

## 小花棘豆 (*Oxytropis glabra* DC) 内生真菌的分布特点

周启武<sup>1</sup>, 路浩<sup>1</sup>, 何平<sup>1</sup>, 严杜建<sup>1,2</sup>, 赵宝玉<sup>1\*</sup>, 张樑<sup>1</sup>, 温伟利<sup>1</sup>, 杨晓雯<sup>1</sup>

<sup>1</sup>西北农林科技大学动物医学院, 杨凌 712100

<sup>2</sup>阿克苏职业技术学院, 阿克苏 843000

**摘要:** 【目的】为探明小花棘豆不同组织中内生真菌带菌率及其种属分布特点, 对采自内蒙古阿拉善盟草原的小花棘豆各组织内生真菌进行检测与分离。【方法】制作小花棘豆不同组织临时装片, 通过染色观察与分离鉴定方法研究小花棘豆各组织中内生真菌分布形态、带菌率以及内生真菌种属分布情况。【结果】通过临时装片染色技术从小花棘豆茎、叶、叶柄及种子中均检测到内生真菌并观察到其在各组织中的分布特点; 采用普通分离方法从小花棘豆四种组织中分离出 79 株内生真菌, 鉴定为 5 个种。比较小花棘豆各组织内生真菌带菌率与分离率发现种子 > 叶 > 茎 > 叶柄, 且小花棘豆内生真菌的主要优势种 (相对分离频率) 为疯草内生真菌 (*Undifilum oxytropis*) (77.32%), 砖格孢属 (*Embellisia* sp.) L12 (64.00%), 镰刀菌属 (*Fusarium equiseti*) (50.00%)。【结论】小花棘豆各组织中普遍存在内生真菌, 其在各组织中的形态分布各异, 内生真菌数量与种属分布存在组织差异性, 种子和叶是内生真菌侵染和定殖的主要部位。

**关键词:** 小花棘豆, 内生真菌, 检测, 分离鉴定, 分布特点

**中图分类号:** X172      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209(2013)05-0478-08

小花棘豆 (*Oxytropis glabra* DC) 为豆科 (Leguminosae) 蝶形花亚科棘豆属 (*Oxytropis*) 多年生草本植物, 俗称醉马草, 是我国西部天然草地重要的疯草 (Locoweed) 类植物<sup>[1-2]</sup>, 主要分布于内蒙古、新疆、陕西、甘肃、宁夏、山西等省区<sup>[3]</sup>。多生于草原、荒漠草原及荒漠区低湿地、湖盆边缘和沙地的盐湿低地、芨芨草盐生草甸群落中, 被认为是荒漠区和草原区盐生草甸的特征种之一<sup>[4-5]</sup>。小花棘豆也是重要的中药和蒙药原料, 有麻醉、镇静和止痛等功效<sup>[6]</sup>。小花棘豆生境特殊, 使其在不断演化中具有耐干旱、耐寒、耐贫瘠与耐盐碱等抗性, 因此再生能力和适应性较强, 具有防风固沙、固土护坡和水土保

持作用以及增强土壤肥力之效, 极具重要的生态学价值<sup>[7]</sup>。小花棘豆本地动物一般不会主动采食, 只有当放牧草地可食牧草缺乏时, 由于小花棘豆抗性较强, 枯竭晚, 返青早, 动物因饥饿而被迫采食后引起中毒。研究表明, 小花棘豆、甘肃棘豆、黄花棘豆、变异黄芪等疯草类植物主要毒性成分是苦马豆素 (swainsonine), 可抑制动物体内  $\alpha$ -甘露糖苷酶活性, 使组织细胞发生广泛的空泡变性, 造成细胞功能紊乱而引起慢性中毒<sup>[8-9]</sup>。长期以来由于草地干旱、超载过牧、盲目开垦等自然和人为因素的影响, 牧草逐渐减少, 草地大面积沙化和毒草化, 草地逆行演替, 小花棘豆已成为荒漠化草地危害畜牧业最严重

**基金项目:** 国家自然科学基金 (31201958, 31072175); 农业部“十二五”公益性行业 (农业) 科研专项 (201203062)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-29-87092429; E-mail: zhaobaoyu12005@163.com

