

低能离子注入对丛枝菌根真菌及其与蒺藜苜蓿共生的影响

陈浩¹, 石磊², 解继红^{3*}, 宋智青¹ (1.内蒙古工业大学, 内蒙古呼和浩特 010051; 2.内蒙古医科大学, 内蒙古呼和浩特 010110; 3.中国农业科学院草原研究所, 内蒙古呼和浩特 010010)

摘要 [目的] 研究低能离子注入对丛枝菌根真菌及其与蒺藜苜蓿共生的影响。[方法] 以丛枝菌根真菌 *Arbuscular mycorrhizal fungi* 为试验材料, 以豆科模式植物——蒺藜苜蓿为寄主, 经低能离子注入后, 考察丛枝菌根真菌的孢子萌发率和菌丝长度; 然后建立蒺藜苜蓿与丛枝菌根真菌的共生关系, 并对根的侵染、孢子产量以及根外菌丝的生长进行评估。[结果] 低剂量的离子注入能刺激丛枝菌根真菌孢子的萌发和早期的生长; 高剂量的离子注入则抑制丛枝菌根真菌孢子的萌发和早期的生长; 在所选剂量范围内, 离子注入不影响丛枝菌根真菌与蒺藜苜蓿建立共生关系。[结论] 可以利用离子束生物技术对丛枝菌根真菌进行改良; 该研究为提高豆科牧草抗逆性的研究提供了新思路和新方法。

关键词 丛枝菌根真菌; 离子束; 蒺藜苜蓿

中图分类号 S-3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)26-0001-02

Effects of Ion Beam Implantation on *Arbuscular mycorrhizal fungi* and *Mycorrhizal Medicago truncatula*

CHEN Hao¹, SHI Lei², XIE Ji-hong³ et al (1.Inner Mongolia University of Technology, Hohhot, Inner Mongolia 010051; 2.Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia 010110; 3. Institute of Grassland Research of CAAS, Hohhot, Inner Mongolia 010010)

Abstract [Objective] The aim of the study was set to investigate the effect of ion beam on *arbuscular mycorrhizal fungi* (AMF) and mycorrhizal *Medicago truncatula*. [Method] Taking *Arbuscular mycorrhizal fungi* and Legume model plant *Medicago truncatula* as test material and host respectively, after ion irradiation, spore germination rate and hyphal length of *Arbuscular mycorrhizal fungi* was studied, then Symbiotic relationship between *Arbuscular mycorrhizal fungi* and *Medicago truncatula* was established. Infection of root, spore production and growth of external hyphae were evaluated. [Result] The results showed that early germination and growth of AMF were significantly affected by ion beam irradiation. Low dose ion implantation promoted the development of AMF. High dose ion implantation inhibited the development of AMF. Ion implantation did not affect the symbiotic relationship between AMF and *Medicago truncatula*. [Conclusion] These results supported that ion beam implantation may serve as a powerful tool to improve AMF. This study provided new ideas and new methods to improve the stress resistance of leguminous forage.

Key words *Arbuscular mycorrhizal fungi*; Ion beam; *Medicago truncatula*

20 世纪 80 年代中期, 余增亮研究员带领的研究组首先将低能离子注入技术应用于农作物的诱变育种, 发现低能离子注入作为一种新的生物诱变源具有损伤轻、突变率高、突变谱广的特点。该技术关联度高、影响面广, 用于农作物和微生物育种取得一系列成果, 是一种行之有效的诱变方法^[1-4]。与此同时, 低能离子注入的当代刺激效应也能够促进微生物和植物生长, 这些作用对于物种的改良都十分重要。然而, 关于低能离子注入对植物根部微生物影响的研究很少, 限制它的应用。

丛枝菌根真菌 (*Arbuscular Mycorrhizal fungi*, AMF) 是一种专性共生真菌, 而丛枝菌根 (*Arbuscular Mycorrhiza*, AM) 是由丛枝菌根真菌与植物形成的共生联合体, 是地球上分布最广泛的共生体。丛枝菌根真菌能够侵染包括豆科牧草在内的 80% 的陆生植物, 它能够从土壤中吸收矿质元素, 如 N、P 等, 并传输给植物促进其生长, 同时也从植物体中吸收碳水化合物和脂类^[5-8]。但是, 当丛枝菌根共生体暴露在土壤中时, 土壤环境中的负面因素 (如盐碱、干旱、低温、污染物等) 对其孢子的萌发、菌群落的变化、繁殖也有一定的影响, 必然会影响丛枝菌根的形成及功能, 进而影响丛枝菌根的接种效果。如果能将低能离子束生物技术应用用于丛枝菌根真菌的

