

# 杨树根系-真菌互作体系构建方法

## Method for constructing poplar-root fungus interaction system

何兴华<sup>1,2#</sup>, 单晓亮<sup>1,2#</sup>, 彭龙<sup>1,2</sup>, 袁志林<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> 林木遗传育种国家重点实验室, 中国林业科学研究院, 北京; <sup>2</sup> 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 杭州

\*通讯作者邮箱: [yuanzl@caf.ac.cn](mailto:yuanzl@caf.ac.cn)

#共同第一作者/同等贡献

**摘要:** 杨树 (*Populus*) 是重要的造林树种, 也是研究林木基础生物学性状的模式材料。此外杨树可与多种真菌 (外生菌根真菌、丛枝菌根真菌和内生真菌) 类群建立共生关系。目前, 在杨树-真菌互作体系中, 通过构建杨树-双色蜡蘑 (*Laccaria bicolor*) 和卷缘桩菇 (*Paxillus involutus*) 互惠共生提高杨树非生物胁迫能力的生理机制方面的研究已取得多项突破, 而关于杨树-根系内生真菌互作的研究较少。我们构建了杨树-根系真菌悉生共生体系, 为揭示树木和根系真菌之间互惠共生机制提供理想模型。该体系能够基于不同目的使用不同培养容器来研究真菌对树木的影响, 这在现有的树木-外生菌根共生体系中很少见。构建杨树-真菌互作体系是研究一系列如共生真菌侵染结构观察、互作转录组研究等生物学问题的关键, 并且有助于加深理解共生真菌对林木表型和生理代谢的表观遗传学调控机制。

**关键词:** 杨树, 真菌, 互作体系

## 材料与试剂

1. 琼脂 (北京鼎国昌盛生物技术有限公司, DING GOU, catalog number: DH010)
2. 葡萄糖 (上海麦克林生化科技有限公司, 麦克林, catalog number: D810588)
3. 硫酸链霉素 (GENVIEW 公司, GENVIEW, catalog number: AS325)
4. 盐酸四环素 (上海麦克林生化科技有限公司, 麦克林, catalog number: D807503)
5.  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (国药集团化学试剂有限公司, 沪试, catalog number: 6484522)
6.  $\text{KNO}_3$  (国药集团化学试剂有限公司, 沪试, catalog number: 10017218)

- 30 7.  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (国药集团化学试剂有限公司, 沪试, catalog number: 20011160)
- 31 8.  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (国药集团化学试剂有限公司, 沪试, catalog number: 10013018)
- 32 9.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( 国药集团化学试剂有限公司, 沪试, catalog number: 10017618)
- 33 10. KI (国药集团化学试剂有限公司, 沪试, catalog number: 10017160)
- 34 11.  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (上海麦克林生化科技有限公司, 麦克林, catalog number: B802544)
- 35 12.  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (上海沃凯化学试剂有限公司, 沃凯, catalog number: B22081)
- 36 13.  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Sigma 公司, Sigma, catalog number: Z0251)
- 37 14.  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (国药集团化学试剂有限公司, 沪试, catalog number: 10019818)
- 38 15.  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (国药集团化学试剂有限公司, 沪试, catalog number: 10008218)
- 39 16.  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Sigma 公司, Sigma, catalog number: 31277)
- 40 17.  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (国药集团化学试剂有限公司, 沪试, catalog number: 10012116)
- 41 18.  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Sigma 公司, Sigma, catalog number: E6635)
- 42 19. IBA (Sigma 公司, Sigma, catalog number: V9003250)
- 43 20. 封口膜 (Polysciences Inc 公司, Parafilm, catalog number: PM996)
- 44 21. PDA 培养 (见溶液配方)
- 45 22. 土豆汁 (见溶液配方)
- 46 23. IBA 母液 (见溶液配方)
- 47 24. 20×大量元素 (见溶液配方)
- 48 25. 100×微量元素 (见溶液配方)
- 49 26. 100×铁盐母液 (见溶液配方)
- 50 27. 杨树-真菌共培养培养基 (见溶液配方)
- 51 28. 改良 MS 生根培养基 (见溶液配方)

