

Kvælstofbindende effektivitet hos sneglebælg-gruppens rodknoldbakterier, med særligt henblik på lucerne

Ved H. L. Jensen

851. beretning fra Statens Forsøgsvirksomhed i Plantekultur

Nærværende beretning indeholder en oversigt over de kvælstofbindingsforsøg med lucerne-knoldbakterier, der siden 1953 har været udført ved Statens Planteavlslaboratoriums bakteriologiske afdeling, især angående de bakteriestammer, der har været anvendt eller anvendes til fremstilling af nitratin. Undersøgelserne er ledet og beretningen udarbejdet af forstander, dr. agro. H. L. Jensen, medens det tekniske forsøgsarbejde mest er udført af laboratorieassistenterne frk. Esther Christensen († 1958) og frk. Anna-Lise Hansen.

Forstanderne ved Statens Forsøgsvirksomhed i Plantekultur

Indledning

Rodknoldbakterierne hos arter af sneglebælg (*Medicago*), stenkløver (*Melilotus*) og bukkehorn (*Trigonella*) udgør med hensyn til både kulturelle og symbiotiske egenskaber en ret veldefineret gruppe, der ofte henregnes til samme art (*Rhizobium meliloti*) og i almindelighed ikke danner rodknolde på værtplanter udenfor de tre nævnte slægter, der på den anden side som regel ikke lader sig inficere af knoldbakterier fra andre bælgplanteslægter; nogle undtagelser er dog rapporteret, bl.a. af Bonnier (1962) og af Bjällfve (1963).

Medens de forskellige stammer af *R. meliloti* udviser et nogenlunde ensartet billede med hensyn til rodknolddannende evne (»virulens«), gør der sig andre forhold gældende i deres evne til at foranledige kvælstofbinding (»effektivitet«) hos værtplanterne. Homologe bakteriestammer, dvs. sådanne isolerede fra en given værtplanteart, kan overfor denne vise ret varierende eller endog helt manglende effektivitet, og endnu oftere ses dette, når der er tale om heterologe bakterier og værtplanter. Undersøgelser af Brockwell & Hely (1966) i Australien viste rodknolddannelse i 889 og positiv men variabel effektivitet i 637 af 974 kombinationer mellem 42 knoldbakteriestammer og plantearter og -varieteter af de tre ovennævnte slægter. De mest »ekklusive«

værtplanter var den eenårige *Medicago lacinata* samt *Trigonella suavissima*, medens lucerne syntes at have det bredeste knoldbakterie-spektrum. Tidligere fandt Burton & Erdman (1940), at *Trigonella foenum-graecum* kun lod sig effektivt inficere af sine homologe bakterier, der på den anden side var effektive overfor lucerne, hvid stenkløver og den eenårige *Medicago hispida*. Mange andre eksempler på varierende effektivitetsforhold mellem bakterier fra lucerne og eenårige sneglebælgarter er fremdraget af Purchase o.a. (1951) og Brockwell & Hely (1961). Hertil kommer, at varierende effektivitet kan gøre sig gældende selv overfor forskellige sorter af lucerne (Burton & Wilson 1939, Kroulik & Gainey 1940).

Ved Statens Planteavlslaboratoriums bakteriologiske afdeling er der i årenes løb skabt en betydelig samling kulturer af rodknoldbakteriestammer siden »podning« af lucernefrø blev almindelig som følge af Christensen's (1914) banebrydende arbejde. Oprindeligt isolerede man nye bakteriestammer hvert år ud fra den betragtning, at bakteriernes »virulens« (dengang opfattet som deres kvælstofbindende effektivitet) ikke kunne holdes vedlige i kunstig kultur; det har dog senere vist sig, at dette ikke gælder for kulturer, der opbevares i steril jord (Jensen 1962). Fra omkr. 1920

kontrollerede man tillige regelmæssigt stammernes rodknolddannende evne ved podning på sterile kimplanter (*Petersen* 1940), ligesom man også iagttog planternes forbedrede vækst som tegn på effektivitet. Yderligere er der siden 1953 til oplysning om mulige forskelligheder i stammernes effektivitet udført en række kvantitative kvælstofbindingsforsøg, hvis resultater meddeles i den følgende beretning.

Bakteriestammer og metodik

Laboratoriets kultursamling omfattede ved forsøgenes indledning 114 stammer af *R. meliloti*. Til nærmere afprøvning udvalgte man 77 stammer, hvoraf 67 var isolerede fra lucerne, 7 fra humlesneglebælg, 2 fra hvid stenklover og 1 fra bukkehorn (*Trigonella foenum-graecum*). Den ældste af de undersøgte stammer var isoleret i 1911, den nyeste i 1967. Med få undtagelser fra de seneste år opbevarede alle stammer i steril jordkultur, hvor hverken infektionsevne eller effektivitet har vist sig at gå tabt (*Jensen* 1962). I løbet af 1966-68 blev der desuden isoleret og undersøgt enkelte andre stammer med specielle effektivitetsforhold.

Kvælstofbindingsforsøgene udførtes med aseptisk dyrkede planter i vatlukkede 22 × 200 mm reagensglas indeholdende et kombineret agar-sand-substrat: 25 ml »N-frit« agar-medium dækket med ca. 15 g groft sterilt sand som tidligere beskrevet (*Jensen* 1955, 1962, 1968). Agarmediet havde oprindelig den af *Petersen* (1940) angivne sammensætning; senere udelod man ferrifosfat og tilsatte istedet 10 p.p.m. ferrosulfat, 1,0 p.p.m. natrium-molybdat og 1,0 p.p.m. manganosulfat. Senere igen har man anvendt sekundært istedet for normalt calciumfosfat, der ofte i forbindelse med ledningsvand gav substratet en stærkere alkalisk reaktion end ønskeligt. Pr. glas såede man 4 eller 5 frø, der var udvendigt desinficerede med sublimat eller koncentreret svovlsyre; den sidste viste sig fordelagtig især til lucernefrø, der spirede hurtigere og sikrere efter denne behandling. Efter spiring udtynedes kimplanterne til 2 pr. glas, og efter frem-

komst af det første blivende blad podedes de med en tynd suspension af bakterier fra unge agarkulturer.

