丛枝菌根真菌 (AMF) 孢子、菌丝密度及侵染率定量测定方法

Practical Methods for Arbuscular Mycorrhizal Fungal Spore Density, Hyphal Density and Colonization Rate of AMF

王思雨, 魏涵, 陈科宇, 董强, 纪宝明, 张静*

草业与草原学院, 北京林业大学, 北京

*通讯作者邮箱: zhangjing_2019@bjfu.edu.cn

引用格式: 王思雨, 魏涵, 陈科宇, 董强, 纪宝明, 张静. (2021). 枝菌根真菌(AMF)孢子、菌丝密度及侵染率定量测定方法. *Bio-101* e2104253. Doi: 10.21769/BioProtoc.2104253.

How to cite: Wang, S. Y., Wei, H., Chen, K. Y., Dong, Q., Ji, J.M. and Zhang, J. (2021). Practical methods for arbuscular mycorrhizal fungal spore density, hyphal density and colonization rate of AMF. *Bio-101* e2104253. Doi: 10.21769/BioProtoc.2104253. (in Chinese)

摘要: 丛枝菌根真菌 (Arbuscular mycorrhizal fungi, AMF) 在陆生菌根中起源最早且分布最广, 可以与大多数植物根系形成互惠共生体, 被誉为"植物根内共生体之母", 对陆地植物的生理、生态功能具有重要意义, 是土壤微生物生态研究的热点对象。而侵染率、菌丝密度、孢子密度是判断 AMF 生长发育状况的重要指标, 常被用于评价 AMF 与宿主植物的共生状态及其生理生态功能。本方法系对已有方法进行梳理归纳并结合实验经验改进完善后所得。其中侵染率采用台盼蓝染色法, 菌丝密度采用真空泵微孔滤膜抽滤法, 孢子密度采用湿筛倾析-蔗糖密度梯度离心法。该方法操作简便, 易于掌握, 普遍适用于 AMF 生长状况的观察与测定, 同时能够对目前广泛应用的 AMF 群落高通量测序数据提供有效的补充, 提升对测序结果的解释度。

关键词: 丛枝菌根真菌, 侵染率, 菌丝密度, 孢子密度

研究背景

丛枝菌根是球囊菌门真菌与植物根系组成的共生体系, 是一类重要的内生菌根类型 (Brundrett and Tedersoo, 2018)。丛枝菌根真菌(AMF)能够与陆地生态系统中大多数植

物形成共生关系,帮助植物吸收 N、P 等矿质元素,提高植物生产力与抗逆性,此外还具有促进土壤水稳性团聚体的形成,改善土壤环境等生态学意义(Smith and Read, 2008)。AMF 侵染植物后会在植物根皮层组织内形成典型的无隔膜的丛枝(arbuscule)、根内菌丝(intraradical hyphae)和泡囊(vesicle)结构,根外结构则包括土壤中的孢子(spore)和根外菌丝(extraradical hyphae) (Smith and Read, 2008)。其中,丛枝是 AMF 侵入植物根系皮层细胞后连续双叉分枝形成的类似树枝状的菌丝结构,是真菌与植物进行物质交换的重要场所,丛枝的卷曲结构增加了其物质交换的表面积,因此丛枝的侵染率常被用于评价 AMF-宿主植物的共生状态。泡囊是根内菌丝末端膨大而成,富含脂类物质和碳水化合物等,约有 80%的 AMF 可形成泡囊结构,其被认为是养分储存结构和繁殖器官。根内菌丝则负责传输营养物质,与植物和真菌的营养交换有关(Johnson *et al.*, 2003)。根外菌丝在土壤中形成庞大的菌丝网络,主要是用于扩展 AMF 在土壤中的侵染空间以及吸收土壤中的矿质营养和水分(Miller, 1995),此外,还参与土壤团聚体的构成,可提高团聚体的稳定性,改善土壤状况(Rillig, 2004)。孢子是 AMF 发育到一定阶段在根外菌丝上形成的厚壁无性繁殖器官,也是一些脂类的储藏结构(Smith and Read, 2008)。传统的 AMF 鉴定方法主要以孢子的形态特征为依据,许多科研工作者在这方面开展了大量研究并对 AMF 不同种属的孢子特征作了详细的描述,以网站的形式提供给研究人员参考 (<http://invam.wvu.edu/>) (Stürmer *et al.*, 2021),极大地方便了 AMF 的鉴定。然而孢子的产生受环境与宿主的影响,因此土壤中孢子的群落与植物根系中 AMF 定殖情况有所差异,孢子计数往往不能真实反映植物根内 AMF 的群落结构和丰度的变化(Clapp *et al.*, 1995)。随着分子生物技术手段的不断发展,高通量测序技术被广泛用于检测土壤或宿主根内的群落结构和多样性,但只能得到分子种,无法获得 AMF 菌株资源(刘永俊和冯虎元, 2010),且无法对其进行定量分析。而对 AMF 侵染效果(侵染率)和生物量(孢子密度、菌丝密度)的测定,不仅是菌根学研究中一项重要的基础性工作,同时也能够在一定程度上解决对 AMF 的定量问题。

