

# 瑞香狼毒内生真菌的分离与鉴定

王欢, 路浩, 郭亚洲, 冯柯, 耿朋帅, 赵宝玉\*

(西北农林科技大学动物医学院, 杨凌 712100)

**摘要:** 为探明瑞香狼毒(*Stellera chamaejasme*)内生真菌的种类及其种属分布特点, 进一步揭示瑞香狼毒内生真菌与毒性物质合成、化感作用以及抗逆性形成之间的相互关系, 作者对采自4省5个地区瑞香狼毒的茎、叶、花部位进行内生真菌的分离和纯化, 通过形态学和分子生物学方法鉴定种属。结果表明, 瑞香狼毒中共分离到21株内生真菌, 19株菌分属7纲8目9科8属, 2株未鉴定种属, 所有从瑞香狼毒分离到的内生真菌中链格孢属(*Alternaria* sp.) 8株, 占总分离菌株的42%, 为瑞香狼毒的优势菌株, 除1株粪壳菌纲(*Sordariomycetes* sp.) 和8株链格孢属(*Alternaria* sp.) 外, 其余菌属均首次从瑞香狼毒中分离得到。

**关键词:** 瑞香狼毒; 内生真菌; 分离; 鉴定

中图分类号: S859.87

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)08-1696-08

## Isolation and Identification of Endophytic fungi from *Stellera chamaejasme*

WANG Huan, LU Hao, GUO Ya-zhou, FENG Ke, GENG Peng-shuai, ZHAO Bao-yu\*

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

**Abstract:** To explore the classes and distribution characteristics of endophytic fungi in *Stellera chamaejasme* and further explain the connection between fungal endophytes and the toxin synthesis, allelopathy and stress resistance formation, the endophytic fungi in the stems, leaves and flowers of *Stellera chamaejasme* were isolated, purified and identified through morphological and molecular methods. Among 21 isolates obtained from *Stellera chamaejasme*, 19 strains were identified to belong to 8 genera, 9 families, 8 orders and 7 classes, and 2 strains were unidentified. Eight strains of fungi were identified as *Alternaria* sp., and take 42% of all strains isolated and were the dominant fungal. Except for 1 *Sordariomycetes* sp. and 8 *Alternaria* sp., other species were all first isolated from *Stellera chamaejasme*.

**Key words:** *Stellera chamaejasme*; endophytic fungi; isolation; identification

瑞香狼毒(*Stellera Chamaejasme*)俗称断肠草、馒头花、红火柴头等, 属瑞香科狼毒属多年生草本植物, 在中国主要分布于东北、华北、西北及西南的草甸草地、典型草地、高寒草地以及荒漠草地<sup>[1]</sup>。一般情况下, 在适度放牧的草地, 瑞香狼毒在草地植物群落中以偶见种或伴生种存在, 而在放牧过度的退化草地常成为优势种。瑞香狼毒全草有毒, 其主要毒性成分为黄酮类化合物, 如狼毒素、异狼毒素

等, 人接触后会发生过过敏性皮炎, 家畜误食后产生腹痛、腹泻、卧地不起、全身痉挛等症状, 严重时虚脱或惊厥死亡<sup>[2]</sup>。宋晓平等<sup>[3]</sup>用瑞香狼毒中的黄酮类化合物对小鼠进行急性攻毒试验, 发现小鼠肝、肾和心肌等发生不同程度的病变。

植物内生真菌是一定阶段或全部阶段寄生于健康植物器官和组织内部的真菌, 普遍存在各种植物中。植物内生真菌能够产生多种次级代谢产物, 包

收稿日期: 2016-01-22

基金项目: 农业部“十二五”公益性行业(农业)科研专项(201203062)

作者简介: 王欢(1990-), 女, 山西运城人, 硕士生, 主要从事动物中毒病与毒理学研究, E-mail: wah2318@163.com

\* 通信作者: 赵宝玉(1964-), E-mail: zhaobaoyu12005@163.com

括抗生素、杀虫剂、植物生长调节剂<sup>[4]</sup>和抗肿瘤化合物等多种活性物质。有学者从银杏、杜仲等植物中分离到了多种能产生黄酮类化合物的内生真菌<sup>[5-6]</sup>。虽然杨国栋<sup>[7]</sup>和 H. Jin<sup>[8]</sup>等从瑞香狼毒中分离得到了一些子囊菌门和担子菌门的内生真菌,但有关瑞香狼毒内生真菌的种属分布特点及其多样性研究还鲜有开展。而且如前所述,瑞香狼毒的主要化学毒性成分也是黄酮类化合物,但是这些黄酮类化合物是由瑞香狼毒自体产生,还是其内部(与银杏和杜仲等植物相似)也具有产黄酮类化合物的内生真菌,目前尚未见报道。据此,作者对采自不同地区的瑞香狼毒内生真菌进行分离鉴定,旨在阐明瑞香狼毒内

