

# 栎类外生菌根形态学特征描述

## Morphological Description of *Quercus* Ectomycorrhizae

王科选<sup>1,2</sup>, 靳微<sup>1,2</sup>, 杨预展<sup>2</sup>, 袁志林<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> 林木遗传育种国家重点实验室, 中国林业科学研究院, 北京; <sup>2</sup> 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 杭州

\*通讯作者邮箱: <mailto:yuanzl@caf.ac.cn>

**摘要:** [实验原理] 对栎类的外生菌根进行处理后, 在显微镜下进行观察并对其进行特征描述。[实验目的] 外生菌根的形成, 可增加植物根系与土壤的接触面积, 扩大植物根系的吸收范围, 改善植物的营养条件, 促进植物生长, 提高植物抗逆性与抗病性。但目前, 我国南方栎类树种外生菌根资源调查及形态学描述还鲜有报道。所以本研究针对栎类树种外生菌根进行形态学特征描述, 这对进一步认识栎树外生菌根、统筹外生菌根资源具有重要的科学意义和应用价值。[实验方法] 对栎类外生菌根的分枝结构、菌套特征和横截面进行形态学描述。[实验结论] 所有栎树均可形成外生菌根结构且都可采用形态学特征描述的方法, 本研究结果对深入认识栎类外生菌根真菌多样性、挖掘优良菌株, 从而提升栎类的栽培质量具有重要的参考价值。

**关键词:** 栎类, 外生菌根, 菌根形态学描述

## 材料与试剂

1. 菌根样品
2. 甲苯胺蓝 (国药集团化学试剂有限公司, 沪试, catalog number: 71041280)
3. 二甲苯 (国药集团化学试剂有限公司, 沪试, catalog number: 10023418)
4. 冰乙酸 (国药集团化学试剂有限公司, 沪试, catalog number: 10000218)
5. 甲醛 (国药集团化学试剂有限公司, 沪试, catalog number: 10010018)
6. 乙醇 (国药集团化学试剂有限公司, 沪试, catalog number: 80176961)
7. 石蜡 (国药集团化学试剂有限公司, 沪试, catalog number: 69018961)
8. 中性树胶 (国药集团化学试剂有限公司, 沪试, catalog number: 10004160)
9. 番红 (阿拉丁生化科技股份有限公司, Aladdin, catalog number: S104171-50g)

10. 固绿 (索莱宝科技有限公司, Solarbio, catalog number: IF0020)

11. FAA 固定液 (见溶液配方)

12. 染色剂 (见溶液配方)

13. 无菌水

## 仪器设备

1. 自封袋

2. 镊子

3. 长绣花针 (针长度 13.5 cm, 针尖直径 1 mm, 针柄直径 3 mm)

4. 载玻片

5. 超景深显微镜 (基恩士有限公司, Keyence, model: VHX-5000)

6. 体式显微镜 (北京清大德人科技有限公司, 清德, model: XTL-81)

7. 光学显微镜 (德国卡尔蔡司公司, Carl Zeiss, model: Axio Scope A1)

8. AxioCamMRc5 数码摄像机 (德国卡尔蔡司公司, Carl Zeiss, model: AxioCam MRc5)

9. 切片机 (赛默飞世尔科技有限公司, Thermo Scientific, model: Microm HM325)

10. 电热鼓风干燥箱 (上海新诺仪器设备有限公司, 新诺, model: DHG-9000A)

## 实验步骤

### 1. 样品采集及处理

#### 1.1 苗圃地一年生实生幼苗

苗圃中幼苗根部常覆盖密集的菌丝, 这被认为是潜在的外生菌根。将 1 年生幼苗 (每个栎属物种至少有 3 到 5 株幼苗) 根系发育良好的外生菌根放入无菌聚乙烯袋中并带回处理。

