

王 宁,刘 铜,靳亚忠,等.木霉菌对土壤微生物多样性及草莓生长和发病的影响[J].江苏农业科学,2018,46(18):108-112.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.18.027

# 木霉菌对土壤微生物多样性及草莓生长和发病的影响

王 宁<sup>1</sup>,刘 铜<sup>2</sup>,靳亚忠<sup>2</sup>,咸洪泉<sup>1</sup>

(1. 青岛农业大学,山东青岛 266109; 2. 黑龙江八一农垦大学,黑龙江大庆 163319)

**摘要:**在草莓苗期施用木霉菌可湿性粉剂后,通过对土壤微生物基因进行高通量测序,研究土壤微生物多样性变化。结果表明,木霉菌对细菌的影响主要表现为假单胞菌属(*Pseudomonas*)数量明显增多;对真菌的影响主要表现为头梗霉属(*Cephalophora*)、赤霉菌属(*Gibberella*)和毛壳菌属(*Chaetomium*)数量明显减少,四枝孢属(*Tetracladium*)数量明显增多。总体看出,施用木霉菌可湿性粉剂对细菌多样性的影响较小,对真菌多样性的影响较大,会使真菌多样性指数明显降低。此外,施入木霉可湿性粉剂对草莓植株具有明显的促生长作用,并对草莓灰霉病有很好的预防和治疗作用。

**关键词:**木霉;土壤微生物;多样性;高通量测序

**中图分类号:**S154.36;S668.401 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)18-0107-05

木霉菌是优良的生防真菌,在应用真菌防治土传病害的研究中,应用最广泛的真菌杀菌剂便是木霉菌<sup>[1]</sup>。土壤微生物群落结构失衡是造成土传病害发生的主要原因<sup>[2-3]</sup>,其多样性高低是衡量土壤健康与否的一项重要指标<sup>[4]</sup>。施用木霉菌后,通过对土壤微生物多样性产生影响来达到防治病害、改良土壤的作用,因此,研究土壤微生物多样性意义重大。目前微生物多样性的研究方法多为活菌培养,局限在部分微生物总体数量研究,对种类的研究比较少,而土壤中的大多数微生物是无法进行培养的,可培养率只有 0.1%~1.0%<sup>[5-6]</sup>。高通量测序具有无需培养、能够客观还原菌群结构和数据量大等优点<sup>[7]</sup>,近年来,高通量测序技术不断发展,尤其是第二代测序方法,即 Illumina 454 和 SOLiD Ion Torrent 具有诸多优点<sup>[8-10]</sup>。这些测序平台最大数据产出通量高,在土壤微生物多样性的研究中可以获得丰富的信息<sup>[11-12]</sup>。因此,笔者试图通过对土壤微生物基因组进行高通量测序,研究木霉菌施用后对土壤微生物多样性的影响,为进一步揭示木霉菌和土壤微生物多样性之间的关系提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试菌剂为青岛农业大学研发的木霉菌可湿性粉剂,棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*)的孢子浓度为  $1 \times 10^9$  CFU/g,草莓品种为红颜。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 田间试验设计** 试验在黑龙江省大庆市萨尔图区春雷农场塑料大棚内进行,木霉菌可湿性粉剂于苗期施用。设

木霉菌可湿性粉剂、对照 2 个处理,小区面积为 0.02 hm<sup>2</sup>,共 3 次重复。木霉菌可湿性粉剂处理为将木霉菌可湿性粉剂稀释 300 倍进行灌根,灌根量为 300 mL/株,对照用等体积的水灌根。灌根时间为 2016 年 11 月 4 日,21 d 后采用对角线五点取样法取草莓根际土。

**1.2.2 土壤微生物测序** 微生物多样性研究主要基于编码核糖体 RNA 的核酸序列,其中细菌多样性研究主要是基于 16S rDNA V3 + V4 区,真菌多样性研究主要基于内转录间隔区 ITS1 区。提取样品总 DNA,细菌 V3 + V4 扩增采用的引物如下: F, 5' - ARACTYCTACGGRAGGCWG - 3'; R, 5' - GACTACNVGGGTATCTAATCC - 3'。真菌 ITS1 扩增引物如下: ZF, 5' - AACCTGCGGAAGGATCATT - 3'; ZR, 5' - GARCCAAGAGATCCRTTG - 3'。进行 PCR 扩增并对其产物进行纯化、定量和均一化形成测序文库,对于建好的文库先进行文库质检,质检合格的文库用 Illumina HiSeq 2500 进行测序。测序由北京百迈客生物科技有限公司完成。

