

研究报告

西洋参幼苗内生真菌多样性及其与代谢之间的关联性分析

毛欣颖¹, 丁宇¹, 王悦¹, 陈田¹, 刘子琪¹, 王汝振¹, 方磊¹, 周洁^{*1,2}¹ 济南大学 生物科学与技术学院, 山东 济南 250022² 中国中医科学院 中药资源中心 道地药材品质保障与资源持续利用全国重点实验室, 北京 100700

毛欣颖, 丁宇, 王悦, 陈田, 刘子琪, 王汝振, 方磊, 周洁. 西洋参幼苗内生真菌多样性及其与代谢之间的关联性分析[J]. 微生物学通报, 2025, 52(7): 3124-3144.

MAO Xinying, DING Yu, WANG Yue, CHEN Tian, LIU Ziqi, WANG Ruzhen, FANG Lei, ZHOU Jie. Endophytic fungal diversity and its correlation with metabolism in *Panax quinquefolius* seedlings[J]. Microbiology China, 2025, 52(7): 3124-3144.

摘要:【背景】近年来, 药用植物内生菌多样性及其与代谢产物之间的相关性研究已成为中药资源领域研究热点。名贵中药材西洋参内生菌资源研究非常薄弱。【目的】探究不同生长时期西洋参内生真菌多样性及其与西洋参代谢物的相关性, 筛选出具有促生活性的菌株, 为挖掘西洋参内生真菌资源和开发促生菌剂提供基础数据。【方法】运用高通量测序技术分析西洋参出苗前后内生真菌多样性、共现网络分析及功能预测; 运用代谢组学技术分析出苗前后代谢物的差异及其富集途径; 通过相关性分析筛选出与代谢物相关的内生真菌属, 通过体外分离培养、溶磷、解钾等实验筛选具有促生活性的内生真菌。【结果】西洋参出苗前后内生真菌群落存在多样性和差异性, 子囊菌门(Ascomycota)为2个时期的共同优势菌门。相关性分析表明, 鲜重与曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)、链格孢属(*Alternaria*)和篮状菌属(*Talaromyces*)等呈显著正相关。胚根长与木霉属(*Trichoderma*)和粘帚霉属(*Clonostachys*)等呈显著正相关($P<0.05$)。篮状菌属(*Talaromyces*)与IAA-Glu、Ala-Glu、L-组氨酸等呈显著正相关, 青霉属(*Penicillium*)与吲哚-3-丁酸(indole-3-butyric acid, IBA)呈显著正相关, 木霉属(*Trichoderma*)与IBA、L-组氨酸和L-赖氨酸(L-lysine)等呈显著正相关, 粘帚霉属(*Clonostachys*)与Asp-Glu和琥珀酸等呈显著正相关, 曲霉属(*Aspergillus*)与瓜氨酸(citrulline)、3'-腺苷一磷酸(3'-adenosine monophosphate, 3'-AMP)和甘油醛 3-磷酸等呈显著正相关($P<0.05$)。通过分离、鉴定及活性筛选获得6株具有促生活性的内生真菌, 其中大前郁夫-安娜篮

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFC3503802); 山东省重点研发计划(2022TZXD0036); 中央本级重大增减支项目(2060302-2302-06); 山东省自然科学基金(ZR2022MH101)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFC3503802), the Key Research and Development Program of Shandong Province (2022TZXD0036), the Major Increases or Decreases in Expenditure at the Central Level (2060302-2302-06), and the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2022MH101).

*Corresponding author. E-mail: zhoujie8761@163.com

Received: 2024-11-27; Accepted: 2024-12-23; Published online: 2025-02-07

状菌(*Talaromyces oumae-anna*) S-20 具有溶磷能力, 肺炎青霉菌(*Penicillium aeneum*) S-7 和钩状木霉(*Trichoderma hamatum*) S-21 具有解钾能力, 罗杰斯无性穗霉(*Clonostachys rogersiana*) S-10、*Trichoderma hamatum* S-21、黑曲霉(*Aspergillus niger*) S-25 和黄曲霉(*Aspergillus flavus*) S-27 具有产铁载体能力。【结论】不同生长时期西洋参幼苗内生真菌和代谢物组成存在明显差异, 与代谢物之间存在显著相关性的内生真菌将为西洋参促生菌剂的开发奠定基础。

关键词: 西洋参; 内生真菌; 多样性; 代谢; 活性

Endophytic fungal diversity and its correlation with metabolism in *Panax quinquefolius* seedlings

MAO Xinying¹, DING Yu¹, WANG Yue¹, CHEN Tian¹, LIU Ziqi¹, WANG Ruzhen¹, FANG Lei¹, ZHOU Jie^{*1,2}

¹ School of Biological Science and Technology, University of Jinan, Jinan 250022, Shandong, China

² State Key Laboratory for Quality Ensurance and Sustainable Use of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: [Background] In recent years, the diversity of endophytic fungi in medicinal plants and its correlation with metabolites have become a research hotspot in the field of Chinese medicinal material resources. However, studies are limited regarding the endophyte resources of *Panax quinquefolius*. **[Objective]** To explore the diversity of endophytic fungi of *P. quinquefolius* at different growth stages and its correlation with metabolites and screen out the strains with plant growth-promoting activity, so as to provide basic data for mining endophytic fungal resources of *P. quinquefolius* and developing plant growth-promoting agents. **[Methods]** High-throughput sequencing was conducted to analyze the diversity of endophytic fungi in *P. quinquefolius* before and after seedling emergence, and then co-occurrence network analysis and functional prediction were carried out. The metabolomics technology was used to analyze the metabolites before and after seedling emergence and the associated pathways. The correlation analysis was performed to select the endophytic fungal genera related to metabolites. The *in vitro* isolation and culture, phosphate solubilization, and potassium solubilization experiments were carried out to select the fungal strains with plant growth-promoting effects. **[Results]** The endophytic fungi were diverse and different before and after the emergence of *P. quinquefolius*. Ascomycota was a common dominant fungal phylum both before and after seedling emergence. The correlation analysis showed that the fresh weight was positively correlated with *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, and *Talaromyces*. The radicle length was positively correlated with *Trichoderma* and *Clonostachys* ($P < 0.05$). *Talaromyces* was positively correlated with IAA-Glu, Ala-Glu, and L-hisidine. *Penicillium* was positively correlated with indole-3-butyric acid (IBA). *Trichoderma* was positively correlated with IBA, L-hisidine, and L-lysine. *Clonostachys* was positively correlated with Asp-Glu and succinic acid. *Aspergillus* was positively correlated with citrulline, 3'-adenosine monophosphate (3'-AMP), and glycerol 3-phosphate ($P < 0.05$). Through isolation, identification, and activity measurement, six strains of endophytic fungi with plant growth-promoting effects were

obtained. Among the six strains, *Talaromyces oumae-anna* S-20 had phosphate-solubilizing ability; *Penicillium aeneum* S-7 and *Trichoderma hamatum* S-21 had potassium-solubilizing ability; *Clonostachys rogersoniana* S-10, *Trichoderma hamatum* S-21, *Aspergillus niger* S-25, and *Aspergillus flavus* S-27 were capable of producing siderophores. **[Conclusion]** The endophytic fungi and metabolite composition of *P. quinquefolius* seedlings at different growth stages were significantly different. The endophytic fungi showing significant correlations with metabolites lay a foundation for the development of growth-promoting agents for *P. quinquefolius*.

Keywords: *Panax quinquefolius*; endophytic fungi; diversity; metabolism; activity

内生菌是指栖息在健康植物器官和组织内,与植物形成良好的共生关系且不会对宿主造成明显伤害的微生物类群^[1]。研究表明,内生真菌能通过多种机制促进植物对氮、磷、钾等营养元素的吸收和利用,可通过产生生长素等生长调节剂,以及调控植物代谢等促进植物生长发育^[2-5],植物内生菌与其生长密切相关。

中药西洋参源于五加科植物西洋参(*Panax quinquefolius*)的干燥根,始载于《本草新编》^[6],具有补气养阴、清热生津之功效^[7],在我国已有 300 多年的药用历史^[8]。西洋参原产于美国和加拿大^[9],20 世纪 80 年代在我国引种成功。西洋参相关研究多集中在活性成分和药理活性^[10],其内生真菌的研究及其应用相对薄弱。课题组前期研究发现,西洋参植株不同部位内生菌群落与结构存在明显差异性,并且与代谢产物之间存在显著相关性^[11]。有文献报道,当归^[12]、小花南芥^[13]、小麦^[14]和蚕豆^[15]等植物幼苗中含有丰富的内生菌资源,在蚕豆幼苗中筛选出具有溶磷、解钾活性的内生真菌^[15],从玉米中分离出具有产 IAA 和溶磷活性的内生真菌^[16]。西洋参幼苗内生真菌资源及其活性研究相对薄弱,深入研究西洋参幼苗内生真菌资源并挖掘具有活性的菌株对微生物菌剂的开发具有重要意义。

本研究以西洋参幼苗为研究对象,通过高通量测序研究西洋参幼苗前后内生真菌多样性、共现网络及功能预测等;运用代谢组学技术分析出苗前后代谢物的差异性及其富集途径等;通过相关性分析筛选出与幼苗生长与初生代谢相关的内生真菌属;通过体外分离培养、

溶磷、解钾等活性测定实验筛选具有促生活性的内生真菌,以期筛选出优良的促生内生真菌,为西洋参幼苗内生真菌研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品

西洋参种子采于山东省威海市文登区西洋参主产区。选取大小均一、健康有活力的西洋参种子为实验材料。

1.2 主要试剂和仪器

甲醇和甲酸, Thermo Fisher 科技公司;土壤 DNA 提取试剂盒, MoBio 公司; Phusion[®] High-Fidelity PCR Master Mix, NEB 公司; CTAB, 北京诺博莱德科技有限公司。梯度 PCR 仪, Bio-Rad 公司;电泳仪,北京市六一仪器有限公司;质谱仪、色谱仪、色谱柱和 NanoDrop 2000 分光光度计, Thermo Fisher 科技公司;低温离心机, Scilogex 公司;液相色谱质谱联用仪, Agilent Technologies Inc.。

1.3 培养基

西洋参内生真菌的分离使用马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基^[17]、溶磷活性测定使用蒙金娜无机磷(Pikovskaya, PVK)培养基^[18]、解钾活性测定使用解钾培养基^[19]、产铁载体活性定性测定使用铬天青(chrome azurol sulphionate, CAS)培养基^[20]。活化发酵菌株采用马铃薯葡萄糖肉汤(potato dextrose broth, PDB)培养基^[17]。King 培养基,青岛海博生物技术有限公司。

1.4 种子萌发试验

采用“三步消毒法”对种子进行表面消毒处理^[21],将种子置于无菌的土壤中,于温度 24 °C,湿度 80%的培养箱中培养。取种子萌发胚根长 2 mm 左右(SPI期)与幼苗地上部分长 4 cm (SPII期) 2 个时期的西洋参整株幼苗作为实验材料(图 1)。采用“三步消毒法”对植株表面进行消毒,取消毒后的最后一次清洗液涂抹在 PDA 培养基上进行消毒效果检测,以 PDA 平板上有无菌落生成确定是否消毒彻底,消毒结果已提交到国家微生物科学数据中心,编号为 NMDCX0001781 (<https://nmhc.cn/resource/attachment/detail/NMDCX0001781>)。

1.5 幼苗生长指标的测定

随机选取 50 粒长势健康且相似的幼苗,用电子天平称量其鲜重后取平均值。随机选取 50 粒长势健康且相似的幼苗,用游标卡尺测定其胚根长度后取平均值。

1.6 内生真菌 DNA 的提取及高通量测序

按照土壤 DNA 提取试剂盒说明书提取西洋参幼苗中内生真菌的总基因组 DNA。使用

NanoDrop 2000 分光光度计对 DNA 进行定量。利用引物 ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAA GTAA-3')和 ITS1R (5'-GCTGCGTTCTTCATCG ATGC-3')扩增真菌 ITS1-1F 区域。PCR 反应体系(30 μ L): 模板 DNA (1 ng/ μ L) 10 μ L, Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix 15 μ L, 正、反向引物(1 mol/L) 0.2 μ L, 无菌 ddH₂O 补足 30 μ L。PCR 反应条件: 98 °C 30 s; 98 °C 15 s, 50 °C 30 s, 6 个循环,每个循环降低 0.5 °C; 72 °C 30 s, 98 °C 15 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s, 29 个循环; 72 °C 2 min。PCR 扩增产物经纯化回收后,利用 1%琼脂糖凝胶电泳技术对提取的 DNA 进行检测。最后委托北京诺禾致源科技股份有限公司完成基于 Illumina NovaSeq 平台的 PE250 测序。

1.7 内生真菌的分离与鉴定

采用组织匀浆涂布法^[22]进行内生真菌体外培养与分离。分别取 2 个时期消毒后的整株幼苗,在无菌研磨器中研磨成组织液,用无菌移液枪吸取组织液到 PDA 培养基上,采用一次性涂布棒均匀涂布,置于 27 °C 的恒温培养箱中培养 5–7 d,其间根据菌落的形态特征进行分离并纯化,最终纯化至单菌落后编号保存。经形态学与分子生物学鉴定相结合的方法对分离到的单菌落进行鉴定。采用埋片培养法^[23]处理,在光学显微镜下观察菌丝体和孢子体的形态,参考《真菌鉴定手册》^[24]进行形态学鉴定。采用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和引物 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')对内生真菌的 rDNA-ITS 序列进行 PCR 扩增,委托济南天一生物科技有限公司完成。使用 MEGA 11.0 软件基于 NCBI 数据库进行比对及同源性分析,选择相似性最高的近缘序列,以稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*) HR (GenBank 登录号为 PQ341094.1)作为外群,运算重复 1 000 次,通过邻接法构建系统发育树。

1.8 菌株促生活性的测定

溶磷活性的测定: 采用琼脂块法^[25]筛选具有促生活性的内生真菌。将待测菌株接种于



图 1 西洋参幼苗生长过程取样形态图 A: SPI期; B: SPII期。

Figure 1 Sampling morphology of *Panax quinquefolius* seedling growth process. A: SPI stage; B: SPII stage.

