

木霉菌对杨树生长量及土壤水解氮含量的影响

巩赫欣,王 慧,杨 睿,李 敏,郭宇萌,商双骄,张荣沐

(东北林业大学 园林学院,黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:为了促进木霉免疫诱导剂类生物肥料及土壤改良剂在木本植物生长中的应用,采用盆栽试验方法,以 T1(5×10^2 cfu·cm⁻³)、T2(5×10^3 cfu·cm⁻³)和 T3(5×10^4 cfu·cm⁻³)3 个水平的木霉分生孢子诱导杨树苗 60 d,研究根施棘孢木霉 ACCC30536 分生孢子悬液后山新杨的生长量及土壤中水解氮含量变化规律。结果表明: T2 水平诱导的效果最佳,杨树苗在 15 d 内的株高和茎基生长量的最大值分别为 7.01 cm 和 0.15 cm,是对照 CON4(不施木霉)的 5.12 和 2.14 倍;单株杨树苗根的平均干重为 7.38 g,较 CON4 增加 50.92%;单株杨树苗茎的平均干重为 4.24 g,较 CON4、T1 和 T3 分别增加了 16.48%、49.82%和 7.34%。同时,以 T2 水平木霉诱导杨树苗 30 d,种植杨树苗的盆土中水解氮含量较 CON(不施用木霉且不栽培杨树苗的盆土)、CON2(施用 T2 水平的木霉但不栽培杨树苗的盆土)及 CON4 分别提高 16.81%、9.5%和 20.26%。说明棘孢木霉具有极显著促进杨树苗生长和改善土壤中水解氮含量的作用,最佳诱导量为 5×10^3 cfu·cm⁻³。

关键词:棘孢木霉;山新杨;生长量;水解氮含量

中图分类号:S792.11

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2014)02-0045-05

随着可持续、无公害农业的发展,为了维持土壤生态平衡、减少农药和化肥的使用量,生防因子和生物肥^[1-2]的利用逐步受到重视。木霉(*Trichoderma* sp.)是良好的生态型生防因子,在改善土壤生态环境方面具有提高肥料利用率、改善土壤结构、对生态环境进行生物修复的作用^[3-5]。研究发现,棘孢木霉(*T. asperellum*)可以促进植物种子萌发、植株的生长和开花、提高作物产量^[6],然而,以往有关木霉菌促进植物生长的相关研究多以草本植物为材料,对木本植物的作用及其机制研究很少。而木本植物与草本植物在生理、形态结构及生长发育等诸多方面有着明显的区别。

山新杨(*Populus davidiana* × *P. bolleana*, Shanxinyang)是目前我国北方窄冠杨树中最耐寒、最美观的园林绿化和防护用材首选树种^[7],也是研究木霉菌促进木本植物生长作用的理想物种之一,棘孢木霉 ACCC30536 促进杨树生长的研究尚未见报道。研究发现,土壤中氮素是植物营养三要素之一,植物氮素营养,主要是依靠土壤中的矿质态氮和水解性态氮。土壤水解氮通常用作施肥指标,也

是评价土壤自然肥力的重要指标之一^[8]。该研究以棘孢木霉分生孢子悬液诱导一年生山新杨组培移栽苗,分析木霉菌对杨树苗生长及土壤中水解氮含量的影响,将为棘孢木霉免疫诱导剂类生物肥料及土壤改良剂在促进木本植物生长中的应用提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为一年生山新杨组培移栽苗。供试棘孢木霉 ACCC30536 (*T. asperellum* ACCC30536)菌株由东北林业大学林学院森保学科提供。供试土壤来源于哈尔滨市郊的农田地表土。

1.2 方法

1.2.1 试验设计 试验在东北林业大学园林学院花卉研究所苗圃进行。采用东北林业大学林学院森保学科建立的山新杨组培体系,继代培养基以 WPM 为基础培养基,加 6-BA 0.5 mg·L⁻¹、NAA 0.1 mg·L⁻¹;生根培养基以 WPM 为基础培养基,加 IBA 0.4 mg·L⁻¹。山新杨的驯化移栽采用刘志华等^[9]的专利方法。2012 年 6 月 10 日将山新杨组培苗移入营养钵(高 21 cm、直径 21 cm)自然条件下盆栽(平均每盆盛土量为 6 dm³),同时将所设置的对照试验的盆土装好,与种植杨树苗的盆钵同样管理。采用 PDA(Potato Dextrose Agar)固体培养基,将棘孢木霉分生孢子在无菌条件下接种到培养皿中,在 25℃ 条件下培养 10 d 获得大量分生孢子。将分生孢子悬液梯度稀释后,在显微镜下计数,用自来水配制成 3 个浓度梯度的木霉分生孢子悬液,

