

外生菌根真菌纯培养的生态学研究*

赵志鹏 郭秀珍

(中国林业科学研究院林业研究所)

摘要 本文研究了 *Boletus griseus* Frost. (灰盖牛肝菌), *Boletus* sp. 和 *Suillus grevillei* (Klotz.) Sing. (厚环乳牛肝菌) 3 种菌根菌在纯培养条件下对温度、pH、盐浓度和水势等 4 个因子的生态适应性以及同油松和湿地松纯培养合成菌根的能力。结果表明, pH 和盐浓度对菌根菌生长的影响比较小, 而温度和水势则对真菌的生长具有很大的影响。其中 *B.* sp. 与 *S. grevillei* 具有很强的生态适应能力, 而 *B. griseus* 则稍差。此外, 结果还表明 PEG 4 000 可能会促进菌根菌在液体培养中的生长。在菌根纯培养合成研究中, 共形成 5 种菌根, 其中油松-*B. griseus* 属新发现的外生菌根。5 种菌根中, 以油松-*S. grevillei* 和湿地松-*B. griseus* 较为理想。

关键词 外生菌根; 真菌; 生态学

外生菌根在林业上的应用受到越来越广泛的重视, 因而筛选优良菌株, 通过生物工程的方法商品生产外生菌根真菌纯培养接种体, 并应用于生产实践, 成为一个很有前途的研究领域^[1]。1977年 J. M. Trappe^[2] 提出的选择优良外生菌根菌菌株的基本准则中, 强调了菌根菌的寄主广谱性及对生态的适应能力在菌根菌筛选中的重要性。其后, 国外的菌根工作者先后开展了这方面的工作^[3-9], 但普遍缺乏系统性, 而国内这方面研究工作的报道却相当少。本文旨在探讨外生菌根菌对四个生态因子的适应能力, 从而判定各生态因子在外生菌根菌筛选中的重要性, 同时还研究了 3 种外生菌根菌同油松 (*Pinus tabulaeformis*) 和湿地松 (*P. elliotii*) 形成外生菌根的能力。

一、材料与方 法

(一) 实验菌株与培养基

3 种菌根菌为: *Boletus griseus* Frost. (灰盖牛肝菌), *Boletus* sp., *Suillus grevillei* (Klotz.) Sing. (厚环乳牛肝菌), 分别从云南和北京采集分离。

实验中采用了两种培养基¹⁾:

本文于1988年10月18日收到。

• 本文系第一作者硕士学位论文研究工作的一部分。在工作中得到了中国科学院毕国昌先生及本院王学聘、戴蓬韵两位老师的热情帮助, 特此致谢。

1) 郭秀珍等, 1989, 林木的菌根及其研究方法, 中国林业出版社(待出版)。

PDA: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 15—20 g, 蒸馏水 1 000 ml。

MMN: CaCl_2 0.05 g, KH_2PO_4 0.5 g, NaCl 0.025 g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.25 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g, FeCl_3 0.012 g, Vit B_1 1 mg, 麦芽汁 (12—18 Be) 100 ml, 葡萄糖 10 g, 牛肉蛋白胨 15 g, 蒸馏水 1 000 ml, pH 5.5—5.7。

(二) 温度效应^[3]

将 3 个菌株分别接种到 PDA 平板和含 25 ml MMN 培养液的 150 ml 三角瓶中, 每个处理 3 个重复, 分别置于 5 °C、10 °C、15 °C、20 °C、25 °C、30 °C、35 °C 下进行培养。PDA 平板培养物每 12 h 观测 1 次, 记录菌落直径。MMN 三角瓶培养物在培养 15 d 后, 过滤收集菌丝体, 然后置于 102 °C 下烘干 6 h, 测量菌丝体的干物质重量。

(三) pH 效应^[3,4]

实验采用 Sorensen 缓冲液^[10]初步调节经修改的 MMN 培养液的 pH, 随后再分别用 1N HCl 和 1N KOH 准确调节培养液的 pH 至 4、5、6、7、8、9。该 pH 为培养基配制后灭菌前的 pH 值, 采用 pH 81-A 酸度计测定, 待培养液灭菌后, 再测 1 次实际 pH 值。