PDA 培养基中, 27 °C活化培养 7 d。挑取 0.6 cm 活化的待测真菌菌块分别接种至解无机磷固体培养基中, 27 °C恒温培养 7 d, 测量溶磷圈直径 D 与菌落直径 d , 用 D/d 表征菌株溶磷的能力, 比值越大, 溶磷能力越强。每个处理 6 个重复, 以接种 0.6 cm 的无菌 PDA 培养基为对照组。

解钾活性的测定: 将活化待测的内生真菌菌块接种至解钾固体培养基上, 27 °C培养 7 d。观察菌落周围透明圈, 测量解钾透明圈直径 D 与菌落直径 d , 用 D/d 表征菌株解钾的能力, 比值越大, 解钾能力越强。

产 IAA 活性的定性测定: 将活化待测的内生真菌菌块接至 King 培养基上, 27 °C培养 7 d。观察菌落周围透明圈, 测量产 IAA 透明圈直径 D 与菌落直径 d , 用 D/d 表征菌株产 IAA 的能力, 比值越大, 产 IAA 能力越强。

产铁载体活性的定性测定: 将活化待测的内生真菌菌块接种至 CAS 培养基中, 27 °C培养 7 d。观察菌落周围橙黄色晕圈, 测量晕圈直径 D 与菌落直径 d , 用 D/d 表征菌株产铁载体的能力, 比值越大, 产铁载体能力越强。

产铁载体活性的定量测定: 采用铁载体活性单位(SU)表示铁载体的产量^[26]。将接种内生真菌 27 °C、120 r/min 恒温培养 7 d 的 PDB 培养基和未接种内生真菌的 PDB 培养基 8 000 r/min 离心 10 min, 分别取上清液与 CAS 检测液等体积混匀, 暗处静置 1 h 后, 分别测 OD_{630} 。铁载体含量测定公式如下:

$$SU = [(A_r - A_s) / A_r] \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中: A_r 为铁载体检测液与 PDB 培养基混合后测定的吸光值, A_s 为铁载体检测液与内生真菌发酵液混合后测定的吸光值。

1.9 代谢组学分析

1.9.1 样品提取和制备

将用于代谢组学分析的 SPI 和 SPII 样品分别在液氮中研磨成粉末。代谢物提取步骤如下: 收集 100 mg 液氮研磨的组织样本置于 EP 管中, 加入 500 μ L 80%的甲醇溶液混合并涡旋 10 s; 涡

旋振荡后冰浴静置 6 min, 15 000 r/min、4 °C离心 20 min。取上清液加质谱水稀释至甲醇含量为 53%, 15 000 r/min、4 °C离心 20 min, 收集上清液, 用 0.22 μ m 过滤器过滤, 利用液质联用(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)技术进行分析, 每个时期的样品 5 个重复。

1.9.2 色谱-质谱条件

梯度由 0.1%甲酸(A)和甲醇(B)组成。色谱条件: 色谱柱: Hypesil Goldcolumn C18 柱; 线性梯度设置如下: 0–1.5 min, 2% B; 1.5–3.0 min, 2%–85% B; 3–10 min, 85%–100% B; 10–10.1 min, 100%–2% B; 10.1–11 min, 2% B; 11–12 min, 2% B。柱温: 40 °C, 流速: 0.2 mL/min, 进样量: 5 μ L。质谱条件: 扫描范围选择 m/z 100–1 500; 电喷雾电离(electrospray ionization, ESI)源的设置如下: 喷雾电压, 3.5 kV; 雾化器压力, 35 Psi; 鞘气温度, 350 °C; 极性, 正离子、负离子; MS/MS 二级扫描为数据依赖性扫描。

1.10 数据处理

通过 Illumina NovaSeq 平台 PE250 测序得到原始数据, 经拼接和过滤后得到有效数据。通过 DADA2 降噪处理后获得最终的扩增子序列变体(amplicon sequence variant, ASV)用于后续的分析, 包括 Venn 图分析、物种的群落组成分析、 α 多样性分析(Chao1、Shannon 和 Simpson 指数)、 β 多样性分析[非度量多维尺度(non-metric multi-dimensional scaling, NMDS)]及共现网络分析。利用 LDA Effect Size (LEfSe)方法筛选出具有统计学差异的内生真菌, 并绘制线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA)值分布柱状图及进化分支图。通过 FUNGuild 软件对内生真菌的功能进行预测。采用 SPSS 软件进行差异显著性检验并利用 GraphPad Prism 9.5 绘制相关性热图。

将质谱检测离机数据导入 Compound Discover 3.3 (CD 3.3)软件对代谢物进行定量分析。使用主成分分析(principal component analysis,

PCA)和偏最小二乘法判别分析(partial least Squares discriminant analysis, PLS-DA)初步分析不同生长时期西洋参幼苗的差异情况,判断不同样本生物学重复代谢组的数据可靠性和稳定性。使用 R 包 ggplot 2 绘制筛选差异代谢物的火山图。对差异代谢物的 fold change 值以 2 为底做对数转换并以此排序,并各取上、下调的前 20 个代谢物绘制火柴秆图。采用 Pearson 相关系数对差异代谢物之间的相关性进行分析,使用 R 语言中的 corplot 软件包绘制相关性热图。使用 R 包 ggplot 2 绘制气泡图,使用 KEGG 数据库对代谢物的功能和参与的代谢途径进行分析。

2 结果与分析

2.1 不同时期西洋参幼苗生长情况

SPI 期与 SPII 期分别代表西洋参幼苗不同生长期,如图 1 所示。SPI 期幼苗鲜重及胚根长

分别为 49.02 mg 和 1.98 mm。SPII 期幼苗的相应指数分别为 153.03 mg 和 23.12 mm。

2.2 西洋参幼苗内生真菌的多样性分析

Venn 图结果显示, SPI 期与 SPII 期共有内生真菌 ASVs 21 个, SPII 期特有 ASVs 107 个(图 2A)。NMDS 结果显示, SPI 期和 SPII 期组内重复样本群落表现出良好的分离效果,表明西洋参出苗前后内生真菌群落存在显著差异($P<0.05$) (图 2B)。2 个时期内生真菌的 Chao1、Shannon 和 Simpson 指数均存在显著性差异($P<0.05$),表明不同时期西洋参幼苗内生真菌群落的丰富度和多样性存在显著性差异(图 2C)。

2.3 西洋参幼苗内生真菌群落组成分析

不同分类水平的物种注释结果分析显示,在门水平上共鉴定出 7 门,子囊菌门(Ascomycota)为 2 个时期的优势菌门。SPI 期中子囊菌门(Ascomycota)和被孢霉门(Mortierellomycota)的

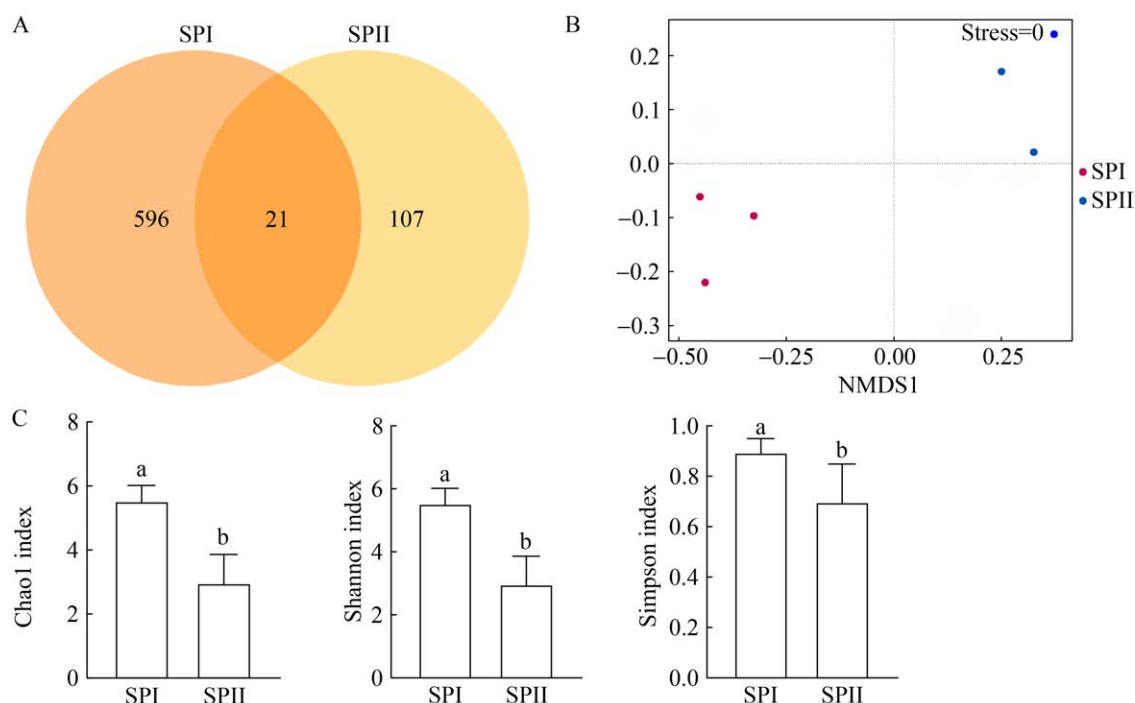


图 2 西洋参出苗前后内生真菌群落的 Venn 图(A)、NMDS 图(B)和 α 多样性(C)分析 不同小写字母表示差异显著。

Figure 2 Venn diagram (A), NMDS diagram (B) and alpha diversity (C) of endophytic fungal communities of *Panax quinquefolius* before and after emergence. Different lowercase letters indicate significant differences.