#### 1.2 野外栎树母树林

在距树干 0.5-1 m 处, 去除凋落物层, 小心挖取带土的菌根样品放入自封袋里 (无需灭菌), 样完毕后立即将样品带回处理。

#### 1.3 处理

将采集到的栎类外生菌根在无菌水中清洗、震荡（清洗可在盛有无菌水的容器中进行，适当用手进行揉搓）。洗净后（菌根表面无泥土和其他杂质）将样品用于形态观察和特征描述。

## 2. 外生菌根的分枝结构及外层菌套观察

选取典型菌根在超景深显微镜下根据 Agerer (2012) 所提出的外生菌根形态分类要点，观察其分支类型、分支末端形状、颜色、表面性状、外延菌丝和根状菌索等特征，并进行拍照。

不同类型外生菌根的分枝结构如下图（图 1）所示。

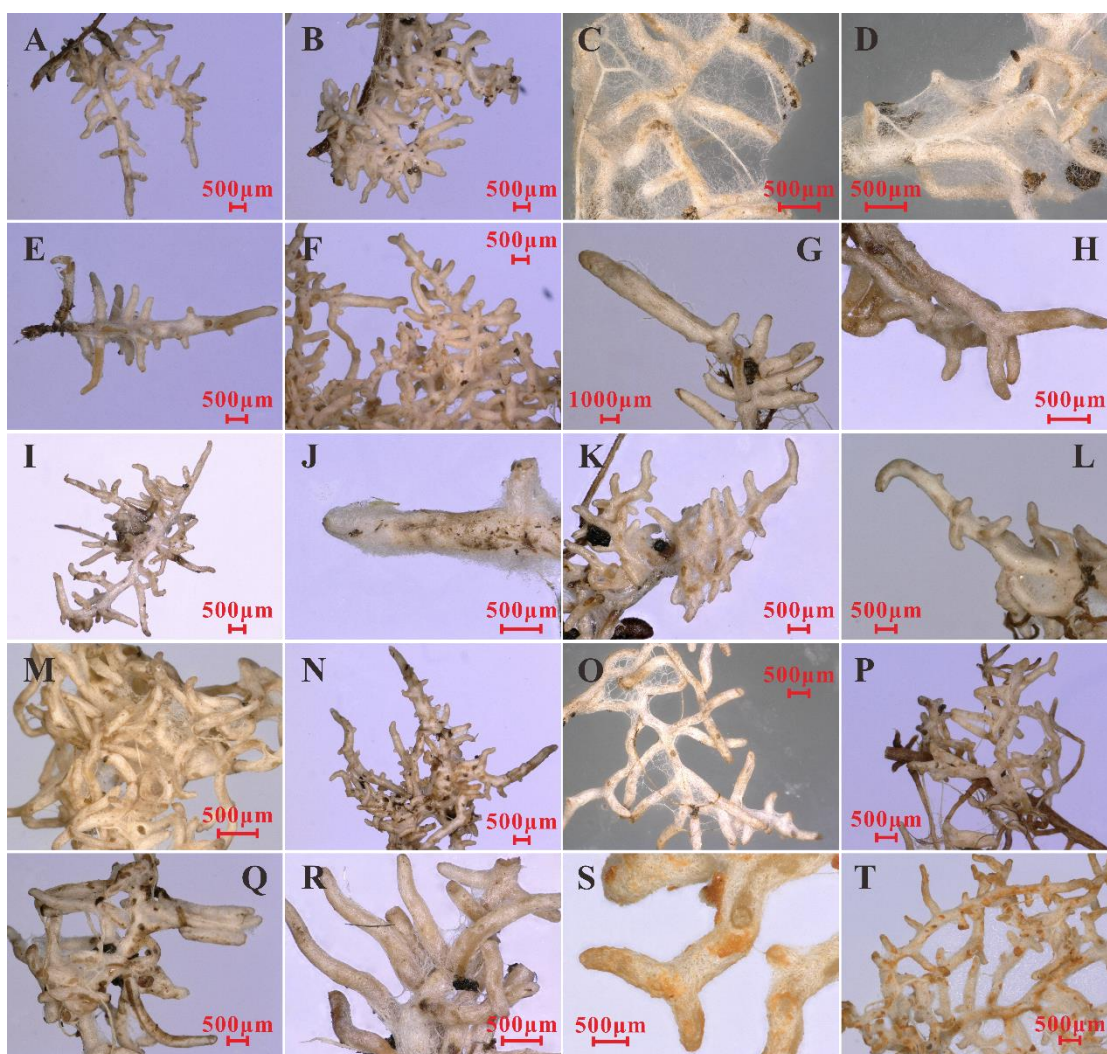


图 1. 栎树一年生实生幼苗外生菌根分枝结构。A. 白栎，塔状；B. 白栎，二叉分枝、珊瑚状分枝、不规则分枝；C. 大果栎，羽状分枝；D. 大果栎，不规则分枝；E. 弗栎，塔状分枝；F. 弗栎，塔状分枝、二叉分枝；G. 弗栎，棒状；

