

ECM 和 VAM 菌混合接种对 尾叶桉生长效应的研究*

陈应龙 弓明钦 王凤珍 陈羽

摘要 本文报道混合接种外生菌根真菌彩色豆马勃和 VA 菌根真菌苏格兰球囊霉对尾叶桉苗期的接种效应。根系样品检查表明接种的两个菌株均能在尾叶桉上成功合成相应的菌根。接种后5个月试验苗生长量和生物量的分析结果表明, 接种与未接种对照差异极显著($P=0.01$), 其中, 两种混合接种方式苗木干重分别比对照增加了240.3%和194.3%; 苗高生长增加了73.8%和41.7%; 地径增加了17.2%和19.3%。试验苗木对菌根的依赖性(MD)均较强, 其中对混合菌根的依赖性为340.3%~294.3%。研究结果还表明, 接种方式影响菌根的接种效应, 接种 VAM 菌后20 d 再接种 ECM 菌表现出极大的接种效果, 在苗高生长和生物量方面都明显超过了单接种。试验进一步证实, 接种菌根菌能显著促进苗木生长和对干物质的积累, 混合接种发挥的效应更大。

关键词 混合菌根 VAM ECM 尾叶桉 接种效应

桉树(*Eucalyptus*)是一种菌根营养型树种, 它不仅具有外生菌根(ectomycorrhiza, ECM), 也具有内生菌根(endomycorrhiza), 即泡囊—丛枝状菌根(VA 菌根), 此外还发现有混合菌根^[1-3]。所谓混合菌根(ecto-and endomycorrhiza 或 dual mycorrhiza), 是指在同一株植物的根系上, 由不同种或不同种类的真菌形成不同类型的菌根, 或者在同一小根上既有外生菌根形成的菌套(mantle)和哈蒂氏网(Hartig net), 又有内生菌根真菌形成的泡囊或丛枝^[2]。在许多既可形成外生菌根, 又可形成内生菌根的树种上常发现有混合菌根的存在。例如, 桉、柳(*Salix*)、杨(*Populus*)、金合欢(*Acacia*)、柏木(*Cupressus*)、刺柏(*Juniperus*)、椴树(*Tillia*)、榆(*Ulmus*)及木麻黄(*Casuarina*)等属的树种, 在一定条件下均可形成混合菌根^[1-4]。国外对桉树和杨树混合菌根的初步研究, 证实了混合菌根具有较好的促生作用, 并能提高宿主的抗逆能力^[4,5]。我们是在对桉树外生菌根和 VA 菌根研究的基础上, 开展了桉树混合菌根人工合成研究。本文报道尾叶桉混合菌根接种试验的部分研究结果, 即混合菌根的苗期接种效应。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种 ECM 菌选用彩色豆马勃[*Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch] Pt 9303 菌株, 由本课题组分离培养; VAM 菌选用苏格兰球囊霉[*Glomus caledonium*(Nicol. &

1998—03—17收稿。

陈应龙研究实习员, 弓明钦, 王凤珍, 陈羽(中国林业科学研究院热带林业研究所 广州 510520)。

* 本研究为国家自然科学基金1997~2001年“杉木、桉树人工林长期生产力保持机制研究”和中澳合作 ACIAR 9425项目1996~1998年“中国桉树人工林的外生菌根菌”内容之一。本文得到北京林业大学雷增普教授和北京市农林科学院张关庆研究员的指导和审阅, 特此致谢。

Gerd) Trappe & Gerd] Gc 90068 菌株,由南京土壤所林先贵先生提供。接种所用的菌剂分别采用液体培养和生物繁殖法生产。

1.1.2 试验树种 尾叶桉(*Eucalyptus urophylla* S. T. Blake) 种子由本所吴菊英先生提供,种源号为14531。

1.1.3 育苗基质 采用消毒的混合基质(山蛭石、泥炭、河砂按照体积比1.5:1:2混匀)。

1.2 方法

1.2.1 接种方法 待无菌苗长到3 cm 左右时进行移苗,同时进行第一次接种。ECM 菌采用菌丝球接种,每株幼苗接种菌丝球2~3粒,VAM 菌用孢子菌剂接种。20 d 后,根据试验设计,对需要进行混合接种的苗木,采用注入法进行第二次接种。

