



利用禾草内生真菌创制大麦新种质

李春杰, 王正凤, 陈泰祥, 南志标*

兰州大学草地农业生态系统国家重点实验室/兰州大学草地农业教育部工程研究中心/兰州大学甘肃省西部草业技术创新中心/兰州大学草地微生物研究中心/兰州大学草地农业科技学院, 兰州 730020

* 联系人, E-mail: zhibiao@lzu.edu.cn

2020-12-13 收稿, 2021-01-24 修回, 2021-01-25 接受, 2021-01-26 网络版发表
国家重点基础研究发展计划(2014CB138702)和国家自然科学基金(31971756)资助

摘要 禾草内生真菌共生体在草地农业生态系统中扮演了重要角色。诸多研究表明, 内生真菌可以提高宿主抗生物与非生物胁迫的能力并促进生长。利用有益禾草内生真菌进行牧草育种, 是草业育种的一个新方向。开展这一工作的前提, 是获得有益禾草内生真菌, 其最关键的技术是禾草内生真菌人工接种技术。人工接种也是创制禾草内生真菌-植物新种质、改善和加强其生理功能, 以及获得新生理功能的主要手段。本研究将分离于野大麦(*Hordeum brevisubulatum*)的内生真菌(*Epichloë bromicola*)通过人工接种至栽培大麦(*Hordeum vulgare*)柴青1号裸大麦和扬饲麦1号皮大麦两个品种, 创制出了野大麦内生真菌*E. bromicola*-大麦新种质。与未接种的对照相比, 接种后的皮大麦新种质的地上生物量和单株种子产量提高了46%和22%, 生育期提前了5 d; 裸大麦新种质地上生物量和单株种子产量显著提高了37%和28%, 生育期未发生改变。本研究成功创制了*E. bromicola*内生真菌-大麦新种质, *E. bromicola*内生真菌将其提高原宿主植物生长的优良特征赋予新种质中, 为进一步开发利用*E. bromicola*-大麦新种质提供了科学依据和技术保障, 为植物育种提供了新途径。

关键词 野大麦, 内生真菌, 大麦, 种质创制

禾草内生真菌是指存在于禾草地上部分, 绝大部分生活周期在植株体内完成, 但不导致禾草产生外部症状的一类真菌, 其主要靠种子进行垂直传播而侵染新的宿主植物^[1]。禾草内生真菌共生体最显著的特点是具有双重特性: 一方面, 禾草为内生真菌提供了生存空间和养分, 内生真菌提高宿主禾草生长和对生物及非生物胁迫的抗性, 二者形成互惠共生体; 另一方面, 互惠共生体产生的有毒生物碱等次生代谢物, 可导致草食动物中毒, 影响草地畜牧业的健康发展^[2,3]。目前, 全世界已在80个属的300余种禾草中发现并分离鉴定出*Epichloë*属内生真菌48种^[4-8]。

大量研究结果表明, 这类内生真菌通过种子垂直

传播给下一代宿主植物, 且较容易从其宿主植物中分离和实验室条件下进行离体培养^[9,10], 使人工接种创制新的优良内生真菌-禾草共生体成为可能。

利用禾草内生真菌进行禾草育种, 特别是抗性与品质育种, 是近年来国际草业领域的发展趋势^[11]。此育种方法首先是筛选有益内生真菌, 然后采用人工接种有益禾草内生真菌至新的宿主植物体内, 创制内生真菌-禾草新种质, 使非天然宿主植物获得新的优良性状^[12]。利用禾草内生真菌进行禾草育种的方法, 借助了内生真菌对禾草诸多方面的增益作用和内生真菌随宿主种子垂直传播的特性^[13]。利用禾草内生真菌这一类新的微生物资源, 已成功培育出一些草坪草及少数牧

引用格式: 李春杰, 王正凤, 陈泰祥, 等. 利用禾草内生真菌创制大麦新种质. 科学通报, 2021, 66: 2608–2617

Li C J, Wang Z F, Chen T X, et al. Creation of novel barley germplasm using an *Epichloë* endophyte (in Chinese). Chin Sci Bull, 2021, 66: 2608–2617, doi: 10.1360/TB-2020-1587

草新品种^[14], 例如, 将内生真菌优良菌株MaxQ[®]、MaxP[®]、AR1和AR37等通过人工接种方法, 成功接种于高羊茅(*Festuca arundinacea*)和多年生黑麦草(*Lolium perenne*)中获得优良品种, 在新西兰、南美、澳大利亚和美国成功商业化^[15,16]。我国在禾草内生真菌共生体抗逆性和生理活性物质资源等方面开展了大量研究, 为利用内生真菌人工接种进行粮饲作物育种奠定了基础。兰州大学经过多年努力, 筛选获得了高内生真菌带菌率、抗锈病的坪用多年生黑麦草-兰黑1号, 是国内第一个禾草-内生真菌共生体新品系, 2020年已获批进入国家林业和草原局新品种区域试验。

对采集于兰州大学临泽草地农业试验站的野大麦(*Hordeum brevisubulatum*)内生真菌(*Epichloë bromicola*)研究发现, 其侵染野大麦后, 可促进宿主生长和提高抗逆性^[17,18], 其中菌株WBE1基因组中含有抗虫生物碱——波胺peramine的合成基因, 不含对动物有害的麦角类生物碱的关键合成基因^[19]。至今, 在栽培大麦中尚未发现*Epichloë*内生真菌, 也未见人工接种内生真菌的报道^[20]。新西兰Simpson等人^[21]的研究发现, *Epichloë*类禾草内生真菌接种至与原宿主植物的亲缘关系较近的植物时, 更容易成功获得新的共生体。因此, 本研究选择与野大麦亲缘关系较近的栽培大麦进行人工接种, 创制野大麦内生真菌*E. bromicola*-大麦新种质, 为更好地利用禾草内生真菌这一优良真菌资源改善粮饲作物的生长与抗逆特性、创制新种质提供技术支撑和理论依据, 同时为进一步研究*E. bromicola*-大麦新种质提供基础材料。

