

宁夏贺兰山青海云杉根系共生真菌的分离与鉴定

肉斯塔木·艾买提^{1,2}, 秦红亚^{1,2}, 闫兴富^{1,2}, 王继飞³, 刘建利^{1,2}, 邓晓娟^{*1,2}, 李靖宇^{*1,2}

1 北方民族大学生物科学与工程学院, 宁夏 银川 750021

2 国家民委黄河流域农牧交错区生态保护重点实验室, 宁夏 银川 750021

3 宁夏贺兰山国家级自然保护区管理局, 宁夏 银川 750021

肉斯塔木·艾买提, 秦红亚, 闫兴富, 王继飞, 刘建利, 邓晓娟, 李靖宇. 宁夏贺兰山青海云杉根系共生真菌的分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2022, 49(2): 449-462

Rousitamu Aimaiti, Qin Hongya, Yan Xingfu, Wang Jifei, Liu Jianli, Deng Xiaojuan, Li Jingyu. Isolation and identification of symbiotic fungi in roots of *Picea crassifolia* on Helan Mountain in Ningxia, China[J]. Microbiology China, 2022, 49(2): 449-462

摘要:【背景】青海云杉(*Picea crassifolia*)是中国特有植物, 具有极高的生态价值, 是西北地区重要的森林更新树种和荒山造林树种, 其生长发育及其抗逆性与根系共生真菌多样性密切相关。

【目的】从青海云杉根系分离并鉴定定殖的可培养共生真菌, 阐明青海云杉根系可培养共生真菌的种类组成, 为共生真菌在青海云杉育苗、造林及生态恢复的应用研究提供依据。【方法】采用根段直接分离培养法, 对青海云杉根系共生真菌进行分离培养, 描述菌落形态特征。结合 rDNA ITS 序列分析的方法, 对分离的真菌进行鉴定。【结果】从青海云杉根系中分离获得 65 株真菌, 隶属 1 门 4 纲 8 目 13 科 16 属 18 种, 均属于子囊菌门(*Ascomycota*); 属水平上, 以瓶头霉属(*Phialocephala*) 分离频率最高, 占分离菌株总数的 31%; 种水平上, 以 *Phialocephala lagerbergi* 分离频率最高(22%), *Cadophora interclivum*、*Pleotrichocladium opacum*、福廷瓶头霉(*Phialocephala fortinii*)和 *Alfoldi* sp. 次之, 分别为 18%、17%、9%和 9%。从不同发育阶段的青海云杉根系分离得到的共生真菌的种类和数量不同, 其中幼树阶段分离频率最高(52%), 幼苗阶段次之(28%), 成树阶段最低(20%)。【结论】宁夏贺兰山青海云杉根系可培养的共生真菌种类丰富, 其种类和数量在植株不同发育阶段差异较大。本实验分离的真菌种类均为青海云杉中首次获得。本研究结果是以往相关研究的重要补充, 为进一步挖掘青海云杉根系共生真菌资源、探索青海云杉适应本地高寒与干旱逆境的共生微生物组作用机制奠定了基础。

关键词: 宁夏贺兰山; 青海云杉; 共生真菌; 分离培养; 鉴定

基金项目: 宁夏自然科学基金(2018AAC03110, 2021AAC03202); 宁夏回族自治区财政林业新技术引进及推广项目(2021NX04); 北方民族大学研究生创新项目(YCX21017)

Supported by: Natural Science Foundation of Ningxia Hui Autonomous Region (2018AAC03110, 2021AAC03202); Introduction and Promotion Project of New Forestry Technology in Ningxia Hui Autonomous Region (2021NX04); Graduate Innovation Program of North Minzu University (YCX21017)

*Corresponding authors: E-mail: DENG Xiaojuan: xiaojuantuber@163.com; LI Jingyu: lijingyu1986@126.com

Received: 2021-07-05; Accepted: 2021-10-15; Published online: 2021-11-23

Isolation and identification of symbiotic fungi in roots of *Picea crassifolia* on Helan Mountain in Ningxia, China

Rousitamu Aimaiti^{1,2}, QIN Hongya^{1,2}, YAN Xingfu^{1,2}, WANG Jifei³, LIU Jianli^{1,2},
DENG Xiaojuan^{*1,2}, LI Jingyu^{*1,2}

1 College of Biological Science and Engineering, North Minzu University, Yinchuan 750021, Ningxia, China

2 Key Laboratory of Ecological Protection of Agro-Pastoral Ecotones in the Yellow River Basin, National Ethnic Affairs Commission of China, Yinchuan 750021, Ningxia, China

3 Administration of Helan Mountain National Nature Reserve, Yinchuan 750021, Ningxia, China

Abstract: **[Background]** *Picea crassifolia*, an endemic plant with great ecological value in China, is an important tree species for forest regeneration and afforestation in desert mountain areas in Northwest China. The diverse symbiotic fungi in the roots of *P. crassifolia* contribute to its growth, development, and stress resistance. **[Objective]** The culturable symbiotic fungi were isolated from the roots of *P. crassifolia* on Helan Mountain and identified to reveal the fungal community composition. The results provide basic data for seedling breeding, afforestation, and ecosystem restoration of *P. crassifolia*. **[Methods]** The culturable symbiotic fungi in the roots of *P. crassifolia* were isolated directly from root tips and identified based on the morphological characteristics of colony and the rDNA ITS sequence. **[Results]** A total of 65 fungal strains were isolated from the roots of *P. crassifolia*, belonging to 18 species, 16 genera, 13 families, 8 orders, 4 classes of 1 phylum (*Ascomycota*). *Phialocephala* was the genus with the highest isolation frequency, with the isolates accounting for 31% of the total isolates. *Phialocephala lagerbergii* was the species with the highest isolation frequency (22%), followed by *Cadophora interclivum* (18%), *Pleotrichocladium opacum* (17%), *Phialocephala fortinii* (9%) and *Alfoldi* sp. (9%). The species and number of the symbiotic fungi varied at different development stages of *P. crassifolia*. The fungal isolation frequency in the roots of saplings, seedlings, and adult trees was 52%, 28%, and 20%, respectively. **[Conclusion]** The symbiotic fungi in the roots of *P. crassifolia* on Helan Mountain in Ningxia were diverse, the species and number of which varied at different development stages of the tree. All the isolated fungi in this study were obtained from *P. crassifolia* for the first time. The results are an important supplement to previous related studies, laying a foundation for further investigating the resources of culturable symbiotic fungi in the roots of *P. crassifolia* and exploring the role of symbiotic fungi in the process of *P. crassifolia* adapting to the alpine and arid environment.

Keywords: Helan Mountain in Ningxia; *Picea crassifolia*; symbiotic fungi; isolation and culture; identification

青海云杉(*Picea crassifolia*)为松科(*Pinaceae*)云杉属(*Picea*)的植物, 中生乔木, 主要分布于我国青海、甘肃、内蒙古和宁夏贺兰山等地; 在海拔 1 750–3 100 m 的阴坡或半阴坡高山地带, 青海云杉常组成纯林或与白桦、山杨形成混交林^[1]。青海云杉是贺兰山区森林群落主要

的建群树种, 分布范围大, 空间分异明显, 具有非常重要的生态价值和研究意义^[2]。作为贺兰山主要优势树种, 青海云杉在海拔 2 000 m 以上形成大片景观带, 对于当地水土保持和生物多样性维持都具有非常重要的作用^[3]。

