

陈 波,张锡炎,黄 霄,等. 香蕉枯萎病区土壤真菌多样性分析[J]. 江苏农业科学,2013,41(11):354-357.

香蕉枯萎病区土壤真菌多样性分析

陈 波^{1,2}, 张锡炎¹, 黄 霄¹, 刘小玉¹, 周登博¹, 谭 昕¹, 高祝芬¹, 戚春林²

(1. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101; 2. 海南大学环境与植物保护学院, 海南海口 570228)

摘要:研究香蕉园土壤可培真菌数量分布特征,并以 T-RFLP(terminal restriction fragment length polymorphism,末端限制性片段多态性分析)技术研究不同地区发病与健康土壤真菌的多样性,探讨土壤真菌数量分布及群落结构与土壤因子的关系。结果表明,同一地区的蕉园中,发病蕉园土壤的大部分理化性质指标低于健康蕉园,以 pH 值、有效磷含量的差异最显著,pH 值、有效磷含量同时还影响着土壤中可培真菌的数量与分布;发病土壤的真菌群落多样性比健康土壤丰富;蕉园土壤中优势真菌种群分别为片段长度为 72、112 bp 的 T-RFs;大部分 T-RFs 的分布与 pH 值、全氮、碱解氮、速效钾、有效磷及水分含量有关,且在发病土壤中的相对丰度小于健康土壤;真菌群落的辛普森指数与土壤因子有一定的相关性。

关键词:香蕉枯萎病;土壤因子;真菌群落;多样性

中图分类号: S154.36 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)11-0354-04

香蕉枯萎病是一种由尖孢镰刀菌古巴专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)引起的土传维管束病害。我国香蕉枯萎病的发病率一般为 10%~40%,最严重时达 90%甚至毁园^[1-2]。目前主要采取轮作、选用抗病品种、化学防控和生物防治等措施来防控香蕉枯萎病,但均没有取得理想的效果^[3],所以必须寻求有效的防控手段。有研究表明,土壤微生物群落的多样性与植物土传病害有一定关系^[4-6],并可以影响植物土传病害的发生^[7]。

真菌是土壤生物量及有机质分解的主要组成部分,在农业生态系统的结构和功能上占有重要地位^[8]。自然界中约有 150 万种真菌,但只有 0.7%能被分离和培养^[9],因此采用传统方法研究土壤真菌群落具有很大的局限性。末端限制性片段多态性分析(T-RFLP)技术分辨率高、重复性好,还可以对微生物种群进行定性分析,可应用于各种微生物群落的分析比较、微生物群落多样性及结构特征研究等多个方面,是一种较先进的研究微生物群落的分子生态学方法^[10-11]。

本研究以香蕉枯萎病区土壤为对象,以现代分子技术与传统方法相结合,研究发病蕉园与健康蕉园土壤的真菌数量分布特征及真菌群落多样性,并对其与理化性质的相关性进行探讨,旨在了解土壤养分与真菌群落结构的关系、发病蕉园与健康蕉园土壤的真菌群落组成和结构的差异,以期利用微生物群落平衡防控香蕉枯萎病提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

土壤基因组 DNA 提取试剂盒(北京百泰克生物技术有

限公司);DNA 凝胶回收试剂盒(爱思进生物技术公司);*Taq* DNA 聚合酶(北京博迈德生物公司);*Msp* I 限制性内切酶(北京 NEB 公司);引物合成与基因扫描由上海生工生物工程有限公司完成。SHP-450 生化培养箱(上海精宏实验设备有限公司);ST16R 型台式冷冻离心机(德国 Thermo 公司);TC-96/7/(a)型 PCR 仪(浙江杭州博日生物技术公司);BG-gds Auto 型凝胶成像仪(北京百晶生物技术有限公司)。

1.2 土壤样品采集与预处理

本研究共设 3 个采样地区,分别为海南省临高县南宝镇、美台镇、皇桐镇,每个地区分健康蕉园与枯萎病发病蕉园,各 1 个,供试蕉园基本情况见表 1。样品为五点混合样,每个点取量大致相等、位于香蕉假茎 0.5 m 以内,深 5~30 cm 的根围土壤,混匀后置于无菌封口袋中于冰盒中保存。

