

Om forholdet mellem værtplanter og rodknoldbakterier hos nogle grupper af bælgplanter

Ved H. L. JENSEN

683. beretning fra Statens Forsøgsvirksomhed i Plantekultur

Nærværende beretning er et led i undersøgelserne over kvælstofbindende bakterier ved Statens Planteavlslaboratoriums bakteriologiske afdeling og omhandler udvekslingen af rodknoldbakterier mellem værtplanter af forskellige bælgplantegrupper, især lupin-serradel-gruppen og kællingetand-rundbælg-gruppen. Beretningen er udarbejdet af forstander, dr. agro. H. L. Jensen..

Forstanderne ved Statens Forsøgsvirksomhed i Plantekultur

Indledning

Inddelingen af bælgplanternes knoldbakterier (slægten *Rhizobium*) i arter har steds mødt vanskeligheder, bl.a. fordi den bakteriologiske systematik's gængse kriterier: cellemorfologi, farvelighed, kulturelle karaktertræk, forgærmingsmønstre, serologiske reaktioner osv. dels ikke giver nogen sikker differentiation og dels ikke viser nogen tydelig korrelation med den egenskab, hvorefter slægtsnavnet er dannet, nemlig evnen til at danne rodknolde hos visse mere eller mindre veldefinerede grupper af bælgplantearter eller -slægter. Artsinddelingen har hidtil i det væsentlige været baseret på disse (supponerede) »krydspodningsgrupper« eksistens; på dette grundlag har FRED o.a. (1932) i deres klassiske monografi opstillet de i tabel 1 angivne arter, der i almindelighed betragtes som gyldige. De opstillede yderligere 10 bakteriegrupper uden artsnavne, deriblandt en meget omfangsrig gruppe nr. 7 omfattende bakterier fra 21 overvejende tropiske bælgplanteslægter. Som nr. 8 figurerer »kællingetand-gruppen« med værtplanteslægterne *Lotus* og *Anthyllis*, for hvilken gruppe DANGEARD (1926) forud havde foreslået det mageløst uheldige

navn *Rhizobium loti* (sml. *meliloti*), der dog heldigvis ikke har vundet indpas. I det følgende anvendes betegnelsen »*Rhizobium ex Lotus-Anthyllis*«, uden at dette skal opfattes som et bakteriologisk artsnavn.

Tabel 1. Arter af rodknoldbakterier (*Rhizobium*) ifl. FRED o.a. (1932).

Gruppe og artsnavn:	Værtplanteslægter:
1. - Sneglebælg-gruppen, <i>Rh. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>
2. - Kløver-gruppen, <i>Rh. trifolii</i>	<i>Trifolium</i>
3. - Ærte-gruppen, <i>Rh. leguminosarum</i>	<i>Pisum, Lathyrus, Vicia, Cicer, Lens</i>
4. - Bønne-gruppen, <i>Rh. phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
5. - Lupin-gruppen, <i>Rh. lupini</i>	<i>Lupinus, Ornithopus</i>
6. - Soyabønne-gruppen, <i>Rh. japonicum</i>	<i>Glycine</i>

Værdien af denne klassifikation på grundlag af bakteriernes evne til infektion¹ af forskellige værtplanter er dog blevet mere og mere anfægtet, efterhånden som man har iagttaget stedse flere »overskridelser« af krydspodningsgruppernes grænser. Foruden tidligere citerede angivelser (JENSEN 1949) kan følgende nævnes: SARIC (1960) fandt infektion af knoldbakterier fra *Genista* sp. og *Lespedeza* sp. (begge Gr. 7) på *Lupinus albus* (Gr. 5). LANGE (1961, 1962) viste, at mange bakteriestammer fra vildtvoksende australske bælgplanter kunne danne knolde på havebønne (Gr. 4) og soyabønne (Gr. 6) samt flere arter af lupin, medens omvendt *Rh. lupini* fra *Lupinus digitatus* og *L. angustifolius* kunne danne knolde (tildels effektive) på tre slægter af vildtvoksende bælgplanter. BONNIER (1962) fandt gensidig knolddannelse af *Rh. trifolii* (Gr. 2) og *Rh. meliloti* (Gr. 1) på henholdsvis lucerne og hvidkløver; især syntes ineffektive bakteriestammer tilbøjelige til sådan heterolog infektion. En enkelt ineffektiv *Rh. meliloti* syntes at udvikle nogen effektivitet overfor hvidkløver efter 6 passager gennem dennes rodknolde. BJÄLFVE (1963) berettede om isolation af bakteriestammer, der var ineffektive overfor deres oprindelige værtplante, men effektive overfor planter udenfor den »normale« krydspodningsgruppe. F.eks. viste en stamme af

1. Ved infektion forstås i det følgende alene dannelse af rodknolde, medens effektivitet betyder evnen til at danne rodknolde med kvælstofbindende funktion, og ineffektivitet mangelen på kvælstofbindende evne.

Rh. phaseoli (Gr. 4) sig ineffektiv overfor pralbønne, hvorfra den var isoleret, og ligeledes overfor ært og hestebønne (Gr. 3), men effektiv overfor hvidkløver. Omvendt kunne en effektiv *Rh. meliloti* (Gr. 1) danne ineffektive knolde på ært (Gr. 3), og en effektiv *Rh. lupini* (Gr. 5) dannede enkelte ineffektive knolde på lucerne (Gr. 1). Ligesom BONNIER (1962) fremhævede BJÄLFVE, at infektion af heterologe værtplanter skete langt senere end normalt og måske netop derfor ofte er blevet overset. Senere isolerede BJÄLFVE (iflg. personlig meddelelse) rhizobier fra *Genista* og *Mimosa* effektive overfor lupin (som senere omtalt).

At knoldbakterier kan tilpasse sig til fremmede værtplanter blev forøvrigt opdaget allerede af NOBBE & HILTNER (1900), som viste, at bakterier fra ært (Gr. 3) og havebønne (Gr. 4) kunne danne ineffektive knolde på hinandens værtplanter, overfor hvilke de efter re-isolation havde erhvervet nogen effektivitet (sml. BONNIER (1962)). KRASILNIKOV (1945) meddelte, at forskellige knoldbakteriearter efter vækst i hinandens kulturfiltrat fik infektionsevne overfor de tilsvarende værtplanter, f.eks. *Rh. meliloti* overfor kløver og *Rh. trifolii* overfor lucerne. Disse angivelser forekommer ikke utrolige i belysning af vort nuværende kendskab til visse bakteriers transformation, d.v.s. arvelige ændringer ved eksperimentel overførelse af andre bakteriearters genetiske materiale i form af deoxyribonucleinsyre (DNA). Sådanne ændringer er også set hos knoldbakterier. For BALASSA (1960) lykkedes det at give en stamme af *Rh. lupini* infektionsevne overfor lucerne ved behandling med DNA fra *Rh. meliloti*, og efter gentagen transformation blev den endog effektiv. LANGE & ALEXANDER (1961) viste, at *Rh. meliloti*, *Rh. trifolii* og *Rhizobium* fra *Astragalus sinicus* kunne danne rodknolde på hverandres værtplanter efter behandling med specifikt polysaccharid fra deres slimsubstans; virkningen gik tabt efter behandling med deoxyribonuclease og skyldtes sandsynligvis forurening af polysaccharidet med DNA. Analogt viste LJUNGGREN (1961), at stammer af *Rh. trifolii*, der havde mistet deres infektionsevne, kunne genvinde denne ved behandling med polysaccharid (sandsynligvis DNA-holdigt) fra normale stammer.

