

文章编号: 100F 1498(2001) 01 0028 07

几种丛生竹根际联合固氮研究

顾小平, 吴晓丽, 汪阳东

(中国林业科学研究院 亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

摘要: 对几种丛生竹种麻竹、吊丝球竹、青皮竹、粉丹竹、马甲竹、绿竹等进行根系固氮能力调查测定, 用直接法测定(干根样品)前5个种竹种的根系最高固氮酶活性分别为20.50、24.81、10.83、7.49、2.46 $\text{nmol}(\text{C}_2\text{H}_4) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 用富集培养法测定(鲜根样品)前5个种竹种的根系平均固氮酶活性分别为275、431、169、188、79 $\text{nmol}(\text{C}_2\text{H}_4) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。不同生境和不同季节丛生竹根系固氮能力的调查显示, 充足的水分供应、较高的温度及适当施用有机肥有利于竹子固氮。对几种丛生竹种根际不同部位固氮菌数调查测定显示, 根际固氮菌数最多的竹种是吊丝球竹, 在根际不同部位固氮菌数由非根际土 \rightarrow 根际土 \rightarrow 根表 \rightarrow 根内依次急剧递增, 越往内部根际效应越明显。用 $2^{\#}$ 、 $12^{\#}$ 、 $14^{\#}$ 、 $7^{\#}$ 菌及混合菌液对麻竹组培苗进行接种显示, 接种固氮菌可提高苗木成活率和植株含氮量, $14^{\#}$ 、 $7^{\#}$ 菌和混合菌接种可显著提高麻竹组培苗生物量。

关键词: 丛生竹; 根际; 联合固氮作用; 固氮菌接种

中图分类号: S718.83

文献标识码: A

生物固氮是大气氮向农田生态系统和森林生态系统输入的一个重要途径。在环境污染日益严重的今天, 对它的研究和利用已越来越受到重视。过去对联合固氮的研究主要集中在禾本科(Gramineae)农作物上^[1~4], 而目前对竹类植物的联合固氮研究还只是起步。

竹类植物是我国乃至世界的重要森林资源, 1994年作者调查和报道了毛竹[*Phyllostachys heterocyda* var. *pubescens* (Mazel) Ohwi]等几种主要分布于北亚热带的散生竹种的联合固氮作用^[5]。竹类植物种类多、分布广, 而丛生竹大多分布于热带和南亚热带, 由于地域和生态环境的差异, 丛生竹与散生竹在生长特点和生物学特性等方面有很多差异。因此, 丛生竹是否与散生竹一样, 根际也具有联合固氮作用, 它们在联合固氮方面的特性等有待研究。本文通过对几种主要丛生竹种根系固氮能力的调查, 根际土壤、根表、根内不同部位固氮菌数的计数测定, 以及固氮菌对丛生竹组培苗的回接试验, 以了解和证实丛生竹的联合固氮能力和特点。

1 材料与方法

1.1 竹根系固氮酶活性测定

1.1.1 材料 试验材料为吊丝球竹[*Dendrocalamopsis beecheyana* (Munro) Keng f.]、麻竹(*Dendrocalamus latiflorus* Munro)、青皮竹(*Bambusa textilis* McClure)、粉丹竹(*Bambusa chungii* McClure)、马甲竹(*Bambusa tulda* Roxb)、绿竹[*Dendrocalamopsis oldhami* (Munro) Keng f.]等的根系, 采自广东省林科院和广西林科院竹种园。取样方法为分别选1、2、3年生竹株, 在其基部顺竹箨连土

收稿日期: 2000 05 08

基金项目: 国家自然科学基金“联合固氮菌在竹类植物根际接种和定殖的研究”(39970606)部分内容

作者简介: 顾小平(1959), 男, 浙江杭州人, 副研究员, 博士。

挖取竹根, 除去根表浮土后连土带回实验室处理并测定, 测定后取其平均值。

1.1.2 测定方法 采用 N_2 回充法、直接测定法和富集培养法^[6]测定竹根系固氮酶活性。

1.2 竹根际固氮菌计数

固氮菌计数方法见参考文献[7]。

1.3 固氮菌接种竹子组培苗试验

1.3.1 参试菌株 2[#] 菌(多粘芽孢杆菌 *Bacillus polymyxa* Macé), 12[#]、14[#] 菌(地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis* Chester 的不同菌株)和 7[#] 菌[肺炎克雷伯氏菌 *Klebsiella pneumoniae* (Schroeter) Trevisan]。

