

目前 AM 真菌培养特性方面研究的基本概况*

张 英 刘润进

(莱阳农学院菌根生物技术实验室 莱阳 265200)

郭良栋

(中国科学院微生物研究所真菌地衣开放实验室 北京 100080)

摘要: 从盆钵培养、双相培养和纯培养 3 个层次讨论了当前探索丛枝菌根 (AM) 真菌培养特性的研究现状, 并探讨了当前培养 AM 真菌的动向与展望。

关键词: 丛枝菌根真菌, 培养基, 生长, 孢子

中图分类号: S154.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 04-0086-05

菌根在生物界发生发展的历史是非常悠久的。大约在 4.1~3.6 亿年以前, AM 真菌可能就已和泥盆纪的古蕨类植物建立了共生体, 在南极三迭纪沉积物化石中, 于中生代 (2.15 亿年) 的早期 AM 真菌已十分普遍^[1]。这类真菌同植物一起共同进化发展, 一直保持着同植物根器官营共生的生活方式。在漫长的进化过程中, AM 真菌就形成了专性活体营养的生物学特性。故其培养特性与一般的腐生性真菌有很大差别, 其纯培养问题至今尚未得到彻底解决。本文主要讨论 AM 真菌培养特性方面的研究状况。

1 盆钵培养 (pot culture) 特点

1.1 寄主植物对 AM 真菌生长发育的影响 AM 真菌必须和寄主植物生活在一起才能正常生长发育, 虽然它们对寄主植物没有严格的专一性, 但存在一定的相互选择关系; 而且不同寄主植物菌根的发育程度不同。例如 5 种植物对 *Glomus mosseae* 产孢的影响研究, 大麦根围内孢子数量最多, 其次是鹰嘴豆和菜豆, 玉米和 Okra 最低。三叶草上 AM 真菌的接种势数值大于苏丹草和烟草, 认为烟草是用于单孢接种和接种物生产的良好寄主植物^[13]。一些根量大、多年生、对 AM 真菌选择性弱的植物, 如红三叶草、新西兰白三叶草、苜蓿、烟草、苏丹草等是培养 AM 真菌的优良寄主。用烟草或红三叶草培养 *Glomus* spp. 的产孢量通常是玉米和草莓的 2~3 倍。最近研究表明, *Gigaspora* spp. 和 *Scutellospora* spp. 似乎对一些特殊的寄主植物亲和力更大一些, 产孢更多。

1.2 盆栽基质对 AM 真菌侵染和发育的影响 盆栽基质能抑制或促进 AM 真菌的侵染。土壤是比较常见的生长基质之一。一般说来, 肥力高的土壤中 AM 真菌孢子数量较少; 肥力低的尤其是速效氮和 (或) 磷含量低的土壤内孢子数量较多。这说明基质内养分种类和数量对 AM 真菌发育有重要影响。当土壤有效磷含量过低时会降低 AM 真菌侵染率, 适当施磷能显著提高侵染率, 然而过高则会抑制侵染。另外, 土壤磷素水平对 AM 真菌侵染的影响可能因植物、真菌和土壤种类而异。细的河砂、蛭石和草炭也是常见的盆栽基质, 往往会影响寄主植物和 AM 真菌的发育。例如: 直径 0.50mm~0.78 mm 砂粒基质中 *Glomus intraradices* 的孢子产量和侵染率高于其他粒径的处理^[3]。

* 国家重点基础研究发展规划资助项目 (No. G2000046802)

山东自然科学基金资助项目 (No. Y99D05)

收稿日期: 2001-01-02, 修回日期: 2001-05-10

1.3 培养的环境条件对 AM 真菌生长发育的影响 温度和光照是影响 AM 真菌生长发育重要的环境因子。球囊霉属的某些种对高温耐力较大,但高于 40℃ 时孢子就不能发芽,AM 真菌的侵染也就停止。当白天温度控制在 26℃,夜间在 21℃ 时,真菌发育滞缓期最短,侵染速度最快,产生孢子也最多;当昼夜温度控制在 16℃ ~ 11℃ 时,每株洋葱最终产孢总数将由 2,600 个下降到 50 个,菌根侵染率由 82% 减少到 11%。强光照下,增加光照,根分泌物中可溶性糖增多。用球囊霉属真菌孢子接种洋葱,AM 发育最好,丛枝数量也最多。关于光照强度和光周期对 AM 真菌发育的作用尚需进一步研究。

