

# 一种改进的丛枝菌根染色方法

杨亚宁, 巴 雷, 白晓楠, 张立朝, 王德利\*

(东北师范大学草地科学研究所, 植被生态科学教育部重点实验室, 长春 130024)

**摘要:** 研究改进了 Vierheilig 等描述的 AM 菌根染色法: 将根样于 20% KOH 溶液中 60℃ 水浴透明 40—120 min, 5% 醋酸酸化 5 min 后, 用 5% 醋酸墨水染色液(派克纯黑书写墨水 Quink), 于 60℃ 水浴染色 30 min, 清水浸泡脱色(14h)后即可镜检。根皮层细胞内 AM 真菌的丛枝结构清晰可见, 并且能够明确地分辨 AM 真菌与其它未知真菌。此外, Quink 初染后, 再经过 Sudan IV 复染(60℃、60 min), 70% 乙醇脱色 5 min, 暗隔真菌的透明菌丝内所积聚的脂类颗粒被 Sudan IV 染上鲜红色, 在复式显微镜下能够观察到此类透明菌丝在根皮层组织内的存在状况。采用甘油明胶为封固剂制片, 根的染色效果可以保存长久。此项技术可以对同一种植物的多个根样进行同步的透明和染色处理, 而且操作简便、低毒性、成本低廉、染色效果极佳, 适用于野生和栽培草本植物 AM 菌根的染色和制片观察。

**关键词:** 丛枝菌根; 醋酸墨水; 暗隔真菌

## An improved method to stain arbuscular mycorrhizal fungi in plant roots

YANG Yaning, BA Lei, BAI Xiaonan, ZHANG Lichao, WANG Deli\*

Institute of Grassland Science, Key Laboratory of Vegetation Ecology of Ministry of Education, Northeast Normal University, Changchun 130024, China

**Abstract:** The procedure for staining arbuscular mycorrhizal (AM) fungal colonization in root tissues developed by Vierheilig *et al.* was modified by authors. Roots were cleared in 20% KOH for 40 to 120 min at 60℃ in water bath and then acidified by 5% acetic acid for 5 min. Cleared roots were stained for 30 min in 5% ink-vinegar solutions (Parker black writing ink, Quink) at 60℃ in water bath. Roots were destained by immersing in tap water for 14 h. Arbuscules of the AM fungi in root cortex were clearly visible and the distinctions between AM and other unidentified fungi could be noticed under a compound microscope. Moreover, lipid bodies within the hyaline hyphae of dark septate endophytes (DSE) were stained bright red and clearly distinguished when roots were restained in Sudan IV (60℃ for 60 min) and destained for 5 min in 70% ethanol. Stained roots could be mounted in glycerin jelly for making a permanent slide with high staining quality. This method should allow a large number of root samples of individual plant to be cleared and stained simultaneously and provided a simple, low toxic and inexpensive technique for staining AM fungi in cleared root for both wild and cultivated herbaceous plants with excellent staining results.

**Key Words:** arbuscular mycorrhiza; ink-vinegar; dark septate endophytes

Phillips 和 Hayman 和 Kormanik 等分别报道了台盼蓝和酸性品红染色法<sup>[1-2]</sup>。这两种染色方法的染色效果可靠而稳定, 但也有不足之处, 即除了 AM 真菌被染色外, 根皮层组织也被染上相同而略浅的颜色, AM 真菌与根皮层组织之间的颜色反差不明显, 不利于对 AM 真菌细微结构(如丛枝)的显微拍照。Brundrett 等采用氯唑黑 E (chlorazol black E) 染色法<sup>[3]</sup>, 并结合使用诺马斯基微分干涉差显微镜(DIC)观察和拍摄 AM 真菌在根皮层组织内的侵染状态, 获得了极佳的染色与反差效果, Brundrett 等的照片对丛枝结构表现清晰细致, 因而被广为引用。Vierheilig 等指出台盼蓝、酸性品红和氯唑黑 E 都是致癌疑似物, 对长期使用者的健康可能有

