

H9 和 H10 亚型禽流感病毒二重 RT-PCR 检测方法的建立

李丹, 谢芝勋*, 李孟, 罗思思, 谢丽基, 张民秀, 黄娇玲, 范晴, 王盛, 谢志勤, 邓显文, 曾婷婷, 张艳芳

(广西壮族自治区兽医研究所, 广西兽医生物技术重点实验室, 广西南宁 530001)

摘要 [目的]建立可同时鉴别检测 H9 和 H10 亚型禽流感病毒(AIV)的二重 RT-PCR 检测方法。[方法]根据 GenBank 中 H9 和 H10 亚型 AIV 的 HA 基因保守序列,分别设计 2 对特异性引物,优化引物之间的浓度与退火温度等条件,建立了可同时鉴别检测 H9 和 H10 亚型 AIV 的二重 RT-PCR 检测方法。[结果]特异性试验结果表明,该方法可以特异性扩增出 H9 和 H10 亚型 AIV 对应大小的目的条带,而对其余亚型禽流感病毒及其他禽病原体均未扩增出特异性条带。同时,该检测方法对 H9 和 H10 亚型 AIV 的扩增下限均为 5×10^4 拷贝/ μL 。临床样品的检测结果表明其与病毒分离结果相一致(100%)。[结论]该研究建立的二重 RT-PCR 检测方法特异性强、敏感性高,可在一管内同时鉴别检测 H9 与 H10 两种亚型 AIV,为 H9 与 H10 亚型 AIV 的监测提供了技术支持。

关键词 禽流感病毒;H9 亚型;H10 亚型;二重 RT-PCR

中图分类号 S852.65 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)05-0096-04

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2020.05.026



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Establishment of a Duplex RT-PCR Assay for Detection of AIV H9 Subtype and H10 Subtype

LI Dan, XIE Zhi-xun, LI Meng et al (Guangxi Veterinary Research Institute, Guangxi Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Nanning, Guangxi 530001)

Abstract [Objective] To establish a duplex RT-PCR assay method for simultaneous detection of H9 and H10 subtype of avian influenza virus. [Method] According to the HA genes conserved sequences of H9 and H10 subtypes of avian influenza virus in GenBank database, 2 pairs of specific primers were designed, the primers density and annealing template of the reaction conditions were optimized, and the duplex RT-PCR assay for detection of AIV H9 subtype and H10 subtype was established. [Result] The results of the specificity test showed that this method could specifically amplify the target bands corresponding to H9 and H10 subtypes AIV, but no specific band was amplified from other subtypes of AIV or other avian pathogenic virus. The limit of detection for H9 and H10 subtype avian influenza virus was 5×10^4 copies/ μL . The detection results of duplex RT-PCR assay for clinical samples were the same as that of viral isolation (100%). [Conclusion] This duplex RT-PCR assay was a specific and sensitive method for the detection of H9 and H10 subtypes of AIV, which could provide technical support for the monitoring of H9 and H10 subtypes of AIV.

Key words Avian influenza virus; H9 subtype; H10 subtype; Duplex RT-PCR

禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)是正黏病毒科中 A 型流感病毒属成员。根据其表面抗原血凝素蛋白(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶蛋白(neuraminidase, NA)的差异可以将 AIV 划分为 16 种不同的 HA 亚型(H1~H16)和 9 种不同的 NA 亚型(N1~N9)^[1-3]。H9 亚型 AIV 自 1966 年在美国首次被发现,目前已经给全球养禽业造成了十分严重的经济损失^[4]。自 1998 年广东首次发现人感染 H9N2 亚型 AIV 病例以来, H9N2 型 AIV 感染人事件也在不断发生^[5]。H10 亚型 AIV 主要在北美地区的鸡、火鸡、野鸟及南非地区的鸭中分离到病毒^[6],近年来在我国华南地区的环境及家禽拭子样品中也有分离到 H10 亚型禽流感毒株的报道^[7-8]。在 2004 年和 2010 年,埃及和澳大利亚分别出现 H10 亚型 AIV 感染人事件^[9]。自 2013 年 12 月以来,我国先后发生 3 例人感染 H10N8 亚型禽流感病毒的病例并造成其中 2 人死亡,这是世界上首次报道 H10 亚型流感病毒感染人并致死的病例^[10]。近年来低致病性禽流感的流行病学监测中发现 H9 和 H10 亚型禽流感病毒混合感染普遍存在,研究还表明感染人的 H10N8 亚型流感病毒的部分内部基因来源于 H9N2 亚

