松树 Pt 菌剂育苗菌根化研究*

花晓梅 骆贻颛 刘国龙

摘要 分别用 Pisolithus tinctorius (Pt)菌根真菌重分离与母菌株培养物的比较及菌根子实体鉴定等方法,确证 Pt 菌剂人工接种的成功;并用照片描述形成 Pt 菌根的外部形态和解剖结构;发现典型外生菌根真菌——Pt 在苗圃人工接种条件下,可与松苗形成内外生菌根。结合生产大田应用试验,证明中国林业科学研究院林木菌根研究开发中心研制的 Pt 菌根剂具有明显的菌根化效果,和促进苗木生长、提高生物产量的作用。所试 4 种松树菌根化率均为 100%, Pt 指数在 84 以上,提高合格苗产量 14.6%以上,平均苗高、地径、干物重、侧根数和根系总长分别增加 28.1%~71.4%、22.8%~49.2%、66.7%~457.1%、128.0%~200.0%和 82.4%~101.0%。

关键词 彩色豆马勃、菌根、纯培养菌剂、松树、育苗、造林

松树(*Pinus* spp.)是重要的用材树种。在自然条件下,没有外生菌根,松树就不能成活或正常生长发育^[1,2]。我国用于林业生产的土地多半是土壤贫瘠,水土流失严重的荒山荒地,在这样的土壤中很少或几乎没有菌根真菌的存在。因此,在生产中常常出现松苗变黄、生长不良甚至大量死亡的现象。松苗菌根化是解决这个问题的根本途径。

外生菌根真菌彩色豆马勃($Pisolithus\ tinctorius\ (Pers.)$ Coker & Couch)(简称 Pt)是许多松树的最适菌根真菌^[2],也是促进许多松树速生丰产效果最好的菌种。发达国家,如美国已进行 Pt 菌根菌剂的商品化生产,在美国和加拿大对不同树种在各种立地条件下进行试验和推广应用,取得成效^[3]。中国林科院菌根中心经过 7 a 的研究也已在筛选 Pt 优良菌株的基础上,成功地研制出 Pt 菌剂。本文应用该中心生产的菌剂进行松树育苗菌根化试验,评价其效果,为在我国林业生产中大面积推广应用菌根菌剂提供依据。

1 材料和方法

1.1 供试树种及种子处理

选用火炬松(Pinus taeda L.)、湿地松(Pinus elliottii Engelm.)、晚松(Pinus serotina Michx.)、马尾松(Pinus massonian Lamb.)为试验对象,其种子均由江西省种子公司调拨,按生产常规进行催芽和消毒。

1.2 接种体及接种方法

以 Pt 菌根剂作为试验接种体,由中国林科院菌根中心提供;用芽苗移栽菌根化育苗技术进行人工菌根接种[12]。

¹⁹⁹⁴⁻⁻⁰⁹⁻⁻²⁴ 收稿。

花晓梅副研究员(中国林业科学研究院林业研究所 北京 100091);骆贻颢(江西省林业厅);刘国龙(中国林业科学研究院亚热带林业实验中心)。

^{*}本文为 1989 年国家自然科学基金资助项目和中国国家造林项目菌根科研推广课题的部分内容,江西省枫树山林场 沈根度,刘邦业,蒋彦章,夏锡凤和中国林业科学研究院亚热带林业实验中心张效林,曾平生等同志参加部分育苗试验,特此 致谢。

1.3 土壤条件及处理

试验地为生产育苗圃地,土壤为中厚层红壤,pH5,圃地 3 a 前作:1 a 为水稻,后 2 a 为杉木。土壤处理按生产常规进行。每公顷施硫酸亚铁 112.5 kg 消毒,4.0 m×1.0 m×0.3 m 的 高床。

