

研究报告

高通量测序分析环保肥料增效剂对马铃薯根际土壤真菌多样性变化影响

张国青¹ 赵盼² 董彦旭³ 武东波⁴ 郑维平⁵ 詹虹⁶ 钞亚鹏¹ 仲乃琴^{2*}

(1. 中国科学院微生物研究所 传感技术联合国家重点实验室 北京 100101)

(2. 中国科学院微生物研究所 植物基因组学国家重点实验室 北京 100101)

(3. 宁夏现代农业综合开发工程技术研究中心 宁夏 银川 750001)

(4. 宁夏自治区 农业综合开发办公室 宁夏 银川 750011)

(5. 宁夏海原县农业综合开发办公室 宁夏 海原 755200)

(6. 宁夏农垦贺兰山种业有限公司 宁夏 银川 750001)

摘要: 【目的】高通量测序技术对研究环境样品中微生物群落组成具有很大的应用价值。土壤微生物群落结构和多样性及其变化在一定程度上反映了土壤的质量。旨在从微生物群落结构的角度阐述环保肥料增效剂对马铃薯根际土壤主要真菌类群结构的影响。【方法】通过高通量测序结果对比分析应用增效剂前后马铃薯根际真菌宏基因组 ITS1 区,并依据 RDP 中设置的分类阈值对序列进行物种分类。【结果】测序结果经过质量控制,共获得有效条带 437 375 条,依据 97%的序列相似性做聚类分析,获得全部样品的可分类操作单元(OTUs)共 633 个。子囊菌的总体数量在所有样品中最多(相对丰度在 56.95%–97.23%之间),且处理后呈增加趋势(HY 除外),而担子菌门数量在处理呈下降的趋势。基于真菌 ITS1 高通量测序结果获得的 α 指数显示,样品内部处理和对照之间真菌物种多样性有差别。基于真菌 ITS1 高通量测序获得的 β 指数显示,处理组与对照组的真菌多样性之间没有差别,这表明真菌多样性之间的差异更多地取决于样品采集地点。【结论】土壤特性是影响真菌种群的重要因素之一,环保肥料增效剂显著改善了土壤真菌的种群结构。

关键词: 高通量测序, 新型肥料增效剂, 根际土壤, 真菌多样性

Foundation item: STS Project of Chinese Academy of Sciences (No. KFJ-EW-ST5-067)

***Corresponding authors:** E-mail: nqzhong@im.ac.cn

Received: April 11, 2017; **Accepted:** August 10, 2017; **Published online** (www.cnki.net): August 30, 2017

基金项目: 中国科学院重点部署项目(No. KFJ-EW-ST5-067)

***通讯作者:** E-mail: nqzhong@im.ac.cn

收稿日期: 2017-04-11; **接受日期:** 2017-08-10; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-08-30

Effects of a novel fertilizer synergist on fungi diversity from potato rhizosphere soil

ZHANG Guo-Qing¹ ZHAO Pan² DONG Yan-Xu³ WU Dong-Bo⁴ ZHENG Wei-Ping⁵
ZHAN Hong⁶ CHAO Ya-Peng¹ ZHONG Nai-Qin^{2*}

(1. State Key Laboratory of Transducer Technology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(2. State Key Laboratory of Plant Genomics, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)
(3. Ningxia R&D Center for Modern Agriculture, Yinchuan, Ningxia 750001, China)

(4. Comprehensive Development Office of Agriculture in Ningxia Autonomous Region, Yinchuan, Ningxia 750011, China)

(5. Agriculture Comprehensive Development Office of Haiyuan County, Haiyuan, Ningxia 755200, China)

(6. Ningxia Nongken Helan Mountain Seed Co. Ltd., Yinchuan, Ningxia 750001, China)

