•研究报告•

用传统分离培养法和高通量测序技术分析 印度块菌子囊果内细菌的群落结构

邓晓娟¹ 刘建利¹ 闫兴富¹ 刘培贵^{2*}¹ (北方民族大学生物科学与工程学院, 银川 750021)² (中国科学院昆明植物研究所生物多样性与生物地理学重点实验室, 昆明 650201)

摘要: 块菌是重要的经济真菌, 在其生长发育过程中, 细菌扮演了重要角色。本文利用传统分离培养法和高通量测序技术分析印度块菌(*Tuber indicum*)子囊果内细菌的群落结构。共分离得到细菌532株, 根据物种累积曲线, 选取其中的112株细菌进行了16S rRNA基因序列分析, 共鉴定出4属40种, 其中假单胞菌属(*Pseudomonas*)菌株占所测菌株数的80%, 不动杆菌属(*Acinetobacter*)占12.5%, 链霉菌属(*Streptomyces*)占5%, 贪噬菌属(*Variovorax*)占2.5%。通过对印度块菌子囊果16S rRNA基因的V1–V3区高通量测序分析, 共获得细菌序列9,862条, 分属于7门43属220种, 其中变形菌门、拟杆菌门和放线菌门的物种占总物种数的99.7%, 是印度块菌子囊果内的优势细菌。黄杆菌属(*Flavobacterium*)、壤霉菌属(*Agromyces*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、剑菌属(*Ensifer*)和寡养食单胞菌属(*Stenotrophomonas*)的物种数占总物种的86.3%, 是印度块菌子囊果内细菌的优势属。研究表明, 采用胰蛋白大豆培养基仅分离得到印度块菌子囊果内少数细菌物种, 而采用高通量测序技术分析发现, 印度块菌子囊果内细菌物种种类丰富, 群落结构复杂。

关键词: 印度块菌; 子囊果; 细菌; 培养; 高通量测序

Community composition of bacteria associated with ascocarps of *Tuber indicum* using traditional culture method and Roche 454 high-throughput sequencing

Xiaojuan Deng¹, Jianli Liu¹, Xingfu Yan¹, Peigui Liu²¹ College of Biological Science and Engineering, Beifang University of Nationalities, Yinchuan 750021² Key Laboratory of Biodiversity and Biogeography, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201

Abstract: Truffles are important economic fungi, and bacteria play an important role in their growth and development. We investigated the bacterial community composition inside ascocarps of *Tuber indicum*. Using the traditional culture method, 532 isolates were obtained from ascocarps. Using the rarefaction curve, the 16S rRNA gene was collected and sequenced from 112 purified isolates to identify 4 genera and 40 species. Isolates of the genera *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Streptomyces* and *Variovorax* accounted for 80%, 12.5%, 5% and 2.5% of the number of these sequenced isolates, respectively. On the other hand, 9,862 sequences of the bacterial V1–V3 region of 16S rRNA gene, which represented 220 species, were analyzed via Roche 454 high-throughput sequencing. Species of the phyla Proteobacteria, Bacteroidetes, and Actinobacteria were dominant, accounting for 99.7% of all identified species. Genera *Flavobacterium*, *Agromyces*, *Microbacterium*, *Ensifer*, and *Stenotrophomonas* were dominant among the bacteria identified with this alternative method, accounting for 86.3% of the number of total species. It was found that relatively few bacterial species were isolated from ascocarps of *T. indicum* when analyzed via traditional culture method. The bacterial population associated with ascocarps of *T. indicum* was augmented when analyzed by Roche 454 high-throughput sequencing, which indicates that this latter method provides more comprehensive

收稿日期: 2018-07-03; 接受日期: 2018-12-21

基金项目: 北方民族大学重点科研项目(2017KJ27)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: pglu@mail.kib.ac.cn

results.

