

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

邢转青 纪燕玲 陆涛 王志伟*

(南京农业大学 生命科学学院 江苏 南京 210095)

摘要:【目的】鉴定分离自辽宁省大连市细叶早熟禾中的内生真菌。【方法】在辽宁省大连市的黄金山和白玉山采集细叶早熟禾(*Poa angustifolia* L.), 通过显微镜观察植物是否含菌, 统计样品中内生真菌的检出率; 从含菌样品中分离内生真菌, 纯化后在马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基上培养3周, 测定分离菌株的形态学特征; 运用 IQS 法提取分离菌株的总 DNA, 利用特异性引物扩增分离菌株的 β -Tubulin (*tubB*)和 Translation elongation factor 1- α (*tefA*)基因片段, 利用 DNAssist 2.2 和 ClustalX 1.81 软件进行序列的多重比对和分析, 运行 PAUP 4 beta 10、MrModeltest 2.3 选择合适的模型, 用 MrBayes 3.1.2 构建最大似然树, 分析分离菌株的系统发育学特征。【结果】共采集植物样品 262 个, 其中内生真菌的检出率达 57.3%; 根据分离地点和菌落特征筛选和纯化了 10 个分离菌株, 选用其中 6 个分离菌株进行形态学特征的调查, 发现分离菌株呈典型的 *Neotyphodium* 属形态学特征, 进而和其他宿主为早熟禾属植物的内生真菌进行比较, 发现分离菌株的特征与 *Epichloë liyangensis* 相近, 但分生孢子较小 [$(5.3 \pm 0.3) \mu\text{m} \times (2.9 \pm 0.2) \mu\text{m}$], 生长速度稍慢(每周 $8.7 \pm 1.4 \text{ mm}$); 基于 5 个分离菌株 *tubB* 和 *tefA* 片段序列的系统发育学特征显示, 它们的 *tubB* 和 *tefA* 序列分别为单拷贝, 并与 *E. liyangensis* 中的第二拷贝聚为一类。【结论】分离菌株在原始宿主植物上没有形成子座, 分离菌株的形态学特征和系统发育学特征均与 *E. liyangensis* 有明显差异。兼顾其它早熟禾属植物内生真菌的宿主植物的种类和地理分布特征, 这些菌株有可能属于一个新的内生真菌类群。

关键词: 细叶早熟禾, 内生真菌, 形态学特征, 系统发育学特征

Morphological and phylogenetic properties of an endophyte from *Poa angustifolia* grown in Dalian, Liaoning

XING Zhuan-Qing JI Yan-Ling LU Tao WANG Zhi-Wei*

(College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: [Objective] Ten endophytic strains obtained from *Poa angustifolia* grown in mountains of Huangjin and Baiyu in Liaoning Province were identified. [Methods] Asymptomatic *P. angustifolia* samples were collected. Plant culms from each sample were stained by Rose Bengal (1%) for 5 minutes. Hyphae were detected under microscope and the infection level was calculated. The fungal strains were isolated, purified and incubated to observe the morphological properties. Fungal genomic

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30800156, 30970081, 31372365)

*通讯作者: Tel: 86-25-84395531; 信箱: zwwang@njau.edu.cn

收稿日期: 2013-11-26; 接受日期: 2014-01-13; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-16

DNA samples were extracted by IQS DNA extraction method. Fragments of β -tubulin (*tubB*) and translation elongation factor 1- α (*tefA*) genes were amplified by specific PCR primers for isolated strains. Sequences of *tubB* and *tefA* were aligned and analyzed by DNAssist 2.2 and ClustalX 1.81, the model was selected by PAUP 4 beta 10 and MrModeltest 2.3. The phylogenetic characteristic of these strains were analyzed through the maximum likelihood tree performed by MrBayes 3.1.2. **[Results]** Total of 262 *Poa angustifolia* samples were collected, 57.3% of the plants were infected while no stroma was discovered on the culms. Ten endophytic strains were isolated and purified from these plants samples. Six strains were used to observe the morphological properties. Each of them was identical with those of epichloid endophytes. Comparing with other endophytes from *Poa* spp. plants, morphological characteristics of the strain were similar to *E. liyangensis* except smaller conidia and slower growth rate. Five strains were confirmed to possess single alleles of *tubB* and *tefA*. Phylogenetic trees based on *tubB* and *tefA* fragments respectively revealed that these 5 strains clustered with the second alleles of *E. liyangensis*. **[Conclusion]** These results indicated significant differences between these strains and *E. liyangensis*. Based on the host species and geographic distribution of other endophytes from *Poa* spp. plants, they might be a new taxonomic group of epichloid endophyte.

