

# 根瘤菌和内生菌根混合接种 对三叶草增产的效应\*

程 桂 芬

(中国农科院土壤肥料研究所)

豆科作物接种根瘤菌,通过固定大气氮素供给作物氮素营养,增加产量,这一事实已得到公认。现在,泡囊丛枝内生菌根(VAM)增加作物产量的研究也已引起广泛的兴趣<sup>[1, 2]</sup>。

VAM的菌丝体长而密,在土壤中伸长至根外几厘米的区域,帮助根系吸收水分和营养,其中最主要的是磷,也吸收锌、铜、硼、铁、铜、硫等其它元素<sup>[1]</sup>。

豆科作物混合接种根瘤菌和VAM,其中根瘤菌固定大气氮素,VAM扩大根系吸收各种营养元素的范围,在缺磷的土壤中往往能为作物摄取充足的磷,而作物本身则制造并供应碳水化合物及各种有机营养,这三者间的相互作用,无论在田间或温室均已有研究<sup>[3, 4]</sup>。

前人的实验指出:根瘤菌和VAM混合接种比单一接种效果好。多数报导认为在缺磷土壤上,无论灭菌或不灭菌,接种VAM效果大于接种根瘤菌。甚至有些报导认为,在缺磷土壤上没有菌根感染的豆科作物接种根瘤是无效的<sup>[5]</sup>。

本实验就瑞士牧草一年收割多次的习惯,采用定期切割的方法,研究三叶草不同生长期,根瘤菌及菌根所起的作用,并比较了在沙土及沙壤土上的生长效果。

## 一、材料与方法

试验分别于1981年和1982年在温室进行。

(一)土壤性质 列于表1。

(二)试验处理

试验1:两种土壤,分别为灭菌(蒸汽121℃灭菌2小时,下同)与不灭菌,再进行根瘤菌单独接种(R),VAM单独接种(M),根瘤菌和VAM混合接种(RM)与不接种对照(C)四种处理,进行盆钵试验,每盆装土300克。每一处理设5盆,收割并测定地上植株重量及养分含量。另设5盆,植株收割时期同上,但每月用一盆采取根样,以检查根瘤及VAM感染状况。

试验2:一种沙土,进行灭菌处理,接种处理为R、M、RM和C四种。采用35×35×15立方厘米(长×宽×高)的石盆,每盆盛土15公斤,每处理重复4次。

(三)供试作物

供试作物为三叶草(*Trifolium alexandrinum*),种子用98%浓H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>表面消毒3分钟,然后立即用无菌水冲洗两次,用无菌镊子点播。试验1每盆5株,试验2每盆48株。

(四)根瘤菌剂:

\*该试验系作者在瑞士联邦农业研究所 Dr. Schuepp 指导下进修时进行的。

表1

试验土壤基本性质

| 土壤处理     | pH  | 速效氮<br>(N, ppm) | 速效磷<br>( $P_2O_5$ , ppm) | 速效钾<br>( $K_2O$ , ppm) | 砂粒<br>(1—0.05mm) | 粉粒<br>(0.05—0.001mm) |
|----------|-----|-----------------|--------------------------|------------------------|------------------|----------------------|
| 试验 1     |     | (1981)          |                          |                        |                  |                      |
| 灭菌土壤 I   | 7.9 | 15.1            | 14.3                     | 20.2                   | —                | —                    |
| 灭菌土壤 II  | 7.7 | 19.9            | 14.4                     | 47.5                   | —                | —                    |
| 未灭菌土壤 I  | 8.0 | 13.2            | 9.2                      | 27.6                   | 92.0             | 7.9                  |
| 未灭菌土壤 II | 7.9 | 16.3            | 13.7                     | 48.7                   | 47.7             | 52.1                 |
| 试验 2     |     | (1982)          |                          |                        |                  |                      |
| 灭菌土壤 I   | 8.0 | 18.0            | 12.3                     | 21.6                   | —                | —                    |

