

# 小麦叶面固氮菌的筛选及应用研究

牛福文 赵书斌 刘荣昌 曾广勤 李凤汀

(河北省科学院微生物研究所,保定)

七十年代初,中国科学院植物研究所在玉米、棉花、水稻、甘薯、高粱、甘蔗上分离到叶面固氮菌,此后同河北省微生物研究所协作,对棉花、玉米叶面固氮菌的增产效果和作用机制等作了进一步研究<sup>[1,2]</sup>。但至今国内尚未见到有关小麦叶面固氮菌的报道,为此我们进行了分离筛选和应用试验。现将初步结果报道如下:

## 材料和方法

### (一) 分离鉴定和田间试验供试菌株

1. 玉米叶面分离的固氮菌即褐球固氮菌 *Azotobacter chroococcum* (菌号 2092),中国科学院植物研究所提供。

2. 土壤中分离的褐球固氮菌 *A. chroococcum* (菌号 1213);植物致病真菌:玉蜀黍赤霉菌 *Gibberella zeae* (菌号 3.2873)。大班病长蠕孢 *Helminthosporium turcicum* (菌号 3.3114)。稻梨孢 *Piricularia oryzae* (菌号 3.3283)。均为中国科学院微生物研究所提供。

3. 小麦叶面固氮菌“135”、“129-4”系我所分离的菌株。

### (二) 分离及测定

1. 培养基:菌株分离、培养均采用阿须贝(Ashby)无氮培养基。分离时固体培养基中添加 100 ppm 灰黄霉素。

2. 分离及测定方法:参照文献[1]方法选用叶片贴接后培养 24 小时出现的单菌落,用国产 102-D 型气相色谱仪测定固氮酶活性进行初筛。菌种纯化后,选固氮酶活性高的菌株用凯氏定氮法测定固氮量。液体培养物含菌数用平板计数法。激素生物测定仅用离心后的培养液上清液,测燕麦芽鞘伸长率。用管碟法测定拮抗指示菌抗距(半径)mm。根据测试的综合结果

选择优良菌株进行菌株鉴定和田间应用试验。喷菌后从叶面回接记菌数用固体培养法<sup>[4]</sup>。

### (三) 菌株鉴定方法

参照参考文献[5,6]中有关菌落、菌体形态特征和生理指标的描述进行。

### (四) 田间试验用的菌剂制备方法<sup>[7]</sup>

### (五) 田间试验

1979—1981 年采用 Lg(3<sup>4</sup>) 正交试验<sup>[8]</sup>,试验内容见表 1,两次重复。

表 1 正交试验

A 处理项目	B 喷施量(斤/亩)	C 喷施时期
135 菌株	5	返青和拔节
培养基、水(1979) (1980)	10	拔节和孕穗
129-4 菌株	15	孕穗和抽穗

1981 年采用随机排列法,共设四个处理:菌株“135”;菌株“129-4”;培养基和水均为对照。四次重复。于小麦拔节期和孕穗期各喷施一次,每次每亩用原菌液 10 斤。

上述三年共 18 个试点,小区面积均为 20 m<sup>2</sup>,原菌液加水稀释 6-10 倍后喷施(含菌 1 亿/ml 以上)。收各小区实产折合成亩产。

## 结果与讨论

### (一) 菌株筛选结果

以玉米叶面固氮菌 2092 为对照,筛选出的“135”除固氮量外,其它项目测试结果好于 2092,而“129-4”固氮量多。结果见表 2。以下

郝正然、李春辉、何珍、姚惠芬同志参加部份工作。新城、无极、怀安县科委组织了田间使用试验。

表 2 菌株测试结果

待测项目	N/糖 (mg/g)	含 菌 (亿/ml)	燕麦芽鞘伸长 %	指示菌拮抗 mm (半径)		
				3. 2873	3. 3114	3. 3283
“135”	16.8	30—32	30	25	3.7—7	2.5—10
“129-4”	23	24—26	24	18	0	0
“2092”	17	26—30	*	17—20	1—2	0.5—1.0
培养基	—	—	7.5	—	—	—

