

禾草内生真菌生物碱的研究进展

高嘉卉 ,南志标 *

(兰州大学草地农业科技学院 ,兰州 730020)

摘要 综述了国内外近 20a 以来在禾草内生真菌生物碱方面的研究进展。目前 ,已发现至少 4 大类 10 余种生物碱与内生真菌有关。各类生物碱中典型代表物的分子结构已完全清楚 ,部分内生真菌在离体条件下可产生除黑麦草碱外的生物碱 ,但产碱量较其在植物体中所产生的低很多 ,可相差 150 余倍之多。随着生物技术的发展 ,美国、新西兰等国在波酸、麦角碱和 loline 的生物合成途径方面已有了初步的进展 ,对个别具有重要功能基因以及其所编码的酶已有了深入研究。各种生物碱的致毒机理尚未完全清楚 ,除饱和吡咯化合物为新陈代谢类毒素和神经性毒素外 ,其余 3 类生物碱均为神经性毒素。生物碱可增加禾草对 40 余种害虫的抗性 ,并可增加对某些线虫和病害的抗性。诸多因素均可影响寄主植株中生物碱的种类和浓度 ,包括寄主植株 :种群和生态型 ,植物品种和基因型 ,植株的部位和生长期 ,环境 :气候因素 ,土壤养分 ,季节和年度变化 ;内生真菌菌株和草地管理利用方式等。用于生物碱检测的主要方法为预分离检测法和直接检测法 ,其中高效液相色谱法以其分离能力强、选择性高、测定灵敏度高 ,操作简单 ,可在室温下进行 ,应用范围极广的优点而广泛应用。目前 ,国际关于禾草内生真菌生物碱研究的重点包括创造不含对家畜有毒素的有益禾草-内生真菌共生体 ,开展基因工程研究以及合理利用生物碱 ,使其成为新一代的“生物农药”。

关键词 :内生真菌 ,禾草 ,生物碱

文章编号 :1000-0933 (2007)06-2531-16 中图分类号 :Q143 ,Q948 ,S154 文献标识码 :A

A review of bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbioses

GAO Jia-Hui , NAN Zhi-Biao *

College of Pastoral Agricultural Science and Technology , Lanzhou University , P. O. Box 61 , Lanzhou 730020 , China

Acta Ecologica Sinica 2007 27 (6) 2531 ~ 2546.

Abstract : Symbiotic interactions of C_3 grasses with fungal endophytes , *Epichloë* species and their asexual relatives *Neotyphodium* , often provide the grass hosts with major fitness enhancements. The endophytes protect host plants from both biotic and abiotic environmental stresses. Documented enhancements to host fitness include greater resistance to mammalian herbivores and over 40 species of insects , pathogens and nematodes. Endophyte-infected plants exhibit several morphological and physiological responses to drought stress compared with E- plants. Drought-induced leaf rolling , leaf senescence , stomatal closure , and osmotic adjustment are more prevalent in E+ than in E- plants and may be mediated through endophyte enhancement of the production of phytohormones such as abscisic acid. Endophyte-infected plants have been shown to be more productive and competitive than E- plants through improvement of germination , tillering , and biomass production per tiller. The increase in tiller production associated with endophyte infection may be due to fungal secretion of indoleacetic acid. Our understanding of the mechanisms responsible for all of these effects on improved host fitness enhancements are largely attributable to the accumulation of four groups of alkaloids : lolines , peramine , ergot

基金项目 : 国家科技部国际科技合作重点项目计划资助项目 (2004DFA02000)

收稿日期 : 2006-06-24 ; 修订日期 : 2006-12-15

作者简介 : 高嘉卉 (1980 ~) 女 , 甘肃兰州市人 , 硕士 , 主要从事禾草内生真菌研究。

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail : zhibiao@lzu.edu.cn

Foundation item : The project was financially supported by China International Science and Technology Cooperation on Key Projects (No. 2004DFA02000)

Received date 2006-06-24 ; **Accepted date** 2006-12-15

Biography : GAO Jia-Hui , Master , mainly engaged in endophytes of grass.

alkaloids and lolitrems. The type and concentrations of alkaloids in grass-endophyte symbiote are affected by several factors. (a) host related factors such as gene-type, population, species, tissue and growth stages of plant; (b) environmental factors, such as climate factors (e. g. temperature and precipitation), nutrients in soil, seasons changes; (c) other factors, such as fungal strains and field managements. The objective of this paper is to present the current status of knowledge on these alkaloids, focusing on their biological activities, the potential for genetically manipulating their expression in grass-endophyte symbiot, and the determining methods.

Future perspectives in endophyte research, including synthesis of specific alkaloids, which can kill pest insects and are safe to livestock, genetic engineering to enhance the alkaloids productions and biocontrol applications of alkaloids in agricultural and natural ecosystems are also discussed.

Key Words: endophyte fungi; grass; alkaloids

禾草内生真菌 (grass endophyte fungal endophyte; endophytic fungi) 是指生长在植株体内并完成全部或大部生活周期, 而禾草不显示外部症状的一大类真菌。目前全世界已正式报道的内生真菌均为 *Neotyphodium* 属, 共 15 种^[1,2], 其中数种已知其有性阶段为香柱菌属 (*Epichloë*) 真菌。另有数十种新的禾草-内生真菌共生体已被发现, 有待于进行种的分类学鉴定和命名^[3-8]。该类真菌与其寄主植株互惠共生, 并且绝大多数在其寄主植株内产生生物碱。早在 1944 年就发现, 羊采食了多年生黑麦草 (*Lolium perenne*) 后出现类似麦角中毒的症状^[9]。Cunningham 在其随后的报道中指出, 引起这些中毒症状的禾草并未受任何病害侵染。此后相继有多篇高羊茅 (*Festuca arundinacea*) 引致家畜中毒的报道, 并详细描述了“Fescue Foot”的症状^[10]。20 世纪 60 年代, 从高羊茅和多年生黑麦草中分离出数种生物碱^[11], 但之后数年, 关于生物碱的产生原因及其合成机制方面的研究均报道较少^[12]。Bacon 等人在 1979 年首次报道内生真菌 (*Neotyphodium coenophialum*) 离体培养条件下可产生生物碱。进一步研究发现, 带有生物碱的多年生黑麦草种子可使家畜产生与黑麦草蹒跚病类似的病症, 并通过人工饲喂试验确定了生物碱是引起黑麦草蹒跚病的原因所在^[13]。随后 Porter 和 Bacon 等分别对几种有毒禾草中内生真菌进行了系统研究, 并在离体条件下建立了由四种不同内生真菌 (*N. epichloë*, *N. claviceps*, *N. henningsiana*, *N. strangulans*) 和香柱菌 (*Epichloë typhina*) 所产生的棒麦角模型生物碱体系^[14]。此后新西兰、美国先后报道了在多年生黑麦草和高羊茅中存在的多种生物碱, 但大量研究集中在生物碱的分离、提纯、鉴定及其分子结构等方面。目前在以下几方面有了初步进展: 生物碱使寄主产生抗性的机制, 尤其是抗虫性; 不同内生真菌产生生物碱的类型及其对家畜的毒性; 影响生物碱浓度的因素; 生物合成途径等^[15]。

我国禾草内生真菌的研究始于 20 世纪 90 年代初, 主要集中于内生真菌的调查及生理生态机制^[16-20], 尚未开展禾草内生真菌生物碱的研究。我国对于生物碱的研究当前多集中于药用植物和谷类作物^[21,22]。

本文拟分 3 个部分介绍禾草内生真菌生物碱的研究进展: 即禾草中生物碱的产生、类型、毒性、使其寄主产生的抗性及其生物合成途径, 影响植株体内生物碱浓度的因素和检测生物碱浓度的方法。

1 禾草内生真菌生物碱

目前, 已发现至少 10 余种生物碱与内生真菌有关, 可分为以下 4 类 (表 1)。各类生物碱母核的基本结构已研究清楚, 其代表性生物碱分子结构如图 1 所示。

1.1 离体条件下生物碱的产生

目前已知部分内生真菌如: *Neotyphodium coenophialum*、*N. lolii*、*N. typhinum* 和香柱菌等在人工培养条件下可单独产生 Lolitrem B, 波胺和多种麦角碱^[1,14,23,30-33]。但其生物碱浓度远较内生真菌与禾草共生体产量低 (表 2)。由此给生物碱的研究带来了一定的困难, 对于内生真菌体外产碱的培养条件尚需进一步的摸索。还未发现任何内生真菌可在人工培养条件下产生黑麦草碱。

山梨醇、色氨酸 (Tryptophan)、苹果酸等物质可促进大部分内生真菌体外产碱^[38]。由于内生真菌生长缓

表 1 禾草内生真菌生物碱的分类

Table 1 Alkaloid types and representative compounds

生物碱类型 Alkaloid type	主要代表物 Representative compound	文献 Reference	
吲哚双萜类 Indol diterpene	震颤素 Lolitrem B lolitrem A Lolitrem D	[23] [24]	
吡咯并吡嗪类 Pyrrolopyrazine	波胺 Peramine	[25]	
麦角碱类 Ergot alkaloids	麦角酰胺 Amine alkaloids	Ergonovine ergine (Lysergic acid amide)	[26] [27]
	麦角肽 Ergopeptines	Ergotamine ergocristine ergosine	[28]
饱和吡咯化合物 Pyrrolizidine	黑麦草碱 (Loline)N-formylloine N-acetylloine N-methylloine N-acetyl norloine	[23]	

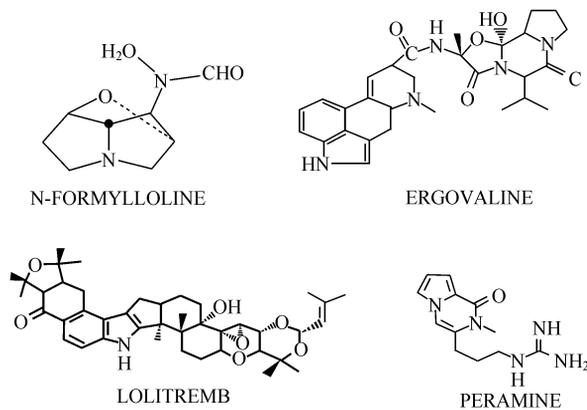


图 1 4 种代表性生物碱的分子结构式 [29]

