

ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

生态学报

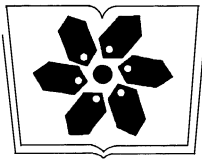
Acta Ecologica Sinica



第 32 卷 第 19 期 Vol.32 No.19 **2012**

中国生态学会
中国科学院生态环境研究中心
科学出版社

主办
出版



中国科学院科学出版基金资助出版

生态学报

(SHENGTAI XUEBAO)

第 32 卷 第 19 期

2012 年 10 月 (半月刊)

目 次

中国野生东北虎数量监测方法有效性评估	张常智, 张明海, 姜广顺 (5943)
城市居民食物氮消费变化及其环境负荷——以厦门市为例	于 洋, 崔胜辉, 赵胜男, 等 (5953)
珠江口水域夏季小型底栖生物群落结构	袁俏君, 苗素英, 李恒翔, 等 (5962)
2010 年夏季雷州半岛海岸带浮游植物群落结构特征及其与主要环境因子的关系	龚玉艳, 张才学, 孙省利, 等 (5972)
阿根廷滑柔鱼两个群体间耳石和角质颞的形态差异	方 舟, 陈新军, 陆化杰, 等 (5986)
黄河三角洲滨海草甸与土壤因子的关系	谭向峰, 杜 宁, 葛秀丽, 等 (5998)
盘锦湿地净初级生产力时空分布特征	王莉雯, 卫亚星 (6006)
菜豆根瘤菌对土壤钾的活化作用	张 亮, 黄建国, 韩玉竹, 等 (6016)
花生植株和土壤水浸液自毒作用研究及土壤中自毒物质检测	黄玉茜, 韩立思, 杨劲峰, 等 (6023)
遮荫对金莲花光合特性和叶片解剖特征的影响	吕晋慧, 王 玄, 冯雁梦, 等 (6033)
火干扰对小兴安岭草丛、灌丛沼泽温室气体短期排放的影响	顾 韩, 牟长城, 张博文, 等 (6044)
古尔班通古特沙漠南部植物多样性及群落分类	张 荣, 刘 彤 (6056)
黄土高原樟子松和落叶松与其他树种枯落叶混合分解对土壤的影响	李 茜, 刘增文, 米彩红 (6067)
长期集约种植对雷竹林土壤氨氧化古菌群落的影响	秦 华, 刘卜榕, 徐秋芳, 等 (6076)
H ₂ O ₂ 参与 AM 真菌与烟草共生过程	刘洪庆, 车永梅, 赵方贵, 等 (6085)
北京山区防护林优势树种分布与环境的的关系	邵方丽, 余新晓, 郑江坤, 等 (6092)
旱直播条件下强弱化感潜力水稻根际微生物的群落结构	熊 君, 林辉锋, 李振方, 等 (6100)
不同森林类型根系分布与土壤性质的关系	黄 林, 王 峰, 周立江, 等 (6110)
臭氧胁迫下硅对大豆抗氧化系统、生物量及产量的影响	战丽杰, 郭立月, 宁堂原, 等 (6120)
垃圾填埋场渗滤液灌溉对土壤理化特征和草本花卉生长的影响	王树芹, 赖 娟, 赵秀兰 (6128)
稻麦轮作系统冬小麦农田耕作措施对氧化亚氮排放的影响	郑建初, 张岳芳, 陈留根, 等 (6138)
不同施氮措施对旱作玉米地土壤酶活性及 CO ₂ 排放量的影响	张俊丽, 高明博, 温晚霞, 等 (6147)
北方农牧交错区农业生态系统生产力对气候波动的响应——以准格尔旗为例	孙特生, 李 波, 张新时 (6155)
辽宁省能源消费和碳排放与经济增长的关系	康文星, 姚利辉, 何介南, 等 (6168)
基于 FARSITE 模型的丰林自然保护区潜在林火行为空间分布特征	吴志伟, 贺红士, 梁 宇, 等 (6176)
不同后作生境对玉米地天敌的冬季保育作用	田耀加, 梁广文, 曾 玲, 等 (6187)
云南紫胶虫种群数量对地表蚂蚁多样性的影响	卢志兴, 陈又清, 李 巧, 等 (6195)
阿波罗绢蝶种群数量和垂直分布变化及其对气候变暖的响应	于 非, 王 吟, 王绍坤, 等 (6203)
专论与综述	
海水养殖生态系统健康综合评价: 方法与模式	蒲新明, 傅明珠, 王宗灵, 等 (6210)
海草场生态系统及其修复研究进展	潘金华, 江 鑫, 赛 珊, 等 (6223)
水华蓝藻对鱼类的营养毒理学效应	董桂芳, 解绶启, 朱晓鸣, 等 (6233)
环境胁迫对海草非结构性碳水化合物储存和转移的影响	江志坚, 黄小平, 张景平 (6242)
生态免疫学研究进展	徐德立, 王德华 (6251)
研究简报	
喀斯特峰丛洼地不同森林表层土壤有机质的空间变异及成因	宋 敏, 彭晚霞, 邹冬生, 等 (6259)
准噶尔盆地东南缘梭梭种子雨特征	吕朝燕, 张希明, 刘国军, 等 (6270)
期刊基本参数: CN 11-2031/Q * 1981 * m * 16 * 336 * zh * P * ¥ 70.00 * 1510 * 35 * 2012-10	



