

# 5种染色剂对生姜根系丛枝菌根(AM)真菌的染色效果比较

汪茜<sup>1</sup>, 龙艳艳<sup>1</sup>, 李冬萍<sup>1</sup>, 张金莲<sup>1</sup>, 宋娟<sup>1</sup>, 周生茂<sup>2</sup>, 车江旅<sup>2\*</sup>, 陈廷速<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>广西农业科学院 微生物研究所, 南宁 530007; <sup>2</sup>广西农业科学院 蔬菜研究所, 南宁 530007)

**摘要:**【目的】建立一种生姜根系内生真菌的最佳染色方法,更好地观察、分析生姜根际土壤丛枝菌根(Arbuscular mycorrhiza, AM)真菌对生姜根系的侵染情况,便于国内学者应用。【方法】在盆栽灭菌条件下,利用AM真菌对生姜进行接种试验,探讨5种染色剂(酸性品红、台盼蓝、苏丹红、苯胺蓝、墨水)对生姜根系丛枝菌根真菌的染色效果。【结果】5%醋酸墨水染色液的染色效果最佳,根皮层细胞内AM真菌的菌丝、泡囊、孢子等结构清晰可见,且能够明确分辨AM真菌与其他未知真菌,根的染色效果可以长久保存。【结论】墨水染色操作简便、毒性低、成本低廉、染色效果极佳,适用于生姜根系AM真菌的染色和制片观察。

**关键词:** 生姜; 根系; 丛枝菌根真菌; 醋酸墨水; 染色

中图分类号: Q939.96

文献标志码: A

文章编号: 2095-1191(2015)08-1425-05

## Staining effects of five stains on arbuscular mycorrhizal(AM) fungi in ginger roots

WANG Qian<sup>1</sup>, LONG Yan-yan<sup>1</sup>, LI Dong-ping<sup>1</sup>, ZHANG Jin-lian<sup>1</sup>, SONG Juan<sup>1</sup>,  
ZHOU Sheng-mao<sup>2</sup>, CHE Jiang-lü<sup>2\*</sup>, CHEN Ting-su<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Microbiology Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China; <sup>2</sup>Vegetable Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences Nanning 530007, China)

**Abstract:**【Objective】The method for dyeing endophytic fungi in roots of ginger was established to observe and analyse ginger roots infected by arbuscular mycorrhizal(AM) fungi, in order to makes it easier for domestic scholars to study.【Method】After sterilizing potting soil, AM fungi was inoculated into ginger. Then, five kinds of stains viz., acid fuchsin, trypan blue, Sudan, aniline blue and ink-vinegar were used to dye AM fungi in ginger roots.【Result】The optimal dyeing effect was obtained by using 5% ink-vinegar staining solution, it was found that the structure of AM fungi in root cortex were clearly visible, including hypha, vesicle and spore. And AM was distinguished from other unidentified fungi under microscope.【Conclusion】The ink-vinegar staining method is characterized by easy operation, low toxicity and low cost, which is applicable to dyeing AM fungi in ginger roots.

**Key words:** ginger; root system; AM; ink-vinegar; staining

## 0 引言

【研究意义】姜瘟病又称腐烂病或青枯病,是由青枯劳尔氏菌引起的一种土传病害。近年来,随着生姜种植年限的延长和生产规模的扩大,姜瘟病的危害也日趋严重,成为制约生姜优质高产的毁灭性病害之

一。丛枝菌根真菌(Arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)是一类在生物防治土传病害和提高植物抗、耐病性方面极具应用潜力的微生物资源,丛枝菌根(AM)真菌作为生态系统中重要的一员,广泛分布于自然界各生态系统中。90%以上的植物都能被AM

收稿日期:2014-12-05

基金项目:广西自然科学基金项目(2014GXNSFB118123);广西农业科学院科技发展基金项目(2014YP06,2015YZ12)

作者简介:\*为通讯作者,车江旅(1976-),副研究员,主要从事蔬菜栽培与育种研究工作,E-mail:jlvche@163.com。汪茜(1984-),主要从事作物土传病害与土壤微生物互作相关机理研究工作,E-mail:wangqian589@126.com

