

土壤丛枝菌根真菌准离体培养体系的建立

何俊良^{1#}, 和展梅^{1#}, 何辰辰¹, 黄心铷¹, 谢贤安^{1,2*}

1 华南农业大学 林学与风景园林学院, 广东省森林植物种质创新与利用重点实验室, 广东 广州

2 山东省农业科学院, 养分资源高效利用全国重点实验室, 山东 济南

何俊良, 和展梅, 何辰辰, 黄心铷, 谢贤安. 土壤丛枝菌根真菌准离体培养体系的建立[J]. 微生物学报, 2025, 65(4): 1587-1600.

HE Junliang, HE Zhanmei, HE Chenchen, HUANG Xinru, XIE Xian'an. Establishment of an *in vitro* quasi-symbiotic culture system for indigenous arbuscular mycorrhizal fungi from soil[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(4): 1587-1600.

摘要:【目的】丛枝菌根(arbuscular mycorrhizal, AM)真菌是植物根围微生物群的关键组成部分, 能与 72% 的陆生植物形成共生体。然而, AM 真菌属于植物专性共生土壤真菌, 难以进行富集分离和人工纯培养。本研究旨在建立一种基于添加根系分泌物的非植物共生培养体系, 以解决 AM 真菌难以离体培养的问题。【方法】利用“多层三明治”夹膜培养体系, 对土壤 AM 真菌孢子进行非植物共生的准离体培养, 并采用分子系统学方法对培养的 AM 真菌进行鉴定。【结果】利用“多层三明治”夹膜培养体系对土壤 AM 真菌进行非植物共生的准离体培养, 发现紫云英的根系分泌物能有效促进 AM 真菌的菌丝生长。与培养 30 d 和 45 d 相比, 在培养 60 d 时产生大量的次生孢子, 数量为(951±45)个。进一步的孢子回接试验表明, 该培养产生的次生孢子能侵染紫云英幼苗根系。使用分子鉴定法鉴定出适用于“多层三明治”夹膜培养体系的 2 种 AM 真菌, 分别为摩西斗管囊霉(*Funneliformis mosseae*)和隐类球囊霉(*Paraglomus occultum*)。使用模拟紫云英根系分泌物成分配制的营养液对 AM 真菌孢子进行“多层三明治”夹膜离体培养, 结果表明添加根系分泌物显著促进 AM 真菌菌丝生长。【结论】在植物培护的“多层三明治”夹膜培养体系中, 紫云英根系分泌物能持续诱导 AM 真菌在非共生条件下产生菌丝体和具有侵染宿主植物能力的次生孢子。本研究为进一步解决 AM 真菌离体培养和分离鉴定等问题提供了新方法。

关键词: 丛枝菌根真菌; “多层三明治”培养体系; 准离体培养; 分离鉴定

资助项目: 国家自然科学基金(32370108, 32170116); 广东省基础与应用基础研究基金(2022A1515012013); 养分资源高效利用全国重点实验室开放基金(KF2024-4)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32370108, 32170116), the Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (2022A1515012013), and the Open Research Fund of State Key Laboratory of Nutrient Use and Management (KF2024-4).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: xiexianan8834203@126.com

Received: 2024-11-15; Accepted: 2025-03-05; Published online: 2025-03-19

Establishment of an *in vitro* quasi-asympbiotic culture system for indigenous arbuscular mycorrhizal fungi from soil

HE Junliang^{1#}, HE Zhanmei^{1#}, HE Chenchen¹, HUANG Xinru¹, XIE Xian'an^{1,2*}

1 Guangdong Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Forest Plant Germplasm, College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong, China

2 State Key Laboratory of Nutrient Use and Management, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan, Shandong, China

Abstract: [Objective] Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi are crucial components of the plant rhizosphere microbiota, capable of forming symbiotic relationships with 72% of terrestrial plants. However, AM fungi are plant-specific symbiotic fungi in soil, and they are difficult to be enriched for isolation and achieve artificial pure culture. This study aimed to develop a non-plant symbiotic culture system based on the addition of root exudates to solve the problem of difficult *in vitro* culture of AM fungi. [Methods] The “multi-layer sandwich” culture system was used for the *in vitro* quasi-asympbiotic culture of AM fungal spores from soil. Molecular systematics methods were employed to identify the cultured AM fungi. [Results] A “multi-layer sandwich” culture system was used for the *in vitro* quasi-asympbiotic culture of AM fungi from soil. It was found that the root exudates of *Astragalus sinicus* effectively promoted the hyphal growth of AM fungi. A large number (951 ± 45) of secondary spores were produced after 60 days of culture, exceeding those after 30 days and 45 days of culture. Further spore inoculation tests indicated that the secondary spores produced from this culture colonized the roots of *A. sinicus* seedlings. Two AM fungal species, *Funneliformis mosseae* and *Paraglomus occultum*, were identified by molecular characterization as suitable for the “multi-layer sandwich” culture system. Finally, a nutrient solution composed of simulated root exudate components from *A. sinicus* was used for the “multi-layer sandwich” culture of AM fungal spores. The results showed that the addition of root exudates significantly promoted the hyphal growth of AM fungi. [Conclusion] In the plant-assisted “multi-layer sandwich” culture system, the root exudates of *A. sinicus* can continually induce AM fungi to produce hyphae and secondary spores capable of colonizing host plants under non-symbiotic conditions. This study provides a new method for solving the problem related to the *in vitro* culture, isolation, and identification of AM fungi.

Keywords: arbuscular mycorrhizal fungi; “multi-layer sandwich” culture system; quasi-asympbiotic culture; isolation and identification

丛枝菌根(arbuscular mycorrhizal, AM)真菌是一类古老且重要的陆生植物根系内生菌根真菌, 是植物根围微生物群的重要组成部分^[1]。AM 共生是 AM 真菌与 72% 的陆生植物根系建

立的互利共生关系^[2], 能够促进植物生长、养分吸收, 以及增强植物对生物或非生物胁迫的耐受性, 对生物地球化学循环和微生物群落稳态具有重要作用^[3-6]。

AM 真菌属于植物专性共生真菌^[7], 归因于 AM 真菌在与宿主植物共同进化过程中编码参与脂肪酸从头合成以及蔗糖和硫胺素代谢相关酶的基因丢失^[8-9]。因此, AM 真菌完成其生命周期需要依赖宿主植物提供的有机碳, 包括糖类和脂肪酸^[10-13], 这一特性导致 AM 真菌在非宿主植物共生的情况下难以像其他丝状真菌一样进行富集分离和人工纯培养。尽管如此, 先前对 AM 真菌根内根孢囊霉(*Glomus intraradices*, 现拉丁名为 *Rhizophagus intraradices*)和强壮类芽孢杆菌(*Paenibacillus validus*)细菌菌株的共培养研究表明, 细菌分泌物能够有效诱导 AM 真菌菌丝生长, 并促进次生孢子的产生^[14]。此外, 近年来的研究发现, 外源脂肪酸(如棕榈酸和肉豆蔻酸)可以刺激 AM 真菌的菌丝萌发, 并产生具有侵染宿主植物能力的次生孢子^[15-16]。在外源脂肪酸和有机氮存在下, 植物激素(如独脚金内酯和茉莉酸酯)的添加进一步促进了 AM 真菌的产孢过程^[17]。这些研究结果表明, 在人工培养条件下, 提供合理的 AM 真菌必需营养物质能够激发 AM 真菌独立于宿主植物的生长和产孢潜力。然而, 与植物共培养产生的次生孢子相比, 通过纯培养方法获得的 AM 真菌数量及其对宿主植物根系的定殖能力仍表现出一定的局限性。

