网络出版时间:2025-07-18 DOI:10.13207/j.jnwafu.2026.01.017

苦豆子可培养内生真菌群落组成及其产喹诺里西啶生物碱菌株筛选

鞠明岫,王若彤,刘冠兰,王文凯,金婧,顾沛雯
(宁夏大学 农学院,宁夏 银川 750021)

[摘 要] 【目的】明确宁夏苦豆子不同器官可培养内生真菌的群落结构及其多样性,筛选能产喹诺里西啶生物碱的资源菌株,为苦豆子内生真菌资源开发利用提供理论依据。【方法】以宁夏回族自治区盐池县花马池镇天然草场的健康苦豆子为材料,采用组织分离法分别从苦豆子根、茎、叶和种子中分离可培养内生真菌,明确苦豆子可培养内生真菌的群落结构及其多样性。基于酸性染料比色法、薄层色谱法和高效液相色谱法,筛选产喹诺里西啶生物碱的内生真菌菌株,并利用多基因联合分析法明确其分类地位。【结果】采用组织分离法从苦豆子不同器官中分离得到可培养内生真菌 394 株,分离率为 109.44%,定殖率为 79.44%,隶属于 18 属,其中镰刀菌属(*Fusarium*)和链格孢属(*Alternaria*)为优势类群。苦豆子不同器官内生真菌群落组成与分布存在明显差异。根中优势属为镰刀菌属(*Fusarium*),相对分离频率为 91.09%;茎中优势属为光黑壳属(*Preussia*),相对分离频率为 74.03%;叶中优势属为座坚壳属(*Rosellinia*),相对分离频率为 22.22%;种子中优势属为链格孢属(*Alternaria*),相对分离频率为 59.26%。叶内生真菌群落多样性最高且分布最均匀,茎内生真菌群落丰富度最高,根中内生真菌群落多样性、丰富度和均匀度均最低。采用酸性染料比色法、薄层色谱法和高效液相色谱法从 394 株内生真菌中筛选出 102 株产喹诺里西啶生物碱的内生真菌菌株,占内生真菌总数的 25.89%,产碱类型为槐定碱,产碱量为 0.65~20.32 mg/g。其中镰刀菌属占产碱菌株的 24.51%,包括尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)、变红镰刀菌(*F. incarnatum*)和茄病镰刀菌(*F. solani*);链格孢属占产碱菌株的 18.63%,均为互隔链格孢(*A. alternata*)。【结论】苦豆子中蕴藏着丰富的内生真菌资源,且内生真菌分布具有组织特异性。筛选产槐定碱内生真菌的种属多样,具有良好的开发潜力和应用前景。

[关键词] 苦豆子;内生真菌;喹诺里西啶生物碱;槐定碱
[中图分类号] S567.23+9;Q949.32 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2026)01-0168-13

Composition of culturable endophytic fungal communities in *Sophora alopecuroides* and screening of quinolizidine alkaloid-producing strains

JU Mingxiu, WANG Ruotong, LIU Guanlan, WANG Wenkai, JIN Jing, GU Peiwen
(*School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia* 750021, *China*)

Abstract: 【Objective】 This study aimed to investigate the community structure and diversity of culturable endophytic fungi across distinct organs of *Sophora alopecuroides* in Ningxia, to screen fungal strains capable of producing quinolizidine alkaloids, and to thereby provide a theoretical basis for the development and utilization of its endophytic fungal resources. 【Method】 Healthy *S. alopecuroides* specimens collected from natural grasslands in Huamachi Town, Yanchi County, Ningxia Hui Autonomous Region were subjec-

[收稿日期] 2024-08-30 [修回日期] 2024-10-16
[基金项目] 宁夏回族自治区重点研发计划项目(2023BCF01026)
[作者简介] 鞠明岫(1994—),女,内蒙古巴彦淖尔人,在读博士,主要从事草地有害生物控制研究。E-mail: jmxlqy@163.com
[通信作者] 顾沛雯(1969—),女,宁夏银川人,教授,博士生导师,主要从事植物病理学、生物防治及微生物资源利用等研究。E-mail:gupeiwen2019@nxu.edu.cn

ted to tissue isolation to obtain culturable endophytic fungi from roots, stems, leaves, and seeds, thereby characterizing the fungal community structure and diversity. Quinolizidine alkaloid-producing endophytic fungal strains were screened through approaches of acid dye colorimetry, thin-layer chromatography, and high-performance liquid chromatography. Taxonomic status of the highly active alkaloid-producing strains was subsequently determined via multi-locus phylogenetic analysis.【Result】 A total of 394 culturable endophytic fungal strains were isolated from different organs of *S. alopecuroide* via tissue isolation, with a total isolation rate of 109.44% and a total colonization rate of 79.44%. These isolates belonged to 18 genera, with *Fusarium* and *Alternaria* being the dominant taxa. There were significant differences in the composition and distribution of endophytic fungal communities in different organs of *S. alopecuroides*. The dominant genus in the roots was *Fusarium*, with a relative isolation frequency of 91.09%. In the stems, *Preussia* was the dominant genus, with a relative isolation frequency of 74.03%. *Rosellinia* was the dominant genus in the leaves, accounting for a relative separation frequency of 22.22%. For the seeds, the dominant genus in the seeds was *Alternaria*, with a relative isolation frequency of 59.26%. Leaves displayed the highest diversity and evenness of distribution, while stems showed the greatest species richness. In contrast, roots showed the lowest values in diversity, richness, and evenness. A total of 102 strains of sophoridine-producing endophytic fungi were identified from 394 fungal strains via acid dye colorimetry, thin-layer chromatography (TLC), and high-performance liquid chromatography (HPLC), accounting for 25.89% of the total endophytic fungi, with sophoridine yields ranging from 0.65 to 20.32 mg/g. Among the quinolizidine alkaloids-producing strains, *Fusarium* accounted for 24.51%, including *F. oxysporum*, *F. incarnatum*, and *F. solani*. While *Alternaria* accounted for 18.63% of the total, all of which were *A. alternata*.【Conclusion】 There are abundant endophytic fungi resources in *S. alopecuroides*, and the distribution of endophytic fungi is tissue-specific. The taxonomic diversity of sophoridine-producing endophytic fungal strains screened in this study demonstrates substantial potential for future development and application.

Key words: *Sophora alopecuroides*; endophytic fungi; quinolizidine alkaloids; sophoridine

苦豆子（*Sophora alopecuroides* L.）是豆科槐属多年生草本植物，主要分布在亚洲大陆的干旱和半干旱地区，在中国主要分布于新疆、内蒙古、青海、甘肃和宁夏等地区[1]。苦豆子根系发达，具有良好的耐旱、耐盐碱、耐贫瘠和防风固沙作用，是中国荒漠草原环境保护的重要先锋植被之一[2]。苦豆子全草可入药，其主要的活性成分是喹诺里西啶生物碱（quinolizidine alkaloids），包括氧化苦参碱、苦参碱、槐定碱、槐果碱和氧化槐果碱等[3]，具有清热燥湿、止痛消炎等功效，是中国传统的中药材[1]。生产上主要依靠刈割苦豆子野生资源，通过提取获得其有效成分。但苦豆子野生资源有限，过度采收将导致大量天然草场退化，影响生态平衡[4]。人工栽培苦豆子不经济，存在发芽率低、生长缓慢、种植成本高，且有效成分活性降低等问题，难以满足药用市场对苦豆子的大量需求[4-5]。由于苦豆子喹诺里西啶生物碱的特殊疗效，国内外学者对于其全合成、衍生物及其类似物的合成做了大量研究工作，但其合成步骤繁琐、代价昂贵，至今无法进行工业化生产。所以，研究苦豆子喹诺里西啶类生物碱的新来源显得尤为重要。

研究发现，内生真菌能够合成与宿主植物相同或相似的次生代谢物质，可以作为一种潜在的天然产物开发的重要原材料，在医疗、农业、生态等领域具有广泛的应用前景[6]。国内外学者已从滇重楼（*Paris polyphylla*）、香樟木（*Cinnamomum camphora*）和千层塔（*Polystictus versicolor*）等多种珍稀植物中分离出能够产生皂苷、喜树碱和石杉碱等活性成分的内生真菌，并通过对内生真菌的人工选育和发酵培养，合成与宿主植物相同的活性物质，从而有效降低了人类对珍稀植物资源的过度依赖和破坏[7-9]。例如，石杉甲碱（HupA）是石杉科（Huperziaceae）植物的主要成分，由内生真菌生物合成，其种类包括支顶孢属（*Acremonium*）、竹黄属（*Shiraia*）和曲霉属（*Aspergillus*）等 15 属[10]。EL-SAYED 等[11]从红豆杉（*Taxus baccata*）中分离得到一株产紫杉醇的内生真菌菌株 *Epicoccum nigrum* TXB502，紫杉醇产量可达 61.35 mg/g。王维夫等[12]从小花棘豆（*Oxytropis glabra*）分离出链格孢