**1.2.3 信息分析流程** 利用双末端测序(paired-end)的方法,构建小片段文库进行测序。通过对 reads(读长)拼接过滤,得到优化序列(tags)。将优化序列进行操作分类单元(operational taxonomic units,简称 OTUs)聚类,并进行物种注释及丰度分析,以揭示样品的物种构成。进一步进行  $\alpha$  多样性分析(alpha diversity),研究单个样品内部的物种多样性,统计各样品在 97% 相似度水平下的 Ace、Chao1、Shannon 及 Simpson 指数。

**1.2.4 草莓生长指标测定** 施用木霉菌可湿性粉剂 50 d 后,测定单株叶片数及单张叶面积,测定数量为 10 株。单张叶面积的测定参考乔宝营等的方法<sup>[13]</sup>。

**1.2.5 草莓灰霉病的调查** 施药后在生育期内定期观测连作草莓土传病害的发生情况,主要调查整个试验处理草莓灰霉病的病株数,并参照朱虹等方法计算防效<sup>[14]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 样品测序结果评估

通过数据统计软件处理各阶段样品序列数,评估数据质

收稿日期:2017-03-30

基金项目:国家科技基础性工作专项(编号:2014FY120900);山东省重点研发计划(编号:2018GNC110024);山东省农业重大应用技术创新项目(编号:2217003)。

作者简介:王 宁(1991—),女,山东莱芜人,硕士研究生,主要从事农业微生物方面的研究。E-mail:ningwang\_rain@163.com。

通信作者:咸洪泉,博士,教授,主要从事植物病害生物防治工作。E-mail:hqxian@qau.edu.cn。

量。各样品测序数据评估结果如表 1、表 2 所示。

稀释性曲线(rarefaction curve)用于验证测序数据量是否足以反映样品中的物种多样性,并间接反映样品中物种的丰富程度<sup>[15]</sup>。由图 1 可以看出,在一定范围内,随着测序数的增多,若曲线表现为急剧上升,则表示群落中有大量物种被发现;当曲线趋于平缓时,则表示此环境中的物种并不会随着测序数量的增加而明显增多。稀释曲线可以作为对各样本测序

表 1 样品细菌测序数据结果统计

处理	双端 reads 数 (个)	原始序列 数(个)	优化序列 数(个)	优化序列占比 (%)
T <sub>1</sub>	80 415	76 297	63 698	79.20
T <sub>2</sub>	80 509	76 422	64 196	79.74
T <sub>3</sub>	79 583	75 428	63 206	79.42
CK <sub>1</sub>	79 948	75 396	63 513	79.41
CK <sub>2</sub>	79 916	75 605	63 254	79.15
CK <sub>3</sub>	79 809	75 656	63 652	79.76

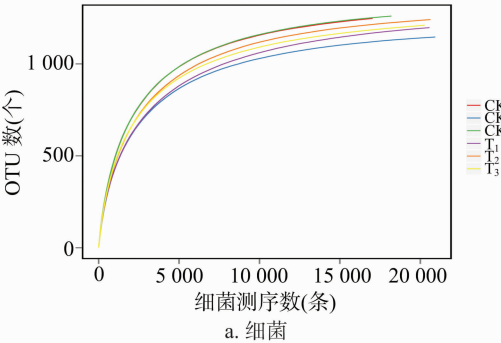


表 2 样品真菌测序数据结果统计

处理	双端 reads 数 (个)	原始序列 数(个)	优化序列 数(个)	优化序列占比 (%)
T <sub>1</sub>	80 118	51 337	49 572	61.87
T <sub>2</sub>	80 192	53 576	51 069	63.68
T <sub>3</sub>	80 137	52 327	50 640	63.19
CK <sub>1</sub>	79 593	50 969	46 457	58.37
CK <sub>2</sub>	79 836	56 269	52 957	66.33
CK <sub>3</sub>	80 090	53 943	50 834	63.47

量是否充分的判断,如果曲线急剧上升,表明测序量不足,需要增加序列数;反之,则表明样品序列充分,可以进行数据分析。样品稀释曲线分别在测序数为 10 000、20 000 条处逐渐趋向平坦,而表 1 显示,细菌的优化测序数量超过 60 000 条,表 2 显示,真菌的优化序列超过 40 000 条,说明样品序列充分,测序数量合理。