相对丰度分别占 28.89%和 5.36%，在 SPII 期中 *Ascomycota* 和 *Mortierellomycota* 的相对丰度分别占 79.81%和 10.89% (图 3A)。在科水平上共鉴定出 20 科，共有科为织球壳科 (*Plectosphaerellaceae*)、被孢霉科 (*Mortierellaceae*) 和黑盘孢科 (*Melanommataceae*)，SPI 期特有科为枝孢霉科 (*Cladosporiaceae*) 和毛孢子菌科

(*Trichosporonaceae*) (图 3B)。在属水平上共鉴定出 81 属，物种相对丰度前 20 的拟球腔菌属 (*Plectosphaerella*)、毛孢子菌属 (*Cadophora*)、林内霉属 (*Linnemannia*) 和孢霉菌属 (*Sporidesmiella*) 等菌属在幼苗出苗前后都存在。粘帚霉属 (*Clonostachys*)、链格孢属 (*Alternaria*)、蛇孢霉属 (*Polyscytalum*) 等菌属为 SPI 期中的特有菌属 (图 3C)。

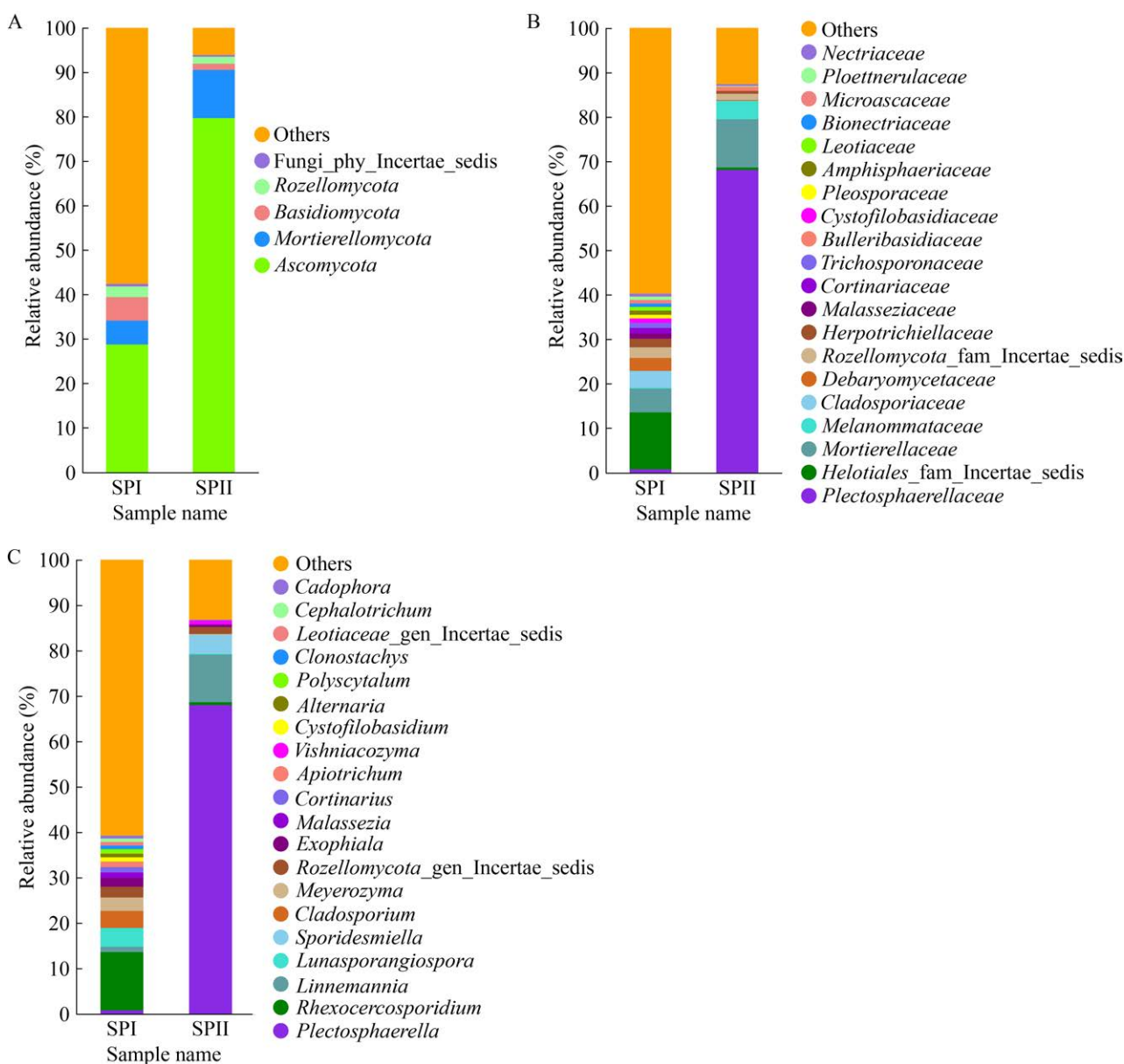


图 3 西洋参出苗前后内生真菌群落在门(A)、科(B)和属(C)水平上的相对丰度柱形图

Figure 3 Histogram of relative abundance of endophytic fungal communities at phylum (A), family (B) and genus (C) levels before and after the emergence of *Panax quinquefolius*.

2.4 西洋参幼苗内生真菌群落 LEfSe 分析

LEfSe 分析显示, SPI 期与 SPII 期内生真菌群落中共筛选出 7 个具有显著性差异的生物标识类群($2 < \text{LDA} < 4$, $P < 0.05$), 其中毛孢子菌目(*Trichosporonales*)、毛孢子菌科(*Trichosporonaceae*)、

袍腔菌科(*Pleosporaceae*)和链格孢属(*Alternaria*)内生真菌群落在 SPI 期富集; 角担菌科(*Ceratobasidiaceae*)、鸡油菌目(*Cantharellales*)和亡革菌属(*Thanatephorus*)内生真菌群落在 SPII 期富集($P < 0.05$), 表明不同生长时期西洋参幼苗内生真菌群落存在显著性差异的生物标识类群(图 4)。

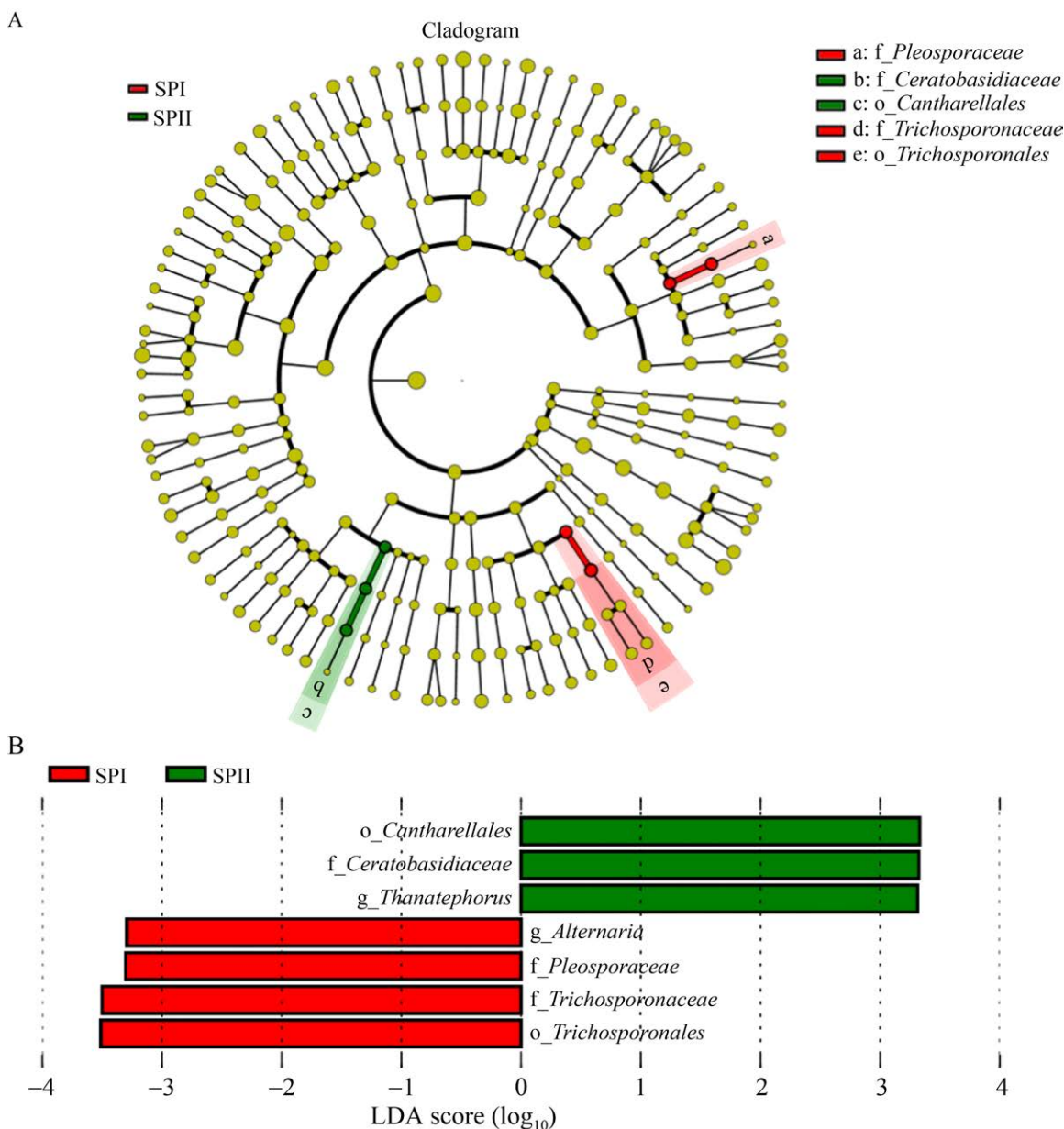


图 4 西洋参出苗前后内生真菌群落 LEfSe 分析 A: 进化分支图; B: LDA 值分布柱状图。

Figure 4 LEfSe analysis of endophytic fungal community of *Panax quinquefolius* before and after emergence. A: Evolutionary branch diagram; B: Bar chart of LDA value distribution.

2.5 西洋参幼苗内生真菌功能预测分析

FunGuild 功能注释分析显示, SPI 期与 SPII 期内生真菌的功能类群主要存在于 15 个营养模式类群中。SPI 期和 SPII 期幼苗内生真菌的未定义-腐生营养型分别为 6.56% 和 21.24%, 植物-病原营养型分别为 15.53% 和 1.98%, 内生植物病原体分别为 3.78% 和 3.04% (图 5), 表明出苗前后西洋参内生真菌群落的营养模式存在差异。

2.6 西洋参幼苗内生真菌共现网络分析

共现网络分析显示, 内生真菌群落网络节点间的相关关系均以正相关关系为主, 说明西洋参幼苗内生真菌间协同作用大于竞争作用。内生真菌群落共现网络主要分布在子囊菌门(Ascomycota)和担子菌门(Basidiomycota)中。其中, 亡革菌属(*Thanatephorus*)、莱索孢菌属(*Rhexocercosporidium*)、林内霉属(*Linnemannia*)、头束霉属(*Cephalotrichum*)等菌属与多个不同的属之间具有较强的正相关性, 拟球腔菌属(*Plectosphaerella*)与马拉色氏霉菌属(*Malassezia*)、曲霉属(*Aspergillus*)、枝孢属(*Cladosporium*)等菌属呈负相关(图 6, 表 1), 以上结果说明不同菌

属之间存在一定的相互作用关系, 共同维系内生真菌群落稳定。

2.7 西洋参幼苗内生真菌属与幼苗生长指标的相关性分析

Spearman 相关性分析显示, 西洋参幼苗中存在与幼苗生长指标具有相关性的内生真菌属, 并利用 GraphPad Prism 9.5 软件绘制相关性热图发现, 鲜重与曲霉属(*Plectosphaerella*)、青霉属(*Penicillium*)、链格孢属(*Alternaria*)和篮状菌属(*Talaromyces*)呈显著正相关; 胚根长与木霉属(*Trichoderma*)和粘帚霉属(*Clonostachys*)等菌属呈显著正相关($P < 0.05$) (图 7)。

2.8 西洋参出苗前后代谢组学分析

2.8.1 多元统计分析及差异代谢物筛选

PCA 和 PLS-DA 显示, 2 个时期样本分离效果明显, 表明出苗前后西洋参幼苗代谢物存在显著差异(图 8A、8B)。进一步对差异代谢物进行聚类分析, 结果显示, 出苗前后不同样本之间存在显著差异($P < 0.05$) (图 8C)。通过火山图分析结果发现, 相较于 SPI 期, SPII 期中存在 174 个代谢物显著上调, 182 个代谢物显著

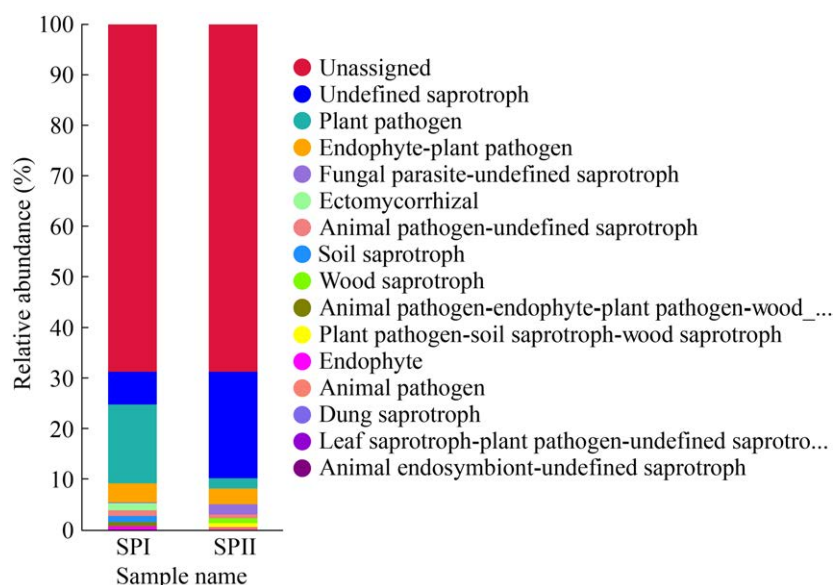


图 5 西洋参出苗前后内生真菌 FunGuild 功能柱形图

Figure 5 Functional histogram of endophytic fungi FunGuild before and after the emergence of *Panax quinquefolius*.