Opfattelsen af rhizobierne fra kællingetand og rundbælg som en særskilt gruppe er i hovedsagen baseret på nogle ikke meget

omfattende podningsforsøg af NOBBE o.a. (1908) og SIMON (1908, 1914) samt serologiske undersøgelser af KRÜGER (1913). Allerede NOBBE & HILTNER (1896) iagttog dog en vis positiv virkning af rhizobier fra robinia på vækst af rundbælg, og NOBBE o.a. (1908) ligeså af *Rh. lupini* på kællingetand (som senere omtalt). WESTERMANN (1918) fandt derimod ingen virkning af kællingetand-rhizobier på kløver og lucerne eller omvendt. I nyere tid har MAC DONALD (1946) angivet infektion af kællingetand med *Rh. trifolii* samt rhizobier fra *Ononis vaginalis* og *Caragana frutescens*. GREGORY & ALLEN (1953) iagttog en åbenbart effektiv knolddannelse på kællingetand podet med rhizobier fra *Caragana arborescens*. ERDMAN & MEANS (1950) fandt ingen infektion af kællingetand med stammer af *Rh. meliloti*, *trifolii*, *leguminosarum*, *japonicum* eller den store Gruppe 7. Rhizobier fra *L. corniculatus* angives at danne ineffektive knolde på sumpkællingetand (*L. uliginosus*) og omvendt ifl. ERDMAN & MEANS (1950), LYNCH & SEARS (1950) og GAVIGAN & CURRAN (1962).

Ved Statens Planteavls-Laboratorium undersøgte i foråret 1962 nogle nysisolerede stammer af *Rh. ex Lotus-Anthyllis* til laboratoriets kultursamling. Nogle kimplanter af kællingetand i agar-kultur podedes forsøgsvis med forskellige fremmede rhizobier, og en stamme af *Rh. lupini* viste sig at danne typisk ineffektive rodknolde: talrige, små, spredte, uden synligt rødt pigment og uden synlig forbedring af værtplanternes vækst. Til nærmere oplysning om dette forhold anstilledes en række krydspodningsforsøg med flere stammer af *Rh. lupini* og *Rh. ex Lotus-Anthyllis*.

Metoder og bakteriestammer

Podningsforsøg udførtes som tidligere beskrevet (JENSEN 1955) i store reagensglas, i regelen med to planter i hvert, og med agar-substrat under et lag groft sand (der udelodes i enkelte forsøg). Glassene opstilledes i et drivhus med supplerende kunstig belysning i vintermånederne, og planterne undersøgte for knolddannelse 2 til 3 måneder efter podningen. I nogle forsøg bestemtes planternes kvælstofindhold ved Kjeldahl-analyse af det samlede plantetørstof fra flere parallelglas.

Følgende bakteriestammer indgik i forsøgene:

1) *Rh. ex Lotus-Anthyllis*: 11 stammer, hvoraf 6 (betegnede K.1-K.6) fra kællingetand og 5 (bet. R.1.-R.5) fra rundbælg. Stammerne K.6 og R.5 var modtaget fra Rothamsted Experimental Station, England, medens resten var lokale isolater. Alle dannede effektive rodknolde på begge værtplanter.

2) *Rh. lupini*: 36 stammer, hvoraf 4 fra laboratoriets kultursamling, resten fra forskellige institutioner:

Institution:	Betegnelse:
Statens Planteavls-Laboratorium	L.1-L.4
Dept. of Agriculture, Beltsville, USA	A.1-A.4
Directie van de Wieringermeer, Kampen, Nederland	H.1-H.7
Inst. v. Bodemvruchtbaarheid, Groningen, Nederland	H.8-H.18
Rothamsted Experimental Station, England	R.1-R.5
Kungl. Lantbrukshögskolan, Uppsala, Sverige	U.1-U.5

Af disse var 13 stammer (A.3-4, H.1, H.3 (tildels), H.8, H.10-14, R.1, R.4-5) ineffektive overfor serradel, og for nogles vedkommende var endog knolddannelse usikker.

3) Desuden undersøgte et betydeligt antal andre *Rhizobium*-arter, dels fra laboratoriets kultursamling og dels fra nogle af de ovennævnte institutioner, hvis ledere (Dr. Ura Mae Means, Beltsville, Dr. D. A. van Schreven, Kampen, Dr. G. W. Harmsen, Groningen, Dr. P. S. Nutman, Rothamsted, fhv. overassistent G. Bjälfve, Uppsala, og Dr. G. V. Bhide, Poona, Indien) takkes hjerteligst for deres imødekommenhed.

Infektionsforsøg

Til iagttagelse af de forskellige stammers infektionsevne anvendtes som regel 8 til 10 planter i 4 eller 5 glas. Efter 2 til 3 måneders vækst fjernedes planterne fra substratet, rodknoldene taltes, og man noterede planternes almindelige tilstand, specielt forekomst af rødt pigment (leghæmoglobin) i rodknoldene samt eventuelle tegn på effektivitet: kraftigere vækst og friskere grøn farve end i de upodede kontrolplanter, der stedse viste alle tegn

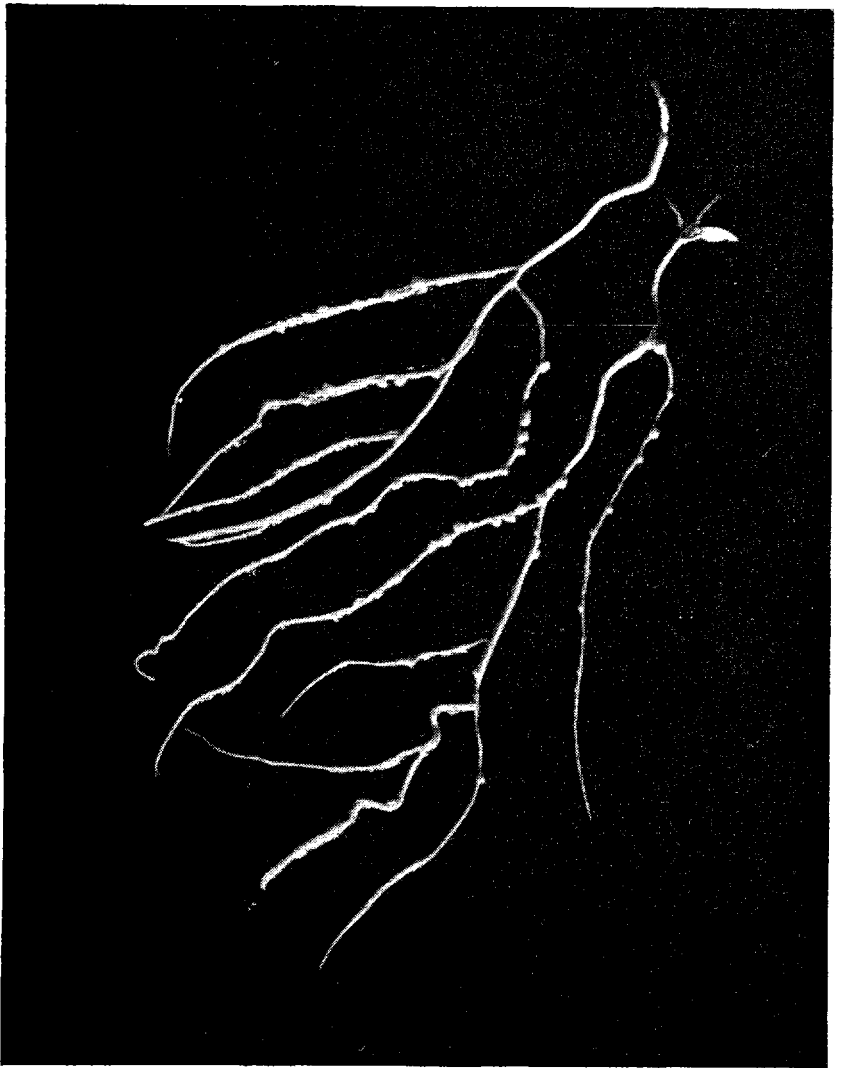


Fig. 1. Rodsystem af kællingetand podet med *Rhizobium lupini* U. 3
(sml. tabel 2) (ca. $\frac{2}{3}$ nat. størr.).

