

研究报告

羊肚菌白霉病发生对土壤真菌群落结构的影响

陈诚¹ 李强² 黄文丽² 王剑¹ 伏荣桃¹ 罗曦¹ 卢代华^{1*}

(1. 四川省农业科学院植物保护研究所 四川 成都 610066)

(2. 四川省农业科学院生物技术核技术研究所 四川 成都 610066)

摘要:【目的】了解羊肚菌白霉病发生对土壤真菌群落结构的影响。【方法】采用 Illumina MiSeq 高通量测序技术,对未栽培羊肚菌土壤、正常生长羊肚菌和染白霉病羊肚菌根际土壤真菌群落结构进行研究。【结果】9个样品共得到 393 347 条有效序列。未栽培羊肚菌土壤真菌多样性指数和丰度显著大于羊肚菌根际土,染病羊肚菌根际真菌丰度和多样性大于正常生长的羊肚菌,各样品的群落组成和优势类群有较大差异。【结论】羊肚菌栽培后真菌多样性降低,白霉病发生后根际真菌种类增多,土壤真菌群落结构发生变化,优势真菌类群也产生了较大变化。

关键词: 羊肚菌, 白霉病, MiSeq 高通量测序, 真菌群落结构

Effects of *Morchella* white mold disease on soil fungal community structure

CHEN Cheng¹ LI Qiang² HUANG Wen-Li² WANG Jian¹ FU Rong-Tao¹
LUO Xi¹ LU Dai-Hua^{1*}

(1. Institute of Plant Protection, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu, Sichuan 610066, China)

(2. Biotechnology and Nuclear Technology Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu, Sichuan 610066, China)

Abstract: [Objective] To understand the effect of the *Morchella* white mold on soil fungal community structure. [Methods] Illumina MiSeq high throughput sequencing technology was used to analyze the fungal community structure of control soil, rhizosphere soil of diseased and healthy *Morchella*. [Results] The results showed that a total of 393 347 valid sequences were obtained from 9 samples collected. The fungal abundance and diversity of control soil were the highest among all the samples, followed by that of diseased *Morchella*, which were significantly higher than that of healthy *Morchella*. The community composition and dominant taxa of different samples varied

Foundation item: The Project of Thirteenth Five Year Plan of Sichuan Province (No. 2016NYZ0053-1); The Foundation Program of the Financial & Innovational Capacity Building Project of Sichuan Province (No. 2016GYSH-014); Key Technologies R&D program of Sichuan Province (No. 2016KZ0006)

*Corresponding author: Tel: 86-28-84590065; E-mail: daihualu@126.com

Received: January 11, 2017; Accepted: April 24, 2017; Published online (www.cnki.net): May 09, 2017

基金项目: 四川省“十三五”农作物及畜禽育种攻关项目(No. 2016NYZ0053-1); 四川省财政创新能力提升工程项目(No. 2016GYSH-014); 四川省科技支撑计划项目(No. 2016KZ0006)

*通讯作者: Tel: 86-28-84590065; E-mail: daihualu@126.com

收稿日期: 2017-01-11; 接受日期: 2017-04-24; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-05-09

significantly. **[Conclusion]** The diversity of soil fungi decreased in the field of cultivated *Morchella*. While, the occurrence of white mold disease lead the abundance of rhizosphere fungi increased, the community structure changed, and the dominant fungi groups varied.

Keywords: *Morchella*, White mold, MiSeq high-throughput sequencing, Fungal community

羊肚菌(*Morel*)属子囊菌亚门 Ascomycota 盘菌纲 Discomycetes 盘菌目 Pezizales 羊肚菌科 Morchellaceae 羊肚菌属 *Morchella*, 是一类名贵的食药两用真菌^[1]。羊肚菌含有丰富的人体必需氨基酸、多糖和萜类化合物, 具有增强免疫、抗氧化、抗肿瘤、保肝保肾等活性作用^[2-6]。随着栽培规模的扩大, 病虫害成为限制羊肚菌产业发展的重要因素之一。白霉病因其在田间发生的症状而得名, 是在羊肚菌子实体菌柄或菌盖部位表现白色绒毛的症状, 由长毛拟青霉 (*Paecilomyces penicillatus*) 引发^[7], 是羊肚菌栽培最常见的病害, 严重影响了羊肚菌的产量和品质。因此, 研究白霉病发生后土壤的微生物群落结构, 可以为该病害的发生机制和生物防治研究提供一定的基础数据。

