

玉米根系简化细菌群落的定量与其生物防治效果的评价方法

Quantification of the Composition Dynamics of a Maize Root-associated Simplified Bacterial Community and Evaluation of Its Biological Control Effect

董颖^{1, #}, 焦朕^{1, #}, 郑小琪², 沈博¹, 刘悦¹, 贾洪柏¹, 李晓岩¹,

牛犇^{1, *}, Roberto Kolter³

¹ 林木遗传育种国家重点实验室, 生命科学学院, 东北林业大学, 哈尔滨, 黑龙江省;

² 数学系, 上海师范大学, 上海市; ³Department of Microbiology and Immunobiology, Harvard Medical School, Boston, MA 02115

*通讯作者邮箱: ben_niu@nefu.edu.cn

#共同第一作者/同等贡献

引用格式: 董颖, 焦朕, 郑小琪, 沈博, 刘悦, 贾洪柏, 李晓岩, 牛犇, Roberto Kolter. (2021). 玉米根系简化细菌群落的定量与其生物防治效果的评价方法. *Bio-101* e2003399. Doi: 10.21769/BioProtoc.2003399.

How to cite: Dong, Y., Jiao, Z., Zheng, X. Q., Shen, B., Liu, Y., Jia, H. B., Li, X. Y., Niu, B. and Roberto Kolter. (2021). Quantification of the Composition Dynamics of a Maize Root-associated Simplified Bacterial Community and Evaluation of Its Biological Control Effect. *Bio-101* e2003399. Doi: 10.21769/BioProtoc.2003399. (in Chinese)

摘要: 植物共生微生物群落的组装机理与其生物学功能是植物微生物组领域的重要研究内容。在前期的研究中, 我们在玉米根表构建了一个由 7 株细菌组成的简化且具有代表性的模式细菌群落, 这 7 株细菌分别是寡养单胞菌属、苍白杆菌属、短小杆菌属、肠杆菌属、金黄杆菌属、草螺菌属以及假单胞菌属的成员。本文将描述利用该模式细菌群落研究根系微生物组组装过程中的微生物种间互作以及根系微生物组对寄主健康的有益功能的实验操作流程。该流程可简要归纳为: 采用针对各细菌菌株的特异性选择培养基, 监测模式细菌群落组成结构的动态变化, 解析细菌种间互作对群落组装的影响; 通过比较病原真菌轮枝镰刀菌在接种与未接种模式细菌群落的玉米种子表面的生长以及由该病原菌引起的玉米苗枯病的严重程度, 评价模式细菌群落防治植物病害的效果。

关键词: 玉米, 合成菌群, 选择性培养基, 动态变化, 群落组装和生物防治

材料与试剂

一、耗材

1. 一次性培养皿 (VWR, catalog number: 89022-320)
2. 移液枪枪头 (Corning, Axygen®, catalog number: T1005WBCRS; Biotix, catalog number: M-0200-1RCNS)
3. 封口膜 (VWR, catalog number: 52858-000) (制造商: Bemis, catalog number: PM996)
4. 接种环 (Globe Scientific, catalog number: 130118)
5. 2.0 ml 离心管 (康宁, Axygen®, catalog number: MCT-200-C-S)
6. 1.5 ml 离心管 (VWR, catalog number: 20170-038)
7. 50 ml 离心管 (Corning, catalog number: 352098)
8. 手术刀片 (Integra LifeSciences, catalog number: 4-110)
9. 玻璃珠 (Propper, catalog number: 03000600)
10. 纸巾 (KCWW, Kimberly-Clark, catalog number: 34155)
11. 96 孔板 (Corning, catalog number: 351172)
12. 细胞刮 (VWR, catalog number: 89260-222)
13. 方形平板 (Thermo Fisher Scientific, Nunc, catalog number: 242811)
14. 移液管 (Gilson, 型号: P20, P200 和 P1000, catalog number: F123600, F123601 和 F123602; Thermo Fisher Scientific, 型号: F1-ClipTip™, catalog number: 4661140N 和 4661130N)

二、植物

玉米 cv. Sugar Buns F1 (se+) (Johnny's Selected Seeds, catalog number: 267)

三、细菌菌株

嗜麦芽寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*) ZK5342, 垂体苍白杆菌 (*Ochrobactrum pituitosum*) ZK5343, 极小短小杆菌 (*Curtobacterium pusillum*) ZK5344, 路德维希肠杆菌 (*Enterobacter ludwigii*) ZK5345, 产吡啶金黄杆菌 (*Chryseobacterium indologenes*) ZK5346, 弗里辛恩斯草螺菌 (*Herbaspirillum frisingense*) ZK5347 与恶臭

假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) ZK5348 (Niu *et al.*, 2017; Niu and Kolter, 2017)。

四、真菌菌株

轮枝镰刀菌 (*Fusarium verticillioides*) MRC826 (Hinton and Bacon, 1995)