1.3.2 参试植物 麻竹组培苗, 来自广东省林科院。

1.3.3 基质 采自富春江的河沙和中国林科院亚林所内的山地红壤按其体积 1:1 混合后, 在 170 °C 烘箱中灭菌 4 h, 冷却至室温后放入经灭菌的底部有孔的塑料杯中(300 g·杯⁻¹), 然后加入 100 mL 无菌水, 待水自然渗透 2 d 后备用。

1.3.4 试验设计 设 5 个处理组, 1 个对照组, 每组 16 个重复。

1.3.5 接种 将已鉴定并纯化的固氮菌分别接入 Döbereiner 无氮液体培养基中, 培养 24 h 后用离心法收集菌细胞, 再在收集到的菌细胞中加入 45 mL 无菌水和 5 mL Döbereiner 无氮液体培养基, 形成 50 mL 固氮菌悬浮液(每毫升约 10^8 个菌细胞)作为待接种菌液。将组培苗从培养瓶中取出, 用无菌水洗去根部培养基后在高锰酸钾溶液中消毒 5 min, 再用无菌水冲洗数次后放入装有湿沙土的塑料杯中, 在组培苗根部及周围土壤上滴加 2 mL 上述待接菌液, 然后覆盖大约 2 cm 厚的湿土。对照处理的接种方法基本相同, 但接种液在接种前已经高温、高压灭活。混合菌液为各菌液等体积混合。

1.3.6 苗木培养 培养方法见参考文献[8]。

1.3.7 生长指标测定 本试验中组培苗接种时间为 4 月初, 各项生长指标的测定于次年 1 月上旬进行。全 N 用凯氏定氮法测定, 其它指标用常规方法测定。

2 结果与讨论

2.1 竹根系固氮酶活性

通过多种方法及不同生境、不同季节等对几种丛生竹根系固氮酶活性进行调查测定。用直接法测定的几种丛生竹根系固氮酶活性及其和散生竹种的比较列于表 1。

表 1 几种丛生竹根系固氮酶活性(直接法测定)及其和散生竹种的对比

测定方法	竹种	样品总数/ 个	活性样品数/ 个	活性样品 比例/ %	最高活性/ [nmol(C ₂ H ₄) ·g ⁻¹ ·h ⁻¹]	平均活性/ [nmol(C ₂ H ₄) ·g ⁻¹ ·h ⁻¹]
直接 测定 法	丛 麻竹	48	40	83.3	20.50	4.78
	生 吊丝球竹	48	42	87.5	24.81	7.00
	竹 青皮竹	48	32	66.7	10.83	2.00
	粉丹竹	10	8	80.0	7.49	5.69
	马 甲竹	10	7	66.7	2.46	2.18
N_2 回充 法	散 毛竹	48	24	50.0	3.87	
	生 浙江淡竹	48	21	43.8	2.10	

注: 直接法测定为干根样品, 下同。

在前期研究中对浙江地区毛竹和浙江淡竹(*Phyllostachys meyeri* McClure)根系固氮酶活性的调查发现^[5], 毛竹和浙江淡竹根系用直接法测定时一般测不出固氮酶活性, 用 N_2 回充法测定时

有明显的固氮酶活性。而广东、广西等地的丛生竹根系用直接法测定基本上都能测出固氮酶活性,且固氮酶活性比较高。这说明散生竹根际可能是以厌氧性固氮菌为主,丛生竹根际可能有大量的好氧性固氮菌存在。本项目未对丛生竹进行 N_2 回充法测定,但从上面的结果已可以看出,南亚热带地区的丛生竹根系固氮酶活性一般要高于北亚热带地区的散生竹。而不同丛生竹种之间又以吊丝球竹为最高,麻竹次之。

