

王璟,杨敬林,廖健程,等.稻-稻-油菜轮作对土壤枯草芽孢杆菌数量的影响研究[J].江西农业大学学报,2019,41(1):43-49.



稻-稻-油菜轮作对土壤枯草芽孢杆菌数量的影响研究

王璟¹,杨敬林¹,廖健程¹,丁鑫¹,陈哲¹,张立成^{2*}

(1.湖南农业大学工学院,湖南长沙410128;2.福建省农业科学院土壤肥料研究所,福建福州350013)

摘要:为检测长期进行稻-稻-油菜轮作土壤中枯草芽孢杆菌的数量变化,以长期稻-稻连作土壤为对照比较。在连续30年轮作和连作的大田(湖南安仁试验基地)进行试验,应用荧光定量PCR技术,对两类土壤中的枯草芽孢杆菌的数量进行检测。试验于2015年7月、10月和2016年4月3个时期对定点试验土壤进行取样。通过枯草芽孢杆菌特异性引物进行荧光定量PCR扩增。3个时期采样土壤的检测结果显示:轮作土壤中枯草芽孢杆菌数量比连作土壤分别增加37.50%,27.06%和20.20%;轮作和连作2015年7月采样土壤中枯草芽孢杆菌数量大于2016年4月采样土壤测定值,大于2015年10月采样土壤测定值。研究结果表明稻-稻-油菜轮作提高了土壤枯草芽孢杆菌的数量,使土壤中对作物生长有益的特定功能微生物数量增加,有利于改善土壤生态环境。

关键词:稻-稻-油菜轮作;枯草芽孢杆菌;荧光定量PCR;土壤环境

中图分类号:S154.36 **文献标志码:**A **文章编号:**1000-2286(2019)01-0043-07

Fluorescent quantitative PCR analysis of *Bacillus subtilis* in rice-rice-rape rotation system

WANG Jing¹, YANG Jing-lin¹, LIAO Jian-cheng¹, DING Xin¹,
CHEN Zhe¹, ZHANG Li-cheng^{2*}

(1.Hunan Agricultural University Engineering College, Changsha 410128, China; 2.Soil and Fertilizer Institute, Fujian Academy of Agricultural Science, Fuzhou 350013, China)

Abstract: In order to test the number of *Bacillus subtilis* in soil under the long-term rice-rice-rape rotation condition, taking long-term rice-rice rotation cultivation as the control, a comparison between the soils of the two cultivating types in Anren Hunan was made the soils were measured by quantitative PCR, one was the rice-rice-rape seed rotation soil and the other was rice-rice continuous cropping soil, which were both cultivated for 30 years. The soil samples were taken in the fixed-point test spot in July, 2015 and October, 2015 and April, 2016. The special primers of *Bacillus subtilis* were amplified with fluorescent quantitative PCR. The results of testing the soils sampled in the 3 periods showed that the *Bacillus subtilis* of the rice-rice-rape seed rotation soil, compared with the rice-rice continuous cropping soil, increased by 37.50% and 27.06% and 20.20% respectively. The

收稿日期:2018-05-21 修回日期:2018-06-19

基金项目:国家自然科学基金项目(31272248)和湖南省研究生创新项目(CX2017B364)

Project supported by the National Science Foundation of China (31272248) and Graduate Innovation Foundation of Hunan Province (CX2017B364)

作者简介:王璟(1965—),男,高级工程师,主要从事农业工程研究,420893751@qq.com; *通信作者:张立成,博士, zlc730@163.com。

number of *Bacillus subtilis* of the rice-rice-rapessed rotation soil and the rice-rice continuous soil sampled in July, 2015 was greater than that of the soil sampled in October, 2015, and both were greater than that of the soil sampled in April, 2016. The cultivation of rice-rice-rape rotation can improve the number of *Bacillus subtilis* and then improve the micro ecological environment of soil.

