

甘肃棘豆中产苦马豆素内生真菌的分离与鉴定

余永涛¹, 王建华¹, 赵清梅², 李海利¹, 宋毓民¹, 王妍¹,
张志敏¹, 崔忠华¹, 耿果霞¹, 李勤凡¹

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 2 北方民族大学 生命科学与工程学院, 宁夏 银川 750021)

【摘要】【目的】确定甘肃棘豆中是否存在产生苦马豆素(SW)的内生真菌。【方法】对甘肃棘豆的内生真菌进行分离,应用薄层色谱法和气相色谱-甲基化- α -D-甘露糖苷内标法分别对菌丝中 SW 进行检测,筛选可生成 SW 的疯草内生真菌;通过形态学观察,应用聚合酶链反应对 5.8S rDNA-ITS 序列进行扩增,并对扩增序列进行分析,构建系统发育树,对其进行种属分类。【结果】筛选出 1 种可以产生 SW 的甘肃棘豆内生真菌 FEL3,气相色谱内标法测得其菌丝中 SW 含量为 400.52 $\mu\text{g/g}$ 。根据形态学、5.8S rDNA-ITS 序列分析结果和文献报道,确定 FEL3 为埃里格孢属真菌。【结论】甘肃棘豆中存在生成 SW 的内生真菌 *Embellisia* sp. FEL3。

【关键词】 甘肃棘豆;苦马豆素;内生真菌;埃里格孢属

【中图分类号】 Q949.32

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)02-0040-07

Isolation and identification of swainsonine-producing fungal endophyte from *Oxytropis kansuensis*

YU Yong-tao¹, WANG Jian-hua¹, ZHAO Qing-mei², LI Hai-li¹, SONG Yu-min¹,
WANG Yan¹, ZHANG Zhi-min¹, CUI Zhong-hua¹, GENG Guo-xia¹, LI Qin-fan¹

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Life Sciences and Engineering, North University for Nationalities, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

Abstract: 【Objective】 The study was to confirm whether *Oxytropis kansuensis* is infected by the swainsonine-producing fungal endophyte. 【Method】 One of the main locoweeds in China was assessed for endophytic fungi. The chemical composition of isolated fungus were detected by thin-layer chromatography and gas chromatography-methyl- α -D-mannopyranoside internal standard method. In addition to observing the morphology of swainsonine-producing fungal endophyte, we analysed the 5.8S rDNA-ITS sequence of the fungi that was amplified by polymerase chain reaction. Depending on the analyzed result of the sequence, the phylogenetic tree was established based on the morphology, the phylogenetic tree and documents. 【Result】 A species of fungal endophyte that producing swainsonine, FEL3, was determined. FEL3 was identified as *Embellisia* sp. FEL3. 【Conclusion】 This is the first report about swainsonine-producing fungal endophyte from *Oxytropis kansuensis*.

Key words: *Oxytropis kansuensis*; swainsonine; fungal endophyte; *Embellisia*

苦马豆素(Swainsonine, SW)是一种有毒生物碱,化学名为 1,2,8-三羟基吡啶里西啶,是由 Coleg-

* [收稿日期] 2008-04-15

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30871901,30571315)

[作者简介] 余永涛(1980-),男,宁夏平罗人,在读博士,主要从事动物中毒病与免疫毒理学研究。

[通信作者] 王建华(1948-),男,河南南阳人,教授,博士生导师,主要从事动物中毒性与营养代谢性疾病研究。

E-mail:jhwang1948@sina.com

ate 等^[1] 1979 年从澳大利亚有毒植物灰苦马豆 (*Swainsina canescens*) 中分离得到。SW 是疯草 (豆科黄芪属和棘豆属的有毒植物) 的主要毒性成分^[2-5], 可抑制哺乳动物细胞的溶酶体 α -甘露糖苷酶和高尔基体甘露糖苷酶 II 的活性, 导致低聚糖代谢和糖蛋白合成障碍^[6-7], 从而引起动物组织器官功能紊乱。动物采食疯草后, 会发生中毒, 导致大批家畜死亡, 给畜牧业造成巨大损失。除疯草中含有苦马豆素外, 人们从豆类丝核菌 (*Rhizocroniu legumicola*)、金龟子绿僵菌 (*Metarhizium anisopliae*) 等真菌的代谢产物中也分离到 SW^[8-10]。Harris 等^[11] 将疯草 *Astragalus oxyphysus* 的化学成分与豆类丝核菌的代谢产物进行了比较, 发现这种疯草中的 2 种化学物质与豆类丝核菌合成苦马豆素的前体物质相同, 提出疯草中苦马豆素的产生可能是由于疯草感染豆类丝核菌或类似的微生物所致。Braun 等^[12] 从美国疯草中分离到可以产生苦马豆素的内生真菌—*Embellisia* sp., 并证明疯草中苦马豆素的含量和内生真菌感染的程度相关。以上研究结果为人们提出了新的问题: 疯草中苦马豆素是由其寄生的内生真菌单独生成的, 还是由疯草的植物细胞和内生真菌共同生成的。该问题的解答将为从根本上防治动物疯草中毒病提供科学依据。

