

新疆棉花长期连作对土壤真菌群落结构组成的影响*

陈一峰¹ 高亚楠² 朱杰² 张伟^{2**}

(1. 新疆农业科学院微生物应用研究所 乌鲁木齐 830000; 2. 新疆师范大学生命科学学院 乌鲁木齐 830046)

摘要 土传性真菌病害给新疆连作棉花造成巨大损失, 为了解新疆地区棉花在长期连作过程中土壤真菌群落结构演替与作物产量的增减及病虫害的发作规律。本文利用 18S rRNA-PCR-DGGE 法对比研究了新疆石河子棉区分别连作 0 a(未开垦土壤)、1 a、3 a、5 a、10 a、15 a 和 20 a 棉田 0~40 cm 范围内 4 个不同深度土壤中真菌群落组成的变化规律。结果表明, 相同深度的土壤样品中真菌群落结构随着连作年限的延长 Shannon-Weiner 多样性指数、丰富度指数和均匀度指数都表现为不同程度下降后又增加并达到新的稳定状态, 其中 11~20 cm 深度的样品下降最多、最快。聚类分析结果表明, 相同深度的土壤样品随连作年限延长也表现出快速变化后并达到新的稳定状态, 其中不同深度样品中真菌群落受影响最大的连作年限不同。主成分分析显示, 连作年限对真菌群落结构形成直接影响, 但随着连作年限延长, 样品中真菌群落结构的变化趋缓, 甚至有恢复迹象。部分 DGGE 条带回收、测序并比对后发现, 100% 的序列信息都属于未培养真菌。整体上连作棉田真菌群落结构变化及演替规律与棉花连作有很强的关联性。

关键词 连作 棉田 土壤 真菌群落 多样性指数 群落结构相似性 群落演替
中图分类号: Q938 **文献标识码**: A **文章编号**: 1671-3990(2015)01-0080-07

Analysis of the fungal community in continuous cropping cotton field of Xinjiang using 18S rDNA-PCR-DGGE

CHEN Yifeng¹, GAO Yanan², ZHU Jie², ZHANG Wei²

(1. Institute of Applied Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830000, China;
2. College of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi 830046, China)

Abstract Long-term continuous cropping of cotton has caused dramatic soil-borne diseases in many places, leading to substantial agricultural losses. However, in some areas of Xinjiang Uygur Autonomous Region, the obstacles caused by continuous cotton cropping can spontaneously restore and maintain high yields of cotton for many years. To analyze the variable spectrum of soil fungal communities and changes in the community structure in these spontaneously restored fields during cropping, soils at depths of 1 to 10 cm, 11 to 20 cm, 21 to 30 cm and 31 to 40 cm were sampled from cotton fields with a history of 0 a (unused field), 1 a, 3 a, 5 a, 10 a, 15 a or 20 a of cotton cropping in the Shihezi Region of Xinjiang Uygur Autonomous Region. The fungal communities in these samples were studied using 18S rRNA-based polymerase chain reaction-density gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE). Fungal community diversity indices including the Shannon-Wiener diversity index, abundance index and evenness index were compared among these samples. Samples from the unused field had relatively high levels of those three indices. With increasing years of cotton cropping, the fungal abundance, diversity and evenness indices descend, whereas those three indices showed a different decrease in different depth. However, after 10 a of continuous cropping, all these indices were restored to their original values or reached a relative stable level. Cluster analysis of DGGE fragments indicated that the samples of each depth were clustered into different branches. Soil fungi of 21-30 cm plow layer was most significantly affected by continuous cropping. Soil fungi community obviously fluctuated in different depths. Principal component analysis (PCA) showed that at each soil depth, the first two principal components were of the greatest importance and had a combined variance contribution rate >60.1%. Except for the 11-20 cm and 21-30 cm depths of the 1 a continuous cropping soil, all of the cotton soils were positively correlated with the first principal

* 国家自然科学基金项目(31460108)和“新疆师范大学微生物重点学科资助”项目资助

** 通讯作者: 张伟, 主要研究方向为微生物生态。E-mail: zw0991@sohu.com

陈一峰, 主要研究方向为棉花田微生物生态。

收稿日期: 2014-09-22 接受日期: 2014-11-15

component and fluctuated on the right of the first principal component between the positive and negative axes of the second principal component. Both cluster analysis and PCA results suggested that, compared to that from original uncropped field, the fungal community structure showed the most variation in samples from the depth of 11–30 cm of continuously cropped soils. Twenty-four clones were sequenced and submitted to GenBank (accessory no. JN572633 to JN572656). By aligning with the GenBank database, all sequences from DGGE were classified into three groups: *Mitosporic* fungi, Uncultured fungi, and *Pyronemataceae*. Further analysis demonstrated that the isolated sequences showed a homology of 98.5%–100% to known sequences in GenBank and 100% of the sequences belonged to fungium which were not cultured. No microbial data were correlated with soil-borne plant diseases of cotton. The study demonstrated that the age of cotton fields had significant effects on soil fungal diversity. Continuous cotton cropping exerted significant influences on the community structure of soil fungus in Xinjiang Uygur Autonomous Region, with an initial suppression effect on fungal diversity. However, the fungal community reached a stabilized level or a new balance compared with its original state after 10 a of continuous cropping.

