

野生板栗根部菌根真菌的分离与回接效应研究

柴迪迪, 郭素娟, 牛晓丹

(北京林业大学 省部共建教育部森林培育与保护重点开放试验室, 北京 100083)

摘 要:以北京市怀柔区野生板栗的根部为试材,通过分离、纯化和培养获得培养性状与已知菌不同的3株菌种:菌A、菌B和菌C。采用双因素随机区组设计,将菌A、菌B、菌C和已知与板栗形成良好共生关系的红绒盖牛肝菌(*X.c*)制成菌液和固体菌剂,对板栗幼苗进行接种试验,之后测定苗木的生长指标,研究菌根的回接效应。结果表明:所有菌种固体菌剂的侵染率均高于液体菌剂;菌A的侵染率明显高于菌B、菌C和菌*X.c*,达到90.75%,分别提高11.1%、39.2%和12.75%。同时,菌A显著促进苗木地径生长,生物量最大,是值得应用推广的菌种。

关键词:板栗;菌根菌;侵染率;回接效应

中图分类号:S 664.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)21-0018-04

板栗(*Castanea mollissima* Blume)是我国山区重要的经济树种之一^[1]。菌根是土壤微生物和植物相容性最普遍的共生现象^[2],研究表明外生菌根的形成使树木依靠菌根菌的帮助对单位体积土壤中的水分和养分的吸收能力大大增强,尤其磷的吸收提高最明显^[3]。外生菌根菌还能分泌有机态磷分解酶将枯枝落叶和动物残骸中的有机态磷分解吸收直接传输给树木利用^[4-5]。Theodorou 和 Bowen 发现牛肝菌和淡黄须腹菌接种辐射松幼苗与没有接种的相比对干旱的适应能力大大增强^[6],因此,菌根菌在苗木培育中应用越来越广泛。中国林科院林研所成功的采用液体发酵法制备出可应用于松树幼苗的外生菌根菌剂在育苗中应用效果良好^[7]。板栗的根系可以与外生菌根菌共生,形成典型的外生菌根^[8]。板栗菌根化研究已有成功报道,但接种的菌剂均采用的是外来菌种^[8-10]。虽然秦岭也成功从板栗产区土壤中采集多种真菌子实体,但此种方法局限于子实体分布于板栗根附近,共生关系的确定较复杂,且未见回接试验报道^[11]。该研究试图直接从野生板栗根系进行菌根菌的分离以及回接试验,并通过与外来菌种进行比较分析,获得与板栗形成最佳共生关系的菌根菌种,从而为开发板栗天然菌根资源和应用优势菌根菌奠定良好的基础。

第一作者简介:柴迪迪(1985-),男,硕士,研究方向为种苗培育技术。

通讯作者:郭素娟(1965-),女,博士,教授,大专,高级工程师,现从事森林培育及种苗培育和经济林培育理论与技术研究工作。

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划资助项目(2006BAD18B0202)。

收稿日期:2010-08-16

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验菌种分别来自北京市怀柔区野生板栗苗根部经分离、纯化和培养获得的3株菌种:菌A、菌B和菌C,以及购自中科院微生物所,经研究证明能够与板栗形成很好共生关系的菌种:红绒盖牛肝菌(*Xerocomus chrysenteron*,缩写*X.c*)^[9]。

回接试验所用苗木由北京怀柔板栗试验站提供板栗种子,在北京林业大学苗圃温室培育的板栗容器苗。相应用菌A、菌B、菌C、菌*X.c*处理和对照(CK)分别记作处理1、处理2、处理3、处理4和处理5。

1.2 试验方法

1.2.1 板栗容器苗培育 于2009年3月将经过低温层积催芽的板栗种子,播于盛有按土壤:草炭土:沙子为3:2:1混合成的基质,规格为20 cm×20 cm的容器中。待板栗容器苗刚长出2片真叶时进行接种^[1]。

