

丛枝菌根(AM)对根瘤菌趋化作用研究

贾永² 宋福强^{1*}

(1. 黑龙江大学生命学院微生物重点实验室 哈尔滨 150080)

(2. 浙江林学院林业与生物技术学院 临安 311300)

摘要: 对紫穗槐非接种(AM⁻Rh⁻)、单接种根瘤菌(Rh⁺)、单接种 AM 真菌(AM⁺)和双接种(AM⁺Rh⁺)处理, 研究 AM 真菌、根瘤菌对宿主植物紫穗槐侵染情况, 并采用经过改良的根部微生物趋化试验手段研究 AM 真菌侵染根系后分泌物对根瘤菌的趋化性。实验结果表明: 在接种 AM⁺+Rh⁺情况下, 使宿主先于 AM⁺、Rh⁺处理形成根瘤, 且双接种能够显著提高菌根侵染率; 在共生体形成期间, AM 真菌与根瘤菌之间存在着识别互动反应和一定的信号物质, 接种 AM 真菌对根瘤菌有正趋化作用; 同时, 外界温度对 AM 真菌-宿主植物-根瘤菌三者共生体初始信号识别也起到一定的调控作用。

关键词: 丛枝菌根真菌, 根瘤菌, 根系分泌物, 趋化作用

The Chemotaxis of Arbuscular Mycorrhizal to Rhizobia

JIA Yong² SONG Fu-Qiang^{1*}

(1. Key Laboratory of Microbiology, Life Science School of Heilongjiang University, Harbin 150080)

(2. Forest and Biotechnology School of Zhejiang Forest College, Lin'an 311300)

Abstract: Through the study of symbiosis of AMF (Arbuscular mycorrhizal fungi)-*Amorpha fruticosa*, the infection sequence, the infection rates and the chemotaxis between AMF and rhizobia had been determined. The diversity of infection between AMF and rhizobia in time-space under the inoculation conditions of mon-inoculation (AM⁺) and dipl-inoculation (AM⁺+Rh⁺) was investigated and the relationship between AMF and rhizobia in the chemotaxis test was studied. The results suggested that there were some signals between AMF and rhizobia and there existed auxoaction in coordination during the formation of symbiosis. The chemotaxis between the root-exudates and rhizobia under the inoculation conditions of AM⁻+Rh⁻, AM⁺ and AM⁺+Rh⁺ in 25°C, 28°C, 31°C showed that the surrounding conditions (temperature) in rhizosphere have some effects on the regulation of incipient identification signals in the tri-symbiosis of AMF-host-rhizobia.

Keywords: Arbuscular mycorrhizal fungi, Rhizobia, Root exudates, Chemotaxis

微生物与植物共生(Symbiosis)是自然界中普遍存在的一种生物学现象, 其中对菌根真菌与植物根

系建立的互惠共生体-菌根、根瘤菌与相应的豆科植物形成的互惠共生体-根瘤, 一直是近年来共生生态

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30571493); 黑龙江省自然科学基金项目(No. C2007-08); 黑龙江省普通高等学校青年学术骨干支持计划项目(No. 1152G029); 哈尔滨市科技创新人才研究专项资金优秀学科带头人项目(No. 2007RFXXN047); 博士后研究人员落户黑龙江科研启动资金项目(No. LBH-Q0615)

* 通讯作者: ☒: 0431sfq@163.com

收稿日期: 2007-12-24; 接受日期: 2008-03-14

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

学的一个研究热点^[1,2]。而在一些豆科植物中, AM 真菌-豆科植物-根瘤菌三者形成的共生体是微生物与植物共生的一种特殊类型。但到目前为止, 国内外对“AM 真菌-宿主植物-根瘤菌”之间关系的研究都只是停留在对其现象上的描述和营养生理分析^[3], 关于菌根真菌、根瘤菌对宿主植物侵染的时间变化, 共生体识别过程中的影响因子, 二者间的信号物质及趋化作用的研究到目前为止还未有全面报道。

