NONGYEZENGCHANXINJISHU

农业增产新技术

·人工根瘤试验方法·

聂延富　主编



青岛海洋大学出版社

China需要全本请访问 www.ertongbook.com

农业增产新技术

·人工根瘤试验方法·

主　编　聂延富

编写者　聂延富　汪天虹　赵立东
刘相梅　黄　峰　宋　军
李素翠

青岛海洋大学出版社

423072

鲁新登字 15 号

E172/13

农业增产新技术

聂廷富 著

*

青岛海洋大学出版社出版发行
青岛市鱼山路 5 号
邮政编码 266003
新华书店经销
青岛海洋大学出版社激光排版中心排版
山东电子工业印刷厂印刷
*
1993 年 8 月第 1 版 1993 年 8 月第 1 次印刷
32 开本(787×1092 毫米) 6 插页 5.5 印张 112 千字
印数 1—5000
ISBN 7—81026—373—0/S・16
定价:3.90 元

China

1988 年“全国首届非豆科作物固氮研讨会”在山东大学所在地济南市召开，与会专家教授对山东大学的 2,4—D 人工根瘤研究通过多家验证给予应有的评价，在会议纪要中提到该项工作是开拓性的，国际领先的。

在首次非豆科作物固氮国际会议上(1993 年 7 月 1—2 日山东大学召开)该会议主席聂延富教授主持会议致开幕词。

左起第六位为聂延富教授为1990—1993年间中澳非豆科作物生物固氮合作项目中方主任(山东大学)。
左起第五位为澳大利亚悉尼大学I.R.Kennedy博士为1990—1993年间中澳非豆科作物生物固氮合作项目澳方主任(悉尼大学)。
左起第三位(女)为参加本书编著者汪天虹讲师(留澳学者)。
左起第七位(女)为参加本书编著者赵立冬讲师(留澳学者)。
右起前排第一位(女)为参加本书编著者刘相梅老师(留澳学者)。

1987年悉尼大学与山东大学两校合作研究人工根瘤;1990升级为两国政府级合作项目,由中方国家教委和澳方IDP组织主持,这是山东大学与悉尼大学有关领导及工作人员在悉尼签定两国合作协议时的留影,不久,法国巴斯德研究所也参加到这一合作中来。

China需要全本请访问 www.ertongbook.com

序

自 1991 年《绿色革命的曙光——非豆科作物固氮研究》出版，至今不到半年时间，人工根瘤的研究在国内、外又取得重大进展。山东大学在小麦 2,4—D 人工根瘤研究中，不但首次发现了在无菌培养条件下，接种小麦以田菁根瘤菌，在根毛中出现明显含游动细菌的侵入线样结构，而且在接种小麦以多种自生固氮微生物时，在严格无菌培养条件下，不但能结根瘤，根瘤细胞中含菌，而且同样也在根毛中发现有含菌的侵入线样结构和根毛分叉等被称为与豆科植物结瘤共生的根瘤菌的结瘤基因有关的类似性状出现。这对结瘤基因的深入研究，显然具有重要意义。

采用一种新的简易根瘤压片方法，观察到接种不同的固氮微生物，在根瘤含某些固氮细菌细胞区中，绝大多数含菌细胞形态正常，细胞核和大量菌体同时存在于细胞内而该现象多与有效菌和有效瘤相联系；解决了细胞外有菌附着的观察干忧；并找到了选择性使菌体着色，植物细胞不着色的染色方法。

除近来用由田菁根瘤菌、固氮螺菌侵入小麦 2,4—D 人工根瘤中的小麦幼苗，用 ARA 法测出高的固氮活性外，又在肺炎克氏杆菌和其他一些自生固氮微生物和根瘤菌侵入的小麦人工根瘤样品中，同样测出 ARA 固氮活性，其中有的菌活

China

性相当高。更有甚者，由这些根瘤中分离出的菌，在不加或少加 2,4—D 条件下，再次回接原小麦品种的幼苗，虽然根瘤的寿命有的较短或不结瘤，但曾多次测得其中有的有 ARA 固氮活性比原来回接前的小麦根瘤样品，有进一步提高的趋势。提出用减低诱瘤剂用量，强化回接菌的习惯性结瘤、固氮作用的办法，有利于掌握 2,4—D 的有益用量，夺取高产的效果。

