

简 报

禾本科植物内生真菌研究 20：基于 NRPS5 基因的我国东部早熟禾亚科植物内生真菌系统发育学分析

郭萍 王冠华 纪燕玲 于汉寿* 王志伟

(农业部农业环境微生物学重点实验室 南京农业大学生命科学学院 江苏 南京 210095)

摘 要:【背景】冷季型禾草-*Epichloae* 真菌内生共生体在我国广泛存在, *Epichloae* 内生真菌具有遗传多样性。【目的】选取来自江苏、山东和安徽等 6 省共 8 地的早熟禾亚科植物中的 21 个 *Epichloë* sp. 菌株, 检测菌株的 NRPS5 基因; 分析不同宿主内 *Epichloë* 属内生真菌 NRPS5 基因多样性。【方法】提取 *Epichloë* spp. 菌株 DNA, 利用特异性引物对菌株中 NRPS5 基因进行 PCR 检测和序列分析, 并基于 NRPS5 基因构建最大简约法系统发育树。【结果】NRPS5 基因可能广泛分布于我国东部冷季型禾本科植物 *Epichloae* 内生真菌中。在同种内生真菌和同一宿主(除鹅观草)中的不同种内生真菌中 NRPS5 基因相对保守, 但不同宿主的内生真菌其碱基序列差异大, 与宿主植物采集地点、采集时间和子座的有无均无相关性, NRPS5 基因的差异主要与宿主植物有关。这说明 NRPS5 基因序列比较保守, 推测属于 NRPS 蛋白的功能核心区。【结论】NRPS5 基因序列相对保守, 可作为真菌遗传多样性分析的一种辅助手段。

关键词: NRPS5 基因, *Epichloae*, 早熟禾亚科植物, 遗传多样性

Grass endophyte researches 20: Genetic phylogeny analysis of endophytes inhabited in gramineous plants in east China based on NRPS5

GUO Ping WANG Guan-Hua JI Yan-Ling YU Han-Shou* WANG Zhi-Wei

(Key Laboratory of Agricultural Environmental Microbiology, Ministry of Agriculture, College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: [Background] *Epichloae* endophyte-cool season grasses associations spread widely in China, there is genetic diversity in endophyte. [Objective] We collected plants from 8 cities of 6 provinces throughout China and hundreds of strains were obtained. NRPS5 genes of 21 *Epichloë* spp. strains obtained from endophyte-grass associations were detected. Genetic diversity of NRPS5 genes in *Epichloë* spp. was analyzed. [Methods] Fungal genomic DNA was extracted. NRPS5 genes

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (30800156, 30970081, 31372365)

*Corresponding author: Tel: 86-25-84395531; E-mail: yuhans@njau.edu.cn

Received: April 03, 2018; **Accepted:** June 11, 2018; **Published online** (www.cnki.net): June 25, 2018
基金项目: 国家自然科学基金(30800156, 30970081, 31372365)

*通信作者: Tel: 86-25-84395531; E-mail: yuhans@njau.edu.cn

收稿日期: 2018-04-03; 接受日期: 2018-06-11; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-06-25

were detected by specific DNA primers by PCR, and PCR products were then sequenced and analyzed. Phylogenetic tree based on maximum-parsimony of NRPS5 gene was constructed. [Results] NRPS5 genes may be distributed widely in *Epichloae* inhabited in the cool season grasses of eastern China. There was a small number of bases difference in same *Epichloë* spp. or different *Epichloë* spp. from same host except *Roegneria* spp., and there was a large number of bases difference of different host plants. There was no correlation between the locations of the host plant, the time of collection and the formation of stromata, and the differences in the NRPS5 gene fragment were mainly related to the host plants. These results indicated that NRPS5 fragment sequence is conservative, should locate in the function core of the NRPS proteins. [Conclusion] NRPS5 gene is relatively conserved, and could be an aiding method to evaluate genetic diversity of *Epichloë* spp. endophytes.

Keywords: NRPS5 gene, *Epichloae*, Poaceae grasses, Genetic diversity

植物内生菌的研究是最近微生物学研究中的热点, 其中禾本科植物的 *Epichloae* 内生真菌是研究最早、最深入的类群^[1-2]。*Epichloae* 内生真菌[子囊菌门(Ascomycota)肉座菌目(Hypocreales)麦角菌科(Clavicipitaceae)]可与多种冷季型禾草共生, 在所形成的禾草-内生真菌共生体中, 真菌从植物中获取营养物质并可通过种子进行垂直传播; 同时可使植物提高抗病、抗虫以及抗旱、抗寒、耐热等能力^[3]。大多数内生真菌只能生活在特定的宿主内, 具有较强的宿主特异性^[4]。

我国的禾本科植物内生真菌研究已有二十多年的历史^[1]。在我国东部地区常见的早熟禾亚科(Poöideae)植物主要有翦股颖族(Agrostideae)、短柄草族(Brachypodieae)、雀麦族(Bromeae)、臭草族(Meliceae)、早熟禾族(Poeae)、针茅族(Stipeae)和小麦族(Triticeae)等 7 族^[5-7], 我们发现我国东部地区的这些族中都能找到含有 *Epichloae* 内生真菌的植物^[5,8]。这些内生真菌在经典微生物学特征和基于 *tefA*、*tubB* 片段的系统发育学特征方面有一定的差异^[9-10], 但是这些内生真菌之间的相互关系仍不清楚。