细菌的趋化作用就是指运动性细菌对其生长环境中存在的化学物质的浓度梯度所作出的趋向(正趋化)或远离(负趋化)该化学物质的反应。本研究通过对 AM 真菌-木本豆科植物紫穗槐-根瘤菌三者之间联合共生体模式系统的研究来探讨菌根真菌、根瘤菌对宿主植物侵染的时间变化, 并利用“根部微生物趋化试验手段”分析共生体识别阶段接种 AM 真菌对根瘤菌的趋化性及外界温度对共生体识别的影响, 目的是为了揭示 AM 真菌与根瘤菌之间的趋化关系、二者共生体形成早期信号物质的存在与否及外界温度对其共生体初始信号物质的识别是否有调控作用, 为今后共生体初始识别信号的研究提供一些方法, 认识其共生现象的普遍性与特殊性, 为其共生理的研究奠定一定的理论基础。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

供试 AM 真菌为摩西球囊霉(*Glomus mosseae*, GM), 该菌剂孢子含量为 1630 个孢子/20 mL, 由北京市农林科学院植物营养与资源研究所提供; 供试植株紫穗槐苗木种子由吉林省林业科学研究院提供; 供试根瘤菌菌株(*Mesorhizbium amorphae*) 来自中国农业大学。

1.2 研究方法

1.2.1 苗木培养: 紫穗槐种子消毒(20 ~30 的温水搓洗后用 0.3% KMnO₄ 浸泡 3 h~4 h)和催芽(20 ~30 温水中浸泡 24 h, 隔天换水 1 次); 然后将草碳土、细沙、蛭石按 2:2:6 的比例装入锡纸做成的灭菌容器中, 0.1 MPa 高压蒸汽灭菌 2 h, 用牛皮纸包起, 自然晾干。随后, 对灭菌后的土壤做如下处理:

(1) 不接种土壤: 灭菌后未做任何处理的混和土壤。

(2) 单接种 AM 真菌土壤: 在灭菌后的混和土

壤中按每千克加入 1 mL 摩西球囊霉(*Glomus mosseae*, GM)菌剂, 混和均匀。

(3) 单接种根瘤菌土壤: 在灭菌后的混和土壤中按每千克加入 1 mL 根瘤菌菌液, 喷洒混和均匀。

(4) 双接种土壤: 在灭菌后的混和土壤中按每千克加入 1 mL 摩西球囊霉(*Glomus mosseae*, GM)菌剂和 1 mL 根瘤菌菌液, 混和均匀。

将催芽后紫穗槐种子种植在处理后的土壤中, 对其不接种、单接种和双接种得到如下品系: 非接种植株(AM⁻+Rh⁻)、单接种 AM 真菌植株(AM⁺)、单接种根瘤菌植株(Rh⁺)、双接种植株(AM⁺+Rh⁺), 作为研究材料。

1.2.2 AM 真菌、根瘤菌对宿主的侵染顺序及 AM 真菌侵染率的测定: 在紫穗槐出苗后每隔 1 周取样, 对样根进行观察、处理, 将洗净的紫穗槐根段切成长度为 1 cm, 放入装有 10 mL 10% KOH 的试管内, 于沸水中加热、透明 30 min, 水洗后加入 5 mL 2% HCl 溶液中和 5 min, 再用蒸馏水清洗, 加入乳酸酸性品红溶液置于 90 °C 下水浴 30 min 进行染色, 然后用乳酸甘油脱色, 经多次清洗后取样镜检。在苗木生长的不同时期取样观察、分析 AM 真菌和根瘤菌在侵染根部过程中的相互关系, 根据 Trouvelot 法计算菌根侵染率并对其根部出现根瘤情况进行观察^[3]。

1.2.3 AM 真菌对根瘤菌的趋化性的研究: 越来越多的证据表明在 AM 真菌菌丝分枝期间, 共生体各个成员之间开始初始信号识别, 是初始识别信号最活跃的时期^[4]。通过对宿主植物根部进行品红染色, 利用倒置荧光显微镜对植物根围的菌丝体及 AM 真菌侵染率的观察, 确定在紫穗槐出苗后 15 d 菌丝体开始出现分枝, 共生体进入初始信号识别阶段, 对此时土壤中根部和菌物分泌物进行收集: 分别取出 100 g (AM⁻+Rh⁻, AM⁺, AM⁺+Rh⁺) 植株根际土壤, 用 500 mL 80% 的乙醇进行溶解, 将混合物放入 70 °C 的恒温水浴锅中, 充分溶解 3 h, 使土壤中的信号物质充分溶解, 将上层液体用化学分析定性滤纸进行过滤, 并将所得的滤液用 0.22 μm 微孔滤膜抽滤(微孔滤膜提前 1 d 在 70 °C 水浴锅中放置 24 h), 保留抽滤液, 再将抽滤液用真空旋转蒸发器在 40 °C 下由 500 mL 浓缩至 10 mL, 放入-20 °C 冰箱中保存备用。