品质改良, 则可望提高丛枝菌根真菌利用的效果。蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) 因与其他重要作物如大豆、紫花苜蓿亲缘关系很近, 而且具有其他豆科植物所不具有的遗传特性而被人们选择为研究豆科的模式植物^[9]。同时, 蒺藜苜蓿可以和丛枝菌根真菌形成良好的共生关系。因此, 蒺藜苜蓿是用来研究丛枝菌根共生的优良材料。

选定豆科模式植物——蒺藜苜蓿为宿主, 以光自养培养体系共生培养, 研究低能离子注入对丛枝菌根真菌生长及其与蒺藜苜蓿共生的影响, 探讨提高蒺藜苜蓿-丛枝菌根共生体系在逆境生存力的方法, 为提高豆科牧草抗逆性的研究提供新思路和新方法。

1 材料与方法

1.1 供试菌种 *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann 由美国康奈尔大学 Teresa E. Pawlowska 博士馈赠。

1.2 寄主及培养基 蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*, ecotype Jemalong A17) 由美国明尼苏达大学 N.D. Young 博士馈赠。蒺藜苜蓿和丛枝菌根真菌都是在 MSR 培养基上生长 (modified Strullu-Romand medium)^[10]。MSR 培养基成分见表 1。

1.3 丛枝菌根真菌孢子的无菌提取 当 AMF 新生孢子成熟后, 将含有孢子的培养基放入无菌锥形瓶中, 加入 10 倍体积无菌的 10 mmol/L 柠檬酸钠, 并充分搅拌至孢子和菌丝分离。用 200 目尼龙网过滤得到孢子, 以去除残留的柠檬酸钠, 再用无菌水将孢子洗下, 在解剖镜下将孢子用 20 μ L 移液器收集到无菌的 1.5 mL 离心管中待用^[11]。

基金项目 内蒙古自然科学基金项目 (2015MS0119); 内蒙古自然科学基金项目 (2015BS0311); 内蒙古工业大学科学研究项目 (x201516)。

作者简介 陈浩 (1977—), 男, 内蒙古呼和浩特人, 讲师, 博士, 从事环境生物物理方面的研究。* 通讯作者, 副研究员, 硕士, 从事牧草育种方面的研究。

收稿日期 2018-04-25

表 1 MSR 培养基组分

Table 1 The composition of modified Strullu-Romand (MSR) media

		mg/L	
组分 Composition	含量 Content	组分 Composition	含量 Content
MgSO ₄ ·7H ₂ O	739	KCl	65
KNO ₃	76	KH ₂ PO ₄	4.1
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	359	MnSO ₄ ·4H ₂ O	2.45
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.29	H ₃ BO ₃	1.86
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.24	Na ₂ MoO ₄	0.002 4
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.035	Thiamin (V _{B1})	1
Pyridoxine (V _{B6})	0.9	Cyanocobalamine (V _{B12})	0.4
Nicotinic acid	1	泛酸钙	0.9
生物素 Biotin	0.9×10 ⁻³	NaFe·EDTA	8

注:调节 pH, 121℃ 高压蒸汽灭菌 15 min

Note: Regulating pH, high pressure steam sterilization for 15 min at 121 °C

1.4 低能离子注入 注入装置为低能离子注入机 (IBBe-Device)。注入离子为 Ar 离子, 剂量为 0 (CK₁), 1.25×10¹⁵, 2.50×10¹⁵, 3.75×10¹⁵, 5.00×10¹⁵, 6.25×10¹⁵, 7.50×10¹⁵ ions/cm², 以真空作对照组 (CK₂)。能量为 30 keV, 脉冲注入, 每个脉冲注入 1.25×10¹⁵ ions/cm², 脉冲之间间隔 30 s, 真空度为 0.05 Pa。真空对照组置于注入托盘上, 除了没有接受离子注入外, 其他条件及后续处理均与处理组一致。

1.5 孢子萌发率和菌丝长度检测 每个平皿中接入 80~100 个提取的 *Glomus etunicatum* 无菌孢子。用 Parafilm 膜封口后, 于 28 °C 黑暗倒置培养 10 d。取出置于解剖镜 (Motic K-700 L) 下统计孢子萌发率, 于显微镜 (Olympus X51) 下统计菌丝长度, 每组处理重复 3 次。相对菌丝长度计算公式如下:

$$\text{相对菌丝长度 (\%)} = \frac{\text{处理组孢子菌丝长度}}{\text{对照组孢子菌丝长度}} \times 100\% \quad (1)$$