生真菌的种类及其种属分布特点,以期为进一步探究瑞香狼毒中所含黄酮类化合物的生成与其内生真菌种属之间的关系,以及瑞香狼毒的化感毒性和抗逆性研究提供实验基础和理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 瑞香狼毒植物样品 2015 年 6—8 月间采自甘肃肃南县、甘肃天祝县、青海门源县、山西阳城县和陕西旬邑县,样品采集地信息见表 1。现场采集的瑞香狼毒样品放在装有变色硅胶的自封袋中保存备用。

表 1 瑞香狼毒植物材料信息与内生真菌分离结果

Table 1 Plants information of *Stellera chamaejasme* and isolation results of endophytic fungi

地点 Location	地理位置 Geographic sites	海拔 Latitude	分离部位 Plant tissue	菌株编号 Isolates number
甘肃肃南县 Sunan, Gansu	N38°29', E100°24'	2 500 m	茎,叶,花 Stem, leaf, flower	SC1L1-1, SC1L6-1, SC3S6-1, SC4L3-1, C5F2-1
甘肃天祝县 Tianzhu, Gansu	N36°58', E103°07'	2 600 m	茎 Stem	SC5S1-1
青海门源县 Menyuan, Qinghai	N37°57', E101°24'	2 700 m	叶,花 Leaf, flower	SC6F3-1, SC6F5-1, SC6L3-1, SC8L3-1
山西阳城县 Yangcheng, Shanxi	N3520', E112°13'	1 680 m	叶 Leaf	SY1L2-1, SC16L4-1, SC16L5-1
陕西旬邑县 Xunyi, Shaanxi	N3503', E108°32'	1 690 m	茎,叶,花 Stem, leaf, flower	SC10L2-1, SC12S1-1, SC13L2-1, SC13L5-1, SC13L5-2, SC13F1-1, SC13S1-1, SC15L2-1

1.1.2 培养基 PDA 双抗培养基:马铃薯 200 g · L<sup>-1</sup>,葡萄糖 20 g · L<sup>-1</sup>,琼脂 10 g · L<sup>-1</sup>,20 g · L<sup>-1</sup>。灭菌后的 PDA 培养基按 100 IU · mL<sup>-1</sup> 分别加入青霉素和链霉素。

1.1.3 试剂与仪器设备 75%酒精,次氯酸钠溶液,CTAB 提取液,氯仿,异戊醇,无水乙醇,TAE (Tris, Na<sub>2</sub>EDTA · 2H<sub>2</sub>O, 乙酸),琼脂糖,2 × Taq Master Mix (赫特生物技术公司),10 × Loading buffer (TaKaRa),VL2000 marker (TaKaRa),真菌特异性引物 ITS1 和 ITS4,ITS1 序列:CCGTAG-GTGAACCTGCGG,ITS4 序列:TCCTCCGCT-TATTGATATGC(南京金斯瑞),冰箱(新飞 BCD-213KA),电热恒温培养箱(天津泰斯特 DH4000A,精宏),超净工作台(AIR TECH),冷冻离心机(SIGMA 3K15),PCR 仪(Bio-Rad),全自动凝胶成像系统(SYNGENE)。

### 1.2 方法

1.2.1 内生真菌的分离 采用组织块表面消毒法进行瑞香狼毒内生真菌的分离<sup>[9-10]</sup>。具体方法如下:将瑞香狼毒植物样品用自来水反复冲洗干净,用灭菌蒸馏水浸泡,至植物组织水饱和复原。选择 75%酒精和 2%次氯酸钠作为表面消毒剂,用 75%酒精处理 30~60 s,灭菌蒸馏水漂洗 2 次,2%次氯酸钠处理 1.5~3 min,灭菌蒸馏水漂洗 3 次。消毒后的植物用剪刀剪成 5 mm × 5 mm × 5 mm 的组织块,置于培养基上培养 7~15 d,培养温度 28 °C,每 2 d 观察一次,观察植物组织创口边缘是否有菌丝生长。试验中需设立 3 个对照,以保证所分到的真菌属于植物内生真菌。一是超净工作台无菌检测,选择一含有培养基的平皿,分离过程中将其敞口放于工作台。二是组织块表面无菌检测,将表面消毒过的样品不经剪切放置在 PDA 培养基上。三是灭