五、化学试剂

1. 乙醇 (Decon Labs, catalog number: V1001)
2. 次氯酸钠溶液 (Janitorial Supplies, Clorox® 95, catalog number: CLO30966CT)
3. Bacto™ 胰蛋白胨大豆肉汤培养基 (不含葡萄糖) (BD, catalog number: 286220)
4. 大豆酪蛋白消化琼脂 (HiMedia Laboratories, catalog number: GM290-500G)
5. 琼脂 (BD, catalog number: 214010)
6. 10× 磷酸盐缓冲盐 (PBS) (Lonza, catalog number: 17-517Q)
7. Murashige 和 Skoog 基础盐混合物 (MS) (Sigma-Aldrich, catalog number: M5524-50L)
8. 萘啶酸 (Sigma-Aldrich, catalog number: N8878-5G)
9. 粘菌素 (Sigma-Aldrich, catalog number: C4461-100MG)
10. 林可霉素 (Sigma-Aldrich, catalog number: 62143-1G)
11. 金霉素 (Solarbio, catalog number: C4881-5G)
12. 红霉素 (Sigma-Aldrich, catalog number: E5389-1G)
13. 万古霉素 (Sigma-Aldrich, catalog number: 75423-5VL)
14. 氯化钠 (VWR, catalog number: BDH9286-500G)
15. 新生霉素 (Sigma-Aldrich, catalog number: N1628-1G)
16. 妥布霉素 (Sigma-Aldrich, catalog number: T4014-100MG)
17. 葡萄糖 (VWR, catalog number: BDH9230-500G)
18. 胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (见溶液配方)
19. 0.1× 胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (见溶液配方)
20. 胰蛋白胨大豆肉汤培养基 (见溶液配方)
21. 1× 磷酸盐缓冲液 (PBS) (见溶液配方)
22. ½ Murashige 和 Skoog (MS) 琼脂培养基 (见溶液配方)

23. *S. maltophilia* ZK5342 选择培养基 (见溶液配方)
24. *O. pituitosum* ZK5343 的选择培养基 (见溶液配方)
25. *C. pusillum* ZK5344 选择培养基 (见溶液配方)
26. *E. ludwigii* ZK5345 选择培养基 (见溶液配方)
27. *C. indologenes* ZK5346 选择培养基 (见溶液配方)
28. *H. frisingense* ZK5347 选择培养基 (见溶液配方)
29. *P. putida* ZK5348 选择培养基 (见溶液配方)
30. 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (见溶液配方)
31. 水琼脂培养基 (见溶液配方)

仪器设备

1. 镊子
2. 二级生物安全柜 (Thermo Fisher Scientific, 型号: Herasafe™KS9)
3. 离心机 (Eppendorf, 型号: 5424)
4. 涡旋混合器 (Scientific Industries, 型号: Vortex-genie2, catalog number: G560)
5. 分光光度计 (Beckman Coulter, 型号: DU 640)
6. 超声波细胞破碎仪 (Qsonica, 型号: Q125, catalog number: Q125-110)
7. 天平 (Mettler-Toledo International, catalog number: AG135)
8. 细胞计数板 (Hausser Scientific, catalog number: 1492)
9. 显微镜 (ZEISS, 型号: Axioscop 2 plus)
10. 体视显微镜 (ZEISS, 型号: Stemi SV 6)

软件和数据库

1. RStudio (version 0.99.903)
2. QIIME (version 1.6.0)
3. PRISM (version 6.0c)

实验步骤

一、玉米种子的表面灭菌与萌发

1. 挑选 10 粒健康的完整玉米种子, 用镊子放在培养皿 (直径 9 cm) 中 (图 1. A)。

2. 用 70% (v/v) 的酒精浸泡种子 3 min, 然后倒掉酒精。
3. 用 5% (有效氯含量, v/v) 的次氯酸钠溶液浸泡种子 3 min, 然后倒掉次氯酸钠溶液。
4. 用无菌蒸馏水冲洗种子 3 次。
5. 吸取第三次冲洗液 250 μ l, 涂布于胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA) 平板上, 检查种子是否污染。
6. 将 TSA 平板置于 30 °C 过夜培养。
7. 若 TSA 平板上未长出微生物菌落, 则继续进行后续步骤, 否则, 丢弃玉米种子, 并重复步骤 1 至 6, 直到 TSA 平板没有菌落长出。
8. 除去培养皿中最后一次清洗玉米种子的蒸馏水。
9. 胚朝上放置玉米种子, 并向培养皿中加入 7 ml 无菌蒸馏水 (图 1. B)。
10. 将装有种子的培养皿放置于 30 °C 的黑暗环境中。
11. 培养 24 h 后, 从培养皿中吸取出 250 μ l 水, 并涂布到 TSA 平板上, 以检查种子是否污染。
12. 将 TSA 平板置于 30 °C 过夜培养。
13. 若 TSA 平板上未长出微生物菌落, 则继续进行后续步骤, 否则, 丢弃玉米种子, 并重复步骤 1 至 12, 直到 TSA 平板没有菌落长出。
14. 除去培养皿中的水, 并补充 7 ml 无菌蒸馏水。
15. 将培养皿放回 30 °C 黑暗环境中继续培养。
16. 总共培养 50 至 55 h 后, 选择已发芽的且根长为 1-2 cm 的玉米种子 (图 1. C), 进行后续步骤。

注: 在生物安全柜中进行步骤 2 至 16。

二、接种细菌群落至玉米幼苗

1. 将 7 株细菌 (*S. maltophilia* ZK5342、*O. pituitosum* ZK5343、*C. pusillum* ZK5344、*E. ludwigii* ZK5345、*C. indologenes* ZK5346、*H. frisingense* ZK5347 和 *P. putida* ZK5348) 划线接种于 0.1× TSA 平板上, 30 °C 培养 24-48 h。
2. 挑取每个菌株的单菌落, 并接种于 5 ml 胰蛋白胨大豆肉汤培养基 (TSB) 中, 30 °C, 120 rpm 过夜摇培。

