

## 蒙古黄芪内生真菌菌群结构、多样性及其对 8 种病原菌的拮抗活性

杨舒涵<sup>1</sup>, 李 晓<sup>2</sup>, 张思媛<sup>1</sup>, 霍慧玲<sup>1</sup>, 许静怡<sup>1</sup>, 陈佳蕊<sup>1</sup>, 秦路平<sup>1,3\*</sup>, 朱 波<sup>1,3\*</sup>

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311402

2. 内蒙古医科大学药学院, 内蒙古 呼和浩特 010107

3. 浙江中医药大学松阳研究院, 浙江 松阳 323400

**摘要:**目的 探讨蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* 内生真菌的菌群结构、多样性及其对病原菌的拮抗活性, 为黄芪内生真菌资源开发利用提供依据。方法 采集 9 个产地的新鲜蒙古黄芪样本, 对蒙古黄芪 3 个部位(根、茎、叶)的内生真菌进行分离与纯化, 根据菌株的培养特征与 ITS 分子序列扩增对菌种进行鉴定; 分析内生真菌菌群结构, 并采用 Shannon-Wiener 多样性指数 ( $H'$ ) 和 Simpson 多样性指数 ( $J$ ) 分析多样性; 采用平板对峙法考察内生真菌对 8 种常见病原菌的拮抗活性。**结果** 共分离得到蒙古黄芪内生真菌 1 531 株, ITS 分子鉴定为 22 个分类单位, 归属于真菌界 1 门 3 纲 4 目 7 科 10 属; 根、茎、叶共有内生真菌 11 种; 9 个产地优势共有目为肉座菌目 (Hypocreales) 与多孔菌目 (Pleosporales); 组织部位方面, 内生真菌  $H'$  指数与  $J$  指数分别在 1.942~2.265 与 0.805~0.855, 以根的多样性最高; 产地方面, 内生真菌内生真菌  $H'$  指数与  $J$  指数分别在 1.202~2.193 与 0.514~0.850, 以内蒙古自治区和林格尔县的多样性最高; 68.18% 的内生真菌对 8 种常见病原菌均有抑制作用, 其中 AMH104 粉红螺旋聚孢霉菌 *Clonostachys rosea*、AMH95 蜡蚧刺束梗孢菌 *Akanthomyces lecanii* 抑菌效果较好。**结论** 蒙古黄芪内生真菌资源丰富, 筛选得到的活性菌株为蒙古黄芪病害防治提供了候选菌株。

**关键词:** 蒙古黄芪; 内生真菌; 菌群结构; 多样性; 病原菌拮抗活性

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)19-7178-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.19.027

## Endophytic fungal community, diversity of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* and their antagonistic activities against eight pathogenic fungi

YANG Shuhan<sup>1</sup>, LI Xiao<sup>2</sup>, ZHANG Siyuan<sup>1</sup>, HUO Huiling<sup>1</sup>, XU Jingyi<sup>1</sup>, CHEN Jiarui<sup>1</sup>, QIN Luping<sup>1,3</sup>, ZHU Bo<sup>1,3</sup>

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

2. College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010107, China

3. Songyang Research Institute, Zhejiang Chinese Medical University, Songyang 323400, China

**Abstract: Objective** To investigate the fungal community and diversity of endophytic fungi in *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* and their antagonistic activity against pathogens and provide a basis for the utilization of endophytic fungal resources in *A. membranaceus* var. *mongholicus*. **Methods** Fresh *A. membranaceus* var. *mongholicus* samples were collected from nine different regions in China. Endophytic fungi were isolated and purified from three tissues (root, stem, and leaf) and further identified using culture characteristics of the strain and ITS molecular sequence amplification. After identification, fungal community were analyzed, and its diversity was assessed using the Shannon-Wiener diversity index ( $H'$ ) and Simpson diversity index ( $J$ ). The antagonistic activity of endophytic fungi against eight common pathogens was evaluated using the plate confrontation method. **Results** A total of 1 531 strains of endophytic fungi were gained and identified into 22 taxonomic units by ITS, belonging to one phylum, three classes, four orders, seven families, and ten genera. Eleven endophytic fungal species were shared among the roots, stems, and leaves. The most dominant common orders in the nine producing areas were Hypocreales and Pleosporales. The  $H'$  and  $J$  indices of the tested endophytic fungi in tissues ranged from 1.942 to 2.265 and 0.805 to 0.855, respectively, with the highest diversity index in roots. The  $H'$  and  $J$

收稿日期: 2025-04-05

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

作者简介: 杨舒涵 (2004—), 女, 本科生。E-mail: YSH13027677292@outlook.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, 研究方向为药用植物内生菌。E-mail: zhubo@zcmu.edu.cn

indices of endophytic fungi from nine regions ranged from 1.202 to 2.193 and 0.514 to 0.850, respectively, with the highest diversity found in Helingeer County, Inner Mongolia Autonomous Region. Endophytic fungi (68.18%) exhibited inhibitory effects against eight pathogens. Among them, AMH104 (*Clonostachys rosea*) and AMH95 (*Akanthomyces lecanii*) demonstrated the strongest antagonistic effects. **Conclusion** *A. membranaceus* var. *mongholicus* harbors abundant endophytic fungal resources, and the anti-pathogenic active strains screened provide potential candidates for disease prevention and control of *A. membranaceus* var. *mongholicus*.

