

# 三叶草接菌效果及根瘤菌存活条件

姚惠琴 曹景勤 陈碧云

(中国科学院南京土壤研究所)

## 摘 要

在红壤地区栽培绛三叶草,接种根瘤菌是重要的增产措施。作物根际效应、土壤含水量及根瘤菌自身的耐酸能力是影响根瘤菌在该土壤中存活的主要条件。

绛三叶草(*Trifolium incarnatum* L.)是欧美普遍种植的越年生豆科绿肥,也是澳大利亚牧场开发时期引种较多的一种高产优质的豆科牧草,70年代引入我国。引种试验证明,绛三叶草具有早熟、高产、适应性强和抗病虫等特性,适宜于我国大面积推广种植。而接种根瘤菌则是引种三叶草成功的关键。

本工作研究了红壤地区绛三叶草接种根瘤菌的增产效益和根瘤菌在土壤中的存活条件,为提高该地区三叶草和根瘤菌的共生固氮效益提供依据。

## 一、材料和方法

### (一)供试菌株

1. 接种菌株。将从不同地区采集到的绛三叶草植株,按常规方法分离根瘤菌<sup>[1]</sup>。用砂培方法,将所有的菌株进行入侵和结瘤有效性试验,从中选得优良菌株“Wu95”<sup>\*</sup>和“402”作为田间和盆栽试验的菌剂菌株。

2. 耐药菌株。用含药梯度平板法<sup>[2]</sup>选得共生固氮性状不低于亲株的自然耐药突变菌株“S—13—2”(耐500ppm硫酸盐链霉素)作为接种菌回收率的测定。

### (二)供试土壤

盆栽试验土壤采自浙江金华上华茶场田间试验区。土壤为已垦殖利用五年的第四纪红色粘土, pH5.2; 含氮量0.04%; 速效磷低, 约为4 ppm( $P_2O_5$ )。

### (三)盆栽试验

盆栽试验分三个处理即对照(不施肥、不接菌); 施磷肥不接菌; 施磷肥接菌。每个处理重复四次。每个钵(直径12×15厘米)装混合均匀的风干土1250克。施肥处理的钵, 每盆加钙镁磷肥(含 $P_2O_5$ 12.49%)0.5克和过磷酸钙(含 $P_2O_5$ 15%)1.25克。种子(播前进行表面灭菌)穴播, 每盆三穴, 每穴定苗4株, 接菌数每穴约为3亿。

### (四)田间试验 试验分三个处理:

\* Wu95从澳大利亚引进

处理1. (对照)施有机肥, 不施磷肥, 不接菌;

处理2. 施有机肥和磷肥, 不接菌;

处理3. 施有机肥、磷肥并接菌。

每个处理重复3次, 随机排列。小区面积为  $6 \times 1.5\text{m}$  (0.0135亩)。施肥小区每区施钙镁磷肥0.7斤(合50斤/亩); 厩肥40斤(合30担/亩); 菌剂4克(合300克/亩)。播种量每小区40克(合6斤/亩)。1984年9月14日播种。1985年4月21日盛花期收割, 共生长220天。

### (五) 培育试验

1. 测定根际效应的培育试验。将20克干土装在塑料管中(直径 $2.8 \times 10.7$ 厘米), 加水, 播种待测作物(绛三叶草、紫云英和小麦)的种籽2—3粒。播后7天间苗, 使每管保持一株苗, 并接种耐药标准菌株“S—13—2”, 以不种作物的土壤为对照。以后每隔一定时间用平板稀释法测定土壤中根瘤菌菌数。分离培养基为酵母膏葡萄糖+500ppm硫酸盐链霉素+6ppm结晶紫。

2. 土壤水分对根瘤菌存活的影响。取10克土壤(pH6.5)三份, 分别装入小玻管中, 经15磅湿热灭菌1小时, 在无菌条件下接种一定数量的三叶草根瘤菌悬液, 使土壤含水量分别保持75%(淹水); 25%(湿润); 9%(风干)。置于室温, 用称量法保持恒湿。分别于培育后第20、60、100和120天测定活根瘤菌数。

