

钙磷对酸铝土壤中苜蓿根瘤菌迁移定殖和群体感应的影响*

张磊^{1†} 王晓锋^{1,2} 罗珍¹ 刘晓燕¹ 吴先勤¹ 付莉¹ 蔚建军¹

(1 西南大学资源环境学院, 重庆 400716)

(2 重庆大学资源及环境科学学院, 重庆 400044)

摘要 采用分室(内、外室)培养法,以紫花苜蓿及其耐酸根瘤菌 91522 为材料,在酸性土壤(pH4.45)中额外补充 Al^{3+} 至中度铝毒水平,从培养装置根箱外接种,探讨了补充 Ca^{2+} 、P 后,耐酸苜蓿根瘤菌在酸性土壤上的存活、迁移以及群体感应的变化动态。结果表明,补充 $5 \text{ mmol kg}^{-1} \text{Ca}^{2+}$ 处理的土壤根瘤菌的数量在 97 d 种植期内均显著高于对照(Ca0P0,即无 Ca^{2+} 无 P 处理), $\text{Ca}^{2+} 5 \text{ mmol kg}^{-1} + \text{P} 0 \mu\text{mol kg}^{-1}$ 处理近根区(距苜蓿植株根 1~2 cm)土壤最大根瘤菌数量为同期对照的 6.15 倍;在此基础上补充 P 后根瘤菌的数量进一步增加,“ $\text{Ca}^{2+} 5 \text{ mmol kg}^{-1} + \text{P} 4 \mu\text{mol kg}^{-1}$ ”处理近根区最大根瘤菌数量为同期对照处理的 9.40 倍。因此推断 Ca^{2+} 和 P 的上述作用存在交互效应。施加 Ca^{2+} 、P 能够显著提高土壤中根瘤菌群体感应物质 N-酰基高丝氨酸内酯衍生物(N-acyl-homoserine actones, AHLs)的含量,且 $\text{Ca}^{2+} 5 \text{ mmol kg}^{-1}$ 效果好于 $\text{Ca}^{2+} 10 \text{ mmol kg}^{-1}$ 处理。根瘤菌数量在远根区(距苜蓿植株根 6~8 cm)与近根区变化规律一致,即接种 1 周后根瘤菌数量由远根区向近根区逐渐增加,接种后 30 d 内达到最高值,之后数量下降并趋于稳定。但近根区根瘤菌数量和 AHLs 含量均高于远根区,说明宿主根际微环境也能够影响根瘤菌数量和群体感应。初步认为,酸性有铝土壤上补充 $\text{Ca}^{2+} 5 \text{ mmol kg}^{-1}$ 和 P $30 \mu\text{mol kg}^{-1}$ 对耐酸根瘤菌的存活、迁移和群体感应有良好的改善效果。该处理最终显著地增强了对酸性土壤极为敏感的苜蓿植株的耐酸铝胁迫能力,较对照显著($p < 0.05$)改善了酸铝胁迫下苜蓿的植株根鲜重(为对照的 4.67 倍)、地上部鲜重(3.10 倍)、含氮量(2.47 倍)和根瘤数(14.74 倍)等农艺性状。

关键词 酸铝土壤;苜蓿根瘤菌;钙磷交互效应;群体感应;迁移定殖

中图分类号 S182 **文献标识码** A

全世界 50% 以上的耕地和潜在可耕地属于酸性土壤,中国在 2000 年初酸性土壤面积就已经达到 $2.03 \times 10^7 \text{ hm}^2$, 占全国土地总面积的 21%^[1]。在我国南方大部分地区,酸雨分布广泛,加剧了土壤的酸化进度,严重影响南方种植业和相关产业的发展。随着土壤 pH 下降,铝离子从硅酸盐或氧化物中释放出来,对作物产生毒害作用^[2],成为酸性土壤上作物减产的重要原因。紫花苜蓿(*Medicago sativa* L., 俗称 alfalfa)是一种营养丰富的豆科牧草,具共生固氮能力,根系非常发达,能有效防止雨水的冲刷,是理想的水土保持植物^[3]。近年来,由于国内市场对苜蓿的需求,我国已经由苜蓿出口国变为苜蓿进口国(http://bbs.jrj.com.cn/doldmsg/5_

84146568.html),在“退耕还林还草”和“南种北引”等政策扶持下,扩大苜蓿在南方的种植已被列入国家重大规划项目。但是,紫花苜蓿是对酸性土壤条件最为敏感的植物之一^[4],酸性土壤的铝毒胁迫限制了苜蓿的北草南引。因此,有必要建立高效耐酸铝的豆科植物-根瘤菌共生体系,并结合物理化学手段,提高苜蓿耐受酸性土壤及其铝毒胁迫的能力。

接种高效根瘤菌是提高紫花苜蓿产量的最重要的方法之一^[5]。张琴等研究表明,接种耐酸根瘤菌能够提高苜蓿在酸性条件下的产量、结瘤数和高效固氮^[6]。然而,土壤酸化导致的铝和锰过量、钙和磷不足恶化了根瘤菌的存活和繁殖,影响结瘤过程、根瘤功能及寄主植物的生长,限制了苜蓿的高

* 国家自然科学基金项目“钙对酸性土壤中苜蓿-根瘤菌体系群体感应及固氮性能的影响”(编号:30871597)资助

† 通讯作者, E-mail: zhanglei03@aliyun.com

作者简介:张磊(1967—),女,内蒙古哲里木盟人,博士,副教授,主要从事环境微生物和农业面源污染研究

收稿日期:2013-12-05;收到修改稿日期:2014-04-23

产和优质。酸性土壤中磷素的缺乏,导致根瘤菌虽可进入根部,但形成有效根瘤少,从而影响固氮效果^[7]。对一种热带苜蓿的研究证明,根瘤数、根瘤大小和固氮水平随磷水平的升高而提高^[8]。 Ca^{2+} 缓解酸性土壤上铝毒害的研究较多^[9-10],如张琴等的研究表明 Ca^{2+} 能够提高苜蓿-根瘤菌体系的耐酸能力^[11]。所以,研究在土壤中同时补充 Ca^{2+} 和磷素对根瘤菌在酸性高铝土壤中存活定殖的影响具有一定的实践意义。

“群体感应”(Quorum sensing,简称QS)^[12]是指细菌能够通过小的可扩散的信号分子感知细胞密度和调控其各生理功能的一种化学行为。群体感应在根际微生物定殖、竞争中发挥着重要作用,影响整个根际生态环境^[13]。对根瘤菌而言,其与豆科宿主植物间共生关系的形成是宿主和根瘤菌间复杂的信号释放和识别的结果^[14-15],该识别过程首先引起大量根瘤菌在植物根系聚集,细胞密度的增加受群体感应调控^[16]。苜蓿根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)的群体感应系统被证明可能会影响结瘤数目和共生过程^[17];苜蓿中华根瘤菌的群体感应物质是一种 N-酰基高丝氨酸内酯衍生物(N-acyl-homoserine actones,AHLs)^[18],控制胞外多糖 EPS II 的产生,该多糖与根瘤的形成过程有关。

本研究利用分室培养箱装置,在根箱外室间接接种耐酸根瘤菌,检测根瘤菌在加入铝离子以及钙磷的酸性土壤上的存活、迁移、定殖动态,同时分析土壤中群体感应物质的含量变化,从群体感应这一化学行为入手,探索钙磷对耐酸根瘤菌在酸铝土壤中生态状况的影响,以进一步阐明 Ca^{2+} 、P 对酸铝胁迫后苜蓿根瘤菌共生过程的影响机理。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验装置:采用有机玻璃加工而成两室培养装置,底面为正方形,边长为 25 cm × 25 cm,高 20 cm (见图 1)。内室与四周外室之间用 200 目的尼龙网相隔,外室用灭菌的石英砂填充,内室用酸性黄壤填充。根系被限制在内室生长,而根瘤菌在石英砂中培养一段时间之后,可以穿过尼龙网,感受苜蓿根系结瘤信号物质,发生趋向性迁移,最后达到根系周围,完成共生结瘤。

