

丛枝菌根真菌繁殖体的高效扩繁

黄玉丹¹, 张淑彬², 李琳¹, 梁斌¹, 高雪¹, 武亚芬¹, 李敏³, 向丹^{*1}

1 青岛农业大学资源与环境学院, 山东 青岛 266109

2 北京市农林科学院植物营养与资源研究所, 北京 100097

3 青岛农业大学园艺学院, 山东 青岛 266109

黄玉丹, 张淑彬, 李琳, 梁斌, 高雪, 武亚芬, 李敏, 向丹. 丛枝菌根真菌繁殖体的高效扩繁[J]. 微生物学通报, 2023, 50(2): 503-513.

HUANG Yudan, ZHANG Shubin, LI Lin, LIANG Bin, GAO Xue, WU Yafen, LI Min, XIANG Dan. Efficient propagation of arbuscular mycorrhizal fungal propagules[J]. Microbiology China, 2023, 50(2): 503-513.

摘要:【背景】丛枝菌根(arbuscular mycorrhiza, AM)真菌能够和大多数植物形成互利共生体系, 以促进植物生长、提高抗逆能力, 在生产中具有重要作用, 但 AM 真菌的繁殖技术限制了其应用。

【目的】构建 AM 真菌的高效繁殖体系。【方法】于温室盆栽条件下, 将根内根孢囊霉(*Rhizophagus intraradice*)接种于由 3 种寄主植物高粱(*Sorghum bicolor*)、玉米(*Zea mays*)、红三叶草(*Trifolium repens*)与 5 种培养基质(沸石、河砂、草炭、珍珠岩和蛭石)构建的 4 种繁殖体系中进行培养。研究不同繁殖体系对根内根孢囊霉侵染程度、产孢量的影响; 然后利用高粱接种扩繁的菌剂进行 AM 真菌侵染能力的测定以验证其扩繁效果; 最后基于筛选出的最优扩繁条件探讨对其他种类 AM 真菌摩西斗管囊霉(*Funneliformis mosseae*)、幼套近明球囊霉(*Clariodeoglous etunicatum*)、地表多样孢囊霉(*Diversispora versiformis*)和脆无梗囊霉(*Acaulospora delicata*)的扩繁效果。【结果】基质为河砂+蛭石+草炭(体积比为 1:4:1), 寄主植物为玉米+红三叶草处理的根内根孢囊霉产孢量最高, 达到 1 912 个/g-基质且接种高粱后表现出较好的侵染潜力, 同时显著提高了高粱的地上部生物量。此外, 利用该组合扩繁其他种类 AM 真菌, 发现孢子数均得到了显著的提高, 扩繁后摩西斗管囊霉、幼套近明球囊霉、地表多样孢囊霉和脆无梗囊霉的孢子数较扩繁前分别增加了 6.24、2.92、35.18 和 4.18 倍。

【结论】以玉米+红三叶草为寄主植物, 以河砂+蛭石+草炭(1:4:1)为基质, 即通气孔隙为 3.57%、持水孔隙为 48.19%、容重为 1.03 g/cm³、电导率为 152.5 μS/cm、pH 值为 5.61、速效磷为 5.6 mg/kg、碱解氮为 80 mg/kg、速效钾为 449.8 mg/kg、有机质为 56.11 g/kg 的条件有助于根内根孢囊霉达到最佳的扩繁效果, 同时对其他 AM 真菌扩繁效果也相对较好, 能够达到高效扩繁 AM 真菌繁殖体的目的。

关键词: 丛枝菌根真菌; 基质; 寄主植物; 孢子密度

资助项目: 山东省重大科技创新工程项目(2021CXGC010801); 国家农业产业技术体系项目(CARS-10-B11); 青岛市科技惠民项目(21-1-4-ny-13-nsh)

This work was supported by the Major Scientific and Technological Innovation Project of Shandong Province (2021CXGC010801), the China Agriculture Research System Project (CARS-10-B11), and the Qingdao Science and the Technology Benefiting the People Project (21-1-4-ny-13-nsh).

*Corresponding author. E-mail: smilingxiangdan@163.com

Received: 2022-04-29; Accepted: 2022-06-28; Published online: 2022-08-25

Efficient propagation of arbuscular mycorrhizal fungal propagules

HUANG Yudan¹, ZHANG Shubin², LI Lin¹, LIANG Bin¹, GAO Xue¹, WU Yafen¹, LI Min³, XIANG Dan^{*1}

1 School of Resources and Environment, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong, China

2 Institute of Plant Nutrition and Resources, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China

3 School of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong, China

Abstract: [Background] Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi can form mutualistic symbiosis with most plants to promote the growth and enhance the stress resistance of plants, playing an important role in production. However, the immature propagation technology limits the application of AM fungi. [Objective] To establish an efficient propagation system of AM fungi. [Methods] A pot experiment was conducted. Specifically, *Rhizophagus intraradice* was inoculated into four propagation systems constructed with three host plants (*Sorghum bicolor*, *Zea mays*, and *Trifolium repens*) and five substrates (zeolite, river sand, peat, perlite, and vermiculite) for culture. The effects of different propagation systems on the infection and sporulation of *R. intraradice* were studied. Then, we measured the infection ability of AM fungi by inoculating *S. bicolor* with propagation inoculum to verify the propagation effect. Finally, the optimal propagation conditions were employed to explore the propagation of other species of AM fungi: *Funneliformis mosseae*, *Clariodeoglous etunicatum*, *Diversispora versiformis*, and *Acaulospora delicate*. [Results] The propagation system with river sand+vermiculite+peat (1:4:1) as the substrate and *Z. mays*+*T. repens*, *R. intraradice* as the host plants had the highest spore production of 1 912 spores/g-dry substrate. Moreover, the AM fungi propagated with this system showed better infection potential and remarkably increased the aboveground biomass of *S. bicolor*. In addition, the propagation with this system increased the sporulation of *F. mosseae*, *C. etunicatum*, *D. versiformis*, and *A. delicate* by 6.24, 2.92, 35.18, and 4.18 times, respectively, compared with that before propagation. [Conclusion] The propagation system with *Z. mays*+*T. repens* as the host plants and river sand+vermiculite+peat (1:4:1) as the substrate had the optimum results. This system had the aeration porosity of 3.57%, the water-holding porosity of 48.19%, the bulk density of 1.03 g/cm³, the electrical conductivity of 152.5 μ S/cm, pH 5.61, the available phosphorus of 5.6 mg/kg, the available nitrogen of 80 mg/kg, the available potassium of 449.8 mg/kg, and the organic matter of 56.11 g/kg, which are conducive to the efficient propagation *R. intraradice* and other AM fungi.