研究禾本科植物内生真菌之间的相互关系, 主要有经典分类法中的杂交等方法, 基于 DNA 的系统发育学分析等方法也已经被广泛运用。由于全基因组信息的积累尚少, 至今禾本科植物内生真菌的系统发育学分析主要依赖特定的 DNA 片段进行。

除了 16S rRNA 基因、rDNA-ITS 序列外, 更常用的 DNA 片段还有序列相对保守的 *tefA/tubB/actG*, 而 *gyrB* 等片段的利用却很少见^[4,11]。

2007 年 Johnson 从部分 *Epichloae* 内生真菌中检测到了 NRPS (非核糖体的蛋白质合成酶)基因^[12]。NRPS 基因催化合成许多重要的肽类次级代谢产物, 具有由多个基因组成基因簇、真菌 NRPSs 中的模块数量和排序决定最终肽产物的长度和结构、序列长、部分核心序列比较保守等特征。例如, 扩增子表达的每个克隆基因就有 140 kb。在禾本科植物内生真菌中, NRPS 基因在合成波胺(Peramine)、麦角碱(Ergot alkaloids)等次生代谢物途径中起着重要作用, 但仍有很多 NRPS 基因的功能未知, 它们在不同菌株间的分布也引起了科研人员的关注^[12]。本实验室以来自黑茶样品的散囊菌菌株为材料, 检测到的 NRPS 基因数呈现较多样的变化, 反映了散囊菌的遗传多样性^[13]。

NRPS5 首次从具 *Epichloë festuca* 起源的杂交内生真菌 *E. siegelii* 和 *E. coenophiala* 中被检测到。因已被鉴定功能的同源 NRPSs 基因匮乏, NRPS5 基因功能未知^[12]。在镰孢氨基酸家族和产红霉素类细菌红霉糖多孢菌(*Saccharopolyspora erythraea*)中 NRPS5 基因对铁载体的合成至关重要^[14], 但 *Epichloae* 内生真菌中 NRPS5 基因的功能尚不清楚。

关于 NRPS 基因的研究并不多, 而且禾本科植物内生真菌的 NRPS 基因的研究更少^[15]。本研

究利用实验室分离、保存的不同早熟禾亚科宿主内 21 个 *Epichloë* 属菌株，对菌株中 NRPS5 基因片段进行 PCR 检测和序列分析，研究了部分早熟禾亚科宿主内 *Epichloë* 属内生真菌的遗传多样性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

孟加拉红、乙醇、氯仿均为分析纯，南京寿德实验器材有限公司；复杂植物基因组 DNA 快速提取试剂盒，上海普迪生物公司。凝胶成像仪，上海天能科技有限公司；PCR 扩增仪，杭州博日科技有限公司；高压灭菌锅，江阴滨江医疗设备有限公司；恒温培养箱，宁波江南仪器厂；高速离心机，湘仪离心机仪器有限公司。

1.2 供试材料及其保藏

从吉林省长春，辽宁省抚顺和大连，内蒙古自治区呼和浩特，江苏省南京，山东省东营，安

徽省黄山和合肥等 6 省(自治区) 8 地的多个地点采集早熟禾属植物样品，参考《中国高等植物》^[16] 鉴定植物样品为早熟禾、短柄草、拂子茅、鹅观草、雀麦、披碱草 6 种禾本科植物。利用孟加拉红染色显微观察菌丝的分布。选取部分含内生真菌植物茎秆切成小段，经乙醇、NaClO、乙醇表面消毒各 2 min，再经无菌水依次漂洗 3 次后，置于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基上，于 25 °C 黑暗培养，培养约 1–2 周后茎秆切口长出内生真菌菌落。菌株经分离和 3 次纯化后置于 PDA 斜面上保藏。观察菌落形态特征，在光学显微镜下观察菌株分生孢子及分生孢子梗形态。

选取分离自早熟禾亚科植物中的 *Epichloë* 属内生真菌 21 个菌株用于 NRPS5 基因的检测和分析。供试 21 个菌株均由本实验室分离、保存(表 1)。菌株均保藏于 4 °C 的 PDA 斜面培养基^[17]。

