

共生固氮技术手册

豆科植物-根瘤菌

M. 奥巴托 等 著

科学出版社

共生固氮技术手册

豆科植物-根瘤菌

M. 奥巴托等著

蒋有绎 周 枫译

江亦行校

科 学 出 版 社

1987

内 容 简 介

本书系联合国粮食及农业组织邀请各国有关生物固氮方面的专家分工编写而成。全书共分六个部分,对豆科植物及根瘤菌这一共生固氮系统的两个重要组成部分作了全面的论述,既从宏观的生态学角度阐明了豆科植物在农业生产中的重要地位和经济价值,又从微观的细胞学角度介绍了根瘤菌的特性、分离和鉴定;既从理论上阐述了涉及共生固氮生物学的一些基本问题,又从实践上详细说明了接种剂的生产方法、质量检查和接种技术;最后还提供了进行豆科植物接种试验的正确方法,是一本内容很丰富、编排有特色的技术手册。

本书可供农业院校师生、农业科技推广机构的科技人员,以及从事根瘤菌菌肥生产的工人、种植豆科植物的广大农民阅读。

M. Obaton et al.

TECHNICAL HANDBOOK ON SYMBIOTIC NITROGEN FIXATION

Legume-Rhizobium

FAO Rome, 1983

共生固氮技术手册

豆科植物-根瘤菌

M. 奥巴托等著

蒋有铨 周枫译

江亦行校

责任编辑 吴铁双

科学出版社出版

北京朝阳门内大街147号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1987年6月第 一 次 开本: 787 × 1092 1/32

1987年6月第一次印刷 印张: 4 3/8

印数: 0001—3,000 字数: 97,000

统一书号: 13031 · 3519

本社书号: 4970 · 13—8

定价: 0.85 元

前 言

关于如何在世界范围内战胜饥饿的问题，联合国粮食及农业组织（FAO）采取的战略是，投较少的资金生产出更多的产品，同时还要保护好自然资源。

综合满足植物的营养是实现这一项战略任务最重要的手段之一。在今后数年里，生物学方法对实现这一目标可望起到极大的作用。在这些方法中，共生固氮作用是最基本的。如果土壤和生活于土壤的生物以及人类的各种限制因素得以减少或消除，那末生物学方法就能产生最大的效率。

编写本书的目的在于提高人们对共生固氮在作物生产中的作用的認識，同时在采用这项技术时，希望能把这本书作为资料的来源，最终的想法是使农民也能从这本书中获得好处。

鉴于这个题目具有多学科的特点，粮食及农业组织的肥料和植物营养处、植物生产和保护处、土壤资源发展和保护处都参加了这项工作。粮食及农业组织还邀请了法国技术研究和交换小组的专家参加工作，他们利用其多学科合作者的联络网获得最新和最有价值的技术，这些技术在田间同样也是适用的。

由于生物学研究的进展相当快，本书的内容要定期更新，所以采用活页的形式出版，以便把从技术角度来看已经过时的材料换下来，添加有关新内容的材料。

改革是需求和知识相结合的产物，因此读者提出的对提高本书质量有用的任何意见和建议都会受到欢迎。

目 录

第一部分 共生固氮生物学概述	(1)
一 豆科植物与氮素循环	M. 奥巴托(1)
二 各种固氮的生物	J. J. 德雷丰(4)
三 主要生态系统中生物固氮的主要来源	J. J. 德雷丰(7)
四 根瘤菌-豆科植物共生固氮概述	M. 奥巴托(11)
五 用乙炔还原活性法测定豆科植物根瘤的固氮酶活性	J. J. 德雷丰(16)
六 豆科植物根瘤的放氮及影响共生固氮效率的限制因素	J. J. 德雷丰(21)
第二部分 农业系统中的共生固氮	(26)
一 豆科植物	P. 格里格纳克, J. 韦雷(26)
二 豆科植物的历史和地理起源	J. 韦雷, P. 格里格纳克(33)
三 豆科植物的生物学和农业特性	J. 韦雷, P. 格里格纳克(36)
四 豆科植物的用途及其经济价值	J. 韦雷, P. 格里格纳克(39)
五 作物轮作中油料和蛋白质作物的作用和地位	德纳雷, 玛特, 卡别哥尼(42)
第三部分 根瘤菌、类菌体	(46)
一 根瘤菌的特性和生态学	N. 阿玛杰, B. 拉格卡里(46)
二 从豆科植物根系上采集和保存根瘤的过程	