Keywords: *Poa angustifolia*, Epichloid endophyte, Morphological characteristic, Phylogenetic analysis

Epichloë 属真菌(在植物体表形成子座)及仅具无性世代的 *Neotyphodium* 属真菌(在植物体表无任何症状)统称为 Epichloid 内生真菌或 Epichloae 内生真菌^[1-2]。它们部分或全部生活于植物体内,对宿主植物有提高抗旱、抗寒、抗病虫害和促进生长的作用,但同时有的也会造成昆虫及家畜中毒^[3-5]。Epichloid 内生真菌与冷季型禾本科植物的互惠共生关系在种植业、畜牧业和草坪业方面具有广泛的应用价值,作为一种新型微生物资源备受关注^[6]。目前,全球已报道 *Epichloë* 属 14 种,其中 12 个为欧洲和北美洲种,2 个为亚洲种;*Neotyphodium* 属 23 个种 5 个变种,广泛分布于世界各地^[6-8]。多种信息表明, *Neotyphodium* 属真菌是由一种 *Epichloë* 属真菌单独演化、或多种 *Epichloë* 属真菌杂交而来,这两类真菌的相应菌群之间有着比较明显的亲缘关系^[1]。

早熟禾属(*Poa*)植物全球约有 500 余种,广泛分布于温寒带、热带和亚热带地区。国际上关于其中内生真菌的报道主要来自北美、南美和欧洲。国外研究人员从生长在北美和欧洲各地的草地早熟禾(*Poa pratensis*)、*P. silvicola*、林地早熟禾(*P. nemoralis*)和普通早熟禾(*P. trivialis*)等植物中发现了 *E. typhina*^[9-10],从生长在南美的 *P. huecu* 中获

得了 *N. tembladerae*^[11],从生长在北美的 *P. secunda* ssp. *juncifolia* 中分离了 *E. poae*^[8]。*E. typhina* 研究较早,主要依据形态学特征进行鉴定,所以一些研究者认为它可能是一个混合种;*N. tembladerae* 宿主不仅限于早熟禾,还被推测起源于 *E. typhina* 和 *E. festucae*; *E. poae* 在系统发育学上与 *E. typhina* 高度聚为一类,但没有发现成熟的子囊孢子和子囊壳,是一个非杂交的 *Epichloë* 属内生真菌^[8-11]。

我国有 230 多种早熟禾属植物,作为林间的下繁草(Caespitose plants)广泛分布于全国,但这些植物中的内生真菌在我国很少被报道。2001 年以来,我们从淮河以南多个地区的部分早熟禾属植物中以很高的频率发现了内生真菌的存在,但一直没有进行详细的菌物学调查。南志标和李春杰从西北 4 种早熟禾属植物、Wei 等从内蒙 5 种早熟禾属植物中也分别检测到内生真菌,但都没有展开详细的研究^[12-13]。直到 2009 年春,我们在江苏省溧阳市发现了能在草地早熟禾草地亚种(*P. pratensis* ssp. *pratensis*)植株上产生子座的内生真菌,2011 年后证明该真菌为新种,命名为 *Epichloë liyangensis* Wang, Kang et Miao。这是在我国发现的第一个能在宿主植物植株上产生子座的早熟禾属植物内生真菌,也是国际上第一个报道的具有杂交起源的

Epichloë 属真菌^[14]。

我们于 2012 年调查发现, 辽宁省大连市的早熟禾属植物含有内生真菌, 但植株上未见子座, 明显不同于此前在江苏省溧阳市发现的 *E. liyangensis*。本研究对该地区的早熟禾属植物进行采样调查, 检测、分离含菌植株的内生真菌, 并对分离菌株的形态学特征和系统发育学特征进行了比较。

1 材料与方法

1.1 植物样品的采集、保存及鉴定

2012 年 7 月, 从大连黄金山和白玉山 2 个采样区的多个地点采集早熟禾属植物样品。根据植株或群落生长的特征, 选择带有花序的分蘖从茎基部剪断, 保湿处理后运回实验室, 置于 4 °C 保存, 并保存植物标本。为了保障所采样品的独立性和代表性, 1 个植株或 1 个群落只采 1 个分蘖。

植物样品的鉴定参考《中国高等植物》, 根据花序等的特征描述进行^[15]。

1.2 内生真菌的镜检及宿主体内形态特征的观察

剪取植物样品的茎秆部分, 用刀片刮取茎秆内的髓组织, 经 1%碱性孟加拉红染液(1%孟加拉红, 4% NaOH)在室温下染色 5 min 后制成临时切片。在显微镜下观察菌丝的分布与否, 是否分叉, 并用目镜测微尺测量菌丝的直径。

1.3 内生真菌的分离、纯化和保藏

将含菌植物茎秆切成小段, 依次经乙醇—NaClO—乙醇表面消毒各 2 min, 再经无菌水漂洗 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^[16]。

1.4 分离菌株的培养及菌株的形态特征

将纯化后的菌株在 PDA 平板上 25 °C 培养 21 d, 观察菌落形态特征并测定菌落生长速度, 每株菌 4 个重复。挑取菌落边缘菌丝, 在光学显微镜下观察菌株分生孢子及分生孢子梗形态并测定其大小, 每株菌 20 个重复, 计算平均值。

1.5 *tubB* 和 *tefA* 片段的克隆、测序和分析

采用 IQS 法提取分离菌株的总 DNA^[17]。以提取的总 DNA 为模板, 利用 *tubB* 和 *tefA* 片段的通用引物进行 PCR 扩增^[18], 1%琼脂糖凝胶电泳检测达到测序要求后, PCR 产物直接委托上海美吉生物医药科技有限公司测序。所得序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对, 检验其可靠性。