Abstract: [Objective] The structure and diversity of soil microbial community and their changes reflect the quality of soil. To study the effects of a fertilizer synergist, we analyzed fungal communities from potato rhizosphere soil. [Methods] We used high throughput sequencing technology to sequence the fungi metagenomic DNA of the fungal internal transcribed spacer 1 (ITS 1) in the roots of potatoes. With the aid of RDP classifier, all rhizosphere soil fungi were identified from the reads of OTUs. [Results] Sequencing data suggested that after the quality control, 437 375 reads were remained. Cluster similarity analysis was performed with threshold of 97% sequence similarity, yielding 633 OTUs from the 12 samples. Phylogenetic analysis showed that Ascomycota were predominant in all samples (relative abundance from 56.95% to 97.23%). Ascomycota in all samples but Haiyuan with Novel Fertilizer Synergist increased. However, Basidiomycota decreased. Alpha diversity analysis showed that the fungal community diversity of the rhizosphere soil in the same site was different after fertilizer synergist application. however, in beta diversity analysis, no significant differences were observed with respect to fungal community composition, which could be attributed to the discrepancy in soil properties from different sampling sites. [Conclusion] Soil characteristics are one of the important factors in explaining the variation of microbial diversity. Fungal communities could be greatly changed by using Novel Fertilizer Synergist.

Keywords: High throughput sequencing, Novel fertilizer synergist, Rhizosphere soil, Fungal community diversity

土壤微生物是一个庞大的类群,很大程度上会影响土壤与植物相互作用的过程,对土壤的形成发育、物质循环和肥力演变都具有重要意义^[1-2]。它们不仅是土壤的重要组成部分,更是土壤养分循环的主要推动者,其群落的变化在一定程度上可以反映土壤质量的变化趋势^[3-4],土壤微生物,特别是根际微生物作为植物和土壤之间关键的联系媒介,对植物的生长发育起到了重要作用^[5]。

高通量测序作为第二代测序技术^[6],能够一次并行对几百万到上千万条的 DNA 序列分别进行测序,对于研究环境样品中微生物群落组成具有很大

的应用价值。目前高通量测序技术的发展实现了大规模直接测序^[7],在水环境及土壤微生物群落研究领域已得到广泛应用^[8-11],揭示了深海、土壤等复杂环境中的微生物多样性,有助于准确分析环境中微生物的组成和分布^[12],测序的结果能够更加深入地了解微生物群落组分在科、属和 OTU 水平上的变化^[13-14]。

目前,长期施肥对土壤理化和生物学性质的影响已有大量报道^[15]。土壤群落生态研究发现,长期施用化肥使土壤板结,抑制根系生长、降低水肥利用效率。本课题组研发的新型环保肥料增效剂是能

够显著提高肥料利用率,促进作物增产^[16-17]。本文通过分析对照和处理土壤样品中微生物结构的变化,了解增效剂对马铃薯根际土壤主要微生物类群结构的影响,揭示增效剂的作用机理,为保持农业生产的长期可持续发展积累资料。

1 材料与方法

1.1 土壤特性及样品采集

试验分别位于宁夏境内西吉(东经 105.70°, 北纬 35.97°)、固原(东经 106.28°, 北纬 36.01°)、海原(东经 105.64°, 北纬 36.56°)、隆德(东经 106.11°, 北纬 35.63°)、彭阳(东经 106.65°, 北纬 35.85°)等 5 个县的 6 块马铃薯试验田,土壤类型均为黑垆土。各试验点土壤基本性质如表 1 所示。

各试验田土壤样品分为对照与处理两组,对照组为底肥中无增效剂,处理组为底肥中添加 10%增效剂。在 2015 年 4 月,底肥随马铃薯播种施入大田。样品于 2015 年 9 月进行随机采集,每两个采集地点间距离大于 10 m。样品采挖后装入干净塑料袋,编号标记,放入保温箱中带回实验室备用。肥料增效剂由中国科学院微生物研究所提供。

1.2 土壤样品总 DNA 提取与测序

土壤样品总 DNA 提取方法见文献^[18];对 DNA 样品进行检测,合格后用于构建文库。以各样品总 DNA 为模板,进行融合引物 PCR。PCR 扩增引物为扩增真菌 ITS1 区的特异性引物。采用 Illumina MiSeq 2×300 测序平台对 PCR 扩增产物进行双端测

序分析。测序委托华大基因公司完成。

1.3 数据统计

对原始数据进行处理过滤。具体步骤包括 4 个部分,首先采取按窗口去低质量的方法,具体操作如下:设置 25 bp 为窗口长度,如果窗口平均质量值低于 20,从窗口开始截除 Read 末端序列,移除最终 Read 长度低于原始 Read 长度 75%的 Reads;其次去除接头污染 Reads (默认 Adapter 序列与 Read 序列有 15 bp 的 Overlap,设置为 15 bp,允许错配数为 3);接着去除含 N 的 Reads;最后去除低复杂度 Reads (默认 Reads 中某个碱基连续出现的长度≥10,设置 10 bp)。

