

# 菌根共生体形成过程中的信号识别与转导机制\*

袁志林 陈连庆\*\*

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 富阳 311400)

**摘要:** 在菌根共生体建立过程中存在信号分子的多重性和信号通路的多样性以及共生体特异基因的表达调控, 从分子水平上揭示了菌根整个发育过程。

**关键词:** 菌根, 共生体, 信号传导

**中图分类号:** Q939.96 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 01-0161-04

## The Mechanism of Signal Recognition and Transduction in the Establishment of Mycorrhizal Associations\*

YUAN Zhi-Lin CHEN Lian-Qing\*\*

(Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400)

**Abstract:** Multiplicity of signals and diversity of signaling pathways exist during the establishment of mycorrhizal associations together with the regulation of symbiosis-specific genes expression. This mechanism of signal recognition and transduction related with development process of the symbiont was reviewed at the molecular level.

**Key words:** Mycorrhiza, Symbiont, Signal transduction

菌根是植物根系与真菌形成的一种互惠共生体。100多年来,人们发现菌根在生理生态中发挥了突出作用,能改善植物营养并增强其在逆境条件下(如土传病害、水分胁迫、盐分胁迫和重金属毒害等)的适应性<sup>[1,2]</sup>。但对于菌根共生体的发生机理却研究较浅。随着分子生物学技术日益渗透生命科学各个研究领域,有必要从分子水平阐述其形成机制。

在菌根真菌与植物长期进化过程中,两者在生态、生理方面已经具有高度依赖性,是在双方的自我调控基础上完成的。在前共生阶段(presymbiotic phase)和共生阶段(symbiotic phase),为了保持物质能量传递和消息交流,根系和菌丝释放诸如“信息素”之类的信号分子,并各自形成一种识别机制(如细胞鉴定受体和信号配体)被对方识别,诱导特异性功能基因的表达,从而引起生理代谢、细胞结构的变化;植物细胞也进行所谓的“适应性程序”(accommodation program)

利于菌丝侵染,最后完成菌根的整体发育周期<sup>[3-7]</sup>。目前菌根信号传导研究以外生菌根(ECM)和丛枝菌根(AM)为主。

### 1 侵染前菌根真菌与根系在土壤中的信号交换识别及产生的植物防御反应

**1.1 植物根系分泌的“诱导菌丝分枝因子”** 早期的研究表明极大巨孢囊霉(*Gigaspora gigantea*)的气生菌丝具有对宿主植物根系定位的能力,表明在真菌和根系非直接物理接触前就开始了信号的交流。在没有宿主根系的条件下,真菌不能完成其生活史,虽然孢子能萌发但菌丝生长受到限制<sup>[8]</sup>。由于根系分泌物(root exudates)的成分很复杂且浓度较低,很难区别哪些化合物具有信号分子的特性,基于对其他植物-微生物相互作用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<sup>[9]</sup>。如植物根系分泌的一些黄酮类物质能在微摩尔浓度下

\* 国家自然科学基金项目资助 (No. 30170767)

\*\* 通讯作者 Tel: 0571-63310046, E-mail: Clq@fy.hz.zj.cn

收稿日期: 2006-03-29, 修回日期: 2006-07-06

刺激 AM 菌丝生长且能促进菌根的形成,起初人们认为该物质在菌根共生体形成中起重要作用,正如在豆科植物—根瘤菌共生体中的功能一样,但通过玉米查耳酮合成酶(合成黄酮类物质的关键酶)缺陷突变体的研究发现,也能被几种 AM 真菌侵染,而且 Ri-T-DNA 转化的胡萝卜根器官培养物被广泛应用于 AM 体外培养,也不产生类黄酮,提示黄酮类物质对于菌根形成并非必需<sup>[3]</sup>。

