

非培养方法在植物内生和根际细菌研究中的应用*

孙磊^{1,2} 宋未^{1**}

1. 首都师范大学生命科学学院, 北京, 100037; 2. 河北大学生命科学学院, 保定 071002

摘要 植物内生和根际细菌中的一部分可通过多种方式促进植物生长, 是植物促生细菌的主要成员, 由于它们在植物生长过程中的重要作用而备受人们关注. 以非培养(culture-independent)方法对植物内生和根际细菌进行研究已成为植物促生细菌研究领域中的一个重要发展趋势. 文中评述了非培养方法的优势特点, 在植物内生和根际细菌研究中的主要应用, 及研究过程中应注意的主要问题.

关键词 非培养方法 植物内生细菌 植物根际细菌

植物内生细菌(endophytic bacteria)和植物根际细菌(plant rhizobacteria)是植物微生态系统中的重要组成部分, 其中许多细菌能够促进植物生长, 被称作植物促生细菌(plant growth-promoting bacteria, PGPB)^[1]. 植物促生细菌可通过固氮作用^[2]、分泌植物生长调节物质^[3]、合成铁载体^[4]及抑制疾病的发生^[5]等方式促进植物生长, 在农业生产中具有很大的应用潜力, 因而备受科学工作者的关注. 在对植物内生和根际细菌几十年的研究过程中, 一直沿用传统的微生物培养和分离技术, 而许多研究已经证实, 通过传统的分离方法鉴定的微生物只占环境微生物总数的0.1%—10%^[6], 远不能满足微生物生态学的需要. 植物内生和根际细菌同其他环境中的微生物一样由于难以模拟其生长繁殖的原位条件而大多不能获得纯培养. 此外, 传统的培养和分离技术都不可避免地偏离植物内生和根际细菌原来的生境, 而且在新的人为培养条件下会改变微生物群落原来的结构, 这就使得用传统方法研究植物内生和根际细菌的种群结构、多样性及与宿主之间的相互作用受到了极大的限制. 近年来基于rRNA基因分析的非培养的分子生物学方法开始应用于植物促生细菌

的研究, 通过DNA水平上的研究, 直接探讨植物内生和根际细菌的种群结构及其与环境的关系, 在一定程度上克服了传统培养方法的缺欠.

目前应用于植物内生和根际细菌研究的非培养方法基本上都是基于PCR的研究方法, 起始于样品总DNA的提取, 然后选择通用的或特异的引物进行PCR反应, 在此基础上再进行各种分析. 包括扩增核糖体DNA限制酶分析(ARDAR)^[7], 随机扩增多态性DNA(RAPD)^[8], 限制性片段长度多态性(RFLP)^[9], 末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)^[10], 变性梯度凝胶电泳(DGGE)^[11], 温度梯度凝胶电泳(TGGE)^[12]及16S rDNA文库构建等^[13]. 这些方法的原理在许多文献中都有详述, 本文不再涉及. 在此我们仅将非培养方法在植物内生和根际细菌研究中的应用加以评述.

1 非培养方法在植物内生细菌研究中的应用

非培养(culture-independent)方法应用于植物内生细菌的研究已成为植物内生细菌研究的一个新的发展态势^[14]. 目前主要以马铃薯、玉米、小麦、柑橘及油菜等少数几种农作物为材料, 应用非培养

2005-07-15 收稿, 2005-08-26 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 30170035, 30370032)

** 通讯作者, E-mail: songwei@mail.cnu.edu.cn

方法对其内生细菌从以下几个方面进行了研究。

1.1 群落多样性的研究

植物内生细菌是植物微生态系统中的重要成员,但人们对其多样性的了解还不够全面。目前,微生物生态学研究使用的非培养方法开始应用于植物内生细菌多样性的研究,并从DNA水平上证实植物内生细菌具有丰富的多样性。Reiter等^[15]使用16S rDNA-T-RFLP技术,分析了两个不同品种的马铃薯被胡萝卜软腐欧文氏菌(*Erwinia carotovora*)感染后内生细菌的种群多样性,结果表明被感染植株的内生细菌种群多样性比对照组有所增加。Ueda等^[16]通过扩增 *nifH* 基因分析了水稻根中固氮细菌的多样性,结果表明水稻根中存在8个新的 *nifH* 类型。本研究组通过构建16S rDNA文库的方式对水稻(*Oryza sativa* L., cv. 90-3)根内生细菌种群多样性进行了研究,实验结果表明变形细菌为优势菌群,其他还含有低GC含量的革兰氏阳性菌、CFB类群(*Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*)、古菌(Archaea)等,说明水稻根内生细菌具有丰富的多样性(数据尚未发表)。

