



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.
LIN Yulan,ZHANG-YUAN Kexin,WANG Baoying,et al. Isolation,identification and differences in community characteristics of endophytic fungi from healthy and root rot-diseased *Panax notoginseng*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2024,47(4):689-699.

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

林于蓝¹,张园可心¹,王宝英¹,黄杜鹃¹,林广宁¹,魏富刚²,张金波¹,蔡祖聪¹,赵军^{1*}

(1.南京师范大学地理科学学院/江苏省土壤利用与农业可持续发展工程研究中心/
江苏省地理信息资源开发与利用协同创新中心,江苏 南京 210023;
2.文山苗乡三七科技有限公司,云南 文山 663000)

摘要:[目的]本文旨在探究健康与罹病根腐病三七内生真菌群落特征差异及在不同植株部位的分布特征与随生长年限的变化规律。[方法]选取1年、2年生健康与罹病根腐病的三七植株,采用组织分离法对其根、茎部位的内生真菌进行分离,基于形态特征和ITS序列分析对分离得到的菌株进行分类鉴定,并对内生真菌群落组成及多样性特征进行分析。[结果]共分离获得966株内生真菌,经鉴定隶属于3门、5纲、14目、25科、31属。从菌株分离数及分离率看:罹病植株>健康植株,2年生>1年生,根部>茎部。健康和罹病三七的可培养内生真菌组成存在明显差异,其中曲霉属、耙齿菌属、毛壳属和青霉属在健康三七内生真菌群落中占主导,而镰刀菌属、曲霉属、篮状菌属、毛壳属和木霉属是罹病三七内生真菌的优势属。植株部位对三七内生真菌群落组成具有明显影响,其中罹病三七根部镰刀菌属的分离频率高达52%,显著高于其茎部的11.2%,且在罹病三七根部大量分离到木霉属和篮状菌属等有益真菌,其分离频率分别为11.0%和14.5%,而三七茎部内生真菌群落多样性、丰富度和均匀度均高于根部。此外,随着生长年限的增加,三七内生真菌群落的发育更加完善,健康和罹病三七内生真菌群落组成及多样性特征也随之变化,其中尖孢镰刀菌和腐皮镰刀菌在罹病三七植株中的分离频率大幅增加,达到14.5%和32.9%。健康三七内生真菌多样性、丰富度和均匀度随生长年限增加逐渐上升,而罹病三七内生真菌多样性和均匀度逐渐降低。[结论]三七植株内生真菌多样性丰富,健康和罹病三七可培养内生真菌定殖数量及群落组成具有显著差异,且植株部位与生长年限均对三七可培养内生真菌群落特征具有显著影响。

关键词:三七;内生真菌;根腐病;多样性;生长年限

中图分类号:S154.3

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)04-0689-11

Isolation, identification and differences in community characteristics of endophytic fungi from healthy and root rot-diseased *Panax notoginseng*

LIN Yulan¹,ZHANG-YUAN Kexin¹,WANG Baoying¹,HUANG Dujuan¹,LIN Guangning¹,
WEI Fugang²,ZHANG Jinbo¹,CAI Zucong¹,ZHAO Jun^{1*}

(1.School of Geography/Jiangsu Engineering Research Center for Soil Utilization & Sustainable Agriculture/Jiangsu Center for Collaborative Innovation in Geographical Information Resource Development and Application,Nanjing Normal University, Nanjing 210023,China;2.Wenshan Miaoxiang Sanqi Technology Co. Ltd.,Wenshan 663000,China)

Abstract:[Objectives]The aim of this study was to investigate the differences of endophytic fungal community characteristics between healthy and root rot-diseased *Panax notoginseng*,as well as the distribution pattern in different plant tissues and their changes with growth years.[Methods]1-year-old and 2-year-old of healthy and root rot-diseased *P. notoginseng* were randomly collected and the endophytic fungi in their roots and stems were isolated by tissue isolation method. Based on morphological characteristics and ITS sequence analysis,the isolated strains were classified and identified,and the community composition and diversity of endophytic fungal community were analyzed.[Results]A total of 966 endophytic fungi strains were isolated and identified,which belonged to 3 phyla,5 classes,14 orders,25 families and 31 genera. The number and isolation rate of endophytic isolates were as follows:diseased plant>healthy plant,2-year-old *P. notoginseng*>1-year-old *P. notoginseng*,root>stem. The composition of the culturable endophytic fungi in healthy and root rot-diseased *P. notoginseng* was quite different,of which the genus *Aspergillus*,*Irpex*,*Chaetomium*,and *Penicillium* were the dominant endophytic fungi in the healthy *P. notoginseng*,while the predominant culturable endophytic fungi of root rot-diseased *P. notoginseng* were *Fusarium*,*Aspergillus*,*Talaromyces*,*Chaetomium*,and *Trichoderma*. The composition and diversity of endophytic fungi of *P. notoginseng* was significantly affected by plant tissues. Specially,the isolation frequency of genus *Fusarium* from roots of root

收稿日期:2023-07-26

基金项目:国家自然科学基金项目(42077031,42090065);云南省专家工作站建设项目(202205AF150039);江苏省卓越博士后计划资助项目(2023ZB047);江苏省研究生科研与实践创新项目(KYCX22_1568,KYCX22_1569)

*通信作者:赵军,副教授,研究方向为三七连作障碍防控与道地品质提升,E-mail:junzhao37@njnu.edu.cn.

rot-diseased *P. notoginseng* was 52%, which was significantly higher than that from the stems of 11.2%. Beneficial fungi such as *Trichoderma* and *Talaromyces* were also frequently isolated from diseased roots, with the isolation frequencies of 11.0% and 14.5%, respectively. Moreover, the diversity, richness, and evenness of endophytic fungal community in stems of *P. notoginseng* were higher than those in roots. With the increase of growth years, the composition and diversity of endophytic fungal community of healthy and root rot-diseased *P. notoginseng* also changed, and the isolation frequency of *Fusarium oxysporum* and *F. solani* in diseased *P. notoginseng* increased greatly, reaching 14.5% and 32.9%, respectively. Furthermore, the diversity, richness, and evenness of endophytic fungal community in healthy *P. notoginseng* increased gradually with growth year, while the diversity and evenness of endophytic fungal community in root rot-diseased *P. notoginseng* were gradually declined. [Conclusions] *P. notoginseng* harbored a rich diversity of endophytic fungi and its colonization quantity and community composition were significantly distinct between healthy and root rot-diseased plants. Moreover, plant tissues and growth ages also significantly affected the diversity and composition of endophytic fungal community.