**作者简介:** 周启武 (1987-), 男, 云南牟定人, 硕士研究生, 从事动物中毒病与毒理学研究。E-mail: zhqiwu1987@163.com

**收稿日期:** 2012-10-18; **修回日期:** 2013-01-07

的毒草,被列为草原四害之一<sup>[1,10]</sup>。

内生真菌(Endophytic fungi)是指在其生活史中某一段时期内或整个生命时期生活于植物组织内部,对其宿主不引起明显疾病的一类真菌,还包括腐生真菌、病原真菌和菌根菌<sup>[11]</sup>。研究发现,内生真菌与疯草长期协同进化过程中,彼此形成了互惠互利的共生关系,植株为内生真菌创造适宜的生存环境,提供光合产物及矿物质,而内生真菌或其代谢物能刺激植物生长发育,提高宿主植物对生物胁迫和非生物胁迫的抵抗力<sup>[12]</sup>。近年来,国内外学者已从不同生境的多种疯草中分离获得产苦马豆素的内生真菌,并对内生真菌与疯草间的相互作用关系进行了研究,发现疯草内生真菌与疯草抗逆性及疯草毒素的产生有密切关系<sup>[13]</sup>。卢萍等<sup>[14]</sup>、霍红雁等<sup>[15]</sup>从不同地理种群的小花棘豆中分离获得产苦马豆素的内生真菌——埃里砖格孢属(*Embellisa* sp.)真菌;Gao等<sup>[16]</sup>从内蒙古小花棘豆中分离获得产苦马豆素的疯草内生真菌(*Undifilum oxytropis*);卢围等<sup>[17]</sup>、Lu等<sup>[18]</sup>从小花棘豆中分离获得可产苦马豆素的内生真菌—镰刀菌属(*Fusarium* sp.)真菌。然而,有关小花棘豆内生真菌的种属与分布特点尚未见报道,本研究旨在通过临时装片技术检测与常规分离鉴定方法观察内生真菌在小花棘豆各组织中的分布特征,并确定小花棘豆中内生真菌的主要种属类型,为小花棘豆内生真菌多样性研究提供基础资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 植物样品:**新鲜健康小花棘豆地上部分全草及其茎、叶、种子等样品,2011年8月采集于内蒙古阿拉善左旗天然草地(N:38°49′ 803″, E:105°42′ 015″),植株采集后立即放入装有变色硅胶的保鲜袋中脱水处理,带回实验室4℃冰箱保藏备用。

**1.1.2 培养基:**PDA双抗培养基,即马铃薯200 g/L,葡萄糖20 g/L,琼脂15 g/L。灭菌后加入150 μg/mL青霉素钾和120 μg/mL硫酸链霉素以抑制细菌生长。

**1.1.3 主要试剂和仪器:**霉菌培养箱(MJP-150)、4℃冰箱(FRESTECH SC-208A)、超低温冰箱(SANYO MEDICAL FREEZER)、普通光学显微镜

(重庆光电仪器有限公司)、显微照相机(MOTIC)、高速冷冻离心机(SIGMA 3K15)、普通PCR仪(Bio-Red)、全自动凝胶成像系统(SYNGENE)等。

### 1.2 植物组织预处理

选取脱水保藏的小花棘豆各部位组织,用流水冲洗干净后,于无菌水中浸泡过夜,使组织细胞充分吸水复原,用吸水纸吸干组织表面水分后进行内生真菌检测与分离培养。

### 1.3 各组织内生真菌的检测

从预处理的小花棘豆样品中随机选取一定数量的茎、叶、叶柄与种子进行内生真菌检测。检测茎时取靠近叶柄或穗轴端一段长约2-5 cm的茎轴,用解剖刀纵向切成两半,用刀尖轻轻刮取少量茎髓质,于载玻片上展开,加1滴乳酸酚棉蓝染液染色约30 s;检测叶片和叶柄时用解剖刀横向轻轻划破叶片内表皮,用眼科镊夹起叶脉边缘顺叶脉生长方向至上而下轻轻撕下内表皮,或纵向削取叶柄薄片,将表皮组织及叶柄薄片置于载玻片上,加1-2滴乳酸酚棉蓝染液,染色约30-90 s;检测种子时将种子置于30 mL 5% NaOH溶液中浸泡过夜,自来水洗去种子表面残留的NaOH,将其置于载玻片上,用解剖刀将种子切开并用眼科镊剥开种皮、糊粉层及胚乳等相关组织,滴1滴乳酸酚棉蓝染液,染色1-3 min;染色结束尽量摊开组织,盖上盖玻片压平,用滤纸吸去周围多余染液,排尽组织周围气泡后于普通光学显微镜(400×)下观察各组织中内生真菌菌丝体分布情况并统计带菌率<sup>[19]</sup>。

### 1.4 内生真菌分离培养

随机选取染色检测后带菌的小花棘豆各组织,采用75%酒精和2% NaClO进行表面消毒,消毒后将茎和叶柄剪成5 mm小段,叶剪成5 mm×5 mm小块,种子分成4份,分别置于PDA培养基表面,切口面紧贴培养基,每个平板接种6-7块组织。28℃下恒温培养,待切口边缘长出菌丝后,采取尖端菌丝挑取法纯化菌株2-3次,得到纯化菌株后编号。将纯化菌株分别接种于新鲜PDA培养基上,记录长出菌落的形态、颜色差异及生长速率等特征,采用插片法观察菌丝显微结构,最终根据有关资料初步确定菌株种属地位<sup>[20]</sup>。

