

内蒙古中东部草原羽茅 *Epichloë* 属内生真菌的分布
及 rDNA-ITS 序列系统发育

张 欣 李 熠 魏宇昆 王银华 林 枫 任安芝 高玉葆*

(南开大学生命科学学院,天津 300071)

摘要 对内蒙古中东部地区分布的羽茅 6 个地理种群的染菌率进行了调查,采集种子并从中分离得到不同形态型的内生真菌,选取其中的 19 株进行 rDNA-ITS 片段的扩增、克隆、测序和系统发育分析。结果表明:(1) 6 个样地羽茅种群内生真菌感染率除西乌旗为 96.7% 外,其他 5 个样地均为 100%,表明内生真菌侵染羽茅并非偶然现象,二者之间存在一种稳定的共生关系。(2) ITS 和 5.8S 序列得到的 N-J 树显示,相对于 *Epichloë* 属的其他参考菌株,不同地理种群羽茅中的内生真菌聚为一类,形成一个具有 97% 支持强度的分支。由此推测,不同地理种群羽茅中的内生真菌具有相同的起源点。(3) 结合形态观察结果和 rDNA-ITS 序列分析结果可以看出,羽茅内生真菌种群的优势种亲缘关系较近,可能起源于同一种内生真菌,但由于其地理分布广、气候差异大、群落类型差别也较大,从而造成不同地理种群内生真菌形态上的分化以及种群间明显的遗传分化和较高的遗传多样性。

关键词 羽茅;内生真菌;系统发育;rDNA-ITS

文章编号 1000-0933 (2007) 07-2904-07 中图分类号 Q948.5154 文献标识码 A

Distribution and rDNA-ITS sequence analysis of *Epichloë* endophyte symbiosis with *Achnatherum sibiricum* in mid- and eastern Inner Mongolia Steppe

ZHANG Xin, LI Yi, WEI Yu-Kun, WANG Yin-Hua, LIN Feng, REN An-Zhi, GAO Yu-Bao*

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

Acta Ecologica Sinica 2007 27 (7) 2904 ~ 2910.

Abstract : The complex functions of fungal endophytes have received intensive study during the past three decades because of their roles in production loss of livestock and enhancement of biotic and abiotic stress resistances in hosts. Most of these studies focused on cultivated grasses, but little is known about the distribution and mechanisms of endophytes in native grass populations.

Surveys of grass species associated with *Neotyphodium* and *Epichloë* fungal endophytes made in native grasslands of northern China suggested that endophytes are widely distributed in natural grass populations. Among them, *Achnatherum sibiricum* was found to associate with fungal endophytes in all sites investigated. *Ach. sibiricum* is a perennial, sparse bunch grass that inhabits temperate steppe in China. This grass can be found in different habitats such as meadows, typical steppes and forests. Its distribution may be largely determined by precipitation, while it is usually a companion species in

基金项目 国家重点基础研究发展计划资助项目 (2007CB106802);国家自然科学基金资助项目 (30370239)

收稿日期 2006-09-17;修订日期 2007-05-24

作者简介 张欣 (1982 ~),女,天津人,博士生,主要从事禾草内生真菌多样性与系统进化研究. E-mail: zhangx@mail.nankai.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: ybgao@nankai.edu.cn

Foundation item The project was financially supported by National Key Basic Research Program of China (No. 2007CB106802) and National Natural Science Foundation of China (No. 30370239)

Received date 2006-09-17; **Accepted date** 2007-05-24

Biography ZHANG Xin, Ph. D. candidate, mainly engaged in biodiversity and phylogeny of grass endophyte. E-mail: zhangx@mail.nankai.edu.cn

communities and it sometimes can become the dominant species. Untill now ,no toxicosis problems in grazing animals have been reported in pastures containing *Ach. sibiricum*.

