

玄参内生真菌对宿主叶斑病的防治作用

张思媛¹, 任 丹¹, 张 楠¹, 黄倩儿¹, 许静怡¹, 施江南¹, 徐绍恺¹, 秦路平^{1,2*}, 朱 波^{1,2*}

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311402

2. 浙江中医药大学松阳研究院, 浙江 松阳 323400

摘要: 目的 筛选得到能够有效防治玄参 *Scrophularia ningpoensis* 叶斑病的内生真菌, 并探讨其作用机制。方法 以前期分离得到的玄参内生真菌为候选菌株, 玄参叶斑病原菌草茎点霉 (*Phoma herbarum*, PH) 为指示菌, 采用平板对峙法筛选内生真菌拮抗菌株; 采用活体叶片接种试验, 考察内生真菌对玄参叶斑病的活体防治效果, 测定玄参过氧化氢酶 (catalase, CAT) 防御酶、活性氧、水杨酸 (salicylic acid, SA) 等生理指标。采用 ITS 分子序列扩增对生防菌株进行菌种鉴定。结果 72 株受试内生真菌中, 共有 28 株对草茎点霉菌存在显著抑制作用, 其中抑菌率最高的菌株为 D90, 抑菌率为 $(83.30 \pm 3.00)\%$ 。共有 4 株内生真菌对玄参活体叶斑病具有显著防治效果, 分别为 D1、D3、D18 和 D90, 其病斑面积占比分别为 $(20.53 \pm 0.32)\%$ 、 $(2.07 \pm 0.05)\%$ 、 $(5.15 \pm 0.12)\%$ 和 $(1.92 \pm 0.08)\%$, 其中 D90 的防治效果最好, 防效为 54.70%; ITS 分子鉴定 D90 为果生刺盘孢菌 *Colletotrichum fructicola*。接种 D90 后, 玄参 CAT 酶活性得到显著提升, 在接种第 4、6 天, PH+D90 处理组 CAT 酶活性显著高于叶斑病模型组, 同时, D90 显著提升玄参超氧阴离子自由基、木质素含量水平积累, 但降低了玄参 SA、NO 的含量。结论 内生真菌 D90 能有效防治玄参叶斑病, 该作用可能与诱导玄参 CAT 酶活性提升、活性氧的迸发及木质素含量积累有关。

关键词: 玄参; 内生真菌; 叶斑病; 果生刺盘孢菌; 生物防治

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)09-3283-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.09.025

Biocontrol effect of endophytic fungi from *Scrophularia ningpoensis* on host's leaf spot disease

ZHANG Siyuan¹, REN Dan¹, ZHANG Nan¹, HUANG Qing'er¹, XU Jingyi¹, SHI Jiangnan¹, XU Shaokai¹, QIN Luping^{1,2}, ZHU Bo^{1,2}

1. School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311402, China

2. Songyang Institute of Zhejiang Chinese Medical University, Songyang 323400, China

Abstract: Objective To screen candidate endophytic fungi for the biocontrol of *Scrophularia ningpoensis* leaf spot disease and reveal their mechanism. **Methods** Based on the endophytic fungal strains isolated from *S. ningpoensis*, the antagonistic strains, were screened by plate confrontation trial with *Phoma herbarum* (PH) while using *Trichoderma harzianum* (TH) as an indicator. Control effect of endophytic fungi on the leaf spot of *S. ningpoensis* was investigated by *in vivo* leaf inoculation test, and the physiological indexes including plant protective enzyme activity, reactive oxygen species (ROS) level and salicylic acid (SA) content were determined. Further, the biocontrol strains were identified by ITS molecular sequence amplification. **Results** Among the 72 endophytic fungi tested, a total of 28 strains had significant inhibitory effects on PH, while endophytic fungus D90 had the highest inhibitory rate $0.833\% \pm 0.030\%$. The results of *in vivo* inoculation of leaves showed that a total of four endophytic fungi had significant control effects on the leaf spot disease of *S. ningpoensis*, including D1, D3, D18 and D90, with the proportion of lesion area was $(20.53 \pm 0.32)\%$, $(2.07 \pm 0.05)\%$, $(5.15 \pm 0.12)\%$ and $(1.92 \pm 0.08)\%$, respectively. D90 had the best control effect, with a control effect of 54.70%. D90 was identified as *Colletotrichum fructicola*. CAT activity of *S. ningpoensis* was significantly improved after inoculation

收稿日期: 2024-08-08

基金项目: 浙江中医药大学松阳研究院科技攻关专项 (SY-Z-2024501); 浙江省重点研发计划项目 (2021C04029)

作者简介: 张思媛 (2003—), 女, 在读本科生。E-mail: 1937347676@qq.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, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为植物内生菌。E-mail: zhubo@zcmu.edu.cn

of D90; On the 4th and 6th day of inoculation, compared with the leaf spot model group, D90 significantly increased the superoxide anion radical and lignin content of *S. ningpoensis*, but decreased the content of SA and NO in *S. ningpoensis*. **Conclusion** Endophytic fungus D90 has good biocontrol potential for *S. ningpoensis* leaf spot disease, this may be attributed to the improvement of CAT activity, ROS burst, and lignin content accumulation.

