

农用化学品污染对土壤微生物群落 DNA 序列多样性影响研究

姚 健¹, 杨永华^{1*}, 沈晓蓉², 陆维忠²

(1. 南京大学生物科学与技术系, 南京 210093; 2. 江苏省农科院农业生物遗传生理研究所, 南京 210014)

摘要:采用 RAPD 分子遗传标记技术研究了农用化学品不同使用环境下的 4 种土壤微生物群落 DNA 序列多样性的变化。结果表明, 4 种土壤微生物群落 DNA 序列在其丰富度、多样性指数、均匀度等方面均存在差异; 农用化学品的使用会对土壤微生物群落在 DNA 分子水平上的多样性产生影响; 而不同的农用化学品对土壤微生物群落 DNA 序列多样性影响各不相同; 化肥污染会引起某些土壤微生物的富集和一些微生物物种的丧失; 农药污染会引起土壤微生物 DNA 序列本身发生变化。

关键词:分子遗传标记; RAPD; 农用化学品; 土壤微生物; 微生物群落; DNA 序列多样性

A preliminary study on DNA sequence diversity of soil microbial community affected by agricultural chemicals

YAO Jian¹, YANG Yong-Hua^{1,*}, SHEN Xiao-Rong², LU Wei-Zhong² (1. *Department of Biological Science and Technology, Nanjing University Nanjing, 210093, China*; 2. *Institute of Agrobiological Genetics and Physiology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China*)

Abstract: The DNA sequence diversity in four soil microbial communities affected by agricultural chemicals was evaluated by using random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints. The results showed that these soil microbial communities had differences at DNA sequence richness, diversity index and evenness. The changes in the soil microbial community diversity by agricultural chemicals were found at the DNA level. It was suggested that enrichment or loss of some microbial species may occur in the soils polluted by fertilizers and that DNA sequences of microbial communities may be changed in the soils polluted by pesticides.

Key words: molecular marker; RAPD; agricultural chemicals; soil microbe; microbial community; DNA sequence diversity

文章编号: 1000-0933(2000)06-1021-07 中图分类号: S154.36 文献标识码: A

农用化学品是一类具有重要用途的有毒化学品, 主要包括农药和化肥。使用农用化学品可以减少病虫对作物的危害, 提高作物产量; 但对其使用不当会对环境造成严重污染。Babich 等提出一种化学污染物对某一生态系统中微生物的影响, 可以间接反映出该种化学品对此生态系统的影响^[1]。因此, 研究农用化学品对微生物群落的影响具有重要意义。农用化学品进入土壤后, 首先会影响土壤微生物的生理生化活性进而影响土壤微生物群落的多样性。长期以来, 农用化学品对土壤微生物群落影响的研究主要集中在土壤微生物生理生化方面, 如土壤呼吸^[2]; 土壤酶活性^[3]; 土壤氮循环^[4]; 以及土壤微生物量^[5,6]等。而土壤微生物群落多样性方面的研究鲜见报道, 甚至被忽略。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39670151)的部分内容。

* 通讯联系人 Author for correspondence.

收稿日期: 1998-09-15, 修订日期: 1999-10-15

作者简介: 姚 健(1974~), 男, 江苏省南通人。主要从事生物多样性和生物技术的研

Williams 等^[7]发展起来的随机扩增的多态性 DNA(RAPD,Random Amplified Polymorphic DNA)分子遗传标记技术以检测多态 DNA 为目的,因其快速、简便在物种分类和亲缘关系鉴定^[8]、抗病基因定位^[9]、基因组分析^[10,11]等方面得到广泛应用。本文对处于农用化学品不同影响环境中的 4 种土壤微生物群落进行 RAPD 分析,以期在 DNA 分子水平上研究农用化学品对土壤微生物群落多样性的影响。

1 材料与方法

1.1 土壤样品

4 种表层土壤样品 1998 年 1 月采集于南京市高淳县不同农用化学品使用条件下的农田。采集地点及有关环境特性见表 1。每种土样采集约 4 kg,混合并筛选(2mm)装入聚乙烯袋保存于-18℃下。土壤元素分析由南京大学现代分析中心测定,其中土壤有机碳、氢元素使用 Perkin-Elmer 240C 仪器(Perkin-Elmer, Norwalk,CT)分析,全氮测定使用 Foss Heraeus CHN-O-Rapid 仪器分析;其余元素测定采用电感耦合等离子发射光谱法(ICP)。

