

文章编号: 1001-1498(2003) 03-0262-07

# 彩色豆马勃与松树形成内外生菌根的研究

郑来友<sup>1</sup>, 李文钊<sup>2</sup>, 成小飞<sup>2</sup>, 花晓梅<sup>1</sup>

(1 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091; 2 中国林业科学研究院森林  
生态环境与保护研究所, 北京 100091)

**摘要:** 采用组培菌根合成技术、纸三明治菌根快速合成技术和圃地截根菌根化育苗技术使彩色豆马勃 RG310 和 RG49 菌株在马尾松、火炬松、湿地松上形成内外生菌根。不同菌根化技术形成菌根的过程和类型有差异。在组培菌根合成的条件下, 菌与根接触后的第 3~4 d 首先开始形成菌丝套, 第 8 d 开始形成哈蒂氏网, 第 18 d 菌丝进入皮层细胞内, 哈蒂氏网由单列变为多列菌丝细胞组成; 采用纸三明治菌根快速合成技术进行截根菌根化, 促进了菌根真菌的定殖, 以截面伤口侵入为主要的侵入方式, 扩大了根内外菌根侵染区(MIZ), 定殖、侵染同时发生, 菌丝套、哈蒂氏网和胞内菌丝结构几乎同时形成, 仅在 2.5 h 内就开始形成, 菌根真菌的菌丝进入了内外皮层和髓部; 采用圃地截根菌根化育苗技术, 仍然形成内外生菌根, 但菌丝不侵入内皮层以内的根组织。根据研究提出“菌根类型”假说, 即树木形成的菌根类型不但随菌根真菌和树木种类而异, 而且随菌根化方法、生态条件等其它因子而异。

**关键词:** 彩色豆马勃; 松树; 内外生菌根; 菌根化; 组培; 截根

中图分类号: S718.8 S791.24 文献标识码: A

内外生菌根兼有内生菌根和外生菌根两种结构的形态特征。这种类型的结构有时也在专性外生菌根树种——松属(*Pinus*) 树木上形成。许多学者报道了与松树形成内外生菌根类型的真菌多半属于子囊菌(ascmycetes)或半知菌(imperfect fungi), 有的属内囊霉科(Endogonaceae)的藻状菌(phycomycetes)<sup>[1,2]</sup>, 迄今尚未见到担子菌(basidiomycetes)与松树形成内外生菌根的报道。彩色豆马勃(*Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch) 简称(*Pt*) 是松树常见的一种外生菌根真菌, 属担子菌亚门(Basidiomycotina)、腹菌纲(Gasteromycetes)、硬皮马勃目(Sclerodermatales)、硬皮马勃科(Sclerodermataceae)、豆马勃属(*Pisolithus*)。用 *Pt* 纯培养菌丝体菌剂在苗圃进行松树菌根化时发现 *Pt* 与火炬松(*Pinus teada* L.) 形成了内外生菌根。通过试验进一步证实此种发现的正确性、可靠性, 研究此种菌根类型的形成过程及其作用, 为 *Pt* 在松树育苗和造林中的应用提供理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 菌株及接种体

##### 1.1.1.1 菌株 RG310 和 RG49 由中国林科院林业所菌根中心提供。

收稿日期: 2003-03-22

基金项目: 本研究为国家“八五”攻关专题“湿地松、火炬松、马尾松、桉树和落叶松菌根应用技术研究”和国家“九五”攻关“纸浆材树种 VA 菌根应用技术的探索性研究”的部分内容

作者简介: 郑来友(1971—), 北京顺义人, 助理研究员。

1.1.1.2 接种体 采用两种接种体, 即大田圃地菌根化育苗采用纯培养菌丝体菌根剂; 纯培养菌根合成采用在 MMN 平板上培养 2 周的菌落, 切取其直径为 6.0 mm 的菌丝片。

