

研究报告

内生真菌 *Epichloë guerinii* 对宿主德兰臭草抗病性的影响

王传哲, 施宠*, 何嘉坤, 张梦梦, 石精涛

新疆农业大学资源与环境学院, 新疆 乌鲁木齐 830052

王传哲, 施宠, 何嘉坤, 张梦梦, 石精涛. 内生真菌 *Epichloë guerinii* 对宿主德兰臭草抗病性的影响[J]. 微生物学通报, 2024, 51(7): 2411-2422.

WANG Chuanzhe, SHI Chong, HE Jiakun, ZHANG Mengmeng, SHI Jingtao. Effects of endophytic fungus *Epichloë guerinii* on disease resistance of the host *Melica transsilvanica*[J]. Microbiology China, 2024, 51(7): 2411-2422.

摘要:【背景】前期研究表明, 从国内仅在天山北坡分布的德兰臭草(*Melica transsilvanica*)中分离得到内生真菌 *Epichloë guerinii* SC012, 是一种与禾草共生的香柱菌(*Epichloë*)。【目的】研究内生真菌 *Epichloë guerinii* 与宿主德兰臭草抗病性的相互关系。【方法】体外纯培养条件下内生真菌与4种常见植物病原菌的对峙试验和病原菌侵染宿主的盆栽试验。【结果】平板对峙试验中, 分离自德兰臭草的一株内生真菌 *Epichloë guerinii* 对立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、链格孢菌(*Alternaria tenuis*)和禾谷炭疽菌(*Colletotrichum cereale*)均有抑制作用, 抑制率分别为 57.39%、26.30% 和 20.92%, 且内生真菌发酵液也可有效抑制这3种病原菌的生长, 抑制率分别为 64.94%、32.93% 和 15.61%, 2种体外培养试验中内生真菌对镰刀菌(*Fusarium* sp.)生长无影响; 盆栽试验中, 与 *Epichloë guerinii* 共生可以有效降低宿主德兰臭草在立枯丝核菌、链格孢菌和禾谷炭疽菌侵染下的病情指数, 相对防效分别为 36.61%、16.01%和 21.87%, 除可降低立枯丝核菌发病率外, 对降低其余病原菌侵染下的发病率并无显著作用。带内生真菌(E+)与不带内生真菌(E-)的德兰臭草植株除在镰刀菌侵染下苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonialyase, PAL)活性无显著差异外, E+植株的多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)与 PAL 活性在各组试验中均显著高于E-植株($P < 0.05$)。【结论】内生真菌 *Epichloë guerinii* 能提高宿主德兰臭草对一些特定病原菌的抗性, 但对不同病原菌的抗性存在差异, 这为利用禾草内生真菌进行生物防治或是抗性育种提供了依据。

关键词: 内生真菌; 德兰臭草; 生防作用; 对峙试验; 防御酶

资助项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2022D01A79)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2022D01A79).

*Corresponding author. E-mail: shichong98@163.com

Received: 2023-10-11; Accepted: 2023-11-21; Published online: 2023-11-28

Effects of endophytic fungus *Epichloë guerinii* on disease resistance of the host *Melica transsilvanica*

WANG Chuanzhe, SHI Chong^{*}, HE Jiakun, ZHANG Mengmeng, SHI Jingtao

College of Resources and Environment, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang, China

Abstract: [Background] *Epichloë guerinii* SC012 isolated from *Melica transsilvanica*, a plant only growing in the northern slope of the Tianshan Mountains in China, is a type of endophytic fungus of grasses. [Objective] To investigate the relationship between *E. guerinii* and the disease resistance of its host *M. transsilvanica*. [Methods] Dual-culture tests were conducted to assess the interactions between the endophytic fungus and four common plant pathogenic fungi. A pot experiment was performed to evaluate the resistance of *M. transsilvanica* with *E. guerinii* to pathogen invasion. [Results] In the dual-culture tests, *E. guerinii* isolated from *M. transsilvanica* exhibited inhibitory effects on *Rhizoctonia solani*, *Alternaria tenuis*, and *Colletotrichum cereale*, with the inhibition rates of 57.39%, 26.30%, and 20.92%, respectively. The fermentation broth of *E. guerinii* also inhibited the growth of the three pathogens, with the inhibition rates of 64.94%, 32.93%, and 15.61%, respectively. The endophytic fungus and its fermentation broth had no impact on the growth of *Fusarium* sp. The results of the pot experiment showed that *E. guerinii* reduced the disease indexes of *M. transsilvanica* exposed to the invasion of *R. solani*, *A. tenuis*, and *C. cereale*, with the relative protective effects of 36.61%, 16.01%, and 21.87%, respectively. Apart from reducing the incidence caused by *R. solani*, *E. guerinii* showed no significant effect on the incidence caused by other pathogens. *M. transsilvanica* plants with the endophytic fungus (E+) had higher polyphenol oxidase (PPO) and phenylalanine ammonialyase (PAL) activities than the plants without the endophytic fungus (E-) ($P < 0.05$), except that the PAL activity had no significant difference in the case of *Fusarium* sp. infection. [Conclusion] The endophytic fungus *E. guerinii* can enhance the resistance of *M. transsilvanica* to specific pathogens, while the resistance varies depending on the pathogens. The findings provide a basis for the use of endophytic fungi of grasses in the biocontrol and breeding of disease resistant crops.

