

甘蔗根系内生真菌染色方法探讨

廖楠^{1,2} 张金莲² 李冬萍² 汪茜² 龙艳艳²,
谭裕模³ 李松⁴ 陆祖军^{1*} 陈廷速^{2*}

(1. 广西师范大学生命科学院, 广西 桂林 541004; 2. 广西农业科学院微生物研究所, 广西 南宁 530007; 3. 广西农业科学院农业资源与环境研究所, 广西 南宁 530007; 4. 广西农业科学院甘蔗研究所, 广西 南宁 530007)

摘要: 为了建立一种甘蔗根系内生真菌最佳的染色方法, 便于更好观察甘蔗根际土壤丛枝菌根(Arbuscular mycorrhiza, AM) 真菌和深色有隔内生真菌(Dark septate endophytes, DSE) 对甘蔗根系的侵染情况。将甘蔗根样置于 20% 的 KOH 溶液中 90 °C 水浴透明 90~120 min; 接着加入碱性 H₂O₂ 脱色 60 min; 5% 的乙酸酸化 5 min 后, 用 5% 的墨水醋酸染液(Quink 牌纯黑墨水、北京牌蓝黑墨水)、酸性品红、苏丹红 IV、台盼蓝、苯胺蓝为染液, 在 66 °C 水浴染色 30 min, 用清水浸泡(12 h) 脱色后即可镜检。经过碱性 H₂O₂ 脱色 60 min 后 Quink 牌纯黑墨水染色的根系, AM 真菌的菌丝和泡囊以及 DSE 微菌核能够清晰可见。此实验建立的墨水醋酸染法安全性高而且操作简便, 成本低廉。相对于其他染色方法毒性低, 对环境的污染小, 而且染色效果稳定, 更适于观察和镜检拍照。

关键词: 甘蔗根系; 内生真菌; 丛枝菌根真菌; 深色有隔内生真菌; 染色

中图分类号: S154.38 文献标识码: A

Method to Stain Endophytic Fungi in Sugarcane Roots

LIAO Nan^{1,2}, ZHANG Jin-lian², LI Dong-ping², WANG Qian², LONG Yan-yan², TAN Yu-mo³, LI Song⁴, LU Zu-jun^{1*}, CHEN Ting-su^{2*}
(1. College of Life Science, Guangxi Normal University, Guangxi Guilin 541004, China; 2. Microbiology Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Guangxi Nanning 530007, China; 3. Resource and Environment Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Guangxi Nanning 530007, China; 4. Sugarcane Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Guangxi Nanning 530007, China)

Abstract: An experiment was conducted to establish a method for staining endophytic fungi in sugarcane roots to observe arbuscular mycorrhizal (AM) fungi and dark septate endophyte (DSE) colonizations. Sugarcane roots were treated with 20% KOH solution for 90 to 120 min in water bath at 90 °C, and then the roots were destained by immersing in alkaline H₂O₂ for 60 min. After acidified in 5% acetic acid for 5 min, the roots were dyed with five stains i. e. vinegar with 5% ink dye (Black ink of Quink brand and Dark blue of Beijing brand), acid fuchsin, Sudan Red IV, trypan blue, and aniline blue in water bath for 30 min at 66 °C. Sugarcane roots were cleared by immersing in tap water for 12 h. After clearing with alkaline H₂O₂ solution for 60 min, the structure of both of hyphae and vesicle of AM fungi and microscle-rotia of DSE stained with ink dye (Black ink, Quink brand) could be clearly visible. The ink-vinegar solution staining provided a simple, low toxic and inexpensive technique for staining endophytic fungi in sugarcane roots with excellent staining results, and it is beneficial for observation and photograph, with little pollution to the environment.