将目的序列在 NCBI 数据库中进行序列比对, 下载相似度较高、且有代表性的 *Epichloë* 属和 *Neotyphodium* 属菌株序列, 选取 *Claviceps purpurea* ATCC20102 作为外群, 用 DNAssist 2.2 和 ClustalX 1.81 软件进行序列的多重比对和分析。运行 PAUP 4 beta 10、MrModeltest 2.3 选择合适的模型, 用 MrBayes 3.1.2 构建最大似然(Maximum likelihood, ML)树。

2 结果与分析

2.1 植物样品的采集、鉴定和内生真菌的检测

2012 年 7 月初, 从大连 2 个采样区采集早熟禾属植物, 植株较小, 簇生或成片生长。从 2 个地区的不同采样点共采集了样品 262 个(黄金山 82 个, 白玉山 180 个)。植株大多数生长于林缘、沟谷和山麓。高约 30–60 cm; 圆锥花序长圆形; 侧生小穗柄短; 小穗卵圆形, 具 2–5 小花; 外稃间脉明显, 无毛, 基盘密生长绵毛, 内稃等长或稍长于外稃, 脊具纤毛。根据花序和花器官的特征, 植物样品被鉴定为细叶早熟禾(*Poa angustifolia* L., 图 1A)。

染色后观察发现叶鞘中菌丝细长, 直径 2–3 μm, 粗细均匀, 多数平行于植物细胞长轴, 不交叉、不分叉, 少数弯曲, 在植物细胞间隙生长而不进入细胞(图 1B)。从 262 株细叶早熟禾样品中发现 150 株含菌, 总检出率约为 57.3%。

2.2 内生真菌菌株的分离

将表面消毒的植物茎秆置于 PDA 培养基在 25 °C 恒温培养箱中培养, 约 1–2 周后, 从茎秆两侧切口处长出白色菌落, 根据分离地点和菌落特征等进行筛选以及 3 次纯化, 共分离得到内生真菌

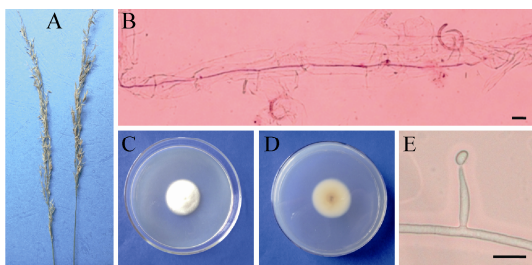


图1 细叶早熟禾花序及分离菌株 Plsb203 的基本形态特征
Figure 1 Morphological characteristics of *Poa angustifolia* and endophytic strain Plsb203

注:A:植物样品的花序特征;B:茎髓中的菌丝(标尺为 10 μm);
C:菌落正面;D:菌落反面(PDA, 21 d, 25 $^{\circ}\text{C}$);E:分生孢子及分生孢子梗(标尺为 10 μm).

Note: A: Inflorescence of *Poa angustifolia*; B: A fungal hypha within plant pith (bar=10 μm); C: Obverse of a colony; D: Reverse of a colony (PDA, 21 d, 25 $^{\circ}\text{C}$); E: A conidiophore and a conidium (bar=10 μm).

10 株。纯化菌株置于 PDA 斜面培养基上培养 3 周后,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,用于后续菌物学特征的调查。

2.3 分离菌株的形态学特征

来自细叶早熟禾的 6 个分离菌株(Plsb201、Plsb202、Plsb203、Plsb205、Plsb206、Plsb207)菌落正面白色棉质,质地紧密,气生菌丝短,与培养基连接紧密,菌落中央稍有隆起,边缘整齐,背面从中央到边缘黄色变浅(图 1C、D)。菌落在 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下的平均生长速度为每周 8.7 ± 1.4 mm (表 1)。

分生孢子梗长 20.9 ± 3.4 μm ,基部宽 2.0 ± 0.2 μm ,顶端宽 1.0 ± 0.1 μm ,垂直于菌丝,单生,基部多数有隔膜。分生孢子单个顶生,无色透明,肾型或卵圆形, (5.3 ± 0.3) $\mu\text{m}\times(2.9\pm 0.2)$ μm 。这些都符合 *Neotyphodium* 属真菌的典型特征(图 1E,表 1)。

2.4 分离菌株的系统发育学分析

以 5 个分离菌株(Plsb201、Plsb203、Plsb205、Plsb206、Plsb210)的总 DNA 为模板,利用 *tubB* 和 *tefA* 的通用引物扩增分离菌株的这两段基因,各扩增出 1 个目的片段, *tubB* 片段约 630 bp, *tefA* 片段约 640 bp,没有发现第二拷贝。将测序得到的序列通过 DNAssist 2.2 比对发现,在 5 个分离菌株中, *tefA* 和 *tubB* 片段都仅有 1 个碱基的差异。

将测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对,发现分离菌株的 *tubB* 片段与 *E. poae* 等的高度相似,而 *tefA* 片段和多种 *Epichloë* 属和 *Neotyphodium* 属内生真菌的片段高度相似。利用 DNAssist 2.2 比对分离菌株和本课题组已发表的 *E. liyangensis* 的 *tubB* 和 *tefA* 片段发现,分离菌株的 *tubB*、*tefA* 片段与 *E. liyangensis* 的第二拷贝高度相似,仅有 1–3 个碱基的差异。

运行 PAUP 4 beta 10、MrModeltest 2.3 软件后,选择构建 *tubB* 片段系统发育树的模型为 SYM+G, *tefA* 片段的模型为 SYM+I+G。利用 MrBayes 3.1.2 构建 *tubB* 和 *tefA* 的 ML 系统发育树。