.....J. C. 克里耶特-玛里尔(49)	
三 根瘤菌菌株的分离.....J. C. 克里耶特-玛里尔(51)	
四 鉴定根瘤菌的各种方法.....	
.....J. C. 克里耶特-玛里尔(53)	
五 鉴定根瘤菌的两种血清学方法.....	
.....J. C. 克里耶特-玛里尔(54)	
六 根瘤菌培养基的制备.....	
.....J. C. 克里耶特-玛里尔(56)	
第四部分 接种剂的生产.....(59)	
一 有关接种剂的一般知识.....M. 奥巴托(59)	
二 豆科植物的根瘤菌接种剂.....D. 蒙塔基(61)	
三 根瘤菌菌株的培养.....P. 伯纳德(63)	
四 培养基接种.....D. 蒙塔基(65)	
五 液体培养基中生长根瘤菌的装置.....	
.....H. 塞恩特·马卡瑞(68)	
六 液体接种物计数.....P. 伯纳德(71)	
七 接种剂的质量检查(73)	
第五部分 豆科植物的接种(83)	
一 有关接种的一般知识.....M. 奥巴托(83)	
二 哪些豆科植物需要接种.....M. 奥巴托(84)	
三 接种方法.....D. 蒙塔基, H. 塞恩特·马卡瑞(88)	
四 土壤中根瘤菌的计数.....D. 蒙塔基, P. 伯纳德(90)	
五 桶栽半无菌法培养豆科植物.....	
.....D. 蒙塔基, H. 塞恩特·马卡瑞(95)	
第六部分 试验方法.....(98)	
一 豆科植物的接种试验(98)	
二 多点接种试验.....J. J. 德温(113)	
三 NIFTAL 接种试验.....C. 贝奥(122)	
四 变量分析.....G. 卡奥尔克斯(130)	

第一部分 共生固氮生物学概述

一、豆科植物与氮素循环

(一) 引言

在农业生产中,氮素和水分是两个最常遇到的限制因素。当植物需要氮素营养的时候,农民面临的一个难题就是既要提供植物所能吸收的氮素,还要使土壤能保持足够的氮素贮备。

土壤中含有相对稳定的有机质,它构成土壤的养分,能缓慢地被植物吸收利用。

能够增加土壤中氮素的环境条件是:

(1) 通过增加有机质(收获后的残茬、堆肥、动植物残体和废弃物);

(2) 通过增施氮肥(硝酸盐、铵盐、尿素等);

(3) 通过非生物固氮(每年的雷暴雨可以使每公顷土壤得到 10—15 公斤的氮素),特别是生物固氮[自生固氮微生物有自生固氮菌 (*Azotobacter*),梭状芽孢杆菌 (*Clostridium*),蓝细菌 (*Cyanobacteria*);共生固氮微生物指的是各种植物,特别是豆科植物与共生固氮微生物之间建立的共生关系]。

有机质在土壤中发生矿质化(腐殖化、氨化和硝化作用)。产生的氨能通过挥发损失掉,或有一小部分被植物吸收,硝酸盐能被雨水淋溶掉,或通过反硝化作用生成挥发性气体(氧化氮),但大部分为植物所吸收。

尽管收获时农产品带走了大量氮素,使土壤中的氮素明

显减少，然而施用氮肥和种豆科植物是给土壤提供充足氮素的两个主要来源。

(二) 在氮素循环中豆科植物的地位(见图1)

