

研究报告

不同绿僵菌定殖水稻根系及其促生效应

王华峰, 魏阳, 纪丽莲, 扶教龙, 白净*

苏州科技大学 化学与生命科学学院, 江苏 苏州 215009

王华峰, 魏阳, 纪丽莲, 扶教龙, 白净. 不同绿僵菌定殖水稻根系及其促生效应[J]. 微生物学通报, 2024, 51(9): 3523-3534.

WANG Huafeng, WEI Yang, JI Lilian, FU Jiaolong, BAI Jing. Colonization and rice growth-promoting effects of different *Metarhizium* strains[J]. Microbiology China, 2024, 51(9): 3523-3534.

摘要:【背景】绿僵菌(*Metarhizium* spp.)是一种重要的昆虫病原真菌,近年来发现它也可以定殖于植物根系促进植物生长,但对水稻生长的影响及促生机制尚不明晰。此外,不同种绿僵菌的定殖及促生效应的差异也有待研究。【目的】明确罗伯茨绿僵菌(*Metarhizium robertsii*)和蝗绿僵菌(*Metarhizium acridum*)在水稻根内的定殖及对水稻生长影响的差异。【方法】通过选择培养、显微镜观察、分子生物学鉴定确定罗伯茨绿僵菌和蝗绿僵菌在水稻根系的定殖情况,同时比较在土培和水培条件下两株绿僵菌对水稻种子萌发、株高、根长、鲜重、干重、叶绿素含量和根系活力的影响。【结果】罗伯茨绿僵菌能够在水稻根内定殖并促进水稻种子萌发及生长。土培条件下,罗伯茨绿僵菌对水稻株高、根长、鲜重、干重、叶绿素含量和根系活力增效最高分别为45.2%、72.3%、30.5%、72.6%、92.3%和63.7%;水培条件下,对水稻株高、根长、鲜重、干重和叶绿素含量增效最高分别为59.3%、17.9%、90.9%、28.4%和64.8%。土培条件下,罗伯茨绿僵菌对水稻根长、干重和叶绿素含量增效高于水培条件,而株高和鲜重增效低于水培。【结论】罗伯茨绿僵菌能够定殖在水稻根内并促进水稻生长,而蝗绿僵菌对水稻生长无显著影响,这为绿僵菌水稻促生机制的研究提供了一定的理论依据。

关键词: 绿僵菌; 水稻; 定殖; 促生作用

资助项目: 江苏省自然科学基金(BK20210864); 苏州科技大学自然科学类校级科研基金(XKZ2020005)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20210864), and the Suzhou University of Science and Technology Natural Science University-level Scientific Research Foundation (XKZ2020005).

*Corresponding author. E-mail: baijing@mail.usts.edu.cn

Received: 2023-11-28; Accepted: 2024-02-05; Published online: 2024-03-15

Colonization and rice growth-promoting effects of different *Metarhizium* strains

WANG Huafeng, WEI Yang, JI Lilian, FU Jiaolong, BAI Jing*

School of Chemistry and Life Sciences, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou 215009, Jiangsu, China

Abstract: [Background] The recent studies have shown that *Metarhizium* spp., major entomopathogenic fungi, can colonize plant roots and promote plant growth. However, the effects and mechanisms of *Metarhizium* in promoting rice growth remain unclear. In addition, the colonization abilities and growth-promoting effects of different *Metarhizium* strains remain to be studied. [Objective] To clarify the colonization abilities and rice growth-promoting effects of *M. robertsii* and *M. acridum*. [Methods] The colonization abilities of *M. robertsii* and *M. acridum* were determined by selective culture, microscopic observation, and molecular methods. At the same time, the growth and physiological indexes of rice treated the two strains under soil cultivation and hydroponic cultivation conditions were compared, including the seed germination rate, plant height, taproot length, fresh weight, dry weight, chlorophyll content, and root vitality. [Results] Only *M. robertsii* colonized rice roots, accelerated the germination of rice seeds, and promoted the growth of rice. Under soil cultivation conditions, *M. robertsii* increased the height, taproot length, fresh weight, dry weight, chlorophyll content, and root vitality of rice plants by a maximum of 45.2%, 72.3%, 30.5%, 72.6%, 92.3% and 63.7%, respectively. Under hydroponic cultivation conditions, it increased the plant height, taproot length, fresh weight, dry weight, and chlorophyll content by a maximum of 59.3%, 17.9%, 90.9%, 28.4%, and 64.8%, respectively. *M. robertsii* exerted stronger promoting effects on the root length, dry weight and chlorophyll content of rice plants in soil cultivation than in hydroponic cultivation, while it demonstrated stronger promoting effects on the plant height and fresh weight of rice plants in hydroponic cultivation than in soil cultivation. [Conclusion] *M. robertsii* could colonize rice roots and promote the growth of rice, whereas *M. acridum* had no significant effect on the growth of rice. The findings provide a theoretical basis for deciphering the rice growth-promoting mechanism of *Metarhizium*.

Keywords: *Metarhizium* spp.; rice; colonization; growth-promoting effect

作为研究应用最多的虫生真菌之一,绿僵菌(*Metarhizium* spp.)凭借无毒、无害、无残留、环境友好、害虫不会产生抗药性等优点在农业领域创造了巨大价值。在进化过程中,绿僵菌属从昆虫寄主范围较窄的蝗绿僵菌(*Metarhizium acridum*, MAC)和白色绿僵菌(*M. album*, MAM)

逐渐进化为大孢绿僵菌(*M. majus*, MAJ)和贵州绿僵菌(*M. guizhouense*, MGU)等寄主范围宽泛的真菌,最后进一步进化为褐色绿僵菌(*M. brunneum*, MBR)、金龟子绿僵菌(*M. anisopliae*, MAN)和罗伯茨绿僵菌(*M. robertsii*, MAA)等广谱性寄生真菌。这种寄主差异性与绿僵菌一系列