型 AIV^[11]。因此, H9 与 H10 亚型 AIV 对家禽养殖及人类健康卫生具有重要意义。

由于经典的病毒分离鉴定方法存在检测鉴定周期较长且需要进一步的血清学及分子生物学方法鉴定,而常用的血清学方法则需要较多标准阳性血清且不同亚型血清之间存在不同程度的交叉反应,具有一定的局限性,所以目前检测禽流感病毒主要采用分子生物学方法^[12]。分子生物学方法特别是 PCR 检测方法具有操作简便、特异性好、敏感性高等优点,在禽流感病毒的监测和诊断过程中得到了广泛应用^[13]。由于 AIV 混合感染普遍存在且具有相似临床症状,难以及时准确地对其进行鉴别区分。近年来,多重 PCR 技术在禽流感诊断中的应用越来越多,但关于 H9 与 H10 亚型 AIV 混合感染的多重 PCR 检测方法还未见报道。笔者建立了一种可同时检测 H9 与 H10 亚型 AIV 的二重 RT-PCR 检测方法,不仅可以快速准确的鉴别 2 种不同亚型 AIV,而且可为感染人的 AIV 病原学监测提供技术支持。

1 材料与方法**1.1 材料**

1.1.1 毒株 AIV 毒株(H1N2、H3N2、H6N2、H9N2、H9N6、NDV、IBV、MG、ARV、MG 及 ILTV 均由广西兽医生物技术重点实验室保存; AIV(H7N2、H14N5、H15N9 和 H16N3)的 cDNA 模板由美国宾夕法尼亚州立大学惠赠; AIV 毒株(H5N1、H5N2、H5N7 和 H5N9) cDNA 模板均由美国康涅狄格州立大

基金项目 广西科技重大专项(桂科AA17204057);广西科技基地和人才专项项目(桂科AD17195083);广西科技项目(桂科专项 16-1);广西“八桂学者”专项(2019-79);国家“万人计划”领军人才专项(2016-37-88)。

作者简介 李丹(1990-),女,广西临桂人,硕士,从事病原分子生物学研究。
*通信作者,研究员,从事预防兽医学研究。

收稿日期 2019-09-11

学惠赠;其他 AIV 毒株 (H2N3、H4N5、H5N1、H7N9、H8N4、H10N3、H11N3、H12N5 和 H13N5) 毒株或 cDNA 模板均由香港大学惠赠。

1.1.2 试剂。增殖病毒所用 SPF 鸡胚购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司, DNA/RNA 抽提试剂盒、PCR Mix、琼脂糖凝胶回收试剂盒、DNA Marker DL 1 000、快速连接载体及质粒抽提试剂盒均购自北京全式金生物技术有限公司。MLV 逆转录酶、10 mmol dNTP、感受态细胞及 RNA 抑制剂均购自宝生物(大连)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计及合成。从 GenBank 数据库中下载 H9 和 H10 亚型 AIV 的 HA 基因序列,使用 DNASTar 软件对上述序列进行比对分析,找出特异性的保守区域,然后使用 Primer Premier 5.0 软件结合 Oligo7 分析软件,设计并通过验证筛选出 2 对针对 H9 和 H10 亚型 AIV HA 基因进行扩增的特异性引物。引物由宝生物(大连)有限公司进行合成。引物序列及目的片段大小见表 1。

