

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54(5): 572–581; 4 May 2014
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.05.012

小花棘豆和变异黄芪内生真菌显微分布及定量检测

周启武¹, 于龙凤¹, 路浩², 曹丹丹², 赵宝玉^{2*}

¹ 临沧师范高等专科学校农学系, 云南 临沧 677000

² 西北农林科技大学动物医学院, 陕西 杨凌 712100

摘要 【目的】了解内蒙古阿拉善和宁夏天然草原的小花棘豆和变异黄芪不同组织中内生真菌 *Undifilum oxytropis* 的显微分布特点和含量分布规律。【方法】通过石蜡切片结合乳酸酚棉蓝染色法观察, 采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 进行定量研究, 获得各组织(茎、叶、种子和根)中内生真菌分布和含量。【结果】种子中内生真菌主要定殖于种皮栅栏组织与薄壁组织两层的细胞间隙; 叶片组织主要定殖于靠近气孔的表皮细胞层, 茎髓中内生真菌围绕于茎髓质维管束纵轴边缘的薄壁细胞层中; RT-qPCR 的检测限为 0.029 pg/ng 总 DNA, 各采样点相应组织内生真菌含量不同, 两采样点小花棘豆种子中 *U. oxytropis* 含量均为最高, 叶和茎相反, 两地变异黄芪为种子中最高, 根最低, 叶和茎相反。【结论】内生真菌寄生在植物组织时对宿主组织和细胞类型均有选择性, 生境对疯草中内生真菌的定殖和分布也有影响。

关键词: 小花棘豆, 变异黄芪, 疯草, 内生真菌, 显微分布, 荧光定量 PCR

中图分类号: X172 文章编号: 0001-6209(2014)05-0572-10

疯草 (Locoweed) 是指含有苦马豆素 (Swainsonine, SW), 且能引起动物疯草中毒典型神经学症状和病理学变化的有毒植物的统称^[1], 目前已成为全世界范围内影响草地畜牧业发展最严重的毒草^[2]。我国已发现的疯草类有毒植物共 47 种, 其中棘豆属 (*Oxytropis* sp.) 23 种, 黄芪属 (*Astragalus* sp.) 23 种, 苦马豆属 1 种, 对草地畜牧业构成严重灾害的有 13 种^[3], 其中小花棘豆 (*O. glabra*) 和变异黄芪 (*A. variabilis*) 分别构成棘豆属和黄芪属类疯草中对草地和畜牧业危害最严重的种类, 仅这两类疯草每年给我国畜牧业造成的直接经济损失高达几百万元^[3]。随着草场利用度增加、气候干旱、管理滞后等人为和自然因素的影响, 部分牧区出现草

地大面积沙化和毒草化, 已直接威胁到我国内蒙古、新疆等边疆少数民族地区的可持续发展。另一方面, 疯草能在草场沙化较严重的地带生长, 具有耐干旱、耐寒、耐贫瘠与耐盐碱等抗性^[4], 可起到防风固沙、固土护坡和水土保持等作用, 还能增强土壤肥力, 极具重要的生态学价值^[5]。因此, 了解植物的动物毒性和生态作用的特征和规律对如何科学地开发利用疯草类植物的生物学价值就显得尤为重要。

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^[6]。内生真菌长期生活于疯草组织内部, 与宿主长期协同进化过程中, 彼此形成了

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

* 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: 2013-09-13; 修回日期: 2013-12-27

互惠互利的共生关系, 密切完成物质、能量及各种信号分子等传递^[7]。我国小花棘豆和变异黄芪主要生长在陕西、内蒙古、宁夏、甘肃和新疆等省(区)的草原、山地和荒漠、半荒漠地区, 能够抵抗各种恶劣的生存环境, 这主要与疯草中感染了内生真菌有关^[4-8-9]。1999年, Braun首次从疯草(绢毛棘豆)中分离出内生真菌并鉴定为对链格孢属(*Alternaria* sp.)真菌^[10]; 2003年又从密柔毛黄芪、绢毛棘豆和蓝伯氏棘豆分离出能够产生苦马豆素的内生真菌(*Embellisia* sp.)^[11]; 随后的研究发现, 疯草内生真菌(*Undifilum oxytropis*) 在苦马豆素合成过程中起着主导作用, 是疯草类植物中苦马豆素的主要来源, 而且疯草内生真菌感染后可以明显增强宿主抵抗盐碱、高温、高寒等逆境的能力^[12-16]。仅10多年时间, 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 SW 的内生真菌, 并对内生真菌与疯草间的互作关系进行了研究, 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^[7]。目前, 已证实能够产生疯草毒素的内生真菌主要有埃里砖格孢属真菌(*Embellisia* sp.)、镰刀孢属真菌(*Fusarium* sp.) 和疯草内生真菌(*U.*

oxytropis) 三类^[3]。但有关内生真菌在疯草组织中的定殖特点及数量分布研究较少。

本研究旨在通过石蜡切片结合乳酸酚棉蓝染色法, 观察小花棘豆和变异黄芪各组织中内生真菌的显微分布形态及特点, 并采用实时荧光定量 PCR 法(RT-qPCR) 检测各组织中内生真菌 *U. oxytropis* 的含量, 为了解我国疯草内生真菌多样性和分布规律, 为疯草与内生真菌互作关系研究提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物样品: 新鲜健康的小花棘豆和变异黄芪地上部分全草及其茎、叶、种子和根等样品 2011年7~8月采集于内蒙古阿拉善左旗和宁夏银川的天然草地(表1)。样品幼嫩组织放入 FAA 固定液 B 液中, 较老组织放入 FAA 固定液 A 液瓶中固定, 带回实验室用于组织石蜡切片制作; 同时将相应组织放入装有变色硅胶的保鲜袋中脱水处理, 带回实验室用于内生真菌 RT-qPCR 检测。

