

CNIC-01367
CSNAS-0128

水稻-固氮菌联合体系的固氮作用 及其促生效应

林 凡 王 路

(江苏省农科院原子能农业利用研究所, 南京, 210014)

摘 要

综述了近年来应用耐铵型固氮工程菌株研制的联合固氮菌剂接种水稻, 进行田间小区 ^{15}N 示踪试验和大面积田间对比示范试验, 研究了水稻等多种作物表现的固氮作用、促生效应及增产效果。

The Effects of Nitrogen Fixation and Plant Growth-promoting in Rice-diazotroph Association

(In Chinese)

LIN Fan WANG Lu

(Institute for Application of Atomic Energy, Jiangsu Academy
of Agriculture Sciences, Nanjing, 210014)

ABSTRACT

This is a review of studies on applications of the genetic engineered ammonium-tolerant diazotrophs as an inoculum with the effects of nitrogen-fixation, plant growth-promoting and yield-increasing on rice and some crops by using ^{15}N tracer in mini-plot and field experiments in recent years.

前 言

生物固氮是提供人类所需氮素的重要来源,联合固氮作为生物固氮的一个重要分支,已引起各国的关注,近年来,随着现代科学技术的进步得到了快速发展。我国科学家从根际分离并用遗传工程技术构建的三种联合固氮菌株,即粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*) A1523,阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*) E2613 和催娩克氏杆菌(*Klebsiella oxytoca*) NG1390,已完成了基础性研究并通过了实验室工作鉴定。为了进一步探索在田间条件下的固氮能力及其接种菌剂后对作物产生的效应,我们利用上述三种菌株经特殊工艺生产的联合固氮混合菌剂接种水稻,应用同位素 ^{15}N 技术进行田间小区试验,并在多点大面积对比示范试验的基础上,于全国 12 省市开展了不同地域条件和品种上的示范与应用。研究的结果,为评价联合固氮菌的性能及进一步开发利用提供了科学依据。

1 “固氮细菌-禾本科作物”联合共生固氮体系

固氮微生物可通过其体内固氮酶的作用将空气中分子态氮固定而转为氨态氮,其中,联合固氮是介于自生固氮和共生固氮体系二者的中间类型,它是利用某些具有固氮能力的细菌与相应联合的植物间具有密切的相互关系,组成“非豆科植物-固氮细菌”的联合固氮体系,它不像豆科植物由根瘤菌侵入植物体内形成具有共生特殊结构的根瘤,而是具有趋化性,能趋向植物根系,并聚居于植物根际、根表及根表粘液鞘内(部分固氮细菌可进入根内,乃至根细胞内)^[1],以作物根分泌物为碳源,营联合共生固氮,其所固定的大气氮能迅速为作物所利用^[2]。科学家曾将这种“松散”的共生类型称为“联合共生固氮”,现多称为“联合固氮”。

诸多研究表明,联合固氮菌对其相应联合的植物(作物)间的作用,除供给氮源外,还具有多种功能:分泌植物激素类物质,提高植物体内内源激素水平,促进植物根系发育,从而提高植物对矿质营养的吸收;多数联合固氮菌本身含有硝酸还原酶,在土壤中,特别是在硝酸盐浓度较低的土壤中,有利于提高固氮活性;促进联合固氮作用,联合固氮菌能影响植物根表面膜活性,提高分泌能力,增加难溶性矿物质盐类的溶解度和可利用性;在植物根际对其它微生物具有一定的竞争作用,从而可防止病原菌对植物的侵染^[1]等。可认为联合固氮菌在涉及“植物-土壤-微生物”生态系统中的作用是上述诸因素的综合效应。

生物固氮研究已有百余年的历史,而联合固氮的大量工作始于 70 年代,随着氮肥用量的不断增加而使土壤肥力日趋下降,不仅影响着作物产量,还严重影响着生态和农业生产,如何保持农业生态环境的良性循环和农业的持续发展,已日益成为当今世界现代农业中共同关切的问题,充分利用生物固氮是解决这些问题的有效途径之一,其中,以联合共生固氮解决禾谷类作物(如水稻、小麦和玉米等)的氮素来源,更加显示了它的特殊意义。国内外对非豆科作物的联合固氮研究在近十余年来得到了迅速发展,特别是随着分子生物学等现代高新技术的发展与渗透,对联合固氮作用机理的研究起到了重要的推动作用,水稻等禾谷类作物的联合固氮效果及其在农业中的潜在经济价值,已越来越引起人们的重视。