1 试验材料和方法

1.1 试验材料

大麦种子: 扬饲麦1号皮大麦(*Hordeum vulgare* cv. Yangsimai No. 1), 购买于江苏宿迁蒂景园林绿化工程有限公司。柴青1号裸大麦(*H. vulgare* var. *nudum* cv. Chaiqing No. 1), 由甘肃省农业科学院提供。

内生真菌菌株: 分离于野大麦的*E. bromicola*内生真菌菌株WBE1, 由兰州大学草地微生物菌种保藏中心提供。

1.2 *E. bromicola*-大麦新种质创制

内生真菌接种: (1) 无菌苗培养。选择色泽、大小均匀的大麦成熟种子, 用75%酒精溶液消毒5 min, 无菌

水冲洗3~5次; 再用10% NaClO溶液消毒5 min, 无菌水冲洗3~5次; 将处理后的种子置于无菌滤纸, 直至将种子表面水分吸干。将消毒处理好的种子, 置于水琼脂培养基(30%), 于恒温培养箱(25±2)°C条件下黑暗培养5~7 d, 培养期间将染杂菌的种子剔除, 获得大麦无菌苗。(2) 接种。参考Latch和Christensen^[10]的方法, 用手术刀在大麦幼苗分生组织处切2~3 mm小口, 将培养好的菌丝(内生真菌菌株在PDA培养基培养3周)塞入伤口处, 置于人工气候箱恒温(25±2)°C条件下黑暗培养7 d, 然后在恒温25°C、光照强度为2500 LUX、光照时间16 h d⁻¹条件下培养7 d。对照无菌苗用手术刀在幼苗分生组织处切2~3 mm小口, 在同样的条件下培养。(3) 移栽。将接种后大麦幼苗根部培养基洗净后, 移入经高压蒸汽灭菌后的基质(珍珠岩、蛭石和营养土的体积比=2:3:1)中培养。培养条件为(25±2)°C、光照强度为2500 LUX、光照时间14 h d⁻¹, 黑暗条件为(12±2)°C、10 h d⁻¹, 直至种子收获。对照无菌苗在同样的条件下培养, 按需进行浇水。

E. bromicola-大麦新种质内生真菌检测: 待接种内生真菌的大麦植株移栽生长60 d左右, 种子成熟时, 分别采用组织染色法和PDA平板分离培养法, 检测植株和种子中内生真菌侵染情况^[15]。

1.3 *E. bromicola*-大麦新种质农艺性状评价

2019年3月17日在兰州大学景泰草地农业试验站进行*E. bromicola*-大麦新种质播种。试验地海拔1620 m, 年降雨量184 mm, 高于0°C的年积温3594.5°C。土质为沙壤土, 肥力较好。种植2个新种质(*E. bromicola*-皮大麦新种质、*E. bromicola*-裸大麦新种质)及2个对照(未接种的皮大麦、裸大麦)。采用随机区组设计, 每一种质为一小区, 每小区种3行, 处理种3行, 行长1 m, 行距30 cm, 株距3 cm, 重复3次。人工开沟后点播, 播深3~4 cm。田间管理按当地大田生产进行。

待种子成熟后, 每个小区随机选取植株15株, 测定株高后, 完整挖出, 用自来水快速冲洗植株上的土和杂质, 采用滤纸吸干水分。将植株地下和地上部分切开, 分别称其鲜重, 然后分别测定分蘖数、单株穗数、单株种子鲜重、主穗长度、主穗粒数等。采用Excel 2010和SPSS 19.0进行实验数据的录入及统计分析。用独立样本T-test检测接种新种质与对照未接种大麦植株不同参数之间的差异, 用GraphPad Prism 8软件制图。

2 结果

2.1 *E. bromicola*-大麦新种质创制

E. bromicola 内生真菌菌株 WBE1 采用无菌苗分生组织法接入大麦无菌苗中(图1(a), (b)), 显微镜检测结果发现, 共接种大麦 1050 株. 其中, 接种成功 36 株

(3.4%), 未成功接种大麦 1014 株(96.6%). 将镜检检测成功的大麦植株进行内生真菌重分离培养发现, 大麦接种成功率为 2%.

菌丝在成功接种的植株叶鞘中沿细胞壁平行生长(图1(c)), 主要分布在成熟种子外稃和糊粉层中, 糊粉层中菌丝弯曲(图1(d)), 胚乳中未发现. 重分离得到的内生

