



史丽琦,郭世辉,闫更轩,等. 菌根真菌定殖检测技术研究进展[J]. 黑龙江农业科学,2019(4):151-153.

菌根真菌定殖检测技术研究进展

史丽琦¹,郭世辉²,闫更轩¹,杨洪一¹

(1. 东北林业大学 生命科学学院,黑龙江 哈尔滨 150040;2. 浙江中环检测科技股份有限公司,浙江 温州 325000)

摘要:菌根真菌可与植物根系形成菌根共生体,从而影响植物生长发育。绝大多数菌根真菌促进植物生长,并能够促进植物抵御环境胁迫,因而了解菌根真菌在植物根部的定殖具有重要意义。本文对锥虫蓝染色法、免疫组化及免疫荧光技术、原位杂交这几种主要的菌根真菌定殖检测技术进行了介绍,并对各方法的特点进行了评述。

关键词:菌根;锥虫蓝染色法;免疫组化;原位杂交法

菌根真菌广泛分布于土壤中,能够与大部分陆地植物种类形成菌根真菌-植物共生体,即通常所说的菌根^[1]。只有少量植物种类,如苋科、藜科、石竹科、十字花科等被认为是非菌根植物^[2]。菌根在植物营养吸收和维护生态系统功能中具有重要作用。菌根可通过影响固氮过程、硝化过程及反硝化过程等来影响土壤的氮素循环^[3],并促进宿主植物对土壤中硫、磷等矿质元素的吸收;一些菌根真菌能够产生植物激素,间接促进宿主的生长发育^[4],同时可增强宿主的抗逆性及抗病力^[5-6]。近年来,菌根在环境修复方面的应用也受到了研究人员的广泛关注,研究表明,菌根可以有效帮助植物抵抗污染环境或胁迫环境,并参与降解环境污染物,其在污染综合防治、污染场地生物修复、胁迫环境恢复重建等领域也拥有巨大的潜力^[7]。此外,菌根也可影响宿主植物对土壤中重金属的吸收与积累^[8]。

菌根真菌种类繁多,当前较多研究围绕着分离具有促生或抗逆作用的优良菌株,并进一步制备生物菌剂施入田间。然而,分离的优良菌根真菌菌株能否定殖于田间,是菌根真菌发挥其生物学功能的关键环节,因而对菌根真菌定殖的检测极为关键。当前,常见的菌根真菌定殖检测技术包括锥虫蓝染色法、免疫组化及免疫荧光法、原位

杂交技术等,本文将对上述3种检测技术进行介绍,并比较其优缺点,为今后的研究提供选择依据。

1 锥虫蓝染色法

1.1 简介

锥虫蓝染色法由Phillips和Hayman在1970年首次应用。1989年,Koske和Gemma又进一步进行了应用及优化^[9]。锥虫蓝是细胞活性染料,一般用于检测细胞膜的完整性。锥虫蓝染色剂包括锥虫蓝、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钠以及用于调节pH的氢氧化钠^[10]。锥虫蓝染液可以将根系内的真菌菌丝染成深蓝色,而植物根系染色较浅或不染色,从而有利于将根系及根系内的菌根真菌区分开。

1.2 主要步骤

根段预处理:挑选大小粗细适当的根段,用无菌水清洗干净,剪成大约0.5 cm长的根段;固定:将剪好的根段放在FAA固定液中固定24 h以上;透明:用无菌水清洗干净,再浸泡到10% KOH溶液中,并置于水浴锅中透明处理,至幼根无色;酸化:取出根段组织,用蒸馏水充分清洗,再浸至5%乳酸中进行酸化处理,将经酸化处理的根段置于锥虫蓝染液中,室温过夜或水浴处理;分色及保存:将根段放入乳酸甘油溶液中浸泡,进行分色和保存;之后将根段放在含有甘油的载玻片中,镜检观察^[11]。

1.3 特点

锥虫蓝染色法操作简单,用时少且效果明显,可将植物根系本身的颜色脱色至浅色或无色,观察过程中背景色干扰较少,结果可信度高^[12]。可

收稿日期:2018-10-24

基金项目:黑龙江省自然科学基金(LC2016005)。

第一作者简介:史丽琦(1993-),女,在读硕士,从事越橘与菌根真菌共生相关mRNA研究。E-mail: 7993727811@qq.com。

通讯作者:杨洪一(1978-),男,博士,副教授,从事微生物学等研究。E-mail: 18830701@qq.com。

在显微镜下直观的了解根系内菌根真菌感染状态,包括胞外穿梭菌丝、细胞内菌丝卷曲等特殊菌丝形态^[13],以及泡囊结构等^[14]。此外,也有利于观察到菌根真菌与深色有隔内生真菌等内生真菌在植物根系的共感染状态。

锥虫蓝染色法总体上适合对根系内菌根真菌的侵入进行快速检测及观察菌根真菌在根组织内的分布,总体上试验结果较直观,结合十字交叉法等记数方法,可对菌根真菌的感染率进行量化分析。