修改后的 MMN 培养基为: CaCl_2 0.05 g, NH_4Cl 0.025 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g, FeCl_3 0.012 g, Vit B_1 1 mg, 麦芽汁 100 ml, 蔗糖 10 g, 牛肉蛋白胨 15 g, 蒸馏水 1 000 ml。

根据温度实验的结果, 将 *B. griseus* 培养于 20 °C, 而 *B. sp.* 和 *S. grevillei* 则培养于 30 °C。

(四) 盐浓度效应^[6]

培养及观测方法与温度和 pH 实验相同, 培养基中 NaCl 浓度分别为 0、2、4、6、8、10 g/L。

(五) 水势效应^[6]

采用聚乙二醇 (PEG 4000) 调节水势, 依据 J. Mexal 等^[6]提出的对应关系, 在 MMN 培养液中加入 PEG 4000, 将其水势分别调节到 0-bar、5-bar、10-bar、15-bar、20-bar。培养、观测方法与以上实验相同。

为了试验 PEG 4000 是否会被菌根菌作为碳源利用, 本文又进行了碳源实验。试验使用菌根 Mycorrhiza 培养基^[10]: CaCl_2 0.1 g, NH_4Cl 0.5 g, NaCl 0.1 g, MgSO_4 0.3 g, KH_2PO_4 1.0 g, FeCl_3 0.01 g, 葡萄糖 0.5 g, 蒸馏水 1 000 ml。其中, 碳源采用 PEG 4000 替代葡萄糖作为处理, 而以葡萄糖和无添加碳源作为对照。培养及测量方法同以上实验。

(六) 外生菌根菌同松苗纯培养合成菌根的研究^[7-9,11]

以油松 (*Pinus tabulaeformis*) 和湿地松 (*P. elliottii*) 为寄主植物。用于菌根菌接种体制备的是 VPMMN 培养袋 (蛭石: 泥炭 (1:1) + MMN 培养液)。纯培养的容器采用 20 × 2.5 cm 大试管, 内装的培养物质为: 蛭石: 泥炭 (1:1) + MMN 培养液, 装量约为 1/3。对种子进行层积、温汤浸种和升汞表面消毒等一系列处理后, 将种子移入装有湿滤纸圆片的培养皿内。待种子发芽至 1—2 cm 后, 将其移入经过灭菌的大试管内继续生长, 至种皮脱落形成幼植株后, 向大试管内加入菌根菌接种体约 1 g, 再适量加入无菌蒸馏水约 2—4 ml, 在试管口上套扎耐高温的塑料小袋, 内衬纱布。每处理 20 个重复。将培养物放入光照培养箱内, 在 20—30 °C, 14 h/d 光照条件下, 培养 6 个月。每隔 2 月, 加 1 次稀释 MMN 培养液。

经 6 个月生长后, 小心取出整个植株, 自来水冲洗 15 min, 然后测量松苗的生长参数,

观察是否形成菌根及菌根化程度,对实验数据采用方差分析及q-检验法进行统计分析。取1段小根为材料,徒手切片,棉兰染色,光学显微镜下观察菌根形成情况及发育水平。

二、结 果

(一) 温度效应

图1显示了培养在PDA平板上的3种菌根菌对温度不同的适应能力。图中每个菌株都由最适与最差生长温度的生长曲线围成一个生长速度变化区。随着培养温度的变化,菌株的生长曲线在该区域内变化,因而该区域面积越小,斜率越大,说明菌株的温度适应能力越强,生长越好。

