

# 杜鹃花类菌根真菌研究进展

李丽丽<sup>1</sup>, 杨洪一<sup>2</sup>

(1. 黑龙江省林业科学研究所, 黑龙江 哈尔滨 150081; 2. 东北林业大学 生命科学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

**摘要:**杜鹃花类菌根对越橘属植物的生长发育具有重要作用。现对杜鹃花类菌根真菌的多样性、菌根菌产细胞壁降解酶、漆酶及侵入动态、定殖影响因子、共生信号分子、转录组学、蛋白质组学技术及二者相结合的技术体系在共生研究中的应用进行了综述;并综合国内外进展,建议从共生信号分子、定位共生基因、筛选优良菌根菌菌株方面加大研究力度。

**关键词:**越橘属;菌根菌;共生

**中图分类号:**S 663.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)11-0173-04

杜鹃花科植物,特别是越橘属(*Vaccinium*)植物,其根系没有根毛,吸收能力比具有根毛的根系小得多,因而不能有效吸收土壤中的水分和养分;但自然条件下几乎所有的越橘细根都有内生菌根真菌的寄生,其克服了越橘由于没有根毛而造成的对水分及营养的吸收困难,从而改善植株营养状况,调节宿主的代谢活性,增强植株的抗逆性,提高越橘的产量<sup>[1]</sup>。早在1910年,Coville就首先在高丛越橘中发现菌根,并推测菌根真菌的侵染可能对越橘的生长有益。李亚东等<sup>[2]</sup>报道指出,Frieslehen于1936年首次从越橘根系中分离出了菌根真菌,发现其与大多数杜鹃花科植物有共生关系。基于越橘菌根的重要性,国内外科研人员围绕着越橘菌根菌多样性、侵入动态、共生等方面进行了深入研究。

**第一作者简介:**李丽丽(1978-),女,辽宁阜新,人,博士,助理研究员,现主要从事经济林研究工作。

**责任作者:**杨洪一(1978-),男,吉林九台人,博士,副教授,现主要从事微生物学等研究工作。E-mail: yhyi1@sohu.com

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31200517;31300573)。

**收稿日期:**2014-03-11

## 1 越橘菌根菌简介

越橘菌根菌主要专性寄生杜鹃花科植物,因而这种菌根统称为杜鹃花类菌根(Ericoid mycorrhizal,ERM),也称为欧石楠类菌根。杜鹃花类菌根结构极简单,不含丛枝、哈蒂氏网等特殊结构,菌根菌专一与杜鹃花科植物共生,因而杜鹃花类菌根真菌是菌根真菌中最为独特的类型之一。杜鹃花科约有305属3350种植物,寄主植物的多样性在一定程度上决定了菌根真菌多样性。目前已知,形成杜鹃花类菌根的真菌有盘菌属、珊瑚菌属和一些不产生子实体、仅见菌丝体的真菌类群。研究显示杜鹃花科植物在世界上广泛分布,而且大多生境条件恶劣,生存土壤多矿化率低、营养贫瘠,与其共生真菌有着举足轻重的关系;菌根对杜鹃花类植物的营养吸收、增强对逆境因子的抗性等方面具有重要的作用<sup>[2-3]</sup>。

## 2 菌根真菌的侵入动态

菌根形成是一个相互对抗,最终形成平衡的过程。在杜鹃花类菌根菌和植物相互作用过程中,首先,真菌孢子萌发形成菌丝,产生细胞壁降解酶。目前已有较多杜鹃花类菌根真菌分泌细胞壁降解酶(如果胶酶、纤维

**Abstract:** Based on analyzing the status of the vegetable industry in Heilongjiang, some problems were pointed out, including low levels of vegetable seed industry and uncoordinated industrial development in upstream industry, the rapid development of production, the lack of standardized security model and intensive breeding of low production and mechanization level in midstream industry, the lag of export processing and sales in downstream industry; the advantage of vegetable industry in Heilongjiang at geography and natural environment, cold vegetable industry, technology were analyzed. And for the technology bottlenecks of the development of vegetable industry in Heilongjiang, some proposals were pointed out that vegetable research funding should be increased, the advantages of breeding new varieties of vegetables, facilities and cultivation techniques, post-harvest technology and cold chain logistics should be strengthened.