Keywords: *Panax notoginseng*; endophytic fungi; root rot-disease; diversity; growth year

植物内生菌(plant endophytes)是指其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物组织内部,但不引起宿主植物病症的一类微生物,包括内生细菌、内生真菌和内生放线菌^[1]。内生菌是植物微生态系统的重要组成部分,其与宿主植物在长期协同进化过程中形成了互惠共生的关系^[2]。研究表明,内生菌不仅能够促进宿主植物生长、增强宿主植物抗逆性,还能提高宿主植物抗病虫害能力、调控宿主植物次生代谢过程,对宿主植物的生长发育、健康及其品质形成具有重要的影响^[3-5]。González等^[6]从健康西瓜植株中分离得到350株内生真菌,研究发现木霉菌(*Trichoderma* sp.)能够广谱性地抑制多种土传病原菌,并能有效降低瓜类作物的病害发生率。江曙等^[7]从4个产地明党参植株中共分离到8属116株内生真菌,研究发现接种镰刀菌(*Fusarium* sp.)能够显著促进明党参细胞生长和多糖积累。因此,植物内生真菌作为一类可持续利用的微生物资源,在保障农业绿色发展和促进药用植物有效成分积累方面具有广阔的应用前景^[8]。

三七[*Panax notoginseng*(Burk.)F. H. Chen]为五加科人参属多年生草本植物,以干燥根和根茎入药,具有散瘀止血、消肿定痛等功效,是我国独有的传统名贵中药材^[9]。根腐病是三七种植过程中危害最为严重的病害,可在三七生长的各个阶段发生,常年发病率为5%~20%,严重时可致绝收^[10]。目前,以根腐病高发频发为主要特征的连作障碍问题已成为制约三七产业可持续发展的关键瓶颈^[11]。因此,深入研究三七内生真菌的群落组成及其演替规律可为分离根腐病高效生防菌提供重要线索。现有研究表明健康状况对三七内生真菌群落组成及其多样性具有显著影响,其中健康三七内生真菌多样性高于罹患根腐病三七^[12];亦有研究比较了健康和罹病三七内生真菌群落组成的差异,发现镰刀菌属(*Fusarium*)、赤霉属(*Gibberella*)、青霉属(*Penicillium*)、被孢霉属(*Mortierella*)、木霉属(*Trichoderma*)、篮状菌属(*Talaromyces*)和毛壳属(*Chaetomium*)的相对丰度在患病三七中高于健康三七^[13]。除宿主植物健康状况以外,其所处生境、生长阶段以及植株部位等因素均会对内生真菌群落组成造成影响^[2,14-15]。当前,健康、罹病三七内生真菌群落组成在不同植株部位的分布特征以及随生长年限的变化规律尚不清楚,有待进一步研究。

本研究以不同种植年限的健康与罹患根腐病三七植株为研究对象,采用组织分离法,结合形态特征和分子生物学鉴定技术对三七根、茎部位的可培养内生真菌群落组成及多样性进行比较分析,旨在明确健康和罹病三七可培养内生真菌群落特征差异,阐明其在不同部位的分布特征及其随生长年限的变化规律,为后续开展功能研究,研发促进三七根腐病绿色防治和药材品质提升的技术措施提供菌株资源。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试三七植株采自云南省文山苗乡三七科技有限公司的种植示范基地(23°42'N,104°16'E)。该基地地处亚热带气候区,海拔约1514 m,年均气温15~17℃,年降水量1100~1319 mm,土壤类型为黄棕壤^[16]。在基地中毗邻的不同种植年限三七园内,按照五点法取样原则,随机采集健康和罹患根腐病的1年生和2年生三七植株若干,分别装入自封袋后用冰盒运回实验室。用无菌水将三七植株洗净后,通过根部病斑观察筛选,共确定56株三七植株用于后续内生真菌分离试验,其中1年生三七患病植株12株,2年生三七患病植株18株,1年生三七和2年生三七健康植株各13株。

供试培养基为马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基,购于青岛高科技工业园海博生物技术有限公司,用

于内生真菌的分离和纯化;真菌基因组 DNA 提取试剂盒 (E.Z.N.A.[®] Fungal DNA Mini Kit) 购于美国 Omega Bio-Tek 公司;PCR 扩增引物 ITS1f 和 ITS4 由南京金斯瑞生物科技股份有限公司合成。

1.2 三七内生真菌的分离纯化

采用组织块分离法^[17]分离三七内生真菌。首先将洗净的三七植株叶片剪掉,然后将根和茎分离后放入超声水浴锅内超声清洗 3 次,每次超声 20 s,用 75% (体积分数) 乙醇漂洗 2 min,无菌水冲洗 3 次;用 5.5% 的次氯酸钠溶液浸泡 2 min,无菌水冲洗 3 次后用无菌滤纸吸干表面水分,取最后一次无菌水冲洗液作为空白对照。在超净工作台用灭菌刀片将已消毒的三七根和茎样品切成 5 mm×5 mm 大小的组织块,从每一植株的根和茎样品中各随机选取 10 个组织块,共计 1 200 个组织块用于三七内生真菌分离。将选取的组织块均匀放置于含链霉素(100 mg·L⁻¹)的 PDA 平板上,封口后置于 28 °C 恒温培养箱中黑暗培养 7 d,于接种组织块第 8 天统计内生真菌的数量。用接种环挑取颜色、形态不一的菌丝转接至新的 PDA 平板上进行纯化培养,如此反复数次,直至形成单一菌落,于 4 °C 斜面保存待用。

1.3 三七内生真菌的分类鉴定

参考《真菌鉴定手册》^[18]对纯化得到的内生真菌进行初步分类,并对特征不同的菌株进行分子生物学鉴定。挑取约 100 mg 纯培养菌株菌丝至 2 mL 离心管中,采用真菌基因组 DNA 提取试剂盒提取真菌基因组 DNA,利用通用引物 ITS1f (5'-TCCGTAGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGAT-ATGC-3') 对真菌 ITS 区域进行 PCR 扩增。扩增反应体系为 20 μL:引物 ITS1f 和 ITS4 各 1 μL, *Taq* DNA 聚合酶 10 μL,真菌 DNA 模板 2 μL, ddH₂O 6 μL。扩增程序:95 °C 5 min;95 °C 1 min,55 °C 30 s,72 °C 1 min,30 个循环;72 °C 10 min。扩增产物经 10 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳检测后送安徽通用生物有限公司进行测序,并使用 NCBI 网站 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对所测得的内生真菌 ITS 序列进行 BLAST 比对分析,根据相似度 (identity) 确定所测样品序列的分类地位。若目标序列和参考序列相似性高于 95%,则暂定到参考序列所在的属;若相似性高于 99% (包括 99%),则暂定到种。为了更好地从功能角度展开讨论,本文中分离得到的对植物生长有利的常见真菌属被认为可能是有益菌,而常见的与根腐病相关的真菌属被认为可能是病原菌。

1.4 数据统计分析

Ds、Dr、Hs、Hr 分别表示罹病三七茎部、罹病三七根部、健康三七茎部和健康三七根部;D1、D2、H1、H2 分别表示 1 年生罹病三七、2 年生罹病三七、1 年生健康三七和 2 年生健康三七。参照孙思胜等^[19]的方法对内生真菌的分离率和分离频率进行统计分析;采用 Shannon 多样性指数、Margalef 丰富度指数和 Pielou's 均匀度指数对内生真菌的多样性特征进行分析^[20];采用层次聚类 and 韦恩图对内生真菌群落组成的相似性以及其不同部位及年际间的演化进行分析。

1) 分离率 (isolation rate, IR), 用于衡量植物组织中内生真菌的丰富程度和每个组织块受多重定殖的发生频率。其公式:

$$IR = (N/M) \times 100\% \quad (1)$$

式中: N 为样品组织块中分离得到的内生真菌总数; M 为样品组织块总数。

2) 分离频率 (isolation frequency, IF), 用于反映不同种类的内生真菌在群落中的优势程度。定义 IF > 5% 的内生真菌类群为优势类群。其公式:

$$IF = (n/M_s) \times 100\% \quad (2)$$

式中: n 为某一群落中特定类型内生真菌的菌株数; M_s 为该群落中所有内生真菌的菌株总数。

3) Shannon 指数 (H')、Margalef 指数 (R) 和 Pielou's 指数 (J) 分别用于评估内生真菌群落的多样性、丰富度和均匀度特征。其公式:

$$H' = - \sum_{i=1}^S P_i \cdot \ln P_i \quad (3)$$

$$R = \frac{S-1}{\ln N} \quad (4)$$

$$J = \frac{H'}{\ln S} \quad (5)$$

式中: S 为分离得到的内生真菌种类数; P_i 为第 i 种内生真菌菌株数与全部内生真菌菌株总数的比值;

