

5种染色剂对枳砧纽荷尔脐橙根系 AM 真菌染色效果比较

李冬萍¹, 宋娟¹, 李铭燕², 刘金华³, 刘升球⁴, 郭道君⁵, 李贤良⁴, 张金莲^{1,6}, 陈廷速¹

(1 广西农业科学院微生物研究所, 南宁, 530007; 2 河池学院, 广西宜州, 546300;

3 浙江养生堂天然药物研究所有限公司, 杭州, 310007; 4 广西特色作物研究院, 广西桂林, 541004;

5 广西大学农学院, 南宁, 530007; 6 厦门大学公共卫生学院, 福建厦门, 361005)

摘要 以广西富川栽培的枳砧纽荷尔脐橙健康植株的根系为试验材料, 探讨 5 种染色剂(苏丹红 IV、酸性品红、苯胺蓝、台酚蓝和 Quink 牌纯黑墨水)对根系 AM 真菌染色效果的影响。结果表明, Quink 牌纯黑墨水的染色效果最佳, 根系 AM 真菌的菌丝、孢囊、丛枝等结构清晰可见, 且不易褪色、操作简单、安全无毒, 适用于根系 AM 真菌的染色和制片观察。研究也显示 AM 真菌在广西富川的枳砧纽荷尔脐橙根系上普遍存在。

关键词 柑桔; 枳; 根系; AM 真菌; 染色

丛枝菌根(arbuscular mycorrhizal, AM)真菌广泛分布于土壤中, 是一类专性活体营养共生菌, 只有与活体植物根系建立共生关系后, 才能正常地生长、发育、繁殖并完成生活史^[1]。当 AM 真菌菌丝的一端着生在根系内部, 即形成丛枝菌根。AM 真菌发达的根外菌丝能从土壤中吸收矿质营养元素和水分等供寄主植物生长, 另一方面则需要寄主植物提供其自身生长所需的生长物质和碳水化合物等^[2]。许多研究表明, AM 真菌不仅能够促进宿主植物对水分和土壤矿质元素(尤其是磷、锌、铜等矿质元素)的吸收和利用, 增强宿主植物对贫瘠、干旱、病虫害等不良环境的抵抗能力, 还能改善土壤的理化性状, 促进植物生长, 提高作物品质和产量^[3-4]。在栽培条件下, 柑桔根系根毛短且少, 甚至没有, 很大程度上依赖 AM 真菌来增强吸收功能^[5]。因此, AM 真菌对于促进柑桔生长、抗性及其果实品质具有重大意义。

AM 真菌侵染情况观察是 AM 真菌研究的基础。多年来, 学者们为找到安全无毒、

操作简单、染色效果稳定的根系 AM 真菌染色技术, 针对不同的植物相继建立了多种染色方法。Phillips 和 Kormanik 等^[6-7]首先分别报道了台酚蓝和酸性品红染色法, 应用于根系 AM 真菌观察。Vierheilig 等^[8]首次将醋酸墨水染色法应用于根系 AM 真菌染色, 染色效果极佳。吴强盛等^[9]用台酚蓝染柑桔的根样可以清楚看到 AM 真菌的各个结构, 但是没有明确显示丛枝结构的形态细节。

本研究比较了苏丹红 IV、酸性品红、苯胺蓝、台酚蓝、Quink 牌纯黑墨水 5 种常用染色剂对枳砧纽荷尔脐橙根系 AM 真菌的染色效果, 获得了较清晰的 AM 真菌在根系中的丛枝结构照片, 建立安全可靠理想的染色方法, 为研究柑桔根系的 AM 真菌提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料 多年种植的枳砧纽荷尔脐橙根系, 于 2019 年 1 月 27 日采自广西壮族自治区贺州市富川瑶族自治县, 均为健康植株的根系, 清水冲洗干净后, FAA 固定液[福尔马

收稿日期: 2020-01-09; 修回日期: 2020-04-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31360356); 广西科技攻关项目(桂科 AA17204046-4); 厦门大学联合项目(2017-21); 广西农业科学院科技项目(2015YT81); 广西科技基地和人才专项(桂科 AD20159001)资助。