封面图说: 岸边的小白鹭——鹭科白鹭属共有 13 种, 其中有大白鹭、中白鹭、白鹭 (小白鹭)、黄嘴白鹭等, 体羽皆是全白, 世通称白鹭。夏季的白鹭成鸟繁殖时枕部着生两条狭长而软的矛状羽, 状若双辫, 肩和胸着生蓑羽, 冬季时蓑羽常全部脱落, 白鹭虹膜黄色, 嘴黑色, 脚部黑色, 趾呈黄绿色。小白鹭常常栖息于稻田、沼泽、池塘水边, 以及海岸浅滩的红树林里。白天觅食, 好食小鱼、蛙、虾及昆虫等。繁殖期 3—7 月。繁殖时成群, 常和其他鹭类在一起, 雌雄均参加营巢, 次年常到旧巢处重新修葺使用。

彩图提供: 陈建伟教授 北京林业大学 E-mail: cites.chenjw@163.com

DOI: 10.5846/stxb201108251240

秦华, 刘卜榕, 徐秋芳, 白建峰, 李永夫, 李永春. 长期集约种植对雷竹林土壤氨氧化古菌群落的影响. 生态学报, 2012, 32(19): 6076-6084.

Qin H, Liu B R, Xu Q F, Bai J F, Li Y F, Li Y C. Effects of long-term intensive management on soil ammonia oxidizing archaea community under *Phyllostachys praecox* stands. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(19): 6076-6084.

长期集约种植对雷竹林土壤氨氧化古菌群落的影响

秦 华^{1,2}, 刘卜榕^{1,2}, 徐秋芳^{1,2,*}, 白建峰³, 李永夫^{1,2}, 李永春^{1,2}

(1. 浙江省森林生态系统碳循环与固碳减排重点实验室, 浙江农林大学, 临安 311300;

2. 浙江农林大学环境与资源学院, 临安 311300; 3. 上海第二工业大学城市建设与环境工程学院, 上海 201209)

摘要:应用荧光定量 PCR 以及 PCR-DGGE 技术研究了雷竹林长期集约种植过程中土壤氨氧化古菌种群数量及群落结构的演变趋势, 并利用典范对应分析(CCA)方法研究影响土壤氨氧化古菌群落的主要环境因子。研究表明, 水稻田改种雷竹后, 土壤氨氧化古菌种群数量显著增加, 在 4 a 时达到最高, 但在集约种植后快速下降, 9 a 雷竹林土壤氨氧化古菌数量最低, 随后逐渐稳定。雷竹林土壤氨氧化古菌种群主要为不可培养泉古菌, 聚类分析结果表明集约种植前后氨氧化古菌群落结构存在明显差异, 长期集约经营雷竹林土壤以适应较低 pH 值的物种为主要优势种群。CCA 分析表明, 集约种植时间较长的 11 a 和 15 a 林地群落结构较为类似, 与 7 a 和 9 a 样地明显区分。土壤 NO_3^- -N 与氨氧化古菌群落变化的相关性最强, 说明氨氧化古菌在雷竹林土壤硝化过程中发挥着重要作用。土壤 pH 值及速效养分对土氨氧化古菌群落也具有较大影响, 它们与 NO_3^- -N 合计解释了 59.7% 的样本总变异, 表明土壤酸化以及过量养分的积累对氨氧化古菌群落具有重要影响。