Keywords: endophytic fungus; *Melica transsilvanica*; biocontrol; dual-culture test; defense enzymes

内生真菌(endophytic fungi)是指在植物体内完成其生活史且不会引起宿主明显的病害症状的一类微生物^[1]。在自然条件下,大多数早熟禾亚科(*Pooideae*)植物能够与 *Epichloë* 内生真菌形成共生关系^[2],并通过宿主的种子进行垂直传播形成一种稳定共生体^[3]。宿主禾草为

内生真菌提供营养,内生真菌则可以提高宿主对于旱^[4]、食草动物^[5]和病原体感染^[6]等生物和非生物胁迫的抗性。

植物病害是影响天然草地健康的主要因素,不仅降低牧草的产量和质量、制约草地的可持续利用和畜牧业的发展^[7],甚至还对谷物

类农作物生产构成威胁^[8]。通过施用化学农药可一定程度减轻病害造成的损失,但化学农药不仅造成环境问题,还诱导病原菌产生耐药性^[9]。目前,培育抗病品种或利用生物防治被认为是最经济环保的方法^[10]。禾草内生真菌可提高宿主对病原菌胁迫的抗性,也能够宿主体外对病原菌产生抑制作用,并且可通过种子垂直传播,因此,禾草内生真菌是挖掘新的生物防控剂的重要潜在资源,利用禾草内生真菌进行抗性育种逐渐成为一种趋势^[11]。

德兰臭草(*Melica transsilvanica*)是禾本科臭草属多年生牧草,草质柔软、适口性好,在欧洲、中亚地区、俄罗斯西伯利亚和高加索地区分布广泛,国内仅分布于新疆北部地区,是极具研究价值并亟待推广的优良牧草^[12]。本研究以本课题组前期在德兰臭草中分离的一株内生真菌 *Epichloë guerinii* SC012 为研究对象^[13],比较 *Epichloë guerinii* 在体外纯培养和与宿主共生条件下对 4 种常见的禾本科植物病原菌立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、禾谷炭疽菌(*Colletotrichum cereale*)、链格孢菌(*Alternaria tenuis*)和镰刀菌(*Fusarium sp.*)的抑制作用,探讨德兰臭草内生真菌 *Epichloë guerinii* 在体外培养条件下是否对病原菌有抑制作用,以及与植物共生是否能够提高宿主植物对病原真菌的抗性,进而为利用禾草内生真菌进行生物防治或抗性育种提供基础的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 植物材料

德兰臭草(*Melica transsilvanica*)种子采集于乌鲁木齐县水西沟镇(87.42°E, 43.47°N),海拔 1 393 m。

1.1.2 菌 株

内生真菌 *Epichloë guerinii* SC012 分离自德兰臭草^[13]。立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、禾谷炭疽菌(*Colletotrichum cereale*)、链格孢菌(*Alternaria tenuis*)和镰刀菌(*Fusarium sp.*)均由新疆农业大学农学院植物病理系提供。

1.1.3 培养基

菌株培养、对峙培养及抑菌试验均使用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)和马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB),参考文献^[14]配制。

1.1.4 主要试剂和仪器

多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)试剂盒和苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonialyase, PAL)试剂盒,南京奥青生物技术有限公司。紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;台式高速冷冻离心机,上海力申科学仪器有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 德兰臭草种子预处理及带菌率的测定

将自然采集的种子去除颖壳并混匀,采用赵晓静等^[15]的方法对德兰臭草种子进行染色,观察种皮中是否存在内生真菌菌丝,使用公式(1)计算其带菌率为 91.67%,简称 E+。使用输出功率 300 W 的微波处理德兰臭草种子 30 s 能有效杀灭其中的内生真菌^[16],将种子微波灭菌后进行二代繁殖,收获二代种子后通过染色确定其带菌率为 0%,作为本试验不带菌的种子,简称 E-。

带菌率(%)=(种皮中存在内生真菌菌丝的种子数/供试种子总数)×100 (1)

1.2.2 内生真菌与 4 种植物病原菌的对峙培养

参考王欣禹等^[17]的平板对峙方法稍作改动,将内生真菌 SC012 与 4 种病原真菌分别接种在 PDA 培养基中在(25±1) °C 黑暗培养 2 周供试验使用,用 7 mm 灭菌打孔器在内生真菌菌

落边缘打出完整的菌块,将菌块接种到 90 mm 的 PDA 平板中央,置于(25±1) °C 的培养箱中进行黑暗培养。由于内生真菌菌株生长较病原真菌缓慢,因此 3 d 后在接种有内生真菌的平板边缘分别等距离接种同一种病原真菌的 3 个直径为 7 mm 的菌饼,每个处理 3 个重复。同时在空白 PDA 平板边缘等距离接种 4 种不同病原真菌菌饼作为空白对照。培养 7 d 后测量病原真菌菌落的半径,并按公式(2)计算抑菌率。

抑菌率(%)=(对照组菌落半径-处理组菌落半径)/(对照组菌落半径-3.5 mm)×100 (2)

1.2.3 内生真菌发酵液对 4 种植物病原菌的抑制作用测定

制备内生真菌发酵液:将内生真菌 SC012 接种到 100 mL PDB 培养基中,25 °C、200 r/min 振荡培养。2 周后取 10 mL 发酵液到 15 mL 的离心管中,先以 4 000 r/min 离心 5 min 取上清液,再以 6 000 r/min 离心 10 min 取上清液置于 4 °C 冰箱保存,取 0.5 mL 上清液涂布于 PDA 培养基中,(25±1) °C 黑暗培养 3 d,平板中无菌落生长,经验证发酵液无菌,试验可用。

无菌条件下将 10 mL 无菌发酵液加入 200 mL 融化状态下(40-50 °C)的 PDA 培养基中振荡混匀后倒平板,待凝固后分别取 7 mm 的供试病原真菌菌饼置于平板中央,同时接种在普通 PDA 培养基中作为对照处理,每个处理重复 3 次,在(25±1) °C 培养箱中黑暗培养。7 d 后分别测量病原真菌菌落直径,并按公式(3)计算抑制率。

抑制率(%)=(对照组菌落直径-处理组菌落直径)/(对照组菌落直径-7 mm)×100 (3)

1.2.4 内生真菌在体外条件下对宿主抗病性的影响

依次将 E+和 E-德兰臭草种子用 4%的次氯酸钠处理 3 min,然后用 75%乙醇处理 3 min 并

用无菌水清洗 3 次,表面消毒后分别种植于营养钵中,每个营养钵 20 粒即为一个生物学重复,每组 3 个生物学重复。生长期给予正常管理,植株生长 2 个月后进行病原菌侵染试验。由于立枯丝核菌不产生孢子,因此均制备菌悬液用于接种。将 4 种病原真菌分别接种到 100 mL PDB 培养基中,25 °C、200 r/min 振荡培养,1 周后用匀浆机匀浆 30 s 制成菌丝悬浮液,用无菌水将浓度调至 1×10⁸ CFU/mL。以向每钵植株叶片喷洒 20 mL 的菌悬液的方法分别接种 4 种病原真菌。15 d 后,每钵随机取 50 片叶片,参考李彦忠等^[18]对禾草的病情分级标准,并按公式(4)、(5)和(6)分别计算各组发病率、病情指数和相对防效。使用 PPO 试剂盒与 PAL 试剂盒分别测定各组植株发病叶片的 PPO 与 PAL 活性。