Six natural populations (IMGERS-CAS , *Leymus chinensis* plot of the IMGERS-CAS , Xi Ujimqin Qi , Hulingol , Arshan , Hailar) of *Ach. sibiricum* in mid- and eastern Inner Mongolia Steppe of varying distances from each other were chosen. Locations and descriptions of sampling sites were recorded. Infection frequency of fungal endophytes was detected and seeds from 30 *Ach. sibiricum* individuals were collected. Fungal endophytes of different morphologies were isolated from seeds and at each site ,strains of different morphologies were used as internal transcribed spacers of the nuclear ribosomal DNA (rDNA-ITS) sequence analysis. Regions of rDNA-ITS were amplified , cloned , sequenced and submitted to GenBank. Furthermore ,phylogenetic analysis was conducted with additional sequences conserved in GenBank.

Fungal endophytes were found at high frequencies in all investigated local populations regardless of their location , elevation ,annual precipitation , mean temperature and vegetation types , implying a systemic association between native grasses and fungal endophytes. In plants which have seed-transmitted endophytes , high infection frequency suggests a selective advantage compared with uninfected plants. This may be due to increased resistance to pathogens or herbivores. Another possible factor is that endophyte infection enhanced plant’s resistance to an abiotic stress ,such as drought or fire.

Nineteen strains from six populations were used in rDNA-ITS sequence analysis. They were IB from IMGERS-CAS ; LB , LC , LL from *Leymus chinensis* plot of the IMGERS-CAS ;XA ,XB ,XD ,XE ,XF ,XG from Xi Ujimqin Qi ;HA ,HE from Hulingol ;AA ,AB , AC , AD from Arshan and EA , EB , EC from Hailar. Besides LC , LL and XE , which were pathogens belonged to Ascomycota but not *Epichloë* ,there were only five informative sites in the alignment of 16 rDNA-ITS sequences and there were no correlation between differences of sequences and geographical distances. Among them IB ,LB , AC and EB have the same sequences ,which is consistent with the results of morphological observation. Results of Maximum parsimony tree and N-J tree based on ITS&5.8S sequences of 16 fungal strains showed that all *Epichloë* symbionts with *Ach. sibiricum* were clustered into one taxonomic group with 97% bootstrap support compared to other reference endophyte isolates used in this analysis. Therefore we propose that all *Epichloë* symbionts share the same evolutionary origin. Their diverse morphologies and high genetic variations among different populations are attributed to broad distribution of *Ach. sibiricum* and differences in climate and plant community.

Key Words : *Achnatherum sibiricum* ; endophytes ; phylogeny ; rDNA-ITS

内生真菌 (Endophyte)一词由 De Bary 于 1866 年首次提出 ,是指一类生长在植物体内的真菌 ,这些真菌包括子囊菌纲、麦角菌科 (Clavicipitaceae)、瘤座菌族 (Balansieae)的许多种类^[1]。香柱菌属 *Epichloë* (Ascomycota ; Clavicipitaceae)真菌和它的无性型 *Neotyphodium* 属真菌是冷季型禾草中的共生真菌 ,这些真菌存在于宿主地上部分的组织中 ,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^[2,3]。感染了内生真菌的禾本科和莎草科植物常常会表现出典型的香柱病 (choke disease) ,对宿主造成不利影响。而有些冷季型禾草感染的内生真菌则可以增强宿主植物的竞争力 ,提高宿主抗旱性 ,促进宿主获取养分 ,增强宿主对植食动物以及其他病原菌的抗性^[4~8]。

目前 ,rDNA-ITS 序列分析已经被广泛应用于推测各种内生真菌之间的系统发育关系^[9,10]以及它们与宿主植物之间的协同进化关系^[11]。本文在对内蒙古中东部地区分布的羽茅 (*Achnatherum sibiricum* (L.) Keng) 6 个种群内生真菌侵染率进行调查的基础上 ,分离了羽茅种子中的内生真菌 ,并对它们的形态和 rDNA-ITS 序列进行分析 ,从而了解羽茅中内生真菌的分布以及系统发育关系。

