

三叶草根瘤菌耐药突变 菌株共生固氮有效性的研究

曹景勤 陈碧云 姚惠琴

(中国科学院南京土壤研究所)

自1954年Balassa首先证明细菌的耐药性可通过DNA转移给予子代以来,耐药突变菌株便广泛应用于根瘤菌的遗传和生态方面的研究^[1]。目前,免疫血清技术和耐药标记技术均已成功地用于鉴别土壤中根瘤菌的不同品系。与免疫血清技术相比,虽然耐药标记技术具有简单、快速和经济的特点,但是,已有的工作证明,根瘤菌的突变菌株极易丧失其原有亲株所具有的结瘤能力和共生固氮有效性。

关于三叶草根瘤菌耐链霉素突变菌株与共生固氮有效性的关系,各研究者的认识极不一致,有人认为,耐药突变菌株可以完全丧失其固氮有效性和结瘤能力^[2],也有人认为不会丧失固氮有效性^[1,3,4]。本文就三叶草耐链霉素突变菌株在绛三叶草上的共生固氮有效性和入侵性问题进行了初步的研究。

一、材料和方法

(一)供试菌株 供试菌株计有13-2、38、40、43、402、47、49、60*和Wu**等9株。

(二)寄主作物 绛三叶草(*Trifolium incarnatum* L.)

(三)培养基 葡萄糖 10克; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.5克; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2克; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.02克; H_3BO_3 0.02克; $CaCO_3$ 1.5克; NaCl 0.1克; 酵母膏 1克; 水 1000毫升。以上配制的液体培养基,加13克琼脂粉即为固体培养基。用于平板分离时还需加入5毫升 0.5%刚果红溶液。

(四)耐药突变菌株的筛选 将固氮能力强的优良菌株活化后,接种于培养基斜面上,待生长至丰满后,刮取一环接种到5毫升葡萄糖-酵母膏液体培养基中,置28℃恒温室中培养,并经常摇动。当培养液由清变浊时,取一滴混浊液涂布在含500微克硫酸盐链霉素(华北制药厂生产)的培养基平板上,置28℃恒温室中培养。挑取单菌落在含药平板上纯化,将纯菌移至无药斜面培养基上保存。

(五)培育试验

1. 斜面结瘤试验 在5×30厘米试管中,加入100毫升无氮培养液-琼脂,制成斜面。切去其顶端部分琼脂,使成一个平台,在其上播种带有根瘤菌的已萌芽的三叶草种子两粒,待三叶草出苗后,逐日观察成瘤速度和结瘤情况。

2. 砂培试验 在300毫升高型烧杯中加入300克石英砂及90毫升无氮培养液(其组成为:

*由江苏省淮阴地区农科所提供。

**系华中农学院1983年根瘤菌——豆科植物训练班试验菌株。

K_2SO_4 0.9克; $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ 0.5克; $NaCl$ 0.5克; H_3BO_3 0.02克; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.02克; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.5克; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5克; $FeCl_3$ 0.02克; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.02克和水1000毫升。pH调至7.0—7.4。3份营养液加1份水稀释后备用。), 烧杯口用牛皮纸扎好, 经湿热灭菌(121℃, 40分钟)后, 播入接菌种子, 每杯播3穴, 出苗后每穴留1棵植株, 置温室中生长。

3. 盆栽试验 将1250克第四纪红色粘土(采自浙江上华茶场, pH5.2; 全N 0.041%; 有效磷低)装入小号瓷钵中, 加入1.25克过磷酸钙(P_2O_5 15%)和0.5克钙镁磷钾肥(P_2O_5 12.49%; K_2O 1.76%), 充分搅拌均匀, 加240克水。播入三叶草种子, 播前已分别接种优良菌株 Wu 95、402、43和耐药突变菌株 S-13-2、S-38和 S-47(每盆接菌数约30亿), 生长167天收获。测定三叶草的干物重、株高和分枝数。

4. 田间小区试验 试验是在上华茶场的第四纪红色粘土红壤旱地上进行的。分两个处理; 有机肥+磷肥区和有机肥+磷肥+耐药突变菌株区, 每处理重复3次, 小区面积为9M²。播种三叶草, 生长220天收获。测定三叶草株高、鲜草重和植株含氮量等。