Keywords: rice-rice-rape rotation cropping; *Bacillus subtilis*; fluorescent quantitative PCR; soil environment

土壤微生物种类多、数量大,其对土壤养分元素循环、物质分解和植物生长有着直接或间接的影响,对维持土壤微环境生态系统结构和功能稳定具有十分重要的作用^[1-2]。土壤微生物的生长受到土壤理化性质、酸碱度、湿度、温度和土壤植被类型等多因素的影响。土壤类型和土壤环境条件相同时,土壤中的微生物群落变化与土壤植被类型有较大的相关性^[3]。栽种不同作物的土壤,各类微生物数量会发生变化,例如种植豆科作物的土壤,固氮菌类微生物数量增加,这与豆科植物根系产生的根瘤菌相关^[4]。轮作和连作是2种不同的耕作方式,已有研究报道轮作与连作相比较可明显提高作物产量和减少病害现象^[5]。连作是相同作物重茬种植,容易引发致病菌类微生物在土壤中的积累形成土传病菌,轮作是不同作物之间间隔茬种植,已有研究报道轮作能够抑制土传病菌在土壤中的积累^[6-7]。稻-稻-油菜轮作是我国南方地区常见的一种耕作模式,该栽培方式提高了耕地利用率和土地生产力,对作物生长有一定的促进作用^[8]。有学者研究发现轮作后的土壤微生物群落结构发生变化,形成了特定的优势菌群,提高了微生物的多样性^[9-10]。轮作土壤形成的优势菌群包含有大量有益微生物对作物生长产生影响,枯草芽孢杆菌是土壤中一种有益微生物,它能够促进作物生长,抑制土传病菌等作用^[11]。由于枯草芽孢杆菌与其他同属类菌株具有较高的相似特性,因此采用传统方法难以对其鉴定和检测。荧光定量PCR技术是一项基于分子水平的分析技术,可以通过DNA扩增过程中荧光显色测定微生物数量^[12]。Ito等^[13]应用PCR技术成功测定出根肿病菌类微生物。高菁^[14]通过筛选特异引物运用PCR荧光定量分析对土壤中黄瓜棒孢叶斑病的孢子数目进行测定。关于稻-稻-油菜轮作后土壤中枯草芽孢杆菌的数量变化目前鲜有报道。对此,本研究应用荧光定量PCR方法分析稻-稻-油菜轮作土壤中枯草芽孢杆菌数量,并以稻-稻连作土壤作为对照比较。通过对枯草芽孢杆菌数量定量分析,探索稻-稻-油菜轮作栽培对土壤中特定功能类微生物的影响,以期对稻-稻-油菜轮作栽培后对作物的促长作用机制从特定功能微生物水平上提供理论参考作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于2015年和2016年在湖南省安仁县渡口乡的轮作试验基地采集土壤样品。试验点地理位置坐标(N26°37', E113°20'),试验区域属亚热带季风气候,年均温度14~16℃,年均降雨量1200~1400mm。

1.2 试验设计

采用单因素分组的田间定位试验,将一块20m×8m试验大田分成“轮作”和“连作”2个试验小区组。沿试验大田长边方向每隔3m起垄将其分隔成6个3m×8m的试验小区,其中3个试验小区进行稻-稻-油菜轮作,另外3个试验小区进行稻-稻连作。稻-稻-油菜轮作种植方式:每年4月份播种早稻,7月份收割;早稻收割后立即播种晚稻,然后10月份收割;晚稻收割后立即播种油菜至第二年4月收割。稻-稻连作种植方式:每年4月份播种早稻,7月份收割;早稻收割后立即播种晚稻,10月份收割,然后进入冬闲状态。稻-稻-油菜轮作和稻-稻连作水稻季种植时间和种植方式完全相同。试验在连续30年的轮作和连作后于2015年7月、2015年10月和2016年4月分别在早稻收割期、晚稻收割期和油菜收割期采集根际土壤样品。连作由于不种植油菜,2016年4月采集冬闲土壤样品。试验按S型随机采样法从每个试验小区中采集5个土壤样品混匀后放入无菌自封袋中并编号。采样方式:将作物根系拔出后,抖动根围土壤,然后用手(戴无菌手套)取出根际土壤装入自封袋中并进行样品标记。试验将稻-稻-油菜轮作编号为DDY,稻-稻连作编号为DD。采集的土壤样品存放于冰盒中,然后迅速转移至试验室4℃冰箱待测。