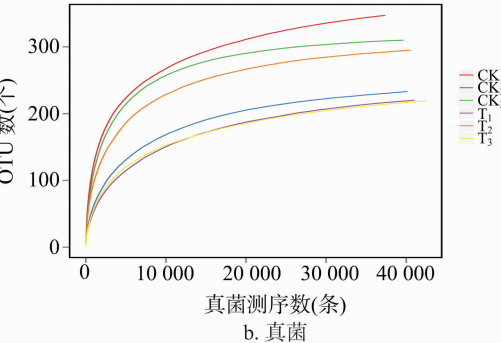


图1 样品稀释曲线

2.2 OTU 划分结果

6 个样品测序共获得 479 966 对 reads,双端 reads 拼接、过滤后共产生 301 529 条 tags,平均每个样品产生 43 076 tags。根据不同的相似度水平,对所有序列进行 OTU 划分,在一般情况下,如果序列之间的相似性高于 97% 就可以把它定义为 1 个 OTU,每个 OTU 对应 1 种代表序列<sup>[16]</sup>。使用 QIIME

(version 1.8.0) 软件中的 UCLUST 对 tags 在 97% 的相似度水平下进行聚类,获得 OTU,并基于 Silva(细菌)和 UNITE(真菌)分类学数据库对 OTU 进行分类学注释。由表 3 看出,各处理组和对照组细菌的总种类数变化非常小,而真菌种类的数量差异较大,处理组较对照组真菌种类总数明显减少,降低了 17.57%。

表 3 通过聚类得到的不同处理土壤中的 OTU 数量

菌类	CK 的 OTU 数(个)				处理的 OTU 数(个)				总 OTU 数 (个)
	CK <sub>1</sub>	CK <sub>2</sub>	CK <sub>3</sub>	平均	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	平均	
细菌	1 247	1 146	1 260	1 217	1 197	1 241	1 210	1 216	1 391
真菌	347	233	310	296	220	295	219	244	459

2.3 属水平丰度变化

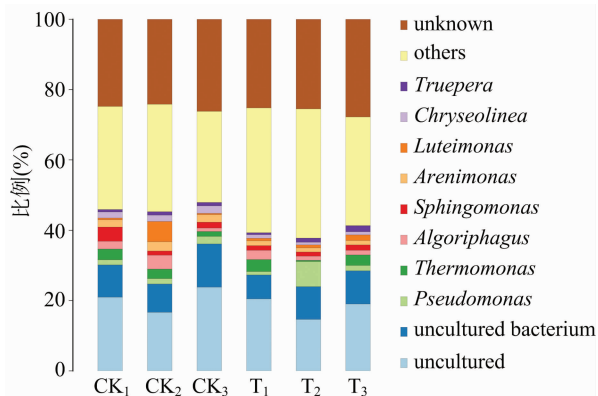
由图 2 可以看出,细菌属水平的丰度变化表现如下:在土壤中,特吕珀菌属(*Truepera*)、*Chryseolinea*、藤黄单胞菌属(*Luteimonas*)、铁矿沙单胞菌属(*Arenimonas*)、鞘鞍醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、冷菌属(*Algoriphagus*)和热单胞菌属(*Thermomonas*)丰度较高,处理组和对照组相比没有明显变化。处理组的假单胞菌属(*Pseudomonas*)丰度所占比例比对照增加 45.8 百分点。假单胞菌属是土壤中病原菌的拮抗菌,其种类和数量增多有利于土壤健康<sup>[17]</sup>。

由图 3 可以看出,真菌属水平丰度的变化表现如下:镰刀菌属(*Fusarium*)在 T<sub>3</sub> 处理中丰度占比 2.41%,T<sub>3</sub> 处理中其他种类真菌数量较少,镰刀菌占据绝对优势,与往年 T<sub>3</sub> 处理

是根腐病严重区有关。大棚内有相同根腐病发生区的土壤中,镰刀菌丰度占比达 3.35%,木霉菌处理后下降 28.06 百分点。丰度占比前 10 的头梗霉属(*Cephalophora*)、赤霉菌属(*Gibberella*)、毛壳菌属(*Chaetomium*)相对丰度明显减少,分别降低 245.20、322.53、38.46 百分点,羽藓属(*Tetracladium*)相对丰度明显增多,增加 348.29 百分点。毛壳菌广泛存在于土壤中,它可以有效降解纤维素和有机物,对微生物产生拮抗作用,是广泛应用的生防菌<sup>[18]</sup>。而木霉菌和毛壳菌互相拮抗,所以会造成毛壳菌丰度的减少<sup>[19]</sup>。

