

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (3) :273 - 281; 4 March 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140268

基于 *act* 序列中国西部披碱草属植物所带内生真菌的系统演化

宋辉, 李秀璋, 鲍根生, 宋秋艳, 田沛, 南志标*

草地农业生态系统国家重点实验室, 兰州大学草地农业科技学院, 甘肃 兰州 730020

摘要: 【目的】研究中国西部披碱草属植物 (*Elymus* spp.) 所带无性世代内生真菌的系统进化关系。【方法】克隆 15 条分离于中国西部披碱草属植物无性世代内生真菌肌动蛋白基因 (*act*) 序列, 并与下载自 GenBank 中内生真菌的 *act* 序列共同构建系统进化树和网络结构拓扑图。【结果】供试无性世代内生真菌 *act* 序列均为单拷贝基因。系统进化关系表明, 它们与分离于北美洲披碱草属植物的有性世代内生真菌 *Epichloë elymi* 存在不同的起源, 而与分离于北美洲直芒草 (*Achnatherum eminens*) 的无性世代内生真菌 *Neotyphodium chisosum* 具有较近的亲缘关系。进一步研究发现, 由北美洲直芒草无性世代内生真菌 *N. chisosum* 形成的单元型 Hap 8 与本研究菌株所组成的单元型 Hap 3 之间可能存在基因流。

关键词: 内生真菌, 披碱草属植物, 肌动蛋白, 系统发育

中图分类号: Q939 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 03-0273-09

禾本科植物内生真菌主要是麦角菌科的子囊菌, 存在无性世代 (*Neotyphodium* spp.) 和有性世代 (*Epichloë* spp.) 两种形式^[1-2]。2014 年, Leuchtmann 等^[3] 根据基因序列和形态分析结果重新命名了禾草无性世代和有性世代内生真菌, 定义了 43 种内生真菌种名, 大量的无性世代和有性世代内生真菌被命名为一个种。他们同时认为, 无性世代内生真菌只是暂时没有找到相应的有性阶段。不过, 关于无性世代内生真菌的起源存在两种观点, 一种观点认为^[4], 无性世代内生真菌起源于失去有性阶段的内生真菌; 另一种观点认为^[5-6], 无性世代内生真菌起源于无性世代或有性世代内生真菌之间的种间杂交。由于 Leuchtmann 等关于内生真菌的命名并不能很好地揭示无性世代内生真菌的起源。因此, 在本文中仍采用原有的分类方法。

目前, 肌动蛋白基因 (*act*) 序列是研究禾草内生真菌系统进化常用的分子标记之一。虽然该标记的使用频率相对于 *tub* (微管蛋白基因) 和 *tef* (延长因子基因) 的使用频率低, 但该标记由于其在系统进化分析中的稳定性而被广泛使用。Moon 等^[7] 通过使用 *act* 序列从针茅族 (*Stipeae*) 和臭草族 (*Meliceae*) 宿主植物中鉴定出 3 种内生真菌的新种。此外, *act* 序列还被用来分析内生真菌之间的系统进化关系。例如, Zhang 等^[8] 和 Zhu^[9] 等利用 *act* 序列分别分析了中国地区羽茅 [*Achnatherum sibiricum* (Linn.) Keng] 和羊草 [*Leymus chinensis* (Trin.) Tzvel.] 所带内生真菌的多样性。但是, 使用 *act* 序列分析披碱草属植物所带内生真菌的研究尚未见报道。因此, 本研究选用 *act* 序列作为分子标记分析披碱草属植物所带内生真菌的系统进化关系。

基金项目: 国家“973 项目”——国家重点基础研究发展计划 (2014CB138702); 中央高校基本科研业务费专项资助 (lzujbky-2014-76, lzujbky-2014-81)

* 通信作者。E-mail: zhibiao@lzu.edu.cn

作者简介: 宋辉 (1985 -), 男, 山东鱼台人, 博士研究生, 从事草类生物技术研究。E-mail: songh12@lzu.edu.cn

收稿日期: 2014-05-21; **修回日期:** 2014-10-24

披碱草属植物 (*Elymus* spp.) 作为优良的牧草广泛地分布于温带地区, 目前大约共发现 150 多种^[10-11]。关于披碱草属植物内生真菌的研究已有报道。在北美地区, 披碱草属植物所带内生真菌以有性世代为主^[12-13], 如, 分离于毛野麦 (*E. villosus* Muhl. ex Willd.)、维吉尼亚黑麦草 (*E. virginicus* L.)、东部蝇子草 (*E. hystrix* L.) 有性世代内生真菌 *Epichloë elymi* Schardl & Leuchtm 和分离于加拿大披碱草 (*E. canadensis* L.) 有性世代内生真菌 *E. canadensis* Charlton & Young。而在中国, 披碱草属植物内生真菌以无性世代为主。Zhang 和 Nan^[14-15] 已报道了分离于中国的披碱草 (*E. dahuricus* Turcz. ex Griseb.) 无性世代内生真菌, 并从内生真菌产生生物碱和对宿主植物的影响等方面进行了研究。他们的研究表明, 共生体所产的生物碱 peramine 的含量随季节变化, 其中生长季末含量最高, 另外, 披碱草内生真菌能提高宿主植物的耐旱性和发芽率^[16]。本研究采集了中国西部 871 株野生披碱草属植物, 包括披碱草、垂穗披碱草 (*E. nutans* Griseb.)、圆柱披碱草 (*E. dahuricus* var. *cylindricus* Franch.) 和麦宾草 [*E. tangutorum* (Nevski.) Hand. -Mazz.] 等, 经过进行内生真菌检测和分离, 共得到 15 株无性世代内生真菌。基于 *act* 序列构建系统进化树和网络结构拓扑图以期揭示这 15 株无性世代内生真菌与其他内生真菌的系统进化关系。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究从中国西部采集 42 份共 871 株披碱草属植物, 采集省份包括: 四川、宁夏、甘肃、青海、西藏和新疆 (表 S1)。

