丛枝菌根真菌*Rhizophagus irregularis*菌丝分泌物可诱导解磷细菌*Rahnella aquatilis*向菌丝移动

孙宁康[†], 江飞焰[†], 张林, 冯固^{*}

中国农业大学资源与环境学院, 北京 100193

[†] 同等贡献

^{*} 联系人, E-mail: fenggu@cau.edu.cn

2021-06-17 收稿, 2021-07-14 修回, 2021-07-15 接受, 2021-07-19 网络版发表

国家自然科学基金(U1703232, 32011530457)资助

摘要 丛枝菌根真菌(AM真菌)和菌丝际解磷细菌是土壤中广泛存在的功能类微生物, 两者通过合作能帮助植物获取更多磷, 改善植物的磷素营养. AM真菌将来自植物的碳水化合物分泌到菌丝际, 招募解磷细菌在菌丝际定殖并共同完成土壤难溶性磷的活化利用, 但菌丝分泌物吸引解磷细菌向菌丝移动的机制仍不清楚. 为了理解解磷细菌向菌丝移动过程中的趋化性作用, 本文利用3D打印微流体芯片, 研究菌丝分泌物对解磷细菌的趋化作用, 揭示解磷细菌在土壤中向菌丝际移动并定殖的过程. 试验结果表明, 菌丝分泌物存在时解磷细菌的趋化性系数(C/C_0)为0.243, 而无菌丝分泌物对照组的趋化性系数仅为0.033; 解磷细菌接触菌丝分泌物2 h后, 其控制趋化性运动的组氨酸蛋白激酶基因*CheA*和连接蛋白基因*CheW*表达水平分别上调了4和2倍. 上述结果表明, AM真菌对解磷细菌的招募涉及趋化性过程, 菌丝分泌物中存在趋化因子并能够吸引解磷细菌的趋向性移动.

关键词 丛枝菌根真菌, 解磷细菌, 菌丝分泌物, 趋化性, 微流体芯片

丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhiza fungi, 简称AM真菌)是生态系统中最为常见的微生物之一, 能够与80%以上的陆地植物形成共生关系^[1,2]. AM真菌的根外菌丝在土壤中形成庞大的菌丝网络, 到达植物根系不能进入的土壤孔隙中, 扩大根系对养分的吸收范围^[3]; AM真菌还能分泌有机酸阴离子^[4], 活化土壤中难溶性无机磷. 土壤中还存在大量有机磷, 需要经过磷酸酶水解成正磷酸根才能被AM真菌吸收利用^[5]. 而目前研究表明, AM真菌或许不能直接利用有机磷, 如对AM真菌模式菌株*Rhizophagus irregularis* DAOM 197198的基因组分析发现其缺少编码植酸酶的基因^[6]. 通过显微镜观察、高通量测序等方式发现, AM真菌菌

丝际有多种解磷细菌定殖^[7~11], 它们能分泌磷酸酶, 活化土壤中的有机磷^[12~14]. 因此AM真菌可以通过与解磷细菌合作, 实现对有机磷的活化利用. AM真菌通过产生菌丝分泌物, 主动招募解磷细菌在菌丝际定殖, 为其提供碳营养, 从而建立两者间以碳磷交换为基础的合作关系, 但维持合作的机制仍亟待揭示.

土壤中磷呈异质性分布. 解磷细菌依靠其鞭毛运动在土壤中的迁移范围十分有限, 因为土壤颗粒表面的水膜厚度与连续性的不足严重限制了细菌的移动. AM真菌根外菌丝网络不仅能够作为解磷细菌的定殖场所, 还能作为细菌在土壤中快速迁移到达养分斑块的“高速公路”. 最近的研究发现, 具有鞭毛的解磷细菌

引用格式: 孙宁康, 江飞焰, 张林, 等. 丛枝菌根真菌*Rhizophagus irregularis*菌丝分泌物可诱导解磷细菌*Rahnella aquatilis*向菌丝移动. 科学通报, 2021, 66: 4157–4168
Sun N K, Jiang F Y, Zhang L, et al. Hyphal exudates of an arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* induce phosphate-solubilizing bacterium *Rahnella aquatilis* to swim towards its hyphae (in Chinese). Chin Sci Bull, 2021, 66: 4157–4168, doi: 10.1360/TB-2021-0579

水生拉恩氏菌(*Rahnella aquatilis*) HX2能够以菌丝及其表面的水膜为载体、以菌丝分泌物作为能量沿着菌丝网络向植酸磷斑块中长距离快速迁移,进而实现了与AM真菌合作促进植酸磷活化利用的目的^[15]。但是,解磷细菌到达菌丝之前,如何受到菌丝分泌物的吸引并在土体中向菌丝迁移仍不清楚。

趋化性(chemotaxis)是细菌在资源异质性分布环境中定向移动的现象^[16],指具有运动能力的细菌在外界化学成分、浓度发生变化时,对物质成分和浓度梯度作出趋向或远离化学物质的响应。该特性使细菌趋向有益刺激,逃避有害刺激^[17]。Zhang等人^[18]发现,腐生真菌能够通过菌丝分泌物趋化根瘤菌移动,并且菌丝的存在为根瘤菌向豆科植物根系的移动提供了路径,以便后续结瘤,但该试验仅对根瘤菌的趋化性进行了定性分析。趋化性在解磷细菌向AM真菌菌丝移动的过程中是否发挥作用目前仍不清楚,即AM真菌菌丝分泌物在土壤中形成的浓度梯度能否吸引解磷细菌向菌丝趋向性移动并定殖?

