微生物学报 29 (2): 137—140, 1989
Acta Microbiologica Sinica

固氮螺菌突变株 CWV-22 对提高小麦固氮量的初步研究*

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)

严家骐 陈华癸
(武汉大学，武汉) (华中农业大学，武汉)

固氮螺菌突变株 CWV-22 与玉米、小麦联合体的固氮作用经采用纯培养物和密闭培育装置试验已被证实。在此基础上进行了盆栽(砂培)试验，结果表明：在无 NH_4^+ 存在下，接菌 CWV-22 和接菌 Sp7 的小麦联合体对比，小麦苗期每克干物质中的含氮量，前者比后者高 2.1 倍；在 30mmol/L NH_4^+ 存在下，前者比后者高 46mg；而在 30mmol/L $^{15}NH_4^+$ 存在下，小麦苗期植株中吸收的 ^{15}N 量，接菌 CWV-22 的比接菌 Sp7 的小麦联合体高 13μg。

关键词 固氮螺菌突变株 CWV-22; NH_4^+ 或 $^{15}NH_4^+$ 浓度的影响；小麦

固氮螺菌突变株 CWV-22[1] 与玉米、小麦联合体的固氮作用已被证实[2]。本文首次报道在环境中含有 30mmol/L NH_4^+ 或 30mmol/L $^{15}NH_4^+$ 浓度下，接种固氮螺菌突变株 CWV-22 对提高小麦苗期固氮量的一些结果。

材料和方法

(一) 材料

1.供试小麦品种及其处理：品种为苏麦 2 号。处理按常规方法进行[2]。每缸定植小麦幼苗 12 株。

2.播种及生长天数：第一批于 1985 年 5 月 13 日—5 月 27 日。生长期为 14d。第二批于 1985 年 9 月 20 日—10 月 23 日，生长期为 34d。

3.菌种培养及使用：原始菌株为 Sp7 (ATCC 29145)，突变株为 CWV-22。其培养条件和使用方法按参考文献[2]所描述的程序进行。

4.河砂及砂培的培养液成分：河砂用 2% 的 HCl 浸泡，用无菌水洗到无 NH_4^+。每缸装处理过的砂子 1000g。砂与营养液的比例按 22% 配制。营养成分见参考文献[2]。

(二) 方法

1.同位素过量 ^{15}N 原子%的测定：混合样品送中国科学院南京土壤研究所质谱组进行检测。

2.总氮量测定：采用凯氏比色法[5]。

3.吸收 ^{15}N 量的计算：本试验采用 $(^{15}NH_4)_2SO_4$ 中 ^{15}N 的丰度为 11.59%。

$$固\ ^{15}N 量\ (mg) = \frac{C_1 - C_0}{C_2 - C_0} \times (W_0 + W_1)$$

W_0——小麦植株吸收 ^{15}N 的量 (mg);

W_1——小麦植株吸收 ^{14}N 的量 (mg);

$(W_0 + W_1)$ = 小麦植株中测得的总氮量 (mg);

C_0——^{15}N 的自然丰度；

C_1——收获时小麦植株中 ^{15}N 的丰度；

C_2——施入缸中 ^{15}N 的丰度。

4.试验处理：

1.不接菌加 30mmol/L $^{15}NH_4^+$(对照)，[$^{15}NH_4^+$ 为 $(^{15}NH_4)_2SO_4$，下同]；

2.接菌 (CWV-22) 加 30mmol/L $^{15}NH_4^+$;

3.接菌 (Sp7) 加 30mmol/L $^{15}NH_4^+$；以上为第一批试验。

本文于 1987 年 10 月 24 日收到。
* 系中国科学院基金资助项目。

4. 不接种，不加 NH_4^+，(NH_4^+ 为 NH_4Ac，下同)。

5. 接菌 (CWV-22)，不加 NH_4^+；

6. 接菌 (Sp7)，不加 NH_4^+；

7. 不接菌，加 30mmol/L NH_4^+ (对照)；

8. 接菌 (CWV-22)，加 30mmol/L NH_4^+；

9. 接菌 (Sp7)，加 30mmol/L NH_4^+；以上是第二批试验。

上述两批试验，均采用随机排列，每个处理四个重复。

结 果

(一) 在不加 NH_4^+ 的条件下，各处理含氮量的变化

在不加 NH_4^+ 的试验中(表 1)，接菌 CWV-22 的小麦植株每克干物质的含氮量比接菌 Sp7 的小麦植株高于 2.1 倍，接菌 Sp7 的小麦植株含氮量均低于 CWV-22-小麦联合体和不接菌的对照。这一结果表明：接菌 Sp7 的小麦植株，在苗期显示固氮量很低，可能是由于 Sp7 的固氮量甚微，在其繁殖过程中本身消耗了部分氮，因而小麦植株中的氮量减少了。