(Fot. A. Munch, Landbrugets Informationskontor).

på kvælstofhunger (vantrivsel, gullige og ofte visne blade, anthocyanholdige bladstilke og stængler).

Kællingetand (Lotus corniculatus) og rundbælg (Anthyllis vulneraria) podede med Rhizobium lupini.

Resultaterne af forsøgene med kællingetand ses i tabel 2. Kun 5 af de undersøgte stammer mangler ganske infektionsevne, og 2 må kaldes tvivlsomme, idet der opstod dels abnormt fortykkede rødder og dels ejendommelige perlesnorlignende dannelser, der ikke med sikkerhed kunne erkendes som rodknolde. De fleste andre stammer dannede udpræget ineffektive knolde uden synligt pigment (fig. 1 viser et typisk billede). Undertiden syntes knoldene at indeholde lidt rødligt pigment (angivet ved (?) i tabellen), uden at planterne trivedes synligt bedre end de upodede kontrolplanter. Enkelte stammer forbedrede dog væksten noget, og to af dem var utvivlsomt effektive: A.3, der oplystes at være isoleret fra *Lupinus densiflorus*, og R.3 (»*Bulduri*«), der ifl. KALNINS (1938) stammer fra gul lupin og er effektiv overfor denne såvel som serradel.

Blandt mange andre heterologe rhizobier fandtes der 6 infektionsdygtige stammer fra 5 værtplanter: krageklo (*Ononis repens*), sødbladet astragal (*Astragalus glycyphyllus*), ærtetræ (*Caragana arborescens*, 2 stammer), *Genista ovata* og *Mimosa* sp. De fire første var lokale isolater, medens de to sidste hidrørte fra bælgplantelaboratoriet ved landbrugshøjskolen i Uppsala (sml. s. 3). Resultaterne er inkluderet i tabel 2: astragal-stammen er fuldtud effektiv, medens de andre er typisk ineffektive, også stammerne fra *C. arborescens*. (GREGORY & ALLEN (1953) fandt derimod tegn på effektivitet).

Tabel 2. Rodknolddannelse af heterologe bakterier (*Rh. lupini* og andre) på kællingetand (*Lotus corniculatus*).

Stamme	Forsøgs- periode	Antal planter		Antal rodknolde*	P.	E.
		ialt	m. knolde			
<i>Rh. lupini</i>						
L. 1	12/9-5/11-62	10	5	60 (9-18)	÷	÷
L. 2	» » »	10	8	46 (1-12)	÷	÷
L. 3	» » »	10	8	53 (3-11)	?	÷
L. 4	1/6-29/7-62	8	8	(talrige)	÷	÷
A. 1	12/9-5/11-62	8	7	59 (3-17)	÷	÷
A. 2	» » »	8	6	86 (3-40)	?	?
A. 3	» » »	8	8	65 (2-18)	+	+++
A. 4	» » »	6	1	4	÷	÷

Tabel 2 fortsat

Stamme	Forsøgs- periode	Antal planter		Antal rodknolde*	P.	E.
		ialt	m. knolde			
H. 1	9/11-1/2-63	8	0	—	—	—
H. 2	» » »	8	8	80 (4-21)	+	+
H. 3	9/11-1/2-63	4	4	113 (12-46)	÷	÷
H. 4	» » »	8	7	115 (5-32)	÷	÷
H. 5	» » »	8	7	40 (4-10)	÷	÷
H. 6	» » »	8	8	95 (1-25)	÷	÷
H. 7	» » »	8	8	55 (2-15)	÷	÷
H. 8	7/1-21/3-63	12	4	43 (6-15)	+	?
H. 9	» » »	12	12	197 (6-28)	+	+
H. 10	» » »	12	3(?)	(tvivlsom)	÷	÷
H. 11	» » »	12	0	—	—	—
H. 12	» » »	12	0	—	—	—
H. 13	7/1-21/3-63	12	(?)	(tvivlsom)	÷	÷
H. 14	» » »	8	2	7 (3-4)	÷	÷
H. 15	» » »	12	10	70 (1-25)	÷	÷
H. 16	» » »	12	12	263 (6-36)	?	?
H. 17	» » »	12	12	187 (1-42)	?	?
H. 18	» » »	12	10	78 (1-25)	?	÷
R. 1	10/10-3/1-63	8	3	36 (9-15)	÷	÷
R. 2	» » »	8	7	28 (1-8)	?	?
R. 3	» » »	8	6	50 (5-10)	+	+++
R. 4	» » »	8	0	—	—	—
R. 5	» » »	8	0	—	—	—
U. 1	18/1-12/3-63	8	7	79 (3-20)	+	÷
U. 2	» » »	8	6	59 (3-18)	+	÷
U. 3	» » »	8	8	146 (8-31)	+	÷
U. 4	26/7-16/9-63	9	6	125 (14-28)	÷	÷
U. 5	18/1-12/3-62	8	7	86 (1-25)	+	÷

Rhizobium fra

<i>Ononis repens</i>	17/7-21/9-62	8	8	(m. talrige)	÷	÷
<i>Caragana</i>						
<i>arboresc.</i> a)	10/10-3/1-63	8	6	19 (1-5)	÷	÷
» b)	» » »	7	5	24 (1-10)	÷	÷
<i>Astragalus gl.</i>	» » »	12	12	134 (6-17)	+	+++
<i>Gen. ovata</i> U.	18/1-12/3-63	6	6	67 (6-15)	+	÷
<i>Mimosa</i> sp. U.	» » »	8	6	92 (10-22)	?	÷

* Tallene i parentes angiver minimum og maximum.
P: pigment (rødt) i rodknolde. — E: tegn på effektivitet.

Tabel 3. Rodknoiddannelse af heterologe bakterier (*Rh. lupini* og andre) på rundbælg (*Anthyllis vulneraria*).