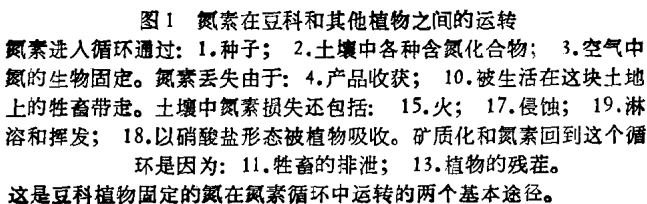
为了合理利用豆科植物来肥沃土壤，或者利用它来作为一茬副作物，必须了解它是怎样向土壤提供氮素的。

一茬豆科作物能在每公顷土地上固定 200—300 公斤氮素，有时甚至更多。但是只有在它们长得相当繁茂或者土壤本身氮素自然缺乏的情况下才会产生这样的效果。如果豆科植物不固定空气中的氮，而靠吸收土壤中存在的氮素(有机质矿质化及施肥提供的氮素)生长，那末也经常会出现豆科植物大量消耗掉土壤氮素的情况。

此外，植物中的氮素有 60—90% 是随收获的产品带走了。

留在田间的残茬能使一部分氮素返回土壤，植株中的氮素在成熟时大部分用于籽粒的形成，籽粒被收获了，地上部植株中的氮素剩下并不多。对大豆来说，每公顷的茎杆和根茬能提供 35—70 公斤氮素，而苜蓿可提供 50—80 公斤，但是只有在最后一茬苜蓿被耕翻到土壤里，这些氮素才进入土壤。

豆科植物的根系并不能为后茬作物(例如谷类作物)提供足够数量的氮素，而通过叶子的脱落却能增加不少氮素，(在海地，利用木豆和玉米接茬种植就是一个例子)，农民把豆科植物的茎杆割下来铺在土壤表面，这样能使土壤中的氮素增加(在菲律宾，利用银合欢和玉米或木薯接茬种植，银合欢能为后茬作物提供 60—90 公斤氮素)。如果在草地放牧，牲畜把混播的牧草吃掉，通过排泄的粪尿，又可以把一部分豆科植物固定的氮素还回土壤。



(三) 结 论

豆科植物并不是“利他主义”的，它们是为了本身正常生长才进行固氮的，所以农民必须让全部或部分的植株归还到地里，才能使土壤肥力得到提高。

二、各种固氮的生物

固氮是把氮(N_2)还原成氨(NH_3)的过程，因此需要能量。在工业上哈勃法合成氨用的是不可再生的矿物燃料。

有些微生物(细菌和放线菌)利用固氮酶能够固定空气中的氮。这种酶最重要的特性是遇到氧就失去活性。这些微生物合成氨以碳水化合物作为能源。碳水化合物的来源是不一样的，自生的微生物能直接从土壤中得到，根际的微生物从根系分泌物中得到，而与植物共生的微生物则直接从宿主体内得到。宿主植物通过进行光合作用，把太阳能转化为碳水化合物的形式，这是在整个地球表面到处可以获得的一种可以重复再利用的能量来源。

据计算空气中的氮每年被生物固定的数量达到1.75亿吨，大约占每年地球上固氮总量的70%。

固氮途径	固氮数量(百万吨/年)
工业固氮(哈勃法)	40
大气固氮(闪电等)	10
燃烧(工业、汽车)	20
臭氧化	15
生物固氮	175

固氮细菌存在于各种哺乳动物的肠道(固氮的数量很少)