Keywords: arbuscular mycorrhizal fungi; substrate; host plant; spore density

丛枝菌根(arbuscular mycorrhiza, AM)真菌是一类广泛分布于土壤中的有益微生物,能与绝大多数高等植物根系形成共生体系^[1]。AM真菌不仅可以促进寄主植物对土壤中氮、磷、钾等矿质元素的吸收^[2],还可以提高植物的抗逆能力(如抗寒、抗旱、耐盐碱、抗病性等)^[3-4],有利于植物的生长发育,对于农林业生产具有重要意义^[5]。

近年来,AM真菌作为一种新型生物菌肥,可以提高作物的产量和品质,并减少农药和化肥的施用,在生产中具有广阔的应用前景^[6]。已有研究表明,AM真菌促进了各种大田作物,包括棉花、番茄、橙子、胡椒、洋葱、马铃薯、小麦和玉米等的生长^[7]。但市场上可购买到的AM真菌菌剂数量少、价格贵,购买后仍需要扩繁且菌剂扩繁后质量参差不齐,AM真菌的大规模应用仍然受到限制,菌剂的开发成为当前的紧要任务^[8-9]。目前AM真菌的扩繁方法有盆栽培养法、水培法、气培法及体外培养法^[10]。盆栽培养法因操作简易、方法可靠、成本低廉^[11],在宿主植物中的定殖效率更高^[12],是目前扩繁AM真菌的主要方式。目前,国内外已经进行了大量关于AM真菌盆栽扩繁的研究,因其扩繁效果受到培养基质、寄主植物、培养条件及培养时间等诸多因素的影响^[13],扩繁效果欠佳且差异较大。如王亚军等^[14]以河砂为培养基质,玉米为寄主植物扩繁根内根孢囊霉、地表多样孢囊霉、摩西斗管囊霉和缩球囊霉,120 d后孢子密度分别为7、6、5、5个/g-基质;Harikumar等^[15]使用椰麸和印楝饼(5:1,体积比)为基质、芝麻为寄主植物扩繁两型柄管囊霉,繁殖后孢子数目为40-50个/g-基质;周霞等^[16]以河砂+蛭石+草炭(体积比为1:4:1)为培养基质、玉米和红三叶草为寄主,90 d后根内根孢囊霉孢子数为115个/g-基质。截至目前,AM真菌扩繁后孢子数目并无大幅度提高,繁殖技术仍未取得预期

的进展,难以满足实际生产中的需求,迫切需要探索更加高效且稳定的扩繁体系。

根内根孢囊霉是AM真菌自然生态系统中最常见的物种之一,其作为共生真菌存在于大多数植物中^[17]。在质地较重的农业土壤中,根内根孢囊霉可以主导AM真菌群落^[18]。但是针对根内根孢囊霉扩繁的研究相对缺乏,该菌种高效扩繁的条件仍然未知。因此,为了生产出高效力、低成本的根内根孢囊霉菌剂,更好地发挥基质、寄主和菌种之间的互作效应,本研究选用沸石、河砂、蛭石、珍珠岩和草炭不同配比的基质,以及联合玉米、三叶草和高粱的寄主组合,探讨不同处理对AM真菌菌种根内根孢囊霉的侵染程度和产孢量的影响,并进行侵染潜力能力的测定以验证其扩繁效果,同时探索最优扩繁体系对其他种类AM真菌扩繁的影响,以期为菌根生物技术的大范围应用提供切实依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

供试AM真菌:根内根孢囊霉(*R. intraradice*)、摩西斗管囊霉(*F. mosseae*)、幼套近明球囊霉(*C. etunicatum*)和脆无梗囊霉(*A. delicate*)由北京市农林科学院植物营养与资源研究所提供;地表多样孢囊霉(*D. versiformis*)由青岛农业大学菌根生物技术研究提供。

供试寄主植物:红三叶草(*T. repens*),江苏亨信种业有限公司;玉米(*Z. mays*,郑单958)和高粱(*S. bicolor*,黄河红高粱),寿禾种业有限公司。

供试基质:沸石、河砂、草炭、蛭石和珍珠岩均购于市场。

1.1.2 主要试剂和仪器

Hoagland营养液成分、重铬酸钾、浓硫酸、磷酸二氢钾、乙酸铵、硼酸、碳酸氢钠均为国

产分析纯。电导率仪,上海精密科学仪器有限公司;分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;离心机,长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司;火焰光度计,上海欣益仪器仪表有限公司;水浴锅,北京市永光明医疗仪器有限公司;生化培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;体视显微镜,奥林巴斯工业有限公司;电子显微镜,尼康株式会社。