**Key words:** vegetable industry; present situation; problem; suggestion; Heilongjiang province

素酶)、多酚氧化酶(如漆酶)的报道<sup>[4-5]</sup>。一方面这些酶促进菌根菌分解土壤中的植物残体,为植物提供养分,如漆酶可降解土壤中单宁为植物提供 N 元素<sup>[6-7]</sup>。另外,这些酶也在菌根菌侵入过程中发挥着重要作用,可破坏细胞壁,利于菌丝侵入形成共生体;但其酶活远低于植物病原真菌,过高的酶活、对植物细胞壁过大的破坏,可能会引起植物强烈的防御反应。一般认为杜鹃花类菌根真菌仅引起较轻微的防御反应,一些防御性物质,如多酚类物质加速形成,但植物与真菌可能通过一系列“分子对话”(Cross talk),使防御反应逐渐消失,但其具体过程不详。从酶学方面来看,杜鹃花类菌根真菌产生漆酶等多酚氧化酶,该酶可破坏酚类物质,可能破坏植物的防御体系,以利于菌根菌侵入<sup>[4,8]</sup>。漆酶可能在菌根菌侵入过程中发挥重要作用,但菌根菌侵入是一个复杂的过程,漆酶是否与细胞壁降解酶协同作用尚不清楚。

菌根菌的侵入及定殖受土壤因子(土壤 pH、养分、类型、含水量、透气性、微生物、重金属离子等)、气候和地理因素(温度、光照、纬度等)、农业措施(施肥、农药、灌溉、种植方式等)、寄主专化性等因子的影响,其中 pH、土壤养分、透气性、其它环境微生物对菌根菌定殖影响较大<sup>[9-11]</sup>。在越橘菌根真菌研究中显示,耕作土菌根真菌的侵染率明显低于有野生越橘分布的森林土壤;土壤 pH 值低、营养水平高的土壤中侵染率高于营养水平低的干燥沙土。盆栽试验显示,pH 4.5 时越橘菌根侵染率为 69%,而 pH 6.5 时侵染率仅 4%<sup>[1]</sup>。在云锦杜鹃研究中,有机氮作氮源,杜鹃花类菌根侵染率高于无机氮作氮源;有机氮源中,精氨酸、牛血清蛋白为氮源时侵染率较高,无机氮中硝态氮为氮源时侵染率高<sup>[12]</sup>。杜鹃花类菌根中的内生真菌或其它伴生菌也与菌根定殖密切相关,如根际的担子菌类可分解木质素,为菌根提供营养。一些研究中也发现了较多杜鹃花类菌根与植物内生菌-深色有隔内生菌(Dark septate endophytes,DSE)伴生,二者侵染呈负相关;DSE 一般生存在自然环境条件恶劣或重金属污染严重环境中,其对杜鹃花类菌根真菌的影响尚不明确<sup>[4]</sup>。

### 3 菌根共生信号分子

菌根形成过程中,植物和菌根菌都要发生一系列生理生化变化,通过一系列信号识别、交换和转导,最终激活植物和真菌一些基因表达,从而引发复杂的形态学和生理学变化。

宿主植物根系产生的信号分子诱导真菌菌丝延伸,并在根附近形成分枝,最后与植物根发生物理接触。此类信号分子来源于根系分泌物,由于植物根系分泌物成分复杂且浓度较低,很难区分哪些化合物具有信号分子的特性,基于对其它植物-微生物互作信号识别机制的认

识,人们推测根系产生的次生代谢产物极有可能充当信号分子的角色。目前大多数研究主要集中于植物根系产生的次生代谢物,如黄酮、异黄酮、黄烷酮和苯基乙烯酮等<sup>[13]</sup>。类黄酮曾被认为是一种植物信号物质,能促进或抑制 AM 真菌生长,但有研究显示不能合成类黄酮的玉米突变体也能被 AM 真菌侵染,由此可知,类黄酮并不是丛枝菌根形成所必需的化合物诱导菌丝分枝因子。2005 年,Akiyama 等<sup>[14]</sup>从日本百脉根(*Lotus japonicus*)分泌物中分离出一种倍半萜类内酯-独脚金内酯(Strigolactones),并证明其能够诱导 AM 真菌菌丝分枝。独脚金内酯是植物与 AM 真菌联系的必需信号物质,但独脚金内酯在 AM 共生系统中的水平调节机制尚不明确。目前菌根共生相关基因及信号分子研究主要集中于 AM 菌根,其它类型菌根鲜有报道。宿主根系分泌物中的信号物质远不止独脚金内酯这一种,还有很多能被真菌识别的信号物质有待提取分离和研究。

真菌在宿主植物信号物质的刺激下,能释放可扩散信号物质,促使一些相关植物基因的表达。早期即推断 AM 真菌产生一种能够诱导基因表达的信号物质-菌根因子(Myc factor)。Maillet 等<sup>[15]</sup>通过萃取、色谱纯化、质谱鉴定,解析了菌根因子的化学结构;与根瘤因子类似,是一种几丁质寡聚物(Lipochitooligosaccharide),可激活一些共生基因的表达,能通过根瘤和 AM 菌根所必须的共同信号途径来促进菌根形成。