本实验中,AMF 侵染率测定基于染色镜检法,主要分为根系透明-染色-分色 3 个过程。关于染色方法目前国内外比较常用的有台盼蓝染色法和酸性品红染色法,而关于侵染率的统计方法主要有十字交叉法、根段侵染率加权法等。由于研究者所采用的方法不同,其结果也会存在差异。关于侵染率不同测定方法的比较可参考盛萍萍等(2011)人的文章。本文重点介绍采用台盼蓝染色和十字交叉法计算 AMF 侵染率。关于土壤中菌丝

密度的测定同样也是基于台盼蓝染色和网格交叉法的原理，土壤中孢子的分离则是基于蔗糖密度梯度离心法的原理，采用湿筛倾析-蔗糖梯度离心法进行测定(Brundrett *et al.*, 1994)。

材料与试剂

1. 组织包埋盒
2. 载玻片
3. 盖玻片
4. 移液枪头 (5 ml)
5. 0.45 μm 微孔滤膜
6. 100 ml 离心管
7. 培养皿
8. 根际风干土壤
9. 新鲜根系
10. 10% KOH 溶液
11. 蒸馏水
12. 自来水
13. 2% HCl 溶液
14. 0.05% 台盼蓝 (乳酸:甘油:蒸馏水 = 1:1:1)
15. 脱色液 (甘油:乳酸:蒸馏水 = 1:1:1)
16. 45%-50%蔗糖溶液

仪器设备

1. 剪刀
2. 千分之一天平
3. 500 ml 烧杯
4. 水浴锅
5. 镊子
6. 计数器

7. 光学显微镜
8. 高速粉碎机
9. 磁力搅拌机
10. 20 目筛
11. 400 目筛
12. 移液枪 (5 ml)
13. 过滤器
14. 真空抽滤泵
15. 玻璃棒
16. 离心机 (有效半径 2.5 cm)
17. 体视镜

实验步骤

图 1. 丛枝菌根真菌 (AMF) 孢子、菌丝密度和侵染率测定实验流程

一、孢子密度测定 (Spore Density)

1. 称取10-20 g风干土样放入烧杯内，用100 ml自来水浸泡20-30 min。
2. 待大的石砾或者杂物沉积在烧杯底部，将上悬液迅速倒在上下分别为 20 目和 400 目的双层筛中。
3. 用洗瓶将下层筛中的过滤物冲洗至100 ml离心管中，3000 rpm离心3 min。

4. 除去水面杂物及上清液。有时上清液中含有较轻的孢子，应先检查后再除去。
5. 向沉淀物中加入45%-50%的蔗糖溶液至离心管的2/3。
6. 搅拌均匀后迅速放入离心机，3000 rpm离心2 min。
7. 将上悬液迅速过400目筛，并用自来水冲洗数分钟以除去残留的蔗糖溶液。
8. 用洗瓶依次轻轻冲洗停留在筛面上的筛余物，将其轻轻冲洗到一个清洁的培养皿中。
9. 转移至培养皿后，于体视镜下进行观察统计培养皿内所有孢子数量。

二. 菌丝密度测定 (Hyphal Density)

