

文章编号: 1674-7054(2012)03-0232-04

酸性条件下接种根瘤菌对热研2号 柱花草产量及含氮量的影响

张洁^{1,2}, 董荣书^{1,2}, 黄艳霞³, 郝恒福¹, 刘国道¹

(1. 中国热带农业科学院 热带作物品种资源研究所/农业部华南作物基因资源与种质创制重点实验室 海南 儋州 571737;
2. 海南大学 农学院 海南 海口 570228; 3. 福建龙岩市农业科学研究所 福建 龙岩 364000)

摘要: 通过水培试验, 研究不同酸性条件下接种5株根瘤菌对热研2号柱花草产量和含氮量的影响, 结果表明, 在3个酸性条件下接种5株根瘤菌都能提高柱花草植株的干质量和含氮量; 除菌株PN13-3在pH3.5时的产量最高外, 其他菌株都是在pH4.5时产量及含氮量最高, 与不接菌(CK)一致; 菌株PN13-3适合用于较酸的环境中, 菌株BS1-1、RJS9-2次之; 菌株在酸性逆境条件下对柱花草的促生能力较强, 植株干质量和含氮量的增加倍数随pH的降低而升高。

关键词: 根瘤菌; 热研2号柱花草; pH值

中图分类号: S541.9; S3 **文献标志码:** A

热研2号柱花草(*Stylosanthes guianensis* cv. Reyan No. 2)是我国热带、亚热带地区的推广种植的主要豆科牧草品种^[1-2]。而接种根瘤菌是牧草高产种植的一个重要手段^[3]。Vincent提出根瘤菌的共生过程受寄主基因组、根瘤菌基因组和环境因子等因素的影响^[4]。我国南方土壤大部分偏酸性、贫瘠^[5], 且不同根瘤菌的耐酸性不同^[6]。因此, 筛选出酸性条件下柱花草及根瘤菌的高效组合是提高柱花草产量的有效途径之一。笔者在测定出圭亚那柱花草根瘤菌耐酸性的基础上^[7], 从不同酸碱度条件的水培环境中, 筛选出柱花草和菌株的最优搭配体系, 为热研2号柱花草的高产种植及柱花草根瘤菌的研究应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料 试验所需的热研2号柱花草和5株柱花草根瘤菌菌株均由中国热带农业科学院品资所热带牧草研究中心提供, 热研2号柱花草是该中心选育推广的品种。5种菌株的名称和特征见表1。

表1 根瘤菌菌株名称及特性

菌株编号	名称	特性
BS1-1	<i>Bradyrhizobium</i> sp. RY1	侵染能力强, 结瘤数多, 结瘤体积大, 抗逆性强, 同时能使两个柱花草品种高产
RJS9-2	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> RY2	侵染能力强, 耐盐, 结瘤数多
YM11-1	<i>Bradyrhizobium</i> sp. RY3	侵染能力强, 结瘤数多, 抗逆性强
PN13-3	<i>Bradyrhizobium</i> sp. RY4	侵染能力强, 结瘤数多, 结瘤体积大, 抗逆性强
LZ3-2	<i>Bradyrhizobium</i> sp. RY5	侵染能力强, 结瘤数多, 结瘤体积大, 抗逆性强

1.2 方法

1.2.1 试验设计 试验采用pH、菌株双因子随机区组设计。pH设3.5、4.5、5.8三个水平, 菌株5种, 不接菌处理组作为对照, 重复4次(见表2)。

收稿日期: 2012-05-21

基金项目: 科技基础性工作专项子课题(2007FY110500); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(PZS083)和海南省自然科学基金项目(808176)

作者简介: 张洁(1987-), 女, 傈僳族, 云南怒江人, 海南大学农学院2009级硕士研究生。

通信作者: 刘国道(1963-), 男, 博士, 研究员。E-mail: liuguodao2008@163.com

表2 不同菌株及酸处理的双因子随机区组设计

pH	BS1-1(B1)	RJS9-2(B2)	YM11-1(B3)	PN13-3(B4)	LZ3-2(B5)	CK(B6)
3.5(A1)	A1B1	A1B2	A1B3	A1B4	A1B5	A1B6
4.5(A2)	A2B1	A2B2	A2B3	A2B4	A2B5	A2B6
5.8(A3)	A3B1	A3B2	A3B3	A3B4	A3B5	A3B6

