

## 研究报告

## 三种药用兰科植物内生微生物多样性与功能分析

姚娜<sup>1</sup>, 王涛<sup>2</sup>, 王雁<sup>1</sup>, 孙嫚潞<sup>1</sup>, 郑宝强<sup>\*1</sup>, 曹晓璐<sup>\*1</sup>

1 中国林业科学研究院林业研究所 国家林业和草原局林木培育重点实验室 林木遗传育种国家重点实验室, 北京 100091

2 国家植物园(北园) 植物迁地保护国家林业和草原局重点实验室, 北京 100093

姚娜, 王涛, 王雁, 孙嫚潞, 郑宝强, 曹晓璐. 三种药用兰科植物内生微生物多样性与功能分析[J]. 微生物学通报, 2025, 52(3): 1166-1179.

YAO Na, WANG Tao, WANG Yan, SUN Manlu, ZHENG Baoqiang, CAO Xiaolu. Diversity and functions of endophytic microorganisms in three medicinal orchids[J]. Microbiology China, 2025, 52(3): 1166-1179.

**摘要:**【背景】兰科植物根部内生微生物在促进幼苗生长、提高植株环境适应性等方面发挥重要作用。【目的】通过对卵叶贝母兰(*Coelogyne occultata*)、竹叶兰(*Arundina graminifolia*)和手参(*Gymnadenia conopsea*)这3种药用兰科植物根部内生微生物进行多样性分析与菌株分离培养, 解析不同兰科植物内生微生物群落结构, 筛选功能性菌株。【方法】采用 Illumina MiSeq 高通量测序技术分析3种药用兰科植物根部内生微生物群落结构, 采用微生物分离培养方法分离根部内生细菌和内生真菌, 并进行功能菌株筛选。【结果】在属水平, 卵叶贝母兰和竹叶兰的内生微生物群落聚为一支。卵叶贝母兰、竹叶兰和手参内生细菌优势属分别为分枝杆菌属(*Mycobacterium*, 70.65%), 伯克霍尔德氏菌属-卡瓦列罗菌属-副伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*, 26.35%)和戈登氏菌属(*Gordonia*, 6.65%); 内生真菌优势属分别为镰刀菌属(*Fusarium*, 21.07%), 未分类柔膜菌目(unclassified *Helotiales*, 46.74%)和羊肚菌属(*Morchella*, 91.21%)。 *Pseudomonas nunensis* Coeb11、 *Rahnella sikkimica* Coeb32 和森林鲁氏菌(*Rouxiella silvae*) Coeb22 同时具有溶磷、固氮和分泌吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)的功能; 真菌 *Cladophialophora chaetospira* Aruf26 可作为深色有格内生真菌定殖在铁皮石斛根细胞内部。【结论】本研究揭示了3种药用兰科植物根部内生微生物群落组成, 筛选出功能菌株, 为药用兰科植物资源保护、林下仿生栽培和功能微生物的开发与利用提供依据。

**关键词:** 卵叶贝母兰; 竹叶兰; 手参; 深色有格内生真菌

资助项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项基金(CAFYBB2019ZA001); 国家自然科学基金(32101497)

This work was supported by the Special Fund for Basic Research Operations of Central Public Welfare Research Institutes (CAFYBB2019ZA001) and the National Natural Science Foundation of China (32101497).

\*Corresponding authors. E-mail: ZHENG Baoqiang, zhengbaoqiang@aliyun.com; CAO Xiaolu, caoxiaolucx1@caf.ac.cn

Received: 2024-06-04; Accepted: 2024-08-12; Published online: 2024-09-23

## Diversity and functions of endophytic microorganisms in three medicinal orchids

YAO Na<sup>1</sup>, WANG Tao<sup>2</sup>, WANG Yan<sup>1</sup>, SUN Manlu<sup>1</sup>, ZHENG Baoqiang<sup>\*1</sup>, CAO Xiaolu<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup> State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation of National Forestry and Grassland Administration, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China

<sup>2</sup> Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration on Plant Ex Situ Conservation, China National Botanical Garden (North Garden), Beijing 100093, China

**Abstract:** [Background] Endophytic microorganisms in the roots can promote the seedling growth and improve the environmental adaptability of orchids. [Objective] To reveal the structures of endophytic microbial communities in three medicinal orchids (*Coelogyne occultata*, *Arundina graminifolia*, and *Gymnadenia conopsea*) and screen out functional strains. [Methods] Illumina MiSeq high-throughput sequencing was employed to analyze the structures of endophytic microbial communities in the roots of the three orchids. Conventional methods were adopted to isolate the endophytic bacteria and fungi from the roots, and the functional microorganisms were screened. [Results] The endophytic microbial communities of *C. occultata* and *A. graminifolia* clustered into one group at the genus level. In *C. occultata*, *A. graminifolia*, and *G. conopsea*, the dominant endophytic bacterial genera were *Mycobacterium* (Coe: 70.65%), *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* (Aru: 26.35%), and *Gordonia* (Gym: 6.65%), respectively; the dominant endophytic fungal genera were *Fusarium* (Coe: 21.07%), unclassified *Helotiales* (Aru: 46.74%), and *Morchella* (Gym: 91.21%), respectively. Bacterial isolates *Pseudomonas nunensis* Coeb11, *Rahnella sikkimica* Coeb32, and *Rouxiella silvae* Coeb22 had the functions of dissolving phosphorus, fixing nitrogen, and secreting indole-3-acetic acid. The hyphae of the fungal isolate *Cladophilophora chaetospira* Aruf26 could colonize the cells of *Dendrobium officinale* as the dark septate endophyte. [Conclusion] This study revealed the structures of endophytic microbial communities in the roots of three medicinal orchids and screened the functional microorganisms. The findings provide a scientific basis for the protection of medicinal orchids, biomimetic cultivation under forests, and development and utilization of functional microorganisms.

**Keywords:** *Coelogyne occultata*; *Arundina graminifolia*; *Gymnadenia conopsea*; dark septate endophyte

内生微生物在促进植物生长发育、提高植株环境适应性等方面发挥重要作用<sup>[1-2]</sup>。了解植物内生微生物群落结构、挖掘功能微生物,对维持生态平衡、开发微生物资源具有重要意义<sup>[3]</sup>。由于兰科植物种子萌发依赖真菌、种群扩散能力弱、栖息地特化程度高等原因,目前面临种

群濒危<sup>[4-5]</sup>。进行兰科植物内生微生物群落结构分析和功能微生物筛选,对恢复兰科植物种群、提高栽培适应性、促进次生代谢产物合成等均很重要。

为进行兰科植物资源保护与开发,近年来开展了兰科植物内生微生物群落组成与功能研

究,发现除常见的兰科植物菌根真菌(orchid mycorrhizal fungi, OMF)之外,兰科植物根部还定殖了其他类型真菌,如外生菌根真菌(ectomycorrhizal fungi, ECMF)<sup>[6]</sup>、深色有格内生真菌(dark septate endophyte, DSE)等<sup>[7-8]</sup>;以及具有固氮、溶磷、分泌吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)等功能的内生细菌<sup>[9]</sup>。

针对兼具药用价值和观赏价值的兰科植物,如手参(*Gymnadenia conopsea*)、贝母兰(*Coelogyne* sp.)和竹叶兰(*Arundina graminifolia*)等,现有研究集中于野生资源分布<sup>[10-12]</sup>、药用成分分析<sup>[13-15]</sup>、无菌播种与快繁<sup>[16-18]</sup>等。在微生物群落结构方面,主要关注不同地理分布<sup>[19]</sup>和生态位<sup>[20]</sup>真菌群落结构特征,关于贝母兰和竹叶兰的报道多为分布于广西、云南和福建的居群<sup>[20-23]</sup>,对分布于西藏的居群鲜有报道。在功能微生物方面,筛选出促进种子萌发的角担菌属(*Ceratobasidium*)菌株<sup>[24]</sup>,提高幼苗抗旱性的胶膜菌科(*Tulasnellaceae*)<sup>[21]</sup>和外瓶霉属(*Exophiala*)菌株<sup>[22]</sup>,以及可拮抗植物病原菌的平革菌属(*Phanerochaete*)真菌<sup>[23]</sup>;目前,关于这3种药用兰科植物内生细菌的系统性报道较少。

