内蒙古中东部草原羽茅内生真菌的遗传多样性

魏宇昆 高玉葆* 李川 许华 任安芝

(南开大学生命科学学院 天津 300071)

摘要 该文从形态学和基因水平上对内蒙古中东部草原 4 个羽茅(*Achnatherum sibiricum*)种群所含的 27 个内生真菌(*Neotyphodium*)菌株的遗传多样性进行了研究。结果表明羽茅内生真菌在形态学和基因水平上均表现出较高的遗传多样性。在 PDA 培养基上,根据菌落颜色、质地、生长速率和分生孢子外观等特征,可分为 4 个形态型。西乌旗、霍林郭勒和定位站 3 个种群所含的内生真菌菌落具有相似的生长特性和外观,而羊草(*Leymus chinensis*)样地种群无论从菌落外观和质地的多样性,还是遗传多样性指数均高于其它 3 个样地。用 20 个随机引物对这 27 株内生真菌基因组 DNA 进行 RAPD 分析,共检测到 463 个位点,其中 461 个为多态位点,多态位点百分率达 99.6%。特有位点 93 个,占 20.1%。Nei 基因多样性指数 h 和 Shannon 多样性指数 I 分别为 0.238 0 和 0.387 0;多数菌株间的遗传一致度较低而遗传距离较大,在 DNA 水平上存在较显著的遗传变异。基于 Nei 无偏遗传距离和 UPGMA 法的聚类分析结果将 27 株内生真菌分为 7 组,并且与形态型的划分基本一致,RAPD 分析方法提高了内生真菌类群划分的可靠性。

关键词 羽茅 内生真菌 *Neotyphodium* 形态型 RAPD 遗传多样性

GENETIC DIVERSITY OF NEOTYPHODIUM ENDOPHYTES ISOLATED FROM ACHNATHERUM SIBIRICUM POPULATIONS IN MID- AND EASTERN INNER MONGOLIA STEPPE, CHINA

WEI Yu-Kun GAO Yu-Bao* LI Chuan XU Hua and Ren An-Zhi

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

Abstract Background and Aims The fungal endophytes in grasses grow intercellularly and systemically in aboveground plant tissues. Vertically transmitted asexual endophytes (*Neotyphodium*) forming asymptomatic infections of cool-season grasses have been repeatedly derived from sexual species (*Epichloë*) that abort host inflorescences. The phylogenetic distribution of seed-transmitted endophytes is strongly suggestive of co-cladogenesis with their hosts. Endophytes are considered plant mutualists: they receive nutrition and protection from the host plant while the host plant may benefit from enhanced competitive abilities and increased resistance to herbivores, pathogens, and various abiotic stresses. Most studies of grass-endophyte associations have been undertaken with two economically important plant species, *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. The interactions between endophytes and other grasses in natural plant communities, however, are seldom concerned. Much less attention has been paid to native grasses in Inner Mongolia Steppe, which lies in the north of China and is an important part of Steppe in Eurasia, and only limited published symbiosis studies are available in this natural ecosystem. Thereby, a more comprehensive view of the ecology, diversity of endophytes and their interactions with host plants becomes essential.

Methods Our research of grass (*Achnatherum sibiricum*) associated with *Neotyphodium* endophyte (a new grass-endophyte association) was carried out in the Inner Mongolia Steppe, China. Twenty-seven endophyte strains were isolated from four *A. sibiricum* populations including Hulingol (H), Xi Ujimqin Qi (X), Inner Mongolia Grassland Ecosystem Research Station of the Chinese Academy of Sciences (IMGERS-CAS) (I), and the *Leymus chinensis* plot of the IMGERS-CAS (L), respectively. Colony morphology, growth rate on potato dextrose agar (PDA) and conidial measurements of isolates were used to characterize diversity of endophytes hosted by *A. sibiricum*. The genetic polymorphisms of *Neotyphodium* species from the four *A. sibiricum* populations were also analyzed using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers.

Key Results Four morphological groups of *Neotyphodium* species and five individual morphological types were

described based on the colony morphology, growth rate, and conidial shape and size. A total of 463 bands were obtained using 20 RAPD primers, of which 461 bands were polymorphic. A total of 93 unique loci were obtained, accounting for 20.1% of the total amplified loci. Nei's diversity index (h) and Shannon's diversity index (I) were 0.238 and 0.387, respectively. In the four populations (H, X, I, and L), the value of h was 0.122 0, 0.180 4, 0.146 3 and 0.210 7, respectively. The four populations may be ranked in a descending order as $L > X > I > H$, and the I of the four populations had a similar trend. The fixation index (F_{ST}), the coefficient of gene differentiation (G_{ST}), and the genetic differentiation ($H_{sp-Hpop}/H_{sp}$ (estimated by Shannon's diversity index)) were 0.205 1, 0.300 4, and 0.355 0, respectively. The genetic variation of *Neotyphodium* species mainly existed within populations. Genetic similarities within each population were found to be in the range of 0.647 9–0.943 8 in similarity, and the average genetic distance among the four populations was 0.285 8, varying from 0.057 8 to 0.433 9. Clustering analysis based on Nei's unbiased genetic distance and UPGMA method showed that there were seven distinct RAPD genetic groups.

Conclusions The high incidence of endophytic infection in *A. sibiricum* was indicative that the presence of the endophyte gave the grass a competitive advantage over non-infected grasses. The study also indicated that there were higher genetic diversity based on morphological and RAPD results, and that there were relatively high genetic variations among the four populations and higher genetic differentiation of *Neotyphodium* sp. within a geographical region. Most of the genetic groups were related to geographical origins of the strains. The dendrogram of genetic distance matched rather well with the morphological data, as reflected by the four morphotypes.

