

DOI:10.11937/bfyy.201511024

# 铁皮石斛菌根的建立及相关基因的表达研究

冒佩佩, 周丽婷, 吴琳, 吴剑丙, 王慧中

(杭州师范大学 生命与环境科学学院, 浙江省药用植物种质改良与质量控制技术重点实验室, 浙江 杭州 310036)

**摘要:**围绕菌根共生体系中菌根真菌与宿主植物的互作机制展开研究,以石斛小菇 *Mycena dendrobii* 与铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 为试验材料,建立二者的共生体系,对其根系切片进行显微观察,并采用实时荧光定量 PCR 技术检测石斛基因的表达情况。结果表明:二者能成功形成菌根结构,分支酸合成酶基因和甘露糖特异结合植物血凝素基因在共生早期发生上调,参与了共生的调节。试验旨在为今后阐明菌根真菌与兰科植物的共生机制奠定理论基础。

**关键词:**铁皮石斛;石斛小菇;共生;差异表达

**中图分类号:**S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)11-0098-05

菌根真菌在兰科植物的生长发育中占有重要地位,大多兰科植物均可与相应的菌根真菌建立互惠的共生关系,形成典型的菌根结构<sup>[1-2]</sup>。菌根真菌对植物有显著促生长作用,同时又或多或少为植物提供营养<sup>[3-4]</sup>。石斛属兰科(Orchidaceae)石斛属(*Dendrobium* Sw.)多年生附生草本植物,是我国传统名贵中药材,具有很高的药用价值及观赏价值<sup>[5]</sup>。但是,由于自然生长需求苛刻、繁殖率低、生长缓慢、开采过度和人工扩繁难度大等原因,石斛资源日益匮乏,因此,研究真菌与植物的互作对利用真菌提高石斛植物产量具有重要意义。

目前,有关真菌与植物互作机制的研究多集中于信号转导途径,这些途径包括真菌活性氧(reactive oxygen species)信号途径、促有丝分裂原活化蛋白(Mitogen-activated Protein, MAP)激酶途径,以及植物受真菌诱导的共生信号途径(common symbiosis signaling pathway, CSSP)等。真菌互作分子机制中,活性氧信号途径中的 NADPH 氧化酶(NADPH oxidase, Nox)的功能缺失,会导致互惠共生关系的瓦解,真菌无限制地侵染宿主植物,诱导植物发育不良及早衰<sup>[6-8]</sup>。有趣的是,真菌应激丝裂原活化蛋白激酶 sakA(fungal stress-activated mitogen-activated

protein kinase)缺陷,直接导致真菌与植物之间的相互关系由互惠互利转变成致病<sup>[9]</sup>。另外,研究发现丛枝真菌 Myc 因子可诱导植物 CSSP 途径,并对共生互作有促进作用<sup>[10]</sup>。目前,研究者在植物中也挖掘出了许多共生相关基因,例如, *pmi1*/*pmi2*(premycorrhizal infection 1/2)、*nop1*(no perception 1)、*VapA* 和 *PAM1*,这些基因的突变会抑制共生过程中真菌生长、附着枝和丛枝结构的形成<sup>[11-16]</sup>。此外,研究者认为植物表皮的渗透元件可能与共生有关,如受体激酶 DMI2/SYMRK、钙调素依赖性激酶 DMI3/CCaMK 和 CYCLOPS 以及阳离子通道 CASTOR 和 DMI1/POLLUX 等,这些基因的突变会影响共生过程<sup>[17-24]</sup>。对于兰科植物来说,众多的研究集中在内生真菌分离鉴定、菌根形态、药效成分、基因分型等方面,在共生机制方面的研究相对较少。

该研究采用石斛内生真菌石斛小菇(*Mycena dendrobii*)接种铁皮石斛(*D. officinale*)无菌苗建立菌根共生体系,显微观察不同接种时期的菌根解剖结构,同时运用荧光定量 PCR 检测各个时期菌根中石斛基因表达,旨在初步探讨菌根真菌与兰科植物的互作分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