Wang 等^[13] 从我国重要疯草——甘肃棘豆中分离到一种内生真菌——*Embellisia oxytropis*, 与 Braun 等^[12] 在美国疯草中发现的内生真菌形态相似, 同为一属, 但未对其代谢产物进行研究。中国疯草中是否存在能够合成苦马豆素的内生真菌, 目前还未见报道。为此, 本研究对甘肃棘豆中的内生真菌进行了分离, 筛选出能够合成苦马豆素的内生真菌, 并对其进行了种属分类, 以期研究甘肃棘豆中苦马豆素的合成机制提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 植物材料 盛花期健康的全株甘肃棘豆, 2007-07 采于甘肃省天祝藏族自治州乌鞘岭, 采集后于 12 h 内进行内生真菌的分离。

1.1.2 仪器与试剂 苦马豆素 (SW) 标准品, 由西北农林科技大学动物医学院生物毒素与分子毒理学实验室提供; 甲基化- α -D-甘露糖苷 (me-Gal) 和双 (三甲基硅烷基) 三氟乙酰胺 (BSTFA) + 三甲基氯硅烷 (TMCS), 均购自美国 SIGMA 公司; DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、DNA 聚合酶、T

载体等分子生物学试剂, 均购自 TaKaRa 公司; AG 50W 树脂, 购自美国 BIO-RAD 公司; 有机试剂均为国产色谱纯或分析纯。

1.2 产苦马豆素内生真菌的分离

1.2.1 植物材料表面的消毒 用去离子水洗去甘肃棘豆表面的尘土, 用灭菌镊子将植物的叶、茎、花分离, 然后将叶、茎、花分别用纱布包扎, 进行表面消毒。表面消毒的程序为: 首先, 用体积分数为 70% 的乙醇浸泡 30 s, 再用有效氯含量为 1% 的次氯酸钠溶液浸泡 3 min, 最后用灭菌的去离子水冲洗 2 次, 每次 1 min, 收集去离子水接种于新制的 PDA 或 Czapek 琼脂培养基表面, 观察 30 d, 确定该培养基表面是否有真菌生长, 以此来检验表面消毒的效果。

1.2.2 内生真菌的分离 用灭菌的滤纸吸去经表面消毒植物组织上的水分, 再用灭菌剪刀将叶、茎、花等分别剪成 3 mm 的组织块, 分别用灭菌镊子将各组织块接种于水琼脂培养基表面, 置培养箱中 18 $^{\circ}$ C 培养。待组织块周围长出适当大小的菌落时, 挑取边缘菌丝接种于 PDA 琼脂培养基表面, 置 18 $^{\circ}$ C 培养箱中培养。若在 PDA 琼脂培养基上生长的菌落仍未纯化时, 将其再次接种于新制的 PDA 琼脂培养基表面, 重复此操作过程, 直至得到纯化的菌株。将分离到的真菌编号, 分别接种于 PCA 斜面, 于 4 $^{\circ}$ C 中保存。

1.3 产苦马豆素内生真菌的筛选

1.3.1 植物材料及其内生真菌中 SW 的薄层色谱法检测 将甘肃棘豆样品和从甘肃棘豆中分离的真菌菌丝分别放入索氏提取器中, 用甲醇 (色谱纯) 70 $^{\circ}$ C 回流提取 24 h。将提取液浓缩挥干, 用去离子水溶解后, 加入 5 cm 长的 AG 50W 阳离子交换树脂柱。先用去离子水洗脱树脂柱, 再用氨水洗脱树脂柱, 收集氨水洗脱液, 并将其浓缩挥干, 然后用甲醇将其溶解, 制成待检液。将 SW 标准品、甘肃棘豆待检液、内生真菌菌丝待检液分别点样于硅胶薄层板上, 用 $V_{\text{氯仿}} : V_{\text{甲醇}} : V_{\text{氨水}} : V_{\text{水}} = 70 : 26 : 2 : 2$ 展开剂展开。待展开剂到达薄层板前沿时, 将其取出挥干溶剂, 先将 H_2O_2 喷洒于薄层板表面, 置 110 $^{\circ}$ C 加热 10 min; 接着喷洒醋酐, 置 110 $^{\circ}$ C 加热 10 min; 再喷洒 Ehrlich's 试剂, 置 110 $^{\circ}$ C 加热 10 min, 最后观察待检样品在薄层板上的位移和斑点颜色, 若具有与 SW 标准品颜色和位移相同的斑点, 即可初步确定其对应的内生真菌能够产生 SW。