特征基因组相关,推动了绿僵菌的物种形成^[1]。

近年来,绿僵菌与昆虫及植物寄主互作关系的相关研究成为了昆虫病原真菌开发应用研究领域的新方向。绿僵菌与植物之间建立了复杂的共生系统,从帮助植物抵抗虫害到促进植物生长发育,成为了昆虫与植物沟通的桥梁,这种三边关系为植物保护和农业发展提供了新的思路。随着对绿僵菌不断地深入研究,人们发现绿僵菌除了能够感染并消灭目标害虫外,还可以作为植物内生菌定殖于植物根系,通过介导昆虫植物碳氮元素交换、分泌代谢产物、诱导植物抗性等途径促进植物的生长^[2-3]。研究表明,绿僵菌可以定殖并促进一些常见植物的生长,包括番茄^[4]、玉米^[4-6]、大豆^[5,7]、拟南芥^[4,8]、柳枝稷^[9]、扁豆^[9]、花生^[10-12]、木薯^[13]、甜椒^[14]、水稻^[15]等,同时种之间的差异性在与植物互作时产生了影响,不同种绿僵菌在植物根际的存活能力不同,对植物生长的影响程度也不同^[16]。

目前对绿僵菌植物促生作用的研究才刚刚起步,相关研究数量较少且尚不成熟,研究植物的范围也有限。水稻作为常见农作物,是人类重要的粮食来源,而目前绿僵菌与水稻相互作用的研究报道仅2篇^[15,17],并且侧重于水稻对重金属离子的抗胁迫。罗伯茨绿僵菌与蝗绿僵菌在生态学进化、寄主偏好和寄主转换等研究方面是优秀的模式生物,两者由于基因组差异而导致昆虫寄主范围产生很大差异,这种差异性在与植物互作是否有体现目前还知之甚少。因而本研究以水稻为寄主植物,选用基因组存在较大差异的罗伯茨绿僵菌和蝗绿僵菌为试验菌株,明确不同绿僵菌水稻根系的定殖及对水稻生长的影响和差异,探究绿僵菌与植物之间的潜在作用,为拓宽其在农业领域的应用范围、制备杀虫促生于一体的新型生物制剂提供帮助。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

水稻种子为苏州市农业科学院朱勇良教授惠赠,品种为苏香梗3号;罗伯茨绿僵菌 ARSEF 23 和蝗绿僵菌 CQMa 102,由浙江大学生科院微生物所方卫国教授实验室提供,源自美国纽约州伊萨卡市的美国植物、土壤与营养实验室,25%甘油长期保藏于-80℃冰箱。

1.1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基,上海博微生物科技有限公司;营养液:称取1.260 g 霍格兰营养液粉末和0.945 g 钙盐,加热溶解于1 L 蒸馏水中;绿僵菌多果定选择培养基(g/L):多果定0.050,氯霉素0.100,放线菌酮0.125,葡萄糖20.000,酵母提取物10.000,琼脂粉20.000^[18]。

1.1.3 主要试剂和仪器

多果定(N-十二烷基胍单醋酸盐)、氯霉素和放线菌酮, Bio-Rad 公司; DL5000 DNA Marker、Ultra GelRed、PCR 扩增试剂盒、10×DNA Loading Buffer, 南京诺唯赞生物科技有限公司;根系活力检测试剂盒,上海源叶生物科技有限公司; Triton X-100、霍格兰营养液、钙盐、次氯酸钠、乙醇、氢氧化钾、葡萄糖、酵母提取物和琼脂粉等试剂,国药集团有限公司。生化培养箱,新苗医疗器械有限公司; PCR 扩增仪, Eppendorf 公司;电泳仪,北京六一生物科技有限公司;叶绿素仪,浙江托普云农科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 试验设计

试验分别用罗伯茨绿僵菌 ARSEF 23 (MAA 处理组)、蝗绿僵菌 CQMa 102 (MAC 处理组)和 Triton X-100 (对照组)拌种处理各200粒健康水稻种子,选取萌发较好的种子进行土培和水培,

土培每个处理设置 20 盆, 每盆播种 3 粒种子, 水培每个处理播种 60 粒种子, 均匀平铺在育苗盘中, 于光照培养箱中培养 30 d, 选取生长状况良好的水稻每 5 d 测定 1 次株高、根长、鲜重、干重和叶绿素这 5 项生理指标, 每 10 d 测定 1 次土培下水稻根系活力, 每个测定指标重复 3 次。

1.2.2 孢子悬浮液的制备

用无菌刀刮取在 PDA 培养基上 30 °C 培养 14 d 的绿僵菌表面的分生孢子, 用 10 mL 0.1% 的 Triton X-100 悬浮孢子, 在 250 mL 无菌锥形瓶中加入玻璃珠 30 °C、200 r/min 搅拌 30 min, 摇匀后用无菌粗棉布过滤悬浮液, 使用血球计数板测定孢子浓度, 用无菌蒸馏水将孢子浓度稀释至 1×10^8 个/mL。

1.2.3 水稻种子的萌发

将水稻种子浸泡在蒸馏水中过夜, 第 2 天将种子均匀平铺在放有滤纸的培养皿中, 不定时地在培养皿中加入蒸馏水, 使种子保持湿润, 在植物培养箱中黑暗条件 28 °C 萌发 5 d。

1.2.4 拌种处理

将萌发好的种子在 2% 次氯酸钠中灭菌 2 min, 70% 的乙醇中灭菌 60 s, 再用无菌蒸馏水漂洗 2-3 次, 每次 30 s, 室温风干 5 min。之后将水稻种子浸泡在含有 40 mL 绿僵菌孢子悬浮液的 250 mL 无菌锥形瓶中, 30 °C、200 r/min 培养 4 h, 对照组浸泡在 40 mL 0.1% Triton X-100 中培养 4 h。

1.2.5 水稻播种与管理

土培: 每盆中加入 400 g 左右土壤(营养土: 珍珠岩: 蛭石体积比为 2:1:1), 播种 3 粒拌种处理后的水稻种子, 同时在播种处加 5 mL 绿僵菌孢子悬浮液, 对照组加入 5 mL 0.1% Triton X-100, 放置在光照培养箱中, 昼夜温度为 24 °C 和 20 °C, 光周期为光照 16 h 黑暗 8 h, 每天用蒸馏水灌溉至盆容量的 85%, 培育 30 d, 整个过程