目前,对于菌丝或根系分泌物这类信号物质的分离、纯化、鉴定以及功能特性已成为菌根研究的热点之一。Akigama 等(2005)从日本百脉根(*Lotus japonicus*)的根系分泌物中分离到了一种倍半萜物质(sesquiterpenes),被发现是诱发菌丝分枝的物质,这一发现突出显示了植物和真菌的密切关系,也许为农业和自然生态系统中有益真菌共生体和破坏性杂草的控制提供一个新策略<sup>[10]</sup>。Nagahashi 等(2004)首次研究发现蓝光和一种根系分泌混合物(PCs, photo-mimetic compounds)对 *G. gigantea* 菌丝分枝具有协同功效,可能参与第二信使的作用<sup>[11]</sup>。此外,体外研究发现植物根系释放的挥发性分子如 CO<sub>2</sub> 也能刺激 AM 真菌的生长,和根系分泌物也具有协同作用<sup>[3]</sup>。

在外生菌根方面也有类似的研究。Lagrange 等(2001)报道尤加利树(*Eucalyptus globulus*)根系分泌了一种芸香苷,刺激彩色豆马勃(*Pisolithus tinctorius*)菌丝生长,首次被鉴定为是一种黄酮类信号从根系传向外生菌根真菌<sup>[12]</sup>。另外在桉树根系分泌物中也检测到了一种植物细胞分裂素—玉米素,能够调节马勃菌丝的分支生长状况。

**1.2 菌根真菌释放的信号分子** 菌丝也能分泌某些因子被根系识别。Kosuta 等(2003)利用物理屏障(如聚碳酸酯膜、玻璃纸或透析膜等)将 AM 真菌和紫花苜蓿(*Medicago truncatula*)隔开进行双重培养,证实 AMF 真菌孢子能分泌一种扩散因子(Myc 因子)被根系识别。这种 AM 因子能诱发 Nod 因子诱导的 *MiENOD11* 基因(early nodulation11, 早期结瘤基因)的表达, pMt ENOD11-GusA 报告基因检测到主要在皮层细胞表达。研究还发现 *M. truncatula* 的突变体 Nod<sup>-</sup>/Myc<sup>-</sup> 对该因子仍能识别,而对 Nod 因子无反应,说明两种因子存在不同的信号通路以及对 *MiENOD11* 的表达调控

方式也不同<sup>[13]</sup>。

在尤加利树和彩色豆马勃建立外生菌根时,菌丝分泌了一种下箴刺桐碱(hypaphorine),首次被确认是一种参与共生诱导分化的分子。同时,外生菌根真菌也能分泌激素如生长素作为一种根际信号对植物根系生长进行调节,刺激根系形成新的分生组织与次级根。但研究也发现下箴刺桐碱对生长素具有竞争对抗作用,能抑制天然植物生长素 IAA 的活力,但不影响人工合成的激素(如 2, 4-D 等),推测是生长素的结合蛋白或受体<sup>[14]</sup>。

**1.3 宿主植物产生的防御反应** 随着共生体信号交换识别,菌根真菌诱发了植物体的防御反应。在 AM 和 ECM 发育早期过程中,植物根系 POD 酶、几丁质酶含量增加。此外,一些类苯丙醇物质在根部积累。表明尽管菌根共生体是互惠互利的,但根系在识别真菌时同样产生防御反应。在病原菌与植物的相互作用中,病原菌细胞壁的某些组分称之为诱导子(elicitor),作为信号分子引发植物防御反应。同样,外生菌根真菌如大毒粘滑菇(*Hebeloma crustuliniforme*),丛枝菌根真菌如根内球囊霉(*Glomus intraradices*)均能释放诱导子(外源诱导子)<sup>[6]</sup>。同时,菌丝也能释放水解酶降解植物细胞壁组分,形成内源性诱导子(endogenous elicitor)。植物体对于这些诱导子能产生相似的反应,如三聚体 G 蛋白的激活、蛋白质磷酸化和去磷酸化、SA(水杨酸)的积累、Ca<sup>2+</sup>内流等。与病原菌不同的是,这种防御反应强度较弱,酶或代谢物的累积只是暂时的或定位在局部根系细胞,可能机制是:(1)菌根真菌诱导子较低的诱发能力;(2)植物或菌根共生体可能组成型表达水解酶(hydrolase)如几丁质酶来降解外源诱导子<sup>[15,16]</sup>。