植物根系分泌物是植物与土壤微生物相互作用的重要媒介, 其成分中富含各种营养物质和信号分子。根系分泌物的主要组成成分包括高分子量的蛋白质和黏液, 以及多样化的低分子量化合物。后者包括广泛的初级代谢物(如氨基酸、糖和羧酸盐)^[18-20]和次级代谢物(如脂肪酸和类黄酮)^[21]。AM 真菌在纯培养过程中所需的营养物质与植物根系分泌物中的次级代谢物部分种类非常相似, 这表明根系分泌物能够为 AM 真菌的生长和繁殖提供必要的营养支持, 促进

其菌丝萌发与产孢。因此, 建立一种非植物共生的培养方法, 通过提供植物根系分泌物或类似根系分泌物成分的营养液来培育 AM 真菌, 对于促进其萌发和产孢具有重要的研究意义。这一研究不仅有助于深入理解植物与微生物之间的相互作用, 也为 AM 真菌资源的开发与利用提供了新的思路。

本研究采用“多层三明治”夹膜培养体系, 对土壤中的 AM 真菌菌种进行非植物共生培养, 并通过添加豆科植物紫云英根系分泌物, 诱导 AM 真菌在离体条件下产生菌丝和次生孢子。这一方法为 AM 真菌的基础与应用研究提供了一种更加简便和可行的扩繁途径。此外, 本研究对适用于“多层三明治”夹膜培养体系的土壤 AM 真菌进行了分子生物学鉴定, 以期丰富亚热带地区 AM 真菌的种质资源库, 并为 AM 真菌在农林业生产中的研究与应用提供可行的方法。

1 材料与方法

1.1 样品采集

为获取 AM 真菌材料, 选取广州市天河区华南农业大学树木园作为采样区域, 该区域土壤类型为花岗岩发育的中性或弱酸性赤红壤。采样方法如下: 在采样区域内选取 5 个华南地区乡土树种的根区土壤采样点, 参照周小勤等^[22]的方法进行根区土壤样品采集。每个采样点的有效磷含量、土壤 pH 值和宿主植物详见表 1。待土样自然风干后, 采用湿筛倾析-蔗糖离心法^[23]分离 AM 真菌孢子, 并将孢子收集于无菌培养皿中, 在体式显微镜(Nikon 公司)下挑取 AM 真菌孢子。

1.2 供试植物材料

供试植物为紫云英(*Astragalus sinicus*), 种子来源于华中农业大学农业微生物资源挖掘与利用全国重点实验室生物固氮分室。

表1 根区土壤采样信息

Table 1 Sampling information of root-zone soils

采样点 Sampling point	经纬度 Longitude and latitude	宿主植物 Host plants	土壤pH pH of the soil	有效磷含量 Phosphate content (mg/kg)	
				平行样 Duplicates	平均值±SD Mean±SD
1	23°9'43"N 113°21'13"E	菠萝蜜 <i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.	6.4	53	57.0±3.7
				56	
				62	
2	23°9'134"N 113°21'12"E	构树 <i>Broussonetia papyrifera</i> (Linn.) L'Hér. ex Vent.	7.1	56	52.7±2.5
				52	
				50	
3	23°9'36"N 113°21'16"E	阴香 <i>Cinnamomum burmanni</i> (Nees & T. Nees) Blume	6.2	52	51.0±4.5
				45	
				56	
4	23°19'35"N 113°22'17"E	阳桃 <i>Averrhoa carambola</i> L.	6.8	52	58.7±4.8
				61	
				63	
5	23°15'22"N 113°25'33"E	龙眼 <i>Dimocarpus longan</i> Lour.	7.0	70	76.7±8.7
				71	
				89	

对紫云英种子进行灭菌处理和萌发，步骤如下：将紫云英种子浸入 15% 次氯酸钠(NaClO)溶液进行表面灭菌 20 min，充分吸干次氯酸钠溶液后，用无菌水漂洗种子 5 次，每次 5 min；随后加入 75% 乙醇浸泡 20 min，继续用无菌水洗去残留的乙醇溶液。之后将种子浸泡在无菌水中，置于 25 °C暗处吸胀 24 h。将吸胀的种子点播于 Murashige-Skoog (MS) 固体培养基(Coolaber 公司)上，于 25 °C暗处培养 2 d 使其萌发，再将培养基置于光照培养室内继续培养 14 d。随后，紫云英幼苗可用于“多层三明治”夹膜法作为培护植物，也可用于次生孢子回接试验的宿主植物。

1.3 “多层三明治”夹膜法培养 AM 真菌

挑取大小一致、无萌发管的 AM 真菌孢子进行表面消毒处理。以每份 20 个孢子的数量注射到直径为 50 mm、孔径尺寸为 0.8 μm 的微孔

过滤膜(天津津腾科技有限公司)上，用另一张相同规格的微孔过滤膜将其覆盖，形成夹心结构^[24]。在夹心结构的两外侧分别放置 2 株紫云英幼苗(紫云英萌发情况如 1.2 节所述)，将紫云英幼苗的侧根展开并以覆盖状形式铺在微孔滤膜的孢子层外侧，再用 2 张滤膜夹住紫云英幼苗，形成多层“三明治夹心”装置，并将其竖直插入到含石英砂的方形花盆中央，将滤膜的 1/5 曝露在外(图 1A、1B)。用改良的 Long Ashon (mLA)培养液^[25](含 30 μmol/L NaH₂PO₄ 和 250 μmol/L NaNO₃)浇灌“多层三明治”夹膜培养体系，每 3 d 浇灌 1 次，培养 35 d 以上，随后抽出盆栽中孢子层夹膜，观察并记录菌丝的长度及统计次生孢子数量。

