

微生物帮助烟草抗旱的机理及其应用

黄化刚¹ 吕立新² 张艳茗² 姜 壮² 申 燕¹ 安千里^{2*}

(¹贵州省烟草公司毕节市公司, 贵州毕节 551700; ²浙江大学生物技术研究所, 杭州 310058)

摘 要 干旱是中国烟草种植业面临的较为严重的非生物胁迫.很多与植物共生或联合的根际微生物能帮助植物避旱和耐旱.微生物能通过菌丝吸水并转运到植物,通过产生植物激素或改变植物内源激素的平衡来促进根发育和伸长,或诱导叶片关闭气孔,促进根吸水和减少叶片散失水分来避旱.微生物能通过调整不同激素介导的信号通路,诱导植物产生系统抗逆性,促进植物细胞产生渗透保护剂、抗氧化物和活性氧清除剂而耐旱.微生物还能帮助植物吸收营养,以支持植物在干旱胁迫下的代谢和生长.本文关注丛枝菌根真菌、模式内生真菌印度梨形孢和根际促植物生长细菌帮助烟草和番茄等植物抗旱的机理,探讨如何在烟草育苗和栽培中应用有益微生物来帮助烟草抗旱.

关键词 AM 真菌; 印度梨形孢; 根际促植物生长细菌; ACC 脱氨酶; 微生物组

Microbe-assisted drought resistance for tobacco plants: Mechanisms and applications.

HUANG Hua-gang¹, LYU Li-xin², ZHANG Yan-ming², JIANG Zhuang², SHEN Yan¹, AN Qian-li^{2*} (¹*Bijie Tobacco Company of Guizhou Province, Bijie 551700, Guizhou, China*; ²*Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China*).

Abstract: Drought is one of the most destructive abiotic stresses to tobacco farming in China. Many microbes in symbiosis or association with plant roots are able to help plant to avoid and tolerate drought stress. Microbes absorb water via mycelia and transport water to plant hosts; microbes produce plant hormones or change plant endogenous hormones to promote root development and elongation or leaf stomatal closure, leading to drought avoidance via increase of water absorption and decrease of water loss. Microbes modulate plant signal transduction pathways mediated by different plant hormones to induce plant systemic tolerance to abiotic stresses via accumulation of osmoprotectants, antioxidants, and scavengers of reactive oxygen species. Microbes also help plant hosts to absorb nutrients and thus support plant metabolism and growth under drought stress. This paper reviewed the mechanisms of microbe-assisted plant resistance to drought stress based mainly on the studies on tobacco and tomato plants inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi, the model endophytic fungus *Piriformospora indica*, and plant growth-promoting rhizobacteria. This paper also discussed the use of these beneficial microbes to promote tobacco resistance to drought stress for tobacco farming.

Key words: arbuscular mycorrhizal fungi; *Piriformospora indica*; plant growth-promoting rhizobacteria; 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase; microbiome.

随着全球变暖和人口增长,淡水资源相对短缺,干旱成了当前农作物生长最重要的环境胁迫因子.植物抗旱的机制包括避旱和耐旱.避旱主要通过增

加根冠比,形成深密的根系促进水分吸收,缩小叶面积、关闭气孔、增加叶角质层的厚度等方式减少水分损失.耐旱通过植物细胞积累渗透调节物质来调节细胞渗透压,维持细胞水分和膨压;通过细胞产生抗氧化物和活性氧清除剂,清除活性氧,维持细胞膜的完整性.耐旱过程中,植物细胞经历对干旱胁迫的信号感应、信号转导放大和基因表达,涉及转录因子和蛋白激酶等很多胁迫相关蛋白,分子水平的调控最

本文由贵州省烟草公司毕节市公司科技项目(BJYC-201309)和浙江省自然科学基金项目(LY14C010002)资助 This work was supported by the Bijie Tobacco Company of Guizhou Province (BJYC-201309) and Natural Science Foundation of Zhejiang Province, China (LY14C010002).

2017-01-04 Received, 2017-05-19 Accepted.

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: an@zju.edu.cn

终会降低植物呼吸水平,延缓生长.植物遗传学和蛋白质组学研究发现了成百上千个数量性状位点和基因或蛋白能够响应干旱胁迫,显示了植物抗旱机制的复杂性和多样性,以及通过常规育种或分子育种产生抗旱作物的难度^[1].

植物激素在植物响应干旱胁迫过程中起调控作用,脱落酸(ABA)、乙烯和茉莉酸等抑制植物生长的植物激素是植物响应干旱的正调控信号,在干旱时增加;而生长素、细胞分裂素和赤霉素等促进生长的植物激素是负调控信号,在干旱时减少^[2].ABA是植物响应胁迫的信号转导通路中最重要的植物激素^[3].植物根系感受到干旱胁迫后,产生的ABA通过木质部运送到叶片,被叶片的保卫细胞识别,经信号转导调控气孔开闭和耐旱相关基因表达,导致植物代谢活动减弱^[3].植物由几十个调节蛋白负责响应ABA,分级多层次地调控上千个基因表达所形成的网络,调控植物对干旱等胁迫的响应^[4].

植物根系向根际释放碳氮源和次生代谢物为众多微生物提供营养并选择塑造根际微生物群落^[5].根际微生物群落的宏基因组或微生物组被认为是植物的第二基因组^[5].根际微生物对植物营养、健康和适应环境有重要作用,其中有些与植物共生或联合的微生物能帮助作物避旱或耐旱.

烟草叶片大,需水多,耗水量大,对水分亏缺敏感.目前中国大规模种植烟草的育苗方式以漂浮育苗为主.漂浮烟苗的根系为水生根,移栽到田间后要转化为旱生根,转化期间对干旱敏感.而且,中国大部分烟草产区在烟苗移栽时正值旱季,水分供应和烟苗的抗旱能力是烟苗移栽存活和烟叶产量与品质的重要限制因素.另外,作为中国烟草主产区的西南地区属喀斯特岩溶生态系统,地表缺水,烟草在整个生长期常面临干旱胁迫.因此,干旱是中国烟草种植业面临的重要非生物胁迫,在生产上急需提升烟草栽培综合抗旱技术,除了适时适度灌溉烟田,通过分子育种产生抗旱高产的烟草新品种,还应重视利用微生物帮助烟草抗旱,在栽培管理上整合有益微生物的作用.

烟草是研究植物与病原微生物互作的模式植物之一,但目前对烟草与有益微生物互作机理的研究较少,关于微生物帮助烟草抗旱的研究很少.本文关注对烟草和另一茄科作物番茄的研究,整理了丛枝菌根(arbuscular mycorrhiza, AM)真菌、模式内生真菌印度梨形孢(*Piriformospora indica*)和根际促植物生长细菌帮助植物抗旱的机理,在了解有益微生物

帮助植物抗旱机理的基础上,探讨如何在烟草育苗和栽培中应用有益微生物,帮助烟草抗旱.

1 AM 真菌

AM 真菌与 80% 以上的现存陆生植物共生^[6].它们在从寄主植物获取营养物质的同时,能帮助寄主植物吸收水分、矿质营养和抗逆.而 AM 真菌与已灭绝的早期植物共生,在植物从水生环境到陆生环境的变迁和适应陆生环境的进化过程中发挥了重要作用^[7].很多论著阐述了 AM 真菌与植物共生帮助植物适应逆境的机理和在作物生产上的应用前景^[8-10].

