

根瘤菌对厚荚相思组培苗的效应

孙成毅¹, 吕成群², 方丽英³, 杨来安², 农韧钢³, 刘萍³

(1. 广西七坡林场, 广西 南宁 530225; 2. 广西大学林学院, 广西 南宁 530004; 3. 广西壮族自治区林业局, 广西 南宁 530022)

摘要: 采用不同根瘤菌接种到厚荚相思组培苗上, 探讨不同根瘤菌对厚荚相思组培苗的影响, 结果表明: 不同根瘤菌对厚荚相思组培苗的高生长、生物量、叶绿素含量和结瘤率均有明显的作用, 表现出根瘤菌与植物种存在不同的亲和关系; 根据苗木各项指标的测定结果, 筛选出 HO6 和 HA4 优良菌株。

关键词: 根瘤菌; 厚荚相思; 组培苗

中图分类号: S718.8

文献标识码: A

Effects of Different Rhizobia Inoculated on *Acacia crassicaarpa* Tissue-Cultured Plantlets

SUN Cheng-yi¹, LÜ Cheng-qun², FANG Li-ying³, YANG Lai-an², NONG Ren-gang³, LIU Ping³

(1. Qi Po Forest Farm of Guangxi, Nanning 530225, Guangxi, China; 2. Forest College of Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China; 3. Forest Bureau of Guangxi, Nanning 530022, Guangxi, China)

Abstract: For probing into the effects of different Rhizobia inoculated on *Acacia crassicaarpa* tissue-cultured plantlets, different Rhizobia were inoculated on *Acacia crassicaarpa* tissue-cultured plantlets. The results showed that the effects of different Rhizobia on the plantlet's height growth, biomass, chlorophyll contents and nodulation rate were markedness. There were different appetency between different Rhizobia and host species. The strains HO6 and HA4 were selected as superior strains based the mensuration results of the plantlets.

Key words: Rhizobia; *Acacia crassicaarpa*; tissue-cultured plantlet

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, 在生物固氮中占有重要的地位^[1]。厚荚相思 (*Acacia crassicaarpa* A. Cunn ex Benth) 为热带速生豆科乔木树种, 属含羞草科, 其适应性强, 具有固氮改土性能, 是优良纸浆和用材树种^[2]。20 世纪 80 年代我国从国外引进, 经种源试验和林木改良, 厚荚相思已在华南地区推广, 成为我国南方短周期工业用材林的主要造林树种之一; 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^[3]。为了提高厚

荚相思组培苗的生长, 促进其与根瘤菌的共生固氮效果, 采用广西大学林学院提供的相思树种根瘤菌接种到厚荚相思组培苗上, 探讨并评价不同根瘤菌接种对厚荚相思组培幼苗的生长、结瘤能力、叶绿素含量等效应, 从中筛选出优良菌株, 为在生产上应用根瘤菌提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 根瘤菌及组培苗来源

根瘤菌菌株来源: 由广西大学林学院从广西境内不同的相思树种林分中采集根瘤, 并分离、纯化、

筛选获得 5 株根瘤菌菌株 (表 1)。试验前将保存的菌株活化后,28 ℃ 摇床培养至对数期,所培养的根瘤菌液用于苗木浆根接种。

表 1 筛选的根瘤菌菌株及宿主植物

菌株编号	宿主植物
HO6(厚荚相思 6 号菌株 <i>Rhizobium tropici</i> sp.)	厚荚相思
ZY3(直干大叶相思 3 号菌株 <i>Bradyrhizobium</i> sp.)	直干大叶相思
ZY4(直干大叶相思 4 号菌株 <i>Bradyrhizobium</i> sp.)	直干大叶相思
HA4(黑木相思 4 号菌株 <i>Rhizobium</i> sp.)	黑木相思
HA8(黑木相思 8 号菌株 <i>Rhizobium</i> sp.)	黑木相思

注:直干大叶相思 (*Straight-stem A. auriculiformis*),黑木相思 (*A. meknoxybn*)。

组培苗来源及根瘤菌接种:采用国有广西高峰林场苗圃组培厂生产的组培瓶子苗。将组培瓶子苗的培养基用自来水洗干净,采用浆根法接种根瘤菌,然后定植于以黄心土为基质的营养杯中进行大田育苗,苗木培育的其余环节按常规技术要求进行。

1.2 试验设计

采用完全随机试验设计,设 6 个处理,即分别接种 ZY3、HA4、HO6、ZY4、HA8 和不接种 (对照)。每个处理组培苗 1 000 株以上,3 个重复,每重复 300 ~ 500 株。