N 为分离得到的内生真菌总数。

2 结果与分析

2.1 健康和罹病三七内生真菌组成及多样性差异

从 56 株植株 1 120 个三七组织块中共分离得到 966 株内生真菌,分离率为 86.3%(表 1)。其中 271 株内生真菌分离自健康三七植株,分离率为 52.1%,占内生真菌分离总数的 28.1%;695 株内生真菌分离自罹病三七植株,分离率为 115.8%,占内生真菌分离总数的 71.9%。根据 BLAST 比对结果,所有菌株隶属于 3 门、5 纲、14 目、25 科、31 属(另有 1 个未知属)、67 种(另有 16 个未知种)。

表 1 健康和罹病根腐病三七根部和茎部分离得到的内生真菌数量

Table 1 Number of endophytic fungi isolated from the roots and stems of healthy and root rot-diseased *Panax notoginseng*

植株状态 Plant status	1 年生三七 One-year old <i>P. notoginseng</i>			2 年生三七 Two-year old <i>P. notoginseng</i>			总计 Total
	根部 Root	茎部 Stem	总计 Total	根部 Root	茎部 Stem	总计 Total	
健康三七 Healthy <i>P. notoginseng</i>	64	15	79	127	65	192	271
罹病三七 Diseased <i>P. notoginseng</i>	80	62	142	410	143	553	695
总计 Total	144	77	221	537	208	745	966

由图 1 可知,健康和罹患根腐病三七的内生真菌组成存在明显的差异。在纲水平上,健康三七的优势纲为散囊菌纲 (Eurotiomycetes)、伞菌纲 (Agaricomycetes)、粪壳菌纲 (Sordariomycetes) 和座囊菌纲

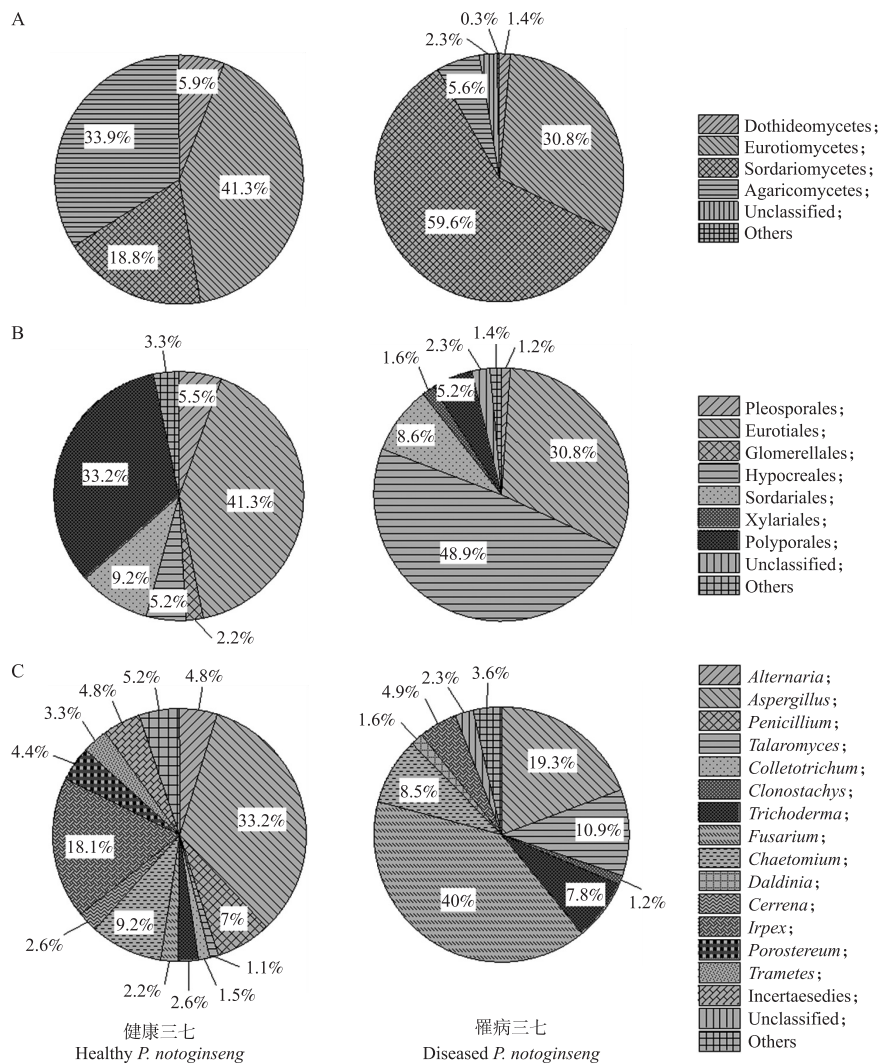


图 1 健康与罹病三七内生真菌在纲(A)、目(B)和属(C)水平的分离频率(≥1%)

Fig. 1 Isolation frequency (≥ 1%) of endophytic fungi at phylum (A), order (B) and genus (C) level of healthy and root rot-diseased *P. notoginseng*

在各分类水平上,分离频率<1%的真菌类群归并为“Others”。下同。At each classification level, fungal taxa with *IF*<1% were grouped into “Others”. The same below.

(Dothideomycetes),其分离频率分别为 41.3%、33.9%、18.8%和 5.9%;而罹病三七内生真菌中粪壳菌纲的分离频率最高,达到 59.6%,其次是散囊菌纲和伞菌纲,分离频率分别为 30.8%和 5.6%(图 1-A)。在目水平上,健康三七的优势目为散囊菌目(Eurotiales)、多孔菌目(Polyporales)、粪壳菌目(Sordariales)、格孢腔菌目(Pleosporales)和肉座菌目(Hypocreales),其分离频率分别为 41.3%、33.2%、9.2%、5.5%和 5.2%;罹病三七的优势目为肉座菌目(48.9%)、散囊菌目(30.8%)、粪壳菌目(8.6%)和多孔菌目(5.2%)(图 1-B)。在属水平上,曲霉属(*Aspergillus*)、耙齿菌属(*Irpex*)、毛壳属(*Chaetomium*)和青霉属(*Penicillium*)在健康三七内生真菌群落中占主导,其分离频率分别为 33.2%、18.1%、9.2%和 7.0%;而镰刀菌属(*Fusarium*)在罹病三七内生真菌中的分离频率最高,达到 40.0%,其次依次为曲霉属、篮状菌属(*Talaromyces*)、毛壳属和木霉属(*Trichoderma*),其分离频率分别为 19.3%、10.9%、8.5%和 7.8%(图 1-C)。罹病三七内生真菌中的镰刀菌属主要为腐皮镰刀菌(*F. solani*)和尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*),其分别占镰刀菌属的 69.4%和 29.9%。除优势内生真菌存在差异外,分离频率在 1%~5%的内生真菌在健康和罹病三七中也存在明显差异。

由图 2 可见,有益菌耙齿菌属和青霉属真菌在健康三七中的分离数和分离频率均明显高于罹病三七;而病原菌镰刀菌属、有益菌篮状菌属和木霉属真菌则呈现相反的趋势,其中罹病三七中分离到的镰刀菌属真菌数量为 278 株,显著高于健康三七中的 6 株。有益菌毛壳属真菌在健康三七中的分离数低于罹病三七,但分离频率差异不大。由表 2 可知,健康与罹病三七内生真菌的香农指数差异不大,罹病三七内生真菌的丰富度较健康三七高,但健康植株均匀度高于罹病植株。