菌蒸馏水无菌检测,将最后一次漂洗样品的蒸馏水均匀涂抹在 PDA 培养基上。将以上 3 个培养皿与放置组织块的平皿同时置于培养箱进行培养,3 个培养皿中均无真菌生长则说明分离出来的是瑞香狼毒内生真菌。

1.2.2 内生真菌的纯化与保存 组织块边缘有菌丝生长时,用接种针挑取边缘菌丝接种至新的 PDA 培养基,待菌落生长至一定大小,重复以上操作 2 次,直至得到纯化的内生真菌。将纯化的内生真菌接种至 PDA 斜面培养基,置于培养箱中,28 ℃ 进行培养,待真菌长满斜面后,取出放于冰箱,4 ℃ 保存。每 3 个月对试管中的内生真菌进行活化,将试管中的真菌接种至 PDA 培养基,培养到一定大小,再次进行菌种保存。

1.2.3 内生真菌的鉴定 结合传统的形态学鉴定方法与分子生物学鉴定方法对瑞香狼毒内生真菌进行鉴定<sup>[11]</sup>。

1.2.3.1 形态学鉴定:观察 PDA 培养基上生长的菌落,记录真菌生长的快慢,菌落的形状,菌丝的形态,有无色素产生等。采用插片培养法,在真菌生长的对数期,在菌落边缘以 45° 斜插盖玻片,使菌丝沿盖玻片生长直至覆盖整个盖玻片,取出盖玻片,显微镜下观察菌丝的颜色,孢子形态,产孢结构以及是否有横隔。结合菌落形态和菌丝显微形态,参照《真菌鉴定手册》对分离出的内生真菌进行初步鉴定。

1.2.3.2 分子生物学鉴定:基于 rDNA-ITS 区的序列多态性确定内生真菌的种属<sup>[12]</sup>。基本原理是提取真菌的 DNA,通过聚合酶链式反应扩增 ITS1、5.8S rDNA 和 ITS2 区,琼脂糖凝胶电泳检测目的片段,出现 500 bp 左右的条带即为阳性,说明目的片段扩增成功。

内生真菌总 DNA 的提取:采用改良的 CTAB 法提取内生真菌的总 DNA<sup>[13]</sup>。真菌铺满 PDA 培养基后,取得菌丝并称重,取 50 g 用于提取 DNA。将菌丝放于 1.5 mL 离心管,加入液氮充分研磨,研磨后的菌丝中加入 60 μL CTAB 提取液(65 ℃ 预热),离心管使用封口膜封口,放于水浴锅中,65 ℃ 加热 45~60 min,间隔摇晃 3 次。加入 600 μL 氯仿和异戊醇混合液(576:24),摇晃均匀后,12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,取离心后的上清液,重复以上步骤,直至两相间澄清。吸取最后一次离心的上清液至 2 mL 的离心管中,加入 900 μL 无水乙醇与 60 μL 3 mol·L<sup>-1</sup> 乙酸钠(pH=6),混匀后放于冰箱

-20 ℃,沉淀 1 h 以上或过夜。12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,弃上清。沉淀用无水乙醇(-20 ℃ 预冷)清洗 2~3 次,挥干乙醇。加适量 ddH<sub>2</sub>O 溶解沉淀,放于冰箱-20 ℃ 保存。

目的片段的扩增:选择 ITS1(5'-TCCGTAG-GTGAACCTGCGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCT-TATTGATATGC-3')真菌特异性引物,扩增真菌核糖体 RNA 基因的 ITS1、5.8S rDNA 和 ITS2 区。取 5 μL PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,使用成像系统观察结果并拍照,将阳性结果测序(上海桑尼生物科技有限公司)。

1.2.3.3 系统发育树构建:测序结果提交至美国国家生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information,NCBI)的 BLAST 子网,寻找具有同源性的序列,将所测序列与同源性高的序列使用软件 Mega5.1 进行序列对齐,进而使用邻接法(Neighbor-joining)构建系统发育树,自展法检测发育树,分析发育树以确定真菌种属。

## 2 结果

### 2.1 瑞香狼毒内生真菌的分离

从来自 4 省 5 个地区的瑞香狼毒中进行瑞香狼毒茎、叶、花三个部位内生真菌的分离,通过形态学观察,根据各菌株菌落形态特征,将疑似同种属的菌株合并,合并后的菌株共有 21 株,其中叶中分离到的最多,共 13 株,其余有 4 株来自茎,4 株来自花(表 1)。

