

## 研究报告

### Research Report

# 香蕉根系丛枝菌根(AM)真菌染色方法比较

覃晓娟 陈廷速 李冬萍\* 张金莲 龙艳艳 仇惠君

广西农业科学院微生物研究所, 南宁, 530007

\* 通讯作者, qinxiaojuan2012@gxaas.net

**摘要** AM真菌侵染情况观察是AM真菌研究的重要基础。本研究比较了5种不同染色剂(5%醋酸墨水, 酸性品红, 苏丹红, 台酚蓝, 苯胺蓝)对香蕉根系AM真菌的染色效果。研究表明5%醋酸墨水和台酚蓝染色液的染色效果最佳, 根皮层细胞内的AM真菌的菌丝、丛枝、泡囊及内含物等结构清晰可见, 且能够明确分辨出AM真菌与其他未知真菌。但综合考虑操作难易程度、价格成本和毒性等因素, 5%醋酸墨水染色液更适用于香蕉根系AM真菌的染色和制片观察。

**关键词** 香蕉根系, 丛枝菌根真菌, 染色

## Comparison of Staining Methods on Arbuscular Mycorrhizal (AM) Fungi in Banana Roots

Qin Xiaojuan Chen Tingsu Li Dongping\* Zhang Jinlian Long Yanyan Qiu Huijun

Microbiology Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, 530007

\* Corresponding author, qinxiaojuan2012@gxaas.net

DOI: 10.13417/j.gab.036.002447

**Abstract** It is essential to establish a method for staining endophytic fungi in banana roots to observe arbuscular mycorrhizal (AM) fungi colonizations. An experiment was conducted to evaluate the banana roots dyed with five stains i.e. vinegar with 5% ink dye, acid fuchsin, sudan red, trypan blue, and aniline blue. The result showed that the structure of hyphae, arbuscular, vesicle and inclusion of AM fungi stained with both ink dye and trypan blue could be clearly visible. And AM fungi was distinguished from other unidentified fungi under microscope. The 5% ink-vinegar solution staining provided a simple, low toxic and inexpensive technique for staining AM fungi in banana roots with excellent staining results, and it was beneficial for observation and photograph, which had no pollution to the environment.

**Keywords** Banana root, Arbuscular mycorrhizal fungi, Staining

香蕉枯萎病(*Fusarium oxysporum* sp. *cubense*)又名香蕉巴拿马病、黄叶病,是一种由古巴专化型尖孢镰刀菌侵染维管束引起植株凋萎的毁灭性真菌土传病害(高乔婉, 1996, 中国农业百科全书·植物病理学卷, pp.283)。由于该致病菌具有传染性强、只可防不可治、菌株存活时间长等特点,已给中南美洲及我国台湾、海南、广东等产蕉区带来毁灭性的损失(苏祖祥, 2014, 农业研究与应用, (6): 72-73)。目前, 枯萎病

已成为制约香蕉产业可持续健康发展的最大障碍。

丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)是由球囊霉(glomeromycota)真菌与植物根系形成的互惠共生体, 是一类能够有效促进宿主对水分和养分(特别是磷)的吸收和利用, 并在防治土传病害、提高抗病性和改善土壤生态方面极具应用潜力的微生物资源, 80%以上的陆地植物都能形成丛枝菌根。多项研究表明, AM真菌能降低真菌、线虫、细菌等病原

基金项目 本研究由广西自然科学基金项目(2016GXNSFBA380096)资助

引用格式: Qin X.Q., Chen T.S., Li D.P., Zhang J.L., Long Y.Y., and Qiu H.J., 2017, Comparison of staining methods on arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in banana roots, Jiyingzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics And Applied Biology), 36(6): 2447-2451 (覃晓娟, 陈廷速, 李冬萍, 张金莲, 龙艳艳, 仇惠君, 2017, 香蕉根系丛枝菌根(AM)真菌染色方法比较, 基因组学与应用生物学, 36(6): 2447-2451)

体对黄瓜、西瓜、香蕉、柑橘和玉米等作物的危害程度,并具有显著的促生功能(Artursson et al., 2006; 王倡宪等, 2007; Garg and Chandel, 2010; 王倡宪等, 2012)。目前已经证实的可有效控制植物土传病害的 AM 真菌超过 30 种。

