

黑麦草 (*Lolium perenne* L.) 内生真菌的检测、分离及鉴定*

聂立影 陈 磊 任安芝 高玉葆**

(南开大学生命科学学院 天津 300071)

摘要: 从多年生黑麦草 (*Lolium perenne* L.) 5 个品种——SR4000、Pinnacle、Topgun、Calypso II、Justus 中分离出 61 个菌株。次培养后, 所得形态稳定的菌株可分为 4 个形态群, 依据其形态特征及 AP-PCR 的结果, 确定其中的 57 个分离菌株为 *Neotyphodium lolii*。

关键词: 黑麦草, 内生真菌, AP-PCR, *Neotyphodium lolii*

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 01-0010-05

Detection, Isolation and Identification of Endophytes in *Lolium perenne* L.

NIE Li-Ying CHEN Lei REN An-Zhi GAO Yu-Bao**

(College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract: A total of 61 Strains were isolated from five perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties——SR4000, Calypso II, Pinnacle, Topgun and Justus. By subculture, the stable strains were separated into four morphological groups (MGs). Based on the morphological characteristics and the results of AP-PCR, 57 strains of them were identified as *Neotyphodium lolii*.

Key words: *Lolium perenne* L., Endophyte, AP-PCR, *Neotyphodium lolii*

内生真菌 (endophyte 或 endophytic fungi) 是指生活史中某一阶段生活在植物组织内, 对植物没有引起明显病害症状的一类真菌。这个定义包括那些生活史中某一阶段营表面生的腐生菌, 暂时没有引起宿主明显病害症状的潜伏性病原菌和菌根菌^[1] (本文将采用此定义)。内生真菌广泛存在于各个植物类群中, 与植物之间的关系多样, 既可以是互利的, 也可以是暂时对宿主无害的寄生关系或中性关系^[2]。

黑麦草 (*Lolium perenne* L.) 是重要的草坪植物和牧草, 内生真菌与之共生可以促进其生长, 增强其抗生物胁迫、非生物胁迫的能力, 使之表现出明显的优势, 但同时也可导致牲畜中毒。尽管人们对黑麦草内生真菌的关注与日俱增, 但由于大部分内生真菌终生存在于宿主体内, 使人们对黑麦草内生真菌的生物学特征了解甚少, 国内这方面的报道也较少。本文采用微生物和分子生物学手段对黑麦草内生真菌进行检测、分离和鉴定, 为进一步认识黑麦草内生真菌的生物学特征奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

分离内生真菌所用的种子和幼苗来自 5 个黑麦草品种, 它们分别为 SR4000、Pinnacle、Topgun、Calypso II 和 Justus。SR4000 由天津红旗农场提供, Pinnacle 从美国俄勒冈

* 国家自然科学基金专项基金项目 (No. 30240083)

国家自然科学基金项目 (No. 30370239)

** 联系人 Tel: 022-81715673, E-mail: ybgao@nankai.edu.cn

收稿日期: 2004-03-02, 修回日期: 2004-04-25

种子公司购进, Topgun、Calypso II 由天津园林绿化研究所提供, Justus 从美国克劳沃种子公司购进。

1.2 内生真菌的检测

种子和叶鞘内生真菌的检测均应用乳酸—苯胺蓝染色法, 参照文献[3]进行。

1.3 内生真菌的分离

分离种子、叶鞘的内生真菌按照文献[4]方法进行。

1.4 分生孢子的诱导

采用 NO. 9、PDA、OA、CMA 4 种培养基诱导产生分生孢子, 除 NO. 9 外其余培养基配方参见文献[5], NO. 9 培养基配方为: 酵母粉 2g, KH₂PO₄ 5g, MgSO₄ 0.5g, 葡萄糖 5g, 琼脂 15g, 加蒸馏水定容到 1L。

1.5 应用 AP-PCR 方法鉴定菌种

参照文献[6]的方法略有改动, PCR 扩增改用以下程序: 94℃ 4min, 94℃ 1min, 36℃ 1min, 72℃ 2min 40 个循环, 72℃ 8min。

2 结果

2.1 内生真菌的检测

不同品种黑麦草中的内生真菌特征基本一致。叶鞘中的菌丝细长, 很少分支, 分隔明显, 呈波浪型, 纵向分布于细胞间, 宽 2.0μm ~ 2.5μm (图 1)。种子中的菌丝短粗弯曲, 分支较少, 分隔明显, 宽度一般在 2.5μm ~ 3.0μm, 常见于种子的糊粉粒细胞间, 密度高 (图 2)。黑麦草不同品种种子及叶鞘的内生真菌感染率见表 1。