供试土壤:采用重庆市北碚区缙云山的酸性冷沙黄泥土。风干,过 2 mm 筛,用高压灭菌锅在

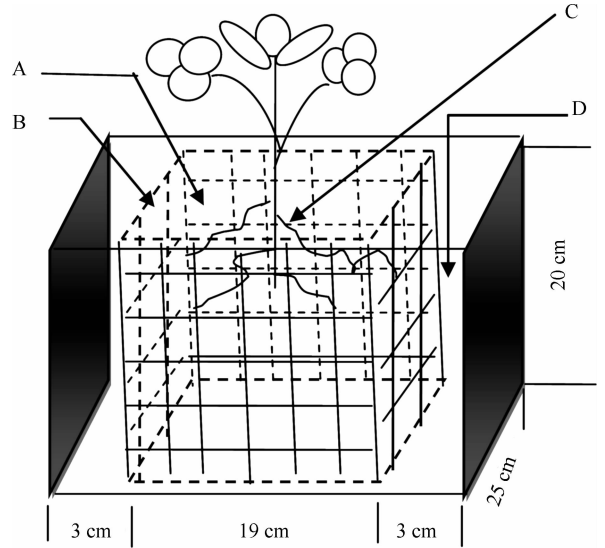


图 1 试验装置(A,内室,填充土壤;B,200目滤布;C,中心点,种植紫花苜蓿;D,外室,填充石英砂)

Fig.1 Designing of the pots used in the experiment (A, inner chamber filled with soil; B, 200-mesh sieve; C, the central point where alfalfa was planted; D, outer chamber filled with quartz sand)

121 °C 蒸汽压下灭菌 2 h,以灭活土壤中的土著根瘤菌以及其他微生物,风干后待用。为了满足酸铝胁迫条件,本试验在原始土壤中混入 1 mmol kg^{-1} AlCl_3 溶液,装入分室根箱中,每盆装入 6 kg 含铝土壤,保持土壤含水量为 15%,平衡 1 个月之后采集土壤测定理化性质如表 1,其交换性钙和有效磷含量均低于耕地土壤养分平均水平(参照第二次土壤普查数据)。

供试作物:紫花苜蓿为三得利紫花苜蓿(*Medicago sativa* L. cv. Sanditi),购自江苏省连云港草业中心。紫花苜蓿种子先用 95% 乙醇浸泡 5 min,再用 0.1% HgCl_2 溶液消毒 6 ~ 10 min,无菌水冲洗 5 ~ 6 次,播种于灭菌的滤纸上,于 $28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 下暗培养 1 d,再于 $28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 16 h 的 1 000 ~ 2 000 lux 光照强度下萌发 1 ~ 2 d 或 5 ~ 7 d 备用。

供试菌株:苜蓿根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*) 91522 为本研究室分离获得,能在 pH 4.8 的 YMA 固体培养基上正常生长并能使紫花苜蓿植株结瘤,是一株耐酸根瘤菌^[19-21]。根瘤菌培养基采用改进的 YMA 培养基:甘露醇 10 g,酵母浸出粉 5 g,NaCl 0.1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, K_2HPO_4 0.5 g^[22]。供试 Ca^{2+} 为分析纯 CaCl_2 ,磷素为分析纯 NaH_2PO_4 。

自体诱导物(Autoinducers,AI)高效检测菌株 KYC55^[23]由南京农业大学朱军教授馈赠。

表 1 供试土壤化学性质

Table 1 Chemical properties of the experimental soil

土壤 Soil	pH (H ₂ O) ¹⁾	有机质 Organic matter (g kg ⁻¹)	全氮 Total nitrogen (g kg ⁻¹)	全磷 Total phosphorus (g kg ⁻¹)	全钾 Total potassium (g kg ⁻¹)	碱解氮 Alkaline-N (mg kg ⁻¹)	有效磷 Olsen-P (mg kg ⁻¹)	速效钾 Available kalium (mg kg ⁻¹)	交换性钙 Exchan- geable calcium (mmol kg ⁻¹)	交换性酸 Exchan- geable acid (cmol kg ⁻¹)	交换性铝 Exchan- geable aluminum (cmol kg ⁻¹)
原始土壤 ^①	4.73 ± 0.09	7.16	0.67	0.10	10.8	66.57	5.89	61.37	3.44	3.24	2.38
加铝土壤 ^②	4.45 ± 0.13	6.87	0.68	0.11	10.8	69.95	5.88	61.82	3.41	6.05	4.65

① Acid soil, ② Acid soil with aluminum added. 1) 水土比 2.5:1 Water-soil ratio is 2.5:1

1.2 试验设计

试验于 2012 年 4 月—8 月在西南大学温室内进行。试验装置如图 1, 内室装入 6 kg 加铝土壤, 外室加入经高压灭菌的石英砂, 厚度与内室土壤基本相同。试验过程中控制土壤含水量保持在田间持水量的 40%~50%。

3 月 24 日在分室根箱内室中移栽培养 7 d 的紫花苜蓿幼苗, 每盆 10 株, 培养 14 d 后进行 Ca²⁺、磷处理, 以 CaCl₂ 和 Na₂HPO₄ 为 Ca²⁺、磷源, 分 6 次添加, 使添加 Ca²⁺、磷累计添加量如表 2, 共 9 个处理, 每个处理设置 3 个重复; Ca²⁺、磷处理平衡 14 d 后, 即苜蓿生长 30 d (4 月 24 日) 后, 在外室石英砂内接种新培养的 DO₆₀₀ = 1 (约含根瘤菌数量 10⁸~10⁹ ind ml⁻¹) *S. meliloti* 91522 菌液 10 ml, 接种方法为 10 ml 菌液用无菌水稀释至 200 ml 后均匀洒入外室四周的石英砂上, 尽可能保持四周菌液量相同。

接种后第 1、3、5、7、12、17、27、37、57、77、97 天分别在距离植株 6~8 cm (远根区, 以内室中心为中心, 下同) 和 1~2 cm (近根区) 处用打孔器取样, 每次分别从四周取样以保持取样均匀, 测定根瘤菌数量和群体感应强度。同时在种植 3 个月收获苜蓿, 测定生物量、全氮含量及其他农艺性状。

表 2 试验钙、磷水平设计表

Table 2 Design of treatments

Ca ²⁺ (mmol kg ⁻¹)	P (μmol kg ⁻¹)		
	0	4	30
0	Ca0P0	Ca0P4	Ca0P30
5	Ca5P0	Ca5P4	Ca5P30
10	Ca10P0	Ca10P4	Ca10P30

1.3 测定方法

1.3.1 群体感应测定^[24]

AHLs 粗提液的获

得: 将从培养箱中所取 25 g 土壤浸入 25 ml 乙酸乙酯 (约 1:1), 充分振荡, 静置 12 h, 收集的乙酸乙酯溶液用旋转蒸发仪蒸发至剩余 2 ml 左右, 在真空干燥器中蒸干, 用 1 ml 水解, -20℃ 保存备用。

群体感应测定: 按照 Gao 等^[25] 的方法测定 β-半乳糖苷酶活法检测自体诱导物活性。将检测菌株 KYC55 在不含抗生素的新鲜大肠菌群显色液体培养基 (AT 培养基) 培养至 OD₆₀₀ = 0.5 左右, 摇匀, 分装到 1.5 ml 离心管中, 加入 150 μl AHLs 粗提液后摇匀, 28℃ 过夜培养约 14 h; 吸取 200 μl 上述 KYC55 与 AHLs 粗提液混合物加入到 2 ml 无菌离心管, 然后依次加入 0.8 ml Z-buffer、50 μl 0.1% SDS、150 μl 氯仿, 剧烈振荡 10 s 后, 加入 100 μl 4 mg ml⁻¹ 的邻硝基苯-β-D 半乳糖苷 (ONPG), 摇匀, 待变黄后加入 600 μl Na₂CO₃ (1 mol L⁻¹) 终止反应, 记录变色时间和 OD₆₀₀; 16 000 × g 离心 5 min 后, 以新鲜培养基作阴性对照, 测定上清液 OD₄₂₀; 根据变色时间, 计算 β-半乳糖苷酶的活性。计算公式如下:

$$\text{米勒单位 (Miller units)} = 1\,000 \times \text{OD}_{420} / [\text{OD}_{600} \times (T_s - T_0) \times 0.2]$$

式中, T₀ 表示起始时间; T_s 表示变色时间。

1.3.2 其他指标测定

植株全氮采用半微量凯氏定氮法测定; 土壤 pH 采用 2.5:1 水浸提电位法测定; 土壤交换性钙采用乙酸铵交换—原子吸收分光光度法, 土壤交换性酸、铝采用 KCl-NaF 浸提—酸碱滴定法^[26] 测定; 根瘤菌数量采用稀释梯度平板法^[27] 测定。

1.4 数据处理

原始数据在 Excel 中进行标准化处理, 应用 SPSS18.0 软件对试验数据进行方差分析, 5% 水平下 LSD 多重比较各处理平均值之间的差异显著性。

2 结果

2.1 钙磷交互作用对酸铝土壤中苜蓿根瘤菌迁移定殖的影响

2.1.1 钙磷交互作用对距离宿主 6~8 cm 处(远根区)根瘤菌数量的影响

首先,通过间接接种根瘤菌,在酸铝土壤中能够检测到根瘤菌数量的变化,说明本试验所用菌株是能够在酸铝土壤中存活和繁殖的。接种 1 周后土壤中根瘤菌数量开始快速增加,至 30~40 d 根瘤菌数量出现最大值,随后开