1.3.2 植物材料及其内生真菌中 SW 的气相色谱法检测 准确称取一定量的 SW 标准品,用吡啶配制成系列质量浓度的标准品溶液。精确量取 100 μL 各标准品溶液,分别加入 20 μL 1 mg/mL 的内标(甲基化- α -D-甘露糖苷)吡啶溶液,混匀,再加入硅烷化(BSTFA+TMCS)试剂,室温反应 1 h,SW 标准品溶液的终质量浓度分别为 3.125,1.562 5,0.625,0.312 5,0.125,0.062 5,0.025,0.012 5 和 0.005 g/L,依次进行气相色谱分析。色谱条件为:GC-14C(日本岛津公司),威玛龙色谱工作站,SE54 石英毛细管柱(30 m \times 0.25 mm \times 0.33 μm),柱温 200 $^{\circ}\text{C}$,进样口温度 300 $^{\circ}\text{C}$,氢火焰离子化检测器(FID)温度 280 $^{\circ}\text{C}$,载气为氮气,流速为 2 mL/min,进样 1 μL ,分流比 60:1。以标准样品中 SW 的峰面积和内标峰面积之比为横坐标 x 、以 SW 的质量浓度(g/L)为纵坐标 y ,绘制标准曲线。将 1.3.1 中制备的植物样品待检液和经薄层色谱初步确定能够生成 SW 的内生真菌待检液离心,除去不溶物后挥干,用吡啶溶解,然后同上法依次加入内标溶液和硅烷化试剂进行气相色谱分析。若样品溶液经气相色谱分离后出现与标准品中 SW 色谱峰保留时间相同的峰,即可确定样品溶液中含有 SW,然后根据标准曲线方程,计算样品溶液中 SW 含量。

1.4 产苦马豆素内生真菌的形态学观察

将 1.3 中筛选得到的产苦马豆素内生真菌接种于 PCA 平板上,置 18 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 30 d,记录菌落的颜色、形状、气生菌丝的疏密程度,并挑取少许菌丝于载玻片上,以水或棉兰乳酸酚作浮载剂,观察并记录真菌的分生孢子梗及其分生孢子形态,测量分生孢子大小。

1.5 rDNA-ITS 序列分析

1.5.1 真菌基因组 DNA 的提取 刮取 PDA 培养基表面生长 2 个月的产 SW 内生真菌菌丝,液氮研磨,然后用 TaKaRa 公司提供的 DNA 提取试剂盒提取真菌基因组 DNA,用 Biophotometer 测定提取的 DNA 浓度。

1.5.2 5.8S rDNA-ITS 片段的扩增与核苷酸序列的测定 采用引物 ITS1 和 ITS4^[13] 扩增内部转录间隔区(ITS),该区域包括 ITS1、5.8S rDNA、ITS2 的全部序列,以及 18S rDNA、28S rDNA 的部分序列。PCR 反应体系为 50 μL :TaKaRa Taq 2.5 U,10 \times PCR Buffer 5 μL ,MgCl₂ 3 μL ,dNTP 4 μL ,ITS1 和 ITS2 引物各 2 μL ,模板 DNA 0.5 μL ,加双蒸水至 50 μL 。反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;95

$^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,30 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延长 10 min 使其完全反应。将 PCR 产物加入 15 g/L 琼脂糖凝胶中电泳,5.8S rDNA-ITS 序列的长度一般为 500~700 bp。电泳后,将扩增所得的 5.8S rDNA-ITS 片段切下,用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收。将回收的 5.8S rDNA ITS 片段与 T 载体(TaKaRa pMD19-T Vector)连接,再将连接复合物转化 DH5 α 型感受态大肠杆菌。转化后的 DH5 α 型感受态大肠杆菌涂布于含有 Amp、IPTG、X-gal 的 LB 琼脂培养基表面,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24 h,挑取白色的单个菌落进行菌落 PCR,反应体系和条件同上。若菌落 PCR 产物经凝胶电泳后,出现 5.8S rDNA-ITS 对应条带,将该单个菌落接种于 LB 液体培养基中培养过夜,用 TaKaRa Min-BEST Plasmid Purification 质粒提取试剂盒提取含有 5.8S rDNA-ITS 片段的质粒。提取的质粒经适当稀释后,用 BigDye Terminator v3.1 测序试剂盒扩增目的片段,引物为 M13-47。扩增产物经纯化后,在 ABI PRISM 3730XL 序列分析仪上进行序列测定。

登录 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>,用 BLAST,将测定的 5.8S rDNA-ITS 序列与 GenBank 中的 5.8S rDNA-ITS 序列进行同源性比较,以假球壳科(Pleosporaceae)的链格孢属(*Alternaria*)、匍柄霉属(*Stemphylium*)、假格孢属(*Nimbya*)、埃里格孢属(*Embellisia*)、细基格孢属(*Ulocladium*)、突脐蠕孢属(*Exserohilum*)、平脐蠕孢属(*Bipolaris*)、弯孢属(*Curvularia*)、内脐蠕孢属(*Drechslera*)等菌株序列构建系统发育树。应用 ClustalX 1.83 version 和 MEGA 4.0 软件,采用邻接法(Neighbor-joining, NJ)构建系统发育树,自展法检测发育树,自展数据集为 1 000 次。