研究者们通常将能与植物建立互惠共生关

系的真菌统称为植物互惠共生真菌, 主要包括外生菌根真菌、丛枝菌根真菌、兰科菌根真菌和欧石楠菌根真菌、暗隔内生真菌、印度梨形孢(*Piriformospora indica*)、木霉(*Trichoderma* spp.)、白僵菌(*Beauveria* spp.)和绿僵菌(*Metarhizium* spp.)等^[4]。菌根真菌可促进寄主植物的养分吸收和生长发育^[5]。其中, 外生菌根真菌种类最丰富, 全球约 2 万种外生菌根真菌定殖于 6 000 余种木本植物^[6], 我国已分离到 40 科 80 属近 600 种^[7]。丛枝菌根真菌与宿主植物所形成的互惠共生体是生态系统中分布最广泛的共生体系之一^[8], 目前全球已描述的丛枝菌根真菌 314 种^[9], 能够与 20 余万种植物的根系共生, 并不断有新种被报道^[10-11]。兰科菌根真菌伴随着兰科植物从种子萌发到开花结果的整个生活史, 所有的兰科植物都与真菌共生^[12], 我国已分离的兰科菌根真菌约 100 种^[7]。暗隔内生真菌是能够纯培养的一类植物共生真菌^[13], 具有促进植物利用有机氮、磷和硫源, 增强植物的抗逆性, 以及在胁迫环境下促进植物生长等生态功能^[14]。目前有 114 科 320 属近 600 种植物被暗隔内生真菌侵染^[15], 几乎从温带、热带^[16-17]、荒漠^[18]、极地和高山^[19]等所有生境中均有暗隔内生真菌的发现。白僵菌和绿僵菌在传统认知上一直被认为是昆虫病原真菌, 但近年来的研究发现, 这两类真菌同时大量存在于植物根际土壤环境并兼具腐生性, 对植物根系的发育和植株生长有促进作用^[20-21]。综上所述, 植物互惠共生真菌种类繁多, 所发挥的生理生态作用巨大, 该领域已受到越来越多生物学家及生态学家们的关注。

针对青海云杉的互惠共生真菌, 国内采用分子技术重点开展了其外生菌根真菌物种多样性研究。如: 通过菌根形态鉴定和高通量测序, 樊永军等^[22]首次报道了 11 种内蒙古贺兰山地

区青海云杉外生菌根真菌; 樊永军等^[23]自贺兰山内蒙古段的南寺和哈拉乌沟 2 个区域鉴定出与青海云杉共生的外生菌根真菌 239 个 OTU, 隶属于 18 科 31 属, 其中优势属为蜡壳耳属(*Sebacina*)、棉革菌属(*Tomentella*)、滑锈伞属(*Hebeloma*)和威氏盘菌属(*Wilcoxina*); 伊如汗^[24]采用 454 高通量测序技术获得了内蒙古贺兰山青海云杉 255 个外生菌根真菌 OTU 序列, 隶属于 3 门 6 纲 10 目 19 科 24 属, 其中鉴定到科水平的 OTU 共 96 个, 火丝菌科(*Pyronemataceae*)、革菌科(*Thelephoraceae*)和蜡壳耳科(*Sebacinaceae*)为优势科, 鉴定到属水平的 OTU 共 127 个, 蜡壳耳属(*Sebacina*)和棉革菌属(*Tomentella*)为优势菌属; 魏杰等^[25]从内蒙古阿拉善和赤峰地区的青海云杉的菌根样品中分离得到一种浅棕色外生菌根, 具有棉革菌属(*Tomentella*)外生菌根的形态特征; 杨岳^[26]对内蒙古代表性树种根围土壤外生菌根真菌群落结构进行研究时, 获得的青海云杉外生菌根真菌序列归属于 316 个 OTU, 隶属于 2 门 5 纲 11 目 23 科 29 属, 优势属依次为丝膜菌属(*Cortinarius*)、蜡壳耳属(*Sebacina*)和丝盖菌属(*Inocybe*)。以上研究均主要集中于青海云杉外生菌根真菌类群, 目前还缺乏对青海云杉根系其他互惠共生真菌状况的了解。本研究采用传统的分离培养技术对宁夏贺兰山青海云杉根系共生真菌进行分离和鉴定, 以期为进一步研究青海云杉与其共生真菌间的共生互作机制提供资料和依据。

1 材料与方法

1.1 研究地区概况

宁夏贺兰山自然保护区是宁夏三大天然林区之一, 是中国三大沙漠(毛乌素沙漠、乌兰布和沙漠、腾格里沙漠)与银川平原的分界线, 也是西北地区最后一道生态屏障^[27]。贺兰山地理

坐标为东经 105°49′–106°41′, 北纬 38°19′–39°22′, 南北长 170 km, 东西宽 20–40 km, 保护区总面积为 193 535.68 hm² [28]。贺兰山具有典型大陆性气候特征, 年平均气温 8.6 °C, 年均降水量约 209.2 mm, 年降水分布不均, 多集中于 7–9 月 [29]。受气候、土壤、海拔等因素的影响, 贺兰山植被具有明显的垂直分布特征, 随海拔升高依次为山地草原带(1 400–1 600 m)、山地疏林草原带(1 600–2 000 m)、山地针叶林带(1 900–3 000 m)、亚高山灌丛和草甸带(3 000–3 556 m), 与之对应的是短花针茅(*Stipa breviflora*)和猪毛蒿(*Artemisia scoparia*)群落、蒙古扁桃(*Amygdalus mongolica*)和狭叶锦鸡儿(*Caragana slenophylla*)群落、油松(*Pinus tabuliformis*)群落、油松和山杨(*Populus davidiana*)群落、山杨和青海云杉(*P. crassifolia*)群落及高寒草甸群落 [30]。

1.2 样品采集

在宁夏贺兰山自然保护区苏峪口国家森林公园内, 选取 3 个典型青海云杉、山杨混交林作为试验样地(表 1)。根据丁国民等 [31] 青海云杉种群径级结构的划分标准, 结合贺兰山青海云杉种群的实际生长情况, 以 3 个不同发育阶段(1 龄级幼苗阶段: 胸径 < 2 cm; 2 龄级幼树阶段: 2 cm ≤ 胸径 < 5 cm; 3 龄级成树阶段: 5 cm ≤ 胸径 < 17 cm) 的青海云杉作为研究对象, 分别于 2019 年 9 月和 2020 年 9 月, 在 3 个样地内分别采集不同发育阶段的青海云杉根系样

品 4 份, 总计采集 72 份根系样品。

采集根样时, 先用铁锹除去林木基部周围的地表覆盖物, 再掘取靠近主根的侧根, 将整个侧根挖出, 装入密封袋内(携带少量土壤用于根系保鲜), 于当天带回实验室, 置于 4 °C 冰箱中保藏(根样保藏时间不超过 1 周)。在实验室将根样置于培养皿内, 加入清水浸泡, 待根样表面土壤松软后, 用细小毛刷小心地移除根表面的土壤并剔除杂草等其他植物根系, 蒸馏水冲洗根系 3–5 次。根系清洗干净之后置于清水中, 用于根系共生真菌的分离。

1.3 方法

1.3.1 根系共生真菌的分离纯化

采用根段直接培养法进行根系共生真菌分离。分离和纯化采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA) [32], 具体操作步骤: 在超净工作台内, 将准备好的根系于 75% 无水乙醇中浸泡 1 min, 无菌水漂洗 3–5 次; 再于 0.1% 氯化汞中浸泡 3 min, 无菌水漂洗 3–5 次, 用无菌滤纸吸干水分; 随后将根系切成 0.5–1.0 cm 的根段, 每个 PDA 培养基平板上放 5–6 个根段, 置于 25 °C 黑暗培养。待菌落在平板上长出后, 挑取少量菌丝转接至 PDA 培养基平板上, 培养 7 d 后观察菌落形态的一致性和均匀性。若菌落形态有差异, 则进行二次分离转接, 如此反复直至获得纯化菌株。将纯化菌株接种至 PDA 培养基平板上置于 25 °C 黑暗培养, 同时制作斜面培养