1.2 内生真菌的检测和分离

采用苯胺蓝染色法检测这些披碱草属植物的带菌情况发现, 15 份披碱草属植物带有内生真菌, 并且带菌的披碱草属植物主要分布在甘肃, 青海和宁夏 (表 S1)。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA) 被广泛的应用于禾本科植物所带内生真菌的分离^[8, 17-18]。本研究将经过表面消毒的披碱草属植物的茎秆放置于 PDA 培养基上, 待菌丝长出后, 用无菌解剖针挑取少量菌丝于新鲜的 PDA 培养基上, 形成菌落后, 供

下一步试验。

1.3 内生真菌 DNA 提取

使用真菌 DNA 提取试剂盒 (D3195-01, OMEGA 公司) 提取本研究所分离的内生真菌的 DNA。

1.4 内生真菌 *act* 序列的扩增和测序

act 序列已成功的应用于内生真菌系统进化关系的分析^[8-9]。本文采用扩增羊草 (*L. chinensis*) 所带内生真菌 *act* 序列的引物^[9], *act1-exon5u-1*: (5'-TAATCAGTCACATGGAGGGT-3') 和 *act1-exon6u-1* (5'-AACCACCGATCCAGACAG AGT-3')。PCR (polymerase chain reaction) 扩增体系和程序参考先前扩增羊草内生真菌 *act* 序列的方法^[9]。

PCR 扩增产物于 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 回收片段连接于 pMD18-T 载体并转入大肠杆菌 DH5 α 。每个样本选择 3-5 个阳性克隆委托兰州励合生物公司进行测序。所测序列提交至 GenBank 数据库, 登录号为 KJ585701-KJ585715。

1.5 数据分析

为尽可能多的获到内生真菌 *act* 序列, 本研究以测序结果作为查询序列, 使用公共数据库 NCBI (National center for biotechnology information) 中的 Blast 程序进行比对, 得到不同内生真菌的 *act* 序列, 这些内生真菌分布于亚洲、欧洲、非洲、大洋洲、北美洲和南美洲。除此之外, 本研究以从禾本科软条青蒿竹 [*Arundinaria tecta* (Walter.) Muhl.] 中分离出的 *Dussiaella tuberiformis* (Berk. & Ravenel) Pat. 的 *act* 序列作为系统进化分析中的外群^[19]。

使用 Clustal X 程序^[20] 进行多序列比对, 分别使用 PAUP 4.0 程序^[21] 构建 MP (maximum parsimony) 和 MEGA 6.0 程序^[22] 构建 NJ (neighbour joining) 系统进化树。其中, MP 进化树参数包括: 采用启发式搜索, 随机选取 100 颗树, 比对产生的空位作为丢失信息。NJ 进化树选择 p-distance 模型。这两种不同算法构建的进化树均采用 1000 次随机取样重复, 即自举值 (bootstrap value) 设置为 1000。

系统进化树虽能很好地反映物种之间的亲缘关系, 却不能揭示父本 (或母本) 与子代之间的关系。网络结构 (network) 不仅能揭示父本 (或母本) 与子代之间的关系, 还能反映样本之间的地理关系^[23]。因此, 本研究首先使用 Recco 程序^[24] 评估 *act* 内含子序列的重组情况, 如序列间未发生基因重组事件则可用于网络结构分析。使用 DnaSP 5.0 程序^[25]

划分单元型, 采用 Network 4.0 程序 (Fluxus Technology Ltd, Clare, Suffolk, UK) 中的 MJ (median-joining) 法构建内生真菌 *act* 序列的网络结构, 以揭示各大洲内生真菌之间的关系。

2 结果

2.1 *act* 序列分析

测序结果表明, 本研究所克隆的 15 株菌株的 *act* 序列均为单一条带且长 1523 bp, 包括 5 个外显子 (1024 bp) 和 4 个内含子 (499 bp)。由于不同研究者使用不同的引物扩增内生真菌 *act* 序列, 因此, 研究者们向 GenBank 数据库中提交序列的长度各不相同; 同时, 很多研究者使用 *act* 序列的内含子作

为研究内生真菌系统发育关系的标记^[8-9]。结合以上两点, 本研究提取了所有序列 (包括外群) 的内含子序列, 并且尽量选取相同长度的核苷酸序列。以大多数序列的长度 (约 422 bp) 为标准, 把较长序列中的多余碱基序列去掉, 而相对较短的序列如果不影响系统进化树的构建则保留, 最终确定了 126 条 *act* 序列。

将 126 条 *act* 内含子序列进行多重比对, 比对后的序列长 460 bp, 包括 110 个不变位 (invariable sites)、121 个可变位点 (variable sites) 和 64 个简约信息位点 (parsimony informative sites)。多重比对的结果还发现, 本研究所克隆的 15 条 *act* 序列和从 GenBank 数据库中下载的 26 条序列与其他序列相比, 这 41 条序列存在 9 个碱基的缺失 (TGGGCACTG) (图 1)。