2 体外培养 (in vitro culture) 特性

2.1 固体培养基的双相培养 (1) AM 真菌与普通根的双向培养: AM 真菌无菌根段培养的研究经历了一个十分曲折的过程,最早的成功报道为英国人 Mosse 等提出以苜蓿离体根在改良的 White 培养基上,用发芽的 *Glomus* 孢子接种建立了 AM 真菌的侵染体系;但好多年无人做重复试验,直到 1984 年 Miller-Wideman 等用番茄根培养基上接种发芽的 *Gigaspora margarita* 孢子,建立了侵染体系并能形成丛枝、泡囊,但培养皿上仅产生 3 ~ 5 粒新的无性孢子,还不及原接种的 10 粒孢子,并无明显突破。Diop 等首次利用离体植物根在水琼脂培养基上进行 AM 真菌的长期培养,并使其完成生活史,说明 AM 真菌需要从植物中获取的营养物质是少量的。

近年来, Vierhelig 等研究发现不被 AM 真菌侵染的植物,其根系分泌物对 AM 真菌菌丝的伸长无作用,甚至抑制其菌丝的伸长^[11]。而大多数试验证实能被 AM 真菌侵染的植物,其根系分泌物能刺激菌丝伸长;还有试验表明侵染前菌丝的生长受二氧化碳和根系分泌物协同作用的影响。另外,在双相培养中发现根系分泌中的易挥发类物质能刺激 *Gi. gigantea* 的芽管向根的方向伸长;在石英砂、土壤中这种诱导效应表现也很明显。近年来,不少研究者开始用隔网分室的方法来研究根系分泌物对 AM 真菌的效应^[6]。Vierhelig 等用此方法研究发现土壤中大豆水溶性根系分泌物能强烈诱导 AM 真菌菌丝的生长^[12]。

用植物根的离体培养技术建立 AM 真菌侵染体系,为研究 AM 真菌的侵染过程及生理、生化特性提供了极大的方便。同时为纯培养研究提供了重要依据。

(2) AM 真菌与转型根的双相培养:随着分子生物学的迅猛发展,人们发现转型根能产生自身需要的生长素和细胞分裂素,开始有人想到用农杆菌 *Agrobacterium rhizogenes* 感染寄主根后产生转型根,此种根在离体条件下生长迅速、对养分需求较低,也许能加速生长缓慢的 AM 真菌的生长,以致改善双相培养的效果。于是同样地由 Mosse 领导的研究小组于 1987 年首先报道了 AM 真菌能侵染转型根,并观察到大量根外菌丝。1988 年,另外一个加拿大研究小组 Piche 等人开始利用胡萝卜转型根及 *Gi. margarita* 孢子做了许多基础性研究工作,而且产孢量也远超过 Miller-Wideman 等人的试验。吕斯文等利用胡萝卜 Ri T-DNA 转型根及番茄根双相培养 *Gi. gigantea* 及 *G. mosseae* 孢子,顺利完成了其生活史并且产生的孢子可以作为接种物重新侵染寄主植物^[7]。Plenchette 等将 *G. versiforme* 与离体 Ri T-DNA 转型胡萝卜根一起放置,经过 4 个月的培养,获得大量无菌 AM 真菌的繁殖体。用新生胡萝卜根接替 4 个月老根段后获得了 3 代连续孢子和菌根根段,但继代中孢子和菌根根段的侵染率明显下降,而菌根根段显示出比孢子强的侵染特性^[10]。十分有趣的是将 *Glomus etunicatum* 同 Ri T-DNA 转型胡萝卜根于离体条件下

