

2 种杓兰属植物内生狭截盘多毛孢菌的分离与鉴定

徐玲玲¹, 赵桂仿^{2*}, 孙敬祖³, 张 焱¹, 陶贵荣¹

(1 西安文理学院 生物与环境工程学院, 植物微生物协同研究重点实验室, 西安 710065; 2 西北大学 生命科学学院, 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 西安 710069; 3 中国科学院 微生物研究所真菌学国家重点实验室, 北京 100101)

摘 要: 该文报道了西藏杓兰(*Cypripedium tibeticum*)和无苞杓兰(*C. bardolphianum*)根中内生真菌新记录种——狭截盘多毛孢(*Truncatella angustata*)。该研究从四川黄龙沟不同海拔区分别采集到西藏杓兰和无苞杓兰, 并在其根中分离获得 148 个狭截盘多毛孢菌株。形态学观察显示, 狭截盘多毛孢菌株在 PDA 培养基上菌落白色, 背面黄褐色; 分生孢子器黑色脓包状; 分生孢子梭型, 4 个细胞, 3 个隔膜; 顶端附属丝 1~5 根。ITS rDNA 分析发现 3 种新基因型菌株(HLIO15_15a_22、HLIO15_20a_42 和 HLIO15_17a_46); 在海拔最高(3 330~3 400 m)的居群中狭截盘多毛孢的分离率最高, 且包含全部 3 种基因型菌株。构建截盘多毛孢属(*Truncatella*)真菌 ITS 序列系统发育树, 发现狭截盘多毛孢不同生态功能的菌株没有形成明显分支。

关键词: 狭截盘多毛孢; 兰科植物; 形态; 生态功能

中图分类号: Q948.12; Q938.1 **文献标志码:** A

Isolation and Identification of Endophytic *Truncatella angustata* in Roots of Two *Cypripedium* Species

XU Lingling¹, ZHAO Guifang^{2*}, SUN Jingzu³, ZHANG Yan¹, TAO Guirong¹

(1 Key Laboratory of Plant-microbe Collaboration Research, School of Biological and Environmental Engineering, Xi'an University, Xi'an 710065, China; 2 Key Laboratory of Resources Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, School of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China; 3 State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: One new record of endophytic fungus, *Truncatella angustata*, in roots of *Cypripedium tibeticum* and *C. bardolphianum*, was reported in this paper. 148 strains of *Truncatella angustata* were isolated from the roots of *C. tibeticum* and *C. bardolphianum* as endopytes at different altitudinal areas in Huanglong Valley, Sichuan Province, China. Morphological descriptions of *T. angustata* revealed that the colony on PDA pale yellow, reverse of the culture yellowish brown; pycnidia black, pustule-like; conidia fusiform, 4-celled, 3-septate; apical appendages 1–5. Three genotypes (HLIO15_15a_22, HLIO15_20a_42 and HLIO15_17a_46) were identified by ITS rDNA analysis. The isolation rate of *T. angustata* was highest in the highest altitude population, containing all three genotype strains. The phylogenetic tree of the ITS sequence of the genus *Truncatella* was constructed. It was found that the strains with different ecological functions of the genus *Truncatella* did not form obvious clades.

Key words: *Truncatella angustata*; Orchidaceae; morphology; ecological function

收稿日期: 2019-04-28; 修改稿收到日期: 2019-07-03

基金项目: 国家自然科学基金(31300366); 西安市科技计划项目(CXY1531WL18, 2017CGWL02)

作者简介: 徐玲玲(1981—), 女, 博士, 副教授, 主要从事兰科植物与菌根真菌互作研究。E-mail: missilexll@163.com

* 通信作者: 赵桂仿, 教授, 硕、博士生导师, 主要从事植物系统进化与分子生态研究。E-mail: gzfzhao@nwu.edu.cn

截盘多毛孢属(*Truncatella*)属于炭角菌目(Xylariales),通常认为它是拟盘多毛孢样真菌(pestalotioid fungi)^[1]。狭截盘多毛孢(*Truncatella angustata*)最初由 Persoon 于 1801 年以 *Stilbospora angustata*^[2] 的名字描述。除了腐生以外,目前已报道的狭截盘多毛孢多为维管植物病原体^[3-5],也可能引起人类皮肤感染^[6],有少量外生菌根菌^[7]和内生菌^[8-9]的报道。到目前为止,还没有狭截盘多毛孢作为兰科植物内生真菌的报道。