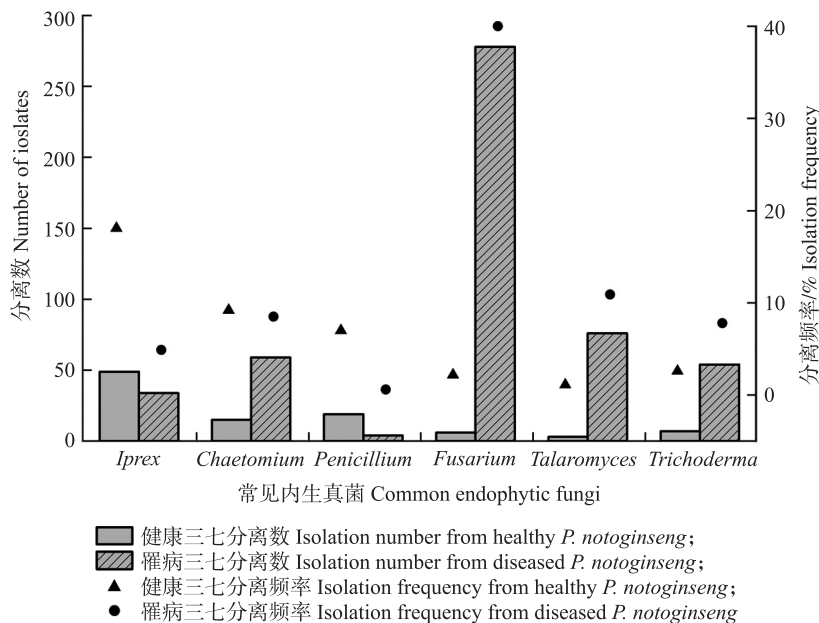


图 2 健康与罹病三七内生真菌中常见病原菌和有益菌的分离数与分离频率

Fig. 2 The number and frequency of isolation of common pathogenic and beneficial fungi from healthy and root rot-diseased *P. notoginseng*

表 2 健康和罹患根腐病三七内生真菌的多样性指数

Table 2 Diversity indices of endophytic fungi in healthy and root rot-diseased *P. notoginseng*

植株状态 Plant status	香农指数(H') Shannon index	丰富度(R) Margalef index	均匀度(J) Pielou's index
健康三七 Healthy <i>P. notoginseng</i>	2.674	6.069	0.752
罹病三七 Diseased <i>P. notoginseng</i>	2.673	6.418	0.711

2.2 植株部位对健康和罹病三七内生真菌群落特征的影响

由表 1 可知,不同三七植株部位中内生真菌的数量存在较大差异,从三七根部分离得到的内生真菌数量远多于其茎部,其中 Dr 的内生真菌分离率高达 163.3%,而 Ds 的内生真菌分离率为 68.3%。如图 3-A 所示,从 Ds、Dr、Hs 和 Hr 中分别分离到 14、11、17 和 18 个真菌属,其中 Hr 和 Hs 的共有属数为 12 个,而 Dr 和 Ds 的共有属数仅为 6 个,且 Ds、Dr、Hs 和 Hr 中的特有属数分别为 6、2、4 和 3,表明与健康植株相比,患病能够加剧三七根、茎之间内生真菌群落组成的差异,且这种差异主要是由于其茎部塑造了一个特异化的内生真菌群落。聚类分析(图 3-B)表明,健康三七植株根部和茎部的内生真菌群落结构相似,其中 Hr

中分离到的优势属为曲霉属(40.8%)、耙齿菌属(15.2%)、毛壳属(7.9%)和青霉属(6.8%);而 Hs 中具有同样的优势属,其中耙齿菌属、曲霉属、毛壳属和青霉属的分离频率分别为 25.0%、15.0%、12.5%和 7.5%。Dr 中分离到的优势属为镰刀菌属、篮状菌属、木霉属和曲霉属,其分离频率分别为 52.0%、14.5%、11.0%和 7.8%;而 Ds 中优势属的种类及分离频率均与 Dr 存在差异,分别为曲霉属(46.8%)、毛壳属(23.4%)和镰刀菌属(11.2%)。健康和罹病三七根部和茎部的优势属均包含曲霉属,表明该属是三七内生真菌的优势属。耙齿菌属、毛壳属和青霉属均是 Hr 和 Hs 的共有优势属,而镰刀菌属是 Dr 和 Ds 的共有优势属。

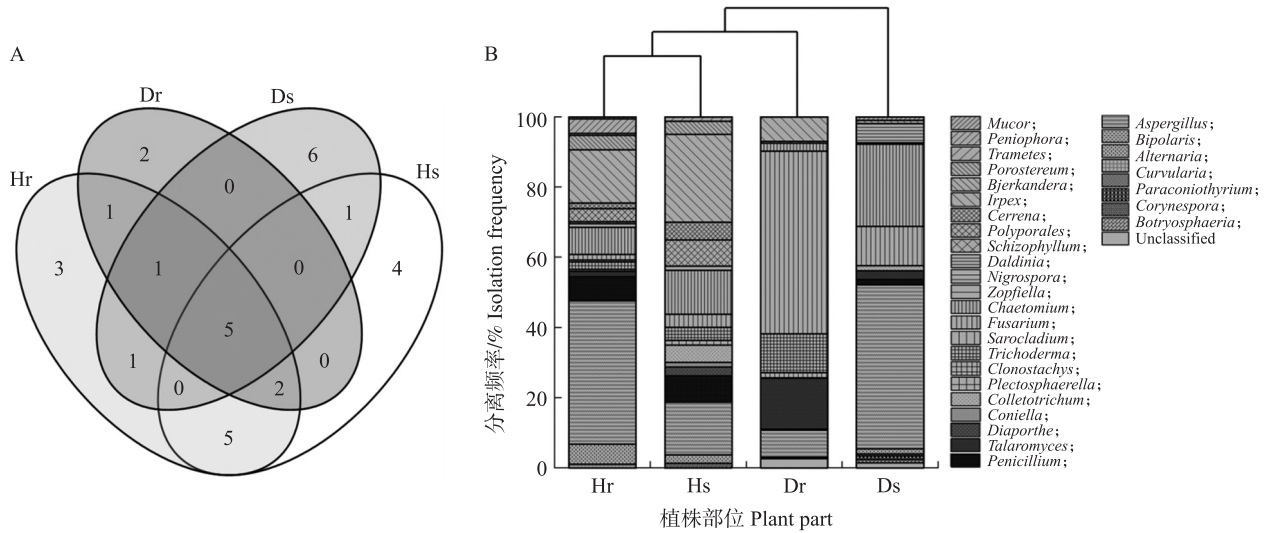


图 3 健康与罹病三七不同部位内生真菌 Venn 图(A)及分离频率图(B)

Fig. 3 Venn diagram (A) and isolation frequency bargraph (B) depicting the endophytic fungi from different parts of healthy and root rot-diseased *P. notoginseng*

Hr 和 Hs 分别表示健康三七的根部和茎部,Dr 和 Ds 分别表示罹病三七的根部和茎部。下同。Hr and Hs represent the root and stem parts of healthy *P. notoginseng*, respectively, while the Dr and Ds represent the root and stem parts of root rot-diseased *P. notoginseng*, respectively. The same below.

