

油松外生菌根真菌对其幼苗根际其它真菌的影响

樊永军^{1,2}, 闫伟¹, 王黎元²

(1. 内蒙古农业大学 林学院 内蒙古 呼和浩特 010018; 2. 包头师范学院 生物科学与技术学院 内蒙古 包头 014030)

摘要:通过对油松菌根化苗与非菌根化苗根际土壤真菌群落的种类、数量进行多样性比较。结果表明:菌根化油松苗根际有8种真菌,非菌根化的油松苗根际有10种真菌,运用群落相似性指数、丰富度指数、均匀度指数和多样性指数对菌根化和非菌根化油松苗根际土壤真菌群落进行了分析比较,表明菌根化和非菌根化油松苗根际土壤真菌群落相似度为0.55,而根际土壤真菌群落丰富度指数、均匀度指数和多样性指数菌根化比非菌根化都低。

关键词:油松;菌根真菌;根际微生物

中图分类号:Q 949.32 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2009)02-0032-04

根际是土壤微生物生活特别旺盛的区域,主要原因在于植物根系不断的分泌着各种代谢产物,为微生物的大量增殖创造了条件,使植物根际具有很高的生物活性。菌根真菌与根际微生物间的关系及其对宿主植物的影响是近年来菌根研究的一个热点话题^[1]。菌根真菌遍布世界各地的土壤中,并与绝大多数陆生植物形成共生关系。有研究证实,一些土壤微生物可与菌根真菌相互作用,并以特殊的方式影响菌根的形成及其对宿主植物的作用^[2]。这种作用往往会对植物的生长发育及其抗逆能力产生深刻的影响,尤其是VA菌根真菌及外生菌根真菌与一些有益微生物的相互作用。有研究表明,影响菌根形成、发育和功能的主要根际因子有根系分泌物、其它微生物及其与菌根真菌的相互作用^[3],而菌根形成对根际微生物群落结构也有很大的影响,其影响仅次于不同的植物种类的影响^[4]。有益的根际微生物与菌根真菌共同存在,可以促进菌根侵染。菌根真菌可以直接或间接地对根际微生物产生影响,即在种类大致不变的前提下,使其数量发生变化,达到新的平衡,并提高它们的活性^[5]。

油松(*Pinus tabulaeformis* Carr.)的自然分布极广,是我国华北、西北及东北南部主要造林树种之一。油松可与外生菌根真菌共生,是菌根真菌依赖性很强的树种。该试验对菌根技术研究室实验地的菌根化油松幼苗根际土壤真菌群落的种类、数量及多样性组成进行了调查,并与油松非菌根化苗根际真菌进行比较,进一步说

明菌根真菌通过改变宿主植物根际微生物环境来提高宿主植物的生长状况。

1 材料与方法

1.1 试验步骤

1.1.1 土样采集与处理 采自于内蒙古农业大学林学院菌根技术实验室的研究基地,去其育苗杯,用“抖土法”将植物根系吸附的土壤轻轻抖落,粘在植物根表的土壤即为根际土壤,用毛刷刷下后,用四分法对混合土样进行分割,取其中的一份,作为试验所需的土壤样品。

1.1.2 培养基配制 选择马丁(Martin)琼脂培养基,培养基中的孟加拉红和链霉素可抑制细菌和放线菌的生长,对真菌无抑制作用。取1000 mL蒸馏水,在其中依次加入除链霉素外的各种成分(葡萄糖10 g,蛋白胨5 g,磷酸二氢钾1 g,硫酸镁0.5 g,1%的孟加拉红3.3 mL,琼脂20 g)加热搅拌溶解后,在高压锅中高压灭菌(0.06 MPa 15~20 min)。待冷却至50℃时,加入链霉素,每100 mL培养基中加1%链霉素0.3 mL,充分混匀后,倾倒入平板凝固后备用。

1.1.3 制备土壤稀释液 称取菌根化和非菌根化油松幼苗土壤的土样各1.0 g分别放入盛99 mL无菌水并带有玻璃珠的2个三角瓶中,置摇床振荡5 min使土样均匀分散在稀释液中成为土壤悬浮液(10^{-2})。分别用2个1 mL的无菌吸头从上述的2个三角瓶中吸取0.5 mL土壤悬液分别注入盛有4.5 mL无菌水的2个试管中,吹吸3次,振荡混匀,得到(10^{-3})土壤溶液。然后再分别用2个1 mL的无菌吸头,从上述2试管中分别吸取0.5 mL注入另2个盛有4.5 mL无菌水配制成为(10^{-4})土壤溶液^[6]。

