

AM 真菌与紫云英 Ri T-DNA 转化根 双重培养体系的建立*

曹玲 赵斌[†]

(华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

ESTABLISHMENT OF A DUAL CULTURE SYSTEM FOR ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI AND Ri T-DNA-TRANSFORMED ROOTS OF *ASTRAGALUA SINICUS* L.

Cao Ling Zhao Bin[†]

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

关键词 双重培养; 丛枝菌根; 发根农杆菌; 转化根

中图分类号 Q939.5 文献标识码 A

丛枝菌根 (Arbuscular mycorrhiza, AM) 真菌是一类古老的植物共生真菌, 与植物约有 4 亿年共生史^[1], 能与 80% 以上的陆生维管植物形成互惠共生体—丛枝菌根, 可以改善植物对磷素营养的吸收^[2-3], 增强植物的抗逆性、抗病力或耐病力, 与根瘤菌共同作用于豆科植物促进豆科植物正常的生长发育, 提高产量, 在自然生态系统和实践中发挥着重要作用^[4-5]。

AM 真菌营专性共生生活, 至今尚未实现纯培养, 因此对 AM 真菌的生理学、遗传学以及 AM 真菌与植物共生分子机制等方面的研究进展缓慢。近 30 年来一些研究者^[6-9]将发根农杆菌 Ri T-DNA 转到高等植物细胞, 诱导出转化根, 为 AM 真菌提供无菌宿主材料。转化根自合成冠瘿碱激素可在培养基上无限快速生长, AM 真菌对其感染率较高, 形成共生体后外生菌丝生长旺盛。本实验以能够被华癸中生根瘤菌 (*Mesorhizohium huakuii*) 感染的紫云英转化根^[10]作为宿主与 AM 真菌建立双重培养体系。此双重培养体系将为在分子和生化水平上研究 AM 真菌与豆科植物共生机理及两者之间相互作用提供可操作的技术平台, 且有望在此双重培养体系基础上建立 AM 真菌、豆科植物与根瘤菌离体三

重培养体系, 对于揭示两类微生物共侵染过程及相互作用机制有重要意义。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试 AM 真菌菌株为 MUCL 43194-*Glomus intraradices*, 为 Ri T-DNA 胡萝卜转化根培养所得 (购自 BCCM/MUCL)。

供试细菌为发根农杆菌 K599 (*Agrobacterium rhizogens* K599), 链霉素抗性, 含质粒 pBI121 (本实验室生物固氮分室提供)。质粒 pBI121 为二元载体, 含有卡那抗性筛选标记和可表达的 GUS 基因。

1.2 供试植物

紫云英 (*Astragalua sinicus* L.), 本室保藏。

1.3 细菌菌株培养

将 -80 °C 保藏的发根农杆菌 K599 接种于含 50 mg L⁻¹ 链霉素 (Str) 和 50 mg L⁻¹ 卡那霉素 (Km) 的 LB 固体培养基, 于 28 °C 恒温培养箱暗培养 2 d。挑取单菌落接种于 LB 液体培养基中, 28 °C 振荡培养 20 h 左右, 取生长旺盛的菌液 ($OD_{600} = 0.6 \sim 0.8$) 进行侵染试验。

* 国家自然科学基金项目 (30270051) 和湖北省国际合作重点项目 (2003CA020) 项目

[†] 通讯作者, E-mail: binzhao@mail.hzau.edu.cn

作者简介: 曹玲 (1982—), 女, 硕士, 主要研究方向: 丛枝菌根生理。E-mail: lingcao82@yahoo.cn

收稿日期: 2009-03-03; 收到修改稿日期: 2009-05-08

1.4 紫云英的转化

选取颗粒饱满、大小均匀、有光泽的紫云英种子,用 75% 乙醇预处理 4 min,无菌水冲洗多次,再用 3% 次氯酸钠表面消毒 10 min,无菌水漂洗至完全除去表面残留的次氯酸钠。种子在无菌水中充分吸涨后,均匀铺于水琼脂(0.8%)平板,置于培养箱内 22~25 °C 暗培养至胚根长约 1 cm,转至光照培养箱(光照强度 8 000 lx),光照时间 14 h d⁻¹,22~25 °C 培养 3~5 d。取已长出子叶的无菌苗,在下胚轴中部切开,弃根部,将剩余部分的切口处完全浸入 K599 菌液中。以无菌水处理作为对照,浸泡 10 min 后,用无菌滤纸吸干植片子叶表面菌液,置于 MS 培养基上,22~25 °C、14 h d⁻¹光照培养。3 d 后转移到含 500 mg L⁻¹ 头孢噻肟钠(Cef)和不同浓度 Km(0,20,40,60 mg L⁻¹)的 MS 培养基中进行紫云英除菌培养,同时进行转化根的筛选。