Key words: Sugarcane root; Endophytic fungi; Arbuscular mycorrhizal fungi; Dark septate endophytes; Staining

甘蔗是我国重要的糖料作物。甘蔗主要采用单一的连作制, 经过多年的连作和过量施用化肥, 许多蔗区土壤呈酸性, 严重退化^[1], 蔗田养分严重失衡, 土壤理化性质的改变和质量下降, 已难以通过单独

增加施肥来提高产量, 成为制约目前甘蔗产业持续发展的重要因素之一。丛枝菌根(Arbuscular mycorrhizal Fungi, AM) 是由球囊霉(Glomeromycota) 真菌与植物根系形成的互惠共生体, 约 80% 以上的陆地植物都能形成丛枝菌根, 是自然界中最普遍的一种菌根类型。AM 真菌与植物根系共生后, 能够促进宿主植物对水分和土壤矿质元素(特别是磷) 的吸收和利用, 提高养分的利用率, 增强抗逆性, 促进植物生长, 提高作物产量。AM 真菌存在植物根际形

收稿日期: 2015-12-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31360356); 国家甘蔗产业技术体系项目(CARS-20-3-5); 广西农业科学院重点项目和学科团队项目(2014YP06, 2015YT81, 2015YZ10)

作者简介: 廖楠(1991-), 女, 广西北海人, 研究方向为土壤 AM 真菌多样性, * 为通讯作者, 陆祖军, E-mail: luzujun2002@yahoo.com.cn; 陈廷速, E-mail: chen20409@hotmail.com。

成的庞大菌丝网络系统中,对稳定土壤结构、控制水土流失、增强对土传病害的抑制、保持植物根际土壤生态系统良性发展有重要意义^[2-3]。大田甘蔗接种 AM 真菌能提高土壤 pH 值,增加株高和有效茎数,提高甘蔗产量^[4]。深色有隔内生真菌(dark septate endophytes, DSE)也是一类定殖于植物根内的小型土壤真菌。其一般特征是菌丝颜色较深、具明显横隔,广泛地存在于健康植物根的表面、皮层甚至维管束组织的细胞内或细胞间隙,能够在植物细胞内或细胞间隙形成“微菌核(Microsclerotia)”。DSE 可能具有与菌根真菌类似的生态学功能,在不同生态系统中发挥着重要作用。因此,研究甘蔗根系内生真菌,利用他们来改善甘蔗土壤生态,对提高甘蔗抗逆性和化肥的利用率具有重要的应用价值。植物根系内生真菌染色常用台酚蓝(Trypan blue)^[5-6]和酸性品红^[7-8]。Andre 等^[8]利用台酚蓝染色法分析 50 种杂草根系中的 AM 真菌和 DSE,发现 41 种杂草根系有 AM 真菌结构,29 种有 DSE 结构,其中 27 种杂草根系中存在两种内生真菌。甘蔗根际土壤中存在丰富的 AM 真菌资源^[9],因此,探讨一种稳定的甘蔗根系内生真菌染色方法很有必要。有人用酸性品红和台酚蓝染色方法,分析盆栽甘蔗根系 AM 真菌的侵染情况,都能清晰鉴别根系内 AM 真菌的结构^[10]。但利用这种染色方法检测大田甘蔗的根系时,发现染色效果不好,背景很深。这是由于取自大田甘蔗的根样,大多是甘蔗的主根及二级根,根系老化,呈棕褐色,没有经过过氧化氢(H_2O_2)脱色的根内菌丝和泡囊结构虽然着色深,但背景颜色较深,故菌丝和泡囊结构与背景颜色反差不大。针对甘蔗根系老化,颜色较深的特点,探讨理想的染色方法,为研究不同土壤类型的甘蔗根系内生真菌染色提供基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料与试验试剂

大田甘蔗根系,取自广西柳城甘蔗试验地,50%乙醇室温保存。试验试剂为:20% KOH,碱性 H_2O_2 ,5%乙酸及 Quink 牌纯黑墨水、北京牌蓝黑墨水、酸性品红、苏丹红 IV、台酚蓝、苯胺蓝。

1.2 试验方法:

