

毛花猕猴桃可培养内生真菌菌群结构、多样性及生物活性分析

黄情儿, 吴 婷, 张轲杰, 何玟叶, 曹家旗, 许静怡, 秦路平*, 朱 波*

浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311402

摘要: **目的** 探讨毛花猕猴桃 *Actinidia eriantha* 可培养内生真菌的菌群结构、多样性、分布规律及其活性, 为内生真菌资源利用提供依据。**方法** 对毛花猕猴桃 3 个部位(根、茎、叶)内生真菌进行分离、纯化与 ITS 分子鉴定, 分析其菌群结构、多样性与分布规律; 采用拟南芥共培养、病原菌平板对峙的方法, 对内生真菌进行促生与病原菌拮抗活性筛选。**结果** 共分离得到 2 446 株内生真菌, 分为 156 个形态型, ITS 分子鉴定为 49 个分类单位, 归属于真菌界 3 门 5 纲 10 目 14 科 18 属, 其中子囊菌门真菌数量最多, 占比 94.89%; 根、茎、叶共有菌 30 种, 其中 *Trichoderma spirale* 是根的特有种, *Bionectria ochroleuca* 是茎的特有种; Shannon-Wiener (H') 以茎多样性指数最高, Simpson 指数 (D) 以叶多样性指数最高; 筛选得到显著促拟南芥生长活性的内生真菌 AE16, 鉴定为 *Clonostachys* sp., 其共生拟南芥鲜质量增长率为 $(37.13 \pm 10.35)\%$; 具有显著抑菌活性的内生真菌 11 株(木霉属 10 株, 白僵菌属 1 株), 其中 AE175 (*Trichoderma* sp.) 抑制效果最好, 相对抑菌率为 $(87.59 \pm 9.36)\%$ 。**结论** 毛花猕猴桃内生真菌资源丰富, 筛选得到的活性菌株为毛花猕猴桃内生真菌资源开发和利用提供依据。

关键词: 毛花猕猴桃; 内生真菌; 菌群结构; 多样性; 生物活性

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)10-3497-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.10.027

Fungal community structure, diversity and biological activity of culturable endophytic fungi from *Actinidia eriantha*

HUANG Qing, WU Ting, ZHANG Kejie, HE Wenye, CAO Jiaqi, XU Jingyi, QIN Luping, ZHU Bo

College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311402 China

Abstract: Objective To investigate the fungal community structure, diversity, distribution and biological activity of culturable endophytic fungi of *Actinidia eriantha*, and to provide the basis for the utilization of endophytic fungi resources. **Methods** The endophytic fungi were isolated, purified, and identified from three parts of *A. eriantha* (roots, stems, and leaves), and their fungal community structure, diversity, and distribution were analyzed; the endophytic fungi were screened for growth promotion and antagonistic activities via *A. thaliana* co-cultured and plate standoff trials. **Results** A total of 2 446 strains of endophytic fungi were isolated and categorized into 156 morphotypes, which were molecularly identified to 49 taxonomic units using ITS amplification tools, belonging to three phyla, five classes, 10 orders, 14 families, and 18 genera of fungi, among which the Ascomycota accounted for 94.89%. The 30 species of fungi were common belonging to roots, stems and leaves, *Trichoderma spirale* was exclusive in roots; *Bionectria ochroleuca* was exclusive in stems. Stem had the highest Shannon-Wiener (H') diversity index while leaf had the highest Simpson's (D) diversity index. AE16 (identified as *Clonostachys* sp.) was found that it could significantly promote growth of *A. thaliana*, with a fresh weight growth rate of $(37.13 \pm 10.35)\%$. A total of eleven strains (10 strains of *Trichoderma* and 1 strain of *Beauveria*) were screened for significant bacterial inhibitory activity, among which AE175 (identified as *Trichoderma* sp.) had the best inhibitory effect with a relative inhibition rate of $(87.59 \pm 9.36)\%$. **Conclusion** *A. eriantha* had rich endophytic fungal resources, the active strains obtained by screening provided the basis for the development and utilization of endophytic fungi resources in *A. eriantha*.

Key words: *Actinidia eriantha* Benth.; endophytic fungi; fungal community structure; diversity; biological activity

收稿日期: 2023-11-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82003896); 浙江省自然科学基金资助项目(LQ21H280003)

作者简介: 黄情儿(2003—), 女, 在读本科生。E-mail: hqe13735759935@163.com

*通信作者: 秦路平, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药资源及品质评价。E-mail: lpqin@zcmu.edu.cn

朱 波, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为植物内生菌。E-mail: zhubo@zcmu.edu.cn

毛花猕猴桃 *Actinidia eriantha* Benth. 系猕猴桃科 (Actinidiaceae) 猕猴桃属植物, 干燥根入药, 俗称白山毛桃根, 临床多用于治疗胃癌、结肠癌、肝硬化、慢性肝炎、白血病、直肠脱垂、疝气和子宫脱垂等^[1]。白山毛桃根是常用畚药之一, 在畚药常用处方中占比达 15%^[2]。现代药理学研究表明, 白山毛桃根具有抗肿瘤、保护神经、抗氧化、抗炎等药理活性, 特别是其可通过诱导细胞凋亡和坏死、免疫调节、阻滞细胞周期等方式, 抑制癌细胞生长^[1]。毛花猕猴桃种质资源丰富, 广泛分布在浙江、江西、福建、湖南等广大丘陵地区^[3]。目前, 毛花猕猴桃已经实现了人工栽培, 在浙江丽水等地有较大面积的种植, 但毛花猕猴桃种植过程中存在根腐病、溃疡病等病害, 对毛花猕猴桃产业发展造成较大影响。

植物内生真菌指的是其生存的部分阶段或全过程存在于健康植物的组织和器官中, 且不会给健康植物带来不良反应的真菌^[4]。植物内生真菌与宿主植物长期协同进化, 保持着互利共生的关系。稳定的植物内生真菌菌群结构与多样性, 是保证植物正常生长发育及其对环境胁迫适应的基础^[5]。因此, 研究药用植物内生真菌的菌群结构与多样性, 有利于实现药用植物微生物资源的有效利用, 为药用植物资源的开发利用及中药产业发展提供研究思路。

