

枫香-真菌互作培养体系构建

Method for Constructing *Liquidambar styraciflua*-Root Fungus Interaction System

王玉宸^{1,2}, 彭龙^{1,2}, 潘雪玉³, 袁志林^{1,2*}

¹ 林木遗传育种国家重点实验室, 中国林业科学研究院, 北京; ² 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 杭州; ³ 中国林业科学研究院热带林业研究所, 广州

*通讯作者邮箱: yuanzi@caf.ac.cn

摘要: 林木可与真菌形成多种不同类型的关系以适应复杂的生存环境。作为林木-真菌互作研究的常见树种之一, 北美枫香 (*Liquidambar styraciflua*) 是一种优良的抗逆树种选育材料, 具有耐干旱、耐瘠薄、萌芽能力强、生长速度快等特点, 通过播种繁殖易获得实生苗, 经消毒处理后可得到无菌苗用于枫香-真菌互作培养体系构建。此外, 北美枫香是优良的彩叶树种, 叶入秋变红, 是极具生态研究价值及观赏经济价值的造林绿化树种。为了探究枫香-真菌的互作机制及促进枫香适应环境胁迫的效应, 需要建立标准的实验室体系互作研究方法。本文介绍了枫香-真菌互作培养体系的构建方法, 包括育苗体系和接种方法等。

关键词: 枫香, 真菌, 互作体系

材料与试剂

1. 泥炭土
2. 珍珠岩
3. 蛭石
4. 有机肥
5. ddH₂O
6. 超纯水
7. WPM 粉末 (EKEAR)
8. 改良 MS 培养基 (见溶液配方)

- 31 9. 20× 大量元素母液 (见溶液配方)
- 32 10. 100× 微量元素母液 (见溶液配方)
- 33 11. 100× 铁盐母液 (见溶液配方)
- 34 12. 100× 有机化合物母液 (见溶液配方)
- 35 13. IBA 母液 (见溶液配方)
- 36 14. 0.85%生理盐水 (见溶液配方)
- 37 15. 0.1%升汞 (见溶液配方)
- 38 16. PDA 培养基 (见溶液配方)
- 39 17. WPM 培养基 (见溶液配方)

40

41 仪器设备

- 42 1. 接种针
- 43 2. 毛刷
- 44 3. 纱布
- 45 4. 剪刀
- 46 5. 镊子
- 47 6. 滤纸
- 48 7. 漏斗
- 49 8. 锥形瓶
- 50 9. 封口膜
- 51 10. 移液枪
- 52 11. 血球计数板
- 53 12. 打孔器 (直径 7 mm)
- 54 13. 大试管 (38 mm × 250 mm)
- 55 14. 大培养皿 (直径 15 cm)
- 56 15. 光学显微镜 (Carl Zeiss, model: Axio Scope A1)
- 57 16. 光照培养箱 (宁波扬辉, model: RDN-1500B)
- 58 17. Phytatray™ II 培养容器 (sigma, catalog number: P5929)
- 59 18. 立式压力蒸汽灭菌器 (上海申安, model: LDZF-50KB-II)

实验步骤

1. 真菌接种剂的准备

1.1 菌饼接种剂准备

- 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，倒入一次性塑料培养皿中，待培养基凝固后，进行接种处理。
- 2) 从纯培养真菌平板菌落边缘用接种针挑取菌块，转移至 PDA 固体培养基上 26 °C 黑暗条件下培养。
- 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。

1.2 孢子悬浮液接种剂准备

- 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，倒入一次性塑料培养皿中，待培养基凝固后，进行接种处理
- 2) 从纯培养真菌平板菌落边缘用接种针挑取菌块，转移至 PDA 固体培养基上 26 °C 黑暗条件下培养 14 d。
- 3) 制备终浓度为 $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ 的孢子悬浮液。制备方法如下：取上一步骤中培养 14 d 的真菌，在其表面倒一层无菌生理盐水 (0.85% NaCl 溶液)，用无菌毛刷轻轻刮取菌丝。以四层无菌纱布过滤并收集滤液；取滤液 50 ml，沿着盖玻片边缘滴入血球计数板计数室，使用光学显微镜进行计数；用生理盐水稀释至浓度为 $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ 的孢子悬浮液作接种剂。

