

白三叶草/根瘤菌共生固氮潜力及干旱限制因素

李志芳¹, 朱春茂¹, 吴文良², 隋新华³

(1. 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193; 2. 中国农业大学资源与环境学院, 北京 100193; 3. 中国农业大学生物学院, 北京 100193)

摘要: 为了探讨白三叶草生物固氮与土壤水分供应和菌种基因型的关系, 采用温室盆栽试验方法, 对 9 个基因型的三叶草根瘤菌固氮效率和与土壤含水量的关系进行了研究。结果发现, 根瘤菌接种后, 白三叶草叶片含氮量明显增加, 有 3 个基因型的根瘤菌接种植株后叶片含氮量达到对照的 3 倍以上, 据此可根据根瘤菌的基因型来预测其固氮效率, 共生固氮效率与根瘤菌基因型的关系较与分离宿主的关系更加密切。在中度干旱胁迫下, 白三叶草植株地上部生物量积累受影响较地下部受影响更大, 在白三叶草与根瘤菌共生体系建立过程中, 当根瘤菌固定的氮素可以满足植株生长需要时, 干旱胁迫可能成为生长的限制因子。

关键词: 共生固氮; 干旱胁迫; 白三叶草; 根瘤菌基因型

中图分类号: X171.1 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2009)03-0639-06

Potential Capacity of Symbiosis Nitrogen Fixation of White Clover-Rhizobium Interaction and Drought Limiting Factor

LI Zhi-fang¹, ZHU Chun-mao¹, WU Wen-liang², SUI Xin-hua³

(1. College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 2. College of Resources and Environmental Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 3. College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: The interactions between white clover (*Trifolium repens* L.) and Rhizobium strains were tested in order to identify the effectiveness of biological nitrogen fixation in relation to water supply, as well as the possibility to predict strain effectiveness according to genotype. Nine Rhizobium strains of *R. trifolii* were isolated from *Trifolium repens* L. and *Trifolium fragiferum* L. from different areas in southern China. White clover (cv Reventel) was planted in pots, nodulated with the nine strains, and grown in a greenhouse with the same amount of irrigation water. Foliage was harvested 8 and 12 weeks after sowing. Significant increases in foliar nitrogen, up to three-fold those of the control, were observed in plants inoculated with the three most effective strains. It was possible to predict the effectiveness of a rhizobial strain from its genotype. Symbiotic nitrogen fixation was more related to the genotype of the rhizobial strain than to host-specific. Once nitrogen was no longer a limiting factor, foliar biomass of all treatments was growing rapidly, leading to increased depletion of soil water. After cyclic moderate drought stress, white clover foliar biomass accumulation was more affected than foliar nitrogen content. The feedback of drought stress on foliar growth may be a new limiting factor when nitrogen demand is met satisfied in plants with the clover-Rhizobium interactions by N₂ fixation.

Keywords: symbiosis nitrogen fixation; drought stress; white clover; Rhizobium

在根瘤菌-豆科植物共生体中, 生物固氮过程涉及到的豆科作物和根瘤菌, 两者都可作为农业可再生资源, 用以提供植物营养和补充土壤氮素平衡, 从而部分或全部替代人工氮肥的投入^[1-2]。与籽粒豆科作物相比, 豆科牧草的固氮能力更强^[3]。白三叶草 (*Trifoli-*

um repens L.) 是农业生产上重要的豆科牧草之一。把白三叶草种植于禾谷类作物的行间, 对禾谷类作物生产可能有潜在的氮素优势^[4]。白三叶草在混合草场也具有广泛应用, 来自于大气的氮素占白三叶草总含氮量的 85% 以上^[3, 5]。

在白三叶草-根瘤菌共生系统中, 不同基因型根瘤菌菌种影响植株的氮素积累和大气源氮素所占的比例。大量研究发现不同基因型根瘤菌菌种影响固氮效率。例如 Pryor 等^[6], 采用 20 个不同类型大豆根瘤