属(*Alternaria*)内生真菌,用气相色谱-质谱联用法(GC-MS)检测,苦马豆素产量为 0.832～573.24 μg/g。从健康植物组织中分离与宿主植物产相同代谢产物的内生真菌,为解决部分资源短缺、产量低的药物提供了新的思路。

本研究以宁夏回族自治区盐池县花马池镇天然草场的健康苦豆子为材料,利用可培养方法分离苦豆子内生真菌,并分析苦豆子可培养内生真菌的群落组成及其物种多样性,通过酸性染料比色法(acid-dye colorimetric)、薄层色谱法(thin-layer chromatography,TLC)和高效液相色谱法(high performance liquid chromatography,HPLC)筛选苦豆子产喹诺里西啶生物碱内生真菌菌株,并利用多基因序列明确其在种水平上的分类地位,为利用苦豆子内生真菌发酵生产喹诺里西啶类生物碱提供新思路,也为野生苦豆子内生真菌资源利用提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 苦豆子样品采集

于 2021 年 9 月 1 日,在宁夏回族自治区盐池县花马池镇(107.46° E,37.77° N,海拔 1 336.4 m)采集成熟期野生苦豆子植株。采用"Z"型取样法设置 5 个采样点,每样点面积 100 m^2,样点间距 150 m。在不破坏生态环境的情况下,去除苦豆子垂直盖度以下的枯枝落叶层和杂物,采集健康且长势良好的完整植株 10 株(取样株距 10 m)作为 1 份,共采集 5 份。采用垂直挖掘法尽可能地保证植株的完整性,取样后覆土。将健康植株放入无菌保鲜袋中,带回实验室立即进行内生真菌的分离。

1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基,用于内生真菌的分离、平板培养和保存;马铃薯葡萄糖液体(PDB)培养基,用于内生真菌的振荡培养。以上培养基均经 121 ℃高压灭菌 20 min 后备用。

1.3 主要试剂和仪器

Biospin 真菌基因组 DNA 提取试剂盒,购自杭州博日科技股份有限公司;2×*Taq* PCR Master Mix、DNA Marker 及引物,购自生工生物工程(上海)股份有限公司;氧化苦参碱、苦参碱、槐定碱、槐果碱和氧化槐果碱等标准品,购自中国食品药品检定研究院,纯度>98%;高效液相色谱所用色谱纯试剂、分析纯有机试剂,均市购;T100TM Thermal Cycler PCR 仪,美国 Biorad;紫外分光光度计 UV2700,日本岛津;Agilent 1260 Ⅱ 高效液相色谱仪、Agilent TC-C18(2)色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),美国 Agilent。

1.4 苦豆子内生真菌的分离、纯化与鉴定

将苦豆子植株分别按根(HG)、茎(HJ)、叶(HY)和种子(HD)4 个组织部位分开。将苦豆子种子脱粒后,用粒径 0.15 mm(180 目)砂纸打磨 1 min 破坏种皮蜡质,将种子放在湿润的无菌滤纸上保湿培养 24 h 使种皮软化,然后用无菌水冲洗数次后备用。将苦豆子根、茎、叶置于流水中反复冲洗,去除样品表面的泥土和附属物,在无菌吸水纸上晾干。采用组织分离法[2,13]对苦豆子各组织样品进行表面消毒,具体操作如下:用无菌水漂洗 1 次,体积分数 75%酒精浸泡 30 s,质量分数 1%次氯酸钠处理 0.5～4 min(根 4 min,茎 2 min,叶 0.5 min,种子 3 min),最后再使用无菌水洗涤 3 次,将待测样品表面水分用无菌滤纸吸干备用。以最后一次冲洗的无菌水涂平板培养,以检验是否表面消毒彻底[2]。使用无菌剪刀剪去叶片组织边缘和根、茎两端接触消毒液的部分后,将根和茎剪切成长 0.5～1 cm 小段,叶片剪成 0.5 cm×0.5 cm 小块,种子用灭菌手术刀切成两瓣,分离种皮和子叶,所有组织切面朝下置于 PDA 培养基平板上。每培养皿放 6 个组织块,每处理 5 个重复,5 个样点共 360 个组织块,置于 25 ℃恒温培养箱中黑暗培养待菌丝长出,用无菌接种针从边缘挑取小块菌块移至新的 PDA 平板上进行纯化。将纯化好的菌株接到 PDA 斜面上,25 ℃培养 4～5 d 后,置于 4 ℃冰箱保藏备用。

将纯化的内生真菌置于 PDA 培养基平板上,26 ℃培养 5 d 后,参照 Biospin 真菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取内生真菌 DNA。利用真菌 *ITS* 基因序列引物[14-15]分别扩增苦豆子内生真菌的基因组 DNA,PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测合格后,切胶回收目标扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,用于扩增和测序的 PCR 引物信息见表 1。测序后进行比对和裁剪,在 NCBI 数据库(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)中进行 BLAST 同源性比对分析,鉴定苦豆子内生真菌的种属分类。

1.5 苦豆子内生真菌群落组成及其多样性分析

1.5.1 *群落组成* 内生真菌侵染苦豆子的程度采用定殖率(colonization rate,CR)表示,内生真菌在植物样品中多重侵染的频率用分离率(isolation frequency,IF)表示,内生真菌在各个组织部位中的优势菌群采用相对分离频率(relative frequency,RF)

表示，具体计算公式如下：

定殖率＝出现内生真菌的组织块数/总分离组织块数×100%；

分离率＝分离到内生真菌的总株数/总分离组织块数×100%；

相对分离频率＝某种（属）内生真菌菌株数/分离内生真菌的总菌株数×100%。

根据苦豆子不同组织内生真菌的相对分离频率绘制堆叠柱状图，根据苦豆子不同组织内生真菌属的个数绘制 Upset 图，使用 Sangerbox Tools 平台（http://sangerbox.com/home.html）完成绘图。

表 1　用于扩增和测序的 PCR 引物信息

Table 1　PCR primer information for amplification and sequencing

基因名称 Gene	引物名称 Primer name	引物序列（5′→3′） Primer sequence (5′→3′)	退火温度/℃ Annealing temperature	参考文献 Reference
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	55	[14-15]
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
*TEF*1-α	EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	55	[16]
	EF1-896R	TACTTGAAGGAACCCTTACC		
GAPDH	Gpd1	CAACGGCTTCGGTCGCATTG	58	[17]
	Gpd2	GCCAAGCAGTTGGTTGTGC		
Alt a 1	Alt-f	ATGCAGTTCACCACCATCGC	57	[18]
	Alt-r	ACGAGGGTGAYGTAGGCGTC		

1.5.2　多样性分析　内生真菌的多样性采用 Shannon-Wiener 多样性指数（H'）评价，内生真菌的群落丰富度采用 Magalef 丰富度指数（R）评价，内生真菌类群分布的均匀程度采用 Pielou 均匀度指数（E）评价，具体计算公式[19-20]如下：

$$H'=-\sum P_i\times\ln P_i;$$

$$R=(S-1)/\ln N;$$

$$E=H'/\ln(S)。$$

式中：P_i 为某特定种（属）内生真菌的菌株数占分离内生真菌总菌株数的比值；S 为物种数，N 为菌株数。

1.6　产喹诺里西啶类生物碱内生真菌的筛选

1.6.1　待测样品制备　将分离纯化的苦豆子内生真菌接种在 PDA 培养基平板上，26 ℃培养 7 d，用灭菌打孔器取 5 个直径 0.6 cm 的菌饼，接种于装有 150 mL PDB 培养基的 250 mL 锥形瓶中，26 ℃、175 r/min 振荡培养 7 d，培养结束后用纱布过滤并收集菌丝，置于 50 ℃烘箱烘至质量恒定，研磨成粉末。称取 1 g 菌丝于 50 mL 离心管中，加入 15 mL 甲醇，在 45 ℃下超声处理 60 min，9 500 r/min 离心 10 min，取上清液 14 mL 置于 150 mL 旋蒸瓶中，旋转蒸发浓缩至 2 mL 制得菌丝提取液，4 ℃保存备用。

