

接种联合固氮菌对毛竹实生苗生长的影响*

顾小平 吴晓丽

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 311400, 浙江富阳; 第一作者 39 岁, 男, 副研究员)

摘要 将从毛竹根际分离的 2[#] 菌株(多粘芽孢杆菌), 12[#]、14[#] 菌株(地衣芽孢杆菌)和从浙江淡竹根际分离的 7[#] 菌株(未最后确定种名), 分别培养制成菌悬液, 回接毛竹实生苗, 进行人工控制条件下的无菌盆栽(沙培)试验。结果显示接菌能不同程度地提高毛竹幼苗成活率并促进其生长, 尤其是对根鲜质量增加明显, 增幅为 44.1% ~ 76.9%, 分别达到显著(14[#] 菌)和极显著(2[#]、12[#]、7[#] 菌)水平。同时, 接种联合固氮菌明显提高苗木体内的氮素含量, 植株含氮量增幅达 22% ~ 38.1%。另外, 统计分析表明: 在无土著菌生长和竞争的条件下, 幼苗期接菌处理比种子发芽期接菌处理更具显著的促进植株生长和提高植株含氮量的效果。

关键词 毛竹; 联合固氮; 固氮菌; 接种; 实生苗生长

分类号 S759.72; S154.381

禾本科(Gramineae)作物联合固氮研究由于涉及众多粮食作物的氮素供应, 故一直为国内外农学家们所重视。研究联合固氮菌的固氮特性及与植物间的相互作用以及田间的接种效果, 自然成为人们关注的热点。

1994 年笔者首次证实并报道了竹类植物根际也存在着联合固氮作用^[1], 并将农业生态系统中的联合固氮研究引入到森林植物的竹林生态系统以来, 现已从毛竹(*Phyllostachys heterocycla* var. *pubescens* (Mazel) Ohwi)、浙江淡竹(*P. meyeri* McClure)、青皮竹(*Bambusa textilis* McClure)、麻竹(*Dendrocalamopsis latiflorus* Munro)、吊丝球竹(*D. beecheyana* (Munro) Keng f.) 等不同竹的根际分离到一批具较高固氮活性的菌株, 并对自毛竹和浙江淡竹根际分离的菌株进行了鉴定。为了进一步研究联合固氮菌与竹类植物间的相互作用机理, 选择适宜的菌株建立高效的竹子-固氮菌联合固氮体系, 将经筛选的固氮活性较高的并具代表性的菌株对毛竹实生苗进行回接, 并就结果作分析讨论。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株

供试菌株为分离自毛竹根际编号 2[#] 的多粘芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa* Macé), 编号 12[#]、14[#] 的地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis* Chester)和分离自浙江淡竹根际的 7[#] 菌株(未最后确定种名)。

1.2 供试植物

毛竹种子用 $W = 0.15\%$ 的升汞溶液消毒后, 用无菌水冲洗, 播于经灭菌处理的培养皿中,

* 本文为 1996 ~ 1998 年国家自然科学基金和浙江省自然科学基金资助项目的研究内容。
1998-06-02 收稿。

置培养箱 25 发芽待用。

1.3 供试土壤

供试土壤为采自富春江的河沙,经 170 ℃、4 h 高温灭菌后装入已经消毒灭菌的塑料杯中(300 g·杯⁻¹),再加无菌水 100 mL,经 2 d 自然渗透后待用。其理化性质见表 1。

表 1 供试土壤的主要理化性质

供试土壤	pH	有机质	全 N	全 P	全 K	碱解 N	速效 P	速效 K
		/g·kg ⁻¹				/mg·kg ⁻¹		
河沙	7.13	0.54	0.24	0.15	42.1	30	7.74	49.5

1.4 试验设置

该试验设 2 个区组,每区组设 1 个对照 4 种处理,15 次重复,同一区组苗木发芽和接种时期相同。

1.5 接种方法

经纯化并鉴定过的各种固氮菌分别接种于液体 Dobereiner 无氮培养基中培养 24 h,然后离心收集菌细胞,用 5 mL Dobereiner 无氮培养基加 45 mL 无菌水稀释至 50 mL 制成各种处理接种用菌悬液(约每毫升 10⁸ 个细胞)待用。对照用经高温高压灭活的上述菌悬液接种。接种方法分 2 种,区组 的接种方法为在培养皿中选取刚露白的种子置于塑杯沙中,吸取以上待用的菌悬液 2 mL 滴于种子上及周围沙中,覆沙 1 cm。区组 的接种方式为在培养皿中选取刚露白的种子置于塑杯沙中覆沙 1 cm,待苗木长到 2 cm 左右高,已展开 2~3 片叶时再在苗木根系周围滴上述菌悬液 2 mL。