铁皮石斛、石斛小菇均为浙江省药用植物种质改良与质量控制技术重点实验室采集并保存。

### 1.2 试验方法

1.2.1 共生体系的建立 石斛小菇菌球的制备:用无菌打孔器在 8 d 菌龄的石斛小菇平板上打孔,并将菌块接

**第一作者简介:**冒佩佩(1988-),女,硕士,研究方向为药用植物基因功能。E-mail:mm3545@126.com

**责任作者:**王慧中(1962-),男,博士,教授,博士生导师,研究方向为中药资源与开发应用。E-mail:whz62@163.com

**基金项目:**浙江省自然科学基金资助项目(LY14C010003);杭州市科技发展计划资助项目(20130432B07);浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划资助项目(ZX13005002070)。

**收稿日期:**2015-01-19

入含有 100 mL PDB 培养基的 250 mL 锥形瓶中,28℃ 150 r/min,摇菌 4 d。共培养:转接大小基本一致的铁皮石斛无菌苗于含有 1/2MS 培养基的组培瓶中,每瓶 4 棵苗。预培养 1 周后,用石斛小菇菌球,轻轻涂抹无菌苗的根,并将菌球放在瓶子中间,28℃ 共培养。共培养时间分为 35、28、21、14、7、0 d 6 个阶段,重复 3 次。

1.2.2 菌根结构的观察 取 6 个时期新鲜的根部样品,采用石蜡切片法制作根部横切面玻片,用番红固绿双重染色、中性树胶封片后,显微镜观察并拍照。

1.2.3 代谢相关基因的差异表达 各时期菌根总 RNA

的提取与电泳检测:利用 Trizol (Invitrogen 公司)提取铁皮石斛菌根 RNA,取 2  $\mu$ L RNA 电泳检测和浓度测定。cDNA 的制备:利用 M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒(生工生物公司),制备共生体系的 cDNA,并稀释 10 倍。荧光定量 PCR:使用 iOTM SYBR® GREEN Supermix 试剂盒(BIO-RAD 公司)进行荧光定量 PCR。反应体系为 cDNA 3  $\mu$ L,SYBR Green 8  $\mu$ L,Primer F/R 0.4  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 补足至 18  $\mu$ L。反应条件为 95℃ 3 min,95℃ 30 s,52℃ 30 s,72℃ 30 s,40 个循环。具体引物见表 1。

表 1 引物列表

Table 1 List of the primers for real-time PCR

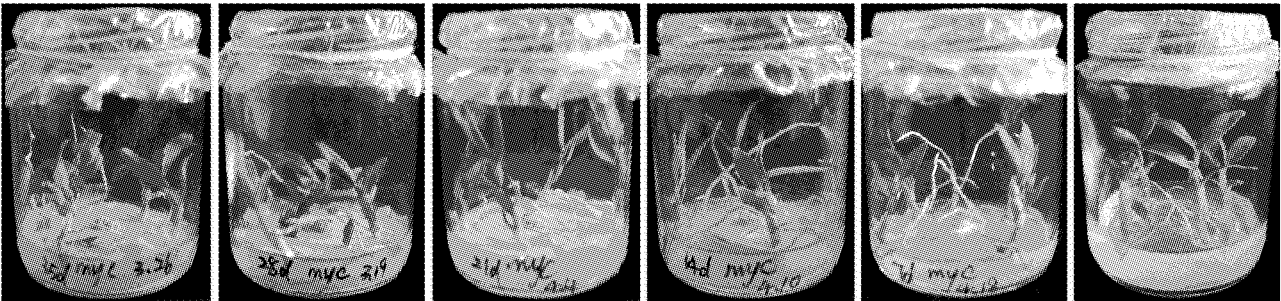
基因名称 Gene Name	上游引物 Upstream primer	下游引物 Downstream primer
肌动蛋白 Actin	AGGCTAACAGAGAGAAGATG	AGCAAGGTCAAGCCTCAGAAT
分支酸合成酶 Chorismate synthase	CCATCAATCTCGACCTCC	AAGCCAGCTCTCAATAACAAG
甘露糖特异结合植物血凝素 Mannose-specific lectin	CACTTGCTCTCCGGTGAG	GTCATAGACAACGAGGTTGCC