1.4 试验设计

分树种按"对比田间试验设计"在苗床中间取 1 m² 为试验小区,设对照和施菌处理,10 次重复,随机排列,其间设一行苗床为隔离带,整个试验区共 160 个苗床。

1.5 试验区的管理

作生产性管理,并记录试验过程中施用的杀虫剂、杀菌剂及化肥的种类、数量和次数。

1.6 结果调查

- 1.6.1 调查阶段和取样 接种后每月跟踪调查,在苗木当年生长中期和末期进行阶段调查。翌年春季起苗后、造林前进行终期调查,各试验区分别起苗,进行苗木分级,记载合格苗和等外苗数,再分别从合格苗内随机取30株苗木进行详细调查和测定。
- 1. 6. 2 菌根外部形态和解剖结构调查 在不同阶段取样进行菌根外部形态和颜色调查,以 Бондардев Л. С. "色谱"比色描述;每条侧根上取代表性菌根作徒手切片和石腊切片,观察解剖结构,确证外生菌根的典型结构——菌丝套和哈蒂氏网的形成。
- 1.6.3 子实体调查和鉴定 从接种后两个月开始调查试验区内子实体出现的种类和数量,计算密度(D)。并沿其基部菌丝束或菌索追溯与之相连的菌根共生体,确证苗木菌根与子实体的关系后,对人工接种所形成的子实体进行分类特征调查和测定,进行菌种鉴定[4~7]。

1.6.4 菌根真菌重分离的鉴定

- 1.6.4.1 分离材料 从不同处理小区取 30 个以上具典型菌根的侧根 10 条为分离材料。
- 1. 6. 4. 2 分离方法 采集的分离材料经表面消毒后,切取有代表性的菌根段,分别置于 MMN 斜面上,27. 5 C温度下培养,经纯化,获得菌根真菌重分离物。
- 1.6.4.3 鉴定方法 将重分离物与接种体母菌株的培养物进行比较^[7],计算重分离频度 (F)。
- 1.6.5 苗木 Pt 菌根化的评价 运用"十分法" [8]调查苗木根系 Pt 和其它菌根真菌的菌根化率,按下列公式计算 Pt 指数 [9]。

$$Pt(指数) = a \times (b/c)$$

式中:a——具Pt 菌根苗木的百分率(苗木菌根化率);b——平均Pt 菌根化率,即Pt 菌根占总 吸收根的平均百分数(没有形成Pt 菌根为零);c——平均总菌根化率,即Pt 菌根与其它菌根 之和占吸收根的平均百分率。

1.6.6 生物产量的调查和分析 在苗木生长中、末期和试验终期进行苗木形态学评定,观察苗木外观形态、生长势和针叶颜色,测定苗高、地径、干物重、侧根数和根系总长等苗木质量指标和合格苗产量指标,通过数量统计进行接菌和对照试验区的综合比较和分析。

2 结果与分析

2.1 Pt 菌根形成的确证

2.1.1 Pt 菌根的形成 每月跟踪调查的结果表明,所试 4 种松树用 Pt 菌根剂人工接种的小

区,1个月后,均在苗木根部有效地形成肉眼可见的浅黄至金黄色的菌根,而在对照小区的苗木没有观察到相同的菌根。因此,可以初步肯定,接种小区苗木形成的菌根主要是Pt菌根剂在接种后与苗木吸收根形成的Pt菌根。

2.1.2 菌根子实体的调查和鉴定 试验小区在接菌后 4 个月(8 月中旬),开始形成不规则的 球形、长梨形至棒形的子实体(见图版 I-1)。10~11 月为该子实体出现盛期,最大密度为 34.0 个/m²,平均密度为 13.0~14.9 个/m²,随树种而异;对照小区很少或不产生相同子实体(见表1)。对该子实体进行形态特征调查,测定结果如下:直径 2.5~11.0 cm,高 5~25 cm,形态多变,基部收缩呈柄状(见图版 I-1);由柠檬黄至

树	种	处理	子实体密度	隻(个/m²)	重分离频度(%		
נייד	TT	双垤	Pt	其它	Pt	其它	
火丸	巨松	接种	14.9	0. 0	100.0	0.0	
		对照	0.0	2. 0	0.0	100.0	
湿堆	也松	接种	14.4	0.0	100.0	0.0	
		对照	0.0	3.0	0.0	100.0	
马耳	尾松	接种	14.5	0.0	100.0	0.0	
		对照	1.0	3.0	0.0	100.0	
晚	松	接种	13.0	0.0	100.0	0.0	
		对照	0.0	1.0	0.0	100.0	