### 1.5 分离菌株的系统发育学分析

**1.5.1 PCR扩增:**将纯化菌株于PDA培养基上扩增培养15-40 d后收集菌丝,用改良CTAB法提取

菌株基因组 DNA<sup>[18]</sup>。采用 White 设计的 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 真菌通用引物扩增其 5.8 S rDNA-ITS 序列<sup>[21]</sup>。PCR 扩增反应体系为 25  $\mu$ L, 含 DNA 模板 3  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L ITS 1 和 ITS 4 各 1  $\mu$ L, 2  $\times$  EasyTaq PCR SuperMix 12  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 8  $\mu$ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测后回收克隆与测序。

**1.5.2 系统发育学分析:** 序列在 GenBank 数据库中与已有 5.8S rDNA-ITS 序列进行在线同源比对, 选取比对后指标靠前的相似序列和分类比较相近种属的序列, 应用 ClustalX1.83 version 和 MEGA5.0 软件, 采用邻接法 (Neighbor-joining, NJ) 构建系统发育树, 以自展数据集 1000 次检测发育树, 结合菌株形态学特征与系统发育树中组群关系确定菌株分类地位。

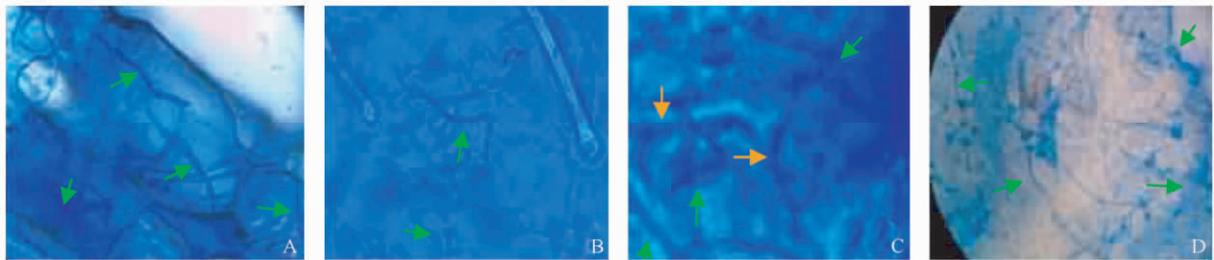


图 1. 菌丝体在小花棘豆组织中的形态 (400  $\times$ )

Figure 1. Morphological characters of hyphae within different tissues of *Oxytropis glabra* DC (400  $\times$ ). A: Hyphae within stem medulla; B: Hyphae within leaf; C: Hyphae within petiole; D: Hyphae within seed.

本研究从小花棘豆茎、叶、叶柄与种子中均检测到内生真菌 (表 1)。从表 1 可以看出, 内生真菌在小花棘豆茎、叶、叶柄与种子中的分布 (带菌率) 存在一定差异, 小花棘豆内生真菌主要分布于种子 (IR = 80.00%), 其次是叶 (IR = 65.73%), 而茎和叶柄的带菌率相当, 但四种组织中内生真菌带菌率均大于 50%, 表明小花棘豆组织中存在内生真菌, 但数量分布表现组织差异性。

表 1. 小花棘豆各组织中内生真菌带菌率

Table 1. Infection rate of endophyte fungi in different tissues of *Oxytropis glabra* DC

Detection tissue	Detection number	Infection number	Infection rate (IR) / %
Stem	125	71	56.80
Leaf	143	94	65.73
Petiole	100	52	52.00
Seed	85	68	80.00

## 2 结果和分析

### 2.1 各组织中内生真菌形态与分布特点

茎髓质中, 菌丝沿髓组织细胞间隙自然弯曲或线状纵向分布, 有时跨过维管束, 有时菌丝体粗细与弯曲程度很不均匀, 但很少有分叉现象; 叶片中, 菌丝主要平行分布于海绵组织细胞周围, 靠近气孔, 纵向排列在植物细胞间隙, 有时紧贴细胞壁, 菌丝体相对较粗, 线状或波浪状; 叶柄中, 内生真菌菌丝较少, 偶见沿细胞间隙线状弯曲分布, 菌丝较细, 弯曲度小、无分支; 种子中菌丝体较多, 主要分布在种皮栅栏组织与薄壁组织两层的细胞间隙, 菌丝体粗细均匀、线状、有隔膜、稍弯曲、无分叉, 但种子胚体部分未见到内生真菌菌丝体分布 (图 1)。

### 2.2 内生真菌分离结果

从小花棘豆茎、叶、叶柄及种子共 201 块组织中分离到 79 株内生真菌, 分离率为 39.3%。根据菌落形态、颜色、生长速率及菌丝显微结构特点初步合并为 5 种形态菌 (图 2), 依次编号为 XJ-J1-1, XJ-J1-2, XJ-J1-4, XJ-Y1-2, XJ-P1-4。根据菌落、菌丝显微特点及国内外报道资料可初步确定 XJ-J1-1 为 *Undifilum* sp. 真菌, 是目前疯草中主要的内生真菌, 但本研究中菌丝显微结构未发现分生孢子等特殊结构; 菌株 XJ-P1-4 菌丝顶端具有少量分枝, 在菌丝分支处或顶端有大量的分生孢子, 有时孢子聚集成团, 有时在菌丝顶端形成孢子链, 分生孢子暗色, 椭圆形或卵形, 可初步确定为链格孢属 (*Alternaria* sp.) 内生真菌; 其余 3 株内生真菌仅从形态学特征未能鉴定其种属情况, 但所有菌株均需进行分子生物学鉴定才能确定其分类地位。