**基金项目:** 国家重点基础研究发展规划资助项目(2007CB106801); 国家自然科学基金资助项目(30571318, 30600427)

**收稿日期:** 2008-12-03; **修订日期:** 2009-01-31

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: wangd@nenu.edu.cn

害<sup>[4]</sup>。并且,随着菌根研究逐渐受到重视,研究者日众,各类染色剂使用量相应增加,出于环境安全考虑,也应当减少此类有害化学物质的使用和排放<sup>[4-5]</sup>。据此,Vierheilig 等提出了醋酸墨水染色法。染色液配方中,仅仅使用书写墨水(钢笔水)和醋酸,价格更为低廉。与台盼蓝染色和酸性品红染色相比,经过醋酸墨水染色后,AM 真菌的菌丝、泡囊和丛枝等着色牢固、耐脱色,与背景的颜色反差很好,更适于镜检观察和拍照。

暗隔真菌(dark septate endophytes, DSE)是一类常见的根系内生真菌<sup>[6]</sup>。DSE 与 AM 真菌经常同时侵染同一植物的根系,但 DSE 生理与生态作用以及 DSE 与 AM 真菌的相互关系还存在争议<sup>[7-8]</sup>。在松嫩草原进行 AM 调查时,发现多种常见植物根系里均有 AM 真菌和 DSE 的双重侵染。DSE 的典型结构是根表面及皮层细胞间的褐色有隔菌丝,以及皮层细胞间和细胞内褐色的微菌核。根段经过 KOH 透明处理后,此二者不必染色就能轻易观察到。当植物处于生理活跃期,DSE 在根皮层内可发育出大量的透明菌丝。Barrow 和 Aaltonen 采用台盼蓝初染和 Sudan IV 复染显示,DSE 的透明菌丝内所积聚的脂类颗粒可以被 Sudan IV 染为红色,借助 DIC 显微镜能够清晰地观察到 DSE 的透明菌丝<sup>[9]</sup>。但国内教学与科研机构目前很少有 DIC 配置,对 DSE 的深入研究受到限制。

染色后的根段常需要装片保存,国内多采用聚乙烯醇乳酸甘油(polyvinyl-lacto-glycerol, PVLG)为封固剂。PVLG 室温下为粘稠液体,制片后,PVLG 的干燥过程缓慢,易受外力挤压而从盖玻片下溢出,造成污染和玻片之间的粘连。因此,储存玻片标本前,要确认 PVLG 已经晾干,储存时,玻片标本还应当水平摆放和间隔放置,由此占用了较多的空间<sup>[10-11]</sup>。Widden 提出了以甘油明胶为封固剂的 AM 菌根永久制片法,制片完成后,甘油明胶在室温下迅速干燥,玻片标本可以重叠存放<sup>[12]</sup>。Widden 比较了采用台盼蓝、酸性品红和氯唑黑 E 这 3 类染色剂染色后相应根段的永久制片效果,观察到台盼蓝和氯唑黑 E 染色的根段可以保存很久而不褪色,而酸性品红染色的根段在制片后仍持续褪色。Widden 进而提出,Vierheilig 等的醋酸墨水染色技术,也应当能够与此种永久制片法兼容。

本研究旨在:(1)筛选出适宜的国产墨水,便于国内学者应用;(2)尝试将醋酸墨水染色与 Sudan IV 复染结合,并应用于 AM 真菌和 DSE 研究中;(3)比较和评价醋酸墨水染色+甘油明胶永久制片,以及醋酸墨水染色+Sudan IV 复染+甘油明胶永久制片的显微观察和显微拍照效果,验证 Widden 的推断,即,醋酸墨水染色技术与甘油明胶永久制片法可以在 AM 染色制片中结合使用。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 植物材料

本实验采用 4 种吉林省西部草甸草原常见的野生植物:羊草(*Leymus chinensis*)、全叶马兰(*Kalimeris integrifolia*)、芦苇(*Phragmites communis*)、蒙古韭(*Allium mongolicum*),以及 2 种栽培植物,紫花苜蓿(*Medicago sativa*)和大葱(*A. fistulosum*)为实验材料。

2007 年 6 月初,将草甸草原上羊草和全叶马兰带土移栽各 10 盆(容积约 3.5 L)。同时,把紫花苜蓿种子浅播在 10 盆移栽有 3—5 株全叶马兰的盆中,待紫花苜蓿出苗 5 叶期后,剪去全叶马兰地上部分。所有植物均露天摆放在平整的裸地上,每周适量浇水两次,人工去除杂草,9 月底收获根系。2007 年 9 月初,在草甸草原蒙古韭单优斑块和地势低洼湿润的芦苇单优群落,分别挖取蒙古韭和芦苇根系。2007 年 10 月初,大葱须根采集于农贸市场。上述植物根样均用清水洗净,剔除老根和粗根,各取鲜重约 500 g 幼嫩的细根(直径 $\leq 2$  mm),用 70% 乙醇保存备用。