已有研究报道显示,AM 真菌在提高香蕉抗枯萎病能力上具有明显效果(李岚岚和李增平, 2015)。AM 真菌侵染情况观察是 AM 真菌研究的基础。多年来,为找到无毒安全、操作简单、快速准确和成本低廉的 AM 真菌染色技术,AM 真菌学者们针对不同的植物类别相继建立了多种染色方法。如 Phillips 和 Hayman (1970)首次将台盼蓝应用于 AM 观察和侵染率测定。Vierheilig 等(1998)将醋酸墨水染色法应用于 AM 真菌染色。包玉英和闫伟(2004)利用台盼蓝染色法,可清晰地观察到灌木类和多年生草本植物根系的 AM 真菌侵染和丛枝等典型结构。陈廷速等(2011)利用酸性品红和 Trypan Blue 染色方法分析盆栽甘蔗根系 AM 真菌的侵染情况。汪茜等(2015)对比了 5 种不同染色剂对生姜根系 AM 真菌的染色效果,表明 5%醋酸墨水染色液的染色效果最佳,能够清晰观察到生姜根系根皮层细胞内 AM 真菌的菌丝、泡囊、孢子等典型结构。

目前,尚无专门针对香蕉根系 AM 真菌染色方法系统研究的相关报道。本研究比较和评价了台盼蓝、酸性品红、墨水等 5 种常用染色剂对香蕉根系 AM 真菌的染色效果,以进一步推动 AM 真菌在香蕉生产上的应用。

## 1 结果与分析

### 1.1 台盼蓝染色

台盼蓝染色效果可靠稳定,可清晰观察到香蕉根系根皮层细胞内 AM 真菌的菌丝、泡囊、丛枝等典型结构,但泡囊内的结构也被染上了略深的蓝色,与根组织之间的颜色反差小(图 1)。

### 1.2 苏丹红染色

用苏丹红染色时,AM 真菌的孢子被染上较深的红色,但香蕉根系的根皮层也被染上了相同或略浅的颜色,菌丝着色不明显(图 2),且毒性较大。

### 1.3 酸性品红染色

酸性品红能将根系内 AM 真菌泡囊和菌丝染上浅黄色,能清晰观察到 AM 泡囊外轮廓形状,但根皮层也被染上相同的颜色,颜色反差小,染色清晰度不高,极少能观察到菌丝染色(图 3),且毒性较大。

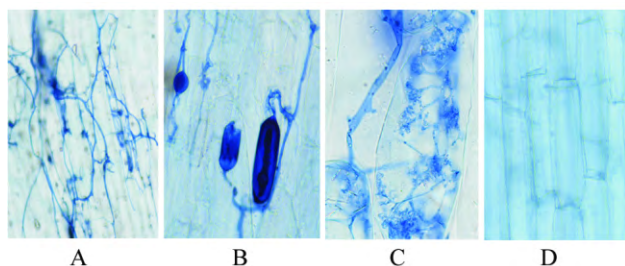


图 1 香蕉根系 AM 真菌台盼蓝染色

注: A: 菌丝; B: 根内菌丝和泡囊; C: 丛枝结构; D: 对照

Figure 1 Dyeing effect of trypan blue in banana root

Note: A: Hyphae; B: Internal hyphae and vesicle; C: Arbuscular structure; D: Control