## 2 侵染后以及共生体建立过程中的信号通路和共生体基因的表达

**2.1 植物体基因参与的信号转导途径** 在 AM 发育过程中,真菌菌丝生长需要穿过根表皮细胞、皮层细胞最终形成丛枝或泡囊等功能结构。目前的研究结果证实有 3 个植物信号元件参与其中,分别是受体样激酶(DMI2)、离子通道(DMI1)、依赖钙调蛋白的激酶(DMI3)<sup>[16]</sup>。

植物突变体的获得是研究菌根发育分子生物学的前提,目前大量的突变体都是从豆科植物中筛选得到,这种突变体不能形成根瘤和菌根,突变的基因统一称为“SYM”基因。如在 *M. truncatula* 中 AM 和结瘤的形成都需要一套共同的基因控制 (*DMI1*, *DMI2*, *DMI3*)<sup>[17,18]</sup>。

研究者发现 SYM 基因在 Nod 因子参与结瘤的信号转导过程中起到很重要的作用,然而有 2 个结瘤特异性的 Nod 因子受体激酶 (NFR1 和 NFR5) 存在于上述通用信号元件的上游。NFR1 或 NFR5 的突变只影响早期 Nod 因子的信号反应,对 AM 共生体没有影响,表明 AM 真菌信号分子与 Nod 因子的效应不在同一信号通路。直接或间接识别 AM 真菌信号分子的受体激酶是 SYMRK/NORK (即 *DMI2*),然后通过胞内激酶区域传递信号。紧接着通过磷酸化作用激活离子通道 *DMI1*, *DMI1* 编码一种新蛋白,与配体门控阳离子通道相似性较低,这种蛋白在被子植物和早期陆生植物中是高度保守的,是一种古老的植物特异性基因,对于  $\text{Ca}^{2+}$  尖峰 ( $\text{Ca}^{2+}$  spiking) 的形成是必需的。之后,对胞质  $\text{Ca}^{2+}$  浓度变化产生响应的是 *DMI3* 元件, Lévy 等 (2004) 在 *Science* 上提出 *DMI3* 基因与钙调蛋白激酶 (CCaMKs) 基因高度相似,在信号通路中能迅速下调  $\text{Ca}^{2+}$  尖峰,表明  $\text{Ca}^{2+}$  尖峰很可能是这个信号级联反应的必需组件<sup>[16,18-21]</sup>。

如前所述,AMF 真菌分泌的一种扩散因子在没有与植物根系物理接触之前就能诱导 *MiENOD11* 基因的表达,同时也发现在这种条件下 *MiENOD11* 基因在 *Myc*<sup>-</sup> (包括 *DMI1*、*DMI2*、*DMI3* 突变体) 中同样表达,这就说明扩散型真菌信号 (*Myc* 因子) 激发了一条信号转导途径而且是不依赖于 *DMI* 途径的另一个信号通路。然而,研究中意外地发现 *DMI2*、*DMI3* 的突变体与菌丝接触后在根细胞组织的任何部位都检测不到 *MiENOD11* 基因的表达,这就提示在 AM 真菌释放的信号分子诱导 *MiENOD11* 的表达存在两种不同的模式,一种是需要与植物根部细胞接触并且是依赖于 *DMI* 途径;另一种则是不需要直接接触的、非 *DMI* 途径的<sup>[13,22]</sup>。

此外,日本学者 Imaizumi-Anraku (2005) 在 *Nature* 上论述了植物细胞壁蛋白对于共生真菌和细菌进入植物根系的重要性,研究发现日本百脉根