Glassene blev anbragt i hvidmalede spiringskasser til beskyttelse af rodsystemerne mod lyset og henstod ca. 2-3 måneder i et væksthuse med supplerende kunstig belysning fra oktober til marts. Ved høstning fjernedes planterne fra substratet, rodknoldene talt, og tørstofvægten blev bestemt i de individuelle glas og kvælstof i det samlede materiale fra fællesglassene (oftest 8-10 for hver stamme). Glas med upodete planter tjente som kontrol. Til forsøgene med lucerne anvendtes sorten DuPuits; af humle-sneglebælg og hvid stenklover anvendtes uspecificeret frø fra Danske Landbo- og Husmandsforeningers Frøsalg.

Da laboratoriet hverken havde eller har et klimarum til rådighed, måtte forsøgene gennemføres under ret uensartede temperatur- og belysningsforhold, hvorfor væksten varierede ganske betydeligt fra det ene forsøg til det andet. Af praktiske grunde kunne der vanskeligt inkluderes mere end 10 stammer i hvert forsøg, og de forskellige stammers kvælstofudbytte i forskellige forsøg lod sig derfor ikke direkte sammenligne, men måtte sættes i relation til en »målestamme«, der indgik i hvert forsøg. Som sådan valgtes stammen L. 40 (isoleret fra lucerne 1928), der i lang tid havde været anvendt til nitraginfremstilling og havde vist god effektivitet overfor såvel lucerne som humle-sneglebælg. De prøvede stammers effektivitet udtryktes som netto-kvælstofbinding (differens mellem de podede planters og de upodete kontrolplanters kvælstofindhold) i pct. af målestammens udbytte. De fleste stammer prøvedes 2 til 5 gange; hyppigst gentoges forsøgene med de stammer, der anvendtes til nitraginfremstilling eller viste tegn på særlig stærk eller særlig svag effektivitet. I adskillige tilfælde, når kvælstofbindingen ikke afveg mere end $\pm 10\%$ fra målestammens, ansås gentagelse for overflødig.

Bakteriestammer isolerede fra lucerne er i det følgende betegnet med symbolet L., fra humle-sneglebælg HS., fra stenklover St. og

fra bukkehorn Tr. – Der er her grund til at bemærke, at forholdsvis mange især af de ældre stammer er isolerede fra jorde i laboratoriets omegn og landbohøjskolens undervisningsmark, hvorfor det ikke er udelukket, at nogle af dem kan være re-isolater fra tidligere podede planter. Et antal repræsentative stammers morfologiske og kulturelle egenskaber er beskrevet af *Petersen* (1940).

Resultater af kvælstofbindingsforsøgene

A). *Lucerne*. – Tabel 1 viser målestammens stærkt varierende kvælstofbinding i 22 forsøg fra 1953 til 1968. Variationerne skyldes selv sagt især forskelle i temperatur- og lysforhold men også den omstændighed, at man for at op-

nå nogenlunde samme udviklingstrin af planterne også måtte lade væksttiden variere en del, fra 56 dage i forsøg nr. 9 og nr. 16 til 95 dage i nr. 1 og nr. 18.

Ligesom i tidligere forsøg (*Jensen* 1955) har de upodede planter som helhed kun optaget små mængder bundet kvælstof fra substratet og atmosfæren, idet deres kvælstofindhold kun i 3 forsøg overstiger det dobbelte af frøenes (0,50 mg). De podede planters kvælstofindhold er gennemsnitlig 6,7 gange så højt som de tilsvarende upodedes, med minimum og maksimum henholdsvis 3,0 (fors. nr. 15) og 13,2 (fors. nr. 18); kun een værdi ligger under 4,0 og kun to på 10 og derover. Kvælstofbindingen giver sig også tydeligt tilkende i tørstoffets

Tabel 1. Målestammens (L.40) kvælstofbinding i 22 forsøg 1953-1968
Lucerne

Fors. nr.	Tidsrum fra podning til høst	Fælles glas	Total N mg pr. 2 planter		N-binding mg/2 pl.
			L.40	Upodet	
1	5/9 53 - 9/12 53	7	1,44	0,28	1,16
2	27/4 54 - 19/7 54	9	2,96	0,47	2,49
3	2/8 55 - 28/9 55	9	2,02	0,29	1,73
4	15/8 55 - 19/10 55	10	2,12	0,32	1,80
5	14/8 55 - x) 55	9	2,08	0,34	1,74
6	1,3 55 - 18,5 55	10	3,21	0,39	2,82
7	20,5 55 - 29,7 55	6	2,42	0,43	1,99
8	13/6 56 - 17/8 56	10	2,77	0,44	2,33
9	24/4 56 - 19/6 56	10	2,14	0,46	1,68
10	18/5 56 - 25/7 56	10	3,07	0,46	2,61
11	22/5 56 - 31/7 56	10	3,09	0,49	2,60
12	26/3 57 - 6/6 57	9	2,62	0,59	2,03
13	18/5 57 - 9/7 57	10	2,11	0,33	1,78
14	21/6 57 - 5/9 57	10	2,45	0,29	2,16
15	5/8 57 - x) 57	8	2,44	0,81	1,63
16	9/5 58 - 1/7 58	10	2,11	0,21	1,90
17	20/2 59 - 12/5 59	10	2,62	0,32	2,30
18	26/2 60 - 31/5 60	10	3,83	0,29	3,54
19	21/5 60 - 8/8 60	10	2,86	0,66	2,20
20	9/7 62 - 30/8 62	5	1,62	0,27	1,35
21	1/5 67 - 3/7 67	11	2,89	xx)	2,48
22	27/3 68 - 30/5 68	6	2,73	0,39	2,34

N pct. i tørstof af podede planter: Min. 2,93, max. 4,35, gns. 3,64.

» » » » upodede » : » 0,73, » 1,98, » 1,18.

x) Dato ikke noteret.

xx) Ingen upodede; gns. (0,41 mg) substrateret som kontrol.

procentiske kvælstofindhold, der hos de opodede planter er gennemsnitlig 3 gange så højt som i de upodede.