Key words: *Scrophularia ningpoensis* Hemsl.; endophytic fungi; leaf spot disease; *Colletotrichum fructicola*; biocontrol effect

玄参药材系玄参科植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. 的干燥根, 别名元参、黑参^[1], 为浙江省著名道地药材“浙八味”之一, 始载于《神农本草经》, 性微寒, 味甘、苦、咸, 具有清热凉血、滋阴降火、解毒散结的功效, 常用于热病伤阴、舌绛烦渴、津伤便秘等症^[2-3]。玄参含有环烯醚萜苷类、苯丙素苷类等活性成分, 具有抗炎、保护心血管、保肝等药理活性^[1-3], 主产地为浙江、湖北、安徽、四川、陕西等地^[3]。

由草茎点霉 *Phoma herbarum* (PH) 引起的玄参叶斑病是玄参叶部主要病害之一, 可使玄参每年减产约 10%, 严重时可达 50%, 严重影响了玄参的产量与品质^[4]。玄参叶斑病于 5 月中旬开始发病, 8 月下旬开始, 随着气温的不断升高, 叶斑病病害逐步加重, 8 月下旬至 9 月下旬为发病高峰期。病害最初在植株老叶上发生, 然后向周围叶片水平扩展, 在盛发期时, 向植株上部叶片垂直发展^[5]。目前, 关于玄参叶斑病的防治措施主要为化学防治和农业防治。化学防治主要依靠喷施 50% 多菌灵可湿性粉剂、60% 代森锰锌或 75% 百菌清粉剂等农药, 对玄参叶斑病有一定的防治效果, 但易造成药材农药残留, 影响临床用药安全, 并对环境造成污染^[5]。农业防治主要依靠加强田间管理, 通过合理选地整地等措施降低病害的发生率, 但难从源头上杜绝病害的发生^[6]。

植物内生真菌 (plant fungal endophytes) 广泛存在于植物内部 (根、茎、叶等), 对宿主植物无明显的危害作用^[7-8]。目前对于植物内生真菌的报道多集中在内生真菌次生代谢、与宿主相互作用、内生真菌多样性等方面^[8-10], 研究发现, 内生真菌及其产生的次生代谢产物具有抑制病原菌生长、提高植物抗病性等作用^[11]。利用植物内生真菌对药用植物病害进行生物防治是目前中药材栽培种植病虫害防治的有效策略, 具有可持续、无环境污染、对人不良反应小以及不易产生抗药性等特点^[12]。但是, 关于通过植物内生真菌防治玄参叶斑病的应用鲜有报道。因此, 本研究在前期分离得到玄参内生真菌的基础上, 探讨内生真菌对玄参叶斑病的防治效果, 以期为大田防治玄参叶斑病提供

菌种材料与参考依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

课题组前期从 7 个玄参主产区健康玄参中分离得到的 72 株玄参内生真菌。玄参叶斑病原菌 PH 和阳性菌哈茨木霉 *Trichoderma harzianum* (TH) 由中国普通微生物菌种保藏中心 (CGMCC) 所提供。2.5% NaClO (批号 S828471, 上海麦克林生化科技股份有限公司)、75% 乙醇 (批号 W14419, 上海源叶生物科技有限公司)、0.9% NaCl (批号 BL158A, 北京兰杰柯科技有限公司)、葡萄糖 (批号 S11022, 上海源叶生物科技有限公司)、琼脂 (批号 9002-18-0, 杭州莱钼特生物科技有限公司)、80% 代森锰锌 1 000 倍液 (批号 N9015801003, 利民化学有限责任公司)、PBS (批号 BL302A, 北京兰杰柯科技有限公司), MS 培养基、过氧化氢检测试剂盒、超氧阴离子自由基检测试剂盒、一氧化氮检测试剂盒和过氧化氢酶检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所), 水杨酸检测试剂盒 (上海双赢生物科技有限公司), 木质素含量检测试剂盒 (上海双赢生物科技有限公司) 等。

玄参种子于 2022 年采集于浙江中医药大学百草园, 由浙江中医药大学药用植物园刘孝铨讲师鉴定为玄参科植物玄参 *S. ningpoensis* Hemsl. 的新鲜种子。

1.2 主要仪器

无菌超净台 (上海博讯医疗生物仪器股份有限公司), MC-100B 型恒温培养摇床 (上海牟测仪器科技有限公司), 超低温冰箱 (Thermo 公司), 台式高速离心机 (Thermo Fisher 公司), Vortex Mixer OL-866 型微型涡旋混合仪 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司), 酶标仪 (Spectro-photometer 公司), 纯水仪 (上海和泰仪器有限公司)。

1.3 供试培养基

1.3.1 PDA 培养基 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 15 g, 水 1 L, pH 自然。

1.3.2 PDB 培养基 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g,

水 1 L, pH 自然。

1.3.3 MS 培养基 MS (百思) 41.74 g, 水 1 L, pH 5.8。

2 方法

2.1 玄参叶斑病病原菌的平板抑制试验

将前期分离得到的内生真菌与 PH 分别在 PDA 培养基上活化。无菌环境下, 用 5 mm 的打孔器分别在供试菌和 PH 的菌落边缘打取菌饼, 以 PH 为中心, 供试菌在其周围均匀等距接种 3 点供试菌菌饼。将仅接 PH 的平板菌落生长半径作为对照, 于真菌培养箱 28 °C 下培养 10 d, 计算抑菌率, 试验平行 3 次^[13]。

