

◎ 国家自然科学基金项目

◎ 国家“863”计划项目 联合资助

◎ 国家科技支撑计划项目

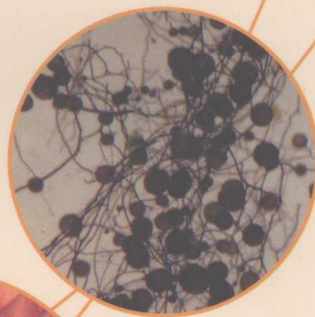
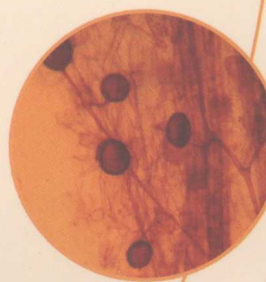
丛枝菌根培养新技术 及其对土地复垦生态效应

Congzhijungen Peiyang Xinjishu

Jiqi Dui Tudifukun Shengtaixiaoying

毕银丽 著

地质出版社



国家自然科学基金项目

国家“863”计划项目 联合资助

国家科技支撑计划项目

丛枝菌根培养新技术 及其对土地复垦生态效应

毕银丽 著

地质出版社

· 北 京 ·

内 容 提 要

本书是关于丛枝菌根生理生化特性研究以及丛枝菌根真菌在土地复垦中作用机理和生态效应的专著。丛枝菌根不能纯培养,对于菌根菌丝吸收养分的详细机理以及菌丝际特性认识几乎还是一片空白,丛枝菌根无杂菌双重培养技术的建立,为丛枝菌根真菌生理生化特性的研究提供了一条新的思路与方法。本书系统研究了丛枝菌根双重培养建立的方法、菌根分泌物的收集与测定方法、无杂菌菌丝际建立,孢子密度总量快速测定的方法、丛枝菌根快速扩繁与基质选择,同时也研究了丛枝菌根对养分和水分利用的状况与生态效应、菌根对压实土壤的改良、菌根对根际微生物群落的影响、菌根与根瘤菌双接种效应,揭示了丛枝菌根进行土地复垦的作用机理和效应。丛枝菌根应用于矿区土地复垦能提高植被的成活率,产生显著的生态效应。本书出版得到国家自然科学基金项目(批准号 40201051 和 20377051)、国家“863”项目(2006AA06Z372 和 2005AA644020)和国家科技支撑计划项目(2006BAC09B03)资助。

本书可供高等院校和科研院所从事土地复垦、环境治理、生物修复、生态重建等领域的人员、管理人员和工作技术人员阅读参考,也可作为大专院校高年级本科生和研究生的教学参考书。

图书在版编目(CIP)数据

丛枝菌根培养新技术及其对土地复垦生态效应/毕银
丽著. —北京:地质出版社, 2007. 5
ISBN 978-7-116-05314-4

I. 丛... II. 毕... III. ①丛枝菌属-培养(育种) ②丛
枝菌属-菌根-矿区-复土造田-研究 IV. Q949. 329

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 070742 号

责任编辑:陈 磊
责任校对:李 玫
出版发行:地质出版社
社址邮编:北京海淀区学院路 31 号, 100083
电 话:(010) 82324508 (邮购部); (010) 82324565 (编辑部)
网 址:<http://www.gph.com.cn>
电子邮箱:zbs@ gph.com.cn
传 真:(010) 82310759
印 刷:北京长宁印刷有限公司
开 本:787 mm × 1092 mm ¹/₁₆
印 张:8 彩版:6 面
字 数:200 千字
印 数:1—800 册
版 次:2007 年 5 月北京第 1 版·第 1 次印刷
定 价:22.00 元
书 号:ISBN 978-7-116-05314-4

(如对本书有建议或意见,敬请致电本社;如本书有印装问题,本社负责调换)

前 言

丛枝菌根真菌是自然界普遍存在的一种土壤微生物,它能够与植物根系形成一种互惠互利的共生关系。丛枝菌根真菌能够显著地增加植物对磷、锌和铜等营养元素的吸收,促进植物生长,提高植物在逆境中的生存能力,但是对丛枝菌根生理生化特性的研究开展较少,对其作用的详细机理研究还不是很深入。近年来丛枝菌根在农业方面的应用较多,而对于矿区被破坏土地的复垦及生态重建研究较少,菌根菌剂不能够产业化生产,限制了菌根技术在土地复垦中的推广应用,因此丛枝菌根培养新技术的建立,以及丛枝菌根在土地复垦中的效应研究对于矿区环境的修复与可持续发展具有重要的现实意义。

在作者主持的国家自然科学基金项目(批准号 40201051 和 20377051)、国家“863”计划项目(2006AA06Z372 和 2005AA644020)和国家科技支撑计划项目(2006BAC09B03)的资助下,对丛枝菌根培养的新技术进行了系统研究,建立了国际上菌根研究的前沿方法——离体双重培养技术,并深入研究了菌根分泌物种类和数量、菌丝际建立的方法、菌根扩繁技术与培养基质选择。系统地研究了丛枝菌根对土地复垦作用机理与生态效应等,并在将丛枝菌根应用于煤矿区土地复垦的实践中,取得了较好的生态效应。本研究内容较广,既有微观的基础理论研究,又有室内生态效应研究,同时使菌根技术走出实验室,应用于矿区环境的生态修复过程中,拓展了丛枝菌根研究的新方向。本书正是在这样的研究背景和基础上编写而成的,将会对矿区土地复垦起到积极的作用,推动土地复垦更加系统化、深入化。