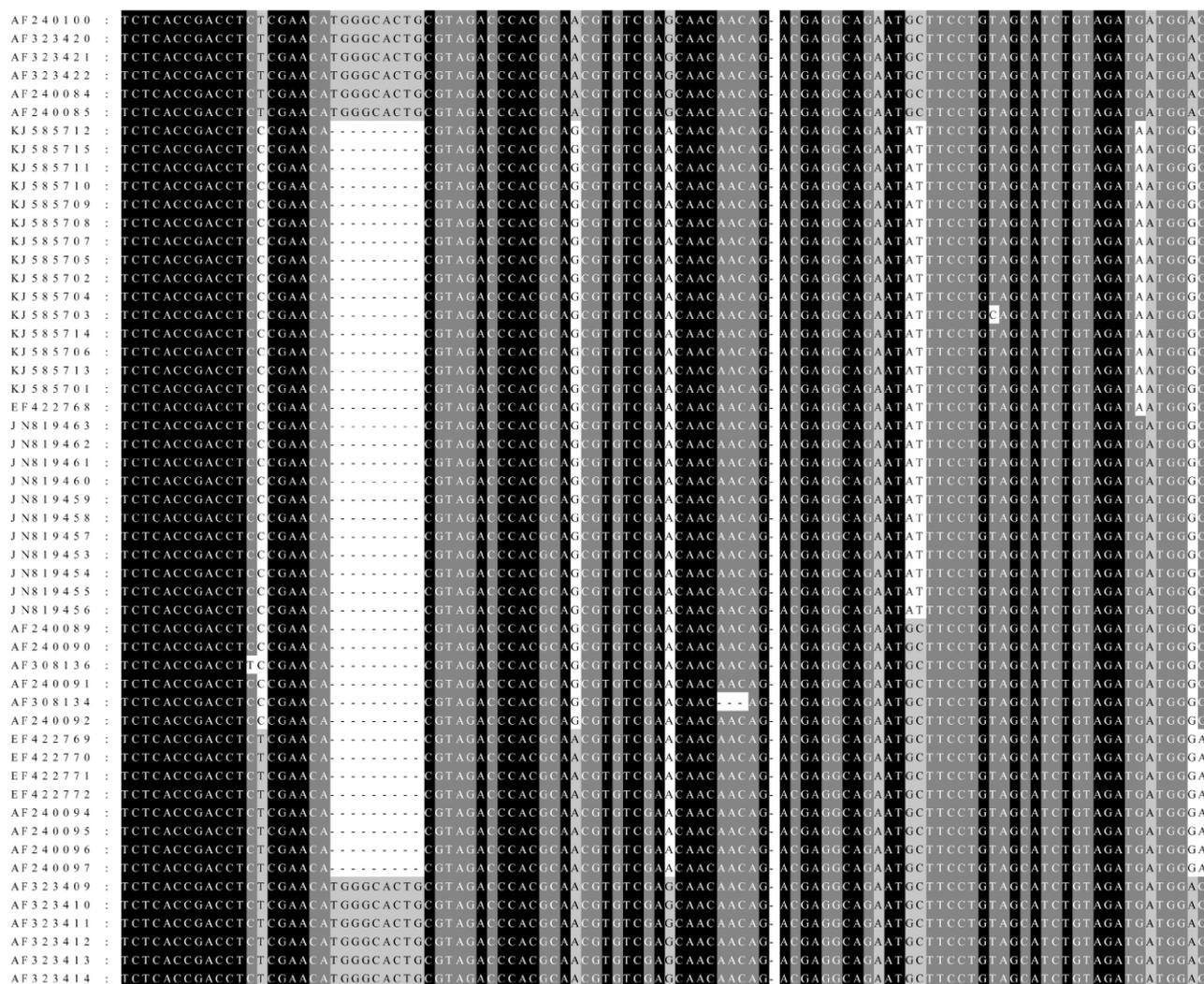


图 1. 部分 *act* 序列的多重比对

Figure 1. Multiple alignment of partial *act* sequences. Nine continuous lines indicate deletion.

2.2 系统进化分析

使用 MP 和 NJ 法构建的系统进化拓扑结构基本一致, 本文只展示 MP 法构建的系统进化树(图 2)。系统进化树分支上只显示自展率大于 50% 的值。MP 系统进化树所产生的树长(tree length)为 323、一致性指数(consistency index)为 0.8421、保留指数(retention index)为 0.9706。

本研究所分离的 15 株无性世代内生真菌的 *act* 序列单独聚集在一个分支(NE)上, 自举值高达 95%, 表明这 15 株无性世代内生真菌虽然分离于不

同的披碱草属植物, 但存在一个共同的祖先(图 2)。进一步分析发现, 它们与分离于北美洲直芒草 [*Achnatherum eminens* (Cav.) Barkworth.] 的无性世代内生真菌 *Neotyphodium chisosum* (White. & Morgan-Jones.) Bacon. & Hanlin. 具有较近的亲缘关系, 自举值为 85%。有趣的是, 同为披碱草属植物, 分离于北美洲披碱草属植物所带有性世代内生真菌 *E. elymi* 的 *act* 序列并不与本研究所分离的无性世代内生真菌的 *act* 序列聚集在一起, 而单独聚集在分支 EE 上(图 2), 并与分离于北美洲睡眠草

