

DOI: 10.5846/stxb201801250202

贾彤,王瑞宏,曹苗文.白羊草 *Epichloë* 属内生真菌的分离鉴定及其重金属耐受性.生态学报,2018,38(18): - .

Jia T, Wang R H, Cao M W. Isolation and identification of the *Epichloë* endophyte from *Bothriochloa ischaemum* and its heavy metal tolerance. Acta Ecologica Sinica, 2018, 38(18): - .

# 白羊草 *Epichloë* 属内生真菌的分离鉴定及其重金属耐受性

贾 彤\*, 王瑞宏, 曹苗文

山西大学黄土高原研究所, 太原 030006

**摘要:**通过对北方铜业铜矿峪矿十八河尾矿坝的优势植被白羊草进行叶鞘内生真菌分离,并对白羊草内生真菌的形态特征及孢子形态进行描述,同时,选取其中 7 个菌株进行 *actG*、*tefA* 和 *tubB* 扩增、测序和系统发育分析。结果表明,从白羊草中分离出的内生真菌属于为 *Epichloë* 属,菌落正面呈白色,背面浅黄色,白羊草内生真菌生长速度较慢,孢子大小为 1.208—8.048  $\mu\text{m}$  之间,孢子形态椭圆、球型。根据分子系统发育学分析结果,将白羊草内生真菌鉴定为 *Epichloë sibirica*。通过对白羊草内生真菌进行不同浓度的重金属胁迫处理,发现其对重金属具有一定耐受性,具体表现为: $\text{Zn}^{2+}$  (120 mg/L)、 $\text{Cu}^{2+}$  (160 mg/L)、 $\text{Pb}^{2+}$  (240 mg/L) 和  $\text{Cd}^{2+}$  (8 mg/L)。对丰富天然禾草内生真菌资源,以及铜矿区生态修复过程中,白羊草内生真菌提高宿主抗性方面的应用具有重要意义。

**关键词:**白羊草;内生真菌;系统发育分析;重金属胁迫

## Isolation and identification of the *Epichloë* endophyte from *Bothriochloa ischaemum* and its heavy metal tolerance

JIA Tong\*, WANG Ruihong, CAO Miaowen

Institute of Loess Plateau, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

**Abstract:** Tailings dams are unique growth environment for plants and contain a large amount of heavy metals in the soil, which affects plant physiology and ecology. To enhance endophytic fungal resources, we studied the endophytic fungi of *Bothriochloa ischaemum* living in copper tailings. *Bothriochloa ischaemum* was the dominant species in ‘eighteenth’ river tailings of the Northern Copper Mine. We collected live plants and separated the endophytes from the sheaths, and observed and described the endophyte characteristics and spore morphology. Simultaneously, we selected seven strains for *actG*, *tefA*, and *tubB* amplification, sequencing, and phylogenetic analysis. Our results showed that the endophytic fungus had a white colony and very slow growth rate. The spores were spherical and oval shaped, between 1.208 and 8.048  $\mu\text{m}$  in size. Molecular identification identified the endophyte as *Epichloë sibirica*. We found that *E. sibirica* had a relatively high tolerance to several different heavy metals as follows:  $\text{Zn}^{2+}$  (120 mg/L),  $\text{Cu}^{2+}$  (160 mg/L),  $\text{Pb}^{2+}$  (240 mg/L), and  $\text{Cd}^{2+}$  (8 mg/L) based on experiments with different heavy metal concentrations. This study provided a theoretical basis for enriching endophytic resources and is of great significance to research of host resistance in the process of ecological restoration in copper mining areas.

**基金项目:**国家自然科学基金项目(31600308);山西省应用基础研究项目(201601D021101);山西省回国留学人员科研资助项目(2016-006);山西省教育厅研究生创新计划项目(2017SY005)

收稿日期:2018-01-25; 修订日期:2018-05-31

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: jiatong@sxu.edu.cn

**Key Words:** *Bothriochloa ischaemum*; endophyte; phylogenetic analysis; heavy metal stress

内生真菌(endophyte)为“生活在活体植物地上部分的组织中,而不引起宿主植物明显病害症状的真菌”<sup>[1]</sup>。草本、灌木、针叶树和藻类等都可成为内生真菌的宿主,其中最常见的宿主是禾本科植物。在温带天然禾草中,约十分之一植物感染内生真菌<sup>[2]</sup>,早熟禾亚科约有30%植物感染内生真菌<sup>[3-4]</sup>。*Epichloë*属内生真菌与冷季型禾草共生,全世界至少有30个属的禾草感染这种内生真菌,也是目前研究最为广泛的内生真菌之一<sup>[5-6]</sup>,已命名的与天然禾草共生的*Epichloë*属内生真菌共有43种<sup>[7]</sup>。例如,王志伟等从华东、华北以及西北等地区的鹅观草属(*Roegneria*)植物中发现*Epichloë yangzii*<sup>[8]</sup>和*Epichloë sinicum*<sup>[9]</sup>两种不同的特异性内生真菌。李春杰等从醉马草(*Achnatherum inebrians*)中得到*Epichloë gansuensis*<sup>[10]</sup>。羽茅(*Achnatherum sibiricum*)在自然种群中感染的两种优势菌株为*Epichloë gansuensis*和*Epichloë sibirica*<sup>[11]</sup>。朱敏杰等<sup>[12]</sup>从羊草(*Leymus chinensis*)中分离得到*Epichloë bromicola*内生真菌。此前,本课题组已对天然禾草白羊草(*Bothriochloa ischaemum*)中内生真菌的分布调查发现,白羊草中感染的16种内生真菌分别为赤霉属(*Gibberella*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、青霉属(*Penicillium*)<sup>[13]</sup>,但对白羊草中*Epichloë*属内生真菌的研究还未见报道。