杓兰属(*Cypripedium* L.)是兰科植物中比较原始的类群,中国是杓兰属植物分布中心,有 30 多个种^[10]。目前对杓兰属植物内生真菌的研究主要集中在菌根真菌^[11],但最近的研究发现,其他内生真菌对兰科植物的生长发育和环境适应也有重要作用^[12-13]。

海拔梯度包含温度、水分和光照等多种环境因子的梯度效应^[14]。目前,对植物丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)的研究发现,海拔变化是影响其多样性的主要因素^[15],这种影响可能与土壤成分变化有关^[16]。在海拔梯度 300 m 时欧洲赤松(*Pinus sylvestris*)外生菌根群落有明显变化,与气候变化有强烈关联^[17]。目前,还缺乏单个优势植物内生真菌沿海拔梯度分布规律的研究,但不同海拔不同植物物种内生真菌的研究显示,内生真菌的丰度在海拔较低处比较高^[18]。

四川黄龙自然保护区地处四川省松潘县境内,其主要景区是黄龙沟。黄龙沟以其海拔变化幅度大和钙华地貌著称,非常适合兰科植物生长^[19]。西藏杓兰和无苞杓兰作为黄龙沟沿海拔梯度分布较为广泛的优势杓兰属植物,为研究兰科植物内生真菌,尤其是优势内生真菌在不同海拔生境中的分布规律提供了便利。

本研究从四川黄龙沟不同海拔采集的健康西藏杓兰和无苞杓兰根中分离内生真菌,通过形态鉴定结合分子生物学方法,确定 148 株内生菌为狭截盘多毛孢,是根中内生真菌的优势种,首次报道狭截盘多毛孢作为兰科植物内生真菌。

1 材料和方法

1.1 样品采集

黄龙沟(101°25'E, 21°41'N)位于中国四川省,其海拔 3 100~3 569 m 部分为黄色钙华地貌,宽度约为 150 m^[20],在海拔 3 170~3 400 m 分布着西藏杓兰和无苞杓兰。于 2015 年 6 月开花季节采

集 2 种杓兰属植物健康植株根,沿海拔梯度划分为 4 个居群,每个居群根据植物的分布情况设置 3~6 个样方(10 m×10 m;表 1)。

每个样方采集每种杓兰各 5 株,每个植株采集 3 个根。因为采集的根数没有超过植株根总数的 1/3,所以不会影响其生长。就地采集苔藓包裹采集的根,回到住地后用显微镜观察根中是否有真菌定殖,将有真菌定殖的根段用苔藓包裹,于 4℃ 冰箱中保存,10 d 内带回实验室进行真菌分离。

1.2 方法

1.2.1 真菌菌株的分离与纯化 将采集的杓兰根用自来水冲洗干净,用 70% 酒精浸泡 1 min, 20% NaClO(0.5% 有效氯)浸泡 4 min, 无菌水冲洗 4~5 次。在无菌培养皿中加少量无菌水,用无菌镊子夹取一小段冲洗好的根放入培养皿中,加入少量水,用解剖刀将根刮碎。用移液枪吸取根碎屑,用无菌水漂洗 3 次后接种到含双抗(50 mg/L 硫酸链霉素和 50 mg/L 青霉素钾)的 1/4PDA^[21] 培养基上,每个培养皿接种 6~10 个根的碎屑,用封口膜封好培养皿倒置于恒温培养箱中 25℃ 恒温暗培养 2 个月。每个样方接种 60 个根的碎屑(表 1),每隔 2 d 观察是否有菌丝长出。用接种针挑取菌落边缘部分转接到 PDA 培养基培养,转接 3~4 次至菌丝形成纯培养物,再转接到铺有灭菌玻璃纸的培养基上培养,用于后续 DNA 提取。