1.2.2 试验设计 试验设5个处理:T1、T3分别为VAM 菌和ECM 菌单接种,T2和T4为混合接种(T2为先接种VAM 菌 Gc90068,第二次接种ECM 菌 Pt9303;T4接种顺序与T2相反),T5为未接种对照。4个重复,重复内各处理苗木10株,按完全随机区组设计。

1.2.3 试验苗生长量测定 完成第二次接种后每月测定一次生长量[苗高 H (cm) 和地径 D_0 (mm)]。接种后5个月时收获苗木,用烘干法测定苗木地上部分干重(W_a) 和地下部分干重(W_u),并计算植株总干重($W_t = W_a + W_u$)。

1.2.4 菌根感染率评价方法

外生菌根(ECM): 菌根感染率(%) = $\frac{\text{感染根段数}}{\text{观察根段的总数}} \times 100\%$

VA 菌根: 菌根感染根段长(%) = $\frac{\text{交叉点上的菌根数}}{\text{根段与划线交叉点总数}} \times 100\%$

1.2.5 菌根依赖性(Mycorrhizal dependence) 计算方法^[6]:

$$MD(\%) = \frac{DW_1}{DW_2} \times 100\%$$

式中: DW_1 为菌根接种苗木植株干重, DW_2 为未接种苗木植株干重。

2 结果与分析

2.1 菌根合成

接种后5个月时,对苗木根系菌根感染情况进行了检查,结果表明,无论是单接种还是混合接种,在苗木根系上均合成了相应的菌根。单接种苏格兰球囊霉,其苗木根系VA 菌根感染根段长达到90%;单接种彩色豆马勃感染率为75%。混合接种T2苗木根系VAM 感染率为82%,其中部分根系同时感染有ECM 菌,ECM 感染根段占观察根段总数的54%;混合接种T4苗木根系ECM 感染率为65%,VAM 感染根段长为48%。试验证明了所采用的两种类型的菌根真菌均能在尾叶桉苗木根系上进行定殖。

2.2 混合菌根对桉树生长的影响

在接种后连续5个月,每月测定一次苗高和地径,将其平均值列于表1;接种后150 d 测定的各处理苗木 W_a 、 W_u 及 W_t 统计于表2。观测值经 F 检测(表3),结果表明,处理间在苗高、地径及干重积累上差异极显著($P = 0.01$)。

2.2.1 对苗期高生长量的影响 从试验苗高生长情况来看,混合接种比不接种(对照)有极显著差异(表3)。在完成接种后60、90、120、150d时,混合接种处理T2比对照分别增长了

表1 试验苗平均苗高、地径与对照比 [单位: $H(\text{cm})$, $Do(\text{mm})$]

处理	30 d		60 d		90 d		120 d		150 d	
	H	Do	H	Do	H	Do	H	Do	H	Do
T1	9.42	1.66	38.15	3.60	66.11	5.76	72.93	7.12	77.8	8.1
T2	9.21	1.82	39.36	3.62	74.22	6.13	81.37	7.25	87.3	8.79
T3	8.40	1.72	32.63	3.73	59.82	5.22	71.86	6.89	77.43	8.65
T4	9.09	1.46	25.76	3.21	51.18	4.98	64.13	6.84	71.20	8.95
T5(CK)	7.98	1.45	24.10	3.43	33.94	5.04	46.37	6.19	50.23	7.50
比对照增加 (%)										
	H	Do	H	Do	H	Do	H	Do	H	Do
T1	18.0	14.5	58.3	5.0	94.8	14.3	57.3	15.0	54.9	8.0
T2	15.4	25.5	63.3	5.5	118.7	21.6	75.5	17.1	73.8	17.2
T3	5.3	18.6	35.4	8.7	76.3	3.6	55.0	11.3	54.2	15.3
T4	13.9	0.7	6.4	-6.4	50.8	-1.2	38.3	10.5	41.7	19.3

表2 试验苗平均干物质重及与对照比

接种处理	平均干重(g)				比T5增加 (%)			菌根依赖性 (%)
	W_u	W_a	$W_l^{\text{①}}$	W_u/W_a	W_u	W_a	W_t	
T1	3.65	7.43	11.08 b	0.491 3	228.8	150.2	174.3	274.3
T2	3.78	9.97	13.75 a	0.379 1	240.5	240.3	240.3	340.3
T3	4.40	8.52	12.92 a	0.516 4	296.4	190.5	219.8	319.8
T4	4.26	7.63	11.89 b	0.558 3	275.6	160.4	194.3	294.3
T5(CK)	1.11	2.93	4.04 c	0.378 8				