3. 菌株耐酸能力测定。称10克土壤二份, 将土壤pH分别调至4.4和6.4, 置500毫升的三角瓶中, 加水10毫升, 经15磅湿热灭菌1小时, 在无菌条件下, 接种一定数量的待测菌液, 定期用平板分离法计算菌数。

## 二、结果和讨论

### (一) 绛三叶草的接种根瘤菌效果

盆栽和田间试验结果都证明, 三叶草接种根瘤菌的效果是很明显的。盆栽试验中施磷接菌处理与施磷处理相比, 绛三叶草的株高、分枝数、瘤数、植株干重以及植株含氮量和固氮量都以接菌处理者优(表1)。田间试验的苗期调查结果(表2)表明, 凡施磷肥又接菌的处理,

表1 接种根瘤菌对绛三叶草生长影响(盆栽生长期167天)

处 理	株 高 (厘米)	分 枝 (个/株)	瘤 数 (个/株)	干 重 (克/盆)	植株含N (%)	N/盆 (毫克)	固 N 量 (毫克/盆)
对 照	4.8	0	0	1.49	2.19	32.7	
施 磷 肥	7.4	1.1	1	2.24*	2.75	61.6	
施 磷 肥 接 菌	15.9	4.2	101	10.95**	3.09	338	227

\*  $P < 0.05$

\*\*  $P < 0.01$

表2 接种根瘤菌对绛三叶草苗期生长的影响(田间试验, 播后80天)

处 理	株 高 (厘米)	分 枝 (个/株)	瘤 数 (个/株)	植株干重 (克/100株)	植株含N (%)	固 氮 量 (克/100株)
厩 肥	6.7	3.4	0.8	17.1	1.10	
厩肥+磷	8.1	3.5	1.4	25.9	1.30	
厩肥+磷 接 菌	12.8	5.2	68.0	63.0	1.85	0.879

绿三叶草的株高、分枝、瘤数、植株含氮量都是明显高于未接菌处理。趋势与盆栽结果相一致。在盆栽或田间试验中凡接菌的植株，其根系有大量的粉红色的有效根瘤；不接菌的植株根系无根瘤或只有少量白色无效根瘤。由于有效根瘤在三叶草上营共生固氮作用，改善植株苗期的氮素营养，故接菌植株生长茂盛，叶色深绿色；不接菌植株矮小，叶色红黄。田间试验结果(表3)表明，施肥接菌处理区，地上部鲜草产量每亩达4420斤，折合干草产量748斤/亩；施肥处理区每亩鲜草产量达1807斤，折合干草产量每亩301斤，接菌增产148.3%，按地上部产量估计，三叶草和根瘤菌营共生固氮所获得的纯氮为13.4斤/亩。

红壤酸度较高(pH4.5—5.5)，土壤中的活性铁、铝易与磷酸根离子结合为难溶性的磷酸铁、铝，降低了土壤中磷的有效性，因而有效磷含量极低。在红壤地区种植三叶草，必须提供足够的磷肥。在田间和盆栽试验中，绿三叶草施用磷肥后干草增产效果分别达47.5%和50.3%。而不施磷肥的对照处理，植株则停止生长甚至死亡，共生固氮作用当然也受到了抑制。所以，施用磷肥成了关系到红壤地区绿三叶草和根瘤菌能否营共生固氮作用的关键措施。

综上所述，在从未种植绿三叶草的红壤丘陵地区，适量施磷并接种根瘤菌，有利于三叶草生长和根瘤菌繁殖，两者能建立良好的共生关系，发挥较大的共生固氮效益。这不但对增加该地区土壤覆盖度减少丘陵土壤冲刷和补充土壤有机质，提高土壤氮素含量等都有较大的现实意义；而且对提高旱地作物和多年生经济林木(桔、茶)的优质高产更具有直接效益。此外，对增辟肥源和青饲料来源，促进农牧业综合发展，建立良好的生态体系也有较好的作用。

