北京林业大学学报
JOURNAL OF BEIJING FORESTRY UNIVERSITY

受枯梢病侵染的有症状和无症状樟子松的内生真菌群落结构

刘玉祥 王磊 任宁红 游崇娟

Community structure of endophytic fungi in asymptomatic and symptomatic *Pinus sylvestris* var. *mongolica* infected by diplodia tip blight

Liu Yuxiang, Wang Lei, Ren Ninghong, You Chongjuan

引用本文:
刘玉祥, 王磊, 任宁红, 游崇娟. 受枯梢病侵染的有症状和无症状樟子松的内生真菌群落结构[J]. 北京林业大学学报, 2024, 46(9):119–131. doi: 10.12171/j.1000–1522.20230350
Liu Yuxiang, Wang Lei, Ren Ninghong, You Chongjuan. Community structure of endophytic fungi in asymptomatic and symptomatic *Pinus sylvestris* var. *mongolica* infected by diplodia tip blight[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(9):119–131. doi: 10.12171/j.1000–1522.20230350

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20230350

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

氮添加及接种处理对1年生樟子松苗木根系形态及养分含量的影响

Responses of root morphology and nutrient content of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* seedlings to nitrogen addition and inoculation treatments

北京林业大学学报, 2021, 43(4): 1–7. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20200071

覆盖对城市裸露土壤真菌多样性及群落结构的影响

Effects of mulching on fungal diversity and community structure in urban exposed soil

北京林业大学学报, 2022, 44(8): 98–106. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210129

辽东山区两种针叶人工林土壤真菌群落结构特征

Characteristics of soil fungal community structure at two coniferous plantations in mountainous region of eastern Liaoning Province, northeastern China

北京林业大学学报, 2019, 41(9): 130–138. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20180147

截冠处理对种子园樟子松壮龄母树结实的影响

Effects of top pruning on seed setting of aged mother trees in orchard of *Pinus sylvestris* var. *mongolica*

北京林业大学学报, 2019, 41(8): 48–56. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20190178

基于树干不同形率的樟子松立木材积方程研建

Equation construction on standing tree volume of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* based on different form quotients of trunk

北京林业大学学报, 2020, 42(3): 78–86. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20190047

植物病原丝状真菌RGS的研究进展

Advances in research on RGS of phytopathogenic filamentous fungi

北京林业大学学报, 2021, 43(4): 150–157. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20200196

DOI:10.12171/j.1000−1522.20230350

受枯梢病侵染的有症状和无症状樟子松的内生真菌群落结构

刘玉祥[1]　王　磊[2]　任宁红[1]　游崇娟[1]
（1. 北京林业大学林木有害生物防治北京市重点实验室，北京 100083；2. 内蒙古呼伦贝尔市红花尔基林业局森防站，内蒙古 呼伦贝尔 165456）

摘要：【目的】分析受樟子松枯梢病侵染的无症状和有症状樟子松不同部位的内生真菌多样性和群落结构，以期为筛选有效的内生拮抗菌并防治樟子松枯梢病提供科学依据。**【方法】**利用分离培养和高通量测序技术，对无症状和有症状樟子松的针叶、嫩梢、韧皮部（胸径处）3 个部位内生真菌群落的多样性和结构进行了比较和分析，并筛选了嫩梢处丰度有显著差异的内生菌。**【结果】**（1）分别在无症状和有症状樟子松中分离到 233 株和 360 株内生真菌，分离率最高的均是 *Diplodia sapinea*。此外，*Hormonema* sp.在无症状樟子松上分离率较高，但在有症状樟子松上分离率较低，且仅在有症状樟子松的嫩梢处分离到。（2）扩增子测序结果显示：无症状和有症状樟子松中内生真菌的 α 多样性无显著差异，但无症状和有症状樟子松的不同部位内生真菌群落结构存在差异。（3）对扩增子数据进行线性判别分析发现：*Hormonema* 属真菌在无症状樟子松嫩梢中丰度最高，而 *Diplodia* 属真菌在有症状樟子松的嫩梢中丰度最高。（4）真菌营养型分类也证实无症状樟子松的 3 个部位中均是腐生菌的相对丰度最高，而有症状樟子松的韧皮部的植物病原菌的相对丰度较无症状显著增多。**【结论】**无症状和有症状樟子松中内生真菌的多样性无显著差异，但其不同部位内生真菌群落结构存在显著差异。下一步将进行拮抗试验以评估无症状樟子松嫩梢部位中显著富集的真菌 *Hormonema* 属真菌作为生防菌的潜力。

关键词：病虫害防治；樟子松；枯梢病；真菌；群落结构；高通量测序
中图分类号：S718.5　**文献标志码：**A　**文章编号：**1000−1522(2024)09−0119−13
引文格式：刘玉祥，王磊，任宁红，等. 受枯梢病侵染的有症状和无症状樟子松的内生真菌群落结构［J］. 北京林业大学学报，2024，46(9)：119−131. Liu Yuxiang, Wang Lei, Ren Ninghong, et al. Community structure of endophytic fungi in asymptomatic and symptomatic *Pinus sylvestris* var. *mongolica* infected by diplodia tip blight［J］. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(9): 119−131.

Community structure of endophytic fungi in asymptomatic and symptomatic *Pinus sylvestris* var. *mongolica* infected by diplodia tip blight

Liu Yuxiang[1]　Wang Lei[2]　Ren Ninghong[1]　You Chongjuan[1]
(1. Beijing Key Laboratory of Forest Pest Control, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;
2. Forestry Protection Station, Honghuaerji Forestry Bureau, Hulunbuir 165456, Inner Mongolia, China)

Abstract:［**Objective**］Diplodia tip blight of Mongolian pine is widely distributed in Honghuaerji, Inner Mongolia of northern China, causing severe damage on natural Mongolian pine (*Pinus sylvestris* var. *mongolica*). Our study analyzed the diversity and community structure of endophytic fungi in different parts of asymptomatic and symptomatic Mongolian pine infected by *Diplodia sapinea*, laying a research foundation for the subsequent screening of effective endophytic antagonistic strains and the control of

收稿日期：2023−12−01　**修回日期：**2024−05−03
基金项目：国家重点研发计划项目（2021YFC2600400），政府间国际科技创新合作（2023YFE0116200）。
第一作者：刘玉祥。主要研究方向：林木病理学。Email：1113845284@qq.com　地址：100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学林学院。
责任作者：游崇娟，副教授。主要研究方向：林木病理学。Email：chongjuan_you@126.com　地址：同上。
本刊网址：http://j.bjfu.edu.cn；http://journal.bjfu.edu.cn

diplodia tip blight. [**Method**] Using culture-based and high-throughput sequencing techniques, the diversity and structure of endophytic fungal communities in different tissues (needles, twigs and phloem) of asymptomatic and symptomatic Mongolian pine were compared and analyzed, and endophytic fungi with significant differences in abundance at twigs were screened. [**Result**] (1) 360 and 233 taxa of endophytic fungi were isolated from symptomatic and asymptomatic Mongolian pine, respectively. *D. sapinea* was isolated from both asymptomatic and symptomatic Mongolian pine, with the highest isolation rate. In addition, *Hormonema* sp. had a higher isolation rate on asymptomatic Mongolian pine, but a lower isolation rate on symptomatic Mongolian pine, and it was only isolated from the diseased twigs. (2) The amplicon sequencing results showed that there were no significant differences of α diversity of endophytic fungi between symptomatic and asymptomatic Mongolian pine, but beta diversity, community composition and structure of endophytic fungi were various according to different tissues from symptomatic and asymptomatic Mongolian pine. (3) Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) analysis of amplicon revealed that the fungus *Diplodia* sp. was significantly enriched in the twigs of symptomatic Mongolian pine, while *Hormonema* sp. was significantly enriched in the twigs of asymptomatic Mongolian pine. (4) Fungal trophic classification confirmed that the relative abundance of saprophytic fungi was highest in all three parts of asymptomatic Mongolian pine, while the relative abundance of plant pathogens in the phloem of symptomatic Mongolian pine was significantly increased. [**Conclusion**] There are no significant differences in the diversity of endophytic fungi between symptomatic and asymptomatic Mongolian pine, but there are significant differences in the community structure of endophytic fungi in different tissues. In the future study, antagonistic experiments will be conducted to evaluate the potential of fungi *Hormonema* sp. from asymptomatic Mongolian pine as biocontrol agents.

