

纯种 VA 菌根菌剂的制备及其在泡桐试管苗上的应用

赵志鹏 郭秀珍

(中国林业科学研究院林业研究所, 北京)

采用根段培养技术在无菌条件下, 以红三叶草 (*Trifolium pratense*) 为载体植物, 制备了单一的地表球囊霉 (*Glomus epigaeum*) 菌根菌剂。并以此为接种体, 以鄂川泡桐 (*Paulownia albiphloea*) 为寄主, 首次将 VA 菌根菌剂接种到植物组织培养的试管苗上。一个月后发生侵染, 形成了丛枝和泡囊, 菌根感染率为 50%。植物化学分析结果表明, 处理与对照相比, 试管苗叶部所含的 N 和 P 元素总量有一定的提高。

关键词 VA 菌根; 菌剂; 组织培养

VA 菌根在促进植物对磷等营养元素的吸收, 提高植物对根部土传病害的抗性, 促进寄主植物的生长, 增强植物的抗逆性等方面均有重要作用。目前已逐步在农作物、果树及林木上应用^[1,2]。泡桐是我国最主要的速生用材树种之一, 它对 VA 菌根的依赖性较强^[3]。近年来采用的离体快速繁殖技术使泡桐育种工作有所改进, 加快了繁殖速度, 并能有效地脱除病毒, 是一种很有前途的育种手段^[4]。但由于幼苗生长阶段缺乏菌根, 导致泡桐组织培养苗(下称组培苗)抗逆性偏低, 试管苗移栽初期生长缓慢, 成活率较低, 从而使泡桐组培苗技术的推广应用受到一定限制。所以在组培苗生长阶段接种菌根真菌已成为植物工厂化育苗中的一项重要技术措施^[5]。

以往的几项组培苗接种菌根真菌的研究工作, 是首先在温室半无菌条件下大量繁殖 VA 菌根接种体, 然后在试管苗的移栽阶段接种 VA 菌根真菌。由于接种时间偏晚, 无法在组培苗的试管苗生长阶段进行接种, 且接种体质量不稳定, 易污染病原菌^[1,6]。作者采用根段培养技术在无菌条件下制备单一的 VA 菌根菌剂, 并将其接种到室内生长的泡桐试管苗上。目的在于

探索一条将 VA 菌根真菌更有效地应用到植物工厂化育苗中去的途径。这项工作在国内未见报道。

材料和方法

(一) 试材、菌种及培养基

1. 试管苗试材^[3,7]: 鄂川泡桐 (*Paulownia albiphloea*) 试管苗的繁殖系采用单芽茎段繁殖。生长于光照培养箱内, 25℃, 日光照时为 14h。

2. 菌种: 实验采用的 VA 菌根真菌是地表球囊霉 (*Glomus epigaeum* Daniels et Trappe)。以红三叶草 (*Trifolium pratense*) 为寄主植物。

3. 培养基及溶液: 泡桐试管苗采用改良的 MS 培养基^[3,7]。三叶草根段培养采用改良 White 培养基^[7,8]。实验中常用培养基为 PDA 培养基^[2]。保存地表球囊霉孢子的溶液为 Ringer 溶液^[8]。

(二) VA 菌根菌剂的制备

1. 三叶草的根段培养^[7,8]: 红三叶草

本文于 1989 年 12 月 7 日收到。

实验用 VA 菌根真菌系加拿大 V. Furlan 博士和 J. A. Fortin 教授所赠。承蒙中国林业科学研究院王学聘和戴莲韵先生的热情帮助, 杨光逢先生协助完成植物化学分析, 在此一并致谢。

种子经浓硫酸表面消毒 20min, 无菌蒸馏水清洗 3 次, 转入置有无菌湿滤纸的培养皿中, 25℃ 无光条件下发芽。当根部长至 1.0—1.5cm 长时, 切取 1.0cm 长根尖, 转入装有改良 White 培养基的 12cm 培养皿中。2 周后在生长良好的根段上再取根尖移至改良 White 培养基上连续培养。以后每 2 周转一次, 进行根段扩大培养。

2. 孢子和感染根段的分离与处理^[1,2,8]: 孢子分离采用湿筛法^[8], 取感染了地表球囊霉的红三叶草根际土样 500g, 加自来水, 搅拌后静置 0.5min, 上清液通过双层土壤筛, 自来水冲洗后将底筛上的筛取物洗入 100ml 离心管中, 3000r/min 离心 5min, 保留沉淀物。向离心管中加入 50ml 40% 蔗糖溶液, 搅拌并立即经 3000r/min 离心 1.5min, 滤纸过滤上清液, 自来水冲洗, 将孢子悬浮液置于盛有 Ringer 溶液的培养皿中, 5℃ 保存。