中存在两种同源的质体蛋白基因: *CASTOR* 和 *POLLUX*,被认为是共生体形成所必需的共同的信号传导组件。分析认为这两种蛋白质能调节质体和胞液之间的离子流量,而这对于  $\text{Ca}^{2+}$  尖峰形成是必需的。这项成果表明:除了上述菌根和根瘤共生体信号通路元件,还存在其他与共生体相关的信号元件,至于 *DMI1*、*DMI2*、*DMI3* 和 *CASTOR*、*POLLUX* 的关系,是否是两条截然不同的信号通路以及所处的信号通路位置等问题有待于进一步探讨<sup>[23]</sup>。

## 2.2 菌根真菌在信号传导过程中的基因表达

Breuninger 等 (2004) 在体外建立了摩西球囊霉 (*Glomus mosseae*) 和荷兰芹 (*Petroselinum crispum*) 的共培养系统,研究在附着胞形成时真菌的基因表达差异,构建扣除抑制文库,其中 200 个克隆推测是 AM 共生体特异性的新基因,某些基因与其他微生物-植物相互作用中依赖  $\text{Ca}^{2+}$  信号传导的基因是共有的,表明  $\text{Ca}^{2+}$  在早期菌根形成中也起到重要作用<sup>[24]</sup>。

在外生菌根中也有报道。研究者从美洲椴树 (*Tilia americana*) 和块菌 (*Tuber borchii*) 建立的外生菌根共生体中研究了 MAPK 的信号通路。通过 cDNA 文库筛选,在 *T. borchii* 中分离到了一个 MAPK 基因 (*TBMK1*),长度 1713bp,包含一个 1056bp 的 ORF (开放阅读框),与非致病镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 的 *FMK1* 和大麦网斑菌 (*Pyrenophora teres*) 的 *PTK1* 是同源的,均参与对宿主植物的侵染<sup>[25]</sup>。Sundaram 等 (2001) 还在双色蜡蘑 (*Laccaria bicolor*) 中分离鉴定了与共生体相关的属于 RAS 基因家族的一个基因 *Lbras*, RAS 基因广泛存在于真核生物中,对细胞外的信号如激素、生长因子或诱导子的刺激均能作出反应并参与一系列信号传导。对于丝状真菌而言, *Ras* 蛋白也是一个多功能蛋白,调控其致病性、DNA 合成、细胞死亡衰老等生理过程。很明显,从真菌与宿主相互识别导致真菌细胞分化、增殖最后形成菌套 (mantle) 和哈帝氏网 (Hartig net) 等功能结构, RAS 基因起到了很重要的作用<sup>[26,27]</sup>。

## 3 总结

在植物根系与菌根真菌建立互惠共生体的早期,存在着信号物质种类的复杂性以及功能的多

重性。随后菌丝沿着表皮层、外皮层侵入直至在内皮层形成功能结构(AM),这个过程中均诱导了根部细胞和菌丝特异性基因的表达,其中植物体中的SYM、质体蛋白基因和真菌(ECM)中的MAPK、RAS等基因参与了多样化的信号转导途径(DMI途径、Myc因子激发的非DMI途径以及由植物质体蛋白基因参与的途径等), $Ca^{2+}$ 在这当中扮演重要角色,这些信号通路可能相互依赖但也具有一定独立性,形成复杂的信号网络,最终完成菌根的整体发育过程。

#### 4 展望

差异RNA显示技术、应用正向遗传学方法从植物突变体中克隆新的共生体相关基因是研究信号通路的有效方法<sup>[9, 28, 29]</sup>。但由于AM真菌菌丝的多核、不能纯培养等特性,而且模式植物拟南芥又是非菌根植物,给进一步深入研究带来很多困难和挑战<sup>[3]</sup>。可喜的是,目前通过国际合作已经开展紫花苜蓿、日本百脉根的基因组测序工作,进行EST序列和表达谱分析<sup>[3, 16, 18]</sup>。另一方面,随着RNA干扰和TILLING(定向诱导基因组局部突变)等反向遗传学技术的成熟,就能更好研究共生体特异基因的表达以及在信号通路中的功能<sup>[30]</sup>。最近还有学者已经尝试用转录子组学(transcriptomics)和蛋白质组学(proteomics)的方法研究植物—微生物互作中的信号转导<sup>[31]</sup>。同时,应着力研究根系分泌物和真菌信号分子的化学本质和功能特性,这种化学物质是自然存在的潜在生物调节因子,可能使其成为“绿色分子”,以利于更好优化和增强自然生态系统中菌根的功能<sup>[3]</sup>。