1.1.4 涂布及培养 分别用几只1 mL无菌吸头从稀释度 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} 的土壤稀释液中各吸取0.1 mL对号放入已写好稀释度的马丁(Martin)培养基平板上,用

第一作者简介:樊永军(1975),男,内蒙古包头市人,博士,讲师,现从事菌根应用技术方面的研究工作。E-mail: fanyj1975@163.com。

基金项目:内蒙古自治区高等学校科学研究资助项目(NJZY07117)。

收稿日期:2008-09-17

无菌玻璃涂棒在培养基表面轻轻地涂布均匀, 每个浓度做3个平板^[7]。将平板倒置于 37℃培养室中培养 5~10 d。统计每个平板长出的平均菌落数。

1.1.5 制片 用剪刀剪取一小段透明胶, 用小镊子夹住一个角, 轻轻地粘一些菌丝或者孢子, 然后将其放入一干净的载玻片上, 在载玻片上滴一滴染色液, 进行染色观察。

1.1.6 真菌形态特征观察 丝状真菌的鉴定主要根据形态特征包括群体形态和个体形态。群体形态即菌落的形态。观察群落形态时采用固定的培养基, 将固体培养基制成平板, 然后于 25~28℃培养一定的时间(2、4、7、10 d)进行观察。观察要点包括大小、颜色、菌落表面的纹饰、菌落的质地、菌落的高度、菌落的边缘、渗出物。个体形态是指菌丝的特征, 子实体的形态(如孢子囊)。孢子的形态(如孢囊孢子, 分生孢子等)。

1.2 真菌群落生态特征分析方法

1.2.1 菌落计数方法 先计算相同稀释度的平均菌落数, 若其中一个培养皿有较大片菌苔生长时, 则不应使用, 而应以无片状菌苔生长的平皿作为该稀释度的平均菌落数, 若片状菌苔的大小不到培养皿的一半, 而其余的一半菌落分布又很均匀时, 可将此一半的菌落数乘以2代表全部平皿的菌落数, 然后再计算该稀释度的平均菌落数^[7]。

$$\text{土壤中菌含量(个/g土壤)} = \frac{\text{同一稀释度3个平板平均菌落数}}{0.1 \times \text{稀释浓度数}} \quad (1).$$

1.2.2 群落相似性的研究方法^[8] 相似指数是用来比较2个地域或2个测点的真菌区系^[9]。在生态学中最早 Jaccard(1912) 提出来的建立在有-无的基础之上, 是在2个地区都很常见的物种的数量与在2个地区都能发现的所有物种的数量的比值。常用公式:

$$ISJ = \frac{c}{(a+b+c)} \quad (2),$$

式中 c 是2个地区共同存在的物种数量, a 是仅在 a 地区发现的物种的数量, b 是仅在 b 地区发现的物种的数量。Sorensen (Jaccard 1948):

$$ISS = \frac{2c}{a+b} \quad (3),$$

它是对 Jaccard 改写, 这个方法适用范围更广, 可实用与定量的目的。式中 c 是2个样品共同存在的物种数量, a 和 b 分别是 a 地区(样品)和 b 地区(样品)中物种的数量。

1.2.3 丰富度指数 丰富度指数 (Species richness index) 主要是测定一定空间范围之内的物种数目以表达生物的丰富程度^[10], 该研究选用2个丰富度指数。

$$R1 = \frac{(S-1)}{\ln N} \quad (4),$$

$$R2 = \frac{S}{\sqrt{N}} \quad (5),$$

其中 S 为群落中物种的总数; N 为观察到的个体数(随样本的增大而增大)。

1.2.4 真菌菌落的多样性分析 物种多样性不仅反映了群落中物种的丰富度、变化程度或均匀度, 也反映了不同环境条件与群落的相互关系, 尤其是群落物种多样性在一般情形下与群落的稳定和动态有很大关系。物种多样性是一个区域或一个生态系统可测定的生物学特征, 是生物多样性在物种水平上的表现形式, 因此一般用物种多样性指标来分析生物多样性^[11]。常用的有物种的丰富度 (Richness)、多样性 (Diversity)、均匀度 (Evenness) 等^[12]。选用 Shannon-Wiener 指数 (H) 和 Simpson 优势度指数 (D), 讨论根际土壤的细菌多样性特征^[13]。多样性指数 H 的计算公式为:

$$H = - \sum P_i \ln P_i \quad (6),$$

式中, $P_i = \frac{N_i}{N}$, N_i 为种 i 的单菌落数量, N 为土样的总单菌落数量, 采用 Simpson 优势度指数测定群落内不同物种所起的作用和所占的地位, 其公式为:

$$D = 1 - \sum P_i^2 \quad (7).$$

均匀度指数 (Evenness index) 为群落中不同物种的多度(株数、生物量、盖度或其它指标) 分布的程度, 即每个种个体数间的差异, 也是群落多样性研究中的一个十分重要的概念, 其计算常用观察多样性和最高多样性的比来表示, 最高多样性即所有种的多度相等时的多样性^[14]。据此导出了均匀度的计算公式: Simpson 均匀度

$$E = \frac{N \times (\frac{N}{S} - 1)}{\sum n_i \times (n_i - 1)} \quad (8),$$

Heip 均匀度

$$Eh = \frac{\exp(-\sum P_i \ln P_i) - 1}{s - 1} \quad (9),$$

式中, P_i 是第 i 种个体数 n_i 占总个体数 N 的比例, 即 $P_i = \frac{n_i}{N}$; S 为物种数目; N 为所有物种的总个体数; n_i 是第 i 种的个体数。

2 结果与分析

2.1 根际土壤真菌种类及形态特征描述

从有菌根与无菌根的油松幼苗中共分离出 11 种真菌来, 在 6~8 d 时 25℃下观察真菌的形态和菌丝形态。

①菌落直径 1~2 cm, 白色, 隆起; 分生孢子球形, 无色。②菌落直径 4.5~5.5 cm, 丝绒状到絮状, 浅黄绿色; 分生孢子球形, 无色。③菌落直径 5~7 cm, 丝绒状, 白色至粉红色。④菌落直径 6~7 cm, 丝绒状, 紫褐色; 分生孢子接近球形。⑤菌落直径 1~2 cm, 黑褐色或黑色; 双胞, 褐色。⑥菌落直径 5~6 cm, 由少量辐射状皱

纹,丝绒状到絮状,灰白色至灰橄榄色;背面橘红色,有轻霉味;孢子球形或近球形。⑦菌落直径2~3 cm,有少量皱纹,丝绒状,灰绿色,背面橘红色;分生孢子不规则的椭圆形(两头大小不一)。⑧菌落直径2~3 cm,丝绒状,蓝灰色,背面红褐色,有红色色素渗入培养基中;分生孢子圆形,无色。⑨菌落直径3~4 cm,丝绒状,灰绿色,背面红褐色;分生孢子圆形或近圆形,无色。⑩菌落直径2~3 cm,丛卷毛状,浅黄色;分生孢子无色,卵形或球形。⑪菌落直径2~3 cm,丝绒状至絮状,前期呈白色,后期呈灰绿色;分生孢子 无色,单胞,长椭圆形。

其中在非菌根化的油松幼苗的情况下共分离出10种(除上述的⑦号真菌外),菌根化的油松幼苗的情况下共分离出8种真菌(除上述的②、④、⑥号真菌外)。

2.2 菌根真菌对根际土壤真菌数量的影响

为了避免干扰,以求数据的准确性,我们采取了同一土样同时培养3批真菌求平均菌落数(表1)。

表1 菌根真菌对油松幼苗根际土壤真菌数量的影响
10⁴个/g(干土)

Table 1 The effect of mycorrhizal fungi of <i>Pinus tabulaeformis</i> on quantity of it's young seedlings rhizosphere soil fungi				
名称	第1批	第2批	第3批	平均
菌根化幼苗	1.267	1.305	1.165	1.245
非菌根化幼苗	1.867	1.912	1.764	1.847