Kvælstofbindingens størrelsesorden er ganske som fundet i udenlandske forsøg under tilsvarende betingelser. I Nordamerika fandt således *Kroulik & Gainey* (1941) med to effektive »målestammer« en 4-5 ganges forøgelse af upodede planters kvælstofindhold i 7 uger, og ganske lignende tal (4,6-5,1 x) fandt *Schwendimann* (1955) i Schweiz med 11 effektive stammer i en adskillig længere forsøgstid.

I tabel 2 ses resultaterne med samtlige 76 stammer sammenlignet med målestammen L. 40. Blandt de homologe stammer (L. 1 - L. 115) er der kun 3 (L. 31 og 2 kulturelt afvigende understammer heraf, L. 64 og L. 65), der tydeligt afviger fra de øvrige og må betragtes som halveffektive med en kvælstofbinding mellem 11 og 69 pct. af målestammens. Blandt de 7 stammer fra sneglebælg er derimod HS. 7, HS. 10 og den tidligere undersøgte HS. 109 (*Jensen* 1955) praktisk talt ineffektive trods rigelig rodknolddannelse; en fjerde stamme, HS. 18, er halveffektiv omtrent som L. 31 (64-65). De øvrige 69 stammer (63 fra lucerne, 3 fra sneglebælg, 2 fra stenkløver og en fra bukkehorn) må betegnes som lucerne-effektive omend i forskellig grad. Kvælstofbindingen i forhold til L. 40 varierer ofte betydeligt fra det ene forsøg til det andet, og gennemsnitstallene fordeler sig som følger:

Effektivitet	N-binding pct. af L.40	Antal stammer
Ineffektive	<10	3
Halveffektive	30 - 60	4
	70 - 79	3
Effektive	80 - 89	22
	90 - 99	21
	100 - 109	19 (+L.40)
	110 - 120	4
		76 (+L.40)

Mere end halvdelen af stammerne ligger indenfor $\bar{\pm}$ 10 pct. af målestammens effektivitet, hvilket ikke kan regnes for signifikant. Stammer med effektivitet under 90 pct. er

betydelig talrigere end over 110 pct, og blandt de første er der 3 der kan kaldes »underlødige«; det samme er muligvis tilfældet i gruppen 80-89 pct., men blandt disse er der adskillige der kun har været prøvet i et enkelt forsøg. De 5 stammer, der foruden L. 40 har været anvendt til nitraginfremstilling, ligger alle på samme niveau (gns. 98-104 pct. Stammer af den højeste gruppe (110-120 pct.) vil fremtidig blive anvendt.

Endelig er det bemærkelsesværdigt, at der ikke eksisterer nogen korrelation mellem stammernes effektivitet og »kulturalder« (fra 1911 til 1967) eller forskel i denne henseende mellem stammer af kulturelt forskellige typer, af *Petersen* (1940) betegnedes som »vandede« eller »stearinlignende«.

B). - Humle-sneglebælg, Hvid stenkløver og bukkehorn. - Fra april 1954 til januar 1968 udførtes 19 tilsvarende forsøg med sneglebælg, der gennemgående voksede langsommere end lucerne og til trods for længere voksetid (70-105 dage) gav en noget mindre kvælstofbinding (1,34-2,89 mg/2 pl. med L. 40, 0,17-0,68, gns. 0,34 i upodede). Adskillige forsøg mislykkedes på grund af varmeskade i sommermånederne, og variationen fra forsøg til forsøg med samme stamme var endnu større end hos lucerne - ikke sjældent 50 pct. og undertiden henved 100 pct. Med sikkerhed kunne man kun fastslå, at samtlige undersøgte stammer fra alle 4 værtplanter var effektive overfor sneglebælg, med undtagelse af L.31 (64-65), der var halveffektive overfor lucerne men her praktisk talt helt ineffektive.

Alle sneglebælg-isolater, inclusive de tre, der var helt ineffektive overfor lucerne, viste sig fuldkommen effektive overfor deres homologe værtplanter, som vist i tabel 3. Stammen HS.8 (isoleret 1919) synes at opfylde alle de krav, der kan stilles til en produktionsstamme for nitragin anvendelig til begge planter (sml. tabel 2). Endelig kan bemærkes, at den lidt lucerne-effektive bukkehorn-stamme Tr.1, omend kun prøvet i to forsøg, synes udmærket effektiv overfor humle-sneglebælg, med en kvælstofbinding på 130-145 pct. af L.40.