1.2.2 基因组 DNA 提取、PCR 和测序 从纯化好的菌株菌落边缘直接刮取菌丝体,提取基因组 DNA,使用引物 ITS5 和 ITS4 进行 PCR 扩增^[22]。PCR 反应采用天根试剂盒(Taq PCR Mastermix, Tiangen, China)进行。25 μL PCR 反应体系:1 μL 模板 DNA, ITS5 和 ITS4 引物(10 μmol/L)各 1 μL, 2×Taq PCR MasterMix 12.5 μL, ddH₂O 9.5 μL。PCR 反应程序为:94℃ 3 min; 95℃ 40 s, 56℃ 40 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 10 min。PCR 产物送生工(上海)生物工程有限公司测序。并在 GenBank 国际核酸序列数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)进行同源序列搜索(Blast),找出与数据库中狭截盘多毛孢属相似性最高的菌株作为本研究的候选菌株。

1.2.3 形态学观察 将代表性菌株,接种于 PDA 培养基上,25℃ 恒温培养 7 d 后观察菌落形态。体式显微镜用于分生孢子器观察。Nikon 光学显微镜和专业成像系统随机选取 30~50 个分生孢子进行形态学描述。用 SPOT 软件测量分生孢子梗、分生

孢子和分生孢子细胞长度和宽度。

1.2.4 系统发育树构建 以拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis malayana*, NR_147550. 1)作为外类群分析狭截盘多毛孢和其他截盘多毛孢属真菌 ITS 序列系统发育关系。用 Clustal X1.81^[23]进行比对,Mr-Bayes 3.1.2^[24]构建系统发育树。Modeltest 3.7 进行最佳模型检验,最佳模型为 GTR+I+G,确定系统发育树参数为 Nst=6,Rates=invgamma。取样代数(sample freq)为 1000,马尔可夫链运行链数(nchains)为 4,舍弃(burnin)掉前 3 棵树(前 2000 代)。用软件 Tracer version 1.4 打开 MrBayes 运行结果中的 P 文件来评价各参数是否合理以及结果是否达到稳态。

2 结果与分析

2.1 菌根真菌分离和分子生物学鉴定

西藏杓兰在 20 个样方中均有分布,共接种 1 200 个根碎屑;无苞杓兰在 1~18 个样方中有分布,接种 1 080 个根碎屑(表 1)。分离获得的菌株中有 148 株菌株的 ITS 序列在 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中进行同源序列比对,相似性最高的序列均为狭截盘多毛孢 *T. angustata* (MH860182.1),是 2 种杓兰根中内生菌的优势种。通过比对,发现 148 株真菌菌株 ITS 序列包括 3 种基因型,其菌株数分别为 142、3 和 3 株。两两基因型之间存在一个碱基的不同,与狭截盘多毛孢 *T. angustata* (MH860182.1)相似性分别为 100%、100%和 99.6%。将 3 种基因型分别选取一株菌株(HLIO15_15a_22、HLIO15_20a_42 和 HLIO15_17a_46)作为代表序列,上传 NCBI 数据库后获得序列号分别为 MF071202、MH760807 和 MH760808。菌株 HLIO15_15a_22 保存在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为 CGMCC3.

19680。以 HLIO15_20a_42 和 HLIO15_17a_46 为代表序列的基因型因为数量比较少,分别用 ITS5 和 ITS4 引物进行了双向测序,得到相同序列,说明 2 种基因型的出现不是因为 PCR 反应的误差造成的。

2 个杓兰根中狭截盘多毛孢菌株主要分布在海拔最高的居群 P4 中(表 1),西藏杓兰和无苞杓兰狭截盘多毛孢的分离率分别达到 32.5%和 6.67%,都为 2 种杓兰中的最高值,且西藏杓兰高于无苞杓兰。