Key words: *Tuber indicum*; acocarps; bacteria; culture; high-throughput sequencing

块菌在商业贸易中被称为松露, 是一种地下菌根真菌, 因含有丰富的氨基酸并且具有独特的香味而享誉世界。块菌在贸易市场上最常见的种类有3种, 分别是产于欧洲的黑孢块菌(*Tuber melanosporum*)、意大利白块菌(*T. magnatum*), 以及产于亚洲的印度块菌(*T. indicum*)。印度块菌主产于中国的云南、四川和西藏, 产量大且分布广, 每年以出口为主, 是中国西南地区主要的野生经济真菌之一(Liu et al, 2016; Qiao et al, 2018)。

在块菌的生长发育过程中, 细菌始终扮演着重要角色。对块菌子囊果内细菌的种群结构进行研究, 了解细菌在块菌生活史中所占据的生态地位具有重要意义(Fu et al, 2016)。块菌子囊果为细菌的生存提供了良好的条件, 在块菌菌丝和孢子表面以及子囊果内部观察到大量的细菌类群, 如放线菌、假单胞菌和需氧芽孢菌等(Citterio et al, 1995; Wan & Liu, 2014)。细菌通过影响块菌子囊果的生态适应性从而影响菌丝的生长和分布(Streiblová et al, 2012)。细菌的群落结构也会影响块菌子囊果的成熟过程和香味的形成(Splivallo et al, 2015)。同时, 块菌菌丝在侵染植物根部形成菌根的过程中受到根际细菌类群的调节(Gryndler et al, 2013)。

虽然对于复杂环境中微生物的纯培养技术已经有了很大的发展(Dorofeev et al, 2014), 但仅能培养出环境微生物群落中的少数物种。高通量测序技术(high-throughput sequencing)极大地推动了人们对微生物生态学的认识(Mavromatis et al, 2012; Siqueira et al, 2012)。本研究将传统的分离培养技术和高通量测序技术相结合, 探讨印度块菌子囊果内细菌的群落结构, 为子囊果内细菌的功能研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 样品的采集

云南省楚雄州是印度块菌主要的出产地。本研究选取云南省楚雄州姚安县左门乡后山的纯云南松(*Pinus yunnanensis*)林为样品采集地。采样地面积约1,000 m², 海拔2,221–2,330 m, 土壤为偏碱性的

石灰质土壤(pH介于6–8), 含碳量22.12–89.22 g/kg, 平均含钙量17.3 g/kg。在采样地发现块菌后, 取出子囊果, 编号放入自封袋中, 带回实验室处理。在16个菌塘中采集到35个印度块菌子囊果, 选取其中6个子囊果为本次实验样品。选取的子囊果完全成熟、无病虫害、无机械损伤、直径1.5–2.0 cm。

1.2 印度块菌子囊果内可培养细菌的分离纯化和鉴定

将印度块菌子囊果表面清洗干净并用酒精消毒, 移入超净工作台, 使用灭菌刀片沿子囊果切向线切开, 取正中间菌肉0.5 g, 移入10 mL三角瓶中。将样品用玻璃棒捣碎至泥状, 加入5 mL灭菌的生理盐水(NaCl 0.85%)稀释成10⁻¹菌液, 同时制备10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵和10⁻⁶稀释液, 用于细菌的分离纯化。

分别取10⁻⁴、10⁻⁵和10⁻⁶的稀释液培养细菌, 采用胰蛋白大豆培养基(TSA)对菌株进行分离, 生化培养箱28 °C条件下培养, 每个浓度的平板设置3个重复。

对分离培养的单菌落进行扩大培养并提取总DNA。利用通用引物27f/1378r扩增细菌16S rRNA基因序列(Gurtler & Stanisich, 1996)。将扩增片段送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测序结果通过NCBI上的Blast功能进行比对, 当序列的相似度大于97%时被归属为同一个分类操作单元(OTU)。使用 SeqMan (DNASTAR Package)对序列进行编辑, 采用Clustal 3 version 1.81进行多序列自动比对(Thompson et al, 1997), 并通过BioEdit Version 5.0.9手动调整矩阵(Hall, 1999)。系统发育分析采用Tamura等(2007)的方法。对挑取的菌落数和物种数绘制物种累积曲线, 当挑选的菌落数增加而种类不变时, 不再增加挑选样本的数量。

1.3 印度块菌子囊果内细菌基因组总DNA的提取

在超净工作台内, 将表面消毒的子囊果切向线切开, 取正中间菌肉0.5 g, 使用MP公司的Fast DNA Spin Kit for Soil (116560-200) 试剂盒, 按照说明书完成微生物基因组总DNA提取。