利用毛细管法对 AM 真菌与根瘤菌之间趋化性

进行研究^[5,6]: 分别取 AM^-+Rh^- 、 AM^+ 和 AM^++Rh^+ 处理的苗木根围分泌物, 在超净台内利用细菌滤器进行灭菌处理; 取试验用的根瘤菌菌株, 在灭菌玻璃容器内制备根瘤菌悬浮液; 将毛细吸管内装满根系分泌物, 用毛细微管方法测定根瘤菌对接种和非接种 AM 真菌苗木根部分泌物的趋化性。

毛细管法 将毛细管(5 cm)5 个一束连接在一起, 让毛细管一端浸入土壤提取液中(AM^-+Rh^- 、 AM^+ 、 AM^++Rh^+), 待浸满根系分泌物后将另一端浸入石蜡中, 封口; 用微量移液器取 13 mL 根瘤菌菌液(600 nm, 0.764)放入灭菌后的试管中, 将毛细管束放入试管中, 封口端露出液面 2 cm, 然后加塞, 并用石蜡将试管开口端封闭。分别放置在适宜根瘤菌生长的 25、28、31 条件下, 待测。随后, 隔两天对毛细管中的根瘤菌数目进行活菌计数, 利用活菌计数法对 AM 与根瘤菌间趋化现象进行定量测定: 取出一组 AM^-+Rh^- 、 AM^+ 、 AM^++Rh^+ 试管对照品, 分别将毛细管取出, 用无菌水将毛细管外壁菌液冲洗干净; 然后在灭菌后的研钵中将毛细管打碎研磨, 用无菌水冲洗研钵后并将其定容至 100 mL 的容量瓶中, 进行梯度稀释至 10^{-2} 浓度, 吸取 10^{-2} 浓度稀释液 0.2 mL 于 YMA 培养基(甘露醇 10 g、酵母粉 3 g、磷酸氢二钾 0.25 g、磷酸二氢钾 0.25 g、蒸馏水 1000 mL、pH 值 6.8~7.2)上, 涂布均匀后将培养皿倒置放入 28 培养箱中进行培养。

1.3 数据处理

对获得的数据采用 SPSS version 10.0 统计软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 AM 真菌与根瘤菌对宿主的侵染顺序、菌根侵染率及根瘤变化

2.1.1 菌物侵染顺序: 在播种后 15 周内, AM^-+Rh^- 、 Rh^+ 、 AM^+ 和 AM^++Rh^+ 四种处理条件下, 都没有出现根瘤; 在第 16 周, AM^++Rh^+ 的处理条件下紫穗槐植株根部首先出现根瘤; 在第 19 周, Rh^+ 处理条件下的紫穗槐植物根部出现根瘤, 其间 AM^+ 和 AM^-+Rh^- 处理条件下的植株根部都没有根瘤生成; 同时发现 AM 真菌在 AM^+ 情况下要比 AM^++Rh^+ 情况下先侵染宿主植物, 其菌根形成先后顺序: AM^+ AM^++Rh^+ ; 在第 9 周后 AM^++Rh^+ 的菌根侵染率增

加, 显著高于 AM^+ 的菌根侵染率。实验中 AM^-+Rh^- 处理没有出现根瘤及菌根侵染情况, 表明土壤基质灭菌彻底, 没有残留土著 AM 真菌和根瘤菌。

2.1.2 菌根侵染率: 制作根切片镜检, 根据 Trouvelot 法计算出不同时间条件下单接种(AM^+)、双接种(AM^++Rh^+)两种情况下 AM 真菌对宿主植物的菌根侵染率变化。

从图 1 可以看出: 在 9 周内 AM^++Rh^+ 的菌根侵染率要略低于 AM^+ 种的菌根侵染率; 但在第 9 周至第 15 周之间 AM^++Rh^+ 的菌根侵染率增加, 显著高于 AM^+ 种的菌根侵染率。可见, 在双接种(AM^++Rh^+)的情况下, 可以明显促进其宿主植物的菌根侵染率, 由此可以推测, 在 AM 真菌和根瘤菌之间存在着识别互动的过程, 识别后二者间可产生协同增效作用。