1.1 AM 真菌帮助植物抗旱的机理

1.1.1 AM 真菌帮助植物吸水 AM 真菌的根外菌丝能帮助植物根系从低水势的土壤中吸水而避旱^[8].水在干旱的土壤中多存留在细小的孔隙中,而 AM 真菌菌丝的直径(2~20 μm)通常比根毛直径小,根外菌丝能进入根和根毛不能触及的孔隙,扩大了根的吸水范围和吸收表面积,减少了土壤中的气隙,维持了土壤的导水率^[8,11].AM 真菌吸收的水分要转运到植物细胞,可能需要动员真菌和植物细胞的水通道蛋白.水通道蛋白在细胞质膜和内膜上,调控水分子顺水势被动运输.干旱引起菌根中 AM 真菌的水通道蛋白基因表达上调^[12-13].在无菌根中,干旱总体上下调植物水通道蛋白基因的表达,降低膜的透水性,防止水分散失^[14].而在菌根中,AM 真菌对植物不同亚家族水通道蛋白基因表达的影响则复杂得多.如在玉米菌根中,在不同水分条件下,水通道蛋白基因中的 16 个基因表现出 6 种表达模式:在短期干旱下,菌根可能比无菌根获得更多的水分,AM 真菌上调多数玉米水通道蛋白基因的表达,促进这些水通道蛋白参与的生理过程.在长期干旱下,菌根可获得的水资源受限,AM 真菌仅上调少数水通道蛋白基因的表达,下调部分水通道蛋白基因的表达,限制多数水通道蛋白参与的生理过程^[14].水通道蛋白不仅运输水分子,还能运输 NH_3 或 NH_4^+ 和尿素,以及 H_2O_2 、甘油、类金属 B 和 Si 等.AM 真菌调节水通道蛋白基因表达可能不仅调节菌根的水分状况,还有更复杂的作用^[14].

1.1.2 AM 真菌帮助植物吸收矿质营养 AM 真菌的根外菌丝在帮助植物吸水的同时也帮助植物吸收 P、N、K、S、Zn、Ca、Fe、Mg 和 Cu 等矿质营养^[11,15-16].在干旱条件下,土壤失水降低矿质元素的流动性,而且植物吸收和同化矿质的能力下降.而 AM 真菌的

根外菌丝不仅扩大了根吸收土壤矿质的范围,而且在提高根导水率的同时也提高了矿质的流动性,利于根吸收矿质营养.AM 真菌尤其能帮助植物获取 P,因为菌丝吸收 P 的速率比根毛高几倍^[11,15].菌丝分泌的乙酸和柠檬酸等有机酸能溶解土壤中的难溶磷酸盐,菌根和菌根周围土壤中高的酸性磷酸酶活性也能提高有效 P 的量^[11,15].AM 真菌通过诱导提高植物硝酸还原酶、谷氨酰胺合酶和谷氨酸合酶等的活性,提高植株对 N 的吸收和利用效率,改善植物营养状况^[11].

1.1.3 AM 真菌减弱植物受活性氧伤害 植物遭受胁迫会产生活性氧,如 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 、 $HO\cdot$ 和 1O_2 ,能氧化破坏蛋白、核酸和脂类.胁迫早期产生的活性氧也是植物响应胁迫的信号分子.过量的不能被抗氧化物清除的活性氧则对细胞产生次生氧化胁迫.植物具有酶类和非酶类的抗氧化物,以避免活性氧伤害是植物抗逆的重要机制.AM 真菌帮助植物吸水可阻止或减缓叶片脱水,避旱或降低受旱的程度,产生比无菌根植物较少的活性氧.同时,AM 真菌帮助植物吸收矿质营养,而超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和抗坏血酸氧化酶等抗氧化酶都是金属酶,菌根植物在遭受胁迫时能获得比无菌根植物较多的金属元素,从而维持较高的抗氧化酶活性,清除较多的活性氧.而且,AM 真菌也能诱导植物产生比无菌根植物更多的抗氧化酶^[17] 和非酶抗氧化物^[18],清除较多的活性氧,遭受较弱的氧化胁迫,使菌根植物表现得比无菌根植物更抗逆.

1.1.4 AM 真菌影响植物的渗透调节 干旱条件下土壤水势降低,植物细胞需要通过积累渗透调节物质来降低水势,避免细胞脱水和维持根从土壤吸水的水势梯度.AM 真菌帮助植物吸收水分和营养,使得菌根植物比无菌根植物受干旱的束缚少,在低度干旱条件下,地上部能维持正常的光合作用和呼吸代谢,持续为根部和 AM 真菌提供碳源,维持菌根的生长,也能合成较多的渗透调节物质,如蔗糖、甘露醇、脯氨酸和甜菜碱,帮助植物在持续干旱下耐旱.

对干旱条件下菌根的渗透调节研究较多的是脯氨酸的合成与积累.有研究发现,菌根比无菌根积累更多的脯氨酸,有的研究结果则相反.原因可能是不同研究中植物经受的干旱程度不同,不同植物响应不同程度干旱和不同 AM 真菌的机制有差异,植物的营养状况不同,植物根和地上部渗透调节的程度有差异.植物细胞积累脯氨酸主要靠从头合成.具有 γ -谷氨酰激酶活性和谷氨酸- γ -半醛脱氢酶活性的

Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸合成酶 (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase, P5CS) 是脯氨酸合成的限速酶^[19].在烟草中通过表达 P5CS 基因能够增加脯氨酸的合成和积累,提高转基因烟草耐受渗透胁迫的能力^[20].P5CS 基因的表达受 AM 真菌和干旱的双重诱导,且与组织特异性和干旱胁迫时间有关^[21].这也使得脯氨酸参与菌根在干旱胁迫下渗透调节的表现多样.

1.1.5 AM 真菌调节植物激素平衡 植物通过调整体内植物激素的平衡来调节植物与 AM 真菌共生及增强菌根的抗旱能力^[22-25].调节的方式包括:1) 植物激素参与调控 AM 真菌的侵染、定殖、形成丛枝结构及建立菌根共生;2) 植物激素调整光合产物流向菌根,从而调控菌根的生长;3) 植物激素调控菌根对胁迫的响应.

烟草在受旱早期,主要通过释放束缚型 ABA 来响应干旱,转导信号;在干旱持续和加剧情况下,烟草通过合成新 ABA 来调控激素平衡.ABA 主要由烟草根部合成,通过木质部导管和韧皮部筛管运输到其他部位,降低叶片气孔导度,减少蒸腾作用和水分流失,提高水分利用率,抑制光合作用,减缓叶片生长,减少水分需求^[2].

9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶(9-cis-epoxy-carotenoid dioxygenase, NCED) 催化环氧类胡萝卜素氧化裂解成黄氧素,是 ABA 合成的限速酶.干旱诱导植物 NCED 基因表达上调(如烟草 NCED3^[26] 和番茄 LeNCED1^[27]).对于 ABA 在植物响应干旱和 AM 真菌接种中的作用,在番茄中研究较多^[28-30].干旱诱导番茄根部和地上部 NCED 基因表达上调;在正常供水条件下,接种 AM 真菌诱导番茄根部和地上部 NCED 基因表达上调^[28].ABA 支持 AM 真菌侵染番茄根,根部 ABA 含量增加可能抑制乙烯、茉莉酸或水杨酸介导的针对 AM 真菌的防卫反应,从而促进 AM 真菌的侵染和发育^[13,24,29-30].在干旱条件下,番茄根部 ABA 水平较高,支持 AM 真菌侵染,对经干旱胁迫的番茄接种 AM 真菌则不再上调根部 NCED 基因表达.而对已建立菌根共生的番茄进行干旱胁迫,会上调番茄根部 NCED 基因的表达,但比干旱上调无菌根中 NCED 基因表达的程度低^[28].即 AM 真菌侵染已上调根部 NCED 基因表达,增加根部 ABA 含量,菌根共生为番茄抗旱做了准备^[8].在干旱条件下,AM 真菌侵染不会上调番茄地上部 NCED 基因的表达;而对于已建立菌根共生的番茄,干旱胁迫下调番茄地上部 NCED 基因的表达^[28],可

能降低或维持地上部 ABA 的含量,维持甚至提高地上部光合作用的强度^[8],为菌根提供碳源.与此相符,干旱下菌根植物叶片的气孔导率、气体交换率和水势梯度比无菌根植物高^[8].而菌根响应干旱进而调控叶片气孔行为的机制可能涉及 ABA 和细胞分裂素从根到叶的流动和平衡^[8].

