DOI: 10. 11686/cyxb2025486 http://cyxb. magtech. com. cn
朱小姗, 龙胤芮, 段廷玉, 等. 丛枝菌根真菌与木霉菌对紫云英菌核病的防控效果及叶际细菌群落响应. 草业学报, 2026, 35(11): 52－63.
ZHU Xiao-shan, LONG Yin-rui, DUAN Ting-yu, *et al*. Effects of arbuscular mycorrhizal fungus and *Trichoderma* on the control of *Sclerotinia* rot of *Astragalus sinicus* and the response of phyllosphere bacterial communities. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(11): 52－63.

丛枝菌根真菌与木霉菌对紫云英菌核病的防控效果及叶际细菌群落响应

朱小姗, 龙胤芮, 段廷玉, 尚盼盼*
(兰州大学草种创新与草地农业生态系统全国重点实验室, 农业农村部草牧业创新重点实验室, 兰州大学草地农业科技学院, 甘肃 兰州 730020)

摘要: 紫云英是重要的豆科牧草和绿肥作物, 对提高土壤肥力和改善土壤生态有重要作用。近年来在我国江淮流域和沿江江南等地大力推广种植。菌核病是紫云英上常见且危害较重的真菌病害, 严重影响其生长和产量。丛枝菌根(arbuscular mycorrhizal, AM)真菌和木霉菌均具有提高植物抗病性的潜力, 但目前尚未有两者联合应用于紫云英菌核病防治的研究。因此, 通过温室盆栽试验, 研究分别接种 AM 真菌和木霉菌, 以及两者联合接种对紫云英生长发育及抗病能力的影响。结果表明, 核盘菌显著抑制紫云英生长, 致其茎部软腐倒伏。木霉菌单独施用可缓解危害, 使染病植株株高提升 11. 95%、发病率下降 26. 57%; 使染病植株过氧化氢酶(CAT)活性显著提高 24. 7%($P<0.05$)。但 AM 真菌与木霉菌菌联合接种产生负面效应, 显著降低发病植株地下生物量。对不同处理下的叶际细菌进行 16S 测序分析发现, 接种 AM 真菌和病原菌使叶际细菌扩增子序列变体(ASVs)增加。α多样性分析显示病原菌降低了 ACE 和 Shannon 指数, 而 AM 真菌、木霉菌及联合接种提高了发病条件下的α多样性。LEfSe 分析显示病原菌处理富集假单胞菌属和无色杆菌属细菌, 木霉菌处理富集寡养单胞菌属和芽孢杆菌属细菌。本研究揭示了紫云英叶际细菌群落对病原菌入侵及 AM 真菌、木霉菌接种的动态响应, 为紫云英菌核病生物防控提供了理论支撑。

关键词: 紫云英; 菌核病; 哈茨木霉菌; 丛枝菌根真菌; 生物防控; 叶际细菌; 多样性

Effects of arbuscular mycorrhizal fungus and *Trichoderma* on the control of *Sclerotinia* rot of *Astragalus sinicus* and the response of phyllosphere bacterial communities

ZHU Xiao-shan, LONG Yin-rui, DUAN Ting-yu, SHANG Pan-pan*
State Key Laboratory of Herbage Improvement and Grassland Agro-ecosystems, Key Laboratory of Grassland Livestock Industry Innovation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Pastoral Agriculture Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730020, *China*

Abstract: Milk vetch (*Astragalus sinicus*) is an important leguminous forage and green manure crop, playing a significant role in improving soil fertility and enhancing soil ecology. In recent years, it has been widely promoted and cultivated in the Jianghuai region and the Jiangnan area along the Yangtze River in China. *Sclerotinia* rot is a common and severe fungal disease affecting *A. sinicus*, significantly impacting its growth and yield. Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi and *Trichoderma* have the potential to enhance plant disease resistance, but there has been no research on the combined application of the two for the control of *A. sinicus* sclerotium disease. Therefore, this

收稿日期: 2025-12-01; 改回日期: 2026-01-12
基金项目: 国家绿肥产业技术体系(CARS-22)资助。
作者简介: 朱小姗(2004－), 女, 广西贺州人, 在读本科。E-mail: 320220901900@lzu. edu. cn
*通信作者 Corresponding author. E-mail: shangpp0903@163. com

study employed greenhouse pot experiments to investigate the effects of inoculating AM fungi and *Trichoderma* separately, as well as their combined inoculation, on the growth, development, and disease resistance of milk vetch. Results indicated that *Sclerotinia sclerotiorum* significantly inhibited milk vetch growth, causing stem soft rot and lodging. *Trichoderma* application alone mitigated damage, increasing infected plant height by 11.95% and reducing disease incidence by 26.57%. It also significantly elevated catalase (CAT) activity in infected plants by 24.7% ($P<0.05$). However, combined inoculation of AM fungi and *Trichoderma* produced adverse effects, markedly reducing the below-ground biomass of diseased plants. 16S sequencing analysis of the phyllosphere bacteria under different treatments revealed that inoculation with AM fungi and the pathogen increased the number of amplicon sequence variants (ASVs) in the phyllosphere bacterial community. Alpha diversity analysis indicated that the pathogen decreased the ACE and Shannon indices, while AM fungi, *Trichoderma*, and combined inoculation enhanced α diversity under diseased conditions. LEfSe analysis showed that the pathogen treatment enriched *Pseudomonas* and *Achromobacter* genera, while the *Trichoderma* treatment enriched *Stenotrophomonas* and *Bacillus* genera. This study elucidated the dynamic responses of the phyllosphere bacterial community of *A. sinicus* to pathogen invasion and inoculation with AM fungi and *Trichoderma*, providing data to assist the formulation of biological control measures for *Sclerotinia* disease in *A. sinicus*.

Key words: *Astragalus sinicus*; *Sclerotinia* rot; *Trichoderma harzianum*; arbuscular mycorrhizal fungi; biological control; phyllosphere bacteria; diversity

紫云英(*Astragalus sinicus*)又称红花草,隶属于豆科黄芪属,是一年生或越年生植物,在我国豆科牧草与绿肥作物中占据重要地位[1]。把紫云英翻压进土壤,能显著提升土壤肥力、优化土壤生态环境,还能助力农产品产量增加与品质提升,作用十分关键[2]。同时,它也是优质饲草,茎叶富含蛋白质和维生素,粗纤维含量低、品质优良,不仅适口性佳,消化吸收效果也很好[3]。无论是鲜草、干草、叶蛋白浓缩物,还是青贮饲料等多种形态,用其饲喂都能获得理想效果。紫云英的野生种群广泛分布于秦岭、淮河至五岭的广阔区域以及西南高原,人工栽培种则主要集中在长江流域及长江以南各地[4]。在我国南方,紫云英的种植十分普遍,传统种植模式中,农民常会将其作为绿肥翻耕入土,待其腐烂分解后,会释放出丰富养分,这些养分可有效替代部分化肥,满足作物生长所需。相关研究显示,当紫云英翻压量达22500 kg·hm^{-2}时,与化肥搭配施用,既能有效减少化肥施用量,还能进一步提升施肥效果[3]。