表 1 供试蕉园基本情况

| 样品 编号 | 香蕉 品种 | 种植 年限 | 枯萎病危害 程度(%) | 土壤 类型 | 经度 | 纬度 |
|----------|----------|----------|----------------|----------|-------------|------------|
| HB | 威廉斯 | 3 | 38.5 | 黏土 | 109°50'58"E | 19°49'58"N |
| HJ | 巴西蕉 | 2 | 3.3 | 黏土 | 109°50'58"E | 19°49'58"N |
| MB | 巴西蕉 | 5 | 46.2 | 黏土 | 109°35'58"E | 19°40'51"N |
| MJ | 巴西蕉 | 15 | 2.5 | 黏土 | 109°35'58"E | 19°40'51"N |
| NB | 巴西蕉 | 6 | 39.8 | 粉壤土 | 109°51'17"E | 19°47'1"N |
| NJ | 巴西蕉 | 10 | 2.8 | 粉壤土 | 109°51'17"E | 19°47'1"N |

注:HB、HJ、MB、MJ、NB、NJ 分别代表皇桐发病土壤、皇桐健康土壤、美台发病土壤、美台健康土壤、南宝发病土壤、南宝健康土壤。表 2、表 3、图 1、图 2、图 3 同。

土壤样品带回实验室后,除去根系、石块等杂物,充分混匀后分成 2 份:一份于 4℃冰箱中保存,用于土壤真菌分离及真菌群落多样性分析,2 d 内完成土壤真菌分离,1 周内完成土壤基因组 DNA 提取;另一份用于测定土壤养分含量及理化性质,pH 值及水分含量当天测定,剩余土样于阴凉处室温风干后过 4 mm 筛,测定其余指标。

1.3 土壤可培真菌的分离及计数

采用固体平板梯度稀释涂布培养计数法^[12],选用马丁-

收稿日期:2013-02-26

基金项目:国家现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-32)。作者简介:陈 波(1987—),女,浙江嘉兴人,硕士研究生,研究方向为热带农业生态学。E-mail: yiluo_feeling@ qq. com。

通信作者:张锡炎,博士,教授,从事香蕉高技术产业化推广研究。E-mail: zhangxiyan@ itbb. org. cn。

孟加拉红琼脂培养基(葡萄糖 10 g, 蛋白胨 5 g, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 0.1% 孟加拉红溶液 3.3 mL, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 L, 灭菌后加入过滤除菌的 1% 链霉素溶液 3 mL)。采用 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 3 个浓度梯度的土壤悬液, 摇匀后吸取 0.1 mL 加入培养基中, 用涂布棒涂布均匀, 每个浓度梯度 3 次重复。封口膜密封后置于 28 °C 恒温培养箱中培养, 2 d 后记录真菌的菌落数。

1.4 土壤因子测定

测试方法采用常规化学分析方法^[13], 每个指标设 2 个重复。测定指标有土壤含水量、pH 值、有机质含量、全氮含量、碱解氮含量、有效磷含量和速效钾含量。

1.5 末端限制性片段多态性分析

1.5.1 土壤总 DNA 的提取 土样用孔径 4 mm 的过滤筛过滤, 准确称取 1 g 土样提取基因组 DNA。DNA 样品置于 -20 °C 冰箱中保存。

1.5.2 真菌 ITS rDNA 的 PCR 扩增 正向引物 ITS1 (5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGC - 3', 反向引物 ITS4 (5' - TCCTC-CGCTTATTGATATGC - 3')^[14]; 正向引物 5' 端用 6 - 羟基亚磷酸胺 (FAM) 标记。50 μL 的反应体系为: DNA 模板 (100 ng/ μL) 0.5 μL ; 2 \times Taq PCR Master Mix (Taq DNA Polymerase 2.25 U; Mg^{2+} 4 mmol/L; dNTPs 0.4 mmol/L) 25 μL ; 10 $\mu\text{mol/L}$ 正向引物、10 $\mu\text{mol/L}$ 反向引物各 1 μL ; ddH₂O 22.5 μL 。PCR 扩增程序为: 94 °C 预变性 10 min; 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 °C 终延伸 10 min, 4 °C 保存。PCR 产物用 1.5% TAE - 琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶成像仪下观测目的 DNA 条带并切胶回收。