### 1.2 染色剂

本实验采用以下 15 种常见品牌墨水与 Vierheilig 使用的 Shaeffer(原文如此)黑色墨水进行比较。

### 1.3 染色步骤

取上述 6 种植物的根样,流水洗去乙醇。剪为 3 cm 长的根段,再分别称取等量鲜重(2.5 g)若干份,然后按照以下方法进行透明、酸化、染色、脱色和复染处理。

表 1 实验中使用墨水的制造商、品牌、颜色与用途

Table 1 Manufacturer, brand, color and application of the inks used in the experiment

| 制造商 Manufacturer    | 品牌 Brand   | 颜色 Color | 用途 Application |
|---------------------|------------|----------|----------------|
| 美国犀飞利 (Sheaffer) 公司 | Sheaffer * | 黑色       | 书写墨水           |
| 普特 (香港) 国际有限公司      | Pot        | 黑色       | 喷墨打印机专用墨水      |
| 贵州博士文化体育用品有限公司      | 英克斯 9930   | 纯蓝       | 书写墨水           |
|                     | 老板牌 853    | 纯蓝       | 书写墨水           |
|                     | 英克斯 9910   | 黑色       | 碳素墨水           |
|                     | 鸵鸟 312     | 纯蓝       | 书写墨水           |
| 天津市鸵鸟墨水有限公司         | 鸵鸟 313     | 蓝黑       | 书写墨水           |
|                     | 鸵鸟 881     | 黑色       | 书写墨水           |
|                     | 亚马逊鳄鱼 818  | 黑色       | 书写墨水           |
| 上海羽龙文化用品有限公司        | 亚马逊鳄鱼      | 红色       | 书写墨水           |
|                     | 元昌 201     | 红色       | 书写墨水           |
| 上海元昌文化用品有限公司        | 英雄 202     | 蓝黑       | 书写墨水           |
| 上海墨水厂               | 英雄 203     | 纯蓝       | 书写墨水           |
|                     | 英雄 204-A   | 黑色       | 书写墨水           |
|                     | 沪光         | 黑色       | 绘图墨水           |
| 上海派克笔有限公司           | Quink      | 纯黑       | 书写墨水           |

\* Sheaffer 牌黑色书写墨水 (Sheaffer black ink) 购自于美国波士顿, 经 Vierheilig 确认, 与 Vierheilig 等使用的为同一种墨水

透明 1000 ml 烧杯内装有 20% KOH 600 ml, 放入电热水浴锅内 60℃ 水浴, 再将盛有根样的容器 (100 ml 的瓶壁和瓶底布满透水孔的乳白色半透明聚乙烯塑料广口瓶, 孔径约为 0.5 mm) 浸于 KOH 溶液中。透明处理时间分别为蒙古韭 40 min、大葱 50 min、全叶马兰 60 min; 羊草 100 min、芦苇 110 min、紫花苜蓿 120 min。根样经过透明处理后, 再按照下述步骤依次进行。

酸化 流水冲洗 5 min, 再用 5% 乙酸酸化 5 min。

染色 使用 5% 醋酸墨水染色液 (5% 的冰醋酸 95 ml, 墨水 5 ml), 60℃ 水浴, 染色 30 min。

脱色 清水浸泡脱色。普通国产墨水染色的根样脱色 10 min—2 h; Pot、Sheaffer 和 Quink 染色的根样脱色 12 h 以上。

复染 Sudan IV (天津市光复精细化工研究所) 染色液 (Sudan IV 3 g, 70% 乙醇 1000 ml), 60℃ 水浴染色 60 min, 而后清水冲洗 3 min, 再用 70% 乙醇脱色 5 min。