发病率(%)=(染病叶片数/调查总数)×100 (4)

病情指数= \sum (各级叶片数×该病级值)/(调查叶片总数×最高级值)×100 (5)

相对防效(%)=(E-组病情指数-E+组病情指数)/E-组病情指数×100 (6)

1.3 数据处理

采用 Excel 2016 软件进行数据整理,利用 SPSS 23 软件进行单因素方差分析,并使用 GraphPad 9.3 软件对各组对照与处理进行独立样本 *t* 检验分析及图形绘制。

2 结果与分析

2.1 对峙培养菌株 SC012 对 4 种植物病原真菌的拮抗作用

直接观察对峙培养中病原真菌生长情况,可直观看出菌株 SC012 对除镰刀菌以外的其余 3 种病原真菌生长有明显的拮抗作用(图 1)。在菌株 SC012 的抑制作用下,立枯丝核菌、链格孢菌和禾谷炭疽菌的菌落半径均显著小于对照组(*P*<0.05),对照组的菌落半径分别是处理组的

2.15、1.36 和 1.27 倍(图 2), 而镰刀菌的生长几乎不受影响(图 1D, 图 2)。在与立枯丝核菌的对峙培养中, 两株菌相交后产生清晰的拮抗带(图 1A), 且两株菌平均间距达 18.47mm, 抑菌率达 57.39%, 显著高于其他 2 组($P<0.05$)。在与链格孢菌的对峙培养中, 两株菌相交后相较于对照, 链格孢菌菌落边缘颜色加深且菌丝密度稀疏(图 1B), 两株菌平均间距为 10.34 mm, 抑菌率为 26.30%, 显著高于对禾谷炭疽菌的抑制作用($P<0.05$)。在与禾谷炭疽菌的对峙培养中, 两株菌相交后禾谷炭疽菌菌落边缘菌丝较对照明显稀疏(图 1C), 两株菌平均间距为 5.67 mm, 抑菌率为 20.92% (表 1)。菌株 SC012 对立枯丝核菌抑制率最高, 分别是链格孢菌、禾谷炭疽

菌抑制率的 2.19 倍和 2.74 倍。以上结果表明菌株 SC012 对立枯丝核菌、链格孢菌和禾谷炭疽菌均存在显著的抑制效果($P<0.05$), 抑制作用由高到低分别为立枯丝核菌>链格孢菌>禾谷炭疽菌, 对镰刀菌无抑制作用。

2.2 菌株 SC012 发酵液对 4 种植物病原菌的抑制作用

直接观察发酵液抑菌试验中病原真菌生长情况, 可直观看出菌株 SC012 发酵液对除镰刀菌以外的其余 3 种病原真菌生长有明显的抑制作用, 与各组对照相比生长速度减慢, 菌丝生长受到了不同程度的抑制(图 3)。在发酵液抑制作用下立枯丝核菌、链格孢菌和禾谷炭疽菌菌落直径均显著小于各组对照的菌落直径($P<0.05$),

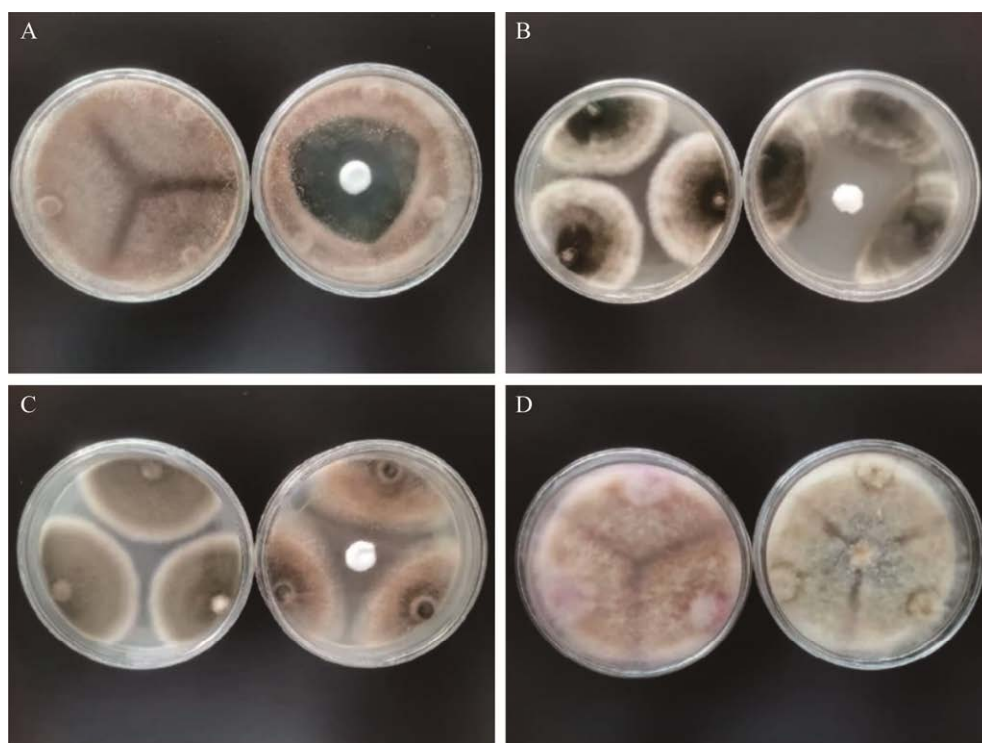


图 1 菌株 SC012 与 4 种植物病原真菌的对峙培养试验 A: 立枯丝核菌. B: 链格孢菌. C: 禾谷炭疽菌. D: 镰刀菌. 每张图片中, 左侧平板为对照组, 右侧平板为处理组

Figure 1 Dual-culture test of strain SC012 with four types of plant pathogenic fungi. A: *Rhizoctonia solani*. B: *Alternaria tenuis*. C: *Colletotrichum cereale*. D: *Fusarium* sp. In each picture, the left petri dish is the control group and the right petri dish is the treatment group.