二、结果与讨论

(一) 耐药突变菌株的共生固氮有效性和入侵能力 表1结果表明, 耐药突变菌株的入侵能力、固氮酶活性和结瘤数与亲株大致相同, 甚至略高于后者, 说明菌株并未因耐药而改变其固有的特性。

表1 耐药突变菌株的入侵能力结瘤能力和固氮酶活性与亲株的比较

菌株号	项				目	
	入侵所需天数		结瘤数(个/株)		固氮酶活性*(μg 分子 C_2H_2 /株/分钟)	
	亲株	耐药菌株	亲株	耐药菌株	亲株	耐药菌株
13-2	11	10	9.0	19.0	—	—
47	13	11	5.0	5.8	—	0.350
38	12	12	4.2	4.2	0.470	0.639
40	12	12	6.8	5.9	0.518	0.489
49	11	11	4.6	5.5	0.374	0.326

* 按中科院上海植生所“固氮研究中乙炔还原定量测定简易法”测定。

(二) 耐药突变菌株的竞争结瘤能力

1. 耐药突变菌株的竞争结瘤能力 在灭菌的条件下, 将耐药突变菌株和亲株等量混合后, 将其接种在缙三叶草种子上, 进行砂培。待植株根部出现根瘤后, 取瘤分别在无药平板和含药平板上测定菌数, 结果列于表2。结果表明, 突变菌株即使与亲株混合后, 突变菌株的回收率仍可高达73.5%, 说明耐药突变菌株竞争结瘤能力高于亲株。

表2 耐药突变菌株和亲株竞争结瘤能力比较

菌株号	无药平板上出现的菌数(个)	耐药平板上出现的菌数(个)	回收率(%)
亲株60	60	0	0
亲株60+突变菌株60	68	50	73.5
突变菌株60	30	30	100

2. 耐药突变菌株和非耐药菌株之间的竞争结瘤能力 为了比较耐药突变菌株与非耐药菌株竞争结瘤能力, 将耐药突变菌株 S-13-2 和普通菌株 Wu 95及43等量混合, 然后接种于缙三叶草种子, 进行砂培, 61天后测定各自的结瘤能力。结果列于表3。

由表 3 可见, 耐药突变菌株 S-13-2 分别与非耐药菌株 Wu95 和 43 混合接菌后, 它们的竞争结瘤率分别为 83.3 和 96.6%, 说明 S-13-2 的竞争结瘤能力明显地高于 Wu95 和 43 菌株。

关于突变菌株具有较强的竞争结瘤能力的现象, Margaret E. Brown^[5]曾作如下的解释: 由于豆科植物根际有大量的细菌、真菌和放线菌的存在, 而产生了各种抗菌素, 但这些抗菌素并不影响耐药突变菌株的大量繁殖, 因而耐药突变菌株成了作物根际占优势的微生物, 故而竞争结瘤能力较强。但是, 本文中的耐链霉素突变菌株的入侵能力是否也与此有关, 尚需作进一步的研究。

(三) 绛三叶草接种耐药突变菌株的增产效果 盆栽及大田小区试验结果都表明, 绛三叶草接种耐药突变菌株后, 其鲜草产量(或干物重)及固氮量高于未接种者。表 4 结果表明, 与对照相比, 接种耐药突变菌株的植株其干物重增加 146—246.8%; 株高增加 5—7 厘米; 分枝增加 1—2 个/株。接种优良菌株的植株, 其干物质重较对照增加 178.0—338.0%; 株高增加 7.5—8.2 厘米; 分枝增加 0.9—2.7 个/株, 表明突变菌株的接菌效果与优良菌株相近。

表 4 绛三叶草接种耐药菌株的效果(盆栽试验)

项 目	菌 株 号						
	耐 药 突 变 菌 株			对 照	优 良 菌 株		
	S-47	S-13-2	S-38		402	43	Wu95
干物重 克/盆	6.15	8.67	6.86	2.5	7.53	6.95	10.96
增加%	246.0	346.8	274.4	100	312.0	278.0	438.0
株高(厘米)	12.3	13.8	14.1	7.4	15.6	14.9	15.2
分枝 个/株	2.7	2.4	3.2	1.1	3.4	2.0	3.8