Stamme	Forsøgs- periode	Antal planter		Antal rodknolde*	P.	E.
		ialt	m. knolde			
<i>Rh. lupini</i>						
L. 1	28/5-16/8-62	8	4	8 (1-4)	?	÷
L. 2	29/5-6/8-63	8	4	11 (1-4)	÷	÷
L. 3	13/11-18/2-63	8	4	31 (3-12)	÷	÷
L. 4	5/5-8/7-63	9	4	12 (1-14)	÷	÷
A. 1	9/10-21/1-63	7	3	9 (2-5)	÷	÷
A. 2	» » »	8	7	13 (1-3)	÷	÷
A. 3	» » »	8	8	23 (1-5)	+	+
A. 4	» » »	8	8	19 (1-4)	÷	÷
H. 1	9/11-7/2-63	10	0	—	—	—
H. 2	» » »	10	7	30 (1-10)	÷	÷
H. 3	» » »	10	2	2 (1-1)	÷	÷
H. 4	» » »	10	8	20 (1-5)	÷	÷
H. 5	» » »	10	3	13 (1-7)	÷	÷
H. 6	» » »	10	3	10 (2-5)	÷	÷
H. 7	» » »	8	4	7 (1-2)	÷	÷
H. 8	30/1-4/4-63	8	4	19 (4-6)	?	÷
H. 9	» » »	8	7	14 (1-3)	÷	÷
H. 10	» » »	8	8	27 (1-8)	?	?
H. 11	» » »	8	0	—	—	—
H. 12	» » »	8	0	—	—	—
H. 13	» » »	8	0	—	—	—
H. 14	» » »	8	0	—	—	—
H. 15	» » »	8	7	30 (3-8)	÷	÷
H. 16	30/1-4/4-63	8	8	44 (1-11)	÷	÷
H. 17	» » »	8	7	54 (2-16)	?	÷
H. 18	» » »	8	7	47 (4-13)	÷	÷
R. 1	9/10-22/1-63	8	5	19 (2-7)	÷	÷
R. 2	5/5-8/7-63	8	3	12 (2-8)	÷	÷
R. 3	9/10-22/1-63	8	5	16 (1-6)	÷	÷
R. 4	28/5-6/8-63	8	2	3 (1-2)	÷	÷
R. 5	9/10-22/1-63	8	0	—	—	—
U. 1	17/12-5/3-63	10	5	23 (1-7)	÷	÷
U. 2	» » »	10	6	9 (1-4)	÷	÷
U. 3	» » »	8	5	19 (1-8)	÷	÷
U. 4	» » »	10	5	6 (1-2)	÷	÷
U. 5	» » »	10	5	18 (1-9)	÷	÷

* Tallene i parentes angiver minimum og maximum.

P: pigment (rødt) i rodknoldene. — E: tegn på effektivitet.

Tabel 3 fortsat

Stamme	Forsøgs- periode	Antal planter		Antal rodknolde	P.	E.
		ialt	m. knolde			
<i>Rhizobium</i> fra						
<i>Ononis repens</i>	12/7-25/9-62	10	6	8 (1-2)	÷	÷
<i>Caragana</i>						
<i>arboresc.</i> a)	17/12-19/3-63	8	7	22 (2-6)	÷	÷
» b)	5/5-8/7-63	12	6	14 (1-4)	?	÷
<i>Astragalus gl.</i>	9/11-7/2-63	8	8	24 (1-7)	+	++
<i>Gen. ovata</i> U.	5/5-8/7-63	11	7	25 (1-6)	÷	÷
<i>Mimosa</i> sp. U.	17/12-5/3-63	10	8	33 (1-8)	÷	÷

De tilsvarende forsøg med rundbælg gav de i tabel 3 viste resultater, der i det store og hele stemmer overens med de foregående. Infektionen er her gennemgående noget svagere, hvad angår såvel antallet af inficerede parallel-planter som antallet af rodknolde, medens derimod et par stammer mere end hos kællingetand viser infektionsevne. Sikker effektivitet sås kun hos lupin-stammen A.3 samt hos astragel-stammen.

Infektionsforsøg foretoges endvidere på begge værtplanter med følgende heterologe rhizobier (antal stammer af hver er angivet i parentes): *Rh. meliloti* (7), *Rh. trifolii* (6), *Rh. leguminosarum* (6), *Rh. phaseoli* (1), *Rh. japonicum* (5), desuden fra esparsette, *Onobrychis sativa* (3), guldregn, *Cytisus laburnum* (1), gyvel, *Sarothamnus scoparius* (1), visse, *Genista tinctoria* (1), jordnød, *Arachis hypogaea* (1), *Cajanus cajan* (1), *Crotalaria juncea* (1). De fem sidste regnes af FRED o.a. (1932) til den store heterogene gruppe 7. Kun undtagelsesvis sås der nogen dannelse af rodknolde, alle meget små og uden mindste tegn på effektivitet.

Undtagelserne var de følgende:

Værtplante	<i>Rhizobium</i>	Antal planter		Antal rodknolde	
		ialt	knold- bærende		
Kællingetand	<i>trifolii</i> CF.	13	4	20	} usikre
»	» 220	8	4	14	
Rundbælg	<i>japonicum</i> V. 5	8	1	6	
»	» »	10	1	1	
»	» 663	10	1	4	
»	<i>leguminosarum</i> T	8	1	4	
»	<i>meliloti</i> T. f-g	10	2	?	

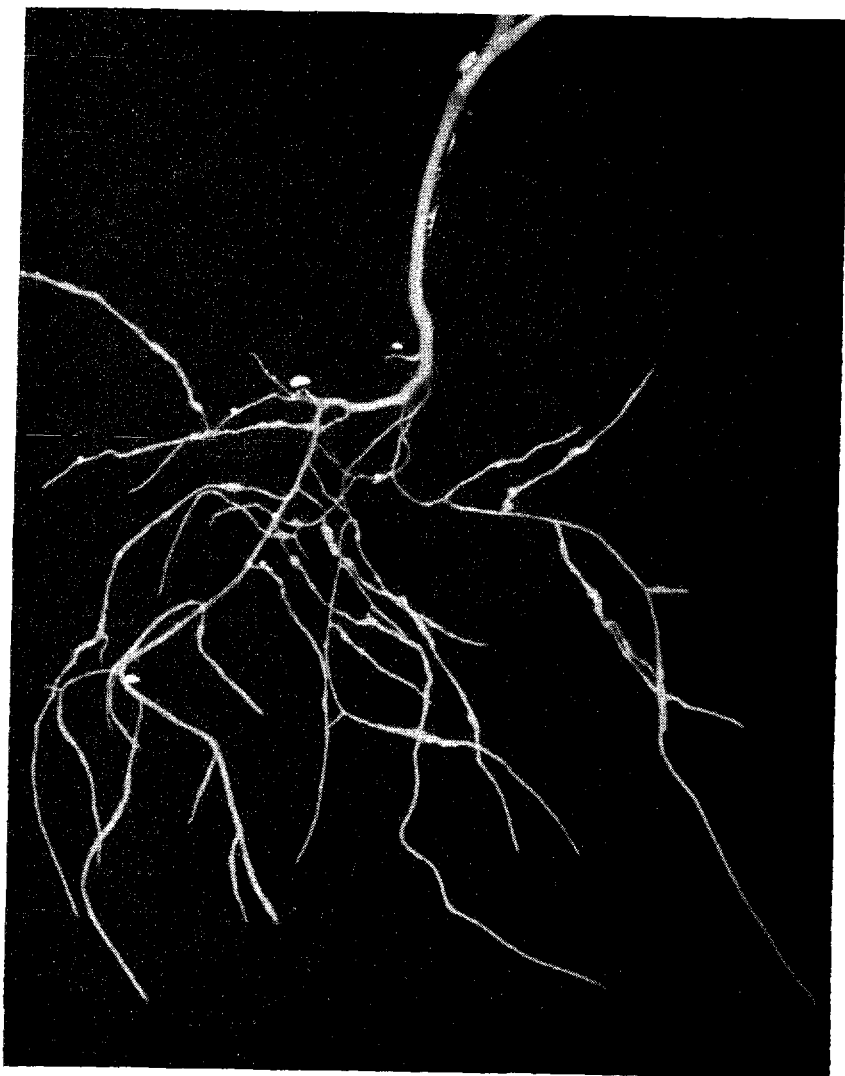


Fig. 2. Rodsystem af serradel podet med *Rhizobium* fra rundbælg R. 1 (sml. tabel 3) (ca. $\frac{2}{3}$ nat. størr.).

