

# 土壤中 VA 菌根孢子数检测法

程桂芬

(中国农科院土壤肥料研究所,北京)

孢囊丛枝内生菌根(VAM)生态学调查方法主要有三种:1.感染率测定;2.土壤中孢子数检测;3.生化法:将真菌几丁质水解成氨基葡萄糖,再进行比色测定<sup>[1]</sup>。方法1最为方便、省时,使用得较多;但感染率检查离不开植物,无法应用于休闲土壤或播种前后的生态学调查;方法2对土壤中VA菌根的生态学调查及分类有特殊意义,可应用于休闲土壤的调查,但比较费时;方法3因过程复杂,目前仍未推广。

土壤中VAM孢子数检测,是直接测定土壤中的孢子数,有无植被情况下都可进行,可以作为土壤生态学调查的一种手段:如调查其生态学分布及分类学等。其存在问题主要是有的种如 *Acaulospora trappei* 产生孢子太小,不易检出,也有少数种不形成孢子。

孢子的筛选方法很多,有湿筛倾倒法<sup>[2]</sup>、漂浮小管法、浓度梯度离心、蔗糖离心、土壤稀释<sup>[3]</sup>、平板法等。其中以湿筛法为最常用、简单易行并不需特殊装置。在冲洗、倾倒过程中注意认真操作可使孢子回收率达90%,故可以用作孢子的定量检查,下面介绍这一方法。

## 材料与方 法

- 1.称取20g新鲜土壤于500ml烧杯中,加200ml自来水浸泡。
- 2.在磁力搅拌器上慢速搅拌10分钟。
- 3.倒入一套150,100,70,60 $\mu\text{m}$ 孔径的土壤筛中冲洗,开始时水流要慢,以防筛孔被淤泥堵住而水从筛面上溢出,待冲净淤泥,水流通畅

时加大水力,以冲净孢子,整个过程均应防止样品冲出筛外。

4.检查冲下的水确实不带泥沙时,将各层筛子中的样品用少量水,分别洗入烧杯内,每烧杯加水至100ml。

5.分别倒入100ml量筒内,盖塞后上下颠倒两次,静置3分钟,倾上清液于分液漏斗,再用原烧杯向原量筒加水100ml,如此共三次,上清液均合并入同一分液漏斗,弃去量筒底之砂子。

6.将分液漏斗盖上塞子,颠倒两次静置10分钟后开始从下口放水,流速控制在出口处水流速度成滴而不成线,这时孢子大部份附着在玻壁上,大部份细砂能随水流走,在水量只剩20ml左右时,关住下口,从上口倒出样品于烧杯内,再用少许水洗涤分液漏斗的壁,合并入烧杯,如此洗三次。

7.取直径12cm的快速滤纸,用铅笔划间隔为3mm的直线,然后放在大小合适的古氏漏斗中抽气过滤,烧杯用水洗两次,洗液倾入漏斗过滤。若发现有样品(水中固体物)从滤纸四周逸漏,则需将抽滤瓶中水倒出,过滤在同一张滤纸上。

8.孢子这时附着在滤纸上,混同着植物碎片和部份砂子。

9.将滤纸放在大培养皿中,以保持湿度。观察时,去掉上皿,将下皿连同滤纸于体视显微镜

本文为作者1981—1983年在瑞士联邦农业研究所进修时,在Dr. H. Schuepp指导下所学习的研究方法之一。

下观察。如果冲洗得当,细泥可全部冲洗掉,留下砂粒很少,视野中以植物根的碎片为主并混以孢子,孢子干净发亮,多数 VAM 孢子是球状的,紫的象葡萄,黄的和白的犹如鱼肝油丸,也有的种类孢子表面粗糙,或有小突起,可按滤纸上铅笔画线为记号,逐行计数,得出每张滤纸所载孢子数。每一份土壤样品应重复三次检查。

为方便起见,人们往往只收集计数  $100\mu$  至  $150\mu$  的大孢子,根据实验需要可检查  $70-100\mu\text{m}$  或更小的孢子。

应该注意的是,在显微镜下数孢子时,滤纸会因反光镜的温度而变干引起变形,影响焦距而不易看清,此时可用喷雾器轻轻喷雾使滤纸湿润(不要用力喷,以防吹走孢子)。

## 结果与讨论

1. 不同质地的土壤对 VAM 孢子形成的影响: 在相同条件下,VAM 孢子形成于沙土多于壤土,壤土又多于粘土(表 1)。

2. 土壤水份对 VAM 形成孢子的影响: 对一片已有 17 年历史的燕麦草和三叶草混长的牧草地进行调查,水浇区(含水量  $20.1\%$ —

$25.4\%$ )的 VAM 孢子数少于非水浇区(含水量  $13.8\%—19.1\%$ ),说明 VAM 在含水量较低的土壤中形成更多孢子(表 2)。

3. 土壤中 VAM 孢子数在越冬前后的变化: 越冬后土壤中 VAM 孢子明显减少(表 3)。不少学者报导过: VAM 孢子能被天敌,如线虫等所吞食<sup>[4]</sup>。