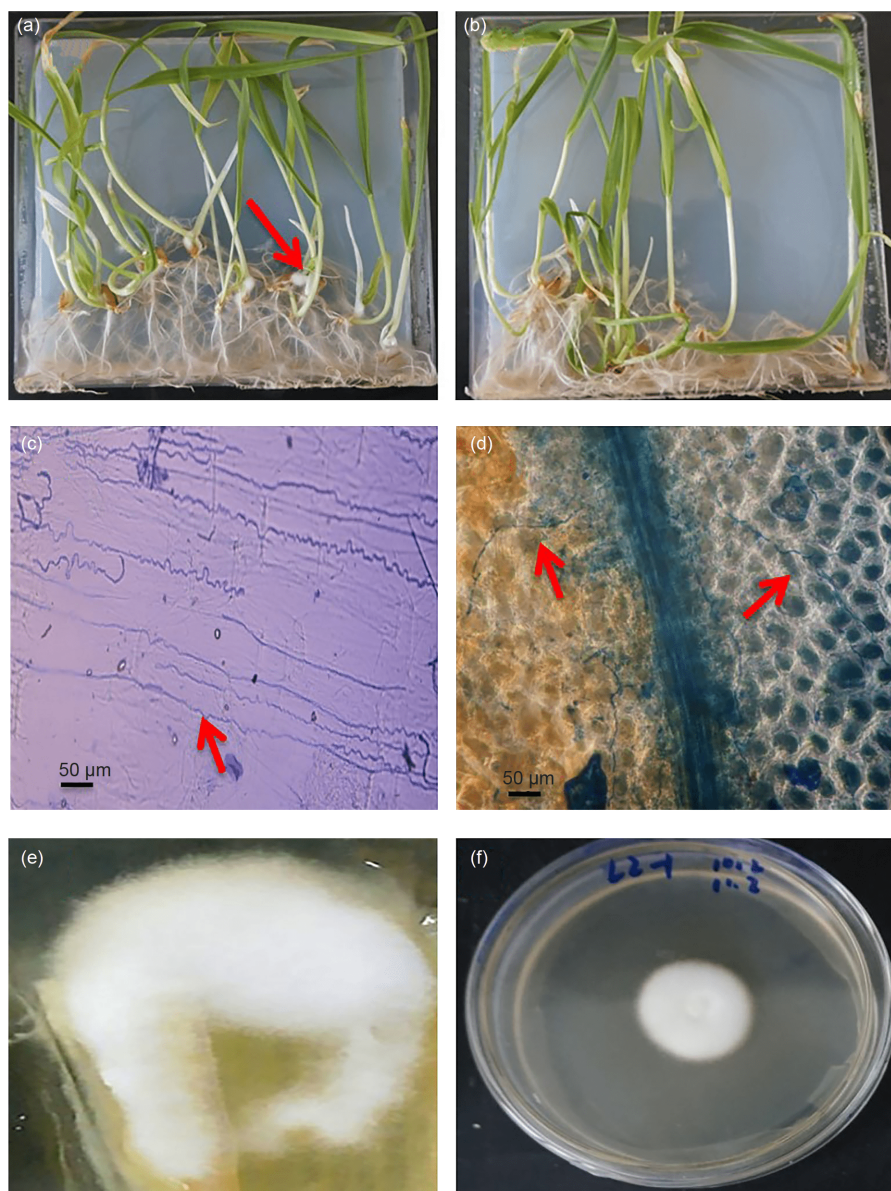


图 1 *E. bromicola* WBE1 内生真菌菌株在大麦叶鞘和种子中的分布特征及重分离培养的菌落特征. (a) 接种 *E. bromicola* WBE1 内生真菌菌株 7 d 后的大麦无菌苗; (b) 未接种的大麦无菌苗; (c) 新接种的大麦叶鞘中的内生真菌菌丝体; (d) 新接种的大麦种子糊粉层中的内生真菌菌丝体; (e) 自新接种的大麦叶鞘中重分离获得的内生真菌菌丝体; (f) 自新接种的大麦叶鞘中重分离获得的内生真菌菌落(培养皿 $d = 9$ cm)

Figure 1 Mycelium in leaf sheath and seed of *E. bromicola* WBE1 strain inoculated barley and colony feature of re-isolated fungal endophyte. (a) Endophyte strain of *E. bromicola* WBE1 inoculated sterile barley seedling after 7 d growth; (b) endophyte uninoculated sterile barley of after 7 d growth; (c) endophyte mycelium in leaf sheath of inoculated barley; (d) endophyte mycelium in aleurone layer of seed harvested from inoculated barley; (e) endophyte strain re-isolated from inoculated leaf sheaths; (f) colony incubated from re-isolated endophyte ($d = 9$ cm)

真菌菌落与原菌落形态特征一致(图1(e), (f)).

2.2 *E. bromicola*-皮大麦新种质主要农艺性状评价

接种野大麦内生真菌*E. bromicola* WBE1后, 皮大麦新种质植株的株高(图2(a))和分蘖数(图2(b))较未接种的对照植株分别提高5%和20%; 新种质植株的地上生物量鲜重较未接种的对照植株提高46%, 生育期提前5 d(图2(c)).

内生真菌可显著提高皮大麦新种质植株的单株穗数、主穗长、主穗粒数和单株种子产量, 与未接种的对照植株相比, 分别提高10%、4%、24%和22%(图3).

通过比较*E. bromicola*-皮大麦新种质和对照各农艺性状的差异发现, *E. bromicola*-皮大麦新种质性状的变异系数均大于对照. *E. bromicola*-皮大麦新种质的分蘖数、单株鲜重、单株穗数和单株种子产量的变异系数均在40%以上, 接种*E. bromicola*内生真菌使皮大麦