### 2.2 瑞香狼毒内生真菌的鉴定

观察记录 21 株真菌的菌落形态,是否产生色素,菌丝显微形态(表 2,图 1),初步鉴定 SCL6-1、SC16L5-1、SC15L2-1、SC13S1-1、SC13L5-1、SC13L2-1、SC12S1-1、SC10L2-1 共 8 株菌属于链格孢属,其余各菌株形态差异大,通过分析 5.8S rDNA-ITS 区序列进行分子生物学鉴定。除未鉴定的 2 株菌,瑞香狼毒中分离的其余 19 株菌分属于真菌的担子菌亚门,半知菌亚门,子囊菌门的子囊菌亚门和盘菌亚门,共 7 纲 8 目 9 科 8 属。已鉴定的 19 株菌中,1 株仅确定到纲,为子囊菌门盘菌亚门粪壳菌纲(*Sordariomycetes* sp.),1 株确定到科,子囊菌亚门核菌纲炭角菌目毛孢壳科(*Coniochaetaceae* sp.)。11 株菌确定到属,其中 8 株是链格孢属(*Alternaria* sp.),枝孢属(*Cladosporium* sp.) 2 株,戴氏霉属(*Taifanglania* sp.) 1 株。6 株确定到种,分

别是柄孢壳属 *Podospora vesticola*、核座孢属 *Plenodomus hendersoniae*、光黑壳属 *Preussia funiculata* 和 *Preussia intermedia*、球盖菇属 *Leratiomyces laetissimus*、茎点霉属 *Phoma moricola*。由

图 2 可见,链格孢属 (*Alternaria* sp.) 是瑞香狼毒内生真菌的优势菌属,其余菌属的菌株数目相当,均为 1~2 个。瑞香狼毒中分离出的 19 株菌株序列已提交至 GenBank,登入号信息见表 2。

表 2 瑞香狼毒内生真菌形态学特征、种属和 GenBank 登入号

Table 2 Morphological characteristics, genus and species and accession number of endophytic fungi from *Stellera chamaejasme*

菌株编号 Strain number	种属 Genus and species	登入号 Accession number	形态学特征 Morphological characteristics
SC1L1-1	<i>Cladosporium</i> sp.	KT235907	菌丝绿色、质密、匍状生长,菌落中间凸四周扁平,背面菌落绿色、边缘白色、全圆,生长速度 $3.3 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ Green, compact hyphae creep. The colony is protuberant in the middle and flat around. The colony looks green, white in the edge from the back and shows a whole circle. Growth rate is $3.3 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$
SC1L6-1, SC10L2-1, SC12S1-1, SC13L2-1, SC13S1-1, SC13L5-1, SC15L2-1, SC16L5-1	<i>Alternaria</i> sp.	KT235908	菌丝绿色、质密、匍状生长,菌落中间凸四周扁平,背面菌落白色、边缘黑色、全圆,生长速度 $11 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ Green, compact hyphae creep. The colony is protuberant in the middle and flat around. The colony looks green, black in the edge from the back and shows a whole circle. Growth rate is $11 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$
SC3S6-1	<i>Preussia intermedia</i>	KT235913	菌丝白色、质密、匍状生长,菌落扁平,背面菌落黄色、锯齿状、边缘白色泛黄,生长速度 $0.075 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ Green, compact hyphae creep. The colony is flat. The colony looks yellow, white with yellow in the edge and serrated from the back. Growth rate is $0.075 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$
SC4L3-1	<i>Podospora vesticola</i>	KT235909	菌丝米白、质密、匍状生长,菌落中间凸四周扁平,背面菌落白色、全圆、边缘白色泛浅绿,生长速度 $0.33 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ Beige, compact hyphae creep. The colony is protuberant in the middle and flat around. The colony looks white, white with light green in the edge and shows a whole circle. Growth rate is $0.33 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$
SC5S1-1	<i>Plenodomus hendersoniae</i>	K235910	菌丝白色、质密、辐状生长,菌落半球形,背面菌落黑色、全圆、边缘白色,生长速度 $0.05 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ White, compact hyphae grow radially. The colony is hemispheric. The colony looks black, white in the edge and shows a whole circle. Growth rate is $0.05 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$
SC5F2-1	<i>Leratiomyces laetissimus</i>	KT235914	菌丝白色、质密、匍状,菌落不规则圆形,背面菌落白色、不规则圆形,生长速度 $0.02 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ White, compact hyphae creep. The colony is irregular circle. The colony looks white in the back and shows an irregular circle. Growth rate is $0.02 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$

(续表 2 Continued)