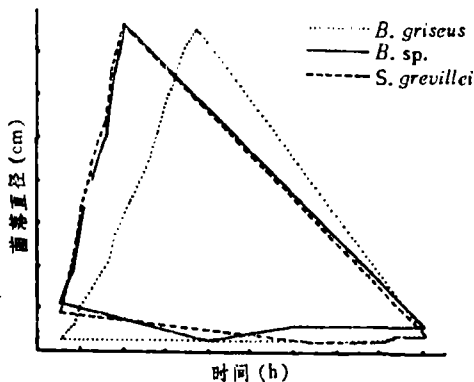


图1 示3种外生菌根菌PDA平板温度效应的生长速度变化区

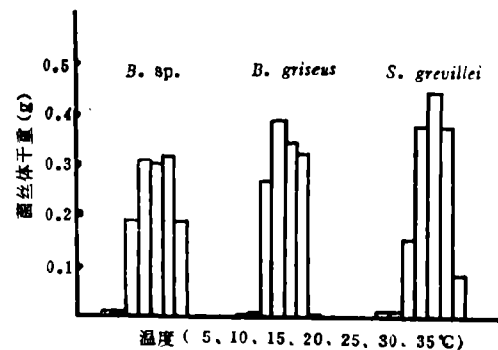


图2 3种外生菌根菌在MMN三角瓶中生长的温度效应

整个实验结果表明(图1,2),温度对这3种菌根菌的生长有较大的影响。其中*B. sp.*与*S. grevillei*对温度变化的适应能力基本相同,都很强,生长也很快,而*B. griseus*的适应能力则稍弱,生长温度范围较窄,且在PDA平板上生长较慢。

(二) pH 效应

灭菌前后培养液的pH值有变化(表1),但加入Sorensen缓冲液的培养基同未加的相比,加入的培养基pH值变动范围较小,为pH 4.00—8.15。

表1 培养基灭菌前后 pH 值的比较

培养基	测定时间	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
MMN	灭菌前	3.90	5.09	6.10	7.00	8.02	9.03
	灭菌后	3.60	4.95	5.65	6.00	6.45	7.18
Sorensen-MMN	灭菌前	4.00	4.85	6.05	7.15	8.30	9.60
	灭菌后	4.00	4.95	6.00	6.85	7.55	8.15

由实验结果可以看出(图3),pH值的变化对3株菌根菌生长的影响比较小,3株菌根菌对pH变化的适应能力也比较强。其中*B. griseus*比较适宜于在酸性条件下生长,*S. grevillei*喜中性,而*B. sp.*则偏碱性,但专一性并不强,相互差别较小。

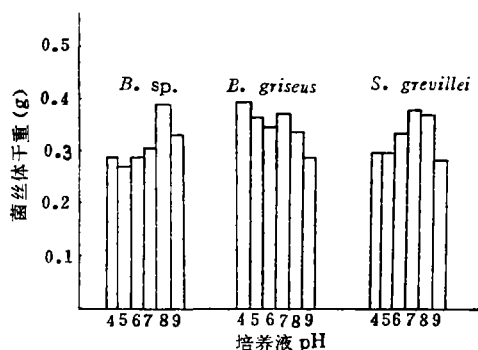


图3 3种菌根菌在Sorensen-MMN培养液中生长的pH效应

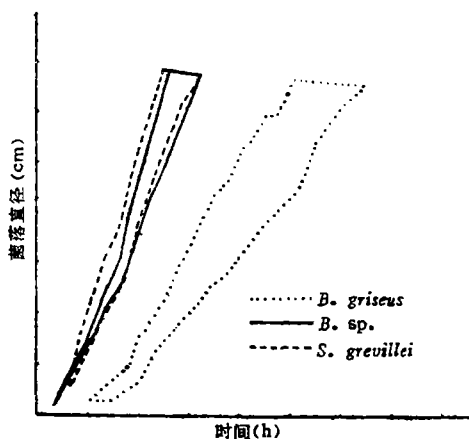


图4 3种外生菌根菌pDA平板盐浓度效应的生长速度变化区示意图

(三) 盐浓度效应

盐浓度变化对这3株菌的生长影响很小,而真菌对盐浓度变化的适应能力也很强(图4, 5),可以在所有测试的盐浓度下生长良好。其中*B. sp.*在高盐浓度(2 g/l以上)下表现了很强的生长能力。而*B. griseus*和*S. grevillei*则逊之。

(四) 水势效应

菌根菌在PEG 4000-Mycorrhiza培养液中不能生长,说明PEG 4000不能做为碳源为*B. griseus*、*B. sp.*及*S. grevillei* 3株菌根菌所利用。