表 1 PCR 扩增用引物序列

Table 1 Sequences of primers for PCR

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'→3')	扩增产物大小 Size of amplified products/bp
H9-F	GCAGCAGATAGAGACTCAACC	490
H9-R	CAAGAGATGAGCGACAGT	490
H10-F	ACGAACACTTACAGAAACACGGA	272
H10-R	CTCGGTGCTATCAGACCCG	272

1.2.2 病原 RNA/DNA 的提取与 cDNA 合成。参照核酸抽提试剂盒使用说明书对该研究中所用到的 AIV、IBV、NDV 和 ARV 的 RNA 及 ILTV 和 MG 的 DNA 进行抽提,抽提后的核酸模板用 33 μL RNA-free 水溶解。RNA 模板参照宝生物反转录试剂盒的说明书进行 cDNA 的合成,所有核酸模板均置于 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下低温保存备用。

1.2.3 二重 RT-PCR 反应体系的建立及优化。该方法运用 20 μL 反应体系:2 \times PCR Mix 10 μL ,H9 与 H10 亚型 AIV cDNA 模板各 1 μL ,引物 H9-F、H9-R、H10-F 和 H10-R (25 pmol/ μL) 分别加入 0.1~1.0 μL ,共 10 个梯度,每个梯度递增 0.1 μL ,进行 2 个引物组合浓度的优化,最后用 RNA-free 补足至 20 μL 。同时,根据引物各浓度梯度的试验效果,再对退火温度及反应时间进行组合优化,最终确定该方法的最佳反应体系及条件。

1.2.4 特异性试验。运用上述所建立的二重 RT-PCR 检测方法按照对 H1N2、H2N3、H3N2、H4N5、H5N1、H6N2、H7N9、H8N4、H11N3、H12N5、H13N5、H14N1、H15N5、NDV、ARV、IBV、ILTV 和 MG 的 cDNA/DNA 进行检测,验证所建方法的特异性。

1.2.5 标准品的制备。参考文献[14]中 HA 全长基因的引物,分别以 H9N2 与 H10N3 毒株 cDNA 为模板进行 HA 基因 RT-PCR 的扩增,得到其全长目的片段,并将目的片段分别连接到载体上并送交华大基因公司进行测序。将插入有 H9 与 H10 亚型 AIV 的 HA 基因全长片段并测序正确的重组质

粒分别命名为 H9-T 和 H10-T。用商品化的质粒抽提试剂盒分别提取含有 H9-T 和 H10-T 的质粒,并使用微量核酸检测仪对其浓度进行测定,按照相关公式计算样品相对应的拷贝数,同时将 H9-T 与 H10-T 质粒等拷贝数混合,并将混合好的样品进行 10 倍倍比稀释,以便获得 H9-T 与 H10-T 质粒 DNA 浓度为 $5\times 10^1\sim 5\times 10^9$ 拷贝/ μL 的标准品。

1.2.6 敏感性试验。运用上述优化好的二重 RT-PCR 检测方法对制备的质粒 DNA 浓度 $5\times 10^1\sim 5\times 10^9$ 拷贝/ μL 的 H9-T 与 H10-T 质粒样品进行扩增,验证该检测方法的敏感性。

1.2.7 临床样品检测。运用试验所建立的二重 PCR 检测方法对近期从活禽市场采集的 120 份鸡和鸭咽喉及泄殖腔棉拭子样品一部分进行 PCR 检测鉴定,同时将相同编号剩余样品经过处理后接种 SPF 鸡胚进行流感病毒的分离与鉴定,并将 H9 与 H10 亚型 AIV 鉴定为阳性的样品进行 HA 基因测定。然后,将上述 2 种方法的结果进行比较,进而验证二重 RT-PCR 检测结果的准确性。