本研究对分布于西藏地区的卵叶贝母兰(*Coelogyne occultata*)、竹叶兰和分布于北京百花山的手参,进行了根部内生微生物群落结构分析和功能菌株筛选,以期构建稳定有效的合成微生物群落、增强药用兰科植物环境适应性、促进次生代谢产物合成提供科学依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 样品

卵叶贝母兰和竹叶兰根部样品于2023年9月采自西藏自治区(图1A-1D),手参根部样品于2023年9月采自北京百花山(图1E、1F)。每种兰科植物选择5棵植株,每棵植株采集2-3条健

康饱满的根段,随即填土或覆盖苔藓复原。将收集到的样品置于无菌袋内,于冰上保存运输至实验室进行后续处理。

选择铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)幼苗作为真菌回接材料,用于接种真菌的铁皮石斛幼苗为在Murashige & Skoog (MS)培养基上非共生萌发的实生苗,苗高约1 cm。为确定分离获得的真菌菌株与兰科植物菌根真菌之间的关系,进而构建合成真菌群落以促进兰科植物种子萌发和植株生长,选择胶膜菌属(*Tulasnella*)菌株JL2进行真菌平板对峙试验,菌株JL2分离自建兰根部,可有效促进铁皮石斛种子共生萌发<sup>[25]</sup>,具有菌剂开发潜力。

### 1.2 培养基、主要试剂和仪器

R2A培养基(g/L):酵母浸出粉0.5,蛋白胨0.5,酪蛋白水解物0.5,葡萄糖0.5,可溶性淀粉0.5,  $K_2HPO_4$  0.3,  $MgSO_4$  0.024,丙酮酸0.3,琼脂15.0;马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基参考文献[22]配制;燕麦(oatmeal agar, OMA)培养基参考文献[25]配制。

E.Z.N.A.<sup>®</sup> High Performance 植物基因组DNA提取试剂盒及E.Z.N.A.<sup>®</sup> 真菌基因组DNA提取试剂盒, Omega Bio-Tek公司;细菌基因组DNA提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;PCR扩增引物,生工生物工程(上海)股份有限公司;2×EasyTaq<sup>®</sup> PCR SuperMix,北京全式金生物技术有限公司。PCR仪, Bio-Rad公司;超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;Illumina MiSeq PE300测序及分析平台,上海美吉生物医药科技有限公司。

### 1.3 植物材料表面消毒

除去植物根表面附着的泥土和苔藓,流水冲洗根部15 min,无菌滤纸吸干表面水分。将植物材料转移至超净工作台内,在无菌容器内进行表面消毒(75%乙醇浸泡30 s,无菌水冲洗

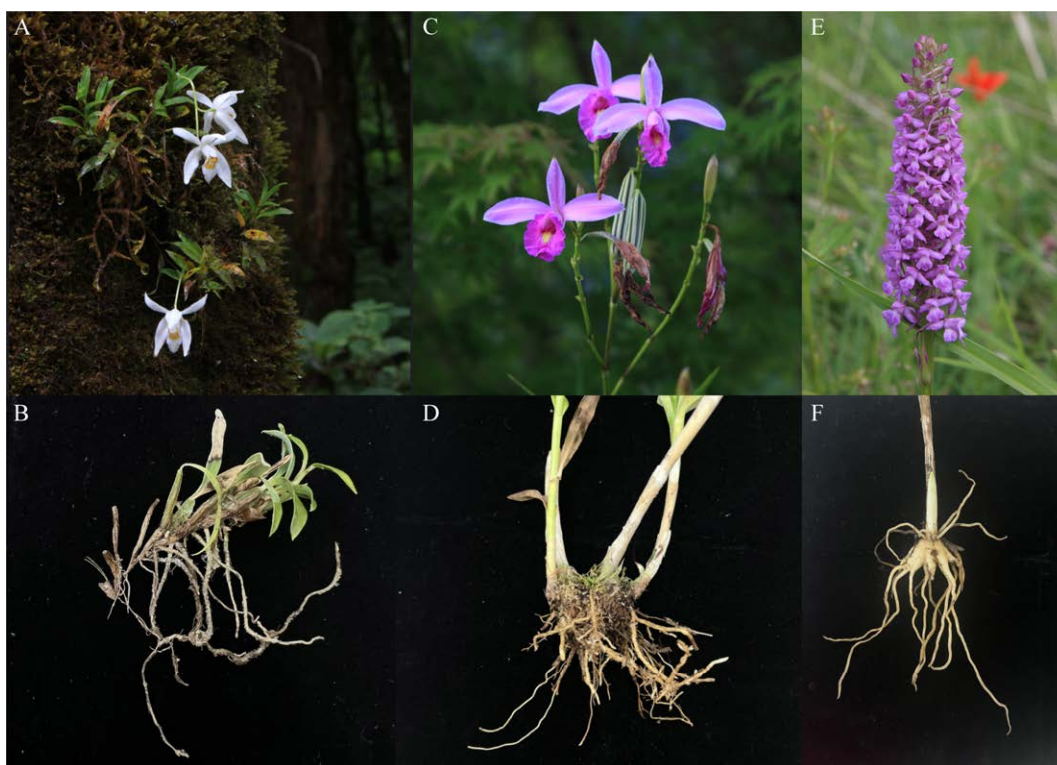


图 1 三种药用兰科植物 A、B: 卵叶贝母兰; C、D: 竹叶兰; E、F: 手参。

Figure 1 The three medicinal orchids. A, B: *Coelogyne occultata*; C, D: *Arundina graminifolia*; E, F: *Gymnadenia conopsea*.

1 次,有效氯浓度 1%的次氯酸钠溶液处理 5 min, 无菌水冲洗 5 次, 无菌滤纸吸干表面水分)。切去表面消毒时曾暴露在次氯酸钠溶液中的根部两端, 将剩余的根切成 2–3 mm 长的根段。吸取 200  $\mu$ L 最后一次冲洗的无菌水, 涂布于 R2A 培养基和 PDA 培养基上, 28  $^{\circ}$ C 培养 7 d, 检测表面消毒效果。

将来自不同植株的同种兰科植物样品进行等质量混合后分装至无菌冻存管内, 每管保存 0.5 g 样品。用于高通量测序的样品于 -80  $^{\circ}$ C 保存; 用于微生物分离培养的样品于 4  $^{\circ}$ C 保存, 4 h 内使用。

#### 1.4 根部内生微生物群落高通量测序与数据分析

采用 E.Z.N.A.<sup>®</sup> High Performance 植物基因

组 DNA 提取试剂盒, 从 0.5 g 表面消毒后的根部样品中提取基因组 DNA。用引物 799F (5'-AACMGGATTAGATACCCKG-3')和 1193R (5'-ACGTCATCCCCACCTTCC-3')扩增细菌 16S rRNA 基因 V5–V7 区<sup>[26]</sup>。用引物 ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')和 ITS2R (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')扩增真菌 ITS1 区<sup>[27]</sup>。委托上海美吉生物医药科技有限公司进行 PCR 扩增、产物纯化和高通量测序, 测序结果上传至 NCBI 数据库 (PRJNA1118021, PRJNA1118027)。

利用 QIIME 2 平台对序列进行合并、去噪、过滤嵌合体。每个扩增子序列变异 (amplicon sequence variant, ASV) 定义为序列相似性为 100% 的序列。基于 SLIVA 数据库和 UNITE 数

数据库分别对细菌和真菌 ASV 进行物种注释;使用 Mothur v1.30.2 进行  $\alpha$  多样性分析;使用 QIIME v1.9.1 进行  $\beta$  多样性分析;使用 FAPROTAX 对内生细菌群落进行功能预测,使用 FUNGuild 对内生真菌群落进行功能预测。

### 1.5 根部内生微生物的分离鉴定

内生细菌的分离鉴定:将 1.0 g 表面消毒后的根段在无菌研钵内研磨均匀,采用稀释涂布平板法分离内生细菌,取  $10^{-2}$  稀释度的根组织悬液 100  $\mu$ L 涂布于 R2A 固体培养基,28  $^{\circ}$ C 倒置培养 3–5 d。挑取形态存在差异的单菌落,在 R2A 固体培养基上纯化 2–3 次。提取纯化后菌株的基因组 DNA,以 27F (5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGCTACC TTGTTACGACTT-3')为扩增引物,进行 16S rRNA 基因 PCR 扩增<sup>[28]</sup>。扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,测序结果与 EzBioCloud 数据库进行比对,确定菌株的分类地位,并提交菌株 16S rRNA 基因序列至 GenBank 数据库。