表 1 供试菌株及其来源
Table 1 Strains used in this study and their sources

菌株编号	菌株分类地位	采集地点	宿主植物	采集时间	子座
Strains No.	Taxon	Geographic origin	Host	Collection time	Choke
Plsb201	<i>Epichloë</i> sp.	辽宁旅顺 Lüshun, Liaoning	细叶早熟禾 <i>Poa angustifolia</i>	2012	No
Plsb203	<i>Epichloë</i> sp.	辽宁旅顺 Lüshun, Liaoning	细叶早熟禾 <i>P. angustifolia</i>	2012	No
Pdlb102	<i>Epichloë</i> sp.	辽宁大连 Dalian, Liaoning	细叶早熟禾 <i>P. angustifolia</i>	2012	Yes
Pdlb103	<i>Epichloë</i> sp.	辽宁大连 Dalian, Liaoning	细叶早熟禾 <i>P. angustifolia</i>	2012	Yes
Pdlb108	<i>Epichloë</i> sp.	辽宁大连 Dalian, Liaoning	细叶早熟禾 <i>P. angustifolia</i>	2012	Yes
Brhs0302	<i>E. sylvatica</i>	安徽黄山 Huangshan, Anhui	小颖短柄草 <i>Brachypodium sylvaticum</i>	2010	Yes
Brhs0307	<i>E. sylvatica</i>	安徽黄山 Huangshan, Anhui	小颖短柄草 <i>Br. sylvaticum</i>	2010	Yes
Cnj6617	<i>E. stromatolonga</i>	江苏南京 Nanjing, Jiangsu	拂子茅 <i>Calamagrostis epigeios</i>	2006	Yes
Cnja210	<i>E. stromatolonga</i>	江苏南京 Nanjing, Jiangsu	拂子茅 <i>C. epigeios</i>	2011	Yes
Chs7804	<i>Epichloë</i> sp.	安徽黄山 Huangshan, Anhui	拂子茅 <i>C. epigeios</i>	2007	No
Rnj6102	<i>E. sinica</i>	江苏南京 Nanjing, Jiangsu	鹅观草 <i>Roegneria kamoji</i>	2006	No
Rdy5503	<i>E. sinica</i>	山东东营 Dongying, Shandong	鹅观草 <i>Roegneria</i> sp.	2010	No
Rjl7101	<i>E. sinica</i>	吉林长春 Changchun, Jilin	犬草 <i>Roegneria canina</i>	2007	No
Rnj6404	<i>E. sinica</i>	江苏南京 Nanjing, Jiangsu	鹅观草 <i>Roegneria kamoji</i>	2006	No
Bhsb101	<i>Epichloë</i> sp.	安徽黄山 Huangshan, Anhui	大雀麦 <i>Bromus magnus</i>	2012	No
Bhsb112	<i>Epichloë</i> sp.	安徽黄山 Huangshan, Anhui	大雀麦 <i>B. magnus</i>	2012	No
Bhsb204	<i>Epichloë</i> sp.	安徽黄山 Huangshan, Anhui	大雀麦 <i>B. magnus</i>	2012	No
Ehta101	<i>Epichloë</i> sp.	内蒙古呼和浩特 Hohhot, Inner Mongolia	披碱草 <i>Elymus</i> sp.	2011	No
Ehta105	<i>Epichloë</i> sp.	内蒙古呼和浩特 Hohhot, Inner Mongolia	披碱草 <i>Elymus</i> sp.	2011	No
Rnj0104	<i>E. yangzii</i>	江苏南京 Nanjing, Jiangsu	鹅观草 <i>Roegneria</i> sp.	2010	Yes
Rhf0307	<i>E. yangzii</i>	安徽合肥 Hefei, Anhui	鹅观草 <i>Roegneria</i> sp.	2010	Yes

1.3 供试菌株总 DNA 的提取及 *tubB/tefA*、NRPS5 基因的扩增和测序

用复杂植物基因组 DNA 快速提取试剂盒提取菌株的总 DNA。经 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测合格后备用。所得总 DNA 于 4 °C 保存备用, 或放于 -20 °C 长期保存。

以提取的总 DNA 为模板, 利用 *tubB/tefA* 基因的通用引物进行 PCR 扩增^[17], PCR 产物直接委托上海美吉生物有限公司测序。所得序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对, 检验其可靠性。

以提取的总 DNA 为模板, 利用引物 RJ148-F (5'-AAGGGAGCTGGTGTGTGACT-3') 和 RJ148-R (5'-TCCTTGGTGGGCCGAAGAGCCT-3') 扩增 NRPS5 基因序列^[12]。所得目的 PCR 扩增产物送至上海美吉生物有限公司测序。

1.4 NRPS5 基因的序列分析

通过 NCBI GenBank 数据库进行序列比对, 将碱基序列翻译为氨基酸序列, 分析碱基差异在氨基酸密码子的多样性。将序列整理成类似的碱基序列矩阵。

1.5 基于 NRPS5 基因序列的系统发育学分析

用 BioEdit 分析所得序列与下载序列之间的差异及不同位点等信息。通过 ClustalW 进行比对并采用 MEGA 6.06 软件, 用最大简约法(Maximum parsimony, MP)进行系统发育学分析。

2 结果与分析

2.1 供试菌株物种鉴定

根据供试菌株宿主特异性、菌丝形态和菌落形态学初步鉴定菌株为 *Epichloë* 属内生真菌。利用 *tubB/tefA* 基因的通用引物进行 PCR 扩增, PCR 产物测序结果在 NCBI 上进行比对, 进一步确认分离菌株为 *Epichloë* 属内生真菌。其中, 从宿主 *Poa angustifolia*、*Bromus magnus* 中分离获得的菌株是 *tubB/tefA* 基因可以区分的尚未正式提名的新物种^[6,18]; 从 *Elymus* sp. 中获得的菌株分类地位尚不明确; 采集自安徽黄山的拂子茅

菌株尚未鉴定到种^[5], 也写为 *Epichloë* sp., 以上这 4 类菌株均写为 *Epichloë* sp.。采集自江苏南京的拂子茅菌株已命名为 *E. stromatolonga*^[15], 与采集自安徽黄山的拂子茅菌株关系正在进一步验证中。根据 *tefA/tubB* 基因测序结果, 从鹅观草中得到的分离菌株被鉴定为 *E. yangzii* 或 *E. sinica*^[17] (表 1)。

