

Illumina 高通量测序揭示黄连根腐根际土壤真菌群落组成及多样性

宋旭红^{1,2,3}, 谭 均^{1,2,3}, 李隆云^{1,2,3*}, 王 钰^{1,2,3}, 伍晓丽^{1,2,3}

1. 重庆市中药研究院, 重庆 400065

2. 重庆市中药良种选育与评价工程技术研究中心, 重庆 400065

3. 中国中医科学院 中药资源中心重庆分中心, 重庆 460005

摘 要: 目的 对黄连根腐病病株及健株根际土壤真菌种群组成、丰富度及多样性进行分析。方法 利用 Illumina 高通量测序技术分析黄连根腐病病株及健株根际土壤真菌种群组成、丰度和多样性。用 Spearman 分析土壤理化性质和土壤真菌丰富度前 35 个属的相关性进行分析。结果 高通量测序共获得 106 267 个有效标签 (effective tags), 主要分为子囊菌门、接合菌门、担子菌门、球囊菌门、壶菌门和 Neocallimastigomycota。健株和病株土样真菌种群多样性差异不显著。病株土样中, 子囊菌门、担子菌门和壶菌门的相对丰度显著高于健株土壤; 而接合菌门、球囊菌门和 Neocallimastigomycota 在病株土样的相对丰度则显著低于健株土样。在属水平上, 病株土壤中镰刀菌属的相对丰度显著高于健株土样。Spearman 分析结果表明, 镰刀菌属与 pH 值和速效磷的含量呈显著正相关, 与碱解氮的含量呈显著负相关。结论 土壤理化性质的改变与土壤真菌多样性变化相关。

关键词: 黄连; 根际土; 黄连根腐病; 真菌种群组成; 种群多样性; 丰度

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)22-5396-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.22.026

Illumina high-throughput sequencing reveals fungal community composition and diversity in root rot of *Coptis chinensis* in rhizosphere soil

SONG Xu-hong^{1,2,3}, TAN Jun^{1,2,3}, LI Long-yun^{1,2,3}, WANG Yu^{1,2,3}, WU Xiao-li^{1,2,3}

1. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China

2. Chongqing Engineering Research Center for Fine Variety Breeding Techniques of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China

3. Chongqing Sub-center of National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Science, Chongqing 400005, China

Abstract: Objective To reveal fungal community composition and diversity in health and root rot of *Coptis chinensis* in rhizosphere soil. **Methods** High-throughput sequencing technology was used to characterize the fungal community composition, richness, and diversity of health and root rot *Coptis chinensis* in rhizosphere soil in Shizhu County of Chongqing Province. Spearman analysis was used to evaluate the correlation between soil physicochemical parameters and the first 35 most abundant fungal genera. **Results** More than 106 267 effective tags were obtained, and the community was composed of six phyla (Ascomycota, Zygomycota, Basidiomycota, Glomeromycota, Chytridiomycota, and Neocallimastigomycota). The fungal community diversity showed no significant difference in healthy and root rot samples. The relative abundance of Ascomycota, Basidiomycota and Chytridiomycota in root rot soil was significantly higher than that in healthy soil. Moreover, the relative abundance of Zygomycota, Glomeromycota, and Neocallimastigomycota in root rot soil was significantly lower than in healthy soil. The relative abundance of *Fusarium* was significantly higher in root rot samples than in healthy samples. Spearman analysis showed that the relative abundance of *Fusarium* was significantly positively correlated with pH and available phosphorus, but negatively correlated with alkali-hydrolyzable nitrogen. **Conclusion** Changes in soil physicochemical characteristics were related to the changes in soil fungal diversity.

Key words: *Coptis chinensis* Franch.; rhizosphere soil; root rot of *Coptis chinensis*; fungal community composition; community diversity and richness; abundance

收稿日期: 2018-03-26

基金项目: 中医药现代化研究专项 (SQ2017YFC170397); 国家中药材产业技术体系 (CARS-21); 重庆市现代山地特色高效农业技术体系 (2018-[5]号); 重庆市基本科研业务项目 (2015scstcjbky01904); 重庆市卫计委项目 (ZY201801006, ZY201802038)

作者简介: 宋旭红 (1979—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向为药用植物病虫害及连作障碍研究。E-mail: songxiaoxu2004@126.com

*通信作者 李隆云 (1964—), 男, 博士, 研究员, 主要从事中药栽培与质量评价研究。Tel: (023)89029118 E-mail: lilongyun8@163.com

黄连 *Coptis chinensis* Franch., 又名味连、鸡瓜连, 为毛茛科多年生草本植物, 以根茎入药, 《中国药典》2015 年版一部收录^[1], 是我国常用大宗中药材, 被用来治疗发烧、腹泻、痢疾、黄疸、急性发热和化脓性感染、温病、痢和咽喉痛^[2-3]。黄连传统产区分布在我国西南地区, 包括贵州省、湖北省、湖南省和陕西的南部, 近年来主产地为重庆的石柱县和湖北的利川。然而, 随着黄连栽培面积的不断扩大, 连续栽培等导致石柱黄连病害尤其是黄连根腐病发生日益严重^[4]。