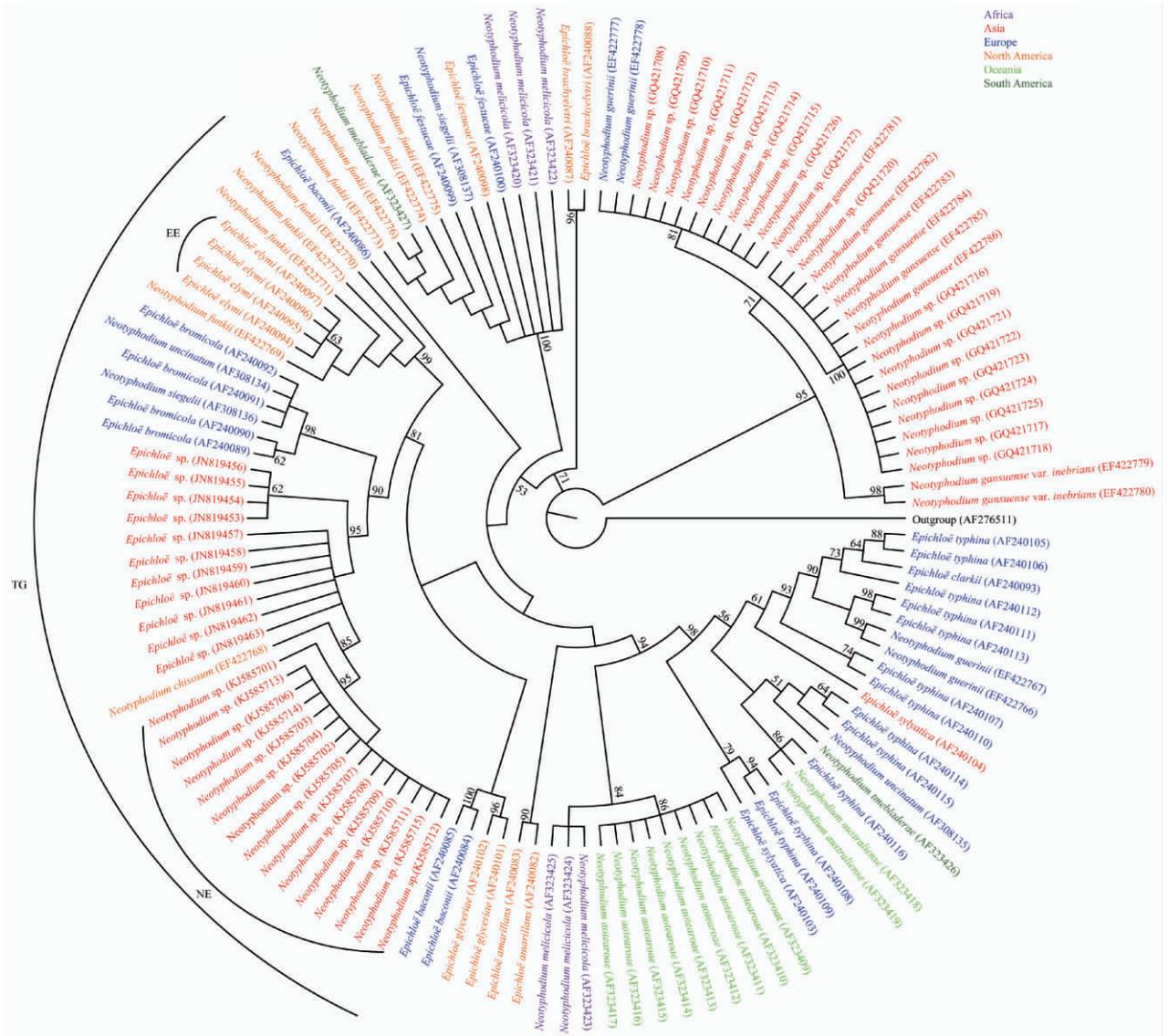


图 2. 基于最大简约法构建有性世代和无性世代内生真菌 *act* 内含子序列的系统发育树

Figure 2. Phylogenetic trees of *Epichloë* spp. and *Neotyphodium* spp. based on maximum parsimony (MP) analysis of sequences from intron portions of *act* genes. The tree is 323 steps in length, consistency index = 0.8421, retention index = 0.9706. Maximum parsimony (MP) trees were constructed in PAUP 4.0b10 package. MP trees implemented using the heuristic search based on tree bisection-reconnection (TBR) branch swapping and 100 random addition replicates. Alignment gaps were treated as missing information. Nucleotide substitutions were unordered and unweighted. Bootstrap support values were calculated by 1000 replications. Branches with bootstrap values > 50% are shown.

(*Achnatherum robustum* (Vasey.) Barkworth.) 的无性世代内生真菌 *N. funkii* Craven. & Schardl. 具有较近的亲缘关系。值得注意的是, 分支 TG 包含的 41 条序列与图 2 中缺失 9 个碱基 (TGGGCACTG) 的序列相对应, 说明它们具有一个共同的起源, 缺失的 9 个碱基在这 41 个内生真菌分化前已经形成。

2.3 网络结构分析

在 MJ 网络拓扑结构图中, 125 条序列组成 39 个单元型, 单元型多样性为 0.95。18 个单元型仅由 1 条序列组成, 27 个单元型由 2 条以上的序列组成。其中, 单元型 Hap 35 包含的序列最多, 高达 13 条 (表 S1)。在含有多条序列的单元型中, 单元型 Hap 10、21、23 和 29 同时含有有性世代和无性世代内生真菌 *act* 序列 (表 S1), 表明有性世代和无性世代内生真菌之间存在基因流 (gene flow)。进一步对含有多个 *act* 序列的单元型分析发现, 单元型 Hap 23、29 和 34 中的 *act* 序列来自多个大洲。其中, 单元型