以及白蚁的腹腔。

就陆地生态系统中的固氮总量而言，共生系统起着主要的作用。

1. 根瘤菌 (*Rhizobium*)-豆科植物共生体

(1) 种植制度中：豆科植物在轮作系统或永久牧场中有一定的代表性(90%的氮是由豆科植物的根瘤所固定)。

(2) 长着各种各样豆科植物的大片天然土地上。

可以计算出，地球上根瘤菌-豆科植物共生体固氮的量占全部固氮量的50%。

2. 红萍 (*Azolla*)-鱼腥藻 (*Anabaena*) 共生体

主要在水田系统特别是稻田中存在。

3. 放线菌 (*Actinomycetes*)-高等植物共生体

主要在一些森林系统特别是温带地区的林地中存在。

在自生微生物中，只有异形细胞的蓝细菌和粘杆菌(*Gleocapsa*)起着重要作用，特别是在淹水土壤中。

生活在根瘤里的共生固氮细菌即根瘤菌，要比自生固氮细菌和联合共生体系具有更高的固氮效率，其原因是：

(1) 根瘤具有供应光合产物的内部结构；

(2) 根瘤组织保护根瘤菌不受其他微生物的干扰；

(3) 豆血红蛋白(输送氧的蛋白)形成阻碍氧自由扩散的屏障，因此起到保护固氮酶不受氧抑制的作用；

(4) 根瘤具有能把固氮产物输送到宿主植物地上部分的有效系统。

自生或联合共生体系只有在外界环境条件合适的情况下才会有固氮的作用。

表 1 自生固氮微生物

生理特征	属	固氮能力(公斤/公顷/年)
异养细菌		
需氧	固氮菌 (<i>Azotobacter</i>), 贝氏固氮菌 (<i>Beijerinckia</i>) 假单胞菌 (<i>Pseudomonas</i>), 固氮螺菌 (<i>Azospirillum</i>) 产甲烷细菌 (<i>Methylococcus</i> , <i>methylobacter</i>)	有氧时固氮, 但效率低 0.5—1
兼性需氧	芽孢杆菌 (<i>Bacillus</i>), 埃希氏菌 (<i>Escherichia</i>) 克氏杆菌 (<i>Klebsiella</i>), 肠杆菌 (<i>Enterobacter</i>), 梭状芽孢菌 (<i>Clostridia</i>)	无氧时固氮 1
自养细菌		
光能自养	红假孢菌 (<i>Rhodospseudomonas</i>), 着色菌 (<i>Chromatium</i>), 红螺菌 (<i>Rhodospirillum</i>)	少氧时固氮
化能自养	硫细菌 (<i>Thiobacillus</i>)	
蓝细菌(蓝藻)		
有异形胞的丝状体	鱼腥藻 (<i>Anabaena</i>), 念珠藻 (<i>Nostoc</i>)	10—15
无异形胞的丝状体	织线藻 (<i>Plectonema</i>), 束毛藻 (<i>Trichodesmium</i>)	少氧时固氮
单细胞	粘杆菌 (<i>Gloeocapsa</i>)	有氧时能适当固氮
联合固氮		
雀稗根际	雀稗固氮菌 (<i>Azotobacter paspali</i>)	5—10
俯仰马唐根际	含脂固氮螺菌 (<i>A. lipoferum</i>), 巴西固氮螺菌 (<i>A. brasilense</i>)	直到 30
水稻根际	固氮菌, 贝氏固氮菌, 假单胞菌, 节杆菌 (<i>Arthrobacter</i>)	20—50
植物叶际		很低

表 2 共生固氮微生物

微共生体	大共生体	固氮能力(公斤/公顷/年)
根瘤菌	被子植物: 20,000 个种 豆科植物有根瘤的: 蝶形花亚科 <i>Papilionoideae</i> 占90% 含羞草亚科 <i>Mimosoideae</i> 占90% 云实亚科 <i>Caesalpinioideae</i> 占30%	平均 200 某些联合体 500
根瘤菌(豇豆)	被子植物: <i>Parasponia</i> 非豆科(热带): <i>Zygophyllaceae</i>	40—200
放线菌 (<i>Actinomyces</i>)	被子植物: 木麻黄 (<i>Casuarina</i>) (热带)	
弗兰氏菌 (<i>Frankia</i>)	非豆科: 马桑 (<i>Coriaria</i>) <i>Purshia</i> , 桤木 (<i>Alnus</i>) 杨梅 (<i>Myricaceae</i>) (120 个温带的种)	
蓝细菌	被子植物:	
鱼腥藻	裸子植物: (<i>Cycas</i> , <i>Bowen-ia</i>)	2—5
念珠藻	(热带-亚热带) 地衣 苔藓 蕨: 红萍 (<i>Azolla</i>)	100—200