Key words: pest control; *Pinus sylvestris* var. *mongolica*; diplodia tip blight; fungi; community structure; high-throughput sequencing

樟子松(*Pinus sylvestris* var. *mongolica*)隶属于松科(Pinaceae)松属(*Pinus*),是欧洲赤松(*Pinus sylvestris*)的一个地理变种。因其具有耐寒、耐旱、防风固沙等优良特性,被作为治沙造林的首选树种,已在我国三北地区的辽宁、内蒙古、陕西、甘肃和新疆等13个省(自治区)300多个县(旗)先后被成功引种[1]。内蒙古红花尔基,作为樟子松良种基地,分布着亚洲最大,我国唯一集中连片的沙地樟子松林带。但是,近年来,樟子松枯梢病(diplodia tip blight)在红花尔基发生严重,造成大面积天然樟子松死亡。该病害是一种寄主主导性病害,典型症状是新发嫩梢萎蔫弯曲,针叶褪色变黄,枝干出现溃疡、溢脂,最终引起枯梢[2]。引起该病的病原菌是 *Diplodia sapinea*(异名:*Sphaeropsis sapinea*),其隶属于子囊菌门(Ascomycota)葡萄座腔菌科(Botryosphaeriaceae)色二孢属(*Diplodia*)。关于该菌无性型的正确名字尚存在争议,在 Index Fungorum 上推荐使用 *S. sapinea*,而 EPPO 则推荐使用 *D. sapinea*[3−5]。但是 Phillips 等[6]分别观察了 *D. sapinea* 和 *S. sapinea* 的模式标本,认为二者的分生孢子等形态特征存在显著差异。因此,认为引起松枯梢病的病原菌为 *D. sapinea*。该病菌主要从伤口侵入寄主,也可以从针叶的气孔侵入或直接侵染嫩梢、嫩叶,以菌丝体和分生孢子器在病梢、病叶、茎部溃疡斑和球果等病组织中越冬。翌年春夏季释放出的分生孢子成为初次侵染来源。分生孢子借风雨传播[2,7−9]。

D. sapinea 被认为是松树的内生真菌被广泛报道[5]。1996 年,该菌作为内生真菌首次从健康欧洲赤松上分离到[10]。之后,Flowers 等[11]和 Terhonen 等[12]陆续在美国和芬兰的健康欧洲赤松上也分离到该菌。研究表明,当寄主松树受到干旱、冰雹、极端温度、昆虫或机械损伤等生物或非生物胁迫时,树势下降,该菌转变为机会病原菌引起枯梢病的发生[3,13]。近年来,全球气候变化包括干旱、气温升高、冰雹等大大加剧了松枯梢病的爆发[13−14]。因此,理解气候变化下植物内生菌在病害表达过程中(潜伏或拮抗)的机制是非常必要的。但是,*D. sapinea* 转变为致病菌并引起病害的分子机理尚不明确[14],尤其内生真菌群落在松枯梢病发生过程中发挥的作用仍不清楚。

Bußkamp 等[15]对有枯梢病症状和无明显病害症状的欧洲赤松进行了内生真菌的分离和鉴定,探究了有/无症状松树的内生真菌群落组成。结果发现有症状和无症状松树枝条的内生真菌群落组成无显著

差异，且超过 80% 的树木中都有 *D. sapinea* 的存在。Blumenstein 等[5]研究表明不同生长年份和不同采样时间的松树的内生真菌群落结构存在显著差异，但健康松树和患病松树内生真菌群落结构无差异。*D. sapinea* 在健康树木中丰度较高，证实了该菌以内生菌的方式在健康树木中积累，并在多年后造成病害突然爆发和迅速扩散流行。基于内生菌分离结果，Blumenstein 等[13]筛选了对松杉球壳孢具有拮抗效应的多种内生真菌，包括 *Sydowia polyspora*、*Alternaria alternata* 等，并探究了在不同程度的干旱胁迫条件下，单独接种 *D. sapinea* 和联合接种多个内生真菌对枯梢病病害症状的影响。但是 *D. sapinea* 与其他内生菌的互作关系，仍不清楚。

近年来，我国东北地区樟子松枯梢病的研究，多集中于病原菌的生物学特性、病害发生流行规律、化学防治及生态控制技术等。常忠连[16]研究证实 *D. sapinea* 在樟子松的病健组织中都可分离到，其在针叶中分离率最高，其次为枯枝部位。杨传波等[17]、周秀华[18-19]和鞠洪波[20]分别对樟子松树栖真菌群落物种多样性及其与病害的关系进行了分析，结果表明：芽栖、叶栖、枝栖和果栖真菌的组成和数量与樟子松树龄、叶龄、枝龄、树冠层次等关系密切，发病林分中病原菌的数量激增。谢宪等[21]研究认为赤松（*Pinus densiflora*）纯林无病斑针叶与染病针叶内生真菌群落结构差异显著，在染病较轻的针叶中以病理营养型真菌为主。此外，我国学者开展了樟子松枯梢病的生物防治技术研究，筛选出多种木霉菌、螺卷毛壳菌等具有较好防效的生防菌剂[22–24]。这些菌剂均是自然界中常见的生防菌，并不是从樟子松相关生态环境中分离到的，缺乏具有拮抗作用的樟子松内生真菌。

为了探究内生菌在无症状和有症状樟子松中的差异和功能作用，本研究对受枯梢病侵染的无症状和有症状樟子松的不同部位的内生真菌进行了分离培养和鉴定，同时，利用 Pacbio Sequel Ⅱ 高通量测序技术对其针叶、嫩梢、韧皮部（胸径处）等不同部位的内生真菌群落结构和多样性进行比较和分析。通过探究无症状和有症状樟子松不同部位的内生真菌的群落差异，为后续筛选有效的内生拮抗菌、防治樟子松枯梢病奠定研究基础。

1　材料与方法

1.1　试验材料

无症状樟子松（无症状：< 10% 的树冠出现枯梢症状）样地，位于内蒙古自治区呼伦贝尔市红花尔基的宝根图林场（119°55′57″E，48°24′12″N）。发病樟子松（有症状：> 30% 的树冠出现枯梢症状）样地，位于头道桥林场（120°13′39″E，48°16′47″N）（图 1）。两个样地之间相距 75 km，气候、土壤等条件相似。在 2021 年 7 月，分别在两个样地中选取 30 棵相同林龄（40 年生）且长势相似的樟子松，采集每棵树的当年生针叶、当年生嫩梢和胸径处韧皮部等 3 个部位的样品，共计 180 份（H、D 分别表示无症状樟子松和有症状樟子松，其中无症状樟子松的针叶、嫩梢、韧皮部样品分别被标记为 HA、HB、HC，有症状樟子松针叶、嫩梢、韧皮部分别被标记为 DA、DB、DC）。取样后将样品迅速装入冻存管中进行液氮冷冻保存，并尽快带回实验室进行内生菌的分离和鉴定。

1.2　内生菌的分离及鉴定

内生菌的分离参照 Oliva 等[4]的方法。首先，对所采集的样品进行表面消毒：在 75% 酒精中浸泡 1 min，后放入 2% 次氯酸钠 1 min，随后在 75% 酒精中浸泡 30 s，最后用无菌水冲洗 3 次。将消毒后不同部位的样品切成 4 个约 5 mm × 5 mm 大小的组织块，放入 0.3%MEA 培养基中[25]，在 25 ℃ 黑暗条件下培养 3 ~ 4 d。之后，挑取不同形态的菌落并转移到 2%MEA 培养基上，进行纯化培养，分别在 3、7、10 d 观察和记录菌落形态等特征。同时，选择形态特征相同的菌株放入 0.3%MEA 培养基中，25 ℃ 黑暗条件下培养 1 周，用于分子鉴定。轻轻刮取菌丝，经液氮研磨后，采用 CTAB 法[26]进行 DNA 提取。利



图 1　无症状（a）和有症状（b）樟子松样地

Fig. 1　Asymptomatic Mongolian pine sample plot (a) and symptomatic Mongolian pine sample plot (b)

用通用引物 ITS1(5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′)和 ITS4(5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′)[27]对内生真菌的 ITS 区进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(20 μL)为：2× Es Taq MasterMix 10 μL，超纯水 7 μL，模板 DNA 1 μL，引物(10 μmol/L)1 μL。反应程序为：94 ℃ 5 min；94 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，共 35 个循环；72 ℃ 5 min。反应结束后，送至北京诺赛基因组研究中心有限公司进行测序。将序列进行 BLAST 比对[4]，结合菌落、菌丝、孢子等形态特征，对分离到的内生真菌进行鉴定。分离所获得的菌株均保存在北京林业大学林学院省部共建森林培育与保护教育部重点实验室。

1.3 扩增子测序

在 2 个样地中选择 4 棵无症状樟子松和 4 棵有症状樟子松，分别对其针叶、嫩梢和韧皮部 3 个部位进行扩增子测序。样品处理参照内生真菌分离方法，采用 CTAB 法提取内生真菌 DNA[27]。使用真菌通用引物 ITS1(5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′)和 ITS4(5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′)扩增 ITS 片段。30 μL PCR 反应体系为 DNA 1.5 μL，无核酸酶水 11.7 μL，KOD One DNA 聚合酶 15 μL，barcode 引物对 1.8 μL。反应条件为 95 ℃ 预变性 5 min，8 个循环(95 ℃ 变性 30 s，55 ℃ 退火 30 s，72 ℃ 延伸 45 s)，24 个循环(95 ℃ 变性 30 s，60 ℃ 退火 30 s，72 ℃ 延伸 45 s)，最后 72 ℃ 延伸 5 min。利用 DNA 凝胶回收试剂盒(北京天根生化科技有限公司)进行 PCR 产物纯化，将纯化后的扩增产物送交至北京百迈客生物科技有限公司，在 Pacbio Sequel Ⅱ平台上构建文库并测序。

