植物营养与肥料学报 2015,21(1):211-216
Journal of Plant Nutrition and Fertilizer doi: 10.11674/zwyf.2015.0123

大豆丛枝菌根共生结构和多聚磷累积双定位方法

周 佳, 张 爽, 廖 红, 王秀荣*
(华南农业大学, 根系生物学研究中心, 资源环境学院, 广东广州 510642)

摘要:【目的】多聚磷是丛枝菌根内磷的主要贮存形式,定性、定量观察多聚磷对于解析菌根中磷代谢具有重要意义。随着植物体内越来越多的参与菌根真菌与寄主植物之间营养交换过程的基因被鉴定,迫切需要进一步提高根内菌根共生结构和多聚磷累积的染色和定位分析技术。**【方法】**本研究利用丛枝菌根真菌 *Glomus mosseae* 侵染的大豆植株,采集新鲜根样制片,一部分薄根片利用低浓度荧光染料麦胚凝集素,室温染色 30 min,在波长 488 nm 的蓝光激发下使用荧光显微镜观察拍照;另一部分薄根片利用荧光染料 4',6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐(DAPI)进行染色,在波长 405 nm 紫外光激发下观察并拍照;进一步取新鲜制备的薄根片,先后用以上两种荧光染料进行染色,分别在波长 405 nm 和 488 nm 的激发光下观察并拍照,完成了菌根共生结构和多聚磷的共定位。**【结果】**1)使用荧光染料麦胚凝集素,大豆丛枝菌根真菌侵染结构的荧光标记活性染色法,可以清晰地检测到大豆丛枝菌根中所有的共生结构,包括丛枝,泡囊和根内菌丝等。2)在丛枝菌根真菌侵染的根中,各种共生结构都呈现出黄色荧光,为 DAPI 与多聚磷结合在紫外光激发下的呈色。根段中部分细胞内的蓝白色斑点为 DAPI 与细胞核中 DNA 结合的显色结果。在含有成熟丛枝结构的细胞中,也可观察到大部分丛枝呈蓝白色,主要是丛枝膜质结构的呈色。因此,利用荧光染料 4',6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐染色法定位多聚磷,能很好地区分多聚磷酸盐、DNA 和膜质。3)在以上研究的基础上,通过荧光光路的切换,可以同时观察到菌根共生结构和多聚磷的共定位。处于发育阶段的整个丛枝中多聚磷累积的亮黄色清晰可见。在成熟的丛枝中,由于膜质结构发达,对累积在丛枝结构中的多聚磷的染色观察产生了一定影响,导致仅仅局部的多聚磷累积清晰可见。**【结论】**本研究建立的大豆菌根共生结构与多聚磷累积的双定位分析系统,能够直观观察植物与丛枝菌根真菌的养分交换,清晰地对丛枝菌根共生结构中多聚磷的累积进行定位分析,可作为从组织和细胞水平研究菌根共生体的重要技术手段。

关键词: 大豆; 丛枝菌根真菌; 丛枝菌根共生结构; 多聚磷; 荧光染料
中图分类号: S131^{+}.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-505X(2015)01-0211-06

Dual localization of arbuscular mycorrhizal structures and polyphosphate accumulation in soybean roots

ZHOU Jia, ZHANG Shuang, LIAO Hong, WANG Xiu-rong*
(*Root Biology Center, College of Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou, 510642, China*)

Abstract:【Objectives】 Polyphosphates are major phosphorus forms existing in the structural bodies of arbuscular mycorrhizae. Qualitative and quantitative analyses of polyphosphates are important to understand the phosphorus metabolism in arbuscular mycorrhizae. Many genes have been identified to involve in nutrient exchanges between mycorrhizal fungi and host plants. Therefore, the technology for the staining and localization of polyphosphates in arbuscular mycorrhizae is urgently required. **【Methods】** Fresh roots from *Glomus mosseae* colonized soybean plants were sampled and made into thin slices. Some of them were stained with low concentration of wheat germ agglutinin for 30 min at room temperature, and photographed using a fluorescence microscope at blue light excitation with wavelength of 488 nm; the others were stained with the fluorescent dye 4, 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, and photographed at ultraviolet excitation with wavelength of 405 nm. The polyphosphates were