Keywords Continuous cropping; Cotton field; Soil; Fungi community; Diversity indices; Community structure similarity; Community succession

(Received Sep. 22, 2014; accepted Nov. 15, 2014)

新疆维吾尔自治区(简称新疆)是我国最早种植棉花的地区之一,也是目前我国唯一的长绒棉种植基地。由于新疆地区具有日照充足,降水稀少,空气干燥,昼夜温差大和利用雪水人工灌溉等各种独具特色的适于棉花种植的自然环境条件,自20世纪80年代以来新疆棉花的种植面积不断扩大,到今年为止新疆棉花在种植面积、总产量、平均亩产等7项指标上已连续22年位居全国首位^[1]。与此同时,由于新疆农作物种类单一,长期以来棉花连作现象严重,尤其是主产区,棉花种植面积占到95%以上,倒茬、轮作几乎是不可能的。起初棉花在新疆连作也带来了病虫害持续加重、土壤中农药、化肥、地膜污染长期积累等生态问题^[2],但随着连作年限的继续延长,棉区局部地区长期连作后并未形成规律性的连作障碍,且常年能保持高产、稳产,这一现象引起大家的关注。

DGGE技术是近年来国内外研究微生物分子生态的重要技术手段,可用来监测特定生境中微生物群落结构及其在时间或空间上的动态变化,也可以对环境中的微生物多样性进行定性和半定量分析^[3]。1993年Muyzer等^[4]首次将该技术应用于微生物生态学的研究,随后该技术被广泛应用于其他各种环境微生物生态学的研究,如湖泊、海洋、活性污泥、土壤等,目前在土壤微生物生态研究领域应用非常广泛^[5–6]。

客观上新疆棉花主产区同时存在着棉花连作时间跨度从0~30 a的各类棉田,长期的棉花种植形成了独特的棉田土壤微生物群落^[7–8]。这些微生物参与土壤物质转化过程,在土壤形成、肥力演变、农业污染物的降解和土壤结构的形成与改良等方面起重要作用,但长期棉花连作使得该地区土壤微生物群落结构由细菌型向真菌型转变,尤其是对土族真菌群落结构带来的影响和棉花连作后连作障碍的发生及自然消除之间的关系还不清楚。本研究采用PCR-DGGE

技术,利用新疆拥有的不同连作年限棉田,探讨随着棉花连作年限的延长,土壤中真菌群落在组成、多样性和演替等方面发生的变化,尝试从土壤微生物生态的角度解释新疆棉花长期连作后连作障碍自发消除,以及该地区棉花种植过程中病虫害的发生规律与土壤微生物群落结构演替的关系。

1 材料和方法

1.1 样品的采集

采样时间、方式和位置:依据当地农技推广站的记载,2011年8月于新疆石河子高产棉区,选择棉花连作年限为0 a(未开垦土壤)、1 a、3 a、5 a、10 a、15 a和20 a的棉田分别收集土壤样品。土钻垂直打下40 cm深度取土,1~10 cm、11~20 cm、21~30 cm和31~40 cm深度分别取样,相同深度的相同连作年限棉田至少选择5处不同地点采集等量样品,混合后作为一个土样,合计为28个土样。采样范围为85°21'81"~85°25'55"E,44°25'47"~44°26'96"N。土样采集后低温保存带回实验室,-4 °C储存7 d内使用。

1.2 样品总DNA的提取和纯化

DNA的提取参照Zhou等^[9–10]的SDS based DNA extraction法,唯一改动之处是,在氯仿、异戊醇抽提前多加了一步等体积的酚、氯仿和异戊醇抽提。DNA纯化参照Moreira^[11]的方法。

1.3 18S rRNA片段的PCR扩增

第1套PCR:用真菌的通用引物NS1/NS2+10(5'-CCAGTAGTCATATGCTTGTC-3',5'-GAATTACCGCGGCTGCTGGC-3')扩增近全长的18S rRNA^[12]。25 μL反应体系:2.5 mmol·L⁻¹的dNTP 2.8 μL,2.5 μL 10×Buffer,1uTaq酶,上下游引物各3 pmol。反应程序:94 °C,5 min;94 °C,60 s;65 °C(前20个循环每个循环降0.5 °C,降至55 °C),45 s;72 °C,60 s(后10个循环每个循环增加1 s);共30个循环;72 °C,5 min后稳定在4 °C。

