

乙草胺胁迫对土壤真菌拮抗功能和假单胞菌以及芽胞杆菌群落结构的影响

吴敏娜^{1,2}, 张惠文¹, 李新宇¹, 张彦¹, 苏振成¹, 张成刚¹

(1.中国科学院沈阳应用生态研究所, 辽宁 沈阳 110016; 2.中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘 要: 真菌拮抗功能是自然健康土壤对病原真菌所具有的免疫能力, 这种能力与土壤中许多可分泌拮抗物质的细菌有关, 而假单胞菌和芽胞杆菌是目前研究最多的具拮抗功能的种群。乙草胺是北方使用量最大的除草剂, 目前它的施用对土壤真菌拮抗能力的影响还未见报道。本文通过室内模拟培养, 考察不同浓度乙草胺(0、50、150、250 mg·kg⁻¹ 土)对土壤真菌拮抗能力的影响, 并运用PCR-DGGE(变性梯度凝胶电泳)方法研究真菌拮抗功能逐渐下降的土壤样品中假单胞菌和芽胞杆菌群落结构变化情况。结果表明, 在实验室微宇宙条件下, 乙草胺的施用会降低土壤真菌拮抗能力, 在处理第 12 d 时可以得到土壤真菌拮抗功能差异显著的土壤样品。土壤芽胞杆菌多样性随乙草胺浓度的升高而下降, 而假单胞菌多样性变化不大。乙草胺胁迫下芽胞杆菌和假单胞菌群落结构都发生明显改变, 尤其是芽胞杆菌(处理土壤样品与对照的群落结构相似性为 0.60), 且施加浓度越高, 群落结构组成偏离自然土壤越远。真菌拮抗能力的降低与假单胞菌和芽胞杆菌多样性和结构的改变相关。

关键词: 乙草胺; 假单胞菌; 芽胞杆菌; 多样性; 种群结构; PCR-DGGE

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2008)03-0926-06

Effects of Acetochlor on Soil Fungistasis and the Community Strcture of *Pseudomonas* and *Bacillus*.

WU Min-na^{1,2}, ZHANG Hui-wen¹, LI Xin-yu¹, ZHANG Yan¹, SU Zhen-cheng¹, ZHANG Cheng-gang¹

(1. Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Science, Shenyang 110016, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: Fungistasis is one of soil important functions which have shown to be closely correlated with soil bacterial community especially with *Bacillus* and *Pseudomonas* genus. Any factors which have effects on soil bacterial community can influence the fungistasis including agrochemicals such as acetochlor which was widely applied in north China. The effects of different concentrations of acetochlor (0, 50, 150 and 250 mg·kg⁻¹) on soil fungistasis was investigated in laboratory microcosm soil, and the characteristics of *Pseudomonas* and *Bacillus* genus community structure in treated soil was studied by *Bacillus* and *Pseudomonas* specific PCR-DGGE (polymerase chain reaction coupled with denatured gradient gel electrophoresis). The results showed that the soil fungistasis declined with the application concentration increasing of acetochlor at the 12th day. At the same time, the diversity of *Bacillus* and *Pseudomonas* in soil treated with acetochlor was lower than that in the control. The diversity index of *Bacillus* decreased from 3.05 to 1.98 with acetochlor concentration increasing (0 to 150 mg·kg⁻¹), but it was 2.53 at 250 mg·kg⁻¹ of acetochlor. The community structure of *Bacillus* and *Pseudomonas*, especially *Bacillus*, were significantly different from that in the control soil, and the higher concentration of acetochlor applied, the more degenerated of soil fungistasis was as well as the further bacterial community structure deviated from the control soil.

Keywords: acetochlor; *Pseudomonas*; *Bacillus*; diversity; community structure; PCR-DGGE

收稿日期: 2007-08-28

基金项目: 国家青年科学基金资助项目(40701088); 国家自然科学基金资助项目(30770405)

作者简介: 吴敏娜 (1981—), 女, 博士研究生, 主要从事环境微生物分子生态研究。E-mail: happy_minzi@163.com

通讯联系人: 张惠文 E-mail: huiwen_zhang@yahoo.com.cn

土壤真菌拮抗功能是指自然土壤所具有的在一定程度上控制真菌 (特别是病原真菌) 生长繁殖的能力, 对控制农作物土传病害具有积极的生态学意义, 它与土壤微生物参与的碳-氮循环等功能一样, 也是土壤质量和生物学功能的重要指标。半个世纪以来, 人们从土壤理化性质、营养因素、环境变化以及微生物特征等方面对土壤真菌拮抗功能的机理进行了探讨, 越来越多的证据表明土壤微生物群落组成及代谢物活性与土壤真菌拮抗功能密切相关^[1-3], 土壤中的微生物是真菌拮抗功能的决定因素, 土壤类型、耕作方式、植被种类等其他因素通过影响微生物而作用于土壤真菌拮抗功能^[4-6]。