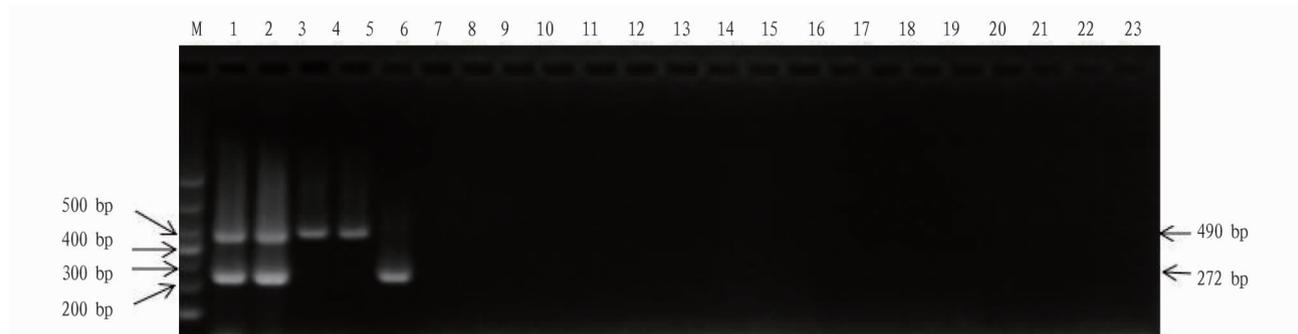
2 结果与分析

2.1 二重 RT-PCR 反应条件的优化 对 H9 与 H10 亚型 AIV HA 基因 2 对特异性引物浓度比例及扩增温度时间等的优化,确定二重 RT-PCR 反应的最佳体系:2 \times PCR Mix 12.5 μL ,H9 与 H10 亚型 AIV 2 μL 作为模板,特异性引物 H9-F 和 H9-R (20 pmol/ μL) 的加入量为 0.75 μL ,特异性引物 H10-F 及 H10-R (20 pmol/ μL) 的添加量为 1 μL ,用 RNA-free 水补足,使终体积至 20 μL 。通过对退火温度进行梯度优化筛选,确定该反应体系的最佳退火温度为 $53\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

2.2 特异性试验 用所建立的二重 RT-PCR 法从 H9 及 H10 亚型 AIV 混合样品分别检测出 2 条特异性的条带,分别为 490 bp (H9 亚型) 及 272 bp (H10 亚型);对 H9N2 和 H9N6 亚型 AIV PCR 检测的结果仅出现 1 条特异性条带,片段大小为 490 bp;对 H10N3 亚型 AIV 进行扩增只检测出 1 条特异性条带,片段大小为 272 bp;对其他亚型 AIV 和常见的禽病病原体均未扩增出任何条带,结果表明该方法具有良好的特异性。特异性结果见图 1。

2.3 敏感性试验 运用该方法针对 $5\times 10^9\sim 5\times 10^1$ 拷贝/ μL 的 H9 与 H10 亚型的 AIV 质粒模板进行扩增,结果显示对浓度为 $5\times 10^9\sim 5\times 10^4$ 拷贝/ μL 的 H9 与 H10 亚型的 AIV 均有 2 条明显的特异性扩增条带出现,片段大小分别为 490 和 272 bp;对浓度等于或小于 5×10^3 拷贝/ μL 的 H9 与 H10 亚型 AIV 均无扩增条带(图 2)。由此可见,该方法最低能检测到质粒模板量为 5×10^4 拷贝/ μL 的 H9 与 H10 亚型 AIV。

2.4 临床样品检测 运用建立的方法对分别从南宁地区不同活禽市场采集到的 120 份鸡和鸭咽喉及泄殖腔拭子样品进行 PCR 检测,样品检测的结果显示有 6 份样品为 H9 与 H10 亚型 AIV 混合感染阳性,阳性率为 5%;21 份样品能扩增出 490 bp 大小的目的条带,为 H9N_x AIV;2 份样品能扩增出 272 bp 大小的目的条带,为 H10N_x AIV;部分临床样品 PCR 检测的结果见图 3。上述检测结果与样品的病毒分离鉴定及其 HA 基因测序结果完全相符。

