

# 内生真菌对草坪植物病原真菌抑制作用的比较

谢凤行, 任安芝, 王银华, 林 枫, 高玉葆\*

(南开大学生命科学学院, 天津 300071)

**摘要:** 分别从野生牧草羽茅(*Achnatherum sibiricum* (L.) Keng)、栽培种高羊茅(*Festuca arundinacea* Schreb.) (品种 Millennium)、栽培种黑麦草(*Lolium perenne* L.) (品种 Justus) 中分离出内生真菌 *Neotyphodium* sp.、*N. coenophialum* 和 *N. lolli*, 通过体外培养法比较了这 3 种内生真菌对草坪植物病原真菌的抑制作用。结果表明, 从羽茅中分离的内生真菌 *Neotyphodium* sp. 在两菌相交前对所有供试的病原真菌都有一定的抑制作用, 其中对枝孢霉属(*Cladosporium* sp.)、弯孢霉属(*Curvularia* sp.) 和拟茎点属(*Phomopsis* sp.) 病原真菌的抑制效果尤为显著, 对峙培养 3d 后的抑菌率分别达 70.1%、52.3% 和 30.9%, 营养竞争作用、重寄生作用是其主要的拮抗机制; 从高羊茅中分离的内生真菌 *N. coenophialum* 对枝孢霉属病原真菌存在一定的抑制作用; 而从黑麦草中分离的内生真菌 *N. lolli* 与病原真菌对峙培养时, 病原真菌菌落慢慢侵占整个营养空间, 内生真菌停止生长并逐渐褐变死亡。体外培养结果说明 *Neotyphodium* sp. 对供试病原真菌的拮抗效果优于 *N. coenophialum* 和 *N. lolli*, 由此推测 *Neotyphodium* sp. 与宿主植物羽茅的共生可能有利于宿主植物抵抗病原真菌的侵扰。

**关键词:** 内生真菌; 病原真菌; 抑制作用

文章编号: 1000-0933(2008)08-3913-08 中图分类号: Q948 文献标识码: A

## A comparative study of the inhibitive effect of fungal endophytes on turf grass fungus pathogens

XIE Feng-Xing, REN An-Zhi, WANG Yin-Hua, LIN Feng, GAO Yu-Bao\*

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

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(8): 3913 ~ 3920.

**Abstract:** Since 1866, large quantities of endophytes with metabolic activity have been isolated from almost all kinds of plants including trees, shrubs, grasses, and even from algae, moss and ferns. The grass endophytes and their hosts are mutualistic symbionts which differ from other endophytes. Studies on *Neotyphodium* endophytes and grasses indicate that the endophytes can not only protect the host grass from abiotic stresses but also enhance its resistance to biotic disturbances, such as herbivores and pathogens. Up to now, most research on the pathogen resistance ability of endophytic fungi has focused on endophytes isolated from non-grass medicinal plants. As for grass endophytes, limited studies have reported that endophyte-infected grasses are less frequently infected by pathogen disease. Was the resistance from endophytes themselves or from the interaction of the grass-endophyte associations? To address this question, this experiment was performed with isolated endophytes in vitro.

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(30770348); 天津市自然科学基金资助项目(06YFJMJ11600); 教育部博士点基金资助项目(20060055012)

**收稿日期:** 2007-08-14; **修订日期:** 2008-04-09

**作者简介:** 谢凤行(1979~), 女, 湖南邵阳人, 硕士, 主要从事微生物生态研究. E-mail: fengxingx@mail.nankai.edu.cn

\* 通讯作者 Author for correspondence E-mail: ybgao@nankai.edu.cn

**Foundation item:** The project was financially supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30770348), Tianjin Natural Science Foundation (No. 06YFJMJ11600) and the Doctoral Foundation Item Programme of Education Ministry (No. 20060055012).

**Received date:** 2007-08-14; **Accepted date:** 2008-04-09

**Biography:** XIE Feng-Xing, Master, mainly engaged in micro-ecology. E-mail: fengxingx@mail.nankai.edu.cn

In this paper three endophytes were used, i. e., *Neotyphodium* sp., *N. coenophialum* and *N. lolli*. They were isolated from *Achnatherum sibiricum* (L.) Keng (a native grass which was widely distributed in the Inner Mongolian Plateau), *Festuca arundinacea* Schreb and *Lolium perenne* L (cultivated grasses which were widely grown in north China lawns), respectively. Five turf grass pathogens were chosen, i. e., *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Cladosporium* sp., *Phomopsis* sp. and *Curvularia* sp., antagonistic interaction experiment, spore germination experiment and micro-cultivation experiment were carried out to address if the endophytes could resist pathogen fungi in vitro. If this is the case, what kind of antagonistic mechanisms might be involved?