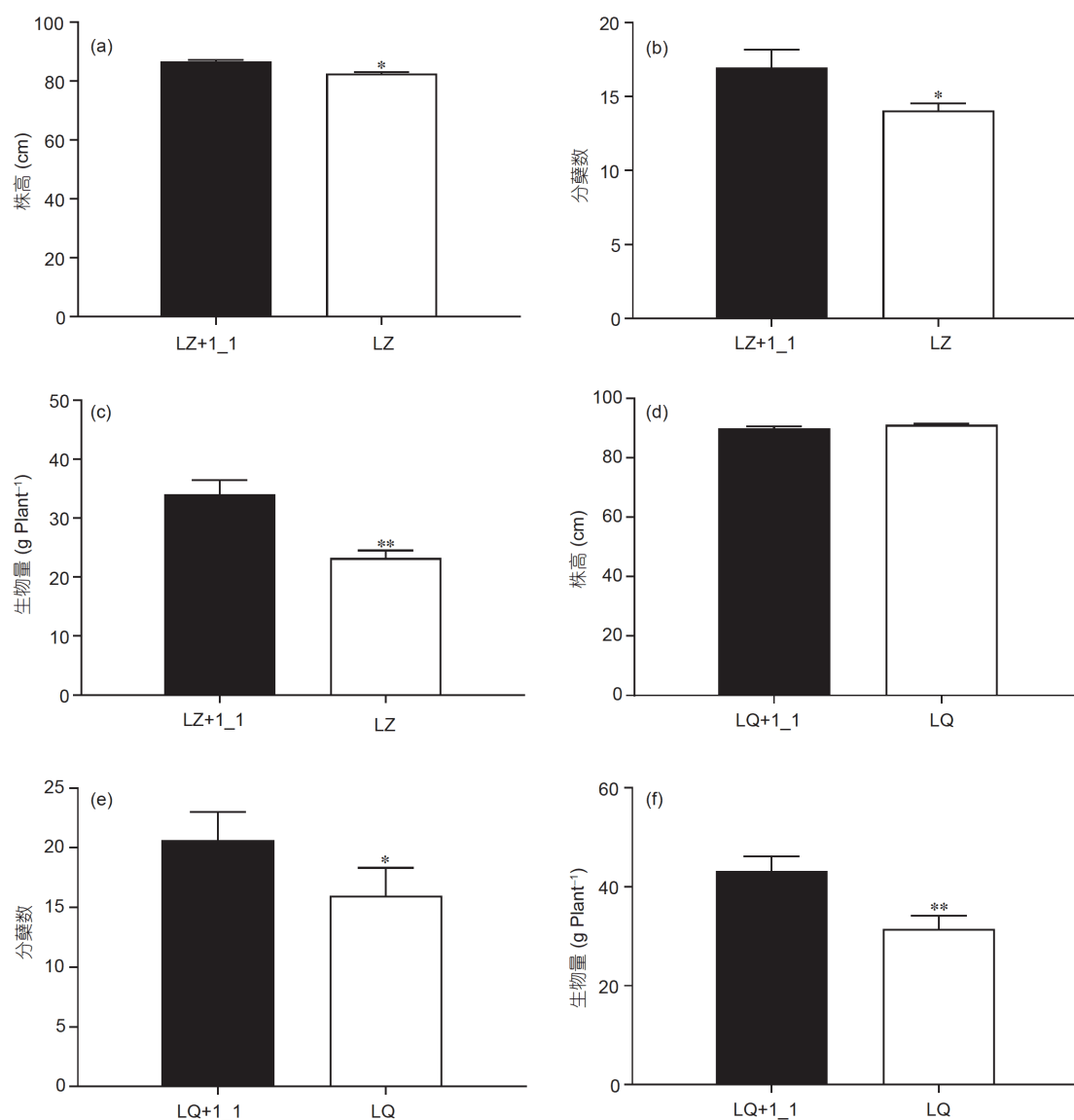


图2 *E. bromicola*-皮大麦新种质(LZ+1_1)、*E. bromicola*-裸大麦新种质(LQ+1_1)和对照皮大麦(LZ)、裸大麦(LQ)的株高(a), (d)、分蘖数(b), (e)、地上生物量(c), (f). 数值为均值±SE. *和**分别表示 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 水平

Figure 2 Plant height (a), (d), tiller numbers per plant (b), (e), and biomass (c), (f) of *E. bromicola*-hulled barley novel germplasm (LZ+1_1), *E. bromicola*-hulless barley novel germplasm (LQ+1_1), hulled barley (LZ) and hulless barley (LQ) (values are Means ± SE). * and ** indicate significant at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ between treatments (T-test)

各性状的变异潜力增大(表1).

2.3 *E. bromicola*-裸大麦新种质主要农艺性状评价

接种*E. bromicola*内生真菌对裸大麦植株的株高影响不显著(图2(d)); 但植株的分蘖数较对照显著提高29%(图2(e)); 接种内生真菌后对植株地上生物量鲜重影响显著, 较对照提高了37%(图2(f)).

接种内生真菌显著提高了裸大麦的单株穗数、主穗长度、主穗粒数和单株种子产量, 较对照分别提高了33%、9%、4%和28%(图4).

通过*E. bromicola*-裸大麦新种质和未接种对照植株各性状的差异性比较发现, 新种质株高、主穗粒数和主穗长的变异系数大于对照, 而分蘖数、单株鲜重、单株穗数和单株种子产量变异系数小于对照. 接

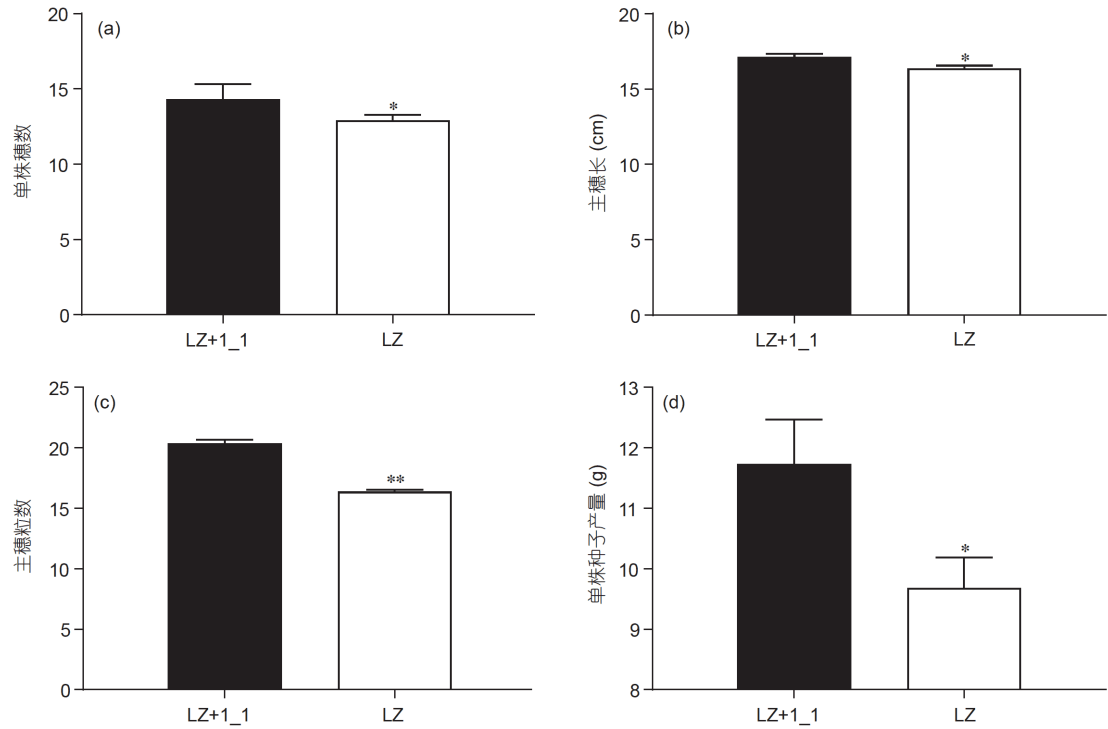


图3 *E. bromicola*-皮大麦新种质(LZ+1_1)和对照(LZ)的单株穗数(a)、主穗长(b)、主穗粒数(c)和单株种子产量(d). 数值为均值±SE. *和**分别表示 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 水平

