

· 综述 ·

基于高通量测序技术的菌根共生研究概况

刘思琪¹, 赵明明^{2*}

(1. 中国中药公司, 北京 100195;

2. 中国医学科学院北京协和医院药用植物研究所, 北京 100193)

[摘要] 菌根是自然界中普遍存在的一种共生现象, 它是由土壤中的菌根真菌与高等植物根系形成的一种共生体。鉴于其在自然界中的重要作用, 菌根研究日益引起世界各国学者的普遍关注。本文归纳总结了主要菌根互作类型丛枝菌根、外生菌根和兰科菌根利用高通量测序技术的研究进展。

[关键词] 高通量测序; 丛枝菌根; 外生菌根; 兰科菌根

Progress of Mycorrhizal Symbiosis Analysis Using High Throughput Sequencing

LIU Siqi¹, ZHAO Mingming^{2*}

(1. China National Traditional Chinese Medicine Corporation, Beijing 100195, China;

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences Peking

Union Medical Collage, Beijing 100193, China)

[Abstract] Mycorrhiza is a common existence in nature, and it is a symbiosis formed by mycorrhizal fungi in soil and roots of higher plants. In view of its important role in nature, mycorrhizal research has attracted more and more attention from scholars all over the world. In this paper, we summarized recent progresses in the research of arbuscular mycorrhiza, ectotrophic mycorrhiza and orchidaceous mycorrhiza symbiosis using high throughput sequencing.

[Keywords] High throughput sequencing; Arbuscular mycorrhiza; Ectotrophic mycorrhiza; Orchidaceous mycorrhiza
doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.5.029

大约有 90% 的陆地植物可与土壤菌根真菌共生, 形成菌根。菌根的形成在土壤结构、植物养分吸收与生长、生物多样性及农业和自然生态系统的生产力等方面发挥重要作用^[1]。根据形态结构的不同, 菌根可分为丛枝菌根 (Arbuscular mycorrhiza, AM)、浆果鹃类菌根 (Arbutoid mycorrhiza)、外生菌根 (Ectomycorrhiza, EM)、欧石南类菌根 (Ericoid)、石晶兰类菌根 (Monotropoid mycorrhiza) 和兰科菌根 (Orchid mycorrhiza)。其中最普遍且最有经济价值的两大类当属与农业中绝大部分的谷类作物、蔬菜和水果等共生的丛枝菌根以及与树木、灌木共生的外生菌根。

1 丛枝菌根

丛枝菌根 (AM) 真菌是一类以特定的形式定植于植物体根细胞, 从而协调植物生长的真菌种类。AM

真菌从特定的接口入侵植物, 从而建立共生关系^[2]。基于分子生物学的丛枝菌根共生研究已开展多年, 并取得了一定成果。在植物方面, 已经建立有关 AM 共生 cDNA 的文库, 通过抑制性消减杂交技术获得大量的克隆, 测序得到 AM 共生相关表达序列标签 EST^[3]等方面的工作。所获得的 ESTs 可以转移到固相载体 (阵列), 从而使不同来源获得的 cDNA 杂交 RNA 以积累 AM 共生过程中的基因表达概况; 在真菌方面, EST 库也正在建立, 同样采用的是直接克隆及抑制性消减杂交技术。双方的互作关系主要表现为一些相关基因的调节和功能验证, 以及各自在共生体系中扮演的角色, 这已成为科学界关注的热点^[4]。

蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* 和百脉根 *Lotus japonicas* 作为 AM 菌根互作研究的模式植物^[5-6], 已分别进行了基因组测序和突变体筛选^[7-9]等方面的研