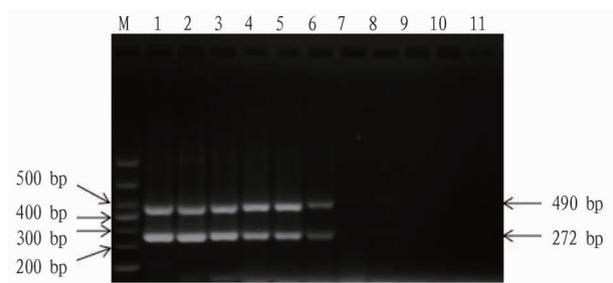


注: M. DNA Marker DL1000; 1. H9+ H10; 2. H9+ H10; 3. H9N2; 4. H9N6; 5. H10N3; 6. H1N2; 7. H2N3; 8. H3N2; 9. H4N6; 10. H5N1; 10. H6N2; 10. H7N9; 11. H8N4; 12. H9N2; 13. H11N2; 14. H12N5; 15. H13N5; 16. H14N1; 17. H15N5; 18. NDV; 19. IBV; 20. ARV; 21. ILTV; 22. MG; 23. 阴性对照

Note: M. DNA Marker DL1000; 1. H9+ H10; 2. H9+ H10; 3. H9N2; 4. H9N6; 5. H10N3; 6. H1N2; 7. H2N3; 8. H3N2; 9. H4N6; 10. H5N1; 10. H6N2; 10. H7N9; 11. H8N4; 12. H9N2; 13. H11N2; 14. H12N5; 15. H13N5; 16. H14N1; 17. H15N5; 18. NDV; 19. IBV; 20. ARV; 21. ILTV; 22. MG; 23. Negative control

图1 特异性试验结果

Fig. 1 The results of specificity test

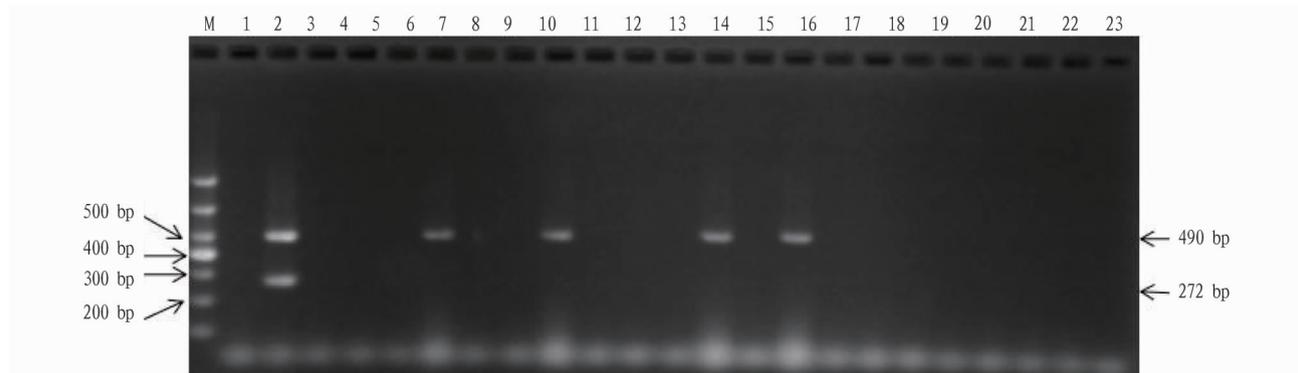


注: M. DNA Marker DL1000; 1, 5×10^9 拷贝/ μL ; 2, 5×10^8 拷贝/ μL ; 3, 5×10^7 拷贝/ μL ; 4, 5×10^6 拷贝/ μL ; 5, 5×10^5 拷贝/ μL ; 6, 5×10^4 拷贝/ μL ; 7, 5×10^3 拷贝/ μL ; 8, 5×10^2 拷贝/ μL ; 9, 5×10^1 拷贝/ μL ; 10, 阴性对照

Note: M. DNA Marker DL1000; 1, 5×10^9 copies/ μL ; 2, 5×10^8 copies/ μL ; 3, 5×10^7 copies/ μL ; 4, 5×10^6 copies/ μL ; 5, 5×10^5 copies/ μL ; 6, 5×10^4 copies/ μL ; 7, 5×10^3 copies/ μL ; 8, 5×10^2 copies/ μL ; 9, 5×10^1 copies/ μL ; 10, Negative control