本书系统地介绍了丛枝菌根培养新技术、菌根对植物生长的作用机理以及丛枝菌根在矿区土地复垦的效应。全书分为十四章,内容主要为五部分:第一部分包括第一章至第四章,主要内容为丛枝菌根培养新技术——无菌双重培养方法的建立及其特性研究,建立了菌根分泌物收集方法和无菌菌丝际体系;第二部分包括第五章至第七章,主要内容为丛枝菌根扩繁技术及孢子密度总量的快速测定方法,为丛枝菌根在野外应用奠定基础;第三部分包括第八章至第十一章,主要内容为丛枝菌根对土地复垦和生态重建的作用与效应,重点介绍丛枝菌根对养分和水分吸收利用机理与效应、丛枝菌根对压实

土壤的修复、丛枝菌根对根际微生物影响以及丛枝菌根与根瘤菌双接种的效应；第四部分为第十二章，主要内容是丛枝菌根应用于矿区土地复垦的生态效应，对植被成活率、根系发育、根际微生物种群以及酶活性进行了系统的分析测试；第五部分包括第十三章至第十四章，主要内容是对菌根生态效应的综合评价，以及对丛枝菌根研究的展望。

本研究内容由作者和所指导的研究生共同完成的。参加工作的研究生有武玉坤、吴王燕、任婧、吴福勇、柳博会、刘银平和郭婧婷，刘榕榕参加了部分校稿工作。在现场调研过程中，得到了神东煤炭分公司翟桂武和伊茂森副总经理、计划处梁占耀处长、环保处李世明处长、王义副处长、刘慧辉科长以及榆家梁矿杜善周矿长的大力支持与帮助，也得到了神宁煤炭分公司环保处刘杰处长、大武口洗煤厂蔡斌总工程师和杨永峰副总工程师的大力协助。得到北京市农林科学研究所张美庆研究员和王幼珊研究员在菌种和技术方面的支持与帮助，在实验测试过程中，得到北京市园林科学研究所王燕春高级工程师、李芳博士和赵燕玲主任的大力协助。得到中国农业大学李隆教授提供的文献资料，英国贝尔法斯特 Peter Christie 博士对英文摘要的修改。感谢中国矿业大学（北京）科研处和资源与安全工程学院各位领导和老师对研究工作的支持。对上述个人和单位在此一并表示衷心感谢！

感谢国家自然科学基金委员会和国家科技部资源环境领域办公室和煤炭工业协会等项目主管单位及有关老师的支持与帮助。

在本书即将出版之际，作者特别感谢两位恩师——中国农业大学李晓林教授和中国农业科学院汪洪钢研究员多年来的教诲与支持，正是两位恩师的指点与教导将我引进菌根研究的领域，点点滴滴无不有着导师的关怀与帮助。感谢导师汪洪钢研究员对本书的宝贵意见以及部分图片的无偿赠与，感谢李慧荃老师多年来无微不至的关怀与支持。

感谢爱人全文智多年来的支持与帮助，正是他的支持才能够顺利完成各个项目，也使本书顺利完成。

由于作者知识水平有限，难免有错误与不妥之处，恳请专家、学者不吝批评和赐教，也期待在日后工作中进一步完善，推动我国微生物复垦的深入研究。

作 者

2007年4月于北京

目 次

前 言

1 绪 论	(1)
1.1 丛枝菌根研究的历史背景	(1)
1.1.1 扩大吸收面积	(2)
1.1.2 增加运输的速度	(2)
1.1.3 改变根际土壤 pH 值	(3)
1.2 丛枝菌根双重培养方法的建立	(4)
1.2.1 无菌根器官的培养	(4)
1.2.2 无杂菌接种物的获得	(5)
1.3 双重培养	(6)
1.3.1 双重培养的基质	(7)
1.3.2 双重培养方法的建立	(8)
1.4 丛枝菌根双重培养的优势	(8)
1.5 不同丛枝菌根真菌的双重培养	(8)
1.6 双重培养条件下共生联合体生物学特性研究	(9)
1.6.1 菌根共生联合体形态学特性研究	(9)
1.6.2 菌根共生联合体生理学特性研究	(11)
1.7 丛枝菌根的主要生理生态功能	(11)
1.7.1 促进植物对矿质营养的吸收	(11)
1.7.2 提高植物的抗逆性	(12)
2 无菌双重培养技术与方法	(13)
2.1 丛枝菌根真菌孢子萌发的方法	(13)
2.1.1 概述	(13)
2.1.2 不同孢子表面消毒方法的比较	(14)
2.1.3 不同培养基质对孢子萌发的影响	(15)
2.1.4 不同 pH 对孢子或孢子果萌发的影响	(16)
2.2 转移 Ri T-DNA 胡萝卜根器官的获得	(17)
2.2.1 胡萝卜根器官培养的意义	(17)
2.2.2 转移 Ri T-DNA 胡萝卜根器官的获得	(18)