**Key words:** *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao; endophytic fungi; fungal community; diversity; antagonistic activity against pathogens

黄芪系豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 和膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根, 具有补气升阳、固表止汗、利水消肿、生津养血等功效, 常用于治疗贫血、虚弱、疲乏无力、子宫脱垂等症<sup>[1]</sup>。目前, 药用蒙古黄芪主要分布在我国内蒙古自治区、山西省、陕西省等地, 多为人工栽培<sup>[2]</sup>。

植物内生真菌是一类存在于植物组织或器官内部而不引起植物病害的真菌<sup>[3]</sup>。在长期的协同进化过程中, 内生真菌与宿主植物形成了和谐互利的共生关系。一方面, 植物为内生真菌提供生命活动所需的场所和营养物质; 另一方面, 内生真菌通过自身代谢和信号转导等作用影响宿主植物, 促进其生长和提高抗逆性<sup>[4]</sup>。健康稳定的植物内生真菌菌群结构对于植物正常生长发育与抗逆胁迫至关重要, 植物病害的发生往往与植物微环境紊乱密切相关, 然而, 植物不同产地与组织部位的内生真菌具有差异化或特异性的菌群结构与分布规律<sup>[5-6]</sup>, 研究内生真菌菌群结构与多样性有助于理解药用植物与内生真菌互利共惠的科学内涵。

药用植物病害是中药材生态产业发展中亟待有效解决的重要问题, 传统的化学防治方法虽然有效, 但容易造成环境污染、病原菌抗药性增强等问题, 植物内生真菌作为一种天然的生物防治资源, 具有绿色环保、效果好、可持续等特点<sup>[7-8]</sup>。研究表明, 植物内生真菌可通过多种途径增强植物的抗病能力, 包括直接抑制病原菌生长、生态位竞争、诱导植物产生系统性抗性等<sup>[9-10]</sup>, 这些特性使内生真菌成为生物防治和中药材可持续发展的重要策略。

目前, 对于蒙古黄芪的研究多集中在化学成分<sup>[11-12]</sup>、药理活性<sup>[13-14]</sup>、种质资源评价<sup>[15-16]</sup>、真伪品鉴别<sup>[17-18]</sup>等方面, 有关蒙古黄芪内生真菌的研究较少, 已有的研究也只针对某一具体部位, 以蒙

古黄芪健康植株的块根为材料进行内生真菌的分离, 同时利用其中分离出的5株内生真菌进行液体发酵培养, 分析了不同内生真菌对不同液体发酵影响因素的敏感程度<sup>[19]</sup>, 蒙古黄芪内生真菌资源未得到充分开发利用。本实验通过分离鉴定9个产地蒙古黄芪可培养内生真菌, 分析其菌群结构与多样性, 并进行病原菌拮抗活性分析, 筛选抗病活性菌株, 以期对蒙古黄芪高效优质栽培提供参考依据。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

2022年9月, 采集内蒙古自治区武川县(110.97° E, 41.11° N)、四子王旗县(111.56° E, 41.81° N)、和林格尔县(111.78° E, 40.38° N)、锡林郭勒盟多伦县(116.83° E, 42.33° N)、呼和浩特市(111.35° E, 40.78° N)、包头市(110.21° E, 41.25° N)、陕西省子洲县(109.89° E, 37.72° N)、山西省应县(113.18° E, 39.41° N)、山西省五寨县(111.81° E, 38.98° N)的蒙古黄芪健康新鲜植株, 由浙江中医药大学张巧艳教授鉴定为豆科植物蒙古黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao。病原菌麦根腐平脐蠕孢病菌 *Bipolaris sorokiniana*、胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides*、刺盘孢炭疽菌 *Colletotrichum camelliae*、核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum*、腐皮镰刀菌 *Fusarium solani*、立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani*、尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum*、葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea* 均取自本实验室菌种资源库。

### 1.2 试剂与仪器

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(土豆200 g/L, 葡萄糖20 g/L, 琼脂10~15 g/L, pH自然, 经121 °C高压蒸汽灭菌20 min, 冷却至50 °C加入适量青霉素钠), SW-CJ-1D型超净工作台(苏州净化设备有限公司), Takara9770A和RR003A试剂盒(宝日生物技术(北京)有限公司), ABI(Proflex)型PCR