1.4 OTU 聚类及 RDP 分类

序列拼接使用软件 FLASH^[2] (Fast length adjustment of short reads, v1.2.11),根据质量控制所得的优质序列,将多条序列按其序列间的距离根据 UPARSE 软件在 97%相似度下进行聚类,得到 OTU (Operational taxonomic unit)的代表序列;通过 RDP classifier (v2.2)软件,将 OTU 代表序列与数据库比对,并进行物种注释,置信度阈值设置为 0.8。

1.5 群落组成分析

对各样品中的菌群进行分类。OTU 丰度代表对应样品的物种丰富程度^[19-21],并构建稀释曲线^[22]。在形成的 OTU 聚类结果基础上,对样品进行 Alpha 多样性分析,采用软件计算样本的丰富度指数、辛普森指数(Simpson)、香农指数(Shannon)、Chao1 指数、ACE 指数来衡量样本的物种多样性。其中群落

表 1 各试验点土壤基本性质

Table 1 Properties of basic soils in different experimental sites

土壤基本性质 Properties of basic soils	固原 GY	海原 HY	隆德 LD	彭阳 PY	西吉新营原种地 XJXY	西吉新营原种地 XJXY
pH	6.88	5.92	6.45	6.01	5.37	5.84
Organic matter (g/kg)	49.36	29.30	32.31	37.30	28.07	27.85
Total nitrogen (g/kg)	1.52	1.14	1.24	1.48	1.57	1.12
Alkali hydrolyzable nitrogen (mg/kg)	137.60	107.40	117.60	125.70	143.10	101.80
Available phosphorus (mg/kg)	121.46	80.93	57.25	90.72	113.27	79.77
Available potassium (mg/kg)	85.79	50.20	67.43	97.42	139.54	153.20

丰富度用 Chao1 指数描述, 数值越高表明群落物种的丰富度越高。香农指数可以反映样品的多样性程度, 数值越高表明群落物种(程度)种类越丰富。根据分类学分析结果, 绘制样品菌群分布条形图, 比较样品间的菌群组成差异。

2 结果与分析

2.1 样品采集

共在 6 组平行处理小区采集 36 份土壤样品, 分别对同一地点的 3 个不同样品进行混合, 得到 12 个样品, 其中 6 个为增效剂处理后的样品, 另外 6 个为相应的对照。分别标记为固原(对照: GYD, 处理: GYC), 西吉新营原种地(对照: XJXYD, 处理: XJXYC), 西吉新营原原种地(对照: XJXYD, 处理: XJXYC), 海原(对照: HYD, 处理: HYC); 隆德(对照: LDD, 处理: LDC)以及彭阳(对照: PYD, 处理: PYC)。

2.2 序列质量控制

12 个样品共获得原始 Reads 683 188 条, 质量控制后共获得优质序列 437 375 条 Tags, 全部序列长度均大于 220 bp ($X=233$ bp)。

2.3 OTU 聚类及 RDP 分类

质控后的序列, 依据 97% 的序列相似性获得的可

分类操作单元(OTUs) 633 个。各样品获得的 OTUs 数目见表 2。RDP 分类全部 OTUs 可划分为 5 个门, 9 纲, 17 目, 18 科, 32 属(Others<0.5%除外)。稀释曲线(Rarefaction curve)反映了样品的取样深度, 可以用来评价测序量是否足以覆盖所有类群。真菌丰富度稀释曲线(图 1)显示, 随着测序量的不断增大, 各样品 OTUs 数目的增加趋于平缓, 达到饱和, 在 97% 相似水平上计算样品测序的覆盖度, 结果表明, 所有样本文库的覆盖率在 99.89%–99.93% 之间, 说明取样合理, 真实环境中真菌群落结构的置信度高, 能够真实地反映土壤样本的真菌群落。

