

16.1736/20

肥菌痛根



农业出版社

根 瘤 菌 肥

山东省土壤肥料研究所微生物室編

农 业 出 版 社

根 瘤 菌 肥

山东省土壤肥料研究所微生物室编

农业出版社出版 新华书店北京发行所发行

农业出版社印刷厂印刷

787×1092 毫米 32 开本 1.25 印张 23 千字
1978 年 5 月第 1 版 1978 年 5 月北京第 1 次印刷
印数 1—30,500 册

统一书号 16144·1806 定价 0.11 元

前 言

根瘤菌肥是推广最早、效果显著的一种细菌肥料。我国古代劳动人民很早就知道种豆可以肥田。早在一千五百年以前，我国的古农书《齐民要术》中就有过这方面的记载。解放以后，党和国家十分重视细菌肥料的研究工作。1956年，在毛主席亲自主持制订的《全国农业发展纲要》中，明确规定了要“积极发展细菌肥料”，从而为细菌肥料的研究、生产、应用指明了广阔的前景。从此以后，菌肥应用逐渐在全国各地发展起来。

自然界蕴藏着丰富的氮素，在大气中约有五分之四是氮气。但是这些氮都以游离态存在，一般植物不能利用。而有一些微生物和藻类却可以利用空气中游离态的氮素，我们称之为生物固氮。生物固氮对于自然界氮素的循环起着巨大的作用。人工合成的氮素化合物提供给农作物的仅占6%左右。农作物所需要的大部分氮素则要依靠生物固氮供给。据估计，地球上一年生物固定的氮素约为1亿吨左右，而根瘤菌固定的氮素为3,500—5,500万吨。可见积极地利用和发展根瘤菌肥对于农业生产有着极为重要的意义。试验表明，一亩地豆科植物根部的根瘤，每年可以固定大气中的氮素12—32斤，相当于60—160斤硫酸铵。如果在种植豆科植物时施用根瘤

菌，按每亩地多固定2斤氮素计算，仅山东省种植的大豆和花生两项，就可以从空气中多得到9万吨硫酸铵，而国家却基本不投资。

这几年的实验也表明，施用根瘤菌肥可以提高豆科作物种子和鲜草的产量，同时培肥了地力。据山东省多年试验结果，花生施用根瘤菌后，一般可以增产15%左右；大豆接种根瘤菌一般可以增产7.5%左右；而南方的江苏、湖南、湖北、浙江、四川等省推广稻田绿肥紫云英时，从未种植过紫云英的地区，在初种时接种根瘤菌的地块常比不接种的成倍增产。即使在多年种过紫云英的地区，接种根瘤菌后仍能增加10—20%的鲜草产量。广大群众都称赞说：“根瘤菌肥是个宝，花钱少，效果好。”近几年在农业学大寨的群众运动中，根瘤菌肥的应用逐年扩大，形势一片大好。

为了更好地推广和应用根瘤菌肥，使根瘤菌肥更好地为农业学大寨的群众运动服务，我们参照各地的经验，结合我们的工作，编写了这本小册子，以供参考。

目 录

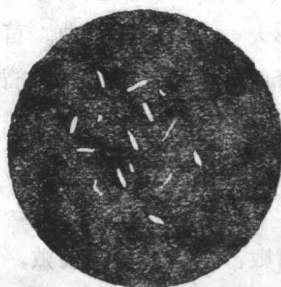
一、根瘤菌及其生物学特征	1
(一) 根瘤菌的形态及其生活史	1
(二) 根瘤菌的培养特征	4
(三) 根瘤菌的生理特征	4
(四) 根瘤菌的专性	6
二、根瘤菌与豆科植物的共生关系	7
(一) 根瘤的形成和发育	7
(二) 根瘤菌与寄主的相互关系	9
三、菌种选育、保存和复壮	10
(一) 菌种的选育及鉴定	10
(二) 菌种的保存和复壮	18
四、根瘤菌肥的生产	20
(一) 生产流程	20
(二) 菌种	20
(三) 二级扩大	22
(四) 检查	23
(五) 吸附剂准备	24
(六) 吸附和培养	24
(七) 质量检查	25
(八) 根瘤菌苗圃法的生产和应用	25
五、根瘤菌的有效使用	27