关键词:集约种植; 雷竹林土壤; 氨氧化古菌; 典范对应分析

Effects of long-term intensive management on soil ammonia oxidizing archaea community under *Phyllostachys praecox* stands

QIN Hua^{1,2}, LIU Borong^{1,2}, XU Qiufang^{1,2,*}, BAI Jianfeng³, LI Yongfu^{1,2}, LI Yongchun^{1,2}

1 Zhejiang Provincial Key Laboratory of Carbon Cycling in Forest Ecosystems and Carbon Sequestration, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300, China

2 School of Environmental and Resources, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300, China

3 School of Urban Development and Environmental Engineering, Shanghai Second Polytechnic University, Shanghai 201209, China

Abstract: *Phyllostachys praecox* is a favorable bamboo species for the production of edible shoots, and has been widely planted in southern China. Intensive management practices such as regular high rate of fertilization and annual heavy winter mulch in the stands established more than 5 years, has been employed by many bamboo growers to improve yields. However, these practices may have adverse effects on the ecosystem. Ammonia-oxidizing archaea (AOA) has been found in various habitats and played a key role in soil nitrification. There is no published information available on the impact of long-term intensive land management practices on the population size and community structure of soil AOA in *Phyllostachys praecox* stands. In this study, the abundance and composition of soil AOA communities across a long-term chronosequence under intensive managed *Phyllostachys praecox* stands were investigated using real-time polymerase chain reaction (PCR), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), cloning and sequencing approaches based on *amoA* genes. Canonical correspondence analysis (CCA) was also used to determine the environmental variables which are significantly correlated with community structure.

基金项目:浙江省自然科学基金项目(Y3080337); 浙江农林大学人才启动基金资助(2351000731)

收稿日期:2011-08-25; **修订日期:**2012-05-17

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: xuqiufang@zafu.edu.cn

Treatments in this study were based on the cultivation history which corresponded to 4, 7, 9, 11 and 15 years after establishment of bamboo stands. Paddy fields with similar topography were used as the control. Each cultivation history had three replications. The archaeal *amoA* gene copy numbers ranged from 1.79×10^7 to 3.93×10^7 per gram of dry soil, and changed greatly in response to the long-term intensive management. The 4-year-old treatment had the highest copy numbers of *amoA* genes, whereas the lowest copy numbers were recorded in the 9-year-old treatment. Ammonia-oxidizing archaea were more abundant than ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in all the corresponding treatments though they were of the same order of magnitude. There was no significant correlation between AOA abundance and soil nitrification potential. The DGGE patterns revealed that the intensive management resulted in an obvious change of the AOA community, significant change was also observed among the treatments with different intensive management history. Phylogenetic analysis of the *amoA* gene fragments showed that all AOA sequences from different treatments were associated with uncultured Crenarchaeote. The AOA species that adapt to low pH soils dominated in the 7-, 9-, 11- and 15-year-old treatments while species associated with paddy soil and sediment soil clone dominated in the control and 4-year-old treatment, indicating a pronounced difference in the community composition of AOA in response to the long-term intensive management. Canonical correspondence analysis exhibited a significant difference in microbial community structures between the treatments before and after intensive management application. The 11- and 15-year-old treatments were clustered together, and clearly separated from the 7- and 9-year-old treatments along both the first and second ordination axes. Concentrations of soil NO_3^- -N, NH_4^+ -N and available phosphorus, and soil pH together explained 62.2% of the total variation of soil AOA community. The first ordination axis explained 33.9% of the variation and the second axis explained 25.8% of the variation. Among the four soil parameters measured, soil NO_3^- -N concentration explained most of the variation of AOA community, but the influence was not significant ($P < 0.05$). The results suggest that long-term intensive management had a significant impact on AOA abundance and composition, and the soil acidification and nutrient accumulation should be important factors influencing the shift of AOA community in the intensively managed *P. praecox* stands.