关于内生真菌提高栽培禾草的抗生物与非生物胁迫的研究较多,但关于尾矿区内生真菌感染对天然禾草的重金属抗性研究还相对较少。微量金属离子可满足微生物正常生长,过量则会产生毒害作用。高重金属环境中,有些微生物对多种重金属具有抗性,这些微生物在重金属污染的生物修复过程中发挥重要作用。大多数抗重金属微生物的研究集中于根际和非根际土壤微生物,对植物内生真菌重金属抗性的研究报道较少。有研究发现,紫霉属(*Purpureocillium*)内生真菌可以在铜胁迫条件下促进秋茄红树林生长<sup>[14]</sup>。Zhang等<sup>[15]</sup>研究3种深色有隔内生真菌(H93、H125和H114)都对Pb和Cd具有耐受性。康宇等发现接种深色有隔内生真菌能改善重金属Cd胁迫下紫茎泽兰的生长状态<sup>[16]</sup>,并且深色有隔内生真菌通过调节植物激素平衡以及光合作用强度使玉米中Cd含量降低,进而促进玉米生长<sup>[2,17-18]</sup>。相对于菌根真菌,内生真菌存在于植物的地上部分,同时内生真菌感染对宿主植物的生长具有促进作用<sup>[16]</sup>,染菌植物可能借助于菌丝本身对重金属的积累,使宿主具有较高生物量且根系活动加强,进而在修复重金属污染土壤中发挥作用。内生真菌宿主范围较广且可分离培养,例如青霉(*Penicillium*)、曲霉(*Aspergillus*)、木霉(*Trichoderma*)以及镰刀菌(*Fusarium*)等都是植物体内常见的内生菌。*Epichloë*属内生真菌也能够提高寄主禾草对Al<sup>[19]</sup>、Zn<sup>[20]</sup>和Cu<sup>[21]</sup>的耐受性。内生真菌还可以影响宿主禾草对Fe、Zn、Cu、Ca和P等矿质元素的吸收和运输<sup>[19,22]</sup>。李川等研究发现,感染内生真菌可以提高宿主植物羽茅和高羊茅(*Festuca arundinacea*)对重金属锌的耐受性<sup>[18,23]</sup>。醉马草感染的*Epichloë gansuensis*内生真菌可提高宿主的抗旱性、耐盐性<sup>[24]</sup>、和对重金属胁迫的耐受性<sup>[25-26]</sup>。

白羊草为禾本科孔颖草属多年生牧草,属于喜温性中旱生植物<sup>[27]</sup>,属于根茎疏丛型下繁禾草,具有短根茎、根系发达、分蘖能力强、能形成大量基生叶丛的特点<sup>[28]</sup>。叶片无毛或少毛,茎顶着生有4~多数总状花序,颖果,具有有性及无性繁殖能力,寿命长达10年以上。适口性强,是一种优良水土保持型的牧草资源。白羊草群落是我国暖温带森林草原区有代表性的植被类型,也是落叶阔叶林区森林破坏后出现的次生植被类型<sup>[29]</sup>,白羊草广泛分布于黄土高原东南部和南部的低山丘陵、梁峁顶部的温暖带地段<sup>[30]</sup>。本实验通过形态学描述和分子鉴定的方法,对铜尾矿库白羊草内生真菌进行分离和鉴定,探究与白羊草共生的*Epichloë*属内生真菌特点,并通过对内生真菌进行不同重金属胁迫处理,探究与白羊草共生的*Epichloë*属内生真菌重金属耐受性潜力,这为丰富禾草内生真菌资源,以及内生真菌资源在重金属污染土壤修复中发挥作用提供科学基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究区概况

本研究试验样地位于山西省垣曲县,该地年均气温13.5℃,年均降水量631 mm。北方铜业铜矿峪矿十八

河尾矿坝, 沟口筑坝, 坝体呈梯形。始建于 1969 年, 初期坝高 23.0 m, 坝顶高程 509.0 m。现已筑 14 级子坝, 坝顶高程 564.2—570.8 m, 平均坝高 43.0 m, 坝顶长度 1714.8 m<sup>[31]</sup>。尾矿库坝体为人工堆积, 将库区近坝体矿砂推至坝前, 通过碾压处理将其压实形成坝体, 其成分主要为尾矿土、尾矿砂和人工覆盖的黄土。各个子坝植物群落以白羊草为优势种。2015 年 7 月, 自上而下共设置 9 个不同恢复年限的样地, 在每个样地采集白羊草 30 株。将白羊草带回实验室进行内生真菌的分离与鉴定, 研究结果发现, 不同子坝白羊草内生真菌为赤霉属、镰刀菌属、青霉属(*Penicillium*)<sup>[13]</sup>以及 *Epichloë* 属。通过用强氧化物对白羊草地上部分进行消解, 再将消解产物用等离子体发射光谱仪(iCAP 6000, Thermo Fisher, UK)测定其重金属含量<sup>[32]</sup>。重金属进行检测, 结果发现 As 含量为 0.46 mg/L, Cd 含量为 3.07 mg/L, Cr 含量为 658.55 mg/L, Cu 含量为 153.29 mg/L, Pb 含量为 194.82 mg/L, Zn 含量为 62.35 mg/L。

### 1.2 内生真菌分离及孢子观察

首先进行植物表面灭菌, 将白羊草叶鞘剪成约 1 cm 的小段, 放入 70% 的酒精中 5 s, 再用 5% 的次氯酸钠浸泡 7 min, 在浸泡过程中不断摇晃, 倒掉次氯酸钠加入无菌水, 用无菌水清洗至少 3 次, 每次 30 s。将表面灭菌后的茎段横放或插入配制好的马铃薯葡萄糖琼脂培养基(Potato Dextrose Agar, PDA)中, 置于 25℃ 培养<sup>[12]</sup>。待真菌从培养基上长出来后, 对单一菌落进行纯化, 纯化 4 代后, 菌落形态保持世代不变后进行孢子形态观察。将无菌水滴在载玻片上, 挑取菌丝置于载玻片上, 盖上盖玻片用数码成像显微系统(Moticam Pro 205A, Motic, Germany)观察<sup>[9]</sup>。