1.3 试验测定及取样

组培苗定植 3 个月 after,在每重复小区内抽取 2 行 (共 50 株),测定 6 种不同处理苗的生长状况。用钢卷尺测定每木的苗高,算出每个重复的苗高平均值;根据平均值,每个重复各取 5 株平均苗带回实验室,用于测定叶绿素、生物量及结瘤效果。

1.4 指标测定及计算方法

1.4.1 叶绿素的测定及计算 取苗木中部成熟新鲜叶片 0.3 g 左右,共 3 份,分别放入研钵中,加入少量碳酸钙粉及 2 ~ 3 mL 80% 的丙酮,研成匀浆,再加入丙酮 10 mL,继续研磨至组织变白,静置 3 ~ 5 min,过滤到 25 mL 棕色容量瓶中,然后用丙酮定容至 25 mL,摇匀,把叶绿素提取液倒入比色杯,以 80% 的丙酮为空白,在波长 663、645 下测定消光度,其计算公式为:

叶绿素 a 浓度:
 $C_a = 12.21D_{663} - 2.81D_{645}$
叶绿素 b 浓度:
 $C_b = 20.13D_{645} - 5.03D_{663}$
叶绿素总浓度:

$C = \text{叶绿素 a} + \text{b 浓度}$

$\text{叶绿素含量 (mg} \cdot \text{kg}^{-1}) = \frac{C \times T \times N}{M}$

上式中: C_a 、 C_b 分别指叶绿素 a、b 的浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), D_{663} 、 D_{645} 分别指叶绿素提取液在波长 663、645 nm 下的消光度, C 为叶绿素总浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), T 为提取液总量 (mL), N 为稀释倍数, M 为材料鲜质量 (g)。

1.4.2 生物量的测定及计算 将培养杯撕裂,取出苗木,每株苗木分为地上和地下两部分 (地下部分包括根瘤);将苗木根部土壤清除干净 (注意要捡起清理土壤时掉下的根瘤),风干表面水后迅速称质量。每个处理每个重复分别统计。

每个重复的地上部生物量 = (该重复的 5 株苗地上部质量之和 + 该重复测定叶绿素时取走的质量) / 5

每个重复的地下部生物量 = 该重复的 5 株苗地下的质量之和 (包括根瘤) / 5

1.4.3 单株结瘤量、平均单个瘤质量的测定及计算 生物量测定之后,把每株苗根系上的全部根瘤摘下 (包括清理土壤时掉下的根瘤),清理干净后逐一计数并称质量。每个处理每个重复分别统计。

每个重复的单株结瘤量 = 每个重复的总根瘤数量 / 此重复的苗木株数

每个重复的平均单个瘤质量 = 该重复的总根瘤质量 / 重复中总根瘤个数

2 结果与分析

2.1 接种不同根瘤菌对厚荚相思幼苗苗高生长的影响

从表 2 可看出:6 种处理的平均苗高大小为 HO6 > HA4 > ZY3 > 对照 > HA8 > ZY4,其中 HO6、HA4、ZY3 处理的平均苗高分别比对照高 15.6%、12.6%、8.9%。经方差分析,接种不同根瘤菌对苗木平均高生长的影响达显著水平 (表 3);但多重比较检验结果表明,各差异水平之间都不显著 (表 4)。

表 2 接种不同根瘤菌幼苗的苗高生长量 cm

重复	菌株处理					
	ZY3	HO6	ZY4	HA8	HA4	对照
	16.50	14.42	11.53	11.94	14.42	12.21
	12.16	15.92	12.54	12.64	15.33	15.03
	13.74	14.69	11.86	11.81	14.09	11.69
平均	14.13	15.01	11.98	12.13	14.61	12.98

表 3 接种不同根瘤菌幼苗的苗高方差分析结果

差异源	SS	df	MS	F	Fcrit
组间	25.163 33	5	5.032 667	3.154 969 *	$F_{0.05} = 3.11$
组内	19.141 87	12	1.595 156		
总计	44.305 2	17			

注: *表示 $F > F_{0.05}$ 达显著差异。

表 4 接种不同根瘤菌幼苗的苗高多重比较 cm

处理	ZY4 (11.98)	HA8 (12.13)	对照 (12.98)	ZY3 (14.13)	HA4 (14.61)	HO6 (15.01)
HO6(15.01)	3.03	2.88	2.03	0.88	0.40	0.00
HA4(14.61)	2.63	2.48	1.63	0.48	0.00	
ZY3(14.13)	2.15	2.00	1.15	0.00		
对照(12.98)	1.00	0.85	0.00			
HA8(12.13)	0.15	0.00				
ZY4(11.98)	0.00					

