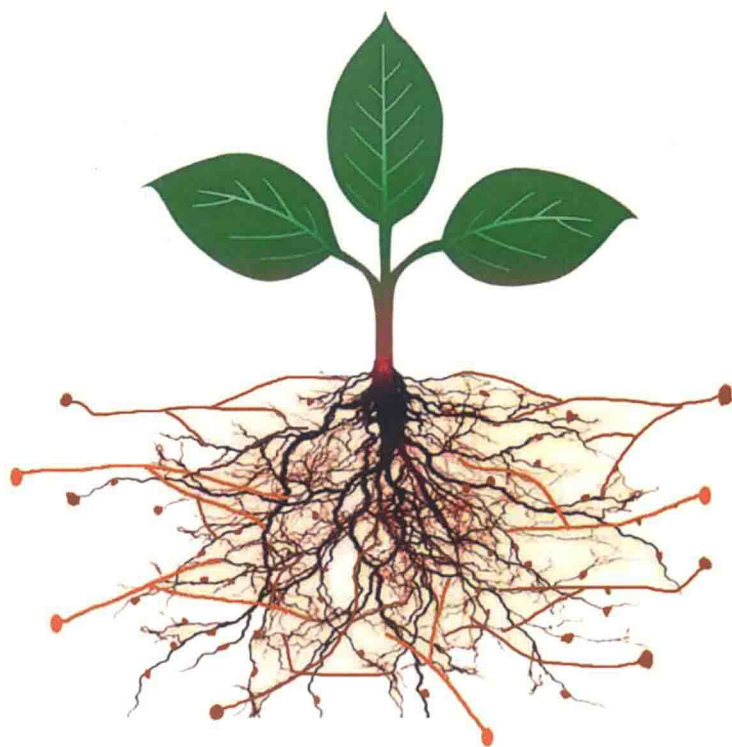


Study on the Formation Mechanism
of Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis

丛枝菌根共生体形成 机制研究

宋福强 著



科学出版社

丛枝菌根共生体形成机制研究

宋福强 著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

丛枝菌根真菌能够与 90%以上的植物建立共生关系,对陆生植物的形成、进化及维持生态系统的稳定起着重要的作用。但由于丛枝菌根真菌不能纯人工培养,严重制约了人们对宿主植物形成丛枝菌根机制的认识。本书凝练了作者关于“丛枝菌根共生体形成机制”研究的最新进展,重点揭示了丛枝菌根真菌对宿主植物防御功能的调控,以及采用同位素标记相对和绝对定量技术、抑制消减杂交技术和转录组测序技术等现代研究手段,深入揭示了宿主植物形成丛枝菌根过程中诱导产生的共生相关蛋白与共生基因,同时深入探讨了丛枝菌根真菌与宿主植物的共生关系,为进一步了解丛枝菌根的代谢特征和分子调控机制奠定了理论基础。

本书适合微生物生态学、森林病理学、分子生态学及农业和环境等领域的广大科研、教学、专业技术人员及相关专业研究生阅读与参考。

图书在版编目 (CIP) 数据

丛枝菌根共生体形成机制研究/宋福强著. —北京: 科学出版社, 2020.1
ISBN 978-7-03-062167-2

I. ①丛… II. ①宋… III. ①丛枝菌属-菌根菌-植物共生-研究
IV. ①Q949.329.08

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2019)第 179088 号

责任编辑: 岳漫宇 闫小敏 / 责任校对: 严 娜
责任印制: 吴兆东 / 封面设计: 刘新新

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京虎彩文化传播有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2020 年 1 月第 一 版 开本: B5 (720×1000)

2020 年 1 月第一次印刷 印张: 11 3/4

字数: 237 000

定价: 110.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

前 言

丛枝菌根 (arbuscular mycorrhizal, AM) 发生在专性真菌和大部分陆生植物根系之间, 是一种最为古老并广泛分布的互利共生体系。这种互利性是通过双向营养交换来体现的: 植物通过光合作用为菌根真菌提供碳水化合物; 菌根真菌拥有强大的外部菌丝系统, 可以更有效地帮助植物吸收矿质营养元素, 从而改善植物体内养分状况, 调节植物生理代谢活动, 促进植物成活, 增强植物对外界不良环境的抵抗能力。

与国外相比, 我国关于丛枝菌根的研究起步较晚。但近些年, 经过广大科研工作者的不断努力, 在许多方面已经取得了一些国际认可的研究成果。目前国内关于丛枝菌根形成机制的相关研究成果少见。作者在国家自然科学基金项目 (No.31971527、No.31570635、No.31270535、No.31070576、No.30571493) 及黑龙江省自然科学基金研究团队项目 (No.TD2019C002) 等国家课题及黑龙江省自然科学基金研究团队项目 (TD2019C002) 等地方课题的资助下, 深入地开展了丛枝菌根形成机制的相关研究工作, 获得了一些原创性研究成果, 积累了大量资料。现把部分内容整理成册, 希望借此提升我国丛枝菌根研究的学术地位。