第2套PCR:用NS26/518rGC(5'-CTGCCCTAT

CAACTTTCGA-3', 5'-CGCCC GCCGCGCGCGGG CGGGGCGGGGCACGGGGGATTACCGCGGCT GCTGG-3')引物扩增真菌18S rRNA间隔区^[13]。25 μL反应体系: 稀释100倍的第1套PCR产物1 μL, 2.5 mmol·L⁻¹的dNTP 2.8 μL, 2.5 μL 10×Buffer, 1 U Taq酶, 引物各5 pmol。反应程序: 94 °C, 5 min; 94 °C, 60 s; 65 °C (前20个循环每个循环降0.5 °C, 直至降到55 °C)45 s; 72 °C, 60 s; 共30个循环; 72 °C, 5 min后稳定在4 °C。

1.4 PCR产物的DGGE电泳

第2套PCR产物用D-code System电泳仪(Bio-Rad公司)进行DGGE电泳分离。制备变性梯度凝胶, 使PAGE胶浓度为6%~8%, 变性梯度30%~70% (7 mol·L⁻¹尿素和40%甲酰胺为100%变性), 电泳缓冲液为1×TAE, 25 μL PCR产物在60 °C、150 V条件下电泳4 h, 取出后用硝酸银法染色^[14]。FR-200紫外与可见分析装置(复日科技)下进行拍照。

1.5 条带数据处理

数据为3次重复的平均值, 采用Quantity One v4.62、Gel-Pro analyzer、SPSS 16.0和Excel等软件进行DGGE指纹聚类[采用未加权算术平均组对法(unweighted

pair group with mathematical averages, UPGAMA)、平均吸光值、主成分(PCA)]和相关方差分析。用Shannon-Wiener指数(H)、丰富度(S)和均匀度(E_H)来评价土壤真菌群落的多样性, 其算式为:

$$H = -\sum_{i=1}^S p_i \ln p_i \quad (1)$$

$$E_H = H/H_{\max} = H/\ln S \quad (2)$$

式中: p_i 为某一条带的强度与同泳道中所有条带总强度的比值, H_{\max} 为最大物种多样性指数, S 为每一泳道总的条带数。根据泳道的 p_i 值进行PCA分析^[15]。

1.6 回收DGGE条带序列分析

回收电泳图中灰度大, 并与对照样品中有明显不同的条带, 送予上海生物工程股份有限公司测序。合计24个18S条带被测, 并申请了GenBank序列号, 分别是JN572633~JN572656。所有数据在NCBI数据库中用Blast软件进行信息分析并构建进化树。

2 结果与分析

2.1 真菌群落结构多样性变化

多样性指数结果(表1)显示, 在1~10 cm土壤深

表1 不同连作年限及土壤深度下棉花土壤真菌DGGE多样性指数变化

Table 1 Diversity properties of cotton soil fungus using DGGE bands pattern data under different continuous cropping years and soil depths

土壤深度 Soil depth (cm)	连作年限 Continuous cropping years (a)	Shannon-Wiener 指数 Shannon-Wiener index	丰富度指数 Richness index	均匀度指数 Evenness index
1~10	0	1.97±0.2d	8±1.0b	0.95±0.05bc
	1	1.46±0.8bc	5±0.5a	0.90±0.04b
	3	1.19±0.2a	5±0.5a	0.74±0.04a
	5	0.99±0.3a	3±0.5a	0.90±0.06b
	10	1.59±0.4b	6±0.3ab	0.89±0.03b
	15	0.99±0.2a	4±0.5a	0.71±0.06a
	20	1.28±0.5ab	5±0.5a	0.79±0.05a
11~20	0	1.37±0.9c	4±0.4ab	0.99±0.07b
	1	1.16±0.7bc	4±0.3ab	0.84±0.05a
	3	1.48±0.8d	5±0.2b	0.92±0.03ab
	5	0.00±0.1a	1±0.1a	—
	10	1.03±0.4b	3±0.2a	0.94±0.05ab
	15	0.68±0.3a	2±0.2a	0.99±0.05b
	20	0.87±0.1a	3±0.3a	0.79±0.05a
21~30	0	1.80±0.7d	7±0.5ab	0.92±0.07c
	1	1.27±0.3ab	6±0.5a	0.70±0.06a
	3	1.74±0.6cd	10±1.0c	0.72±0.03a
	5	1.60±0.6c	6±0.5a	0.89±0.08bc
	10	1.17±0.2a	6±0.5a	0.65±0.04a
	15	1.05±0.3a	4±0.2a	0.76±0.03ab
	20	1.37±0.3b	6±0.2a	0.76±0.04ab
31~40	0	2.10±0.7d	9±0.5c	0.95±0.08a
	1	1.24±0.6c	4±0.3a	0.90±0.07a
	3	1.03±0.4b	3±0.1a	0.94±0.06ab
	5	1.67±0.7d	6±0.5b	0.93±0.04ab
	10	0.91±0.1a	3±0.4a	0.82±0.05a
	15	0.72±0.1a	2±0.2a	1.04±0.09bc
	20	1.42±0.5c	5±0.3ab	0.88±0.06a

同列不同小写字母表示不同年限之间差异显著($P<0.05$)。Different small letters in the same column indicate significant difference among different years at 0.05 level.

