

不同根瘤菌接种厚荚相思幼苗的试验效果

石 前¹, 黄宝灵¹, 吕成群¹, 伍荣善², 李飞宇¹, 陈李花¹

(1. 广西大学 林学院, 广西 南宁 530005; 2. 广西钦廉林场, 广西 合浦 536128)

摘要: 为了探讨接种不同根瘤菌对厚荚相思 *Acacia crassicaarpa* 苗木生长以及对土壤肥力和土壤酶活性的影响, 以 3 个根瘤菌菌株接种厚荚相思幼苗进行研究。结果表明: 接种根瘤菌能显著提高厚荚相思苗木的苗高、地径、叶片含氮量、土壤全氮量、土壤有机质及土壤磷酸酶和果聚糖蔗糖酶活性, 其中苗高生长量增加 15.1% ~ 27.4%, 地径生长量增加 7.7% ~ 32.0%, 叶片含氮量提高 54.7% ~ 84.6%, 土壤全氮量提高 21.4% ~ 31.6%, 土壤有机质提高 31.0% ~ 38.7%, 土壤磷酸酶活性提高 23.4% ~ 34.7%, 果聚糖蔗糖酶活性提高 64.5% ~ 178.0%; 苗木的生物量也有显著增加, 苗木单株总生物量增加 22.6% ~ 73.1%。综合分析表明, 接种根瘤菌具有良好的生态效益。表 4 参 20

关键词: 微生物生态学; 根瘤菌; 厚荚相思; 接种; 生物量; 土壤肥力; 土壤酶活性

中图分类号: S718.3; S154.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5692(2009)04-0544-05

Inoculation of *Acacia crassicaarpa* seedlings with three rhizobia bacteria

SHI Qian¹, HUANG Bao-ling¹, LÜ Cheng-qun¹, WU Rong-shan², LI Fei-yu¹, CHEN Li-hua¹

(1. Forestry College, Guangxi University, Nanning 530005, Guangxi, China; 2. Qinlian Forest Farm of Guangxi, Hepu 536128, Guangxi, China)

Abstract: To determine the effect of different rhizobia on growth as well as their influence on soil fertility and soil enzyme activity, three rhizobia(HM4, HO6, HM8) were used to inoculate tissue culture seedlings of *Acacia crassicaarpa*. We use randomized block design with single factor(no inoculation as a control), with three replications. After five months of growth, we measured height, base diameter, biomass, N contents in leaf or soil, soil organic matters, and phosphatase and levansucrase activity in soil. Compared to a control, results showed increases in seedling height 15.1% - 27.4% ($P < 0.05$), seedling base diameter 7.7% - 32.0% ($P < 0.05$), N content of the leaf 54.7% - 84.6% ($P < 0.01$), soil N 21.4% - 31.6% ($P < 0.01$), soil organic content 31.0% - 38.7% ($P < 0.01$), soil phosphatase enzyme 23.4% - 34.7% ($P < 0.05$), and levansucrase activity in the soil 64.5% - 178.0% ($P < 0.05$). This study indicated that there were good ecological benefits after inoculation with the rhizobia. [Ch, 4 tab. 20 ref.]

Key words: microbial ecology; rhizobia; *Acacia crassicaarpa*; inoculation; biomass; soil fertility; soil enzyme activity

豆科 Leguminosae 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^[1-2], 在生物固氮中有重要的地位。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^[3], 而对木本豆科植物则研究、应用不多^[4]。厚荚相思 *Acacia crassicaarpa*, 又名粗果相思, 为热带常绿速生乔木树种, 原产澳大利亚。该树种 1985 年引种中国后, 经种源试验和林木改良, 已在华南地区推广, 成为中国南方短周期工业用材林的主要造林树种之一。该树种生长快, 干形较直,

收稿日期: 2008-09-24; 修回日期: 2008-11-24

基金项目: 广西壮族自治区自然科学基金资助项目(0448005)

作者简介: 石前, 从事微生物生态学研究。E-mail: sq821@163.com。通信作者: 黄宝灵, 研究员, 博士, 从事林学和森林微生物学研究。E-mail: hnboln@126.com

耐干旱, 抗逆性强, 具有固氮改土性能, 能耐火烧和海风(含盐)^[5], 可在多种土壤上生长^[6], 是一种多功能的速生用材树种, 可固氮 $10 \sim 32 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2} \cdot \text{a}^{-1}$ 。由于引种时间短, 对厚荚相思根瘤菌的研究较少。作者着重研究将不同相思根瘤菌株接种到厚荚相思幼苗后, 其半年生苗木的生长与不接种对照的比较, 从而探讨根瘤菌固氮在林木上的应用效应, 同时能筛选出促进厚荚相思幼苗生长显著的优良菌种, 为进行大面积人工接种根瘤菌提供科学依据^[7]。