\* 未测

的菌株鉴定和田间施用试验,均选用“135”和“129-4”两个菌株进行的。

(二) 菌株鉴定结果

分离到的 135、129-4 菌株,在甘露醇无氮培养基上生长良好,菌落由乳白色逐渐变微黄至棕褐色,不产生水溶性色素。液体培养混浊,不生菌膜。周生鞭毛,运动, G<sup>-</sup>。不产荧光色素。不利用鼠李糖。每消耗 1g 葡萄糖固氮 16.8—23mg (仅 10% 的氮素分泌到胞外)。鉴定结果表明,135、129-4 属圆褐自生固氮菌。但与已知的土壤圆褐自生固氮菌和在小麦叶面上分离到的自生固氮菌尚有差异,表现在: 1. 土壤圆褐自生固氮菌最适 pH7.0—7.2, 而 135、

129-4 最适 pH5—6.5。2. 将菌液喷施在小麦植株上,经回接测定,135 菌株能在叶面上存活 9 天以上,129-4 存活 5 天,土壤中分离的圆褐自生固氮菌 1213 仅存活 1 天。3. 印度学者 Bhurat (1968)<sup>[3]</sup> 在小麦叶片上分离到的自生固氮菌均为硝酸盐还原负反应,然而我们分离的 135 菌株为正反应 (129-4 负反应)。上述生理生化差异说明,135 菌株应属圆褐自生固氮菌中的一个生理小种。

(三) 田间试验结果

1. 增产效果与最优施用条件: 试验结果采用多点多年试验结果的统计分析方法<sup>[8]</sup>, 统计结果详见表 3。表明在河北省自然条件下,各

表 3 1979—1981 年 18 个试验点产量结果统计分析\*

年份 处理	年份																		平均 斤/亩	增 产 斤/亩	%
	1979						1980						1981								
	中 东 铺	西 后	艾 各 庄	东 张	怀 安	东 后 坊	齐 洽	艾 各 庄 (正交)	艾 各 庄 (列区)	北 永 固	怀 安	齐 洽	西 后	新 城 农 科 所	乔 刘 凡	北 永 固	杨 漫 散	怀 安			
135	571	338	282	943	545	833	586	400	384	431	360	790	597	739	470	632	435	552	549	49	9.86
129-4	545	359	269	887	545	755	596	409	357	440	350	775	581	671	448	641	439	485	531	31	6.23
对照	540	336	233	870	510	722	545	368	337	421	310	759	520	615	462	599	407	500	500	—	—
平均	552	347	261	900	533	770	576	392	359	431	340	775	560	635	448	624	427	572			
注	以培养基为对照						以水为对照						以水为对照								

\* 根据多点多年试验结果统计分析方法,经统计:  
 处理间  $F = 12.84 > \text{理论 } F = 8.65 (p = 0.01)$   
 地区间  $F = 203.75 > \text{理论 } F = 8.65 (p = 0.01)$   
 年份间  $F = 88.8 > \text{理论 } F = 8.65 (p = 0.01)$   
 地区 × 年份  $F = 42.6 > \text{理论 } F = 7.01 (p = 0.01)$   
 处理 × 年份和处理 × 地区  $F = 0.56 < \text{理论 } F = 3.84 (p = 0.05)$

表4 喷菌后小麦增产因素调查

项目	成 穗		穗 粒		灌浆速度		千 粒 重		旗叶面积		倒二叶面积	
	万/亩	± %	粒	± %	日增 g/千粒	± %	g	± %	cm <sup>2</sup> /叶	± %	cm <sup>2</sup> /叶	± %
135	39.995	4.45	25	3.92	1.44	7.2	40.4	2.03	17.27	11.48	18.5	12.19
129-4	39.402	2.9	25.3	5.37	1.38	2.9	40.6	2.48	16.8	8.28	17.9	8.55
培养基	39.280	2.59	23.9	-0.66	1.34	—	39.4	-0.4	15.7	1.29	16.4	-0.54
水	38.290	—	24	—	—	—	39.6	—	15.5	—	16.49	—