1.5.3 酶切及 T - RFLP 分析 纯化的 PCR 产物用 *Msp* I 进行酶切, 50 μL 酶切体系: *Msp* I 1 μL ; 10 \times NEB buffer 5 μL ; 100 \times BSA 0.5 μL ; ddH₂O 33.5 μL ; 37 °C 温育 4 h, 65 °C 终止反应 30 min。酶切产物由 ABI 3730 测序仪扫描, 扫描结果用 Peak Scanner Software 1.0 软件分析。

1.6 数据及结果处理

1.6.1 T - RFs (terminal restriction fragment) 处理 对 T - RFLP 图谱设定阈值, 片段大小为 50 ~ 500 bp, 荧光强度 > 50 荧光单位 (FU) T - RFs 视为有效峰^[15], T - RFs 的相对丰度 $Ap = n_i / N \times 100$, 其中 n_i 为单个 T - RF 的峰面积, N 为图谱中所有有效峰的面积总和^[16]。根据图谱中有效峰的数量及丰度, 用 BIO - DAP 软件进行多样性指数计算, 包括香浓指数、辛普森指数、均匀度指数。

1.6.2 方差分析及多重比较 可培真菌数量、土壤理化因子的方差分析、多重比较及简单相关性分析采用 SAS 6.12

软件。

1.6.3 去趋势对应分析 (DCA) 与典范对应分析 (CCA) 对多样性指数、超过 50% 的样品中出现的 24 种 T - RFs 在不同图谱中的分布及丰度进行去趋势对应分析 (DCA), 计算其第一排序轴的梯度范围^[17]。土壤因子数据进行标准化处理后, 进行典范对应分析。数据标准化、DCA 及 CCA 分析采用 CANOCO Version 4.5 软件。

2 结果与分析

2.1 土壤中可培真菌数量

6 个供试蕉园 5 ~ 30 cm 土层的真菌数量见图 1。不同地区之间, HB、HJ 2 处蕉园的土壤可培真菌数量较大, 分别为 1.54×10^5 、 1.32×10^5 CFU/g, 其中 HB 与 MJ、NJ 之间的差异达显著水平 ($P < 0.05$); MJ、NJ 最低, 分别为 0.89×10^5 、 0.84×10^5 CFU/g; MB、NB 分别为 1.02×10^5 、 0.98×10^5 CFU/g。相同地区之间, 发病蕉园的土壤可培真菌数量均大于健康蕉园, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。

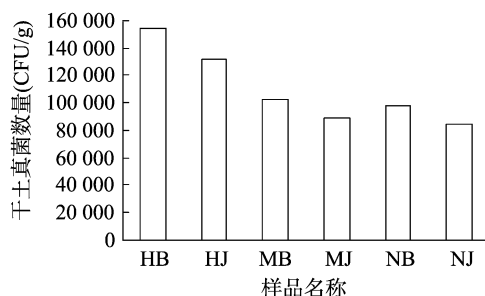


图1 干土可培真菌数量特征

2.2 土壤因子特征

供试蕉园土壤理化性质见表 2。相同地区之间, 发病蕉园土壤的有效磷含量显著低于健康土壤 ($P < 0.05$); 发病土壤 pH 值显著低于健康土壤 ($P < 0.05$); 发病土壤的含水量、有机质、全氮、碱解氮、速效钾等指标含量大多低于健康蕉园土壤, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。不同地区之间, 南宝地区蕉园土壤的有效磷最高、有机质含量最低, 其中有机质含量的差异显著 ($P < 0.05$); 皇桐地区蕉园土壤的有机质、全氮显著高于其他地区 ($P < 0.05$), 此外, 该地区土壤含水量、碱解氮与速效钾低于其他地区, 其中 HJ 速效钾含量与其他样品差异显著, HB 速效钾与美台地区蕉园差异显著 ($P < 0.05$); 美台地区的速效钾含量差异高于其他地区 ($P < 0.05$), 其碱解氮含量最低, 差异不显著 ($P > 0.05$)。