同时, 在此感谢国家自然科学基金及黑龙江省科技厅的资助, 感谢黑龙江大学对本书出版给予的支持, 感谢研究生宋鸽、齐丹丹、刘璇、孔祥仕、贺文员、张童等在开展科学研究和书稿整理过程中给予的帮助。

本书如能成为广大读者的良师益友, 推动我国菌根学的研究和发展, 作者将感到莫大的欣慰。恳切希望同行专家、学者和广大读者批评指正。

宋福强

2019年秋季于哈尔滨

目 录

1 绪论	1
1.1 丛枝菌根概述	1
1.1.1 AM 真菌的生活史	1
1.1.2 AM 真菌的非共生生长	2
1.2 AM 真菌与植物共生的过程和稳定性机制	3
1.2.1 AM 真菌与植物共生的过程	3
1.2.2 AM 真菌与植物共生的稳定性机制	8
1.3 AM 真菌与宿主共生过程中附着胞的形成和防御反应的产生	9
1.3.1 附着胞的形成	9
1.3.2 防御反应的产生	10
1.4 AM 共生体中植物防御反应的调节机制	13
1.4.1 外源诱导子的降解	14
1.4.2 防御信号分子的钝化	15
1.4.3 碳水化合物和激素的调节	16
1.4.4 磷和黄酮/异黄酮类物质的调节	18
1.5 菌根共生相关蛋白	18
1.6 菌根共生相关基因	20
参考文献	22
2 AM 真菌和根瘤菌侵染紫穗槐的时空变化	31
2.1 材料和方法	31
2.1.1 紫穗槐苗木培养	31
2.1.2 AM 真菌和根瘤菌侵染紫穗槐的测定	32
2.1.3 透射电镜观察 AM 真菌和根瘤菌侵染紫穗槐	33
2.2 结果与分析	33
2.2.1 AM 真菌和根瘤菌侵染紫穗槐的动态变化	33
2.2.2 透射电镜观察 AM 真菌和根瘤菌侵染紫穗槐的动态变化	36

2.3	讨论	39
2.4	本章小结	40
	参考文献	40
3	AM 真菌对紫穗槐防御反应的调控及共生相关蛋白的 SDS-PAGE 分析	41
3.1	材料和方法	41
3.1.1	实验材料	41
3.1.2	实验方法	41
3.2	结果与分析	47
3.2.1	AM 真菌对紫穗槐植株生长的影响	47
3.2.2	AM 真菌调控紫穗槐防御反应的研究	50
3.2.3	黄酮/异黄酮类物质的分离提取、鉴定和含量测定	54
3.2.4	菌根共生相关蛋白 SDS-PAGE 分析	59
3.3	讨论	64
3.3.1	AM 真菌调控植物防御反应的机制	64
3.3.2	AM 共生体建立的调节信号分子——黄酮/异黄酮类物质	65
3.3.3	菌根共生相关蛋白的研究现状	66
3.3.4	菌根共生相关蛋白的产生与 AM 共生体中防御反应调控的关系	67
3.4	本章小结	67
	参考文献	68
4	基于 iTRAQ 技术对紫穗槐菌根共生蛋白分析	70
4.1	材料和方法	70
4.1.1	实验材料	70
4.1.2	实验方法	70
4.2	结果与分析	74
4.2.1	用于 iTRAQ 分析的实验样品	74
4.2.2	蛋白质定量	75
4.2.3	SDS-PAGE 初步检测	75
4.2.4	菌根蛋白的鉴定及分析	76
4.2.5	菌根差异表达蛋白的鉴定	78
4.2.6	菌根差异表达蛋白的功能分类	83
4.3	讨论	84
4.3.1	信号转导相关蛋白	84

4.3.2 胁迫和防御相关蛋白	85
4.3.3 蛋白质折叠和降解相关蛋白	86
4.3.4 能量相关蛋白	87
4.3.5 细胞结构相关蛋白	88
4.3.6 膜和运输相关蛋白	88
4.3.7 代谢相关蛋白	88
4.3.8 蛋白质合成相关蛋白	89
4.3.9 转录相关蛋白	89
4.3.10 未知蛋白	89
4.4 本章小结	89
参考文献	91
5 基于抑制消减杂交技术筛选 AM 真菌与紫穗槐共生相关基因	93
5.1 材料和方法	93
5.1.1 实验材料	93
5.1.2 实验方法	93
5.2 结果与分析	104
5.2.1 紫穗槐培养和侵染情况检测	104
5.2.2 总 RNA 完整性和纯度检测	107
5.2.3 紫穗槐 AM 相关基因的 SSH	107
5.2.4 紫穗槐 SSH cDNA 文库的构建和插入片段的 PCR 鉴定	108
5.2.5 差异基因的反向 Northern Blot 杂交验证	109
5.2.6 序列测定和基因功能注释	110
5.2.7 已知共生相关基因的功能分类	112
5.2.8 未知基因序列编码肽段的预测分析	113
5.3 讨论	115
5.3.1 测试样品 RNA 提取	115
5.3.2 SSH 技术	115
5.3.3 AM 真菌与紫穗槐共生相关基因的研究	116
5.4 本章小结	122
参考文献	122
6 基于转录组测序技术分析紫穗槐菌根差异表达基因	125
6.1 材料和方法	125