核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)侵染引发的菌核病,对作物与蔬菜具有毁灭性危害,在全球范围内造成了巨额经济损失[5-6]。该病害的发生会严重抑制紫云英的生长发育,导致其鲜草和种子产量大幅降低,因此紫云英菌核病的防治工作显得尤为关键。已有研究证实,当前广泛应用的化学防治方法,存在成本高昂且防治效果不理想的弊端[7]。丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhizal, AM)是自然界中分布广泛的土壤微生物类群,能够与超过80%的陆生植物建立共生关系[8]。AM 真菌与宿主植物形成共生体系后,可优化植物对土壤养分的吸收利用,促进植物生长,同时增强植物的抗病性,提升其对病原物的抵抗能力[7-9]。木霉菌(*Trichoderma* spp.)为丝状真菌,在土壤、植物体表、植物残体及根际环境中均有广泛分布。这类真菌能够诱导寄主植物激活自身防御系统,使其获得抗病性[10]。部分内生木霉菌可产生多种生物活性物质,如抗生素、细胞壁分解酵素等,还能通过营养竞争、寄生作用以及诱导植物自身产生抗性等多重机制,对植物病原真菌和细菌发挥拮抗效应,进而实现对植物病害的有效防控[11]。

木霉菌和AM真菌可以有效防治植物病原真菌。目前,对于真菌联合作用抗菌核病的研究主要集中在蔬菜类作物[11-12],关于真菌联合作用对绿肥作物紫云英抗菌核病的研究还未见报道。鉴于化学防治紫云英菌核病对环境造成的压力,有必要研发环境友好型的微生物促生生防菌剂。因此本研究拟通过温室盆栽试验,以紫云英为植物材料,接种AM真菌和木霉菌,比较其生长与生化指标差异以期解析AM真菌和木霉菌联合作用对紫云英响

应菌核病原菌侵染的影响，揭示其调控紫云英抗病性的机制，为评价两类微生物的生防潜力提供理论依据，为研究抗菌核病提供新思路。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试植物为弋江籽紫云英(Yijiangzi)，种子由安徽省农业科学院提供，盆栽试验于2024年在兰州大学榆中校区陇山堂实验室进行。

供试病原菌为核盘菌，由兰州大学草地农业科技学院草种创新与草地农业生态系统全国重点实验室分离鉴定所得。

供试木霉菌为哈茨木霉菌(*Trichoderma harzianum*)，AM真菌菌剂为扭形球囊霉(*Sieverdingia tortuosa*)，购买于中国丛枝菌根真菌菌种保藏中心，用河沙培养白三叶(*Trifolium repens*)扩繁所得，将白三叶根段和培养基质混合均匀作为接种物。

1.2 试验设计

盆栽试验于2024年7月在光照培养箱(KHG-300B，科恒，中国)进行，温度为25 ℃，相对湿度为60%～80%，光照强度为8000 lx，光照周期为光照期12 h，黑暗期12 h。试验用土由草炭土和沙子两部分组成，草炭土在高压灭菌器(GR60DA，致微，中国)中进行两次灭菌处理，每次持续1 h，两次处理间隔24 h。沙子过2 mm筛后，在170 ℃烘箱中进行5 h的干热灭菌。之后将草炭土与沙子按照1∶3的比例混合均匀即为土壤基质。共设8个处理(表1)，每个处理设置5个重复，共计40盆，每盆加土壤基质1200 g(含AM菌剂)。

表1 8种试验处理的编号及操作时间安排

Table 1 Treatment codes and timing of experimental manipulations of the eight treatment

处理 Treatment	编号 Code	第3周 Week 3 (3 w)	第4周 Week 4 (4 w)
未接种 None	NMT－S－	/	收获 Harvest
仅接种哈茨木霉菌 Inoculated with *T. harzianum* only	NMT＋S－	/	收获 Harvest
仅接种扭形球囊霉 Inoculated with *S. tortuosa* only	AMT－S－	/	收获 Harvest
接种扭形球囊霉和哈茨木霉菌 Inoculated with *S. tortuosa* and *T. harzianum*	AMT＋S－	/	收获 Harvest
仅接种核盘菌 Inoculated with *S. sclerotiorum* only	NMT－S＋	核盘菌 *S. sclerotiorum*	收获 Harvest
接种哈茨木霉菌和核盘菌 Inoculated with *T. harzianum* and *S. sclerotiorum*	NMT＋S＋	核盘菌 *S. sclerotiorum*	收获 Harvest
接种扭形球囊霉和核盘菌 Inoculated with *S. tortuosa and S. sclerotiorum*	AMT－S＋	核盘菌 *S. sclerotiorum*	收获 Harvest
接种扭形球囊霉、哈茨木霉菌和核盘菌 Inoculated with *S. tortuosa*, *T. harzianum* and *S. sclerotiorum*	AMT＋S＋	核盘菌 *S. sclerotiorum*	收获 Harvest

注：NM表示未接种丛枝菌根真菌；AM表示接种丛枝菌根真菌；S＋表示接种核盘菌；S－表示未接种核盘菌；T＋表示接种哈茨木霉菌；T－表示未接种哈茨木霉菌。

Note: NM indicates no inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi; AM indicates inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi; S+ indicates inoculation with *S. sclerotiorum*; S− indicates no inoculation with *S. sclerotiorum*; T+ indicates inoculation with *T. harzianum*; T− indicates no inoculation with *T. harzianum*.

AM真菌处理：称取25 g AM菌剂(孢子浓度＞50个孢子·g^{-1})，与1175 g土壤基质混合均匀后装盆，对照组菌剂(nonmycorrhizal, NM)替换为等质量土壤基质，以保证菌剂中其他微生物种类相同。

哈茨木霉菌处理：采用直接接种法接种，播种前将哈茨木霉菌发酵液按1∶10的比例稀释，每盆加100 mL菌液与土壤基质均匀混合，完成接种；对照组用等体积无菌水代替木霉菌发酵液。

栽培植株：挑选外形一致且表面无伤的紫云英种子，使用10% H_2O_2对种子表面进行消毒处理，再用无菌水冲洗，后将种子置于25 ℃的恒温培养箱(HH-B11.250-BY，上海)中进行催芽，待种子露白后播种。每盆播入8粒种

子，播种深度约 1 cm。出苗一周后，选择长势一致的幼苗保留 6 株。

病原菌接种处理：待植株生长 3 周之后进行病原菌接种处理，将 20 mL 核盘菌孢子悬浮液（孢子浓度：4×10^6 个孢子·mL^{-1}）接种于紫云英，对照组以等量无菌水代替，接种后，套袋保湿 24 h，植株发病后一周收获。

1.3　指标测定

植株生长指标测定：每个花盆中选取长势均一的 4 株植株进行生长性状测定。采用直尺测定株高（自然高度），记录每个植株上所有的叶片和分枝数。刈割后立即称其鲜重，烘干测定干重。

每个花盆中选取长势均一的 4 株植株的所有叶片进行发病情况统计，分级标准[13−14]如下：

1）0 级：无病；1 级：轻微发病，发病面积占主茎表面积的 5% 以下；3 级：轻度发病，发病面积占主茎表面积的 6%～15%；5 级：中等发病，发病面积占主茎表面积的 16%～30%；7 级：高度发病，发病面积占主茎表面积的 31%～50%；9 级：严重发病，发病面积占主茎表面积的 50% 以上。

