

水稻根际固氮量及根系不同部位的固氮活性

莫文英 贾小明 钱泽澍

(浙江农业大学)

摘 要

采用乙炔还原法测定水稻根际原状土粒的固氮活性,以3:1的换算比例推算为田间固氮量。每季水稻根际固氮量早稻为0.4—0.45斤氮/亩/66天;晚稻为0.6—0.79斤氮/亩/72天。其中早稻80—90%的氮素在抽穗至成熟期固定,而晚稻在这段期间固定的氮素占总数的40—52%。

经多次测定表明:水稻根系不同部位固氮活性的趋势是,埋入土中带根基茎段2.5厘米活性最高,根基以下3厘米根段次之,3厘米以下根段活性很低,水稻根系结合的腐生性细菌以固氮菌占优势,同时也含有少量的丁酸固氮梭菌。

氮素是作物生长不可缺少的营养元素,人们对水稻田的氮素来源问题进行了大量研究,稻田中除施入有机和无机氮肥以外,部份氮素来自生物固氮作用,根际固氮便是氮素来源之一,为了探讨其在稻田氮素供应上的作用,我们采用乙炔还原法估测了水稻原状土柱及水稻根系的固氮量,探讨在温带气候条件下,每季水稻的固氮量及水稻根系不同部位的固氮活性。

一、材料和方法

试验在校内水泥池进行,小区面积为2.25平方米,供试水稻品种:早稻为广陆矮4号,晚稻为农虎6号。每小区100丛,每丛定植6株。插秧时每小区施硫酸铵25克(折合每亩15斤),一直保持水层。采样时间为上午9—10时。

土壤肥力状况:有机质1.23%,全氮0.124%,水解氮9.024毫克/100克土,pH6.8。

(一) 水稻根际固氮活性

三天取样一次,割去植株地上部分,用内径5.5厘米的取土器,取出根际原状土粒,高度为7厘米,放入500毫升左右的标本瓶中,用装有导气管的橡皮塞密封,按除去土柱体积的玻璃瓶有效空间计算,抽出10%空气,以乙炔代替,在28℃培养20小时左右,测定乙炔还原活性,每测定一次,推算为前后三天田间固氮量。早稻从分蘖至收获共测21次,晚稻22次,推算出全生长期的固氮量。另一方法取各生育期的平均固氮量推算至全季的固氮量。每次取样6次重复。

(二) 水稻根区不同部位固氮活性及微生物区系分析

1. 根系固氮活性的测定 水稻抽穗期前后,随机挖取根样,沿土面割去地上部分,连根挖出在自来水中洗净,拣去黑根,把地下部分分成三个部位,即 I. 带根基茎段(长度约2.5厘米), II. 近根基3

厘米根段, III. 3 厘米以下根段。三种样品各用无菌水冲洗三次。然后分成两部分: 一部分用于根系固氮活性的测定, 即称取三个部位的根样各 10 克, 放入 70 毫升玻璃瓶中, 用血清瓶塞密封, 以玻璃瓶空间计算抽出 10% 空气以乙炔代替, 28℃ 培养 20 小时左右, 测定乙炔还原活性, 每个处理重复 5 次; 另一部分根系用于微生物区系分析。

2. 根系不同部位好氧固氮细菌、厌氧固氮细菌和氯化细菌的测定^[1] 好氧固氮菌培养基: Doberciner 半固体培养基, 即 K_2HPO_4 0.1 克, KH_2PO_4 0.4 克, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 克, NaCl 0.1 克, CaCl₂ 0.02 克, 琥珀酸钠 5 克, 溴麝香草酚蓝溶液 5 毫升, 琼脂 1.75 克, 水 1000 毫升, pH7.0。

氯化细菌培养基: 牛肉膏 3 克, 蛋白胨 10 克, NaCl 5 克, 水 1000 毫升 pH7.2。

厌氧固氮菌培养基: 葡萄糖 20 克, NaCl 0.25 克, K_2HPO_4 1.0 克, $FeSO_4$ 0.01 克, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 克, $MnSO_4$ 0.01 克, 水 1000 毫升。

