

黄瓜连作对土壤微生物区系影响 II —— 基于 DGGE 方法对微生物种群的变化分析

胡元森^{1,2}, 吴坤¹, 李翠香², 贾新成¹

(¹河南农业大学生命科学院, 郑州 450002; ²河南工业大学生物工程学院, 郑州 450052)

摘要: 【目的】研究黄瓜连作土壤微生物群落演替规律。【方法】采用 PCR-DGGE 技术分析不同种植茬次黄瓜根区土壤微生物群落的动态变化。【结果】黄瓜连作引起土壤中细菌种群发生较大变化, 其中 *Bacteriovorax* sp. (序列同源性为 93%)、*Pseudomonas* sp. (序列同源性达 97%) 和另两种未培养 (Uncultured) 细菌种群数量减少, 而 *Sphingomonas* sp. (序列同源性达 100%) 和另一未培养细菌种群数量增加。连作对土壤真核微生物影响较小, 但在根际的数量变化幅度较非根际明显。【结论】黄瓜根际细菌数量与其生长发育关系密切, 而非根际细菌数量随黄瓜生长发育变化不大。黄瓜连作导致根际微生物数量显著变化可能与根分泌物在根部累积有关。

关键词: 黄瓜; 连作; 根际微生物; PCR-DGGE

Effect of Continuous Cropping of Cucumber on Soil Microbial Population II —— Variation Analysis Based on DGGE Approach

HU Yuan-sen^{1,2}, WU Kun¹, LI Cui-xiang², JIA Xin-cheng¹

(¹College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002; ²College of Bioengineering, Henan Technology University, Zhengzhou 450052)

Abstract: 【Objective】The aim of this experiment is to get insight into the nature of disease incidences and microbial community change. 【Method】The dynamics of soil microbe population induced by continuous cropping of cucumber was studied based on PCR-DGGE approach. 【Result】Continuous mono-cropping caused a great bacterial species change, of which *Bacteriovorax* sp. (identity of 93%), *Pseudomonas* sp. (identity of 97%) and two uncultured bacteria reduced in population, while *Sphingomonas* sp. (100% similarity) and another uncultured bacteria increased. Monocropping has little effect on eukaryote in soil. For all samples analyzed using culture-independent approach, the bacteria and eukaryotic species change was more sensitive in rhizosphere than in bulk soils. 【Conclusion】In the whole growth cycle, the variation of rhizosphere bacterial number was closely coincident with cucumber developmental stages, while less apparent change can be observed in bulk soils.

Key words: Cucumber (*Cucumis sativus* L.); Continuous cropping; Rhizosphere microbe; PCR-DGGE

0 引言

【研究意义】连作常导致蔬菜产量下降, 品质变劣, 植株早衰, 病虫害严重等一系列问题^[1]。有关研究表明, 土传病害是引起连作障碍因子中最主要的因子^[2]。笔者设想连作土壤中病原增加是由于根际正常微生物群落被打破, 微生物多样性水平降低, 病原拮

抗菌减少所致, 而正常微生物群落的存在是作物生长良好的前提条件。因此, 研究连作土壤中微生物菌群的变化, 进一步明确微生物群落中的优势功能菌, 为人为引入一些特殊功能菌群和有益土壤微生物种群, 恢复原有微生物群落, 进而抑制病原菌增殖, 从根本上解除连作障碍奠定坚实的理论基础。【前人研究进展】前人从土壤微生态角度对连作障碍机理进行过探

收稿日期: 2006-07-10; 接受日期: 2006-11-24

基金项目: 河南省教育厅科技攻关项目 (200510466021)

作者简介: 胡元森 (1976-), 男, 河南光山人, 博士, 研究方向为土壤微生物学。Tel: 0371-67789926; 通讯作者贾新成 (1943-), 男, 河南郑州人, 教授, 研究方向为土壤微生物学。Tel: 0371-63555915; E-mail: jxch43@163.com

