

邱 丹,杜芮萍,孟德凯,等. 砷超富集植物蜈蚣草丛枝菌根观察方法的优化[J]. 江苏农业科学,2017,45(7):236-238.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.07.062

砷超富集植物蜈蚣草丛枝菌根观察方法的优化

邱 丹¹,杜芮萍¹,孟德凯¹,黎 宁²,顾明华¹,王学礼¹

(1. 广西大学农学院,广西南宁 530004;2. 广西壮族自治区环境监测中心站,广西南宁 530028)

摘要:为了便于蜈蚣草菌根结构的观察及侵染状况的测定,研究根系组织透明(脱色)流程优化及采用酸性品红乳酸液、曲利苯蓝、蓝黑醋酸墨水(北京牌)和纯黑醋酸墨水(Quink 牌)4 种染液处理对菌根染色效果的影响,以优化蜈蚣草丛枝菌根观察的脱色条件及染液染色方法。结果表明,采用 20% KOH 于 90 ℃ 水浴 60 min、碱性 H₂O₂ 处理 45 min 的方法对根系的脱色效果最好;采用醋酸墨水染色,菌丝、泡囊、丛枝的染色效果明显。研究结果将为观察蜈蚣草菌根提供技术指导,方便测定真菌侵染状况,从而为进一步研究丛枝菌根真菌对砷在蜈蚣草体内的迁移转化提供方法指导。

关键词:砷;超富集植物;丛枝菌根;蜈蚣草;共生体系;观察;优化

中图分类号: Q944.54;Q949.32 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)07-0236-03

丛枝菌根(*Arbuscular mycorrhizae*,简称 AM)形态结构观察是从事菌根研究的一项基础工作,是后期丛枝菌根真菌(*Arbuscular mycorrhizae* fungi,简称 AMF)鉴定、植物侵染率测定等相关研究的必经环节。目前用于菌根观察的方法主要是染色镜检法^[1],其操作简便、易于观察,主要步骤为固定、透明、染色、分色、制片和观察,其中根系透明、染色是关键步骤。一般植物根系采用 5%~10% KOH 溶液于 90 ℃ 透明处理 20~60 min 即可达到满意的效果。但不同的植物其根系生长状况不同,因而 KOH 浓度及处理时间也不同。AM 染色的方法有多种,目前使用最多的染色液是酸性品红和曲利苯蓝^[1]。

蜈蚣草是一种砷超富集植物^[2],具有极强的吸收砷特性,已经广泛应用于砷污染土壤的修复中^[3],已有在蜈蚣草中发现丛枝菌根的报道^[4]。AM 真菌侵染能提高根际土壤磷酸还原酶的活性,利于磷酸盐转换为亚磷酸盐,促进砷从蜈蚣草根部分转移到地上部,明显提高蜈蚣草地上部中砷含量,从而提高蜈蚣草的砷修复效率^[5-7]。但是,蜈蚣草根系中单宁含量高^[8],根系木质化、偏硬,颜色较深,在菌根观察过程中不易于根系脱色,对后期染色后的观察产生严重干扰。针对此问题已有相关报道,如 Trotta 等采用 10% KOH 于 60 ℃ 透明处理 60 min,并置于室温下处理 1 周^[8];刘逸竹采用 10% KOH 于 95 ℃ 保温 30~60 min^[9];Wu 等采用 10% KOH 于 90 ℃ 处理 60 min,并用新配的碱性 H₂O₂ 处理 20~60 min^[10]。总体来看,不同研究者所采取的方法不同,其观察效果存在很大不同,且研究结果间缺乏可比性,这在很大程

度上影响了蜈蚣草丛枝菌根的相关研究。因此本研究旨在通过优化蜈蚣草菌根透明条件以及选用不同的染色液来探究蜈蚣草最适的菌根观察方法,在此基础上标准化蜈蚣草菌根观察方法,并为侵染率测定及后续砷在丛枝菌根-蜈蚣草共生体系中的迁移转化研究提供方法支撑。