第一作者: 李冬萍(1986—), 女, 助理研究员, 研究方向为土壤 AM 真菌。E-mail: 1300187839@qq.com

通信作者: 张金莲, 助理研究员。E-mail: zhangjinlian1@126.com

陈廷速, 研究员。E-mail: chen20409@hotmail.com

DOI: 10.13938/j.issn.1007-1431.20200028

林(38%甲醛)5 mL+冰醋酸5 mL+70%酒精90 mL]处理并室温保存。

苏丹红IV染色剂:苏丹IV染料0.1 g,溶于10 mL 95%酒精中,然后加入10 mL甘油。酸性品红染色剂:酸性品红0.05 g+乳酸-甘油-蒸馏水(1:1:1)混剂100 mL。苯胺蓝染色剂:苯胺蓝0.1 g+95%酒精100 mL。台酚蓝染色剂:台酚蓝0.05 g+乳酸-甘油-蒸馏水(1:1:1)混剂100 mL。Quink牌纯黑墨水染色剂:5%冰乙酸95 mL+Quink牌纯黑墨水5 mL。

1.2 染色 染色方法参考文献[1]并略作改进。取保存于FAA固定液的根系,清水冲洗干净用漏勺控干水分→根系剪成约1 cm长,放入组织包埋盒中,加入20% KOH溶液(完全浸泡),90℃水浴0.5 h,清水冲洗3次并控干水分→加入碱性H₂O₂(10% H₂O₂ 10 mL+氨水1 mL+蒸馏水189 mL)室温脱色2 h,用清水冲洗3次并控干水分→加5%冰乙酸,室温酸化2 h,倒掉冰乙酸溶液,将根系分装到离心管中→分别用供试染色剂66℃水浴染色1 h,完成后倒去染液,用清水漂洗数次,再用清水浸泡12 h以上脱色,备用。

1.3 制片、显微观察和侵染率计算 取完成染色处理的根段于载玻片上,挑出根中的坚硬组织,将剩余组织平展在载玻片上,柑桔根的外皮为两层结构(外皮及内皮),轻轻地用尖嘴镊子将外皮与内皮分开,每片平行摆放2~4个根段,盖上盖玻片,用镊子轻轻敲压使根段平展均匀。每个处理制片3张,3次重复。使用尼康Eclipse Ci-L和DS-Ri2观察和拍照。

按照BGC使用的方法测定菌根侵染率:在显微镜下检查每条根段的侵染情况,如菌丝、泡囊、丛枝等,逐段打分(最低分为0,以10%分为一级,最高分为100%。没有菌根结构的根段为0,若该根段只有一半长度被侵染则为50%,若该根段全部被侵染记为100%,以此类推),记录不同分值的根段条

数,各分值根段条数与其分值乘积之和除以观察根段总数,即为该样品的侵染率^[1]。参考公式:侵染率=(∑分值×该分值根段数)/观察根段总数。

2 结果与分析

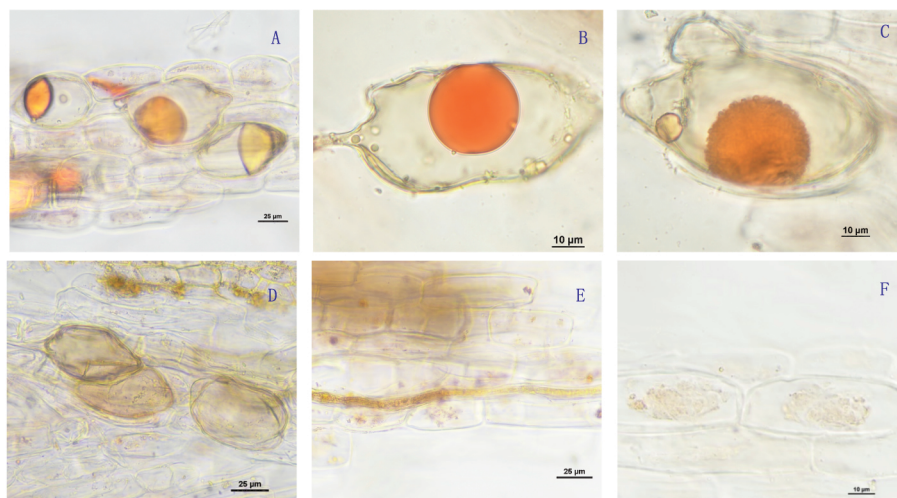
2.1 不同染色剂染色效果 苏丹红IV:染色后,不褪色,但染色不太均一。有些泡囊的内含物染成橙色或橙红色很好辨认(图1A-C);有些泡囊只是染上很浅的黄色,与背景很接近,很难区别(图1D)。菌丝能染成橙色,但是数量极少(图1E);大部分菌丝没有染上颜色,很难鉴别出来。丛枝结构染上很淡的颜色,很难辨别清楚(图1F)。