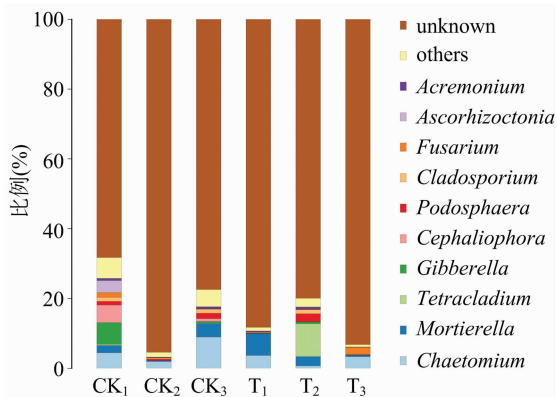
2.4 物种丰度聚类热图

Heatmap 是以颜色梯度来代表数据矩阵中数值的大小并根据物种或样品丰度相似性进行聚类的一种图形展示方式。



*Truepera*—特吕珀菌属; *Chryseolinea*暂无统一的中文名; *Luteimonas*—藤黄单胞菌属; *Arenimonas*—铁矿沙单胞菌属; *Sphingomonas*—鞘鞍醇单胞菌属; *Algoriphagus*—冷菌属; *Thermomonas*—热单胞菌属; *Pseudomonas*—假单胞菌属。1 种颜色代表 1 个物种, 色块长度代表物种所占相对丰度比例; 柱状图只显示丰度水平前 10 的物种, 并将其物种合并为 others, 在图中显示, unknown 代表未得到分类学注释的物种; 图 3 同

图2 细菌属水平物种分布



*Acremonium*—支顶孢属; *Ascorhizoctonia*—子囊菌属; *Fusarium*—镰刀菌属; *Cladosporium*—枝孢菌属; *Podosphaera*—足球菌属; *Cephalophora*—头梗霉属; *Gibberella*—赤霉属; *Tetracladium*—羽鲜属; *Mortierella*—被孢霉属; *Chaetomium*—毛壳菌属

图3 真菌属水平物种分布

将高丰度和低丰度的物种分块聚集, 通过颜色梯度及相似程度来反映多个样品群落组成的相似性和差异性。在热图聚类结果中, 颜色代表物种丰度; 纵向聚类表示不同物种在各样品间丰度的相似情况, 2 个物种间距离越近, 枝长越短, 说明这 2 个物种在各样品间的丰度越相似; 横向聚类表示不同样品的各物种丰度的相似情况, 与纵向聚类一样, 2 个样品间距离越近, 枝长越短, 说明这 2 个样品的各物种丰度越相似。

从图 4 可以看出, 木霉菌制剂处理的土样真菌丰度明显降低, 尤其是处理 1 和处理 3。处理 2 和对照 2 纵向聚类丰度相近, 纵向聚类丰度差异较大。头梗霉属、赤霉属等一些土壤致病菌明显减少, 而圆酵母属 (*Torula*)、摩西管柄囊霉 (*Funneliformis*)、羽鲜属 (*Tetracladium*) 丰度增加, 其中摩西管柄囊霉和羽鲜属均是菌根真菌, 对土壤健康的保持非常重要。21 d 后木霉菌的数量会明显降低。

## 2.5 Alpha 多样性分析

Alpha 多样性有 Chao1、Ace、Shannon、Simpson 等多种衡

量指标<sup>[20]</sup>。其中 Chao1 和 Ace 指数能简单地反映群落中物种的数量, 而不表示群落中每个物种的丰度信息。Shannon 和 Simpson 指数用于衡量群落多样性, 受样品群落中物种丰度和物种均匀度的影响。Chao1、Ace、Shannon 指数越大, Simpson 指数越小, 说明样品的物种多样性越高<sup>[21]</sup>。另外, 本研究还统计了样本文库的覆盖率 (Coverage), 其数值越高, 则表明样本中序列被测出的概率越高, 而没有被测出的概率越低。该指数可以反映测序结果是否能够代表样本中微生物的真实情况。

