

利用无菌植物和可培养细菌体系研究根系微生物组功能

Utilization of Axenic Plants and Cultivated Bacteria for Studying Root Microbiota's Function

徐浩然^{1, 2, 3, 4, #}, 张婧赢^{1, 2, 3, #}, 曲宝原^{1, 2, 3}, 刘永鑫^{1, 2, 3}, 白洋^{1, 2, 3, 4, *}

¹植物基因组学国家重点实验室, 种子创新研究院, 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京; ²生物
互作卓越创新中心, 中国科学院大学, 北京; ³中国科学院-英国约翰英纳斯中心植物和微生物科学联合
研究中心, 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京; ⁴现代农学院, 中国科学院大学, 北京

*通讯作者邮箱: ybai@genetics.ac.cn

#共同第一作者/同等贡献

摘要: 自然界中, 正常生长的植物根系富集了大量且种类繁多的微生物。这些存在于根
系表面或内部的微生物编码了数量庞大的功能基因, 在植物生长、营养吸收以及抗逆等
方面发挥着重要作用。随着植物微生物组的研究不断深入, 微生物组在植物营养吸收及
抵抗疾病过程的功能逐渐被报道, 本文建立了一种利用无菌培养体系研究微生物功能的
方法。此方法可在可控的实验室条件下可重复的研究微生物组的功能及植物与其微生物
组的互作, 对阐明微生物功能及植物与微生物的互作机理有重要意义。

关键词: 无菌培养体系, 微生物功能, 植物与微生物互作

研究背景

以群落形式聚集于植物根内或根表的根系微生物组(Microbiota)以其促进植物生
长、帮助植物营养吸收(Zhang et al., 2019)、抵抗极端环境(Xu et al., 2018)、抵抗疾
病(Paloma et al., 2018)等重要作用, 对植物的生长发育过程产生广泛的影响。因此,
研究根系微生物组与植物间的关系有着重要价值。生态学方法通常直接研究植物与根
系微生物的整体, 这对于揭示自然环境中微生物组的组成结构等至关重要。而相比之
下, 使用将微生物组成员的个体或集合接种至无菌植物的还原法思想则可以规避一些
不可控变量, 将微生物组和植物间的互作分解为可控变量如接种的微生物种类、植物
种类及基因型、添加的营养条件等。目前, 大量植物的微生物组成员被分离培养(Bai
et al., 2015; Zhang et al., 2019), 这使得使用还原法深入阐释植物与微生物组的互作
的因果关系、剖析微生物组成员间的相互作用成为可能。本文提供了使用无菌植物和

可培养细菌体系研究根系微生物功能的实验思路及方法，此方法可以用于研究植物和微生物组间的相互作用。

材料与试剂

1. 乙醇 (SIGMA, catalog number: E7023-500ML)
2. 次氯酸钠 (Macklin, catalog number: S828471)
3. Murashige Skoog 培养基（含维生素） (MS, Caisson, catalog number: MSP09)
4. 木村 B 培养基 (Coolaber, catalog number: NSP1050-2000L)
5. 胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB, OXOID, catalog number: CM0129)
6. 琼脂粉 (SIGMA, catalog number: A7921-100G)
7. 植物凝胶 (Caisson, catalog number: G024-1KG)
8. 蔗糖 (HuShi, catalog number: JC-SJ03064)

仪器设备

1. 超净工作台 (Thermo Fisher Scientific, catalog number: 51029701)
2. 灭菌袋 (Sun bag, SIGMA, catalog number: B7026-100EA)
3. 移液器枪头 (Nuclease-free, 10, 200, 1000 μ l; Axygen, catalog number: T-300, T-200-Y, T-1000-B)
4. 130 mm 方形培养皿 (MaiSiNuo, catalog number: HZX064-1)
5. 60 mm 圆形培养皿 (Corning, catalog number: 430166)
6. 1 L 试剂瓶 (Cleman, catalog number: CN-600-1000)
7. 50 ml 离心管 (BD Falcon, catalog number: 352070)
8. 恒温摇床 (Shanghai Zhichu Instrument, catalog number: ZQZY-CF)
9. 高速离心机 (Eppendorf, model: 5810R)
10. 三角瓶 (aladdin, catalog number: T4227-500ml-1EA)
11. 镊子 (Jinzhong, catalog number: JD5020)
12. 塑料方形组培瓶 (Magenta, catalog number: GA-7)
13. 塑料圆形组培瓶 (Zhihongsujiao, catalog number: ZH-8)