图 1 黑麦草叶鞘中菌丝形态

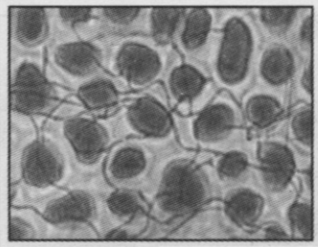


图 2 黑麦草种子中菌丝形态

表 1 5 个黑麦草品种种子及幼苗的内生真菌的感染率

	SR4000	Pinnacle	Calypso II	Topgun	Justus
种子内生真菌感染率	90%	90%	80%	90%	85%
幼苗内生真菌感染率	85%	50%	30%	25%	85%

2.2 内生真菌的分离

对黑麦草 5 个品种的内生真菌进行分离, 共分离得到 61 个菌株。分离自同一黑麦草品种的菌株形态较为一致, 归为 1 个分离株, 而 Justus 较特别, 从中分离得到 3 类形态不同的菌株, 归为 3 个不同的分离株, 为便于说明, 以下以宿主黑麦草品种名的首字母, 即 S、P、T、C、J1、J2、J3 代表各分离株。从图 3A-E1 看, 生长于 PDA 培养基上的分离株 S、P、T、C、J1 虽菌落形态有所不同, 但有其共同点, 即菌落中央突起褶皱, 无气生菌丝, 蜡质, 周围一圈平坦, 有稀薄的气生菌丝, 呈白色毛毡状, 个别菌

株的气生菌丝可逐渐长到褶皱上并稀薄的覆盖部分或整个菌落。J2 始终未出现气生菌丝，其菌落形态与 S、P、T、C、J1 相似，J3 与其它分离株都不同，菌落平坦，表面白色呈毛毡状。

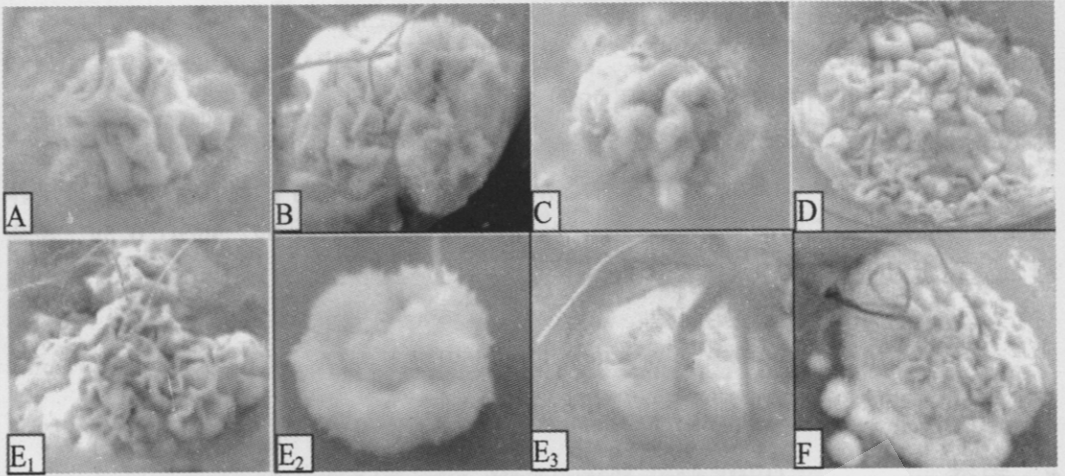


图 3 黑麦草各分离株 PDA 培养基上的菌落形态

A 分离株 S, B 分离株 P, C 分离株 T, D 分离株 C,
E1 ~ E3 分别为分离株 J1、J2、J3、F 示菌落表面完全被气生菌丝覆盖

取 S、P、T、C、J1、J2、J3 菌落无气生菌丝部分于 PDA 培养基上次培养，获得表型稳定的菌株依据菌落形态的区别可划分为 4 个形态群 (MGs)，即 MG1、MG2、MG3、MG4 (图 4)，各形态群所含菌株数见表 2。

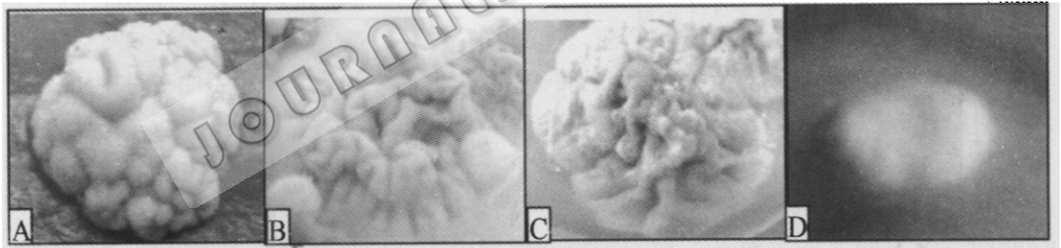


图 4 黑麦草分离株划分的 4 个形态群

A MG1, B MG2, C MG3, D MG4

表 2 不同品种黑麦草分离的菌株数及所属形态群

	Pinnacle	SR4000	Topgun	Calypso II	Justus		
典型菌株	P	S	T	C	J1	J2	J3
分离株数	7	11	5	4	29	1	4
形态群	MG1	MG1	MG2	MG1	MG3	MG1	MG4