内生真菌的分离鉴定:采用组织切片法分离根部内生真菌,将表面消毒后的根段切成约 1 mm 的根片,置于 PDA、1/2PDA、1/4PDA 培养基上,28  $^{\circ}$ C 暗培养直至长出真菌。挑真菌菌丝在 PDA 培养基上连续纯化 3 代后,提取基因组 DNA,以 ITS1 和 ITS4 为引物<sup>[29]</sup>对 ITS 序列进行扩增测序,结果提交至 GenBank 数据库。

### 1.6 功能菌株的筛选

功能细菌筛选:使用 Ashby 培养基<sup>[30]</sup>筛选固氮细菌;使用 Pikovskaya (PKO)培养基<sup>[31]</sup>和蒙金娜培养基<sup>[32]</sup>筛选降解无机磷和有机磷的菌株;使用 Salkowski 比色法<sup>[33]</sup>对菌株分泌 IAA 能力进行定性筛选。

功能真菌筛选:将分离获得的真菌菌株与铁皮石斛幼苗在 OMA 培养基上进行共培养,观察真菌与铁皮石斛的互作关系及真菌定殖情况;将真菌菌株与胶膜菌属菌株 JL2 进行平板对峙试验,确定菌株与胶膜菌属真菌之间的互作关系。

## 2 结果与分析

### 2.1 内生微生物测序数据统计与 $\alpha$ 多样性分析

经过序列去噪、过滤嵌合体,从 3 种药用兰科植物根部共检测到 524 687 条高质量细菌序列;其中,从卵叶贝母兰(Coe3)中检测到的序列数最少(47 071 条),从手参(Gym1)中检测到的序列数最多(94 145 条)。稀释曲线表明,测序深度可反映样品中大部分细菌的群落特征(图 2A);按照样本最小序列数抽平后,共检测到 6 826 个细菌 ASV,属于 37 门 391 科 836 属;卵叶贝母兰根部内生细菌群落的物种丰富度和多样性均低于竹叶兰和手参(图 2B、2C)。

从 3 种药用兰科植物根部共检测到 749 110 条高质量真菌序列;稀释曲线达到平台期(图 2D);按照样本最小序列数(Gym2: 58 698 条)进行抽平后,共检测到 465 个真菌 ASV,属于 6 门 92 科 156 属;其中,手参根部内生真菌群落的物种丰富度显著低于竹叶兰(图 2E),物种多样性显著低于卵叶贝母兰和竹叶兰(图 2F)。

### 2.2 内生微生物群落 $\beta$ 多样性及物种组成分析

$\beta$  多样性距离矩阵进行样本层级聚类分析结果表明,在属水平卵叶贝母兰和竹叶兰根部内生微生物群落聚为一小支(图 3A、3B),二者群落结构更为接近,而与手参根部内生微生物群落结构存在较大差异。

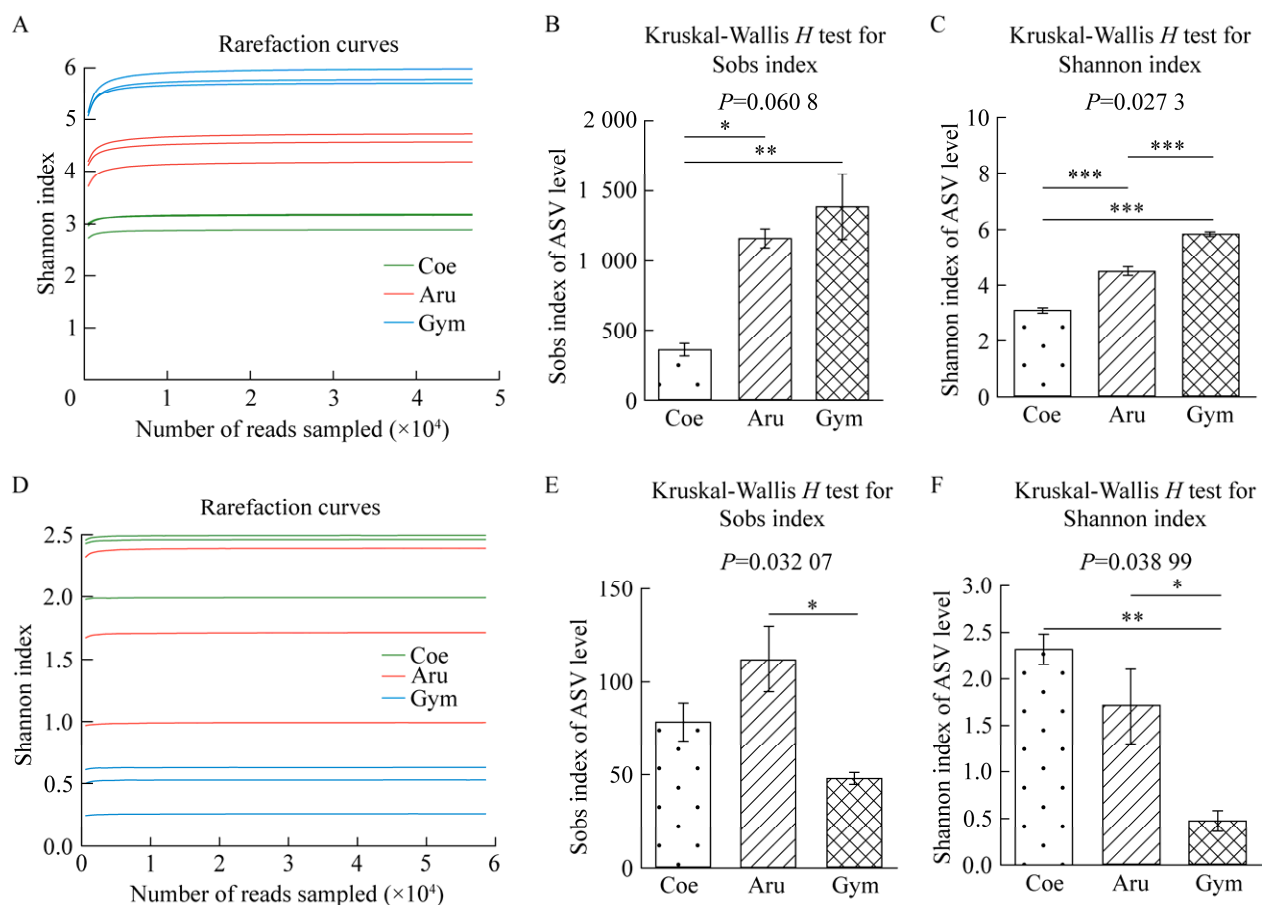


图 2 根内微生物群落稀释曲线与  $\alpha$  多样性 A: 细菌 ASV 水平稀释曲线; B: 细菌 ASV 水平 Sobs 指数; C: 细菌 ASV 水平 Shannon 指数; D: 真菌 ASV 水平稀释曲线; E: 真菌 ASV 水平 Sobs 指数; F: 真菌 ASV 水平 Shannon 指数。Coe: 卵叶贝母兰; Aru: 竹叶兰; Gym: 手参。

Figure 2 The rarefaction curve and the  $\alpha$  diversity of microorganisms in root of the three orchids. A: The rarefaction curves of bacteria on ASV level; B: Sobs index of bacteria on ASV level; C: Shannon index of bacteria on ASV level; D: The rarefaction curves of fungi on ASV level; E: Sobs index of fungi on ASV level; F: Shannon index of fungi on ASV level. Coe: *Coelogyne occultata*; Aru: *Arundina graminifolia*; Gym: *Gymnadenia conopsea*. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

在细菌物种组成方面(图 3A), 卵叶贝母兰和竹叶兰的优势属均为分枝杆菌属(*Mycobacterium*) (Coe: 70.65%; Aru: 5.74%), 伯克霍尔德氏菌属-卡瓦列罗菌属-副伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*) (Coe: 14.15%; Aru: 26.35%)和戴氏菌属(*Dyella*) (Coe: 3.62%; Aru: 18.35%); 手参的优势属为戈登氏菌属(*Gordonia*, 6.65%), 假单胞菌属(*Pseudomonas*,

6.32%)和代尔夫特菌属(*Delftia*, 5.99%)。

三种药用兰科植物根部内生真菌物种组成差异较大(图 3B), 卵叶贝母兰的优势属为篮状菌属(*Talaromyces*, 17.06%), 镰刀菌属(*Fusarium*, 21.07%)和软盘菌属(*Mollisia*, 19.14%); 竹叶兰优势属为未分类柔膜菌目(unclassified *Helotiales*, 46.74%), *Arcopilus* (14.99%)和木霉属(*Trichoderma*, 10.93%); 手参优势属为羊肚菌属(*Morchella*,