选已感染地表球囊霉的红三叶草根系, 自来水浸泡过夜, 剪成 1.0cm 小段, 连同筛选的孢子, 分别置于双层滤纸之间, 经 50% 酒精表面消毒各 1—2min, 0.1% HgCl₂ 各消毒 4 min 和 1 min, 无菌蒸馏水冲洗 3 次, 分别转到 PDA 培养基上, 置于 25℃, 无光条件下培养。不断观察, 挑出污染的孢子及根段。

3. 纯培养合成 VA 菌根^[7,9]: 将在 PDA 培养基上培养了 3 天的三叶草感染根段和培养 6 天的孢子分别接种到生长于 12cm 培养皿中的三叶草根尖上, 用胶膜封住培养皿, 25℃ 无光条件下培养 30 天后, 将根取出剪成 2.0cm 的根段, 采用 Phillips 和 Hayman 染色方法^[2]进行染色, 检查侵染情况。

4. VA 菌根菌剂的制备^[6]: 菌根菌剂采用蛭石为固体基质, 装入带有封口膜的耐高温塑料小袋中, 营养液为改良 White

培养液, 高压蒸气灭菌 1h。从纯培养合成的 VA 菌根根系上选取带有根尖的一段根, 经无菌蒸馏水清洗。置入塑料袋中 25℃ 无光条件下培养, 即为 VA 菌根菌剂。

(三) 鄂川泡桐试管苗接种 VA 菌根菌剂

将塑料小袋中的 VA 菌根取出, 剪成 2.0cm 根段, 经无菌蒸馏水清洗, 接种到生长了 20 天的鄂川泡桐试管苗根上, 置于光照培养箱内 25℃ 条件下生长, 日光照时为 14h。30 天后, 随机取 20 株接种了 VA 菌根真菌的泡桐试管苗, 以未接种的作为对照, 观测其生长及菌根形成情况, 测定其叶部和茎部含 C、N、P、K 的含量, 将处理与对照进行比较。

碳的测定采用重铬酸钾法; 氮的测定采用凯氏定氮法, 使用瑞士 BuCHI-322 全自动定氮仪; 磷的测定采用氯化亚砷还原法, 使用 721-分光光度计; 钾的测定系采用 FLAPHO 4 火焰光度计测定。

结 果

(一) VA 菌根菌剂

在改良 White 培养基上, 红三叶草的根尖生长十分旺盛, 形成大量的离体根系。将在 PDA 培养基上已经萌发了的孢子及感染根段接种到三叶草离体根系上, 都会发生侵染, 且侵染速度较快, 仅 30 天培养即可经染色在红三叶草根段的细胞内观察到地表球囊霉形成的孢囊。但实验表明, 通常在根尖 2—4cm 范围内, 没有发现 VA 菌根真菌的存在, 这可能是由于 VA 菌根真菌是在根段培养一定时间后才接种上去的, 而地表球囊霉在红三叶草根内的生长速率并不快于红三叶草根本身的生长速率的缘故。

在将 VA 菌根根系转移到塑料小袋

中后,根系会继续生长,VA 菌根真菌在根内的生长也不停止。这时的 VA 菌根根系即为菌剂。

(二) VA 菌根菌剂对泡桐试管苗的接种及生长效应

地表球囊霉菌根菌剂接种到鄂川泡桐试管苗上后,发生侵染,感染率为 50%。经染色,可在鄂川泡桐试管苗的根段上观察到丛枝和泡囊。但其形成的速率要比在红三叶草的根系上稍慢一些。

鄂川泡桐试管苗接种一个月后,与对照相比,在总长及根径等生长参数上没有显著差异。但其叶部的 N 和 P 总量在一定程度上高于对照, K 的含量略有提高,而 C 的含量则由于 VA 菌根真菌的共生而略有下降(表 1)。

表 1 泡桐试管苗接种 VA 菌根菌剂后叶部化学元素含量的变化

Table 1 Differences of the chemical element contents of leaves between inoculated *Paulownia* and uninoculated

	C (%)	N (%)	P (%)	K (%)
接种 VA 菌剂苗 Inoculated <i>Paulownia</i>	17.856	5.708	5.322	2.510
对 照 Uninoculated <i>Paulownia</i>	19.124	4.745	4.883	2.378