由图 4 可知,在罹病植株中分离得到的尖孢镰刀菌与腐皮镰刀菌主要在其根部大量富集,其分离频率分别为 16.1%与 35.7%;有益菌木霉属和篮状菌属真菌在 Dr 的分离数和分离频率均明显高于其他部位,其中分离数分别为 54 和 71 株,分离频率分别为 11.0%与 14.5%。耙齿菌属在 Dr 中的分离数最高,与 Hr 和 Hs 的差异不大,但 Hr 和 Hs 的分离频率较 Dr 高。毛壳属真菌在 Ds 中的分离数和分离频率均明显高于其他部位,而青霉属真菌在 Hr 中的分离数最高,但其分离频率与 Hs 相当。

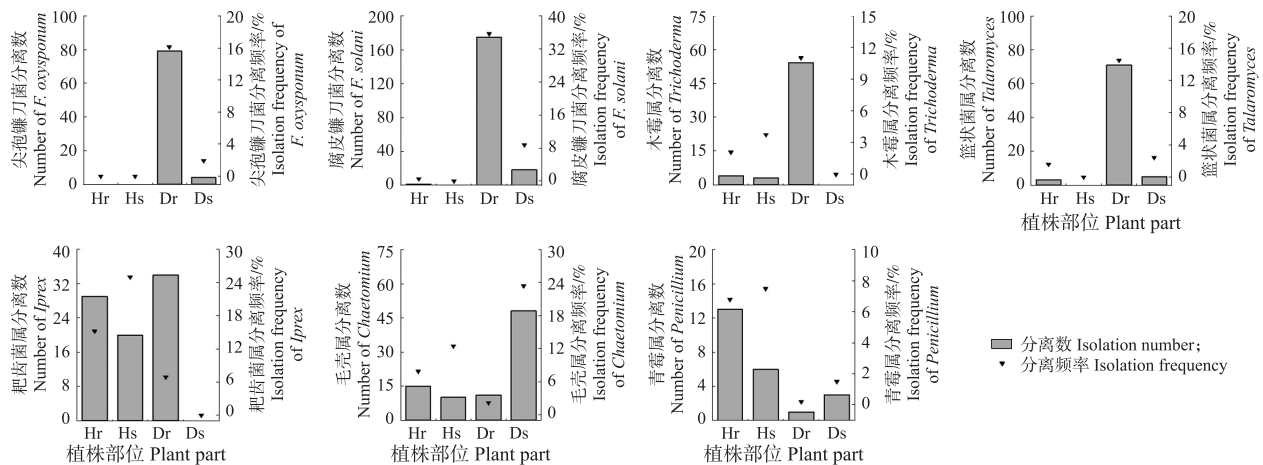


图 4 健康与罹病三七不同部位内生真菌常见病原菌和有益菌的分离数与分离频率

Fig. 4 The number and frequency of isolation of common pathogenic and beneficial fungi from different parts in healthy and root rot-diseased *P. notoginseng*

多样性分析(表 3)结果显示,Hs 的内生真菌多样性和均匀度指数最高,分别为 2.672 和 0.865,而 Dr 的内生真菌多样性和均匀度指数最低,分别为 2.303 和 0.707。不同三七植株部位内生真菌的丰富度指数差异较大,为 4.036~5.260,从大到小依次为 Ds、Hs、Hr、Dr。

2.3 生长年限对健康和罹病三七内生真菌群落特征的影响

由表 1 可知,不同生长年限三七植株内生真菌的数量存在较大差异,从 2 年生三七分离得到的内生真菌数量多于 1 年生三七,其中 D2 植株内生真菌的分离率高达 153.6%,而 D1 植株内生真菌的分离率仅为 59.2%。如图 5-A 所示,D1、D2、H1 和 H2 分离得到的内生真菌可分别归类至 8、18、11 和 17 个属,其中 D1、D2、H1 和 H2 中具有的特有属数分别为 1、7、3 和 8,表明随着三七的生长,健康和罹病三七内生真菌群落组成变得更为复杂,且差异化也在逐渐增大。聚类分析(图 5-B)显示,健康和罹病三七内生真菌的群落组成随生长年限的增加而发生演替,其中 H1 内生真菌中的优势属为曲霉属、链格孢属、炭疽菌属与木霉属,分离频率分别为 60.8%、12.7%、5.1%和 5.1%;而 H2 内生真菌中的优势属包括耙齿菌属、曲霉属、毛壳属、青霉属和孔韧菌属(*Porostereum*),其分离频率分别为 23.9%、20.5%、10.7%、8.8%和 5.9%。D1 内生真菌中的优势属分别为曲霉属、毛壳属、木霉属和镰刀菌属,其分离频率分别为 33.1%、26.8%、23.9%和 10.6%,而 D2 内生真菌中的优势属为镰刀菌属、曲霉属和篮状菌属,其分离频率分别为 48.7%、16.1%和 13.5%。

表 3 三七植株不同部位内生真菌多样性指数

Table 3 Diversity indices of endophytic fungi of *P. notoginseng* in different plant parts

植株部位 Plant part	香农指数(H') Shannon index	丰富度(R) Margalef index	均匀度(J) Pielou's index
Hr	2.426	4.569	0.754
Hs	2.672	4.792	0.865
Dr	2.303	4.036	0.707
Ds	2.400	5.260	0.713

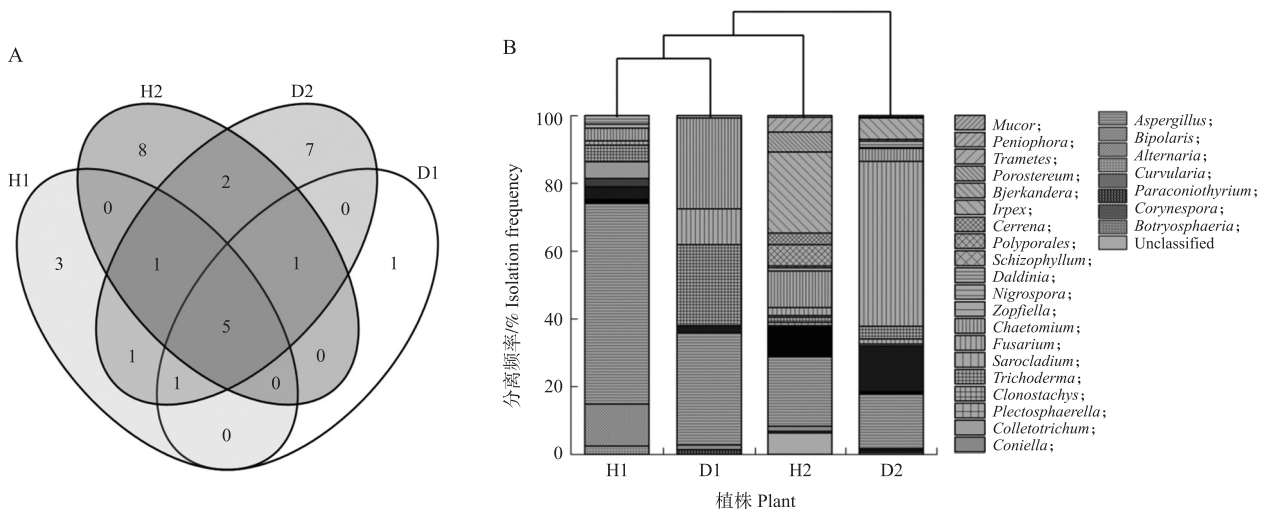


图 5 不同生长年限健康与罹病三七内生真菌 Venn 图(A)及分离频率图(B)

Fig. 5 Venn diagram(A) and isolation frequency bargraph (B) depicting the endophytic fungi of healthy and root rot-diseased *P. notoginseng* at different ages

H1 和 H2 分别表示 1 年生和 2 年生三七健康植株,D1 和 D2 分别表示 1 年生和 2 年生三七罹病植株。下同。H1 and H2 represent the 1-year-old and 2-year-old healthy *P. notoginseng*, respectively, while the D1 and D2 represent the 1-year-old and 2-year-old root rot-diseased *P. notoginseng*, respectively. The same below.