52

## 53 仪器设备

- 54 1. 培养箱 (上海博讯, 产品型号: SPX-250B-Z)
- 55 2. 光照培养箱 (宁波扬辉, 产品型号: RDN-1500B)
- 56 3. 立式压力蒸汽灭菌器 (上海申安, 产品型号: LDZF-50KB-II)
- 57 4. PC 材料广口组培瓶 (带瓶盖, 体积 480 ml)
- 58 5. 一次性塑料培养皿 (直径 90 mm)

## 实验步骤

### 一、真菌材料的准备

#### 1. 菌饼接种剂准备

1.1 PDA 培养基灭菌后取出，室温下放置，待培养基温度约 45 °C 后，倒入 15 ml PDA 培养基至一次性塑料培养皿中，待培养基凝固后（约 1 h 后），进行接种处理。

1.2 使用接种针从纯培养真菌菌落边缘挑取菌块，接种至 PDA 固体培养基表面，置于培养箱 26 °C 黑暗条件下培养。

1.3 待培养 7 d 后，自菌落边缘使用打孔器（直径 7 mm）取菌饼作接种剂。

### 二、杨树幼苗无性系组培扩繁

#### 1. 杨树无性系组培苗生根培养和继代繁殖

采用组培快繁的方法在短期内获得优质杨树无菌幼苗。以美洲黑杨杂种优良无性系 NL895 杨 (*Populus deltoides* × *P. euramericana* cv. 'Nanlin895', NL895) 和毛白杨 (*P. tomentosa*) 为例。

1.1 超净工作台紫外消毒后，将杨树组培苗幼茎（带叶片）剪断，高度约为 2 cm，转接至改良 MS（秦媛，2017）生根培养基（配方见表 1）中，使组培苗直立，并尽量避免叶片碰到培养基，每个组培瓶扦插 3-4 株幼茎，盖上组培瓶盖。转移到组培室中，保持温度 25 °C，湿度 60 %，设置光周期 12 h（光照强度为 20,000 Lx）。

1.2 幼苗生根培养 3 周左右，苗高达到 5-6 cm 后，将组培苗取出进行继代繁殖。操作步骤同上。然后选取根系大小、发达程度和株高（5-6 cm）较一致的无菌幼苗，进行共培养接种实验。

### 三、杨树无菌幼苗-根系真菌互作体系构建

#### 1. 大培养皿共培养体系

1.1 超净工作台紫外消毒后，无菌大培养皿（直径 150 mm）中倒入 100 ml 杨树-真菌共培养培养基，使培养基在大培养皿中凝固后呈斜面（如图 1 所示）。

1.2 将挑选的根系和株高较为均一的杨树无菌幼苗用镊子轻轻取出，用无菌水小心洗除幼苗根部的琼脂，转接至大培养皿共培养基表面，每皿 3 株幼苗。使无菌苗根系贴附于共培养基表面，地上部分放置于不含共培养基的一侧 (如图 1 所示)，用封口膜进行密封，防止污染。然后转移至光照培养箱中，25 °C，设置光周期 12 h (光照强度为 20, 000 Lx)，培养 7 d。

1.3 待培养 7 d 后，将步骤一中获得的菌饼接种剂，随机挑取 5 个均匀转接至根系周围 (菌饼距皿壁约 1.5 cm，如图 1 所示)，对照组接种无菌 PDA 琼脂块，用封口膜进行密封，防止污染。再次转移至光照培养箱中，25 °C，设置光周期 12 h (光照强度为 20, 000Lx)，继续培养。根据自身实验要求设计共培养时间，然后取样进行生理指标的测定。