Key words Endophyte, *Achnatherum sibiricum*, *Neotyphodium*, Morphotypes, RAPD, Genetic diversity

子囊菌纲麦角菌科的香柱菌属 *Epichloë* 及其无性型 *Neotyphodium* 与禾本科植物是系统发生的、互利的共生关系。对具有重要经济价值的高羊茅 (*Festuca arundinacea*) 和黑麦草 (*Lolium perenne*) 与 *Neotyphodium* 属共生体的研究证实:内生真菌是植物抵抗昆虫、线虫、野生动物及放牧家畜取食的重要介质,同时可提高宿主的抗旱能力 (Schardl, 1996)。

Epichloë 的生活史形式多样,与植物的关系是一个从拮抗关系 (Antagonistic) 到互利共生 (Mutualistic) 的连续体 (Schardl, 1996; Saikkonen *et al.*, 1998), 而失去有性繁殖能力的 *Neotyphodium* 则完全生活在植物体内,依靠植物种子传播 (Schardl, 1996), 理论预测是一种共生程度更高的形式,因为它们的适合度与植物的适合度联系更加紧密,互利性关系更显著 (Faeth & Sullivan, 2003)。然而最近的研究表明,即使是这种系统发生的共生体在生态系统中的作用也是复杂而多变的 (Saikkonen *et al.*, 2004), 多数学者认同的植物通过真菌毒素增加的抗性是针对栽培牧草得到的结论,而在自然生态系统中的禾草和乔木上却很少见 (Saikkonen *et al.*, 1998; Faeth, 2002; Ahlholm *et al.*, 2002; Faeth & Sullivan, 2003)。

国外对禾草内生真菌的研究已经历了一个世纪,从分子水平直到生态系统层次探讨了其共生机制及其生态效应。我国在这方面开展研究较晚,对内生真菌资源的状况还很不清楚,更缺乏深入的研究。全世界现已报道 14 种内生真菌与 23 个属的禾

草形成共生体,我国已在 13 属 25 种天然禾草中发现内生真菌 (南志标和李春杰, 2004)。在内蒙古广大地区分布着以禾本科植物为主体的温带草原,禾草种类丰富,遗传多样性高,然而对与其共生的内生真菌的资源状况却缺乏了解。本文在广泛调查内蒙古草原禾草内生真菌资源的基础上,对侵染率较高且分布广泛的羽茅内生真菌进行了研究,以初步揭示羽茅内生真菌的遗传多样性,为深入研究内生真菌与禾本科植物的共生机制并且有效地利用这一真菌资源奠定基础。

1 材料和方法

1.1 样地

2004 年 8~9 月在内蒙古中东部霍林郭勒市 (行政隶属于通辽市), 西乌珠穆沁旗 (锡林郭勒盟), 中国科学院内蒙古草原生态系统定位研究站北沙地和定位站羊草 (*Leymus chinensis*) 样地 (分别用字母 H, X, I 和 L 表示) 采集羽茅植株进行内生真菌检测。

1.2 样品采集

在每一样地内设置一个 50 m × 50 m 的样区,在其中选取羽茅 (*Achnatherum sibiricum*) 植株 30 株,其间隔大于 3 m 以保证每个材料并非同一植株的分蘖。采集时将植物的地上部全部收集,特别注意保证叶鞘的完整性 (内生真菌主要分布在植物叶鞘组织), 以利于检测内生真菌侵染状况。不同植株的种

子分开保存,用于分离内生真菌。

1.3 内生真菌的检测

参考 Latch 等(1984)的方法,撕取叶鞘内侧的上表皮,撕裂面朝下将其放置于载玻片上,滴一滴苯胺蓝染液于叶表皮上,然后将盖玻片置于液滴上轻压,酒精灯上加热几秒钟以加强染色,置于光学显微镜下观察。若有沿植物细胞间隙纵向生长,呈波浪状或线状且极少分枝的菌丝出现,则认为该植物含有内生真菌。

1.4 内生真菌的分离和鉴定

将野外采集的含菌植物种子进行灭菌消毒处理:50%硫酸浸泡 20 min,无菌水冲洗 3 次;次氯酸钠(有效氯浓度不低于 0.5%)浸泡 20 min,无菌水冲洗 3 次,处理期间不时搅动溶液;在无菌操作台上,用消毒过的镊子将种子置于 PDA 培养基上,轻压使种子嵌入培养基内,但不应过深,每皿接种 5~7 粒种子,封口后的培养皿置于恒温培养箱 25℃暗培养 1 个月,若有白色较为致密的菌丝从种子周围缓慢长出时,将其转接到新的 PDA 培养基上;大约培养半个月后从颜色、质地均一的菌落边缘挑取少量菌丝,连同培养基一同转入新的培养基,经过若干次继代,获得单一的菌落。

利用解剖镜和显微分析系统观察菌落特征和生殖器官显微结构。菌落形态指标包括:菌落大小、颜色、质地、高度、生长速率以及是否有渗出物。个体形态指标包括:菌丝粗细、孢子大小、形状、着生方式及孢子梗形状。参考以往发表的禾草内生真菌文献(Morgan-Jones & Gams, 1982; Latch *et al.*, 1984),对羽茅内生真菌进行鉴定。

1.5 内生真菌总 DNA 提取及 PCR 扩增

参考 Guo 等(2001)的 CTAB 方法,稍有改动:从培养基上取刚长成的新鲜菌丝提取 DNA;提取的总 DNA 经 RNAase 处理后,测定所提取基因组 DNA 的 OD 值,判断其纯度。然后进行电泳检测,在紫外检测仪上观测其纯度并判别 DNA 分子的大小及是否降解。