三、主要生态系统中生物固氮的主要来源

(一) 温带陆地生态系统

在农业栽培地区,根瘤菌-豆科植物共生体是最重要的固氮来源。在这个共生体中,豆科植物包括结籽粒的作物如蚕豆、豌豆、大豆和羽扇豆,还包括饲料作物如苜蓿、三叶草和驴

喜豆。在这个农业生态系统中平均固氮量大约每年每公顷为 100 公斤。如果能选到合适的根瘤菌株、合适的宿主植物品种,再加上适宜的生长条件,那末每年每公顷的固氮量就能够提高到 200 公斤的水平。其他固氮来源包括自生和联合共生类型,对于栽培作物相对来说则不太重要。

在非农业栽培地区,野生豆科植物共生固氮类型、蓝细菌(即蓝藻)以及自生固氮细菌全都参与空气中氮的固定,但固氮量每年每公顷不超过 30 公斤。

在森林地区,非豆科结瘤植物如桤木具有很强的固氮能力,因此能够发挥重要作用(每年每公顷固氮量约为 200—300 公斤)。红枝桤木(*Alnus rubra*)的情况尤其如此,它的效果比针叶树还要好,在美国西北部森林区,其产量占全部木材产量的 60%,*Coriaria arborea* 在新西兰松林中也起到同样的作用。

(二) 热带和亚热带陆地生态系统

1. 旱作系统

在耕作土地上,根瘤菌-豆科植物共生体仍然是固氮的最主要来源。这些豆科植物主要是结籽的豆科作物如豇豆、花生、蚕豆、鹰嘴豆、绿豆、扁豆和木豆等。在很多情况下,这些共生体的固氮能力往往由于不利的环境条件而受到限制(干旱、缺肥)。用作饲料的豆科牧草只是在很有限的地区种植。

2. 水田系统

自生固氮的蓝细菌在稻田里起很重要的作用,因此只要在稻田里建立起这种共生系统,就会产生很好的效果。把田菁(*Sesbania*)这种豆科作物(一种经济作物)种在稻田里作

绿肥，它的根瘤每年每公顷固氮量高达 500 公斤。然而在稻田里，用于水稻生长最普遍的共生固氮系统是红萍-鱼腥藻。红萍是一种很小的水生蕨类，通过营养体大量繁殖，在水稻茎秆之间生长。鱼腥藻是一种丝状固氮藻类，能在红萍的空腔中生长。这种共生体固氮量每年每公顷可达到 100—200 公斤。

3. 潜在的高固氮力的系统

有些饲料作物如 *Stylosanthes*、山蚂蝗 (*Desmodium*)、*Macroptilium* 和 *Pueraria* (图 2) 虽然分布不太广泛，但它们的固氮能力却每年每公顷高达 300 公斤。还应该提及的是点状雀稗 (*Paspalum notatum*)-雀稗固氮菌 (*Azotobacter paspali*) 共生体，在巴西，这种共生体每年的固氮量相当大。