6.1.1	实验材料	125
6.1.2	实验方法	125
6.2	结果与分析	130
6.2.1	紫穗槐根部 RNA 质检结果	130
6.2.2	转录本组装及数据统计	131
6.2.3	原始数据质控	134
6.2.4	组装后功能注释结果	139
6.2.5	差异表达基因分析	143
6.2.6	qRT-PCR 结果分析	148
6.3	讨论	157
6.3.1	转录组测序技术	157
6.3.2	紫穗槐与 AM 真菌共生相关基因	158
6.3.3	qRT-PCR 检验结果	164
6.4	本章小结	164
	参考文献	165
	附录	169

1 绪 论

1.1 丛枝菌根概述

丛枝菌根 (arbuscular mycorrhizal, AM) 真菌是一种土著微生物, 新近的一些分类系统将 AM 真菌列入球囊菌门, 根据目前已有的一些资料推测 AM 真菌起源于 4.6 亿年前 (Schüßler et al., 2001)。球囊菌门真菌经常与绝大多数的陆生植物, 包括被子植物、裸子植物、蕨类植物及一些苔藓植物形成互惠共生体——丛枝菌根 (Smith and Read, 1997)。AM 真菌是专性活体营养微生物, 迄今为止不能在离体条件下纯培养, 原因可能是 AM 真菌在离体条件下不能合成新的 DNA, 所以不能形成新的细胞核 (温莉莉等, 2009)。AM 能够促进土壤中营养元素循环, AM 真菌能够供给植物必需的营养元素, 尤其是磷元素, 在磷元素缺乏或是磷元素移动性很低的土壤中, AM 真菌的作用尤为显著。反过来, 植物光合作用合成的碳水化合物转移进入土壤, 经过植物根的转运到达 AM 真菌, AM 真菌将这些易位的碳水化合物合成脂质和糖类物质, 然后转移进入土壤中的外生菌丝 (Bago et al., 2003)。虽然 AM 真菌在陆地生态系统中具有非常重要的作用, 但是目前关于 AM 共生体如何发挥功能方面的知识极度缺乏, 原因是这是一种处于地下环境中的共生体, AM 真菌通常隐藏在植物根的内部。近 10 年来, 随着生物化学和分子生物学技术的发展, AM 共生体的研究取得了极大的进展, 高通量遗传分析表明, AM 共生体的基因、蛋白质和代谢产物表达模式与非菌根化植物相比明显发生了变化 (Bestel Corre et al., 2004)。研究方法和手段的进步有助于揭开关于 AM 共生体的未解之谜, 包括植物和真菌相互作用的早期阶段双方是如何交换信号分子, 以及植物分泌的信号物质是如何被 AM 真菌所感知的。

1.1.1 AM 真菌的生活史

AM 共生体的形成开始于土壤中外生菌丝上无性厚垣孢子的萌发, 通常一些一年生植物的死亡须根是非常好的接种物来源, 因为它们能够保护真菌免受环境的危害, 一直到新的菌丝伸长穿越死亡植物根接触到其他植物的根部, 并且成功地定居其中 (Requena et al., 1996)。如图 1-1 所示, 菌丝侵入植物根皮层细胞形成一些特殊的形态学专化结构: 胞内和胞外菌丝、泡囊和丛枝。丛枝是专化的菌丝, 类似于植物病原真菌的“吸根”, 其功能可能主要是作为菌根与植物体之间营

养元素的交换场所，然而在 Paris 类型菌根中发现丛枝是完全不存在的，因此推测植物和真菌之间还存在着其他的交换营养元素的结构（Smith and Smith, 1990）。AM 真菌在宿主植物根内定居后，外生菌丝吸收土壤中的矿质营养元素，同样在 AM 真菌遇到其他的敏感宿主植物的根时也能够定居其中（Johnson, 2010）。