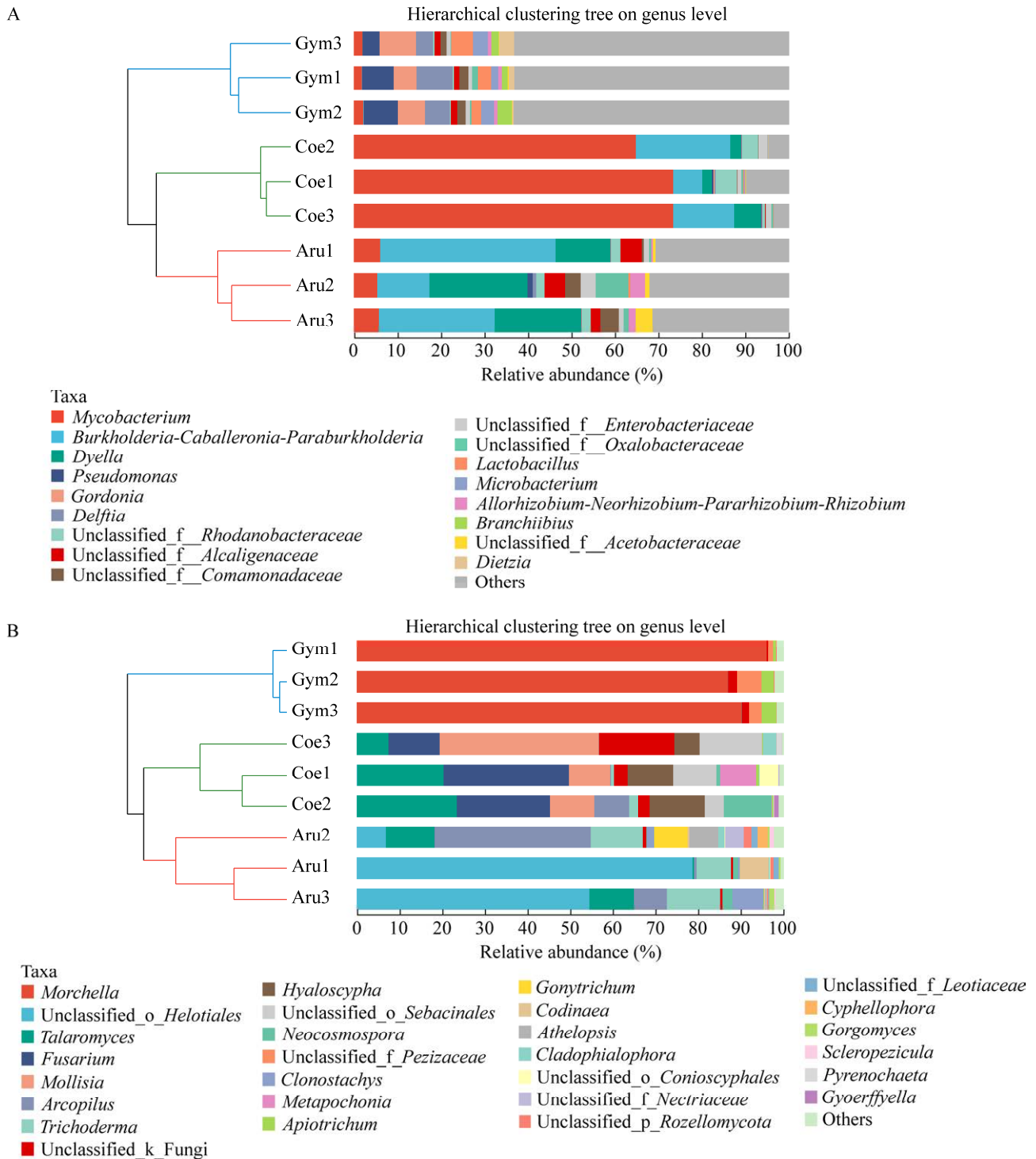


图3 三种药用兰科植物根部内生微生物群落属水平样本层级聚类及物种组成分析 A: 内生细菌; B: 内生真菌。

Figure 3 Hierarchical clustering and species composition analysis at genus level of endophytic microbial communities in the root of three medicinal orchids. A: Endophytic bacteria; B: Endophytic fungi.

91.21%), 未分类盘菌科(*unclassified Pezizaceae*, 3.25%)和 *Apiotrichum* (2.36%)。对于常见的兰科植物菌根真菌类群, 从卵叶贝母兰中检测到未分类蜡壳耳目(*unclassified Sebacinales*, 9.74%), 从手参中检测到低丰度的角担菌科(*Ceratobasidiaceae*, 0.38%), 在 3 种药用兰科植物根内均未检测到胶膜菌科真菌。

### 2.3 三种药用兰科植物微生物群落功能预测

采用 FAPROTAX 预测 3 种药用兰科植物根部内生细菌群落功能(图 4A), 共注释到 14 种差异显著( $P < 0.05$ )的生物功能, 其中需氧化能异养(aerobic chemoheterotrophy)、化能异养(chemoheterotrophy)、固氮(nitrogen fixation)和硝酸盐还原(nitrate reduction)等功能相对丰度较

高。竹叶兰内生细菌的固氮功能显著高于手参和卵叶贝母兰( $P < 0.05$ ), 手参内生细菌的硝酸盐还原功能显著高于卵叶贝母兰和竹叶兰( $P < 0.05$ )。

采用 FUNGuild 预测 3 种兰科植物根部内生真菌群落功能(图 4B), 仅分析已知功能的真菌 ASV, 发现卵叶贝母兰和竹叶兰内生真菌以未定义腐生菌(undefined saprotroph)为主, 手参内生真菌以外生菌根-未定义腐生菌-木质腐生菌(ectomycorrhizal-undefined saprotroph-wood saprotroph)混合类型为真菌功能的优势类群。