1.2 试验设计

1) 试验I: 根内根孢囊霉的扩繁

以不同的培养基质和寄主植物扩繁根内根孢囊霉,分为A、B、C、D这4个处理(表1),随机排列,重复4次,共计16盆。

选用规格为AB280的花盆,每盆装2 kg的基质。在播种前,对所用基质进行121 °C灭菌1 h,并用75%酒精对温室和培养容器进行消毒。挑选饱满、均一的寄主植物种子,采用10% H₂O₂消毒20 min,然后用清水浸泡一夜后于培养箱中28 °C黑暗催芽。每盆接种剂量为20 g,接入AM真菌菌剂时,先装入2/3的基质,平铺菌剂,再装入剩余1/3的基质,播种后盖苗、浇水。出苗大约1周后定苗。出苗4周后,每周用减半含磷量的Hoagland营养液浇一次,试验期间采用干湿交替原则根据需要浇水。5个半月后停止浇水,剪掉地上部分,6个月收获。

2) 试验II: 试验I扩繁获得根内根孢囊霉侵染能力的测定

采用平均侵染法(mean infection percentage, MIP)对扩繁菌剂进行侵染能力的测定^[19]。将高

粱接种不同处理扩繁的4种根内根孢囊霉进行穴盘栽培,通过测定一定时期内高粱根系被侵染程度确定扩繁根内根孢囊霉的侵染能力。每个处理重复12次,设立空白无菌剂对照(CK),共计60穴。基质为沸石+河砂。播种前,高粱种子用10% H₂O₂消毒20 min,用清水浸泡一夜后于培养箱中28 °C黑暗中催芽。基质于121 °C灭菌1 h。基质:菌种为9:1(体积比),基质与菌种充分混合,播种后盖苗、浇水,在出苗1周左右进行定苗。在出苗2周后,定时浇Hoagland营养液,1个月后收获。

3) 试验III: 其他菌剂扩繁

运用菌剂高效扩繁方法扩繁菌种摩西斗管囊霉、幼套近明球囊霉、地表多样孢囊霉、脆无梗囊霉,其他处理同试验I。

1.3 项目测定

1.3.1 样品收获

试验I植株剪掉地上部分,用直径1.5 cm打孔器取适量根样品,其余地下部分留在盆里并在黑暗阴凉处阴干。地下部分完全阴干之后,将基质中的根段完全剪碎,过2 mm筛后将含有孢子和根段的混合土样放在4 °C冰箱里保存。

试验II植株剪掉地上部分,称重,将地下部分剪成1 cm长的根段。

1.3.2 侵染程度

洗净获得的根样品剪成1 cm长的小段,曲利苯蓝染色后用根段频率标准法测定菌根侵染率^[20],并用MYCOCALC软件计算孢囊丰度和丛枝丰度。

表1 试验处理

Table 1 Experimental treatment

Treatment	Substrate (volume ratio)					Host plant (plants/pot)		
	Zeolite	River sand	Vermiculite	Perlite	Peat	<i>S. bicolor</i>	<i>T. repens</i>	<i>Z. mays</i>
A	1	1	0	0	0	10	20	0
B	1	1	0	0	0	15	0	0
C	0	2	1	1	0	0	0	4
D	0	1	4	0	1	0	40	3

1.3.3 孢子密度

寄主植物生长 6 个月后收获菌剂, 称取一定量的风干菌剂, 用湿筛-倾注-蔗糖离心法分离获得孢子, 在显微镜和体视镜下观测计数, 测定孢子密度^[21]。

1.4 数据处理

用 SPSS 22.0 进行统计分析, 采用 Duncan 法对均值检测其显著性差异 ($P=0.05$), 采用 ORIGIN 作图。

2 结果与分析

2.1 不同基质理化性状

不同基质物化性状差别较大(表 2), 其中沸石+蛭石+珍珠岩(2:1:1)属于中等容重基质, 总孔隙度较大, 持水孔隙较高; 沸石+河砂(1:1)和河砂+蛭石+草炭(1:4:1)属于高等容重基质,

总孔隙度小, 持水孔隙较低; 3 种基质的 pH 值为 5.61–6.63; 在基质河砂+蛭石+草炭(1:4:1)中, 由于草炭的添加, 其电导率、速效磷、碱解氮、速效钾和有机质含量远高于其他基质。

2.2 不同处理对 AM 真菌生长发育的影响

2.2.1 不同处理对 AM 真菌侵染率的影响

菌根侵染率是衡量 AM 真菌在寄主植物根系扩展能力的重要指标, 侵染率越高, AM 真菌在寄主根系上的扩展范围越大^[22]。不同处理对 AM 真菌侵染程度的影响见表 3。4 种处理的侵染率无显著性差异, 处理 A 的侵染强度和泡囊丰度显著高于其他处理。图 1 显示了 AM 真菌在不同处理下侵染的根系状况。从图 1 中可以看出, 在菌剂扩繁过程中, 寄主植物根系中能够形成大量的泡囊和丛枝结构, 表明 AM 真菌与寄主植物根系形成了较好的共生关系。

表 2 不同基质理化性状

Table 2 Physical and chemical properties of different substrates

Substrate	Bulk density (g/cm ³)	Total porosity (%)	Aeration porosity (%)	Water-holding porosity (%)	Electrical conductivity (μS/cm)	pH	Available phosphorus (mg/kg)	Available nitrogen (mg/kg)	Available kalium (mg/kg)	Organic matter (g/kg)
Zeolite+river sand (1:1)	1.32	41.64	2.87	38.76	48.70	6.63	0.23	3.03	124.42	3.46
River sand+vermiculite+perlite (2:1:1)	0.48	66.28	2.03	64.25	40.90	6.28	0.26	0.61	149.45	4.72
River sand+vermiculite+peat (1:4:1)	1.03	51.76	3.57	48.19	152.50	5.61	5.60	80.00	449.78	56.11