随机引物为 10 个碱基的寡聚核苷酸,25 μ l PCR 反应体系中各成分的终浓度为:10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.8), 50 mmol·L⁻¹ KCl, 2 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 0.4 mmol·L⁻¹ dNTP, 1 U *Taq* DNA Polymerase(以上均为上海生工产品), 0.32 μ mol·L⁻¹ Primer (Operon 公司), 模板 DNA 50 ng, 双蒸水 17.3 μ l。PCR 扩增反应在 PTC-100 PCR 仪上进行,扩增程序:94℃预变性 4 min; 94℃40 s, 36℃1 min, 72℃1 min, 共进

行 40 个循环;最后 72℃延伸 10 min。

1.6 电泳结果记录及数据分析

扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳(含 1 μ l·ml⁻¹ EB)进行分离,电泳缓冲液为 1×TBE,以鼎国生物生产的 DGL2000 为分子量标准,电泳结果在紫外投射仪上观察拍照。对电泳中稳定出现的扩增条带计为 1,没有扩增产物的计为 0,将数据以 0、1 矩阵形式输入计算机进行统计分析,计算多态条带百分率 P 。应用 Popgene3X(Yeh *et al.*, 1997)软件计算平均等位基因数 N_a 、有效等位基因数 N_e 、Nei 基因多样性指数 h (Nei, 1973)、Shannon 多样性指数 I 、基因分化系数 G_{ST} 、种群每代迁移数 N_m 和 Nei 无偏遗传距离(Nei, 1978)。用 Arlequin2.000(Schneider *et al.*, 2000)进行 AMOVA 分析。根据 Nei 无偏遗传距离,采用 UPGMA 法对种群进行聚类分析。

2 实验结果

2.1 羽茅内生真菌侵染状况

从 4 个样地羽茅的检测结果可以看出,不同样地羽茅种群的内生真菌侵染率差别较大,侵染率最高的西乌旗种群和羊草样地种群都为 90%,定位站种群为 80%,而霍林郭勒种群的侵染率只有 40%,与另外 3 个种群差异显著。

2.2 内生真菌培养特征及孢子形态多样性

本实验从 4 个羽茅种群中共分离出 27 株内生真菌菌株,在 PDA 培养基上,菌落的外观和生长特征均存在一定差异。菌落颜色大多数为白色,少数略带黄色或奶油色;质地差异较大,有的菌落呈疏松绵状,而有的则呈致密棉状,其中呈疏松绵状的菌落中有的产生大量气生菌丝,有的则无明显气生菌丝;菌落突出培养基的程度差异明显,有的紧贴表面而有的显著突出,有的菌落中央明显高于边缘而有的菌落中央凹陷,大多数菌落没有分泌物,只有个别菌落在生长后期分泌黄色或蜜色的液滴。

从菌落的不同来源看,霍林郭勒种群菌落颜色以微黄色为主,而其它种群菌落以白色为主;从菌落生长速率看,霍林郭勒种群和西乌旗种群的菌落平均生长速率分别为 1.68 和 1.89 mm·d⁻¹,差异不显著,气生菌丝较丰富,而定位站种群和羊草样地种群的菌落分别只有 0.32 和 0.87 mm·d⁻¹,显著小于前两个种群,且都很少有气生菌丝;在 4 个羽茅种群内部,羊草样地内生真菌的表型多样性最丰富,无论从菌落颜色、质地以及生长速率都表现出个体间较大的差异,而其它 3 个样地,尤其是定位站样地的 4 个

菌落外观几乎一致。综合 4 个种群羽茅内生真菌培养物的形态学特征,将 27 株内生真菌划分为 4 个形态型。形态型 I 包括 HA、HB、HC、HF,特征是菌落中间微黄,质地棉状、疏松,生长速率在 $1.24 \sim 1.63 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ 之间;形态型 II 包括 XA、XB、XC、XD、XE、XF、XG,特征是菌落白色,绵状疏松,气生菌丝较丰富,生长速率在 $1.45 \sim 2.38 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ 之间;形态型 III 包括 IB、IC、ID、IG、LB、LE、LH、LJ、LK,特征是菌落白色,棉状致密,无气生菌丝,生长速率在 $0.22 \sim 0.52 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ 之间,生长缓慢;形态型 IV 由羊草样地的 LA 和 LC 组成,特征是菌落灰白色,毡状具辐射状褶皱,紧密,有少量气生菌丝,生长速率 $1.23 \sim 1.83 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$;另外的几株真菌 HD、LD、LI、LL、LM 形态特征独特,无法归入以上 4 种形态型,各自作为 1 类。

Neotyphodium 属真菌营无性繁殖,只产生分生孢子,有的真菌甚至不产生分生孢子(Bruehl *et al.*, 1994)。本研究也发现一部分菌株不产生分生孢子,从观察到的分生孢子形态可以看出,它们都应属于 *Neotyphodium*,但其孢子形态和大小还是表现出了多样性,霍林郭勒种群、西乌旗种群内生真菌的分生孢子以卵形、半圆形为主,定位站和羊草样地内生真菌分生孢子以肾形和船形为主,不同样地内生真菌的菌落特征和孢子形态如表 1 所示。

2.3 内生真菌鉴定

将分离得到的菌株进行纯化培养,根据禾本科植物内生真菌的生物学特征,如菌落外观、质地、分生孢子及孢子梗的形状、大小等鉴定依据,参考已发表文献的模式菌株进行鉴定,判定羽茅内生真菌为 *Neotyphodium* 属(Morgan-Jones & Gams 1982; Glenn *et al.*, 1996)。同时我们认为在野外广泛地调查羽茅内生真菌感染状况时,并未发现 *Epichloë* 属真菌所特有的、形成于植物花序和旗叶上的真菌子座,同时各地羽茅种群的感染率普遍较高,应是一种特化的系统发生的共生,因为只有失去了有性繁殖能力而完全依赖宿主植物种子传播的 *Neotyphodium*,才能有相当高的感染率(Saikkonen *et al.*, 1998; Clay & Schardl 2002)。