表 1 4 种土壤样品采集地点及其环境特性

Table 1 Collecting sites of four soil samples and their environment properties		
土壤样品	采集地点	环境特性
Soil sample	Collecting site	Environment property
S1	南京市高淳县无污染土	无农用化学品使用
S2	南京市高淳县一般农田	农用化学品使用一般
S3	南京市高淳县化肥厂边农田	农药污染严重
S4	南京市高淳县南京农药厂边农田	化肥污染严重

括 94℃ 1min,36℃ 1min,72℃ 2min;循环结束后 72℃ 延伸 5min。扩增产物在 1.8% 琼脂糖凝胶(含溴化乙锭)上电泳,紫外灯下观察并照相。

1.4 RAPD 分子遗传标记的指纹分析

通过计算机图像分析系统可分析电泳照相底片上 RAPD 指纹信息,进而得出引物对 4 种土壤微生物群落总 DNA 的扩增情况。将底片信息扫描进计算机,通过分析统计 4 种土壤微生物群落 DNA 的 RAPD 条带数;分析各 RAPD 条带的灰度(范围 0~255,0:灰度最小,255:灰度最大),由于底片上 RAPD 条带的灰度与其含量呈比例关系,用条带灰度大小来代替每个 RAPD 条带的扩增量(N_i)用于后述的计算。

1.5 土壤微生物群落 DNA 序列多样性研究方法

本实验是采用随机引物对 4 种土壤微生物群落总 DNA 的进行扩增,实际上就是检测群落 DNA 的一些位点,所扩增的 RAPD 条带可初步反映整个群落 DNA 序列的有关信息。由于采用的是随机引物,每一次扩增反应相当于对整个群落 DNA 序列作一次随机取样,扩增的 RAPD 条带的数量可代表群落 DNA 序列的丰富度(S),群落 DNA 序列多样性指数可采用 Shannon-Weaver 指数及其均匀度^[14]来表示。Shannon-Weaver 指数及其均匀度由下式计算:

$$D_{sh} = - \sum_{i=1}^s P_i \ln P_i = - \sum_{i=1}^s (N_i/N) \ln (N_i/N)$$
$$J_{sh} = D_{sh} / \ln S$$

式中, D_{sh} 为 Shannon-Weaver 指数, J_{sh} 为均匀度, P_i 为第 i 个 RAPD 条带出现概率, N_i 为第 i 个 RAPD 条带的扩增量, N 为土壤微生物群落 DNA 的 RAPD 条带的扩增总量($N = \sum N_i$), S 为群落 DNA 序列丰富度。 D_{sh} 最大值为 $\ln S$ 。

1.6 土壤微生物群落 DNA 序列相似系数

1.2 土壤微生物群落 DNA 的提取和纯化

土壤微生物群落 DNA 的提取采用 SDS/CTAB 法^[12];DNA 纯化采用低熔点琼脂糖法^[13]。

1.3 RAPD 分子遗传标记分析

PCR 扩增反应在 20 μ l 体积中进行,包括 10ng 土壤 DNA 样品、20pm 随机引物(引物序列特征见表 2)、lu Taq 酶(Promega Inc.,Madison,WI)、2.0mM $MgCl_2$ 和 0.2mM dNTP(Gibcobrl Inc.),反应缓冲液系用 Promega 配套产品。PCR 扩增反应在 Perkin-Elmer 9600 PCR 扩增仪(Perkin-Elmer, Norwalk, CT)上进行;PCR 扩增反应进程如下:94℃ 1min 使土壤 DNA 变性;再进行 40 个循环反应,每个循环包

土壤微生物群落 DNA 序列的相似系数的计算由下式求得:

$$S_{xy} = N_{xy}/(N_x + N_y)$$

式中, S_{xy} 为土壤 x 和土壤 y 之间的 DNA 序列相似系数, N_{xy} 为土壤 x 和土壤 y 共有扩增条带数, N_x 为土壤 x 的扩增条带数, N_y 为土壤 y 的扩增条带数。