2.2 形态描述

将菌株数最多的基因型代表菌株 HLIO15_15a_22 进行形态学描述。其在 PDA 上菌落白色,柔软,菌落背面黄褐色(图 1,a)。菌落上分布着黑色脓包状圆形或椭圆形的分生孢子器,直径约 607~1 212 μm (图 1,b~d)。分生孢子梗颜色透明,大小 12.4~27.0 $\times$ 2.1~4.6 μm ($\bar{x}$ =20.5 $\times$ 3.1 μm)(图 1,e,g)。分生孢子梭型,共 4 个细胞,3 个隔膜,大小 15.8~19.1 $\times$ 5.4~6.3 μm ($\bar{x}$ =17.5 $\times$ 5.8 μm),平均分生孢子长:宽=3:1。中间 2 个细胞近圆柱状,厚壁,光滑,棕色,长 10.8~12.8 μm ($\bar{x}$ =11.4 μm)(图 1,f,h~o);从顶孢开始,第 2 个细胞长 5.3~7.6 μm ($\bar{x}$ =6.1 μm),第 3 个细胞长 3.9~6.0 μm ($\bar{x}$ =5.3 μm)。顶孢圆锥形,无色,壁光滑,长 2.0~3.6 μm ($\bar{x}$ =2.4 μm),有 1~5(多为 2~4)根附属丝,无色透明且有分枝,附属丝长 9.6~28.2 μm ($\bar{x}$ =17.2 μm)。尾孢为倒圆锥形,壁光滑,无色透明,长 3.1~5.9 μm ($\bar{x}$ =4.3 μm)。

2.3 系统发育分析

将本研究狭截盘多毛孢 3 种基因型 ITS 序列,与已经发表的截盘多毛孢属其他菌株 ITS 序列构建系统发育树(图 2),发现 3 种基因型菌株都与已经报道狭截盘多毛孢 ITS 序列聚在一个单独的分支上,与其他截盘多毛孢属的其他物种没有聚在一