菌株编号 Strain number	种属 Genus and species	登入号 Accession number	形态学特征 Morphological characteristics
SC6L3-1	<i>Comiochaetaceae</i> sp.	KT235912	菌丝白色泛黄、质密、匍匐, 菌落圆形, 背面黄色, 生长速度 $0.43 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ White with yellow, compact hyphae creep. The colony shows a circle and looks yellow from the back. Growth rate is $0.43 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$
SC6F3-1	<i>Pyrenophora teres</i>	KT235911	菌丝绿色、质密、辐状生长, 背面绿色, 边缘白色, 不规则圆形, 生长速度 $0.56 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ Green, compact hyphae grow radially. The colony looks green and white in the edge from the back. Growth rate is $0.56 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$
SC8L3-1	<i>Sordariomycetes</i> sp.	KT757361	菌丝白色、质密、匍状, 菌落形状不规则, 后期颜色逐渐变深发黑, 背面菌落边缘白色, 生长速度 $2.4 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ White, compact hyphae creep. The colony is irregular and it turns dark with growth. The colony looks white in the edge from the back. Growth rate is $2.4 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$
SC13F1-1	<i>Preussia funiculata</i>	KT757356	菌丝白色泛红、质密、匍状, 菌落丘状, 背面中间红四周白色, 边缘不规则, 生长速度 $3.8 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ White with red, compact hyphae creep. The colony looks domal. The colony looks red in the middle and white in the edge from the back. The edge is irregular. Growth rate is $3.8 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$
SC16L4-1	<i>Phoma moricola</i>	KT757352	菌丝乳白、质密、匍状, 菌落中间凸四周平, 背面白色, 边缘全圆, 生长速度 $9.5 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ Milky-white, compact hyphae creep. The colony protuberant in the middle and flat around. The colony looks white from the back and the edge shows a whole circle. Growth rate is $9.5 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$
SY1L2-1	<i>Taifanglania</i> sp.	KT757351	菌丝浅紫色、质密, 菌落不规则圆形, 背面紫色、边缘白色, 生长速度 $5.3 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ Hyphae is light purple and compact. The colony shows an irregular circle. Growth rate is $5.3 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$

### 2.3 内生真菌遗传进化分析

对分离出的 19 株内生真菌与 Blast 上具有与其 5.8S rDNA-ITS 区相似性序列的真菌, 以 5.8S rDNA-ITS 区为对象, 通过序列对齐, 邻接法构建系统发育树, 得到图 2 所示系统发育树。分析发育树可见, 瑞香狼毒内生真菌分属于 I、II、III 3 大类群, 3 个类群自展系数均达到 99% 以上。类群 III 仅包含 1 株菌 SC5F2-1, 且与其他菌株亲缘关系较远。类群 II 可分

为 C 和 D 两个小类群, 其中 D 中的 3 株菌亲缘关系较近, 都属于子囊菌亚门。类群 I 在 3 个类群中菌株数量最多, 除链格孢属的 8 株菌外, 其余 2 株菌都属于半知菌亚门腔孢纲球壳孢目球壳孢科。