羊肚菌不适宜连作, 连作会造成产量降低, 白霉病发病更严重。然而农作物连作障碍和病害高发又与土壤的微生物群落结构有密切的联系^[8]。土壤中的微生物包括有益微生物和有害微生物, 作物连作导致病害高发的原因主要是有益微生物减少和病原菌的积累^[9]。根际是植物生态系统和土壤生态系统交叉形成的特殊区域, 根际微生物可通过竞争、拮抗和诱导系统抗性机制抑制病原菌, 也可通过病原菌的积累导致植物死亡^[10]。如张丽娟等^[11]对大蒜根际土壤微生物群落多样性进行研究, 表明根际土壤微生物与大蒜根腐病存在一定的相关性。

随着羊肚菌栽培规模的不断扩大, 白霉病对羊肚菌产量和品质的影响日益突出, 其发病率由 2013 年的 10% 增加到 2015 年的 60%–80%, 该病害发生在子实体整个生长期乃至储藏期, 但其发生的机制仍不明确, 且尚无对白霉病有效的防治办法^[7]。本研究运用高通量测序技术研究未栽培羊肚

菌土壤和羊肚菌栽培地白霉病发病子实体和未表现白霉病子实体的根际土壤的真菌群落结构, 探讨白霉病发生对栽培地真菌群落结构的影响, 为羊肚菌白霉病的防控提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 样品采集

土壤样品采集于四川省成都市温江区羊马镇羊肚菌栽培基地, 选用随机取样的办法, 采集白霉病发病子实体和正常生长子实体各 12 株, 按 Cui 等^[12]的方法采集子实体根际土, 正常生长的子实体根际土样编号记为 Soil-1, 染病子实体根际土样编号记为 Soil-2, 每个处理采集 3 个样品。以相同环境下未栽培羊肚菌的土壤为对照, 对照土样编号记为 CK-1。将土样装入无菌 EP 管, 用冰盒保存, 立即带回微生物实验室。

1.2 主要试剂和仪器

DNA 提取试剂盒 (E.Z.N.A.[®] Soil DNA Kit), 杭州西顿生物科技有限公司; 胶回收试剂盒 (DP209-02), 北京天根生化科技有限公司; 引物合成, 上海派森诺生物科技有限公司; Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase (MO491L), 北京 NEB 有限公司。2700 型 PCR 扩增仪, 美国 ABI 公司; DYY-6C 电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; MiSeq PE300 测序平台, 美国 Illumina 公司。

1.3 DNA 提取、PCR 扩增及高通量测序

基因组 DNA 按试剂盒操作说明进行。实验采用 18S V4 区作为目标 DNA 序列, 扩增引物为 0817F (5'-TTAGCATGGAATAATRRATAGGA-3') 和 1196R (5'-TCTGGACCTGGTGAGTTTCC-3')^[13]。PCR 反应体系 (25 μ L) 为: 5 \times Reaction buffer 5 μ L, 5 \times GC buffer 5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μ L, 正反向引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, DNA 模板 (20 ng/ μ L) 2 μ L,

ddH₂O 8.75 μL, Q5 DNA 聚合酶(2 U/μL) 0.25 μL。PCR 反应条件为: 95 °C 2 min; 95 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 45 s, 32 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增完成后用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 电压 100 V, 电泳时间为 20 min。PCR 产物检测合格后, 将样品送至上海派森诺生物科技有限公司在 Illumina MiSeq 平台进行高通量测序。

1.4 数据分析

采用滑动窗口法对原始数据的双端序列逐一做质量筛查, 利用 FLASH 软件^[14]对通过质量初筛的双端序列根据重叠碱基进行配对连接。运用 QIIME 软件^[15]识别疑问序列, 通过 Mothur 软件^[16]调用 UCHIME 检查并剔除嵌合体序列^[17]。使用 QIIME 软件, 调用 UCLUST 这一序列比对工具^[18], 对获得的高质量序列按 97% 的序列相似度进行归并和 OTU 划分, 采用 Silva 数据库对序列进行比对^[19]。获得 OTU 丰度矩阵之后绘制稀疏曲线^[20]。采用 Mothur 软件分析真菌样品的 Alpha 多样性, 包括 Chao1 指数^[21]、ACE 指数^[22]、Simpson 指数^[23]和 Shannon 指数^[24]。使用 R 软件, 对丰度前 50 位的属进行聚类分析并绘制热图。PCA 分析采用 Ramette 的方法^[25]。柱状图制作采用 Exclle (2007), 试验数据采用 SPSS (19.0)^[26]进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 测序结果及真菌多样性分析