将另一份 AM 真菌孢子注射到上述“三明治夹心”结构中，并将“多层三明治”夹膜培养体系垂直插入方形花盆中央，使约 1/5 的过滤膜直

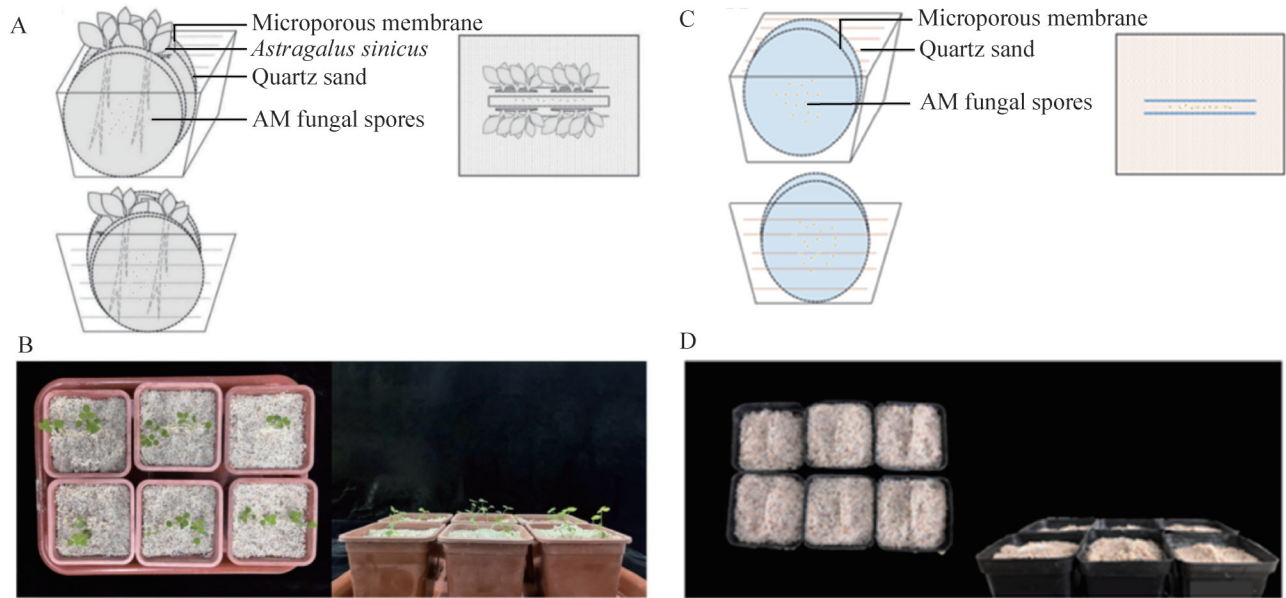


图1 “多层三明治”夹膜法培养AM真菌孢子示意图。A和B分别为添加植物培护的“多层三明治”夹膜法示意图和实物图；C和D分别为添加模拟根系分泌物营养液的“多层三明治”夹膜法示意图和实物图。

Figure 1 Schematic diagram of the “multi-layer sandwich” method for cultivation of AM fungal spores. A and B: Schematic diagram and physical image of the plant-assisted “multi-layer sandwich” method; C and D: Schematic diagram and physical image of the “multi-layer sandwich” method adding nutrient solutions that simulate root exudates.

径曝露在外(图 1C、1D)。用模拟根系分泌物成分的营养液(自行配制)或 mL A 营养液进行营养管理, 每盆隔天注射 1 次模拟根系分泌物成分营养液或 mL A 营养液到中间含孢子的夹膜中, 每次用量 1 mL, 培养 35 d 以上, 随后抽出盆栽中孢子层夹膜, 观察并记录菌丝长度及次生孢子数量。

1.4 AM 真菌菌丝长度和次生孢子直径测定

在体视显微镜(Nikon 公司)下观察 AM 真菌菌丝生长情况并记录次生孢子数量, 使用图像处理软件 Scion Image 测量菌丝长度。所得实验数据用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。分析采用邓肯(Duncan)多重比较法, 数据以不同生物学重复的 $\text{mean} \pm \text{SE}$ 表示。不同字母表示各数据间存在显著性差异($P < 0.05$)。

1.5 孢子回接试验

使用无菌的微型注射器针头, 去除附着在“多层三明治”夹膜法实验滤膜上的母孢子(mother spore, 直径约为 $100 \mu\text{m}$, 孢子颜色深黄褐色, 孢子壁较厚)。将萌发并培养 14 d 的紫云英幼苗根系放置在含有次生孢子(直径约为 $15\text{--}30 \mu\text{m}$, 浅白色, 孢子壁较薄, 着生于分枝菌丝末端)的滤膜上, 每份滤膜上放置 2 株大小一致、长势相近的幼苗。从同一储备样品中挑出等数量的休眠孢子(也称母孢子)放置于新的微孔过滤膜上, 每份使用同样大小且长势一致的 2 株紫云英幼苗进行盆栽培养。侵染紫云英根系 28 d 后, 测定菌根侵染率。

1.6 AM 真菌侵染率测定

收集紫云英根样置于离心管内, 加入 10% 的 KOH 溶液(0.1 g/mL), 放置于 90°C 水浴中

表2 模拟根系分泌物的营养液配方

Table 2 Nutrient solution formulations for simulated root exudates

营养成分 Nutrient composition	含量 Content
MgSO ₄ ·7H ₂ O	731.000 0 mg/L
KNO ₃	80.000 0 mg/L
KCl	65.000 0 mg/L
KH ₂ PO ₄	4.800 0 mg/L
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	288.000 0 mg/L
Fe(III)-EDTA	8.000 0 mg/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	3.000 0 mg/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.300 0 mg/L
H ₃ BO ₃	1.500 0 mg/L
KI	0.750 0 mg/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.065 0 mg/L
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.001 2 mg/L
2-morpholinoethanesulfonic acid monohydrate (MES)	1.952 0 mg/L
Glucose	1.00 g/L
Glycine	3.000 0 mg/L
Pyridoxine-HCl	0.100 0 mg/L
Nicotinic acid	0.500 0 mg/L
Myo-inositol	50.000 0 mg/L
Thiamine-HCl	10.000 0 mg/L
Peptone	1.00 g/L
NaCl	6.70 g/L
C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O	1.47 g/L
KH ₂ PHO ₄	250.000 0 mg/L
NaOH	500.000 0 mg/L
Potassium myristate (Myr-k)	100 nmol/L
Strigolactone analogue (GR24)	10 ⁻⁵ mmol/L
Methyl jasmonate (MeJA)	10 ⁻³ mmol/L

1 h, 随后加入 2% HCl (0.55 mol/L) 浸泡 10 min, 用无菌水清洗 3 次。使用 0.5 g/L 台盼蓝和 5 μg/mL 荧光麦胚凝集素 488 (wheat germ agglutinin 488, WGA488) 对紫云英根段进行染色, 参照 Trouvelot 等^[25]的方法统计菌根真菌侵染紫云英根系的水平。

1.7 AM 真菌的分子生物学鉴定

采用单孢 PCR 方法^[23]对“多层三明治”夹膜培养法扩繁后的母孢子进行分子鉴定。AM 真菌孢子表面灭菌方法参考 Xie 等^[26]。以含有孢子 DNA 的内含物直接作为扩增模板, 利用 GeoA2/Geo11^[27]和 AML1/AML2^[28]引物对进行巢式 PCR 扩增。回收扩增片段后, 进行 T/A 克隆转化。次日挑取转化子进行测序, 将测序获得的 AM 真菌特异性序列提交至 NCBI 网站进行同源序列搜索, 选取相似性较高的序列作为参考序列, 与测序获得的目的序列一同在 MEGA 11 软件^[29]中采用邻接法(neighbor-joining method)构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 “多层三明治”夹膜法促进 AM 真菌菌丝生长和产生次生孢子

“多层三明治”夹膜培养体系依靠微孔滤膜将植株根部与 AM 真菌孢子分隔, 在非植物共生培养条件下, AM 真菌通过摄取紫云英渗透到滤膜的根系分泌物, 促进菌丝生长以及形成次生孢子^[24]。为明确在不同培养时间段 AM 真菌孢子产生次生孢子的情况, 分别对培养 30、45 和 60 d 的次生孢子数量及大小进行统计。培养 30 d 时, AM 真菌母孢子仅产生少量次生孢子(图 2A–2C), 数量为(6±2)个; 培养 45 d 时, 母孢子产生次生孢子的数量明显增加, 数量为(118±18)个(图 2D–2F), 并显著多于培养 30 d 时产生的次生孢子。与培养 30 d 和 45 d 相比, AM 真菌在分隔培养 60 d 时产生了大量次生孢子(图 2G–2I), 数量为(951±45)个, 显著高于培养 30 d 和 45 d 时产生的次生孢子(图 2J)。由此可见, 在非植物共生培养条件下, 随着培养时间的增加, AM 真菌母孢子能产生更多数量的次生孢子。