1.6.2　酸性染料比色法检测　参照顾沛雯等[21]的方法，配置质量浓度为 0.5 mg/mL 喹诺里西啶生物碱混合标准品溶液 2 mL，将菌丝提取液和标准品溶液进行如下操作：水浴挥去甲醇，加水至 2 mL，加 0.878 3 mg/mL 溴甲酚绿 2 mL 摇匀，加入二氯甲烷 5 mL，漩涡混合 5 min，3 000 r/min 离心 10 min，取二氯甲烷层 2 mL 于 60 ℃水浴挥去溶剂，加磷酸缓冲液（pH＝6）10 mL，充分溶解混匀。将样品磷酸缓冲液置于紫外分光光度计中，使用磷酸缓冲液（pH＝6）调零，在波长 300～800 nm 范围内进行扫描，喹诺里西啶生物碱标准品在 615 nm 处出现吸收峰。若样品溶液也在 615 nm 处出现吸收峰，则说明样品溶液中含有喹诺里西啶生物碱。

1.6.3　薄层色谱法检测　参照周星辰等[22]的方法并修改，分别吸取氧化苦参碱、苦参碱、槐定碱、槐果碱和氧化槐果碱标准品与供试菌株菌丝提取溶液样品各 5 μL，点于同一硅胶薄层板上，以体积比乙酸乙酯∶乙醇∶浓氨水（5∶1∶0.5）为展开剂展开，取出后晾干，喷碘化铋钾溶液，在 105 ℃加热至斑点清晰，日光下检视。观察待检样品在薄层板上的位移和斑点颜色。若样品中具有与生物碱标准品一致的斑点，即可初步确定其对应的内生真菌菌丝中含有对应的生物碱。

1.6.4　高效液相色谱法检测　色谱条件：Agilent-TC-C18(2)色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相 A：0.2%磷酸（三乙胺 2.00 mol/L），B：乙腈，洗脱梯度为 0～22 min，96.5% A，3.5% B；22～23 min，96.5%～0% A，3.5%～100% B；23～27 min，0% A，100% B，27～28 min，0%～96.5% A，100%～3.5% B；28～34 min，96.5% A，3.5% B，检测波长 205 nm，流速 1.0 mL/min，进样量 10 μL，柱温 30 ℃[4]。

标准曲线的制备：称取对照标准品适量，加流动相溶解并定容，配成对照标准品溶液。用流动相对半逐级稀释到合适质量浓度，以上述色谱条件测定。以峰面积 y 为纵坐标，以生物碱质量浓度 x 为横坐

标,拟合得到标准曲线方程 $y=1\ 827.9x-42.46$ ($R^2=0.999\ 9$,线性范围为 0.05～2 mg/mL)。计算样品溶液中槐定碱的质量浓度(mg/mL)及内生菌株的槐定碱产量。

槐定碱产量(mg/g)=(槐定碱质量浓度×体积)/菌丝干质量。

1.7 产喹诺里西啶生物碱菌株的多基因鉴定

在苦豆子内生真菌 *ITS* 基因鉴定的基础上,利用 MEGA 7.0 基于邻接法(Neighbour-Joining)构建产喹诺里西啶生物碱的内生真菌 *ITS* 基因系统发育树。对于链格孢属(*Alternaria*)和镰刀菌属(*Fusarium*)真菌,进一步扩增 *GAPDH*、*TEF*1-α 和 *Alt a* 1 基因序列,利用 PhyloSuite 软件,分别按照 *ITS-GAPDH-TEF*1α-*Alt a* 1 和 *ITS-TEF*1α 的基因顺序串联,利用 MEGA 7.0 基于邻接法构建多基因系统发育树,最后在 GenBank 数据库中提交菌株序列获得菌株登录号。用于扩增和测序的 PCR 引物信息见表 1。

2 结果与分析

2.1 苦豆子内生真菌的群落组成

由表 2 可知,从 360 个苦豆子组织块中共分离得到 394 株内生真菌,内生真菌的分离率为 109.44%;有 286 个组织块中分离到内生真菌,内生真菌的定殖率为 79.44%。苦豆子不同组织部位中分离的内生真菌菌株数有差异,其中叶中内生真菌的定殖率最高,为 98.89%;其次为根部,定殖率为 97.78%;种子中内生真菌的定殖率最低,仅为 52.22%。内生真菌在苦豆子不同组织中的分离率与定殖率变化规律相同,叶和根部内生真菌的分离率较高,分别为 180.00%和 112.22%。

表 2 苦豆子内生真菌的定殖率和分离率

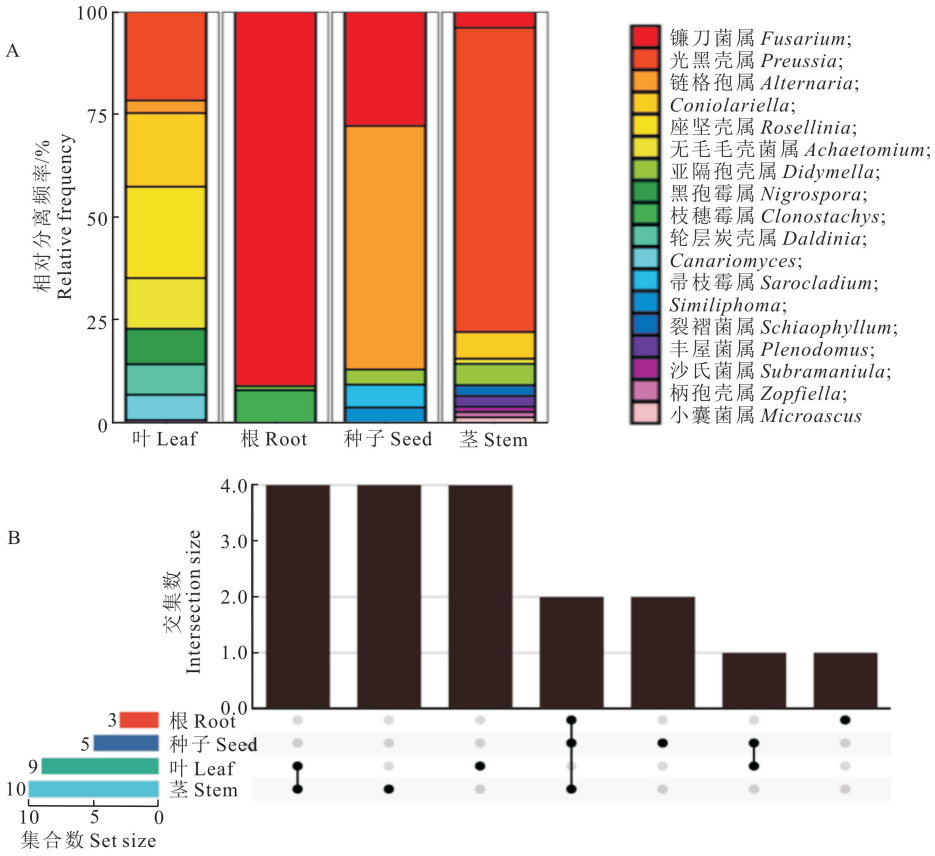
Table 2 Colonization rate and isolation frequency of endophytic fungi in *Sophora alopecuroides*

组织器官 Plant organ and tissue	分离组织数 Number of tissue isolated	产菌组织数 Number of tissue segments with fungi	分离菌株数 Number of fungal strains isolated	定殖率/% Colonization rate	分离率/% Isolation frequency
根 Root	90	88	101	97.78	112.22
茎 Stem	90	62	77	68.89	85.56
叶 Leaf	90	89	162	98.89	180.00
种子 Seed	90	47	54	52.22	60.00
总计 Total	360	286	394	79.44	109.44

将分离到的 394 株苦豆子内生真菌鉴定为 2 门 3 纲 6 目 14 科 18 属,分别为镰刀菌属(*Fusarium*)、光黑壳属(*Preussia*)、链格孢属(*Alternaria*)、座坚壳属(*Rosellinia*)、*Coniolariella*、无毛毛壳菌属(*Achaetomium*)、黑孢霉属(*Nigrospora*)、轮层炭壳属(*Daldinia*)、*Canariomyces*、枝穗霉属(*Clonostachys*)、亚隔孢壳属(*Didymella*)、帚枝霉属(*Sarocladium*)、裂褶菌属(*Schizophyllum*)、沙氏壳属(*Subramaniula*)、*Similiphoma*、丰屋菌属(*Plenodomus*)、柄孢壳属(*Zopfiella*)和小囊菌属(*Microascus*)。由图 1-A 可知,从苦豆子根样本中分离出的 101 株内生真菌,分属于枝穗霉属(*Clonostachys*)、镰刀菌属(*Fusarium*)和亚隔孢壳属(*Didymella*),其中镰刀菌属占比最多,相对分离频率为 91.09%;其次是枝穗霉属,相对分离频率为 7.92%。茎样本中分离出 77 株内生真菌,分属于 10 个属,其中光黑壳属(*Preussia*)占比最多,相对分离频率为 74.03%;其次是 *Coniolariella*,相对分离频率为 6.49%。叶片样本中共分离出 162 株内生真菌,分属于 9 个属,其中座坚壳属(*Rosellinia*)占比最多,相对分离频率为 22.22%;其次是光黑壳属,相对分离频率为 21.60%。种子样本中分离出的 54 株内生真菌分属于 5 个属,其中链格孢属(*Alternaria*)占比最多,相对分离频率为 59.26%;其次是镰刀菌属(*Fusarium*),相对分离频率为 27.78%。上述结果表明,苦豆子不同器官中内生真菌菌群组成和数量分布均具有一定差异,苦豆子可培养内生真菌具有丰富的多样性。