H. 弗栎，二叉分枝；I. 纳塔栎，塔状分枝；J. 纳塔栎，棒状；K. 牛栎，塔状分枝；L. 琴叶栎，塔状分枝；M. 琴叶栎，不规则分枝；N. 舒玛栎，塔状分枝；O. 舒玛栎，羽状分枝；P. 栓皮栎，二叉分枝；Q. 水栎，羽状分枝；R. 水栎，不规则分枝；S. 猩红栎，二叉分枝；T. 猩红栎，塔状分枝、羽状分枝。

对苗圃地栎树幼苗外生菌根的调查发现，所有物种均形成相对发达的外生菌根，白色菌套明显可见，表面光滑呈网状至羊毛状，大多呈单轴羽状分枝、塔状分枝、二叉分枝、单轴不分枝等。

### 3. 外生菌根菌套解剖

3.1 用镊子和长绣花针，在体式显微镜下对一个末端未分支的菌根进行菌套剥离。

3.2 用光学显微镜配备 AxioCamMRc5 数码摄像机观察其菌套内外层菌丝组织类型、菌丝排列方式、外延菌丝特征和菌索类型等解剖特征。

以弗吉尼亚栎母树林为例，其形态结构与解剖结构观察结果如下图（图 2-5）所示。

白色菌根大多不规则羽状分支，0-3 级，少数单轴状，疏水。末端变细。表面性状为密羊毛状，具大量棉絮状外延菌丝，菌索透明。菌套内外层均为密丝组织，菌套类型为 A 型。外延菌丝表面光滑，具锁状联合。菌索未分化，松散缠绕。

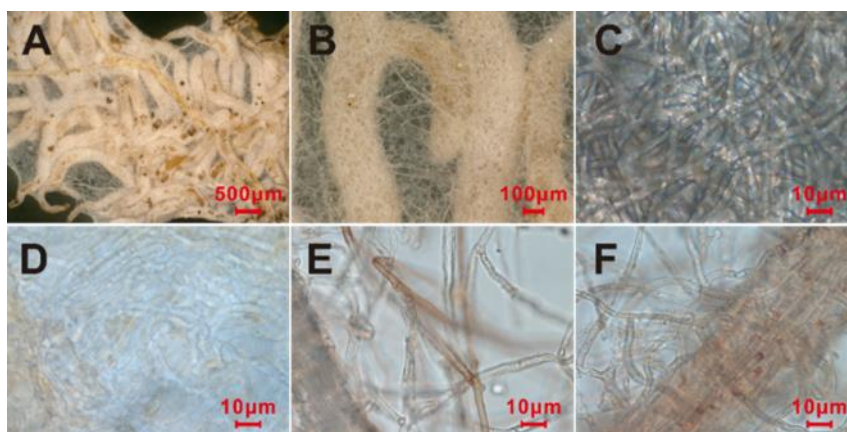


图 2. 弗栎母树林白色菌根形态结构与解剖结构观察。A-B. 外部形态特征；C. 外层菌套；D. 内层菌套；E. 外延菌丝；F. 菌索。



黑色菌根大多呈羽状和塔状，0-3 级，亲水。少数呈未分支末端棒状，顶端圆钝。外层菌套为拟薄壁组织，表面光滑，菌丝细胞排列呈石堆状，菌丝细胞三角至多角形，未见圆形细胞堆积，菌套类型为 L 型。内侧菌套为拟薄壁组织，菌丝细胞为拟薄壁细胞。外延菌丝极少且具有锁状联合。菌索浅黄色未分化，表面光滑。