2.4 OTU 组成分析

OTU 组成分析发现增效剂处理后真菌菌群的种类发生了明显甚至显著的变化。在海原采集的样品中, 对照和处理共有的种群为 98 个, 对照独有的为 25 个, 处理土壤中独有的为 116 个; 在彭阳样品中, 对照和处理共有的种群为 127 个, 对照独有的为 124 个, 处理样中独有的为 50 个。在隆德的样品中, 对照和处理共有的种群为 178 个, 对照独有的为 58 个, 处理土壤中独有的为 61 个; 在西吉原种的样品中, 对照和处理共有的种群为 135 个, 对照独有的为 46 个, 处理土壤中独有的为 106 个; 在西吉原原种的样品中, 对照和处理共有的种群为

表 2 各样品的 α 多样性
Table 2 Alpha diversity index of all samples

样品名称 Sample name	Tag 数量 Tag number	OTU 数量 OTUs	Chao1 指数 Chao1 index	ACE	Shannon 指数 Shannon index	Simpson 指数 Simpson index	覆盖率 Good's coverage (%)
GYC	36 185	204	225.136 4	230.439 9	3.338 551	0.084 343	99.91
GYD	36 118	154	189.062 5	182.992 6	2.346 979	0.179 431	99.91
HYC	34 972	214	226.545 5	226.723 6	3.497 862	0.050 047	99.93
HYD	32 579	123	143.312 5	145.090 9	1.063 408	0.650 133	99.92
LDC	35 037	239	253.040 0	254.785 2	3.895 613	0.032 111	99.92
LDD	34 990	236	248.500 0	251.259 0	3.849 484	0.034 460	99.92
PYC	37 148	177	204.333 3	212.371 8	2.400 018	0.171 572	99.89
PYD	32 227	251	262.000 0	261.465 9	3.713 866	0.048 454	99.93
XJXYC	34 342	241	263.037 0	263.093 6	3.605 165	0.052 157	99.90
XJXYD	23 257	181	196.789 5	197.284 8	3.584 455	0.044 325	99.89
XJXYC	34 724	182	193.040 0	197.433 3	3.043 725	0.087 936	99.93
XJXYD	26 690	192	208.235 3	204.533 0	3.558 935	0.050 889	99.91

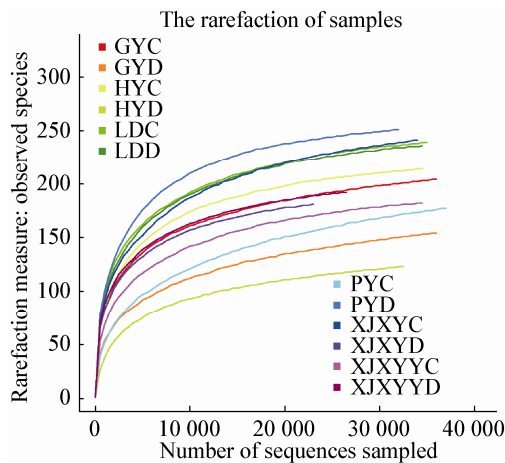


图 1 相似度为 0.97 条件下各土壤样品的稀释曲线
Figure 1 Rarefaction curves of soil samples at cut off level of 3%

89 个, 对照独有的为 103 个, 处理土壤中独有的为 93 个; 在固原的样品中, 对照和处理共有的种群为 122 个, 对照独有的为 32 个, 处理土壤中独有的为 82 个。

主成分分析(Principal component analysis, PCA)是一种分析和简化数据集的技术, 常用于减少数据集的维数, 同时保持数据集中的对方差贡献最大的特征。这是通过保留低阶主成分, 忽略高阶主成分做到的。这样低阶成分往往能够保留住数据的最重要方面。通过分析不同样品 OTU (97%相似性)组成可以反映样品的差异和距离。

根据 OTU 在每个样品的丰度文件计算出样品的相对丰度, 利用这个丰度信息进行 OTU 的 PCA 分析。通过 R (v3.1.1)语言中 ade4 包进行统计与作图。从图 2 可以看出, 应用增效剂同一地点的处理与对照样品间 OTU 丰度组成发生了变化。

2.5 不同分类地位的分布

在门、科及属 3 个层次上对 12 个样品进行群落组成分析。除去未鉴定出的真菌外, Chytridiomycota 门只出现在西吉新营原种样品中。Ascomycota、Basidiomycota、Glomeromycota、Zygomycota 四个门类群在所有样品中都有分布。各样本在门水平上的真菌类群分布及相对丰度见

