

菌根分子生物学研究进展*

王琚钢¹ 峥 嵘^{1,2} 白淑兰^{1**} 高晓敏³ 刘 敏¹

(¹ 内蒙古农业大学林学院, 呼和浩特 010019; ² 内蒙古师范大学生命科学与技术学院, 呼和浩特 010022; ³ 内蒙古农业大学农学院, 呼和浩特 010019)

摘 要 随着分子生物学的快速发展, 分子生物学技术在菌根研究领域中的应用越来越广泛。本文通过总结国内外相关文献, 从如下方面综述了近期菌根分子生物学研究进展: 菌根真菌的 DNA 条形码、基因组测序; 菌根形成过程中基因表达; 菌根营养吸收过程相关蛋白的变化; 共生体受逆境胁迫时水孔通道蛋白和 SOD 酶的响应机制和菌根分子生物学发展的限制因素。未来菌根分子生物学研究应关注以下三方面工作: 筛选适用于菌根研究的模式植物和突变体、优化 AM 真菌离体培养技术和加大高通量测序技术的运用。

关键词 丛枝菌根; 外生菌根; DNA 条形码; 基因组测序; 功能蛋白; 分子生物学

中图分类号 S793 **文献标识码** A **文章编号** 1000-4890(2014)3-0816-09

Research progress in mycorrhizal molecular biology. WANG Ju-gang¹, ZHENG Rong^{1,2}, BAI Shu-lan^{1**}, GAO Xiao-min³, LIU Min¹ (¹ College of Forestry, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, China; ² College of Life Science and Technology, Inner Mongolia Normal University, Hohhot 010020, China; ³ College of Agriculture, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, China). *Chinese Journal of Ecology*, 2014, 33(3): 816–824.

Abstract: With the rapid development of molecular biology, the molecular biological technologies have been applied widely in the field of mycorrhizal research. In this paper, the research progress in the mycorrhizal molecular biology was reviewed, including DNA barcode and genomic sequencing of mycorrhizal fungi, gene expression during the formation of mycorrhiza, relevant protein expression changes in the process of mycorrhizal symbiosis' nutrient uptake, the response of mycorrhizal aquaporins and SOD to stress conditions, as well as the limiting factors for development of mycorrhizal molecular biology. We proposed that more attention should be paid on screening appropriate model plant and mutant for mycorrhizal research, optimizing *in-vitro* culture technology for AM fungi and increasing the application of high-throughput sequencing technology in the future research.

Key words: arbuscular mycorrhiza; ectomycorrhizae; DNA barcode; genomic sequencing; functional protein; molecular biology.

菌根在陆地生态系统中占据非常重要的生态位, 植物提供给菌根真菌有机物, 菌根真菌促进宿主植物营养和水分的吸收(Parniske, 2008)。丛枝菌根(arbuscular mycorrhiza, AM)和外生菌根(ectomycorrhizae, ECM)在菌根共生体中最为常见, 其他类型的菌根只占少数, 且特殊类型菌根的宿主植物局限于特定植物(Smith & Read, 2008)。随着研究的不断深入, 菌根共生体的一些现象在生理生化水平已明

确, 但分子水平的研究相对滞后, 这主要是因为大多数菌根真菌的全基因组序列并不清楚(Sharmah *et al.*, 2010)。此外, 菌根真菌还具有共生特性(Gamper *et al.*, 2010), 即菌根真菌完成其生活史需和宿主植物共生, 而且到目前为止认为分子生物学研究中的模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)并非菌根植物(Kemppainen & Pardo, 2013)。近年来, 随着分子生物学技术的进步, 尤其是高通量测序技术的出现, 菌根分子生物学得到了快速发展。本文通过总结近期国内外相关研究, 从菌根真菌 DNA 条形码、基因组测序、菌根共生体功能蛋白以及限制菌根

* 国家自然科学基金项目(31060110)和内蒙古农业大学创新培育团队项目资助。

** 通讯作者 E-mail: baishulan2004@163.com

收稿日期: 2013-09-10 接受日期: 2013-11-13

分子生物学发展的因素等四个方面综述菌根研究中分子水平新进展,以期推动我国菌根分子生物学研究。

1 菌根真菌 DNA 条形码

DNA 条形码(DNA barcode)是指生物体内能够代表该物种的、标准的、有足够变异的、易扩增且相对较短的 DNA 片段,DNA 条形码已成为生态学研究的重要工具,常用于物种鉴定。该技术准确、快速、廉价、无需进行纯培养且不需要熟练的操作经验(Frézal & Leblois,2008)。对动物和植物的 DNA 条形码来说,运用最多的是线粒体中细胞色素 C 氧化酶基因,但真菌中细胞色素 C 氧化酶基因长度变化较大(0.64~12.3 kb),并不符合 DNA 条形码技术的要求(Seifert *et al.*,2007)。菌根真菌的 DNA 条形码最有可能是核糖体基因内转录区(internal transcribed spacer,ITS)序列(Nilsson *et al.*,2008),ITS 序列是核糖体 DNA (rDNA) 上的一个非编码区域,包含位于 18S rDNA 和 5.8S rDNA 之间的 ITS1 区(小亚基(small subunit,SSU)),以及位于 5.8S rDNA 和 28S rDNA 之间的 ITS2 区(大亚基(large subunit,LSU))。由于该区域受外界环境因素的影响较小,进化速度很快,可以提供丰富的信息位点和变异位(Porter *et al.*,2011)。

