

某些生物因子对苕子根瘤菌菌剂和 土著根瘤菌竞争结瘤的影响

姚惠琴 朱增炎 曹景勤 许月蓉 陈碧云

(中国科学院南京土壤研究所)

早在本世纪三十年代,国外已发现根瘤菌竞争结瘤的现象,并对三叶草根瘤菌品系之间的竞争结瘤进行了系统的研究。认为同时接种两个不同的根瘤菌品系,它们的结瘤率是取决于各个品系入侵竞争能力的大小,并引出了竞争优势种的概念。之后,随着免疫学、遗传标记和抗药标记等方法的相继应用,对竞争结瘤问题进行了深入的研究。六十年代初,有人用黄萎病诱发菌株研究了大豆有效菌株之间的竞争关系,指出混合菌剂中各个菌系的菌数比例与结瘤率不一致,有的菌株在混合菌剂中所占比例虽小,但结瘤率很高^[1]。接着又研究了三叶草根瘤菌的接种菌与土著菌之间的竞争关系,经过定量研究认为要提高接种菌株的结瘤率,就要根据土著菌数来确定有效菌剂的施用量。每粒种子上附着的菌剂菌数与土著菌数要有一定的比例,才能保证菌剂的有效性^[2-4]。

在经常种植豆科植物的老区土壤中,多少存在土著的根瘤菌。在这种土壤中施用菌肥,由于根瘤菌菌系之间的竞争结瘤,往往使接种菌株的入侵结瘤率降低。作为一个接种菌株,只有在取得结瘤优势的前提下,才能发挥它的菌剂作用,否则,就会影响菌剂的使用效果。所以,根瘤菌竞争结瘤的研究,对合理施用菌肥,选育优良菌株,发挥豆科植物最大共生固氮效益等方面都有重要的现实意义。在前人工作的基础上,本文对影响苕子根瘤菌竞争结瘤的几个生物因子进行了初步观察与研究。

一、材料与方 法

(一) 材 料

供试苕子根瘤菌菌系: S-7130,耐硫酸盐链霉素突变菌株,菌株的耐药量为每公升500毫克;6034,该菌株在葡萄糖酵母膏刚果红培养基上,具有明显的菌落特征,培养七天后,菌落中央呈不透明乳白色,四周透明,容易辨认;2-12,竞争结瘤强、固氮酶活性高的优良菌株。

供试寄主植物:毛苕(*Vicia villosa*);光苕(*Vicia villosa* var.);箭舌豌豆(*Vicia sativa*);美国豌豆(*Pisum sativum*. L.)。

(二) 方 法

1. 砂培 取400毫升高型烧杯,内装石英砂1斤,干热灭菌(180℃)2小时,冷却后加无氮营养液90毫升。分别播种经表面消毒和催芽的毛苕、光苕种子。每盆3穴,每

穴 2 株,定苗后每穴加接种菌 S-7130、6034、2-12 的菌液各 0.3 毫升,每穴共加 0.9 毫升。各个菌液含菌数每毫升约为 2 亿。4 月 2 日播种,5 月 27 日收获,生长期 55 天。收获后,用 0.1% 升汞液将带瘤的根进行表面消毒,并将根瘤逐个编号,摘取每个根瘤压碎,将少量瘤汁分别涂布于含药与不含药平板上,培养 5 天,凡是在含药平板上出现菌落则为耐药菌株 S-7130 所形成的根瘤,在不含药平板上出现的菌落,按其菌落特征可辨认出 6034、2-12 菌株所形成的根瘤,并测得各个菌系的结瘤率,以此代表各菌系的竞争结瘤能力。

2. 土培试验 盆栽土壤采自淮阴农科所大田。所采的两个土样除含土著苕子根瘤菌数不同外,土壤性质相似,肥力水平相近,同属黄泛冲积土。第一个土样,含土著菌数每克干土约为 3200—4000 个(前后 2 次测定结果)。第二个土样,含土著苕子根瘤菌约为每克干土 50 个。另取土著菌多的上述土壤灭菌、稀释,使其含菌数约为每克干土 4 个。取上述含菌数不同的土壤进行盆栽试验,每盆装土三市斤,播种经催芽拌菌(S-7130,6034)的毛苕种子,每盆三穴,每穴定苗三株。3 月 14 日播种,5 月 15 日收获并测定各菌的结瘤率。