收稿日期: 2013-10-18 **接受日期:** 2014-11-03
基金项目: 国家自然科学基金项目(31372126)资助。
作者简介: 周佳(1985—), 女, 吉林省珲春市人, 博士研究生, 主要从事植物营养生理与遗传研究。E-mail: zhoujia8555@163.com
* 通信作者 E-mail: xrwang@scau.edu.cn

thus localized by both the methods. 【**Results**】1) Using fluorescent active staining method (stained with wheat germ agglutinin), all arbuscular mycorrhizal structures could be clearly detected, including arbuscules, vesicles and intercellular hyphae. 2) In the infected roots, polyphosphates in arbuscular mycorrhizal structures showed yellow fluorescence under excitation of ultraviolet light. DNA in nucleus interacting with 4, 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride showed blue-white fluorescent dots, and arbuscular membrance of mature arbuscules in the cells exhibited blue-white fluorescence. So, using fluorescent dye 4, 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride to position the polyphosphates, the pigmentation of polyphosphates, DNA and membrane structure were obviously distinguished. 3) Based on the above results, dual localization of mycorrhizal structures and polyphosphate accumulation was realized by changing the fluorescent channels. Furthermore, polyphosphate accumulation in immature arbuscules showed light yellow fluorescence, and those in mature arbuscules could only partly be observed since highly developed membrane structure affected the staining and appearance of polyphosphates. 【**Conclusions**】The dual staining method using fluorescent dyes wheat germ agglutinin and 4, 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride is able to localize the mycorrhizal structures and polyphosphate accumulation in soybean roots. Using the method, the nutrient exchanges between arbuscular mycorrhizal fungi and plant roots can be visually observed. Therefore, it is prospective technology for the study of mycorrhizal symbiosis at tissue and cellular level.

Key words: soybean; arbuscular mycorrhizal fungi; arbuscular mycorrhizal structures; polyphosphates; fluorescent dyes

自然界中,丛枝菌根真菌(Arbuscular Mycorrhizal Fungi,AMF)可以与近80%的陆生植物形成互惠共生关系。共生过程中AMF的孢子萌发产生根外菌丝,随后在植物根内形成根内菌丝、泡囊、丛枝等一系列共生结构。根外菌丝吸收土壤中的无机磷,并快速转变成多聚磷(Polyphosphate, Poly-P),转运至根内共生结构中,在丛枝结构中再转化成无机磷形态转运给寄主植物利用[1-2]。多聚磷是丛枝菌根内磷的主要贮存形式,对多聚磷的定性、定量观察对于解析菌根中磷代谢具有重要意义。随着植物体内越来越多的负责菌根真菌与寄主植物之间营养交换的转运子被鉴定[3-6],迫切需要进一步提高根内菌根共生结构和多聚磷累积的染色和定位分析技术。

根内菌根共生结构的染色常用的是非活性染色法,较难观测到清晰的菌根结构。1991年,Smith和Dickson[7]首次应用麦胚荧光素(Wheat germ agglutinin,WGA)活性染色,观察到清晰的菌根共生结构,该方法不易操作,需要较好的经验和技术,故发展受到一定限制。但由于其显著的优点,被染色菌根共生结构清晰、美观、易于观察,越来越多的实验室仍然试图建立这种荧光染色方法。多聚磷染色常用的方法有吕氏亚甲基蓝染色(多聚磷颗粒为粉紫色),奈瑟氏染色(多聚磷颗粒为紫黑色)和DAPI(4′,6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)染色(多聚磷颗粒为黄色)。其中,DAPI染色多聚磷颗粒为黄色,与DNA和膜质结构所呈蓝白色形成鲜明对比,因为易于区分而成为最常用的多聚磷染色方法[8-9]。然而,DAPI常用于聚磷菌体内多聚磷的染色,将其用于菌根真菌侵染结构的染色报道较少[10-11],利用WGA和DAPI双染色将菌根共生结构,以及共生结构中的多聚磷颗粒进行双定位分析还未见报道。本研究尝试建立大豆丛枝菌根共生结构的荧光染色定位方法,并对AMF侵染结构中磷的主要存在形态—多聚磷的累积进行DAPI法定位分析,进而发展菌根共生结构与多聚磷累积的双定位分析系统,以期为从组织和细胞水平上研究菌根共生体提供关键技术手段。