不施肥、不做无菌处理。

水培: 将水稻种子均匀平铺在育苗盘中, 加入营养液至盘容量的 85%, 光照培养箱设置昼夜温度为 24 °C 和 20 °C, 光周期为光照 16 h 黑暗 8 h, 每 2 d 更换 1 次营养液, 培育 30 d, 整个过程不做无菌处理。

1.2.6 绿僵菌根内定殖的测定

根处理: 自来水冲洗根, 洗去泥土, 无菌水漂洗 3-5 次, 用 4% 次氯酸钠浸泡 5 min 后无菌水漂洗 3-5 次, 用 70% 乙醇消毒 1 min 后无菌水漂洗 3-5 次, 然后将根剪成适宜大小后无菌水漂洗 3-5 次, 吸干水分, 保存至 4 °C 冰箱。

显微镜染色观察: 将水稻根冲洗干净, 用 50% 乙醇固定 24 h 以上, 蒸馏水冲洗乙醇。用 10% 氢氧化钾完全浸泡根样, 90 °C 水浴 90 min 后倒去氢氧化钾溶液, 蒸馏水冲洗 3 次并控干水分。用 2% 乳酸于室温下酸化 5 min, 倒去乳酸。加入 5% 醋酸墨水(5 mL 墨水+95 mL 醋酸)染色 10 min, 用蒸馏水洗去染液后放在清水中浸泡过夜, 进行显微镜切片观察。

菌落形态观察: 将处理好的根切碎, 放置在绿僵菌多果定选择培养基上, 30 °C 恒温培养, 将培养基上的疑似试验菌株分离纯化 3 代, 观察菌落形态, 与试验菌株进行对比。

DNA 的提取、PCR 扩增及基因测序: 通过苯酚氯仿法提取分离菌株和试验菌株的基因组 DNA, 并使用真菌通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μ L): DNA 模板 1 μ L, 引物 ITS1 和 ITS4 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 2 \times Easy Taq PCR SuperMix 12.5 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 50 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。配制 2% 琼脂糖凝胶, 用 Ultra GelRed 染色, 将 PCR 扩

增产产物进行电泳检测,并送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.2.7 水稻生长情况的测定

发芽率:将未萌发的水稻种子拌种处理,放置在无菌培养皿中萌发,每天统计 100 粒水稻种子萌发数量(以水稻芽长达到水稻种子长度一半为标准)。

发芽率(%)=已发芽的种子数/种子总数×100 (1)

株高:用直尺测量水稻地上部高度。

根长:将水稻根系冲洗干净,拉直,用直尺测量水稻最长根长度。

鲜重:将水稻冲洗干净,用吸水纸吸去水分,称量水稻鲜重。

干重:将鲜重样品于 90 °C 烘箱放置 30 min 后调整为 70 °C 烘干至恒重,称量水稻干重。

叶绿素:采用叶绿素仪测定水稻叶片相同位置叶绿素含量。

根系活力:采用植物根系活力检测试剂盒测定。

水稻每个指标的增长率计算公式:

增长率=(处理组-对照组)/对照组 (2)

1.3 数据处理

利用在线 BLAST 进行分离菌株和试验菌株 ITS 序列比对。运用 SPSS Statistics 18.0 软件中单因素方差分析(one-way ANOVA)对数据进行统计分析,显著性水平定义为 $P<0.05$ 。使用 Excel 2019 和 Origin 2021b 绘图。

2 结果与分析

2.1 绿僵菌在水稻根内定殖情况

2.1.1 绿僵菌选择分离和水稻根内生定殖的观察

图 1A-1C 分别为对照组、MAA 处理组、MAC 处理组水稻碎根放置在绿僵菌选择培养基上培养 7 d 后的菌落生长情况,仅 MAA 处理组出现白色菌落。将该菌落分离纯化 3 代后与试验菌株对比,分离菌株呈棉絮茸毛状,含有大量白色菌丝。随着培养时间增加,分离菌株菌落表面

出现大量分生孢子,该菌落初期呈黄色,逐渐变为黄绿色,与罗伯茨绿僵菌 ARSEF 23 相似(图 2)。图 3A-3C 分别为对照组、MAA 处理组、MAC 处理组的水稻根显微镜图,仅 MAA 处理组能观察到水稻根内绿僵菌的定殖。

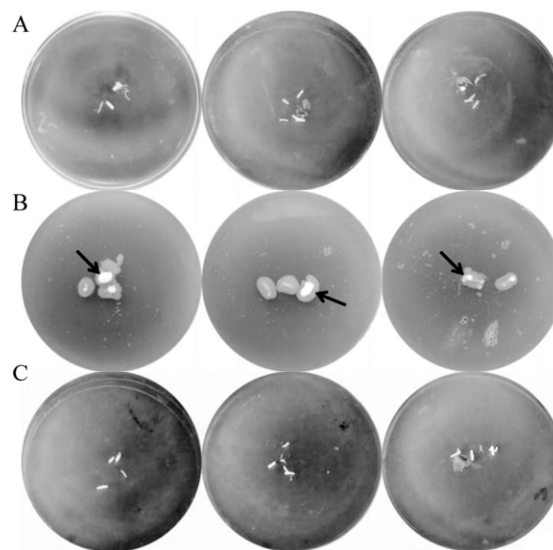


图 1 水稻根内绿僵菌的选择培养 A: 对照组. B: 罗伯茨绿僵菌处理组. C: 蝗绿僵菌处理组. 箭头所指为菌落

Figure 1 Selective culture of *Metarhizium* spp. in the rice roots. A: Control group. B: *Metarhizium robertsii* treatment group. C: *Metarhizium acridum* treatment group. Colonies were indicated by the arrows.