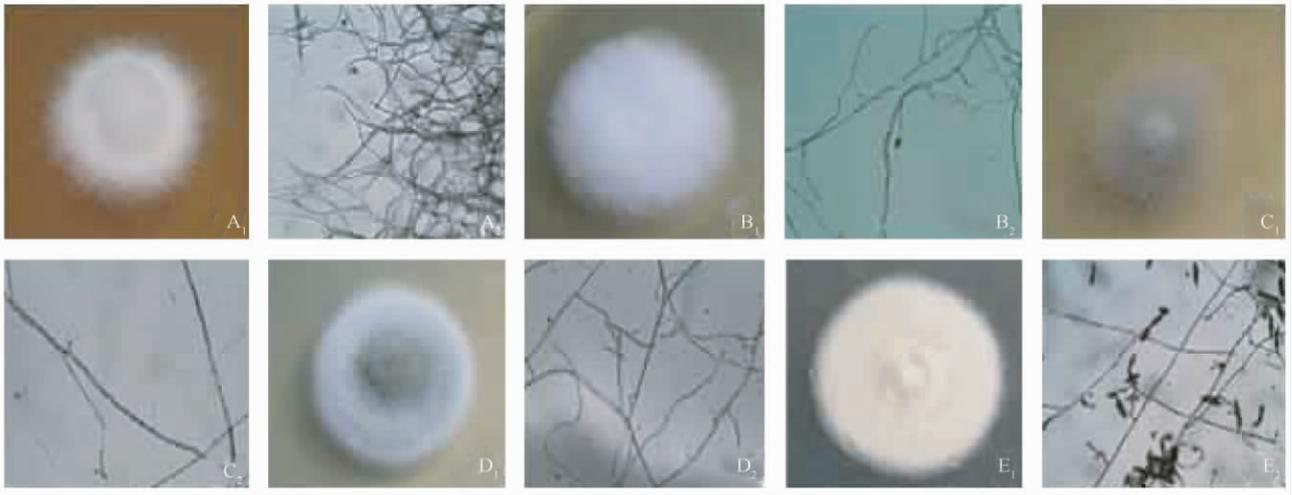


图 2. 小花棘豆内生真菌菌落与菌丝形态(菌丝照 400 ×)

Figure 2. Morphology of colonies and hyphae of fungi from *Oxytropis glabra* DC (hyphae 400 ×). A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>: The colony and hyphae of XJ-J1-1; B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>: The colony and hyphae of XJ-J1-2; C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>: The colony and hyphae of XJ-J1-4; D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>: The colony and hyphae of XJ-Y1-2; E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>: The colony and hyphae of XJ-P1-4.

从内生真菌分离培养结果可以看出,内生真菌在小花棘豆四种组织中的分布具有一定规律性(表 2)。由表 2 可知,小花棘豆内生真菌主要分布于叶和种子中,分离率分别为 56.82% 和 42.37%,且在叶和种子中的优势菌株均为 XJ-J1-1,相对分离频率分别为 76.00% 和 86.21%,这与临时装片检测结果相同,表明小花棘豆叶和种子中内生真菌数量与种属分布具有一致性。此外,小花棘豆各组织内生真

菌的分离率除叶外,其他组织分离率均远低于 50%,这与临时装片检测结果差异很大,可能因分离内生真菌时采用的消毒剂浓度不当或消毒时间过长引起,也可能是小花棘豆组织中存在大量共生的但不能用普通培养基分离培养的内生真菌。从分离结果可知,小花棘豆内生真菌种属分布也表现组织差异性。

表 2. 小花棘豆不同组织内生真菌分离结果

Table 2. Endophytic fungi from the different tissues of *Oxytropis glabra* DC

Tissues	Tissues umber	Colony number	Isolation rate/ %	Dominant strains	Isolation frequency/ %
Stem	60	19	31.67	XJ-J1-1	68.42
Leaf	44	25	56.82	XJ-J1-4	76.00
Petiole	38	10	26.32	XJ-J1-2	50.00
Seed	59	25	42.37	XJ-J1-1	86.21

### 2.3 内生真菌系统发育分析

从 5 种小花棘豆内生真菌基因组 DNA 中均扩增获得 500 bp 左右的 5.8S rDNA-ITS 序列。将 PCR 产物测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 比对,选取比对后相似系数较高的种属序列用邻接法构建系统发育树(图 3)。由图 3 可知,小花棘豆内生真菌 XJ-J1-1、XJ-J1-4、XJ-P1-4 形成一个大的支持率为 100 的聚类,该聚类下又分为两个小的分支,XJ-J1-4 与 XJ-P1-4 在同一分支上,支持率为 72%,说明这两株菌间亲缘关系相对较近,且它们与各自比对菌株序