## 2. 大试管共培养体系

超净工作台紫外消毒后，无菌玻璃大试管 (直径 25 mm，长度 240 mm，瓶口带透气硅胶塞)中倒入 60 ml 杨树-真菌共培养基，待培养基凝固后待用。将步骤二挑选的根系和株高较为均一的杨树无菌幼苗用镊子轻轻取出，放入装有无菌水的玻璃大培养皿中，小心洗除根部的琼脂，并用无菌滤纸吸干表面水份后，转接至大试管共培养基表面，并使无菌苗根系贴附于共培养基表面 (如图 2 所示)。大试管瓶口用透气硅胶塞封口，并在透气硅胶塞上盖一层锡箔纸，再用塑料保鲜膜进行密封，防止污染。而后，转移至光照培养箱中，25 °C，设置光周期 12 h (光照强度为 20,000 Lx)，培养 7 d。待培养 7 d 后，接种真菌菌株，每株无菌幼苗仅接种 1 个菌饼。

*注：大培养皿体系主要目的是用于直观的观测根系内生菌对树木根系的促生作用，而大试管体系的目的是使根系内生菌完全侵染根系后可用于盆栽试验 (耐盐、耐旱等)。*

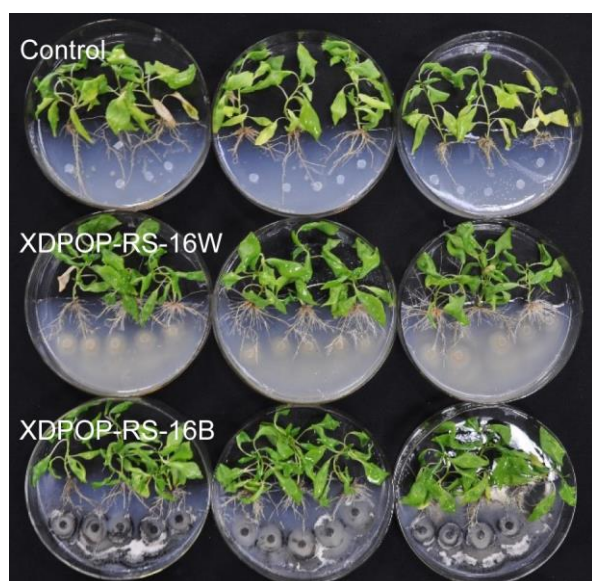


图 1. 大培养皿杨树 (NL895 杨)-真菌共培养体系

该图为共培养 21 天后的 NL895 杨生长状态。Control: 空白对照组; XDPOP-RS-16W 和 XDPOP-RS-16B 为根际壳多孢霉 (*Stagonosporopsis rhizophylae*) 处理组, 该菌株能够显著促进 NL895 杨根系的生长发育。

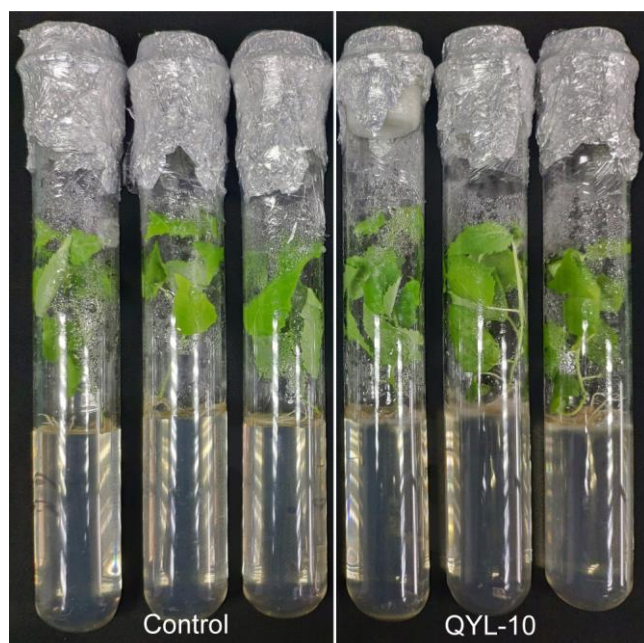


图 2. 大试管杨树 (毛白杨)-真菌共培养体系



该图为共培养 7 天后的毛白杨生长状态。Control: 空白对照; QYL-10 为荷伯生氏斜盖伞 (*Clitopilus hobsonii*) 处理组, 该菌株可以显著提高毛白杨的钾离子吸收。