为观察 AM 真菌菌丝的生长情况, 对菌丝

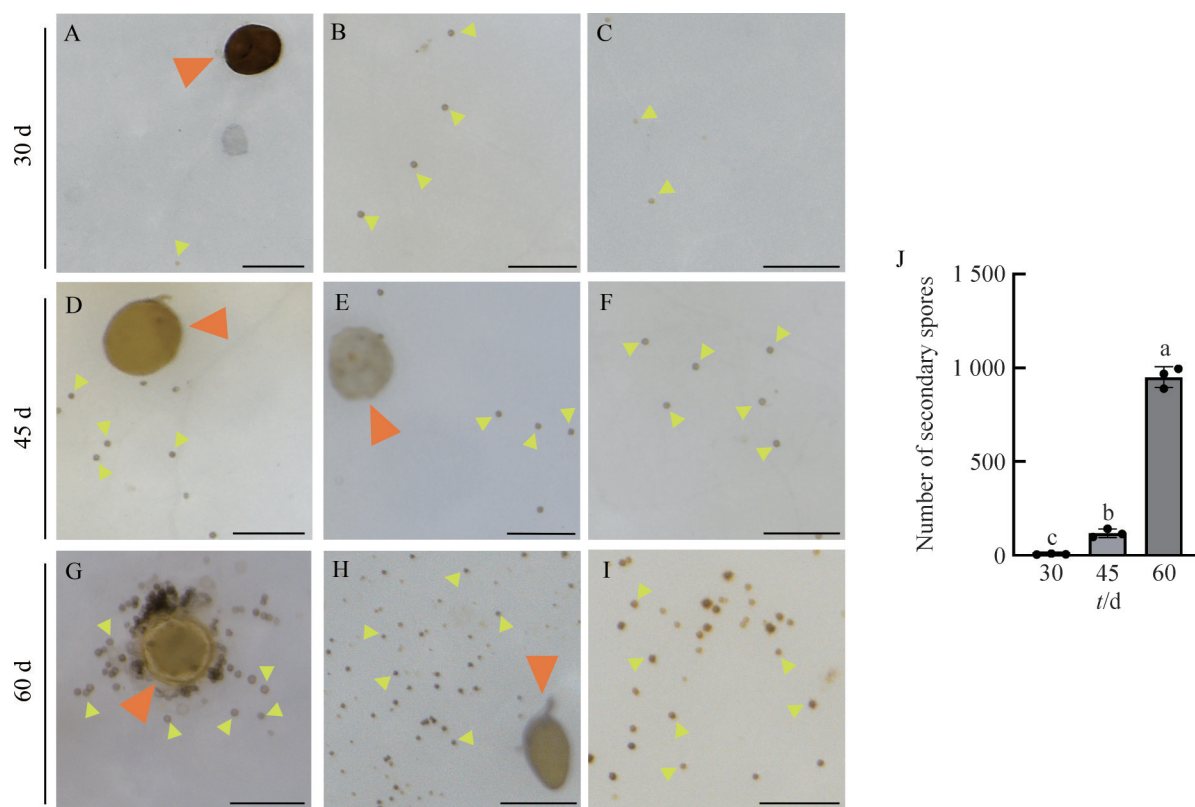


图2 紫云英根系分泌物诱导土壤AM真菌产生次生孢子及数量统计示意图。A–I：添加紫云英根系分泌物培养30 d (A–C)、45 d (D–F)和60 d (G–I)后AM真菌次生孢子的生长情况。J：紫云英根系分泌物处理下AM真菌次生孢子在30 d、45 d和60 d时的数量比较。橙色箭头表示母孢子，黄色箭头表示次生孢子；图中比例尺为100 μm。根据邓肯多重比较计算显著性，柱状图中不同字母表示显著性差异， $P<0.05$ 。

Figure 2 Schematic diagram of secondary spore production and counts of indigenous AM fungi induced by root exudates of *Astragalus sinicus* in vitro. A–I: The growth of AM fungus secondary spores after 30 d (A–C), 45 d (D–F), and 60 d (G–I) culture with addition of root exudates of *A. sinicus*. J: Comparison of the number of AM fungal secondary spores at 30 d, 45 d, and 60 d under the treatment with root exudates of *A. sinicus*. Orange arrows indicate mother spores and yellow arrows indicate secondary spores. The scale bar in the figure is 100 μm. Significance was calculated based on Duncan's multiple comparisons, and different letters in the bar graphs indicate significant differences at $P<0.05$.

进行台盼蓝染色。培养 30 d 时，观察到分枝菌丝结构(图 3A、3B)，此时菌丝长度为 (33.80 ± 18.74) mm。培养 45 d 时，菌丝长度为 (109.30 ± 10.02) mm，相较于培养 30 d 时显著增加(图 3J)，并产生大量分枝菌丝结构，该结构可以促进 AM 真菌吸收来自紫云英一侧的根系分泌物并延伸形成游走菌丝。培养 60 d 时，菌丝长度为

(188.07 ± 2.69) mm，此时产生大量菌丝，菌丝顶端膨大形成直径较小的次生孢子，并形成高度分枝的菌丝-孢子结构网络(图 3H、3I)。

为证实土壤 AM 真菌产生的次生孢子是由紫云英根系分泌物诱导产生，对培养植株的紫云英根段进行染色并观察。结果显示，在 3 个培养时间段(30、45 和 60 d)内(图 4A–4C)，