* [通信作者] 赵明明, 博士后, 研究方向: 中药资源学, E-Mail: mmzhao@icmm.ac.cn

究。Frenzel 等^[10]已成功构建的随机 cDNA 文库 MtAMP, 来源于蒺藜苜蓿与丛枝菌根真菌 *Glomus intraradices* 共生后的主要发育阶段的组织样品, 文库中共包含了 5' 端 ESTs 3448 条。Journet 等^[11]也在 2002 年构建了含有 8567 条 ESTs 的蒺藜苜蓿和丛枝菌根真菌 *G. intraradices* 的随机 cDNA 文库 MtBC。随后, Liu 等^[12]在 2003 年建立了包含 9030 条 ESTs 的蒺藜苜蓿和丛枝菌根真菌 *G. versiforme* 的随机 cDNA 文库 MHAMHE MHAM2。由于从随机文库中发现高表达的基因是比较困难的, 研究趋势转为用差减测序技术替代随机 cDNA 文库技术^[13]。在采用抑制差减杂交 (SSH) cDNA 文库方法建立的蒺藜苜蓿和丛枝菌根真菌根的差减杂交 EST 文库 MtGIM 中, 对照组分别是未被侵染的根、磷酸盐处理的根、苜蓿根瘤菌 *Sinorhizobium meliloti* 侵染的根和豌豆褐斑菌 *Aphanomyces euteiches* 侵染的根, 共获得了 1686 条 ESTs, 这些序列中很大一部分被证明是菌根诱导相关基因^[14-15]。AM 菌根真菌 *G. mosseae* 建立了附着胞生长相关的 SSH cDNA 文库, 获得 658 条 ESTs, 这些序列被用于研究共生最早期的真菌基因表达^[16]。Ouziad 等^[17]对 AM 菌根真菌 *G. intraradices* 进行不同外源因子刺激后, 菌丝生长的 SSH cDNA 文库中共获得 2059 条 ESTs。Hildebrandt 等^[18]以 *G. intraradices* 的萌发孢子和向外缘生长的菌丝为材料构建的 2 个 SSH cDNA 文库中, 共获得 3708 条 ESTs。由菌根组织获得的 ESTs 中, 真菌序列低于 10%, 而来源于 AM 根的序列主要用于发现与菌根共生的建立和功能相关的植物基因^[19-20]。

微阵列技术也是近年来研究有多少基因能相互作用以及一个细胞网如何同时控制大量基因的新方法。微阵列分为 cDNA 微阵列和寡聚核苷酸微阵列。微阵列技术就是利用分子杂交原理, 使同时被比较的标本(用同位素或荧光素标记)与微阵列杂交, 通过检测杂交信号强度及数据处理, 把他们转化成不同标本中特异基因的丰度, 从而全面比较不同标本的基因表达水平的差异^[21]。微阵列技术是一种探索基因组功能的有力手段^[22]。在蒺藜苜蓿 *M. truncatula* 中首先建立了含有 6359 个 EST 簇的根的微阵列 Mt6k-RIT^[23]。这些序列代表了来源于氮缺乏根的 cDNA 文库、幼小根瘤 cDNA 文库和 AM 菌根 cDNA 文库的 21 473 条 ESTs^[24]。基于花和豆荚随机 cDNA 文库中的 2516 条 ESTs、1776 个 cDNA 克隆经聚合酶链式反应 (PCR) 扩增后补充到

Mt6k-RIT 中, 建立了新的 Mt8k cDNA 芯片, 该芯片上大约有 6300 个 *M. truncatula* 的基因探针^[25]。关于豆科模式植物 *M. truncatula* 的其他基因组表达分析还包括 AM 菌根的 2.5 k cDNA 宏阵列和 6 k 微阵列^[26-27]。近几年来 cDNA 探针逐渐被 70mer 寡聚核苷酸代替^[28]。

2 外生菌根

以欧洲山杨 *Populus tremula* 和毒蝇鹅膏 *Amanita muscaria* 为外生菌根互作研究的模式共生体系中, 已建立了含有 6669 条 ESTs 的随机 cDNA 文库^[29]。以外生菌根真菌 *A. muscaria* 在低氮源的葡萄糖培养基上生长的菌丝和无葡萄糖高氮源培养基上生长的菌丝为对照组, 构建的 SSH cDNA 文库中, 共获得 582 条 ESTs。外生菌根真菌 *Hebeloma cylindrosporum* 建立了不同氮源条件下菌丝生长的随机 cDNA 文库, 共获得 459 条 ESTs^[30]。未来研究可能更多采用差异表达分析策略, 鉴定菌根共生互作过程的活性基因, 这些策略基于高通量 EST 测序、EST 聚类 and 注释、菌根相关基因表达的生物信息学分析及基于基因芯片技术的转录组分析。