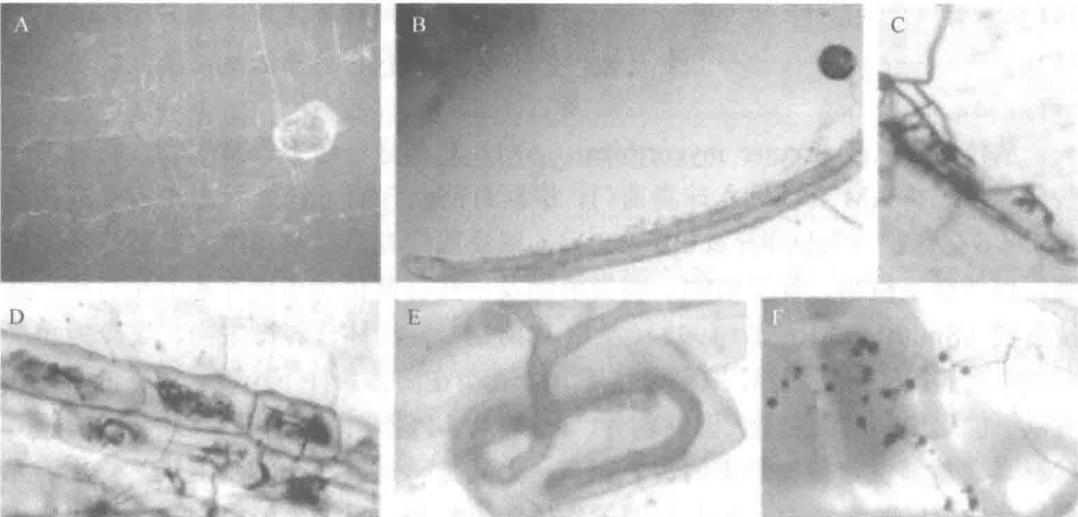


图 1-1 AM 真菌的生活史（Natalia et al., 2007）（彩图请扫封底二维码）

Fig. 1-1 Life cycle of an arbuscular mycorrhizal fungus (Natalia et al., 2007) (For color version, please sweep QR Code in back cover)

(A) 水琼脂中的孢子萌发及非共生生长；(B) 宿主识别及孢子在宿主植物根部附近生长；(C) 根表皮的附着胞形成和表皮层定殖；(D) 内皮层细胞中的丛枝结构；(E) 根皮层细胞内菌丝的细节，即线圈，观察真菌菌丝内的大脂滴；(F) 外生菌丝在土壤中生长形成下一代孢子

(A) Spore germination and asymbiotic growth on water agar; (B) Host recognition and presymbiotic growth in the proximity of a host plant root; (C) Appressoria formation on the root epidermis and colonization of the first root cortex layer; (D) Arbuscules in inner cortical cells; (E) Detail of an intracellular hyphae, the so-called coil, in a cell of the root cortex. Observe the big lipid droplets within the fungal hypha; (F) Extraradical mycelium exploring the soil and forming the next spore generation

1.1.2 AM 真菌的非共生生长

AM 真菌是专性共生微生物，在非共生阶段不能独立完成生活史（Bonfante and Bianciotto, 1995）。AM 真菌孢子的萌发是唯一一个共生菌不依赖于植物生活的阶段。AM 真菌的孢子被厚厚的细胞壁所包围，平均直径 50~100μm，含有大量的细胞核，每个孢子可达 2000 个左右（Bécard and Pfeffer, 1993）。AM 真菌孢子萌发后，菌丝通常是多核的，这个事实使得 AM 真菌不能按照传统的遗传分析方法进行研究。Hijri 和 Sanders（2004）对两个 AM 真菌种类进行研究，结果表明它们是单倍体，而且有很高的遗传多态性。研究表明，不同 AM 真菌种类之间

基因组的变化很大,从根内球囊霉 (*Glomus intraradices*) 基因组的 16.5Mb 一直到群生盾巨孢囊霉 (*Scutellospora gregaria*) 基因组的 1058.4Mb。 *G. intraradices* 因基因组极小常作为 AM 真菌基因组测序的模式真菌。

然而,AM 真菌孢子有着特殊的生理特征,同其他土著真菌的区别是其能够萌发,大多数情况下,缺乏植物分泌信号时停止生长 (Koske, 1981)。AM 真菌孢子在适当的水分和温度条件下能够萌发,菌丝能够生长 2~3 周。孢子中的一些细胞核能够移动进入伸长的菌丝中,而且一些细胞核能够进行有丝分裂 (Requena et al., 2000),这时真菌菌丝伸长几厘米,其特异的生长模式表现为显著的顶端优势和罕见的菌丝分支。在缺乏宿主植物的情况下,菌丝顶端中隔的生长能够维持 2~4 周 (Mosse, 1988)。菌丝中隔含有大量的空泡、收缩的原生质体及细胞核 (Logi et al., 1998)。在非共生阶段,AM 真菌生活的物质来源主要是储备的三酰甘油。在萌发-生长培养基中,不同碳、氮源对 AM 真菌菌丝的伸长和扩展有极小的效应 (Hepper, 1979),然而在对这些营养元素识别的过程中,一些营养元素能够诱导真菌基因表达和酶活性发生变化 (Breuninger and Requena, 2004; Requena et al., 2003)。孢子在储备物质减少之前生长停止,很可能是由缺乏宿主植物分泌信号导致的。在缺乏宿主植物分泌信号的情况下生长就处于非共生阶段。细胞学研究表明,虽然在这个阶段发生了细胞核的分裂,但是大多数的细胞核都停止在 S 期,或者是 G₂-M 期 (Natalia et al., 2007)。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中控制着细胞周期的 *TOR2* 基因已经从摩西球囊霉 (*Glomus mosseae*) 中分离到。目前已知抗炎药物雷帕霉素能够干扰基因 *TOR2*,控制细胞分裂停留在 G₁ 期,在非共生阶段能够发现少量菌丝分支,但是它不影响孢子的萌发 (Requena et al., 2000),这就表明 DNA 的复制对于非共生阶段孢子的萌发和伸长是非必需的。体外培养 AM 真菌,发现存在一定的土壤微生物能够明显增强非共生阶段腐生性菌丝体的生长 (Hepper, 1979)。一些微生物能够改善孢子的萌发,而且大多数有机体对于菌丝生长、分支及营养孢子的产生是有益的。关于这些微生物能够改善 AM 真菌非共生阶段生长机制方面的研究非常少,然而分子生物学方面的研究表明真菌能够感知到微生物存在,而且对这些微生物产生的反应是改变基因表达模式 (Requena et al., 1999)。