从表 4、表 5 可以看出, 经过木霉菌处理后, 土壤微生物多样性指数整体上变低, 细菌多样性指数变化不大, Ace 和 Shannon 指数变化较小, Chao1 和 Simpson 指数略微下降。真菌的多样性指数明显降低, 对照 Ace、Chao1、Shannon 指数分别比处理增加 18.51%、18.81%、31.03%; 对照 Simpson 指数比处理降低 50.96%。分析原因, 可能是由于木霉菌对细菌的拮抗性较小, 主要拮抗真菌。

## 2.6 木霉制剂对草莓植株生长及灰霉病发生的影响

施入可湿性粉剂后, 分别在生育期内进行草莓叶片数量、面积测定。表 6 结果表明: 处理组的草莓叶片数量、叶面积均比对照组明显增加。施药后 50 d 时, 处理组叶片数量、叶面积分别比对照组增加 10.78%、10.94%, 对草莓灰霉病的相对防效达 65%。结果说明, 施入木霉菌对草莓植株具有明显的促生长作用, 并对草莓灰霉病有很好的预防和治疗作用。

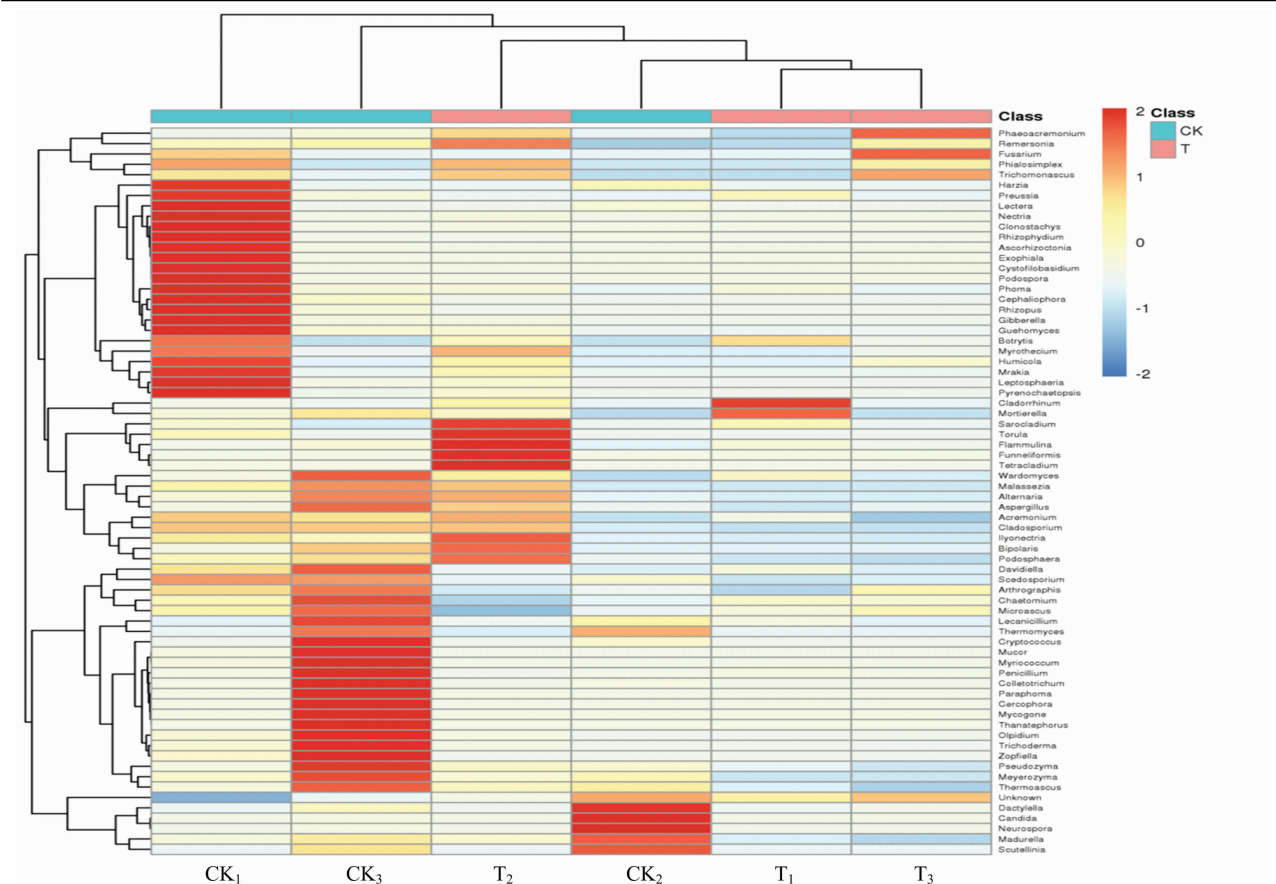
## 3 结论与讨论

本试验采用土壤宏基因组高通量测序的方法研究木霉菌制剂施用后对土壤微生物多样性的影响, 结果表明, 施用木霉菌对土壤中细菌多样性影响较小, 但会使真菌多样性明显降低。木霉菌对细菌多样性的影响主要表现为假单胞菌属数量明显增多; 对真菌多样性的影响主要表现为头梗霉属、赤霉属和毛壳菌属等数量明显减少, 酵母菌、羽鲜属等数量明显增多。木霉菌的施用会造成很多病原菌含量减少, 也会造成一些有益菌含量减少, 从而重新塑造土壤的微生态系统, 间接改良土壤, 增强植株长势, 并减轻灰霉病等土传病害的发生程度<sup>[22]</sup>。

马建华等报道, 在土壤中施入深绿木霉后细菌增长速度缓慢, 而真菌数量显著降低<sup>[23]</sup>。古丽君等研究发现, 施入深绿木霉 17 d 后, 真菌的数量比对照减少了  $4 \times 10^3$  CFU/g, 土壤中细菌的数量增加了  $1.27 \times 10^{10}$  CFU/g, 放线菌数量没有明显变化<sup>[24]</sup>。另有报道显示, 木霉菌和假单胞菌属可以协同作用, 从而提高生防效果<sup>[25]</sup>。毛壳菌属是优良的生防菌, 但木霉菌施用后会造成其数量下降, 已有报道显示两者互相拮抗<sup>[19]</sup>。

有关木霉菌在土壤中存活时间的问题, 当前研究结果不一, 康萍芝等研究发现, 施用木霉菌后 11 d, 木霉菌含量达到高峰, 之后开始降低, 55 d 后土壤中几乎检测不到木霉菌<sup>[26]</sup>。杜娟娟等发现, 施用木霉菌后 35 d, 木霉菌含量达到高峰, 之后开始下降<sup>[27]</sup>。古丽君等发现, 木霉在施入 25 d 时, 相对含量达到最低值<sup>[24]</sup>。本研究发现, 施用木霉制剂 21 d 后根际土壤中木霉菌含量已经很低, 其原因有待进一步研究。

土壤微生物多样性是衡量土壤健康与否的重要指标。木



