

研究报告

印度块菌(*Tuber indicum*)菌根促生细菌的研究

王冉 刘培贵 万山平 于富强*

(中国科学院昆明植物研究所 资源植物与生物技术实验室 云南 昆明 650201)

摘要:【目的】筛选对印度块菌菌根量和菌根苗长势有促进作用的菌根促生细菌(Mycorrhization helper bacteria, MHB)。【方法】选择华山松为宿主植物,自块菌菌根根际土壤中分离得到的11种细菌为供试菌株,将印度块菌菌剂与不同浓度的细菌混合于特定基质中后接种于华山松上,并通过对印度块菌与华山松形成的菌根数、华山松的株高和地径三方面的统计与分析,确认MHB。【结果】*Pseudomonas* sp. JCM 5481 (P143)、*Streptomyces* sp. EN31 (S191)、*Variovorax paradoxus* (V633)在浓度为 2.4×10^9 CFU/mL时对印度块菌菌根数、株高和地径均有极显著促进作用($P < 0.01$); *Pseudomonas chlororaphis* (P11)、*Pseudomonas corrugate* (P127)在浓度为 0.8×10^9 CFU/mL时对印度块菌菌根数、株高和地径均有显著促进作用($P < 0.05$)。4种假单胞菌浓度梯度的设置显示了不同菌株适宜的浓度不同。【结论】实验获得5种MHB,并表明细菌浓度是获得MHB的一个重要影响因素。

关键词: 印度块菌, 菌根合成, 菌根促生细菌

Study on mycorrhization helper bacteria (MHB) of *Tuber indicum*

WANG Ran LIU Pei-Gui WAN Shan-Ping YU Fu-Qiang*

(Laboratory of Economic Plants and Biotechnology, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan 650201, China)

Abstract: [Objective] To screening mycorrhization helper bacteria (MHB) which were facilitation to the quantity of mycorrhiza and the growing of mycorrhizal seedlings. [Methods] *Pinus armandii* was an experimental tree species, and eleven bacteria were isolated from rhizosphere soil of *Tuber indicum* as experimental bacteria. *T. indicum* inocula and different concentration bacteria were inoculated on *P. armandii* seedlings. The MHB were ascertained by statistics and analysis of the quantity of mycorrhiza, plant height and ground diameter of the *P. armandii* mycorrhizal seedlings synthesized by *T. indicum*. [Results] *Pseudomonas* sp. JCM 5481 (P143), *Streptomyces* sp. EN31 (S191) and *Variovorax paradoxus* (V633) of 2.4×10^9 CFU/mL had highly significant role in promoting ($P < 0.01$) the quantity of mycorrhiza, plant height and ground diameter, as well as *Pseudomonas chlororaphis* (P11) and *P. corrugate* (P127) of 0.8×10^9 CFU/mL had significant role in promoting ($P < 0.05$) the quantity of mycorrhiza, plant height and ground diameter. Different concentration setting of four *Pseudomonas*

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31270075, 31370070)

*通讯作者: ✉: fqyu@mail.kib.ac.cn

收稿日期: 2015-03-02; 接受日期: 2015-05-27; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-07-03

showed each strain has its suitable concentration respectively. [Conclusion] Five MHB were obtained in the experiment, and indicated that the concentration of bacteria was a key factor to get MHB.

Keywords: *Tuber indicum*, Mycorrhizal synthesis, Mycorrhization helper bacteria

块菌(Truffle)是一类与特定林木共生的外生菌根真菌(Ectomycorrhizal fungi), 属地下真菌(Hypogeous fungi), 因其子实体呈球形、半球形或不规则块状而得名。我国西南地区块菌俗称“土菇”、“松露菌”、“猪拱菌”、“煤黑”等。块菌属可以与栎(*Quercus*)、榛(*Corylus*)、松(*Pinus*)、冷杉(*Abies*)等属的树木形成菌根^[1-4]。块菌子囊果独特的香味与丰富的营养价值使其在欧洲市场久负盛名, 经济价值极高的法国黑孢块菌(*Tuber melanosporum*)和意大利白块菌(*T. magnatum*)被誉为“地下黄金”、“厨房里的黑钻石”、“上帝的食物”等^[5]。印度块菌(*T. indicum*)作为我国主要的出口经济种, 因与黑孢块菌在外形上非常相似而得到重视^[6]。近几十年来, 人们进行了有关块菌的形态特征^[7-8]、系统演化^[9-11]、生理生态^[12-13]等研究。面对植被破坏、森林火灾、人为不当的采收等各种因素, 菌根合成及人工栽培^[14-16]也已成为块菌研究的重要课题。

在人工接种条件下合成块菌菌根是人工栽培的关键环节, 而真菌能否顺利侵染植物幼根并形成菌根, 不仅取决于周围的非生物因素, 如土壤 pH、肥力、湿度和温度^[17], 也受到一些生物因素, 如土壤微生物^[18]的影响。Mosse^[19]表示一些根际细菌和它们的培养滤出液能够刺激摩西球囊霉(*Glomus mosseae*)的孢子萌发; Bowen 等^[20]的研究表明一些细菌能够促进辐射松菌根(与须腹菌共生)的生长, 而一些细菌则有抑制作用。1994 年 Garbaye^[21]首次提出了菌根促生细菌(Mycorrhization helper bacteria, MHB)的概念: 即 MHB 是可以促进菌根真菌在宿主植物根部的定殖、生长, 从而间接地促进植物生长的细菌。研究表明 MHB 普遍存在于丛枝菌根和外生菌根根际土壤中。