表 3 不同处理对 AM 真菌侵染程度的影响

Table 3 Effects of different treatments on the degree of AM fungal infection

Treatment	Substrate	Host plant	Infection rate (%)	Infection intensity (%)	Arbuscular abundance (%)	Vesicle abundance (%)
A	Zeolite+river sand (1:1)	<i>S. bicolor</i> + <i>T. repens</i>	99.17a	80.53±4.97a	61.00±3.47a	48.48±4.85a
B	Zeolite+river sand (1:1)	<i>S. bicolor</i>	100a	72.50±4.87ab	55.25±9.69a	40.50±3.12ab
C	River sand+vermiculite+perlite (2:1:1)	<i>Z. mays</i>	100a	69.25±2.63b	55.92±6.28a	36.50±3.92b
D	River sand+vermiculite+peat (1:4:1)	<i>Z. mays</i> + <i>T. repens</i>	99.17a	69.83±9.33b	56.90±11.04a	33.98±8.14b

表中数据为平均值±标准差($n=4$), 同列小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)

Values are the means±SD ($n=4$), different letters in the same column show significant difference at $P<0.05$ level.

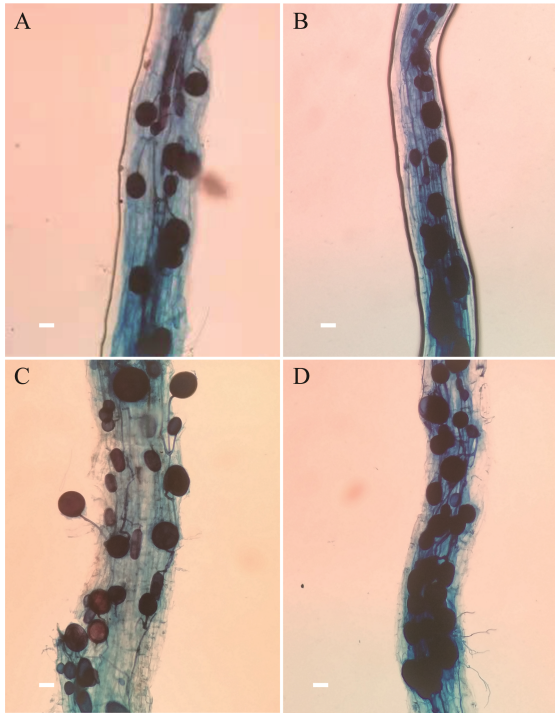


图 1 显微镜下根系中的菌根结构 A: 处理 A 扩繁后根系中的菌根结构. B: 处理 B 扩繁后根系中的菌根结构. C: 处理 C 扩繁后根系中的菌根结构. D: 处理 D 扩繁后根系中的菌根结构. 标尺为 200 μm
Figure 1 Mycorrhizal structure in root system under microscope. A: Mycorrhizal structure in root system after propagation of treatment A. B: Mycorrhizal structure in root system after propagation of treatment B. C: Mycorrhizal structure in root system after propagation of treatment C. D: Mycorrhizal structure in root system after propagation of treatment D. Bars: 200 μm .

2.2.2 不同处理对 AM 真菌孢子数的影响

不同繁殖体系对 AM 真菌产孢量的影响有所不同(图 2、图 3), N 为扩繁前孢子密度, 所有处理扩繁后孢子密度均显著高于扩繁前, 其中, 处理 D (基质为河砂+蛭石+草炭 1:4:1, 寄主植物为玉米+红三叶草)孢子密度最高, 为 1 912 个/g-干土, 显著高于处理 A 和处理 C; 处理 A、B、C 之间产孢量无显著性差异, 分别为 1 338、1 633 和 1 268 个/g-干土。

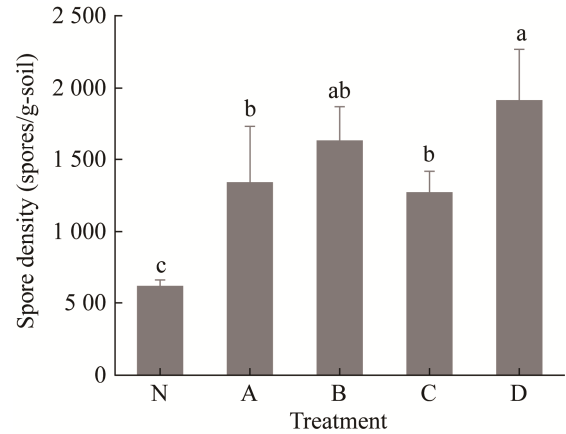


图 2 不同处理对 AM 真菌产孢量的影响
Figure 2 Effects of different treatments on sporulation of AM fungi.

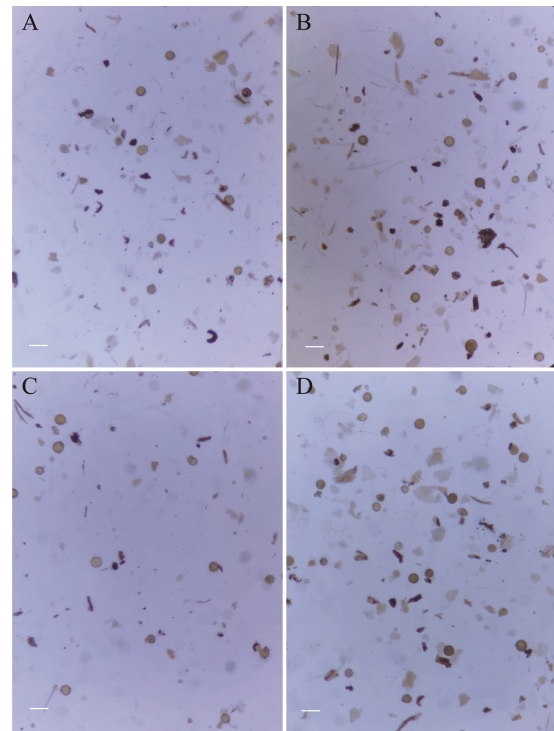


图 3 不同处理的产孢情况 A: 处理 A 的产孢情况. B: 处理 B 的产孢情况. C: 处理 C 的产孢情况. D: 处理 D 的产孢情况. 标尺为 200 μm
Figure 3 Sporulation of different treatments. A: Sporulation of treatment A. B: Sporulation of treatment B. C: Sporulation of treatment C. D: Sporulation of treatment D. Bars: 200 μm .