中药材根腐病主要由真菌、细菌、线虫等引起^[5], 根际土壤对植物的健康和土壤肥力至关重要^[6], 根际土壤的真菌群落组成的变化也可影响植物的健康^[6-7]。然而, 迄今为止还没有有效的预防和控制根腐病的方法。因此, 对根腐病的根际土壤真菌群落组成和多样性进行分析是十分必要的。相较于以往 454 测序平台, Hiseq 平台双端 PE250 测序的读长不断增长, 使得基于 Hiseq 测序研究物种多样性的准确性大幅度提高^[8], 该项技术已经被用来揭示三七连作障碍^[6]及苹果再植病害等^[9]土壤微生物群落组成和多样性^[10-11]。

1 材料

黄连根际土壤取自重庆市石柱县黄水镇黄连种植地 (东经 108°26', 北纬 29°59'), 海拔 1 667 m, 年降水量为 1 200 mm, 年平均气温为 16 °C。土壤类型为沙壤土, 采集 3 年生栽培黄连健株及根腐病根际土壤^[4], 分别记为 H.RMS 和 D.RMS, 样品的一部分保存于-80 °C 直至 DNA 提取, 一部分常温阴干后进行 pH 值及土壤养分的测定。

2 方法

2.1 土壤养分测定

土壤 pH 值、有机碳、碱解氮、速效磷和速效钾的测定根据宋旭红等^[4]描述的方法进行测定。

2.2 土壤总 DNA 的提取和真菌 ITS1 序列的扩增

土壤总 DNA 的提取使用美国 MP 生物公司 (Fast DNA™ SPIN Kit for Soil) 土壤 DNA 提取试

剂盒提取土壤总 DNA, 利用琼脂糖电泳检测 DNA 的纯度和浓度, 用灭菌后的超纯水稀释至 1 ng/μL 后存于-80 °C 冰箱待用。使用 ITS5-1737F 和 ITS2-2043R 为引物对 ITS1 区真菌进行扩增^[12]。

2.3 数据分析

土壤 pH 值及养分数据采用 Excel 2003 和 SPSS 16.0 (New York, 美国) 进行分析, 差异显著性分析采用单因素方差分析 (ANOVA)。序列分析使用 QIIME (Version 1.7.0) 软件包进行 α -多样性分析, 观察到的物种种类 (observed-species)、香农指数 (Shannon)、辛普森指数 (Simpson)、Chao 1 和 ACE 5 个指标用来计算物种的 α -多样性。上述结果采用 R 软件 (Version, 2.15.3) 进行展示。稀释度曲线、Venn 图、Spearman 分析和 35 个优势真菌属的热图分析也由 R 软件 (Version 2.15.3) 分析和生成。

3 结果与分析

3.1 土壤 pH 值和养分^[4]

黄连健株 (H.RMS) 和根腐病 (D.RMS) 根际土壤的 pH 值及养分变化 (表 1), 从表 1 可以看出, 根腐病的根际土壤有机碳, 碱解氮显著低于健康植株 ($P<0.05$); 而健康植株根际土壤的 pH 值、速效磷和速效钾的含量却显著低于病株土样 ($P<0.05$)。

3.2 土壤真菌 α -多样性分析

对健株和病株黄连根际土壤真菌进行 α -多样性分析表明 (表 2), 健康的黄连植株根际土壤真菌中, 种群多样性指数 (Shannon 和 Simpson) 显著低于根腐病植株根际土 ($P<0.05$), 种群丰富度指数 (Chao1 和 ACE) 则稍高于病株土样 ($P>0.05$)。

稀释曲线可直接反映测序数据量的合理性, 并间接反映样品中物种的丰富度。从图 1-a 可以看出, 黄连健株和病株根际土壤稀释曲线比较平坦, 说明测序数据量渐进合理, 更多的数据量只会产生少量新的物种 (OTUs), 因此, 本次测序数据量合理。从图 1-b Venn 图可以看出, 黄连健株和病株根际土壤真菌之间有共 1 296 个 OTUs, 健康植株土样

表 1 黄连植株根际土壤营养成分变化 ($n=3$)

Table 1 Nutrient changes in *C. chinensis* rhizosphere soil collected from healthy plants and root rot plants ($n=3$)

黄连植株	pH 值	有机碳/(g·kg ⁻¹)	碱解氮/(mg·kg ⁻¹)	速效磷/(mg·kg ⁻¹)	速效钾/(mg·kg ⁻¹)
H.RMS	5.60 ^b	7.47 ^a	179.40 ^a	135.68 ^b	394.78 ^b
D.RMS	5.78 ^a	6.30 ^b	137.87 ^b	140.89 ^a	961.43 ^a

同列不同字母表示差异显著 ($P<0.05$), 表 2 同

Different letters in same column indicated significant differences ($P < 0.05$), same as table 2