收稿日期:2013-09-27

基金项目:东北林业大学本科生创新训练资助项目(201210225099);黑龙江省自然科学基金资助项目(C201216);国家自然科学基金资助项目(31170601)

第一作者简介:巩赫欣(1991-),女,辽宁省阜新市人,在读学士,从事园林植物种质资源研究。E-mail: 1522116877@qq.com。

通讯作者:张荣沐(1965-),女,博士,硕士生导师,从事园林植物种质资源及病害生物防治研究。E-mail: zrs6504@sina.com。

T1 为 5×10^2 cfu·cm⁻³、T2 为 5×10^3 cfu·cm⁻³ 和 T3 为 5×10^4 cfu·cm⁻³ 用来诱导杨树苗。7 月 10 日开始用棘孢木霉分生孢子悬液进行诱导处理,以不施用木霉菌且不栽培杨树苗的盆土(CON)、施用 T1 水平木霉分生孢子但不栽培杨树苗的盆土(CON1)、施用 T2 水平木霉分生孢子但不栽培杨树苗的盆土(CON2)、施用 T3 水平木霉分生孢子但不栽培杨树苗的盆土(CON3)、栽培杨树苗但不施用木霉菌的盆土(CON4)为对照,采用 T1、T2、T3 共 3 个水平的木霉分生孢子根施杨树苗,每处理为 10 株杨树苗,设 3 个重复。

1.2.2 土壤样品采集 分别于诱导后 8、15、30、45 和 60 d 采集土壤样品,取 5 cm 深处的土,每盆取 100 g 左右,每处理 10 盆,3 次重复;风干后用于检测土壤水解氮含量。

1.2.3 山新杨生长量测量及生物量测定 7 月 10 日起,每隔 15 d 测量一次山新杨移栽苗株高和茎基周长的生长变化;于处理 60 d 后测定不同处理山新杨根、茎和叶等组织部位的生物量干重。分析木霉菌诱导对杨树苗的生长及生物产量的影响。

1.2.4 土壤中水解氮含量测定方法 采用碱解-扩散法^[10]测定不同水平木霉分生孢子诱导的栽培山新杨移栽苗的土壤(T1、T2 和 T3 水平)及 CON、CON1、CON2、CON3 和 CON4 对照的土壤样品中的水解氮含量。

1.2.5 数据分析 利用 Microsoft Office Excel 2007 和 SPSS18.0 软件对数据进行分析并绘制图表。对不同处理间的差异显著性进行 ANOVA 分析,在 $P=0.05$ 及 $P=0.01$ 水平下比较差异性,并对杨树苗生长量与土壤水解氮含量动态变化进行

Pearson 相关性分析。

2 结果与分析

2.1 不同水平棘孢木霉分生孢子对山新杨组培移栽苗生长量的影响

由图 1(A)可见,7 月 10 日采用不同水平棘孢木霉分生孢子诱导山新杨移栽苗后,杨树苗株高迅速增长,进入 8 月份以后生长速度逐渐减慢。木霉菌诱导杨树苗 30 d 后(8 月 10 日),T2 和 T3 处理的杨树苗株高生长明显加快,分别达到 53.8 和 48.68 cm,较对照 CON4 的生长量分别增加 1.32 和 1.36 倍($P<0.01$);而诱导 45 d 以后(8 月 25 日),T2 处理的杨树苗株高为 60.41 cm,15 d 内的生长量达 6.61 cm,分别大于对照 CON4 和 T1、T3 处理杨树苗 4.59、5.26 和 5.44 cm,与对照 CON4、T1 及 T3 相比均具有极显著差异;60 d(9 月 10 日)时 T2 处理的杨树苗株高生长量达 7.01 cm,较对照 CON4 (1.37 cm)、T1(3.00 cm)和 T3(3.64 cm)分别提高 4.12、1.34 和 0.93 倍($P<0.01$)。