2.3 根内根孢囊霉侵染能力的测定

为验证自繁菌剂的效果, 将不同处理扩繁的根内根孢囊霉对高粱进行侵染能力的测定。由表 4 可知, 各处理侵染率均为 100%, 表明各个处理扩繁的根内根孢囊霉侵染能力强, 总繁殖体数量高。其中, 高粱幼苗接种处理 A 扩繁的根内根孢囊霉, 其根系侵染强度和丛枝丰度均最高, 与其他处理间存在显著性差异; 但接种处理 D (基质为河砂+蛭石+草炭 1:4:1, 寄主植物为玉米+红三叶草) 扩繁的根内根孢囊霉高粱地上部干重最高, 为 0.15 g, 显著高于接种处理 B 和处理 C 扩繁的菌剂, 并且与对照存在显著性差异。

2.4 根内根孢囊霉最优繁殖体系对不同 AM 真菌产孢量的影响

孢子作为 AM 真菌的主要繁殖体, 因其生命力、侵染率强过菌丝, 并且有利于储运, 是

AM 真菌菌剂的最有效成分^[2,14]。因此, 选用产孢量最高的 D 处理(基质为河砂+蛭石+草炭 1:4:1, 寄主植物为玉米+红三叶草)对其他 4 种不同 AM 真菌进行扩繁, 以验证对其他菌剂的扩繁效果。由表 5 可知, 扩繁后孢子数目较扩繁前增加明显。其中孢子数增加最多的是地衣多样孢囊霉, 扩繁后孢子数目为 1 970 个/g-干土, 较扩繁前增加 35.2 倍; 其次为摩西斗管囊霉, 扩繁后孢子数目为 711 个/g-干土, 较扩繁前增加 6.2 倍; 脆无梗囊霉扩繁后孢子数目为 493 个/g-干土, 较扩繁前增加 4.18 倍; 增加倍数最少的是幼套近明球囊霉, 扩繁后孢子数目为 1 530 个/g-干土, 较扩繁前增加 2.9 倍。

3 讨论与结论

评价 AM 真菌菌剂质量的指标包括侵染根段、菌丝、孢子等^[23]。孢子、侵染根段、菌丝

表 4 高粱幼苗侵染和生长情况

Table 4 Infection and growth of sorghum seedlings

Treatment	Infection rate (%)	Infection intensity (%)	Arbuscular abundance (%)	Vesicle abundance (%)	Above-ground dry weight (g)
Control	0	0	0	0	0.12±0.01c
A	100a	53.39±1.09a	31.17±1.09a	9.29±1.21a	0.14±0.02ab
B	100a	41.24±2.73b	17.83±2.73c	3.38±1.52c	0.13±0.02bc
C	100a	38.21±1.52b	18.43±2.06c	6.07±3.25b	0.09±0.02d
D	100a	41.72±7.14b	24.18±5.61b	9.73±3.49a	0.15±0.02a

表中数据为平均值±标准差(n=12), 同列小写字母不同表示差异显著(P<0.05)

Values are the means±SD (n=12), different letters in the same column show significant difference at P<0.05 level.

表 5 根内根孢囊霉最优繁殖体系对不同 AM 真菌产孢量的影响

Table 5 Effects of the same conditions on the sporulation of different AM fungi

AM strain	Spore density before propagation (spores/g-soil)	Spore density after propagation (spores/g-soil)	Multiple propagation of spores
<i>F. mosseae</i>	114	711±31	6.24±0.27
<i>D. versiformis</i>	56	1 970±106	35.18±8.08
<i>C. etunicatum</i>	524	1 530±185	2.92±0.35
<i>A. delicata</i>	118	493±62	4.18±0.53

表中数据为平均值±标准差(n=4)

Values are the mean±SD (n=4).

均具有侵染能力,其中,孢子更是作为 AM 真菌的主要繁殖体具有较稳定的形态结构,能够在土壤中长期存在^[24],因此,孢子数目是影响 AM 真菌侵染和繁殖的主要因素^[25],也是 AM 真菌菌剂的最有效成分^[26],所以本研究选用产孢量作为优先评价指标。以往也有许多对菌剂扩繁的研究,扩繁后孢子数目从几个到几百个不等。例如,左龙亚等^[27]以菜园土+河砂(1:1)为培养基质,以玉米、高粱和紫云英为供试植物扩繁 AM 真菌,结果表明玉米、高粱对根内根孢囊霉和明根孢囊霉尤其是孢子的生长较为有利,分别为 4 个/g-基质、5 个/g-基质;Wu 等^[28]以白三叶为寄主植物,采用根际土壤接种本土 AM 真菌,繁殖 3 个月后的土壤孢子密度最高为 13 个/g-干土。马继芳^[29]以河沙为培养基质,葱为宿主植物扩繁根内根孢囊霉,孢子数目最高为 170 个/g-基质。而本研究的处理 D (基质为河砂+蛭石+草炭 1:4:1,寄主植物为玉米+红三叶草)扩繁根内根孢囊霉,扩繁后孢子数目最高可达 1 912 个/g-基质,显著高于以往的研究,是目前文献报道的最高孢子数目,而且扩繁后的根内根孢囊霉具有较好的侵染能力,高粱接种该处理扩繁的菌剂后幼苗地上生物量最高,促生效果最好。同时以产孢量最高的 D (基质为河砂+蛭石+草炭 1:4:1,寄主植物为玉米+红三叶草)处理扩繁其他菌剂时,孢子数目大幅度增加,是扩繁前的 2.92–35.18 倍,因此,综合考虑处理 D,即以河砂+蛭石+草炭(1:4:1)为基质、玉米+红三叶草为寄主植物为扩繁菌剂的最佳选择。