2.2.3 转移 Ri T-DNA 胡萝卜根在 M 培养基中的生长状况	(19)
2.2.4 转移 Ri T-DNA 胡萝卜根在不同培养基中生长状况	(20)
2.3 双重培养体系的建立	(20)
2.3.1 双重培养方法建立的意义	(20)
2.3.2 孢子萌发的特性	(20)
2.3.3 菌根共生体的培养	(21)
2.3.4 <i>Gigaspora margarita</i> 对转移 Ri T-DNA 胡萝卜根的侵染	(21)
2.3.5 菌丝的伤愈现象	(24)
2.3.6 菌丝内原生质的流动	(25)
2.3.7 新 <i>Gigaspora margarita</i> 孢子的形成及其再发芽与侵染的能力	(25)
2.4 小结	(26)
3 纯净菌根分泌物的收集与测定技术	(28)
3.1 菌根分泌物收集方法概述	(28)
3.2 转移 Ri T-DNA 胡萝卜根器官在营养液中的生长情况	(28)
3.3 丛枝菌根真菌对根段的侵染	(30)
3.4 菌丝在培养液中伸长及分枝状况	(31)
3.5 培养液 pH 的变化状况	(31)
3.6 菌根分泌物的组成	(32)
3.7 小结	(32)
4 纯净丛枝菌根菌丝际的建立	(33)
4.1 纯净菌丝际建立的意义	(33)
4.2 孢子的萌发特性	(33)
4.3 菌根室中共生联合体的建立	(34)
4.4 菌根室中共生联合体生长状况	(34)
4.5 菌丝在菌丝室中的生长及分枝情况	(35)
4.6 小结	(37)
5 一种改进测定丛枝菌根孢子密度总量方法——染色法	(38)
5.1 概述	(38)
5.2 研究方法	(38)
5.2.1 方法一——常规的湿筛倾析法	(38)
5.2.2 方法二——湿筛倾析染色法	(39)
5.3 两种方法对菌根孢子的形态特性以及测定精度比较	(39)
5.4 两种方法对孢子密度测定速度的比较	(40)

5.5 小结	(40)
6 丛枝菌根对矿区废弃基质的生态适应性	(41)
6.1 丛枝菌根在矿区应用意义	(41)
6.2 不同基质对苜蓿菌根侵染率的影响	(41)
6.3 不同基质对不同菌根孢子密度的影响	(43)
6.4 不同基质对菌根根外菌丝长度的影响	(43)
6.5 小结	(44)
7 一种改进的丛枝菌根菌剂扩繁技术	(45)
7.1 扩繁技术改进的必要性	(45)
7.2 不同基质对植物地上干重影响	(45)
7.3 不同基质对菌根侵染率影响	(46)
7.4 不同基质对菌丝长度影响	(47)
7.5 不同处理对菌根孢子密度影响	(47)
7.6 小结	(48)
8 丛枝菌根对土地复垦和生态恢复的作用	(49)
8.1 土地复垦存在的主要障碍	(49)
8.2 丛枝菌根对土地复垦和生态恢复的作用	(50)
8.2.1 改良土壤结构	(50)
8.2.2 增加土壤肥力	(50)
8.2.3 提高土壤生物活性	(50)
8.2.4 促进植物生长	(50)
8.2.5 益于生态恢复	(51)
8.3 丛枝菌根对白三叶草水分和养分吸收作用	(51)
8.3.1 丛枝菌根真菌对白三叶草的侵染率	(52)
8.3.2 接种菌根对植株生长影响	(52)
8.3.3 接种菌根对植株养分吸收影响	(53)
8.3.4 土壤速效磷的变化	(54)
8.3.5 植株对水分的利用	(54)
8.4 丛枝菌根对玉米的生理生态效应	(55)
8.4.1 不同处理对玉米侵染率影响	(56)
8.4.2 不同处理对玉米生长及根长的影响	(56)
8.4.3 不同处理对玉米养分吸收影响	(58)
8.4.4 不同处理对玉米水分利用影响	(59)

8.4.5 不同处理对土壤速效磷吸收利用的影响	(59)
8.5 丛枝菌根对冬小麦的抗旱生理生态效应	(61)
8.5.1 菌根对冬小麦菌根侵染率的影响	(61)
8.5.2 不同处理对冬小麦生长影响	(62)
8.5.3 不同处理对冬小麦养分吸收影响	(63)
8.5.4 不同处理对冬小麦水分利用的影响	(65)
8.6 丛枝菌根对草地植被的生理生态效应	(65)
8.6.1 菌根对植被恢复的意义	(65)
8.6.2 不同处理对草木樨菌根侵染率的影响	(66)
8.6.3 不同处理对丛枝菌根孢子密度的影响	(66)
8.6.4 不同处理对菌根依赖性的影响	(67)
8.6.5 接种丛枝菌根真菌对植株生长状况的影响	(68)
8.6.6 接种丛枝菌根真菌对植株的水分利用状况	(69)
8.6.7 接种菌根对植株磷营养吸收状况的影响	(70)
8.6.8 不同处理对基质营养状况的影响	(72)
8.7 小结	(73)
9 丛枝菌根对压实土壤修复的生理生态效应	(74)
9.1 菌根对压实土壤修复的意义	(74)
9.2 不同处理对玉米菌根侵染率的影响	(74)
9.3 接种菌根对玉米生物量的影响	(75)
9.4 接种菌根对玉米根长的影响	(75)
9.5 接种菌根对不同处理玉米营养状况的影响	(76)
9.5.1 接种菌根对玉米氮营养的影响	(77)
9.5.2 接种菌根对玉米磷营养的影响	(77)
9.5.3 接种菌根对玉米钾营养的影响	(77)
9.6 不同处理对基质氮和磷含量的影响	(77)
9.7 小结	(78)
10 丛枝菌根对根际土壤微生物群落的影响	(79)
10.1 研究概况	(79)
10.2 不同菌根对植物生物量的影响	(79)
10.3 不同处理菌根侵染率比较	(80)
10.4 不同处理对根际微生物数量影响	(80)
10.5 不同接种处理对土壤磷营养的影响	(81)