### 1.3 内生真菌的分子鉴定

内生真菌 DNA 提取<sup>[8]</sup>; 提出来的 DNA 用多功能酶标仪(Infinite M200Pro NanoQuant, TECAN, Austria)测定其浓度和纯度, 并用 1% 的琼脂糖凝胶电泳观察提取结果<sup>[13]</sup>。PCR 反应: 将提出来的 DNA 稀释至 10 ng/ $\mu$ L, 选用引物见表 1<sup>[5]</sup>。*act* 反应体系 50  $\mu$ L, 含有: Template 10  $\mu$ L, *act*-F、*act*-R 各 1.0  $\mu$ L(10  $\mu$ mol/L)(上海生工), 10 $\times$ *EasyTaq* Buffer 5  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTPs 2.5  $\mu$ L, *EasyTaqDNA* Polymerase 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 30  $\mu$ L。根据曹苗文等所设置的条件进行调整<sup>[13]</sup>, 下同, 反应条件为: 94℃, 9 min; 94℃, 1 min; 52℃, 1 min; 72℃, 2 min; 72℃, 5 min, 共 40 个循环; *Tub* 反应体系 50  $\mu$ L, 含有: Template 10  $\mu$ L, *Tub*-F、*Tub*-R 各 0.8  $\mu$ L(10  $\mu$ mol/L)(上海生工), 10 $\times$ *EasyTaq* Buffer 5  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTPs 2.5  $\mu$ L, *EasyTaqDNA* Polymerase 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 30.4  $\mu$ L。反应条件: 94℃, 9 min; 94℃, 1 min; 54℃, 1 min; 72℃, 2 min; 72℃, 5 min, 共 40 个循环; *tef* 反应体系 50  $\mu$ L, 含有: Template 10  $\mu$ L, *tef*-F、*tef*-R 各 1.0  $\mu$ L(10  $\mu$ mol/L)(上海生工), 10 $\times$ *EasyTaq* Buffer 5  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTPs 2.5  $\mu$ L, *EasyTaqDNA* Polymerase 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 30  $\mu$ L。反应条件: 94℃, 9 min; 94℃, 1 min; 60℃, 1 min; 72℃, 2 min; 72℃, 5 min, 共 40 个循环<sup>[7-8]</sup>。经琼脂糖凝胶电泳确定 PCR 结果, 选择最佳 PCR 产物送至华大基因有限公司测序。

表 1 用于 *tubB*、*tefA* 和 *actG* PCR 扩增的引物

Table 1 Primers used for the PCR of *tubB*, *tefA* and *actG*

扩增基因 Amplified genes	引物编号 Primer number	引物序列(5'-3') Primer sequence	扩增基因 Amplified genes	引物编号 Primer number	引物序列(5'-3') Primer sequence
<i>tefA</i>	<i>tef1-exon1d-1</i>	5'-GGG TAA GGA CGA AAA GAC TCA-3'	<i>tubB</i>	<i>tub2-exon1d-1</i>	5'-GAG AAA ATG CGT GAG ATT GT-3'
	<i>tef1-exon5u-1</i>	5'-CGG CAG CGA TAA TCA GGA TAG-3'		<i>tub2-exon4u-2</i>	5'-GTT TCG TCC GAG TTC TCG AC-3'
<i>actG</i>	<i>act1-exon1d-1</i>	5'-TAA TCA GTC ACA TGG AGG GT-3'			
	<i>act1-exon6u-1</i>	5'-AAC CAC CGA TCC AGA CAG AGT-3'			

### 1.4 重金属胁迫处理

向 YM 液体培养基(每 1 L 蒸馏水中有麦芽糖 3 g, 酵母粉 3 g, 蛋白胨 5 g 和葡萄糖 10 g)中加入不同浓度的重金属溶液, 基于前期对铜尾矿坝土壤及白羊草叶片和根重金属的背景调查, 分别利用 ZnSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, PbSO<sub>4</sub>, CdCl<sub>2</sub> 母液设置重金属胁迫梯度为 Zn<sup>2+</sup>(0、20、40、60、80、120 mg/L), Cu<sup>2+</sup>(0、20、40、80、120、160 mg/L)

L),  $Pb^{2+}$  (0、60、120、180、240、300 mg/L),  $Cd^{2+}$  (0、2、4、6、8 mg/L), 每个浓度设置 3 个重复。无菌条件下, 从活化后的内生真菌液体培养基上吸取 350  $\mu$ L 菌悬液于 YM 培养基中, 将其放置到恒温培养振荡器 (ZWY-200D) 中培养 (200 rpm, 25 $^{\circ}$ C), 根据白羊草内生真菌生长曲线的结果, 本实验将内生真菌生长的测定时间确定为 15 天。培养结束后, 用灭菌滤纸过滤收集内生真菌, 放入烘箱 65 $^{\circ}$ C 烘干称重, 计算菌丝生长量。菌丝体干重的计算: 过滤菌液前将滤纸标号并称重, 在烘箱中至恒重后用电子天平称滤纸干重, 烘干后滤纸的干重与过滤前滤纸差值即为菌丝体干重。

### 1.5 分子系统学分析

对于序列数据, 首先把测序结果前端和后端的杂峰序列去除, 然后在 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 数据库进行 BLAST 比对。先使用 MEGA6 校准, 然后去除比对序列两端多余的部分, 使序列等长, 然后运用最大似然法 (Maximum-Likelihood 法) 进行系统发育分析, 制作系统进化树, 同时计算遗传距离。

### 1.6 统计分析

不同重金属胁迫下内生真菌生长量的均值比较采用 SPSS 19.0 进行单因素方差 (One-way ANOVA) 分析, 并进行 Duncan 显著性检验, 结果采用 SigmaPlot 12.5 进行作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 白羊草内生真菌形态学特征

菌落在 25 $^{\circ}$ C、PDA 培养基上生长 4 周的直径为 23.2—39.1 mm。菌落白色、棉质、紧实、在培养基表面突出、无回旋或呈轻微回旋状; 气生菌丝透明、丰富、光滑; 菌落背面浅黄色。培养条件下孢子丰富, 产孢细胞在气生菌丝上侧向生长, 分生孢子透明, 椭圆形或肾形, 大小为 1.2—8.0  $\mu$ m (图 1, 表 2)。

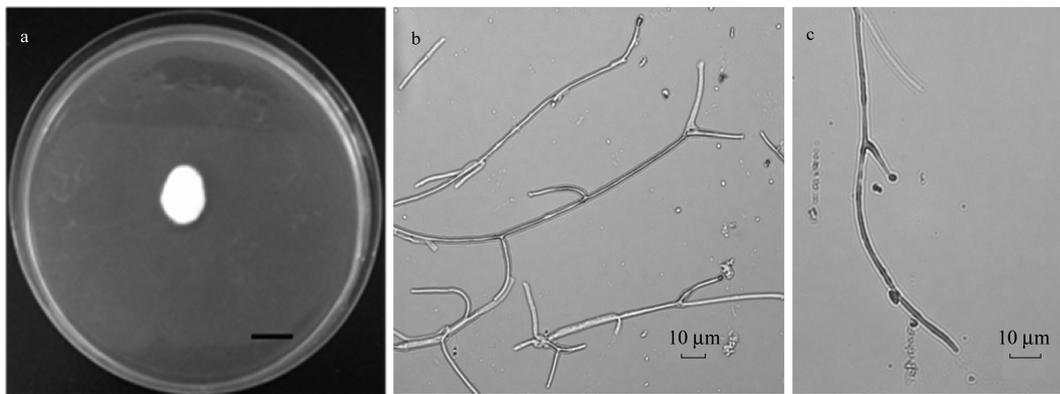


图 1 白羊草中 *Epichloë sibirica* 的菌落 (a) 和分生孢子形态 (b, c)

