | 培养物过量 $^{15}\text{N}$ 原子%<br>$^{15}\text{N}$ atom% excess<br>of pure culture | 吸收固定 $^{15}\text{N}$ 量 ( $\mu\text{g}$ )<br>Amount of absorption<br>and fixation of $^{15}\text{N}$ |
|------------------|---|---|--|---|
| Sp7              | 30.0  | 8.784                                     | 1.94   | 55  |
| CWV-22           | 26.2  | 8.296                                     | 1.18   | 36  |
| Sp7              | 32.5  | 68.530                                    | 0.05   | 1   |
| CWV-22           | 25.0  | 70.488                                    | 0.49   | 135   |
| 不接种对照<br>Control | 0   | 0   | 0  | 0   |
| 不接种对照<br>Control | 0   | 70.000                                    | 0  | 0   |

注: 1. 贮气瓶中  $^{15}\text{N}_2$  丰度%为 10.64。

2. 上表数字系三个重复的平均值。

1. The percentage of  $^{15}\text{N}_2$  enrichment in gas reservoir was 10.64.

2. The figures listed in this table were the mean values of triplicate specimens.

表 4 有或无  $\text{NH}_4^+$  对玉米植株分别同 SP7 菌株及 CWV-22 菌株联合体的固  $^{15}\text{N}$  影响Table 4 The effect of the presence or absence of ammonium ions on the  $^{15}\text{N}$  fixation by the combinants of maize plants with Sp7 and CWV-22 respectively

| 菌号<br>Strain     | 烘干重 (g)<br>Dry weight |                   | 总 N 量 (mg)<br>Total amount of<br>nitrogen |                   | 样品中过量 $^{15}\text{N}$<br>原子%**<br>$^{15}\text{N}$ atom% excess<br>of samples |                   | 吸收生物固 $^{15}\text{N}$ 量 ( $\mu\text{g}$ )<br>Amount of absorption<br>and fixation of $^{15}\text{N}$ |                   |                               |
|------------------|-----------------------|-------------------|---|-------------------|--|-------------------|--|-------------------|-------------------------------|
|                  | 根<br>Root             | 茎、叶<br>Stem, leaf | 根<br>Root                                 | 茎、叶<br>Stem, leaf | 根<br>Root  | 茎、叶<br>Stem, leaf | 根<br>Root  | 茎、叶<br>Stem, leaf | 根+茎、叶<br>Root + stem,<br>leaf |
| Sp7              | 0.1809                | 0.3112            | 21.1592                                   | 38.4062           | 0.007  | 0.008             | 15   | 30                | 45                            |
| CWV-22*          | 0.1276                | 0.1432            | 2.3041                                    | 60.6172           | 0.016  | 0.009             | —  | 53                | >53                           |
| Sp7              | 0.1391                | 0.3808            | 48.3321                                   | 57.6576           | 0.009  | 0.005             | 42   | 28                | 70                            |
| CWV-22           | 0.1731                | 0.3593            | 53.2236                                   | 42.2736           | 0.049  | 0.022             | 254  | 91                | 345                           |
| 不接种对照<br>Control | 0.0993                | 0.2042            | 9.8691                                    | 11.0382           | 0.003  | 0.002             | 6.2  | 4.6               | 10.8                          |

\* 生长发育受阻碍,其原因不明。

\*\* 贮气瓶中  $^{15}\text{N}_2$  丰度%与表 3 相同。

\* The growth of roots has been retarded for unknown reason.

\*\* The percentage of  $^{15}\text{N}_2$  enrichment in gas reservoir was 10.64.

联合体植株的过量  $^{15}\text{N}$  原子%均提高,表明均有一定的固氮作用,并能将固定的  $^{15}\text{N}$  运送到茎叶部位。在 30mM 或 40mM  $\text{NH}_4^+$  存在条件下,接种 CWV-22 菌株的小麦或玉米植株联合体比接种 Sp7 菌株的联合体植株吸收生物固定  $^{15}\text{N}$  量大 5—8 倍;在无  $\text{NH}_4^+$  存在时,前者为后者的 1—2 倍,但接种 CWV-22 菌株的玉米,由于生长发育不

够正常,无法加以讨论。从装置中取出的小麦干重和总氮量。在无  $\text{NH}_4^+$  时,接种 CWV-22 菌株的比较种 Sp7 菌株的差别小,和不接种的对照相比,干重差别也不大,但总氮量都比对照高 4—5 倍。在 30 mM  $\text{NH}_4^+$  存在时,接种 CWV-22 菌株与接种 Sp7 菌株的植株干重和总氮量差别也不大,但植株吸收生物固氮量, CWV-22