表2 土壤样品主要理化性质

| 样品编号 | pH 值 | 含水量 (%) | 有机质含量 (g/kg) | 全氮含量 (%) | 碱解氮含量 (mg/kg) | 有效磷含量 (mg/kg) | 速效钾含量 (mg/kg) |
|------|--------|---------|--------------|----------|---------------|---------------|---------------|
| HB | 4.17c | 11.58a | 2.43a | 0.150 1a | 92.4a | 37.4f | 214.5b |
| HJ | 4.63b | 12.39a | 2.45a | 0.149 5a | 84.8a | 54.2e | 85.4c |
| MB | 4.07c | 15.26a | 1.74c | 0.109 2b | 133.2a | 104.1d | 518.6a |
| MJ | 5.03ba | 16.75a | 1.91b | 0.114 3b | 145.4a | 120.0c | 676.9a |
| NB | 4.53bc | 17.87a | 1.56d | 0.098 3b | 109.1a | 276.1b | 286.2b |
| NJ | 5.47a | 16.48a | 1.70dc | 0.111 4b | 125.1a | 314.5a | 309.0b |

注: 同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。表 3 同。

2.3 多样性指数分析

根据 T-RFLP 图谱中有效 T-RFs 的数量及相对丰度,分别计算 6 个样品的真菌多样性指数(表 3)。NB 拥有最高的香浓指数、均匀度指数与最低的辛普森指数;HB、HJ 则拥有较低的香浓指数、均匀度指数与较高的辛普森指数。相同地区之间,发病蕉园的香浓指数均大于健康蕉园,但发病蕉园的辛普森指数小于健康蕉园;皇桐、南宝地区发病蕉园的均匀度指数大于健康蕉园。

表 3 土壤真菌群落的多样性指数

| 样品编号 | 香浓指数 | 辛普森指数 | 均匀度指数 | T-RFs 数量 |
|------|------|-------|-------|----------|
| HB | 2.10 | 0.22 | 0.662 | 24 |
| HJ | 2.07 | 0.23 | 0.654 | 23 |
| MB | 2.54 | 0.17 | 0.688 | 48 |
| MJ | 2.35 | 0.17 | 0.728 | 28 |
| NB | 2.56 | 0.14 | 0.736 | 44 |
| NJ | 2.34 | 0.20 | 0.662 | 34 |

2.4 优势真菌群落的种类及丰度

T-RFLP 图谱中的 1 个片段代表了 1 个或 1 个以上的物种^[18],用峰面积来定量描述物种丰度。在 6 个样品的 T-RFLP 图谱中,片段长度为 72、112 bp 的 2 个 T-RFs 占据了绝对优势。各样品的优势 T-RFs 略有差异:HB、HJ 为 72、112 bp;MB 为 72、111、112 bp;MJ 为 60、72、112 bp;NB 为 72、111、112 bp;NJ 为 86、111、112 bp。

2.5 土壤因子与可培真菌的相关分析

土壤真菌与土壤理化性质之间有着紧密联系:土壤 pH 值、有效磷含量与真菌数量表现为负相关,相关性均较大但未达到显著水平($P>0.05$);水分、速效钾含量均与真菌数量呈正相关,相关程度不显著($P>0.05$);有机质、全氮、碱解氮与真菌数量呈负相关,相关程度均不显著($P>0.05$)(表 4)。

表 4 土壤因子与可培真菌的相关性

| 土壤因子 | 相关系数 |
|------|----------|
| pH 值 | -0.539 4 |
| 含水量 | 0.058 6 |
| 有机质 | -0.164 5 |
| 全氮 | -0.134 8 |
| 碱解氮 | -0.123 9 |
| 有效磷 | -0.454 2 |
| 速效钾 | 0.019 1 |