Fig.1 Colony (a) and conidia (b, c) of *Epichloë* sp. isolated from *B. ischaemum*

照片拍摄于菌株 (*Epichloë* sp.) 在 PDA 培养基上黑暗培养 3 周后。左: 标尺 = 1 mm; 中: 标尺 = 10  $\mu$ m

表 2 内生真菌生长速率及其孢子大小

Table 2 Endophytic fungi growth rate and the spore size

编号 Number	孢子大小/ $\mu$ m Spore size	生长速率 Growth rate/ (mm/周)	编号 Number	孢子大小/ $\mu$ m Spore size	生长速率 Growth rate/ (mm/周)
<i>Epichloë</i> sp.01	(1.208-3.642) $\times$ (1.703-3.642)	8.248 $\pm$ 1.011	<i>Epichloë</i> sp.05	(2.036-3.115) $\times$ (2.036-5.260)	9.788 $\pm$ 2.432
<i>Epichloë</i> sp.02	(3.025-3.025) $\times$ (3.025-5.122)	6.239 $\pm$ 0.164	<i>Epichloë</i> sp.06	(2.067-4.931) $\times$ (2.067-7.718)	8.248 $\pm$ 1.835
<i>Epichloë</i> sp.03	(1.876-2.626) $\times$ (1.876-5.281)	7.180 $\pm$ 0.204	<i>Epichloë</i> sp.07	(1.360-3.054) $\times$ (1.360-6.773)	6.332 $\pm$ 0.166
<i>Epichloë</i> sp.04	(1.997-4.188) $\times$ (1.997-8.048)	5.810 $\pm$ 0.120			

## 2.2 白羊草内生真菌部分 *Epichloë* sp. 菌株 *tubB*、*tefA* 和 *actG* 扩增结果

用 Moon 等<sup>[23,25]</sup>设计的引物(表 1), 分别对白羊草内生真菌 *actG*、*tefA* 和 *tubB* 进行扩增, 结果显示: 3 对引物在所有菌株的 *actG*、*tefA* 和 *tubB* 扩增中, 都得到了清晰的片段, 大小分别为 1600 bp, 800 bp 和 940 bp 左右(图 2)。

## 2.3 白羊草内生真菌系统发育分析

从不同白羊草叶鞘中分离得到的内生真菌在菌落形态和生长速度上都具有典型的 *Epichloë* 属内生真菌的特征(图 1)。将白羊草叶鞘分离出的内生真菌对 *actG*、*tubB* 和 *tefA* 片段进行 PCR 扩增并测序, 将测序结果在 NCBI 数据库进行 BLAST 比对, 结果发现, 这些内生真菌与 *Epichloë* 属菌相似性达到 97% 以上。将这些菌株序列与白羊草内生真菌进行系统发育分析。从 *actG* 系统发育树可以看出, 白羊草内生真菌与羽茅和醉马草中的 *E. gansuensis* 和羽茅中的 *E. sibirica* 相似可能性较大(图 3); 从 *tefA* 系统发育树结果可知, 白羊草内生真菌与 *E. sinicum* 系统发育距离最近, 其次为 *E. chisosum*, 而与 *E. gansuensis* 和 *E. bromicola* 形成了一个亚枝(图 4)。*tubB* 的系统发育树结果显示, 白羊草内生真菌首先与鹅观草属植物中 *E. sinicum* 聚合在一起, 然后与来自日本两种冰草属 (*Agropyron ciliare* 和 *Agropyron tsukushiense*) 菌株形成一亚枝(图 5)。

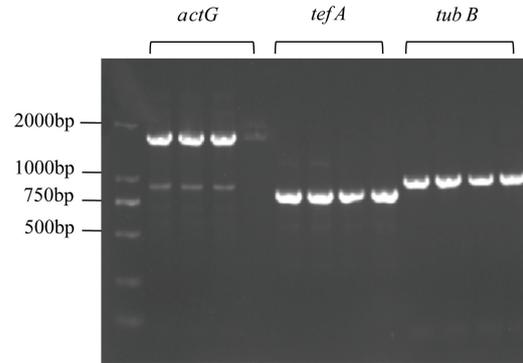


图 2 部分白羊草内生真菌 *actG*、*tefA* 和 *tubB* 扩增结果  
Fig. 2 Some PCR products of *actG*, *tefA* and *tubB* from endophytes associated with *B. ischaemum*