1.5 转化根的检测

20 d 后从愈伤组织处剪下无向地性、颜色较白、分枝多的根段,标记为 A。同时选取对照根段标记为 B,重复 3 次。将剪下的根段放入 1.5 ml eppendorf 管,加 GUS 染液(成分:75 mmol L⁻¹ pH 7.0 磷酸缓冲液、1 g L⁻¹ X-Gluc、10 mmol L⁻¹ EDTA、0.1% Triton X-100、50 nmol L⁻¹ K₄[Fe(CN)₆]、50 nmol L⁻¹ K₃[Fe(CN)₆])^[11] 浸没根段,37 °C 温育 12 h,95% 乙醇冲洗后,解剖镜下观察结果。

1.6 转化根的除菌

从愈伤组织处剪下的转化根,转接到双重培养基(MSR)上,22~25 °C 暗培养,每 10~15 d,剪取转化根根尖(约 4 cm)转接新鲜 MSR 培养基,转接 3~4 次以完全除去转化根所带细菌。

双重培养采用 MSR 培养基,组分为(mg L⁻¹): MgSO₄ · 7H₂O 739; KNO₃ 76; KCl 65; KH₂PO₄ 4.1; Ca(NO₃)₂ · 4H₂O 359; Na-FeEDTA 1.6; MnSO₄ · 4H₂O 2.45; ZnSO₄ · 7H₂O 0.28; H₃BO₃ 1.85; CuSO₄ · 5H₂O 0.22; Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.0024; NH₄MoO₄ 0.034; 泛酸钙 0.9; 生物素 0.000 1; 烟酸 0.1; 盐酸吡哆素 0.09; 盐酸硫胺素 0.1; 钴胺素 0.04; 蔗糖 10 000; 琼脂 8 000; pH 5.5。

1.7 孢子的接种

剪取在 MSR 培养基上生长 15~20 d、长度约 5~6 cm 紫云英 Ri T-DNA 转化根两条,首尾并排放于含有 MSR 培养基的平皿一端。*G. intraradices* 为保藏在 MSR 培养基中的成熟孢子,用解剖刀将培养基切成 2 mm 小块(每个小块约有 10~20 个孢子)

放到距 Ri T-DNA 紫云英转化根根尖约 1 cm 处。每皿接种 5~6 个带 *G. intraradices* 的培养基块,25 °C 倒置暗培养。

1.8 AM 真菌侵染根器官的检查

接种后每 5 d 取出平皿在体视显微镜下观察菌丝的分布、与根的接触情况、新孢子的形成等。40 d 后开始收获。80 °C 水浴溶化培养基后,取出根段,剪成约 1 cm 长,采用 Trouvelot 等^[12] 描述的 Trypan blue(TB)染色法进行染色,显微镜下观察 AM 真菌侵染根器官情况。

1.9 数据统计与分析

试验数据采用统计分析软件 DPS V6.55 版,显著性分析采用 Duncan's 多重比较测验法。

2 结果与分析

2.1 Km 对紫云英 Ri T-DNA 转化根筛选的影响

转化根因被转入质粒 pBI121 而具有 Km 抗性,非转化根没有 Km 抗性,因此在生根培养基中加入 Km 能抑制紫云英非转化根的生长而提高紫云英生根植株的转化率。

紫云英植株转化后 20 d,观察其在不同 Km 浓度培养基上的生长状况。在不加 Km 的培养基上生长的紫云英,切口处很少长出愈伤组织,非转化根生长旺盛,生根植株转化率仅为 46.9(±2.7)% (见表 1)。而在加有 20、40 mg L⁻¹ Km 培养基上,紫云英切口处形成愈伤组织并长出转化根,且生根植株的转化率随着培养基中 Km 浓度的增高而增高。而在含有 60 mg L⁻¹ Km 培养基上紫云英叶片变黄正常生长受抑制(数据未检测)。可见 Km 能够有效抑制非转化根的生长,明显提高生根植株的转化率。在 Km 浓度为 40 mg L⁻¹ 时生根植株转化率约为对照的 2 倍。