度, Shannon-Wiener 指数随连作年限的延长快速下降, 至第 5 a 达到最低点并反弹后稳定在连作 3 a 左右的水平; 均匀度指数和丰富度指数也经历类似变化。在 11~20 cm 深度, Shannon-Wiener 指数连作第 1 a 快速下降, 第 3 a 快速反弹, 之后反复剧烈地在很低的水平范围内波动, 均匀度指数和丰富度指数同样也经历类似变化。在 21~30 cm 深度, Shannon-Wiener 指数和丰富度指数缓慢持续的下降到连作 15 a, 只在第 3 a 出现反弹, 而均匀度指数则相对平稳。在 31~40 cm 深度, 连作导致 Shannon-Wiener 指数连续下降, 至第 5 a 出现反弹, 之后经历反复波动后稳定在连作 1 a 的水平, 丰富度指数变化类似, 均匀度指数则变化不大。多样性指数被用来衡量一个生态环境中物种的多样性, 各指数代表的内容各不相同, 通过对比不同连作年限不同深度土壤各样品 Shannon-Wiener 指数、均匀度指数和丰富度指数的变化, 发现棉花在 0~20 a 连作过程中对土壤真菌群落产生了很大影响, 年限不同、深度不同, 影响程度也不同。其中在 11~30 cm 深度范围, Shannon-Wiener 指数和丰富度指数变化最剧烈, 可能原因是这个深度是棉花根系分布最多, 也是和土壤进行物质交换

最密切的区域, 对土壤中微生物的影响也最大。所有样品中均匀度指数总体变化不大, 可能原因是棉花连作导致了该群体中总体类群的变化, 但个体的丰富度变化不大。

2.2 群落结构相似性

通过分析 DGGE 电泳图谱中代表各种类真菌条带的变化可以对比出各样品间相似性。聚类分析显示, 在 1~10 cm 深度, 连作 1 a 和 15 a 的样品相似性超过 52%; 连作 3 a、10 a 和 20 a 的聚为一类, 相似性为 44%。在 11~20 cm 深度, 连作 3 a、10 a 和 15 a 的聚为一类, 相似性为 38%; 其他的聚为一类, 相似性仅为 16%。在 21~30 cm 深度, 连作 1 a 和 10 a 的样品首先聚在一起, 相似性高达 65% 以上; 其他样品按照 20 a、5 a、15 a、0 a 和 3 a 的顺序依次聚到一起, 最低相似性也达 30%。在 31~40 cm 深度, 连作 1 a、3 a 和 5 a 的较为相似, 连作 15 a 和 20 a 的较为相似(图 1)。总体对比后可知, 在耕作层的 21~30 cm 深度, 连作对土壤真菌影响最大, 并且在各深度真菌类群都明显表现出反复波动^[16-17]。原因可能与新疆半年耕作、半年休作的耕作制度有关, 但在棉花长期连作影响下, 总体上还是发生了连续的变化。