## (二)影响三叶草根瘤菌在土壤中存活的因素

1. 根际效应。由于作物根系分泌物的刺激作用，三叶草根瘤菌可以在豆科植物或非豆科植物根际大量繁殖<sup>[3]</sup>。绝大多数非豆科植物对根瘤菌的根际效应小于豆科植物<sup>[4]</sup>。三叶草根瘤菌在绿三叶草(寄主作物)，紫云英和小麦根际的数量，列于表4。由表可见，接菌30天后，三叶草根际的菌数由 $5.2 \times 10^3$ 个/克干土增加到 $28.0 \times 10^3$ 个/克干土；接菌14天后，紫云英根际的菌数由 $5.2 \times 10^3$ 个/克干土，增加到 $26.1 \times 10^3$ 个/克干土；小麦根际，接菌30天后由 $5.2 \times 10^3$ 个/克干土增加到 $15.0 \times 10^3$ 个/克干土；不种作物的土壤中接菌14天后菌数由 $5.2 \times 10^3$ 个/克干土下降至 $2.8 \times 10^3$ 个/克干土，60天后下降至零。说明寄主作物和豆科作物的根际对三叶草根瘤菌的刺激作用比非豆科植物强。作物的根际效应是促使根瘤菌在土壤中生长、繁殖的一种积极因素。但是，对长期不种植寄主作物的红壤来讲，非豆科植物的根际效应，对保持根瘤菌在土壤中存活与繁殖，也起着重要作用。

表4 三叶草根瘤菌在不同作物根际的数量变化( $\times 10^3$ /克干土)

根际种类	测定天数				
	0	7	14	30	60
无根际(对照)	5.2	1.4	2.8	0.3	0
绿三叶草根际	5.2	27.2	—	28.9	10.7
紫云英根际	5.2	1.1	26.1	1.5	6.6
小麦根际	5.2	8.3	—	14.7	1.4

表3 接种根瘤菌对绿三叶草花期生长的影响(田间试验，生长220天)

处 理	鲜 草 (斤/亩)	干 草 (斤/亩)	植株 含N (%)	纯 N (斤/亩)(固N斤/亩)
厩 肥	1381	204.2	2.54	5.19
磷+厩肥	1807	301.0*	2.99	9.02
磷+厩肥 接 菌	4420	745.5**	3.00	22.4
				13.4

\* P < 0.05

\*\* P < 0.01

2. 土壤水分对根瘤菌存活的影响。据报道，三叶草根瘤菌能在风干土中存活达19年之久<sup>[5]</sup>。但是，从农业观点来看，风干土壤既不利于作物生长，也不利于三叶草根瘤菌的存活。由图1可见，根瘤菌在红壤中的存活(土壤pH为6)数量随土壤水分的减少而下降。将当年接种过耐药菌株“S—13—2”

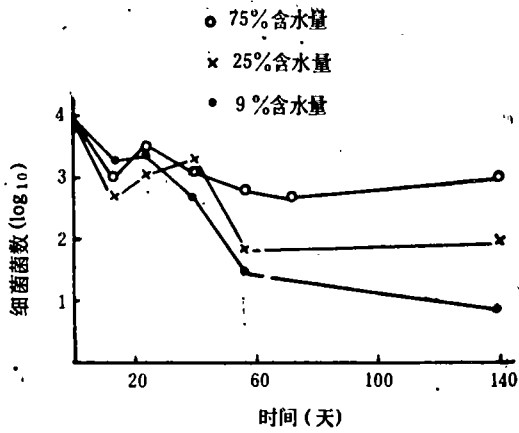


图1 土壤水分对根瘤菌存活的影响

回收率(表5)即可看出,含水量为8%时,根瘤菌存活数大大下降,影响了第二年寄主植物的结瘤,植株根系的瘤数明显下降。与淹水土壤相比(79%含水量),虽然湿润土壤(22%含水量)中存活菌数也大为下降,但还能使寄主保持良好的结瘤性状,其结瘤数为63个/株,接近于淹水土壤植株的结瘤数67个/株。表明菌剂施用一年后,如果土壤水分接近22%时,土壤中存活的菌数仍足以使第二年寄主作物有较高的结瘤量。