将保存于 50%乙醇的甘蔗根系,流水冲洗去掉乙醇。将甘蔗根系剪成 1 cm 长的根段,置于 6 个 50 mL 离心管中。按照如下步骤来处理甘蔗根系:①透明:每个离心管中的甘蔗根段用 20%的 KOH 浸没,放入 90℃的水浴锅内,水浴 90~120 min,以除去根部皮层细胞中的细胞质,便于以后的染色中染料能

够尽快渗透^[11]。加热结束后,倒去 KOH,用清水漂洗数遍并将水分控干。②脱色:在 6 个离心管中分别加入碱性 H_2O_2 (10% H_2O_2 30 mL,氨水 3 mL,蒸馏水 567 mL)漂白 60 min,除去甘蔗根系表面的深褐色,同时也可以软化根系。另一个离心管不进行脱色处理作为对照。脱色完成后用清水漂洗并将水分控干。③酸化:在完成不同脱色处理的离心管中加入 5%的乙酸酸化 5 min。④染色:分别加入 6 种不同染液:2 种不同墨水配置的 5%的墨水醋染液(5%乙酸 95 mL + 墨水 5 mL 配制而成);酸性品红(0.15 g 酸性品红 + 100 mL 乳酸 + 100 mL 甘油 + 100 mL 蒸馏水);苏丹红 IV(0.3 g 苏丹红 IV + 74 mL 的 95%酒精 + 24 mL 蒸馏水);台酚蓝[0.05 g 台酚蓝 + 乳酸、甘油、蒸馏水(1:1:1) 100 mL];苯胺蓝(0.5 g 苯胺蓝 + 100 mL 无水乙醇),放入 66℃的水浴锅中水浴染色 30 min。⑤褪色:染色完成后,倒去染液,并用清水漂洗数次后,用清水浸泡 12 h 以上脱色。

1.3 制片及显微观察

选取数根大小一致的根段,平行摆放于载玻片上,盖上盖玻片,用手指将根段稍用力按压。对于一些不易按压的老根,可用镊子将甘蔗根系中心的梗轻挑出来,再进行压片。

2 结果与分析

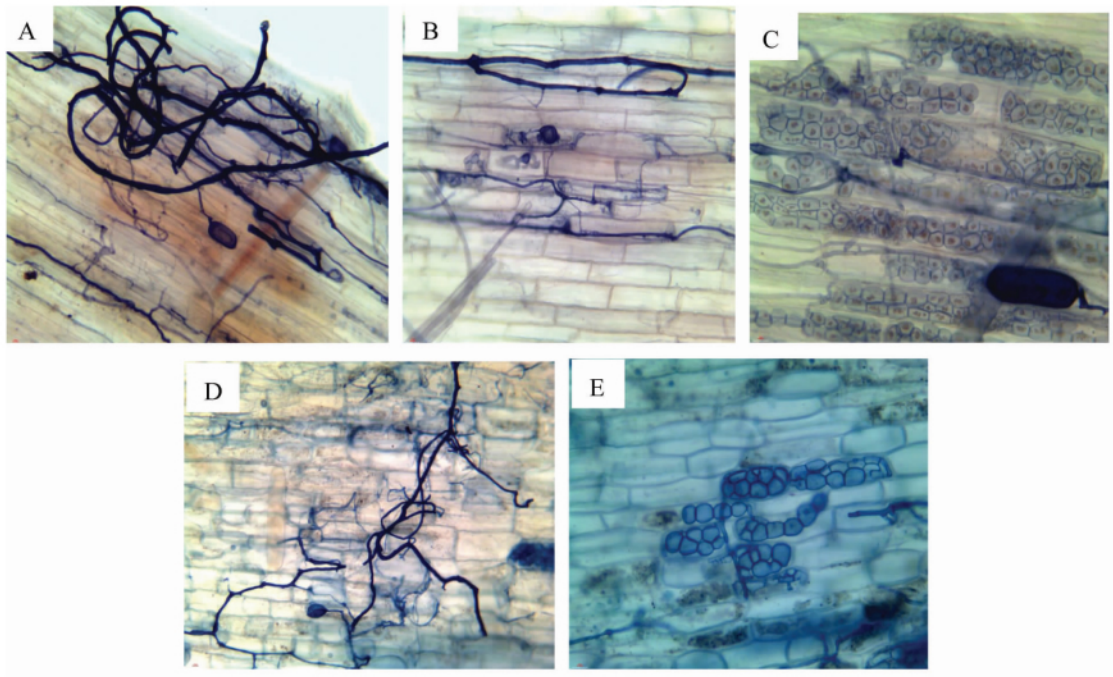
2.1 墨水染色(Quink 牌纯黑墨水、北京牌蓝黑墨水)