从苦豆子不同组织器官内生真菌群落的 Upset 分析结果(图 1-B)可知,4 个组织器官中无共有内生真菌属;有 2 个属在根、茎和种子中共有,即镰刀菌属(*Fusarium*)和亚隔孢壳属(*Didymella*);有 4 个属在茎和叶 2 个组织器官中共有,即 *Coniolariella*、光黑壳属(*Preussia*)、无毛毛壳属(*Achaetomium*)和沙氏壳属(*Subramaniula*);链格孢属(*Alternaria*)在叶片和种子中共有。部分内生真菌呈现出一定的组织特异性,在根、茎,叶和种子 4 个器官中都有各自特有的内生真菌类群。其中茎和叶片中的特有内生真菌属最多,茎中特有内生真菌隶属于裂褶菌属(*Schizophyllum*)、柄孢壳属(*Zopfiella*)丰屋

菌属（*Plenodomus*）和小囊菌属（*Microascus*），叶片中特有内生真菌隶属于 *Canariomyces*、轮层炭壳属（*Daldinia*）、黑孢霉属（*Nigrospora*）和座坚壳属（*Rosellinia*）。综上所述，苦豆子不同组织器官中内生真菌群落组成与分布存在明显差异。



A. 相对分离频率堆叠图；B. Upset 图，横坐标表示集合数，即不同器官内生真菌属的个数，纵坐标表示交集数，即相对应的组织器官中共有/特有内生真菌属的个数。

A. Relative frequency stacking map; B. Upset diagram, the horizontal coordinate represents the set size, which is the number of endophytic fungal genera in different organs, and the vertical coordinate represents the intersection size, which is the number of endophytic fungal genera common to/specific to the corresponding organs.

图 1　苦豆子不同组织器官内生真菌的群落组成

Fig. 1　Composition of endophytic fungal communities in different organs of *Sophora alopecuroides*

2.2　苦豆子内生真菌群落的多样性

由表 3 可得，苦豆子内生真菌群落 Shannon-Wiener 多样性指数由高到低依次为叶＞茎＞种子＞根，Magalef 丰富度指数排序为茎＞叶＞种子＞根，Pielou 均匀度指数排序为叶＞种子＞茎＞根，说明苦豆子内生真菌在叶中的多样性最高且分布最均匀，在茎中的丰富度最高，在根中的多样性、丰富度和均匀度均最低。表明苦豆子不同器官内生真菌的群落多样性有明显差异。

表 3　苦豆子内生真菌群落的多样性

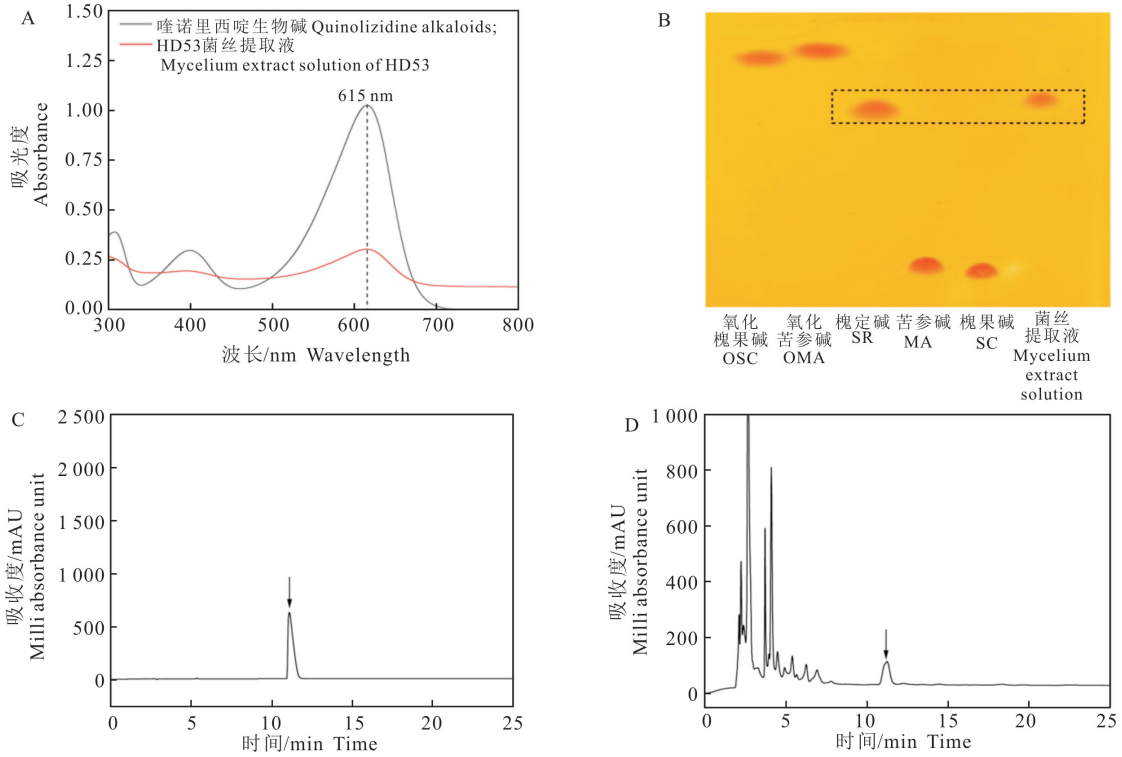
Table 3　Diversity of endophytic fungal communities in *Sophora alopecuroides*

组织器官 Plant organ and tissue	分离菌株数 Number of fungal strains isolated	物种数 Number of fungal species	Shannon-Wiener 多样性指数 Shannon-Wiener index	Margalef 丰富度指数 Margalef index	Pielou 均匀度指数 Pielou index
根 Root	101	3	0.33	0.43	0.30
茎 Stem	77	10	1.10	2.07	0.48
叶 Leaf	162	9	1.95	1.57	0.89
种子 Seed	54	5	1.07	1.00	0.67

2.3　苦豆子产喹诺里西啶生物碱内生真菌的筛选

将分离得到的 394 株苦豆子内生真菌经生长适应性筛选后，进行酸性染料比色法检测，检测结果（图 2-A）表明，有 102 株内生真菌菌丝提取液均在

615 nm 处出现吸收峰,与喹诺里西啶生物碱标准品出峰位置相同。进一步薄层色谱检测结果(图 2-B)表明,102 株内生真菌的菌丝提取物与槐定碱标准品在薄层板上的位移和斑点颜色相同,但未出现与氧化苦参碱、苦参碱、槐果碱和氧化槐果碱相同的斑点,初步确定这 102 株内生真菌菌丝中含有槐定碱。HPLC 图谱分析发现,槐定碱标准品出峰时间在 11.093 min(图 2-C),各菌株菌丝提取液样品在 11.169 min 有较强吸收峰(图 2-D),与槐定碱标准品出峰时间相近,且与周围其他杂质峰分离性良好。上述结果表明,这 102 株内生真菌菌丝中均含有槐定碱。根据标准曲线得到样品溶液中槐定碱的质量浓度,再计算槐定碱的产量。由表 4 可知,内生真菌菌株 HY51 的槐定碱产量最高,达 20.32 mg/g;其次是菌株 HD53,其槐定碱含量为 11.48 mg/g;菌株 HG21 的槐定碱产量最低,仅为 0.65 mg/g。



A. 紫外光谱图;B. 薄层色谱图;C. 槐定碱标准品高效液相色谱图;D. HD53 菌株菌丝提取液的高效液相色谱图。

A. Ultraviolet spectrogram; B. Thin-layer chromatogram; C. High-performance liquid chromatogram of sophoridine standard; D. High-performance liquid chromatogram of mycelium extract solution of representative strain HD53.