2 结果与分析

2.1 铁皮石斛无菌苗与石斛小菇共生培养结果

研究设定了 6 个共培养阶段,发现铁皮石斛无菌苗生长良好,未发生枯黄等现象,石斛根系健壮,有新根长出。同时,瓶中菌丝量与共培养时间呈正相关,时间越

长,接菌苗根表面覆盖的菌丝越明显(图 1)。但是,由于试验设定的共培养时间较短,以及石斛生长缓慢,处理组 7、14、21、28、48 d 与对照组 0 d 的植株生长差别不大,无法计算石斛小菇对铁皮石斛生长产量的作用效果。



注:从左至右分别为共生 35、28、21、14、7、0 d。

Note: Symbiotic periods are 35, 28, 21, 14, 7 and 0 days from left to right.

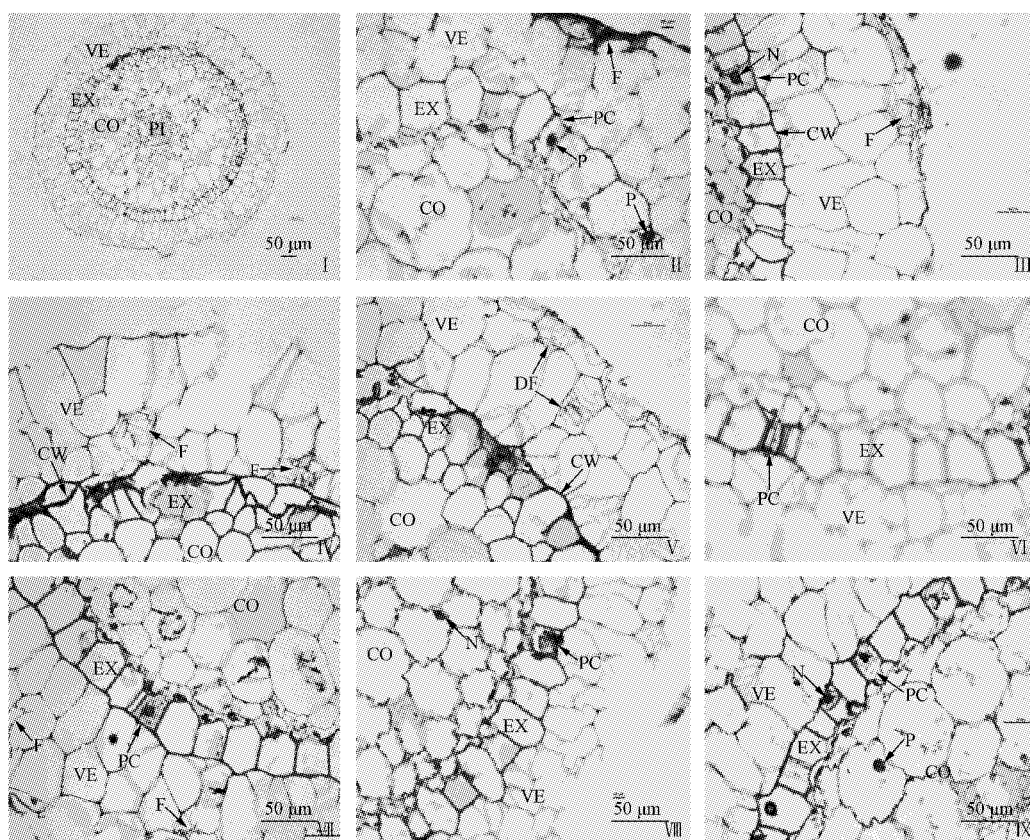
图 1 石斛苗生长状况

Fig. 1 Dendrobium seedlings growth conditions

2.2 铁皮石斛菌根结构分析

对不同共生时期的铁皮石斛根系进行切片观察,发现形成的菌根其组织结构与普通营养根相同,都由根被、皮层(包括外皮层、中皮层和内皮层)及中柱 3 层结构组成(图 2-D)。根被是由 3 层左右的死细胞组成,无细胞核,观察发现菌丝富集在根被表面,通过破坏根被细胞入侵根的内部(图 2-II、2-III),在不断消解的同时,不断生长,促进分枝(图 2-IV F),最终形成致密的、形状不一、着色较深的菌丝结(图 2-IX P)。外皮层只有 1 层细胞,中