目 次

10.6 小结	(82)
11 菌根真菌和根瘤菌双接种对沙打旺生理生态效应	(83)
11.1 研究概述	(83)
11.2 不同接种处理对沙打旺菌根侵染率影响	(83)
11.3 不同接种处理对植株固氮能力的影响	(83)
11.4 不同处理对沙打旺生物量的影响	(85)
11.5 不同接种处理对沙打旺根长的影响	(86)
11.6 不同接种处理对沙打旺营养吸收的影响	(86)
11.6.1 不同接种处理对沙打旺氮营养吸收的影响	(86)
11.6.2 不同处理对沙打旺磷营养吸收的影响	(87)
11.6.3 不同处理对沙打旺钾营养吸收的影响	(88)
11.7 不同处理的植株对水分利用	(88)
11.8 不同接种处理对土壤中氮和磷含量的影响	(89)
11.8.1 不同接种处理对基质氮含量的影响	(89)
11.8.2 不同处理对基质磷含量的影响	(89)
11.9 小结	(90)
12 丛枝菌根对煤矸石山土地复垦生态效应	(91)
12.1 试验区概况	(91)
12.2 接种菌根对白蜡成活率影响	(92)
12.3 接种菌根对白蜡生长量的影响	(92)
12.4 接种菌根对植被盖度影响	(93)
12.5 接种菌根对生物多样性影响	(93)
12.6 接种菌根对根系发育及侵染率影响	(94)
12.7 接种菌根对根际菌丝长度影响	(94)
12.8 接种菌根对孢子密度影响	(95)
12.9 接种菌根对植物根际酶活性影响	(95)
12.10 接种菌根对植物根际微生物影响	(96)
12.11 小结	(97)
13 丛枝菌根生态效应的土地生产力初步评价	(98)
13.1 评价指标体系的建立	(98)
13.2 对退化土地生产力的初步评价	(98)
13.2.1 不同磷水平下对退化土地生产力的初步评价	(98)
13.2.2 退化土地上双接丛枝菌根真菌和根瘤菌的生产力初步评价	(99)

13.2.3 在不同容重土壤中接种菌根对退化土地生产力初步评价	(100)
13.3 接种菌根在矿区复垦的经济效益分析与评价	(100)
13.3.1 接种菌根降低矿区生态修复的投入费用	(100)
13.3.2 接种菌根降低了生态工程治理费用	(101)
13.4 小结	(101)
14 结论与展望	(102)
14.1 研究特色	(102)
14.1.1 将丛枝菌根双重培养技术系统化,促进了菌根研究方法的完善,为菌根生理生化研究 奠定基础	(102)
14.1.2 深入研究丛枝菌根对土地复垦的作用机理	(102)
14.1.3 丛枝菌根在矿区土地复垦的应用技术与效应	(102)
14.2 主要结论	(103)
14.3 丛枝菌根研究展望	(104)
参考文献	(105)

1 绪 论

1885 年 Frank 提出了“菌根 (Mycorrhiza)”这一术语来描述植物与真菌的共生联合体,由此菌根研究开始迅速发展。菌根是土壤中的一类真菌与植物根系之间所形成的互惠互利的共生联合体。世界上的有花植物,具有外生菌根和内外生菌根的约占 3%,绝大部分都是乔灌木树种。而对于内生菌根,具有丛枝菌根的植物占 90%,大部分是草本植物及一部分木本植物,其他内生菌根的植物占 4%,没有发现内生菌根的植物约占 3%。从地理分布上看来,热带植物多为内生菌根,寒带植物多为外生菌根,沙漠地区的植物也多为外生菌根(郭秀珍等,1989)。可见丛枝菌根是分布最广、作用最大的一类真菌,几乎全部的农作物包括粮食作物,如小麦、大麦(冉成玺,1990)、玉米(李晓林等,1988);经济作物,如棉花(赵斌等,1987)、绿豆(冉成玺等,1988;汪洪钢等,1983、1989)、花生、西瓜(冉成玺等,1988);绿肥作物,如桉麻(毕国昌等,1986)、三叶草(李晓林等,1992a)、紫云英、蚕豆(冉成玺等,1988);果树,如中国樱桃(刘润进等,1988)、柑橘(万水林,1992;胡正月等,1990;唐振尧等,1980)、苹果(刘润进等,1987);蔬菜作物,如芦笋(林先贵等,1994)、番茄、青椒、辣椒(张美庆等,1987)都能形成丛枝菌根。因此研究丛枝菌根共生联合体具有重要的现实意义。

1.1 丛枝菌根研究的历史背景

丛枝菌根的共生联合体是由宿主植物的根系、根皮层组织内的真菌结构、土壤中的根外菌丝及孢子组成的。通常,菌根真菌感染宿主植物根系后,菌丝一方面在根内皮层细胞间伸展和穿入细胞内,形成典型的泡囊——丛枝结构;另一方面菌丝向根外广泛分枝扩展,形成庞大的根外菌丝体。丛枝菌根真菌在分类上属于藻菌,菌丝没有横隔,多核。它的主要构造(图 1-1)包括泡囊、丛枝、菌丝(根外菌丝和根内菌丝)、孢子或孢子果等。泡囊是由内生菌丝的顶端膨大形成一个口袋似的结构,有时泡囊与菌丝相通,但经常是被泡囊壁所隔绝(Nicolson, 1959)。丛枝体位于宿主皮层的深处细胞内,是由内生菌丝侵入宿主细胞经过连续的双分叉而形成的一种