2.2 供试菌株的 NRPS5 基因检测

用复杂植物基因组 DNA 快速提取试剂盒提取菌株的总 DNA, DNA 条带明亮可用于后续试验。从 21 株供试菌株的总 DNA 中都扩增出了 NRPS5 基因, 其长度约 200 bp。扩增片段直接测序, 21 株供试菌株 NRPS5 目的基因长度为 195–200 bp。对测得的序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对, 所得结果表明序列均为目的片段。在早熟禾、短柄草、拂子茅、鹅观草、雀麦、披碱草 6 种禾本科植物中均检测到了 NRPS5 基因(图 1)。说明 NRPS5 基因可能广泛分布于我国东部冷季型禾本科植物 *Epichloae* 内生真菌中。

2.3 供试菌株 NRPS5 目的基因的比对

用 BioEdit 软件比对相关序列显示: Plsb201、Plsb203、Pdlb102、Pdlb103 和 Pdlb108, Bhs68 和 Bhsb204, Chs7804、Cnj6617 和 Cnja210, Brhs0302

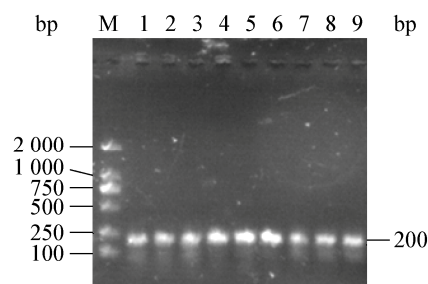


图 1 部分宿主内 *Epichloë* spp. 内生真菌 NRPS5 基因的扩增

Figure 1 Amplification of NRPS5 gene of *Epichloë* spp. from different host plants

Note: M: Marker; 1: Cnja210; 2: Chs7804; 3: Brhs0302; 4: Rnj6102; 5: Rnj0104; 6: Ehta101; 7: Bhsb204; 8: Pdlb102; 9: Plsb201.

和 Brhs0307, Ehta105 和 Ehta101, Rjl7101 和 Rdy5503, Rnj0104 和 Rhf0307 碱基序列相同。*P. angustifolia*、*B. magnus*、*Br. sylvaticum*、*C. epigeios*、*E. cylindricus* 宿主内的菌株无碱基差异或只有 1 个碱基差异, 同种宿主内的 NRPS5 基因序列相对保守。

P. angustifolia 宿主中不带子座菌株与带子座菌株碱基序列相同。*C. epigeios* 中的 *Epichloë* spp. 菌株与 *E. stromatolonga* 菌株碱基序列相同, 同种宿主内不同种内生真菌 NRPS5 基因序列相对保守, 与菌株是否在宿主上形成子座无相关性。

E. sinica 内生真菌在宿主 *R. canina*、*Roegneria* spp.、*R. kamoji* 内无碱基差异或只有个别碱基差异, 同种内生真菌在不同宿主内 NRPS5 基因序列相对保守。*Roegneria* spp. 宿主中的 *E. yangzii* 内生真菌菌株碱基序列相同, 与 *E. sinica* 内生真菌菌株有 6–9 个碱基不同(图 2)。鹅观草内 *E. yangzii* 与 *E. sinica* 菌株碱基差异较多。

Roegneria spp. 宿主内菌株 *E. sinica* 与 *P. angustifolia* 宿主中菌株有 13–14 个碱基差异, 与 *B. magnus* 宿主中菌株有 6–7 个碱基差异, 与 *C.*

epigeios 宿主中菌株有 11–13 个碱基差异, 与 *Br. sylvaticum* 宿主中菌株 *E. sylvatica* 有 11–12 个碱基差异, 与 *Elymus* sp. 宿主中菌株有 6–8 个碱基差异(图 2)。不同种宿主植物内生真菌 NRPS5 目的基因碱基差异较大。

2.4 供试菌株 NRPS5 目的基因的系统发育学分析

P. angustifolia、*Br. sylvaticum*、*C. epigeios* 宿主中的内生真菌聚为一大支。*Roegneria* spp.、*B. magnus* 和 *Elymus* sp. 宿主中的内生真菌聚为一大支, 自展值高达 99%。

P. angustifolia 宿主中的内生真菌不带子座的 Plsb201、Plsb203 与带子座的 Pdlb102、Pdlb103 和 Pdlb108 聚为一支, 自展值为 88%。*C. epigeios* 宿主中的 *Epichloë* spp. 菌株 Chs7804 与带子座的 *E. stromatolonga* 菌株 Cnj6617、Cnja210 聚为一支, 自展值为 99% (图 3)。

Roegneria spp. 宿主内 *E. sinica* 菌株 Rjl7101、Rdy5503、Rnj6404 和 Rnj6102 聚为一支, 自展值为 86%。*Roegneria* spp. 宿主中的 *E. yangzii* 内生真菌 Rnj0104 和 Rhf0307 聚为一支, 自展值为 66%。