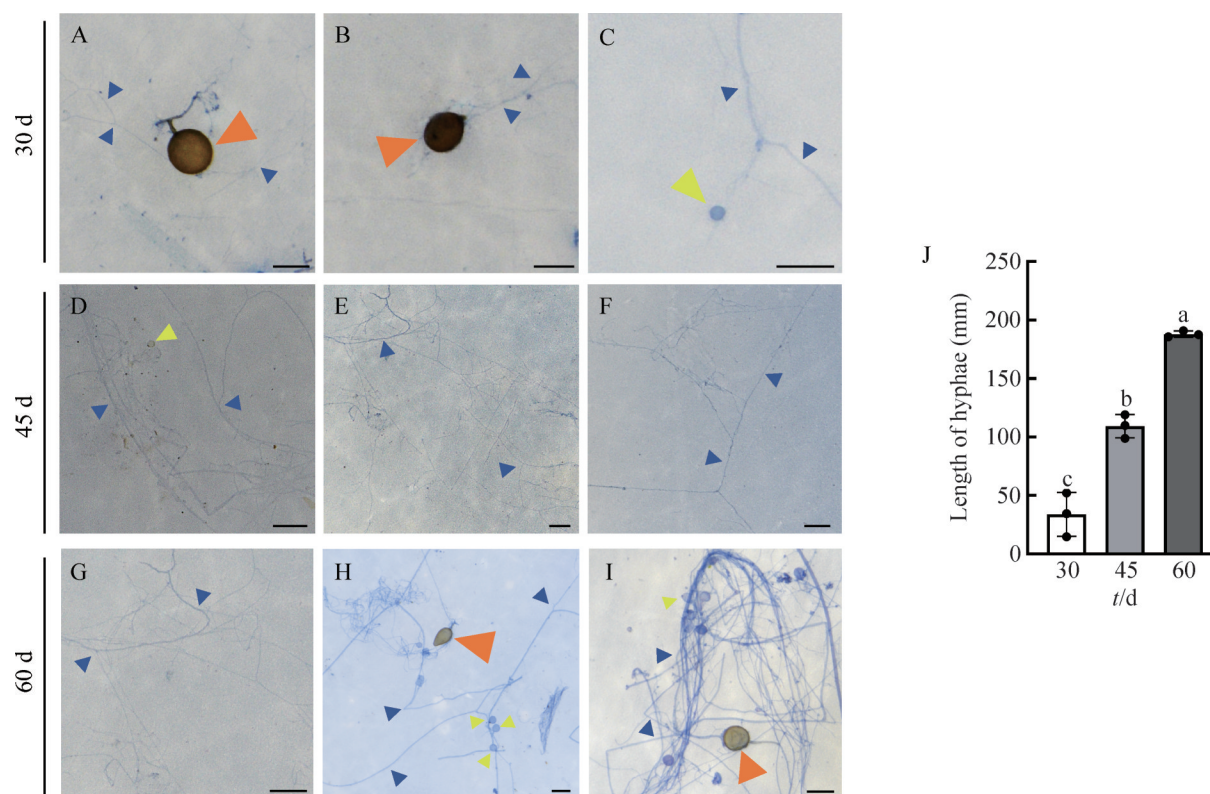


图3 紫云英根系分泌物诱导土壤AM真菌菌丝生长及菌丝长度统计示意图。A-I: 添加紫云英根系分泌物培养30 d (A-C)、45 d (D-F)和60 d (G-I)后AM真菌菌丝生长情况; J: 紫云英根系分泌物处理下AM真菌菌丝在30 d、45 d和60 d时的长度比较。橙色箭头表示母孢子, 黄色箭头表示次生孢子, 蓝色箭头表示菌丝。图中比例尺为100 μm。根据邓肯多重比较计算显著性, 柱状图中不同字母表示显著性差异, $P<0.05$ 。

Figure 3 Statistical diagram of hyphal growth and hyphal length of soil AM fungi induced by root exudates of *Astragalus sinicus*. A-I: The growth of hyphae after 30 d (A-C), 45 d (D-F), and 60 d (G-I) culture with addition of root exudates of *A. sinicus*; J: Comparison of the length of AM fungal hyphae at 30 d, 45 d and 60 d under the treatment with root exudates of *A. sinicus*. Orange arrows indicate mother spores, yellow arrows indicate secondary spores, and blue arrows indicate hyphae. The scale bar in the figure is 100 μm. Significance was calculated based on Duncan's multiple comparisons, and different letters in the bar graphs indicate significant differences at $P<0.05$.

AM 真菌均未侵染紫云英根段, 表明 AM 真菌的孢子萌发及次生孢子的产生所需的营养来源于根系分泌物。

2.2 模拟根系分泌物营养液促进土壤AM真菌菌丝生长

利用豆科植物紫云英培护的“多层三明治”夹膜培养实验结果表明, 紫云英的根系分泌物可以促进 AM 真菌菌丝生长及产生次生孢子。

为进一步探究土壤 AM 真菌的离体培养条件, 建立了无植物培护的“多层三明治”夹膜离体培养体系。在 mL 培养基的基础上, 添加脂类(肉豆蔻酸钾和茉莉酸甲酯)、植物激素(独脚金内酯类似物 GR24)以及有机氮(蛋白胨)等物质, 并使用该培养基溶液对 AM 真菌进行离体培养。

培养 60 d 时, 观察到 AM 真菌孢子的连孢菌丝有萌发且伸长现象(图 5D-5F), 使用台盼蓝

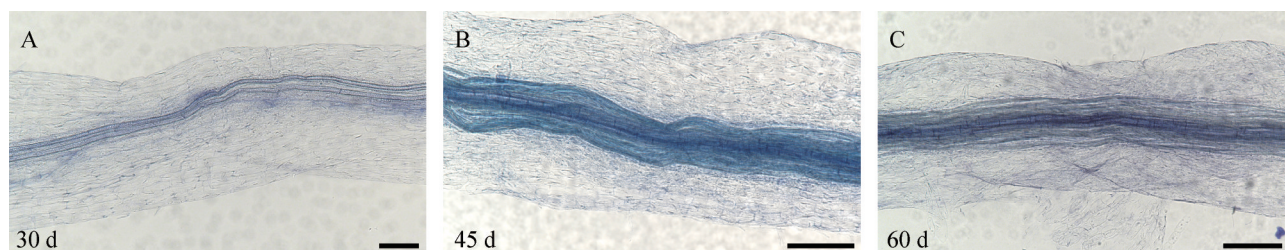


图4 培护植物紫云英的台盼蓝染色根段

Figure 4 The root segments of trypan blue from the companion plant *Astragalus sinicus*. A: 30 d; B: 45 d; C: 60 d. The scale bar in the figure is 100 μm .

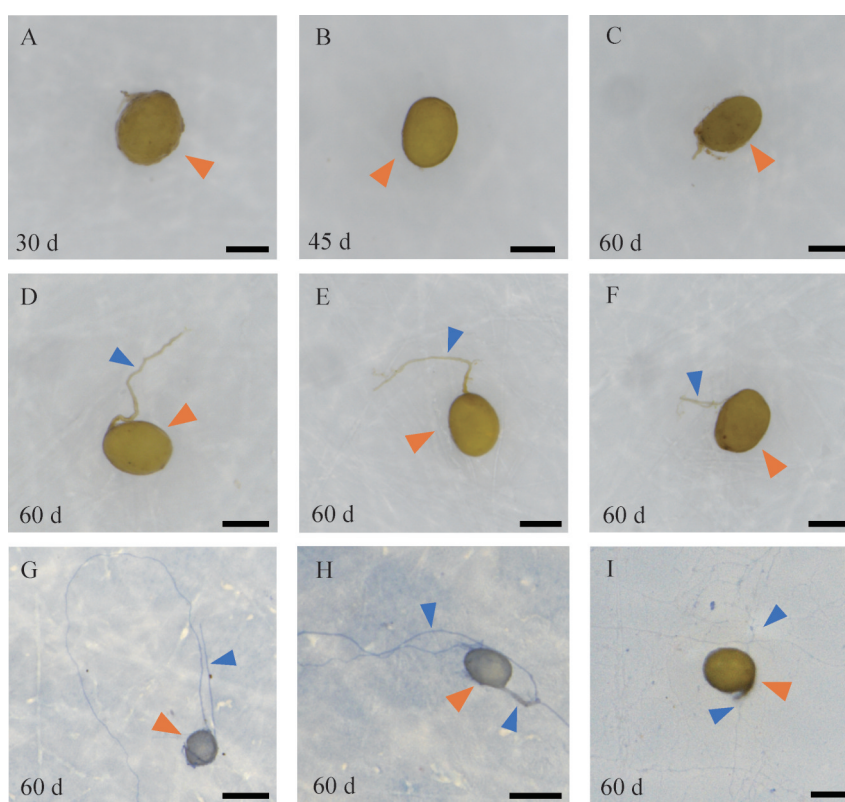


图5 模拟根系分泌物营养液诱导土壤AM真菌菌丝生长。A–C: 添加mLA营养液培养30 d (A)、45 d (B)和60 d (C)后AM真菌菌丝生长情况；D–F: 添加模拟根系分泌物营养液60 d后AM真菌菌丝生长情况；G–I: 添加模拟根系分泌物营养液60 d后，在台盼蓝染色观察下的AM真菌菌丝生长情况。橙色箭头表示母孢子，蓝色箭头表示菌丝。图中比例尺为100 μm 。