酸性品红:染色后,AM真菌的菌丝和泡囊都染上很好的颜色,与背景对比明显,但是没有观察到丛枝(图2)。酸性品红染色效果不稳定,同样的材料有些能染上很好的颜色,有些却染不上色或是颜色很淡,且极易褪色。

苯胺蓝:染色后,根系的很多细胞也被染成相同或是相近的颜色,AM真菌的各个结构很难辨别出来,不利于观察。泡囊染色效果一般(图3A)。菌丝染色效果不佳(图3B),与背景色接近或是染色不连续。丛枝染色效果不明显(图3C)。

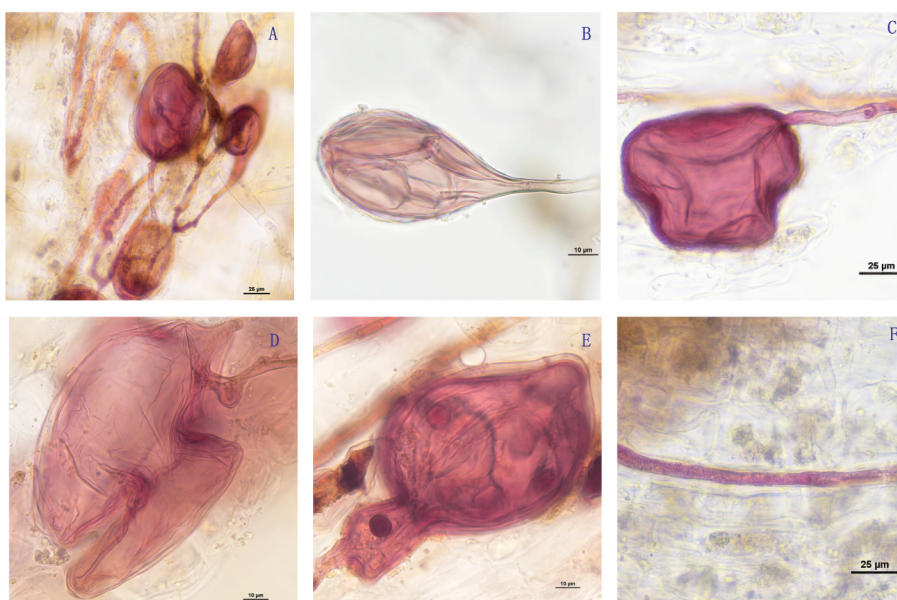
台酚蓝:染色后,可以比较清晰地看到AM真菌的泡囊和菌丝;但从丛枝结构染色效果不是很清晰,由于根皮层组织也染上了略浅的颜色,因此背景反差小,边缘看得不是很清晰(图4)。

Quink牌纯黑墨水:染色后,能清晰地观察到AM真菌的泡囊、根外菌丝、根内菌丝、丛枝等结构,这些结构均染成深蓝紫色且边缘清晰,而且背景颜色淡,反差很大,清晰度高,染色效果极佳(图5)。其中,泡囊的内含物也能看到。可以清楚地看到,AM真菌的菌丝在柑桔根系细胞间生长,再长出侧枝深入细胞内,其菌丝连续二叉式生长形成像花椰菜的丛枝(AM真菌在植物根系特有的典型特征)(图5)。