1.5.3 产苦马豆素内生真菌的分类 根据内生真菌的形态学观察结果,以及由 5.8S rDNA-ITS 序列构建的系统发育树,并结合参考文献报道,对该内生真菌进行分类。

2 结果与分析

2.1 产苦马豆素内生真菌的分离

在甘肃棘豆的叶、茎、花中共分离到 7 种真菌,通过薄层色谱法对这 7 种真菌菌丝中的 SW 进行分析,其中 FEL3 的菌丝提取物经薄层色谱分析,出现与 SW 标准品颜色和位移相同的紫色斑点(图 1),初步确定 FEL3 的菌丝中含有 SW。

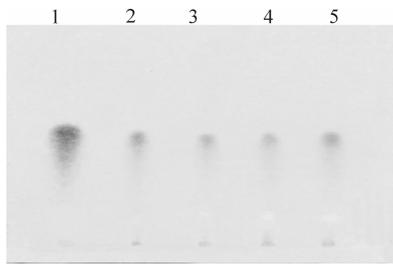


图 1 产苦马豆素内生真菌的筛选结果

1. 苦马豆素标准品;2~3. 甘肃棘豆提取物;
4~5. 内生真菌 FEL3 菌丝提取物

Fig. 1 Screening of swainsonine-producing fungal endophyte

1. SW;2-3. The extraction from *Oxytropis kansuensis*;
4-5. The extraction from endophyte FEL3

以标准样品中 SW 的峰面积和内标峰面积之比为横坐标(x)、以 SW 的质量浓度(g/L)为纵坐标(y)绘制标准曲线,得到标准曲线方程 $y = 0.2648x + 0.0166$ ($R^2 = 0.9987$),说明当 SW 的质

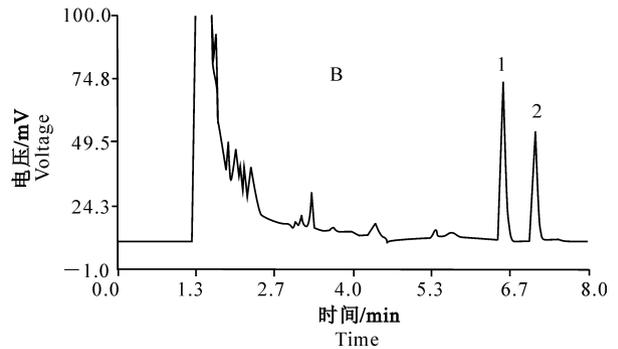
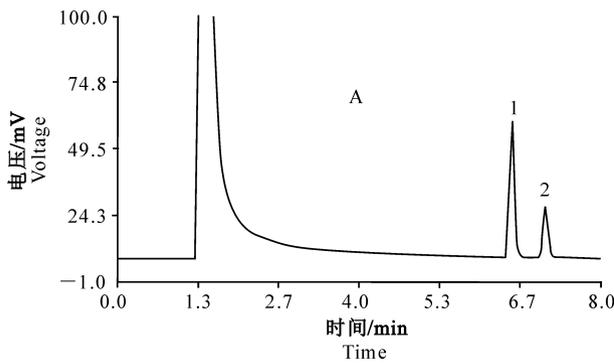


图 3 甘肃棘豆内生真菌 FEL3 提取物的气相色谱图

A. 苦马豆素标准品气相色谱图;B. 甘肃棘豆内生真菌 FEL3 提取物的气相色谱图;1. 内标峰;2. 苦马豆素峰

Fig. 3 GC chromatogram of extraction from endophyte FEL3

A. The GC chromatogram of SW;B. The GC chromatogram of extraction from endophyte FEL3;1. The chromatographic peak of internal standard substance;2. The the chromatographic peak of SW

2.2 产苦马豆素内生真菌的形态特征

FEL3 在水琼脂、PDA、PCA、Czapek 等培养基上生长非常缓慢,其生长速度分别为 0.17, 0.33, 0.40 和 0.30 mm/d。在 PDA、PCA、Czapek 等培养基上,随着培养时间的延长,菌落逐渐由白色变为黄褐色、黑褐色、黑色,菌落呈绒状,中央凸起,气生菌丝较密集(图 4A)。分生孢子稀少,单个散在分布,形态、大小不一,多数呈直的圆柱形,少数呈卵圆形,有的呈膝状弯曲;分生孢子呈褐色,边缘光滑,具有暗色的横隔膜,横隔膜数为 1~4,无纵膈,孢子大小为 $20 \sim 60 \mu m \times 6 \sim 10 \mu m$ (图 4B、4C)。

