

大豆毛状根-VA菌根真菌双重培养体系的建立

李欣欣, 赵静, 廖红*

华南农业大学根系生物学研究中心, 广州510642

摘要: 以大豆毛状根为宿主, 接种VA菌根真菌珠状巨孢囊霉(*Gigaspora margarita*), 经过3.5个月的双重培养, 观察到VA菌根真菌珠状巨孢囊霉对大豆毛状根的侵染, 辅助细胞形成, 并获得VA菌根真菌成熟孢子, 在无茵条件下建立了大豆毛状根-VA菌根真菌双重培养体系, 为研究菌根真菌侵染大豆根部形成共生体系及相关分子机制提供了一种有效的研究方法。

关键词: 大豆毛状根; VA菌根真菌; 珠状巨孢囊霉; 双重培养

Establishment of Dual Culture System of Soybean [*Glycine max* (L.) Merr] Hairy Roots and Vesicular-Arbuscular (VA) Mycorrhizal Fungi

LI Xin-Xin, ZHAO Jing, LIAO Hong*

Root Biology Center, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract: This paper describes the processes of establishment of dual culture system of soybean hairy roots and vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal fungi *Gigaspora margarita* under axenic conditions. Soybean hairy roots were used as host to be infected by *G. margarita*. After 3.5 months of dual culture, the infection of transformed soybean hairy roots by VA mycorrhizal fungi was observed, subsequently auxiliary cells were formed and mature spores of *G. margarita* were obtained. The successful establishment of dual culture system of soybean and VA mycorrhizal fungi provides an effective method to study the mechanisms of symbiosis between soybean roots and VA mycorrhizal fungi and related molecular researches.

Key words: soybean hairy root; vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal fungi; *Gigaspora margarita*; dual culture system

大豆是我国重要的粮食和油料作物, 是人类理想的植物蛋白来源。已有研究表明, 大豆接种丛枝菌根真菌对其增产具有重要的农业生产意义。接种菌根真菌后, 可增强大豆对磷营养的吸收(朱丽湘2001)。刘灵等(2008)研究发现在低磷条件下接种菌根真菌, 大豆的磷吸收量和整株生物量均显著增加, 菌根侵染状况对大豆磷效率的贡献存在互利互补关系。同时, 菌根真菌还能促进大豆对不同有机磷源的利用, 促进根瘤形成, 增强根瘤菌的固氮能力, 从而达到增产的目的(佟丽娜等2009)。大豆上一些受菌根侵染诱导表达的基因也被陆续发现。如Kobae等(2010)研究了大豆16个铵转运子, 其中5个受VA (vesicular-arbuscular)菌根侵染诱导而特异表达, 他们利用大豆毛根转化体系研究发现铵转运子*GmAMT4.1*在菌根侵染和VA菌根丛枝结构形成等方面起着核心作用, 这为从分子水平上解析菌根真菌促进大豆生长开创了一个契机。但是调查分析植物-菌根共生的相互作

用, 受侵染的植物根系必须从土壤中挖出, 就会破坏植物-菌根共生系统的一些特性, 而VA菌根真菌是专性活体营养微生物, 离开寄主活体很难生存, 因此VA菌根真菌与离体根双重培养体系的建立是研究菌根真菌侵染机制、菌根真菌发育过程、共生双方物质和信息交换机制等首选方法。此方法避免了人为及环境因子的影响, 可以动态监测菌根真菌的形态发育和生长变化规律等, 同时为菌根真菌侵染的相应分子机制提供良好的研究平台, 因此双重培养体系的建立具有广泛的应用前景。

双重培养体系在胡萝卜、人参和番茄等植物中已经获得成功。毕银丽等(1999a)建立了珠状巨孢囊霉(*Gigaspora margarita*)和转移Ri T-DNA胡萝卜根器官双重培养体系, 形成了无杂菌的菌丝环

收稿 2011-01-03 修定 2011-03-31

资助 国家自然科学基金重大项目(30890132)。

* 通讯作者(E-mail: hliao@scau.edu.cn; Tel: 020-85283380)。

境,并研究了珠状巨孢囊霉侵染根器官的形态特征(毕银丽等1999b),阐述了根外菌丝双向流动过程,认为菌丝内细胞质的双向流动是物质在菌丝中运输的动力,薄壁菌丝和厚壁菌丝的功能分别是吸收养分和作为养分的运输通道,与Strullu等(1991)研究结果相一致。刑晓科等(2003)以RiT-DNA胡萝卜毛状根为携带VA菌根真菌的载体,建立了人参-VA菌根真菌的双重培养体系,这不仅为相关的科学研究提供了新的研究手段,而且提供了一种新的生产人参-VA菌根真菌接种剂的方法。王晶晶等(2010)也建立了樱桃番茄离体毛状根与*Glomus intraradices*双重培养体系,为模式植物的菌根研究构建了便利和有效的平台。