1.2.2 水培设备及苗的准备 水培实验用塑料桶的规格为上、下口直径各 10 cm,高 7 cm,实验桶先用 $w=0.1\%$ 的高锰酸钾浸泡 2 min,然后用去离子水冲洗晾干,桶外围用黑色袋套住遮光。定植板用 1 cm 厚的泡沫板,在每块板的中央打孔,以中央孔为对角线交点的正方形的 4 个角打孔。水培通气装置有通气管、通气管、通气石、通气接口、定时器。

将柱花草种子去种皮后在 80 °C 的热水中处理 5 min;用 100 mL · L⁻¹ 的过氧化氢溶液灭菌 2 min,然后用无菌水冲洗 4~5 遍。将种子播种于灭菌后的砂培苗床上,并浇 $\rho=0.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硫酸钙溶液,待种子发芽并长出床面后开始浇 1/2 的 Hoaglang^[8] 营养液育苗 2 周。育苗 2 周后,移植生长一致的砂培苗到泡沫板的 4 个边孔中,每孔 1 株苗,共 240 株。用海绵将柱花草茎固定。苗根部浸入 1/4 的 Hoaglang 营养液中,并在中间孔中接入通气石。水培 2 周后,将营养液更换为 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氮浓度的低氮营养液^[9],同时接菌。

1.2.3 菌株培养及接种后处理 各菌株在 YMA 固体培养基上活化后,转接到 YMA 液体培养基恒温培养,待菌液 OD_{600} 为 0.8~1.0 时,将菌接种于柱花草根部,每株柱花草接 5 mL 菌液,并暂停通气 3 d 后再通气。每 4 h 通气 15 min。2 周后柱花草根上开始出现瘤,此时的营养液氮浓度调整为低氮营养液^[9],每 2 h 通气 15 min。每周换 1 次营养液,期间每 2 d 测 1 次营养液 pH 值,保证 pH 值在处理范围内。

1.2.4 测定指标及方法 待柱花草生长到花期时收样,称取地上部柱花草的鲜质量,然后放在信封中,置于烘箱中 105 °C 杀青 20 min,75 °C 烘干称其质量,并测定地上部分样品的氮含量。地上部全氮测定^[10]:先用 H₂SO₄-H₂O₂ 进行消毒,然后用自动定氮仪测定全氮(Kjedahl2300,瑞士 FOSS)。

1.2.5 数据分析 本试验所有数据均用 Microsoft Excel 2003 (Microsoft Company) 进行平均数和标准差计算,并且利用 SAS(SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) 统计软件进行双因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 在不同 pH 条件下接种根瘤菌对热研 2 号柱花草产量的影响 根据表 3 可以看出,热研 2 号柱花草接种 5 株根瘤菌后(以不接种为对照 CK),经不同的 pH 处理,干质量在 pH 值、菌株及二者相互作用上的差异都达到极显著水平。当 pH 为 4.5 时 2 号柱花草的产量最高,显著高于其他 2 个处理;2 号柱花草接种菌株 B2 和 B4 后的产量最高,显著高于接种 B5 和对照组的产量。在所有处理中产量最低的是 A1B6,干质量仅为 0.37 g;产量最高的是 A2B2, A1B2, A2B1(三者差异不显著),分别比 A1B6 增产 12.57, 10.35, 10.5 倍。pH 为 5.8 的对照组的产量最低,为 0.61 g,显著低于接种各菌株的柱花草产量;接种菌株 B2 的柱花草产量最高,为 3.12 g,接种菌株 B4 和 B3 的次之,分别为 2.94, 2.67 g,三者差异不显著,分别比 CK 增产 4.11, 3.82, 3.38 倍。pH 为 4.5 的对照组的产量最低,仅为 1.50 g,显著低于接种菌株 B5 及不接种以外的柱花草产量,接种菌株 B2 和 B1 的 2 号柱花草产量最高,分别为 5.02, 4.09 g,分别比 CK 增产 2.35, 1.73 倍。pH 为 3.5 的酸性环境中,不接菌的柱花草产量最低,为 0.37 g,显著低于接种菌株 B5 外的菌株,接种菌株 B2, B4, B1(三者差异不显著)的产量最高分别为 4.20, 3.75, 3.71 g,分别比 CK 增产 10.35, 9.14, 9.03 倍,显著高于接种菌株 B3, B5 及不接种根瘤菌的柱花草的产量。在 pH 为 4.5 时接种菌株 B1 和 B2 2 号柱花草产量最高, pH 为 3.5 时的产量次之, pH 为 5.8 时的产量最低。在 pH 为 4.5 时接种菌株 B3 的 2 号柱花草的产量最高, pH 为 5.8 时的产量次之, pH 为 3.5 时的产量最低,与不接菌(CK)的变化一致。在 pH 为 3.5 时接种菌株 B4 的 2 号柱花草产量最高, pH 为 4.5 时的产量次之, pH 为 5.8 时的产量最低。