2.6 土壤因子与土壤真菌群落结构的关系

CCA 结果将 24 个 T-RFs 分成 10 组(图 2)。组 I 包括长度为 60、219 bp 的 T-RFs,该组的相对丰度与土壤中水分、碱解氮、有效磷和速效钾的含量呈正相关,与有机质、全氮的含量呈负相关;组 II 包括长度为 72、83、112 bp 的 T-RFs,该组位于远点附近,与土壤因子的相关性很小,且在健康蕉园土壤中的相对丰度大于发病蕉园;组 III 包含了 111、261 bp 的 T-RFs,该组的相对丰度与土壤 pH 值、碱解氮含量和速效钾含量呈负相关,在发病蕉园土壤中的相对丰度大于健康蕉园;组 IV 包含了 93、98、238、289、299 bp 的 T-RFs,该组的分布与土壤中水分、碱解氮、速效钾的含量与 pH 值呈负相关,多数在发病蕉园土壤中的相对丰度大于健康土壤且在美台健康蕉园土壤中未见该组 T-RFs 的存在;组 V 包括了 218、269 bp 的 T-RFs,该组的分布与土壤中水分、碱解氮、速效钾的含量

呈负相关,该组健康蕉园土壤的相对丰度大部分大于发病土壤;组 VI 包含了 217、426 bp 的 T-RFs,与有机质、全氮的含量呈正相关而与水分、碱解氮、有效磷和速效钾呈负相关,在健康蕉园土壤中的相对丰度大于发病土壤,且在美台地区的蕉园中几乎不存在;组 VII 仅由 464 bp 的 T-RFs 组成,其与土壤有机质、全氮含量与 pH 值呈正相关而与水分、碱解氮、有效磷和速效钾呈负相关,且相关程度较大,在健康蕉园土壤中 464 bp 的相对丰度大于发病土壤;组 VIII 包括 86、90、106、458 bp 的 T-RFs,该组只与土壤 pH 值呈正相关,且在健康蕉园土壤中的相对丰度高于发病土壤;组 X 仅含有 330 bp 的 T-RFs,其在土壤中的分布与有机质、全氮的含量与 pH 值呈正相关而与有效磷含量呈负相关,且多存在于健康蕉园土壤中。

2.7 土壤因子与土壤真菌群落多样性的关系

土壤因子与土壤真菌群落多样性的 CCA 分析结果见图 3,香浓指数与均匀度指数均位于原点附近,表明这 2 项指数与土壤因子的关联性很小;辛普森指数与土壤 pH 值、有机质、全氮含量成正相关,而其与土壤水分、碱解氮、速效钾和有效磷的含量成负相关,表明土壤 pH 值、有机质、全氮、含水量、碱解氮、速效钾和有效磷在一定程度上可以影响土壤真菌群落优势度。

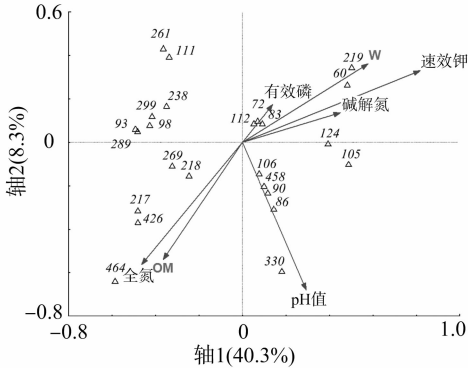


图2 土壤样品中T-RFs的分布与土壤因子的CCA分析结果

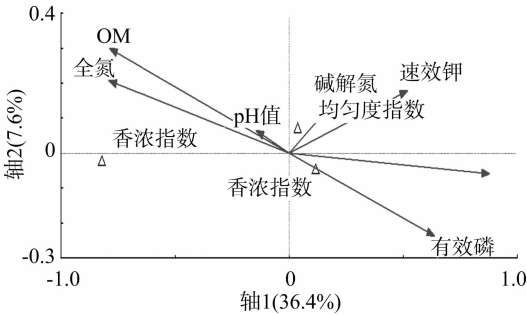


图3 土壤样品的多样性指数与土壤因子的CCA分析结果

3 结论与讨论

香蕉感病后,植株正常生理活动必会受到影响^[19],并会在其根围土壤的性质变化中表现出来。对同一地区的蕉园土壤的理化性质分析表明,发病蕉园土壤的 pH 值、有效磷含量均显著低于健康蕉园,该结果与前人对于土壤 pH 值、有效磷的研究结果^[20]一致。