一起培养时, 用 10mmol/L MES (pH6) 或 MOPSO (pH6.5) 缓冲液配制的改良 White 培养基有利于寄主根的生长、*G. etunicatum* 产孢及菌根的形成; 有菌根结构 (泡囊和丛枝) 的根段长度同孢子数量呈正相关关系。根被侵染后的两个星期内产生了新生孢子, 以后新生孢子不断产生直到根段衰老为止。在培养条件下, 新生的孢子 5~7d 后便呈成熟状态, 大约有 6% 的孢子在发育的不同时期发生退化现象^[9]。Karandashov 等还进一步研究了双相培养所产生孢子对胡萝卜根的侵染、菌根结构和生活史等状况^[7]。另外, *Gi margarita* 同 Ri T-DNA 转型胡萝卜根一起培养 18~20 个月后有 10%~15% 的孢子产生在根内, 而且这些孢子在形态和 DNA 多态性等方面与相同条件下根外产生的孢子相同, 这是 *Gigaspora* 属产生根内孢子的首次报道^[4]。

2.2 液体培养基的培养 早在 1959 年, Mosse 就曾用植物细胞悬浮液对 AM 真菌进行双相培养。后来 Carr 等利用苜蓿细胞悬浮液培养时发现, 溶液中存在强烈刺激菌丝生长的化合物, 而且这类物质有可能具有挥发性。Paula 等用另外几种植物细胞悬浮液培养 *Gi. margarita*, *Gi. gigantea* 和 *Scutellospora heterogama*。其中, 三裂叶葛 (*Pueraria phaseoloides*) 的细胞悬浮液对 AM 真菌生长的刺激作用最为明显。悬浮液中悬浮植物细胞浓度对菌丝生长的影响极为显著, 当细胞浓度为 25 个/mL 时菌丝生长最快。很多试验表明在液体培养基中孢子的发芽率会升高, 而受基质中悬浮细胞的影响很小, 因此悬浮的植物细胞只能促进菌丝的生长和分枝。此外, Mohammad 等人采用了最先进的超声雾化技术, 使寄主根的生长速度和菌根发育明显得到改善, 而且剪下的根段具有高的侵染力^[12]。到目前为止, 约有 5% 的 AM 真菌利用此种方法成功的进行了培养, 而且获得的菌类物质在实践中得到了初步应用, 但是由于技术水平要求较高, 耗资量大等特点, 仍然不能被广泛应用。

3 纯培养 (pure culture) 研究现状

3.1 AM 真菌纯培养的生物学基础 很久以来, 有关 AM 真菌在活体寄主不存在时为什么不能腐生生长一直不清楚, 即在寄主不存在的情况下, 它的生长期只有 20~30d, 此后菌根形态发生变化并且停止生长。曾有人设想, 孢子萌发后其顶端停止生长的原因是核 DNA 复制的终止。休眠的孢子贮藏了丰富的类脂、蛋白质和糖原。象在种子中一样, 这些分子水解产生高能化合物以维持新陈代谢活动和细胞分裂 DNA 的合成。电镜下能识别出许多参与有丝分裂的核。孢子萌发产生的芽管中有许多核, 其中有一些参与有丝分裂。图象分析发现 *Gi. margarita* 单孢子中的核数量在芽管形成过程中出现缓慢下降现象 (3~4d 内从 2000 下降到 800), 但 22d 时发现菌丝体中有 26000 个核, 这表明正在发芽的菌丝体中的核不仅来源于孢子, 还来源于核分裂。用静态的细胞记数法证实了在发芽的 *Gi. margarita* 菌丝体中确实有两种核家族的存在。

用某些生化抑制剂做试验, 以确定和推断在孢子发芽和菌丝生长中发生了那些代谢过程, 也是探索 AM 真菌纯培养的途径之一。研究表明放线酮阻碍了细胞质蛋白的合成, 放线菌素 D 抑制 mRNA 的产生, 二氨基甾醇半硫酸盐和氟尿嘧啶阻止了其他 RNA 的合成。溴乙啶被认为是阻止了线粒体 DNA 的形成。可见, 孢子发芽中蛋白质的合成是按孢子中储存的 mRNA 进行的, 而新合成的 RNA 对菌丝的生长是必须的。