表 1 样地基本信息

Table 1 Sample site information

采样点	样地大小	地理位置	海拔	林木类型	土壤类型
Sample site	Plot size (m×m)	Location	Elevation (m)	Vegetation type	Soil type
1	50×50	105°54′37″E 38°44′7″N	2 210	青海云杉、山杨混交林 Mixed forest of <i>Picea crassifolia</i> and aspen	灰褐土 Grey-brown soil
2	50×50	105°54′33″E 38°43′39″N	2 630	青海云杉、山杨混交林 Mixed forest of <i>Picea crassifolia</i> and aspen	灰褐土 Grey-brown soil
3	50×50	105°54′28″E 38°43′26″N	2 660	青海云杉、山杨混交林 Mixed forest of <i>Picea crassifolia</i> and aspen	灰褐土 Grey-brown soil

基进行菌种临时保藏。2-3 周后对菌落形态特征稳定的菌株观察记录。菌落形态特征描述依据 McLean 等^[33]和 Johansson 等^[34]的方法。指标包括菌落颜色、质地、外形、是否有分泌物、边缘颜色及形状、直径等。

1.3.2 根系共生真菌的分子鉴定

(1) 真菌 DNA 提取

在超净工作台内, 从纯化培养的菌落上收集菌丝体约 0.5 g, 放入已灭菌的陶瓷研钵中, 加入液氮将真菌菌丝研磨成粉末, 采用真菌基因组抽提试剂盒抽提菌株基因组 DNA, 具体操作步骤按照试剂盒说明书进行。提取的 DNA 置于 -20 °C 保存或直接用于后续试验。

(2) 真菌 rDNA ITS 序列 PCR 扩增

以得到的真菌基因组 DNA 为模板, 采用真菌通用引物 ITS1F (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μL): 基因组 DNA 2 μL, ITS1F/ITS4 引物(10 μmol/L) 各 1.5 μL, 2×Hieff PCR Master Mix 25 μL, ddH₂O 补足 50 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 52 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 并对检测合格的样品送至生物工程(上海)股份有限公司测序。

(3) ITS 序列分析

测序所得的 ITS 序列, 采用 Contig Express (V3.0.0)软件进行拼接和质控, 提交至 GenBank 数据库 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行 BLAST 序列比对分析, 并从 NCBI 中下载已知同源序列和模式序列, 运用 MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software>) 软件进行比对和人工校正, 采用 RAxML (windows executables V8.2.10)软件以最大似然法(maximum likelihood, ML)构建系统发育树。

1.4 根系共生真菌数量统计分析

采用分离频率统计青海云杉根系共生真菌不同种类的数量和所占比例。

分离频率=分离得到的某种共生真菌的菌株数/分离到的总菌株数×100%。

2 结果与分析

2.1 根系共生真菌菌落特征观察

从青海云杉根系中分离纯化出 65 株真菌, 依据菌落形态特征分为 18 个类型(表 2、图 1)。菌落有圆形、近圆形, 颜色有白色、灰色、黄色或黑色, 部分产生色素, 生长速度差异较大, 多生长缓慢。其中, H1、H9、H12 的菌落形状呈椭圆形, 其余全部都是圆形; H9 和 H12 的菌落质地是厚蜡状和薄蜡状, 其余都为绒毡状; H4 的菌落边缘颜色是白色, H9 的菌落上有黑色蜡状分泌物; H3、H11 和 H18 生长速度最快, 纯化 30 d 后菌落直径分别为 5.8-7.5 cm、6.6-7.5 cm 和 6.8-7.5 cm, 最快长满平板。H1 和 H13 生长速度最慢, 纯化 30 d 后菌落直径分别为 1.8-2.7 cm 和 1.9-2.6 cm。

2.2 根系共生真菌分子鉴定结果

对分离获得的 65 个菌株的 rDNA ITS 片段进行测序, 将测序所得序列用 Contig Express 软件进行拼接和质控, 提交至 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对, 青海云杉根系共生真菌的 rDNA ITS 序列与 GenBank 中真菌序列的相似度为 92.87%-100% (表 3)。

2.3 真菌 rDNA ITS 序列分析

将 65 株真菌的 rDNA ITS 序列与从 NCBI 下载的同源序列、参考模式菌株以及分类学文献支撑的序列进行多序列比对。从 18 个菌落形态类型中挑选了 34 个代表菌株的 rDNA ITS 序列, 与数据库下载序列共同构建系统发育树(图 2)。根据建树结果, 用于构建系统发育树的

表 2 PDA 培养基上生长 30 d 的菌落形态特征

Table 2 Colony characteristics of strains after 30 days culture on PDA medium

类型 Type	菌落颜色 Colony color	菌落质地 Colony texture	菌落形状 Colony shape	边缘颜色 Margin color	分泌物 Exudation	边缘形状 Margin shape	菌落直径 Colony diameter (cm)
H1	乳白色 Milky-white	绒毡状 Felted	椭圆形 Oval	无 No	无 No	不规则 Irregular	1.8–2.7
H2	灰白到黑色 Gray to black	绒毡状 Felted	圆形 Circle	无 No	无 No	不规则 Irregular	6.1–7.1
H3	深灰色 Dark-grey	绒毡状 Felted	圆形 Circle	无 No	无 No	光滑全缘 Smooth entire	5.8–7.5
H4	黑色 Black	绒毡状 Felted	圆形 Circle	白色 White	无 No	光滑全缘 Smooth entire	1.9–2.8
H5	深灰色 Dark-grey	绒毡状 Felted	圆形 Circle	无 No	无 No	不规则 Irregular	6.4–7.2
H6	白色 White	绒毡状 Felted	圆形 Circle	无 No	无 No	光滑全缘 Smooth entire	6.5–7.4
H7	浅黄色 Light-yellow	绒毡状 Felted	圆形 Circle	无 No	无 No	不规则 Irregular	5.6–7.4
H8	灰白色 Grey-white	绒毡状 Felted	圆形 Circle	无 No	无 No	不规则 Irregular	6.5–7.2
H9	黑色 Black	厚蜡状 Thick waxy	椭圆形 Oval	无 No	黑色蜡状 Black waxy	不规则 Irregular	1.6–4.8
H10	灰色 Grey	绒毡状 Felted	圆形 Circle	无 No	无 No	不规则 Irregular	3.2–4.3
H11	黑白色 Black-white	绒毡状 Felted	圆形 Circle	无 No	无 No	不规则 Irregular	6.6–7.5
H12	浅红色 Light-red	薄蜡状 Thin waxy	椭圆形 Oval	无 No	无 No	不规则 Irregular	2.8–4.3
H13	白色 White	绒毡状 Felted	圆形 Circle	无 No	无 No	不规则 Irregular	1.9–2.6
H14	黄色 Yellow	绒毡状 Felted	圆形 Circle	无 No	无 No	光滑全缘 Smooth entire	6.3–7.3
H15	白色 White	绒毡状 Felted	圆形 Circle	无 No	无 No	不规则 Irregular	3.2–4.9
H16	浅黄色 Light-yellow	绒毡状 Felted	圆形 Circle	无 No	无 No	不规则 Irregular	1.5–3.9
H17	白色 White	绒毡状 Felted	圆形 Circle	无 No	无 No	不规则 Irregular	2.8–4.1
H18	灰白色 Grey-white	绒毡状 Felted	圆形 Circle	无 No	无 No	光滑全缘 Smooth entire	6.8–7.5