从图 1 可知,墨水对根内的 AM 菌丝和泡囊,以及 DSE 的着色都很好,同时背景的褪色也很好,使得染上色的结构与背景的反差大,在低倍镜下就能清楚地观测到(图 1)。墨水染色方法操作简便,成本低廉,而且无毒,染色效果非常好。但是不同的墨水染色之间也存在差异。

用两种不同的墨水进行染色比较,发现 Quink 牌纯黑墨水染色后,经浸泡脱色后背景几乎可以完全褪色,染色效果与背景反差大,在低倍镜下就能清晰地观察到 AM 菌丝和泡囊等结构均着色非常好且牢固;DSE 的微菌核的内含物也能体现出来,可见清晰的有隔菌丝,表现更为细致。而用北京牌蓝黑墨水染色后观察到的菌丝等结构虽然染色效果好,但是相对于 Quink 牌纯黑墨水的背景仍显不足,对 DSE 的表现也不够细致。而且在放置几日后,染上色的菌丝也逐渐褪色,可见染色不够牢固。

2.2 酸性品红染色

用酸性品红染料进行染色后,根内的内生真菌结构着色不好,后期的背景褪色不明显,导致根皮层



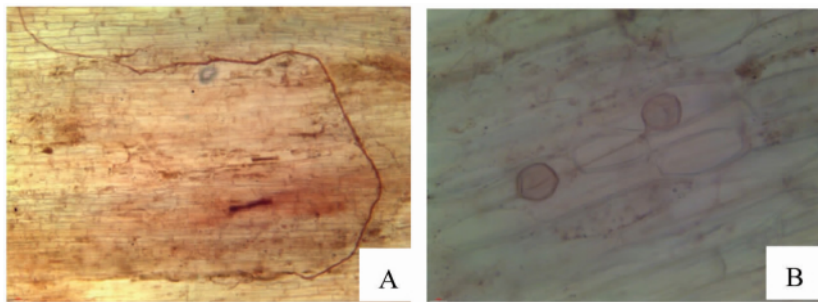
A-B. AM 真菌的菌丝和泡囊 ,Quink 牌纯黑墨水染色; C. DSE 的菌丝和微菌核 ,Quink 牌纯黑墨水染色; D. AM 真菌的菌丝和泡囊 ,北京牌蓝黑墨水染色; E. DSE 的菌丝和微菌核 ,北京牌蓝黑墨水染色

A-B ,AM fungi hyphae and vesicle ,stained with Quick ink; C ,DSE hyphae and microsclerotia ,stained with Quick ink; D ,AM fungal hyphae ,stained with Beijing Dark blue ink; and E ,DSE hyphae and microsclerotia ,stained with Beijing Dark blue ink