量浓度在 0.012 5~1.562 5 g/L 时,SW 的质量浓度与 SW 峰面积和内标峰面积的比值呈良好的线性关系(图 2)。FEL3 菌丝待检液经气相色谱分离后,出现与标准品中 SW 色谱峰保留时间相同的峰(图 3),说明 FEL3 的菌丝中含有 SW,根据标准曲线方程得出 FEL3 菌丝中 SW 的含量为 $400.52 \mu g/g$ 。

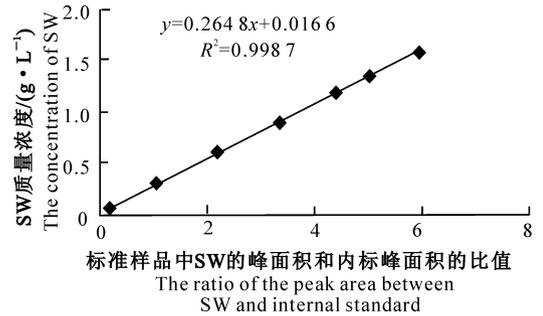


图 2 苦马豆素的内标标准曲线

Fig. 2 Internal standard curve of SW

2.3 产苦马豆素内生真菌 FEL3 的 5.8S rDNA-ITS 序列分析

应用通用引物 ITS1 和 ITS4 扩增的片段,经凝胶电泳分离可知,所扩增的片段长度约为 600 bp(图 5),该片段包括 ITS1、5.8S rDNA、ITS2 的全部序列和 18S rDNA、28S rDNA 的部分序列。

核苷酸序列测定结果显示,FEL3 的扩增片段长度为 602 bp,5.8S rDNA-ITS 序列的 GenBank 登录号为 EU604066,其 31~547 bp 为 5.8S rDNA-ITS 序列。BLAST 比对结果显示,FEL3 与 *Embelisia* sp. L12 的同源性高达 99%,仅有 2 个位点核苷酸不同,变异部位分别位于 ITS1 区和 5.8S rD-

NA 区,与链格孢属(*Alternaria*)、埃里格孢属(*Embellisia*)、细基格孢属(*Ulocladium*)等属的一些种同源性也在 95% 以上。对 FEL3 与链格孢属(*Alternaria*)、匍柄霉属(*Stemphylium*)、假格孢属(*Nimbya*)、埃里格孢属(*Embellisia*)、细基格孢属(*Ulocladium*)、突脐蠕孢属(*Exserohilum*)、平脐蠕孢属(*Bipolaris*)、弯孢属(*Curvularia*)、内脐蠕孢属(*Drechslera*)等属 40 个序列进行系统发育分析,结果见图 6。由图 6 可以看出,系统发育树分成 A、B、

C、D 4 个大组:*Alternaria*、*Embellisia*、*Ulocladium*、*Nimbya* 构成一个较大的复合组 A;*Drechslera* 和 *Stemphylium* 分别构成 B、C 组;*Exserohilum*、*Bipolaris*、*Curvularia* 构成 D 组。其中甘肃棘豆内生真菌 FEL3 与 *Embellisia* sp. L12 的遗传距离最近,与 *Embellisia*、*Alternaria*、*Ulocladium* 等属中的一些成员的遗传关系较近,而与 *Drechslera*、*Stemphylium*、*Exserohilum*、*Bipolaris*、*Curvularia* 等属的遗传关系较远。

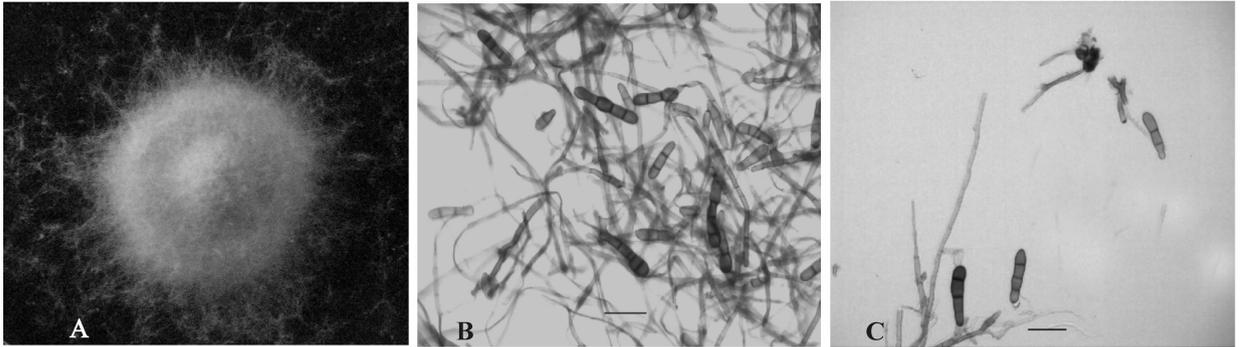


图 4 产苦马豆素内生真菌 FEL3 的形态特征(标尺长度为 50 μm)

A. FEL3 的菌落;B~C. FEL3 的菌丝及分生孢子

Fig. 4 Morphological characteristics of swainsonine-producing fungal endophyte FEL3(Bars=50 μm)