*Fusarium*—镰刀菌属; *Nectria*—丛赤壳属; *Clonostachys*—粉红螺旋聚孢霉; *Rhizophydium*—根生壶菌属; *Ascothizoctonia*—子囊丝核菌属; *Exophiala*—外瓶霉属; *Podospora*—柄孢壳菌属; *Phoma*—茎点霉属; *Cephalophora*—头梗霉属; *Rhizopus*—根霉属; *Gibberella*—赤霉属; *Guehomyces*—耐冷酵母; *Botrytis*—灰葡萄孢菌; *Myrothecium*—漆斑菌属; *Humicola*—腐质霉属; *Mrakia*—耐冷海洋嗜杀酵母; *Leptosphaeria*—小球腔菌属; *Cladorrhinum*—枝鼻菌属; *Mortierella*—被孢霉属; *Sarocladium*—稻帚枝霉; *Torula*—圆酵母属; *Flammulina*—小火火焰菌属; *Funnelliformis*—摩西管柄囊霉; *Tetracladium*—羽蕨属; *Wardomyces*—沃德霉; *Malassezia*—马拉色菌属; *Alternaria*—链格孢属; *Aspergillus*—曲霉属; *Acremonium*—支顶孢属; *Cladosporium*—分子孢子菌属; *Bipolaris*—双极霉属; *Podosphaera*—足球菌属; *Scedosporium*—足放线菌属; *Arthrographis*—爪甲白癣菌; *Chaetomium*—毛壳菌属; *Microascus*—小囊菌属; *Lecanicillium*—蜡蚧属; *Thermomyces*—嗜热真菌属; *Cryptococcus*—隐球菌; *Mucor*—毛霉属; *Penicillium*—青霉菌属; *Colletotrichum*—炭疽菌属; *Paraphoma*—异茎点霉属; *Cercophora*—尾柄孢壳属; *Thanatephorus*—亡革菌属; *Olpidium*—油壶菌属; *Trichoderma*—木霉属; *Zopfiella*—柄孢壳属; *Thermoascus*—热子囊菌属; *Dactylella*—隔指孢属; *Candida*—念珠菌属; *Neurospora*—链孢霉属; *Madurella*—马杜拉分支菌属; *Scutellinia*—盾盘菌属; *Phaeoacremonium*、*Remersonia*、*Phialosimplex*、*Trichomonascus*、*Harzia*、*Preussia*、*Lectera*、*Cystofilobasidium*、*Pyrenochaetopsis*、*Lyonectria*、*Meyerozyma*、*Pseudozyma*、*Davidiella*、*Mycogone*、*Myriococcum*暂无统一的中文名。左侧class代表真菌属分类, 右侧class代表处理组与对照组分类。颜色代表物种丰度, 纵向聚类表示不同物种在各样品间丰度的相似情况, 横向聚类表示不同样品的各物种丰度的相似情况