(Fot. A. Munch, Landbrugets Informationskontor).

Serradel (Ornithopus sativus) podet med Rh. ex Lotus-Anthyllis.
I disse forsøg brugtes serradel som repræsentant for lupingruppens værtplanter, da den i modsætning til de storfræede lupiner

bekvemt lod sig dyrke i reagensglas. Forsøgene omfattede foruden *Rh. ex Lotus-Anthyllis* også de 6 heterologe rhizobier, der havde vist infektionsevne overfor kællingetand og rundbælg (sml. Tabel 2 og 3).

Af resultaterne i tabel 4 fremgår det, at på een (K.3) nær kan alle rhizobium-stammer med infektionsevne overfor kællingetand og rundbælg, både homologe og heterologe, også inficere serradel. Kun to stammer, fra *Genista ovata* og *Mimosa* sp., viste sig effektive, og dette i lige så høj grad som normale stammer af *Rh. lupini*. Som foran bemærket (s. 3) er disse to stammer i Uppsala fundet normalt effektive overfor lupin. I alle andre tilfælde var knolddannelsen udpræget ineffektiv; et eksempel ses i fig. 2.

Tabel 4. Rodknolddannelse af heterologe bakterier (*Rh. ex Lotus-Anthyllis* og andre) på serradel (*Ornithopus sativus*).

Stamme	Forsøgs- periode	Antal planter ialt	m. knolde	Antal rodknolde*	P.	E.
<i>Lotus-Anth.:</i>						
K. 1	1/3-4/5-63	10	7	20 (1-10)	÷	÷
K. 2	17/9-19/11-62	8	?	(tvivlsom)	÷	÷
»	1/3-14/5-63	9	6	27 (1-11)	÷	÷
K. 3	17/9-19/11-62	8	?	(tvivlsom)	÷	÷
»	18/5-26/7-63	10	0	—	—	—
K. 4	3/12-17/2-63	8	5	8 (1-5)	÷	÷
»	18/5-26/7-63	10	6	26 (1-8)	÷	÷
K. 5	» » »	11	11	112 (3-24)	÷	÷
K. 6	28/11-9/2-63	10	4	24 (3-12)	÷	÷
R. 1	17/9-19/11-62	8	3	(talrige)	÷	÷
R. 2	18/5-26/7-63	12	9	48 (1-6)	÷	÷
R. 3	3/12-19/2-63	8	8	58 (1-16)	÷	÷
R. 4	17/9-19/11-62	8	4	(talrige)	÷	÷
R. 5	3/12-19/2-63	8	7	21 (1-6)	÷	÷
<i>Rhizobium fra</i>						
<i>Ononis repens</i>	19/5-26/7-63	10	10	370 (5-62)	÷	÷
<i>Caragana</i>						
<i>arboresc.</i> a)	» » »	8	8	100 (6-12)	÷	÷
» b)	» » »	8	8	80 (3-22)	÷	÷
<i>Genista ovata</i> U.	» » »	10	10	107 (3-21)	+	+++
<i>Mimosa</i> sp U.	» » »	10	10	100 (4-42)	+	+++
<i>Astragalus</i>	3/12-19/2-63	8	5	22 (2-7)	÷	÷
<i>glycyphyllus</i>	17/5-26/7-63	12	11	39 (1-10)	÷	÷

* Tallene i parentes angiver minimum og maximum.

P: pigment (rødt) i rodknoldene. - E: tegn på effektivitet.

Om forsøgene med serradel bør forøvrigt bemærkes, at nogle af de mindste rodknolde muligvis ikke er reelle, da der i et enkelt sæt (6 × 2) upodede kontrol-planter sås enkelte ganske små knoldlignende dannelser, der knapt var synlige uden lup; BONNIER (1961) har berettet om noget lignende hos aseptisk dyrkede bælgplanter.

Infektionsforsøg med Rh. ex Lotus-Anthyllis på andre heterologe værtplanter.

Sådanne forsøg, der teoretisk næsten aldrig ville få ende, anstilledes kun med rødkløver og lucerne samt enkelte andre af den sidste gruppe. Forsøgene med kløver forløb helt negativt, ligeledes med humle-sneglebælg og hvid stenklover, men på lucerne sås af og til nogen antydning af knolddannelse. Rundbælg-stammen R.4 viste i et første forsøg ingen infektion af 10 lucerneplanter. I et følgende forsøg fandtes på een af 8 planter to små knolde indeholdende stavbakterier, men ingen bakteroider. I et tredje med 43 planter inficeredes 3 planter, to med hver een meget lille og een med to ret store men pigmentløse rodknolde, der indeholdt stav- og coccoidformede bakterier; reisolation af bakterierne forsøgt, men lykkedes ikke. I en fjerde forsøgsrække (13/5-31/7 1963) sås der en forholdsvis hyppig infektion:

Stamme	Antal planter	Antal knoldbærende	Antal knolde
R. 2	12	3	6
R. 4	28	3	3
R. 5	18	4	12
K. 5	13	2	4
K. 6	15	1	2
K. 4	15	8	31

Rodknoldene var næsten alle meget små, uden pigment og aldeles ineffektive.

Infektionsforsøg med astragel og krageklo har endnu ikke kunnet foretages på grund af mangel på frø med tilstrækkelig spireevne¹.

1. Nogle stammer af kællingetand- og lupinbakterier o.a. viste sig senere (april 1964) at kunne inficere astragel.

Kvælstofbindingsforsøg

Som bemærket i det foregående sås der i infektionsforsøgene jævnlige tegn på, at heterologe rhizobier dannede helt eller delvis effektive rodknolde, oftere hos kællingetand end hos rundbælg og sjældnest hos serradel. Denne »heterologe effektivitet« var mest udpræget hos *Rh. lupini* A.3 (der forøvrigt var aldeles ineffektiv overfor serradel) samt astragel-stammen. Dette fremgår dels af planternes udseende ved forsøgenes afslutning som vist i fig. 3 og 4, og dels af kvælstofbestemmelser i plantematerialet sammenlignet med kontrolplanter, upodede og podede med homologe rhizobier. Nogle eksempler fra infektionsforsøgene findes i tabel 5 (sml. fig. 3). Resultaterne kan ikke ubetinget sammenlignes, da væksttiden ikke var den samme for alle sæt planter; dog er det klart, at de to heterologe stammer ikke står væsentlig tilbage for de homologe i effektivitet. Her som i flere andre tilfælde er iøvrigt udslagene adskillig tydeligere hos kællingetand end hos rundbælg. I et andet kvælstofbindingsforsøg blev kællingetand podet med astragel-stammen samt *Rh. lupini* R.3 og H.2, der i infektionsforsøgene (sml. tabel 2) havde vist tegn på henholdsvis moderat og svag effektivitet. Dette bekræftedes ganske af resultaterne i tabel 6 (sml. planternes udseende i fig. 4).

Tabel 5. Kællingetand og rundbælg podede med effektive heterologe *Rhizobium*-stammer (sml. Tabel 1-2).