表 1 无 NH_4^+ 对小麦植株分别接菌 CWV-22 和 Sp7 联合体固氮的影响

Table 1 The effect of the absence of ammonium ions on the N_2-fixation by the combinants of wheat plants with Sp7 and CWV-22 respectively

处 理 Treatment	含氮量 (mg-氮/g 干物质) Ammount of nitrogn content (mg-N/g·dry matter)
不接种对照 Without inoculum	30.99±2.75
Sp7	18.37±1.20
CWV-22	39.22±2.34

(二) 在有 NH_4^+ 存在下，接菌 CWV-22-小麦联合体和接菌 Sp7-小麦联合体的固氮量变化

由表 2 结果可知：接菌 CWV-22 的小麦植株的含氮量比接菌 Sp7 的小麦植株含氮量约高 46mg 氮/g 干物质。比不接菌的对照约高 29mg 氮/g 干物质。小麦植株中茎叶部位的含量比根部含氮量高 3—7 倍。各处理间的含氮量变化次序是：CWV-22-小麦联合体＞不接种的对照 ＞ Sp7-小麦联合体。

(三) 用同位素示踪技术测定各处理间吸收固定氮量的变化及其在植株中的分配

表 3 的结果表明：接菌 CWV-22 的小麦植株中的含氮量比接菌 Sp7 的小麦植株高 38.79%，比不接菌的对照的小麦植株含氮量高 24.12%。在植株含氮量的分配上，根部的含氮量比叶部高出 1—1.5 倍。Sp7-小麦联合体的含氮量仍低于其他处理。根据同位素 ^{15}N 稀释法[3,4] 的原理，

表 2 在有 NH_4^+ 存在下，接菌 CWV-22-小麦联合体和接菌 Sp7-小麦联合体的固氮量变化

Table 2 The effect of ammonium ions on the ammount of N_2 fixed by the combinants of wheat plants with Sp7 and CWV-22 respectively

处 理 Treatment	含氮量 (mg-氮/g 干物质) Amount of nitrogen content (mg-N/g·dry matter)		
	茎 叶 Stem and leaf	根 Root	茎叶+根 Stem leaf and root
CK + 30 mmol/L NH_4^+	119.53±2.3	34.78±2.30	154.31±4.6
Sp7 + 30 mmol/L NH_4^+	121.5±3.81	14.52±3.20	137.03±7.01
CWV-22 + 30 mmol/L NH_4^+	159.98±3.11	23.71±2.08	183.59±5.19

表3　有 $^{15}NH_4$ 对小麦植株分别接菌 CWV-22 和 Sp7 联合体的固氮影响*

Table 3　The effect of ammounium ions on the ^{15}N-fixation by the combinants of wheat plants with Sp7 and CWV-22 respectively

处　理 Treatment	烘干重 (g) Dry weight		含氮量 (mg) Amount of nitrogen content		样品中过量 ^{15}N 原子% ^{15}N atom% excess of sample		吸收生物固 ^{15}N 量 (μg) Amount of absorption and fixation of ^{15}N		
	叶 Leaf	根 Root	叶 Leaf	根 Root	叶 Leaf	根 Root	叶 Leaf	根 Root	叶+根 Leaf and root
CK + 30 mmol/L $(^{15}NH_4)_2SO_4$	0.6835	0.2386	10.2838	20.746	9.06	9.64	8.3040	17.9170	26.2210
Sp7 + 30 mmol/L $(^{15}NH_4)_2SO_4$	0.5364	0.2102	5.7215	19.3102	8.96	9.40	4.5690	16.1779	20.7469
CWV-22 + 30 mmol/L $(^{15}NH_4)_2SO_4$	0.5668	0.2048	16.2438	24.6533	8.96	9.41	12.9719	20.6763	33.6482