图 3。子囊菌的总体数量在所有样品中最多(相对丰度在 56.95%–97.23%之间), 且经增效剂处理后呈增加趋势(海原除外, 图 4A), 担子菌门处理后呈下降的趋势(海原除外, 图 4B)。Glomeromycota 门的数量最少, 不超过样品的 0.49%。

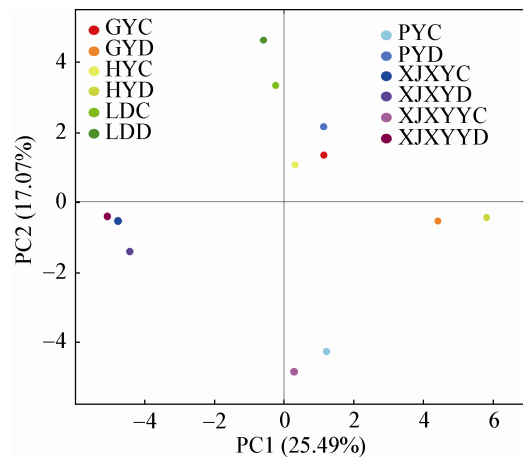


图 2 基于 OTU 丰度的 PCA 分析(按 Description 分组)
Figure 2 PCA analysis based on OTU abundance (grouped by description)

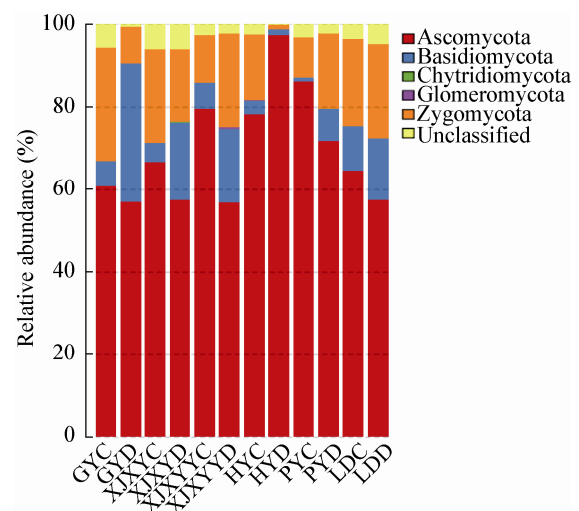


图 3 真菌门级分类单元在各样品中分布
Figure 3 Distribution of fungi in each soil sample at phylum level

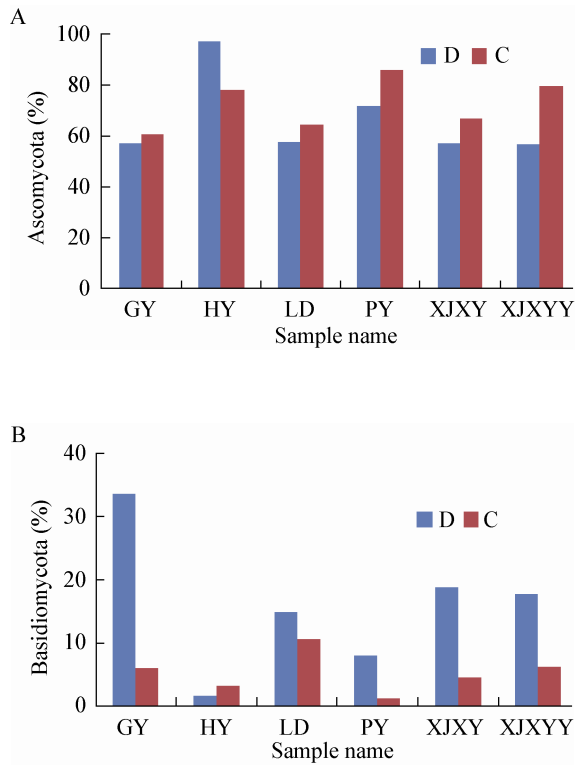


图 4 土壤子囊菌门(A)和担子菌门(B)微生物相对丰度
Figure 4 The relative abundances of different phyla in Ascomycota (A) and Basidiomycota (B)
 注: D: 对照; C: 增效剂处理.
 Note: D: Control; C: Treat.