3. 吸取每个菌株的过夜培养液 50 μ l，并转接至 5 ml 新鲜的 TSB 培养基中，于 30 $^{\circ}$ C 摇培 8 h。
4. 4 $^{\circ}$ C, 2,940 \times g，离心 10 min，收集菌体至 2 ml 离心管中。
5. 将收集的菌体悬浮于 1 \times 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中，并将各菌株的悬浮液稀释至每毫升 10^8 个菌体 (表 1)。

表 1. 各菌株 10^8 个菌体/ml 的悬浮液对应的的 OD₆₀₀ 值

菌株	OD ₆₀₀
<i>S. maltophilia</i> ZK5342	0.13
<i>O. pituitosum</i> ZK5343	0.25
<i>C. pusillum</i> ZK5344	0.11
<i>E. ludwigii</i> ZK5345	0.17
<i>C. indologenes</i> ZK5346	0.13
<i>H. frisingense</i> ZK5347	0.08
<i>P. putida</i> ZK5348	0.27

6. 将各菌株的悬浮液等体积混合于 50 ml 离心管中，制备多菌株悬浮液 (表 2)。

表 2. 多菌株悬浮液的菌株组成

菌株	菌悬液 1	菌悬液 2	菌悬液 3	菌悬液 4	菌悬液 5	菌悬液 6	菌悬液 7	菌悬液 8
<i>S. maltophilia</i> ZK5342	√	×	√	√	√	√	√	√
<i>O. pituitosum</i> ZK5343	√	√	×	√	√	√	√	√
<i>C. pusillum</i> ZK5344	√	√	√	×	√	√	√	√
<i>E. ludwigii</i> ZK5345	√	√	√	√	×	√	√	√
<i>C. indologenes</i> ZK5346	√	√	√	√	√	×	√	√
<i>H. frisingense</i> ZK5347	√	√	√	√	√	√	×	√
<i>P. putida</i> ZK5348	√	√	√	√	√	√	√	×

注：依次去除 7 株细菌，将剩余的 6 株细菌等比例混合，制备 6 菌株悬浮液。“√”表示多菌株悬浮液中包含该菌株，“×”表示多菌株悬浮液中不包含该菌株。

7. 室温下，将制备好的多菌株悬浮液倒入培养皿（直径 9 cm）中，并将不超过 30 粒经表面灭菌且萌发的玉米种子（初生根长度为 1-2 cm）浸泡于菌悬液中（图 1. D），静置 0.5-1 h。
8. 拨动种子，确保初生根完全浸没于菌悬液中。将另外 10 粒表面灭菌且萌发的玉米种子浸泡于 1× PBS 缓冲液中 0.5-1.0 h，作为对照。
9. 用无菌镊子将接种细菌的玉米种子和无菌种子分别转移至盛有 20 ml $\frac{1}{2}$ Murashige and Skoog (MS) 琼脂 (0.8%) 培养基的玻璃试管 (16 x 150 mm) 中，并用无菌镊子轻轻按压种子，将玉米的初生根插入培养基中（图 1. E）。用同样口径的无菌空玻璃试管将装有玉米种子的试管封闭，使用封口膜将两只试管口对口连接并固定（图 2. A）。

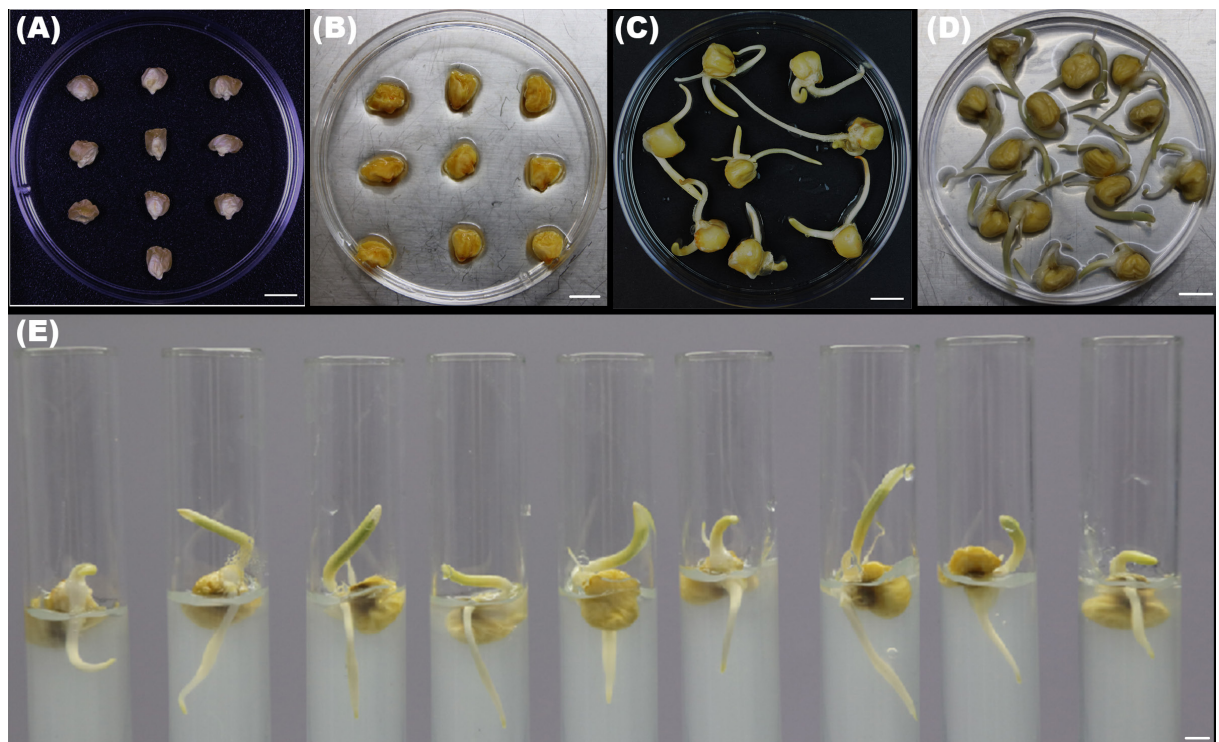


图 1. 玉米种子。 A. 干种子；B. 表面灭菌后的种子；C. 表面灭菌且萌发的种子；D. 浸泡在多菌株悬浮液中的表面灭菌且萌发的种子；E. 在 $\frac{1}{2}$ Murashige and Skoog 琼脂培养基中放置的种子。比例尺= 1 cm。