列同源性均大于 99%。其中,XJ-J1-4 与编号分别为 AY345356 和 AY228650 的 *Embellisia* sp. 亲缘关系密切,据国内外研究报道可知小花棘豆内生真菌 XJ-J1-4 为 *Embellisia* sp. L12。XJ-J1-1 与编号分别为 FJ357318 和 FJ357320 的 *Undifilum oxytropis* 亲缘关系最近,同源性为 99%,结合形态学特征可确定 XJ-J1-1 为 *Undifilum oxytropis*。XJ-Y1-2 在 NCBI 上进行 BLAST 比对时,仅与编号为 FR733810 的 *Aspergillus fumigatiaffinis* 菌株的相似性较高,进化分析后其同源性为 100%。XJ-J1-2 与编号分别为

JQ690085 和 DQ166549 的 *Fusarium* sp. 亲缘关系最近, 同源率为 100%, 结合形态学特征比较后确定为 *Fusarium equiseti*。XJ-P1-4 根据其进关系与菌丝、分生孢子显微结构可确定为 *Alternaria porri*。目前, 已将菌株 *Embellisia* sp. L12 和 *Undifilum oxytropis* 提交

中国工业微生物菌种保藏管理中心 (CICC), 并获菌株保藏号分别为 CICC2492 和 CICC2493。由表 2 可知, 疯草内生真菌 (*Undifilum oxytropis*)、木贼镰刀菌 (*Fusarium equiseti*) 和埃里砖格孢菌 (*Embellisia* sp. L12) 3 株为小花棘豆内生真菌的主要优势菌株。

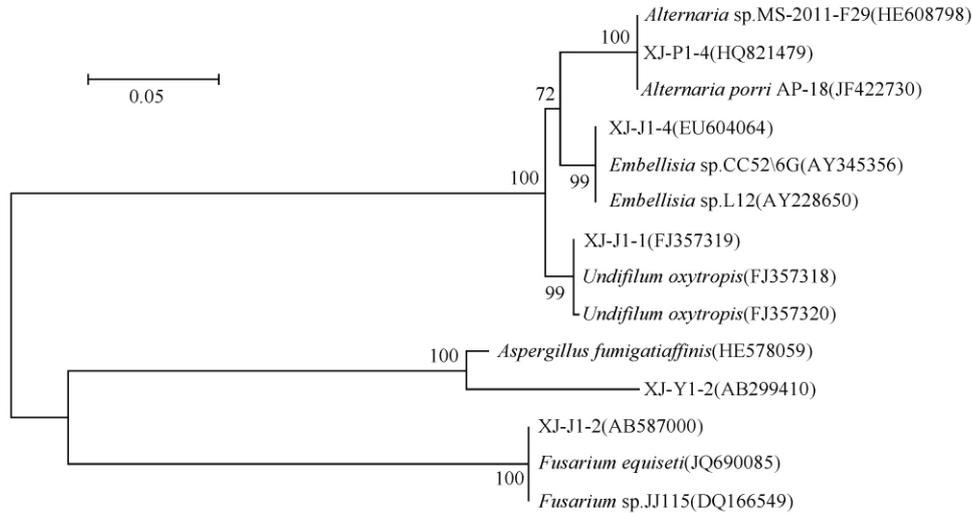


图 3. 基于 5.8S rDNA-ITS 序列由邻近法构建的系统发育树

Figure 3. Neighbor-joining (NJ) tree based on 5.8S rDNA-ITS sequences. The number at each branch points indicate the percentage of bootstrap supporting with bootstrap values calculated from 1000 resampling. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The scale bar indicates 5% substitutions per nucleotide position.

### 3 讨论

内生真菌菌丝体系统地分布于植物茎杆、叶鞘、叶片、花序、果实和种子等器官、组织的细胞或细胞间隙<sup>[7]</sup>。1978 年, Patriquin 等发现苯胺蓝可将真菌原生质体染成蓝色, 便最早建立了苯胺蓝染色检测植物组织内生真菌的方法<sup>[22]</sup>。随后, Kelemu 等采用苯胺蓝染色法染色检测到珊瑚状臂形草感染有内生真菌<sup>[23]</sup>。我国学者南志标<sup>[24]</sup>、王志伟等<sup>[25]</sup>也利用苯胺蓝染液对我国部分国产和引进的禾本科植物中内生真菌分布开展了大量研究, 均取得显著成果。本研究在上述方法的基础上根据小花棘豆组织学特点, 采用乳酸酚棉蓝染色法对小花棘豆不同组织进行处理观察组织中内生真菌分布情况, 并统计各组织中内生真菌带菌率。结果发现, 小花棘豆茎、叶、叶柄及种子中存在内生真菌, 侵染率均大于 50%, 且内生真菌菌丝体在不同组织中的分布规律与禾本科植物相应组织中相似<sup>[26]</sup>, 在疯草种子种的分布与