A. The colony of FEL3;B-C. The conidiophores of FEL3

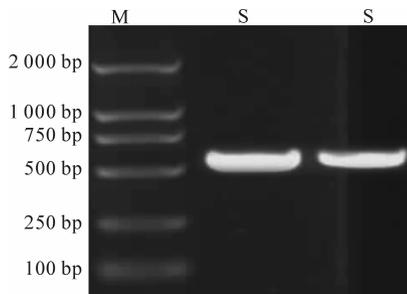


图 5 甘肃棘豆内生真菌 LEF3 5.8S rDNA-ITS 序列扩增片段的凝胶电泳分析

M. DL2000 Marker;S. FEL3 的 5.8S rDNA-ITS 序列的扩增片段

Fig. 5 Agarose electrophoresis of amplified 5.8S rDNA-ITS region from fungal endophyte FEL3, endophyte from *Oxytropis kansuensis* by PCR method

M. DL2000 Marker;S. The amplified 5.8S rDNA-ITS region of FEL3

3 讨论

甘肃棘豆是我国的重要疯草之一,主要分布于甘肃、青海、西藏等省区,可引起放牧牲畜中毒,严重危害西部地区畜牧业的发展。童德文等^[14]从甘肃棘豆中分离到 SW,确定 SW 为甘肃棘豆的主要毒

性成分,但对 SW 在甘肃棘豆中的合成机理仍未阐明。Braun 等^[12]从美国的一些棘豆属和黄芪属疯草中分离到可以生成 SW 的内生真菌 *Embellisia* sp.,发现分离到该真菌的疯草的 SW 含量显著高于未分离到这种真菌的疯草,认为疯草中 SW 的含量一部分是由该内生真菌来控制的。Wang 等^[13]从甘肃棘豆中分离到 1 种内生真菌 *Embellisia oxytropis*, Li 等^[15]从直立黄芪中分离到 1 种病原真菌 *Embellisia astragali*,这 2 种真菌的形态与 Braun 等^[12]分离到的产 SW 内生真菌相近,但未检测其菌丝中是否含有 SW,目前还未见中国疯草内生真菌产生 SW 的报道。

本研究对甘肃棘豆的内生真菌进行了分离和筛选,首次证实甘肃棘豆中存在可以产生 SW 的内生真菌 FEL3。FEL3 的分生孢子具有明显的横隔,无纵膈,其形态与埃里格孢属(*Embellisia*)真菌^[16-19]最为相似,其分离方法、培养特性和分生孢子的形态,与 Braun 等^[12]、Wang 等^[13]报道的疯草内生真菌 *Embellisia* sp. 和 *Embellisia oxytropis* 相近。根据 5.8S rDNA-ITS 序列构建的系统发育树,FEL3 与埃里格孢属、链格孢属、假格孢属、细基格孢属同为一组,与埃里格孢属的进化关系较近,其中与

Braun 等^[12]分离的产 SW 内生真菌 *Embellisia* sp. L12 最近,自检支持率(bootstrap)高达 98%。根据分离方法、培养特性、分生孢子的形态和系统发育分析,可以确定 FEL3 为埃里格孢属真菌。FEL3 与

Embellisia oxytropis 的分生孢子形态相似,但由于未研究 *Embellisia oxytropis* 的 5.8S rDNA-ITS 序列,故还不能确定 FEL3 就是 *Embellisia oxytropis*。

