

# 相思苗木接种根瘤菌的研究\*

康丽华 李素翠

**摘要** 根瘤菌接种对黑木相思、灰木相思、银荆和黑荆苗木的生长、结瘤及固氮效应的研究结果表明: 接种不同根瘤菌的相思苗木其苗高、总生物量和根瘤生物量分别比不接菌的对照苗木增加 35.38% ~ 160.26%、17.85% ~ 238.79% 和 2.4% ~ 102.61%。接菌的不同相思树种/种源苗木其苗高、总生物量和根瘤生物量分别比各自不接菌的对照苗木增加 2.64% ~ 109.82%、1.82% ~ 281.48% 和 64.7% ~ 211.15%。接菌苗木的氮含量和总氮量比对照高出 8.58% ~ 77.55% 和 11.64% ~ 262.50%。根瘤固定的氮绝大部分运输到植株其它部位, 分配到地上部分的氮素多于根部。固氮量与苗木生长量相关。

**关键词** 相思 根瘤菌接种 结瘤 固氮

豆科植物与根瘤菌共生固氮体系的固氮量约占全球生物固氮量的一半<sup>[1]</sup>, 在生物固氮中占有重要地位。但长期以来, 根瘤菌的接种及其在生产上的应用研究较集中在农牧业方面的草本油料豆科植物, 而对木本豆科植物则研究较少、应用不多。

黑木相思(*Acacia melanoxylon* R. Br.)、灰木相思(*A. implexa* Benth.)、银荆(*A. dealbata* Link Enum.) 和黑荆(*A. meamsii* De Wild.) 是我国近年来从澳大利亚新引进的豆科树种, 它具有速生、耐瘠薄且较马占相思(*A. mangium* Wild)、大叶相思(*A. auriculiformis* A. Cunn. ex Benth) 等热带相思耐寒的特性, 在我国热带、南亚热带地区越来越受到重视<sup>[2]</sup>。但由于这些树种引种时间短, 在我国土壤中可能还缺乏能与之共生的根瘤菌, 所以大多数相思树木均结瘤不良或不结瘤, 这就十分迫切需要进行人工接种根瘤菌。本文着重研究并评价根瘤菌接种对黑木相思、灰木相思、银荆和黑荆苗木的生长、结瘤及固氮的效应, 为进行大面积的人工接种根瘤菌提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 根瘤菌来源及分离方法

从分别来自广州龙洞林场和本所苗圃(23°06' N, 113°18' E)、广州筲箕窝(23°15' N, 113°23' E)、广东花县(23°14' N, 113°28' E) 和广东省韶关河口林场(25°08' N, 114°20' E) 的黑木相思、银荆、灰木相思、黑荆和马占相思的根瘤中分离根瘤菌。挑取新鲜、饱满、个大的根瘤, 自来水冲洗干净表面泥沙, 于 95% 酒精中浸泡 15 ~ 30 s 后, 放入 0.1% 酸性升汞溶液中表面消毒 3 ~ 5 min, 无菌水冲洗干净。将经表面消毒后的根瘤放在两片无菌载玻片之间, 用力挤压使根瘤

1997—05—20 收稿。

康丽华副研究员, 李素翠(中国林业科学研究院热带林业研究所 广州 510520)。

\* 本研究为中澳合作 9227 项目 B 课题“相思根瘤菌有效性及持久性研究”(1994 ~ 1996 年) 部分内容。本所郑翠梅同志参加此项工作, 张方秋、孙冰同志协助采集根瘤, 谨此致谢。

破碎,用接种针沾取根瘤液在 YMA<sup>[3]</sup> 平板上划线,28~30 ℃ 恒温培养箱培养至菌落出现,挑取典型菌落纯化及鉴定。分离地点及宿主植物见表 1。

表 1 根瘤菌株与分离地点和宿主植物

菌株	宿主植物	分离地点	菌株	宿主植物	分离地点
LR020	黑木相思	龙洞林场	LL 013	黑木相思	筲基窝
LR005	黑木相思	龙洞林场	LL 004	黑木相思	筲基窝
LR006	黑木相思	龙洞林场	LL 001	黑木相思	筲基窝
LR003	黑木相思	龙洞林场	LL 009	黑木相思	筲基窝
LR022	黑木相思	龙洞林场	LL 018	黑木相思	筲基窝
LR012	黑木相思	龙洞林场	LL 007	黑木相思	筲基窝
LR011	黑木相思	龙洞林场	LL 011	黑木相思	筲基窝
LR032	黑木相思	热林所苗圃	LL 028	黑木相思	筲基窝
LR030	黑木相思	热林所苗圃	LL 016	黑木相思	筲基窝
LR033	黑木相思	热林所苗圃	LL 015	灰木相思	筲基窝
LL 010	黑木相思	筲基窝	IS002	灰木相思	韶关
LL 005	黑木相思	筲基窝	DH001	银荆	花县
LL 027	黑木相思	筲基窝	MH001	马占相思	花县
LL 019	黑木相思	筲基窝	AR003	黑荆	热林所苗圃
LL 002	黑木相思	筲基窝			