收稿日期: 2008-03-2

作者简介: 李志芳 (1968—), 女, 副教授, 主要从事土壤肥力恢复和有机蔬菜栽培方面的研究。E-mail: zhifangli7@cau.edu.cn

通讯作者: 吴文良 E-mail: wuwenli@cau.edu.cn

菌接种同一个大豆品种,植株总氮中来自大气氮素的比例(Ndfa)从最低38%到最高78%^[3,7]。

根瘤菌-豆科作物的相互作用取决于宿主植物自身的性状,尤其是结瘤亲和性^[8]和对限制结瘤环境因子的敏感程度^[2,9]。在干旱和半干旱地区,缺水常成为限制结瘤的环境因子。因此,筛选根瘤菌株的固氮效率和对干旱胁迫的耐受性具有重要意义。

Hardarson^[3]建议,筛选根瘤菌资源时,首先应该从大量的根瘤菌群,如50~100个菌株进行初步筛选。这些菌株可以分离自同一豆科作物物种,也可以来自不同物种但可交叉接种的其他豆科作物,而且这些菌株最好来自不同的采集地区。筛选的第二步是在第一步获得的高效固氮菌中再一次筛选适合本土壤特性和具有较强竞争力的根瘤菌株^[3]。然而,由于筛选的第一步需要大量工作(50~100个菌株,每个菌株至少3个重复),要找出固氮效率高的菌株需要消耗较多的资金和时间。另外,土壤温度、湿度、pH、化学组成等环境因素也影响生物固氮^[3],而且土壤固有微生物也和新加入的菌株存在竞争关系。这样,为了降低要筛选菌株的数量,减少筛选时间,有必要探讨简便有效的高效固氮菌株筛选方法。如Hardarson等^[10]提出,可直接应用豆科作物接种不同根瘤菌株后,把产量作为根瘤菌竞争力大小的鉴定指标。而且,在田间土壤栽培条件下,新接种根瘤菌对土著菌株的竞争力就体现在接瘤和固氮能力方面。由此,我们的试验设计基于以下假设:(1)在相同的水分供应条件下,某个(几个)根瘤菌菌株与白三叶草共生的生物固氮能力最强,包括与土著菌的竞争力最强;(2)通过根瘤菌的基因型近似程度可以预测其固氮活性的近似程度;(3)干旱胁迫影响生物固氮。

基于上述假设,设计了两个试验。一是白三叶草土壤水分胁迫的确定,二是干旱胁迫与根瘤菌基因型双因素对白三叶草固氮能力的影响。

1 材料与方法

1.1 土壤

栽培所用的土壤为砂质壤土,采自北京市南郊实验地(39°48'N,116°16'E)的耕作层。栽培土壤成分的63.4%为砂粒(20~2000 μm),27.8%为壤质(2~20 μm),8.8%为粘粒(<2 μm)。土壤理化性状如下:pH(CaCl₂)为7.8,EC为0.23 mS·cm⁻³,容重0.81 g·cm⁻³,全氮含量0.94 g·kg⁻¹,有机质含量20.4 g·kg⁻¹,速效氮含量26.6 mg·kg⁻¹,P₂O₅含量44.0 mg·kg⁻¹,K₂O含量260

mg·kg⁻¹。土壤采回后过2 mm筛。

1.2 试验1:白三叶草干旱胁迫耐受性

试验所用白三叶草品种为瑞文德和海发,均为来自丹麦的商业种子,以瑞文德为主,海发在鉴定三叶草干旱胁迫耐受性时用作参照品种。播种时把两个品种分别播于含200 g土(干土)的小盆中,设置土壤水分含量为田间最大持水量的45%、55%、65%、75%、85%5个处理,即土壤含水量分别为17%、21%、25%、29%和33%,每日用称重法补充各盆水量。每处理重复4次。每盆播种40粒种子,幼苗出齐后分别留定20棵,苗间距约2 cm。各处理每盆播种20粒三叶草种子,苗龄7 d时统计发芽率,21 d时测定各处理植株生物量。

1.3 试验2:根瘤菌种的固氮效率

试验用采自中国南部不同地区的白三叶草,和可以使白三叶草结瘤的采自红三叶草的根瘤菌菌种(表1),已经根据16S rDNA检测对其进行鉴定结果分为两种类型(表1)。菌种培养于YMA平板培养基上,30℃条件下4 d后用0.6%的NaCl溶液洗下,接种于3周大的白三叶草盆栽幼苗上,接种量不低于每株10⁹。

