

紫云英根瘤菌肥

ziyunying genliujunfei



江苏人民出版社

紫云英根瘤菌肥

江苏农学院土化系微生物教研组编

江苏人民出版社

紫云英根瘤菌肥

江苏农学院土化系微生物教研组编

*

江苏人民出版社出版

江苏省新华书店发行

苏州印刷厂印刷

1975年10月第1版

1975年10月第1次印刷

印数 20,000 册

书号 16100·034 每册 0.10 元

毛主席语录

鼓足干劲，力争上游，多快好省地
建设社会主义。

农业学大寨

以粮为纲，全面发展

我们的方针要放在什么基点上？放
在自己力量的基点上，叫做自力更生。

前 言

接种紫云英根瘤菌是淮北地区引种紫云英成败的关键措施，也是紫云英老区提高鲜草产量的有效方法。几年来，我省淮北地区应用接种根瘤菌技术，引种紫云英获得成功，为徐、淮、盐三地区扩大水稻面积，因地制宜地改制创造了有利的条件。目前紫云英正在我省江淮南北作为优良绿肥品种迅速推广；紫云英根瘤菌肥的生产和使用技术正在开始普及，有的单位并初步积累了一些经验。

在我省农业生产大干快上的高潮中，为了促进紫云英生产的进一步发展，我们在科学实验和群众生产实践的基础上，编写了这本小册子，介绍紫云英根瘤菌的特征特性、共生固氮作用、筛选高效菌种、生产和使用菌肥的简易方法，供菌肥生产者以及其它农业技术人员、知识青年参考。

由于我们水平有限，实践经验不足，难免有错误之处，请读者批评指正。

编 者

一九七五年二月

目 录

一、紫云英根瘤菌的生物学特性·····	(1)
二、紫云英根瘤菌与紫云英的共生关系·····	(5)
三、紫云英根瘤菌种的筛选和培育·····	(11)
四、紫云英根瘤菌肥的生产·····	(18)
五、紫云英苗圃法培育根瘤菌·····	(27)
六、紫云英根瘤菌肥的使用·····	(30)
七、紫云英根瘤菌肥的增产效果·····	(32)
附录·····	(36)

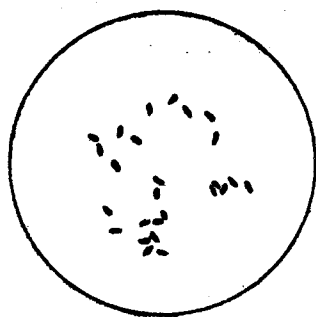
根瘤菌肥是农用微生物制品中推广应用最早，效果显著的一种高效菌肥。它能使豆类作物和豆科绿肥增产，并提高土壤的氮素含量。据试验豆科植物生长期间吸收的氮素约有三分之二是根瘤菌从空气中固定下来的，估计一亩豆类作物根瘤内的根瘤菌能从空气中摄取12~30斤氮素，相当于60~150斤硫酸铵。我省十年前紫云英由苏南引种到苏北，先在里下河地区获得成功，最近又在徐淮地区旱改水田块上试栽成功，获得亩产鲜草4000斤左右的较好产量，并曾出现达万斤的高产田块，对改良土壤，培育肥力，提高水稻产量将发挥良好作用。紫云英在新区栽培成功，应用根瘤菌肥拌种是一个关键性技术措施。就是苏南紫云英老区，使用高效根瘤菌肥拌种后，也有显著的增产效果。我省花生栽培地区近年来用根瘤菌肥拌种平均增产10~20%。其它如大豆、蚕豆、苕子、金花菜等豆类作物和豆科绿肥施用合适的高效根瘤菌肥，也都能增产。因此，选育高效根瘤菌种，制成菌肥，施用于豆类作物和豆科绿肥是提高产量的一个有效措施。