扩增体系为: 5 μL 5 × Fast Pfu缓冲液, 2.5 μL

2.5×10^{-3} M dNTPs, 1.0 μ L 0.5×10^{-5} M 27F引物(5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3'), 1.0 μ L 0.5×10^{-5} M 533R引物(5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3'), 10 ng模板以及0.5 μ L Fast Pfu Polymerase, 最后加ddH₂O到25 μ L。扩增程序: 95℃预变性5 min; 94℃变性1 min, 60℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 共27个循环; 72℃后延伸10 min。1.5%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物, 将扩增产物送至上海美吉生物医药科技有限公司, 利用罗氏454 Titanium测序仪完成高通量测序。

1.4 数据分析

在对序列进行分析时, 去除不含样品信息的序列。过长序列末端的质量会降低, 在分析时去除序列尾部的低质量序列。修剪、去除序列中含有模糊碱基(ambiguous)、单碱基高重复区(homologous)以及长度小于100 bp的序列, 得到供精准分析的优化序列, 并提交至NCBI数据库进行OTU分析。生物信息分析中, 测序得到的每一条序列来自一个菌。要了解一个样品测序结果中的菌种、属等信息, 需要对序列进行归类操作, 将序列相似性达到97%归为一个OUT, 即一个物种。每个物种选取一条或多条高质量序列进行聚类分析。

2 结果

2.1 印度块菌子囊果内可培养细菌多样性

在 10^{-5} 和 10^{-6} 的稀释浓度下, 细菌在TSA培养基上能够形成清晰独立的菌落(图1), 选择菌落数在20–200的培养皿, 挑选细菌纯化培养, 总计得到可培养细菌532株。根据物种累积曲线, 其中112株细菌的16S rRNA基因被测序。对112株细菌的测序结果进行初步筛选, 其中59条高质量的序列(代表40个种)被用于本次分析。同时, 根据序列比对结果,

图1 印度块菌子囊果内可培养细菌

Fig. 1 Culturable bacteria from *Tuber indicum* ascocarps

在NCBI上下载32条高质量序列。自测的59条序列和下载的32条序列共同被用于系统发育树的构建。排序后得到了长度为1,326 bp的序列矩阵, 其中520个为信息位点(parsimony-informative), 459个为非信息位点(parsimony-uninformative)。启发式搜索的最大简约性分析产生了35棵同等简约树, 步长为2,122, 一致性指数(CI)为0.646, 留存指数(RI)为0.826。

基于子囊果内可培养细菌16S rRNA基因序列构建的最大简约树(图2)表明, 以2条大肠杆菌(*Escherichia coli*)的16S rRNA基因序列为外类群(Group 5), 印度块菌子囊果内分离得到的59条序列很好地聚在了4个Groups里。Group 1包含了下载的25条隶属于丙型变形菌门假单胞菌属(*Pseudomonas*)的序列, 49条本次实验获得的序列(代表了32个种)。Group 2包含了下载的5条隶属于乙型变形菌门不动杆菌属(*Acinetobacter*)的序列, 5条本次实验获得的序列(代表了5个种)。Group 3包含了下载的1条隶属于乙型变形菌门贪噬菌属(*Variovorax*)的序列, 1条本次实验获得的序列(代表了1个种)。Group 4包含了下载的4条隶属于放线菌门链霉菌属(*Streptomyces*)的序列, 2条本次实验获得的序列(代表了2个种)。

研究结果表明, 印度块菌子囊果内可培养细菌分属于4个属的40个种, 其中假单胞菌属菌株占所测菌株数的80%, 不动杆菌属占12.5%, 链霉菌属占5%, 贪噬菌属占2.5%。采用TSA培养基培养, 分离得到印度块菌子囊果内少数细菌物种, 其中假单胞菌为绝对优势类群。

2.2 子囊果内细菌高通量测序结果分析

提取印度块菌子囊果内细菌总DNA, 扩增其16S rRNA基因的V1–V3区并高通量测序, 总计得到9,862条序列220个物种。对其测序数量和物种数量之间的关系进行Rarefaction曲线分析(图3), 当测序数量在9,862条, 相似度设为97%时, 物种的数量还在增加, 但曲线趋于缓和, 测序数量可以满足分析要求。

印度块菌子囊果内细菌的220个物种分属于细菌的7门43属, 其中隶属于变形菌门的物种占总物种数的38.9%, 拟杆菌门的物种占总物种数的32.6%, 放线菌门的物种占总物种数的28.2%, 隶属于该3门的物种占总物种数的99.7% (图4a)。在属的级别上, 隶属于黄杆菌属(*Flavobacterium*)的物种占总物种

图2 基于印度块菌子囊果内可培养细菌16S rRNA基因序列构建的最大简约树。分支上的数字为≥ 50%的靴带值。
Fig. 2 One of most parsimonious trees based on the analysis of 16S rRNA gene sequences of culturable bacteria from *Tuber indicum* ascocarps. Numbers above branches indicate bootstrap support above 50%.

