

部分禾本科植物 *Neotyphodium* 属 真菌的分布和形态特征

亢 燕, 纪燕玲, 詹漓晖, 孙相辉, 李 伟, 于汉寿, 王志伟

(南京农业大学生命科学院, 江苏 南京 210095)

摘要:2006年3—7月从上海、江苏、安徽和山西等省(市),采集鹅观草 *Roegneria*、早熟禾 *Poa*、黑麦草 *Lolium*、羊茅 *Festuca*、雀麦 *Bromus* 和拂子茅 *Calamagrostis* 等冷季型禾本科植物共计 1 487 株。内生真菌的总检出率为 54.3%, 江苏省和山西省禾本科植物的检出率分别高达 55.5% 和 69.0%。这些省市的许多禾本科植物都含有 *Neotyphodium* 属真菌, 说明 *Neotyphodium* 属真菌在我国分布广泛, 资源丰富。以分离自纤毛鹅观草 *R. ciliaris* 12 株 *Neotyphodium* 属真菌为材料, 详细研究了我国干旱地区 *Neotyphodium* 属真菌的形态学特征: 在 PDA 平板上生长很快, 21 d 生长 12.5~37.2 mm; 分生孢子梗长 14.9~23.2 μm , 基部宽 1.9~3.1 μm , 顶端小于 1 μm , 通常基部或近基部有隔膜; 分生孢子无色透明, 卵圆形或肾形, 单个顶生, (4.6~5.9) μm × (2.1~3.4) μm , 与其它已知 *Neotyphodium* 属真菌形态差异显著, 需要进行更深入的研究。

关键词: 内生真菌; 禾本科植物; 分生孢子

中图分类号: Q949.32

文献标识码: A

文章编号: 1001-0629(2008)12-0111-06

*1 内生真菌是指在植物体内完成其生活史的部分或全部, 但又不引起明显病征的微生物。目前禾本科植物内生真菌的研究主要集中在分离自冷季型禾本科植物的 *Epichloë* 属真菌和 *Neotyphodium* 属真菌, 它们统称为 *Epichloë endophyte*^[1]。*Epichloë* 属真菌通常在宿主植物的体表形成子座; *Neotyphodium* 属真菌则不给宿主带来任何症状, 仅有少数的 *Neotyphodium* 属真菌在宿主的体表形成无有性孢子的子座^[2]。*Neotyphodium* 属真菌主要分布在温带地区, 与宿主互利共生, 宿主植物为它提供光合产物和矿物质, 而它终生以菌丝形式定居于宿主植物体内, 通过宿主植物种子进行垂直传播, 不能交叉感染其它植物^[1]。

Neotyphodium 属目前有 17 个种^[3]。它们在 PDA 培养基上形成白色绒毛状菌落, 并在气生菌丝上形成柠檬形或镰刀形分生孢子^[4]。*Neotyphodium* 属真菌给宿主植物带来很多益处, 如抗旱抗寒、抗病虫害和促生长分蘖等^[5-7], 内生真菌作为一种新型的微生物资源在国际上正日益受到重视, 并被广泛应用于牧草、草坪和水土保持等

领域^[5,8,9]。

我国幅员辽阔, 禾本科植物资源丰富, 约有 190 多属。西北草原的醉马草 *Achnatherum inebrians* 中发现了 *Neotyphodium* 属内生真菌^[10], 依据其形态学特征命名为 *N. gansuense*^[11]; 在对我国北方草原最近的调查中发现 11 属 25 种禾草中含有内生真菌^[12]。目前, 对禾本科植物内生真菌的调查在我国草原以外的区域开展还不够充分。

此前, 在长江和黄河之间的江苏省苏北地区^[13] 以及山东省东营地区^[14] 的 4 属 7 种以上禾本科植物中发现了 *Neotyphodium* 属内生真菌。研究是关于我国禾本科植物内生真菌系列报道^[2,14-16] 的一部分, 对我国黄河以北以及长江以南的部分农耕区域以及城市绿地中的禾本科植物进行了内生真菌资源的调查。

1 材料和方法

1.1 植物样品的采集、保存和鉴定

2006年3—7月从我国上海, 江苏南京、常州, 安徽广德、

收稿日期: 2007-12-17
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070019; 30670008)
作者简介: 亢燕(1982-), 女, 山西孝义人, 在读硕士生。
通讯作者: 王志伟 E-mail: zwwang@njau.edu.cn