图 2 苦豆子内生真菌产喹诺里西啶生物碱菌株的筛选

Fig. 2 Screening of quinolizidine alkali-producing endophytic fungal strains in *Sophora alopecuroides*

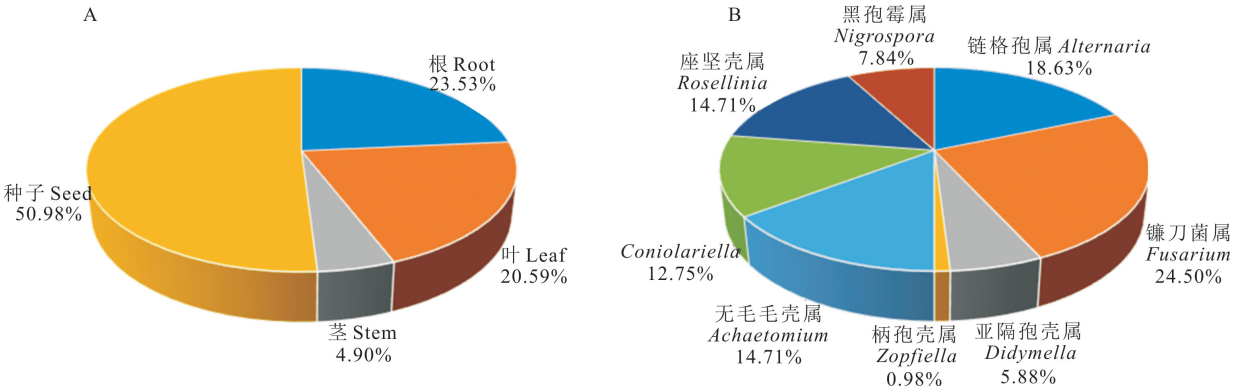
表 4 苦豆子内生真菌槐定碱产量的检测结果

Table 4 Detection of sophoridine production by endophytic fungi in *Sophora alopecuroides*

编号 Sample	产量/(mg·g^{-1}) Yield	菌株数 Number of strains	编号 Sample	产量/(mg·g^{-1}) Yield	菌株数 Number of strains
HY51	20.32	15	HD55	4.52	1
HD53	11.48	2	HD13	3.54	2
HY41	10.62	8	HG36	3.46	11
HY16	9.49	1	HD46	3.03	8
HY39	8.90	7	HG43	2.99	5
HD57	7.95	1	HG34	2.77	3
HJ51	7.42	4	HD35	2.76	2
HY26	5.53	5	HG26	2.24	1
HG210	4.82	1	HY17	2.09	15
HD11	4.77	2	HJ32	1.63	1
HY212	4.77	1	HD22	1.58	1
HD31	4.52	2	HG21	0.65	3

2.4　产槐定碱内生真菌的分布

产槐定碱菌株占苦豆子内生真菌总菌株数的 25.89%。从组织器官分布上看，种子中产槐定碱菌株最多，占产碱菌株总数的 50.98%；其次是根和叶，分别占产碱菌株总数的 23.53% 和 20.59%；茎中产槐定碱菌株最少，占产碱菌株总数的 4.90%（图 3-A）。从内生菌的种属分布上看，产槐定碱菌株分属于 8 个属，其中菌株数最多的是镰刀菌属（*Fusarium*），占产槐定碱菌株总数的 24.50%；其次是链格孢属（*Alternaria*），占产槐定碱菌株总数的 18.63%。（图 3-B）。



A. 不同组织器官；B. 不同属。

A. Different organs and tissue; B. Different genera.

图 3　苦豆子产槐定碱内生真菌的分布

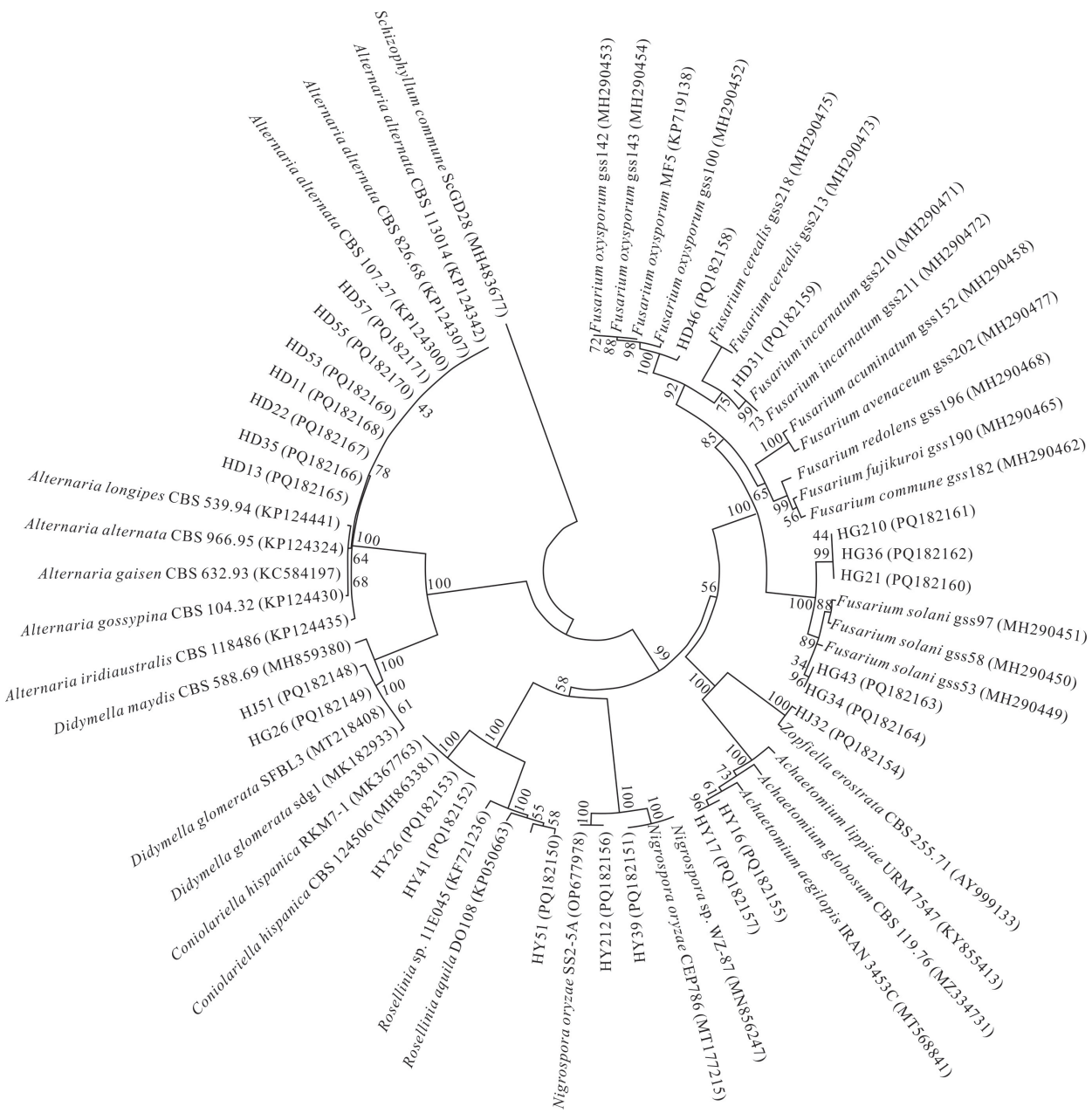
Fig. 3　Distribution of sophoridine-producing endophytic fungi in *Sophora alopecuroides*

2.5　产槐定碱内生真菌的鉴定

基于 ITS 序列的 24 株代表菌株系统发育分析结果如图 4 所示。由图 4 可知，菌株 HD11、HD13、HD22、HD35、HD53、HD55 和 HD57 均与链格孢属（*Alternaria gaisen*、*Alternaria alternata* 和 *Alternaria longipes*）等聚集在一支，支持率为 78%；菌株 HD46 与尖孢镰刀菌（*F. oxysporum*）gss142、gss143、MF5 和 gss100 菌株亲缘关系密切，支持率为 100%；菌株 HD31 与变红镰刀菌（*F. incarnatum*）gss210 和 gss211 菌株亲缘关系密切，支持率为 99%；菌株 HG21、HG36、HG210、HG43 和 HG34 与茄镰刀菌（*F. solani*）gss97、gss53 和 gss58 菌株亲缘关系密切，支持率为 100%；菌株 HY51 与附孢座坚壳（*Rosellinia aquila*）亲缘关系密切，支持率为 58%；菌株 HY41 和 HY26 与 *Coniolariella hispanica* 亲缘关系密切，支持率为 100%；菌株 HY212 和 HY39 与稻黑孢霉（*Nigrospora oryzae*）亲缘关系密切，支持率为 100%；菌株 HJ32 与 *Zopfiella erostrata* 亲缘关系密切，支持率为 100%；菌株 HY16 和 HY17 与无毛毛壳属（*Achaetomium*）亲缘关系密切，支持率为 100%，但未能鉴定到种；菌株 HJ51 和 HG26 与亚隔孢壳（*Didymella maydis*）亲缘关系密切，支持率为 100%。