通过 Illumina MiSeq 高通量测序, 9 份样品总共得到 393 347 条有效序列, 经过过滤和去除嵌合体之后得到 384 732 条优质序列。优质序列的长度在 153–447 bp, 多集中在 320–340 bp。样品的稀释曲线(图 1)显示, 随着测序数据量的增大, 样品的稀释曲线趋于平坦, 说明测序结果基本覆盖了样品中绝大多数真菌的生物学信息, 可用于后续分析。

样品的 Alpha 多样性指数结果(表 1)表明, 未栽培羊肚菌的真菌丰富度明显高于羊肚菌栽培地土壤真菌, 发生白霉病的羊肚菌根际土壤中的真菌 OTU 数比未表现出白霉病症的羊肚菌的根际

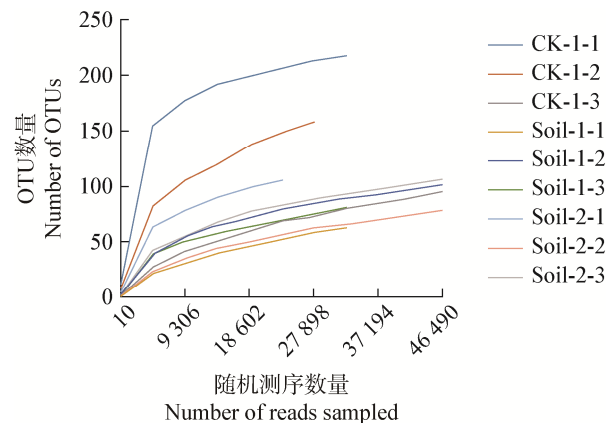


图 1 各样品测序稀释曲线

Figure 1 Rarefaction curve of the sequenced samples

注: 图表示 OTU 数随着样本测序深度而变化。CK-1 为对照土样; Soil-1 为正常生长的子实体根际土; Soil-2 为白霉病染病子实体根际土。各 3 个重复, 下同。

Note: The figure shows that the number of OTUs varies with the number of sequence reads. CK-1: Control soil; Soil-1: Rhizosphere soil of healthy *Morchella*; Soil-2: Rhizosphere soil of diseased *Morchella*. Three replicates of each sample, the same below.

土壤中多。未栽培羊肚菌土壤的 Chao1 指数和 ACE 指数显著高于羊肚菌根际土, 其中有白霉病症的羊肚菌 Chao1 指数和 ACE 指数均大于正常生长的羊肚菌根际土。综合考虑了真菌群落的丰富度和均匀度, 未栽培羊肚菌土壤的 Simpson 指数和 Shannon 指数显著大于羊肚菌生长的土壤, 正常生长的羊肚菌根际土的 Simpson 指数和 Shannon 指数小于染病的羊肚菌根际土, 说明羊肚菌栽培地区土壤真菌多样性降低, 相比于正常生长羊肚菌, 染病羊肚菌子实体根际土的真菌多样性更高。

表 1 样品 Alpha 多样性指数			
Table 1 Alpha-diversity values of samples			
Items	CK-1	Soil-1	Soil-2
OTUs	160.33±36.20a	86.00±13.23b	98.67±13.65b
Chao1	112.00±43.15a	47.67±8.82b	57.00±13.65b
ACE	161.91±27.01a	67.90±12.05b	71.00±11.39b
Simpson	0.797±0.031a	0.094±0.045b	0.189±0.134b
Shannon	3.860±0.362a	0.437±0.179b	0.752±0.462b

注: 同一行中不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: Different letters in the same row indicate significant difference ($P < 0.05$).

2.2 土壤群落分析

根据分类结果, 所测样品由 5 个门的真菌组成, 包括子囊菌门、担子菌门、接合菌门、壶菌门和 Rozellomycota (图 2)。各样品子囊菌门的种类所占的比例都较大, 接合菌门和壶菌门的真菌在未栽培羊肚菌的土壤中所占比例都显著高于羊肚菌根际土, 说明羊肚菌栽培后该类群的真菌受到了抑制。Rozellomycota 的真菌在羊肚菌子实体根际土的比例比对照土壤的比例大, 这可能是羊肚菌的栽培有利于该类群真菌的生长。此外, 担子菌门的真菌在羊肚菌染病子实体根际土的比例最大, 其次是对照土壤, 在正常生长子实体根际土的比例最小, 显示羊肚菌的栽培可能抑制了此类真菌, 而白霉病发生后, 该类群的真菌比例又一定程度地增长。