Fig. 1 Structural formula of representative compounds of each alkaloid group found in grass/endophyte symbiota [29]

表 2 自 *N. coenophialum* 离体培养和 高羊茅或多年生黑麦草叶片内获得的生物碱含量Table 2 The mean concentrations of various alkaloids extracted from tall fescue or perennial ryegrass infected with *N. coenophialum* and from *N. coenophialum* in vitro cultures (mg/kg)

生物碱 Alkaloids	检测对象 Extracted from		文献 Reference
	高羊茅或 多年生黑麦草 Tall fescue or perennial ryegrass	培养基 In vitro culture	
Lolitrem B	2.75	0.18	[34] [35]
Peramine	20	< 0.15	[36] [37]
Ergovaline	2034	12.5	[35]
Loline	271	—	[37]

慢, 离体条件下使内生真菌产碱需很长时间。为了尽量缩短时间, 通常先将内生真菌接种到适应菌丝体生长的液体培养基中 (M102, M43, M96 等见表 3) 震荡培养 2 至 4 周, 当菌丝体的量足够时再转入可促进产碱的液体培养基中 (M104, SM, CDM 等见表 3) 继续震荡培养 2 周, 之后黑暗静置培养。4 至 8 周时可检测到生物碱, 其含量随培养时间而增加, 但在第 8 周之后生物碱有降解的现象 [32, 33, 39]。对于不同的内生真菌亦要选择不同的培养基和培养时间。

除上表中所列出的 3 种内生真菌菌丝体生长培养基外, 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (potato dextrose agar, PDA) 亦被广泛使用, 是一种经济、简单的培养基。但该培养基的各成分及其含量的控制难以十分精确, 在对内生真菌产生的化合物等精确试验中应慎重选择 [38]。

1.2 禾草中生物碱的产生

内生真菌与禾草形成的同一种共生体能产生多种生物碱 (表 4), 同一种生物碱可由不同的共生体产生, 如麦角碱中的一种麦角酸可由受麦角菌 (*Claviceps purpurea*) 侵染的植株产生, 也可由受 *Balansiae* 或 *N. coenophialum* 侵染的高羊茅共生体产生 [40~42]。生物碱在各寄主中的分布没有一一对应的关系。一般在内生真菌与禾草所形成的共生体中可检测到一种或多种生物碱, 但绝大多数含有多种生物碱 (表 4)。在捷克斯洛伐克的调查表明, 当地带菌植物 4 类主要的产碱类型以波胺最为普遍, 而黑麦草碱和 Ergovaline 仅在受内生真菌 *E. festucae*, *N. coenophialum*, 或 *N. uncinatum* 侵染的寄主中检测到 [31]。就同一类生物碱而言, 在含有生物碱 loline 的共生体中普遍存在 N-Formylloine, 而在含有麦角类生物碱的共生体中可普遍检测到

Ergovaline 而 Ergosine (ES), Ergotamine (EA), Ergocryptine (EC), Ergonovine (EN), 和 lysergic acid amide (LAA) 也经常出现^[29]。

表 3 适合内生真菌菌丝体生长和利于产碱的培养基及其组成^[28]

Table 3 Composition of semidefined media used for the culture of *N. coenophialum*^[28]

组分 Components	菌丝体生长培养基 Media for hyphal production			产碱培养基 Media for ergot alkaloids production		
	M43	M96	M102	M104T	SM	CDM
甘露醇 Mannitol (g/L)		10				
山梨醇 Sorbitol (g/L)				100	100	100
蔗糖 Sucrose (g/L)	30	30	30			
淀粉 Starch (g/L)		15				
葡萄糖 Glucose (g/L)				40	40	40
麦芽精膏 Malt extract (g/L)	20	10	20			
酵母精膏 Yeast extract (g/L)	2.5	2	1	3.0	1.0	
蛋白胨 Peptone (g/L)	1		2			
琥珀酸 NH ₄ succinate (g/L)		0.68			10.0	10.0
谷氨酸 Glutamic acid (g/L)				10		
色氨酸 Tryptophan (g/L)				0.8		0.8
MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)			0.5	0.3	0.3	0.3
KCl (g/L)			0.5			
KH ₂ PO ₄ (g/L)			1		1.0	1.0
烟碱酸 Nicotinic acid (mg/L)						0.14
硫胺 Thiamine-HCl (mg/L)						0.2
维生素 B6 Yridoxine (mg/L)						0.2
pH	6.0	6.0	6.0	5.6	5.6	5.6

表 4 生物碱在部分寄主中的分布^[29]

Table 4 Alkaloid profiles for a variety of grass-endophyte association^[29]

寄主 Host grass	内生真菌 Endophyte	生物碱 Alkaloids* (mg/kg)				共生体的形成 Association type
		E	L	LM	P	
<i>Festuca arundinacea</i>	<i>N. coenophialum</i>	0.5	1100	0	2	自然 Natural
<i>F. arundinacea</i>	<i>N. lolii</i>	1.2	0	23	18	人工 Artificial
<i>Lolium. perenne</i>	<i>N. lolii</i>	1.3	0	4.7	19	自然 Natural
<i>L. perenne</i>	<i>N. coenophialum</i>	2.5	1000	0	29	人工 Artificial
<i>L. perenne</i>	<i>Epichloë typhina</i>	0	0	0	53	自然 Natural
<i>L. perenne</i>	<i>N. lolii</i> × <i>E. typhina</i>	4.8	0	0.4	22	自然 Natural
<i>F. pratensis</i>	<i>N. uncinatum</i>	0	5600	0	0	自然 Natural
<i>F. gigantean</i>	<i>E. festucae</i>	0	300	0	4	自然 Natural
<i>F. longifolia</i>	<i>E. festucae</i>	0.9	0	4.0	22	自然 Natural
<i>Festuca rubra subsp. rubra</i>	<i>E. festucae</i>	1.2	0	0	0	自然 Natural

* E, Ergovaline; L, 黑麦草碱 Loine; LM, 震颤素 Lolitrem B; P, 波胺 Peramine

另一方面,人们积极在自然界中寻找或通过人工侵染和杂交技术创造新的禾草-内生真菌共生体或内生真菌菌系,以得到具有抗逆性又对家畜无有害影响的理想共生体。目前美国、新西兰已从自然界中检测筛选得到只产生对昆虫有毒(Peramine)而不产生对哺乳动物有毒(Lolitrem B)的生物碱的禾草-内生真菌共生体^[24]。而在人工侵染和杂交方面,虽然创造了新的禾草-内生真菌共生体或内生真菌菌系,但尚未得到理想的共生体。有趣的是,研究中发现内生真菌对禾草的侵染并形成共生的过程两者似乎存在着互相识别的机制,如人工侵染试验表明内生真菌 *N. lolii*, *Gliocladium-like sp.*, *Phialophora-like sp.* 和香柱菌均可侵染黑麦草,但 *N. coenophialum* 却不能。该机制还有待进一步的研究明确^[43, 44]。

1.3 生物碱的生物合成途径

近年来,随着分子生物学技术的发展,美国、新西兰等国都已开始在分子水平深入研究上述四类主要的生物

碱,并取得了一定的成果,尤其在波胺、麦角碱和 loline 的生物合成途径方面已有了初步的进展,如麦角碱部分生物合成途径见图 2。对这几种生物碱合成途径中的整个基因簇还未见完整的报道,但对个别具有重要功能基因以及其所编码的酶已有了深入研究(表 5)。

表 5 生物碱生物合成途径中重要的基因及其所编码的酶

Table 5 Several important genes and codes the enzyme carry on alkaloid biosynthesis pathway

基因 Gene	编码的酶 Enzyme	调控的生物碱合成 Alkaloids	文献 Reference
<i>dmaW</i>	DMAT synthase	麦角碱 Ergot alkaloids	[48]
<i>lpsA</i>	Lysergyl peptide synthetase	麦角碱 Ergot alkaloids	[49]
<i>lolA</i>	不编码任何酶,调控作用 Regulation	黑麦草碱 Loline	[50]
<i>lolC</i>	不编码任何酶,调控作用 Regulation	黑麦草碱 Loline	[50]
6646 bp 的基因簇	N-methyl-transferase	波胺 Peramine	[51] NCBI GenBank (NZ_AAJM01000271)

由于麦角碱对哺乳动物的强烈毒性及其独特的药理作用,因而较早的受到了人们的关注。Heinstein 等从麦角菌 (*Claviceps* sp.) 中提取纯化了以下这种酶:dimethylallyl- pyrophosphate [L- tryptophan dimethylallyl transferase (DMAT synthase)] ,同时展示了 DMAT 的合成是麦角碱生物合成途径中的第一步,并且具有关键性的调节作用^[49]。随后 Tsai 等克隆了编码该酶的基因 *dmaW* 基因,从麦角菌中得到了它的 cDNA 并通过将其转化至酵母中,使其表达并对 *dmaW* 基因的 cDNA 进行了测序^[50]。Tudzynski 等通过对麦角菌可在无菌培养基中产碱的菌株进行克隆,鉴定了编码 dimethylallyltryptophan 合成酶 (DMATS) 的 *cpd1* 基因,该步是麦角碱生物合成中起催化作用的特殊步骤^[51]。在麦角菌中麦角胺的生物合成途径已经清楚,对其它麦角碱的生物合成途径已知其中的关键性生物反应以及其主要的调控酶及其编码的基因,尤其是 *dmaW* 和 *lpsA* 这两个重要基因的序列已经公布^[45, 52, 53]。另外,在基因的调控和表达方面业已开展了大量的研究^[47, 54]。