仪(赛默飞世尔科技中国有限公司), GelDocXR 型凝胶成像仪(北京科誉兴业科技发展有限公司), LMI-100 型霉菌培养箱(上海龙跃仪器设备有限公司), Eppendorf 5427R 型离心机(德国艾本德股份有限公司)。无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司), 次氯酸钠(国药集团化学试剂有限公司)、青霉素钠(上海索宝来生物科技有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 内生真菌的分离、纯化与 ITS 分子鉴定

**2.1.1 内生真菌分离与纯化** 参考吴婷等<sup>[20]</sup>的方法对 9 个产地蒙古黄芪的根、茎、叶 3 个部位的内生真菌进行分离与纯化。用自来水冲洗新鲜黄芪植株 3~4 次, 用无菌滤纸吸干表面水分。采用 3 步消毒法进行表面消毒, 75%乙醇浸泡 1 min, 2.5%次氯酸钠以根、茎、叶分别为 3 min、1 min、30 s 的方式漂洗, 75%乙醇再次漂洗 30 s, 无菌水冲洗 5 次至表面乙醇冲洗干净。用无菌手术刀将根、茎、叶切成小组织块(0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm), 接种在 PDA 培养基中, 26 °C 密封暗培养, 定期观察。待内生真菌充分长出后用接种针进行纯化, 直至长出形态单一的菌落。根据菌丝及菌落的颜色、形态等特征进行初步分类。

**2.1.2 内生真菌 ITS 分子鉴定** 按照王景暄等<sup>[21]</sup>的方法, 提取内生真菌 DNA, 并采用 ITS5 (5'-GGAAGT-AAAAGTCGTAAGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCG-CTTATTGATATGC-3') 作为引物进行 ITS 序列 PCR 扩增。PCR 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测合格后, 送至上海生工生物有限公司进行序列测定。

### 2.2 序列分析及构建系统发育树

将真菌菌株的 ITS 基因序列在 NCBI 数据库中使用 BLAST 工具与 GenBank 中的已知序列进行比对分析<sup>[22]</sup>, 查找并下载同源性较高的序列, 使用 MEGA11.0 软件, 采用邻接法构建系统发育树, 确定菌株分类地位。

### 2.3 内生真菌菌群结构与多样性分析

以内生真菌的相对频率(relative frequency, RF)作为内生真菌菌群结构的评价指标<sup>[23-25]</sup>。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<sup>[26]</sup>。

### 2.4 内生真菌对病原菌的拮抗作用

采用平板对峙法<sup>[27]</sup>探讨蒙古黄芪内生真菌对病原菌的拮抗作用。选取培养成熟的病原菌, 用无菌打孔器在菌落边缘打取 5 mm 的菌饼置于 PDA 平板的中心, 同时用无菌打孔器在内生真菌菌饼边缘打取 3 个菌饼, 接种在 120° 方向距离中心 2.25 cm 处, 进行病原菌拮抗实验, 对照组只接种病原菌, 每个处理重复 3 次。26 °C 下培养 5~7 d, 测量病原菌生长半径, 并计算相对抑制率(IR)<sup>[28-29]</sup>。

$$IR = (\text{对照组病原菌菌落直径} - \text{对峙组病原菌菌落直径}) / \text{对照病原菌菌落直径}$$

### 2.5 数据分析

采用 SPSS 软件对实验数据进行统计分析。采用单因素方差(ANOVA)进行方差分析。

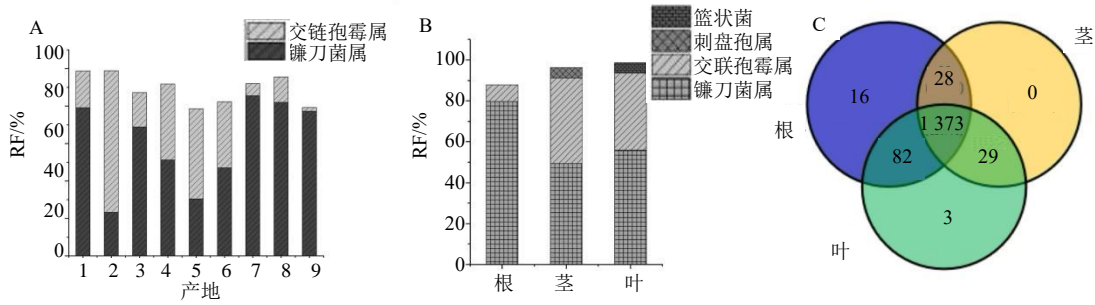
## 3 结果与分析

### 3.1 蒙古黄芪内生真菌菌群结构与分布情况

从 9 个不同地区的蒙古黄芪中共分离得到内生真菌 1531 株。其中, 根 615 株, 茎 547 株, 叶 369 株。IR 从高到低为根>茎>叶(IR 依次为 40.17%、35.73%、24.10%)。黄芪内生真菌的生长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 117 个形态型, 经过 ITS 分子鉴定后确定为 22 个分类单元, 归属到真菌界 1 门 3 纲 4 目 7 科 10 属。大部分分类单元归属于子囊菌纲(Sordariomycetes, RF=69.11%), 少数分类单元属于座囊菌纲(Dothideomycetes, RF=27.37%)与散囊菌纲(Eurotiomycetes, RF=3.53%)。