Tabel 2. Resumé af kvælstofbindingsforsøg med lucerne

Stamme og isolationsår	Kvælstofbinding pct. af L.40, enkeltforsøg og gns. (tallene i parentes angiver forsøgsnummer, cf. Tabel 1) »Ni« angiver stammer anvendt til nitraginproduktion.	Gns.
L.1 (1911)	(6) 114, (8) 82.....	98
L.2 (1913)	(9) 117, (19) 91.....	» 104
L.3 (1913)	(13) 113, (19) 82.....	» 98
L.4 (1914)	(6) 99, (8) 85, (17) 98.....	» 94
L.5 (1915) Ni	(9) 108, (14) 110, (16) 105, (17) 97, (18) 104	» 105
L.6 (1916)	(4) 106, (13) 107.....	» 107
L.9 (1919)	(13) 105, (16) 102, (19) 95.....	» 101
L.12 (1920)	(4) 91, (17) 103.....	» 97
L.13 (1920)	(13) 109, (18) 114.....	» 112
L.14 (1920)	(13) 125, (17) 100.....	» 113
L.16 (1920)	(10) 86, (19) 92.....	» 89
L.17 (1920)	(10) 72, (17) 90.....	» 81
L.19 (1920)	(14) 105.....	» 105
L.20 (1921)	(4) 93.....	» 93
L.22 (1921)	(10) 93.....	» 93
L.24 (1922)	(6) 95.....	» 95
L.25 (1923) Ni	(8) 95, (19) 115.....	» 105
L.26 (1924)	(8) 89, (17) 84.....	» 87
L.27 (1925)	(6) 102, (14) 104.....	» 103
L.31 (1926)	(3) 38, (5) 69, (9) 12.....	» 40
L.32 (1926)	(2) 92, (14) 98.....	» 95
L.33 (1926)	(15) 98.....	» 98
L.34 (1926)	(4) 82, (19) 82.....	» 82
L.36 (1927)	(15) 98.....	» 98
L.37 (1927)	(13) 112, (21) 104.....	» 108
L.42 (1928) Ni	(9) 81, (12) 110, (17) 95, (18) 105.....	» 98
L.44 (1929)	(4) 84, (17) 106.....	» 95
L.48 (1929)	(4) 87.....	» 87
L.53 (193 ?)	(3) 97, (5) 110.....	» 104
L.54 (193 ?)	(4) 81.....	» 81
L.55 (1935)	(13) 112, (17) 109.....	» 111
L.56 (1935)	(13) 124, (16) 114, (18) 107.....	» 115
L. 57 (1936)	(4) 82, (19) 79.....	» 81
L.58 (1936)	(13) 121, (16) 91.....	» 106
L.59 (193 ?)	(9) 98.....	» 98
L.62 (1937)	(9) 70, (19) 97, (20) 101.....	» 89
L.64 (1940)*)	(3) 28, (5) 60, (9) 11, (19) 38.....	» 36
L.65 (1940)*)	(8) 69, (14) 45.....	» 57
L.66 (1940)	(3) 94, (5) 103.....	» 99
L.70 (1940)	(14) 87.....	» 87
L.71 (1940)	(5) 84.....	» 84
L.72 (1940)	(14) 81, (19) 92.....	» 87
L.77 (1941)	(13) 106.....	» 106
L.78 (1941)	(9) 89.....	» 89
L.79 (1941)	(14) 92.....	» 92

*) Understamme af L.31.

(Tabel 2 fortsat)

Stamme og isolationsår	Kvælstofbinding pct. af L.40, enkeltforsøg og gns.	Gns.	
L.81 (1941)	(8) 74, (17) 97.....	86	
L.82 (1941)	(14) 103.....	»	103
L.83 (1941)	(15) 92.....	»	92
L.84 (1941)	(10) 85.....	»	85
L.85 (1941)	(10) 80, (14) 100.....	»	90
L.87 (1944)	(10) 76, (19) 91, (20) 102.....	»	90
L.89 (1944)	(13) 115, (17) 89.....	»	102
L.90 (1944)	(10) 82.....	»	82
L.92 (1944)	(10) 87.....	»	87
L.94 (1944) Ni	(10) 92, (12) 120, (14) 95, (17) 94, (18) 106.....	»	101
L.95 (1944)	(10) 75, (16) 81, (20) 101.....	»	86
L.96 (1944)	(11) 72, (17) 94, (19) 80.....	»	82
L.97 (1944)	(12) 118, (13) 95, (14) 97, (18) 108.....	»	105
L.98 (1944)	(1) 62, (16) 95.....	»	79
L.99 (1945)	(12) 115, (14) 96, (15) 111, (18) 104.....	»	107
L.100 (1947)	(13) 78, (17) 83, (18) 93.....	»	85
L.101 (1047)	(16) 91, (21) 100, (20) 89.....	»	93
L.102 (1947)	(1) 78, (2) 75, (17) 82.....	»	78
L.103 (1947)	(11) 95.....	»	95
L.104 (1947)	(8) 87, (14) 90.....	»	89
L.115 (1967)	(21) 100, (22) 104.....	»	102
HS.7 (191?)	(3) 13, (5) 0, (6) 0.....	»	(4)
HS.8 (1919) Ni	(9) 99, (12) 113, (14) 102, (18) 103.....	»	104
HS.10 (1920)	(3) 5, (7) 0.....	»	(2)
HS.18 (1920)	(3) 24, (5) 34, (10) 51.....	»	36
HS.38 (1926)	(5) 92, (11) 102, (12) 89.....	»	94
HS.109 (1950)	(1) 0, (2) 0, (7) 0.....	»	(0)
HS.111 (1950)	(2) 89, (5) 111, (11) 95, (13) 121, (14) 92... »	»	102
St.105 (1950)	(2) 79, (17) 93.....	»	86
St.106 (1950)	(1) 85, (2) 67, (17) 93.....	»	82
Tr.1 (1960)	(20) 74, (21) 79.....	»	77

Tabel 3. Rhizobier fra humle-sneglebælg

Stamme nr.	N-binding pct. af L.40		
	Lucerne, gns.*)	Humle-sneglebælg	
		Enkelt	Gns.
HS.7	(4)	105,108.....	gns. 107
HS.8 (Ni)	104	95, 121, 134, 150.....	» 125
HS.10	(2)	112, 137.....	» 125
HS.18	36	103, 109, 129.....	» 114
HS.38	94	96, 107.....	» 102
HS.109	(0)	101, 116, 137.....	» 118
HS.111	102	77, 87, 105, 121, 123... »	» 101

*) sml. tabel 2.

Skønt stenklover ikke hos os har nogen dyrkningsmæssig betydning og højest kan spille

en rolle som vildtvoksende »reservoir« for *R. meliloti*, anstilledes der et par kvælstofbindingsforsøg, hvis resultater ses i tabel 4. Det første forsøg (1959) tyder på, at stenklover som værtplante kombinerer lucernens og humle-sneglebælgens egenskaber: L.40 og de to homologe stammer er lige effektive, L.31 (64-65) er halveffektive ligesom hos lucerne, og de 4 helt eller delvis lucerne-ineffektive sneglebælg-stammer er her lige så effektive som overfor deres homologe værtplanter, hvad der for stammen HS. 109 var set i tidligere forsøg (Jensen 1955). I det andet forsøg (1962) viste 5 tilfældigt valgte lucerne-effektive stammer en moderat kvælstofbinding i sammen-

ligning med St. 105, der her tjente som målestamme.

I sommeren 1960 udførtes tillige et forsøg med bukkehorn (*Trigonella foenum-graecum*), der podedes med 15 stammer fra lucerne, sneglebælg og stenkløver, indbefattende effektive og ineffektive. Alle dannede talrige rod-knolde, dog ofte af en abnorm type (rækker af tenformede opsvulmninger snarere end egentlige knolde), og uden mindste tegn på kvælstoffbinding (sml. *Burton & Erdman* 1940).