Key Words: intensive management; *Phyllostachys praecox*; ammonia-oxidizing archaea; Canonical correspondence analysis

雷竹(*Phyllostachys praecox*)是中国长江以南地区广泛分布的优良笋用竹种,近十几年来,以冬季覆盖和大量施肥为主要特征的雷竹集约种植技术已在生产上大面积推广,成为当地农村收入的主要来源。但是,长期集约种植也产生了一系列的生态环境问题,如土壤有机质以及速效氮、磷、钾等含量显著增加,土壤 pH 值急剧下降,以及土壤细菌群落结构发生改变等,从而导致雷竹林提前退化^[1-2]。另一方面,土壤中积累的养分元素如氮、磷等通过挥发、径流、渗滤等途径进入周边环境,对大气和水体质量产生严重威胁^[3]。

硝化作用是全球氮素循环的重要环节,其中由氨氧化微生物主导的将氨转化为亚硝酸的氨氧化过程为限速步骤,因此氨氧化微生物也被认为是硝化作用的主要驱动者^[4]。过去一直认为土壤硝化作用由氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)进行,近年来的研究表明泉古菌门的一些古菌也具有 *amoA* 基因,并可以进行硝化作用^[5]。目前已经发现,氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)的关键功能基因 *amoA* 广泛存在于海洋和陆地环境^[6],且较为丰富。自然环境中硝化古菌关键功能基因 *amoA* 的数量通常高于细菌,已知的最大差别达 8000 倍^[7]。He 等^[8]对农田土壤生态系统中 AOA 和 AOB 的丰度、组成及对环境的响应进行了研究,发现各处理中 AOA 的丰度明显高于 AOB,且与 AOB 相比,长期施肥处理对 AOA 的群落结构组成产生了更为明显的影响,可见 AOA 在农田土壤生态系统中的重要作用。目前的研究表明,土壤环境因子如铵浓度、温度、施肥处理、pH 值以及植被等对不同的氨氧化细菌及古菌种群均具有特异的选择性,氨氧化微生物作为理想的土壤质量生物学指标受到了广泛关注^[9-10]。

氨氧化古菌在氨氧化微生物中的重要地位已经被深刻认识,因此继氨氧化细菌后,非常有必要对不同生态系统中的氨氧化古菌群落及其作用进行科学评价。雷竹林长期集约种植过程中土壤氨氧化细菌的演变趋

势及其影响因素已经被初步揭示^[11],而氨氧化古菌在长期集约种植雷竹林土壤中的功能及其演变趋势还没有相关研究。本文通过选取不同集约种植年限雷竹林,采用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)、变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)及荧光定量 PCR 方法研究氨氧化古菌数量及种群结构的演变趋势,并利用典范对应分析方法探讨其主要影响因素,旨在评估集约种植条件下土壤氨氧化古菌的生态功能,从而更好的了解土壤硝化过程,为提高肥料利用率、保护生态环境提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 研究地概况

土壤样品采自浙江省临安市太湖源镇(30°18' N, 119°33' E),该地属中纬度北亚热带季风气候,年降水量 1420 mm,多年平均气温为 15.8 °C,历年平均日照时数 1939 h,无霜期 234 d。雷竹栽培区属低山丘陵地貌,土壤为粉砂岩母质上发育的红壤土类。雷竹林种植之前均为水稻田,雷竹定植后的前 5 a 基本不施肥或施少量复合肥,从雷竹栽培的第 5 年起开始实施集约种植,模式为:每年 11 月下旬至 12 月上旬对雷竹林地表进行覆盖,保温保湿以利于竹笋早发。通常是在雷竹林地表先覆 10—15 cm 稻草,再在上面覆盖 10—15 cm 的砻糠,稻草用量 40 t/hm²,砻糠用量 55 t/hm²,翌年 3、4 月揭去表层未腐烂的砻糠,而下层的稻草经过一个冬春的发酵和雨雪水的淋泡已基本腐烂入土。每年施 3 次肥,时间分别为 5 月上旬、9 月中旬和 11 月下旬(覆盖前),每年施肥总量为无机复合肥(N:P:K= 15:15:15) 2.25 t/hm²和尿素(含 N 46%)1.125 t/hm²,或施等量养分的有机肥^[2]。

1.2 样品采集与处理

为研究集约种植年限对雷竹林土壤氨氧化古菌群落结构的影响,分别采取种植历史为 4、7、9、11 和 15 a 的雷竹林土壤,同时采集邻近同一母质且地形地貌特征相似的水稻田土壤作为对照(CK)。随机取样法采取各处理 0—20 cm 土壤样品,每个雷竹林样地 10 个取样点,装入密封袋,放入冰桶带回实验室。新鲜土样充分混匀后,去除大的石块和植物残体,过 2 mm 钢筛。样品分为两份,一份立即冷冻干燥,用于提取土壤细菌总 DNA,供氨氧化古菌群落结构及定量分析使用;另外一份于室内自然风干,研磨过筛后用于土壤基本理化性质分析。