图 1 甘蔗根系内生真菌——墨水染色

Fig. 1 The endophytic fungi in sugarcane roots dyed with ink

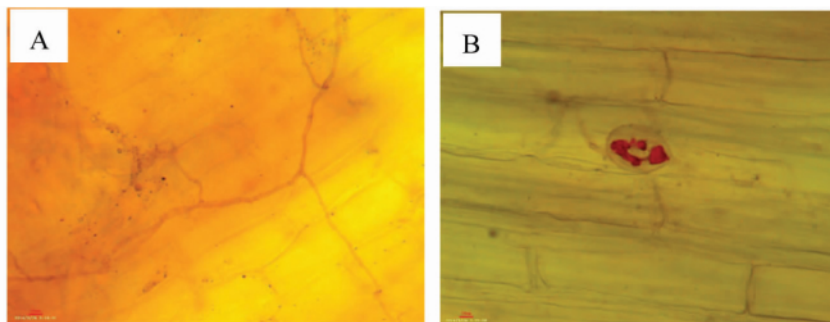
颜色与菌丝等结构颜色相近 ,检测不到 DSE 的着色 ,不利于观察(图 2)。



A. 菌丝; B. 泡囊; A. hyphae; B. vesicle

图 2 甘蔗根系 AM 真菌——酸性品红染色

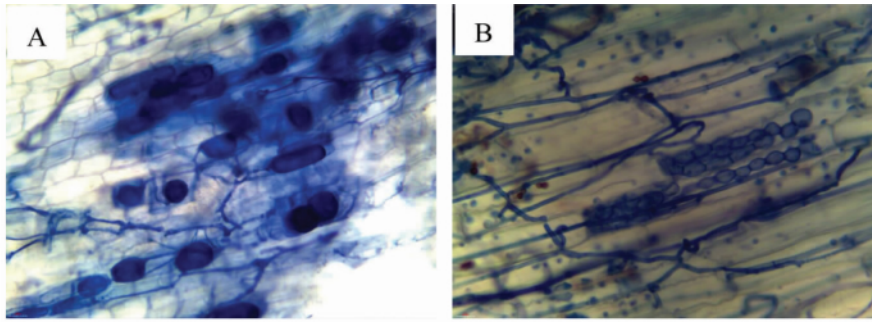
Fig. 2 The AM fungi in sugarcane roots——dyed with acid fuchsin



A. 菌丝; B. 泡囊; A. hyphae; and B. vesicle

图 3 甘蔗根系 AM 真菌——苏丹红 IV 染色

Fig. 3 The AM fungi in sugarcane roots——dyed with Sudan Red IV

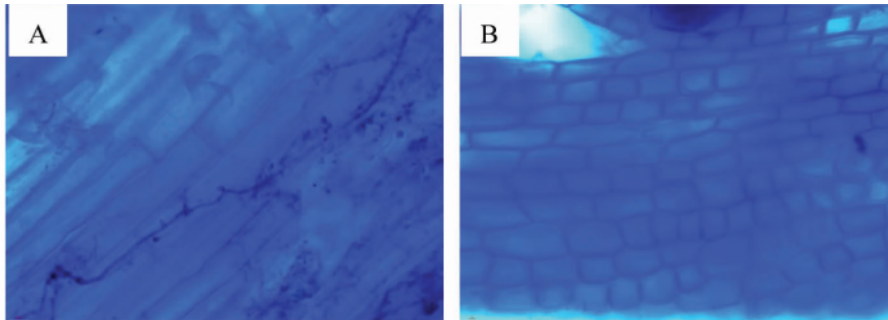


A. AM 真菌的菌丝和泡囊; B. DSE 的菌丝和微菌核

A. AM fungi hyphae and vesicle; ; B. DSE hyphae and microsclerotia

图 4 甘蔗根系内生真菌——台盼蓝染色

Fig. 4 The endophytic fungi in sugarcane roots——dyed with trypan blue



A. 菌丝; B. 背景对照

A. hyphae; ; B. backgroundcontrol

图 5 甘蔗根系内生真菌——苯胺蓝染色

Fig. 5 The endophytic fungi in sugarcane roots——dyed with aniline blue

2.3 苏丹红IV染色

经过苏丹红IV染色后,根系皮层也被染上相同的颜色,不易褪色,但菌丝、泡囊等结构着色淡,与背景反差小,无法观察到DSE的结构(图3)。

2.4 台盼蓝染色

用台盼蓝进行染色后,虽然可观察到AMF和DSE,但是由于根皮层组织和根内的杂质同时也染上了相同或者相近的颜色,所以菌丝颜色与背景反差小(图4)。而且台盼蓝为致癌疑似物,对身体的伤害较大,不利于长期使用。