真菌浸染而形成互惠共生体,特别是栽培植物中绝大多数农作物、园艺作物、牧草等均能形成丛枝菌根(刘润进等,2001;谢莉等,2010)。AM菌被誉为“生物肥料”,在促进植物生长发育、提高作物产量和改良作物品质、增强植物抗逆性和抗病性等方面均具有显著的促进作用。如AM菌能提高玉米对磷素养分的吸收,提高植物的抗旱性(姜德锋等,1998;赵平娟等,2004;贺学礼等,2008;袁丽环等,2009);AM真菌能够促进植物生长,改善植物健康状况,增强植物对生物和非生物胁迫的抗性,在保持土壤与植物健康方面发挥着关键作用(刘润进和李晓林,2000;李敏等,2002)。作物土传病害发生发展过程中,AM真菌与其他微生物尤其是病原物的比率和动态平衡,以及由此对寄主植物生理生化的影响是近年来菌根领域研究的热点之一。AM侵染情况观察是AM真菌研究的基础,目前虽然AM侵染状况观察测定方法较多,但良莠不齐,而且由于研究者所采用的方法不同,其研究结果也缺乏可比性,在很大程度上限制了菌根学的发展与应用。因此,有必要对AM侵染状况的观察测定方法进行评价,以确定无毒可靠、省时省力、快速准确、方便易行的实用技术,从而以更加科学化、标准化的方法观察AM侵染状况,加快推动该领域研究进程。【前人研究进展】由于几乎所有的AM真菌接种试验均涉及到菌根发育状况观察与侵染率测定,因此半个多世纪以来人们十分重视其观察与测定方法研究,相继建立了台酚蓝染色法和酸性品红染色法来观察AM的发育状况。如Phillips和Hayman(1970)首次将台酚蓝染色法应用于AM观察和侵染率的测定;Brundrett等(1984)建立了氯唑黑E染色法。为寻找有毒染料的替代品,人们曾尝试过多种染色方法。如Vierheilig等(1998)建立了醋酸墨水染色法;包玉英和闫伟(2004)用台酚蓝对多年生草本和灌木类植物的根系进行染色,能清晰的发现AM真菌侵染,并且能观察到丛枝的结构类型;高秀兵(2010)用酸性品红染色橡胶根系,镜检橡胶树根部,可见清晰的菌丝、泡囊、侵入点和丛枝结构。【本研究切入点】本课题组曾分别用酸性品红、台酚蓝和墨水醋染色方法分析盆栽甘蔗根系AM真菌的侵染情况,均能清晰鉴别根系内AM真菌的结构(陈廷速等,2011),但由于不同作物的根系染色方法不同,因此不能确定这些染色方法对生姜根系丛枝菌根真菌染色是否有效。【拟解决的关键问题】在盆栽灭菌条件下,利用AM真菌对生姜进行接种试验,探讨5种染色剂(酸性品红、台酚蓝、苏丹红、苯胺蓝、墨水)对生姜根系丛枝菌根真菌的染色效果,以便于国内学者在AM真菌研究中应用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

从市场上购买新鲜生姜,先经流动清水浸泡36 h,再用50%多菌灵1000倍液消毒10 min,然后种植在基质为沙子的花盆中(花盆用4%的福尔马林表面消毒,沙子经高压湿热灭菌消毒,消毒条件为121 ℃、2 h)。AM真菌(LCGX-58)由广西农业科学院微生物研究所分离保藏。种植方式:先把消毒过的沙子放入花盆1/2左右,将菌根真菌的孢子放入中部,然后把消毒处理过的生姜平摆在基质表面,姜芽向上,最后用消毒过的沙子盖种5 cm,平时注意保湿。另以用无菌沙栽培的生姜作为无AM真菌侵染的空白对照。生姜出苗后定期施加稀释的Hoagland营养液(陈廷速等,2011)。

染色剂:(1)0.05%酸性品红:0.15 g酸性品红+100 mL乳酸+100 mL甘油+100 mL蒸馏水;(2)台酚蓝溶液:0.05 g台酚蓝+乳酸、甘油、蒸馏水(1:1:1)100 mL;(3)苏丹红染色液:苏丹染料0.1 g,溶于10 mL 95%酒精中,然后加入10 mL甘油;(4)苯胺蓝溶液:0.1 g苯胺蓝+100 mL 95%酒精;(5)5%醋酸墨水:5 mL派克纯黑书写墨水+95 mL家用白醋。