14. Parafilm 封口膜 (Bemis, catalog number: PM-996)
15. 3M 微孔通气胶带 (3M, catalog number: 1530C-1)
16. 透气封口膜 (Thermo, catalog number: 241205)
17. 高压蒸汽灭菌锅 (PHCbi, catalog number: MLS-3781-PC)
18. 鼓风干燥箱 (Binder, catalog number: FP53)
19. 酒精灯 (Azone, catalog number: 6-487-01)
20. 可见分光光度计 (XinMao, catalog number: 723PCS)
21. 单道移液器 (10, 20, 100, 200, 1000 μ l; Eppendorf, cat. nos. 3120000020, 3120000038, 3120000046, 3120000054, 3120000062)
22. 电子天平 (Mettler Toledo, catalog number: AL104)
23. 1/2 TSB 固体培养基 (见溶液配方)
24. 1/2 TSB 液体培养基 (见溶液配方)
25. 无菌去离子水 (见溶液配方)
26. 2.5%有效氯浓度的次氯酸钠溶液 (见溶液配方)
27. 70%乙醇溶液 (见溶液配方)
28. 1/2 MS 固体培养基 (见溶液配方)
29. 1/2 MS 液体培养基 (见溶液配方)
30. 木村 B 液体培养基 (见溶液配方)

实验步骤

实验主要分为四部分：1. 无菌培养体系的准备；2. 种子消毒及萌发；3. 微生物的活化及富集；4. 添加微生物及无菌苗移植。

一、无菌培养体系的准备

1. 选择合适大小的组培瓶。对于体积较大的植株，例如水稻，可选用底部直径 73 mm，顶部直径 95 mm，高度 160 mm 的圆桶形组培瓶；对于体积较小的植株，例如拟南芥，可选用底部直径 76 mm，高度 102 mm 的方形组培瓶。
2. 为了满足植株生长，需考虑体系通风透气性并选择合适大小的生长空间。可以选用具有透气孔的组培瓶盖，也可以将组培瓶打孔后在上部封顶。在植物移栽入培养体

系后，所有透气孔及连接处需要用 3M 微孔通气胶带封闭，也可以使用无菌透气封口膜封闭组培瓶。

3. 组培瓶及瓶盖需灭菌使用。将所需器皿用灭菌袋包装好，高压 121℃ 灭菌 15 min，灭菌后放入烘箱内烘干备用（可放置 3-5 天）。

二、种子消毒及萌发

注：以下实验以水稻为例，需在超净台内完成。

1. 挑选饱满的水稻种子。去除水稻种子颖壳，弃去干瘪的种子，不要损伤胚，置于无菌三角瓶内。
2. 使用酒精灭菌。加入 70% 酒精，液面没过种子，消毒 30 s，期间不停晃动瓶身，保证每粒种子都能与酒精充分接触。弃去酒精。
3. 使用次氯酸钠灭菌。加入 2.5% 有效氯浓度的次氯酸钠溶液，液面没过种子，消毒 15 min，期间不停晃动瓶身。弃去次氯酸钠。此步重复 3 次。
4. 使用无菌去离子水清洗。加入无菌去离子水，液面没过种子，清洗 10 min，期间不停晃动瓶身。弃去无菌水。此步重复 3 次。
5. 接种至培养基。使用无菌镊子将种子整齐均匀的平铺于 1/2 MS 固体培养基表面，每皿可容纳 10 粒种子，将种子横向均匀排列于平板底部向上约 5 cm 处，种子胚向上竖直放置，使用 Parafilm 封口膜封口。
6. 培养水稻幼苗。将培养皿竖直放置，于 25 °C，16 小时(h)光照，21%湿度的培养间内培养 5-7 天。

三、微生物的活化及富集

注：以下实验需在超净台内完成。

1. 使用固体培养基活化保藏的菌株。使用无菌枪头从冻存的菌株表面挑取部分培养物，转移至 1/2 TSB 固体培养基上，使用连续划线法涂布。室温下培养 3-5 天。
2. 使用液体培养基扩繁细菌。使用无菌枪头从 1/2 TSB 固体培养板上挑取单菌落，转移至无菌 1/2 TSB 液体培养基内。将培养基置于恒温摇床内，在 28℃ 200 rpm 条件下培养 3-5 天，直至菌液浑浊。