始降低,后期趋于稳定(图 2)。根据根瘤菌的数量,将整个培养期分为根瘤菌的迁移期(4月24日至5月1日)、繁殖期(5月1日至5月30日)、稳定期(5月30日至7月30日)。施加 P 和 Ca^{2+} 对同期根瘤菌数量有提高作用(图 2A,图 2B)。相同 Ca^{2+} 水平下,施加不同浓度磷素处理中以 $30 \mu\text{mol kg}^{-1}$ 处理根瘤菌数量最高,在繁殖期内显著高于低磷($4 \mu\text{mol kg}^{-1}$)处理(图 2A,图 2C,图 2E),以 $\text{Ca}^{2+} 5 \text{ mmol kg}^{-1}$ 处理下增幅较大(图 2C,图 2E)。所以在 Ca^{2+} 为 5 mmol kg^{-1} 条件下补充磷素对根瘤菌在酸铝土壤中的存活和繁殖有良好的改善效果。

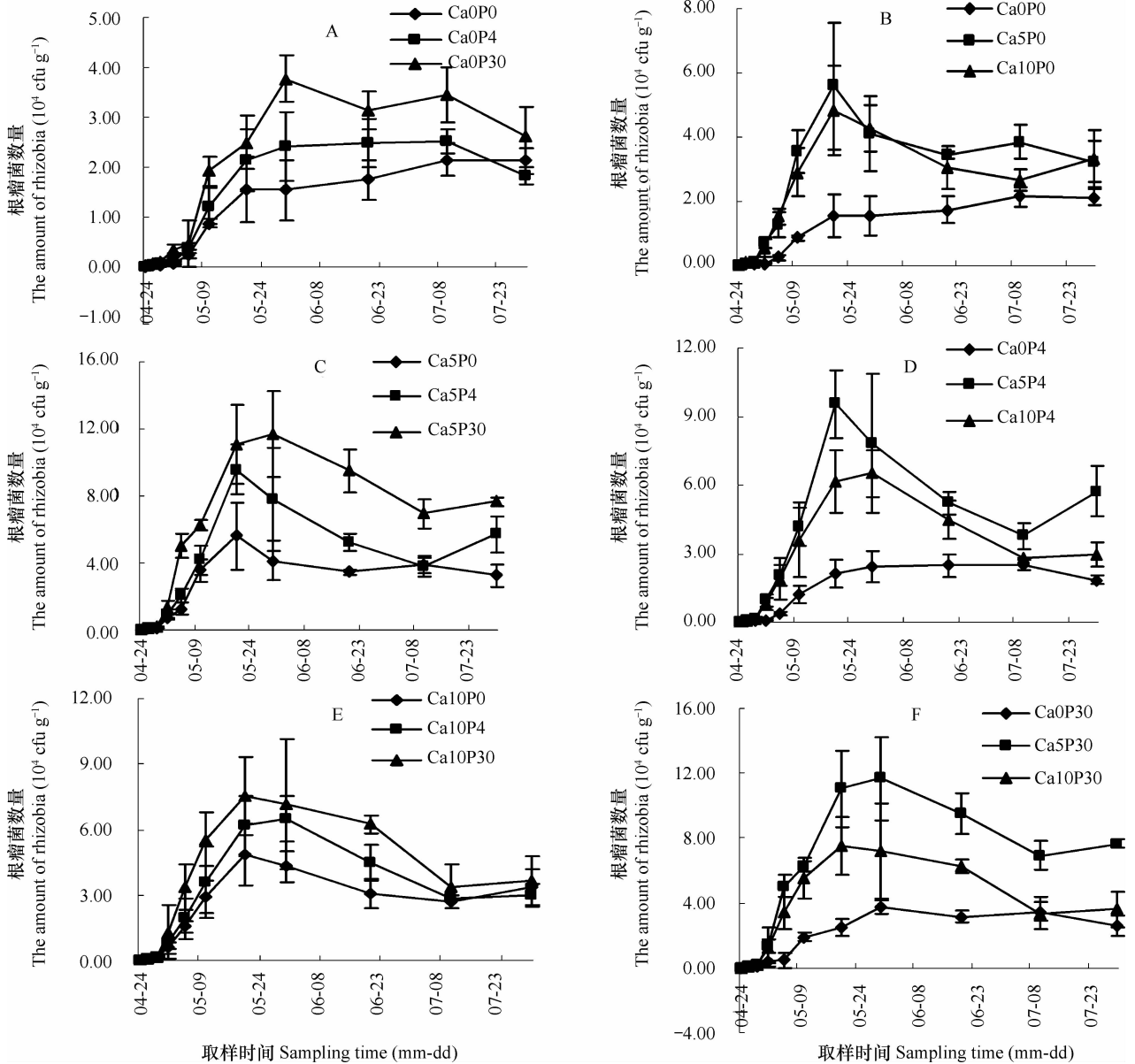


图 2 酸铝土壤钙磷交互作用下距离宿主 6~8 cm 处土壤根瘤菌数量

Fig. 2 Number of acid-tolerant rhizobia in acid and aluminum soil 6~8 cm apart from the root as affected by interaction of Ca and P

施加 Ca^{2+} 对同时期酸铝土壤中根瘤菌数量有显著提高, Ca^{2+} 在接种 1 周后即使根瘤菌数量显著高于无 Ca^{2+} 处理, 整个培养过程中施 Ca^{2+} 均表现出这样的显著效果 (图 2B)。高浓度 Ca^{2+} 和低浓度 Ca^{2+} 表现相同规律。在培养结束时 Ca^{2+} 5 mmol kg^{-1} 和 10 mmol kg^{-1} 处理的根瘤菌数量分别为无 Ca^{2+} 处理的 36.08 倍和 37.02 倍。在 $\text{P } 30 \mu\text{mol kg}^{-1}$ 处理条件下, Ca^{2+} 5 mmol kg^{-1} 根瘤菌数量高于 Ca^{2+} 10 mmol kg^{-1} 处理, 且在稳定期与后者达到显著差异 (图 2F)。所以, 钙磷交互作用下, 以 Ca^{2+} 5 mmol kg^{-1} 和 $\text{P } 30 \mu\text{mol kg}^{-1}$ 处理的酸铝土壤中, 根瘤菌的存活和繁殖好于其他处理, 该处理下培养结

束时根瘤菌数量为对照的 85.24 倍。

2.1.2 钙磷交互作用对距离宿主 1 ~ 2 cm (近根区) 根际土壤中根瘤菌数量的影响 距离植物根系 1 ~ 2 cm (近根区) 处根瘤菌的存活和繁殖状态与距离根系较远的远根区有差异 (图 2, 图 3)。差异首先表现在根瘤菌繁殖数量达到最高值的时期。各处理远根区根瘤菌的数量一般在 5 月 20 日或 5 月 30 日取样时达到最高值, 而近根区在 6 月 20 日或 7 月 10 日至最高, 此滞后期为根瘤菌由外室向内室的迁移时间。其次, 表现为根瘤菌的数量。虽然 1 ~ 2 cm 根际土壤中根瘤菌数量也是从 5 月 1 日取样期开始与远根区 (6 ~ 8 cm) 同步增加, 但近根区