为了确定链格孢属和镰刀菌属真菌在种水平上的分类地位，进一步构建代表菌株的多基因系统树。以 *ITS*、*GAPDH*、*TEF*1-*α* 和 *Alt a* 1 拼接序列为依据构建链格孢属内生真菌的系统发育树，以 *Alternaria iridiaustralis* CBS118486 为外参。结果（图 5-A）表明，7 株链格孢菌分为 2 个分支，其中菌株 HD22、HD55、HD53、HD13 和 HD57 与互隔链格孢（*Alternaria alternata*）CBS 107.27 和 CBS 826.68 菌株亲缘关系较近，支持率为 96%；菌株 HD11 和 HD35 与互隔链格孢 CBS 113014 和 CBS 966.95 菌株亲缘关系较近，支持率为 99%。表明苦豆子内生链格孢菌均为互隔链格孢，但具有较大的种内差异。

以 *ITS* 和 *TEF*1-*a* 拼接序列为依据构建镰刀菌属内生真菌的系统发育树，以 *Colletotrichum kahawae* IMI 319418 为外参，结果（图 5-B）与 ITS 进化树分类结果一致，菌株 HD46 与尖孢镰刀菌（*F. oxysporum*）亲缘关系密切，支持率为 97%；菌株 HD31 与变红镰刀菌（*F. incarnatum*）亲缘关系密切，支持率为 100%；菌株 HG21、HG36、HG210、HG43 和 HG34 与茄镰刀菌（*F. solani*）亲缘关系密切，支持率为 100%。其中茄镰刀菌（*F. solani*）又可分为 2 个亚支，菌株 HG43 和 HG34 与菌株 gss97 亲缘关系更近，支持率为 68%；菌株 HG36、HG21、HG210 与菌株 gss53 和 gss58 亲缘关系密切，支持率为 63%。表明茄镰刀菌的进化支具有种内多样性。



括号内序号为 GenBank 登录号;节点处的数值为支持率;比例尺表示替换数。

GenBank accession numbers are shown in parentheses. Bootstrap support values are displayed at the nodes.

Scale bar represents the number of substitutions.

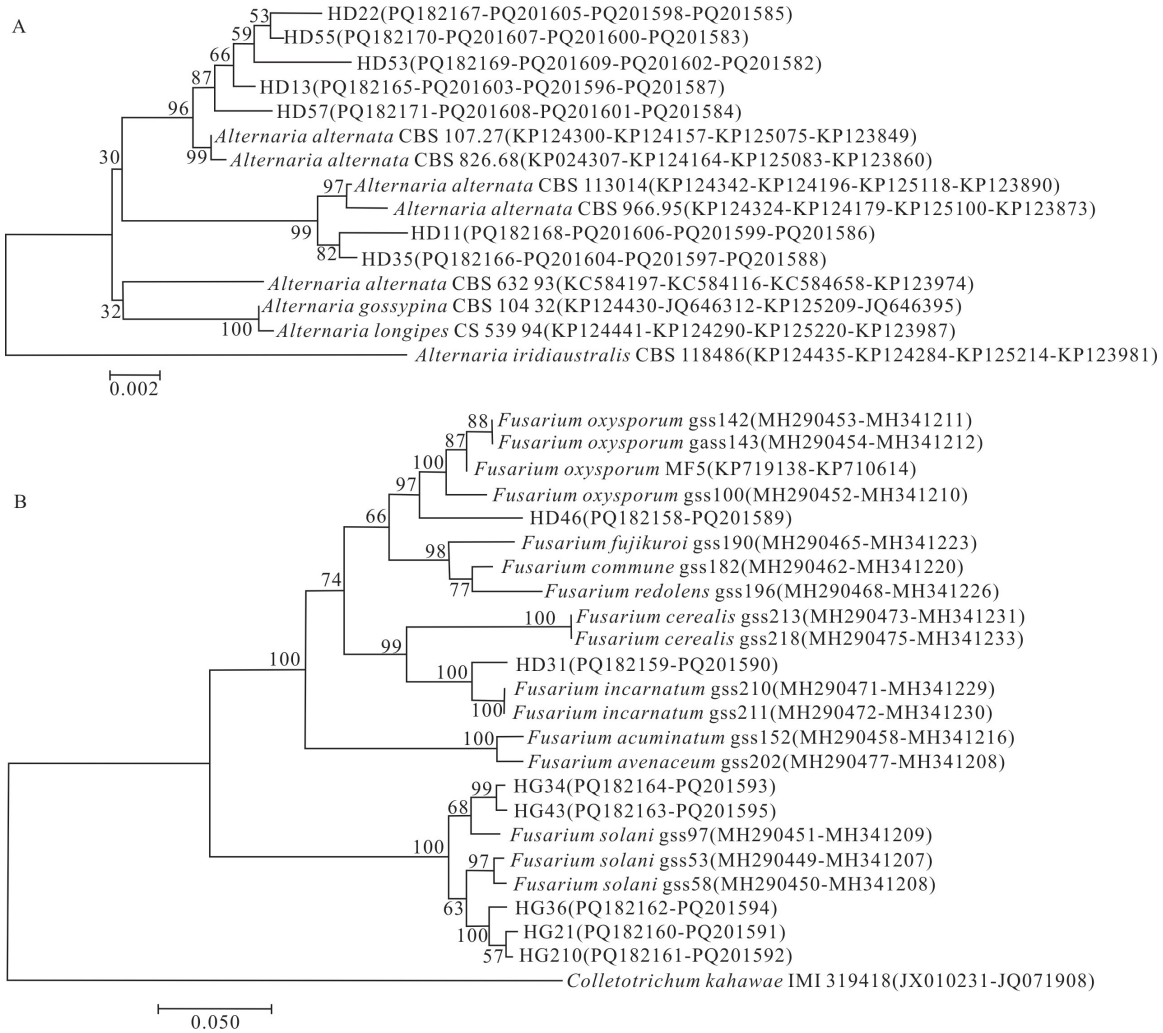
图 4 苦豆子产槐定碱内生真菌代表菌株的系统发育树

Fig. 4 Plylogenetic tree of representative sophoridine-producing endophytic fungi from *Sophora alopecuroides*

3 讨 论

药用植物中存在多种多样的内生真菌,具有丰富多样的生物学活性,是生物活性天然产物重要资源菌,在医药和农业领域具有开发潜力[23]。然而,大多数内生真菌的多样性仍有待发现。尽管免培养技术能提供大量物种信息,但基于组织分离和平板培养依然是挖掘功能性内生真菌资源的有效手段。HUANG 等[24]从中国不同地区的 29 种药用植物中分离得到 1 160 株内生真菌,这些内生真菌具有较高的生物多样性、宿主重复率、组织特异性和空间异质性。笔者前期通过高通量测序研究发现,器官是影响苦豆子内生真菌群落结构差异的主要因素[2-4],这与本研究苦豆子可培养内生真菌的分离结果一致。本研究中镰刀菌属(*Fusarium*)和链格孢属(*Alternaria*)是苦豆子内生真菌的优势属,也是药用植物中常见的内生真菌[25-26]。此外,本研究分离到在其他药用植物中未曾分离到的较为新颖和少见

的内生真菌属，如无毛毛壳属（*Achaetomium*）、*Canariomyces*、*Coniolariella*、丰屋菌属（*Plenodomus*）和沙氏壳属（*Subramaniula*）等，这可能与苦豆子植物独特的微环境有关[2]。不同药用植物都具有独特的药用化学成分，不同器官的化学成分和含量也有差异，这导致了独特的化学环境和生态位，在微生物与宿主的共同选择下，完全适应了植物内环境的微生物成功定殖并保留下来，形成了独特的内生菌群落[23,27]。



A. 基于 *ITS-GAPDH-TEF*1α-*Alt a* 1 构建的链格孢属系统发育树；B. 基于 *ITS-TEF*1α 构建的镰刀菌属系统发育树。

A. *Alternaria* phylogenetic tree based on I *ITS-GAPDH-TEF*1α-*Alt a* 1; B. *Fusarium* phylogenetic tree based on *ITS-TEF*1α.

