



脱落酸对丛枝菌根真菌侵染和产孢的调控效应研究

刘晓迪^{1,2}, 冯曾威², 朱红惠¹, 姚青^{2*}

¹广东省科学院微生物研究所, 华南应用微生物国家重点实验室, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东 广州 510070

²华南农业大学园艺学院, 广东省微生物信号与病害防治重点实验室, 广东 广州 510642

摘要:【目的】揭示脱落酸(ABA)对丛枝菌根(AM)真菌侵染和产孢的影响, 建立利用外源 ABA 促进孢子产量的高效菌剂扩繁方法。【方法】利用番茄毛状根和 AM 真菌 *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198 建立双重培养体系, 通过外源施用 ABA、赤霉素(GA)或者使用 ABA、GA 的缺陷突变体, 染色观察菌根侵染, 荧光定量 PCR 测定丛枝发育和脂质合成运输相关基因的表达, 统计丛枝和孢子的数量, 从而揭示 ABA 对 AM 真菌侵染和产孢的影响。【结果】ABA 缺陷突变体 *not* 中的 F% (侵染频率)、a% (丛枝丰度)、丛枝数量, 以及丛枝发育特异性相关基因 *EXO70A1-like* (LOC101253481)、脂质合成运输相关基因 *RAM2* 和 *STR2* 的表达均显著低于其野生型 MT; 外源施用 ABA 显著促进了 F%、M% (侵染强度)、丛枝数量、孢子产量, 以及脂质合成运输相关基因 *RAM2* 和 *STR2* 的表达, 外源添加 ABA 处理的孢子产量约为不添加处理的 4.5 倍; 外源 GA 处理极显著抑制了菌根侵染的所有指标和孢子产量; GA 缺陷突变体 *gib3* 与其野生型 MM 的 AM 真菌侵染之间没有显著差异, 但 *gib3* 的孢子产量显著高于 MM。【结论】ABA 通过促进脂质的合成和运输, 提高 AM 真菌的侵染和丛枝形成, 进而增加 AM 真菌的孢子产量。

关键词: 脱落酸, 丛枝菌根真菌, 丛枝形成, 孢子产量, 赤霉素

丛枝菌根(arbuscular mycorrhiza, AM)真菌是土壤中普遍存在的球囊霉亚门(*Glomeromycotina*)真菌, 可以与 80%以上的陆生植物建立共生关系, 为植物提供氮和磷等矿质养分, 并从宿主植物获得碳源, 供给自身的生长发育和繁殖^[1]。AM 真菌与植物建立共生关系后, 能够提高农作物对许多

基金项目: 广东省科技创新战略专项资金(重点领域研发计划)(2018B020205001); 国家自然科学基金(42077040); 广东省科学院“千名博士(后)计划”引进专项(2021GDA5YL-20210103023)

*通信作者。Tel: +86-20-85286902; Fax: +86-20-85280228; E-mail: yaoqscau@scau.edu.cn

收稿日期: 2020-10-20; 修回日期: 2020-12-12; 网络出版日期: 2021-03-09

生物与非生物胁迫的耐受性,比如提高农作物对养分贫瘠、干旱、重金属毒害、酸碱度胁迫、病虫害等的耐受性,改善农作物的生长势,进而提高农作物的产量、改善农作物的品质^[2-3]。在农林业生产(尤其是可持续生产)中能够发挥重要的作用,具有很大的应用潜力。

目前,AM 真菌的纯培养尚未取得成功,因此并未在农林业生产中大量应用。现有的商业化菌剂是利用与宿主植物的共生来生产的,菌剂扩繁方式较为复杂,限制了菌剂的生产。孢子是 AM 真菌的繁殖体,孢子数量是衡量菌剂质量的关键指标。AM 真菌的孢子储存大量营养,其主要成分是中性脂(三酰基甘油)^[4]。但 AM 真菌并不能从头合成脂肪酸,需要从植物中获取脂肪酸以供给自己的生长繁殖^[5-6]。在 AM 共生体中,丛枝是两者之间进行物质交换的主要场所,丛枝在皮层细胞内不断分支形成巨大的表面积^[7],而丛枝这个膜结构含有大量的磷脂^[4]。丛枝衰老崩溃后,脂质从丛枝通过外生菌丝转移到 AM 真菌的产孢菌丝,有利于孢子形成^[8]。因此,丛枝形成及丛枝丰度对于孢子形成、菌剂质量非常关键。

AM 真菌与植物建立共生过程中需要一系列信号分子,植物激素作为重要的信号物质不仅调控植物的生长发育,也能调控 AM 的共生关系。Herrera-Medina 等^[9]的研究表明脱落酸(abscisic acid, ABA)能够促进 AM 真菌侵染,尤其是提高丛枝丰度。Liu 等^[10]发现外源添加 ABA 能够促进异形根孢囊霉菌株 DAOM 197198 (*Rhizophagus irregularis* DAOM 197198)在非共生状态下孢子的产生,说明 ABA 能够调控 AM 真菌的侵染和孢子的形成,但是 ABA 对共生状态下 AM 真菌产孢的影响未见报道。在共生状态下,丛枝是 AM 真菌

共生体物质和信息交换的核心结构,丛枝丰度受到抑制或者促进与宿主植物提供给 AM 真菌的脂类减少或增加密切相关^[4],而孢子是存贮脂质的结构,AM 真菌通过丛枝从植物获得的脂质最终以孢子的形式贮存。基于 ABA 能够促进丛枝的形成,而丛枝对于孢子形成具有关键作用,因此,我们推测 ABA 能够促进共生状态下孢子的形成。