1.4 数据分析

根据内生真菌的分离情况，通过香农−威纳多样性指数(Shannon-Weiner diversity index，*H′*)、辛普森指数(Simpson index，*D′*)、均匀度指数(evenness index，*E*)分析内生真菌的群落组成和多样性。在 Excel 中使用 *T*-test 进行差异显著性分析。在 Anosim 分析中，*R* 值表示组间与组内的差异程度。*R* 的范围是−1 到 1。$R < 0$ 表示组间差异小于组内差异；$R > 0$ 表示组间差异大于组内差异；$R = 0$ 组间差异等于组内差异。

在扩增子测序中，利用 Flash 软件拼接序列，使用 Trimmomatic 软件进行质控过滤。利用 Usearch 软件根据 97% 序列相似性进行 OUT 划分[28]，使用 UCHIME 软件剔除嵌合体。选取 OUT 的代表性序列进行物种注释，采用 UNITE 数据库，将获得的分类学信息分别在门、纲、目、科、属水平上统计各样本的群落组成。使用 QIIME2(https://qiime2.org/)计算 α 多样性指数和 β 多样性指数[29]。其中，Chao1 指数和 ACE 指数代表群落丰度，香农−威纳多样性指数和辛普森指数代表群落物种的丰富度和多样性[30]。采用 LEfSe(linear discriminant analysis effect size)(http://huttenhower.sph.harvard.edu/lefse/)估算每个物种丰度对差异效果的影响，找到不同组织间在丰度上有显著差异的物种。线性判别分析(linear discriminant analysis，LDA)阈值设为 4，LDA 绝对值大于 4，表示差异显著。采用 FUNGuild 对内生真菌进行功能预测[31]。使用 R 语言 Vegan 包进行主坐标分析和非度量多维排列，并用 R 语言作图。

2 结果与分析

2.1 樟子松内生真菌的分离与鉴定

分别从无症状和有症状樟子松的 3 个不同部位分离到 233 株和 360 株内生真菌(表 1、2，图 2)。结合形态特征和 ITS 序列，明确各菌株的分类地位。在无症状樟子松上分离率最高的内生真菌是 *D. sapinea*(18.89%)，其次是 *Hormonema* sp.(15.02%)和 *Sydowia polyspora*(12.02%)。这 3 类内生真菌均可在无症状樟子松的 3 个不同部位上分离得到，且在针叶上的分离率最高，韧皮部的分离率最低。有症状樟子松上分离率最高的内生真菌是 *D. sapinea*，达 20%。除了尚未鉴定到种属的 other fungi(14.44%)，分离率较高的是 *Alternaria alternata*(12.78%)和 *Sydowia polyspora*(12.22%)。这 3 种菌在有症状樟子松的 3 个不同部位上均可分离到，但在不同部位的分离率不同。*D. sapinea* 在有症状樟子松的针叶上分离率最高，在韧皮部分离率最低。

多样性分析表明：无症状樟子松韧皮部的内生真菌的香农−威纳多样性指数最高，其次是嫩梢处；而辛普森指数从高到低依次为韧皮部 > 嫩梢 > 针叶(表 3)。有症状樟子松的嫩梢处的内生真菌的香农−威纳多样性指数最高，其次是韧皮部；辛普森指数从高到低依次为韧皮部 = 嫩梢 > 针叶(表 4)。无、有症状樟子松 3 个部位的内生真菌群落均无显著差异($P > 0.05$)

2.2 樟子松内生真菌的群落组成

24 个样本的扩增子测序共获得 323 207 条 Raw CCS(circular consensus sequencing)序列，质控后平均每个样品产生 13 467 条 CCS 序列。有效序列平均长 271.47 bp。在 97% 相似度下进行分类操作单元(operational taxonomic unit，OTU)聚类，共获得 1 031 个 OTU。通过随机抽样方法从有效序列中生成稀释性曲线。各样品的稀释曲线大多趋向平缓，这表明各样品的取样和扩增子测序数量合理、数据有效，能

表 1　无症状樟子松的不同部位内生真菌的分离结果

Tab. 1　Isolation results of endophytic fungi from different parts of asymptomatic Mongolian pine

类群 Taxa	分离部位 Isolation part			菌株数 Strain number	分离率 Isolation rate/%
	针叶 Needle	嫩梢 Twig	韧皮部 Phloem		
Capturomyces luteus	0	0	10	10	4.29
Alternaria alternata	10	6	7	23	9.87
Irpex lacteus	5	0	0	5	2.15
Diplodia sapinea	22	16	6	44	18.89
Pezizomycetes sp.	0	5	5	10	4.29
Trichoderma sp.	0	10	8	18	7.71
Sydowia polyspora	12	10	6	28	12.02
Fusarium sp.	4	4	0	8	3.43
Cyclaneusma minus	8	5	0	13	5.58
Coniochaeta sp.	0	0	6	6	2.58
Aureobasidium pullulans	0	0	8	8	3.43
Phanerochaete sp.	0	5	0	5	2.15
Hormonema sp.	15	12	8	35	15.02
其他真菌Other fungi	8	6	6	20	8.58
合计Total	83	80	70	233	100.00

表 2　有症状樟子松的不同部位内生真菌分离结果

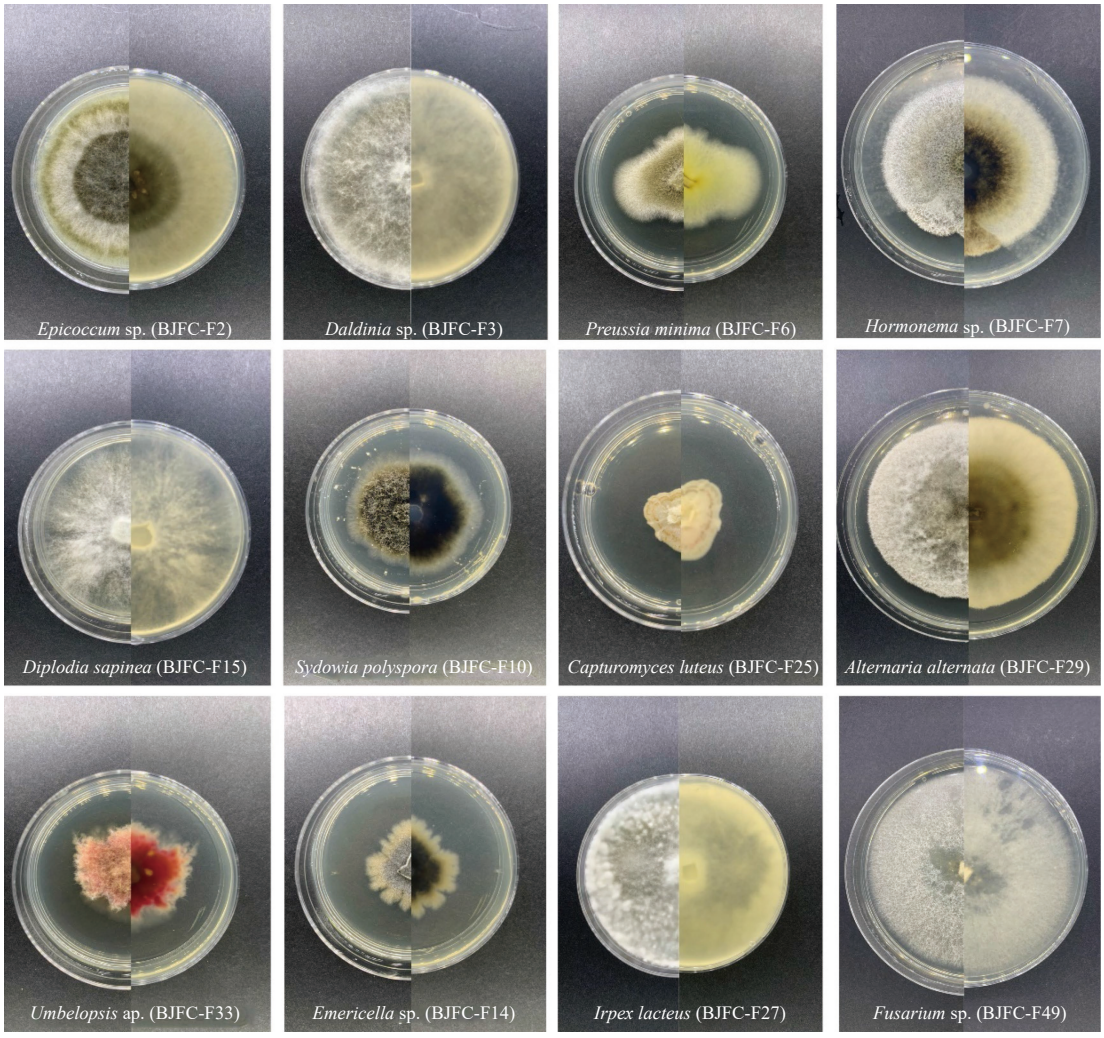
Tab. 2　Isolation results of endophytic fungi from different parts of symptomatic Mongolian pine