### 1.2 试验方法

试验在广西农业科学院微生物研究所大棚温室内进行。

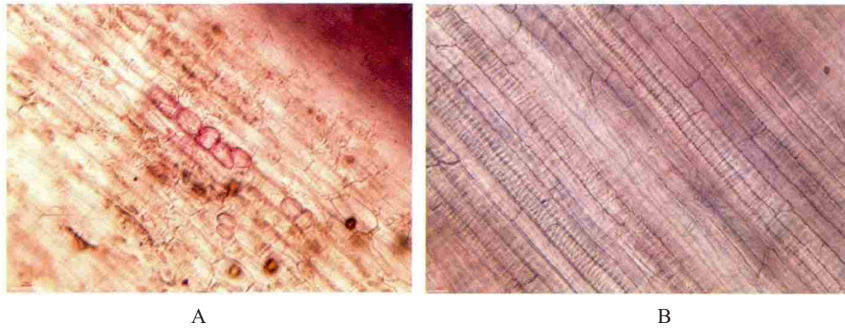
1.2.1 菌根侵染试验 生姜根系菌根侵染试验参考王幼珊等(2012)的方法并略作改进。取完整的生姜根系,用自来水冲洗干净,滤纸吸干水。将根系剪成2 cm长,加10% KOH溶液完全浸泡根系,90 ℃水浴10 min后用自来水轻轻冲洗3次。用10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>脱色3 h后用自来水冲洗3次。加2% HCl溶液室温酸化20 min,去掉HCl溶液,用自来水轻轻冲洗3次。用5种染色剂进行染色处理:①0.05%酸性品红染色;②台酚蓝溶液染色;③苏丹红染色液染色;④苯胺蓝溶液染色;⑤5%醋酸墨水染色。染色液室温过夜后,用①~④染色后的根段放在乳酸甘油溶液(50 mL乳酸+100 mL甘油+50 mL蒸馏水)中保存,用墨水染色的根段放在水中保存。

1.2.2 制片与显微镜观察 挑取脱色处理后的根段于载玻片上,每片平行摆放4个根段,加2~3滴乳酸于根系使起褪色作用,盖上24 mm×50 mm盖玻片,用手指将根段稍用力压扁。使用奥林巴斯BX53-32p02显微镜观察和拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 酸性品红染色效果