一、紫云英根瘤菌的生物学特性

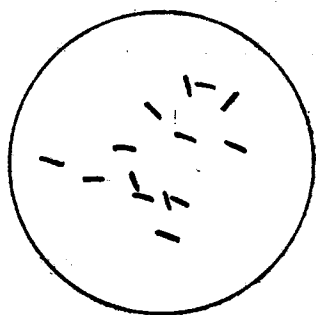
1. 紫云英根瘤菌的形态特征

豆科植物的根瘤菌是短杆状细菌。其因生活环境和发育阶段不同，形态上有变化。从根瘤中分离所得的根瘤菌在琼脂培养基上发育时呈短小杆状，不同的种大小略有差异，一般为0.5~1×1~5微米，具端生或周生鞭毛，能运动。紫云英根瘤菌在琼脂培养基面发育为短杆状，其大小为

0.6~1.0×1.3~1.5微米；在液体培养基中发育为细杆状，大小为0.5~0.8×2~3微米。端生鞭毛，能直线向前游动（图1）。根瘤菌都不生芽孢，格兰氏染色呈阴性反应。根瘤菌人工培养较久，杆状菌体略粗大，染色不匀，中部色深，两端渐浅。杆状菌体在根瘤中繁殖时，初为短小杆状，没有鞭毛。根瘤长大后，杆状菌体停止分裂繁殖，逐渐延长变大，菌体内出现许多液泡，原生质收缩呈环节状，染色不均匀，菌体变形，一端膨大呈棍棒状、茄子状或分叉作Y、T、X等形。这种变形的菌体称类菌体，不同根瘤菌种的类菌体形状各异。紫云英根瘤菌的类菌体为茄子状，或在膨大的一端稍分叉，其大小约为短杆状体的5~10倍（图2）。当紫云英结荚成熟时，根瘤变成灰褐色，开始腐败，其中类菌体裂解成几个细小的球状体，逐渐发育成短小杆状菌，根瘤腐败后，散入土中继续发育，并进行分裂繁殖。



紫云英根瘤菌短杆状菌体
(琼脂斜面培养3天)



紫云英根瘤菌杆状菌体
(液体培养3天)

图1. 紫云英根瘤菌杆状菌体

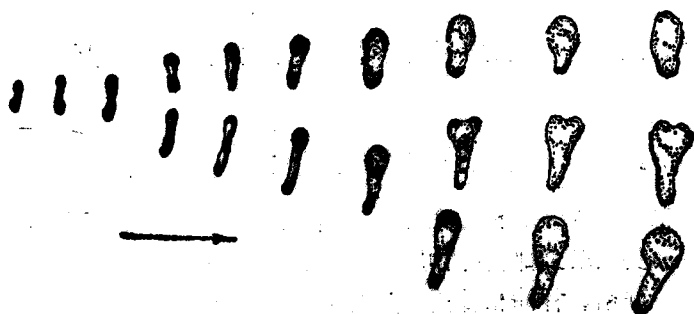


图2. 紫云英根瘤菌的类菌体发育过程

2. 紫云英根瘤菌的培养性状

(1) 琼脂斜面培养: 紫云英根瘤菌在琼脂斜面培养基上接种后, 培养在 $25\sim 28^{\circ}\text{C}$ 中, 经36小时即开始生长。72小时后即发育成菌苔, 5天后菌苔发育丰满, 为无色、半透明、粘糊状, 常流向底部累积。

(2) 菌落性状: 紫云英根瘤菌在琼脂培养基平面上发育的单独菌落呈圆形, 直径 $0.5\sim 1.0$ 厘米, 边缘完整, 稍隆起, 无色、半透明。若培养基内加有刚果红或结晶紫染料, 根瘤菌菌落不着色或着色很浅, 可与染色深的其它细菌的菌落相区别。发育在培养基中的埋藏菌落细小呈扁圆形。

(3) 液体培养: 紫云英根瘤菌接种在试管液体培养基中生长3天后, 培养液逐渐变浑浊, 稍有沉淀, 液面不结菌膜。培养较久, 在接近液面的管壁上集有胶粘物质。

(4) 生长速度: 紫云英根瘤菌在各种根瘤菌中属于生长快的类型。在琼脂培养基平面上接种后5天, 菌苔即充分发育, 并产生大量较稀薄的胶粘物质, 使菌苔呈粘糊状。但紫