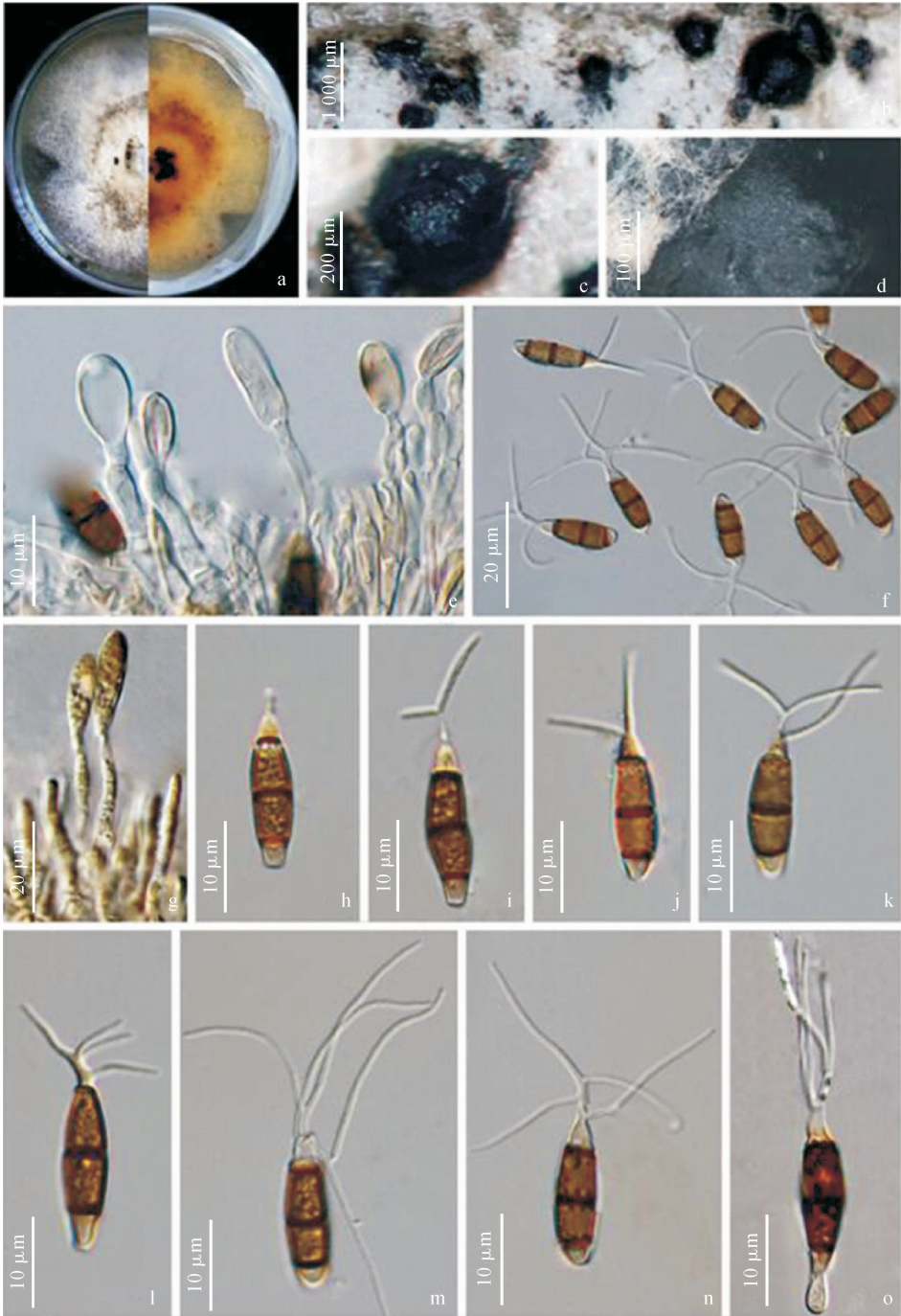
表 1 狭截盘多毛孢菌株在不同居群中的分离率

Table 1 The isolation rate of *T. angustata* strains in different populations

群落 Community	样方 Quadrat	海拔 Altitude/m	西藏杓兰 <i>Cypripedium tibeticum</i>			无苞杓兰 <i>Cypripedium bardolphianum</i>		
			根碎屑数量 No. of root fragments	菌株数 No. of strains	分离率 Isolation rate/%	根碎屑数量 No. of root fragments	菌株数 No. of strains	分离率 Isolation rate/%
P1	1~3	3 170~3 200	180	4	2.22	180	0	0.00
P2	4~8	3 200~3 260	300	0	0.00	300	3	1.00
P3	9~14	3 260~3 330	360	16	4.44	360	2	0.6
P4	15~20	3 330~3 400	360	117	32.50	240	16	6.67

注:无苞杓兰分布于采样样方 1~18

Note: *C. bardolphianum* distributed in sampling quadrat 1-18



a. PDA 培养基中培养 7 d 的菌落形态(左:正面;右:反面);b~d. 分生孢子器;e, g. 分生孢子梗和分生细胞;
f, h~o. 有 1~5 个附属丝的分生孢子