图 5　苦豆子产槐定碱内生真菌代表菌株的多基因系统发育树

Fig. 5　Multi-locus plylogenetic tree of representative sophoridine-producing endophytic fungi isolated from *Sophora alopecuroides*

大量研究表明，植物不同组织器官内生真菌的多样性存在很大差异[4,28]。顾美英等[29]分析了黑枸杞（*Lycium ruthenicum*）不同组织可培养内生真菌群落的 Alpha 多样性指数，发现黑枸杞根和果中真菌群落多样性和丰富度较高，花中真菌群落多样性最低，茎中真菌群落丰富度最低。CUI 等[30]分离了蛇足石杉不同组织器官的内生真菌，结果表明叶和茎中内生真菌的丰富度和多样性均高于根部，且茎和叶中内生真菌群落相似度最高。高媛等[31]研究发现，苦豆子内生真菌在分布上具有一定的组织特异性，根中内生真菌定殖数量高于其他部位，而茎部内生真菌多样性指数最高。本研究中，苦豆子内生真菌群落在叶中的多样性最高且分布最均匀，在茎中丰富度最高，在根中多样性、丰富度和均匀度最低。造成这种差异性的原因可能有两点：一是植物组织器官所处的环境生态位对内生真菌的影响，二是不同组织器官自身的生理结构和代谢不同[2,32-33]。植物叶片表皮细胞柔软，分布大量气孔，

叶片内部组织疏松透气,有利于真菌转移[2]。

大多数内生微生物在与宿主漫长的相互适应过程中发生了进化,基因结构或基因功能也会发生改变,甚至可以产生特定化合物适应生存环境[34]。虽然内生菌的进化机制尚未完全了解,但其有能力产生多种新型化合物,营造更加有益于宿主植物的化学环境[23]。本研究利用酸性染料比色法、TLC 和 HPLC 筛选苦豆子产槐定碱的内生真菌,发现苦豆子叶片中产槐定碱的菌株数最多,其次是种子和根,茎中最少,这可能与苦豆子不同组织部位的生物碱或其他物质含量有关。值得注意的是,源自药用植物内生真菌的特定化合物与宿主相同和相似,具有多种生物学特性,如抗菌、抗虫、抗氧化、免疫抑制剂和抗癌活性[23,35-36]。研究发现,从黄芪(*Astragalus membranaceus*)、决明子(*Semen cassiae*)和威灵仙(*Bauhinia guianensis*)内生真菌中提取的类固醇,具有抗氧化、抗增殖和抗炎活性[37-38];从榕树内生真菌 *Alternaria sp.* FL25 中分离到 4 个化合物,经波谱(MS、^{1}H-NMR、^{13}C-NMR)解析,分别为烟曲霉素 B、烟曲霉素 C、烟曲霉酸和环(苯丙-丝)二肽,这些代谢产物对灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)、芸苔链格孢(*A. brassicae*)、禾谷镰刀菌(*F. graminearum*)、辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)和黑腐皮壳菌(*Valsa mali*)等具有较强的抗菌活性[39]。

本研究从苦豆子不同组织中筛选到大量产槐定碱的内生真菌,其中镰刀菌属(*Fusarium*)和链格孢属(*Alternaria*)是主要的两大类群。研究表明,镰刀菌属和链格孢属分布广泛,会产生包括含氮化合物、生物碱、类固醇、萜类、吡喃酮、醌类和酚类等多种活性化合物[23,39-40],具有细胞毒性、免疫调节、抗菌和除草活性,在开发新型医疗和农业制剂方面的潜力巨大[23]。研究还发现,从柴龙树(*Apodytes dimidiata*)中分离出镰刀菌属内生真菌(MTCC 9667 和 MTCC 9668),可以产生 10-羟基喜树碱,现已工业化用于治疗结肠癌和乳腺癌[41];从疯草中分离的棘豆链格孢(*Alternaria oxytropis*),可以产生苦马豆素生物碱,被用于对抗 A549 和 HeLa 癌细胞的细胞毒性[42]。人工培养的小花棘豆(*Oxytropis glabra*)链格孢属内生真菌,其苦马豆素的产量为 0.832~573.24 μg/g[12]。本研究中互隔链格孢(*Alternaria alternata*)HD53 的槐定碱产量为 11.48 mg/g,可以作为后续槐定碱开发的潜在资源菌。

然而,内生真菌活性成分产量低是一个普遍存在的问题,可能的原因在菌株特性、培养条件、活性成分的结构属性等方面[43]。目前,科研人员通过改变菌株的培养条件、诱导激活合成途径、改善提取工艺等手段来增加菌株的活性成分产量[23]。在化学结构上,槐定碱、氧化苦参碱、槐果碱和苦参碱属于四环型喹诺里西啶生物碱,具有相同内酰胺环结构[3]。在体外,可通过羟基化、去氢等结构修饰进行互相转化,在生物和医药上发挥了重要作用[3]。但在生物体内该类生物碱如何进行合成与转化的机制尚不清楚。本研究从苦豆子不同组织器官筛选的产槐定碱内生真菌,产量相对较低,后期可通过优化菌株发酵条件、突变和遗传改造等手段提高其合成生物碱的产率,增加其槐定碱产量,进一步提升该类菌株在医疗、农业和畜牧业等方面的应用潜力。

4 结 论

从苦豆子不同器官分离得到可培养内生真菌 394 株,隶属于 18 属,根、茎、叶和种子中的优势属分别为镰刀菌属(*Fusarium*)、光黑壳属(*Preussia*)、座坚壳属(*Rosellinia*)和链格孢属(*Alternaria*)。不同器官中内生真菌分布具有组织特异性,根、茎、叶和种子 4 个组织器官中分离的内生真菌无共有属,茎和叶片中的特有属最多。不同器官苦豆子内生真菌的群落多样性有差异,叶内生真菌群落多样性最高且分布最均匀,茎部内生真菌群落丰富度最高。利用酸性染料比色法、TLC 和 HPLC 法共筛选出 102 株产槐定碱的内生真菌,占内生真菌总数的 25.89%,产碱量为 0.65~20.32 mg/g,其中优势类群为镰刀菌属(*Fusarium*)和链格孢属(*Alternaria*)。本研究从苦豆子不同组织器官筛选的产槐定碱内生真菌种属多样,具有良好的开发潜力和应用前景。

[参考文献]

[1] WANG R Z, DENG X X, GAO Q X, et al. *Sophora alopecuroides* L.: an ethnopharmacological, phytochemical, and pharmacological review [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 248: 112172.

[2] WANG R T, ZHANG Q C, JU M X, et al. The endophytic fungi diversity, community structure, and ecological function prediction of *Sophora alopecuroides* in Ningxia, China [J]. Microorganisms, 2022, 10(11): 2099.

[3] YANG L, GUAN W, JIE L, et al. Quinolizidine alkaloids derivatives from *Sophora alopecuroides* Linn: bioactivities, structure-activity relationships and preliminary molecular mechanisms [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2020, 188: 111972.

[4] JU M X, ZHANG Q C, WANG R T, et al. Community ecologi-

cal succession of endophytic fungi associates with medicinal compound accumulation in *Sophora alopecuroides* [J]. Microbiology Spectrum, 2024, 12(2): e0307623.

[5] JU M X, ZHANG Q C, WANG R T, et al. Correlation in endophytic fungi community diversity and bioactive compounds of *Sophora alopecuroides* [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 955647.

[6] MANGANYI M C, ATEBA C N. Untapped potentials of endophytic fungi: a review of novel bioactive compounds with biological applications [J]. Microorganisms, 2020, 8(12): 1934.

[7] 李艳冰，林亮，廖秋红，等. 促进滇重楼皂苷类活性成分积累的内生真菌筛选 [J]. 云南农业大学学报(自然科学)，2019，34(1)：132-137.
LI Y B, LIN L, LIAO Q H, et al. Screening of endophytic fungi for promote the accumulation of active components of saponins from pairs *Polyphylla* var. *Yunnanensis* [J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2019, 34(1): 132-137.

[8] ELDEGHIDY A, ABDEL-FATTAH G, EL-SAYED A S A, et al. Production, bioprocessing and antiproliferative activity of camptothecin from *Aspergillus terreus*, endophyte of *Cinnamomum camphora*: restoring their biosynthesis by indigenous microbiome of *C. camphora* [J]. Microbial Cell Factories, 2023, 22(1): 143.

[9] 肖郑鹏，朱亚婷，张雨轩，等. 产石杉碱甲内生真菌的复壮及产量提高研究 [J]. 微生物学报，2023，63(11)：4372-4382.
XIAO Z P, ZHU Y T, ZHANG Y X, et al. Rejuvenation and yield improvement of a huperzine A producing endophytic fungus [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(11): 4372-4382.

