

木麻黄弗兰克氏菌的菌剂类型与保藏方法对接种效果的影响*

康丽华¹⁾ 李素翠¹⁾ 彭耀强²⁾ 刘玉焱²⁾ 陈华成²⁾ 罗成就²⁾

(1) 中国林业科学研究院热带林业研究所, 510520, 广州; 2) 广东省林业厅, 510173, 广州;
第一作者 44 岁, 女, 副研究员)

摘要 用弗兰克氏菌(*Frankia*) 9022 菌株和 287 菌株的 3 种菌剂类型、2 种保藏方法对木麻黄苗木接种效果影响的研究结果表明: 9022 菌株的 3 种菌剂类型以室温保藏 6~9 个月的蛭石菌剂的接种效果最好, 287 菌株则以 4 保藏 6~9 个月的干海藻酸钙菌剂的接种效果最好, 其苗高生长、生物量、结瘤量和侵染率最高。室温保藏的 9022 菌株和 287 菌株的干海藻酸钙菌剂接种效果最差。应用 MPN 方法测定了经过 24 个月室温保藏的 9022 菌株蛭石菌剂的活菌数量为 4.8×10^3 个 $\cdot g^{-1}$ 。

关键词 弗兰克氏菌剂; 保藏; 接种效果
分类号 S718.81

当前, 世界上的人口、资源、环境已成为举世瞩目的问题, 微生物制剂在持续发展的农、林业中的应用无疑将占有愈益重要地位, 因为它不但有利于产量和品质的提高, 而且能够减缓环境污染。目前研究和应用较多的有根瘤菌剂、固氮菌剂等^[1], 但对弗兰克氏菌(*Frankia*) 菌剂研究较少。弗兰克氏菌与木麻黄共生固氮, 对提高木麻黄生长和林地土壤改良具有重要意义^[2]。进行大面积的人工接种迫切需要应用简便、携带方便的优良菌剂。本文研究了弗兰克氏菌的 3 种菌剂类型、2 种保藏温度及不同保藏时间对苗木接种效果的影响, 旨在为弗兰克氏菌剂生产提供科学依据。结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 弗兰克氏菌株来源及菌体的培养

供试菌株 JCT 287 从澳大利亚细枝木麻黄(*Casuarina cunninghamiana* Miq) 根瘤中分离获得^[3]; 弗兰克氏 9022 菌株从本所苗圃粗枝木麻黄(*C. glauca* Sieber) 根瘤中分离获得^[2]。弗兰克氏菌的大量培养采用 Bap^[4]培养基和通气培养法^[5], 25 培养 14 d 后用来制备菌剂。

1.2 菌剂制备

1.2.1 海藻酸钙胶囊菌剂 将培养好的弗兰克氏菌用海藻酸钙溶液包埋, 使之成为直径 0.5~0.7 cm 的球形颗粒^[6], 在 Bap 培养液培养 10 d 后, 自然风干成干菌剂备用。

1.2.2 草炭菌剂 草炭经 60 号土壤筛(筛孔为 0.25 mm), 每个塑料袋装 8 g, 121 高温灭菌 1 h 待冷却后加入上述培养的弗兰克氏菌悬液 8 mL, 混匀后封口, 放室温培养 10 d 备用。

1.2.3 蛭石菌剂 蛭石经 10 号土壤筛(筛孔为 2 mm), 每个塑料袋装 8 g, 121 高温灭菌

* 本文属广东省林业厅项目“木麻黄根瘤菌——弗兰克氏菌应用研究”课题(1993~1997 年)和中国林科院基金项目“木麻黄根瘤菌——弗兰克氏菌的应用生态学研究”课题(1993~1995 年)的一部分。参加工作的还有热林所郑翠梅同志。
1998-08-15 收稿。

1 h待冷却后加入上述培养的弗兰克氏菌悬液 8 mL, 混匀后封口, 放室温培养 10 d 备用。

1.3 菌剂保藏方法

将上述的海藻酸钙胶囊菌剂、草炭菌剂和蛭石菌剂分别于 4℃ 冰箱和室温条件下保藏, 在保藏 3、6、9、12、24 个月时, 分别接种到木麻黄苗木根系。

1.4 苗木培育方法

接种采用木麻黄无性系苗木, 每次接种的无性系插条均采自本所苗圃同一株普通木麻黄 (*C. equisetifolia* Miq), 生根方法用小枝水培法^[7], 待插条的根长至 2~3 cm 时移入装有经 121℃ 高温灭菌的蛭石和沙(体积比为 1:1)的塑料育苗容器, 每个塑料育苗容器移 1 株苗。