Værtplante og bakteriestamme	N, mg pr. 2 planter, gns.	N i tørstof %
Kællingetand, upodet, 6 × 2 pl. (a).....	0.17	1.21
» » 6 × 2 pl. (b).....	0.22	1.00
» + <i>Rh. lupini</i> A. 3, 4 × 2 pl.	1.07	3.22
» + <i>Rhizobium ex Astragalus glycyphyllus</i> , 6 × 2 pl.	1.16	3.54
» + homolog <i>Rhizobium</i> K. 3, 8 × 2 pl.	1.35	3.68
 Rundbælg, upodet, 6 × 2 pl.	 0.60	 1.04
» + <i>Rh. lupini</i> A. 3, 4 × 2 pl.	1.09	1.79
» + <i>Rhizobium ex Astragalus glycyphyllus</i> , 4 × 2 pl.	1.38	2.32
» + homolog <i>Rhizobium</i> K. 4, 8 × 2 pl.	1.81	2.47

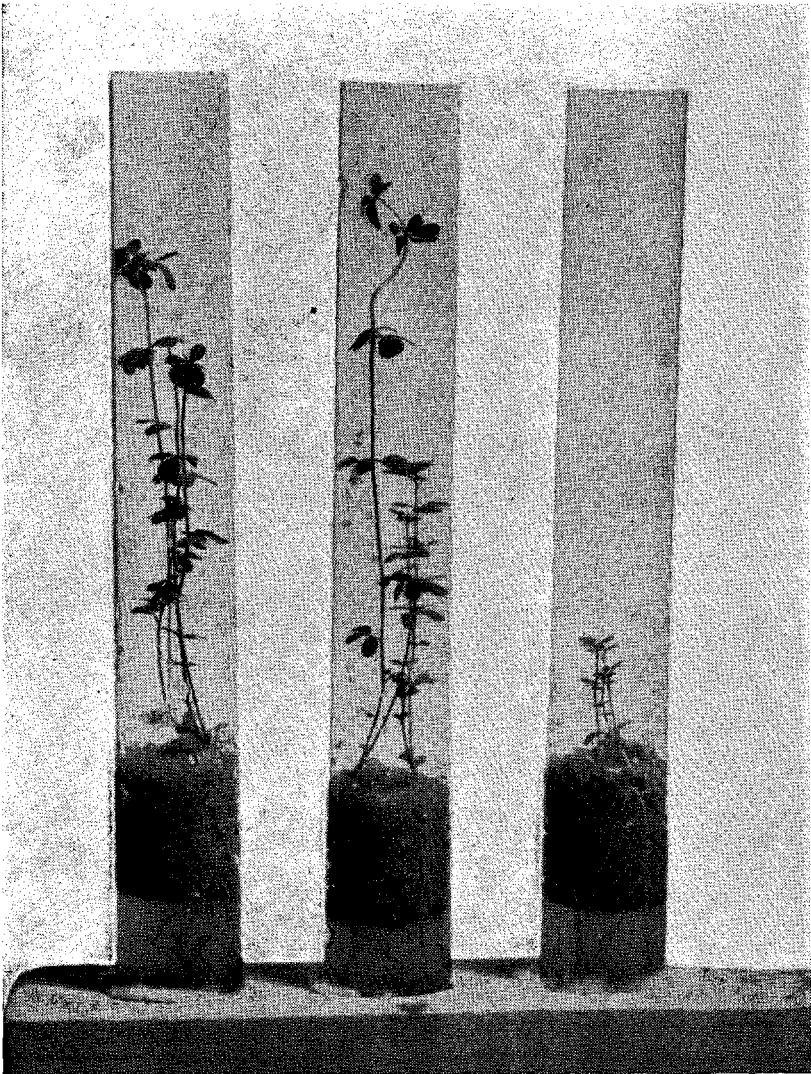


Fig. 3. Kællingetand podet med (fra venstre): Homolog *Rhizobium* K.3
- *Rhizobium lupini* A.3 - Upodet. (13/9-9/11 1962) (ca. $\frac{2}{3}$ nat. størr.).

(Fot. A. Munch. Landbrugets Informationskontor).

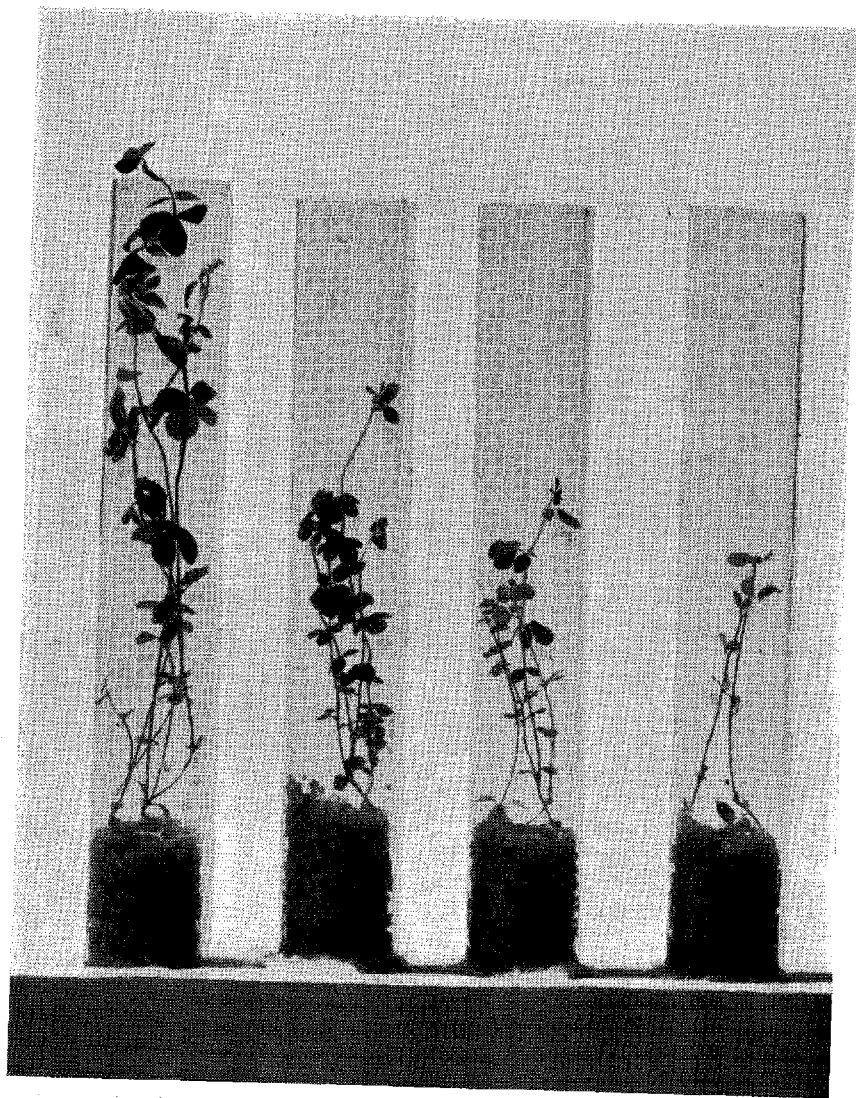


Fig. 4. Kællingetand podet med (fra venstre): *Rhizobium* fra *Astragalus glycyphyllus* - *Rh. lupini* R. 3. - *Rh. lupini* H. 2 - Upodet. (1/2-22/4 1963)
(ca. $\frac{2}{3}$ nat. størr.).