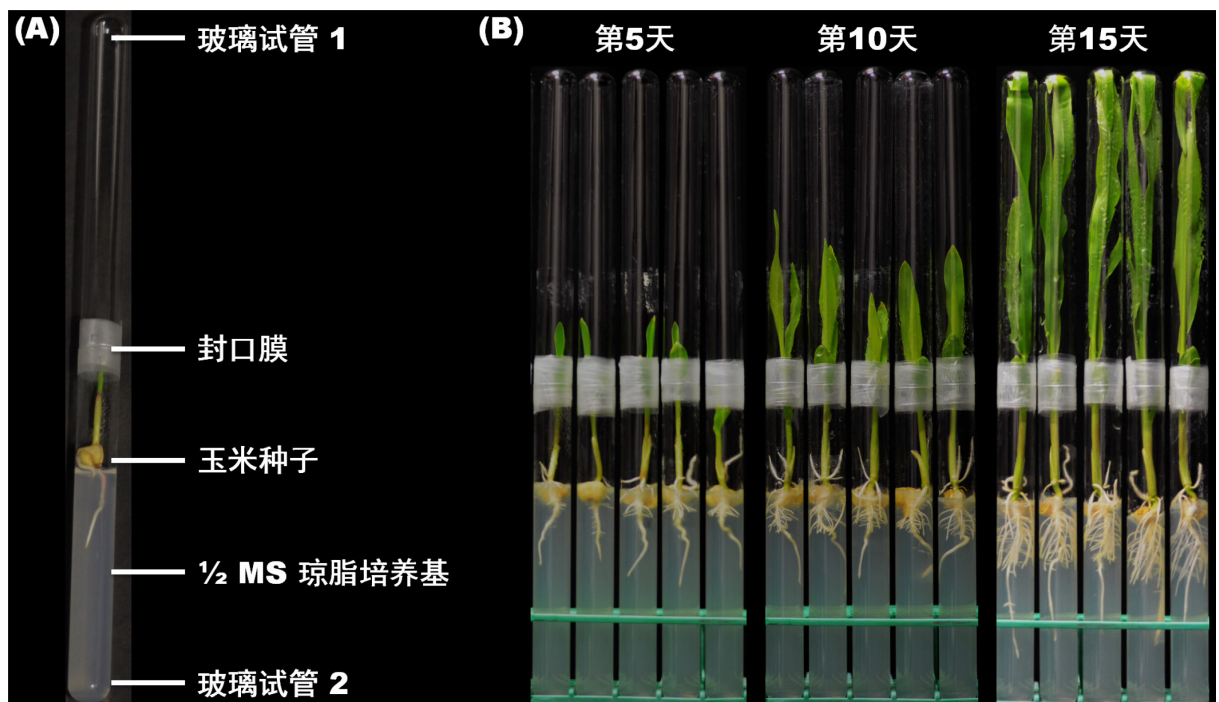


图 2. 玉米无菌苗的生长。 A. 双试管生长室。用封口膜将两个玻璃试管口对口连接并固定。 B. 在双试管生长室中生长的不同苗龄的无菌玉米苗。

10. 将玉米幼苗置于 25 °C，相对湿度 54%，光照 16 h / 黑暗 8 h, 4,000 lx 的条件下连续培养 15 天。

注：在生物安全柜中或靠近火焰处进行步骤 1 至 9。

三、玉米根系细菌群落组成的定量

1. 在接种细菌群落后的第 5 天、第 10 天和第 15 天，从接种不同群落的处理中分别选取 3-5 株玉米幼苗样品。
2. 使用无菌手术刀片（视频 1）切下玉米幼苗的根系。



视频 1. 玉米幼苗根系样品的采集

3. 使用无菌 1× PBS 缓冲液快速冲洗根系样品，去除附着在根表面的琼脂。
4. 使用无菌手术刀片切取近籽粒的 1 cm 长的初生根片段。
5. 使用无菌手术刀片切除根段上的侧根。
6. 使用两个无菌的 200 μ l 枪头将根段转移至 1.5 ml 离心管中。
7. 将 6 个玻璃珠 (直径: 3 mm) 放入离心管中，并加入 1 ml 无菌 1× PBS 缓冲液。
8. 超声波震荡 1 min (振幅: 30%; 脉冲: 01 s, 01 s; 时间: 30 s)，洗脱定殖于根表面的细菌，然后涡旋震荡 1 min。
9. 重复步骤 8 两次后，将离心管在冰上放置 1 min。
10. 向 96 孔细胞培养板的 1 列，8 个孔中，分别加入 180 μ l 无菌 1× PBS 缓冲液 (视频 2)。