1 材料和方法

1.1 研究区域概况、内生真菌染菌率调查和植物材料采集

选取内蒙古中东部草原为考察区域 ,自西向东共设置 6 个采样地点 ,其地理位置和自然概况见表 1。其

中 ,定位站样地位于中国科学院内蒙古草原生态系统定位研究站北沙地 ,羊草样地即中国科学院内蒙古草原生态系统定位研究站羊草样地。

表 1 研究区域地理位置和自然概况

Table 1 Location and description of sampling sites						
采样地点 Sampling sites	经纬度 Location coordinates		海拔高度 Elevation	年降水 Annual precipitation	年均温 Mean temperature	样地植被类型 Vegetation type
	°E	°N	(m)	(mm)	(℃)	
定位站 IMGERS-CAS	116.701	43.517	1190	350	1.60	沙地植被
羊草样地 <i>Leymus chinensis</i> plot of the IMGERS-CAS	116.533	43.500	1254	350	1.60	典型草原
西乌旗 Xi Ujimqin Qi	117.667	44.533	1128	340	1.50	草甸草原
霍林河 Hulingol	119.183	45.617	991	340	1.47	典型草原
阿尔山 Arshan	119.967	47.183	1134	460	-3.10	林缘草甸
海拉尔 Hailar	119.700	49.200	619	350	-2.00	草甸草原

2005 年 8 月 27 日 ~9 月 10 日在每个地点设置一个 50m × 50m 的样地 ,在其中选取羽茅植株 30 株 ,其间隔大于 3 m 以保证每个材料属于不同植株的分蘖。采集时将植物的地上部分全部收集 ,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。内生真菌的检测参照 Latch 等的方法^[12]。不同植株的种子分开保存 ,用于分离内生真菌。

1.2 内生真菌的分离和形态观察

内生真菌的分离和鉴定参照魏宇昆等的方法^[13]。分离得到的内生真菌按照菌落形态进行分类 ,对分离得到的不同形态的菌株进行 rDNA-ITS 分子系统学分析 (表 2)。

1.3 内生真菌总 DNA 的提取、rDNA-ITS 序列的扩增和克隆测序

分离纯化后的内生真菌接种到 PDA 培养基上 , 25℃ 暗培养 3 至 4 周。参照 Guo 等^[14]的方法提取内生真菌总 DNA ,并根据测得的 OD 值将其稀释至 10ng/μl。

选用 White 等^[15]设计的引物 ITS5 (5'-GGAAGTA AAAGTCGTAACAAGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGC TTATTGATATGC-3') (上海生工)对 rDNA-ITS 片段进行扩增。反应体系 50μl ,含有 10mmol/L PCR 缓冲液 ,1. 5mmol/L MgCl₂ ,引物 ITS4 和 ITS5 分别为 150nmol/L ,dATP、dTTP、dGTP、dCTP 分别为 200 μmol/L ,2. 5U Taq DNA 聚合酶 (上海生工) ,100ng 基

表 2 用于 rDNA-ITS 序列分析的内生真菌菌株、取样地点以及在 GenBank 中的序列号

Table 2 Endophyte isolates which were applied to rDNA-ITS sequence analysis , their sampling sites and GenBank accession numbers

内生真菌 分离株 Endophyte isolates	采样地点 Sampling sites	GenBank 序列号 GenBank accession numbers
IB	定位站 IMGERS-CAS	DQ675574
LB	羊草样地 <i>Leymus chinensis</i> plot of the IMGERS-CAS	DQ855269
LC	羊草样地 <i>Leymus chinensis</i> plot of the IMGERS-CAS	-
LL	羊草样地 <i>Leymus chinensis</i> plot of the IMGERS-CAS	-
XA	西乌旗 Xi Ujimqin Qi	DQ675577
XB	西乌旗 Xi Ujimqin Qi	DQ675578
XD	西乌旗 Xi Ujimqin Qi	DQ675579
XE	西乌旗 Xi Ujimqin Qi	-
XF	西乌旗 Xi Ujimqin Qi	DQ675580
XG	西乌旗 Xi Ujimqin Qi	DQ675581
HA	霍林河 Hulingol	DQ855270
HE	霍林河 Hulingol	DQ675576
AA	阿尔山 Arshan	DQ675582
AB	阿尔山 Arshan	DQ675583
AC	阿尔山 Arshan	DQ675584
AD	阿尔山 Arshan	DQ675585
EA	海拉尔 Hailar	DQ675586
EB	海拉尔 Hailar	DQ675587
EC	海拉尔 Hailar	DQ675588