2 免疫组化及免疫荧光

2.1 简介

免疫组化即免疫组织化学,又称免疫细胞化学,其利用特异性标记抗体(或抗原)对组织内抗原(或抗体)的分布进行定性和定位检测,当抗原、抗体结合后,基于特异性标记产生的显色反应,利用显微镜观察阳性信号的分布^[16]。大多数可作抗原的物质,如蛋白质、多肽、激素、磷脂、多糖等,都可以被相应的特异性抗体在组织内定位^[17]。利用免疫组化方法可对菌根真菌进行定位分析,基于阳性信号分析真菌的分布,可明显将真菌与植物根组织区分开。

免疫荧光是免疫组化中的一种常见类型,是通过荧光标记抗体(或抗原)的方法检测组织中抗原(或抗体)的分布^[18]。此种方法在 1942 年由 Coons 等发现,是现代生物学和医学广泛应用的技术之一^[19]。免疫荧光技术将荧光蛋白基因转入菌根真菌内,或利用荧光标记菌根真菌特异的酶,从而最终可基于荧光信号分布推断真菌的分布及侵入动态。

2.2 主要步骤

根段处理:挑选粗细适中的幼根,用自来水将表面泥土清洗干净,再用无菌水清洗数次后,剪成长约 0.5 cm 的均匀根段;固定:将根段浸入 FAA 固定液中,4℃ 固定过夜;包埋及切片;丙酮固定:向载玻片上滴加预冷的丙酮,4℃ 固定 10 min。之后 PBS 洗涤;内源性过氧化物酶灭活:利用 3% H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶。之后 PBS 洗涤;Triton X-100 处理及封闭;一抗孵育,之后 PBS 洗涤;二抗 4℃ 过夜孵育,之后 PBS 洗涤;显色:利用 NBT/BCIP 显色体系显色。

2.3 特点

免疫组化包括抗原抗体反应和显色反应两部

分,灵敏度高、特异性强,可以将形态、代谢和生物学功能紧密结合^[20]。免疫荧光法综合了抗原抗体结合的特异性和荧光信号的高灵敏性,该技术可精确地检测出少量抗原或抗体,从而可了解其在组织内的定位及分布,是检测菌根真菌侵入根系动态变化的一种较简便的方法^[21]。与锥虫蓝染色法类似,免疫组化也易受到褐化根组织对阳性信号的干扰。另外,在普通荧光显微镜下,植物组织的自发荧光也可能对免疫荧光结果有所影响;应用激光共聚焦显微镜可在一定程度上解决此问题。

3 原位杂交技术

3.1 简介

原位杂交技术是一项利用标记后的已知序列的 DNA 或 RNA 探针直接在组织切片上与核酸进行杂交,定位特定靶基因序列的分子细胞遗传学技术^[22]。此技术由 Gall 和 Pardue 在 1969 年发现^[23]。将原位杂交技术应用于菌根真菌定位时,通常需要获得菌根真菌基因组的一段核苷酸序列,基于此制备 DNA 或 RNA 探针,最后使用该探针定位菌根真菌在根系中的位置。

3.2 主要步骤

切片:制备冰冻切片或石蜡切片;脱水:利用不同浓度的乙醇溶液进行脱水操作;

内源性过氧化物酶灭活处理;蛋白酶 K 处理:利用蛋白酶 K 破坏细胞,使探针等试剂能够进入胞内,之后利用甘氨酸溶液灭活蛋白酶 K 活性;预杂交及杂交;洗涤及阻断杂交反应;抗体孵育;洗涤及信号检测。

3.3 特点

原位杂交技术的灵敏度较高,特异性较强,可对菌根真菌定殖进行检测。原位杂交技术缺点在于操作较复杂,试验流程较长,技术含量高,且需要制备特异性探针^[25]。此外,还可以依照不同种真菌的核苷酸序列设计特异性探针,可分析根系内部不同种类的真菌的分布。通过分别单接种及混合接种不同类型的真菌,利用原位杂交技术可了解不同类型真菌的侵入动态,并推测不同真菌的相互作用关系。

4 结语

试验锥虫蓝染色法不需要对根段进行切片的步骤,操作最为简便,且结果最直观,但需要根据

根段生长状态优化透明及脱色过程,在保证根段完整性的基础上,获得最佳的染色效果。该方法有利于从宏观上分析大面积组织中真菌的分布,也可分析一些明显形态不同的真菌在组织中的分布特点,对一些形态相似的真菌则难以区分。免疫组化、免疫荧光和原位杂交技术皆需要固定及切片过程,需防止试验过程中的切片脱落问题。总体上原位杂交技术的特异性最好,灵敏度最高,但是其操作最为复杂,需要经过一定的训练才能得到较好的试验结果。

参考文献:

- [1] Smith S E, Read D J. Mycorrhizal Symbiosis (2nd)[M]. London: Academic Press, 1997.
- [2] 丁艳华. “非菌根植物”深色有隔内生真菌(DSE)研究[D]. 昆明: 云南大学, 2016.
- [3] 陈永亮, 陈保冬, 刘蕾, 等. 丛枝菌根真菌在土壤氮素循环中的作用[J]. 生态学报, 2014, 34(17): 4807-4815.
- [4] 徐丽娟, 刁志凯, 李岩, 等. 菌根真菌的生理生态功能[J]. 应用生态学报, 2012, 23(1): 285-292.
- [5] 闫姣, 贺学礼, 张亚娟, 等. 荒漠北沙柳根系丛枝菌根真菌和黑隔内生真菌定殖状况[J]. 植物生态学报, 2014, 38(9): 949-958.
- [6] 祝英, 熊俊兰, 吕广超, 等. 丛枝菌根真菌与植物共生对植物水分关系的影响及机理[J]. 生态学报, 2015, 35(8): 2419-2427.
- [7] 王立, 贾文奇, 马放, 等. 菌根技术在环境修复领域中的应用及展望[J]. 生态环境学报, 2010, 19(2): 487-493.
- [8] 伍松林, 张莘, 陈保冬. 丛枝菌根对土壤-植物系统中重金属迁移转化的影响[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(6): 847-856.
- [9] 王鹏. 橘园丛枝菌根真菌的多样性及其对宿主植物生长和基因表达的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- [10] Horiguchi M. Staining of the lens capsule for circular continuous capsulorrhexis in eyes with white cataract[J]. Archives of Ophthalmology, 1998, 116(4): 535-537.

- [11] 唐哲. 蓝莓菌根真菌解磷特性及定殖特点分析[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2015.
- [12] Rogers J M, Daston G P, Ebron M T, et al. Studies on the mechanism of trypan blue teratogenicity in the rat developing *in vivo* and *in vitro*[J]. Teratology, 1985, 31(3): 389-399.
- [13] 陈桂梅. 油松菌根伴生真菌与外生菌根真菌的互作研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2009.
- [14] 张淑容, 贺学礼, 徐浩博, 等. 蒙古沙冬青根围 AM 和 DSE 真菌与土壤因子的相关性研究[J]. 西北植物学报, 2013, 33(9): 1891-1897.
- [15] 张燕. 云南几种特殊生境中深色有隔内生真菌(DSE)研究[D]. 昆明: 云南大学, 2012.
- [16] 张爽. 新城疫病毒分离及免疫组化检测方法的建立[D]. 长春: 吉林农业大学, 2011.
- [17] 周春宇. 间接免疫组化和间接免疫荧光检测石蜡切片中细小病毒方法的建立及其在雏鹅体内病毒分布规律的研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2005.
- [18] 蒋世杰, 杨小芳, 李劲梅. 免疫荧光和免疫组化联合检测难治性癫痫患者脑组织中 β 类淀粉蛋白的表达[J]. 华西医学, 2009, 24(1): 32-34.
- [19] 黄华伟, 杜美菊. 免疫荧光分析的研究进展[J]. 应用化工, 2007, 36(4): 394-397.
- [20] 郭小靖. 乳腺癌新辅助化疗后免疫组化标记物表达改变的研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2017.
- [21] 孙甜. 油菜蜂花粉可逆糖化多肽的纯化、鉴定及其免疫组化定位[D]. 西安: 西北大学, 2016.
- [22] 周仲华, 陈金湘, 何鉴星, 等. 植物原位杂交技术的发展与应用[J]. 作物研究, 2001(S1): 50-55.
- [23] 胡守萍, 尹训南, 付德霞, 等. 原位杂交技术展望[J]. 畜牧兽医科技信息, 2005(12): 14-15.
- [24] 赵兴宇. 大兴安岭野生蓝莓菌根真菌分离及定殖分析[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2015.
- [25] 李杨. 桑属植物染色体倍性研究及 FISH 分析[D]. 重庆: 西南大学, 2015.

Research Progress on Colonization Detection Techniques of Mycorrhizal Fungi

SHI Li-qi¹, GUO Shi-hui², YAN Geng-xuan¹, YANG Hong-yi¹

(1. College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; 2. Science and Technology Limited Company. of Zhonghuan Detection in Zhejiang Province, Wenzhou 325000, China)

Abstract: Mycorrhizal fungi can form mycorrhizal symbiosis with plant roots, thus affecting plant growth and development. Most mycorrhizal fungi can promote plant growth and promote plants to resist environmental stress. Therefore, it is important to understand the colonization of mycorrhizal fungi in plant roots. In this paper, trypan blue staining, immunohistochemistry and immunofluorescence, and in situ hybridization techniques were introduced, and the characteristics of each method were reviewed.

Keywords: mycorrhiza; trypan blue staining; immunohistochemistry; in situ hybridization