3. 为防止在体系内引入培养基导致细菌的过量生长，需去除菌液中的残留培养基。将浑浊菌液于 3,800 rpm (2906 rcf) 转速下离心 10 min。弃去上清。加入 30 ml 无菌去离子水，重悬菌体后于 3,800 rpm (2906 rcf) 转速下离心 10 min，弃去上清。使用无菌去离子水清洗 2 次。
4. 菌液稀释。根据细菌沉淀的量加入一定体积的无菌去离子水重悬菌液，使用分光光度计测量菌液 OD₆₀₀ 值，将菌液稀释到 OD₆₀₀ 值为 0.5。

四、添加微生物及无菌苗移植

注：以下实验需在超净台内完成。

1. 选择植物培养的基质及液体培养基。根据实验需要，种植植物的基质可选择凝胶状基质（如琼脂或植物凝胶等），或颗粒状基质（如煅烧粘土、石英砂等）；液体培养基可以选择 MS 培养基或木村培养基等。所用液体培养基配置完成后应于高压 121 °C 下灭菌 15 min。若选择凝胶状基质可以添加至液体培养基内共同灭菌；若选择颗粒状基质，应在间隔 24 h 的高压 121 °C 15 min 的灭菌条件下处理 3 次后烘干使用。
2. 向体系中添加基质及液体培养基。若使用凝胶状基质，将液体培养基及基质按 1/3 组培瓶体积的量分装入组培瓶；若使用颗粒状基质，将基质按 1/4 组培瓶体积的量分装入组培瓶，并补充基质等重量的液体培养基。
3. 向体系中接种细菌。为模拟土壤中微生物含量，待液体培养基温度降至手温时，按照菌液体积比基质重量为 1: 100 的比例将菌液接种至组培瓶内（凝胶状基质按培养基体积 1/100 计算），混合均匀。若添加的微生物为混合菌群，将各成员按 1: 1 等比例混合均匀后，再次测量并调整 OD₆₀₀ 至 0.5，按比例添加至组培瓶内。
4. 向体系中移栽无菌苗。挑选长势一致的植物无菌苗，使用无菌镊子将无菌苗从培养基中拔出，用无菌去离子水中洗去根上残留的培养基，移栽至组培瓶内。
5. 封闭体系。使用 3M 微孔通气胶带封闭组培瓶的打孔处及所有连接处。
6. 将无菌培养体系置于 25 °C，16 h 光照，21%湿度的培养间内培养 20-30 天。

溶液配方

1. 1/2 TSB 固体培养基

将 15 g TSB 药品和 20 g 琼脂粉溶解于 1 L 去离子水中，121 °C 高压灭菌 15 分钟。于超净台中分装至 60 mm 圆形培养皿中，每皿 10 ml，吹干表面后密封。在 4 °C 条件下可存储 1 周。

2. 1/2 TSB 液体培养基

将 15 g TSB 药品溶解于 1 L 去离子水中，121 °C 高压灭菌 15 分钟。于超净台中分装至 50 ml 尖底离心管内，每管 30 ml。在 4 °C 条件下可存储 1 周。

3. 无菌去离子水

1 L 去离子水装入 1 L 试剂瓶内，121 °C 高压灭菌 15 分钟。在室温条件下可储存 1 个月。

4. 2.5%有效氯浓度的次氯酸钠溶液

将 200 ml 有效氯浓度为 4%的次氯酸钠溶液溶解于 120 ml 无菌去离子水中。现用现配。

5. 70%乙醇溶液

将 70 ml 无水乙醇溶解至 30 ml 无菌去离子水中。现用现配。

6. 1/2 MS 固体培养基

将 2.2 g Murashige Skoog 培养基（含维生素）干粉与 10 g 蔗糖和 8 g 琼脂粉溶于 1 L 无菌去离子水中，调整 pH 至 5.8，121 °C 高压灭菌 15 分钟。于超净台中分装至 13 cm 方形培养皿中，每皿 50 ml。在 4 °C 条件下可存储 1 周。

7. 1/2 MS 液体培养基

将 2.2 g Murashige Skoog 培养基（含维生素）干粉溶于 1 L 无菌去离子水中，调整 pH 至 5.8，121 °C 高压灭菌 15 分钟。在 4 °C 条件下可存储 1 周。