基质作为繁殖菌种和培养寄主植物的载体,是繁殖 AM 真菌菌剂的支持物,其类型、通气状况和肥力等直接影响 AM 真菌对寄主植物的侵染和孢子产生^[30]。AM 真菌作为一种好气性真菌,土壤中的孢子和菌丝都需要通气条件才能生长发育^[31]。含水量少、透气性良好的

土壤有利于 AM 真菌菌丝的萌发和生长^[32]。在河砂+蛭石+草炭(1:4:1)的基质中通气孔隙为 3.57%,明显高于其他处理,更有利于 AM 真菌的生长发育,所以其产孢量较高。土壤 pH 和养分含量也影响着菌根的侵染及其繁殖体的数量,在低 pH 的土壤中,AM 根外菌丝体的伸展受到强烈抑制^[33],且抑制效应随 pH 值的降低而增强,一般而言,pH 值在 5.00–7.00 之间有利于 AM 真菌的生长发育^[34]。本试验中 3 种基质 pH 值在 5.61–6.63 之间,因此均满足 AM 真菌生长发育所需的 pH 条件。一般认为,速效磷含量较高的基质不适合 AM 真菌的生长发育^[35],当土壤中有有效磷大于 10 mg/kg 时,AM 真菌侵染率会降低^[36]。本试验所用的基质速效磷含量均较低(<6 mg/kg)且采用减磷(50%)的营养液,因此有利于 AM 真菌对寄主植物的侵染。氮能够抑制 AM 真菌的侵染,但这种抑制作用在磷供应充足的情况下才表现得较为显著;在河砂+蛭石+草炭的基质中虽然氮含量较高,但是由于磷含量较低,因此并未表现出明显的抑制作用^[37]。同时,在一定范围内,有机质会刺激 AM 真菌孢子萌发和菌丝侵染^[38]。通过添加不同水平草炭探究对 AM 真菌侵染的影响,结果表明,在有机碳含量为 41.2 g/kg,即有机质含量为 71.03 g/kg 时孢子数量最高,而河砂+蛭石+草炭(1:4:1)的基质中有机质含量为 56.11 g/kg,最接近于 Ma 等^[39]的最适有机质,更有利于 AM 真菌的初期侵染和孢子定殖。因此对于基质来说,较高的孔隙度、较低的土壤养分、适宜的有机质含量有利于 AM 菌剂的扩繁,而以河砂+蛭石+草炭(1:4:1)为基质能够很好地满足以上条件,这是其扩繁效果最好的一个重要原因。此条件下产孢量高的另一个原因可能是由于玉米和红三叶草根数量相较于其他处理最大,所以其产生的孢子数量也是最大的。该结果也表明寄主植

物的根系发达程度也影响着孢子密度的变化, 从而影响菌剂的扩繁^[40]。这与李媛媛等^[11]研究结果一致, 因而选择具有大量根系的寄主植物是生产优质菌剂的重要原因之一。本研究表明, 培养基质为河砂+蛭石+草炭(体积比为 1:4:1)、寄主植物为玉米+红三叶草的扩繁体系 D 是高效扩繁根内根孢囊霉的最佳繁殖体系, 同时对其他 AM 真菌扩繁效果也相对较好, 也可为摩西斗管囊霉、地表多样孢囊霉、幼套近明球囊霉、脆无梗囊霉等菌剂的高效扩繁提供依据。但其高效扩繁的机理还有待进一步研究。此外, 在以后的研究中, 将会进一步探索不同菌剂标准化、规模化的扩繁方法, 为 AM 真菌在农业生产中的应用提供基础和依据。