黄山、池州、芜湖,山西孝义3省8市采集冷季型禾本科植物。将植物样品从穗轴或茎基部剪断,取其地上部分,或连根一起采集。样品装于信封,或用报纸包裹,尽快运返实验室后,立即处理或于4℃低温保存,部分样品整株移栽钵钵保存。依据叶、花序、小穗形态等植物分类学特征,参照《中国植物志》^[17]进行植物的鉴定。

1.2 内生真菌的检测 采用孟加拉红染色法^[16]对植物样品的叶鞘、茎或种子等部分进行制片观察。用镊子撕取叶鞘内表皮,或将茎切开,刮取髓组织,在碱性孟加拉红染色液(含1%孟加拉红1 mol/L的NaOH溶液)中染色后,在光学显微镜下检测。将种子在孟加拉红染色液中浸泡12 h除去稃片后检测。

1.3 内生真菌的分离、纯化和保藏 以镜检含有内生真菌的植株样品为材料进行分离。依次经75%酒精、1%氯活性次氯酸钠、75%酒精、无菌水表面消毒后,直接将叶鞘、茎或种子等植物组织置于PDA培养基上,于25℃恒温培养直至长出真菌菌落。

将菌落上产生的孢子用无菌水洗下,获得分生孢子的悬浮液。将孢子悬浮液用无菌水稀释到150~200个/mL后,取200 μL涂布在PDA培养基上,于25℃恒温培养至形成菌落。从形成的单个分散的菌落上移植菌丝体培养。如此反复,纯化3次。

将纯化的菌株于PDA斜面培养,4℃冷藏保存备用。

1.4 真菌的培养特征调查 将纯化的菌株在PDA培养基上25℃培养2周后,挑取菌落边缘菌丝,制作水浸片在光学显微镜下观察、测量并记

录分生孢子及分生孢子梗等形态及大小,每株菌20个重复。

将纯化的菌株在PDA培养基上25℃培养3周后观察菌落形状、正反面的颜色、质地、中央是否隆起等特征,并测量其菌落直径,记录生长速度,每株菌5个重复。

2 结果与分析

2.1 植物样品的采集和鉴定 从3省8市采集禾本科植物共计1487株。这些样品中,30份是植株,116份是植物茎秆,其余1341份都是整个花序,其中绝大部分都是带有成熟种子的花序。1487个样品中,1371株表面无任何征状,116株带有真菌子座(表1)。

根据植株健康分蘖的叶、花序、小穗形态特征,植物样品绝大部分只鉴定到属,其中包括小麦族中的鹅观草 *R. kamoji* (图1A)、竖立鹅观草 *R. japonensis*、纤毛鹅观草 *R. ciliaris* 和未鉴定鹅观草属植物^[17];雀麦族中的雀麦属植物 *Bromus* spp. (图1B);早熟禾族中的早熟禾属植物 *Poa* spp.、黑麦草属植物 *Lolium* spp. (图1C)和小颖羊茅 *Festuca alata*;燕麦族中的拂子茅属植物 *Calamagrostis* sp.;剪股颖族的剪股颖属植物 *Agrostis* spp. 和短柄草族的短柄草属植物 *Brachypodium* spp.。其中除黑麦草属植物以外,都是采样地点常见的本土植物。

2.2 内生真菌的分布 根据禾本科植物内生真菌的典型特征,在3省8市的1487个禾本科植物样品中,共检出825个含有内生真菌,检出率达54.3%,江苏省、安徽省和山西省的禾本科植物内生真菌的检出率分别为55.5%、49.7%和69.0%(表1)。

表1 不同省(市)的禾本科植物样品采集量及其中的内生真菌检出率

采集地	样品数(株)	检出数(株)	检出率(%)	长有子座的样品数量(株)
江苏	986	549	55.5	12E(R) + 7e(P) + 26e(C)
安徽	378	188	49.7	71E(B)
山西	113	78	69.0	—
上海	10	10	100.0**	—
合计	1487	825	54.3	116

注:E表示样品中带有成熟的真菌子座;e表示样品中带有未成熟的真菌子座;R表示鹅观草属植物;C表示拂子茅属植物;P表示早熟禾属植物;B表示短柄草属植物;“—”表示未检测到子座;**表示采集量较少,无法计算出合理的检出率。