The results showed that endophyte *Neotyphodium* sp. was antagonistic to *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp. and *Phomopsis* sp., and the inhibition percentages were 70.1%, 52.3% and 30.9%, respectively, after three days of inoculation. The possible mechanism involved is thought to be competitive advantage of the endophytes for nutrition and super-parasitism. The endophyte *N. coenophialum* had an inhibitory effect to some extent against *Cladosporium* sp., while *N. lolli* appeared to have no inhibitory effect against any of the pathogens. When *N. lolli* was inoculated with the pathogens, it turned brown while the pathogens took up nutritious space. The results demonstrate that *Neotyphodium* sp. is more antagonistic to pathogens than *N. coenophialum* and *N. lolli*, thus being beneficial to its host grass in pathogen resistance.

**Key Words:** endophytes; pathogens; inhibitive effect

内生真菌(endophyte)的概念由 De Bary 于 1866 年首先提出,早期的研究工作局限于牧草中内生真菌的发现与分离,直到 1977 年 Bacon 等人从毒性高羊茅中分离出内生真菌<sup>[1]</sup>,此后内生真菌与宿主植物之间关系的研究才正式开展起来。目前已经从紫杉(*Taxus cuspidate* Sieb. et Zucc.)、冷杉(*Abies holophylla* Maxim)、红杉(*Sequoia sempervirens* Endl)等针叶类以及栎树(*Quercus acutissima* Carr)、白桦(*Betula platyphlla* Suk.)、桉树(*Eucalyptus* spp.)等阔叶树种的树皮、枝叶中分离到许多有代谢活性的内生真菌,此外在灌木和草本、甚至在藻类、苔藓、蕨类植物中也发现了内生真菌。禾草内生真菌与其它植物内生真菌的区别在于它和宿主植物的关系十分密切,大量的研究工作表明禾草内生真菌不仅能提高宿主植物对非生物胁迫的抗性,还能增强宿主植物抗生物干扰的能力,后者主要包括食草动物<sup>[2]</sup>和食草昆虫<sup>[3]</sup>的取食、线虫<sup>[4]</sup>和病原菌<sup>[5]</sup>的危害等。

关于内生真菌对病原真菌抗性的研究主要集中在非禾草药用植物中的内生真菌。Merritt 等<sup>[6]</sup>从 *Eucryphia cordifolia* 中分离出一种胶球菌(*Gloliadium* sp.),它可产生挥发性的杀菌化合物,对终极腐霉(*Pythium ultimum*)和轮枝菌(*Verticillium dahliae*)等病原真菌起致死作用。李桂玲等<sup>[7]</sup>从南方红豆杉和香榧等药用植物中分离出拟青霉属(*Paecilomyces* sp.)内生真菌,其发酵液对脉孢菌属(*Neurospora* sp.)、镰刀菌属(*Fesrium* sp.)、木霉属(*Trichoderma* sp.)等病原真菌的生长具有抑制作用。另外从黄花蒿(*Artemisia annua*)、蒙古蒿(*Artemisia mongolica*)<sup>[8]</sup>、苦皮藤(*Celastrus angulatus*)<sup>[9]</sup>、雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook. F)<sup>[10]</sup>等植物中也分离到对病原真菌和病原细菌有抑制作用的内生真菌。关于禾草内生真菌的情况,目前的报道只有在高羊茅-内生真菌共生体水平上的研究,如 Welty 等研究发现内生真菌感染对高羊茅秆锈病(*Puccinia graminis* Pers subsp. *graminicola* Z. Urban)、叶斑病(*Rhizoctonia zeae* Voorhees)并不起作用,对草皮下的土传病害也无影响<sup>[11]</sup>,而 Gwinn 等的研究结果则表明内生真菌提高了高羊茅幼苗对玉蜀黍丝核病(*Rhizoctonia zeae* Voorh)和褐斑病(*Rhizoctonia solani* Kühn)的抗病性<sup>[12]</sup>。这说明内生真菌可能提高宿主植物对某些病原菌的抗性,但内生真菌在其中的贡献到底有多大,值得深入研究。本文以内蒙古高原广泛分布的野生牧草羽茅和北方城市引种的草坪植物高羊茅、黑麦草中分离的内生真菌为研究对象,通过离体培养比较 3 种内生真菌对草坪植物几种常见病原真菌的抑制作用,探索其拮抗机理,分析内生真菌在对宿主植物可能存在的有益作用,从而为揭示两者共生关系本质提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

内生真菌:内蒙古高原野生牧草羽茅(*Achnatherum sibiricum* (L.) Keng)种子中分离的菌株 Y (*Neotyphodium* sp.),其菌落白色,绵状疏松,气生菌丝较丰富,大量产孢,生长较快;高羊茅(*Festuca arundinacea* Schreb)品种 Millennium 种子中分离的菌株 M (*Neotyphodium coenophialum*),其菌落白色毛毡状,质地紧密,气生菌丝较短,产孢少,生长最慢;黑麦草(*Lolium perenne* L.)品种 Justus 种子中分离的菌株 J (*Neotyphodium lolii*),菌落隆起光滑蜡质,菌落表面有很多波浪型的沟回,形似大脑,不产生气生菌丝和分生孢子,生长较慢。