目前, 对毛花猕猴桃的研究多集中在药理活性^[6-7]、化学成分^[8]、栽培技术^[3]等方面, 有关毛花猕猴桃的内生真菌菌群结构、多样性及其活性分析相关研究较少, 毛花猕猴桃内生真菌资源未得到充分开发。因此, 本实验通过分离鉴定毛花猕猴桃可培养内生真菌, 分析其菌群结构与多样性, 并进行菌株促生与病原菌拮抗等活性分析, 筛选活性菌株, 以期对毛花猕猴桃高效优质栽培提供内生真菌资源。

1 材料与试剂

1.1 材料

2021 年 11 月, 采集浙江省丽水市毛花猕猴桃健康新鲜植株, 经浙江中医药大学刘考铨鉴定为猕猴桃科多年生藤本植物毛花猕猴桃 *Actinidia eriantha* Benth. 拟南芥种子 (型号 Col-0) 由浙江大学董伟国博士惠赠。麦根腐平脐蠕孢病菌 *Bipolaris sorokiniana* Shoemaker, 胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., 刺盘孢炭疽菌 *Colletotrichum camelliae* Massee, 核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, 腐皮镰刀菌 *Fusarium*

solani (Martius) Saccardo, 立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* Kuhn, 尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* sensu Smith & Swingle, 葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not. 均取自本实验室菌种资源库。

1.2 试剂与仪器

1/2MS 培养基 (含糖琼脂 1/2MS 40.47 g, pH 5.8~6.0), PDA 培养基 (马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 琼脂 15~18 g/L, pH 自然), SW-CJ-1D 超净工作台 (苏州净化有限公司), Takara9770A 和 RR003A 试剂盒 (Takara 公司), ABI (Proflex) 型 PCR 仪 (赛默飞世尔科技中国有限公司), GelDocXR 凝胶成像仪 (北京科誉兴业科技发展有限公司), LM I-100 型霉菌培养箱 (上海龙跃仪器设备有限公司), RXZ-500A 型智能人工气候箱 (宁波江南仪器厂), V20 型蔡司体式显微镜 (德国 Carl Zeiss AG 集团)。

2 方法

2.1 内生真菌的分离、纯化与 ITS 分子鉴定

参考吴婷等^[9]的方法进行毛花猕猴桃内生真菌的分离与纯化。根据菌丝、菌落与形态特征, 将内生真菌划分为不同形态型。按照王景暄等^[10]的方法提取内生真菌 DNA 与系统发育树分析的构建。采用 ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAAGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 作为通用引物进行 PCR 扩增, PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 后送至上海生工生物有限公司进行测序。

2.2 内生真菌菌群结构与多样性分析

分离率 (isolation rate, IR) 指某个指定类型的内生真菌菌株数占分离样本组织块总数的百分比; 相对频率 (relative frequency, RF) 指某一内生真菌的菌株数占分离总菌株数的比率。优势菌群判定: P_i 为内生真菌 i 的 RF, S 为每个器官内生真菌种类数, 当 $P_i > 1/S$ 时即 i 为优势菌群^[11]。以根、茎、叶为分类单位, 采用 Shannon-Wiener 多样性指数 (H') 和 Simpson 多样性指数 (I') 分析内生真菌的生物多样性; 采用 Pielou 均匀度指数 (E') 分析同一物种不同部位物种分布的均匀性; 采用 Sorenson 相似性系数 (C_s) 比较不同部位内生真菌物种组成的相似性^[12]。

2.3 毛花猕猴桃内生真菌对拟南芥促生作用

参考杜疏炆等^[13]的方法, 将长至 1.5 cm 左右的

拟南芥幼苗转接至 1/2MS 培养基,并接种内生真菌菌饼,进行内生真菌与拟南芥的共培养。采用直尺和电子天平测定拟南芥的根长、鲜质量等生长性状指标,运用蔡司体视显微镜观察拟南芥根毛及叶片状况。

2.4 毛花猕猴桃内生真菌对病原菌的拮抗作用

采用平板对峙法^[14],将病原菌菌饼置于 PDA 平板中心,同时在 120°方向距中心 2.25 cm 处接种 3 个内生真菌菌饼,进行病原菌拮抗实验。以哈茨木霉菌作为阳性对照组,测量病原菌的生长半径,并计算相对抑制率,实验平行 3 次。

相对抑制率=(对照病原菌菌落直径-对峙病原菌菌落直径)/对照病原菌菌落直径^[15]

2.5 数据分析

采用 IBM SPSS Statistics 27.0 软件进行单因素方差(ANOVA 检验)分析。

3 结果与分析

3.1 毛花猕猴桃内生真菌菌群结构与分布情况

共分离得到毛花猕猴桃内生真菌 2 446 株,其中,根 787 株,茎 946 株,叶 713 株。IR 从高到低为茎>根>叶(IR 依次为 16.77%、13.95%、13.50%)。结果表明,毛花猕猴桃内生真菌的生长、侵染程度以及分布情况因宿主组织部位(根、茎、叶)的不同而存在差异。进一步纯化得到内生真菌 156 个形态型,经过 ITS 分子鉴定后确定为 49 个分类单元。其中 33 个分类单元鉴定到种水平(占比 67.35%),16 个分类单元到属水平(占比 32.65%)(表 1)。49 个分类单元归属到真菌界 3 门 5 纲 10 目 14 科 18 属。其中大部分分类单元归属于子囊真菌门(Ascomycota, RF=94.89%),少数分类单元属于担子菌门(Basidiomycota, RF=3.97%)与毛霉门(Mucoromycota, RF=1.14%)。