3. 三叶草根瘤菌的耐酸能力。土壤酸度是影响根瘤菌存活的另一个重要因素。三叶草根瘤菌虽然具有一定耐酸能力,但是当土壤pH值低于4.5时,就很难在土壤中存活。在人为培养基上约有84%的菌株不能耐酸(pH4.2)<sup>[6]</sup>。我们测定了46个菌株在红壤中(pH5.2)的耐酸情况,其中有65%的菌株因不能耐酸而死亡。同时还测定了6个优良菌株在不同pH值(pH4.4和6.4)的同一土壤中的存活情况,其中有两个菌株在pH4.4的土壤中,经60天后存活数急剧下降或死亡;有四个菌株在不同pH值土壤中存活数量保持恒定(图2),表示菌株间的耐酸能力差异较大。盆栽试验结果还表明,凡接种耐酸菌株的三叶草,其植株干物质重为不接菌的6倍;而接种不耐酸菌株的植株,其干物质重为不接菌的4倍。这可能与耐酸菌株在酸性土壤中存活数量较多有关。Frank认为,不同菌株的耐酸能力是不同的,具有耐酸能力的菌株同时也具有固氮能力<sup>[7]</sup>。看来,为了提高三叶草共生固氮效率,必须选育耐酸能力高的菌株,以适应红壤的酸性环境。

表5 土壤水分对三叶草根瘤菌存活和结瘤的影响(生长55天)

土壤水分	根瘤菌数量 (活菌数/克干土)	根瘤数量 (个/株)	接种菌回收率 (%)
79%	1000	67	90.4
22%	0	63	93.7
8%	0	26	98.2

的三叶草盆栽土壤(pH5.2)的含水量分别保持在79%(淹水状态);22%(湿润状态);8%(风干状态)一年,然后用耐药平板测定土壤根瘤菌数量。并将不同含水量的土壤继续种植三叶草,55天后,测定根瘤数和接种菌的

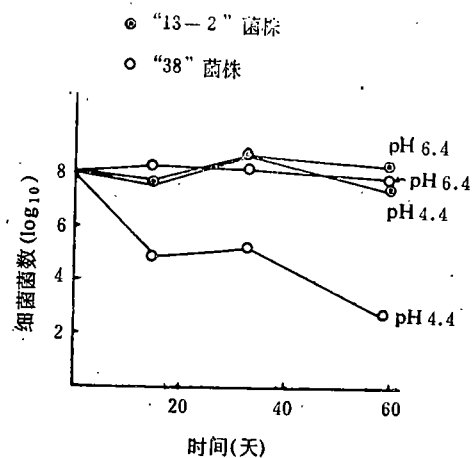


图2 两株三叶草根瘤菌菌株的耐酸能力

#### 参 考 文 献

- [1] 中国科学院南京土壤研究所根瘤菌组, 苕子根瘤菌优良菌株的筛选, 土壤5:205-209页, 1974。
- [2] Waclaw szybalki and vernon Bryson, J. Bacterial, 64: 489-499, 1952.
- [3] Rovira, A. D., Aust. J. Agr. Res., 12:77, 1961.
- [4] In ecology of Soil-borne plant pathogens, University of California press Berkely Nutman.P. S., 1965.
- [5] Danson S. K. A and Alexander. M., Pros. Soil. Sci. Am., 38: 86-89, 1974.
- [6] Frank. C. Thornton F. C., and C. B. Davey, Sci. Soc. Am. J. 47: 496-501, 1983.
- [7] Frank. C. Thornton F. C., and C. B. Davey, Agronomy journal, Vol. 75. May-june, 1983.