表 2 健康和根腐病的黄连根际土壤真菌 α -多样性Table 2 Alpha-diversity analysis of fungal strains in healthy and root-rot *C. chinensis* rhizosphere soil

黄连植株	物种种类	Shannon	Simpson	Chao1	ACE
H.RMS	1 252 ^a	5.892 ^b	0.935 ^b	1 419.72 ^a	1 481.88 ^a
D.RMS	1 181 ^a	6.178 ^a	0.951 ^a	1 335.36 ^a	1 392.54 ^a

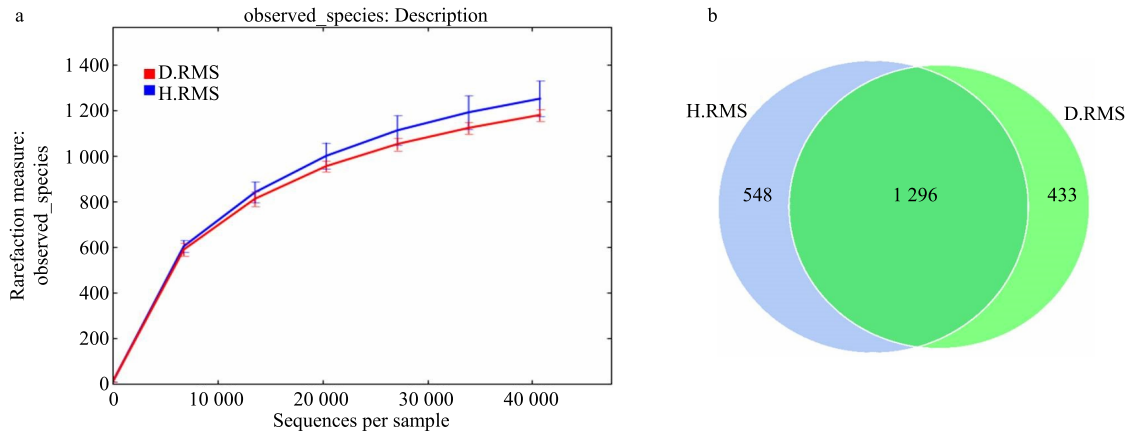


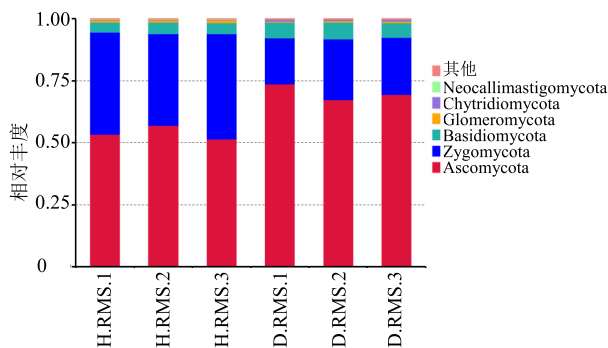
图 1 稀释度曲线 (a) 和 Venn 图 (b)

Fig. 1 Rarefaction curves (a) and Venn diagram (b)

有 548 个特有的 OTUs, 根腐病病株土壤仅有 433 个特有的 OTUs。Venn 图的变化说明, 根腐病导致了黄连根际土壤真菌 OTUs 数的减少。

3.3 黄连健株和病株根际土壤真菌门水平相对丰度分析

从图 2 可以看出, 健株和病株根际土壤真菌组成比较相似。2 个样本中, 优势菌群均为子囊菌门 (Ascomycota)、接合菌门 (Zygomycota) 和担子菌门 (Basidiomycota), 以上菌 (门) 在 2 个样本中的



“其他”表示除这 6 个门之外其他门之和

“others” represents sum of relative abundance of all phyla except those shown in figure

图 2 健康及根腐病植株根际土壤真菌在门水平上的相对丰度

Fig. 2 Relative abundance of different fungal in healthy and root-rot samples in phyla level

相对含量均大于 4%。ANOVA 分析表明, 病株土样中子囊菌门、担子菌门和壶菌门 (Chytridiomycota) 的相对丰度要显著高于健康土样, 而接合菌门、球囊菌门 (Glomeromycota) 和 Neocallimastigomycota 的相对丰度要显著低于健康土样 ($P < 0.05$)。

此外, 病株土壤样本中未知真菌群的相对含量要显著高于健康土样。根据所有样品在属水平的物种注释及丰度信息, 选取丰度排名前 35 的属, 根据其在每个样品中的丰度信息, 从物种和样品 2 个层面进行聚类, 绘制成热图, 可以更直接地显示不同样本中真菌类群的相似性和差异。从图 3 可以看出, 病株土样中 *Etracladium*、*Trichocladium*、*Periconia*、*Aaosphaeria*、镰刀霉属 *Fusarium*、周刺座霉属 *Volutella*、交链孢霉属 *Alternaria*、*Monographella*、*Cystofilobasidium*、*Pseudocercospora*、*Parmicrothyrium*、*Sporothrix*、*Boeremia*、*Clonostrachys*、*Spirosphaera*、木霉属 *Trichoderma*、*Umbelopsis*、*Cladosporium*、*Bisifusarium*、根霉属 *Rhizopus*、青霉菌属 *Penicillium*、赤霉菌属 *Gibberella*、*Heterodermia*、*Cercospora*、毛壳菌属 *Chaetomium* 和轮枝孢属 *Verticillium* 较健株土样具有较高的物种相对丰度, 其中根霉属仅在病株土样中出现, 而健康植株根际土样中 *Microidium*、*Phallus*、*Fusicolla*、*Pachycudonia*、*Talaromyces*、