注：(1) 土壤 I 为沙土，II 为沙壤土。

(2) 速效氮用 1%  $AlK(SO_4)_2$  浸提，蒸馏法测定；速效磷为 Bray 法；速效钾用 1N  $NH_4OH$  提取，火焰光度计测定。

根瘤菌 *Rhizobium trifolium* 174 是由瑞士联邦农业研究所从三叶草 (*Trifolium alexandrinum*) 根瘤分离出的纯种。在处理 R 和 RM 中，种子经消毒后用根瘤菌菌液拌种。

#### (五) 菌根接种剂

VAM 孢子取自当地牧草地，经鉴定属于 *Glomus-mosseae*。孢子用湿筛法筛取直径 63 至 100 $\mu$  的孢子于滤纸上，并计数孢子数量。试验 1 中，用 70% 酒精喷雾对孢子行表面消毒，3 分钟后用无菌水喷洗，将附有孢子的滤纸剪开，使每份滤纸约含黄色、红色及褐色孢子共 50 个，将此滤纸垂直埋入盆中心。试验 2 中，用链霉素、土霉素各 100ppm 的溶液浸泡孢子 4 小时，将孢子悬液倾入漏斗，抽除溶液，置孢子于滤纸上，计数后剪取滤纸成条状，垂直埋入盆内，距植物根约 3 厘米。每盆约接种 1000 个黄、红及褐色的孢子。

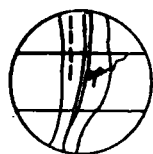
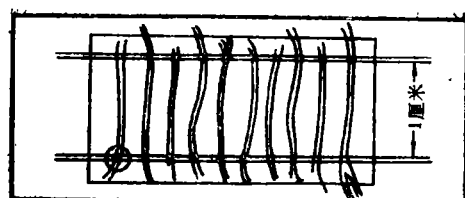
#### (六) 收获

试验 1 及试验 2 均在植株生长 2、3、4 个月时进行收割，头两次从地面 5 厘米处割下，第三次割下全部地上部分。然后于 60℃ 烘干，称植株干重，再磨细，过筛，依次测定氮、磷、钾含量。测定方法：用  $H_2SO_4$ — $HClO_4$  消化后，以蒸馏法定氮，流动注射分析仪钼兰法定磷，火焰光度计法定钾。

#### (七) 结瘤、固氮及菌根感染率检查

结瘤与固氮：试验 1 在三叶草生长 1 个月时取一盆采集根样，检查根瘤数，生长 2、3、4 个月时各取一盆，称取根瘤重量。试验 2 在三叶草生长 4 个月全株收获时，用乙炔还原法测定根瘤固氮酶活性。

菌根感染率检查：试验 1 在三叶草生长 1、2、3、4 个月时，用上述检查过根瘤的根样进行 VAM 感染率的检查，剪取侧根，除去其顶尖 1 厘米，剪下第二段大于 1 厘米作为待查样品，每盆取样品三份，分别染色。染色法：加 10% KOH 溶液使没过根，于 50℃ 沙浴上加热 15 分钟，冷却，倾去 KOH 溶液，加 0.2% 锥虫兰酚液染三分钟，倾去染色液，在酚液 (100 克酚，100 毫升乳酸，100 毫升甘油和 200 毫升蒸馏水混合而成) 中过夜。检查法：在每份染色样品中随机取样，用三块载玻片，先在载玻片背面划两道距离为 1 厘米的平行线，再将染好色的根段放在载玻片的正面上，每片 10 条，以盖玻片盖好并压紧，用显微镜检查根与平行线交叉点是否有感染，并以 0 至 5 等份记载其感染程度 (图 1)。算法：以  $x = 4y^2$  的公式计算感染百分比， $x$  为感染率， $y$  为感染程度，从 0 至 5 共分成 6 级。



交叉点检查区

| 感染状况       | 等级 | 感染率 (%) |
|------------|----|---------|
| 无          | 0  | 0       |
| 很少         | 1  | 4       |
| 少(一侧感染)    | 2  | 16      |
| 中(两侧感染)    | 3  | 36      |
| 多(尚有非感染细胞) | 4  | 64      |
| 很多(无非感染细胞) | 5  | 100     |