#### 1.4 制片与显微观察

挑取脱色处理后的根段于载玻片上, 每片平行摆放 6 个根段, 滴加适量的甘油明胶封固剂 (明胶 10 g, 百草酚 0.25 g, 蒸馏水 60 ml, 甘油 70 ml), 盖上 24 mm × 50 mm 盖玻片, 用手指将根段稍用力压扁。每种植物根样初染后制片 3 张, Sudan IV 复染后制片 3 张, 使用 Nikon 80i 正置显微镜观察和拍照。

## 2 结果与分析

各种颜色和品牌墨水的染色效果有很大差别 (表 2)。国产红色书写墨水都不能使根内的 AM 真菌结构着色, 4 种纯蓝色书写墨水均能够使泡囊很好地着色 (图 1: 6), 但是, 丛枝的细微结构模糊难辨, 蓝黑色书写墨水仅能够使泡囊着色, 但极为模糊。普通黑色书写墨水 (鸵鸟 881、亚马逊鳄鱼 818)、英克斯碳素书写墨水 9910 和沪光黑色绘图墨水都不能使 AM 真菌菌丝、泡囊和丛枝着色。Quink 和 Sheaffer 黑色书写墨水对 AM 真菌菌丝、泡囊和丛枝着色的染色牢固。Quink 与 Sheaffer 黑色书写墨水相比较, 单染时, Quink 对羊草 (图 1: 1)、紫花苜蓿 (图 1: 4) 和芦苇的细根染色效果更佳; Sheaffer 对蒙古韭 (图 1: 7)、全叶马兰和大葱的细根 (皮层组织饱满) 染色的表现力更细致; 但是 Quink + Sudan IV 复染效果要优于 Sheaffer + Sudan IV, DSE 的透明菌丝着色更明晰可辨 (图 1: 2)。在所有的供试墨水中, 黑色打印墨水 Pot 对 AM 真菌丛枝结构染色的表现力最为细致 (图 1: 8)。

上述可以使 AM 真菌着色的墨水中,不同颜色墨水对真菌菌丝的着色力也有强弱之别,脱色(在清水中浸泡)的适宜时间分别为:4 种纯蓝色书写墨水 0.5 h,Quink 和 Sheaffer 黑色书写墨水以及 Pot 黑色打印墨水(1%)14 h,5% Pot 染色后需要脱色 48 h。

表 2 不同墨水对 AM 菌根染色效果比较  
Table 2 Comparison of different inks for staining arbuscular mycorrhiza in the cortex of roots

| 颜色 Color | 品牌 Brand       | 染色结果 Staining result                   | 评论 Comments |
|----------|----------------|----------------------------------------|-------------|
| 红色       | 亚马逊鳄鱼          | AM 真菌未着色                               | 不适用         |
|          | 上海元昌           | AM 真菌未着色                               | 不适用         |
| 纯蓝       | 英克斯 9930       | 泡囊清晰、丛枝细微结构难辨                          | 适用范围有限      |
|          | 老板牌 853        | 泡囊清晰、丛枝细微结构难辨                          | 适用范围有限      |
|          | 鸵鸟 312         | 泡囊清晰、丛枝细微结构难辨                          | 适用范围有限      |
|          | 英雄 203         | 泡囊清晰、丛枝细微结构难辨                          | 适用范围有限      |
| 蓝黑       | 鸵鸟 313         | 泡囊着色很浅,丛枝未着色                           | 不适用         |
|          | 英雄 202         | 泡囊着色很浅,丛枝未着色                           | 不适用         |
| 黑色       | 英克斯碳素墨水 9910   | AM 真菌未着色                               | 不适用         |
|          | 鸵鸟 881         | AM 真菌未着色                               | 不适用         |
|          | 亚马逊鳄鱼 818      | AM 真菌未着色                               | 不适用         |
|          | 英雄 204-A       | AM 真菌未着色                               | 不适用         |
|          | 沪光黑色绘图墨水       | AM 真菌未着色                               | 不适用         |
|          | 派克标准墨水纯黑 Quink | AM 真菌着色,菌丝、泡囊、丛枝深蓝色,皮层淡粉色;反差好          | 适用          |
|          | Sheaffer       | AM 真菌着色,菌丝、泡囊、丛枝深蓝色,皮层淡绿至淡粉色(不同植物);反差好 | 适用          |
|          | Pot 打印墨水       | AM 真菌着色,菌丝、泡囊、丛枝蓝黑色,皮层淡棕色;反差好          | 适用          |