云英根瘤菌的不同菌系，其生长速度是不一致的。实践经验证明，生长速度快的菌系结瘤性能往往不好，被认为是菌种退化的象征。

3. 紫云英根瘤菌的生理习性

根瘤菌离开了根瘤在土壤中营腐生生活。进行人工培养时，需要供给全部营养物质。紫云英根瘤菌的碳素营养以葡萄糖、蔗糖、甘油和甘露醇为合适；氮素营养以简单的有机氮化物如氨基酸类为适宜，也能利用铵盐和硝酸盐，但不能利用蛋白质；矿质营养，如磷、硫、钾、钙、镁、铁都需要，微量的钼、锰、钴、硼有促进生长的作用；维生素类物质对根瘤菌发育的影响很大，当培养基中含有乙种维生素，特别如生物素和硫胺素时，可以提高发育量几倍，这类物质在酵母细胞和豆芽中含量较多。因此，配制培养基时加新鲜酵母浸汁或黄豆芽煮汁，除能供应氨基酸类有机氮素营养外，还提供了生长素类物质，有利于根瘤菌旺盛生长。

根瘤菌与合适的豆科植物营共生生活时，在根瘤中进行固氮作用，自给氮素营养，而所需的碳素和矿质营养，则由共生的豆科植物供给。

根瘤菌属好气性。生长适温 $25\sim 28^{\circ}\text{C}$ 。适宜的pH值为 $6.5\sim 7.5$ ，但在培养过程中可产生有机酸，使培养液的pH值下降，因此培养基中可加适量碳酸钙，使起中和作用。

各种根瘤菌都有它们各自适应的豆科植物建立共生关系，形成根瘤，表现了根瘤菌的专性。紫云英根瘤菌只能与紫云英共生，在根部形成根瘤。所以一种根瘤菌肥只能用于相适应的豆科植物才能生效（表1）。

表 1. 根瘤菌种与共生的豆科植物

根 瘤 菌 名 称	共 生 的 豆 科 植 物
豌豆根瘤菌	豌豆、蚕豆、苕子、小巢豆、箭舌豌豆
三叶草根瘤菌	各种三叶草
菜豆根瘤菌	菜豆(四季豆)
苜蓿根瘤菌	紫苜蓿、草木樨、金花菜
大豆根瘤菌	各种大豆(黄豆、青豆、黑豆等)
紫云英根瘤菌	紫 云 英
豇豆根瘤菌	豇豆、花生、绿豆、赤豆、刀豆、怪麻

二、紫云英根瘤菌与紫云英的共生关系

1. 紫云英根瘤菌与紫云英的共生组织——根瘤的形成

在紫云英幼苗发育过程中，由于根部分泌物的影响，使根周围土壤中的紫云英根瘤菌（拌种带入或土壤中原来生存的）迅速大量繁殖，并由根毛先端入侵，在根毛中继续繁殖，经根的表皮层进入内部，刺激管束鞘细胞进行分裂，增加新细胞。当这些新细胞长大向外突出时，根面上即出现瘤状隆起，初为小圆球状，渐长大呈卵圆形、长圆形或茄子形，少数呈倒三角形或分叉作鸡冠状，其大小为 $0.2 \sim 0.5 \times 0.1 \sim 0.3$ 厘米。

将根瘤作纵剖面观察时周围是由4~5层细胞构成的皮层，起保护作用。其内部先端有一堆小方形细胞构成的分生

组织，后面由大形薄壁细胞构成的含菌组织，占了根瘤的绝大部分，成为根瘤的主体组织，是进行固氮作用的场所。分生组织的细胞具分生能力，不断进行分裂，增加新细胞。这些新细胞成长为大形薄壁细胞，扩大含菌组织，使根瘤逐渐长大。含菌组织内的根瘤菌进行大量繁殖后，逐渐发育变形，成为类菌体。含菌组织因各细胞中形成豆血红蛋白而呈鲜红色。皮层的细胞较含菌组织的细胞小，不含根瘤菌，也没有豆血红蛋白形成。在根瘤基部的皮层中分化有维管束组织，与根的维管束相连接，输导水分和养分（图3）。