2.5 苯胺蓝染色

苯胺蓝染色后的背景为深蓝色,和菌丝等结构颜色几乎无法区分,很难观察,而且根内的杂质也多被染色,不利于实验的观察(图5)。而且苯胺蓝的毒性也很大,所以不适用于菌根的染色和制片观察。

2.6 甘蔗根系脱色处理

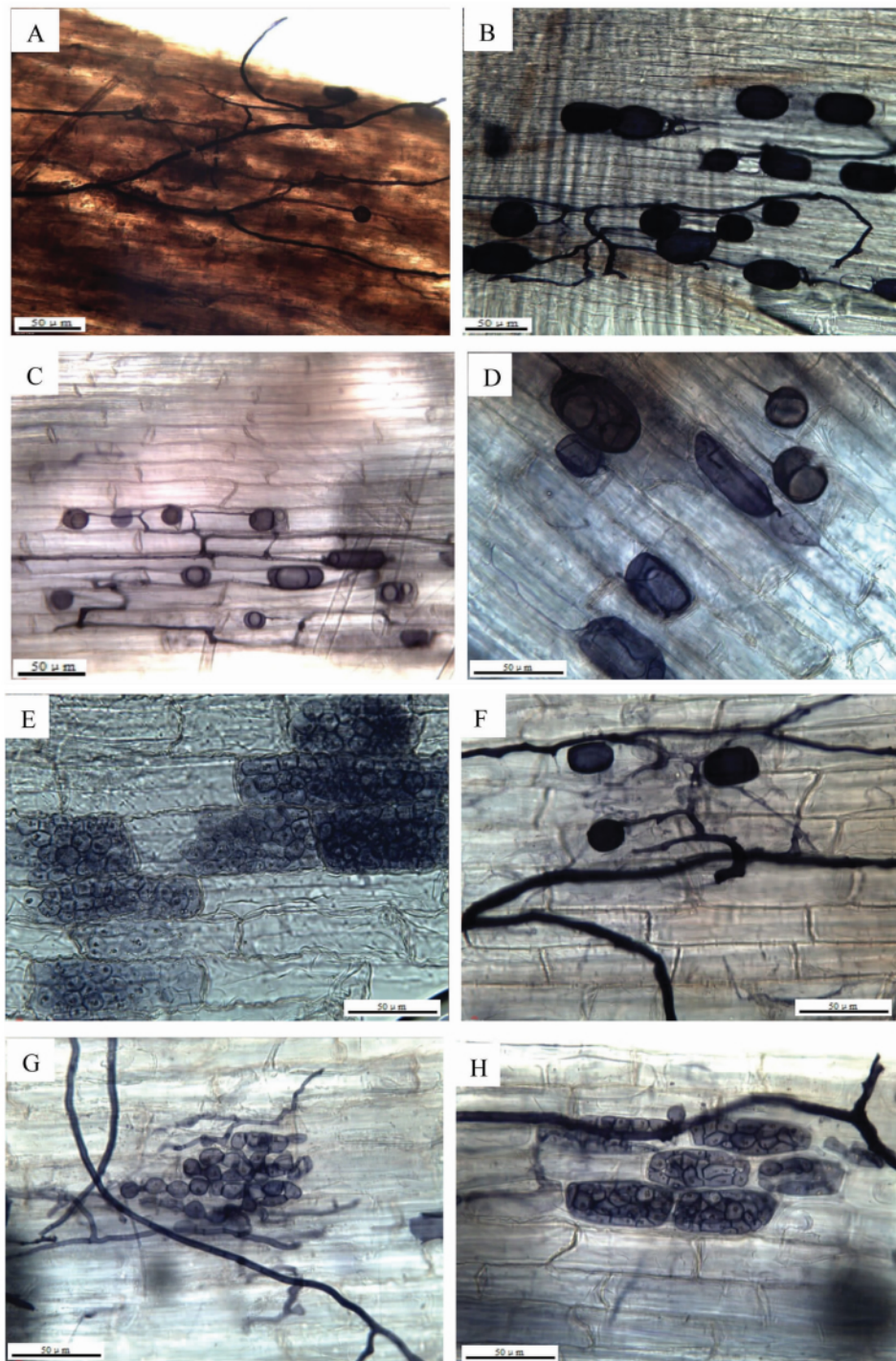
本研究采用以下几种不同脱色处理:无 H_2O_2 脱色、3% H_2O_2 漂白30 min、10% H_2O_2 漂白270 min、碱性 H_2O_2 漂白60 min 4种不同的脱色方法进行脱色比较。我们的研究表明在无 H_2O_2 脱色的根系中,其菌丝和泡囊结构虽然着色深,但是背景颜色没有褪去。因此,菌丝和泡囊结构与背景颜色反差