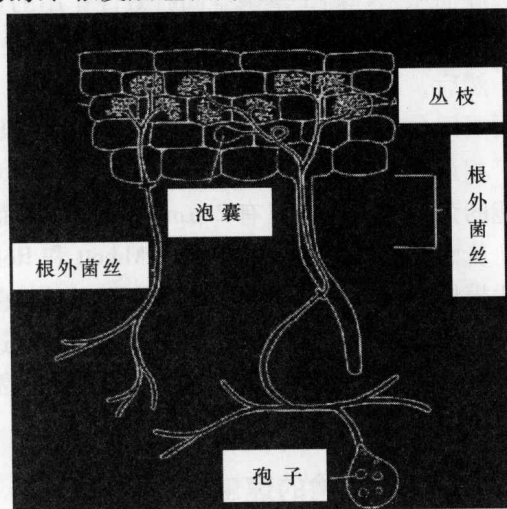


图 1-1 菌根结构示意图
(据洛桑试验站, 1994)

树枝状的构造。外生菌丝是丛枝菌根真菌的重要组成部分，分布在根的周围，构成一个松散的菌丝网，与根内的菌丝相通（Gerdemann, 1968）。

根外菌丝有两种，一种是厚壁菌丝，一种是薄壁菌丝。厚壁菌丝的表面粗糙，有双分叉，壁厚，菌丝内充满稠密的细胞质，在厚壁菌丝的一侧能看到三角形的突起，具有生长点的作用；薄壁菌丝比较细，但是它的穿透力和吸收能力很强，当营养被吸尽后，薄壁菌丝中的细胞质就往厚壁菌丝内回缩，并在薄壁菌丝内出现横隔前端，菌丝凋萎。根内菌丝一般是无隔的（Gerdemann, 1968）。根外菌丝通过根的表皮细胞或根毛进入根的内部，在皮层内继续生长。因此，丛枝菌根真菌是通过菌丝与植物相连，菌丝是丛枝菌根共生体进行营养交换的主要器官和场所。菌根真菌通过根外菌丝，为宿主植物的生长提供多种矿质养分，同时也从这些植物体内获得其自身生长所需要的光合产物。在低肥力以及其他逆境条件下，丛枝菌根能够改善植物的营养状况，维持和促进植物的生长，增强宿主植物对逆境的适应能力。

丛枝菌根的研究在形态解剖、分类、生态、生理生化等方面都有很大的进展，但是目前研究最多的还是菌根在植物营养中的作用，主要集中于它对各种矿质养分的吸收及其机制方面，尤其是对土壤中移动性较低的磷的吸收（汪洪钢等，1983；李晓林，1990；李晓林、曹一平，1992b；Abbott 和 Robson, 1982；Smith 和 Gininazzi-Pearson, 1988；Kucey 等，1989；Rhodes 和 Gerdemann, 1978；Daft 和 Nicolson, 1969）效应更为明显。菌根植物比非菌根植物能够吸收更多的磷，其机制主要如下所述。

1.1.1 扩大吸收面积

土壤中磷向根表的迁移主要靠扩散作用（陆景陵，1994）。植物根系对磷的吸收使根周围出现磷的亏缺区（Hardie 等，1981）。亏缺区的宽度为 1 mm ~ 2 mm，因而，土壤磷的空间有效性往往是限制植物吸收磷素的关键因素（陆景陵，1994）。增加植物对土壤磷的吸收面积是提高土壤磷空间有效性作用的重要途径。菌根改善植物磷素营养的重要机理之一，就是菌根菌丝能够穿透根际磷的亏缺区，吸收利用对根本身是空间无效的那部分磷，然后，通过菌丝运输到宿主植物的根系（李晓林、曹一平，1993a）。Li 等（1991a）应用隔网盆栽方法，研究了白三叶草上菌根菌丝在边室的耗竭区可延伸到离根 11.7 cm 处，相当于将根的径向吸收的范围扩大了近 60 倍。同时，菌根菌丝比较纤细，具有吸收功能的菌丝直径通常只有 2 μm ~ 7 μm ，因而它能进到根系难以进入的土壤孔隙中吸收养分，从而增加了植株吸磷总量（Abbott 和 Robson, 1977）。李晓林等（1994）采用隔网分室法模拟自然条件下不同土壤紧实度对丛枝菌根吸收磷的影响，结果证明，随土壤容重的增加，植物根系生长受到抑制，当土壤容重达 1.8 g/cm³ 时，植物根系基本不能生长。然而，在此容重条件下，菌根真菌仍能够正常生长，吸收土壤中的磷，满足植物生长的需要。

1.1.2 增加运输的速度

由于丛枝菌根真菌的菌丝无横隔，磷可以随原生质环流向根内运输（Harley 和 Smith, 1983），因而运输阻力小，速度快，大约为 20 mm/h（Parfitt, 1979），而植物体内磷主要

以无机磷的形式运输, 运移速率只有 2mm/h (Crossett 和 Loughman, 1966)。丛枝菌根菌丝吸收土壤中的无机磷后以多聚磷酸盐颗粒 (Smith 和 Gianinazzi-Pearson, 1990) 的形式在液泡中储存或在菌丝中向植物根运输。储存的磷不断地向宿主细胞运输, 从而形成磷在菌丝和外界土壤中的浓度梯度, 促进菌丝不断从外界土壤中吸收养分, 供给宿主植物。