不同产地蒙古黄芪中内生真菌优势类群存在差异。9 个地点优势共有目为肉座菌目(Hypocreales)和多孔菌目(Pleosporales)。产地间优势属的 RF 不同, 镰刀菌属 *Fusarium* 为优势属的有武川县(镰刀菌属 RF=79.14%)、和林格尔县(RF=68.80%)、多伦县(RF=51.27%)、陕西子洲县(RF=47.06%)、山西应县(RF=85.51%)、包头市(RF=82.02%)、山西五寨县(RF=77.23%), 优势属为交链孢霉属 *Alternaria* 的为四子王旗县(RF=75.58%)与呼和浩特特市(RF=48.21%) (图 1-A)。鉴定的 22 个分类单元中, 只有 1 个分类单元 AMH58 (*Fusarium* sp4.) 为 9 个产地共有。

蒙古黄芪不同组织部位中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=87.64%、51.19%、56.91%)与多孔菌目(Pleosporales, RF=8.13%、



A-不同产地内生真菌优势属 (1-内蒙古武川, 2-内蒙古四子王旗, 3-内蒙古和林格尔, 4-内蒙古锡林郭勒盟多伦, 5-内蒙古呼和浩特, 6-内蒙古包头, 7-陕西子洲, 8-山西应县, 9-山西五寨); B-不同组织部位内生真菌优势属; C-内生真菌菌种分布韦恩图。

A-dominant genera of endophytic fungal in different producing areas (1-Wuchuan, Inner Mongolia; 2-Siziwangqi, Inner Mongolia; 3-Horinger, Inner Mongolia; 4-Duolun, Xilingol League, Inner Mongolia; 5-Hohhot, Inner Mongolia; 6-Baotou, Inner Mongolia; 7-Zizhou, Shaanxi; 8-Yingxian, Shanxi; 9-Wuzhai, Shanxi.); B-dominant genera of endophytic fungai in different tissue parts; C-Venn diagram of endophytic fungal distribution.

图1 蒙古黄芪内生真菌菌群结构

Fig. 1 Endophytic fungal community of *A. membranaceus* var. *mongholicus*

41.86%、37.94%); 在属水平, 根的优势属为镰刀菌属 (*Fusarium*, RF = 79.67%) 与交链孢霉属 (*Alternaria*, RF = 8.13%), 茎的优势属为镰刀菌属 (*Fusarium*, RF = 49.36%)、交链孢霉属 (*Alternaria*, RF = 41.86%)、刺盘孢属 (*Colletotrichum*, RF = 5.12%), 叶的优势属为镰刀菌属 (*Fusarium*, RF = 53.66%)、交链孢霉属 (*Alternaria*, RF = 37.94%)、篮状菌 (*Talaromyces*, RF = 4.88%)。在种水平, *Akanthomyces lecanii*、*Bionectria ochroleuca*、*Penicillium thomii* 是根的特有种, *Beauveria bassiana* 是叶的特有种, *Fusarium* sp9.、*Alternaria alternata*、*Talaromyces pinophilus*、*Trichoderma harzianum* 是根和叶的共有种, *Fusarium* sp7.、*Clonostachys rosea* 是根和茎的共有种, *Talaromyces purpleogenus*、*Colletotrichum incanum* 是茎和叶的共有种, 其余 10 种真菌均为根、茎、叶的共有种 (图 1-B、C)。

采用  $C_s$  来比较黄芪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  $C_s$  在 0.121~0.222 (表 1)。结果表明, 3 种不同组织部位的内生菌物种组成的相似程度较低。

### 3.2 内生真菌多样性分析

蒙古黄芪不同产地与组织部位内生真菌多样

表 1 蒙古黄芪不同组织部位内生真菌菌群  $C_s$

Table 1 Similarity of endophytic fungal flora of different tissues in *A. membranaceus* var. *mongholicus*

不同组织部位	$C_s$		
	根	茎	叶
根	1.000		
茎	0.121	1.000	
叶	0.222	0.129	1.000

性存在差异。组织部位方面, 内生真菌  $H'$  指数为 1.942~2.265, 以根的多样性最高, 茎的多样性最低。 $I$  值为 0.805~0.855, 以根的多样性指数最高, 叶的多样性指数最低。Pielou 均匀度指数  $E$  值为 0.699~0.780, 根的均匀度最高, 茎的均匀度最低 (表 2)。产地方面, 内生真菌  $H'$  指数为 1.202~2.193。以内蒙古自治区和林格尔县的多样性最高, 山西省五寨县的多样性最低。 $I$  值为 0.514~0.850, 以内蒙古自治区和林格尔县的多样性指数最高, 山西省五寨县的多样性指数最低。 $E$  值为 0.260~0.412, 内蒙古自治区呼和浩特市的均匀度最高, 山西省五寨县的均匀度最低。