1.2 AM 真菌与植物共生的过程和稳定性机制

1.2.1 AM 真菌与植物共生的过程

AM 真菌侵入宿主植物的过程实际上是一个连续的过程,但可以人为地分为三个阶段:①预共生信号识别阶段;②菌丝侵入阶段;③丛枝或菌丝盘形成阶段。

AM 真菌在宿主中定殖后,菌丝会从根表面长出来,探索土壤中的矿质营养元素,并进一步侵染其他兼容根。

1.2.1.1 预共生信号识别阶段

AM 真菌孢子在适当水分和温度条件下萌发,并进行菌丝生长 2~3 周。孢子中的一些细胞核移动到延伸的菌丝中,并且其中一些核会进行分裂。如果没遇到植物的根,2~4 周后会停止生长。与土壤病原菌不同,在没有植物分泌信号的情况下,AM 真菌菌丝会在顶点分隔,并产生大量气泡,然后收回细胞质及大部分细胞核到孢子中,孢子能够这样萌发及停止生长数次。在非共生阶段,菌丝主要靠储藏在孢子中的三酰甘油提供能量来完成生长 (Requena et al., 2007)。因此在物理接触之前,首先进行的是信号对话。

(1) 独脚金内酯

目前所有的研究都集中在化学信号上,未见有关电磁场信号或者重力场信号等物理信号诱导共生微生物的报道。在 AM 共生(arbuscular mycorrhizal symbiosis, AMS)中,最重要的植物分泌信号物质就是独脚金内酯(strigolactone, SL)。Akiyama 等(2005)采用水耕法从百脉根的菌根中分离到了这种诱导 AM 真菌分支的分支因子(branching factor, BF),利用色谱分析其结构,显示为倍半萜(烯)化合物。

SL 一直被认为在寄生植物的种子萌发过程中起刺激作用 (Scholes and Press, 2008)。但是近几年随着关于 SL 的报道越来越多,SL 开始被看作是一种新植物激素。SL 在植物多种生理过程中起着重要的作用,包括调控幼芽分化 (Domagalska and Leyser, 2011)、抑制芽的横向分化、调节根毛伸长及抑制须根伸长,以及调节根的发育 (Koltai, 2011)。SL 和细胞分裂素作为一对拮抗物质一起直接控制花蕾的过度生长 (Dun et al., 2012)。在 AM 真菌与植物根系互作过程中,BF 先诱导线粒体活性相关基因的表达,增强呼吸作用,促进线粒体的再生,从而诱导真菌菌丝进行有丝分裂,形成新的菌丝,增加真菌与宿主植物接触的机会。在不能形成 AM 的拟南芥中,SL 的量与能形成 AM 的植物相比非常低 (Westwood, 2009)。SL 从植物根系分泌到土壤中,并快速水解,被 AM 真菌识别后,可以刺激根际 AM 真菌分支并决定 AM 真菌的生长方向。至今,AM 真菌中 BF 的受体是什么,AM 真菌识别 BF 的机制都还是个谜。

(2) Myc 因子

当植物的信号因子被 AM 真菌接收并识别后,AM 真菌会分泌一种可溶的扩散因子,即 Myc 因子 (Bucher et al., 2009)。后来 Maillet 等 (2011) 发现 AM 真菌能分泌类似结瘤因子的脂质几丁寡糖 (lipochitooligosaccharide, LCO),并且在 *G. intraradices* 菌根化根及萌发孢子的分泌物中都检测到这种活性因子。细菌中编

码 LCO 的 *nod* 基因大概在 6000 万年前从 AM 真菌中通过横向转移获得, 然后扩散到各种土壤细菌中 (Maillet et al., 2011)。根据 Maillet 等 (2011) 的报道, Myc-LCO 是一类硫酸化和非硫酸化物质的混合物, 属于四聚体几丁寡糖。Myc-LCO 可以刺激多种植物形成 AM, 并通过共生 *DMI* 基因刺激豆科植物苜蓿根的生长和分枝。LCO 被确定为 Myc 因子, 与植物受体结合后启动下游共生级联反应。

(3) Myc 因子受体

在豆科植物 Nod 因子受体 (Nod factor receptor, NFR) 基因 *LjNFR1* 和 *LjNFR5/MtNFP* 突变体中并没有观察到菌根缺失的表型, 因此人们认为 Myc 因子受体 (Myc factor receptor, MFR) 与 Nod 因子受体之间无联系。最近发现, 在能形成根瘤和菌根的非豆科植物木麻黄中, 同源于 Nod 因子受体基因 *LjNFR5/MtNFP* 的 *PaNFP* 也是形成菌根所必需的 (Op den Camp et al., 2011)。所以在豆科等高等植物中菌根因子的受体基因很可能是 *NFR1/NFR5* 的同源基因。