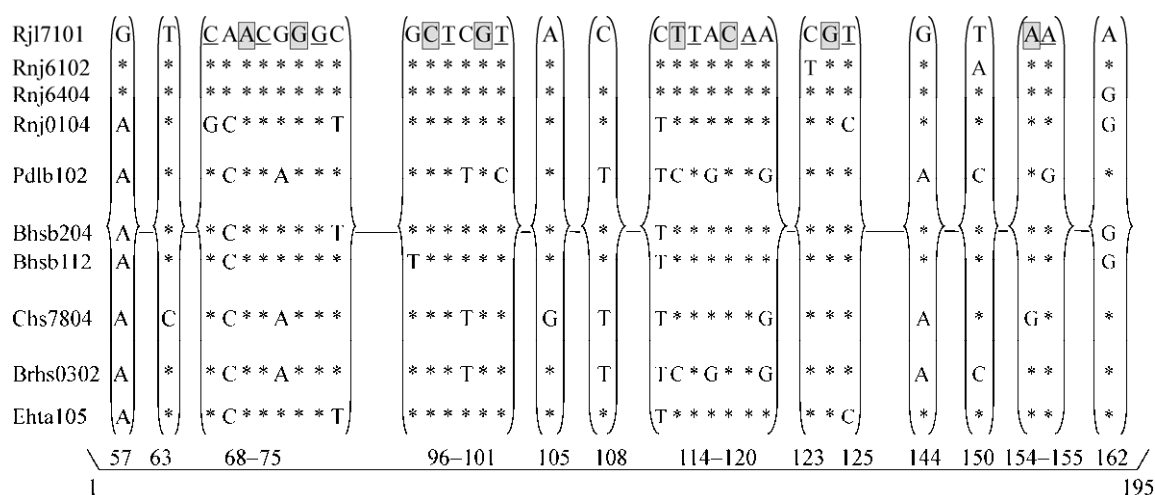


图 2 不同宿主内 *Epichloë* spp. 内生真菌 NRPS5 基因序列比对

Figure 2 Alignment of NRPS5 gene sequences of *Epichloë* spp. from different host plants

注: A/T/C/G 表示第一密码子, 下划线标记碱基第二密码子。

Note: A/T/C/G base is first codon, underlined base is second codon.

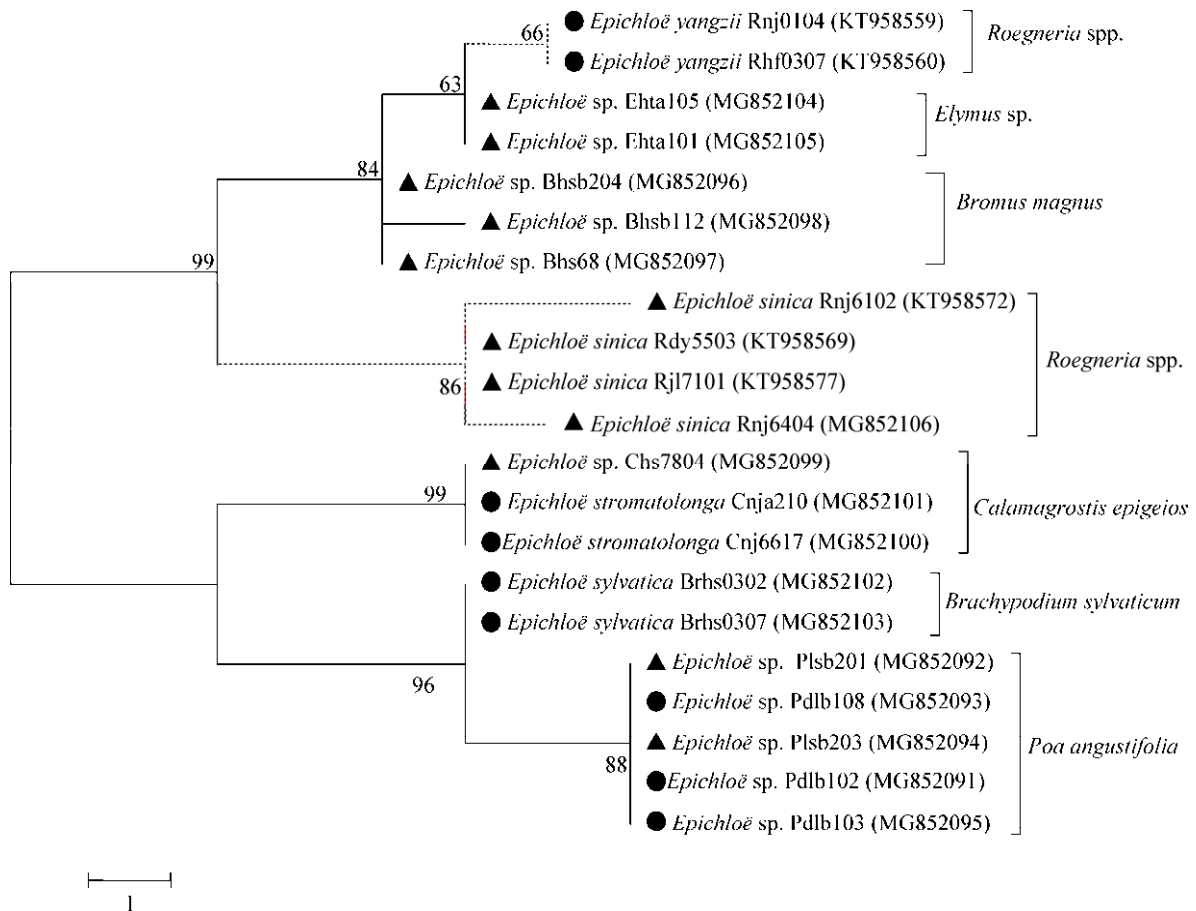


图 3 基于不同禾本科宿主内 *Epichloë* spp. 内生真菌 NRPS5 基因序列构建的最大简约法系统发育树

Figure 3 Maximum parsimony tree based on NRPS5 gene sequences of *Epichloë* spp. strains