抑菌率=(对照组菌落半径-处理组菌落半径)/对照组菌落半径

2.2 内生真菌对玄参叶斑病的防效测定

2.2.1 玄参无菌苗的培养 选取饱满、大小相近的玄参种子置于离心管中, 加入 75%乙醇处理 10 s, 倾去处理液, 再加入 2.5% NaClO 处理 8 min, 倾去处理液。后用无菌水冲洗 4~5 次, 每次 5 min。将消毒好的玄参种子置于无菌滤纸上, 吸干水分, 用镊子接种于 MS 培养基中, 每瓶接种 20 颗, 光照, 温度 26 °C 培养, 2 周后转移至新的 MS 培养基中。

2.2.2 玄参叶斑病模型的构建 选取生长 2 月左右的健康玄参植株叶片, 放于铺有无菌滤纸的培养皿中, 每片叶子用 5 mL 注射器扎 4 个孔, 每个孔上接种已活化的 PH 菌饼 (5 mm), 置于 26 °C、12 h 光暗交替培养的光照培养箱中保湿培养 (每个培养皿中加入等比例的 PDB 与无菌水), 每隔 24 h 移动菌块, 防止粘连, 接种 4 d 后移去。每天观察叶片发病情况, 记录病斑的颜色及大小, 以接种空白菌丝块的叶片作为空白对照。

2.2.3 玄参内生真菌对玄参叶斑病的活体防效试验

(1) 孢子悬浮液的制备: 供试菌株在 PDA 培养基培养 1 周左右, 用 5 mm 打孔器打取菌落边缘菌块, 转接于含有 50 mL PDB 培养基中, 于 28 °C、180 r/min 的摇床培养 1 周, 四层纱布滤过, 除掉菌丝, 血球计数板观察, 调整孢子浓度为 10^7 cfu/mL, 待用。

(2) 菌悬液的制备: 供试菌在 PDA 培养基上活化后, 打取 5 mm 菌丝块转接于 50 mL PDB 培养基中, 于 28 °C、180 r/min 的摇床培养 1 周, 四层纱布过滤得到菌丝球, 加适量无菌水粉碎, 即得菌悬液, 待用。

(3) 玄参叶斑病生防菌株的筛选: 将制备好的供试菌孢子悬浮液以及菌悬液喷施于已接 PH 的玄参叶片上, 接种 48 h 后移去 PH 菌块, 每天记录叶片颜色、病斑大小。本实验共有 3 组处理, 接菌处理: 向保湿后的玄参叶片上先接种 PH 菌块, 48 h 后再接种无菌水 (PH+水); 接种后处理: 向保湿后的玄参叶片上先接种 PH, 48 h 后再分别接种供试菌的孢子悬浮液及菌悬液 (PH+拮抗菌); 对照处理: 接种无菌水为空白对照 (水)。每组处理重复 6 次, 计算病斑面积占比。

根据初步筛选的结果, 选取病斑面积占比最小的供试菌, 按上述同样的方法进行进一步分析, 共 6 组处理, 接菌处理: 向保湿后的玄参叶片上先接种草茎点霉菌块, 48 h 后再接种无菌水 (PH+水); 先接种供试菌, 48 h 后再接种无菌水 (拮抗菌+水); 接种后处理: 向保湿后的玄参叶片上先接种草茎点霉菌, 48 h 后再分别接种供试菌孢子悬浮液及菌悬液 (PH+拮抗菌)。对照处理: 向保湿后的玄参叶片上先接种草茎点霉菌块, 48 h 后再分别接种适量的哈茨木霉 (PH+哈茨木霉) 和 80%代森锰锌 1 000 倍液 (PH+80%代森锰锌 1 000 倍液); 接种无菌水为空白对照 (水)。每天观察叶片病斑大小, 一周后计算病情指数 (DI)。玄参叶斑病的分级标准: 0 级: 叶片无病斑出现; 1 级: 病斑面积低于整片叶面积的 1/4; 2 级: 病斑面积占整片叶面积的 1/4~1/2; 3 级: 病斑面积占整片叶面积的 1/2~3/4; 4 级: 病斑面积高于整片叶面积的 3/4 以上。

$DI = \sum (\text{发病叶数} \times \text{发病等级}) / \text{总叶片数} \times \text{最高等级}$

2.3 生防真菌的鉴定

将生防菌株接种到 PDA 培养基上进行活化培养, 采用 Takara9770A 试剂盒对其进行基因组 DNA 提取。按照黄情儿等^[14]的方法进行 PCR 扩增。登陆 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 利用 BLAST 将测序获得的各菌株 ITS 和 5.8 S 基因序列与 GenBank 中的已知序列进行比对, 下载相似性最高的菌种, 使用 MEGA7.0 软件作邻接法 (neighbor-joining, NJ) 分析, 通过构建系统进化树, 结合形态学特征确定待测菌株的分类学地位。真菌鉴定参照王景暄等^[15]的方法。

2.4 样本前处理

玄参叶片材料的获得及单独接种 PH、拮抗菌、PH 加拮抗菌、PH 加哈茨木霉、PH 加 80%代森锰锌 1 000 倍液稀释液和无菌水的 6 种接种处理方案按

“2.2.3”项方法，并于接种后每隔 0、2、4、6 和 8 天，共 5 个时间点，分别采集各处理样本，进行植物叶片防御酶活性测定和生理指标分析。每个生理指标取样量：每组处理取样量 0.05 g，平行重复 3 次，共 5 个时间点，7 个关键生理指标，每组处理共取 15 批样品，6 个处理组共取 90 批样品。叶片采集后，立即装入 1.5 mL 冻存管中，迅速冻存于液氮中，待测。