MG1 (图 4A) 菌落隆起光滑蜡质，菌落表面有很多波浪型的沟回，形似大脑，不产生气生菌丝和分生孢子，边缘比较陡直。MG2 (图 4B) 菌落光滑，菌落中央的形态类似于 MG1，但边缘平坦，紧贴在培养基上，不产生气生菌丝和分生孢子。MG3 (图 4C) 菌落中央凸起褶皱，边缘较平坦，形态和 MG2 相似，但在菌落生长 15 ~ 20d 后，在菌落的四周甚至整个菌落上长出稀薄白色的气生菌丝。这 3 个形态群的菌株生长都

较缓慢, 菌丝形态基本一致, 较细, 宽度一般为 $1.0\mu\text{m} \sim 2.0\mu\text{m}$, 分隔明显, 多分叉 (图 5)。MG4 (图 4D) 比较特别, 菌落白色平坦, 表面长有气生菌丝, 生长十分缓慢, 仅 Justus 的 J3 划为此形态群。

2.3 分生孢子的诱导

MG1、MG2、MG3 中一些菌株在 NO.9、PDA、OA 培养基上尽管偶尔出现稀少的气生菌丝, 但都不产生分生孢子。在 CMD 培养基上发现了稀少的分生孢子, 分生孢子的形态一致, 分生孢子梗从气生菌丝长出, 直立, 光滑, 无色, 不分支, 底部无隔膜, 基部较宽 $1.5\mu\text{m} \sim 2.0\mu\text{m}$, 顶部较细 $1.0\mu\text{m} \sim 1.5\mu\text{m}$, 分生孢子梗较长, 可达到 $100\mu\text{m}$ 。分生孢子呈肾形, 长 $5.0\mu\text{m} \sim 7.0\mu\text{m}$, 宽 $2.0\mu\text{m} \sim 3.5\mu\text{m}$, 单个着生于分生孢子梗上 (图 6)。

2.4 AP-PCR 法鉴定菌种

所用的 DNA 提取方法可得到纯度较高的模板 DNA, OD260/OD280 在 1.7 到 1.9 之间, PCR 扩增结果重复性好 (图 7), S、P、C、T、J1、J2 在同样位点扩增同样, 在 0.5、0.7、0.9、2.1kb 左右出现了文献报道的属于 *Neotyphodium lolii* 的特异带。

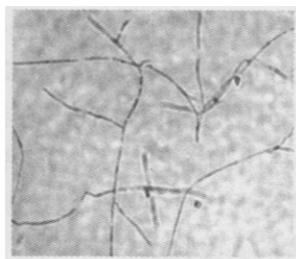


图 5 S 在 PDA 上营养菌丝

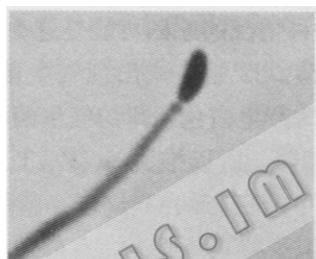


图 6 S 在 CMD 上的分生孢子

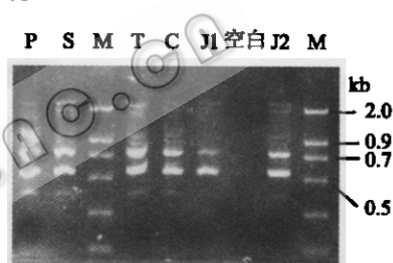


图 7 AP-PCR 电泳结果图

3 讨论

形态学方法和分子标记是真菌菌种鉴定的主要手段, 本文从这两方面对分离得到的内生真菌进行了菌种鉴定。

综合 Latch 等人^[7]和 Naffaa 等人^[8]的报道, 现在从多年生黑麦草中可以分离出四类内生真菌, 即 e-型的无性型内生真菌 *Neotyphodium lolii*、LpTG-2 和 e-型的有性型内生真菌 *Epichloë typhina*, 以及 p-型的内生真菌 *Gliocladium-like*。 *Epichloë typhina* 在宿主花絮上形成子座导致宿主不育, 无法形成种子, 而本文检测到的内生真菌皆为种子传播, 所以可首先排除分离到的内生真菌为 *Epichloë typhina* 的可能性。