注: $W_{0.05} = 3.46$,各差异水平都不显著;“()”内的数据为平均值,下同。

表 5 接种不同根瘤菌幼苗的叶绿素含量 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

重复	菌株处理					
	ZY3	ZY4	HO6	HA8	HA4	对照
平均	0.014 71	0.015 95	0.017 80	0.016 28	0.018 40	0.015 63
	0.015 02	0.014 00	0.018 85	0.016 72	0.017 42	0.017 38
	0.015 53	0.016 77	0.019 44	0.018 23	0.018 14	0.014 78
	0.015 09	0.015 57	0.018 70	0.017 08	0.017 99	0.015 93

表 6 接种不同根瘤菌幼苗的叶绿素含量方差分析结果

差异源	SS	df	MS	F	F crit
组间	0.000 031 802	5	0.000 006 360 4	7.86 * *	$F_{0.01} = 5.06$
组内	0.000 009 713	12	0.000 000 809 4		
总计	0.000 041 515	17			

注: * *表示 $F > F_{0.01}$ 达极显著差异。

表 7 接种不同根瘤菌幼苗的叶绿素含量多重比较结果 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

处理	ZY3(0.015 09)	ZY4(0.015 57)	对照(0.015 93)	HA8(0.017 08)	HA4(0.017 99)	HO6(0.018 70)
HO6(0.018 70)	0.003 61 *	0.003 13 *	0.002 77 *	0.001 62	0.000 71	0.000 00
HA4(0.017 99)	0.002 90 *	0.002 42	0.002 06	0.000 91	0.000 00	
HA8(0.017 08)	0.001 99	0.001 51	0.001 15	0.000 00		
对照(0.015 93)	0.000 84	0.000 36	0.000 00			
ZY4(0.015 57)	0.000 48	0.000 00				
ZY3(0.015 09)	0.000 00					

注: $W_{0.05} = 0.002 34$, $W_{0.01} = 0.009 59$; *表示在 0.05 水平差异显著。

2.3 接种不同根瘤菌对厚荚相思幼苗生物量的影响

2.3.1 接种不同根瘤菌对厚荚相思幼苗地上部生物量的影响 由表 8 可看出:接种不同根瘤菌幼苗的地上部生物量大小排序为 HA4 > HO6 > HA8 > ZY3 > 对照 > ZY4。方差分析结果(表 9)表明,6 种处理的地上部生物量间差异达显著水平。地上部生物量多重比较结果(表 10)表明:接种根瘤菌 HA4 幼苗的地上部生物量最高,极显著大于 ZY4,显著大于对照,比对照高 34.9%,说明根瘤菌 HA4 对幼苗

2.2 接种不同根瘤菌对厚荚相思幼苗叶绿素含量的影响

从表 5 可看出:HO6、HA4、HA8 处理的叶绿素含量都高于对照,其中,HO6 处理的叶绿素含量最高,比对照增加 17.4%;而 ZY3、ZY4 处理的叶绿素含量略低于对照,ZY3 处理的叶绿素含量最低,比对照低 5.3%。经方差分析,接种不同根瘤菌的叶绿素含量差异达极显著水平(表 6)。多重比较结果(表 7)表明:HO6 处理苗的叶绿素含量显著大于 ZY3、ZY4 和对照;HA4 处理苗的叶绿素含量仅次于 HO6,显著大于 ZY3;HA8 处理苗的叶绿素含量处于中等水平,虽然比对照大,但差异不显著。

地上部生物量有明显的影响,而 ZY4 处理对幼苗地上部生物量的影响不明显。

表 8 接种不同根瘤菌幼苗的地上部生物量 $\text{g} \cdot \text{株}^{-1}$

重复	菌株处理					
	ZY3	HA4	HO6	ZY4	HA8	对照
平均	1.530	2.107	1.538	1.474	1.616	1.471
	1.921	2.341	1.940	1.470	1.768	1.827
	1.571	1.958	1.644	1.571	1.640	1.450
	1.674	2.135	1.707	1.505	1.675	1.583

表 9 接种不同根瘤菌幼苗的地上部
生物量方差分析结果

差异源	SS	df	MS	F	F crit
组间	0.724 916	5	0.144 983	4.787 732 *	$F_{0.05} = 3.11$
组内	0.363 387	12	0.030 282		
总计	1.088 303	17			