2）$发病率=\dfrac{病叶数}{调查总叶数}\times100\%$

3）$病情指数=100\times\dfrac{\sum 各级病叶数\times各级代表值}{调查总叶数\times最高级代表值}$

防御性酶活性测定：每盆随机取 2.5 g 新鲜的紫云英叶片样品于研钵中，加入少量 pH 为 7.8 的磷酸缓冲溶液，研磨成匀浆后转移至 25 mL 容量瓶中，使用相同的缓冲液冲洗研钵，并将冲洗液转至容量瓶中，用同一缓冲液定容，随后以 4000 r·min^{-1} 的速度离心 15 min，上清液即为酶的粗提液。采用氮蓝四唑（nitroblue tetrazolium，NBT）光化学还原法测定超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）活性；采用愈创木酚比色法测定过氧化物酶（peroxidase，POD）活性；采用比色法测定多酚氧化酶（polyphenol oxidase，PPO）活性；采用高锰酸钾滴定法测定过氧化氢酶（catalase，CAT）活性；采用硫代巴比妥酸反应物质（thiobarbituric acid reactive substances，TBARS）法测定丙二醛（malondialdehyde，MDA）含量，采用蒽酮法测定可溶性糖（soluble sugars，SS）含量。测定方法均参考李合生等[15]的《植物生理生化实验原理与技术》。

叶际细菌 DNA 提取及 16S rRNA 高通量测序：每盆随机取 2 g 叶片放入含有 150 mL 无菌缓冲液（0.1 mol·L^{-1} 磷酸钾缓冲液，含 0.1% 甘油和 0.15% 吐温 80，pH 7.0）的 250 mL 无菌玻璃瓶中，在 40 kHz 频率下超声处理 1 min，接着在 200 r·min^{-1} 的摇床振荡 4 min，此过程重复 2～3 次，完成对微生物细胞的收集。将微生物细胞缓冲液通过 0.22 μm 的滤膜进行过滤，完成外源微生物细胞的收集。在超净工作台上，使用无菌剪刀将滤膜剪碎，并使用 Power Soil DNA 提取试剂盒，按照说明书指示进行 DNA 提取。使用 Nano Drop ND-1000 分光光度计（赛默飞世尔科技，美国）和琼脂糖凝胶电泳评估提取总群落的 DNA 数量和质量。借助 Illumina Miseq 测序平台对细菌 16S rRNA 基因片段（V3～V4 区域）进行 PCR 扩增。通过使用 DADA 2 算法作为 QIIME 2 的插件，从原始序列中消除低质量序列，包括平均质量分数＜20，长度＜250 bp，含有模糊碱基，或无有效引物序列、条形码序列的低质量序列。剩余序列只包含高质量读段。使用 SILVA16S rRNA 数据库（https://www.arb-silva.de/）对细菌序列的扩增子序列变异进行分类鉴定（相似性为 99%）。

1.4　数据处理与分析

使用 Microsoft Excel 2021 对试验数据进行初步整理，并用 IBM SPSS 20.0 软件进行统计分析。不同处理之间的差异显著性使用单因素方差分析（one-way ANOVA）处理，使用 GraphPad Prism 8 进行作图，平均值使用 Tukey HSD 检验进行比较。

2　结果与分析

2.1　植株生长指标

接种核盘菌 3～4 d 后植株茎部出现水渍状和淡褐色病斑，部分为褐色或黑褐色，茎部组织软腐，引起倒伏。健康植株试验期间未见菌核病病害症状（图 1a）。结果显示，仅接种病原菌处理相较健康植株降低了株高、叶片数和地上生物量，其中接种病原菌时株高比未接种显著降低了 14.8%（$P<0.05$，图 1b）；仅接种病原菌对分枝数

无显著影响,但接种AM真菌和木霉菌处理下,接种病原菌处理使分枝数降低(图1c)。接种病原菌之后,相较于未接种木霉菌处理(NMT－S＋),木霉菌单独处理使株高显著增加了11.95%(图1b);使发病率和病情指数分别显著降低26.57%和38.19%(图1g,h)。单独接种AM真菌使健康紫云英叶片数、地上生物量和地下生物量相较于未接种的健康叶片分别增加了10.98%、8.09%和67.08%(图1d～f);同时,使接种病原菌紫云英的叶片数增加了8.46%(图1d)。值得注意的是,AM真菌、木霉菌和病原菌三者交互效应结果显示,AM真菌和木霉菌联合接种反而使发病植株地下生物量显著降低58.73%,使病情指数显著升高84.77%($P<0.05$,图1f和h,表2)。