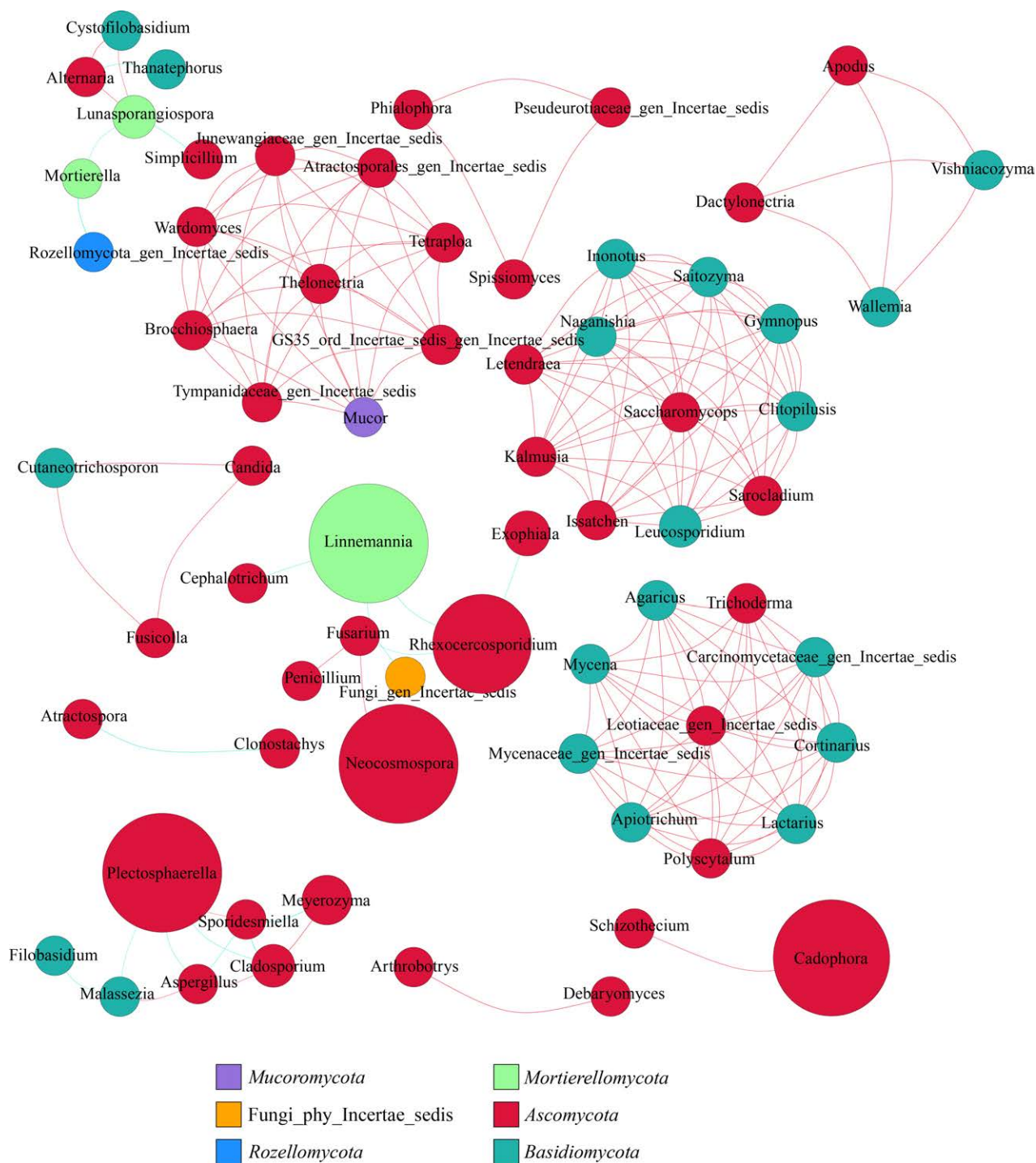


表 1 西洋参幼苗内生真菌共现网络拓扑结构
Table 1 Topology of endophytic fungal co-occurrence network in *Panax quinquefolius* seedlings

网络拓扑指标	内生真菌
Network topology indicator	Endophyte
Network diameter (ND)	3.00
Modularity (MD)	0.76
Clustering coefficient (CC)	0.99
Graph density (GD)	0.06
Average degree (AD)	9.45
Average path length (APL)	1.03
正相关占比 Proportion of positive correlation (%)	94.94
负相关占比 Proportion of negative correlation (%)	5.06

下调(图 8D)。根据差异代谢物绘制火柴杆图结果显示,相较于 SPI 期, SPII 中上调了 D-果糖、6-甲巯基嘌呤、L-蛋氨酸甲酯盐酸盐、1,N6-乙二醇-2-脱氧腺苷等代谢物(图 8E)。

2.8.2 西洋参出苗前后差异代谢物 KEGG 分析

KEGG 富集分析显示,有 20 条通路被显著富集($P<0.05$)。相较于 SPI 期, SPII 期中半乳糖代谢(galactose metabolism)、甘油磷脂代谢(glycerophospholipid metabolism)、精氨酸类生物合成(arginine biosynthesis)、苯丙氨酸代谢

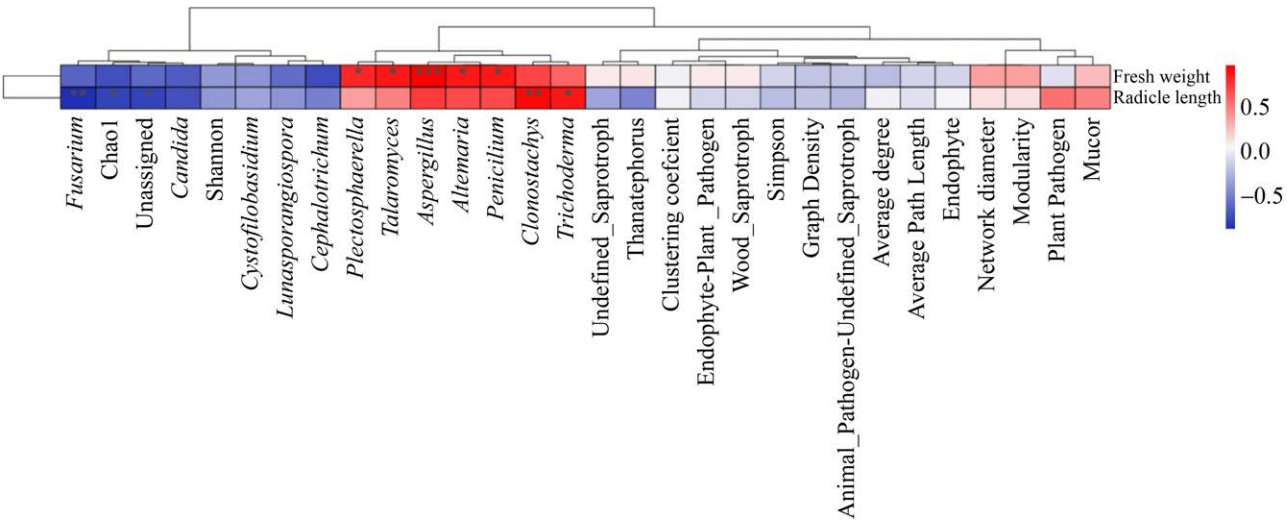
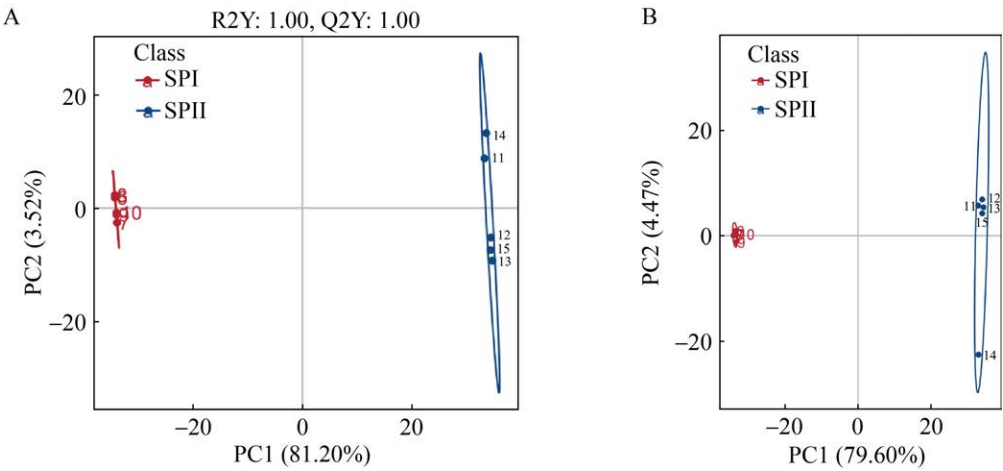


图 7 西洋参幼苗内生真菌属与幼苗生长指标的相关性热图
Figure 7 Correlation heat map between endophytic fungi and seedling growth indices of *Panax quinquefolius* seedlings.



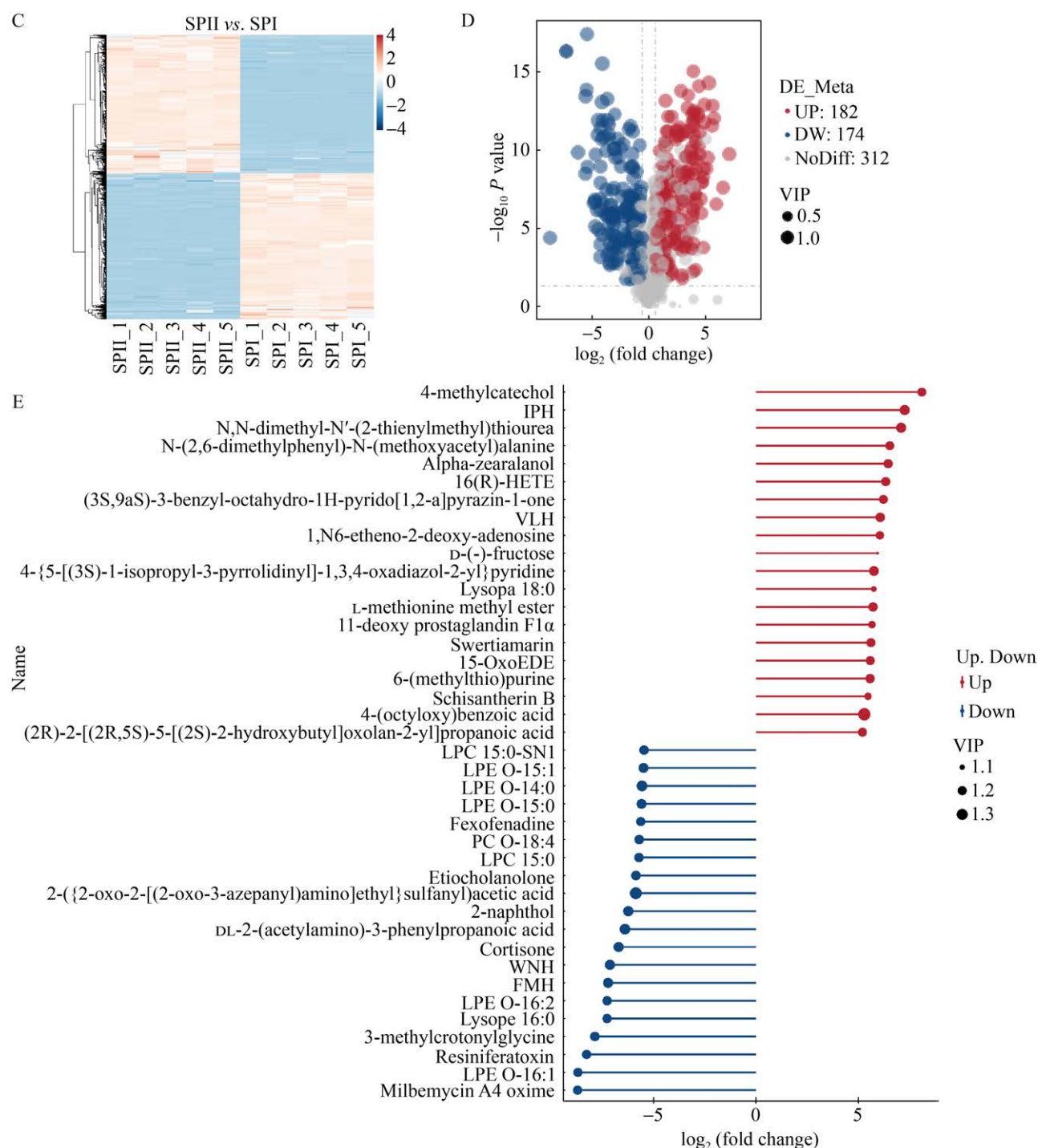


图 8 多元统计分析差异代谢物的筛选 A: 主成分分析(PCA)图; B: 偏最小二乘判别分析(PLS-DA)图; C: 差异代谢物聚类热图; D: 差异代谢物火山图; E: 总差异代谢物排名前 20 的差异代谢物火柴杆图。

Figure 8 Multivariate statistical analysis and screening of differential metabolites. A: Principal component analysis (PCA) diagram; B: Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) chart; C: Differential metabolite cluster heat map; D: Volcanic maps of differential metabolites; E: Matchstick chart of the top 20 differential metabolites in terms of total differential metabolites.