### 2.4 可培养菌株鉴定与功能筛选

从 3 种药用兰科植物根部共分离获得 31 株细菌, 除去从同种植物内分离获得的序列相似度为 100%的重复菌株后, 共获得 13 株内生细菌

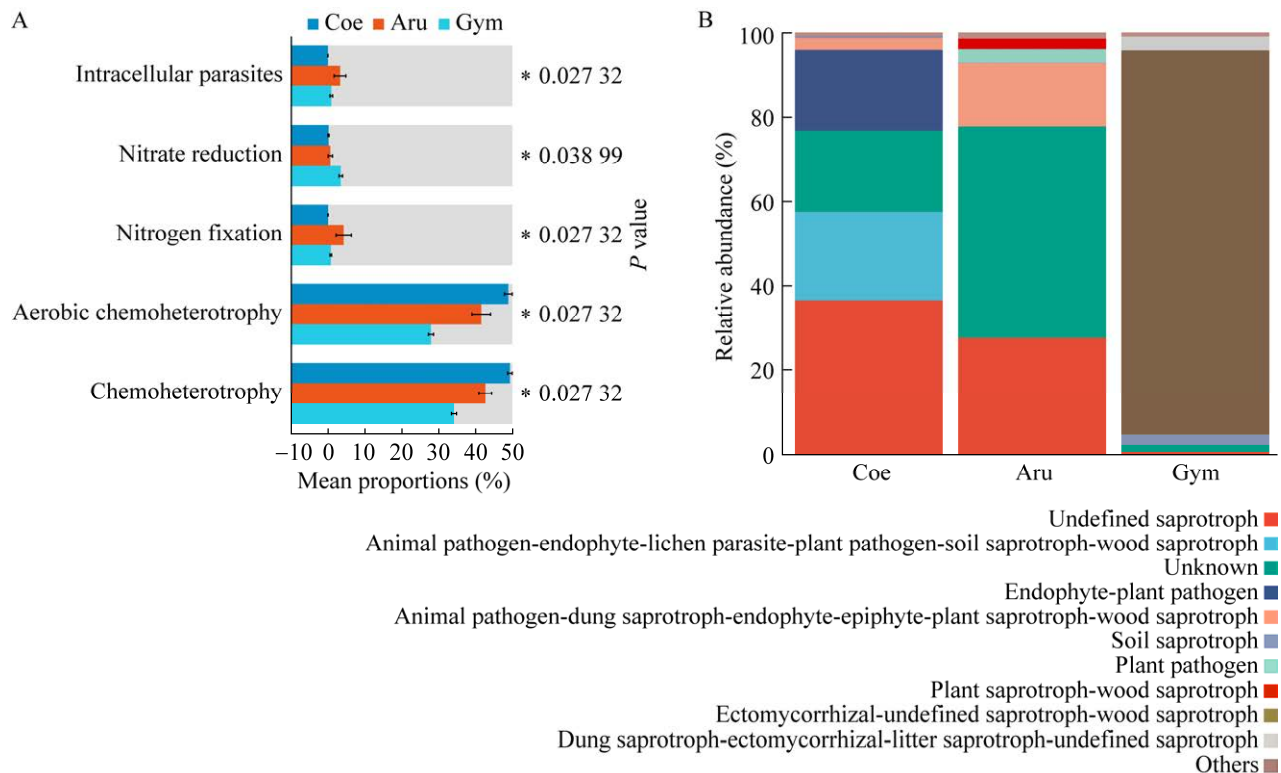


图 4 三种药用兰科植物根部微生物群落功能预测 A: 内生细菌; B: 内生真菌。

Figure 4 Functional prediction of the microbial communities in the root of three medicinal orchids. A: Endophytic bacteria; B: Endophytic fungi. \*:  $P < 0.05$ .



(表 1), 属于 8 属 12 种; 与高通量测序结果比较发现, 6 株细菌具有相似度为 100% 的 ASV, 其中与菌株 Coeb43 序列一致的 ASV3172 在群落中相对丰度较高(5.37%), 该菌株具有溶磷和固氮功能; 尼氏假单胞菌(*Pseudomonas nunensis*) Coeb11、(*Rahnella sikkimica*) Coeb32 和森林鲁氏菌(*Rouxiella silvae*) Coeb22 同时具有溶磷、固氮和分泌 IAA 的功能。

从 3 种药用兰科植物根部共分离获得 9 株真菌, 除去从同种植物内分离获得的序列相似度为 100% 的重复菌株后, 共获得 5 株内生真菌(表 1, 图 5A–5E), 属于 5 个不同的分类单元; 与高通量测序结果比较发现, 3 株真菌具有相似度为 100% 的 ASV, 与 Coef34 序列一致的 ASV293

在群落中相对丰度较高(19.14%)。在离体条件下, 真菌菌株与胶膜菌属菌株 JL2 (图 5F、5L) 表现出不同的互作关系(图 5G–5K), 同为柔膜菌目的 Goef34 和 Cymf42 与胶膜菌属真菌存在竞争关系(图 5G、5K), 菌株 Aruf44 和 Aruf26 与胶膜菌互不影响(图 5H、5I)。将铁皮石斛幼苗与真菌共培养后(图 5M–5R), 与菌株 Aruf26 共培养的铁皮石斛可正常生长(图 5N), 经鉴定该菌株为 *Cladophialophora chaetospora*; 显微观察发现, 菌株 Aruf26 菌丝可定殖在铁皮石斛细胞内部, 形成类似菌丝团的结构(图 6), 菌丝可穿透细胞壁定殖于邻近细胞内; 与菌株 Gymf42 共培养的铁皮石斛部分幼苗发生白化死亡; 与菌株 Coef34 和 Coef24 共培养的石斛幼苗全部死亡(图 5M、5P)。

表 1 分离培养的细菌和真菌菌株及其促生能力

Table 1 Plant growth-promoting properties of the isolated strains

Isolate	NCBI accession number	Taxonomy	Similarity (%)	Corresponding ASV	IPS	OPS	IAA	NF
Arub11	PP851157	<i>Bacillus altitudinis</i>	99.79	–	+	+	–	+
Arub34	PP851155	<i>Bacillus hominis</i>	99.93	ASV187	+	–	–	+
Arub23	PP851156	<i>Bacillus toyonensis</i>	99.93	ASV135	–	–	–	+
Coeb43	PP851149	<i>Paraburkholderia bryophila</i>	98.72	ASV3172	+	+	–	+
Coeb36	PP851150	<i>Pseudomonas edaphica</i>	99.36	–	+	+	–	+
Coeb11	PP851153	<i>Pseudomonas nunensis</i>	99.79	–	+	+	+	+
Coeb32	PP851151	<i>Rahnella sikkimica</i>	99.63	–	+	+	+	+
Coeb22	PP851152	<i>Rouxiella silvae</i>	99.43	–	+	+	+	+
Gymb11	PP851145	<i>Bacillus mycoides</i>	99.86	ASV187	–	–	–	+
Gymb45	PP851148	<i>Bacillus toyonensis</i>	99.93	ASV135	–	–	–	–
Gymb322	PP851154	<i>Gottfriedia solisilvae</i>	99.51	–	–	–	+	–
Gymb52	PP851147	<i>Peribacillus frigiditolerans</i>	100.00	–	+	–	–	+
Gymb10	PP851146	<i>Staphylococcus warneri</i>	100.00	ASV4277	+	–	–	–
Aruf44	PP854981	<i>Phaeosphaeria spartinicola</i>	97.96	–	–	–	–	–
Aruf26	PP854982	<i>Cladophialophora chaetospora</i>	98.11	ASV22	–	–	–	–
Coef34	PP854979	<i>Mollisia novobrunsvicensis</i>	100.00	ASV293	–	–	–	–
Coef24	PP854980	<i>Trichoderma viride</i>	100.00	–	–	–	–	–
Gymf42	PP854978	Uncultured <i>Lachnum</i>	99.45	ASV275	–	–	–	–

IPS: 溶无机磷; OPS: 溶有机磷; IAA: 吲哚乙酸; NF: 固氮; +: 可见相关物质的产生, -: 不产生相关物质。

IPS: Inorganic phosphorus solubilizing; OPS: Organic phosphorus solubilizing; IAA: Indole-3-acetic acid; NF: Nitrogen fixation; +: A visible production of related substances, -: No production of related substances.