试验所用的白三叶草(品种为瑞文德),所用土壤及性状与试验1相同。采用不施氮肥的土壤栽培方法确定根瘤菌的固氮效率。试验应用圆形栽培盆,装入

表1 试验用根瘤菌特点

Table 1 Characteristics of the tested Rhizobium strains

	宿主 Host	采集地 Isolated area (Province in China)	分类 Taxon	基因型分类 (16SrDNA) Genotype (16SrDNA)
对照/Control	-	-	-	-
BAU61374	<i>Trifolium repens</i>	四川省 Sichuan	<i>Rhizobium</i>	
BAU43054	<i>Trifolium fragiferum</i>	湖北省 Hubei	<i>Rhizobium</i>	
BAU43041	<i>Trifolium fragiferum</i>	湖北省 Hubei	<i>Rhizobium</i>	
BAU33133	<i>Trifolium repens</i>	江西省 Jiangxi	<i>Rhizobium</i>	
BAU43201	<i>Trifolium repens</i>	湖北省 Hubei	<i>Bradyrhizobium</i>	
BAU23170	<i>Trifolium fragiferum</i>	安徽省 Anhui	<i>Bradyrhizobium</i>	
BAU43196	<i>Trifolium repens</i>	湖北省 Hubei	<i>Bradyrhizobium</i>	
BAU23210	<i>Trifolium repens</i>	安徽省 Anhui	<i>Bradyrhizobium</i>	
BAU43112	<i>Trifolium fragiferum</i>	湖北省 Hubei	<i>Sinorhizobium</i>	

折合 1 500 g 干土的新鲜土壤。每盆播种 50 粒种子, 幼苗出齐后留定 30 株, 苗间距约 2 cm。幼苗发芽 3 周后, 每盆接种一种根瘤菌(表 1), 放置于昼夜温度分别为 25~32 °C 和 15~18 °C、自然光周期条件下的温室中生长。

试验过程中, 采用相同水量进行灌溉。根据室内温度和土壤水分散失量, 每隔 2~5 d 进行一次灌溉。播种后第 8 周和第 12 周分别进行了两次收获, 每次收获测定三叶草叶片生物量, 叶片氮含量(浓度), 叶片氮产量(生物量×N%), 并根据收获后土壤鲜重和烘干重(105 °C 烘干 24 h) 计算土壤含水量。收获后统计植株根系结瘤数。

1.4 统计分析

采用 SAS8.1(SAS 研究中心, 美国)进行数据统计分析, 干旱胁迫试验和根瘤菌种试验各处理差异显著性应用双因素方差分析, 处理平均值应用最小显著差数法(LSD)进行多重比较($P=0.05$)。相关性采用 students-T 检验、线性回归方法计算, 回归系数和置信限根据各处理平均值分析。三叶草发芽率和幼苗生物量应用双因素方差分析, LSD($P=0.05$)方法进行多重比较。

2 结果与讨论

2.1 干旱胁迫的界定

试验 1 的结果表明, 土壤含水量对白三叶草种子发芽率和植株生物量积累有很大影响, 土壤含水量在 21%~25%(相当于田间持水量的 55%~65%)时, 最有利于种子发芽和幼苗生长, 而土壤含水量在 17%以下或 29%以上则限制种子萌发和幼苗生长(表 2)。土壤水分在田间持水量的 60%以下能够满足植株生长需要, 而在田间持水量 45%以下则会对植株造成干旱胁迫。试验 2 也证实了这一结果。

2.2 根瘤菌种固氮效率

试验 2 的数据证明, 几乎所有接种的根瘤菌种都有利于白三叶草(品种为瑞文德)叶部氮素积累(表 3)。根据接种后各处理的叶片含氮量和总氮素积累量, 可把被测定的 9 个根瘤菌种按照固氮能力的大小分为 3 组:(1)BAU61374, BAU43041, BAU43054;(2)BAU33133, BAU43201, BAU23170;(3)BAU43196, BAU23210, BAU43112。其中, 第 1 组的固氮能力最强, 第 2 组其次, 第 3 组根瘤菌接种植株后对叶片氮含量和产量仅有细微影响, 其固氮能力与土著菌相似。据此, 甚至可把土著菌类归为第 3 组(表 3)。