趋化性的定量分析最早是利用毛细管分析法进行的^[19]。该方法通过毛细管内液体向外扩散形成浓度梯度吸引细菌趋化性移动来完成。由于该方法需要将毛细管内液体取出进行平板涂布,因而误差较大^[20]。微流体技术通过溶液在基底扩散形成稳定的浓度梯度^[21],分析速度快、成本低、消耗低、精度高,受到了广泛应用^[22]。本研究利用转移Ri T-DNA质粒的胡萝卜毛根与AM真菌双重培养体系收集菌丝分泌物,用3D打印的微流体芯片创造菌丝分泌物浓度梯度对解磷细菌进行培养,通过趋化性系数 C/C_0 反映菌丝分泌物对解磷细菌的趋化作用;同时,通过测定菌丝分泌物诱导解磷细菌体内趋化性相关基因(组氨酸蛋白激酶基因*CheA*、连接蛋白基因*CheW*)表达水平的变化。本研究的假设是如果AM真菌菌丝分泌物对解磷细菌存在趋化作用,那么细菌在感受菌丝分泌物时,会作出响应,向菌丝际聚集,其体内*CheA*和*CheW*基因表达会上调。

1 材料方法

1.1 生物试验材料选择与培养

1.1.1 宿主材料

宿主选用转移Ri T-DNA质粒的胡萝卜(*Daucus carota* L.)根器官,克隆为DC2。

1.1.2 供试AM真菌

AM真菌选用*Rhizophagus irregularis* MUCL 43194,由球囊菌门离体保存中心提供(GINCO网址为:<http://www.mycorrhiza.be/ginco-bel>)。*R. irregularis*是一种应用广泛的模式AM真菌菌株,与胡萝卜根在改进的Strullu-Romand(MSR)培养基上共培养(培养基配方见表1)。配制工作液时吸取相应体积的母液,加10 g/L蔗糖, pH调至5.5,固体培养基加3 g/L植物凝胶,121°C下灭菌20 min,侵染的胡萝卜根段被选用于试验材料。

1.1.3 供试解磷细菌

解磷细菌菌种选用水生拉恩氏菌(*Rahnella aquatilis*) HX2。该细菌分离自北京葡萄园土壤,由中国农业大学资源与环境学院郭岩彬教授提供。该细菌全基因组已经测序^[23],已通过电激转化的方法将含有表达绿色荧光蛋白(GFP)基因的质粒pSMC21转到细菌*R. aquatilis*体内。通过荧光显微镜可以观测*R. aquatilis*在微流体

表1 改进的Strullu-Romand(MSR)培养基母液配方

Table 1 Concentration of stock solutions to prepare the modified Strullu-Romand (MSR) medium

	成分	母液浓度 (g/L)	配1 L 营养液需母液 体积(mL)
大量元素	KNO ₃	7.6	10
	KCl	6.5	
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	73.9	
	KH ₂ PO ₄	0.41	
Ca	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	35.9	10
Fe	NaFeEDTA	1.6	5
微量元素	MnSO ₄ ·4H ₂ O	2.45	1
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.28	
	H ₃ BO ₃	1.85	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.22	
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.034	
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0024	
维生素	泛酸钙	0.18	5
	生物素	0.18×10 ⁻³	
	维生素B ₆	0.18	
	维生素B ₁	0.2	
	氰钴胺	0.08	
	烟酸	0.2	

板中的移动、聚集情况。

1.2 微流体装置的制作

由于菌丝分泌物数量少, 并且毛细管法不易操作、无法形成稳定准确的浓度梯度, 本研究用3D打印机制作了微流体芯片(图1)用于检测解磷细菌的趋化性。微流体芯片的构建参照Lambert^[24]的方法。每个微流体模板由3×3个孔构成, 每个孔直径为6.8 mm, 深度为3 mm, 能容纳约110 μL 液体。不同孔的行间距为17 mm(中心之间), 列间距为9 mm。每个孔上方的接口直径为800 μm , 深度为1.6 mm。利用3D打印获得微流体模板后, 向模板内倒入26 g聚二甲基硅氧烷(PDMS)材料, 在40℃条件下放置过夜凝固, 用刀片将凝固后的PDMS板切割并从模板中取出。利用等离子清洗机/消毒机, 在氧等离子体下放置5 min, 以将PDMS板键合到消毒玻片(75 mm×50 mm×1 mm)中心, 并在玻片外围黏合PDMS材料围栏, 高度为3 mm, 同时在紫外灯下灭菌。在90℃条件下放置10 min加速共价键的形成, 完成后

该微流体芯片便可在室温下储存至使用。

1.3 试验一: 菌丝分泌物收集

为了消除双分格培养体系收集菌丝分泌物过程中根系分泌物扩散进入菌丝室带来的污染, 本试验参照Jiang等人^[15]的方法, 利用双层培养皿(150 mm×15 mm, 90 mm×15 mm)培养AM真菌侵染的胡萝卜毛根来收集菌丝分泌物(图2): 在菌丝室中加入50 mL固体MSR去碳培养基(不含蔗糖、EDTA和维生素), 在根室中加入80 mL固体MSR培养基。本试验为单因素试验设计, 根据菌丝室是否有AM真菌*R. irregularis*菌丝, 包括两个处理: (1) 菌丝室没有AM真菌*irregularis*菌丝(CK); (2) 菌丝室有AM真菌*irregularis*菌丝(+AM真菌)。定期观察, 在根生长靠近培养皿隔断之前将根系挑除。

两个月后, 当菌丝室中大部分基质被AM真菌菌丝覆盖时, 将另一个小培养皿(即90 mm×15 mm, 菌丝分泌物收集室)放在菌丝室下面, 并用烙铁在分泌物室顶部穿两个孔。菌丝通过两个10 mL离心管盖到达分泌物

