

文章编号 1000-5013(2005)03-0259-04

# 丛枝菌根真菌的增殖技术比较分析

王 晓 琴

( 华侨大学材料科学与工程学院, 福建 泉州 362011 )

**摘要** 以三叶草作宿主植物, 采用单孢接种和多孢接种, 接种摩西球囊霉、地表球囊霉、地球囊霉、缩球囊霉和网状球囊霉, 在土培、沙培和液培 3 种条件下进行增殖. 收获后分别测定丛枝着生率、孢囊的数量和产孢量等重要的生产指标. 研究表明, 土培法、沙培法、液培法都可用来生产接种剂, 但生产效果存在显著差异, 所测定的各个指标在液培条件下都较高, 沙培法次之, 土培法最低. 参试的 5 个菌种都对三叶草表现出亲和性, 其中摩西球囊霉和地表球囊霉各项指标都较高, 适于生产菌剂; 多孢接种较单孢接种具有显著的数量优势, 单孢接种可用于菌种纯化.

**关键词** 丛枝菌根真菌, 三叶草, 增殖技术, 多孢接种, 单孢接种

**中图分类号** Q 949.320.3; Q 93-335

**文献标识码** A

据统计, 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. 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<sup>[1]</sup>. 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. 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发育繁殖能力的差异, 探索菌根真菌培养方法和接种方法的最佳结合, 发展丛枝菌根真菌传统增殖技术.

## 1 材料与方法

### 1.1 试验容器及装置

3 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, 然后流水冲洗. 土培法和沙培法在培养架上进行; 液培法采用专用的静止液培槽.

### 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. ). AMF 的供试菌种有, 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

将孢子浸泡在体积分数为 0.02 的氯氨 T 和  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  链霉素溶液中 15 min, 然后用无菌水冲洗数次. 将三叶草种子用体积分数为 0.75 的乙醇进行表面消毒, 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

土壤采自西北农林科技大学林学院苗圃地的垆土, 过 2 mm 的筛, 湿热灭菌 3 h 并放置 2 d 后备用. 取建筑用河砂过 3 mm 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<sup>[2]</sup>, 配方参见文[3].

收稿日期 2004-09-27

作者简介 王晓琴(1977), 女, 助教, 硕士, 主要从事丛枝菌根真菌增殖技术的研究. E-mail: wangxiaojin77@sohu.

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, 另设对照. 每个培养处理下采用两种接种方法, 单孢接种、多孢接种, 对照除外. 共设 30 个处理, 3 个对照, 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 2 d 用半强度的营养液浇灌一次. 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, 使营养液质量分数减少到 0. 10. 培养液的深度以浸没 1/3 培养管为宜, 在培养过程中, 及时补加半强度对应营养液. 生长期间温度维持在 20~ 28 ℃, 光照时间为每天 15 h. 每天 8 点到 23 点, 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<sup>[4]</sup>

培养 105 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. 测定丛枝形成率  $\eta$ 、每厘米根段孢囊数量  $k_1$ (个)、每个培养管产孢量  $k_2$ (个).

2 结果与分析

2.1 AMF 在三叶草上形成丛枝和孢囊的能力

丛枝是真菌侵入植物根系皮层细胞后, 其菌丝连续二分叉式生长, 形成所谓的树枝或花椰状结构. 丛枝结构是确定丛枝菌根真菌侵染根系形成共生的必要条件, 所有的丛枝菌根真菌侵染根系都能形成丛枝. 从功能来看, 丛枝是真菌和植物之间物质交换的场所. 试验中观察到, 一些丛枝结构几乎占据了整个细胞, 而大部分只占据了细胞中很小的空间(不到 1/3). 孢囊由菌丝顶端(也可间生)膨大成的球形、圆柱形、椭圆形结构, 可在根系皮层细胞内或细胞间生长发育, 直径为 30~ 50  $\mu\text{m}$  或 80~ 100  $\mu\text{m}$ . 并非所有的丛枝菌根真菌都能产生孢囊, 但本研究中所选用的 5 个菌种都可产生孢囊. 试验中观察到不同属种的丛枝菌根真菌, 往往形成不同形态、大小和数量的孢囊. 有研究表明, 具有孢囊的根段可作为接种物用, 而不形成根内孢囊的侵染根段则无侵染能力. 从形成菌根的根段中分离出的孢囊仍保持较高的侵染势, 而菌丝则不能. 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根系的丛枝着生率和孢囊数量, 如表 1 所示.