REFERENCES

- [1] WANG HX, HAO ZP, ZHANG X, XIE W, CHEN BD. Arbuscular mycorrhizal fungi induced plant resistance against *Fusarium* wilt in jasmonate biosynthesis defective mutant and wild type of tomato[J]. *Journal of Fungi*: Basel, Switzerland, 2022, 8(5): 422.
- [2] SCHUBRET R, WERNER S, CIRKA H, RÖDEL P, TANDRON MOYA Y, MOCK HP, HUTTER I, KUNZE G, HAUSE B. Effects of arbuscular mycorrhization on fruit quality in industrialized tomato production[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(19): 7029.
- [3] 郭开发, 杨宇彤, 陈慧, 刘红彦, 谢丹, 周琦, 金晨钟. 适合 *G. mosseae* 扩繁的最佳培养基质和最适宿主植物[J]. *湖南农业科学*, 2020(1): 51-53.
Guo KF, YANG YT, CHEN H, LIU HY, XIE D, ZHOU Q, JIN CZ. The best medium and host plant for *G.mosseae* propagation[J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2020(1): 51-53 (in Chinese).
- [4] JONGEN M, ALBADRAN B, BEYSCHLAG W, UNGER S. Can arbuscular mycorrhizal fungi mitigate drought stress in annual pasture legumes?[J]. *Plant and Soil*, 2022, 472(1/2): 295-310.
- [5] HANSCH F, JASPAR H, von SIVERS L, BITTERLICH M, FRANKEN P, KÜHN C. Brassinosteroids and sucrose transport in mycorrhizal tomato plants[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2020, 15(2): 1714292.
- [6] BASU S, RABARA RC, NEGI S. AMF: the future prospect for sustainable agriculture[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2018, 102: 36-45.
- [7] 郝志鹏, 谢伟, 陈保冬. 丛枝菌根真菌在农业中的应用: 研究进展与挑战[J]. *科技导报*, 2022, 40(3): 87-98.
HAO ZP, XIE W, CHEN BD. Application of arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture: research progress and challenges[J]. *Science & Technology Review*, 2022, 40(3): 87-98 (in Chinese).
- [8] SELVAKUMAR G, KRISHNAMOORTHY R, KIM K, SA TM. Propagation technique of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from coastal reclamation land[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2016, 74: 39-44.
- [9] FASUSI OA, AMOO AE, BABALOLA OO. Propagation and characterization of viable arbuscular mycorrhizal fungal spores within maize plant (*Zea mays* L.)[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2021, 101(14): 5834-5841.
- [10] IJDO M, CRANENBROUCK S, DECLERCK S. Methods for large-scale production of AM fungi: past, present, and future[J]. *Mycorrhiza*, 2011, 21(1): 1-16.
- [11] 李媛媛, 王晓娟, 豆存艳, 林双双, 罗巧玉, 崔慧君, 孙莉, 金樑. 四种宿主植物及其不同栽培密度对 AM 真菌扩繁的影响[J]. *草业学报*, 2013, 22(5): 128-135.
LI YY, WANG XJ, DOU CY, LIN SS, LUI QY, CUI HJ, SUN L, JIN L. Effects of four host plants and different cultivation densities on the propagation of arbuscular mycorrhizal fungi[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2013, 22(5): 128-135 (in Chinese).
- [12] SCHLEMPER TR, STÜRMER SL. On farm production of arbuscular mycorrhizal fungi inoculum using lignocellulosic agrowastes[J]. *Mycorrhiza*, 2014, 24(8): 571-580.
- [13] SMITH SE, READ DJ. *Mycorrhizal Symbiosis*[M]. New York: Academicpress, 2010: 185-187.
- [14] 王亚军, 安巍, 罗青, 马萍, 石志刚, 赵建华. 丛枝菌根真菌菌剂扩繁及菌根化枸杞育苗技术研究[J]. *北方园艺*, 2014(5): 139-143.
WANG YJ, AN W, LUO Q, MA P, SHI ZG, ZHAO JH. Research on enlargement reproducing of AMF microbial inoculum and growing seedling technology of wolfberry with mycorrhization[J]. *Northern Horticulture*, 2014(5): 139-143 (in Chinese).
- [15] HARIKUMAR VS. A new method of propagation of arbuscular mycorrhizal fungi in field cropped sesame

- (*Sesamum indicum* L.)[J]. Symbiosis, 2017, 73(1): 71-74.
- [16] 周霞, 崔明, 秦永胜, 于萌, 黄建国, 周金星. 扩繁条件对3种丛枝菌根真菌(AMF)的影响[J]. 中国农学通报, 2012, 28(12): 83-87.
ZHOU X, CUI M, QIN YS, YU M, HUANG JG, ZHOU JX. The effects of the propagation condition on the three kinds of arbuscular mycorrhizal fungi[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(12): 83-87 (in Chinese).
- [17] LI YD, NAN ZB, DUAN TY. *Rhizophagus intraradices* promotes alfalfa (*Medicago sativa*) defense against pea aphids (*Acyrtosiphon pisum*) revealed by RNA-Seq analysis[J]. Mycorrhiza, 2019, 29: 623-635.
- [18] MATHIMARAN N, RUH R, VULLIQUOD P, FROSSARD E, JANSÁ J. *Glomus intraradices* dominates arbuscular mycorrhizal communities in a heavy textured agricultural soil[J]. Mycorrhiza, 2005, 16(1): 61-66.
- [19] 王幼珊, 张淑彬, 张美庆. 中国丛枝菌根真菌资源与种质资源[M]. 北京: 中国农业出版社, 2012.
WANG YS, ZHANG SB, ZHANG MQ. Fungi Resources and Germplasm Resources of Arbuscular Mycorrhizal in China[M]. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2012 (in Chinese).
- [20] PHILLIPS JM, HAYMAN DS. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection[J]. Transactions of the British Mycological Society, 1970, 55(1): 158-161.
- [21] 刘润进, 陈应龙. 菌根学[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
LIU RJ, CHEN YL. Mycorrhizology[M]. Beijing: Science Press, 2007 (in Chinese).
- [22] 周浓, 丁博, 冯源, 戚文华, 张华, 郭冬琴, 向军. 接种不同 AM 真菌对滇重楼菌根感染率和入药品质的影响[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(16): 3158-3167.
ZHOU N, DING B, FENG Y, QI WH, ZHANG H, GUO DQ, XIANG J. Effects of mycorrhizal colonization and medicine quality of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* inoculated by different foreign AM fungi specie[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2015, 40(16): 3158-3167 (in Chinese).
- [23] 陈宁, 王幼珊, 蒋家珍, 杨延杰, 林多, 仇宏伟, 张美庆. 培养基质对丛枝菌根(AM)真菌生长发育的影响[J]. 农业工程学报, 2007, 23(9): 205-207.
CHEN N, WANG YS, JIANG JZ, YANG YJ, LIN D, QIU HW, ZHANG MQ. Effects of culture substrates on development of arbuscular mycorrhizal fungi[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2007, 23(9): 205-207 (in Chinese).
- [24] 孙向伟, 王晓娟, 陈牧, 豆存艳, 高飞翔, 金樑. 生态环境因子对 AM 真菌孢子形成与分布的作用机制[J]. 草业学报, 2011, 20(1): 214-221.
SUN XW, WANG XJ, CHEN M, DOU CY, GAO FX, JIN L. Effects of eco-environmental factors on the production and distribution of arbuscular mycorrhizal fungal spores[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2011, 20(1): 214-221 (in Chinese).
- [25] TANAKA S, HASHIMOTO K, KOBAYASHI Y, YANO K, MAEDA T, KAMEOKA H, EZAWA T, SAITO K, AKIYAMA K, KAWAGUCHI M. Asymbiotic mass production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus*[J]. Communications Biology, 2022, 5: 43.
- [26] 毕银丽, 孙欢, 郭楠, 胡晶晶, 龚云丽, 裘浪. 不同基质和菌种组合对丛枝菌根真菌扩繁效果的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2017, 23(4): 616-621.
BI YL, SUN H, GUO N, HU JJ, GONG YL, QIU L. Propagate-effects of different substrates and strain combinations on arbuscular mycorrhizal fungi[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2017, 23(4): 616-621 (in Chinese).
- [27] 左龙亚, 郭冬琴, 周浓, 丁博, 张丹, 王雪, 阮神清. 8 属 22 种 AM 真菌增殖技术的初步研究[J]. 资源开发与市场, 2014, 30(11): 1281-1283.
ZUO LY, GUO DQ, ZHOU N, DING B, ZHANG D, WANG X, RUAN SQ. Preliminary study of propagation technology of twenty-two species of arbuscular mycorrhizal fungi belonging to eight genera[J]. Resource Development & Market, 2014, 30(11): 1281-1283 (in Chinese).
- [28] WU QS, HE JD, SRIVASTAVA AK, ZHANG F, ZOU YN. Development of propagation technique of indigenous amf and their inoculation response in citrus[J]. Indian Journal of Agricultural Sciences, 2019, 89(7): 1190-1194.
- [29] 马继芳. 丛枝菌根(AM)真菌高效繁殖条件及应用的研究[D]. 金华: 浙江师范大学硕士学位论文, 2011.
MA JF. High efficient propagation and application of arbuscular mycorrhiza (AM) fungi[D]. Jinhua: Master's Thesis of Zhejiang Normal University, 2011 (in Chinese).
- [30] 郭娟娟, 李改丽. 扩繁条件对柠条土著 AM 真菌生长发育的影响[J]. 黑龙江农业科学, 2012(12): 44-47.
GUO HJ, LI GL. Effects of propagation condition on growth and development of arbuscular mycorrhizal