#### 参考文献

- [1] 唐明娟, 郭顺星. 微生物学通报, 2000, 27(6): 446~449.
- [2] 黄 艺, 姜学艳, 季海波, 等. 微生物学通报, 2004, 31(3): 45~49.
- [3] Bécarré G, Kosuta S, Tamasloukht M, et al. Canadian Journal of Botany, 2004, 82(8): 1186~1197.
- [4] Parniske M. Nature, 2005, 435: 750~751.
- [5] Martin F, Duplessis S, Dittengou F, et al. New Phytologist, 2001, 151: 145~154.
- [6] Podila G K, Douds D D Jr. Current Advances in Mycorrhizae. Research. APS press, 2000. 1~28.
- [7] Strack D, Fester T, Hause B, et al. Journal of Chemical Ecology, 2003, 29(9): 1955~1979.
- [8] Gadkar V, Schwartz R D, Kunik T, et al. Plant Physiology, 2001, 127: 1493~1499.
- [9] Marsh J F, Schultze M. New Phytologist, 2001, 150: 525~532.
- [10] Akiyama K, Matsuzaki K I, Hayashi H. Nature, 2005, 435: 824~827.
- [11] Nagahashi G, Douds D D Jr. Mycologia, 2004, 96(5): 948~954.
- [12] Lagrange H, Jay-Allegmand C, Lapeyrie F. New Phytologist, 2001, 149: 349~355.
- [13] Kosuta S, Chahaud M, Lounnon G, et al. Plant Physiology, 2003, 131: 952~962.
- [14] Dittengou F A, Lapeyrie F. MPMI, 2000, 13(2): 151~158.
- [15] Garcia-Garrido J M, Ocampo J A. Journal of Experimental Botany, 2002, 53: 1377~1386.
- [16] Parniske M. Current Opinion in Plant Biology, 2004, 7: 414~421.
- [17] Harrison M J. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1999, 50: 361~389.
- [18] Hause B, Fester T. Planta, 2005, 221: 184~196.
- [19] Jean-Michel A, Goryunov B K, Riely B K, et al. Science, 2004, 303: 1364~1366.
- [20] Lvy J, Bred C, Geurts R, et al. Science, 2004, 303: 1361~1364.
- [21] Stracke S, Kistner C, Yoshida S, et al. Nature, 2002, 417: 959~962.
- [22] Weidmann S, Sanchez L, Descombin J, et al. MPMI, 2004, 17(12): 1385~1393.
- [23] Imaizumi-Anraku H, Takeda N, Charpentier M, et al. Nature, 2005, 433: 527~531.
- [24] Breuninger M, Requena N. Fungal Genetics and Biology, 2004, 41: 794~804.
- [25] Menotta M, Pierleoni R, Polidori E, et al. 7th European Conference on Fungal Genetics Copenhagen, 2004.
- [26] Lammers P J. New Phytologist, 2004, 161: 321~324.
- [27] Sundaram S, Kim S J, Suzuki H, et al. MPMI, 2001, 14(5): 618~628.
- [28] Harrier L A. Journal of Experimental Botany, 2001, 52: 469~478.
- [29] Lapopin I, Pearson V G, Franken P. Plant Molecular Biology, 1999, 41: 669~677.
- [30] Perry J A, Wang T L, Welham T J, et al. Plant Physiology, 2003, 131: 866~871.
- [31] Bestel-Corre G, Dumas-Gaudot E, Gianinazzi S. Mycorrhiza, 2004, 14: 1~10.