由实验结果可以得出结论(图6),水势对菌根菌的生长有相当大的影响。而所测试的3种菌根菌都表现出很强的耐旱、喜旱特性,在很低的水势下生长极好。其中*B. sp.*在15-bar时的菌丝体生物量是0-bar时的8.5倍,*B. griseus*是6.7倍,而*S. grevillei*菌丝体生物量随水势的降低而不断提高,20-bar时的生物量是0-bar时的3.7倍。总的来看,以*B. sp.*耐旱生长能力为最强,*S. grevillei*和*B. griseus*次之。

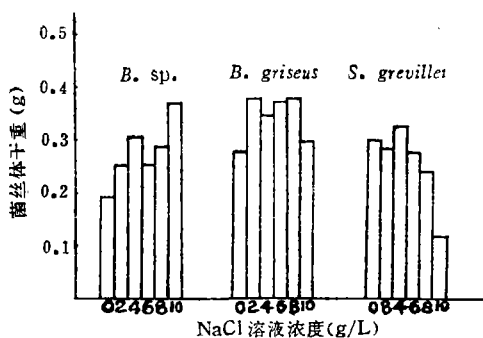


图5 3种外生菌根菌在MMN三角瓶中生长的盐浓度效应

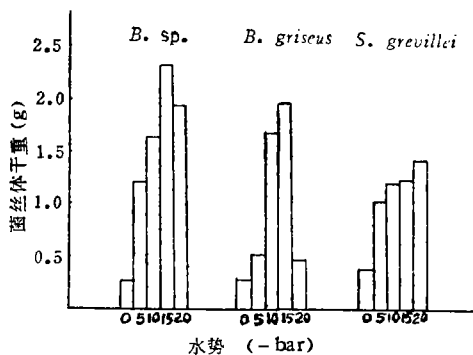


图6 3种菌根菌在PEG4000-MMN培养液中生长的水势效应

(五) 菌根菌同松苗纯培养合成的外生菌根

通过整体及光学显微镜的观察,证明油松和湿地松同3种菌根菌共生能形成5种外生菌根(表2,图版I)。其中,油松-B. *griseus* 菌根以前未有报道,属新发现的外生菌根。由表2的结果可以看出,在油松形成的3种菌根中,以油松-S. *grevillei*为最佳;而湿地松的2种菌根,则以湿地松-B. *griseus*较为理想。

表2 5种外生菌根幼苗的生长参数

外生菌根	整 苗		根 部			地 上 部 分		菌 根 化 程 度
	长 度 (cm)	鲜 重 (g)	长 度 (cm)	鲜 重 (g)	直 径 (mm)	长 度 (cm)	鲜 重 (g)	
油 松-B. <i>g.</i>	13.2 c ^②	0.15 a	5.0 b	0.03 a	1.18 a	8.2 b	0.13 a	+ ^①
油 松-B. <i>s.</i>	17.1 b	0.16 a	8.2 a	0.03 a	1.05 a	8.9 ab	0.13 a	+
油 松-S. <i>g.</i>	18.5 a	0.17 a	8.5 a	0.03 a	0.96 a	10.0 a	0.14 a	+
湿 地 松-B. <i>g.</i>	22.3 a	0.31 a	4.2 a	0.02 a	1.05 a	18.2 a	0.29 a	++
湿 地 松-S. <i>g.</i>	16.5 b	0.20 b	3.5 a	0.04 a	0.86 a	13.0 b	0.16 b	++

①每1个+约10%的菌根化;②a、b、c表示差异显著水平,具有相同字母的平均数值没有显著差异(P=0.95)。

三、讨 论

1. 本文共研究了温度、pH、盐浓度、水势4个生态条件对菌根菌生长的影响。其中温度和水势对菌根菌的生长影响极大,菌根菌的生长都有极限温度范围,同时在不同水势下,菌根菌生物量的差异相当大。而pH和盐浓度对菌根菌生长的影响比较小,也说明菌根菌耐极端pH条件和盐浓度影响的能力较强,而对温度和水势较为敏感。另外,B. *griseus*、B. sp.、S. *grevillei*3种菌根菌在低水势条件下生长极好,预示着在某些菌根菌的培养中,如果加入PEG 4000可能会增加菌丝体的生物量。

