

文章编号 1000-5013(2004)03-0301-04

# 丛枝菌根真菌的增殖技术

王 晓 琴

(华侨大学材料科学与工程学院, 福建 泉州 362011)

**摘要** 对目前国内丛枝菌根真菌的主要增殖方法进行比较研究. 以三叶草作宿主植物, 采用单孢和多孢两种接种方法, 分别将摩西球囊霉、地表球囊霉、地球囊霉、缩球囊霉和网状球囊霉, 在土培、沙培、水培的条件下进行增殖. 收获后分别测定它们的侵染株率、侵入点的密度和侵染率. 研究表明, 三叶草是理想的宿主植物, 其在液培条件下丛枝菌根真菌侵染能力最高, 沙培法次之, 土培法最低, 摩西球囊霉和地表球囊霉对三叶草侵染能力较高.

**关键词** 丛枝菌根真菌, 三叶草, 增殖技术, 培养方法, 侵染能力

**中图分类号** Q 949.32 Q 93-335

**文献标识码** A

菌根是土壤中的真菌与植物根系的共生体, 这种共生现象在自然界普遍存在. 严格的讲, 大多数植物没有根系, 只有菌根. 其中, 接合菌纲 (*Zygomycetes*) 的部分真菌菌丝, 可在植物根细胞内形成丛枝状特殊变态结构, 因此我们把这种菌根称为丛枝菌根 (*Arbuscular mycorrhiza*, 简称 AM). 据统计, 地球上 90 % 的有花植物都形成丛枝菌根. 也就是说, 80 % 以上的陆生植物都能够与丛枝菌根真菌 (*Arbuscular mycorrhiza Fungus*, 简称 AMF) 形成共生体<sup>[1]</sup>. 研究表明, 丛枝菌根不仅可促进植物对营养元素的吸收, 还能提高植物的抗病、抗逆能力, 有利于植物的生长, 对农林业生产具有重要的意义. 然而, 丛枝菌根真菌目前还不能进行纯培养, 必须与植物共生才得以繁殖. 目前, 盆栽法仍是普遍应用和大力推广的一种方法. 盆栽法主要有土培法、沙培法和液培法 3 种形式. 本研究将 5 种丛枝菌根真菌在宿主植物三叶草上进行单孢接种和多孢接种, 比较不同培养条件下, 其侵染能力的差异; 探索菌根真菌的培养方法和接种方法的最佳结合, 从而, 发展丛枝菌根真菌的传统增殖技术.

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验容器及装置

三种方法均采用容积为 200 mL 的培养管, 使用前用质量分数为 0.003 的高锰酸钾溶液消毒 3 h, 然后经流水冲洗. 土培法和沙培法在培养架上进行, 液培法在专用的静止液培槽进行.

### 1.2 增殖宿主植物及 AMF 供试菌种

增殖宿主选用牧草植物红三叶草 (*Trifolium pratense* L.). 供试菌种分别是摩西球囊霉 (*G. mosseae* Gerdemann & Trappe)、地表球囊霉 (*G. versiforme* Berch)、地球囊霉 (*G. geosporum* Walker)、缩球囊霉 (*G. constrictum* Trappe)、网状球囊霉 (*G. reticulatum* Bhattacharjee & Mukerji)

### 1.3 孢子和种子的表面消毒

将孢子浸泡在质量分数为 0.02 的氯胺 T 和 200 mg L<sup>-1</sup> 链霉素溶液中 15 min, 用无菌水冲洗数次. 将三叶草种子用体积分数 0.75 的酒精进行表面消毒, 然后用无菌水反复冲洗, 置于催芽箱中催芽.

### 1.4 供试基质及营养液

**收稿日期** 2004-01-12

**作者简介** 王晓琴 (1977-), 女, 助教, 硕士, 主要从事丛枝菌根真菌的生态生理及增殖技术的研究. E-mail: wangxiaojin77@sohu.com

土壤采自西北农林科技大学林学院苗圃地的垆土,经 2 mm 筛过筛,湿热灭菌 3 h 并放置 2 d 后备用.取建筑用河砂经 3 mm 筛过筛后,流水冲洗直到洗液不再浑浊为止,干热灭菌 2 h,备用.营养液采用修改的 Hoagland 营养液,配方如表 1 所示<sup>[2]</sup>.表中  $C_1$  为母液浓度, $C_2$  为营养液浓度.