1.5 菌剂的接种方法

分别取出经不同时间、不同方法保藏的草炭菌剂、蛭石菌剂 3 袋, 混匀后, 每株苗木分别接种草炭或蛭石菌剂 1 g 或接种海藻酸钙胶囊菌剂 20 粒。每个处理重复接种 8 株苗。6 个月后发现苗木高生长、生物量、根瘤数量及质量。

1.6 菌剂弗兰克氏菌活菌计数

采用植物侵染试验的 MPN 方法(最大可能数法)测定在室温和冰箱保存 24 个月菌剂的弗兰克氏菌活菌数量^[8]。

2 结果与讨论

2.1 保藏方法对菌剂接种效果的影响

表 1 是室温和 4℃ 保藏 12 个月的 3 种菌剂类型接种苗木的结果, 表明不同的保藏方法影响菌剂的接种效果。其中室温条件下保藏的 9022 菌株的蛭石菌剂接种效果最好, 苗高生长、根瘤数量和质量、结瘤率、地上部分和地下部分及总生物量最高; 其次为草炭菌剂; 而 287 菌株则是草炭菌剂的接种效果最好, 其次为蛭石菌剂。9022 和 287 菌株的干海藻酸钙菌剂的接种效果最差。4℃ 保藏的 9022 和 287 菌株的干海藻酸钙菌剂其接种效果最好, 其次为蛭石菌剂; 草炭菌剂的接种效果最差。试验结果说明蛭石和草炭菌剂较适合在室温条件下保藏, 干海藻酸钙菌剂则较适合在 4℃ 条件下保藏。弗兰克氏菌的蛭石和草炭菌剂的保藏特性与根瘤菌菌剂较适合在低温保藏的特性有所不同, 这可能与弗兰克氏菌具有孢子的形态特征有关, 一般来说具有孢子的微生物对不良环境的抵御能力较强。据报道用无氮培养基在室温条件下保藏 6 a 的弗兰克氏菌仍然存活^[9]。

表 1 菌剂保藏方法与接种效果

菌株	菌剂类型	菌高/ cm		瘤数/ (个·株 ⁻¹)		瘤重/ (mg·株 ⁻¹)		地上部分/ (g·株 ⁻¹)		地下部分/ (g·株 ⁻¹)		总生物量/ (g·株 ⁻¹)		结瘤率/ %	
		4	室温	4	室温	4	室温	4	室温	4	室温	4	室温	4	室温
9022	蛭石	19.4	18.0	29	37	44.9	63.0	1.08	1.07	0.19	0.21	1.27	1.28	62.5	75.0
	草炭	17.3	18.4	20	31	42.7	44.8	0.66	0.83	0.17	0.17	0.83	1.00	42.9	75.0
	干海藻酸钙	17.8	16.4	16	12	45.8	41.3	0.91	0.68	0.27	0.19	1.18	0.87	50.0	37.5
287	蛭石	17.5	18.9	28	33	27.0	50.8	0.57	1.00	0.19	0.20	0.76	1.20	33.3	75.0
	草炭	19.1	19.6	46	29	31.2	48.6	1.05	1.14	0.15	0.17	1.15	1.31	62.5	85.7
	干海藻酸钙	21.7	17.3	40	1.5	63.2	21.3	1.59	0.60	0.20	0.21	1.79	0.81	85.7	25.0
对照	(不接菌)	14.2		2		0		0.56		0.15		0.71		0	

2.2 保藏时间对菌剂接种效果的影响

图 1 中 3 种菌剂类型在室温和 4℃ 保藏 3 个月时接种的苗木根瘤生物量很少; 9 个月时接种的苗木根瘤生物量最高; 保藏 12 个月时接种的苗木根瘤生物量已开始下降。根瘤生物量说明了苗木的结瘤情况, 同时也反映出不同菌剂类型弗兰克氏菌的存活情况, 结果表明弗兰克氏菌能够在草炭、蛭石和海藻酸钙载体中生长繁殖。