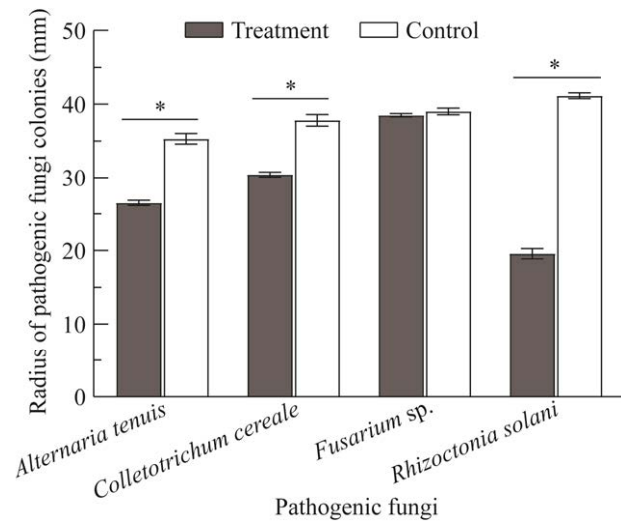


图 2 对峙培养中病原真菌的菌落半径 *：各处理间差异显著($P < 0.05$). 下同

Figure 2 Colony radius of the pathogenic fungi in the dual-culture test. *: Significant differences between the treatments ($P < 0.05$). The same below.

表 1 平板对峙试验中内生真菌与病原真菌菌落间距及抑菌率

Table 1 Colony spacing and inhibition rate between endophytic fungi and pathogenic fungi in the dual-culture test

病原真菌 Pathogenic fungi	间距 Spacing (mm)	抑菌率 Inhibition rate (%)
立枯丝核菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	18.47±3.73a	57.39±1.56a
链格孢菌 <i>Alternaria tenuis</i>	10.34±1.99b	26.30±0.82b
禾谷炭疽菌 <i>Colletotrichum cereale</i>	5.67±1.32c	20.92±1.08c
镰刀菌 <i>Fusarium sp.</i>	-	-

Fusarium sp.

同一列中不同小写字母表示 0.05 水平上的差异显著性；-：无抑制效果。下同

Different lowercase letters within the same column indicate significant differences at the 0.05 level; -: No inhibition effect. The same below.

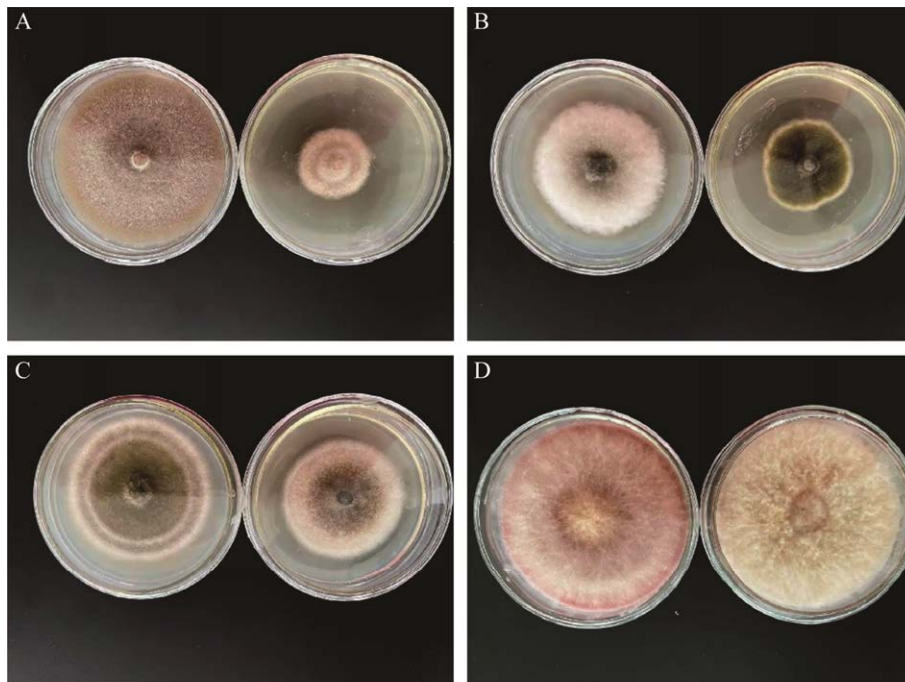


图 3 菌株 SC012 发酵液对 4 种植物病原真菌的抑制试验 A：立枯丝核菌. B：链格孢菌. C：禾谷炭疽菌. D：镰刀菌. 每张图片中，左侧平板为对照组，右侧平板为处理组

Figure 3 Inhibition test of strain SC012 fermentation broth against four types of plant pathogenic fungi. A: *Rhizoctonia solani*. B: *Alternaria tenuis*. C: *Colletotrichum cereale*. D: *Fusarium sp.* In each picture, the left petri dish is the control group and the right petri dish is the treatment group.

对照组的菌落直径分别是处理组的 2.49、1.42 和 1.16 倍，而镰刀菌的生长不受发酵液的影响(图 3D, 图 4)。菌株 SC012 发酵液对立枯丝核菌、链格孢菌和禾谷炭疽菌的抑制率分别为 64.94%、32.93%和 15.61% (表 2)。发酵液对立枯丝核菌的抑制率显著高于对链格孢菌和禾谷炭疽菌的抑制率($P<0.05$), 分别高出 1.97 倍和 4.16 倍。以上结果表明菌株 SC012 发酵液对立枯丝核菌、链格孢菌和禾谷炭疽菌均存在显著的抑制效果($P<0.05$), 抑制作用由高到低分别为立枯丝核菌>链格孢菌>禾谷炭疽菌, 对镰刀菌无抑制作用。

