

简 报

云南干巴菌子实体内可培养微生物

王冉 于富强*

(中国科学院昆明植物研究所 资源植物与技术重点实验室 云南 昆明 650201)

摘 要:【背景】微生物在菌根真菌的孢子萌发、菌丝体生长、菌根形成以及子实体发育等过程中起到一定作用。【目的】对采自云南省昆明市嵩明县和楚雄彝族自治州禄丰县的 8 个干巴菌子实体内的微生物进行分离培养鉴定, 为后期研究微生物与干巴菌之间的相互作用奠定基础。【方法】采用传统平板分离法从干巴菌子实体内分离获得微生物群落, *t* 检验分析不同地区采集的干巴菌子实体内微生物菌落总数的差异, 16S rRNA 基因和 ITS 序列进行系统发育树构建和微生物多样性分析。【结果】采自嵩明县和禄丰县的 8 个干巴菌子实体内共分离获得 282 株可培养的细菌, 两个地区的细菌菌落总数无显著差异($P=0.22$)。所有细菌分属 2 门 12 属 15 种。其中 80% 的细菌属于变形菌门, 且以 γ -变形菌为优势菌群, 假单胞菌属(*Pseudomonas*)为优势菌属。其余 20% 的细菌属于拟杆菌门。从干巴菌子实体中分离获得 114 株真菌, 两个地区的真菌菌落总数无显著差异($P=0.65$)。所有真菌分属 2 门 10 属 10 种。其中 62% 的真菌属于子囊菌门(Ascomycota), 并以分离自禄丰县干巴菌子实体内的 *Lophiostoma* 为优势属。38% 的真菌属于担子菌门(Basidiomycota), 并以 *Asterotremella* 为优势属。【结论】两个不同地区采集的干巴菌子实体内细菌和真菌在菌落总数上无显著差异。所有细菌都以 γ -变形菌为优势菌群, 假单胞菌属为优势菌属。嵩明干巴菌子实体内真菌以担子菌门为优势菌群, *Asterotremella* 为优势属。而禄丰干巴菌子实体内真菌则以子囊菌门为优势菌群, *Lophiostoma* 为优势属。

关键词: 干巴菌, 内生菌群, 真菌, 细菌, 多样性

Culturable microorganisms associated with basidiocarps of *Thelephora ganbajun*

WANG Ran YU Fu-Qiang*

(Key Laboratory of Economic Plants and Biotechnology, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan 650201, China)

Abstract: [Background] Microorganisms have a role in spore germination, hyphal growth, mycorrhiza

Foundation items: Chinese Academy of Sciences (CAS) President's International Fellowship Initiative (2015VBA067); Yunnan Talent Plan High-End Foreign Experts Project; Independent Deployment Project of Kunming Institute of Botany, CAS (Y6620321)

*Corresponding author: E-mail: fqyu@mail.kib.ac.cn

Received: July 13, 2017; **Accepted:** October 26, 2017; **Published online** (www.cnki.net): November 02, 2017

基金项目: 中国科学院国际人才计划项目(2015VBA067); 云岭英才高端外国专家项目; 中国科学院昆明植物研究所特色研究所自主部署项目(Y6620321)

*通信作者: E-mail: fqyu@mail.kib.ac.cn

收稿日期: 2017-07-13; 接受日期: 2017-10-26; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-11-02

formation and basidiocarp development of mycorrhizal fungi. **[Objective]** Microorganisms of eight basidiocarps of *Thelephora ganbajun* which were collected from Songming County, Kunming and Lufeng County, Chuxiong Yi autonomous Prefecture, Yunnan Province, SW China was studied, which lay a foundation for follow-up studies on the interaction between microorganisms and *T. ganbajun*. **[Methods]** The dilution plate method was carried out to obtain the microbial isolates from basidiocarps of *T. ganbajun*. The difference of microbial quantity of *T. ganbajun* which were collected from different sites was analyzed by *t*-test. Diversity of microorganisms was analyzed by 16S rRNA gene and ITS amplification, sequencing and establishment of phylogenetic tree. **[Results]** A total of 282 culturable bacterial isolates of eight basidiocarps from Songming County and Lufeng County belonged to 15 species and 12 genera in 2 phyla. 80% of bacteria were affiliated to the Proteobacteria and dominated by γ -Proteobacteria and *Pseudomonas*. The other 20% were affiliated to the Bacteroidetes. A total of 114 culturable fungal isolates belonged to 10 species and 10 genera in 2 phyla. 62% of fungi were affiliated to the Ascomycota, dominated by *Lophiostoma* which was only isolated from Lufeng County. 38% of fungi were affiliated to the Basidiomycota, dominated by *Asterotremella*. **[Conclusion]** There was no significant difference in the number of CFU of bacteria ($P=0.22$) and fungi ($P=0.65$) among basidiocarps of *T. ganbajun* which were collected from different sites. All bacteria isolates were dominated by γ -Proteobacteria and *Pseudomonas*. Fungi were dominated by Basidiomycota and *Asterotremella* in Songming, whereas fungi were dominated by Ascomycota and *Lophiostoma* in Lufeng.