1.3 主要试剂与引物

PowerSoil™ Total DNA Isolation Kit 试剂盒购于美国 Mo Bio 公司;Taq DNA 聚合酶、SYBR® Premix Ex Taq™、pMD 18-T 载体、凝胶回收试剂盒 Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 以及质粒提取试剂盒 MiniBEST Plasmid Purification Kit 均购于宝生物工程公司(TakaRa,大连);荧光染料 SYBR green I 购于美国 Invitrogen 公司;引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.4 分析方法

1.4.1 土壤理化性质

土壤理化性质参照文献^[12]进行。其中,土壤 pH 值采用 1:2.5 土水比,复合电极测定;有机质含量采用重铬酸钾-硫酸外加热法测定;总氮采用半微量凯氏定氮法;碱解氮采用碱解扩散法;有效磷采用 Bray 法,盐酸-氟化铵溶液浸提,钼锑抗比色法测定;速效钾采用醋酸铵提取,火焰光度计测定;土壤矿质态氮采用氯化钾浸提—流动分析仪测定法。不同种植年限雷竹林土壤理化性质分析结果见表 1。

1.4.2 土壤总 DNA 的提取及纯化

采用 PowerSoil™ Total DNA Isolation Kit 试剂盒提取土壤总 DNA,称取 0.25 g 于-20 °C 保存的土壤样品,按试剂盒说明书进行土壤 DNA 提取,提取后的 DNA 样品保存于-20 °C。

1.4.3 土壤氨氧化古菌的 PCR-DGGE 分析

采用一对氨氧化古菌 *amoA* 基因特异引物 Arc-amoAF 和 Arc-amoAR 对氨氧化古菌 *amoA* 基因进行扩增。Arc-amoAF;5'-STA ATG GTC TGG CTT AGA CG-3';Arc-amoAR;5'-GCG GCC ATC CAT CTG TAT GT-3',其中, Arc-amoAR 在 5'端加一段 GC 夹:cgc ccg ccg cgc ccc gcg ccc ggc ccg ccg ccc ccg ccc c^[13]。使用 Bio-Rad 公司

的 S-1000 PCR 仪对土壤总 DNA 进行扩增。25 μL 反应体系如下:10 $\times$ PCR Buffer(缓冲液)2.5 μL , MgCl_2 (25 mmol/L)2.0 μL , dNTP (2.5 mmol/L)2.0 μL , 引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.25 μL , *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μL)0.25 μL , 模板 DNA 0.5 μL , 用无菌双蒸水补足至 25 μL 。PCR 反应参数:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。取 3 μL PCR 反应产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 检测产物及其长度。

表 1 不同种植年限雷竹林土壤理化性质

Table 1 Soil characteristics of bamboo stands with different cultivation history

处理 Treatment	pH (H_2O)	有机质 Organic C /(g/kg)	全氮 Total N /(g/kg)	碱解氮 Available N /(mg/kg)	有效磷 Available P /(mg/kg)	速效钾 Available K /(mg/kg)	铵态氮 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ /(mg/kg)	硝态氮 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ /(mg/kg)
CK	6.0(0.4)c	15.5(0.2)ab	2.20(0.25)ab	174(10)b	15(2)a	42(8)a	42.4(1.6)b	11.2(0.1)a
4 a	5.3(0.4)b	13.1(0.2)a	1.93(0.14)a	160(8)a	29(3)b	110(10)b	29.9(2.5)a	12.3(0.7)a
7 a	3.6(0.1)a	17.7(0.2)b	2.38(0.24)b	179(10)b	35(4)b	168(1)c	73.1(4.9)c	17.3(0.2)b
9 a	3.7(0.4)a	16.2(0.4)ab	2.33(0.35)b	201(6)c	209(11)c	212(19)d	88.4(6.6)d	38.7(1.4)d
11 a	3.7(0.3)a	16.3(0.2)ab	2.40(0.35)b	211(6)c	296(11)d	207(2)d	99.5(4.0)e	20.2(0.5)c
15 a	4.2(0.1)a	33.6(0.2)c	4.30(0.24)c	238(6)d	364(5)e	218(4)d	104.0(2.1)e	21.0(1.2)c