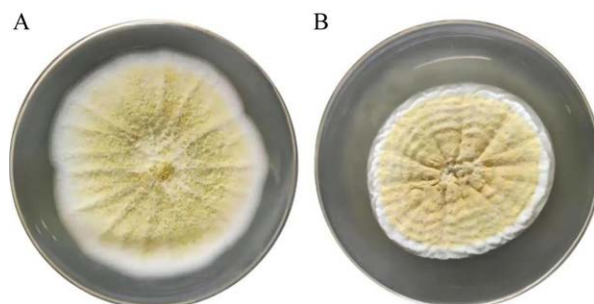


图 2 罗伯茨绿僵菌 ARSEF 23 (A)与分离菌株(B)的形态

Figure 2 Morphology of *Metarhizium robertsii* ARSEF 23 (A) and isolated strain (B).

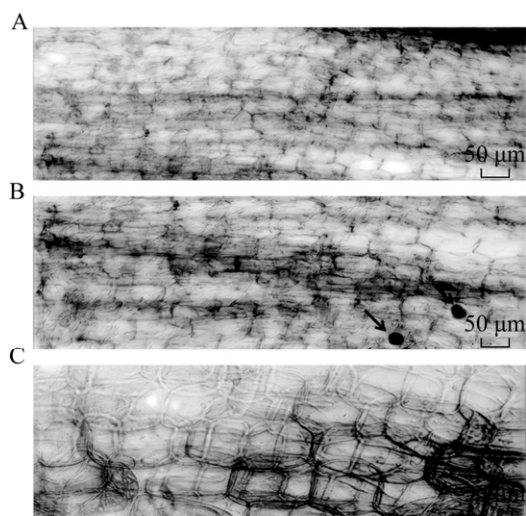


图3 水稻根的显微镜图 A: 对照组. B: 罗伯茨绿僵菌处理组. C: 蝗绿僵菌处理组. 箭头所指为疑似真菌孢子

Figure 3 Microscopic image of rice roots. A: Control group. B: *Metarhizium robertsii* treatment group. C: *Metarhizium acridum* treatment group. The suspected fungal spores were indicated by the arrows.

2.1.2 分离菌株的鉴定结果

图4为菌株基因组PCR扩增ITS序列的电泳图,结果显示从根内分离得到的菌株基因组PCR电泳条带位置与试验菌株一致。图5为基于分离菌株的ITS序列构建的系统发育树,经NCBI-BLAST比对后发现,从水稻根内分离的菌株与罗伯茨绿僵菌ARSEF 23相似性为100%,表明该菌株是罗伯茨绿僵菌,分离菌株的GenBank登录号为PP474695,罗伯茨绿僵菌ARSEF 23的GenBank登录号为HM055440。

2.2 MAA、MAC对水稻种子萌发的影响

MAA处理组的水稻种子在前3天萌发率显著高于对照组和MAC ($P < 0.05$);在第4、5天时,水稻种子萌发最终稳定,对照组、MAA处理组、MAC处理组的水稻种子最终萌发率各为90%、92%、92%,无显著性差异 ($P > 0.05$),这表明MAA

可以加速水稻种子的萌发,而MAC对水稻种子萌发无显著影响 ($P > 0.05$),同时2株绿僵菌对水稻种子最终萌发率并无影响(图6)。

2.3 土培、水培条件下MAA、MAC对水稻生长的影响

2.3.1 MAA、MAC对水稻株高和根长的影响

图7直观显示第20天时两种培养条件下MAA处理组的水稻株高和根长明显高于对照组和MAC处理组,MAC处理组与对照组之间差距不大。两种培养条件下,MAA处理组的水稻株高和根长均比对照组和MAC高,而MAC处理组与对照组无显著差异 ($P > 0.05$) (图8)。水培条件下,第20天时MAA处理组对水稻株高促进效果最好,较对照组增加了59.3%,而根长较对照组在第30天达到最高增长率17.9%;土培条件下,MAA处理组的水稻株高较对照组在第15天达到最高增长率45.2%,根长在第15天达到最高增长率,为72.3%。

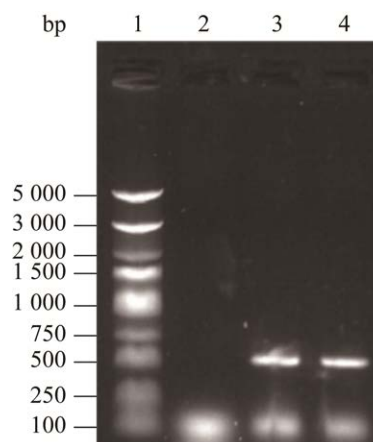


图4 引物ITS1/ITS4对菌株扩增DNA片段的电泳图 1: DL5000 DNA Marker; 2: 阴性对照; 3: 罗伯茨绿僵菌ARSEF 23; 4: 分离菌株

Figure 4 Electropherogram of strain-amplified DNA fragments with primer ITS1 and ITS4. 1: DL5000 DNA Marker; 2: The negative control; 3: *Metarhizium robertsii* ARSEF 23. 4: The isolated strain.

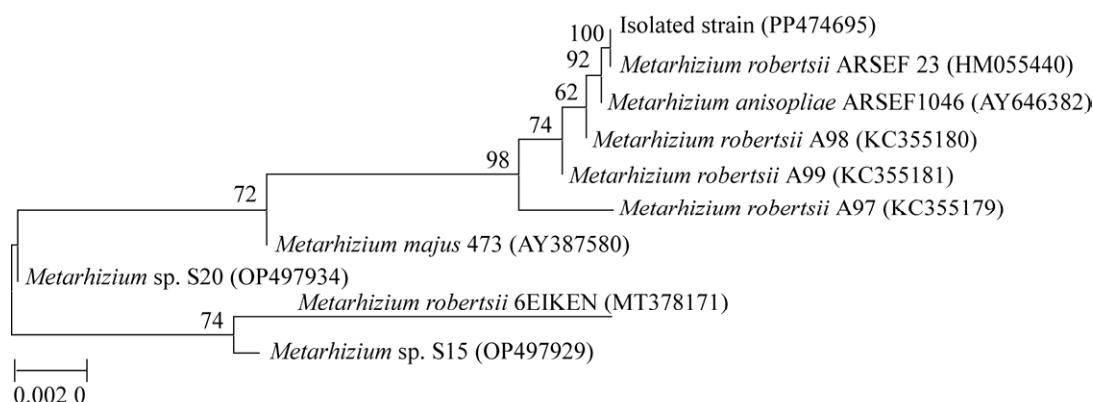


图 5 基于分离菌株 ITS 序列构建的系统发育树 分支处数值代表 bootstrap 的支持率；括号内为 GenBank 登录号；标尺代表进化距离

Figure 5 Phylogenetic tree of isolated strain based on ITS sequence. Numbers at branch point represents the support rate of bootstrap; GenBank accession numbers are shown in parentheses; Bar represents evolutionary distances.