在植物体中,赤霉素(gibberellin, GA)是与 ABA 具有拮抗关系的一类植物激素^[11],外源 GA 会抑制植物体内 ABA 的合成,而 GA 缺乏会促进 ABA 的合成。最近的研究发现,GA 也参与丛枝的形成,GA 合成缺陷的豌豆突变体根系中丛枝丰度很高,但是叶片施用 10 μ L 的 GA 使得丛枝比例降低到野生型水平^[12]。这表明 GA 也可能影响 AM 真菌的孢子形成,但是目前尚未见相关报道。通过调控植物体内的 GA 含量,可以调控植物体内 ABA 含量,因此,我们推测外源添加 GA 或者利用 GA 缺陷突变体可能通过调控植物体内 ABA 含量而抑制或者促进孢子产量。

为了验证上述的推测,本试验以番茄毛状根为宿主材料,接种 AM 真菌,通过添加外源 ABA 或者 GA,使用 ABA 缺陷突变体或者 GA 缺陷突变体,明确在 AM 真菌与植物共生过程中,ABA 对 AM 真菌侵染和产孢的影响模式和作用机制。本研究的结果有助于建立一种便捷高效的促进 AM 真菌产孢的方法,也能加深对 AM 真菌生理生化特性的认识,丰富 AM 真菌生物学内容,从而为 AM 真菌在农林业生产上的应用奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 生物材料

本试验使用的植物材料是番茄(*Solanum*

lycopersicum), 品种为‘新金丰一号’, 种子购买于市场, 发芽率在 90% 以上。番茄 ABA 缺陷突变体和 GA 缺陷突变体与对应的野生型种子从加州大学戴维斯分校国家植物种质系统生物学系 Tomato Genetics Resource Center (TGRC) 种子资源库(<http://tgrc.ucdavis.edu/>)获得。*not* (*notabilis*) 为 ABA 缺陷突变体, 其 9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶合成酶突变, 类胡萝卜素双加氧酶是 ABA 合成过程中所需要的关键酶^[13], Micro-Tom (MT) 为其野生型; *gib3* (*gibberellin-deficient-3*) 为 GA 缺陷突变体, MoneyMaker (MM) 为其野生型。

番茄种子消毒后, 播种到装有 MS 培养基的组培瓶中培养获得无菌苗。将无菌苗制备的外植体用发根农杆菌 *Agrobacterium rhizogenes* ACCC10060/ACCC 10060 (广东省微生物菌种保藏中心) 诱导毛状根, 除菌后备用。

AM 真菌异形根胞囊霉 *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198 从加拿大的 Premier Tech 公司购买, 使用毛状根接种 AM 真菌双重培养体系扩繁孢子。培养 3 个月孢子成熟后用于本试验。

1.2 外源 ABA 对 AM 真菌侵染、丛枝发育和脂质运输的影响

将毛状根与菌株 DAOM 197198 建立共生关系, 采用两因子完全随机设计, 即番茄基因型(野生型 MT 和 ABA 缺陷突变体 *not*) 和 ABA 处理(+ABA 和-ABA)。ABA(Sigma, A1049)施用浓度为 10^{-7} mol/L, 使用直径 15 cm 的培养皿, 倒入 MSR 培养基^[14]。每个培养皿上均匀接种约 100 个孢子, 置于 25 °C 恒温培养箱中暗培养 5 d, 在孢子开始萌发后将 8 条长约 5 cm 的毛状根呈辐射状径向均匀置于培养皿中, 根系距孢子约 0.5 cm, 培养皿用封口膜封口后置于 25 °C 恒温培养箱中

暗培养。每个处理 5 个重复, 4 个处理共 28 个培养皿, 培养 8 周后取样。

1.3 外源 ABA 对 AM 真菌孢子产量的影响

毛状根与菌株 DAOM 197198 共生后, 设 2 个外源 ABA 处理(+ABA 和-ABA)。ABA 施用浓度为 10^{-7} mol/L, 在 9 cm 培养皿中倒入 MSR 培养基, 每个培养皿上均匀接种约 50 个孢子, 置于 25 °C 恒温培养箱中暗培养 5 d, 在孢子开始萌发后将 3 条长约 3 cm 的毛状根呈辐射状径向均匀置于培养皿中。培养条件与 1.2 相同。每个处理 5 个重复, 2 个处理共 14 个培养皿, 培养 12 周后统计孢子数量。

1.4 利用 GA 验证 ABA 对 AM 真菌侵染和产孢的影响

毛状根与菌株 DAOM 197198 共生后, 采用两因子完全随机设计, 即番茄基因型(野生型 MM 和 GA 缺陷突变体 *gib3*) 和 GA 处理(+GA 和-GA) 处理, GA 施用浓度为 10^{-5} mol/L。使用的培养皿、孢子接种方法、根系放置方式及培养条件与 1.2 节相同, 培养 8 周后取样。