香蕉枯萎病区土壤可培真菌的数量分析结果表明,同一块地的发病蕉园土壤的可培真菌数量大于健康蕉园,这与蔬

菜、棉花等研究结果^[21-24]一致,发病蕉园土壤的真菌数量增加,反映了土壤微生物群落向真菌化发展。土壤真菌的分布受诸多因素影响,例如季节、气候变化^[25]和土壤层次^[26]等。在本研究中,可培真菌的数量与土壤 pH 值、有效磷含量呈负相关。

基于 T-RFLP 图谱的多样性指数分析结果说明,发病蕉园植株根围土壤比健康蕉园土壤有着更丰富的真菌多样性。造成这个结果的主要原因可能有:感病蕉园土壤理化性质的改变,尤其是土壤酸碱度的变化,引起了土壤真菌群落的组成和结构的变化^[27];发病蕉园中为了控制枯萎病的蔓延大量施用有机肥,而有机肥能够促进蔬菜等作物根际真菌的繁殖^[28]。土壤真菌群落多样性与土壤因子的 CCA 分析结果中,只有辛普森指数与土壤因子有一定的相关性。辛普森指数体现的是群落的优势度,由此可见,土壤环境的变化可能会引起一些真菌的消长,但对总体真菌群落多样性与均匀度的影响不大。

土壤真菌群落结构与土壤因子的 CCA 分析结果显示,大部分的 T-RFs 的分布与 pH 值、全氮含量、碱解氮含量、速效钾含量、有效磷含量与含水量有关,而且发病蕉园植株根围土壤中的相对丰度小于健康蕉园;而处于绝对优势的 72、112 bp 的 T-RFs 在发病土壤中的相对丰度均低于健康土壤。此外,在 HB、HJ 2 个样品中,72、112 bp 的 T-RFs 的相对丰度与其他 T-RFs 相差极大,而这 2 个样品中真菌的数量显著高于其他样品,其碱解氮、有效磷、速效钾与水的含量均低于其他地区样品,且其具有最低的多样性指数、均匀度指数与最高的优势度指数,这表明该地区蕉园土壤真菌群落的功能与结构均处于相对不稳定的状态。

本研究对香蕉枯萎病区土壤的真菌多样性进行分析,但在 RDP 数据库中无真菌 ITS 区域的数据,因此无法对土壤真菌进行定性分析。T-RFLP 技术作为一种基于 PCR 的分子生态学方法,具有一定缺陷,例如不同微生物种群 DNA 的差异性扩增;以基于 T-RFLP 图谱中峰面积计算所得的多样性指数描述微生物种类和丰度,也存在一定局限性^[29]。T-RFLP 技术与构建 16S 文库的方法结合才能克服 T-RFLP 技术的缺陷,以便更精确地分析细菌真菌群落多样性。

参考文献:

- [1] 曾惜冰,王碧青,韩路,等. 香蕉品种资源抗枯萎病的鉴定[J]. 中国果树,1996(2):28-29.
- [2] 黎永坚,于莉. 香蕉枯萎病发病机制及其防治技术研究[J]. 中国农学通报,2006,22(8):515-519.
- [3] 肖爱萍,游春平,梁关平,等. 香蕉枯萎病拮抗菌的筛选及其作用机制研究[J]. 植物保护,2006,32(4):53-56.
- [4] 徐瑞富,王小龙. 花生连作田土壤微生物群落动态与土壤养分关系研究[J]. 花生学报,2003,32(3):19-24.
- [5] 李洪连,王守正,张明智,等. 棉花不同抗性品种根际真菌对枯萎病菌抑制作用的研究[J]. 棉花学报,1992,4(2):73-76.
- [6] 封海胜,张思苏,万书波,等. 土壤微生物与连、轮作花生的相互效应研究[J]. 莱阳农学院学报,1995,12(2):97-101.
- [7] 吴敏娜,张惠文,李新宇,等. 土壤抑真菌作用与细菌群落结构的关系[J]. 应用生态学报,2008,19(7):1574-1578.
- [8] Joergensen R G, Wichern F. Quantitative assessment of the fungal