国外学者对 MHB 的研究较早, Cristiana 等^[22]研究表明被波氏块菌(*T. borchii*)侵染的欧洲栎(*Quercus robur*)菌根上的细菌多为荧光假单胞菌

(*Pseudomonas fluorescens*)和皱纹假单胞菌(*P. corrugate*), 此类细菌具有促进菌根真菌孢子萌发和菌丝体生长的作用; Barbieri 等^[23]研究了意大利白块菌在成熟过程中细菌群落的多样性, 其中固氮细菌在意大利白块菌子囊果生长和发育过程中扮演着重要的角色; 而 Sbrana 等^[24]和 Frey-Klett 等^[25]的研究则表明了菌根真菌中的细菌在其子囊果的形成中发挥着重要作用, 同时对其菌根的合成有着促进作用。我国的李守萍等^[26]探讨了荧光假单胞菌与菌根真菌的互作关系, 发现一定浓度的荧光假单胞菌菌液能够促进外生菌根真菌的生长; 邓晓娟等^[27]研究发现相同的细菌对不同的块菌与植物合成的菌根有着真菌特异性。鉴于 MHB 在菌根真菌生长发育中起到的促进作用, 筛选块菌 MHB, 以为块菌菌根合成提供方法与资料。

1 材料与方法

1.1 育苗

(1) 自来水漂洗华山松种子, 30% H₂O₂ 浸泡 30 min 进行表面消毒。浸泡后的种子用无菌水冲洗 3 遍。最后用起始温度为 30 °C 的无菌水浸泡 24 h 备用。

(2) 蛭石与珍珠岩在 1×10⁵ Pa 灭菌 1 h, 待冷却后按 1:1 的比例配置, 加适量蒸馏水拌匀, 达到紧握成团, 松手即散为宜。置 1/3 基质于铺有干净纱布的塑料筐中, 然后将处理好的华山松种子均匀地撒在基质表面。最后均匀铺上一层厚薄适中的基质。所育的苗均置于自然光的温室条件下培养。

1.2 菌根促生细菌的选择

所用细菌均来自本实验室印度块菌菌根根际土壤中分离得到的优势菌株, 细菌浓度选择参照顾金刚等^[28]的方法(表 1)。

1.3 菌根合成

1.3.1 菌剂的制备: 印度块菌购买于香格里拉, 均

为成熟子实体。根据耿丽英^[29]对印度块菌与不同树种菌根合成研究的结果,将华山松接种菌剂的浓度设为 5×10^6 个孢子/株。先称取10 g印度块菌子囊果,使用料理机充分粉碎,所得到的孢子悬浮液定容至100 mL。充分混匀悬浮液后从上中下层各取1 mL液体分别置于3个量筒内,并稀释至10 mL。从稀释后的悬浮液上中下层再分别取一滴液体,根据沈

萍等^[30]的方法使用血球计数板在相差显微镜下进行孢子计数,得到每克块菌所含的孢子数。然后根据华山松接种菌剂的浓度,计算出每株实验苗对应的印度块菌重量。最后根据表1中不同处理下的实验苗数量,分别称取相应重量的印度块菌充分粉碎待用。

1.3.2 接种: 1×10^5 Pa 高压灭菌后的腐殖土、细沙、

表1 不同细菌及浓度处理
Table 1 Different microbes and amount of inoculum

细菌菌株编号 Number of bacteria	细菌类型 Type of bacteria	细菌浓度 Concentration of bacteria (CFU/mL)	菌根苗总数量 The quantity of mycorrhizal seedlings
P11B1	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	0.8×10^9	15
P11B2	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	2.4×10^9	15
P11B3	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	4.0×10^9	15
P127B1	<i>Pseudomonas corrugate</i>	0.8×10^9	15
P127B2	<i>Pseudomonas corrugate</i>	2.4×10^9	15
P127B3	<i>Pseudomonas corrugate</i>	4.0×10^9	15
P143B1	<i>Pseudomonas</i> sp. JCM5481	0.8×10^9	15
P143B2	<i>Pseudomonas</i> sp. JCM5481	2.4×10^9	15
P143B3	<i>Pseudomonas</i> sp. JCM5481	4.0×10^9	15
P579B1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.8×10^9	15
P579B2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2.4×10^9	15
P579B3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4.0×10^9	15
S767	<i>Streptomyces scabiei</i>	2.4×10^9	15
S191	<i>Streptomyces</i> sp. EN31	2.4×10^9	15
A222	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	2.4×10^9	15
A336	<i>Acinetobacter oryzae</i>	2.4×10^9	15
A558	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	2.4×10^9	15
A659	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	2.4×10^9	15
V633	<i>Variovorax paradoxus</i>	2.4×10^9	15
CK	CK	0.0	20

注: CK: 不加细菌的菌根苗。

Note: CK: Mycorrhizal seedlings without bacteria.

蛭石、珍珠岩和石子按接种苗数量以相应比例配置, 并加入一定量的石灰粉调节 pH 至 7.5。加入相应的印度块菌菌剂到基质中, 同时按表 1 中加入扩大培养后的不同细菌各 15 mL, 再加入适量的自来水拌匀, 然后将基质装入营养袋内。华山松苗视幼根生长情况, 剪掉一定长度的须根后移栽入营养袋内。

1.3.3 后期工作: 松苗在初期需浇透水, 后期根据基质的湿度来控制浇水的时间与频率。所有松苗都在自然光的温室条件下培养, 并于 3 个月后抽查是否有菌根形成, 每 2 周抽查一次直至观察到有菌根形成。