图2 敏感性试验结果

Fig. 2 The results of sensitivity test



注: M. DNA Marker DL1000; 7、10、14 和 16 为 H9 亚型 AIV 阳性产物; 2 为 H9 与 H10 亚型 AIV 的阳性产物; 其余为阴性产物

Note: M. DNA Marker DL1000; 7, 10, 14 and 16 were positive products of H9 subtype AIV; 2 was positive product of H9 and H10 subtypes of AIV; the others were negative products

图3 部分临床样品检测结果

Fig. 3 The detection results of some clinical samples

3 讨论

H9 与 H10 亚型禽流感病毒均属于 LPAIV。H9 亚型 AIV 已成为我国家禽养殖场内流行的禽流感病毒的主要亚型, 不仅给养禽业造成了严重的经济损失, 而且自 20 世纪 90 年代以来 H9N2 亚型 AIV 直接感染人的事件也不断发生。H10 亚型 AIV 对家禽虽然呈现低致病性, 但已有报道国外出现过感染人的病例, 2013 年 12 月江西报道了首例人感染 H10N8 亚型 AIV 并出现致人死亡的病例。近年来, 还有研究证实 H9 亚型 LPAIV 还可以为 HPAIV 的重组提供内部基因 (包括 H10N8 亚型 AIV)^[15-16], 这些“新毒株”已经对人类公共卫生的安全构成了严重威胁, 从而引发了科学家对 H9 与 H10 亚型 AIV 的广泛关注和深入研究。

近年来, 笔者所在实验室对广西地区家禽中 LPAIV 流行情况进行持续监测, 发现家禽中感染 H9 亚型 LPAIV 的比例较高, H10 亚型 AIV 也时常被检测到, 这与赵坤坤等^[14]、Luo 等^[17] 和 Peng 等^[18] 对华东地区不同亚型 LPAIV 的监测

结果基本一致。由于很多亚型的 LPAIV 在家禽体内经常是以混合感染的形式存在, 它们对家禽不产生明显的临床症

状, 难以靠肉眼和常规的方法进行快速的鉴别诊断。H9 与 H10 亚型 AIV 不仅在家禽中普遍流行, 而且严重威胁人类健

康,其在家禽中混合感染的情况也比较常见。目前,对于 H9 与 H10 亚型 AIV 的混合感染迫切需要建立一种能够在较短时间内快速检测及鉴别 H9 与 H10 亚型 AIV 的方法,为 2 种亚型 AIV 的鉴别及 LPAIV 流行病学的监测提供可靠的技术支撑。

该研究通过设计针对 H9 与 H10 亚型 AIV HA 基因的特异性引物,经过对不同引物组合的筛选得到扩增效果的一个引物组合,然后继续对其引物浓度、退火温度和扩增时间进行优化,最终建立可同时检测 H9 与 H10 亚型 AIV 的方法。特异性和敏感性试验结果表明,该方法只能扩增出 H9 与 H10 亚型 AIV HA 基因,不能检测出其他亚型 AIV 及常见家禽病原的核酸,最低能检测到量为 5×10^4 拷贝/ μL 质粒模板,另外临床样品的检测结果也表明其与病毒分离结果完全相符。综上所述,该研究成功建立了能同时检测 H9 与 H10 亚型 AIV 二重 RT-PCR 方法,该方法具有特异性强及灵敏度高、方便和快速等优点,一次 PCR 反应便可确定 H9 与 H10 亚型 AIV 的混合感染及单一感染情况,方便基层单位应用,为 H9 与 H10 亚型 AIV 的快速鉴别诊断提供有效的技术支撑。

参考文献

[1] 秦爱建. 禽流感病毒[M]//韦平,秦爱建. 重要动物病毒分子生物学. 北京:科学出版社,2008:3-27.
 [2] WEBSTER R G, AIR G M, METZGER D W, et al. Antigenic structure and variation in an influenza virus N9 neuraminidase[J]. J Virol, 1987, 61(9): 2910-2916.
 [3] WEBSTER R G, BEAN W J, GORMAN O T, et al. Evolution and ecology of influenza A virus[J]. J Microbiol Rev, 1992, 56: 152-179.
 [4] HOMME P, EASTERDAY B C. Avian influenza virus infections. I Characteristics of influenza A-turkey-Wisconsin-1966 virus[J]. Avian Dis, 1970,

14(1):66-74.