表 1. 植物样品采集坐标及其生长环境

Table 1. Locations and Growth situation of plants sampled

plant / location	GPS(No.)	altitude/m	phenological period	land forms and soil
<i>Oxytropis flabra</i> (BayanHot in Inner Mongolia)	38°49' 805" 105°42' 021"	1593	fruiting stage	dandelion , plantain , MAO grass , wheatgrass , brown calcic soil
<i>Oxytropis flabra</i> (Yinchuan in Ningxia)	38°29' 870" 106°08' 288"	1108	flowering fruit stage	grass lawn , wheatgrass , bitter Herbs , thermopsis lanceolata , , grey soil
<i>Astragalus variabilis</i> (Jilantai in Inner Mongolia)	38°49' 813" 105°41' 983"	1599	flowering fruit stage	wheatgrass , MAO grass , grit , Gobi Desert , brown calcic soil
<i>Astragalus variabilis</i> (AoLun Prague in Inner Mongolia)	40°26' 874" 106°12' 878"	1036	fruiting stage	wheatgrass , MAO grass , Gobi Desert , grit , brown calcic soil

1.1.2 标准菌株: 本实验室从疯草中分离并保存在国家微生物菌种保藏中心的可产疯草毒素的内生真菌 *U. oxytropis* CICC2493, 在 PDA 培养基上复壮后的纯培养物作为 RT-qPCR 检测的标准菌株。

1.1.3 主要仪器: 普通光学显微镜(重庆光电)、显微照相机(MOTIC)、干湿两用培养箱(DGP-9057B-2, 上海福玛)、切片机(Leica RM2016, 德国)、毛笔、摊片机、超低温冰箱(SANYO MEDICAL FREEZER)、高速冷冻离心机(SIGMA 3K15)、普通 PCR 仪(Bio-Rad)、超微量分光光度计(Bio-Tek Epoch)、实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad-iQ5)、全自动凝胶成像系统(SYNGENE)等。

1.1.4 主要试剂: 5% NaOH 溶液(自配)、乳酸酚棉蓝染液(自配)、FAA 固定液(A 液和 B 液, 自配)、中性树胶(国药集团化学试剂有限公司)、EasyPure™ Plant Genomic DNA Kit(北京全式金)、2 × TransStart™ Top Green qPCR SuperMix(北京全式金)、限制性内切酶 *Ava* II(纽英伦, 北京)等。

1.2 石蜡切片法检测疯草内生真菌

1.2.1 材料预处理: 取出 FAA 固定液中保存的植物组织, 分别将幼嫩和较老的组织放入 50% 和 70% 酒精中分别洗涤 3 次, 每次 1.5 h, 以充分去除组织中的固定液。

1.2.2 各组织石蜡切片制作: ①将组织依次放入

70% 至 100% 的梯度酒精逐级脱水, 然后常规透明;
 ②透明完毕放入 38 - 40℃ 左右的干湿两用培养箱, 逐渐加入适量石蜡屑, 至蜡屑不能溶解并与二甲苯形成糊状物为止, 调节温度为 60℃ 鼓风干燥蒸发二甲苯, 然后放入纯蜡中, 每隔 2 h 换一次纯蜡(共 3 次), 完成渗蜡, 并包埋; ③修块后采用切片机(Leica RM2016, 德国)切片, 厚度 15 μm - 20 μm , 用毛笔和刀片小心取下平整连续的蜡带于摊片机水槽中(48℃), 使组织薄片自然摊开在载玻片上, 编号后放入烤片槽中(68℃)烤片 15 min, 然后移入 72℃ 烘片箱内烘烤 20 min。④取出切片进行脱蜡和醇化; ⑤滴加乳酸酚棉蓝染液依组织切片厚度适当调整时间染色为 5 - 15 min, 然后进行组织脱水与透明; ⑥封片观察。

1.3 Real-time qPCR 法检测疯草内生真菌

1.3.1 反应体系的建立及优化: 取已纯化回收的 *U. oxytropis* CICC2493 真菌 PCR 产物 2 μL , 通过超微量分光光度计测定浓度, 调整浓度后进行 6 - 8 次 10 倍连续梯度稀释, 作为标准样品。应用 *U. Oxytropis* 真菌特异性引物 ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') 和 OR1 (5'-GTCAAAAAGTTGAAAATGTGGCTTG-3')^[17] 扩增菌株 5.8S rDNA-ITS 区段, 引物由南京金斯瑞科技有限公司合成。

通过实时 PCR 仪(IQ5; Bio-Rad) 进行荧光定量 PCR 扩增, 体系为: 模板(标准 DNA/阴性对照) 3 μL / 0 μL , ITS5 和 OR1 各 1 μL , 2 \times TransStartTM Top Green qPCR SuperMix 12.5 μL , Passive Reference Dye 0.5 μL , 加 ddH₂O 水补足 25 μL 。反应条件为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 15 s, 58℃ 30 s, 72℃ 40 s, 共 40 个循环。反应结束后检测 PCR 产物, 并使温度从 55℃ 开始以 0.5℃/10 s 的幅度上升到 95℃, 至 PCR 产物完全解链, 期间每间隔 10 s 检测一次荧光信号。根据反应的 C_t 值、最高荧光值以及熔解曲线等对引物反应浓度、最佳退火温度及扩增效率进行优化, 以扩增 C_t 值在 15 - 35 之间, 扩增效率接近 100% 为最佳反应。

1.3.2 标准曲线制作: 通过 1.3.1 进行反应体系的建立及优化, 确定标准 DNA 梯度浓度、引物浓度和最佳反应条件, 在最佳(相同)反应条件下进行 RT-qPCR 扩增, 同时设置不加模板的阴性对照, 每个反应体系重复 3, 由 IQ5 软件自动生成标准曲线和方