- fungi in the rhizosphere of *Caragana korshinskii*[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2012(12): 44-47 (in Chinese).
- [31] DOUDS DD JR, NAGAHASHI G, HEPPELRY PR. Production of inoculum of indigenous AM fungi and options for diluents of compost for on farm production of AM fungi[J]. Bioresource Technology, 2010, 101: 2326-2330.
- [32] RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA S, FREITAS H. Diversity of AMF associated with *Ammophila arenaria* ssp. *arundinacea* in Portuguese sand dunes[J]. Mycorrhiza, 2006, 16(8): 543-552.
- [33] CHAIYASEN A, CHAIYA L, DOUDS DD, LUMYONG S. Influence of host plants and soil diluents on arbuscular mycorrhizal fungus propagation for on-farm inoculum production using leaf litter compost and agrowastes[J]. Biological Agriculture & Horticulture, 2017, 33(1): 52-62.
- [34] 张琳. 三种土壤长期不同施肥措施对丛枝菌根真菌的影响[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2017. ZHANG L. Response of arbuscular mycorrhizal fungi to long-term chemical and organic nutrient inputs in three distinct soils[D]. Nanjing: Master' Thesis of Nanjing Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [35] 陈梅梅, 陈保冬, 王新军, 朱永官, 王幼珊. 不同磷水平土壤接种丛枝菌根真菌对植物生长和养分吸收的影响[J]. 生态学报, 2009, 29(4): 1980-1986. CHEN MM, CHEN BD, WANG XJ, ZHU YG, WANG YS. Influences of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on the growth and ecological stoichiometry of clover and ryegrass grown in monoculture or in mixture at different phosphorus (P) levels[J]. Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(4): 1980-1986 (in Chinese).
- [36] 孙金华, 毕银丽, 裘浪, 江彬. 土壤中丛枝菌根真菌对宿主植物磷吸收作用机制综述[J]. 土壤通报, 2016, 47(2): 499-504. SUN JH, BI YL, QIU L, JIANG B. A review about the effect of AMF on uptaking phosphorus by host plants in soil[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2016, 47(2): 499-504 (in Chinese).
- [37] LIN CY, WANG YX, LIU MH, LI Q, XIAO WF, SONG XZ. Effects of nitrogen deposition and phosphorus addition on arbuscular mycorrhizal fungi of Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*)[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 12260.
- [38] GAMPER H, PETER M, JANSKA J, LÜSCHER A, HARTWIG UA, LEUCHTMANN A. Arbuscular mycorrhizal fungi benefit from 7 years of free air CO₂ enrichment in well-fertilized grass and legume monocultures[J]. Global Change Biology, 2004, 10(2): 189-199.
- [39] MA N, YOKOYAMA K, MARUMOTO T. Promotion of host plant growth and infection of roots with arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margaritaby* the application of peat[J]. Soil Science and Plant Nutrition, 2006, 52(2): 162-167.
- [40] 马俊卿, 侯宁, 孙晨瑜, 杨怡森, 覃圣峰, 王勇, 刘璐, 廖虹霖, 黄京华. 宿主不同对丛枝菌根真菌扩繁效应的影响[J]. 中国农学通报, 2022, 38(1): 7-14. MA JQ, HOU N, SUN CY, YANG YS, QIN SF, WANG Y, LIU L, LIAO HL, HUANG JH. Effects of different hosts on propagation of arbuscular mycorrhizal fungi[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2022, 38(1): 7-14 (in Chinese).