[10] LE T T M, HOANG A T H, LE T T B, et al. Isolation of endophytic fungi and screening of Huperzine A-producing fungus from *Huperzia serrata* in Vietnam [J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 16152.

[11] EL-SAYED E S R, ZAKI A G, AHMED A S, et al. Production of the anticancer drug taxol by the endophytic fungus *Epicoccum nigrum* TXB502: enhanced production by gamma irradiation mutagenesis and immobilization technique [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(16): 6991-7003.

[12] 王维夫，钱亚光，卢萍，等. 内蒙古不同小花棘豆种群苦马豆素及其内生真菌关系的分析 [J]. 畜牧兽医学报，2022，53(1)：304-314.
WANG W F, QIAN Y G, LU P, et al. The relationship between swainsonine and endophytic fungi in different populations of *Oxytropis glabra* from Inner Mongolia [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2022, 53(1): 304-314.

[13] ZHANG X G, GUO S J, WANG W N, et al. Diversity and bioactivity of endophytes from *Angelica sinensis* in China [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1489.

[14] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]//PCR Protocols. Amsterdam: Elsevier, 1990: 315-322.

[15] GLASS N L, DONALDSON G C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(4): 1323-1330.

[16] CARBONE I, KOHN L M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes [J]. Mycologia, 1999, 91(3): 553-556.

[17] BERBEE M L, PIRSEYEDI M, HUBBARD S. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences [J]. Mycologia, 1999, 91(6): 964-977.

[18] WOUDENBERG J H C, TRUTER M, GROENEWALD J Z, et al. Large-spored *Alternaria* pathogens in section *Porri* disentangled [J]. Studies in Mycology, 2014, 79: 1-47.

[19] 谢华蓉，徐在超，刘军，等. 广藿香内生真菌多样性及其对青枯菌的拮抗活性 [J]. 微生物学通报，2017，44(5)：1171-1181.
XIE H R, XU Z C, LIU J, et al. Diversity and the antagonistic activities of endophytic fungi from patchouli against *Ralstonia solanacearum* [J]. Microbiology China, 2017, 44(5): 1171-1181.

[20] 张青青，董醇波，梁宗琦，等. 不同产地杜仲树皮可培养内生真菌群落组成和多样性 [J]. 菌物学报，2021，40(10)：2685-2699.
ZHANG Q Q, DONG C B, LIANG Z Q, et al. Community composition and diversity of culturable endophytic fungi in bark of *Eucommia ulmoides* from different regions of China [J]. Mycosystema, 2021, 40(10): 2685-2699.

[21] 顾沛雯，王文凯，鞠明岫. 一种喹诺里西啶生物碱快速检测的方法及试剂盒：CN117491126A [P]. 2024-02-02.
GU P W, WANG W K, JU M X. A method and kit for the rapid detection of quinolizidine alkaloids: CN117491126A [P]. 2024-02-02.

[22] 周星辰，郝丽，张伟，等. 产喹诺里西啶碱苦豆子内生真菌的筛选与鉴定 [J]. 农业科学研究，2013，34(1)：28-32.
ZHOU X C, HAO L, ZHANG W, et al. Screening and identification of quinolizidine alkaloid-forming of endophytic fungi from *Sophora alopecuroides* [J]. Journal of Agricultural Sciences, 2013, 34(1): 28-32.

[23] ZHOU Z Y, LIU X, CUI J L, et al. Endophytic fungi and their bioactive secondary metabolites in medicinal Leguminosae plants: nearly untapped medical resources [J]. FEMS Microbiology Letters, 2022, 369(1): fnac052.

[24] HUANG W, CAI Y, HYDE K, et al. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants [J]. Fungal Diversity, 2008, 33(61): 75.

[25] GU H P, ZHANG S K, LIU L, et al. Antimicrobial potential of endophytic fungi from *Artemisia argyi* and bioactive metabolites from *Diaporthe* sp. Ac1 [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 908836.

[26] HUANG L Q, NIU Y C, SU L, et al. The potential of endophytic fungi isolated from cucurbit plants for biocontrol of soilborne fungal diseases of cucumber [J]. Microbiological Re-

search,2020,231:126369.

[27] SINGH A,SINGH D K,KHARWAR R N,et al. Fungal endophytes as efficient sources of plant-derived bioactive compounds and their prospective applications in natural product drug discovery:insights,avenues,and challenges [J]. Microorganisms,2021,9(1):197.

[28] KÖNGAS K,BAHRAM M,PÕLDMAA K. Host tree organ is the primary driver of endophytic fungal community structure in a hemiboreal forest [J/OL]. FEMS Microbiology Ecology, 2020, 96 (2): 2 [2024-08-27]. DOI: 10. 1093/femsec/fiz199.

[29] 顾美英,张志东,唐光木,等.黑果枸杞不同组织内生真菌群落组成及生态功能分析[J].菌物学报,2022,41(8):1254-1267.
GU M Y,ZHANG Z D,TANG G M,et al. Community composition and ecological function of endophytic fungi in different tissues of *Lycium ruthenicum* [J]. Mycosystema,2022,41(8):1254-1267.

[30] CUI L L,NOUSHAHI H A,ZHANG Y P,et al. Endophytic fungal community of *Huperzia serrata*: diversity and relevance to the production of huperzine A by the plant host [J]. Molecules,2021,26(4):892.

[31] 高媛,周星辰,孙牧笛,等.宁夏白芨滩国家级自然保护区苦豆子内生真菌多样性及生态分布[J].草地学报,2016,24(6):1309-1317.
GAO Y,ZHOU X C,SUN M D,et al. Diversity and ecological distribution of endophytic fungi of *Sophora alopecuroides* L. from Baijitan Nature Reserve of Ningxia [J]. Acta Agrestia Sinica,2016,24(6):1309-1317.

[32] 祁鹤兴,周星辰,胡美娟,等.宁夏白芨滩自然保护区苦豆子内生放线菌多样性及其分布[J].微生物学通报,2015,42(6):990-1000.
QI H X,ZHOU X C,HU M J,et al. Diversity and distribution of endophytic actinomycetes strains in *Sophora alopecuroides* L. from Baijitan Nature Reserve of Ningxia [J]. Microbiology China,2015,42(6):990-1000.

[33] DELGADO-BAQUERIZO M,ELDRIDGE D J,LIU Y R,et al. Global homogenization of the structure and function in the soil microbiome of urban greenspaces [J]. Science Advances,2021,7(28):eabg5809.

[34] GÓMEZ O C,LUIZ J H H. Endophytic fungi isolated from medicinal plants: future prospects of bioactive natural products from *Tabebuia/Handroanthus* endophytes [J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2018,102(21):9105-9119.

[35] KUMAR S,AHARWAL R P,JAIN R,et al. Bioactive molecules of endophytic fungi and their potential in anticancer drug development [J]. Current Pharmacology Reports,2021,7(2):27-41.

[36] LIU P J,ZHANG D K,SHI R R,et al. Antimicrobial potential of endophytic fungi from *Astragalus chinensis* [J]. 3 Biotech,2019,9(11):405.

[37] KURIAKOSE G C,LAKSHMANAN M D,BP A,et al. Extract of *Penicillium sclerotiorum* an endophytic fungus isolated from *Cassia fistula* L. induces cell cycle arrest leading to apoptosis through mitochondrial membrane depolarization in human cervical cancer cells [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy,2018,105:1062-1071.

[38] DUAN C,GE X N,WANG J C,et al. Ergosterol peroxide exhibits antiviral and immunomodulatory abilities against porcine deltacoronavirus (PDCoV) via suppression of NF-κB and p38/MAPK signaling pathways *in vitro* [J]. International Immunopharmacology,2021,93:107317.

[39] SAXENA S. Biologically active secondary metabolites from endophytic *Alternaria* species [M]//Endophytes, Singapore: Springer Singapore,2021:1-20.

[40] RANA S,SINGH S K,DUFOSSÉ L. Multigene phylogeny, beauvericin production and bioactive potential of *Fusarium strains* isolated in India [J]. Journal of Fungi, 2022, 8(7):662.

[41] VENUGOPALAN A,POTUNURU U R,DIXIT M,et al. Effect of fermentation parameters,elicitors and precursors on camptothecin production from the endophyte *Fusarium solani* [J]. Bioresource Technology,2016,206:104-111.

[42] TAN X M,ZHANG X Y,YU M,et al. Sesquiterpenoids and mycotoxin swainsonine from the locoweed endophytic fungus *Alternaria oxytropis* [J]. Phytochemistry, 2019, 164:154-161.

[43] TIWARI P,BAE H H. Endophytic fungi:key insights,emerging prospects,and challenges in natural product drug discovery [J]. Microorganisms,2022,10(2):360.

(责任编辑:陈丽)