1 材料和方法

1.1 试点与材料

1.1.1 试验地点 广西南宁市高峰林场二塘分场苗圃。位于南宁市北郊 20 km 处。该苗圃地年平均气温为 $21.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 年降水量 $1\,200 \sim 1\,500 \text{ mm}$, 年蒸发量 $1\,250 \sim 1\,620 \text{ mm}$; 年日照时数为 $1\,450 \sim 1\,650 \text{ h}$, 相对湿度 80% 以上^[8]。地形为低丘, 海拔为 $150 \sim 400 \text{ m}$, 土壤为赤红壤, 土层厚度 $60 \sim 100 \text{ cm}$ 。

1.1.2 供试苗木 试验所用苗木为高峰林场二塘分场苗圃提供的厚荚相思待移栽的组培瓶苗。

1.1.3 菌株 试验选用的根瘤菌采自相思树 *Acacia confusa* 根瘤, 经加有刚果红的 YMA (yeast-extract mannitol mineral salt agar)^[9-10] 平板划线培养以及纯化、鉴定^[11], 并通过回接结瘤的菌株^[12], 编号分别为 HM4, HO6 和 HM8, 由广西大学林学院提供。

1.2 试验方法

1.2.1 试验地、试验设计和方法 试验采取单因素随机区组设计, 分别设接种 HM4, HO6 和 HM8 等 3 株根瘤菌和未接种根瘤菌(ck)4 个处理。设 3 次重复。所有苗木除不施肥外, 均采用苗圃常规管理。

1.2.2 接种方法 将供试菌株分别接种到装有 YMB (yeast mannitol broth) 液体培养基的三角瓶中, $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床培养, 5 d 后测其光密度值 ($A = 600 \text{ nm}$), 菌液浓度达到 $1 \times 10^8 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。采用浆根法将清水洗净的厚荚相思组培苗的根系分别浸入各菌株的菌液中, 然后定植于黄心土营养袋中(即直径为 40 mm 塑料薄膜育苗袋, 内装 $100 \sim 200 \text{ g}$ 过筛红壤, 在移栽前 2 d 用 $0.5 \sim 1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 高锰酸钾溶液淋透消毒) 常规育苗。

1.2.3 苗木测定 苗龄 5 个月时, 实地测定苗高和地径, 每重复测定 10 株。然后求出平均值, 按平均值取 3 株平均木带回实验室, 测其生物量、叶片含氮量、土壤含氮量、土壤有机质、土壤磷酸酶和果聚糖蔗糖酶活性。

1.2.4 测定及计算方法 生物量测定: 样品于 $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘至恒量, 称干质量。叶片含氮量、土壤含氮量和土壤有机质含量按照《林业标准汇编(三)》^[13] 中相关方法进行测定。土壤磷酸酶和果聚糖蔗糖酶活性按照文献^[14] 中的相关方法进行测定。测定结果采用 SPSS 软件^[15] 进行方差分析, 用 Duncan 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 接种根瘤菌对厚荚相思苗木苗高、地径及生物量的影响

接种不同根瘤菌对厚荚相思幼苗高生长的影响有明显差异(表 1)。其中, HM4, HO6 和 HM8 的苗高生长量分别比对照的增加 27.4%, 26.5% 和 15.1%。方差分析表明, 苗木高生长量差异达极显著水平 ($F = 7.921\,894^{**} > F_{0.01} = 7.590\,992$)。多重比较表明(表 2), HM4, HO6 和 HM8 与对照的差异均达显著水平, 其余菌株间无显著差异。

接种不同根瘤菌对厚荚相思幼苗地径生长量的影响有明显差异(表 1)。其中, HM4, HO6 和 HM8 的地径生长量分别比对照的增加 32.0%, 24.8% 和 7.7%。方差分析表明, 苗木地径生长量差异达极显著水平 ($F = 7.806\,356^{**} > F_{0.01} = 7.590\,992$)。多重比较表明(表 2), HM4 和 HO6 与对照的差异达显著水平; HM4 与 HM8 之间差异显著; 而 HM8 与对照, HO6 与 HM4 和 HM8 之间均无显著差异。

接种不同根瘤菌对厚荚相思幼苗单株生物量的影响有明显差异(表 1)。其中, HM4, HO6 和 HM8 的生物量分别比对照的增加 63.4%, 22.6% 和 73.1%。方差分析表明, 苗木生物量差异达到显著水平 ($F = 4.176\,871^{*} > F_{0.05} = 4.066\,181$)。多重比较表明(表 2), HM4 和 HM8 与对照的差异达显著水平;

