

广西金花茶根系丛枝菌根真菌染色方法探讨

许诗萍^{1,2,3}, 高日芳², 张金莲², 宋娟², 李冬萍², 何苑皞^{1*}, 曾诗媛^{3*}, 陈廷速²

1. 中南林业科技大学林学院, 湖南长沙 410004; 2. 广西农业科学院微生物研究所, 广西南宁 530007; 3. 玉林师范学院, 广西玉林 537000.

摘要: 金花茶 (*Camellia nitidissima*) 为山茶科山茶属植物, 属于国家一级保护植物, 具有很高的观赏价值及药用价值。但目前金花茶野生资源少, 因此寻找高效的人工种植方法快速繁殖金花茶优良种苗, 进而大幅度提高规模化种植金花茶的产量十分必要。丛枝菌根 (arbuscular mycorrhiza, AM) 真菌能显著促进植物生长发育、提高作物产量、增强植物抗逆性和抗病性, 金花茶接种 AM 真菌, 对金花茶有积极的影响。由于几乎所有的 AM 真菌接种试验均涉及菌根发育状况观察与侵染率测定, 而目前 AM 侵染状况的观察测定方法种类繁多, 良莠不齐, 因此本研究探究一种金花茶根系 AM 真菌检测的最佳染色方法, 以便更好地观察 AM 真菌对金花茶根系的侵染情况。本研究以金花茶健康植株根系为试验材料, 探讨 5 种染色剂 (苏丹红 IV、酸性品红、苯胺蓝、台酚蓝、醋酸墨水) 对金花茶根系 AM 真菌的染色效果。研究表明: 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; 利用苏丹红 IV 和酸性品红染色的 AM 真菌菌丝、泡囊与背景反差不明显, 而且酸性品红的染色效果保存时间短, 不利于观察; 苯胺蓝和台酚蓝的染色效果略次于醋酸墨水, 且价格昂贵, 成本高。除醋酸墨水外, 其他 4 种染色剂均是疑似致癌物, 长期使用对操作人员的健康产生非常大的安全隐患。醋酸墨水染色操作简便、毒性低、成本低廉、染色效果极佳, 适用于金花茶根系 AM 真菌的染色和制片观察。本研究结果可为今后金花茶菌根种苗的应用提供新的思路。

关键词: 金花茶; 根系; 丛枝菌根真菌; 染色

中图分类号: S685.14 文献标识码: A

Method to Stain Arbuscular Mycorrhiza Fungi in the Roots of Guangxi *Camellia nitidissima*

XU Shiping^{1,2,3}, GAO Rifang², ZHANG Jinlian², SONG Juan², LI Dongping², HE Yuanhao^{1*}, ZENG Shiyuan^{3*}, CHEN Tingsu²

1. College of Forestry, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China; 2. Institute of Microbiology, Guangxi Academy of Agricultural Science, Nanning, Guangxi 530007, China; 3. Yulin Normal University, Yulin, Guangxi 537000, China

Abstract: *Camellia nitidissima* belongs to the genus *Camellia* of theaceae and belongs to the first-level national protection plant, with high ornamental value and medicinal value. However, at present, there are few wild resources of *C. nitidissima*. It is necessary to find efficient artificial cultivation methods, rapidly propagate excellent *C. nitidissima* seedlings, and then greatly improve the yield of large-scale cultivation of *C. nitidissima*. Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi can significantly promote plant growth and development, increase crop yield, and enhance plant stress and disease resistance. Inoculation of AM fungi into *C. nitidissima* has a positive effect on the cultivation of *C. nitidissima*. Since almost all AM fungal inoculation test involves the growth of mycorrhizal observation and infection rate determination, and AM infection situation observation methods available are not efficient. An efficient dyeing of AM fungi *C. nitidis-*

收稿日期 2022-06-14; 修回日期 2022-10-14

基金项目 广西科技基地和人才专项 (桂科 AD20159001); 广西农业科学院基本科研业务专项 (桂农科 2021YT097)。

作者简介 许诗萍 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物检疫。*通信作者 (Corresponding author): 何苑皞 (HE Yuanhao), E-mail: heyuanhao218@163.com; 曾诗媛 (ZENG Shiyuan), E-mail: 854135592@qq.com。

sima was reported. In this study, the effects of five dyes (Sudan red IV, acid fuchsin, trypan blue, aniline blue and acetic acid ink) on AM fungi of healthy plant roots of *C. nitidissima* were investigated. The results showed that 5% acetic acid ink staining solution had the best staining effect. Mycelia, vesicles, spores and other structures of AM fungi in root cortex cells were clearly visible, and AM fungi could be clearly distinguished from other unknown fungi, and the root staining effect could be preserved for a long time. The mycelia and vesicles of AM fungi stained with Sudan red IV and acid fuchsin were not in obvious contrast with the background, and the preservation time of acid fuchsin staining was short, which was not conducive to observation. The dyeing effect of aniline blue and trypan blue was slightly inferior to acetic acid ink, and the price was expensive and the experimental cost was high. The last four dyes are suspected of causing cancer, and the long-term use has great potential safety risks to the health of operators. Acetic acid ink dyeing is simple, low toxicity, low cost and excellent dyeing effect. It is suitable for the staining and section observation of AM fungi in the roots of *C. nitidissima*. The results would provide new ideas for the future application of *C. nitidissima* mycorrhizal seedlings.

Keywords: *Camellia nitidissima*; roots; arbuscular mycorrhiza (AM) fungi; staining

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.01.023

金花茶 (*Camellia nitidissima*) 属于山茶科山茶属植物, 是国家一级保护植物和世界珍稀观赏植物^[1-2], 素有“植物界大熊猫”“茶族皇后”的美称, 具有较高的观赏性以及极大的市场开发潜力^[3]。金花茶植物含有黄酮类、多糖、茶多酚等多种活性成分^[4-6]以及丰富的天然微量元素^[7], 具有降血脂、降血糖、抗氧化、抗肿瘤等多种功效^[8-11]。金花茶自然分布区域窄, 采种困难, 近年来人们过度开发, 导致其野生资源减少^[12-13], 寻找高效的人工种植方法, 快速繁殖金花茶优良种苗^[14-16], 以期大幅度提高规模化种植金花茶的产量, 精深开发金花茶新一代医药保健产品^[17-18], 造福人类的健康极具重要的科研价值。