根据 *tubB* 和 *tefA* 序列构建的 ML 系统发育树拓扑结构基本相似,并且主要的分支都具有较高的后验概率支持(图 2 和 3)。分离菌株都相互聚为一类并与 *N. huerfanum*、*E. liyangensis*、*N. tembladerae* 等内生真菌在 ETC (*E. typhina* complex)上形成 1 个分支,与序列比对结果一致。在根据 *tubB* 片段构建的 ML 树中,分离菌株与 *E. liyangensis*、*E. poae*、*N. tembladerae*、*N. huerfanum* 形成 1 个后验概率为 0.90 的独立分支。在根据 *tefA* 片段构建的 ML 树中,分离菌株与 *E. typhina*、*E. liyangensis*、*N. huerfanum*、*N. tembladerae*、*N. schardlii* 形成 1 个后验概率为 0.59 的独立分支。因此,细叶早熟禾分离菌株有可能为一个新的内生真菌类群(表 1,图 2、3)。

3 讨论

目前,国外已在 10 多种早熟禾属植物中发现内生真菌^[8-11,19]。而我国对早熟禾属植物内生真菌的研究尚不充分,至今成功分离并报道的含菌早熟禾属植物仅有 *P. pratensis* ssp. *pratensis* 一例^[14]。在我国东部地区,细叶早熟禾等早熟禾属植物一般作为林间的下繁草存在。其茎叶和植株茎秆细且质软,种子较小,很难从种子中检测到内生真菌,因而研究此类植物中的内生真菌往往需要利用细软的植物营养体茎秆。本研究首次从大连的细叶早熟禾的营养体中分离到典型的 *Neotyphodium* 属内生

表 1 供试菌株与相近内生真菌的菌物学特征的比较 Table 1 Mycological properties of strains in this study and closely related endophytes										
菌种 Species	宿主植物 Hosts	采集地 Sample sites	起源 Origin	分生孢子			分生孢子梗			参考文献 Reference
				Conidium (μm)			Conidiophore (μm)			
				长 Length	宽 Diameter	长 Length	基部宽 Width at base	顶宽 Size at tip	生长速度 Growth rate (mm/week)	
<i>Epichloë typhina</i>	<i>Dactylis glomerata</i>	瑞士	ETC	4.5–5.3	2.1–2.9	17.0–28.0	1.7–2.7	1.0	ND	White 等 1993 ^[10]
<i>Neotyphodium huerfaniae</i>	<i>Festuca arizonia</i>	北美洲	ETC	3.0–4.0	2.0–2.5	13.0–25.0	1.5–3.0	0.5–1.0	7.0 (22 °C)	White 等 1987 ^[22]
<i>N. tembladerae</i>	<i>P. huerca</i>	南美洲	EFE×ETC	4.0–10.0	2.0–4.0	10.0–31.0	1.5–3.5	0.5–1.8	4.9–7.0 (24 °C)	Cabral 等 1999 ^[11]
<i>E. liyangensis</i>	<i>P. pratensis</i> ssp. <i>pratensis</i>	中国	ETC×EBY	5.9–6.4	3.0–3.2	22.1–24.5	2.3–2.5	1.0	12.1–16.6 (24 °C)	Kang 等 2011 ^[14]
<i>E. poae</i>	<i>P. secunda</i> ssp. <i>juncifolia</i>	北美洲	ETC	3.7±0.4	2.3±0.3	13.6±2.5	1.6±0.2	0.6±0.2	11.7±0.4 (22 °C)	Tadych 等 2012 ^[8]
本研究菌株 Strains in this study	<i>P. angustifolia</i>	中国	ETC	5.3±0.3	2.9±0.2	20.9±3.4	2.0±0.2	1.0±0.1	8.7±1.4 (25 °C)	本研究

Note: ETC: *E. typhina*, *E. clarkii* and *E. sylvatica*; EBY: *E. bromicola* & *E. yangzii*; EFE= *E. festucae*; ND: Not determined.