1.1.2 树种及种苗 试验树种为火炬松(*Pinus taeda* Linn.)、湿地松(*Pinus elliotii* Engelm.)、马尾松(*P. massoniana* Lamb.)。前两种大田圃地菌根化育苗试验的种子由江西省种子分公司调拨, 纯培养菌根合成试验的种子是由林业部种子分公司进口, 为美国路易斯安娜州种源; 后一种为浙江省淳安县姥山马尾松种子园优良种源, 由中国林业科学研究院亚热带林业研究所秦国峰提供。大田圃地菌根化育苗试验是将经 0.2% 高锰酸钾消毒和温水(40~60 °C)浸种催芽的种子, 播种于控温(25~30 °C)、控湿(相对湿度 60%~80%)的砂床, 培育成幼苗(芽苗)备用。纯培养菌根合成试验将经过 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 表面消毒和裸层积催芽 30 d 的种子置于 1.0% 水琼脂基表面上, 25 °C 温度下萌发形成无菌幼苗备用。组培菌根合成试验所用种子除去外种皮, 用 70% 乙醇消毒 1 min, 然后用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒 10 min, 无菌水冲洗 4~5 次, 剥取种胚接入不定芽诱导培养基。

1.1.3 培养基 菌根真菌培养和纯培养菌根合成分别采用 MMN 固体培养基和液体培养基; 组培菌根合成不定芽诱导培养基为 GD(Gresshoff & Doy, 1972) + 2.0 mg·L<sup>-1</sup> BA(6-苄基嘌呤), 不加 IAA(吲哚乙酸); 不定芽生长培养基为 1/2GD(大量元素)附加 IBA(吲哚丁酸)0.1 mg·L<sup>-1</sup>, 生根和菌根合成培养基为 1/2GD<sup>[3]</sup>。

## 1.2 试验方法

1.2.1 菌根化方法 室内采用组培菌根合成技术<sup>[3]</sup>、纸-三明治快速菌根合成技术<sup>[4]</sup>; 室外采用圃地截根菌根化技术<sup>[5]</sup>。

1.2.2 取样和测定方法 根据不同试验方法形成菌根的时间确定取样时间。组培菌根合成技术分别在第 3、4、5、6、7、13、18、24、45 d 取样; 纸-三明治快速菌根合成技术在 24 h 内每隔 2.5 h 取样, 以后分别在第 2、4、6、8、10、20 d 取样; 室外圃地截根菌根化在半月以后跟踪调查取样。

