

校园绿化草坪植物高羊茅内生真菌的检测

黎 勇¹, 戚 芳², 卢建军¹

(1. 内江师范学院 生命科学学院, 四川 内江 641112; 2. 内江一中, 四川 内江 641112)

摘要:通过对内江师院校园草坪植物高羊茅(猎狗 5 号及法恩)植株以及种子进行带菌的检验。结果表明:校园高羊茅内生真菌主要分布在植株的叶鞘和茎秆中, 检出率种子>茎秆>叶鞘;高羊茅两品种的种子带菌率依次为:猎狗 5 号(18.4%)>法恩(10.5%), 远低于文献资料(80%)。

关键词:茅状羊茅; 内生真菌; 猎狗 5 号; 法恩; 检出率

中图分类号: S688.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2012)02-0097-03

内生真菌(Fungal endophyte or Endophytic fungi)是一类新型微生物资源, 它们生活在植物体内, 能够赋予寄主植物抗逆性与抗病虫害特性^[1]。因此, 选择高感染率的草坪草种, 可降低草坪成本, 又为草坪的管理提供便利, 同时也减少化学控制所带来的环境问题。

高羊茅又名茅状羊茅(*Festuca arundinacea*)是常用的冷季型草坪草中全年绿色期最长的草种, 丛生型, 须根发达, 具有广泛的适应性, 耐寒能力强, 耐热性好, 耐践踏性强, 抗病性强, 较耐低修剪^[2]。校园草坪的培育有自身的要求与规律, 与校园的绿化及环境安全性密切相关, 对于校园绿化草坪草内生真菌的分布与栽培适宜性相关研究还未见报道。该试验检测其中内生真菌分布与检出率, 纯化培养, 观察显微结构特征, 可以为相关的栽培技术改良提供依据和参考。

1 材料与方法

1.1 材料

高羊茅种子(猎狗 5 号, 法恩)取自内江师范学院绿化科; 植株样品采自内江师范学院绿化草坪, 采样时间为 5 月。

1.2 方法

1.2.1 染液配制 苯胺蓝染液: 0.325 g 苯胺蓝, 溶于 100 mL 蒸馏水中, 加 50 mL 85% 的乳酸, 置于棕色试剂瓶内避光备用。

0.1% 孟加拉红染液: 孟加拉玫瑰红 0.1 g,

NaOH 4 g, 加蒸馏水至 100 mL 备用。

1.2.2 种子内生真菌的检测 随机取 500 粒待检验的种子置于小烧杯中, 倒入 5% NaOH 溶液 20~30 mL (浸没种子), 在室温下浸泡约 15 h。用自来水轻轻冲洗种子, 洗去粘留在种子表面的氢氧化钠后, 将种子置于载玻片上, 用解剖针拨去颖片和种皮, 滴 1~2 滴苯胺蓝溶液, 浸泡约 10 s 后, 用盖玻片覆盖后, 再盖上一张载玻片轻轻挤压至原种子大小的 3~4 倍^[3]。光学显微镜(100~400×)下观察。同法做孟加拉红染色比较。

1.2.3 叶鞘内生真菌的检测 随机采取校园广场及体育馆前区的茅状羊茅植株各 350 份。选择株体较大的分蘖, 从中取出叶龄相对较长的叶鞘, 用解剖针横向轻轻划破叶鞘内表皮, 至上而下, 顺叶脉生长的方向, 用尖细的镊子轻轻撕下内表皮, 将表皮组织置于载玻片上, 滴 1~2 滴苯胺蓝溶液, 浸泡约 10 s 后, 用盖玻片覆盖(滤纸吸取盖玻片周围多余的溶液)^[3]。光学显微镜(100~400×)下观察。按“组织内, 细胞外, 很少分叉, 波浪式延续”及其特殊的形态确认^[1]。同法做孟加拉红染色比较。

1.2.4 茎秆和穗轴内生真菌的检测 利用 1.2.3 中的植株材料, 取茎(或穗轴)一段, 2~10 cm 均可, 纵切为两半, 用镊子或刀尖轻轻刮取少量茎髓质, 置于载玻片上, 滴 1 滴苯胺蓝溶液浸泡约 3~5 s 后, 盖上玻片, 光学显微镜(100~400×)下观察比较^[4-6]。确认方法同 1.2.3。同法做孟加拉红染色比较。