[5] 刘娟. H9N2 亚型禽流感病毒抗原性及其与 HA 基因变异的相关性研究[D]. 泰安:山东农业大学,2013.
 [6] 黄建龙,王昌建,谭丹,等. 洞庭湖区 H10 亚型禽流感监测及其遗传进化分析[J]. 中国农学通报,2014,30(32):15-20.
 [7] 王德丽,慈彦鹏,崔艳芳,等. 一株 H10N7 亚型禽流感病毒的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 中国预防兽医学报,2015,37(1):6-9.
 [8] 彭宜,张伟,薛峰,等. 2006-2008 年华东地区家禽不同 HA 亚型低致病性禽流感的病原学监测[J]. 中国人兽共患病学报,2009,25(2):119-121.
 [9] ARZEY G G, KIRKLAND P D, ARZEY E K, et al. Influenza virus A (H10N7) in chickens and poultry abattoir workers, Australia[J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(5):814-816.
 [10] 谭伟,谢芝勋. H10N8 亚型禽流感病毒的研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2014,41(8):236-241.
 [11] CHEN H Y, YUAN H, GAO R B, et al. Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection: A descriptive study[J]. The Lancet, 2014, 383(9918):714-721.
 [12] 罗思思,谢芝勋,谢志勤,等. H6N1 亚型禽流感病毒二重 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 畜牧与兽医,2015(8):24-27.
 [13] 谭伟,李孟,谢芝勋. 禽流感病毒的监测及诊断[J]. 中国人兽共患病学报,2014,30(11):1145-1149.
 [14] 赵坤坤,仲书官,赵国,等. 2009-2010 年华东地区家禽低致病性禽流感病毒的流行病学调查与分析[J]. 中国兽医学报,2012,32(3):345-349.
 [15] LIU D, SHI W F, GAO G F. Poultry carrying H9N2 act as incubators for novel human avian influenza viruses[J]. The Lancet, 2014, 383(9920):869.
 [16] XU W, LI X D, BAI T, et al. A fatal case of infection with a further reassortant, highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N6 virus in Yunnan, China[J]. Infect Genet Evol, 2016, 40:63-66.
 [17] LUO S S, XIE Z X, XIE Z Q, et al. Surveillance of live poultry markets for low pathogenic avian influenza viruses in Guangxi Province, Southern China, from 2012-2015[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):1-9.
 [18] PENG Y, XIE Z X, LIU J B, et al. Epidemiological surveillance of low pathogenic avian influenza virus (LPAIV) from poultry in Guangxi Province, Southern China[J]. PLoS One, 2013, 8(10):e77132.

(上接第 95 页)

自毒化合物^[21]。韩丽梅等^[22]从番茄的根系分泌物中分离出了香草酸、对羟基苯甲酸、龙胆酸等化感物质。张璐等^[23]研究表明,连作甜瓜土壤中对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、香兰素、香豆酸、阿魏酸、苯甲酸的含量随着连作年限的增加而增加,连作 3 年后 7 种酚酸的总量显著高于未连作土壤。该研究分离到的 V-5 菌株可以降解香草酸、对羟基苯甲酸、丁香酸、苯甲酸等酚酸化合物,因而对防治酚酸化合物介导的多种植物连作障碍都具有较大开发价值。