视频 2. 细菌悬浮液的稀释与涂板

11. 吸取步骤 9 中获得的细菌悬浮液 20 μ l，加入第一个孔内，使用移液器反复吸吐混匀。
12. 使用镊子将根段取出，并用吸水纸擦干后，在天平上称重，记录根段的质量。
13. 依次将 20 μ l 细菌悬浮液从第一个孔转移至第八个孔内，使用移液器反复吸吐混匀后，获得 10^{-1} 至 10^{-8} 倍菌悬液稀释液。
14. 使用排枪从每个孔中吸取 10 μ l 菌悬液，滴加在 0.1× TSA 选择性平板 (表 3) 上，倾斜平板，使菌悬液朝一个方向移动，将菌体分散在平板表面。

表 3. 选择培养基的添加物与各菌株的培养时间

菌株	0.1× TSA 添加物	培养时间
<i>S. maltophilia</i> ZK5342	60 µg/ml 新生霉素 + 1 µg/ml 妥布霉素	36h
<i>O. pituitosum</i> ZK5343	4 µg/ml 粘菌素 + 5 µg/ml 红霉素 + 14 µg/ml 万古霉素	36h
<i>C. pusillum</i> ZK5344	10 µg/ml 萘啶酸 + 4 µg/ml 粘菌素 + 3.54% (wt/vol) NaCl	60h
<i>E. ludwigii</i> ZK5345	5 µg/ml 红霉素 + 7.14% (wt/vol) NaCl	60h
<i>C. indologenes</i> ZK5346	13 µg/ml 金霉素 + 8 µg/ml 粘菌素 + 2.5 µg/ml 萘啶酸	36h
<i>H. frisingense</i> ZK5347	10 µg/ml 萘啶酸 + 4 µg/ml 粘菌素 + 100 µg/ml 林可霉素	36h
<i>P. putida</i> ZK5348	5 µg/ml 萘啶酸 + 5 µg/ml 红霉素	16h

15. 每个样品重复 3 次。
16. 于生物安全柜中，将接种了细菌的选择性 0.1× TSA 平板晾干。
17. 在 30 °C、黑暗条件下，培养 16 至 60 h (表 3)。
18. 统计并记录选择性平板上菌落形成单位 (CFU) 的数量 (图 3. A)。
19. 使用 10 到 200 之间的 CFU 数值 (图 3. B) 计算细菌含菌量：

$$\text{细菌含菌量} = \frac{\text{CFU 数目} \times 100 \times \text{稀释倍数}}{\text{根段重量 (mg)}}$$

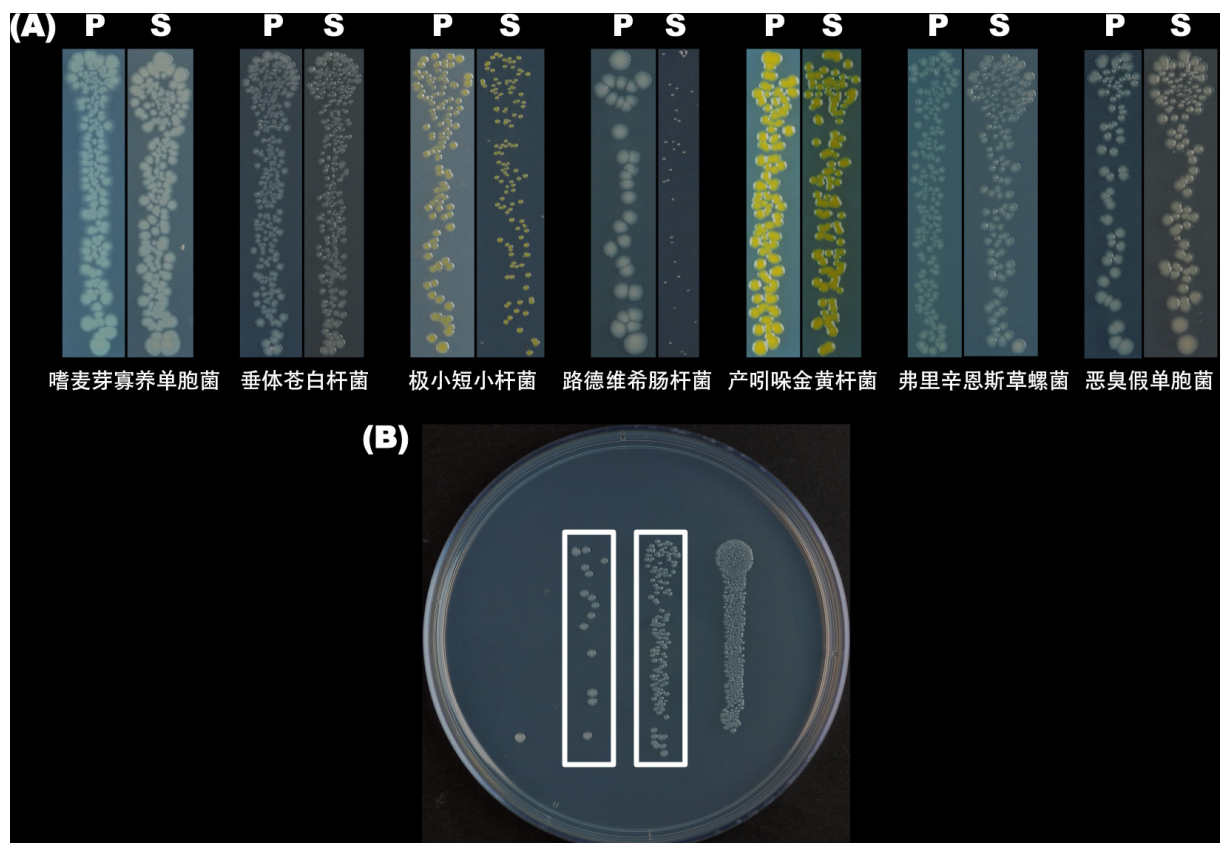


图 3. 模式细菌群落中各菌株的菌落。 A. 生长在普通与选择性 0.1× TSA 平板上的 7 个细菌菌株的菌落形态。“P”和“S”分别代表普通 0.1× TSA 平板与选择性 0.1× TSA 平板。B. 在选择性 0.1× TSA 平板上生长的垂体苍白杆菌。从左到右，依次接种 10^4 、 10^3 、 10^2 与 10 倍菌悬液稀释后长出的细菌菌落。方框标记区域的 CFU (菌落形成单位) 数量适用于细菌的定量。