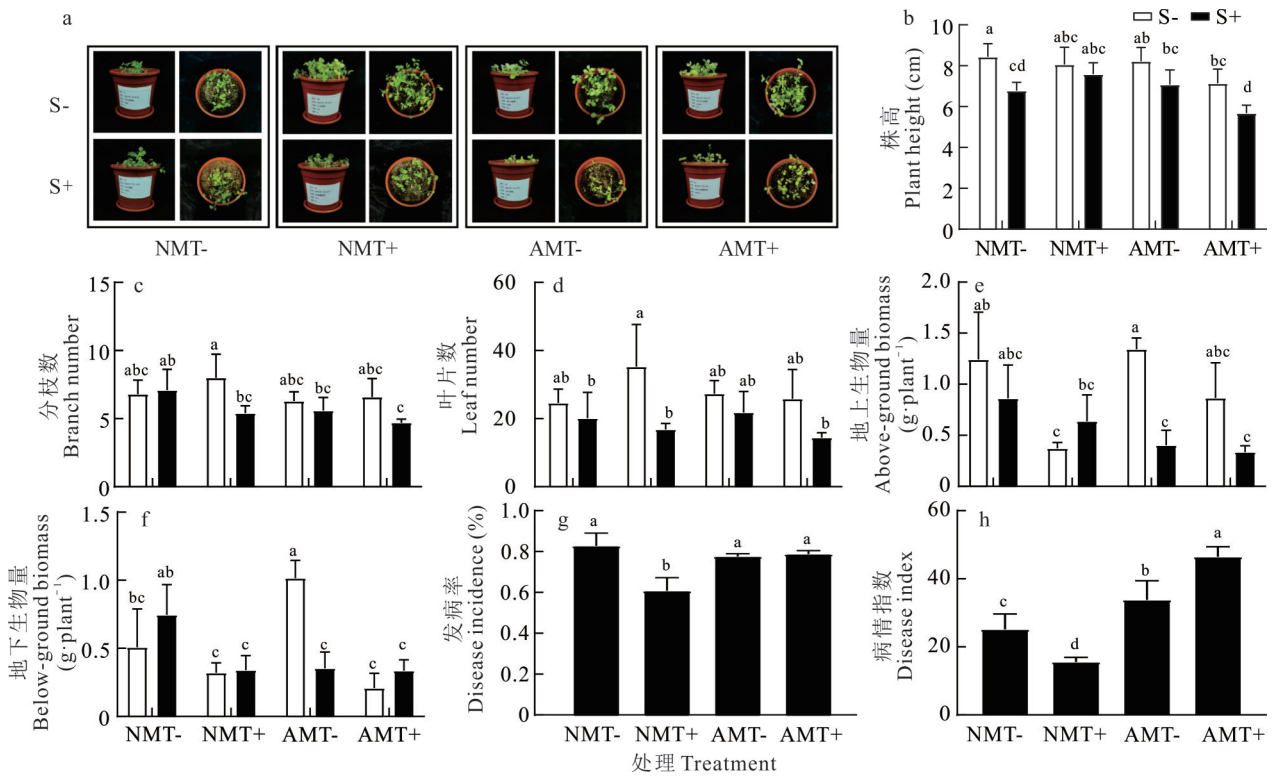


图1 不同接种处理下的植物生长情况

Fig. 1 Plant growth under different inoculation treatments

(a):植株生长情况 Plant growth status;(b):株高 Plant height;(c):分枝数 Branch number;(d):叶片数 Leaf number;(e):地上生物量 Above-ground biomass;(f):地下生物量 Below-ground biomass;(g):发病率 Disease incidence;(h):病情指数 Disease index. 误差棒代表平均值±标准偏差($n=5$)。不同的字母表示经Duncan检验后($P<0.05$)处理间存在显著差异。下同。Each bar represents mean±standard deviation ($n=5$). Different letters indicate significant differences among treatments by Duncan's test at $P<0.05$. The same below.

2.2 植物生理指标

AM真菌和木霉菌联合接种使病原菌侵染下紫云英的PPO活性增加(图2a);各不同接种处理对POD和SOD活性均未造成显著影响(图2b和d)。NM处理下,病原菌侵染使紫云英的CAT活性降低,但接种木霉菌后CAT活性显著提高24.7%($P<0.05$,表2和图2c)。病原菌侵染显著提高了植株的MDA含量($P<0.05$),但对可溶性糖含量的影响不显著($P>0.05$,图2e和f),AM真菌、木霉菌对植株可溶性糖含量均没有显著影响(图2f)。

2.3 叶际细菌多样性

2.3.1 物种组成与群落多样性 对不同处理下的紫云英叶际细菌进行16S测序分析。门和属水平Top10的物种分布结果显示,接种病原菌、AM真菌和木霉菌均使紫云英叶际细菌物种组成和相对丰度发生改变。门水平上,主要由变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteriota)、拟杆菌门(Bacteroidota)、芽单胞菌门(Gemmatimonadota)、酸杆菌门(Acidobacteriota)和黏球菌门(Myxococcota)组成;其中,菌核病病原菌抑制了放线菌门和芽单胞菌门的相对丰度,促进了变形菌门的相对丰度,但是接种AM真菌和

表 2　丛枝菌根真菌、木霉菌和病原菌及三者互作效应的方差分析

Table 2　Analysis of variance for arbuscular mycorrhizal fungi (AM), *Trichoderma* (T), pathogenic fungi (S) and their interactions

指标 Parameter	互作效应 Interactions effect						
	丛枝菌根真菌 Arbuscular mycorrhizal (AM)	木霉菌 *Trichoderma* (T)	核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum* (S)	AM×T	AM×S	T×S	AM×T×S
株高 Plant height (PH)	0.002	0.016	<0.001	<0.001	NS	NS	NS
叶片数 Leaf number (LN)	NS	NS	<0.001	NS	NS	0.025	NS
分枝数 Number of branch (BN)	0.007	NS	0.001	NS	NS	0.007	NS
地上生物量 Above-ground biomass (AGB)	NS	<0.001	<0.001	NS	0.001	0.009	NS
地下生物量 Below-ground biomass (BGB)	NS	<0.001	NS	NS	0.002	0.019	<0.001
发病率 Disease incidence	0.004	<0.001	<0.001	NS	0.004	<0.001	NS
病情指数 Disease index	<0.001	NS	<0.001	<0.001	<0.001	NS	<0.001
超氧化物歧化酶活性 Superoxide dismutase activity (SOD)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
过氧化物酶活性 Peroxidase activity (POD)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
过氧化氢酶活性 Catalase activity (CAT)	<0.001	NS	0.006	NS	NS	0.013	<0.001
多酚氧化酶活性 Polyphenol oxidase activity (PPO)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
丙二醛含量 Malondialdehyde content (MDA)	NS	NS	<0.001	NS	NS	0.010	NS
可溶性糖含量 Soluble sugar content (SS)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

注：NS 表示无显著影响（$P>0.05$）。

Note: NS indicates no significant effect ($P>0.05$).

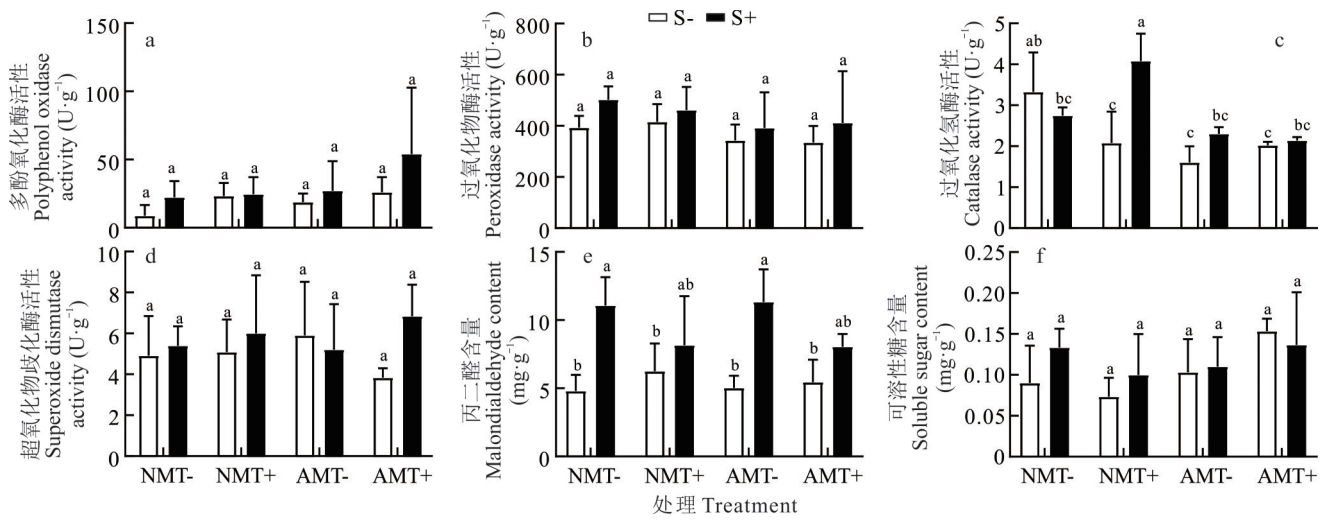


图 2　不同接种处理下的生理指标变化

Fig. 2　Changes in physiological indices under different inoculation treatments

木霉菌之后结果相反（图 3a）。属水平上，主要由假单胞菌属（*Pseudomonas*）、甲基过食菌属（*Methyloversatilis*）、寡养单胞菌属（*Stenotrophomonas*）、葡萄球菌属（*Staphylococcus*）和芽孢杆菌属（*Bacillus*）组成；其中接种病原菌使寡养单胞菌属和葡萄球菌属的相对丰度增加（图 3b）。扩增子序列变体（amplicon sequence variants，ASVs）统计结果显示，接种病原菌使其数目减少，而 AM 真菌和木霉菌接种均使其数目增加，其中 AM 真菌和木霉菌联合接种（AMT＋S－）时数目最多，共有 2554 个叶际细菌 ASVs（图 3c）。