表 1 从毛花猕猴桃中分离出的内生真菌
Table 1 Endophytic fungi isolated from *A. eriantha*

编号	分类地位	名称(序列号)	序列相似度/%	数量			总菌数
				根	茎	叶	
AE03	<i>Trichoderma</i> sp.1	<i>Trichoderma guizhouense</i> (MT448971.1)	100.00	2	26	26	77
		<i>T. lixii</i> (MT434003.1)	100.00				
AE67	拟康氏木霉 <i>Trichoderma pseudoasiaticum</i>	<i>T. pseudoasiaticum</i> (MN977792.1)	99.82	2	11	9	44
AE137	<i>Trichoderma</i> sp.2	<i>T. effusum</i> (MN644616.1)	100.00	1	7	10	35
		<i>T. atrobunneum</i> (MH459162.1)	100.00				
AE169	深绿木霉 <i>Trichoderma atroviride</i>	<i>T. atroviride</i> (MT520552.1)	100.00	2	13	20	56
AE23	哈茨木霉 <i>Trichoderma harzianum</i>	<i>T. harzianum</i> (KY750420.1)	99.14	1	18	12	44
AE44	螺旋木霉 <i>Trichoderma spirale</i>	<i>T. spirale</i> (MK387951.1)	100.00	1	0	0	16
AE111	拟康宁木霉 <i>Trichoderma koningiopsis</i>	<i>T. koningiopsis</i> (KX496883.1)	98.00	2	8	0	36
AE151	<i>Trichoderma</i> sp.3	<i>T. anisohamatum</i> (MH262586.1)	92.32	3	0	0	32
		<i>T. asperellum</i> (MT529860.1)	92.27				
		<i>T. pubescens</i> (MT529314.1)	92.27				
AE175	<i>Trichoderma</i> sp.4	<i>T. ovalisporum</i> (KX911713.1)	100.00	3	21	15	73
		<i>T. caribbaeum</i> (OP163640.1)	100.00				
AE194	<i>Trichoderma lentiforme</i>	<i>T. lentiforme</i> (MK714910.1)	93.31	1	12	18	49
AE20	钩状木霉 <i>Trichoderma hamatum</i>	<i>T. hamatum</i> (OQ701345.1)	99.83	1	25	22	60
AE80	<i>Trichoderma</i> sp.5	<i>T. tawa</i> (KC847178.1)	72.86	3	16	9	28
		<i>T. harzianum</i> (KU904475.1)	72.93				
AE181	深褐木霉 <i>Trichoderma atrobunneum</i>	<i>T. atrobunneum</i> (MH459162.1)	100.00	3	9	16	28
AE120	<i>Clonostachys</i> sp.1	<i>Clonostachys pseudochroleuca</i> (MN046880.1)	99.80	1	11	16	40
		<i>C. rosea</i> (MT215574.1)	99.80				
AE156	<i>Clonostachys</i> sp.2	<i>C. byssicola</i> (MN597463.2)	99.80	1	26	22	62
		<i>C. rosea</i> (MN696682.1)	99.80				
AE16	<i>Clonostachys</i> sp.3	<i>C. farinosa</i> (OQ910594.1)	99.58	1	24	27	67
		<i>C. byssicola</i> (MN597463.2)	99.58				
AE174	淡色生赤壳菌 <i>Bionectria ochroleuca</i>	<i>Bionectria ochroleuca</i> (KC285891.1)	99.61	0	32	0	32
AE56	粉红螺旋聚孢霉 <i>Clonostachys rosea</i>	<i>C. rosea</i> (KR183785.1)	88.44	7	12	6	25
AE57	<i>Clonostachys rhizophaga</i>	<i>C. rhizophaga</i> (OK560685.1)	95.89	1	15	3	30
AE04	<i>Clonostachys</i> sp.4	<i>C. capitata</i> (MH862394.1)	84.50	0	16	0	16
		<i>C. leptoderma</i> (OP205474.1)	84.04				
AE179	<i>Clonostachys araneum</i>	<i>C. araneum</i> (NR_164542.1)	99.80	9	15	18	42
AE51	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium proliferatum</i> (MT541890.1)	100.00	2	30	23	74
		<i>F. mangiferae</i> (MT358788.1)	100.00				

表 1 (续)