### 3 讨论

虽然 H. Jin 等<sup>[8]</sup>从瑞香狼毒中分离到 41 种, 其中 40 个属于子囊菌门, 1 个属于担子菌门, 杨国

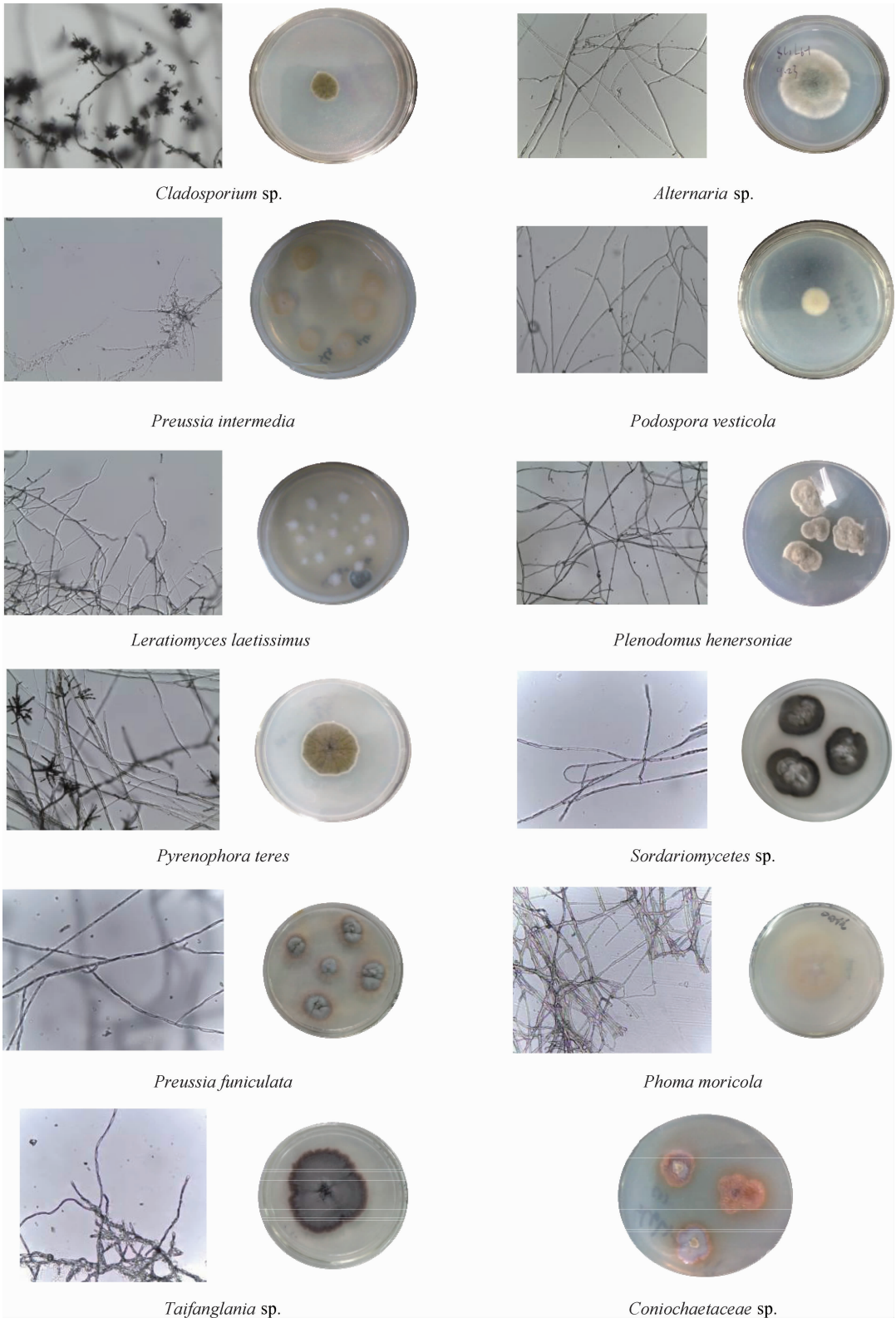


图 1 瑞香狼毒内生真菌菌落与菌丝形态(400×)

Fig. 1 Hyphae and Colony characteristics of endophytic fungi from *Stellera chamaejasme* (400×)