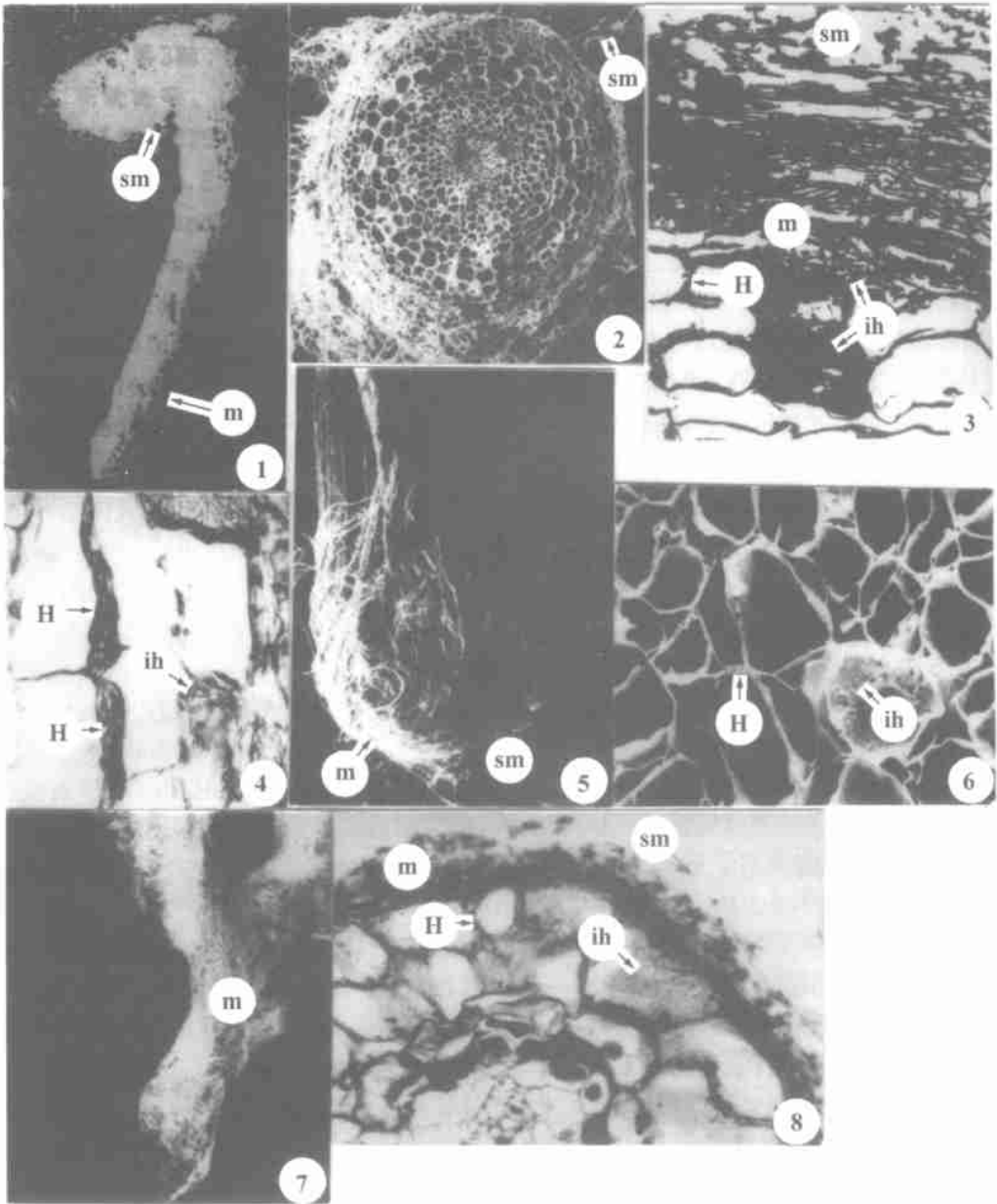
制作新鲜材料徒手切片, 用光镜跟踪观察菌根形成阶段, 确证菌丝套、哈蒂氏网的形成以及胞内感染的发生, 并用电子显微镜技术进一步观测和确证。光镜观测采用 FAA 固定液, 石蜡切片厚 10~20 μm, 番红和固绿对染。扫描电子显微镜技术: 根尖整装, 徒手厚切片, 经酒精梯度脱水, 醋酸异戊酯置换, 临界点干燥和高真空涂炭和金; 石蜡切片厚 16 μm, 用甘油明胶粘剂粘帖于小盖片上, 再固定于样品台上, 烘干, 二甲苯脱蜡, 真空喷涂炭和喷金。Philips 505 型扫描电子显微镜观察和拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 组培菌根合成试验

将组培小植株与 RG49 菌丝片同时植入组培生根培养基, *Pt* 菌丝迅速生长, 覆盖培养基表面, 并包裹根尖形成菌根。

2.1.1 菌丝套的形成 在小植株与菌丝片植入培养基后第 3~4 d, 根尖周围开始出现菌丝, 并覆盖根尖(图版 I-1, 2)。随着菌丝在根表数量和厚度的不断增加, 于第 6~7 d 形成菌丝纵横交织的网状菌丝套, 为菌丝束似网状排列密丝组织类型, 菌丝厚度为 300~400 μm, 菌丝具分隔、锁状联合和双核, 平均直径为 2.5~4.5 μm, 最粗达 8.0~9.0 μm。