Hap 29 中的 *act* 序列来自北美洲、南美洲、非洲和欧洲; 单元型 Hap 23 中的 *act* 序列来自大洋洲和欧洲; 单元型 Hap 34 中的 *act* 序列来自亚洲和欧洲 (表 S1)。在统计来自同一大洲单元型的数量时发现, 来自欧洲 (14 个) 的 *act* 序列组成的单元型最多, 其次是亚洲 (12 个), 再次是北美洲 (7 个)。

本研究所分离的 15 条无性世代内生真菌的 *act* 序列可划分为 5 个单元型, 即单元型 Hap 3、4、5、6 和 7。其中单元型 Hap 4、5、6 和 7 均只含有 1 条 *act* 序列, 单元型 Hap 3 含有 11 条 *act* 序列 (图 3)。此外, 分离于北美洲直芒草的无性世代内生真菌 *N. chisosum* 的 *act* 序列形成单元型 Hap 8, 该单元型与单元型 Hap 3 之间存在基因流。与此相比, 北美洲披碱草属植物有性世代内生真菌 *E. elymi* 的 *act* 序列仅划分为 1 个单元型, 即单元型 Hap 13 (图 3)。这再次表明, 15 株分离于中国西部披碱草属植物的无性世代内生真菌与 4 株分离于北美洲披碱草属植

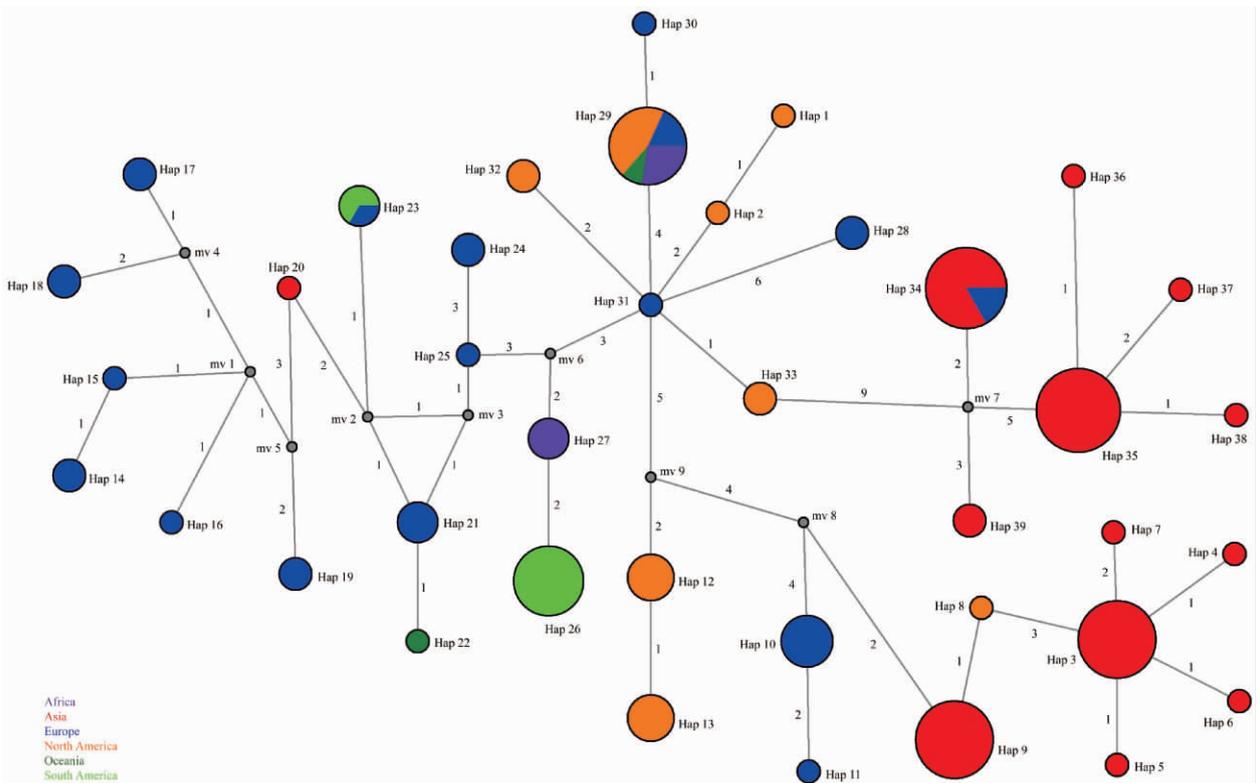


图 3. 基于无性世代和有性世代内生真菌 *act* 序列单元型的网络拓扑结构

Figure 3. Median-joining networks of *act* haplotypes from *Epichloë* spp. and *Neotyphodium* spp.. Each circle indicated one haplotype, with circle size being proportional to the number of isolates with that haplotype, and mv (median vectors) indicating missing intermediates of unsampled nodes inferred by MJ network analysis, and the number along the branches shows the number of mutations separating nodes. In addition, different colors indicate different continents, e. g., red, blue, cyan, orange, green, purple and black indicate Asia, Europe, Oceania, North America, South America, Africa and unknown continents, respectively.