1.1.6 AM 真菌帮助土壤保湿 除了对植物的直接作用,AM 真菌还能通过土壤间接作用于植物.AM 真菌能在根围和根外菌围促进形成并稳定能保水的土壤团聚体,提高土壤保水性来减轻植物受旱.土壤通过有机质,如与多价金属阳离子联合的芳香族化合物和有吸附作用的多聚物,自组织成土壤微粒^[31].根和 AM 真菌菌丝则提供网架^[32],结合缠绕土壤微粒形成更大、更稳定的土壤团聚体.菌丝甚至在植物死后几个月还能稳定土壤团聚体^[33].AM 真菌菌丝能分泌多糖和糖蛋白来黏合根外菌丝网络和土壤微粒,其中球囊霉素是含金属离子的糖蛋白,性质非常稳定,包裹在菌丝外保护菌丝,还有超级胶的作用,粘合菌丝和土壤微粒^[34].根外菌丝的分泌物还为周围其他微生物提供碳源,调节菌丝周围微生物群体的组成^[32,35].AM 真菌和周围其他微生物群体一起促进形成和稳定土壤团聚体,保持土壤水分.AM 真菌在土壤中的部分对菌根植物叶片气孔导率的影响甚至可能比 AM 真菌在根中的部分大^[36].AM 真菌化的土壤还能影响外来的不能被 AM 真菌定殖植物的气孔导率^[37].由此可见,AM 真菌与土壤和土壤微生物互作对植物适应环境的重要性.

1.2 AM 真菌帮助烟草抗旱的应用

决定 AM 真菌对作物作用的首要因素是作物能否与 AM 真菌共生,能否积极响应 AM 真菌.烟草能与 AM 真菌共生,能积极响应某些 AM 真菌^[38-40].AM 真菌能帮助烟草抗旱^[41-42].所以,在育苗和栽培上用 AM 真菌促烟草生长和抗旱是可行的.

AM 真菌与作物的亲和性对 AM 真菌在田间的接种效应有重要影响.尽管 AM 真菌与植物共生具有广谱性,特异性低,但土著 AM 真菌与作物的亲和性往往比外来的 AM 真菌高,田间土著 AM 真菌的数量影响接种外来 AM 真菌的效果.土著 AM 真菌多,接种外来 AM 真菌的效果不易表现出来.因此,筛选高效的土著 AM 真菌用于接种作物可能效果显著.

农艺措施对田间土著 AM 真菌的种群和作用有重要影响.化学杀真菌农药对 AM 真菌的生长和繁殖有直接的抑制作用^[43].施肥、闲田和耕地对田间

AM 真菌的种群和侵染作物多有负作用^[44].田间施肥水平,尤其是 P 肥的水平越高,AM 真菌种群多样性越低,侵染作物的水平越低.闲田裸地不仅让水土流失,也让田间长时间没有植物供给土壤微生物碳源,AM 真菌没有植物寄主,导致土壤微生物和 AM 真菌的多样性大幅降低.耕地破坏土壤中 AM 真菌的菌丝网络,破坏土壤团聚结构,加快土壤失水.因此,应提高田间土著 AM 真菌种群多样性、侵染水平和共生效应;减施农药和化肥、控制作物苗期和伸根期的 P 肥、增施有机肥;实施轮作和免耕覆盖.

对于漂浮育苗再移栽的烟草,用筛选出的有效 AM 真菌接种作物或用适当的农艺措施让田间土著 AM 真菌发挥作用是可行的.可大规模培养筛选出的 AM 真菌,在烟草漂浮育苗基质中混入 AM 真菌接种物,如含有 AM 真菌菌丝、孢子、扩繁寄主植物根段和培养基质的混合物^[45],在烟草种子萌发和生根期通过不施肥来促进 AM 真菌侵染定殖,让烟草在育苗期形成菌根.这在移栽烟苗后,接种 AM 真菌的促生效应受田间土著 AM 真菌的影响会较小.采用这种方式应用 AM 真菌的瓶颈是 AM 真菌的专性寄生,培养扩繁必需种植植物或培养植物发根,大规模培养 AM 真菌的难度大、成本高^[46].也可用烟田就地扩繁田间的土著 AM 真菌,在种烟后的秋冬田轮作耐寒的 AM 真菌扩繁作物,如豆科作物(如豌豆)、牧草(如三叶草)或绿肥(如苕子).豆类成熟收获后,用根作为 AM 真菌接种物填垄,秸秆作为绿肥填沟或覆盖免耕.在烟苗移栽后初期少施 P 肥,在菌根形成后增施 P 肥,促进烟草生长发育.这是目前在田间大规模应用 AM 较可行的方式,但在时效上,不能用于让移栽烟苗适应从水生到旱生的冲击,也不能提高烟苗在移栽时遭受干旱的抗性,只能用于帮助烟苗在移栽成活以后抗旱.另外,即使育苗期接种 AM 真菌的方式,烟田轮作豆科绿肥和免耕也是减肥增效和增加土壤微生物的量、多样性和促植物生长作用的适宜农艺措施.

2 内生真菌

内生菌(endophyte)指定殖在植物体内但不损害植物的真菌和细菌^[47].烟草中有很多内生真菌和细菌^[48].有些定殖在植物根内的内生真菌能像 AM 真菌那样促进植物的生长发育和抗逆,在与植物协同进化中甚至可能特化成专性寄生而成为 AM 真菌,如蜡壳耳目(Sebacinales)的真菌就包括 AM 真菌和内生真菌^[49].内生真菌促进植物生长发育和抗

逆的机制与 AM 真菌大体相似,不同的内生真菌各有特性.本文以有益内生真菌研究领域的一种模式真菌印度梨形孢为例,简述内生真菌帮助植物抗旱的机理和应用.

印度梨形孢是属于蜡壳耳目的一种类似于 AM 真菌的内生真菌,在功能上与植物互惠共生,但没有专性寄生,能在人工合成培养基上离体生长.最初是从印度 Thar 沙漠中一丛灌木获得了 AM 真菌孢子,经玉米诱捕培养后,发现了一个可离体培养的真菌^[50],因能产生梨形的厚垣孢子而得名^[50-51].印度梨形孢只侵染植物根而不侵染地上部,定殖于根围、根表面和根皮层组织的细胞间和细胞内,不穿过根的内皮层进入维管束^[52].印度梨形孢的寄主没有特异性.研究显示,印度梨形孢能侵染苔藓类、蕨类、裸子植物和被子植物中的上百种植物^[53],包括 AM 真菌不能共生的十字花科植物,如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*).印度梨形孢能促进很多重要农作物的生长发育、抗逆和抗病并提高产量^[54].如促进烟草种子萌发、茎秆伸长,提高结实率^[55-56],提高烟草组培苗的移栽存活率^[57],提高大麦和白菜的耐旱能力^[58-59],诱导增强烟草对多种病害的抗性^[60],减轻由大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)引起的番茄黄萎病,提高番茄产量^[61].印度梨形孢促进模式植物(拟南芥、大麦和烟草)生长发育和抗逆的机理已被深入研究.

2.1 印度梨形孢帮助植物抗旱的机理

印度梨形孢主要侵染根的成熟区,形成胞间和胞内菌丝,在伸长区形成胞间菌丝.印度梨形孢侵染根先经历一个活体营养期,定殖在活细胞的胞间和胞内.不同于 AM 真菌,其共生过程要再经历一个部分根表皮细胞和皮层细胞死亡的时相,在死细胞里产生厚垣孢子^[62-63].根细胞死亡经历了内质网膨胀和液泡崩溃^[63].印度梨形孢入侵诱导了根细胞的内质网胁迫,同时又抑制根细胞对内质网胁迫的响应通路,使得被定殖的根细胞不能缓解内质网胁迫而激活细胞死亡程序^[63].在活体营养期,印度梨形孢激活了植物的茉莉酸信号通路来抑制植物的早期免疫反应,包括活性氧迸发,以及与水杨酸和葡糖异硫氰酸相关的防卫反应^[64-65].在促根细胞死亡期,印度梨形孢激活植物赤霉素信号通路来抑制植物的防卫反应^[64,66].而被激活的乙烯信号通路所介导的防卫反应则抑制印度梨形孢过度定殖^[67].总之,印度梨形孢通过改变植物体内激素的平衡,激活和抑制不同激素介导的信号通路,调整植物的防卫反应,完

成侵染定殖,同时诱导植物产生系统抗病性和抗逆性^[68].