索, 如汪立刚等^[3]研究表明灭菌土壤能有效解除连作障碍的不良影响, 并能显著提高重、迎茬大豆产量。吴凤芝等^[4]研究也表明土壤灭菌后黄瓜生长发育得到了显著改善。张春兰等^[5]研究生物有机肥减轻设施栽培黄瓜连作障碍的效果时发现, 施肥后土壤微生物数量增多, 连作土壤的活性提高, 作物抗逆性增强。Shiomi 等^[6]研究发现病原菌很难在微生物多样性高的土壤中滋生。上述研究都表明连作障碍发生与土壤微生物正常种群异常变动密切相关。在生产实践中也发现, 微生物种群减少和有害微生物数量增加是连作中的一个普遍现象。【本研究切入点】迄今为止, 对黄瓜连作土壤微生物区系特别是未培养微生物连续变化的跟踪研究还鲜见报道。笔者在前文^[7]用平板培养法初步探讨了连作条件下根部微生物区系的演替规律, 但这种建立在可培养层面上的微生物研究方法还不能反映整个微生物种群变化的全貌。PCR-DGGE 直接以土壤微生物总基因组 DNA 为研究对象, 通过比较细菌种群 16SrRNA 及真核微生物 5.8S-18S 核糖体间隔区基因信息来了解其多样性变化。这种试验技术有效避免了传统培养中由于培养基的选择性而导致微生物群体多样性丧失, 种群构成发生变化等弊病, 能够更直接更可靠反映土壤微生物的原始组成情况^[8]。【拟解决的关键问题】本文用 PCR-DGGE 方法监测黄瓜连作土壤微生物种群连续性变化, 试图阐明黄瓜连作条件下土壤微生物群落演替规律, 为从根际微生物生态角度重新理解连作障碍问题, 进而揭示其与连作障碍间的关系奠定理论基础。

1 材料与方 法

1.1 试验地的选择

试验地选在河南省农业厅无公害蔬菜试验基地, 面积约 50 m×10 m。土壤基本理化性质见文献^[8]。试验地共划分 4 个小区, 在其中的 3 个小区中分别种植头茬、重茬及 3 茬黄瓜, 另一个未种植黄瓜^[7]。

1.2 盆栽条件及样品采集

2004 年 10 月 13 日, 在上述种植不同茬次黄瓜的 4 个小区分别取耕作层土壤进行盆栽, 形成盆栽正茬 (not continuous cropping, 简略为 NC, 下同)、连作 2 茬 (a second cropping, SC)、3 茬 (a third cropping, TC)、4 茬 (a fourth cropping, FC) 的种植体系。为增加土壤疏松度及保湿能力, 在土样中添加 20%(v/v) 蛭石, 每盆 (250 mm×180 mm) 装混合土样 5~6 kg。盆栽条件及样品采集方法见文献^[7]。黄瓜生长后期

(12 月 25 日) 取样分析各连作茬次土壤微生物区系变化。

1.3 黄瓜不同生育期根部土壤细菌种群变化

2004 年 4 月 25 日在未种植黄瓜的小区取土, 添加 20% 体积的蛭石后装盆 (250 mm×180 mm)。将黄瓜种子播于盆中, 上覆薄层散土后置于大棚中, 适时浇水。在黄瓜苗期 (5 月 15 日)、花期 (6 月 1 日)、盛果期 (6 月 20 日)、结果后期 (7 月 10 日)、生长末期 (7 月 20 日和 28 日) 分别取根际、非根际土, 考查细菌种群变化情况。

1.4 土壤微生物基因组提取及纯化

土壤微生物基因组 DNA 提取及纯化方法参照文献^[9]。

1.5 PCR 扩增

1.5.1 16S rDNA 基因 V3 区扩增 PCR 反应体系为 10×buffer(含 20 mmol·L⁻¹ MgCl₂) 5 μl, 引物对^[10]R518/F341-GC 各 20 pmol, 4 μl 5 mmol·L⁻¹ dNTPs, 模板 DNA 50 ng, Taq 酶 2.5U (Promega 公司), 3 000 ng BSA (牛血清白蛋白), 加超纯水至 50 μl。PCR 反应参数为 94℃ 变性 5 min; 10 个循环的 94℃ 1 min, 65℃ 1 min, 72℃ 1 min, 退火温度每两循环降低 1℃。再在退火温度为 56℃ 时循环 15 次; 72℃ 延伸 5 min。

1.5.2 真核生物 18S~5.8S rDNA 间隔区扩增 采用引物对^[11]ITS1/ITS2-GC 扩增真核生物 18S~5.8S rDNA 间隔区。PCR 反应加样量同 1.5.1。PCR 反应参数为 94℃ 变性 5 min; 94℃ 30 s, 56℃ 45 s, 72℃ 40 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