近年来分子生物学的兴起, 启发人们从分子水平去认识、解释在纯培养中所存在的问题, Hua 提出, 应用化学诱变剂对 AM 真菌进行诱变, 以便获得能在培养基上生长

的突变体。另外, Burggraaf 和 Beringer 提出核分裂可能是限制 AM 真菌在纯培养中正常生长的关键因素之一。因为寄主-真菌之间的相互选择性要求并不严格, 因此寄主-真菌亲合性的基因在植物和真菌的基因类型上很可能是一致的, 这些基因控制植物-真菌间的识别、真菌侵染、植物反应、菌根的最终形态和进行养分交换等功能。但是, 控制这些不同的过程产生菌根功能的精确生理机制仍知之甚少。

3.2 AM 真菌纯培养的生理、生化和生态基础研究 (1) 培养基的主要成分对 AM 真菌纯培养的影响: 大量试验结果表明: 培养基中过量的可溶性盐的浓度常抑制孢子发芽, 而微量的含盐量常是孢子发芽和芽管伸长所必须的, 维生素和有机酸常能刺激孢子发芽, 一定量的蔗糖可促进孢子发芽而葡萄糖则有抑制作用, 土壤和植物根的抽提物常能促进孢子发芽和芽管伸长。在典型的常规培养基如 PDA、玉米粉培养基和麦芽汁培养基上却不能生长。数种有机酸能促进 *G. mosseae* 菌丝生长, 而麦芽糖、纤维素、蔗糖和葡萄糖对芽管的伸长却有抑制作用, 而普通存在于真菌中的海藻糖和甘露糖则对菌丝生长没有影响。然而低浓度的 D-半乳糖醛酸 (0.1%) 促进孢子萌发, 而 0.4% 的蔗糖和 1% 的土壤浸取液琼脂培养基促进了菌丝的生长。此外, 还发现非含氮化合物能促进菌丝生长, 而硝酸钠、酪蛋白和酵母抽提物都没有改变菌丝的生长速度。彭生斌观察到大豆愈伤组织和细胞的研磨过滤液和煮沸抽提液对 *G. mosseae* 和 *G. sinensis* 的孢子发芽和芽管伸长有明显的促进作用, 但对 *G. versiforme* 芽管伸长却无效果。

生长着的植物根围似乎存在着促进 AM 真菌生长的挥发性物质, 植物根的分泌物也促进真菌的生长, 当根和孢子在无菌的条件下被放在一起, 这种作用就可以被观察到。将蛋白胨、酵母提取液、硫胺素和利马豆洋菜加进基本培养基中可以真正地促进 *G. caledonium* 菌丝生长, 蛋白胨在 1~5 g/L 时对真菌生长的刺激作用最大, 并且证明是由于胱氨酸、甘氨酸和赖氨酸的作用, 且赖氨酸效果最明显。而 Becard 等则报道根的分泌物与类黄酮都可以刺激 AM 真菌的生长, 但是类黄酮并不是其生长所必须的物质^[3]。关于植物内源激素对纯培养中的产孢和菌丝生长的影响, 仅有微量的乙烯促进菌丝的生长, 而过量的乙烯对其有抑制作用。业已证实, AM 真菌侵染根系后, 植物内源激素 (CTK, IAA) 含量提高, 因此植物激素对 AM 真菌侵染与产孢的影响值得深入探索。