20. 计算群落中各菌株的相对含量。

20.1 在生物安全柜中或靠近火焰处进行步骤 2 至 16。

20.2 观看视频 1，了解步骤 2 至 7 的详细信息。

20.3 观看视频 2，了解步骤 10 至 16 的详细信息。

四、模式细菌群落防治玉米苗枯病效果的检测

注：在超净工作台内或靠近火焰处进行步骤 1 至 10。

1. 将直径为 0.5 cm 的轮枝镰刀菌 (*Fusarium verticillioides*) MRC826 的菌饼置于马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 平板的中心，于 28 °C 培养 7 天，直到菌丝覆盖整个平板。

2. 将 20 ml 的无菌 1× PBS 缓冲液加入生长于 PDA 平板上的轮枝镰刀菌菌落中。
3. 使用细胞刮刀收获新鲜的真菌孢子。
4. 采用八层无菌纱布过滤真菌孢子悬浮液。
5. 稀释孢子悬浮液，并在显微镜下使用血球计数器对孢子进行计数。
6. 使用 0.01% (vol/vol) 的无菌吐温 20 将悬浮液的浓度调整至每毫升约 10^8 个孢子，并储存于 4 °C。
7. 使用无菌 1× PBS 缓冲液稀释悬浮液至每毫升约 10^6 个孢子。
8. 将真菌孢子涂布于 20 ml 2.25% (wt/vol) 的水琼脂平板上 ($\sim 10^3$ CFU/cm²)。
9. 将 10 粒经表面灭菌的玉米种子 (图 1. B) 分别置于 30 ml 7 菌株悬浮液、各单一菌株悬浮液、或者大肠杆菌 DH5α 悬浮液中，浸泡 0.5 至 1.0 h。另外，将 10 粒经表面灭菌的种子浸泡于 30 ml 的无菌 1× PBS 中 0.5 至 1.0 h，作为对照。
10. 用无菌镊子将玉米种子放在水琼脂平板上。
11. 将平板置于 23 °C、黑暗条件下 10 天。
12. 每天统计并记录各处理中表面可观察到真菌菌丝的种子数 (图 4. A)，根据以下公式计算真菌定殖率：

$$\text{真菌定殖率} = \frac{\text{表面有明显菌丝的种子数}}{\text{种子总数}} \times 100\%$$
13. 分别在接种后的第 4 天与第 10 天，使用体视显微镜拍摄每粒种子表面的真菌菌丝 (图 4. B)。