关于土壤真菌拮抗功能的作用机制有多种假说, 其中抗真菌抗生素假说得到了广泛认可, 而假单胞菌及芽胞杆菌是土壤微生物中最主要的抗真菌物质生产者, 是土壤真菌拮抗功能重要的贡献者。目前已经分离出许多拮抗菌^[7-9], 部分已经应用到实际生产中, 如假单胞菌 M18, 其发酵产物已被制成申嗪霉素广泛应用于瓜果蔬菜真菌病害的防治。

乙草胺作为旱地酰胺类芽前除草剂, 主要应用于玉米、大豆、花生、棉花、甘蔗等种植地。目前已知乙草胺施用会导致土壤微生物在数量、结构上发生改变^[10-13], 而对其是否影响土壤真菌拮抗功能尚未见报道。本实验通过施加不同浓度乙草胺于自然清洁土壤中, 研究了乙草胺对土壤真菌拮抗功能的影响, 并揭示了乙草胺所致土壤芽胞杆菌群落结构改变是影响土壤真菌拮抗功能的重要因素。

1 材料与方法

1.1 土壤样品采集

采集中国科学院沈阳生态实验站近 10 年未受农药和肥料影响的自然撂荒地潮棕壤。土壤 pH 值为 6.21, 有机质含量为 $15.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土, 含有 14.1% 的沙粒, 62.8% 的粉粒和 23.1% 的粘粒。采取叉花式采样法, 分别采集 0~20 cm 表层土壤, 充分混匀, 过 2 mm 筛子后于 4 °C 保存备用。

1.2 土壤样品处理

用市售产品(禾耐斯 harness, 90% 乳油, 美国孟山都公司)配制乙草胺甲醇($250 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)储备液。将土壤样品分为两部分, 其中一部分土壤样品分成 4 份, 每份 3 kg, 施以不同剂量乙草胺。设对照和乙草胺低、中、高 3 个浓度(50、150 和 $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土)共 4 个处理, 每个处理 3 个重复。将农药施入土壤, 充分混匀

后, 放置 30 min 使乙草胺中甲醇挥发, 加水使土壤含水量达田间最大含水量的 60%, 然后装入花盆中, 保证一定的通气性, 并置于培养箱中 25 °C 避光培养, 培养过程中以称重法定期补充水分, 每隔 6 d 取一次样。另一份先 121 °C 湿热灭菌 1 h, 再分成 4 份, 每份 3 kg, 进行以上处理, 检测无土壤微生物时乙草胺对指示菌的直接作用。

1.3 土壤真菌拮抗能力检测

在 PDA 平板中央接种禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*), 28 °C 培养 3 d, 备用。每次取样后, 称取未灭菌和灭菌的各处理土壤样品 40 g 于培养皿中, 在中央接入 0.8 cm 直径的带 *Fusarium graminearum* 菌丝的琼脂块, 28 °C 培养 3 d, 测量菌丝在土壤表面的生长直径, 每个处理 3 次重复,

1.4 PCR-DGGE 分析

1.4.1 土壤总 DNA 提取

称取 1 g 土壤样品, 加入 0.5 g 无菌石英砂, 900 μL 提取缓冲液($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, pH 8.0), 于涡旋仪旋振 10 min, 然后加入 50 μL 溶菌酶($100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)混匀, 于 37 °C 摇床 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡 30 min, 再加入 100 μL 20% SDS 溶液, 混匀后于 65 °C 水浴裂解 30 min (每隔 10 min 颠倒混匀一次)。上述土壤微生物裂解液采用 Yeates^[16]的方法进行 DNA 抽提, 得到的 DNA 溶液于 -20 °C 保存备用。