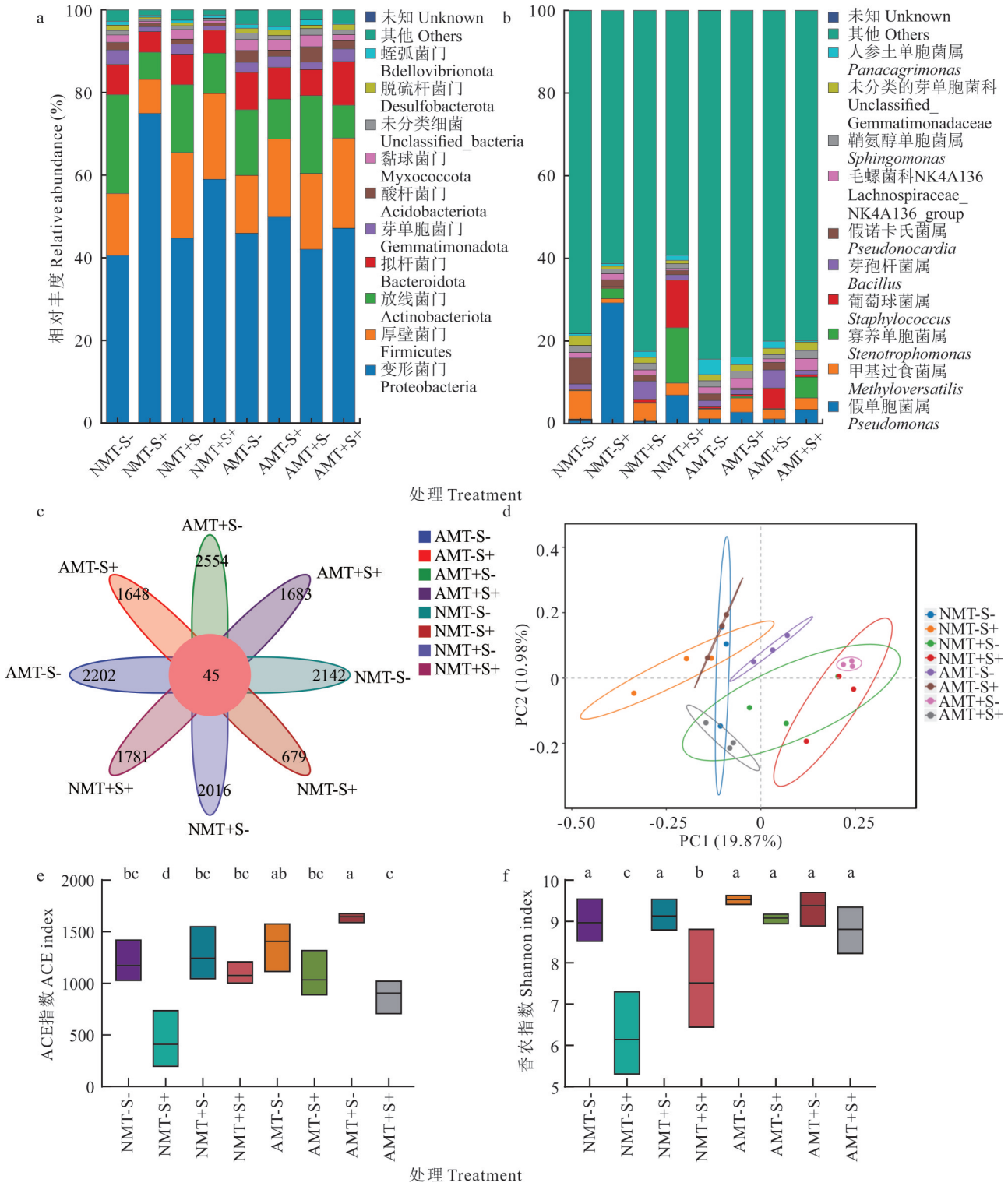


图3 不同接种处理下细菌物种组成及群落多样性

Fig. 3 Bacterial species composition and community diversity under different inoculation treatments

(a)：门水平下的物种组成 Species composition at the phylum level；(b)：属水平下的物种组成 Species composition at the genus level；(c)：不同处理组扩增子序列变体花瓣图 Petalograms of amplicon sequence varians in different treatment groups；(d)：不同处理样本的主坐标分析 Principal co-ordinates analysis of samples from different treatments.

基于 Bray-Curtis 距离矩阵的主坐标轴分析(principal co-ordinates analysis，PCoA)来表征接种 AM 真菌和木霉菌对紫云英叶际细菌的群落结构差异。PCoA 结果表明，PC1 解释了 19.87% 的变异度，PC2 解释了 10.98% 的变异度(图 3d)。α 多样性分析结果表明，不同接种处理下叶际细菌 ACE 和 Shannon 指数均有显著差异。相较

于对照(NMT-S-),接种病原菌(NMT-S+)使 ACE 和 Shannon 指数显著降低($P<0.05$);而较于 NMT-S+,AM 真菌、木霉菌和联合接种均使 ACE 和 Shannon 指数显著提高($P<0.05$,图 3e 和 f)。

2.3.2　组间差异分析　　通过 LEfSe 分析(线性判别分值 linear discriminant analysis score, LDA score≥3.0)确定了在不同接种处理条件下的生物标志物(biomarkers),以探索叶际细菌的响应。结果显示,各个不同接种处理下的叶片均富集了不同的细菌类群。值得注意的是,假单胞菌属(*Pseudomonas*)和无色杆菌属(*Achromobacter*)在接种病原菌(NMT-S+)时富集;寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)分别在接种木霉菌(NMT+S-和 NMT+S+)处理时富集(图 4a,b)。

2.3.3　相关性与关联分析　　为了了解不同细菌类群之间网络相互作用的差异,利用 ASVs 构建了不同接种处理下细菌物种之间的共生网络(图 5a)。其中,变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidota)、厚壁菌门(Firmicutes)和放线菌门(Actinobacteriota)具有更高的网络连接度。