1 材料与方法

1.1 实验材料

采用砂培方式,植物材料为大豆(*Glycine max* (L.) Merr)基因型HN66,接种10%的AMF *Glomus mosseae* 菌剂(即孢子、根外菌丝及被侵染根段等的混合物),在25 ℃、14 h光照,22 ℃、10 h黑暗的培养室中培养,每周浇一次低磷(25 μmol/L)改良的1/2 Hoagland营养液[12],pH 6.0,期间补水,常规管理,接种28 d后,采集新鲜根样制片观察。

1.2 根鲜样切片

收取新鲜根样,洗净,切成约1 cm长的根段,用

PEM buffer(50 mmol/L PIPES、5 mmol/L EGTA 和 5 mmol/L $MgSO_4$,pH 7.0)固定 1 h。将固定好的根段取出,纸巾吸干表面水分,用低熔点 agar 包埋,使用振动切片机(Leica VT1200S)将根段纵切成 50 μm 厚的薄根片。

1.3　染色方法

1.3.1 WGA488 染色法　将切好的薄根片放在离心管中,加入 PBS buffer(pH 7.4)(KH_2PO_4,0.144 g/L;NaCl,9.0 g/L;$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$,0.795 g/L)漂洗三次,使用 PBS buffer 稀释的 10 μg/mL WGA488(购自 Invitrogen,WGA488 干粉用 PBS buffer 溶解为 1 mg/mL 的储存液,放置 -20 ℃长期保存),荧光染料室温染色 30 min 后,再使用 PBS buffer(pH 7.4)漂洗三次,将染色好的薄根片摆放在加有 PBS buffer 的载玻片上,压片,在波长 488 nm 的蓝光激发下使用荧光显微镜观察拍照。

1.3.2 DAPI 染色法　将切好的薄根片放在离心管中,用 PBS buffer 漂洗三次,使用含有 10% H_2O_2 的甲醇溶液室温浸泡 10 min,用 20 μg/mL 的 DAPI 工作液(购自 Sigma,DAPI 干粉用灭菌双蒸水溶解为 1 mg/mL的储存液,放置 -20 ℃长期保存),荧光染料室温染色 30 min 后,再用 PBS buffer 漂洗三次,将染色好的薄根片摆放在加有 PBS buffer 的载玻片上,压片,在波长 405 nm 的紫外光激发下使用荧光显微镜观察并拍照。

1.3.3 WGA488 和 DAPI 双染色定位法　将切好的薄根片放在离心管中,用 PBS buffer 漂洗三次,使用含有 10% H_2O_2 的甲醇溶液室温浸泡 10 min,首先,使用 20 μg/mL 的 DAPI 室温染色 30 min,再使用 10 μg/mL 的 WGA488 荧光染料室温染色 30 min 后,再用 PBS buffer 漂洗三次,将染色好的薄根片摆放在加有 PBS buffer 的载玻片上,压片,分别在波长 405 nm 和 488 nm 的激发光下使用荧光显微镜观察并拍照。