1.4 菌根数据统计及分析

所有接种苗均于 2013 年 3 月底进行菌根检测。统计前先观察菌根形态, 然后再随机抽取每个处理下的菌根苗各 6 株, CK 8 株进行菌根计数。由于华山松小根较粗, 其菌根从颜色和个体上都易于识别且数量较少, 因此可以采用全根系菌根统计方法, 统计时将由连续菌套包裹的菌根视为一个菌根^[31]。在统计容器内加入一半容积的净水, 将冲洗后的苗放到容器内, 把所有根系剪成 3–5 cm 长的小段, 以便将所有根系分散开, 一一计数每一根段的菌根数。同时记录华山松松苗的株高和地径(即松苗干近地表面处的直径)。

使用 Excel 和 SPSS V13.0 (<http://www.spss.com.cn/>) 对所得数据进行 ANOVA 平均方差分析及显著性差

异分析($P<0.05$), 并使用 Excel 做不同处理因子对菌根数、株高、地径影响的柱形图, 根据 SPSS V13.0 数据结果添加误差线, 注明不同处理间的显著差异。

2 结果与分析

2.1 菌根形态观察

12 种处理下的华山松松苗均有菌根形成。华山松作为针叶树种, 其菌根的分支主要以二叉状(Dichotomous)(图 1A、B)、珊瑚状(Coralloid)(图 1C、D)或介于两者之间的分支类型。总长 2–5 mm; 基部(Main axes)粗; 末级分枝(Unramified ends)棒状或近圆柱状; 顶端直; 表面光滑, 具白色外延菌丝。

2.2 菌根数据统计与分析

对每个处理下的华山松菌根数、株高和地径进行计数统计, 统计结果显示于表 2。同时进一步对不同处理之间的数据差异进行 ANOVA 平均方差分析及显著性差异分析。

2.2.1 细菌种类及其浓度对菌根数的影响: 在实验细菌浓度为 2.4×10^9 CFU/mL 的特定条件下, 对 11 种不同细菌处理下的菌根数以及 CK 空白对照进行总体方差分析, 并把显著性水平设为 $P<0.05$ 时差异显著, $P<0.01$ 时差异极显著。表 3 显示不同细菌形成的菌根数存在极显著差异($P<0.01$)。表 4 显示不同因素和不同水平条件下形成的菌根数存在极显著差异($P<0.01$)。

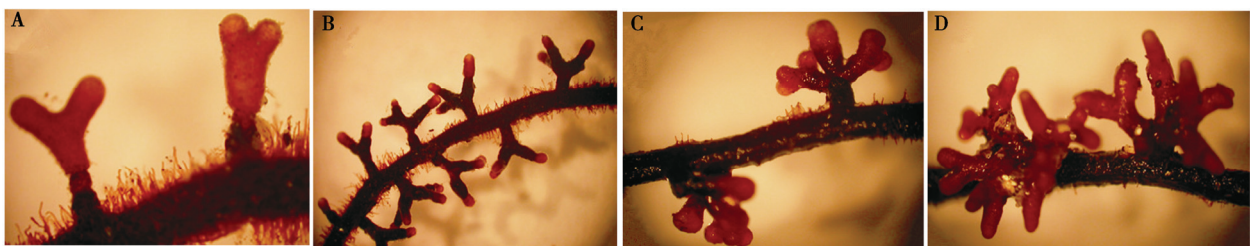


图 1 印度块菌与华山松形成的外生菌根外观形态

Figure 1 Morphological characteristics of ectomycorrhizae of *Tuber indicum* with *Pinus armandii*

注: A、B: 二叉状菌根; C、D: 珊瑚状菌根。

Note: A, B: Dichotomous mycorrhiza; C, D: Coralloid mycorrhiza.

表 2 细菌种类和浓度的不同水平对华山松菌根数、株高和地径的影响
Table 2 Effects of different levels of bacteria type and amount of inoculum on quantity of mycorrhizae, plant height and ground diameter of *Pinus armandii*

细菌菌株 Bacterial strains	细菌浓度 Concentration of bacteria (CFU/mL)	菌根均值 The mean of mycorrhizae	株高均值 The mean of plant height (cm)	地径均值 The mean of ground diameter (mm)
P11	0.8×10 ⁹	247.50±25.93	28.63±1.76	3.15±0.45
	2.4×10 ⁹	188.67±19.95	24.88±3.40	3.07±0.26
	4.0×10 ⁹	218.17±41.24	27.37±2.68	3.07±0.37
P127	0.8×10 ⁹	296.67±34.79	26.52±1.20	2.98±0.45
	2.4×10 ⁹	216.17±49.00	27.77±1.58	3.11±0.31
	4.0×10 ⁹	288.33±51.98	27.67±2.78	3.10±0.30
P143	0.8×10 ⁹	285.00±34.41	27.55±3.57	2.92±0.40
	2.4×10 ⁹	469.00±51.02	29.45±3.21	3.38±0.19
	4.0×10 ⁹	281.00±74.01	26.67±3.61	3.16±0.40
P579	0.8×10 ⁹	157.00±33.85	25.37±2.85	2.86±0.37
	2.4×10 ⁹	153.33±31.66	24.42±2.87	3.15±0.45
	4.0×10 ⁹	254.83±43.87	29.87±3.10	3.52±0.29
S767	2.4×10 ⁹	176.83±42.86	27.63±4.78	3.24±0.34
S191	2.4×10 ⁹	319.00±18.98	29.17±1.51	3.31±0.35
A222	2.4×10 ⁹	403.83±77.51	28.70±2.42	3.00±0.41
A326	2.4×10 ⁹	172.83±29.55	29.00±5.46	3.22±0.30
A558	2.4×10 ⁹	289.67±53.00	28.28±1.54	3.00±0.32
A659	2.4×10 ⁹	207.83±46.18	25.67±3.26	3.06±0.29
V633	2.4×10 ⁹	358.33±68.20	28.36±3.23	3.04±0.27
CK	0	234.00±41.69	24.20±1.35	2.73±0.48