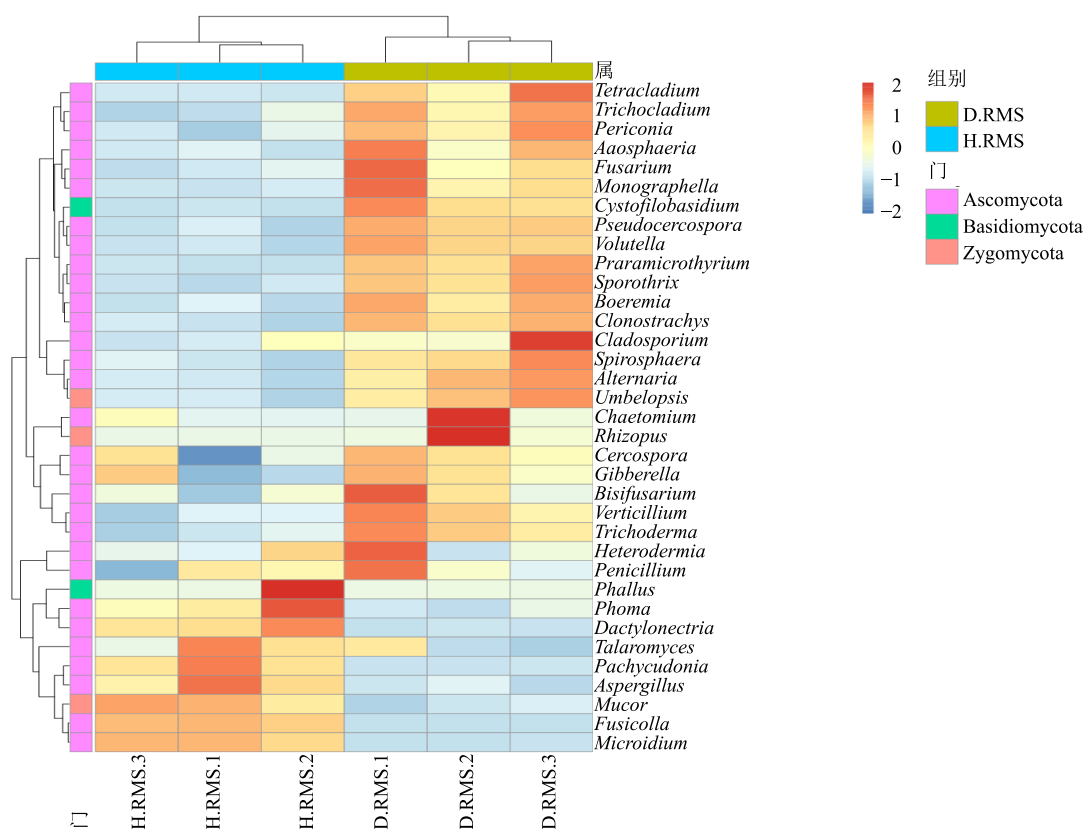


图 3 健株和病株黄连根际土壤真菌物种丰度聚类图

Fig. 3 Distribution of first 35 most abundant fungal genera among healthy and root-rot *C. chinensis* rhizosphere soil samples

Dactylonectria、曲霉属 *Aspergillus*、毛霉属 *Mucor* 和茎点霉属 *Phoma* 相对丰度则高于病株土样。

3.4 黄连健株及病株根际土壤真菌聚类分析

以 Weighted UniFrac 距离矩阵做 UPGMA 聚类分析，并将聚类结果与各样品在门水平上的物种相对丰度整合展示在图 4 中，3 个病株样本和 3 个健株样本分别聚在一起，这种结果说明，黄连健株与病株的根际土壤真菌存在明显差异。

3.5 根际土壤真菌多样性与土壤环境因子之间的相关性分析

在本研究中，Spearman 分析被用来评估土壤环境因子与排名在前 35 的土壤真菌属相对含量之间的相关性，从图 5 可以看出，pH 值与轮枝孢属，*Sporothrix*、*Trichocladium*、*Periconia*、*Monographella*、镰刀霉属和木霉属的相对丰度呈显著正相关，与 *Dactylonectria*、*Pachycudonia*、*Fusicolla*、曲霉属和