2.1.3 菌根重分离的鉴定 接种小区内苗木的典型菌根重分离物,经与母菌株比较后证实为 Pt,出现的频率为 100%(见表 1),而对照产生的白色菌根的重分离物其形态特征和生理特性 均与母菌株不同,为自然感染菌根。本研究发现 Pt 菌根重分离物产生了严重分化(另文报道)。

2.2 Pt 菌根形态特征

- 2.2.1 Pt 菌根的外部形态特征 试验跟踪调查证实,Pt 与所试不同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,颜色由金黄逐渐变为黄棕色至烟草棕色(见图版 $I-2\sim3$)。
- 2.2.2 Pt 菌根解剖结构特征 从菌根横切面(图版 I-4)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 $10\sim80~\mu m$,随菌根的生育期和成熟度而异。菌丝套外表面菌丝膨大,壁薄、较粗,直径为 $2.0\sim4.5~\mu m$;菌丝纵横交错,排列疏松,分隔明显,间隔长度为 $12.5\sim25.0~\mu m$;菌丝套中部菌丝较细,间隔距离较短,菌丝细胞排列似网状;菌丝内层细胞排列更紧密,相互层叠,代替根表皮,紧紧包在吸收根表面。

从该图还可见 Pt 菌根哈蒂氏网是由单层菌丝组成、菌丝直径为 $2.0 \sim 8.5 \, \mu m$,菌丝分隔 平均长度为 $10.3 \, \mu m$,进入皮层细胞 $1 \sim 2$ 层;Pt 菌丝不但形成外生菌根的典型结构——菌丝套和哈蒂氏网,而且进入皮层细胞内形成内外生菌根的结构。 $Zak^{[10]}1976$ 年报道 Pt 在纯培养条件下与熊果[$Arctostaphylos\ uva-ursi\ (L.)$]形成内外生菌根,而在苗圃育苗条件下与松树形成内外生菌根,尚未见报道,本研究观察到 Pt 能与松树形成内外生菌根,还属首次。这充分说明专性外生菌根树种(松树)与典型外生菌根真菌(Pt)在不同的生态条件下,有时可以形成内外生菌根。

2.3 苗木 Pt 菌根化的评价

0.0b

根据上述菌根的形态,检查菌根化的效果,所试松树苗木菌根化率均达 100%,Pt 指数均在 84 以上(见表 2),说明:(1)Pt 是这些松树的最适外生菌根真菌,它们具有密切的共生关系;(2)所试菌剂菌根化效果好,无论苗木菌根化率,还是 Pt 指数均与对照有极显著差异。

树 种	处 理	苗木 Pt 菌根化率 (%)	吸收根总菌根化率 (%)	吸收根 Pt 菌根化率 (%)	Pt 指数
火炬松	接种	100.0 a	69. 0	62.0 a	89.0 a
	对 照	0.0 b	55.0	0.0 b	0.0 b
湿地松	接种	100.0 a	75. 0	66.0 a	88.0 a
	对 照	0.0 b	39.0	0.0 b	0.0 Ь
马尾松	接种	100.0 a	78. 0	66.0 a	84.0 a
	对 照	0.0 b	38.0	0. 0 b	0.0 Ь
晚 松	接种	100.0 a	67.0	60.0 a	89.6 a

表 2 Pt 菌根剂接种于松树的菌根化效果

注:经新复距极差检验,竖行中不同英文字母表示差异极显著(P=0.01),下表同。

2.4 Pt 菌根化对苗木生物产量的影响

应用 Pt 纯培养制剂进行松苗菌根化,对其生物产量的影响较大,表现在提高苗木质量的各个方面,首先从苗木的外观形态来看,接种试验区苗木生长势旺盛,生长健壮、整齐,高粗生长量大,叶色深绿,与未用 Pt 菌剂接种的小区产生鲜明对照。使用 Pt 菌剂接种的菌根化苗木的质量明显优于自然感染菌根的常规苗木(对照)。