印度梨形孢侵染改变植物激素平衡也调节植物的生长和发育.例如,印度梨形孢侵染可提高大麦和白菜根中生长素的水平^[59,65],提高拟南芥根中细胞分裂素的水平^[69].生长素或细胞分裂素介导的信号通路不影响印度梨形孢在根中的定殖,而且促进根的生长发育^[59,65,69].

印度梨形孢能从土壤获取吸收 P、N、K、S、Mg、Fe、Zn、Mn 和 Cu 等矿质元素并向植物转运^[52,68].如印度梨形孢能产生磷酸酶裂解不溶的多磷酸盐和有机磷酸盐中的磷酸键,能分泌有机酸溶解不溶的多磷酸盐^[70],且自身有高亲和力的磷酸盐转运体吸收 P^[71-72],因而能有效地溶解吸收土壤中的 P.印度梨形孢还能诱导植物的磷酸盐转运体,促进植物从土壤吸收 P^[68].不同于 AM 真菌从土壤主要吸收铵,印度梨形孢介导吸收硝酸根,能够增强根中 NADH-依赖的硝酸还原酶(Nia2)基因的表达和酶活性^[56].印度梨形孢在帮助植物获得较多矿质营养的同时,也上调根中淀粉裂解酶基因的表达,降解根中储藏的淀粉,为根和真菌提供碳源,共同增强根的初级代谢,促进根的生长和发育,进而促进叶合成较多的叶绿素和类胡萝卜素,提高光合效率,为根和印度梨形孢输入较多碳源,维持较发达根系的功能,吸收较多水分而避旱.这也使得印度梨形孢的促生抗旱效应在营养有限的条件下表现得更明显^[68,73].

干旱胁迫也诱导改变植物的激素平衡,上调 ABA.有印度梨形孢定殖的根能更快地产生更高水平的 ABA,更快地地上调植物耐旱相关基因的表达,通过积累脯氨酸等渗透调节物质来降低植物细胞的水势,通过增加抗氧化酶和抗氧化物、提高抗氧化酶活性来清除活性氧、减轻活性氧伤害,增强植物耐旱的能力^[68].

2.2 印度梨形孢帮助烟草抗旱的应用

能用人工合成培养基大量培养的印度梨形孢比 AM 真菌更易于接种应用.可将印度梨形孢菌体(菌丝和孢子)和培养液(含有印度梨形孢释放的促植物生长物质)与烟草育苗基质混匀,让印度梨形孢在烟草漂浮育苗阶段定殖在烟苗根部,促进烟苗生长,在移栽后帮助烟草抗旱.

接种后能成功侵染定殖根是印度梨形孢发挥作用的前提.对于烟草漂浮育苗体系,接种后的印度梨形孢和 AM 真菌面临同样问题.1)它们都是好氧生长的真菌,孢子萌发和菌丝生长都需要氧气.若土壤

水分过多、通气性差,会抑制菌根的形成和发育.而当土壤含水量略低于田间持水量时,真菌为了吸水并在低土壤水势条件下生长,会倾向于侵染植物,从植物中吸水或从植物和土壤中吸收更多的渗透调节物质以维持膨压.因此,轻度土壤干旱会促进真菌侵染植物,通过吸收植物的碳水化合物来达到水势梯度和细胞渗透势.而在漂浮育苗条件下,育苗池中的液面被育苗盘覆盖,液面与空气接触面小,水中的溶氧量小,对生长在水饱和基质中的新生根系和菌体供氧不足,使烟苗根系受低氧胁迫而活力低,也抑制真菌的活力、真菌侵染根和共生菌根的形成.解决这一问题可以在烟草种子萌发期和幼苗生根期采用湿润式育苗,即育苗前期不用漂浮,通过浇水控制育苗基质的含水量,让基质保持适度的透气性,按烟草种子萌发和幼苗生根所需浇水,直到烟苗根从育苗盘底的孔伸出后再进行漂浮育苗.2)真菌在植物矿质营养受限的条件下为植物提供营养是菌根共生的基础,基质富养抑制真菌侵染.因此,在烟草种子萌发和生根期不施肥,让烟苗仅利用基质营养生长,待烟苗根从盘底的孔伸出后开始在漂浮育苗池中添加育苗肥,先施少量肥,以后按需增施.3)接种物在基质中分布不均可能让部分无菌或少菌的盘孔中没有真菌定殖烟苗,而把接种物在大量育苗基质中混匀费时、费力.解决这一问题可研制含印度梨形孢的育苗基质,如将以蛭石为载体的接种菌剂^[74]与育苗基质的其他组分混匀,甚至进行固体发酵,让均匀分布的印度梨形孢菌体在固体基质中继续生长和产孢.

在烟苗移栽时也可接种印度梨形孢,将菌剂随移栽水肥和农药一同施入.但在时效上,不能用于让移栽烟苗适应从水生到旱生的冲击,真菌侵染根的效率会受到肥和农药的影响.因此,移栽时接种要控制肥量,选择不影响印度梨形孢生长和侵染的农药.

印度梨形孢能与其他细菌^[74]或真菌^[75]协同促进植物生长、抗逆和抗病.对病原真菌有拮抗作用的生防细菌或真菌也可能拮抗印度梨形孢,如有哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)在平板上对峙培养时抑制印度梨形孢的生长,与印度梨形孢同时接种植物会抑制印度梨形孢的定殖.通过先接种印度梨形孢,让印度梨形孢在育苗锻炼期定殖植物,移栽时再接种木霉,能让二者共同促进植物生长、抗逆和抗病^[75].

3 根际促植物生长细菌

在植物根内、根表面和根周围土壤中生存的大

量细菌中有很多能促进植物生长,被称为根际促植物生长细菌(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR).PGPR通过自身代谢产物和与植物互作来促进植物生长发育,改善植物营养,诱导植物产生系统抗病性和系统抗逆性^[5,76-77].

3.1 PGPR 帮助植物抗旱的机理

PGPR 帮助植物抗旱的主要机制是改变植物体内激素的平衡,激活和抑制不同激素介导的信号通路,调控基因表达和代谢,促进植物生长,诱导植物产生系统抗逆性.PGPR 与植物互作来改变植物体内激素平衡的主要方式有:1)细菌合成释放植物激素(如生长素、细胞分裂素、赤霉素和 ABA 等)和挥发性化合物(如 2,3-丁二醇)作用于植物,引起植物内源激素平衡发生变化;2)细菌用 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)脱氨酶分解植物产生的乙烯合成前体 ACC 而降低植物产生乙烯的水平;3)植物应对细菌定殖入侵而调整内源植物激素的合成和转运,调控激素介导的信号通路.互作的结果若导致生长素、细胞分裂素和赤霉素等促植物生长激素的水平适度升高,则会促进植物的生长发育,为植物抗旱准备物质基础.互作的结果也可能激活启动植物通过水杨酸、茉莉酸和乙烯及 ABA 等信号分子介导的植物防卫反应,产生诱导系统抗病性和抗逆性,让植物能更快、更有效地应对病原菌的侵袭和非生物胁迫^[5,76-77].

吲哚乙酸(IAA)是最常见的生长素,也是最常见的 PGPR 能合成的植物激素,能刺激植物细胞增殖和伸长.PGPR 从种子和根分泌物中获得合成 IAA 的前体色氨酸.PGPR 合成释放的 IAA 被植物吸收后,能促进初生根伸长和根毛形成、促进双子叶植物侧根和单子叶植物不定根的形成,导致植物生成较发达的根系.这是 PGPR 促进植物生长和发育的重要机制^[78].发达的根系能吸收更多的水分和矿质营养,使植物避旱,并维持生长和抗逆所需的营养.