4. 土壤消毒对 VAM 孢子存活的影响: 小区试验,(1)用  $121^\circ\text{C}$  蒸汽进行土壤蒸汽灭菌,使土壤  $0-20\text{cm}$  处表土在  $80^\circ\text{C}$  以上维持 20 分钟;(2)用杀菌剂克菌丹拌入  $0-20\text{cm}$  土层,用量为  $10\text{g}/\text{m}^2$ ;(3)用杀菌剂五氯硝基苯拌入  $0-20\text{cm}$  土层,用量为  $60\text{g}/\text{m}^2$ ;(4)对照土壤不灭菌。处理后 10 天,用湿筛倾倒法各处理均能查出孢子,用土壤稀释法检查结果是,蒸汽灭菌和五氯硝基苯处理区无孢子。用克菌丹处理区尚存部份孢子,但仅为对照土壤的十分之一(表 4)。

原因是,湿筛倾倒法所观察到的孢子包括死孢子和活孢子,而土壤稀释法检出的只是活孢子。

从上述各表可以看出: 孢子数的检测既可

表 1 不同质地土壤对 VAM 孢子形成的影响

孢子直径 ( $\mu\text{m}$ )	土壤类型		壤 土		粘 土	
	孢子数(个)/ 100g 干土		$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
100—150	103.3	4.3	40.5	2.7	4.8	0.1
70—100	884.0	13.7	129.5	8.1	53.3	0.9
60—70	1233.2	18.1	201.8	22.2	13.5	1.2

为盆栽试验,每盆装土  $3\text{kg}$ ,经高压灭菌后,接种 *Clomus mosseae* 孢子 100 个/盆,播三叶草(*Trifolium alexandrinum*),收割后测孢子数。 $\bar{x}$  为平均值, $\sigma$  为标准差(三盆重复)。

表 2 水浇区与非水浇区 VAM 形成孢子数的差别

孢子直径 ( $\mu\text{m}$ )	处 理		水 浇 区	
	孢子数(个)/ 100g 干土		$\bar{x}$	$\sigma$
100—150	234.1	10.5	50.3	3.3
70—100	1007.6	18.4	214.4	4.6

表3 越冬前后土壤中 VAM 孢子数的变化

孢子直径 ( $\mu\text{m}$ )	处 理		越 冬 前		越 冬 后	
	孢子数(个)/ 100g 干土		$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
100—150			205.0	7.1	34.7	2.8
70—100			552.2	13.5	112.9	4.0

前茬为法国菜豆 (*Phaseolus vulgaris*)。

表4 不同土壤消毒法对 VAM 孢子存活的影响\*

孢子性质	处 理		蒸 汽 灭 菌		克 菌 丹		五 氯 硝 基 苯		不 灭 菌 对 照	
	孢子数(个)/ 100g 干土		$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
100—150( $\mu\text{m}$ ) a			213.2	11.8	355.1	2.5	327.5	5.7	383.4	4.2
活孢子 b			0	0	53.5	1.2	0	0	651.3	10.8

a. 为湿筛倾倒法所检结果；b. 为稀释法所检结果

\* 土壤稀释法：用蒸汽灭菌土壤作稀释剂，按 10 倍的序列稀释法与欲测土样混合，播种寄主植物，根据有无感染，从最大或然数表查出孢子数。

用于土壤生态的横向研究：比较同一时期不同性质及不同含水量土壤中的孢子数（表 1 和表 2）。也可用于土壤生态的纵向研究：比较了越冬前后和土壤消毒前后不同期孢子数的变化（表 3 和表 4）。

此外，还可用于 VAM 分类学的调查研究，这要根据孢子的形态特征来分类，很费时间，有时还需借助于电子显微镜。目前，用于常规的

调查，一般还仅检查孢子数量。

## 参 考 文 献

- [1] Hepper, C. M.: *Soil Biol Biochem.* 9: 15—18, 1976.
- [2] Gerdemann, J. W.: *Mycologia*, 47: 691—632, 1955.
- [3] Porter, W. M.: *Aust. J. Soil Res.*, 17: 515—519, 1979.
- [4] Jenkins, W. R.: *Plant Dis. Rep.*, 48: 692. 1964.