丛枝菌根 (arbuscular mycorrhiza, AM) 真菌广泛分布于土壤中, 是一类专性活体营养共生菌^[19]。许多研究表明, AM 真菌不仅能促进宿主植物对水分和土壤矿质元素 (尤其是磷、锌、铜等) 的吸收和利用, 还能增强宿主植物对贫瘠、干旱、病虫害等不良环境的抵抗能力, 以及改善土壤的理化性状, 促进植物生长, 提高植物品质和产量^[20-21]。探究 AM 真菌与金花茶根系所形成的互惠共生体, 有助于金花茶菌根种苗的应用, 可以为提高金花茶存活率、解决其生长慢产量低的问题提供思路。目前, 国内外有关 AM 真菌在金花茶上的侵染状况尚无报道, 但同属于山茶科山茶属的茶树根际均有 AM 真菌定殖, 能形成典型的 AM 真菌结构^[22], AM 真菌能增强茶树的耐盐性^[23]、抗旱性^[24]、抗重金属胁迫能力^[25]。

丛枝菌根真菌通常从植物的幼嫩根系进行侵染, 多数情况下是从根系成熟区的根毛、根表皮

短细胞或细胞间隙侵入, 形成丛枝、泡囊、根内菌丝等典型的菌根结构。部分根内菌丝顶端膨大形成圆形、椭圆形泡囊或菌丝二分叉式生长形成丛枝结构, 有些根内菌丝在细胞内形成螺旋状菌丝圈。根内菌丝、泡囊可存在于细胞中, 也可存在于细胞间隙, 而丛枝只存在于细胞中, 后期处于消解状态, 呈海绵状, 泡囊壁薄, 内含不同形态的油滴等内含物^[26-28]。通常认为深色有隔菌丝和微菌核是深色有隔内生真菌 (dark septate endophytes, DSE) 在植物根内的 2 种典型特征结构。深色有隔菌丝分布于根的表皮、皮层的胞间和胞内, 颜色深浅不一, 常见深棕色至浅棕色, 随着菌丝的延伸, 颜色可能逐渐变浅。菌丝壁较厚, 具明显的横隔, 菌丝直或曲, 常伴有树枝状随意隆起的分枝。微菌核由细胞壁加厚的膨大的细胞紧密堆积形成, 形状大小不一, 颜色多为深棕色, 同一微菌核团块的颜色也有深浅变化。分布于根的表皮、皮层细胞中或细胞间隙, 有时可见与其相连的菌丝^[29]。

由于几乎所有的 AM 真菌接种试验均涉及菌根发育状况观察与侵染率测定, 因此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植物根系 AM 真菌的侵染状况。如 PHILLIPS 等^[30]和 KORMANIK 等^[31]分别利用台酚蓝和酸性品红染色法观察根系 AM 真菌, 但 AM 真菌结构和周围的根皮层组织均染上了相近的颜色, 使二者颜色反差不大, 不利于观察拍照。吴强盛等^[32]利用台酚蓝染柑橘的根样可以清楚地看到 AM 真菌的各个结构, 但是未能拍到柑橘根清晰的丛枝结构。VIERHEILIG

等^[33]将醋酸墨水染色法应用于根系 AM 真菌染色, 并指出台酚蓝和酸性品红均为致癌疑似物。唐燕等^[34]用苯胺蓝染色液对腋花杜鹃的根系进行染色, 能清楚地观察到 AM 真菌和内生真菌的侵入, 并能观察到 AM 真菌菌丝、孢囊和深色有隔内生真菌菌丝。不同种、属的植物根系结构存在差异, 因此前人的染色方法并不一定适用于金花茶。

本研究以广西防城港市原生金花茶科技有限公司金花茶资源圃的金花茶(品种名为防普金花茶)根系为样品, 比较和评价苏丹红Ⅳ、酸性品红、苯胺蓝、台酚蓝、醋酸墨水 5 种常用染色剂对其 AM 真菌的染色效果, 以建立安全、可靠、理想的染色方法, 为金花茶根系的 AM 真菌研究提供支持。

1 材料与方法

1.1 材料

选取种植多年的金花茶健康植株根系。于 2021 年 7 月 29 日采自广西防城港市原生金花茶科技有限公司金花茶资源圃种植基地, 清水冲洗干净后置于 50%乙醇溶液, 室温保存。

1.2 方法

1.2.1 染色剂配制 染色剂各成分比例参考李冬萍等^[35]的方法。(1) 苏丹红Ⅳ: 0.1 g 苏丹红Ⅳ+10 mL 95%乙醇+10 mL 甘油;(2) 酸性品红: 0.05 g 酸性品红+100 mL 乳酸-甘油-蒸馏水(1:1:1)混剂;(3) 苯胺蓝: 0.1 g 苯胺蓝+100 mL 95%乙醇;(4) 台酚蓝: 0.05 g 台酚蓝+100 mL 乳酸-甘油-蒸馏水(1:1:1)混剂;(5) 醋酸墨水: 95 mL 5%冰乙酸+5 mL Quink 牌纯黑墨水(上海派克笔有限公司)。

1.2.2 根系菌根染色 参考文献[19]的方法, 对以上 5 种染色剂进行根系菌根染色试验, 略作改进。取保存于 50%乙醇溶液的根系, 清水冲洗干净并将水分控干。(1) 透明: 将金花茶的 3~4 级根(直径 1~2 mm)剪成约 1 cm 长, 加入 20% KOH 溶液完全浸泡根系, 于 90 ℃水浴 120 min, 清水冲洗 3 次并控干水分。(2) 脱色: 加入碱性 H₂O₂(30 mL 10% H₂O₂+3 mL 氨水+567 mL 蒸馏水)室温脱色 60 min, 用清水冲洗 3 次并控干水分。(3) 酸化: 加入 5%冰乙酸, 室温酸化 5 min, 清水冲洗 3 次并控干水分。(4) 染色: 用 5 种染色剂分别进行染色处理, 66 ℃水浴染色 60 min, 并用清水漂洗数次。(5) 褪色: 用 4 ℃清水浸泡

12 h 以上, 备用, 因酸性品红染色后极易褪色, 故该染色组免去褪色步骤, 需及时制片观察。

1.2.3 制片与显微观察 将脱色处理后的根段置于载玻片上, 用尖嘴镊子挑出金花茶根的坚硬组织, 剩余组织平展在载玻片上, 盖上盖玻片, 然后用镊子轻轻敲压使平展均匀。每个处理制片 3 张, 3 次重复。使用尼康 Eclipse Ci-L 和 DS-Ri2 观察、拍照。

2 结果与分析

2.1 苏丹红Ⅳ染色

用苏丹红Ⅳ染色时, 根内和根外的 AM 真菌菌丝着色均不明显(图 1A, 图 1B); 部分孢囊主体被染成橘黄色, 观察不到内含物(图 1C); 另一部分孢囊着色不明显, 但能观察到内含物(图 1D); DSE 的菌丝和微菌核着色不明显(图 1E), 可观察到微菌核的油滴状内含物(图 1F)。