具有联合固氮作用的固氮细菌,国内外已从不同地区、不同作物根际分离出许多属、种,在我国曾分离出粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*)和稻黄杆菌(*Flavobacterium ovizae*)等,不仅丰富了固氮资源,也为我国联合固氮菌的开发和利用带来了光辉的前景。国家“863”生物技术课题组(中国农科院原子能利用研究所、上海植物生理研究所和广东省微生物研究所等单位)采用基因工程技术,构建的三种耐铵型固氮工程菌株(粪产碱菌 A1523,阴沟肠杆菌 E2613 和催婉克氏杆菌 NG1390),为在农业生产中应用联合固氮菌奠定了基础。林凡、宋木等(1993~1996)应用上述三种耐铵型固氮工程菌株研制成“联合固氮菌剂”,在进行田间接种示范试验的同时,通过电镜观察接种菌剂的水稻根际标本,验证了田间条件下,在水稻根表分泌物与土壤微颗粒间的缝隙中存在与水稻根表结合紧密的联合固氮菌群,且接种混合菌剂的结合能力较接种单一菌株的显著加强^[3],为联合固氮工程菌株的开发利用提供了科学依据。

2 “联合固氮菌-水稻”联合体系田间固氮特性

由上述供试的三种性能互补的联合固氮菌株研制的联合固氮混合菌剂,以沾秧根的方式接种于水稻(紫香糯稻),并应用 ^{15}N 示踪技术测定不同生育期水稻植株固氮量和固氮率,体现了水稻联合固氮系统的联合固氮作用^[4](见表 1、2),这种固氮作用随水稻生育期的进程逐渐加强,拔节-齐穗期,系统的固氮活性最旺盛,处于固氮的高峰期,日平均固氮量达 $24.31 \text{ kg} / \text{hm}^2 \cdot \text{d}$,这个阶段的固氮量占整个生育期的 40.9%,拔节-成熟期占整个生育期固氮量的 70%以上。水稻植株的联合固氮量约为 $15.45 \sim 39.7 \text{ kg} / \text{hm}^2$,固氮率为 6.7%~16.2%,与对照相比,每公顷可增产稻谷 300 kg 以上,节约氮肥(硫酸铵)200 kg 左右。

表 1 水稻联合固氮系统的固氮作用
Table 1 The nitrogen fixation in rice plant-diazotroph association

项目 Item	分蘖盛期 Profuse tillering	拔节期 Jointing	齐穗期 Complete heading	成熟期 Maturing
固氮量 Amount of fixed nitrogen(mg/miniplot)	170	431	1063	1544
固氮率 Nitrogen-fixing rate/%	2.7	6.4	4.8	6.7

表 2 水稻联合固氮系统的日平均固氮量与相对固氮量

Table 2 The nitrogen fixation in rice plant-diazotroph association

水稻生育阶段 Rice growth stage	起止日期 Duration	经历天数 Days	日平均固氮量 Daily average amount of fixed nitrogen	相对固氮量 Relative amount of fixed nitrogen
			mg/miniplot · day	%
移栽-分蘖盛期 Transplanting-profuse tillering	06-14~07-04	20	8.50	11.0
分蘖盛期-拔节期 Profuse tillering-jointing	07-04~07-26	22	11.86	16.9
拔节期-齐穗期 Jointing-complete heading	07-26~08-21	26	24.31	40.9
齐穗期-成熟期 Complete heading-maturing	08-21~10-06	46	10.46	31.2

3 联合固氮菌剂对田间作物的促生效应

联合固氮菌剂接种作物后产生的有益效应是作物增产的基础，是联合固氮菌开发应用的重要依据，国内外科学家的研究报道认为，接种联合固氮菌所产生的增产效果，主要在于促进作物生长或抑制植物病原微生物，提高作物的抗病（逆）性能^[5]。由供试的联合固氮菌剂接种水稻后，从水稻的农艺性状分析、内源激素测定和抗病性调查等方面，充分表征了联合固氮菌剂的促生效果。

3.1 联合固氮菌剂对水稻农艺性状和产量的影响

(1) 以联合固氮的混合菌剂于水稻（盐粳 187）播前谷芽浸泡后进行大面积田间接种试验（于江苏大中农场进行），结果表明，不论是秧苗素质和成熟期产量构成性状，均具明显优势（见表 3）。