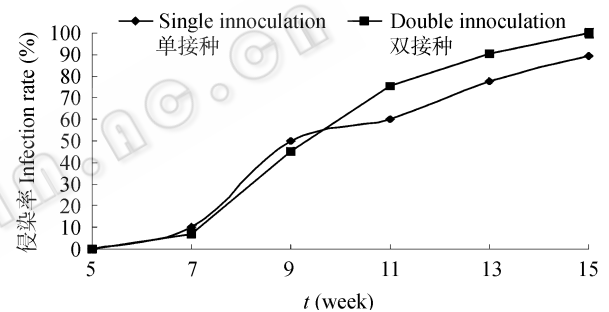


图 1 单接种(AM^+)和双接种(AM^++Rh^+)对宿主植物的菌根侵染率变化曲线

Fig. 1 The mycorrhiza infection rate of host under mon-inoculation (AM^+) and di-pl-inoculation (AM^++Rh^+)

2.2 AM 真菌对根瘤菌的趋化性

利用毛细微管法测定 AM^-+Rh^- 、 AM^+ 和 AM^++Rh^+ 苗木的根部提取物对根瘤菌的趋化性, 将 3 种处理条件下的趋化实验装置分别置于不同温度(25、28、31)条件下, 在不同时间分别进行根瘤菌菌落数的定量测定。

由图 2、3、4 可知, 25、28 和 31 的 AM^++Rh^+ 处理条件下, 在试验初期对根瘤菌的诱导效果要略低于 AM^+ 和 AM^-+Rh^- 的处理, 但在 9 d 左右其诱导效果开始高于 AM^+ , 在 21 d 左右 AM^+ 和 AM^++Rh^+ 根瘤菌数都在达到最大值后逐步趋于稳定, 且都显著高于 AM^-+Rh^- 的处理。进一步表明, 在 AM 真菌与根瘤菌之间确实存在着相互作用, 彼此间有一个识别互动过程。