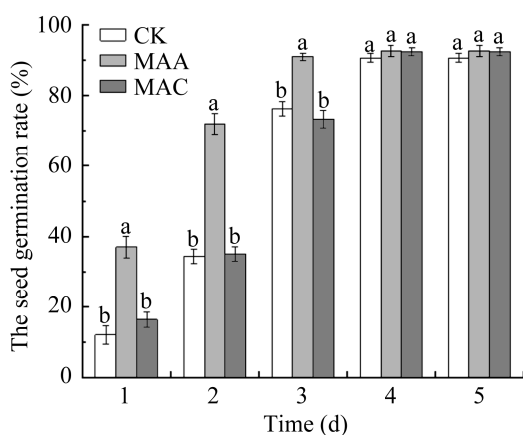


图 6 绿僵菌对水稻种子萌发影响 CK: 对照组. MAA: 罗伯茨绿僵菌处理组. MAC: 蝗绿僵菌处理组. 不同的小写字母表示不同处理之间存在显著差异($P<0.05$). 下同

Figure 6 Effect of *Metarhizium* spp. on the germination of rice seed. CK: Control group. MAA: *Metarhizium robertsii* treatment group. MAC: *Metarhizium acridum* treatment group. Different lowercase letters indicate significant differences among treatments ($P<0.05$). The same below.

2.3.2 MAA、MAC 对水稻鲜重和干重的影响

两种培养条件下, MAA 处理组的水稻鲜重与干重均比对照组和 MAC 高, 而 MAC 处理组与对照组无显著差异($P>0.05$) (图 9)。相较于对

照组, MAA 处理组的水稻鲜重在水培第 20 天、土培第 30 天达到最高增长率, 分别为 90.9%、30.5%; 同时水培条件下, MAA 处理组的水稻干重较对照组在第 30 天达到最高增长率 28.4%, 土培条件下则第 15 天达到最高增长率, 为 72.6%。

2.3.3 MAA、MAC 对水稻叶绿素含量的影响

两种培养条件下, MAA 处理组的水稻叶片叶绿素含量均比对照组和 MAC 高, 而 MAC 处理组与对照组无显著差异($P>0.05$)。相比于对照组, MAA 处理组的水稻叶片叶绿素含量在水培第 10 天、土培第 30 天达到最高增长率, 分别为 64.8%、92.3% (图 10)。另外, 两种培养条件下,



图 7 绿僵菌对水稻生长影响 A: 水培. B: 土培
Figure 7 Effect of *Metarhizium* spp. on rice . A: Hydroponics. B: Soil culture.