图4 属水平样品丰度聚类热图

表 4 细菌 Alpha 多样性指数统计

处理	OTU 数 (个)	Ace 指数	Chao1 指数	Simpson 指数	Shannon 指数	覆盖率 (%)
CK <sub>1</sub>	1 247	1 309.26	1 318.66	0.003 5	6.37	99.20
CK <sub>2</sub>	1 146	1 193.68	1 195.96	0.007 7	5.99	99.47
CK <sub>3</sub>	1 260	1 315.26	1 325.00	0.003 0	6.40	99.29
CK 平均	1 218	1 272.73	1 279.87	0.004 7	6.25	99.32
T <sub>1</sub>	1 197	1 268.94	1 283.14	0.005 1	6.10	99.28
T <sub>2</sub>	1 241	1 295.36	1 329.26	0.008 0	6.12	99.37
T <sub>3</sub>	1 210	1 267.99	1 283.06	0.004 0	6.25	99.36
处理平均	1 216	1 277.43	1 298.49	0.005 7	6.16	99.34

霉菌的施用会改变土壤中的微生态系统, 往往使一些土传病害真菌种类和数量减少, 而土壤中有许多真菌往往是重要的病原菌<sup>[28]</sup>, 从而使土壤有益菌和病原菌保持一种动态平衡, 达到抑制病害发生和促进作物生长的目的。

参考文献:

[1] 杨依军, 王 勇, 杨秀荣, 等. 拮抗木霉菌在生物防治中的作用[J]. 天津农业科学, 2000, 6(3): 29-33.

表 5 真菌 Alpha 多样性指数统计

处理	OTU 数 (个)	Ace 指数	Chao1 指数	Simpson 指数	Shannon 指数	覆盖率 (%)
CK <sub>1</sub>	347	380.18	368.62	0.076 0	3.52	99.8 7
CK <sub>2</sub>	233	249.91	270.19	0.133 1	2.59	99.91
CK <sub>3</sub>	310	317.48	318.64	0.159 1	3.01	99.95
CK 平均	297	315.86	319.15	0.122 7	3.04	99.91
T <sub>1</sub>	220	241.64	245.55	0.162 0	2.40	99.90
T <sub>2</sub>	295	312.36	314.84	0.157 9	2.86	99.92
T <sub>3</sub>	219	245.58	245.46	0.430 8	1.71	99.92
处理平均	245	266.53	268.62	0.250 2	2.32	99.91

表 6 木霉制剂对草莓生长和灰霉病发生的影响(施药后 50 d)

处理	平均叶片数量 (张/株)	平均叶面积 (cm <sup>2</sup> /张)	施后病情指数	防效 (%)
木霉菌	11.3	7.1	1.44	65
对照	10.2	6.4	4.11	

[2] Rao S, Chan Y, Bugler – Lacap D C, et al. Microbial diversity in soil, sand dune and rock substrates of the Thar monsoon desert, India[J]. Indian Journal of Microbiology, 2016, 56(1): 35 – 45.

[3] Garbeva P, van Veen J A, van Elsas J D. Microbial diversity in soil: selection microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness[J]. Annual Review of Phytopathology, 2004, 42(1): 243 – 270.