目前,关于VA菌根真菌与大豆离体毛状根双重培养方面的研究尚未见报道。本文用发根农杆菌菌株K599诱导大豆子叶产生毛状根,此毛状根生长速度快,能产生许多分枝,材料易获得;再用珠状巨孢囊霉孢子侵染大豆离体毛状根,进行双重培养。此系统的建立有利于单一菌剂的扩繁,排除其他环境因子的影响及其他菌落的互作干扰,有助于研究单一丛枝菌根真菌与大豆根系的共生机制。由于发根农杆菌侵染植物产生的毛状根是由单细胞产生的,每一条毛状根就是一个转化体,可利用该双重培养体系研究大豆根部受菌根真菌侵染而特异表达基因的功能及相关的分子机制,从而丰富菌根学理论研究内容,为生产实践提供理论指导。

材料与方法

1 供试菌株和菌剂

发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)菌株K599由澳大利亚Peter Gresshoff教授惠赠。菌剂为本课题组繁殖的大豆根际土壤与珠状巨孢囊霉(*Gigaspora margarita*)真菌孢子的混合物。

2 植物材料

供试大豆[*Glycine max* (L.) Merr]为磷高效基因型‘HN89’。

3 培养基成分及所用抗生素

大豆萌发培养基成分(单位: $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)为: KNO_3 1900、 NH_4NO_3 1650、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 370、 $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 332、KI 0.83、 H_3BO_3 6.2、 $\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 22.3、

$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.6、 $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25、 $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.025、NaFeEDTA 37.3、甘氨酸2、 VB_1 0.1、 VB_6 0.5、 VB_5 0.5、肌醇100、 KH_2PO_4 170, pH 5.8。发根诱导培养基和继代培养基是在萌发培养基上添加抑菌剂羧苄青霉素 $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。双重培养时,培养基中 KH_2PO_4 用量减半,即 $85\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

4 大豆毛状根与VA菌根真菌双重培养体系

4.1 发根农杆菌的活化和感菌液的制备

用接种环沾取保存在灭菌甘油中的K599菌液,在YEP固体培养基上划线,28℃暗培养2 d至菌落长起,再挑单菌落到新YEP固体培养基上划线生长以活化细菌。侵染前1 d挑取单菌落到装有液体YEP培养基的50 mL离心管中,28℃、250 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 过夜生长,当 OD_{600} 值达到0.8~1.0时,可作为感菌液。

4.2 大豆毛状根的诱导

大豆毛状根的诱导按照王秀荣(2008)的方法进行,即在Cho等(2000)建立的诱导方法的基础上,根据国内条件和实验经验进行优化。首先将粒大、饱满、无种皮破损的大豆种子置于装有氯气(100 mL次氯酸钠中加入4.2 mL浓盐酸)的干燥器中灭菌13.5 h。灭菌后种子播于萌发培养基上,待种子萌发至子叶竖起、种皮大部分脱落且子叶尚未张开时(约4~5 d),用农杆菌K599菌液侵染大豆子叶。侵染时切下子叶,保留1 cm左右下胚轴,纵切分离两片子叶,去除种皮,挖去腋芽。用解剖刀蘸取菌液,在子叶和子叶节部位切十余刀;放在培养皿中用无菌水润湿的双层滤纸上,封上保鲜膜,25℃下光照培养5 d,然后将其转移到诱导培养基上。约2周后便从形成的愈伤组织处长出毛状根,将整条根沿基部切下转移到继代培养基,并轻轻压平,继代3次后,毛状根用于VA菌根真菌侵染,进行双重培养时不添加任何抗生素和筛选剂。

4.3 菌根真菌孢子的准备

在大豆毛状根第二次继代培养时,准备接种用的珠状巨孢囊霉孢子。用湿筛倾析法(Gerdemann 1955)从繁殖的大豆根际中筛出珠状巨孢囊霉孢子。光学显微镜下用毛笔将淡黄色、均匀一致的孢子挑到预先润湿的滤纸上,去除附着在孢子表面的杂物后,将其挑到特制的离心管中(离心管底部有筛网,孢子不能通过),用无菌水冲洗3次