酸性品红染色方法操作简便、染色效果可靠稳定,但由于根皮层也被染上相同或略浅的颜色,导致颜色反差不明显(图1)。



A B

图 1 酸性品红染色效果

Fig.1 Dyeing effect of acid fuchsin

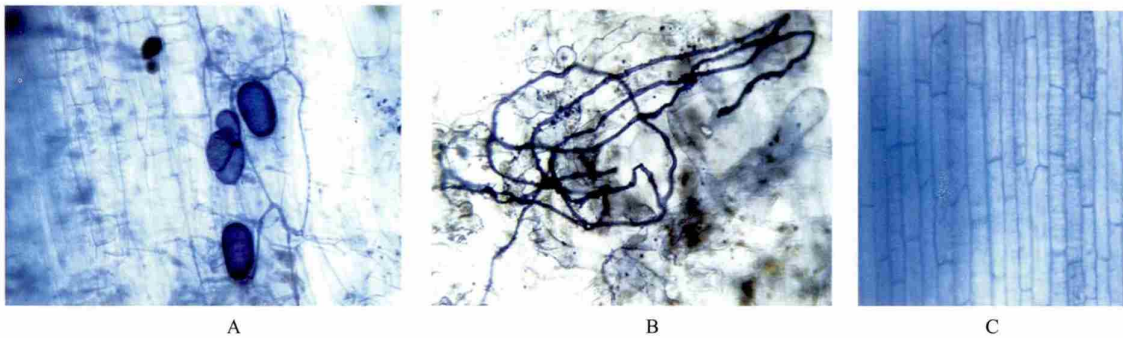
A: 泡囊; B: 对照

A: Vesicle; B: Control

### 2.2 台酚蓝染色效果

台酚蓝染色效果可靠稳定,但根皮层也被染上相

同或略浅的颜色,AM真菌与根皮层组织之间颜色反  
差小(图2),且毒性较大。



A B C

图 2 台酚蓝染色效果

Fig.2 Dyeing effect of trypan blue

A: 泡囊; B: 菌丝; C: 对照

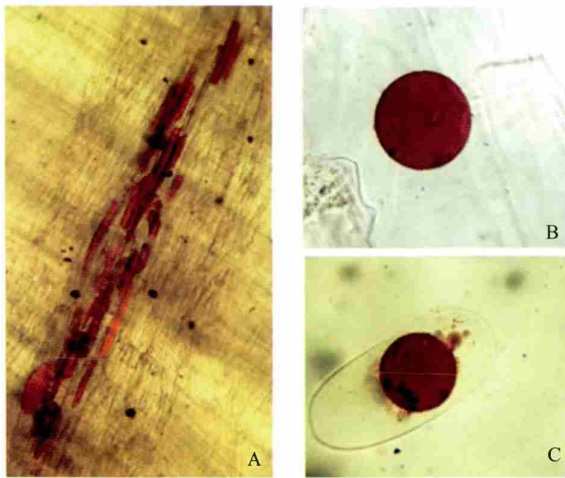
A: Vesicle; B: Hyphae; C: Control

### 2.3 苏丹红 染色效果

苏丹红 染色能清晰地观察到AM真菌的泡囊和  
孢子,但是看不见菌丝着色(图3)。

### 2.4 苯胺蓝染色效果

苯胺蓝染色能使AM真菌菌丝、孢子、泡囊染上较  
深的颜色,同时根内杂质也都会染上较深的颜色(图  
4),且背景颜色较深,以至于难以观察。



A B C

图 3 苏丹红 染色效果

Fig.3 Dyeing effect of Sudan

A: 泡囊; B, C: 孢子

A: Vesicle; B, C: Spore



图 4 苯胺蓝染色效果

Fig.4 Dyeing effect of aniline blue

### 2.5 墨水染色效果

墨水染色对AM真菌泡囊、菌丝和孢子着色牢固  
(图5),且该技术操作简便、无毒、成本低、清晰度高、  
反差大,染色效果极佳,适用于AM真菌的染色和制片  
观察。