取组织块 (0.02~0.05 g)，最少可到 2~5 mg 在冰冷的 PBS 中漂洗，滤纸拭干，称定质量，置于离心管中；用移液管取遇冷的匀浆介质 (0.9% NaCl 溶液)，按质量：体积=1：4 的比例加入装有组织液的离心管中，用眼科小剪剪碎组织块（在冰上操作）；匀浆的方式选用反复冻融，将装有组织块的离心管置于液氮中 30 s，然后置于 37 ℃ 水浴锅中溶解，反复进行 4 次左右；将制备好的 20% 植物组织匀浆液用离心机 4 ℃，4 000 r/min，离心 10~15 min，取上清液，4 ℃ 冰箱保存。

2.5 生理生化指标测定

收集不同处理组、不同时间点的玄参叶片组织后，按“2.4”项进行组织前处理后，测定不同处理组中参与调控的过氧化氢酶 (catalase, CAT) 防御酶的活性。CAT 活性采用相关试剂盒进行检测，每个样本平行重复 3 次。玄参叶片经组织样品处理后，一氧化氮 (NO)、过氧化氢 (H₂O₂)、超氧阴离子自由基、水杨酸 (salicylic acid, SA)、木质素的检测均使用相应的理化检测试剂盒进行检测，每个样本平行重复 3 次^[16-17]。

3 结果与分析

3.1 玄参内生真菌对叶斑病原菌的平板抑制作用

采用平板对峙方法对 72 株供试菌株进行平板拮抗分析，共得到 28 株对 PH 具有较好拮抗作用的内生真菌，拮抗菌株占比 38.89%。只接种 PH 的 PDA 培养基中，PH 生长良好，菌落呈黄棕色，拮抗菌存在的情况下，PH 的生长明显受到抑制，菌落逐渐被拮抗菌包围、吞噬，28 株拮抗菌中，内生真菌 D90 的抑菌作用最好，相对抑制率为 (83.30±3.00) %，见表 1，28 株内生真菌对 PH 抑制效果见图 1。

表 1 玄参内生真菌对 pH 的相对抑菌率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Relative inhibitory rate of endophytic fungi of *S. ningpoensis* against *Phoma herbarum* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

玄参内生真菌 相对抑菌率/%		玄参内生真菌 相对抑菌率/%	
D1	81.6±2.6	D55	71.1±4.6
D2	84.2±5.3	D56	71.0±6.1
D3	80.7±1.5	D90	83.3±3.0
D4	79.8±3.0	D115	76.3±4.6
D5	81.6±2.6	D143	72.8±1.5
D7	76.3±4.6	D162	70.1±2.6
D10	74.6±1.5	D170	71.5±5.3
D11	70.2±3.0	D180	78.1±5.5
D12	81.6±5.3	D191	78.9±4.6
D14	75.4±1.5	D208	70.3±3.0
D15	71.1±4.0	D215	71.2±7.6
D17	71.0±5.5	D234	81.6±2.6
D18	72.1±1.3	D242	71.8±5.3
D34	80.7±1.5	D250	80.8±5.5

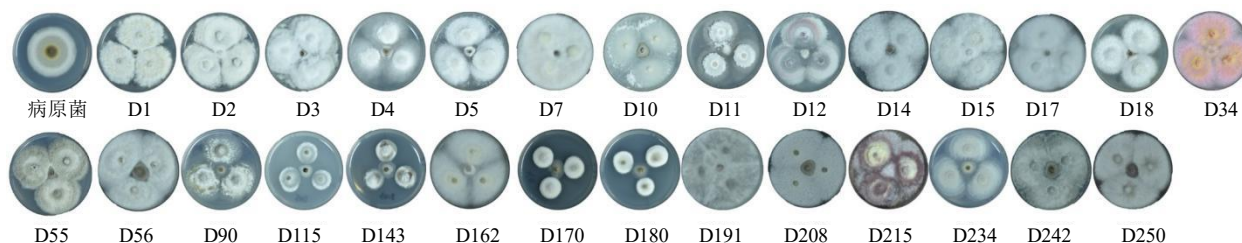


图 1 28 株玄参内生真菌对 PH 的抑制作用

Fig. 1 Inhibitory effects of 28 endophytic fungi of *S. ningpoensis* against *Phoma herbarum*

3.2 内生真菌对玄参叶斑病的活体防效测定

在病原菌接种第 2 天，玄参叶片表面开始出现黑褐色斑点，第 4 天病斑面积增大，叶片出现变黄、萎蔫等症状。接种 28 株内生真菌后，多数玄参叶片仍然出现了叶斑病的病害表征，但是接种内生真菌

D1、D3 的活体菌悬液和 D18、D90 的孢子悬浮液的玄参叶片只有轻微发病，病斑面积占比分别为 (20.53±0.32) %、(2.07±0.05) %、(5.15±0.12) % 和 (1.92±0.08) %，该 3 株内生真菌对玄参 PH 引起的叶斑病具有防治效果 (表 2)。进一步对 D90

表 2 4 株玄参内生真菌对叶斑病的防治效果

Table 2 Biocontrol effect of four endophytic fungal isolates on *S. ningpoensis* leaf spot disease

处理	病斑面积占比/%
D1 (菌悬液)	20.53±0.32
D3 (菌悬液)	2.07±0.05
D18 (孢子悬浮液)	5.15±0.12
D90 (孢子悬浮液)	1.92±0.08
PH	47.101±0.130
无菌水	0

的防治效果进行定量分析,发现在已接种 pH 的玄参叶片喷施 D90 的孢子悬浮液,玄参叶片的病情指数是仅为 28.77%,生防效果为 54.70% (图 2、表 3)。



a-病原菌+80%代森锰锌; b-病原菌+哈茨木霉; c-病原菌+拮抗菌; d-病原菌+无菌水; e-拮抗菌+无菌水; f-无菌水+无菌水。

a-PH+Positive drug; b-PH+Positive fungus; c-PH+D90; d-PH+Water; e-D90+Water; f-Water.