1.4.2 PCR 扩增

用半巢式 PCR 体系扩增假单胞菌及芽胞杆菌 16S rRNA 基因的 V6/V7 区。各引物序列见表 1。

(1) 假单胞菌 PCR 扩增: 用假单胞菌特异性引物 PsF 和 PsR^[17]进行巢式第一步, PCR 反应条件为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 1 min, 66 °C 1 min, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。扩增产物稀释 50 倍作为模板, 用引物 F968-GC 和 PsR 进行巢式第二步, PCR 反应条件采用降落 PCR 策略, 即 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 2 min; 94 °C 1 min, 60 °C ~55 °C 1 min(-0.5 °C/循环), 72 °C 2 min, 10 个循环; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 20 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

(2) 芽胞杆菌 PCR 扩增: 用芽胞杆菌特异性引物 BacF^[18]和细菌通用引物 R1378 进行巢式第一步, PCR 反应条件为 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 65 °C 90 s, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。扩增产物稀释后作模板, 用细菌通用引物 F968-GC 和 R1378 进行巢

表 1 引物的序列以及扩增位置和长度
Table 1 The sequence of primers, their target regions and length

引物	序列	位置
PsR	GGTCTGAGAGGATGATCAGT	289-308
PsF	TTAGTCTCCACCTCGCGGC	1 258-1 272
BacF	GGGAAACCGGGGCTAATACCGGAT	79-102
R1378	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG	1 378-1 401
F968	AACGCGAAGAACCTTAC	968-984

GC夹序列:CGCCCCGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGG
The sequence of GC clamp:
CGCCCCGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGG

式第二步,PCR 反应为 94 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min,63 ℃/61 ℃/59 ℃/57 ℃/55 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,每个退火温度各 2 个循环;94 ℃ 1 min,55 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,20 个循环;最后 72 ℃退火 10 min。

1.4.3 DGGE 条件

DGGE 采用 Dcode TM (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA),假单胞和芽胞菌的 DGGE 条件相同,都是 8%聚丙烯酰胺凝胶,变性梯度为 45%~65% (100%变性相当于 7 mol·L⁻¹ 尿素和 40%去离子甲酰胺),PCR 产物加样量 40 μL, 在 60 ℃,1×TAE,200 V 电压下电泳 5 h。电泳胶片用 GeneFinder(BIO-V)染料染色 45 min,然后采用 Bio-Rad 凝胶成像系统进行扫描分析。

1.5 实验数据处理

真菌拮抗实验的数据采用 SPSS 11.5 软件进行单因素方差分析(ANOVA)。

用 Quantity One(4.2.3)软件对 DGGE 图谱进行分析,计算各样品多样性指数($H=-\sum P_i \ln P_i$,其中 $P_i=n_i/N$, n_i 为某个带的峰强度, N 为该带所在泳道所有谱带峰强度之和)并进行聚类分析(UPGMA)。

2 结果与讨论

2.1 乙草胺对土壤真菌拮抗功能的影响

Fusarium graminearum 在不同浓度乙草胺处理的灭菌土壤表面生长速度几乎相同,并且在第 3 d 时均覆盖整个培养皿,菌丝生长无显著性差异。

分析各处理土壤表面禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)菌丝的生长直径(图 1),发现乙草胺处理第 12 d 时各处理对指示真菌抑制作用有显著差异。对照土壤中指示真菌菌丝生长只局限于接入的菌块范围,直径为 0.80 cm;随着乙草胺浓度的升高,指示

真菌生长得到促进,菌丝直径不断增大,高浓度乙草胺处理土壤中的菌丝直径达到 2.34 cm,且不同处理之间菌丝直径差异显著。

Fusarium graminearum 是一种常见的农作物病原真菌,能引起田间禾本科作物的根腐、茎腐、穗腐病^[14,15],是小麦赤霉病和玉米青枯病等的主要致病菌,因此本实验以其作为真菌生长指示菌来反映土壤真菌拮抗功能的强弱。病原真菌菌丝在土壤中生 长直径的大小可以用来指示土壤真菌拮抗功能的高低^[4],禾谷镰刀菌菌丝直径随乙草胺浓度的升高不断增大表明乙草胺可降低自然土壤的抗真菌能力,且浓度越高,土壤真菌拮抗功能下降越多,禾谷镰刀菌生长越旺盛。这与前人的研究结果一致,他们采用与本实验相同的乙草胺处理浓度,在研究乙草胺对土壤细菌和真菌的影响时发现乙草胺处理初期强烈抑制土壤细菌的生长,同时刺激土壤真菌生长,长期作用则使细菌和真菌 CFU 均接近对照,但是群落结构发生不可恢复的改变^[11,19]。