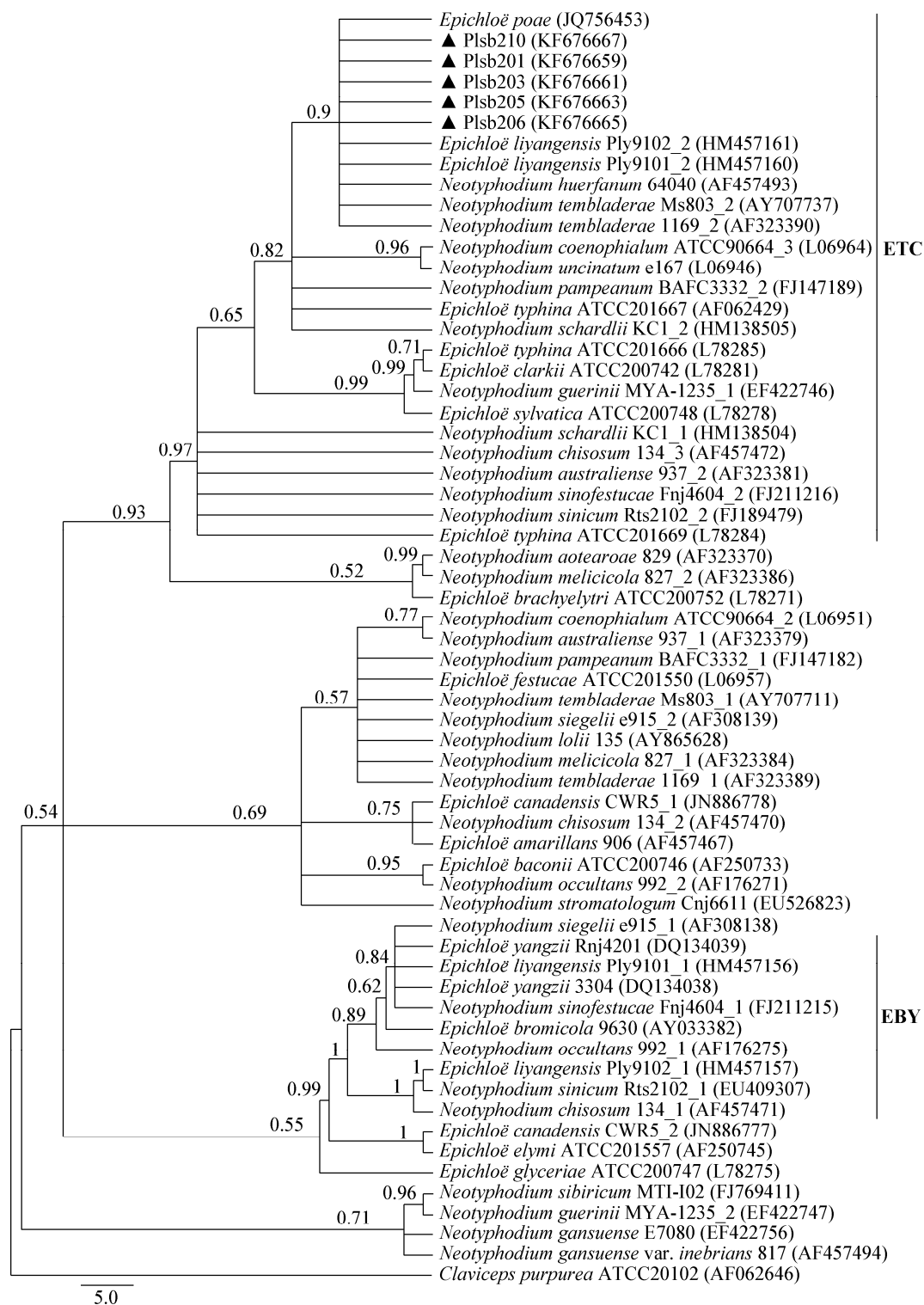


图2 基于 *tubB* 片段序列的部分 Epichloid 内生真菌的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree based on sequences of *tubB* fragment of some epichloid endophytes

注: ▲: 本研究菌株; 分支上的数字代表后验概率值; 标尺代表相对遗传距离。

Note: ▲: Strains in this study. Numbers on the branches are posterior probability. The bar represents the relatively genetic distance.