### 3 结论和讨论

Koske 和 Gemma 对 Phillips 和 Hayman 的台盼蓝染色法的染色液配方做出了重要改进,除掉了苯酚和乳酸,但同时强调,为了使染色剂在真菌菌丝上均匀沉积,甘油是不可缺少的<sup>[13]</sup>。Vierheilig 等没有明确显示经过醋酸墨水染色后 AM 菌根丛枝的形态细节,本文研究表明,仅使用醋酸和墨水配制的染色液,即可以清晰地区别丛枝的类型,如羊草的 P 型和全叶马兰的 A 型(图 1:1,8)。诚然,在醋酸墨水染色液配方中加入甘油后,根的皮肤组织和根内真菌菌丝的形态会显得更加光泽饱满(图片未显示)。

英雄 203 等 4 种纯蓝墨水对泡囊着色效果好,对丛枝的表现模糊。因此,此类墨水仅适用于对 AM 菌根的初级观察(如 AM 真菌存在与否的初步判定和普通的教学演示等),不适用于研究性实验。虽然 Pot 黑色打印墨水对 AM 菌根的丛枝结构的表现力比 Sheaffer 和 Quink 更为细致,但是脱色后,皮层组织呈淡棕色,致使 DSE 的暗隔菌丝不易辨认。曾试用过的其他品牌的喷墨打印机专用墨水,包括黑色和红色的、水溶性和脂溶性的墨水,对 AM 菌根的染色效果皆好。由于目前国内打印墨水市场竞争激烈,缺少一个持久知名的品牌,且打印墨水对人体的毒性不清楚。因此 AM 菌根染色应用中应慎用。

现代书写墨水的发展趋势是尽量减少配方中的有毒和腐蚀性成分<sup>[14]</sup>。如果按照规定配方生产,并且依照一套细则来实施监督,供学生使用的书写墨水应当是无毒性或毒性很低的。Quink 与 Sheaffer 都是国际知名品牌的书写墨水,墨水中使用的染料均为无毒安全的食用色素<sup>[15]</sup>。因此,在醋酸墨水染色法中使用 Quink 黑色墨水为染色剂,可以兼顾到好的染色效果和低毒性两个方面。

以 AM 真菌为目标进行染色时,会有其他种类真菌同时被染色。其中,个别种类真菌的菌丝形态与着色程度与 AM 真菌近似(图 1:3),当采用酸性品红或台盼蓝染色时,很容易与 AM 真菌混淆<sup>[16]</sup>。采用 Quink 等黑色墨水染色时,菌丝着色十分牢固,经过清水长时间浸泡脱色后,根皮层组织可以接近完全脱色,然而真菌的菌丝仍然保持鲜明的蓝色,可以通过形态特征的比较,区分 AM 真菌与其他真菌。与此相比,酸性品红和台

盼蓝染色后,在脱色阶段,皮层组织与真菌是同步脱色的,当皮层组织脱色至无色透明时,真菌菌丝的形态亦不再可辨。因此,醋酸墨水染色法对于区分 AM 真菌与其他真菌更有效,在统计根系中 AM 真菌的侵染率时,可以减少误差。