1.1.3 改变根际土壤 pH 值

菌根侵染影响植物的生理代谢活动, 增进植物根系对周围环境中营养元素的吸收, 改善植株地上部分的生长, 同时也会对根系的分泌作用产生影响, 进而造成根际土壤 pH 值的变化 (Harley, 1983; 曹一平、李晓林, 1989; 周文龙等, 1993)。Smith 等 (1986) 也认为菌根活动与根际 pH 值变化有关。石灰性土壤中根际 pH 值下降有利于植物对磷的吸收, 在缺磷的条件下, 植物本身具有通过分泌 H^+ 和有机酸来降低根际土壤 pH 值的适应机理 (Nye, 1981)。Li 等 (1991c) 证明丛枝菌根菌丝也与植物根系一样具有酸化菌丝际土壤的能力。在施用 NH_4-N 的土壤中, *G. mosseae* 的根外菌丝可以使其周围土壤 pH 值下降 0.5 个单位, 菌丝际 pH 梯度范围为 3 mm, 酸化了菌丝际土壤, 从而提高了磷的有效性。Buwalda (1983) 的研究表明, 谷类作物被丛枝菌根真菌侵染后阴离子吸收增加, 导致了根际 pH 值上升。在 pH 较低的酸性土壤中真菌对植物的侵染在一定程度上升高了植物根际 pH 值, 提高了植物的吸磷量, 增加了磷的生物有效性。

丛枝菌根菌丝除了对磷的吸收较为敏感外, 近年来研究发现, 菌根菌丝对氮 (Ames 等, 1983; Johansen 等, 1993; Barea 等, 1987)、碳 (Rhodes 和 Gerdemann, 1978; 唐振尧等, 1989)、铁 (唐振尧、何首林, 1991)、硼和氯 (Buwalda, 1983) 等的吸收中也有一定的作用, 但效应并不稳定。丛枝菌根能够吸收土壤中的锌 (李晓林、曹一平, 1992a)、铜 (李晓林、曹一平, 1992a)、钙 (Rhodes 和 Gerdeman, 1978; 唐振尧等, 1989) 等养分元素。就其对植物营养的重要性而言, 菌根对锌和铜吸收最为突出 (李晓林、曹一平, 1992a; Gnekow 和 Marschner, 1989)。因这两种元素在土壤中的移动性弱, 根际会出现亏缺区, 根系本身吸收的锌和铜常常不能满足其正常生长的需求 (陆景陵, 1994), 而庞大的根外菌丝网则能够帮助根系摄取亏缺区以外的养分 (Cooper 和 Tinker, 1978; Pacosky, 1986)。在隔网分室三叶草盆栽试验中, 与不接种丛枝菌根真菌的对照植株相比, 在所有外室施磷水平相同的情况下, 菌根都显著提高了植物体内锌和铜的含量 (李晓林、曹一平, 1992a)。

丛枝菌根菌丝对水分的吸收利用也是十分显著的, 能够提高植物对干旱的抵抗能力。刘润进 (1988) 报道丛枝菌根使中国樱桃叶片气孔传导力和蒸腾速率增加, 萎蔫点降低。无论在正常供水、干旱环境还是萎蔫点状态下, 湖北海棠菌根苗的叶水势、气孔阻力、叶片脯氨酸含量和萎蔫点均显著低于非菌根化苗, 供水后恢复快, 有利于植物的抗旱; 汪洪钢 (1989) 计算出不同含水量的沙培条件下, 菌根化植物制造一克干物重所消耗的水分都是未接种植株的一半; 林先贵等 (1992) 认为土壤水分长期处于亏缺状态虽不利于植物生长, 但对菌根侵染率和菌类发育影响不大, 接种菌根真菌能够提高植物的抗旱能力。

丛枝菌根具有增加植物抗性的功能。赵士杰等 (1993) 发现, 接种丛枝菌根的韭菜, 在低温下细胞膜受害程度较轻, 增强了植株抗冻性; 刘润进 (1993) 指出丛枝菌根可以

减轻棉花黄萎病；杨兴洪等（1994）的试验证明在一定程度上能利用菌根克服重茬障碍；王幼珊（1992）、林先贵（1992）等证实了丛枝菌根有提高植物抗旱、抗涝的能力。菌根增强植物的抗逆性研究目前虽还不很多，但已经显示了其在生产上的重大实际意义。

菌根不仅能够提高作物产量，还能够改善某些植物的品质，如：提高西瓜糖分含量（冉成玺等，1988）、增加某些药用植物的药用成分含量（魏改堂、汪洪钢，1989；1991）、提高芦笋中人体所需氨基酸含量（林先贵，1994）。

丛枝菌根的生理生化特性国外已经做了很多的研究，我国报道不多。毕国昌等（1990）采用扫描电镜和 X-射线能谱仪分析了柑橘菌根构造中化学元素的分布，结果表明丛枝体、胞间泡囊和胞间菌丝中含 P、S 和 Mg 最多，丛枝体的不同部位和不同的发育时期，同一条菌丝或泡囊内营养元素的差别很大。李慧荃等（1992）发现同一种丛枝菌根真菌孢子和孢子果中的 N、C 含量及 N/C 比值相对稳定，不受菌种来源和宿主影响，建议将它作为菌种鉴定的一项辅助指标。