Table 2 RAPD random primer sequences			Table 3 Physiochemical properties of soils *				
编号	序列	GC 含量(%)	项目	土壤样品 Soil sample			
Code	Sequence	Content of GC	Item	S1	S2	S3	S4
PS01	CGTCACAGAG	60	土壤种类(texture)	壤土	壤土	壤土	壤土
PS02	GAGGCCCGTT	70	有机碳(m/m %)(org.C)	2.99	1.88	1.24	7.00
PS03	CAGGCTCTAG	60	全氮(m/m %)(Total N)	0.31	0.19	0.14	0.56
PS04	GTTGTGCCTG	60	有机碳:全氮(C/N ratio)	9.6	9.9	8.8	12.5
PS05	GAGGTTCAAC	50	P(m/m %)	0.19	0.14	0.04	0.43
PS06 *	GCTTACGCA	60	H(m/m %)	1.18	0.63	0.54	0.75
PS07	CGACGCCCTG	80	K(m/m %)	1.58	1.26	1.28	1.38
PS08	CTCACATGCC	60	Ca(m/m %)	0.60	0.40	0.34	0.64
PS09	GCGTCGAGGG	80	Na(m/m %)	0.23	0.72	0.66	0.40
PS10 *	CTCCTGTGCG	70	Mg(m/m %)	0.40	0.33	0.34	0.41
PS11	CCGTCTCTTT	50	Cu(m/m %)	29.0	23.9	12.0	32.9
PS12	TAGGCGGCGG	80	Fe(m/m %)	4.24	2.49	2.68	4.89
PS13	CCCGCCGTTG	80	pH	6.11	5.27	6.54	6.65
PS14	TGGTCCTGGC	70	含水量	32.29%	31.19%	28.79%	37.80%
			Water content				

* 表示该引物未有 RAPD 条带扩增 This primer did not amplify RAPD fingerprint bands.* 数据以干土重量计 Based on masses of oven-dried soil

2 结果与分析

2.1 土壤物质分析

对土壤有关物质含量分析可以间接反映土壤微生物群落的一些信息。由表 3 可见,在有机碳含量方面,农用化学品一般使用条件下的土壤 S2 的有机碳含量比无农用化学品使用的土壤 S1 减少 37.1%;农药严重污染条件下的土壤 S3 比土壤 S1 减少 58.6%;化肥严重污染条件下的土壤 S4 则比土壤 S1 提高 134%。对许多农田土壤而言,其微生物生物量占土壤有机质的比率是一个相对恒定的常数^[15],土壤有机碳和土壤有机质也存在比例关系,因此农药污染可能会引起土壤微生物生物量即土壤微生物数量的减少,而化肥污染则可能造成土壤微生物数量大大增加。

土壤碳氮比值(C/N)高低反映有机质矿化过程中所释放的有效氮的多少,C/N 比值越小,释放的有效氮量越多。表 3 可知,土壤 S4 的 C/N 比值高于土壤 S1、S2 和 S3(分别高 30%、26%、42%),这说明化肥污染会造成土壤微生物对 N 的矿化能力的下降。

2.2 土壤微生物群落 DNA 序列多样性的分析

2.2.1 土壤微生物群落 DNA 的总体扩增状况 本实验共检测了 14 个随机引物(表 2),除两个引物(PS06 和 PS12)外,其余 12 个引物的扩增产物在 1.8%的琼脂糖凝胶中能分辨出清晰的 RAPD 指纹带,共计扩生出 155 个 RAPD 条带,其中非多态性条带 21 条占 13.5%,多态性条带 134 条占 86.5%(表 4),非多态性条带指对 4 种土壤微生物群落 DNA 均扩增出的条带,多态性条带指对 4 种土壤微生物群落 DNA 并