1.6 变性梯度凝胶电泳 (DGGE)

DGGE 条件, 目标条带的分离、测序方法见文献^[12]。条带测定序列在 GenBank 的登录号为 DQ059304~DQ059309。

2 结果与分析

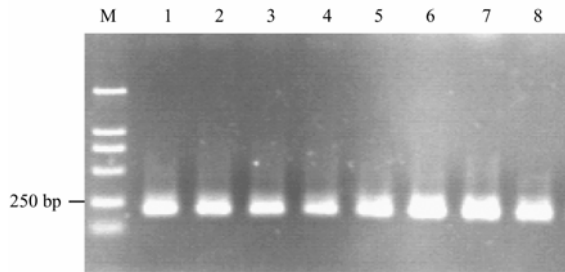
2.1 PCR 扩增结果

以纯化后总基因组 DNA 为模板, 采用 R518/F341-GC 和 ITS1/ITS2-GC 两对特异性引物进行 PCR 扩增后均得到预期长度的 DNA 片段, 扩增产物长度分别为 230 bp 和 250 bp (图 1、图 2)。

2.2 连作土壤中微生物菌群的 DGGE 分析

2.2.1 细菌菌群 DGGE 分析 由图 3 可见, 在近 20 个条带中, 有 6 个条带随连作茬次增加而呈现灰度变化。条带 A1、A4 从第 3 茬开始灰度逐渐降低。至第 4 茬时, 条带 A4 灰度已基本消失。条带 A2 和 A3 灰

度在连作 3 茬的土壤中无明显变化，连作 4 茬时灰度开始降低。条带 B1 和 B2 的灰度随连作茬次增加而显著增强。根际土样随连作茬次增加而发生灰度变化的 6 个条带中，只有 A4 和 B1 在非根际表现出来，而其余 4 个条带灰度变化不明显（图 4）。



M: DL2000 DNA marker
1~4 和 5~8 分别为头茬、二茬、三茬、四茬黄瓜根际土和非根际土。
下同
1-4, 5-8 are the bulk and rhizosphere soil of NC, SC, TC and FC respectively. The same as below

图 1 16SrDNA V3 区扩增结果

Fig. 1 Result of V3 region PCR amplification

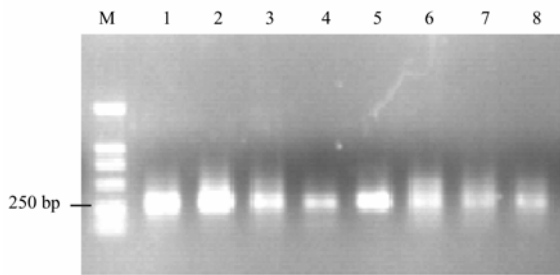
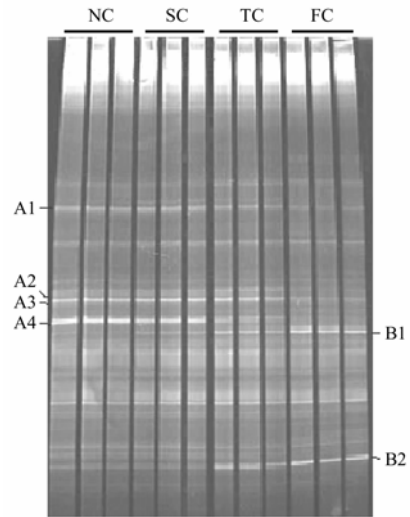


图 2 18S-5.8S 间隔区 PCR 扩增结果

Fig. 2 Result of 18S-5.8S spacer PCR amplification

2.2.2 序列测定 将上述发生灰度变化的 6 个条带序列测定后与 GenBank 数据库序列进行比对，结果见表。由表可知，条带 A2、A4 和 B2 的序列与可培养细菌种属相似性较低（数据未列出），而与已发现的未培养细菌种属核酸序列相近，相似性分别达 97%、95%和 100%。这些未培养种群大多从污染土壤、植物根际土壤中获得。条带 A1 与 *Bacteriovorax* sp. EPC3 相似性达 93%，至于 *Bacteriovorax* sp. 的功能还少有文献报道。条带 A3 和 B1 分别与 *Pseudomonas* 属和 *Sphingomonas* 属有较近的亲缘关系，序列相似性分别达到 97%和 100%。