用紫云英根瘤菌肥拌种后发育的幼苗，在长出第一片真叶后，主根基部即开始出现细粒状的小瘤（图4），随着根系的发育而陆续增多，逐渐长大。并在侧根及支根上也发生根瘤。一棵紫云英在开花前根部发生的大小根瘤通常有几十个至上百个；开花以后，根瘤逐渐停止发育；荚果成熟时，大部分根瘤腐败，其中的类菌体分散在土壤中。

集生在主根和侧根基部的根瘤发生早，生长期长，瘤体

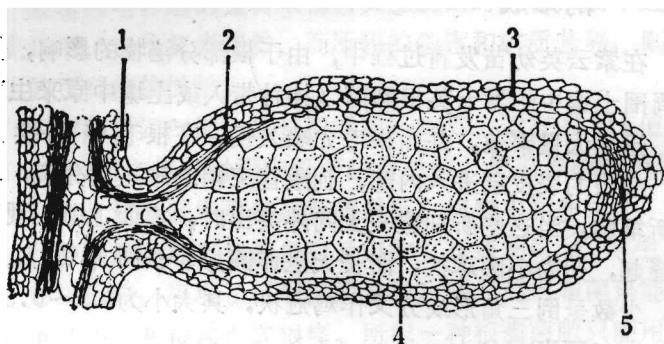
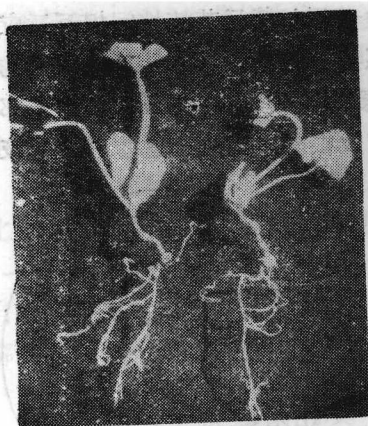
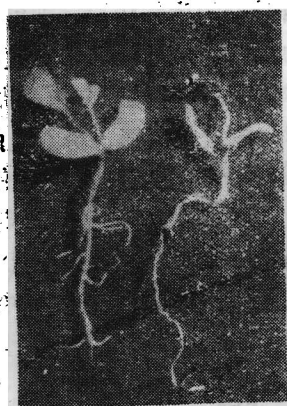


图3. 紫云英根瘤纵剖面

1.根 2.维管束 3.皮层 4.含菌组织 5.分生组织



1. 拌菌(根基部出现球状小瘤)



2. 未拌菌(对照, 根部无瘤)

图 4. 紫云英幼苗一叶期的结瘤情况

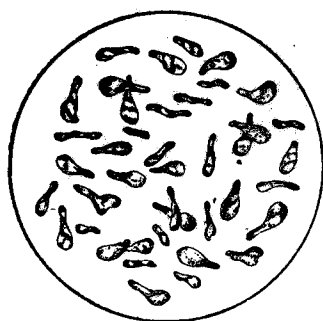
大, 含菌组织多, 瘤色红润, 固氮效率高, 而且进行固氮作用的时间长, 是有效根瘤。在紫云英生长后期发生的根瘤多分散在支根上, 生长期短, 瘤体小, 含菌组织少, 瘤色灰白, 固氮效率低, 是无效根瘤。