程以建立 C_t 值与内生真菌浓度之间的线性关系。

1.3.3 疯草内生真菌的 RT-qPCR 检测: (1) 组织基因组 DNA 提取: ①随机选取各采样点 3 个重复的小花棘豆和变异黄芪茎、叶、种子等组织在液氮中充分研磨, 称取 30 mg 左右粉末于 1.5 mL 无菌 EP 管中; ②按 Plant Genomic DNA Kit 试剂盒提取各组织基因组总 DNA。即首先加入 250 μL 的 RB1 溶液, 震荡摇匀后加入 30 μL 10% 的 SDS 和 15 μL 的 RNase A, 充分摇匀后于 55℃ 水浴 15 min; 水浴完毕 12000 \times g 离心 10 min, 吸取上清于干净的 EP 管中, 加入 100 μL PB1 溶液, 摇匀冰浴 5 min 后 12000 \times g 离心 5 min; 再吸取上清于干净的 EP 管中, 加入 375 μL 溶液 BB1 充分混匀后全部混合液加入吸附柱中, 12000 \times g 离心 1 min, 弃去流出液并加入 500 μL 溶液 12000 \times g 离心 1 min, 再先后两次加入 WB1 适量 12000 \times g 离心 1 min; 最后, 将吸附柱置于一干净的 EP 管中, 在柱的正中央加入 60 μL 预热(60℃) 的 EB, 室温稍静置后 12000 \times g 离心 1 min, 洗脱 DNA 即可。

(2) RT-qPCR 检测: ①为准确测定和表示疯草组织中 *U. oxytropis* 的含量(pg/ng 总 DNA), 首先通过超微量分光光度计测定各组织基因组 DNA 浓度; ②分别以小花棘豆和变异黄芪各组织总 DNA 为模板, 在最佳扩增条件下对内生真菌含量进行 RT-qPCR 检测, 同时观察熔解曲线并检测荧光信号; ③检测完毕, 将每个样品对应的 C_t 值带入标准曲线方程, 计算各组织中内生真菌的含量(pg/ng)。

1.3.4 RT-qPCR 扩增产物特异性与重复性评价: 为避免非特异性扩增或引物二聚体对检测结果的影响, 本研究在 PCR 扩增反应结束后进行熔解曲线分析, 以区分 PCR 产物与本底或引物二聚体与本底结合发出的荧光。并应用特异性的限制性内切酶 *Ava* II 对 PCR 产物进行水解酶切, 通过凝胶电泳检测 PCR 产物是否具有特异性的酶切位点, 来验证 PCR 反应的特异性。同时在对每个样品(包括标准样品和阴性对照) 进行测定时, 均设定同一样品的 3 个重复检测, 以验证检测结果的重复性。

2 结果和分析

2.1 内生真菌石蜡切片检测结果

在小花棘豆叶片组织的表皮层中, 内生真菌分

布自然、菌丝体弯曲度小,主要在细胞间隙,有部分菌丝体横穿两层细胞中间,菌丝体出现分叉现象(图1-A)。在茎髓质中,内生真菌菌丝体沿髓质细胞纵向排列分布,粗细均匀,弯曲度小,有时菌丝体穿过茎髓细胞横断面到达细胞另一侧,多条菌丝同

时在细胞横断面相遇时出现分叉现象,在周围发现菌丝团(图1-B)。在种子中内生真菌数量较多,菌丝体粗细均匀,较短,弯曲度较大,无分叉,且主要分布在种脐周围的种皮栅栏组织与薄壁组织两层的细胞间隙,胚体部分未见到内生真菌菌丝体(图1-C)。

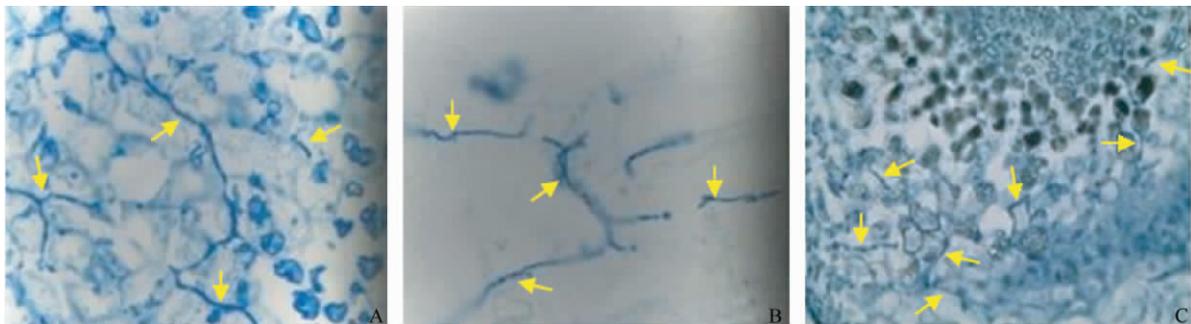


图1. 内生真菌在小花棘豆不同组织部位的显微分布(400×)

Figure 1. Microscopic distribution of endophyte fungi in different tissues of *O. glabra* DC (400×). A: Hyphae distribution in leaf; B: Hyphae distribution in stem; C: Hyphae distribution in seed.