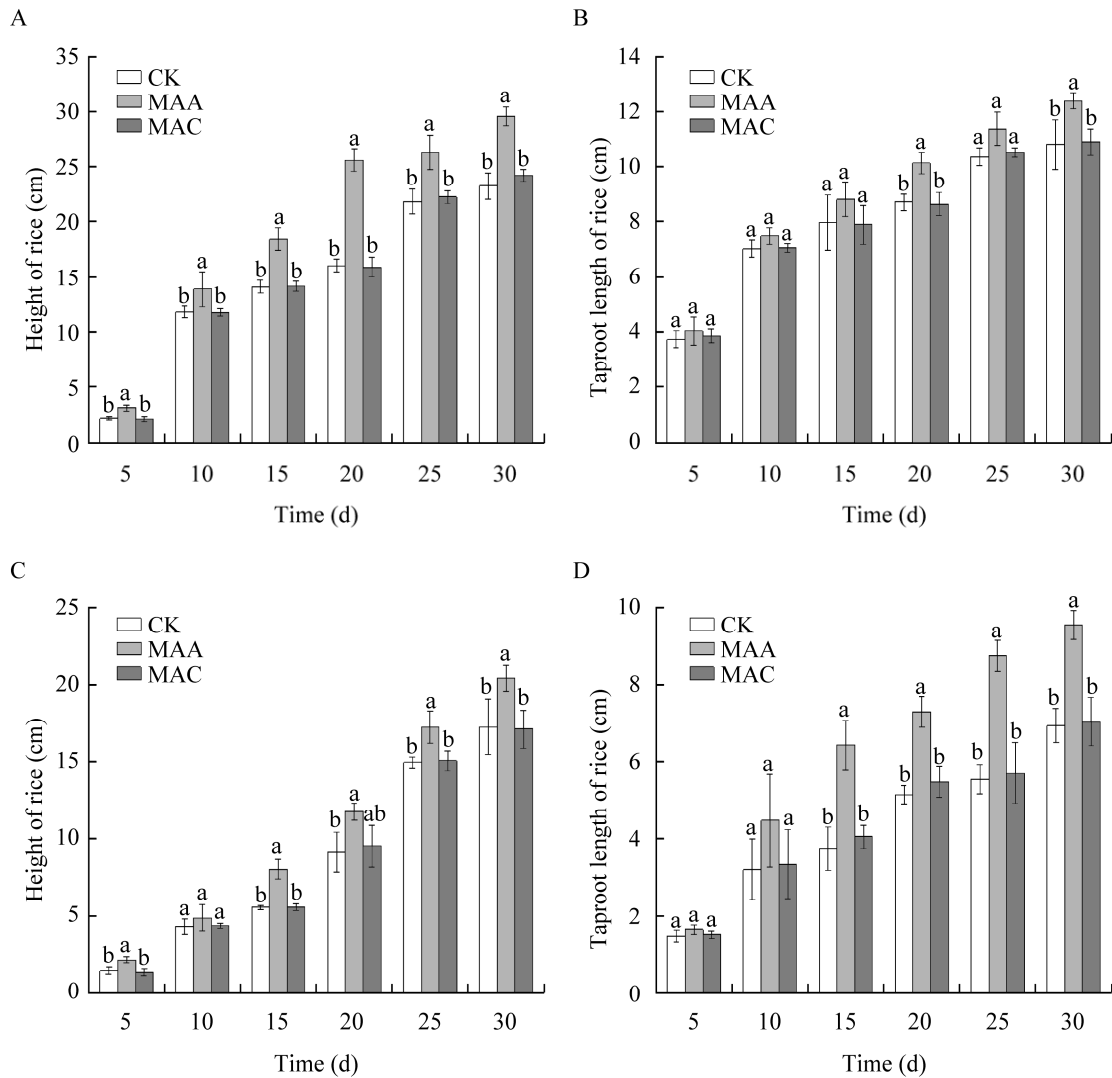


图 8 绿僵菌对水稻株高和根长的影响 A: 水培株高. B: 水培根长. C: 土培株高. D: 土培根长.

Figure 8 Effect of *Metarhizium* spp. on the height and the taproot length of rice. A: Height of rice under hydroponic cultivation. B: Taproot length of rice under hydroponic cultivation. C: Height of rice under soil cultivation. D: Taproot length of rice under soil cultivation.

3 种处理方式的水稻叶绿素含量均呈现先上升后下降的趋势, 水培条件下的水稻叶绿素含量在第 15 天后出现下降趋势, 而土培则在第 25 天后开始下降。

2.3.4 MAA、MAC 对水稻根系活力的影响

植物根系活力是根的重要生理指标, 植物根的生长情况和活力水平直接影响地上部的

营养状况及产量水平。土培下 MAA 处理组的水稻根系活力均比对照组和 MAC 处理组高, 并且具有显著性差异($P < 0.05$), MAC 处理组与对照组无显著差异($P > 0.05$)。第 10、20、30 天, MAA 处理组的水稻根系活力比对照组分别增加了 47.8%、63.7%、25.5% (图 11)。

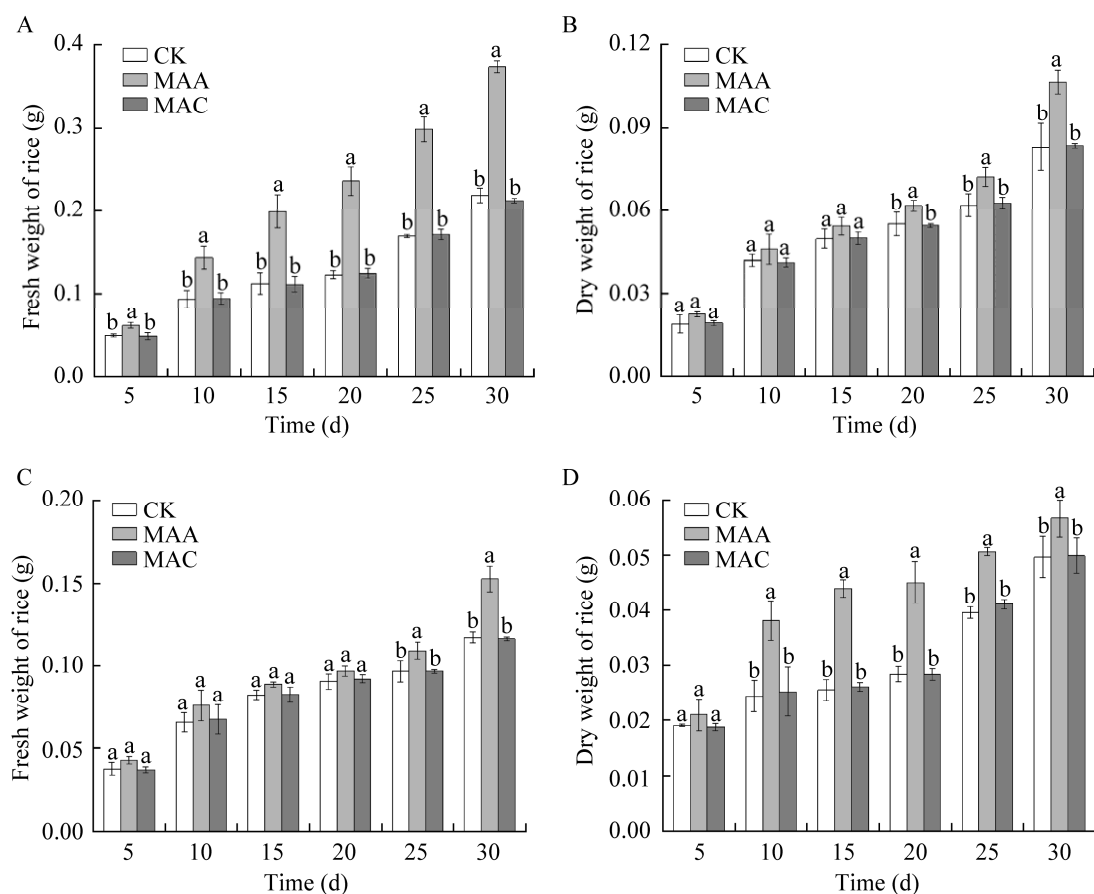


图 9 绿僵菌对水稻鲜重和干重影响 A: 水培鲜重. B: 水培干重. C: 土培鲜重. D: 土培干重.

Figure 9 Effect of *Metarhizium* spp. on the fresh weight and dry weight of rice. A: Fresh weight of rice under hydroponic cultivation. B: Dry weight of rice under hydroponic cultivation. C: Fresh weight of rice under soil cultivation. D: Dry weight of rice under soil cultivation.