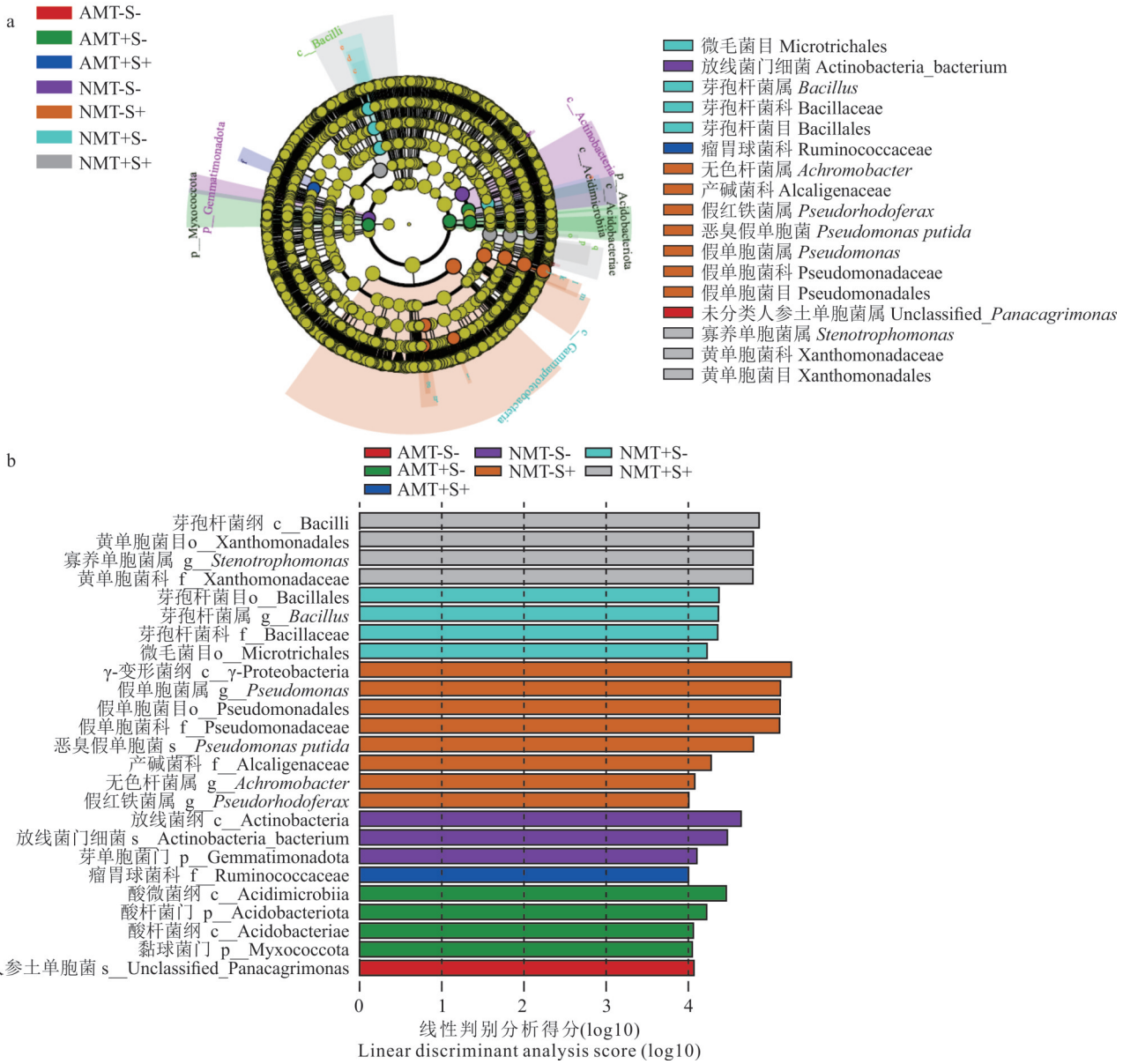


图 4　不同接种处理下的生物标志物

Fig. 4　Biomarkers under different inoculation treatments

(a): LEfSe 分析进化分枝图 Evolutionary branching diagram of LEfSe analysis; (b): LDA 值分布柱状图 Histogram of linear discriminant analysis value distribution.

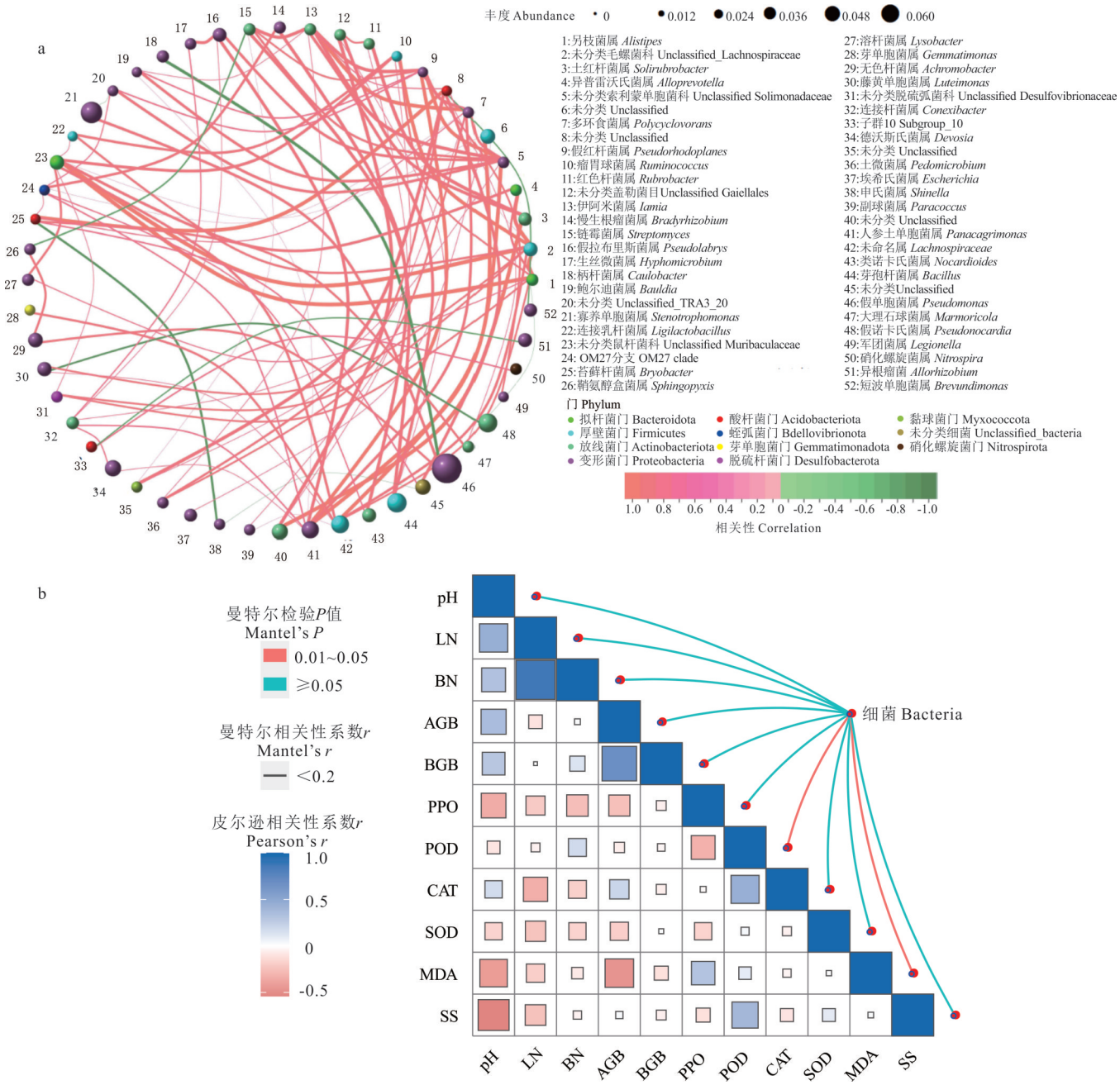


图5 细菌类群之间网络互作及生理指标相关性分析

Fig. 5 Analysis of network interactions among bacterial communities and the correlation of physiological indicators

(a): 属水平各物种网络图 Network diagram of each species at the genus level; (b): 植物生理指标相关性分析及叶际细菌扩增子序列变体的曼特尔分析 Correlation analysis of plant physiological indicators and Mantel analysis of interleaf bacterial amplicon sequence varians.