1.1 菌根真菌 ITS 测序

在 AM 真菌的 ITS 鉴定中,既有基于 5.8S SSU 分析(Ryszka *et al.*,2010),也有基于 28S LSU 分析(Stockinger *et al.*,2009;Ryszka *et al.*,2010),但运用最多的是 18S SSU(Stockinger *et al.*,2009;Ryszka *et al.*,2010;Rath *et al.*,2013)。Lee 等(2008)通过当时已公布的 28 种 AM 真菌 18S SSU 序列设计出了针对 AM 真菌 ITS 测序的特异性引物,并且筛选出了可用于 AM 真菌 ITS 测序非特异性引物(表 1),这些引物序列在许多研究中都有运用(Martínez-García *et al.*,2011)。

ECM 真菌的分子鉴定也主要依据 ITS 序列。Timiling 等(2012)检测了北美北极 5 个气候区中北极柳(*Salix arctica*)和全缘叶仙女木(*Dryas integrifolia*)根系中的 ITS 序列,共检测到 204 个 ECM 真菌分类单位(operational taxonomic units,OTUs),远超出了此前形态学鉴定,此外,他们还发现,虽然不同气候区的 2 种宿主植物的数量随着纬度的升高而减少,但根系下 ECM 真菌的种类并未减少。同样利用

表 1 常用于 AM 真菌 ITS 测序的引物
Table 1 Primers usually used in the AM fungi ITS sequencing

引物	序列(5'—3')			T _m (℃)
AM 真菌	AML1	ATC AAC TTT CGA TGG TAG GAT AGA		50.0
特异性引物	AML2	GAA CCC AAA CAC TTT GGT TTC C		48.2
非特异性	T3	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG		46.9
引物	H1	GAT TAA CCC TCA CTA AAG GG		47.0
	H2	ATT TAA CCC TCA CTA AAG GG		46.9
	H3	GTT TAA CCC TCA CTA AAG GG		47.2
	H7	AAA TAA CCC TCA CTA AAG GG		46.9
	H8	AAT AAA CCC TCA CTA AAG GG		46.9
	H11	AAT AAA CCC TCA CTA AAC GG		47.2
	H12	AAT AAA GCC TCA CTA AAG GG		46.9
	H13	AAT AAA CCC TCA GTA AAG GG		46.9

ITS 检测,Smith 等(2011)在热带雨林的 3 种豆科(Leguminosae)乔木中检测到 118 种 OTUs,Richard 等(2011)在地中海西南部的冬青栎(*Quercus ilex*)森林中检测到 129 种 OTUs。

在对其他类型的菌根真菌的 ITS 测序中,研究最多的是兰科菌根(orchidaceous mycorrhizae,OM)真菌,OM 真菌大多是一些 ECM 真菌,且 OM 真菌几乎不从宿主植物获得有机物,它们的宿主植物被称为菌根异养型植物(Yagame *et al.*,2012)。利用 ITS 测序,扩大了一些兰科植物菌根真菌种类数(Bougouere *et al.*,2009;Jacquemyn *et al.*,2012),结合同位素示踪技术,使研究者对 OM 植物与菌根真菌营养交换也获得了新的认知(Kennedy *et al.*,2011)。

在大量研究数据的基础上,DNA 条形码数据库(BOLD,<http://www.barcodinglife.org>)中已经收录并分析了许多有关菌根真菌 ITS 序列(Porter *et al.*,2011)。

1.2 菌根真菌 DNA 条形码的优缺点

除去 DNA 条形码技术的一般优点,基于 ITS 测序的菌根真菌 DNA 条形码还有着独特的优势。AM 真菌种的形态学鉴定利用的是真菌的孢子,除了需要鉴定者有着丰富的经验外,直接从土壤中分离孢子会因不同种产孢时间不同而产生多样性丢失,继代培养也会因植物对 AM 真菌的偏好而导致一些真菌人为流失(王幼珊等,2012);ECM 真菌的形态学更加需要丰富的经验,对那些不产生子实体的 ECM 真菌,目前对它们的鉴定依据主要是解剖镜下菌套和哈氏网的特征,但这会因宿主植物根系细微差异而使鉴定结果产生较大的偏差(白淑兰,2011)。利用菌根真菌 DNA 条形码可以避开传统形态学鉴定

所遇到的上述问题:从含有植物根系的土壤中直接提取 DNA,利用 ITS 测序特异性引物,结合巢式-PCR 扩增和变性梯度凝胶电泳技术,可以快速而又准确地对复杂样品中菌根真菌进行鉴定 (Martínez-García *et al.*, 2011)。

DNA 条形码技术出现仅 10 余年,菌根真菌的 DNA 条形码在应用时也存在一些问題:(1) DNA 条形码鉴定出的菌根真菌种类数远超出形态学鉴定。利用 DNA 条形码技术,Öpik 等 (2013) 对全球 25 个采样点 96 种植物样本根际 AM 真菌进行鉴定,在分子水平上至少发现了 204 个种,远超出了此前形态学鉴定的 156 种。Timiling 等 (2012) 对北美北极地区和 Richard 等 (2011) 对地中海南部 ECM 真菌进行 ITS 测序时也有类似结果。对 ECM 真菌来说,这种差异目前还能被人们接受,因为目前还认为存在着相当数量的未鉴定的无法形成子实体的 ECM 真菌 (Smith & Read, 2008)。但对 AM 真菌来说,最近的研究显示,我们必须改变以往对 AM 真菌 DNA 条形码的认知,这主要包括:①在形态学鉴定上都为根内球囊霉 (*Glomus intraradices*) 的 4 个不同菌株,在分子鉴定上却归为 3 个种 (Stockinger *et al.*, 2009);② 454 高通量测序的结果显示,AM 真菌群落有着很高基因重组频率且对此有很强耐受力 (Lekberg *et al.*, 2012);③ AM 真菌的孢子在萌发的过程中会发生基因重组,对特定群落的特定种 AM 真菌,至少需要 8 个孢子才能完全反映该种 AM 真菌的全部遗传信息 (Sanders & Croll, 2010)。从上面 3 个研究可知,基于 ITS 序列的 AM 真菌 DNA 条形码所鉴定出的种可能并不是传统意义上种,AM 真菌的 DNA 条形码必须要建立在传统的形态学鉴定的基础上。(2) 检测结果容易出现单例真菌,即使多次重复也很难再次检测 (Richard *et al.*, 2011)。对 AM 真菌来说,还可以用 AM 真菌高基因重组频率来解释,但对 ECM 真菌来说,还没有报道表明 ECM 真菌有较高的基因重组频率,这给 ECM 真菌的 DNA 条形码应用带来了一定困难。