图3 印度块菌子囊果内细菌的序列数量和物种数量之间的Rarefaction曲线分析

Fig. 3 Rarefaction curve between species and sequences of bacteria from *Tuber indicum* ascocarps

数的31.4%，壤霉菌属(*Agromyces*)占14.4%，微杆菌属(*Microbacterium*)占14%，剑菌属(*Ensifer*)占13.8%，寡养食单胞菌属(*Stenotrophomonas*)占12.7%，鞘氨醇盒菌(*Sphingopyxis*)占6.2%，假单胞菌属占2.2%，贪噬菌属(*Variovorax*)占2.7%，其余35个属的物种占总物种数的2.6% (图4b)。在物种的分布上，变形菌门、拟杆菌门和放线菌门细菌是印度块菌子囊果内细菌的优势类群，黄杆菌属、壤霉菌属、微杆菌属、剑菌属和寡养食单胞菌属是其优势属。基于非培养的高通量测序研究发现，印度块菌子囊果内细菌物种种类丰富，群落结构复杂，优势菌群集中。

3 讨论

块菌的代谢产物影响其周围的土壤理化性质以及共生植物根部微生物的类群，使得块菌生长并

形成子囊果的地方大部分草本植物枯死，形成无草或少草的火烧区式的“菌塘”。菌塘微生物的种群组成和块菌之间的关系紧密而复杂。细菌通过影响块菌子囊果的生态适应性，从而影响菌丝的生长、分布及子囊果的形成(Streiblová et al, 2012)。

本次实验选取6个成熟的印度块菌子囊果，对其内部细菌群落结构进行了分析。传统平板培养方法得到的结果显示，印度块菌内部可培养细菌以假单胞菌为绝对优势类群。假单胞菌隶属于丙型变形菌门，能在植物根际土壤中大量增殖，许多菌株对植物有抑制病害、促进生长的作用，其中荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)成为近几十年来研究最多、最具应用前景的一类生防菌(Yan et al, 2013)。假单胞菌可促进波氏块菌(*T. borchii*)孢子的萌发和菌丝的生长，并为子囊的分化起到积极作用(Sbrana et al, 2000, 2002)。假单胞菌也是沙漠块菌(*Terfezia clavaryi*)菌根际土壤可培养细菌的优势类群，且其中孟氏假单胞菌(*P. mandelii*)明显提高了菌根的感染率，被认为是一种良好的菌根促生细菌而被用于菌根合成生产中(Navarro-Ródenas et al, 2016)。假单胞菌除在块菌菌根际土壤里是优势类群，也是波氏块菌菌根根尖以及意大利白块菌和布吉纳法索沙漠块菌(*Te. boudieri*)子囊果内的优势类群(Dib-Bellahouel & Fortas, 2014; Picceri et al, 2018)。

奥斯陆莫拉菌(*Moraxella osloensis*)隶属于变形菌门，被认为是块菌子囊果的常见伴生细菌，不同的块菌子囊果内都相继分离得到该细菌(Citterio et al,

图4 印度块菌子囊果内细菌物种在不同门的分布(a)和在不同属的分布(b)

Fig. 4 Distribution of bacterial species in phylum (a) and at genus level (b)

2001; Barbieri et al, 2007)。在意大利白块菌的子囊果中, 奥斯陆莫拉菌占据优势地位, 并且影响子囊果的产量(Mello et al, 2010)。然而, 在本实验中, 印度块菌子囊果内并未分离得到奥斯陆莫拉菌, 产于中国的另一种块菌——攀枝花块菌(*T. panzhihua-nense*)的子囊果内也未分离得到该细菌(Wan & Liu, 2014)。