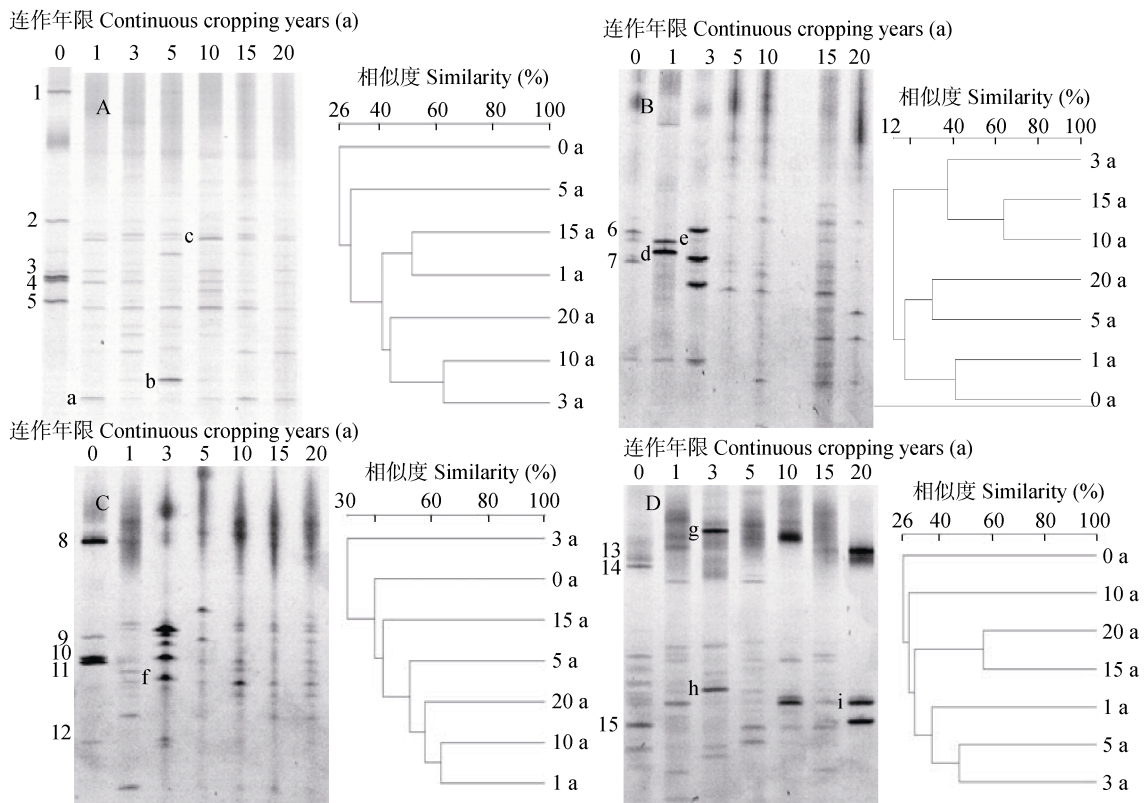


图 1 不同深度(A: 1~10 cm、B: 11~20 cm、C: 21~30 cm、D: 31~40 cm)土壤样品不同连作年限 DGGE 电泳图(左)和聚类图(右)

Fig.1 DGGE electrophoretogram (left) and cluster analysis (right) of different soil depths (A: 1~10 cm; B: 11~20 cm; C: 21~30 cm; D: 31~40 cm) under different continuous cropping years 1~15 和 a~i 指回收的条带 Lanes 1~15 and a~i are the excised bands.

2.3 系统进化和主成分分析

PCA分析了不同深度连作棉田土壤真菌群落结构的变化。在各深度土壤中前两个主成分复合贡献率都超过60.1%。除11~20 cm和21~30 cm连作1 a样品以外,其他所有样品都与第1主成分呈正相关,并都在第2主成分轴右侧上下波动(图2)。说明连作年限是导致真菌群落变化的主要原因,而反复的波动说明土壤真菌群落自身有一定的修复能力和在新选择压力下具有趋于达到新平衡的趋势^[18]。

回收了DGGE凝胶上24个条带,其序列被送去测序。条带1~15是未开垦对照样品中灰度最大、最能代表未开垦土壤真菌类群的条带,条带a~i是连作后新出现的灰度较大的条带,最能代表连作后发生较大改变的真菌类群(图1)。这些序列在GenBank数据库中的登录号分别是JN572633~JN572656。在NCBI网上利用Blast工具对这些序列分析后发现,这些序列与库中序列相似性介于83%~100%(图3),并且都属于未培养真菌,因此推断其他没有分析的条带中大多数也都代表着未知的真菌类群^[19-20]。

3 讨论与结论

DGGE是一种分析微生物群落结构组成强有力的工具,但在该试验中数据的精确性受多种因素的影响^[21-22]。比如土壤类型、DNA提取方法、样品采

集时间和方式、PCR扩增条件等^[23-24]。为保证试验数据的可靠,研究中采取了一些措施,第1:样品采集时间选在8月中旬,这个时间是当地农业管理措施实施完,棉花即将收获的季节,土壤微生物群落相对稳定。第2:采样点选在距离棉花根际15 cm处(行间距60 cm),这个位置离根系区域适中,土壤微生物最具有代表整体群落^[25]。第3:所有样品DNA的提取方法完全一致,避免人为干预导致结果的误差。第4:通过摸索优化PCR条件,使各条带得到同等的扩增。即便如此,由于真菌遗传特征的复杂性、难以鉴定等特点以及真菌通用引物并不像细菌的那样有很强代表性,在DGGE方法应用上,本研究得出的结论与连作导致的细菌群落变化依然有相似之处^[26]。

相关研究都认为作物连作给土壤微生物群落结构产生了深刻影响^[27]。本文研究初步认为棉花长期连作对土壤真菌群落组成造成的影响也是长期的,但连作年限不同、土壤深度不同,造成影响的大小和快慢有所不同。例如,在11~30 cm土壤深度,耕作层的这个深度是作物根际最发达也是与土壤物质交换最频繁的区域,土壤真菌群落结构的变化也最剧烈。在连作年限上,当连作年限达到10 a以上后,各样品中真菌群落结构的变化趋缓,似乎有形成新相对稳定结构的趋势。此外,对比0~20 a棉花栽培数据