1.5 培养方法

本研究采用土培法、沙培法、液培法 3 种培养方法.土培法以土壤为基质,沙培法和液培法以河砂为基质.以三叶草为宿主培养上述 5 种丛枝菌根真菌,每个培养处理下采用单孢接种、多孢接种两种接种方法(对照除外).共设 30 个处理,每个处理均重复 10 次.

1.6 管理方法

土培法和沙培法的培养管放置在生长室内的培养架上,土培法用手动喷雾器喷水,沙培法每 14 d 用半强度的营养液浇灌 1 次.培养过程中,注意调换培养管的位置.液培法的培养管放在静止培养台上,向培养槽内加入大量元素减少至 10 % 的营养液.培养液的深度以浸没培养管 1/3 为宜.在培养过程中,当液面降至 1/4 时,补加半强度对应营养液至 1/3 处.生长期间温度维持在 20 ~ 28 ℃,每天光照时间为 15 h.早晨 8 00 到晚上 23 00 采用日光灯补充光照.7 d 后定苗,每管择优留苗 3 株,将其余植株的地上部分剪去.

1.7 收获及测定

培养 84 d 后,分别收获三叶草的地上和地下部分,基质保留待筛取孢子.分别测定侵染株率( $i_1$ )、侵入点的密度( $k$ )和菌根侵染率( $i_2$ )<sup>[3]</sup>3 个指标,其单位每厘米根系长度侵入点的个数.

2 结果与分析

2.1 侵染株率的测定

2.1.1 接种方法对侵染株率的影响 采用单孢接种和多孢接种两种接种方法,5 种丛枝菌根真菌都侵染了三叶草.但是,侵染株率却存在明显的差异(表 2),5 种丛枝菌根真菌均为多孢接种高于单孢接种.由于两种接种方法接种的孢子数量不同,所以多孢接种具有数量优势.尽管厚垣孢子具有顽强的生命力,但是在土培条件下,用 *G. reticulatum* 单孢接种三叶草,约 4/5 的孢子丧失了生命力或侵染能力.而在液培条件下,*G. versiforme* 单孢接种取得了非常成功的接种效果,侵染株率高达 50.2 %.在试验测定的过程中发现,同一培养器中的 3 株植物的侵染状况通常保持一致,即都被感染或都未被感染.所以,侵染株率也可以作为评价单孢接种物的质量指标.多孢接种提高了侵染株率,尤其是在土培条件下更为显著.总体来看,侵染株率与接种的孢子数量正相关,但不是线性关系.单孢接种和多孢接种是在科研和生产中常用的两种接种方法.单孢接种多用于菌种纯化,多孢接种多用于真菌增殖.本研究采用两种接种方法,目的是比较两者在丛枝菌根真菌增殖所带来的差异程度.

表 2 不同培养方法下 AMF 在三叶草上的测定结果

培养法		<i>G. mosseae</i>			<i>G. versiforme</i>			<i>G. geosporum</i>			<i>G. constrictum</i>			<i>G. reticulatum</i>		
		$i_1$ / (%)	$k$	$i_2$ / (%)	$i_1$ / (%)	$k$	$i_2$ / (%)	$i_1$ / (%)	$k$	$i_2$ / (%)	$i_1$ / (%)	$k$	$i_2$ / (%)	$i_1$ / (%)	$k$	$i_2$ / (%)
土培	单孢	33.2	5	24.4	27.6	6	25.8	23.2	4	19.8	22.3	3	20.6	21.7	3	12.4
	多孢	100.0	10	51.3	100.0	11	50.2	88.3	9	47.7	61.7	7	44.5	59.3	8	39.2
沙培	单孢	35.6	7	30.5	34.4	9	27.6	29.8	6	25.4	26.5	5	19.6	28.4	6	20.8
	多孢	100.0	13	68.2	100.0	14	62.9	92.9	11	54.3	76.9	9	42.3	79.0	8	45.6
液培	单孢	45.7	13	38.6	50.2	12	35.7	38.6	10	34.1	33.2	8	23.9	32.6	9	23.4
	多孢	100.0	15	79.5	100.0	16	75.2	95.0	14	64.6	86.7	12	49.8	85.4	14	58.7

2.1.2 培养方法对侵染株率的影响 在 3 种培养方法中,参试的 5 个菌种都在三叶草上保持了较高的侵染能力,但侵染株率因培养方法的不同呈现显著差异,表 3 所示.由表 3 可知,由高到低依次是液培法、沙培法、土培法.液培法和沙培法都采用有机质含量极低的河沙,透气性能好,且营养液采用专用配方,降低了大量元素尤其是 P 的含量.这些措施可为孢子萌发提供了更好的条件.但是,在试验期间,沙培法较难管理,河沙的保水性能极差,在生长期光照较强的情况条件下,非常容易发生烧苗现象.与液培法相比,宿主植物生长也较差,可能间接影响了丛枝菌根真菌的侵染能力.在液培条件下,5 个菌种的侵染株率都较高,采用单孢接种表现更为明显.