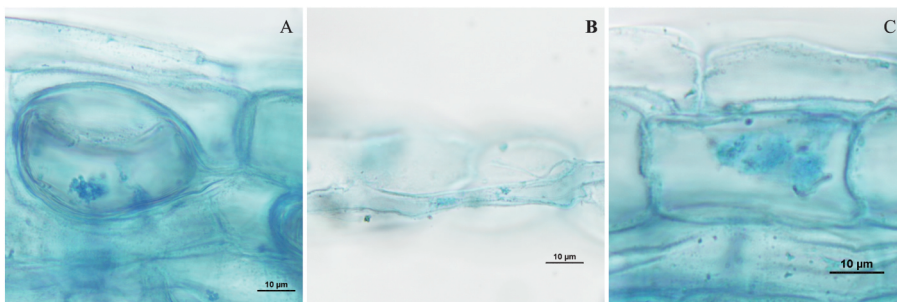
注: A 整体染色效果, B-D 孢囊, E 菌丝, F 丛枝。

图 1 苏丹红 IV 对柑桔丛枝菌根染色的效果



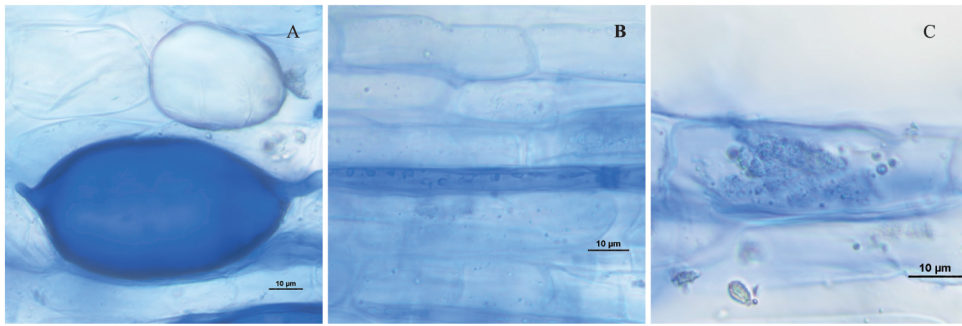
注: A 孢囊和菌丝, B-E 孢囊, F 菌丝。

图 2 酸性品红对柑桔丛枝菌根染色的效果



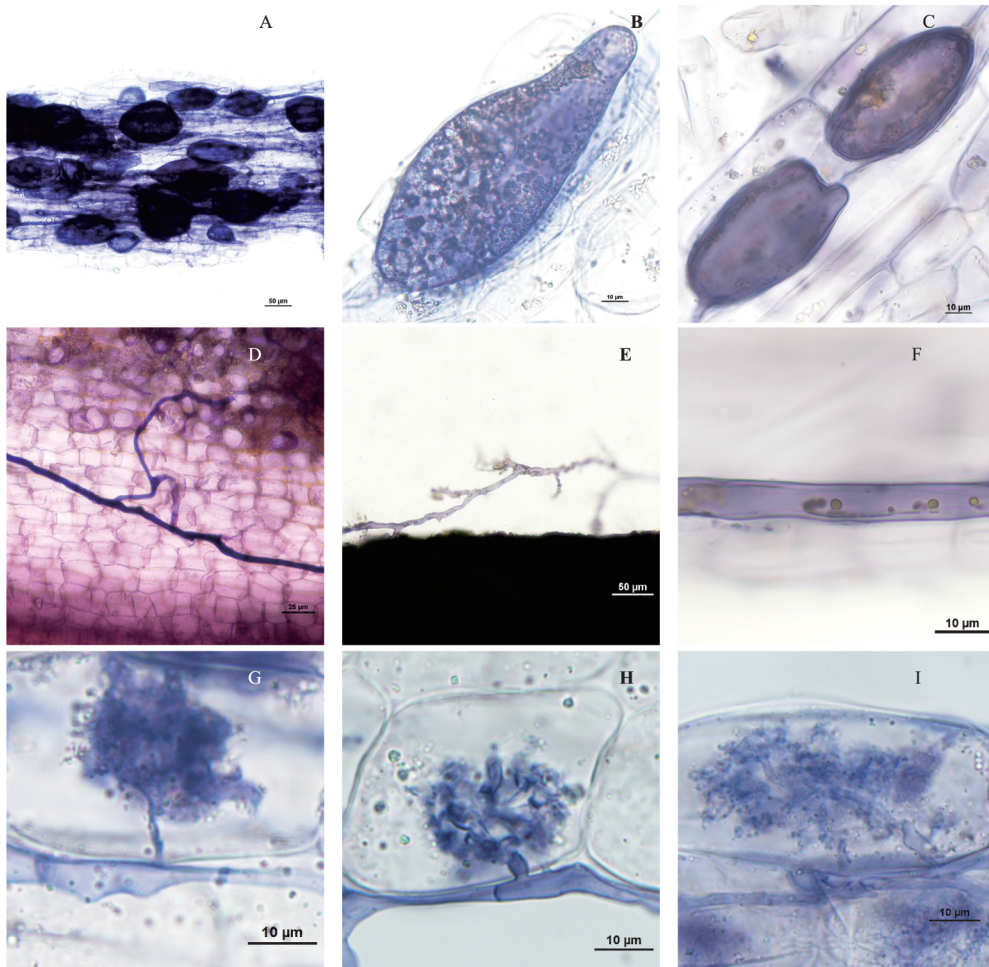
注: A 孢囊, B 菌丝, C 菌丝和丛枝。

图 3 苯胺蓝对柑桔丛枝菌根染色的效果



注:A 孢囊,B 菌丝,C 丛枝。

图4 台酚蓝对柑桔丛枝菌根染色的效果



注:A 整体染色效果, B—C 孢囊, D—E 根上菌丝, F 根内菌丝, G—I 各种形态的丛枝。

图5 Quink 牌纯黑墨水对柑桔丛枝菌根染色的效果

不同染色剂染色效果比较:不同染色剂对AM真菌结构染色的清晰度、反差效果、保存时间以及染色剂的成本、毒性等方面存在较大差别(见表1)。

2.2 侵染率 采用 Quink 牌纯黑墨水对在广西富川所采集的枳砧纽荷尔脐橙植株根样进行染色观察。结果表明,所有调查的根样除了FC2没有被AM真菌侵染外,其余都被

AM 真菌侵染, 菌根侵染率为 13.33%~95.33%(见表 2), AM 真菌在广西富川的枳砧纽荷尔脐橙根系上普遍存在。

从菌根侵染率来看, 各个样点根系的侵染率存在很大的差别。富阳镇木榔村种植 6 年的植株根系侵染率为 0; 立新农场一队同为种植 30 年的植株, 不同点的侵染率相差很大, 一个点仅为 13.33%, 另一个点却高达 95.33%; 由此可见, 菌根侵染率与植株种植年限没有必然的联系。菌根的侵染率受众多环境因子的影响, 如土壤类型、pH 值、养分、含水量和透气性等, 任何因子的变化或者因子间的交互作用, 都会影响 AM 真菌的侵染和扩展^[10]。