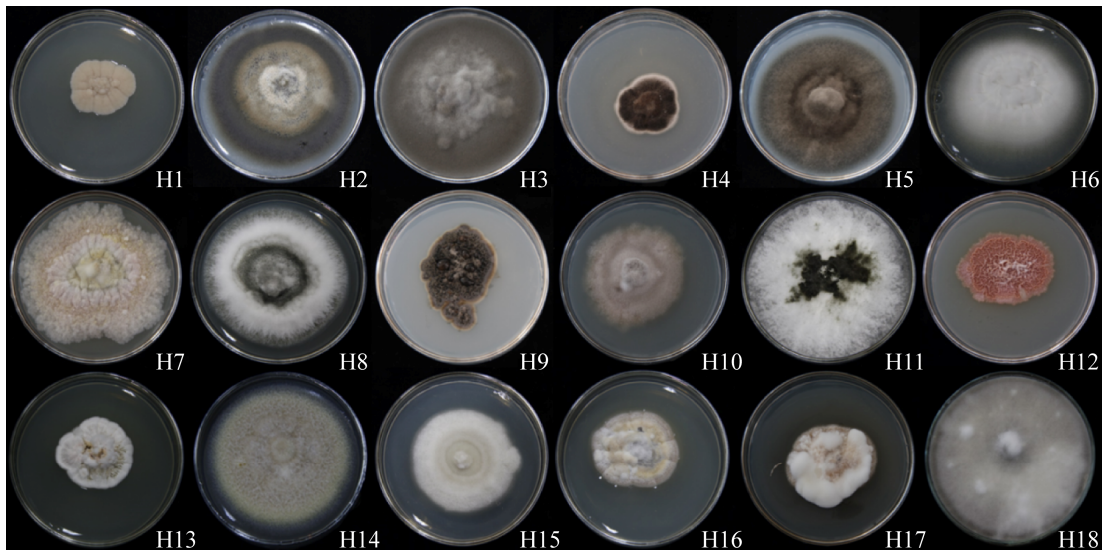


图 1 在 PDA 培养基上生长 30 d 后的菌落形态特征

Figure 1 Morphology of fungal colony isolated from roots after 30 days culture on PDA medium.

表3 青海云杉根系共生真菌 rDNA ITS 序列的 BLAST 结果

Table 3 BLAST results of rDNA ITS sequences of symbiotic fungi *Picea crassifolia*

菌落类型 Colony type	代表菌株 Strain No.	相似真菌 Similar fungal species (GenBank accession No.)	相似性 Similarity (%)	菌株数量 Strain amount	分离频率 Isolation ratio (%)	参考菌株编号 Reference strain No.
H1	B51	<i>Polyphilus sieberi</i> (KT269499)	97.10	1	1.54	MG719688 ^[35]
H2	A16, A57	<i>Dactylonectria macrodidyma</i> (MK841907)	99.60	2	3.08	—
H3	A37, B10, B30, B40	<i>C. interclivum</i> (MF979577)	99.44	12	18.46	MF979577-Holotype
H4	B65, B19	<i>Varicosporium</i> sp. (KX100406)	95.21	2	3.08	JQ412864
H5	B11, B15, B18	<i>P. fortinii</i> (LC206662)	99.50	6	9.23	NR103577-Isotype
H6	B43	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (MT635286)	100.00	1	1.54	NR119839-Neotype
H7	B37	<i>Penicillium raistrickii</i> (MK450710)	99.78	1	1.54	NR119493-Neotype
H8	A2, A6, B21, B52	<i>P. opacum</i> (MT294424)	99.65	11	16.92	NR155696-Epitype
H9	A7, A15, B17, B56	<i>Alfordia vorosisii</i> (NR171211)	94.85	6	9.23	NR171211-Holotype
H10	B31	<i>Pleosporales</i> (LT821464)	99.58	1	1.54	—
H11	B42	<i>Xylaria</i> sp. (KF871461)	95.47	1	1.54	—
H12	B58	<i>Lecanicillium fungicola</i> (KY400076)	100.00	1	1.54	NR119653-Epitype
H13	B64	<i>Monocillium constrictum</i> (MG827006)	92.87	1	1.54	NR157501-Holotype
H14	B3	<i>Neonectria ramulariae</i> (KM249079)	100.00	1	1.54	JF735313 ^[36]
H15	B24, B66	<i>Ilyonectria crassa</i> (MT573482)	100.00	2	3.08	JF735275 ^[36]
H16	A10	<i>Dactylonectria novozelandica</i> (MN817697)	100.00	1	1.54	NR121499-Holotype
H17	B12, B22, B32	<i>P. lagerbergii</i> (AB190400)	99.80	14	21.54	—
H18	B27	<i>Paecilomyces</i> sp. (KF871460)	100.00	1	1.54	—

注: —: 在数据库中未查询到该种模式菌株序列

Note: —: The sequence of model strain is not inquired in the database.

34 个代表菌株(黑色加粗字体标出)归属于 1 门 4 纲 8 目 13 科 16 属 18 种, 其中鉴定到种水平的有 12 个、鉴定到属水平的有 5 个、仅鉴定到目水平的有 1 个(表 4)。分离得到的青海云杉根系共生真菌全部隶属于子囊菌门, 其中 B12、B22、B32、A37、B10、B30、B40、B65、B19、B11、B15、B18、B51 这 13 个菌株的序列聚在分支 I 上, 隶属于锤舌菌纲(*Leotiomycetes*); B42、B27、B58、B64、A57、A16、A10、B24、B66、B3 这 10 个菌株的序列聚在分支 II 上, 隶

属于粪壳菌纲(*Sordariomycetes*); A2、A6、B21、B52、A7、A15、B17、B56、B31、B43 这 10 个菌株的序列聚在分支 IV 上, 隶属于座囊菌纲(*Dothideomycetes*)。B37 序列单独聚在分支 III 上, 隶属于散囊菌纲(*Eurotiomycetes*)。

2.4 根系共生真菌的分离频率

综合菌落形态特征和 rDNA ITS 序列分析, 分离得到的 65 株根系共生真菌被鉴定为 12 种(表 4)。不同种类的真菌其分离数量和分离频率差别较大(表 3), 分离频率比较高的种有 5 个,