2.2 酸性品红染色

酸性品红将 AM 真菌菌丝和部分孢囊及二者的连接处染成肉粉色, 与背景反差不明显, 孢囊可观察到内含物(图 2A~图 2D)。DSE 的菌丝和微菌核与背景反差明显(图 2E, 图 2F)。

2.3 苯胺蓝染色

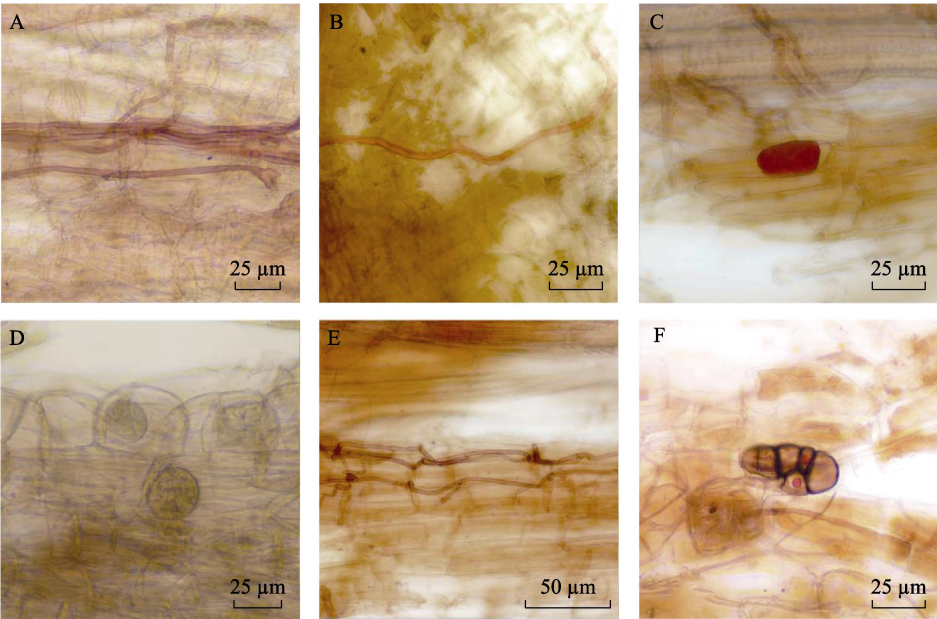
用苯胺蓝染色时, AM 真菌菌丝和孢囊呈蓝色, 边缘清晰, 观察不到孢囊内含物(图 3A~图 3C)。丛枝呈浅蓝色的海绵状, 边缘模糊, 但根皮层也被染上了相同或略浅的颜色(图 3D, 图 3E)。深色有隔内生真菌的菌丝与背景反差明显, 易观察(图 3A)。还分辨出一种未知真菌结构(图 3F)。

2.4 台酚蓝染色

用台酚蓝染色后, 根皮层细胞为浅蓝色, AM 真菌菌丝和孢囊呈略深的蓝色, 可观察到孢囊内含物(图 4A~图 4C)。能轻易分辨不同形态的丛枝(图 4D, 图 4E)。细胞内的菌丝圈清晰可见(图 4F, 图 4G)。DSE 的菌丝和微菌核染色效果不明显(图 4H, 图 4I)。

2.5 醋酸墨水染色

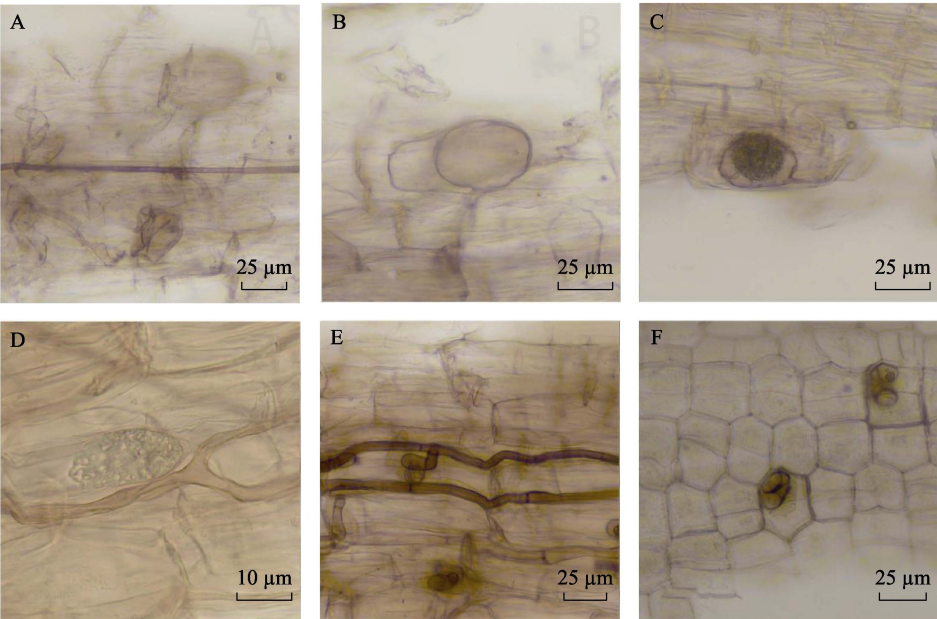
经醋酸墨水染色的 AM 真菌结构均清晰可见, AM 真菌根内和根外菌丝均呈紫色, 走向明显(图 5A, 图 5B)。孢囊和不同形态的丛枝均染上深浅不一的蓝紫色, 均与浅色的背景反差大, 易观察, 孢囊可观察到内含物(图 5B~图 5G)。DSE 的菌丝和微菌核清晰(图 5H, 图 5I)。以上各种典型结构在低倍镜下均能清晰地观察到。



A: 根内菌丝; B: 根外菌丝; C、D: 泡囊; E: 深色有隔菌丝及其分枝; F: 微菌核。
A: Internal hyphae; B: External hyphae; C, D: Vesicle; E: DSE hypha and branches; F: Microsclerotia.

图 1 苏丹红Ⅳ对金花茶根系 AM 真菌的染色效果

Fig. 1 Dyeing effect of Sudan red IV on AM fungi in *C. nitidissima* roots



A: 菌丝; B、C: 泡囊; D: 菌丝和泡囊; E: 深色有隔菌丝及其分枝; F: 微菌核。
A: Hyphae; B, C: Vesicle; D: Hyphae and vesicle; E: DSE hypha and branches; F: Microsclerotia.