因组 DNA。PCR (Programmable Thermal Controller PTC-100 ; MJ Research , Inc. , Watertown , MA)反应程序设

置如下 95℃ 预变性 3min ,95℃ 变性 40s ,52℃ 退火 50s ,72℃ 延伸 60s ,35 个循环 ,最后 72℃ 延伸 10min。部分 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离鉴定 ,溴化乙锭染色后的 DNA 在紫外灯下显示清晰的条带 ,阳性条带大小约为 600bp。

剩余 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后 ,用无菌手术刀将含有目的 DNA 片段的胶块切下 ,使用 DNA 纯化试剂盒 (上海申能博彩生物科技)对其进行回收和纯化。使用 PCR 产物克隆试剂盒 (上海生工)将纯化后的片段与 *pUCm-T* 载体连接 ,反应体系 10μl ,包括 :10 × 连接缓冲液 1μl ,50% PEG4000 1μl ,*pUCm-T* 载体 1μl ,纯化后的 PCR 产物 6μl ,T4 DNA 连接酶 1μl。连接反应在 16℃ 进行 2h 至过夜。连接产物转化进大肠杆菌 DH5α 感受态细胞 (感受态细胞用 CaCl₂ 法制备 ,冻存于 -70℃ 冰箱)。转化后的大肠杆菌在含有氨苄青霉素的 LB 平板 (50μl 100mg/ml 的 Amp ,4.768μl 200mg/ml 的 IPTG ,200μl 20mg/ml 的 X-gal)上进行蓝白筛选。挑取白斑摇菌 ,少量提取质粒 DNA。提取的质粒 DNA 用 *Pst* I (上海生工)单酶切鉴定 ,酶切产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 ,阳性重组子片段大小约为 600bp。挑阳性重组子菌落于液态培养基中培养过夜 ,菌液送至天津生物芯片技术有限责任公司测序。

1.4 序列数据分析

以每个菌株的 ITS 和 5.8S 序列作为靶序列 ,在 GenBank 中用 BLAST 程序搜索同源序列 ,挑选与菌株序列相近的参考序列用于系统发育分析 (表 3)。

表 3 系统发育分析中使用的参考菌株及其 rDNA-ITS 序列在 GenBank 中的登记号

Table 3 Reference endophyte isolates and their GenBank accession numbers used in this study			
种名 Species	菌株 Isolate	宿主 Host	GenBank 序列号 GenBank accession numbers
<i>Epichloë amarillans</i>	163	<i>Achnatherum sibiricum</i>	AF385200
<i>E. brachyelytri</i>	E1045	<i>Brachyelytrum erectum</i>	L78296
<i>E. bromicola</i>	E502	<i>Bromus erectus</i>	L78295
<i>E. clarkii</i>	ATCC90168	<i>Holcus lanatus</i>	L78299
<i>E. elymi</i>	E56	<i>Elymus Canadensis</i>	L07131
<i>E. festucae</i>	e32	<i>Festuca rubra</i>	X62987
<i>E. glyceriae</i>	E277	<i>Glyceria striata</i>	L78302
<i>E. sylvatica</i>	E503	<i>Brachypodium sylvaticum</i>	L78304
<i>E. typhina</i>	E2461	<i>Dactylis glomerata</i>	L20306
<i>Neotyphodium chisosum</i> (Ach.)	196	<i>Achnatherum sibiricum</i>	AF385203
<i>N. chisosum</i> (S.)	164	<i>Stipa eminens</i>	AF385201
<i>N. coenophialum</i>	19	<i>Festuca arundinacea</i>	X60185
<i>N. lolii</i>	e2	<i>Lolium perenne</i>	L07130
<i>N. occultans</i>	Lm2	<i>Lolium multiflorum</i>	AF176265
<i>N. tembladerae</i>	DE2200	<i>Festuca argentina</i>	AF385207
<i>N. typhinum</i> var. <i>canariense</i>	Lc4	<i>Lolium canariense</i>	AF176260
<i>N. uncinatum</i>	e105	<i>Festuca pratensis</i>	L07128
<i>Claviceps purpurea</i>	511	<i>Spartina anglica</i>	AJ311951