3 讨论与结论

根系菌根染色效果直接影响分析菌根定殖的准确性, 因此找到稳定可靠、反差大、安全无毒的染色方法, 十分必要。本试验以枳砧纽荷尔脐橙根系为对象, 当采用苏丹红 IV 染色, AM 真菌孢囊里的内含物染上很深的颜色, 但是菌丝和孢囊壁上染上很浅的颜色或染不上颜色, 连续性不好; 采用酸性品红染色, 孢囊和菌丝能染上很好的颜色, 但是效果不稳定, 有些时候染不上色, 并且持续褪色; 采用苯胺蓝染色, 根的皮层细胞被染上较深的颜色, 但菌丝着色较浅, 较难准确辨别; 采用台盼蓝染色, 根的皮层细胞被染上较浅的颜色, 菌丝边缘不是特别清晰; 采用 Quink 牌纯黑墨水染色, 经清水浸泡过夜后, 虽然根的外皮层细胞颜色还比较深, 但 AM 真菌主要侵染的内皮层细胞可基本完全脱色, AM 真菌各结构则仍然保持鲜亮的深蓝紫色, 与背景反差大, 孢囊、菌丝和丛枝等 AM 真菌典型结构均清晰可见, 染色效果极佳。

台盼蓝和酸性品红是使用较多的染色

表 1 5 种染色剂对枳砧纽荷尔脐橙根系 AM 真菌染色效果

染色剂	染色效果	反差效果	保存时间	成本/ 元·g ⁻¹	毒性
苏丹红 IV	一般	明显	很久不褪色	3	致癌疑似物
酸性品红	一般	明显	持续褪色	10	致癌疑似物
苯胺蓝	差	不明显	很久不褪色	12	致癌疑似物
台盼蓝	好	不明显	很久不褪色	16	致癌疑似物
Quink 牌纯黑墨水	好	明显	很久不褪色	2	无毒