1.4 生物碱的毒性

对各种生物碱的致毒机理尚未完全清楚,只对四大类生物碱有初步研究(表 6)。对上述四类生物碱在昆虫和哺乳动物毒性的研究表明,除波胺以外的其余 3 类生物碱均对哺乳动物具有毒性,其中毒性最强的是麦角碱和 lolitrem B,分别是引致牛的狐茅中毒症和羊的蹒跚病的主要原因^[1, 24];对昆虫均有不同程度的毒性,毒性最强的是 peramine 和黑麦草碱。带有内生真菌的高羊茅和黑麦草中通常同时存在着多种麦角碱,他们共同作用不仅使所采食的动物中毒,还可改变其部分生理指标如:体表温度、血浆中催乳激素含量、牛奶产量、肌肉纤维产量及体重,重者可导致死亡,甚至可在其牛奶中检测到几种麦角碱,造成间接中毒^[56~63];其中麦角新碱和麦角酰胺两种生物碱是导致家畜中毒的重要毒素^[48, 63~66]。Lolitre B 也可降低家畜的体重^[67]。

除吡咯并吡嗪类生物碱目前只发现波胺一种以外,每类都含有几种生物碱,而且每种生物碱的生理作用及其程度都有所不同。由于麦角碱有明显的毒理作用和医药作用,对各种麦角碱的毒理及相互关系研究较深入,如对 Ergonovine、Ergovaline 和 Ergotamine 的研究表明, Ergonovine 可显著抑制 Na^+/K^+ ATPase 和 Mg^{2+} ATPase 的活性,但后者较弱^[69]。带菌的高羊茅中 Ergotamine 和 Ergonovine 可与 D_2 Dopamine 相结合从而抑制 AMP 循环,而饱和吡咯化合物类生物碱则不能^[70]。与此相比,其他生物碱的作用还有待进一步研究。

1.5 生物碱对寄主抗性的影响

内生真菌的侵染给禾草带来了生物和非生物抗性,如抗虫、抗干旱、抗病等^[71~73]。目前,已明确与生物碱有关的有抗虫性、阻止食草动物(家畜和野生动物)的采食优势以及抗病性。

在早期研究中,就发现与不带内生真菌的同种禾草相比,带内生真菌的禾草具有抗虫性。但直至生物碱的发现,才进一步证明是禾草中内生真菌产生的生物碱对动物的胃等消化系统产生不良影响,从而使寄主具有抗虫或阻止食草动物的采食优势。南志标和李春杰在其综述中列出了目前已报道的受带有内生真菌的禾草影响的害虫种类^[1]。

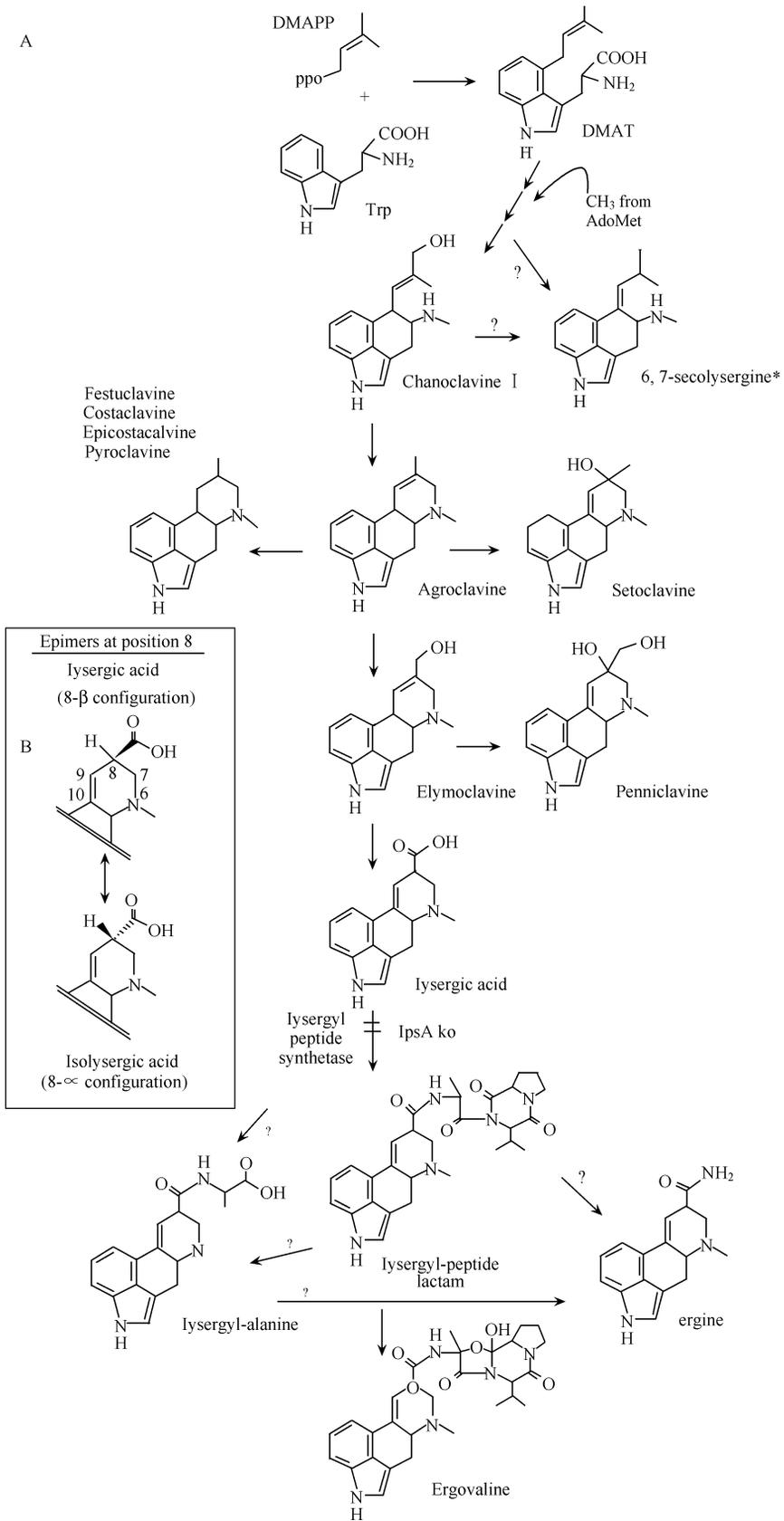


图2 麦角酸 ergovaline 和麦角酰胺的生物合成途径 [55]

Fig. 2 Biosynthesis pathway of ergovaline and ergine [55]

图B为麦角碱的8位点的生物合成途径

表 6 四类生物碱对家畜的制毒机理

Table 6 Activities of alkaloids in livestock

生物碱 Alkaloids	毒素类型 Type of toxic	制毒机理 Activities	文献 Reference
吲哚双萜类 Indol diterpene	神经性毒素 Neuropathic toxic	与神经受体相结合, 抑制 K^+ 通道 Affinity for neurilemmal receptors to stop K^+ channels	[29]
吡咯并吡嗪类 Pyrrolopyrazine	神经性毒素 Neuropathic toxic	与肠道受体相结合, 抑制营养吸收 Affinity for receptors of small intestine to stop assimilating nutrition	[68]
麦角碱类 Ergot alkaloids	神经性毒素 Neuropathic toxic	1. 降低家畜血浆中泌乳刺激素的浓度, 间接减少牛奶和体重的产量 2. 抑制 Na^+/K^+ ATPase 和 Mg^{2+} ATPase 的活性 3. D_2 dopamine 相结合从而抑制 AMP 循环 1. Decrease the production of milk and body weight by reducing prolactin levels in blood 2. Inhibit activity of Na^+/K^+ ATPase and Mg^{2+} ATPase 3. Affinity for D_2 dopamine receptors to inhibit cyclic AMP	[60] [69] [70]
饱和吡咯化合物 Pyrrolizidine	新陈代谢毒素 神经性毒素 Neuropathic and metabolic toxic	1. 与 α -2-adrenergic 或血清素受体相结合, 抑制 AMP 循环 2. 与肠道受体相结合, 抑制营养吸收 1. Affinity for α -2-adrenergic or serotonergic receptors to inhibit cyclic AMP 2. Affinity for receptors of small intestine to stop assimilating nutrition	[29]

4 类生物碱都不同程度的对昆虫有毒性, 如波胺 Peramine、Loline、Lolitrem B 和部分麦角碱 (Ergovaline, Ergoline, Ergopeptine) 均使其寄主具有抗虫性 [74~76]。不同种类的生物碱对不同害虫的毒性程度不同, 而生物碱浓度与其寄主抗虫性的相关性尚无定论 [68]。生物碱在植物地上部分, 尤其是在茎基部、叶鞘、花序和种子等组织中的浓度较高, 这或许可反映生物碱浓度和抗虫性的一定联系。

生物碱亦可增加寄主植物抗某些线虫的能力。目前已知在带有内生真菌的高羊茅生长的土壤内, 其螺旋线虫 (*Helicotylenchus dihystra*)、根结线虫 (*Meloidogyne marglandi*)、根斑线虫 (*Paratylenchus scribneri*)、*P. projectus* 和 *Tylenchorhynchus acutus* 等群体数量显著低于不带菌禾草生长的土壤 [77]。

由于除 peramine 以外的其余 3 类生物碱均对哺乳动物有毒性, 尤其是麦角碱和 lolitrem B, 因此在自然条件下可阻止家畜 [56, 57, 78, 79] 和鼠类、鸟类等野生动物的采食 [80~82], 从而为带菌禾草的物种延续提供了支持。

某些生物碱亦增加寄主的抗病性, 主要表现为抑制病原菌的生长、抑制孢子的萌发、阻止传媒介体昆虫等。离体条件下内生真菌的纯培养对某些病原真菌菌落的生长及其产孢有一定的抑制作用, 目前已证实内生真菌产生的生物碱或毒素等物质对其有抑制作用, 但试验未对拮抗结果作显著性比较, 并且具体机制尚不明了 [83~88]。值得注意的是, 虽然内生真菌所产生的生物碱可使寄主产生抗性, 但有时也使其寄主的发育速率降低 [89]。