1.3 测定项目和方法

1.3.1 枯草芽孢杆菌引物 土壤枯草芽孢杆菌株的引物设计参照相关文献[15-17]所提供土壤常见的几种芽孢杆菌特异引物,引物类型及序列如表 1 所示。引物由北京擎科生物科技有限公司(长沙试验中心)合成。

表 1 枯草芽孢杆菌的特异 PCR 引物筛选
Tab.1 Screening of specific PCR primers for *Bacillus subtilis*

序号 Serial number	引物(5'-3') Primer	序列 Sequence	基因 Gene	退火温度/℃ Annealing temperature
1	F	ATG AAG ATT TAC GGA ATT TA	sfp	60
	R	TTA TAA AAG CTC TTC GTA CG		
2	F	GTAAGGCGGGATCTAGAATGAGTCC	rodA	60
	R	ATACCACCAGATCTCTATTGCC		
3	F	AGA GTT GAT CCT GGC TCA G	16Sr DNA	58
	R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T		

1.3.2 土壤样品 DNA 的提取及 PCR 扩增 采用土壤基因组 DNA 提取试剂盒(宁波有成生物医药科技有限公司)提取。采用表 1 中的引物对提取的 DNA 进行 PCR 扩增,选择最适合本研究的引物序列。PCR 总反应体系为 20 μL , 10 \times Taq Buffer 5 μL , 上、下游引物各 1 μL , dNTP 2 μL , DNA 模板 1 μL , Taq DNA 聚合酶 0.25 μL , ddH₂O 9.75 μL 。扩增程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ (引物 3 为 58 $^{\circ}\text{C}$) 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 40 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。扩增完成后进行琼脂糖凝胶电泳并用回收试剂盒进行纯化回收。

1.3.3 重组质粒构建标准曲线 将枯草芽孢杆菌 PCR 扩增产物纯化回收后的目的基因连接至 pMD18-T 质粒载体,转化至 DH5 α 感受态细胞。转化步骤:将 100 mL 感受态细胞置于冰上,完全解冻后轻轻将细胞均匀悬浮,然后加入 10 mL 连接酶,轻轻混匀后于冰上放置 30 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴热 45 s, 冰上放置 15~20 s; 加 600 mL SOC (强化营养)培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 200 r/min 振荡培养 1 h; 室温下 4 000 r/min 离心 5 min, 用枪头吸掉 400 mL 上清液,用剩余的 SOC 培养基将细胞悬浮培养;将细菌涂布在预先用 20 μL 100 mmol/L IPTG (异丙基硫代半乳糖苷)和 100 μL 20 mg/mL X-gal (β -半乳糖苷酶显色剂)混合的氨苄青霉素平板上,将平板倒置培养过夜。挑取转化后平板上白色显阳性细菌质粒,使用 GENERAY 质粒提取试剂盒 GK2004 提取质粒 DNA,对质粒 DNA 测序后与目的基因比对确定重组质粒是否成功。用紫外分光光度计测定质粒 DNA OD_{260} 的值计算重组质粒浓度,以 10 倍梯度稀释质粒浓度,选择稀释后的 7 个不同浓度的重组质粒作为构建标准曲线的模板 DNA。以重组质粒模板 DNA 初始拷贝数的对数值为横坐标, C_t (荧光定量 PCR 中的循环数)值为纵坐标绘制标准曲线。

1.3.4 荧光定量 PCR 土壤样品 DNA 的检测 对重组质粒的 DNA 和土壤样品提取的 DNA 进行绝对荧光定量检测,每个土壤 DNA 样品进行 3 个重复。荧光定量 PCR 的总反应体系为 20 μL : 上、下游引物各 0.5 μL , Super Mix (SYBR Green 1 染料、dNTP、Taq 酶混合物) 10 μL , DNA 模板 1 μL , ddH₂O 8.0 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 40 次循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

1.4 数据分析

采用 Excel 2010 软件整理数据,应用 SPSS19.0 软件进行差异性统计分析。标准曲线中质粒浓度与拷贝数的关系式^[18]:

$$C = \frac{T \times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23}}{W} \quad (1)$$

