

玉米根际固氮活力的研究

第一报：玉米根部的固氮活力和固氮部位

张 宏 宋明芝 刘淑环

(吉林省农业科学院土肥所微生物室)

提 要

通过1979年对38个玉米品系300个根系样品的调查, 证实在吉林($N43.5^{\circ}$)的玉米根系具有固氮活力, 一般在 $0.04\sim 29.3$ 乙烯毫微克分子/克干根/小时。其固氮部位在于根系各部。根内部可能有固氮微生物结合共生。在研究方法方面, 提出在测定根系固氮活力时, 取样以一个根的混合样品重复3~5次比较合适。

近年来, 关于玉米根部固氮的研究报导很多[1][2][9], Y.Dommergues [2]指出玉米可固氮 $3\text{ kg}/\text{垧}/\text{生长季节}$ 。美国Stephan L Albrecht等[3]的研究指出, 玉米和含脂刚螺菌(*Spirillum lipoferum*)结合固氮, 可固氮 $0.5\text{ kg}/\text{垧}/\text{生长季节}$ 。湖北微生物研究所生物固氮组[4]在武汉、南宁等地调查, 有40个玉米品系固氮活力超过100乙烯毫微克分子/瓶/小时, 最高能达1100乙烯毫微克分子/克干根/小时。美Florida [10]在谷类植物和饲草上接种固氮螺菌后, 可以增加玉米、高粱的固氮活力, 并增加珍珠谷和粟类的产草量。本试验目的是调查了解玉米根系的固氮活力及其固氮部位。

材 料 和 方 法

(一) 采样及固氮活力的测定。在我院试验地栽种不同玉米品系38个品种、施磷肥300斤/垧。根据Y.Dommergues [2]的试验, 玉米根部固氮活力随着作物生长而增加, 以出苗后90~100天时为最高。因此, 我们采用结穗期及成熟期作为采样测定时期。从田间挖取玉米根立即用自来水冲洗干净, 剪成2~3厘米根段, 称2克样品放于40毫升玻璃管中, 加水1毫升, 用血清瓶盖盖紧。玻璃管中的空气用 N_2 和 O_2 (96:4)的混合气体置换三次。30℃保温箱中培养18~20小时, 然后充入8%乙炔, 30℃培养2.5~3小时。用1毫升注射器取气样1毫升, 在气相层析仪上进行乙烯量的测定。气相层析仪为国产102G型, 柱长1米, 内径4毫米, 固定相为氢氧化铝涂上阿配松M。柱温60~80℃, 氢火焰离子化鉴定器。载气为 N_2 。

(二) 玉米根固氮部位取样方法。田间采回样品立刻用自来水冲洗干净后, 从根基部往下取根0~2厘米、2~4厘米, 4厘米以下分三层取样。

(三) 根段表面灭菌用次氯酸钠溶液(0.16~1.5%)浸泡三分钟后, 取出用灭菌水冲洗三次。

(四) 四氮唑盐还原测定法。按照Dobereiner〔5〕测定马唐属(Digitaria.sp)的根切片中螺菌存活部位的四氮唑盐还原法, 在测定出固氮活力较高的根段中, 选择无病斑健壮的, 用通草作徒手横切片, 挑取根切片放于载玻片上, 覆盖上加温至40°C的四氮唑洋菜液(0.2% 2、3、5 氯化三苯基四氮唑, 0.5%蔗糖和0.7%洋菜, 于0.05 M磷酸缓冲液中PH7.0)。立即盖上盖玻片, 30°C保温培养数小时或过夜, 第二天用显微镜观察。

结 果 和 讨 论

(一) 玉米根系的固氮活力。在玉米出苗后三个月和四个月(即在结棒和成熟期)对38个玉米品系的根测定了固氮活力, 结果玉米根系固氮活力一般为0.04~29.3乙烯毫微克分子/克干根/小时。平均在10~16乙烯毫微克分子/克干根/小时的六个玉米品系, 详见表1。

表 1 六个玉米品系、田间根系的N₂ (C₂H₂) 固氮活力

玉 米 品 系	固氮活力(乙烯微克分子/克干根/小时)			
	出苗后3个月	平 均	出苗后4个月	平 均
吉69	2.44~2.93	2.68	8.3~29.93	16.00
宽甸小红骨	3.94~4.39	4.11	7.95~15.84	11.89
吉725	1.815~5.60	3.70	8.48~14.56	11.52
吉63	1.51~1.51	1.51	9.64~11.88	10.76
索黄	1.34~2.53	1.93	6.0~15.00	10.5
蛟河白头霜	1.51~2.14	1.82	6.38~14.48	10.42