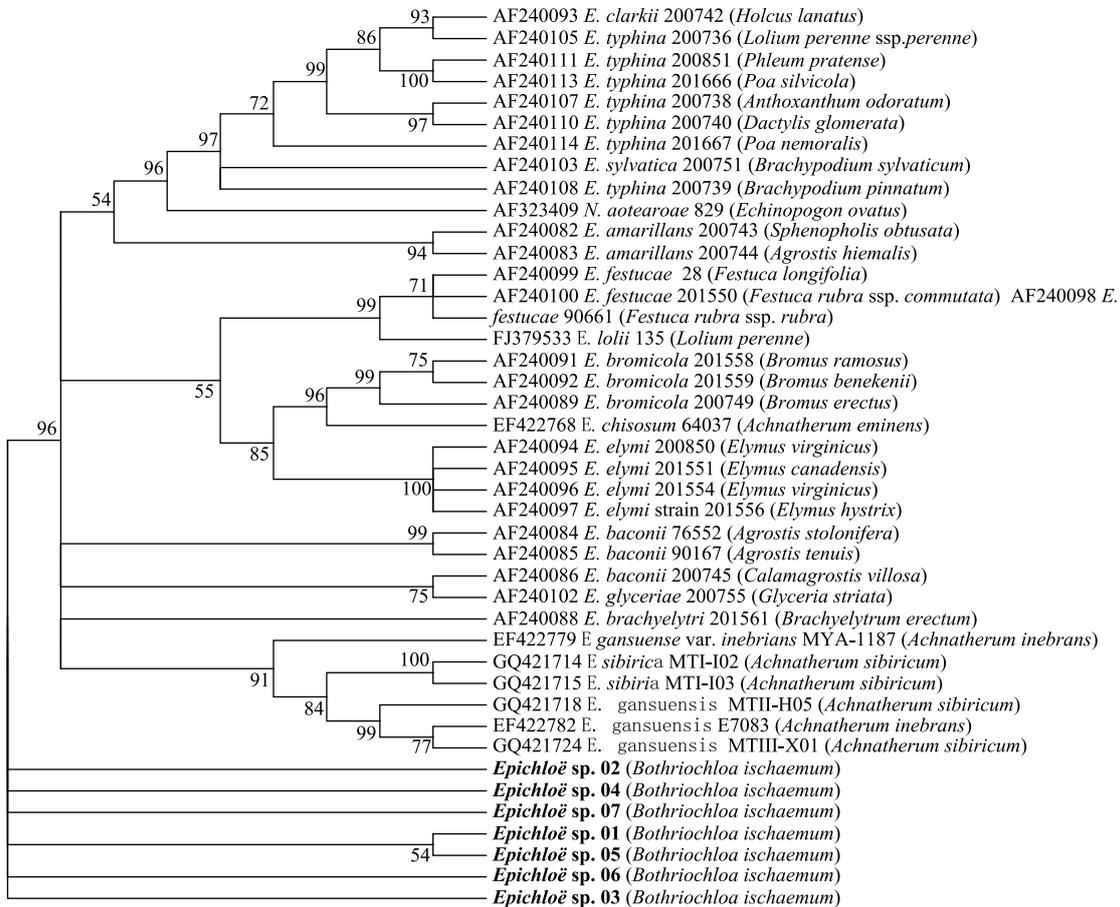


图 3 根据 *actG* 序列, 使用最大似然法 (ML) 构建系统发育树

Fig. 3 Phylogeny derived from the maximum likelihood (ML) analysis of *actG* sequences

进化枝上显示的数字 ( $\geq 50\%$ ) 表示 1000 次自展检验后的置信度

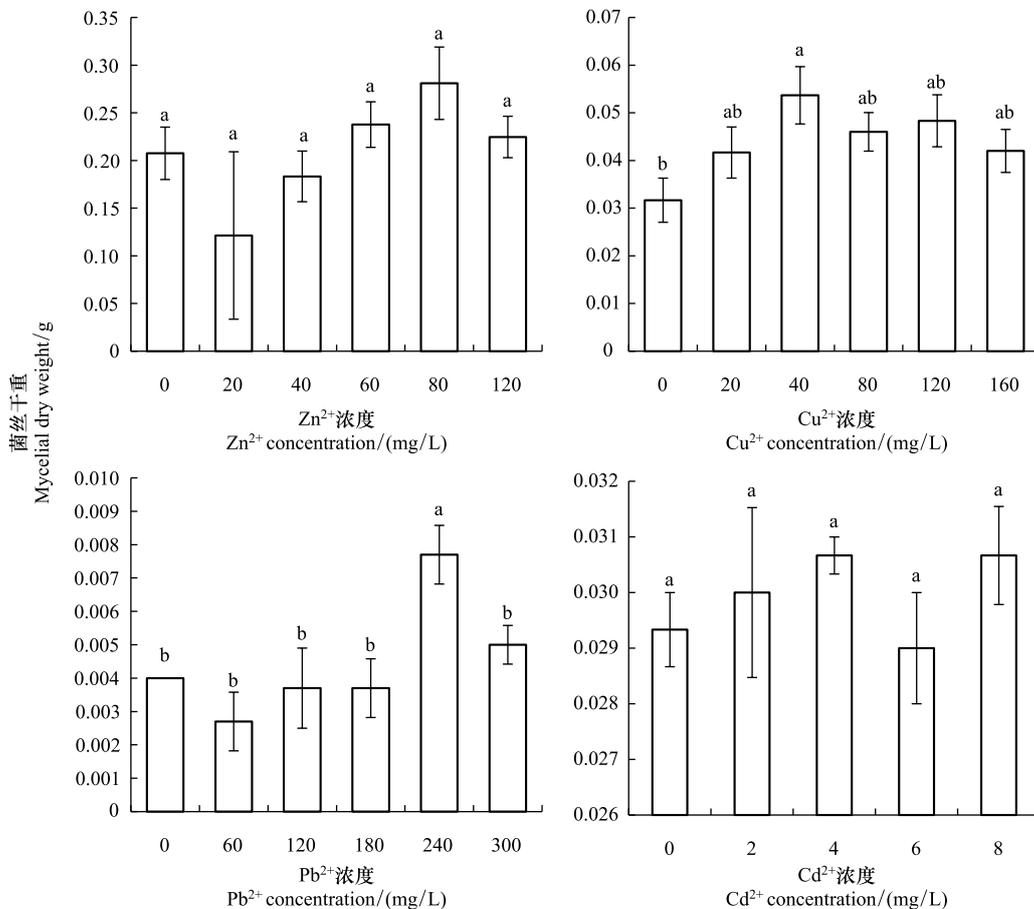


图4 根据 *tefA* 序列,使用最大似然法(ML)构建系统发育树

Fig.4 Phylogeny derived from the maximum likelihood (ML) analysis of *tefA* sequences