式(1)中 C 表示拷贝数(单位:copies $\cdot\mu\text{L}^{-1}$), T 表示质粒浓度(单位:ng $\cdot\mu\text{L}^{-1}$), W 表示重组载体分子量(计算方式为碱基数 \times 660 道尔顿,单位:g $\cdot\text{mol}^{-1}$)。

2 结果与分析

2.1 土壤样品 DNA 普通 PCR 扩增

试验对土壤提取的基因组 DNA,参照已发表文献[15-17]中的枯草芽孢杆菌 PCR 扩增引物。所选用的表 1 中的 3 对引物进行 PCR 扩增,第 1 对引物扩增出 340 bp 大小的基因片段、第 2 对引物扩增出 450 bp 大小的基因片段、第 3 对引物扩增出 650 bp 大小的基因片段。为了适于荧光定量对枯草芽孢杆菌进行较好的定量分析,试验选用第 1 对引物进行荧光定量 PCR 扩增。普通 PCR 扩增完成后将第 1 对引物扩增产物进行回收和纯化,然后对其重组质粒构建标准曲线。

2.1 荧光定量 PCR 标准曲线的构建

2.1.1 质粒浓度构建标准曲线 PCR 扩增检验 重组质粒经 Nanodrop 分光光度计检测,测得枯草芽孢杆菌重组质粒浓度为 0.42 ng/ μL 根据重组序列的引物和质粒载体碱基数和阿伏加德罗分子数计算出枯草芽孢杆菌重组质粒的初始浓度对应的拷贝数分别为 1.216×10^8 个/ μL 、 1.368×10^8 个/ μL 。采用 10 倍梯度稀释法对重组质粒样品进行稀释。将枯草芽孢杆菌重组质粒的初始拷贝数按 10 倍梯度递减稀释至 12.161 个/ μL 。图 1 和图 2 为实时荧光定量 PCR 梯度稀释样品扩增曲线和溶解曲线(扩增曲线仅选择中间 5 个点作图分析)。图 1 中扩增曲线光滑平稳,指数增长长期明显,不同浓度之间间隔一致,图 2 中溶解曲线仅出现一个单峰,没有杂峰和低谷,说明试验扩增效果较好。

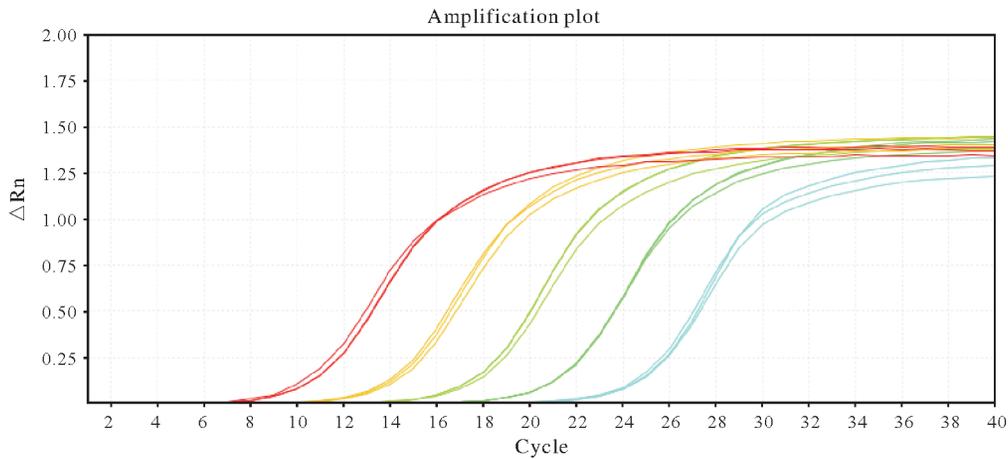


图 1 实时荧光定量 PCR 梯度稀释样品扩增曲线

Fig.1 Emulsion curve of real-time fluorescence quantitative PCR gradient dilution samples