通过 UNITE 数据库比对, 统计各样本在各个分类等级水平的群落组成。选择 Soil-1 和 Soil-2 含量大于 0.1% 且 CK 土壤中含量大于 1% 的真菌分类单元为代表类群, 其余部分合并为 Others (其他), 获得各样品的群落组成(图 3)。由图 3 可以看出, 对照土样的优势类群主要包括 *Trichoderma*、*Rhynchosporium*、*Staphylotrichum*、*Cyphellophora*、*Myriangiales* 和 *Microascaceae*。Soil-1 样品中占比最高的类群为 *Morchella*, 所占比例达到 96.207%,

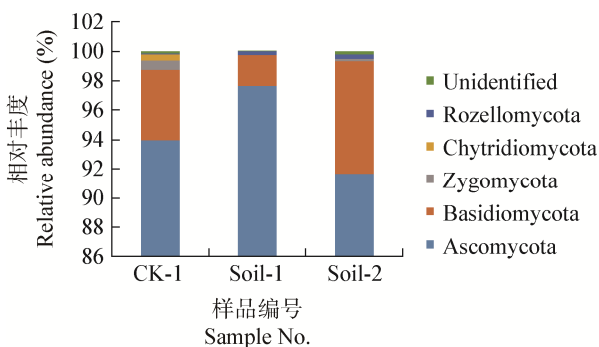


图 2 门水平上各样品的真菌群落组成
Figure 2 The composition of the samples at the level of the phylum

注: 不同颜色代表不同真菌门, 纵坐标代表各真菌门所占百分比, 在门水平未被注释的真菌种用 Unidentified 表示。
Note: Different colors represent different phylum of fungus, the ordinate represents the percentage of each phylum. Sequences could not be classified into any groups were assigned as unidentified.

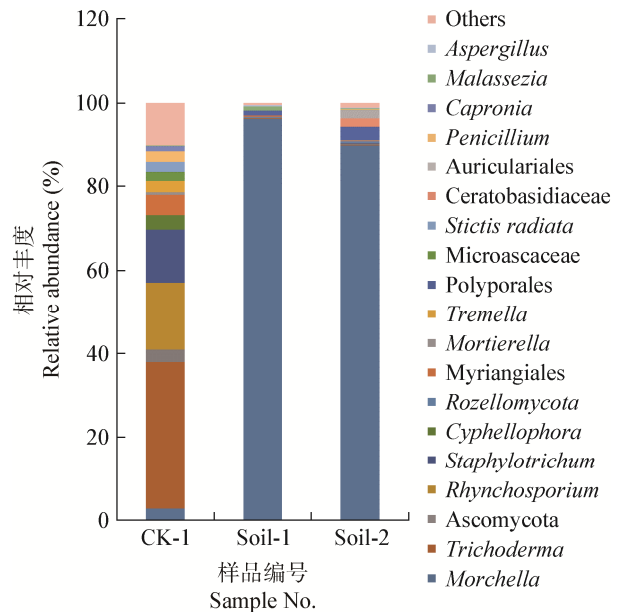


图 3 各样品的真菌群落组成
Figure 3 The composition of the samples
注: 不同颜色代表不同真菌属, 若在属水平上未被注释则以上一级分类单元表示, 以此类推; 纵坐标代表各真菌属所占的百分比。

Note: Different colors represent different genus. Sequences could not be classified into genus were given names of the upper level and so on. The ordinate represents the percentage of each genus.

其他优势类群有 *Trichoderma*、*Rozellomycota*、*Myriangiales* 和 *Polyporales*。Soil-2 样品中占比最高的类群也是 *Morchella*, 所占比例为 89.949%, 其他优势类群有 *Trichoderma*、*Ascomycota*、*Rozellomycota*、*Myriangiales*、*Mortierella*、*Polyporales* 和 *Ceratobasidiaceae*。

通过统计发现, 羊肚菌栽培后, 有 23 个类群的真菌丰度降低或消失, 包括 *Onygenales*、*Myceliophthora*、*Arthrinium*、*Stachybotrys*、*Glomerellaceae*、*Trichocomaceae*、*Verticillium*、*Phaeoacremonium*、*Devriesia*、*Clonostachys*、*Mycothermus*、*Neoleurodiscus*、*Graphium*、*Lectera*、*Sphaerulina*、*Phaeosphaeriaceae*、*Lulwoana*、*Chaetomiaceae*、*Codinaeopsis*、*Eurotiales*、*Sordariales*、*Pseudeurotium* 和 *Cordyceps*。有 11 个类群的真菌仅在对照土壤和正常生长的羊肚菌根际子实体中被检测到, 在染病子实体根际土中消失, 包括