2 影响生物碱的因素

影响生物碱种类和浓度的因素很多, 如寄主植株的品种、生态型、基因型, 内生真菌的种、菌株, 植株生长的温度、土壤水分、营养状况以及管理措施等都可能有一定的作用。在诸多因素中, Hill 等人认为生物碱浓度受不同寄主和内生真菌形成共生体的影响很大。但亦有试验表明, 寄主的生态型对生物碱浓度影响较共生体更大 [41]。也有学者认为就植株基因型和内生真菌菌株两个因素而言, 植株基因型对生物碱浓度的影响较大且效果显著 [90]。

目前的研究多集中在对植株体内生物碱浓度的测定, 对离体条件下内生真菌菌系产生生物碱的测定还很少见。而在同一种共生体中某一种生物碱的浓度个体差异很大, 以麦角类生物碱的浓度变化最为显著, 如麦角碱在高羊茅两个个体中的浓度差异极大, 种子中的浓度分别为, 8659mg/kg 和 3mg/kg; 在秸秆中的浓度分别为, 1268mg/kg 和 8mg/kg, 前者分别是后者的 2886 和 158 倍。因此分析数据时差异常常不显著 [91]。由于内生真菌一般在寄主植株内产生的生物碱种类较多, 就目前研究的几种主要生物碱而言, 对不同种类的生物

碱其影响因素的相关重要性也会随之变化。

2.1 寄主植物

2.1.1 种群及生态型

Faeth 等人对美国 17 个地区受 *Neotyphodium* 侵染的多年生黑麦草中的麦角类生物碱 (Ergonovine, Ergine, Isolysergic acid amides) 的检测表明,不同种群其生物碱浓度差异显著,其中只有一个种群 SP 其平均总生物碱浓度与地理分布成线性关系。有趣的是有些种群的带菌率虽为 100%,但却不产生生物碱^[92]。在对受同种内生真菌侵染的天然针草 (Needlegrass) 的个体生物碱检测 (麦角碱类和 line) 时,也发现某些带菌植株体不含任何生物碱^[78]。受同一内生真菌侵染的不同种群植物体内的生物碱浓度各异。如 Kearney 等人对两种不同生态型受 *Neotyphodium lolii* 侵染的多年生黑麦草中生物碱浓度研究表明,对于 Ergovaline,两种生态型分别有 70% 和 53% 的种群浓度高于平均值,而对于 Lolitrem B 一种生态型的全部种群及另一生态型 28% 的种群高于平均值^[93]。

2.1.2 植物品种及基因型

不同植物品种中生物碱浓度变化较大,甚至差异极显著^[94]。研究表明,高羊茅不同品种间生物碱浓度具有显著差异^[92]。但也有研究表明,不同基因型的高羊茅和黑麦草中生物碱的含量变化甚微^[12, 95, 96]。Ball 等人用 HPLC (High-performance liquid chromatography) 测定了感染内生真菌 *Neotyphodium lolii* 的多年生黑麦草两种基因型的生物碱 (Lolitrem B) 浓度,结果表明,不同基因型的黑麦草生物碱浓度因部位而变化,一种在植株衰老或死亡的叶鞘和叶片中浓度最高,另一种则在种子中浓度最高^[97]。

2.1.3 植株的部位及生长期

与内生真菌在植株体内的分布相似,生物碱也主要分布在植株的地上部分,尤其是在茎基部、叶鞘、花序和种子等组织中的浓度高。在高羊茅中,麦角碱在种子中的浓度最高,并显著高于在其它部位中的浓度^[12, 98]。多年生黑麦草中,Lolitrem B 和波胺的浓度也有相同的趋势,叶鞘的基部浓度最高,75% 的生物碱都集中在地上 5cm 内的植株基部;其次是生殖枝和种子,在根中浓度最低,而越老的叶片其浓度越高^[97, 99, 100] (图 3)。

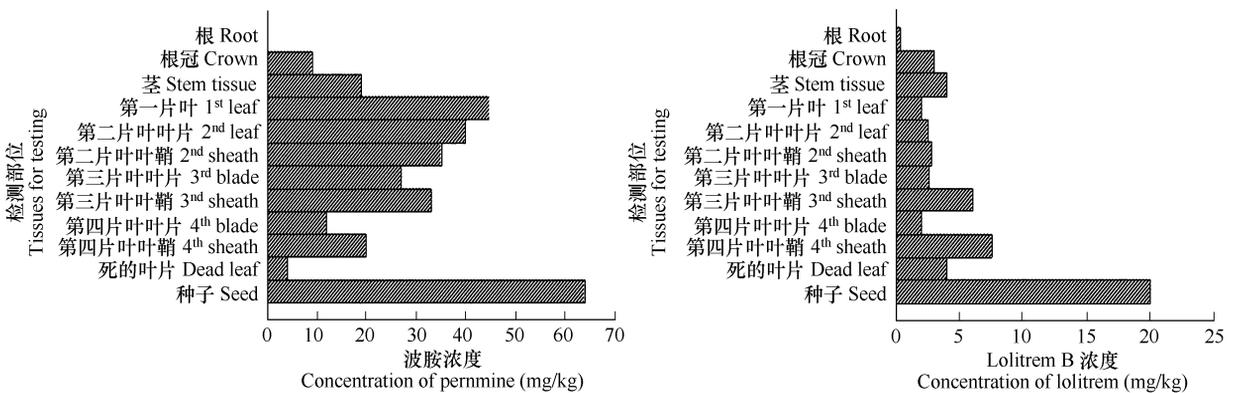


图 3 波胺和 lolitrem B 在多年生黑麦草各部位的浓度

Fig. 3 Concentration of peramine and lolitrem B in different components of *N. lolii*-infected perennial ryegrass

根据文献^[100, 97]绘制 Re-drawn from references 100 and 97

就不同生长期而言,高羊茅在温室试验中麦角碱浓度在出苗后 2 至 4 周时达到最高,之后逐渐降低,6 周以后达到稳定;在大田试验中也有相同趋势,在放牧期时达到最高,当植物进入成熟期时植株茎和叶片中生物碱浓度迅速降低,而花序和种子中的生物碱浓度反而会增加^[12, 101, 102] (图 4)。植株体内生物碱浓度存在较大的个体差异,尤其是在植物生长初期,随着生长季节的变化其个体差异减小^[94]。影响生物碱在植物不同生长期分布的主要因素是:内生真菌菌丝体含量的分布,以及该生物碱在植物体内的转运和降解。

2.2 环境

2.2.1 气候因素

气温和湿度均可影响植物体内某种生物碱的浓度。Reinholz 等人通过温室和田间试验研究表明,在相同的地理条件下温度的升高(17℃白天/10℃夜晚和27℃白天/19℃夜晚)可使多年生黑麦草的根、叶片、叶鞘中生物碱(lolitre B)的浓度显著升高,其含量甚至可达到低温时的7倍。但在完全相同的条件下植株生物碱浓度个体差异仍很大。这可能是内生真菌产生生物碱的机能不能被外界条件完全激发所致^[104]。在捷克的田间试验表明,温度的升高和降雨的增多均可使受 *Neotyphodium* spp. 侵染的多年生黑麦草中的 Ergovaline 浓度升高,但另一种生物碱裸麦角碱(Chanoclavine)的浓度却无很大变化^[41]。水分胁迫会促使生物碱浓度升高,但部分生物碱也有相反的试验结果。高羊茅在水分胁迫下其麦角碱(Ergopeptine alkaloid)、波胺和 Lolitre B 的浓度升高,相反的另一生物碱 pyrrolizidine 的浓度降低^[7, 105]。可能由于不同生物碱在寄主不同生理反应中起着一定的作用,寄主可改变其自身生理过程,影响生物碱的含量,进而提高其抗逆性。

2.2.2 土壤养分

土壤含水量和营养成分的浓度亦可影响生物碱的浓度,但影响甚微,目前尚未发现明显规律^[90]。

试验表明,土壤中的磷与高羊茅根中生物碱的累积量存在正线性关系^[4]。但亦有研究发现磷和钾可大幅减少生物碱 Perloine 在高羊茅植株体内的生物合成,而氮会增加其生物合成^[2]。

2.2.3 季节与年度变化

植物体内生物碱浓度受季节变化的影响,但不同生物碱其变化规律各异。试验证明,多年生黑麦草中 Lolitre B 的浓度冬季时很低,春季时升高而晚秋有所下降。麦角碱类在6月份和9月份的浓度显著高于其它月份^[92]。与此不同,高羊茅的叶片和叶鞘中 Ergovaline 的浓度一年中在12月最高,每年冬末3月份其浓度降低幅度可达85%^[9, 106]。Ergovaline 在茎和种子中的浓度随年份变化很大,但由于个体差异较大其平均值近似,也有报道它们之间无规律可循^[41, 91]。

在美国密苏里州种植的高羊茅在1999至2000年 Ergovaline 浓度是454mg/kg,而次年浓度下降为175mg/kg^[106]。在新西兰种植的黑麦草1991年11月 Lolitre B 的浓度是1.2mg/kg,而次年浓度上升为7.0mg/kg,是上一年的将近5.8倍^[97]。受 *Neotyphodium coenophialum* 侵染的高羊茅秸秆中 Ergovaline 1991与1992年的平均浓度差异显著,但在种子中的浓度相似^[91]。于2001、2002、2003年检测受 *Neotyphodium* 侵染的多年生黑麦草种群中麦角类生物碱(Ergonovine, Ergine, Isolysergic acid amides) 2001年与2002年相比,除 Ergine 以外包括总生物碱的其他麦角类生物碱浓度差异显著,2002年与2003年相比,包括总生物碱在内全部生物碱浓度都差异显著^[92]。

自然条件下,水分、温度、营养等因素均较难严格控制,种群生物碱浓度差异虽然显著,但影响的因素亦难以分析。

2.3 内生真菌菌株

同一内生真菌菌株在不同种寄主中可产生同种生物碱,如内生真菌 *Neotyphodium* 可在9种不同的寄主中产生 Ergovaline,但其浓度各异^[107]。

相同寄主中不同的内生真菌种类不但会产生不同或相同的生物碱,并且每种生物碱的浓度也会随之变化。从紫羊茅(*Festuca rubra*)中分离出了3种不同的内生真菌均可产生生物碱,但其中两种在植物体内所产