表 2 富川不同采样点枳砧纽荷尔脐橙根系 AM 真菌侵染情况

编号	采样点	种植时间/年	AM 真菌不同结构侵染率/%				总侵染率/%
			根外菌丝	根内菌丝	孢囊	丛枝	
FC1	立新农场七队	25	6.10	86.67	0.17	69.50	86.67
FC2	富阳镇木榔村	6	0.17	0	0	0	0
FC3	柳家乡	8	6.17	89.33	3.20	83.33	89.50
FC4	立新农场一队	30	0	13.33	12.67	0	13.33
FC5	立新农场一队	30	0	95.33	94.33	0	95.33
FC6	立新农场七队	5	1.87	58.33	45.30	6.10	58.50
FC7	福利镇浮田村	8	0.33	82.67	53.50	0	82.67

剂, 但却存在不足, 除了 AM 真菌被染色外, 根皮层组织也会被染上相同而略浅的颜色, 使得 AM 真菌的结构与根组织颜色反差不大, 不利于对丛枝结构等细节进行观察。Vierheilig 指出, 台盼蓝和酸性品红都是致癌疑似物, 采用醋酸墨水与台盼蓝进行比较, 两种方法的侵染率测定结果并无差异, 而醋酸墨水法更简单和安全^[8]。杨亚宁在 Vierheilig 的研究基础上进行改进, 发现 Quink 牌纯黑墨水在各方面的表现比 Shaeffer 牌纯黑墨水更优异^[11], 这两种墨水中使用的染料有亮黑 (CI. 28440, CI. Food Black 1) 和坚牢黄 (CI. 13015, CI. Food Yellow 2), 均为食用色素, 安全无毒^[12]。除 Quink 牌纯黑墨水外, 其余 4 种染料都是致癌疑似物, 长期使用可能对操作者的健康有害, 价格也比较高。因此, 采用 Quink 牌纯黑墨水染色可以兼顾好的染色效果、准确且安全, 适合枳砧柑桔嫁接树根系 AM 真菌侵染检测、制片和观察。

参 考 文 献

- [1] 王幼珊, 张淑彬, 张美庆. 中国丛枝菌根真菌资源与种质资源[M]. 北京: 中国农业出版社, 2012
- [2] SMITH S E, READ D J. Mycorrhizal Symbiosis[M]. 2nd ed. London: Academic Press, 1997
- [3] BOROWICZ V. Do arbuscular mycorrhizal fungi alter plant-pathogen relations[J]. Ecology, 2001, 82: 3057-3068 (下转第 44 页)

脐橙完全成熟期的可溶性固形物含量为 13.62%，维生素 C 含量为 63.41 mg/100 g^[14]。肖南等研究发现，广西贺州市不同脐橙的可溶性固形物含量最高的为 12.5%^[15]。本研究发现，浙江省脐橙的可溶性固形物含量在 12.00%~15.25% 之间，朋娜裂果率平均达 14.48%，纽荷尔裂果率平均为 4.04%，其他品种(系)的裂果率平均为 10.08%。综合可溶性固形物含量、可食率和裂果率，在浙江省纽荷尔脐橙的综合性状较朋娜和其他脐橙品系佳。与全国脐橙主产地相比，浙江省脐橙的品质总体较佳。

开展脐橙种质间亲缘关系分析，可为今后的品种选育及改良提供参考，对保护基因资源多样性和制定科学合理的选种、育种策略均具有重要意义。本结果表明，根据遗传距离，在供试 17 份脐橙种质中，Q001、Q002、Q003、Q006、Q007 和 Q013 亲缘关系近，聚为一类，为朋娜类；Q017 与 Q018 的遗传距离为 0.0762，说明脐橙 4 号有可能是纽荷尔品种。将 Q011、Q015、Q016、Q017 和 Q18 亲缘关系近，聚为一类，为纽荷尔类；其他材料不能归为朋娜或纽荷尔。苍南产地的 Q004(脐橙 2 号)与其他各品种之间的遗传距离远，说明并非纽荷尔和朋娜品种。Q005 和 Q009 的遗传距离为 0.1805，亲缘关系较近，由此认为 Q005(脐橙 3 号)并非朋娜系品种，而有可能是与 Q009 来源相同的日本大