乙草胺处理灭菌土壤中 *Fusarium graminearum* 生长直径差异不显著,表明实验浓度乙草胺对接入土壤表面的 *Fusarium graminearum* 菌丝生长没有刺激或抑制作用,处理自然土壤样品中指示真菌菌丝直径的差异不是乙草胺直接作用的结果,而是乙草胺通过作用于土壤微生物而间接产生的。

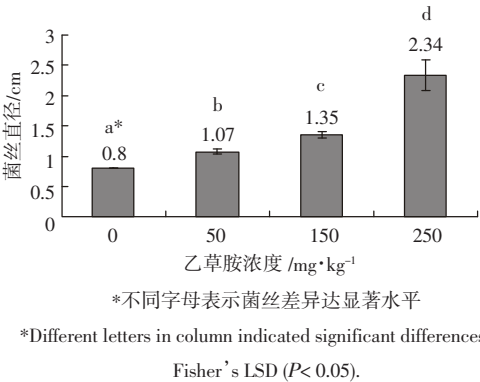


图 1 乙草胺对土壤真菌拮抗能力的影响
Figure 1 Effect of acetoachlor on soil fungistasis

2.2 乙草胺对假单胞菌及芽胞杆菌群落组成的影响

假单胞菌 DGGE 图谱中各泳道条带在数量和亮度上差异很小(图 2 a),多样性指数相近(表 2),说明实验浓度乙草胺对假单胞菌多样性几乎没有影响。土壤假单胞菌 DGGE 指纹图谱聚类分析结果表明,对照与低浓度乙草胺处理土壤聚为一簇,相似性指数高达 0.92;中、高浓度乙草胺处理土壤聚为另一簇,相似性

为 0.88,但 4 个样品的相似性仍高达 0.85(图 3a)。假单胞菌群落结构组成的研究表明,乙草胺能轻微影响假单胞菌种群结构,浓度越高,土壤细菌群落结构改变越大,偏离对照土壤越远。

芽胞杆菌 DGGE 图谱中各泳道条带有着很大的差异(图 2b),对照土壤样品含有最多的条带,其多样性指数也最高,达到 3.05。低、中浓度乙草胺处理土壤的条带逐渐减少,多样性指数也不断下降,但是高浓度乙草胺处理土壤中出现了新的条带,多样性指数随之上升(表 2)。对土壤芽胞杆菌 DGGE 指纹图谱进行聚类分析(图 3b),结果表明,乙草胺作用下芽胞杆菌群落结构发生了一定的变化,对照土壤与低、中浓度乙草胺处理土壤以 0.62 的相似性聚在一起,与高浓度乙草胺处理土壤的相似性则为 0.60。高浓度乙草胺

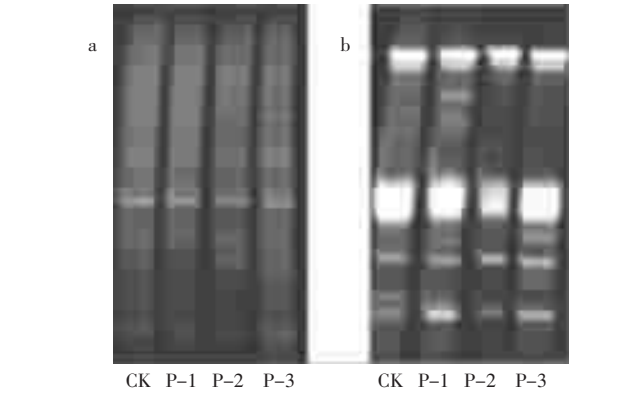
处理土壤中新的特异性条带导致了群落结构的较大变化,而低、中浓度乙草胺处理土壤群落结构差异较小,相似性达到 0.73。