在科水平上, 不同地点的样品处理与对照比, 高产纤维素降解酶的毛球壳科(Lasiosphaeriaceae)的相对数量均不同程度增加(彭阳除外); 散孢盘菌(Thelebolaceae)也呈现大幅度增加的趋势(西吉新营原除外)。然而在固原处理样品中, 丛赤壳科(Nectricaceae)菌数显著增加; 能产生脂肪酸等有机化合物的被毛霉科(Mortierellaceae)也明显增加; 火丝菌科(Pyronemataceae)的数量更是大幅度增加。但其他地点的样品中, 处理与对照之间的变化与固原样并不一致。

使用增效剂后根际微生物真菌群落在属的水平上也同样存在着变化, 不仅在数量上, 也体现在多样性上(图 5)。6 个样品中频繁出现的主要有 32 个属(除去未分类的和 Others<0.5%), 其中, 处理土样中 *Mortierella* 及 *Alternariade* 属的相对含量均大于 9% (西吉新营原除外), 是优势的真菌群落。处理与对照相比, *Tetracladium* (Fungi, Ascomycota, Leotiomyces, Helotiales, Incertae_sedis 螺旋藻; *Tetracladium*, 彭阳除外)和 *Thelebolus* (Fungi, Ascomycota, Leotiomyces, Thelebolales, Thelebolaceae, *Thelebolus*, 西吉新营原除外)的菌群数量均增加了。

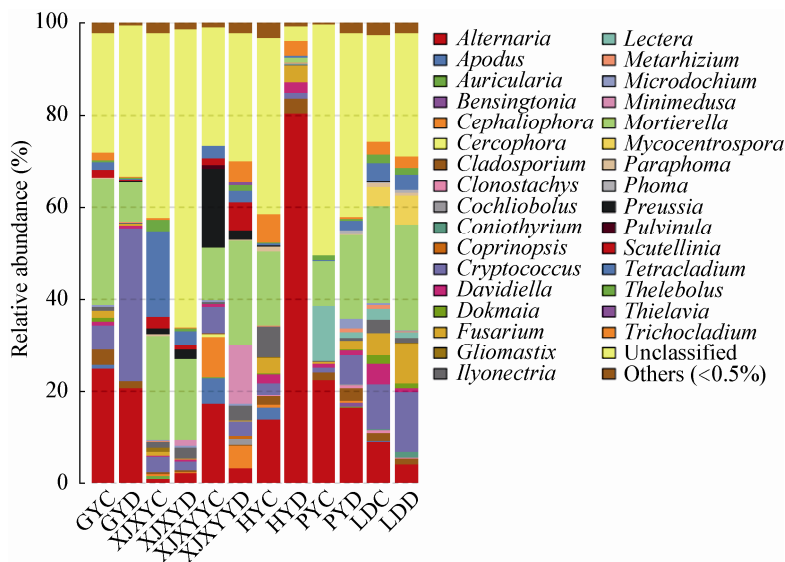


图 5 真菌属级分类单元在各样品中分布
Figure 5 Distribution of fungi in each soil sample at genus level

2.6 多样性分析

表 2 数据显示, 6 组样品的聚类数目特点不同。固原、海原、西吉新营原种样品中, 处理土样中真菌菌群数量明显增多, 都大于 30%; 而隆德和西吉新营原种土样处理前后种类数目变化不明显; 只有彭阳处理样中真菌类型的数目降低了 30% 左右。基于真菌 ITS1 高通量测序结果获得的 α 指数显示, 样品内部处理和对照之间真菌物种多样性有差别, 无明显规律可循。而基于真菌 ITS1 高通量测序获得的 β 指数显示, 处理组与对照组的真菌多样性之间没有差别, 真菌多样性之间的差异更多地取决于样品采集地点。

通过 Chaol 指数和 ACE 指数来评估微生物物种的丰富度, 两种指数结果一致表明, 真菌物种丰富度在对照和处理之间发生了变化。有的变化大, 有的变化不太明显。通过香农指数(Shannon index)对微生物的多样性进行评估, 除彭阳和西吉新营原种样品之外, 处理与对照相比真菌物种多样性均有不同程度地增加。固原、海原和隆德三地环保肥料增效剂处理的土壤样品辛普森指数较对照显著降低, 说明处理后菌群均匀度降低, 可能出现了优势菌群。