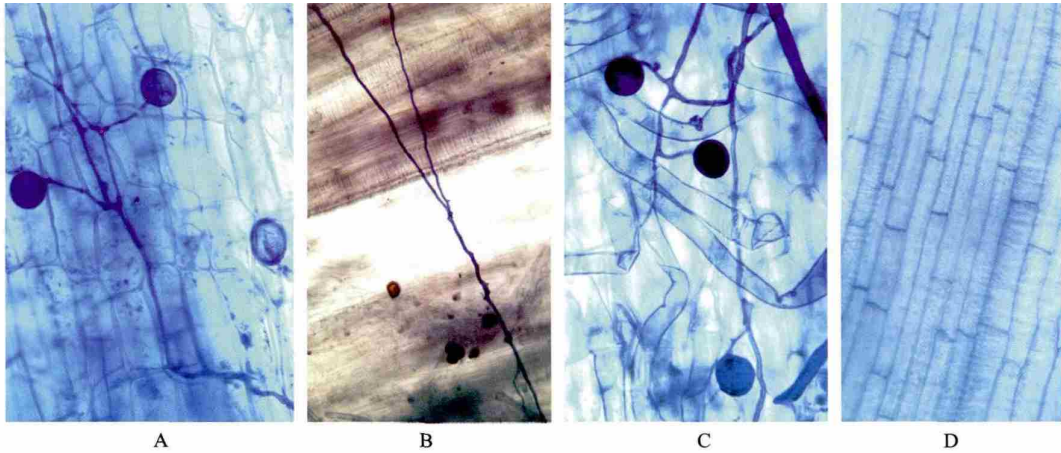


图 5 墨水染色效果

Fig.5 Dyeing effects of ink

A: 菌丝及泡囊; B: 菌丝; C: 菌丝及孢子; D: 对照

A: Hyphae and vesicle; B: Hyphae; C: Hyphae and spore; D: Control

### 2.6 不同染色剂染色效果比较

在光学显微镜下对不同染色剂处理的菌根结构进行观察,各处理根系均可观察到丛枝菌根真菌的菌

丝、泡囊和孢子,但不同染色剂的染色效果有很大差别,详见表1。

表 1 5种常见的丛枝菌根染色方法比较

Tab.1 Comparison on five different methods for dyeing AM

染色剂 Dye	染色效果 Dyeing effect	反差效果 Contrast effect	成本 元/5 g) Cost	毒性 Poisonousness	保存时间 Preservation time
酸性品红 Acid fuchsin	效果一般,泡囊颜色较浅,不好观察	与背景颜色接近,反差不明显	220	致癌疑似物	持续褪色
台酚蓝 Trypan blue	效果一般,泡囊、菌丝能着色,根表皮也染上略浅的颜色	反差不明显	70	致癌疑似物	很久不褪色
苏丹红 Sudan	效果一般,孢子、泡囊清晰,菌丝未着色	反差明显	15	致癌疑似物	很久不褪色
苯胺蓝 Aniline blue	效果一般,菌丝、泡囊颜色太深,杂质也着色	没反差,背景颜色太深,不易观察	121	致癌疑似物	很久不褪色
墨水 Ink	效果较好,菌丝、泡囊深蓝色,皮层淡粉色	反差明显,易于观察	10	无毒	很久不褪色

### 3 讨论

AM真菌形态结构观察主要采用染色镜检法,通常需要经过根系透明—脱色—染色3个步骤,其中最重要的步骤是染色。观察AM真菌生长状况的染色方法有多种,盛萍萍等(2011)采用文献计量方法对所获资料进行统计,分析了国内外研究者采用的染色方法,结果表明,采用最多的是台酚蓝染色法,其次是酸性品红染色法。

染色剂染色效果直接影响试验结果的准确性,故本研究首次以生姜为研究对象,针对清晰度、反差效果、染色时间、褪色时间、毒性、成本等方面对几种常用染色方法进行了比较。以AM真菌为目标进行染色时,会有其他种类真菌同时被染色,其中个别种类真菌的菌丝形态和着色程度与AM真菌近似,当采用酸性品红或台酚蓝染色时,很容易与AM真菌混淆,与Dong等(2006)报道的结果一致;用苏丹红染色时,虽然反差明显,较易观察,但看不见菌丝着色。本课题组其他人员用苏丹红对甘蔗根系进行染色时能观

察到菌丝着色(结果未发表),只是着色颜色较浅,不易于观察菌丝,推测是因为染料对不同植物着色程度不同所致;用苯胺蓝染色时,一般的杂质也能染上较深的颜色,且无反差,不易辨别;采用Quink黑色墨水染色时,菌丝着色十分牢固,经过清水长时间浸泡脱色后,根皮层组织可以接近完全脱色,而真菌菌丝仍然保持鲜明的蓝色,因此通过形态特征比较可区分AM真菌与其他真菌。与此相比,酸性品红和台酚蓝染色后,在脱色阶段,皮层组织与真菌同步脱色,当皮层组织脱色至无色透明时,真菌菌丝的形态亦不再可辨。通过比较可知,经过墨水染色的根系,根内的AM真菌菌丝等结构着色很深,与背景反差大,而且其他各种结构表现都比其他几种染色剂染色效果好。

### 4 结论

本研究结果表明,采用醋酸墨水染色法可有效区分AM真菌与其他种类真菌,减少试验误差,且可兼顾好的染色效果和低毒性两方面,适用于生姜根系AM

## 真菌的染色和制片观察。

致谢:感谢广西农业科学院李杨瑞教授对文稿的修改!