- contribution to microbial tissue in soil[J]. Soil Biology and Biochemistry,2008,40(12):2977-2991.
- [9] Hawksworth D L. The fungal dimension of bio-diversity:magnitude, significance, and conservation[J]. Med Sci Entry for Mycological Research,1991,95:641-655.
- [1] 李献梅,王小芬,崔宗均. 末端限制性片段长度多态性技术(T-RFLP)在微生物群体分析上的应用与技术优化[J]. 中国农业大学学报,2009,14(4):1-9.
- [11] 余素林,吴晓磊,钱易. 环境微生物群落分析的 T-RFLP 技术及其优化措施[J]. 应用与环境生物学报,2006,12(6):861-868.
- [12] 李阜棣,喻子牛,何绍江. 农业微生物系实验技术[M]. 北京:中国农业出版社,1996:134-138.
- [13] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京:中国农业出版社,1999:56-69.
- [14] 王国荣,陈秀蓉,张俊忠,等. 东祁连山高寒灌丛草地土壤微生物生理功能群的动态分布研究[J]. 草业学报,2011,20(2):31-38.
- [15] 段巍巍,娄恺,曾军,等. 新疆沙尘暴源区塔克拉玛干空气真菌群落的 T-RFLP 分析[J]. 新疆农业科学,2011,48(4):769-775.
- [16] Dunbar J, Ticknor L O, Kuske C R. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities[J]. Applied and Environment Microbiology,2001,67(1):190-197.
- [17] 袁三青,薛燕芬,高鹏,等. T-RFLP 技术分析油藏微生物多样性[J]. 微生物学报,2007,47(2):290-294.
- [18] 王晓丹,李艳红. 分子生物学方法在水体微生物生态研究中的应用[J]. 微生物学通报,2007,34(4):777-781.
- [19] 赵炎坤,刘小玉,陈波,等. 不同碳氮比饼肥发酵液对香蕉苗期枯萎病的影响[J]. 广东农业科学,2012,39(3):74-78.
- [20] 张学利,杨树军,张百习,等. 不同感病等级樟子松根际与非根际土壤性质对比研究[J]. 林业科学研究,2006,19(1):88-92.
- [21] 于慧瑛,吕国忠,孙晓东,等. 病健人参根际土壤真菌种类及数量的研究[J]. 安徽农业科学,2007,35(26):8279,8291.
- [22] 苗则彦,赵奎华,刘长远,等. 健康与罹病黄瓜根际微生物数量及真菌区系研究[J]. 中国生态农业学报,2004,12(3):156-157.
- [23] 徐瑞富,陆宁海,李小丽,等. 土壤微生物群落对棉花黄萎病的影响[J]. 棉花学报,2004,16(6):357-359.
- [24] 陆宁海,吴利民. 健康与罹病玉米根际微生物数量及真菌区系研究[J]. 玉米科学,2007,15(5):136-138.
- [25] 周智彬,李培军. 塔克拉玛干沙漠腹地人工绿地土壤中微生物的生态分布及其与土壤因子间的关系[J]. 应用生态学报,2003,14(8):1246-1250.
- [26] 吴红英,孔云,姚允聪,等. 间作芳香植物对沙地梨园土壤微生物数量与土壤养分的影响[J]. 中国农业科学,2010,43(1):140-150.
- [27] 谢龙莲,陈秋波,王真辉,等. 环境变化对土壤微生物的影响[J]. 热带农业科学,2004,24(3):39-47.
- [28] 高玉峰,贺字典. 影响土壤真菌多样性的土壤因素[J]. 中国农学通报,2010,26(10):177-181.
- [29] von Wintzingerode F, Gobel U B, Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples:pitfalls of PCR-based rRNA analysis[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1997, 21(3):213-229.