注: 分支上的数字代表自展值(自展值>60%), 1 000 次重复; 标尺代表相对 1% 遗传距离。虚线分支代表不同宿主内相同的 *Epichloë* spp. 内生真菌。●: 宿主上有子座形成; ▲: 宿主上无子座形成。

Note: Numbers on the branches are confidence values obtained for 1 000 replicates (only values above 60% are shown); The bar represents a phylogenetic distance of 1%. Dashed lines used for branches contain same *Epichloë* sp. obtained from different host. ●: Host bearing stromata; ▲: No stromata formation on host.

3 讨论与结论

本研究采集了来自吉林省长春, 辽宁省抚顺和大连, 内蒙古自治区呼和浩特, 江苏省南京、山东省东营, 安徽省黄山和合肥 6 省(自治区) 8 地多个地点的早熟禾亚科植物, 选取分离的 21 个 *Epichloë* spp. 菌株检测 NRPS5 基因; 说明 NRPS5 基因可能广泛分布于我国东部冷季型禾本科植物 *Epichloae* 内生真菌中。

在同种内生真菌和同一宿主(除鹅观草)中的

不同种内生真菌中 NRPS5 基因相对保守, 但不同宿主的内生真菌碱基序列差异较大, 与宿主植物采集地点、时间和子座的有无均无相关性, NRPS5 基因的差异主要与宿主植物有关。这些说明 NRPS5 基因序列相对保守, 基于 NRPS5 基因序列的分析可作为真菌遗传多样性分析的一种手段, 基于 NRPS5 基因序列的系统发育学分析可作为菌株之间亲缘关系和起源分析的一种手段。

这 21 个菌株是我们精心挑选的代表性研究材料。在目前的研究中作为禾本科植物内生真菌菌株之间亲缘关系和起源分析的手段包括宿主、形态学特征、分子序列数据、杂交方式等分类方法^[15]。其中基于 16S rRNA 基因和 rDNA-ITS 序列的分析构建系统发育树, 是对禾本科植物内生真菌进行分类、鉴定及遗传分析的重要依据^[9,19]。研究结果显示, 在 *Epichloë* spp. 属内生真菌中, 来自同一种宿主植物的菌株多为同一个种^[2]。这种聚类特征在利用其他基因的分析中也得到了重现^[3]。因此, 继续研究和挑选能有效区别来自不同种属宿主植物的 *Epichloë* spp. 属真菌菌株, 对于今后研究 *Epichloë* spp. 属内生真菌的分类以及 DNA 条形码开发有着重要的意义。

李伟等^[9]基于我国东部的部分禾本科植物 rDNA-ITS 序列, 发现无性型 *Epichloë* spp. 菌株具有一定的遗传多样性, 系统发育树的拓扑结构显示了内生真菌不同种之间的亲缘关系, 同时无性型种与有性型种之间的聚类关系也说明了无性型种的进化起源, 但该研究涉及真菌宿主类型较少, 有待进一步对更多宿主进行研究。基于 *tefA*、*tubB* 基因序列的分析是 *Epichloë* spp. 属真菌的进化起源成为分类鉴定的重要依据, 也是鉴定 *Epichloë* spp. 属常用且不可缺少的依据。但有性型和无性型 *Epichloë* spp. 属真菌之间的这种错综复杂的杂交进化关系给其分类带来了困难, 具有杂交起源的内生真菌中 *tefA/tubB* 有多拷贝, 需要 TA 克隆进行测序, 实验所需时间较长。基于 NRPS5 基因序列的分析, 不同宿主中内生真菌聚类一致, 系统发育树的拓扑结构显示了不同宿主中不同种内生真菌之间的亲缘关系, 在含 *tefA/tubB* 多拷贝的内生真菌中 NRPS5 基因未发现多拷贝, 可缩短实验时间。本研究的结果显示, 基于 NRPS5 基因序列的系统发育学分析具有用于系统发育学分析的可能性。

本研究以不同早熟禾亚科宿主内 *Epichloë* 菌株为材料, 在早熟禾、短柄草、拂子茅、鹅观

草、雀麦、披碱草 6 种禾本科植物分离菌株中均检测到了 NRPS5 基因。这不仅说明了 NRPS5 基因有可能在我国冷季型禾本科植物 *Epichloë* 内生真菌中分布比较广泛, 同时说明了 *Epichloë* spp. 属真菌菌株可能起源于共同的含有 NRPS5 基因的祖先, 或者 NRPS5 基因参与的生物碱合成可能在我国禾本科-内生真菌共生体中有着十分重要的作用。

在整体上, NRPS5 基因的差异主要与宿主植物有关, 与宿主植物采集地点、采集时间和子座的有无无相关性(表 1, 图 2)。因此, NRPS5 基因序列比较保守, 应该属于 NRPS 蛋白的功能核心区。

NRPS5 目的基因同义密码子的不同主要由第 3 位密码子的差异引起, 第 1/2 位密码子的差异在细叶早熟禾表现明显, 说明在次生代谢产物基因上该宿主内生真菌与其他宿主内生真菌亲缘关系较远。这与本课题组之前在保守序列上的研究相符合, 在一种大连细叶早熟禾内生真菌的形态学和系统发育学研究发现, 我国南北方禾本科内生真菌群具有不同的物种起源^[6]。