注：*表示 $F > F_{0.05}$ 达显著差异。

表 10 接种不同根瘤菌幼苗的地上
部生物量多重比较结果 $g \cdot 株^{-1}$

处理	ZY4 (1.505)	对照 (1.583)	ZY3 (1.674)	HA8 (1.675)	HO6 (1.707)	HA4 (2.135)
HA4(2.135)	0.630 **	0.552 *	0.461	0.460	0.428	0.000
HO6(1.707)	0.202	0.124	0.033	0.032	0.000	
HA8(1.675)	0.170	0.092	0.001	0.000		
ZY3(1.674)	0.169	0.091	0.000			
对照(1.583)	0.078	0.000				
ZY4(1.505)	0.000					

注： $W_{0.05} = 0.475, W_{0.01} = 0.61$ ；*表示在 0.05 水平差异显著，**表示在 0.01 水平差异显著。

2.3.2 接种不同根瘤菌对厚荚相思幼苗地下部生物量的影响 由表 11 看出：HA4 和 HO6 处理幼苗的地下生物量大于对照，HA4 最高，比对照高 16.0%，ZY3 最低，比对照低 34.0%。方差分析结果(表 12)表明，6 种处理对幼苗地下部生物量的影响达极显著差异。地下部生物量多重比较结果(表 13)表明：HA4 和 HO6 处理幼苗的地下部生物量都极显著大于 ZY3，HA4 显著大于 HA8；HA4 和 HO6 与对照、ZY4 和 HA8 与对照的差异均不显著，ZY3 与对照的差异显著。

表 11 接种不同根瘤菌幼苗的地下部生物量

重复	菌株处理					
	ZY3	HA4	HO6	ZY4	HA8	对照
	0.626	1.160	0.986	0.810	0.839	0.991
	0.795	1.196	1.217	1.000	0.763	1.208
	0.700	1.374	1.379	1.043	1.009	1.016
平均	0.707	1.243	1.194	0.951	0.870	1.072

表 12 接种不同根瘤菌幼苗的地下部
生物量方差分析结果

差异源	SS	df	MS	F	F crit
组间	0.620 443	5	0.124 089	7.114 493 **	$F_{0.01} = 5.06$
组内	0.209 3	12	0.017 442		
总计	0.829 743	17			

注：* *表示 $F > F_{0.01}$ 达极显著差异。

表 13 接种不同根瘤菌幼苗的地下
部分生物量多重比较结果 $g \cdot 株^{-1}$

处理	ZY3 (0.707)	HA8 (0.870)	ZY4 (0.951)	对照 (1.072)	HO6 (1.194)	HA4 (1.243)
HA4(1.243)	0.536 **	0.373 *	0.292	0.171	0.049	0.000
HO6(1.194)	0.487 **	0.324	0.243	0.122	0.000	
对照(1.072)	0.365 *	0.202	0.121	0.000		
ZY4(0.951)	0.244	0.081	0.000			
HA8(0.870)	0.163	0.000				
ZY3(0.707)	0.000					

注： $W_{0.05} = 0.362, W_{0.01} = 0.465$ ；*表示在 0.05 水平差异显著，**表示在 0.01 水平差异显著。

2.4 接种不同根瘤菌对厚荚相思幼苗结瘤的影响 由表 14、15 看出：接种 5 种根瘤菌的单株结瘤量都大于对照，HA4、HO6、HA8、ZY3、ZY4 处理的单株结瘤量分别是对照的 2.63、2.40、2.27、1.97、1.50 倍。方差分析结果(表 15)表明：接种不同根瘤菌的单株结瘤量差异达极显著差异。单株结瘤量多重比较结果(表 16)表明：接种根瘤菌 HA4、HO6、HA8 幼苗的单株结瘤量均极显著大于对照，但 ZY3 和 ZY4 与对照的差异均不显著。

表 14 接种不同根瘤菌幼苗的单株结瘤量

重复	菌株处理					
	ZY3	HA4	HO6	ZY4	HA8	对照
	5.0	9.2	6.4	5.2	7.4	4.0
	7.2	6.6	7.8	4.2	7.8	2.4
	5.6	7.8	7.5	4.2	5.2	2.6
平均	5.9	7.9	7.2	4.5	6.8	3.0

表 15 接种不同根瘤菌幼苗的单
株结瘤量方差分析结果

差异源	SS	df	MS	F	F crit
组间	50.202 78	5	10.040 56	9.150 886 **	$F_{0.01} = 5.06$
组内	13.166 67	12	1.097 222		
总计	63.369 44	17			