称取三个部位洗净的样品各 5 克, 剪成 0.5 厘米小段, 放入无菌研钵中磨碎, 用 10 倍稀释法稀释至 10^{-4} , 选取 4 个稀释度 (10^{-3} — 10^{-6}) 的悬浮液, 分别接种于固氮菌半固体培养基和细菌培养基中, 取 10^{-3} — 10^{-4} 的稀释液接种厌氧固氮菌培养基中 (接种时培养基充氮以除去试管中的氧气), 接种后用橡皮塞密封。每个稀释度重复 4 次, 28℃ 培养 3—4 天, 最大可能数法 (MPN) 计数各类菌的数量。

3. 乙烯含量的测定 测定土柱、根样的乙炔还原活性, 采用上海分析仪器厂 102 G 气相色谱仪, 柱长 1 米, 内径 0.4 厘米, 担体为 GDX-502, 柱温 50℃, 气体流量, H_2 为 40 毫升/分; N_2 为 20 毫升/分, 空气为 600 毫升/分, 氢焰离子检测器测定乙烯生成量, 用乙烯标准曲线计算测定结果, 以 μm 乙烯/土柱/小时或 nm 乙烯/克鲜根/小时, 表示固氮活性。

二、结果和讨论

(一) 水稻根际的固氮量

综合 1979 和 1982 年的试验数据, 前者取其六个生育期的平均值, 后者从水稻反青开始, 间隔两天用原状土柱法测定其根际固氮活性, 然后推算至全季的田间固氮量, 早稻以 66 天、晚稻以 72 天计算, 结果见表 1。

表 1 水稻根际全生育期的固氮量

Table 1 Amount of nitrogen fixed in rice rhizosphere during the whole growing period

取样时间 Sampling time	水稻品种 Varieties		田间固氮量*(克氮/亩) Amount of nitrogen fixed in paddy field (g N ₂ /mu)
1979	早 稻 Early rice	广陆矮 4 号	201±43
		军 协	195±62
		双 珍	200±31
		先锋 1 号	210±68
	晚 稻 Late rice	农虎 6 号	368±37
		湘虎 25 号	301±71
		矮 秆 早	367±42
		宇 矮	398±88
1982	早 稻 Early rice	广陆矮 4 号	226±36
	晚 稻 Late rice	农虎 6 号	313±18

* C_2H_2 : N_2 的换算比例为 3:1。本试验中固氮活性均用此法表示。

表 2 不同时期水稻根际的固氮活性

Table 2 Nitrogen fixation activities in rice rhizosphere at different growing stages

	取样日期 Sampling date	田间固氮量(g N ₂ /mu) Amount of nitrogen fixed in paddy field	克氮/天/亩 g N ₂ /day/mu	占全生育期的固氮量% % in total fixed nitrogen
早稻 Early rice (广陆矮 4号)	5月 15—20日	1.79±0.14	0.29	0.60
	21—26日	2.46±0.12	0.41	1.08
	27—6月1日	5.99±1.69	0.99	2.65
	6月 2—7日	10.92±0.62	1.82	4.80
	8—13日	13.03±1.34	2.17	5.71
	14—19日	12.1±1.58	2.00	5.30
	20—25日*	14.58±1.50	2.43	6.45
	26—7月1日	32.89±2.38	5.48	14.55
	7月 2—7日	28.11±2.31	4.68	12.44
	8—13日	51.15±3.18	8.52	22.63
	14—19日	53.81±4.87	8.96	23.80
	总数 Total		226.80±36.42	
晚稻 Late rice (农虎 6号)	8月 12—17日	14.58±2.93	2.43	4.65
	18—23日	13.04±1.42	2.17	4.16
	24—29日	14.43±1.79	2.41	4.61
	30—9月4日	16.76±1.20	2.79	5.35
	9月 5—10日	23.01±2.7	3.83	7.35
	11—16日	23.26±1.92	3.87	7.43
	17—22日	32.74±1.86	5.45	10.46
	23—28日*	35.08±3.50	5.84	11.20
	29—10月4日	32.52±2.92	5.42	10.38
	10月 5—10日	38.23±3.51	6.37	12.21
	11—16日	35.68±2.81	5.94	11.39
	17—22日	34.14±3.68	5.69	10.90
	总数 Total		313.40±17.68	