山岛品种。

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国国家标准 柑桔鲜果检验方法:GB/T 8210—2011[S]. 北京:中国标准出版社,2011:7-8
- [2] 曹小勇. 槭树科槭树植物形态学研究[J]. 汉中师范学院学报,2000,18(2):69-73
- [3] 张海英,许勇,工勇健. 分子标记技术概述[J]. 园艺学报,2001,16(2):20-26
- [4] WILLIAMS J G K, KUBELIK A R, LIVAK K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acid Res, 1990, 18: 6531-6534
- [5] WELSH J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucleic Acid Res, 1990, 18(24): 7213-7218
- [6] 汪小全,邹喻萃,张大明,等. RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题[J]. 植物学报,1996,38(12):954-962
- [7] 苏晓华,张绮纹,郑先武,等. 美洲黑杨(*Populus deltoides* Marsh)×青杨(*P. cathayana* Rehd.) 分子连锁图谱的构建[J]. 林业科学,1998,34(6):29-37
- [8] 顾红雅,瞿礼嘉. 植物分子生物学实验手册[M]. 北京:高等教育出版社,1998:3-12
- [9] 吴黎明,蒋迎春,吴述勇,等. 5 个晚熟脐橙品种在湖北秭归栽培试验[J]. 中国果树,2015,48(4):53-56
- [10] 李大志,周嘉,刘显东,等. 湖南产区甜橙果实品质分析[J]. 中国南方果树,2019,48(4):10-13
- [11] 朱丽莎,董超,赵静,等. 重庆主栽甜橙品种果实品质比较分析[J]. 中国南方果树,2018,47(4):128-135
- [12] SONG J, LI G, YANG X. Optimizing genetic algorithm-partial least squares model of soluble solids content in Fukumoto navel orange based on visible-near-infrared transmittance spectroscopy using discrete wavelet transform. [J]. J Sci Food Agric,2019, 99(11):4898-4903
- [13] YANG Qiong, WANG Ya, JIA Xuemei, et al. Fruit yield and quality response of Newhall navel orange to different irrigation regimes and ground cover in Chongqing Three Gorges Reservoir area[J]. Scientia Horticulturae, 2018, 241: 57-64
- [14] 孙莹,陈世珍,朱丽琴,等. 不同成熟度赣南“纽荷尔”脐橙香气成分和主要品质指标分析[J]. 江西农业大学学报,2015,37(3):429-434
- [15] 肖南,银秋玲,刘艳珍,等. 贺州市不同脐橙果肉品质的评价与比较[J]. 江西农业大学学报,2019,31(5):91-95 (责任编辑:李治飞)

(上接第 40 页)

- [4] Fitter A H. Darkness visible: reflections on underground ecology[J]. J Ecol, 2005, 93: 231-243
- [5] DAVIES F S, ALBRIGO L G. Citrus[M]. Wallingford: CAB International, 1994
- [6] PHILLIPS J M, HAYMAN D S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection[J]. Transactions of the British Mycological Society, 1970, 55: 158-160
- [7] KORMANIK P P, BRYON W C, SCHULTZ R C. Procedures and equipment for staining large numbers of plant root samples for endomycorrhizal assay[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1980, 26(4): 536-538
- [8] VIERHEILIG H, COUGHLAN A P, WYSS U, et al. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular mycorrhizal fungi[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(12): 5004-5007
- [9] 吴强盛,夏仁学. 柑桔丛枝菌根形态结构观察[J]. 亚热带植物科学,2010,39(2):14-16
- [10] 刘润进,李晓林. 丛枝菌根及其应用[M]. 北京:科学出版社,2000
- [11] 杨亚宁,巴雷,白晓楠,等. 一种改进的丛枝菌根染色方法[J]. 生态学报,2010,30(3):774-779
- [12] 齐宗韶. 犀飞利黑墨水标准派克纯黑墨水染料分析[J]. 中国制笔,2008(2):9-11 (责任编辑:李治飞)