后,进行孢子表面消毒。在超净台上,将盛有珠状巨孢囊霉孢子的特制离心管放入盛有0.05%吐温-20溶液中,浸泡1 min,再将离心管转入盛有新鲜的0.05%吐温-20溶液浸泡1 min,2%氯胺T溶液中浸泡10 min,无菌水中清洗1次后再次转入新鲜的2%氯胺T溶液,浸泡10 min,最后用无菌水冲洗残留的氯胺T。灭菌后孢子贮存在抗生素溶液($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 庆大霉素+ $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 链霉素)中24 h以上即可使用,贮存时间可长达1周。

4.4 菌剂孢子的萌发与接种

在大豆毛状根第三次继代培养的同时,将消毒后的珠状巨孢囊霉孢子用软镊子逐个播种在含有2%植物胶的细胞培养板内(图1),用透气膜封口,25 °C恒温暗培养约4 d,孢子即可萌发。在体视显微镜下观察萌发动态并计算孢子萌发率,萌发率计算方法如下:萌发率(%)=(萌发孢子数/播种孢子

数) $\times 100\%$ 。

在体视显微镜下观察萌发的孢子,将无污染且萌发状态良好的孢子用软镊子挑到继代3次后的大豆毛状根旁进行双重培养(图2)。一个培养皿中接3个萌发的孢子,可根据实验情况适量增加接种孢子数。接种后立即用透气封口膜封口,以防止水分蒸发和污染,置于25 °C培养箱中暗培养,培养过程中定期转动培养皿方向,以便增加VA菌根真菌菌丝与毛状根的接触。

4.5 染色与观察

大豆毛状根与珠状巨孢囊霉孢子双重培养1个月后,进行VA菌根真菌侵染情况的镜检。在体视显微镜下先观察整个培养皿中双重培养的情况,标记出根外菌丝生长密集的部位,将此部位毛状根及其附带的培养基共同取出,用10% KOH于70 °C水浴锅脱色至根系透明,用移液管将液体吸出,2%

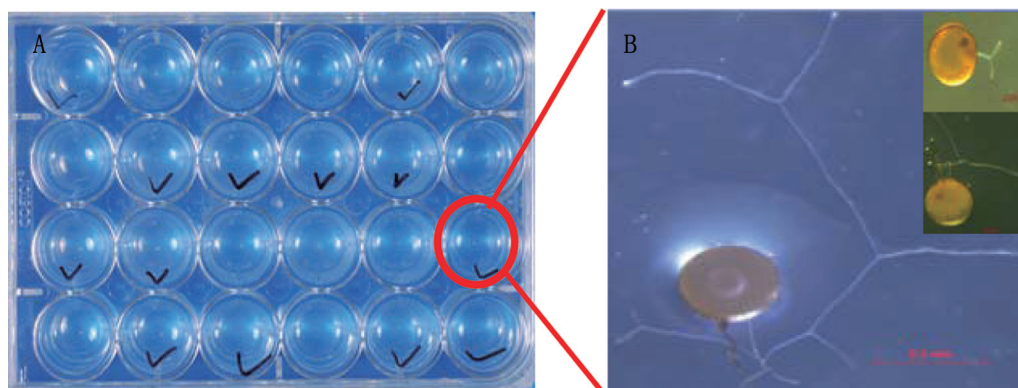


图1 珠状巨孢囊霉孢子的萌发

Fig.1 Germination of *G. margarita* spores

A: 孢子萌发培养板; B: 萌发的孢子及长出的菌丝。

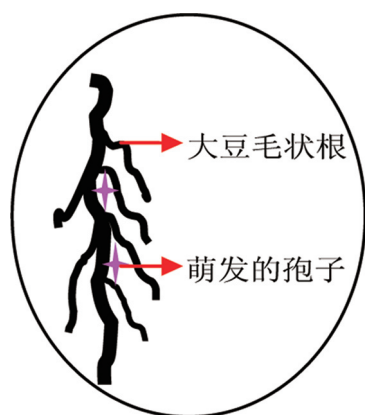


图2 双重培养体系示意图

Fig.2 Schematic diagram of dual culture system

HCl溶液酸化15 min,锥虫蓝乳酸甘油室温染色30 min,将根剪成长度为1 cm左右的根段,用PVLG(聚乙烯醇1.66 g、乳酸10 mL、甘油1 mL、蒸馏水10 mL)作载浮剂,将根段整齐地摆放在载玻片上,盖片,无色指甲油封片,镜检,拍照。