间间隔着通道细胞,这些通道细胞是活细胞,内生菌多侵染并定殖其中(图 2-PC),引起通道细胞发生质壁分离(图 2-VIII PC),进而入侵根内部。持续的真菌入侵,使得外皮层细胞壁加厚(图 2-IV、图 2-V CW),这或许是植物增强抵御真菌侵染能力的方式之一。中皮层则是由多层活细胞组成,在这里能观察到中间或贴壁的细胞核(图 2-VIII N),以及菌丝缠绕形成菌丝结的现象(图 2-IX P)。菌根切片显示,石斛小菇很少侵染中柱细胞(图 2)。



注:I:菌根的横切面;II:菌丝在根被富集;III:菌丝开始侵染根被;IV:菌丝在根被细胞中定殖;V:菌丝侵染外皮层细胞,引起细胞壁加厚;VI:菌丝通过通道细胞侵染;VII,VIII:菌丝侵染外皮层,引起质壁分离;IX:菌丝缠绕细胞核形成菌丝结。VE:根被;EX:外皮层;CO:皮层;EN:内皮层;F:菌丝;DF:衰败的菌丝;P:菌丝结;PC:通道细胞;CW:细胞壁;N:细胞核;PI:髓。标尺=50 μm。

Note:I: The transverse section of mycorrhizal;II: Hyphae were enriched in the velamen;III: Hyphae infect the velamen;IV: Velamen cells is given colonization;V: Hyphae infect exodermis, and cause the cell wall thickness added;VI: Hyphae infected cells through the passage cell;VII, VIII: Mycelium infect exodermis, causing plasmolysis;IX: Hyphae formed the peloton. VE: Velamen; EX: Exodermis; CO: Cortex; EN: Inner cortex; F: Alive fungi; DF: Decaying fungi; P: peloton; PC: Passage cell; CW: Walls; N: nucleus; PI: Marrow. Bars=50 μm.

图2 不同时期铁皮石斛菌根显微结构

Fig. 2 Microstructure of mycorrhizae

### 2.3 菌根形成过程中相关基因的差异表达

为了探索铁皮石斛中有哪些基因可能参与菌根的形成,分别提取0、7、14、21、28、35 d 6个时期菌根的RNA,并从实验室已有的铁皮石斛cDNA文库中挑选多个基因进行差异表达分析。实时荧光定量PCR检测发现,分支酸合成酶和甘露糖特异结合植物血凝素

2个基因的表达量在共生7 d时都有所上调,分别是对照的7.31倍和2.54倍( $P<0.05$ ),随着共生时间的延长,这2个基因的表达量下降甚至下调,而分支酸合成酶基因在21 d时出现明显上调,为对照的9.28倍( $P<0.05$ )。共生的后期,2个基因的表达基本趋于稳定(图3)。

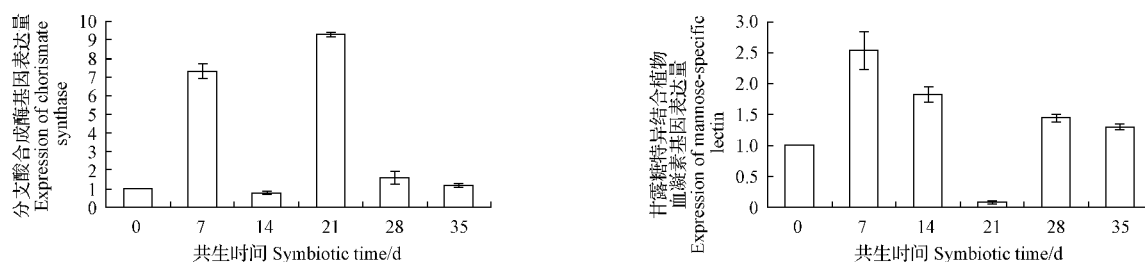


图3 分支酸合成酶和甘露糖特异结合植物血凝素的基因表达量

Fig. 3 Differential expression of chorismate synthase and mannose-specific lectin