栋<sup>[7]</sup>对分离自瑞香狼毒的 68 株内生真菌进行鉴定,发现其分属于 10 个属(群)。但有关瑞香狼毒内生

真菌种属多样性及其分布特点的研究还鲜有报道。本试验中从瑞香狼毒中共分离到 21 株内生真菌,优

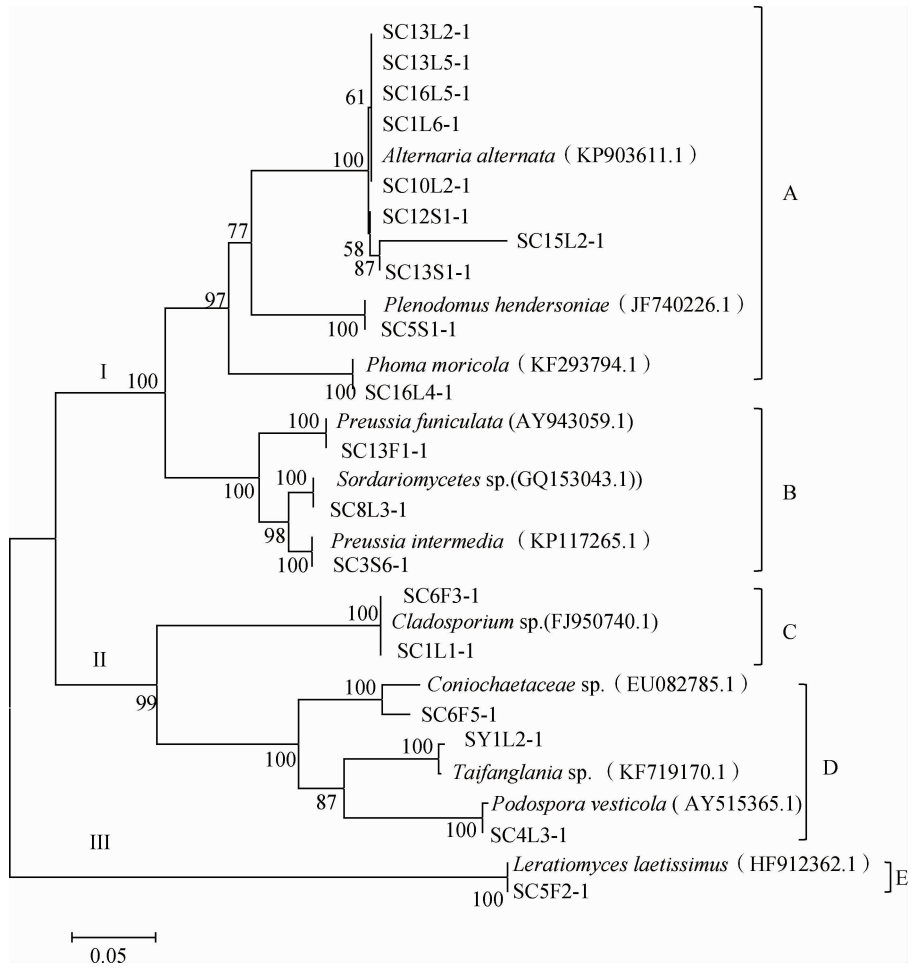


图 2 邻接法构建的基于 5.8S rDNA-ITS 序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree constructed with the programme neighbor-joining based on the 5.8S rDNA-ITS sequences

势菌属为链格孢属(*Alternaria* sp.),与 H. Jin 和 杨国栋等的报道一致,有 10 种是从瑞香狼毒中首次分离到的最新菌属。作者选择了采自 4 省 5 个地区的瑞香狼毒进行内生真菌的分离,其中甘肃肃南县分离到内生真菌 *Cladosporium* sp.、*Alternaria* sp.、*Preussia intermedia*、*Podospora vesticola* 和 *Leratiomyces laetissimus*,甘肃天祝县分离到 *Plenodomus hendersoniae*,青海门源分离到 *Coniochaetaceae* sp. 和 *Sordariomycetes* sp.,山西阳城分离到 *Taifanglania* sp.、*Phoma moricola* 和 *Alternaria* sp.,陕西旬邑分离到 *Preussia funiculata*。不同地区分离到的内生真菌,除链格孢属(*Alternaria* sp.)从采自甘肃肃南和山西阳城的瑞香狼毒中都分离到,其余内生真菌在 5 个地区分布的种类各不相同,这可能是由于不同地区瑞香狼毒中的内生真菌种类存在差异,说明瑞香狼毒内生真菌的种属分布有区域特异性。试验选择的 2 种琼脂比例的 PDA 培养基上

分离出的瑞香狼毒内生真菌种类数目相差不多,10  $g \cdot L^{-1}$  的培养基上分离到 11 株,琼脂比例为 20  $g \cdot L^{-1}$  时,分离到 10 株,但琼脂量少时,组织块上长出内生真菌的时间为 3~10 d,而琼脂量大时,得到内生真菌的时间稍微有所增加,为 7~15 d。试验表明在进行瑞香狼毒内生真菌分离时,选择琼脂为 10  $g \cdot L^{-1}$  的培养基分离效率比琼脂为 20  $g \cdot L^{-1}$  的要高。李姝诺等<sup>[14]</sup>从越橘中分离到能产生黄酮的细链格孢(*Alternaria tenuissima*),产生的黄酮类化合物具有与植物成分相似的结构。本试验从瑞香狼毒中分离到了其优势内生真菌——链格孢属(*Alternaria* sp.),但其是否能产生狼毒素等黄酮类化合物尚有待进一步研究。

#### 4 结 论

从采自 4 省 5 地区的瑞香狼毒中共分离到 21 株菌,属于 7 纲 8 目 9 科 8 属,分别是 *Cladospori-*

*um* sp., *Alternaria* sp., *Preussia intermedia*, *Podospora vesticola*, *Plenodomus henersoniae*, *Leratiomyces laetissimus*, *Coniochaetaceae* sp., *Pyrenophora teres*, *Sordariomycetes* sp., *Preussia funiculata*. 链格孢属(*Alternaria* sp.)是瑞香狼毒内生真菌的优势菌属。