Keywords: *Thelephora ganbajun*, Endogenous microbes, Fungi, Bacteria, Diversity

菌根真菌是自然生态系统中最重要功能群之一,大多数的陆生植物都存在与菌根真菌共生的情况^[1]。在自然界中,菌根真菌要顺利侵染植物营养根形成菌根,菌丝体要顺利生长分化最终形成子实体,不仅取决于其周围的非生物因素,如土壤、气候、光照等,也取决于一些生物因素,如土壤微生物。某些土壤微生物可通过与菌根真菌的相互作用,以特殊的方式影响菌根的形成并对宿主植物产生作用^[2-4]。迄今为止,研究者们已经从不同的菌塘土壤、菌根根际、健康的菌根和子实体中分离获得丰富的微生物信息^[5-8],并不断探索着这些微生物与菌根真菌之间的互作关系。Burke等^[9]利用 T-RFLP 和 16S rRNA 基因序列分析技术对与多种不同菌根真菌共生的花旗松菌根进行分析,结果表明 α -变形菌与拟杆菌门的细菌为花旗松菌根中主要的微生物类群。Kumari等^[10]采集了喜马拉雅西北部地区的鸡油菌属的不同子实体,实验结果表示不同子实体内细菌菌落数量为 $(0.5-1.1) \times 10^3$ CFU/g,包括变形菌门的 γ -变形菌、 β -变形菌和厚壁菌门的细菌。Garbaye^[11]在 1994 年首次提出了菌根促生细菌(Mycorrhization helper bacteria, MHB)的概念:

即 MHB 是可以促进菌根真菌在宿主植物根部的定殖、生长,从而间接促进植物生长的细菌。革兰氏阴性和阳性细菌中的大部分细菌都可以作为 MHB 促进菌根的形成,孢子的萌发和子实体的生长等^[12]。同时,一些特定细菌的存在是真菌散发特殊气味的重要原因,比如 *Tuber borchii* 上散发的噻吩挥发物就是由其子实体内寄居的微生物产生的,且挥发物显著地与优势类群 α -变形菌和次要类群拟杆菌门(Bacteroidetes)的丰富度有关^[13]。

相比丰富的细菌群落,伴生真菌群落的报道相对较少,但伴生真菌依然在菌根真菌的生活史中扮演着重要的角色。万山平^[14]利用传统平板分离法及毛细管电泳筛选,从白块菌菌塘土壤中获得 74 株真菌,并以子囊菌门的真菌为优势类群。陈桂梅等^[15]的研究表明菌根伴生真菌菌丝体可以作为营养物质供外生菌根真菌生长,并诱导其产生中性蛋白酶。

干巴菌(*Thelephora ganbajun*)又名干巴革菌,是云南著名的名贵野生食用菌,隶属于担子菌门(Basidiomycota)革菌科(Thelephoraceae)革菌属(*Thelephora*)。干巴菌为外生菌根真菌,能与云南

松、思茅松和油杉等植物形成共生关系^[16]。朱启顺等^[17]在 1995 年报道了干巴菌根际土壤微生物的几大类群,1997 年杨大智等^[18]从干巴菌子实体中分离到少量真菌,此后关于与干巴菌伴生的微生物的研究一直处于空白。而对于干巴菌的人工栽培,由于纯培养菌丝体难以获得,所以一直未见成功^[19]。鉴于微生物在菌根真菌生活史中的重要作用,本研究对采自两个地区的干巴菌子实体内微生物进行了多样性的研究,这将有助于对干巴菌生活史的了解,填补研究的空白,同时为后期栽培研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2015 年 9 月,分别于云南省昆明市嵩明县阿子营村(T1-T4)和楚雄彝族自治州禄丰县(T5-T8)随机采集新鲜干巴菌子实体共 8 个。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

细菌菌株分离与培养使用胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA),真菌菌株分离与培养使用马丁培养基,各培养基配方参照《微生物学实验》^[20]。上述培养基于 1×10^5 Pa 灭菌 30 min 后备用。

溶菌酶、引物,生工生物工程(上海)股份有限公司;Taq 酶,大连宝生物工程有限公司;无机试剂,昆明仁科商贸有限公司。高通量组织研磨器,宁波新芝生物科技股份有限公司;PCR 仪,杭州博日科技有限公司。

1.3 干巴菌子实体内微生物的分离与培养

选择新鲜、幼嫩、无扇状分支或少分支的干巴菌子实体,清除表面泥土和松针,用 75% 的酒精表面消毒。在超净台中徒手掰开子实体,用无菌手术刀切取 0.5 g 的菌肉放入装有 4.5 mL 灭菌生理液(0.85%氯化钠)的离心管中,用高通量组织研磨器(60 Hz, 1 800 r/min)将菌肉破碎至无成型组织块,并将组织液于 37 °C、120 r/min 培养 30 min。超净台内将组织液分别稀释至 10^{-2} – 10^{-6} g/mL。吸取 50 μ L 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} g/mL 浓度的组织液分别均匀