2.3 计算所分离出真菌种类的百分含量

真菌种类的百分含量=单菌落数量/总菌落数量×100%(表2) (10),

通过表2可知,在非菌根化的油松幼苗的土壤中①占的比例为28.57%,为优势种,①、⑨分别占10.71%和17.85%,为次优势种;在菌根化的油松幼苗的土壤中①占的比例为26.31%,为优势种,①、③、⑤、⑨、⑩分别占13.16%、10.52%、13.16%、15.76%、13.15%,为次优势种,⑦为特殊种,说明菌根真菌的存在影响了油松幼苗根际微生物的种类及其数量。

表2 菌根真菌对松苗幼苗根际土壤真菌所占百分含量的影响

Table 2 The effect of mycorrhizal fungi of <i>Pinus tabulaeformis</i> on percentage of it's young seedlings rhizosphere soil fungi		
真菌种类序号	非菌根化油松幼苗/%	菌根化油松幼苗/%
①	10.71	13.16
②	5.35	—
③	3.57	10.52
④	5.35	—
⑤	7.14	13.16
⑥	3.57	—
⑦	—	2.63
⑧	8.59	5.26
⑨	17.85	15.79
⑩	7.14	13.16
⑪	28.57	26.31

表3 菌根真菌对松苗幼苗根际土壤真菌群落的相似性的影响

Table 3 The effect of mycorrhizal fungi of <i>Pinus tabulaeformis</i> on comparability of it's young seedlings rhizosphere soil fungi community	
ISJ	ISS
0.55	0.67

同时运用ISJ和ISS2个指数来比较了菌根化和非菌根化两种情况下的油松幼苗根际土壤中真菌群落的相似指数(表3),相似指数越大说明这两种情况下真菌菌落的状况越相近,反之,说明这两种情况下真菌菌落的状况相差越大,由表3可知,菌根的存在使得油松幼苗根际土壤中真菌群落状况有了很大的变化。

2.4 根际土壤真菌群落生态特征分析

表4 菌根真菌对松苗幼苗根际土壤真菌群落多样性的影响

Table 4 The effect of mycorrhizal fungi of <i>Pinus tabulaeformis</i> on diversity of it's young seedlings rhizosphere soil fungi community		
	菌根化的油松幼苗	非菌根化的油松幼苗
R1	1.649	2.235
R2	1.136	1.443
多样性指数H	1.887	1.9308
优势度指数D	0.8400	0.8504
E	0.613	0.865
Eh	0.819	0.928

由表4可知,菌根化比非菌根化的油松幼苗的根际土壤真菌群落丰富度指数要低,这说明有可能菌根的存在抑制一些有害真菌的生长。用真菌群落的多样性指数和均匀度指数来说明真菌多样性的变化,菌根化的情况下比非菌根化的情况下的油松幼苗根际土壤真菌群落多样性指数和均匀度指数都要低,这说明菌根真菌的存在使得油松幼苗的根际土壤微生物的多样性变小,说明在根际微生物之间发生了相互作用,从而进一步说明菌根真菌与土壤微生物混合接种对宿主的生长和营养有意义。

3 结论与讨论

3.1 对根际土壤真菌种类的影响

为减小试验误差,试验中对同一土样同时进行3组培养,得到油松幼苗根际土壤真菌菌落的平均数量和种类,并从这2方面对菌根化和非菌根化的油松苗根际土壤真菌菌落进行对比,菌根化的油松苗根际土壤中有8种真菌且平均菌落数为1.245×10⁴,非菌根化的油松苗根际土壤中有10种真菌且平均菌落数为1.847×10⁴,同时也得到出每个群落的百分含量,在菌根化和非菌根化的油松苗根际土壤真菌群落中优势种没有改变,次优势种变化比较大,出现一种特殊种。试验结果表明非菌根化的油松幼苗根际土壤真菌菌落在数量和种类上都要多于菌根化的油松幼苗,这说明菌根的存在抑制了油松幼苗根际土壤真菌菌落中的一部分真菌的生长。

该研究中的真菌尚待进一步鉴定, 虽然基本上明确了菌根化和非菌根化根际土壤真菌的数量和种类, 但还不能完全说明菌根真菌对根际土壤其他真菌的影响程度, 还有待深入研究。