①该栏中,字母相同者为无显著差异,而字母不同者有显著差异($P=0.01$)。

表3 接种试验苗生物量方差分析

变异来源	DF	SS	MS	F
苗高 $H_1(\text{cm})$	4	629.282	157.320	75 393.179**
苗高 $H_2(\text{cm})$	4	2 274.588	568.647	75 752.255**
地径 $D_1(\text{mm})$	4	1.044	0.261	2 609.333**
地径 $D_2(\text{mm})$	4	4.510	1.127	238.863**
根系干重 $W_{u2}(\text{g})$	4	21.455	5.399	47 635.510**
茎叶干重 $W_{a2}(\text{g})$	4	82.485	20.621	6 453.581**
植株干重 $W_{t2}(\text{g})$	4	179.370	44.842	16 247.261**

注:变源栏中生物量1和2分别是指接种后60 d和150 d时的观测值; ** 显著水平 $P=0.01$ 。

63.3%、118.7%、75.5%和73.8%;混合接种处理 T4分别增长6.4%、50.8%、38.3%和41.7% (表1)。在接种后90 d时,两种混合接种苗木的高生长量达到最大增长幅度, T2和 T4分别比未接种(对照)增长了118.7%和50.8%,表现出显著的接种效应,其中 T2接种效果最佳。从各处理苗高生长曲线图(图1)上还可以看出,对照苗从完成接种长至50 cm高,约需要150 d,若从播种计算,则需要180多 d;而在同样试验管理条件下,混合接种 VAM 和 ECM 真菌的试验苗,从播种长至同样高度,只需要100(T2)~120 d(T4),比相应的未接种对照苗木大约缩短了80~60 d。这表明,混合接种菌根真菌能缩短苗木的育苗周期,对苗高生长具有明显的促生效果。

2.2.2 对苗木茎干生长的影响 在接种初期,菌根接种对苗木地径的促生作用,没有在苗高生长方面那么明显,从地径生长曲线图(图2)上仍可以看出增长的趋势。与未接种对照相比,混

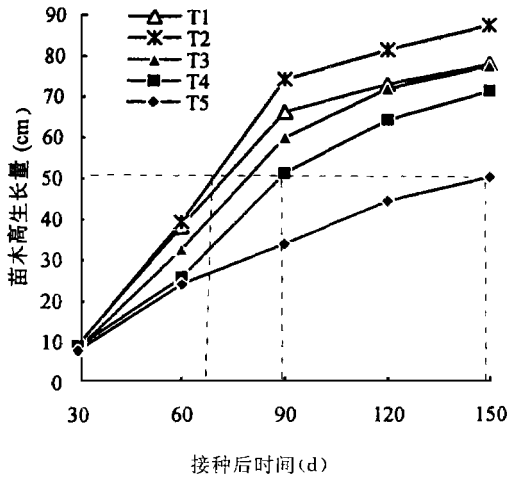


图1 苗木高生长曲线

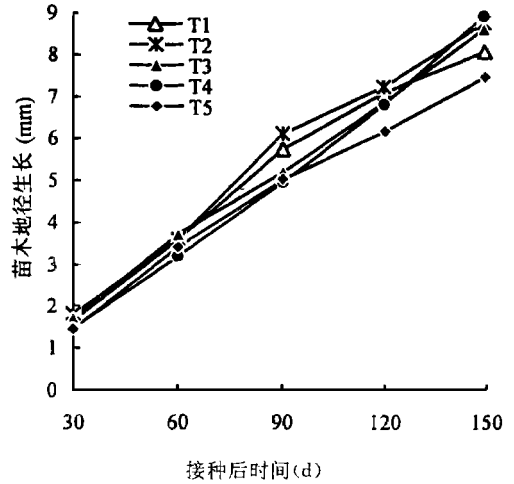


图2 苗木地径生长曲线

合接种苗木地径生长量在接种90 d后开始出现较明显增长趋势。在120 d时, T2和T4分别比对照增加17.1%和10.5%, 150 d时分别增加17.2%和19.3%(表1), 表现出较好的促生作用。

