

牧草种子内生真菌的分离、鉴定与保存方法

Isolation, identification and preservation of endophytic fungi from forage seeds

强晓晶¹, 李玉中^{2,*}

¹中国农业科学院草原研究所, 呼和浩特, 内蒙古自治区; ²中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所, 北京。

*通讯作者邮箱: Lyz_caas@126.com

摘要: 植物内生真菌是指生命周期的全部阶段或部分阶段生活于健康植物组织或细胞内且不引起植物任何病症的真菌。自然界中几乎所有的植物都有内生菌的存在, 采用微生物学中常规的组织分离法分离牧草种子内生真菌。内生真菌的鉴定采用形态鉴定和分子生物学鉴定相结合的方法, 不同微生物在特定的培养基上生长形成的菌落一般具有稳定的特征, 可以成为对该微生物进行分类、鉴定的重要依据。此外, 利用 PCR 技术, 可以快速检测和鉴定微生物种类, 内生真菌的 PCR 鉴定是通过扩增其内部转录间隔区 (ITS) 区域并对该区域序列进行测序, 这种鉴定方法是基于 ITS 区域是真菌种类的主要条码标记。已分离、鉴定的内生真菌低温保存用于后续菌株研究实验。

关键词: 牧草种子, 内生真菌, 分离, 鉴定, 保存。

材料与试剂

1. 披碱草种子
2. 手术刀
3. 镊子
4. 培养皿
5. 封口膜
6. 滤纸
7. PDA 培养基 (美国 BD DIFCO, BD 213400)
8. 无水乙醇 (国药集团, CAS: 64-17-5)
9. 次氯酸钠 (国药集团, CAS:7681-82-9)

- 29 10. 硫酸链霉素 (沃凯, CAS: 3810-74-0)
- 30 11. 甘油 (国药集团, CAS: 56-81-5)
- 31 12. 真菌基因组 DNA 提取试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司 D2300)

32

33 仪器设备

- 34 1. 接种针
- 35 2. 分析天平 (METTLER TOLEDO, PG5001-S)
- 36 3. 高压蒸汽灭菌器 (TOMY, SX-700)
- 37 4. 超净工作台 (HITACHI, PCV clean bench)
- 38 5. 恒温培养箱 (宁波江南仪器厂, DNP-9082)
- 39 6. 光学显微镜 (OLYMPUS, BX51)

40

41 软件和数据库

42 NCBI 中的 Nucleotide BLAST

43 (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)

44

45

46 实验步骤

47 一、牧草种子内生真菌的分离及培养

48 1. 牧草种子内生真菌的分离方法

49 选取干净、颗粒饱满的表面无任何病症的牧草种子足量,然后小心剥去种子的外皮,

50 在超净工作台进行常规的消毒灭菌步骤。具体操作如下:将去皮的牧草种子用无菌

51 水清洗 3 次,95 %乙醇 40 s,无菌水冲洗 1 次,5 %次氯酸钠溶液 1 min,无菌水

52 冲洗 5 次,然后将已消毒的种子置于灭菌滤纸上用解剖刀将种子切为 3-4 小段,放

53 入 PDA 平面培养基中分离内生真菌,并将种子横切面与培养基充分接触,每个培养

54 皿中放入 4-5 个种子段,然后用封口膜封好。表面消毒效果检测采用漂洗检验法,

55 吸取最后一次漂洗种子的无菌水 200 μ l 均匀涂布于 PDA 培养基上作为阴性对照。

56 2. 牧草种子内生真菌的培养方法

把封口的培养基放入 28 °C 恒温培养箱中培养 3-7 天，期间观察对照培养基是否有菌落长出，观察 PDA 培养基种子周围长出的真菌，及时挑取单一菌种菌丝在超净工作台中转移到新的 PDA 培养基以防被后面分离到的真菌覆盖。经过上述分离程序得到的内生真菌分别用接种针挑取单一菌丝转移到新的不含硫酸链霉素的 PDA 培养基上，置于 28 °C 恒温培养箱。观察菌落生长特征，分别为分离到的内生真菌编号命名、拍照记录菌落形态。