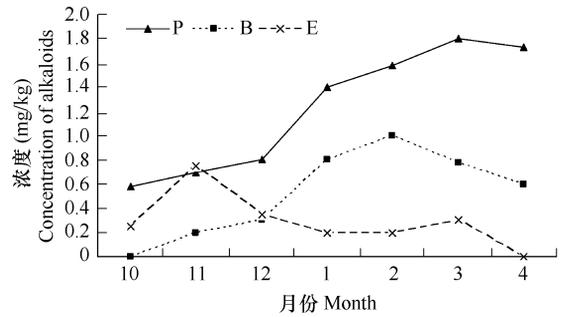


图4 波胺, Lolitre B (B)和 Ergovaline (E)在多年生黑麦草不同生长期的浓度 (P)

Fig. 4 Concentration of peramine (P), lolitre B (B) and ergovaline (E) over the season in *N. lolii*-infected perennial ryegrass

根据文献^[103]绘制 re-drawn from reference^[103]

生的麦角碱浓度较高,另一种产生的 Lolitrem B 较高^[68]。

2.4 草地管理

刈割频率和留茬高度都可影响生物碱的浓度。温室条件下频繁刈割可降低植物体内生物碱浓度。每周刈割 1 次比每两周 1 次的高羊茅体内麦角碱类生物碱浓度低,相同条件下多年生黑麦草中的麦角碱和其它两种生物碱的浓度均具有下降趋势^[108]。同一刈割频度下,高羊茅和多年生黑麦草中生物碱的浓度随刈割高度而升高^[41,109]。

除草剂可有效的降低植物体内的生物碱浓度, Prestidge 等人对已建成的草地分别适量施除草剂百草枯 (Paraquat) 和草甘膦 (Glyphosate), 植物生长剂 (Paclobutrazo), 结果证明只有百草枯可有效的降低多年生黑麦草中的生物碱 Lolitrem B 的浓度^[110]。利用杀菌剂降低禾草中内生真菌感染率也可间接降低草地的生物碱浓度^[111]。多种杀菌剂如: 丙氯灵 (Prochloraz), Diclobutrazol, Procymidone, Propiconazole, 三唑酮 (Triadimefon), Imazalil, 苯莱特 (Benomyl), Oxycarboxin, Triforine 等, 只有用丙氯灵处理的多年生黑麦草种子中内生真菌完全受到抑制, Propiconazole 虽不能完全控制但也可收到良好的效果。如将杀菌剂直接喷在植株叶片上处理, 只有 Propiconazole 对内生真菌的生长有一定的抑制作用。其他杀菌剂效果不显著^[87]。

另外, 干草中生物碱的浓度大大低于鲜草^[12,105]。经过青贮处理的高羊茅中麦角碱 Ergovaline 的浓度无显著变化, 但高羊茅在孕穗期比种子成熟期处理后的麦角碱浓度显著降低^[112]。

3 生物碱的检测

在禾草内生真菌生物碱研究的初期阶段, 简单的显色反应是检测产碱量和筛选突变体的常用技术, 如曾用 Van Urk 反应检测麦角碱^[113,114]。但由于此类检测技术的灵敏度低, 只能根据反应液颜色的深浅大体的将样品分为高含量、中含量、低含量和不含有生物碱, 而无法进行定量研究, 现已不用。目前, 生物碱的检测主要有分离检测法和直接检测法 (HPLC) 这两种方法各有优缺点, 且可相互借鉴、补充。

利用直接检测法——色谱分析法进行生物碱的提取、纯化和定量已有了比较成熟的方法^[23]。一般实验流程为: 取待测物研磨打碎, 用合适的溶剂提取 (如甲醇、乙醇、氯仿、酒石酸、乳酸、乙醚等), 经离心、萃取、层析等方法反复纯化, 如对提取物的纯度要求很高也可用酶系统进一步纯化 (Synaptosomal ATPase Enzyme System), 之后用色谱法定量^[115]。在生物碱的提取和纯化中不可避免的问题是生物碱的降解、氧化、表异构化等, 从而影响测定的最终结果。为了降低试验误差, 生物碱的收集工作最好在室温低于 25°C、柔和的黄光或荧光下进行, 提取纯化后于棕色瓶中低温保存, 以防进一步的降解^[28,50,116~118]。根据生物碱种类的不同, 选择的检测方法也有所不同, 常用方法归纳于表 7。

表 7 禾草内生真菌生物碱含量的主要检测方法

Table 7 Main methods of detecting alkaloids

生物碱 Alkaloids	典型代表物 Representative compounds	检测方式* Method	最低检测值 (mg/kg) Minimum concentration obtained	文献 Reference
吲哚双萜类 Indol diterpene	Lolitrem B	HPLC 荧光检测器	0.01	[34] [23]
吡咯并吡嗪类 Pyrrolopyrazine	Peramine	TLC (Ehrlich's reagent) HPLC (荧光或紫外检测器)	— 1 0.5	[35] [36]
麦角碱类 Ergot alkaloids	Ergonorine	HPLC (荧光或紫外检测器)	10 ⁻⁹ 10 ⁻⁶	[37]
饱和吡咯化合物 Pyrrolizidine	Loline	Capillary GC (FID 或 MS)	10	[38,39]

* HPLC: 高效液相色谱法 High-performance liquid chromatography; TLC: 薄层析法 Thin-layer chromatography; GC: 气相色谱法 Gas chromatography; FID: 火焰电离法 Flame ionization detection; MS: 质谱法 Mass spectrometry

值得注意的是, 随着分子技术的渗透以及对内生真菌生物合成途径的逐步了解, 利用分子技术直接在真

菌基因中检测的新手段正在兴起。无疑该检测方法将更加简洁、方便和精确,但目前还不够成熟^[40]。

3.1 预分离检测法

目前,多采用薄层或柱层进行预分离,取待测组份按比色法、分光光度法(包括可见、紫外、荧光)测定,也可直接在薄层板上按上述方法测定^[41]。大多数生物碱的分离采用薄层层析,它是一种简便、快速、微量的层析方法。但是若单独使用纸层析法、离子对色谱法、薄层层析法,难以获得准确的定性定量结果。相对于柱层析而言,此法步骤繁多且耗时^[41]。

3.2 直接检测法

高效液相色谱法(HPLC)是20世纪60年代末70年代初发展起来的一项新颖快速的分离分析技术。目前已在我国广泛应用。液相色谱分析引进了气相层析的理论,具有气相层析的全部优点:高压、高速、高效、高灵敏度。由于HPLC分离能力强、选择性高、测定灵敏度高,操作简单,可在室温下进行,应用范围极广,无论是极性还是非极性,小分子还是大分子,热稳定还是不稳定的化合物均可用此法测定。对生物碱、蛋白质、核酸、氨基酸、类固醇和类脂等尤为有利,对于挥发性生物碱组分最好用HPLC方法^[41, 42, 43]。

用HPLC分离检测禾草中的生物碱,须根据所测生物碱混合物的特殊物化性质设计适合该生物碱的分离条件。通常采用有机溶液和无机缓冲水溶液或其混合液作为流动相,对于不同种类生物碱流动相的浓度和pH值不同,尚需进一步研究,但都大同小异(表8)^[44~47]。大多数生物碱的检测通常用荧光或紫外检测,其紫外吸光范围为230至320nm,荧光激发波长和检测波长分别是310nm,410nm^[48, 49]。

由于内生真菌-禾草共生体中生物碱成分较复杂,因此,从20世纪80年代初与质谱检测法相结合广泛的应用于对带菌禾草中生物碱的检测,尤其是高羊茅中麦角类生物碱和黑麦草中Lolitrein等生物碱的

检测和纯化^[120~122]。目前对于主要的几种生物碱的检测技术均已成熟,但用HPLC分离时仍存在线性影响太差、峰拖尾、洗脱液组成复杂等问题,目前正积极在技术方面寻求解决方法,部分问题已得到解决;另一方面随着对检测物质的灵敏度及精确度要求不断的提高,对仪器的要求也随之提高^[123, 124]。

4 展望

目前,对禾草-内生真菌共生体中所含的生物碱已有了高度的重视,并且借助分子生物学技术已经对几种生物碱生物合成途径有了一定的了解,相信在不久的将来必定会使各种生物碱的整个合成途径展现在世人眼前。关于内生真菌及其相关理论研究总体向两个大的方面发展:(1)明确以生物碱为中心,包括禾草-内生真菌共生体、食草动物及其相关食物链在内的各组分在草地生态系统中的作用和影响生物碱浓度及其种类的非生物因素。进一步明确每种因素之间的关系以及在该系统中各因素的相关重要性,如共生体对生物碱种类和在植物各组织内的分布的影响;生物碱在种类和植物体内空间的分布规律与生物(害虫、家畜、野生动物等食草动物的采食及其食物链)或非生物(温度、湿度、土壤中的矿物质等)因素的相关性;生物碱对植物的生理反应以及植物对内生真菌的代谢途径的影响等。(2)就生物碱本身而言,已知的四类生物碱中又包含了多种,并且还有新的生物碱被不断地发现,对每种生物碱的毒性以及之间的关系还有待深入研究。另外,在生物碱合成调控方面还需在其基因调控、表达和合成途径中某些大分子化合物(蛋白质、多肽、螯合化合物等)或小分子物质的重要作用等方面深入研究。

另外在应用方面,带菌禾草中生物碱对哺乳动物的毒害无疑是畜牧业生产中的巨大威胁。可从3方面入手解决该问题:第一,寻找、人工培育或用分子技术得到对哺乳动物无毒的禾草-内生真菌共生体。第二,加强

表8 利用HPLC检测生物碱通常所用的流动相

Table 8 Main solutions to follow onto HPLC for detecting alkaloids

生物碱种类 Alkaloids	流动相 Elution solution		文献 Reference
	有机相 Organic solution	无机相 Inorganic solution	
吲哚双菇类 Lolitrein	乙腈、二氯甲烷 Acetonitrile, CH ₂ Cl ₂	—	[50] [19] [110]
	乙腈 Acetonitrile	碳酸胍水溶液 Guanidine carbonate solution	[19] [118]
麦角碱类 Ergonovine	乙腈 Acetonitrile	乙酸胍水溶液 NH ₄ OAc solution	[118]