图1 (网络版彩色)本试验所用的微流体芯片示意图。(a) 微流体芯片中聚二甲基硅氧烷(PDMS)材料板由9个孔构成, 固定在玻片中心, 周围环绕一圈PDMS围栏。(b) PDMS板内孔的平面示意图和单个孔的透视图

Figure 1 (Color online) Fabrication of the microfluidic chip in the experiment. (a) The polydimethylsiloxane (PDMS) in microfluidic chip consists of nine wells centered on a microscope slide and surrounded by a PDMS enclosure. (b) Plan view schematic of wells, and a perspective view of a single

图 2 (网络版彩色)本试验所用的菌丝分泌物收集装置示意图。① 菌丝从根室生长进入菌丝室, 并生长进入小培养皿盖中; ② 菌丝沿着 10 mL 离心管盖进入菌丝分泌物收集室

Figure 2 (Color online) Petri plates system for collecting hyphal exudates. ① Hyphae grow from root compartment (RC) into hypha compartment (HC), then grow into the cap of the small Petri plate; ② hyphae grow into exudate compartment along the cap of a 10 mL tube

室底部的培养基。培养 4 周后, 进行菌丝分泌物的收集。

1.4 试验二: 解磷细菌 *R. aquatilis* 对菌丝分泌物的趋化性

1.4.1 解磷细菌 *R. aquatilis* 在葡萄糖作碳源条件下的生长状况

为了排除细菌生长效应对试验观测的影响, 首先利用葡萄糖溶液对解磷细菌进行培养, 得到解磷细菌的生长曲线, 以确定趋化性试验的观察时间。

在 96 微孔板中不含细菌的边缘孔中加入 200 μL 液体 MSR 培养基 (不含蔗糖、EDTA、和维生素), 避免不同孔间因所加液体体积不同产生误差; 向板中剩余孔内加入 160 μL 培养溶液和 20 μL 超纯水, 之后向孔中加入 20 μL 解磷细菌悬液并混匀。该培养试验为单因素: 用 1 mmol/L 葡萄糖溶液或液体 MSR 培养基 (无碳) 对解磷细菌进行培养。每组处理重复 3 次, 在 37°C 条件下培养细菌, 每半小时用酶标仪测定一次解磷细菌悬液的 A_{600} 值, 共测定 2 h 并记录。

1.4.2 解磷细菌趋化性试验

按照 1.2 节所述方法准备微流体芯片。通过直径为 800 μm 的接口, 在制作好的微流体芯片的一个孔中, 加入 110 μL 解磷细菌悬液。在荧光显微镜下观察并记录

荧光细胞数量 (C_0), 数据处理中将用初始细菌数量 (C_0) 对不同处理的细菌数量进行标准化, 用来量化每个处理中解磷细菌的趋化性聚集。获取初始细菌数量后, 将微流体芯片从显微镜台上取下, 并通过接口向一个临近孔中加入 110 μL 试验三中所收集的菌丝分泌物或对照组中所收集的物质。将芯片放回显微镜台, 此时记作 $t=0$ 。向整个芯片中注满细菌悬液 (因为芯片外围有 3 mm 高的 PDMS 围栏, 因此所注入的细菌悬液不会溢出), 细菌悬液通过接口与孔内物质接触, 因此能够形成稳定的浓度梯度。在培养 45 min 后, 利用奥林巴斯 bx71 倒置显微镜观察记录每个孔内距接口 1.5 mm 处底部的荧光细菌数量 (图 S1)。

为了确定细胞数量, 在实验中准确辨认每张图像中的细胞、去除未聚焦的细胞或者细胞碎片至关重要。为此, 利用图像处理工具 Image J 进行图像处理和分析。首先用带通高斯滤波器对显微镜中获得的图像进行滤波, 以减少高频噪声, 并消除由于照明不均匀或散焦光晕造成的较大对象。然后对处理后的图像进行分隔, 以识别可能的细菌。随后基于平均像素强度和目标区域对这些可能的细菌进行固定筛选, 以列举每个图像中的细胞。手动验证每个图像中的最终细胞数。

为了确定绝对细胞浓度, 需要对所使用细菌的移

动范围进行量化,以便可以根据细胞数量和成像体积来计算细胞浓度。上述细胞的检测取决于门控参数的选择和细胞本身的荧光强度。每个孔中的细胞数量(C)通过在装有细菌悬液孔中测量的初始细菌数量(C_0)进行标准化,利用 C/C_0 来评价解磷细菌的趋化性强弱。

1.5 试验三:菌丝分泌物对解磷细菌*R. aquatilis*趋化性相关基因表达的影响

为了更真实地模拟AM真菌菌丝分泌物对解磷细菌的趋化作用,我们利用双分格培养皿(90 mm×15 mm)培养胡萝卜根(图S2)。培养皿分为根室(RC)和菌丝室(HC),根室中加入25 mL固体MSR培养基,将培养皿倾斜一定角度后于菌丝室中加入4 mL固体MSR培养基(不含蔗糖、维生素)。MSR培养基凝固后形成一定角度的斜坡。在该阶段,培养皿中共有两个处理:(1) RC中有菌根、HC中无*R. irregularis*(RC^{+MR}/HC^{-RI});(2) RC中有菌根、HC中有*R. irregularis*生长(RC^{+MR}/HC^{+RI}),每个处理进行4个重复。