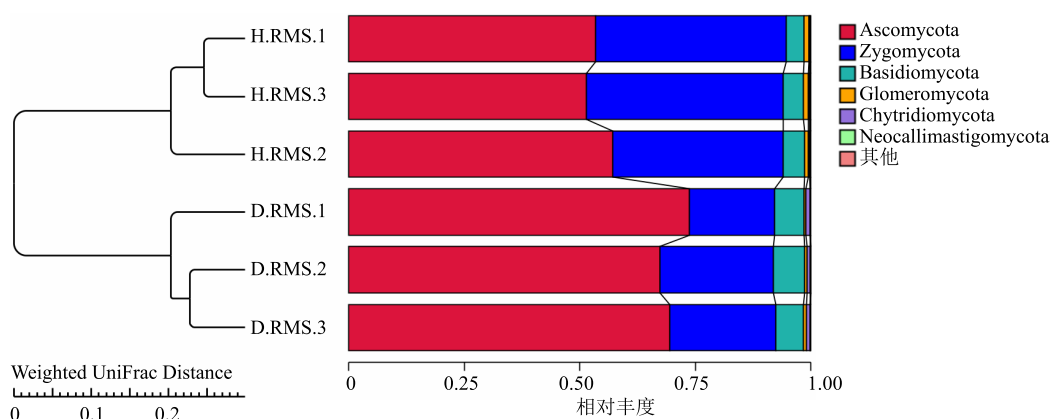


图 4 基于 Weighted UniFrac 距离的 UPGMA 聚类树

Fig. 4 UPGMA clustering tree based on Weighted UniFrac distance

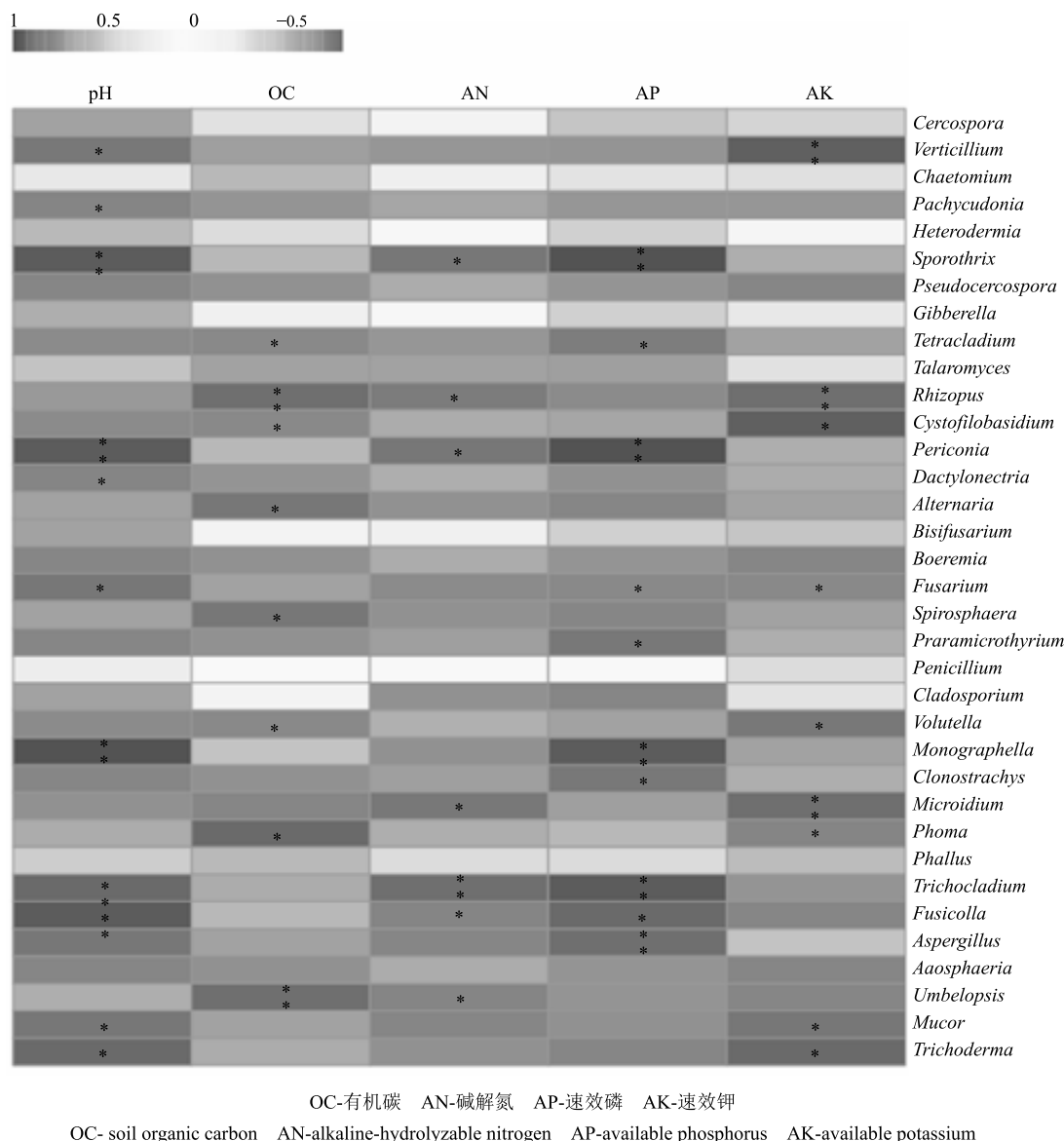


图 5 土壤真菌丰度前 35 的菌属与土壤环境因子之间 Spearman 分析

Fig. 5 Spearman analysis between soil physicochemical properties and first 35 most abundant fungal genera