表 1 Km 浓度对紫云英转化根筛选的影响

Km 浓度(mg L ⁻¹)	植株数	生根植株转化率 ¹⁾ (%)
0	60	46.9 ± 2.7c
20	60	68.7 ± 1.0b
40	60	84.0 ± 3.3a
60	60	ND ²⁾

1) 数据后的不同字母表示 $p < 0.01$ 水平上差异极其显著;
2) ND: 数据未检测

2.2 紫云英 Ri T-DNA 转化根的鉴定结果

标记为 A 的根段经 GUS 组织染色后呈现阳性即深色根段,表明 Ri 质粒已经成功转入紫云英根

段,而对照的紫云英根段 B 呈现 GUS 阴性即白色根段(图 1)。这表明从愈伤组织处长出的无向地性、颜色较白、分枝多的根段均可确定为转化根。

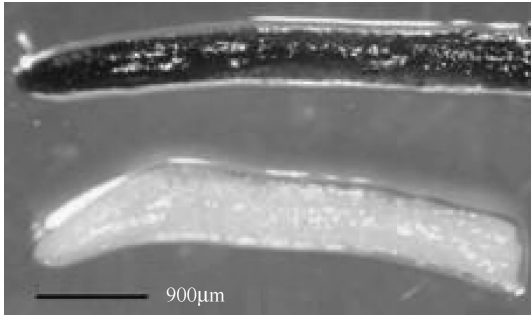


图 1 紫云英 Ri T-DNA 转化根 GUS 染色

2.3 紫云英 Ri T-DNA 转化根的生长情况

紫云英转化后约 7 d 就长出愈伤组织,14 d 左右从愈伤组织处长出转化根,转化根与非转化根相比较有较明显的特征:转化根无向地性,颜色较白,分枝多,根毛多(图 2)。

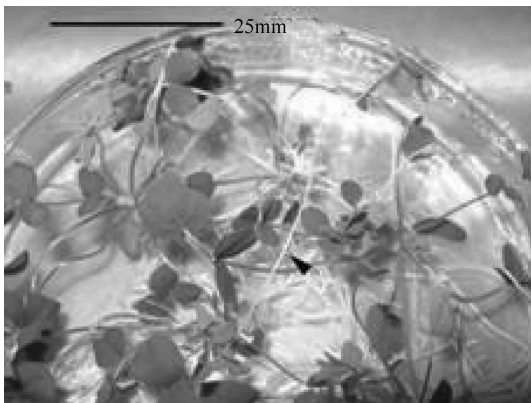


图 2 紫云英 Ri T-DNA 转化根(箭头)

新转接的紫云英 Ri T-DNA 转化根根段在 MSR 培养基上生长迅速,根尖平均生长速度约 4 mm d^{-1} ,分枝细,根毛多。由于转化根的生长无向地性,转化根在生长过程中一部分伸向培养基中一部分伸向空中。经过 3~4 代除菌后,生长 15 d 左右的转化根段即可用于双重培养体系。

2.4 *G. intraradices* 的萌发状况及对紫云英 Ri T-DNA 转化根的侵染

含有 *G. intraradices* 琼脂块在 MSR 培养基上 3 d 开始萌发,每个孢子只有一个萌发管,新形成的菌丝较纤细且生长速度很快,并形成分枝状结构,菌丝的生长表现出明显的趋根性,7 d 后菌丝接触到根段,随后部分菌丝包围根段,在根段表层形成附着胞结构(图 3),表明双重培养体系已经初步建

立。约 15 d 外生菌丝布满平皿并形成很多成促生长的分枝状结构。TB 染色后可以清晰地看到 *G. intraradices* 在根内形成的泡囊(图 3)和丛枝(图 3)。

培养 21 d 形成第一个次生孢子,30 d 后,在培养皿中形成大量的成熟孢子(图 3)。新形成的孢子离根较远,大部分在培养基内部,培养基上空也有少量新形成的成熟孢子。本实验发现,接种后一个月是孢子形成的最旺盛时期,且产孢集中在大约一周的时间内,尤其是紫云英 Ri T-DNA 转化根开始变黄的时候产孢最旺盛。