在27°C黑暗条件下培养7周后,当处理 RC^{+MR}/HC^{+RI} 中的AMF根外菌丝延伸至HC的斜坡上时,向HC中加入液体MSR培养基(不含蔗糖、EDTA和维生素),以便根外菌丝在其中生长。向另一个处理的菌丝室内中也加入相同的液体MSR培养基。4周后,HC中基质被AM真菌根外菌丝覆盖时,将其中残留的MSR基质(~9 mL)转移到15 mL离心管中,并用液体MSR培养基(不含Ca(NO_3)₂·4H₂O、蔗糖和维生素)补充至10 mL,同时加入 $2 \text{ mL } 10^8 \text{ CFUs/mL}$ 细菌悬液并混匀。将混匀的12 mL MSR培养基加入到各处理组HC中,与根外菌丝接触,进行原位培养。加入MSR培养基0、0.25、0.5、1、1.5、2 h后,分别收取0.5 mL MSR基质并加入1 mL RNA保护试剂,储存在-80°C条件下用于后续提取RNA测定基因表达水平。该试验为双因素试验设计,即菌丝室中有无AM真菌菌丝和收样时间。

细菌总RNA用RNeasy[®] Mini Kit(Qiagen)提取,按照试剂盒的步骤进行操作。用TURBO DNA-freeTM Kit (Ambion)取出得到的RNA中可能存在的DNA污染,用300 ng RNA合成cDNA。反转录用Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit(Roche),用随机引物,最终体积为20 μL 。设置程序为65°C反应10 min, 55°C反应20 min, 85°C反应5 min杀死酶活性。得到的产物稀释到100 μL 用于定量PCR。

细菌基因的定量表达采用罗氏LightCycler[®] 96孔定

量PCR系统。每一次定量PCR反应采用10 μL 体系,包括2.5 μL cDNA、5 μL 2×FastStart Essential DNA Green Master(Roche)和0.5 μL 正反引物(5 $\mu\text{mol/L}$)。采用的PCR反应程序如下: 95°C反应600 s, 95°C反应10 s, 60°C反应10 s, 72°C延伸10 s反应45个循环。每一次反应完成后,记录曲线来排除非特异性的PCR产物,本试验所用PCR引物序列见表2。

1.6 数据分析

本试验所有数据均采用Excel 2007进行前期处理,用R. studio、SPSS v. 16.0软件进行数据统计分析。用双因素方差分析判断试验1.4.1节中碳源、培养时间及其交互作用对细菌生长状况的效应。用双因素方差分析判断试验三中收获时间、接种处理及其交互作用对解磷细菌体内趋化性相关基因(*CheA*、*CheW*)表达水平的效应。用 t 检验($P<0.05$)来比较试验1.4.2节中解磷细菌对不同物质的趋化性是否有显著差异。

2 结果

2.1 碳源培养条件下细菌的生长曲线

利用1 mmol/L葡萄糖溶液和液体MSR培养基(不含蔗糖、EDTA和维生素),对解磷细菌*R. aquatilis*培养2 h,每30 min观察一次解磷细菌的生长状况。发现在两种培养条件下,细菌 A_{600} 值在1 h内没有变化;在1 h内每一个时间点,两个处理间的 A_{600} 值也没有显著差异。在用1 mmol/L葡萄糖溶液培养时,细菌 A_{600} 值在1~2 h内显著增加,而在不含葡萄糖的培养条件下,细菌 A_{600} 值在2 h内始终保持稳定;在1 h后的每个时间点上,用1 mmol/L葡萄糖溶液培养的细菌,其 A_{600} 值显著高于对照组(图3,双因素方差分析结果见表S1)。

2.2 解磷细菌*R. aquatilis*对菌丝分泌物的趋化性响应

利用高分辨轨道阱(ThermoFisher Q-Exactive)质谱

表2 本试验所用PCR引物

Table 2 Primers used in this study

引物	引物序列(5'→3')	来源
<i>CheA</i> -F	GGAAGCTCGGCAATCTCGG	本研究
<i>CheA</i> -R	GGTTCGCTGTTCGGCACT	本研究
<i>CheW</i> -F	TCGTGGTTGACGGCGTAT	本研究
<i>CheW</i> -R	GTGCCATTCTTCACTGCTC	本研究

图3 (网络版彩色)解磷细菌*R. aquatilis*在不同碳源培养条件下2 h内的生长状况. 误差线代表标准误差. 两个碳源条件分别为: 液体MSR培养基(不含蔗糖、EDTA、维生素); 1 mmol/L葡萄糖溶液. 星号表示不同碳源处理下RA细菌悬液 A_{600} 值存在显著($P < 0.05$)差异

Figure 3 (Color online) The growth status of PSB *R. aquatilis* under different carbon sources in 2 h. Error bars, $\pm$ SE. Two carbon source treatments are as follows: Liquid MSR medium (without sucrose, EDTA and vitamin); 1 mmol/L glucose solution. Asterisks indicate significant ($P < 0.05$) differences between different carbon source treatments

仪)对1.3节试验一所收集的菌丝分泌物成分进行鉴定. 有AM真菌*R. irregularis*菌丝条件下收集的菌丝分泌物总碳浓度为2.817 mmol/L, 无AM真菌条件下收集液的总碳浓度为0.627 mmol/L, 两个处理之间差异显著; 在有AM真菌的菌丝分泌物中检测到了有机酸、氨基酸、核苷酸等几类物质, 共26种成分(表3).

利用1.3节所述方法进行菌丝分泌物的收集, 并采用微流体芯片构建浓度梯度, 检测*R. aquatilis*对不同接种条件下所收集物质的趋化性. 结果表明, 在45 min内, 菌丝室中存在AM真菌菌丝处理组(+AMF)中收集的菌丝分泌物对解磷细菌*R. aquatilis*的趋化性系数 C/C_0 为0.243, 而菌丝室无AM真菌菌丝处理组(收集到的成分仅有无碳MSR培养基, CK)中收集的物质对解磷细菌*R. aquatilis*的趋化性系数 C/C_0 仅为0.033, 因此AM真菌菌丝分泌物对解磷细菌*R. aquatilis*的趋化作用显著高于对照组, 即解磷细菌*R. aquatilis*对菌丝分泌物有显著的趋化性(图4, t 检验结果见表S2).