非全能扩增的条带。

2.2.2 土壤微生物群落 DNA 序列的丰富度 由于 RAPD 采用的是随机引物,引物对 4 种土壤微生物群落的 DNA 并无特异的选择性。因而,扩增的总条带数可以间接反映 4 种土壤微生物群落在 DNA 序列组成上的差异,扩增的条带越多则 DNA 序列种类相对就越丰富。把 RAPD 扩增条带数作为土壤微生物群落 DNA 序列丰富度(S)。结果表明,对于扩增的 RAPD 指纹而言,即便是由同一种引物产生的,4 种土壤微生物群落的反应也不尽相同。其中土壤 S_3 扩增的总 RAPD 条带最多(95 条),其 DNA 丰富度最大;土壤 S_4 最少(82 条),其 DNA 丰富度最小(表 5)。就其平均值而言,土壤 S_3 的 DNA 序列丰富度为 1,则土壤 S_1 、 S_2 、 S_4 为 0.99、0.94、0.86。

表 4 12 种引物对 4 种土壤微生物群落总 DNA 的扩增结果

Table 4 12 primers amplified outputs to total DNA of four soils microbial communities

引物 ^①	扩增条带数 ^②	非多态性条带数 ^③	多态性条带数 ^④	多态性条带所占比例 ^⑤ (%)
PS01	10	1	9	90
PS02	12	2	10	83
PS03	13	1	12	92
PS04	16	3	13	81
PS05	14	1	13	93
PS07	14	3	11	78
PS08	14	3	11	78
PS09	16	1	15	94
OS10	12	2	10	83
PS11	12	1	11	92
PS13	12	2	10	83
PS14	10	1	9	90
总计 Total	155	21	134	86

①Primer; ②Amplified band; ③A Non-polymorphic amplified band; ④Polymorphic band; ⑤Ratio of polymorphic bands to total bands

2.2.3 群落 DNA 序列的 Shannon-Weaver 指数及其均匀度 DNA 序列的丰富度简明表达了土壤微生物群落 DNA 序列多样性的一个侧面,但它未能反映群落 DNA 序列相对多度的信息。Shannon-Weaver 指数是研究群落物种数及其个体数和分布均匀程度的综合指标。借用这个指数来研究土壤微生物群落 DNA 序列组成多样性。表 6 给出 4 种土壤微生物群落 DNA 序列的 Shannon-Weaver 指数及其均匀度。可以看出,在不同的引物检测条件下,4 种土壤微生物群落的 DNA 序列 Shannon-Weaver 指数表现有所不同,最大为 2.332(土壤 S_4 ,引物 PS04),最小为 0.644(土壤 S_4 ,引物 PS13)。就其平均值而言,各群落 DNA 序列的 Shannon-Weaver 指数表达的结果与其丰富度相似,即最大为土壤 S_3 (1.900),最小为土壤 S_4 (1.670)。群落 DNA 序列的均匀度最大为 0.9907(土壤 S_2 ,引物 PS04),最小为 0.7664(土壤 S_2 ,引物 PS11)。就其平均值而言,4 种土壤微生物群落 DNA 序列的均匀度的最大为土壤 S_2 (0.9437),最小为土壤 S_4 (0.9219),但差别较小。

2.2.4 土壤微生物群落 DNA 序列丰富度的修正统计 上述计算中土壤微生物群落 DNA 所扩增的 RAPD 条带对群落序列丰富度的计算是等效的,但实际上是有差别的。4 种土壤微生物群落均扩增的

表 5 土壤微生物群落 DNA 序列的丰富度(S)

Table 5 Richness of soil microbial community DNA sequences

引物 Primer	土壤微生物群落 DNA 序列的丰富度 Richness of soil microbial community DNA sequence			
	S1	S2	S3	S4
PS01	7	7	5	5
PS02	6	7	6	6
PS03	7	6	7	7
PS04	7	9	10	11
PS05	8	7	7	8
PS07	8	9	8	9
PS08	11	7	10	8
PS09	10	8	7	9
PS10	6	8	10	9
PS11	7	7	9	5
PS13	8	4	8	2
PS14	9	10	8	3
总计 Total	94	89	95	82
平均值 Average	7.8	7.4	7.9	6.8
相对值 Relative value	0.99	0.93	1	0.86