生物技术在我国农业微生物研究中尚未普遍应用。丛枝菌根研究历史虽短，却已经有了少数可喜的成绩：彭生斌等（1990）发现在大豆愈伤组织和细胞提取液中含有促进丛枝菌根真菌孢子发芽和芽管伸长的物质；汪洪钢等（1994）把发根土壤杆菌的 Ri 质粒转移到胡萝卜不定根上，使其自身形成生长激素，在人工培养基上迅速生长，从而加速了丛枝菌根真菌的繁殖，为进一步研究丛枝菌根的生理生化特性奠定了基础。

1.2 丛枝菌根双重培养方法的建立

在自然界或土培盆栽条件下菌根对营养的吸收效应是相当明显的，菌丝是丛枝菌根真菌进行营养吸收的主要器官，菌丝能够吸收大量土壤磷的现象已无可争议，但对于菌丝如何能够吸收大量磷的详细机理直至目前仍了解有限。菌丝吸收养分的复杂过程发生在菌丝周围微小的区域内，即菌丝际内，要揭示菌丝吸收土壤养分的机理，就必须了解菌丝际的特性。然而由于菌丝本身的特性及研究技术和方法的限制，目前对菌丝际特性的认识几乎是一片空白。丛枝菌根菌丝非常纤细，其直径只有几个微米，要直接测定其周围性质的变化有很大困难；至今丛枝菌根真菌的纯培养在技术上尚未突破，原因很多，Burggraaf 和 Beringer（1989）认为离体培养条件下丛枝菌根真菌不能生长，是因为它本身不能合成新的 DNA，因此不形成新的细胞，这样只有在宿主植物参与下菌丝才能进行正常的吸收代谢活动。如此，难以消除的宿主植物的影响成为菌丝际特性研究的另一个主要障碍。而 20 世纪 90 年代以后，Becard 和 Pfeffer（1993），Bianciotto 和 Bonfante（1993）发现核的分裂明显发生于孢子时期和早期的芽管伸出，即核 DNA 复制、mDNA、RNA 及蛋白质的合成在没有共生阶段也会发生，但在纯培养中长期生长仍然不能成功。因而就必须寻找一种新的方法，既不破坏原来的生活环境，又能便于观察，转移 Ri T-DNA 胡萝卜根器官的获得为丛枝菌根的无菌培养提供了可能。

1.2.1 无菌根器官的培养

Mosse（1962）首先报道了在密封的三角瓶中丛枝菌根真菌的孢子可以侵染无菌苗的

根系,证明丛枝菌根真菌完全可以在没有其他微生物的参与下侵染宿主的根系。但是这种方法存在的问题之一是培养基的营养含量很难控制,如果养分含量高,植株生长太快,几天就充满三角瓶,影响观察;而如果养分含量低,养分很快被耗竭,植株也不能正常生长。另外一个问题是,试验所使用的三角瓶在显微镜下仍不利于对一些细微结构进行观察,所以说这种方法虽然脱离了土壤,但是仍然没有解决土培方法中存在的一些问题。1975年 Mosse 报道了利用苜蓿根与 *Glomus mosseae* 能在培养皿中产孢,但其后数年内都无人能重复他们的试验,而只有几篇于试管内成功感染无菌苗的报道,而且这些报道大部分均为 Mosse 这个研究小组所发表。到了1984年,Miller-Wideman 等也报道了在番茄根培养基上能产生 *Gigaspora margarita* 孢子,但是一个培养皿中仅能产生3~5个孢子,还不及接种的10个孢子,没有明显的突破。

20世纪80年代后期,菌根研究者们发展了离体双重培养技术,该技术不需要植物的地上部分,并能在无菌条件下维持菌丝的繁殖和生长,这为菌丝际特性的研究提供了可能。1987年由 Muginer 和 Mosse 的研究小组首先有了转型根(Ri T-DNA 胡萝卜根)感染 *Gigaspora margarita* 的报道,并观察到大量根外菌丝的构造。1988年以后 Becard 和 Fortin, Becard 和 Piche 等利用 Ri T-DNA 胡萝卜根及 *Gigaspora margarita* 孢子作了许多篇研究报道,产孢量也大大地超过了 Miller-Wideman 等的试验,证明了转移 Ri T-DNA 胡萝卜根器官是进行离体双重培养的较好材料。在我国,汪洪钢等(1994)利用土壤发根杆菌 Ri 质粒上的 T-DNA (简称 Ri T-DNA) 转移到某些高等植物细胞中的方法,使其形成正常植株所没有的冠瘿碱,从而形成旺盛生长的不定根。由于 Ri T-DNA 上有控制冠瘿碱和生长激素合成的基因,当 T-DNA 一旦整合到宿主细胞的核基因组中,诱导出来的不定根在不需要外加任何生长激素的情况下,就能保持旺盛生长,继续繁殖下去,为丛枝菌根在无菌条件下的生长提供了大量的宿主。这样产生的不定根对养分的需求较低,生长迅速,并且具有和母根同样的合成能力,是理想的一种宿主。转移胡萝卜根器官的获得,为菌根的研究由土培盆栽转入无菌的培养基质提供了前提条件。