类群 Taxa	分离部位 Isolation part			菌株数 Strain number	分离率 Isolation rate/%
	针叶 Needle	嫩梢 Twig	韧皮部 Phloem		
Asperillus sp.	0	5	6	11	3.06
Epicoccum sp.	4	9	0	13	3.61
Daldinia sp.	0	7	3	10	2.78
Ophiostoma minus	0	0	10	10	2.78
Diplodia sapinea	37	25	10	72	20.00
Preussia minima	6	12	8	26	7.22
Umbelopsis sp.	0	0	6	6	1.67
Sydowia polyspora	22	14	8	44	12.22
Kalmusia sp.	0	6	0	6	1.67
Alternaria alternata	23	12	11	46	12.78
Schizophyllum sp.	4	0	0	4	1.11
Capturomyces luteus	0	0	5	5	1.39
Coniochaeta sp.	0	4	0	4	1.11
Fusarium sp.	12	6	6	24	6.67
Hormonema macrosporum	0	8	0	8	2.22
Therrya pini	5	9	0	14	3.89
Hendersonia pinicola	0	6	0	6	1.67
其他真菌Other fungi	22	17	13	52	14.44
合计Total	135	139	86	360	100.00

真实反映无症状和有症状樟子松不同部位内生真菌的群落组成。

在不同分类等级上分析无症状樟子松和有症状樟子松不同部位内生真菌的群落组成。在门分类水平上，无症状樟子松和有症状樟子松的不同部位的内生真菌群落，均主要由子囊菌门和担子菌门的真菌组成，分别占 99.14% 和 98.66%（图 3a、3b、3c）。

在属分类水平上，无症状樟子松和有症状樟子松的优势内生真菌类群不同（图 3d）。其中，无症状樟子松中，*Hormonema* 相对丰度最高，达 56.99%，



25 ℃，黑暗条件下生长 7 d。每个图片的左右两部分分别代表菌落的正面和反面，括号内信息为菌株编号。Growing at 25 ℃ under dark conditions for 7 d. The left and right parts of each picture represent front and back of the colony. Information in parentheses is the strain No.

图 2 部分内生真菌菌落形态照片

Fig. 2 Morphological photos of some endophytic fungal colonies

表 3 无症状樟子松不同部位内生真菌多样性指数

Tab. 3 Diversity index of endophytic fungi in different parts of asymptomatic Mongolian pine

分离部位 Isolation part	物种数 Species number	*H′*	*D′*	*E*
针叶 Needle	7	1.74	0.85	1.95
嫩梢 Twig	9	1.99	0.89	2.20
韧皮部 Phloem	9	2.07	0.90	2.20

注：*H′*. 香农−威纳多样性指数；*D′*.辛普森指数；*E*.均匀度指数。下同。Notes: *H′*, Shannon-Weiner diversity index; *D′*, Simpson index; *E*, evenness index. The same below.

表 4 有症状樟子松不同部位内生真菌多样性指数

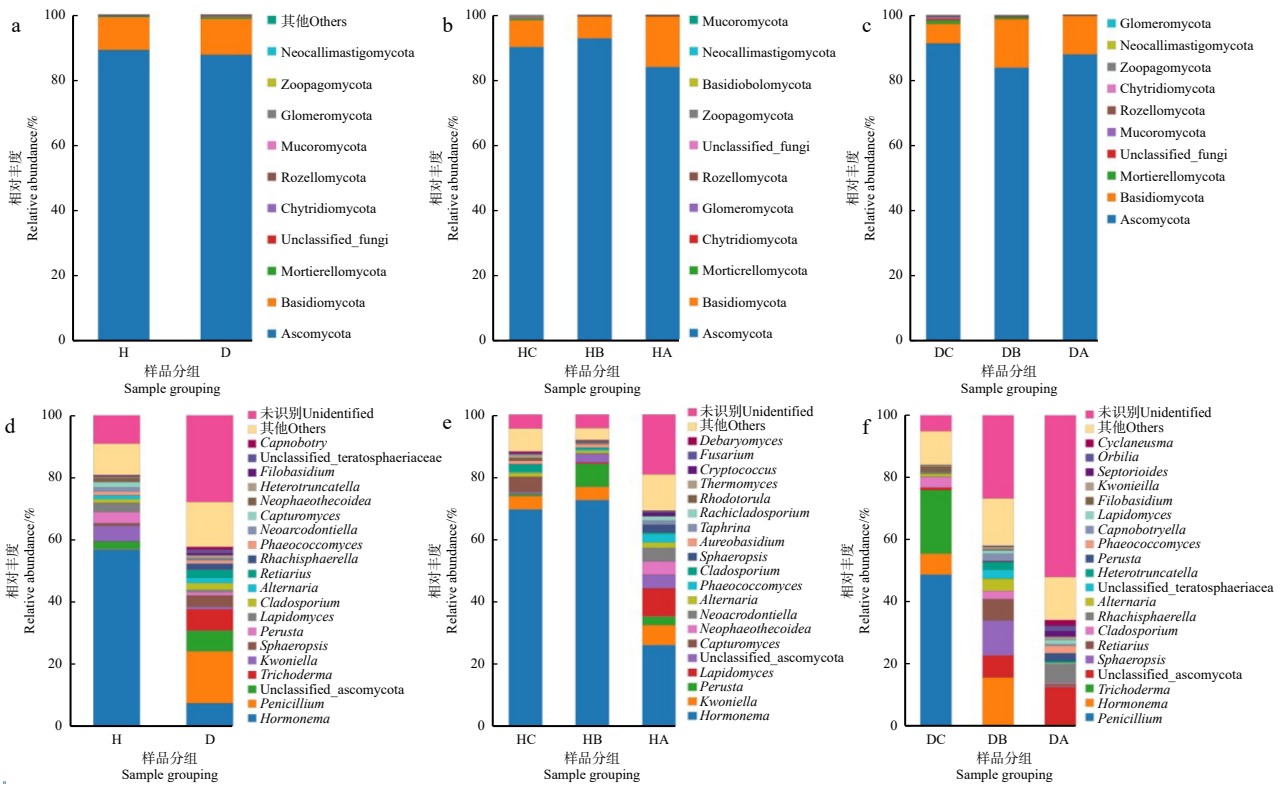
Tab. 4 Diversity index of endophytic fungi in different parts of symptomatic Mongolian pine

分离部位 Isolation part	物种数 Species number	*H′*	*D′*	*E*
针叶 Needle	8	1.63	0.86	2.08
嫩梢 Twig	13	2.26	0.92	2.56
韧皮部 Phloem	10	1.86	0.92	2.30

而 *Diplodia* 的相对丰度较低（0.88%）。有症状樟子松中unidentified fungi（未鉴定类群）的相对丰度最高，达27.67%，其次是 *Penicillium*（16.66%）和 *Hormonema*（7.77%），而 *Diplodia* 的相对丰度达 3.74%。进一步比较分析，发现：无症状樟子松的 3 个部位中，相对丰度最高的内生真菌均是 *Hormonema*，其在针叶、嫩梢和韧皮部中的相对丰度分别是 26.34%、72.69% 和 69.69%（图 3e）。在有症状樟子松针叶部位和嫩梢部位相对丰度最高的均为 unidentified fungi（未鉴定类群），而在韧皮部中丰度最高的是 *Penicillium*（48.98%）。此外，嫩梢部位 *Diplodia* 的相对丰度（11.19%）比在其他两个部位高（图 3f）。

2.3 樟子松内生真菌群落的 α 多样性

无症状和有症状樟子松内生真菌的 α 多样性指数无显著差异。进一步对无症状和有症状樟子松不同部位内生真菌群落的 α 多样性进行比较分析，发现无症状樟子松针叶部位内生真菌的 Chao1 指数



a、b、c 为内生真菌在门分类水平上的相对丰度。d、e、f 为内生真菌在属分类水平上的相对丰度。H 和 D 分别表示无症状樟子松和有症状樟子松。HA、HB、HC 分别表示无症状樟子松的针叶、嫩梢、韧皮部。DA、DB、DC 分别表示有症状樟子松针叶、嫩梢、韧皮部。下同。a, b, c are relative abundance of endophytic fungi at the level of phylum. d, e, f are relative abundance of endophytic fungi at the level of genus. H and D represent asymptomatic and symptomatic pine tree, respectively. HA, HB, and HC represent the needle, twig, and phloem of asymptomatic trees, respectively. DA, DB, and DC represent the needle, twig, and phloem of symptomatic trees, respectively. The same as below.