Figure 5 Simulated root exudates nutrient solution induces hyphae production by indigenous AM fungi. A–C: The growth of hyphae after 30 d (A), 45 d (B), and 60 d (C) culture with addition of mLA nutrient solution; D–F: The growth of AM fungal hyphae after 60 d culture with addition of simulated root exudates nutrient solution; G–I: After adding simulated root exudates nutrient solution for 60 d, the growth of AM fungi was observed under trypan blue staining. Orange arrows indicate parent spores and blue arrows indicate hyphae. The scale bar in the figure is 100 μm .

染色后发现, 土壤 AM 真菌出现菌丝伸长现象, 但菌丝较短, 未形成菌丝网络结构, 且无次生孢子产生(图 5G–5I)。利用 mL 营养液作为对照进行培养, 在 30 d (图 5A)、45 d (图 5B) 以及 60 d (图 5C) 时, 均未观察到土壤 AM 真菌明显的菌丝生长。由此可见, 添加模拟根系分泌物营养液的培养方法对土壤 AM 真菌的生长发育具有促进作用, 这表明在“三明治”夹膜离体培养条件下, 培养基中的脂类(茉莉酸甲酯和肉豆蔻酸钾)、植物激素(独脚金内酯类似物 GR24) 和有机氮(蛋白胨) 能被 AM 真菌吸收利用。

2.3 “多层三明治”夹膜培养中产生的次生孢子对紫云英有侵染能力

为确定“多层三明治”夹膜培养体系产生的次生孢子具有侵染植物的能力, 将次生孢子和

AM 真菌母孢子回接到草本植物紫云英根系。使用 WGA488 对分别由 AM 真菌次生孢子和母孢子侵染的紫云英根段进行染色观察。结果发现, 紫云英根段存在菌丝(图 6B)和泡囊(图 6A)结构, 表明母孢子和次生孢子都具有侵染植物的能力。对紫云英根段总侵染率进行统计, 发现母孢子组的侵染率为 21%, 次生孢子组的侵染率为 13% (图 6C), 次生孢子的侵染率较母孢子略低, 表明次生孢子的侵染能力略弱于母孢子。

2.4 土壤 AM 真菌孢子的分子系统学鉴定

挑取样品中的母孢子进行单孢测序, 其中一种单孢测序序列同源搜索结果显示, 该序列与摩西斗管囊霉(*Funnelformis mosseae*) 的 18S rRNA 基因序列(登录号为 FR750227.1)相似性高

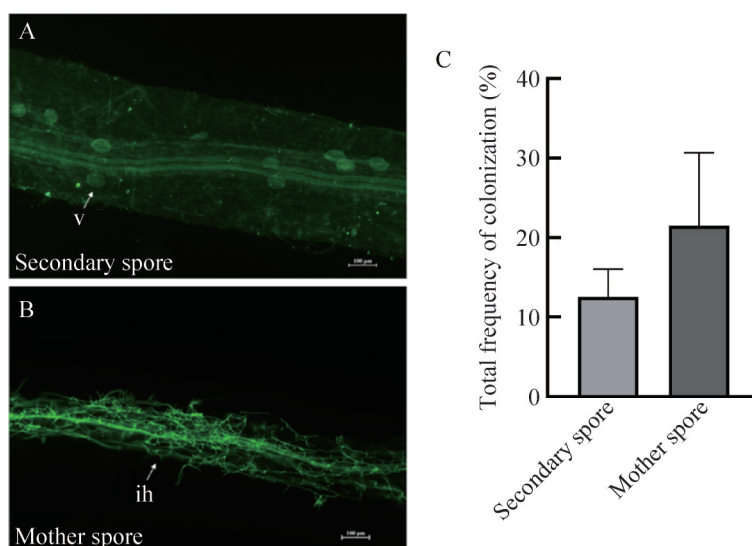


图6 AM真菌次生孢子和母孢子的侵染能力比较。A: AM真菌次生孢子与紫云英根系共生28 d时的菌根定殖情况; B: AM真菌母孢子与紫云英根系共生28 d时的菌根定殖情况; C: 紫云英根系在接种次生孢子和母孢子28 d后的总侵染率比较。v: 泡囊; ih: 根内菌丝。图中比例尺为100 μm 。

Figure 6 Comparison of colonization capacity between secondary spores and mother spores of AM fungi. A: Mycorrhizal colonization of AM fungal secondary spores at 28 d of symbiosis with *A. sinicus* roots; B: Mycorrhizal colonization of AM fungal mother spores at 28 d of symbiosis with *A. sinicus* roots; C: Comparison of total frequency of colonization in *A. sinicus* roots after inoculation with secondary spores and mother spores for 28 d. v: Vesicle; ih: Intraradical hyphae. The scale bar in the figure is 100 μm .

达 99.88% (图 7), 表明该 AM 真菌为 *F. mosseae*。另一种孢子根据系统发育树结果显示, 其与隐类球囊霉(*Paraglomus occultum*)的 18S rRNA 基因被聚类为同一分支(图 7), 表明该 AM 真菌为 *P. occultum*。上述结果表明, “多层三明治”夹膜法培养体系适用于 AM 真菌摩西斗管囊霉和隐