试验结果发现, 在不施肥的土壤中种植白三叶

表 2 白三叶草干旱胁迫的界定

Table 2 Drought stress identification in white clover

处理 Treatments	发芽率/% Seed Germination Rate		地上部产量 /mg·pot ⁻¹ Foliage/mg·pot ⁻¹		单株地上部生物量 /mg·plant ⁻¹ Foliage/mg·plant ⁻¹	
	瑞文达 Rivendel	海发 Haifa	瑞文达 Rivendel	海发 Haifa	瑞文达 Rivendel	海发 Haifa
土壤含水量 Soil water content						
18%	31.9ab	5.6b	21.0b	113.0b	21.0	19.5
22%	53.7a	45.8a	154.3a	174.3ab	16.8	21.7
26%	58.3a	45.8a	172.0a	284.3a	21.5	25.4
30%	38.9a	20.8b	52.3b	109.5b	15.2	20.6
34%	13.3b	10.0b	-	-	-	-

注: 数据后不同字母表示达到显著性差异 ANOVA LSD($P=0.05$)水平。

Note: Values in columns followed by the different letter mean differ significantly at $P=0.05$ by ANOVA LSD test.

草, 尤其是在第一次收获时, 植株叶片氮含量和叶片生物量积累之间关系密切(图 1a)。Boller 与 Nosberger^[11]曾经用 ¹⁵N 同位素方法研究了不同基因型根瘤菌对生物固氮的影响, 也发现处理间来自空气的氮素比例(%Ndfa)差异显著, 而且所固定 N 素直接影响植株干物质积累。试验中每盆土壤所含全部氮素为 1 410 mg, 其中矿化氮含量为 39.9 mg(见材料与方法)。若盆栽条件下植物可利用氮素占总土壤全氮的 5%^[12], 则每盆白三叶草可利用的矿质氮量为 110 mg, 而试验发现每盆三叶草植株仅叶片的氮素积累就高达 430~610 mg。

接种高效固氮的菌株, 白三叶草植株叶片氮含量几乎是接种固氮效率较低菌种和土著菌的 2 倍。这证实了 Hardarson 等^[3]不同基因型根瘤菌种的固氮效率范围为 38%~76%的研究结果。而且, 固氮效率最高的 3 个菌种分离自不同的宿主, 其中 BAU61374 来自白三叶草的根瘤, 而 BAU43041 和 BAU43054 分离自红三叶草根瘤, 但它们的基因型却十分相似(表 1)。这说明植株叶片氮素积累和含氮量与菌种基因型关系密切, 而与宿主却没有明显的关系(表 2、3)。第二次收获时氮素在叶片中的积累与第一次有同样的趋势, 但差异不显著。

一般认为, 土著菌较商业生产的根瘤菌种对当地环境具有更好的适应性^[2], 而我们的盆栽试验发现, 接种的外源根瘤菌(采自中国南部的不同地区, 表 1)有一半以上能提高白三叶草叶片含氮量。虽然人工接种根瘤菌的竞争和生存能力还需在大田条件下进一步进行鉴定, 但无疑根瘤菌基因型是发挥豆科作物共生

表3 根瘤菌基因型对白三叶草生物固氮的影响
Table 3 Effectiveness of biological nitrogen fixation of the tested strains