表 3 不同因素处理下的华山松菌根数总体方差分析
Table 3 Analysis of population variance of the quantity of mycorrhizae synthesized on *Pinus armandii* under different factors

变异来源 Sources of variation	自由度 Degree of freedom	平方和 Sum of squares	均方 Mean square	F 值 F-value	P 值 P-value
模型 Model	11	710 978.2	64 634.38	32.393 99	<0.001
误差 Error	60	119 715.5	64 634.38		
总和 Total	71	830 693.7			

表 4 不同因素和水平条件下华山松菌根数总体方差分析
Table 4 Analysis of population variance of the quantity of mycorrhizae synthesized on *Pinus armandii* under different factors and levels

变异来源 Sources of variation	自由度 Degree of freedom	平方和 Sum of squares	均方 Mean square	F 值 F-value	P 值 P-value
模型 Model	11	457 235.1	41 566.83	22.247 02	<0.001
误差 Error	60	112 105.3	1 868.422		
总和 Total	71	569 340.4			

基于以上分析,进一步对不同细菌种类处理下的菌根数以及同种细菌不同浓度处理下的菌根数进行分析,选择促进华山松菌根形成的细菌及其细菌合适的浓度。方差分析结果(图 2)表明细菌浓度为 2.4×10^9 CFU/mL 时, P11、A326 和 S767 显著抑制了华山松块菌菌根的形成,与 CK 对照相比,3 种处理下的菌根数分别降低了 19.37%、21.87% 和 24.43%。P579 极显著抑制了华山松块菌菌根的形成,菌根数降低了 34.47%; S191、V633、A222 和 P143 极显著促进了华山松块菌菌根的形成,菌根数分别提高了 36.32%、53.13%、72.58% 和 100.43%。

4 种假单胞菌浓度梯度方差分析(图 3)表明 P127 的 3 个浓度差异不显著; P11 的 3 个浓度差异显著,其中浓度 B1 显著促进菌根的形成,菌根数提高 5.77%; P143 和 P579 的 3 个浓度差异极显著。P143 的 B2 浓度极显著促进了菌根的形成,菌根数提高了 36.32%,而 B1 和 B3 浓度对促进菌根的形

成表现不显著; P579 的 B1、B2 浓度都极显著抑制了菌根的形成,菌根数分别降低 32.91% 和 34.47%,而 B3 浓度对菌根的形成无显著作用。

2.2.2 细菌种类及其浓度对株高的影响: 在细菌浓度为 2.4×10^9 CFU/mL 的特定条件下,对 11 种不同细菌处理下的华山松苗株高以及 CK 空白对照进行总体方差分析。表 5 显示不同细菌处理下的华山松苗株高存在极显著差异。表 6 显示不同因素和不同水平条件下华山松苗株高存在极显著差异。

基于以上分析,进一步对不同细菌种类处理下的松苗株高以及同种细菌不同浓度处理下的株高进行分析。方差分析结果(图 4)表明细菌浓度在 2.4×10^9 CFU/mL 时, P11、S767 和 V633 均显著促进了华山松苗的株高,与 CK 对照相比,3 种处理下的株高分别提高了 2.81%、14.17% 和 17.19%; P127、A558、A222、S191 和 P143 极显著促进了华山松苗的株高,株高分别提高了 14.75%、16.86%、

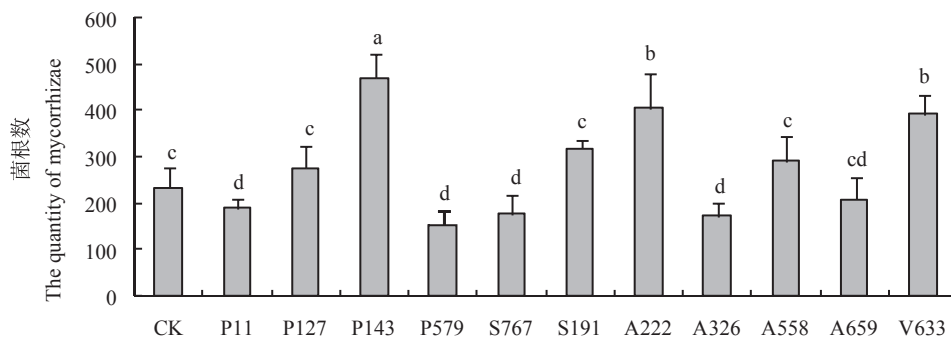


图 2 不同细菌处理下的华山松菌根数

Figure 2 The quantity of mycorrhizae synthesized on *Pinus armandii* under different bacteria