1.6 苗木培养方法

培养苗木的塑杯无色透明,壁厚 1 mm,底直径 52 mm,上口直径 80 mm,高 130 mm,底部穿 2 mm 直径的孔 100 个,以使沙中的水可自然渗漏。在此塑杯的上部和底部反扣和套一只只有孔塑杯,但孔已用透气膜封住,使其只能透气但不能透水更不能透过细菌等,且底部的塑杯口小些,使其只能套在装沙塑杯的中部,下部空间用于盛接从沙中渗出的水。3 只塑杯的接口也用透气膜封住(以上操作均在无菌室中进行),给苗木创造一个内部通气透水,但于外界只通气不透水的无菌的(只有接种菌)生长环境。苗木在室内经人工光照培养,光照时间为 14 h·d⁻¹。从 3 月上旬开始着手发芽处理,3 月下旬接种,直到 11 月初进行各项指标的测定。

1.7 测定方法

全氮用凯氏定氮法测定,固氮活性以离体根预温育法用气相色谱仪测定,其它用重量法和常规法。

2 结果与分析

2.1 接种联合固氮菌对毛竹实生苗成活的影响

苗木经约 7 个月的培养后观察其成活率,植株全部枯黄的记为死亡,有一片或一片以上叶仍保持部分或全部绿色的记为成活。从图 1 接菌与不接菌毛竹实生苗的成活率比较可以看出,和无菌处理相比,接种联合固氮菌的 4 种处理均存在一定程度的提高苗木成活率的效果,幅度为 14.8%~18.5%。从各处理毛竹实生苗的表观生长态势来看,接菌处理的也要优于无菌处

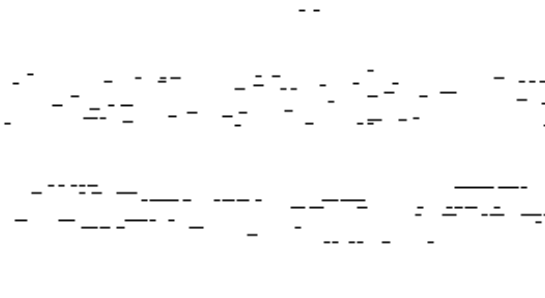


图 1 接种处理对毛竹实生苗成活率的影响

理, 具体表现在接菌植株叶色嫩绿、长势旺, 而不接菌的植株即使未完全死亡叶色大多也已部分枯黄。同时从不同时期对各处理苗木生长势的调查来看, 对照处理的苗木早期生长旺盛, 后期生长衰落, 推测对照处理早期主要是依靠种子提供的养料, 一旦种子的养料耗尽, 沙中的养料又不够, 生长便受到影响, 并停止生长。而接种处理的苗木早期和固氮菌共同消耗种子的养分, 因此生长优势不明显, 但后期由于固氮菌可

为苗木提供一定量的氮素, 因此苗木仍保持嫩绿, 并展出新叶。

2.2 接种联合固氮菌对毛竹实生苗生长的影响

联合固氮菌接种于毛竹实生苗后, 调查显示对各生长因子均具有不同程度的促进作用(表 2)。表 2 中的数据为各种处理每株苗木的平均值。

表 2 接种处理对毛竹实生苗生长的影响

菌株	植株鲜质量		根鲜质量		苗地上部干质量		苗高		叶片数	
	/mg	增长%	/mg	增长%	/mg	增长%	/cm	增长%	/张	增长%
2 [#]	375.1 aA	32.0	177.2 aA	66.7	73.5 aA	8.4	14.39 aA	30.2	14.9 aA	29.2
12 [#]	388.9 aA	36.9	188.0 aA	76.9	75.5 aA	11.4	13.36 bB	20.9	14.1 aA	23.0
14 [#]	360.7 bA	29.9	153.2 aB	44.1	69.5 aA	2.5	12.79 cB	15.8	13.5 aB	17.4
7 [#]	366.1 bA	28.9	161.1 aA	51.6	71.5 aA	5.4	11.93 dC	8.0	13.4 aB	16.8
CK	284.1 bA	0	106.3 bB	0	67.8 aA	0	11.05 dC	0	11.5 bB	0