实验结果表明,采用根段培养技术,在无菌条件下制备单一的 VA 菌根菌剂是一个成功的探索,本项工作在国内外首次成功地将 VA 菌根应用到植物组培苗的试管苗阶段。不但促进了试管苗对 N 和 P 等营养元素的吸收,而且能更有效地缩短试管苗的移栽周期,提高试管苗的成活率^[3,4]。

讨 论

1. 由于 VA 菌根真菌一般不存在于

红三叶草的根尖部位,因而在使用 VA 菌根菌剂时,应使用根尖 5—8cm 以后的根段,保留完整根尖部分,以便红三叶草根段及其内部的 VA 菌根真菌继续保持同步生长,不断提供新的 VA 菌根真菌接种体。因而这种方法制备的 VA 菌根菌剂与其它类型的接种体相比,其利用率得以大大提高。如果能排除污染,定期向袋内加入一定量的营养液,这种菌剂便能循环使用下去。

2. 培养皿内制备的 VA 菌剂同样可以作为菌根菌剂使用,而且易于操作,只是不如生长在塑料袋中那样易于保存运输且节约空间。

3. 接种 VA 菌根菌剂一个月后,在泡桐菌根里可观察到丛枝和泡囊,而在三叶草根内则仅能观察到泡囊。在菌根形成过程中,丛枝通常首先出现,随后几天便消解,而泡囊则形成较晚,存留期也长^[4]。由此可知,地表球囊霉对红三叶草的侵染速率要高于对泡桐的侵染速率。

4. 鄂川泡桐试管苗接种一个月后,在生长参数上,处理与对照没有显著差异,主要是由于组培培养基内营养(尤其是 P 元素)过于丰富所致。尽管如此,两者叶部所含的 N、P、K 等元素总量仍有所不同,一旦试管苗由培养基移栽至容器乃至田间,处理与对照在生长参数上就会产生明显差异,而且接种过 VA 菌根真菌的试管苗也有利于移栽和成活^[3,4]。

处理和对照相比,叶部所含的 C 总量有所下降,其原因可能是由于 VA 菌根真菌在与泡桐试管苗共生过程中利用了寄主的碳水化合物。但从生长结果看,并没有对泡桐试管苗产生什么不良影响,某种程度上反而会抑制病害的发展^[4]。

参 考 文 献

- [1] Schenck, N. C.: Methods and Principles of Mycorrhizal Research, The American Phytopathological Society, Minnesota, USA, pp. 47—89, 1982.
- [2] 郭秀珍等: 林木菌根及应用技术, 中国林业出版社, 北京, pp. 165—172, 1989.
- [3] Kuo, S. C. et al.: Proceedings of First Asian Conference on Mycorrhizae, (ed. Mahadevan, A. et al.), University of Madras, Madras, India, pp. 311—314, 1988.
- [4] 郭秀珍等: 园艺学报, 15(2): 77—82, 1988.
- [5] 陈正华, 木本植物组织培养及其应用, 高等教育出版社, 北京, pp. 24—74, 1986.
- [6] Wood, T.: Mycorrhizae in the Next Decade — Practical Applications and Research Priorities, (ed. Sylvia, D. M. et al.), University of Florida, Florida, USA, p. 274, 1987.
- [7] Mosse, B. et al.: *Physiol. Plant Path.*, 5: 215—223, 1975.
- [8] Mohankumar, V.: Techniques in Mycorrhizal Research, (ed. Raman, N. et al), University of Madras, Madras, India, pp. 88—117, 1988.

PRODUCTION OF AXENIC VA MYCORRHIZA INOCULUM AND ITS INOCULATION EFFECT ON THE TISSUE- CULTURED PLANTLETS OF *PAULOWNIA* *ALBIPHLOEA*

Zhao Zhipeng Guo Xiuzhen

(Research Institute of Forestry, Chinese Academy
of Forestry, Beijing)

The axenic VAM inoculum of *Glomus epigaeum* was produced on *Trifolium pratense* with the root organ culture techniques. It is the first time that the axenic inoculum was applied to the test-tube plantlets of *Paulownia albiphloea*. After 30 days of inoculation, the arbuscules and vesicles were found in the cortex cells of *Paulownia* roots. Chemical analysis of the

plantlets showed that the leaves of inoculated *Paulownia* concentrated more N and P than the uninoculated plantlets did.

Key words

VA mycorrhizae; Inocula; Tissue culture