采用高通量测序技术扩增细菌16S rRNA基因V1-V3区进行测序分析, 发现印度块菌子囊果内的细菌类群具有很高的多样性, 其中变形菌门、拟杆菌门和放线菌门细菌是其优势类群。波氏块菌子囊果内微生物类群同样以隶属于变形菌门的细菌为主要优势类群(Barbieri et al, 2005)。在黑孢块菌的子囊果成熟过程中, 微生物类群虽有动态变化, 但都是以 α -变形菌门和 γ -变形菌门细菌为优势类群(Deveau et al, 2010)。虽然以上研究所选块菌种类不同, 但在子囊果内的细菌优势类群有相似性, 为细菌在块菌子实体形成中的协同效应研究提供了参考。

从研究结果来看, 相对于高通量测序技术, 传统平板培养方法获得的细菌类群相对单一, 并且在属的水平上, 两种方法的分析数据有所差异, 可能在于本实验仅采用TSA一种培养基进行培养, 不能全面揭示可培养细菌类群的多样性。但在门的级别上, 不同方法的分析数据都以变形菌门细菌为绝对优势类群。高通量测序技术在研究微生物群落结构的过程中发挥着传统分析方法无可替代的作用(Soudzilovskaia et al, 2015), 极大地推动了人们对环境微生物生态学的认识。然而, 任何一种微生物的研究手段都有局限性。对于子囊果内细菌的功能以及细菌在块菌子囊果形成过程中的影响作用研究, 都离不开传统平板培养方法。本实验不仅采用高通量测序方法, 还采用传统的平板培养方法对可培养细菌进行了分离并鉴定, 为子囊果内细菌的功能研究以及菌根促生菌的筛选提供了数据。

致谢: 感谢山东省农业科学院乔鹏博士在样品采集和处理过程中的支持和帮助。

参考文献

Barbieri E, Bertini L, Rossi I, Ceccaroli P, Saltarelli R, Guidi C, Zambonelli A, Stocchi V (2005) New evidence for bacterial diversity in the ascoma of the ectomycorrhizal

- fungus *Tuber borchii* Vittad. FEMS Microbiology Letters, 247, 23–35.
- Barbieri E, Guidi C, Bertaux J, Frey-Klett P, Garbaye J, Ceccaroli P, Saltarelli R, Zambonelli A, Stocchi V (2007) Occurrence and diversity of bacterial communities in *Tuber magnatum* during truffle maturation. Environmental Microbiology, 9, 2234–2246.
- Citterio B, Cardoni P, Potenza L, Amicucci A, Stocchi V, Gola G, Nuti M (1995) Isolation of bacteria from sporocarps of *Tuber magnatum* Pico, *Tuber borchii* Vitt. and *Tuber maculatum* Vitt. In: Biotechnology of Ectomycorrhizae (eds Stocchi V, Bonfante P, Nuti M), pp. 241–248. Plenum Press, New York.
- Citterio B, Malatesta M, Battistelli S, Marcheggiani F, Baffone W, Saltarelli R, Stocchi V, Gazzanelli G (2001) Possible involvement of *Pseudomonas fluorescens* and Bacillaceae in structural modifications of *Tuber borchii* fruit bodies. Canadian Journal of Microbiology, 47, 264–268.
- Deveau A, Antony-Babu S, Le Tacon F, Robin C, Frey-Klett P (2016) Temporal changes of bacterial communities in the *Tuber melanosporum* ectomycorrhizosphere during ascocarp development. Mycorrhiza, 26, 389–399.
- Dib-Bellahouel S, Fortas Z (2014) Activity of the desert truffle *Terfezia boudieri* Chatin, against associated soil microflora. African Journal of Microbiology Research, 8, 3008–3016.
- Dorofeev AG, Grigor'eva NV, Kozlov MN, Kevbrina MV, Aseeva VG, Nikolav YA (2014) Approaches to cultivation of “nonculturable” bacteria: Cyclic cultures. Microbiology, 83, 450–461.
- Fu Y, Li X, Li Q, Wu H, Xiong C, Geng Q, Sun H, Sun Q (2016) Soil microbial communities of three major Chinese truffles in Southwest China. Canadian Journal of Microbiology, 62, 970–979.
- Gryndler M, Soukupová L, Hřelová H, Gryndlerová H, Borovička J, Streiblová E, Jansa J (2013) A quest for indigenous truffle helper prokaryotes. Environment Microbiology Reports, 5, 346–352.
- Gurtler V, Stanisich VA (1996) New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S–23S rDNA spacer region. Microbiology, 142, 3–16.
- Hall TA (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, 41, 95–98.
- Liu PG, Chen J, Deng XJ, Wang XH, Qiao P, Zhang JP, Wan SP, Geng LY, Zhao FL, Zhao WQ, Wang XJ (2016) Truffles from China. Science Press, Beijing. (in Chinese) [刘培贵, 陈娟, 邓晓娟, 王向华, 乔鹏, 张介平, 万山平, 耿丽英, 赵峰岚, 赵文青, 王晓进 (2016) 中国的块菌. 科学出版社, 北京.]
- Mavromatis K, Land M L, Brettin T S, Quest D J, Copeland A, Clum A, Goodwin L, Woyke T, Lapidus A, Klenk HP, Cottingham RW, Kyrpides NC (2012) The fast changing