按照Dart.D J和Day T.M〔7〕的叙述, 法国玉米的固氮能力为100~3000乙烯毫微克分子/克干根/小时, 美国为14~19乙烯毫微克分子/克干根/小时。我们的结果低于法国, 与美国相近。在38个玉米品系中有自交系、单交种、双交种、本省地方品种, 还有国内外引进的品系, 在固氮活力上看不出规律性的差异。

按照Hardy〔6〕固氮酶还原3克分子乙炔为乙烯时相当于还原1克分子氮为氨的理论值方法计算。以我们固氮活力测定中最高数值29.3乙烯毫微克分子/克干根/小时, 一株玉米干根为6.2克、每垧地3万株、一天24小时计算, 则每天每垧地能固氮:

$$\frac{62 \times 29.93}{3} \times \frac{28}{10^9} \times 30000 \times 24 = 1.54 \text{克/垧/天}$$

每天每垧地能固氮1.54克/垧/天, 如按90天生长季节计算则1.54克/垧/天×90=0.13公斤/垧/生长季节。又据美国Stephan L Albrecht等的试验结果, 玉米能固氮0.5公斤/垧/生长季节。如果我们按美国75000株/垧和生长季节100天计算则为0.31公斤/垧/生长季节, 也还是比较低。

(二) 玉米根系的固氮部位

1、根系各部位的固氮活力测定。对14个玉米品系，测定了一株玉米根系上不同部位的固氮活力，测定方法如前，结果见表2。从表2看出，14个玉米品系根的三个部位的固氮

表2 玉米根不同部位根段的固氮活力

玉米品系	乙烯毫微克分子/克干根/小时		
	0—2 cm	2—4 cm	4 Cm以下
伊通大苞米	1.80	1.80	1.90
秧	1.80	2.80	2.60
东辽大屁股	3.17	1.89	1.70
铁133	5.10	3.80	3.80
复县黄金顶	2.52	2.52	2.03
通化大青稗	0.04	3.03	2.20
别任丘克	1.90	1.94	1.26
铁岭黄马牙	1.80	3.20	5.40
伯罗乌空齐	0.40	1.10	3.00
斯帕索夫	1.90	1.38	2.10
1	2.45	2.20	2.45
双阳大八趟	2	5.80	7.02
			1.98
1	24.17	10.90	13.70
吉69	2	12.47	29.93
			16.60
1	2.198	2.198	2.198
宝鸡黄马牙	2	6.29	2.84
			1.98
1	2.70	2.198	2.45
长春火苞米	2	1.98	1.584
			1.98
总和	78.488	82.330	69.328
平均	4.36	4.57	3.85

表3 玉米根段表面灭菌后的固氮活力

玉米品系	处 基	乙烯毫微克分子/克干根/小时
索 黄	不灭菌	6.00~8.04
	0.5%灭菌	12.60~15.00
	1.5%灭菌	9.00~10.81
宽甸小红育	不灭菌	7.95~10.81
	0.5%灭菌	10.59~11.052
	1.5%灭菌	11.55~15.84
吉725	不灭菌	8.48~11.76
	0.5%灭菌	10.80~14.5
	1.5%灭菌	10.80~11.05

活力，有九个品系的三种根样是一致的，占50%；其他样品有较大差别，但看不出其规律性。如取其总和的平均数，则离根基部0~2公分分为4.63乙烯毫微克分子/克干根/小时，2~4公分分为4.57乙烯毫微克分子/克干根/小时，4公分以下为3.85乙烯毫微克分子/克干根/小时。说明玉米根系各部位都具有固氮活力，并且差异不大。

2、用根段表面灭菌的方法，观察了固氮活力是在根表面还是在根内部。本试验先进行不同浓度次氯酸钠的根段表面灭菌试验，用0.16%、0.38%、0.56%、1.1%和1.5%浓度进行根段表面灭菌，灭菌后放于Dobereiner〔5〕的螺菌加富培养基平板上，30℃培养18~20小时，观察根表面有无菌存在以鉴定灭菌效果。结果0.56%、1.1%及1.5%三个浓度较好。因此根段表面灭菌采用了0.5%及1.5%两个浓度，结果见表3。从表3看出根段的表面灭菌并不减低玉米根段的固氮活力，相反有增高的趋势，说明玉米的固氮活力存在于根内部。

3、用染色法检查根的内部有无固氮菌结合共生。我们应用Dobereiner〔5〕测定马唐属根的切片中螺菌存活部位的四氮唑盐还原方法，调查了玉米根段横切面中四氮唑盐还原作用情况。用普通光学显微镜观察，看到根的内皮层的薄壁细胞间隙和