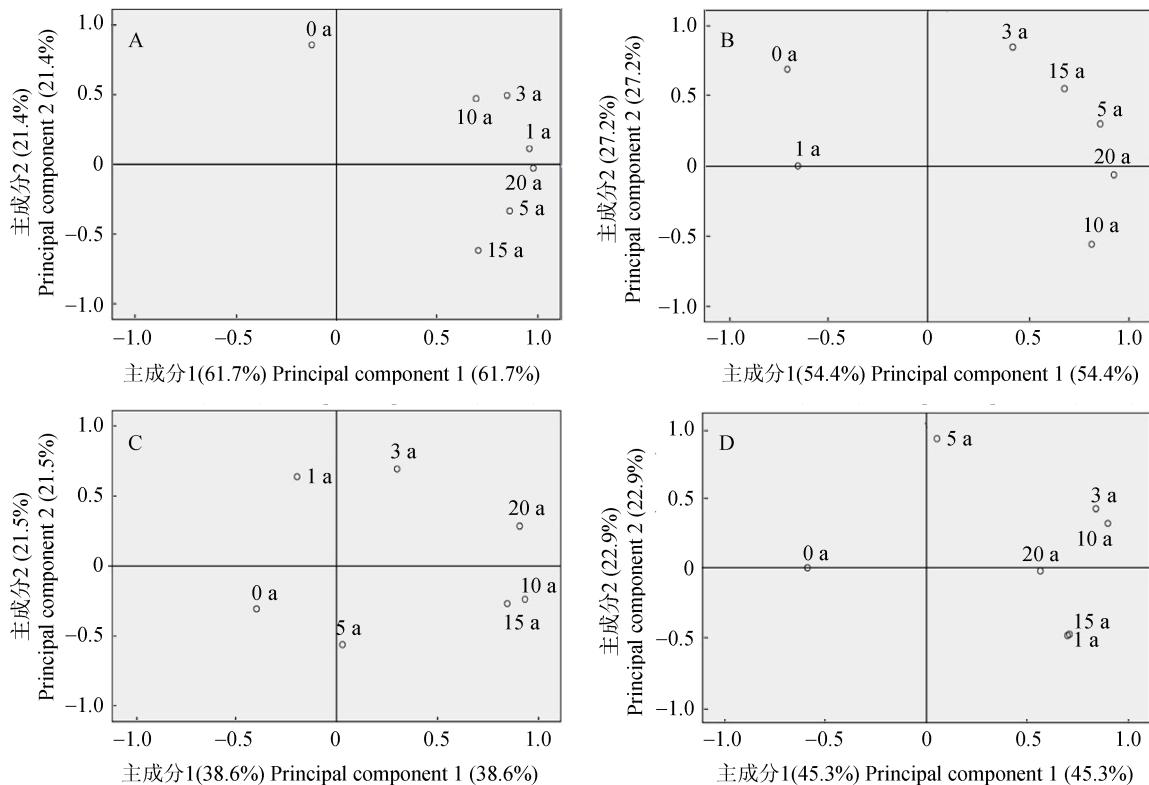


图2 不同土壤深度1~10 cm (A)、11~20 cm (B)、21~30 cm (C)和31~40 cm (D)不同连作年限间的主成分二维分析图
Fig. 2 Principal component analysis (PCA) of the fungal community structures obtained from the soil layers of 1-10 cm (A), 11-20 cm (B), 21-30 cm (C), and 31-40 cm (D) under different continuous cropping years