编号	分类地位	名称 (序列号)	序列相似度/%	数量			总菌数
				根	茎	叶	
AE51	<i>Fusarium</i> sp.	<i>F. concentricum</i> (MT358778.1)	100.00				
		<i>F. oxysporum</i> (MN856435.1)	100.00				
		<i>F. solani</i> (MN486565.1)	100.00				
AE63	淡紫紫孢菌 <i>Purpureocillium lilacinum</i>	<i>Purpureocillium lilacinum</i> (OR225858.1)	100.00	7	16	35	58
AE05	球孢白僵菌 <i>Beauveria bassiana</i>	<i>Beauveria bassiana</i> (MH165267.1)	89.64	10	30	15	55
AE118	<i>Simplicillium</i> sp.	<i>Simplicillium cylindrosporum</i> (MK367728.1)	99.81	6	18	14	38
		<i>S. lanosoniveum</i> (KT878334.1)	99.81				
AE06	<i>Neurospora</i> sp.	<i>Neurospora cerealis</i> (AY681187.1)	99.44	15	34	26	75
		<i>N. dictyophora</i> (MH862539.1)	99.44				
AE11	嗜松篮状菌 <i>Talaromyces pinophilus</i>	<i>Talaromyces pinophilus</i> (MT152340.1)	100.00	13	28	10	51
AE191	疣孢篮状菌 <i>Talaromyces verruculosus</i>	<i>T. verruculosus</i> (MT267807.1)	100.00	15	17	9	41
AE193	<i>Talaromyces amestolkiae</i>	<i>T. amestolkiae</i> (MT441607.1)	99.80	28	20	19	67
AE30	<i>Talaromyces oumae-annae</i>	<i>T. oumae-annae</i> (MT530138.1)	100.00	17	15	14	46
AE199	<i>Talaromyces purpureogenus</i>	<i>T. purpureogenus</i> (MT609898.1)	100.00	14	33	17	64
AE17	棘孢曲霉 <i>Aspergillus aculeatus</i>	<i>Aspergillus aculeatus</i> (MT007537.1)	100.00	12	28	11	51
AE22	<i>Penicillium glaucoroseum</i>	<i>Penicillium glaucoroseum</i> (MT529148.1)	100.00	28	29	20	77
AE32	微紫青霉 <i>Penicillium janthinellum</i>	<i>P. janthinellum</i> (MN452472.1)	100.00	22	36	18	76
AE77	<i>Penicillium sumatraense</i>	<i>P. sumatraense</i> (MT529248.1)	100.00	9	22	11	42
AE131	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>A. assiutensis</i> (MT640286.1)	100.00	13	22	17	52
		<i>A. japonicus</i> (MT602615.1)	100.00				
AE192	<i>Penicillium guanacastense</i>	<i>P. guanacastense</i> (KF991208.1)	100.00	30	22	13	65
AE18	褐紫曲霉 <i>Aspergillus brunneoviolaceus</i>	<i>A. brunneoviolaceus</i> (MT102843.1)	100.00	12	18	9	39
AE132	马洛奇青霉 <i>Penicillium mallochii</i>	<i>P. mallochii</i> (MZ423014.1)	100.00	3	9	10	22
AE29	<i>Penicillium cluniae</i>	<i>P. cluniae</i> (MK450684.1)	100.00	23	16	19	58
AE87	<i>Penicillium cremeogriseum</i>	<i>P. cremeogriseum</i> (KT826681.1)	99.64	23	25	26	74
AE53	小新壳梭孢菌 <i>Neofusicoccum parvum</i>	<i>Neofusicoccum parvum</i> (MK131330.1)	100.00	17	28	12	57
AE110	<i>Botryosphaeria</i> sp.	<i>Botryosphaeria</i> sp. (HQ130715.1)	98.50	13	23	15	51
AE02	出芽短梗霉 <i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i> (MN165500.1)	100.00	22	22	27	71
AE27	芽枝状枝孢霉 <i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (KC329631.1)	99.80	18	22	12	52
AE34	<i>Epicoccum</i> sp.	<i>Epicoccum sorghinum</i> (MT604999.1)	99.78	19	23	31	73
		<i>E. laticollum</i> (MN871865.1)	99.78				
AE52	撕裂耙齿菌 <i>Irpex laceratus</i>	<i>Irpex laceratus</i> (MN644789.1)	99.77	15	21	7	43
AE85	毛木耳 <i>Auricularia polytricha</i>	<i>Auricularia polytricha</i> (MH151030.1)	100.00	23	14	17	54
AE10	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Rhizopus arrhizus</i> (MT540020.1)	100.00	13	8	7	28
		<i>R. oryzae</i> (LC514329.1)	100.00				

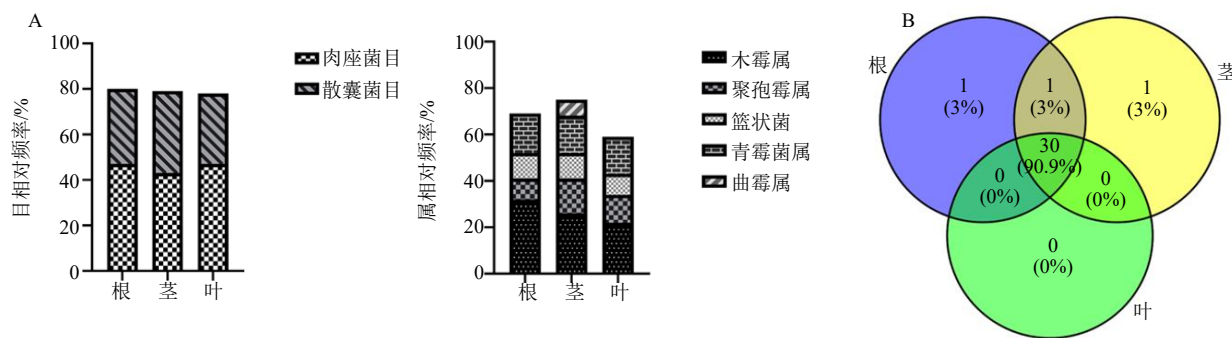
不同组织部位的内生真菌分布存在差异。在目水平,根、茎、叶的内生真菌优势目均为肉座菌目(Hypocreales, RF=47.01%、43.44%、47.12%)与散囊菌目(Eurotiales, RF=33.29%、35.94%、31.28%);但在属水平存在差异,根和叶的优势属为木霉属(*Trichoderma*, RF=32.40%、22.02%)、聚孢霉属(*Clonostachys*, RF=9.022%、12.90%)、篮状菌(*Talaromyces*, RF=11.05%、9.68%)、青霉菌属(*Penicillium*, RF=17.53%、16.41%),茎的优势属为木霉属(*Trichoderma*, RF=26.96%)、聚孢霉属(*Clonostachys*, RF=15.96%)、篮状菌(*Talaromyces*, RF=11.94%)、青霉菌属(*Penicillium*, RF=16.81%)、曲霉属(*Aspergillus*, RF=7.19%) (图 1-A)。在种水平, *Trichoderma spirale* 是根的特

有种, *Bionectria ochroleuca* 是茎的特有种, *Trichoderma koningiopsis* 是根与茎的共有种,其余 30 种真菌均为根、茎、叶的共有种(图 1-B)。

采用 Cs 来比较毛花猕猴桃不同组织部位内生真菌物种组成的相似程度。经计算,不同组织部位的 Cs 在 0.957~0.967。结果表明,3 种不同组织部位的内生真菌物种组成的相似程度均较高,物种分布相对一致。其中叶与根、叶与茎的物种相似程度最高且数值一致,根与茎的物种相似程度最低,详见表 2。

3.2 毛花猕猴桃内生真菌多样性分析

毛花猕猴桃不同组织部位内生真菌多样性存在差异。内生真菌 *H'* 指数为 3.690 2~3.778 1,以茎的多样性指数最高,叶的多样性指数最低。*D* 值为 0.996 5~



A-内生真菌优势目与优势属；B-内生真菌菌种分布韦恩图。

A-dominant order and dominant genus of endophytic fungi; B-venn diagram of endophytic fungal distribution.