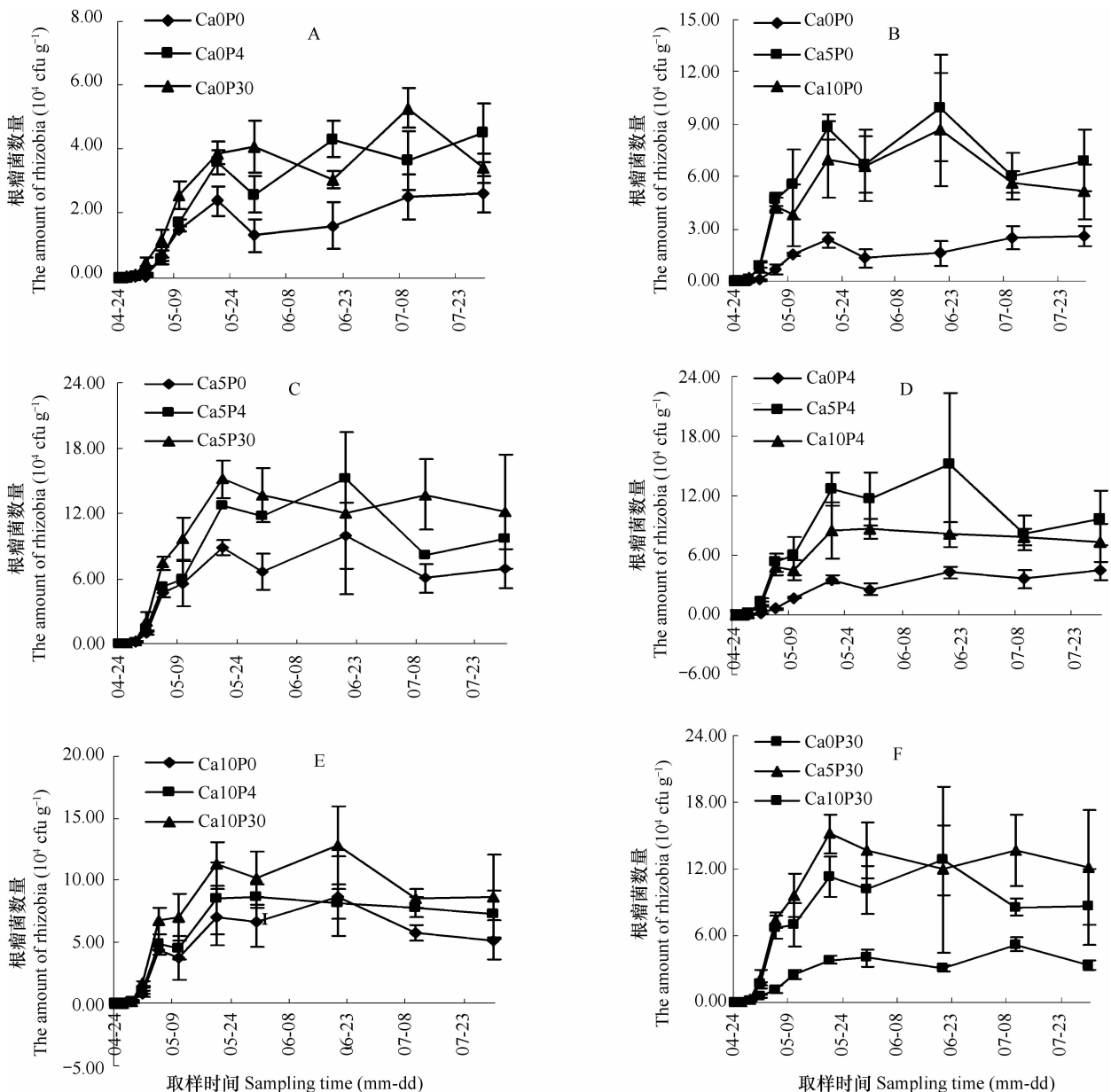


图 3 酸铝土壤钙磷交互作用下距离宿主 1 ~ 2 cm 处土壤根瘤菌数量

Fig. 3 Number of acid-tolerant rhizobia in soil 1 ~ 2 cm apart from the root as affected by interaction of Ca and P

根瘤菌数量增加快于后者,导致同期根瘤菌的数量近根区的高于远根区的,显示了苜蓿的宿主效应。如远根区土壤根瘤菌数量最高值为 11.67×10^4 cfu g^{-1} ,近根区则为 15.13×10^4 cfu g^{-1} (1~2 cm)。再次,在远根区,无论何种 Ca^{2+} 水平处理, P 30 $\mu mol kg^{-1}$ 处理对根瘤菌繁殖的效果均好于其他磷素水平处理;而在近根区,稳定期内,在无 Ca^{2+} 和低 Ca^{2+} 水平下, P 30 $\mu mol kg^{-1}$ 有时低于 P 4 $\mu mol kg^{-1}$ 处理的效果(图 3A,图 3C)。又如图 3A、图 3B 所示, P 30 $\mu mol kg^{-1}$ 和 4 $\mu mol kg^{-1}$ 处理对根瘤菌数量的促进效果在繁殖期和稳定期交错上升。

接种 1 周后,施 Ca^{2+} 处理均开始表现出显著高于不施 Ca^{2+} 处理对根瘤菌繁殖的促进效果,而且高浓度 Ca^{2+} (10 $mmol kg^{-1}$) 与低浓度 Ca^{2+} (5 $mmol kg^{-1}$) 之间没有显著差异(图 3B),但在补充磷素的条件下(图 3D,图 3F), Ca^{2+} 5 $mmol kg^{-1}$ 处理下根瘤菌数量高于 10 $mmol kg^{-1}$ 的,在结束培养时均以 Ca^{2+} 5 $mmol kg^{-1}$ 处理最高。可见 Ca^{2+} 、P 交互作用可以进一步提高根际根瘤菌数量,且低浓度的 Ca^{2+} 下补充适当的磷素更加有利于根瘤菌在酸铝土壤中的繁殖。

值得一提的是,除 Ca5P30 处理外,其他处理根瘤菌数量在 6 月 20 日取样期达到最高。而 Ca5P30 处理的在 5 月 20 日即达到最高值,其值高于其他处理最高值。

2.2 钙磷交互作用对酸铝土壤中苜蓿根瘤菌群体感应强度的影响

2.2.1 钙磷交互作用对距离宿主 6~8 cm 处根瘤

菌群体感应强度的影响 群体感应在很多根瘤菌中被证明与共生结瘤过程有关^[25,28-29]。图 4 为各处理不同取样日期下在远根区根瘤菌群体感应强度变化动态,其群体感应指标 β -半乳糖苷酶的范围为 1.15~17.15 Miller unit $50g^{-1}$ 土。在酸铝土壤条件下,不添加 Ca^{2+} 处理中,远根区在迁移期(4 月 24 日至 5 月 1 日)无法观测到群体感应,之后各处理根瘤菌群体感应强度由迁移期逐渐升高;9 个处理中,包括 Ca5P30 在内的 3 个处理在 5 月 20 日取样期达到最高,其余 6 个处理在 5 月 30 日取样期达到最高,6 月 20 日后逐渐降低。但至收获时,各处理土壤中群体感应水平均高于迁移期。该动态与远根区根瘤菌数量动态一致,表明群体感应可以作为根瘤菌数量的指征。

在 90 d 的培养过程中,无 Ca^{2+} 条件下, P 4 $\mu mol kg^{-1}$ 处理土壤中根瘤菌的群体感应强度较对照(Ca0P0)有所降低,但差异不显著; P 30 $\mu mol kg^{-1}$ 处理的土壤中群体感应强度均较无磷处理高,但差异仍不显著。通过补充 Ca^{2+} ,土壤中根瘤菌群体感应强度均显著提高,而且 Ca^{2+} 5 $mmol kg^{-1}$ 的高于 10 $mmol kg^{-1}$ 处理。 Ca^{2+} 5 $mmol kg^{-1}$ 处理条件下,磷素处理均能在 Ca^{2+} 的基础上进一步提高群体感应强度。整个处理过程中, Ca^{2+} 5 $mmol kg^{-1}$ 、P 30 $\mu mol kg^{-1}$ 处理群体感应强度均高于同时期其他处理。

2.2.2 钙磷交互作用对距离宿主 1~2 cm 处根瘤菌群体感应强度的影响

图 5 为各处理不同取样日期近根区土壤中根瘤菌群体感应强度变化动态,

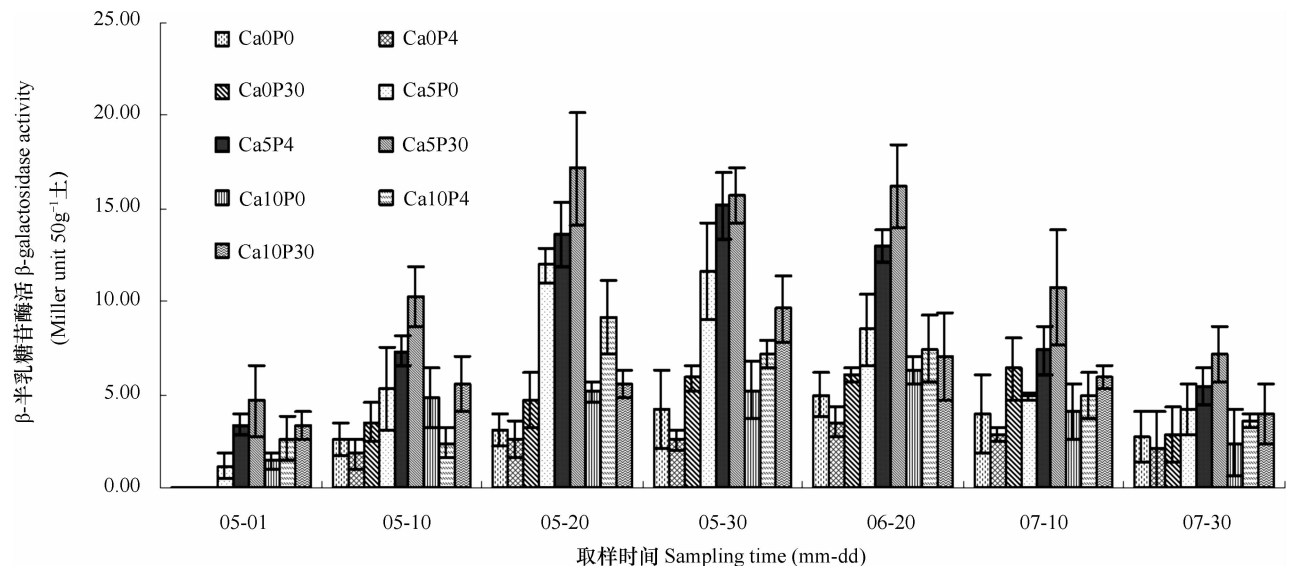


图 4 酸铝土壤不同钙磷交互处理对分根培养装置中距根 6~8 cm 处苜蓿根瘤菌群体感应的影响

Fig. 4 Quorum sensing of *S. meliloti* 91522 in soil 6~8 cm apart from the root as affected by interaction of Ca and P