C. – Forsøg med nye halveffektive og ineffektive stammer.

Siden 1950 har man udført et betydeligt antal forsøg over kvalitativ og kvantitativ forekomst af *R. meliloti* og *R. trifolii* i danske (fortrinsvis) landbrugsjorde med henholdsvis lucerne og rødkløver som indikatorplanter, (*Jensen* 1968). De iagttagne rodknolde var tilsyneladende af den normale, effektivt kvælstofbindende type, men afvigelser fra denne regel sås i nogle af de sidste forsøg.

En jord fra Godthåb (Skanderborg) viste i november-december 1966 fremkomst af lucerneplanter med kvælstofmangelsymptomer og små, spredte, leghæmoglobinløse rodknolde indtil en fortynding på 1:10.000. Først henimod forsøgets afslutning i januar 1967 sås der en plante med en enkelt normalt udseen-

de, pigmentholdig rodknold; herfra isoleredes en rhizobium-stamme, der viste sig fuldt effektiv og figurerer som L.115 i tabel 2. Forsøg på isolation fra de ineffektivt udseende rodknolde mislykkedes. I maj gentoges forsøget med jord fra samme mark (dog uvist om fra præcis samme lokalitet). Effektive knolde fremkom igen kun på et par planter i laveste fortynding, men ineffektive som før indtil fort. 1:1000-10.000; herfra isoleredes 3 stammer betegnede G.b-1, G.b-2 og G.d. Den sidste var kulturelt og morfologisk normal, den første havde påfaldende små, meget livligt bevægelige celler med stærk tendens til lejring i stjerneformede aggregater, og G.b-2 var helt ubevægelig, hvilket sjældent ses hos *R. meliloti* (sml. *Petersen* 1940). Et orienterende forsøg i sommeren 1967 viste, at alle tre stammer var aldeles ineffektive overfor lucerne trods rigelig rodknolddannelse.

På samme tid sås noget lignende i et forsøg fra en mark nær forsøgsarealet ved Aakirkeby, hvor der ikke tidligere var dyrket lucerne. Der fandtes normale knolde på enkelte planter i den laveste fortynding (1:10), men ved højere fortynding kun ineffektive knolde, hvorfra man isolerede to morfologisk og kulturelt normale stammer: Aa.1 og Aa.3. Med disse to samt de tre Godthaab-stammer anstilledes kvælstofbindingsforsøg i lucerne og sneglebælg. Resultaterne ses i tabel 5 og tabel 6.

Tabel 4. Kvælstofbindingsforsøg i hvid stenkløver

Forsøg I: 22/4-15/6 1959. 8 × 2 planter				Forsøg II: 5/7-29/8 1962. 5 × 2 planter			
Stamme	N-binding			Stamme	N-binding		
	N mg i alt	mg	pct. af L.40		N mg i alt	mg	pct. af St. 105
L.40.....	18,1	15,4	(100)	St.105.....	9,74	8,59	(100)
St.105.....	18,2	15,5	101	L.5.....	7,91	6,76	79
St.106.....	17,2	14,5	94	L.62.....	8,10	6,95	81
L.31.....	9,5	6,8	44	L.87.....	8,57	7,42	86
L.64.....	11,6	8,9	58	L.95.....	7,65	6,50	76
HS.7.....	18,0	15,3	99	HS.8.....	7,65	6,50	76
HS.10.....	16,6	13,9	90	Upodet ...	1,15	—	—
HS.18.....	17,7	15,0	97				
HS.109....	18,0	15,3	99				
Upodet ...	2,7	—	—				

Tabel 5. Kvælstofbindingsforsøg med halveffektive (Aakirkeby) og ineffektive (Godthaab) bakteriestammer i lucerne 1967-68

Stamme	N mg i alt	N-binding mg	pct. af L.40	N pct. i tørstof	Planter med rodknolde	Rodknolde, i alt, min. og max.
Forsøg I: 21/7/67 - 21/9/67. 8 × 2 planter						
L.40.....	22,1	18,8	(100)	4,16	16	164 (3 - 22)
Aa.1-0....	13,2	9,9	53	3,78	16	336 (9 - 50)
Aa.3-0....	14,7	11,4	61	3,73	15	243 (11 - 35)
G.b-1.....	3,5	(0,2)	(0)	1,93	15	493 (7 - 54)
G.b-2.....	4,1	(0,8)	(4)	1,74	15	604 (12 - 63)
G.d.....	3,7	(0,4)	(2)	1,51	16	771 (36 - 72)
Upodet*) .	3,3	—	—	(1,18)	—	—
Forsøg II: 30/11/67 - 22/1/68. 5 × 2 planter.						
L.40.....	12,4	10,3	(100)	3,84		
Aa.1-r.I...	8,0	5,9	57	3,26	ikke talt	
Aa.3-r.I...	8,9	6,8	66	3,16		
Aa.3-0....	7,2	5,1	50	2,79		
Upodet*) .	2,1	—	—	(1,18)		
Forsøg III: 28/2 - 2/5/68. 8 × 2 planter						
L.40.....	19,5	16,2	(100)	3,77		
Aa.1-r.II..	9,3	6,0	37	2,76		
Aa.3-r.II..	11,8	8,5	52	2,70		
Upodet*) .	3,3	—	—	(1,18)		

*) Beregnet som gennemsnit af upodede planter i tabel 1. (0,41 mg pr. 2 pl.).