涂于 TSA 培养基上,每个浓度 3 个重复,并于 28 °C 进行培养。 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} g/mL 浓度的组织液涂于马丁培养基上,每个浓度 3 个重复,并于 26 °C 下进行培养^[21]。2–7 d 后,对不同培养基内的微生物进行单菌落计数,将单菌落挑取接种至装有液体 TSA 培养基和马丁培养基的离心管中进行培养。

1.4 可培养微生物的分子鉴定

1.4.1 细菌 DNA 提取与扩增^[22]

5 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,加入 TES buffer (20 mmol/L Tris, 50 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl, pH 7.9), 13 000 r/min 离心 2 min;再加入 1.2 mL TES buffer 重悬,加入 300 μ L 溶菌酶(5 mg/mL)裂解细胞,并将其置于 37 °C 下 60 min。16S rRNA 基因扩增引物^[11]为 63f (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3')和 1495r (5'-CTACGGCTACCTTGTTCGA-3'); 25 μ L PCR 体系:DNA 1 μ L,正、反向引物(5 μ mol/L)各 1 μ L, 10×Buffer (Mg^{2+} free) 2 μ L, dNTPs (10 μ mol/L) 1 μ L, BSA (1%) 0.5 μ L, $MgCl_2$ (25 mmol/L) 1.5 μ L, 5 U/ μ L Taq 酶 0.3 μ L, ddH₂O 16.7 μ L。PCR 反应条件:95 °C 5 min;94 °C 1 min, 60 °C 1 min,72 °C 1 min,27 个循环;72 °C 10 min。

1.4.2 真菌 DNA 提取与扩增

CTAB 法提取真菌 DNA^[23]。扩增引物为 ITS1F (5'-GGTCATTAGAGGAAGTAA-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。25 μ L PCR 反应体系:DNA 1 μ L,正、反向引物(5 μ mol/L)各 1 μ L, 10×Buffer (Mg^{2+}) 2.5 μ L, dNTPs (10 μ mol/L) 1.5 μ L, BSA (1%) 1 μ L, $MgCl_2$ (25 mmol/L) 0.5 μ L, Taq 酶 (5 U/ μ L) 0.3 μ L, ddH₂O 16.2 μ L。PCR 条件:95 °C 5 min;94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35 个循环;72 °C 10 min。

1.5 数据分析

使用 BLAST 对获得的序列与 GenBank 中的序列进行比对,相似度大于 98% 的作为一个 OTU。使用 ContigExpress 拼接与编辑序列,在 BioEdit v7.0.9 中进行比对和自动排序,排好的序列用 MEGA 6.0 中的 Neighbor-Joining 构建系统发育树。

干巴菌 8 个子实体内微生物群落数量用 SPSS 13.0 进行独立样本 *t* 检验(*t*-test)。

2 结果与分析

2.1 干巴菌子实体内的微生物菌落总数

阿子营采集的 4 个新鲜干巴菌子实体内细菌菌落总数为 $4.0\times10^7\text{--}5.2\times10^7$ CFU/g, 禄丰县采集的干巴菌子实体内细菌菌落总数为 $3.0\times10^7\text{--}3.6\times10^7$ CFU/g (表 1)。不同地区的子实体内细菌菌落总数没有显著性差异($P=0.22$)。

阿子营采集的 4 个新鲜干巴菌子实体内真菌菌落总数为 $0\text{--}3.0\times10^4$ CFU/g, 禄丰县采集的干巴菌子实体内真菌菌落总数为 $0\text{--}3.3\times10^4$ CFU/g (表 2)。不同地区的干巴菌子实体内真菌菌落总数没有显著性差异($P=0.65$)。

2.2 干巴菌子实体内的微生物种类多样性

2.2.1 分离的细菌种属

两个不同地区采集的 8 个干巴菌子实体内共

获得 282 株可培养的细菌, 其中来自嵩明县的 4 个子实体(T1–T4)共获得 154 株细菌, 分属 2 门 8 属 11 种。来自禄丰县的 4 个子实体(T5–T8)共获得 128 株细菌, 分属 2 门 7 属 10 种(图 1)。

80%的细菌隶属于变形菌门(嵩明 125 株, 禄丰 101 株), 其余 20% (嵩明 29 株, 禄丰 27 株)的细菌隶属于拟杆菌门。变形菌门的细菌中, 94%的细菌属于 γ -变形菌(嵩明 117 株, 禄丰 96 株), 并以假单胞菌属为优势菌属(嵩明 74 株; 禄丰 49 株) (图 2, 图 3)。其中假单胞菌属包括 4 个种: *P. rhizosphaerae*、*P. fluorescens*、*P. tolaasii* 和 *P. psychrophila*。 γ -变形菌中还包括自然水体中常见的不动杆菌属(*Acinetobacter*)、拉恩氏菌属(*Rahnella*)的细菌以及肠杆菌属(*Enterobacter*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、*Cedecea* 属、泛菌属(*Pantoea*) 的部分细菌。除了 γ -变形菌外, 还分离到少量的 β -变形菌, 包括嵩明干巴菌子实体内分离到的 *Janthinobacterium* 属, 草螺菌属