群体感应指标 β -半乳糖苷酶的范围为 0.53 ~ 24.47 Miller unit 50g^{-1} 土。比较图 4 和图 5 可知在酸铝胁迫条件下,近根区土壤中根瘤菌群体感应表现出与远根区相似的动态,即无 Ca^{2+} 处理接种一周内无法测出群体感应,各处理群体感应从迁移期后期开始升高,在繁殖期达到最高,稳定期内下降。但近根区 9 个处理中 4 个在 5 月 20 日取样期达到最高,包括 Ca5P30 在内的其余 5 个处理群体感应最高值出现在 5 月 30 日,较远根区晚 10 天。结合前文,近根区根瘤菌数量较其群体感应滞后。除 6 月 20 日外,其他采样时间近根区群体感应均高于远根区的,同样显示了宿主的根际效应。

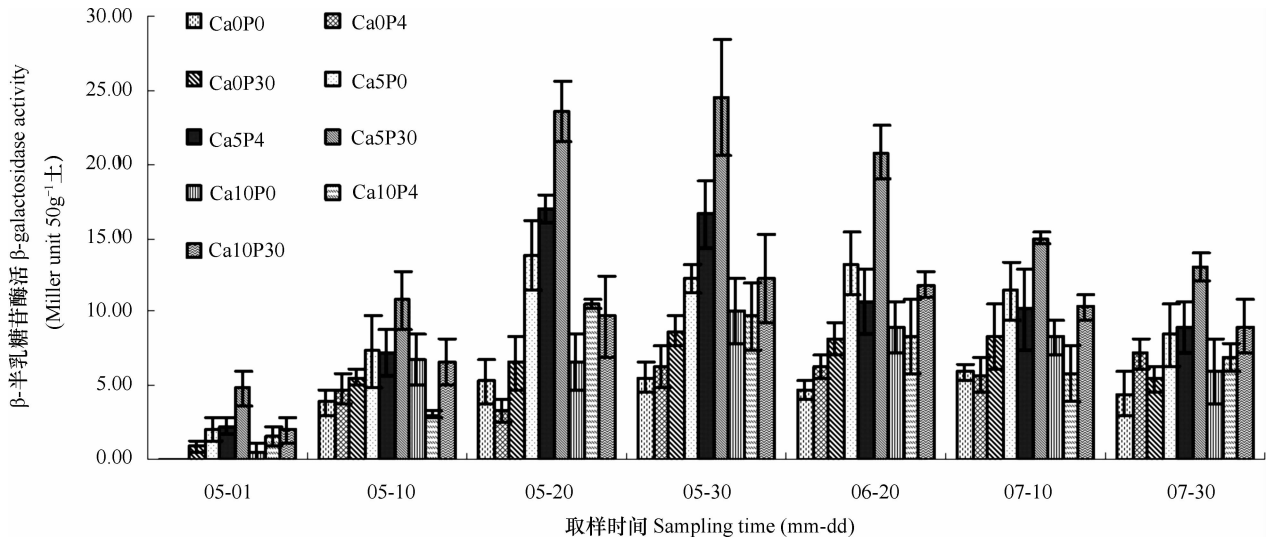


图 5 酸铝土壤不同钙磷交互处理对分根培养装置中距根 1~2 cm 处苜蓿根瘤菌群体感应的影响

Fig. 5 Quorum sensing of *S. meliloti* 91522 in soil 1~2 cm apart from the root as affected by interaction of Ca and P

2.3 钙磷交互作用对酸铝土壤中苜蓿-根瘤菌结瘤和生物量的影响

表 3 显示,酸铝土壤中,苜蓿根鲜重仅为 0.131 g,单独施加磷素后根鲜重有所提高,但均不显著。 Ca^{2+} 能够显著提高根鲜重,而且 Ca^{2+} 5 mmol kg^{-1} 处理高于 10 mmol kg^{-1} ,可使根鲜重较对照提高 2.72 倍;在施 Ca^{2+} 的基础上补充磷素可以显著提高根鲜重,P 30 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ 最高。

单独补充磷素的处理,随磷浓度提高,地上部鲜重增幅增大,但差异不显著。单独施 Ca^{2+} 处理, Ca^{2+} 5 mmol kg^{-1} 和 10 mmol kg^{-1} 较不施 Ca^{2+} 处理地上部鲜重差异显著,较后者分别提高 2.03 倍和 1.17 倍。

在酸铝土壤中单独施加磷素就能够提高结瘤总数,P 30 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ 可使结瘤总数较 Ca0P0 提高

施加磷素后根际土壤中群体感应强度有所提高,但均以 P 30 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ 处理下最高。在 Ca^{2+} 5 mmol kg^{-1} 水平下,通过补充 30 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ 磷素,根瘤菌群体感应强度显著高于 0 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ 和 4 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ 磷素; Ca^{2+} 10 mmol kg^{-1} 条件下补充磷素的增效不如前者明显。在同水平磷素处理下, Ca^{2+} 的作用均表现为 5 mmol kg^{-1} 大于 10 mmol kg^{-1} ,且在 P30 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ 条件下,5 月 10 日至 30 日的 Ca^{2+} 5 mmol kg^{-1} 处理群体感应强度达到最大值 24.47,较对照提高了 340.2%~345.9%。所以在 Ca^{2+} 5 mmol kg^{-1} 和 P 30 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ 处理对根际土壤根瘤菌群体感应促进幅度最大。

70%; Ca^{2+} 对结瘤总数影响显著,分别较无钙磷处理提高了 118% 和 92%。钙磷交互作用表现为同一 Ca^{2+} 水平下,补充磷素均能提高结瘤数,以 Ca^{2+} 5 mmol kg^{-1} 和 P 4 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ 处理结瘤数最高,较对照提高了 1 374%。

在处理浓度范围内,随磷素浓度的提高,紫花苜蓿氮含量提高,P 30 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ 处理下显著高于 0 和 4 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ 处理;而通过施加 Ca^{2+} 能够显著提高宿主氮含量,而且 Ca^{2+} 5 mmol kg^{-1} 处理高于 10 mmol kg^{-1} 处理。同水平 Ca^{2+} 条件下,补充磷素进一步提高了苜蓿氮含量,而且在 Ca^{2+} 5 mmol kg^{-1} 条件下,4 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ 磷素达到显著效果,氮含量以 Ca^{2+} 5 mmol kg^{-1} + P 4 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ 处理下最高,较对照提高了 366%,这与该处理下结瘤数规律一致。

表 3 不同钙磷交互处理对分根装置中酸铝土壤下苜蓿农艺性状及结瘤的影响

Table 3 Agronomic traits and nodulation of alfalfa in the pots as affected by interaction of Ca and P

处理 Treatment	根鲜重 Root fresh weight		地上部鲜重 Shoot fresh weight		结瘤总数 Total of nodules		氮含量 Nitrogen content	
	A (g)	B (%)	A (g)	B (%)	A (ind plant ⁻¹)	B (%)	A (g kg ⁻¹)	B (%)
	Ca0P0	0.131 ± 0.045d	100	0.311 ± 0.041d	100	0.491 ± 0.216d	100	8.57 ± 1.40e
Ca0P4	0.175 ± 0.014d	134	0.350 ± 0.070d	112	0.833 ± 0.167d	170	9.89 ± 0.79e	115
Ca0P30	0.180 ± 0.065d	138	0.412 ± 0.107d	132	1.989 ± 1.040d	405	14.55 ± 0.34de	170
Ca5P0	0.485 ± 0.048b	372	0.944 ± 0.065a	303	3.856 ± 0.666c	786	18.69 ± 0.89cd	218
Ca5P4	0.554 ± 0.098ab	425	0.883 ± 0.094ab	284	6.711 ± 0.883ab	1368	20.41 ± 1.64ab	238
Ca5P30	0.609 ± 0.056a	467	0.964 ± 0.125a	310	7.233 ± 1.358a	1474	21.14 ± 1.68a	247
Ca10P0	0.385 ± 0.036bc	295	0.674 ± 0.157bc	217	3.698 ± 0.919c	754	16.44 ± 0.42cd	192
Ca10P4	0.314 ± 0.085c	241	0.639 ± 0.119cd	205	4.065 ± 1.292c	828	16.52 ± 1.54cd	193
Ca10P30	0.321 ± 0.026c	246	0.759 ± 0.195ab	244	5.192 ± 1.044bc	1058	19.69 ± 1.19bc	230

