

应用免疫血清研究大豆接种根瘤菌的有效性

奥新田 李晓鸣

(黑龙江省农科院土肥所)

大豆接种根瘤菌已被生产实践证明是一项使用方法简单、成本低、效益高的农业增产措施。近年,在我省应用面积逐年增加。但是,目前生产上大豆接种根瘤菌尚有一定的盲目性。因为根瘤菌不但与土壤、大豆品种有一定的相关,而且土壤中还有一定数量的土著根瘤菌。人工接种的根瘤菌既要固氮活性高,又要竞争力强,这样才能在大豆根上有效的结瘤和固氮。近年,国内外已应用抗药标记、遗传标记和免疫血清等方法试图明确人工接种的根瘤菌与土著根瘤菌的竞争力,对大豆的侵染状况以及接种的有效性。本文报导了我们应用根瘤菌免疫血清研究大豆接种根瘤菌有效性的试验结果。

材料和方法

一、根瘤菌免疫血清的制备

1. 抗原: 试验菌种为美国农业部商品菌剂, 菌种编号 61A76。将菌种纯化, 用甘露醇培养基进行斜面试管培养, 温度 28—30℃, 时间 6—8 天。将菌苔无菌操作刮进灭菌的生理盐水 (0.85% NaCl) 中, 充分摇动打碎菌苔, 然后在 60℃ 水浴加热 60 分钟。

2. 家兔免疫: 将根瘤菌悬液对健康家兔进行耳后静脉注射, 首次量为 0.5ml, 每隔 2—3 天, 依次递增 0.5ml, 共免疫 7 次。然后采血测效价。

3. 免疫血清: 从家兔颈部动脉放血, 然后在冰箱内静置, 令其自然析出血清后加入

石碳酸达 0.5%, 最后冰冻保存。

二、血清回收率测定

1. 采集根瘤: 在各试验点于大豆生育期 (分枝期到鼓粒期) 挖取根瘤, 洗净后置于 50% 甘油盐水 (50 毫升甘油加入 50 毫升 8% 的生理盐水) 疫苗瓶中保存。

2. 凝集反应: 取欲测根瘤在无菌研钵中磨碎, 用 5 毫升 0.85% 生理盐水过滤洗入指形管中, 加入 2 毫升 1/500 根瘤菌免疫血清, 置 30℃ 温箱过夜, 记录凝集反应结果。

3. 血清回收率: 将根瘤菌免疫血清与欲测根瘤的凝集反应数减去对照 (不接种) 的凝集反应数, 即为血清回收率, 或称接种回收率。

结果与讨论

一、血清回收率与接种效果的相关

通过对全省八个试验点血清回收率的测定, 可看出在我省不同地区、不同土壤和不同大豆品种上血清的回收率不同, 从 10% 到 50%, 平均为 35%。在一般情况下, 在血清回收率高的地方, 其增产效果也高。例如, 在依安县农科所, 回收率为 50%, 增产为 21.0%; 而林口县五星乡, 回收率为 10%, 增产只有 1.3% (表 1)。根据表 1 绘成图, 阴影部分可作为从血清回收率预诊断其接种效果。

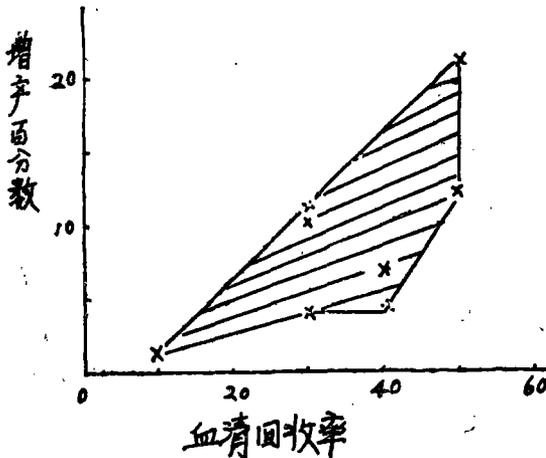
据中国农科院土肥所研究说明: 在田间条件下, 同一大豆品种在不同土壤上种植,

表 1

大豆根瘤菌(61A76)血清回收率与接种增产百分数的相关

(1984年)

| 试验地点 | 根瘤数/株 | | 亩产(斤) | | 增产 % | 血清 回收率 % | 土 壤 | 大豆 品种 |
|--------|-------|-----|-------|-------|---------|----------------|--------|----------|
| | 对 照 | 接 种 | 对 照 | 接 种 | | | | |
| 宾县乌河乡 | 32 | 65 | 355.9 | 398.9 | 12.1 | 50 | 黑 土 | 黑农26 |
| 依安县农科所 | 331 | 428 | 184.8 | 223.5 | 21.0 | 50 | 薄层粘底黑土 | 丰收10 |
| 绥化市农科所 | 190 | 221 | 380.0 | 423.0 | 11.1 | 30 | 黑 土 | 绥农4 |
| 巴彦县农技站 | 275 | 347 | 388.8 | 404.4 | 4.0 | 40 | 薄层黑土 | 黑农26 |
| 林口县五星乡 | 145 | 173 | 384.0 | 388.8 | 1.3 | 10 | 厚层草甸土 | 合丰23 |
| 汤原农技中心 | — | — | 202.2 | 209.8 | 3.8 | 30 | 草 甸 土 | 农家种 |
| 依兰县农科所 | — | — | 358.2 | 381.4 | 6.5 | 40 | 草甸河淤土 | 合丰25 |
| 海伦县长发乡 | 81 | 156 | 378.9 | 417.0 | 10.1 | 30 | 中层黑土 | 东农34 |