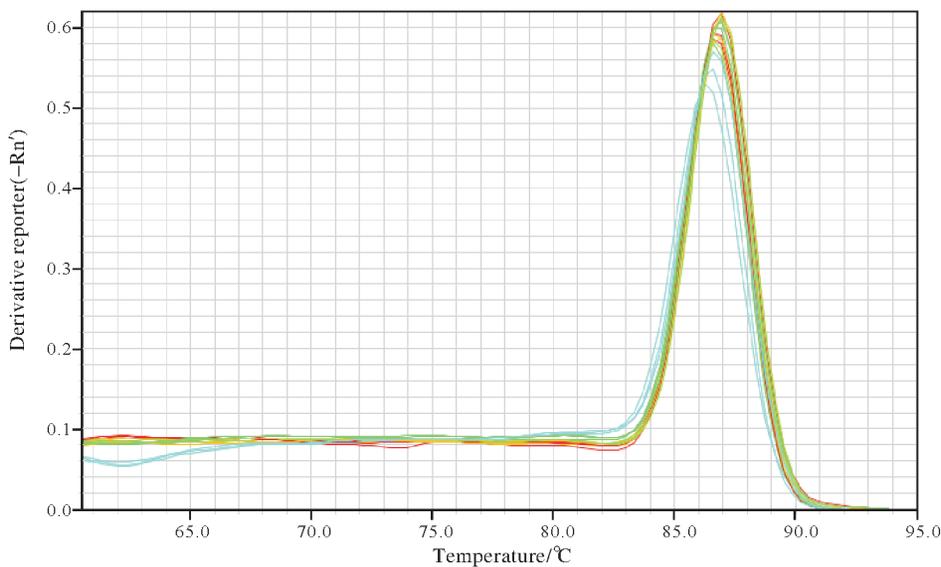
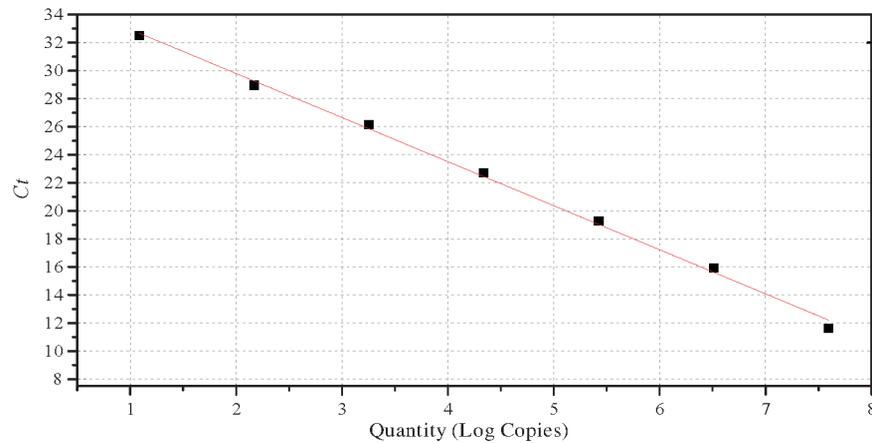


图 2 实时荧光定量 PCR 梯度稀释样品溶解曲线

Fig.2 Dissolution curve of real-time fluorescence quantitative PCR gradient dilution sample

2.1.2 实时荧光定量PCR标准曲线结果 通过对枯草芽孢杆菌 *spf* 基因克隆的重组质粒构建的标准曲线如图3所示。枯草芽孢杆菌标准曲线的相关系数(R^2)为0.997 2,符合标准曲线相关系数大于0.99的计算要求。荧光定量PCR的扩增效率(Eff)为90.329%,扩增效果较好。通过线性拟合计算得出枯草芽孢杆菌的标准曲线函数方程为 $y=-3.143x+36.083$ 。 y 表示循环次数 C_t 值, x 表示拷贝数的对数值,重组质粒DNA拷贝数的对数值与 C_t 值呈较好的线性关系可作为样品荧光定量分析参比曲线。



Tarquet:16S rDNA Slope:-3.143 Y-Inter:36.083 R^2 :0.997 2 Eff %:90.329

图3 重组质粒浓度(copies)与 C_t 循环数的标准曲线

Fig.3 Standard curve of recombinant plasmid concentration(copies) and C_t cycle number