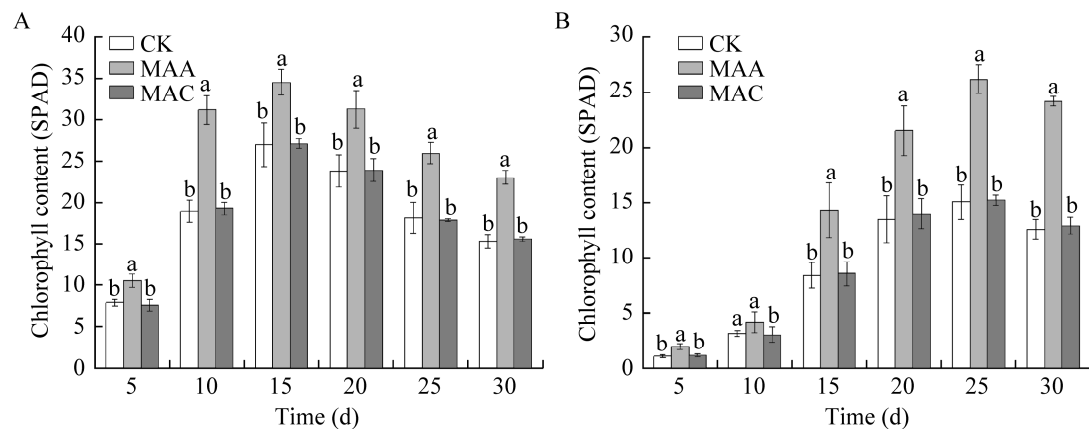


图 10 绿僵菌对水稻叶绿素含量影响 A: 水培. B: 土培.

Figure 10 Effect of *Metarhizium* spp. on the chlorophyll content of rice. A: Hydroponics. B: Soil culture.

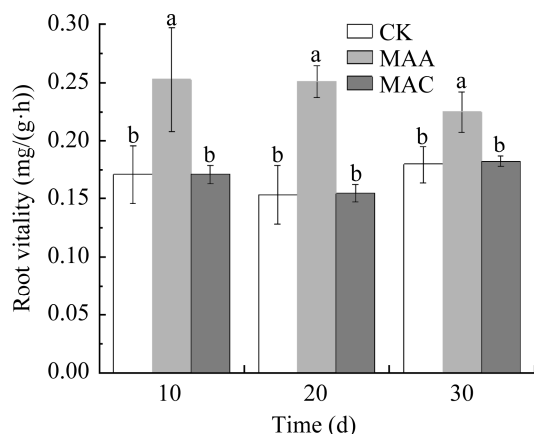


图 11 绿僵菌对水稻根系活力的影响

Figure 11 Effect of *Metarhizium* spp. on the root vitality of rice.

3 讨论与结论

随着对绿僵菌不断深入的研究,人们发现其存在寄生、腐生、植物共生等多种生活方式,占据多种生态位^[19-20]。绿僵菌拥有与植物根关联的能力,尤其是在单子叶植物中,这种内生关联性更加明显^[21]。系统基因组分析表明,罗伯茨绿僵菌和蝗绿僵菌的谱系早在 3 300–4 300 万年前分化,与植物内生菌 *Epichloe festucae* 关系最为密切;许多植物病原菌需要糖苷水解酶、果胶酸裂解酶和角质酸酶来降解植物的角质层和细胞壁,罗伯茨绿僵菌和蝗绿僵菌的糖苷水解酶基因数量接近植物病原菌的平均水平,分泌脂肪酶、木葡聚糖、木葡聚糖转移酶的基因数量高于其他真菌的平均水平^[22],这表明绿僵菌可能是由植物病原菌分化而来。同时,这 2 种绿僵菌比其他真菌具有更多的氨基酸和肽转运体,包括有助于促进绿僵菌在植物根系定殖的棉子糖转运体(*Metarhizium raffinose transporter*, MRT)与单糖转运体(*monosaccharide transporter*, MST1)^[23-24]。

虽然这 2 株绿僵菌都与植物内生菌有密切关联,但试验中发现仅罗伯茨绿僵菌可以定殖

于水稻根内并对水稻的生长具有一定的促进作用,而蝗绿僵菌对水稻生长无影响,这可能由两者基因组差异导致。比较基因组研究表明,相较于蝗绿僵菌,罗伯茨绿僵菌已经进化出许多蛋白酶、几丁质酶、细胞色素合成酶、聚酮合成酶和非核糖体肽合成酶用于角质层降解、解毒和毒素生物合成,同时拥有比蝗绿僵菌更多的次生代谢产物,这可能有助于其适应各种环境^[22]。虽然本研究中蝗绿僵菌并未在水稻根内定殖,但这并不能表明其无法对所有植物产生作用,可能其能对个别特定植物产生作用。另外,与部分研究结果^[9,16]一致的是,本试验中绿僵菌对种子的最终萌发率并无影响,但罗伯茨绿僵菌能够加速种子萌发。在研究球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)与玉米互作时发现,两者共培养 48 h 后白僵菌侵入了玉米种子内部,具有内生能力^[25],由此推测绿僵菌也具有这种能力,从而加速种子萌发。

目前对绿僵菌的虫害防治研究相对比较成熟,而对于植物促生作用的研究才刚刚起步,存在较多问题。首先研究植物范围有限,目前主要集中在拟南芥^[4,8]、玉米^[4-6]、番茄^[4]和花生^[10-12]等常见植物,并且对于其促生机制的研究也较少,而有关绿僵菌与水稻的互作研究仅 2 篇^[15,17]。绿僵菌在植物根系的定殖是两者产生相互关系的前提,虽然在虫生真菌丰富的农业系统中,绿僵菌对植物的定殖并不是一种稳定的现象,但这并不否认将真菌人工引入农业系统后对植物的好处,深入研究绿僵菌定殖与促生作用机制将有助于提高相关生物制剂的效能。植物与菌根真菌或植物病原菌之间的互作研究可为绿僵菌与植物共生关系研究提供依据,免疫和共生都是植物在与微生物长期相互作用和共同进化后产生的适应性,可能涉及共同的调控模式。此外,不同绿僵菌菌株与不同植物之间的相互作用机制可

能因为真菌定殖位置、抗性诱导、对植物激素产生的影响等因素而不同,需要多方位深入研究。今后可从元素转移、真菌-昆虫-植物互作、代谢分泌物、环境等方面深入研究绿僵菌对植物的促生机制。