取样时, 将培养基连同根系一并转移到 500 mL 的锥形瓶中, 加入 200 mL 浓度为 10 mmol/L、pH 6.0 的柠檬酸钠溶液, 然后置于摇床上以 200 r/min 的转速振荡 30 min, 将根系上的 MSR 培养基溶解根。用清水清洗根系, 用吸水纸擦干后测定鲜重, 将老根去除, 细根剪成约 1 cm 的根段混匀。部分根系保存在 4 °C 冰箱用于根系侵染率的测定; 部分根系分成 0.2 g/份, 保存于-80 °C 冰箱中, 用于提取 RNA 测定相关基因的表达。

1.5 菌根侵染率的测定

根据 Phillips 和 Haymann 的方法^[15], 用台盼蓝对根段染色, 测定根系侵染率。根据 Trouvelot

等^[16]的方法使用软件 MYCOCALC (<http://www.dijon.inra.fr/mychintec/Mycocal-prg/Download.html>) 对结果进行计算, 用 3 个参数描述菌根侵染状况: F% (根系中的菌根侵染频率)、M% (根系中的菌根侵染强度) 和 a% (侵染根系中的丛枝丰度)。通常, F% 和 M% 反映了总侵染, 而 a% 反映了丛枝的侵染(即丛枝丰度)。

1.6 丛枝数量和孢子数量的测定

随机挑取 20 条约 1 cm 长的染色根段, 在显微镜下观察根系侵染, 统计每条根段上的丛枝数量。在培养皿底部画 1 cm×1 cm 的方形网格, 在体式显微镜下观察并统计每个网格中孢子的数量, 将所有网格中孢子数相加即为该样品的孢子数量。

1.7 相关基因表达的定量

用 plant RNA kit R6827 (Omega 公司, 广州) 和 TransScript One-Step gDNA Removal Kit and cDNA Synthesis SuperMix (北京 TransGen 生物技术有限公司) 提取 RNA 并反转录; 使用罗氏公司

的 LightCycler 480 II 荧光定量 PCR 仪进行 RT-PCR。10 μL 反应体系为: 5 μL iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (2×), 正反向引物各 0.5 μL (10 μmol/L), cDNA 模板 1 μL 和无菌去离子水 (RNase-free & DNase-free) 3 μL。反应条件为: 94 °C 30 s; 94 °C 5 s, 60 °C 30 s, 39–42 个循环; 溶解曲线分析从 65 °C 加热至 95 °C (每 6 s 间隔上升 0.5 °C)。每个样品 2 个平行。根据公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 以肌动蛋白为内标来计算^[17–18]。

进行定量的相关基因和相关引物的序列见表 1。所有引物序列均通过生工生物工程(上海)股份有限公司广州合成部合成, 使用时按照说明书稀释到所需浓度后使用。

1.8 数据分析

所有结果为 4 次或 5 次重复的平均值。使用 IBM SPSS Statistics Version 21.0 软件(SPSS Inc., Chicago, IL) 对数据进行使用多重比较(Tukey HSD)、两因子方差分析(ANOVA), 使用 Origin 8.5 制图。

表 1 本文用到的基因引物序列
Table 1. Primers used in this study

Gene	Primer sequence (5'→3')	Reference
<i>EXO70A1-like</i> (LOC101253481)	F: CCTCAGAGATTTTGTGGTG R: AAGGCCAAGCTCAAAGAAGAC	[19]
<i>EXO70B1</i> (LOC101260888)	F: CTCCAAAATCAGGAGGTGGAT R: CAGCAAAGCAAACCTGAACCAAC	
<i>EXO70A1-like</i> (LOC101261477)	F: GTCTTTTGTAGTGCCTTCCAAC R: AGGGATAAGAGCTGGTGGTGTAT	[4]
<i>RAM2</i>	F: GATGGAACATTACTTCGAGGAC R: CTCCGAGACGAAGTAGTAAAGAAG	
<i>STR2</i>	F: GGACATAGGGAAGCCGATAA R: AGCCCAACCATGACACTTT	
<i>Actin</i>	F: TTCCGTTGCCAGAGGTCCT R: GGGAGCCAAGGCAGTGATTTC	

2 结果和分析

2.1 脱落酸对 AM 真菌侵染的影响

根系侵染观察表明, 与野生型 MT 相比, *not* 突变体的菌根侵染和丛枝丰度都较低。此外, 外源添加 ABA 提高了菌根侵染, 在 *not* 突变体中尤

为明显(图 1)。

对侵染数据的分析表明, 外源添加 ABA 处理的所有侵染指标均大于不添加处理, 且外源添加 ABA 处理显著促进了 F% ($P=0.000$) 和 M% ($P=0.000$), 而 *not* 突变体中 F% ($P=0.016$) 和 a% ($P=0.016$) 显著低于野生型(图 2, 表 2)。根据丛枝

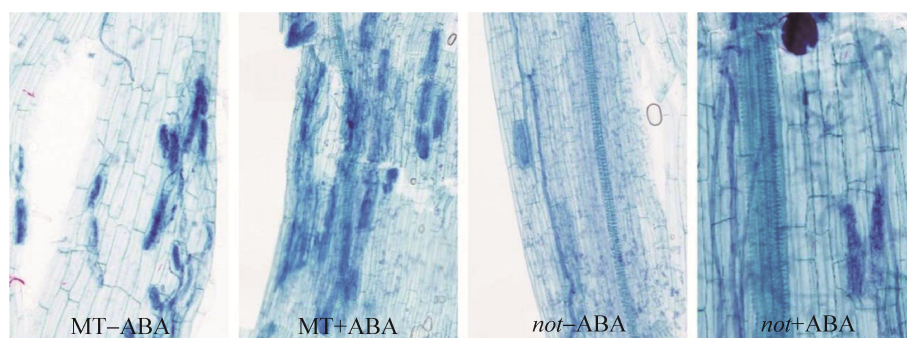


图 1. 不同 ABA 处理根系台盼蓝染色图片

Figure 1. Trypan blue staining images of roots treated with ABA or *not*.