2　结果与讨论

2.1　WGA488 对菌根共生结构的染色

Wheat Germ Agglutinin(WGA)是一种细胞生物学研究中广泛使用的荧光标记麦胚凝集素,是从小麦胚中分离的蛋白,分子量约为 43 KDa,可与 N-乙酰葡糖胺基和唾液酸残基结合[13]。WGA 488 是一种真菌细胞壁染料,其可与真菌细胞壁上的几丁质结合,在波长 488 nm 的蓝光激发下,收集 505～582 nm 散射绿色荧光[13]。本研究通过琼脂包埋根鲜样后,用振动切片机将新鲜根段切成薄根片,再使用低浓度的 WGA488 荧光染料室温避光染色 30 min,成功地建立了大豆丛枝菌根共生结构的荧光标记活性染色法。该方法可以清晰地检测到大豆丛枝菌根中所有的共生结构,包括丛枝、泡囊和根内菌丝。图 1 为 AMF *Glomus mosseae* 侵染大豆 28 d 后的根纵切 WGA488 染色结果。如图中所示,绿色荧光部分可以清晰地看到根内菌丝(IH)、丛枝结构(A)和泡囊(V)。

2.2　DAPI 对菌根内多聚磷的染色

DAPI 是一种荧光染料,与菌体中多聚磷结合,可形成黄色荧光[8-11]。从图 2 可见,在 AMF 侵染的根段中,各种共生结构内都存在黄色荧光,即为 DAPI 染色后多聚磷在紫外光激发下的呈色,尤其是在丛枝结构和泡囊结构中黄色荧光更强(如图 2c,d 所示),说明在这两个共生结构中有较多的多聚磷累积,而根外菌丝,这个主要输送多聚磷的结构中却只能观察到较弱的黄色荧光(如图 2a,b 所示)。这可能是由于丛枝结构是植物与菌根真菌之间多聚磷向无机磷转化的主要场所,而泡囊是菌根真菌用于储存养分的主要场所。DAPI 荧光染料的灵敏度高,在室温、中性条件下即可以对植物薄根片进行染色,且对样品无损伤,可保持样品的活性,同时,不影响其他染料的着色。

DAPI 也用于双链 DNA 的染色,染色后用荧光显微镜可观察到 DAPI-DNA 复合物呈蓝白色[8,9,14]。如图 2b 所示,根段中部分细胞内的蓝白色斑点即为 DAPI 与细胞核中 DNA 结合的显色结果。而且,在含有成熟丛枝结构的细胞中也可观察到高度分支的结构大部分呈蓝白色(图 2a,b),这主要是由于丛枝这一高度分化的结构主要是由膜质结构组成,膜质结构经 DAPI 染色后也会发蓝白色荧光[8,9,11]。而丛枝菌根共生结构中的多聚磷经 DAPI 染色后,呈亮黄色,很容易加以区分开。因此,虽然本研究中 DAPI 对多聚磷的染色不是很特异,但是仍然可以根据染色后的不同呈色,很容易区分 DNA、膜质结构与多聚磷。此外,在根的维管束中也出现了很亮的蓝白色荧光,可能为木质部的自发荧光造成(图 2a)。