3 兰科菌根

兰科菌根是一种内生菌根, 主要寄生于兰科 (Orchidaceae) 植物的种子及根系上。目前已开展对兰科菌根真菌的分类及真菌资源多样性、兰科菌根的形态和菌根对兰科植物的效应等最新的研究^[31]。研究表明, 感染兰科植物根部并能与之共生的真菌绝大多数属于担子菌门 (Basidiomycota) 和半知菌门 (Deuteromycotina), 也有部分属于子囊菌门 (Ascomycota); 兰科菌根的形成可分为两种情况: 一是对兰科植物种子的侵染; 二是对成长新根的侵染^[32]。菌根真菌对兰科植物的种子萌发和植株生长发育均有一定影响。

遗传信息的丰富不仅有利于发现功能基因, 也对未来基因组注释有帮助, 对观赏性兰花黄花杓兰 *Cypripedium flavum* 菌根形成的差异基因表达研究中, 首次获得兰科菌根共生相关差异表达 ESTs^[33]。以 11 种蝴蝶兰属兰花的 cDNA 文库中的 37 979 342 条序列^[34]构建了兰科数据库 OrchidBase, 其中 41 310 条 ESTs 是由 Sanger 法获得的, 37 908 032 条 ESTs 由第二代测序技术获得, 包括 Roche 454 测序技术和 Solexa Illumina 测序技术所获得的 ESTs 经过聚类分

析,分为8501个重叠群(contigs)和76 116单一序列(singletons),平均片段长度为459 bp。该数据库是基于网络的兰科 EST 数据库,不仅能查询到相关的 EST 数据信息,还提供了聚类信息、功能注释、基因分析(gene ontology)和代谢途径分析^[35-36]。兰科数据库是第一个在线的兰科 EST 序列整合信息库,可以自由地上网或下载相关数据信息^[37]。从基因的分子水平和功能分析水平上都为兰科植物研究提供了丰富的遗传数据信息。

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 为兰科(Orchidaceae)石斛属 *Dendrobium* 名贵药材,其种子细小如粉,自然条件下需共生真菌侵染以提供萌发所需的碳、氮源等营养元素。真菌侵染兰科植物种子,形成共生关系是兰科种子萌发的前提,但共生理尚不清楚。在分子水平上揭示兰科种子共生萌发成为近来科学界关注的热点。赵明明等(2013)以铁皮石斛种子接种蜡壳菌属真菌 *Sebacina* sp. 共生萌发至第三阶段的组织样品成功构建抑制性差减杂交 cDNA 文库。测序分析共获得 1437 个 EST 标签,聚类拼接得到 1074 个 unigenes,包括 172 个重叠群(contigs)和 902 个单一序列(singletons)。真核生物蛋白相邻类聚簇(KOG)数据库近似蛋白功能分类、基因本体(GO)注释及京都基因与基因组百科全书(KEGG)途径分析发现,植物来源蛋白涉及 23 个功能类群,主要包含在信号转导、抗逆境胁迫及代谢等途径中^[38]。

我国丛枝菌根、外生菌根和兰科菌根资源均非常丰富,随着对菌根资源的药用价值和食用价值认识的不断深入,越来越多的学者更加关注菌根互作分子生物学领域的研究,通过高通量测序技术、微阵列技术、差减文库技术深层挖掘菌根互作过程中分子水平的基因表达信息,这些研究成果为今后菌根资源的合理开发、利用和保护提供了有力的理论依据。