(一) 使用方法	27
(二) 根瘤菌肥与土壤因素的关系	28
(三) 根瘤菌肥与磷钾肥的关系	28
(四) 根瘤菌肥与微量元素的关系	29
(五) 根瘤菌肥与其他菌肥的复合使用	30
(六) 连续使用根瘤菌肥	30
附: 豆科根瘤菌固氮效率大田调查法	32

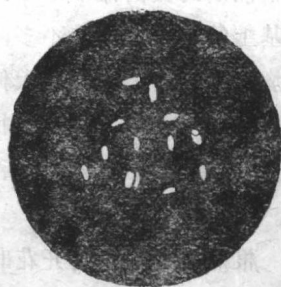
一、根瘤菌及其生物学特征

(一) 根瘤菌的形态及其生活史

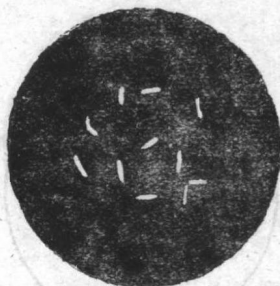
根瘤菌的形态一般为短杆状，两端钝圆，但随生活环境和发育阶段的变化，形态上有所不同。在琼脂培养基上，根



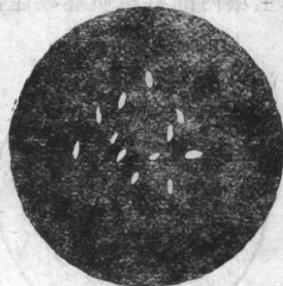
紫云英根瘤菌刚果红
复染色放大1,250倍



苜蓿根瘤菌刚果红复染
色放大1,250倍



大豆根瘤菌刚果红复
染色放大1,250倍



花生根瘤菌刚果红复染
色放大1,250倍

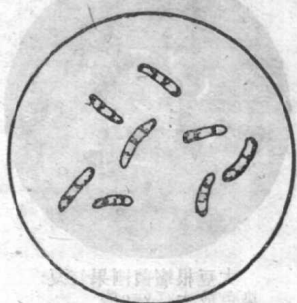
图1 几种常见根瘤菌的形态

瘤菌呈短杆状,不同的种大小略有差异,约为 $0.5-0.9 \times 1-3$ 微米 (图 1), 有鞭毛, 端生或周生, 能运动。培养时间稍长, 菌体略粗大。染色不均匀, 一般不生芽孢。当菌体侵入豆科植物根部, 在形成的根瘤中发育时为短小的杆菌, 无鞭毛, 着色良好, 染色均匀。随着根瘤的长大, 杆状体停止分裂, 逐步延长变大, 菌体内出现液泡, 原生质收缩成环节状, 染色不匀, 一端膨大成棍棒状或分叉变形, 这种菌体称作类菌体。类菌体无核, 不能在一般培养基上生长。不同种的根瘤菌的类菌体形态不同。例如大豆根瘤菌的类菌体和培养基上的菌体形态差不多, 仅略膨大一点或稍稍弯曲。苜蓿根瘤菌的类菌体一端膨大伸长或弯曲和分枝。紫云英根瘤菌的类菌体一端膨大象茄子状。豌豆根瘤菌的类菌体分叉, 呈“X”形、“Y”形等。各种根瘤菌的类菌体和根瘤如图 2 所示。

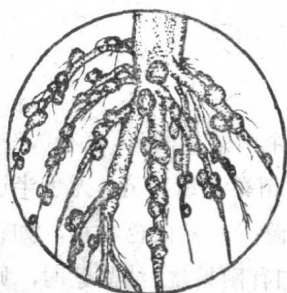
根瘤在豆科作物开花时开始腐败, 早形成的早腐败, 一般瘤龄约为 60 天左右。瘤体腐败后, 菌体又回到土壤中, 依靠土壤内的有机质继续生活。