2.3 菌丝分泌物对解磷细菌*R. aquatilis*中趋化性相关基因表达的影响

在对照处理(RC^{+MR}/HC^{+RI})中, 基因*CheA*、*CheW*的表达均随时间没有显著变化. 在与菌丝接触的处理

(RC^{+MR}/HC^{+RI})中, 除0~0.25 h显著下降外, 其他时间段两个基因表达均呈逐渐增加的趋势. 在0 h时, 基因*CheA*、*CheW*表达水平在两处理条件之间无显著差异; 在1.5、2 h, AM真菌菌丝显著促进了基因*CheA*、*CheW*的表达, 而在0.25、0.5、1 h三个时间点, 在 RC^{+MR}/HC^{+RI} 处理条件下, 两个基因的表达水平与对照处理组间没有显著差异(图5, 双因素方差分析结果见表S3).

3 讨论

3.1 解磷细菌是否对菌丝分泌物具有趋化性

在细菌的趋化性移动过程中, 主要涉及3个阶段, 即化学受体感受外界刺激、信号转导和鞭毛运动^[25]. 甲基受体蛋白MCPs在感受到外界化学物质浓度梯度后, 将信号通过组氨酸蛋白激酶*CheA*、连接蛋白*CheW*, 传导至反应调节蛋白*CheY*, 从而调控鞭毛的运动^[16]. 因此AM真菌招募解磷细菌的过程中, 很有可能通过菌丝分泌物刺激其体内趋化性相关蛋白基因的表达, 从而促使解磷细菌向菌丝趋向性移动.

为了揭示解磷细菌向菌丝移动的生态过程, 本试验通过微流体芯片, 构建菌丝分泌物浓度梯度, 对解磷细菌*R. aquatilis*进行培养. 结果发现, 存在AM真菌菌丝

表 3 有AM真菌条件下收集的菌丝分泌物成分

Table 3 Chemical components of hyphal exudate collected in AM fungi access compartments

代谢物种类	有机酸	氨基酸	核苷酸	其他物质
	琥珀酸	苯丙氨酸	腺嘌呤	烟酸
	甲基琥珀酸	酪氨酸	鸟嘌呤	左旋肉碱
	2-羟基-4-甲基戊酸	酮亮氨酸	胞苷5'-单磷酸	苯甲酰胆碱
	2-羟基异己酸	L-亮氨酸	脱氧核苷	泛酸
	水杨酸	谷氨酸	2'-脱氧鸟苷5'--磷酸	吉西他滨
	尿酸		黄嘌呤	5'-S-甲硫
代谢物名称	己二酸		脱氧鸟苷	异烟酸根
	2-羟基苯乙酸			香兰
	3-羟基-3-甲基戊二酸			柠檬酸盐
	邻苯二甲酸			芹菜定
	2-异丙基苹果酸			L-5-羟脯氨酸
	2-萘磺酸			
	2-苯并噻唑磺酸

图 4 菌丝分泌物处理45 min解磷细菌 *R. aquatilis* 的趋化性响应。误差线代表标准误差。CK, 无AM真菌 *R. irregularis* 菌丝条件下收集的液体; +AMF, 有AM真菌 *R. irregularis* 菌丝条件下收集的菌丝分泌物。星号表示解磷细菌RA对不同接种条件下所收集物质的趋化性系数存在显著($P<0.05$)差异

Figure 4 (Color online) Chemotactic response of phosphate-solubilizing bacteria *R. aquatilis* treated with hyphal secretion for 45 min. Error bars, $\pm$ SE. Treatment codes are as follows: CK, liquid collected under the condition without arbuscular mycorrhizal fungi, *R. irregularis*; +AMF, mycelial exudates collected under the condition of inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi, *R. irregularis*. Asterisks indicate the chemotaxis index of phosphate-solubilizing bacteria RA to the substances collected under different inoculation conditions was significantly different ($P<0.05$)

分泌物时在倒置显微镜下能明显观察到解磷细菌的聚集, 该条件下解磷细菌的趋化性系数 C/C_0 为对照组的7倍。同时利用葡萄糖作为碳源对细菌进行预培养发现, 细菌在1 h内没有增殖, 表明在显微镜下细菌的聚集是由于受到菌丝分泌物的诱导、趋向性移动引起的。细

菌向菌丝移动的过程中趋化性发挥作用, 其能够帮助细菌感知菌丝分泌物中的某些成分, 从而向菌丝趋化性移动、在菌丝际定殖。

解磷细菌 *R. aquatilis* 在接触菌丝分泌物后, 表现出明显的趋化性, 其体内趋化性相关基因的表达很可能上调。在接种细菌后的不同时间, 测定AM真菌菌丝分泌物对其组氨酸蛋白激酶基因 *CheA*、连接蛋白基因 *CheW* 表达情况的影响。结果发现, *CheA*、*CheW* 表达水平整体呈增长趋势, 进一步说明AM真菌菌丝分泌物可以吸引细菌趋化性移动。目前已经证明, 在根际微生物群落的构建过程中, 植物根系分泌物的成分和微生物对物质利用的偏好性共同发挥作用^[26,27]。而在解磷细菌 *R. aquatilis* 向AM真菌菌丝移动并定殖的过程中, 可能涉及相同的机理, 因此在0.25 h后两种基因表达上调。可能是因为菌丝分泌物中细菌偏好性物质占比升高。但由于我们仅对所收集的菌丝分泌物成分进行了定性分析, 因此无法判断是否是因为分泌物中某种成分的存在或占比导致该现象。未来需要更多试验进行探究。