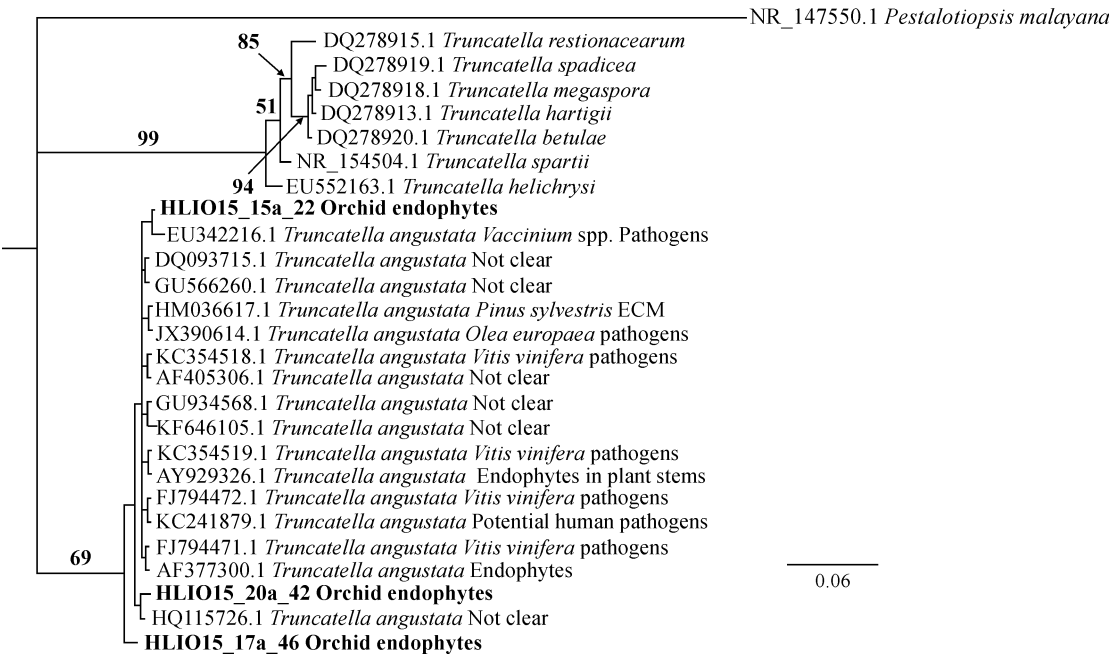
图 1 狭截盘多毛孢

a. Seven-day-old colony on PDA (left: above; right: reverse); b~d. Pycnidium, e, g. Conidiomata and conidiogenous cells;
f, h~o. Conidia with 1-5 appendages

Fig. 1 *Truncatella angustata*

起,进一步证实 3 种基因型菌株都是狭截盘多毛孢。已报道的狭截盘多毛孢具有丰富的生态功能^[1, 4-7, 25-27],包括多种植物寄生菌、外生菌根菌和内生菌菌株(图 2)。除了 HQ115726. 1,其他已报道的菌株与本研究的优势基因型菌株 HLIO15_15a

_22 的 ITS 序列聚在一个分支;HQ115726. 1 与菌株 HLIO15_20a_42 聚在一个分支;已报道的菌株没有与基因型 HLIO15_17a_46ITS 序列完全一致的序列。具有相同生态功能的菌株在 ITS 序列构建的系统发育树上没有形成明显分支(图 2)。



外类群为 *Pestalotiopsis malayana* (NR_147550.1)。每个分支节点上的数字代表>50%的后验概率值;比例尺替换率为0.06;
本研究中涉及的狭截盘多毛孢3种基因型以粗体表示。已经报道的狭截盘多毛孢的生态功能标注在序列名称后

图2 基于rDNA-ITS序列的贝叶斯系统发育树

Pestalotiopsis malayana (NR_147550.1) was used as outgroup; Posterior probability values>50% were shown above nodes;
The scale bar indicates 0.06 substitutions per site; The three genotypes of *T. angustata* in this study were in bold.
The ecological function of reported *T. angustata* is marked after the sequence name

Fig. 2 Bayesian 50% majority-rule consensus phylogenetic tree based on rDNA-ITS sequences

3 讨论

兰科植物内生真菌对兰科植物的分布和环境的适应具有重要作用^[12-13, 28-29]。狭截盘多毛孢作为黄龙沟2种杓兰的优势内生菌,在最高海拔居群杓兰根中分离率最高。在采集样品的过程中发现海拔较高的居群,每个样方中2种杓兰的数量大幅减少,说明高海拔并不利于2种杓兰的生存。因此高海拔狭截盘多毛孢的高分离率可能与杓兰对恶劣环境的适应性有关。

除了在高海拔的分离率比较高,西藏杓兰在最高海拔的居群中还出现了另外2种基因型菌株各3株。某些植物内生真菌的不同基因型菌株具有不同的生态功能。例如,内生菌 *Neotyphodium coenophialum* 的不同基因型菌株会影响高羊茅黑麦草 *Lolium arundinaceum* 植物的群落组成,某些基因型真菌与高羊茅黑麦草共生后能够有效抑制其他植物物种的入侵和扩散,而其他基因型则没有该功能^[30]。阿根廷茎象鼻虫食用2种 *Neotyphodium lolii* 基因型菌株 ARW 和 AR6 共生的黑麦草 (*Lolium perenne*) 后,可以有效阻止象鼻虫中寄生蜂的出现。因此,某些基因型的内生真菌菌株与植物共