草地的人工管理使生物碱浓度降到可接受的程度。第三, 培育具有抗生物碱的家畜品种或制造抗生物碱的疫苗等药物解毒。综合而言, 第一种方法无疑是最经济、简洁的, 而且目前已经得到了这种共生体, 但有待于推广^[66, 77, 108, 110, 125]。综上所述, 生物碱所带给寄主植物的优势是值得关注的, 并将可以人为的调控各种优势, 使内生真菌及其代谢物生物碱成为新一代的“生物农药”。

Reference :

- [1] Nan Z, Li C. Roles of the grass-*Neotyphodium* association in pastoral agriculture systems. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24 (3) :605—616.
- [2] Li C J, Nan Z B, Paul V H, *et al.* A new *Neotyphodium* species symbiotic with drunken horse grass (*Achnatherum inebrians*) in China. *Mycotaxon*, 2004, 90 (1) :141—147.
- [3] White J F, Morgen-Jones G, Morrow A C. Taxonomy, life cycle, reproduction and detection of *Acremonium* endophytes. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 1993, 44 :13—37.
- [4] Bruehl G W, Kaiser W J, Klein R E. An endophyte of *Achnatherum inebrians*, an intoxicating grass of northwest China. *Mycologia*, 1994, 86 (6) :773—776.
- [5] Kaiser W J, Bruehl G W, Davitt C M, *et al.* *Acremonium* isolates from *Stipa robusta*. *Mycologia*, 1996, 88 (4) :539—547.
- [6] Moon C D, Miles C O, Scharl C L. The evolutionary origins of *Neotyphodium* endophytes from grasses indigenous to the Southern Hemisphere. In : Paul V H and Dapprich P D eds. *Proceedings of 4th International Neotyphodium/Grass Interactions Symposium*. Soest, Germany, 2000, 289—293.
- [7] Nan Z B, Li C J. *Neotyphodium* in native grasses in China and observations on endophyte/host interaction. In : Paul V H and Dapprich P D eds. *Proceedings of 4th International Neotyphodium/Grass Interactions Symposium*. Soest, Germany, 2000, 41—50.
- [8] Wang Z W, Wang S M, Ji Y L, *et al.* Plant endophyte research 6 : detection and distribution of endophytic fungus in gramineous plants in saline-alkali area in Dongying. *Pratacultural Science*, 2005, 22 (2) :60—63.
- [9] Cunningham I J, Swan J B, Hopkirk C S M. The symptoms of ergot poisoning in sheep. *The New Zealand Journal of Science and Technology*, 1944, 121—125.
- [10] Yates S G. Toxicity of tall fescue forage : a review. *Economic Botany*, 1962, 16 (4) :295—303.
- [11] Jeffreys J A D. The alkaloids of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) Part I. Perloine. *Journal of Chemical Society*, 1964, 4504—4512.
- [12] Gentry C E, Chapman R A, Henson L, *et al.* Factors affecting the alkaloid content of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Agronomy Journal*, 1969, 61 :313—316.
- [13] Gallagher R T, Smith G S, Menna M E di, *et al.* Some observations on neurotoxin production in perennial ryegrass. *New Zealand Veterinary Journal*, 1982, 30 (12) :203—204.
- [14] Porter J K, Bacon C W, Robbins J D, *et al.* Ergot alkaloid identification in Clavicipitaceae systemic fungi of pasture grasses. *Journal of Agriculture and Food Chemical*, 1981, 29 :653—657.
- [15] Bacon C W. Toxic endophyte-infected tall fescue and range grasses : Historic perspectives. *Journal Animal Science*, 1995, 73 :861—870.
- [16] Nan Z B. Effects of *Acremonium* endophyte on the growth of *Hordeum bogdanii*. *Pratacultural Science*, 1996, 13 (1) :16—18.
- [17] Nan Z B. Incidence and distribution of endophytic fungi in seedings and plants of some native and introduced grasses in China. *Acta Prataculturae Sinica*, 1996, 5 (3) :13—17.
- [18] Nan Z B. Incidence and distribution of endophytic fungi in seed of some native and introduced grasses in China. *Acta Prataculturae Sinica*, 1996, 5 (2) :1—8.
- [19] Chen S P, Gao Y B, Liang Y, *et al.* Effects of endophyte infection on protective enzyme activities in leaves of *Lolium perenne* underwater stress. *Chin J. Appl. Environ. Boil.*, 2001, 7 (4) :348—354.
- [20] Chen S P, Gao Y B, Liang Y, *et al.* Effects of endophyte infection on the concentration of free prolin and ABA of leaves of *Lolium perenne* underwater stress. *Acta Ecologica Sinica*, 2001, 21 (12) :1964—1972.
- [21] Li H, Qing C, Zang Y L, Zhao Z W. Screening for endophytic fungi with antitumour and antifungal activities from Chinese medicinal plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2005, 21 :1515—1519.
- [22] Tian X L, Cao L X, Tan H M, *et al.* Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities *in vitro*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2004 20 (3) :303—309.
- [23] Porter J K. Analysis of endophyte toxins : fescue and other grasses toxic to livestock. *Journal Animal Science*, 1995, 73 :871—880.
- [24] Fletcher L R, Popay A J, Tapper B A. Evaluation of several lolitrem-free endophyte/perennial ryegrass combinations. *The Proceedings of New Zealand Grassland Association*, 1991, 53 :215—219.

- [25] Spiering M J , Davies E , Tapper B A , *et al.* Simplified extraction of ergovaline and peramine for analysis of tissue distribution in endophyte-infected grass tillers. *Journal of Agriculture and Food Chemical* , 2002 , 50 : 5856 — 5862.
- [26] Mantegani S , Brambilla E , Varasi M. Ergoline derivatives : receptor affinity and selectivity. *IL Farmaco* , 1999 , 54 : 288 — 296.
- [27] Olsovska J , Flieger M , Bachechi F , *et al.* Direct resolution of optically active isomers on chiral packings containing ergoline skeleton. 6. enantioseparation of profens. *Chirality* , 1999 , 11 : 291 — 300.
- [28] Shelby R A. Analysis of ergot alkaloids in endophyte-infected tall fescue by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agriculture and Food Chemical* , 1997 , 45 : 4674 — 4679.
- [29] Bush L P , Wilkinson H H , Schardl C L. Bioprotective alkaloids of grass-funga endophyte symbioses. *Plant Physiol* , 1997 , 144 : 1 — 7.
- [30] Christensen M J , Latch G C M , Tapper B A. Variation within isolates of *Acremonium* endophytes from perennial rye-grasses. *Mycological Research* , 1991 , 95 , 918 — 923.
- [31] Leuchtman A , Schmidt D , Bush L P. Different levels of protective alkaloids in grasses with stroma-forming and seed-transmitted *Epichloe/Neotyphodium* endophytes. *Journal of Chemical Ecology* , 2000 , 26 (4) : 1025 — 1036.
- [32] Amici A M , Minghetti A , Scotti T , *et al.* Ergotamine production in submerged culture and physiology of *Claviceps purpurea*. *Appltd Microbiology* , 1967 , 15 (3) : 597 — 602.
- [33] Amici A M , Minghetti A , Scotti T , *et al.* Production of peptide ergot alkaloids in submerged culture by three isolates of *Claviceps purpurea*. *Appltd Microbiology* , 1969 , 18 (3) : 464 — 468.
- [34] Dimenna M E , Mortimer P H , Prestidge R A , *et al.* Lolitrem B concentrations , counts of *Acremonium lolii* hyphae , and the incidence of ryegrass staggers in lambs on plots of *A. lolii*-infected perennial ryegrass. *New Zealand Journal of Agricultural Research* , 1992 , 35 : 221 — 217.
- [35] Miles C O , Lane G A , Menna M E , *et al.* High levels of ergonovine and lysergic acid amide in toxic *Achnatherum inebrians* accompany infection by an *Acremonium*-like endophytic fungus. *Journal of Agriculture and Food Chemical* , 1996 , 44 (5) : 1285 — 1290.
- [36] Tapper B A , Rowan D D , Latch G C M. Detection and measurement of the alkaloid peramine in endophyte-infected grasses. *Journal of Chromatography* , 1989 , 133 — 138.
- [37] Belesky D P , Stringer W C , Plattner R D. Influence of endophyte and water regime upon tall fescue accessions II. Pyrrolizidine and ergopeptide alkaloids. *Annals of Botany* , 1989 , 64 : 343 — 349.
- [38] Parrott W A. *In vitro* approaches for the study of *Acremonium-Festuca* biology. In : Bacon CW , Jr White JF eds. *Biotechnology of Endophytic Fungi of Grasses*. Boca Raton , FL , Chap. 8. CRC Press , 1994. 37 — 39.
- [39] Mukherjee J , Menge M H D , Grammel N , *et al.* Development of a tryptophan auxotrophic mutant of *Claviceps purpurea* 1029 N5 and its preliminary application in the synthesis of new ergot alkaloids. *Acta Biotechnol* , 2002 , 22 (3 — 4) , 411 — 415.
- [40] Bacon C W. Procedure for isolating the endophyte from tall fescue and screening isolates for ergot alkaloids. *Applied and Environmental Microbiology* , 1988 , 24 : 2615 — 2618.
- [41] Caga B , Flieger M , Olsovska J. Concentration of ergot alkaloids in Czech ecotypes of *Lolium perenne* and *Festuca pratensis*. *Grass & Forage Science* , 1999 , 54 (4) : 365 — 370.
- [42] Schardl C L , Blankenship J D , Machado C. Spiering M J. Alkaloid-making fungal symbionts. 2002 , www. plantphys. net.
- [43] Latch G C M , Christensen M J. Artificial infection of grasses with endophytes. *Ann. Appl. Biol.* , 1985 , 107 : 17 — 24.
- [44] Craven K D , Blankenship J D , Leuchtman A , *et al.* Hybrid fungal endophytes symbiotic with the grass *Lolium perenne*. *Sydowia* , 2001 , 53 (1) : 44 — 73.
- [45] Tudzynski P , Correia T , Keller U. Biotechnology and genetics of ergot alkaloids. *Appl. Microbiol. Biotechnol* , 2001 , 57 : 593 — 605.
- [46] Powell G K , Plattner R D , Yate S G , *et al.* Ergobalansine , a new ergot-type peptide alkaloid isolated from *Cenchrus echinatus* (sandbur grass) infected with *Balansia obtecta* , and produced in liquid cultures of *B. obtecta* and *Balansia cyperi*. *J. Nat. Prod.* , 1990 , 53 : 1272 — 1279.
- [47] Spiering M J , Wilkinson H H , Blankenship J D , *et al.* Expressed sequence tags and genes associated with loline alkaloid expression by the fungal endophyte *Neotyphodium uncinatum*. *Fungal Genetics and Biology* , 2002 , 36 : 242 — 254.
- [48] Porter J K. Chemical constituents of grass endophytes. In : Bacon CW , Jr White JF eds. *Biotechnology of Endophytic Fungi of Grasses*. Boca Raton , FL , Chap. 8. CRC Press , 1994. 103.
- [49] Krupinski V M , Robbers J E , Floss H G. Physiological study of ergot : Induction of alkaloid synthesis by tryptophan at enzymatic level. *Journal of Bacteriology* , 1976 , 125 : 158 — 165.
- [50] Gebler J C , Poulter C D. Purification and characterization of dimethylallyltryptophan synthase from *Claviceps purpurea*. *Arch. Biochem. Biophys* , 1992 , 296 : 308 — 313.
- [51] Correia T , Grammel N , Ortel I , *et al.* Molecular cloning and analysis of the ergopeptide assembly system in the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Chem Biol. Dec.* , 2003 , 10 (12) : 1281 — 622.

