

用三叶草离体根建立 VA 菌根

彭生斌 沈崇尧

(北京农业大学,北京)

红三叶草 (*Trifolium pratense* L.) 离体根在改良的 White 培养基上能连续继代培养。将发芽的中国球囊霉 (*Glomus sinensis* Peng & Shen) 孢子接种三叶草离体根,在以 CaHPO_4 为磷源的 White 培养基上培养,能稳定地形成泡囊-丛枝状内生菌根 (Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae, VAM)。真菌在侵染前,菌丝在根分泌物的刺激下常进一步伸长,当菌丝接触到根的适当部位后即开始侵染,侵入前常首先形成附着胞,并通过附着胞进一步向根内侵染,形成具有根内菌丝、丛枝和不明泡囊的内生菌根。随后产生根外菌丝,并产生少量薄壁的“无性孢子”。这些“无性孢子”不能发育成正常的厚垣孢子。本文讨论了这一技术在研究 VA 菌根中的作用和意义。

关键词 三叶草;离体根;中国球囊霉;VA 菌根

在自然界中,许多植物能与菌根真菌在各种生态环境中稳定地形成 VA 菌根。Mosse (1962)^[1] 首先在人工培养基上建立了 VA 菌根,并研究了土壤细菌(如 *Pseudomonas*)、可溶性氮等对菌根形成的影响。后来, Mosse 和 Phillips (1971)^[2] 又在无机盐培养基上,以三叶草为材料,成功地建立了 VA 菌根。此后, Allen(1979)^[3]、St. John 等 (1981)^[4] 也用不同的材料在人工培养基上培养了 VA 菌根。Hepper (1981)^[5] 以滤纸和玻片作为支持物,在琼脂上得到了 VA 菌根的无菌培养物。MacDonald (1981)^[6] 设计了一个可经高压灭菌的液体培养装置用于 VA 菌根的培养。除了用整株植物来培养菌根外, Mosse 和 Hepper (1975)^[7] 还第一次用三叶草和番茄离体根与漏斗球囊霉 [*Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe] 建立了 VA 菌根,并研究了 pH 和不同的磷盐对菌根形成的影响。最近, Miller-Wideman 等(1984)^[8] 也用番茄离体根,以珠状巨孢内囊霉 (*Gigaspora margarita* Becker

& Hall) 为接种体建立了 VA 菌根,并能重新产生孢子。用植物离体根培养菌根给研究菌根的生理过程提供了极大的方便。作者以红三叶草为材料,用中国球囊霉 (*Glomus sinensis* Peng & Shen)^[9] 为接种体,在人工培养基上成功地建立了 VA 菌根,并对菌根形成的过程作了较详细地观察。

材料和方 法

(一) 接种体

中国球囊霉系从北京市郊用湿漏法 (Gerdemann 和 Nicolson, 1963)^[10] 分离得到,并以小麦 (*Triticum aestivum* L.) 为寄主在温室中以砂和土 (3:1) 为基质盆栽繁殖。孢子表面消毒系根据 Mosse (1962)^[11] 和 Koske (1981)^[12] 的方法作了改进。用微量吸管挑取 50—100 个孢子

本文于 1989 年 4 月 17 日收到。

本研究工作在裘维蕃教授指导下进行,特此致谢。

放在直径约为 3cm 的滤纸片上,并将其上盖一直径相当的滤纸片形成滤纸夹。将装有孢子的滤纸夹放在布氏漏斗中,用含 2% 氯铵 T (Chloramine-T) 和 200ppm 链霉素的溶液进行表面消毒。经表面消毒的孢子放在 0—4℃ 下备用。

(二) 培养基

1. 用于孢子发芽的培养基为 1% 的纯化琼脂。121℃ 下灭菌 15 min。

2. 用于三叶草离体根培养的培养基:是根据 White (1954)^[22] 培养基作了改变。其配方如下: KCl 65mg, KNO₃ 80 mg, Ca(NO₃)₂ · 4H₂O 300mg, MgSO₄ · 7H₂O 720mg, NaH₂PO₄ · 2H₂O 10.7mg, MnCl₂ · 4H₂O 4.9mg, KI 0.75mg, H₃BO₃ 1.5mg, ZnSO₄ · H₂O 1.92mg, CuSO₄ · 5H₂O 1μg, Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.168μg, FeNaEDTA 4.6mg, 甘氨酸 3mg, 盐酸硫胺素 0.1mg, 烟酸 0.5mg, 吡哆醇 0.1 mg, 蔗糖 20g, 蒸馏水 1000ml。灭菌前将培养基的 pH 值调到 4.9, 121℃ 下灭菌 15min。