注: A 列代表指标平均值 ± 标准偏差; B 列代表相对 Ca0P0 的百分量 Note: Column A represents mean ± standard deviation of every index. Column B represents component relative to CK (Ca0P0)

2.4 钙磷交互作用下土壤交换性铝钙与根瘤菌数量和群体感应的相关关系

5月1日、10日、20日、30日、6月20日、7月10日、30日的根瘤菌数量、群体感应、交换型钙、交换性铝的相关分析如表4所示。远根区根瘤菌数量和近根区根瘤菌数量显著相关, 相关系数为0.765。远根区群体感应强度和近根区群体感应强度相关

性极显著, 相关系数为0.919。整个培养期内交换性铝与根瘤菌数量、群体感应强度相关性不显著, 而与土壤中交换性钙呈不显著的负相关关系。Ca²⁺对近根区和远根区根瘤菌数量有显著正相关关系, 相关系数分别为0.316和0.363。故Ca²⁺是影响根瘤菌在土壤中的存活和繁殖的关键元素, 其积极作用甚至缓解和覆盖了铝毒对根瘤菌的胁迫。

表 4 不同钙磷交互处理下土壤交换性铝钙与根瘤菌数量和群体感应的相关性

Table 4 Relationships of exchangeable aluminum, calcium with number and quorum sensing of rhizobia as affected by interaction of Ca and P

	远根区群体感应 ^①	近根区群体感应 ^②	远根区根瘤菌数量 ^③	近根区根瘤菌数量 ^④	土壤交换性铝 ^⑤	土壤交换性钙 ^⑥
远根区群体感应 ^①	1.000					
近根区群体感应 ^②	0.919**	1.000				
远根区根瘤菌数量 ^③	0.853**	0.875**	1.000			
近根区根瘤菌数量 ^④	0.682**	0.648**	0.765**	1.000		
土壤交换性铝 ^⑤	0.207	0.121	0.026	0.164	1.000	
土壤交换性钙 ^⑥	0.116	0.027	0.316*	0.363*	-0.059	1.000

①Quorum sensing in the far root zone, ②Quorum sensing in the near root zone, ③Number of rhizobia in the far root zone, ④Number of rhizobia in the near root zone, ⑤Exchangeable aluminum, ⑥Exchangeable calcium

3 讨论

酸性土壤中, H⁺、Al³⁺过量, Ca²⁺、P不足, 限制了豆科植物结瘤固氮。本试验在酸性黄壤中补充Al³⁺, 模拟高酸铝胁迫, 通过补充Ca²⁺、P改善根瘤菌存活生境, 在间接接种的条件下, 检测耐酸苜蓿根瘤菌在胁迫环境条件下的迁移动态。通过补充

Ca²⁺, 土壤中根瘤菌的存活状况显著好于对照, 而且以5 mmol kg⁻¹ Ca²⁺处理下根瘤菌数量最大, 这与Reeve等^[30]的研究结果有相似之处。Reeve等的研究还表明, Ca²⁺浓度的增加可提高根瘤菌在酸性条件下的生长速率, 使其能在酸性更强的环境中生长, 这也是本研究中根瘤菌数量增长快于不施Ca²⁺处理的原因。同时, 已有研究表明豆科植物与根瘤菌的共生固氮和生长过程中必须有磷素的参

与^[31-34],认为磷素直接影响根瘤的形成和生长,或是通过影响豆科作物的生长而间接影响根瘤的形成和生长,而忽略了磷素对根瘤菌在土壤中繁殖和迁移的直接影响。本研究结果显示随磷素浓度的升高,土壤中根瘤菌存活动态也得到改善,其中 P 30 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ 处理最好。因此,在酸性土壤和 Al^{3+} 的双重胁迫下,补充适当的 Ca^{2+} (5 mmol kg^{-1}) 和 P (30 $\mu\text{mol kg}^{-1}$) 可显著提高苜蓿的存活、迁移能力,提高紫花苜蓿结瘤效率,实现了酸性土壤下高效结瘤固氮。进一步地,比较内外室根瘤菌数量变化,远根区表现为先升高后降低,当根瘤菌迁移至近根区时,其数量先升高后有所下降,数量较远根区稳定,显示了苜蓿对根瘤菌的存活和繁殖的根际效应。

根瘤菌产生 AHLs 参与其与宿主豆科植物形成有固氮活性根瘤的过程中的信息交流^[35]。天山根瘤菌 (*Rhizobium tianshanense*) 的群体感应突变株完全丧失了固氮结瘤能力^[29]; Gao 等^[25] 的研究中,经过 4 h 的根系培养,华葵根瘤菌 (*Mesorhizobium huakuii*) 群体感应突变株仅有 6×10^2 依附在 5 条根系,同时约有 7×10^5 的野生型菌株附着,所以群体感应会影响根瘤菌与宿主植物根毛的识别依附,促进二者信号交流,从而影响根毛变形和共生结瘤。AHLs 主要通过影响根瘤菌胞外多糖的产生而影响根瘤菌与豆科植物的共生体的建成和结瘤效率^[36-37],所以根瘤菌群体感应行为与后期侵染宿主形成根瘤具有密切关系。祖慧琳等^[38] 分别采用 3.0、6.0、9.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ AlCl_3 处理 *S. meliloti* 1128 后,其 AHLs 的产生水平及胞外多糖的合成量显著降低,苜蓿中华根瘤菌 1128 对苜蓿幼根根毛的吸附受到抑制,结瘤率降低。Vassileva 等^[39] 的研究表明,随着菜豆根际 Ca^{2+} 浓度的提高, Al^{3+} 的负效应明显被削弱。所以,酸性土壤中的铝离子可能通过限制根瘤菌 AHLs 的分泌进而抑制其繁殖和豆科宿主的共生。本研究土壤中初始交换性铝离子含量为 4.65 cmol kg^{-1} 土,属中度铝毒^[2],试验中对照组群体感应强度最高时为 5.01 Miller unit 50g^{-1} 土,远远低于其在一般土壤的水平^[25],可能是土壤中游离铝离子的作用。施 Ca^{2+} 处理后,群体感应水平显著提高,并随 P 浓度提高 AHLs 含量的增幅增大,这与土壤中根瘤菌数量规律表现一致,同时说明酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 介导的群体感应不仅能调节根瘤菌自身的数目^[16],而且在较低浓度时可以反映土壤中根瘤菌数量和活性。因此,在酸性土壤中,施加 Ca^{2+} 、P 能够修复土著根瘤菌群体感应系统,提高紫花苜蓿

与土著根瘤菌的共生固氮能力,为紫花苜蓿在酸性土壤上良好结瘤提供保障。

韩光^[40] 在酸性土壤条件下补充钙磷能够有效提高紫花苜蓿-根瘤菌的结瘤和固氮过程。本研究中发现施加钙磷对土壤中活性 H^+ 和 pH 的影响均不显著,但对紫花苜蓿生物量和根瘤菌繁殖表现出较好的修复效果,本研究中钙磷的修复机理可能有:(1) 钙磷促进了根瘤菌在酸铝土壤中的存活和繁殖;土壤中充足的钙能够促进结瘤^[41],磷素能够有效促进苜蓿的生长和根系发育,为有效结瘤提供保证;(2) 钙磷配施对根瘤菌群体感应强度的促进作用是根瘤菌和宿主信号交流的重要保证;(3) 施加钙离子引起土壤中交换性盐基离子的升高,土壤缓冲性能提高(数据未列出)。

本研究中 Ca^{2+} 5 mmol kg^{-1} 对酸铝土壤上根瘤菌的繁殖促进作用较好,但 Ca^{2+} 10 mmol kg^{-1} 则有一定抑制作用。可见在实际应用中合理的配施才能发挥良好的作用。酸铝影响苜蓿-根瘤菌高效共生的因素非常多,是复杂的综合效应^[42],有许多基础性问题,如酸性土壤中耐酸根瘤菌对豆科宿主根系的侵染能力、对苜蓿根系信号物质的感知以及群体感应物质在酸性土壤中的作用等,均需要更深入的研究。施用钙磷对酸铝胁迫后苜蓿-根瘤菌共生体系的恢复效果在实际生产环境如何,尚待通过酸性土壤大田试验验证。