物的有性世代内生真菌 *E. elymi* 具有不同的起源。

3 讨论

前人研究表明,无性世代内生真菌的起源存在两种可能,一种观点认为^[4],无性世代内生真菌起源于丢失了有性阶段的内生真菌。Oberhofer 和 Leuchtmann^[26] 通过研究 *Hordelymus* 属植物所带无性世代内生真菌发现,该内生真菌是由有性世代内生真菌失去有性阶段后形成的。另一种观点认为^[5-6],无性世代内生真菌是由无性世代或有性世代内生真菌种间杂交形成的。Moon 等^[19] 研究发现,有性世代内生真菌多以单倍体形式存在,而无性世代内生真菌一般以多倍体形式存在。通过分子标记和同工酶等研究发现^[6, 26],大量的无性世代内生真菌基因组存在多拷贝基因,这可能是由于有性世代内生真菌杂交而成。虽然在已确定的 43 个新种中,发生杂交现象的无性世代内生真菌比未发生杂交现象的无性世代内生真菌的数量多^[3],并且这些内生真菌的宿主植物为分布在世界各地的野生种^[27-29]。但是,在本研究中,通过分析 PCR 和测序结果表明,本研究所分离的无性世代内生真菌均未发生杂交现象。另外,通过分析 *tub* 和 *tef* 分子标记构建的系统发育树发现,分离于中国西部披碱草属植物的无性世代内生真菌为单拷贝基因且具有相同的起源(未发表)。因此,根据目前的结果,笔者推测,本研究所分离的无性世代内生真菌未发生杂交事件。

3.1 北美披碱草和中国西部披碱草所携带内生真菌不同的原因

本研究 *act* 序列数据显示,分离于中国西部披碱草属植物无性世代内生真菌与分离于北美洲披碱草属植物有性世代内生真菌存在不同的起源(图 2)。由此判断这两种性态的内生真菌属于不同的种。另外,先前的研究表明^[30-31],披碱草属植物可能起源于中亚地区。基于这种观点,笔者推测,无性世代内生真菌侵入披碱草属植物可能发生在披碱草属植物传播到北美洲之后。但是,关于内生真菌在披碱草属植物传播到北美洲以后是怎么样侵入的过程,本研究还不能给出合理的解释。

众所周知,内生真菌在宿主植物中的传播方式主要分为两种,即水平传播和垂直传播。传统认识

是^[32-33],无性世代内生真菌主要依靠种子传播,即垂直传播;有性世代内生真菌主要以产生的孢子进行水平传播。而最近的研究表明^[26, 34],无性世代内生真菌也存在水平传播机制。Moon 等^[19, 35] 通过大量的研究发现,同一种无性世代内生真菌存在于不同的宿主植物中,表明内生真菌可能存在水平传播机制。此外, Moon 等^[4] 研究早熟禾族(Poaceae)、燕麦族(Aveneae)和雀麦族(Bromeae)宿主植物内生真菌的传播机制发现,内生真菌不仅能在同一个族(早熟禾族)之间进行水平传播,还能在不同族(燕麦族和雀麦族)之间进行水平传播。在本研究中,分离于中国西部披碱草属(小麦族, Triticeae)植物的无性世代内生真菌与北美洲直芒草(针茅族, Stipeae)植物中的无性世代内生真菌 *N. chisosum* 聚集在一起,表明它们之间可能存在水平传播机制。

Schardl 等^[36] 发现宿主植物的基因型影响寄主植物所带内生真菌的特征。如,燕麦族(Aveneae)剪股颖属(*Agrostis*)和楔鳞草属(*Sphenopholis*)植物所带有性世代内生真菌 *E. amarillans* White. 可以产生子座,但从小麦族植物维吉尼亚黑麦草分离出的有性世代内生真菌 *E. amarillans* 则不产生子座。在本研究中,带菌的披碱草属植物除了西藏披碱草为四倍体植物之外,其余披碱草属植物均为六倍体。另外,有性世代内生真菌 *E. elymi* 的宿主植物北美洲披碱草属植物为四倍体^[37]。因此,笔者认为,中国西部和北美洲披碱草属植物基因型的不同可能是造成携带内生真菌不同的主要原因。不同内生真菌或许对不同基因型的宿主植物有特异性的侵袭。

3.2 内生真菌的起源和传播

MJ 网络结构分析不仅能反映物种间的宗谱关系(genealogical relationships),还能很好地反应物种间的地理分布,距离越近的单元型表明其宗谱关系越近^[23]。本研究中,来源于欧洲的内生真菌可分为 16 个单元型,表明欧洲内生真菌具有较高的遗传多样性。由此推测,禾本科植物内生真菌的起源地可能是欧洲地区。

结合 MJ 网络结构拓扑结构图,笔者认为内生真菌在不同大洲之间的传播途径,可能经历以下过程:分离于欧洲的内生真菌广泛地分布于旧世界(Old World)和新世界(New World)(图 3),表明分离于欧洲的内生真菌起着连接旧世界和新世界“桥梁”的作用。那么,欧洲的内生真菌是怎样传播到