从测定结果来看,所试松树 Pt 菌根苗木各项质量指标比对照都有明显的提高,与对照均有极显著的差异(见表 3)。

		苗	高	地	径	干书	勿 重	合格苗	产苗率	侧柱	製数	根系	总长
树 种	处理	<u>X</u> (cm)	增长 (%)	X (mm)	增长 (%)		增长 (%)	X (%)	增长 (%)	- - 	增长 (%)	<u>X</u> (cm)	增长 (%)
	接种	32.8 a	149.8	8.8 a	149.2	19.5 a	557.1	95. 9 a	127. 4	18.0 a	300.0	216.4 a	201.1
	对照	21.9 b	100.0	5.9 b	100.0	3.5 b	100.0	75.3 Ъ	100.0	6.0 b	100.0	107.6 b	100.0
湿地松	接种	28.3 a	128.1	7.0 a	122.8	16.2 a	249.2	95.8 a	114.6	20.0 a	250.0	187.5 a	193.7
	对照	22. 1 b	100.0	5.7 b	100.0	6.5 b	100.0	83. 6 b	100.0	8.0 Ь	100.0	96. 8 b	100.0
马尾松	接种	14.4 a	171.4	5.3 a	132. 5	9.0 a	257.1	95.0 a	179.6	15.0 a	300.0	171.5 a	182. 4
	对照	8.4 b	100.0	4.0 b	100.0	3.5Ъ	100.0	52.9 b	100.0	5.0 b	100.0	94.0 b	100.0
晚 松	接种	24.4 a	141.0	5.8 a	134.9	7.5 a	166.7	98.6 a	117.1	16.0 a	228.6	160.5 a	183.2
	对照	17.3 b	100.0	4.3 b	100.0	4.5 b	100.0	84. 2 b	100.0	7.0 b	100.0	87. 6 b	100.0

表 3 Pt 菌根化对苗木生物产量的影响

综合表 2、3,可以发现苗木生物产量与苗木 Pt 指数有正相关的趋势。而与吸收根总菌根化率关系不大。就火炬松苗木来说,虽然对照的自然感染总菌根化率达 55.0%,但是 Pt 指数为零,因而苗木生物产量较低。应用 Pt 菌剂人工接种,明显地提高了吸收根 Pt 菌根化率,使 Pt 指数增加至 92.0,最明显的表现是:干物重增加,增长率高达 457.1%;苗高、地径、侧根数、根系总长、合格苗产量也相应增加,增长率为 49.8%、49.2%、200.0%、101.1%和 27.4%。其它树种也具有与火炬松相类似的苗木生物产量与苗木 Pt 指数正相关的趋势。这充分证明用 Pt 菌根剂菌根化育苗对苗木的生物产量有很大的促进作用。

此外,在不同的试验区和苗木不同的生长阶段,Pt 荫根化对苗木生物产量的促进作用有

很大差异(见表 4、5)。

表 4 Pt 菌根化对火炬松苗木高生长的影响

(单位:cm)

试验区	4	长中	期	4	b 长末	期	试	验终	期
编号	接种	对照	增长率(%)	接种	对照	増长率(%)	接种	对照	增长率(%
1	7. 3	5. 1	43. 1	25. 7	18.6	38. 2	31.0	20. 1	54.2
I	6.3	5. 1	23. 5	20. 3	18.6	9. 1	28. 7	20. 1	42.8
I	5.9	3.0	96. 7	23. 7	20.9	13.4	33. 1	20. 4	62. 3
N	4.4	3. 5	25. 7	23. 2	20.5	13. 2	32.8	21.3	54. 0
V	4.8	3. 5	37. 1	22. 4	20.5	9. 3	32. 2	20. 9	54.1
VI	7.8	5. 4	44. 4	26. 3	18.8	39. 9	38. 4	24.6	5 6. 1
VI.	5.6	3.4	64. 7	25. 2	18.5	36. 2	35. 2	24. 4	44.3
VI	4.9	3. 4	44.1	20. 1	18.5	8. 6	28. 3	24. 4	16.0
IX	5.5	3. 2	71. 9	23.7	17.9	32. 4	30. 8	21. 3	44. 6
X	7.4	3. 2	131.3	26.5	17.9	48.0	37.8	21. 3	77. 5

产生上述变化最主要的原因是:本次试验是在完全结合生产的条件下进行的,各试验区由不同承包人实施,虽然试验结果总的趋势一致,Pt 菌剂接种均提高了苗木生物产量,但是,提高的幅度不同。此外,由于试验区管理是按生产常规进行的,施用了过多的化肥、农药(见表 6),从表中可见 4 次施用尿素、3 次喷洒杀菌剂、3 次喷洒杀虫剂,对菌根的形成和发育产生一定干扰,杀虫剂和杀菌剂可直接杀死菌根真菌,而化肥,特别是大量氮肥对菌根生长发育不利[11.12],往往使形成的菌根萎缩,变为非菌根。