表 2 不同组织部位及产地蒙古黄芪内生真菌的多样性  
Table 2 Endophytic fungal diversity of different tissues and origins in *A. membranaceus* var. *mongholicus*

组织部位/产地		$H'$	$E$	$I$
组织部位	根	2.265	0.780	0.855
	茎	1.942	0.735	0.821
	叶	1.978	0.699	0.805
产地	内蒙古武川	1.702	0.334	0.777
	内蒙古四子王旗	1.447	0.281	0.698
	内蒙古和林格尔	2.193	0.373	0.850
	内蒙古锡林郭勒盟多伦	2.076	0.410	0.844
	内蒙古呼和浩特	1.662	0.412	0.780
	陕西子洲	1.860	0.345	0.799
	山西应县	1.825	0.340	0.694
	内蒙古包头	1.796	0.400	0.767
	山西五寨	1.202	0.260	0.514

### 3.3 内生真菌对病原菌的拮抗活性

供试内生真菌菌株对 8 种病原菌具有抑制活性的有 15 株, 占 68.18%, 其中与阳性对照组相比有显著抑制作用的菌株有 9 株 (表 3)。球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* AMH123-1 及粉红粘帚菌 *Clonostachys rosea* AMH104 均对麦根腐平脐蠕孢病菌有显著抑制效果, 抑菌率分别为 76.46% 及 78.33%; 镰刀菌属 *Fusarium* sp9. AMH27、蜡蚧刺束梗孢 *Akanthomyces lecanii* AMH95 及粉红粘帚菌 *Clonostachys rosea* AMH104 对胶孢炭疽菌有显著抑制效果, 抑菌率分别为 79.44%、81.39% 及 84.17%; 蜡蚧刺束梗孢 *Akanthomyces lecanii* AMH95, 球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* AMH123-

1 及粉红粘帚菌 *Clonostachys rosea* AMH104 对核盘菌和腐皮镰刀菌均具有显著抑制效果, 对核盘菌的抑菌率分别为 73.89%、76.67%、77.78%, 对腐皮镰刀菌的抑菌率分别为 85.40%、77.01% 及 77.64%; 蜡蚧刺束梗孢菌 *Akanthomyces lecanii* AMH95 及粉红粘帚菌 *Clonostachys rosea* AMH104 对尖孢镰刀菌具有显著抑制效果, 抑菌率分别为 70.47% 及 79.30%。其中, 粉红螺旋聚孢霉菌 *Clonostachys rosea* AMH104 对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、葡萄座腔菌及尖孢镰刀菌均具有显著抑制性, 抑菌率依次为 78.33%、84.17%、71.73%、77.78%、77.64%、82.90% 及 79.30% (图 2)。

表 3 蒙古黄芪内生真菌对病原菌的拮抗效应

Table 3 Antagonistic activity of endophytic fungi from *A. membranaceus* var. *mongholicus* against pathogens

编号	抑菌效果							
	麦根腐平脐蠕孢	胶孢炭	刺盘孢炭疽	核盘菌	腐皮镰刀	立枯丝核	葡萄座腔	尖孢镰刀
Th	++	+++	+++	+++	+++	+	+++	++
AMH13	+	+	++	+++	+++	+	+	+
AMH28	+	++	+++	+++	++	++	+++	+++
AMH9	+	+	+	+	+++	+	+	+
AMH58	+	++	++	+++	++	++	+	++
AMH62	+	+	+++	+	++	+	+++	++
AMH1	++	++	+	++	++	+	++	++
AMH26	++	++	++	+++	++	+	++	++
AMH12	+++	+	+++	+++	+++	+	++	++
AMH6	++	++	+++	+	++	+	++	++
AMH27	+++	+++	++++	+++	++	+	++++	+++
AMH95	++	+++	++	+++	++++	++	++	+++
AMH12	+++	+	+++	+++	+++	++	+	++
AMH13	+	+	+	+	++	+	++	+
AMH10	+++	+++	+++	+++	+++	+	++++	+++
AMH54	+	+++	+++	+++	+++	++	+	+++
AMH31	+	+	+++	+++	+++	++	+	++
AMH20-	++	+	++	+++	++	+	+++	+
AMH45	+	+	+++	+++	+	+++	+	++
AMH46	++	++	++	++	+	+	+	+++
AMH23	+	+	+++	++	+	++	+++	+++
AMH12	+	+	++	+++	++	++	+	+
AMH22	+++	+	+++	+++	++	++	+	++