NC、SC、TC 和 FC 分别为种植头茬、二茬、三茬及四茬黄瓜
NC, SC, TC and FC represent no continuous cropping, a second, third and fourth cropping

图 3 黄瓜连作根际土壤细菌种群 DGGE 图

Fig. 3 DGGE pattern of bacterial population in rhizosphere soils of various cropping time

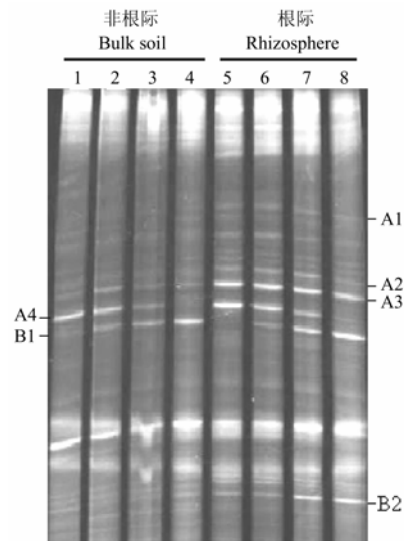


图 4 黄瓜连作根际、非根际细菌种群 DGGE 图

Fig. 4 DGGE pattern of bacterial population in rihzosphere/bulk soils of various cropping time

2.2.3 真核微生物菌群 DGGE 分析 ITS1/ITS2-GC 扩增产物经 DGGE 检测后获得 20 余条清晰条带（图 5），大多数条带灰度并未发生明显变化，只有条带 C1 和 C2 随连作茬次增加而灰度下降，二者在连作 4

茬后几乎完全消失。与根际相比,非根际土样中 C1 和 C2 条带灰度也有所减弱,但趋势较缓(图 6),这

表明连作引起根际真核微生物数量变化幅度较非根际大。

表 连作黄瓜根际土样部分 DGGE 片段序列比对

Table Sequence analysis of six DGGE bands in rhizosphere soil of continuous cucumber

条带 Bands	最相近序列 Most closely related sequences	相似性 Identity (%)	序列登录号 Accession No.
A1	<i>Bacteriovorax</i> sp. EPC3	93 (182/195)	AY294222
A2	Uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium clone 354C	97 (191/195)	AY571797
	Uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium clone	97 (190/195)	AY921881
	AKYH1176 uncultured soil bacterium C008	97 (190/195)	AF128738
A3	<i>Pseudomonas</i> sp. C10-2	97 (190/194)	DQ088664
	Uncultured bacterium clone 47	96 (187/194)	AY796042
	<i>Pseudomonas</i> sp. AZ18R3	95(185/194)	AY308044
A4	Uncultured soil bacterium clone L1A.8E04	95 (186/195)	AY989128
	Uncultured bacterium clone Tc43	94 (185/195)	AF445109
B1	Uncultured alpha proteobacterium clone 80H	100 (169/169)	AY466776
	<i>Sphingomonas</i> sp. L534	100 (169/169)	AY369992
B2	Uncultured yard-trimming-compost bacterium clone S-12	100 (174/174)	AY095384
	Uncultured bacterium CA10	100 (174/174)	AY034839

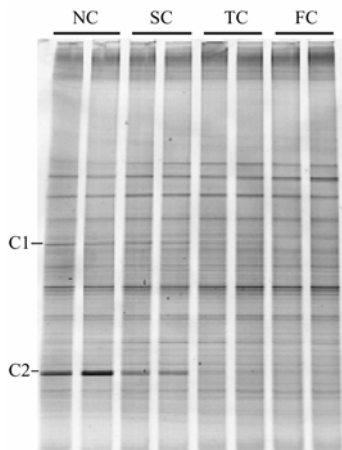


图 5 黄瓜连作根际真核微生物菌群变化 DGGE 图谱

Fig. 5 DGGE pattern of eukaryotic microbes in rhizosphere with various cropping time