7 月 10 日采用不同水平棘孢木霉分生孢子诱导山新杨移栽苗后,杨树苗茎基逐渐增粗;进入 8 月份以后,茎基增粗的速度逐渐减慢(见图 1B)。木霉菌诱导杨树苗 30 d(8 月 10 日)时,对照及各处理杨树苗茎基增粗的速度相近,然而,8 月 25 日测量的结果表明,T2 处理杨树苗的平均茎基周长为 2.47 cm,比对照 CON4 和 T3 处理的杨树苗茎基周长增粗 1.21 倍、比 T1 处理的杨树苗增粗 1.15 倍;诱导 60 d(9 月 10 日)时 T2 处理的杨树苗平均茎基增粗量为 0.15 cm,较对照 CON4(0.07 cm)、T1(0.12 cm)和 T3(0.09 cm)处理的杨树苗分别提高 2.14、1.25 和 1.67 倍(见图 1B)。

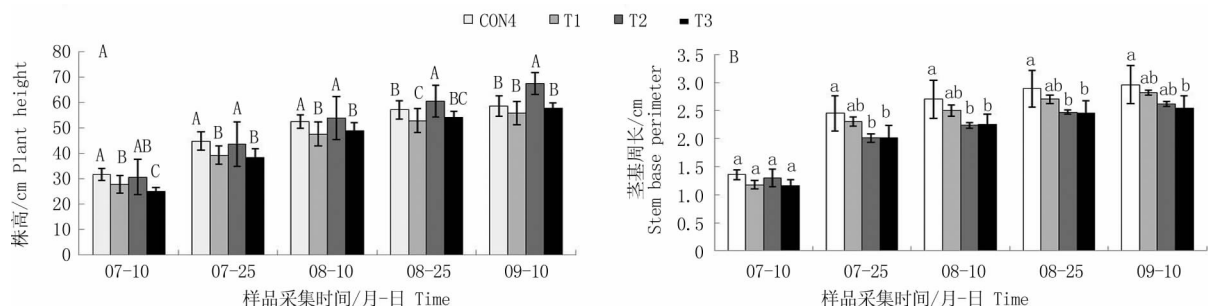


图 1 不同水平棘孢木霉分生孢子诱导后山新杨移栽苗株高(A)和茎基(B)的生长动态

不同大小写字母分别表示在 0.01、0.05 水平下差异显著。下同。

Fig. 1 The growth dynamic of plant height(A)and stem base perimeter(B)of transplanted Shanxinyang seedlings after different inductions
Different capital letters and lowercases mean significant difference at 0.01 and 0.05 level respectively. The same below.

2.2 不同水平棘孢木霉分生孢子对山新杨组培移栽苗生物量的影响

以不同水平棘孢木霉分生孢子诱导山新杨移栽苗 60 d 后,分别采集杨树根、茎、叶等不同组织测定其生物量,采用 Cornelissen 等^[11]的方法进行干燥后,称量获得杨树苗根、茎、叶等不同组织的干重。由图 2 可知,T2 处理的单株杨树苗根的平均干重为 7.38 g,较对照 CON4 增加 50.92%,而 CON4 及 T1、T3 处理的单株杨树苗根的平均干重相近。T2 处理的单株杨树苗茎的平均干重为 4.24 g,较 CON4 及 T1、T3 处理分别增加了 16.48%、49.82%和 7.34%;单株杨树苗叶片的平均干重相近,可能是由于 2012 年夏季遭遇到冰雹天气(6 月 20 日),个别树叶被打烂、脱落,或被虫咬所致。