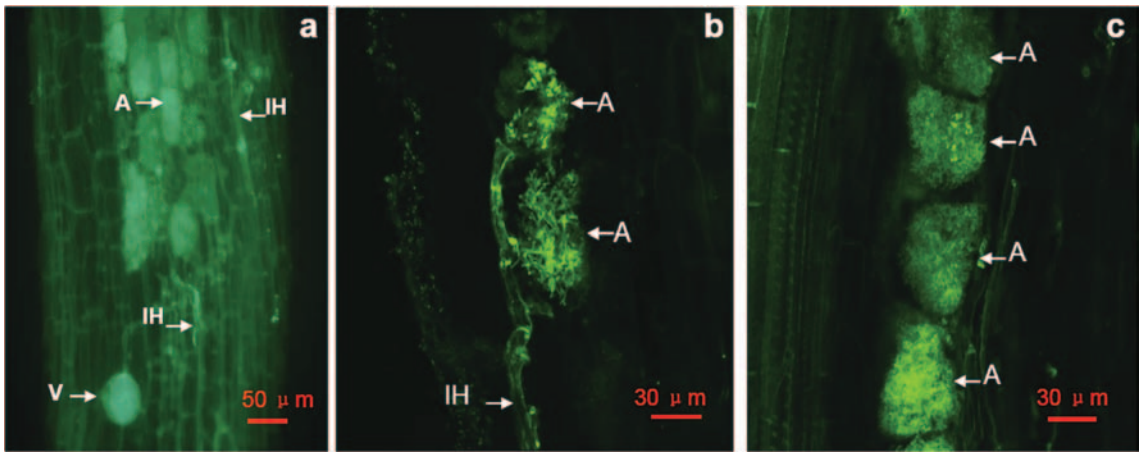

图1 大豆菌根共生结构的WGA488染色

Fig. 1 Vital staining of soybean arbuscular mycorrhizal structures by WGA488

[注(Note):图中白色箭头所指为菌根共生结构 White arrows showed arbuscular mycorrhizal structures.
A—丛枝 Arbuscule; V—泡囊 Vesicle; IH—根内菌丝 Intercellular hypha.]

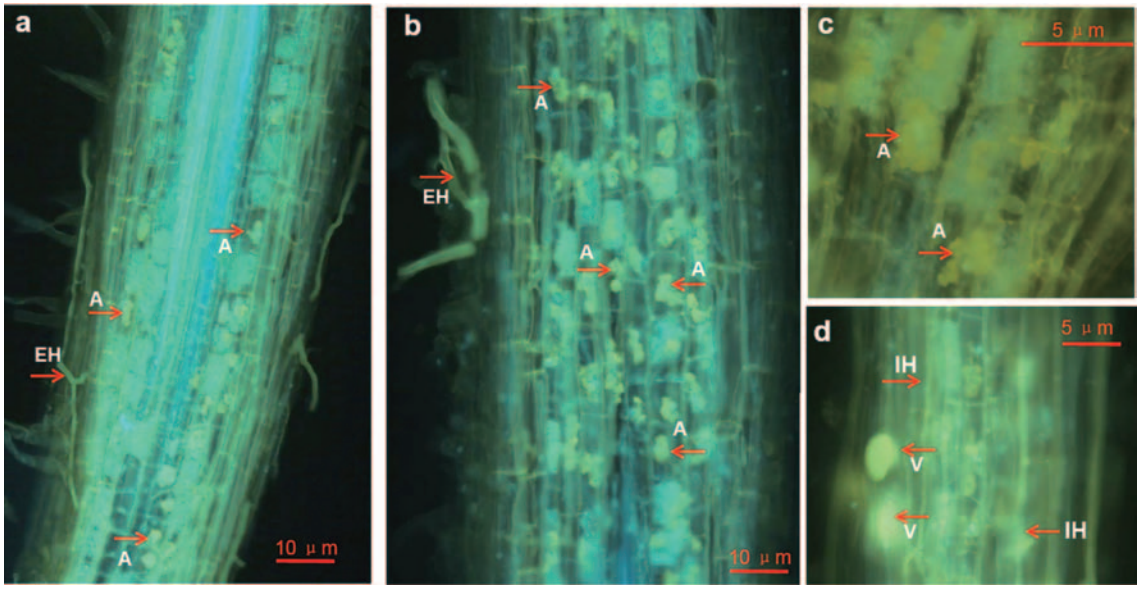

图2 大豆菌根共生结构中多聚磷的DAPI染色

Fig. 2 Staining of polyphosphate in soybean arbuscular mycorrhizal structural bodies by DAPI

[注(Note):图中红色箭头所指为多聚磷的DAPI染色 Red arrows show DAPI staining of polyphosphate.
A—丛枝 Arbuscule; V—泡囊 Vesicle; IH—根内菌丝 Intercellular hypha; EH—根外菌丝 Extracellular Hypha.]