Oldrup 等报道的结果一致<sup>[27]</sup>, 而在其他组织中的分布未见报道。

内生真菌的分离培养是植物内生真菌检测的另一重要手段。本研究采用普通分离培养法研究样品中内生真菌种属分布情况, 发现各部位分离率及总体分离率均远小于临时装片检测时的感染率, 除叶外其他组织中内生真菌分离率均小于 50% (表 2), 说明在检测到含有内生真菌的组织中仍有大量内生真菌未被分离出来。此方法的不足之处在于不同植物不同组织部位采用的消毒时间不确定, 消毒时间过长会杀死组织中内生真菌, 而消毒时间不足则会引入大量表生菌。此外, 植物体内的许多共生真菌不能在人工培养基上生长, 或分离培养过程中组织内生长快的内生真菌长出后就抑制了慢生菌的生长, 不能将植株中所有内生真菌分离出来。因此, 通过组织分离培养法研究植物内生真菌群落分布时, 针对不同组织类型选择最佳表面消毒时间和最佳培养条件是必要的。

从两种检测方法均可发现, 小花棘豆四种组织

中内生真菌的侵染程度依次为种子 > 叶 > 茎 > 叶柄。此外, 从内生真菌分离频发现, 不同组织中侵染的主要内生真菌类型不同, 茎和种子的优势菌株均为 *Undifilum oxytropis*, 分离频分别为 68.42% 和 86.21% (平均 77.32%), 叶的优势菌株为 *Embellisia* sp. L12, 分离频为 76% (平均 64.00%), 叶柄为 *Fusarium equiseti* (50.00%), 表明内生真菌在侵染或定殖植物组织时具有组织选择性, 这可能与疯草内生真菌主要通过菌丝生长进入子房和胚珠, 经种子传播的方式有关<sup>[28]</sup>, 或叶组织的特性和在环境中暴露较大的表面积有利于孢子附着与沉积, 在适宜时间和条件下就可能使内生真菌生存。

本研究获得的 3 株优势菌株分别与卢萍等<sup>[14]</sup>、Gao 等<sup>[16]</sup> 和 Lu 等<sup>[18]</sup> 对我国小花棘豆内生真菌的研究结果相符。*Alternaria porri* 广泛存在于自然界和植物体内, 其与 *Embellisia* sp. 亲缘关系较密切, 本次从小花棘豆中分离出来可能来自环境中也可能为小花棘豆内生真菌, 或出现 Braun 等首次发现疯草中的 *Embellisia* sp. 真菌时将其确定为 *Alternaria* sp. 的现象<sup>[29]</sup>。另外, 本研究通过内生真菌分离鉴定技术从小花棘豆中分离获得的优势菌株 *Undifilum oxytropis* 和 *Embellisia* sp. L12 也是国外疯草中发现的主要内生真菌<sup>[30-31]</sup>。从叶中分离到 *Aspergillus fumigatiaffinis* 为首次报道, 在其他组织或其他棘豆属疯草中是否也存在该属内生真菌, 仍需进一步研究。

资料表明, 疯草内生真菌具有多样性<sup>[13]</sup>。本研究借鉴禾草内生真菌检测技术<sup>[20]</sup>, 首次应用于制作棘豆属疯草(小花棘豆)各组织临时装片, 通过乳酸酚棉蓝染色法与分离培养法相结合能够更准确、全面地阐明小花棘豆各组织内生真菌分布情况。此方法的建立将有待用于研究我国西部草地其他疯草类植物内生真菌, 为尽快探清我国疯草内生真菌在不同组织器官中的分布规律, 进一步培育无菌疯草植株研究内生真菌与疯草抗性关系提供了理论和技术依据。