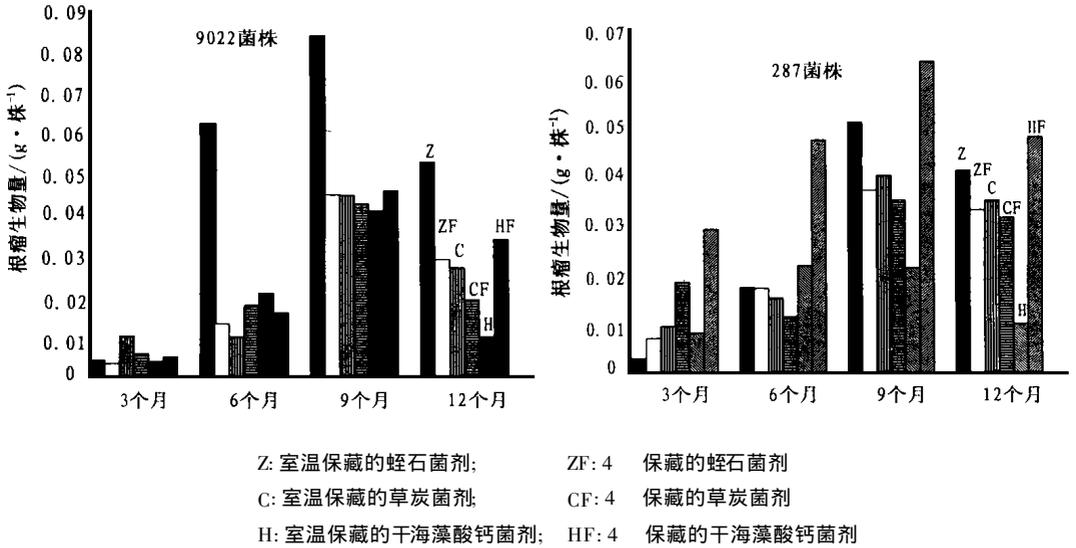


图 1 不同保藏条件下的 *Frankia* 菌剂对木麻黄苗木结瘤的影响

从图 2 可以看出, 除了 4℃ 保藏的干海藻酸钙菌剂在 6 个月后侵染率开始下降外, 其余菌剂在保藏 3 个月其侵染率就开始下降。随着保藏时间的延长, 侵染率明显下降; 其中室温保藏的干海藻酸钙菌剂侵染率下降最为明显。图 2 的结果表明菌剂随着保藏时间的延长, 菌体活

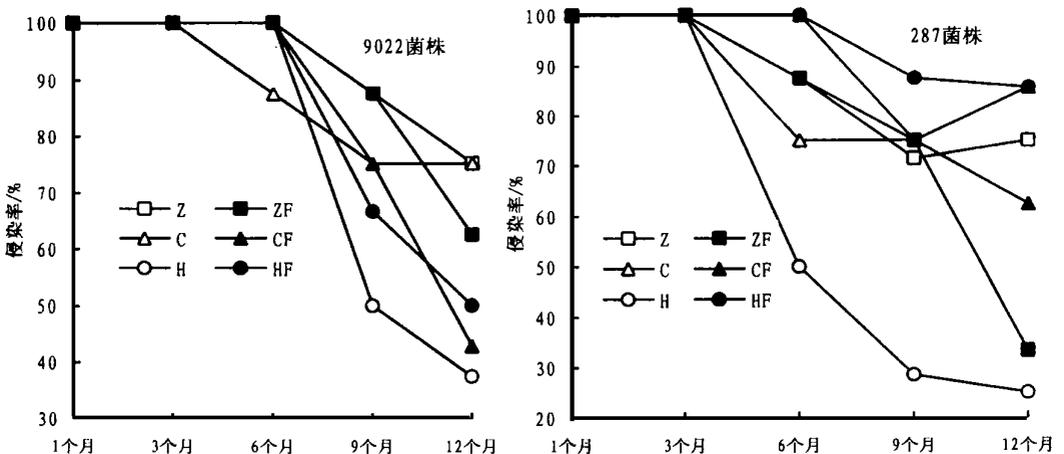


图 2 不同保藏条件下的 *Frankia* 菌剂对苗木侵染率的影响

(图注同图 1)