Chytridiomycota, *Cladophialophora*, *Thermoascus*, *Microascus*, *Periconia*, *Humicola*, *Spizellomyces*, *Cryptococcus*, *Simocybe*, *Cylindrocarpon* 和 *Thermomyces*。此外,有6个类群的真菌仅在白霉病染病子实体根际土中被检测到,包括 *Halosphaeriaceae*, *Candida*, *Arachnomycetaceae*, *Rhodotorula*, *Ochroconis* 和 *Cordycipitaceae*。可见,羊肚菌栽培和白霉病发生对土壤真菌群落结构有

较大的影响。

2.3 真菌群落结构聚类分析

利用 Heatmap 图通过颜色梯度及相似程度来反映各处理在各分类阶元水平上真菌群落组成的相似性、多样性及丰富度,其中红色代表在对应样本中丰度较高的属,绿色代表丰度较低的属;纵向是样品的聚类情况,反映各样品在属水平上群落组成的相似性(图4)。从图4结果看出,对照土壤和

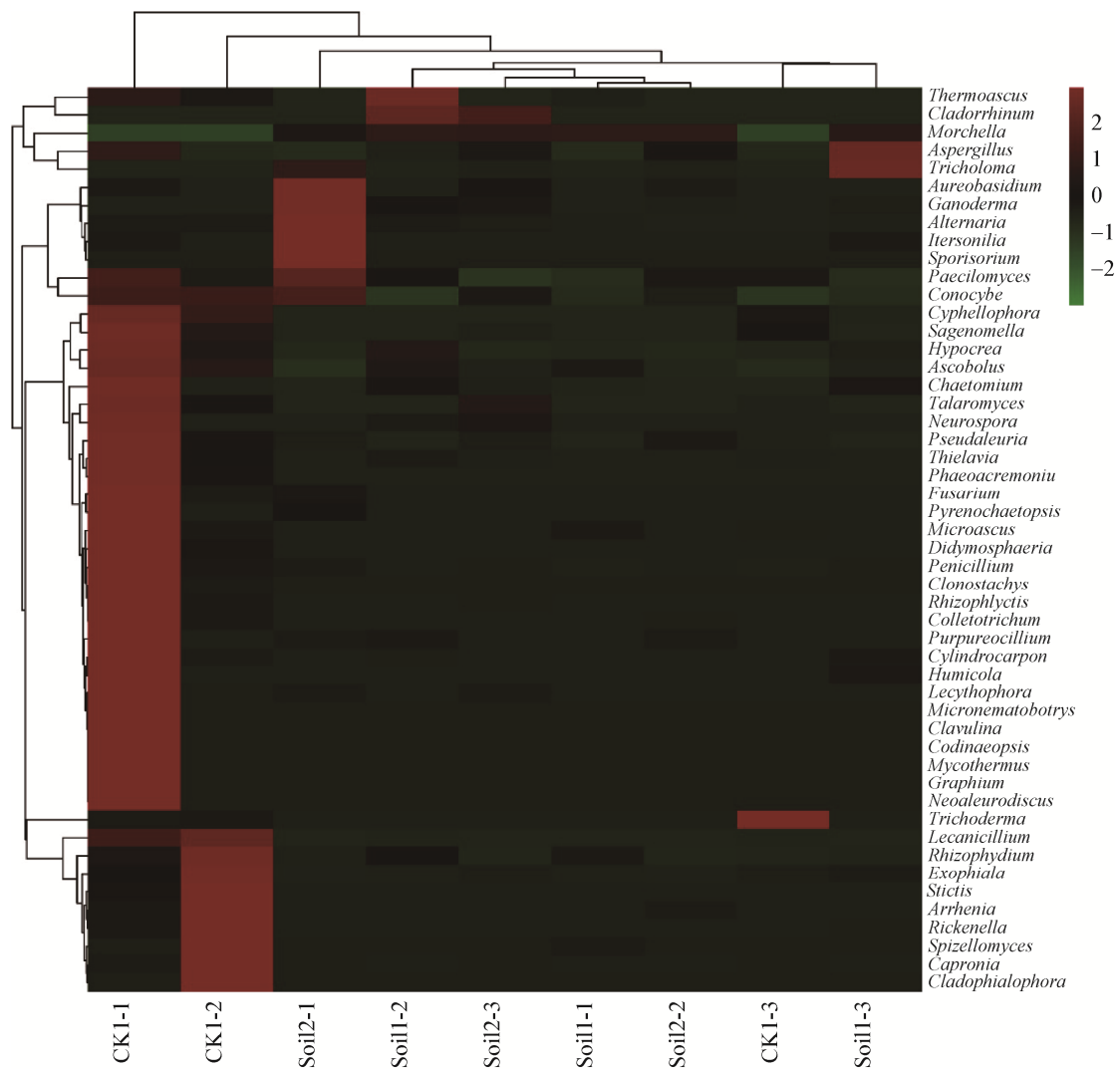


图4 各样品真菌聚类分析热图

Figure 4 Heatmap of samples clustering

注: 横向为各样本的聚类结果, 纵向为各分类单元的聚类结果。红色代表在对应样本中丰度较高的属, 绿色代表丰度较低的属。
Note: The clustering results for each sample were in the horizontal direction and the clustering results for the taxonomic units were in the vertical direction. Red represents the genus with higher abundance in the corresponding sample, and green represents the genus with lower abundance.