2. 无菌北美枫香幼苗的培育

- #### 2.1 枫香果实成熟期为 10-11 月份，果穗由绿色转为黄绿色，果实采集后阴干 4-7 天，然后暴晒数日，用棍打果实即可获得枫香种子 (种子在 0-5 °C 条件下可贮存 5 年左右，在 -18 °C 时贮存时间超过 5 年)。将枫香种子播种育苗床。土壤基质及其配比：泥炭土：珍珠岩：蛭石：有机肥=1：2：2：2 (121 °C 高压灭菌 30 min)，放置于光照培养箱，保持 85%相对湿度，光照条件为 14 h 光照/10 h 黑暗，25 °C 恒温培养。

- #### 2.2 21 天后，当种子萌发并长成株高 3-4 cm 的幼苗时 (如图 1 所示)，从土壤基质中取出。



图 1. 北美枫香实生幼苗培育。图为在育苗床中播种繁殖的枫香实生幼苗，实生幼苗培养条件为：25 °C 恒温；85%相对湿度；14 h 光照/10 h 黑暗。

2.3 在超净工作台剪去幼苗根部，将剩余地上部分放入 0.1% 升汞中进行表面消毒约 12 min，再用 ddH₂O 清洗 4-5 次去除表面残留升汞。

2.4 林木专用生根培养基——WPM 培养基 (Woody Plant Medium) 灭菌后取出，室温下放置，待培养基温度约 45 °C 后，在超净工作台中倒入无菌大试管 (25 × 240 mm) 中，待培养基凝固后，将表面消毒后的幼苗插入培养基 (如图 2 所示)。



图 2. 枫香幼苗生根培养示意图。图为在装有 WPM 培养基的无菌试管中进行幼苗生根培养，光照培养箱内生根培养条件为 25 °C 恒温；14 h 光照/10 h 黑暗。

2.5 将培养有枫香实生幼苗的大试管转移到光照培养箱中，25 °C 恒温培养，光照条件 14 h 光照/10 h 黑暗。待实生幼苗重新生根，苗高达到 5-6 cm 后，可将幼

苗取出进行继代繁殖。将每一株幼苗的幼茎剪断，再次插入新的 WPM 培养基中进行扩繁，转移到光照培养箱中并保持同样的温度和光照条件进行继代繁殖。

2.6 选取根系大小、发达程度和株高较一致 (5-6 cm) 的无菌幼苗，进行共培养。

3. 实验室体系：枫香无菌幼苗-根系真菌互作体系构建

3.1 菌饼接种互作体系构建

- 1) 超净工作台紫外消毒后，无菌 Phytatray™ II 培养容器 (长宽高：11.4 cm × 8.6 cm × 10.2 cm) 中倒入 70 ml 改良 MS 培养基。
- 2) 将步骤 2 挑选的根系和株高较为均一的枫香无菌幼苗用镊子将轻轻取出，放入装有 ddH₂O 的玻璃大培养皿中，洗除幼苗根部的培养基残留，并用无菌滤纸吸干表面水份后，转接至装有改良 MS 培养基的 Phytatray™ II 无菌培养容器内。
- 3) 分为对照组和处理组，每组设置至少 3 个重复，每个重复包含 10 株无菌苗 (如图 3 所示)。将步骤 1.1 中打孔获得的菌饼随机挑取 5 个均匀转接至根系周围，对照组接种灭菌后的菌饼，用封口膜进行密封，防止污染。而后，转移至光照培养箱中以相同条件继续培养，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。