2.2.3 混合接种对苗木干物质积累的影响 接种后150 d, 各处理间苗木相应干重 W_u 、 W_a 及 W_t 有极显著差异(表3), 混合接种苗木, 其 W_u 、 W_a 和 W_t 比未接种对照苗木的相应指标均增加明显(表2); 对于植株总干重 W_t 来说, 混合接种处理 T2和T4分别比对照增加240.3%和194.3%。但从 W_u 和 W_a 的比值来看, 混合接种 T4比值最大, 两种单接种次之, T2和T5均较小, 这说明接种处理对苗木地下部分和地上部分的影响有所差异。

2.2.4 菌根依赖性(MD) 尾叶桉幼苗对两种混合接种方式均有较强的依赖性, MD值分别为340.3%和294.3%, T2的依赖性相对较大。这进一步说明了接种方式对接种效果产生不同的影响, 苗木对T2接种方式的依赖性更大。

2.3 各类型菌根对宿主生长效应的综合评价

接种菌根菌均能促进苗木的生长和对干物质的积累。从试验苗生物量不同时间的观察结果(表1~3, 图1~2)能清楚地看出, 菌根菌接种苗木与未接种(对照)间有显著差异, 充分显示出接种菌根真菌对尾叶桉苗期生长的促生作用, 表现出较好的接种优势; 同时也可以看出, 不同菌根接种方式对苗木生长产生的效果存在差异。

(1) 混合菌根对尾叶桉苗期高生长和干物质的积累效果极其显著。两种混合接种方式的接种效应不同。与单接种处理相比, 在对苗木生物量的影响上, 混合接种T2明显好于单接种; 而混合接种T4要差于T2, 在苗高生长上也低于单接种。

统计分析结果表明, 与单接种ECM菌和单接种VAM菌相比, 在苗高生长和干物质积累上, 混合接种T2具有明显的促进苗木生长的优势。在对苗木高生长上, 接种后150 d时, 4种接种处理苗木分别比对照增加了54.9%、73.8%、54.2%和41.7%, 其中, 混合接种T2增长最多, 两种单接种次之, T4对苗高的影响相对较小; 在对苗木干重的影响上, 4种接种苗木地下部分干重分别增加了228.8%、240.5%、296.45%和275.6%, 地上部分干重依次增加了150.2%、

240.3%、190.5%和160.4%,可以看出,T3、T4和T2对根系干物质的积累均较好,T3增加最多,而T2对苗木地上部分的影响最大;苗木地下部分与地上部分干重的比值(W_u/W_a)表明,混合接种方式T4苗木比值最大,为0.558,单接种ECM菌(T3)次之,混合接种T2与对照相差不多,说明不同接种方式对苗木不同部分产生的影响也有不同。

(2)与未接种(对照)相比,单接种ECM菌或VAM菌,均能显著地促进尾叶桉苗木的生长,表现出显著的接种效应;两种单接种处理中,VAM菌初期接种效果较好,而ECM在接种后期作用明显。

单接种VAM菌5次苗高观察结果,比同期对照苗分别增加18.0%、58.3%、94.8%、57.3%和54.9%;单接种ECM菌,比对照分别增加5.3%、35.4%、76.3%、55.0%和54.2%。在前3次苗高的观察值中,VAM苗木相对较好。菌根接种处理苗木在接种初期对地径的贡献也有差异,在接种后90 d,先接种有VAM菌的苗木(T1和T2),其地径生长效果较好,比T5分别增加了14.3%和21.6%。在接种后150 d时,T1接种苗木干重比对照增加了174.3%,T3接种苗木干重增加了219.8%,说明在观察后期,接种ECM菌对干物质的积累明显好于单接种VAM菌。

(3)从菌根依赖性(MD)来看(表2),在完成接种后150 d,尾叶桉各处理苗木对接种的相应菌根的依赖性均较大,但依赖程度有所差别。其中,混合接种处理T2的MD值最大;T2和T3的MD值均超过300,依赖性强;T4和T1依赖性中等。