参考文献

- [1] Smith S E, Read D J. Mycorrhizal Symbiosis[M]. London: Academic Press, 1997.
- [2] Harrison M J. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis[J]. Annual Review of Microbiology, 2005, 59(1): 19-42.
- [3] Gianinazzipearson V, Brechenmacher L. Functional genomics of arbuscular mycorrhiza: decoding the symbiotic c. [J]. Canadian Journal of Botany, 2004, 82(8): 1228-1234(7).
- [4] Franken P, Requena N. Analysis of gene expression in arbuscular mycorrhizas: new approaches and challenges. [J]. New Phytologist, 2001, 150(3): 517-523.
- [5] Barker D G, Bianchi S, Blondon F, et al. Medicago truncatula, a model plant for studying the molecular genetics of the Rhizobium-legume symbiosis[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1990, 8(1): 40-49.
- [6] Handberg K, Stougaard J. Lotus japonicus, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics[J]. Plant Journal, 1992, 2(4): 487-496.
- [7] Tadege M, Ratet P, Mysore K S. Insertional mutagenesis: a Swiss Army knife for functional genomics of Medicago truncatula[J]. Trends in Plant Science, 2005, 10(5): 229-235.
- [8] Udvardi M K, Tabata S, Parniske M, et al. Lotus japonicus: legume research in the fast lane. [J]. Trends in Plant Science, 2005, 10(5): 222.
- [9] Town C D. Annotating the genome of Medicago truncatula[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2006, 9(2): 122.
- [10] Frenzel A, Manthey K, Perlick A M, et al. Combined transcriptome profiling reveals a novel family of arbuscular mycorrhizal-specific Medicago truncatula lectin genes[J]. Molecular plant-microbe interactions: MPMI, 2005, 18(8): 771-782.
- [11] Journet E P, Van T D, Gouzy J, et al. Exploring root symbiotic programs in the model legume Medicago truncatula using EST analysis. [J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(24): 5579-5592.
- [12] Liu J, Blaylock L A, Endre G, et al. Transcript Profiling Coupled with Spatial Expression Analyses Reveals Genes Involved in Distinct Developmental Stages of an Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis [J]. Plant Cell, 2003, 15(9): 2106-2123.
- [13] Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(12): 6025-6030.
- [14] Wulf A, Manthey K, Doll J, et al. Transcriptional changes in response to arbuscular mycorrhiza development in the model plant Medicago truncatula[J]. Molecular plant-microbe interactions: MPMI, 2003, 16(4): 306-314.
- [15] Brechenmacher L, Weidmann S, Tuinen D V, et al. Expression profiling of up-regulated plant and fungal genes in early and late stages of Medicago truncatula-Glomus mosseae in-