病原真菌:镰刀菌属 *Fusarium* sp.、立枯丝核属 *Rhizoctonia* sp.、枝孢霉属 *Cladosporium* sp.、拟茎点属 *Phomopsis* sp.、弯孢霉属 *Curvularia* sp.,以上菌株由华南农业大学资源环境学院植物病理系从发病草坪中分离所得。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 病原真菌的生长抑制-5 点对峙法

用直径为 5mm 的打孔器在母菌上打孔得到均匀的菌块,在离平板边缘 1.5cm 处对称接种 4 个内生真菌菌块,在中央接种等量的病原真菌,以不接种内生真菌的处理为对照(内生真菌 Y 和病原菌生长较快,两者同时接种;内生真菌 M、J 生长较慢,在平板上接种 M 和 J 内生真菌 1 周后再接种病原真菌)。每个处理设 3 个重复,交叉实验,逐日观察抑菌作用,当内生真菌与病原真菌相交后,用毫米刻度尺测量内生真菌、病原真菌和对照的半径  $R_e$ 、 $R_p$ 、 $R_c$ ,按下列公式计算抑菌率<sup>[13]</sup>:

$$\text{内生真菌对病原真菌的生长抑制率}(\%) = \frac{\text{对照半径 } R_c - \text{对峙培养病原真菌半径 } R_p}{\text{对照半径 } R_c} \times 100\%$$

#### 1.2.2 病原真菌孢子萌发实验

孢子悬液的制备:将病原真菌接种到锥形瓶中的 PDA 培养基上,3d 后在锥形瓶中加入无菌水,制成孢子悬液,孢子浓度大于  $10^4$  个/ml。

发酵液的制备:将内生真菌接种到马铃薯、葡萄糖液体培养基中,振荡培养。2 周后将培养液在无菌条件下用微量加样器吸到 5ml 的离心管中,先以 4000r/m 离心 5min,取上清液,再以 6000r/m 离心 10min 取上清液,得无菌发酵液。

在清洁无菌的双凹载玻片的凹陷穴中,滴加 200 $\mu$ l 的 Y、J 无菌发酵液,室温下在超净工作台中晾干,晾干后加入 150 $\mu$ l 分生孢子液,孢子浓度为 10~60 个/视野(10 $\times$ 16 倍镜),并设加无菌水的处理为对照,每个处理 3 个重复,然后将双凹载玻片放到培养皿中,移入(25 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 温箱内,10h 后检查孢子萌发率。

#### 1.2.3 微培养重寄生作用的观察

在无菌条件下将灭菌后的 PDA 培养基冷却到 50 $^{\circ}$ C 左右,然后滴到灭菌后的双凹载玻片,在凹孔两端分别接种小块的内生真菌和病原真菌,加上盖玻片。在培养皿中放 3 层无菌滤纸,滤纸用 30% 的甘油润湿,将接好菌的载玻片放入培养皿中,用封口膜将培养皿封好,移到(25 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 的恒温培养箱中培养,两菌相交后,在光学显微镜下观察缠绕、穿透、菌丝消解、细胞质变稀薄等现象。

#### 1.2.4 内生真菌菌块对病原真菌菌落形成的影响

将 1.2.2 中的孢子悬液稀释 20 倍,在超净工作台中吸 200ml 稀释液至平板中,用涂布器涂均匀,在平板中央接直径为 5mm 的内生真菌,以不接内生真菌的处理为对照,5 种病原真菌和 3 种内生真菌交叉实验,共 20 个处理,每个处理设 3 个重复。接种后用封口膜将平板封好,放入(25 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 的恒温培养箱中,观察内生真菌菌块对病原真菌菌落形成的影响及在菌块周围是否产生抑菌圈。

### 1.3 数据处理

采用 SPSS10.0 单因素方差分析(one-way ANOVA)中的 Duncan's 多重比较来计算不同内生真菌对病原菌抑制作用差异的显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 内生真菌对病原真菌的抑制作用