用 $^{15}N_2$ 示踪的方法，国内外正在研究在根瘤中被菌固定的氮向植物地上部分运输，从而体现广义共生固氮增产的问题，并已取得一些结果。我们多次用 $^{15}N_2$ 示踪后所得的广义共生结果见后面有关部分的附表。鉴于田间 2,4—D 每次诱瘤处理后，大量接种的固氮微生物侵入瘤细胞内，如果不及时再加 2,4—D 延长根瘤寿命，则根瘤中的细菌，将很快被植物细胞中的溶酶体所释放的多种酶类破坏；其所固定的氮，无论细菌释放不释放给植物利用故称此为（即共生还是寄生）都将连同菌体本身的氮一道被植物吸收利用（剥夺作用）。

目前，在田间增产试验问题上所遇到的问题是：有些植物在田间易结瘤；有的在试管、三角瓶中易结瘤，一到田间试验时（如小麦），便不易结瘤，但有可能通过 2,4—D 强化接种菌的联合固氮作用，以期提高产量。这虽然还会遇到由于不同土壤类型和植物种类，特别是水利条件差的地区尤其是原土壤中氮的含量本身就差别较大等原因，可能出现一些新问题，但看来为了提高固氮酶的活性，除选用高效固氮微生物接种，使用最低用量的诱瘤剂或结合用习惯性结瘤菌接种外，用适宜浓度的 2,4—D 溶液喷叶诱瘤，用药品或岩石粉末中的微量元素（Fe、Mo、Mn、Zn、Co、Cu）等固氮有效因子的结合使用，对增产也有重要意义；磁化水的正确使用及诸如植物打蕊等增

China

产技术结合使用，同样对结瘤、固氮、增产有协助作用。田间试验很难做到各种条件一致特别是土壤中原氮含量一致，面积越大，越不一致，极易得出增减产的膚象。除非有办法使所有重要因子在田间条件下调整一致，否则大面积的试验结果难以相信。

在进行大田增产试验前，用大池（1m²，60cm 深）客土试验，更有指导意义。我们发现试验中引起增、减产的诸因子中，土壤原有的肥力，氮、磷、钾，特别是氮的含量极为重要，不对土壤进行 N、P、K 分析，即便在上述各种条件易控制的大池增产试验中，也将受到很大干扰；何况在十亩、百亩大面积田间增产试验中，选择基本相同的土质、土壤原有肥力，已经相当困难，要控制一切试验条件相同或基本相同更是不易，除非有增产 30% 以上的效果，而且屡试屡验，或每一小区地块均进行过氮素原始肥力的分析，以资参考，才能客观反应增产实情。

《绿色革命曙光》一书的出版，受到了海内外生物界、学术界的普遍关注。这本《农业增产新技术——人工根瘤试验方法》的出版，必将引起农业部门、农技人员的广泛兴趣或关注。我们出版这本通俗小册子的目的，并不想哗众取宠，好大喜功，而是通过介绍人工根瘤试验方法这一新技术，指出可以达到农业增产的一个途径。不根据主客观条件而盲目推广某种方法，这方面的教训是记忆犹新的。本书出版的目的，想引起基层农业领导部门、农技人员的重视，不妨根据本书提供的方法，结合本地区土壤和技术条件，在大田中作对比试验，看看这一新技术能否增产，增产幅度多大。在总结了经验之后，再考虑在多大范围内作进一步试验。我们竭诚希望，运用这一新

技术进行试验的单位，能将试验情况和结果同我们取得联系。来信请寄济南山东大学微生物研究所聂延富收，邮政编码为250100。我们将根据情况采取综合答复、个别指导，必要时办学习班的方法，来共同探讨人工根瘤试验方法的生命力，真正用科学的态度、科学的方法来逐步达到农业增产的目的。

总之，人工根瘤的研究，虽然从1979—1987年经历了最困难的开拓时期，自1987年以后逐渐为国内外验证、承认，目前的研究进展比较快，表现出曲折而较强韧的生命力，但一旦步入田间试验和推广应用，必然又会出现一些新问题，要靠善于克服困难的有心人去一一解决，最后在世界范围内，去夺取人工根瘤研究的圣杯！造福于人类！

聂延富

1992年7月于山东大学

China

绪 论

从法国学者赫尔利格尔(Hellriegel)在 1886 年第 59 届德国科学家和医生大会上，提出关于豆科植物的根瘤能固定大气中(约含 80%)的氮气的报告起开始，生物固氮的研究，迄今在国际上到 1986 年已有 100 年历史，在中国也已有 50 多年的历史。