表 1 干巴菌子实体内细菌菌落数量

Table 1 Number of bacteria isolates from eight basidiocarps of *T. ganbajun*

采集地 Region	干巴菌子实体 <i>T. ganbajun</i> basidiocarps	Total colony ($\times 10^7$ CFU/g)	菌株数量 Number of isolates	OTUs	β -变形菌 β -Proteobacteria	γ -变形菌 γ -Proteobacteria	拟杆菌门 Bacteroidetes
嵩明县 Songming County	T1	7.1 \pm 4.7	24	7	0	19	5
	T2	4.3 \pm 4.0	36	7	0	27	9
	T3	6.0 \pm 4.8	47	8	5	38	9
	T4	8.6 \pm 5.2	47	8	0	39	8
禄丰县 Lufeng County	T5	4.9 \pm 3.5	30	5	3	27	3
	T6	4.5 \pm 3.5	32	4	0	21	11
	T7	8.2 \pm 3.0	33	7	0	28	5
	T8	5.1 \pm 3.6	33	8	2	24	9

表 2 干巴菌子实体内真菌菌落数量

Table 2 Number of fungi isolates from eight basidiocarps of *T. ganbajun*

采集地 Region	干巴菌子实体 <i>T. ganbajun</i> basidiocarps	Total colony ($\times 10^4$ CFU/g)	菌株数量 Number of isolates	OTUs	子囊菌门 Ascomycota	担子菌门 Basidiomycota	不可培养的真菌 Uncultured fungi
嵩明县 Songming County	T1	2.2 \pm 0.17	15	0	0	0	15
	T2	0.0	0	0	0	0	0
	T3	1.7 \pm 0.30	28	3	7	21	0
	T4	0.6 \pm 0.03	4	1	4	0	0
禄丰县 Lufeng County	T5	0.0	0	0	0	0	0
	T6	2.2 \pm 0.33	37	2	16	8	0
	T7	1.6 \pm 0.50	6	1	6	0	0
	T8	3.6 \pm 2.00	24	5	18	6	0

