

## VA 菌根真菌与根瘤菌对离体绿豆根器官的侵染

汪洪钢 吴观以 李慧荃

(中国农业科学院土壤肥料研究所)

**摘要** 在无菌条件下,采用隔离的方法,使离体的绿豆根器官和 VA 菌根真菌与根瘤菌在不同的培养基上分开培养,为研究宿主的营养状况及菌根真菌与根瘤菌的生长条件,对于共生关系可能产生的影响,提供了一项新的实验方法。在黑暗中,经 45 天培养,接种的 VA 菌根真菌和根瘤菌对离体培养的根器官均发生了侵染。本文对这一实验方法做了详细的描述,对存在的问题进行了讨论。

**关键词** VA 菌根真菌;根瘤菌;侵染

VA 菌根是一类分布范围广、同植物生长关系密切的内生菌根,在提高植物营养,尤其是磷素营养上起着重要作用<sup>[3,9]</sup>。根瘤菌能使豆科植物结瘤、固氮。这两种微生物对于豆科植物的正常生长都是必须的<sup>[1]</sup>。

为了深入了解菌根真菌与宿主的关系及外界营养条件对侵染作用的影响, Mosse 和 Hepper<sup>[6]</sup> 首次提出用三叶草根器官接种菌根的平板培养技术,并一直沿用至今<sup>[4]</sup>。他们采用的方法是把根器官与 VA 菌根真菌培养在同一种培养基上,不足之处在于研究的营养条件对于两种生物共生关系的影响,难以确定到底是作用于菌根真菌还是作用于宿主。为了解决这个问题,我们参考了 Raggio<sup>[2]</sup> 培养离体根的设置。把对根器官和 VA 菌根真菌的培养由 Mosse 等人设计的同一培养基改成两种培养基,从空间上分隔开来,并加进根瘤菌,使三种共生生物在同一个装置内同时生长。

## 材料和方法

### (一) 实验的装置

以 250ml 的三角瓶或 15 × 200mm 的大试管作培养容器。在橡皮塞中央打一个直径为 10 mm 的圆孔,将 12 × 80mm 的平底指形管以管口朝下,把管底由橡皮塞的下面插入孔内。平底指形管用来装固体培养基,以代替植物的茎叶提供的养料。切下的根器官倒插在固体培养基内,根尖朝下生长(图版 I-1)。三角瓶内

装有蛭石,蛭石中含有低浓度的营养液,并接种有 VA 菌根真菌的厚垣孢子(或侵染有 VA 菌根真菌的植物根段或根瘤菌的悬液)。

实验装置的全部器皿用加压蒸气(121℃)灭菌 1 小时。

### (二) 离体根的制备

挑选籽粒饱满、发芽率高的绿豆 (*Phaseolus aureus* Roxb.) (Do245-1) 种子,用 75% 的酒精浸种 5 分钟,取出后投入 0.1% 的升汞中继续浸泡 15 分钟,进行表面消毒;再用无菌蒸馏水冲洗 5 次。洗净的绿豆种子在无菌条件下使其吸足水分。把滤纸剪成长 14cm 宽 6cm 的小条,卷成筒插入 20 × 180mm 试管内,管口用牛皮纸扎紧灭菌。将吸足水分并已开始发芽的绿豆种子按胚根朝下,插在纸筒与试管壁之间,试管内保持有 1/4 高度无菌蒸馏水,使胚根沿着试管与滤纸之间的空隙垂直向下生长,经 48—62 小时保温(26℃),当胚根长到 5cm 长时,从基部切断,插入倒置的平底指形管的固体培养基内,使根尖朝下继续生长。

### (三) 培养基的组成

装在平底指形管内的固体培养基由以下成分组成 (mg/l): 甘氨酸 3; 烟酸 0.5; 盐酸硫酸素 0.1; 盐酸吡哆素 0.1; 蔗糖 20000; 琼脂 10000, pH5.8。培养基在装入平底指形管前,