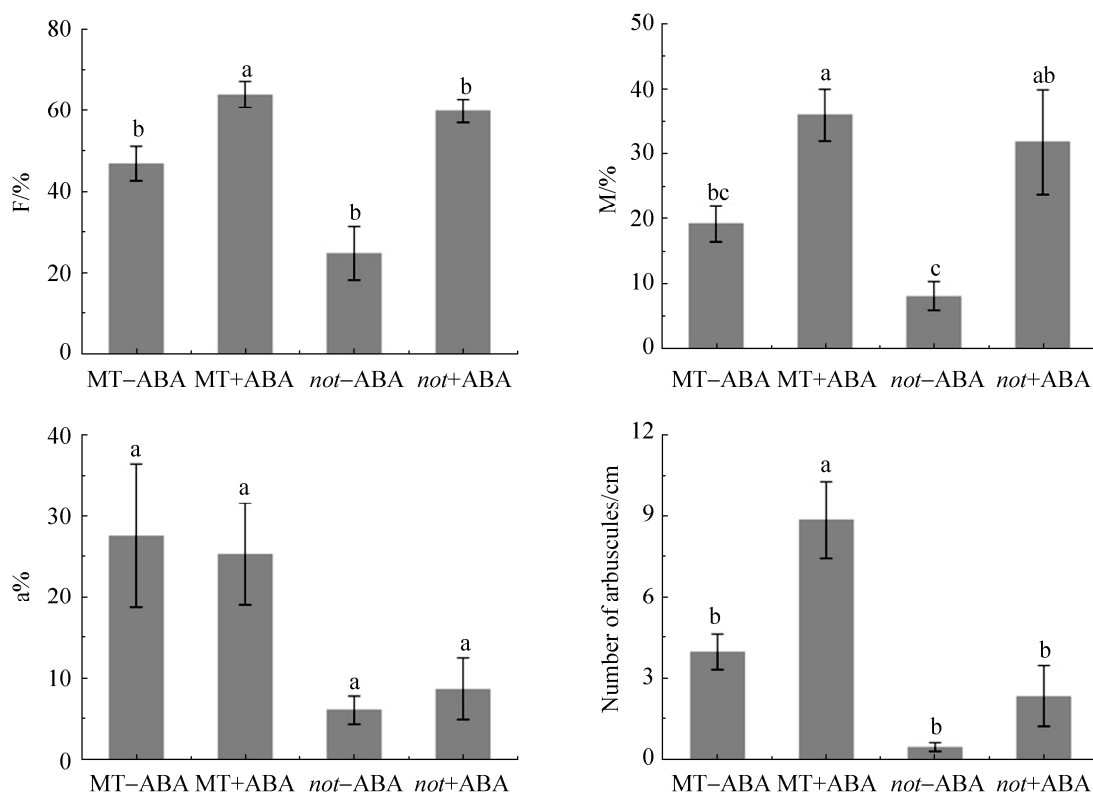


图 2. ABA 对 AM 真菌侵染的影响

Figure 2. Effect of ABA on mycorrhizal colonization and the amount of arbuscules. F: mycorrhizal frequency in root system; M: mycorrhizal intensity in root system; a%: arbuscule abundance in colonized roots. Different lowercase letters indicate significant difference at $P \leq 0.05$.

表2. ABA对AM真菌侵染的影响的双因子方差分析(P值)
Table 2. Two-way ANOVA of ABA effect on mycorrhizal colonization (P value)

Treatment	F%	M%	a%	Number of arbuscules
ABA	0.000	0.000	0.981	0.003
Genotype	0.016	0.080	0.016	0.000
ABA×Genotype	0.083	0.402	0.735	0.122

数量的统计结果,添加外源 ABA 的野生型处理为 8.9 个/cm,显著高于不添加 ABA 的野生型处理(4.0 个/cm),不添加 ABA 的 *not* 突变体处理为 0.5 个/cm,添加 ABA 导致丛枝数量增加至 2.4 个/cm,可见外源 ABA ($P=0.003$)和基因型($P=0.000$)对丛枝数量都产生了显著的影响(图 2, 表 2)。以上结果表明外源 ABA 能够促进 AM 真菌对根系的侵染,尤其促进丛枝的数量。

EXO70 基因编码植物中囊泡的一个亚基,丛枝形成与 *EXO70* 的表达密切相关^[19]。通过对 *EXO70* 基因表达的分析可以看出, *EXO70A1-like* (LOC101261477)和 *EXO70B1* (LOC101260888)在两个基因型之间没有显著差异,但是 *EXO70A1-*

like (LOC101253481)基因在 *not* 中的表达受到显著抑制(表 3),表明 *EXO70A1-like* (LOC101253481)可能是番茄根系中参与 AM 真菌诱导丛枝周膜(periarbuscular membrane, PAM)形成的主要基因,从基因表达水平上验证了 ABA 缺乏能够抑制丛枝形成。