2.3 黄瓜不同生育期根部细菌菌群变化

总体看来,黄瓜不同生育期根部土样细菌种群构成稳定,但某些种群的数量发生了较大变化,这种变化主要发生在黄瓜生长前期,如条带 D1、D2、D3、D4 和 D5 盛果期前在根际始终表现出灰度增加趋势,盛果期后灰度逐渐减弱。条带 E1、E2 和 E3 也在黄瓜生长前期由优势条带逐渐变为生长后期非优势条带。同连作土壤中细菌、真核微生物变化趋势相似,生育期各细菌种群数量变化主要发生在根际部位,而非根

际土样中条带灰度变化不明显。在黄瓜生长前期细菌表现出显著的根际效应,而愈在后期根际效应愈弱(图 7)。

3 讨论

DGGE 条带数目近似体现细菌种群的数量,而条带灰度则反映该种细菌数量的多寡^[8]。据此看来,不论在根际还是非根际,连作并未造成土壤菌群大量丢

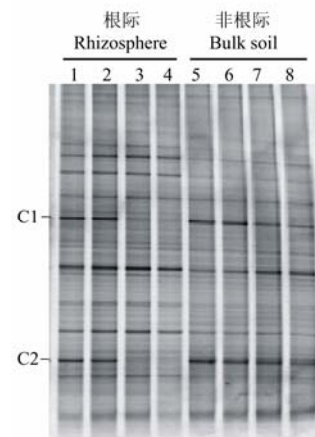
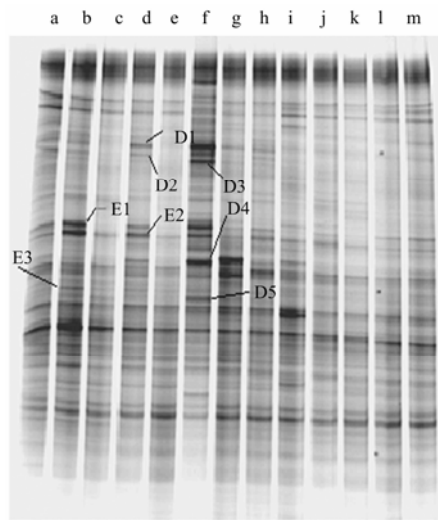


图 6 黄瓜连作根际和非根际真核微生物菌群变化 DGGE 图谱

Fig. 6 DGGE pattern of eukaryotic microbes in rhizosphere and bulk with various cropping time



a. 种前土, b, d, f, h, j, l 分别为苗期、花期、盛果期、结果后期及生长末期根际土; c, e, g, i, k, m 分别为上述各时期非根际土
a. Presowing soil. b, d, f, h, j, l are the rhizosphere soils sampled at seeding, flowering, flourish fruit, late fruit and late growth stages. c, e, g, i, k, m. are the bulk soils at the stages described above

图 7 黄瓜各生育期根际与非根际细菌种群变化 DGGE 图谱
Fig. 7 Variation of bacterial population of cucumber rhizosphere and bulk at each developmental stage

失, 菌群构成仍较稳定。但连作使根际土壤部分种群的数量发生了明显变化, 这体现在条带灰度增强或减弱上, 如条带 A1、A2、A3 和 A4 的灰度随连作茬次增加而不断减弱, 条带 B1 和 B2 的灰度随连作逐渐增强, 这暗示黄瓜连作使 A1、A2、A3 和 A4 所代表的细菌类群数量下降, 而 B1 和 B2 所代表的类群在根部不断富集(图 4)。这一试验结果与雷娟利等^[13]的报道有相似之处, 该研究表明, 黄瓜连作 3 年后部分 DGGE 条带灰度增加, 并且作物种类和连作年限都会影响到土壤细菌群落组成。与连作相比, 作物轮作对土壤微生物群落波动影响较大^[14]。这也从侧面说明连作会造成土壤微生物选择性适应, 出现某些种群富集, 而一些种群数量降低的现象。从对几个 DGGE 条带测序结果看(表), 它们大多与未培养细菌种属的同源性较高, 表明连作对土壤中大量未培养细菌的影响较大, 至于这些类群在土壤中及对植物的作用还不清楚。条带 A3 和 B1 分别与 *Pseudomonas* 属和 *Sphingomonas* 属序列相似性分别达到 97% 和 100%。*Pseudomonas* 属中的多数种, 特别是 *Fluorescent Pseudomonas*, 是重要的病原拮抗菌。*Pseudomonas* sp. 在土壤中的存在状态及生物活性是抑制土壤真菌病害的一个制约因