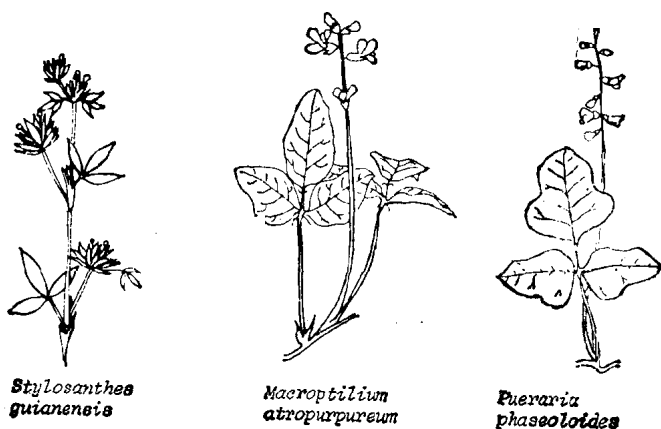


图 2 几种豆科植物

这种情况的出现与热带牧草 (C₄ 代谢途径) 具有高光合效率和大量根系分泌物有关。

最后再解释一下水田的潜力。应该指出，水田里的自生

微生物的固氮水平比较高，无疑是因为淹灌提供了微需氧的环境条件。

在这些地区，豆科植物种类繁多，很多可能是很有用的。譬如银合欢 (*Leucaena*) (图 3) 可用作饲草或当作覆盖作物，它的固氮量每年每公顷为 500 公斤。微白金合欢 (*Acacia albidia*) 生长在撒哈拉地区，在旱季它能固定空气中的氮，此时落下的叶子为随后雨季中生长的谷类作物所利用。

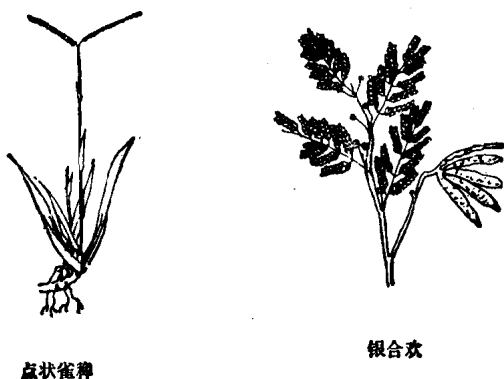


图 3 几种豆科植物

(三) 极地和副极地生态系统

在很少有高等植物生长的地区，自生的或与地衣联合的蓝细菌就成为固氮的主要来源。在冻土带，念珠藻 (*Nostoc*) 的固氮量每年每公顷达到 8—10 公斤的水平。它具有一种特殊的生理性能，即在 0℃ 左右还能使固氮酶保持活性，同时具有迅速恢复活性的能力。

在植物能够生长的那些地方，蓝细菌的作用仍比结瘤的豆科植物的作用要大。另一方面，非豆科结瘤的树种如某些

种类的桤木能够适应这种恶劣条件，它们在当地就可能成为固氮的因素。

（四）水生生态系统

众所周知，在淡水中存在着生物固氮的现象，蓝细菌是固氮的主要来源。在有些湖泊里，细菌和高等水生植物如芦苇（*Phragmites*）和蔺草（*Phalaris*）常常形成固氮的共生体。

关于海洋里生物固氮的情况知道得还不多，一种蓝细菌 *Trichodesmium* 和另一种藻类 *Richelia intracellularis* 常与热带硅藻 *Rhizolenia* 形成共生体，并已证实它们具有较高的固氮能力。但就海洋环境而言，它们的重要性还不太清楚。在潮汐带，自生细菌和那些与各种海生被子植物形成的联合共生体有可能大量固氮。

四、根瘤菌-豆科植物共生固氮概述

根瘤菌属的细菌与许多豆科植物在两者互利的共生关系的基础上组成了共生体。这种共生体使植物根部形成了一种新的组织，即根瘤，空气中的氮就在根瘤部位被固定。

（一）共生体的参加者

1. 豆科植物

豆科植物长根瘤是很常见的现象，但是有一些种类既不被根瘤菌侵染，也不能固氮。据观察，蝶形花亚科 90% 有根瘤，含羞草亚科也是 90% 有根瘤，但云实亚科只有 30% 有根瘤。