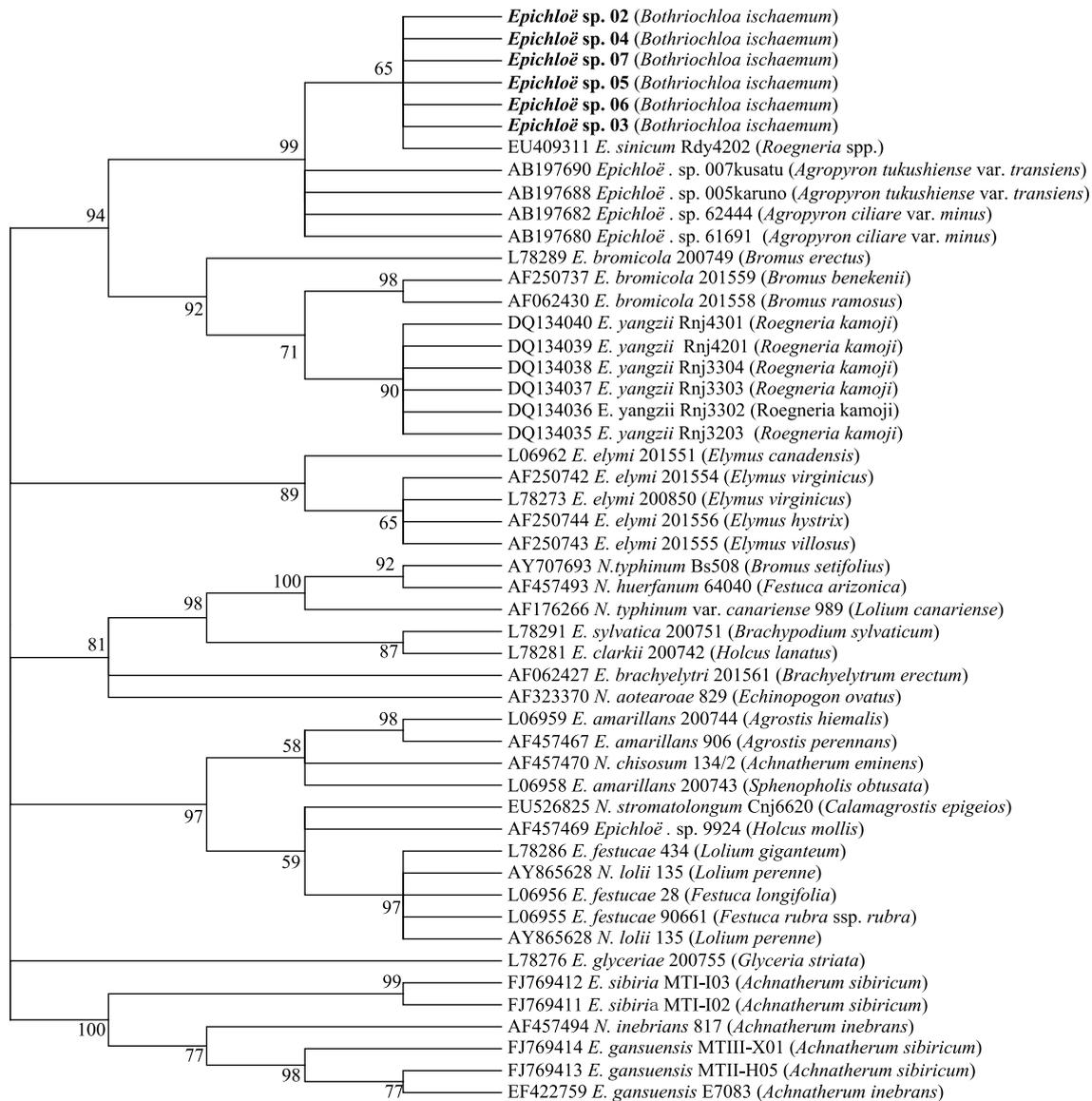
进化枝上显示的数字( $\geq 50\%$ )表示 1000 次自展检验后的置信度

## 2.4 白羊草内生真菌对重金属的耐受性

由图可知,随着  $Zn^{2+}$  浓度的增加,内生真菌干重呈现先下降后上升的趋势,在  $Zn^{2+}$  浓度为 20 mg/L 是内生真菌干重达到最低值为 0.12 g,在浓度为 80 mg/L,干重达到最大值为 0.28 g(图 6)。随着  $Cu^{2+}$  浓度升高,内生真菌干重呈现先升高后下降的趋势, $Cu^{2+}$  浓度为 40 mg/L 时,内生真菌干重达到最大,且显著高于对照组。浓度从 40 mg/L 到 120 mg/L 时菌丝干重缓慢降低(图 6)。*Epichloë* 属内生真菌对  $Pb^{2+}$  胁迫的响应表现为,当  $Pb^{2+}$  为 240 mg/L,菌丝干重达到最大值,并且显著高于其他各浓度下菌丝重量(图 6)。对于  $Cd^{2+}$  胁迫而言,各个梯度下内生真菌干重均无显著差异(图 6)。

## 3 讨论

本研究首次从白羊草中检测并分离得到 *Epichloë* 属内生真菌。*tubB* 和 *tefA* 序列系统发育分析表明,白羊草内生真菌与来自羽茅的 *E. sibirica* 非常相似,支持率分别达 99% 和 98%,与冰草属禾草上的 *Epichloë* 菌株以及雀麦属(*Bromus*)禾草上分离到的 *E. bromicola* 相似可能性较大,进化树上自展率为 94%。在通过 *actG* 基因序列得到的 ML 系统发育树中,白羊草内生真菌与来自羽茅上的 *E. sibirica* 和 *E. gansuensis* 菌株相似性较高,支持率分别达 99% 和 100%,但白羊草内生真菌的形态特征与羽茅中 *E. gansuensis* 不尽一致,具体表现为:从羽茅中分离纯化的内生真菌在 PDA 培养基上生长速度快,并且菌落表面更加光滑和致密<sup>[11-12]</sup>,而本研究中,白羊草内生真菌生长速度缓慢,并且与羽茅中 *E. sibirica* 内生真菌的特征描述相似。通过形态学和分子系统发育学分析,将白羊草内生真菌鉴定为 *Epichloë sibirica*。前期研究结果发现,不同恢复年限分离得到的白羊草内

图5 根据 *tubB* 序列, 使用最大似然法 (ML) 构建系统发育树Fig.5 Phylogeny derived from the maximum likelihood (ML) analysis of *tubB* sequences进化枝上显示的数字 ( $\geq 50\%$ ) 表示 1000 次自展检验后的置信度

生真菌分别为赤霉属、镰刀菌属、青霉属<sup>[13]</sup>以及 *Epichloë* 属。把白羊草内生真菌与已知吸附重金属的内生真菌做系统进化树分析, 发现 *Epichloë* 属和白腐菌有较近的亲缘关系, 白腐菌对镉有良好的吸附作用, 白羊草能够生活在镉污染土壤的植物体内, 可能由于 *Epichloë sibiria* 对镉也有吸附作用。分子鉴定结果揭示与白羊草共生的内生真菌特点, 为今后研究白羊草-内生真菌共生体的生理生态特征提供科学基础。

Vivas 等在锌污染的土壤中筛选到抗 100 mg/L  $Zn^{2+}$  的短芽孢杆菌属 (*Brevibacillus*), 羽茅内生真菌在  $Zn^{2+}$  胁迫下的半致死浓度为 80 mg/L<sup>[35]</sup>, 与已报道的细菌和内生真菌的重金属抗性相比, 本研究中白羊草内生真菌在 120 mg/L 的  $Zn^{2+}$  胁迫处理下能继续生长, 说明白 *E. sibiria* 内生真菌自身对  $Zn^{2+}$  具有较高抗性。Wu 等在铅锌尾矿土中筛选到对 100 mg/L  $Cu^{2+}$  和 300 mg/L  $Pb^{2+}$  都有较强抗性的固氮菌属和芽孢杆菌, 本试验中铜尾矿坝白羊草 *E. sibiria* 内生真菌表现出对 240 mg/L  $Pb^{2+}$  和 160 mg/L  $Cu^{2+}$  都有一定抗性, 这可能是由于植物内生真菌专性寄生于宿主体内, 长期以来形成密切的共生关系, 与细菌相比, 真菌呈丝状生长且生长快, 生物量大, 因而抗重金属能力优于内生细菌<sup>[36]</sup>。已有研究发现, 高羊茅内生真菌和羽茅内生真菌对  $Cd^{2+}$  胁迫的耐