Figure 3 Number of spikes per plant (a), main spike length (b), grain number of main spike (c) and grain yield per plant (d) of *E. bromicola*-hulled barley novel germplasm (LZ+1_1) and hulled barley (LZ) (values are means ± SE). * and ** indicate significant at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ between treatments (*T*-test)

表1 *E. bromicola*-皮大麦新种质主要性状表现^{a)}

Table 1 Main characters of *E. bromicola*-hulled barley novel germplasm

性状	新种质		对照	
	平均值	变异系数CV (%)	平均值	变异系数CV (%)
株高 (cm)	86.2±4.4	5.1	82.5±3.3	4.0
分蘖数	17.0±7.7	45.4	14.1±3.0	21.3
单株鲜重 (g Plant ⁻¹)	34.0±15.7	46.0	23.2±8.3	35.7
单株穗数	14.3±6.6	46.4	12.9±2.5	19.1
主穗粒数	20.4±1.9	9.3	16.4±1.1	6.7
主穗长 (cm)	17.1±1.2	7.2	16.4±1.1	6.7
单株种子产量 (g)	12.1±4.9	40.5	9.6±3.2	33.4

a) 平均值表示为均值±SD

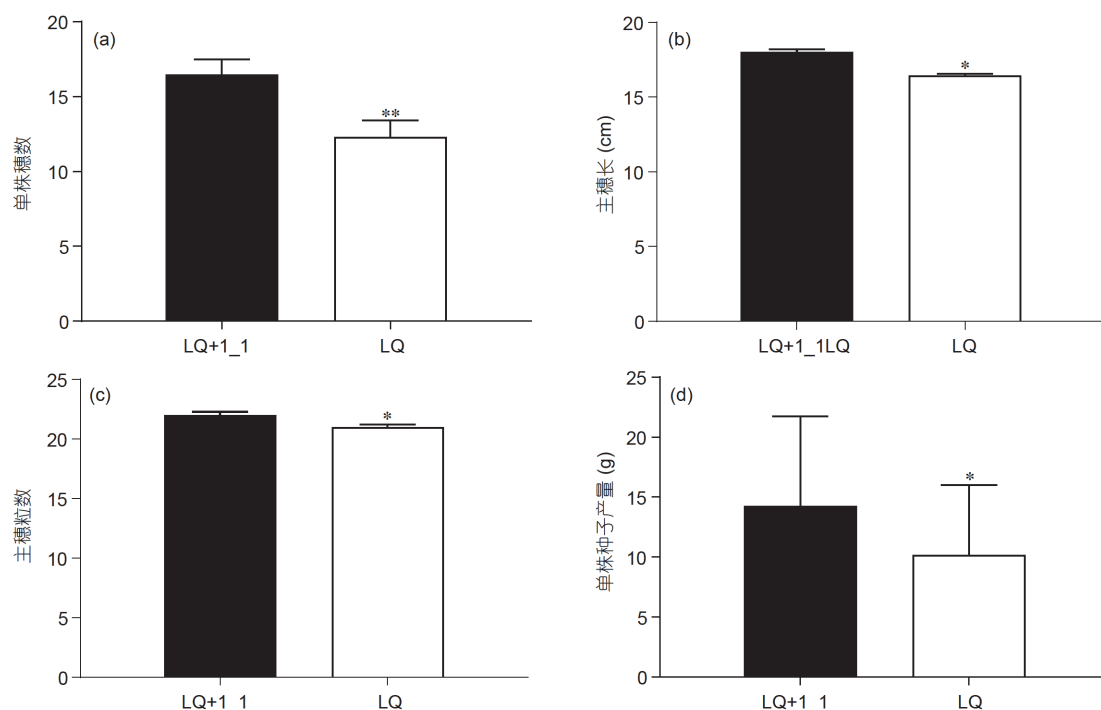


图4 *E. bromicola*-裸大麦新种质(LQ+1_1)和对照(LQ)单株穗数(a)、主穗长(b)、主穗粒数(c)和单株种子产量(d)。数值为均值±SE。*和**分别表示 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 水平

Figure 4 Number of spikes per plant (a), main spike length (b), grain number of main spike (c) and grain yield per plant (d) of *E. bromicola*-hulless barley novel germplasm (LQ+1_1) and hulless barley (LQ) (values are means ± SE). * and ** indicate significant at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ between treatments (T-test)

表2 *E. bromicola*-裸大麦新种质主要性状表现^{a)}

Table 2 Main characters of *E. bromicola*-hulless barley novel germplasm

性状	新种质		对照	
	平均值	变异系数CV (%)	平均值	变异系数CV (%)
株高 (cm)	89.8±4.7	5.2	91.0±3.3	3.6
分蘖数	20.6±8.6	41.5	15.9±8.6	54.1
单株鲜重 (g Plant ⁻¹)	43.2±18.6	43.0	31.5±17.1	54.4
单株穗数	16.5±6.3	38.1	12.3±7.1	57.3
主穗粒数	22.0±1.9	8.6	20.9±1.3	6.3
主穗长 (cm)	18.0±1.0	5.7	16.5±0.6	3.9
单株种子产量 (g)	12.8±5.9	46.4	10±5.6	56.2

a) 平均值表示为均值±SD

种内生真菌后, 主要引起裸大麦新种质株高和主穗性状的变异(表2)。

3 讨论

利用内生真菌进行作物育种, 主要利用了其对宿主植物的诸多增益作用、内生真菌在植物中的分布特点及其随种子传播等优良特性^[22], 主要包括: 内生真菌

侵染所诱导的抗逆性状可稳定遗传^[22,23]; 内生真菌缺乏有性繁殖, 不在植物体外部产生子实体, 这决定了内生真菌与宿主植物的共生特性不会造成种间、个体间的泛滥传播, 对环境具备安全性^[24]; 内生真菌传播具有高效性, 其侵染不受根围和叶围等外界微生物的竞争, 侵染内生真菌的植株可通过种子进行垂直传播, 子代种子带菌率接近100%^[1]。综上所述, 人工接种的方式获