	含氮量/% N concentration/%		地上部生物量/mg·plant ⁻¹ Foliage biomass/mg·plant ⁻¹		地上部氮素积累/mg·plant ⁻¹ Foliage N yield/mg·plant ⁻¹	
	收获时期/周 Harvesting time/weeks		收获时期/周 Harvesting time/weeks		收获时期/周 Harvesting time/weeks	
	8	12	8	12	8	12
对照	1.69d	2.65bc	95ab	603	1.36d	15.96ab
BAU61374	3.55a	3.09a	125ab	594	4.49a	18.35ab
BAU43054	3.33ab	3.00ab	125ab	594	4.49a	18.35ab
BAU43041	3.24ab	2.99ab	135a	682	4.38a	20.38a
BAU33133	3.20ab	2.67bc	126ab	504	4.02ab	13.42b
BAU43201	2.86bc	2.85abc	115ab	636	3.21ab	18.10ab
BAU23170	2.8bc	2.75abc	105ab	628	2.97abc	17.29ab
BAU43196	3.03ab	2.56c	100ab	565	3.00abc	14.46ab
BAU23210	2.27dc	2.62c	105ab	571	2.45bcd	14.98ab
BAU43112	1.69d	2.83abc	85b	639	1.59cd	18.06ab
LSD _{0.05} 根瘤菌基因型× 收获时期 strains×harvest	0.68*	0.34*	43.10*	228.38	1.59*	6.96*
根瘤菌基因型 strains	0.45*		124.98		3.94*	
收获时期 harvest time	0.20		56.02**		1.77**	

注:数据后不同字母表示达到显著性差异 ANOVA LSD(* $P=0.05$, ** $P=0.001$)水平。

Note: Values in columns followed by the different letter means differ significantly at (* $P=0.05$, ** $P=0.001$) by ANOVA LSD test.

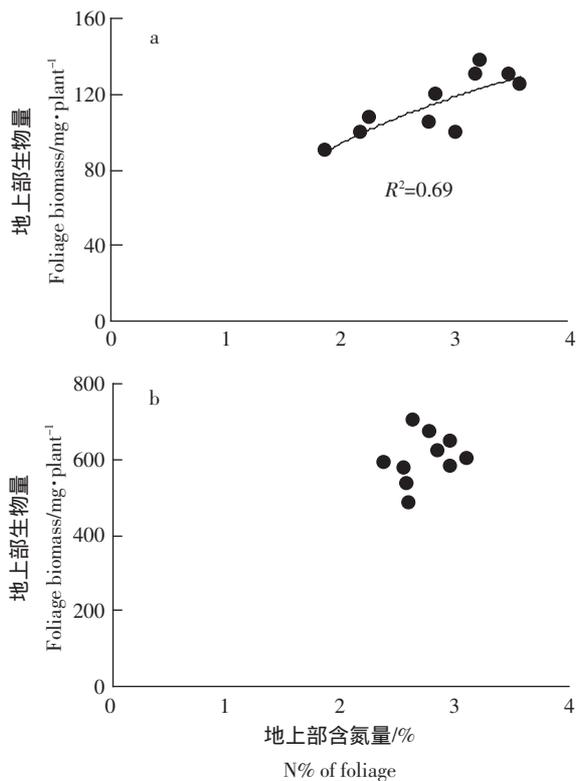


图1 前期收获(a)和后期收获(b)地上部氮素含量与生物产量之间的关系

Figure 1(a) Early harvest and (b) later harvest foliage biomass related to foliage nitrogen concentration. ($P<0.05$, $n=10$)

固氮潜力的重要保障,也是农业生长的自然资源之一。

2.3 干旱胁迫影响

第一次收获时,白三叶草植株叶片生物量与叶片含氮量呈现正相关关系,在 $P=0.05$ 条件下,相关系数为 $R^2=0.69$ (图 1a)。但在第二次收获时,二者已不具有显著的相关关系(图 1b)。相对而言,叶片含氮量与土壤湿度的相关性($R^2=17%$, $P=0.05$)较与根瘤菌基因型更大(图 2a)。叶片氮素积累与土壤含水量的关系呈线性对数相关关系($R^2=0.53$, $P=0.05$,图 2a, b, c)。而且叶片生物量也与土壤含水量呈正相关关系($R^2=0.44$, $P=0.05$)。

本试验中,第一次收获至第二次收获之间的4周处于6月份,气温较高,白三叶草植株生物量积累迅速。两次收获时叶片氮含量基本相同(表3)。而第一次收获时植株叶片生物量和含氮量之间的相关系数达0.69,第二次收获时没有显著相关关系。因此可以认为在第一次收获以后,氮素不再是植物生长的限制因子。在土壤氮不是植株生长限制因子的条件下,接种不同类型根瘤菌对植株生物量没有明显影响^[3]。