在这一百多年中，科学家对生物固氮进行了广泛深入的研究。除揭示了很多规律性的东西以外，还发现生物固氮作用只限于部分原核微生物。其中，除发现大量豆科植物和根瘤菌结瘤共生固氮外，还发现根瘤菌和弗兰克氏菌也能同少数高等植物形成结瘤共生固氮体系；固氮蓝藻可与红萍在叶片中共生固氮，也与一些裸子和被子植物共生；也发现固氮螺菌等在一些禾本科植物根表面和根的皮层组织中生长，进行联合固氮；田菁根瘤菌在毛萼田菁的茎上形成茎瘤，在有氧环境中固氮；叶瘤有否固氮活性问题有争论。没有发现高等植物有自身固氮和农作物有结瘤固氮的例子。

由于只有自然界存在的结瘤固氮的豆科和少数非豆科植物和后来发现的联合固氮植物才有固氮能力，即将其不能直接吸收利用的，从空气成份中约含 80%的气态氮中，固定制造可供植物吸收利用的氮肥，因而才有增产、肥田的本领。因为氮肥是农业增产的限制因子，也由于农家有机肥料来源有限；氮化肥的生产需要巨额投资，且消耗大量能源，污染环境，

China

破坏生态平衡，加重温室效应，而且产量不足，长期使用还可造成土壤板结；大量的非豆科植物，特别是农作物不能自身固氮也不能结瘤固氮；为了广泛开辟氮肥资源，解决当今世界人口剧增、粮食不足、能源缺乏和摆脱农业对化肥的依赖及化肥生产所引起的不良后果；因而，一个如何能开辟一条非豆科植物、作物固氮的新途径问题，早已成为长期以来人类的愿望。虽长期来该愿望没有付诸实现，然而，它始终是人类追求的现代农业科学中富有挑战性的前沿研究重大课题之一，一直引起国内外广泛关注。

近 20 多年来，虽然在非豆科作物固氮方面的研究取得一定进展，如：

1. 已能用改造后的根瘤菌侵染玉米、水稻，获得能使其根毛卷曲的豆科结瘤植物的性状；

2. 已将固氮菌引入外生菌根菌中，能形成菌根固氮；

3. 已能使玉米原生质体吸收棕色固氮菌，形成愈伤组织，培育成幼苗固氮，但固氮活性随后消失；

4. 已可使植物愈伤组织和一些固氮微生物联合培养固氮；

5. 已用酶解植物细胞壁法打破根瘤菌或其他固氮微生物侵染植物细胞的障碍，使非豆科植物结瘤；

6. 也曾用 Ti 质粒将苏芸金菌的一种毒素基因导入烟草中表达，因而揭示，也有一种可能，导入固氮基因(nif)；

7. 已经获得了将豆科和非豆科植物原生质体融合后的融合子，并希望有可能将其培养成固氮植物；

8. 已使植物细胞原生质体，摄取固氮蓝细菌，并培养到两者共生的烟草再生苗，且已具有联合固氮活性；

China需要全本请访问 www.ertongbook.com

9. 已用豆科寄主植物的非变性提取物混合液，提取其中的有关成分，培养相应的根瘤菌，成为转变株，用来处理非豆科种子，并已可引导结瘤固氮。

然而，以上所有的试验，不是停留在细菌和高等植物联合共生阶段，细菌未进入植物细胞内，就是通过细胞融合进入植物细胞内，但或者不能再生出细胞壁，或者最终为再生细胞所排斥，或者通过愈伤组织能培育出固氮幼苗，但随后固氮活性消失。虽然用酶解植物细胞壁法、用豆科幼苗生理活性物质处理法，可使接种菌在一些非豆科作物上结瘤，甚至固氮。但这二种方法没有大田生产应用意义。而其他一些方法，则仅是几种有可能发展成使非豆科植物结瘤或固氮的希望（形成固氮外生菌根的例子除外）。豆科植物提取物转变根瘤菌株诱瘤法未见进一步的报道，估计也会遇到一些问题。

10. 用 2,4—D 等植物激素类有效诱瘤剂诱瘤法，从 1980 年起，已能诱发豆科植物打破其与根瘤菌的互接族界限结瘤、固氮和非豆科作物结共生固氮根瘤。这在田间条件下应用，有时不一定都能结瘤，但很有可能提高联合固氮效果。但该法虽然可在田间使很多植物结瘤，细菌也可侵入根瘤皮层深部细胞间隙或通过各种途径侵入细胞中形成根瘤菌的类菌体结构，根瘤有的也出现红色并初步表现出增产效果或刺激生长作用，而且 2,4—D 用量极微，配成溶液后可将其同接种菌混合浇灌在新生幼根上，并结合叶面喷雾及菌液拌种等方法使用，但也同样存在一些问题需研究解决。例如，要预先取得较理想的使用经验：比如，对某种作物，接种哪种菌，可诱发有效瘤？诱瘤的 2,4—D 最低使用浓度多大？在植物哪个生育期使用，使用几次适宜、不会引起药害、病理现象，而且能刺激生长