## 1.2 苗木培育方法

供试种子全部由澳大利亚种子中心提供。播种前种子置干燥器中过夜,取出后在浓硫酸中浸泡 15~20 min,倒出硫酸液用无菌水冲洗干净种子并在无菌水中浸泡 30 min,播种于经 121 高压灭菌的基质中(蛭石 沙=1:1;体积比)。待苗木长至高为 3~4 cm、根长 2~3 cm 时移入装有黄心土的育苗袋,每个育苗袋移一株苗。

## 1.3 根瘤菌的培养及苗木接种方法

根瘤菌培养采用液体振荡培养法,在温度为 28~30 ℃、转速为 100 r/min 条件下振荡培养 3~5 d 即可用于接种,用移液管吸取 3 mL 菌液注射到苗木根系周围,每个菌株重复接菌 10~30 株苗,并设不接菌为对照。接种 4~6 个月后收获,进行苗木高生长、生物量、结瘤量及氮含量等的分析测定。

## 1.4 测定及计算方法

(1) 根瘤固氮酶活性的测定参照上海植物生理研究所固氮研究室所述的乙炔还原法进行<sup>[4]</sup>,用气相色谱检测乙烯的形成。

(2) 生物量测定采用植物样品在 80 ℃ 烘至恒重称干重,样品含氮量用凯氏定氮法测定。

(3) 总氮量、固氮量及固氮效益的计算:总氮量=植株生物量×氮含量;固氮量=接菌植株的总氮量-对照植株的总氮量<sup>[5]</sup>;固氮效益<sup>[6]</sup>=固氮量/总氮量×100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 接种根瘤菌的生长效应

2.1.1 不同根瘤菌菌株接种的生长效应 黑木相思接种不同根瘤菌菌株的平均株高比较见图 1。接菌植株的高生长均比对照(CK)植株增加 35.38%~160.26%,其中 LR032 菌株的增

加幅度最大, 比对照植株增加 160.26%; 其次是 LL018、LR006 和 LL028 菌株, 增加 141.72% ~ 147.68%; LR030 菌株的增加幅度最少, 为 35.38%。经过方差分析检验, 接菌和不接菌的株高差异达到极显著水平 ( $P < 0.01$ )。