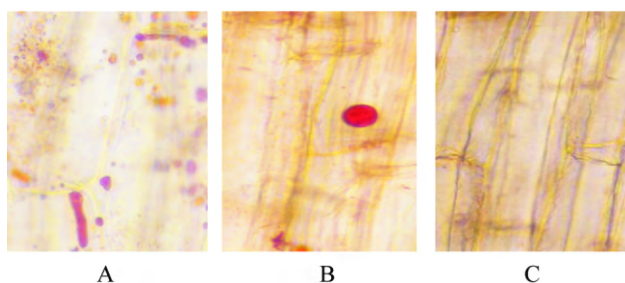


图 2 香蕉根系 AM 真菌苏丹红染色

注: A: 泡囊; B: 孢子; C: 对照

Figure 2 Dyeing effect of Sudan in banana root

Note: A: Vesicle; B: Spore; C: Control

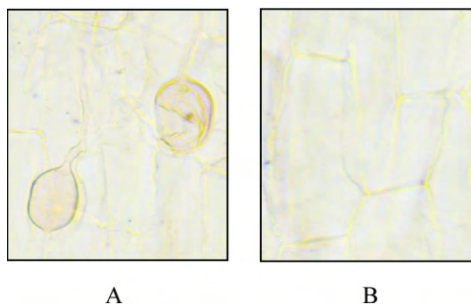


图 3 香蕉根系 AM 真菌酸性品红染色

注: A: 泡囊; B: 对照

Figure 3 Dyeing effect of acid fuchsin in banana root

Note: A: Vesicle; B: Control

### 1.4 醋酸墨水染色

利用醋酸墨水染色时,香蕉根系 AM 真菌的孢子、菌丝和泡囊等结构着色牢固、清晰度高、反差大(图 4),染色效果良好,且操作过程简单、毒性低、成本低,较适用于香蕉根系 AM 真菌的侵染情况观察。

### 1.5 苯胺蓝染色

苯胺蓝染色对香蕉根系 AM 真菌的菌丝着色不

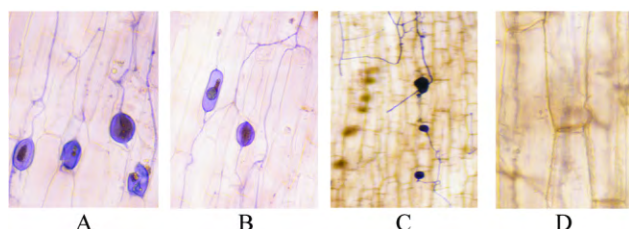


图4 香蕉根系 AM 真菌醋酸墨水染色

注: A, B: 菌丝及泡囊; C: 菌丝及孢子; D: 对照

Figure 4 Dyeing effect of acid ink and vinegar in banana root

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

明显 根皮层细胞也被染上了较深的蓝色,且无法观察到泡囊等典型结构,难以观察清楚(图5)。

### 1.6 5种不同染色剂染色效果比较

在光学显微镜下,观察5种染色剂对香蕉根系AM真菌结构的染色效果。结果表明,不同染色剂对AM真菌染色的清晰度、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(表1)。

## 2 讨论

AM真菌染色是侵染情况观察的基础,其效果直接影响试验结果的准确性,是开展AM真菌研究最重要的步骤。目前,国内外学者采用最多的是台盼蓝染色法,其次是酸性品红染色法(盛萍萍等,2011)。本文以香蕉根系为研究对象,从染色效果的清晰度、操作难易度、效果反差度、毒性大小、成本高低等方面对5种常用染色方法进行了比较和评价。

当采用台盼蓝染色时,其他种类的真菌(尤其是深色有隔内生真菌)易与AM真菌混淆,干扰对AM

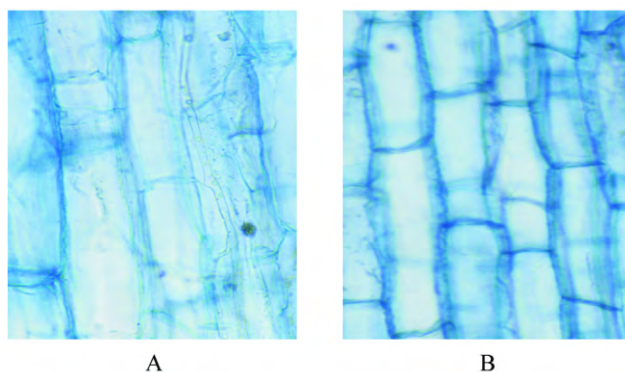


图5 香蕉根系 AM 真菌苯胺蓝染色

注: A: 菌丝; B: 对照

Figure 5 Dyeing effect of acid aniline blue in banana root

Note: A: Hyphae; B: Control

形态的准确判断;用苏丹红染色时,AM真菌孢子被染上较深颜色,但观察不到菌丝着色;用酸性品红染色时,根系皮层组织与真菌同步脱色,真菌菌丝的形态辨别难度较大;用苯胺蓝染色时,根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;采用醋酸墨水染色时,经清水浸泡后,根皮层细胞可基本完全脱色,且真菌菌丝仍然保持鲜亮的蓝色,与背景反差大,且泡囊、丛枝、孢子等典型的AM真菌结构均清晰可见,通过形态特征比较可区分AM真菌与其他真菌,且基本无毒,成本低廉,较其他几种染色剂染色更适合用于香蕉根系AM真菌的染色观察。