## 参考文献

- [1] 马毓泉. 内蒙古植物志. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 1989.
- [2] 史志诚. 中国草地重要有毒植物. 北京: 中国农业出版社, 1997.
- [3] Lu P, Zhao ML, Han GD. Hazards and utilization on toxicity of *Oxytropis glabra*. *Prat Acultural Science*, 2009, 26(3): 97-101. (in Chinese)  
卢萍, 赵萌莉, 韩国栋. 小花棘豆毒性的危害与利用. 草业科学, 2009, 26(3): 97-101.
- [4] Zhao YZ, Liu L. Ecological geographic distributions specificity of flora of *Oxytropis* in NeiM ongol. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Neimongol*, 1996, 27(1): 72-82. (in Chinese)  
赵一之, 刘丽. 内蒙古棘豆属 *Oxytropis* 植物区系生态地理分布特征. 内蒙古大学学报(自然科学版), 1996, 27(1): 72-82.
- [5] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志. 北京: 科学出版社, 1999: 21-190.
- [6] 朱亚民. 内蒙古植物药志. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 1989.
- [7] 卢萍. 内蒙古三种棘豆属植物中苦马豆素相关因子的研究. 内蒙古农业大学硕士论文. 2007.
- [8] Chen SS, Chen JW, Zhao BY, Zhu ZK, Dong Q. The reseach progress of *Oxytropis glabra* DC poisoning in livestock. *Progress in Veterinary Medicine*, 2003, 24(4): 36-38. (in Chinese)  
陈绍淑, 陈继武, 赵宝玉, 朱忠珂, 董强. 家畜小花棘豆中毒的研究进展. 动物医学进展, 2003, 24(4): 36-38.
- [9] Gao XL, Han B, Zhao ML, He JF, Yu T. Locoweed and advances in research on toxic components. *Acta Prataculturae Sinica*, 2011, 20(3): 279-286. (in Chinese)  
高新磊, 韩冰, 赵萌莉, 何江峰 于婷. 疯草及毒性成分研究进展. 草业学报, 2011, 20(3): 279-286.
- [10] 史志诚. 动物毒物学. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [11] Guo LD. Advances of researches on Endophytic Fungi. *Mycosystema*, 2001, 20(1): 148-152. (in Chinese)  
郭良栋. 内生真菌研究进展. 菌物系统, 2001, 20(1): 148-152.
- [12] Chen JP, Ma Y, Lu H, Wang ZX, Zhao BY. Progress on Locoweed-Fungal Endophyte. *Progress in Veterinary Medicine*, 2013, 2(2): 77-81. (in Chinese)  
陈基萍, 马尧, 路浩, 王占新 赵宝王. 疯草内生真菌研究进展. 动物医学进展, 2013, 2(2): 77-81.
- [13] Zhou QW, Bai S, Lu H, Zhao BY, Chen JP. Recent advances and issues on Locoweed-Fungal Endophyte. *Pratacultural Science*, 2012, 7(29): 1049-1057. (in Chinese)  
周启武, 白松, 路浩, 赵宝玉, 陈基萍. 疯草内生真菌

- 研究现状与存在问题. 草业科学, 2012, 7 (29) : 1049-1057.
- [14] Lu P, Child D, Zhao ML, Gardener DR, Lv GF, Han GD. Culture and identification of endophytic fungi from *Oxytropis glabra* DC. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29 (1) : 53-58. (in Chinese)  
卢萍, Child D, 赵萌莉, Gardener DR, 吕桂芬, 韩国栋. 小花棘豆 (*Oxytropis glabra*, DC) 内生真菌的培养与鉴定. 生态学报, 2009, 29 (1) : 53-58.
- [15] Huo HY, Lu P, Niu YF, Lv GY, Li S, Gao J, Qian YG. Isolation, culture and identification the 11 endophytic fungus from *Oxytropis glabra* DC. *Journal of Inner Mongolia University*, 2010, 41 (2) : 206-211. (in Chinese)  
霍红雁, 卢萍, 牛艳芳, 吕桂芬, 李松, 高静, 钱亚光. 小花棘豆 (*Oxytropis glabra* DC) 11 株内生真菌的分离培养及鉴定. 内蒙古农业大学学报, 2010, 41 (2) : 206-211.
- [16] Gao XL, Cook D, Ralphs MH, Yan L, Gardner DR, Lee ST, Panter KE, Han B, Zhao ML. Detection of swainsonine and isolation of the endophyte *Undifilum* from the major locoweeds in Inner Mongolia. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2012, 45: 79-85.
- [17] Lu W, Lu H, Zhao BY, Rong J, Chen JP, Wang R. Wenchao Gao, Zhanli Chen. Screening and identification of swainsonine-producing endophytic fungi from *Oxytropis glabra*. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2011, 42 (3) : 429-436. (in Chinese)  
卢围, 路浩, 赵宝玉, 荣杰, 陈基萍, 王瑞, 高文超, 陈占莉. 小花棘豆产苦马豆素内生真菌的筛选与鉴定. 畜牧兽医学报, 2011, 42 (3) : 429-436.
- [18] Lu H, Chen J, Lu W, Ma Y, Zhao B, Wang J. Isolation and identification of swainsonine-producing fungi found in locoweeds and their rhizosphere soil. *African Journal of Microbiology Research*, 2012, 6 (23) : 4959-4969.
- [19] Li CJ, Nan JB, Liu Y, Paul VH, Peter D. Methodology of endophyte detection of drunken horse grass (*Achnatherum inebrians*). *Edible Fungi of China*, 2008, 27: 16-19. (in Chinese)  
李春杰, 南志标, 刘勇, Paul VH, Peter D. 醉马草内生真菌检测方法的研究. 中国食用菌, 2008, 27: 16-19.
- [20] 魏景超. 真菌鉴定手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [21] White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. eds. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. London: Academic Press, 1990: 315-322.
- [22] Patriquin DG, Döbereiner J. Light microscopy observations of tetrazolium reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. *Canadian Journal of Microbiology*, 1978, 24: 734-742.
- [23] Kelemu S, White JF, Muñoz F, Takayama Y. An endophyte of the tropical forage grass *Brachiaria brizantha*: isolating, identifying, and characterizing the fungus, and determining its antimycotic properties. *Canadian Journal of Microbiology*, 2001, 47: 55-62.
- [24] Nan ZB. Incidence and distribution of endophytic fungi in seed of some native and introduced grass in China. *Acta Prataculturae Sinica*, 1996, 5 (2) : 1-8. (in Chinese)  
南志标. 内生真菌在我国部分国产和引进禾草品种种子中的分布. 草业学报, 1996, 5 (2) : 1-8.
- [25] Wang ZW, Wang SM, Ji YL, Zhao MW, Yu HS. Plant endophyte research 6: Detection and distribution of endophytic fungus in Gramineous plants in saline-alkali area in Dongying. *Pratacultural Science*, 2005, 22 (2) : 60-64. (in Chinese)  
王志伟, 王世梅, 纪燕玲, 赵明文, 于汉寿. 中国禾本科植物内生真菌研究—东营市盐碱地区的禾本科植物内生真菌的检测与分布特征. 草业科学, 2005, 22 (2) : 60-64.
- [26] Lu T, Li XH, Wang Y, Wang GY, Wang ZW. Grass endophyte research in China 14: Distribution and seed transmission of *Neotyphodium sinofestuca* in *Festuca parvigluma* Steud. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2012, 35 (2) : 39-44. (in Chinese)  
陆涛, 李杏辉, 王杨, 王贵英, 王志伟. 禾本科植物内生真菌研究 14: *Neotyphodium sinofestuca* 在颖茅芽体内的分布及其种传特性. 南京农业大学学报, 2012, 35 (2) : 39-44.
- [27] Oldrup E, Mclain-Romero J, Padilla A, Moya A, Gardner D, Creamer R. Localization of endophytic *Undifilum* fungi in locoweed seed and influence of environmental parameters on a locoweed in vitro culture system. *Botany*, 2010, 88 (5) : 512-521.
- [28] Ralphs MH, Cook D, Gardner DR, Grum DS. Transmission of the locoweed endophyte to the next generation of plants. *Fungal Ecology*, 2011, 4 (4) : 251-255.
- [29] Braun K, Romero J, Liddell C, Creamer R. Production of swainsonine by fungal endophytes of locoweed.