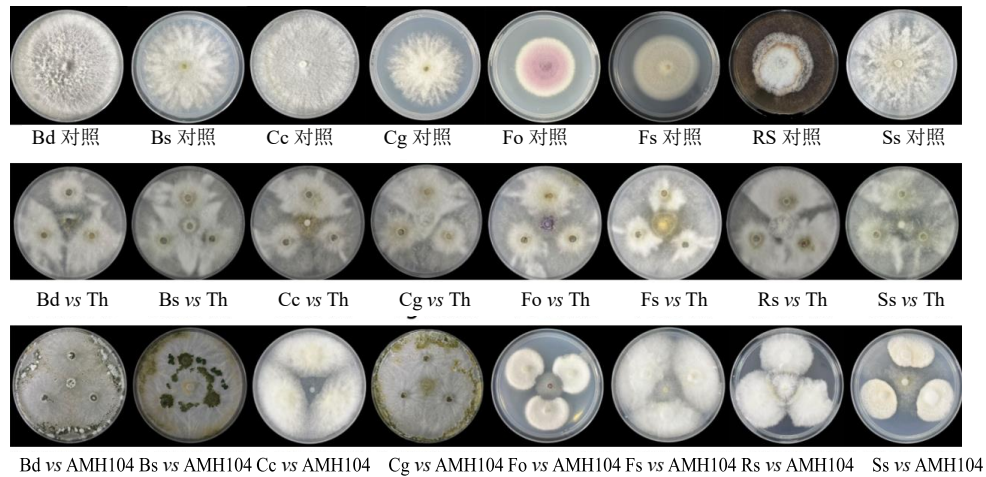
“+”表示抑菌率小于 60%; “++”为 60%~70%; “+++”为 70%~80%; “++++”为 80%~90%。

“+”means < 60%; “++” means 60%—70%; “+++” means 70%—80%; “++++” means 80%—90%.

### 4 讨论

本实验从 9 个产地蒙古黄芪中分离得到可培养内生真菌 1 531 株 (根 615 株、茎 547 株、叶 369 株), 试验选用蒙古黄芪作为研究对象, 主要基于蒙古黄芪的栽培现状、产量及市场特点考虑, 蒙古黄芪栽培历史悠久且规范化程度高, 种植规模大<sup>[30]</sup>。通过

形态学特征与分子鉴定确定为 22 个分类单元, 归属于真菌界 1 门 3 纲 4 目 7 科 10 属。22 个分类单元中有 11 个分类单元鉴定到属, 11 个分类单元鉴定到种。子囊菌门是蒙古黄芪内生真菌的优势菌群, 22 个分类单元均属于子囊菌门中的 3 个纲 (子囊菌纲 (Sordariomycetes)、座囊菌纲 (Dothideomycetes)、



Bd-葡萄座腔菌; Fo-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; Th-哈兹木霉菌, Th 处理组为阳性对照组。

Bd-*Botryosphaeria dothidea*; Fo-*Fusarium oxysporum sensu*; Rs-*Rhizoctonia solani*; Cc-*Colletotrichum camelliae*; Cg-*Colletotrichum gloeosporioides*; Ss-*Sclerotinia sclerotiorum*; Bs-*Bipolaris sorokiniana*; Fs-*Fusarium solani*; Th-*Trichoderma harzianum*; The Th treatment group served as the positive control group.

图 2 AMH104 对 8 种病原菌的抑菌效果

Fig. 2 Inhibitory effect of AMH104 against various pathogens

散囊菌纲 (Eurotiomycetes), 其中子囊菌纲分类单元数目最多。子囊菌纲的优势地位也曾在三七、小麦、竹子等的研究中报道过<sup>[31-33]</sup>归属到的 4 个目为肉座菌目 (Hypocreales)、球囊霉目 (Glomerellales)、多孔菌目 (Pleosporales)、散囊菌目 (Eurotiales)。蒙古黄芪根部内生菌分离的研究报道中也只有其中 2 个目, 肉座菌目和散囊菌目<sup>[34-35]</sup>。多孔菌目 (Pleosporales)、散囊菌目 (Eurotiales) 内生真菌首次在蒙古黄芪中被分离得到。