在理论上以非培养方法研究细菌群落多样性,除了可以检测到培养方法得到的内生菌,还可以检测到非可培养的内生菌。相对于培养方法,非培养方法得到的群落多样性要丰富许多,而培养方法与非培养方法相互结合可更全面地研究植物内生细菌群落多样性,并有利于一些新的微生物资源的发现。Garbeva等^[17]采用DGGE技术与平板培养相结合分析马铃薯内生菌群落多样性,DGGE图谱得到的序列,其中一部分与分离细菌相一致,而一部分与分离细菌不同,证实了非培养方法可以检测可培养和不可培养或尚未培养的内生细菌。Araújo等^[18]采用DGGE方法和平板分离方法研究柑橘植物内生细菌的多样性时也得到了类似的结果。Chelius等^[19]利用16SrDNA-PCR-ARDRA技术和培养方法检测了玉米根内生细菌和古菌的多样性,发现非培养方法得到的微生物种类比培养方法得到的种类丰富许多,并且有些种是首次在植物根内发现的。

非培养方法和培养方法分析内生细菌多样性,不仅得到的丰富度有差别,而且得到的优势种也不

同。Kaiser等^[20]报道使用培养方法和非培养方法检测油菜根面微生物多样性,实验结果证明培养方法和16S rDNA文库所检出的根面优势种群有所差别,培养方法分离的细菌优势类群为变形细菌 β 和 γ 亚类;克隆文库中主要类群是 α 变形细菌和CFB类群。此研究结果表明培养方法和非培养方法相结合可更为全面地研究根面细菌群落多样性。

微生物生态学研究方法有多种,在实际工作中往往会多种非培养方法相互结合使用,能更好地分析内生细菌群落的多样性和功能。Sessitsch等^[21]采用T-RFLP及DGGE两种方法对3个品种的马铃薯的茎、根及块茎的内生菌种群进行了研究,发现健康马铃薯植株的内生菌多样性明显高于受胁迫植株,许多类群的细菌都可以定殖在植物内部。Briones等^[22]采用DGGE和荧光原位杂交(FISH)两种方法分析了水稻根中氨氧化细菌的种群结构,结果表明在根中氨基单加氧酶基因的多样性远远高于根际和没有种植作物的土壤。

非培养方研究植物内生细菌多是基于DNA的研究,而Reiter等^[23]首次使用RNA为基础的非培养方法分析了植物内生细菌,这不仅可了解内生菌多样性,还可掌握细菌在植物体内的活性状态。他们采用16S rDNA-PCR-DGGE和16S rRNA-RT-PCR-DGGE技术分析了马铃薯内生假单胞菌的种群及代谢活性多样性,结果显示了其具有很高的种群多样性,其中某些种的RNA含量很高,表明这些种具有高代谢活性。

1.2 群落动态变化的研究

微生物多样性研究只是微生物生态学研究中的一个方面,研究在一段时间内或环境因素发生改变后微生物群落中种群变化是微生物生态学研究的另一方面。非培养方法不仅可研究植物内生细菌的多样性,还可有效地研究植物内生细菌群落的时空动态变化。目前研究较多的是不同土壤类型和农用化学品的使用对植物内生细菌群落动态的影响。Conn等^[24]使用16S rRNA-T-RFLP技术研究了来自3种不同土壤的小麦根内生放线细菌(*Actinobacteria*)多样性。发现不同土壤类型中生长的小麦根内生放线菌多样性有差别,有机物含量高的土壤会导致小麦根内生放线菌多样性提高,

并提高在植物体内定殖水平。Seghers 等^[25]采用巢式 PCR-DGGE 的方法分析了在长达 20 年的时间里除草剂的使用对玉米根内生菌种群的影响,发现植物体内的细菌和真菌群落变化较小,而内生放线菌则表现出较大的变化,表明农业化学品不仅会对土壤微生物群落产生影响,而且还会对根内生菌群落产生影响。