表 5 有或无  $\text{NH}_4^+$  对小麦植株分别同 Sp7 及 CWV-22 联合体的固  $^{15}\text{N}$  影响  
Table 5 The effect of the presence or absence of ammonium ions on the  $^{15}\text{N}$  fixation by the combinant: of wheat plants with Sp7 and CWV-22 respectively

| 菌号<br>Strain     | 烘干重 (g)<br>Dry Weight |                   | 总 N 量 (mg)<br>Total amount of nitrogen |                   | 样品中过量 $^{15}\text{N}$<br>原子%*<br>$^{15}\text{N}$ atom% excess of samples |                   | 吸收生物固 $^{15}\text{N}$ 量 ( $\mu\text{g}$ )<br>Amount of absorption and fixation of $^{15}\text{N}$ |                   |                            |
|------------------|-----------------------|-------------------|--|-------------------|--|-------------------|---|-------------------|----------------------------|
|                  | 根<br>Root             | 茎、叶<br>Stem, leaf | 根<br>Root                              | 茎、叶<br>Stem, leaf | 根<br>Root  | 茎、叶<br>Stem, leaf | 根<br>Root   | 茎、叶<br>Stem, leaf | 根+茎、叶<br>Root + stem, leaf |
| Sp7              | 0.0390                | 0.1330            | 25.8462                                | 28.5188           | 0.046  | 0.050             | 116   | 138               | 254                        |
| CWV-22           | 0.0484                | 0.1071            | 19.8350                                | 32.6080           | 0.197  | 0.037             | 380   | 111               | 491                        |
| Sp7              | 0.0680                | 0.1388            | 51.9941                                | 59.0058           | 0.01   | 0.006             | 51  | 36                | 87                         |
| CWV-22           | 0.1056                | 0.2068            | 36.9318                                | 87.3114           | 1.29   | 0.026             | 464   | 221               | 685                        |
| 不接种对照<br>Control | 0.0613                | 0.0993            | 12.6656                                | 8.7028            | 0.004  | 0.003             | 4.93  | 2.55              | 7.48                       |

\* 贮气瓶中  $^{15}\text{N}_2$  丰度%与表 3 相同。

The percentage of  $^{15}\text{N}_2$  enrichment in gas reservoir was 10.64.

菌株比 Sp7 菌株大 8 倍。

## 结论与讨论

1. CWV-22 是一株耐高铵、泌铵菌株, 它所分泌的铵能被植株吸收利用, 并能运送到茎和叶中。

当试验环境中存在  $50\text{mM}\text{NH}_4^+$  时 (本实验室试验结果表明, 在  $200\text{mM}\text{NH}_4^+$  条件下, CWV-22 菌株仍有固氮酶活性<sup>[1]</sup>), CWV-22 菌株纯培养物的固氮酶的固氮作用不受  $\text{NH}_4^+$  抑制, 而 Sp7 菌株纯培养物的固氮作用则因  $\text{NH}_4^+$  的存在而不能进行。说明前者能耐高铵, 而后者无耐铵能力。

2. 密闭试验中, 接种 Sp7 菌株或 CWV-22 菌株的过量  $^{15}\text{N}$  原子% 均高于不接种对照, 表明植株在有或无  $\text{NH}_4\text{Ac}$  条件下, 或多或少都吸收了细菌固定的氮。玉米试验由于无  $\text{NH}_4\text{Ac}$ , 接种 CWV-22 菌株的植株生长发育不正常, 无法加以讨论。小麦试验, 在无  $\text{NH}_4\text{Ac}$  条件下, CWV-22 菌株供给植物的氮为 Sp7 菌株的一倍, 在有  $\text{NH}_4\text{Ac}$  条件下, 则为 8 倍。这表明, 尽管 Sp7 菌株在有  $\text{NH}_4\text{Ac}$  条件下, 仍有一些固氮作用, 但显著地被抑制, 而 CWV-22

菌株则不受抑制。

3. Sp7 菌株不耐铵, 在联合体中也有一定的固  $^{15}\text{N}$  能力, 也能被植物吸收利用, 并转运到植株的茎叶部位。

在纯培养物中, Sp7 菌株在含有  $50\text{mM}\text{NH}_4^+$  的培养基中不能固氮, 但植物-Sp7 菌株联合体在  $30-40\text{mM}\text{NH}_4^+$  培养液中都表现能固氮, 这可能是由于植物吸收培养液中的  $\text{NH}_4^+$ , 降低了根际培养液中  $\text{NH}_4^+$  的浓度, 短期和局部地消除了  $\text{NH}_4^+$  的抑制作用, 因而表现出固氮作用。收获时, 用奈氏法测定根系周围的砂中的  $\text{NH}_4^+$  含量只有  $1-2\text{mM}$  (低于抑制浓度), 而根系未达到部位的砂中  $\text{NH}_4^+$  含量仍有  $29.1\text{mM}$  表明  $\text{NH}_4^+$  在砂中的扩散速度低于植物根系吸收速度, 造成局部的低  $\text{NH}_4^+$  环境, 而这正是固氮螺菌能大量生存的场所 (固氮螺菌主要生活在根表), 因而 Sp7 菌株也有固氮酶活性, 能进行固  $^{15}\text{N}$  作用。