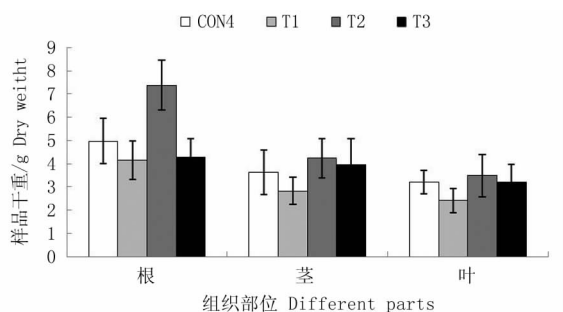


图 2 山新杨移栽苗不同组织部位生物量干重

Fig. 2 Dry weight of different parts of transplanted Shanxinyang seedlings

2.3 不同水平棘孢木霉分生孢子对土壤水解氮含量的影响

由图 3 可知,木霉分生孢子悬液诱导杨树苗后,水解氮含量的变化总体上表现为先升高再降低的变化趋势,诱导 30 d 时,T2 处理栽培山新杨组培苗的土壤中水解氮的含量与对照(CON、CON2、CON4)相比存在极显著差异。种植杨树苗 T2 处理的盆土中水解氮含量最高,为 153.3 mg·kg⁻¹,较对照 CON、CON2、CON4 分别提高 16.81%、9.5%和 20.26%($P < 0.01$),说明适当浓度的木霉分生孢子与植物互作,能极显著($P < 0.01$)影响土壤中水解氮的含量。然而,在对栽培杨树苗的盆土和没有栽培杨树苗的空盆土同时进行处理时,空盆土中水解氮含量却显示出不一样的变化规律。在诱导 30 d 时,CON3(T3 处理的空盆土样)中水解氮含量为 152.34 mg·kg⁻¹,较对照 CON、CON1(T1 处理的空盆土样)、CON2(T2 处理的空盆土样)分别提高 16.08%、18.98%和 8.81%($P < 0.01$),表现为随着施入木霉分生孢子量的增加,水解氮含量极显著增加。在诱导 45 d 时 CON3 中仍检测到很高的水解氮含量(154.44 mg·kg⁻¹),较高水解氮含量的维持时间长于栽培杨树苗盆土中的水解氮含量。这可能是由于植物生长需要吸收土壤中的氮素,与木霉菌互作后会影响到土壤中水解氮的含量,所以栽培杨树的盆土中水解氮含量的下降速度高于空盆土中的水解氮含量。

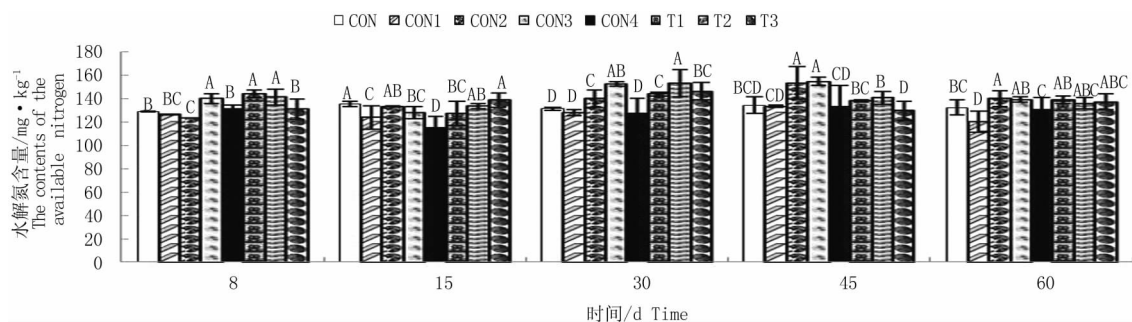


图 3 不同水平木霉分生孢子诱导后不同取样时间土壤中水解氮含量

Fig. 3 Available nitrogen contents of pot soil with different inducing treatments at different time

2.4 土壤中水解氮含量与山新杨移栽苗生长量相关性分析

为了分析山新杨移栽苗株高和茎基生长量与土壤中水解氮含量变化的相关性,将土壤水解氮含量与杨树苗株高和茎基的变化进行 Pearson 相关性分析。结果表明,以不同水平的木霉分生孢子诱

导杨树苗后,杨树苗的株高变化与茎基周长的变化呈极显著正相关(见表 1, $R_{CON4} = 0.980$; $R_{T1} = 0.959$; $R_{T2} = 0.981$; $R_{T3} = 0.977$, $P < 0.01$)。然而,栽培杨树苗盆钵中土壤的水解氮含量与杨树苗株高变化相关性却表现为:与 CON4 和 T1 处理呈负相关,与 T2、T3 处理呈正相关,且相关系数很

小(见表 1, $R_{\text{CON4}} = -0.217$; $R_{\text{T1}} = -0.065$; $R_{\text{T2}} = 0.001$; $R_{\text{T3}} = 0.225$), 且不显著($P > 0.05$); 同样, 栽培杨树苗盆钵中土壤的水解氮含量与杨树苗茎基周长变化相关性也表现为: 与 CON4、T1 和 T2 处

理呈负相关, 与 T3 处理呈正相关, 且相关系数很小(见表 1, $R_{\text{CON4}} = -0.019$; $R_{\text{T1}} = -0.294$; $R_{\text{T2}} = -0.031$; $R_{\text{T3}} = 0.305$), 不显著($P > 0.05$)。

表 1 山新杨移栽苗株高生长量、茎基生长量及土壤中水解氮含量的相关性

Table 1 The correlations between plant height, stem base perimeter and available nitrogen content in soil

项目 Items	H _{CON4}	P _{CON4}	H _{T1}	P _{T1}	H _{T2}	P _{T2}	H _{T3}	P _{T3}
N _{CON4}	-0.217	-0.019						
N _{T1}			-0.065	-0.294				
N _{T2}					0.001	-0.031		
N _{T3}							0.225	0.305
H _{CON4}		0.980 **						
H _{T1}				0.959 **				
H _{T2}						0.981 **		
H _{T3}								0.977 **

注: ** 代表在 0.01 水平上显著相关。N 代表水解氮含量; H 代表株高; P 代表茎基周长。

Note: ** mean significant difference at 0.01 level. N means available nitrogen content in soil; H means plant height; P means stem base perimeter.