2.3 稻-稻-油菜轮作土壤枯草芽孢杆菌定量分析

表2为荧光定量PCR对3次采样土壤测定得的枯草芽孢杆菌拷贝数,所有土壤样品中均检测出含目的基因的荧光信号,说明两类耕作土壤均含有枯草芽孢杆菌微生物。2015年7月、2015年10月和2016年4月3个不同时期采样,土壤枯草芽孢杆菌通过荧光定量的结果各不相同。3次采样均为稻-稻-油菜轮作土壤中枯草芽孢杆菌数量显著高于稻-稻连作。从整体上比较,2015年7月所采集的土壤样品中枯草芽孢杆菌数量大于2016年4月土壤样品,大于2015年10月土壤样品。这可能是枯草芽孢杆菌的繁殖受温度影响,在不同季节生长条件存在差异。其中7月份土壤样品中枯草芽孢杆菌数量最多,表明枯草芽孢杆菌是一种嗜热菌,在其适宜生长温度条件内温度越高生长越好。轮作土壤枯草芽孢杆菌的数量与连作土壤的差异,说明土壤枯草芽孢杆菌生长与耕作方式有较大的相关性。2015年7月、2015年10月和2016年4月这3个时期稻-稻-油菜轮作土壤中枯草芽孢杆菌数量相比稻-稻连作分别增加了37.50%、27.06%和20.20%。3次采样测定结果均表明轮作土壤中枯草芽孢杆菌绝对定量值较高,长期稻-稻油菜轮作栽培对土壤中枯草芽孢杆菌数量增加是轮作栽培产生促长作用的一个重要因素。

表2 稻-稻-油菜轮作和稻-稻连作土壤枯草芽孢杆菌的数量比较

Tab.2 The *Bacillus* numbers compares between rice-rice-rape rotational cropping and rice-rice continuous cropping

土壤样品 Soil sample	2015年7月采样土壤		2015年10月采样土壤		2016年4月采样土壤	
	C_t 值 C_t value	拷贝数 ($\times 10^3$ copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) Copies	C_t 值 C_t value	拷贝数 ($\times 10^3$ copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) Copies	C_t 值 C_t value	拷贝数 ($\times 10^3$ copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) Copies
DDY	20.81 \pm 0.22	1.87 \pm 0.06	21.71 \pm 0.33	1.08 \pm 0.02	21.56 \pm 0.16	1.19 \pm 0.07
DD	21.35 \pm 0.18	1.36 \pm 0.08*	22.07 \pm 0.28	0.85 \pm 0.03*	21.84 \pm 0.22	0.99 \pm 0.05*

*表示 DDY 和 DD 处理组之间差异显著 ($P < 0.05$)

* significant at 0.05 level between DDY and DD

3 讨论与结论

3.1 讨论

土壤微生物特定菌种检测方式中荧光定量是一种比较精确的测定方法。实时荧光定量是利用 SYBR Green 荧光染料能够与双链 DNA 相结合发出荧光,而荧光强弱与双链分子数目相关,通过荧光值间接反映出 DNA 分子数量,可以定量检测出土壤样品的起始模板拷贝数^[19-20]。荧光染料剂在 DNA 双链合成过程中与新扩增的 DNA 双链结合产生荧光,单独存在时不会产生荧光。通过选用适当的基因扩增引物,然后设置合理的升温和退火扩增循环程序等反应条件得到了比较理想的扩增曲线。本研究中选择枯草芽孢杆菌的 *sfp* 基因定为目的基因,是由于该目的基因的扩增片段大小为 340 bp 比较适合于荧光定量 PCR。本研究通过优选的枯草芽孢杆菌的特异性引物进行 PCR 扩增,将目的基因的导入重组质粒,以重组质粒浓度计算拷贝数的方法绘制标准曲线,对比标准曲线中的浓度和循环数 C_t 值计算枯草芽孢杆菌的绝对数量具有较好的科学性。