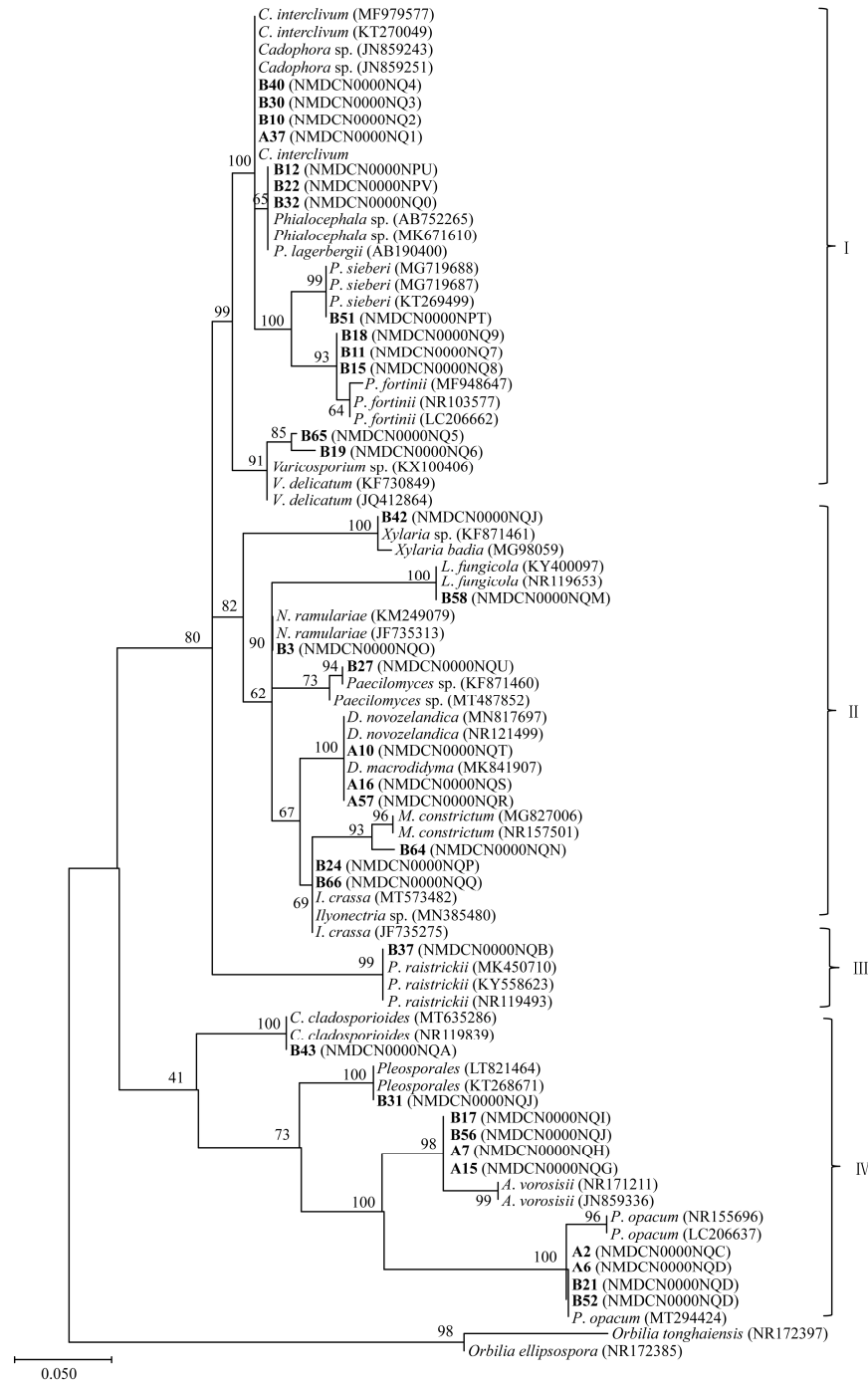


图 2 基于根系共生真菌及其近似种 rDNA ITS 序列采用最大似然法构建的系统发育树。分支上的数字表示支持率；黑体编号代表本次实验分离得到菌株序列；*O. ellipsospora* (NR172385)和 *O. tonghaiensis* (NR172397)是外类群

Figure 2 The phylogenetic tree based on rDNA ITS sequences of root symbiotic fungi and related species using maximum likelihood. The number at the branching point indicates bootstrap; The bold numbers represented the cultures isolated in this study. *Orbilia ellipsospora* (NR172385) and *Orbilia tonghaiensis* (NR172397) are outgroup.

表 4 青海云杉根系可培养共生真菌鉴定结果

Table 4 Identification results of culturable symbiotic fungi in the roots of *Picea crassifolia*

编号 No.	门 Phyla	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus	种 Species
1	子囊菌门 <i>Ascomycota</i>	座囊菌纲 <i>Dothideomycetes</i>	格孢菌目 <i>Pleosporales</i>	<i>Melanommataceae</i>	<i>Pleotrichocladium</i>	<i>P. opacum</i>
2				<i>Amorosiaceae</i>	<i>Alfoldia</i>	
3			<i>Cladosporiales</i>	枝孢霉科 <i>Cladosporiaceae</i>	枝孢菌属 <i>Cladosporium</i>	枝状枝孢菌 <i>C. cladosporioides</i>
4		锤舌菌纲 <i>Leotiomycetes</i>	斑痣盘菌目 <i>Rhytismatales</i>	<i>Calloriaceae</i>	<i>Polyphilus</i>	<i>P. sieberi</i>
5			柔膜菌目 <i>Helotiales</i>	暗皮皿科 <i>Mollisiaceae</i>	瓶头霉属 <i>Phialocephala</i>	<i>P. lagerbergii</i>
6						福廷瓶头霉 <i>P. fortinii</i>
7				<i>Ploettnerulaceae</i>	背芽突霉属 <i>Cadophora</i>	<i>C. interclivum</i>
8				<i>Hydrocinaceae</i>	<i>Varicosporium</i>	
9		散囊菌纲 <i>Eurotiomycetes</i>	散囊菌目 <i>Eurotiales</i>	曲霉科 <i>Aspergillaceae</i>	青霉菌属 <i>Penicillium</i>	雷氏青霉 <i>P. raistrickii</i>
10		粪壳菌纲 <i>Sordariomycetes</i>	炭角菌目 <i>Xylariales</i>	炭角菌科 <i>Xylariaceae</i>	炭角菌属 <i>Xylaria</i>	
11			<i>Sordariales</i>	<i>Aspergillaceae</i>	拟青霉属 <i>Paecilomyces</i>	
12			肉座菌目 <i>Hypocreales</i>	<i>Cordycipitaceae</i>	蜡蚧菌属 <i>Lecanicillium</i>	<i>L. fungicola</i>
13				<i>Niessliaceae</i>	单链孢属 <i>Monocillium</i>	
14				<i>Nectriaceae</i>	<i>Dactylonectria</i>	<i>D. macrodidyma</i>
15						<i>D. novozelandica</i>
16					<i>Ilyonectria</i>	<i>I. crassa</i>
17					丛赤壳科 <i>Neonectria</i>	<i>N. ramulariae</i>

分别为 *P. lagerbergii*、*C. interclivum*、*P. opacum*、*P. fortinii* 和 *Alfoldia* sp., 分离频率依次为 22%、18%、17%、9%和 9%。瓶头霉属(*Phialocephala*) 菌株的分离频率为 31%, 是分离频率最高的优势属, 在 3 个样地的 32 份样品中均分离到该属的真菌。

不同发育阶段的青海云杉根系分离获得的共生真菌的数量和分离频率明显不同(表 5)。从青海云杉幼苗根系分离得到共生真菌 18 株, 分离频率为 28%; 幼树阶段分离得到根系共生真菌 34 株, 分离频率高达 52%; 成树阶段分离得

到根系共生真菌 13 株, 分离频率 20%。在青海云杉的不同发育阶段, 根系共生真菌的分离频率由高到低依次为幼树>幼苗>成树。

3 讨论与结论

已有研究结果表明, 采用高通量测序技术研究青海云杉根系互惠共生真菌组成时, 外生菌根真菌是其重要组分, 在青海云杉根系互惠共生真菌群落中占据重要地位, 其中丝盖菌属(*Inocybe*)、蜡壳耳属(*Sebacina*)、丝膜菌属(*Cortinari*)和棉革菌属(*Tomentella*)为优势属^[37-39]。本研究采用

表 5 不同发育阶段青海云杉根系共生真菌的数量和分离频率

Table 5 Number and isolation frequency of culturable symbiotic fungi in roots at different development stages *Picea crassifolia*

不同发育阶段	菌株数量	分离频率
Stage of development	Strain amount	Isolation ratio (%)
幼苗 Seedlings	18	28
幼树 Sapling	34	52
成树 Adult trees	13	20

根段直接分离培养法, 根据菌落形态特征及 rDNA ITS 序列分析表明, 青海云杉根系可培养共生真菌种类丰富, 以深色有隔内生真菌(dark septate endophytes, DSE)为主要类群, 其中瓶头霉属(*Phialocephala*)为优势属, *P. lagerbergii* 和 *C. interclivum* 为优势种。本研究分离鉴定的根系共生真菌均在青海云杉中首次报道。

Walsh 等^[40]从加拿大亚高山森林白云杉根系中分离出背芽突霉属(*Cadophora*)的 2 种培养物 *C. meredithiae* 和 *C. interclivum*, 并发现它们的内部转录间隔(internal transcribed spacer, ITS)序列与 GenBank 中植物根系生态研究中的多个序列具有较高的相似性, 而且这些相似性序列来源广泛, 从兰科植物^[41-42]、草本植物^[43]到云杉等高大的乔木^[44-45]根系均有分布, 据此推测 *C. meredithiae* 和 *C. interclivum* 广泛定殖于植物根系。杜海燕等^[46]采用分子生物学技术对天山雪岭云杉菌根真菌进行鉴定, 鉴定到 21 种菌根真菌, 其中 *P. lagerbergii*、背芽突霉属(*Cadophora*)和丛赤壳属(*Neonectria*)这 3 种菌根真菌与本实验鉴定到的共生真菌相同。根据已有研究和本研究结果, 我们发现 *P. lagerbergii* 和 *C. interclivum* 普遍定殖于云杉属植物根系中, 并成为该属根系共生真菌的优势种。*P. lagerbergii* 和 *C. interclivum* 可能对云杉属植物的生长和发育存在潜在的影响。

