

## 优良外生菌根真菌的筛选及其菌剂的制备

赵志鹏 王学聘 郭秀珍

(中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

对 21 株外生菌根菌依次有选择地进行了生长能力, 拮抗作用, 生态适应性, 激素分泌等系列筛选实验。所筛选出的 *Swillus grevillei* (Kl.) Sing. 能在 3 种类型的培养基上迅速生长; 对 *Rhizoctonia solani* Kühn 有较强的拮抗作用, 对各种生态条件有较好的耐受能力, 离体培养能产生乙烯和玉米素。实验表明, 液体深层发酵技术制备的 *S. grevillei* 固体菌剂, 对油松幼苗生长有很好的促进作用, 从而验证了本文所提出的筛选程序与准则。

**关键词** 外生菌根; 真菌; 菌剂; 液体发酵

由于外生菌根能促进林木生长, 增强其抗病能力, 因而外生菌根的应用受到了广泛的重视。应用外生菌根首先要筛选优良外生菌根真菌。1977 年 Trappe<sup>[1]</sup> 提出了选择优良菌根菌的基本准则, 即对寄主植物的综合效应, 寄主选择的广谱性, 纯培养的生长, 对生态的适应性, 营养的吸收及有机化合物的分解, 生长调节物质的产生, 同其它微生物间的相互作用等。然而真正将该理论付诸实践者却寥寥无几。

从菌根菌剂应用的前景来看, 采用工业化液体深层发酵技术生产外生菌根菌剂是一个很有前途的领域。美国已采用该技术商业化生产了多种外生菌根菌剂<sup>[2]</sup>。本文组合各种技术方法, 确立了大规模筛选优良外生菌根真菌的程序与标准, 在国内首次采用工业化液体深层发酵技术制备了外生菌根固体菌剂, 并在温室育苗试验中检验了该菌剂的效力。

### 材 料 和 方 法

#### (一) 菌种和培养基

采用 21 株外生菌根真菌(表 1), 分别从云南、北京和山东采集分离。病原菌立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 系自油松病苗上分离得到。试验采用 PDA、MMN 和 Mycorrhiza 培养基<sup>[3,4]</sup>。

#### (二) 外生菌根真菌的筛选

1. 生长能力: 21 株外生菌根真菌分别培养于 PDA 培养基、MMN 培养液和 VPMMN 扩大培养基上。VPMMN 培养基组成为: 蛭石: 泥炭 (1:1) + MMN 培养液。每个处理 3 个重复, 置于 25℃ 无光条件下培养。一周及二周内, 观测生长情况。

2. 拮抗作用<sup>[5]</sup>: 以 *Rhizoctonia solani* Kühn 为致病菌, 测定了初筛的 18 株外生菌根真菌对 *R. solani* 的平板对峙生长与重寄生作用。在 PDA 平板上, 放置 3 块盖玻片,

本文于 1991 年 6 月 7 日收到。

承蒙中国科学院昆明植物研究所戚继教授等的热忱帮助, 特此致谢。

表1 外生菌根真菌的初筛

Table 1 Preliminary selection of ectomycorrhizal fungi

	生长能力 Growth in media				拮抗作用 Resistance	
	PDA	MMN	VPMMN	综合能力 Sum-up	对峙生长能力 Antagonism	重寄生作用 Hyperparasitism
<i>Amanita pantherina</i>	+++	++	++	++	-	-
<i>Boletus griseus</i>	+++	+++	++++	+++	0	-
<i>B. sp.</i>	++++	++++	++++	++++	+	1,3
<i>Cortinarius castaneus</i>	+++	++	++	++	-	-
<i>Gomphidius roseus</i>	+++	++	++	++	-	1,2,3,4
<i>Laccaria amethystea</i> 8628	++++	+++	++	+++	0	1
<i>L. amethystea</i> 86011	+++	+++	++	+++	-	-
<i>L. bicolor</i>	+++	+++	+++	+++	+	1,3,4
<i>Lactarius camphoratus</i>	+++	+++	+	++	+	1,3
<i>L. deliciosus</i>	+++	+++	+++	+++	+	1,2,3,4
<i>Leccinum scabrum</i>	+	+	-	±	-	-
<i>Pisolithus tinctorius</i> 85027	++	+	++	++	-	-
<i>P. tinctorius</i> K-145	++	+	+	+	-	-
<i>Rhizopogon luteolus</i>	+	+	-	±	-	-
<i>Russula lutea</i>	++++	+++	+++	+++	++	-
<i>R. rubra</i>	+++	+++	++++	+++	+	1
<i>Suillus bovinus</i>	++	+	+	+	-	-
<i>S. granulatus</i>	++	+	++	++	-	-
<i>S. grevillei</i>	++++	++++	++++	++++	+	1,3
<i>S. luteus</i>	++	+	++	++	-	-
<i>Xerocomus chrysenteron</i>	+	-	-	±	-	-