IAA 能介导激活植物 ACC 合成酶的表达和合成.ACC 合成酶催化 S-腺苷-甲硫氨酸转变为 ACC.ACC 由 ACC 氧化酶催化转变为乙烯.多数与植物联合的 PGPR 和病原细菌能合成 IAA.持续的 IAA 作用可能让植物产生高水平的乙烯,反过来会抑制植物细胞的增殖和伸长.有些 PGPR 含有 ACC 脱氨酶,能催化 ACC 脱氨产生 α -酮丁酸和氨,作为细菌可利用的碳氮源^[79].PGPR 产生的 IAA 刺激植物细胞伸长时会松弛植物细胞壁,让 ACC 释放到植物细胞外,同时与植物联合的有 ACC 脱氨酶细菌能不断

吸收消耗 ACC,减少植物细胞中的 ACC 和生成乙烯的量,减弱 IAA 持续作用产生的乙烯反馈抑制,维持 IAA 促植物生长的作用.即 PGPR 释放到胞外的 IAA 和 PGPR 细胞内的 ACC 脱氨酶协同作用,持续促进植物生长^[79].在植物中,一氧化氮介导 IAA 指导的侧根和不定根的形成^[80].有些 PGPR 菌,如固氮螺菌(*Azospirillum*)能产生一氧化氮,可能协同 IAA 或单独起作用,促进植物形成侧根^[81].

与植物联合的 PGPR 通过吸收消耗植物细胞合成的 ACC,降低植物产生乙烯的水平,减弱乙烯对植物生长(如根的伸长)的抑制,是 PGPR 帮助植物抗逆的重要机制^[82].植物遭受旱涝、盐碱、高低温、重金属等非生物胁迫和病原微生物等侵袭的生物胁迫时,会产生两个时相的乙烯迸发.第一个乙烯迸发在胁迫发生几个小时后,通过消耗植物细胞储备的 ACC,产生乙烯的量小,持续的时间短,诱导植物防卫反应.第二个乙烯迸发在胁迫发生的 1~3 d 后,需要植物细胞重新合成 ACC,产生乙烯的量,持续的时间长,会抑制植物生长.细菌合成 ACC 脱氨酶需要 ACC 诱导.ACC 诱导细菌合成 ACC 脱氨酶的速率比诱导植物细胞合成 ACC 氧化酶的速率低.而且细菌 ACC 脱氨酶对 ACC 的亲性和比植物 ACC 氧化酶低得多.当植物细胞动用储备的 ACC 迸发乙烯时,分泌到胞外的 ACC 很少,细菌可吸收的 ACC 很少,难以诱导 ACC 脱氨酶,不会影响植物细胞产生少量乙烯来诱导植物的防卫反应.当胁迫持续时,植物细胞重新合成 ACC 并分泌部分 ACC 到胞外;细菌吸收 ACC 后诱导产生高水平的 ACC 脱氨酶来降解 ACC.由此产生从植物细胞“源”到细菌细胞“库”的 ACC 流,减少植物细胞中的 ACC,降低植物产生乙烯的水平,从而缓解胁迫对植物生长的抑制^[82-83].

植物识别微生物表面共有的分子(如 PGPR 和病原细菌表面的鞭毛和脂多糖)会产生先天免疫反应.因此,PGPR 侵染植物能诱导植物产生对病原菌的免疫反应,即诱导系统抗病性^[84].水杨酸、茉莉酸和乙烯等植物激素介导的信号通路调控 PGPR 诱导植物产生的系统抗病性^[84],与植物调控对干旱等非生物胁迫的响应有共通之处,可能促成 PGPR 诱导植物产生对非生物胁迫的系统抗逆性^[76].PGPR 除了通过与植物接触激发植物产生诱导系统抗病性和抗逆性以外,PGPR 还可以产生挥发性化合物,如 2,3-丁二醇,诱导植物产生系统抗病性^[85]和系统抗逆性^[86],不同程度地受到水杨酸、茉莉酸和乙烯等

植物激素介导的信号通路的调控.获得诱导系统抗逆性的植物在遭受干旱胁迫时,比没有 PGPR 作用的植物能更快地产生更高水平的 ABA,更快地调整基因表达和代谢,积累脯氨酸和甜菜碱等渗透调节物质,增加抗氧化酶和抗氧化物,提高抗氧化酶活性,增强植物耐旱的能力^[76-77].

另外,PGPR 通过产生和释放葡萄糖酸和酮基葡萄糖酸等有机酸来溶解土壤中不溶的矿质元素(如 P 和 Fe),为植物提供了生长和抗逆所需的矿质营养^[87].很多 PGPR 产生胞外多糖,包裹着细菌形成生物被膜,覆盖根表,防止细菌和根在干燥环境下脱水,帮助维持根表和根围较高的水势,维持根吸收水和营养.PGPR 产生的胞外多糖还能黏合土壤微粒,促进形成和稳定土壤团聚体,提高土壤保水性,减轻植物受旱^[88].

3.2 PGPR 帮助烟草抗旱的应用

众多研究从植物和土壤中已筛选获得非常多的有 PGPR 潜能的菌株,到最终能被商品化大规模应用、在田间产生持续稳定效益的过程中要关注和解决很多问题.本文以有 ACC 脱氨酶的 PGPR 为主,探讨 PGPR 帮助烟草抗旱的应用.

有 ACC 脱氨酶的细菌能帮助植物抵抗多种逆境,如既能帮助番茄抗旱^[83],也能帮助番茄抗涝^[89].烟草在漂浮育苗时,根系因浸水而遭受低氧胁迫,诱导 ACC 合成酶并产生 ACC.而根中 ACC 因低氧不易被氧化为乙烯,根细胞中积累的 ACC 被释放到胞外后会被转移到地上部,再被 ACC 氧化酶催化产生乙烯,抑制地上部生长,诱导叶片衰老.若烟苗根系已定殖有 ACC 脱氨酶的 PGPR,根细胞中释放的 ACC 会被 PGPR 吸收消耗,降低根和地上部产生乙烯的水平,缓解低氧胁迫对烟苗生长的抑制.当烟苗移栽后受旱,根部有 ACC 脱氨酶的 PGPR 能降低根中产生乙烯的水平,缓解干旱对烟苗生长的抑制.

常用的筛选有 ACC 脱氨酶细菌的方法是让细菌以 ACC 为唯一氮源生长.以 ACC 为唯一氮源的培养基用于分离富集有 ACC 脱氨酶的细菌是有效的^[90],但难以排除有些细菌利用培养基中痕量的其他氮源生长,或是利用空气中的 N₂ 生长,或有与 ACC 脱氨酶同源的其他 5'-磷酸吡哆醛依赖酶进行非特异分解 ACC.因此,有必要用分子生物学方法鉴定有 ACC 脱氨酶的细菌.区分 ACC 脱氨酶及基因序列与同源的 5'-磷酸吡哆醛依赖酶及基因序列间的差异是鉴定 ACC 脱氨酶和有 ACC 脱氨酶细菌的关键.ACC 脱氨酶的第 295 和 322 位的氨基酸残基分

别是谷氨酸(E)和亮氨酸(L)^[91].有些研究没有进行分子生物学检测,仅基于细菌以 ACC 为唯一氮源生长或有 ACC 脱氨酶活性,认定很多芽孢杆菌属(*Bacillus*)的细菌有 ACC 脱氨酶^[92].而笔者从已公布全基因组序列的上千个芽孢杆菌属的细菌中没有检索到有 295E 和 322L 的 ACC 脱氨酶.因此,最常用的芽孢杆菌属的 PGPR 很可能没有 ACC 脱氨酶.

利用 ACC 脱氨酶的 295E 和 322L 位点的保守区和第 78 位的丝氨酸(S)位点的保守区序列分别设计简并引物,能有效特异扩增 ACC 脱氨酶基因(*acdS*)^[91].将扩增到的目标片段测序并进行系统发育分析,能确定扩增序列是否是 *acdS* 序列,细菌是否有 ACC 脱氨酶.先用经典的生理生化方法粗筛,再通过扩增关键基因序列确证也适用于筛选鉴定其他 PGPR 特性^[93].

在自由生长状态下测到的细菌 ACC 脱氨酶活性的高低与 PGPR 促进植物根伸长和帮助植物抗逆程度的相关性很低^[94].PGPR 的其他特性在自由生长状态下和与植物联合状态下的相关性也很低^[95].因此,筛选有效可用 PGPR 的关键在于检测 PGPR 候选菌接种植物的效应.