羊肚菌根际土的优势类群有较大差异, 染病子实体根际土和未表现病害的羊肚菌根际土的优势类群也有一定差异。对照土样中有 2 个及以上处理表现出有较高丰度的属有 *Conocybe*、*Cyphellophora*、*Sagenomella*、*Hypocrea*、*Ascobolus*、*Trichoderma*、*Lecanicillium* 和 *Rhizophydium*。正常生长的羊肚菌子实体根际土中有 2 个及以上处理表现较高丰度的属有 *Morchella*、*Ascobolus*、*Chaetomium* 和 *Rhizophydium*。白霉病发病子实体根际土中有 2 个及以上处理表现出较高丰度的属有 *Morchella*、*Aspergillus*、*Aureobasidium*、*Paecilomyces*、*Conocybe* 和 *Pseudaleuria*。可见, 白霉病发生地土壤的优势真菌类群产生了一定的变化。

2.4 真菌群落结构的主成分分析

PCA 分析通过线性变换, 将原始的高维数据通过线性变换组合, 投影到维度较低的空间坐标系(即主成分)中, 从而达到降维、简化数据结构的目的, 展现样本的自然分布。每个点代表一个样本, 不同颜色的点属于不同样本(组), 两点之间的距离越近, 表明两个样本之间的微生物群落结构相似度越高, 差异越小。坐标轴括号中的百分比代表了对应的主成分所能解释的原始数据中差异的比例。从图 5 结

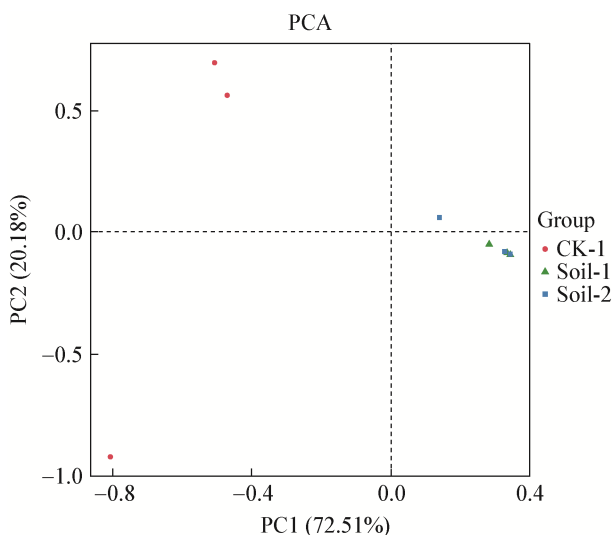


图 5 各样品真菌的主成分分析

Figure 5 Principal component analysis of fungal diversity of samples

果可看出, 未栽培羊肚菌土壤的真菌群落结构与羊肚菌子实体根际土的真菌群落结果有较大的差异; 有 2 个染病和正常生长的羊肚菌子实体根际土的真菌群落结构存在重叠的现象, 说明两者的真菌群落相似性很高, 差异很小; 同时, 各有一个白霉病染病子实体和正常生长的羊肚菌子实体根际真菌群落结构与其他样品有较大差异, 说明白霉病发生后, 土壤真菌群落结构产生了一定变化。