(Fot. A. Munch, Landbrugets Informationskontor).

Tabel 6. Kællingetand podet med helt eller delvis effektive heterologe *Rhizobium*-stammer (1/2-22/4 1963).

Bakteriestamme	N, mg pr. 2 planter, gns.	N i tørstof %
<i>Rhizobium ex Astragalus glycyphyllus</i> , 4 × 2 pl.....	2.44	3.96
<i>Rhizobium lupini</i> R. 3, 8 × 2 pl.....	1.17	3.30
» » H. 2, 6 × 2 pl.....	0.48	1.74
Upodet, 8 × 2 pl.....	0.25	1.09

Ligesom *Rh. lupini* H.3 viste nogle af de fra Dr. Harmsen, Groningen, modtagne stammer tegn på svag effektivitet: synligt rødt rodknoldpigment, friskere grøn bladfarve og tildels lidt bedre vækst end de upodede planter. Også i nogle af disse blev der bestemt kvælstof ved forsøgets afslutning. Resultaterne i tabel 7 bekræfter en ringe men påviselig effektivitet hos 4 stammer; en femte (H. 15) synes virkelig ineffektiv, idet planternes kvælstofindhold ikke er højere end i de ikke-knoldbærende.

De infektionsdygtige heterologe rhizobier synes således overfor kællingetand at frembyde et kontinuert spektrum, der varierer fra fuldkommen ineffektivitet til normal effektivitet, f.eks. i *Rh. lupini* A.3 og astragel-stammen. Om den første må dog bemærkes, at den i kulturel henseende afviger betydeligt fra andre stammer af *Rh. lupini*; det synes ikke udelukket, at der kan være tale om en spontan »fremmedinfektion« af den oprindelige værtplante (*Lupinus densiflorus*) med en stamme af *Rhizobium ex Lotus-Anthyllis*. Med hensyn til den effektive stamme fra astragel foreligger den mulighed, at kællingetand, rundbælg og sødbladet astragel simpelthen har rodknoldbakterier til fælles.

Tabel 7. Kællingetand podet med svagt effektive eller ineffektive stammer af *Rh. lupini* (sml. Tabel 1); 6×2 pl., upodet 3×2.

Stamme	Planternes tilstand	N, mg pr. 2 planter, gns.	N i tørstof %
H. 8	Tildels frisk grønne, uensartede.....	0.45	1.76
H. 9	Små men frisk grønne.....	0.50	1.95
H. 16	» » » »	0.45	1.72
H. 17	» » » »	0.50	1.77
H. 15	Gullige, vantrevne, mange knolde.....	0.27	1.20
H. 11	» » , ingen knolde.....	0.27	0.99
H. 12	» » , » »	0.26	1.02
Upodet	» » , » »	0.32	1.14

Oversigt

Infektionsforsøgene viser ganske utvetydigt, at langt de fleste stammer af *Rh. lupini* kan danne rodknolde på såvel kællingetand som rundbælg, således som det fremgår af nedenstående resumé af tabellerne 2 og 3 (»stvivilsomme« stammer regnet som negative):

Antal stammer af <i>Rh. lupini</i>	Knolddannelse på	
	<i>Lotus</i>	<i>Anthyllis</i>
28	+	+
1	+	÷
2	÷	+
5	÷	÷

Omvendt dannede 10 af 11 *Rh. ex Lotus-Anthyllis*-stammer knolde på serradel. Reciprok infektionsevne overfor hinandens »normale« værtplanter (ialtfald serradel) tør således kaldes en karakteristisk egenskab hos *Rh. lupini* og *Rh. ex Lotus-Anthyllis*. Hvis man betragter infektionsevnen som det primære kriterium for artsinddeling af knoldbakterierne, er det således ikke muligt på dette grundlag at adskille disse to grupper af rhizobier. Hertil kommer, at infektionsevne overfor arter af *Lotus*, *Anthyllis* og *Ornithopus* også tilkommer rhizobier fra endnu andre værtplanteslægter: *Astragalus*, *Caragana*, *Genista*, *Mimosa* og *Ononis*; listen er sandsynligvis ikke udtømt hermed, og i det hele taget må man vente, at krydspodningsgruppernes grænser vil blive stedse videre jo flere bakteriestammer og værtplantearter man undersøger; det må nemlig vel erindres, at hidtil har man kun studeret en lille brøkdel af samtlige bælgplanteslægter i henseende til deres rodknoldsymbionter. »Arter« af *Rhizobium* base-rede på krydspodningsforsøg kan derfor næppe blive andet eller mere end en empirisk betegnelse for grupper af *Rhizobium*-stammer, der »normalt« forekommer som symbionter hos bestemte bælgplanter, men ikke en klassifikation på videnskabeligt grundlag.

Grænsen mellem *Rh. lupini* og *Rh. ex Lotus-Anthyllis* udviskes yderligere derigennem, at heterolog infektion ikke sjældent resulterer i dannelse af mere eller mindre effektive rodknolde. Dette forklarer ganske utvungent resultaterne af et gammelt og som

det synes overset eller glemt forsøg af NOBBE o.a. (1908); her medførte podning af kællingetand med lupin-bakterier i kar-forsøg en signifikant omend beskednen udbytteforøgelse:

Podemateriale	Tørstofudbytte gram pr. kar	L. S. D.
<i>Rh. ex Lotus-Anthyllis</i>	9.75	} 95%: 0.94 g 99%: 1.36 g 99.9%: 2.05 g
<i>Rh. lupini</i>	4.57	
5 andre <i>Rhizobium</i> -stammer	2.15-3.43	
Upodet.....	2.49	

Den lejlighedsvis knolddannelse af forskellige andre heterologe bakteriestammer på kællingetand og rundbælg og disses bakterier igen på f.eks. lucerne lader formode, at der måske ikke eksisterer den bælgplanteslægt eller -art, der ikke undtagelsesvis kan inficeres af en hvilken som helst stamme af *Rhizobium* (men en fuldstændig undersøgelse heraf ville være et sandt Sisyfosarbejde). Sådan exceptionel knolddannelse er dog kvantitativt særdeles forskellig fra den regelmæssighed, hvormed f.eks. *Rh. lupini* og *Rh. ex Lotus-Anthyllis* udveksler værtplanter. Krydspodningsgrupperne kan således nok bevare en vis realitet, men deres grænser er hverken absolutte eller undtagne fra revision.

En særlig høj grad af »promiskuitet« overfor mange, især tropiske værtplanter ses hos rhizobier fra *Vigna sinensis* (af Gruppe 7). NORRIS (1956) har fremsat den teori, at disse rhizobier repræsenterer knoldebakteriernes primitive stamform, hvorfra de mere specialiserede grupper har udviklet sig siden de første bælgplanters optræden i kridttiden, og denne specialisering synes at være gået videst hos *Rh. meliloti*, *trifolii* og *leguminosarum*. Ud fra dette synspunkt kan *Rh. lupini* og *Rh. ex Lotus-Anthyllis* opfattes som indtagende en mellemstilling ligesom rhizobierne fra de vildtvoksende planter astragal, krageklo, *Genista* og *Mimosa*. Et sådant relativt vidt spillerum i valget af værtplanter forklarer måske tildels, hvorfor nogle rhizobier kan bevare deres eksistens i jord, hvor deres »normale« værtplanter ikke vokser, medens dette sjældnere gælder for de mere eksklusive, f.eks. *Rh. meliloti*. For denne mulighed taler bl.a. BJÄLFVE's (1963) fund af rhizobier, der er ineffektive overfor deres oprindelige værtplante, men effektive overfor andre af »fremmede« krydspodningsgrupper.