图1 VAM感染率的检查法

## 二、试验结果

试验1结果(表2)表明:三叶草生长2个月时,各处理的植株干重,单接根瘤菌(R)的与根瘤菌、菌根混接(RM)的接近,对照(C)又与单接菌根(M)的接近,前两者又明显比后两者高。3个月时,产量高低顺序为 $RM > M > R > C$ 。4个月时,在未灭菌土壤中为 $RM > M > R \approx C$ ,在灭菌土壤中则为 $RM > M > R > C$ 。其总产量顺序为 $RM > M \approx R > C$ ,  $R > C$ ,其中RM约为C的两倍。两种土壤性质对产量影响不显著。植株氮、磷、钾含量大致为 $RM > M \approx R > C$ 。

从根瘤生长来看(表3),植株生长一个月时,均以R、RM瘤数最多(二者之间差异不显著),在不灭菌沙土中R比C大6.7倍,不灭菌沙壤土中R比C大2.7倍。在灭菌沙土中,由于外界环境含根瘤菌,对照(C)也有少量根瘤生长,R具有大量根瘤。在灭菌沙壤土中,C无根瘤,R有大量根瘤。

表2

试验1.三叶草的产量及养分含量(5株/盆)

| 土壤处理 |     |    | 干重 (克/盆)       |                |                |       | 3次收获植株养分总含量(%) |                               |                  |
|------|-----|----|----------------|----------------|----------------|-------|----------------|-------------------------------|------------------|
|      |     |    | 第1次收获<br>(2个月) | 第2次收获<br>(3个月) | 第3次收获<br>(4个月) | 总 量   | N              | P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | K <sub>2</sub> O |
| 沙    | 未灭菌 | C  | 2.61           | 2.45           | 2.94           | 8.00  | 0.27           | 0.017                         | 0.16             |
|      |     | R  | 4.08           | 2.78           | 3.08           | 9.94  | 0.23           | 0.027                         | 0.23             |
|      |     | M  | 2.00           | 3.12           | 5.01           | 10.13 | 0.34           | 0.021                         | 0.21             |
|      |     | RM | 3.91           | 3.97           | 5.93           | 13.09 | 0.49           | 0.029                         | 0.30             |
| 土    | 灭菌  | C  | 1.75           | 2.35           | 2.22           | 6.32  | 0.22           | 0.013                         | 0.19             |
|      |     | R  | 4.10           | 2.90           | 2.89           | 9.89  | 0.38           | 0.015                         | 0.31             |
|      |     | M  | 1.85           | 3.30           | 5.50           | 8.04  | 0.35           | 0.020                         | 0.22             |
|      |     | RM | 3.82           | 4.02           | 6.04           | 13.88 | 0.53           | 0.031                         | 0.33             |
| 沙壤土  | 未灭菌 | C  | 3.10           | 2.88           | 3.01           | 8.99  | 0.27           | 0.014                         | 0.15             |
|      |     | R  | 4.38           | 2.91           | 2.97           | 10.26 | 0.31           | 0.019                         | 0.24             |
|      |     | M  | 3.21           | 3.18           | 5.49           | 11.88 | 0.37           | 0.022                         | 0.25             |
|      |     | RM | 4.65           | 3.88           | 6.22           | 14.75 | 0.54           | 0.031                         | 0.32             |
|      | 灭菌  | C  | 2.01           | 2.34           | 2.38           | 6.73  | 0.22           | 0.014                         | 0.21             |
|      |     | R  | 4.95           | 2.97           | 3.33           | 11.25 | 0.34           | 0.019                         | 0.25             |
|      |     | M  | 1.85           | 3.36           | 5.12           | 10.33 | 0.36           | 0.021                         | 0.22             |
|      |     | RM | 4.35           | 4.21           | 7.03           | 15.59 | 0.56           | 0.032                         | 0.35             |