2 菌根真菌基因组测序

随着测序技术的进步,对某一物种进行基因组测序变得容易很多,菌根真菌也不例外。与 AM 真菌不同的是,ECM 真菌可以在体外进行纯培养,得益于此,双色蜡蘑 (*Laccaria bicolor*) (Martin *et al.*, 2008a)、黑孢块菌 (*Tuber melanosporum*) (Martin *et*

al., 2010) 和彩色豆马勃 (*Pisolithus tinctorius*) 的基因组测序工作已经完成 (彩色豆马勃的相关测序工作已由法国 INRA Tree-Microbe Interactions Research Group 在 2012 年 3 月完成,但基因组数据未释放)。由于同一种 AM 真菌不同种群甚至是同一种群的不同孢子之间基因都存在着很大的差异,导致 AM 真菌基因组测序工作进展较慢 (Antunes *et al.*, 2010)。在不断的努力下 (Martin *et al.*, 2008b),根内球囊霉的全基因组测序也已完成,并于 2013 年 7 月 17 日释放了基因组数据 (<http://www.1000.fungalgenomes.org>)。

在未来的菌根真菌基因组测序工作中,有 2 种菌根真菌值得关注:AM 真菌摩西球囊霉 (*Funneliformis mosseae*) 和 ECM 真菌土生空团菌 (*Cenococcum geophilum*)。因为摩西球囊霉的宿主植物范围非常广泛,且在一些逆境中其和植物形成共生体对植物提高抗逆效果最好 (Daei *et al.*, 2009);土生空团菌不形成子实体而且宿主范围较广,在许多恶劣立地条件中均有发现 (白淑兰, 2011)。所以,对这 2 种菌根真菌的基因组测序迫在眉睫,并且意义重大。

3 菌根共生体功能蛋白

传统的分子标记手段是利用物种之间的基因型差异,这些技术在菌根相关研究中的应用已有介绍 (孟静静等, 2009),随着研究不断深入,多种分子生物学技术交叉运用对菌根共生体中具体编码功能蛋白的基因进行研究 (Gamper *et al.*, 2010)。菌根共生体的功能蛋白较多,本文仅对菌根形成过程中的基因、菌根共生体营养吸收 (P、N、C) 相关蛋白、水孔通道蛋白、菌根真菌 SOD 酶进行具体阐述。

3.1 菌根形成过程中基因的表达

胡江等 (2007) 综述了 AM 共生体信号传导路径研究进展, Martin 等 (2001) 也介绍了 ECM 形成过程中信号传导和共生体中一些基因表达变化。近几年有关此方面研究的新进展主要有:1) AM 真菌通过促使根系可利用 P 浓度发生变化来关闭宿主植物的防御相关基因 (几丁质酶、 β -1,3-葡聚糖酶以及过氧化氢酶基因) (Song *et al.*, 2011)、增加植物根系中独角金萜素内酯 (该类物质是 AM 真菌和宿主植物相互识别的物质) 合成相关基因的表达 (Balzer-gue *et al.*, 2011);2) 在基因水平上证实,生长素涉及 AM 早期的形成过程 (Hanlon & Coenen, 2011);3) Vieira 等 (2012) 分离出了彩色豆马勃与欧洲栗

(*Castanea sativa*)形成的 ECM 共生体中菌根形成标志基因 *PtSRP*。

3.2 菌根共生体营养吸收相关蛋白

3.2.1 磷酸盐转运蛋白 在形成菌根的植物中,存在 2 条 P 吸收途径:一是利用根系皮层细胞直接吸收 P,未形成菌根的植物只能依靠此途径吸收 P;二是菌根途径,在形成菌根的植物中,该途径是植物吸收 P 的主要途径(王璐钢等,2012)。在菌根途径中,菌根真菌和植物自身的高亲和力磷酸盐转运蛋白都发挥着重要作用。

1)真菌方面。许多菌根真菌的全长和部分磷酸盐转运蛋白的 cDNA 已经被克隆出来(表 2),其可以帮助宿主植物吸收贫 P 区以外土壤中的 P;Riley 和 Corradi(2013)分析了 AM 真菌与布拉克须霉(*Phycomyces blakesleeanus*)相关基因组数据后认为,AM 真菌的磷酸盐转运蛋白位于交配型位点,极有可能决定着 AM 真菌的“性别”,这为 AM 真菌的有性繁殖假说提供了一些证据。

表 2 在 NCBI 中检索到的菌根菌磷酸盐转运蛋白基因
Table 2 Mycorrhizal fungal phosphate transporter genes retrieved in national center of biotechnology information