图 2 D90 防治玄参叶斑病活体防治试验

Fig. 2 In vivo trial of D90 on leaf spot disease of *S. ningpoensis*

表 3 D90 对玄参叶斑病的防治效果

Table 3 Biocontrol effect of D90 on *S. ningpoensis* leaf spot disease

处理	病情指数/%
病原菌+无菌水	50.26
病原菌+D90	22.77
病原菌+哈茨木霉	20.10
病原菌+80%代森锰锌1000倍液	11.60
D90+无菌水	0
无菌水+无菌水	0

处理组 PH+D90 的超氧阴离子自由基含量显著下降。接种第 4、8 天,处理组 PH+水和处理组 PH+D90 超氧阴离子自由基含量呈上升趋势,并且高于无菌水组,但是接种第 6 天,各处理组(除 PH+80%代森锰锌)超氧阴离子自由基含量均发生明显的下降,处理组 PH+水与 D90+水 超氧阴离子自由基含量下降的最为明显 (图 3)。

3.3.2 NO、SA 和木质素含量测定 不同处理组玄参叶片中 NO 含量整体呈现先增加后减小的趋势。接种第 2 天,接种 PH 的处理组中 NO 的含量开始上升,并高于无菌水组。接种第 4 天,无菌水组 NO 含量达到峰值,而处理组 PH+水 NO 含量下降,并且处理组 PH+水 NO 含量高于处理组 PH+D90。SA 的含量总体呈现下降后小幅上升的趋势。

3.3 玄参生理生化指标的测定

3.3.1 CAT 酶与活性氧指标 CAT 酶活性变化呈现先减少后增加的趋势。在接种第 2 天,无菌水组的 CAT 酶活性显著下降。在接种第 4 天时,处理组 PH+水和 PH+D90 CAT 酶的活性急剧下降。接种的第 6、8 天时,处理组 PH+水和 PH+D90 CAT 酶活性均发生明显上升。玄参叶片接种 PH 后, H_2O_2 含量总体呈先减少再增加的趋势,在接种第 8 天后,处理组 PH+水 H_2O_2 含量较第 6 天急剧增加,但 D90 减少了 PH 接种后期 H_2O_2 含量的过度增加。在接种第 2 天,与无菌水组相比,处理组 PH+水和

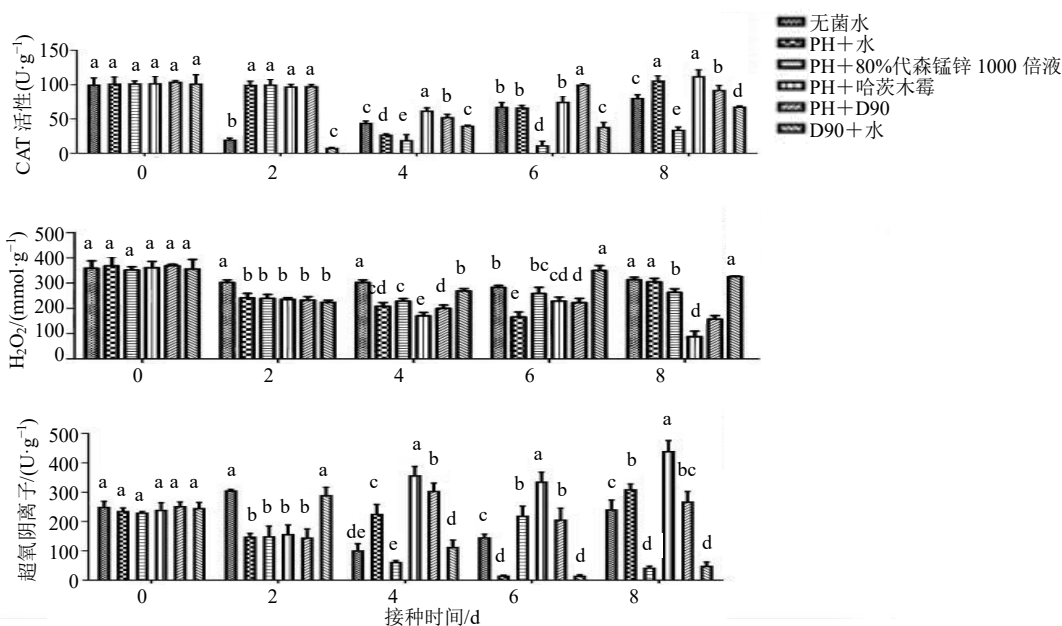
接种第 2 天,处理组 PH+水和 PH+D90 水杨酸含量下降,但高于无菌水组。木质素的含量整体呈现下降趋势,接种第 2~8 天,处理组 PH+D90 木质素含量均高于处理组 PH+水 (图 4)。