以富集法测定的几种丛生竹根系固氮酶活性及其和散生竹种的比较列于表2。

表2 几种丛生竹根系固氮酶活性(富集法测定)及其和散生竹种的对比

竹种	样品总数/个	活性样品数/个	活性样品比例/%	固氮酶活性/[$nmol(C_2H_4) \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$]		
				平均	最高	
丛生竹	麻竹	96	96	100	275	978
	吊丝球竹	96	96	100	431	2 743
	青皮竹	96	96	100	169	915
	粉丹竹	15	12	80	188	397
	马甲竹	15	13	86	79	136
散生竹	毛竹	47	45	95.7	43.2	184.0
	浙江淡竹	30	27	90.0	40.4	160.0

注:富集法测定为鲜根样品,下同。

从表2可以看出以富集法测定的丛生竹种根系平均固氮酶活性远高于散生竹种,差异最高可达10倍;而丛生竹种中以吊丝球竹为最高,最高活性可达 $2 743 nmol(C_2H_4) \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ 。

不同生境条件下主要丛生竹种根系的固氮酶活性调查结果见表3。从表3可以看出竹子根系固氮酶活性明显地受生长环境的影响,各种生境中以河边自然生长的竹子根系固氮酶活性为最高,红壤施有机肥次之,沙质土较差。说明水分对根系固氮酶活性影响很大,施用有机肥可提高竹子根系的固氮酶活性,沙质土可能由于保水和养分条件较差不利于根系固氮。

表3 不同生境条件下几种丛生竹根系的固氮酶活性

竹种	生境	固氮酶活性/[$nmol(C_2H_4) \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$]	
		直接法	富集法
吊丝球竹	红壤坡地,自然生长(南宁)	5.26	156.70
	红壤坡地,施有机肥(南宁)	6.92	164.53
	河边,自然生长(南宁)	7.69	260.50
	沙质土,试验林(广州)	0	27.93
麻竹	红壤坡地,自然生长(南宁)	4.56	70.54
	红壤坡地,施有机肥(南宁)	4.95	505.55
	河边,自然生长(南宁)	5.33	651.27
	沙质土,试验林(广州)	0	29.68
青皮竹	红壤坡地,自然生长(南宁)	2.11	124.53
	沙质土,试验林(广州)	0	9.33
粉丹竹	红壤坡地,自然生长(南宁)	0.98	88.24
	河边,自然生长(南宁)	6.66	288.91
马甲竹	红壤坡地,自然生长(南宁)	2.19	91.35
	沙质土,试验林(广州)	0	67.26
绿竹	沙质土,试验林(广州)	0	5.83

不同季节测定的几种丛生竹根系的固氮酶活性列于表 4。

表 4 不同季节几种丛生竹的根系固氮酶活性(1994年)

nmol(C₂H₄)·g⁻¹·h⁻¹

竹种	2月		5月		8月		11月	
	直接法	富集法	直接法	富集法	直接法	富集法	直接法	富集法
麻竹	1.07	110.78	2.57	450.97	7.36	371.05	6.59	167.80
吊丝球竹	1.28	18.08	9.35	678.03	10.15	587.90	5.72	438.79
青皮竹	0.34	42.79	0.67	214.28	3.87	317.13	1.07	110.78

从表 4 可以看出竹子根系固氮酶活性具有明显的季节变化, 一般 8 月份较高, 2 月份较低, 说明高温有利于固氮菌繁殖和固氮。

2.2 竹根际固氮菌计数

利用 MPN-乙炔还原法对几种丛生竹根际固氮菌进行计数表明(见表 5): 在大多数情况下, 固氮菌数量从非根际土 → 根际土 → 根表 → 根内是急剧递增的, 并且越往内部根际效应越明显, 说明固氮菌具有明显的趋根性, 也就是说固氮菌和竹根之间确实具有松散的联合作用。