RAPD 条带和只在其中 1 个、2 个或 3 个群落扩增的条带对其丰富度的计算有所不同。对其作修正统计,4 种群落均扩增出的条带对丰富度贡献最小作 0 计,仅在 1 个群落中扩增的条带贡献最大作 1 计,而在 2 个或 3 个群落扩增的条带则分别作 2/3 和 1/3 计。由表 7 可见,4 种土壤微生物群落 DNA 序列丰富度修正值,就其平均值而言,土壤 S1 的 DNA 序列丰富度最大(3.72),土壤 S4 仍最小(2.64)为土壤 S1 的 0.71,土壤 S2、S3 为 S1 的 0.75 和 0.86,差别很显著。由于这种修正统计实际增加了特有 DNA 序列对其丰富度的贡献,因此可知无农用化学品污染的土壤 S1 与其它存在污染的土壤相比有更多的特有序列。

表 6 土壤微生物群落 Shannon-Weaver 指数及其均匀度

Table 6 Soil microbial community Shannon-Weaver index and its evenness

引物 Primer	群落 Shannon-Weaver 指数(D_{sh})				群落均匀度(J_{sh})			
	Community Shannon-Weaver index				Community evenness			
	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
PS01	1.638	1.696	1.492	1.560	0.8418	0.8714	0.9270	0.9695
PS02	1.712	1.827	1.520	1.616	0.9555	0.9388	0.8482	0.9019
PS03	1.847	1.500	1.787	1.723	0.9492	0.8373	0.9183	0.8853
PS04	1.924	2.177	2.265	2.332	0.9886	0.9907	0.9837	0.9726
PS05	2.025	1.884	1.883	1.944	0.9740	0.9680	0.9675	0.9348
PS07	1.986	2.096	2.013	2.090	0.9549	0.9540	0.9680	0.9511
PS08	2.301	1.900	2.150	1.844	0.9594	0.9764	0.9336	0.8870
PS09	2.234	1.957	2.076	1.854	0.9701	0.9413	0.9449	0.8920
PS10	1.693	1.998	2.126	2.066	0.9451	0.9606	0.9236	0.9402
PS11	1.233	1.831	1.805	1.355	0.7664	0.9412	0.8214	0.8417
PS13	1.963	1.349	1.688	0.644	0.9441	0.9731	0.8675	0.9580
PS14	2.101	2.133	2.000	1.021	0.9566	0.9710	0.9619	0.9293
平均值 Average	1.888	1.862	1.900	1.670	0.9388	0.9437	0.9222	0.9219

2.3 土壤微生物群落 DNA 序列相似系数

通过计算群落 DNA 序列的相似系数可得到群落之间 DNA 序列差异的信息。表 8 表明,无农用化学品使用的土壤 S1 和有农用化学品使用的土壤 S2、S3、S4 的 DNA 序列相似系数较小(分别为 0.5355、0.5502 和 0.4545);农药和化肥均使用的土壤 S2 和农药严重污染的土壤 S3 及化肥严重污染的土壤 S4 的 DNA 序列相似系数较高(分别为 0.6304 和 0.6549)。这说明农用化学品会改变土壤微生物群落 DNA 序列组成,而土壤 S1 和土壤 S4 的相似系数最小,更表明了化肥的严重污染可能会对土壤微生物群落的 DNA 序列组成造成更大的影响。

3 讨论

长期以来,对物种多样性的研究主要集中在植物、动物和昆虫上^[16,17]。尽管微生物作为生态系统中极为重要的一环并起着某些关键作用,但其多样性的研究较少,甚至被忽视。微生物是地球上最古老和最丰富的物种,通过其代谢多样性和遗传适应性,微生物在许多小生境包括其他生命类型