China

增产?在什么土壤条件下,受哪些因子影响,会使植物不结瘤?及如何研究克服等许多问题。可见,用人工方法改造生物,谈何容易。但人类总不能被动地等待自然的恩赐,只究其所以然,而不去探索规律、能动地向自然索取。

现在,我们正在研究不直接使用 2,4—D 的技术,并已获得初步结果,但尚有待多次重复,最后确定能否用于农业生产。这包括如下几方面的技术:

1. 用某种分解纤维素的细菌、分解果胶的细菌,作为开路先锋菌,混以对某种植物经诱瘤试验证明是结瘤固氮有效的微生物,作为田间接种菌,向植物新生的幼根上使用,以诱发田间根瘤,该试验正在试管中进行,现已获得初步结果。

2. 2,4—D 等诱发根瘤的植物生长调节剂,借设想的生长素对菌体的定向驯化变异诱瘤作用,以一定浓度和时间,对不同固氮微生物进行处理。用洗去或不洗去诱瘤剂的菌体,在田间接种非豆科作物,以期能结瘤、固氮。用该法在试管内曾获得结瘤、固氮效果,只是根瘤的寿命较短,需设法克服。

另一方法是,直接接种加诱瘤剂培养处理的菌液。将其浇灌在新生幼根上做诱瘤试验。目前,在试管中也已取得初步效果。也可再次回接原植物,使其结瘤、固氮。

3. 已用 2,4—D 直接诱发的非豆科作物固氮根瘤,带十几个根瘤的一段小麦的根,研成匀浆,接种同品种小麦,在不再加 2,4—D 和接其他任何菌的条件下,经无菌培养或自然培养,可再次回接,结固氮根瘤,而接种原来未经 2,4—D 处理的同种细菌不结瘤。因此,一旦土壤中这种菌随 2,4—D 诱发根瘤,在植物收获后,残留在土壤中,多到一定数量后,有可能只种同品种植物,不再加 2,4—D 等诱瘤剂,不再接菌,而

China

且只有这种被驯化的菌可专一性地侵入植物根系中结瘤、固氮。这有可能大大缩短了植物同细菌结瘤共生固氮的亿万年的长期自然进化历程。现已发现在1990—1991年夏期间曾使用过2,4—D和菌做增产试验的田间，在1992年种的油菜上未经任何处理出现了根瘤，未用2,4—D和菌的他处地块的油菜无瘤。

4. 作者已经发现某些小麦种子、君子兰种子、仙人球和某些蕨类(羊齿植物)的根部球芽细胞中，含有大量内生细菌。现在已用ARA法和$^{15}N_2$示踪法均在壮年的君子兰叶片中和一种仙人球球体块中，测出明显肯定的固氮活性。如果对测不出固氮活性的含内生菌植物，可望通过各种遗传工程的方法，将固氮基因转移到这种植物的内生菌中，或注入其中，使其具有固氮活性，但要克服许多困难。

5. 把非豆科植物用豆科生理活性物质诱发的含菌根瘤匀浆，回接其曾结瘤的同品种植物，看能否结瘤固氮，或用从根瘤内分离的菌接种。但对此无法解释生长在大豆根瘤中的根瘤菌，处在大豆丰富的生理活性物质中，为什么不能通过接种这些菌使非豆科植物结瘤的问题。故应对豆科植物提取物诱瘤机理进行深入研究。

上述的人工诱瘤方法，在试管、三角瓶及花盆中，因条件易控制，只要接种固氮有效菌，很易结有效瘤。然而在田间，不是用心试验、管理，极少数的植物常得不到好的结瘤效果，其原因很多。如对冬小麦来说，秋天用2,4—D处理，苗期敏感，不应用2,4—D处理，处理后即便结了瘤，立刻进入冬季，收效不大；来年返青时处理好些，但根瘤多在土壤深处新根根尖上，拔麦观察时，带在麦苗上的根常是老根，不长瘤，偶而在刚

China

长出的新根上有瘤。由于2,4—D可促使更多的接种菌进入根表层细胞内或细胞间隙中,这样虽结的根瘤不多,但可用此人工借2,4—D强化的方法提高联合固氮的效果。

人工根瘤如果是广义共生性质的,植物可得到微生物释放到其体外固定的氮;如果某些微生物不释放出其在体内固定的氮,宿主植物可以在经用2,4-D处理的根瘤细胞内,由溶酶体释放酶类,将菌体破坏,"剥夺"其固定的和其自身原含有的氮素;半月十天后,再次加2,4—D,可再次出现一批根瘤,再次被"剥夺"固定的和其自身原含有的氮素,如此,宿主植物同样可以受益。