表 1 不同培养条件下 AMF 在三叶草上发育繁殖状况的测定结果

培养方法		<i>G. mosseae</i>			<i>G. versiforme</i>			<i>G. geosporum</i>			<i>G. constrictum</i>			<i>G. reticulatum</i>		
		$\eta$ (%)	$k_1$ /个	$k_2$ /个	$\eta$ (%)	$k_1$ /个	$k_2$ /个	$\eta$ (%)	$k_1$ /个	$k_2$ /个	$\eta$ (%)	$k_1$ /个	$k_2$ /个	$\eta$ (%)	$k_1$ /个	$k_2$ /个
土培	单孢	18. 2	7	—	16. 7	6	—	11. 2	4	—	8. 1	2	—	5. 8	3	—
	多孢	36. 3	13	103	33. 8	12	97	30. 0	9	86	28. 2	7	64	23. 3	7	43
沙培	单孢	23. 1	10	—	20. 9	11	—	17. 6	5	—	11. 8	4	—	13. 2	6	—
	多孢	53. 2	18	132	50. 1	20	137	39. 4	13	97	26. 8	9	72	28. 3	10	87
液培	单孢	36. 3	12	35	34. 5	14	28	25. 2	11	24	16. 5	6	—	23. 7	8	20
	多孢	63. 2	25	185	59. 8	29	196	57. 6	21	156	33. 4	15	118	44. 1	18	120

2.1.1 接种方法对丛枝形成和孢囊数量的影响 单孢接种和多孢接种丛枝菌根真菌都形成了丛枝和孢囊, 但在数量上差异较大, 如表 1 所示. 采用单孢接种的一些植株, 其根段被侵染, 在显微镜下可以观察到入侵点, 根外菌丝、胞间菌丝, 甚至胞内菌丝, 却未见丛枝结构的形成. 此时, 丛枝菌根真菌和植物的共生关系尚未建立, 可以说两者暂时是寄生关系, 真菌对植物的有益作用微乎其微. 这种现象与菌种有关, 它主要发生在一些侵染率较低的菌种, 如 *G. constrictum* 和 *G. reticulatum*. 另外, 它与孢子的发育密切相关, 而且多发生在土培条件下. 这可能是在液培条件下, 合理的营养促进了孢子的发育. 这种“寄生”关系持续的越久, 对植物的生长越不利. 未形成孢囊的根段不能用作接种物, 鉴于此, 采用单孢接种方法生产接种剂. 一方面考虑培养条件, 比如合理补加营养元素, 促进真菌在植物根系内的发育; 另一方面, 可以适当延长培养时间. 从这两个指标来看, 多孢接种优于单孢接种, 但多孢接种的效果并不是单孢接种的简单加和, 这说明接种的多个孢子之间, 可能存在空间竞争或抑制作用. 接种效果和接种孢子数量

之间, 一定存在最佳的平衡.