* 抽穗开始。

从表 1 看出水稻根际具有一定固氮活性,但固氮量较低,各个品种每季水稻根际固氮量早稻没有超过半市斤氮/亩,晚稻不超过一市斤/亩。这与水稻一生所需氮素相距甚远。虽在不同年份测定,计算方法也有不同,但结果仍比较一致。如 1979 年每亩水稻根际固氮量广陆矮 4 号为 0.4 斤,农虎 6 号为 0.75 斤,1982 年前者为 0.45 斤,后者为 0.64 斤。其结果接近 Watanabe 等人^[2]的报道,他们用原位法测定水稻根际的固氮量,从插秧到收割,水稻品种 IR26 为 5.9 公斤氮/公顷/95 天,IR36 为 4.8 公斤氮/公顷/107 天,略高于我们测定的某些数据,这可能与测定方法、地理位置(菲律宾国际水稻研究所)、水稻品种等因素有关。尤以水稻品种关系较大,如试验中所用晚稻品种字矮的根际固氮量就超过 IR26。从这里可以看出根际固氮量晚稻品种高于早稻品种。

从整个生长季节看,早稻根际固氮主要集中在抽穗至成熟期,占全部固氮量的 80% 以上,前期仅占不到 20% (表 2)。可能与生育期气温、根系分泌物及气态氮向根系扩散速率有关。

由表 2 可见晚稻前期与后期根际固氮量比较一致,抽穗至成熟期占总固氮量的 50% 左右,根际固氮量随生育期逐步上升,但因气温逐渐下降,根际固氮菌的固氮酶活性受到影响^[3]。

目前已有许多报道水稻根际固氮受多种环境因素的影响,但正如 Watanabe 等人推测每季水稻根际固氮量最多不会超过 10 公斤/公顷。

(二) 水稻根系的固氮部位

为探索水稻根系不同部位的固氮活性,以得出固氮活跃的位置,我们于 1982、1983 两年用乙炔还原法测定了早稻根系不同部位的固 N 活性(表 3)。从表 3 中看出固氮活性主要集中在埋入地下带根基的茎段(I),占整个根系固氮活性的 50—90%,其次为根基以下 3—4 厘米根段(II),再下面的根段(III)固氮活性很低,有时未能测出活性。三个不同部位之间的差异除 6 月 19 日测得的 II 与 III 根段间差异不显著外,其余均有显著或极显著差异。稻株茎秆基部的水气关系可能对固氮细菌的生活和繁殖比较适宜,有利于保持较强的固氮酶活性。而渐近根生长点的部位生活力旺盛,在其周围有明显的氧化圈,影响了固氮细菌的固氮酶活性,正如 Panchsakpatana 等人^[4]指出,根际固氮酶活性随根的不同部位而变化,基部的根比接近根尖较幼嫩的根活性更大。Ito 等人^[5]应用 $^{15}\text{N}_2$ 确定,稻茎

表 3 水稻根系不同部位的细菌数量及固氮活性

Table 3 Amount of bacteria and nitrogen fixation activities at different parts of rice roots

根样部位 Root parts	测定日期 Date of determination	根系细菌数量 (10^7 /克鲜根) Amount of bacteria (10^7 /g fresh roots)			根系不同部位固氮活性 Nitrogen fixation activity at different parts of rice roots	
		好氧固氮菌 Aerobic nitrogenfixing bacteria	氨化细菌 Ammonifying bacteria	厌氧固氮菌 Anaerobic nitrogenfixing bacteria	nm 乙烯/克鲜 根/小时 nmC ₂ H ₄ /g fresh roots/h.	差异显著性 Significance 5% 1%
I II III	1982 年 6 月 8 日	11.50 3.50 1.15	1.15 1.15 0.035			
I II III	6 月 14 日	3.50 35.00 1.15	1.15 0.35 0.35		3.73±0.70 2.02±0.27 1.05±0.12	a A b B c B
I II III	6 月 19 日	6.00 0.35 0.25	6.00 0.25 1.15		133±12.45 3.30±0.61 2.20±0.41	a A b B b B
I II III	1983 年 6 月 27 日	40.00 40.00 25.00	25.00 30.00 20.00	250	5.50±1.54 1.52±0.68 微量	a A b B c C
I II III	7 月 1 日	140.00 40.00 95.00	70.00 140.00 35.00	250 160 60	6.60±1.80 3.24±0.92 微量	a A b B c C
I II III	7 月 11 日*	{ 16.50	3.50	700	109.30±31.41 8.25±2.15 微量	a A b B c C