*Mycological Research*, 2003, 107 (8) : 980-988.

- [30] Ralphs MH, Creamer R, Baucom D, Gardner DR, Welsh SL, Graham JD, Hart C, Cook D, Stegelmeier BL. Relationship between the Endophyte *Embellisia* spp. and the toxic Alkaloid Swainsonine in major locoweed species (*Astragalus* and *Oxytropis*). *Journal of Chemical*

*Ecology*, 2008, 34 (1) : 32-38.

- [31] Cook D, Gardner DR, Grum D, Pfister JA, Ralphs MH, Welch KD, Green BT. Swainsonine and Endophyte Relationships in *Astragalus mollissimus* and *Astragalus lentiginosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59: 1281-1287.

## Distribution of endophytic fungi in *Oxytropis glabra* DC

Qiwu Zhou<sup>1</sup>, Hao Lu<sup>1</sup>, Ping He<sup>1</sup>, Dujian Yan<sup>1,2</sup>, Baoyu Zhao<sup>1\*</sup>, Liang Zhang<sup>1</sup>, Weili Wen<sup>1</sup>, Xiaowen Yang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

<sup>2</sup>AKS Vocational and Technical College, Aksu 843000, China

**Abstract:** [Objective] Endophytic fungi were detected and isolated from the stems, leaves, petioles and seeds of *Oxytropis glabra* DC sampled from Alashan of Inner Mongolia to investigate the infection rate and species distribution in different tissues. [Methods] The endophytic fungi infection rate and distribution of species in different tissues were investigated by making temporary slides, staining, isolation and identification. [Results] Endophytic fungi were detected and observed from all parts (stems, leaves, petioles and seeds) of the plant by temporary slides staining. A total of 79 isolates were cultivated from 4 different tissues by common separation methods, which belonged to 10 genera after identification. The infection rate and separation rate were seeds > leaves > stems > petioles. *Undifilum oxytropis*, *Embellisia* sp. L12 and *Fusarium equiseti* were the dominant species in this plant with the relative isolate frequency 77.32%, 64.00% and 50.00%, respectively. [Conclusion] Endophytic fungi were commonly found in the all parts of *Oxytropis glabra* DC. There was an obviously difference in quantity, species and distribution of the endophytic fungi between different parts of plant. Seeds and leaves were the most vulnerable to infection and colonization by the endophytic fungi.

**Keywords:** *Oxytropis glabra* DC, endophytic fungi, detection, isolation and identification, distribution

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31201958, 31072175) and by the Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (201203062)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-29-87092429; E-mail: zhaobaoyu12005@163.com

Received: 18 October 2012/ Revised: 7 January 2013