在不同宿主内 NRPS5 基因序列相对保守, 但在 *R. kamoji* 宿主内 NRPS5 基因碱基差异呈现出多样性。鹅观草分离菌株 *E. yangzii* 与 *E. sinica* 内生真菌菌株有 6–9 个碱基不同(图 2), *E. yangzii* 与 *E. sinica* 同义密码子不同, 有 2 个是由第 1/2 位密码子的差异引起, 在碱基差异中所占比例较大, 且在 *E. sinica* 不同菌株中同义密码子差异与第 2 位密码子有关。*E. yangzii* 与 *E. sinica* 的 NRPS5 基因遗传多样性可能与鹅观草内 *E. yangzii* 和 *E. sinica* 的进化途径和进化关系有关。为进一步证实 *E. yangzii* 与 *E. sinica* 的进化途径和进化关系, 本实验室选取 10 株 *E. yangzii* 和 12 株 *E. sinica* 菌构建系统发育树, 2 种内生真菌分别聚为一大支, 与文献[20]结论一致。*E. sinica* 很可能是 *E. yangzii* 在感染新宿主后失去有性生殖能力而形成的。*E. yangzii* 与 *E. sinica* 菌株之间不能杂交产生可育后代, 从而产生生殖隔离, 形成不同的物种^[21]。

早熟禾属宿主中的内生真菌聚为一大支。短柄草属、拂子茅属、鹅观草属、雀麦属和披碱草属宿主中的内生真菌聚为一大支(图 3)。*Epichloë* 属菌株间遗传学上的差异说明了它们不同的进化起源^[4]。除 *E. tembladerae* 外, 其他有性型和无性型 *Epichloae* 都表现出了对宿主物种、属和相近族的特异性^[22]。本研究中早熟禾属宿主中的内生真菌不带子座的菌株与带子座的菌株聚为一支, 拂子茅属宿主中的 *Epichloë* sp. 菌株与 *E. stromatolonga* 菌株聚为一支(图 3), 与之前的研究结果一致^[5-6]。同种宿主内带子座和不带子座菌株聚为一支, 说明两者之间密切的进化关系^[23]; 而不同属宿主的菌株聚类, 可能与杂交起源的真菌发生宿主迁移有关^[24]。

至今 NRPS 基因的研究多集中在其合成肽等次级代谢产物的能力上, 在分类学中的作用鲜有报道。本研究的结果表明, NRPS5 基因的分析也可能作为真菌遗传多样性分析的一种有效辅助手段, 首次展示了基于 NRPS5 基因序列的系统发育学分析的可能性, 以后的工作应着力于探究 *Epichloë* 属 NRPS5 基因等调控的多种次生代谢产物。

REFERENCES

- [1] Wang ZW, Ji YL, Chen YG. Studies and biological significances of plant endophytes[J]. Microbiology China, 2015, 42(2): 349-363 (in Chinese)
王志伟, 纪燕玲, 陈永敢. 植物内生菌研究及其科学意义[J]. 微生物学通报, 2015, 42(2): 349-363
- [2] Wang ZW, Ji YL, Chen YG. Grass endophytes and their potential applications in agriculture[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2011, 34(5): 144-154 (in Chinese)
王志伟, 纪燕玲, 陈永敢. 禾本科植物内生真菌及其在农业上的应用潜力[J]. 南京农业大学学报, 2011, 34(5): 144-154
- [3] Leuchtmann A, Bacon CW, Schardl CL, et al. Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichloë*[J]. Mycologia, 2014, 106(2): 202-215
- [4] Song H, Nan ZB, Song QY, et al. Advances in research on *Epichloë* endophytes in Chinese native grasses[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1399
- [5] Ji YL, Sun XH, Wang ZW. A survey of the gramineous plant endophytes in Huangshan Geopark[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2011, 34(1): 147-150 (in Chinese)
纪燕玲, 孙相辉, 王志伟. 禾本科植物内生真菌研究 11: 黄山景区禾本科植物内生真菌的检测与分布[J]. 南京农业大学学报, 2011, 34(1): 147-150
- [6] Xing ZQ, Ji YL, Lu T, et al. Morphological and phylogenetic properties of an endophyte from *Poa angustifolia* grown in Dalian, Liaoning[J]. Microbiology China, 2014, 41(8): 1595-1604 (in Chinese)
邢转青, 纪燕玲, 陆涛, 等. 一种大连细叶早熟禾内生真菌的形态学和系统发育学研究[J]. 微生物学通报, 2014, 41(8): 1595-1604
- [7] Zhang CW, Ji YL, Yang SL, et al. Isolation and identification of a fungal endophyte obtained from *Roegneria canina* (L.) Nevski grown in Jilin, China[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2011, 34(2): 78-84 (in Chinese)
张晨炜, 纪燕玲, 杨守玲, 等. 禾本科植物内生真菌研究 12: 吉林犬草内生真菌的分离和鉴定[J]. 南京农业大学学报, 2011, 34(2): 78-84
- [8] Wang ZW, Wang SM, Ji YL, et al. Plant endophyte research 6: detection and distribution of endophytic fungus in Gramineous plants in saline-alkali area in Dongying[J]. Pratacultural Science, 2005, 22(2): 60-64 (in Chinese)
王志伟, 王世梅, 纪燕玲, 等. 中国禾本科植物内生真菌研究——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] Li W, Ji YL, Yu HS, et al. Genetic diversity and rDNA-ITS sequence analysis of endophytic fungi isolated from gramineous plants in China[J]. Mycosystema, 2006, 25(2): 217-226 (in Chinese)
李伟, 纪燕玲, 于汉寿, 等. 中国产禾本科植物内生真菌的遗传多样性及 rDNA-ITS 系统发育分析[J]. 菌物学报, 2006, 25(2): 217-226
- [10] Li W, Ji YL, Yu HS, et al. Distribution and morphological characters of *Epichloë* endophytes in the middle and lower basin of Yangtze River[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2006, 29(2): 39-44 (in Chinese)
李伟, 纪燕玲, 于汉寿, 等. 长江中下游地区 *Epichloë* 属真菌的分布及形态特征[J]. 南京农业大学学报, 2006, 29(2): 39-44
- [11] Zhang X, Ren AZ, Wei YK, et al. Taxonomy, diversity and origins of symbiotic endophytes of *Achnatherum sibiricum* in the Inner Mongolia Steppe of China[J]. FEMS Microbiology Letters, 2009, 301(1): 12-20
- [12] Johnson R, Voisey C, Johnson L, et al. Distribution of NRPS gene families within the *Neotyphodium/Epichloë* complex[J]. Fungal Genetics and Biology, 2007, 44(11): 1180-1190
- [13] Wang H, Wang Y, Ji YL, et al. Detection and distribution of NRPS genes in *Eurotium* spp. isolated from dark tea[J]. Microbiology China, 2013, 40(3): 464-475 (in Chinese)
王晗, 王永, 纪燕玲, 等. 分离自黑茶的散囊菌属真菌中的 NRPS 基因的检测和分布[J]. 微生物学通报, 2013, 40(3): 464-475
- [14] Eisendle M, Schrettl M, Kragl C, et al. The intracellular siderophore ferricrocin is involved in iron storage,