目前还没分离出 Myc 因子特异性受体, 只知道 AMS 与活性氮 (reactive nitrogen species, RNS) 共享受体激酶 (SYMRK 或 DMI2) 信号途径 (Stracke et al., 2002; Endre et al., 2002; Yoshida and Parniske, 2005)。植物通过识别 Myc 因子或 Nod 因子激活这个受体激酶。可能是根瘤菌在进化过程中借用了 AM 真菌的信号识别受体。

SYMRK (symbiosis Leucine-rich repeat receptor kinase) 或 DMI2, 属于富含亮氨酸重复序列 (leucine-rich repeat, LRR) 型植物类受体蛋白激酶, 是一类位于细胞膜上的包含胞外受体结构域、跨膜结构域和胞内蛋白激酶结构域的蛋白质分子。SYMRK 能够感知外生真菌产生的信号并把这种信号转导到细胞内的蛋白激酶结构域。

具有特异性赖氨酸基序类受体激酶结构域的 *NFR1* 和 *NFR5* 只是根瘤共生必需的, AM 共生中并不需要 (Hayashi et al., 2010)。

Myc 因子受体和 Nod 因子受体可能通过定性 (结构) 差异与定量差异来区分相应的配体 (Maillet et al., 2011)。蛋白质分子具有构象动态性, 从而显示出功能混杂性, 也就是具功能多样性。虽然关于 Myc 因子受体的研究还在不断进行, 但是还没分离出 Myc 因子专一性受体, 原因可能是 Myc 因子和 Nod 因子具不同的分子结构, 在与同一受体结合后, 使受体产生不同的构象或构型, 从而诱发不同的级联反应。

(4) 离子通道及钙摆动

在共生信号途径中最重要的是钙摆动, 也就是钙峰, 是受体识别 Myc 因子后产生的共生信号。钙摆动集中在核周围, 有部分钙摆动发生在核质 (Sieberer et al., 2012)。通过反应扩散模拟, 发现细胞质钙摆动在最优的条件下, 不足以通过扩散机制引起核内钙摆动, 反之亦然, 表明核产生的钙峰不可能单独以钙波的方式传

输至胞质。Capoen 等 (2011) 推测在核质和核周胞质, 由共生诱导的钙变化似乎来自核膜, 很有可能是由核内膜释放, 并发现由共生导致钙摆动必需的阳离子通道 DMI1, 其选择性地位于核内膜上。另外, 由共生导致钙摆动必需的内质网钙-ATP 酶在核内膜、核外膜和内质网都有。目前关于核区内靶向钙离子释放的机制还不明确。Capoen 等 (2011) 推测由核内膜释放的钙离子使内质网钙储存库靶向地释放钙离子, 而蒺藜苜蓿 Ca-ATP 酶 (*Medicago truncatula* calcium ATPase, MCA) 成员中的 MCA8 均匀分布于细胞核周围, 有助于从核质和内质网上捕捉钙离子, 以便有效重吸收钙离子。

Lotus CASTOR 和 *POLLUX* (*Medicago DMI1*) 都编码钙激活钾离子通道蛋白, 它们具有相似的结构域和极其相似的序列, 是一对旁系同源基因。钙激活钾离子通道蛋白能在植物细胞膜上形成异源二聚体。它们能作为抗衡离子通道来快速平衡由钙离子流引起的离子失衡 (Peiter et al., 2007)。NUP85 和 NUP133 分别编码核孔蛋白 85 和核孔蛋白 133, 这两个基因与共生体形成与温度调控有关 (Saito et al., 2007; Kanamori et al., 2006)。尽管百脉根突变体 *nena* 能够与百脉根根瘤菌形成粉色根瘤, 但是其不具备固氮功能 (Groth et al., 2010)。不同植物采用不同的钙离子通道, 而不同的钙离子通道运输钙离子的效率不同, 可能与形成不同频率和强度的钙峰有关。

类似神经通过动作电位频率和持续时间来传递刺激的强弱, 植物细胞可能通过改变钙峰持续时间及频率来呈现不同的钙特征 (Harper and Harmon, 2005), 用来区分 AM 真菌和根瘤菌, 从而为微生物内共生做适当的准备。在一开始即 AM 真菌入侵之前, 大规模植物细胞进行改造时, 外皮层细胞显示低频率的钙峰, 是侵入栓 (prepenetration apparatus, PPA) 形成所必需的。在菌丝进入开始和进入期间, 钙摆动由低频率转变为高频率。这个高频率钙峰仅存在于菌丝进入阶段, 跨细胞侵染完成后会完全关掉 (Sieberer et al., 2012)。实际上, AM 真菌诱导的核钙峰频率比由 Nod 因子诱导的要低, 并且没有规律性 (Chabaud et al., 2011; Kosuta et al., 2008; Hazledine et al., 2009)。计算机分析显示, 由 Myc 和 Nod 因子刺激导致的钙摆动在自然状态下是混沌的 (Hazledine et al., 2009)。因为混沌系统更灵活, 对微小信号输入变化更灵敏, 并且能量需求最小, 这就解释了钙摆动可产生不同钙分布模式。