植株的花序

注:

A

为

鹅

观

草

属

植

物;

B

为

雀

麦

属

植

物;

C

为

黑

麦

草

属

植

物。

不同属植物之间 *Neotyphodium* 属真菌的含菌率有差异。鹅观草属植物、早熟禾属植物和小颖羊茅的检出率都在 60% 以上,而黑麦草属植物和雀麦属植物的含菌率则分别为 20.1% 和 33.9% (表 2)。

表 2 不同种属禾本科早熟禾亚科植物的采集地和 *Neotyphodium* 属内生真菌的检出率

宿主类群		样品数 (株)*	检出率 (%)	采集地
小麦族	鹅观草	824	61.4	安徽黄山、池州、芜湖、宣城,江苏南京、常州,山西孝义,上海植物园
早熟禾族	早熟禾	107	60.7	安徽黄山、池州,江苏南京
	黑麦草	164	20.1	安徽黄山、池州,江苏南京、常州
	小颖羊茅	50	66.0	江苏南京
雀麦族	雀麦	115	33.9	安徽黄山、池州,江苏南京
燕麦族	拂子茅	21	100.0	江苏南京
其它	其它植物*	90	8.9	安徽黄山,江苏南京、常州
合计		1 371	51.4	

注: * 表示在目前还没有鉴定出的禾本科植物和采集量较少(≤ 10)的植物,包括翦股颖族的翦股颖属植物 *Agrostis* spp. 和短柄草族短柄草属植物等。

2.3 内生真菌在植物组织内的形态特征

内生真菌系统分布于植物地上部分的叶片、叶鞘(图 2A,图 2B)、茎秆和种子(图 2C)等组织器官中。在茎和叶鞘中菌丝体宽约 $2\ \mu\text{m}$,细长,单行,粗细均匀,有隔膜,很少分叉,微带弯曲,平行于细胞长轴排列在细胞间隙中(图 2);在种子中,菌丝体分布在糊粉层细胞之间,菌丝粗细均匀,弯曲度较大。并且不同属的植物中菌丝弯曲度有所不同(图 2A,图 2B)。到目前为止没有发现菌丝体穿透植物细胞或细胞层,具有禾本科植物内生真菌的典型特征。

2.4 菌株的分离、培养及其特征 从纤毛鹅观草中共分离到 12 株真菌菌株(Rxy6101—6112)。通过 3 次单孢分离后得到纯化菌株。纯化菌株在 PDA 培养基上 $25\ ^\circ\text{C}$ 培养 2~3 周。

分离菌株(12 株)的菌落直径为 $12.5\sim 37.2\ \text{mm}$,正白色,棉质,质地紧密或疏松,中央隆起,背面浅褐色至深褐色。根据菌落形态可分为 3 种类型,A 型:菌株 Rxy6102、Rxy6105 和 Rxy6106,

菌落边缘整齐,质地疏松,气生菌丝短,紧贴培养基,背面中央色深,四周色浅(图 3A),生长速度最快(21 d 生长 $31.2\sim 37.2\ \text{mm}$);B 型:菌株 Rxy6103、Rxy6104、Rxy6107—Rxy6112,菌落边缘整齐,质地紧密,气生菌丝较长(图 3B),生长速度较慢(21 d 生长 $12.5\sim 32.5\ \text{mm}$);C 型:菌株 Rxy6101,菌落边缘不整齐,质地疏松,气生菌丝短,紧贴培养基(图 3C),生长速度较快(21 d 生长 $21.7\sim 26.8\ \text{mm}$)。

分生孢子无色透明,卵圆形或肾形,单个顶生。分生孢子梗呈瓶梗状,垂直于菌丝,单生,通常基部或近基部有隔膜(图 3D)。A 型菌落和 B 型菌落的分生孢子和分生孢子梗大小相似,分生孢子 $(4.6\sim 5.3)\ \mu\text{m}\times(2.1\sim 3.4)\ \mu\text{m}$,分生孢子梗 $(14.9\sim 23.2)\ \mu\text{m}\times(1.9\sim 3.1)\ \mu\text{m}$ 。C 型菌落的分生孢子和分生孢子梗大小比 A 和 B 型菌落大,分生孢子 $5.9\ \mu\text{m}\times 3.1\ \mu\text{m}$,分生孢子梗 $23.2\ \mu\text{m}\times 2.7\ \mu\text{m}$ 。这些特征,都是 *Neotyphodium* 属真菌的典型特征。