REFERENCES

- [1] HU X, XIAO GH, ZHENG P, SHANG YF, SU Y, ZHANG XY, LIU XZ, ZHAN S, ST LEGER RJ, WANG CS. Trajectory and genomic determinants of fungal-pathogen speciation and host adaptation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(47): 16796-16801.
- [2] HU S, BIDOCHKA MJ. Root colonization by endophytic insect-pathogenic fungi[J]. Journal of Applied Microbiology, 2021, 130(2): 570-581.
- [3] HU G, ST LEGER RJ. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(12): 6383-6387.
- [4] GONZÁLEZ-PÉREZ E, ORTEGA-AMARO MA, BAUTISTA E, DELGADO-SÁNCHEZ P, JIMÉNEZ-BREMONT JF. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* enhances *Arabidopsis*, tomato, and maize plant growth[J]. Plant Physiology and Biochemistry: PPB, 2022, 176: 34-43.
- [5] BARON NC, de SOUZA POLLO A, RIGOBELLO EC. *Purpureocillium lilacinum* and *Metarhizium marquandii* as plant growth-promoting fungi[J]. PeerJ, 2020, 8: e9005.
- [6] LIU YM, YANG YK, WANG B. Entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* play roles of maize (*Zea mays*) growth promoter[J]. Scientific Reports, 2022, 12: 15706.
- [7] RUSSO ML, PELIZZA SA, VIANNA MF, ALLEGRUCCI N, CABELLO MN, TOLEDO AV, MOURELOS C, SCORSETTI AC. Effect of endophytic entomopathogenic fungi on soybean *Glycine max* (L.) Merr. growth and yield[J]. Journal of King Saud University - Science, 2019, 31(4): 728-736.
- [8] LIAO XG, LOVETT B, FANG WG, ST LEGER RJ. *Metarhizium robertsii* produces indole-3-acetic acid, which promotes root growth in *Arabidopsis* and enhances virulence to insects[J]. Microbiology, 2017, 163(7): 980-991.
- [9] SASAN RK, BIDOCHKA MJ. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (*Clavicipitaceae*) is also an endophyte that stimulates plant root development[J]. American Journal of Botany, 2012, 99(1): 101-107.
- [10] 刘少芳. 金龟子绿僵菌内生性及对花生生长促进作用[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2015.
- LIU SF. Endophytism and growth-promoting of *Metarhizium anisopliae* during peanut development[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2015 (in Chinese).
- [11] 王峰. 金龟子绿僵菌诱导花生根建立共生的研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2018.
- WANG F. *Metarhizium anisopliae* induced peanut roots response to establish endosymbiosis[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018 (in Chinese).
- [12] LIU SF, WANG GJ, NONG XQ, LIU B, WANG MM, LI SL, CAO GC, ZHANG ZH. Entomopathogen *Metarhizium anisopliae* promotes the early development of peanut root[J]. Plant Protection Science, 2017, 53(2): 101-107.
- [13] GREENFIELD M, GÓMEZ-JIMÉNEZ MI, ORTIZ V, VEGA FE, KRAMER M, PARSA S. *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation[J]. Biological Control: Theory and Applications in Pest Management, 2016, 95: 40-48.
- [14] JABER LR, ALANANBEH KM. Fungal entomopathogens as endophytes reduce several species of *Fusarium* causing crown and root rot in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.)[J]. Biological Control, 2018, 126: 117-126.
- [15] JIANG XH, FANG WG, TONG JH, LIU SX, WU HX, SHI JY. *Metarhizium robertsii* as a promising microbial agent for rice *in situ* cadmium reduction and plant growth promotion[J]. Chemosphere, 2022, 305: 135427.
- [16] 廖兴刚, 胡明瑜, 孟泽彬, 罗倩, 白文钦. 不同绿僵菌菌株在玉米根际的定殖及对玉米生长的影响[J]. 西南农业学报, 2021, 34(8): 1657-1662.
- LIAO XG, HU MY, MENG ZB, LUO Q, BAI WQ.

- Effects of different *Metarhizium* strains on rhizospheric colonization and growth of corn[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2021, 34(8): 1657-1662 (in Chinese).
- [17] JIANG XH, DAI J, ZHANG X, WU HX, TONG JH, SHI JY, FANG WG. Enhanced Cd efflux capacity and physiological stress resistance: the beneficial modulations of *Metarhizium robertsii* on plants under cadmium stress[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 437: 129429.
- [18] WYREBEK M, HUBER C, SASAN RK, BIDOCHKA MJ. Three sympatrically occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity[J]. Microbiology, 2011, 157(Pt 10): 2904-2911.
- [19] VEGA FE. Insect pathology and fungal endophytes[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2008, 98(3): 277-279.
- [20] WANG JB, ST LEGER RJ, WANG C. Advances in genomics of entomopathogenic fungi[J]. Advances in Genetics, 2016, 94: 67-105.
- [21] MOONJELY S, BIDOCHKA MJ. Generalist and specialist *Metarhizium* insect pathogens retain ancestral ability to colonize plant roots[J]. Fungal Ecology, 2019, 41: 209-217.
- [22] GAO Q, JIN K, YING SH, ZHANG YJ, XIAO GH, SHANG YF, DUAN ZB, HU X, XIE XQ, ZHOU G, PENG GX, LUO ZB, HUANG W, WANG B, FANG WG, WANG SB, ZHONG Y, MA LJ, ST LEGER RJ, ZHAO GP, et al. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*[J]. PLoS Genetics, 2011, 7(1): e1001264.
- [23] FANG WG, ST LEGER RJ. *Mrt*, a gene unique to fungi, encodes an oligosaccharide transporter and facilitates rhizosphere competency in *Metarhizium robertsii*[J]. Plant Physiology, 2010, 154(3): 1549-1557.
- [24] DAI J, MI WB, WU CC, SONG H, BAO YT, ZHANG MX, ZHANG SF, FANG WG. The sugar transporter MST1 is involved in colonization of rhizosphere and rhizoplane by *Metarhizium robertsii*[J]. mSystems, 2021, 6(6): e0127721.
- [25] 杨酉琨. 玉米对球孢白僵菌定殖响应的转录组学研究[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2022.
- YANG YK. Transcriptomic study of maize response to colonization of *Beauveria bassiana*[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2022 (in Chinese).