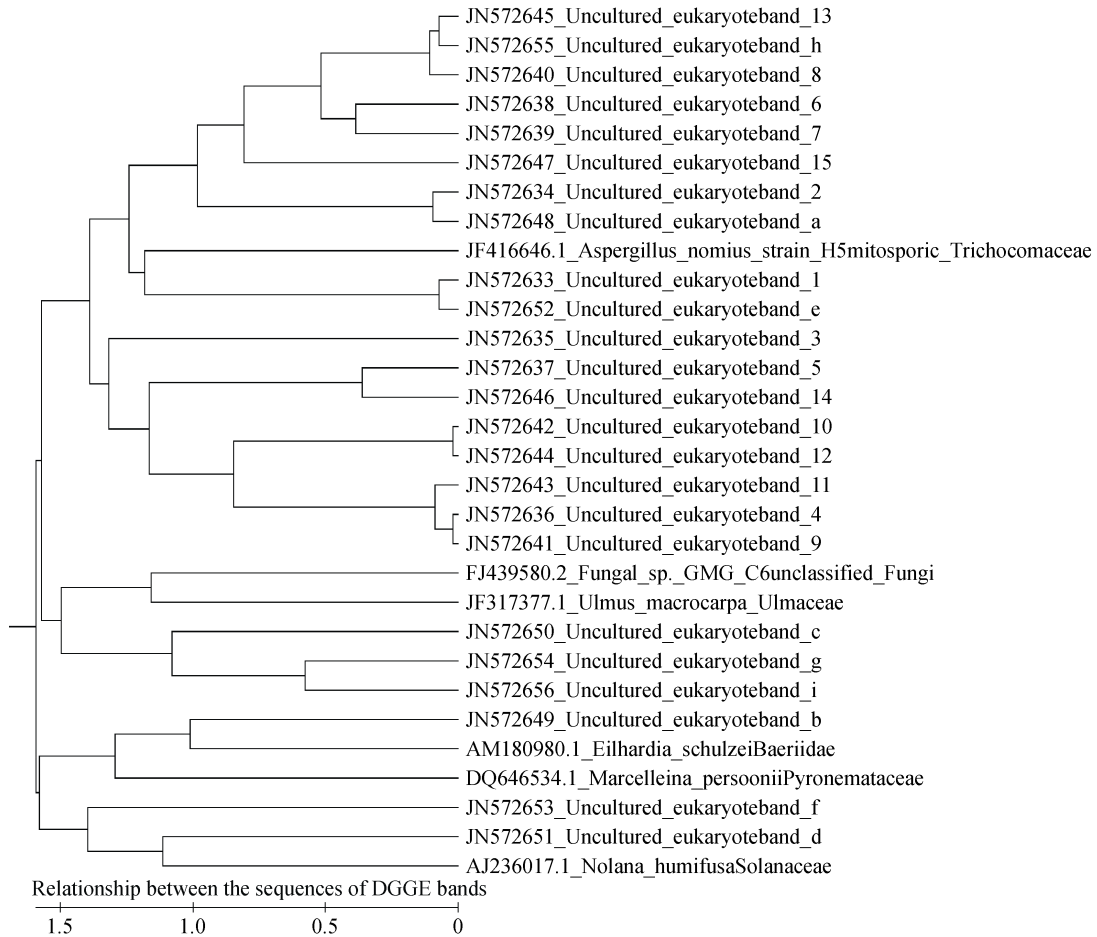


图 3 DGGE 胶回收条带与最相近序列的相似性分析

Fig. 3 Closest sequence match of known phylogenetic affiliation to band sequences extracted from DGGE gel

发现, 真菌群落结构的变化规律与病虫害发生和棉花产量的增减规律有一定联动性, 但是如何相互影响还有待深入研究。

由于连作导致的作物病虫害对产量、品质影响很大, 相关研究有很多都检测了连作土壤中病原菌相关科属的类群丰度变化, 甚至有报道发现连作过程中, 病原菌大量富集进而导致病害的大面积暴发。本研究获得的序列信息主要分为 3 类, 但综合分析没有发现与该地区棉花土传真菌病原体(枯萎病和黄萎病)相关的生物信息, 这点与已经报道的相关文献有所不同^[28]。分析可能有 3 个: 其一是真菌 18S 间隔引物及其 PCR 扩增条件致使被检测的真菌类群有偏向性; 其二是 DGGE 方法的局限性以及回收条带较少等原因致使真菌群落中丰度低的真菌种类信息没有被发现; 其三是土传真菌病原体虽然可以经过土壤传播, 但发生在作物的地上部分, 土壤中很难被检测到。但作物与土壤微生物的关系非常紧密, 土壤微生物群落结构直接影响着作物的健康程度, 因此深度解析单一作物连作过程土壤真菌群落结构的演替过程很有必要。

参考文献

- [1] 金建新. 新疆统计年鉴(2008)[M]. 北京: 中国统计出版社, 2008: 280-308
Jin J X. Xinjiang Statistical Yearbook (2008)[M]. Beijing: China Statistics Press, 2008: 280-308
- [2] 倪天麒, 田长彦, 胡文康. 新疆棉花生产中的重大问题与可持续发展对策[J]. 干旱区研究, 2002, 19(3): 57-61
Ni T Q, Tian C Y, Hu W K. Some vital problems in cotton production in Xinjiang and the countermeasures for achieving a sustainable development[J]. Arid Zone Research, 2002, 19(3): 57-61
- [3] Hooper L V, Wong M H, Thelin A, et al. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine[J]. Science, 2001, 291(5505): 881-884
- [4] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1998, 73(1): 127-141
- [5] He J Z, Zheng Y, Chen C R, et al. Microbial composition and diversity of an upland red soil under long-term fertilization treatments as revealed by culture-dependent and culture-independent approaches[J]. Journal of Soils and Sediments, 2008, 8(5): 349-358
- [6] Ward D M, Bateson M M, Weller R, et al. Ribosomal RNA