参考文献

[1] 吴凤芝,赵凤艳,刘元英. 设施蔬菜连作障碍原因综合分析及防治措施[J]. 东北农业大学学报,2000,31(3):241-247.
 [2] 吴正锋,成波,王才斌,等. 连作对花生幼苗生理特性及荚果产量的影响[J]. 花生学报,2006,35(1):29-33.
 [3] HUANG Y Q, HAN X R, YANG J F, et al. Autotoxicity of peanut and identification of phytotoxic substance in rhizosphere soil[J]. Allelopathy journal, 2013, 31(2):297-308.
 [4] 滕应,任文杰,李振高,等. 花生连作障碍发生机理研究进展[J]. 土壤,2015,47(2):259-265.
 [5] 王小兵,骆永明,刘五星,等. 花生根分泌物的鉴定及其化感作用[J]. 生态学杂志,2011,30(12):2803-2808.
 [6] 李培栋,王兴祥,李奕林,等. 连作花生土壤中酚酸类物质的检测及其对花生的化感作用[J]. 生态学报,2010,30(8):2128-2134.
 [7] 刘苹,赵海军,万书波,等. 连作对花生根系分泌物化感作用的影响[J]. 中国生态农业学报,2011,19(3):639-644.
 [8] PATTERSON D T. Effects of allelopathic chemicals on growth and physiological responses of soybean (*Glycine max*) [J]. Weed Sci, 1981, 29(1):53-59.
 [9] 杜英君,靳月华. 连作大豆植株化感作用的模拟研究[J]. 应用生态学报,1999,10(2):209-212.

[10] 黄玉茜,韩晓日,杨劲峰,等. 花生连作土壤微生物区系变化研究[J]. 土壤通报,2011,42(3):552-556.
 [11] 孙秀山,封海胜,万书波,等. 连作花生田主要微生物类群与土壤酶活性变化及其交互作用[J]. 作物学报,2001,27(5):617-621.
 [12] CHEN M N, LI X, YANG Q L, et al. Dynamic succession of soil bacterial community during continuous cropping of peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. PLoS One, 2014, 9(7):1-11.
 [13] 黄家宇,李莉,刘青,等. HPLC 法同时测定杠板归中阿魏酸与香草酸的含量[J]. 中国药房,2011,22(19):1783-1784.
 [14] WEISBURG W G, BARNES S M, PELLETIER D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. J Bacteriol, 1991, 173(2):697-703.
 [15] ANZAI Y, KUDO Y, OYAZU H. The phylogeny of the genera *Chryseomonas*, *Flavimonas*, and *Pseudomonas supports* synonymy of these three genera[J]. Int J Syst Bacteriol, 1997, 47(2):249-251.
 [16] YU J Q, SHOU S Y, QIAN Y R, et al. Autotoxic potential of cucumber crops [J]. Plant and soil, 2000, 223:147-151.
 [17] LI X Y, LEWIS E E, LIU Q Z, et al. Effects of long-term continuous cropping on soil nematode community and soil condition associated with replant problem in strawberry habitat[J]. Sci Rep, 2016, 6:1-12.
 [18] LI X G, ZHANG T L, WANG X X, et al. The composition of root exudates from two different resistant peanut cultivars and their effects on the growth of soil-borne pathogen[J]. Int J Biol Sci, 2013, 9(2):164-173.
 [19] CHEN S C, YU H J, ZHOU X G, et al. Cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedling rhizosphere *Trichoderma* and *Fusarium* spp. communities altered by vanillic acid[J]. Front Microbiol, 2018, 9:1-11.
 [20] 钱娜,王小兵,汪晓丽,等. 花生化感物质降解菌的筛选、鉴定与降解特性研究[J]. 农业环境科学学报,2019,38(6):1288-1295.
 [21] 吴凤芝,赵凤艳,马凤鸣,等. 酚酸物质及其化感作用[J]. 东北农业大学学报,2001,32(4):402-407.
 [22] 韩丽梅,王树起,鞠会艳,等. 大豆根分泌物的鉴定及其化感作用的初步研究[J]. 大豆科学,2000,19(2):119-125.
 [23] 张璐,杨瑞秀,王莹,等. 甜瓜连作土壤中酚酸类物质测定及降解研究[J]. 北方园艺,2017(9):18-23.