## 4 转录组及蛋白质组学技术在共生研究中的应用

### 4.1 转录组学技术在共生研究中的应用

早期主要通过消减杂交(Subtractive hybridization, SH)、表达序列标签(Expressed sequence tag, EST)、抑制性消减杂交(Suppression subtractive hybridization, SSH)、基因表达序列分析(Serial analysis of gene expression, SAGE)、mRNA 差异显示技术(Differential display)、cDNA-AFLP(Amplified fragment length polymorphism)等技术分析基因表达差异并获得共生相关基因,之后再利用 Real time PCR、原位杂交、cDNA 芯片技术分析共生相关基因的时空表达动态和组织特异性,最后再通过超表达、RNAi(RNA interference)和 TILING(Target-induced local lesions in genomes)等反向遗传学技术了解共生相关基因功能<sup>[16-18]</sup>。相关研究较多,但多数集中于基因表达差异分析方面。Voiblet 等<sup>[19]</sup>利用 cDNA 文库、SSH 差异筛选的方法,获得了 65 个共生差异表达基因,主要包括细胞壁和膜合成、防御反应、蛋白降解等,并进一步利用 cDNA 芯片技术对关键基因的动态表达水平进行了分析。Siciliano 等<sup>[20]</sup>分析了 AM 真菌附着胞形成阶段的基因转录变化,通过文库筛选,获得了 107 个备选专化基因,经杂交、突变体分析,5 个基

因为附着胞形成关键基因。总体来看,大体 1%~4% 基因在共生阶段表现差异性变化,多数上调,较多与蛋白合成与加工、信号转导相关。

SSH、cDNA-AFLP 等技术主要通过间接手段将转录组的一些变化在一定程度上显示出来,具有一定的片面性,近年来较多研究开始探索基于高通量转录组测序、基因芯片技术来高通量、系统化分析转录组变化。高通量转录组测序技术能够在单核苷酸水平对任意物种的整体转录活动进行检测,可有效分析转录本的结构和表达水平。基因芯片技术的优点也在于其可实现高通量检测,研究方法较成熟,但只限于已知序列<sup>[21]</sup>。Sebastiana 等<sup>[22]</sup>利用基因芯片进行转录组分析,从板栗中鉴定出了一个共生相关基因,其主要在共生体早期联系(6~12 h)中发挥功能。高通量转录组测序无需设计探针,即可对任意物种的整体转录信息进行检测,可提供更精确的数字化信号、更广泛的检测范围以及更高的检测通量。此外,高通量转录组测序技术能够精确分析基因的表达水平,比芯片可多检测出 30% 的差异表达基因。此外,近来一些基于单细胞高通量转录组测序的技术正在逐步成熟,Tang 等<sup>[23-24]</sup>报道了单细胞高通量转录组测序技术,其主要通过加 adaptor 引物、二次扩增来提高核酸数量。尽管该方法存在无法分析无 poly(A) mRNA、获得序列数量较少、序列较短等缺点,但其对于细胞水平的转录组差异分析具有重要意义。高通量转录组测序缺点在于成本较高,随着测序技术飞速进步,其检测成本也在快速下降。

#### 4.2 蛋白质组学技术

蛋白质组学旨在建立不同时间与空间的生物组织细胞所有表达蛋白质的动态表达谱,利用蛋白质组学技术可有效分析真菌共生阶段的蛋白质差异<sup>[25]</sup>。Zhang 等<sup>[26]</sup>利用蛋白质组学技术,发现共生菌侵入阶段,组织中较多蛋白上调,其中一关键蛋白经鉴定为病程相关蛋白(Pathogenesis-related protein, PR),经简并引物扩增,获得了 2 个 PR 蛋白的序列,Real time PCR 证明仅其中 1 个基因表达上调。基于一些兰科植物次生代谢产物具有较高的药用价值,较多研究集中于兰科菌根共生差异蛋白质组学研究。朱江敏<sup>[27]</sup>利用双向荧光差异电泳结合质谱分析,从石斛菌根中发现了 46 个共生差异表达蛋白质,其中最大的功能类群是参与信号转导相关的蛋白,约占 22%。在福建金线莲与菌根真菌互作蛋白质组学研究中,获得了 22 个差异蛋白点,其功能较多涉及植物信号传导、代谢调节及光合作用,推测菌根真菌可能通过与植物相互作用,使植物代谢及光合作用增强,从而表现植株健壮、抗性增强<sup>[28]</sup>。