毛霉属的相对丰度呈显著负相关。有机碳的含量与 *Tetraccladium*、根霉属、*Spirosphaera*、*Umbelopsis*、*Cystofilobasidium*、交链孢霉属和周刺座霉属含量显著负相关，仅与茎点霉属相对含量显著正相关。碱解氮含量仅与 *Microdium* 含量呈显著正相关，与 *Sporothrix*、根霉属、*Periconia*、镰刀霉属、*Umbelopsis* 和 *Trichocladium* 含量呈显著负相关。有效磷的含量与 *Sporothrix*、*Periconia*、*Tetraccladium*、*Paramicrothyrium*、*Clonostachys*、镰刀霉属、*Trichocladium*、*Monographella* 相对含量呈显著正相关，与曲霉属含量呈显著负相关。速效钾含量与根霉属、轮枝孢属、*Cystofilobasidium*、木霉属和周刺

座霉属相对含量呈显著正相关，与 *Fusicolla*、茎点霉属、*Microdium* 和毛霉属相对含量呈显著负相关。

4 讨论

本研究采用 HiSeq2500/PE250 测序平台对黄连健株及病株土样真菌进行高通量测序分析，最终得到 Effective Tags 序列共 106 267 条，其中健株土样有 53 280 条，病株土样有 52 987 条。用于后续分析的 Effective tags 数目之多，说明采用该方法适合用于黄连健株和根腐病病株根际土壤真菌种群组成及变异分析。

相较于接合菌门、担子菌门、球囊菌门、壶菌门和 Necallimastigomycota、子囊菌门在健株和病株

土样真菌类群中占显著优势,这个结果与前人对连作三七^[6]和大豆^[7]根际土壤真菌的研究结果一致。

土壤微生物群落由于其在许多生态系统过程中的重要作用而被广泛认为是土壤质量的一个综合组成部分^[13]。微生物种群的多样性和变异性对土壤质量、功能和土壤生态系统的可持续发展起着重要作用^[14],土壤微生物多样性是决定土壤健康的主要因素之一^[15]。土壤微生物群落组成、群落类型或微生物生物量的变化可以反映土壤质量的变化^[16]。真菌在土壤生态系统中起着重要的作用,它负责植物残体的分解和植物病害^[6]。对健康及染根腐病的黄连植株根际土真菌群落的研究表明,健株土样真菌群落的丰富度高于病株土样,同时在病株土样中,保持较高丰富度的属(27个)占全部抽查属(35个)的 77.14%,这就意味着在病株根际土壤真菌中,相对丰度发生明显变化(在属水平上)的百分比就有 77.14%。从图 3 可以看出,有些致病性较强的属(镰刀菌属和交链孢霉属等)在健株和病株土样中的相对丰度更是发生了较大变化,因此推断,较低的种群丰富度和较多的属尤其是致病性较强属的真菌相对丰度的变化造成了黄连根际土壤质量的改变,从而导致了黄连根腐病的发生。

镰刀菌属真菌中的尖孢镰刀菌 *F. oxysporum* 和腐皮镰刀菌 *F. solani* 被认为是造成中药材根腐病的 2 种重要病菌^[5],腐皮镰刀菌在 2012 年被首次发现是造成石柱黄连根腐病的一种致病菌^[17]。然而,在本研究中,尖孢镰刀菌为镰刀菌属优势菌,该菌在健康土样中相对含量为 0.575%,在病株土样中相对含量为 0.779%,而腐皮镰刀菌在健株和病株土壤真菌中的相对含量仅为 0.016%和 0.002%。尖孢镰刀菌是一种典型的土传病害真菌^[18],对欧盟一些国家的观赏性植物造成严重危害^[19],是造成植物枯萎^[20-21]、猝倒^[22-23]、中药材根腐病^[5]的一类重要土传真菌。前人的研究及在本研究中出现相对含量较高的尖孢镰刀菌的现象表明,尖孢镰刀菌有可能是造成黄连根腐病的又一个重要病原真菌。此外,交链孢霉属真菌可引起苹果核腐病^[24]、白叶枯^[25]、叶斑病^[26-28]和腐烂^[29]。本研究发现,病株土样真菌中的链格孢菌数量是健康土样的 3.2 倍。链格孢菌 *A. alternata* 和细极链格孢 *A. tenuissima* 在病株样本中的比例比健康土样中明显增高。对中药材根腐病病原菌的研究表明,同一寄主在不同产地的根腐病病原菌是不同的,同一地区的主要病原菌在种植年限内也有所

不同^[5]。因此,针对一种病原菌的简单的分离和回接,并不足以深入了解黄连根腐病致病菌,采用高通量技术和传统方法相结合的方式,更有助于对黄连根腐病致病菌、致病机制进行深入研究。