2.3 菌株 SC012 对宿主德兰臭草抗病性的影响

2.3.1 菌株 SC012 与德兰臭草共生对 4 种病原菌的防治效果

通过对盆栽试验中发病率与病情指数的统计,发现与菌株 SC012 共生的德兰臭草(E+)在立枯丝核菌侵染下的发病率与病情指数显著低于

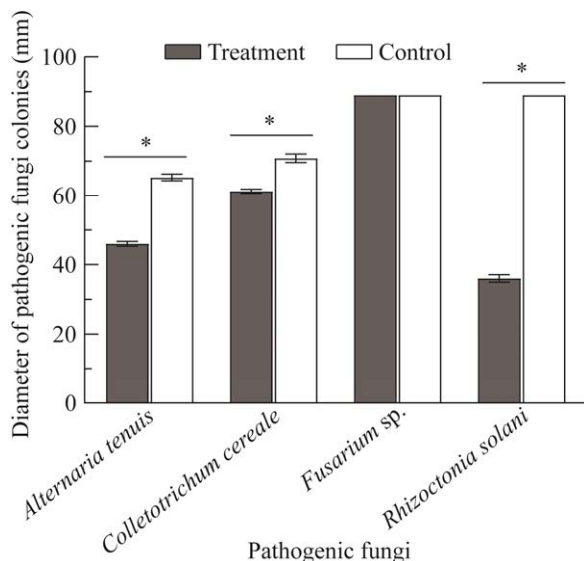


图 4 菌株 SC012 发酵液抑菌试验中病原真菌的菌落直径

Figure 4 Colony diameter of pathogenic fungi in the antimicrobial test with fermentation broth.

表 2 菌株 SC012 发酵液抑菌试验中对不同病原真菌的抑制率

Table 2 Inhibition rates of fermentation broth against different pathogenic fungi in the antimicrobial test

病原真菌	抑制率
Pathogenic fungi	Inhibition rate (%)
立枯丝核菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	64.94±1.17a
链格孢菌 <i>Alternaria tenuis</i>	32.93±2.03b
禾谷炭疽菌 <i>Colletotrichum cereale</i>	15.61±1.59c
镰刀菌 <i>Fusarium sp.</i>	-

E-植株($P<0.05$)。对于链格孢菌和禾谷炭疽菌的侵染, E+植株的病情指数显著低于 E-植株($P<0.05$), 但二者之间的发病率无显著差异。对于镰刀菌的侵染, E+植株与 E-植株的发病率与病情指数均无显著差异(图 5)。通过计算相对防效发现, 菌株 SC012 对立枯丝核菌的相对防效为 36.61%, 显著高于链格孢菌、禾谷炭疽菌($P<0.05$), 而链格孢菌、禾谷炭疽菌二者相对防效无显著差异(表 3)。以上结果表明内生真菌菌株 SC012 能提高宿主德兰臭草对一些特定病原菌的抗性, 但对不同病原菌的抗性存在差异。

2.3.2 菌株 SC012 对 4 种病原菌侵染的德兰臭草防御酶活性的影响

相较于健康植株(CK), E+与 E-植株在被 4 种病原菌侵染后 PAL 与 PPO 的活性均升高, 健康植株中 2 种防御酶活性均无显著差异。对于 4 种病原菌的侵染, E+植株的 PPO 活性均显著高于 E-植株($P<0.05$)。除在镰刀菌侵染 E+植株的 PAL 活性与 E-植株无显著差异外, 对其余 3 种病原菌侵染的 E+植株的 PAL 活性均高于 E-植株($P<0.05$)。其中在立枯丝核菌侵染下 E+植株的 PAL、PPO 这 2 种防御酶与 E-植株相比分别高出 34.34%、41.41% (图 6)。以上结果表明在病原菌侵染后内生真菌能提高宿主德兰臭草 PAL 和 PPO 的活性来提高抗病性。

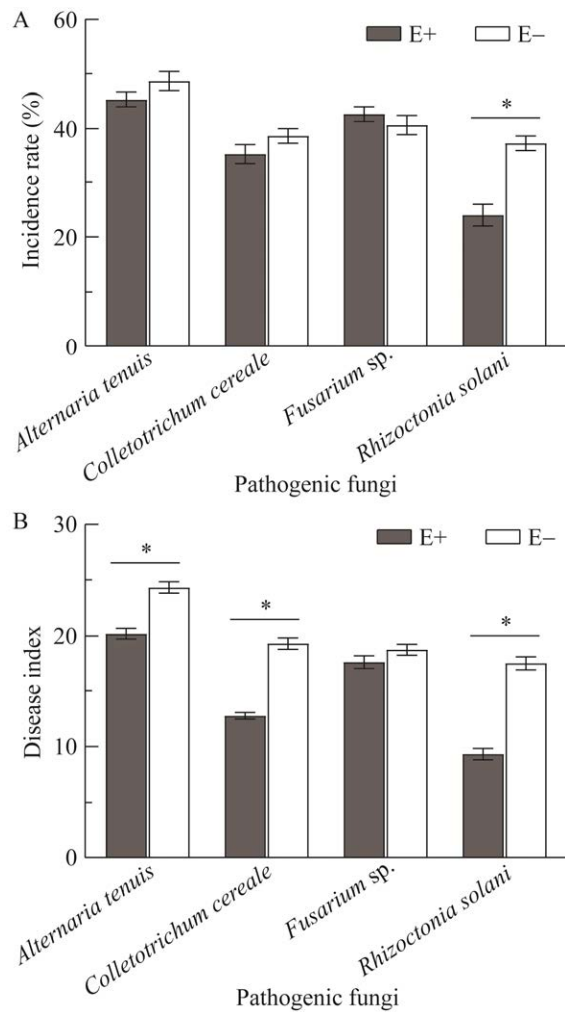


图 5 E+植株与 E-植株在不同病原菌侵染下的发病情况 A: 发病率. B: 病情指数

Figure 5 Disease occurrence in E+ plants and E- plants under infection of different pathogens. A: Incidence rate. B: Disease index.