真菌种类		登录号	文献
AM 真菌	<i>Glomus aggregatum</i>	GU585518.1	Sokolski <i>et al.</i> ,2011
	<i>Glomus clarum</i>	GU585521.1	Sokolski <i>et al.</i> ,2011
	<i>Glomus coronatum</i>	GU585499.1	Sokolski <i>et al.</i> ,2011
	<i>Glomus custos</i>	GU585522.1	Sokolski <i>et al.</i> ,2011
	<i>Glomus diaphanum</i>	GU585519.1	Sokolski <i>et al.</i> ,2011
	<i>Glomus intraradices</i>	GU585520.1	Sokolski <i>et al.</i> ,2011
		AF359112.1	Maldonado-Mendoza <i>et al.</i> ,2001
		AY037894.1	
	<i>Glomus irregulare</i>	GU585503.1	Sokolski <i>et al.</i> ,2011
		GU585504.1	
		GU585508.1	
		GU585511.1	
		GU585512.1	
		GU585513.1	
	<i>Glomus mosseae</i>	DQ074452.1	Benedetto <i>et al.</i> ,2005
		GU585500.1	Sokolski <i>et al.</i> ,2011
		GU585501.1	
	<i>Glomus proliferum</i>	GU585523.1	Sokolski <i>et al.</i> ,2011
	<i>Glomus</i> sp1	GU585514.1	Sokolski <i>et al.</i> ,2011
	<i>Glomus</i> sp2	GU585515.1	Sokolski <i>et al.</i> ,2011
	<i>Glomus</i> sp3	GU585516.1	Sokolski <i>et al.</i> ,2011
	<i>Glomus versiforme</i>	U38650.1	Harriison & Van Buuren,1995
ECM 真菌	<i>Hebeloma cylindrosporum</i>	AJ970310.1	Tatry <i>et al.</i> ,2008
		AJ970311.1	
	<i>Laccaria bicolor</i>	XM_001880935.1	Martin <i>et al.</i> ,2008a
		XM_001890440.1	
	<i>Pholiota nameko</i>	AB060641.1	Tasaki <i>et al.</i> ,2002
	<i>Tuber melanosporum</i>	XM_002837842.1	Martin <i>et al.</i> ,2010

2)宿主植物方面。Xie 等(2013)通过 RNA 干扰技术证实了植物自身的高亲和力磷酸盐转运蛋白受菌根存在的诱导,Chen 等(2011)也分离出了控制菌根激活磷酸盐转运蛋白的 2 个顺式作用元件 *MYCS* 和 *PIBS*,它们在子叶植物中普遍存在。由于 As 和 P 在植物中都依靠磷酸盐转运蛋白运输,菌根的存在也影响着 As 的吸收,Chen 等(2013)用 RT-PCR 技术对接种根内球囊霉后的水稻(*Oryza sativa*)在 As 胁迫下进行了体内磷酸盐转运蛋白家族基因的研究,结果表明,AM 显著降低水稻中 OsPT2 的表达,同时增加 OsPT11 的表达,单位生物量中 As 累积减少,在较高 P 浓度下,菌根化水稻中这种效应更加明显。

3.2.2 N 吸收相关蛋白 菌根共生体 N 吸收的基本过程是:1)硝酸根和铵根通过根外菌丝中的高亲和力 N 转运蛋白被吸收;2)菌根真菌吸收 N 后,将其同化为精氨酸;3)精氨酸转移到根内菌丝中,菌根真菌精氨酸酶将精氨酸分解为鸟氨酸和尿素;4)菌根真菌释放铵根离子到周围的皮层细胞中,最后铵根离子被植物铵根转运蛋白同化(Miransari,2011)。在这一过程中,根内球囊霉中高亲和力的铵根离子转运蛋白 GintAMT1(Lopez-Pedrosa *et al.* ,2006)和精氨酸酶 TC105031(Gomez *et al.* ,2009)已经被表征出来;在百脉根(*Lotus japonicus*)中发现了相当数量的 N 吸收相关基因在含有菌根结构的根系皮层细胞中大量表达,与植物根系中高亲和力磷酸盐转运蛋白表达一样,它们的表达受菌根存在的诱导(Guether *et al.* ,2009)。

对 AM 真菌来说,其自身利用 N 的形式是氨基酸和小肽段,研究表明,AM 真菌从外界环境中直接吸收甘氨酸和精氨酸,摩西球囊霉中命名为 *GmosAAP1* 基因编码的酶可以直接吸收这 2 种氨基酸(Cappellazzo *et al.* ,2008),但目前对 AM 真菌直接吸收氨基酸的生态重要性仍然不得而知(Leigh *et al.* ,2009)。

3.2.3 C 循环相关蛋白 宿主植物提供给菌根真菌的有机物是菌根真菌生存的基础,菌根植物将光合作用产物的 20% 提供给菌根真菌(Smith & Read,2008)。目前认为菌根真菌通过单糖转运蛋白在丛枝膜或菌丝圈界面上转运葡萄糖,但是有关该功能的基因目前只在 *Geosiphon pyriforme*(球囊菌门非菌根真菌,与 AM 真菌亲缘关系很近)中发现(Schüßler *et al.* ,2006),对菌根共生体来说,现在既

未确定这一功能在细胞中发生的具体位置,也未有发现介导宿主植物向菌根真菌转运葡萄糖的编码蛋白。菌根真菌吸收葡萄糖后,通过糖原合成酶将其转化为糖原,根内球囊霉中编码该酶的基因 *GintGS* 已经被表征出来(Bago *et al.*, 2003),对外生菌根真菌双色蜡蘑和黑孢块菌的基因组分析发现同样有类似基因存在(Martin *et al.*, 2008a, 2010)。在根内菌丝中糖原被合成为甘油三酯,以脂小体的形式作为C储存,或者转运到根外菌丝中作为乙醛酸循环燃料增加代谢的活力。菌根真菌乙醛酸循环中已鉴定出来的2个基因是根内球囊霉的异柠檬酸合成酶和苹果酸合成酶基因(Lammers *et al.*, 2011)。