生后,会赋予植物一些特殊的功能^[31]。西藏杓兰在环境相对恶劣的最高海拔居群中出现的另外两种基因型狭截盘多毛孢菌株可能具有一定的生态功能。以 HLIO15_15a_22 菌株为代表的优势基因型与大多数已经报道的狭截盘多毛孢菌株聚在一个分支,说明该基因型最为常见,另外两种基因型有可能是为了协助两种杓兰适应高海拔环境分化出来的新类型。虽然本文对具有不同生态功能狭截盘多毛孢 ITS 序列进行系统发育分析,未能发现基因型与生态功能之间的联系。但这可能是因为目前已经报道狭截盘多毛孢种类和数量都较少。随着研究的深入,在掌握大量不同生物功能狭截盘多毛孢菌株的基础上采用多种看家基因进行分析,可能对狭截盘多毛孢基因型与其生态功能的关系有更深入的认识。

本研究根据形态学和 ITS 序列数据,鉴定分离自西藏杓兰和无苞杓兰的优势内生真菌狭截盘多毛孢,这是狭截盘多毛孢作为西藏杓兰和无苞杓兰内生真菌的首次报道。同时发现狭截盘多毛孢在高海拔分布的杓兰根中分离率较高,且在西藏杓兰中具有3种不同基因型菌株。该研究为兰科植物保育提供了新思路。但关于内生真菌不同基因型的产生及其与兰科植物对环境适应性的关系需进一步研究。

参考文献:

[1] MAHARACHCHIKUMBURA S, LARIGNON P, *et al.* Characterization of *Neopestalotiopsis*, *Pestalotiopsis* and *Truncatella* species associated with grapevine trunk diseases in France[J]. *Phytopathologia Mediterranea*, 2017, **55**(3): 380-390.

[2] HUGHES S J. Revisioes hyphomycetum aliquot cum appendice de nominibus rejiciendis[J]. *Canadian Journal of Botany*, 1958, **36**(6): 727-836.

[3] EKEN C, SPANBAYEV A, TULEGENOVA Z, *et al.* First report of *Truncatella angustata* causing leaf spot on *Rosa canina* in Kazakhstan[J]. *Australasian Plant Disease Notes*, 2009, **4**(1): 44-45.

[4] ESPINOZA J G, BRICEÑO E X, KEITH L M, *et al.* Canker and twig dieback of blueberry caused by *Pestalotiopsis* spp. and a *Truncatella* sp. in Chile[J]. *Plant Disease*, 2008, **92**(10): 1 407-1 414.

[5] URBEZTORRES J R, ADAMS P, KAMAS J, *et al.* Identification, incidence, and pathogenicity of fungal species associated with grapevine dieback in Texas[J]. *American Journal of Enology & Viticulture*, 2009, **60**(4): 497-507.

[6] JAGIELSKI T, ŽAK I, TYRAK J, *et al.* First probable case of subcutaneous infection due to *Truncatella angustata*: A new fungal pathogen of humans? [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2015, **53**(6): 1 961-1 964.

[7] MENKIS A, VASAITIS R. Fungi in roots of nursery grown *Pinus sylvestris*: Ectomycorrhizal colonisation, genetic diversity and spatial distribution[J]. *Microbial Ecology*, 2011, **61**(1): 52-63.

[8] BOTELLA L, DIEZ J J. Phylogenic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*[J]. *Fungal Diversity*, 2011, **47**(1): 9-18.

[9] RAGHAVENDRA A K, NEWCOMBE G. The contribution of foliar endophytes to quantitative resistance to *Melampsora* rust[J]. *The New Phytologist*, 2013, **197**(3): 909-918.

[10] 陈心启, 吉占和. 中国兰花全书[M]. 北京: 中国林业出版社, 1998: 27.

[11] SHEFFERSON R P, WEISS M, KULL T, *et al.* High specificity generally characterizes mycorrhizal association in rare lady's slipper orchids, genus *Cypripedium*[J]. *Molecular Ecology*, 2005, **14**(2): 613-626.