已有研究中关于轮作土壤微生物的报道大多是从土壤微生物群落多样性展开研究,以土壤微生物整体类群作为研究对象^[21-22],研究微生物的物种范围较广,不能从单一类别进行分析。本研究是以土壤中特定微生物物种——枯草芽孢杆菌为研究对象,可以从某一种类微生物数量变化反映耕作方式对其生长的影响。枯草芽孢杆菌是土壤中可促进作物生长,增强土壤中难分解肥效元素的分解和抑制土传病菌危害的多功能微生物。稻-稻-油菜轮作土壤中枯草芽孢杆菌微生物数量显著高于稻-稻连作土壤。说明稻-稻-油菜轮作在土壤中形成了一类对作物生长有益的优势菌体。土壤微生物是由成千上万的不同种类微生物组成,不同种类的微生物之间又存在竞争和互利共生关系,在一定的环境条件下不同微生物类群处于一种动态平衡状态^[23-24]。稻-稻-油菜轮作下土壤中枯草芽孢杆菌数量显著增加,说明了该轮作方式对土壤微生物特定种群数量产生影响,这可能是油菜作物根系分泌物影响的结果,作物根系可以分泌多类有机物和释放光合作用传导的氧气,这对微生物的种群数量影响较大。此外,油菜成熟后叶片会凋落在土壤中被微生物降解,进而增加土壤中的碳源和氮源,为微生物生长提供更多的食物来源,有利于土壤中的一些微生物生长繁殖。

3.2 结论

本研究通过荧光定量 PCR 技术检测了长期稻-稻-油菜轮作和稻-稻连作 2 种耕作方式下枯草芽孢杆菌数量变化,研究结果表明,稻-稻-油菜轮作能够提高土壤中有益微生物枯草芽孢杆菌的数量。本研究应用荧光定量 PCR 测定了土壤中难以鉴定到物种类别的微生物的数量,试验结果更加精准地反映了土壤中单一物种微生物的数量变化。关于稻-稻-油菜轮作土壤中枯草芽孢杆菌的增加的影响机理,以及轮作后土壤中功能类微生物更深层次的变化有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 段庆波.湖北省油-稻轮作下作物施肥效果和养分吸收规律及土壤养分变化特征研究[D].武汉:华中农业大学,2011.
Duan Q B. Study on fertilization effect and nutrients accumulation of crop and changing characteristics of soil nutrients in rapeseed-rice rotation system in Hubei province [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011.
- [2] 杨丹,余旋,刘旭,等.栽培模式对沙棘人工林土壤微生物群落结构和参与氮循环功能基因的影响[J].应用生态学报,2015,26(12):3634-3640.
Yang D, Yu X, Liu X, et al. Effect of afforestation modes on soil microbial community and nitrogen functional genes in *Hippophae rhamnoides* plantation [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2015, 26(12): 3634-3640.
- [3] Schweitzer J A, Bailey J K, Fischer D G, et al. Plant-soil-microorganism interactions: heritable relationship between plant genotype and associated soil microorganisms [J]. Ecology, 2008, 89(3): 773-781.
- [4] Gao S J, Zhang R G, Cao W D, et al. Long-term rice-rice-green manure rotation changing the microbial communities in typical red paddy soil in South China [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2015, 14(12): 2512-2520.
- [5] Chen S, Zheng X, Wang D, et al. Effect of long-term paddy-upland yearly rotations on rice (*Oryza sativa*) yield, soil