HO6与对照之间差异不显著,其他菌株间的差异均不显著。

表1 接种根瘤菌对厚荚相思苗木和土壤的影响及其方差分析

Table 1 Effect of rhizobia on *Acacia crassicaarpa* seedlings and the soil

项目	HM4	HO6	HM8	对照	增长量/%			F 值
					HM4	HO6	HM8	
苗高/cm	59.603	59.223	53.867	46.802	27.4	26.5	15.1	7.921 894**
地径/mm	5.935	5.612	4.845	4.497	32.0	24.8	7.7	7.806 356**
生物量/g	10.133	7.600	10.733	6.200	63.4	22.6	73.1	4.176 871*
叶片含氮量/(g·kg ⁻¹)	2.160	2.020	1.810	1.170	84.6	72.6	54.7	8.431 065**
土壤含氮量/(g·kg ⁻¹)	1.300	1.210	1.200	0.980	31.6	23.5	21.4	12.226 780**
土壤有机质/(g·kg ⁻¹)	5.990	5.700	5.660	4.320	38.7	32.2	31.0	12.126 620**
土壤磷酸酶(苯酚)/(μg·g ⁻¹ ·h ⁻¹)	103.108	94.434	95.616	76.519	34.7	23.4	25.0	8.519 879**
7 d 中果聚糖蔗糖酶(果糖)/(mg·g ⁻¹)	57.484	50.311	34.007	20.675	178.0	143.3	64.5	7.613 720**

说明: $F_{0.05} = 4.066 181$; $F_{0.01} = 7.590 990$ 。

表2 苗高、地径和生物量的多重比较

Table 2 Multiple comparison of height, ground diameter and the biomass of *Acacia crassicaarpa* seedlings

处理	重复	苗高	地径		生物量		
ck	3	46.802 a	4.497 a		6.200 a		
HM8	3	53.867 b	4.845 a	4.845 b			10.733 b
HO6	3	59.223 b		5.612 b	5.612 c	7.600 a	7.600 b
HM4	3	59.603 b			5.935 c		10.133 b
Sig 值	1.000	0.105	0.332	0.052	0.366	0.371	0.076

说明: 小写字母表示显著水平为 0.05。

2.2 接种根瘤菌对厚荚相思苗木叶片及土壤含氮量的影响

接种不同根瘤菌对厚荚相思幼苗叶片及土壤含氮量的影响见表1。其中, HM4, HO6 和 HM8 的叶片含氮量分别比对照增加 84.6%, 72.6% 和 54.7%。方差分析表明, 苗木叶片含氮量差异达极显著水平 ($F = 8.431 065^{**} > F_{0.01} = 7.590 992$)。多重比较表明(表3), HM4 和 HO6 与对照之间叶片含氮量差异达极显著水平; HM8 与对照的差异未达极显著水平, 但差异显著; 其余菌株间差异均不显著。

接种后, HM4, HO6 和 HM8 的土壤含氮量分别比对照增加 31.6%, 23.5% 和 21.4%。方差分析表明, 苗木土壤含氮量差异达极显著水平 ($F = 12.226 780^{**} > F_{0.01} = 7.590 992$)。多重比较表明(表3),

表3 叶片含氮量、土壤含氮量及有机质含量的多重比较

Table 3 Multiple comparison of nitrogen and organic matters of lamina and soil nitrogen

处理	重复	叶片含氮量		土壤含氮量	土壤有机质含量	
ck	3	0.114 A		0.098 A	0.432 A	
HM8	3	0.181 A	0.181 B	0.120 B		0.566 B
HO6	3		0.202 B	0.121 B		0.570 B
HM4	3		0.216 B	0.130 B		0.599 B
Sig 值		0.017	0.153	1.000	1.000	0.325

说明: 大写字母表示显著水平为 0.01。

HM4, HO6 和 HM8 与对照的差异均达极显著水平, 其他菌株间无显著差异。

2.3 接种根瘤菌对土壤有机质含量的影响

接种不同根瘤菌对土壤有机质含量的影响见表 1。其中, HM4, HO6 和 HM8 的土壤有机质含量分别比对照增加 38.7%, 32.2% 和 31.0%。方差分析表明, 土壤有机质含量差异达极显著水平 ($F = 12.126\ 620^{**} > F_{0.01} = 7.590\ 992$)。多重比较表明(表 3), HM4, HO6 和 HM8 与对照的差异均达极显著水平, 其余菌株间无显著差异。