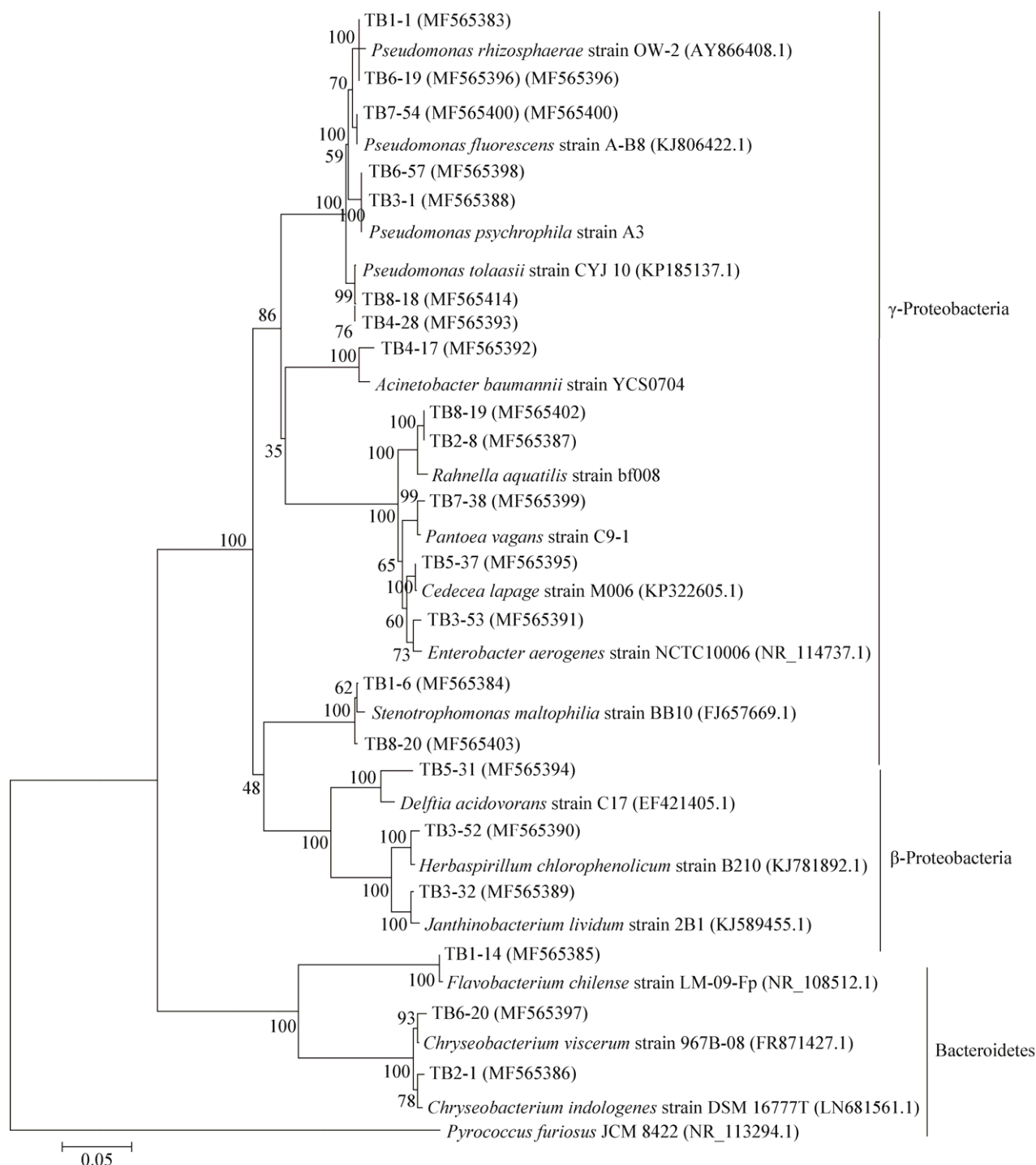


图 1 基于干巴菌子实体内(T1-T8)可培养细菌的 16S rRNA 基因构建的 Neighbor-Joining 进化树

Figure 1 Neighbor-Joining tree of culturable bacteria in *T. ganbajun* basidiocarps (T1-T8) based on 16S rRNA gene partial sequences

注：序列的登录号位于圆括号内；系统发育树分支点处的数字表示基于 1 000 次重复的 Bootstrap 支持率(>50%)；标尺表示 100 个核苷酸中有 5 个被替换。

Note: The accession number is shown in parenthesis; Numbers at the branch points indicated the level of bootstrap support based on 1 000 re-samplings (>50%); The scale bar corresponds to 0.05 substitutions per nucleotide position.

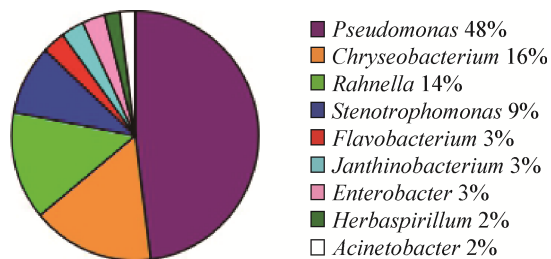


图2 T1-T4 子实体内细菌所在属的分布

Figure 2 Distribution of bacterial genera in *T. ganbajun* basidiocarps (T1-T4)

(*Herbaspirillum*) 的细菌以及禄丰干巴菌子实体内分离到的 *Delftia* 属的细菌。拟杆菌门中 90% 的细菌(嵩明 24 株, 禄丰 27 株)都属于金黄杆菌属(*Chryseobacterium*), 另外从嵩明干巴菌子实体内分离少量产黄杆菌属(*Flavobacterium*) 的细菌。

2.2.2 真菌多样性

两个不同地区的 8 个干巴菌子实体内共获得 114 株可培养的真菌, 其中来自嵩明县的 4 个子实

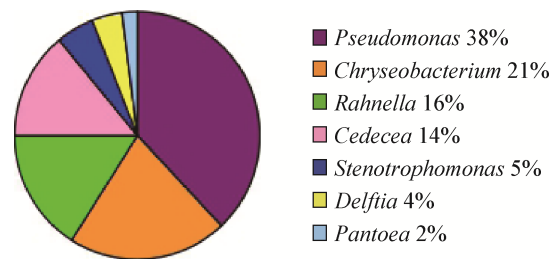


图3 T5-T8 子实体内细菌所在属的分布

Figure 3 Distribution of bacterial genera in *T. ganbajun* basidiocarps (T5-T8)

体共获得 47 株真菌, 分属于 2 个门 4 个属 4 个种。来自禄丰县的 4 个子实体共获得 67 株真菌, 分属于 2 个门 7 个属 7 个种(图 4)。

嵩明采集的子实体内 66% 的真菌属于担子菌门(31 株), 34% 的真菌属于子囊菌门(16 株)。担子菌门中包括以 *Asterotremella* 属(19 株)为优势菌属的真菌以及 *Tremellales* 属(12 株)的真菌。子囊菌门中包括木霉属(*Trichoderma*)和念珠菌属(*Candida*)的真菌