个别根切片髓部的薄壁细胞间隙有深红色的四氮唑盐还原作用，呈圆形，见图1、2。这种四氮唑盐还原作用，初步说明玉米根部可能有固氮螺菌（SPirillum SP）和其结合共生固氮需要进一步研究。



图1 玉米根的横切片、在内皮层细胞间隙，有深红色圆点细菌聚落（×150倍）



图2 玉米根的横切片、髓细胞间隙有深红色圆点细菌聚落（×600倍）

通过以上三方面的测定，看到玉米根系上的固氮活力存在于根的各部。其固氮酶活存在于根的内部，可能有固氮螺菌在根的内皮层和髓部的薄壁细胞间隙进行结合共生固氮。

（三）测定玉米根系固定活力的采样问题。调查了100多株玉米根（用锹挖取）的鲜根重，80%以上是在15~40克，而测定采样只用2克，这就提出了采样的代表性问题。因此，我们测定了一株玉米根子的15个样品的固氮活力以观察样品之间的差异。玉米根子采回，立即冲洗干净，剪成2~3公分根段混合后取样，结果见表4。从表4可以看出，15

表4 玉米吉69一株根的15个样品的固氮活力

样品编号	乙烯毫微克分子/克干根/小时	样品编号	乙烯毫微克分子/克干根/小时
1	9.9	9	12.3
2	12.7	10	13.9
3	11.9	11	13.1
4	12.4	12	8.9
5	11.4	13	10.7
6	10.9	14	8.3
7	12.0	15	12.5
8	10.1	平均	11.2

个样品的固氮活力为8.3~13.9乙烯毫微克分子/克干根/小时。平均数为11.2乙烯毫微克分子/克干根/小时。和平均数接近的占2/3,其他大于或小于平均数者占1/3。因此,我们认为在测定时,采用玉米根段的混合样品3~5次重复即可。

关于玉米植株个体间的固氮活力差异问题。用二个玉米品系,每个品系采样六穴。每穴取混合样品4~6个,测定结果见表5。从表5可看出玉米吉69,六穴的根的固氮活力自1.55~2.065乙烯毫微克分子/克干根/小时,玉米铁133、13.96~2.174乙烯毫微克分子/克干子/小时,在同一次测定中,一个品系的玉米的不同植株的根段之间固氮活力的差异不大。

表5 玉米不同植株的根段的固氮活力

样品号 (穴号)	乙烯毫微克分子/克干根/小时	
	吉69	铁133
1	1.69	1.396
2	1.78	1.424
3	1.747	1.699
4	2.065	1.858
5	1.59	2.174
6	1.55	2.105

参 考 文 献

[1] J.Dobereiner, J.E.Marriell and M.Nery.1976.Ecological distribution of spirillum lipoferum Beijerinck. Can.J.Microbiol vol 22 1465~1473

[2] J.Balandrean and Y.Dommergues 1973.Assaying Nitrogenase (C₂H₂)Acti vity in the Field. Ball EcOl.Res. Comm(Stockholm)17: 247~254

[3] Stephan L. Albrecht,Yaco Okon,and Robert H.Burris.1977, Effects Of light and temperature On the associatiOn between Zea mays and SPirillum lipoferum.Plant PhysiOl vol 60 628~531

[4] 湖北微生物研究所生物固氮组 1979 玉米根系联合固氮细菌的研究 微生物学报19〔2〕160~165

[5]J.Dobereiner and J.M.Pay.1976.Associative Symbioses in tropical grasses: Characterization Of microorganisms and Dinitrogen-fixing sites. Proceeding of the 1st International Symposium on Nitrogen fixation (ed.by Neroton.W.E.G.C.J.Nyman) washington State University Press.Pullman,U.S. A 518~538.

[6] R.W.F.Hardy.R.D.Holstern.E.KJackson.and R.C.Burns 1968 The acetylene.Dethylene assy for N₂ fixation: Laboratory and field evaluationPlant PhysiOl 43:1185~1207

[7] P.J.Dart and J.M.Day 1975 Non-Symbiotic nitrogen fixation in Soil.Soil microbiology,Ed by N. Walker.Atcritical review

batterworths London and Boston 225~252

[8] Lynn E. Barber, John D. Tjepkema 1976. Acetylene reduction (Nitrogen fixation) associated with corn inoculated with Spirillum. Appl. Environ. Microbiol vol. 32 No. 2

[9] John Tjepkema and Peter van Berkam 1977 Acetylene reduction by soil cores of Maize and Sorghum in Brazil. Appl. Environ. Microbiol vol. 33 (2) : 626~629

[10] Smith R.L, Schank S.C. and Quesenberry K.H 1977. Yield increases of tropical grain and forage grasses after inoculation with Spirillum lipoferum in Florida. Biological Nitrogen fixation in farming systems of the tropics.