将 5.8S 基因和 ITS 区序列通过 Clustal X1.83 进行序列间的匹配排序 ,匹配排序后的数据用于最大简约法 (Maximum Parsimony)分析 ,运算过程在 PAUP 4.0b10 软件上进行^[6]。应用启发式搜索 (heuristic search)作为获得最大简约树的方法 ,通过 1000 次重复获得的自展检验 (bootstrap)数值标记在分支上。用 Treeview X (version 0.5.0)观察得到的系统发育树。

DNA 序列同时在 MEGA 3.1 中进行邻接法 (Neighbor-joining)分析。通过 Kimura 双参数模型方法进行不同序列间遗传进化距离的计算 ,每次搜索进行随机 1000 次重复。

2 实验结果

2.1 内生真菌染菌率调查和形态观察

6 个样地羽茅内生真菌感染率除西乌旗为 96.7% 外 ,其他 5 个样地均为 100%。染菌率不随经纬度、海拔、年降水、年均温和植被类型而变化。

从 6 个样地分离得到的内生真菌形态差别较大 ,每个样地得到的不同形态型内生真菌的数目也不一致 ,例如定位站样地只分离得到一种形态型的内生真菌 ,而西乌旗样地一共分离得到 6 种形态型的内生真菌。此外 ,定位站 (IB)、羊草样地 (LB)、阿尔山 (AC)和海拉尔 (EB)种群分离得到的内生真菌的优势种形态相似。

2.2 rDNA-ITS 序列分析

从 19 个内生真菌分离株中共测得 16 个不同的 rDNA-ITS 序列 ,序列间相似性很高 ,信息位点仅有 5 个。其中定位站的 IB、羊草样地的 LB、阿尔山的 AC 以及海拉尔的 EB 具有完全相同的 rDNA-ITS 序列 ,海拉尔的 EC 也与它们只有一个碱基的差别。LC 和 XE 的序列比较相近 ,在 GenBank 中的 BLAST 结果显示它们属于子囊菌门真菌 ,与引起小麦颖枯病的小麦颖枯病病菌 *Septoria nodorum* Berk. 的有性阶段有很高的相似性 ,是一种病原真菌。LL 的 BLAST 结果显示 ,它也是子囊菌门的一种病原真菌。鉴于上述 3 个菌株并非本文所讨论的与冷季型禾草共生的 *Epichloë* 属内生真菌 ,故不在此作具体分析 ,将其他 16 个菌株的 rDNA-ITS 序列提交到 NCBI 的 GenBank 中 ,相应的序列号见表 2。

将 16 个内生真菌分离株的 rDNA-ITS 序列与表 3 中的参考序列进行分子系统发育关系分析 (图 1) ,发现从羽茅中分离得到的 16 株内生真菌与从针茅属 *Stipa lobata* 和 *S. eminens* 中分离到的内生真菌一起形成了一个具有 97% 支持强度的分支。用邻接法构建的系统发育树与最大简约法得到的系统发育树的拓扑结构基本相同 ,在此仅列出邻接法的结果 (图 1)。