1.3 为植物内生菌起源提供更丰富的信息

有关植物内生细菌的起源主要有两种假说,一种假说认为植物内生细菌起源于体外,细菌可通过植物根际、气孔及皮孔等自然孔口或伤口进入植物体内;另一种假说则认为植物内生细菌来源于植物种子。用非培养方法对植物内生细菌进行研究时,获得了不同的结论。Normander 等^[26]用 DGGE 技术分析了大麦植物圈(phytosphere)细菌的多样性,发现根面细菌群落与散土细菌群落的相似性高于与内生菌群落的相似性,认为根面细菌起源于土壤,而许多内生菌是由种子带来的;而 Sessitsch 等^[21]采用 T-RFLP 及 DGGE 两种方法对马铃薯的茎、根及块茎的内生菌种群进行了研究,认为相当一部分内生细菌起源于宿主植物根际。

2 非培养方法对植物根际细菌的研究

非培养方法应用于土壤微生物的研究报道后不久,各国的科研工作者就将注意力转向了根际微生物,并有大量的文献发表。非培养方法对植物根际细菌的研究主要集中在以下几个方面:

2.1 “根际效应”的概念将更加完善

“根际效应”是指由于植物根际有丰富的有机物质存在,使得在这一范围内生活的微生物在数量、种类和活性上都不同于非根际土壤的微生物。根际效应的大小常用根际土和根外散土中微生物数量的比值(R/S 比值)来表示。 R/S 比值越大,根际效应越明显。非培养方法应用于根际微生物的研究进一步证实了根际效应,并发现微生物群落从根面、根际到散土呈现梯度变化。Kandeler 等^[27]利用 DGGE 技术研究了玉米根际微生物群落的组成和功能,发现从根面到距根 2.2 mm 处氨氧化细菌的数量呈现明显的梯度,而没有种植植物的土壤则没有梯度的变化;Marilley 等^[28,29]采用构建 16 S rDNA

克隆文库的方法研究了黑麦草和白三叶的根面土、根际土及散土中微生物多样性。结果表明, γ -变形细菌沿着由外向植物根部呈梯度增加,而全噬菌/酸杆菌(*Holophaga/Acidobacterium*)类群则呈梯度下降;Duineveld 等^[30,31]采用 DGGE 研究菊花根的生长对根际微生物群落的影响时,发现散土细菌群落比根际细菌群落结构更为复杂;Smalla 等^[32]采用 DGGE 技术研究了草莓、油菜、和马铃薯根际土壤及与之相应周围散土的微生物群落结构,结果表明根际细菌群落明显不同于散土细菌群落。诸多报道都说明植物的根为不同微生物种群创造了特定的生境,并表明非培养方法的应用能更真实地反映根际微生物群落的结构,这些研究结果将使 20 世纪中期提出的“根际效应”的概念更加完善。

2.2 植物种类对根际细菌群落的影响

植物种类、植物生长不同时期及土壤类型都可对根际微生物群落产生影响,而植物种类对微生物群落的影响最为明显。Marschner 等^[33]用 DGGE 技术对鹰嘴豆、油菜和苏丹草的根际细菌群落 16 S rDNA 分析时,发现植物种类、根区、和土壤类型都会对其产生影响。Miethling 等^[34]采用了 CLPP (community level physiological profiles), FAME (fatty acid methyl ester analysis), TGGE 等 3 种方法研究了作物种类、土壤来源及接种细菌对植物根际微生物群落结构的影响,3 种方法均证实作物的类型是影响微生物群落结构的最主要因素,土壤来源次之;Wieland 等^[35]使用 16 S rRNA-PCR-TGGE 技术分析了作物种类、土壤类型和作物生长对散土、根际土壤和根面的微生物群落变化的影响,结果表明植物类型对与植物联合的生境产生主要影响,而植物生长阶段对生境的影响相对较小;Marschner 等^[36]用 DGGE 技术研究了白色羽扇豆根际微生物群落的时空动态变化规律,发现非丛生根的根际细菌群落明显不同于丛生根的根际细菌群落,而丛生根根际细菌群落依据丛生根年龄及植物年龄的变化而变化;Ikenaga 等^[37]首次使用 16 S rDNA-PCR-RFLP 技术研究了与水稻不定根相关的根际微生物的演替过程,结果说明根际微生物群落随着不定根从幼嫩到成熟而逐渐发生变化。