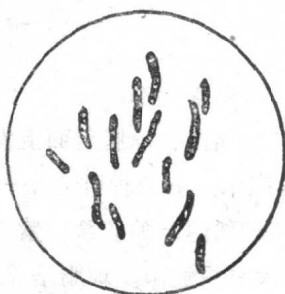
大豆根瘤



大豆根瘤菌类菌体



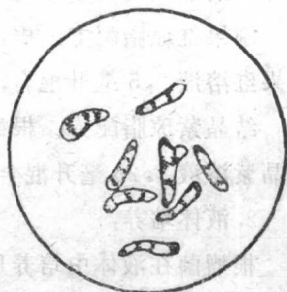
花生根瘤



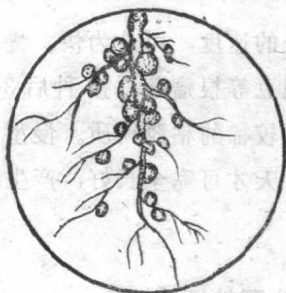
花生根瘤菌类菌体



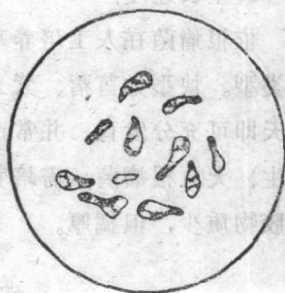
苜蓿根瘤



苜蓿根瘤菌类菌体



紫云英根瘤



紫云英根瘤菌类菌体

图2 几种常见豆科植物的根瘤及根瘤菌类菌体

（二）根瘤菌的培养特征

1. 菌落形态：

根瘤菌在琼脂斜面上发育的单个菌落呈圆形，直径0.5—1.5毫米，有的种可达2—4毫米。菌落边缘整齐，无色半透明，较稀薄，如苜蓿、紫云英根瘤菌；或乳白色粘稠，如花生、大豆根瘤菌。琼脂培养基内如加有刚果红、结晶紫时，则菌落不吸色或早期不吸色，而其他杂菌菌落则易吸色。在培养基内的埋藏菌落细小呈梭形。

刚果红琼脂配方：根瘤菌琼脂培养基 1,000 毫升与 1% 刚果红溶液 2.5 毫升混合，灭菌。

结晶紫琼脂配方：根瘤菌琼脂培养基 1,000 毫升与 1% 结晶紫溶液 1.25 毫升混合，灭菌。

2. 液体培养：

根瘤菌在液体中培养后，培养液逐渐变混浊，稍有沉淀，表面无菌膜，培养时间久时，接近液面的管壁上有粘胶物质。

3. 生长速度：

依根瘤菌在人工培养基上生长的速度，可分为快、慢两种类型。快型如苜蓿、紫云英、豌豆等根瘤菌，接种后 3—5 天即可充分发育，并常产生大量较稀的粘胶物质。慢型如花生、大豆根瘤菌，需培养 7—10 天才可完全长好，产生的粘胶物质少，但稠厚。

（三）根瘤菌的生理特征

1. 培养温度：

人工培养的根瘤菌在 2—7℃ 的低温下也能繁殖，但速度较慢，0℃ 以下停止繁殖，但不死亡，对高温敏感，在 60—62℃ 的温度下就会死亡。一般培养的最适温度为 25—30℃。

2. pH 要求：

一般根瘤菌需要的 pH 环境为 6.5—7.5，过酸过碱都会抑制其生长。在生长过程中，根瘤菌的某些种能产生酸或碱。如紫云英、苜蓿根瘤菌产生酸，大豆、花生根瘤菌产生碱。如果培养基中加有 0.5% 的溴麝香草酚蓝（简称 B.T.B）指示剂（0.5 克 B.T.B 用少量无水酒精溶解后，加入蒸馏水 100 毫升），则花生、大豆根瘤菌生长后可使培养基变蓝，而紫云英根瘤菌则可使培养基变黄〔根瘤菌琼脂培养基 1,000 毫升，加入 0.5% B.T.B 溶液 5 毫升，B.T.B 变色范围 pH 6.0（黄）—7.6（蓝）。调 pH 至 7.0 时琼脂为蓝绿色，当接种根瘤菌后产生碱，琼脂变蓝，接种根瘤菌产生酸，则琼脂变黄〕。

3. 碳源利用：

根瘤菌为好气性异养菌，可以利用多种碳水化合物作为能源，以单糖、双糖、多元醇（甘油、甘露醇）为好，其中葡萄糖、甘露醇为最好，慢型根瘤菌在有五碳糖的培养基上生长最佳。