2.2 ABA 对脂质合成运输相关基因 *RAM2* 和 *STR2* 表达的影响

RAM2 和 *STR2* 是脂质合成转运的关键基因,参与 AM 真菌与植物共生中脂质的合成运输^[5]。AM 真菌共生过程中需要宿主植物提供脂质来保证自身的生长发育,此外,孢子的主要成分是脂质,孢子的形成需要大量脂质的积累。因此, *RAM2* 和 *STR2* 对于孢子的形成也是非常关键的基因。从结果中可以看出,外源添加 ABA 显著促进了 *RAM2* ($P=0.006$)和 *STR2* ($P=0.014$)基因的表达,而 *not* 突变体则显著抑制了 *RAM2* ($P=0.007$)和 *STR2* ($P=0.009$)基因的表达(表 4)。在野生型中,外源添加 ABA 导致 *RAM2* 和 *STR2* 的表达

表3. ABA对*EXO70s*基因相对表达量的影响

Table 3. Effects of ABA on the relative expression levels of *EXO70s*

Genotype	<i>EXO70A1-like</i> (LOC101253481)	<i>EXO70A1-like</i> (LOC101261477)	<i>EXO70B1</i> (LOC101260888)
<i>not</i>	0.20±0.03	1.10±0.07	0.89±0.15
MT	1.60±0.24**	1.01±0.11	0.94±0.11

All the data are presented as the means±SE ($n=4$). **: significant difference at $P\leq 0.005$ between *not* and MT.

表4. ABA对*STR2*和*RAM2*基因相对表达量的影响

Table 4. Effect of ABA on the relative expression levels of *STR2* and *RAM2*

Genotype	ABA treatment	<i>RAM2</i>	<i>STR2</i>
MT	-ABA	1.00±0.00 b	1.00±0.00 b
	+ABA	2.48±0.56 a	14.70±4.83 a
<i>not</i>	-ABA	0.38±0.13 b	0.20±0.06 b
	+ABA	1.01±0.26 b	0.39±0.13 b
Two-way ANOVA (P value)			
ABA		0.006	0.014
Genotype		0.007	0.009
ABA×Genotype		0.021	0.016

All the data are presented as the means±SE ($n=4$). Different lowercase letters indicate significant difference at $P\leq 0.05$ in each column.

分别提高 2.48 和 14.70 倍; 在 *not* 突变体中, 外源添加 ABA 导致 *RAM2* 和 *STR2* 的表达分别提高 2.66 和 1.95 倍(表 4)。显然, 外源 ABA 能够促进番茄根系中菌根特异性的脂类的合成和向 AM 真菌的运输。

2.3 ABA 对 AM 真菌产孢的影响

在野生型接种菌株 DAOM 197198 的共生体系中, 外源添加 ABA 显著促进了孢子的产生, 培养 12 周后添加处理的孢子数量约为不添加处理孢子数量的 4.5 倍, 达到 822.3 个/皿(表 5)。

2.4 利用 GA 对 ABA 菌根效应的验证

为了进一步明确外源 ABA 对 AM 真菌侵染和

产孢的影响, 我们使用 ABA 的拮抗性植物激素 GA 及其缺陷突变体 *gib3* 进行验证。从结果中可以看出, 外源添加 GA 降低了野生型和 *gib3* 突变体中的菌根侵染, F% ($P=0.006$)、M% ($P=0.006$) 和 a% ($P=0.006$) 均显著降低(图 3, 表 6)。通过对孢子数量的统计发现, 外源添加 GA 显著抑制了孢子数量($P=0.000$), 而 *gib3* 突变体显著增加了孢

表 5. ABA 对孢子数量的影响

Table 5. Effect of ABA on the number of spores

ABA treatment	The number of spores (/plate)
+ABA	822.3±441.1*
-ABA	183.8±91.9

All the data are presented as the means±SE ($n=4$). *: significant difference at $P\leq 0.05$ between +ABA and -ABA.