表 3 盐粳 187 接种菌剂对秧苗素质与产量的影响

Table 3 The effects of diazotrophs inoculant on the seedling characters and yields of Yangeng 187

	叶龄	秧苗素质 Seedling characters			产量 Yields/ kg · hm ⁻²			
		白根数	总根数	分蘖数	I	II	III	$\bar{X}$
处理 Treatment	2.6	8.0	10.0	1.5	8100.0	8235.0	7927.5	8120.8
CK	2.1	5.0	8.0	0.8	775.0	7275.0	7290.0	7380.0
增加 Increasing / %	23.8	60.0	37.5	87.5	13.2	6.9	8.7	10.0

在南京地区以沾秧根法进行田间接种菌剂后，水稻（紫香糯稻）植株的长势、营养器官和生殖器官的生长状况等均优于对照（见表 4），稻谷产量比对照增加 5.8 % ~ 10.1 %^[6]。

表 4 不同固氮菌处理稻株的生长性状与稻谷产量
Table 4 The growth character and grain yield of rice
in different tratment for nitrogen fixing bacteria

处理 Treatment	稻株地上部重 Total weight of rice plant above round kg/microplot	稻谷重 Grain weight kg/microplot	稻草重 Straw weight kg/microplot	谷草比 Rate of grain and straw %	每穗实 粒数 Seeds per ear	千粒重 Thousand grain weight g	稻谷产量 Rice grain yield kg/hm ²	比对照 增产 Yield increment %
A1523	2.03	0.76	1.27	59.8	74.3	32.7	7600	10.1
A1501	1.94	0.73	1.21	60.3	78.0	31.4	7300	5.8
CK	1.85	0.69	1.16	59.5	73.5	29.8	6900	

每微区面积为 1 m²。

(3) 在以秧盘育秧的地区, 于插秧前 2~3 d 将联合固氮菌稀释液 (50~100 倍) 均匀喷洒于秧苗, 具有同样的促生效果^[7], 综合各地试验结果普遍认为, 水稻接种联合固氮菌后的表现: 秧苗素质好, 插秧后缓秧快、活棵早 (一般可提前 2~3 d), 分蘖相应提早 2~3 d, 分蘖的成穗率可提高 5%~20%, 有效穗数增加 10%~15%, 生长后期群体生长清秀, 抗早衰、熟相好, 成熟期绿叶数增加 10%~20%, 有利于增加后期植株的光合能力, 提高光合产物的形成与积累, 结实率提高, 实粒数增加 5%~8%。

3.2 联合固氮菌对水稻内源激素的影响

植物内源激素对植物的生长发育和代谢具有显著调控作用。由不同生育期植株内源激素测定结果表明, 接种联合固氮菌剂的水稻, 四种激素的分泌水平均明显高于对照 (见表 5)。按各内源激素的生理功能^[8], 它们有助于促进根系的生长, 提高根系对养分的吸收能力, 有助于促进茎叶生长和发育, 是联合固氮菌对作物产生促进生长作用的内在原因和作物增产的生理基础。

表 5 水稻接种联合固氮菌对植物内源激素的影响 (μg/100g·鲜重)*
Table 5 The effects of diazotroph inoculation of endo-phytohormones production

处理 Inoculation		GA ₁ (赤霉素)	IAA (吲哚乙酸)	ZR (玉米素核苷)	ABA (脱落酸)
拔节期 Jointing	CK	31.3	12.1	39.1	13.0
	处理	54.7	45.3	27.4	25.5
	Treatment				
	增加/% Increasing/%	74.8	274.4		96.2
抽穗期 Needing	CK	39.1	21.8	27.1	24.5
	处理	61.2	24.5	59.2	6.8
	Treatment				
	增加/% Increasing/%	56.5	12.1	118.5	

*水稻品种: 越富 (北京地区)