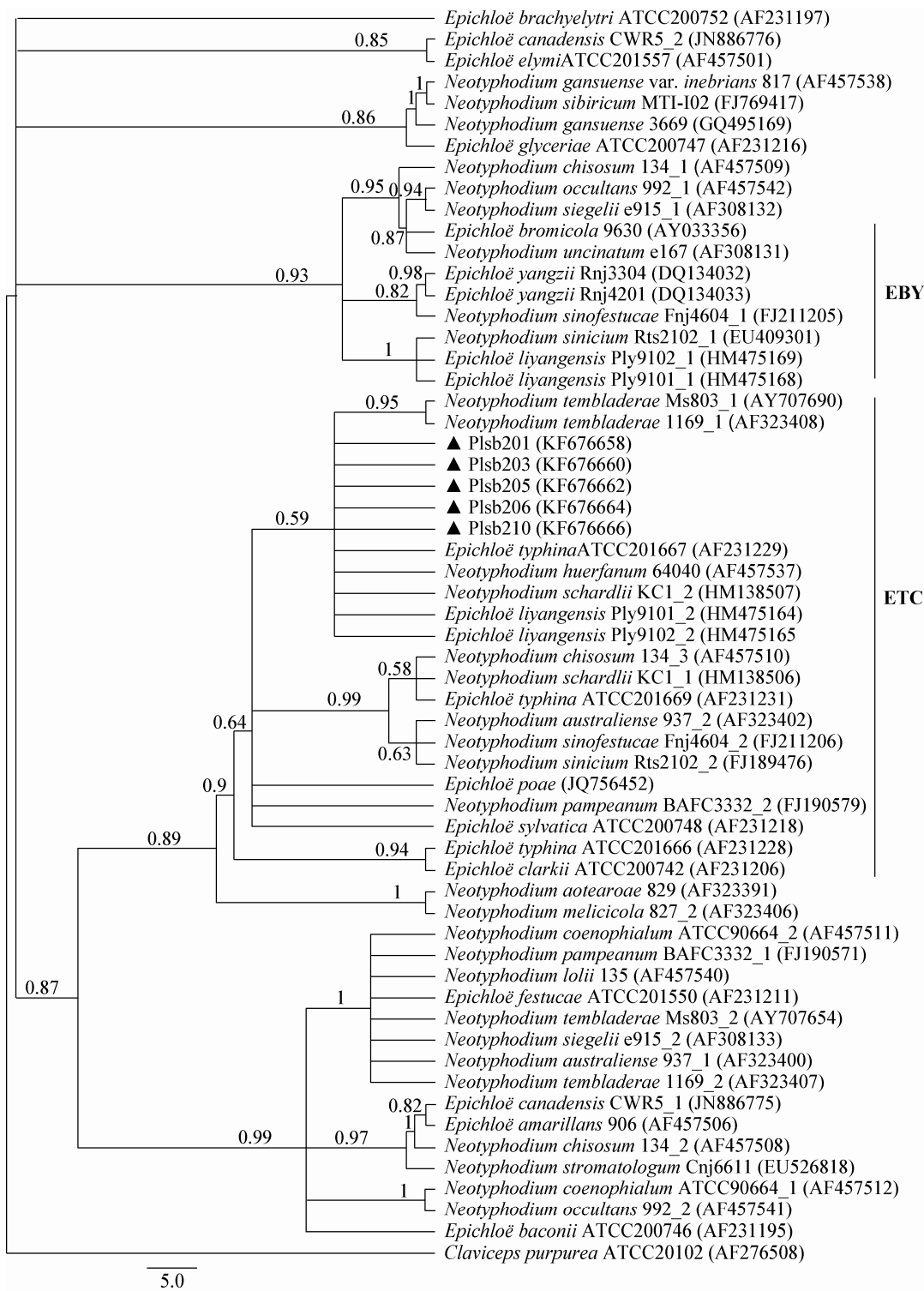


图 3 基于 *tefA* 片段序列的部分 *Epichloid* 内生真菌的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree based on sequences of *tefA* fragment of some epichloid endophytes

注：▲：本研究菌株；分支上的数字代表后验概率值；标尺代表相对遗传距离。

Note: ▲: Strains in this study. Numbers on the branches are posterior probability. The bar represents the relatively genetic distance.

真菌,对我国早熟禾内生真菌资源及其多样性研究具有一定的促进作用。

细叶早熟禾一般在干旱、寒冷的环境中也能够良好地生长,所以分布于中国的西部和北部多个省市^[15]。本研究所调查的地区,细叶早熟禾植物一般植株较小,簇生或成片生长,在2个采集区域的数十个采样点均没有发现含有子座的植物。但通过实验室镜检,发现这些表面无任何症状的植株的检出率都比较高,总检出率高达57.3%,表明这个内生真菌与宿主植物细叶早熟禾在长期的进化过程中形成了良好的共生关系。

禾本科植物内生真菌(*Epichloë* 属和 *Neotyphodium* 属真菌)具有比较严格的宿主特异性和宿主内在性,在一个生态系统中生活的一种宿主植物内一般只含有一种内生真菌。结合国内外禾本科植物内生真菌的研究报道我们发现同一宿主植物中分离得到的内生真菌性状比较类似,分类学地位也基本一样^[7,14-16]。因此,后续研究中我们往往选择代表性植株进行分离。本研究选取不同地点的细叶早熟禾含菌样品进行内生真菌的分离,但在分离过程中多种内外因素影响菌株的成功分离,例如,植物茎秆的新鲜程度,内生真菌生长缓慢,容易污染,从而导致本研究成功分离得到的内生真菌菌株较少。

在菌物学特征上,分离菌株和已报道的早熟禾属植物内生真菌有比较明显的区别。分离菌株的分生孢子和分生孢子梗比 *E. poae* 大,但生长速度却比 *E. poae* 慢,两者之间有显著的不同(表1)^[8]。与 *N. tembladerae* 相似,分离菌株分生孢子梗的基部常有隔膜,形态学特征也符合 *N. tembladerae* 的特征范围,但 *N. tembladerae* 具有广泛的宿主,而分离菌株目前仅在细叶早熟禾中观察到,也显示了两者之间的区别^[11]。与我国本土产的 *E. liyangensis* 的形态特征比较,分离菌株的分生孢子、分生孢子梗和生长速度都略小于 *E. liyangensis*,但菌落形态相似(图1)^[14]。总结已发表的 *Epichloë* 和 *Neotyphodium* 属内生真菌的生长速度,我们发现 *Neotyphodium* 属真菌的生长速度一般较 *Epichloë*

的小,而 *Neotyphodium* 属杂交种的分生孢子比 *Epichloë* 属和 *Neotyphodium* 属非杂交种的分生孢子大^[18]。结合这些特点,本研究分离菌株可能属于 *Neotyphodium* 非杂交种。