植物组织中的形态

注:

A
为
黑
麦
草
叶
鞘;
B
为
鹅
观
草
叶
鞘;
C
为
鹅
观

落、分生孢子梗和分生孢子的形态(PDA, 25 °C, 21 d)

注: A、B、C 分别为 Rxy6102、Rxy6103 和 Rxy6101 的菌落形态类型; D 为分生孢子梗和分生孢子, 标尺为 10 μm。

A 型菌株的生长速度比目前已知的 17 种 *Neotyphodium* 属真菌稍快^[4,12]。B 型菌株的生长速度与 *N. chilense*、*N. gansuense*、*N. huerfannum*、*N. siegelii*、*N. starrii*、*N. tembladerae* 和 *N. typhinum* 相似, 但分生孢子和分生孢子梗大小仅与 *N. tembladerae* 相似^[12]。C 型菌株生长速度与 *N. gansuense* 相似, 但分生孢子和分生孢子梗大小都比 *N. gansuense* 大^[12]。纤毛鹅观草的 12 株 *Neotyphodium* 属真菌与已知的 *Neotyphodium* 属真菌形态学差异比较显著。

3 讨论和结论

在我国长江以南, 黄河以北的 3 省 8 市的 6 族 8 属以上的禾本科植物 1 487 株中, *Epichloë endophyte* 的检出率高达 54.3% (表 1), 和之前的研究结果^[2,13-16] 相吻合, 表明我国内生真菌资源极为丰富, 需要受到广泛的关注, 进行更加深入的研究利用。其中不到 8% 的鹅观草属、拂子茅属、短柄草属和早熟禾属等植物上着生子座, 绝大部分植株(1 371 株)中含有的内生真菌和 *Neotyphodium* 属真菌的表型相一致(表 1)。*Neotyphodium* 属真菌相对于产生子座的 *Epichloë* 属真菌在我国分布更加广泛。

研究着重调查了早熟禾亚科中的部分禾本科植物的内生真菌的分布, 包括小麦族、早熟禾族、雀麦族、燕麦族、短柄草族和翦股颖族的 6 族 8 属以上的禾本科植物, 发现无论是在黄河以北的山西还是长江以南的苏皖沪, 无论是苏皖的农村、山西的山坡、还是上海的植物园, 禾草中普遍含有内生真菌, 而且检出率都相当高(表 1), 研究结果发现我国的禾本科植物内生真菌资源丰富。山西省和江苏省的禾本科植物内生真菌的检出率分别高达 69.0% 和 55.3% (表 1), 说明气候干旱地区和气候湿润地区的禾本科植物内生真菌的检出率相差不大, 降水量不是影响禾本科植物内生真菌分布的主要因素。

在 3 省 8 市不产生子座的 1 371 株植物的叶片、叶鞘、茎秆、种子中都检测到典型的内生真菌的菌丝体(表 1, 2)。这些菌丝体生活在宿主细胞间隙, 不破坏宿主细胞(图 2)。但必须指出的是, 这些内生真菌还刚刚被发现, 其生理功能, 特别是对宿主植物和草食动物的作用以及在生态中的作用还完全没有研究。在很多地区, 这些禾草被当作草食牲畜的饲草使用, 然而这些禾草中的内生真菌是否含有毒素, 是值得研究的重要课题。

内生真菌的检出率在植物种属之间存在明显的差异, 拂子茅属、鹅观草属、早熟禾属植物以及小颖羊茅的检出率比雀麦属和黑麦草属植物高(表 2), 这些禾草中的内生真菌很可能是不同的种类。*Neotyphodium*-*Roegneria* 组合在我国分布比较广, 经燕玲、李伟等已对我国南方地区的鹅观草属植物中的内生真菌进行了一些研究^[13,16,18], 并继续研究干旱地区鹅观草属植物内生真菌。通过对纤毛鹅观草中的分离菌株的特征研究发现, 分离菌株生长速度各异, 有丰富的形态多样性, 且和 17 种已知 *Neotyphodium* 属真菌的差别很大^[3,11]。已知的 *Neotyphodium* 属真菌主要来自臭草族、燕麦族、针茅族和早熟禾族植物, 大多分布在欧洲、美洲和大洋洲, 只有 *N. gansuense* 产自亚洲^[11]。因此, 应结合分子系统学数据进一步确定纤毛鹅观草(小麦族)的 *Neotyphodium* 属真菌的分类地位。