2.4 接种根瘤菌对土壤磷酸酶及果聚糖蔗糖酶的影响

接种不同根瘤菌对土壤磷酸酶及果聚糖蔗糖酶的影响见表 1。其中, HM4, HO6 和 HM8 的土壤磷酸酶活性分别比对照增加 34.7%, 23.4% 和 25.0%。方差分析表明, 土壤磷酸酶活性差异达极显著水平 ($F = 8.519\ 879^{**} > F_{0.01} = 7.590\ 992$)。多重比较表明(表 4), HM4, HO6 和 HM8 与对照的差异均达显著水平, 其余菌株间无显著差异。

接种后, HM4, HO6 和 HM8 的土壤果聚糖蔗糖酶活性分别比对照增加 178.0%, 143.3% 和 64.5%。方差分析表明, 土壤果聚糖蔗糖酶活性差异达极显著水平 ($F = 7.613\ 720^{**} > F_{0.01} = 7.590\ 992$)。多重比较表明(表 4), HM4 和 HO6 与对照的差异达显著水平, HM8 与对照差异不显著; 另外, HM4 与 HM8 之间差异显著。

表 4 土壤磷酸酶、果聚糖蔗糖酶活性的多重比较

Table 4 Multiple comparison of soil phosphatase enzyme and levan sucrase activities in the soil

处理	重复	土壤磷酸酶		果聚糖蔗糖酶		
ck	3	76.519 a		20.675 a		
HM8	3		95.616 b	34.007 a	34.007 b	
HO6	3		94.434 b		50.311 b	
HM4	3		103.108 b		57.484 c	
Sig 值		1.000	0.166	0.154	0.091	0.422

说明: 小写字母表示显著水平为 0.05。

3 小结与讨论

在大田条件下, 用 3 个不同根瘤菌菌株接种厚荚相思苗木的结果显示: 接种根瘤菌能极显著地提高苗木的生长及土壤肥力。其中, 苗高生长量平均增加了 23.0%, 地径生长量平均增加 21.5%, 生物量平均增加 53.0%, 叶片含氮量平均提高 70.7%, 土壤含氮量平均提高 25.5%, 土壤有机质含量平均提高 34.0%, 土壤磷酸酶活性平均提高 27.7%, 果聚糖蔗糖酶活性平均提高 128.6%。3 个不同菌株均能高效促进苗木生长, 但不同菌株的增产效果存在差异: 其中 HM4 接种效果为最佳, HO6 次之, 最后是 HM8。因此, 初步筛选出 HM4 为优良菌株, 可作为促进用材林树种生长的优良菌株。

这些结果显示了接种不同相思根瘤菌后对苗木生长都有不同程度的促生效果。通过结瘤固氮, 植物与土壤中的氮素均相应增加, 从而促进植株生物量的积累及苗高和地径的增长; 同时还改善了土壤肥力^[16], 土壤含氮量和有机质的提高, 可以减少化肥的投入, 有利于维持生态平衡, 对于林地土壤改良, 地力保持具有重大意义^[17]。

试验证明, 接种相思根瘤菌后, 土壤酶活性有极显著提高。土壤酶是一种生物催化剂, 其活性更能直接反映土壤的生物化学过程。根瘤菌在代谢过程中会分泌有机酸、各种氨基酸以及一些酶类。土壤磷酸酶与果聚糖蔗糖酶活性的提高, 促使土壤中难溶性磷酸盐及高分子量糖类的分解^[18], 为土壤生物体提供更多能源。

接种相思根瘤菌到厚荚相思幼苗, 形成的共生体可为植物提高氮素, 增加土壤中的氮素来源^[19], 提高土壤有机质含量, 促使土壤酶活性的提高, 各因素间互相影响^[20], 综合作用, 有利于物质的良性