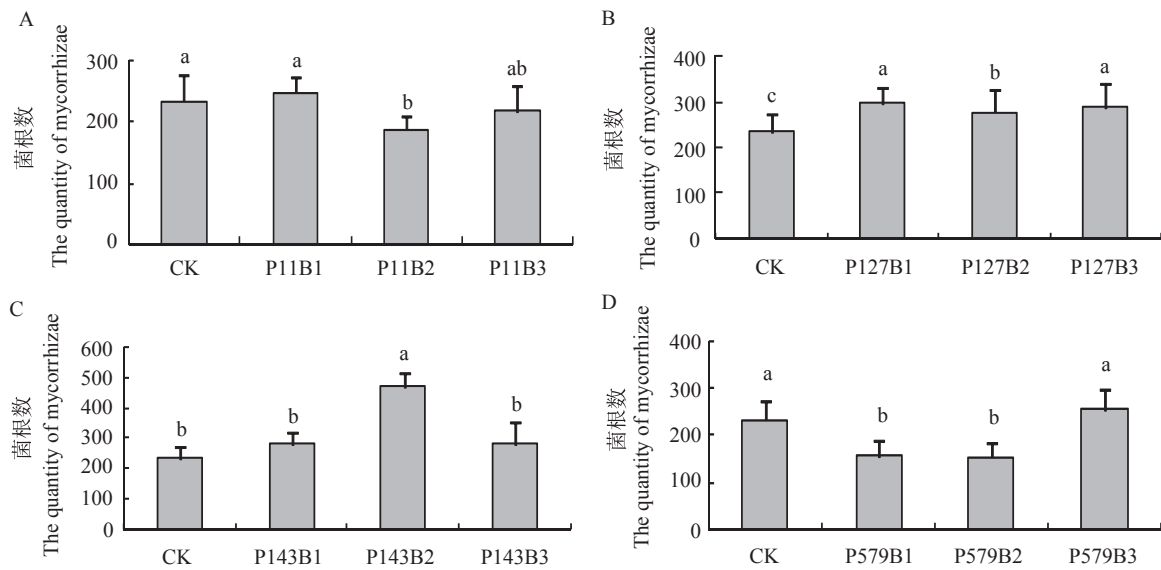


图3 CK及不同浓度的假单胞菌处理下的华山松菌根数

Figure 3 The quantity of mycorrhizae synthesized on *Pinus armandii* of CK and under different concentration of *Pseudomonas*

注: A-D: P11、P127、P143和P579的不同浓度处理下的菌根数。

Note: A-D: The quantity of mycorrhizae under different concentration of P11, P127, P143 and P579.

表5 不同因素处理下的华山松苗株高总体方差分析

Table 5 Analysis of population variance of the plant height synthesized on *Pinus armandii* under different factors

变异来源 Sources of variation	自由度 Degree of freedom	平方和 Sum of squares	均方 Mean square	F值 F-value	P值 P-value
模型 Model	11	471.439 4	42.858 13	3.919 752	<0.001
误差 Error	60	656.033 3	10.933 89		
总和 Total	71	1 127.473 0			

表6 不同因素和水平条件下华山松苗株高总体方差分析

Table 6 Analysis of population variance of the plant height synthesized on *Pinus armandii* under different factors and levels

变异来源 Sources of variation	自由度 Degree of freedom	平方和 Sum of squares	均方 Mean square	F值 F-value	P值 P-value
模型 Model	11	339.486 7	30.862 420	3.799 439	<0.001
误差 Error	60	487.373 3	8.122 889		
总和 Total	71	826.860 0			

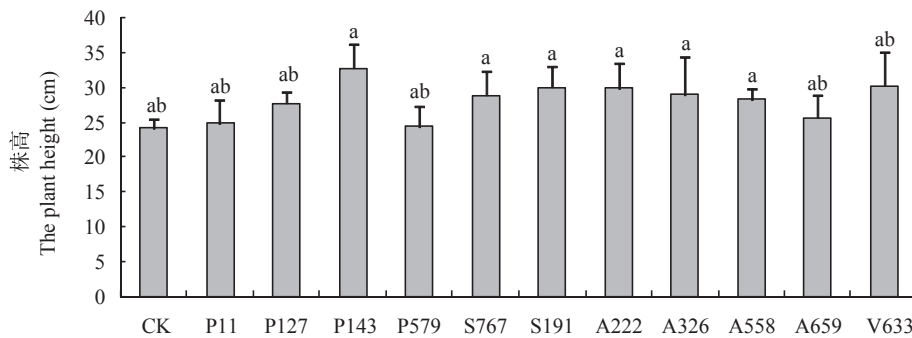


图4 不同细菌处理下的华山松苗株高

Figure 4 The plant height synthesized on *Pinus armandii* under different bacteria

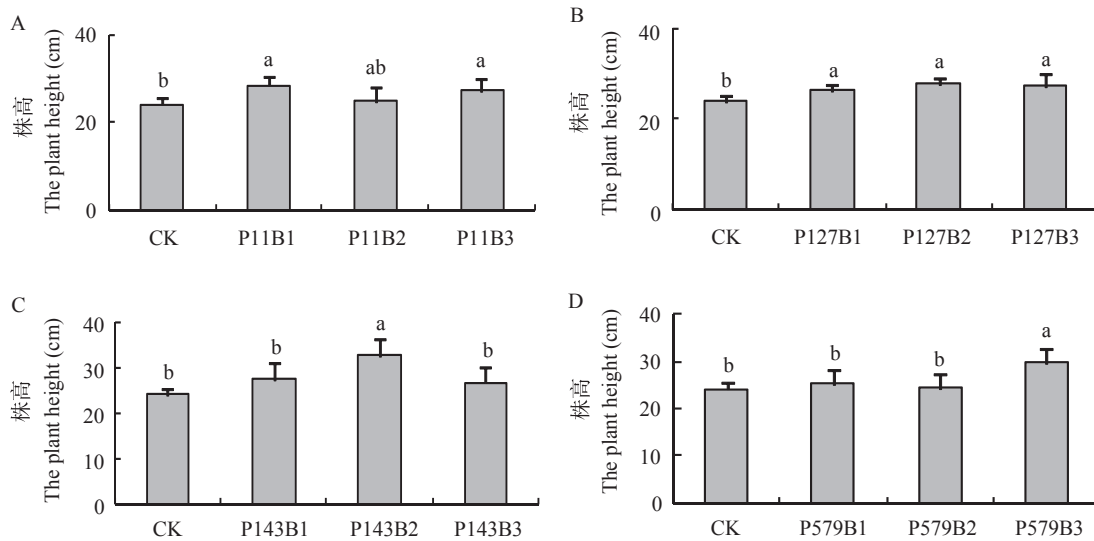


图5 CK及不同浓度的假单胞菌处理下的华山松苗株高

Figure 5 The plant height synthesized on *Pinus armandii* of CK and under different concentration of *Pseudomonas*

注: A-D: P11、P127、P143和P579的不同浓度处理下的株高。

Note: A-D: The plant height under different concentration of P11, P127, P143 and P579.