3. 田间试验 布置在江苏淮安黄泛冲积土上,土著根瘤菌约每克干土 30000 个。用含菌数约每毫升 12 亿的 S-7130 菌液 10 毫升,与粉碎的干土作吸附剂,拌种后播种。试验寄主作物有光苕、毛苕、箭舌豌豆(B_{65})、箭舌豌豆(大荚)、美国豌豆、甜豌豆。作物生长二个月后收获,用含药平板测定菌系 S-7130 的结瘤率。

4. 耐药(链霉素)标记菌株结瘤率的测定 取一定数量的植株,剪去地上部分,将根系用清水洗净,在 0.1% 升汞液中浸泡 1—2 分钟,然后用无菌水洗 5—6 次。用无菌操作逐个地将根瘤取下,挤碎,取部分瘤汁涂布于含药平板上,涂布面积约为 0.2 平方厘米。培养 4—5 天,若涂布点上出现根瘤菌菌落,表明该根瘤为耐药菌株入侵形成。

$$\text{耐药标记菌结瘤率} = \frac{\text{耐药根瘤数}}{\text{测定总根瘤数}} \times 100\%$$

二、结果与讨论

(一) 寄主植物对根瘤菌竞争结瘤的影响

根瘤菌的竞争结瘤除受环境条件的影响外,与寄主植物有密切的关系^[4-6]。为了探讨寄主植物对根瘤菌不同品系的竞争结瘤的影响,分别进行了田间试验和室内砂培试验。在田间试验中测定了菌剂菌株 S-7130 在甜豌豆、美国豌豆、毛苕、光苕、箭舌豌豆(B_{65} 、大荚)等寄主植物上的结瘤率,结果见表 1。

由表 1 可见,菌系 S-7130 在寄主植物的不同种上的结瘤率有明显的差异。如菌系在箭舌豌豆(B_{65})上的结瘤率最高分别为 80.7%、84.2%。其次是苕子,结瘤率分别为 46.3%、49.3%。豌豆的结瘤率最低,分别为 32.7%、26.0%。同一菌系在不同种寄主作物上出现的不同结瘤率说明了寄主植物对菌系入侵结瘤具有明显的选择作用。但是,同一寄主植物的不同品种,对各个菌系的入侵结瘤选择就不明显,如 S-7130 在光苕上结瘤率为 46.3%,在毛苕上为 49.3%,箭舌豌豆(大荚)的结瘤率为 80.7%,箭舌豌豆 B_{65} 为 84.2%,甜豌豆的结瘤率为 32.7%,而美国豌豆为 26.0%。为了进一步说明寄主植物的不同品种对

表 1 菌系 S-7130 在不同寄主植物上的竞争结瘤率*

Table 1 The nodulation competition of streptomycin resistant strain S-7130 on different host plants in soil

| 寄主植物 Host plant | 分析瘤数 Nodules analyzed | S-7130 的结瘤率(%) Nodulation rate of S-7130 |
|--|--------------------------|---|
| 箭舌豌豆(大荚) <i>Vicia sativa</i> (big pod) | 78 | 80.7 |
| 箭舌豌豆 (B ₆₃) <i>Vicia sativa</i> B ₆₃ | 70 | 84.2 |
| 毛 苕 <i>Vicia villosa</i> | 77 | 49.3 |
| 光 苕 <i>Vicia villosa</i> var. | 82 | 46.3 |
| 甜 豌豆 <i>Pisum sativum</i> . L (Sweet pea) | 58 | 32.7 |
| 美国豌豆 <i>Pisum sativum</i> . L (America pea) | 50 | 26.0 |

* 在种植苕子的自然土壤中没有出现耐药菌株 S-7130。

* The strain S-7130 was not found in natural soil which *Vicia villosa* was planted.