(5) CCaMK/DMI3

CCaMK 由丝氨酸/苏氨酸激酶结构域、CaM 结合域及三个类视锥 EF 手域组成, 其中 CCaMK 的 CaM 结合域和 EF 手域是 CCaMK 与 CYCLOPS 相互作用所必需的 (Kang et al., 2011)。CCaMK 是植物通用共生体信号转导途径的中心调控基因。CCaMK 能解码钙摆动信号, 将上游的钙信号转化为基因表达信号激活下游基因的表达。百脉根中 CCaMK 突变后表现为根毛不能生成卷曲分支, 不能形成

侵染线或固氮根瘤 (Tirichine et al., 2006)。钙信号产生后, 钙离子会和 *CCaMK* 结合, 诱发下游信号转导, 可激活共生相关转录因子。

(6) CYCLOPS/IPD3

CYCLOPS/IPD3 与 *CCaMK/DMI3* 相互作用 (Ovchinnikova et al., 2011), 对 *CCaMK* 进行磷酸化产生一定影响。*CYCLOPS/IPD3* 定位在 *CCaMK* 的下游, 虽然 *CYCLOPS* 突变会形成不完整的 AM 和根瘤, 但是仍然有钙峰和根瘤原基形成 (Yano et al., 2008)。虽然它的功能还是未知的, 但包含一个有功能的核定位信号和一个羧基末端卷曲的螺旋域。苜蓿 *CYCLOPS* 突变能严重损害 AM 真菌与豆科植物的感染过程, 导致形成有缺陷的丛枝 (Kistner et al., 2005)。在苜蓿中 *IPD3* 被 *CCaMK* 磷酸化 (Messinese et al., 2007)。

Kang 等 (2011) 以 *CCaMK* 的单激酶结构域作为诱饵, 鉴定了一个新蛋白 *CIP73*, 其具有长柄类泛素结构域, 属于大泛素超家族。与 *CCaMK* 和 *CYCLOPS* 的相互作用不同, *CIP73* 只与 *CCaMK* 的激酶结构域相互作用。*CaM* 结合域和 *EF* 手域在酵母中抑制 *CCaMK* 与 *CIP73* 相互作用。更重要的是, 和 *CYCLOPS* 一样, *CIP73* 是 *CCaMK* 的体外磷酸化底物, 可能是一种新的调节因子。

1.2.1.2 菌丝侵入阶段

信号对话后, AM 真菌入侵始于附着胞的形成。非共生阶段刺激菌丝生长、分支的根分泌物不能诱导附着胞的形成, 其形成可能需要根表面其他触性信号。附着胞不能在非宿主根, 也不能在假根 (如尼龙、聚丙烯、塑料、纤维素或者玻璃丝) 上形成, 即便添加根分泌物 (Giovannetti et al., 1993)。附着胞的形成不需要菌丝分支, 也不需要宿主根分泌的信号物质或者完整的宿主细胞膜 (Nagahashi et al., 1997)。可能是根部细胞壁的一种蛋白质或者特征结构 (根被皮) 触发附着胞的形成, 也可能是表皮细胞的分泌孔。

对细胞骨架和内质网蛋白进行绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 标记, 并结合共聚焦激光扫描显微镜研究显示, 在巨大巨孢囊霉 (*Gigaspora gigantea*) 附着胞形成期间, 菌丝入侵之前, 苜蓿根上皮细胞显示出发生细胞骨架重排反应, 为菌丝进入做准备 (Genre et al., 2005)。首先细胞核再定位到附着胞接触位点, 然后在细胞内重新迁移, 细胞核移动后, 微管、微纤维、内质网泡解散, 以便形成 PPA 结构, 连接附着胞到细胞的另一端, 然后菌丝通过 PPA 穿过细胞, 表明植物能控制真菌穿过细胞的轨道, 类似于 RNS 的侵染线。附着胞可能还释放一些未知的局部信号让表皮细胞感知它的位置 (Bucher et al., 2009)。在苜蓿中, PPA 的形成依赖通用共生基因 *DMI2* (*SYMRK*) 和 *DMI3* (*CCaMK*) (Genre et al., 2005)。

在侵入过程中, 外源生物会诱导植物的防御反应, 宿主植物过氧化氢酶、水

杨酸 (salicylic acid, SA) 和茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 等防御信号分子会不同程度地表达 (Song et al., 2011)。但是植物会为互惠共生菌打开防御门户, 原因可能是植物接收到 AM 真菌分泌的特殊信号物质。*G. intraradices* 会分泌一种蛋白 SP7, 与病原相关转录因子 ERF19 在细胞核内相互作用, ERF19 在根内被病原菌 *Colletotrichum trifolii* 和几种真菌提取物高度诱导, 但是在菌根定殖过程中只是短暂诱导。当根连续表达 SP7 时, 可以导致高度菌根化的同时会降低植物由 *C. trifolii* 介导的防御水平 (Kloppholz et al., 2011)。因此 AM 真菌可以调节植物的防御反应。