2 结果与分析

2.1 内生真菌的基本形态

试验从高羊茅种子及植物组织中均检测到了

收稿日期: 2011-11-01

基金项目: 内江师范学院科研资助项目(07NJZ-03)

第一作者简介: 黎勇(1968-), 男, 四川省夹江县人, 硕士, 副教授, 从事微生物学及应用技术相关研究。E-mail: l68116@163.com。

内生真菌。种子内菌丝(见图 1)位于糊粉层细胞之间,呈线型不规则分布,菌丝粗细均匀(约 2 μm),弯曲度比髓组织中大,菌丝分枝极少,未见分生孢子。在茎髓组织中(见图 2),菌丝自然弯曲,总体上沿髓组织细胞纵向分布,很少分叉,在少数部位弯曲幅度大,甚至有时成团,这些菌丝体有时粗细不均匀。无论在茎髓质中还是种子中,内生真菌分布在禾本科植物自主内部的细胞间隙,不穿透细胞壁进入细胞内部。这些菌丝体的特征即禾本科植物内生真菌的典型特征。

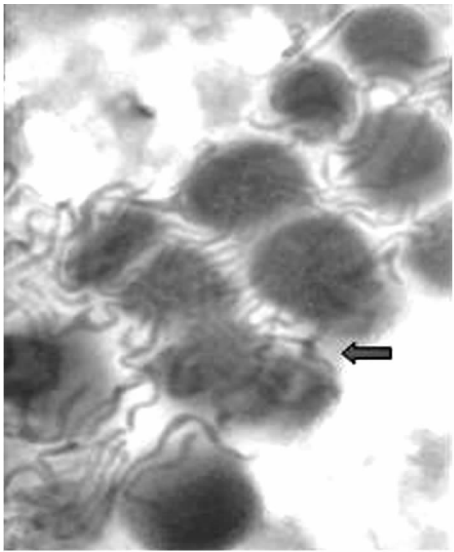


图 1 高羊茅种子中菌丝形态(400 \times)
Fig. 1 Hyphae in the hostplant's seed



图 2 高羊茅茎髓中菌丝形态(400 \times)
Fig. 2 Hyphae in stem culms of *F. arundinacea*

2.2 种子检出率比较

从表 1 可以看出,试验的两份种子样品中均发现有内生真菌的存在;其菌丝体染成蓝色、细线状,弯曲分布于细胞间隙。猎狗 5 号的菌丝体在细胞间比较集中,种子带菌率较高,为 18.4%,法恩稍低,仅 10.4%。但相对参考文献^[4]记载而言,其带菌率偏低。

2.3 茎髓及叶鞘检出率比较

从表 2 的结果可以看出,高羊茅两个品种中内生真菌的检出率均较低,而猎狗 5 号中的带菌率无论在叶鞘及茎髓中的检出率均略高于法恩。从茎髓与叶鞘检出率的比较来看茎髓的检出情况略高。从试验中的重复情况来看,茎髓法的检出率较为稳定可靠。这与文献报道一致。

表 1 高羊茅品种种子内生真菌带菌率

Table 1 The infection rate in the *F. arundinacea*

品种 Variety	检测数/粒 Detection seeds	带菌数/粒 Infection seeds	带菌率/% Infection rate
法恩 Fine	500	52	10.4
猎狗 5 号 Houndog V	500	92	18.4

表 2 高羊茅茎髓及叶鞘带菌率

Table 2 Infection rate of *F. arundinacea* in stem and leaf sheath

样品 Sample	检测部位 Detection part	检测数 Detection number	带菌数 Infection number	带菌率/% Infection rate
猎狗 5 号 Houndog V	叶鞘	350	40	11
	茎髓	350	82	23
法恩 Fine	叶鞘	350	12	3
	茎髓	350	29	8

2.4 内生真菌的分离和培养

检测到含有内生真菌的植物组织表面消毒后静置于 PDA 培养基表面,于 28℃ 下培养。12 d 后开始出现菌落,白色,棉质,中央隆起,气生菌丝较为密集,菌落正反面具有不同颜色。菌落生长速度缓慢,培养 42 d 后布满平板(90 cm),长成稳定菌落(见图 3)。分离后得到 3 株真菌(NJC-1, NJC-2, NJC-3),其菌落特征与已知的 *Neotyphodium* 的特征基本相符^[3]。