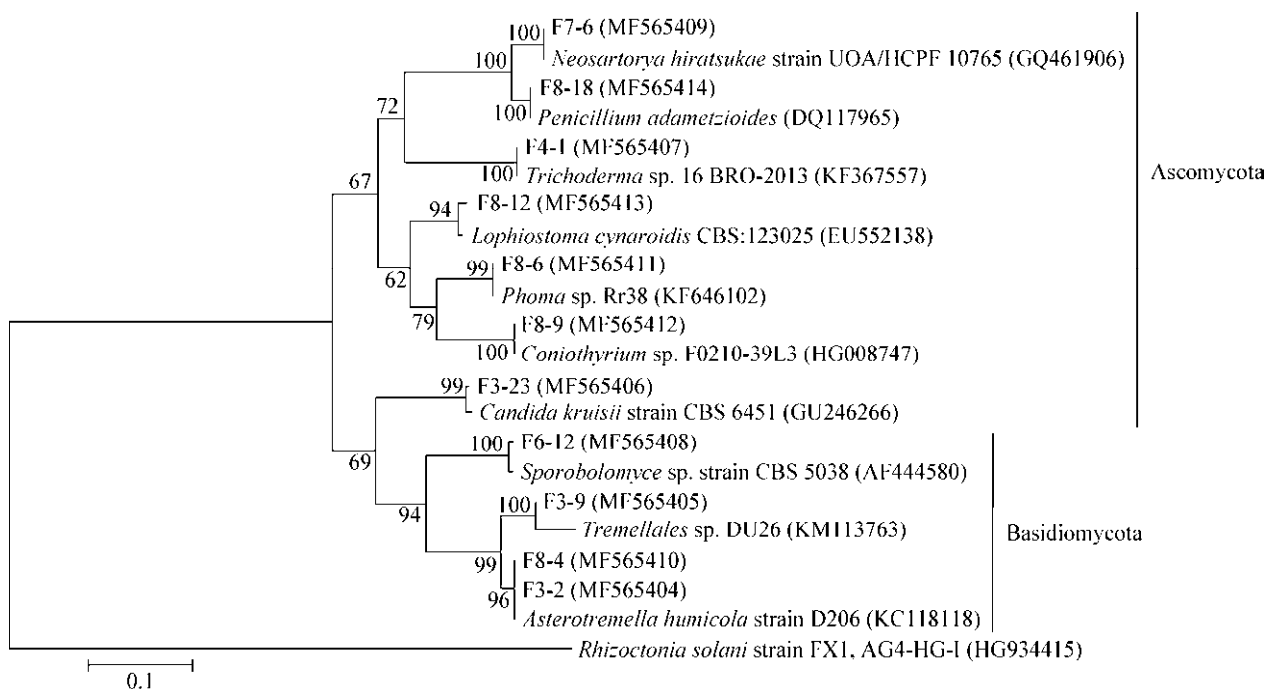


图4 基于干巴菌子实体内(T1-T8)可培养真菌的 ITS 构建的 Neighbor-Joining 进化树

Figure 4 Neighbor-Joining tree of culturable fungi in *T. ganbajun* basidiocarps (T1-T8) based on nearly complete ITS sequences
注: 序列的登录号位于圆括号内; 系统发育树分支点处的数字表示基于 1 000 次重复的 Bootstrap 支持率(>50%); 标尺表示 100 个核苷酸中有 10 个被替换。

Note: The accession number is shown in parenthesis; Numbers at the branch points indicated the level of bootstrap support based on 1 000 re-samplings (>50%); The scale bar corresponds to 0.1 substitutions per nucleotide position.

(图 5)。禄丰采集的子实体内 74% 的真菌属于子囊菌门(50 株), 26% 的真菌属于担子菌门(17 株)。子囊菌门中以 *Lophiostoma* 为优势菌属(25 株), 其次还包括茎点霉属(*Phoma*), 新萨托菌属(*Neosartorya*), 青霉属(*Penicillium*)和盾壳霉属(*Coniothyrium*)的真菌。担子菌门的真菌包括掷孢酵母属(*Sporobolomyces*)和 *Asterotremella* 属(图 6)。两个不同地区的子实体内真菌种类上表现出较大差异。

3 讨论与结论

对来自云南省两个不同地区的干巴菌子实体内微生物进行了分离培养和鉴定, 从中获得 282 株细菌和 114 株真菌。两个不同地区的干巴菌子实体内细菌菌落数量差异不显著, 且细菌种类上都以 γ -变形菌为优势类群, 假单胞菌属为优势菌属。已有研究显示与干巴菌伴生的优势细菌类群有芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和节杆菌属(*Arthrobacter*)等的一些种^[16], 而假单胞菌属

的细菌对真菌孢子的形成、菌丝的生长和子实体的形态建成均有一定促进作用^[24-25]。除了假单胞菌属, γ -变形菌中还包括拉恩氏菌属、寡养单胞菌属、肠杆菌属和不动杆菌属的一些细菌。这些属的细菌在鸡油菌、白块菌等真菌子实体中也曾被分离获得过^[10,26], 而嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)对白块菌和华山松菌根的形成有极显著的抑制作用^[15]。少量 *Cedecea* 属和泛菌属的细菌也被分离得到, 但关于这些属的细菌与菌根真菌之间的相关研究未见报道。研究中还分离到少量的 β -变形菌, 包括草螺菌属、*Janthinobacterium* 属和 *Delfia* 属的细菌。 β -变形菌在外生菌根表面为常见的细菌类群^[27]。除了变形菌门, 干巴菌子实体内还分离到拟杆菌门的大量细菌, 主要为金黄杆菌属的细菌, 此类细菌在松口蘑菌塘土壤内也曾被分离得到^[28]。