注: 数据为区组、的平均。经邓肯氏新复极差检验, 英文小写字母不同表示 $t_{0.05}$ 的显著性差异, 大写字母不同表示 $t_{0.01}$ 的极显著性差异。

2.2.1 植株鲜质量 各菌株处理均表现出不同程度的增加, 与不接菌的对照相比, 增幅达 28.9% ~ 36.9%, 经邓肯氏新复极差检验结果表明, 2[#]、12[#] 菌株接种与对照的差异达显著水平。

2.2.2 根鲜质量 新复极差检验结果表明, 各菌株处理比不接菌的对照, 差异均达到了显著水平, 其中的 2[#]、12[#]、7[#] 菌处理, 差异达到了极显著水平, 经联合固氮菌接种的毛竹实生苗根系生长明显优于不接菌的对照, 根系鲜质量增加 44.1% ~ 76.9%, 这与国内外多数文献报道的接种联合固氮菌能使植株根系形态发生变化, 刺激侧根生长, 根毛数目增多, 根系发达的结果相符^[2,3]。

2.2.3 苗地上部干质量 本次试验接种处理对苗地上部干质量的增加没有其余生长因子那样明显, 与不接菌处理相比, 增幅为 2.5% ~ 11.4%, 新复极差检验结果差异不显著。由此看来, 接种根际联合固氮菌在毛竹幼苗期首先是通过促进根的生长来影响幼苗对矿物盐和水的吸收。

2.2.4 幼苗高生长 接种联合固氮菌对幼苗高生长的增幅为 8% ~ 30%, 检验结果表明 2[#]、12[#]、14[#] 菌对实生苗高生长的增加均达到了极显著水平。

2.2.5 叶片数 各菌株接种处理对幼苗叶片数的影响, 经检验比对照均达到了显著增加的效果。

果,其中 2[#]、12[#] 菌的效果极显著,接种处理与对照相比,增幅为 16.8% ~ 29.2%。

2.3 接种联合固氮菌对植株含氮量的影响

试验结果(图 2)表明,接种联合固氮菌的毛竹实生苗与不接菌的相比,植株含氮量明显增加,增幅达 22.0% ~ 38.1%。为了进一步了解植株含氮量与菌株固氮作用的关系,我们利用离体根预温育法测定了接种各种固氮菌后根系的固氮活性,并与植株含氮量进行了相关分析,求得相关系数 $r = 0.7493$,经假设测验 $t = 2.771 > t_{0.05,6} = 2.447$ 。表明植株含氮量(N%)与接种各种固氮菌后根系的固氮活性存在显著的正相关关系,根系固氮活性愈高,植株含氮量也愈高。



图 2 接菌处理对毛竹实生苗植株含氮量的影响

2.4 不同时期接种联合固氮菌对毛竹实生苗生长的影响

迄今为至,联合固氮菌对禾本科作物接种的研究及推广施用固氮菌肥时,为解决根际竞争,确保接种菌在宿主植物根际处于优势地位,一般均采用菌液浸泡种子或种子包衣等方法,以便于接种菌首先定殖,形成优势菌群。在本试验中,对不同时期接种的 2 个区组,各处理的各项结果进行比较分析列于表 3、图 3。不难看出,种子发芽期接种联合固氮菌的组(组)对毛竹