由于2,4—D作为除莠剂长期在很多国家使用,国外也曾有人发现可使植物根部产生瘤状物,虽然土壤中有各种样微生物,如果不是更大量的人工接种,在这种瘤状物中,经检查不含菌,而被称为假瘤。在人工接菌、加2,4—D条件下,虽然不能完全排除有少数少量杂菌混进根瘤内,但侵入根瘤内的主要是接种菌;也不是所有的菌都能通过大量接种侵入根瘤中去的。即2,4—D只具有一定的广谱诱导,识别缴生物进入根瘤中的作用。

基于土述原因,大量在田间接种一些能侵入、结瘤、不含固氮基因,但证明能对某种植物的生长、发育、抗病、虫害,抗逆性、早熟或改进产品质量有益的微生物,也可诱发"益瘤"。

近来,不但在用田菁根瘤菌接种的小麦人工根瘤中发现了根毛中有侵入线样结构,而且在用一些自生固氮菌接种时,也发现了根毛中的侵入线样结构和根毛分叉现象。日本Shoichiro Akal(1990)用大豆根瘤菌,经2,4—D处理、接种一个不结瘤的大豆品系,结果不但结了含菌根瘤,发现了侵入线

China

结构，而且测得了固氮活性。我们经 2,4—D 处理接种三叶草根瘤菌早已使豇豆结红色根瘤在低 O_2 下测定能固氮。也已经 2,4—D 诱导使杀虫菌(苏芸金菌)在小麦根上结瘤，瘤细胞内含苏芸金菌的芽孢和伴孢晶体(可杀死某些对其敏感的地下害虫)。尚未及试验该菌的内、外毒素有否传递到麦叶中去和杀虫的问题。

悉尼大学证明了乙炔还原法同样可以用在小麦 2,4—D 人工根瘤的固氮活性测定方面。用失去固氮基因的一种固氮螺菌的突变株，经 2,4—D 诱发小麦根瘤，没有测出 ARA 活性；山东大学用不注射乙炔等气体的小麦幼苗根瘤(注空气为对照)也未测出 ARA 活性，都证明了小麦根瘤和小麦幼苗本身没有产生乙烯。固氮螺菌也不产生乙烯；用 ARA 法测出的乙烯是来自固氮酶的。

国内其他单位也在多种植物上，测出 2,4—D 人工根瘤用 ARA 法或 $^{15}N_2$ 稀释法的固氮活性，也证明了是共生固氮，或称广义共生固氮。

最近，山东大学在用定量、定土壤种类、客土大池(1 米间方 60 公分深水泥池半封底)小麦人工根瘤增产试验中发现，试验前对土壤的 N、P、K 分析极为重要，否则可以得出错误的增减产效果。结瘤固氮或联合固氮有效因子(Fe、Mo 等微量元素)的使用及该因子本身对增产都有重要意义。这与微量元素的作用相一致。大池增产试验先要灌满水搅匀泥土，后测定土壤总氮，取含氮量相同的大池土壤进行试验，或将该池一分为 2，作对照和结瘤处理，并保持其他条件完全一致，结果才可靠。

由于接种菌的不同，现在已经多次对人工根瘤的共生问

China

题(即根瘤中的菌释放出其固定的氮供植物利用)进一步地搞清了。希望更多的人参予人工根瘤研究,群策群力解决一些推广前的问题,以便早日应用于农业生产。

只要大池试验得到肯定的增产结果,我们认为便可以在同类型的土壤种类大田间,按大池试验使用 2,4—D 接菌等条件推广应用,不需再进行田间扩大面积试验。因为面积越大,各种条件,特别是原土壤中的氮含量,越难控制一致,得出的增产或减产结果膺象越大。除非证明上述条件确实一致,只有处理或对照的不同,但这是根本做不到的。所以这样说有两点理由:其一是:只要对某种植物所用的接种菌,已经通过大池试验证明能被 2,4—D 诱导结共生固氮根瘤,而 2,4—D 的用量、用时、用次对该植物又有益无害,其二,那么在田间不会也不应该引起减产的接种菌,只应有不同的增产效果;如有减产,则不应归因于诱瘤和接菌处理,可能不经诱瘤处理减产的更多;如有增产,则可能含有诱瘤共生固氮,联合固氮增产或许还有原地块中氮含量本来就较高这几类因素在内。

China需要全本请访问 www.ertongbook.com