为了进一步确定我们利用DAPI荧光染色定位的黄色是聚磷酸盐颗粒而不是其他物质,我们进一步DAPI染色后,使用激光共聚焦显微镜对AMF侵染的大豆根系进行了观察,结果如图3所示,右边照片中绿色十字所指示的蓝色部分为DAPI自身的荧光呈色,其发射波长大约在470 nm,红色十字所指示的黄色荧光为DAPI与多聚磷复合物的荧光呈色,其发射波长大约在550 nm,蓝色十字所指示的蓝白色荧光为DAPI与DNA或膜质结构的荧光呈色,其发射波长大约在500 nm。Aschar-Sobbi等[15]已有的研究发现,DAPI与多聚磷的结合会改变DAPI的激发光谱。激发波长在405 nm时,DAPI与多聚磷结合后的荧光强度显著高于DAPI的荧光强度,并且获得最高荧光强度时的发射波长大约在550 nm处。本研究中,我们发现激发波长在405 nm时,丛枝结构中产生的黄色荧光的发射波长也是大约在550 nm处,参照相关文献报道[10,11,15],可以间接证明黄色荧光是DAPI与多聚磷复合物所发出的荧光。

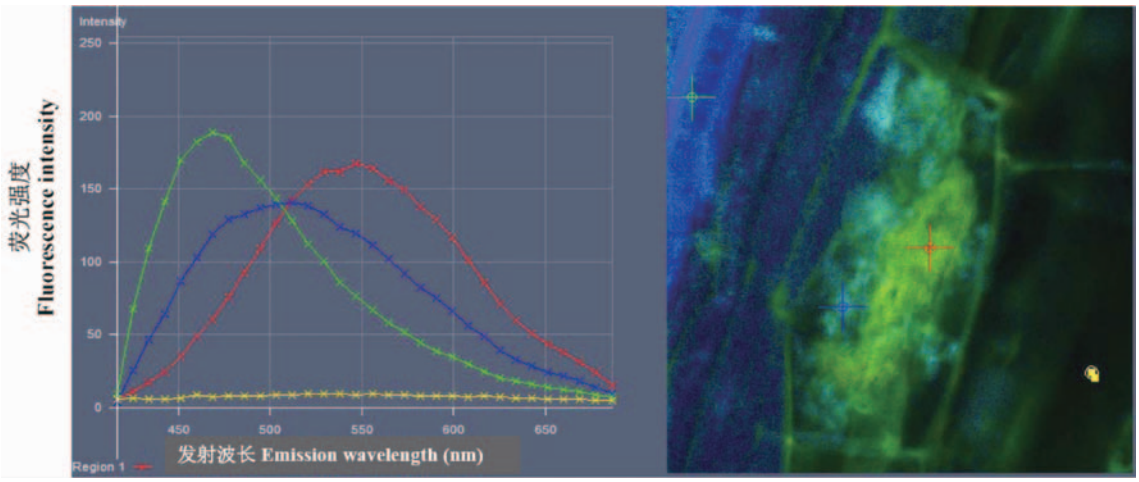

图 3　大豆根中 DAPI 的荧光染色

Fig. 3　Fluorescence staining of soybean roots by DAPI

[注(Note): 左图中绿色曲线和右图中绿色十字所指示的蓝色部分分别表示 DAPI 自身的荧光强度和呈色,红色曲线和红色十字所指示的黄色部分分别表示 DAPI 与多聚磷复合物的荧光强度和呈色, 蓝色曲线和蓝色十字所指示的蓝白色部分分别表示 DAPI 与 DNA 或膜质结构的荧光强度和呈色 Green curve in the left figure and green cross in the right image showed fluorescence intensity and staining of DAPI background, respectively, red curve and red cross showed fluorescence intensity and staining of DAPI and Poly P complex, respectively, blue curve and blue cross showed fluorescence intensity and staining of DAPI and DNA or plasma membrane complex, respectively.]