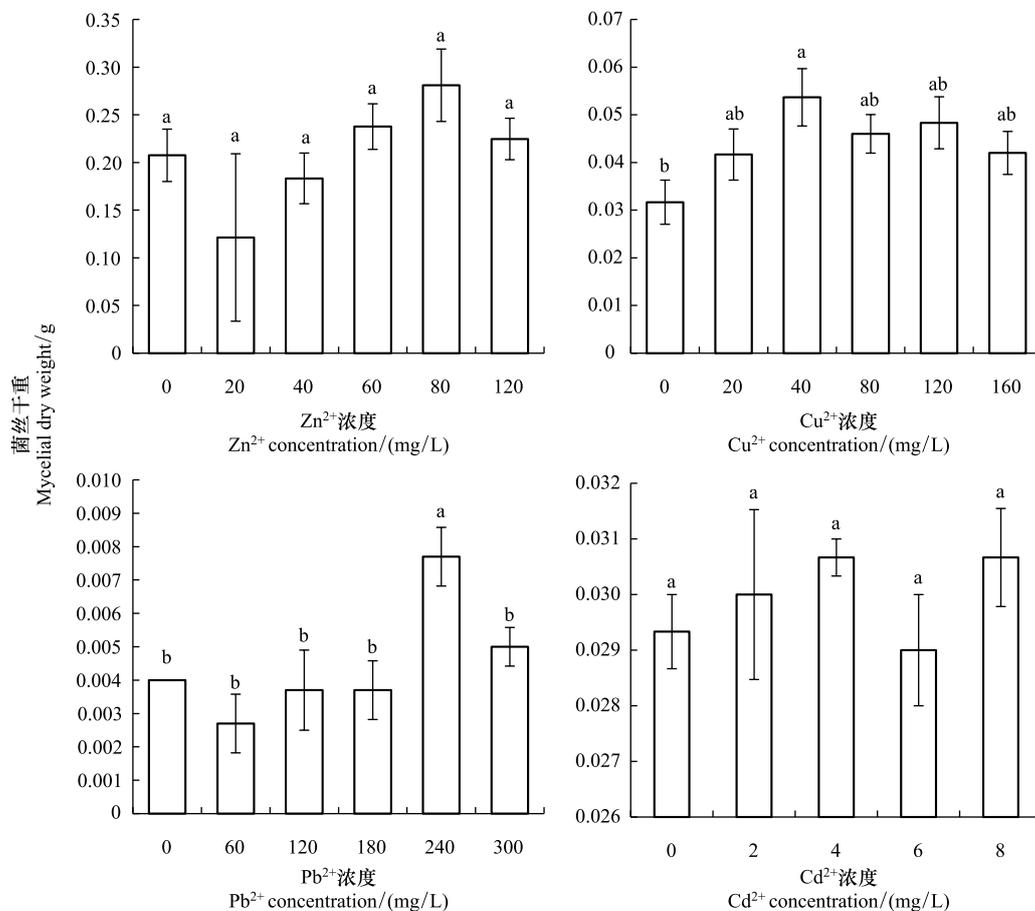


图 6 不同重金属胁迫下白羊草内生真菌的菌丝干重

Fig.6 The dry weight of *Bothriochloa ischaemum* endophytes under different heavy metal stresses

受浓度分别为 1 mg/L 和 5 mg/L<sup>[35]</sup>,而白羊草内生真菌对 Cd<sup>2+</sup>胁迫的耐受浓度为 8 mg/L。本研究中分离纯化得到的铜尾矿坝白羊草 *E. sibirica* 内生真菌,对重金属 Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>和 Cd<sup>2+</sup>具有较高水平的抗性。这可能是内生真菌通过表面的吸附作用,或是菌丝分泌出多糖物质的结合作用使重金属的毒性降低<sup>[37]</sup>。因此,白羊草内生真菌在多种重金属污染的土壤修复过程中可能会有更大的适用性,特别是在铜矿区生态修复过程中,白羊草内生真菌可能对提高宿主抗性方面具有一定潜力。

#### 4 结论

利用 PDA 培养基分离的方法,从白羊草中分离出的菌株菌落正面呈白色,背面浅黄色。菌落质地致密,形状为中间突出。生长速度较慢,位于 5.810—9.788 mm/周之间,孢子大小为 1.208—8.048 μm 之间,孢子形态椭圆、球型。通过进行 *actG*、*tefA* 和 *tubB* 扩增、测序和系统发育分析 将白羊草内生真菌鉴定为 *Epichloë sibirica*。铜尾矿坝白羊草 *E. sibirica* 内生真菌对重金属 Zn<sup>2+</sup> (120 mg/L)、Cu<sup>2+</sup> (160 mg/L)、Pb<sup>2+</sup> (240 mg/L) 和 Cd<sup>2+</sup> (8 mg/L) 具有耐受性。

#### 参考文献 (References):

- [ 1 ] Carroll G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*, 1988, 69(1): 2-9.
- [ 2 ] Bacon C W, Richardson M D, White J F Jr. Modification and uses of endophyte-enhanced turfgrasses: a role for molecular technology. *Crop Science*, 1997, 37(5): 1415-1425.
- [ 3 ] White J F, Sullivan R F, Balady G A, Gianfagna T J, Yue Q, Meyer W A. A fungal endosymbiont of the grass *Bromus setifolius*: distribution in someandean populations, identification, and examination of beneficial properties. *Symbiosis*, 2001, 31(4): 241-257.