2. 紫云英根瘤菌各菌系与紫云英的共生适应性

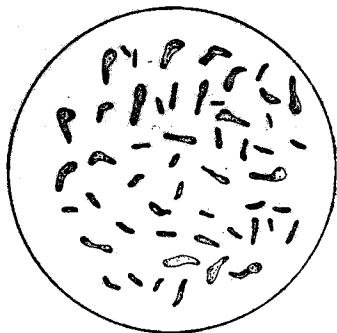
紫云英根瘤菌与紫云英的共生关系是二者长期相互自然适应的结果。紫云英根部受入侵的紫云英根瘤菌的刺激而发生了根瘤, 为根瘤菌提供了一个特殊的生活环境, 使根瘤菌能在生长发育中依赖紫云英供应除氮素以外的各种养分; 根瘤菌固定了空气中的氮素, 除自给氮素营养外, 也营养了紫云英, 彼此在生活上建立了相互有利的关系。

用紫云英根瘤菌的不同菌系分别拌种, 在紫云英的各发育阶段中所发生的根瘤数量和固氮效果是不同的。紫云英幼

苗时期的生长状况，即能反映菌系与紫云英植株间相互适应的程度，从而区别为有效菌系或无效菌系。紫云英根瘤菌的有效菌系，例如紫1和紫11入侵幼苗较早，在主根和侧根基部形成多数长圆形、粉红色的有效根瘤。当压出这些根瘤的液



1.有效根瘤中的类菌体



2.无效根瘤中的类菌体

图5. 紫云英根瘤中的类菌体

汁做染色涂片，在显微镜下观察类菌体的形状和计算其数量时，每个视野中茄子状类菌体占绝大多数，少数呈分叉状或卵圆形，未发育好的类菌体和细长杆状体占极小比例。由于类菌体发育好，数量多，固氮作用强，对紫云英植株的有利影响大。无效菌系例如紫4和退化的湘云6等所形成的根瘤主要散生在侧根上呈分叉或鸡冠状，灰白色，为无效根瘤，在显微镜下观察，其类菌体发育不好，茄子状的只占少数，大部分是细长杆状体，固氮作用弱，对紫云英植株的有利影响小（图5）。

3. 根瘤菌的共生固氮作用

(1) 空气中的分子态氮 (N_2)，经根瘤皮层渗入含菌

组织细胞，通过类菌体中固氮酶系统的作用，并在豆血红蛋白的参与下，被还原成氨（ NH_3 ）。

（2）紫云英供给根瘤菌发育所需要的碳素、矿物元素和生长素类营养物质。

（3）根瘤菌利用合成的氨以及在碳素代谢中生成的酮酸化合而成谷氨酸等氨基酸，并进一步合成细胞蛋白质。

根瘤菌固定的氮素，约有75%以各种简单氮化物的形态自根瘤运至植株各部，余留在根瘤中的部分，待根部腐败分解时，归入土壤，成为下茬作物的土壤氮源。

4. 紫云英根瘤菌的共生固氮效率

紫云英根瘤菌的共生固氮效率是随着紫云英植株的生长发育、根瘤的发生和长大而递增的。紫云英在我省于9月中下旬播种后，到下霜前，幼苗的生长期约有1.5~2个月，可以长出6~8片真叶，2~4个分枝，苗高可达6~7厘米，有根瘤10~30个，最大的根瘤直径可达2~3毫米，但由于其中的类菌体较小，所以固氮量也小。从11月中下旬至第二年2月下旬的越冬期中，紫云英苗的地下部分虽略有伸长，根瘤也有所长大，但因地上部分基本上已停止生长，所以根瘤的固氮量也增加不多。开春后，紫云英苗返青生长，株高和干重增加较快，根瘤菌的固氮效率也相应提高。3月上旬以后，随着紫云英植株的旺盛生长和根瘤的迅速增大，根瘤菌的固氮作用也加强，固氮量增高，使紫云英植株中的含氮率达到较高水平。3月下旬至4月下旬是紫云英的盛发时期，植株干物质迅速增加，根瘤菌的固氮量也相应地迅速增加。根瘤菌固氮效率的提高是和紫云英植株干物质增加成正比的（表2）。