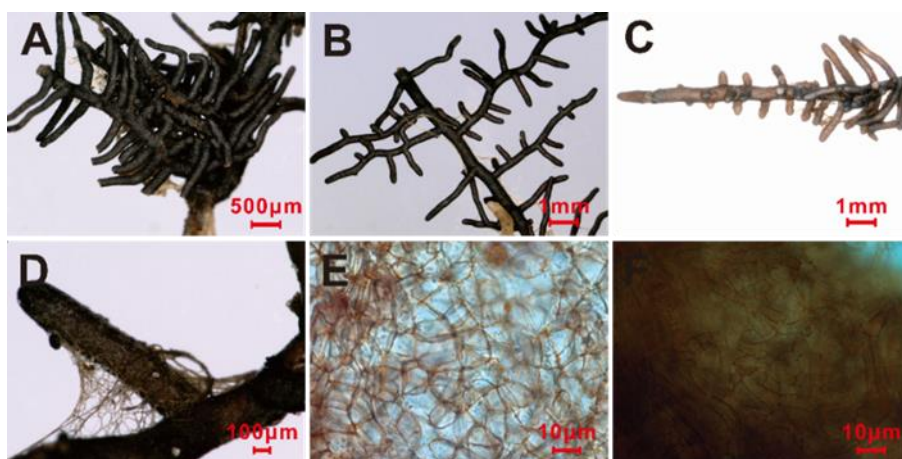
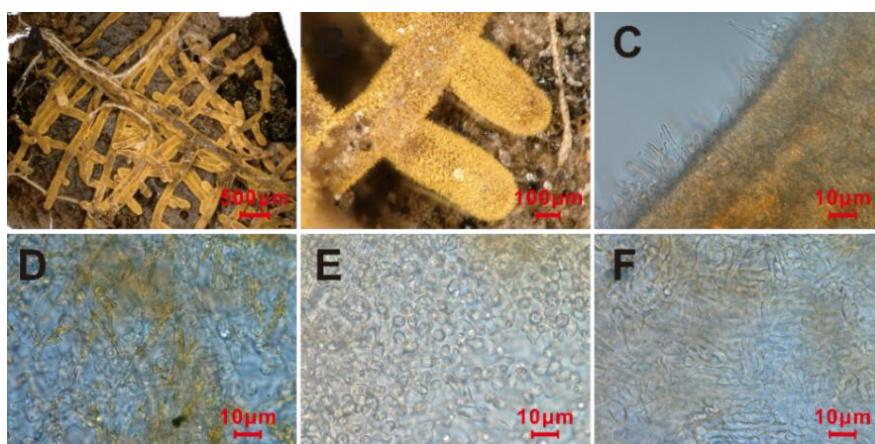


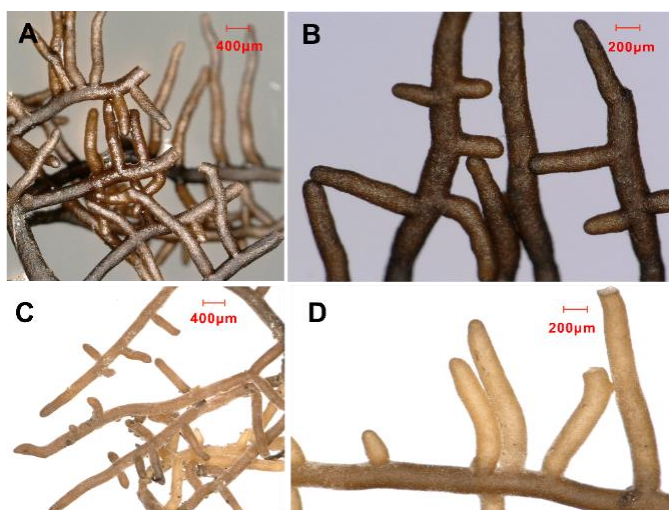
图 3 弗栎母树林黑色菌根形态结构与解剖结构观察。A-C. 菌根不同的分支类型；D. 外延菌丝；E. 外层菌套；F. 内层菌套。