表 3

试验 1. 三叶草根瘤生长量及VAH感染率(5株/盆)

| 土壤处理        |             |    |     | 根瘤数          | 根瘤鲜重(克) |      |      |      | VAM感染率 (%) |      |     |  |
|-------------|-------------|----|-----|--------------|---------|------|------|------|------------|------|-----|--|
|             |             |    |     | (个)<br>(1个月) | 2个月     | 3个月  | 4个月  | 1个月  | 2个月        | 3个月  | 4个月 |  |
| 沙<br>土      | 未<br>灭<br>菌 | C  | 35  | 1.1          | 3.0     | 3.1  | 2.2  | 10.7 | 20.4       | 25.2 |     |  |
|             |             | R  | 242 | 4.5          | 3.6     | 2.9  | 2.7  | 14.2 | 22.2       | 28.1 |     |  |
|             |             | M  | 26  | 2.9          | 5.4     | 5.5  | 7.1  | 32.4 | 44.1       | 61.9 |     |  |
|             |             | RM | 311 | 4.8          | 6.7     | 7.8  | 7.5  | 63.3 | 81.9       | 85.7 |     |  |
|             | 灭<br>菌      | C  | 2   | 0.6          | 1.7     | 2.8  | 0    | 0    | 0          | 0    |     |  |
|             |             | R  | 238 | 5.1          | 3.5     | 4.7  | 0    | 0    | 0          | 0    |     |  |
|             |             | M  | 5   | 1.2          | 2.8     | 5.9  | 7.6  | 17.8 | 51.2       | 72.6 |     |  |
|             |             | RM | 272 | 5.3          | 7.1     | 8.6  | 8.9  | 41.8 | 66.3       | 80.5 |     |  |
| 沙<br>壤<br>土 | 未<br>灭<br>菌 | C  | 82  | 2.2          | 3.7     | 4.2  | 5.3  | 16.0 | 31.4       | 36.5 |     |  |
|             |             | R  | 225 | 6.1          | 5.0     | 4.3  | 4.0  | 14.2 | 37.5       | 40.3 |     |  |
|             |             | M  | 47  | 3.6          | 4.6     | 8.7  | 16.0 | 51.3 | 52.5       | 61.1 |     |  |
|             |             | RM | 224 | 6.9          | 8.2     | 9.9  | 17.8 | 59.9 | 60.3       | 78.2 |     |  |
|             | 灭<br>菌      | C  | 0   | 0            | 0       | 0    | 0    | 0    | 0          | 0    |     |  |
|             |             | R  | 235 | 5.7          | 5.1     | 6.0  | 0    | 0    | 0          | 0    |     |  |
|             |             | M  | 0   | 0            | 0       | 0    | 12.5 | 20.1 | 55.7       | 62.8 |     |  |
|             |             | RM | 246 | 5.9          | 8.4     | 10.8 | 14.2 | 39.7 | 63.8       | 79.0 |     |  |

随着植物生长, 不灭菌土壤中, 接种根瘤菌的R和RM与不接种的C和M相比, 根瘤重量差异逐渐减小, RM根瘤重量最大, M其次。灭菌沙壤土一直未受外界根瘤菌污染, 始终没有生长根瘤。值得注意的是不论沙土或沙壤土, 未灭菌处理中, 4个月时M的根瘤重量都大于R, 沙土灭菌处理的, 因受污染而长根瘤, 到4个月时M的根瘤重竟明显地超过R。

表3结果还表明: 灭菌土壤中都不发生VAM感染。而在未灭菌土壤中均发生感染, 作物生长1个月时RM和M间差异不大, 但明显高于C和R。在沙土中RM和M的VAM感染率分别为7.5%和7.1%, 而C和R分别为2.2%和2.7%; 在沙壤土中RM和M的VAM感染率分别为17.8%和16.0%, C和R分别为5.3%和4.0%, 此时RM和M的区别不大, 随着植物的生长, 4个月时, RM处理中VAM感染率明显超过M, M又高于R及C。两种土壤性质对根瘤及VAM感染率的影响在后期差异不明显。

试验2的结果和试验1很接近: 三叶草生长2个月时, 表现接种根瘤菌有效。3个月时接种VAM有效。无论是植株干重或氮、磷、钾含量均依次为RM>M>R>C。RM的固氮酶