对峙培养的结果表明,Y 对 5 种病原真菌都有不同程度的抑制作用。在培养初期,病原真菌的生长速度明显快于菌株 Y,接种的第 3 天两菌相交。相交前,Y 对所有供试的病原真菌都有显著的抑制作用,其中对枝孢霉属、弯孢霉属和拟茎点属病原真菌的抑制效果尤为显著,表现在与对照(图 1A,E)相比病原真菌菌落生长速率较慢,菌落向周围生长时不呈圆形且菌落边缘几乎不产生气生菌丝(图 1B,F),菌落的生长半径  $R_p$  显著低于对照的半径  $R_c$ ,抑菌率分别达到了 70.1%、52.3% 和 30.9% (表 1)。随着时间的推移,Y 逐渐侵占营养空间,所有供试的病原真菌菌落发生萎缩,被 Y 覆盖,接种第 5 天,Y 占领整个营养空间,病原真菌几乎完全被覆盖(图 1C)。可见,内生真菌 Y 与病原真菌产生营养竞争,结果使病原真菌生长受到明显的抑制。与 Y 不同,M 只对枝孢霉属病原真菌的抑制作用显著(图 1D),病原菌真菌落几乎不产生气生菌丝,生长速率受到明显的抑制作用,到后期,病原真菌与 M 相交时,在接 M 的周围产生明显抑菌圈,病原菌不能越过 M 生长;M 对立枯丝核属和弯孢霉属病原真菌在对峙培养的前期有一定的抑制作用,两菌相交后,M 几乎停止生长,病原真菌越过 M 长满整个平板。对于 J,它在对峙培养前期对镰刀属和拟茎点属病原真菌的抑制效果较明显,两菌相交后,病原真菌菌落慢慢侵占整个营养空间,J 停止生长并逐渐褐变死亡。

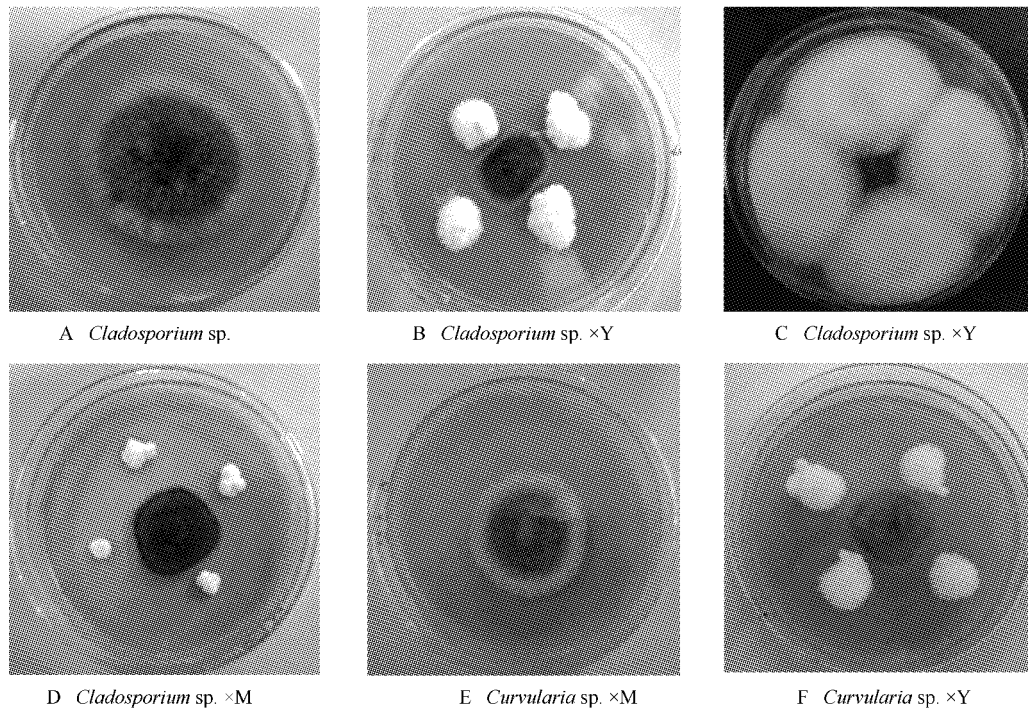


图 1 内生真菌对病原真菌抑制作用

Fig. 1 Inhibition of fungus pathogens by endophytes

A: 枝孢霉属对照; B: 枝孢霉属与 Y 对峙培养(第 3 天); C: 枝孢霉属与 Y 对峙培养(第 5 天); D: 枝孢霉属与 M 对峙培养(第 3 天); E: 弯孢霉属对照; F: 弯孢霉属与 Y 对峙培养(第 3 天)

A: *Cladosporium* sp. control; B: *Cladosporium* sp. antagonistic ally cultured with Y (the third day); C: *Cladosporium* sp. antagonistic ally cultured with Y (the fifth day); D: *Cladosporium* sp. antagonistic ally cultured with M (the third day); E *Curvularia* sp. control; F: *Curvularia* sp. antagonistic ally cultured with Y (the third day)

### 2.2 内生真菌发酵液对病原真菌孢子萌发的影响

显微镜下观察可以发现,各种病原真菌在对照组中孢子上长出的菌丝长度明显长于用内生真菌发酵液处理的孢子,这说明内生真菌发酵液对孢子的萌发有一定的延迟作用。从表 2 可以看出经内生真菌 Y、M 和 J 发酵液处理的各病原真菌孢子萌发率均呈下降趋势,Y 和 M 的发酵液对镰刀属、拟茎点属和弯孢霉属的孢子