瓶头霉属真菌是一种能够侵染多种植物的有益共生真菌, 与不同生态系统中的多种植物建立共生关系, 在大小兴安岭地区落叶松林^[47]、汤旺河国家森林公园的阔叶红松混交林^[48]和净月潭国家森林公园的红松林^[49]、马尾松^[50]等针叶林, 以及浙江大盘山保护区的映山红^[51]、大兴安岭北部地区野生笃斯越橘^[52]和灰背杜鹃^[53]等杜鹃花科植物中均有报道。本研究发现, 在鉴定出的真菌中, 瓶头霉属真菌的分离频率最高, 其是青海云杉根系共生真菌的优势真菌属, 而且与以上报道中瓶头霉属真菌的菌落形态特征一致。瓶头霉属真菌促进植物生长、改善根系对水和矿质营养元素的吸收与利用, 能够极大地提高植物抗逆能力^[54-57]。青海云杉主要分布于寒冷、干旱的高海拔地区, 瓶头霉属作为青海云杉根系共生真菌的优势真菌属, 我们推测其对青海云杉适应严酷的生活环境具有重要意义。

本研究发现, 不同发育阶段青海云杉根系共生真菌的数量和分离频率都存在差异。在幼树阶段分离获得的青海云杉根系共生真菌的种类和数量最多, 在成树阶段明显低于其他发育阶段。贾岩^[58]在锁阳与其寄主白刺内生真菌微生物生态及不同发育期的生态演替规律研究中发现, 旺盛期分离到的锁阳与其寄主白刺内生真菌最多(22.41%), 其次从高到低依次为衰败期(17.39%)、冬藏期(15.05%)、萌发期(12.37%), 而长期(锡林郭勒 9.36%, 通古淖尔 10.02%)分离到的最少。以上研究结果表明, 植物共生真菌在不同发育阶段的分布均有所差异。因此, 对植物互惠共生真菌进行分离时, 选择的样品应涵盖植物的整个生长周期, 这样才能更加真实地反映种类组成状况。

近年来, 随着高通量测序技术的广泛应用, 关于青海云杉根系共生真菌的研究已取得了重要成果, 揭示了青海云杉根系共生菌的群落结

构及其多样性特征。前人在关于青海云杉根系共生真菌的研究中,采用高通量测序等现代分子生物学手段提供了大量多样性数据,本试验则是对前人研究的重要补充。目前,植物共生真菌在农林生产、生物多样性保护、生态平衡维持等方面具有不可替代的作用,其分离和鉴定是研究生态应用的基础,收集、保护和利用共生真菌资源具有重要的生态意义和经济价值^[59]。本研究采用根段直接培养法首次对青海云杉根系可培养共生真菌进行了分离与鉴定,研究结果为完善青海云杉根系共生真菌多样性以及与共生真菌间的共生互作机制研究提供了基础数据,也为青海云杉菌根化育苗、造林和生态系统的恢复等应用提供了科学依据。

REFERENCES

- [1] 樊永军. 内蒙古地区四种树木外生菌根形态多样性及分子鉴定[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学博士学位论文, 2009
Fan YJ. Morphological diversity and molecular identification of ectomycorrhizae of four dominant tree species in Inner Mongolia area[D]. Hohhot: Doctoral Dissertation of Inner Mongolia Agricultural University, 2009 (in Chinese)
- [2] 中国科学院内蒙古宁夏综合考察队. 内蒙古植被[M]. 北京: 科学出版社, 1985: 723-877
Inner Mongolia and Ningxia Comprehensive Investigation Team of the Chinese Academy of Sciences. Inner Mongolia Vegetation[M]. Beijing: Science Press, 1985: 723-877 (in Chinese)
- [3] 文陇英, 陈拓. 不同海拔高度祁连圆柏和青海云杉叶片色素的变化特征[J]. 植物学报, 2012, 47(4): 405-412
Wen LY, Chen T. Changes of pigments in *Sabina przewalskii* and *Picea crassifolia* needles along with different altitudes[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2012, 47(4): 405-412 (in Chinese)
- [4] 刘润进, 王琳. 生物共生学[M]. 北京: 科学出版社, 2018
Liu RJ, Wang L. Biological Symbiotics[M]. Beijing: Science Press, 2018 (in Chinese)
- [5] 王浩, 方燕, 刘润进, 陈应龙. 丛枝菌根中养分转运、代谢、利用与调控研究的最新进展[J]. 植物生理学报, 2018, 54(11): 1645-1658
Wang H, Fang Y, Liu RJ, Chen YL. Recent advances in the studies of nutrient transportation, metabolism, utilization and regulation in arbuscular mycorrhizas[J]. Plant Physiology Journal, 2018, 54(11): 1645-1658 (in Chinese)
- [6] Martin FM, Uroz S, Barker DG. Ancestral alliances: plant mutualistic symbioses with fungi and bacteria[J]. Science, 2017. DOI: 10.1126/science.aad4501
- [7] 于小娟, 胡玉金, 刘润进. 真菌与植物共生机制研究进展[J]. 微生物学杂志, 2017, 37(1): 98-104
Yu XJ, Hu YJ, Liu RJ. Advances in mechanism study of symbiosis between fungi and plants[J]. Journal of Microbiology, 2017, 37(1): 98-104 (in Chinese)
- [8] 王磊, 闫兴富, 唐占辉. 丛枝菌根真菌对植物繁殖的影响研究进展[J]. 广西植物, 2021. DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202101043
Wang L, Yan XF, Tang ZH. Research progress on the effects of arbuscular mycorrhizal fungi on plant reproduction[J]. Guihaia, 2021. DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202101043 (in Chinese)
- [9] 王浩, 吴爱姣, 刘保兴, 刘润进, 陈应龙. 菌根真菌多样性与植物多样性的相互作用研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(11): 3918-3932
Wang H, Wu AJ, Liu BX, Liu RJ, Chen YL. Interactions between mycorrhizal fungal diversity and plant diversity: a review[J]. Microbiology China, 2020, 47(11): 3918-3932 (in Chinese)
- [10] Błazkowski J, Kozłowska A, Niezgoda P, Goto BT, Dalpé Y. A new genus, *Oehlia* with *Oehlia diaphana* comb. nov. and an emended description of *Rhizoglyphus vesiculiferum* comb. nov. in the *Glomeromycotina*[J]. Nova Hedwigia, 2018, 107(3/4): 501-518
- [11] Błazkowski J, Niezgoda P, Goto BT, Kozłowska A. *Halonatospora* gen. nov. with *H. pansihalos* comb. nov. and *Glomus bareae* sp. nov. (*Glomeromycota*; *Glomeraceae*)[J]. Botany, 2018, 96(11): 737-748
- [12] 杨前宇. 兰科菌根真菌多样性研究及其对兰科植物的影响[D]. 北京: 中国林业科学研究院博士学位论文, 2018
Yang QY. Study on diversity of *Orchidaceae* mycorrhizal fungi and its influence on orchid[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Forestry, 2018 (in Chinese)
- [13] Mandyam K, Jumpponen A. Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi[J]. Studies in Mycology, 2005, 53: 173-189
- [14] 代梦雪, 张光群, 范旭杪, 李博, 湛方栋, 何永美.