早在 20 世纪 70 年代至 90 年代,基于传统的微

生物培养方法,已有报道植物基因型对其根际定殖的微生物种群有一定的相关性^[38]或选择性^[39],当前非培养方法的应用,将有助于深入阐明植物与根际定殖微生物相互作用的机理。

2.3 土壤营养状况对根际细菌群落的影响

土壤类型是影响植物根际细菌群落结构的又一重要因素,其作用仅次于植物类型。Yang 和 Crowley^[40]使用 DGGE 技术分析了铁缺乏和铁充足的条件下大麦根部的细菌群落,结果表明在铁缺乏和铁充足条件下大麦根际的细菌群落有很大不同,并且根际群落可因植物铁营养状况变化引起的根分泌物组成的变化而改变;Piceno 等^[41]采用 DGGE 技术分析了向土壤中添加营养物质对根际固氮生物的影响,发现短期内土壤营养物质的改变并不对根际固氮生物种群产生明显的影响,但面对有效营养的长期变化固氮生物的组成也具有潜在的变化;Rangarajan 等^[42]采用 16S rDNA-PCR-RFLP 技术研究了土壤盐度对水稻根际假单胞菌种群多样性影响,发现土壤盐度增加会导致假单胞菌种群多样性降低,而在有机质丰富的土壤中,可在很大程度上减轻盐胁迫,恢复假单胞菌种群多样性。

2.4 其他生物因素对根际细菌群落的影响

其他生物因素,如向植物生长环境中接种菌根菌或细菌及细菌产生的抗生素等也会对根际细菌种群产生影响。Burke 等^[43]采用 PCR-RFLP 技术研究了灌木菌根菌对盐沼草根际固氮微生物多样性的影响,结果表明灌木菌根菌存在时,根际和散土中 *nifH* 基因图谱类型是不同的。Marchner 等^[44]使用 DGGE 技术评价了菌根菌定殖的玉米的根面、根际土壤及非根际土壤中细菌群落结构,发现接种菌根菌的植物根际细菌群落结构与无菌根菌定殖的植物根际细菌群落结构差别很大;Miethling 等^[34]发现接种外来细菌后,紫花苜蓿根际微生物群落的 TGGE 图谱在一定程度上发生了改变;Robledo 等^[45]采用核糖体 rRNA 基因转录间区序列同源性分析的方法评价了抗生素的产生对根际微生物群落的影响,指出菜豆接种产生三叶草素的豆根瘤菌(*R. etli*)CE3(pT2TFXK)后会导致菜豆根际的三叶草素敏感型的 α -变形细菌的多样性显著性减少。

3 研究中存在的问题

3.1 样品 DNA 的提取方法

起始于 DNA 提取并基于 PCR 的非培养方法已广泛地被应用于环境微生物生态学研究,由于 DNA 的提取是这些方法的第一步,因而如何能高效地提取环境样品中细菌的 DNA 一直是研究的重点之一。非培养方法在植物内生和根际细菌的研究中也面临着同样的问题。在样品收集和 DNA 提取过程中必须考虑如下因素:DNA 提取的同时会萃取根际土壤中的腐殖质物质及植物组织中的化合物,而这些物质可限制 PCR 反应,Wilson 等^[46]报道了环境复合物可限制 PCR;在根际土壤和植物组织中某些细菌密度过低;细胞结构不同的细菌同时破壁的最佳时间不同等。目前国内外发展的 DNA 提取方法没有统一的标准,不同的样品还需通过实验确定其最佳 DNA 提取方法,Niemi 等^[47]已证明土壤细菌群落图谱的不同取决于所使用的 DNA 提取和纯化方法。他们以根际土壤为样品比较了 5 种不同的 DNA 提取方法和 3 种纯化方法,发现用土壤 DNA 抽提试剂盒(Mo Bio Laboratories)提取效果最佳,其 DGGE 图谱表明可最大量获得细菌 DNA,包括高 GC 含量的片段,并且提取产物不含 PCR 抑制成分;Wizard DNA 纯化系统可高质量地回收纯化产物,且易于操作。我们在以非培养方法研究水稻根内生细菌时,通过 PCR-DGGE 方法比较了 4 种不同水稻总 DNA 提取方法对其内生细菌 DNA 提取的有效性,发现 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)法比其他几种方法能更有效地提取水稻根内生细菌 DNA。