3 讨 论

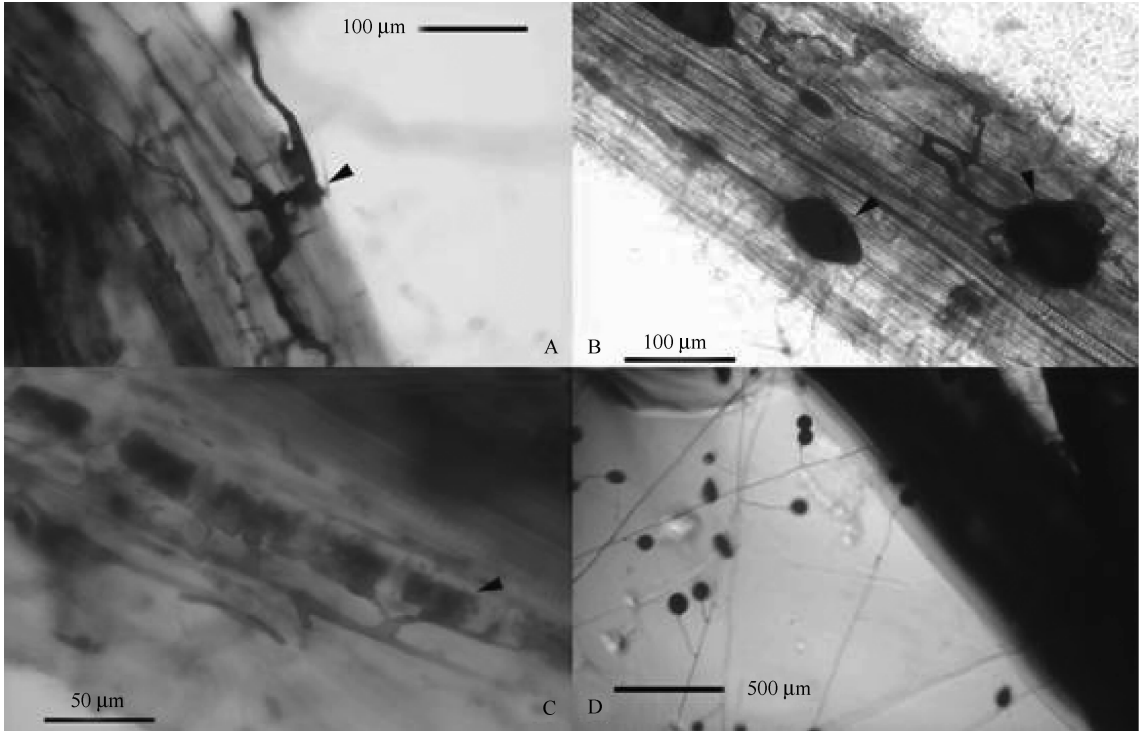
从本研究结果来看,合适的抗生素浓度对紫云英转化根形成的效率影响较大。适当的 Km 浓度 (mg L^{-1}) 会提高紫云英 Ri T-DNA 转化根形成的效率,而过高的 Km 浓度 (60 mg L^{-1}) 抑制转化根形成。当 Km 浓度为 40 mg L^{-1} 时,紫云英转化根因 Ri T-DNA 所带的 Km 抗性而大量生长,非转化根则受到 Km 抑制生长缓慢且数量较少。当 Km 浓度为 60 mg L^{-1} 时,由于浓度过高,无论转化根还是非转化根均受到抑制。这与 Boisson-Dernier 等的研究结果相一致^[13]。

AM 真菌与紫云英双重培养体系的建立具有重要的理论和现实意义,是研究 AM 真菌形态学、生理学、生物与非生物胁迫应答、根际生物(PGPR、病原菌、线虫)的相互作用、分类系统进化等方面的理想模式,更是目前公认的唯一能够提供无污染 AM 真菌材料的方法,这使分子生物学、生物化学技术广泛应用到 AM 真菌的研究中。采用此双重培养体系能够进行 AM 真菌与豆科植物相互识别信号和共生机制的研究。同时此双重培养体系也使 AM 真菌、豆科植物与根瘤菌离体三重培养体系的建立成为可能,将为揭示两类微生物共侵染过程及相互作用机制起到推动作用。