- [52] Wang J H , Machado C , Panaccione D *et al.* Ergot alkaloid biosynthesis genes cloned from *Claviceps* and *Balansia*. The Proceedings of the 20th Fungal Genetics Conference , 1999. 23 — 27.
- [53] Wang J H , Machado C , Panaccione , *et al.* The determinant step in ergot alkaloid biosynthesis by an endophyte of perennial ryegrass. *Fungal Genet Biol* , 2004 , 41 : 189 — 198.
- [54] Herd S , Christensen M J , Saunders K , *et al.* Quantitative assessment of *in planta* distribution of metabolic activity and gene expression of an endophytic fungus. *Microbiology* , 1997 , 143 : 267 — 275.
- [55] Panaccione D G , Tapper B A , Lane G A , *et al.* Biochemical outcome of blocking the ergot alkaloid pathway of a grass endophyte. *Journal of Agriculture and Food Chemical* , 2003 , 51 : 6429 — 6437.
- [56] Bacon C W , Philip C L , Porter J K , *et al.* Ergot toxicity from endophyte-infected grasses : a review. *Agronomy Journal* , 1986 , 78 : 106 — 116.
- [57] Thompson F N , Stuedemann J A. Pathophysiology of fescue toxicosis. *Agriculture , Ecosystems and Environment* , 1993 , 44 : 263 — 281.
- [58] Moubarak A S , Piper E L , Johnson Z B , *et al.* HPLC method for detection of ergotamine , ergosine , and ergine after intravenous injection of a single dose. *Journal of Agriculture and Food Chemical* , 1996 , 44 : 146 — 148.
- [59] Schneider S J , Miles C O , Garthwaite I , *et al.* First report of field outbreaks of ergot-alkaloid toxicity in South Africa. *Journal of Veterinary Research* , 1996 , 63 : 97 — 108.
- [60] Browning R , Thompson F N , Sartin J L , *et al.* Plasma concentrations of prolactin , growth hormone , and luteinizing hormone in steers administered ergotamine or ergonovine. *Journal Animal Science* , 1997 , 75 : 796 — 802.
- [61] Gadberry M S , Denard T M , Spiers D E , *et al.* Effects of feeding ergovaline on lamb performance in a heat stress environment. *Journal Animal Science* , 2003 , 81 : 1538 — 1545.
- [62] Waghorn G C , Latch G C M , Rolston M P. Prolactin assay for fescue toxicity in sheep. *New Zealand Veterinary Journal* , 1994 , 42 : 195 — 197.
- [63] Cross D L , Redmond L M , Strickland J R. Equine fescue toxicosis : signs and solutions. *Journal Animal Science* , 1995 , 73 : 899 — 908.
- [64] Cheeke P R. Endogenous toxins and mycotoxins in forage grasses and their effects on livestock. *Journal Animal Science* , 1995 , 73 : 909 — 918.
- [65] Paterson J , Forcherio C , Larsons B , *et al.* The effects of fescue toxicosis on beef cattle productivity. *Journal Animal Science* , 1995 , 73 : 889 — 898.
- [66] Filipov N M , Thompson F N , Hill N S , *et al.* Vaccination against ergot alkaloids and the effect of endophyte-infected fescue seed-based diets on rabbits. *Journal Animal Science* , 1998 , 76 : 2456 — 2463.
- [67] Eerens J P J , Lucas R J , Easton H S , *et al.* Influence of the ryegrass endophyte (*Neotyphodium lolii*) in a cool moist environment II. Sheep production. *New Zealand Journal of Agricultural Research* , 1998 , 41 : 191 — 199.
- [68] Yue Q , Johnson-Cicalese J , Gianfagna T J , *et al.* Alkaloid production and chinch bug resistance in endophyte-inoculated chewings and strong creeping red fescues. *Journal of Chemical Ecology* , 2000 , 26 (1) : 279 — 292.
- [69] Moubarak A S , Johnson Z B , Rosenkrans C F. Antagonistic effects of simultaneous exposure of ergot alkaloids on kidney adenosine triphosphatase system. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* , 2003 , 39 (8-9) : 395 — 398.
- [70] Larson B T , Harmon D L , Piper E L , *et al.* Alkaloid binding and activation of D₂ Dopamine receptors in cell culture. *Journal Animal Science* , 1999 , 77 : 942 — 947.
- [71] Bacon C W. Abiotic stress tolerances (moisture , nutrients) and photosynthesis in endophyte-infected tall fescue. *Agriculture , Ecosystems and Environment* , 1993 , 44 : 123 — 142.
- [72] Malinowski D P , Belesky D P. Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses : mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science* , 2000 , 40 : 923 — 940.
- [73] Malinowski D P , Belesky D P , Lewis G C. Abiotic stresses in endophyte grasses. In Roberts C A , West C P and Spiers D E , eds. *Neotyphodium in Cool-season Grasses* , 2005 , 187 — 199.
- [74] Scharld C L. *Epichlo festucae* and related mutualistic symbionts of grasses. *Fungal Genetics and Biology* , 2001 , 33 (2) : 69 — 82.
- [75] Hill N S , Thompson F N , Stuedemann J A , *et al.* Ergot alkaloid transport across ruminant gastric tissues. *Journal Animal Science* , 2001 , 79 : 542 — 549.
- [76] Wilkinson H H , Siegel M R , Blankenship J D , *et al.* Contribution of fungal loline alkaloids to protection from aphids in a grass-endophyte mutualism. *Mol. Plant-Microbe Interact* , 2000 , 13 : 1027 — 1033.
- [77] Latch G C M. Physiological interactions of endophytic fungi and their hosts : biotic stress tolerance imparted to grasses by endophytes. *Agriculture , Ecosystems and Environment* , 1993 , 44 : 143 — 159.
- [78] Jones T A , Ralphs M H , Gardner S R , *et al.* Cattle prefer endophyte-free robust needlegrass. *J. Range Manage* , 2000 , 53 : 427 — 431.
- [79] Bacon C W , Porter J K , Robbins J. D , *et al.* *Epichloe typhina* from toxic tall fescue grasses. *Applied and Environmental Microbiology* , 1977 , 34 (5) : 576 — 581.