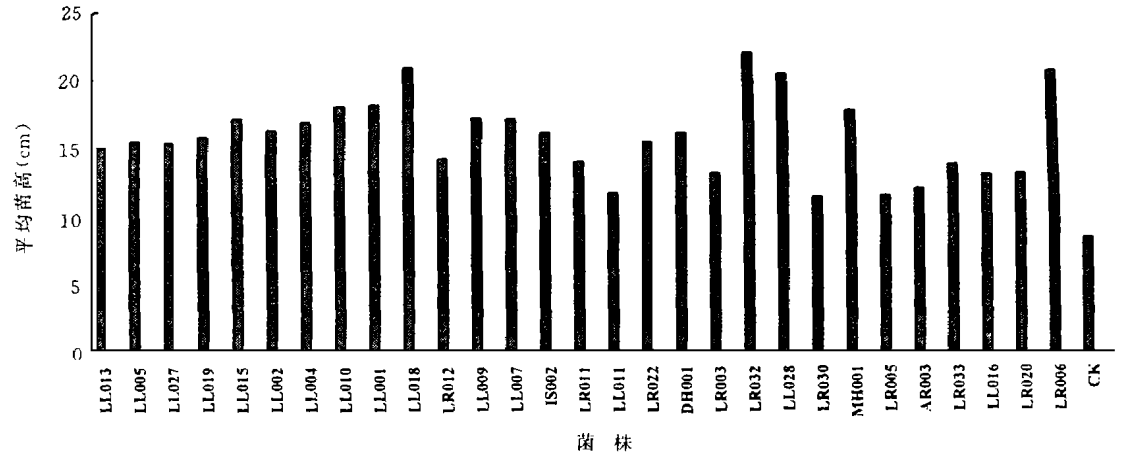


图1 接种根瘤菌对相思苗木高生长的效应

图2则比较了接菌与不接菌植株平均每株生物量的差异。所有接菌植株的生物量均高于对照(CK)植株 17.85% ~ 233.79%, 增幅最大的是接种 LR006 菌株, 比对照增加 233.79%; 其次是接种 LL007、LL015 和 LL009 菌株, 比对照增加 130.22% ~ 156.7%; 最少为接种 AR003 和 LL011 菌株, 仅比对照增加 17.85%。经过方差分析检验, 接菌和不接菌的植株生物量差异达到极显著水平 ( $P < 0.01$ )。

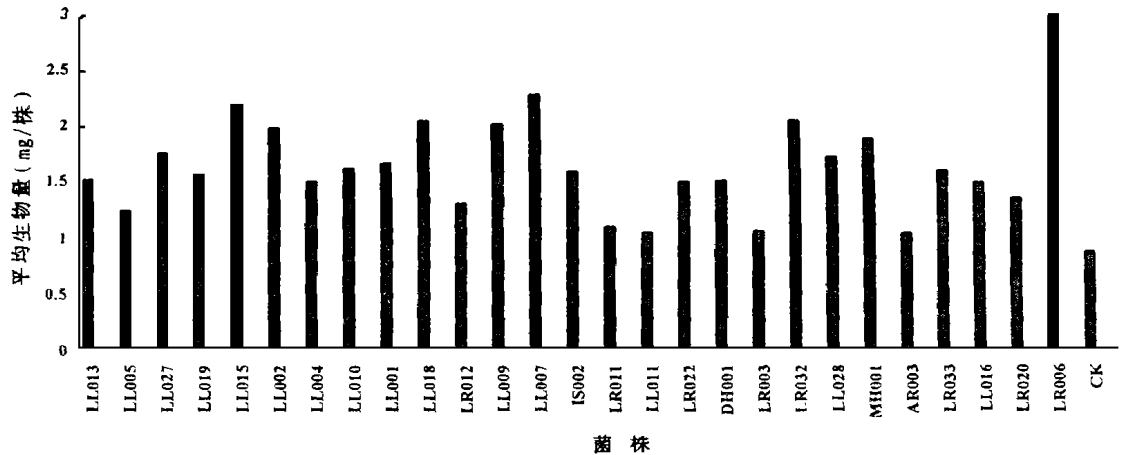


图2 接种根瘤菌对相思苗木生物量的效应

2.1.2 不同树种/种源接种根瘤菌的生长效应 黑木相思、黑荆、银荆和灰木相思 4 个种 6 个种源接种根瘤菌的高生长情况见图 3。所有种源接菌植株均高于各自的对照植株, 增高最明显的是灰木相思的 18859 号种源, 比对照植株增加 109.8%; 增高最少的是黑木相思 18021 种源, 仅比对照增加 2.64%; 其它种源各自比对照增加 20.6% ~ 72.4%。图 3 结果还表明相同树种不同种源之间的接种效果存在差异, 黑木相思 17263 种源接菌比对照增加了 52.9%, 但

18021 种源仅比对照增加 2.64%；黑荆 16246 种源接菌植株比对照增加 72.4%，而 16621 种源仅比对照增加 20.6%。除了黑木相思 18021 种源外，其余树种、种源接菌与不接菌苗高生长差异达到显著水平 ( $P < 0.05$ )。

图 4 比较了各树种/种源接菌与不接菌植株平均每株生物量的差异。全部树种/种源接菌植株的生物量均大于各自对照的生物量，增加幅度最大的为灰木相思 18859 种源，比对照增加 281.5%；最少的为黑木相思 18021 种源，仅比对照增加 1.8%；其余树种/种源增加的幅度均在 72.7% ~ 126.45% 之间。相同树种不同种源接菌后增加的幅度也不一样，黑木相思 17263 种源接菌比对照增加 126.45%，而 18021 种源仅增加 1.8%；黑荆 16621 种源接菌增加 95.1%，而 16246 种源仅增加 72.7%。除了黑木相思 18021 种源外，其余树种/种源接菌与不接菌植株生物量差异达到显著水平 ( $P = 0.05$ )。