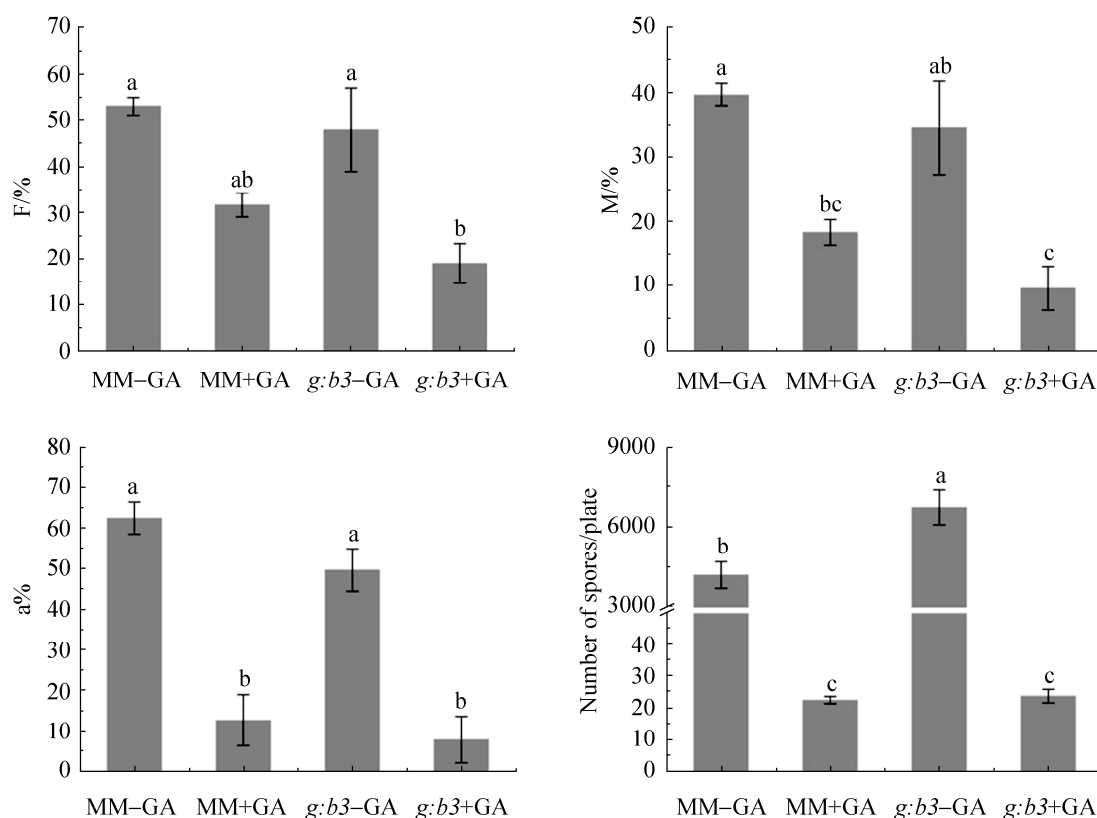


图 3. GA 对 AM 真菌侵染和产孢的影响

Figure 3. Effect of GA on mycorrhizal colonization and sporulation. F: mycorrhizal frequency in root system; M: mycorrhizal intensity in root system; a%: arbuscule abundance in colonized roots. Different lowercase letters indicate significant difference at $P \leq 0.05$.

表 6. GA 对 AM 真菌侵染的影响的双因子方差分析 (P 值)

Table 6. Two-way ANOVA of GA effect on mycorrhizal colonization (P value)

Treatment	F%	M%	a%	Number of spores
GA	0.000	0.000	0.000	0.003
Genotype	0.112	0.121	0.122	0.006
GA×Genotype	0.474	0.675	0.467	0.006

子数量($P=0.006$);在不添加外源 GA 的 *gib3* 突变体共生体系中,孢子数量平均高达 6769 个/皿(图 3,表 6)。显然,作为 ABA 的拮抗性植物激素,外源 GA 的作用与外源 ABA 相反,能够抑制菌根侵染和孢子的形成。

3 讨论

在本研究中,外源 ABA 处理促进了 AM 真菌侵染,显著增加了丛枝数量;GA 与 ABA 在植物体内具有拮抗作用,通过使用外源 GA 处理或 GA 缺陷突变体分别抑制或促进了 AM 真菌的侵染、丛枝丰度。这些结果表明外源 ABA 能够促进 AM 真菌侵染和丛枝的形成。Herrera-Medina 等在土壤中每 2 周喷施 20 mL 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 ABA 溶液能够促进番茄菌根中 AM 真菌的侵染长度和丛枝丰度,且明确指出 ABA 决定了 AM 真菌的丛枝的形成和功能^[9];ABA 缺陷突变体中菌根侵染和丛枝形成受到了严重的抑制^[20-21],而添加 ABA 能够部分恢复突变体中的菌根侵染和丛枝的发育和功能,使用钨酸钠(ABA 合成抑制剂)会显著抑制 AM 的侵染丛枝的形成。这些研究表明外源 ABA 对 AM 真菌侵染和丛枝发育有促进作用,而 ABA 缺陷和外源施用 ABA 合成抑制剂能抑制 AM 真菌侵染和丛枝形成,与我们的结论一致。

本研究中外源添加 ABA 显著提高了不同处理菌根中 *RAM2*、*STR2* 的表达量。*RAM2* 编码 3-磷酸甘油酰基转移酶,并参与内质网中的脂质合成^[22]; *STR2* 合成编码位于 PAM 中的 ATP 结合转运蛋白,其对于丛枝形成是必不可少的^[5]。*RAM2* 和 *STR2* 是丛枝形成过程中脂质合成和运输的关键基因,因此,我们的结果表明外源 ABA 促进了菌根中脂质的合成和运输。

本研究结果表明 ABA 促进孢子的形成。Liu 等发现外源 ABA 能够在非共生和共生前状态下直接促进 AM 真菌的孢子形成^[10],关于 ABA 对共生状态下孢子形成的影响未见报道,而本研究首次证实了 ABA 对共生状态下 AM 真菌产孢的促进作用。AM 真菌与宿主植物共生过程中,在根系表面形成菌足,向根内生长形成根内菌丝和丛枝,然后形成外生菌丝和孢子。在这个过程中,丛枝具有核心作用。但是,丛枝寿命短,仅为 7.5–8.5 d^[23],由于丛枝由大量的膜结构组成,含有丰富的磷脂,因此丛枝的衰老与降解可能对包括产孢在内的 AM 生物学过程产生重要影响。研究指出,AM 真菌的丛枝丰度与中性脂积累密切相关^[4,24];衰老的丛枝中含有大量的中性脂^[8];Feng 等^[4]观察到丛枝的降解和中性脂的积累是同步的。Kobae 等^[8]通过实时成像技术进一步观察到中性脂随后从根内菌丝转运至根外菌丝,而 AM 真菌孢子主要成分是中性脂(三酰基甘油)。这些结果表明在 AM 共生过程中,丛枝在衰老崩溃后其中的磷脂可能被水解转化为中性脂,并转移到 AM 真菌孢子中储存。我们推测,外源 ABA 促进宿主根系中 AM 真菌特异性脂类的合成和向 AM 真菌的运输,从而提高丛枝丰度和丛枝数量,大量的丛枝中含有丰富的脂类,是孢子形成的物质基础,在丛枝衰老崩溃