表 2 菌系 S-7130, 6034, 2-12 在不同品种的寄主植物上的结瘤率

Table 2 Nodulation competition of strains S-7130, 6034, 2-12 on different varieties of host plant

| 寄主植物品种 Varieties of host plant | 分析瘤数 Nodules analyzed | 结瘤率 (%) Nodulation rate | | |
|-----------------------------------|--------------------------|----------------------------|------|------|
| | | S-7130 | 6034 | 2-12 |
| 毛 苕 <i>Vicia villosa</i> | 91 | 13 | 2 | 86 |
| 光 苕 <i>Vicia villosa</i> var. | 60 | 20 | 8 | 73 |

菌系的选择作用,用砂培试验观察了光苕、毛苕对三个根瘤菌品系 S-7130、6034、2-12 的入侵结瘤的影响,测得各菌系的竞争结瘤率(表 2)。从表 2 可看出,菌系 6034、S-7130、2-12 对苕子不同品种光苕、毛苕来说其入侵力强弱趋势基本相近,菌系 2-12 入侵力最强,其次 S-7130、6034 最差。结果显示了同一寄主植物的不同品种对菌系的入侵选择性较弱。

综上所述,无论是同一菌系对不同寄主的竞争结瘤差异,还是不同菌系对同一寄主的竞争结瘤差异都说明了寄主植物对根瘤菌的入侵有明显的选择性。虽然,在豌豆根瘤菌互接种内,某些寄主植物的不同品种,例如光苕、毛苕对根瘤菌入侵选择性较弱,但寄主植物对菌系入侵的选择性还是存在的。由于这种选择性的存在,使得按特定寄主植物选择菌株的选育方法,成为获得优良菌株的正确途径。

此外,当几个菌系混合接种时,各个菌系的结瘤率是随着混合菌系的组成而变化的,例如菌系 S-7130 与 6034 混合接种后,S-7130 的结瘤率为 46.3%;当 S-7130 与 2-12 混合接种后,S-7130 的结瘤率就下降为 19.3%。由此看来,一个菌系对寄主植物

表 3 含土著根瘤菌数不同的土壤对菌系 S-7130, 6034 竞争结瘤的影响

Table 3 Effect of the amount of native R. L. in soil on nodulation competition of strain S-7130, 6034

| 土著菌数* Native R. L. cells/dry soil (g) | 分析瘤数 Nodules analyzed | 结瘤率(%) Nodulation rate |
|--|--------------------------|---------------------------|
| S-7130 | | |
| 3200 | 80 | 22.0 |
| 4000 | 90 | 20.5 |
| 50 | 80 | 48.7 |
| 4 | 102 | 50.7 |
| 6034 | | |
| 3200 | 80 | 10.7 |
| 50 | 80 | 46.5 |

* 土壤含苕子根瘤菌数按间接“植物感染”计数法测定。

表 4 接菌对盆栽植株毛苕干重和固氮强度的影响

Table 4 Effect of inoculation on dry weight of above ground parts of plant and the intensity of N-fixation

| 接种菌号 No. of inoculants | 结瘤率(%) Nodulation rate | 固氮酶活性* (毫微克分子 C ₂ H ₄ /分钟/盆) Nitrogenase activity (nM C ₂ H ₄ /min/pot) | 植株干重(克/每盆) Dry weight (g/pot) |
|---------------------------|---------------------------|--|----------------------------------|
| S-7130 | 48.7 | 15.8 | 2.08 |
| 6034 | 46.5 | 18.6 | 2.36 |
| CK | — | 10.8 | 2.26 |

* 采用上海植生所“固氮研究中乙炔还原定量测定简易法”测定每盆植株根瘤的固氮酶活性。

入侵力的大小和与其混合接种的其他菌系入侵竞争能力有关。一个菌系对某一寄主的结瘤率不是固定不变的。

(二) 土著根瘤菌数量与菌系 S-7130、6034 竞争结瘤的关系

由于老区土壤有土著根瘤菌存在,加之土著菌对环境的适应能力和竞争结瘤能力都较外来菌株强。所以,在这种土壤中施用菌肥,接种菌株的结瘤率普遍都因土著菌的竞争而下降。入侵竞争强的接种菌株,受上述影响小,结瘤率下降少。菌剂的施用效果与土著菌数量有关。为了阐明菌系竞争结瘤与土著菌数量的关系,我们采用了含土著根瘤菌数不同的土壤,对菌系 S-7130、6034 竞争结瘤的影响进行了盆栽试验。结果列于表 3。菌系 S-7130 试验二次,重复结果基本相同。含土著菌数高的土壤约为每克干土 3200—4000 个。接种 S-7130 后结瘤率各为 22.0% 和 20.5%。土著菌数量低的土壤,每克干土约为 50 个,接种 S-7130 后,结瘤率为 48.7%。土壤中的土著菌数由每克干土 4000 个稀释至 4 个时, S-7130 的结瘤率就上升到 50.7%。菌系 6034 在土著菌数高的土壤上的结瘤率为 10.7%,而在土著菌数低的土壤上的结瘤率就上升至 46.5%。其结瘤竞争的趋