萌发存在明显的抑制作用。10h 后,拟茎点属的孢子在对照处理下的萌发率不到 30%,可能是由于拟茎点属的孢子萌发所需时间相对较长,到实验观察时还未到孢子萌发高峰期。经内生真菌 Y 发酵液处理的孢子萌发率只有 9.4%,显著低于对照和其它发酵液处理,说明 Y 的代谢产物中存在某种抑制拟茎点属孢子萌发的物质。内生真菌 J 的发酵液只对镰刀属和拟茎点属的孢子萌发存在一定的抑制作用。

表 1 内生真菌对病原真菌的生长抑制

Table 1 The growth inhibition of fungus pathogens by endophytes

| 病原菌<br>Pathogens                | 对照 Control                    | 菌株 Y                          |                                        | 菌株 M                          |                                        | 菌株 J                          |                                        |
|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------|
|                                 | 菌落半径<br>Colony radius<br>(mm) | 菌落半径<br>Colony radius<br>(mm) | 抑菌率<br>Inhibition<br>percentage<br>(%) | 菌落半径<br>Colony radius<br>(mm) | 抑菌率<br>Inhibition<br>percentage<br>(%) | 菌落半径<br>Colony radius<br>(mm) | 抑菌率<br>Inhibition<br>percentage<br>(%) |
| 镰刀菌属 <i>Fusarium</i> sp.        | 24.0 ± 0.52a                  | 20.3 ± 0.86b                  | 15.6                                   | 22.8 ± 2.23a                  | 5.2                                    | 20.7 ± 1.61b                  | 14.1                                   |
| 立枯丝核属<br><i>Rhizoctonia</i> sp. | 28.9 ± 0.38a                  | 23.5 ± 0.51b                  | 18.7                                   | 25.0 ± 5.40a                  | 14.0                                   | 26.3 ± 2.8a                   | 8.9                                    |
| 枝孢霉属<br><i>Cladosporium</i> sp. | 38.5 ± 0.87a                  | 11.5 ± 0.50c                  | 70.1                                   | 26.1 ± 2.10b                  | 34.2                                   | 36.3 ± 2.5a                   | 5.7                                    |
| 拟茎点属<br><i>Phomopsis</i> sp.    | 42.3 ± 2.25a                  | 29.2 ± 1.06c                  | 30.9                                   | 40.7 ± 1.01a                  | 3.7                                    | 32.3 ± 0.25b                  | 23.7                                   |
| 弯孢霉属<br><i>Curvularia</i> sp.   | 28.1 ± 0.58a                  | 13.4 ± 0.38b                  | 52.3                                   | 24.1 ± 3.8a                   | 12.7                                   | 28.0 ± 0.05a                  | 0.4                                    |

各行中不同字母表示差异显著  $P < 0.05$ , 相同字母表示差异不显著  $P > 0.05$ ; 下同 Different letters within rows indicate a significant difference  $P < 0.05$ , while same letters denote non-significant difference  $P > 0.05$ ; the same below

表 2 发酵液对病原真菌孢子平均萌发率的影响

Table 2 Effect of culture filtrate on average germination rate of the pathogenic spores

| 病原菌 Pathogens                | 对照 Control | Y     | M     | J      |
|------------------------------|------------|-------|-------|--------|
| 镰刀菌属 <i>Fusarium</i> sp.     | 99.3a      | 88.6b | 92.7b | 90.6b  |
| 枝孢霉属 <i>Cladosporium</i> sp. | 100.0a     | 90.0a | 93.3a | 96.7a  |
| 拟茎点属 <i>Phomopsis</i> sp.    | 29.4a      | 9.4c  | 17.2b | 20.5b  |
| 弯孢霉属 <i>Curvularia</i> sp.   | 90.5a      | 83.8b | 81.1b | 87.7ab |

### 2.3 内生真菌对病原真菌的重寄生作用

微培养结果发现 Y 与立枯丝核属病原真菌相交后能平行生长(图 2 A),互相争夺营养空间。Y 与枝孢霉属、拟茎点属和弯孢属的病原真菌除争夺培养基营养空间外,它所形成的分枝可缠绕病原真菌菌丝,从病原真菌吸取营养物质(如图 2 B 空心箭头所示),侵入病原真菌菌丝,使病原真菌菌丝断裂(如图 2C 空心箭头所示),还可与病原真菌菌丝融合(如图 2D 空心箭头所示),使病原真菌的原生质变稀薄。可见,Y 对病原真菌的重寄生作用是其拮抗的重要作用机制之一。由于 M、J 生长速率较慢,只在菌核周围观察到很短的菌丝,而病原真菌生长速率相对较快,其菌丝伸展到内生真菌母菌周围,侵占整个营养空间,最后病原真菌菌丝侵入内生真菌母菌菌块。