2.4 RAPD 分析结果

2.4.1 内生真菌扩增条带的多态性

RAPD 随机引物筛选:通过对代表菌株的 PCR 扩增反应,从 120 条随机引物中筛选出能够稳定扩增、条带清晰且多态性高的 20 条引物。对 27 株内生真菌的扩增结果共得到 463 个 RAPD 标记,其中多态位点 461 个。从整体来看,多态位点占总位点

数的 99.6%,而从 4 个样地各自的种群来看,霍林郭勒、西乌旗、定位站和羊草样地羽茅内生真菌的多态性位点百分率分别为 33.3%、50.3%、35.4% 和 72.4%。27 个菌株的特有位点总数为 93 个,占总位点数的 20.1%。4 个种群内生真菌的平均特有位点数以羊草样地种群最高为 4.1 个,西乌旗最低为 2.3 个,霍林郭勒与定位站相近,分别为 3.6 和 3.5 个。4 个种群的特有位点数占总特有位点的百分率排列顺序是:羊草样地(48.4%)、霍林郭勒(19.4%)、西乌旗(17.2%)、定位站(15.1%)。

2.4.2 内生真菌的遗传多样性

用 Popgene32 软件计算的内生真菌种群遗传多样性及其遗传结构参数见表 2。基于 20 个引物所检测到的 27 株内生真菌的表型频率,用 Shannon 多样性指数表示所有个体及各种群的遗传多样性,结果显示所有位点的 Shannon 指数是 0.387,在 4 个种群中,羊草样地种群内生真菌的遗传多样性最高(0.331 1),霍林郭勒种群内生真菌的遗传多样性最低(0.183 2),遗传多样性顺序为:羊草样地 > 西乌旗 > 定位站 > 霍林郭勒。所有位点总的 Nei 基因多样性指数是 0.238,4 个种群的 Nei 指数与 Shannon 指数反映的趋势一致,仍以羊草样地种群的最高为 0.210 7,西乌旗(0.180 4)其次,定位站(0.146 3)和霍林郭勒(0.122 0)较低。

4 个羽茅种群的内生真菌种群之间的遗传分化系数 $G_{ST} = 0.300 4$,即 4 个种群之间的遗传变异占整个总变异的 30.04%,而其余 69.96% 的变异发生在种群内部。种群每代迁移数 N_m 是测量种群间基因流的一种方法,根据种群间遗传分化系数 G_{ST} 得到的 $N_m = 1.164 4$,利用 Shannon 指数估算的种群间遗传变异比率为 0.355;基于欧氏距离矩阵的 AMOVA 分析得到的固定指数 $F_{ST} = 0.205 1$, $N_m = 0.968 9$ 。以上 3 种指数都是反映种群间遗传分化程度的指标,即大多数变异存在于 4 个内生真菌种群内部,但种群间也有一定的基因流。

菌株间的遗传一致度(即遗传相似性)可以在一定程度上反映不同个体间的遗传分化和 DNA 差异,而遗传距离也是指不同种群或种之间基因差异的程度。利用 Nei(1978)的计算方法得到了 27 株内生真菌的平均遗传一致度是 0.752 8,平均遗传距离是 0.285 8,结果反映出个体间较小的遗传相似性和较大的遗传距离,各菌株间的遗传一致度在 0.647 9 ~ 0.943 8 之间,遗传距离的变化范围是 0.057 8 ~ 0.433 9。

表 1 羽茅内生真菌 *Neotyphodium* 在 PDA 上的培养特征、孢子形态和侵染率
Table 1 The characteristics of colony and conidia of *Neotyphodium* on PDA and infection frequency of *Neotyphodium*

种群 Population	菌株编号 Isolate No.	菌落颜色 Colony color	菌落质地 Colony texture	菌落突出/凹陷 Colony raised/ depressed	生长速率 Growth rate (mm·d ⁻¹)	孢子形态 Conidium shape	孢子平均 长度 Mean length of conidia (μm)	侵染率 Infection frequency (%)
霍林郭勒 Hulingol	HA	中间微黄色、四周白色 Yellowish centre , white margin	棉状、疏松 Cottony ,slightly loose	边缘突出、中间凹陷 Centre depressed , margin raised	1.41	肾形 Reniform	3.1	40
	HB	中间微黄色、四周白色 Yellowish centre , white margin	棉状、疏松 Cottony ,slightly loose	边缘突出、中间凹陷 Centre depressed , margin raised	1.27	卵形/椭圆形、 半圆形 Obovate ,oblong , semiglobular		
	HC	中间微黄色、四周白色 Yellowish centre , white margin	棉状、疏松 Cottony ,slightly loose	边缘紧贴、中间突出 Centre raised , margin appressed	1.24	半圆形 Semiglobular		
	HD	灰白色 Off-white	绵状、松散、 气生菌丝丰富 Lanose , loose , aerial mycelium abundant	紧贴 Appressed	2.86	-		
	HF	中间微黄色、四周白色 Yellowish centre , white margin	棉状、疏松 Cottony ,slightly loose	边缘突出、中间凹陷 Centre depressed , margin raised	1.63	卵形、半圆形 Obovate , semiglobular		
西乌旗 Xi Ujimqin Qi	XA	白色 White	绵状、疏松 Lanose , loose	中间紧贴、边缘突出 Centre depressed , margin raised	1.45	卵形、半圆形 Obovate , semiglobular	4.0	90
	XB	白色 White	绵状、疏松 Lanose , loose	中间紧贴、边缘突出 Centre depressed , margin raised	1.89	椭圆形、肾形 Oblong , reniform		
	XC	白色 White	绵状疏松、 气生菌丝丰富 Lanose , loose , aerial mycelium abundant	边缘紧贴、中间突出 Centre raised , margin appressed	2.01	-		
	XD	白色 White	绵状疏松、 气生菌丝丰富 Lanose , loose , aerial mycelium abundant	边缘紧贴、中间突出 Centre raised , margin appressed	2.38	-		
	XE	白色 White	绵状、疏松 Lanose , loose	边缘突出、中间凹陷 Centre depressed , margin raised	1.92	-		
	XF	白色 White	绵状、疏松 Lanose , loose	边缘突出、中间凹陷 Centre depressed , margin raised	2.01	-		
	XG	白色 White	绵状、疏松 Lanose , loose	边缘突出、中间凹陷 Centre depressed , margin raised	1.54	-		
定位站 IMGERS-CAS	IB	白色 White	棉状、致密 Cottony , compact	突出 Raised	0.28	肾形 Reniform	4.3	80
	IC	白色 White	棉状、致密 Cottony , compact	突出 Raised	0.22	肾形、船形 Reniform , navicular		
	ID	白色 White	棉状、致密 Cottony , compact	突出 Raised	0.5	肾形、船形 Reniform , navicular		
	IG	白色 White	棉状、致密 Cottony , compact	突出 Raised	0.29	-		
羊草样地 <i>Leymus chinensis</i> plot of the IMGERS- CAS	LA	白色/灰白色 White/off- white	毡状、辐射状褶皱、 紧密、气生菌丝少量 Feltly , radial drape , tight , aerial mycelium scarce	紧贴/突出 Elevated to appressed	1.83	-	4.3	90
	LB	白色 White	棉状、致密 Cottony , compact	突出 Raised	0.45	船形 Navicular		