黄色菌根大多不规则羽状分支，偶见塔状分支。0-2 级，亲水。浅黄色，成熟菌根为黄色，未分支末端棒状，顶端圆钝。外层菌套由短刺状菌丝构成，菌套接近 D 型，内层菌套为密丝组织。偶见外延菌丝，未见锁状联合。菌索透明无色，松散排列未分化。多和弗栎叶片凋落物粘连在一起，剥离时会有一部分菌套留在落叶组织中。



**图 4 弗栎母树林黄色菌根形态结构与解剖结构观察。A-B. 菌根形态及分支；**  
**C-D. 外层菌套的短刺状结构；E. 外层菌套；F. 内层菌套。**

深红色菌根与黑色菌根较接近，乳白色菌根与黄色菌根较接近，但菌套外表平滑，无短刺状菌丝。



**图 5 弗栎母树林深红色菌根 (A、B) 和乳白色菌根 (C、D) 形态结构**

#### 4. 石蜡切片观察菌根的横截面

##### 4.1 样品固定

将清洗干净的菌根样品切成 1 cm 左右的小段，放入 1.5 ml 离心管中，常温下加入 50%的 FAA 固定液固定 24 h，再转入 70%的固定液中。

##### 4.2 冲洗、脱水、透明

冲洗：将菌根样品在超纯水中冲洗三次，弃去组织中过剩的固定剂，以免固定剂沉淀于组织之中影响切片的质量。

脱水：用梯度乙醇逐步取代水的过程。70% (两次)—80%—90%—95%—100%梯度乙醇完成，每级 1 h。

透明：将组织块放入等比例 100%的乙醇和二甲苯溶液中，浸泡 1 h 后，再放入二甲苯溶液 1 h。

##### 4.3 浸蜡包埋

将透明的组织块置于二甲苯+石蜡 (1:1) 中，温度 40 °C 过夜。之后材料置于纯蜡 (65 °C) 中两次，每次四小时。将样品切成 3 mm 左右的小段后进行包埋。

#### 4.4 切片

将修整齐的蜡块固定在蜡块固定器上，调整切片厚度为 7 μm，进行切片。

#### 4.5 展片

将水滴在载玻片上，将切好的蜡片铺在水面，展开后除去水分，置于展片机 (58 °C) 上，30 min 后移至干燥箱 (40 °C) 进行烤片，12 h 后处理。

#### 4.6 染色、封片

二甲苯 (1) 脱蜡 4 h 后，①等比例 100%乙醇与二甲苯 5 min；②经 100%—95%—90%—80%—70%各级乙醇，每级 5 min；③1%番红染色 12h；④再经 70%—80%—90%—95%各级乙醇脱水，每级 1 min；⑤0.1%固绿染色 30 s；⑥再依次放入 95%乙醇、100%乙醇、等比例二甲苯和 100%乙醇、二甲苯溶液中，每级 1 min；⑦中性树胶封片。