本研究系国家自然科学基金资助项目。先后参加这项工作的还有吴胜军、魏改堂和孙建光同志。

用加压蒸气(121℃)灭菌 15 分钟,每一平底锥形管注入培养基 10ml。

三角瓶内装有经高压灭菌的蛭石 22.5g(如果用大试管则装蛭石 15g),加进低浓度的营养液。营养液的组成(mg/l):  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  20;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  20;  $\text{KCl}$  6.5;  $\text{KNO}_3$  8.2;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.86;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  74;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.45; 柠檬酸铁 0.4;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.27;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.15;  $\text{KI}$  0.08;  $\text{CuSO}_4$  0.0004;  $\text{MoO}$  0.002, pH7。营养液在加进三角瓶前,灭菌(121℃)15 分钟。每个三角瓶加营养液 30ml(大试管则加营养液 20ml)。

#### (四) 接种试验

##### (1) 接种 VA 菌根真菌

接种物是 VA 菌根真菌 *Glomus epigaeum* Daniels and Trappe 的厚垣孢子。利用湿筛法从人工接种 *Gl. epigaeum* 的盆栽三叶草的根际土壤中获得厚垣孢子。用 2% 氯胺 T(相当于 0.16% 的有效氯)加 166ppm 的链霉素浸泡孢子 20 分钟,再用无菌蒸馏水清洗 8 次,通过小滴管将孢子分散地加到蛭石中,每个三角瓶接种 200 个厚垣孢子。

##### (2) 接种根瘤菌

接种的根瘤菌是 *Rhizobium* sp. 8B6 或 *Rhizobium* sp. 76 的菌悬液。从斜面上将根瘤菌的菌苔刮到无菌蒸馏水中,用振荡器制成悬液,每个三角瓶以 3ml 的菌液(每 ml 菌液约合  $10^6$  细菌)加到蛭石中,进行接种。

##### (3) 接种 VA 菌根真菌+根瘤菌

VA 菌根真菌的接种物是曾人工接种 *Glomus epigaeum* 并已生长 6 个月的盆栽三叶草的根段。试验前,通过镜检,证实三叶草的根系已有大量菌根真菌侵染,然后挖出整个植株,除去地上部,用自来水冲洗根系,再在 0.5% 的次氯酸钠的溶液中浸泡 10 分钟,进行表面消毒;取出后用无菌蒸馏水漂洗 8 次,将洗净的根系剪成 1mm 长的根段连同根瘤菌 *Rhizobium* sp. 8 B6 的悬液一道加进蛭石中,充分拌匀,进行 VA 菌根真菌与根瘤菌双接种。

#### (五) 培养条件

完成接种后,把整个实验装置放进黑暗的培养箱中,在 26℃ 恒温下培养。45 天后检查 VA 菌根真菌与根瘤菌对离体绿豆根器官的侵染。

#### (六) 检查侵染的方法

对于根瘤菌的侵染,只须透过三角瓶或大试管的玻璃壁用肉眼就能看到绿豆根上形成的根瘤。进一步检查必须在收获后用体视显微镜查看每个根系上结瘤的数量和大小。检查 VA 菌根真菌的侵染是采用 Phillips 和 Hayman 的方法<sup>[7]</sup>,通过曲利本蓝或酸性品红染色,确定根器官的皮层内是否有无隔菌丝的入侵或是否有 VA 菌根所特有的泡囊和丛枝构造,计算侵染的百分率。

## 试验结果

培养绿豆根器官单一接种 VA 菌根真菌 *Glomus epigaeum* 的厚垣孢子,共试验 29 支大试管(每支大试管培养一个绿豆根器官),除去污染的不计外,检查 15 个根器官,其中有 4 个根器官侵染有大量 VA 菌根的菌丝(图版 I-2),有的还在皮层中形成了泡囊和丛枝,按接种的根器官计算,侵染率为 26.7%。

培养绿豆根器官单一接种根瘤菌 *Rhizobium* sp. 76,接种的 26 支大试管,每支大试管培养的根器官上都结有根瘤。有的试管在接种后的第 10 天,透过玻璃就能看到瘤已形成,按接种的根器官计算,侵染率为 100%。每个根系平均结瘤 10.9 个;最多的结瘤 35 个(图版 I-3)。

双接种的绿豆根器官是用 250ml 三角瓶培养的。用已形成菌根的三叶草的根段作接种物,同时接种根瘤菌 *Rhizobium* sp. 8B6。共接种 14 个根器官,其中有 2 个根器官获得双侵染,即在同一根系上既有 VA 菌根真菌的侵染又有根瘤菌的侵染,甚至在同一根瘤内又看到了菌根的入侵,形成大量的泡囊(图版 I-4),同时接种两种微生物,双侵染率为 11.8%。