表中数据为平均值, 括号内数值为标准差, 同列中不同字母代表差异达显著水平 ($P < 0.05$)

使用 DCodeTM Universal Mutation Detection System (Bio-Rad), 在变性剂梯度为 30%—50% 的 6% 聚丙烯酰胺凝胶上进行变性梯度凝胶电泳。电泳前对 PCR 产物定量、校正, 使上样量一致。在 60 $^{\circ}\text{C}$ 、80 V 条件下电泳 13 h 后, SYBR green I 染色 30 min, 染色结果用 Gel DocTM EQ (Bio-Rad) 凝胶成像系统成像, 使用 Quantity One 4.4 软件 (Bio-Rad) 进行图像分析。

1.4.4 氨氧化古菌优势种群序列分析

将 DGGE 图谱中的主要条带进行切胶, DNA 回收, 然后再分别以不带 GC 夹的引物 Arc-amoAF / Arc-amoAR 对回收条带 DNA 进行 PCR 扩增, 将扩增产物利用 pMD 18-T 载体进行克隆测序 (Invitrogen 上海实验室代测)。将测序结果登陆 NCBI 通过 Blast 软件与 GenBank 中的已知序列比对来确定测定序列的微生物种类。利用 MEGA4 软件基于 DGGE 条带序列, 进行 Bootstrap 验证系统发育分析, 邻接法 (Neighbor-joining, N-J) 构建系统发育树。

1.4.5 荧光定量 PCR

采用 SYBR[®] Premix Ex TaqTM 试剂盒, 针对氨氧化古菌 *amoA* 基因进行荧光定量 PCR 扩增, 每个样品 3 次重复, 扩增在 Bio-Rad CFX96 扩增仪上进行。荧光定量 PCR 反应体系 25 μL , 引物 Arch-amoAF 和 Arch-amoAR (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.25 μL , SYBR[®] Premix Ex TaqTM 12.5 μL , 模板 1.0 μL , 用无菌 ddH₂O 补足至 25 μL 。荧光定量 PCR 条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 接着 95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 55 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 45 s, 35 个循环。

1.4.6 荧光定量 PCR 标准曲线建立

参照 He 等^[8]报道的方法, 以混合土样总 DNA 为模板进行氨氧化古菌的 *amoA* 基因 PCR 扩增。将 100 μL PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 切下含有氨氧化古菌 *amoA* 基因的条带, 用 Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 (Takara) 凝胶回收试剂盒纯化。使用 pMD 18-T 载体连接 PCR 产物, 连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 在氨苄青霉素平板上进行蓝白斑筛选阳性克隆。取部分阳性转化菌液送上海生工进行测序, 作为氨氧化古菌荧光定量 PCR 分析的标准 DNA。利用 MiniBEST Plasmid Purification Kit (TaKaRa) 试剂盒提取重组质粒 DNA, 质粒 DNA 浓度使用 Nanodrop[®] ND-1000 测定, 氨氧化古菌 *amoA* 基因重组质粒 40.2 ng/ μL 。根据已知重组质粒全序列和阿伏伽德罗常数 (6.02×10^{23} 分子数/mol) 计算 *amoA* 基因拷贝数, 计算得到氨氧化古菌重组质粒为 1.17×10^{10} cells/ μL 。以 10 倍梯度对重组质粒进行梯度稀释 (10^{-3} — 10^{-9}), 每个稀释度 3 次重复, 荧光定量 PCR 扩增获得氨氧化古菌的 *amoA* 基因标准曲线, 标准方程为 $y =$

$-3.20x+37.22$, ($R^2=0.99$)。

1.5 数据处理与统计分析

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据处理, Duncan 单因素方差分析比较各处理之间的差异显著性 ($P < 0.05$)。采用 Bio-Rad 公司的 Quantity One 4.4 软件进行 DGGE 指纹图谱分析。使用 CANOCO 4.5.1 软件 (Microcomputer Power, Ithaca, USA) 对 DGGE 揭示的细菌群落结构与环境参数进行典范对应分析 (Canonical correspondence analysis, CCA)。以 DGGE 中条带的相对密度值作为微生物物种数据, 使用软件中的 manual selection 选项预选影响最显著的一组环境变量, 采用 499 次的蒙特卡罗排列检验 (Monte Carlo permutation test, 499 permutations, full model) 进行显著性检验^[14]。