3.2 PCR 引物设计的合理性

我们在以 DGGE 技术及细菌 16S rDNA 文库构建的非培养方法研究水稻内生菌种群多样性时发现,以非培养方法研究植物内生细菌的种群结构的关键问题是设计合理的引物,以排除植物叶绿体 DNA 和线粒体 DNA 的干扰,这主要是由于非培养方法多是基于 PCR 的分子生物学方法,而植物叶绿体 DNA 和线粒体 DNA 中的 16S rDNA 和细菌的 16S rDNA 高度同源,如果引物设计不合理,PCR 产物中就会混有叶绿体和线粒体的部分,这将给后续分析工作带来困难,也就不能准确地分析细菌的

多样性。

4 结语

由于有益的植物内生和根际细菌对植物生长所具有的促生作用及在农业生产中的应用潜力, 目前它们已成为植物微生物学科中重要的研究对象。非培养方法的应用为植物内生和根际细菌多样性的研究开辟了一条新的途径, 使我们可更全面地了解植物微生态系统中微生物多样性及其物种组成。我们认为非培养方法的灵活使用, 并和传统的培养方法协同结合, 将会有助于将植物内生和根际细菌这一领域的研究引向深入。

参 考 文 献

- Glick B R, Patten C L, Holguin G, et al. Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth-Promoting Bacteria. London: Imperial College Press, 1999, 1—13
- Brown M E. Seed and root bacterization. Ann Rev Phytopathol, 1974, 12: 181—197
- Lazarovits G, Nowak J. Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. Hortscience, 1997, 32: 188—192
- Davison J. Plant beneficial bacteria. Biotechnology, 1988, 6: 282—286
- Bevivino A, Sarrocco S, Dalmastri C, et al. Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of Burkholderia cepacia: Effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. FEMS Microbiology Ecology, 1998, 27: 225—237
- Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cell without cultivation. Microbiol Rev, 1995, 59: 143—169
- Akkermans A D L, Elsas J D V, Bruijn F J D E. Molecular Microbial Ecology Manual. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995, 2: 1—8
- Hadrys H, Balick M, Schierwater B. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. Mol Ecol, 1992, 1: 55—63
- Burkel D A, Hamerlynck E P, Hahnl D. Effect of arbuscular mycorrhizae on soil microbial populations and associated plant performance of the salt marsh grass *Spartina patens*. Plant and Soil, 2002, 239: 141—154
- Liu W T, Marsh T L, Cheng H, et al. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. Appl Environ Microbiol, 1997, 63: 4516—4522
- Muyzer G, Waal E C D, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rDNA. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 695—700
- Elsas J D V, Wellington E M H, Trevors J T. Modern Soil Microbiology. New York: Marcel Dekker, Inc, 1997, 353—374
- Dunbar J, Takala S, Barns S M, et al. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. Appl Environ Microbiol, 1999, 65: 1662—1669
- 韩继刚, 宋 未. 植物内生细菌研究进展及其应用潜力. 自然科学进展, 2004, 14(4): 374—379
- Reiter B, Pfeifer U, Schwab H, et al. Response of endophytic bacterial communities in potato plant to infection with *Erwinia carotovora subsp. Atroseptica*. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(5): 2261—2268
- Ueda T, Suga Y, Yahiro N, et al. Remarkable N₂-Fix bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequence. Journal of Bacteriology, 1995, 177(5): 1414—1417
- Garbeva P, Overbeek L S, Vuurde J W, et al. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA based PCR fragments. Microbial Ecology, 2001, 41: 369—383
- Araújo W L, Macron J, Maccheroni W, et al. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in Citrus plants. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(10): 4906—4914
- Chelius M K, Triplett E W. The diversity of archaea and bacteria in association with the root of *Zea mays* L. Microbial Ecology, 2001, 41: 252—263
- Kaiser O, Pühler 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. Microbial Ecology, 2001, 42: 136—149
- Sessitsch A, Reiter B, Pfeifer U, et al. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and *Actinomyces*-specific PCR of 16S rDNA genes. FEMS Microbiology Ecology, 2002, 39: 23—32
- Briones A M, Okabe S, Umemiya Y, et al. On root biofilms and their possible contribution to N use efficiency of different Ammonia-oxidizing bacteria rice cultivars. Plant and Soil, 2003, 250: 335—348
- Reiter B, Werbter N, Gyamfi S, et al. Endophytic Pseudomonas spp. populations of pathogen-infected potato plants analysed by 16S rDNA and 16S rRNA-based denaturing gradient gel electrophoresis. Plant and Soil, 2003, 257: 397—405
- Conn V M, Franco C M M. Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by ter-