素^[15,16]。*Sphingomonas* 属在根际土壤中表现出数量增加趋势。据报道, *Sphingomonas* 属的一个显著特征是降解多环或单环芳香族化合物如苯甲酸、水杨酸等, 它能利用这些芳香族化合物为惟一碳源进行生长^[17], 而苯甲酸, 水杨酸及其衍生物是黄瓜根系分泌物中的重要化感物质^[18]。由此看来, *Sphingomonas* 属在根际数量增加可能与根分泌物中芳香族化合物在根围土壤中累积有关。近来, 也有文献报道 *Sphingomonas* 和 *Pseudomonas* 属中某些种会引起植物病害^[19,20]。总之, *Sphingomonas* 和 *Pseudomonas* 两个属在以后的植病生防研究中应更引起注意。

从根际和非根际土样 DGGE 图谱来看, 连作引起根际土样发生灰度变化的 6 个条带中, 非根际土样中只有 A4 和 B1 表现出来(图 4)。在连作引起真核微生物种群变化中也发现, 条带 C1 和 C2 的灰度变化在根际远较非根际明显(图 6)。这暗示连作引起微生物种群数量变化主要发生在根际部位。这与笔者在前文^[7]用平板培养法分析连作土壤可培养微生物变化趋势一致。

根际与非根际土壤性质差异主要体现在土壤物理、化学及生物学特性上。植株通过分泌各类有机物质能选择性地影响土壤化学及生物学性质^[21]。前文及本文发现黄瓜连作引起的细菌及真核微生物种群数量变化主要发生在根际部位。因此, 有理由认为, 连作土壤微生物菌群数量变化与植株根系分泌活动密切相关。

为探讨微生物数量变化与黄瓜根系分泌活动间的关系, 笔者研究了黄瓜不同生育期根际与非根际细菌种群的变化趋势。结果表明, 根际细菌种群数量变化在黄瓜生长前期(苗期、花期及盛果期)较明显, 大多数条带随黄瓜生长而呈现灰度增强趋势, 根际效应也较明显。而在生长后期, 根际与非根际细菌数量差别不大, 部分根际细菌种群数量开始减少。这种根际微生物数量变化与植株生长发育阶段高度一致的现象在其它文献^[22]中也有相似报道。出现这种情形与黄瓜生长过程中根际分泌物含量变化有关。苗期到盛果期植株新陈代谢活动旺盛, 其根系分泌物也相应较多, 为微生物提供较多营养, 能促使细菌快速增殖, 因而微生物数量也较多。在生长后期, 黄瓜根系老化, 呼吸作用减弱, 代谢缓慢, 根际微生物营养源不足, 微生物数量就会明显减少, 根际效应也不明显(图 7)。可见, 根际菌群的数量变化与植株根系分泌物有密切关系。

关于根系分泌物对土壤微生物群落的影响,国内外学者已作过研究,如 Ching 等^[23]研究认为铁营养状态改变影响大麦根围根分泌物的组成及含量,进而导致根际细菌种群分布变化。van Bruggen 等^[24]研究发现根际微生物的分布与沿根尖的分泌物含量有关,微生物生物量的积累依赖于根系分泌物的释放。Ryan 等^[25]研究证明,土壤外源添加根系分泌物及根残渣能提高根际微生物量、微生物活性及对根际土壤中菲的生物降解速度。此外,根系分泌物还直接影响土壤酶活性^[26]和植株根系对微量元素的吸收^[27]。

总之,根系分泌物能导致根际微生物种群、土壤酶活性、植物营养状态等多种微生态因子的变化。由此推测,根系分泌物可能是引发土壤物理、化学及生物学性质恶化的最初动力。连作障碍表现出的病原数量增加,微生态平衡破坏只是表观现象,其发生实质可能是根分泌物。因此,加强根分泌物,特别是根分泌物中化感物质的生态效应及根分泌物与连作障碍其它因子间关系的研究是揭示连作障碍机理的一个突破口。

4 结 论

4.1 黄瓜连作导致细菌和真核微生物在根际和非根际土壤中数量减少,二者在根际部位的数量变化幅度较非根际明显。

4.2 DGGE 分析结果表明黄瓜连作引起根际 *Bacteriovorax* sp. (序列同源性为 93%)、*Pseudomonas* sp. (序列同源性达 97%) 和另两种未培养 (uncultured) 细菌种群数量减少,而同时引起 *Sphingomonas* sp. (序列同源性达 100%) 和另一未培养细菌种群数量增加。