(phenylalanine metabolism)等代谢途径被显著富集(图 9)。

2.9 西洋参幼苗内生真菌属与初生代谢物之间的相关性分析

Spearman 相关性分析显示, 西洋参幼苗中存在与初生代谢物相关的内生真菌, 其中篮状菌属与 IAA-Glu、Ala-Glu 和 L-组氨酸等呈显著正相关, 与 D-(+)-葡萄糖、 α -D-葡萄糖-1,6-酮糖等呈显著负相关($P<0.05$)。青霉属与吲哚-3-丁酸(indole-3-butyric acid, IBA)呈显著正相关, 与 D-(+)-葡萄糖、 α -D-葡萄糖-1,6-酮糖等呈显著负相关($P<0.05$)。木霉属与 IBA、L-组氨酸和 L-赖氨酸(L-lysine)呈显著正相关, 与 3-异丙基苹果酸(3-isopropylmalic acid)、L-天冬氨酸(L-aspartic acid)和环二磷酸腺苷核酸糖(cyclic ADP-ribose)呈显著负相关($P<0.05$)。粘帚霉属与 Asp-Glu 和

琥珀酸(succinic acid)呈显著正相关($P<0.05$)。曲霉属与瓜氨酸(citrulline)、3'-腺苷一磷酸(3'-adenosine monophosphate, 3'-AMP)和甘油醛 3-磷酸(glycerol 3-phosphate)呈显著正相关, 与脱落酸葡萄糖酯(abscisic acid glucose ester)呈显著负相关($P<0.01$) (图 10)。

2.10 西洋参幼苗内生真菌鉴定结果

结合形态学与分子生物学的鉴定方法共鉴定出 33 株内生真菌, 分属于链格孢属(*Alternaria*)、曲霉属(*Aspergillus*)、木霉属(*Trichoderma*)和毛霉属(*Mucor*)等 13 个菌属。内生真菌形态图和镜检图已提交国家微生物科学数据中心, 编号为 NMDCX0001781 (<https://nmcdc.cn/resource/attachment/detail/NMDCX0001781>)。系统发育分析显示结果可信度高, 发育树分支可信度多为 100% (图 11)。33 株内生真菌的序列同源性比

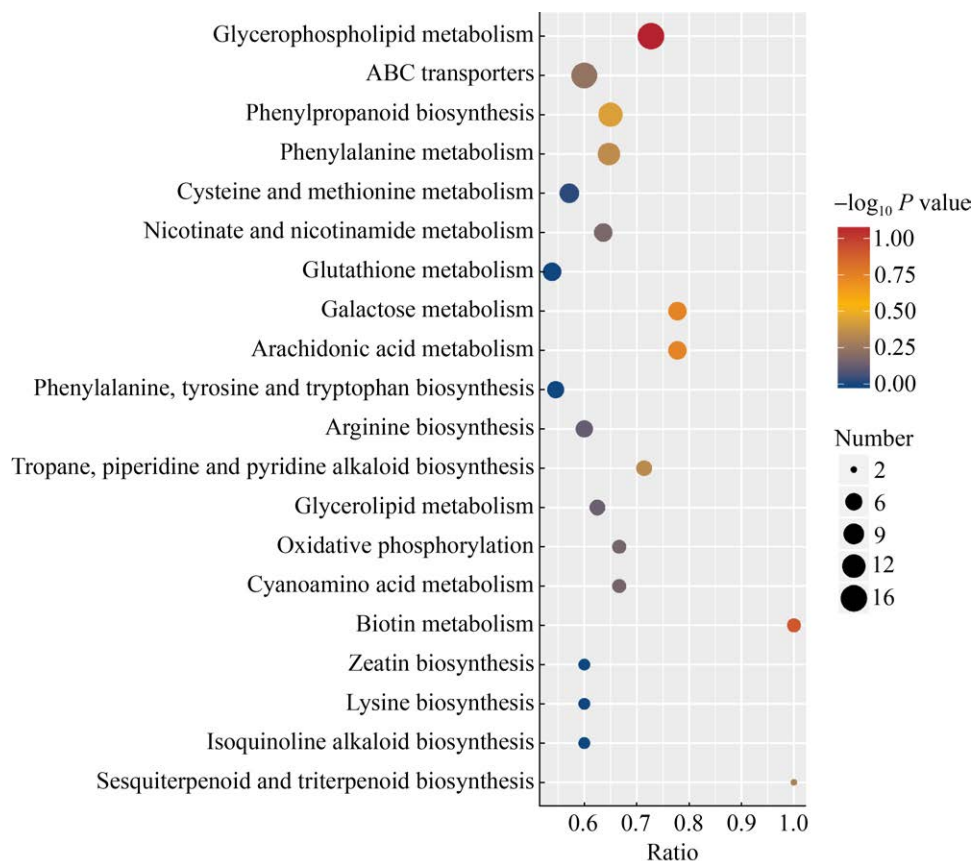


图 9 西洋参出苗前后差异代谢物的 KEGG 分析

Figure 9 KEGG analysis of differential metabolites of *Panax quinquefolius* before and after emergence.

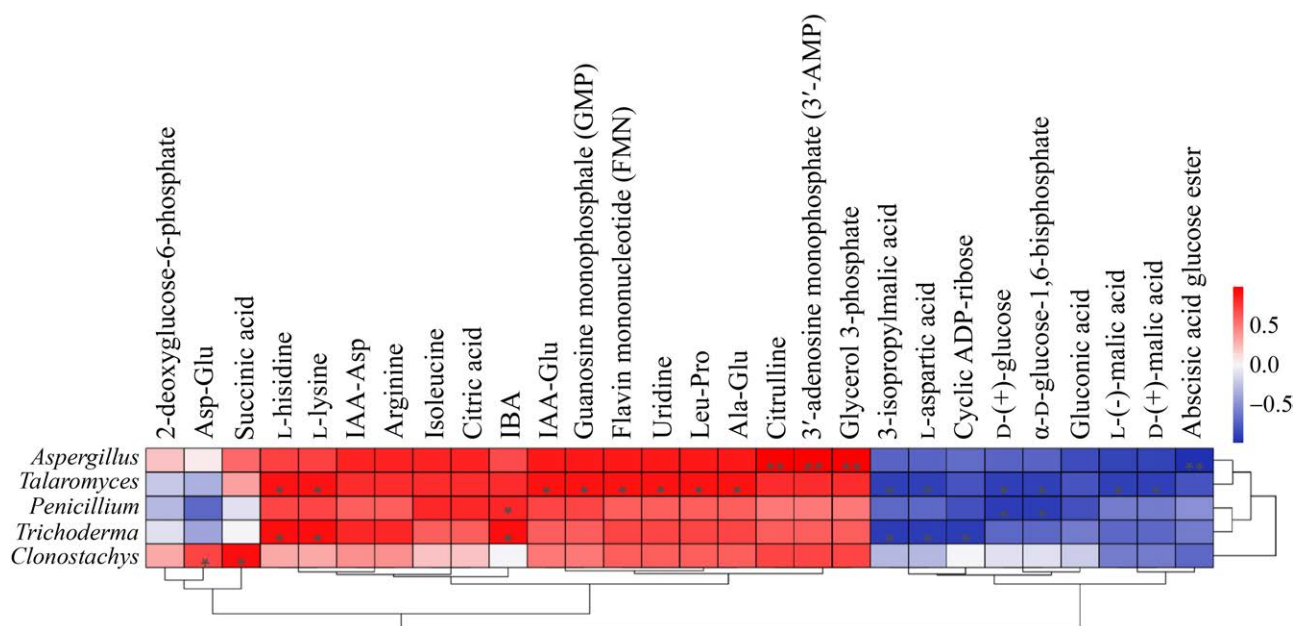


图 10 西洋参幼苗内生真菌菌属与初生代谢物的相关性热图

Figure 10 Correlation heat map of endophytic fungi and primary metabolites in *Panax quinquefolius* seedlings.

对结果已提交到国家微生物科学数据中心，编号为 NMDCX0001781 (<https://nmdc.cn/resource/attachment/detail/NMDCX0001781>)。内生真菌的部分体外分离结果与高通量测序分析结果相对应，其中链格孢属、曲霉属、木霉属、毛霉属、青霉属、*Plectosphaerella* 和粘帚霉属共 7 个菌属与高通量分析测序的结果相同。

2.11 西洋参幼苗内生真菌促生活性筛选

从 33 株内生真菌中共筛选出 10 株具有促生活性的菌株(表 2)。其中菌株 S-20 在溶磷培养基上出现透明圈，其 D/d 值为 1.2，表明该菌株具有溶磷能力(图 12)。菌株 S-7 和 S-21 在解钾培养基上出现透明圈，其 D/d 值分别为 1.5 和 2.5，表明其具有解钾能力(图 13)。菌株 S-4、S-10、S-12、S-21、S-23、S-25、S-27、S-33 等 8 株内生真菌在 CAS 培养基的菌落周围形成大小不一的黄色晕圈，表明其具有不同程度的产铁载体能力，其中菌株 S-10 的产铁载体能力最强，其 D/d 值为 16 (图 14)。33 株内生真菌在 King

培养基上未见透明圈，表明其无产 IAA 的能力。

为验证菌株的发酵产物中铁载体含量，对上述筛选到的 8 株具有产铁载体活性的内生真菌进行铁载体含量测定。结果表明，菌株 S-10、S-21、S-25 和 S-27 产铁载体的活性单位分别是 80.04%、38.64%、40.36%和 68.70%，其他菌株未检测到含量(表 2)。

3 讨论

内生真菌在植物生长与代谢过程中发挥着重要作用^[27-28]。相关研究表明，内生真菌能有效促进宿主植物幼苗生长^[29-30]。本研究发现，曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)和篮状菌属(*Talaromyces*)与西洋参幼苗的鲜重呈显著正相关。木霉属(*Trichoderma*)和粘帚霉属(*Clonostachys*)与胚根长呈显著正相关。有文献报道，曲霉属中的杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*)能提高杜仲幼苗的株高、最大叶长和最大叶宽，与对照相比分别提高了 31.41%、23.71%和 12%^[31]。青霉