I det første lucerne-forsøg (tabel 5,I) viser Aa.1 og Aa.3 sig »halveffektive« ligesom L.31 (64-65), hvilket var ret overraskende, da planterne, hvorfra de to stammer var isolerede, ikke viste bedre vækst end de ikke-knoldbærende planter i det samme forsøg. De tre Godthaab-stammer bandt overhovedet ikke sikkert påviselige mængder kvælstof, til trods for et lidt højere procentisk kvælstofindhold i tørstoffet. En tælling af rodknoldene giver næsten et skoleeksempel på rodknoldenes stigende antal med stammernes aftagende effektivitet. Planterne i fællesglas med Aa.1 og Aa.3 viste temmelig stor variation: i nogle kun svag vækst, i andre næsten lige så god som L.40, hvad der kunne tyde på segregation af de oprindelige isolater i mere eller mindre effektive mutanter. Man foretog derfor ved høstningen en spredning fra en normalt udseende rodknold af hver stamme og foretog et nyt kvæ-

stofbindingsforsøg med to re-isolater: Aa.1-r.I og Aa. 3-r.I, sammenlignet med L.40 og den oprindelige Aa.3-(0). Resultatet (tabel 5,II) er ganske som i det første forsøg, og to nye re-isolater Aa.1-r.II og Aa.3-r.II efter det andet forsøg viser ingen ændrede egenskaber (tabel 5,III). Det er således uvist om der er sket en segregation af rhizobierne i knoldvævet, og dette vil kun kunne afgøres gennem forsøg med et større antal re-isolater fra samme rodknold.

Forsøgene med sneglebælg ses i tabel 6. Stammen Aa.-1 viser sig halveffektiv i det første og helt ineffektiv i det andet forsøg og Aa.-3 ineffektiv i dem begge, hvilket bekræftedes i et sidste kvalitativt forsøg i vinteren 1967-68. Om begge stammer gælder det, at de kun danner ret få rodknolde på humle-sneglebælg, og langt fra alle planter inficeres. Med hensyn til deres effektivitetsforhold synes de nær-

Tabel 6. Kvælstofbindingsforsøg med lucerne-halveffektive (Aakirkeby) og lucerne-ineffektive (Godthaab) bakteriestammer i humle-sneglebælg 1967

Stamme	N mg i alt	N-binding		N pct. i tørstof	Planter med rodknolde	Rodknolde, i alt, min. og max.
		mg	pct. af målestm.			
Forsøg I: 27/7 - 6/10/67. 7 glas med kun een plante pr. glas.						
L.40.....	8,11	6,44	(100)	2,90	5	81 (10 - 29)
Aa.1-0....	4,10	2,43	38	2,41	4	44 (5 - 21)
Aa.3-0....	1,95	0,28	(5)	1,61	2	21 (6 - 15)
G.b-1.....	1,38	(0)	(0)	1,60	7	107 (6 - 22)
G.b-2.....	1,79	(0,1)	(0)	1,38	7	225 (20 - 42)
G.d.....	1,79	(0,1)	(0)	1,43	7	153 (7 - 45)
Upodet...	1,67	—	—	1,32	0	— —
Forsøg II: 29/7 - 11/12/67. 6 × 2 planter.						
L.115.....	11,36	9,32	(100)	3,51	10	246 (18 - 30)
Aa.1-0....	2,30	(0,30)	(3)	1,69	6	42 (8 - 14)
G.b-1.....	1,89	(0)	(0)	1,63	12	296 (9 - 37)
G.b-2.....	2,36	(0,3)	(3)	1,69	12	298 (10 - 47)
G.d.....	2,30	(0,3)	(3)	1,90	10	161 (4 - 30)
Upodet...	2,04	(som gennemsnit af upodede planter, sml. s. 00).				

mest at ligne L.31 (64-65): mangelfuld kvælstofbinding hos lucerne, ringe eller ingen hos humle-sneglebælg.

Podning på hvid stenkløver forsøgtes i vinteren 1967-68 og det følgende forår, men blev ikke gennemført kvantitativt, da der ikke længere kunne skaffes frø med tilfredsstillende spireevne. På nogle få planter viste stammerne fra Godthaab positiv knolddannelse men ingen tegn på kvælstofbinding undtagen måske i en af 3 planter podede med stammen G.b-2.

D). — Kompetitiv virkning mellem lucerne-rhizobier?

Man har længe vidst, at ineffektive stammer af rhizobier kan besidde meget stor infektions-evne, der giver sig udtryk i rigelig knolddannelse. I visse tilfælde har man set, at sådanne ineffektive stammer med stor væksthastighed kan fortrænge effektive stammer fra rodsystemet og medføre en betydelig nedgang i vækst og kvælstofbinding. For kløverarteres vedkommende synes dette først iagttaget af Nicol & Thornton (1941), som fandt sådanne stammer i visse lokaliteter bl.a. i Wales, hvor kun podning med særlig hurtigvoksende effektive stam-

mer var i stand til at sikre dannelse af effektivt kvælstofbindende rodknolde. Senere er dette »konkurrencefænomen« iagttaget hos underjordisk kløver af Harris (1954) og senest af Singer o.a. (1964) i forsøg med hvidkløver. De sidste forfattere fandt i agarkulturer ingen hemningsvirkning, når podematerialet indeholdt ineffektive og effektive rhizobier i et blandingsforhold på 90/10, men tydelig hemning når de effektive udgjorde 1 pct. og meget stærk (men ikke fuldstændig!) når de kun udgjorde 10⁻⁶ pct. Forsøg i to jorde af pH 6,0 gav mindre tydelige resultater; i en mineraljord gav et overtal af 99 pct. ineffektive rhizobier ingen hemning, medens blot 50 pct. gav en stærk hemning i tørvejord — muligvis fordi denne var gunstigere for de ineffektive rhizobiers trivsel.

Tilsvarende resultater med lucerne og *R. meliloti* synes ikke at foreligge bortset fra et orienterende forsøg (Jensen 1955) hvor en lucerne-ineffektiv stamme HS.109 (da kaldet HS. 29) ikke viste nogen hemmende virkning på to effektive stammers rodknolddannelse og kvælstofbinding. I foråret og sommeren 1968 udførtes nogle mere detaljerede forsøg, hvor

de tre ineffektive stammer L.G.b-1, L.G.b-2 og L.G.d. kombineredes med de effektive stammer L.40, L.115 og HS.8. De sædvanlige agar-sand-kulturer af lucerne podedes med suspensioner (0,10 ml pr. glas) af bakterieceller fra unge agarkulturer, indstillede til samme optiske tæthed (O.D. 0,20, $\lambda = 600 \text{ m}\mu$) og blandede i forskellige rumfangsforhold (0 - 10 - 20 - 50 - 80 - 90 - 100 pct. af effektiv og ineffektiv stamme). I intet tilfælde sås der nogen tydelig nedgang i kvælstofbindingen som tegn på, at de effektive stammer blev fortrængt fra rodsystemet, omend der ofte var betydelig variation mellem forsøgsleddene. Et par typiske eksempler ses i tabel 7.