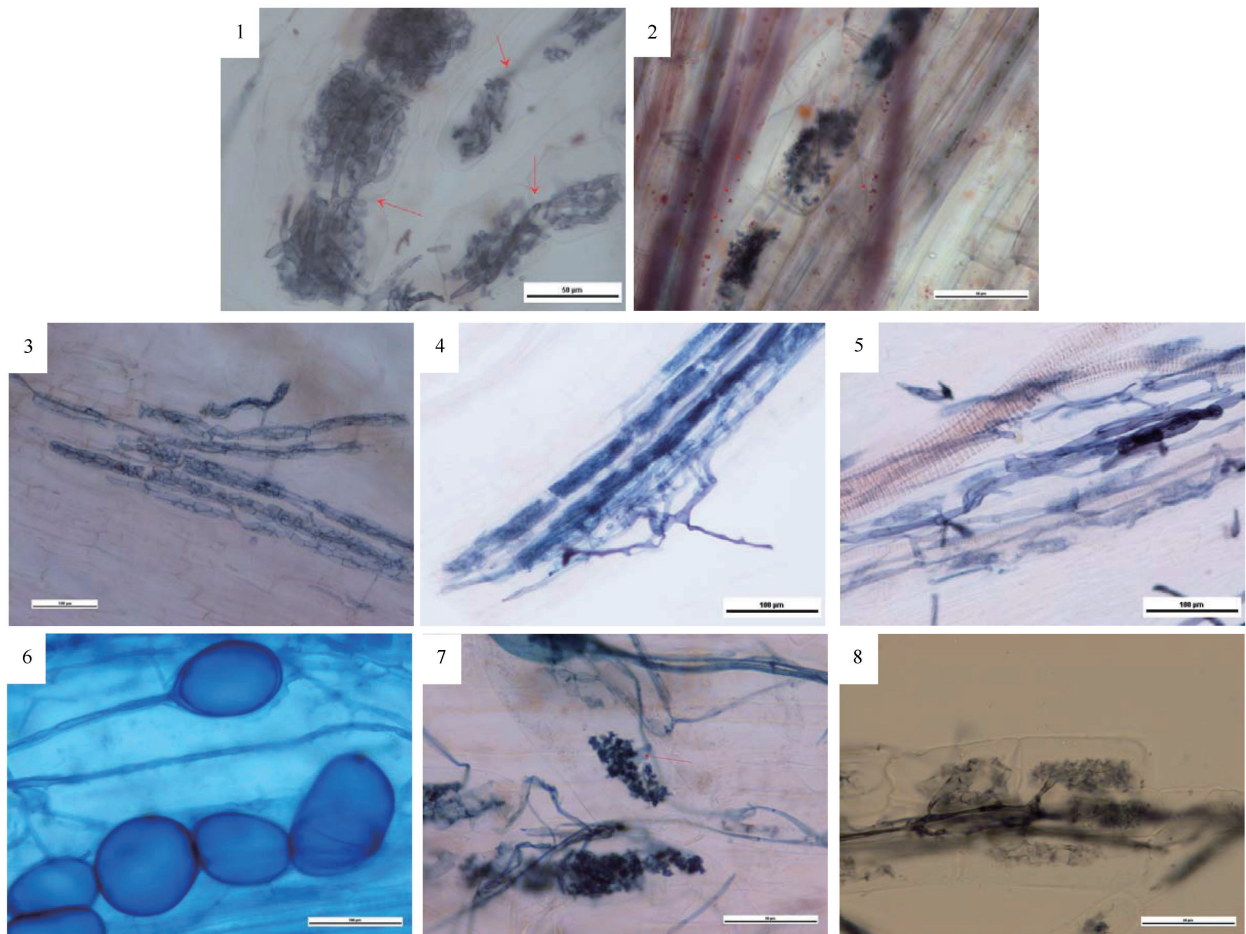


图1 墨水染色的根

Fig.1 Roots stained with inks

图1—5是 Quink 黑色墨水染色的根;1. 羊草根,示 P 型丛枝(红色箭头);2. 羊草根,Sudan IV 复染,丛枝和 DSE 的透明菌丝(红色箭头);3. 全叶马兰根,一种未定名真菌,菌丝形态近似于 AM 真菌;4. 紫花苜蓿根,示侵入点和丛枝;5. 大葱根,示胞间菌丝和丛枝;图6. 全叶马兰根,英雄牌纯蓝墨水染色,示孢囊;图7. 蒙古韭根,黑色书写墨水 Sheaffer 染色,示丛枝(红色箭头);图8. 全叶马兰根,黑色打印墨水 Pot 染色,示 A 型丛枝

在中温透明处理过程中,由于使用可透水的 100 ml 塑料瓶,使随后的冲洗、酸化、染色、脱色等操作过程同步、便捷,有利于同时处理某种特定植物的多个根样,实现批量染色。本实验采用的 6 种植物的根皆是乳黄色至乳白色的,仅使用 KOH 溶液透明处理即可。但有些植物的根是黑色或棕色的,KOH 溶液处理后,根的颜色依然较深,此际可以采用 Koske 和 Gemma 推荐的方法对根样加以漂白处理,比如使用容易购买的过氧化氢 ( $H_2O_2$ , 分析纯,有效含量不少于 30%),稀释 10 倍后,漂白根样 5—30 min。另外值得注意的是,当采用 Sudan IV 复染时,由于 Sudan IV 对聚乙烯塑料制品有极强的附着力,复染时宜换用玻璃容器(如锥形瓶等)。