[12] ZHAO X L, YANG J Z, LIU S, *et al.* The colonization patterns of different fungi on roots of *Cymbidium hybridum* plantlets and their respective inoculation effects on growth and nutrient uptake of orchid plantlets[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2014, **30**(7): 1 993-2 003.

[13] ZHANG F S, LÜ Y L, ZHAO Y, *et al.* Promoting role of an endophyte on the growth and contents of kinsenosides and flavonoids of *Anoectochilus formosanus* Hayata, a rare and threatened medicinal Orchidaceae plant[J]. *Journal of Zhejiang University (Science Edition)*, 2013, **14**(9): 785-792.

[14] GASTON K J. Global patterns in biodiversity[J]. *Nature*, 2000, **405**(6 783): 220-227.

[15] COUTINHO E S, FERNANDES G W, *et al.* Variation of arbuscular mycorrhizal fungal communities along an altitudinal gradient in rupestrian grasslands in Brazil[J]. *Mycorrhiza*, 2015, **25**(8): 627-638.

[16] SHI Z Y, WANG F Y, ZHANG K, *et al.* Diversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi along altitudinal gradients in Mount Taibai of the Qinling Mountains[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2014, **60**(12): 811-818.

[17] JARVIS S G, WOODWARD S, TAYLOR A F. Strong altitudinal partitioning in the distributions of ectomycorrhizal fungi along a short (300 m) elevation gradient[J]. *The New Phytologist*, 2015, **206**(3): 1 145-1 155.

[18] ROJAS-JIMENEZ K, HERNANDEZ M, *et al.* Richness of cultivable endophytic fungi along an altitudinal gradient in wet forests of Costa Rica[J]. *Fungal Ecology*, 2016, **20**: 124-131.

[19] 豪格尔·帕奈, 罗毅波. 黄龙兰花[M]. 成都: 四川美术出版社, 2007: 1-221.

[20] LIU Z H, YUAN D X, HE S Y, *et al.* Geochemical features of the geothermal CO₂-watercarbonate rock system and analysis on its CO₂ sources[J]. *Science in China Series D: Earth Sciences*, 2000, **43**(6): 569-576.

[21] 盖晓彤. 玉米茎腐病与穗腐病致病镰孢菌侵染途径及其致病力差异研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2018.

[22] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]. // INNIS M A, GELFAND D H, SNINSKY J J, *et al.* PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990: 315-322.

[23] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAC F, *et al.* The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25**(24): 4 876-4 882.

[24] HUELSENBECK J P, RONQUIST F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees[J]. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 2001, **17**(8): 754-755.

[25] ARZANLOU M, NARMANI A, *et al.* *Truncatella angustata* associated with grapevine trunk disease in northern Iran [J]. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 2013, **46**(10): 1 168-1 181.

[26] COLLADO J, PLATAS G, BILLS G F, *et al.* Studies on *Morinia*: Recognition of *Morinia longiappendiculata* sp. nov. as a new endophytic fungus, and a new circumscription of *Morinia pestalozzioides*[J]. *Mycologia*, 2006, **98**(4): 616-627.

[27] MENKIS A, IHRMARK K, STENLID J, *et al.* Root-associated fungi of *Rosa rugosa* grown on the frontal dunes of the Baltic Sea Coast in Lithuania[J]. *Microbial Ecology*, 2014, **67**(4): 769-774.

[28] NEWSHAM K K. A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes[J]. *The New Phytologist*, 2011, **190**(3): 783-793.

[29] MA X, KANG J, *et al.* Non-mycorrhizal endophytic fungi from orchids[J]. *Current Science*, 2015, **109**(1): 72-87.

[30] RUDGERS J A, FISCHER S, CLAY K. Managing plant symbiosis: Fungal endophyte genotype alters plant community composition[J]. *Journal of Applied Ecology*, 2010, **47**(2): 468-477.

[31] BULTMAN T L, MCNEILL M R, GOLDSON S L. Isolate-dependent impacts of fungal endophytes in a multitrophic interaction[J]. *Oikos*, 2003, **102**(3): 491-496.

(编辑:宋亚珍)