类球囊霉。

3 讨论

长期以来, AM 真菌被认为是专性共生体, 依赖宿主植物提供有机碳源^[7]。这一特性限制了 AM 真菌的培养方法, 从而影响了其资源的开发

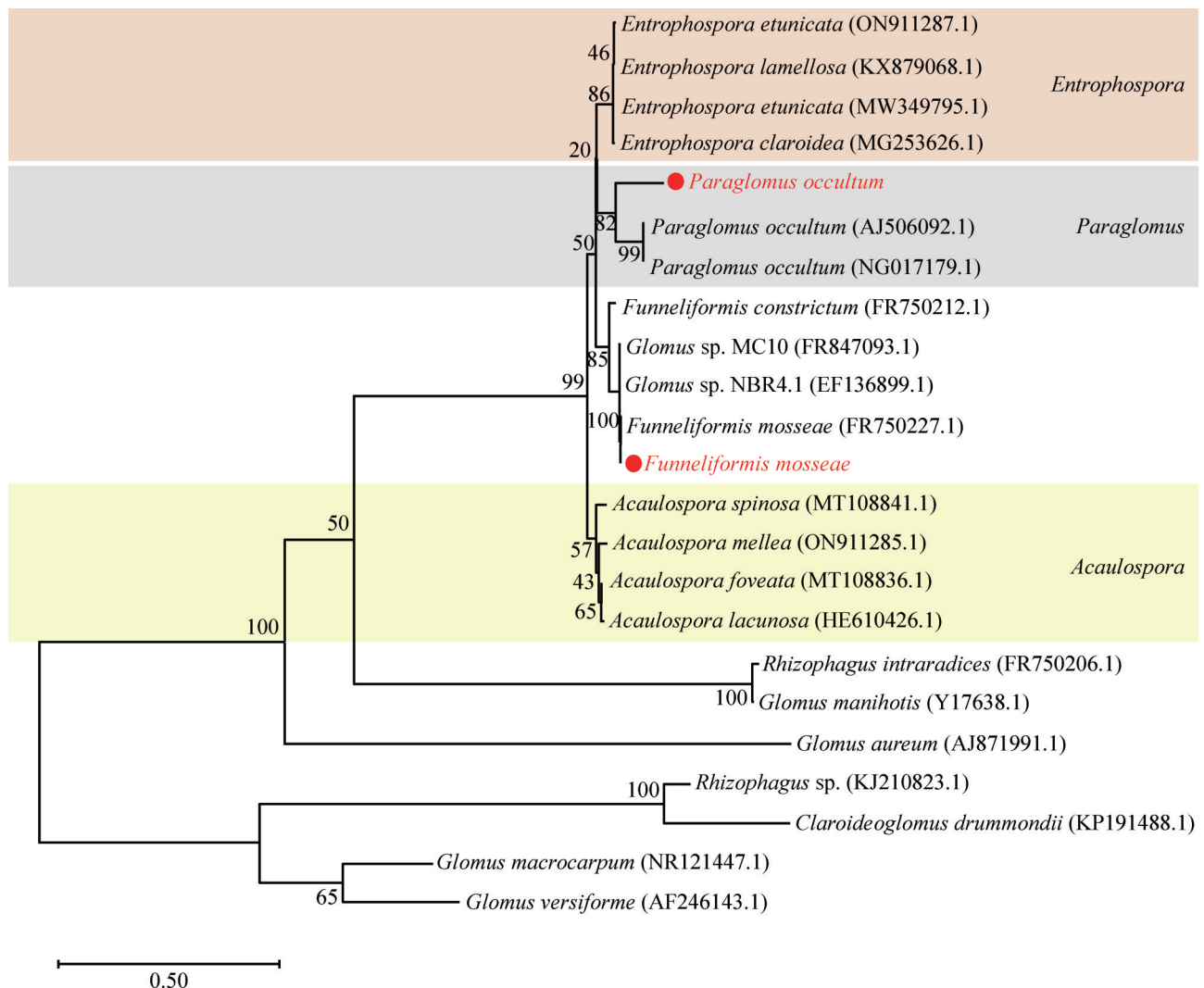


图7 基于18S rRNA基因序列构建的AM真菌系统发育树。利用MEGA 11软件的邻接法构建系统发育树, 树枝名称由真菌名称及其18S rRNA基因序列登录号构成; 标尺代表进化距离。

Figure 7 Phylogenetic tree of AM fungi constructed based on the 18S rRNA gene sequences. Tree was constructed using the neighbor-joining method of the MEGA 11 software, and the names of the branches consisted of the fungi species and their 18S rRNA gene sequence accession numbers. The scale bar represents the evolutionary distances.

与利用。目前, AM 真菌的培养方法种类有限, 其中, 盆栽培养法是生产菌根根段和孢子最常用的方法^[30]。此外, 随着学者们对 AM 真菌脂吸收机制的揭示^[10-11], 研究者们成功开发了一种添加脂肪酸和植物激素的培养方法, 从而实现了少数几种模式 AM 真菌的离体培养^[14-16]。然而, 该方法产生的孢子数量和质量仍难以满足当前基础与应用基础研究以及生产实践的大量需求。本研究采用“多层三明治”夹膜培养体系, 将紫云英幼苗置于其外围, 利用微孔滤膜将 AM 真菌和植物分隔, 以进行非共生的准离体培养。研究表明, 紫云英根系所产生的分泌物能够持续诱导 AM 真菌产生菌丝体和次生孢子(图 2A-2I)。相较于土壤盆栽法和培养基培养法, 添加培护植物的“多层三明治”夹膜培养体系的培养时间更短, 成本更低。

此外, 本研究发现模拟根系分泌物营养液(表 2)的处理仅有效促进了 AM 真菌的孢子萌发及菌丝分枝(图 5), 并未发现次生孢子的产生。相较于土壤中的 AM 真菌(*F. mosseae* 或 *P. occultum*), 前期研究表明, 对 AM 真菌异形根孢囊霉(*Rhizophagus irregularis*)的相同营养液处理则有效促进了次生孢子的产生^[24]。2 种 AM 真菌对模拟根系分泌物诱导所表现出的响应差异, 可能源于它们对不同外源脂肪酸、植物激素或氮源等养分的有效利用存在差异。

人工配制的模拟根系分泌物营养液无法完全复现植物根系分泌物中天然成分, 另一项实验证实了这一点^[24]。在不含活体植物的培养体系中, 仅添加提取的紫云英根系分泌物有效促进了 *R. irregularis* 的产孢。相较于模拟根系分泌物营养液的处理, 由根系分泌物诱导产生的 *R. irregularis* 次生孢子直径更大^[24]。尽管培养液诱导产生的次生孢子大小仍不如植物共生体系产生的 AM 真菌孢子, 但这些次生孢子已具备一

定的宿主植物侵染能力。这表明在非共生条件下, 提供根系分泌物和脂肪酸等营养物质能够实现土壤 AM 真菌的离体培养。

总而言之, 本研究提供了一种更简便的 AM 真菌分离培养方法, 并为 AM 真菌资源的开发与利用提供了一定的技术支撑。

4 结论

本研究表明, 在“多层三明治”夹膜培养体系中, 紫云英根系分泌物能持续诱导 AM 真菌在非共生条件下产生菌丝体和具有侵染宿主植物能力的次生孢子。本研究提供了一种在准离体条件下培养土壤 AM 真菌的简便方法, 但目前仍需要依赖活体植物为 AM 真菌生长繁殖提供所需的营养物质。因此, 亟须优化 AM 真菌培养基的营养种类及配比, 使得 AM 真菌即使在无宿主植物存在的条件下仍具有高效生产菌丝体和次生孢子的能力。不同 AM 真菌菌种对不同脂肪酸和根系分泌的生长因子等的吸收可能具有差异性, 因此, 寻找和合成适合不同土壤 AM 真菌的人工培养基将有助于创制种类更多的优质 AM 真菌菌剂。