力下降致使侵染率明显下降。

2.3 菌剂类型与保藏条件的关系

从图1和图2的结果看出: 菌剂类型与保藏条件关系密切。室温保藏的蛭石菌剂和草炭菌剂接种木麻黄苗木其结瘤和侵染率较高; 而干海藻酸钙菌剂不但结瘤量最低而且侵染率也是最低, 说明在相同的保藏条件下不同的菌剂类型影响其苗木的接种效果。287菌株的干海藻酸钙菌剂4℃保藏时其苗木结瘤量和侵染率最高, 而在室温保存时其苗木结瘤量和侵染率则是最低, 说明保藏方法影响菌剂的接种效果。以上结果表明不同菌株及不同的菌剂类型应当选择各自合适的保藏方法。

2.4 不同菌剂弗兰克氏菌活菌的数量

应用MPN方法对室温和冰箱保藏24个月的9022菌株的菌剂进行活菌数量的检测, 结果见表2, 从中看出经过24个月的室温与4℃冰箱保藏的不同菌剂其活菌数量差异很大。室温保藏的蛭石菌剂活菌数量最多, 每克菌剂含有 4.8×10^3 个活的弗兰克氏菌; 其次为4℃冰箱保藏的蛭石菌剂, 室温保藏的干海藻酸钙菌剂活菌数量最少。

表2 保藏24个月的9022菌株不同菌剂类型活菌数量的分析

菌剂类型	保藏方式	活菌数量/(个·g ⁻¹)
蛭石	室温	4.8×10^3
	4	2.3×10^3
草炭	室温	5.8×10^2
	4	2.3×10^2
干海藻酸钙胶囊	室温	ND(数量极少)
	4	3.6×10^2

3 结 语

综上所述, 弗兰克氏菌9022菌株的3种菌剂类型以室温保藏6~9个月的蛭石菌剂其接种效果最好, 287菌株则以4℃保藏6~9个月的干海藻酸钙菌剂的接种效果最好。室温保藏的9022菌株和287菌株的干海藻酸钙菌剂接种效果最差。

参 考 文 献

- 1 吴薇, 葛诚. 我国微生物肥料生产和应用现状的调查研究. 微生物学通报, 1995, 22(2): 104~107.
- 2 康丽华. 木麻黄苗期接种弗兰克氏菌效应及其与营养元素的关系. 林业科学研究, 1994, 7(2): 129~132.
- 3 Shipton W A, Burggraaf A J P. Aspects of the cultural behaviour of *Frankia* and possible ecological implication. Can. J. Bot., 1983, 61: 2783~2792.
- 4 Murry M A. Growth kinetics and nitrogenase induction in frankia SP HFPPAr1 growth in batch culture. Plant and Soil, 1984, 78: 61~78.
- 5 康丽华. 木麻黄根瘤中分离的三株弗兰克氏菌生长与培养方法的研究. 林业科学研究, 1996, 9(1): 47~51.
- 6 Diem H G, Duhoux E, Simonet P, et al. Actinorhizal symbiosis biotechnology: The present and the future. In: Durand G, Bobichon L, Florent J, eds. Proceeding of the 8th International Biotechnology Symposium, Volume 2, Paris: Societe Francaise de Microbiologie. 1988, 984~995.
- 7 梁子超. 木麻黄抗青枯病小枝水培繁殖法. 林业科技通讯, 1986(5): 24~26.
- 8 伯杰森 F J 主编. 生物固氮研究法. 陈冠雄等译. 北京: 科学出版社, 1987. 222~227.
- 9 苏风岩. *Frankia* 菌种保藏. 微生物学报, 1994, 43(2): 148~151.

Effect on Inoculation of Forms and Storage Methods of *Casuarina Frankia* inoculum

Kang Lihua¹⁾ Li Sucui¹⁾ Peng Yaoqiang²⁾ Liu Yulin²⁾

Chen Huacheng²⁾ Luo Chengjiu²⁾

(1)The Research Institute of Tropical Forestry, CAF, 510520, Guangzhou, China;

2)Forestry Department of Guangdong Province, 510173, Guangzhou, China)

Abstract Significant advances have been made in the development of peat-based, vermiculite-based and alginate bead *Frankia* inoculum. Investigations of storage conditions for peat, vermiculite and alginate *Frankia* inoculum showed that the inoculant of *Frankia* 9022 in vermiculite maintained high viability and infectivity for up to 6 months when stored at room temperature; the inoculant of *Frankia* 287 in alginate bead maintained high viability and infectivity for up to 6 months when stored at 4 °C. Determination the number of potentially infective units for *Frankia* 9022 vermiculite inoculant of 24 months storage at room temperature were 4.8×10^3 /g inoculant.

Key words *Frankia* inoculum; storage; effect of inoculation