图 1 毛花猕猴桃不同组织部位内生真菌菌群结构

Fig. 1 Endophytic fungal community structure of different tissues in *A. eriantha*

表 2 不同组织部位下毛花猕猴桃内生真菌菌群相似度

Table 2 Similarity of endophytic fungal flora of different tissues in *A. eriantha*

不同组织部位	Cs		
	主根	主茎	叶片
主根	1.000		
主茎	0.957	1.000	
叶片	0.967	0.967	1.000

0.997 8, 以叶的多样性指数最高, 茎的多样性指数最低。E 值 0.971 0~0.981 3, 茎的均匀度较高, 根的均匀度较低。结果表明, 从同一种植物体中不同的组织部位分离得到的内生真菌多样性存在差异, 为今后进行内生真菌活性研究提供了良好的菌种资源, 见表 3。

表 3 不同组织部位下毛花猕猴桃内生真菌多样性指数

Table 3 Endophytic fungal diversity index of different tissue parts in *A. eriantha*

不同组织部位	H	D	E
主根	3.738 4	0.997 4	0.971 0
主茎	3.778 1	0.996 5	0.981 3
叶片	3.690 2	0.997 8	0.975 2

3.3 毛花猕猴桃内生真菌对拟南芥促生活性

内生真菌与拟南芥共培养 14 d 后, 65.31%的内生真菌菌丝会覆盖拟南芥, 造成拟南芥枯萎死亡; 22.45%的真菌未覆盖拟南芥, 但拟南芥叶片发黄, 侧根数量少; 12.24%的真菌共生后, 拟南芥长势正常 (图 2-A)。对拟南芥的鲜质量与鲜质量增长率进行统计学分析, 结果表明, 91.84%的真菌对拟南芥生长有抑制作用; 而内生真菌 AE156、AE16、AE174、AE132 处理后, 拟南芥鲜质量增加, 增长

率依次为 18.48%、37.13%、30.99%与 17.02%。方差分析显示 AE16 (*Clonostachys* sp.) 与空白对照组 (CK) 存在显著性差异 ($P<0.05$), 平均鲜质量为 (0.152 ± 0.014) g, 为 CK 组的 1.37 倍 (图 2-B)。将筛选出的有促生作用的生长良好的拟南芥与明显抑制生长、枯萎的拟南芥进行根部与叶片的显微观察, 见图 3。由图可见, 与 AE16 共生的拟南芥根毛较为茂盛, 叶片绒毛较多, 拟南芥生长势良好; 而 AE06 组抑制拟南芥生长, 根部鲜见根毛, 叶片皱缩枯烂, 无绒毛且有菌丝缠绕。

3.4 毛花猕猴桃内生真菌对病原菌的拮抗活性

在 49 株真菌里, 87.76%的真菌对 5 种以上的病原菌均有抑制作用, 其中有 34 株真菌对 8 种病原菌均有抑制作用。34 株真菌来自 17 个不同的属, 包括木霉属、聚孢霉属、淡紫拟青霉菌属、白僵菌属、拟青霉属等, 见表 4。其中, 与阳性对照组相比有显著抑菌作用的菌株有 11 株 (10 株属于木霉属, 1 株属于白僵菌属)。木霉属 AE175 对立枯丝核菌有显著抑制效果; 木霉属 AE137、AE175 及白僵菌属 AE05 对尖孢镰刀菌有显著抑制效果; 木霉属 AE03、AE20、AE23、AE67、AE80、AE137、AE151、AE169、AE175、AE194 对葡萄座腔菌均有显著抑制效果; 其中, AE175 对立枯丝核菌、尖孢镰刀菌、葡萄座腔菌 3 种病原菌抑菌作用最强, IR 依次为 95.93%、88.57%、92.69%, 见图 4。

4 讨论

本研究首次从畚药毛花猕猴桃分离得到内生真菌 2 446 株 (根 787 株, 茎 946 株, 叶 713 株), 通过形态学特征与分子鉴定方法确定为 49 个分类