- 胁迫生境深色有隔内生真菌生态分布与功能研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26(3): 722-729
- Dai MX, Zhang GQ, Fan XM, Li B, Zhan FD, He YM. Research progress regarding the ecological distribution and function of dark septate endophytes in stressful environments[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2020, 26(3): 722-729 (in Chinese)
- [15] Jumpponen A, Trappe JM. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi[J]. The New Phytologist, 1998, 140(2): 295-310
- [16] Massensini AM, Bonduki VHA, Tótolá MR, Ferreira FA, Costa MD. Arbuscular mycorrhizal associations and occurrence of dark septate endophytes in the roots of Brazilian weed plants[J]. Mycorrhiza, 2014, 24(2): 153-159
- [17] Bonfim JA, Vasconcellos RLF, Baldesin LF, Sieber TN, Cardoso EJBN. Dark septate endophytic fungi of native plants along an altitudinal gradient in the Brazilian Atlantic forest[J]. Fungal Ecology, 2016, 20: 202-210
- [18] 张雪, 郭亚楠, 李焯东, 王文彬, 郑盈盈, 赵丽莉, 贺学礼. 西北荒漠带细枝岩黄耆 AM 真菌与 DSE 真菌时空分布研究[J]. 菌物学报, 2019, 38(11): 2030-2042
- Zhang X, Guo YN, Li YD, Wang WB, Zheng YY, Zhao LL, He XL. Spatial and temporal distribution of arbuscular mycorrhiza fungi and dark septate endophytes in *Hedysarum scoparium* from northwest desert belt[J]. Mycosystema, 2019, 38(11): 2030-2042 (in Chinese)
- [19] Kauppinen M, Raveala K, Wäli PR, Ruotsalainen AL. Contrasting preferences of arbuscular mycorrhizal and dark septate fungi colonizing boreal and subarctic *Avenella flexuosa*[J]. Mycorrhiza, 2014, 24(3): 171-177
- [20] St Leger RJ, Wang CS, Fang WG. New perspectives on insect pathogens[J]. Fungal Biology Reviews, 2011, 25(2): 84-88
- [21] 李兴佳, 冯晓洁, 农向群, 蔡霓, 王广君, 周淦, 涂雄兵, 张泽华. 花生田施用绿僵菌对土壤微生物群落的影响[J]. 中国生物防治学报, 2019, 35(6): 867-875
- Li XJ, Feng XJ, Nong XQ, Cai N, Wang GJ, Zhou G, Tu XB, Zhang ZH. Effect of *Metarhizium anisopliae* as a biocontrol agent on soil microbial community in peanut field[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2019, 35(6): 867-875 (in Chinese)
- [22] 樊永军, 闫伟, 王黎元. 贺兰山地区青海云杉外生菌根的形态类型及分子鉴定[J]. 林业科学, 2011, 47(6): 108-113
- Fan YJ, Yan W, Wang LY. Morphological type and molecular identification of ectomycorrhizae on *Picea crassifolia* in Helan mountain[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2011, 47(6): 108-113 (in Chinese)
- [23] 樊永军, 闫伟, 赵艳玲. 贺兰山地区青海云杉 EM 真菌群落组成与多样性[J]. 东北林业大学学报, 2019, 47(3): 89-93
- Fan YJ, Yan W, Zhao YL. Diversity and community constitution of EM fungi in forest communities of *Picea crassifolia* in Helan mountains[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2019, 47(3): 89-93 (in Chinese)
- [24] 伊如汗. 基于 454 高通量测序技术对内蒙古贺兰山青海云杉外生菌根真菌的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2017
- Yi RH. Study on ectomycorrhizal fungal of *Picea crassifolia* in Helan mountain of Inner Mongolia based on the 454 high throughput sequencing[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2017 (in Chinese)
- [25] 魏杰, 郭晓笑, 杨旭东, 杨岳, 闫伟. 内蒙古地区 5 种棉革菌外生菌根形态描述和分子鉴定[J]. 菌物学报, 2017, 36(7): 870-878
- Wei J, Guo XX, Yang XD, Yang Y, Yan W. Morphological description and molecular identification of five *Tomentella* ectomycorrhizae from Inner Mongolia[J]. Mycosystema, 2017, 36(7): 870-878 (in Chinese)
- [26] 杨岳. 内蒙古八个树种根围土壤外生菌根真菌群落结构研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2018
- Yang Y. Ectomycorrhizal fungal community in the rhizospheric soil of eight tree species in Inner Mongolia[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2018 (in Chinese)
- [27] 刘秉儒, 张秀珍, 胡天华, 李文金. 贺兰山不同海拔典型植被带土壤微生物多样性[J]. 生态学报, 2013, 33(22): 7211-7220
- Liu BR, Zhang XZ, Hu TH, Li WJ. Soil microbial diversity under typical vegetation zones along an elevation gradient in Helan Mountains[J]. Acta Ecologica Sinica, 2013, 33(22): 7211-7220 (in Chinese)
- [28] 单秀琪. 温度对贺兰山地区丽斑麻蜥繁殖与氧化应激水平的影响[D]. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文, 2021
- Shan XQ. Effects of temperature on reproduction and oxidative stress of *Eremias ergus* in Helan mountains[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast

- Forestry University, 2021 (in Chinese)
- [29] 孙海燕, 万书波, 李林, 刘登望. 贺兰山西坡不同海拔梯度土壤活性有机碳分布特征及影响因子[J]. 水土保持学报, 2014, 28(4): 194-199, 205
Sun HY, Wan SB, Li L, Liu DW. Distribution characteristics and influencing factors of soil active organic carbon at different elevations on west slope of Helan mountain[J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2014, 28(4): 194-199, 205 (in Chinese)
- [30] 吴梦瑶, 陈林, 庞丹波, 刘波, 刘丽贞, 邱开阳, 李学斌. 贺兰山不同海拔土壤团聚体碳氮磷含量及其化学计量特征变化[J]. 应用生态学报, 2021, 32(4): 1241-1249
Wu MY, Chen L, Pang DB, Liu B, Liu LZ, Qiu KY, Li XB. Changes of the concentrations and stoichiometry of carbon, nitrogen and phosphorus in soil aggregates along different altitudes of Helan Mountains, Northwest China[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2021, 32(4): 1241-1249 (in Chinese)
- [31] 丁国民, 刘兴明, 倪自银, 彭吉廷. 甘肃祁连山青海云杉种群数量动态的初步研究[J]. 植物资源与环境学报, 2005, 14(4): 36-41
Ding GM, Liu XM, Ni ZY, Peng JT. A preliminary study of population dynamics of *Picea crassifolia* in Qilian Mountains, Gansu Province[J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2005, 14(4): 36-41 (in Chinese)
- [32] 李敏, 姚庆智, 魏杰, 刘洋, 李奕祺, 张旋. 贺兰山紫蘑的分离、鉴定与培养条件[J]. 北方园艺, 2017(14): 169-174
Li M, Yao QZ, Wei J, Liu Y, Li YZ, Zhang X. Separation, identification and culture conditions of *Cortinarius* sp.[J]. Northern Horticulture, 2017(14): 169-174 (in Chinese)
- [33] McLean CB, Cunningham JH, Lawrie AC. Molecular diversity within and between ericoid endophytes from the *Ericaceae* and *Epacridaceae*[J]. New Phytologist, 1999, 144(2): 351-35
- [34] Johansson M. Fungal associations of Danish *Calluna vulgaris* roots with special reference to ericoid mycorrhiza[J]. Plant and Soil, 2001, 231(2): 225-232
- [35] Ashrafi S, Knapp DG, Blaudez D, Chalot M, Maciá-Vicente JG, Zagyva I, Dababat AA, Maier W, Kovács GM. Inhabiting plant roots, *Nematodes*, and truffles—*Polyphilus*, a new helotialean genus with two globally distributed species[J]. Mycologia, 2018, 110(2): 286-299
- [36] Cabral A, Groenewald JZ, Rego C, Oliveira H, Crous PW. *Cylindrocarpum* root rot: multi-gene analysis reveals novel species within the *Ilyonectria radicolica* species complex[J]. Mycological Progress, 2012, 11(3): 655-688
- [37] 伊如汗, 闫伟, 魏杰. 内蒙古贺兰山地区青海云杉 (*Picea crassifolia*) 外生菌根真菌多样性研究[J]. 内蒙古林业调查设计, 2017, 40(2): 71-72, 75
Yi RH, Yan W, Wei J. Ectomycorrhizal diversity of *Picea crassifolia* in Helan mountain of Inner Mongolia[J]. Inner Mongolia Forestry Investigation and Design, 2017, 40(2): 71-72, 75 (in Chinese)
- [38] 郭晓笑. 内蒙古森林土壤中革菌科真菌的高通量分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2017
Guo XX. Analysis of the fungi of *Thelephoraceae* in forest soils of Inner Mongolia based on high-throughput sequencing[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2017 (in Chinese)
- [39] 张震. 祁连山青海云杉林土壤真菌及酶活性的季节动态研究[D]. 兰州: 兰州大学硕士学位论文, 2019
Zhang Z. Seasonal dynamics of soil fungi and enzymatic activity in spruce (*Picea crassifolia*) forests of Qilian mountains[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Lanzhou University, 2019 (in Chinese)
- [40] Walsh E, Duan WJ, Mehdi M, Naphri K, Khiste S, Scalera A, Zhang N. *Cadophora meredithiae* and *C. interclivum*, new species from roots of sedge and spruce in a western Canada subalpine forest[J]. Mycologia, 2018, 110(1): 201-214
- [41] Herrera H, Valadares R, Contreras D, Bashan Y, Arriagada C. Mycorrhizal compatibility and symbiotic seed germination of orchids from the Coastal Range and Andes in south central Chile[J]. Mycorrhiza, 2017, 27(3): 175-188
- [42] Schiebold JMI, Bidartondo MI, Karasch P, Gravendeel B, Gebauer G. You are what You get from your fungi: nitrogen stable isotope patterns in *Epipactis* species[J]. Annals of Botany, 2017, 119(7): 1085-1095
- [43] Glynou K, Ali T, Buch AK, Haghi Kia S, Ploch S, Xia XJ, Çelik A, Thines M, Maciá-Vicente JG. The local environment determines the assembly of root endophytic fungi at a continental scale[J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(8): 2418-2434
- [44] Taylor DL, Hollingsworth TN, McFarland JW, Lennon NJ, Nusbaum C, Ruess RW. A first comprehensive census of fungi in soil reveals both hyperdiversity and fine-scale niche partitioning[J]. Ecological Monographs, 2014, 84(1): 3-20
- [45] Knapp DG, Pintye A, Kovács GM. The dark side is not fastidious—dark septate endophytic fungi of native and