表 1(续) Table 1(continued)

种群 Population	菌株编号 Isolate No.	菌落颜色 Colony color	菌落质地 Colony texture	菌落突出/凹陷 Colony raised/ depressed	生长速率 Growth rate (mm·d ⁻¹)	孢子形态 Conidium shape	孢子平均 长度 Mean length of conidia (μm)	侵染率 Infection frequency (%)
	LC	白色/灰白色 White/off-white	毡状、辐射状褶皱、 紧密、气生菌丝少量 Feltly , radial drape , tight , aerial mycelium scarce	紧贴/突出 Elevated to appressed	1.23	—		
	LD	白色 White	绵状、疏松 Lanose , loose	突出半球型 Semiglobular riased	1.81	肾形 Reniform		
	LE	白色 White	棉状、致密 Cottony , compact	突出 Raised	0.38	肾形 Reniform		
	LH	白色 White	棉状、致密 Cottony , compact	突出 Raised	0.52	—		
	LI	白色 White	外层珊瑚状、内层棉状 Centre raised , cottony , coral-like in margin	突出 Raised	0.48	船形 Reniform		
	IJ	白色 White	棉状、致密 Cottony , compact	突出 Raised	0.4	船形 Navicular		
	LK	白色 White	棉状、致密 Cottony , compact	突出 Raised	0.5	船形、半月形 Navicular , lunate		
	LL	墨绿色 Black green	棉状/垫状、致密 Cottony to pulvinate , compact	突出 Raised	1.06	—		
	LM	浅黄色 Buff	无规则腊状小块堆积 Irregular waxy , piled up	突出 Raised	—	—		

2.4.3 聚类分析

基于 Nei 无偏遗传距离和遗传一致度矩阵结合 UPGMA 法的聚类分析结果将 27 株内生真菌分为 7 个遗传组(图 1)相同地理来源的菌株大多聚为一组 :即霍林郭勒组 I(HA、HB、HC、HF) 西乌旗组 II (XB、XC、XD、XE) 羊草样地组 IV(LB、LD、LM、LH、IJ、LK、LI) 均聚为较大的 3 个组 ;同时还有少数菌株聚为较小的组 ,即西乌旗组 V(XA、XF、XG) 羊草样地组 VI(LA、LC)以及定位站组 III(IB、IG)和 VII(IC、ID) ;个别菌株聚类的结果并未与其相同地理来源的菌株聚为一组 ,如 HD、LL 归入了定位站组 III ,LE 归入了定位站组 VII。从聚类结果可以看出 ,各个菌株之间的遗传差异比较大 ,地理距离较近的菌株往往聚在一起 ,说明空间距离对真菌间的基因交流有一定影响。

3 讨 论

3.1 内生真菌侵染率

本研究发现 ,羽茅种群的内生真菌侵染率为 40% ~ 90% ,平均为 75% ,具有较高的侵染水平 ,说

明在内蒙古中东部草原羽茅与内生真菌共生是较为普遍的现象。导致内生真菌侵染率水平在不同地区产生差异的主要因素可能是 :宿主植物的空间分布和种子的散布模式 ;对于无性内生真菌 ,菌丝无法进入植物种子或是侵染种子的菌丝失活(Ravel *et al.* , 1997) ;自然种群中内生真菌侵染对宿主而言 ,其“成本”和“受益”会随着空间和时间 ,以及环境选择压力的变化 ,其侵染率也会相应地发生改变(Saikkonen *et al.* , 1998)。有时这种变化幅度相当大 ,如 Jensen 和 Roulund (2004)对丹麦不同生态型多年生黑麦草(*Lolium perenne*)内生真菌 *Neotyphodium lolii* 的调查显示 ,62 个地点的侵染率变化范围为 4% ~ 82% ,地中海草原区紫羊茅(*Festuca rubra*)内生真菌 *Epichloë festuca* 的 6 个种群侵染率在 44% ~ 92%(平均 70%) ,与本文调查的羽茅侵染率接近 ,表明这种共生体不仅广泛存在并且有很高的侵染率(Zabalgoitia *et al.* , 1999)。Clay 和 Schardl (2002)认为 ,中等侵染率的内生真菌种群可能是不稳定的 ,其侵染率有增加或降低的趋势 ,这决定于所在环境条件的选择方向。