研究表明微生物种群的消失或者减少与真菌拮抗功能直接相关,特别是假单胞菌和芽胞杆菌^[20,21]。对长期草地(50 a)、草地改耕地(20 a)和长期耕地土壤中

表 2 真菌拮抗模型土壤假单胞菌及芽胞杆菌
种群多样性指数

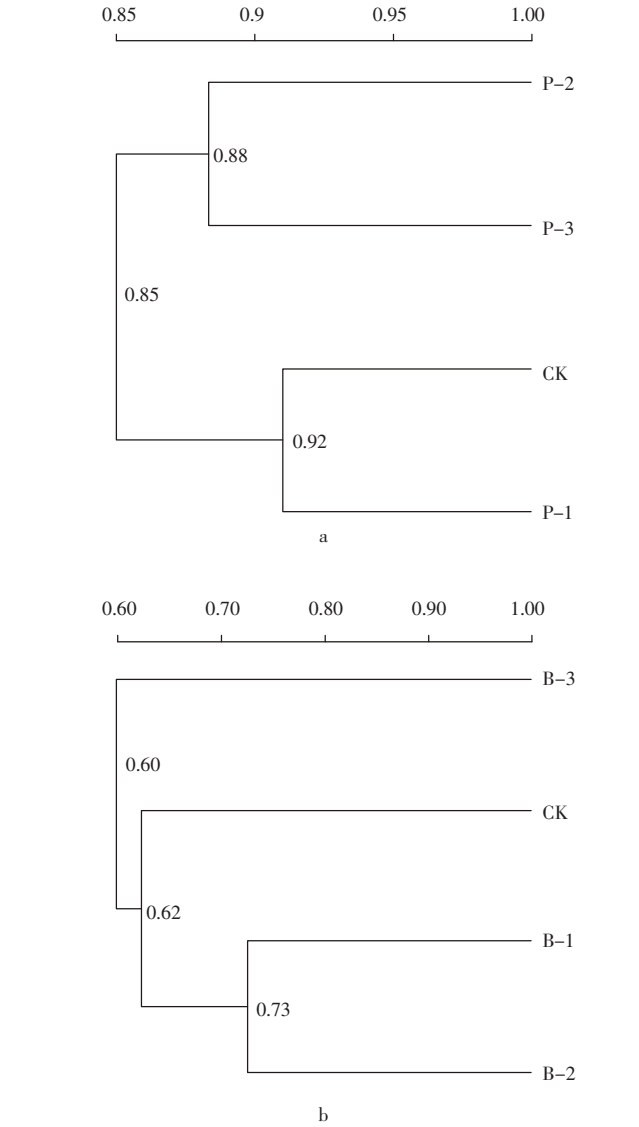
Table 2 Shannon index of *Pseudomonas* and *Bacillus*
community in soil samples based on DGGE

土壤样品	对照	样品 1 乙草胺/ 50 mg·kg ⁻¹	样品 2 乙草胺/ 150 mg·kg ⁻¹	样品 3 乙草胺/ 250 mg·kg ⁻¹
假单胞菌多样性指数	3.39	3.31	3.20	3.35
芽胞杆菌多样性指数	3.05	2.57	1.98	2.53



泳道 CK、P-1、P-2、P-3 分别为对照、50、150、250 mg·kg⁻¹ 乙草胺处理土壤的假单胞菌 (a); 泳道 CK、B-1、B-2、B-3 分别为对照、50、150、250 mg·kg⁻¹ 乙草胺处理土壤的芽胞杆菌(b)。

Lane CK, P-1, P-2, P-3 represent the *Pseudomonas* of soil samples treated by 0, 50, 150, 250 mg·kg⁻¹ acetochlor (a); Lane CK, B-1, B-2, B-3 represent the *Bacillus* of soil samples treated by 0, 50, 150, 250 mg·kg⁻¹ acetochlor (b).



CK、P-1、P-2、P-3 分别为对照、50、150、250 mg·kg⁻¹ 乙草胺处理土壤的假单胞菌(a); CK、B-1、B-2、B-3 分别为对照、50、150、250 mg·kg⁻¹ 乙草胺处理土壤的芽胞杆菌(b)。

CK, P-1, P-2, P-3 represent the *Pseudomonas* of soil samples treated by 0, 50, 150, 250 mg·kg⁻¹ acetochlor (a); CK, B-1, B-2, B-3 represent the *Bacillus* of soil samples treated by 0, 50, 150, 250 mg·kg⁻¹ acetochlor (b).