[4] Xie Y, Fan J, Zhu W, et al. Effect of heavy metals pollution on soil microbial diversity and bermudagrass genetic variation[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7(1): 755.

[5] Pace N R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere[J]. Science, 1997, 276(5313): 734 – 740.

[6] Torsvik V, Goksøyr J, Daee F L. High diversity in DNA of soil bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1990, 56(3): 782 – 787.

[7] Zhang W, Chen L, Zhang R, et al. High throughput sequencing analysis of the joint effects of BDE209 – Pb on soil bacterial community structure[J]. Journal of Hazardous Materials, 2016, 301: 1 – 7.

[8] Quail M A, Kozarewa I, Smith F, et al. A large genome center’s improvements to the Illumina sequencing system [J]. Nature Methods, 2008, 5(12): 1005 – 1010.

[9] Meyer M, Stenzel U, Hofreiter M. Parallel tagged sequencing on the 454 platform[J]. Nature Protocols, 2008, 3(2): 267 – 278.

[10] Mardis E R. The impact of next – generation sequencing technology on genetics[J]. Trends in Genetics, 2008, 24(3): 133 – 141.

[11] Czechowski P, Clarke L J, Breen J, et al. Antarctic eukaryotic soil diversity of the Prince Charles Mountains revealed by high – throughput sequencing[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2016, 95(95): 112 – 121.

[12] Cummings P J, Ahmed H R, Durocher J A, et al. Pyrosequencing for microbial identification and characterization [J]. Journal of Visualized Experiments Jove, 2013(78): e50405.

[13] 乔宝营, 黄海帆, 张信栓, 等. 草莓叶面积简易测定方法[J]. 果树学报, 2005, 21(6): 621 – 623.

[14] 朱虹, 汪章勋, 樊美珍, 等. 草莓灰霉病拮抗木薯菌株筛选及温室防效测定[J]. 中国生物防治杂志, 2005, 21(1): 52 – 54.

[15] Wang Y, Sheng H F, He Y, et al. Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of illumina tags [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(23): 8264 – 8271.

[16] Blaxter M, Mann J, Chapman T, et al. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data [J]. Philosophical Transactions: Biological Sciences, 2005, 360(1462): 1935 – 1943.

[17] 葛红莲, 陈龙, 张军令, 等. 长期污水灌溉对小麦根际土壤微生物区系的影响[J]. 节水灌溉, 2009(5): 14 – 15.

[18] 迟玉杰, 杨谦. 毛壳菌对植物病害的生物防治及存在的问题[J]. 农业系统科学与综合研究, 2002, 18(3): 215 – 218.

[19] 柳婷婷. 木霉菌与毛壳菌组合防治两种蔬菜病害[J]. 中国农业信息, 2015(3): 70 – 72.

[20] 唐玉妹, 魏朝富, 颜廷梅, 等. 土壤质量生物学指标研究进展[J]. 土壤, 2007, 39(2): 157 – 163.

[21] Grice E A, Kong H H, Conlan S, et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome [J]. Science, 2009, 324(5931): 1190 – 1192.

[22] 朱伟杰, 王楠, 郁雪平, 等. 生防菌 *Pseudomonas fluorescens* 2P24 对甜瓜根围土壤微生物的影响[J]. 中国农业科学, 2010, 43(7): 1389 – 1396.

[23] 马建华, 张丽荣, 康萍芝, 等. 秸秆生物反应堆技术的应用对设施黄瓜土壤微生物的影响[J]. 西北农业学报, 2010, 19(12): 161 – 165.

[24] 古丽君, 徐秉良, 梁巧兰, 等. 生防木霉对草坪土壤微生物区系的影响及定殖能力研究[J]. 草业学报, 2013, 22(3): 321 – 326.

[25] 谯天敏, 张静, 朱天辉. 铜绿假单胞菌与长枝木霉对杂交竹梢枯病的协同增效生防研究[J]. 北京林业大学学报, 2015(2): 113 – 120.

[26] 康萍芝, 张丽荣, 沈瑞清, 等. 哈茨木霉制剂对设施连作番茄根际土壤微生物的生态效应及防病作用[J]. 农药, 2013, 52(2): 128 – 131.

[27] 杜婵娟, 付岗, 潘连富, 等. 哈茨木霉 gz – 2 菌株在土壤中的定殖规律研究[J]. 西南农业学报, 2016, 29(1): 138 – 142.

[28] 黄秀梨. 微生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001.