### 2.4 内生真菌菌块对病原真菌菌落形成的影响

接菌 3 天后,病原真菌菌落形成。在接种 Y 的平板上,病原真菌从边缘向中间扩展,开始时在内生真菌菌核周围的病原真菌菌落较稀疏,但随着时间推移,病原真菌和内生真菌交错生长,二者之间没有明显的界限。Y 与拟茎点属病原真菌开始时也和其它病原真菌的特征一样,但相交后在 Y 菌周围的拟茎点属病原真菌慢慢被消融形成明显的抑菌圈(图 3),这说明 Y 能分泌某种物质将拟茎点属病原真菌菌丝消融。对于 M 和 J,由于其生长较慢,而病原真菌的生长速率相对较快,镰刀属、枝孢霉属、拟茎点属和弯孢霉属病原真菌很快就将 M 和 J 吞没,M 被吞没后慢慢萎缩,而 J 被吞没后先变褐,最终死亡。

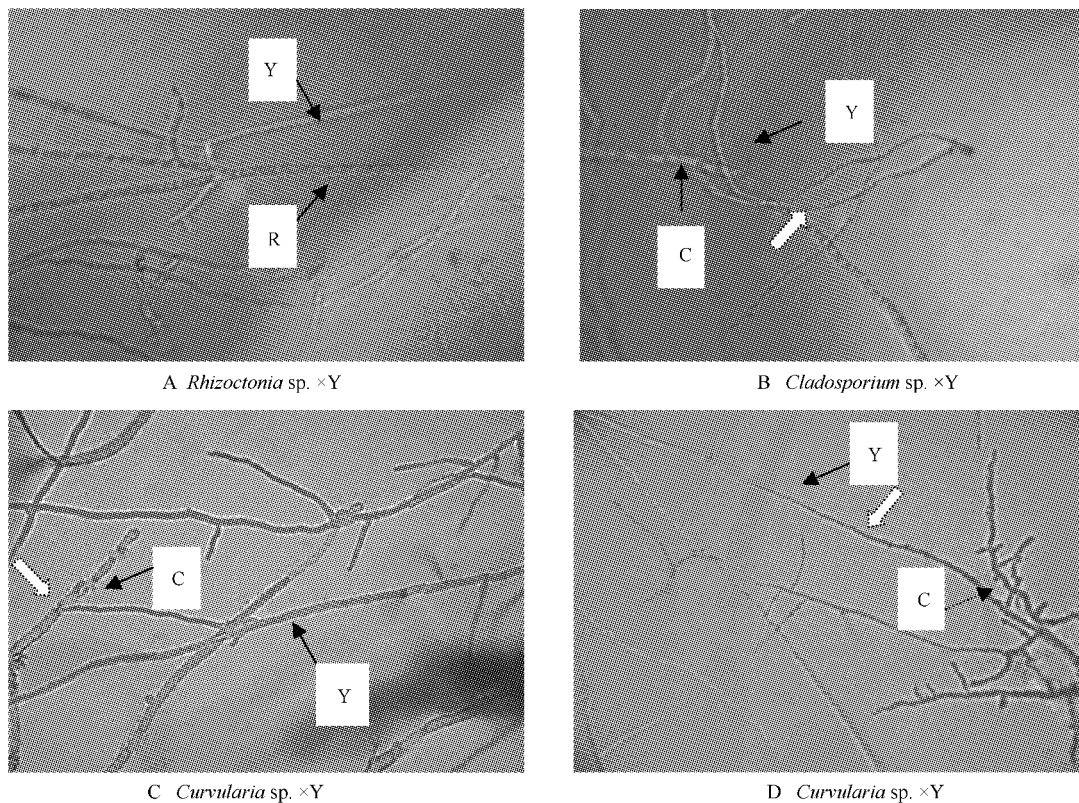


图2 内生真菌与病原真菌菌丝生长状况

Fig. 2 The growth status of endophytes and fungus pathogens

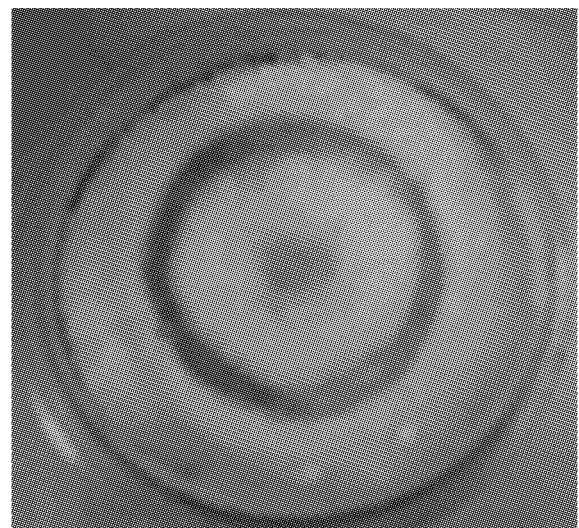
A: Y 与立枯丝核属的菌丝平行生长; B: Y 的菌丝缠绕枝孢霉属菌丝; C: Y 的菌丝穿入弯孢霉属菌丝; D: Y 的菌丝与弯孢霉属菌丝融合, 进入其菌丝内。A, B, C, D: 200 ×