3 讨论

可培养的方法观察到的微生物不到微生物群落的 1%^[27], 无法全面反映微生物的真实状况。Illumina MiSeq 测序技术作为新一代测序技术, 能够直观地反映微生物群落组成, 而且具有高通量、价格低、运行周期短的优势, 已被广泛应用于微生物群落结构研究^[28]。本实验中各样品测序的稀释曲线都趋于平缓, 能够真实全面地反映各样品真菌群落结构的组成情况。从土壤真菌多样性指数可看出, 未栽培羊肚菌土壤的真菌丰度和多样性显著高于羊肚菌根际土真菌多样性, 这与前人的研究结果一致^[29], 可能与土壤中优势的羊肚菌种群对其它种群的抑制有关。此外, 染病子实体根际土真菌丰度和多样性大于正常生长的羊肚菌根际土, 这可能是白霉病病原菌的侵袭打破了羊肚菌的优势地位, 促进了其他羊肚菌根际真菌的繁殖, 也有可能是多种病原真菌在羊肚菌根际聚集扩散, 从而导致羊肚菌发病, 具体机制需进一步研究。

土壤真菌群落结构分析中, 木霉属和多腔菌目的真菌在 3 种样品中均是优势类群, 说明羊肚菌栽培和白霉病发生对其影响较小。被孢霉属和角担菌科的真菌仅在白霉病染病子实体中表现为优势类群, 被孢霉属的真菌被广泛用于脂质合成^[30], 而角担菌科的真菌能造成植物的多种病害^[31-32], 可能它们加快了羊肚菌白霉病发病的进程。羊肚菌白霉病发生后, 有 11 个类群的真菌消失, 有 6 个类群的真菌仅在染病子实体根际土中被检测到, 可能是病原菌入侵后特定类群的真菌受到了抑制而消亡, 同时又促进一些类群真菌的生长, 原因有待进一步

分析。从单一样品的角度分析各处理的群落组成结果可看出,有 6 个属的真菌在 2 个以上的重复样品中表现较高的丰度,其中包括拟青霉属的真菌。羊肚菌白霉病是由拟青霉属的长毛拟青霉引发^[7],可能白霉病的病原菌是通过根部侵染而导致子实体发病。

主成分分析结果中,未栽培羊肚菌土壤真菌与羊肚菌根际真菌差异很大,有 2 个染病子实体和正常生长的子实体根际真菌群落结构存在重叠,表明羊肚菌栽培对土壤真菌群落结构具有较大影响,可以塑造土壤真菌的群落,而单个样品的差异可能与白霉病病原菌的入侵有关。接下来将对羊肚菌白霉病的发生、传播规律和病原菌的侵染机制进行深入研究,从而推动对羊肚菌白霉病的防控。

4 结论

通过 Illumina MiSeq 高通量测序,9 份样品总共得到 393 347 条有效序列,经过过滤和去除嵌合体之后得到 384 732 条优质序列。未栽培羊肚菌土壤真菌 OTU 数、Chao1 指数、ACE 指数、Simpson 指数和 Shannon 指数最大,染病子实体根际土次之,正常生长羊肚菌子实体根际土最小;各个处理的真菌群落结构和优势真菌类群有较大差异。可见,羊肚菌栽培后真菌多样性降低,白霉病发生后根际真菌种类增多,土壤真菌群落结构发生变化,优势真菌类群也产生了较大差异。