1. 称取 5 g 过 1 mm 筛的风干土样至高速粉碎机中，加入 50 ml 自来水，充分搅拌 30 s (10,000 rpm)。
2. 将上清液倒入上下分别为 20 目和 400 目的双层筛中，并用 200 ml 自来水将 400 目上的筛余物转移到 500 ml 烧杯中。
3. 将烧杯放置于磁力搅拌器进行搅拌，1000 rpm 离心 30 s。
4. 静置 30 s。
5. 利用移液枪在液面下 1 cm 处吸取 5 ml，通过真空抽滤泵过 0.45 μ m 孔径的微孔滤膜。
6. 将过滤后的滤膜置于载玻片。
7. 重复 3 至 6 步，每个样品制备 3 个滤膜。
8. 在滤膜上滴加 3 滴 0.05% 的台盼蓝。
9. 待风干后加 1 滴乳酸甘油，盖上盖玻片。
10. 在 200 $\times$ 带网格测微网的显微镜下观察 25 个视野。
11. 使用网格交叉法计数交叉点，计数方法如图 2。其中 AMF 菌丝与非 AMF 菌丝主要通过菌丝的形态及着色进行区分，AMF 菌丝无隔、多分枝且被台盼蓝染成蓝色。

图 2. 丛枝菌根真菌 (AMF)菌丝密度网格交叉法

12. 将菌丝长度换算为菌丝密度 ($\text{m g}^{-1} \text{soil}$)。

菌丝密度公式(Brundrett, 1994):

$$\text{菌丝长度(m)} = \frac{11/14 \times \text{交叉点数} \times \text{网格单元格长度} \times \text{膜面积} \times \text{稀释倍数}}{25 \times \text{网格面积}}$$

$$\text{菌丝密度(m/g)} = \frac{\text{菌丝长度}}{\text{土壤质量}}$$

注释:

11/14 是网格计算方法中的一个常数, 25 为视野个数。

稀释倍数: 每次从 200 ml 转移液中吸取 5 ml 过滤膜, 因此稀释倍数为 40 倍。

网格单元格长度: 一般实验室显微镜最小单元格的边长设置为 1 mm

网格面积: 正方形网格边长为 1 cm, 面积为 1 cm^2

滤膜面积: 油水混合膜 (膜的规格可咨询经销商)

三. 侵染率测定 (Colonization of AMF)

1. 称取 1-2 g 左右的新鲜根系, 清洗后剪成约 1 cm 的根段, 放入组织包埋盒内。
2. 将组织包埋盒放入装有 10% KOH 溶液的 500 ml 烧杯中浸没, 90 °C 水浴锅内放置 10 -90 min(不同根系样品水浴时间不同, 目的是去除根系细胞内含物和细胞壁色素, 使得根系透明)。

3. 弃去 KOH 溶液，用镊子夹住组织包埋盒，蒸馏水冲洗干净。
4. 将组织包埋盒浸泡在装有 2% HCl 溶液的烧杯内，常温 5-10 min。
5. 弃去 HCl 溶液，用镊子夹住组织包埋盒，蒸馏水冲洗干净。
6. 将组织包埋盒浸泡在装有 0.05% 台盼蓝溶液的烧杯内，90 °C 水浴锅内染色 10-30 min。
7. 弃去染液，用镊子夹住组织包埋盒，蒸馏水冲洗干净。
8. 将组织包埋盒浸泡在装有脱色液的烧杯内，常温脱色 2-3 d。
9. 脱色后随机挑取 30-50 个根段制片，每张载玻片压制 10 根。
10. 在 200× 显微镜下采用如图 3 所示的十字交叉法进行侵染率测定(McGonigle *et al.*, 1990)，显微镜十字线中的一条与根系平行，观察另一条与菌丝、丛枝、泡囊是否存在交叉点，每个根段观察 10 个视野，共计 100 个视野。

图 3. AMF 侵染率十字交叉法(仿 McGonigle *et al.*, 1990)

11. 采用 0-1 计数，将有菌丝、丛枝和囊泡交叉的分别记为 1，没有则记为 0，统计结果记录在表 1。之后根据如下公式进行计算：

$$\text{泡囊侵染率} = (\text{泡囊侵染交叉点数} \div \text{总交叉点数}) \times 100\%$$

$$\text{总侵染率} = [(\text{总交叉点数} - \text{无侵染交叉点数}) \div \text{总交叉点数}] \times 100\%$$