4.3 黄瓜不同生育期根际细菌数量与黄瓜生长发育关系密切,而非根际细菌数量随黄瓜生长发育变化不大。

4.4 黄瓜连作障碍表现出的病原菌数量增加,微生态平衡破坏只是表观现象,其发生实质可能与根分泌物有关。

References

- [1] 陈晓红, 邹志荣. 温室蔬菜栽培连作障碍研究现状及防治措施. 陕西农业科学, 2002, (12): 16-17.
Chen X H, Zou Z R. The review of study and prevention for continuous cropping obstacles in greenhouse vegetable cultivation. *Shaanxi Agricultural Sciences*, 2002, (12): 16-17. (in Chinese)
- [2] 喻景权, 杜尧舜. 蔬菜设施栽培可持续发展中的连作障碍问题. 沈

阳农业大学学报, 2000, 31(1): 124-126.

- Yu J Q, Du Y S. Soil sickness problem in the sustainable development for the protected production of vegetables. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2000, 31(1): 124-126. (in Chinese)
- [3] 汪立刚, 王 玉, 华天懋, 王敬国, 张福锁, 阮维斌. 土壤灭菌对大豆的增产效果及其机理探讨. 西北农业学报, 2001, 10(1): 67-71.
Wang L G, Wang Y, Hua T M, Wang J G, Zhang F S, Ruan W B. Research on the effect of soil sterilization on soybean yield increasing and its mechanisms. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2001, 10 (1): 67-71. (in Chinese)
- [4] 吴凤芝, 王 伟, 栾非时. 土壤灭菌对大棚连作黄瓜生长发育影响. 北方园艺, 1999, (5): 49.
Wu F Z, Wang W, Luan F S. Effect of sterilized soil on cucumber growth and development in green house. *Northern Horticulture*, 1999, (5): 49. (in Chinese)
- [5] 张春兰, 吕卫光, 袁 飞, 朱 林. 生物有机肥减轻设施栽培黄瓜连作障碍的效果. 中国农学通报, 1999, 15(6): 67-69.
Zhang C L, Lü W G, Yuan F, Zhu L. The effect of bio-manure on alleviation of continuous cucumber obstacles in green house. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 1999, 15(6): 67-69. (in Chinese)
- [6] Yoshitaka Shiomi, Masaya Nishiyama, Tomoko Onizuka, Takuya Marumoto. Comparison of bacterial community structures in the rhizoplane of tomato plants grown in soils suppressive and conducive towards bacterial wilt. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65 (9): 3996-4001.
- [7] 刘亚峰, 孙富林, 周 毅, 贾新成. 黄瓜连作对土壤微生物区系影响 I: 基于可培养微生物种群的数量分析. 中国蔬菜, 2006, (7): 4-7.
Liu Y F, Sun F L, Zhou Y. The effects of continuous cucumber cropping on microbial communities structure I: Based on quantitative analysis of culturable microbial population. *Chinese Vegetables*, 2006, (7): 4-7. (in Chinese)
- [8] Hu Y S, Wu K, Liu N, Chen H G, Jia X C. Dynamics of microbial communities in bulk and developing cucumber rhizosphere soil. *Agricultural Sciences in China*, 2004, 3(5): 376-383.
- [9] 张瑞福, 曹 慧, 崔中利, 李顺鹏, 樊 奔. 土壤微生物总 DNA 的提取和纯化. 微生物学报, 2003, 43(2): 276-282.
Zhang R F, Cao H, Cui Z L, Li S B, Fan B. Extraction and purification of soil microbial total DNA. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43(2): 276-282. (in Chinese)
- [10] Gerard Muyzer, Ellen C de Waal, Andre G Uitterlinden. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes

- coding for 16SrRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695-700.
- [11] Richard C Hamelin, Pierre Bérubé, Manon Gignac, Martin Bourassa. Identification of root rot fungi in nursery seedlings by nested multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(11): 4026-4031.
- [12] 胡元森, 刘亚峰, 吴 坤, 窦会娟, 贾新成. 黄瓜连作土壤微生物区系变化研究. *土壤通报*, 2006, 37(1): 126-129.
- Hu Y S, Liu Y F, Wu K, Dou H J, Jia X C. Variation in microbial communities structure in relation to successive cucumber cropping soil. *Chinese Journal of Soil Sciences*, 2006, 37(1): 126-129. (in Chinese)
- [13] 雷娟利, 周艳虹, 丁 桔, 王 礼, 喻景权. 不同蔬菜连作对土壤细菌 DNA 分子水平多态性影响的研究. *中国农业科学*, 2005, 38(10): 2076-2083.
- Lei J L, Zhou Y H, Ding J, Wang L, Yu J Q. Effect of continuous cropping of different vegetables on DNA polymorphism of soil bacteria. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38(10): 2076-2083. (in Chinese)
- [14] Alvey S, Yang C H, Buerkert A, Crowley D E. Cereal/legume rotation effects on rhizosphere bacterial community structure in west African soils. *Biology and Fertility Soils*, 2003, 37: 73-82.
- [15] R James Cook, Linda S Thomashow, David M Weller, Debbie Fujimoto, Mark Mazzola, Gita Bangera, Dal-Soo Kim. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92: 4197-4201.
- [16] Brian B Mcspadden Gardener, David M Weller. Changes in populations of rhizosphere bacteria associated with take-all disease of wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(10), 4414-4425.
- [17] Tamara Basta, Sibylle Buerger, Andreas Stolz. Structural and replicative diversity of plasmids from sphingomonads that degrade polycyclic aromatic compounds and xenobiotics. *Microbiology*, 2005, 151: 2025-2037.
- [18] Pramanik M H R, Nagai M, Asao T, Matsui Y. Effects of temperature and photoperiod on phytotoxic root exudates of cucumber (*Cucumis sativus*) in hydroponic culture. *Journal of Chemical Ecology*, 2000, 26(8): 1953-1966.
- [19] Roberto Buonaurio, Vittorio M Stravato, Yoshimasa Kosako, Nagatoshi Fujiwara, Takashi Naka, Kazuo Kobayashi. *Sphingomonas melonis* sp. nov., a novel pathogen that causes brown spots on yellow Spanish melon fruits. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52, 2081-2087.
- [20] Ji P S, Mark Wilson, Assessment of the importance of similarity in carbon source utilization profiles between the biological control agent and the pathogen in biological control of bacterial speck of tomato. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(9): 4383-4389.
- [21] Li S T, Zhou J M, Wang H Y, Chen X Q. Phenolic acids in plant-soil-microbe system: A review. *Pedosphere*, 2002, 12(1): 1-11.
- [22] 张亚平, 刘日明. 根际微生物与地膜甜菜生长发育关系的研究. *石河子大学学报(自然科学版)*, 1999, 3(3): 183-186.
- Zhang Y P, Liu R M. A study on relation between growth of beet and rhizosphere microorganism. *Journal of Shihezi University (Natural Science)*, 1999, 3(3): 183-186. (in Chinese)
- [23] Yang C H, David E Crowley. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(1): 345-351.
- [24] van Bruggen A H C, Semenov A M, Zelenev V V. Wavelike distributions of microbial populations along an artificial root moving through soil. *Microbial Ecology*, 2000, 40: 250-259.
- [25] Ryan K Miya, Mary K Firestone. Enhanced phenanthrene biodegradation in soil by slender oat root exudates and root debris. *Journal of Environmental Quality*, 2001, 30: 1191-1198.
- [26] 傅慧兰, 战景仁, 孟 民, 邹永久. 大豆连作的过氧化氢酶活性与根系分泌物. *吉林农业科学*, 1997, (4): 34-36.
- Fu H L, Zhan J R, Meng M, Zou Y J. Hydrogen peroxide enzyme activity and roots exudations in soybean continuous cropping. *Jilin Agricultural Sciences*, 1997, (4): 34-36. (in Chinese)
- [27] 胡学玉, 李学垣, 谢振翅. 不同青菜品种吸锌能力差异及与根系分泌物的关系. *植物营养与肥料学报*, 2002, 8(2): 234-238.
- Hu X Y, Li X H, Xie Z C. Differences of Zn uptake in various pakchoi cultivars and relationship between Zn uptake and root exudates. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2002, 8(2): 234-238. (in Chinese)