利用分离菌株的 *tubB* 和 *tefA* 片段构建系统发育树,发现分离菌株都处在 ETC 大支中,并且和 *E. liyangensis* 和 *N. tembladerae* 等几个种的一个拷贝聚在一类(图2和3)。*N. tembladerae* 是一个具有杂交起源的南美洲种,它能够在多个植物宿主中定殖,目前仅分布于南美^[11,18-19]。尽管分离菌株与 *N. tembladerae* 的一个拷贝聚在一类,但是由于菌株的地理分布和宿主的差异,以及遗传上的差异,推测分离菌株并不是 *N. tembladerae*。*N. huerfanum* 和 *N. schardlii* 在基于 *tefA* 的系统发育树上也与分离菌株聚在一类,但 *N. huerfanum* 的宿主植物是 *F. arizonia*, *N. schardlii* 则是由 *E. typhina* 菌株种群间通过种内杂交而来。*E. typhina* 是一个形态学种,且宿主广泛。基于系统发育学特征和宿主植物的差异,表明分离菌株不是 *E. typhina*、*N. huerfanum* 及 *N. schardlii*^[20-22]。*E. liyangensis* 的 *tubB* 和 *tefA* 片段分别有两个拷贝,分属于 EBY、ETC 大支,并且可以在宿主植物上形成子座,是本课题组报道的第一个具有杂交起源的 *Epichloë* 属真菌^[14]。分离菌株与 *E. liyangensis* 聚在一类,表明分离菌株与 *E. liyangensis* 可能具有一个共同的 *Epichloë* 属祖先。但分离菌株只分别扩增到一个 *tubB* 和 *tefA* 片段,说明分离菌株可能是由一个 *Epichloë* 属真菌逐渐丢失有性世代的方式进化而来^[23-24]。

由于越来越多的内生真菌新种被发现,传统的形态学特征已经不适用于禾本科植物内生真菌的分类,而是根据分离菌株的生理生化、交配型、宿主特异性、地理分布和系统发育学等综合特征作为判断依据^[23,25-26]。已报道的早熟禾植物内生真菌在形态上差异显著(表1);在系统发育学上则多数起源于 ETC (表1,图2、3)。因此,鉴别早熟禾属植物内生真菌通常也根据经典分类学特征和形态发育学特征,兼顾宿主植物的种类和地理分布进行综合判

断。

在长期的进化过程中, 内生真菌与禾本科植物形成了共同进化的共生体。多数内生真菌具有宿主特异性, 即一种内生真菌只能侵染并存在于少数特定的宿主植物^[2]。早熟禾属作为禾本科中一个较大的属, 其内部又分为多个组, 其中 *P. pratensis* 和 *P. angustifolia* 属于早熟禾组 (Sect. *Poa*), *P. nemoralis* 属于林地组 (Sect. *Nemorales* Stapf), *P. trivialis* 属于砾地组 (Sect. *Glareosae* Stapf), 不同组植物之间的生理和遗传差异以及不同植物地理分布的差异, 为本研究分离菌株可能是一个新类群提供了依据。在我国, *P. pratensis* 和 *P. angustifolia* 在华北、东北、华东、西北、西南等多个地区都有分布, 但 *P. angustifolia* 在华东的江苏、安徽, 华中的湖南、湖北和西南的贵州等省则没有分布。而已报道的 *E. liyangensis* 则分离自江苏溧阳市的 *P. pratensis* ssp. *pratensis*, 在我国其他省市还未见报道, 分离菌株与 *E. liyangensis* 的宿主地理差异表明本研究分离菌株可能不同于 *E. liyangensis*。而分离菌株与已报道的 *E. poae* 和 *N. tembladerae* 内生真菌具有不同的大陆地理分布, 即使分离菌株与其他 3 个已报道的早熟禾属内生真菌都部分起源 ETC 中, 内生真菌也会在漫长的进化过程中发生形态和基因方面的变化, 而可能成为一个新的类群。

研究国内已发表内生真菌的系统发育学特征, 发现南方地区的 *E. yangzii* 在 EBY 分支上, *E. liyangensis*、*N. sinicum*、*N. sinofestuca* 都是 EBY 与 ETC 的杂交后代, *N. stromatolungum* 独立形成一个小支^[14-16,27-29]。北方内生真菌 *N. gansuense* 和 *N. sibiricum* 则独立分布于一个不同于 EBY 和 ETC 的亚支上(图 2 和 3)^[5,24]。本研究分离菌株的系统发育学特征显示该分离菌群是单拷贝, 不具有杂交起源的遗传背景, 表明本研究分离菌株与我国本土已报道内生真菌存在差异, 并提示我国南北方禾本科内生真菌群具有不同的物种起源。

形态学特征、地理分布以及宿主特性的差异等

经典分类学特征显示, 本研究菌群与国外已报道早熟禾内生真菌、遗传上比较近缘的 *N. huerfanum* 以及我国原产的禾本科内生真菌菌群之间都存在着比较明显的区别^[8,10-11,14], 因此大连的细叶早熟禾内生真菌有可能为一个新的内生真菌类群。

近年来我国禾本科内生真菌资源被不断的挖掘和研究, 展示了我国禾本科植物内生真菌的普遍性和资源多样性。本研究不仅扩大了我国本土禾本科植物内生真菌的范围, 而且为如何利用内生真菌提高早熟禾属植物在畜牧业和草坪业上的经济效益奠定了基础。通过对内生真菌系统发育学特征的研究, 发现我国南北方内生真菌起源的差异, 这可能和地理分布有关, 值得我们进一步研究探索。