表 3 测定结果方差分析表( =0.05)

指 标	方差来源	自由度 (单/多)	临界值 (单/多)	离差平方和		均方误差		F 值		显著性	
				单	多	单	多	单	多	单	多
1/ (%)	培养条件	2	3.11	97.7	688.0	48.9	34.4	62.4	46.9	* *	* *
	菌种	4	2.81	30.9	38.9	7.7	9.7	9.9	13.3	* *	* *
	误差	8	-	6.3	5.9	0.8	0.7	-	-	-	-
	总和	14	-	134.9	113.6	-	-	-	-	-	-
k	培养条件	2	3.11	97.7	688.0	48.9	34.4	62.4	46.9	* *	* *
	菌种	4	2.81	30.9	38.9	7.7	9.7	9.9	13.3	* *	* *
	误差	8	-	6.3	5.9	0.8	0.7	-	-	-	-
	总和	14	-	134.9	113.6	-	-	-	-	-	-
2/ (%)	培养条件	2	3.11	281.7	907.2	140.8	453.6	20.3	20.1	* *	* *
	菌种	4	2.81	335.1	984.7	83.8	246.2	12.1	12.6	* *	* *
	误差	8	-	55.5	180.6	6.9	22.6	-	-	-	-
	总和	14	-	672.3	2 072.5	-	-	-	-	-	-

2.1.3 菌种对侵染株率的影响 5 种丛枝菌根真菌单孢接种的侵染株率差异显著(表 3).5 个菌种从大到小依次是,土培方法: *G. mosseae* > *G. versiforme* > *G. geosporum* > *G. constrictum* > *G. reticulatum*.沙培方法: *G. mosseae* > *G. versiforme* > *G. geosporum* > *G. reticulatum* > *G. constrictum*.液培方法: *G. versiforme* > *G. mosseae* > *G. geosporum* > *G. constrictum* > *G. reticulatum*.其中, *G. versiforme* 和 *G. mosseae* 在 3 种培养条件都表现出较高的侵染能力,这也为在三叶草上筛选优良菌种提供了参考.多孢接种由于孢子数量优势而减小了各个菌种间的差异,但仍符合上述排序.侵染株率是在一定条件下衡量某个菌种的侵染能力的一项指标.丛枝菌根真菌孢子的萌发和侵染能力受培养条件的影响,但主要由菌种的本身遗传和生理特性决定的,当然也包括和宿主植物之间的亲和性.

2.2 AMF 在三叶草上形成侵入点的能力

丛枝菌根真菌进入根内的部位称为侵入点.不同培养方法、不同接种方法和不同丛枝菌根真菌在三叶草上形成侵入点的能力不同,如表 2 所示.当菌丝与根表皮或根毛接触时,就形成一个向外突起的类似附着胞的结构,然后进入根内.由于受到根细胞的阻力,侵入的菌丝通常变粗.侵入点部位的菌丝一般染色都比较深,在细胞内或间隙呈“之”字形,或出现卷曲现象.侵入点的数量多少主要取决于植物、菌根真菌和土壤特性.单位根系长度侵入点的数量可作为测定丛枝菌根真菌侵染势大小的指标之一.在测定过程中发现,整株根系上不同部位的侵入点数量不同,分级次数越高的根系侵入点越多.如土培条件下,多孢接种 *G. geosporum* 在主根上侵入点数量为 0 个,在一级侧根上的侵入点上的侵入点数量为 6 个,而在二级侧根上的侵入点达数量为 10 个.在本研究中可观察到,AMF 在根尖上不存在免疫区,可以扩展到整个根尖分布区,这与 1992 年 Smith 等<sup>[4]</sup>的观察结果相符.不同培养条件下,各参试菌种在三叶草单位长度根系上的侵入点数量显著不同(表 3).以多孢接种为例,在液培条件下,侵入点的数量最高, *G. versiforme* 可达 16 个,沙培法次之,土培法最低.仅为每 cm 根系长度 7 个.单孢接种和多孢接种对侵入点数量的影响程度与培养方法有关,土培方法差异最大,沙培次之,液培法最低.根系上所形成的单位根系长度侵入点的数量与植物种类和真菌种类有关.各菌种的侵入点数量从大到小排序为 *G. versiforme* > *G. mosseae* > *G. geosporum* > *G. reticulatum* > *G. constrictum*.