3 结论与讨论

采用不同水平棘孢木霉分生孢子诱导山新杨组培移栽苗, 其株高、茎基生长量以及不同组织部位生物量产量的变化表明, 棘孢木霉菌具有显著促进杨树生长的作用, 且木霉菌不同的分生孢子量对作物生长的影响不同, 以 $5 \times 10^3 \text{ cfu} \cdot \text{cm}^{-3}$ 的棘孢木霉分生孢子为最佳诱导剂量。

研究认为, 木霉菌具有促进植物根部生长的作用。Contreras-Cornejo 等^[12]将绿色木霉(*T. virens*)和深绿木霉(*T. atroviride*)与萌发 4 d 的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)幼苗共培养 5 d 后, 拟南芥幼苗主根较对照平均伸长 0.2 和 0.3 cm, 平均每棵幼苗的侧根数分别增加 6 和 9 个, 茎的生物量鲜重分别提高 87.5% 和 100%。还有研究表明木霉菌能提高番茄(*Solanum lycopersicum*)幼苗干生物量 100% 以上^[13]。而该研究中自然条件下木霉菌诱导山新杨移栽苗 60 d 后, 杨树苗根部生物产量明显增加, 说明棘孢木霉菌具有显著促进杨树苗的根组织生长发育的作用, 杨树苗根系发达, 有利于吸收营养以促进地上部分的生长。徐瑞富等^[14]认为, 自然环境中木霉菌的定殖与繁殖会受到环境中其它微生物的影响。从未灭菌的耕作层和亚表层土壤中微生物种群变化趋势看, 木霉菌的变化与其中真菌的变化有密切关系, 培养 30 d 内木霉菌变化趋势为先增多后减少, 呈波浪状生长曲线, 当木霉菌大量出现时, 抑制了其它真菌, 使真菌数量减少, 继而使木霉菌出现“饥饿”而数量减少, 真菌又得以增加, 形

成木霉菌和真菌之间的生态学平衡。该研究中, T2 水平的木霉分生孢子的剂量仅与 T1、T3 各相差正负 1 个数量级, 对杨树苗生长的影响却表现出不同的结果, 说明木霉菌肥的使用需要控制最佳剂量。

陈建爱等^[5]研究中, 将黄绿木霉(*T. aureoviride*) T1010 对种植草本植物樱桃番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.) 收获中期土壤的不同位置化学指标进行检测, 结果表明, 土壤水解氮含量差异极显著($P < 0.0001$), 均比对照提高(10.02%~17.51%), 并且水解氮含量与木霉动态分析呈正相关, 0~5 cm 处相关系数为 0.9631 ($P < 0.0001$), 证明木霉菌能提高栽培草本植物土壤的水解氮含量。该研究中棘孢木霉 ACCC30536 能极显著影响栽培木本植物杨树苗土壤的水解氮含量, 比对照提高 8.81%~20.26% ($P < 0.01$), 而且与施入木霉分生孢子量相关, 与土壤中棘孢木霉动态的相关性有待于进一步分析。此结果进一步证明, 木霉菌不仅使草本植物栽培土壤, 而且使木本植物栽培土壤水解氮含量提高, 该研究结果将对木霉免疫诱导剂类生物肥料及土壤改良剂在促进林木生产中的应用提供理论指导。