表 2 4 个羽茅内生真菌 *Neotyphodium* 种群的 RAPD 位点和遗传多样性
Table 2 RAPD locus and genetic diversity of four *Neotyphodium* populations

种群 Population	菌株编号 Isolate No.	多态位点数 Number of polymorphic loci	多态位点百分率 Percentage of polymorphic loci (%)	特有位点数 Number of unique loci	特有位点百分率 Percentage of unique loci (%)	等位基因平均数 Average number of alleles (N_a)	有效等位基因数 Number of effective alleles (N_e)	Nei 基因多样性 Nei 's gene diversity (h)	Shannon 多样性指数 Shannon 's index of diversity (I)
霍林郭勒 Hulingol	HA	154	33.26	3	3.22	1.332 6	1.200 5	0.122	0.183 2
	HB			2	2.15				
	HC			2	2.15				
	HD			11	11.8				
	HF			0	0				
西乌旗 Xi Ujimqin Qi	XA	233	50.32	2	2.15	1.503 2	1.303 5	0.180 4	0.270 9
	XB			2	2.15				
	XC			1	1.08				
	XD			1	1.08				
	XE			0	0				
	XF			5	5.38				
	XG			5	5.38				
定位站 IMGERS-CAS	IB	164	35.42	6	6.45	1.354 2	1.255 7	0.146 3	0.213 3
	IC			4	4.30				
	ID			2	2.15				
	IG			2	2.15				
羊草样地 <i>Leymus chinensis</i> plot of the IMGERS-CAS	LA	335	72.35	1	1.08	1.723 5	1.329 9	0.210 7	0.331 1
	LB			11	11.8				
	LC			5	5.38				
	LD			1	1.08				
	LE			6	6.45				
	LH			7	7.52				
	LI			1	1.08				
	LJ			1	1.08				
	LK			1	1.08				
	LL			10	10.8				
	LM			1	1.08				
		461	99.6	93	20.1	1.995 7	1.355 5	0.238	0.387

3.2 内生真菌培养特征及孢子形态多样性

27 株羽茅内生真菌菌株在 PDA 培养基上的形态与生长特征表现出较高的多样性。菌株的表型特征除了受到培养基的营养成分组成影响之外,主要决定于自身的遗传组成特征。本研究中菌株在相同条件下表现出各异的外部特征,是其遗传多样性的外在表现。Moon 等(2002)观察到,禾草 *Echinopogon ovatus* 所含内生真菌种群明显区分为两个形态型,Ⅰ型包括所有的新西兰种群和两个澳大利亚种群,特征是生长缓慢、高度卷绕、大多腊质,但新西兰种群菌落颜色多数棕色,而澳大利亚种群微黄;Ⅱ型是来自澳大利亚的另两个种群,菌落表面似毡状覆盖,生长速率快,产生一定数量的分生孢子。本实验中羽茅 4 个种群内生真菌主要划分为 4 个形态型,其中霍林郭勒位于西乌旗以东约 190 km,西乌旗位于羊

草样地和定位站种群以东 140 km,它们之间的形态特征差别较大,分别单独作为一个形态型,而定位站和羊草样地种群仅相距 10 km 左右,它们中的大多数菌株都归入形态型Ⅲ,由于两个种群相距很近,可能会有基因间的交流,因此形态特征也较为接近;羊草样地种群内的菌株形态特征有很高丰富度,除了与定位站种群一致的形态型Ⅲ之外,还有许多特殊的形态出现,这可能是羊草样地围封多年,其群落物种丰富度、环境异质性高,选择压力小,内生真菌保持了较高的遗传多样性,而定位站种群所在生境为沙地,群落组成单一,内生真菌的多样性也较低,表现为菌落外观、生长特性在 4 个种群中最为一致。

真菌的孢子大小是分类鉴定的依据之一,从测量结果看出不同菌株也有差异,4 个种群的平均孢子长度分别是霍林郭勒3.1μm、西乌旗4.0μm、羊

图 1 根据 Nei 无偏遗传距离用 UPGMA 法对 27 株内生真菌所作聚类图

Fig. 1 UPGMA dendrogram of *Neotyphodium* populations based on Nei's unbiased genetic distance

草样地和定位站都是 $4.3\ \mu\text{m}$ (表 1),表现出从东到西递增的趋势。Zabalgogea 等(2003)调查了西班牙半干旱草原 11 种禾草内生真菌的侵染状况,发现不同宿主的内生真菌生长速率和孢子长度的变化较大,菌落每天的生长速率从 $0.18\ \text{mm}\cdot\text{d}^{-1}$ 至 $2.06\ \text{mm}\cdot\text{d}^{-1}$ 不等,这与本研究的羽茅内生真菌生长速率 $0.22\sim 2.86\ \text{mm}\cdot\text{d}^{-1}$ 的变幅近似。孢子长度除了 1 种禾草的共生真菌为 $9.8\ \mu\text{m}$ 外,其它都在 $4.8\sim 6.2\ \mu\text{m}$ 之间,可以看出禾草内生真菌在不同的分布区其孢子差异明显。Clement 等(2001)根据高羊茅内生真菌 *Neotyphodium* 的孢子长度,划分为两种形态型:短孢型(孢子长 $< 6.5\ \mu\text{m}$)和长孢型(孢子长 $\geq 6.5\ \mu\text{m}$)。研究发现北非两个种群的大多数孢子属于短孢型,而地中海 Sardinian 种群多数是长孢型,认为它们是一个异质性的类群;然而来自 3 个国家的高羊茅内生真菌孢子平均长度 $6.72\ \mu\text{m}$ (Sardinian), $5.96\ \mu\text{m}$ (Morocco) 和 $4.93\ \mu\text{m}$ (Tunisia) 的差异并不显著,只是表明后两个种群更倾向于产生短孢子而已,这些证据表明短孢型是北部非洲高羊茅内生真菌 *Neotyphodium* 的普遍特征。分析本文和相关的研究结果可以发现,虽然 *Neotyphodium* 内生真菌孢子大小是较为稳定的性状之一,但在不同的宿主内和不同