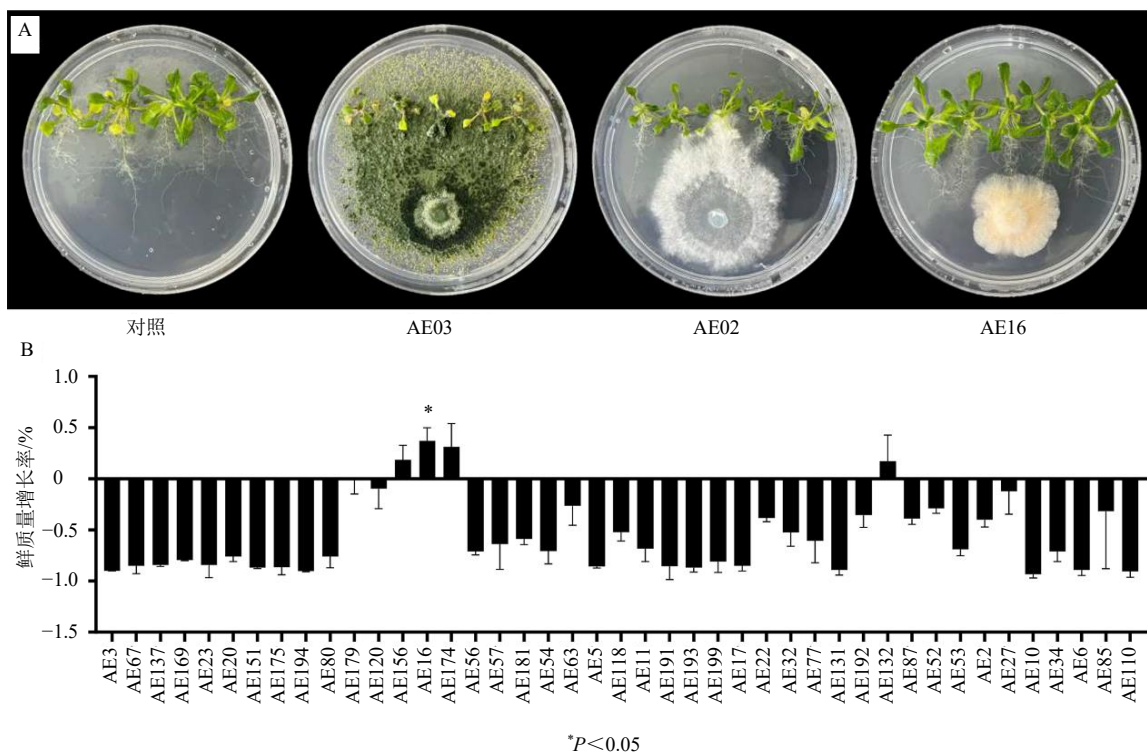


图 2 拟南芥共培养 14 d 生长状况 (A) 与鲜质量增长率 (B)

Fig. 2 Growth promotion (A) and fresh weight growth rate (B) of *A. thaliana* co-cultured for 14 d

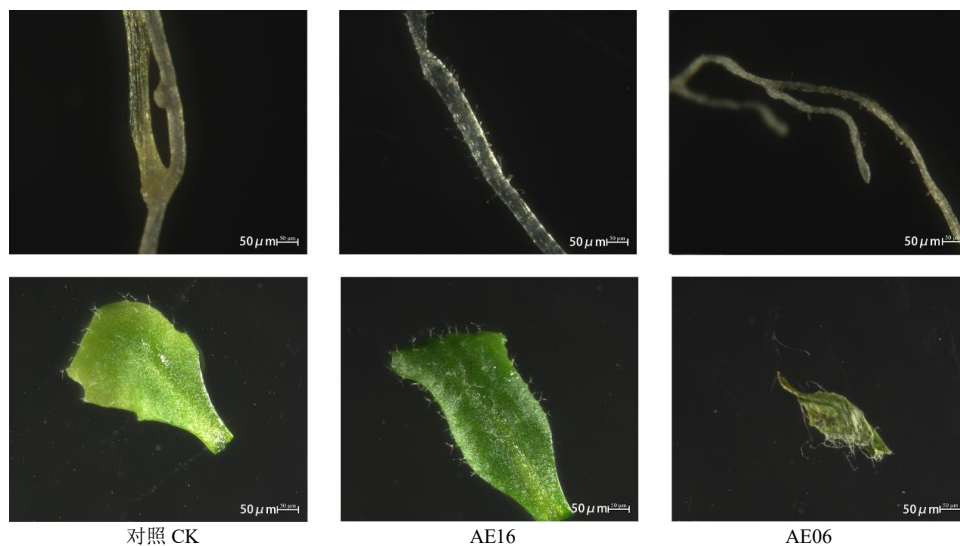


图 3 拟南芥根毛及叶片显微观察

Fig. 3 Microscopic characters of root hairs and leaf blades of *A. thaliana*

单元, 归属于真菌界 3 门 5 纲 10 目 14 科 18 属。在不同组织部位中, 叶与根、叶与茎的相似度最高且一致, 根与茎的相似度最低。相似度的高低水平体现不同部位内生真菌的种类与分布规律存在差异。毛花猕猴桃根、茎、叶组织部位存在共有内生真菌 30 种, 其中 *Trichoderma spirale* 是根的特有

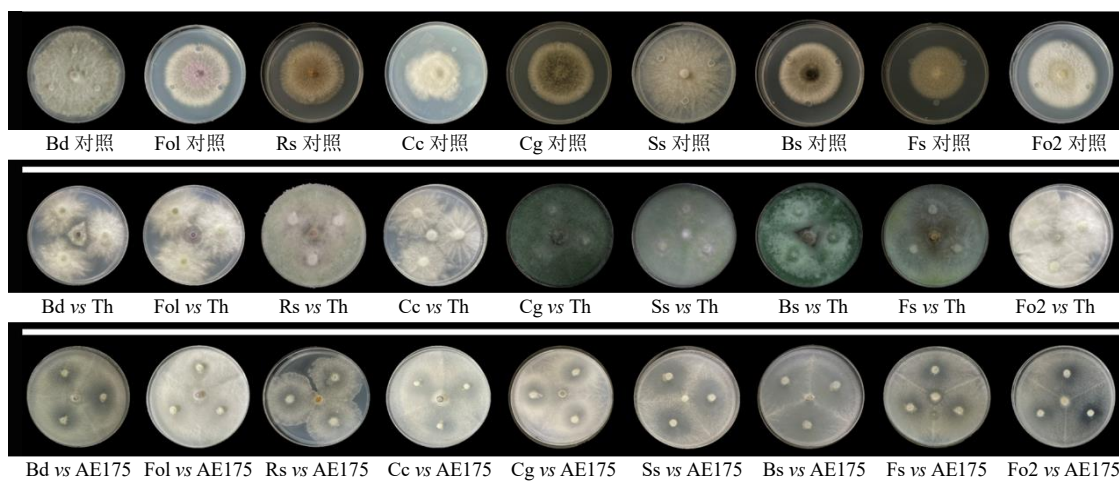
种, *Bionectria ochroleuca* 是茎的特有种。

毛花猕猴桃内生真菌 H 值以茎最高, D 值以叶最高, 均匀度指数以茎最高。多样性、丰富度等指数表明毛花猕猴桃的内生真菌资源较丰富。3 个组织部位的最优势属为木霉属 *Trichoderma*、聚孢霉属 *Clonostachy*、篮状菌 *Talaromyces*、青霉菌属

表 4 毛花猕猴桃内生真菌对病原菌的拮抗效应
Table 4 Antagonistic effect of endophytic fungi from *A. eriantha* on pathogen