本实验中 AM 真菌 *G. intraradices* 次生孢子形成的高峰期集中在 7~10 d 的时间。Bago 等利用番茄和 *G. intraradices* 构建的双重培养体系也观察到同样的结果^[14]。这个现象可能与观察所选取的时间范围、菌种本身的特性或某些培养条件有关。本实验中也观察到,在菌丝生长过程中,未接触到根段的菌丝会分化成 3~4 级的分枝吸收结构(Branched absorbing structures, BAS),这种结构大多

以垂直主干菌丝的方向生长。BeCARD 和 Fortin 认为 BAS 可能是外生菌丝与根直接作用的结果^[8]。Karandashov 等则认为培养基成分的改变如培养过程中培养基 pH 的降低、根产生的代谢产物等均可

能促进外生菌丝产生 BAS^[15]。BAS 是否仅存在于双重培养体系中,我们还知之甚少。因此还需要进一步研究 BAS 的成因以及 BAS 的具体功能。



A *G. intraradices* 形成的附着孢(箭头) B *G. intraradices* 形成的泡囊(箭头)
C *G. intraradices* 形成的丛枝(箭头) D 新形成的 *G. intraradice* 孢子
图 3 *G. intraradices* 侵染紫云英 Ri T-DNA 转化根 TB 染色及新孢子形成

参 考 文 献

- [1] Remy W, Taylor T N, Hass H, et al. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91:11 841—11 843
- [2] Li X L, Geoghe E, Marschner H. Extension of the phosphorus depletion zone in VAM white clover in a calcareous soil. Plant Soil, 1991, 136:41—48
- [3] Li X L, Geoghe E, Marschner H. Phosphorus depletion and pH decrease at the root-soil and hyphae-soil interfaces of VAM white clover fertilized with ammonium. New Phytol, 1991, 119: 397—404
- [4] Tian C J, He X Y, Zhong Y, et al. Effect of inoculation with ecto-and arbuscular mycorrhizae and rhizobium on the growth and nitrogen fixation by black locust, *Robinia pseudoacacia*. New Forest, 2003, 25:125—131
- [5] Xavier L J C, Germida J J. Selective interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobium leguminosarum bv. viceae enhance pea yield and nutrition. Biol Fert Soils, 2003, 37: 261—267
- [6] Mugnier J, Mosse B. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in transformed root-inducing T-DNA roots grown axenically. Phytopathology, 1987, 77:1 045—1 050
- [7] Becard G, Fortin J A. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. New Phytol, 1988, 108:211—218
- [8] Becard G, Piche Y. New aspects of the acquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. New Phytol, 1989, 112:77—83
- [9] Becard G, Piche Y. Establishment of vesiculat-arbuscular mycorrhizae in root organ culture: Review and proposed methodology. Method Microbiol, 1992, 24: 89—108
- [10] Li Y, Zhou L, Li Y, et al. A nodule-specific plant cysteine proteinase, AsNODF32, is involved in nodule senescence and nitrogen fixation activity of the green manure legume *Astragalus sinicus*. New Phytol, 2008, 180(1):185—192
- [11] Hu C, Chee P P, Chesney R H, et al. Intrinsic GUS-like activities in seed plants. Plant Cell Rep, 1990, 9: 1—5
- [12] Trouvelot A, Kough J L, Gianinazzi-Pearson V. Mesure du taux de mycorrhization VA dun systeme racinaire. Recherche de methodes destination ayant une signification fonctionnelle//Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S. Physiological and genetical as-

- pects of mycorrhizae. Paris: INRA, 1986: 217—221
- [13] Boisson-Dernier A, Chabaud M, Garcia F, et al. Agrobacterium rhizo-genes-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol Plant Microb Interact*, 2001, 14: 695—700
- [14] Bago B, Azcón-aguilar C, Goulet A, et al. Branched absorbing structures (BAS): A feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol*, 1998, 139: 375—388
- [15] Karandashov V, Kuzovkina I, Hawkins H J, et al. Growth and sporulation of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus caledonium* in dual culture with transformed carrot roots. *Mycorrhiza*, 2000, 10: 23—28