的分布区还是有不同程度的差异,这与内生真菌的遗传组成和环境条件密切相关,本文的结果显示了相距较远的内生真菌种群孢子大小的差别也较大,这种差异与其地理距离的相关性可能是缘于内生真菌较小的传播范围而产生了地理隔离。

3.3 内生真菌的遗传多样性

现代分子标记技术揭示出禾草内生真菌 *Neotyphodium* 虽然种数不多,但整个种群的遗传多样性却很丰富;*Neotyphodium* 是直接起源于禾草致病真菌 *Epichloë* 的某个种或是 *Epichloë* 种间以及与 *Neotyphodium* 杂交的结果(Moon et al., 2002; Sullivan & Faeth, 2004),*Neotyphodium* 的杂交谱系和基因流在全球都普遍存在。Tsai 等(1994)也证实种间杂交是 *N. coenophialum* 遗传多样性的最主要因素,而杂交起源有两种可能:营养菌丝的融合以及核的融合;*Epichloë* 交配后核的异常分离。同时 *Neotyphodium* 的传播也会受到诸多因素的限制,导致不同程度的生殖隔离而产生种群间的遗传分化。

De Jong 等(2003)利用 SSR 标记评价了禾草内生真菌的遗传多样性,结果表明 *Neotyphodium* 和 *Epichloë* 之间的多态标记超过了 85%,而它们内部的多态标记分别只占 50% 和 60%,基于遗传距离的 UPGMA 聚类图显示,两个属的 20 个内生真菌分离株明显地分为不同的组,证明了 SSR 标记在 *Neotyphodium* 和 *Epichloë* 分类上也很有效。本文利用 RAPD 标记得到的羽茅内生真菌的多态位点百分率为 99.6%,也是一种有效的评价其遗传多样性的方法。

本研究发现羽茅内生真菌种群间有一定的迁移,反映在基因流为 1.938,一般来讲, N_m 的值远小于 1 时将导致较强的遗传分化,而 N_m 值大于 4 的种群可以作为一个单一的随机交配种群(Kimura, 1953);同时也有较高程度的遗传分化,表现在没有遗传背景完全相同的菌株,种群内存在特有的形态和基因位点。在地理距离较近的条件下(平均 33 km),亚利桑那羊茅(*Festuca arizonica*)内生真菌 *Neotyphodium* 4 个种群平均 F_{ST} 值为 0.5116,即使在相距较近的种群间,种的迁移也并不常见,基因流非常低($N_m = 0.477$),远低于花粉介导的宿主植物的基因流(Sullivan & Faeth 2004)。对半干旱草原原羊茅两个相距 41 km 的内生真菌 *Epichloë festuca* 种群 AFLP 分析结果表明,种群内非重组性的无性繁殖占优势,绝大多数遗传变异发生在种群内部,而只有很少的变异存在于种群之间($F_{ST} = 0.197$) (García et

al., 2002), 说明种群间有强的基因流 ($N_m = 2.03$), 其中 S 种群内的个别菌株与 P 种群的遗传距离更近, 说明了两个种群间存在着迁移, *E. festuca* 偶尔发生的有性繁殖和产孢过程能保证足够的种群迁移, 从而限制种群间的遗传分化 (Sullivan & Faeth, 2004)。羽茅内生真菌种群的固定系数、基因流大小介于亚利桑那羊茅和紫羊茅两个种群之间, 可以看出, 自然生态系统当中的内生真菌种群, 其遗传多样性和遗传结构有较大差别, 除了受到真菌生殖模式、传播方式的影响之外, 可能还与其生存的环境因子作用有关, 因内生真菌的繁殖高度依赖于宿主植物的繁殖和种子传播, 因此植物的生物学特性可能是决定内生真菌种群遗传多样性的最主要因素, 未来对于宿主种群遗传多样性的研究将有助于更深入的认识内生真菌的遗传多样性起源。

Kelemu 等 (2003) 选取 11 个随机引物, 对臂形草属 (*Brachiaria*) 内生真菌 *Neotyphodium implicatum* (Glenn et al., 1996) 的 11 个分离菌株做了 RAPD 分析, 根据扩增出的 220 个条带和 Dice 相似系数所作聚类可将这些分离株划分为 7 组, 组内的分离株没有差别, 同时与 AFLP 分析的结果也一致, 认为 RAPD 对于区分该种的内生真菌是很有效的。羽茅菌株形态学特征之间的关系与 RAPD 的聚类结果基本一致, 霍林郭勒内生真菌聚为一类的 4 个菌株外部特征基本一致, 生长速率也很接近, 而 HD 在菌落颜色、质地以及生长速率等方面与其它 4 个菌株差别较大, 结果也是归为另外一个遗传组, 也是菌落的外部形态和遗传背景一致性的反映。西乌旗样地内生真菌明显分成两类, 但在外部形态上差别不大, 可能是不同起源的菌株在形态上产生了趋同性。定位站的 4 个菌株也明显分成两组, 而在形态上却无明显区别, 并且生长都极为缓慢, 分别与菌株 LL 和 LE 聚为一类, 表明其可能有不同的来源, 或因定位站与羊草样地距离很近, 可能会发生种群间的迁移, 或是进化过程中的偶然事件所致。羊草样地的菌株大多聚为一类, 只有在外观上明显不同的 LA 和 LC 单独聚为一组, 菌落颜色差别很大的 LL 归入定位站组 III, 生长极为缓慢的 LE 归入了定位站组 VII。由此可以看出, 根据形态学特征和 DNA 水平对羽茅内生真菌的分类有比较高的一致性, 聚为一类的菌株都有相似的外部形态和生长特性, 同时 RAPD 标记弥补了单纯根据形态学划分类群的不足。总之, 羽茅内生真菌的遗传多样性较高, 可能是一个能够加以利用的新的真菌资源。