图 2 真菌拮抗模型土壤假单胞菌(a)和芽胞杆菌(b)
PCR-DGGE 图谱

Figure 2 PCR-DGGE of *Pseudomonas* and
Bacillus in soils of fungistasis model

图 3 真菌拮抗模型土壤假单胞菌(a)和芽胞杆菌(b)
种群组成相似性矩阵图

Figure 3 Similarity matrix of community composition of
Pseudomonas (a) and *Bacillus* (b) in soils of fungistasis model

的芽胞杆菌和假单胞菌,尤其是抗真菌 *Rhizoctonia solani* AG3 的假单胞菌种群多样性的研究表明,不同的土壤耕作方式可以改变土壤中假单胞菌和芽胞杆菌群落结构,这种改变与土壤真菌拮抗功能密切相关,假单胞菌和芽胞杆菌多样性指数高的草地真菌拮抗功能最强,多样性指数最低的耕地功能最弱^[22,23]。本实验中假单胞菌及芽胞杆菌的 PCR-DGGE 分析结果表明,乙草胺对土壤假单胞菌多样性指数和群落结构的影响很小,但对芽胞杆菌表现出一定的毒害作用,导致 DGGE 图谱中电泳条带明显减少,多样性指数下降,群落结构发生较大变化。高浓度乙草胺处理土壤 DGGE 图谱中出现了新的特异性条带,多样性指数随之回升,但是种群结构改变最大,这可能是土壤中某些耐受乙草胺,或者能够利用乙草胺的芽胞杆菌由于高浓度乙草胺的加入和生长竞争压力的减少而富集的结果。

乙草胺由于其半衰期较短(5~7 d),一直被认为是一种低毒和对环境影响较小的农药而被鼓励使用。但是现在许多研究表明,乙草胺尽管在环境中存在的周期短,但是对土壤微生物的影响是长期和不可逆的^[10,11,13,19]。本实验进一步说明了乙草胺可以通过改变土壤重要的抗真菌功能群——芽胞杆菌和假单胞菌,特别是芽胞杆菌而降低土壤真菌拮抗功能。因此,不要因为乙草胺毒性低、降解周期短而频繁使用。

3 结论

(1)不同浓度乙草胺(0、50、150、250 mg·kg⁻¹)处理自然清洁土壤,可以降低土壤抑真菌能力,在处理第 12 d 时可以得到真菌拮抗功能差异显著的土壤样品。

(2)假单胞菌和芽胞杆菌群落组成随着乙草胺的施加发生改变,尤其是土壤芽胞杆菌群落结构,且浓度越高,越偏离自然土壤群落结构组成。这种改变与土壤真菌拮抗能力下降相关。

参考文献:

- [1] Benizri E, Piutti S, Verger S, et al. Replant diseases: bacterial community structure and diversity in peach rhizosphere as determined by metabolic and genetic fingerprinting[J]. *Soil Biol Biochem*, 2005, 37: 1738–1746.
- [2] Kaiser O, Puhler A, Selbitschka W. Phylogenetic analysis of microbial diversity in the rhizoplane of oilseed rape (*Brassica napus* cv. Westar) employing cultivation-dependent and cultivation-independent approaches[J]. *Microb Ecol*, 2001, 42: 136–149.
- [3] Pérez-Piqueres A, Edel-Hermann V, Alabouvette C, et al. Response of soil microbial communities to compost amendments [J]. *Soil Biol Biochem*, 2006, 38: 460–470.