植物生物量的积累可能受多种因素影响,尤其是植物快速生长阶段的土壤水分供应。本试验数据表明,当三叶草植株生物量积累不断增加时,由于钵钵生长的局限性,土壤水分逐渐成为植株的生长限制因

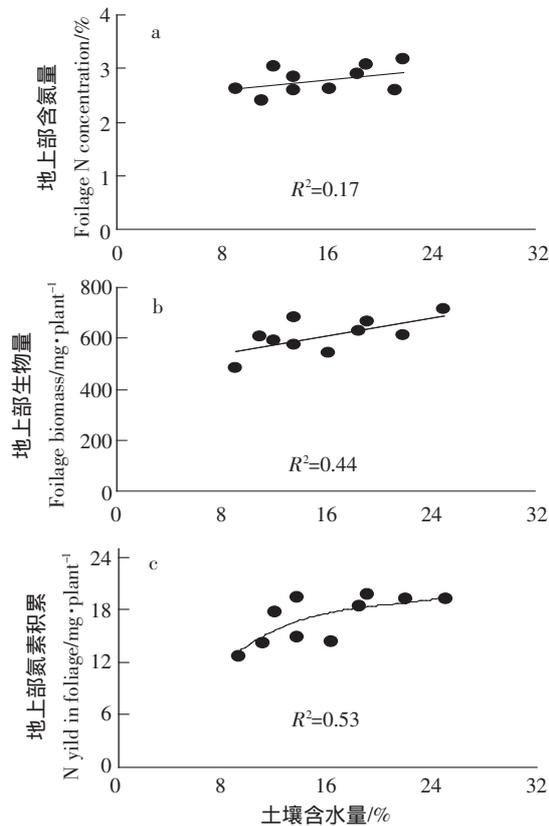


图 2 土壤含水量对地上部含氮量、生物量和氮素积累的影响
Figure 2 Soil water content affects foliage nitrogen concentration, biomass, and nitrogen yield of white clover. ($P < 0.05$, $n = 10$)

子(图 2a b c)。试验中每 2 d 进行 1 次补水,植株干旱胁迫受土壤水分损失的影响。在这种情况下,干旱胁迫可能在干湿交替之间循环性地短期发生。众多研究发现,干旱胁迫影响整个植株的生理过程,导致固氮酶活性降低和光合作用下降^[13-14]。干旱胁迫下,反映苜蓿的光合速率的 C_jC_i 和光通量密度(PPFD)等指标均有所降低,而光呼吸和暗呼吸则相对升高^[15]。干旱胁迫可能抑制植株羧化反应,从而影响光合作用。因此干旱可能是最重要的生长限制因子^[15]。

本试验中,土壤湿度与叶片氮含量的相关性仅为 17%,而与植株生物量积累的相关性则为 44%。这表明植株生物量积累比叶片氮含量更容易受土壤含水量的影响。而且,叶片含氮量与叶片生物量之间没有明显关系,表明土壤干旱胁迫较根瘤菌菌株对植株生长的影响更大。叶片氮素积累是叶片生物量与氮含量的乘积来计算的。土壤含水量对叶片氮素积累的相关性为 53%(图 2c),但二者之间呈对数相关而不是线性相关关系。土壤含水量在 17%以下时,叶片总氮素积累会随土壤含水量的增加而提高;而当土壤含水量

在 19%以上时,二者之间不具有线性相关关系。这与试验一发现的土壤含水量在 17%以下时植株会发生干旱胁迫的结果相吻合。

2.4 生物固氮限制因子

第 1 次收获时,不同根瘤菌种的固氮效率有很大差异,但接着 4 周后的第 2 次收获时,接种不同种类根瘤菌种处理间植株叶片生物量、氮素积累没有显著差异(图 1) 叶片氮含量也没有显著差异(表 3)。两次收获之间,尽管叶片含氮量增加甚微,植株生物量积累却十分迅速,从 $111.6 \text{ mg} \cdot \text{株}^{-1}$ 增加至 $600.8 \text{ mg} \cdot \text{株}^{-1}$ (表 3)。