无论是AM还是ECM,宿主植物在菌根真菌感染后已糖转运蛋白基因在地上和地下部分的表达量均增加(Gamper *et al.*, 2010);此外,真菌的感染增加了植物根系中蔗糖合成酶相关基因的表达(Martin *et al.*, 2001; Nehls *et al.*, 2007)。从表面上看,可能是宿主植物方便为菌根真菌提供蔗糖等有机物,但蔗糖合成酶的活性是在质外体的蔗糖再吸收过程中被激活(Parrent *et al.*, 2009)。宿主植物控制菌根共生体C流动的途径可能是:宿主植物提供给AM和ECM蔗糖,通过植物酸性转化酶(Parrent *et al.*, 2009)、中性转化酶和蔗糖合成酶(Wu *et al.*, 2013)将蔗糖转化为菌根真菌可以利用的葡萄糖和果糖,弥补菌根共生体,尤其是菌根真菌中所缺乏的降解酶以维持菌根真菌的正常生长。

3.3 水孔通道蛋白

水孔通道蛋白是一类促使和调控水分被动运输的蛋白,植物和菌根真菌的细胞膜上都有水孔通道蛋白的存在, Li等(2013)首次克隆出根内球囊霉的2个水孔通道蛋白基因 *GintAQPF1* 和 *GintAQPF2*, 并且用缺陷型酵母杂交验证了其功能。植物和真菌的细胞膜水孔通道蛋白基因(PIPs)在根外菌丝和根之间大量表达,二者之间形成一个高速的水分传输通道(Groppa *et al.*, 2012)。此外,水孔通道蛋白促使H₂O₂的降解,对逆境中植物水分吸收发挥着重要的作用(李涛和陈保冬, 2012)。

在正常水分条件下,不论是AM还是ECM植物,菌根真菌的感染都增加了植物根系中水孔通道蛋白的表达(Smith *et al.*, 2010)。但在水分胁迫条件下,AM植物和ECM植物根系中水孔通道蛋白表达规律并不相同。利用Northern杂交技术, Porcel

等(2006)发现了干旱胁迫下摩西球囊霉和根内球囊霉的感染降低了大豆(*Glycine max*)中 *GmPIP1* 基因和莴苣(*Lactuca sativa*)中 *LsPIP1* 和 *LsPIP2* 基因的表达; Aroca等(2007)发现摩西球囊霉降低了菜豆(*Phaseolus vulgaris*)在干旱、寒冷以及盐胁迫下 *PvPIP1* 和 *PvPIP2* 基因的表达;而ECM真菌感染植物后,逆境中植物根系中PIPs表达则是进一步增加, Marjanović等(2005)报道, 欧美杂种山杨(*Populus tremula* × *tremuloides*)接种毒蝇伞(*Amanita muscaria*)后,水孔通道蛋白在干旱胁迫下比正常水分下表达增加57%。

Aroca等(2009)指出,水分胁迫下,根内球囊霉PIPs的表达关闭了宿主植物中部分PIPs的表达。李涛和陈保冬(2012)在干旱胁迫下接种AM真菌的玉米(*Zea mays*)上也发现有类似现象存在。ECM真菌双色蜡蘑的PIPs家族基因已经被鉴定出来(Dietz *et al.*, 2011),但尚无报道双色蜡蘑的PIPs可以影响宿主植物的PIPs表达。

3.4 菌根真菌SOD酶

超氧化物歧化酶(SOD)是最直接催化活性氧降解的酶。植物在形成菌根共生体后,可以显著提高活性氧清除系统中各相关酶,尤其是SOD酶活性(王琚钢等, 2012)。有研究发现,柑橘(*Citrus sinensis*)接种地表球囊霉后体内SOD活性增加与丛枝结构的丰度呈现显著正相关(Wu & Zou, 2009)。近明球囊霉(*Glomus claroideum*)和根内球囊霉中编码的SOD基因均已被分离表征(Janouskova *et al.*, 2009; González-Guerrero *et al.*, 2010)。AM植株中SOD酶活性增加有AM真菌的参与,但是否归结于AM真菌的SOD酶转移到了宿主植物细胞中目前还不能确定。

对ECM植株来说,目前尚无研究报道ECM的某一结构对提高菌根化植株的SOD活性至关重要。但在体外纯培养的菌丝当中,检测到了彩色豆马勃和圆头伞(*Descolea antarctica*)自身的活性氧清除系统相关酶的存在,假山毛榉(*Nothofagus dombeyi*)在和这2种真菌形成共生体后, SOD酶活性比未接种植株大幅提高(Alvarez *et al.*, 2009);在对根内球囊霉的SOD基因进行BLAST检索时发现,双色蜡蘑和黑孢块菌中也存在类似的基因。这表明ECM真菌自身SOD基因也可能参与ECM植株SOD活性提

高,但具体如何发挥作用有待进一步研究。

4 结 语

近年来菌根分子生物学发展迅速,但仍然存在一些限制其发展的因素。主要包括:菌根菌的共生特性,缺乏足够的突变体、AM 真菌的纯培养技术和自身的高基因变异性。

(1)菌根菌的共生特性。AM 和 ECM 真菌均需和宿主植物共生才能完成全部生活史,分子生物学的模式植物拟南芥是十字花科(Cruciferae)植物,目前尚未发现它能形成菌根共生体。在 AM 共生体的研究过程中,常用模式植物是番茄(*Solanum lycopersicum*)、百脉根(*Lotus* spp.)和蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*),这些植物中已经筛选出了很多 AM 真菌相关突变株(胡江等,2007;Smith *et al.*, 2010);但对于 ECM 共生体来说,由于大多数 ECM 真菌存在着宿主特异性(Zhou & Hyde, 2001),目前还没有一种合适的模式植物。那些可以在腐生和共生两种生活方式中进行转换的 ECM 真菌尤为值得关注,找到控制腐生和共生之间转换的基因,不仅有助于研究 ECM 共生体的共生特性,而且还可能找到珍贵共生食用菌人工快速培育的突破口(白淑兰, 2011)。