表 2. 紫云英接种根瘤菌——紫1菌系的固氮效率

采 样 分 析 日 期	株 高 (厘米)	株鲜重 (克)	株干重 (克)	主根及 侧根基 部大瘤 数	植 株 含 氮 量		固 氮 量 毫克/株
					%	毫克/株	
10月 3 日(50株平均)	2.29	0.095	0.009	8.0	3.22	0.29	
11月 5 日(40株平均)	2.61	0.25	0.029	13.2	4.09	1.19	0.4
12月10日(30株平均)	4.08	0.60	0.085	19.6	3.78	3.21	1.62
1月 8 日(同 上)	5.28	0.59	0.113	14.8	3.96	4.48	2.47
2月26日(同 上)	6.46	0.86	0.145	22.5	4.49	6.51	3.16
3月19日(同 上)	9.48	1.74	0.26	28.6	4.45	11.57	7.80
4月11日(20株平均)	31.1	7.23	0.83	39.5	3.69	30.6	24.8
5月 7 日(15株平均)	61.1	19.10	3.19	—	3.01	95.9	84.8

注：(1)大瘤标准：10月及11月两次分析——直径达1.0毫米，12月、1月、2月、3月四次分析——直径达2.0毫米，4月一次分析——直径达2~3毫米。

(2)植株含氮量 = 植株含氮百分率 × 株干重

(3)固氮量 = 接菌植株含氮量 - 对照(不接菌)植株含氮量

从表 2 可以看出，冬前生长 2 个月的幼苗，株高 5 厘米左右，每株干重 0.1 克左右，根部发育的根瘤虽有 15~20 个，但每株的固氮量平均只有 1.62 毫克。越冬的 3 个月中，株高增加不多，但由于根部发育，每株的干重增加至 0.15 克，每株的固氮量也增加至 3.16 毫克（增加一倍）。从 2 月 26 日至 3 月 19 日的 21 天中，每株固氮量增加至 7.8 毫克，使植株的含氮百分率达 4.45%。3 月下旬至 4 月下旬是紫云英的盛发期，每株的固氮量增加至 84.8 毫克。这时期植株的干重增加很快，当固定的氮量跟不上时，植株中的含氮百分率出现了逐渐下降的现象，5 月 7 日收割鲜草时，植株中的含氮百分率已下降至 3.01%，但是每株固定的氮量仍然作直线上升。从上看出，紫云英根瘤菌的共生固氮作用强度是随着紫云英植株的生长发育而提高的，根瘤菌固定了多量氮素，丰

富了紫云英植株的氮素营养，又促进了紫云英的生长发育，相互为利。

三、紫云英根瘤菌种的筛选和培育

在新区试栽紫云英应选用适应引种的紫云英品种，和当地土壤、气候条件的有效根瘤菌种，制成菌肥进行拌种，以保证栽种成功。就是紫云英老区，也需要从高产田块采瘤筛选和培育高效菌种，进行拌种，促进持续高产。所以筛选和培育菌种是紫云英根瘤菌肥生产和应用实践中的重要问题。

1. 紫云英根瘤菌种的筛选

紫云英根瘤菌种的筛选方法如下：

(1)采瘤：冬前在紫云英苗期生长好的田块中选取发育健壮，叶色深绿，根部结瘤多而大的幼苗，掘取作样株，洗净根部后，选取主根上大而饱满、颜色粉红的长圆形根瘤，用刀片连同一小部分根组织切下（勿伤根瘤），放入培养皿中，用清水继续洗净，然后移入75%的酒精中经2~3分钟，再移入0.1%的升汞溶液中2~3分钟，或在1:1000新洁而灭*溶液中10分钟，并不断用小玻璃棒搅动，进行表面灭菌，以杀死附着在根瘤表面的杂菌。然后用灭菌水冲洗2~3遍，洗去根瘤表面残留的升汞或新洁而灭等灭菌药物。

(2)分离：经表面灭菌的根瘤，以无菌操作移入盛有一

*新洁而灭是一种强力灭菌消毒液，对许多不生芽孢的细菌以及霉菌等经几分钟接触即能杀死。医药公司供应的5%溶液，性能稳定，长期贮存效力不变。取溶液1毫升加蒸馏水49毫升即稀释成1:1000的新洁而灭溶液。