4. 氮源利用：

在人工培养基上根瘤菌的氮素营养以可溶性有机氮化物合适。也能利用结合态氮，如硝态氮或铵态氮。

5. 其他物质的利用：

矿物元素中磷、硫、钾、钙、镁都需要。微量元素钼、硼、锰等能促进根瘤菌的生长。维生素类物质特别是当培养

基中含有乙族维生素（酵母浸汁、豆芽汁）时，可以使繁殖量增加数倍。

（四）根瘤菌的专性

根瘤菌对寄主有一定的选择性，各种根瘤菌只与其相适应的豆科植物建立共生关系。如大豆根瘤菌只能在大豆根部侵入，形成根瘤；紫云英根瘤菌只能侵入紫云英根部形成根瘤等等。所以一种根瘤菌只有用在相应的豆科植物上，才能发挥其有效作用。根据根瘤菌共生关系的选择性，将根瘤菌分成若干种（表1）。

表1 各种根瘤菌及其相应共生的豆科植物

根 瘤 菌 名 称	相 应 共 生 的 豆 科 植 物
花 生 根 瘤 菌	花生、豇豆、绿豆、赤豆、田菁、桤麻等
大 豆 根 瘤 菌	大豆、黑豆、青豆、黄豆
苜 蓿 根 瘤 菌	苜蓿、草木樨、黄花苜蓿等
豌 豆 根 瘤 菌	豌豆、蚕豆、苕子、箭舌豌豆等
紫 云 英 根 瘤 菌	紫云英
菜 豆 根 瘤 菌	菜豆、四季豆
三 叶 草 根 瘤 菌	三叶草

根瘤菌不仅对不同种的豆科植物有一定的选择性，而且对同一种豆科植物的不同品种也有一定的选择性。所以在生产上如果能够为特定的品种选出亲和力强的菌株，往往能更进一步发挥其共生作用，提高接种效果。

二、根瘤菌与豆科植物的共生关系

(一) 根瘤的形成和发育

豆科植物根部的根瘤是根瘤菌与豆科植物共生的结构。它的形成是当豆科植物生长时，由于其根部分泌物的影响，原先存在土壤中或人工接种的根瘤菌在种子附近和幼根区繁殖活动起来，首先从根毛侵入。由于根毛细胞壁的反转生长，转化成一种细的类似菌丝的纤维素的内生管（感染线），根瘤菌通过感染线进入根中，并随着感染线的伸长，在其中繁殖（图3）。发育的根瘤菌刺激根的内皮细胞分裂，逐渐膨大形成突起，即成为根瘤。不同的豆科植物根瘤形成的时间也不同。大豆、紫云英等苗龄10天左右，在大田中生长的植株即可看到主根上开始结瘤，而花生结瘤则较慢。随着植株生长，根瘤逐渐增