世界各地呢? 根据网络拓扑结构图(图3), 笔者认为, 欧洲内生真菌传播到北美洲最有可能的解释是动物通过白令陆桥时将欧洲带有内生真菌的种子传播到北美洲。美洲内生真菌的扩散是通过候鸟在迁徙过程中将被内生真菌侵染的种子在北美洲和南美洲之间进行传播, 这一猜想在 Moon 等^[19] 研究南半球无性世代内生真菌的传播时已被阐述。此外, 欧洲作为欧非亚大陆板块的中心, 很容易通过人为引种或候鸟迁徙等行为将内生真菌传播到亚洲和非洲。有趣的是, 大洋洲四周都是海洋, 欧洲或美洲的内生真菌是怎样传播到大洋洲的呢? 由系统进化树和网络结构拓扑图可知, 大洋洲内生真菌与欧洲内生真菌的关系最为亲密。因此, 最有可能的解释是, 大洋洲内生真菌是由欧洲人迁移至大洋洲时, 将被内生真菌侵染的种子带入大洋洲。Stewart^[38] 证实, 新西兰无性世代内生真菌 *N. lolii* (Latch. & Samuels.) Bacon. & Hanlin. 是由英国移民者于19世纪从英国将黑麦草种子引入新西兰时进行传播的。另一方面, 单元型 Hap 26 和 Hap 27 分别是由大洋洲和非洲的内生真菌 *act* 序列组成的且它们具有较近的宗谱关系, 这表明, 非洲和大洋洲之间存在内生真菌的基因流。对于这一现象的解释可能是, 欧洲人在迁移大洋洲的过程中, 途经非洲进行补给时, 将一部分被内生真菌感染的种子或植物遗留在了非洲, 而其余部分被种植到大洋洲。因此, 非洲和大洋洲的内生真菌会存在基因流。

参考文献

- [1] Clay K. Fungal endophytes of grasses. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1990, 21: 275-297.
- [2] Schardl CL, Leuchtman A, Spiering MJ. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annual Review of Plant Biology*, 2004, 55: 315-340.
- [3] Leuchtman A, Bacon CW, Schardl CL, White Jr. JF, Tadych M. Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichloë*. *Mycologia*, 2014, 106 (2) : 202-215.
- [4] Moon CD, Scott B, Schardl CL, Christensen MJ. The evolutionary origins of *Epichloë* endophytes from annual ryegrasses. *Mycologia*, 2000, 92 (6) : 1103-1118.
- [5] Schardl CL, Tsai HF, Collett MA, Watt DM, Scott DB. Origin of a fungal symbiont of perennial ryegrass by interspecific hybridization of a mutualist with the ryegrass choke pathogen, *Epichloë typhina*. *Genetics*, 1994, 136 (4) : 1307-1317.
- [6] Tsai HF, Liu JS, Staben C, Christensen MJ, Latch GCM, Siegel MR, Schardl CL. Evolutionary diversification of fungal endophytes of tall fescue grass by hybridization with *Epichloë* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91 (7) : 2542-2546.
- [7] Moon CD, Guillaumin JJ, Ravel C, Li C, Craven KD, Schardl CL. New *Neotyphodium* endophyte species from the grass tribes Stipeae and Meliceae. *Mycologia*, 2007, 99 (6) : 895-905.
- [8] Zhang X, Ren AZ, Wei YK, Lin F, Li C, Liu ZJ, Gao YB. Taxonomy, diversity and origins of symbiotic endophytes of *Achnatherum sibiricum* in the Inner Mongolia Steppe of China. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 301 (1) : 12-20.
- [9] Zhu MJ, Ren AZ, Wen W, Gao YB. Diversity and taxonomy of endophytes from *Leymus chinensis* in the Inner Mongolia steppe of China. *FEMS Microbiology Letters*, 2013, 340 (2) : 135-145.
- [10] Dewey DR. The genomic system of classification. A guide to intergeneric hybridization with the perennial Triticeae // Gustafson JP. eds. *Gene Manipulation in Plant Improvement*. New York: Plenum Press, 1984: 209-280.
- [11] Helfgott DM, Mason-Gamer RJ. The evolution of North American *Elymus* (Triticeae, Poaceae) allotetraploids: evidence from phosphoenolpyruvate carboxylase gene sequences. *Systematic Botany*, 2004, 29 (4) : 850-861.
- [12] Craven KD, Hsiao PTW, Leuchtman A, Hollin W. Multigene phylogeny of *Epichloë* species, fungal symbionts of grasses. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 2001, 88 (1) : 14-34.
- [13] Charlton ND, Craven KD, Mittal S, Hopkins AA, Young CA. *Epichloë canadensis*, a new interspecific epichloid hybrid symbiotic with Canada wildrye (*Elymus canadensis*). *Mycologia*, 2012, 104 (5) : 1187-1199.
- [14] Zhang Y, Nan Z. Distribution of *epichloë* endophytes in Chinese populations of *Elymus dahuricus* and variation in peramine levels. *Symbiosis*, 2007, 43 (1) : 13-19.
- [15] Zhang YP, Nan ZB. Growth and anti-Oxidative systems changes in *Elymus dahuricus* is affected by *Neotyphodium* endophyte under contrasting water availability. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 2007, 193 (6) : 377-386.
- [16] Zhang XX, Li CJ, Nan ZB. 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.
- [17] Li W, Ji Y, Yu H, Wang Z. A new species of *Epichloë* symbiotic with Chinese grasses. *Mycologia*, 2006, 98 (4) :560-570.
- [18] Su YY, Guo LD, Hyde KD. Response of endophytic fungi of *Stipa grandis* to experimental plant function group removal in Inner Mongolia steppe, China. *Fungal Diversity*, 2010,43 (1) :93-101.
- [19] Moon CD, Miles CO, Järlfors U, Schardl CL. The evolutionary origins of three new *Neotyphodium* endophyte species from grasses indigenous to the Southern Hemisphere. *Mycologia*, 2002,94 (4) :694-711.
- [20] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997,25 (24) :4876-4882.
- [21] Swofford DL. PAUP* : Phylogenetic analysis using parsimony (* and Other Methods), version 4b10. Sinauer, Sunderland: Massachusetts, USA. 2002.
- [22] Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30 (12) : 2725-2729.
- [23] Jakob SS, Blattner FR. A chloroplast genealogy of *Hordeum* (Poaceae): long-term persisting haplotypes, incomplete lineage sorting, regional extinction, and the consequences for phylogenetic inference. *Molecular Biology and Evolution*, 2006,23 (8) :1602-1612.
- [24] Maydt J, Lengauer T. Recco: recombination analysis using cost optimization. *Bioinformatics*, 2006, 22 (9) : 1064-1071.
- [25] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 2009,25 (11) :1451-1452.
- [26] Oberhofer M, Leuchtman A. Genetic diversity in epichloid endophytes of *Hordelymus europaeus* suggests repeated host jumps and interspecific hybridizations. *Molecular Ecology*, 2012,21 (11) :2713-2726.
- [27] Sullivan TJ, Faeth SH. Local adaptation in *Festuca arizonica* infected by hybrid and nonhybrid *Neotyphodium* endophytes. *Microbial Ecology*, 2008,55 (4) :697-704.
- [28] Kang Y, Ji Y, Sun X, Zhan L, Li W, Yu H, Wang Z. Taxonomy of *Neotyphodium* endophytes of Chinese native *Roegneria* plants. *Mycologia*, 2009,101 (2) :211-219.
- [29] Zhang X, Ren AZ, Ci H, Gao Y. Genetic diversity and structure of *Neotyphodium* species and their host *Achnatherum sibiricum* in a natural grass-endophyte system. *Microbial Ecology*, 2010,59 (4) :744-756.
- [30] Lu BR, Salömon B. Differentiation of the SY genomes in Asiatic *Elymus*. *Hereditas*, 1992,116 (s1) :121-126.
- [31] Torabinejad J, Mueller RJ. Genome constitution of the Australian hexaploid grass *Elymus scabrus* (Poaceae: Triticeae). *Genome*, 1993,36 (1) :147-151.
- [32] Chung KR, Schardl CL. Sexual cycle and horizontal transmission of the grass symbiont, *Epichloë typhina*. *Mycology Research*, 1997,101 (3) :295-301.
- [33] White Jr. JF, Morgan-Jones G, Morrow AC. Taxonomy, life cycle, reproduction and detection of *Acremonium* endophytes. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 1993,44 (1-4) :13-37.
- [34] Tadych M, Ambrose KV, Bergen MS, Belanger FC, White Jr. JF. Taxonomic placement of *Epichloë poae* sp. nov. and horizontal dissemination to seedling via conidia. *Fungal Diversity*, 2012,54 (1) :117-131.
- [35] Moon CD, Craven KD, Leuchtman A, Clement SL, Schardl CL. Prevalence of interspecific hybrids amongst asexual fungal endophytes of grasses. *Molecular Ecology*, 2004,13 (6) :1455-1467.
- [36] Schardl CL, Leuchtman A, Chung KR, Penny D, Siegel MR. Coevolution by common descent of fungal symbionts (*Epichloë* spp.) and grass hosts. *Molecular Biology and Evolution*, 1997,14 (2) :133-143.
- [37] Mason-Gamer RJ. Phylogeny of a genomically diverse group of *Elymus* (Poaceae) allopolyploids reveals multiple levels of reticulation. *PLoS One*, 2013,8 (11) :e78449.
- [38] Stewart AV. Genetic origins of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) for New Zealand pastures. // Breeding for Success: Diversity in Action. Proceedings of the 13th Australasian Plant Breeding Conference (Editor: Mercer CF). 2006: 11-20.