Tabel 7. Kompetitionsforsøg mellem effektive og ineffektive *R. meliloti*

Forsøg 1: 27/3 - 30/5 1968.

Kombination pct.		N mg	N-binding	
L.40	L.G.d	6 × 2 pl.	mg/6 × 2 pl.	pct. af eff.
100	—	16,39	14,07	(100)
80	20	13,88	11,56	82
50	50	16,37	14,05	100
20	80	15,23	12,91	92
10	90	16,39	14,07	100
—	100	2,16	(0)	0
Upodet		2,32	—	—

Forsøg 2: 7/5 - 2/7 1968.

Kombination pct.		N mg	N-binding	
HS.8	L.G.b-2	8 × 2 pl.	mg/8 × 2 pl.	pct. af eff.
100	—	19,03	15,71	(100)
50	50	19,53	16,21	103
20	80	18,16	14,84	94
10	90	19,33	16,01	102
—	100	3,83	(0,5)	(3)
Upodet		3,32	—	—

I kulturerne podet med de tre ineffektive stammer i ublandet suspension sås derimod af og til tegn på, at der opstod mere eller mindre effektive mutanter, idet nogle af planterne udviklede normalt udseende, pigmentholdige rod-knolde og viste forbedret vækst, ligesom ved fremkomsten af den ovenfor omtalte L.115. Dette optrådte så sent (4-6 uger efter podning), at der næppe kunne være tale om frem-

medinfektion, da knolde dannede af effektive rhizobier som regel bliver synlige ca. en uge efter podningen (sml. *Petersen* 1940) og danner synligt pigment i løbet af den næste uge. Noget tilsvarende var set i tidligere forsøg med den lucerne-ineffektive HS.109, der afspaltede en semi-effektiv mutant (*Jensen* 1955). Det er endvidere værd at bemærke, at de semi-effektive Aakirkeby-isolater i de primære kulturer synes helt ineffektive. Muligvis hører disse og Godthaab-isolaterne til en og samme type: ineffektive men med tendens til at danne semi-effektive eller helt effektive mutanter.

Oversigt og konklusioner

I deres effektivitetsforhold overfor lucerne og humle-sneglebælg ses de undersøgte stammer at falde i 3 eller måske 4 grupper:

A. — Stammer der er effektive overfor begge værtplanter, omend i forskellig grad. Disse udgør det langt overvejende flertal (70 af 77 isolater, eller 91 pct.).

B. — Stammer der er helt eller delvis ineffektive overfor lucerne men fuldt effektive overfor humle-sneglebælg. Disse omfatter 4 isolater, alle fra den sidste værtplante.

C. — Stammer der er mangelfuldt effektive overfor lucerne og helt ineffektive overfor humle-sneglebælg. Disse er sjældne og kun fundet hos lucerne: L.31 med dens to understammer, hvortil kommer de sent isolerede Aa.1 og Aa.3 fra samme jordprøve og sandsynligvis identiske.

D. — Stammer helt ineffektive overfor begge værtplanter synes sjældne og er hidtil kun isolerede fra een enkelt jord (Godthaab). Disse er muligvis ustabile og ikke væsensforskellige fra gruppe (C).

Den sparsomme repræsentation af helt eller delvis lucerne-ineffektive stammer af *R. meliloti* står sikkert i forbindelse med den omstændighed, at man i de tidligere isolationer ikke i første række tilsigtede en undersøgelse af effektive og ineffektive stammers relative hyppighed men fremskaffelse af effektive stammer til nitraginfremstilling, hvorfor man i regelen til isolation valgte normale planter i

en god bestand af lucerne eller humle-sneglebælg. I nogle udenlandske undersøgelser synes hyppigheden af ineffektive eller svagt effektive stammer at være en del større. Af de 217 stammer fra lucerne og stenkløver, som Kroulik & Gainey (1941) undersøgte, blev ingen karakteriseret som helt ineffektiv men 21 pct. som »dårlige«, 52 pct. som »middel« og 27 pct. som »gode« i sammenligning med to effektive kontrolstammer. Nogle mere præcise angivelser skyldes Schwendimann (1955), som blandt 26 stammer fra schweiziske jorde fandt 15, der trods betydelig variation ikke syntes signifikant forskellige fra en effektiv kontrolstamme, medens 3 fandtes mangelfuldt effektive og 8 helt ineffektive. Stammerne viste samme rækkefølge i effektivitet overfor lucerne-sorterne Provence og Du Puits som forsøgsplanter. Ligesom i Kroulik & Gainey's forsøg prøvedes stammerne kun overfor lucerne, og det er derfor muligt, at værtplantespecificitet har spillet en rolle, sml. Brockwell & Hely (1966) og de her fundne lucerne-ineffektive stammer HS. 7, 10 og 109, der var udmærket effektive overfor humle-sneglebælg.

Som almindeligt resultat viser de her refererede undersøgelser, at der stendes i laboratoriets historie har været anvendt effektive bakteriestammer til nitraginfremstilling, medens der på den anden side ikke er tvivl om, at den naturlige jordbundsmikroflora rummer stammer af *R. meliloti* med ringe eller ingen kvælstofbindende evne; der er dog ingen tegn på, at disse besidder nogen tydelig konkurrenceevne overfor effektive stammer, der anvendes til podning. Som nævnt i en forudgående beretning (Jensen 1968) er der grund til at bibeholde denne praksis, hvor den ikke direkte vides at være unødvendig.