SUMMARY

On the relation between hosts and root nodule bacteria in certain leguminous plants

Numerous strains of *Rhizobium lupini* proved to be infectious towards *Lotus corniculatus* and *Anthyllis vulneraria* in aseptic agar culture. Among 36 strains, 28 infected both host plants, while one infected *Lotus* alone and two *Anthyllis* alone, and the remaining five failed to infect either plant. Conversely 10 among 11 strains of rhizobia from *L. corniculatus* (6) and *A. vulneraria* (5) formed nodules on serradella (*Ornithopus sativus*). The ability to nodulate each others' host plants (at least serradella as representative of the lupine group) thus seems to be a characteristic property of the two groups of rhizobia.

Among other rhizobia, six strains from *Astragalus glycyphyllus*, *Caragana arborescens*, *Genista ovata*, *Mimosa* sp. and *Ononis repens* produced nodules in *A. vulneraria*, *L. corniculatus* and *O. sativus*. Other heterologous rhizobia did only quite exceptionally nodulate *L. corniculatus* and *A. vulneraria*. The *Lotus-Anthyllis* rhizobia did not infect red clover (*Trifolium pratense*), but a few strains showed some nodulation in lucerne (*Medicago sativa*).

The nodules formed by heterologous rhizobia were mostly ineffective, although some strains of *Rh. lupini* showed an effectiveness in *L. corniculatus* varying from barely noticeable to normal. The last was the case in a strain originating from *L. densiflorus*; this was also the only strain of *Rh. lupini* that proved effective with *A. vulneraria*. A strain from *Astragalus glycyphyllus* was highly effective with *L. corniculatus* and *A. vulneraria* but ineffective with *O. sativus*; the only heterologous rhizobia that effectively nodulated the last species were the strains from *Genista ovata* and *Mimosa* sp.; these had been isolated by Dr. G. Bjälöve, Uppsala, who found them effective towards lupine.

Rh. lupini and the *Lotus-Anthyllis* group of rhizobia thus cannot be distinguished from each other as »cross-inoculation groups« although cultural differences do exist. In respect of host plant specificity they seem to hold a position intermediate between the highly »promiscuous« cowpea group and the more highly specialized *Rh. meliloti*, *trifolii* and *leguminosarum*. The ability to nodulate others than their »normal« host plants may be an ecological factor in maintaining their survival in soils where these host plants do not grow.

LITTERATURHENVISNINGER

- Balassa, R.* (1960). Transformation of a strain of *Rhizobium lupini*. *Nature* v. 188: 246-247.
- Bjälfsve, G.* (1963). The effectiveness of nodule bacteria. *Plant and Soil* v. 18: 70-76.
- Bonnier, C.* (1961). Tumeurs spontanées sur racines de légumineuses stériles. Leur signification possible dans la symbiose à *Rhizobium*. *Ann. Inst. Pasteur* v. 100: 358-367.
- Bonnier, C.* (1962). Relation entre l'efficacité et la spécificité des souches de *Rhizobium*. *Ann. Inst. Pasteur* v. 103: 403-409.
- Dangeard, P.* (1926). Recherches sur les tubercules radicaux des Légumineuses. *Le Botaniste*, ser. 16: 1-270.
- Erdman, L. W., & Means, U. M.* (1960). Strains of *Rhizobium* effective on the trefoils, *Lotus corniculatus* and *Lotus uliginosus*. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* v. 14: 170-175.
- Fred, E. B., Baldwin I. L., & McCoy, E.* (1932). Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants. *University of Wisconsin Studies in Science* No. 5.
- Gavigan, J. C., & Curran, P. L.* (1962). Experiments with the genera *Lotus* and *Anthyllis* and their associated rhizobia. *Proc. Royal Soc. Dublin B.* 1: 37-46.
- Gregory, K. F., & Allen, O. N.* (1953). Physiological variation and host plant specificity of rhizobia isolated from *Caragana arborescens*. *Canad. J. Bot.* v. 31: 730-748.
- Jensen, H. L.* (1949). Nyere undersøgelser over biologisk kvælstofbinding. *Tidsskr. Planteavl* v. 52: 653-690.
- Jensen, H. L.* (1955). En lucerne-ineffektiv stamme af *Rhizobium meliloti*. *Tidsskr. Planteavl*, v. 59: 553-570.
- Kalnins, A.* (1938). The efficiency of different strains of lupine and serratella nodule bacteria in fixing atmospheric nitrogen. (Lettisk m. engl. resumé). *Acta Univ. Latv.* v. 4:41-64.
- Krasilnikov, N. A.* (1945). Engrafting of new virulence characters to nodule and some other bacteria. (Russisk m. engl. resumé). *Mikrobiologiya* v. 14, 1945: 230-236.
- Krüger, R.* (1913). Beiträge zur Artenfrage der Knöllchenbakterien einiger Leguminosen. (Thesis, Dresden).
- Lange, R. T.* (1961). Nodule bacteria associated with the indigenous leguminosae of South-Western Australia. *J. Gen. Microbiol.* v. 26: 351-359.
- Lange, R. T., & Alexander, M.* (1961). Anomalous infections by *Rhizobium*. *Canad. J. Microbiol* v. 7: 959-961.
- Lange, R. T.* (1962). Susceptibility of indigenous South-Western Australian legumes to infection by *Rhizobium*. *Plant and Soil* v. 17: 134-136.
- Ljunggren, H.* (1961). Transfer of virulence in *Rhizobium*. *Nature* v. 191: 623.
- Lynch, D. L., & Sears, D. H.* (1950). The nitrogen-fixing efficiency of strains of *Lotus corniculatus* nodule bacteria. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* v. 14: 168-170.

- MacDonald, H. A.** (1960). Birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.), its characteristics and potentialities as a forage legume. Cornell Univ. Agr. Exp. Station Memoir 261.
- Nobbe, F., & Hiltner, L.** (1896). Ueber die Anpassungsfähigkeit der Knöllchenbakterien ungleichen Ursprungs an verschiedenen Leguminosengattungen. Landw. Versuchsstat. v. 47: 257-268.
- Nobbe, F. & Hiltner, L.** (1900). Künstliche Ueberführung der Knöllchenbakterien von Erbsen in solche von Bohnen. Centralbl. Bakt. (II) v. 6: 449-457.
- Nobbe, F., Richter, L., & Simon, J.** (1908). Weitere Untersuchungen über die wechselseitige Impfung verschiedener Leguminosengattungen. Landw. Versuchsstat. v. 68: 241-252.
- Norris, D. O.** (1956). Legumes and the *Rhizobium* symbiosis. Empire J. Exp. Agriculture v. 24: 247-270.
- Saric, Z.** (1960). On some traits of *Rhizobium*. Trans. 7. Intern. Congr. Soil Sci. (Madison) v. 3: 625-629.
- Simon, J.** (1914). Ueber die Verwandtschaftsverhältnisse der Leguminosen-Wurzelknöllchenbakterien. Centralbl. Bakt. (II) v. 41: 470-479.
- Westermann, T.** (1918). Undersøgelser af Knoldbakterier fra Rødkløver, Lucerne og Kællingetand og deres indbyrdes Virkning paa Værtplanterne. Tidsskr. Planteavl v. 25: 357-366.