3 讨论

目前, 利用高通量测序技术研究植物和环境中的真菌的群落结构及多样性趋势, 呈现逐渐上升的势头^[6]。MiSeq 测序数据能够覆盖土壤大多数真菌的 ITS1 序列, 该技术适用于环境真菌群落结构的研究^[11]。本研究采用基于真核生物高变区的高通量测序技术, 初步探讨了肥料增效剂处理后马铃薯根际真菌群落组成及多样性变化。研究结果为揭示环保肥料增效剂调节马铃薯根际微生物的机理提供了理论依据。通过对高变区 ITS1 的测序, 分析了宁夏五个县 6 个采样地点 12 个样品增效剂处理后马铃薯根际真菌群落结构的变化。测序共获得 437 375 条高质量的序列。依据 97% 的序列相似性作聚类分析, 获得全部样品的可分类操作单元(OTUs)共 633 个。通过 RDP 数据库进行比对, 进一步划分为 5 个门

类群。所有样品中子囊菌的总体数量最多(相对丰度在 56.95%–97.23%之间), 除海原县样品外处理后呈增加趋势, 担子菌门处理后呈下降的趋势。海原处理后真菌菌群变化与其他地区不一致的原因有待于进一步探究。

基于真菌 ITS1 高通量测序结果获得的 α 指数显示, 样品内部处理和对照之间真菌物种多样性有差别, 无规律可循。而基于真菌 ITS1 高通量测序获得的 β 指数显示, 处理组与对照组的真菌多样性之间没有差别, 推测真菌多样性之间的差异更多地取决于样品采集地点。由于土壤取自 5 个县, 每个地点土壤成分差别比较大, 因此造成微生物群落差异显著。分析发现, 增效剂可以有效地调整微生物群落结构。

丰度值较大的优势种真菌可能在与宿主植物相互作用中扮演着重要的角色。据报道子囊菌门中丛赤壳科(Nectricaceae)菌多属菌生真菌, 可以寄生病原真菌。处理后该类菌群数量显著增加, 可能具有抑制病原真菌的功能^[23]。担子菌中包含有黑粉菌、柄锈菌等植物病害菌^[24], 处理后该类菌群数量呈下降的趋势(海原除外), 可能会对植物生长有益。

不同土壤因其酸碱度、水分含量、有机质含量及成土母质的不同, 其微生物种类和数量也各不相同^[3]。土壤特性是影响真菌种群的重要因素之一。实验结果表明增效剂显著改变了土壤真菌的种群结构, 表现出明显的趋势。但是有些微生物类群在不同的土样中, 变化并不一致。土壤微生物是个复杂的类群, 是微生物种群协同作用的结果, 很难从单一或某几个种群的变化来解释增效剂的作用, 还需要对同一地点土壤微生物群落的变化进行连续地考察, 来分析肥料增效剂在土壤改良方面的效果, 进一步揭示其可能的作用机理。

致谢: 感谢中国科学院微生物研究所戴欣博士对实验数据分析方面给予的悉心指导。

参考文献

- [1] Larkin RP. Characterization of soil microbial communities under different potato cropping systems by microbial population