2.2 在不同 pH 条件下接种根瘤菌对热研 2 号柱花草含氮量的影响 根据表 3 可以看出,热研 2 号柱花草接种 2 株根瘤菌后(以不接种为对照 CK),经不同的 pH 处理后,植株含氮量在 pH 值、菌株及二者相互作用上差异都达到极显著水平。在所有处理中,含氮量最低的是 A1B6(显著低于 A1B5, A1B3 外的所有菌株),仅为 5.82 mg · g⁻¹,含氮量最高的是 A2B1, A2B5, A2B4(三者差异不显著),分别比 A1B6 氮含量

增加 85.9% ,79.2% ,78.87%。在 pH 因子中 ,pH 为 4.5 时的氮含量最高 ,pH 为 5.8 时的次之 ,pH 为 3.5 时的最低(两者差异显著);2 号柱花草在接种菌株 B1 ,B4 时的含氮量最高 ,显著高于接种 B5 及不接菌(CK)的含氮量。pH 为 5.8 时 ,不接菌时的 2 号柱花草含氮量最低 ,为 $8.46 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,显著低于接种菌株 B1 ,B2 的含氮量;接种菌株 B1 ,B2 的柱花草含氮量最高 ,分别为 9.69 $9.67 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,二者差异不显著 ,分别比 CK 提高 14.53% ,14.30%。pH 为 4.5 时不接种菌株的柱花草氮含量最低 ,仅为 $9.51 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,显著低于接种菌株 B1 的含氮量 ,接种菌株 B1 的含氮量最高 ,为 $10.82 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,比不接种菌株含氮量增加 13.77%。在 pH 为 3.5 的酸性环境中 ,不接菌的柱花草(CK)含氮量最低 ,为 $5.82 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,显著低于接种菌株 B5 外的菌株 ,接种菌株 B1 ,B4 ,B3(三者差异不显著)的含氮量最高 ,分别为 9.27 9.14 $8.23 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,分别比 CK 增加 59.27% ,57.04% ,41.41%。在 pH 为 4.5 时 2 号柱花草接种菌株 B1 ,B3 ,B4 ,B5 的含氮量最高 ,pH 为 5.8 时的含氮量次之 ,pH 为 4.5 时的含氮量最低 ,与不接菌(CK)的变化一致。在 pH 为 4.5 时 2 号柱花草在接种菌株 B2 的含氮量最高 ,pH 为 3.5 时的产量次之 ,pH 为 5.8 时的含氮量最低。