(2)缺乏足够的突变体。现有的菌根真菌相关基因多是在一些缺陷型酵母和固氮菌上进行验证(胡江等,2007),这可以验证那些酵母菌和 AM 真菌共有的基因,以及菌根形成过程中的部分基因(菌根形成过程和根瘤形成过程部分信号传导路径共用)。对那些菌根真菌独有的基因和特征,目前常用的基因功能验证手段是基因敲除和 RNA 干扰技术,但这 2 种技术均存在着自身的缺点:基因敲除可以直接有效验证某一基因的功能,但对大多菌根真菌来说并不适合,因为其基因组数据并不知晓,此外,该技术需要构筑复杂的体系,操作周期长,费用高,效率低(Devers *et al.*, 2013);RNA 干扰技术存在的问题是:目前还不能控制短发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA)插入基因组的位置,整合到染色体上 shRNA 有可能丢失,而且 shRNA 还存在着脱靶效应(shRNA 会干扰非目的未知基因)(Kempainen & Pardo, 2013)。所以,筛选更多适合于菌根共生体的突变体非常必要。

(3)AM 真菌的纯培养技术和自身的高基因变异性。时至今日,AM 真菌的离体纯培养技术仍未解决,最接近的胡萝卜根培养体系也只能算是半纯

培养。这不仅无法获得足够用于分子生物学相关研究的材料,而且还限制了 AM 真菌在实际生产中大规模应用。此外,AM 真菌存在着很高的基因变异性;同一种 AM 真菌的不同种群,同一种群的不同孢子的基因型之间都有很大变异(Antunes *et al.*, 2010)。高通量测序技术的出现在一定程度上解决了该问题,利用高通量测序技术可以对非模式植物的转录组进行研究,从理论上讲,在有对照的情况下,该技术可以对菌根共生体的转录组进行研究(Larsen *et al.*, 2011),但只能对某一时刻或某一时段段的转录水平进行研究,无法在 DNA 水平上解释问题。

上述问题都是限制菌根分子生物学研究的瓶颈,也是今后一段时间菌根分子生物学要努力解决的热点问题。

参考文献

- 白淑兰. 2011. 菌根研究及内蒙古大青山外生菌根资源. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社.
- 胡 江, 孙淑斌, 徐国华. 2007. 植物中丛枝菌根形成的信号途径研究进展. 植物学通报, **24**(6): 703-713.
- 李 涛, 陈保冬. 2012. 丛枝菌根真菌通过上调根系及自身水孔通道蛋白基因表达提高玉米抗旱性. 植物生态学报, **36**(9): 973-981.
- 孟静静, 贺学礼, 李 君. 2009. 分子生物学新技术在菌根研究中的应用. 河北林果研究, **24**(3): 315-319.
- 王璐钢, 峥 嵘, 白淑兰, 等. 2012. 外生菌根对干旱胁迫的响应. 生态学杂志, **31**(6): 1571-1576.
- 王幼珊, 张淑彬, 张美庆. 2012. 中国丛枝菌根真菌资源与种质资源. 北京: 中国农业出版社.
- Alvarez M, Huygens D, Fernandez C, *et al.* 2009. Effect of ectomycorrhizal colonization and drought on reactive oxygen species metabolism of *Nothofagus dombeyi* roots. *Tree Physiology*, **29**: 1047-1057.
- Antunes PM, Koch AM, Morton JB, *et al.* 2010. Evidence for functional divergence in arbuscular mycorrhizal fungi from contrasting climatic origins. *New Phytologist*, **189**: 507-514.
- Aroca R, Bago A, Sutka M, *et al.* 2009. Expression analysis of the first arbuscular mycorrhizal fungi aquaporin described reveals concerted gene expression between salt-stressed and nonstressed mycelium. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **22**: 1169-1178.
- Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano JM. 2007. How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold, or salinity stresses? *New Phytologist*, **173**: 808-816.
- Bago B, Pfeffer PE, Abubaker J, *et al.* 2003. Carbon export