3.3 联合固氮菌对水稻病原微生物的竞争抑制和病害防治作用

由实验室体外拮抗活性测定表明,联合固氮菌对水稻稻瘟病和纹枯病病菌均具明显的体外竞争抑制作用;1993年于江苏镇江进行田间试验,采样测定表明,接种联合固氮菌剂后的水稻稻瘟病发病率降低了17%,纹枯病发病率仅为对照的51.4%,且发病期推迟10d左右;1994~1996年于闽西地区水稻接种试验地调查结果,接种菌剂的水稻黄化赤枯病发病率明显降低,早稻稻瘟病发病情况也受到抑制^[1],上述室内测定与田间实测结果相一致,充分表明联合固氮菌剂对水稻病菌具有明显的竞争抑制和病害防治作用,且混合菌剂的作用强于单一菌剂,从而提高了水稻的抗病能力,使发病率为降低,保证了水稻后期的生长发育和产量的形成。

上述结果充分显示了联合固氮菌接种于水稻不仅为其生长发育提供氮素,且具有明显的促生效应,成为水稻增产的重要原因之一。

4 联合固氮菌对不同作物的效应及其增产效果

联合固氮菌剂于浙江、江苏、北京、河北和内蒙等地在蔬菜、小麦、棉花和甘薯等作物的试验示范结果表明,施用联合固氮菌剂对这些作物同样具有明显的促进生长作用,从而显著提高作物产量(见表6)。

表6 联合固氮菌在其它作物上的应用效果
Table 6 Application of diazotroph inoculation on some crops

作物名称 Crops	试验地区 Experimental area	增产率 Yield increasing / %	其它效应 Some benefits
日本胡瓜	浙江	20~36.1	增收 2490~3522 元/hm ² 株高、根重、叶重分别高于对照 24.4%、16.8% 和 28.8% 提早上市 4~5 d 耐寒性增强
小黄瓜	浙江	11.5	
西瓜	浙江	2~10	
油菜(叶菜类)	浙江	5~10	
番茄	北京	10.3	
黄瓜	北京	9.8	
大椒	北京	9.1	
茄子	北京	8.8	
西洋芹	江苏南京	7.7	
四季豆	江苏南京	15~20	
青菜(矮脚黄)	江苏南京	7.7	
甘薯	河北	5.8~12.9	
春小麦	内蒙古	14.1	
冬小麦	河北保定	24	
小麦	浙江	8.3	
棉花	江苏江都	10 左右	

5 结 语

经过六年来的实验室研究与田间试验和不同地区、不同作物大面积试验示范结果,由基因工程技术构建的粪产碱菌 A1523、阴沟肠杆菌 E2613 和催娩克氏杆菌 NG1390 等三种耐铵型联合固氮菌株经中试生产的联合固氮混合菌剂的试验表明,在田间条件下,接种于水稻其定殖部位为水稻根际。在全国 12 个省市接种试验与大面积应用,表现了它们的适应性;对田间作物的促生效应,充分表征了它与其它联合固氮菌一样,具有多种功能:在田间条件下的固氮能力较强,固氮率达 6.7%~16.2%^[3]对不同的作物尤其是水稻的田间促生效应显著,具有促进水稻内源激素的分泌、提高内源激素水平及对水稻病害具有明显的防治作用等等。综合作用的结果促进作物的生长发育而增产,从效益方面分析,投入产出比为 1:30 至 1:50,具有显著的经济效果,实践证明,联合固氮菌剂接种于水稻等作物获得的社会、经济和环境效益显著,充分展示了联合固氮菌的广阔应用前景,为今后联合固氮菌的进一步应用与开发利用提供了科学依据,建议尽早将联合固氮菌的试验研究成果开发利用、并进一步拓宽联合固氮作用的研究。

参 考 文 献

- 1 元宏构 联合固氮研究的现状与展望 高技术通讯, 1991, 5: 28~29
- 2 You C et al Associative dinitrogen fixation of *Alcaligenes faecalis* with rice plants Biological Nitrogen Fixation Newsletter, 1983, 11: 92~103
- 3 林凡等 联合固氮菌的应用效益与增产机理 中国农学通报, 1998, 14 (3): 32~34
- 4 林凡, 王正芳等 混合固氮菌剂-水稻联合体系的固氮特性 核农学报, 1997, 11 (3): 179~183
- 5 Kloepper I et al Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity TIBTECH, 1989, 7: 39~44
- 6 王正芳等 粪产碱菌耐铵型工程菌株-水稻植物联合固氮能力的研究 江苏农业学报, 1996, 12 (4): 50~52
- 7 林凡, 王正芳等 耐铵型水稻联合固氮菌的应用与经济效益 核农学通报, 1997, 18(5): 234~237