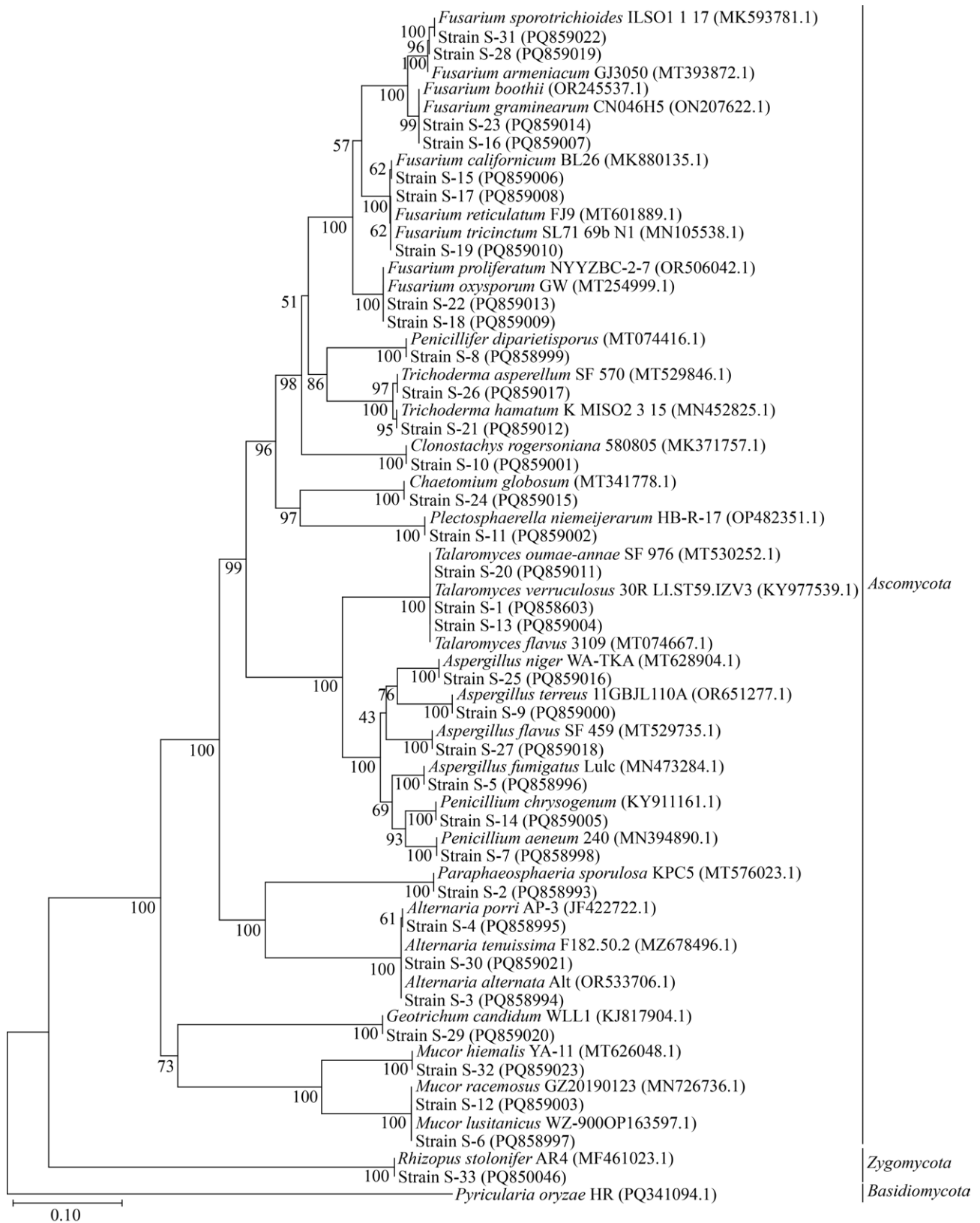


图 11 33 株西洋参幼苗内生真菌菌株基于 rDNA-ITS 序列构建的系统发育树 括号内序号为 GenBank

登录号; 分支点上的数字是自展值, 代表进化树分支可信度的百分比; 标尺 0.10 表示 10% 的序列分歧。
Figure 11 Phylogenetic tree of 33 endophytic fungal strains of *Panax quinquefolius* seedlings based on rDNA-ITS sequence. The serial number in parentheses is GenBank accession number; The number on the branch point is the self-developing value, representing the percentage of the branch confidence of the evolutionary tree; The scale 0.10 indicates 10% sequence divergence.

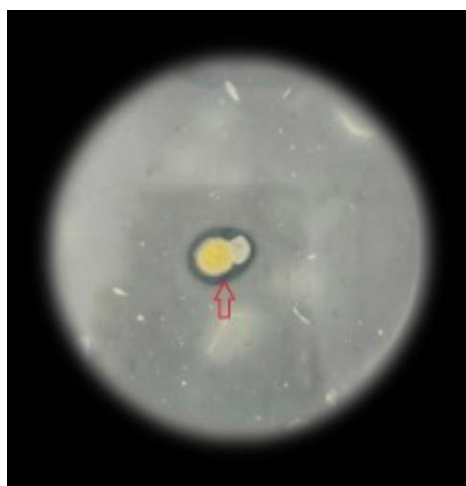
表 2 部分西洋参幼苗内生真菌的促生活性

Table 2 Growth-promoting activity of endophytic fungi in some *Panax quinquefolius* seedlings

Strain code	溶磷 Phosphate solubilization	解钾 Release potassium	产铁载体 Siderophore production	产 IAA Production of IAA	产铁载体含量 Siderophore content (%)
S-4	—	—	+	—	0.00
S-7	—	+	—	—	0.00
S-10	—	—	+	—	80.04
S-12	—	—	+	—	0.00
S-20	+	—	—	—	0.00
S-21	—	+	+	—	38.64
S-23	—	—	+	—	0.00
S-25	—	—	+	—	40.36
S-27	—	—	+	—	68.70
S-33	—	—	+	—	0.00

+: 有该功能特征; —: 无该功能特征。

+: The functional characteristics; —: No such functional feature.



Strain S-20

图 12 西洋参幼苗内生真菌的溶磷效果

Figure 12 Phosphorus solubilization effect of endophytic fungi in *Panax quinquefolius* seedlings.

属中的梅农氏青霉 (*Penicillium menonorum*) KNU-3 显著促进黄瓜幼苗生长, 接种该菌株使根和芽干生物量分别增加 57% 和 52%^[32]。篮状菌属中的产紫篮状菌 (*Talaromyces purpurogenus*)

SW-10 与玉米幼苗共培养后, 其茎干重、根干重和株高分别显著提高 37.93%、31.25% 和 13.03%^[33]。木霉属中的深绿木霉 (*Trichoderma atroviride*) 显著促进米槁幼苗苗高及地下部分的生长^[34]。粘帚霉属中的粉红粘帚霉 (*Clonostachys rosea*) 通过分泌吡啶乙酸促进番茄根生长 20%^[35]。基于上述研究报道, 推测西洋参中曲霉属、青霉属、篮状菌属、木霉属和黏帚霉属等内生真菌在西洋参幼苗的生长中发挥促进作用。

文献[36]报道内生真菌能够参与调控植物体内的代谢过程。本研究发现, 曲霉属与西洋参体内瓜氨酸(citrulline)、3'-AMP 和甘油醛 3-磷酸呈显著正相关。青霉属与 IBA 呈显著正相关, 木霉属与 IBA、L-组氨酸和 L-赖氨酸呈显著正相关 ($P < 0.05$)。据报道, 接种曲霉属中的黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 显著提高绿豆对氮、磷、钾、铁和锌的吸收率, 分别提高 7%、9%、8%、17% 和 9%, 株高、结节数和产量等指标也显著提高 ($P < 0.05$)^[37]。曲霉属中的焦曲霉 (*Aspergillus ustus*) 通过调控生长素和赤霉素信号传导途径促进拟

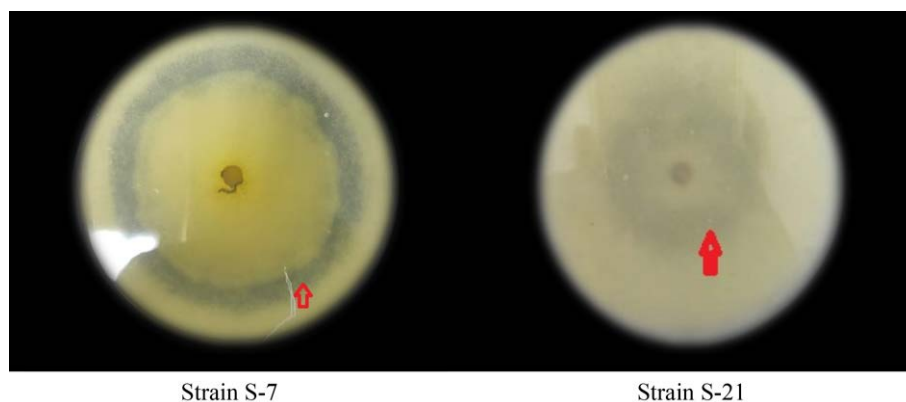


图 13 西洋参幼苗内生真菌的解钾效果

Figure 13 Potassium-removing effect of endophytic fungi in *Panax quinquefolius* seedlings.

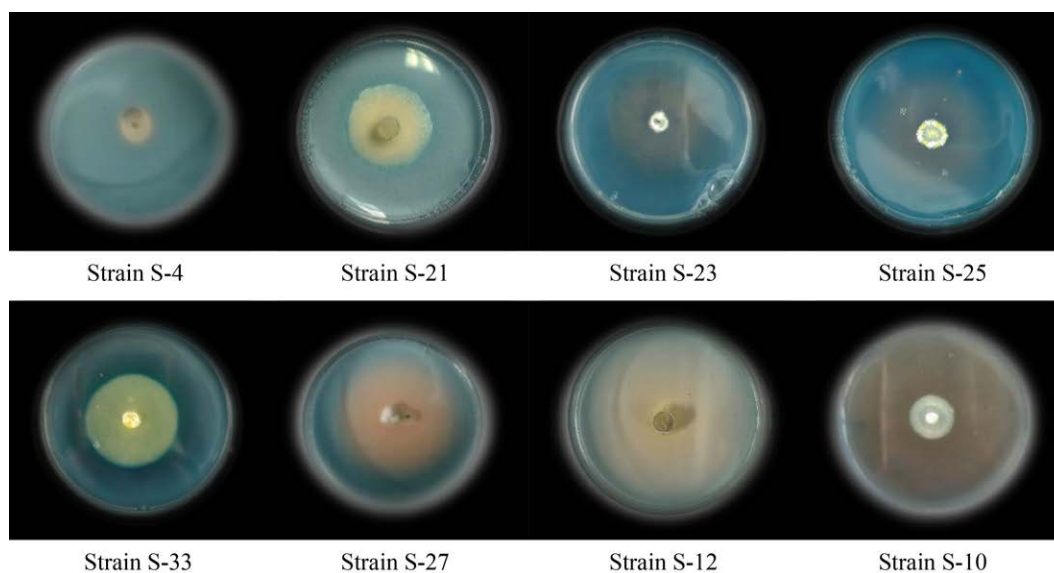


图 14 西洋参幼苗内生真菌的产铁载体效果

Figure 14 Effect of siderophore on endophytic fungi of *Panax quinquefolius* seedlings.

南芥幼苗生长^[38]。青霉属中的 *Penicillium* sp. NICS01 通过调控激素信号途径促进花生幼苗生长^[39]。木霉属中的绿木霉(*Trichoderma virens*) 通过参与生长素运输途径促进拟南芥生长^[40]。由此推测, 西洋参中曲霉属、青霉属和木霉属等内生真菌参与了西洋参幼苗初生代谢。

文献[41]指出内生真菌通过增强植物对营养元素的吸收与利用来促进幼苗生长。本研究从西洋参幼苗中分离出 33 株内生真菌, 并对其促生活性进行了初步筛选。筛选出 6 株具有促生

活性的内生真菌, 其中大前郁夫-安娜篮状菌(*Talaromyces oumae-anna*) S-20 具有溶磷活性, 肺炎青霉菌(*Penicillium aeneum*) S-7 和钩状木霉(*Trichoderma hamatum*) S-21 具有解钾活性, 罗杰斯无性穗霉(*Clonostachys rogersoniana*) S-10、*Trichoderma hamatum* S-21、黑曲霉(*Aspergillus niger*) S-25 和黄曲霉(*Aspergillus flavus*) S-27 均具有产铁载体活性。

磷通过参与能量转换过程、影响根系形态及生理特性等途径促进植物生长^[42-44], 具溶磷活

性的内生真菌可通过分泌有机酸将土壤中难溶性磷转化为可溶性磷,从而提高磷的利用率^[45]。磷的供给对西洋参幼苗的生物量及皂苷含量的积累具有显著影响^[46]。本研究中分离鉴定的 *Talaromyces oumae-anna* S-20 表现出显著的溶磷活性,还发现篮状菌属与 IAA-Glu、Ala-Glu、鲜重和胚根长等呈显著正相关。据报道,篮状菌属中的产紫篮状菌(*Talaromyces purpureogenus*)能显著提高黄瓜幼苗地下鲜重、地下干重和地上鲜重,较对照提高 40%、53%和 19% ($P<0.05$)^[47]。可见, *Talaromyces oumae-anna* S-20 可能通过其溶磷活性对西洋参幼苗的生长产生促生作用,其具体机制尚需将其回接到西洋参幼苗进行深入验证。