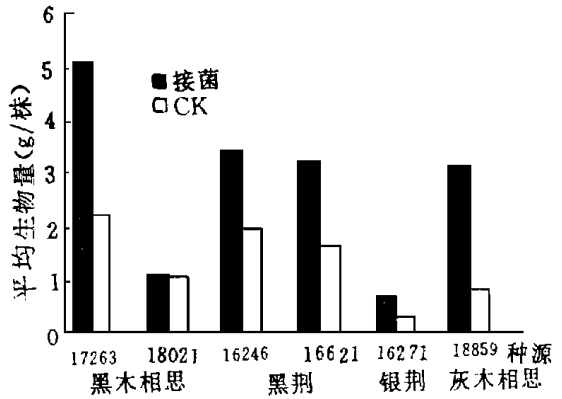
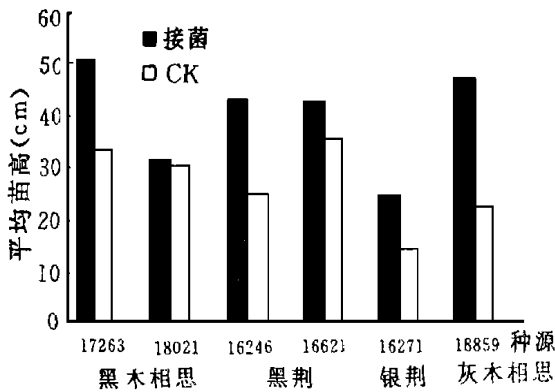


图 3 不同树种/种源接种根瘤菌苗木高生长的效应

图 4 不同树种/种源接种根瘤菌苗木生物量的效应

## 2.2 接种根瘤菌的结瘤效应

2.2.1 不同根瘤菌菌株接种的结瘤效应 接不同根瘤菌菌株的黑木相思植株的根瘤粗大，数量较多且根瘤剖面多呈粉红色，为有效根瘤；而对照植株不结瘤或有少且小的根瘤，剖面多呈白色，即为无效根瘤。根瘤生物量较根瘤数量更能准确反映苗木结瘤固氮情况，因为根瘤生物量与固氮量的关系密切<sup>[7]</sup>，表 2 结果表明黑木相思接菌后根瘤生物量为 88.11 ~ 237.67 mg/株，其中接 LL013 和 MH001 菌株的根瘤生物量最多，比对照增加 123.07% ~ 143.61%，除了 LL011 菌株外，接种其余菌株的根瘤生物量均比对照增加 2.24% ~ 102.61%。

2.2.2 不同树种/种源接种根瘤菌的结瘤效应 不同树种/种源接菌的平均每株根瘤数量及平均每株根瘤生物量见表 3。除了黑木相思 18021 种源外，接菌苗木根瘤生物量比对照增加 64.70% ~ 211.15%，其中黑荆的 16621 种源增加幅度最大，为 211.15%；黑木相思的 17263 种源增加幅度最小，为 64.70%。相同树种不同种源间根瘤生物量增加的幅度不一样，黑木相思的 17263 种源比对照增加了 64.70%，但 18021 种源则少于对照；黑荆的 16621 种源接菌增加根瘤生物量的幅度是 16621 种源的 124.3%。

## 2.3 接种根瘤菌的固氮效应

2.3.1 根瘤固氮酶活性 接菌苗木根瘤固氮酶活性见表 4。由于固氮酶活性具有明显的时空变化并与根瘤的不同发育阶段有关，因此不能根据本次的测定来简单地比较接种不同菌株苗

木根瘤固氮酶活性的高低, 但可以说明所有接菌苗木根瘤都具有固氮酶活性, 证明为有效结瘤, 即接种根瘤菌不仅使苗木结了瘤, 而且还固定了氮素。

表 2 接菌与对照苗木的结瘤状况比较

菌 株	根瘤数量 (个/株)	根瘤生物量		菌 株	根瘤数量 (个/株)	根瘤生物量	
		(mg/株)	增加(%)			(mg/株)	增加(%)
LL013	28.56	237.67	143.61	LR022	24.88	99.75	2.24
LL005	42.25	112.63	15.45	DH001	29.67	120.67	23.69
LL027	29.78	129.56	32.80	LR003	60.67	134.22	37.58
LL019	37.11	104.89	7.51	LR032	51.78	140.67	44.19
LL015	25.50	104.88	7.50	LL028	32.56	136.56	39.98
LL002	32.33	155.11	58.99	LR030	60.57	103.86	6.46
LL004	41.56	120.89	23.91	MH001	41.88	217.63	123.07
LL010	24.11	129.44	32.68	LR005	70.75	131.38	34.67
LL001	43.67	119.89	22.89	AR003	85.67	197.67	102.61
LL018	32.67	169.56	73.80	LR033	52.25	138.75	42.22
LR012	58.44	130.67	33.94	LL016	47.63	139.75	43.25
LL009	50.56	174.11	78.46	LR020	33.22	130.22	33.48
LL007	27.22	144.89	48.51	LR006	53.33	140.11	43.16
IS002	27.56	111.33	14.11	LL011	30.78	88.11	- 9.69
LR011	23.89	107.89	10.59	CK	35.22	97.56	-