注：* *表示 $F > F_{0.01}$ 达极显著差异。

表 16 接种不同根瘤菌幼苗的单株结瘤量多重比较结果
 $g \cdot 株^{-1}$

处理	对照 (3.0)	ZY4 (4.5)	ZY3 (5.9)	HA8 (6.8)	HO6 (7.2)	HA4 (7.9)
HA4(7.9)	4.9 **	3.4 *	2.0	1.1	0.7	0.0
HO6(7.2)	4.2 **	2.7	1.3	0.4	0.0	
HA8(6.8)	3.8 **	2.3	0.9	0.0		
ZY3(5.9)	2.9	1.4	0.0			
ZY4(4.5)	1.5	0.0				
对照(3.0)	0.0					

注： $W_{0.05} = 2.9, W_{0.01} = 3.7$ ；*表示在 0.05 水平差异显著，**表示在 0.01 水平差异显著。

3 结论与讨论

接种不同来源的根瘤菌对厚荚相思组培苗具有不同的效应:

(1)在根瘤菌与其宿主植物亲和性上的表现:在本试验中,分离自厚荚相思根瘤的 HO6 菌株表现较好,其处理幼苗的各项测定指标均处在前列,明显优于对照,反映出宿主植物与菌株之间具有密切的亲和关系;但同样分离自黑木相思的 HA4 和 HA8 菌株却表现不同,HA4 菌株处理的幼苗各项测定指标与 HO6 交互处在前列,对幼苗有明显的促生效果,而 HA8 的处理效应却明显次于 HA4;来自直杆大叶相思的 ZY3 和 ZY4 菌株,促生效果较差,甚至低于对照,表现出与厚荚相思幼苗的排斥性,此结果与黄宝灵等^[4]的试验结果有明显的不同,这可能与幼苗的来源和培育措施有关;同时也表明,一定的根瘤菌种,需要与一定的豆科植物相匹配,才能获得最高的增产效果^[5]。

(2)各菌株的结瘤率与幼苗的高生长、生物量和叶绿素含量之间存在着明显的正相关性,即结瘤量大的菌株,幼苗接种后其苗高、生物量和叶绿素含量也大,而结瘤量小的菌株,幼苗接种后其苗高、生物量和叶绿素含量也小。根瘤是豆科植物与根瘤菌共生形成的固氮器官,其结瘤率的高低,与根瘤的固氮效果有密切的关系^[6];也有人认为,根瘤菌的竞争结瘤能力与宿主植物品种的基因型有一定的依赖关系^[7];本试验结果与前人的研究结果一致。

(3)本试验对幼苗叶绿素的测定结果反映出根瘤菌对幼苗生长的共生有效性,即叶绿素含量高的处理,其幼苗的结瘤率高,生长量大,反之亦然。此结果与前人的关于叶绿素是影响植物光合作用的重

要因素,提高植物的光合效率将有利于植物加强共生固氮作用的碳源和能源的供应以提高根瘤的共生固氮效率的结论一致^[6-8]。

(4)从本试验各处理的地上部生物量和地下部生物量生长的情况来看,HA4 和 HO6 的地下部生物量明显大于其它处理,因此有利于幼苗对营养元素的吸收利用,加上根瘤的固氮作用,自然有利于幼苗地上部的生长。

综上所述,在相思树种根瘤菌的应用过程中,应首先注意树种与根瘤菌的最佳匹配问题,不应盲目使用,同时还应考虑幼苗的培育措施和生长的环境因素,以达到利用生物固氮促进林木生长的最佳效果。综合各项测定指标,在本试验中筛选出 HO6 和 HA4 两个菌株,作为进一步应用试验的优良菌株。

参考文献:

- [1] 李庆逵.我国土壤科学发展与展望[J].土壤学报,1989,26(3): 207 - 216
- [2] 吕成群,黄宝灵,韦原莲,等.不同相思根瘤菌株接种厚荚相思幼苗效应的比较[J].南京林业大学学报:自然科学版,2003,27(4): 15 - 18
- [3] 康丽华,李素翠.相思苗木接种不同根瘤菌的研究[J].林业科学研究,1998,11(4): 343 - 349
- [4] 黄宝灵,吕成群,秦武明,等.厚荚相思苗木接种根瘤菌的造林试验[J].西南林学院学报,2005,25(4): 80 - 83
- [5] 陈文峰,陈文新.我国豆科植物根瘤菌资源多样性及应用基础研究[J].生物学通报,2003,38(7): 1 - 3
- [6] 黄大,林敏.农业微生物基因工程[M].北京:科学出版社,2001
- [7] 缪礼鸿,周俊初.根瘤菌竞争结瘤的研究进展[J].华中农业大学学报,2003,22(1): 84 - 89
- [8] 陈雯莉,李阜棣,周俊初.用叶绿素含量评价快生型大豆根瘤菌的共生有效性[J].华中农业大学学报,1996,15(1): 46 - 51