4. 联合体吸收固定的  $^{15}\text{N}$  量, 能被植物吸收利用, 并且也能够转移到植物的茎、叶中。

在密闭培养装置中,  $^{15}\text{N}_2$  的试验结果 (表 4、5) 表明: 在有或无  $\text{NH}_4^+$  条件下, 联

合体-CWV-22 菌株和联合体-Sp7 菌株所固定的  $^{15}\text{N}$  量, 均被植物的根系吸收固定, 并且能运送到植物的茎-叶中。Stephen<sup>[2]</sup> 等用  $^{15}\text{N}$  示踪法研究玉米植株根系的固氮菌的固氮作用, 其固  $^{15}\text{N}$  只能滞留在植株的根部。我们的结果表明,  $^{15}\text{N}$  不但能被植株根系吸收固定, 而且还能运送到植株的茎、叶中。

### 参 考 文 献

- [1] 罗孝扬等: 微生物学报, 26(1): 47—52, 1986。
- [2] Stephen, W. & W. J. Brill: *Plant Physiol.*, **70**: 1564—1569, 1982。
- [3] 湖北省微生物研究所生物固氮组: 微生物学报, **19**(2): 160—165, 1979。
- [4] Lowry, O. G. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265—275, 1951。
- [5] 尤崇杓等: 原子能, 第 11 期, 第 995—1000 页, 1965。
- [6] 尤崇杓等: 原子能, 第 6 期, 第 535—541 页, 1965。
- [7] Burris, R. H. Methodology, in "The Biology of Nitrogen fixation", Quispel, A. ed. North-Holland Pub. Co., 9—13, 1974。

# NITROGEN FIXATION BY THE COMBINANT OF MUTANT STRAIN OF *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* (CWV-22) WITH MAIZE AND WHEAT

Luo Xiaoyang Jiang Yaping Cai Jinzhi Yang Baoyu  
(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

Yan Jiaqi  
(Wuhan University, Wuhan)

Chen Huakui  
(Huazhong Agricultural University, Wuhan)

By using the acetylene reduction method and isotope  $^{15}\text{N}$  tracing technique, it was shown that CWV-22 (a mutant strain of *Azospirillum brasilense* Sp7) can fix nitrogen in the presence of high concentration of ammonium ions and is capable to excrete  $\text{NH}_4^+$ . In the nitrogen fixed by CWV-22 in the presence of 50 mM  $\text{NH}_4^+$  was 135  $\mu\text{g}$ , whereas that absorbed by the control (i.e. without inoculation) and by *Azospirillum* Sp7 was zero and 1  $\mu\text{g}$ , respectively. The results showed that within the allowed error of determination, Sp7 cannot fix nitrogen in the presence of high concentration of ammonium ions.

In the experiments of  $^{15}\text{N}$ -labelled plants in culture apparatus, it was shown that (1) during the cultivation of maize and wheat, whether in the presence of ammonium acetate or not, the amount of  $^{15}\text{N}$  fixed by plants after Sp7 and CWV-22 have been inoculated was 4.5—9.0 times than that of the uninoculated plants (the  $^{15}\text{N}$  atom% excess of uninoculated plants was 0.002—0.004, which were within the limits of error in determination); (2)

the capability of nitrogen fixation of CWV-22 was not repressed by the presence of ammonium acetate, while the capability of Sp7 was markedly inhibited by it, but could still fix some nitrogen, in the presence of low concentration of  $\text{NH}_4^+$  and the fixed  $^{15}\text{N}$  was transferred to the root, stem and leaf of plants. The result of experiment showed that in the presence of ammonium acetate, the ammonium ion content in sand culture around rhizosphere inoculated with Sp7 decreased to 1—2 mM (the content of  $\text{NH}_4^+$  in sand culture far from rhizosphere was 29.1 mM), and this amount of  $\text{NH}_4^+$  was lower than that to inhibit Sp7. This might be the reason why Sp7 still has the capability of nitrogen fixation in the hermetic plant culture apparatuses.

## Key words

*Azospirillum brasilense*; Maize; Wheat

This investigation was supported by Science Fund from the Chinese Academy of Sciences.