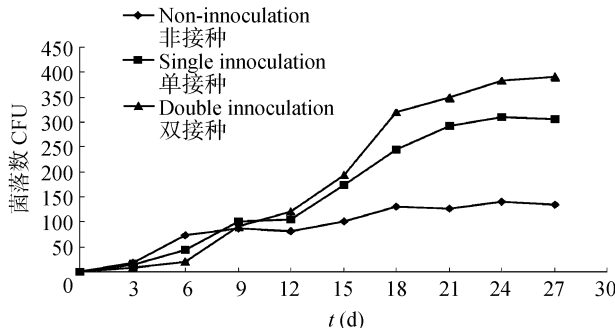


图 2 25℃培养条件下 AM⁻+Rh⁻、AM⁺、AM⁺+Rh⁺的菌落数变化曲线

Fig. 2 The colony number of AM⁻+Rh⁻、AM⁺、AM⁺+Rh⁺ under 25

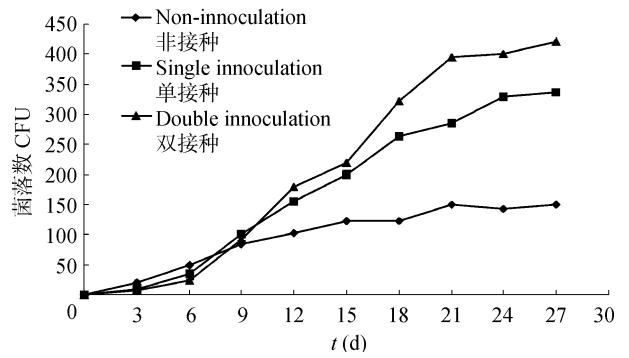


图 4 31℃培养条件下 AM⁻+Rh⁻、AM⁺、AM⁺+Rh⁺的菌落数变化曲线

Fig. 4 The colony number of AM⁻+Rh⁻、AM⁺、AM⁺+Rh⁺ under 31℃

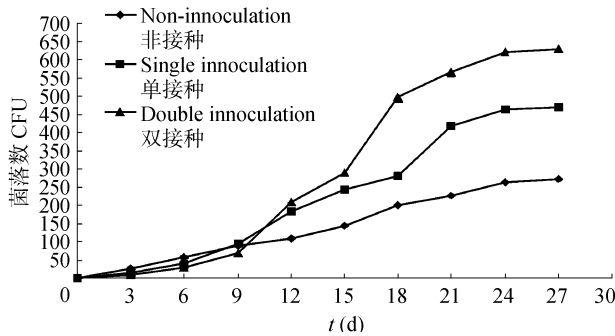


图 3 28℃培养条件下 AM⁻+Rh⁻、AM⁺、AM⁺+Rh⁺的菌落数变化曲线

Fig. 3 The colony number of AM⁻+Rh⁻、AM⁺、AM⁺+Rh⁺ under 28℃

从表 1 中数据可以看出, 在 31 的处理条件下, 单接种 AM 真菌(AM⁺)、双接种(AM⁺+Rh⁺)两种情况的菌落数与 25 处理条件下的菌落数在不同时期取样测定的结果表现出的差异不明显; 而在 28 的处理条件下, 在第 9 天后这两种情况的菌落数都显著多于在 25 和 31 处理条件下的菌落数, 且在 28 处理条件下(AM⁺、AM⁺+Rh⁺)对根瘤菌的诱导性要分别先于 25 和 31 处理条件下(AM⁺、AM⁺+Rh⁺)对根瘤菌的诱导性。这表明外界温度对 AM 真菌-宿主植物-根瘤菌三者共生体初始识别信号的调控也起到一定的作用。

表 1 不同温度条件下 AM⁺和 AM⁺+Rh⁺处理的菌落数
Table 1 The colony numbers of AM⁺+Rh⁺ and AM⁺ under different temperatures

处理 Treatment		Time(d)									
		0	3	6	9	12	15	18	21	24	27
AM ⁺	25	0	13 ± 1b	44 ± 2a	100 ± 2a	104 ± 3c	174 ± 3b	244 ± 6b	292 ± 11b	310 ± 5b	306 ± 10c
	28	0	15 ± 3a	40 ± 3a	94 ± 6a	182 ± 4a	244 ± 5a	280 ± 3a	417 ± 16a	464 ± 10a	469 ± 13a
	31	0	10 ± 2b	35 ± 2a	100 ± 1a	156 ± 3b	200 ± 7b	263 ± 9b	285 ± 13b	330 ± 8b	337 ± 9b
AM ⁺ +Rh ⁺	25	0	7 ± 1b	20 ± 2a	90 ± 5a	120 ± 9c	194 ± 3b	319 ± 10b	350 ± 9c	383 ± 12b	390 ± 8b
	28	0	10 ± 1a	26 ± 3a	70 ± 8b	210 ± 5a	290 ± 9a	498 ± 8a	566 ± 6a	620 ± 9a	629 ± 15a
	31	0	7 ± 0.8b	23 ± 2a	91 ± 4a	180 ± 7b	220 ± 7b	322 ± 11b	396 ± 8b	400 ± 13b	420 ± 6b

注: 表中的数值为平均值 ± 标准误; 同列不同小写字母表示 AM⁺或 AM⁺+Rh⁺的处理在不同温度条件下相同培养时间内出现的菌落数存在显著差异

Note: The data in the table indicates means ± SE (n=3); The different small letters in the same column indicate that the colony numbers were significant differences (P<0.05) when incubated under different temperatures of the same time with AM⁺ or AM⁺+Rh⁺ treatment.

3 讨论

试验过程中采用根部微生物趋化试验手段, 对毛细管法作了进一步的完善, 得到了一套简便、适

用的信号物质和趋化性研究的方法, 对 AM 真菌作用下根系分泌物对根瘤菌的趋化性进行体外验证。根据实验结果可以推测在 AM 真菌-宿主植物-根瘤菌共生体系建立期间, AM 真菌与根瘤菌之间可

能存在着一定的信号物质, 彼此之间有一个识别互动过程, 在识别前, 两种菌物彼此之间存在着拮抗作用; 而在识别后, 二者开始产生协同促进作用; 在不同接种条件下, AM 真菌分泌物对宿主植物根瘤的形成具有促进作用, 对根瘤菌呈现正趋化作用。而 Oldroyd 和 Endre 等在相关的研究中也发现, 结瘤因子诱导信号途径与由 AM 真菌所分泌的信号分子诱导途径是部分共享的^[7], 根瘤菌可以感知由 AM 真菌所分泌的信号分子的存在^[8,9], 且接种 AM 真菌的植株根瘤数要多于不接种 AM 真菌处理^[3,8,10], AM 真菌对根瘤菌侵染植物有促进作用^[11-13], 同时也发现不仅仅是环境中的 pH 值对结瘤因子及共生体的建立有着显著的影响, 外界温度对二者间的信号识别过程也可能有一定的调控作用^[14], 本研究结果进一步证实了这一推论(图 2、3、4 及表 1)。