3 讨论

3.1 内生真菌在天然宿主羽茅中的分布

内生真菌广泛分布于我国内蒙古草原天然植物种群^[7]。本文所调查的 6 个种群地理跨度较大 ,群落类型多样 ,包括沙地植被、典型草原、草甸草原和林缘草甸。羽茅染菌率的检测结果显示 ,内生真菌在 6 个样地中均以接近于 100% 的高染菌率普遍并稳定存在 ,表明内生真菌侵染羽茅并非偶然现象 ,二者之间形成了一种稳定的共生关系。对于通过种子传播的内生真菌而言 ,高染菌率表明相对于不染菌植株 ,感染内生真菌可以增强宿主的竞争力^[18] ,这可能是由于感染内生真菌增强了宿主对病虫害以及其他取食动物的抵抗力 ,也可能是由于感染内生真菌提高了宿主对某些非生物胁迫的抗性。

Schulthess 和 Faeth^[19]从 5 个地理种群天然禾草亚利桑那羊茅 (*Festuca arizonica*) 的叶片中共分离得到 400 多株不同的内生真菌菌株 ,其中 *Neotyphodium starrii* 和其他 13 个形态型的内生真菌占相对较大的比例 ,而大多数菌株都仅仅被分离出 1 次 ,表明天然禾草中内生真菌的分布格局与乔木中的内生真菌相似 ,并且其多样性要远远高于人工栽培禾草。本文中 6 个样地分离得到的内生真菌形态多样性较高 ,但其远远低于亚利桑那羊茅 ,这是由于实验中使用羽茅的种子进行内生真菌的分离 ,而种子中的内生真菌多样性要远远低于叶片。

3.2 rDNA-ITS 序列系统发育分析

到目前为止 ,仅有少数几种分子标记被应用到内生

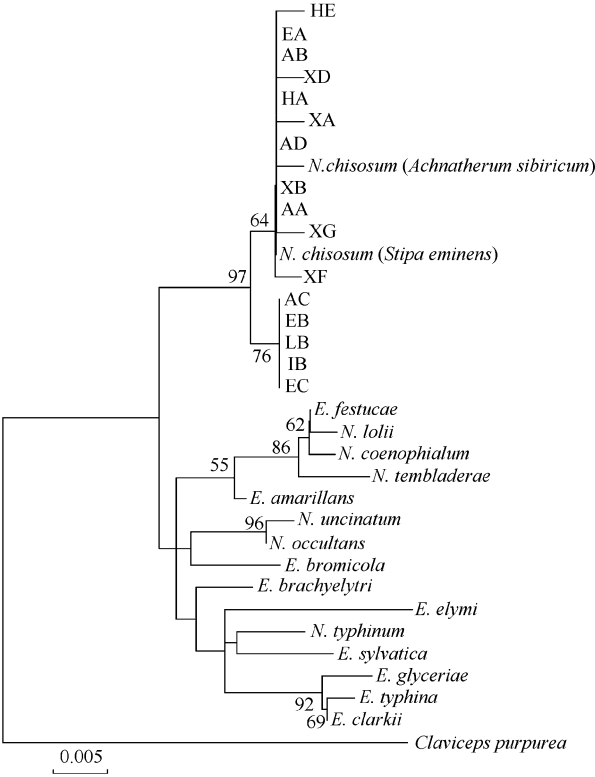


图 1 根据 ITS&5.8S 序列 ,采用邻接法 (Neighbor-joining) 得到的 N-J 树 ,显示羽茅中分离得到的 16 个内生真菌分离株与参考菌株的系统发育关系 ,Claviceps purpurea 为该树的外群 ;分支上的数值表示大于或等于 50% 的 bootstrap 值
Fig.1 Neighbor-joining tree based on ITS&5.8S sequences , representing phylogenetic relationships of endophytes isolated from Achnatherum sibiricum and additional isolates ; Claviceps purpurea was used as outgroup ; Numbers associated with branches are bootstrap support percentages (≥50%) assessed with 1000 replications