显然,干旱胁迫影响植株生物固氮和生物量积累。根瘤形成之后,土壤干旱会导致 N_2 生物固定量降低,当根瘤附近土壤湿度降低至某一田间持水量并持续降低时, N_2 固定几乎停止。Kirda 等^[16]曾报道水分胁迫不会导致固氮能力的明显降低。在本试验中,叶片氮含量受水分胁迫的影响较小,在植株最后收获时与叶片生物量没有显著相关性。对此,一种原因可能是植物在遭受水分胁迫过程中,通过“植株-根瘤菌”共生体固定的大气氮素可以满足植物的氮营养需求,植株生长过程中两次取样(收获)时叶片氮含量之间没有明显差异也证明了这一点。另一种原因可能是,根瘤固氮活性对干旱胁迫影响的敏感性低于白三叶草植株的生长。

然而,另一份研究结论认为,相对于植株根和茎叶的生长代谢,根瘤的形成、生长和固氮活性对水分胁迫更为敏感,土壤水分胁迫对植株氮素固定的影响更为显著^[17-18]。但是,如果氮素营养不是限制因子,干旱胁迫可能对植株比对根瘤的影响更大。第 2 次收获时叶片氮素积累是第 1 次收获时的 5 倍(表 3),这样的叶片氮素积累可能是根瘤已有氮素的转移,或者更有可能来自灌溉与干旱胁迫交替间隙的植株氮素固定。Engin 和 Sprent^[19]报道,在盆栽条件下对白三叶草施以中度水分胁迫,氮素固定在水分胁迫反复发生时,根瘤会有失水和重新吸水的两个过程交替,并会产生新的根瘤分生组织^[14]。另据报道,中度水分胁迫条件下,氮素的重新固定通常发生于根瘤和叶片重新吸水后的 2~4 d 内^[14, 19-20]。在我们的研究中,每隔 2 d 进行土壤水分补充,在三叶草生长过程中,土壤湿度会逐渐减小直到干旱。叶片积累的氮素可能来自于间歇性干旱胁迫中根瘤的氮素固定。

如前所述,土壤湿度与植株叶片氮含量的相关性仅为 17%,对叶片生物量的相关性却为 44%,因此,土壤水分可能通过影响叶片生物量积累而影响了叶

片氮素积累。可见,当氮素不是植株生长限制因子时,植株生物量积累和叶片氮含量之间没有显著关系。另外,在和根瘤菌种建立共生体时,宿主植物要在多种同时存在的菌株中选择,在评价根瘤菌种对水分胁迫的敏感性时,还应该考虑其与宿主植物间复杂的相互选择关系^[21]。不同基因型根瘤菌菌种中,有些可能对水分胁迫更为敏感,有些根瘤菌种类型在结瘤、固氮和促进宿主生物量积累时,可能较其他类型对干旱胁迫更具有适应性。

在白三叶草-根瘤菌共生体系中,宿主和根瘤菌对干旱胁迫具有不同的反应。尽管这种共生关系是很强的,但显然宿主和细菌各自作为独立的生存体,仍具有不同的生态习性。在宿主生长过程中,土壤水分逐渐亏缺,影响根瘤菌生存与繁殖和功能发挥,进而影响生物固氮。盆栽试验中的干旱胁迫较田间试验更易发生,这是由于在氮素不再是限制因子条件下,共生体系具有较高的蒸发蒸腾量,植株迅速生长时土壤水分含量很快降低。

3 结论

试验发现,首先,不同基因型根瘤菌菌种与白三叶草共生,其生物固氮效率存在显著差异。其次,对于分离自同属不同种(如文章中的白三叶草和红三叶草)但可以交叉接种的根瘤菌菌株,其固氮效率的近似程度取决于基因的近似程度,而不是由它们的宿主来源决定。再次,在白三叶草-根瘤菌共生体建立后,生物固氮提供了植株氮素需求,促进了植株生物量的快速积累。但经过一段时间的固氮作用后,由于植株生长迅速,对水分需求增加,共生体中白三叶草生长和根瘤菌功能发挥的限制因子由氮素转变为水分。只有在氮素成为限制因子时,植物的生长才会受到根瘤的固氮能力的影响。

参考文献:

- [1] Peoples M B, Herridge D F, Ladha J K. Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production[J]. *Plant & Soil*, 1995(174): 3-28.
- [2] Mnasri B, Tajini F, Trabelsi M, et al. *Rhizobium gallicum* as an efficient symbiont for bean cultivation[J]. *Agron Sustain Dev*, 2007(27): 331-336.
- [3] Hardarson G. Methods for enhancing symbiotic nitrogen fixation[J]. *Plant & Soil*, 1993(152): 1-17.
- [4] Matthieu C, Stéphane D T, Patrick S, et al. Undersowing wheat with different living mulches in a no-till system. I. Yield analysis[J]. *Agron Sustain Dev*, 2007(27): 347-356.
- [5] Paynel F, Cliquet J B. N transfer from white clover to perennial ryegrass, via exudation of nitrogenous compounds[J]. *Agronomie*, 2003(23): 503-510.
- [6] Pryor H N, Elliot R M, Lowther W L, et al. Effect of rhizobia from caucasian clover(*Trifolium ambiguum*) on nodulation and nitrogen fixation of white clover(*Trifolium repens*) [J]. *NZ J Agric Res*, 2004(47): 75-83.
- [7] Hardarson G, Zapata F, Danso S K A. Field evaluation of symbiotic nitrogen fixation by rhizobial strains using ¹⁵N methodology [J]. *Plant & Soil*, 1984(82): 369-375.
- [8] Michielis J, Dombrecht B, Vermeiren N, et al. *P. vulgaris* is a non-selective host for nodulation[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 1998(26): 193-205.
- [9] Graham P H. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L. a review[J]. *Field Crop Res*, 1981(4): 93-112.
- [10] Hardarson G, Heichel G H, Vance C P, et al. Evaluation of alfalfa and *Rhizobium meliloti* for compatibility in nodulation and nodule effectiveness[J]. *Crop Sci*, 1981(21): 562-567.
- [11] Boller B C, Nosberger J. Differences in nitrogen fixation among field-grown red clover strains at different levels of ¹⁵N fertilization[J]. *Euphytica*, 1994(78): 167-174.
- [12] Luxhoi J, Bruun S, Stenberg B, et al. Prediction of gross and net nitrogen mineralization-immobilization-turnover from respiration[J]. *Soil Sci Soc Am J*, 2006(70): 1121-1128.
- [13] Sinclair T R, Muchow R C, Bennett J M, et al. Relative sensitivity of nitrogen and biomass accumulation of drought in field-grown soybean[J]. *Agron J*, 1987(79): 986-991.
- [14] Davey A G, Simpson R J. Nitrogen fixation by subterranean clover at varying stages of nodule dehydration: carbohydrate status and short-term recovery of nodulated root respiration[J]. *Exp Bot*, 1990, 41(a): 1175-1187.
- [15] Antolin M C, Sanchez-Diaz M. Effects of temporary droughts on photosynthesis of alfalfa plants[J]. *Exp Bot*, 1993(44): 1341-1349.
- [16] Kirda C, Danso S K A, Zapata F. Temporal water stress effects on nodulation, nitrogen accumulation and growth of soybean[J]. *Plant & Soil*, 1989, 120: 49-55.
- [17] Albrecht S L, Bennett J M, Boote K J. Relationship of nitrogenase activity to plant water stress in field-grown soybeans[J]. *Field Crop Res*, 1994(8): 61-71.
- [18] Zahran H H. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate[J]. *Microbiol Molec Biol Rev*, 1999, 63(4): 968-989.
- [19] Engin M, Sprent J I. Effects of water stress on growth and nitrogen-fixing activity of *Trifolium repens*[J]. *New Phytol*, 1973(72): 117-126.
- [20] Huang C Y, Boyer J S, Vanderhoef L N. Limitation of acetylene reduction(nitrogen fixation) by photosynthesis in soybean having low water potentials[J]. *Pl Physiol*, 1975(56): 228-232.
- [21] Hussein H Z. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate [J]. *Microbiology and Molecular Biology Review Vol*, 1999(63): 968-989.

致谢:感谢伦海军、加尔肯、王延芹对我们工作的大力帮助,感谢 T.Mueller 教授对研究提出的中肯建议。