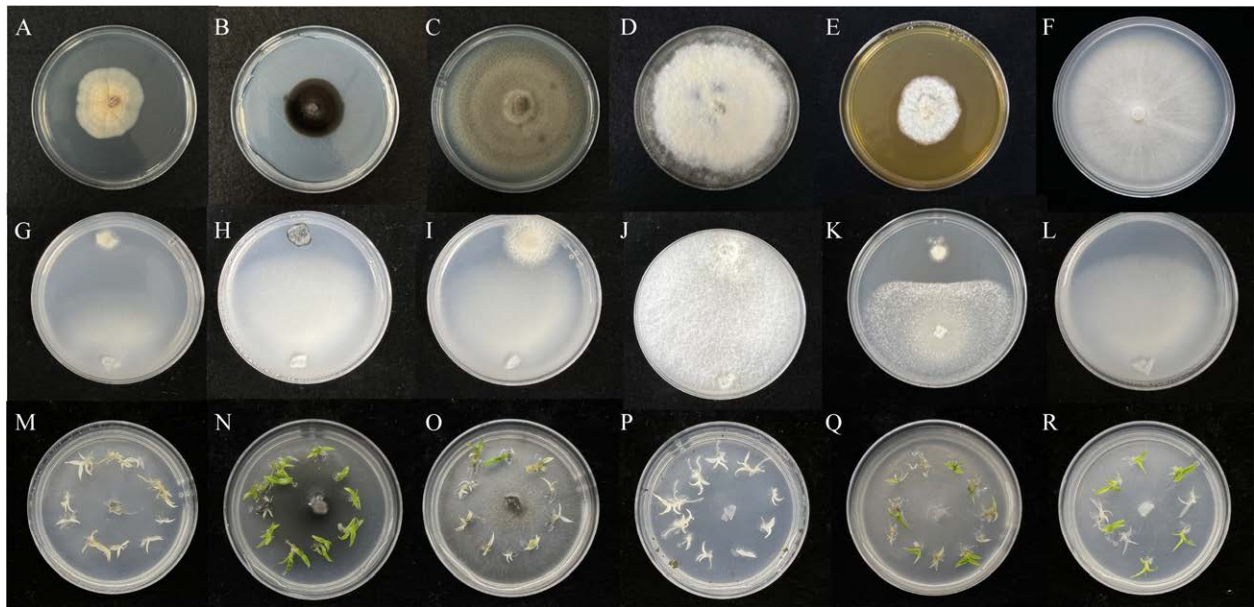


图5 分离获得的真菌菌株及其功能筛选 A: *Mollisia novobrunsvicensis* Coef34; B: *Cladophialophora chaetospora* Aruf26; C: *Phaeosphaeria spartinicola* Aruf44; D: 绿色木霉 Coef24; E: 未分类的粒毛盘菌属 Gymf42; F: 胶膜菌属菌株 JL2; G-K: 菌株 Coef34、Aruf26、Aruf44、Coef24、Gymf42 与菌株 JL2 (L) 对峙培养; M-R: 菌株 Coef34、Aruf26、Aruf44、Coef24、Gymf42、JL2 与铁皮石斛幼苗共培养。  
 Figure 5 The colony morphology of isolated fungi and the functional strain screening. A: *Mollisia novobrunsvicensis* Coef34; B: *Cladophialophora chaetospora* Aruf26; C: *Phaeosphaeria spartinicola* Aruf44; D: *Trichoderma viride* Coef24; E: Uncultured *Lachnum* Gymf42; F: *Tulasnella* sp. JL2; G-K: The interaction between JL2 (L) and Coef34, Aruf26, Aruf44, Coef24, and Gymf42; M-R: The interaction between *Dendrobium officinale* and Coef34, Aruf26, Aruf44, Coef24, Gymf42, and JL2.

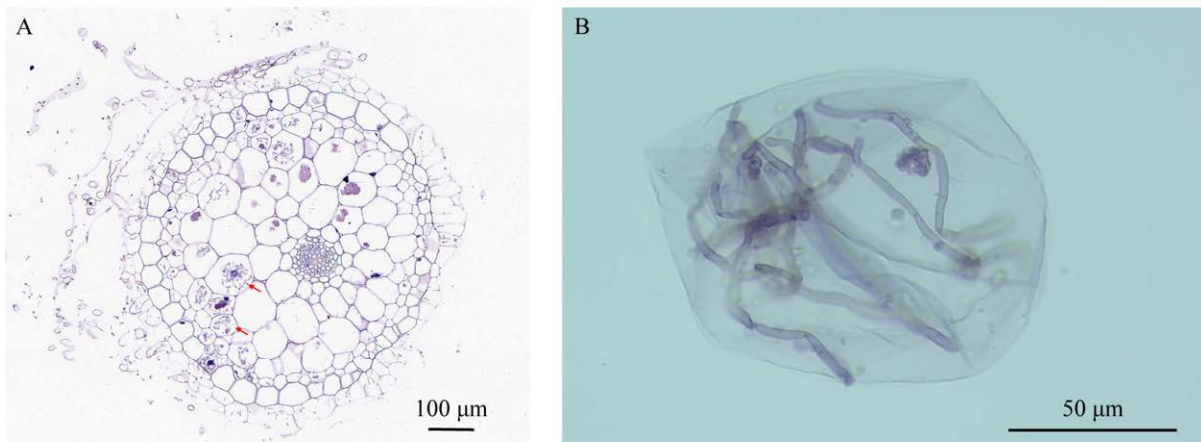


图6 菌株 Aruf26 在铁皮石斛根部的定殖 A: 在铁皮石斛根部定殖; B: 在铁皮石斛根部细胞内定殖。

Figure 6 Colonization of isolate Aruf26 in the root of *Dendrobium officinale*. A: In the root of *D. officinale*; B: In the root cell of *D. officinale*.

### 3 讨论

本研究采用高通量测序和微生物分离培养技术,对3种药用兰科植物根部内生微生物多样性、群落结构及潜在功能进行分析。明确了3种药用兰科植物内生微生物群落组成;从卵叶贝母兰中分离获得兼具溶磷、分泌 IAA 和固氮的细菌菌株 *Pseudomonas nunensis* Coeb11、*Rahnella sikkimica* Coeb32 和 *Rouxiella silvae* Coeb22;从竹叶兰中分离出可定殖在石斛细胞内的 DSE 菌株 *Cladophialophora chaetospora* Aruf26;从手参中分离获得粒毛盘菌属(*Lachnum*)真菌菌株,该属为植物外生菌根菌<sup>[34]</sup>,可促进蓝莓生长<sup>[35]</sup>。

在内生细菌群落组成方面,卵叶贝母兰和竹叶兰的内生细菌优势属为分枝杆菌属和 *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*。在前期报道中,分枝杆菌属细菌为石斛的优势内生细菌<sup>[26]</sup>; *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* 细菌在水稻种子<sup>[36]</sup>、植物气生根黏液<sup>[37]</sup>中高度富集,具有固氮功能<sup>[37]</sup>,本研究从卵叶贝母兰中分离获得的嗜苔藓副伯克霍尔德氏菌(*Paraburkholderia bryophila*) Coeb43 也具有固氮功能。手参内生细菌优势属中的假单胞菌属为常见的植物促生细菌(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)<sup>[38]</sup>,具有降解无机磷<sup>[39]</sup>、分泌 IAA 和固氮<sup>[40]</sup>等功能,本研究从卵叶贝母兰中分离获得了同时具有溶磷、固氮和分泌 IAA 功能的假单胞菌属细菌菌株 Coeb11,但未能从手参中分离获得假单胞菌属细菌。

在内生真菌群落组成方面,从竹叶兰和手参中均检测到了高丰度的外生菌根真菌类群,如柔膜菌目和盘菌科真菌<sup>[41]</sup>,这与百花山手参根部内生真菌优势类群一致<sup>[19]</sup>。本研究从卵叶贝母兰和手参根部分离获得2株柔膜菌目真菌,其中菌株 Coef34 (ASV293)在卵叶贝母兰中

为优势类群。本研究从竹叶兰中分离获得了真菌菌株 *Cladophialophora chaetospora* Aruf26,在前期关于竹叶兰根部内真菌群落的研究中也报道了 *Cladophialophora* sp.的定殖<sup>[20]</sup>;此外, *Cladophialophora* sp.作为内生菌在黄花白芨<sup>[42]</sup>和水稻<sup>[43]</sup>中也被检测到,该属可作为生防菌抑制草莓枯萎病,促进草莓生长<sup>[44]</sup>。在本研究中,离体条件下菌株 Aruf26 与胶膜菌属真菌生长互不干扰,通过与铁皮石斛共培养发现菌丝可定殖石斛细胞内,与深色有格内生真菌 *Exophiala equina* 在禾叶贝母兰(*Coelogyne viscosa*)根内的定殖结构接近<sup>[22]</sup>,菌株 Aruf26 是否可提高兰科植物栽培适应性,还需通过与竹叶兰或其他兰科植物的共培养进行验证。

结合高通量扩增子测序和微生物分离培养,可在解析微生物群落结构的同时获得潜在功能菌株。然而,由于扩增引物的偏好性和微生物分离培养方法的局限性等原因,目前存在分离培养的微生物物种远远少于扩增子测序检测到的物种,或者分离到的菌株在扩增子测序中未检测出的对应物种等问题,为此可通过增加扩增引物、采用原位培养、共培养和流式细胞分选技术等新型培养方法<sup>[45-47]</sup>提高检测准确性和分离培养效率。在本研究中,仅分离获得5株内生真菌,主要原因可能为分离环境和分离培养基无法满足内生真菌的生理特点或营养需求,今后可适当引入厌氧培养、选择植物浸提液作为培养基等措施提高分离效率<sup>[48-49]</sup>;此外,在平板对峙试验中也发现菌株 Coef34 和 Gymf42 在离体条件下表现出与胶膜菌的竞争关系,这种竞争关系也可能限制了胶膜菌属真菌以及其他真菌在分离培养基上的生长。

### 4 结论

兰科植物的保护与资源开发具有重要的生

态价值和广阔的经济前景, 面对兰科植物种子萌发依赖真菌、栖息地特化程度高等问题, 本研究在解析微生物群落结构、分离获得有效功能菌株的基础上, 构建物种或种群特异性的合成微生物组, 有助于提高兰科植物环境适应性、降低栽培成本, 兼顾保护种群与发展林下经济。