图 3　不同分类水平上的内生真菌群落组成及相对丰度

Fig. 3　Endophytic fungi composition and relative abundance at different taxonomic levels

和 ACE 指数显著高于韧皮部（$P < 0.05$），但与嫩梢处无显著差异（$P > 0.05$）（图 4a、4b）。针叶部位内生真菌的物种丰富度最高，且与韧皮部差异显著（$P < 0.05$）。

在有症状的樟子松中，针叶部位内生真菌的 Chao1 指数显著高于其他两个部位。嫩梢和韧皮部内生真菌也有显著差异（$P < 0.05$）（图 4c、4d）。有症状樟子松针叶部位的内生真菌的物种丰富度最高，且与其他两个部位差异明显。

进一步比较分析辛普森指数和香农–威纳多样性指数（图 5a、5b），有症状樟子松的嫩梢部位均显著高于无症状樟子松的嫩梢部位（$P < 0.05$），即与无症状樟子松相比，有症状樟子松的嫩梢部位的内生真菌的物种多样性较高。

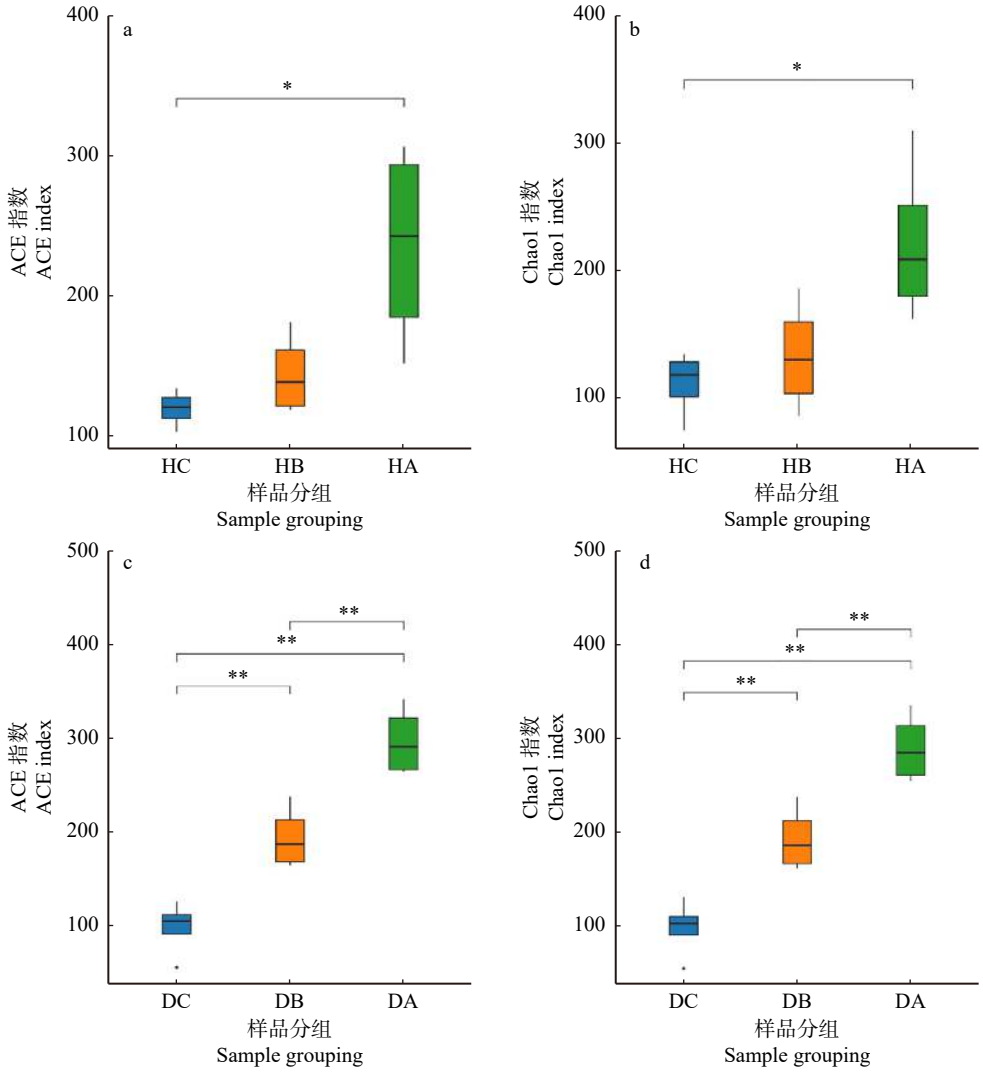
2.4　樟子松内生真菌群落的 β 多样性

利用基于 Bray-Curtis 距离的 PCoA 分析，比较了不同症状樟子松的内生真菌群落的 β 多样性，结果显示：无症状和有症状樟子松的内生真菌的群落存在差异，Anosim 分析表明二者内生真菌的群落差异极显著（$R = 0.392$，$P < 0.001$）。其中，有症状樟子松的韧皮部的内生真菌的物种组成，与其他两个部位内生真菌群落明显不同（$R = 0.664$，$P < 0.001$）。但是，无症状樟子松的 3 个部位的内生真菌群落组成差异不显著（图 4c）。基于 Bray-Curtis 的 NMDS 分析结果得到相同的结论，无症状和有症状樟子松的内生真菌的群落组成差异极显著（Stress = 0.092 8，$R = 0.39$，$P = 0.001$）。有症状樟子松的针叶和嫩梢部位的内生真菌的物种组成显著聚集，且与韧皮部明显相分离（Stress = 0.033 5，$R = 0.66$，$P = 0.001$）。而无症状樟子松的 3 个部位内生真菌的群落组成差异不显著。

2.5　樟子松内生真菌群落的 LEfSe 分析

线性判别分析 LEfSe 结果显示，无症状和有症状樟子松不同部位的内生真菌在丰度上存在显著差异（图 6）。

以无症状和有症状樟子松的嫩梢的内生真菌群落为例，差异物种进化分支图揭示了显著富集的标志物种在分类学层次上的分布。在科分类水平上，畸球腔菌科（Teratosphaeriaceae）、圆盘菌科（Orbiliaceae）以及葡萄座腔菌科（Botryosphaeriaceae）的内生真菌在有症状樟子松的嫩梢处显著富集；而小穴壳菌科（Dothioraceae）和囊担子菌科（Cystobasidiaceae）真



*表示差异显著($P < 0.05$)；**表示差异极显著($P < 0.01$)。下同。* means significant difference (P <0.05); ** means extremely significant difference ($P < 0.01$). Same as below.

图 4 样品的 ACE 指数和 Chao1 指数柱状图

Fig. 4 Histogram of ACE index and Chao1 index of samples

菌在无症状樟子松的嫩梢处显著富集。在属分类水平上，4 个属的内生真菌，包括小葡萄煤炱属(*Capnobotryella*)、*Cladophialophora*、网膜壳属(*Retiarius*)、*Diplodia*，在有症状樟子松嫩梢处显著富集；而线链霉属(*Hormonema*)、翅枝孢菌属(*Rachicladosporium*)和囊担子菌属(*Cystobasidium*)真菌在无症状樟子松嫩梢处显著富集。

差异物种的 LDA 值分布图(图 6)揭示了无症状和有症状樟子松韧皮部中丰度有显著差异的内生菌(LDA 绝对值大于 4，$P < 0.05$)。无症状樟子松嫩梢中丰度显著较高的是 *Hormonema* 真菌，而有症状樟子松嫩梢中丰度显著较高的是 *Diplodia* 真菌。*Diplodia* 真菌在无症状和有症状樟子松韧皮部中存在显著差异，且在有症状樟子松(红色条形图)中丰度最高；同时，*Diplodia* 的 LDA 得分值大于其他分类单元，表明其对组间差异的影响较大。此外，*Hormonema* 真菌在无症状和有症状樟子松韧皮部中存在显著差异，且在无症状樟子松(绿色条形图)中被显著富集，丰度最高。同时，*Hormonema* 的 LDA 得分值大于其他分类单元，表明其对组间差异的影响最大。

2.6 樟子松内生真菌的功能特征分析

利用 FunGuild，对无症状樟子松和有症状樟子松的内生真菌的营养模式进行比较分析。结果显示：在无症状樟子松上，腐生营养型真菌的比例最高，占 85.67%，病理营养型真菌占 11.66%，共生营养型真菌最少，占 2.66%。同样地，在有症状的樟子松上的内生真菌的营养型以腐生营养型为主，占 52.76%，病理营养型次之，占 36.33%，共生营养型最少，占 10.91%(图 7a)。通过比较发现，有症状樟子松中的病理营养型内生真菌的相对丰度较无症状中显著增多($P < 0.05$)。