- properties, and bacteria community diversity[J]. *Scientific World Journal*, 2012, 2012(3): 279641.
- [6] Geng J, Sun Y, Zhang M, et al. Long-term effects of controlled release urea application on crop yields and soil fertility under rice-oilseed rape rotation system[J]. *Field Crops Research*, 2015, 184: 65-73.
- [7] 李清华, 王飞, 林诚, 等. 水旱轮作对冷浸田土壤碳、氮、磷养分活化的影响[J]. *水土保持学报*, 2015, 29(6): 113-117.
Li Q H, Wang F, Lin C, et al. Effects of paddy-upland rotation on the nutrient activation of soil carbon, nitrogen and phosphorus in cold waterlogged paddy field[J]. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2015, 29(6): 113-117.
- [8] Yousaf M, Li X, Zhang Z, et al. Nitrogen fertilizer management for enhancing crop productivity and nitrogen use efficiency in a rice-oilseed rape rotation system in China[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7(7): 1496-1524.
- [9] 张锡洲, 周建新, 郑子成, 等. 水旱轮作条件下免耕土壤微生物生物量变化特征及其活性评价[J]. *四川农业大学学报*, 2010, 28(2): 153-158.
Zhang X Z, Zhou J X, Zheng Z C, et al. Changes of the microbial biomass and microbial activities evaluation of soil under no-tillage and paddy-upland rotation[J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2010, 28(2): 153-158.
- [10] 李文娇, 杨殿林, 赵建宁, 等. 长期连作和轮作对农田土壤生物学特性的影响研究进展[J]. *中国农学通报*, 2015, 31(3): 173-178.
Li W J, Yang D L, Zhao J N, et al. Progress on effects of long-term continuous cropping and rotation systems on farmland soil biological characteristics[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, 31(3): 173-178.
- [11] 宋琼, 任佐华, 杨华, 等. 应用实时荧光定量 PCR 技术检测土壤中根肿病菌休眠孢子[J]. *湖南农业大学学报(自科版)*, 2015, 41(6): 631-635.
Song Q, Ren Z H, Yang H, et al. Application of real-time fluorescent quantitative PCR for detection of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* in field soil[J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2015, 41(6): 631 - 635.
- [12] 宋志强, 王暄, 林宇, 等. 土壤中南方根结线虫的实时 PCR 检测和定量[J]. *植物保护学报*, 2013, 40(3): 255-260.
Song Z Q, Wang X, Lin Y, et al. Detection and quantification of *Meloidogyne incognita* in soil sample using real-time PCR[J]. *Journal of Plant Protection*, 2013, 40(3): 255-260.
- [13] Ito S, Mathara T, Marund E, et al. Development of a PCR-based assay for the detection of *Plasmodiophora brassicae* in soil[J]. *Journal of Phytopathology*, 1999, 147: 83-88.
- [14] 高苇, 李宝聚, 王万立, 等. 土壤中黄瓜棒孢叶斑病病原菌实时荧光定量 PCR 检测技术研究[J]. *华北农学报*, 2014, 29(2): 71-74.
Gao W, Li B J, Wang W L, et al. Detection of *Corynespora cassiicola* in soil with real-time quantitative PCR[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2014, 29(2): 71-74.
- [15] Hsieh F C, Li M C, Lin T C, et al. Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR.[J]. *Current Microbiology*, 2004, 49(3): 186-191.
- [16] Henriques A O, Glaser P, Piggot P J, et al. Control of cell shape and elongation by the rodA, gene in *Bacillus subtilis* [J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 28(2): 235-247.
- [17] Ahn S, Jun S, Ro H J, et al. Complete genome of *Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis* KCTC 31357 and variation on cell wall genes of *B. subtilis* strains[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2018, 28(10): 17600-1765.
- [18] 孙炳剑, 陈清清, 袁虹霞, 等. SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测小麦纹枯病菌体系的建立和应用[J]. *中国农业科学*, 2015, 48(01): 55-62.
Sun B J, Chen Q Q, Yuan H X, et al. Establishment of SYBR Green I real-time PCR for quantitatively detecting *Rhizoctonia cerealis* in winter wheat[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48(01): 55-62.
- [19] 宋亚娜, 林智敏, 陈在杰, 等. 荧光定量 PCR 技术检测红壤稻田土壤厌氧氨氧化细菌[J]. *福建农业学报*, 2010, 25(1): 82-85.
Song Y N, Lin Z M, Chen Z J, et al. Real-time PCR quantification of anaerobic ammonia-oxidizing microorganisms in red paddy soil[J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2010, 25(1): 82-85.
- [20] 赵爽, 罗佳, 凌宁, 等. 基因宏阵列和荧光定量 PCR 方法对西瓜枯萎病害土壤中尖孢镰刀菌的快速检测和定量[J]. *土壤学报*, 2010, 47(4): 703-708.
Zhao S, Luo J, Ling N, et al. Quick check and quantification of *Fusarium oxysporum* in soil with macroarray and real-time PCR method[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2010, 47(4): 703-708.