对植物生理指标相关性及叶际细菌ASVs的Mantel分析结果显示，株高和叶片数呈显著正相关，与MDA和可溶性糖含量呈显著负相关($P<0.05$)；分枝数和叶片数呈极显著正相关($P<0.01$)；地上生物量和地下生物量呈极显著正相关，与MDA含量呈显著负相关；CAT和POD活性呈显著正相关。Mantel检验结果显示，叶际细菌多样性与植物叶片POD活性和MDA含量呈显著正相关($P<0.05$，图5b)。

3 讨论

本研究通过温室盆栽试验，探究了AM真菌和木霉菌对紫云英抗菌核病的影响。结果表明接种AM真菌和木霉菌通过调节紫云英生理活动，并改变叶际细菌组成和多样性，进而影响其生长和抗病性，为紫云英菌核病的

生物防治提供了理论依据。

核盘菌侵染对紫云英生长产生显著抑制作用，不仅导致株高、叶片数量等核心生长指标明显降低，还引发茎部软腐、植株倒伏等典型病害特征，与核盘菌的致病机理高度契合。该病原菌主要通过分泌细胞壁降解酶类破坏植物组织结构，干扰机体正常代谢平衡，最终导致植株生长受阻[16-17]。单独接种木霉菌处理使紫云英株高提升11.95%，同时有效降低病害发生率与病情指数。其作用机制可能源于木霉菌分泌的几丁质酶、抗菌肽等活性物质可直接抑制核盘菌增殖[18]；同时通过诱导紫云英产生系统抗性，增强植株自身的防御能力[19-20]。但是，单独接种AM真菌对紫云英的作用呈现明显环境依赖性，在无病原菌胁迫的健康环境中，AM真菌能促进植株叶片数量增加及地下生物量积累，这得益于其扩大根系吸收面积、优化养分供应的促生特性；但在核盘菌侵染条件下，AM真菌与木霉菌联合接种反而加剧了病情，导致发病植株地下生物量显著下降[21]。这一特殊现象提示，两种微生物的互作效应可能受病原菌胁迫强度调控，或存在资源竞争、信号通路拮抗等复杂机制[22-23]。而方差分析结果显示三者交互效应对地下生物量影响显著（$P<0.05$），进一步印证了这一推测。

植物抗氧化系统与渗透调节物质的动态变化是应对生物胁迫的关键生理响应[24-25]。本研究发现，核盘菌侵染导致紫云英体内丙二醛（MDA）含量显著升高，表明植株细胞膜遭受严重氧化损伤。AM真菌与木霉菌联合处理可诱导多酚氧化酶（PPO）活性提升，作为酚类代谢关键酶，PPO能催化酚类物质氧化形成抑菌屏障，从而增强植株抗病性[26]。木霉菌单独处理则使过氧化氢酶（CAT）活性提高，证实其可通过强化抗氧化系统清除活性氧，减轻细胞膜脂质过氧化伤害[27]。值得注意的是，各处理对超氧化物歧化酶（SOD）和过氧化物酶（POD）活性无显著影响，但CAT与POD活性呈显著正相关，这可能反映出不同抗氧化酶的功能互补性，或紫云英在核盘菌胁迫下优先启动CAT介导的防御途径[28]。此外，病原菌侵染未显著改变可溶性糖含量，这与多数植物生物胁迫下可溶性糖积累的规律不符，推测紫云英可能通过脯氨酸等其他渗透调节物质维持细胞渗透压，该差异或与物种特性及胁迫强度相关。

叶际细菌群落作为植物微生态系统的核心组成，其结构变化与植株健康密切相关[29-31]。核盘菌侵染显著改变紫云英叶际细菌物种构成，降低放线菌门等有益菌群丰度，增加寡养单胞菌属等潜在致病菌比例，同时导致ASVs数目、ACE指数及Shannon指数下降，表明病原菌通过破坏微生态平衡抑制细菌多样性[32]。AM真菌和木霉菌接种可逆转该趋势，提升叶际细菌多样性，LEfSe分析显示木霉菌处理能显著富集芽孢杆菌属等生防菌，这些菌群可通过产生抗菌物质、竞争生态位，增强植物抗病性，构建“微生物－植物”协同防御网络[33-34]。Mantel分析证实叶际细菌多样性与POD活性、MDA含量显著正相关，结合地上生物量与MDA含量负相关的生理指标结果，表明叶际微生态优化可通过调节抗氧化系统功能减轻氧化损伤，进而促进生长[35]。这一关联揭示了叶际微生态与植物抗逆生理的协同调控机制，为微生物调控技术改善植物健康提供了理论支撑。

4　结论

核盘菌的侵染引起紫云英植株的生理生化特征发生变化。AM真菌和木霉菌在不同程度上影响了紫云英的生长和抗病性。其中，AM真菌通过与紫云英根系共生，促进植物生长，从而改变其对病原菌的抗性；木霉菌通过激发植物防御系统抵抗病原菌的侵染和抑制病原菌，并有效促进紫云英生长，是紫云英菌核病生物防控的有效措施。

参考文献 References：

[1] Liu C L, He C M, Wang L M, *et al*. The study on comprehensive value of Chinese milk vetch as forage and green manure. Acta Agrestia Sinica, 2020, 28(3): 857-862.
刘彩玲, 何春梅, 王利民, 等. 紫云英作为饲草和绿肥综合利用价值的研究. 草地学报, 2020, 28(3): 857-862.

[2] Cao W D, Huang H X. Ideas on restoration and development of green manures in China. Soils and Fertilizer Sciences in China, 2009(4): 1-3.
曹卫东, 黄鸿翔. 关于我国恢复和发展绿肥若干问题的思考. 中国土壤与肥料, 2009(4): 1-3.

[3] Zhan Y. Occurrence and control techniques of *Sclerotinia* disease in forage *Astragalus sinicus*. China Agricultural Information,

2015(20): 94－95.
詹杨. 饲用紫云英菌核病发生与防治技术. 中国农业信息, 2015(20): 94－95.

[4] Shi H F, Guo Z F. Advances in research on germplasm resources and genetic breeding of *Astragalus sinicus*. Pratacultural Science, 2020, 37(12): 2507－2519.
施海帆, 郭振飞. 紫云英种质资源与遗传育种研究进展. 草业科学, 2020, 37(12): 2507－2519.

[5] Bolton M D, Thomma P H J, Nelson B D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. Molecular Plant Pathology, 2006, 7(1): 1－16.

[6] Li E C, Xi Z, Zhu N, *et al*. Research advances on biocontrol of sclerotinia rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2023, 38(4): 714－724.
李恩琛, 郗征, 朱娜, 等. 核盘菌引起的菌核病生物防治研究进展. 云南农业大学学报(自然科学), 2023, 38(4): 714－724.

[7] Jia H M, Fang Q, Zhang S H, *et al*. Effects of AM fungi on growth and rhizosphere soil enzyme activities of *Salvia miltiorrhiza*. Acta Prataculturae Sinica, 2020, 29(6): 83－92.
贾红梅, 方千, 张秋华, 等. AM真菌对丹参生长及根际土壤酶活性的影响. 草业学报, 2020, 29(6): 83－92.