从图 6 可见,1 年生和 2 年生三七中,镰刀菌属均是罹病三七内生真菌的优势属,表明该属可作为评价三七健康与患病的内生真菌指示属。随着生长年限的增加,镰刀菌属在罹病植株中的分离数和分离频率均大幅增加,其中尖孢镰刀菌的分离频率从 2.1%增加至 14.5%,而腐皮镰刀菌的分离频率从 7.7%增加至 32.9%。木霉属的分离数和分离频率在 D1 植株中最高,分别为 34 和 23.9%;而篮状菌属的分离数和分离频率在 D2 植株中最高,分别为 73 和 13.2%。耙齿菌属和青霉属真菌在 H2 植株中的分离数和分离频率最高,而毛壳属真菌在 D1 植株中的分离数和分离频率最高。

由表 4 可知,随着种植年限的增加,健康三七内生真菌群落的多样性指数、丰富度指数和均匀度指数随之增加,而罹病三七内生真菌群落的多样性指数和均匀度指数呈现相反的趋势。此外,D2 植株的内生真菌群落丰富度指数较 D1 植株高,为 4.592。

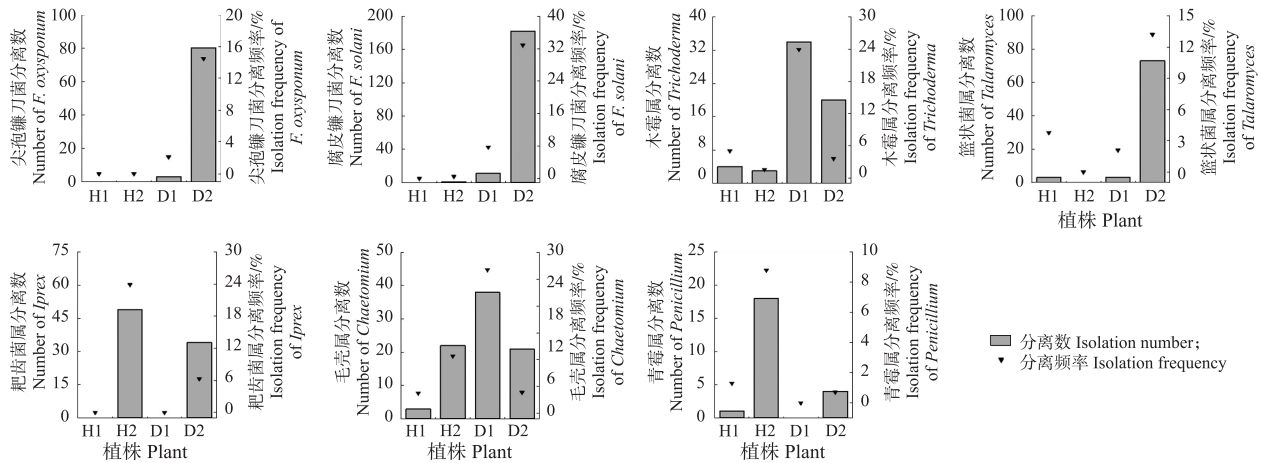


图 6 不同生长年限健康与罹病三七内生真菌常见病原菌和有益菌的分离数与分离频率

Fig. 6 The number and frequency of isolation of common pathogenic and beneficial fungi from different ages in healthy and root rot-diseased *P. notoginseng*

表 4 不同生长年限三七内生真菌多样性指数

Table 4 Diversity indices of endophytic fungi of *P. notoginseng* at different ages

植株 Plant	香农指数(H') Shannon index	丰富度(R) Margalef index	均匀度(J) Pielou's index
H1	2.039	3.662	0.720
H2	2.464	4.375	0.840
D1	2.559	4.036	0.775
D2	2.380	4.592	0.700

3 讨论

健康状况是影响植物内生真菌数量、群落组成及其多样性特征的重要因素^[21]。在本研究中,在罹病三七植株中共分离得到内生真菌 695 株,分离率达 115.8%,均远高于健康三七(271 株,52.1%)。这可能与三七罹患根腐病后,其根部出现损伤,有利于根际微生物进入植株并定殖有关^[22]。文永均等^[13]利用高通量测序技术研究健康与罹病三七内生真菌群落的特征差异,发现镰刀菌属、赤霉属、青霉属、被孢霉属、木霉属、篮状菌属和毛壳属的相对丰度在罹患根腐病三七植株中均高于健康三七。这与本研究结果类似,即健康和罹病三七内生真菌群落组成具有明显差异,其中罹病三七内生真菌中的优势属为镰刀菌属、曲霉属、篮状菌属、毛壳属和木霉属,而曲霉属、耙齿菌属、毛壳属和青霉属在健康三七内生真菌群落中占优势地位。研究表明,镰刀菌属和赤霉属真菌是三七根腐病的常见致病菌^[16,23]。曲霉属、青霉属、被孢霉属、篮状菌属和毛壳属的某些微生物类群具有分泌抗生素、几丁质酶等的作用,可有效抑制多种植物病原菌;而木霉属真菌对病原菌的拮抗主要通过竞争作用、重寄生作用、诱导抗性及其协同拮抗作用等来实现^[24-28]。Duan 等^[29]研究发现,白耙齿菌(耙齿菌属)能够分泌多种生物活性物质,具有广谱抗菌能力。这些结果表明,有益真菌在健康三七内生真菌群落中占主导,可能是抑制病原菌种群增殖、维持三七植株健康的重要因素,而三七患病以后,其可通过分泌特定次生代谢产物促进有益微生物如木霉属、篮状菌属真菌在根际富集并向植株内定殖,以抵御病原菌的侵害^[30-31]。本研究还发现健康三七内生真菌群落的均匀度高于罹病三七,而丰富度较罹病三七低。这可能由于罹病三七植株中镰刀菌属真菌占据绝对优势地位,同时三七患病以后有利于其他真菌类群进入植株定殖,在一定程度上表明均衡的内生真菌群落对于维持寄主植物健康至关重要。此外,健康三七内生真菌群落多样性指数与罹病三七差异不大,这与 Tan 等^[12]的研究结果不一致,原因可能是本研究采用的是分离培养的方法,而 Tan 等^[12]采用的是高通量测序方法。

有研究表明,植物内生真菌的定殖数量、群落组成及多样性特征与分离组织部位密切相关^[32-33]。本研究发现,健康和患病三七根部分离得到的内生真菌数量及分离率均远高于其茎部,这与孙思胜等^[19]的研究结果一致,可能与根际的可利用碳、氮源丰富及有大量微生物定殖有关。同时,健康和罹病三七内生真菌群落在根部和茎部的分布特征均存在差异,其中 Hr 和 Hs 内生真菌的共有属数明显高于罹病三七,

且优势属相同,群落结构也更为相似,而 Dr 和 Ds 中内生真菌群落的优势属种类及分离频率均显著不同,且 Ds 中具有数量最多的特有属,表明三七罹病后植株根、茎间的内生真菌群落结构分异增大,且感病因素对茎部内生真菌群落的影响更大。这与安娜·卡列尼娜定律表达的观点一致,即健康植株的微生物群落更为相似,而罹病植株的微生物群落各有差异^[34]。镰刀菌属在 Dr 中的分离频率高达 52.0%,而在 Ds 中的分离频率仅为 11.2%,这可能与罹病三七根部病原菌的定殖量大有关。耙齿菌属、青霉属等能够分泌活性抗菌物质的有益真菌在 Hr 富集,表明这些菌株在维持植株根际健康、抵御根腐病菌侵染方面具有重要作用^[25,29]。具有拮抗活性的木霉属和篮状菌属真菌主要在 Dr 富集,这与 Dr 中病原菌丰度较高且需要更多拮抗微生物才能有效发挥抑病功能有关^[31]。此外,健康和罹病三七茎部内生真菌群落的多样性均高于其根部,与吕佳等^[15]的研究结果类似,其发现肉桂叶部的真菌多样性最高,其次是枝、根和皮部。