后形成中性脂, 从根内菌丝转移至根外菌丝, 最终形成大量的孢子^[25]。

ABA 是植物受到环境胁迫后应激反应所产生的激素^[26]。植物面对胁迫时产生内源性 ABA, 并可能传递给 AM 真菌, 诱导 AM 真菌的生殖生长, 从而促进产孢。在本试验中, 我们没有对共生体系施加环境胁迫, 因此 AM 真菌和根系的生长发育均未受影响, 但是外源 ABA 可能作为胁迫信号分子能够激发 AM 真菌作出胁迫响应, 增加菌丝的分枝, 增强与宿主植物的共生与吸收养分的功能, 促进丛枝的形成与产孢。

本研究结果表明, ABA 能够促进 AM 真菌侵染和丛枝数量, 进而促进孢子的形成。根据本研究结果, 选择 AM 真菌侵染率和丛枝丰度高的宿主植物进行菌剂扩繁, 有可能提高孢子数量和菌剂质量。此外, 使用外源 ABA 和赤霉素缺陷突变体进行菌剂扩繁, 能够显著增加 AM 菌根真菌的产孢量, 具有广泛的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano JM. How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses? *New Phytologist*, 2007, 173(4): 808–816.
- [2] Seguel A, Cumming JR, Klugh-Stewart K, Cornejo P, Borie F. The role of arbuscular mycorrhizas in decreasing aluminium phytotoxicity in acidic soils: a review. *Mycorrhiza*, 2013, 23(3): 167–183.
- [3] Miransari M, Abbasipour H, Karimi J, Zadeh MRA, Saeidi A. Arbuscular mycorrhizal fungi and alleviation of soil stresses. *Plant Biology*, 2010, 12 (4): 563–569.
- [4] Feng Z, Liu X, Feng G, Zhu H, Yao Q. Linking lipid transfer with reduced arbuscule formation in tomato roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungus under low pH stress. *Environmental Microbiology*, 2020, 22(3): 1036–1051.
- [5] Jiang Y, Wang W, Xie Q, Liu N, Liu L, Wang D, Zhang X, Yang C, Chen X, Tang D, Wang E. Plants transfer lipids to sustain colonization by mutualistic mycorrhizal and parasitic fungi. *Science*, 2017, 356(6343): 1172–1175.
- [6] Luginbuehl LH, Oldroyd GED. Understanding the arbuscule at the heart of endomycorrhizal symbioses in plants. *Current Biology*, 2017, 27(17): R952–R963.
- [7] Javot H, Penmetsa RV, Terzaghi N, Cook DR, Harrison MJ. A Medicago truncatula phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(5): 1720–1725.
- [8] Kobae Y, Gutjahr C, Paszkowski U, Kojima T, Fujiwara T, Hata S. Lipid droplets of arbuscular mycorrhizal fungi emerge in concert with arbuscule collapse. *Plant and Cell Physiology*, 2014, 55(11): 1945–1953.
- [9] Herrera-Medina MJ, Steinkellner S, Vierheilig H, Ocampo Bote JA, García Garrido JM. Absciscic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist*, 2007, 175(3): 554–564.
- [10] Liu X, Feng Z, Zhu H, Yao Q. Exogenous abscisic acid and root volatiles increase sporulation of *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198 in asymbiotic and pre-symbiotic status. *Mycorrhiza*, 2019, 29(6): 581–589.
- [11] Murcia G, Pontin M, Piccoli P. Role of ABA and Gibberellin A₃ on gene expression pattern of sugar transporters and invertases in *Vitis vinifera* cv. Malbec during berry ripening. *Plant Growth Regulation*, 2018, 84(2): 275–283.
- [12] Martín-Rodríguez JÁ, Ocampo JA, Molinero-Rosales N, Tarkowská D, Ruíz-Rivero O, García-Garrido JM. Role of gibberellins during arbuscular mycorrhizal formation in tomato: new insights revealed by endogenous quantification and genetic analysis of their metabolism in mycorrhizal roots. *Physiologia Plantarum*, 2015, 154(1): 66–81.
- [13] López-Ráez JA, Kohlen W, Charnikhova T, Mulder P, Undas AK, Sergeant MJ, Verstappen F, Bugg TDH, Thompson AJ, Ruyter-Spira C, Bouwmeester H. Does abscisic acid affect strigolactone biosynthesis? *New Phytologist*, 2010, 187(2): 343–354.
- [14] Declerck S, Dupré de Boulois H, Bivort C, Delvaux B.