致谢:感谢成都市农林科学院曾先富老师和熊维全老师在采样时提供的帮助。

参考文献

- [1] Kuo M. Morels[M]. Ann Arbor: University of Michigan Press, 2005: SB353.K86
- [2] Cui HL, Chen Y, Wang SS, et al. Isolation, partial characterisation and immunomodulatory activities of polysaccharide from *Morchella esculenta*[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2011, 91(12): 2180-2185
- [3] Fu LH, Wang YP, Wang JJ, et al. Evaluation of the Antioxidant activity of extracellular polysaccharides from *Morchella esculenta*[J]. Food & Function, 2013, 4(6): 871-879
- [4] Hu ML, Chen Y, Wang C, et al. Induction of apoptosis in HepG2 cells by polysaccharide MEP-II from the fermentation broth of *Morchella esculenta*[J]. Biotechnology Letters, 2013, 35(1): 1-10
- [5] Nitha B, Fijesh PV, Janardhanan KK. Hepatoprotective activity of cultured mycelium of Morel mushroom, *Morchella esculenta*[J]. Experimental and Toxicologic Pathology, 2013, 65(1/2): 105-112
- [6] Nitha B, Janardhanan KK. Aqueous-ethanolic extract of morel mushroom mycelium *Morchella esculenta*, protects cisplatin and gentamicin induced nephrotoxicity in mice[J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(9): 3193-3199
- [7] He XL, Peng WH, Miao RY, et al. White mold on cultivated morels caused by *Paecilomyces penicillatus*[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2017, 364(5): fnx037
- [8] Wang F, Li SG, Xu FH, et al. The research progress on mechanism of continuous cropping obstacle[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2013(5): 6-13 (in Chinese)
王飞, 李世贵, 徐凤花, 等. 连作障碍发生机制研究进展[J]. 中国土壤与肥料, 2013(5): 6-13
- [9] Xiong W, Zhao QY, Zhao J, et al. Different continuous cropping spans significantly affect microbial community membership and structure in a vanilla-grown soil as revealed by deep pyrosequencing[J]. Microbial Ecology, 2015, 70(1): 209-218
- [10] Zhou WJ, Lü DG, Qin SJ. Research progress in interaction between plant and rhizosphere microorganism[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2016, 38(3): 253-260 (in Chinese)
周文杰, 吕德国, 秦嗣军. 植物与根际微生物相互作用关系研究进展[J]. 吉林农业大学学报, 2016, 38(3): 253-260
- [11] Zhang LJ, Mao J, Zhang ZD, et al. Study of microbial community diversity in rhizosphere soil from garlic infected by root rot disease[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2013, 50(11): 2109-2117 (in Chinese)
张丽娟, 茆军, 张志东, 等. 新疆大蒜根腐型病害根际土壤微生物群落多样性初探[J]. 新疆农业科学, 2013, 50(11): 2109-2117
- [12] Cui HY, Yang XY, Lu DX. Isolation and characterization of bacteria from the rhizosphere and bulk soil of *Stellera chamaejasme* L.[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2015, 61(3): 171-181
- [13] Rousk J, Bååth E, Brookes PC, et al. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil[J]. The ISME Journal, 2010, 4(10): 1340-1351
- [14] Magoč T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957-2963
- [15] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335-336
- [16] 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
- [17] Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. Bioinformatics, 2011, 27(16): 2194-2200
- [18] Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than

- BLAST[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460-2461
- [19] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(D1): D590-D596
- [20] Heck KL, van Belle G, Simberloff D. Explicit calculation of the rarefaction diversity measurement and the determination of sufficient sample size[J]. *Ecology*, 1975, 56(6): 1459-1461
- [21] Chao A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population[J]. *Scandinavian Journal of Statistics*, 1984, 11(4): 265-270
- [22] Chao A, Yang MCK. Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates[J]. *Biometrika*, 1993, 80(1): 193-201
- [23] Simpson EH. Measurement of Diversity[J]. *Nature*, 1949, 163: 688
- [24] Shannon CE. A mathematical theory of communication[J]. *Bell Labs Technical Journal*, 1948, 27(3): 379-423
- [25] Ramette A. Multivariate analyses in microbial ecology[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 62(2): 142-160
- [26] Park E, Cho M, Ki CS. Correct use of repeated measures analysis of variance[J]. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*, 2009, 29(1): 1-9
- [27] Wang SG, Hou YL. Application of phospholipid fatty acid method in soil microbial analysis[J]. *Microbiology China*, 2004, 31(1): 114-117 (in Chinese)
- 王曙光, 侯彦林. 磷脂脂肪酸方法在土壤微生物分析中的应用[J]. *微生物学通报*, 2004, 31(1): 114-117
- [28] Yang YY, Wang Z, He T, et al. Sediment bacterial communities associated with anaerobic biodegradation of Bisphenol A[J]. *Microbial Ecology*, 2015, 70(1): 97-104
- [29] Shen H, Wang H, Zhao YC, et al. Analysis of fungal communities present in *Morchella* growth soil using denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2009, 16(2): 6-9 (in Chinese)
- 沈洪, 汪虹, 赵永昌, 等. 采用变性梯度凝胶电泳研究羊肚菌土壤真菌群落结构[J]. *食用菌学报*, 2009, 16(2): 6-9
- [30] Münchberg U, Wagner L, Rohrer C, et al. Quantitative assessment of the degree of lipid unsaturation in intact *Mortierella* by Raman microspectroscopy[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015, 407(12): 3303-3311
- [31] Asad-Uz-Zaman M, Bhuiyan MR, Khan MAI, et al. Integrated options for the management of black root rot of strawberry caused by *Rhizoctonia solani* Kuhn[J]. *Comptes Rendus Biologies*, 2015, 338(2): 112-120
- [32] Wang HH, Meng J, Peng XX, et al. Rice WRKY4 acts as a transcriptional activator mediating defense responses toward *Rhizoctonia solani*, the causing agent of rice sheath blight[J]. *Plant Molecular Biology*, 2015, 89(1/2): 157-171