本实验只是对 AM 真菌与根瘤菌之间的信号物质以及趋化特性进行了初步的研究, 证实了二者间信号物质的存在及趋化特性。但对 AM 真菌与根瘤菌共生体的基础性研究仍然需要进一步的研究: (1) AM-根瘤菌趋化过程中的信号物质, 信号的级联放大及信号转导途径^[15]; (2) 已经表明 AM 真菌和根瘤菌双接种对于豆科植物的生长、抗逆性等都有积极的效果^[16], 但在实际情况下, 很多其它的生物与非生物因素都限制着这一共生体的形成及其功能的发挥, 这些因素也都限制了对它的普遍应用^[17], 因此, 这些因素对 AM-根瘤菌间的趋化性、共生体系中的信号识别及形成的影响也将是一个研究热点。

参 考 文 献

[1] Quatrini P, Scaglione G, Incannella G. Microbial inoculants on woody legumes to recover a municipal landfill site. *Water Air Soil Poll*, 2003, **3**: 189-199.
 [2] 赵丹丹, 李涛, 赵之伟. 丛枝菌根真菌-豆科植物-根瘤菌共生体系的研究进展. *生态学杂志*, 2006, **25**: 327-333.
 [3] 董昌金. 根瘤菌与 AM 真菌双接种对大豆植株生长的影响. *湖北农业科学*, 2004, **5**: 41-43.
 [4] Kohki Akiyama, Ken-ichi Matsuzaki, Hideo Hayashi.

Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 2005, **435**: 824-827.
 [5] Sushma GS. Chemotactic response of plant-growth-promoting bacteria towards roots of vesicular-arbuscular mycorrhizal tomato plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, **45**: 219-227.
 [6] 赵大君, 郑师章. 凤眼莲根分泌物氨基酸组分对根际肠杆菌属 F₂ 细菌的趋化作用. *应用生态学报*, 1996, **7**: 207-212.
 [7] Endre G, Kereszt A, Kevei Z. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature*, 2002, **417**: 962-966.
 [8] Oldroyd GED. Nodules and Hormones. *Science*, 2007, **315**: 52-53.
 [9] Harro J, Bouwmeester, Christophe Roux, et al. Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *TRENDS in Plant Science*, 2007, **12**: 5-12.
 [10] 董昌金, 赵斌. 丛枝菌根真菌与根瘤菌互作及类黄酮对互作效果的影响. *应用生态学报*, 2004, **15**: 1585-1588.
 [11] Rosa M, Tobar, Juan Sanjufm. Impact of a genetically modified *Rhizobium* strain with improved nodulation competitiveness on the early stages of arbuscular mycorrhiza formation. *Applied Soil Ecology*, 1996, **4**: 15-21.
 [12] Philippe R, Fabienne M, Patrice L. Molecular basis of symbiotic host specificity in rhizobium meliloti: nodH and nodPQ genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. *Cell*, 1991, **67**: 1131-1143.
 [13] Antunes PM, Rajcan I, Goss MJ. Specific flavonoids as interconnecting signals in the tripartite symbiosis formed by arbuscular mycorrhizal fungi, *Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner) Jordan and soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Soil Biol Biochem*, 2006, **38**: 533-543.
 [14] Cooper JE. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, **5**: 1-5.
 [15] Brendan RK, Jean-Michel A, Varma PR. Genetic and genomic analysis in model legumes bring Nod-factor signaling to center stage. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, **7**: 408-413.
 [16] 杨瑞红, 原永兵, 刘润进. 水杨酸在 AM 真菌侵染和诱导植物抗病性中的作用. *菌物学报*, 2005, **24**: 606-611.
 [17] 宋福强, 杨国亭, 孟繁荣. 丛枝菌根(AM)真菌对苗木根系的影响. *南京林业大学学报*, 2005, **29**: 35-39.