从菌丝在叶鞘和种子中的形态上看, 检测到的菌丝形态与 Latch 等人^[7]描述的 *Acremonium lolii* (即 *Neotyphodium lolii*) 形态完全一致, 不同于 *Gliocladium-like* 的菌丝形态。从分离株的形态特征看, 其生长速度及菌落特征除 J3 外都与 Naffaa 等人^[8]报道的 2 个 *Neotyphodium lolii* 菌株特征基本符合, 即 PDA 培养基上呈脑形、蜡状、乳白色、不产生分生孢子、生长缓慢, 而明显不同于 LpTG-2 白色棉絮状的菌落特征^[5], 由此可确定所得到的分离菌株不含 LpTG-2。分离株菌丝宽度、分生孢子形态及大小与 Latch 等人^[7]报道的 *Acremonium lolii* 特征也基本一致。通过这些形态特征可基本确定分离得到的菌株除 J3 外都为 *Neotyphodium lolii*, 即 MG1、MG2、MG3 菌株皆为 *Neotyphodium lolii*。

2001 年, Bony 等人将他们从黑麦草中分离的内生真菌划为 8 个形态群^[9], 其中的 MG2、MG3 与本文获得的 MG2、MG3 十分相似, 推测为相同的形态群, 本文获得的 MG1 不同于报道中的任何形态群。MG4 的形态特征明显不符合 *Neotyphodium lolii*, 也未见符合此类特征内生真菌的报道, 其分类问题有待进一步研究。

分离株同为 *Neotyphodium lolii*, 纯化后会产生 3 个形态群, 同一个形态群内的不同分离株菌落形态也会有细微差异, 这是因为分离株间存在基因异质性, 基因异质性是由基因突变导致的, 在内生真菌中广泛存在, 它导致同菌种不同分离株在形态和化合物(如生物碱、同工酶等)的产生上有很程度的不同^[10], 同一形态群内这种差异会相对较小。菌落形态的差异同样也是对基因异质性的反映。

通过 AP-PCR 方法, 除 J3 外都扩增出文献中报道的属于 *Neotyphodium lolii* 的特异带, 进一步证实了依据形态特征鉴定的结果, 即除 J3 外分离株都为 *Neotyphodium lolii*。

在对 S、P、T、C、J1 进行次培养的过程中, 取无气生菌丝部分次培养, 除 J1 外都得到与原分离株不同的无气生菌丝菌落, J1 经次培养后尽管也产生气生菌丝, 其菌落也不同于原分离株形态, 而取边缘有气生菌丝部分进行次培养, 所得的菌落形态及菌落形成过程同原分离株, 产生这种情况的原因可能是这 5 个黑麦草品种感染了除 *Neotyphodium lolii* 以外的其他内生真菌。J2 始终未出现气生菌丝, 可能是因为分离到 J2 的种子只感染 *Neotyphodium lolii*。J3 产生白色稀薄的气生菌丝, 其形态和菌丝特征都与 S、P、T、C、J1 周围的气生菌丝相似。所以推测 S、P、T、C、J1 菌落包含 J2、J3 两种菌, J2 在生长过程中将生长缓慢的 J3 排斥在其周围, 菌落边缘 J2、J3 共存, 致使出现 S、P、T、C、J1 的菌落形态, 但这些只是假设, 有待进一步的实验验证。

参 考 文 献

- [1] Petrini O. Microbial Ecology of Leaves. New York: Springer-Verlag Press, 1991. 179 ~ 187.
- [2] Faeth S H, Fagan W F. Integrative and Comparative Biology, 2002, 42 (2): 360 ~ 368.
- [3] Latch G C M, Christensen M J. Ann Appl Biol, 1985, 107: 17 ~ 24.
- [4] Clark E M, White J F, Patterson R M. Journal of Microbiological Methods, 1983, 1: 149 ~ 155.
- [5] 《菌种保藏手册》编著组. 菌种保藏手册. 北京: 科学出版社, 1980. 60, 107, 114.
- [6] Liu D, van H R, Latch G C M, et al. FEMS Microbiology Letters, 1995, 133: 95 ~ 98.
- [7] Latch G C M, Christensen M J, Samuels G J. Mycotaxon, 1984, 20: 535 ~ 550.
- [8] Naffaa W, Astier C, Ravel C, et al. Agronomie, 1999, 19: 133 ~ 144.
- [9] Bony S, Pichon N, Ravel C, et al. New Phytologist, 2001, 152: 125 ~ 137.
- [10] Heeswijck R, McDonald G. Aust J Agric Res, 1992, 43: 1683 ~ 1709.