处理	编号	抑菌效果								
		麦根腐平脐蠕孢病菌	胶孢炭疽菌	刺盘孢炭疽菌	核盘菌	腐皮镰刀菌	立枯丝核菌	葡萄座腔菌	尖孢镰刀菌	
阳性对照组	Th	+++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++++
木霉属	AE03	+	+++	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+++
	AE67	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	++++
	AE137	+++	—	+++	++++	++++	++++	++++	+++	++++
	AE111	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	AE169	+++	++++	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+++
	AE23	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+++
	AE20	+++	++++	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+++
	AE44	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	AE151	++	—	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+++
	AE175	++	++++	+++	++++	++++	++++	++++	+++	++++
	AE194	++	++++	+++	++++	—	++++	++++	+++	+++
	AE80	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++
	AE181	—	++++	+++	++++	+++	++++	+	++	+
	AE120	+	+++	+	++	+++	++	+	+	+++
聚孢霉属	AE156	+	—	+	+++	++	+++	+	+	+
	AE158	+	+++	+	+	++	+	++	+	+
	AE174	+	+++	+	+	+++	+	+	+	+
	AE56	+	++	+	+++	+++	++	+	++	+
	AE57	+	++	+	+++	++	++	++	+	+
	AE04	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	AE179	+	+++	+	++	+++	+++	++	+	+
	AE51	+	+++	+	+++	—	+++	+	+	+
	AE63	+	++++	+	+++	+++	++++	+	+	+
	AE05	++	++++	+++	+++	++++	++++	+	+++	++++
	AE118	+	++	+	++	++	++++	+	+	+
	AE11	+	+++	+	++++	+++	—	+	++	++
	AE191	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	++
	AE193	+	+++	++	+++	+++	+++	+	++	+++
曲霉属	AE30	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	AE199	+	++++	++	+++	+++	+++	+++	++	++
	AE17	++	++++	+	++++	++++	++++	++	++	++
	AE131	+	++++	++	+++	+++	++++	+++	++	+++
青霉菌属	AE22	+	++++	+	+++	+++	+++	+	+	+
	AE32	+	++++	+	+++	+++	+++	++	+	+
	AE77	++	+++	+	+++	+++	++	+	+	+
	AE192	+	++++	+	+++	+++	+++	+	++	+
	AE18	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	AE132	+++	++++	—	++++	++++	++++	+	+++	+++
	AE29	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	AE87	+	+++	+	++	+++	+++	+	+	+
	AE52	+	+++	+	+++	++++	++	+	+	+
	AE53	+	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
	AE110	++	++++	++	+++	+++	++++	+++	++	++
	AE02	+	+++	+	++++	+++	++	+++	+	++
	AE27	+	+++	+	++++	+++	++	+	++	+
	Rhizopus	AE10	++++	—	++++	++++	++++	—	—	—
其他属	Epicoccum	AE34	++++	+	+++	+++	++++	+	+	+
	Neurospora	AE06	+	++++	+	++++	+++	+	+	+++
	毛木耳	AE85	+	+++	+	++	+++	+	+	+

—无抑菌效果; +小于 60%; ++为 60%~70%; +++为 70%~80%; ++++为 80%~90%; +++++为 90%以上。
—No antibacterial effect; + Less than 60%; ++ 60%—70%; +++ 70%—80%; ++++ 80%—90%; +++++ For over 90%.



Bd-葡萄座腔菌; Fol1、Fo2-尖孢镰刀菌; Rs-立枯丝核菌; Cc-刺盘孢炭疽菌; Cg-胶孢炭疽菌; Ss-核盘菌; Bs-麦根腐平脐蠕孢病菌; Fs-腐皮镰刀菌。

Bd-*Botryosphaeria dothidea*; Fol1, Fo2-*Fusarium oxysporum sensu*; Rs-*Rhizoctonia solani*; Cc-*Colletotrichum camelliae*; Cg-*Colletotrichum gloeosporioides*; Ss-*Sclerotinia sclerotiorum*; Bs-*Bipolaris sorokiniana*; Fs-*Fusarium solani*。

图 4 AE175 对病原菌的抑制效果

Fig. 4 Inhibitory effect of AE175 against various pathogens

Penicillium、曲霉属 *Aspergillus*。木霉属、聚孢霉属、青霉菌属、曲霉属均可作为生物防治剂，拮抗植物病原体与诱导植物抗病性，已应用于中药材、农林等生产领域^[16-21]，如拟康宁木霉 *Trichoderma koningiopsis* 可以调控水杨酸和茉莉酸合成和信号途径关键基因表达，进而提高番茄植株的枯萎病抗病性^[22]；篮状菌 *Talaromyces* 作为腐生霉菌分布于植物根、叶部，通过土壤腐殖质、溶解钾长石与磷酸钙等方式，促进植物生长^[23]。

本实验从 49 种内生真菌中筛选出 1 株能显著促进拟南芥生长的菌株 AE16，鉴定为 *Clonostachys* sp.。*Clonostachys* sp. 为聚孢霉属真菌，普遍定殖于植物的根、叶和花等器官中，通过加速生根、增大叶片等方式促进植物生长并提高产量^[18]。下一步可以从多组学及植物生理学等方面研究聚孢霉属促生活性的分子机制，为毛花猕猴桃药材产量提升提供参考依据。抗病活性筛选结果显示，87.76% 的真菌对 5 种以上的病原菌均有抑制作用，69.39% 对 8 种病原菌均有抑制作用。与阳性对照组有显著差异的有 11 株（包括木霉属与白僵菌属），其中抑菌作用最强的为 AE175，鉴定为 *Trichoderma* sp.，能够显著抑制尖孢镰刀菌、立枯丝核菌与葡萄座腔菌的生长。木霉属真菌诱导植物提升对微生物病害的抵御能力，促进植物生长，高效减少微生物病害对种植造成的损失。如木霉属真菌可以用于由尖孢镰刀菌、立枯丝核菌、葡萄座腔菌等引起的根腐病、