在本研究中, 我们还从干巴菌子实体内分离到一定数量和种类的真菌, 并发现不同地区的真菌菌落数量差异不显著, 但真菌种类上却有很大差别。嵩明县干巴菌子实体中分离到的真菌以担子菌门为优势类群, *Asterotremella* 属为优势菌属。此外还分离到 *Tremellales* 属和子囊菌门的念珠菌属、木霉属的真菌。禄丰县干巴菌子实体中分离到的真菌则以子囊菌门为优势类群, *Lophiostoma* 属为优势菌属。此外还包括新萨托菌属、青霉属、盾壳霉属、茎点霉属和担子菌门的 *Asterotremella* 属、掷孢酵母属的真菌。已有的研究中, 干巴菌组织直接接种后分离到毛霉、赤霉、交链孢霉属等的 6 属 6 种真菌^[18], 这些真菌与本研究分离到的真菌无重合。不同的采集生境可能由于土壤性质, 植被分布, 海拔气候等原因对真菌群落的组成产生较大影响。

除了子实体, 菌塘、菌根、菌根根际土壤等均存在丰富的微生物群落, 而已有的研究表明这些微生物在数量和种类上均存在较大差异^[8,29]。为了完善微生物多样性的研究, 在后续实验中将从干巴菌菌塘土壤、菌根等中分离微生物, 并对多个不同生境下采集的干巴菌子实体进行对比, 深入探讨微生物群落的多样性。

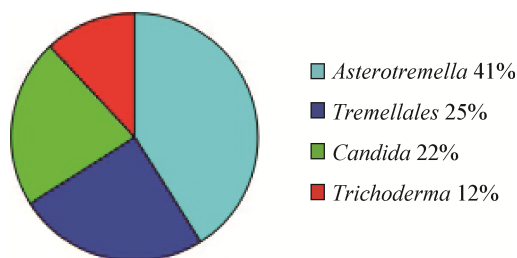


图 5 T1-T4 子实体内真菌所在属的分布

Figure 5 Distribution of fungal genera in *T. ganbajun* basidiocarps (T1-T4)

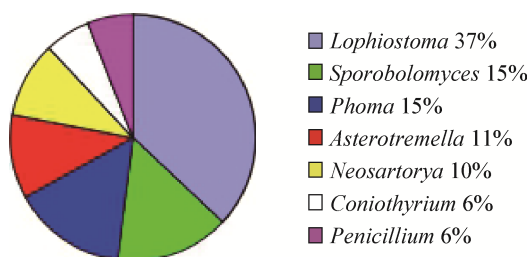


图 6 T5-T8 子实体内真菌所在属的分布

Figure 6 Distribution of fungal genera in *T. ganbajun* basidiocarps (T5-T8)