注：菌丝与丛枝侵染率的计算方法与泡囊相同

例如表 1 中，样品 1 的泡囊侵染率 = $(38 \div 355) \times 100\% = 10.70\%$

$$\text{丛枝侵染率} = (23 \div 355) \times 100\% = 6.48\%$$

$$\text{菌丝侵染率} = (134 \div 355) \times 100\% = 37.75\%$$

$$\text{总侵染率} = [(355 - 160) \div 355] \times 100\% = 54.93\%$$

表 1 丛枝菌根真菌 (AMF)侵染率统计

组别	玻片数	交叉数				
		无侵染	泡囊	丛枝	菌丝	合计
样品 1	1	50	15	9	48	122
	2	54	13	8	46	121
	3	56	10	6	40	112
合计		160	38	23	134	355

溶液配方

1. 10% KOH 溶液

天平称取 10 g KOH，向烧杯内加入 90 g (90 ml) 蒸馏水并用玻璃棒搅拌至完全溶解。

2. 0.05%台盼蓝 (乳酸:甘油:蒸馏水 = 1:1:1)

天平称取 0.15 g 台盼蓝，放入烧杯后加入 100 ml 蒸馏水、100 ml 乳酸、100 ml 甘油，并用玻璃棒搅拌至完全溶解。配制完成后置于 4 °C 冰箱中保存备用。

3. 脱色液

在烧杯中加入 100 ml 蒸馏水、100 ml 乳酸、100 ml 甘油，并用玻璃棒搅拌至完全溶解。配制完成后置于 4 °C 冰箱中保存备用。

4. 45%-50%蔗糖溶液

天平称取 45-50 g 蔗糖，放入烧杯后加入 50-55 g (50-55 ml) 自来水并用玻璃棒搅拌至完全溶解。

致谢

感谢北京林业大学大学生创新创业训练计划(X202110022240)及北京林业大学中央高

校基本科研业务费专项资金项目(BLX201937)对本研究的大力支持，感谢中国农业大学张林副教授对实验流程提供的指导。

附图 1

附图 1. 丛枝菌根真菌 (AMF) 显微镜观察照片 a.显微镜下的 AMF 孢子; b.土壤中 AMF 菌丝结构; c.根系中 AMF 侵染结构。

参考文献

1. 刘永俊, 冯虎元. (2010). [丛枝菌根真菌系统分类及群落研究技术进展](#). 应用生态学报, 216: 1573-1580.
2. 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.
3. Smith, S. E. and Read, D. J. (2008). Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, Cambridge, UK.
4. Brundrett, M.C. and Tedersoo, L. (2018). [Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity](#). *New Phytol* 220:1108-1115.
5. Johnson, N. C., Rowland, D. L., Corkidi, L., Egerton-Warburton L. M. and Allen E. B. (2003). [Nitrogen enrichment alters mycorrhizal allocation at five mesic to semiarid grasslands](#). *Ecology* 84: 1895-1908.

6. Miller, R. M., Reinhardt, D. R. and Jastrow, J. D. (1995). [External hyphal production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrassprairie communities](#). *Oecologia* 103: 17-23.
7. Rillig, M. C. (2004). [Arbuscular mycorrhizae and terrestrial ecosystem processes](#). *Ecol Lett* 7: 740-754.
8. Stürmer, S. L., Bever, J. D., Schultz, P. A. and Bentivenga, S. P. (2021). [Celebrating INVAM: 35 years of the largest living culture collection of arbuscular mycorrhizal fungi](#). *Mycorrhiza* 31:117-126
9. McGonigle, T. P., Miller, M. H., Evans, D. G., Fairchild, G. L. and Swan, J. A. (1990). [A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi](#). *New Phytol* 1153: 495-501.
10. Brundrett, M. M. L. and Peterson, L. (1994). Practical methods in mycorrhiza research. Mycologue Publication, University of Guelph, Canada.
11. Clapp J. P., Young J. P. W., Merryweather J. W. and Fitter A. H.. (1995). [Diversity of Fungal Symbionts in Arbuscular Mycorrhizas from a Natural Community](#). *New Phytol* 130(2): 259-265.