真菌的分子系统发育分析中^[20]。其中,rDNA-ITS 序列分析被证实是研究麦角菌科真菌系统发育分析的一种有效工具^[9] ,广泛应用于 *Epichloë* 和 *Neotyphodium* 内生真菌的系统发育研究中^[9,11,21,22]。多数情况下,rDNA-ITS 序列分析得到的系统发育树与另一种分子标记—— β 微管蛋白基因 (*tub2*)的非编码片段分析得到的结果是一致的,它们的分析结果支持 *Epichloë* 内生真菌的不同交配型与宿主植物间的协同进化^[11]。此外,rDNA-ITS 和 *tub2* 序列分析相结合,还可以证实一些内生真菌的杂交起源^[23,24]。

本实验中,羽茅内生真菌分离株的 rDNA-ITS 序列多态性并不随样地的分布而呈现出一定的规律性。阿尔山和海拉尔与定位站和羊草样地分别位于 6 个样地的东端和西端,但在这 4 个样地分离到了 rDNA-ITS 序列完全相同的菌株,是这 4 个样地中内生真菌的优势种,与形态观察结果相一致。An 等^[10]在 1992 年也曾经用相同的方法分析了 9 个样地亚利桑那羊茅的 rDNA-ITS 序列,结果得到了 3 个不同的序列,其中序列 eI 广泛分布于所有的样地,而序列 eII 和 eIII 并不常见,它们在进化上与序列 eI 有着不同的起源。羽茅中分离得到的 16 个内生真菌分离株 rDNA-ITS 序列差别不大,根据 ITS&5.8S 序列得到的 N-J 树显示,它们形成了一个具有 97% 支持强度的分支,据此推测羽茅中的内生真菌具有相同的起源。各个样地羽茅中内生真菌的高染菌率以及它们相似的 rDNA-ITS 序列都表明,羽茅-内生真菌共生体是一种稳定的共生体。

魏宇昆等^[13]通过形态学和 RAPD 方法对定位站、羊草样地、西乌旗和霍林河 4 个样地所含的 27 个内生真菌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和基因水平上均表现出较高的遗传多样性。

尽管定位站、羊草样地、阿尔山和海拉尔 4 个样地地理跨度大、群落类型相差很大,但是分离得到的内生真菌优势种形态相似,疑似同一种内生真菌。结合 rDNA-ITS 序列分析结果可以推测,羽茅内生真菌种群的优势种亲缘关系较近,可能起源于同一种内生真菌,但由于其地理分布广、气候差异大,从而造成不同地理种群内生真菌形态上的分化以及种群间明显的遗传分化和较高的遗传多样性。

References :

[1] Clay K. Fungal endophytes of grasses. Annual Review of Ecology and Systematics ,1990 ,21 :275 —297.

[2] Schardl C L. *Epichloë* species :fungal symbionts of grasses. Annual Review of Phytopathology ,1996 ,34 :109 —130.

[3] Saikkonen K ,Faeth S H ,Helander M ,et al. Fungal endophytes :a continuum of interactions with host plants. Annual Review of Ecology and Systematics ,1998 ,29 :319 —342.

[4] Clay K ,Holah J. Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional field. Science ,1999 ,285 :1742 —1744.

[5] Arechavalet M ,Bacon C W ,Hoveland C S ,et al. Effect of the tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. Agronomy Journal ,1989 ,81 :83 —90.

[6] Malinowski D P ,Belesky D P. *Neotyphodium coenophialum* endophyte infection affects the ability of tall fescue to use sparingly available phosphorus. Journal of Plant Nutrition ,1999 ,22 :835 —853.

[7] Breen J P. *Acremonium* endophyte interactions with enhanced plant resistance to insects. Annual Review of Entomology ,1994 ,9 :401 —423.