势与 S-7130 相同, 这些结果说明, 在土著菌数不同的土壤中, 菌系 S-7130、6034 的竞争结瘤率皆随土著菌数的减少而增加。所以, 在土著菌数少的土壤中, 由于接种菌株的竞争结瘤较高, 施用菌剂的效果就比较明显。据报道, 一个菌系的竞争结瘤率与它的固氮强度并不成正相关^[5,2], 从表 4 结果可知, 虽然, 菌系 S-7130、6034 在含土著菌少的土壤中, 它们的结瘤率有所提高, 但植株干重和固氮强度与不接种对照相比, 虽然固氮强度比对照高, 但干重反比对照少, 或与其相近。这说明接种菌系的固氮能力并不优于土著的根瘤菌。为要发挥共生固氮的最大效益, 竞争结瘤能力和共生固氮强度是选育优良菌种的两个必要条件。两者不能缺一。

(三) 接种量对提高接种菌株竞争结瘤的效果

澳大利亚 J. M. Vincent 认为在土壤中, 一个菌系的结瘤率虽然随土著根瘤菌含量增加而减少, 但有效菌系的结瘤率随接种量增加而提高。本试验也已证明, 土著根瘤菌的数量是决定接种菌株入侵结瘤率高低的一个重要因素, 那末在盆栽试验条件下, 有土著根瘤菌的土壤, 增加菌剂用量能否提高接种菌株的入侵结瘤率? 若要使接种菌株达到一定数量的结瘤数, 接种菌数与土著菌数之比应该是多少? 为了阐明这些问题, 我们进行了如下试验。称取含菌数每克土壤约为 4000 个的新鲜一号土壤, 并加入耐药标记菌 S-7130 的菌悬液若干(比浊法测数), 然后将菌液与土壤均匀混合, 制成每克干土中菌系 S-7130 与土著菌数量之比各为 1:1; 100:1; 1 万:1; 100 万:1 的四个不同处理的土壤进行毛苕盆栽试验, 生长四十天后收获, 用耐药平板测得各处理中菌系 S-7130 的入侵结瘤率(表 5)。

表 5 菌系 S-7130 与土著根瘤菌不同数量之比对其竞争结瘤的影响

Table 5 The effect of the ratio of S-7130 to native R. L. on nodulation competition of S-7130

| 每克干土中两菌的比例 Ratio of S-7130 to native R. L./dry soil (g) | | 每克干土的菌数* R. L. cells/dry soil (g) | | 分析瘤数 Nodules analyzed | 结瘤率(%) Nodulation rate of S-7130 |
|---|---------------------|--------------------------------------|---------------------|--------------------------|--|
| S-7130 | 土著菌 Native R. L. | S-7130 | 土著菌 Native R. L. | | |
| 1 | 1 | 4000 | 4000 | 269 | 0 |
| 10 ² | 1 | 4000 | 40 | 81 | 0 |
| 10 ⁴ | 1 | 4×10 ⁷ | 4×10 ³ | 206 | 41 |
| 10 ⁶ | 1 | 4×10 ⁷ | 4×10 ¹ | 250 | 77 |

* 同表 3。

表 5 结果说明, 当每克土壤中菌系 S-7130 与土著根瘤菌两者数量之比为 1:1 和 100:1 时, 菌系 S-7130 的结瘤率皆为 0。当土壤中 S-7130 与土著根瘤菌数之比达到 1 万:1 时, S-7130 结瘤率上升到 41.0%; 当 S-7130 与土著菌数量之比为 100 万:1 时, S-7130 的结瘤率上升到 77.0%。显然, 当土壤的土著菌数保持不变情况下, 菌系 S-7130 的入侵结瘤率是随 S-7130 施用量的增加而增加的。而且只有在 S-7130 的数量远远超过土著菌的 1 万、100 万倍时, S-7130 的入侵率才能分别达到 41.0%、77.0%。盆栽试验结果说明, 采用菌剂与土壤均匀混合的接种方法, 接种菌株的竞争结瘤率可随菌剂施用量的增加而增加。但是与上述盆栽相同条件下, (土著菌数每克土壤为 4000 个), 改用