## 3 材料与方法

### 3.1 试验材料

(1)大田香蕉根系:采集于广西农业科学院里建

表1 5种染色剂对香蕉根系AM真菌染色效果比较

Table 1 Comparison of five different dye to stain AM of banana roots

染色剂	染色效果	反差效果	保存时间	成本	毒性
Dye	Staining effect	Contrast effect	Preservation time	Cost	Poisonousness
台盼蓝	好	不明显	>7 d	¥70/5 g	致癌疑似物
Trypan blue	Good	Not obvious	More than 7 days		Suspected carcinogen content
苏丹红	一般	明显	>7 d	¥15/5 g	致癌疑似物
Sudan	General	Obvious	More than 7 days		Suspected carcinogen content
酸性品红	一般	不明显	0 d	¥220/5 g	致癌疑似物
Acid fuchsin	General	Not obvious	0 days		Suspected carcinogen content
墨水	好	明显	>7 d	¥10/5 g	无毒
Ink	Good	Obvious	More than 7 days		Non-toxic
苯胺蓝	差	不明显	>7 d	¥121/5 g	致癌疑似物
Aniline blue	Poor	Not obvious	More than 7 days		Suspected carcinogen content



科研基地,经冲洗干净后,室温保存于50%酒精中。

(2)染色剂 a :台盼蓝染液 :台盼蓝 0.05 g (乳酸溶解)、甘油、蒸馏水(体积比=1: 1: 1) ,100 mL b 苏丹红 染液 苏丹 染料 0.1 g ,10 mL 95%酒精 ,10 mL 甘油 c 0.05%酸性品红染液 酸性品红 0.05 g+乳酸、甘油、蒸馏水(1: 1: 1) 100 mL d 5%醋酸墨水染液 : 5%冰乙酸 95 mL+quink 牌纯黑书写墨水 5 mL e 苯胺蓝溶液 苯胺蓝 0.1 g+95%酒精 100 mL。

(3)其他试剂 20% KOH 碱性 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。

### 3.2 试验方法

#### 3.2.1 菌根侵染实验

取保存于50%酒精中的香蕉根系,用清水冲洗干净,并将水分控干。将香蕉根系剪成约1 cm 长的根段,分装于不同的离心管中,加入20% KOH 溶液完全浸泡根系,90℃水浴15 min (除去根部皮层细胞的细胞质,有利于染料的侵透)后,清水冲洗3~5次并将水分控干。加入碱性H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>室温脱色1.5 h,除去深色根系表层的颜色,同时软化根系,脱色结束后用清水冲洗3~5次并将水分控干。加入5%冰乙酸,室温酸化5 min,倒掉冰乙酸溶液。加入台盼蓝、苏丹红、0.05%酸性品红染色、5%醋酸墨水、苯胺蓝等5种不同染色剂,66℃水浴染色30 min 后,倒去染液,用清水冲洗数次后,在清水中脱色(时间为>12 h)。

#### 3.2.2 制片与显微镜观察

将脱色根段置于载玻片上,挑出根中的坚硬组织,将剩余组织平展在载玻片上,每片平行摆放2个根段,盖上盖玻片,用镊子轻轻敲压使根段平展均匀。每种染色剂处理的根段制片3张,重复3次。使用尼康 MODEL ECLIPSE Ci-L、DS-Ri2 显微镜观察、拍照。

### 作者贡献

覃晓娟和李冬萍是本研究的实验设计和实验研究的执行人;覃晓娟完成数据分析,论文初稿的写作;李冬萍、张金莲和龙艳艳参与实验设计和实验结果分析;陈廷速和仇惠君是项目的构思者及负责人,指导实验设计,数据分析,论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