内生真菌在变异黄芪叶、茎和种子中的显微分布特点与小花棘豆相应3种组织中的分布类似但也有差异(图2)。变异黄芪叶片组织中的菌丝体分布明显较少,菌丝较细,弯曲度较大(图2-A);茎髓质观察到和小花棘豆菌丝分布相同的特点,但也发现变异黄芪茎组织中有的内生真菌同时横向排列在两

层细胞间的数个细胞周围,呈波浪形(图2-B);种子中内生真菌主要分布于种皮中间层(薄壁组织层)与外层(栅栏组织层)和内层(致密的软细胞组织或胚乳层)的两层细胞间(致密软组织细胞层或薄壁层),而在胚体层未见内生真菌分布(图2-C)。

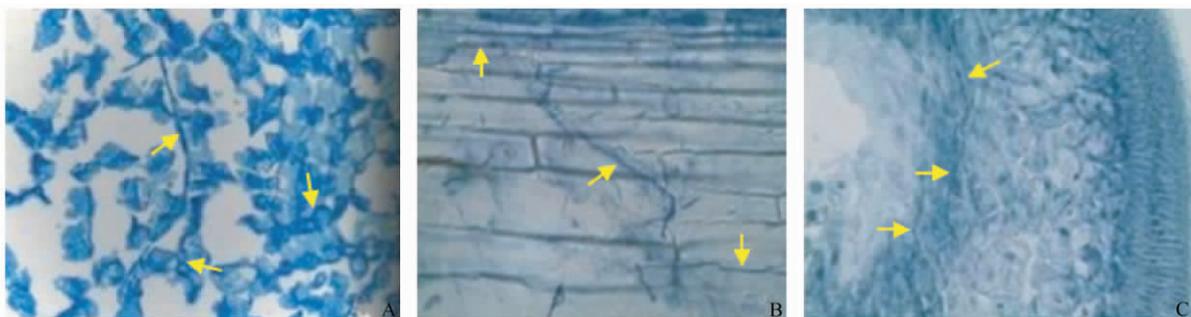


图2. 内生真菌在变异黄芪不同组织部位的显微分布(400×)

Figure 2. Microscopic distribution of endophyte fungi in different tissues of *A. variabilis* (400×). A: Hyphae distribution in leaf; B: Hyphae distribution in stem; C: Hyphae distribution in seed.

2.2 标准曲线的制作

通过最佳体系和反应条件摸索后,将引物浓度调整为 ITS5 和 OR1 各 0.5 μL ,其他体系不变,总体积 25 μL ;反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 sec 60 $^{\circ}\text{C}$ 15 sec 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 sec,共 40 个循环;反应结束后检测荧光信号频率不变。

标准菌株 *U. oxytropis* 的 PCR 产物浓度为 410.238 $\text{ng}/\mu\text{L}$,进行 6 次 10 倍梯度稀释,浓度依次

为 41.0238 $\text{ng}/\mu\text{L}$,4.1024 $\text{ng}/\mu\text{L}$,0.4102 $\text{ng}/\mu\text{L}$,0.0410 $\text{ng}/\mu\text{L}$,0.0041 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 和 0.0004 $\text{ng}/\mu\text{L}$,并以这 6 个标准浓度的 DNA 为模板进行 PCR 扩增,反应结束后由 IQ5 自动生成标准曲线和溶解曲线(图3)。

由图3-A可知,本次PCR定量检测时溶解曲线上形成单一整齐的产物峰,且都相对集中在一个位置上,即溶解温度为88 $^{\circ}\text{C}$,说明无非特异性扩增产

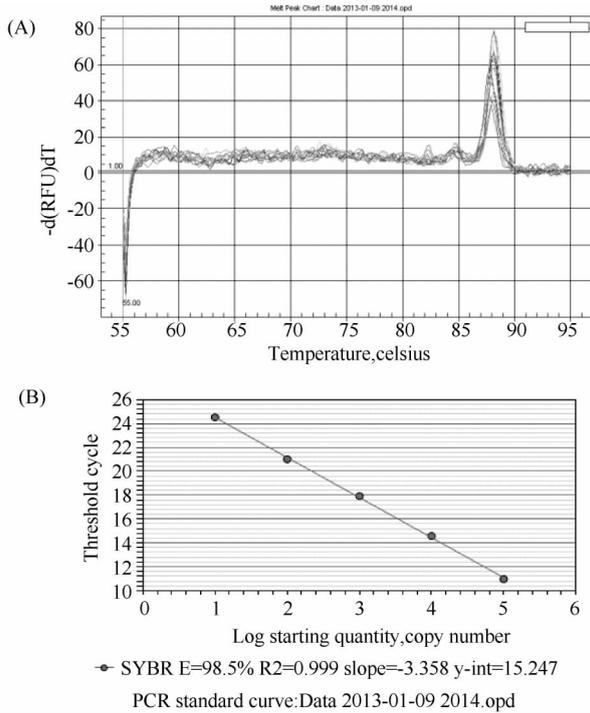


图 3. 标准菌株 DNA 扩增产物熔解曲线 (A) 与标准曲线 (B)

Figure 3. Dissociation curve of PCR products (A) and standard curve of endophytic DNA (B).

物出现,引物设计、浓度及反应条件均较理想。从图 3-B 可知,本次扩增反应的扩增效率 $E = 98.5\%$,说明该反应体系和条件较理想;各浓度梯度间反应的相关性系数 $R^2 = 0.999$,说明标准差都在 0.2 范围内;截距为 15.247。故得出内生真菌的 DNA 起始浓度对数值与 Ct 值之间的线性方程为 $y = -3.358x + 15.247$,其中 y 为扩增反应 Ct 值, x 为内生真菌 DNA 起始浓度的 \log_{10} 值。