3.4 生防菌株 D90 的分子鉴定

ITS 分子鉴定结果显示,菌株 D90 与炭疽菌属菌株有很高的同源性,从其中选择部分同源性高的序列,利用 MEGA6.0 软件构建系统发育树,发现菌株 D90 与果生刺盘孢 *Colletotrichum fructicola* (GenBank 号 MN841836.1) 亲缘关系最近,并且位于同一最小分支,其同源性高达 99.41%,因此,ITS rRNA 序列分析证实了菌株 D90 为果生刺盘孢,见图 5。

4 讨论

本实验通过对前期分离得到的玄参内生真菌进行叶斑病病原菌 PH 的平板对峙试验,筛选得到 28 株对 PH 具有较高抑制率的内生真菌,进一步对其进行室内叶片活体叶斑病防效试验,共得到 4 株对玄参叶斑病具有较好防治效果的生防菌,分别是 D1、D3、D18 和 D90,其中 D90 防治效果最好,对病原菌抑制率 (83.30 ± 3.00)%,活体叶片生防效果为 54.70%。ITS 序列扩增将 D90 鉴定为炭疽菌属果生刺盘孢。



不同字母表示差异显著, * $P < 0.05$, 下同。

Different letters indicate significant differences, * $P < 0.05$, same as below.

图 3 不同处理条件下玄参叶片 CAT 活性、 H_2O_2 和超氧阴离子水平变化

Fig. 3 Variations of CAT activity, H_2O_2 and $O_2^{\cdot -}$ of *S. ningpoensis* leaves in different treatments

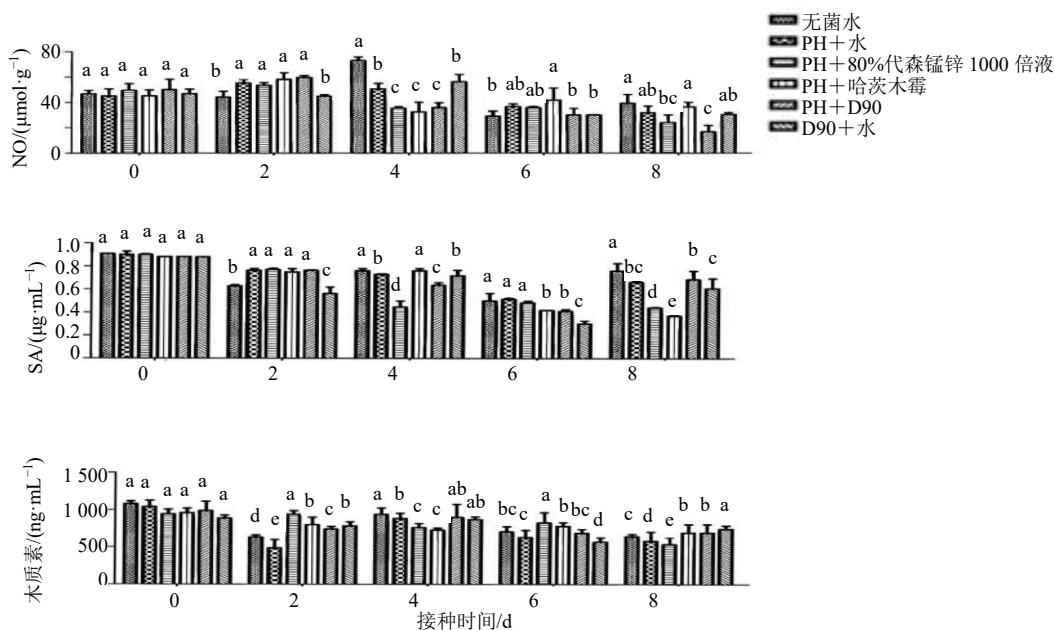


图 4 不同处理条件下玄参叶片中 NO、SA 和木质素水平变化

Fig. 4 Variations of NO, SA and lignin contents of *S. ningpoensis* leaves in different treatments

植物内生真菌的存在可以增强植物对某些病原微生物的抗病能力, 内生真菌是植物防控技术领域重要的微生物资源。目前对果生刺盘孢菌的研究主要集中在其基因功能和致病性分析, 有研究表明油茶炭疽病是油茶最重要病害之一, 引起该病害的主

要致病菌为果生刺盘孢菌, 其转录因子 CfHac1 参与调控果生刺盘孢菌的生长、产孢、附着胞的形成、致病力以及响应外界渗透压胁迫过程^[18]。但是关于通过果生刺盘孢菌提高植物抗病性的应用目前还未见报道。

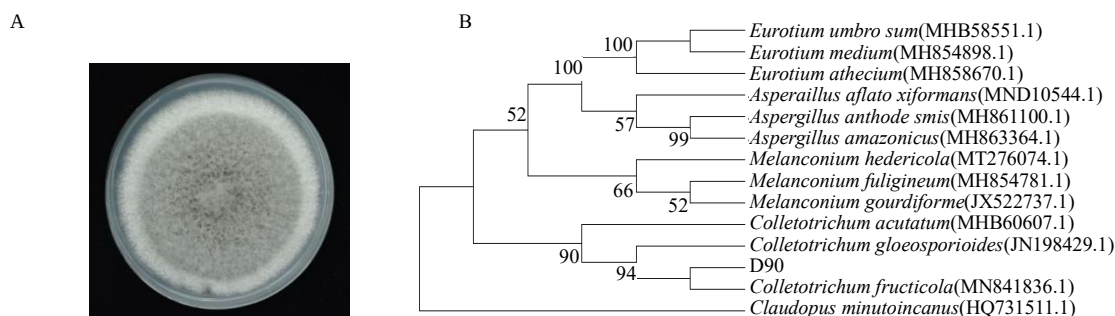


图 5 D90 菌株形态 (A) 及基于 ITS rRNA 序列构建的系统发育树 (B)