图版说明: 采用的缩写字母说明: m——菌丝套; H——哈蒂氏网; ih——胞内菌丝; sm——周围菌丝

1. 菌丝覆盖组培小苗根尖, bar= 1 mm;

2. 组培合成的 *Pt+* 马尾松菌根横切面, 示菌丝套, bar= 0.5 mm

3. *Pt+* 马尾松组培合成菌根的横切面, 示菌丝套、哈蒂氏网和胞内菌丝, bar= 0.1 mm;

4. *Pt+* 马尾松组培合成菌根纵切面, 示多列菌丝组成的哈蒂氏网和胞内菌丝, × 600;

5. *Pt+* 火炬松纸-三明治截根菌根合成, 示菌丝沿幼根轴向截面生长, 高密度包裹截面形成网状菌丝套, bar= 1 mm;

6. *Pt+* 火炬松纸-三明治截根菌根化形成菌根的横切面, 示髓部哈蒂氏网和髓部细胞内菌丝, bar= 1 mm;

7. *Pt+* 火炬松圃地截根菌根化形成的菌根, 示菌根单个分枝龟头状和菌丝套外表面网状菌丝组织, bar= 1 mm;

8. *Pt+* 火炬松圃地截根菌根化形成菌根的横切面, 示菌丝套、哈蒂氏网和胞内菌丝, × 400。

图版1: 彩色豆马勃与松树形成的内外生菌根及其解剖结构

2.1.2 哈蒂氏网的形成 在植入后的第 8 天, 紧贴根表皮细胞外切向壁的菌丝沿着表皮细胞径向壁, 从细胞接合处向细胞内切壁的外侧侵入皮层细胞间隙, 包围表皮细胞, 先形成周表皮哈蒂氏网, 随着菌丝向内进一步侵染, 菌丝包围皮层细胞形成皮层哈蒂氏网。在第 13 天大量菌丝侵入表皮和皮层外层之间, 第 18 天菌丝侵入皮层外层细胞间隙, 形成发育完好的哈蒂氏网。此时, 可认为 *Pt* 与组培苗形成了外生菌根, 然而, 菌根侵染过程并未终止, 菌丝进一步向皮层细胞内侵入。

2.1.3 内外生菌根的形成 在发育完好的哈蒂氏网形成的同时, 菌丝进入皮层细胞内, 形成内外生菌根(图版 I-3)。在第 24~48 天菌丝不断深入至皮层的最内层, 在表皮和皮层之间及其细胞间形成单列或多列菌丝形成的哈蒂氏网, 而细胞内菌丝可呈迷宫状, 未发现菌丝进入内皮层以内的情况(图版 I-4)

## 2.2 纸三明治快速菌根合成试验

采用 2 个处理进行菌根合成试验: (1) 幼苗初生根接菌; (2) 在距根尖 0.5 cm 处截去根尖接菌。结果表明: 两个菌株与 3 种松树形成菌根的过程相似, 但不同处理的菌根形成过程和类型截然不同。

2.2.1 菌丝在根表定殖 处理 1 在根与菌接触后 5.0 h 的第 2 次观察仅发现有极少的菌丝在初生根根尖后 5.0~7.0 mm 处定殖; 而处理 2 则在根与菌接触后 2.5 h 的第 1 次观察就发现大量菌丝在截面上定殖, 高密度包裹截面形成网状的菌丝套(图版 I-5)。随着时间的增长, 两个处理菌丝在根表的定殖长度和定殖强度均加大, 处理 2 比处理 1 先发生侵染。

2.2.2 菌根侵染过程 不同处理对菌根侵染过程有很大的影响, 表 1, 2 中可见处理 2“截根菌根化”大大地促进了菌根真菌定殖、侵染和菌根的形成, 改变了菌根真菌定殖和侵染部位, 扩大了菌根侵染区(MIZ)内外表面积, 缩短菌根侵染过程, 加速菌根形成, 改变了菌根真菌侵染方式和侵染程序, 形成了内外生菌根类型, 菌丝侵入髓部, 形成髓部哈蒂氏网和髓部细胞内感染(图版 I-6)。