不同栎树外生菌根横截面观察如图 6 所示。

在菌根横切面上观察到，哈蒂格网的结构表现为苗根表皮细胞间菌丝的细胞间延伸，皮层细胞内没有真菌定植。



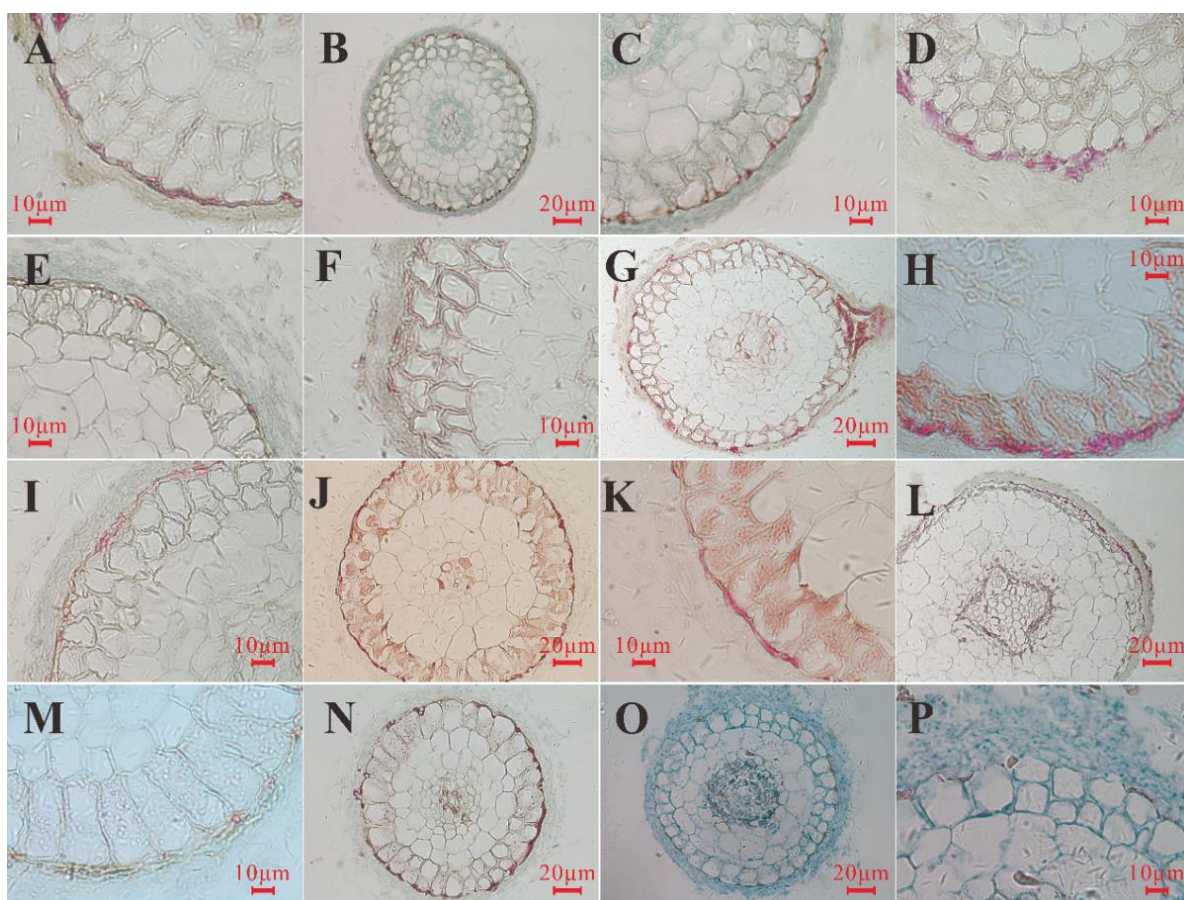


图 6 多种栎树一年生实生幼苗外生菌根横截面。A. 白栎 (*Quercus fabri*); B-C. 大果栎 (*Q. macrocarpa*); D-G. 弗栎 (*Q. virginiana*); H-I. 牛栎 (*Q. michauxii*); J-K. 纳塔栎 (*Q. nuttallii*); L. 舒玛栎 (*Q. shumardii*); M-N. 水栎 (*Q. nigra*); O-P. 猩红栎 (*Q. coccinea*)。

## 注意事项

1. 脱水必须在含有盖子的瓶中进行，以防高浓度乙醇吸收空气中水分导致浓度降低而使脱水不彻底。
2. 若脱水彻底，组织则显现透明状态，若组织中有白色云雾状，说明脱水不彻底。
3. 使用二甲苯进行透明时，应避免其挥发和吸收空气中的水分，并保持其无水状态。

## 溶液配方

1. FAA 固定液的配制

70%或者 50%浓度乙醇：冰乙酸：甲醛=18:1:1



## 2. 染色剂的配制

1%番红: 1 g 番红加入 50%乙醇 100 ml

0.1%固绿: 1 g 固绿加入 95%乙醇 100 ml

## 致谢

感谢中国林业科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资(CAFYBB2017 MA003) 和国家自然科学基金项目 (31722014) 对本研究课题的大力支持。

## 参考文献

1. 靳微, 杨预展, 孙海菁, 陈连庆, 袁志林. (2020) [弗吉尼亚栎母树林外生菌根的真菌多样性](#). 林业科学, 56: 120-132.
2. Agerer, R. (2012). [Colour atlas of ectomycorrhizae, 15th ed.](#) Einhorn-Verlag, Schwäbisch Gmünd.