2 结果与分析

2.1 长期集约经营对土壤氨氧化古菌数量的影响

采用荧光定量 PCR 检测不同集约种植年限雷竹林土壤氨氧化古菌的数量变化, 假定每个 AOA 细胞内含有一个 *amoA* 拷贝, 根据标准曲线计算出土壤中 AOA 的细胞数量。由图 1 可以看出, 雷竹林土壤氨氧化古菌 *amoA* 基因拷贝数处于 1.79×10^7 — 3.93×10^7 copies/g 干土之间。长期种植过程中, 土壤 AOA 数量总体呈先上升后下降的趋势。在母竹定植后的雷竹成林期间, 尽管没有进行覆盖和大量施肥, 4 a 处理与对照相比土壤 AOA 的数量显著增加。雷竹林从第 5 年开始进行集约种植, 此后土壤 AOA 数量急剧下降, 7 a 处理其 AOA 数量显著低于 4 a, 而集约经营 4a 和 6a 后的 9 a 及 11 a 处理其 AOA 数量显著低于 7 a。随着经营时间的延长, 土壤 AOA 数量有逐渐回升的趋势, 15 a 处理其 AOA 数量与 7 a 没有显著差异。

2.2 长期集约经营对土壤氨氧化古菌群落结构的影响

采用氨氧化古菌特异性引物 Arc-*amoA*F 和 Arc-*amoA*R 对 *amoA* 基因进行 PCR 扩增, 经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 氨氧化古菌的 *amoA* 基因扩增片段均为 635 bp, 纯化后进行 DGGE 分析, 结果如图 2 所示。

图 2 中可以看出, 随着雷竹种植年限的延长, DGGE 图谱出现了较明显的差异, 水稻田改种雷竹后, 土壤氨氧化古菌群落变化明显, 原有的优势种群如条带 6、10、12 等减弱或消失, 新的优势种群如条带 5、19、20 等出现。在雷竹林实施集约种植措施后, 土壤氨氧化古菌群落则再次发生变化, 与 4 a 处理相比, 种群丰富度显著下降, 7 a 处理主要由条带 9、11、14 和 16 等 4 个种群组成, 而 9 a 处理则只剩下条带 13—15 这 3 个优势种群, 表明集约种植对土壤 AOA 种群产生了强烈的影响。随着集约经营时间的延长, 土壤中 AOA 种群丰富度开始恢复。但是, 除了条带 9 为所有种植雷竹林土壤样品的共有种群外, AOA 优势种群与集约种植之前相比已经

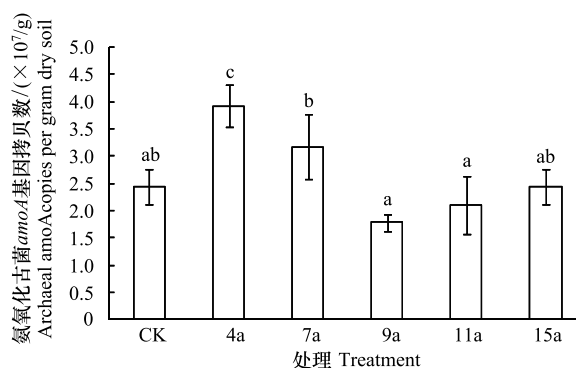


图 1 不同集约种植年限雷竹林土壤氨氧化古菌的数量变化

Fig. 1 AOA population size under long-term intensive managed *Phyllostachys praecox* stands