作者贡献声明

何俊良: 数据分析、数据可视化、论文写作及编辑; 和展梅: 方案设计、试验操作、数据管理、数据可视化; 何辰辰: 试验操作、数据管理; 黄心铷: 方案设计、试验操作、数据管理; 谢贤安: 方案设计、项目管理、试验指导、论文审查及编辑。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] CHIALVA M, LANFRANCO L, BONFANTE P. The plant microbiota: composition, functions, and engineering[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2022, 73: 135-142.
- [2] GENRE A, LANFRANCO L, PEROTTO S, BONFANTE P. Unique and common traits in mycorrhizal symbioses[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(11): 649-660.
- [3] WENG WF, YAN J, ZHOU ML, YAO X, GAO AN, MA C, CHENG JP, RUAN JJ. Roles of arbuscular mycorrhizal fungi as a biocontrol agent in the control of plant diseases[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(7): 1266.
- [4] PARIHAR M, RAKSHIT A, MEENA VS, GUPTA VK, RANA K, CHOUDHARY M, TIWARI G, MISHRA PK, PATTANAYAK A, BISHT JK, JATAV SS, KHATI P, JATAV HS. The potential of arbuscular mycorrhizal fungi in C cycling: a review[J]. *Archives of Microbiology*, 2020, 202(7): 1581-1596.
- [5] SHI JC, WANG XL, WANG ET. Mycorrhizal symbiosis in plant growth and stress adaptation: from genes to ecosystems[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2023, 74: 569-607.
- [6] ZHANG L, ZHOU JC, GEORGE TS, LIMPENS E, FENG G. Arbuscular mycorrhizal fungi conducting the hyphosphere bacterial orchestra[J]. *Trends in Plant Science*, 2022, 27(4): 402-411.
- [7] BONFANTE P, GENRE A. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis[J]. *Nature Communications*, 2010, 1: 48.
- [8] TISSERANT E, MALBREIL M, KUO AL, KOHLER A, SYMEONIDI A, BALESTRINI R, CHARRON P, DUENSING N, FREY NFD, GIANINAZZI-PEARSON V, GILBERT LB, HANDA Y, HERR JR, HIJRI M, KOUL R, KAWAGUCHI M, KRAJINSKI F, LAMMERS PJ, MASCLAUX FG, MURAT C, et al. Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(50): 20117-20122.
- [9] MALAR CM, KRÜGER M, KRÜGER C, WANG Y, STAJICH JE, KELLER J, CHEN ECH, YILDIRIR G, VILLENEUVE-LAROCHE M, ROUX C, DELAUX PM, CORRADI N. The genome of *Geosiphon pyriformis* reveals ancestral traits linked to the emergence of the arbuscular mycorrhizal symbiosis[J]. *Current Biology*, 2021, 31(7): 1570-1577.
- [10] JIANG YN, WANG WX, XIE QJ, LIU N, LIU LX, WANG DP, ZHANG XW, YANG C, CHEN XY, TANG DZ, WANG ET. Plants transfer lipids to sustain colonization by mutualistic mycorrhizal and parasitic fungi[J]. *Science*, 2017, 356(6343): 1172-1175.
- [11] LUGINBUEHL LH, MENARD GN, KURUP S, van ERP H, RADHAKRISHNAN GV, BREAKSPEAR A, OLDROYD GED, EASTMOND PJ. Fatty acids in arbuscular mycorrhizal fungi are synthesized by the host plant[J]. *Science*, 2017, 356(6343): 1175-1178.
- [12] AN JY, ZENG T, JI CY, de GRAAF S, ZHENG ZJ, XIAO TT, DENG XX, XIAO SY, BISSELING T, LIMPENS E, PAN ZY. A *Medicago truncatula* SWEET transporter implicated in arbuscule maintenance during arbuscular mycorrhizal symbiosis[J]. *New Phytologist*, 2019, 224(1): 396-408.
- [13] ZHENG LS, ZHAO SP, ZHOU YF, YANG GL, CHEN A, LI XX, WANG JX, TIAN J, LIAO H, WANG XR. The soybean sugar transporter GmSWEET6 participates in sucrose transport towards fungi during arbuscular mycorrhizal symbiosis[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2024, 47(4): 1041-1052.
- [14] HILDEBRANDT U, OUZIAD F, MARNER FJ, BOTHE H. The bacterium *Paenibacillus validus* stimulates growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* up to the formation of fertile spores[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 254(2): 258-267.
- [15] KAMEOKA H, TSUTSUI I, SAITO K, KIKUCHI Y, HANDA Y, EZAWA T, HAYASHI H, KAWAGUCHI M, AKIYAMA K. Stimulation of asymbiotic sporulation in arbuscular mycorrhizal fungi by fatty acids[J]. *Nature Microbiology*, 2019, 4(10): 1654-1660.
- [16] SUGIURA Y, AKIYAMA R, TANAKA S, YANO K, KAMEOKA H, MARUI S, SAITO M, KAWAGUCHI M, AKIYAMA K, SAITO K. Myristate can be used as a carbon and energy source for the asymbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(41): 25779-25788.
- [17] 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(1): 43.
- [18] MOE LA. Amino acids in the rhizosphere: from plants to microbes[J]. *American Journal of Botany*, 2013, 100(9): 1692-1705.
- [19] SASSE J, MARTINOIA E, NORTHERN T. Feed your friends: do plant exudates shape the root microbiome?[J]. *Trends in Plant Science*, 2018, 23(1): 25-41.
- [20] ZHALNINA K, LOUIE KB, HAO Z, MANSOORI N, Da ROCHA UN, SHI SJ, CHO H, KARAOZ U, LOQUÉ D, BOWEN BP, FIRESTONE MK, NORTHERN TR, BRODIE EL. Dynamic root exudate chemistry and microbial substrate preferences drive patterns in rhizosphere microbial community assembly[J]. *Nature Microbiology*, 2018, 3: 470-480.
- [21] KUMAR GA, KUMAR S, BHARDWAJ R, SWAPNIL P, MEENA M, SETH CS, YADAV A. Recent advancements in multifaceted roles of flavonoids in plant-rhizomicrobiome interactions[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2024, 14: 1297706.
- [22] 周小勤, 黄心翎, 何俊良, 谢鸿运, 李将永, 陈辉, 唐明, 谢贤安. 高磷土壤中丛枝菌根真菌的分离鉴定[J]. *微生物*

- 物学报, 2022, 49(11): 4659-4673.
- ZHOU XQ, HUANG XR, HE JL, XIE HY, LI JY, CHEN H, TANG M, XIE XA. Isolation and identification of arbuscular mycorrhizal fungi from high phosphate soils[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(11): 4659-4673 (in Chinese).
- [23] 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).
- [24] 谢贤安, 黄心铷, 范晓宁, 唐明, 陈辉. 一种利用豆科植物根系分泌物诱导AM真菌离体产生菌丝体和次生孢子的培养方法: CN202310623580.9[P]. 2024-04-12.
- XIE XA, HUANG XR, FAN XN, TANG M, CHEN H. A culture method for inducing the production of mycelium and secondary spores from AM fungi in isolation using legume root secretions: CN202310623580.9[P]. 2024-04-12.
- [25] TROUVELOT A, KOUGH J L, GIANINAZZI-PEARSON V. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. In *Recherche de methods d'estimation ayant une signification fonctionnelle*[M]. Paris, France: INRA Press, 1986: 217-221.
- [26] XIE XA, LIN H, PENG XW, XU CR, SUN ZF, JIANG KX, HUANG AT, WU XH, TANG NW, SALVIOLI A, BONFANTE P, ZHAO B. Arbuscular mycorrhizal symbiosis requires a phosphate transceptor in the *Gigaspora margarita* fungal symbiont[J]. *Molecular Plant*, 2016, 9(12): 1583-1608.
- [27] SCHWARZOTT D, SCHÜBLER A. A simple and reliable method for SSU rRNA gene DNA extraction, amplification, and cloning from single AM fungal spores[J]. *Mycorrhiza*, 2001, 10(4): 203-207.
- [28] LEE J, LEE SS, PETER W YOUNG J. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 65(2): 339-349.
- [29] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [30] GILMORE AE. Phycomycetous mycorrhizal organisms collected by open-pot culture methods[J]. *Hilgardia*, 1968, 39(4): 87-105.