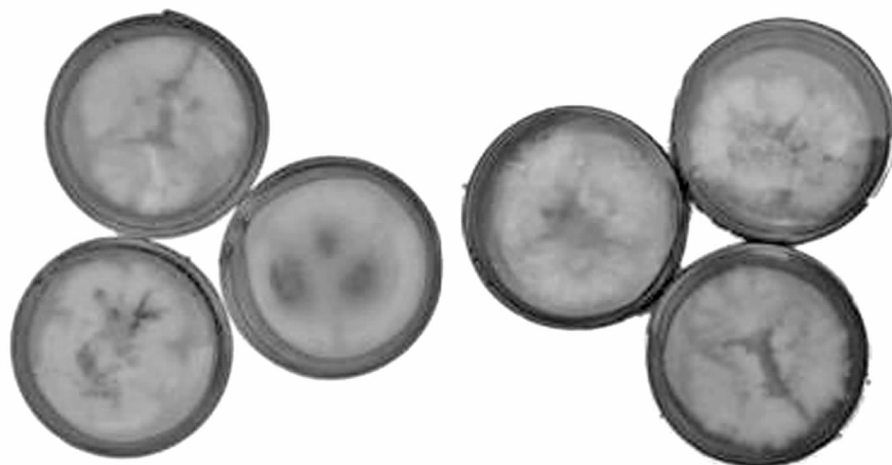


图3 高羊茅3种内生真菌培养特征(左:示平板背面,右:示平板正面)

Fig. 3 Colonies of *Neotyphodium* spp. of *F. arundinacea* on PDA plate

3 结论与讨论

两种高羊茅草坪草种子中带菌率:法恩为10.4%,猎狗5号为18.4%(500粒种子镜检)。相对于文献所记载的(80%)而言,其带菌率偏低,说明校园的栽培环境及栽培技术较大地影响了植株的带菌率。种子检出率偏低的原因,一方面可能是种子贮运条件不同造成的差异,饱满种子更利于内生真菌的寄居,不易丢失;另一方面种子没有进行冷冻保存,这容易导致种子内生真菌丢失^[7]。

从检测方法上,种子内生真菌同成熟组织中的带菌率情况有一定的相关。种子中菌丝检出是预测禾本科植物内生真菌存在与否的最简便方法;植株的检测则以茎髓法较为稳定可靠;叶鞘法的取材选择分蘖大的植株、未老化且已经充分生长的叶鞘,内表皮剥离方便;如果采样后搁置时间较长且组织发蔫,可将样品在水中浸泡一段时间,使之吸水后重新恢复硬度。供试的高羊茅两种植株组织带菌率茎髓略高于叶鞘检出率,表明茎髓法的检出率较为稳定可靠。

检测染液宜用新配制染色液,时间过长的染色效果不好,染液配置后应避光保存,在2周内使用最好。染液的选取,国内可选用碱性孟加拉红染液(含1%孟加拉红的1 mol·L⁻¹ NaOH溶液),但国外用苯胺蓝较多,可能是因为欧美国家的人喜欢蓝色,而不喜欢红色。实际操作中,认为孟加拉红效果更好,染色程度更深,更易于辨别。

在该试验栽培条件下,菌株表现为抗病、抗虫、抗旱等特点,能减少维护所需的费用和减少农

药施用,降低成本,提高环境质量^[8-10]。猎狗5号带菌率高的品种在绿化草坪业的发展上有很好的应用价值。但比较其它文献校园中检出率太低,建议从正确的引种途径和及时播种等方面来提高带菌率,提高草坪质量。

参考文献:

- [1] 纪燕玲,王志伟,于汉寿,等. 分离自苇状羊茅(*Festuca arundinacea* Schreb.)的内生真菌(*Neotyphodium uncinatum*) [J]. 南京农业大学学报, 2003, 26(2): 47-50.
- [2] 徐胜,李建隆,赵德华. 高羊茅的生理生态及其生化特性研究进展[J]. 草业学报, 2004, 13(1): 58-64.
- [3] 李剑,袁庆华. 高羊茅种子内生真菌的检测研究[J]. 贵州畜牧兽医, 2006, 30(1): 1-2.
- [4] 毛益婷,代晓宇,马荣,等. 不同生境下野生铁皮石斛内生真菌多样性的初步研究[J]. 新疆农业大学学报, 2011, 34(3): 234-238.
- [5] 唐雪辉,毛凯,干友民,等. 两株内生真菌对菊花抗盐特性的影响[J]. 中草药, 2011, 42(1): 158-163.
- [6] 李兆星,吴晓红,魏宝阳,等. 一株产吴茱萸碱结构类似物的内生真菌的筛选和初步鉴定[J]. 中南药学, 2011, 9(2): 117-121.
- [7] 任安芝,高玉葆,高文生. 内生真菌浸染对黑麦草种子萌发、幼苗生长及渗透胁迫抗性的影响[J]. 植物生态学报, 2002, 26(4): 420-426.
- [8] 王志伟,王世梅,纪燕玲,等. 中国禾本科植物内生真菌——东营市盐碱地区的禾本科植物内生真菌的检测与分布特征[J]. 草业科学, 2005, 22(2): 60-64.
- [9] 邹英宁,费永俊,王凤玲,等. 高羊茅属草坪草菌根发育及其与土壤有效磷、速效钾的关系[J]. 长江大学学报(自然科学版), 2011, 8(2): 230-233.
- [10] Richard A, Sikora. Potential use of cucumber (*Cucumis sativus* L.) endophytic fungi as seed treatment agents against root-knot nematode *Meloidogyne incognita* [J]. 浙江大学学报 B 辑: 生物医学与生物技术英文版, 2011, 12(3): 219-225.

加强科技创新能力建设 引领区域农业可持续发展

刘春光,于文全,王蕊,赵鹤,赵云彤

(黑龙江省农业科学院牡丹江分院,黑龙江牡丹江 157041)

摘要:黑龙江省农业科学院牡丹江分院是黑龙江省东南部唯一的综合性农业科研单位。为了加强科技创新能力建设,引领区域农业可持续发展,分析了其在“十一五”期间的科技创新工程实施情况,即坚持“开放办院,开放办园”方针,实施了农业科技创新工程,构建创新体系、加强人才队伍和实验室、信息平台建设;根据区域农业生产特点和社会需要,积极调整了科研结构,不断拓宽科研领域,广泛开展合作研究;围绕区域经

关键词:科技创新;产学研;合作共建;服务“三农”

中图分类号:S-0;F303

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2012)02-0100-04

黑龙江省农业科学院牡丹江分院 1958 年成立,作为黑龙江省东南部唯一的综合性农业科研单位,其职责任务是:承担种植业、养殖业、加工业和生物技术等领域的研究工作;承担黑龙江省第

一、二、三积温带农作物和经济作物育种研究工作;承担蜜蜂繁育、病虫害防治和蜂产品加工等技术研究工作;承担果品深加工技术研究工作;并承担优质米开发、系列农化产品的研究与推广工作等。“十一五”期间,黑龙江省农业科学院牡丹江分院通过实施科技创新工程,承担国家各级研究课题、搭建科技服务平台、建立科技示范园区,开展科技合作共建,实现产学研有机结合,为农业生产提供强大、持久和先进的科技支撑,推动了区域

收稿日期:2011-09-15

第一作者简介:刘春光(1975-),男,黑龙江省双鸭山市人,学士,农艺师,从事科研管理工作。

通讯作者:于文全(1973-),辽宁省丹东市人,硕士,副研究员,从事科研管理工作。E-mail: ywq88188@163.com。

Detection of Endophytes in *Festuca arundinacea* Cultivated on Campus

LI Yong¹, QI Fang², LU Jian-jun¹

(1. Life Science Department of Neijiang Teachers College, Neijiang, Sichuan 641112;

2. Neijiang No. 1 Middle School, Neijiang, Sichuan 641112)

Abstract: Samples of *Festuca arundinacea* cultivated on Neijiang Normal University campus were chosen for Endophytes detection (seeds, stem and fruiting spike), and two cultivars of *F. arundinacea*-Houndog V and Fine were selected. The results showed that endophytes were mostly display in leaf sheath and stem, the infection rate in the *F. arundinacea* was seed>stem>leaf sheath, and the infection rate in seeds of two cultivars of *F. arundinacea* mainly cultured on our campus were Houndog V (18.4%)>Fine(10.5%), far lower than data based on references(80%).

Key words: *Festuca arundinacea*; endophytes; Houndog V; Fine; infection rate