Summary

Nitrogen-fixing efficiency in the root-nodule bacteria of the Medicago-Melilotus group, with special reference to lucerne

Seventy-seven strains of *R. meliloti* were isolated from *Medicago sativa* (67), *Medicago lupulina* (7), *Melilotus alba* (2) and *Trigonella foenum-grae-*

cum (1) growing in Danish soils. The strains were isolated between 1911 and 1967 and were tested for nitrogen-fixing effectiveness in lucerne (*M. sativa*) and black medic (*M. lupulina*). The test plants were grown in combined sand-agar culture and a strain of known effectiveness towards both host plants (L.40, isolated from lucerne in 1940) was used as reference strain in all experiments. Three groups of strains were found in respect of host plant specificity.

A.) – The large majority of strains were effective in *M. sativa* as well as *M. lupulina*. The nitrogen fixation in lucerne varied between 70 and 120 pct. of the reference strain, with more than one-half of the number of strains within the group of ± 10 pct, which could not be considered significant. The variability in *M. lupulina* was considerably greater, but a few strains appeared highly effective in this host plant while little effective in lucerne.

B.) – Among four strains isolated from *M. lupulina* and fully effective in their homologous host plant, three proved wholly and one partly ineffective in lucerne.

C.) – Three strains (or more strictly speaking, one original strain and two culturally aberrant substrains) were only semi-effective in this host plant and wholly ineffective in *M. lupulina*.

Some additional experiments with *Melilotus alba* suggested that this host plant combined the properties of *M. sativa* and *M. lupulina*. *Trigonella foenum-graecum* could not be effectively nodulated by strains from the three other host plants, in spite of positive nodule-formation.

No correlation was observed between effectiveness of strains and the number of years (less than one to more than forty) elapsing between isolation and testing of the strains.

Additional experiments were conducted with some apparently ineffective strains from lucerne. Two of these proved semi-effective in their homologous host plant and ineffective in *M. lupulina*, similar to those of group (C). Three other strains from lucerne (another locality) turned out to be ineffective in both host plants and apparently also in *Melilotus alba*. These ineffective strains did not show any competitive effect in lucerne when combined with effective strains in varying proportions. Sometimes, however, they gave some evidence of producing mutants semi-effective in lucerne and perhaps not essentially different from those of Group (C).

The fact that lucerne-ineffective strains of *R. meliloti* were uncommon among the earlier isolates (although they do occur in Danish agricultural soils) finds a simple explanation in the fact that the strains as a whole were isolated with the aim of finding strains suitable for inoculation purpose rather than determining the relative frequency of effective and ineffective strains. The definite although not frequent occurrence of strains defective in nitrogen fixation, however, indicates that as a safety measure it is still advisable to continue the practice of seed inoculation unless a population of effective strains of *R. meliloti* is definitely known to exist in the soil.

Litteraturhenvisninger

- Bjälffve, G. 1963. The effectiveness of nodule bacteria. - Plant and Soil, 18: 70-76.
- Bonnier, C. 1962. Relation entre la specificité des souches de *Rhizobium meliloti*. - Ann. Inst. Pasteur, 103: 403-409.
- Brockwell, J., & Hely, F. W. 1961. Symbiotic characteristics of *Rhizobium meliloti* from the brown acid soils of the Macquarie region of New South Wales. - Aust. J. Agr. Res., 12: 630-643.
- Brockwell, J., & Hely, F. W. 1966. Symbiotic characteristics of *Rhizobium meliloti*. - Aust. J. Agr. Res., 17: 885-899.
- Burton, J. C., & Wilson, P. W. 1939. Host plant specificity among the *Medicago* in association with root nodule bacteria. - Soil Sci., 47: 293-303.
- Burton, J. C., & Erdmann, L. W. 1940. A division of the alfalfa cross-inoculation group correlating efficiency in nitrogen fixation with source of *Rhizobium meliloti*. - J. Amer. Soc. Agron., 32: 439-450.
- Christensen, Harald R. 1914. Forsøg og Undersøgelser vedrørende forskellige Podningsmidler til Bælgplanter. - Tidsskr. f. Planteavl, 21: 97-131.
- Harris, J. R. 1954. Rhizosphere relations of subterranean clover. I. Interaction between strains of *Rhizobium trifolii*. - Aust. J. Agr. Res., 5: 247-271.
- Jensen, H. L. 1955. En lucerne-ineffektiv stamme af *Rhizobium meliloti*. - Tidsskr. f. Planteavl, 59: 553-570.
- Jensen, H. L. 1962. Om lucerne-knoldbakteriers levedygtighed i jordkultur. - Tidsskr. f. Planteavl, 65: 704-715.
- Jensen, H. L. 1964. Om forholdet mellem rod-knoldbakterier og værtplanter hos nogle grupper af bælgplanter. - Tidsskr. f. Planteavl, 68: 1-22.
- Jensen, H. L. 1968. Lucerne- og kløverrodknoldbakteriernes forekomst i danske landbrugsjorde. - Tidsskr. f. Planteavl (i trykken).
- Kroulik J. T., & Gainey, P. L. 1940. Relative nodulation of varieties of *Medicago sativa* varying in susceptibility to alfalfa wilt. - Soil Sci., 50: 135-140.
- Kroulik, J. T., & Gainey, P. L. 1941. Physiological studies of *Rhizobium meliloti*, with special reference to the effectiveness of strains isolated in Kansas. - J. Agr. Res., 62: 359-369.
- Nicol, H., & Thornton, H. G. 1941. Competition between related strains of nodule bacteria and its influence on infection of the legume host. - Proc. Roy. Soc. (London) B. 130: 32-59.
- Petersen, Erik J. 1940. Diagnostiske Undersøgelser over Lucernebakterier. - Tidsskr. f. Planteavl, 44: 504-553.
- Purchase, H., Vincent, J. M., & Ward, L. M. 1951. The field distribution of strains of nodule bacteria from species of *Medicago*. - Aust. J. Agr. Res., 2: 261-272.
- Schwendemann, F. 1955. Versuche zur Herstellung eines *Rhizobium*-Impfmaterials für Luzerne unter besondere Berücksichtigung schweizerischer Verhältnisse. (Thesis, Zürich).
- Singer, M., Holding, A. J., & King, J. 1964. The response of *Trifolium repens* to inocula containing varying proportions of effective and ineffective bacteria. - VIII. Int. Congr. Soil Sci. (Bucharest) Trans. III: 1021-1025.