2.3 内生真菌 RT-qPCR 检测结果

小花棘豆和变异黄芪各组织总 DNA 浓度见表 2,根据各组织总 DNA 浓度及标准曲线制作梯度浓度关系,对全部组织总 DNA 进行 10 倍稀释。将稀释后的各组织样品按制作标准曲线的反应体系和条件进行 SYBR Green I 的荧光定量 PCR 扩增,通过 Bio-Rad-iQ5 进行小花棘豆和变异黄芪各组织内生真菌含量定量检测时,扩增反应曲线和熔解曲线相对较平滑,统一性较好,特异性强,结果可信,并通过软件导出内生真菌检测结果。根据该反应下得出的标准曲线方程和样品稀释处理方法,即可根据以下公式计算出样品中内生真菌的含量,单位为 pg/ng

总 DNA 浓度(表 2)。

内生真菌含量(pg/ng 总 DNA) =

$$\frac{15.247 - C_t}{3.358 \times C_{\text{总 DNA}}} \times 10 \times 1000$$

本研究应用前期提取纯化的标准菌株 PCR 产物作为标准 DNA,适当稀释后进行梯度倍比稀释制作标准曲线,由于本次制作标准曲线的最低浓度为 $0.0004 \text{ ng}/\mu\text{L}$,每个 PCR 反应体系用量为 $3 \mu\text{L}$,因此本次定量检测的最低极限为 $0.029 \text{ pg}/\text{ng}$ 总 DNA。

表 2. 各植物组织总 DNA 扩增 Ct 值和真菌含量 (pg/ng)

Table 2. Total DNA, Ct value and endophyte concentrations in different locoweed tissues (pg/ng)

plant	tissue	total DNA / ($\text{ng}/\mu\text{L}$)	Ct value	amount
<i>O. flabra</i>	Leaf	8.617	25.00	1.4420
<i>BayanHot</i>	Stem	17.898	24.59	0.9223
	Seed	10.669	23.73	2.7803
<i>A. variabilis</i>	Leaf	15.002	23.08	3.0972
	Stem	6.857	24.35	2.8326
	Seed	18.061	21.57	7.2460
<i>Jilantai</i>	Root	14.889	24.06	1.5943
	Leaf	6.258	24.45	2.9037
<i>Yinchuan</i>	Stem	7.266	22.79	7.8060
	Seed	8.192	21.64	15.2334
<i>A. variabilis</i>	Leaf	13.483	22.11	6.7056
	<i>AoLun Prague</i> Stem	14.748	21.15	11.8406
	Seed	7.082	21.18	24.1556
Root	9.836	22.62	6.4793	

由表 2 可知,本次所检测的全部样品中内生真菌的 DNA 浓度均在检测限 ($0.029 \text{ pg}/\text{ng}$) 以上,比较发现,不同组织部位内生真菌含量不同,但两个采样点小花棘豆的种子中内生真菌含量均为最高,茎和叶相反,总体上采自银川的小花棘豆各组织内生真菌含量均比采自巴彦浩特镇的小花棘豆各组织中高;两采样点变异黄芪各组织中内生真菌的含量分布不相似,但种子均为最高,根最低,叶和茎正好相反,且总体呈现出采自敖伦布拉格镇的变异黄芪各组织内生真菌含量均高于吉兰泰采样点变异黄芪的相应组织(图 4)。

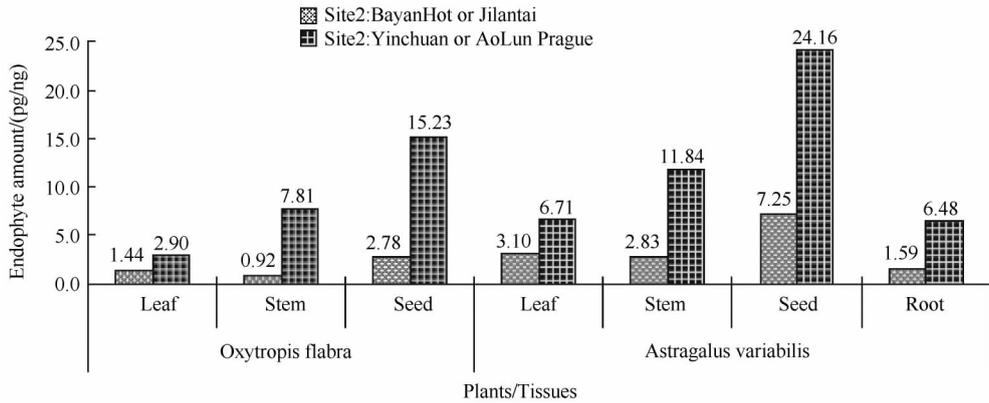


图 4. 不同疯草组织部位内生真菌含量

Figure 4. Endophyte concentrations in different locoweed tissues.

2.4 RT-qPCR 检测的特异性与重复性试验

反应结束后各取 PCR 反应液 5 μ L 于 1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳,在凝胶成像系统中观察到约为 600 bp 的扩增条带(图 5-A),与预期片段大小一致,说明本次 PT-qPCR 反应均扩增获得真菌目的基因片段。同时电泳检测限制性内切酶 *Ava* II 的水解产物情况(图 5-B),其中泳道 1、3、5、7、9 为经过 *Ava* II 水解的 *U. Oxytropis* 真菌 RT-qPCR 扩增产物,发现阳性扩增 PCR 产物(580 bp)被内切酶水解成两个大小约为 380 bp 和 200 bp 的片段(泳道 1 和 3);泳道 2 和 4 为未经内切酶水解的 RT-qPCR 产物,条带整齐,大小均匀;此外,本研究选取实验室从疯草中分离获得的其它优势菌株(*Alternaria* sp., *Fusarium* sp. 和 *Aspergillus* sp. 真菌)的 PCR 产物进行酶切水解(泳道 6、8 和 10),发现限制性内切酶 *Ava* II 不能水解除 *U. oxytropis*(泳道 5、7 和 9)外其他真菌的 ITS 基因序列,本次 RT-qPCR 检测技术对疯草中 *U. oxytropis* 的检测特异性较强。