3.2 菌丝分泌物引起解磷细菌趋化性响应的机制

在AM真菌菌丝际中, 菌丝分泌物不仅能够作为碳源刺激细菌分裂、增加细菌数量^[14,15,18], 其成分中的果糖还能作为信号物质诱导解磷细菌体内磷酸酶基因的

图 5 (网络版彩色)不同碳源条件下,解磷细菌*R. aquatilis*组氨酸蛋白激酶基因*CheA*(a)、连接蛋白基因*CheW*(b)相对表达量。 RC^{+MR}/HC^{-RI} ,根室有菌根,菌丝室中无菌丝; RC^{+MR}/HC^{+RI} ,根室有菌根,菌丝室有菌丝。不同字母表示相同接种处理在不同时间存在显著($P<0.05$)差异;星号表示同一时间 RC^{+MR}/HC^{-RI} 和 RC^{+MR}/HC^{+RI} 处理之间存在显著($P<0.05$)差异

Figure 5 (Color online) Histidine protein kinases gene *CheA* (a) and connexin gene *CheW* (b) expression of *R. aquatilis* growing in different carbon sources. RC^{+MR}/HC^{-RI} , mycorrhizal roots in the root compartment but AMF hyphae omitted from the hyphal compartment; RC^{+MR}/HC^{+RI} , mycorrhizal colonized roots in the root compartment and AMF hyphae permitted into the hyphal compartment. Different letters indicate significant difference ($P<0.05$) among different inoculation treatments; the asterisk shows the significant difference ($P<0.05$) between the average of RC^{+MR}/HC^{-RI} and RC^{+MR}/HC^{+RI}

表达^[28],因此菌丝分泌物的成分可能是引起解磷细菌趋化性的原因。AM真菌的菌丝分泌物成分定性定量分析是菌根研究的热点和难点。有许多研究都对菌丝分泌物的成分进行了定性分析,尽管成分有差异,但主要包括糖类、氨基酸、有机酸三大类含碳化合物^[14,29-31]。AM真菌除了分泌菌丝代谢产物外,还分泌从根系转运来的植物次级代谢物,如类黄酮、梓醇等物质^[32]。本研究通过高分辨轨道阱鉴定菌丝分泌物的成分,主要检

测到了氨基酸和有机酸两类物质。崔庆敏^[33]利用氨基酸化学纯品对解磷细菌*R. aquatilis*进行离体培养,发现酪氨酸、谷氨酸为趋避剂,而酮亮氨酸、亮氨酸为趋向剂,因此在菌丝分泌物中存在的这些氨基酸会影响解磷细菌向菌丝的趋化性移动。Yuan等人^[34]发现,含有机酸的根系分泌物对芽孢杆菌具有明显的趋化作用,其中苹果酸的趋化作用显著,而延胡索酸能够促进细菌生物膜的形成。微生物的趋化性移动、生物膜的形

图 6 (网络版彩色)解磷细菌*R. aquatilis*对菌丝分泌物趋化性响应机理的模式图。① 菌丝向菌丝际释放分泌物,包括糖、氨基酸、有机酸及次级代谢物等;② 解磷细菌感知到菌丝分泌物浓度梯度,其体内基因*CheA*、*CheW*表达上调;③ 解磷细菌鞭毛逆时针旋转,沿菌丝分泌物浓度梯度向菌丝移动

Figure 6 (Color online) Schematic diagram describing the postulated mechanisms of *R. aquatilis* response to hyphal exudates. ① The hyphae release exudates to hyphosphere, including sugars, amino acids, organic acids and secondary metabolites; ② PSB senses the hyphal exudates gradient, and the expressions of *CheA* and *CheW* are upregulated; ③ flagella rotate counterclockwise, leading to smooth swimming towards hyphae

成是细菌定殖不可缺少的过程,因此本研究中检测到菌丝分泌物中存在的有机酸可能也会对解磷细菌*R. aquatilis*向菌丝趋化性移动、在菌丝际定殖有影响。在菌丝分泌物中,除了有机酸、氨基酸、糖类碳源外,还检测到了许多次级代谢物,如类黄酮等。在豆科植物的幼苗期,其根系会分泌类黄酮等次级代谢物物质,能够作为信号分子,诱导根瘤菌向根系移动、促进结瘤^[35],根瘤菌对外源类黄酮也有趋化性,其在根瘤菌与宿主植物共生体形成过程中有显著的影响^[36]。因此,菌丝分泌物中的类黄酮等次级代谢物对解磷细菌向菌丝的趋化性移动以及定殖可能也有影响,未来需要进一步探究。

4 结论

本研究利用3D打印的微流体芯片对解磷细菌*R. aquatilis*培养,并利用双分格培养皿检测AM真菌对细菌趋化性基因表达水平的影响,探究解磷细菌向AM真菌菌丝移动背后的机理。结果发现,AM真菌菌丝分泌物刺激解磷细菌*R. aquatilis*中趋化性相关基因的表达,促进细菌向菌丝的趋化性移动。而这一过程可能会影响解磷细菌在菌丝际的定殖,同时菌丝分泌物中成分的不同会影响细菌中趋化性关键基因的表达水平(图6)。而影响其表达水平的具体成分还未确定,未来需要更多试验进行深入探究。