表 5 不同生境条件下几种丛生竹根际固氮菌数及根际效应

竹种	生境	根际土固氮菌/ (菌细胞个数·g ⁻¹)		根表固氮菌/ (菌细胞个数·g ⁻¹)		根内固氮菌/ (菌细胞个数·g ⁻¹)	
		根际效应	根际效应	根际效应	根际效应		
吊丝球竹	红壤坡地, 自然生长(南宁)	9.0 × 10 ⁴	2.8 × 10	3.6 × 10 ⁷	1.1 × 10 ⁴	3.6 × 10 ⁹	1.1 × 10 ⁶
	红壤坡地, 施有机肥(南宁)	3.0 × 10 ⁶	9.4 × 10 ²	7.0 × 10 ⁶	2.2 × 10 ³	2.1 × 10 ⁹	6.5 × 10 ⁵
	河边, 自然生长(南宁)	2.9 × 10 ⁸	9.1 × 10 ⁴	1.1 × 10 ¹⁰	3.4 × 10 ⁶	3.7 × 10 ⁹	1.2 × 10 ⁶
	沙质土, 试验林(广州)	1.1 × 10 ⁴	2.8 × 10 ²	1.1 × 10 ⁴	2.8 × 10 ²	3.0 × 10 ³	9.4 × 10
麻竹	红壤坡地, 自然生长(南宁)	9.0 × 10 ⁵	8.2 × 10 ²	8.2 × 10 ⁶	2.6 × 10 ³	5.0 × 10 ⁹	1.6 × 10 ⁶
	红壤坡地, 施有机肥(南宁)	5.3 × 10 ⁶	2.8 × 10 ³	2.8 × 10 ⁸	8.8 × 10 ⁴	4.4 × 10 ⁹	1.4 × 10 ⁶
	河边, 自然生长(南宁)	2.6 × 10 ⁵	8.1 × 10	1.4 × 10 ⁹	4.4 × 10 ⁵	5.0 × 10 ⁹	1.6 × 10 ⁶
	沙质土, 试验林(广州)	7.0 × 10	1.75	2.0 × 10 ⁴	5.0 × 10 ²	3.5 × 10 ³	1.1 × 10 ²
青皮竹	红壤坡地, 自然生长(南宁)	1.5 × 10 ⁴	4.7	4.6 × 10 ⁵	1.4 × 10 ²	5.8 × 10 ⁵	1.8 × 10 ²
	沙质土, 试验林(广州)	1.2 × 10 ³	3.0 × 10	4.5 × 10 ⁴	1.1 × 10 ³	7.5 × 10 ²	1.9 × 10
粉丹竹	红壤坡地, 自然生长(南宁)	1.5 × 10 ⁴	5.3	3.6 × 10 ⁵	1.1 × 10 ²	5.0 × 10 ⁵	1.6 × 10 ²
	河边, 自然生长(南宁)	1.7 × 10 ⁸	5.3 × 10 ⁴	5.0 × 10 ⁹	1.7 × 10 ⁶	5.0 × 10 ⁹	1.6 × 10 ⁶
马甲竹	红壤坡地, 自然生长(南宁)	3.0 × 10 ⁴	9.4	1.8 × 10 ⁷	5.6 × 10 ³	1.0 × 10 ⁷	3.1 × 10 ³
	沙质土, 试验林(广州)	1.5 × 10 ³	4.7 × 10	1.6 × 10 ⁴	4.0 × 10 ²	7.5 × 10 ⁴	1.9 × 10 ³
绿竹	沙质土, 试验林(广州)	2.0 × 10 ³	5.0 × 10	2.0 × 10 ⁴	5.0 × 10 ²	3.0 × 10 ³	7.5 × 10
非根际土	红壤(南宁)	3.2 × 10 ³					
	沙质土(广州)	4.0 × 10					

注: 测定样品为干土或干根, 表 6 同。

对不同季节、根际不同部位固氮菌进行计数表明(见表6),丛生竹根际的固氮菌数具一定的季节变化,夏季高冬季低,但因广东和广西两地的冬季并不是非常寒冷,故冬季固氮菌数量也不是很低。

表6 不同季节几种丛生竹根际不同部位的固氮菌数(1994年)

竹种	根际部位	菌细胞个数·g ⁻¹			
		2月	5月	8月	11月
麻竹	根际土	1.2×10 ⁴	4.7×10 ⁵	9.0×10 ⁵	5.7×10 ³
	根表	6.2×10 ⁵	7.5×10 ⁶	8.2×10 ⁶	6.9×10 ⁴
	根内	6.2×10 ⁵	7.5×10 ⁵	5.0×10 ⁹	1.2×10 ⁶
吊丝球竹	根际土	5.9×10 ⁴	4.0×10 ⁶	9.0×10 ⁶	2.6×10 ⁶
	根表	3.3×10 ⁴	5.0×10 ⁶	3.6×10 ⁷	1.7×10 ⁷
	根内	8.7×10 ³	5.0×10 ⁶	2.1×10 ⁹	8.1×10 ⁶
青皮竹	根际土	9.5×10 ²	5.1×10 ²	1.7×10 ²	2.0×10 ³
	根表	1.6×10 ³	3.2×10 ³	3.6×10 ⁵	7.6×10 ³
	根内	1.6×10 ³	3.2×10 ³	5.0×10 ⁵	1.6×10 ⁴