转录组和蛋白质组的首要目的都是获得基因的表达情况,二者大部分是相互关联的。利用转录组和蛋白

质组的差异和互补性,同时对生物体特定状态下的基因和蛋白质表达水平进行全方位度量,可获得表达谱的“全景图”,并挖掘受到转录后调控的基因,这是当前一个重要发展方向。Fan 等<sup>[29]</sup>利用基因芯片及 iTRAQ 技术对甜橙感染黄龙病的差异表达基因进行了分析,2 种方法皆显示防御反应相关蛋白表达明显上调,显示转录组和蛋白质组相结合可增强对植物防御反应机理的理解。

#### 5 小结

总体上来看,目前国外围绕着越橘杜鹃花类菌根菌的多样性、菌根侵入动态、定殖影响因子、共生相关基因及信号分子等方面已有较多报道。国内对越橘杜鹃花类菌根菌的研究还处于起始阶段,相关报道相对较少,已有报道主要围绕菌根调查、菌根菌分离、促生作用等方面进行<sup>[1,8-9,12]</sup>。总体来看,杜鹃花类菌根研究基础较薄弱,有必要在以下方面加大研究力度:一是信号分子方面,分析已知信号分子的具体应用效果,筛选未知信号分子;二是共生相关基因方面:基于高通量测序技术加速共生相关差异表达基因的分离速度;分析有菌丝细胞和无菌丝细胞二者在转录水平上的差异;借鉴 AM 菌根、根瘤的研究策略,基于杜鹃花类菌根的特异性,探索是否具有特殊的共生相关基因、信号转导途径;三是功能基因组方面,将转录组、蛋白质组与代谢组相结合,综合分析各共生相关基因的功能及蛋白合成途径;四是菌根菌资源方面,目前已报道的杜鹃花类菌根菌资源可能仅是极小的一部分,有必要不断挖掘新的菌种资源;五是定殖方面,从环境、营养、土著微生物方面综合分析定殖影响因子,使实验室分离菌株能够有效定殖于田间并发挥促生能力。

当前我国对越橘等小浆果种类的消费量正逐步增长,同时越橘的种植面积逐步扩大,随着栽培区域的扩大,许多栽培地区土著菌群缺乏,因而越橘苗木栽植成活率低,栽后生长缓慢。我国越橘野生种质资源十分丰富,其菌根菌资源也较丰富,因而有必要对杜鹃花类菌根进行系统研究,一方面明晰共生信号分子、定位共生基因,进一步了解共生机制,另外,筛选优良菌根菌菌株并应用于生产,将极大提高越橘的栽培技术水平。

#### 参考文献

- [1] 李亚东,郝瑞,张大鹏. 越桔菌根真菌研究进展一文献综述[J]. 园艺学报,1996(23):133-138.
- [2] Diaz A, Green I, Benvenuto M, et al. Are ericoid mycorrhizas a factor in the success of *Calluna vulgaris* heathland restoration[J]. Restoration Ecology, 2006(14):187-195.
- [3] Kai C R, Caroline S B. Rapid uptake of <sup>15</sup>N-ammonium and glycine-<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N by arbuscular and ericoid mycorrhizal plants native to a Northern California coastal pygmy forest[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 39: 1078-1086.