结果与讨论

1 大豆毛状根的诱导

发根农杆菌菌株K599侵染大豆子叶后,在诱导培养基上生长10 d左右开始有毛状根长出,20 d后毛状根大量生成。经3次继代后,毛根生长迅速,形态上与正常根无差异,有根冠、根尖和根毛,具

有毛状根的特性: 向上或沿培养基生长, 无向地性, 在不合任何激素的培养基上生长迅速等, 可作为宿主用于VA菌根真菌侵染(图3)。

2 孢子萌发

将已消毒并在4 °C贮存24 h以上的孢子播种于细胞培养板上(图1), 每孔播种1个孢子, 25 °C恒温暗培养约4 d后观察。珠状巨孢囊霉成熟孢子呈浅黄色, 直径在340~472 μm, 萌发时从基部的细胞壁内伸出芽管(图1-B), 芽管上再长出菌丝, 一个芽管可以长出大量菌丝, 利于对毛根的侵染。表1为体视显微镜下观察到的孢子萌发数及污染数。从表1中可知珠状巨孢囊霉孢子萌发率在33.33%~

50.00%之间, 无萌发迹象的孢子平均占了58.33%。导致萌发率不高的原因可能是孢子过小或者不够成熟, 发育不够完全。另外, 由于孢子大小不一致, 相同的灭菌时间对小孢子而言灭菌时间过长, 从而也会降低其萌发活性, 在实验中尽量避免挑选颜色偏白或变暗的孢子, 可提高孢子萌发率。实验中, 用湿筛法得到的孢子在体视显微镜下可观察到其表面带有大量附着物, 一些看不见的细菌会藏于孢子外壁并受到外壁的保护使灭菌不完全, 导致污染。本实验中孢子平均污染率为8.33%, 说明采用的孢子灭菌方法效果好, 为无菌的双重培养提供了可能。

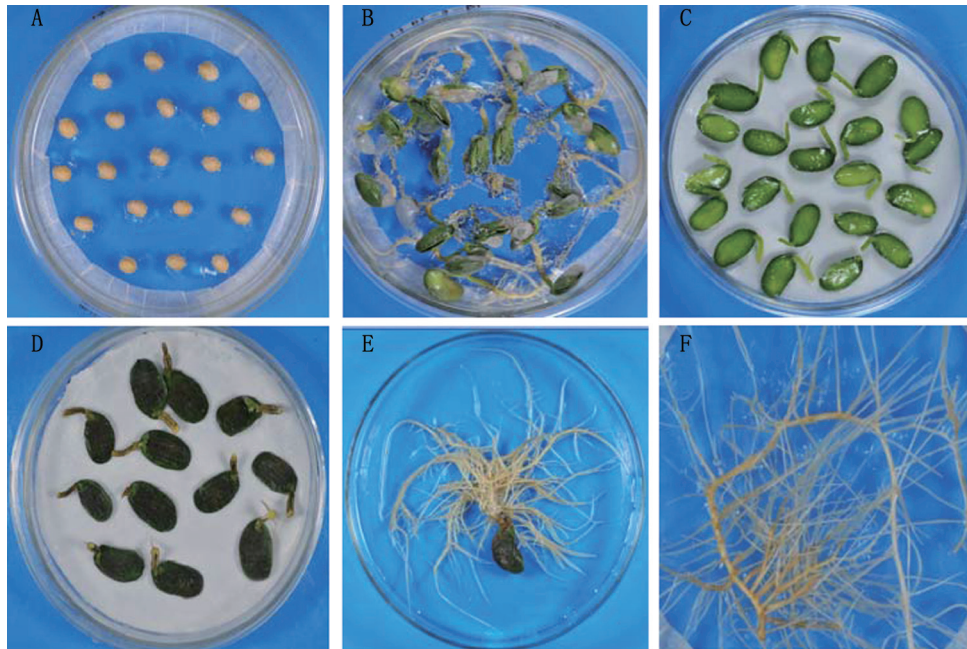


图3 大豆毛状根的诱导

Fig.3 Induction of soybean hairy roots

A: 大豆种子播种于萌发培养基; B: 大豆种子萌发; C: 发根农杆菌-大豆子叶共培养初期; D: 发根农杆菌-大豆子叶共培养5 d后; E: 大豆子叶节长出毛状根; F: 大豆毛状根继代培养。