4 结 论

本研究在酸性土壤中补充 Al^{3+} ,在分室培养箱中培养,通过间接接种耐酸根瘤菌,研究了 Ca^{2+} 、P 对酸铝胁迫下耐酸苜蓿根瘤菌向植物根系迁移动态,以及迁移过程中土壤中根瘤菌群体感应强度的变化动态。结果表明,施加 Ca^{2+} 5、10 mmol L^{-1} 条件下,根瘤菌的迁移快于 0 mmol L^{-1} 处理,补充 P 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 对根瘤菌的迁移有促进作用,钙磷存在交互作用。酸性有 Al^{3+} 土壤,补充 Ca^{2+} 5 mmol L^{-1} 和 P 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 可显著提高苜蓿的存活、迁移能力,提高紫花苜蓿的结瘤效率,实现了酸性土壤下高效结瘤固氮。同时,从群体感应这一化学行为角度出发,施加钙磷后酸铝胁迫下土壤中根瘤菌群体感应强度得到显著提高,整个培养时期, Ca^{2+} 5 mmol L^{-1} 和 P 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 交互处理下根瘤菌群体感应一直处于较高水平,为良好的结瘤提供了保障。

参 考 文 献

- [1] 杨昂, 孙波, 赵其国. 中国酸雨的分布、成因及其对土壤环境的影响. 土壤, 1999, 31(1): 13—18. Yang A, Sun B, Zhao Q G. The distribution, causes of acid rain and its effect on the soil environment in China (In Chinese). Soils, 1999, 31(1): 13—18
- [2] Ma J F, Furukawa J. Recent progress in the research of external Al detoxification in higher plants: A mini review. Journal of Inorganic Biochemistry, 2003, 97: 46—51
- [3] 黄玺, 李春杰, 南志标. 紫花苜蓿与醉马草的竞争效应. 草业学报, 2012, 21(1): 59—65. Huang X, Li C J, Nan Z B. Competitive effects between *Medicago sativa* and *Achnatherum inebrians* (In Chinese). Acta Prataculturae Sinica, 2012, 21(1): 59—65
- [4] 李剑峰, 师尚礼, 张淑卿. 环境酸度对紫花苜蓿早期生长和生理的影响. 草业学报, 2010, 19(2): 47—54. Li J F, Shi S L, Zhang S Q. Effects of the pH value of an acid environment on early growth and physiology of *Medicago sativa* W525 (In Chinese). Acta Prataculturae Sinica, 2010, 19(2): 47—54
- [5] 马其东, 刘自学, 洪绶曾, 等. 不同根系发育能力的苜蓿品种接种根瘤菌的效果. 草业学报, 1999, 8(4): 36—45. Ma Q D, Liu Z X, Hong F Z, et al. Effects of inoculating rhizobium to alfalfa cultivars with different levels of root regeneration ability (In Chinese). Acta Prataculturae Sinica, 1999, 8(4): 36—45
- [6] 张琴, 龙娟, 张磊, 等. 不同 pH 值下接种根瘤菌对紫花苜蓿产量和品质的影响. 草业学报, 2006, 15(5): 59—62. Zhang Q, Long J, Zhang L, et al. Effects on yield and quality of *Medicago sativa* by *Rhizobium* inoculation under different pH value conditions (In Chinese). Acta Prataculturae Sinica, 2006, 15(5): 59—62
- [7] 丁洪, 李生秀. 磷素营养与大豆生长和共生固氮的关系. 西北农业大学学报, 1998, 26(5): 67—70. Ding H, Li S X. The relation of phosphorous nutrition to growth and symbiotic nitrogen fixation of soybean cultivars (In Chinese). Journal of Northwestern Agricultural University, 1998, 26(5): 67—70
- [8] 王清湖, 敬岩, 张慧, 等. 接种根瘤菌和施磷肥对蚕豆共生固氮及产量的影响. 甘肃科学学报, 1996, 32(4): 17—19. Wang Q H, Jing Y, Zhang H, et al. Effect of inoculation of rhizobium agent and application of phosphate fertilizer on symbiotic nitrogen fixation and yield of broad bean (In Chinese). Journal of Gansu Sciences, 1996, 32(4): 17—19
- [9] 蒋廷惠, 占新华, 徐阳春, 等. 钙对植物抗逆能力的影响及其生态学意义. 应用生态学报, 2005, 16(5): 970—975. Jiang T H, Zhan X H, Xu Y C, et al. Roles of calcium in stress-tolerance of plants and its ecological significance (In Chinese). Chinese Journal of Applied Ecology, 2005, 16(5): 970—975
- [10] 罗虹, 刘鹏, 李淑. 硅、钙对水土保持植物荞麦铝毒的缓解效应. 水土保持学报, 2005, 19(3): 101—104. Luo H, Liu P, Li S. Alleviating effect of calcium and silicon on aluminum toxicity in water and soil conservation plant buckwheat (In Chinese). Journal of Soil and Water Conservation, 2005, 19(3): 101—104
- [11] 张琴, 张磊, 魏世清, 等. 钙离子对紫花苜蓿及苜蓿根瘤菌耐酸能力的影响. 应用生态学报, 2007, 18(6): 1231—1236. Zhang Q, Zhang L, Wei S Q, et al. Effects of Ca^{2+} on acid tolerance of *Medicago sativa* and *Rhizobium meliloti* (In Chinese). Chinese Journal of Applied Ecology, 2007, 18(6): 1231—1236
- [12] Bassler B L. Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. Cell, 2002, 109: 421—424
- [13] Downie J A. The roles of extra-cellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. FEMS Microbiology Reviews, 2010, 34(2): 150—170
- [14] Broughton W J, Jabbouri S, Perret X. Keys to symbiotic harmony. Journal of Bacteriology, 2000, 182: 5641—5652
- [15] Perret X, Staehelin C, Broughton W J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000, 64: 180—201
- [16] González J E, Marketon M M. Quorum sensing in nitrogen fixing rhizobia. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2003, 67(4): 574—592
- [17] Rodelas B, Lithgow J K, Wisniewski-Dye F, et al. Analysis of quorum-sensing-dependent control of rhizosphere expressed (*rhi*) genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae. Journal of Bacteriology, 1999, 181: 3816—3823
- [18] Marketon M M, Glenn S A, Eberhard A, et al. Quorum sensing controls exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. Journal of Bacteriology, 2003, 185: 325—331
- [19] 石杰, 张磊, 张琴, 等. 接种耐酸根瘤菌和施钙对酸性土上紫花苜蓿生长的影响. 植物营养与肥料学报, 2008, 14(3): 602—607. Shi J, Zhang L, Zhang Q, et al. The effects of calcium and acid-tolerant rhizobium on the growth of alfalfa planted in acid soil (In Chinese). Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2008, 14(3): 602—607
- [20] 韩华君, 张磊, 谢德体, 等. 耐酸苜蓿根瘤菌在酸性黄壤中的定殖研究. 西南农业大学学报: 自然科学版, 2006, 28(5): 722—726. Han H J, Zhang L, Xie D T, et al. Dynamics of root colonization of acid-tolerant *Rhizobium meliloti* strains in an acid yellow soil (In Chinese). Journal of Southwest Agricultural University: Natural Science Edition, 2006, 28(5): 722—726
- [21] 张学军, 张磊, 张琴, 等. 苜蓿中华根瘤菌 (*Sinorhizobium meliloti*) 的耐酸性研究. 西南大学学报: 自然科学版, 2008, 30(1): 91—97. Zhang X J, Zhang L, Zhang Q, et al. Study of acid tolerance of *Sinorhizobium meliloti* (In Chinese). Journal of Southwest University: Natural Science Edition, 2008, 30(1): 91—97
- [22] 黄维南, 童本仙, 刘承宪. 根瘤菌与植物离体细胞培养物结合时的固氮活性. 实验生物学报, 1980, 13(3): 287—295. Huang W N, Tong B X, Liu C X. The nitrogen fixation activity when rhizobium combine with the cultivation of plant independent cell (In Chinese). Journal of Experimental Biology, 1980, 13(3): 287—295
- [23] 钟涛涛, 周晶, 李路, 等. 利用高效检测菌株对中慢生根瘤