1.2.2 野生板栗菌根菌的分离、纯化与培养 在北京怀柔板栗林地选取当年野生板栗苗,将苗木根系上的白色二叉状或塔状、单轴状等形状的菌根用剪刀剪下,迅速装入盛有湿润营养土的塑料袋里,封口带回实验室^[12]。菌根菌的分离、纯化及培养方法采用孟繁林在林木菌根学中介绍的方法,将分离的菌根表面消毒后,于平板PDA培养基内培养,倒置在24℃培养箱中。菌根分离后培养的菌种若不纯,采用连续划线法纯化菌种。菌种经纯化后,保存在试管斜面培养基中^[13]。

1.2.3 菌剂制作 液体菌剂:将菌根菌于24℃下,在PDA培养基上培养1周得到菌落平板。将各菌落平板上的菌落切成小块,去掉琼脂,放入盛有100 mL PD液体培养基(PDA培养基中去掉琼脂成分)的三角瓶中,然后将三角瓶置于摇床上,于24℃转速140 r/min下培养

1 w 得到菌液^[2]。固体菌剂: 用 80% 草炭土和 20% 玉米面混合成培养基质, 以 1 kg/ 袋的比例装入耐高压袋中灭菌, 然后以基质和菌液为 9 : 1 的比例在超净工作台上进行混合, 混合后封口, 将培养袋放入隔水式恒温箱中, 在 24℃ 下培养 3 w 获得各菌种的固体菌剂^[1]。

1.2.4 回接试验 采用随机区组试验设计。在板栗容器苗刚长出一对真叶时, 将菌液和固体菌剂进行单一菌种接种, 以不接菌为对照(CK)。菌液接种量为 10 mL/ 株, 固体菌剂接种量为 10 g/ 株, 每个菌种接种 3 次重复, 每次接 10 株苗, 并设空白对照不接种。接种 1 个月后, 采用番红-淡绿染色法调查菌根侵染率。经染色后, 根细胞核染成鲜红或紫红色, 菌丝绿色或蓝绿色^[12]。计算公式: 菌根侵染率(%)= 侵染根数/ 全部根数×100%。

1.2.5 菌根侵染后苗木生长指标测定 苗木根系菌根化后 3 个月, 调查苗木的苗高、地径、高径比、根茎比、生物量等生长指标。

2 结果与分析

2.1 野生板栗菌根菌的分离、纯化与培养

通过对野生板栗菌根菌的分离纯化培养, 得到生长形态与已知菌根真菌不同的未知菌种 3 株, 代号分别为菌 A、菌 B 和菌 C。这 3 种菌和菌 *X.c* 的培养性状如表 1 所示。从表 1 可知, 这 4 种菌的培养性状为: 菌 A 的菌丝白色, 菌丝体呈绒毛状, 对培养基产生淡黄色色素, 生长速度快; 菌 B 的菌丝灰白色, 菌丝体呈放射状, 对培养基产生粉红色色素, 生长速度较快; 菌 C 菌丝白色, 菌丝体呈辐射状, 对培养基产生棕褐色色素, 生长速度较慢; *X.c* 菌丝淡棕色, 在培养基上形成灰色环状轮纹, 对培养基产生棕褐色色素, 生长速度较慢。

表 1 不同菌根菌形态学形状

Table 1 Different morphological of mycorrhizal fungi				
菌根菌种类	菌丝颜色	菌丝体形状	产生色素	生长速度
Mycorrhizal class	Mycelium color	Mycelium shape	Produce pigment	Growth rate
菌 A	白色	绒毛状	淡黄色	快
Strain A				
菌 B	灰白色	放射状	粉红色	较快
Strain B				
菌 C	白色	辐射状	棕褐色	较慢
Strain C				
菌 <i>X.c</i>	淡棕色	环状轮纹	棕色	较慢
Strain <i>X.c</i>				

2.2 液体和固体菌剂对板栗实生苗菌根侵染率的影响

菌 A、菌 B、菌 C、菌 *X.c* 固体菌剂接种时, 对板栗苗根部的侵染率分别为 90.75%、78.00%、51.55% 和 79.65%, 此 4 菌种液体菌剂接种时, 侵染率依次为 85.05%、61.55%、40.05% 和 60.5%(图 1)。