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试蜈蚣草于 2015 年 7 月采自广西刁江沿岸金城江区某地土壤砷污染修复基地,为大田生长 1 年的蜈蚣草植株。用自来水轻轻冲洗根系,除去黏着的土壤,得到干净的根系;用滤纸吸干水分,挑选 200 g 较嫩的根系,置于 50% 乙醇溶液中保存,常温放置备用。

1.2 试验试剂

主要试剂:乙醇(天津市富宇精细化工有限公司,分析纯);HCl(沈阳市新光化工厂,分析纯);KOH(Kermel,分析纯);H₂O₂(KESHI,分析纯);氨水[重庆川东化工(集团)有限公司,分析纯]。染色剂:酸性品红(CHEMICAL);曲利苯蓝(天津博迪化工股份有限公司,分析纯);蓝黑醋酸墨水(北京牌);纯黑醋酸墨水[Quink(派克)牌]。

1.3 组织透明及染色

1.3.1 组织透明(脱色) 取 15 支 5 mL 玻璃试管,编号 1~15,分为 3 组,将根系剪成小段(1 cm 左右)后均分置于试管中,分别向 1~5、6~10、11~15 号试管中加入 10%、15%、20% KOH 溶液,置于 90 ℃ 水浴锅中水浴 60 min,随后每组分别进行以下处理:室温下过夜(CK),用碱性 H₂O₂ 处理 30、45、60 min。

1.3.2 漂洗 将溶液倒掉,待试管冷却后用清水将根段冲洗 3 次。

1.3.3 酸化 向试管中加入 2% HCl,对根段进行酸化,以促进染色,5 min 后将 HCl 倒掉。

1.3.4 染色 将每支试管的根均分为 3 组,每组分别用 0.1 g/L 酸性品红乳酸液(1 L 溶液中含 874 mL 乳酸、63 mL

收稿日期:2016-04-30

基金项目:广西自然科学基金(编号:2014GXNSFBA118223);广西特聘专家工程专项经费(编号:2013B015);广西科学研究与技术开发计划(编号:桂科合 14125008-2-23)。

作者简介:邱 丹(1991—),女,湖北武汉人,硕士研究生,主要从事植物修复技术研究。E-mail:2447496512@qq.com。

通信作者:王学礼,博士,讲师,主要从事重金属污染土壤修复研究。E-mail:wxl0524@126.com。

甘油、63 mL 去离子水、0.1 g 酸性品红)、曲利苯蓝染色液(1 L 溶液中含 300 mL 乳酸、300 mL 甘油、0.65 g 曲利苯蓝)、5% 醋酸墨水溶液(含 95 mL 食醋、5 mL 北京牌蓝黑墨水)、5% 醋酸墨水溶液(含 95 mL 食醋、5 mL 派克墨水)染色,于 90 ℃ 染色 20 min。

1.3.5 分色 将染色后的根段用清水清洗 3~4 次后,清水浸泡过夜。

1.4 制片与显微观察

挑取透明染色后的根段,用清水作浮载剂固定在载玻片上,每片平行摆放 10 条根段,压片后置于生物学显微镜(尼

康,型号 NI-U)下观察及拍照。

2 结果与分析

2.1 不同处理对菌根脱色的影响

菌根观察的关键步骤在于细胞组织脱色透明,本研究采用不同浓度 KOH 对菌根进行脱色处理。由图 1 可见,10%、15%、20% 3 个 KOH 浓度处理的脱色效果均不理想,但是随着 KOH 浓度的提高,脱色效果逐步提升,3 个处理中以 20% KOH 处理的效果最好,但仍然无法完全去除蜈蚣草根自身所带的颜色,在一定程度上影响了观察效果。