18.60%、20.54%和21.69%。

4种假单胞菌浓度梯度方差分析(图5)显示P11、P127的3个浓度差异均不显著。P143、P579浓度差异显著, P143的浓度B2显著促进了华山松苗的株高, 株高提高了21.69%。P579的浓度B3极显著促进了华山松苗的株高, 株高提高了23.43%。

2.2.3 细菌种类及其浓度对地径的影响: 在细菌浓度为 2.4×10^9 CFU/mL 的特定条件下, 对11种不同细菌处理下的华山松苗地径以及CK空白对照进行

总体方差分析, 表7显示不同细菌处理下的华山松苗地径存在极显著差异。表8显示不同因素和不同水平条件下华山松苗地径存在极显著差异。

进一步对不同细菌种类处理下的松苗地径以及同种细菌不同浓度处理下的地径进行分析。方差分析结果(图6)表明细菌浓度在 2.4×10^9 CFU/mL 时, V633、A659、P127和P11显著促进了华山松A326、S767、S191和P143极显著促进了华山松苗的地径, 地径分别提高了17.95%、18.60%、21.25%

表 7 不同因素处理下的华山松苗地径总体方差分析

Table 7 Analysis of population variance of the ground diameter of mycorrhizae synthesized on *Pinus armandii* under different factors

变异来源 Sources of variation	自由度 Degree of freedom	平方和 Sum of squares	均方 Mean square	F 值 F-value	P 值 P-value
模型 Model	11	3.720 686	0.338 244	3.524 333	<0.001
误差 Error	84	8.061 813	0.095 974		
总和 Total	95	11.782 500			

表 8 不同因素和水平条件下华山松地径总体方差分析

Table 8 Analysis of population variance of the ground diameter synthesized on *Pinus armandii* under different factors and levels

变异来源 Sources of variation	自由度 Degree of freedom	平方和 Sum of squares	均方 Mean square	F 值 F-value	P 值 P-value
模型 Model	11	4.867 183	0.442 471	4.160 915	<0.001
误差 Error	84	8.932 550	0.106 340		
总和 Total	95	13.799 730			

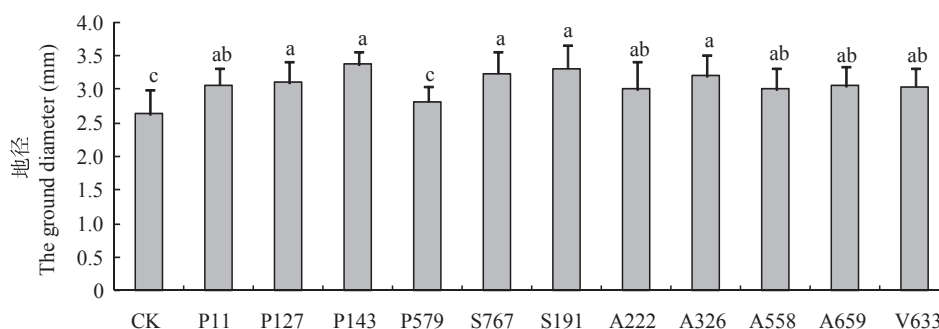


图 6 不同细菌处理下的华山松苗地径

Figure 6 The ground diameter synthesized on *Pinus armandii* under different bacteria

和 23.81%。

对 4 种假单胞菌做了浓度梯度比较, 经过方差分析(图 7)显示 P11、P127 和 P143 的 3 个浓度差异均不显著。P579 的 3 个浓度表现极显著差异, 浓度 B3 极显著促进了华山松苗的地径, 地径提高了 28.94%。

从实验结果可以看出, 对比 CK 苗, 土壤中分离得到的这 11 种优势菌株对菌根苗的菌根数及苗长势的影响效应显著, 且不同细菌及浓度作用效果

不同。当细菌浓度为 2.4×10^9 CFU/mL 时, P143 (*Pseudomonas* sp. JCM 5481)和 S191 (*Streptomyces* sp. EN31)对印度块菌与华山松形成的菌根数、株高、地径均有极显著促进作用; V633 (*Variovorax paradoxus*)对印度块菌与华山松形成的菌根数、株高有极显著促进作用, 对地径有显著促进作用。这 3 种细菌可作为 MHB 的首选用于菌根合成。P11 (*Pseudomonas chlororaphis*)和 P127 (*Pseudomonas corrugate*)在浓度为 0.8×10^9 CFU/mL 时对印度块菌