- [ 4 ] 金文进. 醉马草内生真菌多样性的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2009.
- [ 5 ] 金文进, 李春杰, 王正凤. 禾草内生真菌的多样性及意义. 草业学报, 2015, 24(1): 168-175.
- [ 6 ] 王志伟, 纪燕玲, 陈永敢. 植物内生菌研究及其科学意义. 微生物学通报, 2015, 42(2): 349-363.
- [ 7 ] Leuchtman A, Bacon C W, Scharld C L, White J F Jr, Tadych M. Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichloë*. Mycologia, 2014, 106(2): 202-215.
- [ 8 ] Li W, Ji Y L, Yu H S, Wang Z W. A new species of *Epichloë* symbiotic with Chinese grasses. Mycologia, 2006, 98(4): 560-570.
- [ 9 ] Yan K, Ji Y L, Sun X H, Zhan L H, Li W, Yu H S, Wang Z W. Taxonomy of *Neotyphodium* endophytes of Chinese native *Roegneria* plants. Mycologia, 2009, 101(2): 211-219.
- [ 10 ] Li C J, Nan Z B, Paul V H, Daprich P D, Li Y. A new *Neotyphodium* species symbiotic with drunken horse grass (*Achnatherum inebrians*) in China. Mycotaxon, 2004, 90(1): 141-147.
- [ 11 ] 张欣. 内蒙古中东部草原羽茅种群内生真菌的多样性及与宿主植物协同进化的研究[D]. 天津: 南开大学, 2009.
- [ 12 ] 朱敏杰. 内蒙古中东部草原羊草内生真菌多样性及其对宿主生理生态特性的影响[D]. 天津: 南开大学, 2013.
- [ 13 ] 曹苗文, 贾彤, 景炬辉, 柴宝峰. 铜尾矿库白羊草内生真菌的分布及 rDNA-ITS 系统发育. 草业学报, 2017, 26(5): 163-172.
- [ 14 ] Gong B, Liu G X, Liao R Q, Song J J, Zhang H. Endophytic fungus *Purpureocillium* sp. A5 protect mangrove plant *Kandelia candel* under copper stress. Brazilian Journal of Microbiology, 2017, 48(3): 530-536.
- [ 15 ] Zhang Y J, Zhang Y, Liu M J, Shi X D, Zhao Z W. Dark septate endophyte (DSE) fungi isolated from metal polluted soils: their taxonomic position, tolerance, and accumulation of heavy metals *in vitro*. The Journal of Microbiology, 2008, 46(6): 624-632.
- [ 16 ] 康宇. 紫茎泽兰及其根内生真菌在重金属矿区修复中的基础研究[D]. 昆明: 云南大学, 2010.
- [ 17 ] Zhou Y, Li X, Qin J H, Liu H, Chen W, Niu Y, Ren A Z, Gao Y B. Effects of simultaneous infections of endophytic fungi and arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of their shared host grass *Achnatherum sibiricum* under varying N and P supply. Fungal Ecology, 2016, 20: 56-65.
- [ 18 ] He Y M, Yang Z X, Li M R, Jiang M, Zhan F D, Zu Y Q, Li T, Zhao Z W. Effects of a dark septate endophyte (DSE) on growth, cadmium content, and physiology in maize under cadmium stress. Environmental Science and Pollution Research, 2017, 24(22): 18494-18504.
- [ 19 ] 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(4): 923-940.
- [ 20 ] Bonnet M, Camares O, Veisseire P. Effects of zinc and influence of *Acremonium lolii* on growth parameters, chlorophyll *a* fluorescence and antioxidant enzyme activities of ryegrass (*Lolium perenne* L. cv Apollo). Journal of Experimental Botany, 2000, 51(346): 945-953.
- [ 21 ] Malinowski D P, Belesky D P, Lewis G C. Abiotic stresses in endophytic grasses//*Neotyphodium* in Cool-Season Grasses. Roberts C A, West C P, Spiers D E, eds. Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 2005.
- [ 22 ] Rahman M H, Saiga S. Endophytic fungi (*Neotyphodium coenophialum*) affect the growth and mineral uptake, transport and efficiency ratios in tall fescue (*Festuca arundinacea*). Plant and Soil, 2005, 272(1/2): 163-171.
- [ 23 ] 李川, 李夏, 任安芝, 高玉葆. 内生真菌感染对宿主植物羽茅锌耐受性的影响. 南开大学学报: 自然科学版, 2013, 46(4): 29-35.
- [ 24 ] Zhang X X, Li C J, Nan Z B. Effects of salt and drought stress on alkaloid production in endophyte-infected drunken horse grass (*Achnatherum inebrians*). Biochemical Systematics and Ecology, 2011, 39(4/6): 471-476.
- [ 25 ] Zhang X X, Li C J, Nan Z B. Effects of cadmium stress on growth and anti-oxidative systems in *Achnatherum inebrians* symbiotic with *Neotyphodium gansuense*. Journal of Hazardous Materials, 2010, 175(1/3): 703-709.
- [ 26 ] Zhang X X, Li C J, Nan Z B. Effects of cadmium stress on seed germination and seedling growth of *Elymus dahuricus* infected with the *Neotyphodium* endophyte. Science China Life Sciences, 2012, 55(9): 793-799.
- [ 27 ] 李川, 任安芝, 高玉葆. 内生真菌感染对宿主植物高羊茅锌耐受性的影响. 生态学报, 2010, 30(7): 1684-1690.
- [ 28 ] 王会梅, 徐炳成, 李凤民, 贺学礼. 黄土丘陵区白羊草和柳枝稷适应性生长的比较. 干旱地区农业研究, 2005, 23(5): 35-40.
- [ 29 ] 张桂莲, 张金屯, 程林美. 山西南部山地白羊草群落数量分类和排序. 草业学报, 2003, 12(3): 63-69.
- [ 30 ] 张娜, 梁一民. 干旱气候对白羊草群落土壤水分和地上部生长的初步观察. 生态学报, 2000, 20(6): 964-970.
- [ 31 ] 徐朗然, 张继敏, 丁士友. 黄土高原白羊草草原的基本特征及其地理学意义. 西北植物学报, 1997, 17(1): 88-93.
- [ 32 ] 龙加洪, 谭菊, 吴银菊, 朱奕, 许雄飞. 土壤重金属含量测定不同消解方法比较研究. 中国环境监测, 2013, 29(1): 123-126.
- [ 33 ] Moon C D, Miles C O, Järlfors U, Scharld C L. The evolutionary origins of three new *Neotyphodium* endophyte species from grasses indigenous to the Southern Hemisphere. Mycologia, 2002, 94(4): 694-711.
- [ 34 ] 邢转青, 纪燕玲, 陆涛, 王志伟. 一种大连细叶早熟禾内生真菌的形态学和系统发育学研究. 微生物学通报, 2014, 41(8): 1595-1604.
- [ 35 ] Moon C D, Guillaumin J J, Ravel C, Li C J, Craven K D, Scharld C L. New *Neotyphodium* endophyte species from the grass tribes Stipeae and Meliceae. Mycologia, 2007, 99(6): 895-905.
- [ 36 ] 李川. 内生真菌感染对宿主禾草重金属耐受性影响的研究[D]. 天津: 南开大学, 2009.
- [ 37 ] 姜敏, 曹理想, 张仁铎. 重金属抗性内生真菌与其宿主植物重金属抗性关系初探. 农业环境科学学报, 2007, 26(6): 2038-2042.