[8] Schardl C L ,Leuchtmann A ,Spiering M J. Symbiosis of grasses with seedborne fungal endophytes. Annual Review of Plant Biology ,2004 ,55 :315 —340.

[9] Tredway L P ,White J F Jr ,Gaut B S ,et al. Phylogenetic relationships within and between *Epichloë* and *Neotyphodium* endophytes as estimated by AFLP and rDNA sequences. Mycological Research ,1999 ,103 (12) :1593 —1603.

[10] An Z Q ,Liu J S ,Siegel M R ,et al. Diversity and origins of endophytic fungal symbionts of the North American grass *Festuca arizonica*. Theoretical and Applied Genetics ,1992 ,85 :366 —371.

[11] Schardl C L ,Leuchtmann A ,Chung K R ,et al. Coevolution by common descent of fungal symbionts (*Epichloë* spp.) and grass hosts. Molecular Biology and Evolution ,1997 ,14 (2) :133 —143.

[12] Latch G C M ,Potter L R ,Tyler B F. Incidence of endophytes in seeds from collections of *Lolium* and *Festuca* species. Annals of Applied Biology ,1987 ,111 :59 —64.

[13] Wei Y K ,Gao Y B ,Li C ,et al. Genetic diversity of *Neotyphodium* endophytes isolated from *Achnatherum sibiricum* populations in mid- and eastern Inner Mongolia Steppe ,China. Journal of Plant Ecology ,2006 ,30 (4) :640 —649.

[14] Guo L D ,Hyde K D ,Liew E C Y. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. New

Phytologist , 2000 , 147 : 617 — 630.

[15] White T J , Bruns T D , Lee S , *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In : Innis M A , Gelfand D H , Sninsky J J , *et al.* eds. PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications. New York : Academic Press , 1990. 315 — 322.

[16] Swofford D L. PAUP * . Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods). Sunderland , Massachusetts : Sinauer Associates , Inc. , 1998.

[17] Wei Y K , Gao Y B , Xu H , *et al.* Occurrence of endophytes in grasses native to northern China. Grass and Forage Science , 2006 , 61 : 422 — 429.

[18] Clay K , Schard C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. The American Naturalist , 2002 , 160 (supplement) 99 — 127.

[19] Schulthess F M , Faeth S H. Distribution , abundances , and associations of the endophytic fungal community of Arizona fescue (*Festuca arizonica*). Mycologia , 1998 , 90 (4) 569 — 578

[20] Jong EvZ de , Smith K F , Spangenberg G C , *et al.* Molecular genetic marker-based analysis of the grass- endophyte symbiosis. In : Roberts C A , West C P , Spiers D E eds. *Neotyphodium* In Cool-Season Grasses. Blackwell , Oxford , UK , 2004 : 123 — 138.

[21] Glenn A E , Bacon C W , Price R , *et al.* Molecular phylogeny of *Acemonium* and its taxonomic implications. Mycologia , 1996 , 88 (3) 369 — 383.

[22] Moon C D , Schardl C L , Christensen M J. The evolutionary origins of *Epichloë endophytes* from annual ryegrass. Mycologia , 2000 , 92 (6) : 1103 — 1118.

[23] Schardl C L , Leuchtman A , Tsai H F , *et al.* Origin of a fungal symbiont of perennial ryegrass by interspecific hybridization of a mutualist with the ryegrass choke pathogen , *Epichloë typhina*. Genetics , 1994 , 136 : 1307 — 1317.

[24] Tsai H F , Liu J S , Staben C , *et al.* Evolutionary diversification of fungal endophytes of tall fescue grass by hybridization with *Epichloë* species. Proceedings of the National Academy of Sciences , 1994 , 91 : 2542 — 2546.

参考文献：

[13] 魏宇昆 , 高玉葆 , 李川 , 等. 内蒙古中东部草原羽茅内生真菌的遗传多样性研究. 植物生态学报 , 2006 , 30 (4) : 640 ~ 649.