细菌通过 ACC 脱氨酶分解 ACC 获得碳氮源有利于细菌在植物体生存.PGPR 和病原细菌都可能具有 ACC 脱氨酶.笔者检索病原细菌丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)和茄科雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)的全基因组序列发现,90%以上的菌株有 ACC 脱氨酶.同样,PGPR 和病原细菌都可能产生释放 IAA.如农杆菌产生高水平的 IAA 能让植物产生冠瘿瘤;有些病原菌能通过释放 IAA 诱导植物细胞壁松弛,增强植物 IAA 信号通路的效应来压制植物的防卫反应^[78].所以,筛选有效可用的 PGPR 要依据细菌对植物的作用,检验细菌对植物是否有致病性.

利用 PGPR 的 ACC 脱氨酶能减弱因 IAA 持续作用植物而产生的乙烯反馈抑制,维持 IAA 促植物生长的作用.因此,可筛选有 ACC 脱氨酶且产 IAA 的 PGPR,让 ACC 脱氨酶和 IAA 产生协同增效的作用.IAA 诱导植物细胞壁松弛和抑制植物防卫反应的作用会利于植物病原菌侵染.解决此问题可筛选有 ACC 脱氨酶、产 IAA 且拮抗病原菌的 PGPR 菌株,或组合拮抗病原菌的 PGPR 菌株,如常用的芽孢杆菌.

PGPR 易于制备液体制剂,侵染定殖烟草根受水生和低氧的影响小,易于在育苗和移栽过程的多

个时间点实现多次接种;在播种前用液体菌剂喷湿育苗基质并浸种,在种子萌发后用菌剂喷湿幼苗,在移栽时把菌剂随水、肥和农药一同施入穴中.

4 结 语

微生物帮助植物抗逆涉及微生物与植物的互作,不同微生物的互作,微生物和植物对逆境的响应.让人工制备微生物帮助植物抗逆需要以下条件:1)微生物接种物自身抗逆,适应环境;2)与植物亲和,能稳定地与植物共生或联合;3)比土著微生物有更强或相近的环境适应力和植物亲和力.在实践上,要根据微生物帮助作物抗逆的机理筛选和组合微生物,以适合的方式接种作物检验微生物的效应,尤其要检验在田间的接种效应.

对于在田间应用有益微生物帮助烟草抗旱,目前可行的措施主要有:1)秋冬轮作耐寒、耐旱的豆科作物.利用豆科作物光合作用为烟田土壤输入碳源,利用根瘤菌共生固氮为烟田输入氮源,就地扩繁烟田土著的 AM 真菌,增加烟田土壤微生物多样性,减少因连作烟草而增加的病原菌.还可利用秸秆覆盖免耕保持水土.2)漂浮育苗期接种优选的多功能微生物.利用 AM 真菌或内生真菌的菌丝帮助烟苗吸收营养,利用 PGPR 释放生长素刺激烟苗形成发达根系,利用真菌和 PGPR 诱导烟苗产生系统抗逆性,让烟苗耐受水培的低氧胁迫和移栽时的水旱转换冲击,利用拮抗病原菌的真菌(如木霉)和 PGPR(如芽孢杆菌和链霉菌)预防病害.3)少施化肥和化学农药,多施有机肥和微生物农药.少施化肥促进 AM 真菌和内生真菌侵染烟草根,利用真菌帮助烟草吸收营养提高化肥利用率,利用真菌和 PGPR 拮抗病原菌或诱导系统抗病性来防控病害.

基于大数据分析的组学方法加速了人们对植物抗逆和响应微生物机制的理解.内源植物激素平衡和植物激素介导的信号通路调控植物对逆境和微生物的响应.植物由调节蛋白负责响应植物激素平衡的变化,分级多层次地调控基因表达网络^[4].通过基因编辑控制关键的调节蛋白,可能以统筹的方式高效引发植物抗逆或微生物诱导的系统抗逆性.日新月异的 CRISPR 基因编辑技术^[96-97]也会加速作物抗逆和与微生物互作的功能基因组学的研究进展和获得抗逆高产作物.

参考文献

[1] Hu H, Xiong L. Genetic engineering and breeding of

- drought-resistant crops. *Annual Review of Plant Biology*, 2014, **65**: 715–741
- [2] He J-L (何俊龙), Zhao S-Q (赵世钦), Wang Y-N (王彦楠), *et al.* Response of endogenous hormones of tobacco to drought stress. *Chinese Agricultural Science Bulletin* (中国农学通报), 2015, **31**(30): 205–209 (in Chinese)
- [3] Hirayama T, Shinozaki K. Perception and transduction of abscisic acid signals: Keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends in Plant Sciences*, 2007, **12**: 343–351
- [4] Song L, Huang SC, Wise A, *et al.* A transcription factor hierarchy defines an environmental stress response network. *Science*, 2016, **354**: 1550
- [5] Berendsen RL, Pieterse CM, Bakker PA. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 2012, **17**: 478–486
- [6] Willis A, Rodrigues BF, Harris PJC. The ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2013, **32**: 1–20
- [7] Strullu-Derrien C, Strullu DG. Mycorrhization of fossil and living plants. *Comptes Rendus Palevol*, 2007, **6**: 483–494
- [8] Augé RM. Water relations, drought and vesicular mycorrhizal fungi symbiosis. *Mycorrhiza*, 2001, **11**: 3–42
- [9] Solaiman ZM, Abbott LK, Varma A. Mycorrhizal Fungi: Use in Sustainable Agriculture and Land Restoration. *Soil Biology*, Volume 41. Berlin: Springer-Verlag, 2014
- [10] Zhu Y (祝英), Xiong J-L (熊俊兰), Lyu G-C (吕广超), *et al.* Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and plant symbiosis on plant water relation and its mechanism. *Acta Ecologica Sinica* (生态学报), 2015, **35**(8): 2419–2427 (in Chinese)
- [11] Smith SE, Smith FA. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: New paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review of Plant Biology*, 2011, **62**: 227–250
- [12] Li T, Hu YJ, Hao ZP, *et al.* First cloning and characterization of two functional aquaporin genes from an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist*, 2013, **197**: 617–630
- [13] Sánchez-Romera B, Ruiz-Lozano JM, Zamarreño ÁM, *et al.* Arbuscular mycorrhizal symbiosis and methyl jasmonate avoid the inhibition of root hydraulic conductivity caused by drought. *Mycorrhiza*, 2016, **26**: 111–122
- [14] Bárzana G, Aroca R, Bienert GP, *et al.* New insights into the regulation of aquaporins by the arbuscular mycorrhizal symbiosis in maize plants under drought stress and possible implications for plant performance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2014, **27**: 349–363
- [15] Li A-R (李爱荣), Guan K-Y (管开云). Research history and recent advances in nutrient absorption and transport mechanisms of arbuscular mycorrhizae. *Journal of Microbiology* (微生物学杂志), 2006, **26**(4): 72–76 (in Chinese)
- [16] Subramanian KS, Santhanakrishnan P, Balasubramanian P. Responses of field grown tomato plants to arbuscular mycorrhizal fungal colonization under varying intensities of drought stress. *Scientia Horticulturae*, 2006, **107**: 245–253
- [17] Ruiz-Lozano JM, Collados C, Barea JM, *et al.* Cloning of cDNAs encoding SODs from lettuce plants which show differential regulation by arbuscular mycorrhizal symbiosis and by drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 2001, **52**: 2241–2242
- [18] Baslam M, Goicoechea N. Water deficit improved the capacity of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) for inducing the accumulation of antioxidant compounds in lettuce leaves. *Mycorrhiza*, 2012, **22**: 347–359
- [19] Porcel R, Azcón R, Ruiz-Lozano JM. Evaluation of the role of genes encoding for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) during drought stress in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants. *Physiological & Molecular Plant Pathology*, 2004, **65**: 211–221
- [20] Ábrahám E, Rigó G, Székely G, *et al.* Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 2003, **51**: 363–372
- [21] Huang Z (黄志), Zou Z-R (邹志荣), Huang H-H (黄焕焕), *et al.* Cloning, analysis and expression of a drought-related gene MeP5CS from melon. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 2010, **37**(8): 1279–1286 (in Chinese)
- [22] Shaul-Keinan O, Gadkar V, Ginzberg I, *et al.* Hormone concentrations in tobacco roots change during arbuscular mycorrhizal colonization with *Glomus intraradices*. *New Phytologist*, 2002, **154**: 501–507
- [23] Fester T, Hause B. Drought and symbiosis: Why is abscisic acid necessary for arbuscular mycorrhiza? *New Phytologist*, 2007, **175**: 383–386
- [24] Hause B, Mrosk C, Isayenkov S, *et al.* Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. *Phytochemistry*, 2007, **68**: 101–110
- [25] López-Raéz JA, Pozo MJ, García-Garrido JM. Strigolactones: A cry for help in the rhizosphere. *Botany*, 2011, **89**: 513–522
- [26] Niu Z-Q (牛志强), Liu G-S (刘国顺), Shi T-T (师婷婷), *et al.* Cloning of NCED3 gene in *Nicotiana tabacum* and analysis of its drought stress-induced expression. *Acta Tabacaria Sinica* (中国烟草学报), 2015, **21**(3): 100–106 (in Chinese)
- [27] Thompson AJ, Jackson AC, Parker RA, *et al.* Abscisic acid biosynthesis in tomato: Regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase mRNAs by light/dark cycles, water stress and abscisic acid. *Plant Molecular Biology*, 2000, **42**: 833–845
- [28] Aroca R, del Mar Alguacil M, Vernieri P, *et al.* Plant responses to drought stress and exogenous ABA application are modulated differently by mycorrhization in tomato and an ABA-deficient mutant (Sitiens). *Microbial Ecology*, 2008, **56**: 704–719
- [29] Herrera-Medina MJ, Steinkellner S, Vierheilig H, *et al.* Abscisic acid determines arbuscule development and

- functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist*, 2007, **175**: 554–564
- [30] Martín-Rodríguez JA, León-Morcillo R, Vierheilig H, *et al.* Ethylene-dependent/ethylene-independent ABA regulation of tomato plants colonized by arbuscular mycorrhiza fungi. *New Phytologist*, 2011, **190**: 193–205
- [31] Daynes CN, Field DJ, Saleeba JA, *et al.* Development and stabilisation of soil structure via interactions between organic matter, arbuscular mycorrhizal fungi and plant roots. *Soil Biology & Biochemistry*, 2013, **57**: 683–694
- [32] Wang Q (王 茜), Wang Q (王 强), Wang X-J (王晓娟), *et al.* Research progress on ecological function of arbuscular mycorrhizal network. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2015, **26**(7): 2192–2202 (in Chinese)
- [33] Hallet PD, Feeney DS, Bengough AG, *et al.* Disentangling the impact of AM fungi versus roots on soil structure and water transport. *Plant and Soil*, 2009, **314**: 183–196
- [34] Wang J (王 建), Zhou Z-Y (周紫燕), Ling W-T (凌婉婷). Distribution and environmental function of glomalin-related soil protein: A review. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2016, **27**(2): 634–642 (in Chinese)
- [35] Toljander JF, Lindahl BD, Paul LR, *et al.* Influence of arbuscular mycorrhizal mycelial exudates on soil bacterial growth and community structure. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, **61**: 295–304
- [36] Augé RM, Toler HD, Moore JL, *et al.* Comparing contributions of soil versus root colonization to variations in stomatal behavior and soil drying in mycorrhizal *Sorghum bicolor* and *Cucurbita pepo*. *Journal of Plant Physiology*, 2007, **164**: 1289–1299
- [37] Augé RM, Sylvia DM, Park SJ, *et al.* Partitioning mycorrhizal influence on water relations of *Phaseolus vulgaris* into soil and plant components. *Canadian Journal of Botany*, 2004, **82**: 503–514
- [38] Liu Y-R (刘延荣), Fang Y-C (方宇澄). The selection of effective VAM fungi forming mycorrhizae on tobacco roots. *Journal of Shandong Agricultural University* (Natural Science) (山东农业大学学报: 自然科学版), 1997, **28**(3): 269–274 (in Chinese)
- [39] Zhao F-G (赵方贵), Chen L-P (陈丽平), He X-L (贺学礼). Effects of AM fungi on late growth of tobacco leaf under different phosphate levels. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica* (西北植物学报), 2004, **24**(11): 2122–2125 (in Chinese)
- [40] Jiang L (江 龙), Huang J-G (黄建国), Yuan L (袁玲). Effects of different arbuscular mycorrhizal fungus on growth, nutrition and physiological activity of tobacco seedlings. *Guizhou Agricultural Sciences* (贵州农业科学), 2009, **37**(12): 53–57 (in Chinese)
- [41] Wang M-S (王茂胜), Zhang C-H (张长华), Chen X-M (陈晓明), *et al.* Effect of arbuscular mycorrhiza fungi on drought tolerance of tobacco seedlings. *Journal of Mountain Agriculture and Biology* (山地农业生物学报), 2012, **31**(6): 501–505 (in Chinese)
- [42] Zhou X (周 霞), Liang Y-J (梁永江), Zhang C-H (张长华), *et al.* Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, nutrition and drought resistance of fluecured tobacco seedlings. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica* (华北农学报), 2012, **27**(3): 181–185 (in Chinese)
- [43] Xie L (谢 莉), Wei Y-W (韦业旺), Cai M (蔡敏), *et al.* Influences of fungicides on growth and resistance of arbuscular mycorrhizal tobacco seedlings. *Guangxi Agricultural Sciences* (广西农业科学), 2010, **41**(4): 319–322 (in Chinese)
- [44] Sheng P-P (盛萍萍), Li M (李 敏), Liu R-J (刘润进). Effects of agricultural practices on community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural ecosystem: A review. *Chinese Journal of Applied Microbiology* (应用生态学报), 2011, **22**(6): 1639–1645 (in Chinese)
- [45] Li J-W (李建伟), Jiang L (江 龙), Yuan L (袁玲), *et al.* Influences of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and nutrition of tobacco seedlings under different fertilizer levels. *Plant Nutrition and Fertilizer Science* (植物营养与肥科学报), 2010, **16**(5): 1190–1195 (in Chinese)
- [46] Ijdo M, Cranenbrouck S, Declerck S. Methods for large-scale production of AM fungi: Past, present, and future. *Mycorrhiza*, 2011, **21**: 1–16
- [47] Wilson D. Endophyte: The evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, 1995, **73**: 274–276
- [48] Xing Y (邢 颖), Zhang X (张 莘), Hao Z-P (郝志鹏), *et al.* Biodiversity of endophytes in tobacco plants and their potential application: A mini review. *Microbiology China* (微生物学通报), 2015, **42**(2): 411–419 (in Chinese)
- [49] Weiß M, Sýkorová Z, Garnica S, *et al.* Sebaciniales everywhere: Previously overlooked ubiquitous fungal endophytes. *PLoS One*, 2011, **6**(2): e16793
- [50] Verma S, Varma A, Rexer KH, *et al.* *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov. a new root-colonizing fungus. *Mycologia*, 1998, **90**: 896–903
- [51] Lou B-G (楼兵干), Sun C (孙 超), Cai D-G (蔡大广). *Piriformospora indica* with multiple functions and its application prospects. *Acta Phytophylacia Sinica* (植物保护学报), 2007, **34**(6): 653–656 (in Chinese)
- [52] Oelmüller R, Sherameti I, Tripathi S, *et al.* *Piriformospora indica*, a cultivable root endophyte with multiple biotechnological applications. *Symbiosis*, 2009, **49**: 1–17
- [53] Varma A, Kost G, Oelmüller R. *Piriformospora indica*: Sebaciniales and their biotechnological applications. *Soil Biology*, Volume 33. Berlin: Springer-Verlag, 2013
- [54] Franken P. The plant strengthening root endophyte *Piriformospora indica*: Potential application and the biology behind. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, **96**: 1455–1464
- [55] Barazani O, Benderoth M, Groten K, *et al.* *Piriformospora indica* and *Sebacina vermifera* increase growth performance at the expense of herbivore resistance in