1.2.1.3 丛枝或菌丝盘形成阶段

丛枝发育伴随着围绕在丛枝周围的细胞骨架组分重排, 利用透射电子显微镜研究显示, 细胞质和细胞器包括内质网 (endoplasmic reticulum, ER)、高尔基体、质体、线粒体聚集在丛枝周围。皮层细胞界面形成于侵入后 1~2 天, 涉及细胞核再定位, 而丛枝的形成涉及宿主细胞的重组织, 如液泡片段化、细胞核从外周迁移到中心、细胞骨架重排、质体修饰 (Fester et al., 2001), 细胞膜和基质蛋白表达的改变与再定位, 以便转移营养 (Karandashov and Bucher, 2005)。但是植物细胞内的丛枝仍然被细胞膜包围, 也就是周丛枝膜 (periarbuscular membrane, PAM)。AM 真菌菌丝的高度特异化分支, 具精细末端, 因此比普通菌丝具更大的表面积-体积比 (Reinhardt, 2007), 从而有非常大的交换面积, 这种类似于小肠的结构有助于营养成分高效转运。丛枝是一种短暂的结构, 发育完成后 2~4 天就会塌陷并降解。

细胞重组织发生于丛枝发育之前, 并指导丛枝发育, 类似 PPA 的形成, 但是比 PPA 形成更加复杂, 因为涉及皮层细胞内共生体之间营养转移等高度协调的细胞过程。*ENOD11* 在这些细胞中也诱导表达, 独立于表层细胞的表达 (Smith et al., 2006)。突变 *SYMRK* 和 *CCaMK* 可以阻断 AM 侵染过程中的上表皮入侵。在 RNAi 实验中, *SYMRK* 表达水平明显降低时, 一些菌丝仍然能抵达内皮层并形成丛枝。因此 *SYMRK* 并不是 PAM 形成所必需的 (Gherbi et al., 2008)。另外, PAM 上一些转运体基因的表达可影响丛枝的发育。

1.2.2 AM 真菌与植物共生的稳定性机制

AM 共生体是一种很古老的共生体, 在进化史上比根瘤更古老 (Sprent, 2007)。植物与 AM 真菌共生专一性低, 可以和不同种类 AM 真菌形成共生体。但是植物对不同种类 AM 真菌有选择性, 因此有不同的侵染率, 在有些情况下侵染率会非常低 (Smith et al., 2009)。

AM 真菌共生对植物生长有不同的效应, 从正面到负面作用都有 (Smith et al.,

2011)。也就是说并不是所有的 AM 共生体都能对植物生长产生促进作用。对同一种植物,不同 AM 真菌定殖并不产生同样的生长效应(Klironomos, 2003; Munkvold et al., 2004); 而同一 AM 真菌对不同植物生长产生的效应也不同。AM 对植物生长产生的效应取决于植物基因组与 AM 真菌基因组之间相互关系及环境条件,但是其中的控制机制仍然不明确。

Kiers 等(2011)巧妙地设计了一个三分平板实验,用三种 *G. lomeromyces* 同时接种植物,将平板均分成三个区室,将单种根和两种 AM 真菌同时培养,用 ^{13}C 跟踪植物根提供的碳水化合物掺入到真菌 RNA 的量,研究碳水化合物的分布模式;另外用 ^{33}P 跟踪真菌磷的供给和菌根侵染的关系。结果表明,提供较多磷的菌丝能获得较多碳水化合物;反之亦然,如果根能提供更多碳水化合物,共生真菌也会通过增加营养转移来加强合作。Kiers 等(2011)指出植物可以很精细地区别各种 AM 真菌,即便有很多真菌同时定殖一个根,植物根仍可通过营养物质分配与真菌维持一个精细的资源双向转移的共生关系。因此, Selosse 和 Rousset (2011)就从市场经济学角度把植物和 AM 真菌之间共生的稳定机制看成一种市场机制。

这种通过贸易性的资源分配模式来维持共生的模型已成为共生主流模型(Bever et al., 2010)。共生固氮菌固定 1 mol 氮对 ATP 的需求量高,因此对磷的需求量高(Vance et al., 2003)。与固氮菌共生,作为“成本”,植物需要投资更多的磷;菌根真菌的碳氮比(C/N)为 10:1,相对具有更高 C/N 的植物而言,菌根真菌对氮的需求量更高(Johnson, 2010)。植物与菌根真菌共生要获取较多的磷意味着需要投资更多的氮。资源的双向不均等分配调节着根际微生物与植物、微生物与微生物(包括病原微生物),以及植物与植物之间的微生物生态,维持各种共生关系。

物种之间的互惠共生关系是不稳定的,微生物群落空间结构上的选择性资源分配维持这种共生关系的稳定。互惠共生关系的稳定一般可以通过营养垂直传输来维持(Vogelsang et al., 2006),而 AM 真菌则可以通过水平传输营养来维持共生关系的稳定(Vogelsang et al., 2006)。土壤空间结构在维持植物根与 AM 真菌相互关系上起着重要的作用,土壤的空间结构是诸多因素(包括随机性和宿主专一性)通过相互作用共同决定的,破坏土壤的空间结构,如农业上的耕作,可能就会破坏 AM 真菌与植物的共生关系,让有害微生物扩增(Bever et al., 2009)。

1.3 AM 真菌与宿主共生过程中附着胞的形成和防御反应的产生

1.3.1 附着胞的形成

AM 共生体的发育开始于真菌菌丝接触宿主植物根皮层细胞表面并在这里分