注: 生长能力栏中 ++++ 为生长极好, + 为生长较差, - 为生长极差; 对峙生长栏中, ++ 表示菌根菌长满平板, + 表示菌根菌占优势, 0 表示各占 50%, - 表示 *R. solani* 占优势; 重寄生作用栏中, 1=吸附生长, 2=缠绕, 3=侵入, 4=消解。

Note: In the column of Growth in media, ++++ represents excellent growth, + is fair, - is poor. In the column of Antagonism, ++ represents the ectomycorrhizal fungus covers the plate, + is more than 50%, 0 is equal to 50%, - is less than 50%. In the column of Hyperparasitism, 1 is Appressed growth, 2 is Coiling, 3 is Penetration, 4 is Lysis.

形成倒梯形, 在盖玻片两侧分别接种外生菌根菌与病原菌。观测其对峙生长情况, 并适时将盖玻片取出, 在光学显微镜下观察菌根菌的重寄生作用。

3. 生态适应性: 依据以上实验, 选择了 3 株菌根真菌: *Boletus griseus*, *B. sp.*, *Suillus grevillei*。在不同的生态条件下, 将菌根菌培养于 PDA 平板和含 MMN 培养液的三角瓶中, 每个处理 3 个重复, 定期观测菌丝体生长量。

(1) 温度效应: 温度梯度为 5、10、15、20、25、30、35℃。

(2) pH 效应: 采用 Sorensen 磷酸缓冲液<sup>[6]</sup>将 MMN 培养液 pH 分别调节为 4、5、6、7、8、9。

(3) 盐浓度效应: 培养基中 NaCl 浓度梯度为 0、2、4、6、8、10 g/L。

(4) 水势效应<sup>[6]</sup>: 采用聚乙二醇 (PEG 4000) 将 MMN 培养液的水势分别调节为 0、5、10、15、20-bar。

(5) 寄主范围<sup>[2]</sup>: 油松 (*Pinus tabulaeformis*) 作为乡土树种, 湿地松 (*P. elliottii*) 作为国外引进树种, 用以检测所试真菌对寄主植物的选择能力。纯培养合成菌根的容器为  $20 \times 2.5$  cm 的试管, 内装 VPMMN 培养基。将经表面消毒的发芽种子移入试管内, 形成幼植株后, 接种在 VPMMN 培养袋中生长的菌根真菌菌丝体, 封口后置于光照生化培养箱内, 在  $20-30^{\circ}\text{C}$ , 14 h/d 光照条件下培养 6 个月后, 取出植株观测菌根形成与发育。

4. 植物激素的检测: 据前选出 *Boletus* sp. 和 *Suillus grevillei* 作为测试菌。

(1) 气相色谱法测定乙烯<sup>[7]</sup>: 菌根菌在无光密闭三角瓶中分别培养 1、2、4 天, 抽取瓶中气体作为样品, 在 Shimadzu GC-7AG 气相色谱仪上测定乙烯百分含量。

(2) 高压液相色谱法测定其它激素: 菌根菌在 MMN 培养液中分别培养 1、2、3 周后, 制备菌丝体的丙酮抽提液, 并用 95% 乙醇定容该抽提液挥发后的残留物, 连同培养过滤液一起在 Waters 244HPLC 高压液相色谱仪上检测四大类植物激素。

### (三) 外生菌根菌剂工业化制备的初探

1. 液体深层发酵: 将最终筛选出的 *Suillus grevillei* 的斜面菌种经 PDA 平板培养制备一级菌种, 接种到含 150 ml MMN 培养液的 500 ml 三角瓶中, 置于 TZ-2 型往复振荡器上振荡培养, 振幅 2—3 cm, 频率 130 次/min, 培养温度  $25^{\circ}\text{C}$ , 周期 5 天。所制备的二级菌种, 接种到日本 MJ-N-14L 现代化自控 14 L 发酵罐中, 接种量为 4%, 采用改良 MMN 培养液, 装液量为 8L, 搅拌速度为 150 r/min, 发酵温度  $25^{\circ}\text{C}$ , 通风量 5 L/min, 发酵周期 4 天。