参考文献

- Smith S E, Read D J. Mycorrhizal Symbiosis. 3rd ed. London: Academic Press, 2008
- Smith S E, Smith F A. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: New paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annu Rev Plant Biol*, 2011, 62: 227–250
- Miller R M, Jastrow J D, Reinhardt D R. External hyphal production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrass prairie communities. *Oecologia*, 1995, 103: 17–23
- Wang P, Shu B, Wang Y, et al. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in red tangerine (*Citrus reticulata* Blanco) rootstock rhizospheric soils from hillside citrus orchards. *Pedobiologia*, 2013, 56: 161–167
- Richardson A E, Hadobas P A, Hayes J E. Acid phosphomonoesterase and phytase activities of wheat (*Triticum aestivum* L.) roots and utilization of organic phosphorus substrates by seedlings grown in sterile culture. *Plant Cell Environ*, 2000, 23: 397–405
- Tisserant E, Malbreil M, Kuo A, et al. Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proc Natl*

- Acad Sci USA, 2013, 110: 20117–20122
- 7 Bianciotto V, Bandi C, Minerdi D, et al. An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 3005–3010
- 8 Artursson V, Jansson J K. Use of bromodeoxyuridine immunocapture to identify active bacteria associated with arbuscular mycorrhizal hyphae. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 6208–6215
- 9 Toljander J F, Artursson V, Paul L R, et al. Attachment of different soil bacteria to arbuscular mycorrhizal fungal extraradical hyphae is determined by hyphal vitality and fungal species. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, 254: 34–40
- 10 Scheublin T R, Sanders I R, Keel C, et al. Characterisation of microbial communities colonising the hyphal surfaces of arbuscular mycorrhizal fungi. *ISME J*, 2010, 4: 752–763
- 11 Gahan J, Schmalenberger A. Arbuscular mycorrhizal hyphae in grassland select for a diverse and abundant hyphospheric bacterial community involved in sulfonate desulfurization. *Appl Soil Ecol*, 2015, 89: 113–121
- 12 Zhang L, Fan J, Ding X, et al. Hyphosphere interactions between an arbuscular mycorrhizal fungus and a phosphate solubilizing bacterium promote phytate mineralization in soil. *Soil Biol Biochem*, 2014, 74: 177–183
- 13 Kaiser C, Kilburn M R, Clode P L, et al. Exploring the transfer of recent plant photosynthates to soil microbes: Mycorrhizal pathway vs direct root exudation. *New Phytol*, 2015, 205: 1537–1551
- 14 Zhang L, Xu M, Liu Y, et al. Carbon and phosphorus exchange may enable cooperation between an arbuscular mycorrhizal fungus and a phosphate-solubilizing bacterium. *New Phytol*, 2016, 210: 1022–1032
- 15 Jiang F, Zhang L, Zhou J, et al. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance mineralisation of organic phosphorus by carrying bacteria along their extraradical hyphae. *New Phytol*, 2021, 230: 304–315
- 16 Porter S L, Wadhams G H, Armitage J P. Signal processing in complex chemotaxis pathways. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9: 153–165
- 17 Fenchel T. Microbial behavior in a heterogeneous world. *Science*, 2002, 296: 1068–1071
- 18 Zhang W, Li X G, Sun K, et al. Mycelial network-mediated rhizobial dispersal enhances legume nodulation. *ISME J*, 2020, 14: 1015–1029
- 19 Adler J, Dahl M M. A method for measuring the motility of bacteria and for comparing random and non-random motility. *J Gen Microbiol*, 1967, 46: 161–173
- 20 Ford R M, Phillips B R, Quinn J A, et al. Measurement of bacterial random motility and chemotaxis coefficients: I. Stopped-flow diffusion chamber assay. *Biotechnol Bioeng*, 1991, 37: 647–660
- 21 Hol F J H, Dekker C. Zooming in to see the bigger picture: Microfluidic and nanofabrication tools to study bacteria. *Science*, 2014, 346: 1251821
- 22 Zang X Q, Li Z Y, Zhang X Y, et al. Advance in bacteria chemotaxis on microfluidic devices (in Chinese). *Chin J Anal Chem*, 2017, 45: 1734–1744 [臧潇倩, 李哲煜, 张笑颜, 等. 基于微流控芯片的细菌趋化性检测研究进展. *分析化学*, 2017, 45: 1734–1744]
- 23 Guo Y, Jiao Z, Li L, et al. Draft genome sequence of *Rahnella aquatilis* strain HX2, a plant growth-promoting rhizobacterium isolated from vineyard soil in Beijing, China. *J Bacteriol*, 2012, 194: 6646–6647
- 24 Lambert B S, Raina J B, Fernandez V I, et al. A microfluidics-based *in situ* chemotaxis assay to study the behaviour of aquatic microbial communities. *Nat Microbiol*, 2017, 2: 1344–1349
- 25 Wadhams G H, Armitage J P. Making sense of it all: Bacterial chemotaxis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5: 1024–1037
- 26 Zhalnina K, Louie K B, Zhao H, et al. Dynamic root exudate chemistry and microbial substrate preferences drive patterns in rhizosphere microbial community assembly. *Nat Microbiol*, 2018, 3: 470–480
- 27 Beattie G A. Metabolic coupling on roots. *Nat Microbiol*, 2018, 3: 396–397
- 28 Zhang L, Feng G, Declerck S. Signal beyond nutrient, fructose, exuded by an arbuscular mycorrhizal fungus triggers phytate mineralization by a phosphate solubilizing bacterium. *ISME J*, 2018, 12: 2339–2351
- 29 Toljander J F, Lindahl B Å D, Paul L R, et al. Influence of arbuscular mycorrhizal mycelial exudates on soil bacterial growth and community structure. *FEMS Microbiol Ecol*, 2007, 61: 295–304
- 30 Bharadwaj D P, Alström S, Lundquist P O. Interactions among *Glomus irregulare*, arbuscular mycorrhizal spore-associated bacteria, and plant pathogens under *in vitro* conditions. *Mycorrhiza*, 2012, 22: 437–447
- 31 Luthfiana N, Inamura N, Tantriani N, et al. Metabolite profiling of the hyphal exudates of *Rhizophagus clarus* and *Rhizophagus irregularis* under phosphorus deficiency. *Mycorrhiza*, 2021, 31: 403–412
- 32 Duhamel M, Pel R, Ooms A, et al. Do fungivores trigger the transfer of protective metabolites from host plants to arbuscular mycorrhizal hyphae? *Ecology*, 2013, 94: 2019–2029
- 33 Cui Q M. Characterization of the *CheA* gene in chemotaxis of *Rahnella aquatilis* strain HX2 (in Chinese). Master Dissertation. Beijing: China Agricultural University, 2014 [崔庆敏. *CheA*基因在水生拉恩氏菌HX2趋化中的作用初探. 硕士学位论文. 北京: 中国农业大学, 2014]
- 34 Yuan J, Zhang N, Huang Q, et al. Organic acids from root exudates of banana help root colonization of PGPR strain *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6. *Sci Rep*, 2015, 5: 13438