野生分离的菌种对板栗实生苗的菌根侵染率与已知菌种菌根侵染率存在一定差异, 而且每种菌根菌的液体菌剂与固体菌剂侵染率存在一定差异, 对不同菌根菌

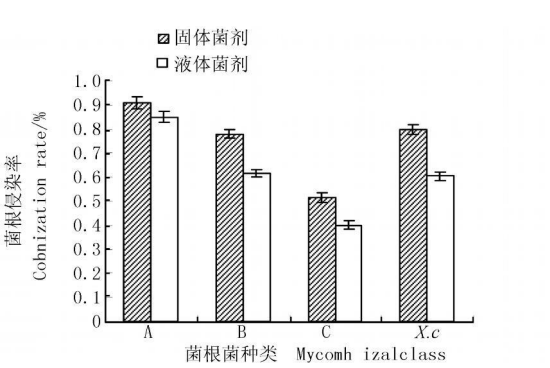


图 1 不同菌根菌种和菌剂类型接种的菌根侵染率

Fig. 1 Infection rate of different mycorrhiza fungi and inoculation types

种和菌剂类型接种的菌根侵染率方差进行分析, 结果显示不同菌根菌种类对板栗苗木菌根侵染率有显著差异。不同菌剂类型对菌根侵染率的影响显著, 菌液接种的菌根侵染率明显低于固体菌剂的侵染率(图 1、表 2)。

表 2 不同菌根菌种和菌剂类型接种菌根侵染率方差分析

Table 2 ANOVA of infection rate of different mycorrhiza fungi and inoculation types						
差异源	离差平方和	自由度	均方差	F 检验	概率值	<i>F</i> _{0.05}
Variation resource	SS	df	MS	<i>F</i> -test	P-value	
菌根菌种						
Mycorrhizal class	1.065417	4	0.266354	28.96 *	0.003269	6.39
菌剂类型						
Type of mycorrhizal agents	0.081903	1	0.081903	8.90 *	0.040579	7.71
误差						
Error	0.036793	4	0.009198			
总计						
Aggregate	1.184113	9				

菌 *X.c* 固体菌剂经该试验室前人的研究证明, 在已知菌种中, 其单一菌种接种板栗效果最佳^[9,13-14], 对不同菌根菌种侵染率进行多重比较分析发现, 接种菌 A 的板栗苗的侵染率显著高于接种菌 *X.c* 的侵染率, 接种菌 B 的侵染率接近接种菌 *X.c* 的侵染率, 而接种菌 C 的侵染率显著低于接种菌 *X.c* 的侵染率(表 3)。

表 3 不同菌根菌种接种菌根侵染率多重比较分析

Table 3 The multicompare of infection rates of different mycorrhiza fungi				
菌种	菌 A	菌 B	菌 <i>X.c</i>	菌 C
Mycorrhizal class	Strain A	Strain B	Strain <i>X.c</i>	Strain C
菌根侵染率	90.75a	79.65b	78.00b	51.55c
Colonization rate/ %				

2.3 不同菌剂对板栗实生苗的影响

2.3.1 苗高 在菌 A、菌 B、菌 C、菌 *X.c* 各处理中, 菌 *X.c*、菌 B、菌 A 对板栗苗苗高促进作用较大, 分别比对照高 34.9%、28.9%、14.9%, 且方差分析表明与对照差

表 4 不同菌根菌接种的苗木生长指标

Table 4 Seedlings inoculated with different mycorrhizal fungus growth index

处理 Treatment	苗高 Seed height / cm	地径 Stem base / cm	高径比 Slenderness ratio	根茎比 Rhizome length ratio	生物量 Biomass / g
1	38.55	0.81	47.48	1.20	20.24
2	43.25	0.71	61.35	1.06	17.95
3	38.42	0.64	60.50	0.92	15.12
4	42.85	0.76	56.09	1.09	18.04
5	38.14	0.63	60.35	0.83	13.7