表 3. RT-qPCR 检测不同样品内生真菌含量的重复性试验

Table 3. Reproducibility testing of RT-qPCR for endophyte concentrations in different tissues

sample and mean	Ct Mean			Ave	STD	VC
	1	2	3			
sample 1	24.24	24.71	24.82	24.59	0.17	0.56%
sample 2	23.62	23.41	24.17	23.74	0.22	0.97%
sample 3	25.41	24.09	25.51	25.00	0.45	0.85%
sample 4	21.18	21.49	22.04	21.57	0.23	0.79%
sample 5	23.75	23.87	24.44	24.02	0.30	0.95%
sample 6	23.92	23.88	24.38	24.06	0.16	1.14%
sample 7	21.82	23.18	24.25	23.08	0.63	0.77%

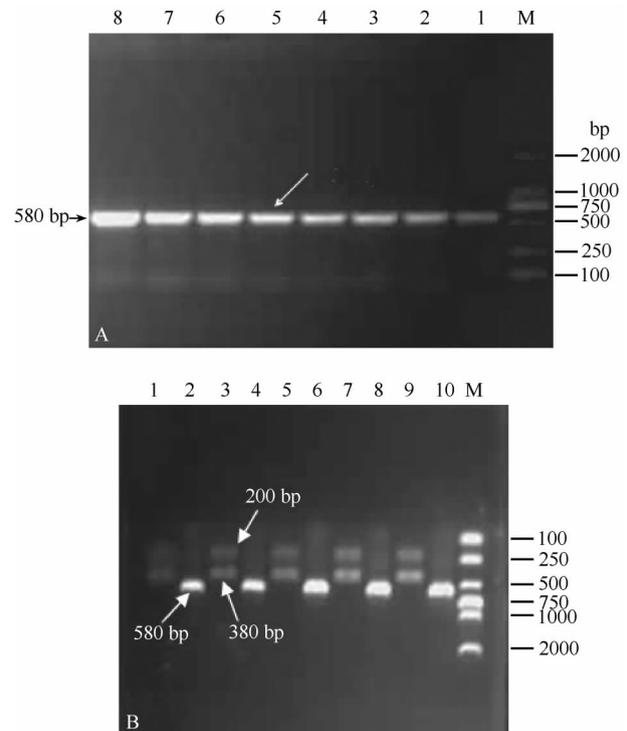


图 5. RT-qPCR 产物(A)及限制性内切酶水解产物(B)凝胶电泳

Figure 5. Agarose gel of RT-qPCR products (A) and restriction enzyme *Ava*II digest products (B).

从检测结果中随机选取平行样品测定的 Ct 值分析发现(表 3),除样品 7 的 3 次重复结果的标准差(STD = 0.63)大于 0.50 外,其余样品重复测定值间的标准差均小于 0.50,说明样品检测的重复性较好,这与较高的扩增效率相符合;从变异系数发现本次检测过程中各样品测定值间的变异系数均较小,

说明本次 RT-qPCR 过程中样品处理较好或检测方法的重复性较高。

3 讨论

石蜡切片技术在植物科学研究领域扮演着十分重要的角色,通过结合乳酸酚棉蓝染液可以很好地研究植物组织内生真菌感染情况及微观分布形态。内生真菌广泛地存在于自然界高等植物与低等植物的根、茎秆、叶鞘、等器官和组织的细胞或细胞间隙^[18]。但在任何一种植物组织中都存在着一些无法通过人工培养条件培养出来的内生真菌,因此通过熟练的组织切片染色技术可以很好地检测植物组织带菌情况,从而更客观地评价植物内生真菌多样性并认识内生真菌在宿主组织细胞间的自然生长状况。

研究植物组织内生真菌显微分布形态有助于阐明内生真菌定殖组织、入侵通路、生态位的竞争以及共生关系等机制。本研究为了更好地观察到小花棘豆和变异黄芪各组织中内生真菌的组织分布情况以及显微形态特征,在植物样品采集后立即装入 FAA 固定液中,通过抽真空使固定液充分渗入组织达到更好地杀死组织细胞。在制作疯草植物组织石蜡切片时,对不同植物及组织的脱水、透明、切片厚度、染色时间等进行了大量摸索,而且为了很好地观察内生真菌菌丝体在植物细胞间的自然分布形态,切片时均选择与组织细胞或纤维长轴平行切面进行。观察发现,种子中内生真菌主要定殖于种皮栅栏组织与薄壁组织两层的细胞间隙,这与 Oldrup 等^[19]在斑荚黄芪 (*Astragalus lentiginosus*) 中发现的结果一致;叶片中主要定殖于靠近气孔的表皮细胞层,茎髓中内生真菌围绕于茎髓质维管束纵轴边缘的薄壁细胞层中,这与周启武等^[20]通过临时装片技术观察到的结果相符。

虽然我国疯草内生真菌的研究还处于起步阶段,但已涉及疯草内生真菌的分离鉴定^[21-22]、活性功能菌株的筛选^[23-26]、功能菌株发酵培养条件的优化^[27-28]以及疯草内生真菌与宿主植物间相互作用关系^[29-31]等方面的研究。2010年,Cook 等^[17]首次

建立了 RT-qPCR 检测疯草内生真菌的方法,并测定了我国内蒙古小花棘豆中内生真菌含量同时与苦马豆素浓度进行了比较^[32]。除此之外,我国尚未报道过实时荧光定量 PCR 技术检测疯草内生真菌的研究。