2.1.2 培养方法及菌种对丛枝形成和泡囊数量的影响 培养方法对丛枝和泡囊形成的趋势大致相同. 以 *G. versiforme* 为例, 在液培条件下, 丛枝侵染率和泡囊数量皆最高, 沙培次之, 土培最低, 且差异显著, 如表 2 所示. 但也有例外, 如土培条件下 *G. reticulatum* 丛枝侵染率高于沙培, 但泡囊密度在沙培条件下较高. 这说明丛枝和泡囊两者的形成互相没有影响. *G. versiforme* 在液培条件下, 每厘米长的根段上形成 29 个泡囊, 高于其他各菌种, 尽管它的丛枝侵染率在同样培养条件下低于 *G. mosseae*. 不同菌种在三叶草根系内, 形成丛枝和泡囊的能力差异均显著(表 2). 丛枝着生率从大到小依次为 *G. mosseae*, *G. versiforme*, *G. geosporum*, *G. constrictum*, *G. reticulatum*(土培); *G. mosseae*, *G. versiforme*, *G. geosporum*, *G. reticulatum*, *G. constrictum*(沙培和液培). 泡囊数量从大到小依次为 *G. mosseae*, *G. versiforme*, *G. geosporum*, *G. reticulatum*, *G. constrictum*(土培); *G. versiforme*, *G. mosseae*, *G. geosporum*, *G. reticulatum*, *G. constrictum*(沙培和液培). 试验中发现, 菌根侵染率和丛枝侵染率的各菌种变化较一致, 而泡囊密度却与它们差异较大. 这可能是因为泡囊作为“繁殖器官”, 与丛枝和内生菌丝这些“营养器官”在各菌种形成的过程和能力不同.

表 2 测定结果方差分析表

指标	方差来源	自由度	临界值	平方和		均方误差		F 值		显著性	
		单/多	单/多	单	多	单	多	单	多	单	多
$\eta$ (%)	培养条件	2	4.46	598.3	1 140.9	299.1	570.4	52.4	20.0	*	*
	菌种	4	3.84	429.8	1 085.9	107.4	271.5	18.8	9.5	*	*
	误差	8	—	45.6	227.9	5.7	28.5	—	—	—	—
	总和	14	—	1 073.7	2 454.7	—	—	—	—	—	—
$k_1$ /个	培养条件	2	4.46	84.1	368.5	42.1	184.3	31.9	64.7	*	*
	菌种	4	3.84	86.3	225.6	21.6	56.4	16.4	19.8	*	*
	误差	8	—	10.5	22.8	1.3	2.9	—	—	—	—
	总和	14	—	180.9	616.9	—	—	—	—	—	—
$k_2$ /个	培养条件	2	4.46	1 526.5	15 056.5	763.3	7 528.3	13.2	68.5	*	*
	菌种	4	3.84	231.7	9 995.7	57.9	2 498.9	1.0	22.7	—	*
	误差	8	—	463.5	879.5	57.9	109.9	—	—	—	—
	总和	14	—	2 221.7	25 931.7	—	—	—	—	—	—

2.2 AMF 在三叶草上的产孢量测定

丛枝菌根真菌的厚垣孢子, 具有顽强的生命力. 其不仅是分类鉴定工作的重要依据, 而且是丛枝菌根真菌的主要繁殖体. 测定结果如表 2 所示.

2.2.1 接种方法对产孢量的影响 单孢接种和多孢接种对产孢量的影响是非常显著的. 本研究培养期短, 在土培、沙培条件下, 由于初接种物太少, 单孢接种的产孢量极低, 每个培养管最高仅达 9~12 个, 在此忽略不计. 但这并不说明单孢接种不能用于使丛枝菌根真菌得到增殖. 这些少量的孢子可以重复侵染宿主, 如此循环下去, 最终也可得到高纯度大量接种物. 这也正是单孢接种接种在科研和小规模生产中广泛应用的原因. 本研究中, 多孢接种在培养期内产孢量较高, 如 *G. mosseae* 在液培条件下, 每个培养管产孢达 185 个, 达到了我们在短期内快速增殖孢子的目的. 所以, 当对纯度要求不高, 而需大量接种物时, 应考虑采用这种接种方法. 在一定范围内, 接种的孢子越多, 产孢量越高, 培养时间越长, 产孢量也越高. 因此, 在一定条件下, 最大产孢量与最少接种孢子数, 最短培养时间与最大产孢量之间都存在着一个最优组合.