表 3 菌株 SC012 与德兰臭草共生对 4 种病原菌的相对防效

Table 3 Relative protective efficacy of strain SC012 symbiosis with *Melica transsilvanica* against four pathogenic fungi

病原真菌	相对防效
Pathogenic fungi	Relative efficacy (%)
立枯丝核菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	36.61±2.87a
链格孢菌 <i>Alternaria tenuis</i>	16.01±3.78b
禾谷炭疽菌 <i>Colletotrichum cereale</i>	21.87±1.60b
镰刀菌 <i>Fusarium sp.</i>	-

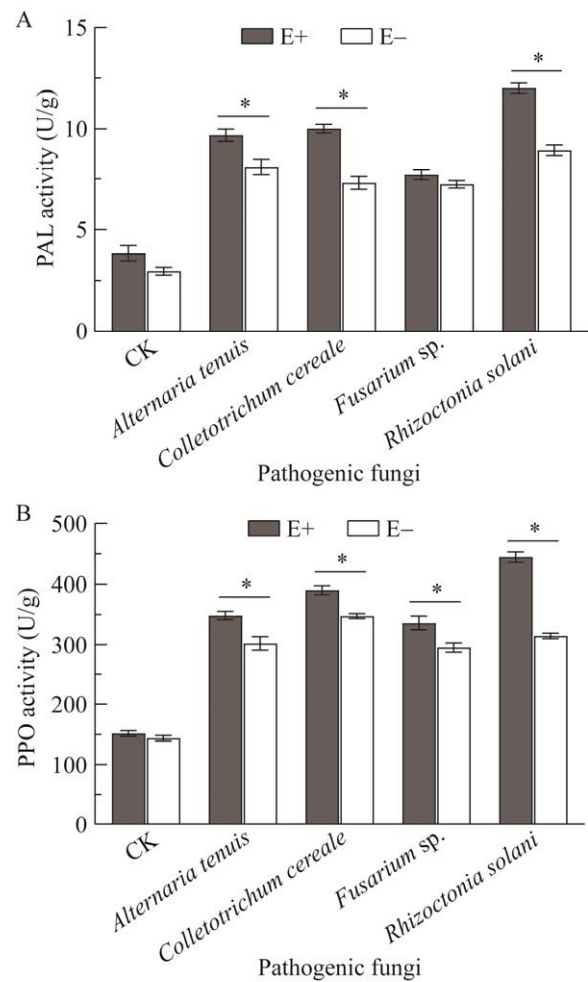


图 6 E+植株与 E-植株在不同病原菌侵染下的防御酶活性 A: PAL 活性. B: PPO 活性

Figure 6 Defensive enzyme activity in E+ plants and E- plants under infection of different pathogens. A: PAL activity. B: PPO activity.

3 讨论与结论

以往关于 *Epichloë* 内生真菌提高宿主禾草抗病性方面的研究都集中在以羊茅属 (*Festuca*)、黑麦草属 (*Lolium*) 和醉马草 (*Achnatherum inebrians*) 为宿主的内生真菌^[19]。其中在体外纯培养条件下分离出的内生真菌对德氏霉属 (*Drechslera*)、镰刀菌属 (*Fusarium*)、丝核菌属 (*Rhizoctonia*)、新月弯孢霉 (*Curvularia*)

lunata)、细交链格孢(*Alternaria alternata*)和根腐离蠕孢(*Bipolaris sorokiniana*)等病原菌都有不同程度的抑制作用^[20]。本研究中德兰臭草内生真菌 *Epichloë guerinii* SC012 在平板对峙试验中可显著抑制立枯丝核菌、链格孢菌和禾谷炭疽菌的菌落生长, 抑菌率分别为 57.39%、26.30%和 20.92%, 对镰刀菌无明显的抑制作用。内生真菌主要通过竞争作用及产生抑菌物质与病原菌产生拮抗^[21]。然而由于内生真菌相较于病原真菌生长速度缓慢, 对于养分竞争与物理生存空间的竞争并不占据优势, 结合发酵液抑菌试验的结果推测, 体外培养下内生真菌主要通过产生具有抑菌作用的代谢物来抑制病原菌的生长。内生真菌 *Epichloë* 主要通过产生生物碱类化合物、挥发性有机化合物(volatile organic compounds, VOCs)、醌类、酚类和多肽等具有抑菌活性的代谢物来抑制离体条件下病原菌的生长^[22-23], 且不同基因型的内生真菌产生的代谢物的种类与含量也有差异^[24]。因此, 对不同病原菌的抑制作用也不尽相同, 至于德兰臭草内生真菌 *E. guerinii* 与同属内生真菌代谢物的差异还需进一步研究。

PAL 和 PPO 是植物抵抗生物胁迫的防御酶。PAL 是植物体内苯丙烷类代谢的关键酶, 与一些重要的次生物质如木质素、异黄酮类植保素、黄酮类色素等合成密切相关^[25-26], PPO 是植物体内生物合成酚类化合物的关键酶, 二者在植物抵御病菌侵害过程中起重要作用。有研究表明, 苯丙氨酸是苯丙烯类代谢的中间代谢产物, 因此当植物受到病原菌侵染时, 内生真菌可能通过消耗苯丙氨酸来产生其他防御化合物如木质素^[27], 木质素可以阻止病原菌侵染植物^[28], 这个过程会使 PAL 活性升高。此外, 在被病原菌侵染后总酚含量明显升高, PPO 活

性也会在这个过程中升高^[29]。在本研究中, 内生真菌菌株 SC012 能提高宿主德兰臭草在立枯丝核菌、链格孢菌和禾谷炭疽菌这 3 种病原菌侵染下的 PAL 和 PPO 的活性, 激活调控其他防御化合物的产生, 从而抵御病原菌的侵染, 这与 Tian 等^[30]结果一致。

以往的研究发现, 内生真菌体外对峙试验与植物共生的环境差异较大, 因此体外纯培养下的抑菌结果通常不能准确预测在活体植物组织中的抗病效果^[31-32]。例如, Wäli 等在 *Epichloë* 菌株对斑点雪霉(*Typhula ishikariensis*)体外对峙培养中表现出明显抑菌作用, 但是田间试验中, 甚至出现了带菌植株(E+)反而更容易受到病原菌侵染的结果^[33]。本研究中盆栽试验与体外抑菌试验的结果也不尽相同, 菌株 SC012 对链格孢菌与禾谷炭疽菌在体外试验中均有显著的抑制作用, 在盆栽试验中菌株 SC012 并未显著降低德兰臭草在二者侵染下的发病率, 只是对病情指数有显著降低。体外和体内结果之间存在差异可能有多种原因: 一方面, 内生真菌产生次生代谢产物的浓度取决于宿主植物, 内生真菌在植物体内相较于在培养基中生长, 可能无法获取相关的营养物质或足够的营养物质, 且代谢产物的生物合成途径可能会像一些病原菌一样被下调^[34]; 另一方面, 体外对峙培养中与病原菌之间的竞争作用和内生真菌产生抑菌物质几乎是唯一的作用机制, 而在与宿主共生后的植物体内存在其他复杂的拮抗机制^[35]。例如, 本试验中菌株 SC012 能提高宿主德兰臭草 PAL 和 PPO 的活性进而促进木质素和酚类化合物等其他防御化合物产生来提高对病原菌的抗性, 但对于镰刀菌的侵染, 菌株 SC012 也显著提高了宿主植物的 PPO 活性, 但对病情指数和发病率均无显著作用。由此也可看出内生真