研究根际土壤中的微生物群落,也为探索土壤中存在拮抗微生物提供了新的线索^[30-31]。木霉属真菌因其在生物防治中的应用潜力而备受关注^[15,19,32],在本研究中,木霉属真菌在病株和健株土样中的相对含量分别为 21.88%和 15.27%,钩状木霉 *T. hamatum* 和厚木霉 *T. crassum* 和哈茨木霉 *T. harzianum* 均为 2 种土样中的优势种。*Metarhizium anisopliae* 和 *M. carneum* 是绿僵菌属 *Metarhizium* 的 2 种优势菌,其中 *M. anisopliae* 为温带土壤中最丰富的一种昆虫病原真菌^[33-35],被广泛地作为微杀虫剂使用^[36-38]。如何充分利用土壤真菌中的优质拮抗或者防真菌,是关系到石柱黄连生态化种植的一个重要研究课题。

植物根系的健康状态是植物、土壤物理环境和化学环境以及土壤中微生物(病原体本身以及其他微生物)之间复杂的相互作用的结果^[39]。土壤的养分和 pH 值可能限制真菌的存活和生长,从而直接改变真菌群落组成^[21]。Spearman 分析表明,木霉属真菌的相对丰度与 pH 值和速效钾的含量呈显著正相关,交链孢属真菌与有机碳的含量呈显著正相关,镰刀菌属真菌与 pH 值和速效磷的含量呈显著正相关,与碱解氮的含量显著负相关。因此,通过人工施肥等措施改变根际土壤 pH 值及养分等理化性质,从而调整病原菌和有益真菌的比例,对今后预防黄连根腐病的发生具有重要意义。

总之,黄连根际土壤真菌种群丰富度的下降和较多的尤其是致病性较强的几个属的真菌相对丰度的增加,改变了黄连根际土壤的质量,从而有可能导致黄连根腐病的发生。另外,黄连根际土壤过氧化物酶活性的显著降低,造成黄连根部有毒害物质的过度积累,也是造成黄连根腐病发生的一个重要原因。采用高通量测序分析的方法,可以更好地去理解黄连健株和病株土样真菌之间的差异及组成,从而为解决黄连根腐病病害提供更好的思路和方法。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] Tang W, Eisenbrand G. *Coptis* spp. *Chinese Drugs of Plant Origin* [M]. New York: Springer-Verlag, 1992.