## 讨 论

1. 正如前述,利用植物根器官的平板培养进行 VA 菌根真菌的接种试验,过去已有报道,本试验研究采用根器官与 VA 菌根真菌和根瘤菌分离培养并获得成功。利用这一方法,可以在有限的空间,无需照明,在黑暗条件下,就能进行 VA 菌根和根瘤菌的接种试验,能以固体培养基代替植物的地上部分,为了解宿主的营养对 VA 菌根真菌和根瘤菌的侵染可能造成的影响提供了一条直接研究的途径。

2. 过去一般认为 VA 菌根真菌是不入侵根瘤的,只限于在根的皮层内发展,并向皮层释放从根外吸收来的磷,然后再由根输送给根瘤<sup>[2]</sup>。但从本试验培养的绿豆根器官上看到,VA 菌根真菌不仅侵入根的皮层,也直接侵入根瘤的内部。我们还在盆栽三叶草和自然生长的银合欢的根上,同样发现这一现象,当根瘤刚开始形成,就有 VA 菌根真菌的入侵,随着根瘤体积的扩大,菌根真菌在整个根瘤内所占空间也逐渐增大。VA 菌根真菌直接侵入根瘤,无疑对加强根瘤菌固氮所需要的磷素营养和提高固氮能力是十分有利的。

3. 本试验中 VA 菌根真菌的侵染率比根瘤菌侵染率低得多,可能与实验装置氧的供应

不足,二氧化碳的浓度过大有关。据 Tacon 等<sup>[8]</sup>用 VA 菌根真菌 *Gl.mosseae* 所做的孢子发芽和菌丝生长的试验表明,空气中氧的分压如果低于 3%,孢子萌发和菌丝生长就要受到抑制,二氧化碳的浓度超过 5% 也同样要引起这一后果。我们设想,如果对本实验的装置加以改进,在橡皮塞上安插一细玻璃管,使内外空气能够交流,VA 菌根真菌对离体培养的根器官侵染率就有可能提高。

## 参 考 文 献

1. 汪洪钢等:微生物学通报 12(2): 49—51,1985。
2. 中国科学院上海植物生理研究所:植物组织和细胞培养,第 190—199 页,科学出版社,1978。
3. Gerdemann J W: *An. Rev. Phytopath* 6: 397—418, 1968.
4. Hepper C M et al.: In *Tissue culture methods for plant pathologists*, ed. Ingram D. S., Helgeson J. P., Blackwell Scientific, Oxford. 167—171, 1980.
5. Mosse B: In *Exploiting the legume-Rhizobium symbiosis in tropical agriculture*, ed. Vincent J. M., Whitney A. S., Bose J., College of tropical agriculture, University of Hawaii Misc. Publ. 275—292, 1977.
6. Mosse B et al.: *Physiol. plant pathol.* 5: 215—223, 1975.
7. Phillips J M et al.: *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158—161, 1970.
8. Tacon F L et al.: *Can. J. Microbiol.* 29: 1280—1285, 1983.
9. Tinker P B: IN *Endomycorrhizas*, ed. Sanders F. E., Mosse B., Tinker P B Acad. Press, London. 353—371, 1975.

## 一株拟青霉的性状和毒力的研究

方 焕 谋      谭 树 明

(湛江农业专科学校,广东)

**摘要** 本文报道在湛江蔗区一种甘蔗害虫——蔗褐蠹蛾 (*Phragmataecia castaneae* Hübner) 虫尸上分离的一株真菌,初步鉴定为拟青霉 (*Paecilomyces* sp.)。经多年试验证明,该菌对多种甘蔗害虫具有较强的致病力。测试结果显示该菌的菌丝体与冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*) 的化学成份基本相同。

**关键词** 拟青霉;蔗褐蠹蛾;湛江蔗区;致病力;化学成分

1985 年 6 月,我们从自然死亡的蔗褐蠹蛾 (*Phragmataecia castaneae* Hübner) 虫尸分离到一株真菌,经初步鉴定为拟青霉 (*Paecilo-*

*myces* sp.)。为了查明该菌在生物防治方面的应用可能性,并探讨其潜在的药效成分,我们进行了此项研究。