## 溶液配方

### 1. PDA 培养基

马铃薯 200 g (去皮煮熟后过滤取汁液)

葡萄糖 20 g

琼脂 15 g

加超纯水定容至 1 L, 用 0.1 M NaOH 溶液调 pH 至 7.0, 115 °C 高温高压灭菌 20 min。

### 2. 土豆汁配制

马铃薯 200 g (去皮煮熟后过滤取汁液)

加超纯水定容至 1 L。

### 3. 0.5 mg/ml IBA 母液配制 (w/v)

IBA 粉末 0.025 g

先溶解于 1 ml 95 %酒精中, 再定容至 50 ml, 4 °C 避光保存。

注: 若有沉淀, 65 °C 水浴加热后使用。

### 4. 20×大量元素 (w/v)

NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 33 g

KNO<sub>3</sub> 38 g

CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 8.8 g

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 7.4 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.4 g

加超纯水定容至 1 L, 4 °C 保存备用。

### 5. 100×微量元素 (w/v)

KI 0.083 g

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.62 g

MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 1.69 g

ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.86 g

150         $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$             0.025 g

151         $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$             0.0025 g

152         $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$             0.0025 g

153        加超纯水定容至 1 L, 4 °C 保存备用。

154    6. 100×铁盐母液 (w/v)

155         $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$             2.78 g

156         $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$         3.73 g

157        加超纯水定容至 1 L, 4 °C 保存备用

158    7. 杨树-真菌共培养培养基

159        土豆汁                        100 ml

160        蔗糖                            1 g

161        葡萄糖                        1 g

162         $\text{NH}_4\text{NO}_3$                     0.33 g

163         $\text{KNO}_3$                         0.38 g

164         $\text{KH}_2\text{PO}_4$                     0.272 g

165         $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$             0.088 g

166         $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$             0.074 g

167        100×微量元素                2 ml

168        100×铁盐溶液                2 ml

169        VB1                             $0.01 \times 10^{-2}$  g

170        琼脂                            10 g

171        超纯水定容至 1 L, 用 0.1 M NaOH 溶液调 pH 5.8, 115 °C 高温高压灭菌 20

172        min。

173        待培养基常温冷却至 45 °C 左右, 加入终浓度分别为 0.02 g/L 和 0.008 g/L 的硫酸

174        链霉素和盐酸四环素, 抑制细菌污染。趁热分装至大试管或大培养皿中, 分装至大

175        培养皿时, 将大培养皿倾斜约 20 °待培养基凝固, 使培养基在大培养皿中形成斜

176        面。

177    8. 改良 MS 生根培养基

178        20×大量元素                25 ml

179        100×微量元素        10 ml  
 180        100×铁盐母液        10 ml  
 181        蔗糖        20 g  
 182        琼脂        10.1 g  
 183        加超纯水定容至 1 L，用 0.1 M NaOH 溶液调 pH 5.8，对应加入 300 μl (NL895 杨)  
 184        或 100 μl (毛白杨) 0.5 mg/ml IBA，121 °C 高压灭菌 30 min。  
 185        注：大培养皿体系与大试管体系的共培养培养基均高压灭菌后，待培养基常温冷却  
 186        至 45 °C 左右，加入抗生素，而后分装至容器中。

187

## 188 致谢

189    本工作的顺利开展得益于国家自然科学基金项目 (资助号：31722014)和中央非营利性  
 190    研究基础研究基金 (资助号：CAFYBB2020ZY002-1 和 CAFYBB2019ZA001-3)的经费  
 191    支持，实验方案改编自中国林科院秦媛硕士发表的论文。

192

## 193 参考文献

194    1. 袁志林, 潘雪玉, 靳微. (2019). [林木共生菌系统及其作用机制——以杨树为例](#). 生  
 195        态学报, 39(01), 385-401.

196    2. 秦媛. (2017). [盐碱地植物共生微生物资源及功能初步研究](#). 中国林业科学研究院

197

198