表 4

试验2. 三叶草的产量、养份含量及固氮酶活性(48株/盆)

| 土壤处理 | 干重(克/盆)        |                |                |       | 植株养分含量 (%) |                               |                  | 4个月植株根瘤固氮酶<br>活性<br>( $\mu$ /乙炔还原/时/10株) |
|------|----------------|----------------|----------------|-------|------------|-------------------------------|------------------|------------------------------------------|
|      | 第1次收获<br>(2个月) | 第2次收获<br>(3个月) | 第3次收获<br>(4个月) | 总 量   | N          | P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | K <sub>2</sub> O |                                          |
| C    | 14.9           | 12.4           | 14.1           | 41.8  | 0.72       | 0.049                         | 0.66             | 25.2                                     |
| R    | 27.1           | 20.2           | 15.9           | 63.2  | 0.81       | 0.063                         | 0.78             | 125                                      |
| M    | 15.4           | 23.1           | 37.9           | 76.4  | 1.01       | 0.077                         | 0.82             | 33.9                                     |
| RM   | 28.1           | 38.4           | 41.0           | 107.5 | 1.43       | 0.105                         | 1.12             | 227                                      |

活性也最高,几乎为R的两倍,处理C和M由于外界根瘤感染,也结少量根瘤,但固氮酶活性很低(表4)。

### 三、讨 论

用分期收割的方法,研究了三叶草的产量、养分含量和根瘤发育与VAM感染率之间的关系。上述各参数与两种土壤的性质关系不大。

试验1和2的结果表明,由于根瘤菌感染早,VAM感染晚,生长2个月时,三叶草的产量以R和RM为高,说明根瘤生长是产量增加的原因;生长3个月时,产量顺序为 $RM > M > R > C$ ,说明菌根的共生促进了三叶草增产;生长4个月时,产量顺序为 $RM > M > R \approx C$ ,说明菌根单独接种也能增加三叶草产量,单接种根瘤菌而无菌根共生,在后期无增产作用,只有根瘤菌和菌根双接种才能自始至终保持高产。

国外有些报道认为:在缺磷的土壤上,如果没有菌根感染,接种根瘤菌是徒然的<sup>[5]</sup>。我们的实验表明,在这种条件下,单接种根瘤菌,对三叶草生长前期还能起到增产作用。这是由于植株在幼小时,对土壤磷素需求量不大,故根瘤菌能暂时发挥作用;其次,某些根瘤菌能适应低磷条件。B. Mosse(1977)报道过:她曾发现在一种对磷有固定作用的土壤中,只含土著根瘤菌,且无菌根,但植株生长、结瘤、固氮都很好,认为可能是这种土著根瘤菌能较好地适应低磷条件<sup>[1]</sup>。我们所用的根瘤菌株 *Rh. trifolium* 174 正是从低磷土壤中分离到的,它可能是一种能适应低磷条件的菌株。但尽管如此,它的固氮效能,只有在VAM存在时,才能更好地发挥。

### 参 考 文 献

- [1] B. Mosse, Exploiting the legume-rhizobium symbiosis in tropical agriculture. Miscellaneous publication, 275—292, 1977.
- [2] B. Mosse, C. L. Powell & D. S. Hayman, New phytol, 76: 331—342, 1976.
- [3] C. Azcon et al., Nature, 279: 325—327, 1979.
- [4] D. S. Hayman & B. Mosse, New phytol, 71: 41—47, 1972.
- [5] J. M. Barca, plant and Soil, 54: 283—296, 1980.
- [6] 程桂芬, 农药对土壤微生物生态的研究. 中国环境科学, 5(1): 21—24, 1985.

(上接第131页)

### 参 考 文 献

- [1] 何群、陈家坊:土壤游离铁和络合态铁的测定,土壤,第15卷第6期,242—244页,1983.
- [2] 许祖诒、陈家坊:土壤中无定形氧化铁的测定,土壤通报,第6期,32—35页,1980.
- [3] 中国科学院南京土壤研究所:中国土壤,299—310页,科学出版社,1978.