- [4] Smith S E, Read David. Mycorrhizal symbiosis (Third edition) [M]. New York: Academic Press, 2008.
- [5] Lin L C, Lee M J, Chen J L. Decomposition of organic matter by the ericoid mycorrhizal endophytes of Formosan rhododendron (*Rhododendron formosanum* Hemsl.) [J]. Mycorrhiza, 2011, 21: 331-339.
- [6] Perotto S, Peretto R, Faccio A, et al. Ericoid mycorrhizal fungi: cellular and molecular bases of their interactions with the host plant [J]. Can J Bot, 1995, 73: 557-568.
- [7] Bending G D, Read D J. Lignin and soluble phenolic degradation by ectomycorrhizal and ericoid mycorrhizal fungi [J]. Mycological Research, 1997, 101: 1354-1384.
- [8] 朱国胜. 贵州特色药用兰科植物杜鹃兰和独蒜兰共生真菌研究与利用 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- [9] 刘润进, 李晓林. 丛枝菌根及其应用 [M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [10] Kosola K R, Workmaster B A. Mycorrhizal colonization of cranberry: effects of cultivar, soil type, and leaf litter composition [J]. J Amer Soc Hort Sci, 2007, 132: 134-141.
- [11] Starrett M C, Blazich F A, Shafer S R, et al. *In vitro* colonization of micropropagated *Pieris floribunda* by ericoid mycorrhizae. I. establishment of mycorrhizae on microshoots [J]. Hort Science, 2001, 36: 353-356.
- [12] 张春英. 云锦杜鹃菌根及其菌根真菌多样性研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2008.
- [13] 尚赏, 王平, 陈彩艳. 丛枝菌根形成过程及其信号转导途径 [J]. 植物生理学报, 2011, 47(4): 331-338.
- [14] Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi [J]. Nature, 2005, 435: 824-827.
- [15] Maillet F, Poinot V, André O, et al. Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza [J]. Nature, 2011, 469 (7328): 58-63.
- [16] Helber N, Wippel K, Sauer N, et al. A versatile monosaccharide transporter that operates in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus* sp is crucial for the symbiotic relationship with plants [J]. The Plant Cell, 2011, 23: 3812-3823.
- [17] Heller G, Adomas A, Li G, et al. Transcriptional analysis of *Pinus sylvestris* roots challenged with the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* [J]. BMC Plant Biology, 2008, 8(1): 19.
- [18] Liu Y, Ianinazzi-pearson V, Arnold C, et al. Fungal genes related to calcium homeostasis and signaling are upregulated in symbiotic arbuscular mycorrhiza interactions [J]. Fungal Biology, 2013, 117: 22-31.
- [19] Voiblet C, Duplessis S, Encelot N, et al. Identification of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs [J]. Plant Journal, 2001, 25: 181-191.
- [20] Siciliano V, Genre A, Balestrini R, et al. Transcriptome analysis of arbuscular mycorrhizal roots during development of the prepenetration apparatus [J]. Plant Physiology, 2007, 144: 1455-1466.
- [21] Ozsolak F, Milos P M. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities [J]. Nat Rev Genet, 2011, 12(2): 87-98.
- [22] Sebastiana M, Figueiredo A, Acioli B, et al. Identification of plant genes involved on the initial contact between ectomycorrhizal symbionts (*Castanea sativa*-European chestnut and *Pisolithus tinctorius*) [J]. European Journal of Soil Biology, 2009, 45: 275-282.
- [23] Tang F, Barbacioru C, Bao S, et al. Tracing the derivation of embryonic stem cells from the inner cell mass by single-cell RNA-Seq analysis [J]. Cell Stem Cell, 2010(6): 468-478.
- [24] Tang F, Barbacioru C, Wang Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell [J]. Nature Methods, 2009(6): 377-382.
- [25] Aloui A, Recorbet G, Robert F, et al. Arbuscular mycorrhizal symbiosis elicits shoot proteome changes that are modified during cadmium stress alleviation in *Medicago truncatula* [J]. BMC Plant Biology, 2011(11): 75.
- [26] Zhang N, Raftery K, Richardson M J, et al. *Neotyphodium lolii* induces a limited host defence response by *Lolium perenne* [C]// In Proceedings of the 6th International Symposium on Fungal Endophytes of Grasses, New Zealand: New Zealand Grasslands Association, 2007: 199-202.
- [27] 朱江敏. 珍稀药用植物石斛共生菌根的蛋白组学研究 [D]. 杭州: 杭州师范大学, 2011.
- [28] 高川, 郭顺星, 张靖, 等. 福建金线莲与菌根真菌互作过程中的蛋白质组研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(24): 3717-3722.
- [29] Fan J, Chen C, Yu Q, et al. Comparative iTRAQ proteome and transcriptome analyses of sweet orange infected by 'Candidatus Liberibacter asiaticus' [J]. Physiologia Plantarum, 2011, 143: 235-245.

## Research Advances of Ericoid Mycorrhizal Fungi

LI Li-li<sup>1</sup>, YANG Hong-yi<sup>2</sup>

(1. Institute of Forestry Science of Heilongjiang Province, Harbin, Heilongjiang 150081; 2. Life Science College, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

**Abstract:** Ericoid mycorrhizal plays an important function for growth and development of *Vaccinium*. In the paper, the ericoid mycorrhizal fungi diversity, production of cell wall-degrading enzymes and laccase from ericoid mycorrhizal fungi, the dynamic process invaded of fungi, the influenced factors for colonization, the signal molecular of symbiosis, and the application in symbiosis with transcriptomics or/and proteome were analyzed and reviewed. Also the strengthening the research for the signal molecular of symbiosis, location of symbiosis gene, the filtration of excellent strains of mycorrhizal fungi on the basis of the advances in the world were suggested.

**Key words:** *Vaccinium*; ericoid mycorrhizal; symbiosis