表 5 Pt 菌根化对火炬松苗木粗生长的影响

(单位:mm)

试图	7 I∆.		生长末	期	试验终期				
编	号 接种		对照	增长率 (%)	接种	对照	增长率 (%)		
J		6. 7	5.5	21.8	7.7	6.4	20. 3		
1		6.1	4.5	35.6 7.7		5.4	42.6		
I		7.0	4.3	62.8	9.4	4.9	91.8		
IV		7.0	5.9	18.6	9. 2	6.6	39. 4		
V		6. 9	5.9	16.9	7.8	6. 2	25.8		
VI		6. 7	4.7	42.6	8.8 6.5		35.4		
VI		7. 0	5.7	22.8	10.0	6.0	66.7		
VII		7. 1	5.7	24.6	24.6 10.1		68. 3		
IX		6.5	5.2	25.0	9. 1	6. 2	46.8		
X		6.5	5.2	25.0	9.3	6.2	50.0		

表 6 试验过程中施用的化肥和农药

	施	肥		杀	菌	剂			杀	虫 剂	
种类	时间 ^① (d)	用 量 (kg/hm²)	种类	时间 ^① (d)	浓	度	用 量 (kg/hm²)	种类	时间 ^① (d)	浓度 (倍)	用量 (kg/hm²)
尿素	39	22. 5	波尔多液	12	0.5:1:	100	37. 5	乐 果	48	2	37.5
	45	30.0		33	1:1:	100	37. 5	敌敌畏	69	1	37.5
	75	37.5		57	1:1:	100	37. 5		84	1	37.5
	96	45.0									

①施用时间用接种后的天数表示。

3 结论和讨论

(1)本文应用中国林业科学研究院林木菌根研究开发中心研制的菌根生物制剂,在完全结合生产的条件下,进行菌剂应用试验。通过菌根形态学,菌根与子实体的联系及其重分离的研究,证实 Pt 菌根剂接种的成功,表明了这种菌根制剂在松树育苗中使用的可行性。

- (2)通过苗木 Pt 菌根化效果的评价和对苗木生物产量影响的研究,证明所试 Pt 菌根剂的菌根化效果好,对松树苗木生物产量有明显的促进作用,苗木菌根化率均达 100%,菌根指数在 84.0%以上;与对照苗木相比,高生长、粗生长、干物重、L 级侧根数和根系总长分别提高了 $28.1\% \sim 71.4\%$ 、 $22.8\% \sim 49.2\%$ 、 $66.7\% \sim 457.1\%$ 、 $128.0\% \sim 200.0\%$ 和 $82.4\% \sim 101.1\%$ 。因此,该菌剂可为林业生产松苗菌根化、培育壮苗,提供稳定、可靠的接种体。
- (3)国内外许多报道指出化肥和农药对菌根真菌有杀伤和抑制作用,本试验虽受化肥和农药的影响,但仍然取得较好的菌根化和增产效果,证明 Pt 不失为优良菌根真菌和高效菌剂。
- (4)Pt 菌根剂是菌根真菌活体制剂,易受人为措施影响。仅就本试验中火炬松为例,由于按生产常规育苗施用大量化肥、农药造成菌根化效果不稳定,加大了苗木生长的变化幅度,高生长增长范围为 9.6%~131.3%(见表 4),粗生长为 16.9%~91.8%(见表 5);即使在同一块地、同一个生长期,由于操作人员技术水平的差异,Pt 菌根剂的使用效果也有差异,高生长增长率可相差 107.8%(见表 4)。由此可见,在常规育苗的基础上研究菌根化育苗技术和严格按技术操作实施是取得 Pt 菌根剂理想使用效果的关键。建议在今后 Pt 菌根剂的应用中,要加强这两方面的工作,特别是技术培训,以取得更大的经济效益和生态效益。
- (5)通常认为 Pt 是典型的外生菌根真菌,但在本研究中,首次发现在苗圃中能与过去一贯认为的专性外生菌根树种——松树形成内外生菌根,因此,提出以下假说:"典型的外生菌根真菌有时能与不同寄主或在生态条件改变的情况下,有可能形成内生或内外生菌根",该假说尚需进一步研究证实。