### 3 讨论

该研究成功建立铁皮石斛无菌苗与石斛小菇的共生体系,通过根系显微结构观察发现,真菌菌丝定殖于石斛根部细胞内,形成菌根结构。在根的外皮层和中皮层能找到分布不均匀、形状大小不一的菌丝结。试验中观察到分布于中皮层的菌丝结较少,而野生石斛的皮层充满致密的菌丝结,甚至在中柱也有发现,这可能是由于该试验接种量少、菌种单一、缺少众多菌根真菌的共同互作以及石斛小菇生长缓慢等原因所引起的。菌根切片发现,根部细胞内同时存在衰弱疏松的菌丝和健壮致密的菌丝,说明石斛小菇在铁皮石斛根系内已经达到一种平衡状态,即菌丝不断被消解,又不断地生长,这可能是二者互惠共生的一种方式,既防止真菌过度生长又不至于使其消亡。另外石斛根系 1~3 层外皮层细胞壁着色较深,细胞壁加厚,其加厚的程度可能跟植物抵抗能力、菌根真菌种类及侵染程度有关。石斛小菇持续侵染,使石斛根系外皮层以内 1~3 层细胞的细胞壁加厚,这个变化一方面控制石斛小菇生长,另一方面可抵御病原菌侵染,同时增加植物的抗旱能力<sup>[25]</sup>。

为了深入研究菌根真菌与兰科植物的互作机制,该研究利用实验室已有的铁皮石斛 cDNA 文库,从中筛选共生过程中的差异表达基因,发现石斛分支酸合成酶和甘露糖特异结合植物血凝素这 2 个基因有明显变化。已有的研究表明,分支酸合成酶 Chorismate synthase 是莽草酸途径 shikimic acid pathway 的关键酶之一,而莽草酸途径是生物体内芳香族氨基酸合成的重要途径,若此途径受阻,芳香化合物合成减少,导致某些激素和关键代谢产物如木质素、类黄酮和酚类等物质代谢失调,最终导致正常氮代谢紊乱,逐步死亡<sup>[26-27]</sup>。同时,有研究者将大麦分支酸合酶(HvCS)、邻氨基苯甲酸合成酶 $\alpha$ 亚基 2(HvASA2)及分支酸变位酶 1(HvCM1)基因沉默,导致大麦细胞对白粉病菌的敏感性增强,而将这些基因过表达则会使敏感性降低,揭示分支酸合成酶在植物防御病菌的过程中发挥着重要作用<sup>[28]</sup>。该研究发现分支酸合成酶基因在共生第 7 天及第 21 天时发生明显上调,说明该酶在菌丝侵染的过程中参与了代谢调节,可能促进大量激素及关键代谢产物(如黄酮类等)合成,帮助植物抵御逆境及真菌的侵染等。另外,分支酸合酶上调会促进木质素的积累,而木质素是植物细胞次生壁的重要组成部分,这与该研究发现菌根皮层细胞壁变厚的结果相一致,证明分支酸合酶参与了铁皮石斛与石斛小菇的共生调节。

该研究发现的另一个有明显变化的基因,甘露糖特异结合植物血凝素基因,其产物是寡聚糖与蛋白质的复合物,能特异结合甘露糖、葡聚糖残基等,对黄曲霉、绿色木霉和尖孢镰刀菌有较强的抑制作用,并可以促进烟

草油菜等与根瘤菌的共生互作<sup>[29-33]</sup>。此外,植物血凝素可以特异识别病原体并与之黏附结合,也可以与靶细胞上病毒受体结合,阻断病毒与细胞的黏附,从而起到抗病毒抗感染的作用。该研究中铁皮石斛的甘露糖结合植物血凝素基因在共生早期发生明显上调,可能通过某种途径,刺激铁皮石斛产生一系列应激反应,并参与对石斛小菇及植物溶酶体等的识别,促进菌丝的凝集或降解,参与共生平衡的调节。