钾通过调节植物糖代谢相关酶的活性、信号传导以及光合作用等生理过程影响植物生长^[48-50]。土壤中的钾大多以难溶的形式存在,具有解钾活性的内生菌可分泌胞外聚合物和酶加快难溶性钾的溶解,将其转化为植物可吸收的可溶性钾^[51]。钾对西洋参幼苗叶绿素含量及光合作用相关参数具有显著影响^[52]。本研究从西洋参幼苗中分离鉴定的 *Penicillium aeneum* S-7 和 *Trichoderma hamatum* S-21 具有解钾活性,还发现青霉属与 IBA、鲜重和胚根长呈显著正相关;木霉属与 IBA、L-组氨酸、L-赖氨酸、鲜重和胚根长等呈显著正相关。有研究表明,在青霉属中的鲜绿青霉(*Penicillium viridicatum*)能显著提高小麦幼苗鲜重、干重和根长^[53]。接种木霉属中的拟康宁木霉(*Trichoderma koningiopsis*)和盖姆斯木霉(*Trichoderma gamsii*)可显著提高蒜头果幼苗地上部分、全株鲜重及地上干重和叶绿素含量^[54]。由此推测,具有解钾活性的 *Penicillium aeneum* S-7 和 *Trichoderma hamatum* S-21 在西洋参苗期具有良好的促生作用。

铁离子在土壤中的溶解度普遍较低,导致其生物有效利用率也较低^[55]。内生真菌可通过分泌铁载体来还原和螯合铁,增强植物对铁的

吸收^[19]。缺铁会导致西洋参幼苗叶片出现明显的失绿黄化现象^[46]。本研究从西洋参幼苗中分离出 4 株具有产铁载体活性的内生真菌黏帚霉属 *Clonostachys rogersoniana* S-10、木霉属 *Trichoderma hamatum* S-21、*Aspergillus niger* S-25 和 *Aspergillus flavus* S-27,还发现黏帚霉属、木霉属、曲霉属与西洋参初生代谢和幼苗生长指标呈显著正相关。据报道,具有产铁载体能力的西蒙斯木霉(*Trichoderma simmonsii*) J12 对紫花苜蓿的株高、根粗和鲜重均表现出显著促生作用($P<0.05$)^[56]。曲霉属中的 *Aspergillus niger* 能显著提高上海青幼苗的鲜重和叶片光合色素含量^[57]。有研究表明,通过拌种和叶面喷洒绿色木霉(*Trichoderma viride*)菌株所制成的生物菌剂能显著提高花生的产量,达到增产效果^[58]。可见,本研究筛选出的 4 株具有产铁载体活性的菌株将为西洋参促生菌剂的开发提供菌种资源。

4 结论

不同生长时期西洋参幼苗内生真菌和代谢物组成存在明显差异,筛选出 6 株具有促生活性的内生真菌,为西洋参促生菌剂的开发奠定一定基础。

作者贡献声明

毛欣颖:样本的收集、菌株的分离与鉴定、实验设计、数据处理、系统发育树的构建、稿件的写作与返修;丁宇:菌株活性筛选;王悦:标本的采集、菌株的分离;陈田:数据的处理;刘子琪、王汝振:数据的收集与整理、菌株的活性筛选;方磊:拍照、数据处理、系统发育树的构建;周洁:指导实验设计、论文的修改与定稿及基金项目支持。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] 李德民, 马小弟, 王康旭, 李媚媛, 罗满平, 孟瑛瑛, 杨爱梅, 王蓓, 张新国. 黄芩内生真菌及其次级代谢产物酶抑制活性研究[J]. 中成药, 2024, 46(8): 2644-2649.
LI DM, MA XD, WANG KX, LI MY, LUO MP, MENG YY, YANG AM, WANG B, ZHANG XG. Endophytic fungi from *Scutellaria baicalensis* and the enzyme inhibitory activities of their secondary metabolites[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2024, 46(8): 2644-2649 (in Chinese).
- [2] 杨立军, 李少刚, 曹倩, 黄豫皖, 陈琼, 汪金萍. 植物内生菌促生机制及应用研究进展[J]. 江苏农业科学, 2024, 52(9): 35-41.
YANG LJ, LI SG, CAO Q, HUANG YW, CHEN Q, WANG JP. Research progress on growth promoting mechanism and application of plant endogenous bacteria[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2024, 52(9): 35-41 (in Chinese).
- [3] 石瑛. 内生真菌对植物生长发育的影响[J]. 现代农业科技, 2010(6): 36-38.
SHI Y. Effects of endophytic fungi on growth and development of plants[J]. Modern Agricultural Sciences and Technology, 2010(6): 36-38 (in Chinese).
- [4] 徐源清, 朱越, 韩佳妮, 徐桂雯, 黄轶勉, 周芳美. 药用植物内生菌促生与生防作用研究进展[J]. 农业灾害研究, 2024, 14(2): 28-30.
XU YQ, ZHU Y, HAN JN, XU GW, HUANG YM, ZHOU FM. Research progress on the promotion and biocontrol effects of endophytic bacteria in medicinal plants[J]. Journal of Agricultural Catastrophology, 2024, 14(2): 28-30 (in Chinese).
- [5] 林亚丽. 内生真菌对丹参生长和代谢的影响研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2018.
LIN YL. Effects of endophytic fungi on plant growth and metabolism of *Salvia miltiorrhiza* bge. (Labiateae)[D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2018 (in Chinese).
- [6] 程超寰. 西洋参的前世今生[J]. 家庭中医药, 2018, 25(1): 10-12.
CHENG CH. Past lives of American ginseng[J]. Family & Traditional Chinese Medicine, 2018, 25(1): 10-12 (in Chinese).
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部: 2020年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
Chinese Pharmacopoeia Commission. People's Republic of China (PRC) Pharmacopoeia-Part I: 2020 Edition[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020 (in Chinese).
- [8] 张正海, 雷慧霞, 钱佳奇, 吴晨, 张亚玉. 西洋参的引种简史[J]. 人参研究, 2020, 32(2): 59-62.
ZHANG ZH, LEI HX, QIAN JQ, WU C, ZHANG YY. Introduction history of *Panax quinquefolium* L.[J]. Ginseng Research, 2020, 32(2): 59-62 (in Chinese).
- [9] SZCZUKA D, NOWAK A, ZAKŁOS-SZYDA M, KOCHAN E, SZYMAŃSKA G, MOTYL I, BLASIAK J. American ginseng (*Panax quinquefolium* L.) as a source of bioactive phytochemicals with pro-health properties[J]. Nutrients, 2019, 11(5): 1041.
- [10] 王蕾, 王英平, 许世泉, 孙成贺, 焉石, 刘继永, 王艳艳, 侯威, 金银萍. 西洋参化学成分及药理活性研究进展[J]. 特产研究, 2007, 29(3): 73-77.
WANG L, WANG YP, XU SQ, SUN CH, YAN S, LIU JY, WANG YY, HOU W, JIN YP. A review on studies of the components and pharmacological activity of *Panax quinquefolium* L.[J]. Special Wild Economic Animal and Plant Research, 2007, 29(3): 73-77 (in Chinese).
- [11] LI R, DUAN WY, RAN ZF, CHEN XL, YU HX, FANG L, GUO LP, ZHOU J. Diversity and correlation analysis of endophytes and metabolites of *Panax quinquefolius* L. in various tissues[J]. BMC Plant Biology, 2023, 23(1): 275.
- [12] 张新玉. 当归种子发芽特性及种苗内生菌研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2017.
ZHANG XY. Study on seed germination characteristics and seedling endophytes of *Angelica sinensis*[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [13] 李欣亚. 小花南芥内生菌对宿主植物生长及重金属富集的影响[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2017.
LI XY. The effect of endophytes on the growth and heavy metal accumulation of plant *Arabis alpina*[D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2017 (in Chinese).
- [14] 赵芹, 邓渊钰, 李伟, 孙海燕, 夏云磊, 陈怀谷. 小麦幼苗内生菌多样性的宏基因组分析[J]. 植物病理学报, 2017, 47(3): 313-324.
ZHAO Q, DENG YY, LI W, SUN HY, XIA YL, CHEN HG. Analysis of endophytes diversity in wheat seedlings by metagenomic technology[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2017, 47(3): 313-324 (in Chinese).
- [15] 王新南, 罗家豪, 郝俊杰, 张晓艳, 刘璐, 付丽平, 王家林, 韩燕红, 刘全兰. 蚕豆幼苗内生固氮菌促生长特性的研究[J]. 中国农业科技导报, 2020, 22(6): 33-39.
WANG XN, LUO JH, HAO JJ, ZHANG XY, LIU L, FU LP, WANG JL, HAN YH, LIU QL. Plant growth-promoting activities of endophytic nitrogen-fixing bacteria isolated from seedlings of faba bean (*Vicia faba* L.)[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2020, 22(6): 33-39 (in Chinese).
- [16] 傅晓方, 韩红江, 郝勇锋, 李维平. 玉米内生固氮菌的分离鉴定及对小麦幼苗的促生效应[J]. 西北农业学报, 2012, 21(1): 66-71.
FU XF, HAN HJ, HAO YF, LI WP. Isolation and identification of endophytic diazotrophic bacteria from maize and their effect on wheat seedling growth[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2012, 21(1): 66-71 (in Chinese).
- [17] 汤阳灿, 李宁, 杨文海. 油茶不同组织内生真菌的分离鉴定及活性分析[J]. 湖南林业科技, 2024, 51(3): 1-9.
TANG YC, LI N, YANG WH. Isolation, identification and activity analysis of endophytic fungi from different tissues of *Camellia oleifera*[J]. Hunan Forestry Science & Technology, 2024, 51(3): 1-9 (in Chinese).
- [18] 易浪波, 彭清忠, 何齐庄, 彭清静. 高效钾长石分解菌株的筛选、鉴定及解钾活性研究[J]. 中国微生物生态学杂志, 2012, 24(9): 773-776, 785.
YI LB, PENG QZ, HE QZ, PENG QJ. Isolation and identification of potash feldspar-solubilizing bacteria and their potassium-releasing activities[J]. Chinese Journal of Microecology, 2012, 24(9): 773-776, 785 (in Chinese).
- [19] 阮彦楠, 番华彩, 王禹童, 付利波, 郑泗军, 毛俊, 李舒, 王志远. 光叶苕子内生真菌分离鉴定及其对香蕉枯萎病的生防和促生潜力[J]. 南方农业学报, 2024, 55(4): 996-1009.