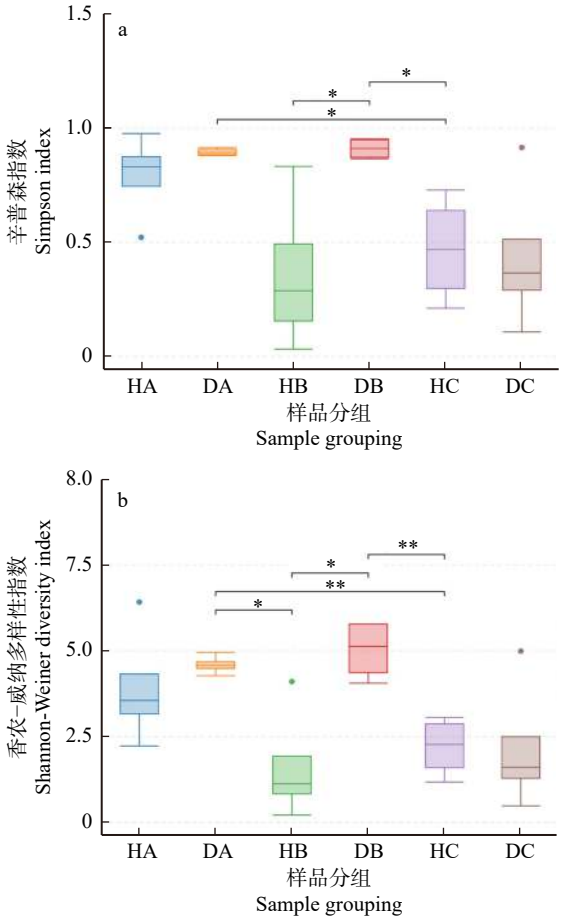


图 5　样品的辛普森指数和香农-威纳多样性指数柱状图

Fig. 5　Histogram of Simpson index and Shannon-Weiner diversity index of samples

进一步比较无症状樟子松和有症状樟子松的不同部位的内生真菌的营养模式(图 7c)，结果显示：无症状和有症状樟子松的针叶、嫩梢和韧皮部的病理营养型真菌和腐生营养型真菌的相对丰度均具有显著性差异($P < 0.05$)，同时，有症状樟子松的 3 个部位的病理营养型内生真菌的相对丰度均高于无症状樟子松。除了有症状樟子松的韧皮部，其他部位上的内生真菌均是腐生营养型为主，而有症状樟子松的韧皮部的病理营养型真菌的比例最高(占 50.79%)。

此外，对有症状和无症状樟子松的不同营养型真菌进行了功能注释(图 7b、7d)，将其分为 7 个生态功能群。在无症状樟子松上，未定义腐生菌(Undefined_Saprotroph)的相对丰度最高，而在有症状樟子松上，植物病原菌(Plant_Pathogen)的相对丰度显著增加。进一步比较分析不同部位内生真菌的相对丰度，无症状樟子松的 3 个部位上均是未定义腐生菌(Undefined_Saprotroph)的相对丰度最高，而在有症状樟子松韧皮部的植物病原菌(Plant_Pathogen)的相对丰度显著增多，在有症状樟子松嫩梢处的植物病原菌(Plant_Pathogen)的相对丰度最少。

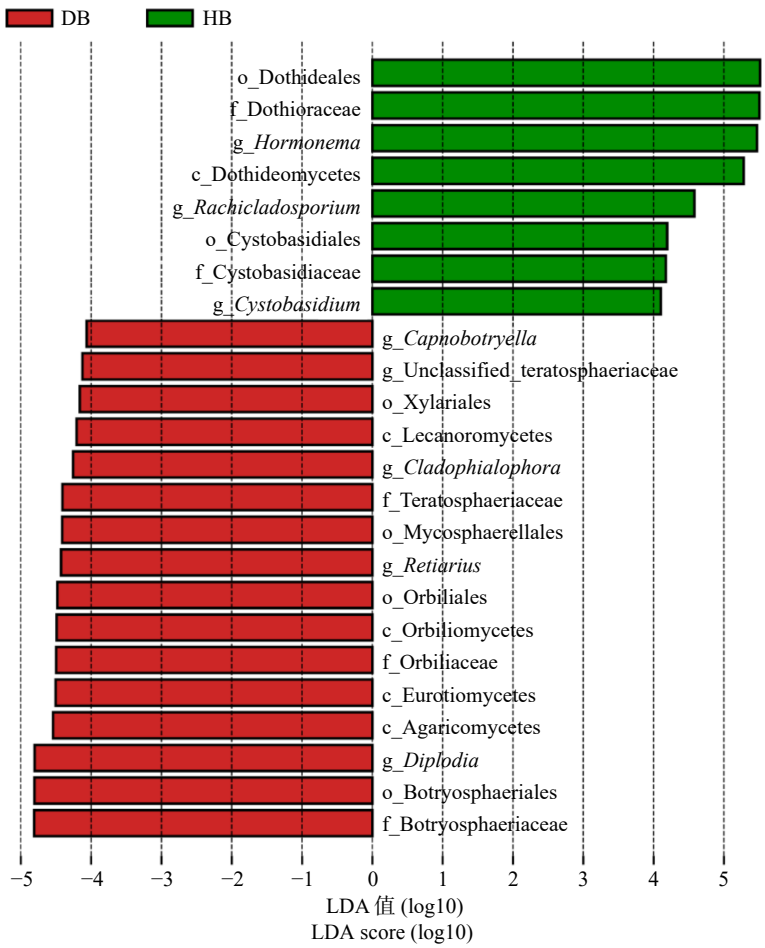
3　讨　　论

本研究通过内生真菌的分离培养和 Pacbio Sequel Ⅱ高通量测序技术，探究了无症状樟子松和有症状樟子松不同部位的内生真菌的群落组成、多样性和营养型功能的差异。内生真菌的分离鉴定结果显示：从无症状和有症状樟子松的 3 个部位均可分离到 *D. sapinea*，且针叶部位的分离率最高，嫩梢次之，韧皮部最少。与庞丽杰[9]和常忠连[16]的研究结果相似。Blumenstein 等[5]的研究结果也显示可从未表现出明显枯梢症状的欧洲赤松上分离出大量的 *D. sapinea*。本研究进一步证实了 *D. sapinea* 的内生菌的特征，其可潜伏寄生于无症状寄主植物上，当受到逆境胁迫，如干旱、冰雹、极端温度或机械损失时，该菌可迅速变为致病菌，造成病害的爆发。

扩增子测序结果显示：无症状樟子松和有症状樟子松中 *D. sapinea* 的相对丰度均较低(分别占 0.88% 和 3.74%)，而分离培养结果显示无症状和有症状樟子松的优势内生菌均是 *D. sapinea*，其分离率最高。本研究中分离鉴定结果和扩增子测序的结果不相吻合。这可能是由于分离培养时 *D. sapinea* 生长速度较快，使其成为优势菌株，导致部分生长缓慢的或无法在 MEA 培养基上生长的代表性菌株分离率较低。此外，由于扩增子测序时引物选择或测序深度等问题，也会造成一些稀有的内生真菌物种没有被检测出[5,32]，从而导致二者结果不一致。

扩增子测序结果表明 *D. sapinea* 在有症状樟子松的嫩梢处丰度最高。因此，对嫩梢处的内生真菌群落进行 LEfSe 分析发现，*Diplodia* 真菌在无症状和有症状樟子松的嫩梢中存在显著差异，且在有症状樟子松的嫩梢中被显著富集，丰度最高。此外，扩增子测序结果显示在无症状樟子松的 3 个部位中 *Hormonema* 均是优势属，其相对丰度最高。该结果与本研究中的内生菌的分离结果相似，分离结果也显示该属真菌 *Hormonema* sp.在无症状樟子松上的分离率较高(高达 15.02%)，但在有症状樟子松上分离率较低。LEfSe 分析结果进一步表明 *Hormonema* 属真菌在无症状和有症状樟子松嫩梢中存在显著差异，且在无症状樟子松嫩梢中被显著富集，丰度最高。

Hormonema sp.真菌广泛分布于全世界，被认为是针叶树的表生真菌或内生真菌[32−33]。该属真菌主要以无性型存在，缺乏有性型。基于无性孢子等特征，该属内的 *Hormonema dematioides* 目前被更名为 *Sydowia polyspora*。Blumenstein 等[5,13]从健康和发病欧洲赤松上也分离到大量的 *Sydowia polyspora*，并通过拮抗试验证实该菌具有抑制 *D. sapinea* 生长的



c_. 纲 Class; o_.目 Order; f_.科 Family; g_.属 Genus

图 6 基于 LEfSe 分析的组间差异性分类单元

Fig. 6 Differentiated taxa between groups based on LEfSe analyses

能力。因此，认为该类真菌可能在樟子松内生真菌群落中扮演重要角色，在一定程度上减少樟子松受 *D. sapinea* 的影响，并作为潜在生防菌被广泛讨论，认为可用于防治松枯梢病的发生[4]。此外，Blumenstein 等[13]认为 *Sydowia polyspora* 是真正的内生菌，在干旱等非生物胁迫条件下，不会使其转变成致病菌并引起病害发生。但是，Cleary 等[34]认为该内生菌是机会病原菌，气候变化下将导致其致病性发生改变。Pan 等[33]利用分离和接种试验证实，*Sydowia polyspora* 可定殖于云南松（*Pinus yunnanensis*）的枝干韧皮部和针叶处，并引起相关病害症状。此外，*Sydowia polyspora* 还可造成北美和欧洲冷杉（*Abies fabri*）的当年生针叶坏死、意大利五针松（*Lycopodium japonicum*）的枝条坏死[35]。*Hormonema macrosporum* 被发现是花旗松（*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*）种子阶段的核心菌群，认为该菌作为非致病菌，在花旗松的种子萌发、幼苗生长等阶段发挥重要作用[36]。同时，Peláez 等[37]发现可从 *Hormonema* 真菌中提取一种抗真菌化合物三萜糖苷（Enfumafungin），表明其在生物防治方面具有良好潜力。因此，下一步将进行拮抗试验以评估 *Hormonema* 属真菌作为生防菌的潜力。