3. 2 对根际土壤真菌群落生态特征的影响

在试验中发现油松幼苗根际土壤真菌, 由于菌根的介入, 使土壤真菌在其生活环境中形成独特的群落种类和组成, 因此菌根化和非菌根化的油松幼苗根际土壤真菌菌落的多样性就存在一定的差异, 其中菌根化和非菌根化的油松幼苗根际土壤真菌群落相似度为 0. 55, 且根际土壤真菌群落丰富度指数、均匀度指数和多样性指数菌根化比非菌根化油松幼苗都低。这说明通过菌根真菌的介入使得根际微生物之间发生了相互作用, 从而可以改变宿主植物根际微生物环境。

参考文献

[1] 赵忠, 王真辉. 菌根真菌与根际微生物的关系及对宿主的植物的影响[J]. 西北林学院学报, 2001, 16(4): 70-75.
[2] Lindeman R G. Mycorrhizal interaction with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect[J]. Phytopathology, 1988, 78(3): 366-371.
[3] Rambelli A. The rhizosphere of mycorrhizae[C]// Marks G L, Kossowski T, Ectomycorrhizae T. New York: Academic Press, 1973: 299-343.
[4] Lindeman R G, Marlow J L, Davis E A. Contribution of microbial as-

sociates of VA mycorrhizae to mycorrhiza effects on plant growth and health [C]// Abstracts of ICOMI. Berkeley campus. California University, USA, 1996.
[5] Kothari S K, Marschner H, Romheld V. Effect of a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus and rhizosphere micro-organisms on manganese reduction in the rhizosphere and manganese concentrations in maize(Zea mays L.) [J]. New phytol, 1991, 117: 649-655.
[6] 郝余祥. 土壤微生物[M]. 北京: 科学技术出版社, 1982: 123-256.
[7] 陈金春, 陈国强. 微生物学实验指导[M]. 北京: 清华大学出版社, 2005: 20-87.
[8] 马克平, 刘玉明. 生物群落多样性的测度方法 II 多样性的测度方法(上)[J]. 生物多样性, 1995 3(1): 38-43.
[9] 奥德穆 E P. 生态学基础[M]. 孙濡涌, 译. 北京: 人民教育出版社, 1981: 138-140.
[10] 马克平, 刘玉明. 生物群落多样性的测度方法 II 多样性的测度方法(上)[J]. 生物多样性, 1994 3(2): 162-168.
[11] 马克平, 刘玉明. 生物群落多样性的测度方法 II 多样性的测度方法(上)[J]. 生物多样性, 1994 4(2): 231-239.
[12] 吴天霖. 生态系统多样性的测度方法及其应用分析[J]. 安庆师范学院学报, 2004 10(3): 18-21.
[13] 钟文辉, 蔡祖聪. 土壤微生物多样性研究方法[J]. 应用生态学报, 2004, 15(5): 899-904.
[14] 贾丽, 冯克宽, 陈源. 天水小陇山白皮松林土壤真菌多样性的初步研究[J]. 福建林业科技, 2006, 33(4): 21-25.

The Research on the Effect of Ectomycorrhizal Fungi of *Pinus Tabulaeformis* on Other Rhizosphere Fungi of It's Young Seedlings

FAN Yong-jun^{1,2}, YAN Wei¹, WANG Li-yuan²

(1. The Forest College of Inner Mongolia Agricultural University, Huhehaote, Inner Mongolia 010018, China; 2. The Biology Science and Technological Department of Baotou Teacher's College Baotou, Inner Mongolia 014030, China)

Abstract: *Pinus tabulaeformis* depended on the ectomycorrhizal fungi strongly. Mycorrhizal formation of *Pinus tabulaeformis* influenced the rhizosphere microbe by affecting rhizosphere micro-environment. Rhizosphere fungi was a very important microbial part in rhizosphere microbe. Based on mycorrhizal and non-mycorrhizal seedlings of *Pinus tabulaeformis*, the variety, quantity and diversity of rhizosphere soil microbial community were compared. The results showed that: (1) the number of fungi of mycorrhizal seedlings of *Pinus tabulaeformis* rhizosphere was 8 species of fungi, non-mycorrhizal was 10 species of fungi. (2) The soil fungal community similar index of Mycorrhizal and non-mycorrhizal seedlings was 0. 55 and rhizosphere soil fungal community richness index, evenness index and the diversity index of mycorrhizal were lower than non-mycorrhizal seedlings.

Key words: *Pinus tabulaeformis*; Mycorrhizal fungi; Rhizosphere microbe