不大。经过3% H_2O_2 脱色处理的根系,虽然菌丝结构着色深,但是背景脱色不够彻底;10% H_2O_2 脱色的根系背景褪色较好,菌丝等结构着色深,泡囊着色一般,但是DSE的边缘模糊。而经过碱性 H_2O_2 脱色的根系,菌丝等结构着色很深,与背景反差大,DSE的边缘清晰,能够体现出内含物,各种结构表现都较好。

3 讨论

目前对于根系内生真菌的染色可以采用台盼蓝、酸性品红、苯胺蓝、墨水多种染色剂^[11]。不同染色处理的根系,染色效果存在较大的差别。龙头山区野生花卉采用苯胺蓝染色法^[12];但在羊草实验中采用台盼蓝染色法效果较好^[13];三角叶黄连^[14]、野生雷山杜鹃^[15]和何首乌^[16]则采用酸性品红染色;但有关研究表明,生姜根系AM真菌时却发现墨水醋染色比其他染料效果更佳,不仅效果稳定而且AM真菌的菌丝、泡囊等结构清晰可见^[17]。鉴于大多数染料试剂耗费较大且有剧毒性,易造成污染,并非理想的选择。

因此,为了能够检测甘蔗根系内生真菌丛枝菌根(arbuscular mycorrhiza, AM)真菌和深色有隔内



A. 不加 H_2O_2 脱色; B. 3 % H_2O_2 脱色处理; C ~ E. 10 % H_2O_2 脱色处理; F ~ H. 碱性 H_2O_2 脱色处理

A. Without H_2O_2 clearing; B. Cleared with 3 % H_2O_2 solution; C - E. Cleared with 10 % H_2O_2 solution; F - H. Cleared with alkaline H_2O_2

图 6 不同脱色处理后 Quink 牌纯黑墨水染色甘蔗根系内生真菌的效果

Fig. 6 Staining of endophytic fungi in sugarcane roots with quink ink after cleared differently

生真菌 (dark septate endophytes, DSE), 找出一种操作简便、价格低廉, 兼顾染色效果好和无毒性的染色方法是非常有必要的。通过实验对比, 当采用北京牌墨水进行染色时, 不仅 AM 菌丝着色好, DSE 也能很明显地呈现出来, 而且与根系的背景反差大, 在低倍镜下就容易分辨得了菌丝和孢囊等结构。而 Quink 牌纯黑墨水在染色后, 经过浸泡脱色后背景

将近无色, AM 菌丝着色深且牢固, 能够清楚辨认深色有隔菌丝, 甚至能够体现出微菌核的内含物, 染色效果非常好。而经过酸性品红和苏丹红 IV 染色后, 根内的皮层细胞也同样着色而且经过浸泡后不易褪色, 根内菌丝等结构着色淡, 故与背景反差小, DSE 结构无法观察, 不利于实验观察。经台酚蓝染色后, 虽然可观察到 AMF 和 DSE, 但是由于根皮层组织和

根内的杂质同时也染上了相同或者相近的颜色,所以菌丝颜色与背景反差小。苯胺蓝染色后,根系皮层和根内杂质同时被染为深蓝色,几乎与菌丝同色,不利于观察。此外,除了墨水外的4种染料均有毒性,不适合用于长期的研究性实验。墨水染色是一种操作简便、价格低廉、染色效果好且低毒性的染色方法。