参 考 文 献

- Ahlholm J, Helander ML, Elamo P, Saloniemi I, Neuvonen S, Hanhimäki S, Saikkonen K (2002). Micro-fungi and invertebrate herbivores on birch trees: fungal mediated plant-herbivore interactions or responses to host quality? *Ecology Letters*, 5, 648 – 655.
- Bruehl GW, Kaiser WJ, Klein RE (1994). An endophyte of *Achnatherum inebrians*, an intoxicating grass of northwest China. *Mycologia*, 86, 773 – 776.
- Clay K, Schardl CL (2002). Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American Naturalist*, 160, 99 – 127.
- Clement SL, Elbertson LR, Youssef NN, Davitt CM, Doss RP (2001). Incidence and diversity of *Neotyphodium* fungal endophytes in tall fescue from Morocco, Tunisia, and Sardinia. *Crop Science*, 41, 570 – 576.
- De Jong EVZ, Guthridge KM, Spangenberg GC, Forster JW (2003). Development and characterization of EST-derived simple sequence repeat (SSR) markers for pasture grass endophytes. *Genome*, 46, 277 – 290.
- Faeth SH (2002). Are endophytic fungi defensive plant mutualists? *Oikos*, 98, 25 – 36.
- Faeth SH, Sullivan TJ (2003). Mutualistic asexual endophytes in a native grass are usually parasitic. *American Naturalist*, 161, 310 – 325.
- García RA, Zapater JMM, Criado BG, Zabalgoizcoa I (2002). Genetic structure of natural populations of the grass endophyte *Epichloë festucae* in semiarid grasslands. *Molecular Ecology*, 11, 355 – 364.
- Glenn AE, Bacon CW, Price R, Hanlin RT (1996). Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. *Mycologia*, 88, 369 – 383.
- Guo LD, Hyde KD, Liew EC (2001). Detection and taxonomic placement of endophytic fungi within frond tissues of *Livistona chinensis* based on rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 20, 1 – 13.
- Jensen AMD, Roulund N (2004). Occurrence of *Neotyphodium* endophytes in permanent grassland with perennial ryegrass (*Lolium perenne*) in Denmark. *Agriculture, Ecosystems, and Environment* 104, 419 – 427.
- Kelemu S, Huang DY, Huang GX, Takayama Y (2003). Detecting and differentiating *Acremonium implicatum*: developing a PCR-based method for an endophytic fungus associated with the genus *Brachiaria*. *Molecular Plant Pathology*, 4, 115 – 118.
- Kimura M (1953). Stepping-stone model of population. *Annual Report of the National Institute of Genetics*, Japan, 3, 62 – 63.
- Latch GCM, Christensen MJ, Samuels GJ (1984). Five endophytes of *Lolium* and *Festuca* in New Zealand. *Mycotaxon*, 20, 535 – 550.
- Moon CD, Miles CO, Järlfors U, Schardl CL (2002). The evolutionary origins of three new *Neotyphodium* endophyte species from

- grasses indigenous to the southern hemisphere. *Mycologia*, 94, 694 – 711.
- Morgan-Jones G, Gams W (1982). Notes on hyphomycetes. XLI. An endophyte of *Festuca arundinacea* and the anamorph of *Epichloë typhina*, new taxa in one of two new sections of *Acremonium*. *Mycotaxon*, 15, 311 – 318.
- Nan ZB(南志标), Li CJ(李春杰) (2004). Roles of the grass-*Neotyphodium* association in pastoral agriculture systems. *Acta Ecologica Sinica* (生态学报), 24, 605 – 616. (in Chinese with English abstract)
- Nei M (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70, 3321 – 3323.
- Nei M (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583 – 590.
- Ravel C, Michalakakis Y, Charmet G (1997). The effect of imperfect transmission of the frequency of mutualistic seed-borne endophytes in natural populations of grasses. *Oikos*, 80, 18 – 24.
- Saikkonen K, Faeth SH, Helander M, Sullivan TJ (1998). Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29, 319 – 343.
- Saikkonen K, Wäli P, Helander M, Faeth SH (2004). Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends in Plant Science*, 9, 275 – 280.
- Schardl CL (1996). *Epichloë* species: fungal symbionts of grasses. *Annual Review of Phytopathology*, 34, 109 – 130.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000). *Arlequin: a software for Population Genetics Data Analysis*, Ver 2.000. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology University of Geneva, Switzerland.
- Sullivan TJ, Faeth SH (2004). Gene flow in the endophyte *Neotyphodium* and implications for coevolution with *Festuca arizonica*. *Molecular Ecology*, 13, 649 – 656.
- Tsai HF, Liu JS, Staben C, Christensen MJ, Latch GC, Siegel MR, Schardl CL (1994). Evolutionary diversification of fungal endophytes of tall fescue grass by hybridization with *Epichloë* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 2542 – 2546.
- Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ, Ye ZH, Mao JX (1997). *Popgene, the User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis*. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada (program available from: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>).
- Zabalgoatzea I, Vázquez de Aldana BR, García Criado B, García Ciudad A (1999). The infection of *Festuca rubra* by the fungal endophyte *Epichloë festuca* in Mediterranean permanent grasslands. *Grass and Forage Science*, 54, 91 – 95.
- Zabalgoatzea I, Vázquez de Aldana BR, García Ciudad A, García Criado B (2003). Fungal endophytes in grasses from semi-arid permanent grasslands of western Spain. *Grass and Forage Science*, 58, 94 – 97.

责任编辑 : 李晓林 责任编辑 : 李 敏