- Extraradical mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus lamellosum* can take up, accumulate and translocate radiocaesium under root-organ culture conditions. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(6): 510–516.
- [15] Phillips JM, Hayman DS. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 1970, 55(1): 158–161.
- [16] Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. //Mycorrhizae: Physiology and Genetics, INRA: Paris, France, 1986: 217–221.
- [17] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [18] Chen A, Hu J, Sun S, Xu G. Conservation and divergence of both phosphate- and mycorrhiza-regulated physiological responses and expression patterns of phosphate transporters in solanaceous species. *New Phytologist*, 2007, 173(4): 817–831.
- [19] Liu X, Feng Z, Zhao Z, Zhu H, Yao Q. Acidic soil inhibits the functionality of arbuscular mycorrhizal fungi by reducing arbuscule formation in tomato roots. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2020, 66(2): 275–284.
- [20] Aroca R, Alguacil MD, Vernieri P, Ruiz-Lozano JM. Plant responses to drought stress and exogenous ABA application are modulated differently by mycorrhization in tomato and an ABA-deficient mutant (*sitiens*). *Microbial Ecology*, 2008, 56(4): 704–719.
- [21] Martín Rodríguez JÁ, León Morcillo R, Vierheilig H, Antonio Ocampo J, Ludwig-Müller J, García Garrido JM. Mycorrhization of the *notabilis* and *sitiens* tomato mutants in relation to abscisic acid and ethylene contents. *Journal of Plant Physiology*, 2010, 167(8): 606–613.
- [22] Wang E, Schornack S, Marsh JF, Gobbato E, Schwessinger B, Eastmond P, Schultze M, Kamoun S, Oldroyd GED. A common signaling process that promotes mycorrhizal and oomycete colonization of plants. *Current Biology*, 2012, 22(23): 2242–2246.
- [23] Kobae Y, Hata S. Dynamics of periarbuscular membranes visualized with a fluorescent phosphate transporter in arbuscular mycorrhizal roots of rice. *Plant and Cell Physiology*, 2010, 51(3): 341–353.
- [24] van Aarle IM, Olsson PA, Söderström B. Arbuscular mycorrhizal fungi respond to the substrate pH of their extraradical mycelium by altered growth and root colonization. *New Phytologist*, 2002, 155(1): 173–182.
- [25] Feng Z, Liu X, Zhu H, Yao Q. Responses of arbuscular mycorrhizal symbiosis to abiotic stress: a lipid-centric perspective. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 578919.
- [26] Ren CG, Kong CC, Xie ZH. Role of abscisic acid in strigolactone-induced salt stress tolerance in arbuscular mycorrhizal *Sesbania cannabina* seedlings. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1): 74.

The regulatory effect of abscisic acid on colonization and sporulation of arbuscular mycorrhizal fungus

Xiaodi Liu^{1,2}, Zengwei Feng², Honghui Zhu¹, Qing Yao^{2*}

¹ Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, Guangdong Province, China

² Guangdong Key Laboratory of Microbial Signaling and Disease Control Laboratory, College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong Province, China

Abstract: [Objective] To reveal the effects of abscisic acid (ABA) on the colonization and sporulation of arbuscular mycorrhiza (AM) fungi, and to establish a highly efficient propagation methods by promoting spore production with exogenous ABA. [Methods] We established the dual culture system with tomato hairy roots and AM fungus *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198, and the exogenous ABA and gibberellin (GA) were applied, or the deficient mutants of ABA and GA were employed. The mycorrhizal colonization was observed after staining, the expression of genes involved in the development of arbuscules and the synthesis and transfer of lipids were measured with qPCR, and the numbers of arbuscules and spores were counted, in order to reveal the effects of ABA on the colonization and sporulation of AM fungus. [Results] In the ABA-deficient mutant *not*, F% (mycorrhizal frequency), a% (arbuscular abundance), number of arbuscules, and the expression of arbuscule development-specific gene *EXO70A1-like* (LOC101253481) and the lipid synthesis and transfer related genes *RAM2* and *STR2* were significantly lower than those in the wild-type MT. Exogenous application of ABA significantly promoted F%, M% (mycorrhizal intensity), number of arbuscules, spore production, and the expression of *RAM2* and *STR2*. The spore production applied with exogenous ABA was approximately 4.5 times of that without application. Exogenous GA significantly inhibited all parameters of mycorrhizal colonization and spore production. The spore production of GA-deficient mutant *gib3* was significantly higher than that of the wild-type MM, although there was no significant difference in mycorrhizal colonization between *gib3* and MM. [Conclusion] By promoting the lipid synthesis and transfer, ABA increases the colonization and arbuscular formation of AM fungi, and further enhances AM fungal sporulation.

Keywords: abscisic acid, arbuscular mycorrhizal fungi, arbuscular formation, spore production, gibberellin

(本文责编: 李磊)

Supported by the Guangdong Technological Innovation Strategy of Special Funds (Key Areas of Research and Development Program) (2018B020205001), by the National Natural Science Foundation of China (42077040) and by the Guangdong Academy of Sciences "1000 Post-doctorate" Special Fund (2021GDASYL-20210103023)

*Corresponding author. Tel: +86-20-85286902; Fax: +86-20-85280228; E-mail: yaoqscau@scau.edu.cn

Received: 20 October 2020; Revised: 12 December 2020; Published online: 9 March 2021

姚青, 男, 农学博士, 华南农业大学园艺学院教授。常年从事土壤微生物与园艺植物的互作研究, 重点研究丛枝菌根真菌与园艺植物之间的共生关系、园艺土壤中的微生物资源及其利用等。近年来主要关注丛枝菌根脂质生物学, 调查了脂质代谢在丛枝菌根真菌生长发育、共生关系建立和非共生产孢等过程中的作用, 探讨了脂质代谢在环境胁迫影响共生体中的调控模式。