(2) 促生根围细菌对 AM 真菌生长发育的影响: 大量试验表明, 土壤中一些游离生活的细菌、AM 真菌孢子表面附着的微生物、有机质中的腐生真菌也能促进其孢子发芽和菌丝生长。植物促生根围细菌 (PGPR) 都能促进 AM 真菌孢子的萌发。一些根围细菌如芽孢杆菌或者它们的细胞培养过滤物能促进 *G. mosseae* 孢子萌发和菌丝生长; 然而也有与此相反的结果。此外, 还有人研究了 3 种放线菌, 分别表现出了不同的作用: 促进、抑制和影响不明显。这表明 PGPR 对 AM 真菌孢子萌发的影响存在着特定的选择关系。把没经过表面消毒的孢子, 放在自来水中, 贮于 0~4℃ 的冰箱中保存时, 孢子能稳定地发芽、长出菌丝并产生无性孢子。将 *G. mosseae* 孢子置于水琼脂培养基上, 在黑暗条件下培养 48h, 会使孢子发芽并形成单壁的球状物, 再培养 10~12d 就产生双层壁的黑色小球, 但这些球状物即使被移到新鲜培养基上也不会萌发, 但有重新侵染根系的能力。这就说明 AM 真菌在发芽及其后的生长过程中对养分的需求并不复杂, 仅在自来水中的养分就能在一定程度上满足它的需要。

(3) 环境因子对 AM 真菌影响: 离体条件下环境因子对 AM 真菌孢子发芽和芽管伸长影响已有许多报道。从土壤中分离得到 *Scutellospora gregaria* 孢子在培养 3~20d 期间,

第6d萌发最多,萌发率随温度的升高而增加,且升至30℃时萌发率最高,高于30℃则萌发率逐渐下降;但有时低温(0℃~4℃)有利于真菌孢子的发芽和产孢,同时在一定范围内,孢子的发芽率随孢子密度的增加而增加。孢子的储存条件也影响其发芽率。孢子在O₂分压过低的条件下不能发芽,O₂含量低,CO₂含量高时,菌丝生长受阻;而适当浓度的CO₂却能促进菌丝伸长。Tylka发现*G. mosseae*在水琼脂上培养,其发芽率并不受pH值的影响,但*S. heterogama*的孢子发芽率却与水琼脂中的pH值成反比。

4 问题与展望

综上所述,关于AM真菌的培养尤其纯培养问题现在仍处于非常有限的阶段,致使这类真菌的分类、遗传和应用等方面都有很大的局限性。双相培养虽以获得较大成功,但因技术水平要求较高、耗资量大,不适合于大量生产,纯盆培养仍然是现在繁殖菌种的主要方式。到目前为止,人们对AM真菌的生理、生化代谢方面的了解是十分有限的,致使人们无法从较深的层次去认识和解释研究中所遇到的问题。因此,只有在加大基础研究力度的基础上,同时加快该类真菌培养特性研究的步伐,才能更有效的推动菌根学的研究和应用。

参考文献

- [1] 刘润进,李晓林. 丛枝菌根及其应用. 北京: 科学出版社, 2000. 1~224.
- [2] 吕斯文, 连瑞娣, 张喜宁. 台大农学院研究报告, 1994, 34 (1): 21~32.
- [3] Becard G, Taylor L P, Douds D D Jr, et al. Mol Plant Microb Interactions, 1995, 8 (2): 252~258
- [4] Gadkar V, Adholeya A. Mycol Res, 2000, 104 (6): 716~721.
- [5] Gaur A, Adholeya A. Mycorrhiza, 2000, 10: 43~48.
- [6] Giovannetti M, Sbrana C, Citeresi A S, et al. New Phytol, 1996, 133: 65~71.
- [7] Karandashov V, Kuzovkina I, Hawkins H-J, et al. Mycorrhiza, 2000, 10: 23~28
- [8] Mohammad A, Khan A. G Mycorrhiza, 2000, 9: 337~339.
- [9] Pawlowska T E, Douds Jr D D, Charvat I. Mycol Res, 1999, 103 (12): 1549~1556.
- [10] Plenchette C, Declercq S, Diop T A, et al. Applied Microbiology and Biotechnology, 1996, 46: 545~548.
- [11] Vierheilig H, Reikhel N, Wiemken A, et al. Boller T Plant Soil, 1996, 183: 131~136.
- [12] Vierheilig H, Bago B, Albrvecht C, et al. In Flavoids in the Living System. New York, 1998.
- [13] Yin S X, Liu R J. Acta Botanica Sinica, 1997, 39 (8): 725~730. © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>