Fig. 5 Morphology of strain D90 (A) and phylogenetic tree (B) constructed based on ITS rRNA sequence

植物在生长发育过程中, 受到一系列如真菌、细菌、病毒和昆虫等病原物的侵袭, 严重阻碍植物的生长发育^[19]。为了抵御病原物的侵袭, 植物会逐渐形成一系列免疫反应以此来阻滞病原物的侵染。植物与病原物的相互作用其本质是一个连续的细胞信号转化及传导的过程, 包括植物与病原物的相互识别, 胞间信号分子的跨膜传递, 胞内第二信使形成, 信号分子的级联传递, 以及信号途径的相互关联, 最终诱导防卫基因的表达^[20]。诱导植物抗病性产生的关键是抗病信号在细胞内的转导, 最早激发的分子事件主要包括活性氧的迸发、NO 的大量积累、防御酶的激活及激素调节等几个主要方面^[21]。活性氧主要包含 H_2O_2 和超氧阴离子自由基等, 主要是 O_2 的连续部分还原产生的一系列毒性中间物^[22]。 H_2O_2 和超氧阴离子自由基的积累可以引起细胞发生过敏性坏死反应, 促使植物细胞壁的木质化以及作为抗病反应中的信号中间体, 调控防卫基因的表达^[23]。除此之外, 活性氧可以从转录水平上诱导植物体内抗病相关基因表达^[24]。因此, 研究植物在抗病过程中活性氧的产生对于植物对病原物的抵御入侵具有重要的意义。

水杨酸在植物病害响应中发挥着重要作用, 有学者研究发现在小麦白粉菌侵染的初期, 小麦可以通过增加体内水杨酸的含量, 增强对白粉菌的抗病响应^[25]。本实验中, 接种第 2 天, 处理组 PH+水和 PH+D90 水杨酸含量下降, 接种第 4 天, 处理组 D90+水和无菌水组水杨酸含量突然上升, 其余处理组呈现不同程度地下降, 表明内生真菌 D90 对玄参叶斑病的抑制作用可能与水杨酸含量增加有关。木质素作为细胞壁的主要成分, 植物可以通过增加细胞壁对病原菌起物理阻碍作用。有学者报道, 接种病原真菌立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* 后, 草地早熟禾叶片木质化明显得到加强, 相比对照组

G 木质素增加了 8%, S 木质素增加了 18%, H 木质素积累量最多, 相比对照增加了 25%, 主要沉积在厚壁组织、表皮细胞外壁、维管束的内鞘细胞和木质部等位点^[26]。本试验发现, 在接种处理的第 2~8 天, 处理组 PH+D90 木质素含量高于处理组 PH+水, 并且在接种第 4 天, 各处理组木质素含量基本达到高峰期, 接种第 8 天, 处理组 PH+D90 木质素含量显著高于处理组 PH+水。结果表明, D90 提高玄参抗叶斑病可能是体内木质素积累所致。NO 在植物的抗病过程中发挥着重要的调控作用, 可有效诱导植物体内的防御反应。NO 可以激发抗氧化系统, 从而通过基因转录和蛋白质功能调节使 ROS 解毒^[27]。NO 充当信号分子具有很强的反应性, 可以相互作用并修饰多种蛋白质^[28]。本研究发现, 玄参叶片经不同处理后, 接种第 2 天, 接种病原菌的各处理组中 NO 的含量开始上升, 并高于无菌水组, 说明其诱导玄参产生抗病性可能与 NO 的积累有关。

本实验结果表明, 通过对玄参叶片进行不同处理, 发现在接种第 0~6 天处理组 PH+D90 超氧阴离子自由基含量始终高于处理组 PH+水; 接种 D90 后, 玄参 CAT 酶活性得到显著提升, 特别是在接种第 4、6 天, 接种 D90 处理组 CAT 酶活性显著高于叶斑病模型组; 接种第 4~6 天, 相对于叶斑病模型组, PH+D90 处理组显著提升玄参超氧阴离子自由基, 但降低了 SA、NO 的含量; 在接种第 8 天, 处理组 D90+水木质素含量显著高于处理组 PH+水。本实验仅考察了玄参离体叶片叶斑病的防效, 下一步将在大田栽培玄参中进行叶斑病防效试验, 并同步考察 D90 孢子悬浮液与叶斑病防效的量效关系、对玄参块根产量与药材品质的影响等, 为内生真菌 D90 应用于玄参实际生产提供依据。植物的抗氧化酶体系通常由 SOD、POD、CAT 等协同作用, 本实验只选择 CAT 酶作为抗氧化酶活性指标存在一定