图 2 酸性品红对金花茶根系 AM 真菌的染色效果

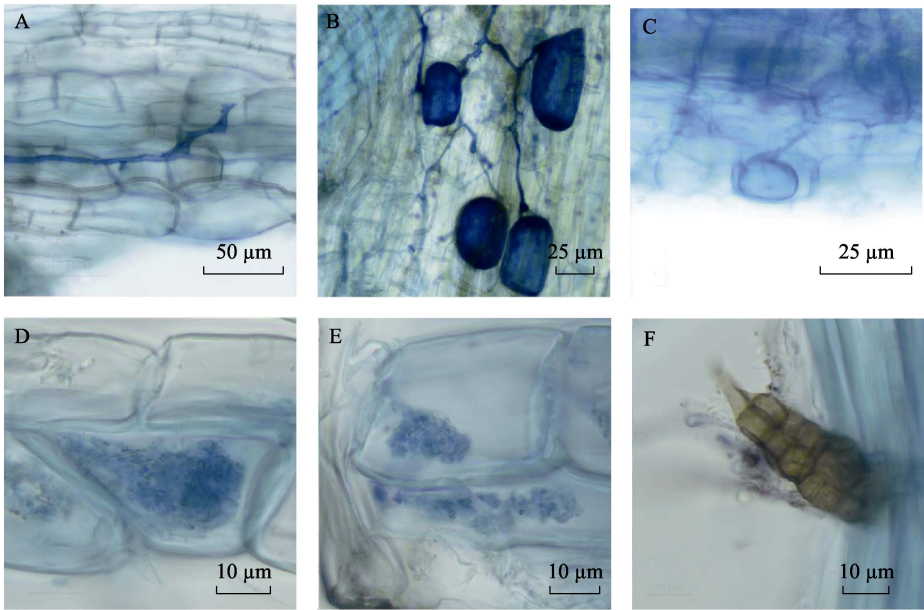
Fig. 2 Dyeing effect of acid fuchsin on AM fungi in *C. nitidissima* roots

2.6 5 种不同染色剂的染色效果比较

比较 5 种染色剂分别对金花茶根系 AM 真菌结构及根组织的染色效果, 结果显示, 每种染色剂均使根内菌丝和泡囊染色, 丛枝的染色情况与根组织很接近, 酸性品红染色的结构数量最少, 醋酸墨水能使金花茶根系 AM 真菌的所有典型结

构染色 (表 1)。

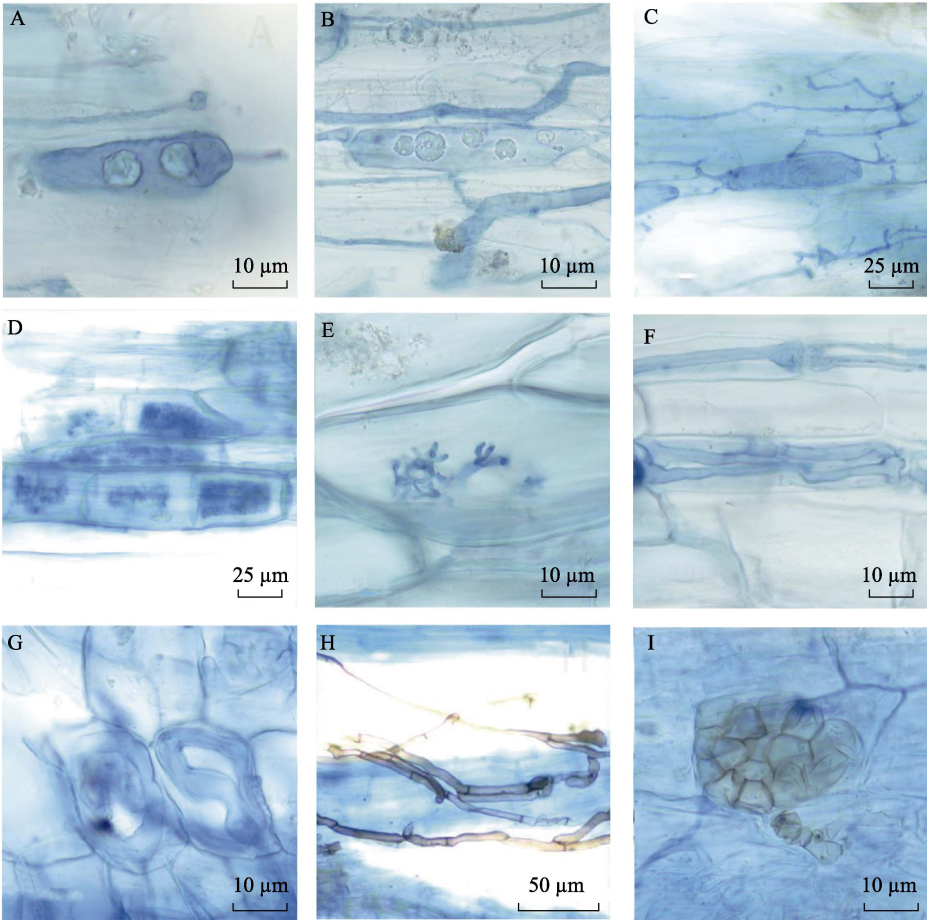
观察 5 种染色剂对金花茶根系 AM 真菌结构的染色效果, 结果显示, 不同染色剂对 AM 真菌结构染色的清晰度、反差效果、保存时间以及染色剂的成本、毒性等方面存在较大差别 (表 2)。



A: AM 真菌菌丝和深色有隔内生真菌菌丝; B、C: 泡囊; D、E: 海绵状丛枝; F: 未知真菌的结构。
A: AM fungi hyphae and DSE hypha; B, C: Vesicle; D, E: Spongy arbuscule; F: Structure of unknown fungi.