在不同组织部位中, 蒙古黄芪内生真菌的物种组成相似程度均较低, 且优势种属存在差异, 其中 *Akanthomyces lecanii*、*Bionectria ochroleuca*、*Penicillium thomii* 是根的特有种, *Beauveria bassiana* 是叶的特有种。在属水平, 根的优势属为镰刀菌属 *Fusarium* 与交链孢霉属 *Alternaria*, 茎的优势属为镰刀菌属 *Fusarium*、交链孢霉属 *Alternaria* 及刺盘孢属 *Colletotrichum*, 叶的优势属为镰刀菌属 *Fusarium*、交链孢霉属 *Alternaria* 及篮状菌 *Talaromyces*。黄芪内生真菌 *H'* 值、*I* 值、均匀度指数均以根最高。地理位置对蒙古黄芪内生真菌组成及其分布也具有影响。在属水平上, 镰刀菌属在多数产地 (武川县、和林格尔县、多伦县、陕西子洲县、山西应县、包头市、山西五寨县) 表现为优势属, 而交链孢霉属 *Alternaria* 则在四子王旗县和呼和浩特市成为优势属。蒙古黄芪内生真菌群落具有较高的产地特异性和多样性。造成内生真菌优势类

群分布差异的原因有多种, 不同地区的土壤肥力、酸碱度和湿度等条件差异显著, 影响内生真菌的生长和繁殖; 温度、湿度和光照等气候因素也会影响真菌的分布<sup>[36-38]</sup>。不同产地蒙古黄芪内生真菌优势类群的差异, 对于蒙古黄芪内生真菌资源开发利用具有指导意义。

抗病活性筛选结果显示, 本实验中分离出的 22 种真菌中对 8 种病原菌具有抑制活性的有 15 株, 占 68.18%。与阳性对照组相比有显著差异的有 9 株。其中 AMH104 粉红螺旋聚孢霉菌 *Clonostachys rosea*、AMH95 蜡蚧刺束梗孢菌 *Akanthomyces lecanii* 抑菌效果较好, AMH131 淡色生赤壳菌 *Bionectria ochroleuca*、AMH54 哈茨木霉菌 *Trichoderma harzianum* 也表现出较好的抑菌作用, 这些内生真菌可以进一步开发用于中药材病害防治。据报道, 粉红粘帚霉孢子粉喷施感染纹枯病的水稻抗病保产效果显著, 且对番茄生长具有促生作用<sup>[39-40]</sup>; 淡色生赤壳菌可抑制番茄灰霉病、叶霉病、绵疫病、黄萎病、枯萎病、杨树烂皮病、杨树枯萎病和黑穗醋栗叶斑病、烟草青枯病等病原真菌的生长<sup>[41]</sup>; 哈茨木霉对黄瓜土传枯萎病有良好控制效果, 对多种植物病原菌有明显抑制作用<sup>[42]</sup>。

本实验对蒙古黄芪内生真菌的菌群结构、多样性及病原菌拮抗性进行了分析, 但是采用了传统的分离方法, 可能会导致部分内生真菌未得到充分分离, 后续可以改用高通量分离方法、增加培养基