还有一些研究发现,植物生长年限对其内生真菌群落特征具有较大的影响^[14]。在本研究中,随着生长年限的增加,三七内生真菌的定殖数量和分离率逐渐增加,且这种趋势在罹病三七植株中更显著。健康和罹病三七中,2年生三七内生真菌可归类到属的数量以及具有的特有属数均高于1年生三七,这可能与三七内生真菌群落的发育程度与生长年限有关,即随着生长年限的增加,三七内生真菌群落的发育更加完善,群落组成更为复杂,差异化逐渐增大^[35]。Tan 等^[12]研究发现,不同生长年限三七内生真菌的群落特征存在差异,这与本研究的结果一致,其中1年生健康三七内生真菌群落中有益的优势属为木霉属,而2年生健康三七内生真菌群落中有益的优势属包括耙齿菌属、毛壳属和青霉属,表明维持三七健康的内生真菌优势属随其生长年限增加而不断演替。在罹病三七中,镰刀菌属真菌的分离频率从1年生三七的 10.6% 大幅增加至2年生三七的 48.7%,其中尖孢镰刀菌和腐皮镰刀菌的分离频率分别增加了 6.9 和 4.2 倍,这可能与罹病2年生三七根际土壤中尖孢镰刀菌和腐皮镰刀菌的种群数量高于1年生三七有关^[16]。同时,罹病三七植株中有益真菌的种类也随生长年限的增加而变化,其中1年生罹病三七中木霉属真菌的分离数和分离频率最高,而2年生三七以篮状菌属真菌占主导。此外,在本研究中,随着生长年限的增加,健康三七内生真菌群落多样性、丰富度和均匀度指数随之增加,而罹病三七内生真菌群落多样性和丰富度指数随之下降,这与 Tan 等^[12]的研究结果趋势一致,表明当三七植株处于健康状态时,会不断地从根部招募真菌至其植株体内定殖,从而增加植株整体内生真菌的多样性;而当三七植株处于发病状态时,少数病原菌在根部迅速增殖后占据主导地位,因此削弱其他内生真菌在群落中的比例,降低了内生真菌的多样性。

综上所述,三七内生真菌丰富多样,健康状况、生长年限及其组织部位均会对内生真菌的数量、群落组成及其多样性特征产生影响,其中内生真菌的定殖数量和分离率随生长年限的增加而不断增加,且根部定殖的内生真菌数量远高于茎部。健康和罹病三七内生真菌群落在根部和茎部的分布特征也明显不同,其中镰刀菌属在罹病三七根部的分离数和分离频率显著高于其茎部,且木霉属和篮状菌属等有益真菌的分离频率与致病菌同频增长。随着生长年限的增加,健康和罹病三七内生真菌群落组成随之变化,其中罹病三七中镰刀菌属的分离数和分离频率均大幅上升。此外,健康三七内生真菌多样性随生长年限的增加而上升,而罹病三七内生真菌多样性的变化趋势则相反;且健康和罹病三七茎部内生真菌群落的多样性、丰富度及均匀度均高于根部。本研究结果为进一步了解健康、罹病三七内生真菌在不同组织部位的分布特征以及其随生长年限的变化规律提供了数据支撑。

参考文献 References:

- [1] 王志伟,纪燕玲,陈永敢. 植物内生菌研究及其科学意义[J]. 微生物学通报,2015,42(2):349-363.
Wang Z W, Ji Y L, Chen Y G. Studies and biological significances of plant endophytes [J]. Microbiology China, 2015, 42(2): 349-363 (in Chinese with English abstract).
- [2] 陈招荣,刘新悦,赵欣迪,等. 植物内生菌群落组成及其功能研究进展[J]. 生命科学,2023,35(2):132-139.
Chen Z R, Liu X Y, Zhao X D, et al. Research progress on community composition and function of endophytes in plants [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2023, 35(2): 132-139 (in Chinese with English abstract).
- [3] Li Z G, Xiong K Y, Wen W E, et al. Functional endophytes regulating plant secondary metabolism: current status, prospects, and applications [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(2): 1153.
- [4] 孙美玲,黄麟,叶建仁,等. 我国用材林主要真菌病害致病机制及内生菌对病害的生防作用[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2022, 46(6): 225-232.
Sun M L, Huang L, Ye J R, et al. Advances on pathogenic mechanisms and endophytes-employed biological control of fungal diseases on major