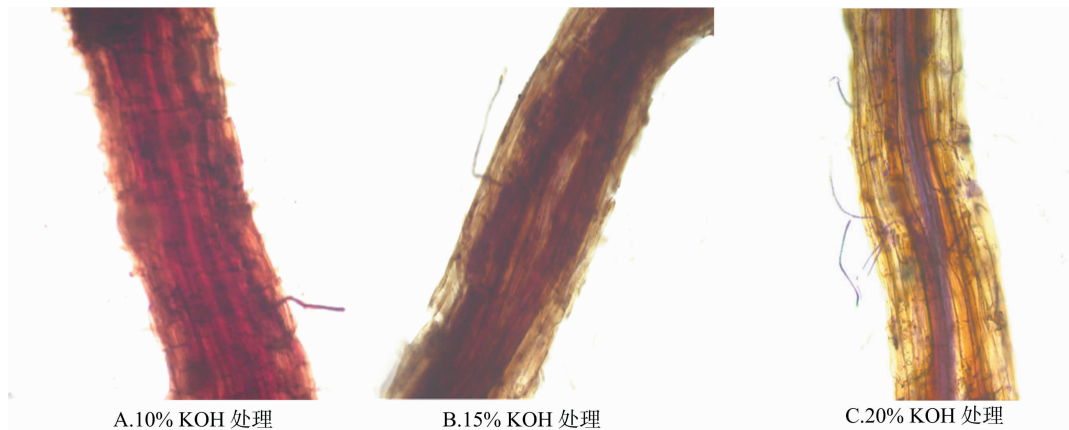


图1 KOH 处理下蜈蚣草根的脱色效果

在上述处理的基础上,通过过夜和添加碱性 H_2O_2 来强化脱色效果。由图 2 可见,不添加 H_2O_2 直接过夜的对照处理效果最差;添加 H_2O_2 能显著提高脱色效果;随着处理时间的延长,脱色效果逐步提高,但碱性 H_2O_2 处理时间过长同样会导致菌根结构染色效果变差,当处理时间为 60 min 时,幼嫩根系细胞受到破坏,细胞普遍染上颜色,不易区分观察(图 2-D)。因此,在过夜处理, H_2O_2 处理 30、45、60 min 等 4 个方法中,用 20% KOH 于 90 ℃ 水浴 60 min 后,再用新配的碱性 H_2O_2 处理 45 min 的方法脱色效果最好(图 2-C),去除了

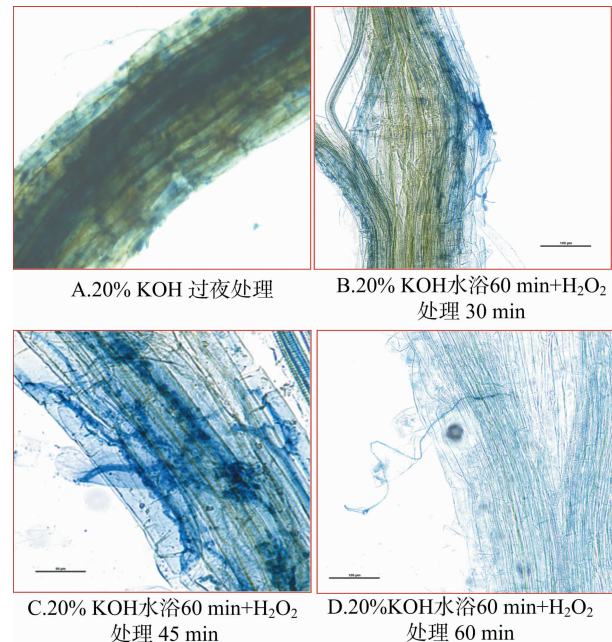


图2 不同处理方法的脱色效果对比

蜈蚣草根本身带有的颜色,将细胞透明化,经染色后能清晰地辨别出菌丝、泡囊、丛枝等菌根结构。

2.2 不同染色剂对菌根观察的影响

不同染色剂对菌根的染色效果差别很大,上述脱色步骤已经证明,先用 20% KOH 于 90 ℃ 水浴 60 min,再用碱性 H_2O_2 处理 45 min 的方法对蜈蚣草根脱色效果最好。在染色阶段采用的 4 种染色剂分别是酸性品红乳酸液、曲利苯蓝染色液、北京牌蓝黑墨水、派克牌纯黑墨水。