表 1 菌根化方式对菌根侵染过程的影响

侵染过程	菌根化方法	
	截根菌根化(处理 2)	幼苗菌根化(处理 1)
侵入孔口与方式	截面伤口侵入为主, 其它方式为辅	自然孔口、直接穿透、酶解孔口
侵染区(MIZ)	截面根部所有薄壁组织, 包括根表皮、外皮层、内皮层及髓部	根尖生长点后及初生皮层开始退化前
侵染途径	根部所有薄壁细胞间隙及细胞内	根表皮和外皮层细胞间隙
侵染程序	定殖、侵染同时发生; 菌丝套、哈蒂氏网、胞内菌丝结构同时形成	先定殖、后侵染; 先菌丝套后哈蒂氏网
菌根类型	内外生菌根	外生菌根
开始侵染时间	2.5 h	6 d

## 2.3 室外圃地截根菌根化试验

跟踪调查证实 *Pt* 与这 3 种松树形成的菌根外部形态相似, 均随不同生育阶段和成熟度逐渐呈棒状、二叉状至珊瑚状的膨大结构, 单个分支扭曲, 呈龟头状(图版 I-7); 颜色由金黄逐渐变为黄棕色至烟草棕色。从菌根横切面(图版 I-8)可见, *Pt* 菌根菌丝套是由多层菌丝在吸收根表面交织成的, 其厚度为 10~80 μm, 随菌根的生育期和成熟度而异。菌丝套外表面为网状

的密丝组织, 菌丝膨大、壁薄、较粗, 直径为 2.0~ 4.5  $\mu\text{m}$ ; 菌丝排列疏松, 分隔明显, 间隔长度为 12.5~ 25.0  $\mu\text{m}$ ; 菌丝套中部菌丝较细, 间隔较短, 菌丝细胞排列较紧; 菌丝内层细胞排列更紧密, 为拟薄壁组织, 呈网状相互重叠, 代替根表皮, 紧紧包在吸收根表面。其哈蒂氏网是由单层菌丝细胞组成, 菌丝较短, 平均直径为 2.0~ 8.5  $\mu\text{m}$ , 平均长为 10.3  $\mu\text{m}$ , 进入皮层细胞 1~ 2 层; 从该图还可见 *Pt* 菌丝不但与松树形成外生菌根的典型结构——菌丝套和哈蒂氏网, 而且进入根皮层细胞内形成内外生菌根的结构。ZaK<sup>[6]</sup> 报道 *Pt* 在纯培养条件下与熊果 (*Arctostaphylos uva-ursi* L.) 形成内外生菌根, 而花晓梅<sup>[7]</sup> 发现 *Pt* 在苗圃地育苗条件下与松树形成内外生菌根, 本实验结果进一步证实了这一内外生菌根现象。

表 2 *Pt* 与松树形成的菌根类型

树种	接菌后的 时间 d	处理 <sup>②</sup>	RG310 菌根化率/ % <sup>①</sup>		RG49 菌根化率/ %	
			ECM	ECEM	ECM	ECEM
马尾松	1	1	0.0	0.0	0.0	0.0
		2	—	100.0	—	100.0
	2	1	0.0	0.0	0.0	0.0
		2	—	100.0	—	100.0
	4	1	0.0	0.0	0.0	0.0
		2	—	100.0	—	100.0
	6	1	10.5	0.0	7.5	0.0
		2	—	100.0	—	100.0
	8	1	15.0	0.0	10.6	0.0
		2	—	100.0	—	100.0
10	1	20.2	0.0	19.4	0.0	
	2	—	100.0	—	100.0	
火炬松	1	1	0.0	0.0	0.0	0.0
		2	—	100.0	—	100.0
	2	1	0.0	0.0	0.0	0.0
		2	—	100.0	—	100.0
	4	1	0.0	0.0	0.0	0.0
		2	—	100.0	—	100.0
	6	1	13.5	0.0	10.6	0.0
		2	—	100.0	—	100.0
	8	1	18.0	0.0	11.8	0.0
		2	—	100.0	—	100.0
10	1	26.7	0.0	20.4	0.0	
	2	—	100.0	—	100.0	
湿地松	1	1	0.0	0.0	0.0	0.0
		2	—	100.0	—	100.0
	2	1	0.0	0.0	0.0	0.0
		2	—	100.0	—	100.0
	4	1	0.0	0.0	0.0	0.0
		2	—	100.0	—	100.0
	6	1	11.3	0.0	8.7	0.0
		2	—	100.0	—	100.0
	8	1	16.7	0.0	11.6	0.0
		2	—	100.0	—	100.0
10	1	19.6	0.0	19.3	0.0	
	2	—	100.0	—	100.0	