参 考 文 献

- [1] Schardl CL, Leuchtmann A, Spiering MJ. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes[J]. Annual Review of Plant Biology, 2004, 55: 315-340.
- [2] Schardl CL, Scott B, Florea S, et al. *Epichloë* endophyte: Clavicipitaceous symbionts of grasses[A]/Deising H. The Mycota V: Plant Relationships[M]. Verlag Berlin Heidelberg: Springer, 2009: 275-306.
- [3] Bush LP, Wilkinson HH, Schardl CL. Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbioses[J]. Plant Physiology, 1997, 114(1): 1-7.
- [4] 陈世苹, 高玉葆. 内生真菌与禾本科植物之间的关系及其生态学意义[J]. 生态学杂志, 2000, 19(5): 52-57.
- [5] Li CJ, Nan ZB, Paul VH, et al. A new *Neotyphodium* species symbiotic with drunken horse grass (*Achnatherum inbrians*) in China[J]. Myotaxon, 2004, 90(1): 141-147.
- [6] 王志伟, 纪燕玲, 陈永敢, 等. 禾本科植物内生真菌资源及其物种多样性[J]. 生态学报, 2010, 30(17): 4771-4781.
- [7] Charlton ND, Craven KD, Hopkins AA, et al. *Epichloë canadensis*, a new interspecific epichloid hybrid symbiotic with Canada wildrye (*Elymus canadensis*)[J]. Mycologia, 2012, 104(5): 1187-1199.
- [8] Tadych M, Ambrose KV, Bergen MS, et al. Taxonomic placement of *Epichloë poae* sp. nov. and horizontal dissemination to seedlings via conidia[J]. Fungal Diversity, 2012, 54: 117-131.
- [9] Schardl CL, Leuchtmann A, Tsai HF, et al. Origin of a fungal symbiont of perennial ryegrass by interspecific hybridization of a mutualist with the ryegrass choke pathogen, *Epichloë typhina*[J]. Genetics, 1994, 136(4): 1307-1317.
- [10] White JF. Endophyte-host associations in grasses. XIX. A systematic study of some sympatric species of *Epichloë* in England[J]. Mycologia, 1993, 85(3): 444-455.

- [11] Cabral D, Cafaro MJ, Saidman B, et al. Evidence supporting the occurrence of a new species of endophyte in some South American grasses[J]. Mycologia, 1999, 91(2): 315-325.
- [12] 南志标, 李春杰. 禾草-内生真菌共生体在草地农业系统中的作用[J]. 生态学报, 2004, 24(3): 605-616.
- [13] Wei YK, Gao YB, Xu H, et al. Occurrence of endophytes in grasses native to northern China[J]. Grass and Forage Science, 2006, 61(4): 422-429.
- [14] Kang Y, Ji YL, Zhu KR, et al. A new *Epichloë* species with interspecific hybrid origins from *Poa pratensis* ssp. *pratensis* in Liyang, China[J]. Mycologia, 2011, 103(6): 1341-1350.
- [15] 傅立国, 陈潭清, 郎楷永, 等. 中国高等植物(第十二卷)[M]. 青岛: 青岛出版社, 2009: 701-714.
- [16] Li W, Ji YL, Yu HS, et al. A new species of *Epichloë* symbiotic with Chinese grasses[J]. Mycologia, 2006, 98(4): 560-570.
- [17] 王永, 纪燕玲, 王晗, 等. 禾本科植物内生真菌研究13: 禾本科植物内生真菌的分离鉴定及基因组 DNA 的快速提取[J]. 南京农业大学学报, 2012, 35(3): 52-56.
- [18] 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.
- [19] Iannone LJ, Novas MV, Young CA, et al. Endophytes of native grasses from South America: biodiversity and ecology[J]. Fungal Ecology, 2012, 5(3): 357-363.
- [20] Moon CD, Craven KD, Leuchtmann A, et al. Prevalence of interspecific hybrids amongst asexual fungal endophytes of grasses[J]. Molecular Ecology, 2004, 13(6): 1455-1467.
- [21] Ghimire SR, Rudgers JA, Charlton ND, et al. Prevalence of an intraspecific *Neotyphodium* hybrid in natural populations of stout wood reed (*Cinna arundinacea* L.) from eastern North America[J]. Mycologia, 2011, 103(1): 75-84.
- [22] White JF, Cole GT, Morgan-Jones G. Endophyte-host associations in forage grasses. VI. A new species of *Acremonium* isolated from *Festuca arizonica*[J]. Mycologia, 1987, 79: 148-152.
- [23] Moon CD, Guillaumin JJ, Ravel C, et al. New *Neotyphodium* endophyte species from the grass tribes Stipeae and Meliceae[J]. Mycologia, 2007, 99(6): 895-905.
- [24] 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.
- [25] Leuchtmann A, Schardl CL. Mating compatibility and phylogenetic relationships among two new species of *Epichloë* and other congeneric European species[J]. Mycological Research, 1998, 102: 1169-1182.
- [26] Moon CD, Miles CO, Jarlfors U, et al. The evolutionary origins of three new *Neotyphodium* endophyte species from grasses indigenous to the Southern Hemisphere[J]. Mycologia, 2002, 94(4): 694-711.
- [27] Kang Y, Ji YL, Sun XH, et al. Taxonomy of *Neotyphodium* endophytes of Chinese native *Roegneria* plants[J]. Mycologia, 2009, 101(2): 211-219.
- [28] 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.
- [29] Chen YG, Ji YL, Yu HS, et al. A new *Neotyphodium* species from *Festuca parvigluma* Steud. grown in China[J]. Mycologia, 2009, 101(5): 681-685.