- dynamics, substrate utilization, and fatty acid profiles[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35(11): 1451-1466
- [2] Ma L, Ma K, Yang GL, et al. Effects of continuous potato cropping on the diversity of soil microorganisms[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2015, 23(5): 589-596 (in Chinese)
马玲, 马琨, 杨桂丽, 等. 马铃薯连作栽培对土壤微生物多样性的影响[J]. *中国生态农业学报*, 2015, 23(5): 589-596
- [3] Xu GH, Li ZG. *Microbial Ecology*[M]. Nanjing: Southeast University Press, 1991: 127-128 (in Chinese)
许光辉, 李振高. *微生物生态学*[M]. 南京: 东南大学出版社, 1991: 127-128
- [4] Li Z, Yuan Y, Ma L, et al. Effects of different rotations on the amount and distribution of soil microorganisms in mudanjiang tobacco-cropping area[J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2010, 38(7): 96-99 (in Chinese)
李喆, 元野, 马力, 等. 不同轮作方式对牡丹江地区烟田土壤微生物数量及分布的影响[J]. *东北林业大学学报*, 2010, 38(7): 96-99
- [5] Lynch JM. *The Rhizosphere*[M]. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 1990: 458
- [6] Schuster SC. Next-generation sequencing transforms today's biology[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(1): 16-18
- [7] Gomez-Alvarez V, Teal TK, Schmidt TM. Systematic artifacts in metagenomes from complex microbial communities[J]. *The ISME Journal*, 2009, 3(11): 1314-1317
- [8] Qin N, Li DF, Yang RJ. Next-generation sequencing technologies and the application in microbiology-a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(4): 445-457 (in Chinese)
秦楠, 栗东芳, 杨瑞截. 高通量测序技术及其在微生物学研究中的应用[J]. *微生物学报*, 2011, 51(4): 445-457
- [9] Liu L, Li YH, Li SL. Comparison of next-generation sequencing systems[J]. *BioMed Research International*, 2012, 2012: 251364
- [10] Miao CP. *Microbial community characteristics in rhizosphere soil of *Panax notoginseng**[D]. Kunming: Doctoral Dissertation of Yunnan University, 2015 (in Chinese)
苗翠苹. 三七根际土壤微生物的群落特征[D]. 昆明: 云南大学博士学位论文, 2015
- [11] Schmidt PA, Bálint M, Greshake B, et al. Illumina metabarcoding of a soil fungal community[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 65: 128-132
- [12] Uroz S, Buée M, Murat C, et al. Pyrosequencing reveals a contrasted bacterial diversity between oak rhizosphere and surrounding soil[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2010, 2(2): 281-288
- [13] Li XZ, Rui JP, Mao YJ, et al. Dynamics of the bacterial community structure in the rhizosphere of a maize cultivar[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 68: 392-401
- [14] Wang QT, Zhu WR, Liu ML, et al. Comparison on bacterial community of rhizosphere and bulk soil of poplar plantation based on pyrosequencing[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2015, 21(5): 967-973 (in Chinese)
汪其同, 朱婉芮, 刘梦玲, 等. 基于高通量测序的杨树人工林根际和非根际细菌群落结构比较[J]. *应用与环境生物学报*, 2015, 21(5): 967-973
- [15] Chen DM, Duan YQ, Yang YH, et al. Effects of long-term fertilization on flue-cured tobacco soil nutrients and microorganisms community structure[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(17): 3424-3433 (in Chinese)
陈丹梅, 段玉琪, 杨宇虹, 等. 长期施肥对植烟土壤养分及微生物群落结构的影响[J]. *中国农业科学*, 2014, 47(17): 3424-3433
- [16] Dong YX, Cai DQ, Huang XY, et al. Novel fertilizer synergist on saving fertilizer and improving fertilizer efficiency[J]. *Chinese Potato Journal*, 2016, 30(3): 164-168 (in Chinese)
董彦旭, 蔡冬青, 黄新异, 等. 新型肥料增效剂对马铃薯肥料减施增效作用研究[J]. *中国马铃薯*, 2016, 30(3): 164-168
- [17] Zhou LL, Zhao P, Chi Y, et al. Controlling the hydrolysis and loss of nitrogen fertilizer (urea) by using a nanocomposite favors plant growth[J]. *ChemSusChem*, 2017, 10(9): 2068-2079
- [18] Clegg CD, Ritz K, Griffiths BS. Direct extraction of microbial community DNA from humified upland soils[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1997, 25(1): 30-33
- [19] Bates ST, Clemente JC, Flores GE, et al. Global biogeography of highly diverse protistan communities in soil[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(3): 652-659
- [20] Bartram AK, Lynch MDJ, Stearns JC, et al. Generation of multimillion-sequence 16S rRNA gene libraries from complex microbial communities by assembling paired-end illumina reads[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(11): 3846-3852
- [21] Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(8): 1621-1624
- [22] Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23): 7537-7541
- [23] Zhuang WY. Taxonomy and related studies on the nectrioid fungi from China[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2010, 22(11): 1083-1085 (in Chinese)
庄文颖. 我国丛赤壳类真菌分类研究[J]. *生命科学*, 2010, 22(11): 1083-1085
- [24] Li X, Hu YH, Pei JJ, et al. Advance and prospect in biotechnology of basidiomycets[J]. *Edible Fungi of China*, 2003, 22(4): 6-8,42 (in Chinese)
李迅, 胡沂淮, 裴建军, 等. 分子生物学技术在担子菌中的研究进展[J]. *中国食用菌*, 2003, 22(4): 6-8,42