1.6 光自养培养体系和侵染率的检测 光自养培养体系装置分 2 个部分: 苗室和菌根室。菌根室中加入约 40 mL MSR 培养基 (用 0.3% Phytogel 固定, 不含蔗糖和维生素)。将萌发 3 d 的幼苗移入菌根室, 并将幼苗顶端插入苗室底部与菌根室相连的孔中, 然后将约 20 粒上述方法得到的孢子加入到幼苗根旁, 用封口膜将培养皿封住。将装置放入光照培养箱中 25 °C 培养, 光照周期为 16 h 白天/8 h 夜晚。

培养 8 周后, 将根从菌根室中取出后, FAA 固定液固定 1 d, 然后用 10% KOH (W/V) 溶液 90 °C 消化 1~2 h, 除去根中的细胞质, 以便于观察。将根浸入 1% HCl 中酸化 3~5 min 后用台盼蓝染色^[11], 进行侵染率检测。

1.7 后代孢子产量和根外菌丝长度的统计 后代孢子数量在解剖镜下镜检; 于显微镜 (Olympus X51) 下统计根外菌丝长度。相对孢子产量、相对根外菌丝长度计算公式如下:

$$\text{相对孢子产量 (\%)} = \frac{\text{处理组孢子产量}}{\text{对照组孢子产量}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{相对根外菌丝长度 (\%)} = \frac{\text{处理组根外菌丝长度}}{\text{对照组根外菌丝长度}} \times 100\% \quad (3)$$

1.8 数据分析 利用 t 检验进行统计学意义分析, 当 $P < 0.05$ 时, 视作差异显著。

2 结果与分析

2.1 离子注入对丛枝菌根真菌孢子萌发的影响 试验结果表明, 1.25×10¹⁵、2.50×10¹⁵、3.75×10¹⁵、5.00×10¹⁵、6.25×10¹⁵、7.50×10¹⁵ ions/cm² 剂量组孢子萌发率分别为 76.7%、78.9%、70.3%、57.9%、34.3%、21.5%, CK₁ 孢子萌发率为 70.4%, CK₂ 孢子萌发率为 71.7%, 各剂量组孢子萌发率与 CK₁ 差异显著。

可以看出, 不同剂量的低能离子注入对丛枝菌根真菌孢子萌发率产生不同的影响。1.25×10¹⁵、2.50×10¹⁵ ions/cm² 剂量组显著提高孢子萌发率; 5.00×10¹⁵ ions/cm² 及以上剂量组抑制孢子萌发, 其中 6.25×10¹⁵ ions/cm² 剂量组可将孢子萌发率降至对照组的 50% 左右。出于当代刺激效应和诱变效应两方面的考虑, 选取 2.50×10¹⁵、6.25×10¹⁵ ions/cm² 两剂量组进行后续研究。

2.2 离子注入对丛枝菌根真菌早期菌丝生长的影响 由表 2 可知, 2.50×10¹⁵ ions/cm² 剂量组孢子相对菌丝长度为 123.3%, 显著促进了菌丝的生长, 而 6.25×10¹⁵ ions/cm² 剂量组孢子相对菌丝长度为 74.1%, 抑制菌丝的生长。说明不同剂量的低能离子注入会对丛枝菌根真菌早期的菌丝生长造成不同程度的影响。

表 2 离子注入对丛枝菌根真菌菌丝长度、真菌侵染率、相对孢子产量、相对根外菌丝长度的影响

Table 2 Effect of ion irradiation on hyphal length, colonization rate, relative pore yield and relative extra-radical hyphal of *Arbuscular Mycorrhizal fungi*

注入剂量 Injected volume ×10 ¹⁵ ions/cm ²	孢子相对 菌丝长度 Hyphal length	侵染率 Infection rate	相对孢子 产量 Relative pore yield	相对根外菌 丝长度 Relative extra-radical hyphal
CK ₁	100	70.70	100	100
2.50	123.3 *	74.30	103.20	106.50
6.25	74.1 *	69.10	94.80	96.10

注: * 表示与 CK₁ 差异显著Note: * stands for significant differences with CK₁

2.3 离子注入对丛枝菌根真菌与蒺藜苜蓿共生的影响

2.3.1 离子注入对丛枝菌根真菌侵染率的影响。丛枝菌根真菌的侵染效果是共生建立的关键因素。由表 2 可知, 各处理组对侵染率影响均不显著。说明低能离子注入虽然影响了丛枝菌根真菌早期生长, 但其与蒺藜苜蓿的共生关系仍可正常建立。

2.3.2 离子注入对丛枝菌根真菌后代孢子和根外菌丝生长的影响。由表 2 可知, 各处理组对后代孢子产量和根外菌丝的生长无显著影响。说明离子注入的丛枝菌根真菌与蒺藜苜蓿建立共生关系后, 仍可正常的完成其生命周期。