3. 用于建立 VA 菌根的培养基:与前面的 White 培养基相似,将其中的 NaH₂PO₄ · 2H₂O 用 CaHPO₄ · 2H₂O(10.7 mg) 代替。灭菌前 pH 值调到 7.0, 在 121℃ 下灭菌 10min, 并迅速降压冷却,取出培养基。

(三) 根的离体培养

红三叶草种子用浓硫酸表面消毒 20 min, 用无菌水清洗多次后,将种子转入无菌湿滤纸上,在黑暗中 25±1℃ 下发芽,当根长到 10—15mm 长时,切下约 8mm 长的根尖(注意不要损伤根的顶端),转入到约有 50ml 培养基的 150ml 三角瓶中,每瓶含 10 个根尖,约 20d 后,就可长出大量的离体根,然后再从这些离体根中选取生长良好的根尖继代培养,以后每 15d 继代

一次,这样即可保持离体根的不断培养。

(四) VA 菌根的建立

将长约 2cm 并带有几个侧根的根段,在无菌条件下转入含有 10—15ml 的液体培养基或含 25—30ml 1% 纯化琼脂的固体培养基中培养,每皿放 2—3 个根段。用作接种体的中国球囊霉的孢子在接种前预先在 1% 的纯化琼脂上发芽,孢子为 5—10 个一组,5—7d 后,将能正常发芽并没有污染的孢子连同小块培养基移出,接种于根上或根的附近。接种后用 parafilm 膜封住皿口,在黑暗中 20±1℃ 培养。20d 后开始抽样检查,以后每 10d 检查一次,用翠盘蓝 (trypan blue) 染色 (Phillips 和 Hayman, 1970)^[23], 观察根的侵染及根外菌丝等的发生情况。

结 果

(一) 根的离体培养

在改良的 White 培养基上,三叶草根尖在供试条件下能旺盛地生长,形成大量的离体根(如图 1-1)。在离体根培养的前期,由种子发芽产生的根尖被接入培养基后,常有 7—10d 或更长的生长停滞期。停滞期过后,根开始迅速生长,约 15d 后即可形成大量离体根。在培养离体根时,应在每个三角瓶中放入 10 个或更多的根尖,这样有几个根尖能正常生长并能继代培养,当单个根尖放入培养基中时常不能生长。根在培养基中连续培养的时间不宜过长,若不及时继代,会变成褐色。褐色的根再继代时,生长缓慢或不能生长,这样的根也不能被真菌侵染。