无症状和有症状樟子松不同部位的内生真菌群落的多样性分析显示：其内生真菌的丰富度和多样性无明显差异，但群落构成差异显著。该结果与 Bußkamp 等[15]结果相似。谢宪等[21]认为无病斑针叶内生真菌的多样性高于染病后针叶的内生真菌多样性。推测原因是当针叶的防御体系被破坏后，单一的腐生营养型真菌相对丰度较高，造成其多样性下降。而在其他植物内生微生物的研究中，当植物受到病菌侵染后，其防御机制被破坏，内部平衡被打破，其他病原微生物及腐生微生物更易进入植物组织内，因此，病原菌的侵染提高了微生物的多样性[38]。本研究中，*D. sapinea* 作为内生菌，一直存在于松树体内。当在逆境胁迫下，宿主植物出现明显的病害症状，但在该病理过程中 *D. sapinea* 与其他内生菌群落的互作关系尚不明确，需结合转录组学、功能基因组学等进行深入分析。本研究进一步分析了不同部位的内生真菌的多样性指数，结果显示：无症状和有症状樟子松的针叶部位的内生真菌的丰度

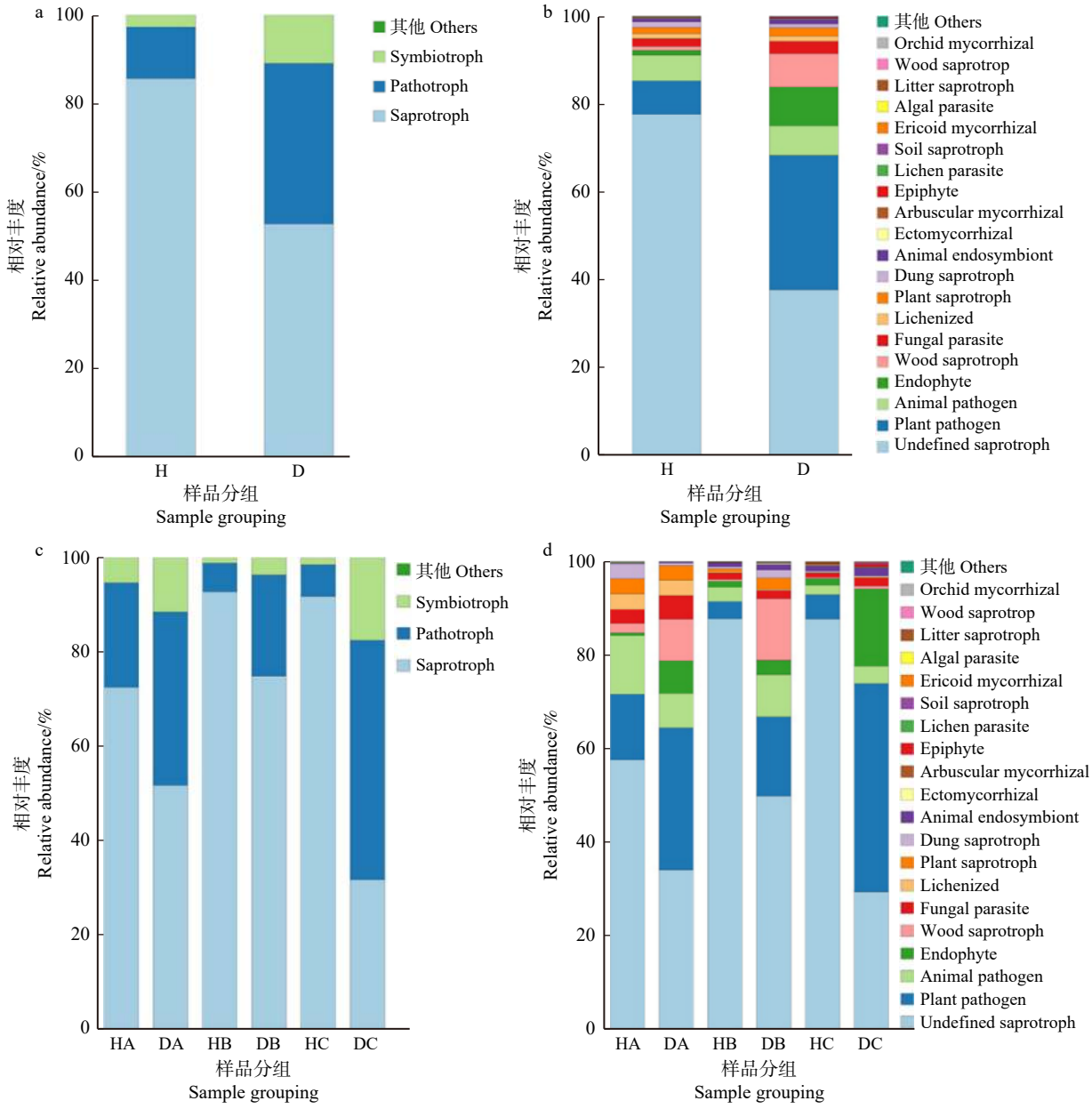


图 7　内生真菌群落 FUNGuild 真菌功能分类

Fig. 7　FUNGuild functional classification of endophytic fungal communities

均最高。同时，有症状樟子松嫩梢处的内生真菌的群落多样性显著高于无症状樟子松的嫩梢处。因此，随着病害症状的出现，嫩梢处的内生真菌的丰富度和多样性呈上升趋势。此外，有症状樟子松的韧皮部内生真菌的群落构成，与其他两个部位有显著差异，而无症状樟子松的 3 个部位内生真菌的群落组成结构差异不显著。真菌营养型分类也证实无症状樟子松的 3 个部位中均是腐生菌的相对丰度最高，同时，病理营养型内生真菌在有症状樟子松的 3 个部位的相对丰度均高于无症状樟子松，尤其在有症状樟子松韧皮部的植物病原菌的相对丰度显著增多。该结果与谢宪等[21]的结果一致，说明病理营养型真菌通过伤害寄主细胞来获取自身所需的营养物质，而腐生营养型真菌通过分解死亡的寄主细胞来获取营养物质。

虽然赤松等松属的内生菌已被广泛研究，但是内生菌群落与其宿主之间的互作机制仍不清楚[5,15]。尤其，*D. sapinea* 作为内生真菌，如何突破寄主防御体系并引起病害症状，在该病理过程中的分子机制尚不明确。本研究中，通过比较无症状和有症状樟子松不同部位的内生真菌的群落多样性和结构，探究了当病害症状出现时，定殖于樟子松不同部位的内生菌群落的作用，将为下一步明确内生真菌与潜伏病原菌之间的竞争互作关系，进一步筛选可能的拮抗内生菌奠定基础。

4　结　　论

本研究利用分离培养和高通量测序技术，对无

症状和有症状樟子松的针叶、嫩梢、韧皮部(胸径处)的内生真菌群落的多样性和结构进行了比较和分析，研究发现无症状和有症状樟子松中内生真菌的多样性无显著差异，但其不同部位内生真菌群落结构存在显著差异。其中 *D. sapinea* 作为内生真菌在无症状和有症状樟子松中都可分离得到。下一步将进行拮抗试验以评估无症状樟子松嫩梢部位相对丰度最高的 *Hormonema* 属真菌作为生防菌的潜力，为樟子松枯梢病的防治提供扎实的理论基础。

参 考 文 献

[1] 康宏樟, 朱教君, 许美玲. 科尔沁沙地樟子松人工林幼树水分生理生态特性 [J]. 干旱区研究, 2007, 24(1): 15−22.
Kang H Z, Zhu J J, Xu M L. Study on water physiological properties of the artificially-planned saplings of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* in the Horqin Sandland[J]. Arid Zone Research, 2007, 24(1): 15−22.

[2] 郑国强. 樟子松枯梢病侵染与流行规律的研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2001.
Zheng G Q. Infection and epidemiology of shoot blight of *Pinus sylvestris* var. *mongolica*[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2001.

[3] Brodde L, Adamson K, Camarero J J, et al. Diplodia tip blight on its way to the North: drivers of disease emergence in northern Europe[J/OL]. Frontiers in Plant Science, 2019, 9: 1818[2019−01−09]. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01818.