2. 在温度和盐浓度效应的研究中,PDA平板实验与MMN三角瓶实验所得结果不尽相同,但总体上来说还是一致的。其中PDA平板生长反映了真菌二维生长的能力,而MMN三角瓶生长则反映了真菌菌丝体生物量的增殖情况。因为PDA平板实验比较简便,因而是一种生态条件实验的基本方法。

3. 在选择各生态条件的实验范围时,除其它因素外,还应考虑到菌根菌寄主植物生长的实地生态条件。如选择适用于油松的菌根菌,就应考虑到北方的寒冷、干旱等因素,这样才能有目的地筛选菌根菌以适应生长环境。

4. 近些年来菌根工作者采用了许多新的菌根纯培养合成方法。而本文之所以采用较为经典、周期较长的固体基质方法,主要是为了在纯培养条件下,除研究菌根菌与植物的共生关系及菌根菌的寄主范围外,还能在接近实际生长条件下比较不同菌根菌对寄主生长的促进作用,以便于最后确定可应用的优良菌株。

参 考 文 献

- [1] Peterson, R. L. et al, 1984, Mycorrhizae and their potential use in the agricultural and forestry industries, Biotech. Advs., 2:101-120.

- [2] Trappe, J. M., 1977, Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries, *Ann. Rev. Phytopath.*, 15:203—222.
- [3] Hung, L. L. et al., 1978, Physiological studies on two ectomycorrhizal fungi, *Pisolithus tinctorius* and *Suillus bovinus*, *Trans. Mycol. Soc. Japan*, 19:121—127.
- [4] Hung, L. L. et al., 1983, Growth variation between and within species of ectomycorrhizal fungi in response to pH in vitro, *Mycologia*, 75:234—241.
- [5] Mexal, J. et al., 1973, The growth of selected mycorrhizal fungi in response to induced water stress, *Can. J. Bot.*, 51:1579—1588.
- [6] Saleh-Rastin, N., 1976, Salt tolerance of the mycorrhizal fungus *Cenococcum graniforme* (Sow.) Ferd, *Eur. J. For. Path.*, 6:184—187.
- [7] Trappe, J. M., 1967, Pure culture synthesis of Douglas-fir mycorrhizae with species of *Hebeloma*, *Suillus*, *Rhizopogon* and *Astraeus*, *Forest Sci.*, 13:121—130.
- [8] Richter, D. L. et al., 1986, Pure culture synthesis of *Pinus resinosa* ectomycorrhizae with *Scleroderma aurantium*, *Mycologia*, 78:139—142.
- [9] Bryan, W. C. et al., 1961, Synthetic culture of southern pines, *Forest Sci.*, 7:123—129.
- [10] 俞大绂, 1959, 植物病理学和真菌学技术汇编(第一册), 人民教育出版社, 74.
- [11] Schenck, N. C., 1982, Methods and principles of mycorrhizal research, The American phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.