2. 固体菌剂的制备: 在具有 Parafilm 封口膜的耐高温塑料袋中, 以棉子壳为固体基质, 适量加入 MMN 营养液, 高温灭菌后, 接种发酵罐生产的三级菌种, 接种量 10 ml, 封接机封口, 静置培养于  $25^{\circ}\text{C}$ , 一周后菌丝体长满培养袋, 即可作为菌剂使用。

### (四) 菌剂对油松容器苗的生长效应

以塑料箱为容器, 内装消毒基质: 蛭石: 泥炭: 沙 (2:1:2)+水。采用菌根条带接种技术<sup>[2]</sup>, 在容器内等距开出 5 cm 宽 3 cm 深沟, 在沟内撒播 *S. grevillei* 菌根菌剂, 再播种经过催芽及表面消毒处理的油松种子, 共育苗 100 株, 同时设置对照。抚育措施为每周浇水 2—3 次, 每 2 周施一次浓度为 500 mg/L 可溶性 NPK (20-19-18) 肥料 100 ml。8 周后, 随机选取处理及对照的油松幼苗各 20 株, 测量统计各项生长参数, 观察菌根形成及菌根化程度。

## 结 果

### (一) 外生菌根真菌的筛选

系列筛选结果见表 1、2。由表 1 可见, *Leccinum scabrum*, *Rhizopogon luteolus* 和 *Xerocomus chrysenteron* 3 株菌生长能力极差, 生长延迟期也很长, 故将其筛去。而 *Boletus* sp. 和 *Suillus grevillei* 生长能力则极强, 在 3 种不同类型的培养基上均生长很好。拮抗作用的研究结果也表明, 该两株菌对 *Rhizoctonia solani* 均具有较强的对峙生长能力和一定的重寄生作用, 故选出。另据实验<sup>[8]</sup>, *Boletus griseus* 能产生拮抗活性物质, 因而也列为进一步筛选的菌种。

表 2 三株外生菌根菌的进一步筛选

Table 2 Further selection of three ectomycorrhizal fungi

	生态适应性 Ecological adaptability			寄主范围 Host specificity		植物激素分泌 Production of phytohormones	
	生长温度极限 Limits of temperature for growth (°C)	良好生长 pH 范围 Limits of pH for better growth	良好生长水势范围 Limits of water stress for better growth (-bar)	油松 <i>Pinus taibaiaciformis</i>	湿地松 <i>Pinus elliottii</i>	玉米素 Zeatin	乙烯 Ethylene
<i>B. griseus</i>	5—30	4—7	10—15	+	+		
<i>B. sp.</i>	5—35	7—9	5—20	+	—	+	+
<i>S. grevillei</i>	5—35	6—8	5—20	+	+	+	+

生态适应性实验表明,温度和水势对菌根真菌生长有较大影响,而 pH 和盐浓度则影响甚小,但不同菌株在不同 pH 条件下生长略有差异。除 *B. griseus* 在 35°C 条件下不能生长外,3 株菌在其它所试条件下均能生长。总体来说,*Boletus sp.* 和 *Suillus grevillei* 对温度和水势变化有较强的适应能力(表 2)。实验表明,菌根真菌在低水势条件下生长很好。据上述实验,选出 *Boletus sp.* 和 *Suillus grevillei* 以检测其离体培养条件下产生植物激素的能力。结果表明,在五大类激素中,该两株菌均能产生乙烯和玉米素,但其代谢机理有所不同。同时出菇试验表明,两株菌能形成正常的子实体。

根据上述系列实验,最终选出 *S. grevillei* 制备菌根菌剂。

## (二) 外生菌根菌剂的制备及其效应

表 3 *Suillus grevillei* 菌剂对油松容器苗的接种效应Table 3 Effects of vegetative inoculum of *Suillus grevillei* on container-grown Chinese pine seedlings