- 菌及红壤中自体诱导物的检测. 土壤, 2005, 37(1): 61—64. Zhong Z T, Zhou J, Li L, et al. Detection of autoinducer in mesorhizobium and red soil (In Chinese). Soils, 2005, 37(1): 61—64
- [24] Fuqua W C, Winans S C. A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. Journal of Bacteriology, 1994, 176: 2796—2806
- [25] Gao Y J, Zhong Z T, Sun K J, et al. The quorum-sensing system in a plant bacterium *Mesorhizobium huakuii* affects growth rate and symbiotic nodulation. Plant and Soil, 2006, 286: 53—60
- [26] 杨剑虹. 土壤农化分析与环境监测. 北京: 中国大地出版社, 2008. Yang J H. Soil agro-chemistry analysis and environmental monitoring (In Chinese). Beijing: China Land Press, 2008
- [27] 李阜棣, 喻子牛, 何绍江. 农业微生物学实验技术. 北京: 中国农业出版社, 1996: 92—93. Li F D, Yu Z N, He S J. Agricultural microbiology experimental technology (In Chinese). Beijing: China Agriculture Press, 1996: 92—93
- [28] Daniels R, De Vos D E, Desair J, et al. The cin quorum sensing locus of *Rhizobium etli* CNPAF512 affects growth and symbiotic nitrogen fixation. Biological Chemistry, 2002, 277: 462—468
- [29] Zheng H M, Zhong Z T, Lai X, et al. A LuxR/LuxI-type quorum-sensing system in a plant bacterium, *Mesorhizobium tianshanense*, controls symbiotic nodulation. Journal of Bacteriology, 2006, 188: 1943—1949
- [30] Reeve W G, Tiwaft R P, Dilworth M J, et al. Calcium affects the growth and survival of *Rhizobium meliloti*. Soil Biology & Biochemistry, 1993, 25: 581—586
- [31] Israel D W. Symbiotic dinitrogen fixation and host-plant growth during development of and recovery from phosphorus deficiency. Physiologia Plantarum, 1993, 88: 294—300
- [32] Drevon J J, Hartwig U A. Phosphorus deficiency increases the argon-induced decline of nodule nitrogenase activity in soybean and alfalfa. Planta, 1997, 201: 463—469
- [33] Almeida J P F, Hartwig U A, Frehner M, et al. Evidence that P deficiency induces N feedback regulation of symbiotic N₂ fixation in white clover (*Trifolium repens* L.). Journal of Experimental Botany, 2000, 51: 1289—1297
- [34] Hellsten A, Huss-Danell K. Interaction effects of nitrogen and phosphorus on nodulation in red clover (*Trifolium pratense* L.). Acta Agriculture Scandinavica, Section B, Soil and Plant Science, 2000, 50(3): 135—142
- [35] 李俊英, 王荣昌, 夏四清. 群体感应现象及其在生物膜法水处理中的应用. 应用与环境生物学报, 2008, 14(1): 138—142. Li J Y, Wang R C, Xia S Q. Quorum sensing system and its application in water treatment with biofilm (In Chinese). Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2008, 14(1): 138—142
- [36] Marketon M M, Gronquist M R, Eberhard A, et al. Characterization of the *Sinorhizobium meliloti* *sinR/sinI* locus and the production of novel N-acyl homoserine lactones. Journal of Bacteriology, 2002, 184: 5686—5695
- [37] Redfield R J. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing. Trends in Microbiology, 2002, 10: 365—370
- [38] 祖慧琳, 朱敏敏, 李永春, 等. 酸性土壤中豆科植物根际微生物群体感应的初步研究//江苏省遗传学会第八届会员代表大会暨学术研讨会论文集, 2010. Zu H L, Zhu M M, Li Y C, et al. The preliminary study on microorganisms quorum-sensing around bean plant in the acid soil (In Chinese)//The 8th Conference of Genetic Association in Jiangsu Province, 2010
- [39] Vassileva V, Milanov G, Ignatov G, et al. Effect of low pH on nitrogen fixation of common bean grown at various calcium and nitrate levels. Journal of Plant Nutrition, 1997, 20: 279—294
- [40] 韩光. 酸性胁迫下 Ca、P 及接种量对苜蓿-根瘤菌体系群体感应及固氮性能的影响. 重庆: 西南大学资源环境学院, 2011: 1—24. Han G. Effect of Ca, P and rhizobium inoculants quantity on quorum-sensing and N-fixzation of *Alfalfa-Rhizobia* system under acidity stress (In Chinese). Chongqing: College of Resources and Environment, Southwest University, 2011: 1—24
- [41] Gentili F, Huss-Danell K. Local and systemic effects of phosphorus and nitrogen on nodulation and nodule function in *Alnus incana*. Journal of Experimental Botany, 2003, 54(10): 2757—2767
- [42] Sultan A K, Gintzburger A G, Obaton B M. Growth and nitrogen fixation of annual *Medicago-Rhizobium* associations during winter in Mediterranean region. European Journal of Agronomy, 2001, 15: 221

EFFECT OF CALCIUM AND PHOSPHOROUS ON MIGRATION, PROPAGATION AND QUORUM SENSING OF RHIZOBIA IN ACID SOIL UNDER ALUMINUM STRESS

Zhang Lei^{1†} Wang Xiaofeng^{1,2} Luo Zhen¹ Liu Xiaoyan¹ Wu Xianqin¹ Fu Li¹ Yu Jianjun¹

(1 College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400716, China)

(2 College of Resources and Environmental Science, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract Soil acidification has become a serious challenge to farmers in the past decades as a result of acid rain, fertilizer application, climate change, etc. In the year of 2000, about 21% of the arable land soil was defined as acid soil in China. At the same time, about 50% of the agricultural soil the world over has become acid soil. Researchers have

been working in fields related to acid soils from the aspect of its biological perspectives in order to remedy and exploit the soil. In the past years the authors have been focusing on the subject of acid tolerance of rhizobium, which may help its legume host, including alfalfa, one of the most sensitive plant to soil acidity, to survive in acid soil. What the authors found in previous studies has shown that acid-tolerant rhizobia improve rhizospheric environment for growth of their legume hosts in acid soil by secreting alkaline substance. Application of a proper amount of calcium (5 mmol kg^{-1}) enhances growth and multiplication of acid-tolerant rhizobia, which leads to better growth of the legume host manifested in significant increase in the concentration of total N in the plant ($p < 0.05$) as compared with CK or Treatment Ca0P0, i. e. no P and Ca addition. At the same time, the quorum sensing of the rhizobia in the rhizosphere improves, too. Addition of phosphorous, as demonstrated in volumes of researches, stimulates root extension and helps the plant stand a number of environmental stresses. Nevertheless so far few papers are available on effect of addition of P and Ca together on growth of rhizobia in acid soil and hence on tolerance of the host plant to acid in soil. To explore the effects, a pot experiment on alfalfa and an acid-tolerant strain of rhizobia, *Sinorhizobium meliloti* 91522 was carried out using the dual-chamber culture method. In the experiment, the pots were packed with acid soil (pH4.45), which was amended with Al^{3+} till Al^{3+} toxicity of the soil reached medium in level and each pot was divided into two chambers, i. e. inner and outer chambers. Rhizobia 91522 were inoculated into the soil in the outer chamber, far from the plant in the inner chamber, to test. Results show that within the 97 days after the inoculation the number of rhizobia was all significantly higher in the pots amended with $5 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$ than in CK. For example, the maximum number of rhizobia in the soil, 1 ~ 2 cm from alfalfa root in the pots treated with Ca^{2+} but no P was 615 times that in CK. On such a basis addition of P enhanced the effect of Ca on growth of rhizobia, e. g. the number of rhizobia, increased up to 9.4 times that in CK. Therefore, it could be concluded that interaction existed between Ca and P in the effect. Addition of Ca^{2+} and P also significantly raised the concentration of N-acetyl-homoserine actones (AHLs) -the indicator of quorum sensing of rhizobia in the soil under acid and aluminum stresses. For this effect, the addition of $5 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$ worked better than that of $10 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ Ca}$. The rhizobia in the near root area (1 ~ 2 cm from the root) and the far root area (6 ~ 8 cm from the root) had similar trends in variation of population during the culturing period, i. e. one week after inoculation, rhizobia spread gradually from the far root zone to the near root zone, peaked in population about 30 days after inoculation, and afterwards the populations of rhizobia in both zones started to decline and level off, However, the population of rhizobia was much bigger in the near root zone than in the far root area all the time except the first two weeks after inoculation, showing that the rhizospheric micro-environment of the host plant is also an important factor affecting the population of rhizobia and quorum sensing. It is tentatively held that addition of $5 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$ and $30 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{ P}$ is an optimal treatment, which helps better survival, migration and quorum sensing of acid-tolerant rhizobia in acid soil under aluminum stress, and hence growth of alfalfa under the aforementioned stresses. The plant in this treatment was 4.67, 3.10, 3.47 and 14.74 times that in CK in root fresh weight, shoot fresh weight, nitrogen concentration and number of nodules, respectively.

Key words Acid soil under aluminum stress; Alfalfa rhizobia; Interaction of Ca and P; Quorum sensing; Migration and multiplication

(责任编辑:陈德明)