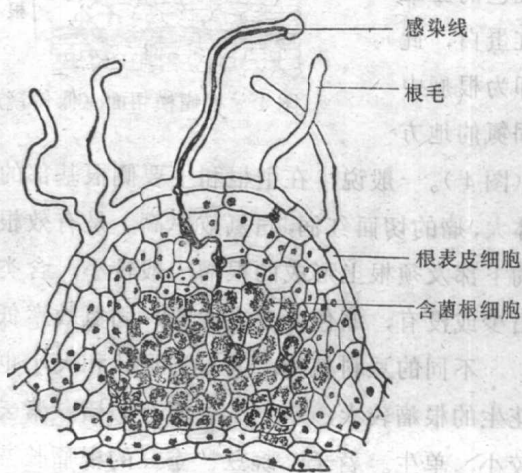


图3 根瘤菌的侵入

多,同时个体也发育、增大。一般在开花期,根瘤逐渐停止发育,开始结荚时,根瘤开始衰败、破溃,根瘤中的菌体又回到土壤中去。

发育好的根瘤切开观察时,其中间为薄壁细胞组成的含菌组织,内含大量的已变成类菌体的根瘤菌,并含有红色的豆血红蛋白,此即为根瘤中固氮的地方

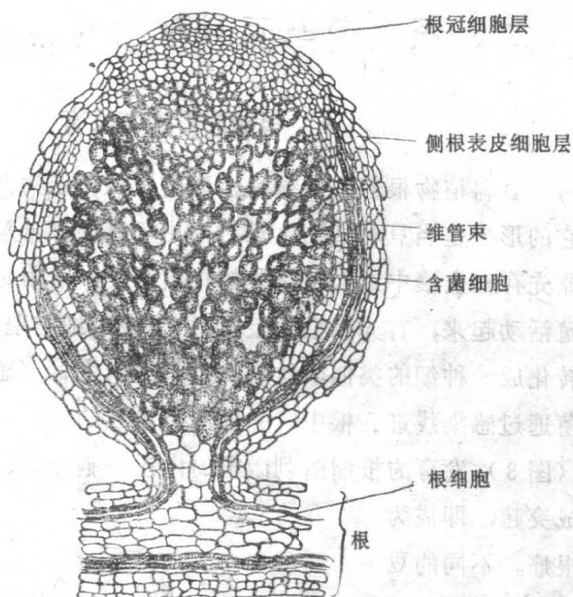


图4 根瘤横切面(低倍镜放大)

(图4)。一般说,在主根和主要侧根基部的根瘤形成早,瘤体大,瘤的切面红润,固氮效率高,是有效根瘤。而后期在根的下部及须根上形成的根瘤一般较小,含类菌体少,血红蛋白少或没有,瘤色灰白或发绿,固氮效率低,是无效根瘤。

不同的豆科植物,其根瘤形状和大小也都不一样。大豆、花生的根瘤较大,单生,表面有皱褶。紫云英、苜蓿的根瘤较小,单生。苕子、豌豆、蚕豆的根瘤长圆形,多聚生一堆或似姜状(见图2)。

(二) 根瘤菌与寄主的相互关系

根瘤菌与豆科植物的共生关系是基于二者之间的相互适应。豆科植物根部受侵染的根瘤菌的刺激产生了根瘤，提供了根瘤菌的适宜生活环境，使根瘤菌在生长发育时依赖植株供应除氮素以外的各种养分，但固定了大气中的氮素，自给氮素营养，也营养了植物，二者在生活上建立了互相有利的共生关系。据研究，有效共生固氮关系的建立，取决于根瘤中是否具有两个新生成的蛋白——豆血红蛋白和固氮酶。决定根瘤菌固氮活性的固氮酶，由两种蛋白组成，一种是铁—蛋白，它与很低电势上的电子传递有关；另一种是铁—钼蛋白，它似乎与分子氮的还原有更密切的联系。固氮酶是由根瘤菌决定的。而根瘤内的豆血红蛋白与氧的运输有关，根瘤中缺少它就不能固氮。而豆血红蛋白的生成，则是由豆科植物决定的。所以，根据国内外的研究，在应用根瘤菌肥的同时，添加钼、钴等微量元素，对于提高肥效有一定作用。

三、菌种选育、保存和复壮

(一) 菌种的选育及鉴定

在自然界里各种根瘤菌是普遍存在的。要使根瘤菌与植物共生后发挥高效的固氮作用，则需要通过人工选育的手段，选出适合于本地区相应豆科植物的根瘤菌菌株，利用这些菌株接种豆科植物后，才能达到增加植株氮素营养和提高产量的目的。优良菌株的标准，根据各地的经验，应该包括：①共生固氮效率高；②侵染寄主植物的能力强；③适应性强。

选育的方法是从根瘤中分离得到根瘤菌，经纯培养后，通过接种试验比较其结瘤能力、固氮效率和接种回收率的高低，以确定是否为优良菌株，可否用在生产上。有条件的地方还可以通过化学、物理的方法进一步诱变育种，以期得到优良菌株。在实验室内还必须进行生理生化鉴定。具体步骤如下：

1. 分离：

从大田中选取生长茂盛、叶色浓绿、根瘤发育良好的植株。采瘤的时间一般以植株处于营养生长旺期，开花以前较好。采取植株将根部洗净切断，选取主根上生长大而饱满、颜色红润的根瘤。

①用刀片将根瘤切下（为使根瘤完整可连带一小部分根组织），将瘤子放入清水中浸洗多次，再在75%酒精中浸3—5