本研究选取 *U. oxytropis* 真菌特异性引物,成功建立了 RT-qPCR 技术对我国小花棘豆和变异黄芪各组织中产苦马豆素内生真菌 (*U. oxytropis*) 含量进行了测定分析,检测限达到 0.029 pg/ng 总 DNA。此方法具有灵敏度高、特异性强、重复性好等特点,可信性优于组织分离法和染色法。本试验以小花棘豆和变异黄芪植株各组织为研究对象,分别从各采样点随机选取 3 个重复植株进行内生真菌检测,发现被检组织中均存在内生真菌,且两个采样点小花棘豆内生真菌含量均为种子最高,叶和茎相反,这可能与内生真菌借助种子发芽后通过种皮进行垂直传播的方式有关,但总体上银川采样点小花棘豆各组织内生真菌含量均比巴彦浩特采样点小花棘豆相应组织高;两个采样点变异黄芪内生真菌含量组织分布种子均为最高,根最低,这可能说明变异黄芪组织中的内生真菌主要来源或寄生于种子中,叶和茎正好相反,且叶中内生真菌的菌丝体分布特点与小花棘豆叶片中内生真菌的菌丝分布明显不同,有可能与两者叶片结构相差较大有关,但总体上敖伦布拉格镇变异黄芪各组织内生真菌含量均高于吉兰泰镇变异黄芪的相应组织。

参考文献

- [1] Stegelmeier BL, Lee ST, James LF, Gardner DR, Panter KE, Ralphs MH, Pfister JA. The comparative pathology of locoweed poisoning in livestock, wildlife and rodents. // Panter KE, Wierenga TL, Pfister JA. ed. *Poisonous Plant: Global Research and Solutions*. Wallingford (UK): CAB International, 2007: 359-365.
- [2] Rong J, Lu H, Zhao B, Wang Z, Lu W, Ma Y, Li R. An overview of poisonous plants and their effects on animal husbandry in the united states. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(17): 3633-3644. (in Chinese)
荣杰,路浩,赵宝玉,王占新,卢围,马尧,李蓉. 美国有毒植物概述及其对畜牧业生产的影响. *中国农业*

- 科学, 2010, 43(17): 3633-3644.
- [3] Zhou Q, Zhao B, Lu H, Wang S, Zhang L, Wen W, Yang X. Research and control situation of ecology and animal poisoning of locoweed in western natural grassland of China. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(6): 1280-1296. (in Chinese)
周启武, 赵宝玉, 路浩, 王姗姗, 张樑, 温伟利, 杨晓雯. 中国西部天然草地疯草生态及动物疯草中毒研究与防控现状. 中国农业科学, 2013, 46(6): 1280-1296.
- [4] Hu Y, Liu L, Liu P, Wang J. An overview of ecological research on locoweed. *Progress in Veterinary Medicine*, 2011, 32(3): 108-112. (in Chinese)
胡延春, 刘玲, 刘鹏, 王建华. 疯草的生态学研究概况. 动物医学进展, 2011, 32(3): 108-112.
- [5] 卢萍. 内蒙古三种棘豆属植物中苦马豆素相关因子的研究. 内蒙古农业大学学位论文, 2007.
- [6] Guo L. 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.
- [7] Zhou Q, Bai S, Lu H, Zhao B, Chen J. 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.
- [8] Gardner DR, Romero J, Ralphs MH, Creamer R. Correlation of an endophytic fungus (*Alternaria* spp.) with the presence of swainsonine in lambert locoweed (*Oxytropis lambertii*). *Poisonous Plants and Related Toxins*, 2004: 32-37.
- [9] Castillo AM, Mario H, Márquez R, Carlos R, Morales NJ, Santos S. Germination of locoweed seed (*Astragalus mollissimus* Torr) at different temperatures ranges and water stress levels. *Tecnica Pecuaria En Mexico*, 2003, 41(1): 85-89.
- [10] Braun K. Fungal endophyte infection and swainsonine toxicity in locoweed. MS Thesis, New Mexico State University, 1999.
- [11] Braun K, Romero J, Liddell C, Creamer R. Production of swainsonine by fungal endophytes of locoweed. *Mycological Research*, 2003, 107(8): 980-988.
- [12] Gardner DR, Molyneux RJ, Ralphs MH. Analysis of Swainsonine: Extraction methods, detection and measurement in population of locoweeds (*Oxytropis* spp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 49: 4573-4580.
- [13] Mclain-Romero J, Creamer R, Zepeda H, Strickland J, Bell G. The toxicosis of *Embellisia* fungi from locoweed (*Oxytropis lambertii*) is similar to locoweed toxicosis in rats. *Journal of Animal Science*, 2004, 82: 2169-2174.
- [14] 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.
- [15] Cook D, Gardner DR, Ralphs MH, Pfister JA, Welch KD, Green BT. Swainsonine concentrations and endophyte amounts of *Undifilum oxytropis* in different plant parts of *Oxytropis sericea*. *Journal of Chemical Ecology*, 2009, 35(10): 1272-1278.
- [16] 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(4): 1281-1287.
- [17] Cook D, Gardner DR, Welch KD, Roper JM, Ralphs MH, Pfister JA, Green BT. Quantitative PCR method to measure the fungal endophyte in locoweeds. *Agriculture and food Chemistry*, 2009, 57: 6050-6054.
- [18] Tiina R, Sannakajsa MV, Tero T, Matti H, Michael M, Taina P. Endophyte communities vary in the needles of Norway spruce clones. *Fungal Biology*, 2013, 117(3): 182-190.
- [19] 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.
- [20] Zhou Q, Lu H, He P, Yan D, Zhao B, Zhang L, Wen W, Yang X. Distribution characteristics of endophytic fungi from *Oxytropis glabra* DC. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(5): 478-485. (in Chinese)
周启武, 路浩, 何平, 严杜建, 赵宝玉, 张樑, 温伟利,