表 7 土壤微生物群落 DNA 序列丰富度的修正值

Table 7 Corrected richness of soil microbial community DNA sequences

引物 primer	丰富度修正值 Corrected richness			
	S1	S2	S3	S4
PS01	4.00	2.67	1.67	1.67
PS02	3.67	3.00	2.00	2.33
PS03	3.00	3.33	3.00	3.67
PS04	3.67	3.33	3.67	4.67
PS05	4.00	3.00	4.33	2.33
PS07	2.33	3.33	2.67	4.33
PS08	4.67	1.33	3.33	2.00
PS09	5.67	4.00	2.67	4.33
PS10	2.00	2.33	4.00	3.33
PS11	3.00	1.67	3.67	1.67
PS13	4.00	1.67	4.67	0.33
PS14	4.67	3.67	3.00	1.00
平均值 Average	3.72	2.78	3.22	2.64
相对值 Relative value	1	0.75	0.87	0.71

不适宜的极端环境中得以生存并发挥作用。可是,在特定环境中,几乎所有包括微生物直接或间接作用的生物过程通常是被忽略的,更不用说进行广泛的研究调控和应用^[18]。研究微生物及其群落的多样性面临许多困难,其中最主要在于微生物物种难以分离并作出有效鉴定,据估计地球上已鉴定的微生物尚未超过实际数目的 13%^[19],这势必造成其多样性度量上的困难。此外,土壤微生物及其群落的多样性研究尚有其它难处,如从土壤中分离和鉴定微生物方法缺少可比性;土壤单位样品所含微生物个体极为巨大,每克土壤含有多于 10⁹ 个微生物^[20,21];土壤微生物的空间分布和微生物-土壤颗粒的互作限制土壤微生物定量化和代表性的抽样^[22,23]等。因此很难用研究大生物群落多样性的方法来研究土壤微生物群落多样性。

由于微生物物种间的差异本质上体现在 DNA 序列结构和功能的多样性上。因此,利用现代 DNA 分子标记技术可从 DNA 水平上来研究微生物群落的多样性及其变化,并可定量分析以克服上述研究上的困难。RAPD 分子标记技术最早应用于鉴定植物基因多态性^[24,25],它作为一种快速而灵敏的方法可用来检测相似或相同基因的微小差异。本文用 RAPD 分子标记技术来研究处于农用化学品不同影响环境下的土壤微生物群落 DNA 序列的多样性,实验表明,农用化学品的使用会改变土壤微生物群落 DNA 的序列组成,并对土壤微生物群落 DNA 序列的多样性产生影响。不同的农用化学品对土壤微生物群落 DNA 序列多样性的影响各不相同;在化肥污染情况下,与无污

表 8 土壤微生物群落 DNA 序列的相似系数
Table 8 Coefficients of soil microbial community DNA sequence similarities

土壤样品 Soil sample	S1	S2	S3	S4
S1		0.5355	0.5502	0.4545
S2	49		0.6304	0.6549
S3	52	58		0.5876
S4	40	56	52	

* 表中对角线上部为群落相似系统,下部为群落总共有扩增片段数。The data above diagonal are coefficients of community similarity and those down diagonal are number of common amplified bands.

染的土壤相比,土壤微生物数量大大增加,但土壤微生物群落的 DNA 序列的丰富度和均匀度及多样性指数都有所降低,DNA 序列种类相似程度最小,反映到土壤微生物群落物种结构上,化肥污染很可能会引起某些土壤微生物的富集和一些微生物物种的丧失;在农药污染情况下,与无污染的土壤相比,尽管土壤微生物数量减少,群落 DNA 序列的相似程度不高,均匀度也有所降低,但其 DNA 序列丰富度和多样性指数却有所增大,因此农药污染很可能会引起土壤微生物 DNA 序列本身发生变化如 DNA 变异、断裂等等。

RAPD 分子标记技术可以作为一种良好的方法应用于土壤微生物群落多样性的研究上,它能够快速灵敏的鉴定群落组成在 DNA 分子水平上的变化,得到土壤微生物群落 DNA 序列多样性的有关信息并量化表示。当然,应用 RAPD 技术研究土壤微生物群落多样性也存在不足,从本次实验来看所得的一些数据差异并不十分显著,主要原因在于 RAPD 技术具有一定的灵敏度范围,若群落 DNA 的差异低于群落总 DNA 量的 1%,该技术将无法完全检测^[12]。如若采用双随机引物的 RAPD 分子标记技术,可望大大提高其灵敏度;通过采用聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染技术可更有效地检测群落 RAPD 指纹的微小差异等等,这些均有待作进一步研究。

参考文献

[1] Babich E, Stotzky G. Developing standard for environmental toxicants; The need to consider abiotic environmental factors and microbe mediated ecological processes, *Environ. Health Perspect.*, 1983, **49**: 345~353

[2] Ou L T, Rothwell D F, Wheeler W B, *et al.* The effect of high 2,4-D concentration on degradation and carbon dioxide evolution in soils. *J. Environ. Qual.*, 1978, **7**: 241~246.