菌与宿主共生后在植物体内存在极其复杂的调控网络，绝不是仅仅只有抑菌代谢物与防御相关化合物的调控。

禾草内生真菌的相关研究不仅具有潜在的研究深度，同时具有多方面的实际应用价值。尤其是利用禾草内生真菌进行抗性育种，已有研究表明，一些特定的 *Epichloë* 菌株^[36]可以接种到大麦(*Hordeum vulgare*)、黑麦(*Secale cereale*)和小麦(*Triticum aestivum*)中，构建出能稳定遗传的新种质^[37-38]。使用内生真菌人工侵染黑麦构建的新种质，在田间试验中表现出对叶锈病菌(*Puccinia recondita*)和条斑病菌(*Cercosporidium graminis*)的抗性^[39]。因此，禾草内生真菌是挖掘新的生物防控剂与抗性育种因子的重要潜在资源，且构建禾草内生真菌与宿主植物良性互作的生态学框架，将会对畜牧业以及传统农业的发展具有积极作用。

REFERENCES

- [1] SIEGEL MR, LATCH GM, JOHNSON MC. Fungal endophytes of grasses[J]. Annual Review of Phytopathology, 1987, 25: 293-315.
- [2] VIKUK V, YOUNG CA, LEE ST, NAGABHYRU P, KRISCHKE M, MUELLER MJ, KRAUSS J. Infection rates and alkaloid patterns of different grass species with systemic *Epichloë* endophytes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(17): e00465-19.
- [3] 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.
WANG ZW, JI YL, CHEN YG. Studies and biological significances of plant endophytes[J]. Microbiology China, 2015, 42(2): 349-363 (in Chinese).
- [4] WANG JJ, ZHOU YP, LIN WH, LI MM, WANG MN, WANG ZG, KUANG Y, TIAN P. Effect of an *Epichloë* endophyte on adaptability to water stress in *Festuca sinensis*[J]. Fungal Ecology, 2017, 30: 39-47.
- [5] BASTIAS DA, ALEJANDRA MARTÍNEZ-GHERSA M, BALLARÉ CL, GUNDEL PE. *Epichloë* fungal endophytes and plant defenses: not just alkaloids[J]. Trends in Plant Science, 2017, 22(11): 939-948.
- [6] SHI X, QIN T, QU Y, ZHANG J, HAO G, ZHAO Y, ZHANG Z, ZHAO N, REN A. Comparative omics analysis of endophyte-infected and endophyte-free *Achnatherum sibiricum* in response to pathogenic fungi[J]. Biological Control, 2022, 175: 105040.
- [7] ZHANG YW, NAN ZB, XIN XP. Response of plant fungal diseases to beef cattle grazing intensity in Hulunber grassland[J]. Plant Disease, 2020, 104(11): 2905-2913.
- [8] FISHER MC, HENK DA, BRIGGS CJ, BROWNSTEIN JS, MADOFF LC, McCRAW SL, GURR SJ. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health[J]. Nature, 2012, 484(7393): 186-194.
- [9] ZHANG ZQ, YAN XM, JONES KC, JIAO C, SUN C, LIU Y, ZHU Y, ZHANG QQ, ZHAI LM, SHEN ZY, CHEN L. Pesticide risk constraints to achieving sustainable development goals in China based on national modeling[J]. Npj Clean Water, 2022, 5: 59.
- [10] BANERJEE S, van der HEIJDEN MGA. Soil microbiomes and one health[J]. Nature Reviews Microbiology, 2023, 21(1): 6-20.
- [11] ZHENG RH, LI SJ, ZHANG X, ZHAO CQ. Biological activities of some new secondary metabolites isolated from endophytic fungi: a review study[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(2): 959.
- [12] 李柯, 施宠, 王文全, 李阳. 重金属 Pb 胁迫下内生真菌侵染对德兰臭草种子萌发及生长的影响[J]. 农业资源与环境学报, 2020, 37(2): 280-286.
LI K, SHI C, WANG WQ, LI Y. Seed germination and growth effects of endophyte infection on *Melica transsilvanica* under Pb stress[J]. Journal of Agricultural Resources and Environment, 2020, 37(2): 280-286 (in Chinese).
- [13] 施宠. 德兰臭草内生真菌生物学特性及其共生体对干旱胁迫的生理响应研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学博士学位论文, 2017.
SHI C. Biological characterization of endophytic fungus associated with *Melica transsilvanica* and their symbiotic physiological response to drought stress[D]. Urumqi: Doctoral Dissertation of Xinjiang Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [14] ADESEMOYE AO, ADEDIRE CO. Use of cereals as basal medium for the formulation of alternative culture media for fungi[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, 21(3): 329-336.
- [15] 赵晓静, 王萍, 李秀璋, 古丽君, 李春杰. 内生真菌