得新种质较传统的育种模式具有目的性强、可预见性、育种周期短和高效遗传性等特点。

利用愈伤组织法将内生真菌接种至直立雀麦(*Bromus erectus*),发现同一植株接种两种内生真菌仅有8%的侵染成功率^[25],人工接种两种内生真菌往往只能成功侵染一种内生真菌^[26]。南开大学高玉葆课题组^[28]利用成株分蘖接种法和幼苗接种法向高羊茅接种内生真菌,接种成功率分别为3%和4%。南京农业大学王志伟课题组^[27]利用愈伤组织法和幼苗切口法接种获得了成功感染内生真菌的高羊茅和多年生黑麦草植株,接种成功率分别为1%和5%。Kaur等人^[29]利用愈伤组织法将内生真菌回接至黑麦草后,内生真菌的感染率为37%~40%。本研究采用无菌苗接种*E. bromicola*内生真菌到大麦后,平均接种率为2%。此结果与Latch和Christensen^[10]利用无菌苗导入法成功构建优异新共生体的研究结果相似,内生真菌新宿主植物接种率较原宿主植物的接种率低。Simpson等人^[21]研究结果发现,*Epichloë*属禾草内生真菌接种至与原宿主植物的亲缘关系较近的新宿主植物时,更容易获得新的共生体,本研究成功将野大麦内生真菌接种至与其原宿主亲缘关系较近的栽培大麦中获得了新的共生体。

禾草内生真菌的菌丝体只存在于细胞间隙,不穿透细胞壁进入细胞内部^[30]。野大麦茎髓组织中内生真菌菌丝体自然弯曲,很少分叉,沿茎髓组织细胞纵向、平行分布,菌丝体粗细分布不均匀,甚至有时呈团状分布;野大麦种子中菌丝主要分布在糊粉层,菌丝稍弯曲、有少许分叉、粗细均匀;茎髓组织和糊粉层中的菌丝体均分布在细胞间隙,不穿透细胞壁进入细胞内部。前期对野大麦内生真菌菌丝体研究发现,叶鞘中的菌丝体纵向、平行排列、菌丝一般不分叉、沿叶脉伸长生长^[31]。本研究发现,*E. bromicola*内生真菌WBE1菌株接种大麦后,菌丝在叶鞘中沿细胞壁平行生长,多数不分叉;菌丝在茎髓部很少有分叉、沿细胞壁伸长生长、粗细均匀;在成熟种子中,菌丝主要分布于糊粉层、胚中有少量分布,胚乳中未发现,糊粉层中菌丝稍弯曲、有少许分叉、粗细均匀,与*E. bromicola*内生真菌菌丝体在野大麦中的分布特征一致。

禾草内生真菌侵染植物后,会给宿主植物带来很多益处,如促进生长和提高生物量^[32]等。本研究发现,*E. bromicola*内生真菌接种至皮大麦后,*E. bromicola*-皮大麦新种质植株较不带菌植株的生育期提前了5 d,但*E. bromicola*内生真菌的接种并没有使*E. bromicola*-

裸大麦新种质的生育期提前。Latch等人^[33]研究发现,内生真菌显著提高了一年生黑麦草叶面积和分蘖数,产量较未接种一年生黑麦草增加了38%。本研究发现,*E. bromicola*-皮大麦和裸大麦新种质的有效分蘖数、单株成熟穗数以及单株种子产量较对照植株均有所提高。尤其是有利于皮大麦新种质的生殖生长,这与内生真菌可以提高盐胁迫下野大麦成熟花絮数、成熟花絮长度、种子数和种子产量,内生真菌的侵染更有利于宿主植物生殖生长的研究结果相一致^[34]。

大量研究发现,内生真菌可以提高大麦(*H. vulgare*)和其他作物产量及抗性,但这些有益作用也可能会随着肥料、杀菌剂的使用以及农田环境条件的变化而减弱或带来相反的作用^[35]。Le Cocq等人^[16]研究发现,在不增加化学合成肥料投入的条件下,内生真菌可作为一个新的资源促进作物生长。Hume等人^[36]研究发现,接种AR37内生真菌的黑麦草的产量高于接种AR1和其他有毒菌株的黑麦草产量。连续3年对AR37、AR1、有毒菌株和未侵染内生真菌的黑麦草农艺性状的调查发现,侵染AR37内生真菌的黑麦草分蘖能力最强。侵染内生真菌后这些禾草的性能得到改善,主要归功于共生体对昆虫和食草动物的抑制作用。在新西兰北部,高羊茅感染MaxP[®]内生真菌后可提高其产量。本研究发现,同种内生真菌接种不同品种的大麦中,内生真菌的增益效果不一致,这与Simpson等人^[21]的研究结果相似,分离于披碱草的内生真菌同一菌株接种不同品种黑麦后,内生真菌对不同品种产生不同影响,其中一种品种表现为株高高于未接种植株,生长较旺盛,另一品种表现为矮化,发育不良。内生真菌在不同品种植物间发挥的作用不一致,即内生真菌的作用与其宿主植物的基因型密切相关。

4 结论

*E. bromicola*内生真菌能够成功接种至与原宿主植物亲缘关系较近的植物中,为植物育种提供了新途径;*E. bromicola*内生真菌能够将其提高原宿主植物生长、抗逆等优良特征赋予新的宿主植物中。*E. bromicola*内生真菌可作为一种新型资源进行植物育种,一方面可以提高植物生长、抗逆等,另一方面可以减少化肥和农药的利用,保护生态环境。本研究为挖掘*E. bromicola*-大麦新种质特性提供了基础材料,为创制更多的优良禾草内生真菌-植物新种质、培育新品种奠定了良好的基础。