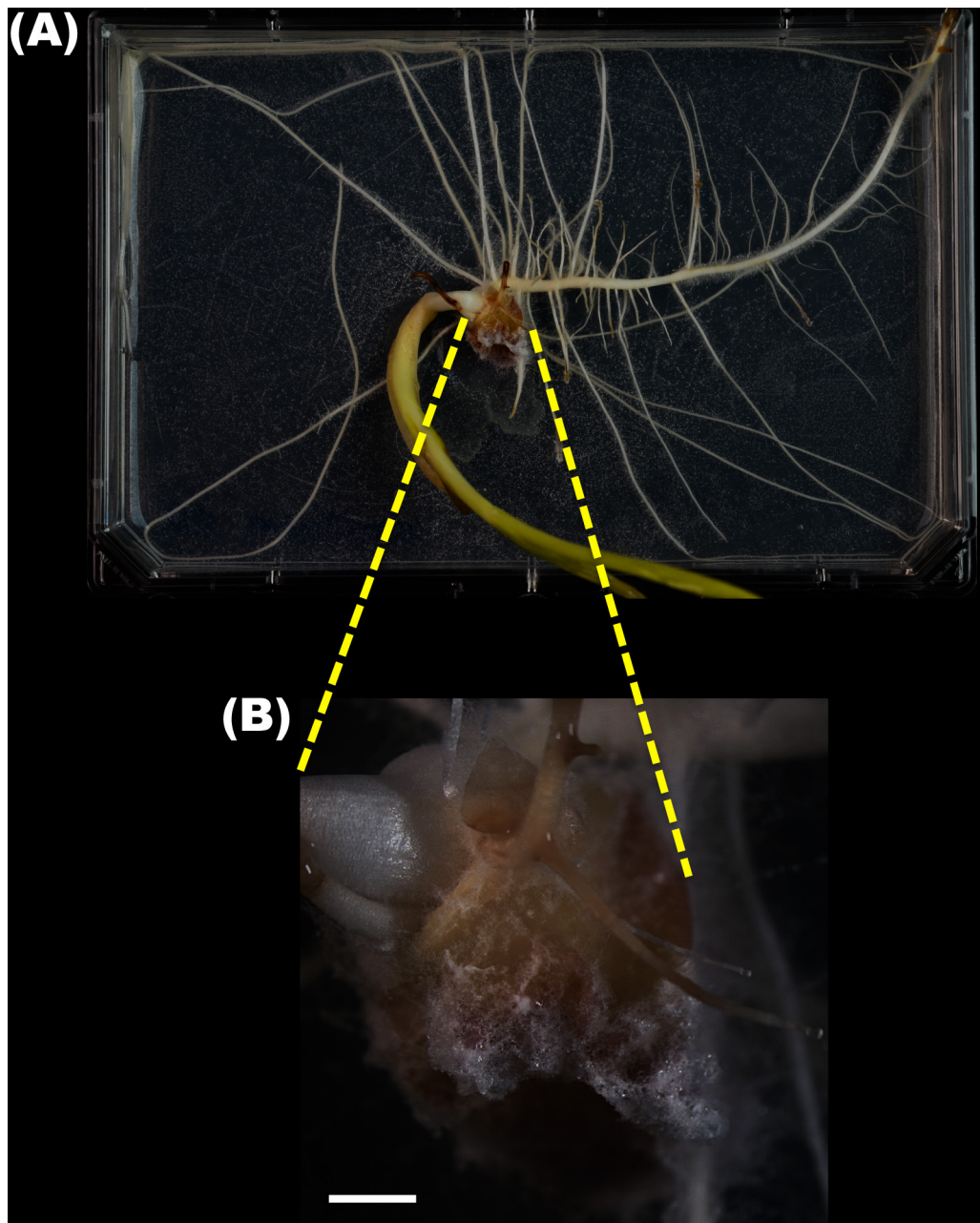


图 4. 接种模式细菌群落与轮枝镰刀菌的玉米幼苗。A. 在涂布真菌孢子的水琼脂上生长 10 天的接种细菌群落的玉米幼苗。琼脂上的白色斑点是由真菌孢子发育而成的真菌菌落。B. 放大的玉米种子，如黄色虚线所示。白色毛状物是定殖于种子表面的真菌菌丝（比例尺= 2 mm）。

14. 接种后第 10 天，调查各处理中玉米苗枯病的严重程度，参考前期研究中确定的病害等级 (Niu *et al.*, 2017)，根据公式 (Sherwood and Hagedorn, 1958) 计算病害严重度指数：

$$\text{病害严重度指数} = \frac{\sum \text{病害等级} \times \text{该等级的幼苗数}}{\text{幼苗总数} \times \text{最大等级}} \times 100$$

病害等级如下:

- 0 级: 籽粒表面无可见真菌菌丝生长, 根部无病斑;
- 1 级: 籽粒表面无可见真菌菌丝生长, 根部出现棕褐色病斑;
- 2 级: 籽粒表面被真菌菌丝部分覆盖, 且根部出现棕褐色病斑;
- 3 级: 籽粒表面被真菌菌丝部分覆盖, 且根部出现棕褐色至褐色病斑;
- 4 级: 籽粒表面被真菌菌丝完全覆盖, 且根部出现棕褐色至褐色病斑;
- 5 级: 籽粒表面被真菌菌丝完全覆盖, 且根部出现棕红色病斑 (Niu *et al.*, 2017)。

数据分析

根据每个菌株的相对含量, 通过使用 RStudio 中 “Vegan” 软件包 (version 0.99.903) 计算 Bray-Curtis (BC) 距离。使用 “gplots” 中的 “hclust” 功能, 通过层次聚类, 生成相异矩阵对应的聚类树状图。采用 QIIME (version 1.6.0) 计算接种 6 菌株混合菌悬液的玉米根表细菌群落与接种 7 菌株混合菌悬液的根表细菌群落之间的 BC 距离。采用 Fisher's LSD 检验 (PRISM, version 6.0c) 进行以下比较: 1) 每株植物的 6 菌株群落与 7 菌株群落之间的 BC 距离。2) 单独采用 *F. verticillioides* 处理, *F. verticillioides* 与模式细菌群落共同处理, *F. verticillioides* 分别与各菌株共同处理, 以及 *F. verticillioides* 与大肠杆菌 DH5α 共同处理的玉米幼苗的真菌定殖率与病害严重度指数。

溶液配方

1. 胰蛋白胨大豆琼脂培养基

20 g 胰蛋白胨大豆琼脂 (HiMedia Laboratories)

1,000 ml 蒸馏水

121 °C 高压灭菌 20 min

2. 0.1× 胰蛋白胨大豆琼脂培养基

1.38 g 胰蛋白胨大豆肉汤 (不含葡萄糖) (BD)

7.5 g 琼脂 (BD)

500 ml 蒸馏水

121 °C 高压灭菌 20 min

3. 胰蛋白胨大豆肉汤培养基

13.75 g 胰蛋白胨大豆肉汤 (不含葡萄糖) (BD)

1,000 ml 蒸馏水

121 °C 高压灭菌 20 min

4. 1× 磷酸盐缓冲液 (PBS)

100 ml 不含钙或镁的 PBS (10×) (Lonza)

900 ml 蒸馏水

121 °C 高压灭菌 20 min

5. ½ Murashige 和 Skoog (MS) 琼脂培养基

2.15 g Murashige 和 Skoog 基础盐混合物 (Sigma-Aldrich)

4 g 琼脂 (BD)

500 ml 蒸馏水

121 °C 高压灭菌 20 min

6. *S. maltophilia* ZK5342 选择培养基

1.38 g 胰蛋白胨大豆肉汤 (不含葡萄糖) (BD)

7.5 g 琼脂 (BD)