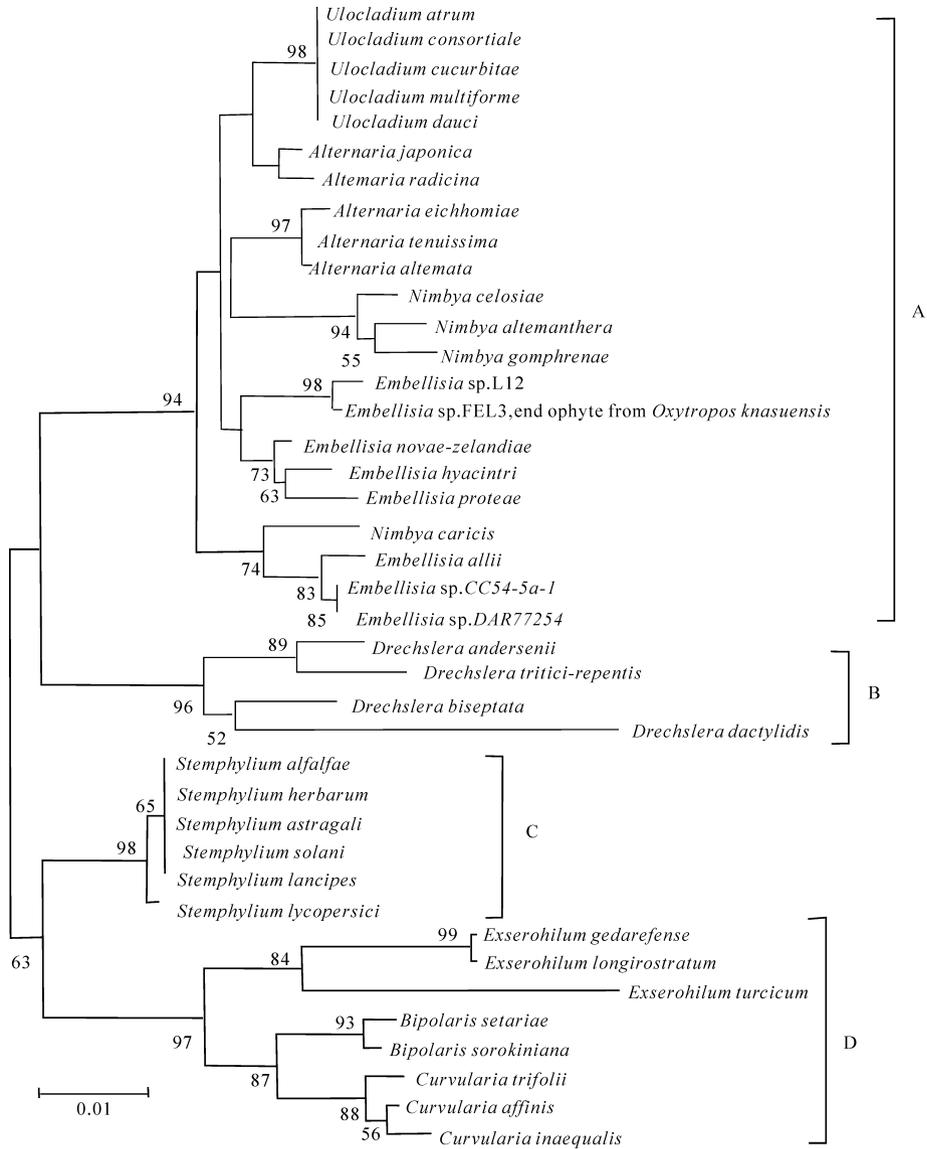


图 6 由 NJ 方法构建 5.8 S rDNA-ITS 序列的系统发育树

比例尺显示水平线的长度,代表碱基替换数;分支处数字为大于 50% 的 Bootstrap 值(1 000 次重复),代表分类单位被聚在一起的几率。

Fig. 6 Phylogenetic tree obtained from the program NJ(Neighbor-joining)

Horizontal branch lengths are drawn to scale and represent the expected number of substitutions;The numbers of nodes are bootstrap values greater than 50% frequencies and represent the percentages of 1 000 bootstrap replications in which the taxa to the right are placed together by the program NJ.

FEL3 与 Braun 等^[12]分离的产 SW 内生真菌 *Embellisia* sp. L12 的 5.8S rDNA-ITS 序列仅有 2 个核苷酸不同。从美国黄芪属疯草 *Astragalus mollissimus* 和棘豆属疯草 *Oxytropis lambertii* 中分别分离到的 *Embellisia* sp. 的 5.8S rDNA-ITS 序列也相差 3 个核苷酸, β -tublin 序列相差 1 个核苷

酸,其菌落的颜色亦有不同,说明从黄芪属和棘豆属疯草中分离的 *Embellisia* sp. 可能为不同的种或亚种^[12]。*Embellisia* sp.、FEL3 等疯草内生真菌是否为不同的种或亚种,还有赖于对其基因间隔区等变异较大序列的研究。

Braun 等^[12]利用酶法和气相色谱质谱联用法对

Embellisia sp. 菌丝中的 SW 进行分析,需要昂贵的试剂、设备和复杂的操作过程,本研究应用较为快捷的薄层色谱法对经过离子交换树脂处理过的真菌菌丝提取物进行检测,经薄层色谱法确定菌丝中含有苦马豆素后,即可应用气相色谱-甲基化- α -D-甘露糖苷内标法对其菌丝中的 SW 进行分析,根据样品色谱峰中是否具有与 SW 色谱峰保留时间相同的峰,来进一步确定样品中是否含有 SW。与酶法和气相色谱外标法相比,气相色谱内标法不受进样重复性和试验条件稳定性的影响,在没有自动进样器等条件时,其分析结果的精确性和准确性仍能得以保证^[20]。通过气相色谱内标法测得,甘肃棘豆内生真菌 *Embellisia* sp. FEL3 的菌丝中 SW 含量为 400.52 $\mu\text{g/g}$,表明 *Embellisia* sp. FEL3 承担着甘肃棘豆中 SW 的生物合成,但甘肃棘豆中的 SW 是由内生真菌 FEL3 单独合成,还是仅由其合成一部分;甘肃棘豆的植物细胞自身是否也可以合成 SW;其他微生物是否也参与 SW 的合成;甘肃棘豆中 SW 含量与内生真菌之间存在何种关系,这些问题仍有待进一步阐明。