图 3 苯胺蓝对金花茶根系 AM 真菌的染色效果

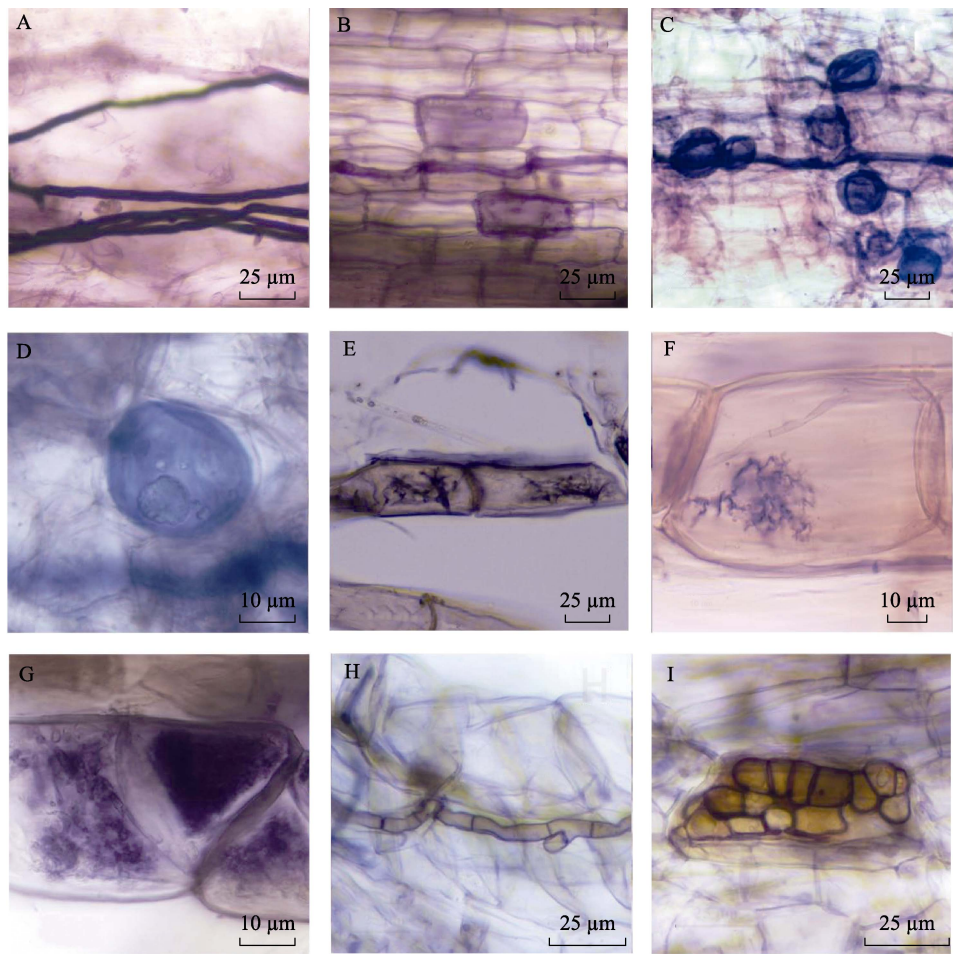
Fig. 3 Dyeing effect of aniline blue on AM fungi in *C. nitidissima* roots



A~C: 不同形态的菌丝和泡囊; D、E: 各种形态的丛枝; F、G: 菌丝圈; H: 深色有隔菌丝及其分枝; I: 微菌核。
A-C: Different forms of hyphae and vesicle; D, E: Different forms of arbuscule; F, G: Hyphae circle; H: DSE hypha and branches, I: Microsclerotia.

图 4 台盼蓝对金花茶根系 AM 真菌的染色效果

Fig. 4 Dyeing effect of trypan blue on AM fungi in *C. nitidissima* roots



A~D: 形态各异的菌丝和泡囊; E~G: 各种形态的丛枝; H: 深色有隔菌丝; I: 微菌核。
A-D: Different forms of hyphae and vesicle; E-G: Different forms of arbuscule; H: DSE hypha; I: Microsclerotia.

图 5 醋酸墨水对金花茶根系 AM 真菌的染色效果

Fig. 5 Dyeing effect of acetic acid ink on AM fungi in *C. nitidissima* roots

表 1 5 种染色剂对金花茶根系 AM 真菌结构及根组织的染色效果比较

Tab. 1 Comparison of staining effect of five dyes on AM fungi structure and root tissue of *C. nitidissima* roots

染色剂 Dye	根内菌丝 Internal hyphae	根外菌丝 External hyphae	泡囊 Vesicle	丛枝 Arbuscule	根组织 Root tissue
苏丹红Ⅳ	+	+	+	—	—
酸性品红	+	—	+	—	—
苯胺蓝	+	—	+	+	+
台酚蓝	+	—	+	+	+
醋酸墨水	+	+	+	+	+

注: +表示各结构或组织染上对应染色剂的颜色; —表示各结构或组织未染上对应染色剂的颜色。

Note: + represents the color of the corresponding staining agent for each structure or tissue; — indicates that each structure or tissue is not stained with the color of the corresponding stain.

表 2 5 种染色剂对金花茶根系 AM 真菌染色效果综合比较

Tab. 2 Comprehensive comparison of effect of five dyes on AM fungi staining of *C. nitidissima* roots

染色剂 Dye	总体染色效果 Overall dyeing effect	内含物 Contents	反差效果 Contrast effect	保存时间 Save time	成本 Cost/(yuan·g ⁻¹)	毒性 Toxicity
苏丹红Ⅳ	差	可观察到	不明显	很久不褪色	3	疑似致癌物 ^[36-37]
酸性品红	差	可观察到	不明显	持续褪色	10	疑似致癌物 ^[33]
苯胺蓝	一般	观察不到	一般	很久不褪色	12	疑似致癌物
台酚蓝	好	可观察到	不明显	很久不褪色	16	疑似致癌物 ^[33]
醋酸墨水	好	可观察到	明显	很久不褪色	2	无毒 ^[38]