参考文献

- 1 Siegel M R, Latch G C M, Johnson M C. Fungal endophytes of grasses. *Annu Rev Phytopathol*, 1987, 25: 293–315
- 2 Nan Z B, Li C J. Roles of the grass-*Neotyphodium* association in pastoral agriculture systems (in Chinese). *Acta Ecol Sin*, 2004, 240: 605–616 [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, 240: 605–616]
- 3 Guo L D. Advances of researches of endophytic fungi (in Chinese). *Mycosystema*, 2001, 20: 148–152 [郭良栋. 内生真菌研究进展. *菌物系统*, 2001, 20: 148–152]
- 4 Leuchtmann A, Bacon C W, Schardl C L, et al. Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichloë*. *Mycologia*, 2014, 106: 202–215
- 5 Campbell M A, Tapper B A, Simpson W R, et al. *Epichloë hybrida* sp. nov., an emerging model system for investigating fungal allopolyploidy. *Mycologia*, 2017, 109: 715–729
- 6 Shymanovich T, Charlton N D, Musso A M, et al. Interspecific and intraspecific hybrid *Epichloë* species symbiotic with the North American native grass *Poa alsodes*. *Mycologia*, 2017, 109: 459–474
- 7 Leuchtmann A, Young C A, Stewart A V, et al. *Epichloë novae-zelandiae*, a new endophyte from the endemic New Zealand grass *Poa matthewsii*. *N Z J Bot*, 2019, 57: 271–288
- 8 Tian P, Xu W, Li C, et al. Phylogenetic relationship and taxonomy of a hybrid *Epichloë* species symbiotic with *Festuca sinensis*. *Mycol Prog*, 2020, 19: 1069–1081
- 9 Bacon C W, White J F. Stains, media and procedures for analysing endophytes. In: *Biotechnology of Endophytic Fungi of Grasses*. Boca Raton: CRC Press, 1994. 47–56
- 10 Latch G C M, Christensen M J. Artificial infection of grasses with endophytes. *Ann Appl Biol*, 1985, 107: 17–24
- 11 Nan Z B, Wang S M, Wang Y R, et al. Stress tolerance mechanisms of 6 native plant species growing in China's northern grassland and their utilization (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2016, 61: 239–249 [南志标, 王锁民, 王彦荣, 等. 我国北方草地6种乡土植物抗逆机理与应用. *科学通报*, 2016, 61: 239–249]
- 12 Li C J, Yao X, Nan Z B. Advances in research of *Achnatherum inebrians*-*Epichloë* endophyte symbionts (in Chinese). *Chin J Plant Ecol*, 2018, 42: 793–805 [李春杰, 姚祥, 南志标. 醉马草内生真菌共生体研究进展. *植物生态学报*, 2018, 42: 793–805]
- 13 Schardl C L, Phillips T D. Protective grass endophytes: Where are they from and where are they going? *Plant Dis*, 1997, 81: 430–438
- 14 Johnson L J, de Bonth A C M, Briggs L R, et al. The exploitation of epichloae endophytes for agricultural benefit. *Fungal Divers*, 2013, 60: 171–188
- 15 Young C, Hume D, McCulley R. Fungal endophytes of tall fescue and perennial ryegrass: Pasture friend or foe? *J Anim Sci*, 2013, 91: 2379–2394
- 16 Le Cocq K, Gurr S J, Hirsch P R, et al. Exploitation of endophytes for sustainable agricultural intensification. *Mol Plant Pathol*, 2017, 18: 469–473
- 17 Song M, Chai Q, Li X, et al. An asexual *Epichloë* endophyte modifies the nutrient stoichiometry of wild barley (*Hordeum brevisubulatum*) under salt stress. *Plant Soil*, 2015, 387: 153–165
- 18 Chen T, Johnson R, Chen S, et al. Infection by the fungal endophyte *Epichloë bromicola* enhances the tolerance of wild barley (*Hordeum brevisubulatum*) to salt and alkali stresses. *Plant Soil*, 2018, 428: 353–370
- 19 Chen T, Simpson W R, Song Q, et al. Identification of *Epichloë* endophytes associated with wild barley (*Hordeum brevisubulatum*) and characterisation of their alkaloid biosynthesis. *N Z J Agric Res*, 2019, 62: 131–149
- 20 Yi M, Hendricks W Q, Kaste J, et al. Molecular identification and characterization of endophytes from uncultivated barley. *Mycologia*, 2018, 110: 453–472
- 21 Simpson W R, Faville M J, Moraga R A, et al. *Epichloë* fungal endophytes and the formation of synthetic symbioses in Hordeae (=Triticeae) grasses. *J Syst Evol*, 2014, 52: 794–806
- 22 Schardl C L, Leuchtmann A, Spiering M J. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55: 315–340
- 23 Siegel M R, Järlfors U, Latch G C M, et al. Ultrastructure of *Acremonium coenophialum*, *Acremonium lolii*, and *Epichloë typhina* endophytes in host and nonhost *Festuca* and *Lolium* species of grasses. *Can J Bot*, 1987, 65: 2357–2367
- 24 Sneek M E, Rudgers J A, Young C A, et al. Variation in the prevalence and transmission of heritable symbionts across host populations in heterogeneous environments. *Microb Ecol*, 2017, 74: 640–653
- 25 Wille P A, Aeschbacher R A, Boller T. Distribution of fungal endophyte genotypes in doubly infected host grasses. *Plant J*, 1999, 18: 349–358
- 26 Wille P, Boller T, Kaltz O. Mixed inoculation alters infection success of strains of the endophyte *Epichloë bromicola* on its grass host *Bromus erectus*. *Proc R Soc Lond B*, 2002, 269: 397–402
- 27 Li F F. Study of biodiversity and artificial inoculation of endophyte fungi of gramineous plants (in Chinese). Master Dissertation. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2004 [李凤飞. 禾本科植物内生真菌的生物多样性和人工接种的研究. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学, 2004]