参考文献

- 1 Meyer F H. Distribution of ectomycorrhizae in native and man-made forests. In: Eds. Marks G C, Kozloski T. Ectomycorrhizae—Their Ecology and Physioloy. New York: Academic Press, 1973. 79~105.
- 2 花晓梅. 林木菌根化栽培技术. 北京:中国科学技术出版社,1993.1~123.
- 3 Marx D H, Cordell C E. The use of specific ectomycorrhizas to improve artificial forestation practices. In: The Biotechnology of fungi for improving plant growth. Proc Symp, Sussex Univ, Littlehampton, England, British Mycol Soc. 1988, 1~29.
- 4 邓叔群. 中国的真菌. 北京:科学出版社,1963. 682~684.
- Orson K, Miller Jr. Mushrooms of North America. New York: E. P. Dutton, 1981. 311.
- 6 Lampky J R. Peterson J E. Pisolithus tinctorius associated with pines in Missouri, Mycologia, 1963, 55; 675 ~ 678.
- 7 Lam D J, Richards B N. Some mycorrhizal fungi of Pinus radiata and P. elliottii var. elliottii in Australia. Tran Br. Mycol Soc. ,1970. 54:371~378.
- 8 Robert Anderson, Elwin Stewart, Sager Krupa. A technique to quantify ectomycorrhizae on forest tree, Proceeding of the third North American Conference on Mycorrhizae, 1977.
- 9 Hua Xiaomei, Cordell C E, Stambaugh W J. Synthesis of *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae and growth responses on some commercially important Chinese tree species, For. Eco. Man., 1991, 42:283~292.
- 10 Zak B. Pure culture synthesis of bearberry mycorrhizae, Can. J. Bot., 1976, 54; 1297~1305.
- 11 Reid C P P. Hacskaylo E. Evaluation of plant response to inoculation. In: Ed. Schenck N C. Methods and Principles of Mycorrhizal Research. The American Phytopathological Society, 1984. 175~187.
- 12 Bowen G D. Mineral nutrition of ectomycorrhizae. In: Eds. Marks G C, Kozlonski T. Ectomycorrhizae Their Ecology and Physiology. New York: Academic Press, 1973. 151~197.

A Study on Mycorrhization of Pines with Vegetative Inoculum of *Pisolithus tinctorius* in Nursery

Hua Xiaomei Lou Yizhuan Liu Guolong

Abstract The success of the artificial inoculation of pines with the vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* (*Pt*) is confirmed by means of making a comparison of cultures between reisolates from ectomycorrhizae formed and mother isolate inoculated, and an identification of sporocarps connected with the ectomycorrhizae; the gross form and anatomy structure of the ectomycorrhizae formed after inoculation are described by using the photos from the experiment. It is discovered that the typical ectomycorrhizae fungus, *Pt* can form ectendomycorrhizae with pines under the condition of artificial inoculation in nursery.

The application experiments conducted in nurseries give evidence that inoculum made by the Center for Mycorrhizal Research and Development, CAF is effective in increasing ectomy-corrhizae, promoting the growth and improving the biomass of the seedlings, 100% seedlings of four pines receiving vegetative Pt inoculum have got Pt ectomycorrhizae with Pt index 88 +, the yield of plantable seedlings increased by more than 14.6%, and height, root-collar diameter, biomass, the number and the total length of the lateral root for the ten-month-old seedlings increased, on the average, by $28.1\% \sim 71.4\%$, $22.8\% \sim 49.2\%$, $149.2\% \sim 457$. 1%, $150.0\% \sim 200.0\%$ and $82.4\% \sim 101.1\%$ respectively.

Key words Pisolithus tinctorius, mycorrhizae, vegetative inoculum, pines, seedling culture, afforestation

Hua Xiaomei, Associate Professor (The Research Institute of Forestry, CAF Beijing 100091); Lou Yizhuan (Forestry Bureau of Jiangxi Province); Liu Guolong (The Experimental Center of Subtropical Forestry, CAF).