表 5

Table 5 Analysis of variance

指标 Target	差异源 Variation resource	离差平方和 SS	自由度 df	均方差 MS	F 检验 F test	F _{0.05}	概率值 P-value
苗高 Seed height/ cm	组间 Between Groups	793.52	4	198.38	69.414 *	2.3719	< 0.0001
	组内 Within Groups	414.4	145	2.858			
	总和 Total	1 207.92	149				
地径 Stem base/ cm	组间 Between Groups	0.752	4	0.188	79.665 *	2.3719	< 0.0001
	组内 Within groups	0.342	145	0.002			
	总和 Total	1.094	149				
高径比 Slenderness ratio	组间 Between Groups	3 912.762	4	978.191	28.131 *	2.3719	< 0.0001
	组内 Within groups	5 042.121	145	34.773			
	总和 Total	8 954.883	149				
根茎比 Rhizome length ratio	组间 Between Groups	2.468	4	0.617	175.389 *	2.3719	< 0.0001
	组内 Within groups	0.51	145	0.004			
	总和 Total	2.978	149				
生物量 Biomass/ g	组间 Between groups	807.168	4	201.792	283.526 *	2.3719	< 0.0001
	组内 Within groups	103.2	145	0.712			
	总和 Total	910.368	149				

表 6 方差分析多重比较汇总

Table 6 Summary of multiple comparison

苗高 Seed height	地径 Stem base	高径比 Slenderness ratio	根茎比 Rhizome length ratio	生物量 Biomass
4a	1a	2a	1a	1a
2a	4b	3a	4b	4b
1b	2c	4b	2b	2b
3b	3d	5b	3c	3c
5b	5d	1c	5d	5d

较低,苗木质量较好,处理 2 的苗高较高,地径不粗,高径比最高,苗木质量居中。处理 3 的苗高中等,地径较细,高径比较高,苗木质量较差。

2.3.4 根茎比和生物量 表 4~6 表明,处理 1 的生物量最大,根茎比最大,说明该处理对苗木根系生长有最大的促进作用。处理 4.2 的生物量较大,根茎比较大,说明这 2 个处理对苗木根系生长有较大的促进作用。处理 3 生物量较小,根茎比也比较小,说明该处理对苗木根系生长作用不明显。

3 结论与讨论

3.1 结论

对不同菌剂类型接种的菌根侵染率进行方差分析,

异显著。菌 C 与对照相比促进作用不明显(表 4.5)。
2.3.2 地径 表 4 表明,处理 1、4、2 的苗木地径较大,分别比对照高 37.2%、27.4、19.1%,且方差分析表明处理 1 与对照差异显著(表 6),处理 3 与对照相比促进作用不明显。表明接种菌 A、B、X.c 促进板栗苗粗生长,有利于培育壮苗。
2.3.3 高径比 表 4 表明,处理 1 的高径比值最小,苗高较高,地径最大,说明处理 1 可以促进苗木地径生长,培育合格壮苗。处理 4 的苗高最高,地径较大,高径比

结果显示不同接种菌剂类型对菌根侵染率的影响显著,固体菌剂的侵染率明显高于菌液接种的菌根侵染率。由此可知固体菌剂接种是更适合的接种形式。

多重比较分析发现,菌 A 回接板栗苗的侵染率显著高于菌 X.c 的侵染率,是值得生产实践推广和进一步研究的菌种。

苗木生长指标结果显示,接种菌 A 的板栗苗地径最粗,显著高于对照,高径比最小显著低于对照,根茎比最大显著高于对照,生物量最大显著高于对照,表明菌 A 对苗木的生长促进作用明显,进一步验证其是值得生产实践推广和进一步研究的菌种。

3.2 讨论

秦岭的研究证明大部分菌根真菌无法进行纯培养,但该研究首次从板栗根部分离、培养获得 3 株菌根菌种,并与外来菌种进行比较,培养性状存在明显差异,还需要进一步鉴定^[1]。

栾庆书证明单一菌接菌效果没有混合接菌效果好,该试验分离出的优势菌种可以与已知其它菌种混合接菌,将使得菌根在板栗的生产实践中应用的效果更好^[10]。

参考文献

[1] 吕全, 雷增普. 外生菌根提高板栗苗木抗旱性能及其机理的研究[J]. 林业科学研究, 2000(3): 249-256.

[2] 弓明钦. 菌根研究及应用[M]. 北京: 中国林业出版社, 1997.

[3] 宝月岱造. 森林生态系树木外生菌根菌共生系[J]. 蛋白质核酸酵素, 1998, 43(9): 1246-1253.