[8] Li X Y, Yi L T, Li Y, *et al*. Advances in research on plant tolerance to abiotic stress by arbuscular mycorrhizal fungi. Journal of Zhejiang Forestry Science and Technology, 2022, 42(1): 101－110.
李晓芸, 伊力塔, 李彦, 等. 丛枝菌根真菌提高植物非生物胁迫耐受性研究进展. 浙江林业科技, 2022, 42(1): 101－110.

[9] Wang G J, Xia S, Cui Y N, *et al*. Effects of AM fungi on plant stress resistance and the mechanisms. Journal of Changchun Normal University, 2019, 38(12): 79－81.
王桂君, 夏霜, 崔亚男, 等. AM真菌对植物抗逆性的影响及机制探讨. 长春师范大学学报, 2019, 38(12): 79－81.

[10] Zhang W, Yang J Y, Lu X, *et al*. A preliminary study of the antifungal activity and antagonism mechanisms of *Trichoderma* spp. against turfgrass pathogens. Acta Prataculturae Sinica, 2021, 30(9): 137－149.
章武, 杨锦玉, 卢翔, 等. 木霉菌对草坪草病原菌的抑菌效果及其机理初步研究. 草业学报, 2021, 30(9): 137－149.

[11] Chen Y R. Screening and disease prevention mechanism of biocontrol *Trichoderma* against *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2022.
陈玉蓉. 向日葵菌核病生防木霉菌的筛选与防病机制研究. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2022.

[12] Liang W B. Diversity in mycoviruses of *Sclerotinia sclerotiorum* from America on pinto and garden bean. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2021.
梁炜博. 美国斑豆和菜豆菌核病菌中真菌病毒的多样性. 武汉: 华中农业大学, 2021.

[13] National Agricultural Technology Extension Service Center. Technical specification for the monitoring and reporting of sclerotinia stem rot in rapeseed: NY/T2038－2011. Beijing: China Agriculture Press, 2011.
全国农业技术推广服务中心. 油菜菌核病测报技术规范: NY/T2038－2011. 北京: 中国农业出版社, 2011.

[14] Yang G, Qiao L, Lv Y H, *et al*. Field control effect of five fungicides on *Sclerotinia trifoliorum*. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2017, 33(14): 109－112.
杨光, 乔利, 吕玉虎, 等. 5种杀菌剂对紫云英菌核病大田防效测定. 中国农学通报, 2017, 33(14): 109－112.

[15] Li H S, Sun Q, Zhao S J, *et al*. Principles and techniques of plant physiology and biochemistry experiments. Beijing: Higher Education Press, 2015.
李合生, 孙群, 赵世杰, 等. 植物生理生化实验原理与技术. 北京: 高等教育出版社, 2015.

[16] Lorrai R, Ferrari S. Host cell wall damage during pathogen infection: mechanisms of perception and role in plant-pathogen interactions. Plants, 2021, 10(2): 399.

[17] Munzert K S, Engelsdorf T. Plant cell wall structure and dynamics in plant-pathogen interactions and pathogen defence. Journal of Experimental Botany, 2025, 76(2): 228－242.

[18] Alfiky A, Weisskopf L. Deciphering *Trichoderma*-plant-pathogen interactions for better development of biocontrol applications. Journal of Fungi, 2021, 7(1): 61.

[19] Chakraborty B N, Chakraborty U, Sunar K. Induced immunity developed by *Trichoderma* species in plants//Anil K S, Pratibha S. Trichoderma: Host pathogen interactions and applications. Singapore: Springer Singapore, 2020: 125－147.

[20] Cai F, Chen W, Wei Z, *et al*. Colonization of *Trichoderma harzianum* strain SQR-T037 on tomato roots and its relationship to plant growth, nutrient availability and soil microflora. Plant and Soil, 2015, 338(1): 337－350.

[21] Shang P P, Zheng R C, Li Y D, *et al*. Effect of AM fungi on the growth and powdery mildew development of *Astragalus sinicus* L. under water stress. Plant Physiology and Biochemistry, 2025, 219: 109422.

[22] Li Y D, Duan T Y. Effects of AM fungi on alfalfa leaf spot caused by *Phoma medicaginis* and pea aphids *Acyrthosiphon pisum*. Chinese Journal of Ecology, 2020, 39(4): 1214－1221.
李应德, 段廷玉. AM真菌对紫花苜蓿茎点霉叶斑病及豌豆蚜为害的影响. 生态学杂志, 2020, 39(4): 1214－1221.

[23] Zhang W Z, Ding T T, Duan T Y. Effect of two kinds of arbuscular mycorrhizal fungi on plant growth and anthracnose of *Vicia sativa*. Pratacultural Science, 2020, 37(2): 320－329.
张伟珍, 丁婷婷, 段廷玉. 两种AM真菌对箭筈豌豆生长及炭疽病发生的影响. 草业科学, 2020, 37(2): 320－329.

[24] Anzano A, Bonanomi G, Mazzoleni S, *et al*. Plant metabolomics in biotic and abiotic stress: a critical overview. Phytochemistry Reviews, 2022, 21(2): 503－524.

[25] Mishra N, Jiang C K, Chen L, *et al*. Achieving abiotic stress tolerance in plants through antioxidative defense mechanisms. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1110622.

[26] Constabel C P, Barbehenn R. Defensive roles of polyphenol oxidase in plants//Andreas S. Induced plant resistance to herbivory. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 2008: 253－270.

[27] Fujita M, Hasanuzzaman M. Approaches to enhancing antioxidant defense in plants. Antioxidants, 2022, 11(5): 925.

[28] Selinski J, Scheibe R, Day D A, *et al*. Alternative oxidase is positive for plant performance. Trends in Plant Science, 2018, 23(7): 588－597.

[29] Gong T, Xin X F. Phyllosphere microbiota: Community dynamics and its interaction with plant host. Journal of Integrative Plant Biology, 2021, 63(2): 297－304.

[30] Chen T, Nomura K, Wang X, *et al*. A plant genetic network for preventing dysbiosis in the phyllospher. Nature, 2020, 580(7805): 653－657.

[31] Sohrabi R, Paasch B C, Liber J A, *et al*. Phyllosphere microbiome. Annual Review of Plant Biology, 2023, 74(1): 539－568.

[32] Wei Z, Hu J, Gu Y A, *et al*. *Ralstonia solanacearum* pathogen disrupts bacterial rhizosphere microbiome during an invasion. Soil Biology and Biochemistry, 2018, 118: 8－17.

[33] Li T, Shi X T, Wang J G, *et al*. Turning antagonists into allies: Bacterial-fungal interactions enhance the efficacy of controlling *Fusarium* wilt disease. Science Advances, 2025, 11(7): eads5089.

[34] Zhu R, Yan W, Wang Y J, *et al*. Plant growth-promoting rhizobacteria and *Trichoderma* shift common vetch (*Vicia sativa*) physiology and phyllosphere bacteria toward antagonism against anthracnose caused by *Colletotrichum spinaciae*. Grassland Research, 2024, 3(3): 275－289.

[35] Custodio V, Salas-González I, Gopaulchan D, *et al*. Individual leaf microbiota tunes a genetic regulatory network to promote leaf growth. Cell Host & Microbe, 2025, 33(3): 436－450.