表 3 不同树种/种源相思苗木接菌与对照的结瘤状况

树 种	种 源	根瘤数量(个/株)		根瘤生物量(mg/株)		
		接 菌	对 照	接 菌	对 照	增 加(%)
黑木相思		112.6	58.5	891	541	64.70
	18021	33.0	39.9	228	265	- 13.96
黑 荆	16246	197.6	97.0	637	236	169.92
	16621	281.6	65.6	837	269	211.15
银 荆	16271	28.5	42.5	387	164	135.98
灰木相思	18859	68.0	17.4	529	187	182.89

表 4 根瘤固氮酶活性

单位:  $\mu\text{mol}(\text{乙炔})/(\text{g}\cdot\text{h})$

菌 株	LL013	LL005	LL027	LL019	LL015	LL002	LL004	LL010	LL001	LL018
固氮酶活性	2.370	1.056	7.636	1.500	2.324	2.624	0.609	0.071	0.367	1.275
菌 株	LR012	LL009	LL007	IS002	LR011	LL011	LR022	DH001	LR003	LR032
固氮酶活性	0.347	1.093	1.634	1.460	2.287	0.583	1.846	1.137	0.368	1.966
菌 株	LL028	LR030	MH001	LR005	AR003	LR033	LL016	LR020	LR006	CK
固氮酶活性	1.605	2.548	1.512	1.270	1.450	2.130	3.502	2.463	2.339	1.050

2.3.2 固氮量与固氮效益 表 5 结果是不同树种/种源的氮含量、总氮量、固氮量和固氮效益。结果表明全部接菌苗木的氮含量比对照高出 8.6%~77.6%。总氮量比对照高出 11.6%~262.5%, 其中黑木相思的 17263 种源的总氮量比对照高出 262.5%。

固氮量反映了固氮作用对植物生长所需氮素营养的绝对贡献, 它与苗木生长及固氮酶活性有关。从表 5 可见, 黑木相思的 17263 种源的固氮量最多, 主要是其根瘤生物量大的缘故。

固氮效益则反映了共生固氮对苗木氮素营养的相对贡献, 或苗木生长所需氮素营养对共

生固氮的依赖性。各个树种/种源的固氮效益不同,在本试验中共生固氮量占了苗木生长所需氮素一半的有灰木相思和黑木相思的 17263 种源。

表 5 接种根瘤菌的固氮效应

树 种	种 源	氮含量(%)		总氮量(g/株)		固氮量 (g/株)	固氮效益 (%)
		接菌	对照	接菌	对照		
灰木相思	18859	2.025 0	1.140 5	1.872 3	0.872 9	0.999 4	53.38
黑木相思	16358	2.188 5	1.842 0	3.334 0	2.983 9	0.350 1	10.50
	17263	2.465 0	2.120	3.674 3	1.013 6	2.660 7	72.41
银 荆	16246	2.098 0	1.914 5	3.198 8	2.201 5	0.997 3	31.18
黑 荆	云南种源	2.114 5	1.947 5	2.608 0	2.336 0	0.272 0	10.43

2.3.3 固氮量的分配 固氮量的分配反映了固氮对植株各部分生长的重要意义。以黑木相思 17263 种源为例,把苗木分为地上部分(茎+叶)、根和根瘤三部分,以接菌苗木和对照苗木各部分总氮量之差作为积累在此部分的固氮量,来估算固氮量在苗木各部分中的分配(图 5)。结果表明,根瘤固定的氮素有 92% 输出并积累到苗木其它部位,其中 76% 运输积累到地上部分,仅 16% 积累在根部。这与 Pate 运用 N 示踪法研究固氮作用氮素分配的结果大体一致<sup>[8]</sup>。

2.3.4 固氮量与苗木高生长的关系 对上述 5 个树种/种源的固氮量与苗木平均高生长进行相关分析。回归方程为:  $y = 25.874x + 6.1366$ ,  $r = 0.7799$ ,  $n = 5$ ; 说明固氮量与相思苗木生长呈正相关关系。