使用 PVLG 为封固剂,制成后的玻片标本通常能保存 2—3 个月(实验观察现象)。检查以往保存时间长于 6 个月的染色的片子发现:以 PVLG 为封固剂的片子大部分已经干透,有整体及局部观察价值的片子,不到原保留片子的十分之一(38/475)。使用甘油明胶为封固剂,甘油明胶制片在保存 5—10 个月后检查,所有玻片标本依然完好,尤其是 Quink 染色根段的染色效果不变。Widden 报道,用甘油明胶制片,染色效果已经保持 5a 以上。此外,在压片时,甘油明胶会溢出,此时可以暂不处理,搁置 10 min 以上,然后在流水中用毛刷洗

去片上溢出甘油明胶,晾至半干,用糙白纸等擦净,使盖玻片和载玻片的表面光洁如新,写好标注后即可分类叠放保存。

#### References:

- [ 1 ] Phillips J M, Hayman D S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular- arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society, 1970, 55: 158-160.
- [ 2 ] Kormanik P P, Bryon W C, Schultz R C. Procedures and equipment for staining large numbers of plant root samples for endomycorrhizal assay. Canadian Journal of Microbiology, 1980, 26(4): 536-538.
- [ 3 ] Brundrett M C, Piché Y, Peterson R L. A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. Canadian Journal of Botany, 1984, 62: 2128-2134.
- [ 4 ] Vierheilig H, Coughlan A P, Wyss U, Piche Y. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular mycorrhizal fungi. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(12): 5004-5007.
- [ 5 ] Vierheilig H, Schweiger P, Brundrett M. An overview of methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in roots. Physiologia Plantarum, 2005, 125(4): 393-404.
- [ 6 ] Liu R J, Chen Y L. Mycorrhizology. Beijing, China: Science Press, 2007: 42-43.
- [ 7 ] Jumpponen A, Trappe J M. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root colonizing fungi. New Phytologist, 1998, 140(2): 295-310.
- [ 8 ] Addy H D, Piercey M M, Currah R S. Microfungal endophytes in roots. Canadian Journal of Botany, 2005, 83(1): 1-13.
- [ 9 ] Barrow J R, Aaltonen R E. Evaluation of the internal colonization of *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. roots by dark septate fungi and the influence of host physiological activity. Mycorrhiza, 2001, 11(4): 199-205.
- [ 10 ] Koske R E, Tessier B. A convenient permanent slide mounting medium. Mycological Society of America Newsletter, 1983, 34(2): 59.
- [ 11 ] Schenck N C, Pérez Y. Making a diagnostic slide and recoring date//Schenck N C and Pérez Y. Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi (third edition). Gainesville: Synergistic Publications, 1990: 11.
- [ 12 ] Widden P. The use of glycerin jelly for mounting stained roots for the observation and quantification of endomycorrhizal fungi. Mycologia, 2001, 93(5): 1026-1027.
- [ 13 ] Koske, R E., Gemma J N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. Mycological Research. 1989, 92: 486-489.
- [ 14 ] Wu X Q. Progress in studies of ink. Jiangxi Chemical Industry, 2004, 1: 51-53.
- [ 15 ] Qi Z S. The dyes analysis of the Sheaffer black ink and the standard Parker pure black ink. China Writing Instruments, 2008, 2: 8-9.
- [ 16 ] Dong C J, Yao F X, Zhao B. Impact of hesperitin on infection hyphal growth and enzyme activity of AM fungus. Acta Pedologia Sinica, 2006, 43(3): 473-477.

#### 参考文献:

- [ 6 ] 刘润进, 陈应龙. 菌根学. 北京: 科学出版社, 2007: 42-43.
- [ 14 ] 吴小琴. 墨水的研究与发展概况. 江西化工, 2004, 1: 51-53.
- [ 15 ] 齐宗韶. 犀飞利黑墨水和标准派克纯黑墨水染料分析. 中国制笔, 2008, 2: 9-10.
- [ 16 ] 董昌金, 姚发兴, 赵斌. 类黄酮对 AM 真菌侵染菌丝生长及酶活性的影响. 土壤学报, 2006, 43(3): 473-477.