8. 木村 B 液体培养基

将 254 mg 木村 B 水稻营养液干粉及 0.2 ml 配套 5,000x钙浓缩液溶解至 1 L 无菌去离子水中，调整 pH 至 5.8，121 °C 高压灭菌 15 分钟。在 4 °C 条件下可存储 1 周。

失败经验

1. 控制体系污染。带菌器材会导致实验体系被污染，所有使用的实验器材均需要高温高压灭菌处理并烘干后使用。

2. 控制种子污染。种子灭菌不彻底会导致实验体系被污染，种子灭菌所用试剂应保证现用现配，防止挥发后浓度降低。配置试剂所用原液应保证正确储藏，防止有效成分挥发、分解。若培养种子的平板出现大量污染可考虑提高次氯酸钠浓度和灭菌时间，但过高的浓度和过久的时间也存在影响萌发率的风险。
3. 培养无菌苗的平板在制备过程中应充分吹干至存放时平板盖上无蒸汽凝结成的液滴。过湿的平板在培养过程中会析出大量水导致污染。
4. 使用液体培养基扩繁细菌时，不同细菌菌液浑浊时间不能保证一致，若统一培养，易产生部分细菌生长过快，菌液过浓，活性下降的情况。应视不同细菌的生长速度分批次培养。

致谢

本项目由中国科学院战略先导专项(编号: XDA24020104)、中国科学院前沿科学重点研究项目(编号: QYZDB-SSW-SMC021)、国家自然科学基金项目(编号: 31772400, 31761143017, 31801945, 31701997)和中国科学院青年创新促进会(编号: 2020101, 2021092) [Supported by the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (Precision Seed Design and Breeding, No. XDA24020104), the Key Research Program of Frontier Sciences of the Chinese Academy of Science (No. QYZDB-SSW-SMC021), the National Natural Science Foundation of China (No. 31772400, 31761143017, 31801945, 31701997), the Chinese Academy of Sciences Youth Innovation Promotion Association (No. 2020101, 2021092)]支持。此实验方法已经在 *Science*(Huang 等, 2019)、*Nature Biotechnology*(Zhang 等, 2019) 等国际顶级期刊发表文章中使用。此外此实验体系也在最近的综述文章中被提及(Liu 等, 2019)。

参考文献

1. Huang, A. C., Jiang, T., Liu, Y. X., Bai, Y. C., Reed, J., Qu, B., Goossens, A., Nützmann, H.-W., Bai, Y. and Osbourn, A. (2019). [A specialized metabolic network selectively modulates Arabidopsis root microbiota](#). *Science* 364(6440): eaau6389.
2. Zhang, J., Liu, Y.-X., Zhang, N., Hu, B., Jin, T., Xu, H., Qin, Y., Yan, P., Zhang, X., Guo, X., Hui, J., Cao, S., Wang, X., Wang, C., Wang, H., Qu, B., Fan, G., Yuan, L., Garrido-Oter, R., Chu, C. and Bai, Y. (2019). [NRT1.1B is associated with root microbiota composition and nitrogen use in field-grown rice](#). *Nat Biotechnol* 37(6): 676-684.
3. Liu, Y.-X., Qin, Y. and Bai, Y. (2019). [Reductionist synthetic community approaches in root](#)

- 207 [microbiome research](#). *Curr Opin Microbiol* 49: 97-102.
- 208 4. Xu, L., Naylor, D., Dong, Z.B., Simmons, T., Pierroz, G., Hixson, K.K., Kim, Y.M., Zink, E.M.,
209 Engbrecht, K.M., Wang, Y., et al. (2018). Drought delays development of the sorghum
210 rootmicrobiome and enriches for monoderm bacteria. *P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, E4952-E4952.
- 211 5. Paloma, D., Thorsten, T., Ruben, G., Matthew, A., Eric, K., Paul S.L., and Stephane, H. (2018).
212 Microbial interkingdom interactions in roots promote Arabidopsis survival. *Cell* 175, 973-983.
- 213 6. Bai, Y., Muller, D.B., Srinivas, G., Garrido-Oter, R., Potthoff, E., Rott, M., Dombrowski, N., Munch,
214 P.C., Spaepen, S., Remus-Emsermann, M., et al. (2015). Functional overlap of the Arabidopsis leaf
215 and root microbiota. *Nature* 528, 364-382.