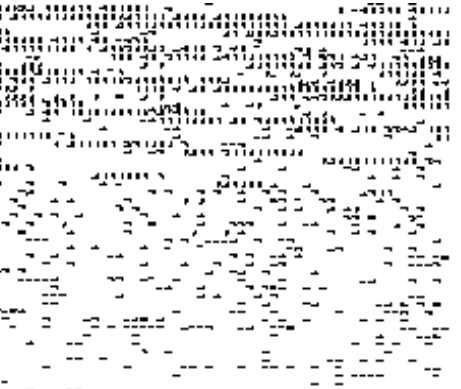


图 5 接种苗木固定的氮素在各器官的分配

### 3 小结与讨论

(1) 从不同地点不同相思树种分离的根瘤菌全部能侵染供试的相思树种/种源,达到 100% 的结瘤率,说明这些根瘤菌能与相思形成共生体,但共生效应存在差异。Keyser、徐玲玫和樊惠等对大豆根瘤菌与大豆共生效应的研究中得出,大豆品种—根瘤菌的不同组合有些能有效共生,有些则是部分有效或无效共生<sup>[9]</sup>。说明选择相思树种/种源,除了树种/种源本身的因素外,还应考虑与根瘤菌形成有效共生体能力的高低。

(2) 接种根瘤菌能提高相思苗木的高生长、生物量及固氮量,但增加的幅度差异很大,说明利用经过筛选的根瘤菌接种相思苗木,提高其生长量的潜力是很大的。从 29 株不同根瘤菌的接种试验结果可以初步选出 LR006 菌株。

### 参 考 文 献

- 1 李庆逵. 我国土壤科学发展与展望. 土壤学报, 1989, 26(3): 207 ~ 216.
- 2 洪菊生主编. 澳大利亚阔叶树研究. 北京: 中国林业出版社, 1993. 157 ~ 234.
- 3 Vincent J M. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP Handbook No 15. Blackwell, Oxford. 1970. 164.

- 4 上海植物生理研究所固氮研究室. 固氮研究中乙炔还原定量方法的简易化. 植物学报, 1974, 16(4): 382 ~ 384.
- 5 Martensson A M, Ljunggren H D. A comparison between the acetylene reduction method, the isotope dilution method and the total nitrogen difference method for measuring nitrogen fixation in lucern (*Medicago sativa* L.). Plant and Soil, 1984, 81: 177 ~ 184.
- 6 樊惠, 葛诚, 徐玲玫. 接种不同大豆根瘤菌株的根瘤放氢和吸氢的研究. 微生物学通报, 1987, 14(1): 3 ~ 6.
- 7 丁明懋, 蚁伟民, 廖兰玉. 大叶相思(*Acacia auriculæformis*) 和马占相思(*Acacia Mangium*) 固氮量的研究. 生态学报, 1991, 11(3): 289 ~ 290.
- 8 陈华癸, 李阜棣, 陈文新, 等. 土壤微生物学. 上海: 上海科学技术出版社, 1981. 146 ~ 147.
- 9 葛诚. 快生形大豆根瘤菌研究的新进展. 大豆科学, 1985, 4(2): 159 ~ 163.

## Responses of *Acacias* to Rhizobia Inoculation

Kang Lihua    Li Sucui

**Abstract** The responses of *A. cacia melanoxylon*, *A. meamsii*, *A. implexa*, *A. dealbata* to rhizobial inoculation were reported in this paper. The results showed that the height, total biomass and nodule biomass of inoculation of *A cacia* with different rhizobium strains were 1.353 8 ~ 2.602 6, 1.178 5 ~ 3.357 9 and 0.022 4 ~ 1.026 1 times higher than those of the controls; the height, total biomass and nodule biomass of inoculation of different *A cacia* species/provenances with the same sets of rhizobium strains were 0.026 4 ~ 1.098 2, 0.018 2 ~ 2.814 8 and 0.647 0 ~ 2.111 5 times higher than those of the controls. The N concentration and total nitrogen of inoculated seedlings were 0.085 8 ~ 0.775 5 and 0.116 4 ~ 2.625 0 times higher than those of the controls. Most of the fixed nitrogen by nodules were transported and stored in aboveground than in underground plant parts. A correlation existed between the fixed nitrogen and the height of seedlings.

**Key words** *A cacias* rhizobia inoculation nodulation nitrogen fixation

Kang Lihua, Associate Professor, Li Sucui (The Research Institute of Tropical Forestry, CAF Guangzhou 510520).