## REFERENCES

- [1] SÁNCHEZ-CAÑIZARES C, JORRÍN B, POOLE PS, TKACZ A. Understanding the holobiont: the interdependence of plants and their microbiome[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2017, 38: 188-196.
- [2] WIPPEL K. Plant and microbial features governing an endophytic lifestyle[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2023, 76: 102483.
- [3] 曾青, 熊超, 尹梅, 葛安辉, 韩丽丽, 张丽梅. 植物微生物组生态功能与群落构建过程研究进展[J]. *生物多样性*, 2023, 31: 22667.  
ZENG Q, XIONG C, YIN M, GE AH, HAN LL, ZHANG LM. Research progress on ecological functions and community assembly of plant microbiomes[J]. *Biodiversity Science*, 2023, 31: 22667 (in Chinese).
- [4] DEARNALEY JDW, MARTOS F, SELOSSE MA. 12 orchid mycorrhizas: molecular ecology, physiology, evolution and conservation aspects[M]//Fungal Associations. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012: 207-230.
- [5] CITES (Convention on the International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna). Checklist of CITES Species [DB/OL]. (2023-11-25) [2024-05-07]. <https://checklist.cites.org/#/en>.
- [6] WANG DY, GEBAUER G, JACQUEMYN H, ZAHN FE, GOMES SIF, LORENZ J, van der HAGEN H, SCHILTHUIZEN M, MERCKX VSFT. Variation in mycorrhizal communities and the level of mycoheterotrophy in grassland and forest populations of *Neottia ovata* (Orchidaceae)[J]. *Functional Ecology*, 2023, 37(7): 1948-1961.
- [7] LIU N, JACQUEMYN H, LIU Q, SHAO SC, DING G, XING XK. Effects of a dark septate fungal endophyte on the growth and physiological response of seedlings to drought in an epiphytic orchid[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 961172.
- [8] HOU XQ, GUO SX. Interaction between a dark septate endophytic isolate from *Dendrobium* sp. and roots of *D. nobile* seedlings[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2009, 51(4): 374-381.
- [9] 张萍, 宋希强. 兰科植物内生细菌物种多样性及其促生理研究进展[J]. *热带亚热带植物学报*, 2012, 20(1): 92-98.  
ZHANG P, SONG XQ. Advances in diversity and promotion mechanism of endophytic bacteria associated with orchids[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2012, 20(1): 92-98 (in Chinese).
- [10] 李孟凯, 邢震, 王伟, 罗艳, 李惠玲. 中国西藏贝母兰属(兰科)新资料[J]. *热带作物学报*, 2022, 43(1): 67-71.  
LI MK, XING Z, WANG W, LUO Y, LI HL. New data of *Coelogyne* (Orchidaceae) in Xizang, China[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2022, 43(1): 67-71 (in Chinese).
- [11] 谢春平, 李超杰, 彭贵花, 杨密尔, 陈林, 刘大伟. 竹叶兰的地理分布及气候影响因子[J]. *信阳师范学院学报(自然科学版)*, 2023, 36(3): 367-372.  
XIE CP, LI CJ, PENG GH, YANG ME, CHEN L, LIU DW. Geographical distribution and climatic limiting factors of *Arundina graminifolia*[J]. *Journal of Xinyang Normal University (Natural Science Edition)*, 2023, 36(3): 367-372 (in Chinese).
- [12] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志-第一卷-总论[M]. 北京: 科学出版社, 2004.  
Editorial committee of Flora of China. Chinese Academy of Sciences. Flora of China[M]. Beijing: Science Press, 2004 (in Chinese).
- [13] 李敏, 郭顺星, 王春兰, 肖培根. 手参块茎化学成分研究[J]. *中国药学杂志*, 2007, 42(22): 1696-1698.  
LI M, GUO SX, WANG CL, XIAO PG. Studies on chemical constituents of tubers of *Gymnadenia conopsea*[J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2007, 42(22): 1696-1698 (in Chinese).
- [14] 陈业高, 徐桃苹, 武荷云. 贝母兰属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2006, 17(3): 338-340.  
CHEN YG, XU TP, WU HY. Advance on the chemical and pharmacological studies on plants of *Coelogyne* genus[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2006, 17(3): 338-340 (in Chinese).
- [15] 张雪飞, 赵俊可, 郝素旗, 丁青, 于世慧, 伊木朗, 王军, 胡海燕. 傣药“雅解”: 宾蒿、傣百解及竹叶兰的生物活性及其解毒机制[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2023, 62(3): 89-99.  
ZHANG XF, ZHAO JK, HAO SQ, DING Q, YU SH, MOHAMMAD IS, WANG J, HU HY. Biological activities and detoxification mechanisms of *Clerodendrum chinense* var. *simplex*, *Marsdenia tenacissima* and *Arundina graminifolia*: the Dai antidotes[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2023, 62(3): 89-99 (in Chinese).
- [16] 张小燕, 白茗洲, 彭德镇, 孔令杰, 杨柏云. 流苏贝母兰的无菌播种与快速繁殖[J]. *植物生理学通讯*, 2009, 45(12): 1205-1206.  
ZHANG XY, BAI MZ, PENG DZ, KONG LJ, YANG BY. Asepsis sowing and rapid propagation of *Coelogyne fimbriata* Lindl.[J]. *Plant Physiology Journal*, 2009, 45(12): 1205-1206 (in Chinese).
- [17] 张文珠, 林炳英, 林德钦. 竹叶兰的无菌播种快繁技术研究[J]. *热带农业科学*, 2011, 31(12): 16-19.  
ZHANG WZ, LIN BY, LIN DQ. Aseptic sowing and rapid propagation technology for *Arundina graminifolia* (D. don) Hochr[J]. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 2011, 31(12): 16-19 (in Chinese).
- [18] 李蒙飞, 刘建军. 手参愈伤组织培养及植株再生[J]. *西北林学院学报*, 2014, 29(6): 110-113.  
LI MF, LIU JJ. *In vitro* culture of rare and endangered orchid: *Gymnadenia conopsea*[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2014, 29(6): 110-113 (in Chinese).
- [19] 陈艳红, 邢晓科, 郭顺星. 北京地区手参内生真菌的区系组成分析[J]. *菌物学报*, 2018, 37(1): 35-42.  
CHEN YH, XING XK, GUO SX. The endophytic