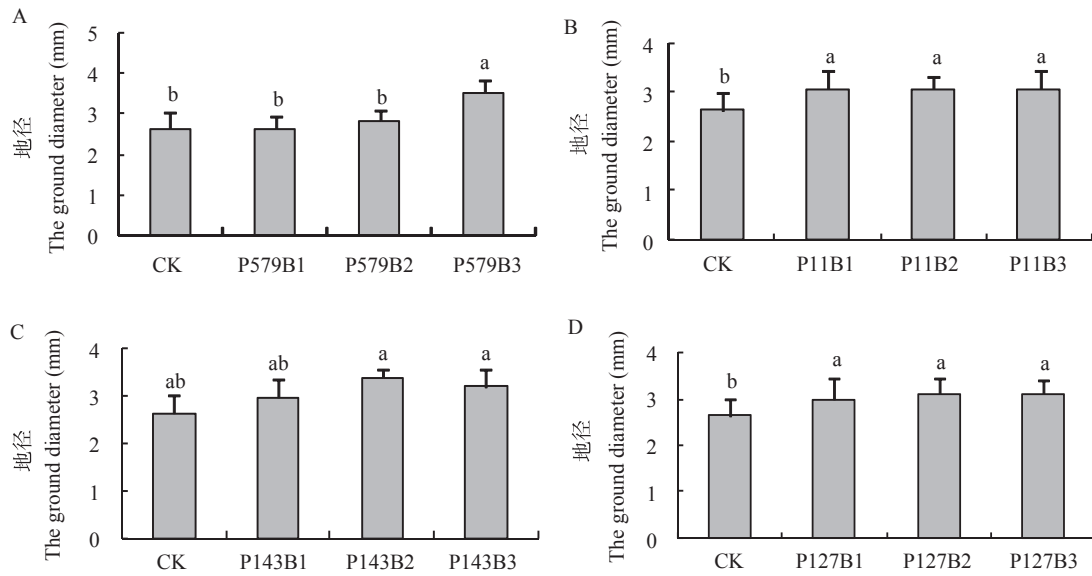


图7 CK及不同浓度的假单胞菌处理下的华山松苗地径

Figure 7 The ground diameter synthesized on *Pinus armandii* of CK and under different concentration of *Pseudomonas*

注: A-D: P579、P11、P143和P127的不同浓度处理下的地径。

Note: A-D: The ground diameter under different concentration of P579, P11, P143 and P127.

与华山松形成的菌根数、株高、地径均有显著促进作用,也可作为MHB用于菌根合成。不同浓度的假单胞菌处理下,P11最适浓度为 0.8×10^9 CFU/mL,P127为 0.8×10^9 CFU/mL,P143为 2.4×10^9 CFU/mL,P579为 4.0×10^9 CFU/mL。

3 结论

本实验所用细菌均来自华山松与印度块菌形成的菌根根际土壤,在进行分离鉴定后选择了其中的优势属和优势种用于印度块菌的菌根合成。邓晓娟^[32]的研究表明印度块菌根际土壤和子囊果内细菌的优势属种不同,因此除了土壤内的细菌,也可以选择子囊果内的细菌来进行MHB的研究。李守萍等^[26]从油松菌根上分离到了MHB,而迄今为止尚未有人做过印度块菌菌根上和菌根内部的细菌分离鉴定,因此从菌根中分离获得MHB也是重要的研究方向。此次实验只对假单胞菌属的4种细菌做了浓度梯度,从实验结果可以看出细菌浓度对MHB的获得有很大影响。因此对每种细菌设置浓度梯度,选择合适的细菌浓度,并从中选出一定浓

度的MHB是重要的实验过程。印度块菌除了与实验中的华山松有共生关系外,还与云南松、思茅松、高山松、锥连栎、麻栎、云南白杨等共生,这些树种不仅是经济树种,而且还是森林生态系统中的建群树种,扮演着重要角色,今后的实验可以进行不同树种与不同细菌之间的交互作用,比较细菌对不同的菌根组合形成的菌根数量是否具有真菌特异性。本实验共获得5种MHB,但鉴于此类实验在国内外研究的还是比较少,所以仍需深入研究,以期MHB的实际应用提供详实有力的数据。

参考文献

- [1] Hall IR, Brown GT, Byars J, et al. The Black Truffle: Its History, Uses and Cultivation[M]. 2nd Edition. Christchurch: New Zealand Institute for Crop & Food Research Limited, 1994
- [2] Chen BD, Christie P, Li XL. A modified glass bead compartment cultivation system for studies on nutrient and trace metal uptake by arbuscular mycorrhiza[J]. Chemosphere, 2001, 42(2): 185-192
- [3] Duñabeitia MK, Hormilla S, Salcedo I, et al. Ectomycorrhizae synthesized between *Pinus radiata* and eight fungi associated with *Pinus* spp.[J]. Mycologia, 1996, 88(6): 897-908
- [4] Rauscher T, Müller WR, Agerer R, et al. *Tuber borchii* Vitt. + *Corylus avellana* L.[J]. Descr Ectomyc, 1996, 1: 173-178
- [5] Hu HD. The precious ingredients are symbiosis with trees—*Edible fungi*[J]. Scientific Development, 2005(389): 14-19 (in Chinese)