的偏差,在后续大田试验中,应补充其他抗氧化酶 SOD、POD 等以及活性氧损伤程度指标 MDA 含量测定,以综合表征玄参活性氧水平变化。有研究表明,根际细菌芽孢杆菌 L8 处理黄瓜幼苗能增强其抗猝倒病的能力,裂根试验表明处理组和应答组 CAT 酶活性均高于空白组^[29]。根际微生物棘孢木霉 *Trichoderma asperellum* T42 和荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* OKC 能通过增强豌豆 ROS 的产生和木质化来增强豌豆对软腐病的抗性^[30]。综上,D90 诱导玄参产生抗病性,其抗病机制可能与诱导玄参 CAT 酶活性、活性氧的迸发与木质素含量的积累有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陈丽新,梁伟.玄参化学成分及药理作用的研究进展[J].特产研究,2023,45(1):147-151.
- [2] 张米娜,陈凯先,李医明,等.道地药材浙玄参的现状调研及展望[J].中华中医药杂志,2022,37(8):4845-4848.
- [3] 李翎熙,陈迪路,周小江.玄参化学成分、药理活性研究进展及其质量标志物分析预测[J].中成药,2020,42(9):2417-2426.
- [4] 韩学俭.玄参病虫害及其防治[J].科学种养,2007,1:29.
- [5] 倪萌.玄参叶斑病的病原学、发生规律及防治技术研究[D].武汉:华中农业大学,2009.
- [6] 杜渐.道真县玄参规范化种植管理技术及病虫害防治[J].农家参谋,2020,16:78.
- [7] 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.
- [8] Ouyang Y, Cheng Q Q, Cheng C S, *et al.* Effects of plants-associated microbiota on cultivation and quality of Chinese herbal medicines [J]. *Chin Herb Med*, 2024, 16(2): 190-203.
- [9] 谢海伟,冯嘉琪,付晓晴,等.药用植物内生真菌的研究进展[J].江苏农业科学,2020,48(14):1-6.
- [10] Zhang J H, Liu J M, Zhu Y C, *et al.* Roles of endophytic fungi in medicinal plant abiotic stress response and TCM quality development [J]. *Chin Herb Med*, 2024, 16(2): 204-213.
- [11] 陈贝贝,章逸松,叶岳宇,等.内生真菌对农作物促生抗逆作用研究进展[J].中国植保导刊,2024,44(3):19-26.
- [12] Thies C, Tschardt T. Landscape structure and biological control in agroecosystems [J]. *Science*, 1999, 285(5429): 893-895.
- [13] 陆洁森,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.
- [14] 黄情儿,吴婷,张轲杰,等.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[J].中草药,2024,55(10):3497-3505.
- [15] 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.
- [16] Mouekouba LD, Zhang L, Guan X, *et al.* Analysis of clonostachys rosea-induced resistance to tomato gray mold disease in tomato leaves [J]. *Plos One*, 2014, 9(7): e102690.
- [17] 王傲雪,吴文鼎,关鑫,等.三株生防酵母菌对 *Botrytis cinerea* 防治效果研究[J].东北农业大学学报,2018,49(6):12-21.
- [18] 姚权,郭源,魏丰园,等.bZIP 转录因子 CfHac1 参与调控果生刺盘孢菌的生长发育和致病力[J].菌物学报,2019,38(10):1643-1652.
- [19] 武居宝.诱导玉米抗弯孢菌叶斑病生防细菌的筛选鉴定及机理初探[D].沈阳:沈阳农业大学,2018.
- [20] 刘兰.植物与病原真菌分子互作机制[J].农村科学实验,2024 13: 57-59.
- [21] Ding L N, Li Y T, Wu Y Z, *et al.* Plant disease resistance-related signaling pathways: recent progress and future prospects [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(24):16200.
- [22] 李陆萍,梁大成.活性氧诱发的植物亚细胞间通讯[J].生物技术通报,2021,37(05):165-173.
- [23] Marcec M J, Gilroy S, Poovaiah B W, *et al.* Mutual interplay of Ca²⁺ and ROS signaling in plant immune response [J]. *Plant Sci*, 2019 283: 343-354.
- [24] Guo H, Bi X, Wang Z, *et al.* Reactive oxygen species-related genes participate in resistance to cucumber green mottle mosaic virus infection regulated by boron in *Nicotiana benthamiana* and watermelon [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 1027404.
- [25] 杨博明.水杨酸信号途径参与小麦抗白粉病基因 Pm21 介导的抗性分子机制研究[D].南京:南京农业大学,2024.
- [26] 刘兴菊.2,3-丁二醇诱导草地早熟禾抗褐斑病过程中木质素生物合成的研究[D].甘肃:甘肃农业大学,2023.
- [27] Praveen A, Pandey A, Gupta M. Protective role of nitric oxide on nitrogen-thiol metabolism and amino acids profiling during arsenic exposure in *Oryza sativa* L [J]. *Ecotoxicology*, 2020, 29: 825-836.
- [28] Praveen A. Nitric oxide mediated alleviation of abiotic challenges in plants [J]. *Nitric Oxide*, 2022, 128: 37-49.
- [29] Liang J, Tao R, Hao Z, *et al.* Induction of resistance in cucumber against seedling damping-off by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) *Bacillus megaterium* strain L8 [J]. *Afr. J. Biotechnol*, 2011, 10(36):6920-6927.
- [30] Patel J S, Kharwar R N, Singh H B, *et al.* *Trichoderma asperellum* (T42) and *Pseudomonas fluorescens* (OKC)-enhances resistance of pea against *Erysiphe pisi* through enhanced ROS generation and lignifications [J]. *Front Microbio*, 2017, 8: 306-317.

[责任编辑 时圣明]