* 表中数据为四缸样品等量混合。

联合体中样品 ^{15}N 富集度%均低于不接菌的对照，表明对照只能吸收以 ^{15}N 的化合态氮作为氮素来源。CWV-22-小麦联合体与 Sp7-小麦联合体的叶和根的 ^{15}N 富集度%尽管没有差异，但由于 Sp7 不耐铵，其固氮酶的固氮作用受 NH_4^+ 所抑制，因而表明在叶和根吸收固定的氮量比不接菌的对照低 26.38%，比 CWV-22-小麦联合体低 62.18%。联合体中固定的 ^{15}N 量不仅根内存在，而且根内存在的部分 ^{15}N 量能输送到植株的茎叶部位。这一结果与参考文献[2]的结果一致。

结 论 与 讨 论

Sp7-小麦联合体无论在无 NH_4^+ 或有 NH_4^+($^{15}NH_4^+$) 存在条件下，其固氮量均低于 CWV-22 小麦联合体与不接菌的对照。其原因在无 NH_4^+ 存在时，Sp7-小麦联合体固定的氮量不能满足小麦苗期对氮素的需要，同时 Sp7 在其本身繁殖过程中需要消耗部分的氮素营养，此时小麦植株的缺氮现象就显得更为突出，致使氮的含量低。在有 30mmol/L NH_4^+ 或 30mmol/L $^{15}NH_4^+$ 存在的环境中，由于 Sp7 不耐铵，其固氮酶的固氮作用受 NH_4^+ 或 $^{15}NH_4^+$ 所抑制，固氮作用不能进行，而其本身又要消耗部分氮，因此，其含氮量既低于不接菌的对照，又低于 CWV-22-小麦联合体。

在含有 30mmol/L NH_4^+ 或 30mmol/L $^{15}NH_4^+$ 的环境中，接菌 CWV-22 与小麦形成的联合体所吸收固氮 (^{15}N) 量与原始菌株 Sp7 或不接种的对照相比，均有明显提高。因此，CWV-22 小麦联合体的固氮体系不仅已经建成，而且在较高的 NH_4^+ 或 $^{15}NH_4^+$ 浓度下仍然能够固定空气中的氮以供给禾本科植株的氮素来源。这一结果将给禾本科植物的氮素营养提供了依据。

参 考 文 献

[1]　罗孝扬等：微生物学报，26(1)：47—52，1980。
[2]　罗孝扬等：微生物学报，27(3)：277—283，1987。
[3]　林　沧等：中国农业科学，4：53—58，1984。
[4]　Boddey, R. M. et al.: International Symposium on N_2-fixation with Non-leyumes (Program Abstract) p. 19.1982.
[5]　Burris, R. H.: Methodology, in "The Biology of Nitrogen Fixation", Ed. Ouispel A. North Holland Publ. Co., pp. 9—13, 1974.

PRELIMINARY STUDY ON THE MUTANT STRAIN OF *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* (CWV-22) RAISING THE AMOUNT OF NITROGEN FIXATION BY WHEAT

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

Yan Jiaqi
(Wuhan University, Wuhan)

Chen Huakui
(Huazhong University Agriculture, Wuhan)

The combinant of *Azospirillum brasilense* mutant (CWV-22) with wheat fixed nitrogen was tested by using both pure culture and hermetic cultural apparatus. On the basis of these experiments, potted culture (sand culture) was conducted, the results showed that in the absence of NH_4^+, when the combinant of wheat with mutant strain CWV-22 was compared with that of wheat with strain Sp7, the nitrogon content per gram of dry matter of wheat seedling of the former was 2.1 times higher than that of the latter. In the presence of 30 mmol/L NH_4^+, the nitrogen content of the former was about 46 mg higher than that of the latter, while in the presence of 30 mmol/L $^{15}NH_4^+$, the amount of ^{15}N absored by the combinant of wheat with strain CWV-22 was 13 μg higher than that of combinant of wheat with strain Sp7.

Key words

Azospirillum brasilense mutant CWV-22; Effect of NH_4^+ or $^{15}NH_4^+$; Wheat

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