表 3 不同时期接菌处理对毛竹实生苗生长的影响

区组	菌株	植株鲜质量		根鲜质量		苗地上部干质量		苗高		叶片数	
		/mg	增长%	/mg	增长%	/mg	增长%	/cm	增长%	/张	增长%
	2 [#]	384 bA	5.2	143 bA	- 10.1	74 aA	4.4	14.58 aA	19.0	15.3 aA	16.4
	12 [#]	462 aA	26.6	213 aA	33.9	73 aA	3.7	13.08 bA	6.8	14.2 bB	7.6
	14 [#]	379 bA	3.8	153 bA	- 3.8	63 bA	- 9.6	12.83 bA	4.7	14.0 bB	6.3
	7 [#]	465 bA	11.0	195 bA	22.6	71 aA	0.14	12.10 bA	- 1.2	12.0 bB	- 8.9
	CK	365 bA	0	159 bA	0	71 aA	0	12.25 bA	0	13.2 bB	0
	2 [#]	456 aA	51.5	189 aA	122.4	73 a	14.9	14.17 aA	32.6	14.3 aA	31.6
	12 [#]	432 aA	43.5	171 aA	101.2	78 a	22.8	13.28 bB	24.2	13.9 aA	27.6
	14 [#]	454 aA	50.8	158 aA	85.9	76 a	19.6	12.61 bC	18.0	12.9 aB	18.4
	7 [#]	418 bA	38.9	141 aB	65.9	72 a	13.6	11.83 cC	10.7	14.2 aA	30.6
	CK	301 bA	0	85 bB	0	63 a	0	10.69 cC	0	10.9 bB	0

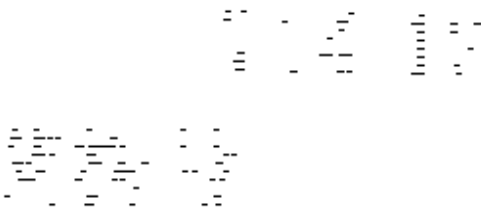


图 3 不同时期接种植株含氮量的增长率

实生苗生长的促进作用不及幼苗期追施固氮菌肥的组(组)。具体表现在:(1)达到统计意义上的具显著促进效应的处理数少;(2)与对照相比的增幅小。

进一步将 2 个区组各处理对生长的增长率作显著性检验,求得 $t = 3.637 > t_{0.01} = 2.861$;将 2 个区组各处理对植株含氮量的增长率作显著性检验,求得 $t = 3.815 >$

$t_{0.05} = 3.182$ 。表明开始长叶时追施固氮菌肥比种子发芽期接菌具极显著促进植株生长的作用, 同时植株含氮量在统计意义上增加明显。究其原因, 可能与发芽期接菌, 由于菌的增殖需要消耗一定的能源, 而此时芽苗尚无法进行光合作用制造养分, 造成固氮菌的增殖和芽苗的生长同时消耗种子所带养分的局面, 从而影响了种苗的生长有关。

3 讨 论

目前, 大量的实验结果表明接种固氮菌在各种环境和土壤条件下对牧草和谷物的生长是有益的。然而, 一直来接种效应的机理却不完全清楚。Rao 等采用固氮螺菌(*Azospirillum* spp.) 接种水稻的田间试验表明, 在低肥力的土壤条件下, 能使作物增产和氮素成分增加^[4]。Watanabe 和 Lin 认为接种固氮螺菌的效应是微生物分泌激素的作用^[3]。通过本次采用多菌种接种毛竹实生苗的试验研究认为:

(1) 本试验所使用的几株联合固氮菌对毛竹实生苗的生长具有明显的促进作用, 尤其是根鲜质量增加非常明显, 说明这几株菌具有较高的研究利用价值。一些文献报道根际接种联合固氮菌对植物的生长特别是在幼苗期有明显的促进作用。主要是由于固氮螺菌产生的植物激素影响了宿主根的呼吸速率、代谢、根毛和次生根的增多, 从而影响了接种植物对矿物盐和水分吸收^[2]。良好的根系生长, 为下一步有机物质的积累和幼苗分蘖生长, 打下了良好的基础。但是本试验中各处理菌株是否可刺激根系产生激素以及产生何种激素尚待研究。

(2) 接种联合固氮菌明显提高了植株含氮量, 同时根系固氮活性与植株含氮量存在一定正相关关系的结果说明, 本试验所使用的联合固氮菌对毛竹幼苗的氮素营养是有贡献的, 这和一些禾谷类作物接种其它联合固氮菌报道相符^[5]。但要想进一步评价根际联合固氮作用对竹苗氮素养分贡献的大小, 还需通过¹⁵N 同位素稀释法进行进一步研究。