[3] Grossbard E. Effects on soil microflora. In: Audus L. J. Ed. *Herbicides*. New York: Academic Press. 1976. 99~148.

[4] Goring C A I, Laskowski D A. The effects of pesticides on nitrogen transformation in soils. In: Stevenson F. J. ed. *Nitrogen in Agricultural Soils*. Madison, WI: American Society of Agronomy and Soil Society of America. 1982. 689~720.

- [5] Wardle D A, Parkinson D. Effects of three herbicides on soil microbial mass and activity. *Plant Soil*, 1990, **122**: 21~28.
- [6] Wardle D A, Parkinson D. Relative importance of the effect of 2,4-D, glyphosate, and environmental variables on soil microbial mass. *Plant Soil*, 1991, **134**: 209~219.
- [7] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 1990, **18**: 6531~6535.
- [8] Bocci G, Menozzi P. Genetic variation of RAPD markers in a *Picea abies* Karst population. *Heredity*, 1995, **75**: 188~197.
- [9] Martin G B, Williams J G K, Tanksley S D. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, **88**: 2336~2340.
- [10] Hardys H, Balick M, Schierwater B. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.*, 1992, **1**: 55~63.
- [11] Grajal-Martin M J, Simon C J, Muehlbauer F J. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to race 2 of *Fusarium oxysporum* sp. pisi. *Phytopathology*, 1993, **83**: 612~614.
- [12] Xia X, Bollinger J, Ogram A. Molecular genetic analysis of response of three soil microbial communities to the application of 2,4-D. *Mol. Ecol.*, 1995, **4**: 17~28.
- [13] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**: 316~322.
- [14] Magurran A E. *Ecological diversity and its measurement*. Princeton: Princeton University Press. 1988. 34~59.
- [15] Jenkinson D S, Ladd J N. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: Paul E. A., Ladd J. N. eds. *Soil Biochemistry* Vol. 5. New York: Marcel Dekker. 1981. 415~471.
- [16] Parkinson D, Coleman D C. Microbial communities, activity, and biomass. *Agric. Ecosys. Environ.*, 1991, **34**: 3~33.
- [17] Kennedy A C, Smith K L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. In: Collins H. P., Robertson G. P., Klug M. J. eds. *The significance and Regulation of Soil Biodiversity*. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 1995. 75~86.
- [18] Zedan H. The economic value of microbial diversity. *Biotech. Appl. Microbiol.*, 1993, **43**: 178.
- [19] Hawksworth D L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol. Res.*, 1991, **95**: 641~655.
- [20] Torsvik V L, Goksoyr J, Daae F L. High diversity of DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990a, **56**: 782~787.
- [21] Torsvik V L, Goksoyr J, Daae F L. Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990b, **56**: 776~781.
- [22] Ahmed M, Oades J M. Distribution of organic matter and adenosine triphosphate after fractionation of soils by physical procedures. *Soil Biol. Biochem.*, 1984, **16**: 465~470.
- [23] Stozky G. Mechanisms of adhesion to clay, with reference to soil system. In: Savage D. C., Fletcher M. ed. *Bacterial Adhesion: Mechanism and Physiological Significance*. New York: Plenum Press. 1985. 195~253.
- [24] Klein-Lankhorst R M, Vermunt A, Weide R, *et al.* Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theor. Appl. Genet.*, 1991, **83**: 108~114.
- [25] Muthalli M, Ford-Lloyd B V, Newbury H J. The random amplification of polymorphic DNA for fingerprinting plants. *PCR Meth. Appl.*, 1992, **2**: 274~292.