[4] Ho I, Zak B. Acid pHosphatase activity of six ectomycorrhizal Douglas fir rootlets and some Mycorrhizal fungi[J]. Plant and soil, 1979, 54: 395-398.

[5] Bending G D, Read D J. The structure and function of the vegetative mycotium of ectomycorrhizal plants. Activities of nutrient mobilising enzymes in birch litter colonized by Paxillus imvovus (Fr) Fr [J]. New phytologist, 1995, 130: 411-417.

[6] Theodorou C, Bowenm G D. Mycorrhizal responses of ra diata pine in experiments with difeemt with different fungi[J]. Austrailan Foresty, 1970, 34: 183-191.

[7] 栾庆书. 外生菌根真菌应用技术研究现状[J]. 辽宁林业科技, 1994

(3/4): 67-69.

[8] 秦岭, 董清华, 郑来友. 等. 菌根对板栗幼苗生长及抗旱性的影响[J]. 北京农学院学报, 2000, 15(2): 10-14.

[9] 石青莲. 板栗菌根化容器育苗技术研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2004.

[10] 栾庆书. 高效外生菌根菌复合菌剂的研究[J]. 辽宁林业科技, 2003 (6): 4-6

[11] 秦岭, 王有智. 板栗菌根真菌及其分离培养[Q]. 中国科协第3届青年学术年会园艺学卫星会议暨中国园艺学会第2届青年学术讨论会论文集, 1998.

[12] 孟繁荣. 林木菌根学[M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 1996.

[13] 张波. 板栗菌根化容器嫁接苗培养技术研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2007.

[14] 牛晓丹. 板栗菌根菌剂制作技术与芽苗嫁接成活机理研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2009.

Mycorrhizal Fungi of Wild Chestnut Isolation and The Effect of Backing up

CHAI Di-di, GUO Su-juan, NIU Xiao-dan

(Key Lab for Silviculture and Conservation of MOE, Beijing Forestry University, Beijing 100083)

Abstract: This paper used the roots of wild chestnut in Huairou district as materials through separation, purification, and cultivation getting three new mycorrhiza fungi: A, B and C. To adopt Two-factor randomized block design, Making inoculant by mycorrhiza fungi A, B, C and Hong Rong cap boletus (*Xc*), inoculated mycorrhizal fungi on chestnut seedlings, then mensurating nursery stock growth index, researching the effect of mycorrhiza-back. The results showed that all mycorrhiza fungi, their solid inoculant infection rates were higher than the liquid inoculant; infection rate of mycorrhiza fungi A was significantly higher than mycorrhiza fungi B, C and XG up to 90.75%, increasing respectively 12.75%, 39.2% and 11.1%. Meanwhile, mycorrhiza fungi A significantly promoted seedling diameter growth, biomass maximum. Mycorrhiza fungi A was worth application and extension, but needing further identification.

Key words: *Castanea mollissima*; mycorrhiza; infection rate; effect of mycorrhiza-back

2011 年《果树实用技术与信息》
有奖征订启事

《果树实用技术与信息》编辑部开展2011年度有奖征订活动, 设一等奖10名, 每名奖励现金50元; 二等奖50名, 每名赠送《21世纪果树优良新品种》图书1册。订阅2011年《果树实用技术与信息》全年期刊的订户均可参加抽奖活动, 请您于2011年1月底之前将订单复印件寄到《果树实用技术与信息》编辑部(注明您的详细通讯地址、联系电话), 编辑部将在2011年2月抽奖, 获奖者名单将刊登在《果树实用技术与信息》2011年第3期, 奖品届时一并寄出。

《果树实用技术与信息》由中国农业科学院果树研究所主办, 月刊, 每月10日出版, 每期定价3.80元, 全年12期共45.60元, 邮发代号: 8-220, 全国各地邮局均可订阅; 直接汇款至编辑部订阅, 免收邮寄费; 订10套以上挂号邮寄, 免收挂号费。

地址: 辽宁省兴城市兴海南街98号中国农业科学院 果树研究所《果树实用技术与信息》编辑部
邮编: 125100 电话: (0429)3598276 传真: (0429)3598132
电子信箱: gssyjs2007@sohu.com