表 3 不同 pH 条件下接种不同根瘤菌后的柱花草干质量及含氮量

处理	pH 及其处理	RY2 干质量/g	处理	pH 及其处理	RY2 含氮量/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
A	A2	3.25a	A	A2	9.92a
	A1	2.55b		A3	9.41b
	A3	2.31b		A1	7.49c
B	B2	4.11a	B	B1	9.58a
	B4	3.36b		B3	9.52a
	B1	3.29b		B4	9.22a
	B3	3.00b		B2	8.65b
	B5	1.61c		B5	8.36b
	B6	0.83d		B6	8.31b
A × B	A2B2	5.02a	A × B	A2B1	10.82A
	A1B2	4.20ab		A2B5	10.46ab
	A2B1	4.09ab		A2B4	10.41ab
	A2B3	3.93bc		A2B2	9.86abc
	A1B4	3.75bcd		A2B3	9.80abcd
	A1B1	3.71bcd		A3B1	9.69bcd
	A2B4	3.40bcde		A3B3	9.67bcd
	A3B2	3.12bcdef		A2B6	9.51bcde
	A3B4	2.94cdef		A1B1	9.27cdef
	A3B3	2.67def		A1B4	9.14cdef
	A3B5	2.44efg		A3B2	9.12cdef
	A1B3	2.40efg		A3B5	8.78cdef
	A3B1	2.06fg		A3B4	8.72def
	A2B5	1.53gh		A3 B6	8.46ef
	A2B6	1.50gh		A1B3	8.23f
	A1B5	0.89hi		A1B2	6.83g
	A3B6	0.61hi		A1B5	6.35g
	A1B6	0.37i		A1B6	5.82g
F			F		
A	12.48 ***		A	87.05 ***	
B	39.70 ***		B	8.65 ***	
A × B	4.33 ***		A × B	7.39 ***	

注: B1 为 BS1-1 ,B2 为 RJS9-2 ,B3 为 YM11-1 ,B4 为 PN13-3 ,B5 为 LZ3-2 ,B6 为 CK; 3 个 pH 梯度为 3.5(A1) 4.5(A2) 5.8(A3); A: 不同 pH 处理; B: 不同柱花草根瘤菌菌株; A × B: 不同菌株与不同 pH 值交互作用; ***: $P < 0.001$

3 讨 论

酸碱度是影响根瘤菌结瘤能力的一个重要生态因素。生长环境的 pH 值对豆科植物结瘤和生长有影响 ,但因植物不同而异。杨敏等人通过低 pH 对苜蓿共生结瘤与生长的影响研究中发现 ,低 pH (pH < 5.0) 能抑制苜蓿结瘤^[11]。本试验在不同 pH 条件下 ,热研 2 号柱花草不接菌时植株干质量及含氮量的

pH 值顺序规律为 $\text{pH}4.5 > \text{pH}5.8 > \text{pH}3.5$ 。在所有接种根瘤菌的处理中,热研2号柱花草在 $\text{pH}3.5$ 的环境中接种根瘤菌应优先选择菌株 B2。但此时的2号柱花草含氮量较低,与 CK 差异不显著,这可能是由于菌株 B2 在 $\text{pH}3.5$ 时固氮能力较弱,其溶磷及分泌生长素能力较强引起的干质量和所致含氮量的差异所致。

热研2号柱花草在不同 pH 条件下接种5株根瘤菌后,其干质量和含氮量在 pH 值、菌株及二者相互作用上的差异都达到极显著水平,在所有处理中, $\text{pH}3.5$ 时不接菌的干质量和含氮量最低,这说明热研2号柱花草不适合于 $\text{pH}3.5$ 的环境。但从柱花草地上部的干质量和含氮量的增加情况来看, $\text{pH}4.5$ 时增加的量最低为 1.73 ~ 2.35 倍(干质量)和 0.14 倍(含氮量), $\text{pH}3.5$ 时的增加量最大为 9.03 ~ 10.35 倍(干质量)和 0.41 ~ 0.59 倍(含氮量)。而不接菌时的植株干质量和含氮量的 pH 值变化规律为: $\text{pH}4.5 > \text{pH}5.8 > \text{pH}3.5$,这说明在适合于柱花草生活的环境中接种根瘤菌发挥的作用较小,而在逆境中接种根瘤菌对柱花草产量及含氮量有更大的促进作用。本实验与姜云植等人研究发现,在 $\text{pH}4.0$ 条件下,对蚕豆及豌豆根瘤菌结瘤有较明显的抑制作用^[12],杨江科等人发现在偏酸条件下对费氏中华根瘤菌和大豆慢生根瘤菌有明显抑制作用^[13],所得结论一致。