注: ①30个样本的平均值; ECM 代表外生菌根; ECEM 代表内外生菌根; ②处理 1 为幼苗初生根接菌, 处理 2 为在距根尖 0.5 cm 处截去根尖接菌。

### 3 结论与讨论

(1) 本研究采用 *Pt* 两个菌株, 以 3 种不同菌根合成方式, 在 3 种松树上进行菌根形成类型的研究, 结果表明, 采用组培菌根化和截根菌根化技术均使 *Pt* 与松树形成内外生菌根类型。因此可以提出“菌根类型”假说, 即树木形成的菌根类型不但随形成菌根的真菌和宿主树木种类而异, 而且随菌根化方法或生态条件等其它因子而异。

(2) 虽然组培菌根化与截根菌根化均形成了内外生菌根类型, 但是这两者有差异, 前者形成的内外生菌根菌丝套厚达 300~ 500  $\mu\text{m}$ , 哈蒂氏网发达, 由 1 至多列菌丝细胞形成; 后者菌丝套和哈蒂氏网不如前者发育好, 但菌丝侵入根部所有的薄壁组织甚至髓部。这种结果可用“临界假说”<sup>[8]</sup> 来解释, 即菌根生长速度在临界值以下整个菌根将发育完好, 反之, 当菌根生长速度超过临界值, 则菌根的形成, 尤其是哈蒂氏网的形成就受到了完全的抑制。未截根的幼苗, 主根生长速度更快, 这就是为什么菌根化速度慢、菌根化率低的原因。大田圃地截根菌根化苗木和纸三明治截根菌根合成苗木的根系显然其生长速度要比组培菌根化苗木根系生长速度快, 这就是不同菌根化形成菌根差异的机制。

(3) 截根菌根化技术是目前林木菌根化的最佳方法<sup>[5]</sup>, 本研究进一步阐明了该技术对菌根侵染过程的影响, 即促进了菌根真菌在根表面的定殖, 缩短了菌根侵染过程, 加速菌根形成, 仅 2.5 h 之内就开始形成内外生菌根。此种菌根化方法扩大了菌根真菌的侵染区(MIZ), 改变了侵染途径和侵染程序, 菌根真菌定殖、侵染同时发生, 菌丝套、哈蒂氏网和胞内菌丝结构同时形成。截去根尖后, 由于切口处没有表皮组织的阻挡, 使得菌丝直接与根组织细胞接触, 一方面扩大了侵染区的面积, 另一方面根组织细胞所分泌的酸和碳水化合物为菌丝的侵染提供了最适宜的环境和丰富的养分, 因此菌丝体的侵染能力得以大幅度提高, 这就是截根菌根化能够在非常短的时间(2.5 h)内就发生侵染并开始形成菌根特有的结构——菌丝套和哈蒂氏网的原因。