- [80] Conover M R. Impact of the consumption of endophyte-infected perennial ryegrass by meadow voles. *Agriculture , Ecosystems and Environment* , 2003 , 97 : 199 — 203.
- [81] Roberts C A , Spiers D E , Karr A L , *et al.* Use of a rat model to evaluate tall fescue seed infected with introduced strains of *Neotyphodium coenophialum*. *Journal of Agriculture and Food Chemical* , 2002 , 50 (20) : 5742 — 5745.
- [82] Strickland J R , Cross D L , Jenkins T C , *et al.* The effect of alkaloids and seed extracts of endophyte-infected tall fescue on prolactin secretion in an *in vitro* rat pituitary perfusion system. *Journal Animal Science* , 1992 , 70 : 2779 — 2786.
- [83] Siegel M R , Latch G C. Expression of antifungal activity in agar culture by isolates of grass endophytes. *Mycologia* , 1991 , 83 : 529 — 537.
- [84] White J F , Cole G T. Endophyte-host associations in forage grasses III. *in vitro* inhibition of fungi by *Acremonium Coenophialum*. *Mycologia* , 1985 , 77 (3) : 487 — 489.
- [85] Christensen M J , Leuchtman A , Rowan D D , *et al.* Taxonomy of *Acremonium* endophytes of tall fescue (*Festuca arundinacea*). meadow fescue (*F. pratensis*) and perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Mycological Research* , 1993 , 97 : 1083 — 1092.
- [86] Christensen M J. Antifungal activity in grasses infected with *Acremonium* and *Epichloe* endophytes. *Australasian Plant Pathology* , 1996 , 25 (3) : 186 — 191.
- [87] Harvey I C , Fletcher L R , Emms L M. Effects of several fungicides on the *Lolium* endophyte in ryegrass plants , seeds , and in culture. *New Zealand Journal of Agricultural Research* , 1982 , 25 : 601 — 606.
- [88] Kelemu S , Cardona C , Segura G. Antimicrobial and insecticidal protein isolated from seeds of *Clitoria ternatea* , a tropical forage legume. *Plant Physiology and Biochemistry* , 2004 , 42 : 867 — 873.
- [89] Bultman T L , McNeill M R , Goldson S L. Isolate-dependent impacts of fungal endophytes in a multitrophic interaction. *OIKOS* , 2003 , 102 : 491 — 496.
- [90] Faeth S H , Bush L P , Sullivan T J. Peramine alkaloid variation in *Neotyphodium*-infected Arizona fescue : effects of endophyte and host genotype and environment. *Journal of Chemical Ecology* , 2002 , 28 (8) : 1511 — 1526.
- [91] Welty R E , Craig A M , Azevedo M D. Variability of ergovaline in seeds and straw and endophyte infection in seeds among endophyte-infected genotypes of tall fescue. *Plant Disease* , 1994 , 78 (9) : 845 — 849.
- [92] Faeth S H , Gardner S R , Hayes C J , *et al.* Temporal and spatial variation in alkaloid levels in *Achnatherum robustum* , a native grass infected with the endophyte *Neotyphodium*. *Journal of Chemical Ecology* , 2005 , 23 : 1 — 16.
- [93] Kearney G , Johnstone G R , Allen D I , *et al.* Incidence of ryegrass endophyte (*Neotyphodium lolii*) and diversity of associated alkaloid concentrations among naturalised populations of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Australian Journal of Agricultural Research* , 2000 , 51 (5) : 569 — 578.
- [94] Ralphs M H , Gardner D R , Turner D L , *et al.* Predicting toxicity of tall larkspur (*Delphinium barbeyi*) : measurement of the variation in alkaloid concentration among plants and among years. *Journal of Chemical Ecology* , 2002 , 28 (11) : 2327 — 2341.
- [95] Hiatt E E , Hill N S. *Neotyphodium coenophialum* mycelial protein and herbage mass effects on ergot alkaloid concentration in tall fescue. *Journal of Chemical Ecology* , 1997 , 23 (12) : 2721 — 2736.
- [96] Cheplick G P , Cho R. Interactive effects of fungal endophyte infection and host genotype on growth and storage in *Lolium perenne*. *New Phytologist* , 2003 , 10 : 1469 — 1837.
- [97] Ball O J P , Barker G M , Prestidge R A , *et al.* Distribution and accumulation of the mycotoxin lolitrem B in *Neotyphodium lolii*-infected perennial ryegrass. *Journal of Chemical Ecology* , 1997 , 23 (5) : 1435 — 1449.
- [98] Siegel M R , Latch G C , Johnson M C. Fungal endophytes of grasses. *Annu Rev. Phytopathol* , 1987 , 25 : 293 — 315.
- [99] Dimenna M E , Mortimer P H , Prestidge R A , *et al.* Lolitrem B concentrations , counts of *Acremonium lolii* hyphae , and the incidence of ryegrass staggers in lambs on plots of *A. lolii*-infected perennial ryegrass. *New Zealand Journal of Agricultural Research* , 1992 , 35 : 221 — 217.
- [100] Ball O J P , Barker G M , Prestidge R A , *et al.* Distribution and accumulation of the alkaloid peramine in *Neotyphodium lolii*-infected perennial ryegrass. *Journal of Chemical Ecology* , 1997 , 23 : 1419 — 1434.
- [101] Belesky D P , Hill N S. Defoliation and leaf age influence on ergot alkaloids in tall fescue. *Annals of Botany* , 1997 , 79 (3) : 259 — 264.
- [102] Ralphs M H , Gardner D R. Distribution of norditerpene alkaloids in tall larkspur plant parts through the growing season. *Journal of Chemical Ecology* , 2003 , 29 (9) : 2013 — 2021.
- [103] Eerens J P J , Lucas R J , Easton H S , *et al.* Influence of the ryegrass endophyte (*Neotyphodium lolii*) in a cool moist environment I. Pasture production. *New Zealand Journal of Agricultural Research* , 1998 , 41 : 39 — 48.
- [104] Reinholz J , Paul V H. Effect of temperature on the lolitrem B content in *Lolium perenne* infected by *Neotyphodium lolii* , The 3rd International Conference on Harmful and Beneficial Microorganisms in Grassland. *Pastures and Turf* , 2000. 57 — 63.
- [105] Eerens J P J , Lucas R J , Easton S , *et al.* Influence of the endophyte (*Neotyphodium lolii*) on morphology , physiology , and alkaloid synthesis of

- perennial ryegrass during high temperature and water stress. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 1998, 41 :219 — 226.
- [106] Kallenbach R L, Bishop-Hurley G J, Massie M D, *et al.* Herbage mass, nutritive value, and ergovaline concentration of stockpiled tall fescue. *Crop Science*, 2003, 43 :1001 — 1005.
- [107] Aldana B R V, Zabalgogezcoa I, Ciudad A G, *et al.* Ergovaline occurrence in grasses infected by fungal endophytes of semi-arid pastures in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2003, 83 (4) :347 — 353.
- [108] Salminen S O, Grewal P S. Does decreased mowing frequency enhance alkaloid production in endophytic tall fescue and perennial ryegrass? *Journal of Chemical Ecology*, 2002, 28 (5) :939 — 950.
- [109] Salminen S O, Grewal P S, Quigley M F. Does mowing height influence alkaloid production in endophytic tall fescue and perennial ryegrass? *Journal of Chemical Ecology*, 2003, 29 (6) :1319 — 1328.
- [110] Prestidge R A, Sprosen J M. The effect of glyphosate, paraquat and paclobutrazol on lolitrem B levels in endophyte-infected perennial ryegrass. *Journal of Chemical Ecology*, 1995, 43 (4) :138 — 140.
- [111] Hill N S, Brown E. Endophyte viability in seeding tall fescue treated with fungicides. *Crop Science*, 2000, 40 :1490 — 1491.
- [112] Dimenna M E, Mortimer P H, Prestidge R A, *et al.* Lolitrem B concentrations, counts of *Acremonium lolii* hyphae, and the incidence of ryegrass staggers in lambs on plots of *A. lolii*-infected perennial ryegrass. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 1992, 35 :22 — 217.
- [113] Turner K E, West C P, Piper E L, *et al.* Quality and ergovaline content of tall fescue silage as affected by harvest stage and addition of poultry litter and inoculum. *Journal of Production Agriculture*, 1993, 6 (3) :423 — 427.
- [114] Srikrai S, Robbers J E. Methods for mutation and selection of the ergot fungus. *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, 45 (4) :1165 — 1169.
- [115] Voigt R. Zur bestimmung der mutterkorn-alkaloide mit p-dimethylamino-benzaldehyd. *Mikrochim. Acta*, 1959, 5 :619 — 630.
- [116] Moubarak A S, Piper E L, West C P, *et al.* Interaction of purified ergovaline from endophyte-infected tall fescue with synaptosomal ATPase enzyme system. *Journal of Agriculture and Food Chemical*, 1993, 41 :407 — 409.
- [117] Shelby R A. Improved method of analysis for ergovaline in tall fescue by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agriculture and Food Chemical*, 1997, 45 :1797 — 1800.
- [118] Yates S G, Plattner R D, Garner G B. Detection of ergopeptine alkaloids in endophyte infected, toxic Ky-31 tall fescue by mass spectrometry/mass spectrometry. *Journal of Agriculture and Food Chemical*, 1985, 33 :722 — 725.
- [119] Ball O J P, Prestidge R A, Sprosen J M. Interrelationships between *Acremonium lolii*, peramine, and lolitrem B in perennial ryegrass. *Applied Environmental And Microbiology*, 1995, 61 (4) :1527 — 1533.
- [120] Yates S G, Powell R G. Analysis of ergopeptine alkaloids in endophyte-infected tall fescue. *Journal of Agriculture and Food Chemical*, 1988, 36 :337 — 340.
- [121] Kennedy J H. HPLC purification of pergolide using silica gel. *Organic Process Research & Development*, 1997, 1 :68 — 71.
- [122] Halada P, Jegorov A, Ryska M, *et al.* Mass spectrometry of ergot alkaloids. *Chemické Listy*, 1998, 92 (7) :538 — 547.
- [123] Bacon C W, Richardson M D, White J F. Modification and uses of endophyte-enhanced turfgrasses: a role for molecular technology. *Crop Science*, 1997, 37 (5) :1415 — 1425.
- [124] Padighioni P, Polcaro C M, Marchese S, *et al.* Enantiomeric separations of halogen-substituted 2-aryloxypropionic acids by high-performance liquid chromatography on a terguride-based chiral stationary phase. *Journal of Chromatogr*, 1996, 756 :119 — 127.
- [125] Wurst M, Flieger M, Renacek Z. Analysis of ergot alkaloids by high-performance liquid chromatography I. clavines and simple derivatives of lysergic acid. *Journal of Chromatography*, 1978, 150 :477 — 483.

参考文献：

- [1] 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. *生态学报*, 2004, 24 (3) :605 ~ 616.
- [8] 王志伟, 王世梅, 纪燕玲, 赵明文, 于汉寿. 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. *草业科学*, 2005, 22 (2) :60 ~ 63.
- [16] 南志标. 内生真菌对布顿大麦草生长的影响. *草业科学*, 1996, 13 (1) :16 ~ 18.
- [17] 南志标. 内生真菌在我国部分国产和引进品种的幼苗及成株中的分布. *草业学报*, 1996, 5 (3) :13 ~ 17.
- [18] 南志标. 内生真菌在我国部分国产和引进品种的种子中分布. *草业学报*, 1996, 5 (2) :1 ~ 8.
- [19] 陈世苹, 高玉葆, 梁宇. 水分胁迫下内生真菌感染对黑麦草叶内保护酶系统活力的影响. *应用与环境生物学报*, 2001, 7 (4) :348 ~ 354.
- [20] 陈世苹, 高玉葆, 梁宇. 水分胁迫下内生真菌感染对黑麦草叶内游离脯氨酸和脱落酸含量的影响. *生态学报*, 2001, 21 (12) :1964 ~ 1972.