软腐病防治，在药材栽培与生产领域具有广泛应用价值^[24-27]。

本研究对毛花猕猴桃内生真菌的菌群结构及生物活性进行了分析，但是采样地较为单一，同时分离方法为传统分离法，可能会导致部分内生真菌未得到充分分离，下一步可进一步优化实验设计，通过增加样地，改用高通量分离方法^[28]等方式，充分挖掘毛花猕猴桃内生真菌资源；对于得到的促生活性菌株 AE16 与强抑菌活性菌株 AE175，可设计多引物进行菌种鉴定，进一步明确其分类学地位，并对其作用机制进行探讨，为毛花猕猴桃产业发展提供微生物工程菌株。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wang S Y, Gao X Q, Sun Q M, *et al.* The phytochemical properties, pharmacological effects and traditional uses of *Actinidia eriantha* Benth.: A review [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 959900.
- [2] 张晓芹, 王娜妮, 李亚平, 等. 禽药白山毛桃根抗肿瘤作用及活性成分研究进展 [J]. *中国现代应用药学*, 2019, 36(22): 2876-2879.
- [3] 高欢, 肖委明, 廖光联, 等. 毛花猕猴桃新品种“赣绿 1 号”的生物学特性及关键栽培技术 [J]. *中国南方果树*, 2024, 53(1): 179-184.
- [4] 党苗苗, 丁海娥, 从丙超, 等. 药用植物内生真菌研究进展 [J]. *农村经济与科技*, 2020, 31(14): 31-32.
- [5] 陈旭, 曾茜, 刘璞玉, 等. 贵州小白及内生真菌多样性

- 与产抗病活性物质菌株的筛选 [J]. 西南农业学报, 2017, 30(1): 111-117.
- [6] 胡玉海, 王晨, 谢宇端, 等. 白山毛桃根提取物通过调控 miR-182-5p/PCDH10 表达抑制非小细胞肺癌细胞增殖、迁移、侵袭 [J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(23): 5383-5387.
- [7] 赵泽义, 陈军堂, 王明明. 白山毛桃根提取物对非小细胞肺癌细胞的抑制效果及机制研究 [J]. 广西医科大学学报, 2020, 37(12): 2166-2172.
- [8] 崔莹. 猕猴桃属植物化学成分及药理活性研究进展 [J]. 西安文理学院学报: 自然科学版, 2011, 14(4): 21-25.
- [9] 吴婷, 王梦迪, 黄情儿, 等. 延胡索不同组织器官中内生真菌菌群结构与多样性分析 [J]. 中草药, 2023, 54(16): 5372-5378.
- [10] 王景瑄, 陈文华, 李思琦, 等. 不同栽培模式铁皮石斛可培养内生真菌菌群结构、多样性及分布规律 [J]. 中草药, 2023, 54(9): 2917-2924.
- [11] 吴令上. 南方红豆杉内生真菌多样性、次生代谢产物及其与宿主的相关性研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2012.
- [12] 沈湛云, 朱波, 张泉龙, 等. 不同产地玄参内生真菌种群结构的比较分析 [J]. 中草药, 2019, 50(4): 957-962.
- [13] 杜疏扬, 杨自强, 韩婷, 等. 促进拟南芥生长的西红花内生真菌的筛选和研究 [J]. 中药材, 2018, 41(6): 1271-1275.
- [14] 陆洁淼, 张家豪, 明乾良, 等. 西红花球茎腐烂病拮抗真菌的筛选、鉴定及抑菌机制 [J]. 中草药, 2022, 53(10): 3165-3170.
- [15] 隋韵静. “核桃黑”病原研究及拮抗菌筛选 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- [16] 蒋恒. 木霉菌对辣椒疫霉菌生防机制的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
- [17] 冉林, 焦阳, 凌键, 等. 茸状木霉 3199 菌株对黄瓜枯萎病的生物防治研究 [J]. 植物病理学报, 2023, 26: 1-9.
- [18] 王光辉, 范君, 刘慧泉. 聚孢霉属真菌研究进展、应用现状及展望 [J]. 植物病理学报, 2023, 28: 1-14.
- [19] 危潇, 黎妍妍, 姚经武, 等. 哈茨木霉 WF2 菌株鉴定及对烟草黑胫病的防效 [J]. 中南农业科技, 2023, 44(11): 12-15.
- [20] 钟宇. 青霉菌灭活菌丝体诱导植物抗病性的机理研究 [D]. 昆明: 云南大学, 2017.
- [21] Thambugala K M, Daranagama D A, Phillips A J L, *et al.* Fungi vs. fungi in biocontrol: An overview of fungal antagonists applied against fungal plant pathogens [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 604923.
- [22] 王前程, 张迎迎, 戴陶宇, 等. 拟康宁木霉 T-51 菌株对番茄枯萎病的生物防治及其机理研究 [J]. 西北植物学报, 2022, 42(6): 974-982.
- [23] 孙剑秋, 阮永明, 金世宇, 等. 篮状菌属的重要性及其分类学研究概况 [J]. 菌物研究, 2021, 19(2): 83-93.
- [24] 陈晓霞, 于红豆, 李梦玮, 等. 基于文献计量分析的根腐病研究现状及趋势 [J]. 应用与环境生物学报, 2024: 1-15.
- [25] 穆向荣, 马逾英, 杨枝中, 等. 药用植物根腐病防治的研究进展 [J]. 中药与临床, 2014, 5(2): 5-8.
- [26] 魏玲. 柠檬醛对猕猴桃采后软腐病的防治机理及保鲜效果研究 [D]. 南昌: 江西农业大学, 2021.
- [27] Khan R A A. 木霉属次生代谢提取物对植物病原真菌、细菌和线虫的活性筛选研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
- [28] Li M, Raza M, Song S, *et al.* Application of culturomics in fungal isolation from mangrove sediments [J]. *Microbiome*, 2023, 11(1): 272.

[责任编辑 时圣明]