循环。

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.
LI Qingkui. Development and forecast of soil in China [J]. *Acta Pedol Sin*, 1989, **26** (3): 207 - 216.
- [2] 曾定. 固氮生物学[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 1987: 125 - 158.
- [3] 陈文新, 李阜棣, 闫章才. 我国土壤微生物学和生物固氮研究的回顾与展望[J]. 世界科技研究与发展, 2002 (4): 7 - 12.
CHEN Wenxin, LI Fudi, YAN Zhangcai. Retrospect and prospect of soil microbiology and biological nitrogen fixation researches in China [J]. *World Sci-Tech R & D*, 2002 (4): 7 - 12.
- [4] 侯远瑞, 邓艳, 林莹, 等. 根瘤菌浸根处理对相思苗木接种的效应初报[J]. 广西林业科学, 2004, **33** (2): 88 - 89.
HOU Yuanrui, DENG Yan, LIN Ying, *et al.* Effect reports of *Acacia* seedlings inoculated with rhizobia soaking the roots [J]. *Guangxi For Sci*, 2004, **33** (2): 88 - 89.
- [5] 潘志刚, 游应天. 厚荚相思的引种及种源试验[J]. 林业科学研究, 1994, **7** (5): 498 - 505.
PAN Zhigang, YOU Yingtian. Introduction and provenance test of *Acacia crassicaarpa* [J]. *For Res*, 1994, **7** (5): 498 - 505.
- [6] 潘志刚, 吕鹏信, 陆熙娟. 中国厚荚相思木制浆特性的研究[J]. 林产工业, 1994, **21** (5): 17 - 19.
PAN Zhigang, LÜ Pengxin, LU Xixian. Research on the system thick liquid characteristic of *Acacia crassicaarpa* woods in China [J]. *China For Prod Ind*, 1994, **21** (5): 17 - 19.
- [7] 康丽华, 李素翠. 相思苗木接种根瘤菌的研究[J]. 林业科学研究, 1998, **11** (4): 343 - 349.
KANG Lihua, LI Sucui. Responses of *Acacia* to rhizobia inoculation [J]. *For Res*, 1998, **11** (4): 343 - 349.
- [8] 广西土壤肥料工作站. 广西土壤[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 1991.
- [9] 上海植物生理学会. 植物生理学手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985.
- [10] VINCENT J M. *A Manual for the Practical Study of Root-nodule Bacteria* [M]. Oxford: IBP Handback, 1970: 164.
- [11] 韩素芬. 固氮豆科树种和豆科树种根瘤菌资源的研究[J]. 林业科学, 1996, **32** (5): 434 - 440.
HAN Sufen. A study on natural resources of nodulating tree legumes and strains of rhizobia [J]. *Sci Silv Sin*, 1996, **32** (5): 434 - 440.
- [12] 芬森特 J M. 根瘤菌实用研究手册[M]. 上海植物生理研究所固氮菌室, 译. 上海: 上海人民出版社, 1974.
- [13] 中华人民共和国林业部科技司. 林业标准汇编(三)[S]. 北京: 中国林业出版社, 1991: 142 - 271.
- [14] 吴金水, 林启美, 黄巧云, 等. 土壤微生物生物量测定方法及其应用[M]. 北京: 气象出版社, 2006: 127 - 138.
- [15] 符伍儒. 数理统计[M]. 北京: 中国林业出版社, 1986: 278 - 280.
- [16] OKON Y, KAPULNIK Y. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots[J]. *Plant Soil*, 1986, **90**: 1 - 6.
- [17] 樊利勤, 庄培亮, 马兰珍, 等. 厚荚相思根瘤菌对盆栽苗木生长及土壤肥力的影响[J]. 生态科学, 2004, **23** (4): 289 - 291.
FAN Liqin, ZHUANG Peiliang, MA Lanzhen, *et al.* Responses of *Acacia crassicaarpa* seedlings and soil nutrition to rhizobia isolated from *Acacia crassicaarpa* [J]. *Ecol Sci*, 2004, **23** (4): 289 - 291.
- [18] 方丽英, 吕成群, 黄宝灵, 等. 土壤益生菌对盆栽马尾松苗生长的影响[J]. 四川林业科技, 2007, **28** (5): 66 - 68.
FANG Liying, LÜ Chengqun, HUANG Baoling, *et al.* Effect of soil probiotics on the growth of potted Masson's pine seedlings [J]. *J Sichuan For Sci Technol*, 2007, **28** (5): 66 - 68.
- [19] 张慧, 余永昌, 黄宝灵, 等. 接种根瘤菌对直杆型大叶相思幼苗生长及土壤营养元素含量的影响[J]. 东北林业大学学报, 2005, **33** (5): 47 - 50.
ZHANG Hui, YU Yongchang, HUANG Baoling, *et al.* Effects of rhizobia inoculation on the growth of straight-stem *Acacia auriculaeform* is seedlings and the contents of soil nutritive elements [J]. *J Northeast For Univ*, 2005, **33** (5): 47 - 50.
- [20] 黄宝灵, 吕成群, 韦原莲, 等. 不同根瘤菌对马占相思苗木的影响[J]. 中南林学院学报, 2004, **24** (2): 33 - 36.
HUANG Baoling, LÜ Chengqun, WEI Yuanlian, *et al.* Effect of different rhizobia on the biomass and nutritive elements of *Acacia mangium* [J]. *J Cent South For Univ*, 2004, **24** (2): 33 - 36.