(4) 本文观测结果表明 *Pt* 与松树不但形成外生菌根, 而且能形成内外生菌根, 理论和实践证明此种菌根类型对松苗的生长是有利的, 尤其在纯培养条件下截根菌根化形成的新内外生菌根类型, 即菌根真菌的菌丝能侵入包括根内皮层以内的所有薄壁组织的细胞间隙和细胞内, 根的薄壁组织具有同化、贮藏、吸收等机能, 菌丝直接侵入这些组织, 尤其根髓部, 密切了根与菌的关系, 有利于加强它们之间的物质交换, 菌丝可将吸收的养分和水分直接输送至髓部, 供给植物生长发育。

#### 参考文献:

- [1] Bjorkman E. Uber die Bedingungen der Mykorrhizabildung bei Keifer und Fichte[J]. Symb Bot Upsaliens, 1942, 6: 190
- [2] Harley J H, Smith S E. Mycorrhizal Symbiosis[M]. London: Acad press Inc. 1983
- [3] 成小飞, 花晓梅, 李文钊. 马尾松离体培养下微繁殖和菌根的形成[J]. 林业科学研究, 1995, 8(3): 241~ 246
- [4] Chilvers G A, Douglass P A, Lapeyrie F F. A paper sandwich technique for rapid synthesis of ectomycorrhizas[J]. New Phytologist, 1986, 103: 397~ 402
- [5] 花晓梅, 刘国龙, 张效林, 等. 松树截根菌根化育苗和造林的研究[J]. 林业科学研究, 1995, 8(5): 535~ 543
- [6] Zak B. Pure culture synthesis of bearberry mycorrhizae[J]. Can J Bot, 1976, 54: 1297~ 1305
- [7] 花晓梅. 林木菌根研究[M]. 北京: 中国科技出版社, 1995. 184~ 193

- [8] Piche Y, Peterson R L, Howarth J, et al. A structural study of the interaction between the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* and *Pinus strobus* root[J]. Can J Bot, 1983, 61: 1185~ 1193

## Study on Ectomycorrhizae Associated by *Pisolithus tinctorius* with Pine

ZHENG Lai-you<sup>1</sup>, LI Wen-tian<sup>2</sup>, CHENG Xiaofei<sup>2</sup>, HUA Xiaomei<sup>1</sup>

(1. Research Institute of Forestry, CAF, Beijing 100091, China; 2 Research institute  
of Forest Ecology, Environment and Protection, CAF, Beijing 100091, China)

**Abstract:** Tissue culture technique, paper-sandwich mycorrhization technique and root-truncating cultivation with mycorrhiza in nursery were used to make *Pisolithus tinctorius* RG310 and RG49 to form ectoectotrophic mycorrhiza on *Pinus massoniana*, *P. taeda* and *P. elliottii*. There are differences in the process and type of mycorrhiza formation among different mycorrhization techniques above mentioned. By using the tissue culture mycorrhization technique, the mantle formed in the third or fourth day after the fungi got in touch with the roots, and began to form Hartig net on the eighth day, the hyphae entered the cortical cells on the 18th day, the inoculation intensity increased with the time extension, the Hartig net formed from the single line hyphae to multi lines hyphae. The paper-sandwich mycorrhization technique was used to promote the colonization of mycorrhizal fungi, shorten the inoculation process and accelerate the mycorrhiza formation. Cutting the surface wound is taken as the main way, which enlarged the MZ inside outside the root and transformed the inoculation procedure. The colonization and inoculation occurred at the same time, the mantle, Hartig net and hyphae inside cells formed nearly at the same time. A new mycorrhiza type—ectomycorrhizae formed only within 2.5 hours and the hyphae entered not only the cortical cells but also the pith. The root-truncating cultivation with mycorrhiza in nursery could also form ectomycorrhiza, but the hyphae could not enter the root tissue inside endodermis. Based on reasearch, the hypothesis “mycorrhiza type” is put forward, i. e. the mycorrhiza type formed by trees varies not only with the species of fungi and tree, but also with the mycorrhization techniques, ecological conditions etc.

**Key words:** *Pisolithus tinctorius*; pine; ectomycorrhiza; mycorrhization; tissue culture; root-truncating