3 结论与讨论

(1)接种菌根菌是否有较显著的接种效应,将直接影响其在今后的生产中的应用前景,因此,接种效应是开展菌根研究的一个重要内容。本研究结果表明,外生菌根菌株彩色豆马勃和VA菌根菌株苏格兰球囊霉接种尾叶桉均能显著促进苗期的生长。关于桉树ECM的接种效应,国内外报道较多,均证明ECM菌在不同程度上能促进桉树苗期的生长^[2,3,7,8]。国内外对桉树接种VAM菌效果的研究结果不一。在国内,窿缘桉(*E. exserta* F. Muell)接种摩西球囊霉[*Glomus moseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe]^[9],能促进苗木的生长。Adjoud等(1996)研究了11种桉树对3种VAM菌的接种效果,表明不同树种与菌种组合的接种效果不同^[10]。也有报道认为,单接VAM菌与对照没有显著差异^[11]。这种不同的接种效果,可能与试验所采用的树种、菌种及试验条件等因素关系很大,因此VAM菌在实际生产应用中,需要先开展苗期接种与菌种筛选试验,以便在大田应用中能得到最佳的接种效果。

(2)国内外对桉树混合菌根的研究较少,本文对尾叶桉进行混合接种,表明两种混合接种方式均能显著促进桉树幼苗的生长,这一结果与Laperiyie和Chilvers^[4]的研究结果相近。然而,不同的接种方式导致了不同的接种效果,并且,接种方式对菌根菌在根系上的定殖和菌根合成程度也有较大的影响;从菌根感染情况来看,不同的接种方式影响菌根菌间的相互作用,主要表现在后加入的菌根菌对早先接种的另一类型的菌根菌在进一步感染上有一定的抑制作用,表现出一定的竞争性(另文报道)。这种抑制作用仅从菌根感染率变化情况来判断的,真菌间是否存在直接的作用关系,还有待深入研究。VAM的加入抑制了先接种的ECM菌的接种效果,已有报道。Muchovej等^[11]用VAM菌剂和ECM菌分别对巨桉(*Eucalyptus grandis* Hill ex Maid.)进行单接种或混合接种,结果也发现VAM菌接种到ECM植株上,影响了外生菌

根的促生作用。赵忠等^[12]对毛白杨菌根的观察和研究结果表明,VA 菌根与外生菌根真菌在对根系的感染上呈负交互作用。对这两种菌根类型真菌间的相互关系的分析,笔者认为,要视具体的情况而定,不能一概而论,因为这不仅与试验接种的菌根真菌有关,还受试验基质、水分及营养条件等的制约^[13];另外,研究者用于计算和评价菌根感染情况的具体方法可能有所差异,譬如,忽略根系本身数量上的增加,可能会得出菌根感染率降低的结论,因此,对菌根感染情况的有关指标有必要加以改进和规范。对这一问题,在另一报道中作了进一步的探讨^[14]。

(3)在接种初期(120 d内),VAM 菌接种的苗木比 ECM 菌接种的效果好;但随着时间的推移,ECM 接种苗木的生物量增长速度逐渐加快,在干物质积累上超过了 VAM 的接种苗木。说明 VAM 接种效果在初期能很快表现出来,而 ECM 菌接种效果要略迟一些,这与 VAM 真菌在根系感染得快,而 ECM 真菌感染慢有一定的关系。VAM 真菌的根系上的定殖,要比 ECM 真菌所需的时间少,从这两种类型的菌根菌的发育特点和不同时期菌根感染率,可以得到较好的解释。

(4)混合菌根是桉树菌根研究的一个重要内容。混合菌根具有较好的接种效果,对宿主的营养生理也产生了一定的影响^[15,16]。与单一真菌接种相比,多种菌根菌混合接种能更有效地发挥各个菌种的长处,体现出综合效应;同时,混合接种符合生物多样性原理,更具有实际意义。本研究结果为今后混合菌根的深入研究提供了线索,为菌根技术在生产实践中的应用提供了理论依据。