### 参考文献:

- 包玉英, 闫伟. 2004. 内蒙古中西部草原主要植物的丛枝菌根及其结构类型研究[J]. 生物多样性, 12(5): 501-508.
- Bao Y Y, Yan W. 2004. Arbuscular mycorrhizae and their structural types on common plants in grasslands of mid-western Inner Mongolia[J]. Biodiversity Science, 12(5): 501-508.
- 陈廷速, 李松, 张金莲, 覃晓娟, 刘红坚, 谭裕模, 袁照年, 李杨瑞. 2011. 丛枝菌根(AM)真菌对甘蔗根系侵染研究[J]. 西南农业学报, 24(5): 1757-1760.
- Chen T S, Li S, Zhang J L, Qin X J, Liu H J, Tan Y M, Yuan Z N, Li Y R. 2011. Research on the formation of arbuscular mycorrhizae in sugarcane[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 24(5): 1757-1760.
- 高秀兵. 2010. 海南橡胶树丛枝菌根真菌种类鉴定及其多样性研究[D]. 海口:海南大学.
- Gao X B. 2010. Identification and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in rubber tree of Hainan province[D]. Haikou: Hainan University.
- 贺学礼, 张焕仕, 赵丽莉. 2008. 不同土壤中水分胁迫和 AM 真菌对油蒿抗旱性的影响[J]. 植物生态学报, 32(5): 994-1001.
- He X L, Zhang H S, Zhao L L. 2008. Effects of AM fungi and water stress on drought resistance of *Artemisia ordosoca* in different soils[J]. Journal of Plant Ecology, 32(5): 994-1001.
- 姜德锋, 姜家慧, 李敏, 刘润进. 1998. AM 菌对玉米某些生理特性和籽粒产量的影响[J]. 中国农业科学, 31(1): 15-20.
- Jiang D F, Jiang J H, Li M, Liu R J. 1998. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on physiological characteristics and grain yield of maize[J]. Scientia Agricultura Sinica, 31(1): 15-20.
- 李敏, 刘润进, 李晓林. 2002. 大田条件下丛枝菌根真菌对西瓜生长和枯萎病的影响[J]. 植物病理学报, 22(4): 472-473.
- Li M, Liu R J, Li X L. 2002. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on plant growth and wilt under field conditions[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 22(4): 472-473.
- 刘润进, 李晓林. 2000. 丛枝菌根及其应用[M]. 北京: 科学出版社: 1-224.
- Liu R J, Li X L. 2000. Arbuscular Mycorrhizae and It's Application[M]. Beijing: Science Press: 1-224.
- 刘润进, 李敏, 王发园. 2001. 大棚蔬菜根围 AM 真菌多样性研究初报[J]. 莱阳农学院学报, 18(4): 280-283.
- Liu R J, Li M, Wang F Y. 2001. A preliminary survey of diversities of arbuscular mycorrhizal fungi on greenhouse vegetables[J]. Journal of Laiyang Agricultural College, 18(4): 280-283.
- 盛萍萍, 刘润进, 李敏. 2011. 丛枝菌根观察与侵染率测定方法的比较[J]. 菌物学报, 30(4): 519-525.
- Sheng P P, Liu R J, Li M. 2011. Methodological comparison of observation and colonization measurement of arbuscular mycorrhizal fungi[J]. Mycosystema, 30(4): 519-525.
- 王幼珊, 张淑彬, 张美庆. 2012. 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.
- Wang Y S, Zhang S B, Zhang M Q. 2012. Fungi Resources and Germplasm Resources of Arbuscular Mycorrhizal in China[M]. Beijing: China Agriculture Press.
- 谢莉, 韦业旺, 蔡敏, 黄建国. 2010. 杀真菌剂对丛枝菌根烟苗生长及抗性的影响[J]. 广西农业科学, 41(4): 319-322.
- Xie L, Wei Y W, Cai M, Huang J G. 2010. Influences of fungicides on growth and resistance of arbuscular mycorrhizal tobacco seedlings[J]. Guangxi Agricultural Sciences, 41(4): 319-322.
- 袁丽环, 闫桂琴, 朱志敏. 2009. 丛枝菌根(AM)真菌对侧金盏花幼苗根系的影响[J]. 西北植物学报, 29(3): 580-585.
- Yuan L H, Yan G Q, Zhu Z M. 2009. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on the seedling roots of *Elaeagnus mollis* Diels[J]. Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin., 29(3): 580-585.
- 赵平娟, 安锋, 丁明明. 2004. 菌根提高植物抗病机理的研究[J]. 西北林学院学报, 19(1): 93-97.
- Zhao P J, An F, Ding M M. 2004. Advances in the researches of the mechanism of disease resistance promotion of mycorrhizae[J]. Journal of Northwest Forestry University, 19(1): 93-97.
- Brundrett M C, Piché Y, Peterson R L. 1984. A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae[J]. Canadian Journal of Botany, 62: 2128-213.
- Dong C J, Yao F X, Zhao B. 2006. Impact of hesperitin on infection hyphal growth and enzyme activity of AM fungus[J]. Acta Pedologica Sinica, 43(3): 473-477.
- Phillips J M, Hayman D S. 1970. 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, 155: 158-160.
- Vierheilig H, Coughlan A P, Wyss U, Piche Y. 1998. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular mycorrhizal fungi[J]. Applied and Environmental Microbiology, 64(12): 5004-5007.

(责任编辑 麻小燕)