二、牧草种子内生真菌的鉴定及保存方法

1. 牧草种子内生真菌的鉴定方法

内生真菌的鉴定采用菌落形态学鉴定与 ITS 序列测序相结合的方法鉴定，其中内生真菌的形态学鉴定是通过 PDA 平板 28 °C 恒温培养 7 天，观察内生真菌的色泽、质地和生长速率等基本菌落形态特征。将灭菌的载玻片放入培养皿中，高压灭菌后的 PDA 培养基轻轻倒于载玻片上形成一层薄薄的培养层，分离的内生真菌分别接种于载玻片 28 °C 恒温培养 5-7 天，于光学显微镜下观察其菌丝生长形态以及是否产孢子，并选取典型生长特征的视野拍照记录。参考《真菌鉴定手册》及其他参考文献进行内生真菌形态的初步鉴定 (魏景超, 1979)。

ITS 序列测序方法是目前最常见的分子鉴定内生真菌的方法，据报道，ITS 序列分析在不产孢真菌鉴定中特别有效，减少了偏倚判断的影响 (Nair and Padmavathy, 2014)。刮取适量 PDA 平板上培养一周的内生真菌菌丝体，根据真菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书，提取分离到的内生真菌的基因组 DNA。用 ITS 通用引物扩增内生真菌的 ITS 片段序列(T. J. White, 1990)。PCR 产物的检测、回收纯化和测序由上海美吉生物公司完成。测序结果在 NCBI 数据库中进行 Nucleotide BLAST 同源性序列比对。根据 BLAST 比对结果选择 identity 高即序列相似性较高的序列，用 MEGA6.0 软件构建系统进化树。采用 neighbor-joining 法，bootstrap value 设置为 1000。通过系统进化发育相似性以及 GenBank 序列相似性结合菌落形态学确定内生真菌的分类地位。

2. 牧草种子内生真菌的保存方法

所有分离的内生真菌分别命名后将其保存于实验室。短期保存方法：将纯化后的内生真菌用接种针接种于 PDA 斜面培养基，28 °C 恒温培养箱培养 7 天，观察菌落形

态与平面培养基一致且无杂菌污染后，置于 4 °C 冰箱中保存。长期保存方法：将以上对应的内生真菌的菌丝块置于 25 %甘油中，-80 °C 超低温冰箱保存。

溶液配方

1. 内生真菌的分离培养基

PDA 平面培养基 (加 0.5 g/L 的硫酸链霉素用于抑制细菌的生长)。称取 39 g PDA 培养基，溶于 1000 ml 蒸馏水中，121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min 后，待培养基冷却到手摸不烫的程度，将事先用 0.22 µm 过滤器过滤的 0.5 g/L 硫酸链霉素加入到培养基中，摇晃均匀，制作 PDA 平面和斜面培养基。

2. 25 %甘油的配制

将 25 ml 甘油试剂溶于 100 ml 蒸馏水中，121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min 后，于常温下保存，一般现配现用。

3. ITS 片段扩增所用引物

ITS1: 3'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-5'

ITS4: 3'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-5'

4. 内生真菌 ITS 片段序列扩增 PCR 体系

表 1. PCR 扩增体系

成分	体积
10×Ex Taq buffer	5.0 µl
2.5mM dNTP Mix	4.0 µl
10p Primer 1	2.0 µl
10p Primer 2	2.0 µl
Template	2.0 µl
5u Ex Taq 酶	0.5 µl
ddH ₂ O	36.5 µl
Total volume	50 µl

5. PCR 扩增程序

94 °C 3 min	
94 °C 30 s	} 30 cycles
55 °C 30 s	
72 °C 1 min	
72 °C 10 min	
4.0 °C ∞	

致谢

本实验方法的完成得到“中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (1610332020014) 的资助。采用本实验方法发表的文章如下: Xiaojing Qiang, Junjun Ding, Wei Lin, Qiaozhen Li, Chunying Xu, Qian Zheng and Yuzhong Li. (2019). [Alleviation of the detrimental effect of water deficit on wheat \(*Triticum aestivum* L.\) growth by an indole acetic acid-producing endophytic fungus](#). *Plant and Soil*. 439(1-2): 373-391.

本实验方法改编自强晓晶博士毕业论文《披碱草内生真菌对小麦抗旱性的影响机制》，在此感谢博士毕业课题为本实验方法的完成提供了良好的基础。

参考文献

1. 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海: 上海科学技术出版社, 1979.
2. Nair, D. N. and Padmavathy, S. (2014). [Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans](#). *Scientific World Journal*. 2014: 250693.
3. T. J. White, T. B., S. Lee, and J. Taylor. (1990). [Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics](#). 18(1): 315-322.