3 结论与讨论

目前, 低能离子注入对丛枝菌根真菌影响的研究极少。该研究结果表明, 不同剂量的 Ar 离子注入对丛枝菌根真菌孢子萌发率产生不同的影响: 1.25×10¹⁵、2.50×10¹⁵ ions/cm²

(下转第 14 页)

- [9] DERRIEN M, VAN PASSEL M W J, VAN DE BOVENKAMP J H B, et al. Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract [J]. Gut Microbes, 2010, 1(4): 254–268.
- [10] REHMAN H U, VAHJEN W, AWAD W A, et al. Indigenous bacteria and bacterial metabolic products in the gastrointestinal tract of broiler chickens [J]. Arch Anim Nutr, 2007, 61(5): 319–335.
- [11] KURIBAYASHI H, MIYATA M, YAMAKAWA H, et al. Enterobacteria-mediated deconjugation of taurocholic acid enhances ileal farnesoid X receptor signaling [J]. Eur J Pharmacol, 2012, 697: 132–138.
- [12] BRISBIN J T, GONG J, SHARIF S. Interactions between commensal bacteria and the gut-associated immune system of the chicken [J]. Anim Health Res Rev, 2008, 9(1): 101–110.
- [13] FORDER R E A, HOWARTH G S, TIVEY D R, et al. Bacterial modulation of small intestinal goblet cells and mucin composition during early post-hatch development of poultry [J]. Poultry Sci, 2007, 86(11): 2396–2403.
- [14] HERMANS D, PASMANS F, MESSENS W, et al. Poultry as a host for the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni* [J]. Vector Borne Zoonotic Dis, 2012, 12(2): 89–98.
- [15] ALEMKA A, WHELAN S, GOUGH R, et al. Purified chicken intestinal mucin attenuates *Campylobacter jejuni* pathogenicity in vitro [J]. J Med Microbiol, 2010, 59(8): 898–903.
- [16] COLLIER C T, HOFACRE C L, PAYNE A M, et al. Coccidia-induced mucogenesis promotes the onset of necrotic enteritis by supporting *Clostridium perfringens* growth [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2008, 122(1/2): 104–115.
- [17] MWANGI W N, BEAL R K, POWERS C, et al. Regional and global changes in TCR $\alpha\beta$ T cell repertoires in the gut are dependent upon the complexity of the enteric microflora [J]. Dev Comp Immunol, 2010, 34(4): 406–417.
- [18] HAGHIGHI H R, GONG J, GYLES C L, et al. Modulation of antibody-mediated immune response by probiotics in chickens [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2005, 12(12): 1387–1392.
- [19] HAGHIGHI H R, GONG J, GYLES C L, et al. Probiotics stimulate production of natural antibodies in chickens [J]. Clin Vaccine Immunol, 2006, 13(9): 975–980.
- [20] BRISBIN J T, GONG J, OROUJI S, et al. Oral treatment of chickens with lactobacilli influences elicitation of immune responses [J]. Clin Vaccine Immunol, 2011, 18(9): 1447–1455.
- [21] MACPHERSON A J, UHR T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria [J]. Science, 2004, 303(5664): 1662–1665.
- [22] SATO A, HASHIGUCHI M, TODA E, et al. CD11b+ Peyer's patch dendritic cells secrete IL-6 and induce IgA secretion from naive B cells [J]. J Immunol, 2003, 171(7): 3864–3890.
- [23] WIJBURG O L, UREN T K, SIMPFENDORFER K, et al. Innate secretory antibodies protect against natural *Salmonella typhimurium* infection [J]. J Exp Med, 2006, 203(1): 21–26.
- [24] SINGH M, VOHRA H, KUMAR L, et al. Induction of systemic and mucosal immune response in mice immunised with porins of *Salmonella typhi* [J]. J Med Microbiol, 1999, 48(1): 79–88.
- [25] MACH N, BERRI M, ESTELLÉ J, et al. Early-life establishment of the swine gut microbiome and impact on host phenotypes [J]. Environ Microbiol Rep, 2015, 7(3): 554–569.
- [26] DERACHE C, ESNAULT E, BONSERGENT C, et al. Differential modulation of beta-defensin gene expression by *Salmonella* Enteritidis in intestinal epithelial cells from resistant and susceptible chicken inbred lines [J]. Dev Comp Immunol, 2009, 33(9): 959–966.
- [27] SINGH K M, SHAH T M, REDDY B, et al. Taxonomic and gene-centric metagenomics of the fecal microbiome of low and high feed conversion ratio (FCR) broilers [J]. J Appl Genet, 2014, 55(1): 145–154.
- [28] TOROK V A, HUGHES R J, MIKKELSEN L L, et al. Identification and characterization of potential performance-related gut microbiotas in broiler chickens across various feeding trials [J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77: 5868–5878.
- [29] ANGELAKIS E, RAOULT D. The increase of *Lactobacillus* species in the gut flora of newborn broiler chicks and ducks is associated with weight gain [J]. PLoS One, 2010, 5(5): 1–5.
- [30] EHRMANN M A, KURZAK P, BAUER J, et al. Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry [J]. J Appl Microbiol, 2002, 92(5): 966–975.
- [31] GUO M J, HAO G G, WANG B H, et al. Dietary administration of *Bacillus subtilis* enhances growth performance, immune response and disease resistance in cherry valley ducks [J]. Front Microbiol, 2016, 7: 1975.