据统计,我国有 30 余种疯草,广泛分布于西藏、新疆、青海、甘肃、宁夏、陕西及内蒙古等省(区),面积超过 1 100 万 hm^2 ^[21],除甘肃棘豆外,其他疯草中是否也存在能够生成 SW 的疯草内生真菌,疯草内生真菌与疯草中 SW 含量之间存在何种联系,这些问题的研究将为进一步阐明疯草中 SW 的合成机理提供了试验依据和基础,并为从根源上解决动物疯草中毒病提供新的思路。

致谢:感谢西北农林科技大学植物保护学院孙广宇教授、赵杰博士在甘肃棘豆内生真菌的分离和鉴定中,提供了宝贵的意见和支持。

[参考文献]

- Colegate S M, Dorling P R, Huxtable C R. A spectroscopic investigation of swainsonine; an α -mannosidase inhibitor isolated from *Swainsina canecens* [J]. Aust J Chem, 1979, 32: 2257-2264.
- Molyneux R J, James L F. Loco intoxication indolizidine alkaloids of spotted locoweed (*Astragalus lentiginosus*) [J]. Science, 1982, 216: 190-191.
- 曹光荣, 李绍君, 段得贤, 等. 黄花棘豆有毒成分的分离与鉴定 [J]. 西北农业大学学报, 1989, 17(3): 1-8.
Cao G R, Li S J, Duan D X. The isolation and identification of toxic componets from *Oxytropis ochrocephala* [J]. Journal of Northwest Agricultural University, 1989, 17(3): 1-8. (in Chinese)
- 李勤凡, 王建华, 李蓉, 等. 冰川棘豆生物碱分析及苦马豆素的分离、鉴定 [J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(12): 1339-1343.
Li Q F, Wang J H, Li R, et al. Detection of alkaloid and isolation of swainsonine from *Oxytropis glacialis* [J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2005, 36(12): 1339-1343. (in Chinese)
- 余永涛, 刘志滨, 赵兴华, 等. 毛瓣棘豆中苦马豆素的纯化与鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2006, 38(5): 1-3.
Yu Y T, Liu Z B, Zhao X H, et al. Purification and identification of swainsonine in the *Oxytropis serioopetala* C. R. C. Fisch [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2006, 38(5): 1-3. (in Chinese)
- Dorling P R, Huxtable C R, Colegate S M. Inhibition of lysosomal α -mannosidase by swainsonine, an indolizidine alkaloid isolated from *Swainsona canescens* [J]. Biochem J, 1980, 191: 649-651.
- Tulsiani D R P, Harris T M, Touster O. Swainsonine inhibits the biosynthesis of complex glycoproteins by inhibition of golgi mannosidase II [J]. JBC, 1982, 257(14): 7936-7939.
- Schneider M J, Ungemach F S, Broquist H P, et al. (1S, 2R, 8R, 8aR)-1, 2, 8-trihydroxyocta- hydroindolizidine (swainsonine), an α -mannosidase inhibitor from *Rhizocroniu leguminicola* [J]. Tetrahedron, 1983, 39: 29-32.
- 杨鸣琦, 曹光荣, 李绍君. 豆类丝核菌中苦马豆素的提取 [J]. 西北农业大学学报, 1998, 26(4): 87-90.
Yang M Q, Cao G R, Li S J. Abstraction of swainsonine from *Rhizoctonia leguminicola* [J]. Journal of Northwest Agricultural University, 1998, 26(4): 87-90. (in Chinese)
- Hino M, Nakayama, Tsurumi Y, et al. Studies of an immunomodulator, swainsonine. I. Enhancement of immune response by swainsonine *in vitro* [J]. The Journal of Antibiotics, 1985, 38(7): 926-935.
- Harris C M, Campbell B C, Molyneux R J, et al. Biosynthesis of swainsonine in the diablo locoweed (*Astragalus oxyphyrus*) [J]. Tetrahedron Letters, 1988, 29(38): 4815-4818.
- Braun K, Romero J, Liddell C, et al. Production of swainsonine by fungal endophytes of locoweed [J]. Mycol Res, 2003, 107(8): 980-988.
- Wang Q, Nagao H, Li Y L, et al. *Embellisia oxytropis*, a new species isolated from *Oxytropis kansuensis* in China [J]. Mycotaxon, 2006, 95: 255-260.
- 童德文, 曹光荣, 李绍君. 甘肃棘豆中苦马豆素的分离与鉴定 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2001, 29(3): 5-8.
Tong D W, Cao G R, Li S J. Isolation and identification of swainsonine from *Oxytropis kansuensis* Bunge [J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry: Natural Science Edition, 2001, 29(3): 5-8. (in Chinese)
- Li Y Z, Nan Z B. A new species, *Embellisia astragali* sp. nov., causing standing milk-vetch disease in China [J]. Mycologia, 2007, 99(3): 406-411.