2.3　菌根共生结构和多聚磷的双定位

通过将新鲜根样经固定—琼脂包埋—振荡切片—双氧水 - 甲醇处理—DAPI-WGA488 荧光染料染色—显微镜观察等步骤,本研究成功地建立了大豆菌根共生结构和多聚磷累积的双染色共定位分析系统。该方法在用显微镜观察时,只需切换荧光光路即可同时完成菌根共生结构和多聚磷的共定位。图 4a 为未经染色明场的纵切根段,丛枝以及根内菌

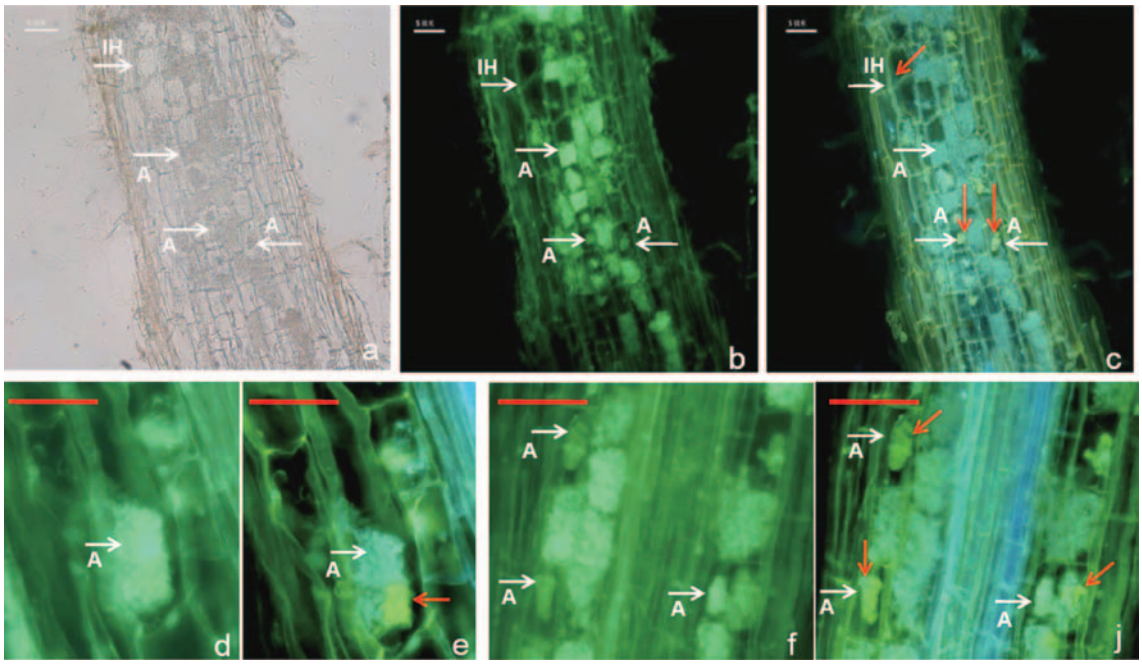

图 4　WGA488 和 DAPI 双染色的菌根共生结构

Fig. 4　Dual staining of arbuscular mycorrhizal structures with WGA488 and DAPI

[注(Note): a—明场 bright field; b,d,f—WGA488 染色 WGA488 staining; c,e,j—DAPI 染色 DAPI staining; 图中白色箭头所指为菌根共生结构 White arrows show arbuscular mycorrhizal structures; 红色箭头所指为多聚磷的 DAPI 染色 Red arrows show DAPI staining of polyphosphate accumulation; a - c—Bar = 10 μm; d,e—Bar = 2.5 μm; f,j—Bar = 5 μm.]

丝结构清晰可见。图 4b-j 为同时使用 WGA488 和 DAPI 对菌根共生结构和多聚磷进行染色,分别在蓝光和紫外光下的观察结果。纵切的根片段中可以观察到丛枝、根内菌丝等结构。WGA488 染色的丛枝结构中绿色荧光颜色比较均匀,且荧光最强,根内菌丝的荧光较弱(图 4b,d,f)。DAPI 染色结果可以看到,在含有丛枝的细胞中有蓝白色荧光,为 DAPI 与丛枝膜质结构的显色结果。同时,可以看到,在一些含有丛枝的细胞中,明显有黄色荧光的分布,即为多聚磷累积的 DAPI 染色结果(图 4c,e,j)。并且,在成熟丛枝中,由于膜质结构发达,对累积在丛枝结构中的多聚磷的染色观察产生了一定影响,导致仅仅局部的多聚磷累积清晰可见(图 4e)。而处于发育阶段的整个丛枝中多聚磷累积的亮黄色更清晰,更易观察(图 4c,j)。此外,与图 2 类似,维管束中也出现了很亮的荧光,可能为木质部的自发荧光(图 4j)。本实验中,双染色实现了非常一致的菌根共生结构和多聚磷累积的双定位,但由于本研究观察拍照主要使用普通荧光显微镜,所以观测到的丛枝等结构立体感不足,还有待进一步的改进。