(上接第2页)

剂量组显著提高孢子萌发率; 5.00×10^{15} ions/cm² 及以上剂量组抑制孢子萌发, 其中 6.25×10^{15} ions/cm² 剂量处理可将孢子萌发率降至对照组的 50% 左右。出于利用当代刺激效应和诱变效应两方面的考虑, 选取 2.50×10^{15} 、 6.25×10^{15} ions/cm² 两剂量组进行后续研究。 2.50×10^{15} ions/cm² 剂量组显著促进菌丝的生长, 而 6.25×10^{15} ions/cm² 剂量组抑制菌丝的生长。孢子萌发率和菌丝的生长是从枝菌根真菌初期生命活力的表征, 低剂量的离子注入促进这些指标上升, 对于在逆境中提高丛枝菌根真菌的活力有重要意义。而高剂量的离子注入抑制丛枝菌根真菌的存活和初期的生长, 说明离子注入可能会对其产生诱变效应。

由于专性共生的特点, 菌根真菌对宿主植物根系的侵袭是其生长发育的先决条件, 而侵染率是直接反映 AM 真菌对宿主植物亲和性的指标。侵染率的高低会影响菌根真菌从宿主植物获取碳水化合物化合物的能力, 进而影响菌根真菌的生长发育如根外孢子萌发以及菌丝生长等。AM 真菌的根外真菌生物量直接反映后代根外真菌的生长状况, 其中包括孢子和菌丝的数量。在该试验中, 各处理组对后代侵染率、孢子产量和根外菌丝的生长均无显著影响。说明离子注入虽然会对 AM 真菌早期生长产生影响, 但丛枝菌根真菌仍可完成其生命周期, 菌与根的共生仍然能够建立。这种结果意味着可

以在高剂量离子注入后, 对丛枝菌根真菌的生长进行长期的观测和筛选, 这对于丛枝菌根真菌的离子束诱变育种工作具有重大意义。

参考文献

- [1] YU Z L, VILAITHONG T, BROWN I G. Introduction to ion beam biotechnology [M]. New York: Springer-Verlag, 2005.
- [2] 余增亮. 离子束生物技术引论 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1998.
- [3] WANG T, LI F H, LIU Q F, et al. Homologous recombination in *Arabidopsis* seeds along the track of energetic carbon ions [J]. Mutation research, 2012, 737(1/2): 51–57.
- [4] CHEN H, LI F H, YUAN H, et al. Abscopal signals mediated bio-effects in low-energy ion irradiated *Medicago truncatula* seeds [J]. Journal of radiation research, 2010, 51(6): 651–656.
- [5] MOORE P D. Mycorrhizal associations [J]. Nature, 1979, 282(5741): 780.
- [6] MORRISON T M. Mycorrhiza and phosphorus uptake [J]. Nature, 1957, 179(4566): 907–908.
- [7] CHRISTIE P, LI X L, CHEN B D. Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc [J]. Plant and soil, 2004, 261(1/2): 209–217.
- [8] ZHU Y G, MILLER R M. Carbon cycling by arbuscular mycorrhizal fungi in soil-plant systems [J]. Trends in plant science, 2003, 8(9): 407–409.
- [9] COOK D R. *Medicago truncatula*: A model in the making! Commentary [J]. Current opinion in plant biology, 1999, 2: 301–304.
- [10] DECLERCK S, STRULLU D G, PLENCHETTE C. *In vitro* mass-production of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus versiforme*, associated with Ri T-DNA transformed carrot roots [J]. Mycological research, 1996, 100(10): 1237–1242.
- [11] 陈浩, 肖翔, 王军, 等. 丛枝菌根真菌自养培养体系的建立 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(25): 13605–13606.