2.2.2 培养方法对产孢量的影响 培养条件主要通过两方面来影响丛枝菌根真菌的产孢量. (1) 在不同培养条件下, 丛枝菌根真菌的侵染发育能力不同; 而某一菌种在宿主植物根系上侵染率时, 其产孢量相应就高. (2) 在不同培养条件下, 植物的生长存在差异, 尤其是根系的长度对产孢量有着间接的影响. 所以, 综合分析表明, 3 种培养条件下的产孢量排序是液培法>沙培法>土培法, 且差异显著.

2.2.3 菌种对产孢量的影响 丛枝菌根真菌的产孢量, 主要取决于真菌本身产孢的生物学特性及宿主植物的亲和性. 所以, 菌种对产孢量起着决定性的影响. 从表 2 可以看出, *G. versiforme* 产孢量较高, *G.*

*mosseae* 次之, *G. geosporum* 高于 *G. rectilatum* 和 *G. constrictum*. 后两者产孢能力差异不明显, 且随培养条件有所改变. 如果仅从产孢量来看, 前三者是我们在三叶草上生产接种物首选的菌种. 而且, 从其他两种菌种在不同培养条件下的产孢量来看, 我们在扩繁丛枝菌根真菌孢子、生产丛枝菌根真菌菌剂时, 一定要同时考虑到宿主、菌种和培养条件.

2.3 3 种培养方法生产成本的比较

在实际生产中, 土培法和沙培法完全可以不用任何容器, 基质平铺在所选场地即可进行. 而液培法不仅需要培养器, 还需要做专用的液培槽. 沙培法和液培法均需多种化学药品, 来配制大量培养液. 所以, 从生产成本来看, 液培法花费的人力、物力远远大于土培法和沙培法. 如果仅一次性使用, 建立液培系统是一种劳民伤财的做法. 在进行大规模生产时, 不仅要考虑待选方法的优越性, 更要结合具体情况, 兼顾生产成本.

3 结束语

本研究证实生产效果与接种的孢子量不存在线性关系, 多孢接种的生产效果不是单孢接种的简单加和. 本研究结合当前实际生产现状, 选择了 3 种培养方法进行了比较, 并在三叶草上筛选了增殖丛枝菌根真菌的优良菌种, 基本达到了研究的最初目的.

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, 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, 2000. 70~ 71  
3 王晓琴. 丛枝菌根真菌的增殖技术[ J]. 华侨大学学报( 自然科学版), 2004, 25( 3): 301~ 302  
4 Biermann B, Linderman R G. Quantifying vesicular *Arbuscular mycorrhizas*: A proposed method towards standardization[ J]. New Phytol, 1981, ( 87): 63~ 67

Comparing the Propagation Technologies of  
*Arbuscular mycorrhizal* Fungi  
Wang Xiaoqin

( College of Material Science and Engineering, Huaqiao University, 362021, Quanzhou, China)

**Abstract** Taking clove as the host plant and adopting single spore vaccination and multi spore vaccination, the author enabled *glomus. Mosseae*, *G. versiforme*, *G. geosporum*, *G. constrictum* and *G. reticulatum* to be propagated in soil, sand and liquid respectively; and measured their respective arbuscular infection rate, vesicular quantity and spore production after harvest. As shown by the study, *Arbuscular mycorrhizal* Fungi inoculum can be produced under the conditions of soil, sand or liquidation but there existed sygnificant difference in productive effect. all indices were in the highest under liquid cultivation, the next under sand cultivation and the last under soil eultivation; 5 fungal species participating in the test showed affinity to clove, in which *G. mosseae* and *G. versiforme* showed preponderance in inoculum production; multi-spore vaccination showed quantitative preponderance in reproduction as compared with single spore vaccination, but the latter can be used for purifying the fungi.

**Keywords** *Arbuscular mycorrhizal* Fungi, clove, propagation technology, cultural method