ECOLOGICAL STUDIES ON ECTOMYCORRHIZAL FUNGI IN PURE CULTURES

Zhao Zhipeng Guo Xiuzhen

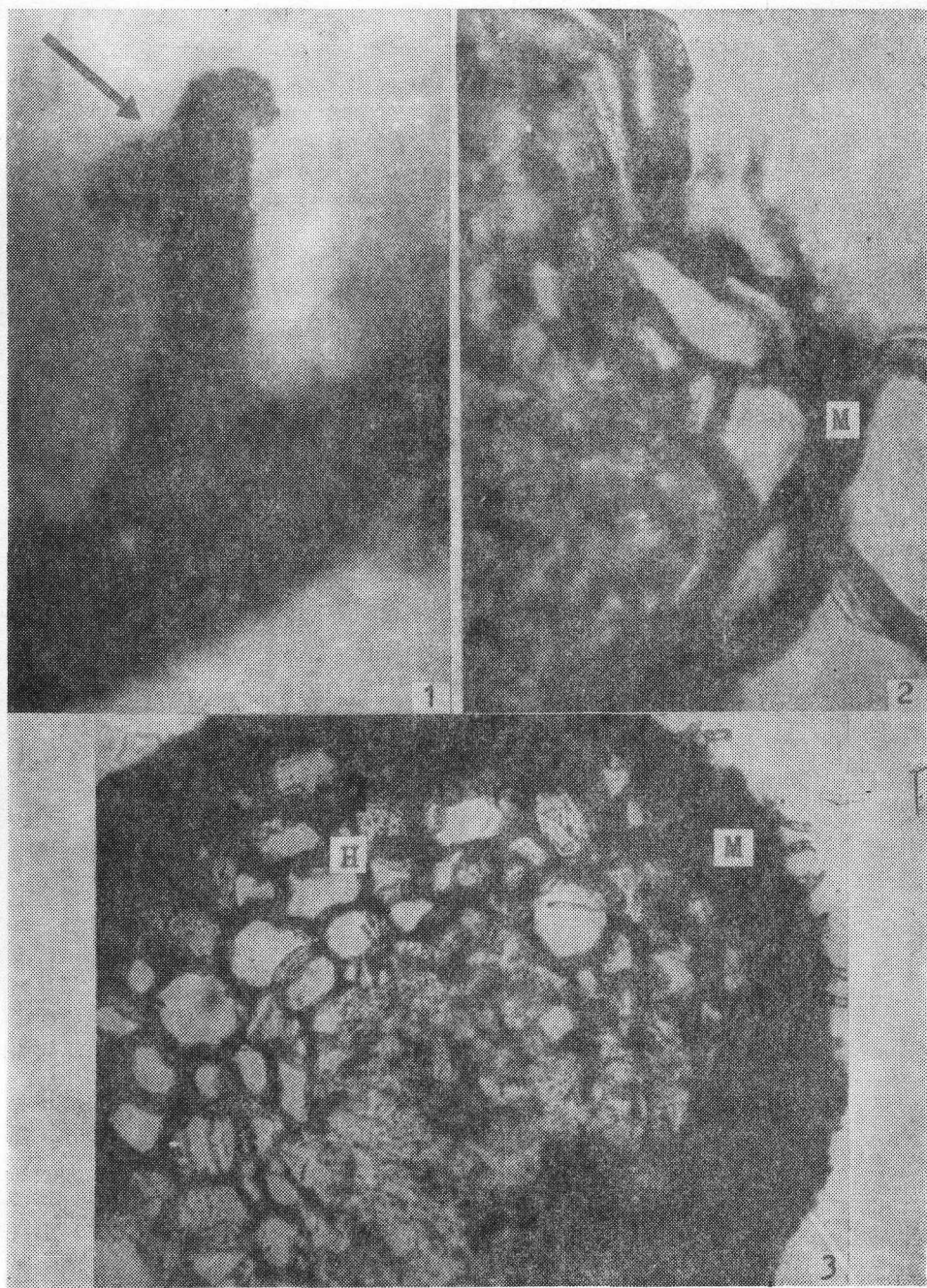
(The Research Institute of Forestry CAF)

Abstract Three ectomycorrhizal fungi, *Boletus griseus*, *B. sp.* and *Suillus grevillei*, were chosen to be studied on ecological adaptability to environmental factors, such as temperature, pH, salt concentration and water potential. Besides, the 3 fungi were used in pure culture synthesis of *Pinus tabulaeformis* and *P. elliotii* ectomycorrhizae.

Generally, pH and salt concentration had slight effects on the growth of ectomycorrhizal fungi but temperature and water potential had strong effects in the ecological adaptability experiments using 3 fungi. *B. sp.* and *S. grevillei* displayed their strong adaptability in varied ecological conditions. In addition, it's evident that PEG-4000 can accelerate the growth of ectomycorrhizal fungi in liquid.

In the pure culture synthesis, five ectomycorrhizae were formed, in which *P. tabulaeformis* - *B. griseus* were discovered for the first time. *P. tabulaeformis* - *S. grevillei* and *P. elliotii* - *B. griseus* are better ones of the 5 mycorrhizae.

Key words ectomycorrhizae; fungi; ecology



1. 湿地松-*B. griseus* 外生菌根二分叉的形态特征, 500 \times ; 2. 形成初期的湿地松-*B. griseus* 外生菌根, 4000 \times ; 3. 一年生的湿地松-*B. griseus* 外生菌根, 4000 \times 。其中: M——菌套; H——哈蒂氏网。