3 讨论

根系菌根的染色效果直接影响菌根定殖分析的准确性,因此找到稳定可靠、染色对象与背景反差大、安全无毒的染色方法,十分必要。

在光学显微镜下,观察 5 种染色剂对金花茶根系 AM 真菌结构的染色效果,结果表明,不同染色剂对 AM 真菌结构染色的清晰度、稳定性、反差效果等方面存在较大差异。当采用苏丹红 IV 染色时,泡囊外轮廓模糊,很难观察到完整的泡囊结构,也不易观察到泡囊和 AM 真菌菌丝的相对位置,染色不均;AM 真菌菌丝染色清晰度不高,不易辨别其形态;未观察到丛枝结构。而在枳砧纽荷尔脐橙^[39]根系 AM 真菌染色中,可观察到丛枝在细胞内呈淡粉色,其原因可能是取样的根系无丛枝结构或者丛枝染色非常浅,难以鉴别。酸性品红染色后,泡囊和 AM 真菌菌丝着色浅,在脱色阶段,皮层组织与 AM 真菌结构同步脱色且速度极快,若不能及时观察,需放回酸性品红染液中常温复染,复染时间在 10 h 以上效果较好,操作繁琐。汪茜等^[40]和覃晓娟等^[41]采用酸性品红分别观察生姜根系和香蕉根系,也出现同样的现象。而高秀兵等^[22]采用酸性品红观察茶树根系,可清楚地观察到菌丝、泡囊、丛枝等 AM 真菌结构,推测是染色剂的具体使用步骤或对不同科、属植物的着色效果不同而导致观察结果有差异。用苯胺蓝染色时,AM 真菌结构的颜色与根内的皮层细胞相近且略深,与背景反差小,看不到泡囊内含物,但唐燕等^[34]可以清楚地观察到腋花杜鹃的泡囊内含物,其原因可能是苯胺蓝未能使金花茶根系的泡囊内含物染色,或者取样根系的泡囊处于内含物不明显的生理阶段。用台酚蓝染色,可辨别 AM 真菌的菌丝形态。在 66 °C 水浴加热 1 h 的条件下,染色效果很强,根段整体呈现灰蓝色,细胞壁颜色更深,只能观察到染成深蓝色的 AM 真菌菌丝和深褐色的 DSE 菌丝;将染色操作换成 66 °C 水浴加热 15 min 后,清水浸泡下根皮层细胞褪色效果较好,能分辨不同形态的丛枝,但染色清晰度不高,这与香蕉根系 AM 真菌染色方法^[41]的报道一致,猜测是根系皮层组织与 AM 真菌结构同步褪色的缘故,说明台酚蓝对 AM 真菌结构的染色无特异性。采用醋酸墨水染色时,金花茶根系经清水浸泡 12 h 后,大部分的皮层细胞已褪至浅紫色,而 AM 真菌各结构仍然保持鲜亮的蓝紫色。清水浸泡 36 h 后,皮层细胞接近完全脱色,

丛枝等典型的 AM 真菌结构边缘清晰,能轻易分辨海绵状和二分叉式的丛枝,染色效果稳定不褪色。

从 5 种染色剂的染色效果来看,每种染色剂均能使根内菌丝和泡囊染色,说明这 2 个结构比较常见,也较容易染上色,具体的染色机理需要进一步探讨。苏丹红 IV 和酸性品红均未能使丛枝和根组织染上明显的颜色,结合这 2 种染色剂对其他结构的染色情况,可以初步得出这 2 种染色剂均不是理想的染色剂的结论。醋酸墨水能使金花茶根系 AM 真菌的所有典型结构染色,也能使根组织染上颜色,表明醋酸墨水的染色能力强。在染色能力方面,苯胺蓝和台酚蓝并不比醋酸墨水逊色,但是醋酸墨水对根组织的染色在清水中就能迅速褪色,并且可以使 AM 真菌结构染上的颜色保持鲜亮,在浅色的背景上很容易进行进一步观察。

5 种染色剂均能分辨出 AM 真菌与 DSE 的主要原因:一是本次样品中 DSE 侵染的范围广,未出现取样的根系无特征结构的情况;二是作为背景的组织,在染色的透明和脱色步骤成功脱去本色,而 DSE 的 2 种典型结构(即深色有隔菌丝和微菌核)颜色深,未受到 20% KOH 溶液和碱性 H₂O₂ 溶液的明显影响,后期也不易被染色,与背景反差明显;三是 DSE 的菌丝具明显的横隔特征。有文献报道,在显微镜下观察经苏丹红 IV 染色的 DSE,能看到 DSE 透明菌丝中的油滴体^[29]。本研究中能观察到浅色微菌核的油滴体,在 DSE 菌丝里却未观察到。其原因可能是 DSE 菌丝颜色太深,掩盖了油滴体的颜色,或者油滴体只出现在 DSE 结构的特定阶段,而能在微菌核里看到油滴体,可能原因是 DSE 的菌丝和微菌核成分相近,结构相似,文献报道有时可见与微菌核相连的菌丝^[29]也可印证这个猜测。DSE 菌丝分布于根的表皮、皮层的胞间和胞内^[29],而本研究中的 DSE 菌丝在视觉上相对完整紧凑地出现在根组织的上方,且沿根的纵轴方向延伸,形成菌丝网络,可能原因是在制片时过于用力,压碎了根组织,影响了后续的观察和拍照,同时能判断出此根段中的 DSE 菌丝均为胞间菌丝。在苯胺蓝染色时,还分辨出第三种真菌的未知真菌结构,疑似链格孢属(*Alternaria*)真菌的分生孢子^[42],因该种真菌侵染程度不深,未留下更多可供观察和分析判断的结构。

此外,Quink 牌墨水由淡黄色的喹啉黄(CI

47005, CI Food yellow 13)、橙色的日落黄 (CI 15985, CI Food yellow 3) 和蓝色的阴丹士林蓝 (CI 69800, CI Food Blue 4, 又名蓝蒽酮) 3 种染料组成, 安全无毒^[38]。从保存时间、成本、毒性、操作复杂程度等方面考虑, 醋酸墨水染色法均更优于其他 4 种染色方法, 因此醋酸墨水较其他几种染色剂更适用于金花茶根系 AM 真菌的染色观察。