表 5 是绛三叶草苗期接种突变菌株的田间小区试验结果。结果表明, 绛三叶草在苗期接种突变菌株能明显提高三叶草的共生固氮效率, 改善三叶草的氮素营养, 增加植株干物质的累积, 为壮苗越冬, 早春先发打下了良好基础。接种菌株的三叶草较未接种者, 其百株干物质重增加 53.7%, 冬前固氮量增加 122.4%。

表 5 绛三叶草苗期接种突变菌株的效果(田间小区试验)

处 理	项 目						
	株 高 (厘米)	植株干物重		植株含氮量		固 氮 量	
		克/100株	增长率(%)	N %	克/100株	克/100株	增长率(%)
有机肥 + 磷	8.1	25.9	100	1.109	0.2872	—	—
有机肥 + 磷 + 突变菌株*	10.7	39.7	153.7	1.609	0.6387	0.3515	122.4

表 6 接种耐药突变菌株对绛三叶草产量的影响

处 理	株高(厘米)	地上部鲜草产量 (斤/亩)	接 菌 效 果	
			增产(斤/亩)	增长率(%)
有机肥 + 磷	38.9	1807.3	—	—
有机肥 + 磷 + 突变菌株	49.2	2719.8	912.5	50.5

* S-47、S-13-2、S-38 三个菌株的混合接种

棉花施肥效应的经济分析

王 黎

(山东农业大学)

一、分析依据

作物施肥效应是指作物对所施用肥料在产量上的反应。通过对试验数据的统计,即可拟合出反映作物产量和施肥水平关系间的施肥效应曲线(或曲面)。人们根据肥料效应曲线(或曲面)方程可以对肥料的经济效益进行各种分析,并求出最高产量施肥量、最佳经济施肥量、不同利润率的施肥量以及最大利润率的施肥量等,可作为农业生产上提供施肥建议时的参考。

但是,肥料效应函数只是一定条件下肥料用量与作物产量间相互关系的反映,它将随条件而变化。因此,在使用肥料效应方程推荐各种肥料用量时,必须考虑其使用条件。否则,将毫无意义或甚至导出错误的结论。

1982—1985年,笔者参加了“山东省棉花综合开发试验”及“黄淮海中低产田棉花开发试验”。曾在山东省西北部潮土区(包括盐化潮土),进行了棉花氮肥试验(以百斤过磷酸钙为底肥和磷肥试验(各处理施用等量氮素追肥),以及氮磷肥配合试验,六年累计试验总数共43个(其中有12个试验设三次重复,其余为多年多点无重复试验)。氮肥试验设对照、每亩纯氮12斤、24斤和36斤四个处理;磷肥试验设对照、每亩纯磷(P_2O_5)8斤、16斤、24斤四个处理;氮磷

从三叶草的产量来看,接种耐药突变菌株的效果也是令人满意的。表6结果表明,在营养条件相似的情况下,接种者较未接种者鲜草产量增加912.5斤,增产率高达50.5%。

三、小 结

1. 耐药突变菌株的入侵力、固氮酶活性和结瘤数与亲株大致相同。
2. 耐药突变菌株接种至绛三叶草上,可以提高绛三叶草的结瘤率、固氮量和鲜草(或干物质)的产量。
3. 耐药突变菌株较能忍受高剂量抗菌素的影响,并可通过含药平板测定其在土壤中的消长情况。

参 考 文 献

- [1] Schwing Hamer, E. A., Canadian Journal of microbiology, Vol, 10, 1964.
- [2] Zelazna-Kowalska, I., Plant and Soil, Special Volume, 67-71, 1971.
- [3] Gupta, B. M. and Kleczkowska, J. J., gen, Microbial, 27: 473-476, 1962.
- [4] Brockwell, J., Schwinghamer. E. A. and Gault, R. R., Soil Biol, Biochem., 9: 19-24, 1977.
- [5] Margaret. E. Brown, J. gen. Microbiol., 24: 369-377, 1961.