- minal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(3): 1787—1794
- 25 Seghers D, Wittebolle L, Top E M, et al. Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(3): 1475—1482
- 26 Normander B, Prosser J I. Bacterial origin and community composition in the barley phytosphere as a function of habitat and presowing conditions. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66: 4372—4377
- 27 Kandeler E, Marschner P, Tschierko D, et al. Microbial community composition and functional diversity in the rhizosphere of maize. *Plant and Soil*, 2002, 238: 301—312
- 28 Marilley L, Vogt G, Blanc M, et al. Bacterial diversity in the bulk soil and rhizosphere fractions of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* as revealed by PCR restriction analysis of 16S rDNA. *Plant and Soil*, 1998, 198: 219—224
- 29 Marilley L, Aragno M. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. *Appl Soil Ecol*, 1999, 13: 127—136
- 30 Duineveld B M, Rosado A S, Elsas J D V, et al. Analysis of the dynamic of bacterial community in the rhizosphere of the Chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis and substrate utilization patterns. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(12): 4950—4957
- 31 Duineveld B M, Kowalchuk G A, Keijzer A, et al. Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(1): 172—178
- 32 Smalla K, Wieland G, Buchner A, et al. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: Plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 4742—4751
- 33 Marschner P, Neumann G, Kania A, et al. Spatial and temporal dynamics of the microbial community structure in the rhizosphere of cluster roots of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant and Soil*, 2002, 246: 167—174
- 34 Miethling R, Wieland G, Backhaus H, et al. Variation of microbial rhizosphere communities in response to crop species, soil origin, and inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33. *Microbial Ecology*, 2000, 41: 43—56
- 35 Wieland G, Neumann R, Backhaus H. Variation of microbial communities in soil, rhizosphere, and crop development. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(1): 5849—5854
- 36 Marschner P, Yang C-H, Leiberei R, et al. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biol Biochem*, 2001, 33: 1437—1445
- 37 Ikenaga M, Muraoka Y, Toyota K, et al. Community structure of the microbiota associated with nodal roots of rice plants along with the growth stages: Estimation by PCR-RFLP analysis. *Biol Fertil Soils*, 2002, 36: 397—404
- 38 王敬国. 根际微生物的植物基因型特征. 见: 张福锁主编, 植物营养生态生理学和遗传学. 北京: 中国科学技术出版社, 1993, 313—341
- 39 Mavingui P, Laguerre G, Berge O, et al. Genetic and phenotypic diversity of *Bacillus polymyxa* in soil and the wheat rhizosphere. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58: 1894—1903
- 40 Yang C H, Crowley D E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(1): 345—351
- 41 Piceno Y M, Lovell C R. Stability in natural bacterial communities II. Plant resource allocation effects on rhizosphere diazotroph assemblage composition. *Microbial Ecology*, 2000, 39: 41—48
- 42 Rangarajan S, Saleena L M, Nair S. Diversity of *Pseudomonas* spp. isolated rice rhizosphere population grown along a salinity gradient. *Microbial Ecology*, 2002, 43: 280—289
- 43 Burke D J, Hamerlynck E P, Hahn D. Effect of arbuscular mycorrhizae on soil microbial populations and associated plant performance of the salt marsh grass *Spartina patens*. *Plant and Soil*, 2002, 239: 141—154
- 44 Marschner P, Baumann K. Changes in bacterial community induced by mycorrhizal colonization in split-root maize. *Plant and Soil*, 2003, 251: 279—289
- 45 Robleto E A, Borneman J, Triplett E W. Effect of bacterial antibiotic production on rhizosphere microbial communities from a culture-independent perspective. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 5020—5022
- 46 Wilson M J, Weightman A J, Wade W G. Applications of molecular ecology in the characterization of uncultured microorganisms associated with human disease. *Rev Med Microbiol*, 1997, 8: 91—101
- 47 Niemi R M, Heiskanen I, Wallenius K, et al. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *J Microbiol Methods*, 2001, 45: 155—165