- Nicotiana attenuata*. *Oecologia*, 2005, **146**: 234–243
- [56] Sherameti I, Shahollari B, Venus Y, *et al.* The endophytic fungus *Piriformospora indica* stimulates the expression of nitrate reductase and the starch-degrading enzyme glucan-water dikinase in tobacco and *Arabidopsis* roots through a homeodomain transcription factor which binds to a conserved motif in their promoters. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, **280**: 2641–2647
- [57] Sahay N, Varma A. *Piriformospora indica*, a new biological hardening tool for micropropagated plants. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, **181**: 297–302
- [58] Ghabooli M, Khatabi B, Ahmadi FS, *et al.* Proteomics study reveals the molecular mechanisms underlying water stress tolerance induced by *Piriformospora indica* in barley. *Journal of Proteomics*, 2013, **94**: 289–301
- [59] Sun C, Johnson JM, Cai D, *et al.* *Piriformospora indica* confers drought tolerance in Chinese cabbage leaves by stimulating antioxidant enzymes, the expression of drought-related genes and the plastid-localized CAS protein. *Journal of Plant Physiology*, 2010, **167**: 1009–1017
- [60] Hui F-Q (惠非琼), Ma J (马杰), Liu J (刘剑), *et al.* Disease resistance analysis of *Nicotiana tabacum* induced by *Piriformospora indica*. *Tobacco Science & Technology* (烟草科技), 2014 (11): 74–79 (in Chinese)
- [61] Fakhro A, Andrade-Linares DR, von Bargen S, *et al.* Impact of *Piriformospora indica* on tomato growth and on interaction with fungal and viral pathogens. *Mycorrhiza*, 2010, **20**: 191–200
- [62] Deshmukh S, Hückelhoven R, Schäfer P, *et al.* The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, **103**: 18450–18457
- [63] Qiang X, Weiss M, Kogel K, *et al.* *Piriformospora indica*: A mutualistic basidiomycete with an exceptionally large plant host range. *Molecular Plant Pathology*, 2011, **13**: 508–518
- [64] Jacobs S, Zechmann B, Molitor A, *et al.* Broad-spectrum suppression of innate immunity is required for colonization of *Arabidopsis* roots by the fungus *Piriformospora indica*. *Plant Physiology*, 2011, **156**: 726–740
- [65] Schäfer P, Pfiffi S, Voll LM, *et al.* Phytohormones in plant root-*Piriformospora indica* mutualism. *Plant Signaling & Behavior*, 2009, **4**: 669–671
- [66] Schäfer P, Pfiffi S, Voll LM, *et al.* Manipulation of plant innate immunity and gibberellin as factor of compatibility in the mutualistic association of barley roots with *Piriformospora indica*. *Plant Journal*, 2009, **59**: 461–474
- [67] Camehl I, Sherameti I, Venus Y, *et al.* Ethylene signaling and ethylene-targeted transcription factors are required to balance beneficial and nonbeneficial traits in the symbiosis between the endophytic fungus *Piriformospora indica* and *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 2010, **185**: 1062–1073
- [68] Johnson JM, Alex T, Oelmüller R. *Piriformospora indica*: The versatile and multifunctional root endophytic fungus for enhanced yield and tolerance to biotic and abiotic stress in crop plants. *Journal of Tropical Agriculture*, 2014, **52**: 103–122
- [69] Vadassery J, Ritter C, Venus Y, *et al.* The role of auxins and cytokinins in the mutualistic interaction between *Arabidopsis* and *Piriformospora indica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2008, **21**: 1371–1383
- [70] Malla R, Prasad R, Kumari R, *et al.* Phosphorus solubilizing symbiotic fungus; *Piriformospora indica*. *Endocytobiosis & Cell Research*, 2004, **15**: 579–600
- [71] Yadav V, Kumar M, Deep DK, *et al.* A phosphate transporter from a root endophytic fungus *Piriformospora indica* plays a role in the phosphate transfer to the plants. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, **285**: 26532–26544
- [72] Kumar M, Yadav V, Kumar H, *et al.* *Piriformospora indica* enhances plant growth by transferring phosphate. *Plant Signaling & Behavior*, 2011, **6**: 723–725
- [73] Vahabi K, Dorcheh SK, Monajembashi S, *et al.* Stress promotes *Arabidopsis*–*Piriformospora indica* interaction. *Plant Signaling & Behavior*, 2016, **11**: e1136763
- [74] Sarma MVRK, Kumar V, Saharan K, *et al.* Application of inorganic carrier-based formulations of fluorescent pseudomonads and *Piriformospora indica* on tomato plants and evaluation of their efficacy. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, **111**: 456–466
- [75] Anith KN, Faseela KM, Archana PA, *et al.* Compatibility of *Piriformospora indica* and *Trichoderma harzianum* as dual inoculants in black pepper (*Piper nigrum* L.). *Symbiosis*, 2011, **55**: 11–17
- [76] Yang J, Kloepper JW, Ryu CM. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, 2009, **14**: 1–4
- [77] Vurukonda SSKP, Vardharajula S, Shrivastava M, *et al.* Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, 2015, **184**: 13–24
- [78] Duca D, Lorv J, Patten CL, *et al.* Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2014, **106**: 85–125
- [79] Glick BR, Penrose DM, Li J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 1998, **190**: 63–68
- [80] Correa-Aragunde N, Graziano M, Lamattina L. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta*, 2004, **218**: 900–905
- [81] Molina-Favero C, Creus CM, Simontacchi M, *et al.* Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2008, **21**: 1001–1009

- [82] Glick BR, Todorovic B, Czarny J, *et al.* Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2007, **26**: 227–242
- [83] Mayak S, Tirosh T, Glick BR. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Science*, 2004, **166**: 525–530
- [84] Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, *et al.* Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 2014, **52**: 347–375
- [85] Ryu CM, Farag MA, Hu CH, *et al.* Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2004, **134**: 1017–1026
- [86] Cho SM, Kang BR, Han SH, *et al.* 2R, 3R-butaneidol, a bacterial volatile produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6, is involved in induction of systemic tolerance to drought in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2008, **21**: 1067–1075
- [87] Miller SH, Browne P, Prigent-combare C, *et al.* Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in pseudomonas species. *Environmental Microbiology Reports*, 2010, **2**: 403–411
- [88] Sandhya V, Ali SKZ, Grover M, *et al.* Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. *Biology and Fertility of Soils*, 2009, **46**: 17–26
- [89] Grichko VP, Glick BR. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiology & Biochemistry*, 2001, **39**: 11–17
- [90] Li Z, Chang S, Lin L, *et al.* A colorimetric assay of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) based on ninhydrin reaction for rapid screening of bacteria containing ACC deaminase. *Letters in Applied Microbiology*, 2011, **53**: 178–185
- [91] Li Z, Chang S, Ye S, *et al.* Differentiation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase from its homologs is the key for identifying bacteria containing ACC deaminase. *FEMS Microbiology Ecology*, 2015, **91**: fiv112, doi: 10.1093/femsec/fiv112
- [92] Marasco R, Rolli E, Ettoumi B, *et al.* A drought resistance-promoting microbiome is selected by root system under desert farming. *PLoS One*, 2012, **7**(10): e48479
- [93] Bruto M, Prigent-Combaret C, Muller D, *et al.* Analysis of genes contributing to plant-beneficial functions in plant growth-promoting rhizobacteria and related Proteobacteria. *Scientific Reports*, 2014, **4**: 6261, doi: 10.1038/srep06261
- [94] Penrose DM, Glick BR. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum*, 2003, **118**: 10–15
- [95] Smyth EM, McCarthy J, Nevin R, *et al.* *In vitro* analyses are not reliable predictors of the plant growth promotion capability of bacteria: A *Pseudomonas fluorescens* strain that promotes the growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, **111**: 683–692
- [96] Jain M. Function genomics of abiotic stress tolerance in plants: A CRISPR approach. *Frontiers in Plant Science*, 2015, **6**: 375, doi: 10.3389/fpls.2015.00375
- [97] Gao J, Wang G, Ma S, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology*, 2015, **87**: 99–110

作者简介 黄化刚,男,1982年生,博士,副研究员.主要从事烟草生理生态研究. E-mail: hhg491124@163.com

责任编辑 肖红