(二) VA 菌根的形成及其侵染过程

在改良的 White 液体培养基和加 1% 纯化琼脂的固体培养基上,中国球囊霉都能侵染三叶草离体根,形成 VA 菌根。表 1 列出了在两种形式培养基

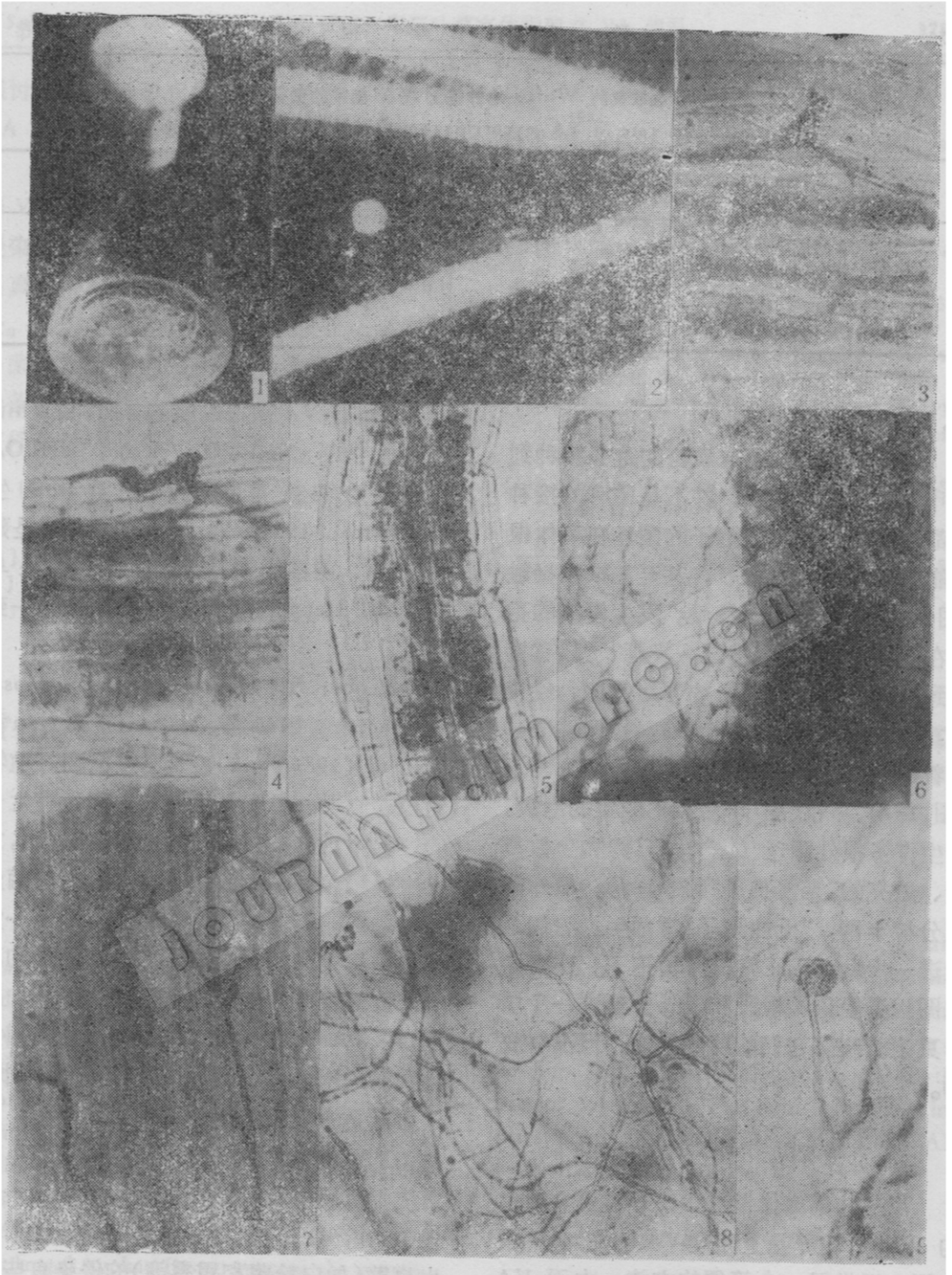


图1 1.在改良的White培养基上培养的三叶草离体根; 2.示发芽的中国球囊霉孢子接种在根的近后菌丝的进一步伸长($\times 20$); 3,4.真菌在侵入根内前形成的附着胞($\times 200$); 5.由三叶草离体根与中国球囊霉形成的具有丛枝的内生菌根($\times 100$); 6.菌根形成后产生的根外菌丝($\times 50$); 7.根内菌丝($\times 160$); 8.根外菌丝及分枝($\times 80$); 9.新产生的薄壁的“无性孢子”($\times 80$)。

Fig.1 1. The excised roots of clover (*Trifolium pratense* L.) in modified White's medium; 2. Hyphal elongation of germinated spore of *Glomus sinensis* Peng & Shen after being inoculated around growing roots; 3,4. Appressoria occurring ahead of establishment of VA mycorrhizae; 5. Endomycorrhizae with arbuscules synthesized with clover excised root and *G. sinensis*; 6. Extraradical mycelium after the formation of VA mycorrhizae; 7. Intraradical hyphae; 8. Details of extraradical hyphae and branch; 9. Thin-walled "vegetative spore".

表 1 在改良的 White 培养基上 VA 菌根的侵染率
Table 1 Infection rate of VA mycorrhizae on modified White's media

培养基形式 Media	培养皿数 Number of culture	侵染皿数 Infection number	侵染百分率(%) Infection rate
White 液体培养基 White's liquid medium	135	31	23
White + 1% 纯化琼脂 White + 1% purified agar	120	20	18

上, VA 菌根的侵染率。

当把发芽的中国球囊霉的孢子接种到三叶草离体根附近后,并不是所有的接种体都能侵染根,有些孢子的菌丝在离体根旁能进一步延长并分枝,甚至与根表接触(图 1-2),却不发生侵染。发生侵染的孢子在侵入前,菌丝也常进一步延长,只有接触到根的适当部位后,才开始侵染。侵染时,首先形成附着胞(图 1-3,4),然后通过附着胞进一步向内侵染,并形成根内菌丝(图 1-7)、丛枝(图 1-5)和不明显的泡囊,产生许多根外菌丝(图 1-6,8)和少数薄壁、透亮的“无性孢子”(图 1-9)。根外菌丝分枝丰富,“无性孢子”常顶生,它们不能进一步发育成正常的厚垣孢子。作者曾试图用受侵染的根段和根外菌丝进一步培养真菌以获得它们的纯培养物,但没有成功。

讨 论

用三叶草离体根与中国球囊霉在改良的 White 培养基上建立 VA 菌根,为菌根的研究提供了一个简便的方法。由于 VA 菌根是在完全无菌的条件下形成的,因而使研究的环境及其影响因子大大减少。这也说明 VA 菌根的形成可以不依靠植物的地上部分及复杂的土壤因子,从而使 VA 菌根真菌与寄主之间的关系更加明确。毫无疑问,这对人们进一步研究 VA 菌根真菌的纯培养也有重要的参考价值。