致谢 感谢广西防城港市原生金花茶科技有限公司提供的金花茶根系样品。

参考文献

- [1] 梁盛业. 金花茶的发现与命名[J]. 植物杂志, 1992(5): 7.
LIANG S Y. The discovery and nomenclature of *Camellia nitidissima*[J]. Plant Journal, 1992(5): 7. (in Chinese)
- [2] 梁盛业. 广西树木园的珍稀濒危植物[J]. 植物杂志, 1993(4): 12-13.
LIANG S Y. Rare and endangered plants in Guangxi arboretum[J]. Plant Journal, 1993(4): 12-13. (in Chinese)
- [3] 黄燮才. 金花茶开发利用概况及前景预测[J]. 中国中医药信息杂志, 1994(6): 10-11.
HUANG X C. Development and utilization of *Camellia nitidissima* and its prospect forecast[J]. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine, 1994(6): 10-11. (in Chinese)
- [4] 张佩霞, 于波, 邹春萍, 黄丽丽, 赵超艺, 孙映波. 金花茶黄酮类化合物的生物学功能及提取分离测定方法研究进展[J]. 广东农业科学, 2019, 46(1): 13-20.
ZHANG P X, YU B, ZOU C P, HUANG L L, ZHAO C Y, SUN Y B. Research progress in biological functions and methods of extraction, separation, determination of flavonoids from *Camellia nitidissima*[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2019, 46(1): 13-20. (in Chinese)
- [5] 许凡萍. 金花茶化学成分的抗氧化活性研究[J]. 农产品加工, 2019(23): 67-68, 75.
XU F P. Antioxidative properties of chemical components of *Camellia chrysantha* (Hu) Tuyama[J]. Farm Products Processing, 2019(23): 67-68, 75. (in Chinese)
- [6] 李仁菊. 广西金花茶中多酚的提取和抗氧化性能研究[D]. 南宁: 广西大学, 2007.
LI R J. Study on antioxidation and extraction of polyphenol from *Camellia chrysantha*[D]. Nanning: Guangxi University, 2007. (in Chinese)
- [7] 罗在柒, 姜运力, 李兰, 田凡, 颜凤霞. 贵州原产两种金花茶不同部位微量元素及重金属成分分析[J]. 农业与技术, 2020, 40(15): 61-63.
LUO Z Q, JIANG Y L, LI L, TIAN F, YAN F X. Analysis of trace elements and heavy metals in different parts of two kinds of *Camellia nitidissima* native to Guizhou[J]. Agriculture and Technology, 2020, 40(15): 61-63. (in Chinese)
- [8] 何进勇, 邝新红, 李征征, 卫晓慧, 杜鸿志, 林森森, 袁胜涛, 孙立. 三种金花茶提取物降脂作用实验研究[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(4): 644-647.
HE J Y, KUANG X H, LI Z Z, WEI X H, DU H Z, LIN S S, YUAN S T, SUN L. Lipid regulation of three kinds of *Camellia chrysantha* (Hu) Tuyama extraction[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2018, 18(4): 644-647. (in Chinese)
- [9] 陈林妹, 王亚军, 肖颖梅, 孟凡燕, 夏星. 壮药金花茶叶的降血糖活性筛选[J]. 现代中药研究与实践, 2017, 31(2): 31-35.
CHEN L M, WANG Y J, XIAO Y M, MENG F Y, XIA X. Screening the hypoglycemic active section of Zhuang medicine *Camellia chrysantha* (Hu) Tuyama leaves[J]. Research and Practice on Chinese Medicines, 2017, 31(2): 31-35. (in Chinese)
- [10] 宁恩创, 熊燕, 韦璐, 黄文雯, 刘志新, 秦小明. 金花茶黄酮的分离及体外抗氧化活性研究[J]. 广西轻工业, 2011, 27(3): 1-2, 19.
NING E C, XIONG Y, WEI L, HUANG W W, LIU Z X, QIN X M. Isolation and antioxidant activity of flavonoids from *Camellia nitidissima*[J]. Guangxi Journal of Light Industry, 2011, 27(3): 1-2, 19. (in Chinese)
- [11] 何甘霖, 王春燕, 谭获, 郑丽霞, 于宝丹, 李宏伟. 金花茶叶子提取物对人单核细胞白血病细胞株 U937 细胞抑制作用的研究[J]. 光明中医, 2014, 29(7): 1382-1384.
HE G L, WANG C Y, TAN H, ZHENG L X, YU B D, LI H W. Study on the inhibitory effect of extract of *Camellia nitidissima* seed on human monocytic leukemia cell line U937[J]. Guangming Journal of Chinese Medicine, 2014, 29(7): 1382-1384. (in Chinese)
- [12] 陈文荣. 几种金花茶组植物无性繁殖技术[J]. 福建林业科技, 2016, 43(4): 120-124.
CHEN W R. Study on the cloning technology of several plants within Sect. *Camellia nitidissima*[J]. Journal of Fujian Forestry Science and Technology, 2016, 43(4): 120-124. (in Chinese)
- [13] 罗沐阳. 基于金花茶生态习性的人工方法初探[J]. 绿色科技, 2016(15): 96-97.
LUO M Y. Preliminary study on artificial methods based on ecological habits of *Camellia nitidissima*[J]. Journal of Green Science and Technology, 2016(15): 96-97. (in Chinese)
- [14] 吴丽君, 高楠, 陈达, 陈文荣. 金花茶杂交种子无菌苗的组培快繁研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2018, 42(5): 32-38.

- WU L J, GAO N, CHEN D, CHEN W R. Tissue culture and rapid propagation of sterile seedling of *Camellia nitidissima* C.W. Chi hybrid germplasm[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2018, 42(5): 32-38. (in Chinese)
- [15] 高宇琼, 赖钟雄. 金花茶体胚和叶片愈伤组织培养[J]. 亚热带农业研究, 2010, 6(2): 130-135.
- GAO Y Q, LAI Z X. A study on callus culture from somatic embryos and leaves in *Camellia nitidissima* Chi[J]. Sub-tropical Agriculture Research, 2010, 6(2): 130-135. (in Chinese)
- [16] 林莉. 金花茶离体培养研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2005.
- LIN L. *In vitro* culture of *Camellia nitidissima* Chi[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2005. (in Chinese)
- [17] 郑文雄, 麦晓怡, 张宇翠, 黄琪, 王颖. 金花茶天然抗氧化五谷代餐粉加工工艺[J]. 食品工业, 2021, 42(2): 87-91.
- ZHENG W X, MAI X Y, ZHANG Y C, HUANG Q, WANG Y. The processing technology of natural antioxidant grains meal substitute for *Camellia nitidissima*[J]. The Food Industry, 2021, 42(2): 87-91. (in Chinese)
- [18] 张海龙. 金花茶黄酮类化合物抗食源性肥胖作用和机制研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2020.
- ZHANG H L. Study on the inhibitory effect on diet-induced obesity of the flavonoids compounds in *Camellia nitidissima* Chi flowers and its mechanism[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2020. (in Chinese)
- [19] 王幼珊, 张淑彬, 张美庆. 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, 2012: 166-167.
- WANG Y S, ZHANG S B, ZHANG M Q. Arbuscular mycorrhizal fungi and germplasm resources in China[D]. Beijing: China Agriculture Press, 2012: 166-167. (in Chinese)
- [20] BOROWICZ V. Do arbuscular mycorrhizal fungi alter plant-pathogen relations?[J]. Ecology, 2001, 82: 3057-3068.
- [21] FITTER A H. Darkness visible: reflections on underground ecology[J]. Journal of Ecology, 2005, 93: 231-243.
- [22] 高秀兵, 陈娟, 赵华富, 李珍, 郭灿, 周富裕, 王振轩, 涂逸洋, 周玉锋. 贵州地方种茶树根系丛枝菌根真菌的侵染特征[J]. 西南农业学报, 2016, 29(6): 1328-1335.
- GAO X B, CHEN J, ZHAO H F, LI Z, GUO C, ZHOU F Y, WANG Z X, TU Y Y, ZHOU Y F. Colonization characteristics of arbuscular mycorrhiza fungi in rhizosphere of local tea trees in Guizhou[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2016, 29(6): 1328-1335. (in Chinese)
- [23] 南雪芹. 不同丛枝菌根真菌(AMF)对茶树生长及耐盐性的影响研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.
- NAN X Q. Effects of different AMF species on the growth and salt tolerance of tea plant[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2016. (in Chinese)
- [24] 许平辉. 丛枝菌根真菌(AMF)对水分胁迫下茶树生长及抗旱性的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- XU P H. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and drought resistance of tea plant under water stress[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2017. (in Chinese)
- [25] 杜娟. 根内球囊霉菌对茶树抗铅胁迫能力的调节效应[D]. 郑州: 河南农业大学, 2013.
- DU J. Adjustment effect of *Glomus intraradices* on Pb stress resistance ability of the tea plants[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2013. (in Chinese)
- [26] 田蜜, 陈应龙, 李敏, 刘润进. 丛枝菌根结构与功能研究进展[J]. 应用生态学报, 2013, 24(8): 2369-2376.
- TIAN M, CHEN Y L, LI M, LIU R J. Structure and function of arbuscular mycorrhiza: a review[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2013, 24(8): 2369-2376. (in Chinese)
- [27] 孟晓燕. 塔里木河下游地区丛枝菌根植物多样性及侵染特点[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2007.
- MENG X Y. Diversity and infection of arbuscular mycorrhizae plants in the lower reaches of Tarim River[D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2007. (in Chinese)
- [28] 高秀兵, 陈娟, 郭灿, 姚雍静, 赵志清. 茶树丛枝菌根真菌的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2011, 39(9): 122-126.
- GAO X B, CHEN J, GUO C, YAO Y J, ZHAO Z Q. Advances in arbuscular mycorrhizal fungi of *Camellia sinensis*[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2011, 39(9): 122-126. (in Chinese)
- [29] 刘茂军, 张兴涛, 赵之伟. 深色有隔内生真菌(DSE)研究进展[J]. 菌物学报, 2009, 28(6): 888-894.
- LIU M J, ZHANG X T, ZHAO Z W. Advances in the research of dark septate endophytes[J]. Mycosystema, 2009, 28(6): 888-894. (in Chinese)
- [30] PHILLIPS J M, HAYMAN D S. 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, 1970, 55: 158-160.
- [31] KORMANIK P P, BRYON W C, SCHULTZ R C. Procedures and equipment for staining large numbers of plant root samples for endomycorrhizal assay[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1980, 26(4): 536-538.
- [32] 吴强盛, 夏仁学. 柑橘丛枝菌根形态结构观察[J]. 亚热带植物科学, 2010, 39(2): 14-16.
- WU Q S, XIA R X. Observation on morphological structure of arbuscular mycorrhizas in *Citrus*[J]. Subtropical Plant Science, 2010, 39(2): 14-16. (in Chinese)