1.2.2 无杂菌接种物的获得

离体情况下丛枝菌根共生体系能否成功,首要前提是菌根真菌孢子表面消毒的彻底与否。表面消毒剂的选择是相当关键的步骤。对表面消毒剂的选择,许多科学家们进行了探索(Mosse, 1962; Mertz 等, 1979; Tommerup 和 Kidby, 1980; Marcdonald, 1981; Strullu 和 Romand, 1986),目前大多科学家采用2% (m/V) 氯胺 T, 加痕量的表面活性剂和抗生素如链霉素和庆大霉素(Mosse, 1962)。这些表面消毒剂的成功应用,在很大程度上依赖于这些消毒剂的浓度及消毒剂应用于何种微生物。

由于大多数的污染物来源于旧的孢子或碎屑,被消毒的真菌孢子应该尽可能地纯化。利用湿筛倾析法(Gerdeman 和 Nicolson, 1963)得到的孢子,应该再经过比重计沉降来除去一些死的孢子和碎屑。这种方法分离出来的真菌孢子易于进行表面消毒。Furlan 等(1977)报道的沉降方法已经被有效地利用于筛选各种丛枝菌根真菌孢子。表面消毒的过程包括利用2%氯胺 T 消毒10 min,此方法的有效性被 Mertz 等(1979)详细阐述过。汪洪钢等(1994)采用粒径为0.5 mm~1.0 mm 的石英砂,按2次/s的速度摇晃孢子及其菌

丝体, 打掉附着在孢子表面的杂物, 是一种很有效的去除杂物的试验方法。

接种物的萌发特性是进行双重培养的基础。不同类型的孢子萌发所需要的条件是不同的, 这与孢子自身的特性有关。介质 pH 值对孢子萌发有很大影响, *Gigaspora heterogama*、*Gigaspora coralloidae* 和 *Glomus mosseae* 孢子的最大萌发率分别出现在 pH 为 6、pH 为 5 和 pH 为 7 的情况下。孢子萌发对 pH 值的反应与菌种的原产地有关, 一般产于酸性土壤上的孢子适合于在酸性条件下萌发; 产于中性或偏碱性条件下的孢子在中性或偏碱性环境中会更适应其萌发, 这是菌种长期适应环境的结果。温度对孢子萌发也有影响, *Glomus mosseae* 孢子在 10.5℃ ~ 20℃ 时萌发率最大; 而 *Gigaspora* 属的孢子在 10.5℃ ~ 34℃ 时萌发率最高 (有可能比 10.5℃ ~ 34℃ 更高) (Schenck 等, 1975), 孢子的萌发对温度的反应与对 pH 值的反应类似, 也与它的原产地有关。湿度也影响孢子的萌发, *Glomus epigaeus* 孢子萌发率在湿度大于 40% 时最大, 小于 30% 时则迅速下降 (Daniels, 1980)。CO₂ 及 O₂ 分压也是影响孢子萌发和菌丝伸长的因素, O₂ 分压大于 5% 时有利于孢子萌发, 因为丛枝菌根是好气性真菌, 萌发需要一定 O₂。高 CO₂ 分压对孢子的萌发影响不大, 却严重抑制了菌丝的伸长, 可能是由于 CO₂ 使介质 pH 值发生变化的结果 (Tacon 等, 1978)。温度、pH、湿度、光强、CO₂ 及 O₂ 浓度对不同的菌根真菌产生不同的影响 (Schenck 等, 1975; Daniels, 1980; Furlan 等, 1977; Tacon 等, 1983)。活性炭也影响孢子的萌发 (Watrud 等, 1978)。Siqueira 等 (1982) 认为矿质营养、维生素 B₁ 及一些有机物对孢子的萌发及芽管的生长有一定的作用。Barbara 等 (1976) 探索了土壤浸提液对孢子萌发的刺激作用。Hepper (1976) 研究了煮过的种子、蛋白胨对孢子萌发的影响。葡萄糖 (Koske, 1981) 和重金属 (Hepper, 1976) 对孢子萌发产生抑制作用。Gianinazzi 等 (1989) 认为黄酮类化合物对孢子的萌发有一定的促进作用。在自然生态环境中, 孢子与植物的根生活于同一空间, 根的分泌物也会刺激孢子的早萌发 (Becard 和 Piche, 1989; Tawaraya 等, 1996)。本研究利用东方链霉菌促进孢子萌发的结果与 Mugnier 和 Mosse (1987) 的结果相一致的。另外, 甘氨酸、赖氨酸、胱氨酸含量适宜会使菌丝伸长增加 2 ~ 3 倍, 而且, 若在同一培养基上这 3 种氨基酸含量都在最适宜时会使菌丝的伸长速度增加 5 倍 (Hepper 和 Jakobsen, 1983)。

1.3 双重培养

双重培养的建立一般是在固体培养基上进行的, 也就是将两种有机体在一起共同培养的方法。Mosse 和 Hepper (1975) 利用分隔盘培养两种有机体并没有得到很好的优势。不同的丛枝菌根真菌都有其独特的特性, 菌根真菌经过湿筛和表面消毒后, 在琼脂培养基上萌发是较为容易的, 可以根据不同的研究目的, 选择合适的菌种以研究共生体不同的特性。即使如此, 在离体双重培养中用转移 Ri T-DNA 胡萝卜根来定殖丛枝菌根真菌也是相当困难的 (Redecker, 1995)。因为不同的菌种, 其孢子的发芽和菌丝的生长、根生长的缓冲系统及 pH 需要不断调整, 而基质的磷浓度对不同菌种的影响也不同 (Sylvia 和 Scheck, 1983)。