3 孢子对大豆毛状根的侵染

将刚萌发的珠状巨孢囊霉孢子移到大豆毛状根旁, 恒温暗培养, 孢子菌丝迅速生长, 当菌丝接触到根后, 在根的表皮上形成入侵点或者沿着根生长, 形成多个入侵点(图4-B)。在体视显微镜下观察到根外菌丝不断生长蔓延, 在根系周围形成大的菌丝网(图4-C), 其中毛状根根段附近菌丝最为密集, 可能是由于在共生体系中根系分泌物会

促进菌根真菌的生长(Becard和Piche 1989), 根周围的菌丝与毛状根之间需要进行养分相互运输。从萌发孔萌发出的菌丝形成强大分枝继而侵入到根皮层内, 并与根内菌丝相连(图4-D)。外生菌丝有时可延伸几十厘米长, 扩大了根的吸收面积(图4-E)。本实验中观察到萌发生长的菌丝受向地性的影响, 即具有负向地性, 这与前人研究的结果相同(邵菊芳等2008), 因此当毛状根与萌发孢子进行

表1 孢子萌发率

Table 1 The rate of spore germination

培养板编号	观察总数	萌发数	污染数	萌发率/%	污染率/%
I	24	9	3	37.50	12.50
II	24	10	1	41.67	4.16
III	24	8	2	33.33	8.33
IV	24	12	0	50.00	0
V	24	12	4	50.00	16.67
VI	24	9	4	37.50	16.67
VII	24	11	0	45.83	0
VIII	24	8	1	33.33	4.16
平均值	24	10	2	41.67	8.33

双重培养时要定时转动培养皿方向, 使生长的菌丝与毛状根充分接触, 增大感染几率。

4 根外辅助细胞的形成及成熟孢子的获得

实验中观察到珠状巨孢囊霉不能形成根内孢囊, 但可形成强大的根外辅助细胞, 辅助细胞结构类似于孢子, 形成于根外菌丝分支上, 成簇的生长, 外表有刺状突起(图4-F、G)。辅助细胞被认为是一种贮藏养分的器官, 能否作为繁殖体而具备孢囊的功能还需进一步研究。双重培养3.5个月后, 培养皿内产生珠状巨孢囊霉孢子, 孢子可形成于空间菌丝上(图4-H), 有的形成于培养基的表面(图