该研究通过构建铁皮石斛与石斛小菇共生体系,观察菌根形成过程,并发现石斛中可能参与共生调节的分支酸合酶及甘露糖特异结合植物血凝素这 2 个基因,它们可能通过产生类黄酮、木质素等中间产物参与共生调节,及通过识别细胞中广泛存在的甘露糖和葡聚糖残基,参与各种代谢反应进而调节共生。解开这 2 个基因参与共生的具体作用方式及最终揭示石斛与真菌的共生机制需要进一步的深入研究。

### 参考文献

- [1] 陈金花,胡美姣,宋希强,等.野生五唇兰菌根显微结构观察[J].菌物学报,2010,29(1):26-30.
- [2] 伍建榕,吕梅,刘婷婷,等.6 种兰科植物菌根的显微及超微结构研究[J].西北农林科技大学学报,2009,37(7):199-207.
- [3] Chen X M, Dong H L, Hu K X, et al. Diversity and antimicrobial and plant-growth-promoting activities of endophytic fungi in *Dendrobium loddigesii* Rolfe[J]. Plant Growth Regul, 2010, 29: 328-337.
- [4] 刘婷婷,伍建榕,合灿帆.铁皮石斛菌根化研究[J].北方园艺,2008(9):107-109.
- [5] 屠国昌.铁皮石斛的化学成分、药理作用和临床应用[J].海峡药学,2010,22(2):70-71.
- [6] Takemoto D, Tanaka A, Scott B. A p67Phox-like regulator is recruited to control hyphal branching in a fungal-grass mutualistic symbiosis[J]. Plant Cell, 2006, 18: 2807-2821.
- [7] Tanaka A, Christensen M J, Takemoto D, et al. Reactive oxygen species play a role in regulating a fungus-perennial ryegrass mutualistic association[J]. Plant Cell, 2006, 18: 1052-1066.
- [8] Tanaka A, Takemoto D, Hyon G S, et al. NoxA activation by the small GTPase RacA is required to maintain a mutualistic symbiotic association between *Epichloë festucae* and *Perennial ryegrass*[J]. Molecular Microbiology, 2008, 68: 1165-1178.
- [9] Eaton C J, Cox M P, Ambrose B, et al. Disruption of signaling in a fungal-grass symbiosis leads to pathogenesis[J]. Plant Physiology, 2010, 153: 1780-1794.
- [10] Op den Camp R, Streng A, De Mita S, et al. LysM-type mycorrhizal receptor recruited for rhizobium symbiosis in nonlegume *Parasponia*[J]. Science, 2011, 331: 909-912.
- [11] David-Schwartz R, Gadkar V, Winer S, et al. Isolation of a premycorrhizal infection (pmi2) mutant of tomato, resistant to arbuscular mycorrhizal fungal colonization[J]. Mol Plant Microbe Interact, 2003, 16: 382-388.
- [12] Gadkar V, David-Schwartz R, Nagahashi G, et al. Root exudate of pmi tomato mutant M161 reduces AM fungal proliferation *in vitro*[J]. FEMS Microbiol Lett, 2003, 223: 193-198.
- [13] Paszkowski U, Jakovleva L, Boller T. Maize mutants affected at distinct stages of the arbuscular mycorrhizal symbiosis[J]. Plant Journal, 2006, 47:

165-173.