- 28 Xie F X. Screening of endophytic fungal resistant strains and construction of artificial symbionts (in Chinese). Master Dissertation. Tianjin: Nankai University, 2006 [谢凤行. 内生真菌抗性菌株的筛选及人工共生体的构建. 硕士学位论文. 天津: 南开大学, 2006]
- 29 Kaur J, Ekanayake P N, Tian P, et al. Discovery and characterisation of novel asexual *Epichloë* endophytes from perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Crop Pasture Sci*, 2015, 66: 1058–1070
- 30 Nan Z B. Effects of *Acremonium* endophyte on the growth of *Hordeum bodgail* (in Chinese). *Partac Sci*, 1996, 1: 16–18 [南志标. 内生真菌对布顿大麦草生长的影响. 草业科学, 1996, 1: 16–18]
- 31 Zhao X J, Wang P, Li X Z, et al. Distribution characteristics of *Epichloë* endophyte in gramineous Grasses (in Chinese). *Partac Sci*, 2015, 32: 1206–1215 [赵晓静, 王萍, 李秀璋, 等. 内生真菌在禾草体内的分布特征. 草业科学, 2015, 32: 1206–1215]
- 32 Malinowski D P, Belesky D P. *Epichloë* (formerly *Neotyphodium*) fungal endophytes increase adaptation of cool-season perennial grasses to environmental stresses. *Acta Agrobot*, 2019, 72: 1767
- 33 Latch G C M, Hunt W F, Musgrave D R. Endophytic fungi affect growth of perennial ryegrass. *N Z J Agric Res*, 1985, 28: 165–168
- 34 Wang Z, Li C, White J. Effects of *Epichloë* endophyte infection on growth, physiological properties and seed germination of wild barley under saline conditions. *J Agron Crop Sci*, 2020, 206: 43–51
- 35 Murphy B R, Doohan F M, Hodgkinson T R. Fungal root endophytes of a wild barley species increase yield in a nutrient-stressed barley cultivar. *Symbiosis*, 2015, 65: 1–7
- 36 Hume D E, Cooper B M, Panckhurst K A. The role of endophyte in determining the persistence and productivity of ryegrass, tall fescue and meadow fescue in Northland. *Proc N Z Grassl Assoc*, 2009, 71: 145–150

Summary for “利用禾草内生真菌创制大麦新种质”

Creation of novel barley germplasm using an *Epichloë* endophyte

Chunjie Li, Zhengfeng Wang, Taixiang Chen & Zhibiao Nan*

State Key Laboratory of Grassland Agro-Ecosystems; Engineering Research Center of Grassland Industry, Ministry of Education; Gansu Tech Innovation Center of Western China Grassland Industry; Center for Grassland Microbiome; College of Pastoral Agriculture Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China

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

Plant-endophyte associations play important roles in grassland agricultural ecology. Many studies indicate that endophytic fungi can promote host growth and reduce the biotic and abiotic stresses of host plants. *Epichloë* endophytes of the family Clavicipitaceae are fungal symbionts of Poaceae grasses. These endophytes usually do not express any obvious host symptoms. Many *Epichloë* endophytes can endow hosts with increased abiotic stress tolerance as a result of enhanced growth, tillering, reproduction and nutrient acquisition, particularly under conditions of drought, cold, salt and nutrient deficiencies and thus, have important roles in pastoral agricultural systems. Animal-safe grass-endophyte associations that confer bio-protective properties for increased pasture persistence and productivity have been developed and commercialized.

Artificial inoculation with symbiotic *Epichloë* microbes is an important technique for the creation of novel germplasm. Selected *Epichloë* strains can add value to some grass-based forage systems by providing both biotic and abiotic stress resistance. In addition, they can improve and strengthen grass physiological functions and plant vigor. The *Epichloë bromicola* WBE1 endophyte of *Hordeum brevisubulatum* played an important role in maintaining the growth of host grass by promoting nutrient absorption and maintaining the ionic balance under salt stress. *E. bromicola* WBE1 can produce peramine, an alkaloid produced by *Epichloë* species, that protects host grasses from herbivorous insects. However, this strain was unable to synthesize the alkaloids that are toxic to livestock, such as ergine, ergonovine, ergovaline or lolitrem B.

Barley (*Hordeum vulgare*) is one of the most important cereal crops. The importance of barley to human and animal nutrition, and indeed to the foundation and maintenance of human civilization, is well documented. Traditional barley breeding for improved environmental stress tolerance has resulted in good varieties. However, conventional breeding techniques neglect the microorganisms in plants.

In this study, animal-safe endophytic *E. bromicola* WBE1 isolated from wild barley (*H. brevisubulatum*) was artificially inoculated into cultivated hulled barley (*H. vulgare* cv. Yangsimai No. 1) and hull-less barley (*H. vulgare* var. *nudum* cv. Chaiqing No. 1), creating novel barley germplasm.

Plants that were inoculated with endophytes and those that were free of endophytes were evaluated for growth in the field. The plant height, tiller numbers, biomass and the grain weight per plant of endophyte-inoculated hulled barley plants (Yangsimai No. 1) were 5%, 20%, 46% and 22% higher than those of the control hulled barley plants, respectively, and they matured about 5 days earlier. The tiller numbers, biomass and grain weight per plant of endophyte-inoculated hull-less barley plants (Chaiqing No. 1) were 29%, 37% and 28% higher, respectively, than those of the control hull-less barley plants in the field. However, there was no significant difference between inoculated hull-less barley plants and control hull-less barley plants in the plant height and growth period.

A novel germplasm of barley containing the endophyte was successfully created. *E. bromicola* improves plant characteristics and the growth of host. The results presented here provide evidence that the inoculation of barley with *E. bromicola* may be used to improve its germplasm. *E. bromicola* can be successfully inoculated into other phylogenetically close host species, and this technique has the potential to improve the growth of Poaceae cereal crops and serve as a broad application to produce agriculturally useful synthetic novel symbioses in germplasm.

***Hordeum brevisubulatum*, *Epichloë* endophyte, *Hordeum vulgare*, novel germplasm**

doi: [10.1360/TB-2020-1587](https://doi.org/10.1360/TB-2020-1587)