类型等充分挖掘蒙古黄芪内生真菌资源<sup>[43]</sup>；对于得到的强抑菌活性菌株 AMH104 等，可进一步进行蒙古黄芪植株抗病试验，明确其对蒙古黄芪病害的生防作用，为蒙古黄芪大田栽培病害防治提供依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2025: 323-325.
- [2] 余坤子, 刘靖, 洪浩, 等. 黄芪种植产地与生态环境及饮片规格的调查研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(9): 1112-1115.
- [3] 任航洁, 吴启婷, 陆洁淼, 等. 西红花球茎病变对内生真菌多样性及菌群结构的影响 [J]. 浙江农业科学, 2022, 63(5): 1079-1081.
- [4] Haroim P R, van Overbeek L S, Berg G, *et al.* The hidden world within plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2015, 79(3): 293-320.
- [5] 吴晓菡, 李文超, 秦路平. 天目山山胡椒不同部位内生真菌组成及多样性分析 [J]. 植物资源与环境学报, 2012, 21(2): 107-113.
- [6] 金蕊, 杨明攀, 刘飞虎. 工业大麻内生真菌菌群结构及其在植株内的空间分布特征 [J]. 中国农学通报, 2013, 29(36): 313-318.
- [7] 韩一人. 多花黄精根茎内生真菌物种多样性及抑制根腐病菌活性研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2023.
- [8] 张晶晶, 张宁, 侯微, 等. 一株人参内生真菌的鉴定及对人参根腐病的防效 [J]. 东北农业科学, 2024, 49(1): 80-84.
- [9] 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.
- [10] 孙凯. 氮素调控内生真菌根香拟茎点霉与植物共生互作的机制研究 [D]. 南京: 南京师范大学, 2021.
- [11] 包振江. 蒙古黄芪药用成分代谢组学分析及黄酮类化合物提取工艺研究 [D]. 通辽: 内蒙古民族大学, 2023.
- [12] 王强雄, 郭盛, 李会伟, 等. 不同产地蒙古黄芪茎叶 UPLC 指纹图谱建立及化学模式识别研究 [J]. 中草药, 2023, 54(13): 4312-4320.
- [13] 杜津. 蒙古黄芪的化学成分及抗炎、免疫活性研究 [D]. 昆明: 云南中医药大学, 2022.
- [14] 毕小凤, 庞静, 史宪海, 等. 蒙古黄芪根部与茎叶中部分药理活性成分差异研究 [J]. 山西中医学院学报, 2017, 18(1): 29-31.
- [15] 张浩博, 侯对虎, 吴宇涵, 等. 基于表型性状和 TOPSIS 模型联合分析的蒙古黄芪种质资源评价 [J]. 中药材, 2024, 47(12): 2974-2979.
- [16] 崔洁, 王丹丹, 王倩玉, 等. 山西与内蒙产蒙古黄芪的 ISSR 体系优化及遗传多样性分析 [J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(11): 1941-1948.
- [17] 罗丽, 胡力, 蒋超, 等. 蒙古黄芪、膜荚黄芪及混伪品种子的位点特异性 PCR 鉴别 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(4): 21-28.
- [18] 喻思淼. 基于中药多糖结构指纹图谱技术的两种法定基源黄芪多糖鉴别研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2020.
- [19] 孔祥军. 蒙古黄芪内生真菌分离鉴定及活性成分初步研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2011.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 李春霖, 肖强, 张瑛, 等. 基于 ITS 序列对两株野生大型真菌的鉴定及系统发育分析 [J]. 湖北林业科技, 2024, 53(2): 46-50.
- [23] 沈湛云, 朱波, 陆洁淼, 等. 玄参内生真菌菌群结构与哈巴昔和哈巴俄昔含量的相关性 [J]. 中药材, 2021, 44(9): 2059-2062.
- [24] 张大琪, 任立瑞, 杜洪志, 等. 微生物菌剂处理增加了生姜土壤中有益微生物的相对丰度 [J]. 植物保护, 2023, 49(4): 55-66.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] 赵杰, 田琼金, 聂蔓茹, 等. 红芸豆根腐病拮抗内生细菌的筛选和鉴定 [J]. 山西农业科学, 2023, 51(10): 1226-1232.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] 秦雪梅, 李震宇, 孙海峰, 等. 我国黄芪药材资源现状与分析 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(19): 3234-3238.
- [31] 郝杰. 耕作施氮对旱地小麦氮素利用及根际 AMF 群落的影响 [D]. 太谷: 山西农业大学, 2019.
- [32] 林于蓝, 张园可心, 王宝英, 等. 健康与罹病三七内生真菌的分离鉴定及其群落特征差异分析 [J]. 南京农业大学学报, 2024, 47(4): 689-699.
- [33] 代冬琴, 韩莉苏, 金星辰. 云南竹生子囊菌的物种鉴定与多样性调查 [J]. 曲靖师范学院学报, 2022, 41(3): 16-

- 28.
- [34] Zhang J Y, Phookamsak R, Mapook A, et al. *Monilochaetes pteridophytophila* (Australiascaceae, Glomerellales), a new fungus from tree fern [J]. *Biodivers Data J*, 2021, 9: e67248.
- [35] Barreto G G, Gusmão L F P. *Eucalyptus* microfungi: A newly discovered species of *Kylindria* (Glomerellales, Reticulascaceae) from Brazil and a key to the genus [J]. *N Z J Bot*, 2022, 60(1): 60-67.
- [36] 李国斌, 李光跃, 孙窗舒, 等. 干旱胁迫对蒙古黄芪生物量及其根际微生物种群数量的影响 [J]. *西北植物学报*, 2015, 35(9): 1868-1874.
- [37] 王文娟, 李景文, 王中斌, 等. 胡杨根际土壤真菌群落代谢特征及其土壤影响因子研究 [J]. *西北植物学报*, 2017, 37(7): 1429-1437.
- [38] Giauque H, Hawkes C V. Climate affects symbiotic fungal endophyte diversity and performance [J]. *Am J Bot*, 2013, 100(7): 1435-1444.
- [39] 王淑芳, 马桂珍, 暴增海, 等. 生防菌粉红粘帚霉制剂防治水稻纹枯病田间药效试验 [J]. *安徽农业科学*, 2013, 41(34): 13242.
- [40] 王傲雪, 张莉莉, 王旭, 等. 粉红粘帚菌对番茄促生作用及施用方式研究 [J]. *东北农业大学学报*, 2015, 46(10): 37-44.
- [41] 陈秀玲, 李景富, 张丽莉, 等. 一株淡色生赤壳菌的生防作用分析及系统发育树构建 [J]. *生物技术通报*, 2014, 30(5): 184-189.
- [42] 陈立华. 哈兹木霉及其微生物有机肥对黄瓜土传枯萎病的生物防治及其机理 [D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- [43] 胡子贤, 许慧, 邓鹏飞, 等. 结香患根腐病植株根际土壤微生物群落组成与多样性 [J]. *江苏农业学报*, 2024, 40(12): 2254-2265.

[责任编辑 时圣明]