- [14] Pumplun N, Mondo S J, Topp S, et al. Medicago truncatula Vapyrin is a novel protein required for arbuscular mycorrhizal symbiosis[J]. Plant Journal, 2010, 61: 482-494.
- [15] Feddermann N, Muni R D, Zeier T, et al. The PAM1 gene of petunia, required for intracellular accommodation and morphogenesis of arbuscular mycorrhizal fungi, encodes a homologue of VAPYRIN [J]. Plant Journal, 2010, 64: 470-481.
- [16] Murray J D, Muni R R, Torres-Jerez I, et al. Vapyrin, a gene essential for intracellular progression of arbuscular mycorrhizal symbiosis, is also essential for infection by rhizobia in the nodule symbiosis of *Medicago truncatula* [J]. Plant Journal, 2011, 65: 244-252.
- [17] Imaizumi-Anraku H, Takeda N, Charpentier M. Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots [J]. Nature, 2005, 433: 527-531.
- [18] Ane J M, Kiss G B, Riely B K. *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes [J]. Science, 2004, 303: 1364-1367.
- [19] Endre G, Kereszt A, Kevei Z, et al. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development [J]. Nature, 2002, 417: 962-966.
- [20] Stracke S, Kistner C, Yoshida S. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbioses [J]. Nature, 2002, 417: 959-962.
- [21] Levy J, Bres C, Geurts R. A putative  $\text{Ca}^{2+}$  and calmodulin independent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses [J]. Science, 2004, 303: 1361-1364.
- [22] Mitra R M, Gleason C A, Edwards A, et al. A  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development; gene identification by transcript-based cloning [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004, 101: 4701-4705.
- [23] Tirichine L, Imaizumi-Anraku H, Yoshida S. Dereglulation of a  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development [J]. Nature, 2006, 441: 1153-1156.
- [24] Yano K, Yoshida S, Mülle J. CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105: 20540-20545.
- [25] 陈连庆, 王小明, 裴致达. 石斛气生的兰科菌根组织结构及其对御旱研究 [J]. 生态环境学报, 2010, 19(1): 160-164.
- [26] Gruys K J, Walker M C, Sikorski J A. Substrate synergism and the steady-state kinetic reaction mechanism for EPSP synthase from *Escherichia coli* [J]. Biochemistry, 1992, 31: 5534-5544.
- [27] Gruys K J, Marzabadi M R, Pansegrau P D, et al. Steady-state kinetic evaluation of the reverse reaction for *Escherichia coli* 5-enolpyruvoylshikimate-3-phosphate synthase [J]. Arch Biochem Biophys, 1993, 304(2): 345-351.
- [28] Hu P, Meng Y, Wise R P. Functional contribution of chorismate synthase, anthranilate synthase, and chorismate mutase to penetration resistance in barley-powdery mildew interactions [J]. Molecular Plant-microbe Interactions, 2009, 22(3): 311-320.
- [29] Brown G D, Gordon S. Fungal beta-glucans and mammalian immunity [J]. Immunity, 2003, 19(3): 311-315.
- [30] 许莉. Dectin-1 在抗真菌免疫中的作用研究 [J]. 华中医杂志, 2007, 31(5): 360-361.
- [31] Vershinina Z P, Baimiev A K, Blagova D K, et al. Bioengineering of symbiotic systems; creation of new associative symbiosis with the use of lectins on the example of tobacco and colza [J]. Prikl Biokhim Mikrobiol, 2011, 47(3): 336-342.
- [32] Sitohy M, Doheim M, Badr H. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds [J]. Food Chemistry, 2007, 104(3): 971-979.
- [33] Zhang G, Sun J, Wang H, et al. First isolation and characterization of a novel lectin with potent antitumor activity from a *Russula mushroom* [J]. Phytomedicine, 2010, 17(10): 775-781.

## Establishment of *Dendrobium officinale* Mycorrhiza System and the Study on Its Related Gene Expression

MAO Pei-pei, ZHOU Li-ting, WU Lin, WU Jian-bing, WANG Hui-zhong

(Zhejiang Provincial Key Laboratory for Genetic Improvement and Quality Control of Medicinal Plants, College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou, Zhejiang 310036)

**Abstract:** The study focused on the interaction mechanisms between mycorrhizal fungi and host plants. Taking *Mycena dendrobii* and *Dendrobium officinale* as materials, the symbiotic system of *M. dendrobii* and *D. officinale* was constructed. The microscopic observation of microsection of symbiont showed that *M. dendrobii*-*D. officinale* mycorrhizal symbiont was established successfully. Simultaneously, the chorismate synthase gene and mannose-specific lectin gene were tested using fluorescent quantitative Polymerase Chain Reaction, showing that these genes were up-regulated in early symbiosis stage. The results showed that these genes participate in the regulation of symbiosis. This study laid the foundation for clarifying the interaction molecular mechanisms between orchid and mycorrhizal fungi.

**Keywords:** *Dendrobium officinale*; *Mycena dendrobii*; symbiosis; differential expression