试区、各年份的喷菌区都有增产作用,其差异极为显著。L.S.D 理论值 14.3 斤 ( $p = 0.01$ ), 而“135”为 49.36 斤,“129-4”为 31.17 斤。

以 1979—1981 年各年度每亩平均增产量和增产率相比较,“135”菌株每亩分别增产 50.1 斤、36 斤、58.1 斤,增产率为 9.37、9.1、10.69%,“129-4”分别增产 26.6、33.9、33.1 斤,增产率 4.9、8.5、6.0%,培养基比水每亩增产 11.4 斤,增产率 2.1%。所以,供试的两个菌株中“135”为最优菌株。培养基比水略有增产作用,但差异不显著,不能代替喷菌的作用。

从最适施用条件(正交试验平均结果),测定结果看小麦拔节期和孕穗期各喷一次的亩产 536 斤,比返青期和拔节期亩产 528 斤,或孕穗期和抽穗期亩产 525 斤的都略好。每亩喷施量用原菌液 5 斤的亩产 524 斤、10 斤的亩产 531 斤、15 斤的亩产 536 斤,说明以每亩每次用原菌液 10—15 斤加水稀释到 60—100 斤,含菌量 1 亿/ml 以上为宜。

2. 增产因素分析:以喷施“135”菌液为例,喷后小麦植株体内叶绿素、含氮量都有增加。喷后 7 天取旗叶分析,叶绿素含量 3.85mg/100g,比喷水的 3.72mg/100g 增加 3.5%;植株全氮量 1.74mg/100g,比喷水的 1.66mg/100g 增加 5%。由于该菌能在叶面上存活,为植株提供氮素和激素类物质,而这些物质能迅速被叶子吸收利用,所以当小麦拔节期正置分蘖两极分化和幼穗进入小穗分化阶段,喷菌后可起到增加有效穗和穗粒数的作用;在孕穗初期喷菌后增加了

旗叶和倒二叶的叶面积,提高了光合作用面积,利于植株体内营养物质的运输和干物质的积累,促进了小麦增粒和增加千粒重的作用。这些因素的改善对小麦增产提供了物质基础。因此,构成小麦增产的主要因素如有效穗、穗粒数、千粒重等都有明显增加(见表 4),进而达到增产目的。

## 讨 论

我们分离到的小麦叶面固氮菌 135、129-4 菌株,经鉴定属圆褐自生固氮菌。但 135 菌株适宜在小麦叶面上生存,存活期 9 天以上(1213 菌存活 1 天),最适 pH、硝酸盐反应都与已知的圆褐自生固氮菌及其变种不同。因此,应属圆褐自生固氮菌中的一个生理小种。

田间施用试验表明,菌株 135 每亩增产 49 斤比 129-4 每亩增产 31 斤,增加 58%。同时增产效果稳定,三年中平均每亩增 36—58 斤。喷施时期及用量以小麦拔节和孕穗期各喷一次,每次每亩用原菌液 10—15 斤,用水稀释 60—100 斤(含菌量 1 亿/ml 以上)。菌剂制备方法简单、成本低(每亩 0.5 元),对小麦增产有实用前景。但每亩用菌剂量大,不适应运输和保存。因此,须在菌剂类型上进一步研究和改进。

## 参 考 文 献

- [1] 中国科学院植物研究所等:微生物学通报,6(5): 8—10, 1979。
- [2] 河北省微生物研究所等:微生物学通报,6(6): 1—4,

(下转第 86 页)

（上接第 61 页）

1979。

[3] bhurat, M. C. and A. Sen: *Indian, J. Agr. Sci.* **38**:319—325, 1968.

[4] Sangharshk, Tripathi. J. C. Edward: *Current Science*. Vol. 48, No. 2, 1979.

[5] Bergey's manual of determinative bacteriology 7th. ed. Williams & Wilkins Company, London, 1957.

[6] 中科院微生物研究所细菌分类组: 一般细菌常用鉴定方法, 科学出版社, 北京, 1978。

[7] 河北省微生物研究所固氮室: 微生物学通报, **8**(1): 49, 1981。

[8] 阮寿康编: 常用农业试验的统计分析方法, 河北省植物保护研究所印, 1977。