500 ml 蒸馏水

121 °C 高压灭菌 20 min

将灭菌后的培养基冷却至 60 °C, 加入 300 µl 新生霉素 (Sigma-Aldrich) (100 mg/ml)

和 12.8 µl 妥布霉素 (Sigma-Aldrich) (39.1 mg/ml)

7. *O. pituitosum* ZK5343 的选择培养基

1.38 g 胰蛋白胨大豆肉汤 (不含葡萄糖) (BD)

7.5 g 琼脂 (BD)

500 ml 蒸馏水

121 °C 高压灭菌 20 min

将灭菌后的培养基冷却至 60 °C, 加入 200 µl 粘菌素 (Sigma-Aldrich) (10 mg/ml),

125 µl 红霉素 (Sigma-Aldrich) (20 mg/ml) 和 70 µl 万古霉素 (Sigma-Aldrich) (100 mg/ml)

8. *C. pusillum* ZK5344 选择培养基

1.38 g 胰蛋白胨大豆肉汤 (不含葡萄糖) (BD)

7.5 g 琼脂 (BD)

500 ml 蒸馏水

121 °C 高压灭菌 20 min

将灭菌后的培养基冷却至 60 °C, 加入 1,132 µl 萘啶酸 (Sigma- Aldrich) (5 mg/ml), 226.4 µl 粘菌素 (Sigma-Aldrich) (10 mg/ml) 和 66 ml NaCl (VWR International) (30%, wt/vol)

9. *E. ludwigii* ZK5345 选择培养基

1.38 g 胰蛋白胨大豆肉汤 (不含葡萄糖) (BD)

7.5 g 琼脂 (BD)

500 ml 蒸馏水

121 °C 高压灭菌 20 min

将灭菌后的培养基冷却至 60 °C, 加入 163.77 µl 红霉素 (Sigma-Aldrich) (20 mg/ml) 和 155.07 ml NaCl (VWR International) (30%, wt/vol)

10. *C. indologenes* ZK5346 选择培养基

1.38 g 胰蛋白胨大豆肉汤 (不含葡萄糖) (BD)

7.5 g 琼脂 (BD)

500 ml 蒸馏水

121 °C 高压灭菌 20 min

将灭菌后的培养基冷却到 60 °C, 加入 650 µl 金霉素 (Solarbio) (10 mg/ml)、400 µl 粘菌素 (Sigma-Aldrich) (10 mg/ml) 和 250 µl 萘啶酸 (Sigma-Aldrich) (5 mg/ml)

11. *H. frisingense* ZK5347 选择培养基

1.38 g 胰蛋白胨大豆肉汤 (不含葡萄糖) (BD)

7.5 g 琼脂 (BD)

500 ml 蒸馏水

121 °C 高压灭菌 20 min

将灭菌后的培养基冷却至 60 °C，加入 1,000 µl 萘啶酸 (Sigma-Aldrich) (5 mg/ml), 200 µl 粘菌素 (Sigma-Aldrich) (10 mg/ml) 和 1,000 µl 林可霉素 (Sigma-Aldrich) (50 mg/ml)

12. *P. putida* ZK5348 选择培养基

1.38 g 胰蛋白胨大豆肉汤 (不含葡萄糖) (BD)

7.5 g 琼脂 (BD)

500 ml 蒸馏水

121 °C 高压灭菌 20 min

将灭菌后的培养基冷却到 60 °C 左右后，加入 500 µl 萘啶酸 (Sigma-Aldrich) (5 mg/ml) 和 125 µl 红霉素 (Sigma-Aldrich) (20 mg/ml)

13. 马铃薯葡萄糖琼脂培养基

200 g 马铃薯提取物

17 g 琼脂 (BD)

20 g 葡萄糖 (VWR International)

1,000 ml 蒸馏水

115 °C 高压灭菌 20 min

14. 水琼脂培养基

11.25 g 琼脂 (BD)

500 ml 蒸馏水

121 °C 高压灭菌 20 min

致谢

感谢 Charles Bacon 博士馈赠轮枝镰刀菌菌株 (*Fusarium verticillioides*)。感谢 Kolter 实验室成员提供的宝贵建议。本项工作得到了国家自然科学基金 (31801785)、黑龙江省自然科学基金 (YQ2019C002)、美国卫生部项目 (GM58213)、中央高校基本科研业务费专项资金项目 (2572018BD05) 与东北林业大学引进人才科研启动经费项目 (JQ2017-02) 的资助。本实验流程基于已发表的论文 (Niu and Kolter, 2017; Niu *et al.*, 2017) 撰写。

参考文献

1. Hinton, D. M. and Bacon, C. W. (1995). [Enterobacter cloacae is an endophytic symbiont of corn.](#) *Mycopathologia* 129(2): 117-125.
2. Niu, B. and Kolter, R. (2017). [Complete genome sequences of seven strains somposing a model cacterial community of maize roots.](#) *Genome Announc* 5(36).
3. Niu, B., Paulson, J. N., Zheng, X. and Kolter, R. (2017). [Simplified and representative bacterial community of maize roots.](#) *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(12): E2450-E2459.
4. Sherwood, R. and Hagedorn, D. J. (1958). [Determining common root rot rotential of rea fields.](#) *Agricultural Experiment Station*, University of Wisconsin, Madison, WI.

请通过以下链接下载视频 1，视频 2：

视频 1：

https://os.bio-protocol.org/doc/upprotocol/p3399/Abstract3399_20200723070734209/Video%201.mov

视频 2：

https://os.bio-protocol.org/doc/upprotocol/p3399/Abstract3399_20200723070734561/Video%202.mov