3.2 孢子悬浮液接种互作体系构建

- 1) 超净工作台紫外消毒后，无菌 Phytatray™ II 培养容器(长宽高：11.4 cm × 8.6 cm × 10.2 cm) 中倒入 70 ml 改良 MS 培养基。
- 2) 将步骤 2 挑选的根系和株高较为均一的枫香无菌幼苗用镊子将轻轻取出，放入装有 ddH₂O 的玻璃大培养皿中，洗除幼苗根部的培养基残留，并用无菌滤纸吸干表面水份后，转接至装有改良 MS 培养基的 Phytatray™ II 无菌培养容器内。
- 3) 分为对照组和处理组，每组设置至少 3 个重复，每个重复包含 10 株无菌苗 (如图 3 所示)。将步骤 1.2 中稀释获得的孢子悬浮液用移液枪吸取 1 ml 接种至根系周围，对照组加入 0.85% 无菌生理盐水 1 ml。而后，转移至光照培养箱中以相同条件继续培养，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。



图 3. 枫香-真菌共培养体系示意图。 图为在装有改良 MS 培养基的 Phytatray™ II 无菌培养容器中进行枫香-真菌共培养实验 **a:** 接种无菌 PDA 琼脂块作空白对照组；**b:** 接种长满菌丝的菌块作实验处理组

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

加超纯水至 1 L, 调 pH 至 7.0, 121 °C 高温高压灭菌 15 min

2. WPM 培养基 (Woody Plant Medium)

WPM 粉末	2.78 g
蔗糖	20 g
琼脂粉	7 g
IBA 母液	600 µl

加超纯水至 1 L, 调 pH 至 5.8, 121 °C 高温高压灭菌 15 min

3. 改良 MS 培养基

20× 大量元素母液	25 ml
100× 微量元素	10 ml
100× 铁盐母液	10 ml

156	100× 有机化合物	10 ml
157	蔗糖	2 g
158	琼脂粉	7 g
159	加超纯水至 1 L，调 pH 至 5.8 ， 121 °C 高温高压灭菌 25 min	
160	4. 20× 大量元素母液	
161	NH ₄ NO ₃	33 g
162	KNO ₃	38 g
163	CaCl ₂ ·2H ₂ O	8.8 g
164	MgSO ₄ ·7H ₂ O	7.4 g
165	KH ₂ PO ₄	3.4 g
166	加超纯水至 1 L	
167	5. 100× 微量元素母液	
168	KI	0.083 g
169	H ₃ BO ₃	0.62 g
170	MnSO ₄ ·4H ₂ O	1.69 g
171	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.86 g
172	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.0025 g
173	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0025 g
174	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0025 g
175	加超纯水至 1 L	
176	6. 100× 铁盐母液	
177	FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.78 g
178	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	3.73 g
179	加超纯水至 1 L	
180	7. 100× 有机化合物母液	
181	肌醇	10 g
182	IVB 烟酸	0.05 g
183	盐酸硫胺素	0.01 g
184	盐酸吡哆醇	0.05 g
185	甘氨酸	0.2 g
186	加超纯水至 1 L	

8. IBA 母液

IBA 粉末 40 mg

溶于少量无水乙醇，吹打混匀

加 60 °C 超纯水至 80 ml

9. 0.1%升汞

升汞 1 g

溶于少量无水乙醇，吹打混匀

加超纯水至 1 L

10. 0.85%生理盐水

NaCl 8.5 g

加超纯水至 1 L，121 °C 高温高压灭菌 15 min

致谢

本工作的顺利开展得益于国家自然科学基金青年项目 (31901290) 的经费支持。

参考文献

1. 秦媛. (2017). [盐碱地植物共生微生物资源及功能初步研究](#). (Master's thesis, 中国林业科学研究院).
2. 潘雪玉. (2018). [沿海防护林树种促生、耐盐根系真菌筛选及机制初探](#). (Master's thesis, 中国林业科学研究院).