- 35 Chou M X, Wei X Y. Review of research advancements on the molecular basis and regulation of symbiotic nodulation of legumes (in Chinese). *Chin J Plant Ecol*, 2010, 34: 876–888 [丑敏霞, 魏新元. 豆科植物共生结瘤的分子基础和调控研究进展. *植物生态学报*, 2010, 34: 876–888]
- 36 An Q, Yin B, Zhang J C, et al. The chemotaxis and nodulation effect of soybean rhizobium on exogenous flavonoids (in Chinese). *Soybean Sci*, 2017, 36: 900–904 [安琦, 殷博, 张介驰, 等. 外源类黄酮对大豆根瘤菌趋化性与结瘤效果的影响. *大豆科学*, 2017, 36: 900–904]

补充材料

图S1 解磷细菌趋化性试验流程图

图S2 不同接种条件对解磷细菌R.a进行培养

表S1 细菌离体培养试验中碳源、时间及其交互作用对解磷细菌生长状况的双因素方差分析表

表S2 细菌趋化性/检验分析表

表S3 细菌趋化性基因表达水平试验中收获时间、接种处理及其交互作用对细菌组氨酸蛋白激酶基因和连接蛋白基因表达效应的双因素方差分析表

本文以上补充材料见网络版csb.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

Summary for “丛枝菌根真菌 *Rhizophagus irregularis* 菌丝分泌物可诱导解磷细菌 *Rahnella aquatilis* 向菌丝移动”

Hyphal exudates of an arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* induce phosphate-solubilizing bacterium *Rahnella aquatilis* to swim towards its hyphae

Ningkang Sun[†], Feiyan Jiang[†], Lin Zhang & Gu Feng^{*}

College of Resources and Environmental Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China

[†] Equally contributed to this work

^{*} Corresponding author, E-mail: fenggu@cau.edu.cn

Arbuscular mycorrhizal fungi (AM fungi) not only form hyphal networks which expand their nutrient absorption range beyond roots, but also release carboxylates or protons to mobilize insoluble inorganic P, then improve plant phosphorus status. However, recent studies show that AM fungi have little ability to use organic P in soil, for example. This is because they don't harbor the genes encoding phytases, which hydrolyze phytate, the predominant form of organic P in agricultural soil, which accounts for about 20%–80% of the total P in a wide range of soils. In order to utilize organic P, AM fungi have to cooperate with phosphate-solubilizing bacteria (PSB), which have a strong ability to produce phosphatase. To maintain the cooperation, AM fungi usually release carbohydrates to soil to recruit PSB to colonize in hyphosphere.

The extraradical hyphae of AM fungi are not only the habitat of PSB, but also the “highway” that helps PSB to move to the organic P patch, by providing a water film to travel in and carbon source for energy in the form of hyphal exudates. However, before moving along the hyphae, how PSB migrate to the hyphae is not clear. Chemotaxis is the ability of microorganisms to sense chemical gradients and move either up the gradient towards the source (attraction) or down the gradient away from the source (repulsion). Here, we investigated whether chemotaxis plays a role in the process of bacteria migrating towards the AM fungal hyphae. We hypothesized that hyphal exudates act as an attractant to PSB, and during the contact process, the expression level of chemotaxis-related genes (e.g., *CheA*, *CheW*) will be upregulated.

Using a microfluidic chip made by 3D printing technology, we observed that in 45 min PSB showed a significant positive response to the hyphal exudates and the chemotactic index (C/C_0) is 0.243, was significantly greater than the control (culture bacteria in the medium without any carbon). Under strict *in situ* culture conditions, after 2 h of contact with the exudates, the expression of the gene-encoding histidine kinases (*CheA*) and connexin (*CheW*) increased 4 and 2 folds, respectively. These results provide evidence that hyphal exudates are an attractant and PSB can migrate up the exudates gradient. Our results suggest, for the first time, that the process of AM fungi *R. irregularis* recruiting phosphate-solubilizing bacteria *R. aquatilis* involves chemotaxis, and some chemokines in hyphal exudates can attract bacteria to swim chemotactically.

arbuscular mycorrhiza fungi, phosphate-solubilizing bacteria, hyphal exudates, chemotaxis, microfluidic chip

doi: [10.1360/TB-2021-0579](https://doi.org/10.1360/TB-2021-0579)