### 参考文献(References):

- [1] 刘 英,龙瑞军,姚 拓. 草地狼毒研究进展[J]. 草业科学,2004,21(6):55-61.  
LIU Y, LONG R J, YAO T. Research progress on *Stellera chamaejasme* L. in grassland[J]. *Pratacutural Science*, 2004, 21(6):55-61. (in Chinese)
- [2] 韩 波,屈 萌,马晓莉,等. 狼毒毒性和炮制方法研究进展[J]. 中药材,2013,36(2):330-333.  
HAN B, QU M, MA X L, et al. Research progress on *Stellera chamaejasme* toxicity and processing methods[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2013, 36(2):330-333. (in Chinese)
- [3] 宋晓平,曹光荣,李绍君. 瑞香狼毒中总黄酮的提取分离及其毒性研究[J]. 西北农业大学学报,1996,24(4):35-38.  
SONG X P, CAO G R, LI S J. Abstraetion and toxicity of total-flavonoids in *StelleraChamaejasme* L[J]. *Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry*, 1996, 24(04):35-38. (in Chinese)
- [4] QIAN C D, FU Y H, JIANG F S, et al. Lasiodiplodia sp. ME4-2, an endophytic fungus from the floral parts of *Viscum coloratum*, produces indole-3-carboxylic acid and other aromatic metabolites[J/OL]. *BMC Microbiol*, 2014, 30(14):297. [2016-06-03]. <http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-014-0297-0>
- [5] 沈书庆,殷 红,刘 芸,等. 产杜仲黄酮内生真菌的初步研究[J]. 菌物研究,2008,6(1):46-48.  
SHEN S Q, YIN H, LIU Y, et al. Primary Studies on Flavonoid-Producing Endophytic Fungi Isolated from a Medicinal Plant *eucommia ulmoides* [J]. *Journal of Fungal Research*, 2008, 6(01):46-48. (in Chinese)
- [6] 韩晓丽,康冀川,何 劲,等. 银杏产黄酮内生真菌的分离与鉴定[J]. 菌物研究,2008,6(01):40-45.  
HAN X L, KANG J C, HE J, et al. Isolation and identification of endophytic fungi of falvonoid-producing *Ginkgo biloba* [J]. *Journal of Fungal Research*, 2008, 6(01):40-45. (in Chinese)
- [7] 杨国栋. 瑞香狼毒内生真菌对原植物成分降解作用的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2009.  
YANG G D. Research in the Degradation of *Stellera chamaejasme* L's composition by its Endophytic Fungi[D]. Yangling:North West Agriculture and Forestry University,2009. (in Chinese)
- [8] JIN H, YAN Z, LIU Q, et al. Diversity and dynamics of fungal endophytes in leaves, stems and roots of *Stellera chamaejasme* L. in northwestern China[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2013, 104(6):949-963.
- [9] 何 佳,刘笑洁,赵启美,等. 植物内生真菌分离方法的研究[J]. 食品科学,2009,30(15):180-183.  
HE J, LIU X J, ZHAO Q M, et al. Isolation of endophytes from pseudolarix kaempferi gord[J]. *Food Science*, 2009, 30(15):180-183. (in Chinese)
- [10] 王利娟,贺新生. 植物内生真菌分离培养的研究方法[J]. 微生物学杂志,2006,26(04):55-60.  
WANG L J, HE X S. Research methods of the isolation and sublimation of plant endophytical fungi[J]. *Journal of Microbiology*, 2006, 26(04):55-60.
- [11] Ratnaweera P B, de Silva E D, Williams D E, et al. Antimicrobial activities of endophytic fungi obtained from the arid zone invasive plant *Opuntia dillenii* and the isolation of equisetin from endophytic *Fusarium* sp. [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15:220-227.
- [12] 燕 勇,李卫平,高雯洁,等. rDNA-ITS 序列分析在真菌鉴定中的应用[J]. 中国卫生检验杂志,2008,18(10):1958-1961.  
YAN Y, LI W P, GAO W J, et al. Application of rDNA ITS sequence analysis in fungus identification [J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2008, 18(10):1958-1961. (in Chinese)
- [13] 杨晓雯,赵宝玉,路 浩,等. 不同培养条件对甘肃棘豆内生真菌多样性的影响[J]. 畜牧兽医学报,2013,44(10):1660-1666.  
YANG X W, ZHAO B Y, LU H, et al. Effect of different culture conditions on diversity of endophytic fungi in *Oxytropis kansuensis* [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2013, 44(10):1660-1666. (in Chinese)
- [14] 李姝诺,李亚东,王 琦. 越橘产黄酮类化合物内生真菌的筛选[J]. 吉林农业大学学报,2009,31(5):587-591  
LI S N, LI Y D, WANG Q. Bolting flavonoid-producing endophytic fungi from *Vaccinium* [J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2009, 31(5):587-591. (in Chinese)