(3) 幼苗期追施联合固氮菌, 效益明显优于发芽期接种固氮菌这一结果对选择合适的接种时期及方法具指导意义。同时也可以推测接种上述固氮菌后固氮菌在根际是有增殖的, 而这种增殖和固氮是通过消耗种子及根系的养分(能量)而达到的, 只要选择合适的接种方法及时期, 固氮菌和竹子之间的互惠互利体系是可以建立的。

(4) 不同菌株处理, 对促进毛竹实生苗的生长存在差异的结果说明, 选择适宜的菌株是建立高效的竹子-固氮菌联合固氮体系的基础。

(5) 由于本试验是在人工、无菌、沙培的特殊环境中进行的, 在进入应用前还需研究诸如和土著菌之间的竞争及外界环境条件等因素的影响等问题。

参 考 文 献

- 1 顾小平, 吴晓丽. 毛竹及浙江淡竹根际联合固氮的研究. 林业科学研究, 1994, 7(6): 618~623.
- 2 李久蒂, 安千里. 联合固氮研究进展. 植物学通报, 1997, 14(3): 14~21.
- 3 Watanabe I, Lin C. Response of wetland rice to inoculation with *Azospirillum ipf erum* and *Pseudomonas* sp. . Soil Sci. Plant Nutr., 1984, 30: 117.
- 4 Rao V R, Nayok D N, Charyulu PBN. Yield response of rice to root inoculation with *Azospirillum*. J. Agric. Sci. Camb., 1983, 100: 689.
- 5 林敏, 尤崇杓. 根际联合固氮作用的研究进展. 植物生理学通讯, 1992, 28(5): 323~329.

Effects of Inoculating Associated Nitrogen Fixing Bacteria to Moso Bamboo Seedlings Growth

Gu Xiaoping Wu Xiaoli

(The Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, 311400, Fuyang, Zhejiang, China)

Abstract Four strains, 2[#] (*Bacillus polymyxa*), 12[#], 14[#] (*B. licheniformis*), isolated from *Phyllostachys heterocyclus* var. *pubescens* rhizosphere, 7[#] (The species name have not been determined finally), isolated from *P. meyeri* rhizosphere were cultured and prepared into liquid inoculums and inoculated back to moso bamboo (*Phyllostachys heterocyclus* var. *pubescens*) seedlings. Potted culture (sand culture) under artificial and sterile conditions was then conducted. The results showed that all of four strains were, more or less, able to raise the survival rate and promote the seedling growth in various aspects. Especially for root fresh weight were increased by 44.1% ~ 76.9%, reaching significant level (14[#]) and remarkable significant level (2[#], 12[#], 7[#]) respectively. The nitrogen content of seedlings was also increased considerably, increase rate reach to 22% ~ 38%. Meanwhile, statistical analysis results showed, under the condition of no indigenous bacteria, inoculating stage will also influence the growth of seedling, when inoculated on seedling stage the seedlings' growth and total nitrogen content was better and higher than that inoculated on seed germinating stage, the diversity reach to remarkable significant level.

Key words moso bamboo; associated nitrogen fixation; nitrogen fixing bacteria; inoculation; seedling growth

《中国林学》(英文版)于1999年创刊

经国家科技部(原国家科委)批准,《中国林学》(英文版)(*Forestry studies in China*)于1999年创刊,1999年6月出版第1卷第1期。原《北京林业大学学报英文版》1998年12月出版第7卷第2期后停办。

创办《中国林学》,意在扩大我国林业对外宣传窗口,使外界进一步了解我国林业科研的现状、水平、进展以及发展方向,促进林业科研的国际交流。《中国林学》将面向国内外征稿,力争使刊载论文一方面代表国内先进水平,一方面尽量与同类研究的国际水平一致或接近。

《中国林学》1999年出版2期,分别于6月、12月出版。《中国林学》由北京林业大学主办,《中国林学》编辑部负责组织论文审查、编辑加工以及出版发行。办公地点:北京林业大学主楼2层;通信地址:北京市清华东路北京林业大学148信箱,邮编:100083;电话:(010)62338397; E-mail: bldxeb@beilin.bjfu.edu.cn。

《中国林学》备有投稿指南(英文),需要者可径向编辑部索取。