- [3] Chao T H, Chao H F, Shi L S, *et al.* Alkaloids from *Coptis chinensis* root promote glucose uptake in C2C12 myotubes [J]. *Fitoterapia*, 2014, 93(8): 239-244.
- [4] 宋旭红, 王 钰, 李隆云, 等. 石柱黄连根腐病根际土壤细菌微生态研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(7): 1304-1311.
- [5] 高 芬, 任小霞, 王梦亮, 等. 中草药根腐病及其微生物防治研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(21): 4122-4126.
- [6] Tan Y, Cui Y S, Li H Y, *et al.* Rhizospheric soil and root endogenous fungal diversity and composition in response to continuous *Panax notoginseng* cropping practices [J]. *Microbiol Res*, 2017, 194(9): 10-19.
- [7] Bai L, Cui J Q, Jie W G, *et al.* Analysis of the community compositions of rhizosphere fungi in soybeans continuous cropping fields [J]. *Microbiol Res*, 2015, 180: 49-56.
- [8] Luo C W, Tsementzi D, Kyrpides N, *et al.* Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30087.
- [9] Sun J, Zhang Q, Zhou J, *et al.* Illumina amplicon sequencing of 16S rRNA tag reveals bacterial community development in the rhizosphere of apple nurseries at replant at a replant disease site and a new planting site [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e111744.
- [10] Caporaso J G, Lauber C L, Walters W A, *et al.* Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms [J]. *ISME J*, 2012, 6(8): 1621-1624.
- [11] Degnan P H, Ochman H. Illumina-based analysis of microbial community diversity [J]. *ISME J*, 2012, 6(1): 183-194.
- [12] Magoč T, Salzberg S L. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [13] Yao H Y, Jiao X D, Wu F Z. Effects of continuous cucumber cropping and alternative rotations under protected cultivation on soil microbial community diversity [J]. *Plant Soil*, 2006, 284(1/2): 195-203.
- [14] Kennedy A C, Smith K L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils [J]. *Plant Soil*, 1995, 170(1): 75-86.
- [15] Gajera H, Domadiya R, Patel S, *et al.* Molecular mechanism of *Trichoderma* as bio-control agents against phytopathogen system-a review [J]. *Curr Res Microbiol Biotechnol*, 2013, 1(3): 133-142.
- [16] Liu J, Wu F Z, Yang Y. Effects of cinnamic acid on bacterial community diversity in rhizosphere soil of cucumber seedlings under salt stress [J]. *Agr Sci China*, 2010, 9(2): 266-274.
- [17] Luo X M, Li J L, Dong J Y, *et al.* First report of *Fusarium solani* causing root rot on *Coptis chinensis* in Southwestern China [J]. *Plant Dis*, 2014, 98(9): 1273.
- [18] Gordon T R, Martyn R D. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum* [J]. *Annu Rev Phytopat*, 1997, 35(35): 111-128.
- [19] Lecomte C, Alabouvette C, Edel-Hermann V, *et al.* Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: A review [J]. *Biol Control*, 2016, 101(19): 17-30.
- [20] Basallote-Ureba M J, Vela-Delgado M D, Capote N, *et al.* Control of Fusarium wilt of carnation using organic amendments combined with soil solarization, and report of associated *Fusarium* species in southern Spain [J]. *Crop Prot*, 2016, 89(21): 184-192.
- [21] Zhang D, Meng K X, Hao Y H, *et al.* Comparative proteomic analysis of cucumber roots infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium* Owen [J]. *Physiol Mol Plant P*, 2016, 96: 77-84.
- [22] Ortu G, Bertetti D, Gullino M L, *et al.* A new forma specialis of *Fusarium oxysporum* on *Crassula ovata* [J]. *J Plant Pathol*, 2013, 95(1): 33-39.
- [23] Lamprecht S C, Tewoldemedihin Y T. *Fusarium* species with damping-off rooibos seeding and the potential of compost as soil amendment for disease suppression [J]. *S Afr J Bot*, 2016, 110: 110-117.
- [24] Ntasiou P, Myresiotis C, Konstantinou S, *et al.* Identification, characterization and mycotoxigenic ability of *Alternaria* spp. causing core rot of apple fruit in Greece [J]. *Int J Food Microbiol*, 2015, 197: 22-29.
- [25] Landschoot S, Carrette J, Vandecasteele M, *et al.* Boscalid-resistance in *Alternaria alternata* and *Alternaria solani* populations: An emerging problem in Europe [J]. *Crop Prot*, 2017, 92(6): 49-59.
- [26] Pati P K, Sharma M, Salar R K, *et al.* Studies on leaf spot disease of *Withania somnifera* impact on secondary metabolites [J]. *Indian J Microbiol*, 2008, 48(4): 432-437.
- [27] Furukawa T, Kishi K. *Alternaria* leaf spot on three species of pelargonium caused by *Altrrnaria alternata* in Japan [J]. *J Gen Plant Pathol*, 2013, 67(4): 268-272.
- [28] Basim E, Basim H, Abdulai M, *et al.* Identification and characterization of *Alternaria alternata* causing leaf spot of olive tree (*Olea europaea*) in Turkey [J]. *Crop Prot*, 2017, 92(12): 79-88.

- [29] Yang J L, Sun C, Zhang Y Y, *et al.* Induced resistance in tomato fruit by γ -aminobutyric acid for the control of alternaria rot caused by *Alternaria alternate* [J]. *Food Chem*, 2017, 221(56): 1014-1020.
- [30] Berendsen R L, Pieterse C M J, Bakker P A H M. The rhizosphere microbiome and plant health [J]. *Trends Plants Sci*, 2012, 17(8): 478-486.
- [31] Han Y S, Xu L X, Liu L Q, *et al.* Illumina sequencing reveals a rhizosphere bacterial community associated with foxtail millet smut disease suppression [J]. *Plant Soil*, 2017, 410(1/2): 411-421.
- [32] Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti E L, *et al.* Trichoderma-plant-pathogen interactions [J]. *Soil Biol Biochem*, 2008, 40(1): 1-10.
- [33] Bidochka M J, Kasperski J E, Wild G A M. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats [J]. *Can J Bot*, 1998, 76(7): 1198-1204.
- [34] Keller S, Kessler P, Schweizer C. Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae* [J]. *Biol Control*, 2003, 48(3): 307-319.
- [35] Klingen I, Eilenberg J, Meadow R. Effects of farming system, field margins and bait insects on the occurrence of insect pathogenic fungi in soils [J]. *Agr Ecosyst Environ*, 2002, 91(1/3): 191-198.
- [36] Wakil W, Ghazanfar M U, Riasat T, *et al.* Effects of interactions among *Metarhizium anisopliae*, *Bacillus thuringiensis* and chlorantraniliprole on the mortality and pupation of six geographically distinct *Helicoverpa armigera* field populations [J]. *Phytoparasitica*, 2013, 41(2): 221-234.
- [37] Jarrahi A, Safavi S A. Fitness costs to *Helicoverpa armigera* after exposure to sub-lethal concentrations of *Metarhizium anisopliae* sensu lato: Study on F1 generation [J]. *J Invertebr Pathol*, 2016, 138(7): 50-56.
- [38] Zimmermann G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* [J]. *Biocontrol Sci Techn*, 2007, 17(9/10): 715-728.
- [39] Xu L H, Ravnskov S, Larsen J, *et al.* Soil fungal community structure along a soil health gradient in pea fields examined using deep amplicon sequencing [J]. *Soil Biol Biochem*, 2012, 46(1): 26-32.