- from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. *Plant Physiology*, **131**: 1496–1507.
- Balzerque C, Puech-Pagès V, Bécard G, *et al.* 2011. The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signaling events. *Journal of Experimental Botany*, **62**: 1049–1060.
- Benedetto A, Magurno F, Bonfante P, *et al.* 2005. Expression profiles of a phosphate transporter gene (*Gmos PT*) from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza*, **15**: 620–627.
- Bougoure J, Ludwig M, Brundrett M, *et al.* 2009. Identity and specificity of the fungi forming mycorrhizas with the rare mycoheterotrophic orchid *Rhizanthella gardneri*. *Mycological Research*, **113**: 1097–1106.
- Cappellazzo G, Lanfranco L, Fitz M, *et al.* 2008. Characterization of an amino acid permease from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant Physiology*, **147**: 429–437.
- Chen AQ, Gu M, Sun SB, *et al.* 2011. Identification of two conserved cis-acting elements, MYCS and PIBS, involved in the regulation of mycorrhiza-activated phosphate transporters in eudicot species. *New Phytologist*, **189**: 1157–1169.
- Chen XW, Wu FY, Li H, *et al.* 2013. Phosphate transporters expression in rice (*Oryza sativa* L.) associated with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) colonization under different levels of arsenate stress. *Environmental and Experimental Botany*, **87**: 92–99.
- Daei G, Ardakani M, Rejali F, *et al.* 2009. Alleviation of salinity stress on wheat yield, yield components, and nutrient uptake using arbuscular mycorrhizal fungi under field conditions. *Journal of Plant Physiology*, **166**: 617–625.
- Devers EA, Teply J, Reinert A, *et al.* 2013. An endogenous artificial microRNA system for unraveling the function of root endosymbioses related genes in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biology*, **13**: 82.
- Dietz S, von Bülow J, Beitz E, *et al.* 2011. The aquaporin gene family of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*: Lessons for symbiotic functions. *New Phytologist*, **190**: 927–940.
- Frézal L, Leblois R. 2008. Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. *Infection, Genetics and Evolution*, **8**: 727–736.
- Gamper HA, van der Heijden MGA, Kowalchuk GA. 2010. Molecular trait indicators: Moving beyond phylogeny in arbuscular mycorrhizal ecology. *New Phytologist*, **185**: 67–82.
- Gomez SK, Javot H, Deewatthanawong P, *et al.* 2009. *Medicago truncatula* and *Glomus intraradices* gene expression in cortical cells harboring arbuscules in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *BMC Plant Biology*, **9**: 10.
- González-Guerrero M, Oger E, Benabdellah K, *et al.* 2010. Characterization of a Cu, Zn superoxide dismutase gene in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Current Genetics*, **56**: 265–274.
- Groppa MD, Benavides MP, Zawoznik MS. 2012. Root hydraulic conductance, aquaporins and plant growth promoting microorganisms: A revision. *Applied Soil Ecology*, **61**: 247–254.
- Guether M, Balestrini R, Hannah M, *et al.* 2009. Genome-wide reprogramming of regulatory networks, transport, cell wall and membrane biogenesis during arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicus*. *New Phytologist*, **182**: 200–212.
- Hanlon MT, Coenen C. 2011. Genetic evidence for auxin involvement in arbuscular mycorrhiza initiation. *New Phytologist*, **189**: 701–709.
- Harriison MJ, Van Buuren ML. 1995. A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature*, **378**: 626–629.
- Jacquemyn H, Dejal A, de Hert K, *et al.* 2012. Variation in mycorrhizal associations with Tulasnelloid fungi among populations of five *Dactylorhiza* species. *PLoS ONE*, **7**: e42212.
- Janouskova M, Seddas P, Mrnka L, *et al.* 2009. Development and activity of *Glomus intraradices* as affected by co-existence with *Glomus claroideum* in one root system. *Mycorrhiza*, **19**: 393–402.
- Kemppainen MJ, Pardo AG. 2013. *LbNrt* RNA silencing in the mycorrhizal symbiont *Laccaria bicolor* reveals a nitrate-independent regulatory role for a eukaryotic NRT2-type nitrate transporter. *Environmental Microbiology Reports*, **5**: 353–366.
- Kennedy AH, Taylor DL, Watson LE. 2011. Mycorrhizal specificity in the fully mycoheterotrophic *Hexalectris* Raf. (Orchidaceae: Epidendroideae). *Molecular Ecology*, **20**: 1303–1316.
- Lammers PJ, Abubaker J, Arreola R, *et al.* 2011. The glyoxylate cycle in an arbuscular mycorrhizal fungus: Gene expression and carbon flow. *Plant Physiology*, **127**: 1287–1298.
- Larsen PE, Sreedasyam A, Trivedi G, *et al.* 2011. Using next generation transcriptome sequencing to predict an ectomycorrhizal metabolome. *BMC Systems Biology*, **5**: 70.
- Lee J, Lee S, Young JPW. 2008. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, **65**: 339–349.
- Leigh J, Hodge A, Fitter AH. 2009. Arbuscular mycorrhizal fungi can transfer substantial amounts of nitrogen to their host plant from organic material. *New Phytologist*, **181**: 199–207.
- Lekberg Y, Schnoor T, Kjølør R, *et al.* 2012. 454-sequencing reveals stochastic local reassembly and high disturbance tolerance within arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Journal of Ecology*, **100**: 151–160.
- Li T, Hu YJ, Hao ZP, *et al.* 2013. First cloning and characterization of two functional aquaporin genes from an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist*,