Phylogeny of *Neotyphodium* endophyte from western Chinese *Elymus* species based on *act* sequences

Hui Song, Xiuzhang Li, Gensheng Bao, Qiuyan Song, Pei Tian, Zhibiao Nan*

Key Laboratory of Grassland Agro-Ecosystems, College of Pastoral Agriculture Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730020, Gansu Province, China

Abstract: [Objective] We analyzed phylogenetic relationships between asexual endophytes isolated from western Chinese *Elymus* species. [Methods] Fifteen *act* sequences were cloned from asexual endophytes of the western Chinese *Elymus* species. The phylogenetic tree and network topology structure were constructed using *act* sequences obtained and Genbank. [Results] The *act* sequences from asexual endophyte were single-copy gene. The western Chinese asexual endophyte (*Neotyphodium* spp.) has a different origination from the North American sexual endophyte (*Epichloë elymi*) from *Elymus* species, but there is a closer relationship between *Neotyphodium* spp. and *Neotyphodium chisosum* from North American *Achnatherum eminens*. Further, endophyte gene-flow exists between sexual *Neotyphodium chisosum* from North American *Achnatherum eminens* (Hap 8) and asexual *Neotyphodium* sp. from western Chinese *Elymus* species (Hap 3).

Keywords: endophyte, *Elymus* species, actin, phylogeny

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2014CB138702) and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (lzujbky-2014-76, lzujbky-2014-81)

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

Received: 21 May 2014 / Revised: 24 October 2014