杨树苗的生长量可能受土壤多种营养因素的综合影响, 该研究土壤水解氮含量与杨树苗株高和茎基周长指标变化的相关性不大。其它土壤营养指标受木霉菌影响引起的变化有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Tchameni S N, Ngonkeu M E L, Begoude B A D, et al. Effect of *Trichoderma asperellum* and arbuscular mycorrhizal fungi on cacao growth and resistance against black pod disease[J]. Crop Protection, 2011, 30:1321-1327.
- [2] Adams P, De-leij F A, Lynch J M. *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 mediates growth promotion of Crack Willow(*Salix fragilis*) saplings in both clean and metal-contaminated soil[J]. Microbial Ecology, 2007, 54(2):306-313.
- [3] Hoyos-Carvajal L, Orduz S, Bissett J. Growth stimulation in bean(*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*[J]. Biological Control, 2009, 51:409-416.
- [4] Sofo A, Tataranni G, Xiloyannis C, et al. Direct effects of *Trichoderma harzianum* strain T-22 on micropropagated shoots of GiSeLa6(*Prunus cerasus* × *Prunus canescens*) rootstock[J]. Environmental and Experimental Botany, 2012, 76:33-38.
- [5] 陈建爱, 杜方岭, 黄绿木霉 T1010 对樱桃番茄横向土壤环境性状改良效果研究[J]. 农学学报, 2011(6):36-41.
- [6] Viterbo A, Landau U, Kim S, et al. Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203[J]. FEMS Microbiology Letters, 2010, 305(1):42-48.
- [7] 王红蕾. 山新杨高效组培再生体系的建立[J]. 北方园艺, 2010(13):174-175.
- [8] 王琳. 中国东北暗棕壤 N 含量简易测定法[J]. 北方园艺, 2008(1):45-46.
- [9] 刘志华, 王志英, 王玉成, 等. 一种杨树组培苗的生根移栽方法: 中国[P]. 专利号: 201210074323.
- [10] 陈立新. 土壤实验实习教程[M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2005:149-152.
- [11] Cornelissen J H C, Lavorel S, Garnier E, et al. A handbook of protocols for standardized and easy measurement of plant functional traits worldwide[J]. Australian Journal of Botany, 2003, 51:335-380.
- [12] Contreras-Cornejo H A, Macías-Rodríguez L, Cortés-Penagos C, et al. *Trichoderma virens*, a Plant Beneficial Fungus, Enhances Biomass Production and Promotes Lateral Root Growth through an Auxin-Dependent Mechanism in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2009, 149(3):1579-1592.
- [13] Fontenelle A D B, Guzzo S D, Lucon C M M, et al. Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. [J]. Crop Protection, 2011, 30(7):1492-1500.
- [14] 徐瑞富, 陆宁海, 张定法, 等. 土壤不同微生物量对木霉菌定殖的影响和木霉菌生态学习性研究[J]. 中国生态农业学报, 2007, 15(1):207-208.

Effects of *Trichoderma* on Growth of *Populus davidiana* × *P. bolleana* Seedlings and Available Nitrogen Content of Soil

GONG He-xin, WANG Hui, YANG Rui, LI Min, GUO Yu-meng, SHANG Shuang-jiao, ZHANG Rong-shu

(College of Landscape Architecture, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract: In order to improve the application of *Trichoderma asperellum* immune-inducer-like bio-fertilizer and soil amendment in benefiting growth of woody plants, pot culturing experiment was carried out to study the effects of *Trichoderma asperellum* ACCC30536 spore suspension of different concentrations (T1, 5×10^2 cfu·cm⁻³; T2, 5×10^3 cfu·cm⁻³ and T3, 5×10^4 cfu·cm⁻³) on *Populus davidiana* × *P. bolleana* growth, the spore suspensions were added to its root to induce the growth for 60 days, the plants and available nitrogen content in soil were measured. The results showed that T2 induction had significant efficiency, the seedlings achieved maximum plant height and stem base perimeter increased by 7.01 cm and 0.15 cm respectively for 15 days, which were 5.12 and 2.14 times more than control CON4 (without *Trichoderma asperellum* treatment). The average dry root weight of T2 seedlings was 7.38 g, which increased by 50.92% compared with CON4, and average dry stem weight of T2 seedlings was 4.24 g, which increased by 16.48%, 49.82% and 7.34% compared with CON4, T1 and T3 respectively. Simultaneously, after inducing for 30 days, the available nitrogen content of T2 pot soil increased by 16.81% compared with CON1 (pot soil with neither seedling nor inducing), 9.5% compared with CON2 (pot soil with inducing as T2 without seedling) and 20.26% compared with CON4. The results above showed that *T. asperellum* had significant effects on the improvement of growth for *Shanxinyang* and the available nitrogen content of the pot soil, the best concentration of inducing spore suspension was 5×10^3 cfu·cm⁻³.

Key words: *Trichoderma asperellum*; *Populus davidiana* × *P. bolleana*; growth; available nitrogen content