- 杨晓雯. 小花棘豆(*Oxytropis glabra* DC.) 内生真菌的分布特点. 微生物学报, 2013, 53(5): 478-485.
- [21] Lu H, Ma Y, Zhao B, Lai H, Li R, Lu W, Rong J. Isolation and identification of endophytic fungus from *Oxytropis deflexa*. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2010, 41(7): 902-908. (in Chinese)
- 路浩, 马尧, 赵宝玉, 来航线, 李蓉, 卢围, 荣杰. 急弯棘豆内生真菌的分离与鉴定. 畜牧兽医学报, 2010, 41(7): 902-908.
- [22] Huo H, Lu P, Niu Y, Lv G, Li S, Gao J, Qian Y. 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.
- [23] Yu Y, Wang J, Zhao Q, Song Y, Zhang Z, Cui Z, Geng G, Li Q. Isolation and identification of swainsonine-producing fungal endophyte from *Oxytropis kansuensis*. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2009, 37(2): 40-46. (in Chinese)
- 余永涛, 王建华, 赵清梅, 宋毓民, 张志敏, 崔忠华, 耿果霞, 李勤凡. 甘肃棘豆中产苦马豆素内生真菌的分离与鉴定. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2009, 37(2): 40-46.
- [24] Yu Y, Wang J, Wang Y, Song Y, Geng G, Li Q. Identification of swainsonine-producing fungal endophytes from three species of locoweeds in Tibet. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(10): 3662-3671. (in Chinese)
- 余永涛, 王建华, 王妍, 宋毓民, 耿果霞, 李勤凡. 西藏 3 种疯草中合成苦马豆素内生真菌的鉴定. 中国农业科学, 2009, 42(10): 3662-3671.
- [25] Ma Y, Lu H, Zhao B, Lai H, Li R, Wang Z, Chen J, Lu W, Rong J. Screening and identification of swainsonine-secreting fungal. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2010, 41(5): 621-629. (in Chinese)
- 马尧, 路浩, 赵宝玉, 来航线, 李蓉, 王占新, 陈基萍, 卢围, 荣杰. 产苦马豆素真菌的筛选与鉴定. 畜牧兽医学报, 2010, 41(5): 621-629.
- [26] Lu W, Lu H, Zhao B, Rong J, Chen J, Wang R, Gao W, Chen Z. Screening and identification of swainsonine-producing endophytic fungi from *oxytropis flabra*. *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.
- [27] Guo W, Li Q, Kong X, Ren J, Jin X. Optimization of fermentation conditions for producing SW by *Undifilum oxytropis* FEL3. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2011, 39(8): 34-38. (in Chinese)
- 郭伟, 李勤凡, 孔祥雅, 任杰, 荆新堂. 埃里格孢菌 FEL3 产 SW 发酵培养条件的优化. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2011, 39(8): 34-38.
- [28] He S, Lu P, Bao R. Optimization of solid culture conditions of fungal endophytes isolated from *Oxytropis glabra*. *Journal of Inner Mongolia Normal University (Natural Science Edition)*, 2012, 41(1): 105-108. (in Chinese)
- 何珊, 卢萍, 包睿媛. 小花棘豆(*Oxytropis glabra*) 内生真菌固体培养条件优化研究. 内蒙古师范大学学报(自然科学汉文版), 2012, 41(1): 105-108.
- [29] 程翠. 小花棘豆内生真菌及其与幼苗抗性关系的研究. 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2009.
- [30] 钱亚光. 四个种群小花棘豆内生真菌与苦马豆素关系的研究. 内蒙古师范大学硕士学位论文, 2011.
- [31] 高薪磊. 小花棘豆内生真菌 *Undifilum oxytropis* 与苦马豆素关系研究. 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2011.
- [32] 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.

Microscopic distribution and quantitative detection of endophytic fungus *Undifilum oxytropis* from *Oxytropis glabra* DC and *Astragalus variabilis*

Qiwu Zhou¹, Longfeng Yu¹, Hao Lu², Dandan Cao², Baoyu Zhao^{2*}

¹Department of Agriculture, Lincang Teachers' College, Lincang 677000, Yunnan Province, China

²College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China

Abstract [Objective] The characteristics of microscopic distribution and content of *Undifilum oxytropis* were observed and quantified in different tissues of *Oxytropis glabra* and *Astragalus variabilis* from natural grasslands of Inner Mongolia and Ningxia Province. **[Methods]** Distribution of fungal endophyte was obtained in all the tissues (stems, leaves, seeds and roots) of *O. glabra* and *A. variabilis* though paraffin section and staining method of lactic acid phenol cotton blue; and content of fungal endophyte was determined though Real time-qPCR. **[Results]** Endophytic fungi were observed mainly within the gap between the palisade tissue and parenchymatous tissue of seed coat in seed, mainly colonized in the superficial cells layer near stoma in the leaves, and in pith of stem mainly plants in the parenchymatous tissue around the edge of the vertical axis of the vascular bundle. There was an obviously difference in concentration of *U. oxytropis* in the plants collected in different locations. The content of *U. oxytropis* was highest in all seeds of *O. glabra*, while it was opposite in stems and leaves of two sampling points. Similarly, the content of *U. oxytropis* was highest in seeds, it was lowest in roots, and stems and leaves were opposite in *A. variabilis* from two sampling points. The detection limit was 0.029 pg/ng total DNA by Real time-qPCR. **[Conclusion]** When endophytic fungi infected the tissues of plants, there was selectivity to the tissues and cell type of host, and the colonization and distribution were influenced by habitats in fungal endophytes of locoweeds.

Keywords: *Oxytropis glabra* DC, *Astragalus variabilis*, locoweed, endophytic fungi, microscopic distribution, real-time qPCR

(本文责编: 王晋芳)