- invasive plants of semiarid sandy areas[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e32570
- [46] 杜海燕, 常顺利, 宋成程, 张毓涛. 天山雪岭云杉森林菌根真菌多样性及其影响因子[J]. 干旱区研究, 2019, 36(5): 1194-1201
Du HY, Chang SL, Song CC, Zhang YT. Diversity of mycorrhizal fungi of *Picea schrenkiana* forest and its affecting factors in the Tianshan mountains[J]. Arid Zone Research, 2019, 36(5): 1194-1201 (in Chinese)
- [47] 杨秀丽. 大兴安岭兴安落叶松森林生态系统菌根及其真菌多样性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学博士学位论文, 2010
Yang XL. Mycorrhizal diversity in the *Larix gmelinii* forest ecosystems of Da Hinggan Ling mountains[D]. Hohhot: Doctoral Dissertation of Inner Mongolia Agricultural University, 2010 (in Chinese)
- [48] 罗琪珊. 汤旺河国家公园森林土壤真菌多样性分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2018
Luo QS. Fungi diversity in the soil of forest in Tangwanghe National Park[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2018 (in Chinese)
- [49] 冀瑞卿, 周吉江, 马世玉, 卡苏尔曼, 徐洋, 李玉. 净月潭国家森林公园针叶林根系共生真菌初步调查[J]. 菌物研究, 2020, 18(3): 154-161
Ji RQ, Zhou JJ, Ma SY, Ka Su'erman, Xu Y, Li Y. Investigation on symbiotic fungi in roots of coniferous forests in Jingyuetan national forest park[J]. Journal of Fungal Research, 2020, 18(3): 154-161 (in Chinese)
- [50] 赵燕珍, 冯万艳, 冯婧玮, 孙学广. 福廷瓶头霉与马尾松的共生特征[J]. 菌物学报, 2020, 39(5): 806-816
Zhao YZ, Feng WY, Feng JW, Sun XG. Characteristics of *Phialocephala fortinii* and *Pinus massoniana* symbiosis[J]. Mycosystema, 2020, 39(5): 806-816 (in Chinese)
- [51] 刘亚, 王盼, 周钰鸿, 陈江芳, 陈子林. 浙江大盘山映山红菌根真菌的分离和鉴定[J]. 北方园艺, 2019(9): 77-82
Liu Y, Wang P, Zhou YH, Chen JF, Chen ZL. Mycorrhizal fungi isolation and identification of *Rhododendron simsii* in Dapanshan, Zhejiang[J]. Northern Horticulture, 2019(9): 77-82 (in Chinese)
- [52] 刘振华, 李潞滨, 童方平, 姚娜. 灰背杜鹃菌根真菌的分离与鉴定及 DGGE 的应用[J]. 湖南林业科技, 2012, 39(4): 16-20
Liu ZH, Li LB, Tong FP, Yao N. Isolation and identification of mycorrhizal fungi from *Rhododendron hippophaeoides* and application of DGGE[J]. Hunan Forestry Science & Technology, 2012, 39(4): 16-20 (in Chinese)
- [53] 杨秀丽, 闫伟. 笃斯越橘菌根真菌多样性[J]. 微生物学报, 2015, 55(2): 214-219
Yang XL, Yan W. Mycorrhizal fungi diversity of *Vaccinium uliginosum* L.[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(2): 214-219 (in Chinese)
- [54] Obase K, Matsuda Y. Culturable fungal endophytes in roots of *Enkianthus campanulatus* (Ericaceae)[J]. Mycorrhiza, 2014, 24(8): 635-644
- [55] Vohnik M, Albrechtova J, Vosatka M. The inoculation with *Oidiodendron maius* and *Phialocephala fortinii* alters phosphorus and nitrogen uptake, foliar C:N ratio and root biomass distribution in *Rhododendron* cv. Azurro[J]. Azurro. Symbiosis, 2005, 40(3): 251-251
- [56] 刘永金, 徐滔, 袁银, 刘亚, 洪文君, 庄雪影. 接种福廷瓶头霉对毛棉杜鹃幼苗共生效应及其对加磷的响应[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(34): 225-228
Liu YJ, Xu Tao, Yuan Y, Liu Y, Hong WJ, Zhuang XY. Symbiotic effect and responses to adding phosphorus to *Rhododendron moulmianense* seedling after inoculated with *Phialocephala fortinii*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2015, 43(34): 225-228 (in Chinese)
- [57] 刘静, 刘凤红, 宿红艳, 宋方圆, 程显好. 接种深色有隔内生真菌对蓝莓果实品质的影响[J]. 北方园艺, 2016(20): 33-36
Liu J, Liu FH, Su HY, Song FY, Cheng XH. Effect of inoculation DSE fungi on blueberry fruit quality[J]. Northern Horticulture, 2016(20): 33-36 (in Chinese)
- [58] 贾岩. 锁阳与其寄主白刺内生真菌微生态及不同发育期的生态演替规律[D]. 太原: 山西大学硕士学位论文, 2017
Jia Y. Research of micro-ecology and evolution of endophytic fungi from *Cynomorium songaricum* and its host *Nitraria tangutorum* in different developmental stages[D]. Taiyuan: Master's Thesis of Shanxi University, 2017 (in Chinese)
- [59] 林双双, 孙向伟, 王晓娟, 豆存艳, 李媛媛, 罗巧玉, 孙莉, 金樑. 我国菌根学研究进展及其应用展望[J]. 草业学报, 2013, 22(5): 310-325
Lin SS, Sun XW, Wang XJ, Dou CY, Li YY, Luo QY, Sun L, Jin L. Mycorrhizal studies and their application prospects in China[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2013, 22(5): 310-325 (in Chinese)