2.3 固氮菌接种竹子组培苗试验

2.3.1 接种固氮菌对组培苗成活的影响

从组培试管中选取植株和根系生长基本一致的单株麻竹组培苗,于1999年4月移入土壤中并同时接种固氮菌,在人工环境下培养至次年1月调查成活率。结果见图1。

从图1可以看出对照组的成活率只有31.3%,而混合菌接种组的成活率最高,为87.5%,其它处理组均为68.8%,接菌处理组成活率均明显高于对照组。

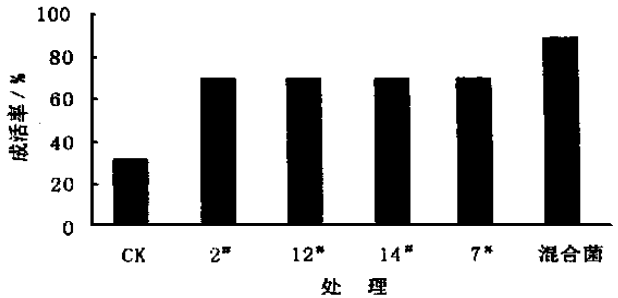


图1 接种固氮菌对麻竹组培苗成活率的影响

2.3.2 接种固氮菌对植株含氮量的影响

从图2可以看出接菌处理的麻竹组培苗含氮量均高于对照组,对照组的含氮量为13.81 g·kg⁻¹,而14[#]菌和混合菌液处理的含氮量最高,可分别达到21.25、21.23 g·kg⁻¹。说明固氮菌在一定程度上可能为植株补充和提供N素。但是,为了获取更有说服力的证据,还需做进一步的N¹⁵标记试验。

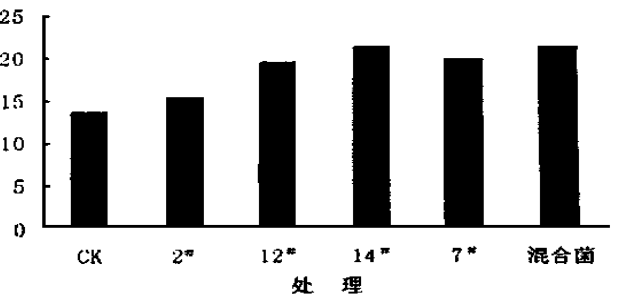


图2 接菌处理对麻竹植株含氮量的影响

2.3.3 接种联合固氮菌对组培苗生长的影响 麻竹组培苗接菌后经过近 8 个月的生长, 对其总干生物质量、地上部分干质量、地下部分干质量进行调查测定和统计分析, 结果见表 7。

利用 PLSD 统计结果表明, 14[#]、7[#] 菌和混合菌处理组植株总干生物质量、地上部分干质量、地下部分干质量等指标与对照组相比均达到极显著水平。2[#] 菌和 12[#] 菌处理组苗木各项指标虽也具有差异, 但统计结果不显著。

表 7 接种固氮菌对麻竹组培苗生长的影响

处 理	植株总干生物质量		地上部分干质量		地下部分干质量	
	mg·株 ⁻¹	增长/ %	mg·株 ⁻¹	增长/ %	mg·株 ⁻¹	增长/ %
CK	85.6	0	39.8	0	45.6	0
2 [#]	106.2	24.1	45.8	15.1	60.8	33.3
12 [#]	130.2	52.1	73.0	83.4	59.2	29.8
14 [#]	230.6 [*]	169.4	120.4 [*]	202.5	110.6 [*]	142.5
7 [#]	214.6 [*]	150.7	107.2 [*]	169.3	107.5 [*]	135.7
混合菌	274.6 [*]	220.8	136.4 [*]	242.7	138.4 [*]	203.5