在进行 VA 菌根的纯培养时,将 White 培养基中的 Na_2HPO_4 改为 CaHPO_4 ,这是因为钠盐常抑制菌根真菌的生长(Hirrel, 1981)^[4],而 CaHPO_4 则是建立 VA 菌根的理想磷源,这一结果与 Mosse和 Hepper (1975)^[7]的结果是一致的。

Hepper 和 Mosse (1975)^[4]、Mosse 和 Hepper (1975)^[7]、Miller-Wideman 和 Watrud (1984)^[6]的实验已经证明,植物幼小的侧根一般容易受侵染,菌丝在生长的过程中,只有遇到合适的侵染部位时,才发生侵染。在本实验中也发现,有时菌丝能接触根的表面,并附着到根上,却不一定能进一步侵染到根的内部,这说明根的不同部位对真菌的侵染具有重要的影响。此外,在 VA 菌根的培养过程中,当真菌接种到根的附近后,其菌丝常能进一步延长,这可能是由于根分泌物的刺激作用。

VA 菌根真菌在侵入根内部以前,常首先形成附着胞(图 1-3、4),然后进一步侵染,并产生丛枝。这与其它一些绝对寄生真菌(如白粉菌和霜霉等)的侵染有些相似。这里的丛枝可能和其它寄生真菌在侵染时形成的吸器有相似的作用。因此,丛枝的产生可能是菌根真菌吸收和转移营养所必须的。

VA 菌根形成后,能产生根外菌丝和“无性孢子”,但这种“无性孢子”不能进一步发育成正常的厚垣孢子。因此,进一步

探讨厚垣孢子形成和发育的条件, 对解决 VA 菌根真菌的纯培养具有重要意义。

用植物的离体根, 在人工培养基上培养 VA 菌根, 如果能使根稳定地发生大量侵染, 并大量产生根外菌丝, 这将为 VA 菌根真菌接种体的生产提供一个可能的途径。因为在正常情况下, 受侵染的根和根外菌丝是能作为接种体用的^[5,6]。在本实验条件下, 受侵染的根和根外菌丝是否具有侵染性有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Mosse, B.: *J. G. Microbiol.*, 27: 509, 1962.
 [2] Mosse, B. et al.: *ibid.*, 69: 157, 1971.
 [3] Allen, M. F. et al.: *Mycologia*, 71: 668, 1979.

- [4] St. John, T. V. et al.: *New Phytol.*, 88: 81, 1981.
 [5] Hepper, C. W.: *New Phytol.*, 88: 641, 1981.
 [6] MacDonald, R. M.: *ibid.*, 89: 87, 1981.
 [7] Mosse, B. et al.: *Physiol. Plant Pathol.*, 5: 215, 1975.
 [8] Miller-Wideman, M. A.: *Can. J. Microbiol.*, 30: 642, 1984.
 [9] Peng, S. B. et al.: *Trans. Br. Mycol. Soc.*, Submitted.
 [10] Gerdemann, J. W. et al.: *ibid.*, 46: 235, 1963.
 [11] Koske, R. E.: *Mycologia*, 73: 288, 1981.
 [12] White, P. R.: *Cultivation of Animal and Plant Cells*, 2nd Ed., The Ronald Press Company, New York, 1954.
 [13] Phillips, J. M. et al.: *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 55: 158, 1970.
 [14] Hirrel, M. C.: *Mycologia*, 73: 610, 1981.
 [15] Hepper, C. W. et al.: *Endomycorrhizas*, Sanders, F. E. et al., Ed. Academic Press, p. 65, 1975.

THE ESTABLISHMENT OF VA MYCORRHIZAE IN EXCISED ROOT CULTURE OF CLOVER

Peng Shengbin Shen Chongyao

(Beijing Agricultural University, Beijing)

The excised roots of red clover (*Trifolium pratense*) were subcultured in the modified White's medium. Vesicular-arbuscular mycorrhizae (VAM) were established in the excised roots inoculated with the germinated spores of *Glomus sinensis* in the modified White's medium containing CaHPO₄. The germ tubes of spores usually elongated further under the stimulation of growing roots after being inoculated. Prior to infection, the fungal hyphae first contacted the growing root and then produced appressoria with which the fungal hyphae entered the cortex of the root, and formed VA mycorrhizae with

arbuscules and unclear vesicles. Finally many external mycelium and small number of "vegetative spores" appeared in the medium. The "vegetative spores" were unable to develop into normal chlamydospores in the present conditions. The significance and implication of the results in the study of VAM were discussed.

Key words

Trifolium pratense; Excised root; *Glomus sinensis*; VA mycorrhizae