参考文献:

- [1] 刘国道. 海南饲用植物志 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2000: 218 - 221.
- [2] 刘国道. 南方农区畜牧业发展实践与技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2008: 170 - 172.
- [3] 蔡小艳, 赖志强, 易显凤, 等. 我国南方柱花草的利用现状及发展对策 [J]. 上海畜牧兽医通讯, 2010(3): 51 - 53.
- [4] 多立安. 豆科牧草的利用与草地畜牧业的持续发展 [J]. 中国草地, 1996(4): 52 - 56.
- [5] 赵志强. 花生钼营养研究综述 [J]. 花生科技, 1997(3): 23 - 24.
- [6] BROMFIELD E S P, JONES D G. Studies on acid tolerance of *Rhizobium trifolii* in culture and soil [J]. J Appl Bacteriol, 1980, 48: 253 - 264.
- [7] 杨茂, 严小龙. 柱花草在酸性红壤中磷吸收效率及其形态和生理生化特性初探 [J]. 草地学报, 1998, 6(3): 213 - 220.
- [8] 黄艳霞, 董荣书, 白昌军, 等. 柱花草根瘤菌的耐酸性与耐盐性 [J]. 热带作物学报, 2010, 31(6): 914 - 919.
- [9] 杜育梅, 白昌军, 田江, 等. 柱花草适应酸性缺磷土壤的基因型差异及可能的生理机制 [J]. 华南农业大学学报, 2008, 29(4): 6 - 11.
- [10] 古昌红. 微波消解-纳氏试剂分光光度法测定土壤中总氮 [J]. 重庆工商大学环境与生物工程学院, 2010, 27(6): 613 - 616.
- [11] 杨敏, 陈秀虎, 黎晓峰, 等. 低 pH 对苜蓿共生结瘤与生长的影响研究 [J]. 江西农业学报, 2007, 19(7): 68 - 70.
- [12] 姜云植, 张梅芳. 豌豆族根瘤菌菌株分离筛选及某些因素对结瘤的影响 [J]. 广西农学院学报, 1992, 11(2): 30 - 36.
- [13] 杨江科, 周琴, 周俊初, 等. pH 对土壤中土著快、慢生大豆根瘤菌结瘤的影响 [J]. 应用生态学报, 2001, 12(4): 639 - 640.

The Impact of Rhizobium Bacteria Inoculation on the Growth of *Stylosanthes guianensis* Reyan 2 under Different pH Values

ZHANG Jie^{1,2}, DONG Rong-shu^{1,2}, HUANG Yan-xia³, HUAN Heng-fu¹, LIU Guo-dao¹

(1. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China, Ministry of Agriculture, Danzhou 571737, China; 2. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 571737, China; 3. Longyan Institute of Agricultural Sciences, Longyan 364000, China)

Abstract: Five strains of nitrogen fixing bacteria, *Rhizobium*, were inoculated onto *Stylosanthes guianensis* Reyan 2 water cultured under different acidity levels to observe their impact on the yield and nitrogen contents of *S. guianensis* Reyan 2. *S. guianensis* Reyan 2 showed higher dry weight and nitrogen contents under 3 acidic levels after inoculated with the rhizobium bacteria. Strain B4 inoculation treatment gave the highest yield at pH 3.5, while other strains inoculation treatments produced the highest yield and nitrogen content at pH 4.5, which were the same as the CK. Strain B4 was adapted to more acid environment, followed by Strains B1 and B2. All the strains of the rhizobium had great improvement on the growth of *S. guianensis* Reyan 2 water cultured under acidic conditions, and reduced the dry weight and nitrogen content of *S. guianensis* Reyan 2 with the increase of the acidity of the cultural solution.

Key words: rhizobium; *Stylosanthes guianensis* Reyan 2; pH value