在长江流域的上海、江苏、安徽和黄河流域的山西进行的冷季型禾本科植物内生真菌的调查, 显示了我国本土植物中丰富的内生真菌资源, 以及内生真菌资源丰富的生物多样性。这些资源的分布和微生物学特征研究, 对于有效地开发和利用这些资源有着重要的积极意义。

致谢: 感谢上海秦祥堃研究员在植物鉴定方面的指导和帮助!

参考文献

- [1] Schardl C L, Leuchtman A, Spiering M J. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes[J]. Annual Review of Plant Biology, 2004, 55: 315-340.
- [2] White J F Jr, Morrow A C, Morgan-Jones G. Endophyte-host associations in forage grasses. IX. Concerning *Acremonium typhinum*, the anamorph of *Epichloë typhina*[J]. Mycotaxon, 1987, 29: 489-500.
- [3] Moon C D, Guillaumin J J, Ravel C, et al. New *Neotyphodium endophyte* species from the grass tribes Stipeae and Meliceae[J]. Mycologia, 2007, 99(6): 895-905.
- [4] Glenn A E, Bacon C W, Price R, et al. Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications[J]. Mycologia, 1996, 88(3): 369-383.
- [5] Hoveland C S. Importance and economic significances of the *Acremonium endophytes* to performance of animals and grass plant[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 1993, 44: 3-12.
- [6] 李飞, 李春杰. 内生真菌对禾草类植物抗旱性的影响[J]. 草业科学, 2006, 23(3): 57-62.
- [7] 吴欣明, 王运琦, 刘建宁, 等. 羊茅属植物耐盐性评价及其对盐胁迫的生理反应[J]. 草业学报, 2007, 16(6): 67-73.
- [8] Rolston M P, Stewart A V, Latch G C M, et al. Endophytes in New Zealand grass seeds: occurrence and implications for conservation of grass species[J]. New Zealand Journal of Botany, 2002, 40(3): 365-372.
- [9] 廖芳, 刘跃庭, 崔铁军, 等. 苇状羊茅与多年生黑麦草内生真菌菌丝基因组 DNA 提取的优化及 PCR 初步检测[J]. 草业科学, 2006, 23(6): 22-26.
- [10] Bruehl G W, Kaiser W J, Klenin R E. An endophyte of *Achnatherum inebrians*, an intoxicating grass of northwest China[J]. Mycologia, 1994, 86(6): 773-776.
- [11] Li C J, Nan Z B. A new *Neotyphodium* species symbiotic with drunken horse grass (*Achnatherum inebrians*) in China[J]. Mycotaxon, 2004, 90(1): 141-147.
- [12] Wei Y K, Gao Y B, Xu H, et al. Occurrence of endophytes in grasses native to northern China[J]. Grass and Forage Science, 2006, 61: 422-429.
- [13] 纪燕玲. 鹅观草植物内生真菌的基础研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2002. 29-51.
- [14] 王志伟, 王世梅, 纪燕玲, 等. 中国禾本科植物内生真菌的研究——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): 60-63.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第 9 卷第 3 分册)[M]. 北京: 科学出版社, 1987. 59-104.
- [18] Li W, Ji Y L, Yu H S, et al. A new species of *Epichloë* symbiotic with Chinese grasses[J]. Mycologia, 2006, 98(4): 560-570.

Distribution and morphological characters of *Neotyphodium endophytes* in some grasses

KANG Yan, JI Yan-ling, ZHAN Li-hui, SUN Xiang-hui, LI wei, YU Han-shou, WANG Zhi-wei
(College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Distribution of the *Epichloë endophytes* and their host plants were surveyed in Shanghai, Jiangsu, Anhui and Shanxi from March to July 2006. In total 1,487 grass plants, 54.3% was detected to be infected by *Epichloë endophytes*. In Jiangsu and Shanxi, the infection rates were as high as 55.5% and 69.0%, respectively. *Neotyphodium endophytes* were detected in these grasses grown in