其中,酸性品红乳酸液染色后的菌根呈红色,从图 3-A 中可以看出,品红乳酸液在将蜈蚣草菌根结构染色的同时,也

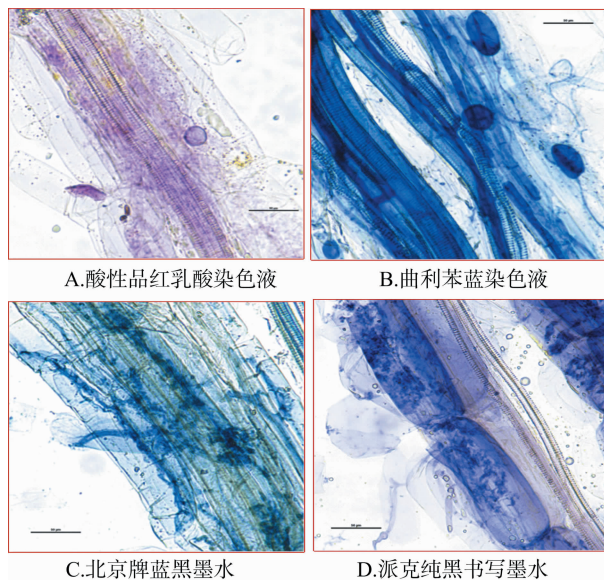


图3 不同墨水染色效果的对比

将根皮层细胞染上了相同或略浅的颜色,导致反差效果不明显,并且会持续褪色,使染上颜色的菌根随着时间的推移颜色变淡甚至褪去,即染色效果不稳定,这势必影响菌根的观察效果。

由图 3-B 可见,曲利苯蓝染液染色后的菌根呈蓝色,染色效果可靠稳定,能持久保持,但与品红乳酸液一样,在将菌根结构染色的同时也将根皮层细胞液染上相同或略浅的颜色,反差效果不明显。

北京牌蓝黑墨水、派克牌纯黑墨水 2 种墨水的染色效果均较好。从图 3-C、图 3-D 可以看出,这 2 种墨水染色后菌根内部的菌丝、泡囊等结构清晰可见,且经其染色的根皮层基本未染上颜色,反差效果明显。

3 讨论

丛枝菌根的观察是从事菌根研究的一项基础性工作。宿主和所采根系的生长状况,如年龄、粗细、木质化程度不同等均会影响 AM 的观察^[11],因此不同植物采用的脱色和染色方法不同。KOH 溶液的浓度及其处理时间会显著影响根系的透明度和染色效果,对于根系木质化较轻的植物如玉米、黄花蒿、三叶草等,采用 5% 左右的 KOH 溶液于 70~90℃ 透明处理 20~30 min 即可达到脱色效果^[2]。但是对于蜈蚣草及木本植物如茶树、苹果、核桃等,由于其根系木质化程度高,而且根系含色素,颜色较深,处理条件不当会使根系透明(脱色)不完全,染色后产生干扰,不易观察^[12-13]。本研究通过适当提高 KOH 浓度,延长处理时间,并用碱性 H₂O₂ 辅助,达到了很好的改善透明效果的目的,为下一步染色提供了一定的基础。

土壤中有许多与 AM 真菌结构相似的真菌,当以 AM 菌根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、着色程度与 AM 真菌近似,对菌根观察产生干扰。当采用酸性品红或曲利苯蓝染色时,很容易与 AM 真菌混淆^[14],且酸性品红和曲利苯蓝染色后,在脱色阶段,皮层组织与真菌是同步脱色的,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;同时,两者都是致癌疑似物,毒性较大,对长期使用者的健康可能有害^[15],建议尽量少采用。采用北京牌墨水、派克牌墨水等醋酸墨水染色时,菌丝着色牢固,经过清水长时间浸泡脱色后,根皮层组织可视是完全脱色,而真菌的菌丝、泡囊等结构仍然保持鲜明的蓝色,色差明显,可见可以通过形态特征的比较,区分 AM 真菌与其他真菌^[16]。因此,醋酸墨水染色法对于染色和区分 AM 真菌与其他真菌更有效,在统计根系中 AM 真菌的侵染率时可以减少误差。