- timber forests in China[J]. Journal of Nanjing Forestry University(Natural Sciences Edition),2022,46(6):225-232(in Chinese with English abstract).
- [5] White J F, Kingsley K L, Verma R, et al. Review: endophytic microbes and their potential applications in crop management[J]. Pest Management Science,2019,75(10):2543-2548.
- [6] González V F, Armijos E, Garcés C A. et al. Fungal endophytes as biocontrol agents against the main soil-borne diseases of melon and watermelon in Spain[J]. Agronomy,2020,10(6):820.
- [7] 江曙,段金庾,陶金华,等. 明党参内生真菌种群的生态分布及其诱导子活性研究[J]. 中草药,2010,41(1):121-125.
Jiang S,Duan J A,Tao J H,et al. Ecological distribution and elicitor activities of endophytic fungi in *Changium smyrnioides*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs,2010,41(1):121-125(in Chinese with English abstract).
- [8] 常恺莉,张琳,周红英,等. 药用植物内生菌资源在农业中的应用与研究进展[J]. 山东农业科学,2021,53(7):135-141.
Chang K L,Zhang L,Zhou H Y,et al. Application and research progress of endophyte resources of medicinal plants in agriculture[J]. Shandong Agricultural Sciences,2021,53(7):135-141(in Chinese with English abstract).
- [9] 李云龙,王宝英,常亚锋,等. 土壤强还原处理对三七连作障碍因子及再植三七生长的影响[J]. 土壤学报,2019,56(3):703-715.
Li Y L,Wang B Y,Chang Y F,et al. Effects of reductive soil disinfestation on obstacles and growth of replant seedlings in Sanqi Ginseng mono-cropped Soils[J]. Acta Pedologica Sinica,2019,56(3):703-715(in Chinese with English abstract).
- [10] 姚春芝,蒋宇婷,杨玉婷,等. 三七连作土壤浸提液对其根腐病菌的化感效应[J]. 应用生态学报,2020,31(7):2227-2235.
Yao C Z,Jiang Y T,Yang Y T,et al. Allelopathic effect of extracts from *Panax notoginseng* mono-cropped soil on its root rot pathogens[J]. Chinese Journal of Applied Ecology,2020,31(7):2227-2235(in Chinese with English abstract).
- [11] 常亚锋,于文豪,陈厚朴,等. 种植年限对健康三七根际土壤微生物活性和功能的影响[J]. 土壤,2023,55(1):132-139.
Chang Y F,Yu W H,Chen H P,Effect of planting years on rhizosphere soil microbial activity and function of healthy Sanqi ginseng[J]. Soils,2023,55(1):132-139(in Chinese with English abstract).
- [12] Tan Y, Cui Y S, Li H Y, et al. Rhizospheric soil and root endogenous fungal diversity and composition in response to continuous *Panax notoginseng* cropping practices[J]. Microbiological Research,2017,194:10-19.
- [13] 文永均,黄璜,马中刚,等. Illumina 高通量测序分析健康三七与患根腐病三七根际土和根内生真菌多样性[J]. 食品与发酵科技,2020,56(6):22-30.
Wen Y J, Huang H, Ma Z G, et al. Illumina high-throughput sequencing reveals fungal community composition and diversity in root and rhizosphere soil of health and root-rot *Panax notoginseng*[J]. Food and Fermentation Sciences & Technology,2020,56(6):22-30(in Chinese with English abstract).
- [14] 张培良,王国凯,郁阳,等. 不同生长时期风丹内生真菌的分离鉴定及多样性研究[J]. 安徽中医药大学学报,2016,35(5):78-82.
Zhang P L,Wang G K,Yu Y,et al. Isolation and identification of endophytic fungi from *Paeonia ostii* and their diversity in different growth periods[J]. Journal of Anhui University of Chinese Medicine,2016,35(5):78-82(in Chinese with English abstract).
- [15] 吕佳,罗碧,钱家萍,等. 广东肉桂内生真菌多样性及其抗肉桂枝枯病菌初步研究[J]. 菌物学报,2022,41(3):435-449.
Lü J,Luo B,Qian J P,et al. Diversity of endophytic fungi from *Cinnamomum cassia* and their antagonism to the pathogen of *C. cassia* branch blight in Guangdong,South China[J]. Mycosystema,2022,41(3):435-449(in Chinese with English abstract).
- [16] Wang B Y, Xia Q, Li Y L, et al. Root rot-infected Sanqi ginseng rhizosphere harbors dynamically pathogenic microbiotas driven by the shift of phenolic acids[J]. Plant and Soil,2021,465(1/2):385-402.
- [17] 许小蓉,黄之镨,虞泓,等. 云南高明大哨天然虫生真菌及其内生真菌的分离鉴定与抑菌活性分析[J]. 微生物学通报,2022,49(10):4048-4065.
Xu X R,Huang Z P,Yu H,et al. Isolation, identification, and antimicrobial activities analysis of natural entomogenous fungi and the endophytic fungi from Dashao village, Songming county, Yunnan province[J]. Microbiology China,2022,49(10):4048-4065(in Chinese with English abstract).
- [18] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979.
Wei J C. Molecular Identification of Fungi[M]. Shanghai:Shanghai Science Technology Press,1979(in Chinese).
- [19] 孙思胜,张晓娟,马传贵,等. 怀牛膝可培养内生真菌的多样性研究[J]. 安徽农业科学,2022,50(10):149-151,156.
Sun S S,Zhang X J,Ma C G,et al. Study on diversity of culturable endophytic fungi from *Achyranthes bidentata* Blume[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences,2022,50(10):149-151,156(in Chinese with English abstract).
- [20] 刘政,李燕,孙艳,等. 黄萎病侵染后棉花根部内生真菌群落结构分析[J]. 西北农业学报,2016,25(1):42-47.
Liu Z,Li Y,Sun Y,et al. Analyzing endophytic fungi communities in cotton roots infected with *Verticillium*[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica,2016,25(1):42-47(in Chinese with English abstract).
- [21] 钟雅婷,邹东霞,廖旺姣,等. 轮斑病导致的桉树叶片内生真菌群落结构差异分析[J]. 中南林业科技大学学报,2022,42(4):68-75.
Zhong Y T,Zou D X,Liao W J,et al. Differential analysis of community structure of endophytic fungi in the eucalyptus leaves infected by *Coniella eucalyptorum*[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology,2022,42(4):68-75(in Chinese with English abstract).
- [22] Steinrucken T V, Bissett A, Powell J R, et al. Endophyte community composition is associated with dieback occurrence in an invasive tree[J]. Plant and Soil,2016,405(2):311-323.

- [23] 缪作清,李世东,刘杏忠. 三七根腐病原研究[J]. 中国农业科学,2006,39(7):1371-1378.
Miao Z Q,Li S D,Liu X Z. The causal microorganisms of *Panax notoginseng* root rot disease[J]. Scientia Agricultura Sinica,2006,39(7):1371-1378(in Chinese with English abstract).
- [24] 汤逸飞,张国平. 曲霉属微生物资源在植物保护中应用研究进展[J]. 上海农业科技,2017(5):22-26.
Tang Y F,Zhang G P. Research progress on the application of *Aspergillus* microbial resources in plant protection[J]. Shanghai Agricultural Science and Technology,2017(5):22-26(in Chinese).
- [25] Xiong W,Li R,Ren Y, et al. Distinct roles for soil fungal and bacterial communities associated with the suppression of vanilla *Fusarium* wilt disease[J]. Soil Biology and Biochemistry,2017,107:198-207.
- [26] Park Y H,Chung J Y,Ahn D J, et al. Screening and characterization of endophytic fungi of *Panax ginseng* Meyer for biocontrol activity against ginseng pathogens[J]. Biological Control,2015,91:71-81.
- [27] Bara R,Aly A H,Pretsch A, et al. Antibiotically active metabolites from *Talaromyces wortmannii*, an endophyte of *Aloe vera*[J]. The Journal of Antibiotics,2013,66:491-493.
- [28] 邹佳迅,范晓旭,宋福强,等. 木霉(*Trichoderma* spp.)对植物土传病害生防机制的研究进展[J]. 大豆科学,2017,36(6):970-977.
Zou J X,Fan X X,Song F Q, et al. Biocontrol mechanism of *Trichoderma* spp. against soilborn plant disease[J]. Soybean Science,2017,36(6):970-977(in Chinese with English abstract).
- [29] Duan X X,Dan Q,Song H C, et al. Irpexlactone A-D, four new bioactive metabolites of endophytic fungus *Irpex lacteus* DR10-1 from the waterlogging tolerant plant *Distylium chinense*[J]. Phytochemistry Letters,2019,32:151-156.
- [30] 张嘉慧,邢佳佳,彭丽媛. 丛枝菌根真菌提高感染青枯菌番茄根际土壤细菌群落多样性和稳定性及有益菌属相对丰度[J]. 植物营养与肥料学报,2023,29(1):120-131.
Zhang J H,Xing J J,Peng L Y. Arbuscular mycorrhizal fungi improves diversity and stability of bacterial community and abundance of beneficial bacteria genus in the rhizosphere of tomato infected with *Ralstonia solanacearum*[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizers,2023,29(1):120-131(in Chinese with English abstract).
- [31] 刘婷,文涛,赵梦丽,等. 番茄根际代谢物抵御茄科劳尔氏菌入侵机制研究[J]. 南京农业大学学报,2020,43(3):460-467. DOI: 10.7685/jnau.201905051.
Liu T,Wen T,Zhao M L, et al. The mechanisms of tomato rhizosphere metabolites resistance to *Ralstonia solanacearum* invasion[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2020,43(3):460-467(in Chinese with English abstract).
- [32] Guo L D,Huang G R,Wang Y. Seasonal and tissue age influences on endophytic fungi of *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in the Dongling mountains,Beijing[J]. Journal of Integrative Plant Biology,2008,50(8):997-1003.
- [33] Zhao R L,Li W J,Yin Z, et al. Endophytic fungi from the medicinal plant, *Panax notoginseng*, isolated from healthy and root-rot diseased individuals[J]. Chiang Mai Journal of Science,2013,41(2):249-261.
- [34] Arnault G,Mony C,Vandenkoornhuysen P. Plant microbiota dysbiosis and the Anna Karenina Principle[J]. Trends in Plant Science,2023,28(1):18-30.
- [35] 陈绍通,戴军,姜雪萍,等. 不同生长年限霍山石斛内生菌的多样性与差异性[J]. 中国中药杂志,2019,44(6):1145-1150.
Chen S T,Dai J,Jiang X P, et al. Diversity and difference of endophytes in *Dendrobium huoshanense* with different growth years[J]. China Journal of Chinese Materia Medica,2019,44(6):1145-1150(in Chinese with English abstract).

责任编辑:刘怡辰