注: 数据为各处理组平均值; * * 表示与对照比具 0.01 显著差异。

3 小 结

丛生竹主要分布在热带和南亚热带, 它和散生竹相比在生长特点和生物学特性上有明显差异, 一般热带植物由于常年处于温暖气候较其它地带的植物具有更强的固氮优势, 从本项调查可以看出丛生竹不仅具有固氮能力, 而且固氮能力较散生竹更高。

丛生竹的联合固氮能力除受竹种本身生物学特性制约外, 还受到许多环境因子的影响。从本项调查来看不同竹种中以吊丝球竹和麻竹的固氮酶活性较高。而环境因子中水分、温度、养分(包括有机养分)等均对丛生竹的固氮能力产生影响, 并有待进一步研究。

目前丛生竹组培苗造林规模不断扩大, 通过对组培苗接种固氮菌, 提高苗木成活率并促进苗木生长, 在生产中具有重要的研究和应用价值。

参考文献:

- [1] Bodley R M, Dohereiner J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent results and perspectives for future research [J]. Plant and Soil, 1988, 108: 53~ 65.
- [2] Chalk P M. The contribution of associative and symbiotic nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of nonlegumes [J]. Plant and Soil, 1991, 132: 29~ 39.
- [3] Tribikram B D H. Yield responses of Nepalese spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars to inoculation with *Azospirillum* sp. of Nepalese origin[J]. Plant and Soil, 1993, 151: 67~ 721.
- [4] 李久蒂, 安千里. 联合固氮研究进展[J]. 植物学通报, 1997, 14(3): 14~ 21.
- [5] 顾小平, 吴晓丽. 毛竹及浙江淡竹根际联合固氮的研究[J]. 林业科学研究, 1994, 7(6): 618~ 623.
- [6] Dohereiner J, Day J M. Proceedings of the 1st International symposium on nitrogenization[M]. University of Washington Press, 1976.
- [7] 许光辉, 郑洪元. 土壤微生物分析方法手册[M]. 北京: 农业出版社, 1986.
- [8] 顾小平, 吴晓丽. 接种联合固氮菌对毛竹实生苗生长的影响[J]. 林业科学研究, 1999, 12(1): 7~ 12.

Study on Associated Nitrogen Fixation of Several Sympodial Bamboo Species

GU Xiao-ping, WU Xiao-li, WANG Yang-dong

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

Abstract: Root nitrogen fixing activities of several sympodial bamboo species, namely *Dendrocalamus latiflorus*, *Dendrocalamopsis beecheyana*, *Bambusa textilis*, *Bambusa chungii*, *Bambusa tulda*, *Dendrocalamopsis oldhami* were investigated and tested. It is shown that using direct testing methods the root nitrogen fixing activity of first five bamboo species above mentioned can reach to 20.50, 24.81, 10.83, 7.49, 2.46 $\text{nmol}(\text{C}_2\text{H}_4) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ respectively, when using enrichment culture methods the roots nitrogen fixing activity of first five bamboo species can reach 275, 431, 169, 188, 79 $\text{nmol}(\text{C}_2\text{H}_4) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ respectively. The root nitrogen fixing activity of bamboo species grown in different environments and different seasons were investigated and tested. It is shown that sufficient water supply, suitable high temperature and applying organic fertilizer can moderately promote root nitrogen fixing activity. When counting the amount of nitrogen fixing bacteria at different rhizosphere position, it is shown from non-rhizosphere soil, rhizosphere soil, root surface to root inner, the nitrogen fixing bacteria increased sharply and from outside to inside the rhizosphere effect are more and more obviously. Inoculating nitrogen fixing bacteria ($2^\#$, $12^\#$, $14^\#$, $7^\#$, and mixing bacteria species) to tissue culture younglings of *Dendrocalamus latiflorus*, it is shown that inoculating nitrogen fixing bacteria can promote younglings survival rate and plant nitrogen content. $14^\#$, $7^\#$ and mixing nitrogen fixing bacteria can promote the biomass of tissue cultured younglings remarkable.

Key words: sympodial bamboo; rhizosphere; associated nitrogen fixation; inoculating