- 197: 617–630.
- Lopez-Pedrosa A, Gonzalez-Guerrero M, Valderas A, *et al.* 2006. GintAMT1 encodes a functional high-affinity ammonium transporter that is expressed in the extraradical mycelium of *Glomus intraradices*. *Fungal Genetics and Biology*, **43**: 102–110.
- Maldonado-Mendoza IE, Dewbre GR, Harrison MJ. 2001. A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **14**: 1140–1148.
- Marjanović Ž, Uehlein N, Kaldenhoff R, *et al.* 2005. Aquaporins in poplar: What a difference a symbiont makes! *Planta*, **222**: 258–268.
- Martin F, Aerts A, Ahrén D, *et al.* 2008a. The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature*, **452**: 88–92.
- Martin F, Duplessis S, Ditengou F, *et al.* 2001. Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: Signal and communication genes. *New Phytologist*, **151**: 145–154.
- Martin F, Gianinazzi-Pearson V, Hijri M, *et al.* 2008b. The long hard road to a completed *Glomus intraradices* genome. *New Phytologist*, **180**: 747–750.
- Martin F, Kohler A, Murat C, *et al.* 2010. Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature*, **464**: 1033–1038.
- Martínez-García LB, Armas C, Miranda JD, *et al.* 2011. Shrubs influence arbuscular mycorrhizal fungi communities in a semi-arid environment. *Soil Biology & Biochemistry*, **43**: 682–689.
- Miransari M. 2011. Arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen uptake. *Archives of Microbiology*, **193**: 77–81.
- Nehls U, Grunze N, Willmann M, *et al.* 2007. Sugar for my honey: Carbohydrate partitioning in ectomycorrhizal symbiosis. *Phytochemistry*, **68**: 82–91.
- Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, *et al.* 2008. Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary Bioinformatics*, **4**: 193–201.
- Öpik M, Zobel M, Cantero JJ, *et al.* 2013. Global sampling of plant roots expands the described molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, **23**: 411–430.
- Parniske M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, **6**: 763–775.
- Parrent JL, James TY, Vasaitis R, *et al.* 2009. Friends or foe? Evolutionary history of glycoside hydrolase family 32 genes encoding for sacrolytic activity in fungi and its implications for plant–fungal symbioses. *BMC Evolutionary Biology*, **9**: 148.
- Porcel R, Aroca R, Azcon R, *et al.* 2006. PIP aquaporin gene expression in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants in relation to drought stress tolerance. *Plant Molecular Biology*, **60**: 389–404.
- Porter TM, Martin W, James TY, *et al.* 2011. Molecular phylogeny of the Blastocladiomycota (Fungi) based on nuclear ribosomal DNA. *Fungal Biology*, **115**: 381–392.
- Rath M, Weber HC, Lmhof S. 2013. Morpho-anatomical and molecular characterization of the mycorrhizas of European Polygala species. *Plant Biology*, **15**: 548–557.
- Richard F, Roy M, Shahin Q, *et al.* 2011. Ectomycorrhizal communities in a Mediterranean forest ecosystem dominated by *Quercus ilex*: Seasonal dynamics and response to drought in the surface organic horizon. *Annals of Forest Science*, **68**: 57–68.
- Riley R, Corradi N. 2013. Searching for clues of sexual reproduction in the genomes of arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Ecology*, **6**: 44–49.
- Ryszka P, Błaskowski J, Jurkiewicz A, *et al.* 2010. Arbuscular mycorrhiza of *Arnica montana* under field conditions: Conventional and molecular studies. *Mycorrhiza*, **20**: 551–557.
- Sanders IR, Croll D. 2010. Arbuscular mycorrhiza: The challenge to understand the genetics of the fungal partner. *Annual Review of Genetics*, **44**: 271–292.
- Schüßler A, Martin H, Cohen D, *et al.* 2006. Characterization of a carbohydrate transporter from symbiotic glomeromycotan fungi. *Nature*, **444**: 933–936.
- Seifert KA, Samson RA, deWaard JR, *et al.* 2007. Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**: 3901–3906.
- Sharmah D, Jha DK, Pandey RR. 2010. Molecular approaches in arbuscular mycorrhizal research: A Review. *Journal of Phytology*, **2**: 75–90.
- Smith ME, Henkel TW, Catherine Aime M, *et al.* 2011. Ectomycorrhizal fungal diversity and community structure on three co-occurring leguminous canopy tree species in a Neotropical rainforest. *New Phytologist*, **192**: 699–712.
- Smith SE, Facelli E, Pope S, *et al.* 2010. Plant performance in stressful environments: Interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil*, **326**: 3–20.
- Smith SE, Read DJ. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. San Diego: Academic Press.
- Sokolski S, Dalpe Y, Piche Y. 2011. Phosphate transporter genes as reliable gene markers for the identification and discrimination of arbuscular mycorrhizal fungi in the genus *Glomus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**: 1888–1891.
- Song FQ, Song G, Dong AR, *et al.* 2011. Regulatory mechanisms of host plant defense responses to arbuscular mycorrhiza. *Acta Ecologica Sinica*, **31**: 322–327.
- Stockinger H, Walker C, Schüßler A. 2009. ‘*Glomus intraradices* DAOM197198’, a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. *New Phytologist*

- logist*, **183**: 1176–1187.
- Tasaki Y, Kamiya Y, Azwan A, *et al.* 2002. Gene expression during Pi deficiency in *Pholiota nameko*: Accumulation of mRNAs for two transporters. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **66**: 790–800.
- Tatry MV, Kassis EE, Lambilliotte R, *et al.* 2008. Two differentially regulated phosphate transporters from the symbiotic fungus *Hebeloma cylindrosporum* and phosphorus acquisition by ectomycorrhizal *Pinus pinaster*. *The Plant Journal*, **57**: 1092–1102.
- Timling I, Dahlberg A, Walker DA, *et al.* 2012. Distribution and drivers of ectomycorrhizal fungal communities across the North American Arctic. *Ecosphere*, **3**: 111.
- Vieira HEE, Lima CEP, Calzavara-Silva CE, *et al.* 2012. The full length *PtSRP* (*Pisolithus tinctorius* symbiosis related protein) fungal mRNA encodes a potential marker of ectomycorrhiza formation. *American Journal of Molecular Biology*, **2**: 258–264.
- Wu QS, Zou YN, Huang YM, *et al.* 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi induce sucrose cleavage for carbon supply of arbuscular mycorrhizas in citrus genotypes. *Scientia Horticulturae*, **160**: 320–325.
- Wu QS, Zou YN. 2009. Mycorrhiza has a direct effect on reactive oxygen metabolism of drought-stressed citrus. *Plant, Soil and Environment*, **55**: 436–442.
- Xie XA, Huang W, Liu FC, *et al.* 2013. Functional analysis of the novel mycorrhiza-specific phosphate transporter AsPT1 and PHT1 family from *Astragalus sinicus* during the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, **198**: 836–852.
- Yagame T, Orihara T, Selosse MA, *et al.* 2012. Mixotrophy of *Platanthera minor*, an orchid associated with ectomycorrhiza-forming Ceratobasidiaceae fungi. *New Phytologist*, **193**: 178–187.
- Zhou DQ, Hyde KD. 2001. Host-specificity, host-exclusivity, and host-recurrence in saprobic fungi. *Mycological Research*, **105**: 1449–1457.

作者简介 王琚钢,男,1987年生,博士研究生。主要从事根际微生物与林木生物技术研究。E-mail: wangjugang123456@126.com

责任编辑 魏中青