- analysis of microorganisms as they occur in nature[J]. *Advances in Microbial Ecology*, 1992, 12: 219–286
- [7] 高群, 孟宪志, 于洪飞. 连作障碍原因分析及防治途径研究[J]. *山东农业科学*, 2006(3): 60–63
Gao Q, Meng X Z, Yu H F. Reason analysis and control methods of succession cropping obstacle[J]. *Shandong Agricultural Science*, 2006(3): 60–63
- [8] 吴凤芝, 赵凤艳, 刘元英. 设施蔬菜连作障碍原因综合分析与防治措施[J]. *东北农业大学学报*, 2000, 31(3): 241–247
Wu F Z, Zhao F Y, Liu Y Y. On the reasons of continuous cropping obstacles in vegetable facility gardening[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2000, 31(3): 241–247
- [9] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2): 316–322
- [10] 夏北成, Zhou J Z, Tiedje J M. 植被对土壤微生物群落结构的影响[J]. *应用生态学报*, 1998, 9(3): 296–300
Xia B C, Zhou J, Tiedje J M. Effect of vegetation on structure of soil microbial community[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 1998, 9(3): 296–300
- [11] Moreira D. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations[J]. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26(13): 3309–3310
- [12] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697–703
- [13] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695–700
- [14] Liang X L, Zhu Y L, Jiang Y J, et al. Diversity of bacterial communities of pickle by PCR-DGGE[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2008, 8(3): 133–137
- [15] Hill T C J, Walsh K A, Harris J A, et al. Using ecological diversity measures with bacterial communities[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 43(1): 1–11
- [16] Ge Y, Zhang J B, Zhang L M, et al. Long-term fertilization regimes affect bacterial community structure and diversity of an agricultural soil in northern China[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2008, 8(1): 43–50
- [17] Ndaw S M, Gama-Rodrigues A C, Gama-Rodrigues E F, et al. Relationships between bacterial diversity, microbial biomass, and litter quality in soils under different plant covers in northern Rio de Janeiro State, Brazil[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2009, 55(9): 1089–1095
- [18] de Figueiredo D R, Ferreira R V, Cerqueira M, et al. Impact of water quality on bacterioplankton assemblage along Cértima River Basin (central western Portugal) assessed by PCR-DGGE and multivariate analysis[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2012, 184(1): 471–485
- [19] Li C G, Li X M, Kong W D, et al. Effect of monoculture soybean on soil microbial community in the Northeast China[J]. *Plant and Soil*, 2010, 330(1/2): 423–433
- [20] Zhang X L, Li X, Zhan C G, et al. Ecological risk of long-term chlorimuron-ethyl application to soil microbial community: An in situ investigation in a continuously cropped soybean field in Northeast China[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2011, 18(3): 407–415
- [21] Jiang W, Jiang Y T, Li C L, et al. Investigation of supragingival plaque microbiota in different caries status of Chinese preschool children by denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *Microbial Ecology*, 2010, 61(2): 342–352
- [22] Graham M H, Haynes R J. Catabolic diversity of soil microbial communities under sugarcane and other land uses estimated by Biolog and substrate-induced respiration methods[J]. *Applied Soil Ecology*, 2005, 29(2): 155–164
- [23] Acosta-Martínez A, Dowd S, Sun Y, et al. Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(11): 2762–2770
- [24] Wang W, Ma Y, Ma X, et al. Seasonal variations of airborne bacteria in the Mogao Grottoes, Dunhuang, China[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2010, 64(4): 309–315
- [25] Curlevski N J A, Xu Z H, Anderson I C, et al. Diversity of soil and rhizosphere fungi under *Araucaria bidwillii* (Bunya pine) at an Australian tropical montane rainforest site[J]. *Fungal Diversity*, 2010, 40(1): 12–22
- [26] 孟品品, 刘星, 邱慧珍, 等. 连作马铃薯根际土壤真菌种群结构及其生物效应[J]. *应用生态学报*, 2012, 23(11): 3079–3086
Meng P P, Liu X, Qiu H Z, et al. Fungal population structure and its biological effect in rhizosphere soil of continuously cropped potato[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2012, 23(11): 3079–3086
- [27] 尹承苗, 王功帅, 李园园, 等. 连作苹果园土壤真菌的 T-RFLP 分析[J]. *生态学报*, 2014, 34(4): 837–846
Yin C M, Wang G S, Li Y Y, et al. Assessment of fungal diversity in apple replanted orchard soils by T-RFLP analysis[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(4): 837–846
- [28] Zhang Y, Du B H, Jin Z G, et al. Analysis of bacterial communities in rhizosphere soil of healthy and diseased cotton (*Gossypium* sp.) at different plant growth stages[J]. *Plant and Soil*, 2011, 339(1/2): 447–455