S-7130 泥炭菌剂穴施, 每穴菌数达 3 亿, 每穴三棵植株, 测得 S-7130 的入侵率仅为 14.2%。导致穴施菌剂结瘤率降低的原因, 可能是由于施加的菌剂多集中于种子附近, 而根瘤菌在土中垂直移动距离很小, 加之根系生长速度较快, 使根系附近的菌剂菌数随着根的伸长而减少, 菌剂菌数与土著根瘤菌的比数减少, 从而减低了菌剂菌株的入侵率。经测定, 由菌剂菌株所形成的瘤数中有 83% 的瘤着生于种子以下 1—2 公分根区内, 17% 的瘤着生于种子以下 3—7 公分根区内。这表明随着作物根系的伸长, 菌剂入侵机会就减少。当采用菌剂与土壤均匀混合的接种方式, 由于在寄主根系所到之处, 土壤土著菌数与菌剂菌数保持一定比例, 所以接种菌株的入侵结瘤率可随菌剂使用量增加而提高。由此看来, 当土壤中有较多土著根瘤菌时, 在盆栽条件下, 用土壤接种方法, 菌剂菌株的结瘤率随菌剂用量的增加而提高; 而用拌种或穴施的接种方法, 虽加大菌剂用量, 却很难提高菌剂菌株的结瘤率。

接种菌株的竞争结瘤率虽然受土著根瘤菌数的影响, 有时, 在两个含土著根瘤菌数不同的同一类型的土壤上, 菌系 S-7130 对同一寄主的竞争结瘤率却相差不大。如淮安土样土著菌数为每克干土 3.17 万, 淮阴土样土著菌数每克干土为 0.32 万, 接种菌株 S-7130 在毛苕上的结瘤率淮安土样为 47.5%, 淮阴土壤为 48.7%。可见, 在自然条件下, 除了土著菌数和寄主外, 还因地区、土壤的不同等其他因子而影响着菌系的竞争结瘤。

参 考 文 献

- [1] Holland, A. A., 1970: Competition between soil- and seed-borne rhizobium trifolii in nodulation of introduced trifolium subterraneum. *Plant and Soil*. 32: 293—302.
- [2] Nicol, H. and Thornton, H. G., 1941: Competition between related strains of nodule bacteria and its influence on infection of the legume host. *Proceeding of the Royal Society of Lond Series B Biological Science* 130: 32—59
- [3] Labandera, C. A., and Vincent, J. M., 1975: Competition between an introduced strain and native Uruguayan strains of rhizobium trifolii. *Plant and Soil*. 42: 327—347
- [4] Vincent, J. M. and Waters, L. M., 1953: The influence of the host on competition amongst clover root-nodule bacteria. *The Journal of General Microbiology*. 9: 357—370
- [5] Read, M. P., 1953: The establishment of serologically identifiable strains of rhizobium trifolii in field soils in competition with the native microflora. *The Journal of General Microbiology*, 9: 1—14.
- [6] Johnson, H. W. and Erdman, L. W., 1961: Competition between bacterial strains effecting nodulation in soybeans. *Soil. Sci. Soc., Amer. Proc.*, 25: 105—108.

INFLUENCE OF SOME BIOLOGICAL FACTORS ON THE COMPETITION OF NODULATION OF VETCH BETWEEN INOCULANTS AND INDIGENOUS STRAINS OF RHIZOBIA

Yao Huiqin, Zhu Zengyan, Cao Jingqin, Xu Yuerong and Chen Biyun
(*Institute of Soil Science, Academia Sinica, Nanjing*)

Summary

This article deals with some biological factors affecting the competition of nodulation between different strains of *Rh. leguminosarum* on vetch. The results are summarized as follows:

1. Nodulation competition of *Rhizobium* is mainly affected by the host plant. It is shown that host plants are quite susceptible to definite strains of *Rhizobium*, either in the case of a definite strain infecting different species of plant or in the case of various strains infecting the same species of host plant. And, the susceptibilities of the *Rhizobium* to different species of host plant are more sensitive than that to the varieties of host plant.
2. Rate of nodulation of the inoculant is decreased with the increase of the amount of native strains in soil.
3. Rate of nodulation is increased with the increase of the amount of inoculant applied in soil where native strains are populated. But, it is not true by seed inoculation under the same soil condition.