根瘤菌血清回收率与增产效果相关图

其瘤内菌系比例有很大差异。因此，根瘤菌的接种效果不仅与竞争力(血清回收率)相关，也与土壤的种类和大豆品种等因子相关。在多种因子的条件下取单一因子寻找接收有效性的相关，不可能呈直线正相关，但可以找出一个大概的相关范围。

二、血清回收率与接种量的相关

据澳大利亚试验，在有利的条件下，接种时每粒种子有100个菌，就可以迅速有效的结瘤，然而，在不利于根瘤菌存活和繁殖或存在有土著根瘤菌菌株与接种根瘤菌竞争的情况下，却需要每粒种子上有10万个菌以上。目前，我省大豆根瘤菌剂每克含活菌数在1亿左右，如每亩按接种半斤菌剂，每

亩大豆播种量为10斤，大豆百粒重为20克计算，可得以下式子：

$$\begin{aligned}
 \text{菌数/粒种子} &= (10^8 \times 250) \\
 &+ (500 \times 10 \times 100 \div 20) \\
 &= 25 \times 10^9 \div 25000 \\
 &= 1000000
 \end{aligned}$$

所以，如用含菌数为1亿/克接种，则每粒种子可带菌100万个。

通过不同接种方法和接种量试验，结果血清的回收率也不同(表2)。增加接种量可增加血清回收率，例如，用0.5斤菌剂(1亿活菌/克菌剂)拌种，回收率为10%。如用1斤菌剂拌种，回收率可增到30%。加大接种量，即增加了种子带菌量，增加了根瘤菌与种子和根接触的机会，有利于侵染结瘤。

表 2 血清回收率与接种量的相关

(北兴农场, 1984)

| 处 理 | 菌剂用量 (斤/亩) | 每 粒 种 子 带 菌 量 (万) | 血 清 回 收 率 (%) |
|-----------|---------------|-------------------------|---------------------|
| 根 瘤 菌 拌 种 | 0.5 | 100 | 10 |
| 根 瘤 菌 拌 种 | 1 | 200 | 30 |
| 根瘤菌稀释苗床 | 1 | 200 | 40 |
| 加三料拌种 | 1 | 200 | 50 |

三、不同菌种混合接种的血清回收率

据美国农业部田间试验表明，大豆品种

对大豆根瘤菌菌株有选择性,某些菌株在某些品种的根瘤内较多,而在其他品种的根瘤内则较少。我们应用 61A76 菌种和 61A76 与 110 混菌接种,其血清回收率也证明了这一点(表 3)。

例如,在黑农 26、东农 34 品种上 61A76 单独接种时回收率为 40—50%。而在 61A76 与 110 混菌时,回收率为 30%。而在丰收 10、绥农 4、合丰 23 号等品种上,61A76 单独接种时回收率为 30—50%,而在混菌时只为 10%。可见,61A76 对黑农 26 大豆品种侵染率高,接种增产效果好。据全省 17 个中间试验点对 5 个菌种进行比较试验说明,61A76 对黑农 26 号大豆增产效果最好(表 4)。

表 3 61A76 大豆根瘤菌单独和混菌时的血清回收率

| 试验地点 | 61A76 回收率 % | 61A76 增产 % | 61A76 + 110 回收率 % | 61A76 + 110 增产 % | 大豆品种 |
|--------|-------------|------------|-------------------|------------------|------|
| 汤原农技中心 | 30 | 3.8 | 10 | 20 | 农家种 |
| 林口县五星乡 | 10 | 1.3 | 10 | -5.7 | 合丰23 |
| 巴彦县农技站 | 40 | 4.0 | 30 | 2.3 | 黑农26 |
| 宾县乌河乡 | 50 | 12.1 | 30 | 16.2 | 黑农26 |
| 依安县农科所 | 50 | 21.0 | 10 | 15.8 | 丰收10 |
| 绥化市农科所 | 30 | 11.1 | 10 | 7.9 | 绥农4 |
| 海伦县长发乡 | 30 | 10.1 | 30 | 13.6 | 东农34 |

因此,在生产上应考虑菌种与大豆品种的适宜组合,这样才能发挥出根瘤菌的增产效果。

表 4 不同菌种在黑农 26 号大豆上的增产效果 (17 个试验点平均)

| 菌种 | 亩增产 (斤) | 亩增产 (%) |
|-----------------|---------|---------|
| 61A76 | 29.0 | 8.5 |
| 2028 | 20.5 | 5.9 |
| B ₁₅ | 15.7 | 4.5 |
| 110 | 12.4 | 2.6 |
| E ₄₅ | 9.5 | 2.6 |

结 论

1. 应用根瘤菌免疫血清可评价根瘤菌接种的有效性。在一般情况下,血清回收率高的地方,大豆接种根瘤菌的增产效果也高。

2. 加大接种量,可以提高血清的回收率。因此,大豆接种根瘤菌每亩以 0.5—1.0 斤为宜。

3. 不同根瘤菌菌种对不同大豆品种有一定的亲合力。因此,在生产上应选择根瘤菌与大豆品种适宜的组,这样才能充分发挥根瘤菌的增产效果。

参 考 文 献

1. D. F. Weber 等:美国农业部对大豆—根瘤菌共生的一些研究,生物固氮,科学技术文献出版社重庆分社,1975,91—95。
2. R. A. Date, 豆科植物接种和结瘤中的微生物学问题,澳大利亚生物固氮讲习班,1980。
3. 葛诚等:土著大豆根瘤菌的田间侵染动态及其在不同大豆品种上的分布观察,中国土壤学会论文集(下册),1983,61。