- oxidative-stress resistance, germination, and sexual development in *Aspergillus nidulans*[J]. Eukaryotic Cell, 2006, 5(10): 1596-1603
- [15] Ji YL, Zhan LH, Kang Y, et al. A new stromata-producing *Neotyphodium* species symbiotic with clonal grass *Calamagrostis epigeios* (L.) Roth. grown in China[J]. Mycologia, 2009, 101(2): 200-205
- [16] Fu LG. Higher plants in China[M]. Qingdao: Qingdao Press, 2009: 12 (in Chinese)
傅立国. 中国高等植物[M]. 青岛: 青岛出版社, 2009: 12
- [17] Li W, Ji YL, Yu HS, et al. A new species of *Epichloë* symbiotic with Chinese grasses[J]. Mycologia, 2006, 98(4): 560-570
- [18] Zhang HX, Ji YL, Xing ZQ, et al. Grass endophyte researches 17: biological properties of *Bromus magnus*-epichloid endophyte symbiosis grown in Huangshan[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2013, 36(5): 59-64 (in Chinese)
张红侠, 纪燕玲, 邢转青, 等. 禾本科植物内生真菌研究 17: 黄山大雀麦-内生真菌新共生体的生物学特征[J]. 南京农业大学学报, 2013, 36(5): 59-64
- [19] Shi C, An SZ, Yao ZP, et al. Toxin-producing *Epichloë bromicola* strains symbiotic with the forage grass *Elymus dahuricus* in China[J]. Mycologia, 2017, 109(6): 847-859
- [20] Guo P. Research on the biological characteristics of the symbiote: *Epichloë sinica*/*Roegneria kamoji*[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2017 (in Chinese)
郭萍. *Epichloë* 内生真菌——鹅观草共生体生物学特性的研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2017
- [21] Kang Y, Ji YL, Sun XH, et al. Taxonomy of *Neotyphodium* endophytes of Chinese native *Roegneria* plants[J]. Mycologia, 2009, 101(2): 211-219
- [22] Gentile A, Rossi MS, Cabral D, et al. Origin, divergence, and phylogeny of *epichloë* endophytes of native Argentine grasses[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2005, 35(1): 196-208
- [23] Leuchtman A, Oberhofer M. The *Epichloë* endophytes associated with the woodland grass *Hordelymus europaeus* including four new taxa[J]. Mycologia, 2013, 105(5): 1315-1324
- [24] Charlton ND, Craven KD, Afkhami ME, et al. Interspecific hybridization and bioactive alkaloid variation increases diversity in endophytic *Epichloë* species of *Bromus laevipes*[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2014, 90(1): 276-289

稿件书写规范

高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目，是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目，也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟，一方面为高校微生物学科的教师提供一个发表论文的平台，同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表，是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其他实验类研究报告，特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线，撰写的稿件内容必须要有新意、要实用，不是泛泛地叙述教学设计与过程，而是确实有感而发，是教学工作中的创新体会，或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性，做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进，注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中，只有这样才能真正起到教与学的互动，促进高校生物学教学的发展，更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时，为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台，本栏目还开辟了“名课讲堂”版块，邀约相关生命科学领域，如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点，推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文，为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习的平台，促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿！欢迎对本栏目多提宝贵意见！