综上所述,随着 KOH 浓度的提高,蜈蚣草菌根脱色透明的效果逐步提高,在碱性 H₂O₂ 强化作用下,可达到理想的效果。就染色效果而言,2 种醋酸墨水的染色效果较好,着色稳定且清晰,能将菌丝、泡囊等形态特征区分开来。因此,综合

考虑蜈蚣草菌根结构观察的清晰度、反差效果、毒性及成本等方面,建议先用 20% KOH 于 90℃ 水浴 60 min,后用碱性 H₂O₂ 处理 45 min 的方法进行脱色透明处理,再用采用醋酸墨水进行染色。

参考文献:

- [1] 陈同斌,韦朝阳,黄泽春,等. 砷超富集植物蜈蚣草及其对砷的富集特征[J]. 科学通报,2002,47(3):207-210.
- [2] 盛萍萍,刘润进,李敏. 丛枝菌根观察与侵染率测定方法的比较[J]. 菌物学报,2011,30(4):519-525.
- [3] Chen T B, Liao X Y, Huang Z C, et al. Phytoremediation of As-contaminated soil in China [M]//Willey N. Phytoremediation: methods and reviews. New Jersey: Humana Press, 2007: 393-404.
- [4] Liu Y, Zhu Y, Chen B, et al. Influence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on uptake of arsenate by the As hyperaccumulator fern *Pteris vittata* L. [J]. Mycorrhiza, 2005, 15(3): 187-192.
- [5] Leung H, Wu F, Cheung K, et al. Synergistic effects of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate rock on heavy metal uptake and accumulation by an Arsenic hyperaccumulator [J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 181(1/2/3): 497-507.
- [6] Chen B, Zhu Y, Duan J, et al. Effects of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on growth and metal uptake by four plant species in Copper mine tailings [J]. Environmental Pollution, 2007, 147(2): 374-380.
- [7] Leung H, Leung A, Ye Z, et al. Mixed arbuscular mycorrhizal (AM) fungal application to improve growth and arsenic accumulation of *Pteris vittata* (As hyperaccumulator) grown in As-contaminated soil [J]. Chemosphere, 2013, 92(10): 1367-1374.
- [8] Trotta A, Falaschi P, Cornara L, et al. Arbuscular mycorrhizae increase the arsenic translocation factor in the As hyperaccumulating fern *Pteris vittata* L [J]. Chemosphere, 2006, 65(1): 74-81.
- [9] 刘逸竹. 丛枝菌根共生体系中砷的吸收和形态转化以及与宿主抗砷毒的关系[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014: 24-25.
- [10] Wu F, Ye Z, Wong M. Intraspecific differences of arbuscular mycorrhizal fungi in their impacts on Arsenic accumulation by *Pteris vittata* L [J]. Chemosphere, 2009, 76(9): 1258-1264.
- [11] 王发园, 刘润进. 生物因子对 AM 真菌多样性的影响[J]. 生态学报, 2002, 22(3): 403-408.
- [12] 郑芳. 茶树接种 VA 菌根生理生化特性的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010: 20-21.
- [13] 赵志昆. 土壤环境对果树 VA 菌根的影响[C]//中国青年农业科学学术年报: 1997·B 卷. 北京: 中国土壤协会, 1997.
- [14] 董昌金, 姚发兴, 赵斌. 类黄酮对 AM 真菌侵染菌丝生长及酶活性的影响[J]. 土壤学报, 2006, 43(3): 473-477.
- [15] 吴小琴. 墨水的研究与发展概况[J]. 江西化工, 2004(1): 51-53.
- [16] 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.