A: Y growing parallel to hyphae of *Rhizoctonia* sp.; B: Y coiling around hyphae of *Cladosporium* sp.; C: Y inserting into hyphae of *Curvularia* sp.; D: Y penetrating hyphae of *Curvularia* sp. and growing inside of it. A, B, C, D: 200 ×

### 3 讨论

本研究中内生真菌菌株 Y 从野生牧草羽茅中分离获得, 到目前为止未发现感染内生真菌的羽茅对放牧家畜产生任何不良影响。内生真菌菌株 M 和 J 分别从草坪植物高羊茅 *Millenium* 和黑麦草 *Jusus* 中分离, 二者分别可能导致羊茅毒性综合症 (fescue toxicosis)<sup>[14]</sup> 和黑麦草蹒跚症 (staggers syndrome)<sup>[15]</sup>。这就说明高羊茅、黑麦草和羽茅中的内生真菌对哺乳动物的毒性存在一定的差异, 本实验的研究结果表明在体外培养条件下这 3 种植物中的内生真菌对病原真菌的抑制作用也各不相同。

内生真菌 Y 对草坪植物病原真菌枝孢霉属、弯孢霉属和拟茎点属有一定的抑制作用。Y 的生长速度快, 具有较强的营养竞争能力, 在生长过程中能占据大部分的营养空间, 从而使病原真菌菌落最终萎缩, 说明竞争作用是 Y 抑制病原真菌的主要机制。Y 对病原真菌的重寄生作用也是其拮抗病原真菌的重要机制, 它通过缠



Phomopsis sp. × Y

图3 拟茎点属与 Y 共培养, 在 Y 周围产生抑菌圈

Fig. 3 When *Phomopsis* sp. was cultured with Y, there was an inhibition circle around *Phomopsis* sp. colony

绕、穿透、侵入等多种寄生方式侵入病原真菌菌丝,通过酶的作用消解病原真菌细胞壁,最终导致病原真菌死亡。同时 Y 在生长过程中可能产生某些对拟茎点属孢子有抑制作用的抗生物质,达到抑菌效果。内生真菌 M 较所有病原真菌生长慢,营养竞争能力相对较弱,虽在对峙培养初期对枝孢霉属病原真菌有显著抑制作用,但最终病原真菌占领整个营养空间, M 被病原真菌覆盖。相对 M 而言, J 的生长速度更慢,病原真菌不仅侵占整个营养空间并且其分泌物对 J 造成一定的毒害作用,使 J 慢慢褐变死亡。比较 Y、M、J 3 种内生真菌对草坪植物几种常见病原真菌的拮抗实验可以得知, Y 对病原真菌的拮抗效果优于 M 和 J。内生真菌与宿主植物的相互关系是长期协同进化的结果, Y、M、J 表现出对病原真菌抗性的差异可能与宿主植物所处的原生境及其生态功能有关。

最近的一项调查发现,在羽茅的分布区内,所有的种群都有共生的内生真菌,并且其侵染率都很高<sup>[16]</sup>。相对于人工草地栽培种而言,野生牧草受到诸多不定因素的影响,比如多变的自然环境条件、捕食者类型及捕食强度多样、因迁移造成的基因流动等,这些因素都会影响到野生牧草和内生真菌的相互作用<sup>[17~20]</sup>。然而到目前为止,有关内生真菌和野生牧草相互关系的研究刚刚起步,关于内生真菌在野生牧草中稳定存在的原因及其生态学意义尚处于探索阶段。羽茅中内生真菌的普遍存在和高的侵染率,说明内生真菌对羽茅的广泛分布产生了一定的影响,而本实验证明 Y 对所有供试的病原真菌都产生了明显的抑制作用,由此推测 Y 对宿主植物羽茅抗生物干扰方面有一定的有益作用。

目前国内外关于内生真菌的研究与开发主要集中在医药领域,而在农业领域的研究和开发相对较少。研究工作者已经从苦皮藤、雷公藤、蒙古蒿等植物的内生真菌发酵液中提取到对病原真菌和病原细菌有抑制作用的活性物质,这说明内生真菌可能成为生物防治中有潜力的微生物农药和增产菌。到目前为止,全世界至少在调查过的 80 个属的 290 多种禾草中发现有与之共生的内生真菌<sup>[21]</sup>,是一个丰富的内生真菌资源库,阐明内生真菌与宿主植物之间的相互关系将对生态农牧业的发展带来巨大的经济效益和生态效益。