由于所获取的大田甘蔗根系多为老根,组织较硬,颜色深。要观察其内生真菌,不仅要使深色的背景颜色褪去,还要使根系的菌丝和泡囊结构(AM真菌)或微菌核(DSE)染色后与背景颜色反差大以便于观察,故根系的脱色是实验中至关重要的一步。为了更好地检测甘蔗根系内生真菌,优化染色方法,在对甘蔗根系进行脱色时,分别采用了不同的脱色处理对比,其中以碱性 H_2O_2 脱色处理表现最好。

4 结 论

采用碱性 H_2O_2 脱色处理,Quink牌纯黑墨水染色甘蔗根系内生真菌,其染色效果稳定,非常适于观察侵染效果。而且此方法安全性高,操作简便,成本低廉。相对于其他染色方法如台酚蓝、酸性品红、苯胺蓝等毒性低,对环境的污染小。

参考文献:

[1]黄绍富,黄杰基.蔗区土壤肥力现状与甘蔗测土配方施肥[J].广西蔗糖,2006(4):10-17.
 [2]Borowicz V. Do arbuscular mycorrhizal fungi alter plant-pathogen relations[J]. Ecology, 2001, 82: 3057-3068.
 [3]Erik V, Wilfred F M R, Hannes A G, et al. Positive effects of organic farming on below-ground mutualists: large-scale comparison of mycorrhizal fungal communities in agricultural soils[J]. New Phytologist,

2010, 186(4):968-979.

- [4]陈廷速,李松,王维赞,等.甘蔗大田接种AM菌剂效应研究[J].甘蔗糖业,2013(3):6-10.
 [5]Koske R E, Gemma J N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas[J]. Mycol Res, 1989, 92(4):484-488.
 [6]Keerthi Mandyam, Chad Fox, Ari Jumpponen. Seasonal and temporal dynamics of arbuscular mycorrhizal and dark septate endophytic fungi in a tallgrass prairie ecosystem are minimally affected by nitrogen enrichment[J]. Mycorrhiza, 2008, 18(3):145-55.
 [7]刘润进,陈应龙.菌根学[M].北京:科学出版社,2007:386-387.
 [8]André Marcos Massenssini, Víctor Hugo Arátujo Bonduki, Marcos Rogério Tótola, et al. Arbuscular mycorrhizal associations and occurrence of dark septate endophytes in the roots of Brazilian weed plants[J]. Mycorrhiza, 2014, 24:153-159.
 [9]陈廷速,张金莲,李松,等.广西东南沿海蔗区根际土壤AM真菌多样性研究[J].南方农业学报,2012,43(1):57-61.
 [10]陈廷速,李松,张金莲,等.丛枝菌根(AM)真菌对甘蔗根系侵染研究[J].西南农业学报,2011,24(5):1757-1760.
 [11]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,2012:166-167.
 [12]丁琼,贾桂霞,姜洪波.龙头山区野生花卉丛枝菌根调查及应用[J].北京林业大学学报,2004,26(5):51-54.
 [13]岳英男.不同盐度样地羊草丛枝菌根真菌侵染状况比较[J].内蒙古农业科技,2014(4):25-27.
 [14]黄文丽,范新建,严铸云,等.三角叶黄连丛枝菌根真菌的多样性研究[J].中药材,2012,35(5):689-693.
 [15]刘仁阳,欧静.雷山杜鹃菌根的显微结构与菌根真菌的侵染率[J].贵州农业科学,2014,42(9):109-111.
 [16]罗充,吴涛,谭金玉.何首乌丛枝菌根真菌的多样性[J].贵州农业科学,2013,41(2):107-111.
 [17]汪茜,龙艳艳,李冬萍,等.5种染色剂对生姜根系丛枝菌根(AM)真菌的染色效果比较[J].南方农业学报,2015,46(8):1425-1429.

(责任编辑 温国泉)