2.3 AMF 对三叶草的侵染能力

2.3.1 接种方法对侵染率的影响 侵染率是衡量丛枝菌根真菌在宿主植物根系扩展能力的重要指标.

某一菌种侵染率越高,说明其在宿主根系上扩展的能力越大.不同培养方法、不同接种方法和不同丛枝菌根真菌对三叶草根系的侵染率,如表 2 所示.多孢接种和单孢接种两种接种方法所用接种物的数量不同,多孢接种比单孢接种侵染率更高.在测定的过程中还发现,即使在同等的侵染率条件下,多孢接种的根段上的菌体密度远远高于单孢接种.

2.3.2 培养方法及菌种对侵染率的影响 在 3 种不同的培养方法,不同菌种的侵染率差异显著(表 3).液培条件下,各参试菌种的侵染能力都得到了提高.土培和沙培对各参试菌种的侵染率影响不一致.总体来看,沙培条件下,AMF 的扩展能力更高,但 *G. versiforme* 在沙培条件下侵染率仅比在土培条件下高 1.8%,而 *G. constrictum* 在土培条件下,侵染率达 23.9%,高于沙培法,*G. mosseae* 沙培法高于土培法.可能是土壤中含有的某种元素对其发育发挥着重要的作用.由此可见,培养方法和菌种作为一个组合共同影响着侵染率.根据菌种不同,选用适合的培养方法,以便更好的指导生产.

### 3 结束语

侵染株率、侵入点的密度和侵染率,都是用来表征丛枝菌根真菌在宿主植物上的侵染能力的大小的重要指标.从以上研究结果可以看出,三叶草是理想的增殖丛枝菌根真菌的宿主,5 个菌种都对其进行了较高程度的侵染.多孢接种具有显著的数量优势,摩西球囊霉、地表球囊霉对三叶草表现出更高的亲和性.从提高丛枝菌根真菌对宿主植物的侵染率这一角度来讲,液培法表现出显著的优越性,沙培法次之,土培法最差.然而,土培法成本较低,较易管理,在大田推广中应用较为广泛.

### 参 考 文 献

- 1 李晓林,冯 固.丛枝菌根生态生理[M].北京:华文出版社,北京:2001. 4~5
- 2 刘润进,李晓林丛枝菌根及其应用[M].北京:科学出版社,北京:2000. 70~71
- 3 Biermann B, Linderman R G. Quantifying vesicular-arbuscular mycorrhizas: A proposed method towards standardization[J]. New Phytol., 1981, 87:63~67
- 4 Smith S E, Dickson S, Walker N A. Distribution of VA mycorrhizal entry points near the root apex: Is there an uninfected zone at the root tip of leek or clover[J]. New Phytologist, 1992, 122(3):469~477

## Propagation Technology of AMF

Wang Xiaoqin

(College of Mater. Sci. & Eng., Huaqiao Univ., 362021, Quanzhou, China)

**Abstract** A comparative study is made on the main propagation technology of *Arbuscular mycorrhizal Fungus* (AMF) in domestic labs at present. Take clove (*Trifolium pratense*) as host plant and adopt single spore and multi-spore methods of inoculation. Let *G. mosseae*, *G. versiforme*, *G. geosporum*, *G. constrictum* and *G. reticulatum* be multiplied under the conditions of soil, sand and nutrition liquid cultivation respectively. After harvest, determine respectively the rate of plants infected, the density of infection points and the infection rate. As shown by results of research, clove is an ideal host plant; the infection ability of AMF is the highest under sand-cultivation liquid-cultivation, the second under sand-cultivation, and the last under soil-cultivation; *G. mosseae* and *G. versiforme* have higher infection ability.

**Key words** *Arbuscular mycorrhizal Fungus*, clove, propagation technology, cultivation method, infection ability