### 致谢

本研究由广西自然科学基金项目(2016GXNSF-

BA380096)资助。广西农业科学院微生物研究所汪茜助理研究员对本研究有帮助。

### 参考文献

- Artursson V., Finlay R.D., and Jansson J.K., 2006, Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth, *Environmental Microbiology*, 8(1): 1-10
- Bao Y.Y., and Yan W., 2004, Arbuscular mycorrhizae and the irstructural types on common plants in grasslands of mid-western Inner Mongolia, *Shengwu Duoyangxing (Biodiversity Science)*, 12(5): 501-508 (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, *生物多样性*, 12(5): 501-508)
- Chen T.S., Li S., Zhang J.L., Qin X.J., Liu H.J., Tan Y.M., Yuan Z.N., and Li Y.R., 2011, Research on the formation of arbuscular mycorrhizae in sugarcane, *Xinan Nongye Xuebao (Southwest China Journal of Agricultural Sciences)*, 24(5): 1757-1760 (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, *西南农业学报*, 24(5): 1757-1760)
- Garg N., and Chandel S., 2010, Arbuscular mycorrhizal networks: process and functions. a review, *Agronomy for Sustainable Development*, 30(3): 581-599
- Li L.L., and Li Z.P., 2015, Species diversity of arbuscular mycorrhizal fungus associated with *Musa* spp. in Hainan Province, *Redai Zuowu Xuebao (Chinese Journal of Tropical Crops)*, 36(9): 1631-1639 (李岚岚, 李增平, 2015, 海南香大蕉丛枝菌根真菌研究, *热带作物学报*, 36(9): 1631-1639)
- Phillips J.M., and Hayman D.S., 1970, Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of in fection, *Transactions of the British Mycological Society*, 55(55): 158, IN16-161, IN18
- Sheng P.P., Liu R.J., and Li M., 2011, Methodological comparison of observation and colonization measurement of arbuscular mycorrhizal fungi, *Junwu Xuebao (Mycosystema)*, 30(4): 519-525 (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, *菌物学报*, 30(4): 519-525)
- Vierheilig H., Coughlan A.P., Wyss U., and Piché Y., 1998, Ink and vinegar a simple staining technique for arbuscular mycorrhizal fungi, *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12): 5004-5007
- Wang C.X., Li X.L., Qin L., Wang G.Q., Zhou J.C., and Yang H. M., 2007, Review on increasing resistance to pathogens by arbuscular mycorrhizal fungi, *Zhongguo Shengwu Fangzhi (Chinese Journal of Biological Control)*, 23(s1): 64-69 (王倡宪, 李晓林, 秦岭, 王贵强, 周建朝, 杨慧民, 2007, 利用丛

- 枝菌根真菌提高植物抗病性研究进展, 中国生物防治, 23 (s1): 64-69
- Wang C.X., Li X.L., Song F.Q., Wang G.Q., and Li B.Q., 2012, Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on fusarium wilt and disease resistance-related enzyme activity in cucumber seedling root, Zhongguo Shengtai Nongye Xuebao (Chinese Journal of Eco-Agriculture), 20(1): 53-57 (王倡宪, 李晓林, 宋福强, 王贵强, 李北齐, 2012, 两种丛枝菌根真菌对黄瓜苗期枯萎病的防效及根系抗病相关酶活性的影响, 中国生态农业学报, 20(1): 53-57)
- Wang Q., Long Y.Y., Li D.P., Zhang J.L., Song J., Zhou S.M., Che J.L., and Chen T.S., 2015, Staining effects of five stains on arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in ginger roots, Nanfang Nongye Xuebao (Journal of Southern Agriculture), 46 (8): 1425-1429 (汪茜, 龙艳艳, 李冬萍, 张金莲, 宋娟, 周申茂, 车江旅, 陈廷速, 2015, 5种染色剂对生姜根系丛枝菌(AM)真菌的染色效果比较, 南方农业学报, 46(8): 1425-1429)

### Journal of Mosquito Research (JMR)



Journal of Mosquito Research (ISSN 1927-646X) is an open access, peer reviewed journal published online by BioPublisher. The journal is publishing high quality original research on all aspects of mosquito and its affecting the living organisms, as well as environmental risk and public policy relevant to mosquito modified organisms. Topics include (but are not limited to) the research at molecular or protein level of mosquito, impact on the ecosystem, containing positive and negative information, natural history of mosquito, also publishing innovative research findings in the basic and applied fields of mosquito and novel techniques for improvement, as well as the significant evaluation of its related application field.

Email: [edit@jmr.biopublisher.ca](mailto:edit@jmr.biopublisher.ca)

Web: <http://jmr.biopublisher.ca>