- fungal community composition of *Gymnadenia conopsea* in Beijing[J]. *Mycosystema*, 2018, 37(1): 35-42 (in Chinese).
- [20] 艾叶, 谢泰祥, 刘江枫, 兰思仁, 彭东辉, 张清华. 竹叶兰根系共生真菌群落结构及生物学功能初探[J]. 菌物学报, 2019, 38(10): 1631-1642.  
AI Y, XIE TX, LIU JF, LAN SR, PENG DH, ZHANG QH. Community structure and biological function of the root symbiotic fungi of *Arundina graminifolia*[J]. *Mycosystema*, 2019, 38(10): 1631-1642 (in Chinese).
- [21] 翟明恬. 广西雅长自然保护区优势兰科植物根部内生真菌鉴定及多样性研究[D]. 北京: 北京林业大学硕士学位论文, 2015.  
ZHAI MT. Identification and diversity of endophytic fungi in roots of dominant *Orchidaceae* plants in Yachang nature reserve, Guangxi[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing Forestry University, 2015 (in Chinese).
- [22] 刘娜. 菌根真菌提高禾叶贝母兰(附生兰)抗旱性的作用及机制研究[D]. 北京: 中国医学科学院北京协和医学院硕士学位论文, 2022.  
LIU N. Study on the effect and mechanism of mycorrhizal fungi on improving drought resistance of *Fritillaria graminea* (Epiphyte)[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Medical Sciences Peking Union Medical College, 2022 (in Chinese).
- [23] 宋新月. 竹叶兰内生菌的分离及其生物活性的初步研究[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2018.  
SONG XY. Isolation and preliminary study on biological activity of endophytic bacteria from *Phyllanthus bambusae*[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2018 (in Chinese).
- [24] 高越, 陈艳红, 邢晓科. 兰科药用植物手参种子的真菌共生萌发[J]. 菌物学报, 2019, 38(11): 1948-1957.  
GAO Y, CHEN YH, XING XK. Symbiotic fungi inducing seed germination of medicinal *Gymnadenia conopsea* of *Orchidaceae*[J]. *Mycosystema*, 2019, 38(11): 1948-1957 (in Chinese).
- [25] 王淑华, 马艳军, 姚娜, 范可可, 胡晓萌, 江泽慧, 胡陶. 菌根真菌对  $^{60}\text{Co}-\gamma$  辐射后铁皮石斛种子萌发的影响[J]. 核农学报, 2023, 37(5): 889-896.  
WANG SH, MA YJ, YAO N, FAN KK, HU XM, JIANG ZH, HU T. Effect of mycorrhizal fungi on the germination of *Dendrobium candidum* seeds after  $^{60}\text{Co}-\gamma$  irradiation[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2023, 37(5): 889-896 (in Chinese).
- [26] 王珊珊, 刘佳萌, 孙晶, 贾宁, 金诺, 刘佳妮, 范蓓, 王凤忠. 不同栽培方式的铁皮石斛根、茎中内生细菌多样性及其抑菌活性研究[J]. 微生物学报, 2021, 61(12): 4006-4025.  
WANG SS, LIU JM, SUN J, JIA N, JIN N, LIU JN, FAN B, WANG FZ. Diversity and antibacterial activity of endophytic bacteria in roots and stems of *Dendrobium officinale* with different cultivation patterns[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(12): 4006-4025 (in Chinese).
- [27] CHEN L, WANG YC, QIN LY, HE HY, YU XL, YANG MZ, ZHANG HB. Dynamics of fungal communities during *Gastrodia elata* growth[J]. *BMC Microbiology*, 2019, 19(1): 158.
- [28] 孙磊, 邵红, 刘琳, 张瑞英, 赵立华, 李潞滨, 姚娜. 可产生铁载体的春兰根内生细菌多样性[J]. 微生物学报, 2011, 51(2): 189-195.  
SUN L, SHAO H, LIU L, ZHANG RY, ZHAO LH, LI LB, YAO N. Diversity of siderophore-producing endophytic bacteria of *Cymbidium goeringii* roots[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(2): 189-195 (in Chinese).
- [29] WHITE TJ, BRUNS T, LEE S, TAYLOR J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]//PCR Protocols. Amsterdam: Elsevier, 1990: 315-322.
- [30] 赵廷伟, 彭轶楠, 梁燕, 王治业, 季彬. 耐盐碱微生物菌种的筛选鉴定及其功能性与促生性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(10): 4033-4047.  
ZHAO TW, PENG YN, LIANG Y, WANG ZY, JI B. Screening and identification of saline-alkali-resistant microbial strains and research on their functions and growth-promoting properties[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(10): 4033-4047 (in Chinese).
- [31] 朱培森, 杨兴明, 徐阳春, 欧阳红, 沈其荣. 高效解磷细菌的筛选及其对玉米苗期生长的促进作用[J]. 应用生态学报, 2007, 18(1): 107-112.  
ZHU PM, YANG XM, XU YC, OUYANG H, SHEN QR. High effective phosphate-solubilizing bacteria: their isolation and promoting effect on corn seedling growth[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(1): 107-112 (in Chinese).
- [32] 王欢, 王敬敬, 徐松, 赵维, 韩一凡, 王兴彪, 黄志勇. 有机磷降解菌的筛选及其促生特性[J]. 微生物学报, 2017, 57(5): 667-680.  
WANG H, WANG JJ, XU S, ZHAO W, HAN YF, WANG XB, HUANG ZY. Screening and growth promoting characteristics of efficient organophosphate-degradation bacteria[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(5): 667-680 (in Chinese).
- [33] 罗兴, 邹兰, 吴清山, 张要朋, 巫荣星, 王茜, 熊伟, 戴维, 叶坤浩, 黄晶. 乌头产吡啶乙酸内生细菌遗传多样性、抗逆性及其对水稻幼苗生长的影响[J]. 微生物学报, 2022, 62(4): 1485-1500.  
LUO X, ZOU L, WU QS, ZHANG YP, WU RX, WANG Q, XIONG W, DAI W, YE KH, HUANG J. Genetic diversity, stress resistance, and effect on rice seedling growth of indoleacetic acid-producing endophytic bacteria isolated from *Aconitum carnichaelii* Debeaux[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(4): 1485-1500 (in Chinese).
- [34] GAO Q, YANG ZL. Ectomycorrhizal fungi associated with two species of *Kobresia* in an alpine meadow in the eastern Himalaya[J]. *Mycorrhiza*, 2010, 20(4): 281-287.
- [35] BIZABANI C, DAMES J. Effects of inoculating *Lachnum* and *Cadophora* isolates on the growth of *Vaccinium corymbosum*[J]. *Microbiological Research*, 2015, 181: 68-74.
- [36] MATSUMOTO H, FAN XY, WANG Y, KUSSTATSCHER P, DUAN J, WU SL, CHEN SL, QIAO K, WANG YL, MA B, ZHU GN, HASHIDOKO Y, BERG G, CERNAVA T, WANG MC. Bacterial seed endophyte shapes disease resistance in rice[J]. *Nature Plants*, 2021, 7(1): 60-72.
- [37] PANG ZQ, MAO XY, ZHOU SQ, YU S, LIU GZ, LU CK, WAN JP, HU LF, XU P. Microbiota-mediated nitrogen fixation and microhabitat homeostasis in aerial root-mucilage[J]. *Microbiome*, 2023, 11(1): 85.

- [38] ZHUANG LB, LI Y, WANG ZS, YU Y, ZHANG N, YANG C, ZENG QC, WANG Q. Synthetic community with six *Pseudomonas* strains screened from garlic rhizosphere microbiome promotes plant growth[J]. *Microbial Biotechnology*, 2021, 14(2): 488-502.
- [39] 杨荣, 高婷, 李滢璟, 魏崇瑶, 高森, 马莲菊. 辣椒根际促生菌的分离筛选及抗病促生特性研究[J]. *生物技术通报*, 2020, 36(5): 104-109.
- YANG M, GAO T, LI YJ, WEI CY, GAO M, MA LJ. Isolation and screening of plant growth-promoting rhizobacteria in pepper and their disease-resistant growth-promoting characteristics[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(5): 104-109 (in Chinese).
- [40] 胡春锦, 林丽, 史国英, 汪茜, 王钱崧, 李杨瑞. 广西甘蔗根际高效联合固氮菌的筛选及鉴定[J]. *生态学学报*, 2012, 32(15): 4745-4752.
- HU CJ, LIN L, SHI GY, WANG Q, WANG QS, LI YR. Screening and identification of associative nitrogen fixation bacteria in rhizosphere of sugarcane in Guangxi[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(15): 4745-4752 (in Chinese).
- [41] TEDERSOO L, MAY TW, SMITH ME. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages[J]. *Mycorrhiza*, 2010, 20(4): 217-263.
- [42] TAO G, LIU ZY, HYDE KD, LIU XZ, YU ZN. Whole rDNA analysis reveals novel and endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (*Orchidaceae*)[J]. *Fungal Diversity*, 2008, 33: 101-122.
- [43] YUAN ZL, ZHANG CL, LIN FC, KUBICEK CP. Identity, diversity, and molecular phylogeny of the endophytic mycobiota in the roots of rare wild rice (*Oryza granulata*) from a nature reserve in Yunnan, China[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(5): 1642-1652.
- [44] HARSONOWATI W, MARIAN M, Surono, NARISAWA K. The effectiveness of a dark septate endophytic fungus, *Cladophialophora chaetospora* SK51, to mitigate strawberry *Fusarium* wilt disease and with growth promotion activities[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 585.
- [45] LEWIS WH, TAHON G, GEESINK P, SOUSA DZ, ETTEMA TJG. Innovations to culturing the uncultured microbial majority[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19(4): 225-240.
- [46] ZHANG JY, LIU YX, GUO XX, QIN Y, GARRIDO-OTER R, SCHULZE-LEFERT P, BAI Y. High-throughput cultivation and identification of bacteria from the plant root microbiota[J]. *Nature Protocols*, 2021, 16(2): 988-1012.
- [47] NILSSON RH, ANSLAN S, BAHRAM M, WURZBACHER C, BALDRIAN P, TEDERSOO L. Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(2): 95-109.
- [48] 邢磊, 赵圣国, 郑楠, 李松励, 王加启. 未培养微生物分离培养技术研究进展[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(12): 3053-3066.
- XING L, ZHAO SG, ZHENG N, LI SL, WANG JQ. Advance in isolation and culture techniques of uncultured microbes: a review[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(12): 3053-3066 (in Chinese).
- [49] 周士越, 周欣, 张志锋, 梁俊敏, 蔡磊. 未培养真菌分离培养方法初探[J]. *菌物学报*, 2020, 39(4): 766-776.
- ZHOU SY, ZHOU X, ZHANG ZF, LIANG JM, CAI L. Attempt to isolate hitherto uncultured fungi[J]. *Mycosystema*, 2020, 39(4): 766-776 (in Chinese).