	苗高 Height		根径 Diameter of root		根长 Length of root		干物重 Dry weight	
	cm	%	cm	%	cm	%	g	%
对照 Control <i>S. grevillei</i>	8.23	100	0.097	100	4.04	100	0.168	100
	9.88**	120	0.101	104	5.83*	144	0.246**	146

\* 差异显著,  $P = 0.05$ ; \*\* 差异极显著,  $P = 0.01$ 。

发酵罐生产的三级菌种可直接作为液体菌剂应用,也可制成固体菌剂。将制备的菌剂接种到油松容器苗上后,对幼苗的生长有很好的促进作用(表 3),在苗高、根长、干物重等方面均有很好的效应,但菌根的形成尚处于初级阶段,菌根化程度还比较低,对根径的影响也不大。然而,系列筛选实验表明, *S. grevillei* 是一株生长旺盛,对生态适应力强,有一定抗病能力,并具有较好的生长促进效应的优良菌株。该菌株目前已用于大规模生产菌剂,并在育苗造林中应用(另文发表)。

## 讨 论

从菌根应用的角度来看,菌根真菌的田间筛选试验困难很多,因而大规模室内筛选是必要的。由于各种因素的限制,不可能对所有菌根菌进行全部筛选实验,因而只能依据各实验的重要性来排列筛选实验的顺序,依次对菌根菌进行优选、淘汰,最终选出最佳菌株,并制备菌剂,验证其实际效力,以最终确定可实际应用的菌株。

通过对 21 株菌根菌选择性地生长、拮抗、生态条件、激素等系列实验,最终筛选出 *S. grevillei* 进行菌剂制备,在生产中应用获得很好的效果(另文发表),证明了该筛选程序与准则是切实可行的,具有实用价值。

菌剂接种到油松容器苗上后,尽管接种处理与对照相比差别较大,但由于接种时间较短,菌根的生长发育还处于最初阶段,此时菌根菌要从营养物质有限的幼苗上获得碳水化合物等物质,由此对苗木生长会略有影响,但由于菌根菌能从基质中获取更多的矿物质养分及水分供给苗木,因而总效应还是促进生长。待苗木再生长一段时间后,菌根的效应就会更明显表现出来。

## 参 考 文 献

- [1] Trappe, J. M.: *Ann. Rev. Phytopath.*, 15:203—222, 1977.
- [2] Schenck, N. C.: *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*, The American Phytopathological Society, Minnesota, pp. 100—146, 1982.
- [3] 郭秀珍等: 林木菌根及应用技术, 中国林业出版社, 北京, 第 200—209 页, 1989.
- [4] 俞大维: 植物病理学和真菌学技术汇编(第一册), 人民教育出版社, 北京, 第 74; 437 页, 1959.
- [5] Wu, W. S. et al.: *Plant Prot. Bull.*, 28:91—100, 1986.
- [6] Saleh-Rastin, N.: *Eur. J. For. Path.*, 6: 184—187, 1976.
- [7] Graham, J. H. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 26:1340—1347, 1980.
- [8] Zhao, Z. P. et al.: *Agric. Ecosystems Environ.*, 28:575—579, 1989.

## SELECTION OF FUNGI FOR THE PRODUCTION OF ECTOMYCORRHIZAL FUNGUS INOCULUM

Zhao Zhipeng Wang Xuepin Guo Xiuzhen

(Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091)

Twenty-one ectomycorrhizal fungi were used to screen for producing commercial ectomycorrhizal fungus inoculum through a series of experiments, which included growth in different media, antagonism and hyperparasitism against the pathogenetic fungus—*Rhizoctonia solani*, ecological adaptability such as temperature, pH, salt tolerance, water stress and host specificity, production of phytohormones and so on.

In these experiments, *Suillus grevillei* (K1) Sing showed its strong abilities to grow fast in varied media, antagonize against and hyperparasitize on *R. solani* in plates, keep alive at a broad range of ecological conditions, form ectomycorrhizae with *Pinus elliotii* and *P. tabulaeformis*, produce ethylene and zeitin. So *S. grevillei* was chosen to be produced vegetative inoculum by 14-litre auto-control fermentor. Then the inoculum was applied onto the container seedlings of *P. tabulaeformis* in greenhouse. The results demonstrated that *S. grevillei* could accelerate the growth of seedlings, enhance the biomass of trees in general.

### Key words

Ectomycorrhizae; Fungi; Inocula; Liquid fermentation