3 结论

WGA488 对菌根共生结构的染色结合 DAPI 对菌根内多聚磷的染色,实现大豆菌根共生结构与多聚磷累积的双定位,能够直观观察植物与丛枝菌根真菌(Arbuscular Mycorrhizal Fungi,AMF)的养分交换,可用于从组织和细胞水平研究菌根共生体。

参 考 文 献:

[1] Parniske M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses[J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6: 763-775.

[2] Harrison M, van Buuren M. A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* [J]. Nature, 1995, 378: 626-629.

[3] Harrison M J, Dewbre G R, Liu J. A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi [J]. The Plant Cell, 2002, 14(10): 2413-2429.

[4] Paszkowski U, Kroken S, Roux C, Briggs S P. Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002, 99(20): 13324-13329.

[5] Pumplin N, Harrison M. Live-cell imaging reveals periarbuscular membrane domains and organelle location in *Medicago truncatula* roots during arbuscular mycorrhizal symbiosis [J]. Plant Physiology, 2009, 151(2): 809-819.

[6] Kobae Y, Tamura Y, Takai S *et al*. Localized expression of arbuscular mycorrhiza-inducible ammonium transporters in soybean [J]. Plant and Cell Physiology, 2010, 51(9): 1411-1415.

[7] Smith S E, Dickson S. Quantification of active vesicular-arbuscular mycorrhizal infection using image analysis and other techniques[J]. Australian Journal of Plant Physiology, 1991, 18(6): 637-648.

[8] 任世英, 肖天. 聚磷菌体内多聚物的染色方法[J]. 海洋科学, 2005, 29(1): 59-63.
Ren S Y, Xiao T. Staining methods for intracellular polymers deposited by polyphosphate-accumulating microorganisms [J]. Marine Sciences, 2005, 29(1): 59-63.

[9] Smolders G, van der Meij J, van Loosdrecht M *et al*. Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process stoichiometry and pH influence [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1994, 43(6): 461-470.

[10] Boddington C, Dodd J. Evidence that differences in phosphate metabolism in mycorrhizas formed by species of *Glomus* and *Gigaspora* might be related to their life-cycle strategies[J]. New Phytologist, 1999, 142, 531-538.

[11] Funamoto R, Saito K, Oyaizu H *et al*. Simultaneous in situ detection of alkaline phosphatase activity and polyphosphate in arbuscules within arbuscular mycorrhizal roots[J]. Functional Plant Biology, 2007, 34(9): 803-810.

[12] Zhou J, Xie J N, Liao H, Wang X R. Overexpression of β-expansin gene *GmEXPB2* improves phosphorus efficiency in soybean[J]. Physiologia Plantarum, 2014, 150: 194-204.

[13] Bonfante-Fasolo P, Faccio A, Perotto S, Schubert A. Correlation between chitin distribution and cell wall morphology in the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*[J]. Mycological Research, 1990, 94(2): 157-165.

[14] Tijssen J P F, Beekes H W, Steveninck J. Localization of polyphosphates in *Saccharomyces fragilis*, as revealed by 4, 6-diamidino-2-phenylindole fluorescence [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1982, 721(4): 394-398.

[15] Aschar-Sobbi R, Abramov A, Diao C *et al*. High sensitivity, quantitative measurements of polyphosphate using a new DAPI-based approach[J]. Journal of Fluorescence, 2008, 18: 859-866.