## References:

- [1] Bacon C W, Porter J K, Robbins J D. *Epichloe typhina* from toxic tall fescue grasses. *Applied and Environmental Microbiology*, 1977, 34: 576 — 581.
- [2] Ball D M. Significance of endophyte toxicosis and current practices in dealing with the problem in the United States. *Neotyphodium/grass interactions*. New York: Plenum Press, 1997. 395 — 410.
- [3] Breen J P. *Acremonium* endophyte interactions with enhanced plant resistance to insects. *Annual of Review Entomol*, 1994, 39: 401 — 423.
- [4] Eerens J P J, Visker M H P W, Lucas R J, *et al.* Influence of the ryegrass endophyte on phyto-nematodes. *Neotyphodium/grass interactions*. New York: Plenum Press, 1997. 153 — 156.
- [5] Peters S, Dammeyer B, Schulz B. Endophyte-host interactions I. Plant defense reactions to entophytic and pathogenic fungi. *Symbiosis*, 1998, 25: 193 — 211.
- [6] Stinson M, Ezra D, Hess W M. An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. *Plant Science*, 2003, 165(4): 913 — 922.
- [7] Li G L, Wang J F, Huang Y J, *et al.* Study on the antifungal activities of endophytic fungi isolated from several pharmaceutical plants. *Microbiology*, 2001, 28(6): 64 — 68.
- [8] Zou W X, Meng J C, Lu H, *et al.* Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. *Journal of Natural Products*, 2000, 63: 1529 — 1530.
- [9] Lan Q, Ji Z Q, Gu A G, *et al.* Preliminary study on the insecticidal and fungicidal components of endophytic fungus in *Celastrus angulatus*. *Journal of North west Science-Technology University of Agriculture and Forest (Nat Sci Ed)*, 2004, 2(10): 81 — 86.
- [10] Strobel G A, Thorczyński R, Bollon A. *Acremonium* sp. — a leucinostatin A producing endophyte of European yew (*Taxus baccata*). *Plant Science*, 1997, 128: 97 — 108.
- [11] Welty R E, Barker E C, Azevedo M D. Reaction of tall fescue infected and noninfected by *Acremonium coenophialum* to *Puccinia graminis* subsp.

graminicola. Plant Disease, 1991, 75:883—886。

- [12] Gwinn K D, Bernhard E C. *Acremonium coenophialum* does not affect *Rhizoctonia zae* growth in vitro or in vivo. Phytopathology, 1988, 78:15~24.
- [13] Liu X G, Gao K X, Gu J C, *et al.* Testing on the antagonism of the dominant of endophytic fungi from *Populus tomentosa*, chaetomium ND35 in the laboratory. Scientia Silvae Sinicae, 1999, 35(5):57—62.
- [14] Hoveland C S, Schmidt S P, King C C Jr, *et al.* Steer performance and association of *Acremonium coenophialum* fungal endophyte on tall fescue pasture. Agronomy Journal, 1983, 75: 821—824.
- [15] Fletcher L R, Harvey I C. An association of a *Lolium* endophyte with ryegrass staggers. New Zealand Veterinary Journal, 1981, 28: 185—186.
- [16] 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.
- [17] Clay K, Holah J. Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. Science, 1999, 285: 1742—1744.
- [18] Omacini M, Chaneton E J, Ghersa C M, *et al.* Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. Nature, 2001, 409: 78—81.
- [19] Omacini M, Chaneton E J, Ghersa C M, *et al.* Do foliar endophytes affect grass litter decomposition? A microcosm approach using *Lolium multiflorum*. Oikos, 2004, 104(3):581—590.
- [20] Rudgers J A, Koslow J M, Clay K. Endophytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. Ecology Letters, 2004, 7(1): 42—51.
- [21] Zou W X, Tan R X. Recent advances on endophyte research. Acta Botanica Sinica, 2001, 43(9):881—892.

#### 参考文献:

- [7] 李桂, 王建锋, 黄耀坚, 等. 几种药用植物内生真菌抗真菌活性的初步研究. 微生物学通报, 2001, 28(6):64~68.
- [9] 兰琪, 姬志勤, 顾爱国, 等. 苦皮藤内生真菌中杀虫杀菌活性物质的初步研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2004, 32(10):81~86.
- [13] 刘晓光, 高克祥, 谷建才, 等. 毛白杨内生菌优势种毛壳 ND35 室内拮抗作用的研究. 林业科学, 1999, 35(5):57~62.
- [16] 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. 植物生态学报, 2006, 30(4):640~649.
- [21] 邹文欣, 谭仁祥. 植物内生菌研究新进展. 植物学报, 2001, 43(9):881~892.