参 考 文 献

- 1 郭秀珍,毕国昌. 林木菌根及应用技术. 北京:中国林业出版社,1989. 161~163.
- 2 弓明钦,陈应龙,仲崇禄. 菌根研究及应用. 北京:中国林业出版社,1997. 84~88.
- 3 Brundrett M, Bourgher N, Dell B, et al. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Canberra: ACIAR Monograph 32, 1996. 34~35.
- 4 Lapeyrie F F, Chilvers G A. An endomycorrhizal-ectomycorrhiza succession associated with enhanced growth by *Eucalyptus dumosa* seedlings planted in a calcareous soil. New Phytol., 1985, 100: 93~104.
- 5 Lodge D J. Negative associations among VA mycorrhizal fungi and some ectomycorrhizal fungi inhabiting the same root system. DIKOS, 1989, 57: 347~356.
- 6 Menge J A, Johnson E L V, Platt R G. Mycorrhizal dependency of several citrus cultivars under three nutrient regimes. New Phytol., 1978, 81: 553~559.
- 7 Gong Mingqin, Wang Fengzhen, Chen Yu, et al. Development of technology for the ectomycorrhizal inoculation of *Eucalyptus* cuttings and tissue culture plantlets in southern China. In: Brundrett M, Dell B, Malajczuk N. et al. (eds.), Mycorrhizas for Plantation Forestry in Asia. ACIAR Proceedlings, 1994, 62: 138~142.
- 8 Malajczuk N, Molina R, Trappe J M. Ectomycorrhiza formation in *Eucalyptus*. I. Pure culture synthesis, host specificity and mycorrhizal compatibility with *Pinus radita*. New Phytol., 1982, 91: 467~482.
- 9 Liang Xioutang Inoculation of forest and fruit trees with VA mycorrhizal fungi in Guangxi Province, China. In: Brundrett M, Dell B, Malajczuk N, et al. (eds.). Mycorrhizas for Plantation Forestry in Asia. ACIAR Proceedlings, 1994, 62: 91~94.
- 10 Adjoud D, Plenchette C, Halli-Hargas R. Response of 11 eucalyptus species to inoculation with three arbuscular mycorrhizal fungi. Mycorrhiza, 1996, 6: 129~135.
- 11 Muchovej R M C, Amorim E F C. Development and effect of endo- and or ectomycorrhizal fungi on seedlings of *Eucalyptus grandis*. In: Abstracts of the 8th NACOM. Jackson Wyoming, 1990. 251.

- 12 赵忠, 马利欣, 段安安, 毛白杨 VA 菌根与外生菌根关系的研究. 林业科学, 1994, 30(2): 111 ~ 116.
- 13 Lodge D J. The influence of soil moisture and flooding on formation of VA-endo- and ectomycorrhizae in *Populus* and *Salix*. Plant and Soil, 1989, 117: 255 ~ 262.
- 14 Chen Yinglong, Brundrett M, Dell B. Effects of dual inoculation vs ectomycorrhizal and VA mycorrhizal fungi on root colonization and growths of *Eucalyptus globulus* and *E. urophylla*. New Phytol., 1998 (in press).
- 15 Chen Yinglong, Gong Mingqin, Wang Fengzhen, et al. Influence on nutrient uptake of *Eucalyptus urophylla* seedlings by inoculating with dual VAM and ECM fungi. In: Proceedings of International Workshop on Tropical Forest Rehabilitation in the Asia-Pacific Region, the 6th Annual International Workshop of BIO-REFOR. Brisbane Australia, 1997.
- 16 陈应龙, 弓明钦, 王凤珍, 等. 尾叶桉混合菌根营养生理研究. 林业科学研究, 1998, 11(3): 237 ~ 242.

Effects of ECM and VAM Fungi Combined Inoculation on the Growth of *Eucalyptus urophylla*

Chen Yinglong Gong Mingqin Wang Fengzhen Chen Yu

Abstract Ectomycorrhiza (ECM) and vesicular-arbuscular mycorrhiza (VAM) are the two principal associations on root systems of most vesicle plants worldwide. It is proved that the genus *Eucalyptus* is capable of forming both ECM and VAM, even at the same root system. This paper represents the third part of the report with results from coinoculation experiment using two fungal isolates (*Pisolithus tinctorius* and *Glomus caledonium*), and demonstrates the inoculant effectiveness on the growth of *Eucalyptus urophylla* Seedlings. The results showed significant differences in growth and biomass between inoculated and uninoculated seedlings ($P = 0.01$). Five months after inoculation, average height and basal diameter of coinoculated seedlings increased by 41.7% ~ 73.8% and 17.2% ~ 19.3% respectively, comparing to that of controls. Additionally, their mean dry weight was enhanced by 194.3% ~ 240.3%. Mycorrhizal dependence (*MD*) of combined inoculated seedlings ranged from 340.3% to 294.3% based on their top dry weight. The effects on the growth of *Eucalyptus* inoculated with fungal isolates alone or in competition was also compared.

Key words ecto- and endomycorrhiza (dual mycorrhiza) VAM ECM *Eucalyptus urophylla* inoculant effectiveness

Chen Yinglong, Assistant Engineer, Gong Mingqin, Wang Fengzhen, Chen Yu (The Research Institute of Tropical Forestry, CAF Guangzhou 510520).