- [33] VIERHEILIG H, COUGHLAN A P, WYSS U. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular mycorrhizal fungi[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(12): 5004-5007.
- [34] 唐燕, 李敏, 马焕成, 伍建榕. 云南轿子山腋花杜鹃菌根多样性研究[J]. *云南大学学报(自然科学版)*, 2019, 41(5): 1062-1072.
- TANG Y, LI M, MA H C, WU J R. Mycorrhizal diversity of *Rhododendron axillae* in Jiaozi Mountain, Yunnan[J]. *Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition)*, 2019, 41(5): 1062-1072. (in Chinese)
- [35] 李冬萍, 廖楠, 汪茜, 龙艳艳, 宋娟, 张金莲, 陈廷速. 木薯根系丛枝菌根真菌染色方法[J]. *亚热带农业研究*, 2016, 12(1): 50-55.
- LI D P, LIAO N, WANG Q, LONG Y Y, SONG J, ZHANG J L, CHEN T S. A method to stain arbuscular mycorrhizal fungi in cassava roots[J]. *Subtropical Agriculture Research*, 2016, 12(1): 50-55. (in Chinese)
- [36] 严玉霖, 高洪, 孙文汇, 高利波, 赵汝. 苏丹红 I 对大鼠肝损伤及 CYP 1A1 表达的影响[J]. *动物医学进展*, 2010, 31(增刊 1): 31-35.
- YAN Y L, GAO H, SUN W H, GAO L B, ZHAO R. The effect of Sudan I on liver injury and expressions of CYP 1A1 in rats[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2010, 31(Suppl. 1): 31-35. (in Chinese)
- [37] 周向丽. 苏丹红在辣椒制品中的研究现状[J]. *现代食品*, 2022, 28(7): 45-49.
- ZHOU X L. Research status of Sudan in chilli products[J]. *Modern Food*, 2022, 28(7): 45-49. (in Chinese)
- [38] 齐宗韶. 超级派克黑墨水染料分析[J]. *中国制笔*, 2008(3): 11-13.
- QI Z S. The dyes analysis of the super parker black ink[J]. *China Writing Instruments*, 2008(3): 11-13. (in Chinese)
- [39] 李冬萍, 宋娟, 李铭燕, 刘金华, 刘升球, 郭道君, 李贤良, 张金莲, 陈廷速. 5 种染色剂对枳砧纽荷尔脐橙根系 AM 真菌染色效果比较[J]. *中国南方果树*, 2020, 49(5): 36-40, 44.
- LI D P, SONG J, LI M Y, LIU J H, LIU S Q, GUO D J, LI X L, ZHANG J L, CHEN T S. Comparison of the dyeing effect with five stains on AM fungi in roots of Newhall navel orange grafted on rootstock trifoliate orange[J]. *South China Fruits*, 2020, 49(5): 36-40, 44. (in Chinese)
- [40] 汪茜, 龙艳艳, 李冬萍, 张金莲, 宋娟, 周生茂, 车江旅, 陈廷速. 5 种染色剂对生姜根系丛枝菌根(AM)真菌的染色效果比较[J]. *南方农业学报*, 2015, 46(8): 1425-1429.
- WANG Q, LONG Y Y, LI D P, ZHANG J L, SONG J, ZHOU S M, CHE J L, CHEN T S. Staining effects of five stains on arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in ginger roots[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2015, 46(8): 1425-1429. (in Chinese)
- [41] 覃晓娟, 陈廷速, 李冬萍, 张金莲, 龙艳艳, 仇惠君. 香蕉根系丛枝菌根(AM)真菌染色方法比较[J]. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(6): 2447-2451.
- QIN X J, CHEN T S, LI D P, ZHANG J L, LONG Y Y, QIU H J. Comparison of staining methods on arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in banana roots[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2017, 36(6): 2447-2451. (in Chinese)
- [42] 冯中红, 孙广宇. 链格孢属及相关属分类研究新进展[J]. *菌物研究*, 2020, 18(4): 294-303.
- FENG Z H, SUN G Y. Advances in the classification of *Alternaria* and related genera[J]. *Journal of Fungal Research*, 2020, 18(4): 294-303. (in Chinese)