- [4] De Boer W, Verheggen P, Klein Gunnewiek P J A, et al. Microbial community composition affects soil fungistasis [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 835–844.
- [5] Marschner P, Yang C H, Lieberei R, et al. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere[J]. *Soil Biol Biochem*, 2001, 33: 1437–1445.
- [6] 李 斌,谢关林,陈若霞,等. 耕作与栽培方式对瓜类土壤细菌数量及枯萎病拮抗细菌分布的影响 [J]. *应用生态学报*, 2006, 17(10): 1937–1940.
- LI B, XIE G L, CHEN R X, et al. Effects of cropping system and cultivation pattern on bacterial populations and anti-fusarium wilt bacteria in melon soils[J]. *Chin J Appl Ecol*, 2006, 17(10): 1937–1940 (in Chinese).
- [7] 薛东红,刘训理,陈 凯,等. 一株植物病原真菌拮抗细菌的分离与鉴定[J]. *山东农业大学学报(自然科学版)*, 2006, 37(1): 1–5.
- XUE D H, LIU X L, CHEN K, et al. Isolation and identification of a strain of antagonistic bacteria inhibiting against plant pathogenic fungi[J]. *J Shangdong Agri Univ (Nat Sci Ed)*, 2006, 37(1): 1–5 (in Chinese).
- [8] 郑爱萍,李 平,王世全,等. 水稻纹枯病强拮抗菌 B34 的分离与鉴定[J]. *植物病理学报*, 2003, 33(1): 81–85.
- ZHENG A P, LI P, WANG S Q, et al. Screening, taxonomy of antagonistic strain B34 against *Thanatephorus cucumeris*[J]. *Acta Phytopath Sinica*, 2003, 33(1): 81–85 (in Chinese).
- [9] De La Fuente L, Thomashow L, Weller D, et al. *Pseudomonas fluorescens* UP61 isolated from birdfoot trefoil rhizosphere produces multiple antibiotics and exerts a broad spectrum of biocontrol activity[J]. *Eur J Plant Patho*, 2004, 110: 67–678.
- [10] Zhang H, Zhang Q, Zhou Q, et al. Binary-joint effects of acetochlor, methamidophos, and copper on soil microbial population[J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2003, 71: 746–754.
- [11] Li X Y, Zhang H W, Zhou Q X, et al. Effects of acetochlor and methamidophos on fungal communities in black soils [J]. *Pedosphere*, 2005, 15(5): 646–652.
- [12] 罗海峰,齐鸿雁,张洪勋.乙草胺对农田土壤细菌多样性的影响[J]. *微生物学报*, 2004, 44(4): 519–522.
- LUO H F, QI H Y, ZHANG H X. The impact of acetochl on the bacterial diversity in soil [J]. *Acta Microbiol Sinica*, 2004, 44 (4): 519–522 (in Chinese).
- [13] 张惠文,张倩茹,周启星,等. 乙草胺及铜离子复合施用对黑土农田生态系统土著微生物的急性毒性效应[J]. *农业环境科学学报*, 2003, 22(2): 129–133.
- ZHANG H W, ZHANG Q R, ZHOU Q X, et al. Combined effects of acute toxicity of acetochlor and copper on soil microbial population and biological characteristics in maize-wheat-soybean agroecosystem [J]. *J Agro-Environ Sci*, 2003, 22(2): 129–133 (in Chinese).
- [14] 刘金华,肖成蕊,魏春艳.应用 PCR 技术检测玉米中的禾谷镰刀菌[J]. *植物检疫*, 2004, 18(6): 333–335.
- LIU J H, XIAO C R, WEI C Y. Species-specific PCR assays for the identification of *Fusarium graminearum* in maize [J]. *Plant Quar*, 2004, 18(6): 333–335 (in Chinese).
- [15] 张小红,陈耀峰,闵东红,等. 胚发育时间和禾谷镰刀菌粗毒素对

小麦幼胚愈伤组织诱导及幼苗分化的影响 [J]. 西北农林科技大学 (自然科学版), 2006, 34(12): 92–96.

ZHANG X H, CHEN Y F, MIN D H, et al. Effect of *Fusarium graminearum* crude toxin and embryo development time on inducement and plantlet differentiation of calli in wheat young embryos culture [J]. *J Northwest Sci-Tech Univ Agri and For (Nat Sci Ed)*, 2006, 34(12): 92–96 (in Chinese).

[16] Yeates C, Gillings M R, Davison A D, et al. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification [J]. *Biol Proced Online*, 1998, 1(1): 40–47.

[17] Elsas J D V, Garbeva P, Veen J A V. Assessment of the diversity and antagonism toward *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2003, 47: 51–64.

[18] Garbeva P, Veen J A V, Elsas J D. Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR–DGGE [J]. *Microb Ecol*, 2003, 45: 302–316.

[19] 张惠文. 复合农药胁迫下黑土土壤微生物生态过程及分子生态学研究 [A]. 沈阳: 中国科学院沈阳应用生态研究所, 2003, 86–88.

ZHANG H W. Ecological process and molecular ecology of microbial

community in black soil under stress of acetochlor, methamidophos, copper, and their binary combinations [A]. Shenyang: Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, 2003, 86–88 (in Chinese).

[20] Gorissen A, van Overbeek L S, van Elsas J D. Pig slurry reduces the survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in soil [J]. *Can J Microbiol*, 2004, 50: 587–593.

[21] Hunter P J, Petch G M, Calvo–Bado L A, et al. Differences in microbial activity and microbial populations of peat associated with suppression of damping–off disease caused by *Pythium sylvaticum* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72: 6452–6460.

[22] Garbeva P, van Veen J A, van Elsas J D. Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR–DGGE [J]. *Microb Ecol*, 2003, 45: 302–316.

[23] Garbeva P, van Veen J A, van Elsas J D. Assessment of the diversity, and antagonism towards *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2004, 47: 51–64.