- 在禾草体内的分布特征[J]. 草业科学, 2015, 32(8): 1206-1215.
- ZHAO XJ, WANG P, LI XZ, GU LJ, LI CJ. Distribution characteristics of *Epichloë* endophyte in gramineous grasses[J]. Pratacultural Science, 2015, 32(8): 1206-1215 (in Chinese).
- [16] 施宠, 张蕊思, 黄长福, 邢圆通, 安沙舟. 微波处理构建不感染内生真菌德兰臭草种群的方法探讨[J]. 草地学报, 2016, 24(5): 1016-1021.
- SHI C, ZHANG RS, HUANG CF, XING YT, AN SZ. Using microwave treatment to construct endophyte-free *Melica transsilvanica* population[J]. Acta Agrestia Sinica, 2016, 24(5): 1016-1021 (in Chinese).
- [17] 王欣禹, 周勇, 任安芝, 高玉葆. 内生真菌感染对宿主羊草抗病性的影响[J]. 生态学报, 2014, 34(23): 6789-6796.
- WANG XY, ZHOU Y, REN AZ, GAO YB. Effect of endophyte infection on fungal disease resistance of *Leymus chinensis*[J]. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(23): 6789-6796 (in Chinese).
- [18] 李彦忠, 南志标. 牧草病害诊断调查与损失评定方法[M]. 南京: 江苏凤凰科学技术出版社, 2015.
- LI YZ, NAN ZB. The Methods of Diagnose, Investigation and Loss Evaluation for Forage Diseases[M]. Nanjing: Phoenix Science Press, 2015 (in Chinese).
- [19] PÉREZ LI, GUNDEL PE, ZABALGOGEAZCOA I, OMACINI M. An ecological framework for understanding the roles of *Epichloë* endophytes on plant defenses against fungal diseases[J]. Fungal Biology Reviews, 2020, 34(3): 115-125.
- [20] XIA C, LI NN, ZHANG YW, LI CJ, ZHANG XX, NAN ZB. Role of *Epichloë* endophytes in defense responses of cool-season grasses to pathogens: a review[J]. Plant Disease, 2018, 102(11): 2061-2073.
- [21] XIE FX, REN AZ, WANG YH, LIN F, GAO YB. A comparative study of the inhibitive effect of fungal endophytes on turf grass fungus pathogens[J]. Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(8): 3913-3920.
- [22] FERNANDO K, REDDY P, HETTIARACHCHIGE IK, SPANGENBERG GC, ROCHFORD SJ, GUTHRIDGE KM. Novel antifungal activity of *Lolium*-associated *Epichloë* endophytes[J]. Microorganisms, 2020, 8(6): 955.
- [23] AMEYE M, ALLMANN S, VERWAEREN J, SMAGGHE G, HAESAERT G, SCHUURINK RC, AUDENAERT K. Green leaf volatile production by plants: a meta-analysis[J]. New Phytologist, 2018, 220(3): 666-683.
- [24] PAŃKA D. Occurrence of *Neotyphodium lolii* and its antifungal properties[J]. Phytopathologia Polonica, 2008, 48: 5-12.
- [25] ABO-ELYOUSR KAM, ALMASOUDI NM, ABDELMAGID AWM, ROBERTO SR, YOUSSEF K. Plant extract treatments induce resistance to bacterial spot by tomato plants for a sustainable system[J]. Horticulturae, 2020, 6(2): 36.
- [26] CARETTO S, LINSALATA V, COLELLA G, MITA G, LATTANZIO V. Carbon fluxes between primary metabolism and phenolic pathway in plant tissues under stress[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(11): 26378-26394.
- [27] WANG XY, QIN JH, CHEN W, ZHOU Y, REN AZ, GAO YB. Pathogen resistant advantage of endophyte-infected over endophyte-free *Leymus chinensis* is strengthened by pre-drought treatment[J]. European Journal of Plant Pathology, 2016, 144(3): 477-486.
- [28] FUNNELL-HARRIS DL, PEDERSEN JF, SATTLER SE. Alteration in lignin biosynthesis restricts growth of *Fusarium* spp. in brown midrib sorghum[J]. Phytopathology®, 2010, 100(7): 671-681.
- [29] PAŃKA D, PIESIK D, JESKE M, BATURO-IEŚNIEWSKA A. Production of phenolics and the emission of volatile organic compounds by perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.)/*Neotyphodium lolii* association as a response to infection by *Fusarium poae*[J]. Journal of Plant Physiology, 2013, 170(11): 1010-1019.
- [30] TIAN P, NAN ZB. *Epichloë festucae* var. *lolii* endophyte affects host response to fungal disease progression in perennial ryegrass (*Lolium perenne*)[J]. Science China Life Sciences, 2019, 62(9): 1264-1265.
- [31] WHITAKER BK, BAKKER MG. Bacterial endophyte antagonism toward a fungal pathogen *in vitro* does not predict protection in live plant tissue[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2019, 95(2): fiy237.
- [32] YAKTI W, KOVÁCS GM, FRANKEN P. Differential interaction of the dark septate endophyte *Cadophora* sp. and fungal pathogens *in vitro* and in planta[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2019, 95(12): fiz164.
- [33] WÄLI PR, HELANDER M, NISSINEN O, SAIKKONEN

- K. Susceptibility of endophyte-infected grasses to winter pathogens (snow molds)[J]. *Canadian Journal of Botany*, 2006, 84(7): 1043-1051.
- [34] SPANU PD. The genomics of obligate (and nonobligate) biotrophs[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2012, 50: 91-109.
- [35] CARD SD, BASTÍAS DA, CARADUS JR. Antagonism to plant pathogens by *Epichloë* fungal endophytes: a review[J]. *Plants*, 2021, 10(10): 1997.
- [36] CARD SD, FAVILLE MJ, SIMPSON WR, JOHNSON RD, VOISEY CR, de BONTH ACM, HUME DE. Mutualistic fungal endophytes in the *Triticeae*-survey and description[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 88(1): 94-106.
- [37] SIMPSON WR, FAVILLE MJ, MORAGA RA, WILLIAMS WM, McMANUS MT, JOHNSON RD. *Epichloë* fungal endophytes and the formation of synthetic symbioses in *Hordeae* (= *Triticeae*) grasses[J]. *Journal of Systematics and Evolution*, 2014, 52(6): 794-806.
- [38] 李春杰, 王正凤, 陈泰祥, 南志标. 利用禾草内生真菌创制大麦新种质[J]. *科学通报*, 2021, 66(20): 2608-2617.
- LI CJ, WANG ZF, CHEN TX, NAN ZB. Creation of novel barley germplasm using an *Epichloë* endophyte[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2021, 66(20): 2608-2617 (in Chinese).
- [39] HUME DE, STEWART AV, SIMPSON WR, JOHNSON RD. *Epichloë* fungal endophytes play a fundamental role in New Zealand grasslands[J]. *Journal of the Royal Society of New Zealand*, 2020, 50(2): 279-298.