- teractions[J]. *Mycorrhiza*, 2004, 14(4): 253-262.
- [16] Breuninger M, Requena N. Recognition events in AM symbiosis; analysis of fungal gene expression at the early appressorium stage[J]. *Fungal Genetics & Biology* Fg & B, 2004, 41(8): 794-804.
- [17] Ouziad F, Hildebrandt U, Schmelzer E, et al. Differential gene expressions in arbuscular mycorrhizal-colonized tomato grown under heavy metal stress[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2005, 162(6): 634-649.
- [18] Hildebrandt U, Ouziad F, Marnier F J, et al. The bacterium *Paenibacillus validus* stimulates growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* up to the formation of fertile spores[J]. *Fems Microbiology Letters*, 2006, 254(2): 258-267.
- [19] Martin F, Podila G K. Symbiotic Sequencing for the *Populus Mesocosm*[J]. *New Phytologist*, 2004, 161(2): 330-335.
- [20] Lammers P, Tuskan G A, Difazio S P, et al. Mycorrhizal symbionts of *Populus* to be sequenced by the United States Department of Energy's Joint Genome Institute. [J]. *Mycorrhiza*, 2004, 14(1): 63-64.
- [21] Lam S H, Mathavan S, Gong Z. Zebrafish Spotted-Microarray for Genome-Wide Expression Profiling Experiments. Part I: Array Printing and Hybridization[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2009, 546(546): 175-195.
- [22] Quackenbush J. Microarray data normalization and transformation[C]// *Nat Genet*. 2002.
- [23] Küster H, Hohnjec N, Krajinski F, et al. Construction and validation of cDNA-based Mt6k-RIT macro- and microarrays to explore root endosymbioses in the model legume *Medicago truncatula*. [J]. *Journal of Biotechnology*, 2004, 108(2): 95-113.
- [24] Yahyaoui F E, Amor B B, et al. Expression Profiling in *Medicago truncatula* Identifies More Than 750 Genes Differentially Expressed during Nodulation, Including Many Potential Regulators of the Symbiotic Program[J]. *Plant Physiology*, 2004, 136(2): 3159-3176.
- [25] Firmhaber C, Küster H. EST sequencing and time course microarray hybridizations identify more than 700 *Medicago truncatula* genes with developmental expression regulation in flowers and pods. [J]. *Planta*, 2005, 222(2): 269-283.
- [26] Lohar D P, Sharopova N, Endre G, et al. Transcript analysis of early nodulation events in *Medicago truncatula*. [J]. *Plant Physiology*, 2006, 140(1): 221-234.
- [27] Colebatch G, Kloska S, Trevaskis B, et al. Novel aspects of symbiotic nitrogen fixation uncovered by transcript profiling with cDNA arrays[J]. *Mol Plant Microbe Interact*. 2002, 15(5): 411-420.
- [28] Alba R, Fei Z, Payton P, et al. ESTs, cDNA microarrays, and gene expression profiling: tools for dissecting plant physiology and development [J]. *Plant Journal*, 2004, 39(5): 697-714.
- [29] Grunze N, Willmann M, Nehls U. The Impact of Ectomycorrhiza Formation on Monosaccharide Transporter Gene Expression in Poplar Roots [J]. *New Phytologist*, 2004, 164(1): 147-155.
- [30] Wipf D, Benjdia M, Rikirsch E, et al. An expression cDNA library for suppression cloning in yeast mutants, complementation of a yeast *his4* mutant and EST analysis from the symbiotic basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum* [J]. *Genome*. 2003, 46(2): 177-181.
- [31] Wipf D, Benjdia M, Rikirsch E, et al. An expression cDNA library for suppression cloning in yeast mutants, complementation of a yeast *his4* mutant, and EST analysis from the symbiotic basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum*[J]. *Genome / National Research Council Canada = Génome / Conseil national de recherches Canada*, 2003, 46(2): 177.
- [32] Delseny M, Han B, Yueie H. High throughput DNA sequencing: the new sequencing revolution. [J]. *Plant Science An International Journal of Experimental Plant Biology*, 2010, 179(5): 407-422.
- [33] Watkinson J I, Welbaum G E. Characterization of gene expression in roots of *Cypripedium parviflorum* var. *pubescens* incubated with a mycorrhizal fungus [J]. *Acta Horticulturae*, 2003, 624(64): 463-470.
- [34] Hsiao Y Y, Tsai W C, Kuoh C S, et al. Comparison of transcripts in *Phalaenopsis bellina* and *Phalaenopsis equestris* (Orchidaceae) flowers to deduce monoterpene biosynthesis pathway[J]. *BMC Plant Biology*, 2006, 6(1): 14.
- [35] Otero J T, Flanagan N S. Orchid diversity-beyond deception[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2006, 21(2): 65-66.
- [36] Peakall R. Speciation in the Orchidaceae: confronting the challenges[J]. *Mol Ecol*. 2007, 16(14): 2834-2837.
- [37] Tsai W C, Hsiao Y Y, Lee S H, et al. Expression analysis of the ESTs derived from the flower buds of *Phalaenopsis equestris*[J]. *Plant Sci*. 2006, 170(3): 426-432.
- [38] Yu H, Goh C J. Molecular genetics of reproductive biology in orchids[J]. *Plant Physiology*, 2001, 127(127): 1390-1393.

(收稿日期 2017-05-11)