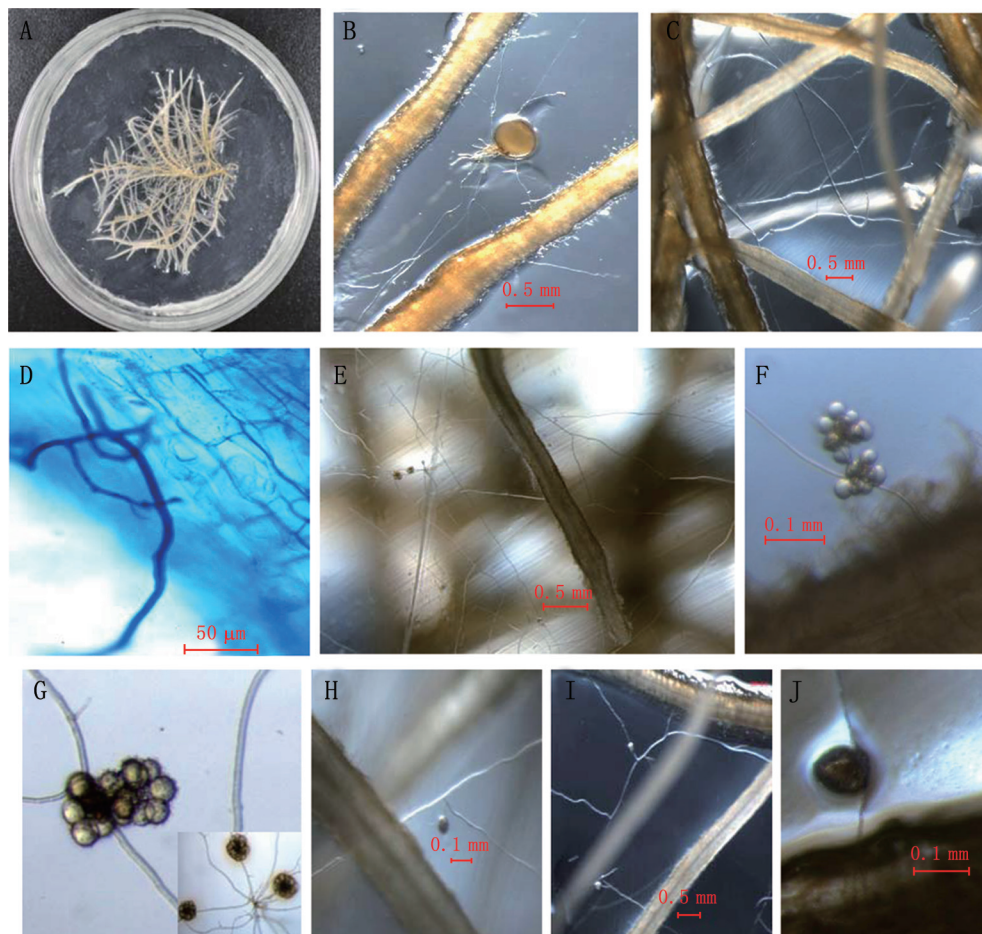


图4 大豆离体毛状根与丛植菌根真菌珠状巨孢囊霉的双重培养

Fig.4 An *in vitro* dual culture between transformed soybean hairy root and *G. margarita*

A: 继代3次后用于双重培养的大豆毛状根; B: 萌发的孢子与大豆毛状根的共培养; C: 根外菌丝的形成; D: 锥虫蓝乳酸甘油室温染色显示珠状巨孢囊霉菌丝入侵离体毛状根; E: 多级分支菌丝的形成; F: 根外辅助细胞的形成; G: 根外辅助细胞形态; H、I、J: 孢子形成。

4-I), 有的形成于培养基的底部(图4-J)。成熟孢子一般为浅黄色, 同时形成鳞茎孢源细胞, 孢源细胞

附近形成萌发孔, 孢子萌发时菌丝从萌发孔中长出, 故在此大豆毛状根与VA菌根真菌双重培养无

菌条件下, VA菌根真菌能完成其自身的生活周期。该双重培养体系的成功建立为进行大豆根部受菌根真菌感染特异诱导表达基因的功能分析构建了良好的研究平台, 从而丰富菌根学理论内容, 为生产实践提供理论指导, 目前正在利用该系统进行相关基因的分子研究。

参考文献

- 毕银丽, 汪洪钢, 李晓林(1999a). VA菌根真菌对转移Ri T-DNA胡萝卜根器官的侵染. 植物营养与肥料学报, 5 (1): 76~80
- 毕银丽, 汪洪钢, 李晓林(1999b). 丛植菌根真菌与转移Ri T-DNA胡萝卜根器官双重培养的形态学研究. 菌物系统, 18 (2): 159~163
- 刘灵, 廖红, 王秀荣, 严小龙(2008). 磷有效性对大豆菌根感染的调控及其与根构型、磷效率的关系. 应用生态学报, 19 (3): 564~568
- 邵菊芳, 朱红威, 滕婷婷(2008). AM真菌孢子萌发及双重培养研究. 安徽农学通报, 14 (5): 18~20
- 佟丽娜, 李淑敏, 孟令波(2009). 双接种对大豆利用不同有机磷源的影响. 东北农业大学学报, 40 (10): 37~42
- 王晶晶, 孙淑斌, 徐国华(2010). 丛枝菌根真菌侵染番茄离体毛状根双重培养体系的建立. 菌物学报, 29 (1): 68~74
- 王秀荣(2008). 大豆磷高效转基因体系的优化和应用[博士学位论文]. 广州: 华南农业大学
- 刑晓科, 李玉, 王义, 张美萍(2003). 人参VA菌根真菌双重培养体系的建立. 吉林农业大学学报, 25 (2): 154~157
- 朱丽湘(2001). VA菌根接种白浆土对大豆磷素营养的影响. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 17 (5): 91~93
- Becard G, Piche Y (1989). Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Appl Environ Microbiol, 55: 2320~2325
- Cho HJ, Farrand SK, Noel GR, Widholm JM (2000). High-efficiency induction of soybean hairy roots and propagation of the soybean cyst nematode. Planta, 210: 195~204
- Gerdemann JW (1955). Relation of a large soil-borne spore to phyto-mycetous mycorrhizal infections. Mycologia, 47: 619~632
- Kobae Y, Tamura Y, Takai S, Banba M, Hata S (2010). Localized expression of arbuscular mycorrhiza-inducible ammonium transporters in soybean. Plant Cell Physiol, 51 (9): 1411~1415
- Strullu DG, Romand C, Plenchette C (1991). Axenic culture and encapsulation of the intraradical forms of *Glomus* spp. World J Microbiol Biotechnol, 7: 292~297