* 三类细菌的数量系整个根段的菌数。

较低的部位, 包括外叶鞘、内叶鞘以及根基是固氮作用的位置。但在本试验测定过程中, 水稻根系固氮活性主要集中于根基上下较老的部位, 即固氮活性随着根龄而变化, 越接近根尖, 固氮活性越低。偶而出现 II 根段固氮酶活性最强, 原因有待进一步探讨。

从整个水稻植株看, 土面以上带水的茎段也具有固氮活性, 含有一定数量的固氮菌, 水面以上的茎段未测到活性。在同样条件下, 不淹水的稻田, 土面以上茎段无固氮活性, 这说明水稻植株的固氮活性及固氮菌的分布与水分和空气有关。

(三) 稻根不同部位微生物区系分析

水稻根系栖息着各种异养细菌, 为了探明与水稻根系密切结合的优势微生物群落, 我们于 1982、1983 两年对好氧固氮菌、厌氧固氮菌、氨化细菌进行了分析, 结果由表 3 可见, 不同时间测得的水稻根系三个部位的固氮菌数量, 除个别数据外, 均高于氨化细菌数。这说明水稻根系有固氮菌生长繁殖的适宜环境。1979 年 Watanabe 和 Barraquio 报道^[6]在胰蛋白大豆琼脂培养基分离的根系细菌中以固氮菌占优势。

水稻根系经充分洗涤后仍包含着很多厌氧固氮菌, 经显微镜检查, 视野中出现很多梭状芽孢杆菌和小杆菌, 使培养基中散发出丁酸的特殊气味, 这说明与水稻根系紧密结合的微生物群落中, 好氧细菌生活的结果创造了厌氧细菌生活的条件。

参 考 文 献

- [1] 钱泽澍等, 1981: 水稻不同生育期根际的固氮活性。浙江农业大学学报, 第 7 卷 2 期, 15—24 页。
- [2] Buresh, R. J., Casselman, M. E., and Patrick, W. H., Jr., 1980: Nitrogen fixation in flooded soil systems, A Review, In "Advances in Agronomy" (N. C. Brady, ed.) 33: 149—192, Academic press, New York and London.
- [3] Vlassak, K., Paul, E. A. and Harris, R. E., 1973: Assessment of biological nitrogen fixation in grassland and associated sites. Plant and soil, 38: 637—649.
- [4] Panichsakpatana, S., Wada, H., Kimura, M., and Takai, Y., 1979: Nitrogen fixation in paddy soils III N_2 fixation and its active-sites in soil and rhizosphere. Soil Sci. Plant Nutr., 25: 165—171.
- [5] Ito, O., Cabrera, D., and Watanabe, I., 1980: Fixation of dinitrogen-15 associated with rice plant. Appl. Environ. Microbiol., 39: 554—558.
- [6] Watanabe, I., and Barraquio, W. L., 1979: Low levels of fixed nitrogen required for isolation of free-living N_2 -fixing organisms from rice roots. Nature, 277: 565—566.

AMOUNT OF NITROGEN FIXED IN RHIZOSPHERE OF RICE PLANT AND NITROGEN FIXATION ACTIVITIES AT DIFFERENT PARTS OF ROOT

Mo Wenying, Jia Xiaoming and Qian Zeshu
(Zhejiang Agricultural University)

Summary

The nitrogen fixation activities in soil cores of rice rhizosphere were measured by the acetylene-reduction method. As calculated according to the theoretical value of the ratio of acetylene reduced to N fixed (3:1), the amount of nitrogen fixed in paddy field of early rice ranged from 200—226 g per mu for 66 days and that of late rice from 301—398 g per mu for 72 days respectively, in which about 80—90% of N_2 was fixed from the heading to ripening stages for early rice and 40—52% of N_2 was fixed during the same growing period for late rice. The results of experiments showed that the nitrogen fixation activity in rice rhizosphere varied with different parts of root. The highest activity was found at the basal part of stem connect with root system buried in soil about 2.5 cm, the lower was at the roots below basal stem about 3 cm in soil and the lowest was at the roots near root tip. Among the heterotrophic bacteria associated with rice plant roots, nitrogen-fixing organisms was dominant, with a few *Clostridium butyricum*.