- 胡弘道. 与林木共生的珍贵食材—食用真菌[J]. 科学发展, 2005(389): 14-19
- [6] Paolocci F, Rubini A, Granetti B, et al. Typing *Tuber melanosporum* and Chinese black truffle species by molecular markers[J]. FEMS Microbiology Letters, 1997, 153(2): 255-260
- [7] Pacioni G, Comandini O. *Tuber*[A]/Ectomycorrhizal Fungi Key Genera in Profile[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 1999: 163-186
- [8] Sisti D, Giomaro G, Cecchini M, et al. Two genetically related strains of *Tuber borchii* produce *Tilia* mycorrhizas with different morphological traits[J]. Mycorrhiza, 2003, 13(2): 107-115
- [9] Roux C, Séjalon-Delmas N, Martins M, et al. Phylogenetic relationships between European and Chinese truffles based on parsimony and distance analysis of ITS sequence[J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 180(2): 147-155
- [10] Murat C, Diez J, Luis P, et al. Polymorphism at the ribosomal DNA ITS and its relation to postglacial re-colonization routes of the Perigord truffle *Tuber melanosporum*[J]. New Phytologist, 2004, 164(2): 401-411
- [11] Mello A, Murat C, Vizzini A, et al. *Tuber magnatum* Pico., a species of limited geographical distribution: its genetic diversity inside and outside a truffle ground[J]. Environmental Microbiology, 2004, 7(1): 55-65
- [12] Pomarico M, Figliuolo G, Rana GL. *Tuber* spp. biodiversity in one of the southernmost European distribution areas[J]. Biodiversity and Conservation, 2007, 16(12): 3447-3461
- [13] Splivallo R. Biological significance of truffle secondary metabolites[A]/Karlovsky P. Secondary Metabolites in Soil Ecology[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2008, 14: 141-165
- [14] Rincón A, Parladé J, Pera J. Effects of ectomycorrhizal inoculation and the type of substrate on mycorrhization, growth and nutrition of containerised *Pinus pinea* L. seedlings produced in a commercial nursery[J]. Annals of Forest Science, 2005, 62(8): 817-822
- [15] Ricard JM. Truffle: Technical Guide for Trufficulture[M]. Paris, France: Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes, 2003
- [16] Garcia-Montero LG, Pascual C, Garcia-Abril A, et al. Problems of using rockroses in *Tuber melanosporum* culture: soil and truffle harvest associated with *Cistus laurifolius*[J]. Agroforestry Systems, 2007, 70(3): 251-258
- [17] Chen YL. Mycorrhizal formation and morphological studies on truffles (*Tuber* spp.)[J]. Edible Fungi of China, 2000, 20(3): 20-21 (in Chinese)
陈应龙. 块菌菌根合成及其形态研究[J]. 中国食用菌, 2000, 20(3): 20-21
- [18] Slankis V. Soil factors influencing formation of mycorrhizae[J]. Annual Review of Phytopathology, 2003, 12(3): 437-456
- [19] Mosse B. The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions[J]. Journal of General Microbiology, 1962, 27(3): 509-520
- [20] Bowen GD, Theodorou C. Interactions between bacteria and ectomycorrhizal fungi[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1979, 11(2): 119-126
- [21] Garbaye J. Mycorrhization helper bacteria: A new dimension to the mycorrhizal symbiosis[J]. Acta Botanica Gallica, 1994, 141(4): 517-521
- [22] Cristiana S, Monica A, Stefano B, et al. Diversity of culturable bacterial populations associated to *Tuber borchii* ectomycorrhizas and their activity on *T. borchii* mycelial growth[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 211(2): 195-201
- [23] Barbieri E, Guidi C, Bertaux J, et al. Occurrence and diversity of bacterial communities in *Tuber magnatum* during truffle maturation[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(9): 2234-2246
- [24] Sbrana C, Bagnoli G, Bedini S, et al. Adhesion to hyphal matrix and antifungal activity of *Pseudomonas* strains isolated from *Tuber borchii* ascocarps[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2000, 46(3): 259-268
- [25] Frey-Klett P, Chavatte M, Clause ML, et al. Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere *Fluorescent pseudomonads*[J]. New Phytologist, 2005, 165(1): 317-328
- [26] Li SP, Cheng YE, Tang M, et al. Isolation and identification of mycorrhiza helper bacteria *Pseudomonas fluorescens* of *Pinus tabulaeformis*[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2009, 29(10): 2103-2108 (in Chinese)
李守萍, 程玉娥, 唐明, 等. 油松菌根促生细菌—荧光假单胞菌的分离与鉴定[J]. 西北植物学报, 2009, 29(10): 2103-2108
- [27] Deng XJ, Zhao QM, Song LJ, et al. Study on Mycorrhization Helper Bacteria of *Tuber* spp.[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2014, 42(36): 13179-13184 (in Chinese)
邓晓娟, 赵清梅, 宋李杰, 等. 块菌菌根促生细菌研究[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(36): 13179-13184
- [28] Gu JG, Fang DH, Li TF, et al. Mechanisms of *Pseudomonas fluorescens* RB-42 and RB-89 in Biocontrol of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2004, 20(1): 76-78 (in Chinese)
顾金刚, 方敦煌, 李天飞, 等. 两株荧光假单胞杆菌菌株对烟草黑胫病原菌的抑制作用[J]. 中国生物防治, 2004, 20(1): 76-78
- [29] Geng LY. Mycorrhizal Synthesis of *Tuber indicum* with *Pinus armandii*, *Castanea mollissima* and *Quercus franchetii*[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Lanzhou University, 2009 (in Chinese)
耿丽英. 印度块菌与华山松、板栗和锥连栎的菌根合成[D]. 兰州: 兰州大学硕士学位论文, 2009
- [30] Shen P, Fan XR, Li GW. Microbiology Experiment[M]. Beijing: Higher Education Press, 1996 (in Chinese)
沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1996
- [31] Agerer R. Colour Atlas of Ectomycorrhizae: with Glossary[M]. Schwäbisch Gmünd: Einhorn-Verlag, 1987-2002
- [32] Deng XJ. Study on white *Tuber* spp. and microbial diversity of *Tuber indicum* ectomycorrhizosphere and ascomata[D]. Kunming: Doctoral Dissertation of Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, 2012 (in Chinese)
邓晓娟. 印度块菌菌根际和子囊果内微生物及白块菌分类研究[D]. 昆明: 中国科学院昆明植物研究所博士学位论文, 2012