REFERENCES

- [1] van Der Heijden MGA, Martin FM, Selosse MA, et al. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future[J]. *New Phytologist*, 2015, 205(4): 1406-1423
- [2] Meyer JR, Linderman RG. Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and a plant growth-promoting bacterium, *Pseudomonas putida*[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1986, 18(2): 185-190
- [3] Linderman RG. Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect[J]. *Phytopathology*, 1988, 78(3): 366-371
- [4] Navarro-Ródenas A, Berná LM, Lozano-Carrillo C, et al. Beneficial native bacteria improve survival and mycorrhization of desert truffle mycorrhizal plants in nursery conditions[J]. *Mycorrhiza*, 2016, 26(7): 769-779
- [5] Vaario LM, Fritze H, Spetz P, et al. *Tricholoma matsutake* dominates diverse microbial communities in different forest soils[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(24): 8523-8531
- [6] Bending GD, Poole EJ, Whipps JM, et al. Characterisation of bacteria from *Pinus sylvestris*-*Suillus luteus* mycorrhizas and their effects on root-fungus interactions and plant growth[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 39(3): 219-227
- [7] Long LK, Lin QY, Yao Q, et al. Population and function analysis of cultivable bacteria associated with spores of arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*[J]. *3 Biotech*, 2017, 7(1): 8
- [8] Dahm H, Wrotniak W, Strzelczyk E, et al. Diversity of culturable bacteria associated with fruiting bodies of ectomycorrhizal fungi[J]. *Phytopathologia Polonica*, 2005, 38: 51-62
- [9] Burke DJ, Dunham SM, Kretzer AM. Molecular analysis of bacterial communities associated with the roots of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) colonized by different ectomycorrhizal fungi[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 65(2): 299-309
- [10] Kumari D, Reddy MS, Upadhyay RC, et al. Diversity of cultivable bacteria associated with fruiting bodies of wild Himalayan *Cantharellus* spp.[J]. *Annals of Microbiology*, 2013, 63(3): 845-853
- [11] Garbaye J. Tansley Review No.76 Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis[J]. *New Phytologist*, 1994, 128(2): 197-210
- [12] Schrey SD, Schellhammer M, Ecke M, et al. Mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* AcH 505 induces differential gene expression in the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*[J]. *New Phytologist*, 2005, 168(1): 205-216
- [13] Splivallo R, Deveau A, Valdez N, et al. Bacteria associated with truffle-fruited bodies contribute to truffle aroma[J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(8): 2647-2660
- [14] Wan SP. Microorganism diversity in Chinese white truffles and their application in the mycorrhizal synthesis[D]. Kunming: Master's Thesis of Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, 2013 (in Chinese)
万山平. 国产白块菌微生物多样性及其在菌根合成中的应用[D]. 昆明: 中国科学院昆明植物研究所硕士学位论文, 2013
- [15] Chen GM, Li SP, Zhang HH, et al. Influence of mycorrhiza-associated fungi on the growth and neutral proteases in ectomycorrhizal fungi[J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2009, 37(5): 206-210 (in Chinese)
陈桂梅, 李守萍, 张海涵, 等. 菌根共生真菌对外生菌根真菌生长及其中性蛋白酶活性的影响[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2009, 37(5): 206-210
- [16] Fu SQ, Wei RC. Research advance in *Thelephora ganbajun*[J]. *Forest Science and Technology*, 1997(8): 21-23 (in Chinese)
傅四清, 魏蓉城. 干巴菌研究进展[J]. *林业科技通讯*, 1997(8): 21-23
- [17] Zhu QS, Yang DZ, Liu H. A study of *Thelephora ganbajun* I. relation between *T. ganbajun* and environmental factors[J]. *Edible Fungi of China*, 1995(4): 49,52 (in Chinese)
朱启顺, 杨大智, 刘屹. 干巴菌(*Thelephora ganbajun* Zang)的研究 I. 干巴菌与其生境因子的关系[J]. *中国食用菌*, 1995(4): 49,52
- [18] Yang DZ, Zhu QS, Yang ZB, et al. Study on companion fungi in *Thelephora ganbajun*'s fruit-body[J]. *Edible Fungi of China*, 1997, 16(2): 8-9 (in Chinese)
杨大智, 朱启顺, 杨正斌, 等. 干巴菌子实体内共生真菌的研究[J]. *中国食用菌*, 1997, 16(2): 8-9
- [19] Feng YL, Guo X, Yang ZF, et al. Research advance in *Thelephora ganbajun* which is belonged to *Thelephora*[J]. *Edible Fungi*, 2016, 38(4): 1-3 (in Chinese)
冯云利, 郭相, 杨珍福, 等. 革菌属干巴菌研究进展[J]. *食用菌*, 2016, 38(4): 1-3
- [20] Zhao B, He SJ. Microbiology Experiment[M]. Beijing: Science Press, 2002: 85 (in Chinese)
赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 85
- [21] Gazzanelli G, Malatesta M, Pianetti A, et al. Bacteria associated to fruit bodies of the ecto-mycorrhizal fungus *Tuber borchii* vittad[J]. *Symbiosis*, 1999, 26(3): 211-222
- [22] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. Short Protocols in Molecular Biology[M]. Beijing: Science Press, 2001: 39 (in Chinese)
奥斯伯 FM, 布伦特 R, 金斯顿 RE, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 39
- [23] Gardes M, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts[J]. *Molecular Ecology*, 1993, 2(2): 113-118
- [24] Barbieri E, Guidi C, Bertaux J, et al. Occurrence and diversity of bacterial communities in *Tuber magnatum* during truffle maturation[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(9): 2234-2246
- [25] Li SP, Cheng YE, Tang M, et al. Isolation and identification of mycorrhiza helper bacteria *Pseudomonas fluorescens* of *Pinus tabulaeformis*[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2009, 29(10): 2103-2108 (in Chinese)
李守萍, 程玉娥, 唐明, 等. 油松菌根促生细菌——荧光假单胞菌的分离与鉴定[J]. *西北植物学报*, 2009, 29(10): 2103-2108
- [26] Wan SP, Liu PG. Diversity of culturable bacteria associated with ascocarps of a Chinese white truffle, *Tuber panzhihuanense* (Ascomycota)[J]. *Plant Diversity and Resources*, 2014, 36(1): 29-36
- [27] Khetmalas MB, Egger KN, Massicotte HB, et al. Bacterial diversity associated with subalpine fir (*Abies lasiocarpa*) ectomycorrhizae following wildfire and salvage-logging in central British Columbia[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2002, 48(7): 611-625
- [28] Jiang H, He CG, Yu FQ, et al. Bacterial diversity cultured from shirooms of *Tricholoma matsutake*[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2015, 34(1): 150-156 (in Chinese)
姜华, 何承刚, 于富强, 等. 松口蘑(*Tricholoma matsutake*)菌塘土壤可培养细菌多样性[J]. *生态学杂志*, 2015, 34(1): 150-156
- [29] Frey P, Frey-Klett P, Garbaye J, et al. Metabolic and genotypic fingerprinting of fluorescent pseudomonads associated with the Douglas fir-*Laccaria bicolor* mycorrhizosphere[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(5): 1852-1860