landscape of sequencing technologies and their impact on microbial genome assemblies and annotation. PLoS ONE, 7, e48837.

Mello A, Miozzi L, Vizzini A, Napoli C, Kowalchuk G, Bonfante P (2010) Bacterial and fungal communities associated with *Tuber magnatum*—productive niches. Plant Biosystems, 144, 323–332.

Navarro-Ródenas A, Berná L M, Lozano-Carrillo C, Andrino A, Morte A (2016) Beneficial native bacteria improve survival and mycorrhization of desert truffle mycorrhizal plants in nursery conditions. Mycorrhiza, 26, 769–779.

Picceri GG, Leonardi P, Iotti M, Gallo M, Baldi F, Zambonelli A, Amicucci A, Vallorani L, Piccoli G, Ciccimarra G, Arshakyan M, Burattini S, Falcieri E, Chiarantini L (2018) Bacteria-produced ferric exopolysaccharide nanoparticles as iron delivery system for truffles (*Tuber borchii*). Applied Microbiology and Biotechnology, 102, 1429–1441.

Qiao P, Tian W, Liu PG, Yu GQ, Chen J, Deng XJ, Wan SP, Wang R, Wang Y, Guo HG (2018) Phylogeography and population genetic analyses reveal the speciation of the *Tuber indicum* complex. Fungal Genetics and Biology, 113, 14–23.

Sbrana C, Bagnoli G, Bedini S, Filippi C, Giovanetti M, Nuti MP (2000) Adhesion to hyphal matrix and antifungal activity of *Pseudomonas* strains isolated from *Tuber borchii* ascocarps. Canadian Journal of Microbiology, 46, 259–268.

Sbrana C, Agnolucci M, Bedini S, Lepera A, Toffanin A, Giovannetti M, Nuti MP (2002) Diversity of culturable bacterial populations associated to *Tuber borchii* ectomycorrhizas and their activity on *T. borchii* mycelial growth. FEMS Microbiology Letters, 211, 195–201.

Siqueira JF Jr, Fouad AF, Rôças IN (2012) Pyrosequencing as

a tool for better understanding of human microbiomes. Journal of Oral Microbiology, 4, 10743.

Streiblová E, Gryndlerová H, Gryndler M (2012) Truffle brûlé: An efficient fungal life strategy. FEMS Microbiology Ecology, 80, 1–8.

Soudzilovskaia NA, Douma JC, Akhmetzhanova AA, Van Bodegom PM, Cornwell WK, Moens EJ, Treseder KK, Tibbett M, Wang YP, Cornelissen JHC (2015) Global patterns of plant root colonization intensity by mycorrhizal fungi explained by climate and soil chemistry. Global Ecology and Biogeography, 24, 371–382.

Splivallo R, Deveau A, Valdez N, Kirchhoff N, Frey-Klett P, Karlovsky P (2015) Bacteria associated with truffle fruiting bodies contribute to truffle aroma. Environmental Microbiology, 17, 2647–2660.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 24, 1596–1599.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The Clustal_X Windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 25, 4876–4882.

Wan SP, Liu PG (2014) Diversity of culturable bacteria associated with ascocarps of a Chinese white truffle. Plant Diversity and Resources, 36, 29–36.

Yan WR, Zhao TC, Xiao TB, Xiao M, Zhao ZX, Chen MC (2013) Applications of biocontrol bacterial in plant disease control. Genomics and Applied Biology, 32, 533–539.

(责任编辑: 杨祝良 责任编辑: 时意专)