- RUAN YN, FAN HC, WANG YT, FU LB, ZHENG SJ, MAO J, LI S, WANG ZY. Isolation and identification of endophytic fungi of *Vicia villosa* var. and their biocontrol against banana wilt and growth promotion potentials[J]. Journal of Southern Agriculture, 2024, 55(4): 996-1009 (in Chinese).
- [20] 程单单, 刘玉军, 丁文娜, 韩一人, 陈名君. 拮抗多花黄精根腐病的内生真菌鉴定及发酵条件研究[J]. 安徽农业大学学报, 2024, 51(5): 740-748.
- CHENG DD, LIU YJ, DING WN, HAN YR, CHEN MJ. Study on identification and fermentation conditions of biocontrol endophytic fungus against *Fusarium oxysporum*[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2024, 51(5): 740-748 (in Chinese).
- [21] 张凯晔, 刘晓琳, 董小燕, 刘润进, 贺立恒, 解志红. 田菁种子内生菌的分离及其对萌发的影响[J]. 中国农业科技导报, 2020, 22(6): 40-48.
- ZHANG KY, LIU XL, DONG XY, LIU RJ, HE LH, XIE ZH. Isolation of endophytic cultures from *Sesbania cannabina* seeds and their effects on germination[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2020, 22(6): 40-48 (in Chinese).
- [22] 刘学周, 李绍宾, 赵智灵, 张连学, 孙福仁. 西洋参内生菌株的分离及拮抗活性菌株的筛选和鉴定[J]. 中草药, 2014, 45(22): 3332-3336.
- LIU XZ, LI SB, ZHAO ZL, ZHANG LX, SUN FR. Isolation of endophytes from *Panax quinquefolium* and screening and identification of strains with antagonistic activity[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2014, 45(22): 3332-3336 (in Chinese).
- [23] LUGTENBERG BJJ, CARADUS JR, JOHNSON LJ. Fungal endophytes for sustainable crop productionFree[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2016, 92(12): fiw194.
- [24] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- WEI JC. Handbook of Fungal Identification[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1979 (in Chinese).
- [25] ABDELFATTAH A, TACK AJM, LOBATO C, WASSERMANN B, BERG G. From seed to seed: the role of microbial inheritance in the assembly of the plant microbiome[J]. Trends in Microbiology, 2023, 31(4): 346-355.
- [26] WAGHUNDE RR, SABALPARA AN. Impact of *Pseudomonas* spp. on plant growth, lytic enzymes and secondary metabolites production[J]. Frontiers in Agronomy, 2021, 3: 752196.
- [27] 杨波, 陈晏, 李霞, 任承钢, 戴传超. 植物内生菌促进宿主氮吸收与代谢研究进展[J]. 生态学报, 2013, 33(9): 2656-2664.
- YANG B, CHEN Y, LI X, REN CG, DAI CC. Research progress on endophyte-promoted plant nitrogen assimilation and metabolism[J]. Acta Ecologica Sinica, 2013, 33(9): 2656-2664 (in Chinese).
- [28] HUREK T, REINHOLD-HUREK B. *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes[J]. Journal of Biotechnology, 2003, 106(2/3): 169-178.
- [29] 于汉寿, 纪燕玲, 翁忠贺, 王志伟. 禾本科植物内生真菌研究 10: 内生真菌共生体的苗期生物学特性[J]. 草业科学, 2009, 26(10): 150-154.
- YU HS, JI YL, WENG ZH, WANG ZW. Grass endophyte research 10: seedling properties of *Neotyphodium* endophyte-host complexes[J]. Pratacultural Science, 2009, 26(10): 150-154 (in Chinese).
- [30] 谢佳月, 何益帆, 白纯旭, 李明龙, 杨赫, 于海燕, 袁福松, 王平, 贺海生, 肖佳雷. 野生大豆内生真菌对大豆萌发和苗期生长作用效应分析[J]. 分子植物育种, 2023, 21(16): 5423-5428.
- XIE JY, HE YF, BAI CX, LI ML, YANG H, YU HY, YUAN FH, WANG P, HE HS, XIAO JL. Effects analysis of wild soybean endophytic fungi on soybean germination and seedling growth[J]. Molecular Plant Breeding, 2023, 21(16): 5423-5428 (in Chinese).
- [31] 张青青. 杜仲种子内生微生物及其对幼苗生长的影响[D]. 贵阳: 贵州大学, 2023.
- ZHANG QQ. Endophytic microorganisms in *Eucommia ulmoides* seeds and their effects on seedling growth[D]. Guiyang: Guizhou University, 2023 (in Chinese).
- [32] BABU AG, KIM SW, YADAV DR, HYUM U, ADHIKARI M, LEE YS. *Penicillium menonorum*: a novel fungus to promote growth and nutrient management in cucumber plants[J]. Mycobiology, 2015, 43(1): 49-56.
- [33] SUN XF, LIU F, JIANG W, ZHANG PY, ZHAO ZX, LIU X, SHI Y, SUN Q. *Talaromyces purpurogenus* isolated from rhizosphere soil of maize has efficient organic phosphate-mineralizing and plant growth-promoting abilities[J]. Sustainability, 2023, 15(7): 5961.
- [34] 彭靓, 陈梦, 廖小锋, 刘济明, 陈敬忠, 童炳丽. 米槁根部内生促生真菌筛选及其促生特性研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2023, 51(9): 84-91.
- PENG L, CHEN M, LIAO XF, LIU JM, CHEN JZ, TONG BL. Screening and characteristics of endophytic growth-promoting fungi in roots of *Cinnamomum migao*[J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2023, 51(9): 84-91 (in Chinese).
- [35] HAN ZY, GHANIZADEH H, ZHANG HT, LI XM, LI TT, WANG Q, LIU JY, WANG AX. *Clonostachys rosea* promotes root growth in tomato by secreting auxin produced through the tryptamine pathway[J]. Journal of Fungi, 2022, 8(11): 1166.
- [36] 高小音. 大红景天对内生真菌应答的代谢及代谢通路的研究[D]. 太原: 山西大学, 2019.
- GAO XY. Studies on metabolism and metabolic pathways of *Rhodiola crenulata* in response to endophytic fungi[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2019 (in Chinese).
- [37] YADAV BK. Improvement of mung bean growth and productivity by phosphate-dissolving fungi *Aspergillus niger* seed inoculation[J]. Legume Research, 2011, 34(3): 217-221.
- [38] SALAS-MARINA MA, SILVA-FLORES MA, CERVANTES-BADILLO MG, ROSALES-SAAVEDRA MT, ISLAS-OSUNA MA, CASAS-FLORES S. The plant growth-promoting fungus *Aspergillus ustus* promotes growth and induces resistance against different lifestyle pathogens in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 21(7): 686-696.
- [39] RADHAKRISHNAN R, SHIM KB, LEE BW, HWANG CD, PAE SB, PARK CH, KIM SU, LEE CK, BAEK IY. IAA-producing *Penicillium* sp. NICS01 triggers plant growth and suppresses *Fusarium* sp.-induced oxidative

- stress in sesame (*Sesamum indicum* L.)[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, 23(6): 856-863.
- [40] CONTRERAS-CORNEJO HA, MACÍAS-RODRÍGUEZ L, CORTÉS-PENAGOS C, LÓPEZ-BUCIO J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2009, 149(3): 1579-1592.
- [41] 方爱国, 李春杰. *Neotyphodium* 属禾草内生真菌和球囊霉属菌根真菌对野大麦生长的影响[J]. 草业科学, 2014, 31(3): 457-461.
- FANG AG, LI CJ. Effects of *Neotyphodium* endophyte and AMF on *Hordeum brevisubulatum* growth[J]. Pratacultural Science, 2014, 31(3): 457-461 (in Chinese).
- [42] 孙艳, 洪婉婷, 韩阳, 徐梓楷, 程凌云. 植物内部磷循环利用提高磷效率的研究进展[J]. 植物营养与肥料学报, 2021, 27(12): 2216-2228.
- SUN Y, HONG WT, HAN Y, XU ZK, CHENG LY. Targeting internal phosphorus re-utilization to improve plant phosphorus use efficiency[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizers, 2021, 27(12): 2216-2228 (in Chinese).
- [43] 郑亚萍, 信彩云, 王才斌, 孙秀山, 杨伟强, 万书波, 郑永美, 冯昊, 陈殿绪, 孙学武, 吴正锋. 磷肥对花生根系形态、生理特性及产量的影响[J]. 植物生态学报, 2013, 37(8): 777-785.
- ZHENG YP, XIN CY, WANG CB, SUN XS, YANG WQ, WAN SB, ZHENG YM, FENG H, CHEN DX, SUN XW, WU ZF. Effects of phosphorus fertilizer on root morphology, physiological characteristics and yield in peanut (*Arachis hypogaea*) [J]. Chinese Journal of Plant Ecology, 2013, 37(8): 777-785 (in Chinese).
- [44] 于天一, 李晓亮, 路亚, 孙学武, 郑永美, 吴正锋, 沈浦, 王才斌. 磷对花生氮素吸收和利用的影响[J]. 作物学报, 2019, 45(6): 912-921.
- YU TY, LI XL, LU Y, SUN XW, ZHENG YM, WU ZF, SHEN P, WANG CB. Effect of phosphorus (P) on nitrogen (N) uptake and utilization in peanut[J]. Acta Agronomica Sinica, 2019, 45(6): 912-921 (in Chinese).
- [45] 江红梅, 殷中伟, 史发超, 刘彩月, 程明芳, 范丙全. 一株耐盐溶磷真菌的筛选、鉴定及其生物肥料的应用效果[J]. 植物营养与肥料学报, 2018, 24(3): 728-742.
- JIANG HM, YIN ZW, SHI FC, LIU CY, CHENG MF, FAN BQ. Isolation and functional evaluation of phosphate-solubilizing fungi with salt-tolerant characteristics[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizers, 2018, 24(3): 728-742 (in Chinese).
- [46] 李俊飞, 邵慧慧, 毕艳孟, 焦晓林, 张西梅, 高微微. 营养元素缺乏对西洋参生长及皂苷积累的影响[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(8): 1866-1872.
- LI JF, SHAO HH, BI YM, JIAO XL, ZHANG XM, GAO WW. Effects of nutrients deficiency on growth and saponin accumulation of American ginseng[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2020, 45(8): 1866-1872 (in Chinese).
- [47] ZHAO L, ZHAO W, DENG H. Effects of *Talaromyces purpureogenus* on cucumber growth promotion and its mechanism[J]. Journal of Bacteriology and Mycology, 2021, 8(3): 1173.
- [48] 柳洪韵, 史春余, 张立明, 张海峰, 王振振, 柴沙沙. 钾素对食用型甘薯糖代谢相关酶活性的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2012, 18(3): 724-732.
- LIU HJ, SHI CY, ZHANG LM, ZHANG HF, WANG ZZ, CHAI SS. Effect of potassium on related enzyme activities in sugar metabolism of edible sweet potato[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2012, 18(3): 724-732 (in Chinese).
- [49] WANG Y, WU WH. Potassium transport and signaling in higher plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2013, 64: 451-476.
- [50] PETTIGREW WT. Potassium influences on yield and quality production for maize, wheat, soybean and cotton[J]. Physiologia Plantarum, 2008, 133(4): 670-681.
- [51] PARMAR P, SINDHU SS. The novel and efficient method for isolating potassium solubilizing bacteria from rhizosphere soil[J]. Geomicrobiology Journal, 2019, 36(2): 130-136.
- [52] 徐成路, 孙海, 王秋霞, 李乐, 张亚玉. 低钾胁迫对西洋参某些生理特性的影响[J]. 吉林农业大学学报, 2016, 38(1): 63-68.
- XU CL, SUN H, WANG QX, LI L, ZHANG YY. Effects of low potassium stress on some physiological characters of *Panax quinquefolius* [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2016, 38(1): 63-68 (in Chinese).
- [53] KHOKHAR I, HAIDER M, MUKHTAR I, ALI A, MUSHTAQ S, ASHFAQ M. Effect of *Penicillium* species culture filtrate on seedling growth of wheat[J]. International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science, 2015, 3: 24-29.
- [54] 王俊威, 雷小铃, 陈婉东, 潘悦, 王娟. 两株蒜头果内生木霉的物种鉴定及其对幼苗的促生作用研究[J]. 江西农业大学学报, 2023, 45(2): 273-284.
- WANG JW, LEI XL, CHEN WD, PAN Y, WANG J. Identification of two endophytic *Trichoderma* strains in *Malania oleifera* and their growth promoting effects on seedlings[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2023, 45(2): 273-284 (in Chinese).
- [55] 金杰人, 鲁凯珩, 肖明. 荧光假单胞菌的应用与展望[J]. 上海师范大学学报(自然科学版), 2019, 48(5): 526-535.
- JIN JR, LU KH, XIAO M. Application and prospect of *Pseudomonas fluorescens* [J]. Journal of Shanghai Normal University (Natural Sciences), 2019, 48(5): 526-535 (in Chinese).
- [56] 周士家, 孙正海, 李丽萍. 喀西茄内生真菌分离鉴定及促生功能验证[J]. 西南农业学报, 2024, 37(11): 2436-2443.
- ZHOU SJ, SUN ZH, LI LP. Isolation, identification and growth promoting function of endophytic fungi in *Solanum aculeatissimum* [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2024, 37(11): 2436-2443 (in Chinese).
- [57] 许佳露, 张平, 李美芳, 廖柏寒, 彭佩钦, 李靖, 梅金星. 产铁载体菌株的分离、培养条件优化及初步应用[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 1004-1016.
- XU JL, ZHANG P, LI MF, LIAO BH, PENG PQ, LI J, MEI JX. Isolation, culture condition optimization, and preliminary application of siderophore-producing strains[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 1004-1016 (in Chinese).
- [58] 徐秀娟, 赵志强, 鄢洪海, 李尚霞, 吕志宁. 绿色木霉菌剂及其在有机食品花生的应用[J]. 农药, 2006, 45(4): 272-274.
- XU XJ, ZHAO ZQ, YAN HH, LI SX, LYU ZN. A *Trichoderma viride* fungal preparation and its use with organic edible peanuts[J]. Agrochemicals, 2006, 45(4): 272-274 (in Chinese).