[4] Oliva J, Ridley M, Redondo M A, et al. Competitive exclusion amongst endophytes determines shoot blight severity on pine[J]. Functional Ecology, 2021, 35(1): 239−254.

[5] Blumenstein K, Bußkamp J, Langer G J, et al. *Sphaeropsis sapinea* and associated endophytes in scots pine: interactions and effect on the host under variable water content[J/OL]. Frontiers in Forests and Global Change, 2021, 4: 655769[2021−05−24]. https://doi.org/10.3389/ffgc.2021.655769.

[6] Phillips A J L, Alves A, Abdollahzadeh J, et al. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture[J]. Studies in Mycology, 2013, 76(1): 151−167.

[7] 项存悌, 原树忠, 孟繁荣, 等. 樟子松枯梢病的研究 [J]. 东北林学院学报, 1981, 6(2): 1−10, 129.
Xiang C T, Yuan S Z, Meng F R, et al. Studies on the diplodia shoot-blight of *Pinus sylvestris* var. *mongolica*[J]. Journal of Northeast Forestry University, 1981, 6(2): 1−10, 129.

[8] 黄敬林, 李耀民, 杨传波, 等. 樟子松枯梢病的侵染规律 [J]. 东北林业大学学报, 2002, 30(3): 13−16.
Huang J L, Li Y M, Yang C B, et al. Infection law of shoot blight of *Pinus sylvestris* var. *mongolica*[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2002, 30(3): 13−16.

[9] 庞丽杰. 樟子松枯梢病流行规律和测报技术的研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2004.
Pang L J. Study on the epidemiology and forecast technology of Shoot Blight of *Pinus sylvestris* var. *mongolica*[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2004.

[10] Smith H, Wingfield M J, Crous P W, et al. *Sphaeropsis sapinea* and *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Pinus* spp. and *Eucalyptus* spp. in South Africa[J]. South African Journal of Botany, 1996, 62(2): 86−88.

[11] Flowers J, Nuckles E, Hartman J, et al. Latent infection of Austrian and Scots pine tissues by *Sphaeropsis sapinea*[J]. Plant Disease, 2001, 85(10): 1107−1112.

[12] Terhonen E, Babalola J, Kasanen, R, et al. *Sphaeropsis sapinea* found as symptomless endophyte in Finland[J/OL]. Silva Fennica, 2021, 55(1): 13[2021−01−26]. https://doi.org/10.14214/sf.10420.

[13] Blumenstein K, Bußkamp J, Langer G J, et al. The Diplodia tip blight pathogen *Sphaeropsis sapinea* is the most common fungus in Scots Pines' mycobiome, irrespective of health status: a case study from Germany[J/OL]. Journal of Fungi, 2021, 7(8): 607[2021−07−27]. https://doi.org/10.3390/jof7080607.

[14] Sherwood P, Villari C, Capretti P, et al. Mechanisms of induced susceptibility to diplodia tip blight in drought-stressed Austrian pine[J]. Tree Physiology, 2015, 35: 549–562.

[15] Bußkamp J, Langer G J, Langer E J. *Sphaeropsis sapinea* and fungal endophyte diversity in twigs of Scots pine (*Pinus sylvestris*) in Germany[J]. Mycological Progress, 2020, 19(9): 985−999.

[16] 常忠连. 辽西地区樟子松固沙林衰退枯死原因及改造方式研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2004.
Chang Z L. Study on reason of the death and reconstruction techniques of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* plantation for sandy-fixation in west of Liaoning Province[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2004.

[17] 杨传波, 黄敬林, 李宝年, 等. 樟子松树栖真菌群落物种多样性及其与病害的关系 [J]. 东北林业大学学报, 2004, 32(5): 94−96.
Yang C B, Huang J L, Li B N, et al. The relationship between the species diversity of dendrocola mycoflora on *Pinus sylvestris* var. *mongolica* and disease[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2004, 32(5): 94−96.

[18] 周秀华. 樟子松树栖真菌生物相的研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2004.
Zhou X H. The studies on the *Pinus sylvestris* var. *mongolica* of sudendrocola mycoflora[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2004.

[19] 周秀华. 樟子松干栖真菌类群的研究 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(5): 2784−2785.
Zhou X H. Study on groups of fungi on boles of *Pinus sylvestris* var. *mongolica*[J]. AnHui Agricultural Science, 2011, 39(5): 2784−2785.

[20] 鞠洪波. 樟子松枯梢病微生态控制研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2004.
Ju H B. The Research of micro-ecological control on shoot blight of *Pinus sylvestris* var. *mongolica*[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2004.

[21] 谢宪, 梁军, 朱彦鹏, 等. 赤松纯林不同松枯梢病病级针叶的内生真菌多样性及群落结构 [J]. 林业科学, 2020, 56(9): 51−57.

Xie X, Liang J, Zhu Y P, et al. Diversity and community structure of endophytic fungi in the pure forest of *Pinus densiflora* infected by different incidences of *Sphaeropsis sapinea*[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2020, 56(9): 51−57.

[22] 李宝年, 徐树辉, 杨传波, 等. 樟子松枯梢病拮抗真菌的筛选 [J]. 东北林业大学学报, 2004, 32(5): 97−99.
Li B N, Xu S H, Yang C B, et al. Screening of antagonistic fungus for *Pinus sylvestris* var. *mongolica* shoot blight[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2004, 32(5): 97−99.

[23] 周秀华, 崔磊. 螺卷毛壳对樟子松枯梢病病原菌的影响 [J]. 长春大学学报, 2009, 19(10): 69−70,74.
Zhou X H, Cui L. Effect of *Chaetomium cochliodes* on the pathogen of *Sphaeropsis sapinea* blight of *Pinus sylvestris* var. *mongolica*[J]. Journal of Changchun University, 2009, 19(10): 69−70,74.

[24] 邓勋, 宋瑞清, 宋小双, 等. 高效木霉菌株对樟子松枯梢病的抑菌机理 [J]. 中南林业科技大学学报, 2012, 32(11): 21−27.
Deng X, Song R Q, Song X S, et al. High efficient *Trichoderma* strains and theirs bio-control effects on shoot blight of *Pinus sylvestris* var. *mongolica*[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2012, 32(11): 21−27.

[25] Oliva J, Boberg J, Stenlid J. First report of *Sphaeropsis sapinea* on Scots pine (*Pinus sylvestris*) and Austrian pine (*P. nigra*) in Sweden[J]. New Disease Reports, 2013, 27(1): 23−23.

[26] Porebski S, Grant B L, Bernard R. B. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1997, 15(1): 8−15.

[27] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]// MA Innis. PCR protocols: a guide to methods and applications. New York: Academic Press, 1990: 315−322.

[28] Edgar R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996−998.

[29] Bolyen E, Rideout J R, Dillon M R, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2[J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(8): 852−857.

[30] Grice E A, Kong H H, Conlan S, et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome[J]. Science, 2009, 324: 1190−1192.

[31] Nguyen N H, Song Z, Bates S T, et al. FUNGuild: an open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild[J]. Fungal Ecology, 2016, 20: 241−248.

[32] Bills G F, Collado J, Ruibal C, et al. *Hormonema carpetanum* sp. nov., a new lineage of dothideaceous black yeasts from Spain[J]. Studies in Mycology, 2004, 50: 149−157.

[33] Pan Y, Ye H, Lu J, et al. Isolation and identification of *Sydowia polyspora* and its pathogenicity on *Pinus yunnanensis* in southwestern China[J]. Journal of Phytopathology, 2018, 166(6): 386−395.

[34] Cleary M, Oskay F, Doğmuş H T, et al. Cryptic risks to forest biosecurity associated with the global movement of commercial seed[J/OL]. Forests, 2019, 10(5): 459[2019−05−27]. https://doi.org/10.3390/f10050459.

[35] Talgø V, Chastagner G, Thomsen I M, et al. *Sydowia polyspora* associated with current season needle necrosis (CSNN) on true fir (*Abies* spp.)[J]. Fungal Biology, 2010, 114(7): 545−554.

[36] Bergmann G E, Busby P E. The core seed mycobiome of *Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii* across provenances of the Pacific Northwest, USA[J]. Mycologia, 2021, 113(6): 1169−1180.

[37] Peláez F, Cabello A, Platas G, et al. The discovery of enfumafungin, a novel antifungal compound produced by an endophytic *Hormonema* species biological activity and taxonomy of the producing organisms[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2000, 23(3): 333−343.

[38] 刘政, 李燕, 孙艳, 等. 黄萎病侵染后棉花根部内生真菌群落结构分析 [J]. 西北农业学报, 2016, 25(1): 42−47.
Liu Z, Li Y, Sun Y, et al. Analysing endophytic fungi communities in cotton roots infected with *Verticillium*[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2016, 25(1): 42−47.

（责任编辑　范　娟　孟　瑶
责任编委　张星耀）