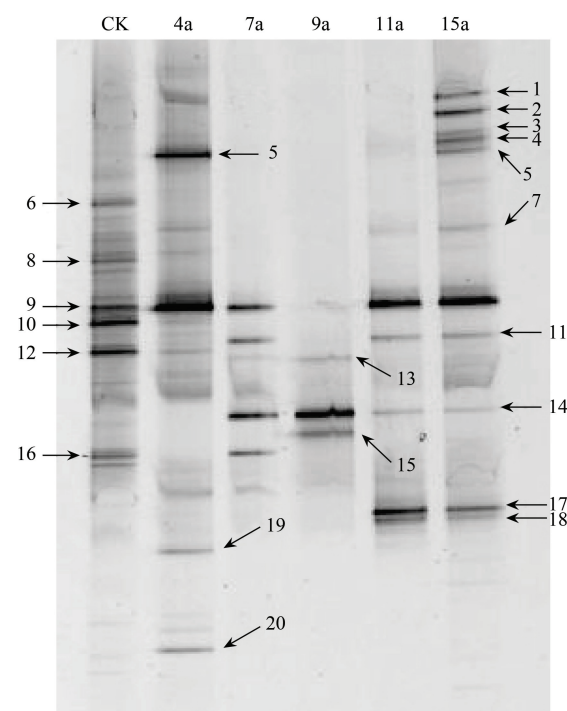


图 2 雷竹林土壤氨氧化古菌群落的 DGGE 分析

Fig. 2 DGGE analysis of soil AOA community in *Phyllostachys praecox* stands

发生了明显的变化。

通过对主要的 DGGE 条带进行序列分析来确定雷竹林集约经营过程中土壤氨氧化古菌的群落演变过程,共选取了 20 条 DGGE 条带进行分析(图 2)。在 Genebank 中进行 Blast 序列比对,利用 MEGA4 构建系统发育树(图 3)。结果表明,雷竹林土壤中的氨氧化古菌均归类于不可培养的泉古菌(Uncultured Crenarchaeote)。水稻田土壤中主要 AOA 种群(条带 9、10、12)与已知的沉积物土壤中的 AOA 种群距离较近,而集约经营后的雷竹林土壤 AOA 种群发生较大变化,除 15 a 雷竹林土壤中的条带 2—5 聚为一支,与水稻田土壤 AOA 种群的遗传距离较为接近外,11 a 和 15 a 雷竹林土壤中的主要条带 11、14、17 和 18 等聚为一支,与集约经营之前的 AOA 种群遗传距离较远,说明长期的集约经营改变了土壤氨氧化古菌的种群结构。

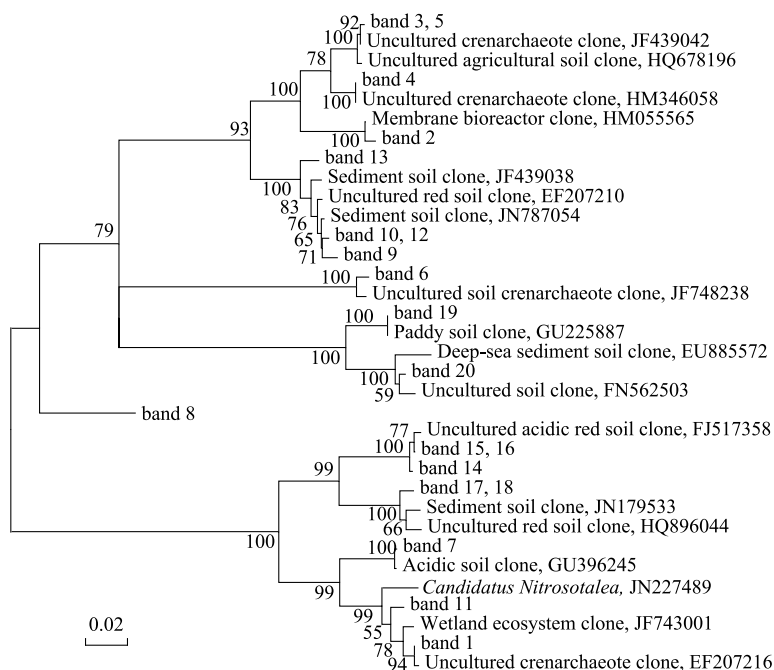


图 3 基于雷竹林土壤氨氧化古菌 DGGE 条带序列的 N-J 系统发育树

Fig. 3 Neighbor-joining tree of AOA sequences in *Phyllostachys praecox* stands

2.3 环境因子对土壤氨氧化古菌群落结构的影响

对各样品的 DGGE 条带进行典范对应分析(CCA),结果如图 4 所示。结果表明,水稻田改种雷竹林后,土壤氨氧化古菌群落结构发生明显改变,而随着集约种植措施年限的延长,不同种植阶段土壤氨氧化古菌群落差异明显。CK 与 4 a 样地较为接近,但是其与集约经营后的雷竹林样地差异较大。集约经营雷竹林中,7 a 与 9 a 样地较为接近,而长期集约经营的雷竹林样地 11 a 和 15 a 则聚为一簇,说明植被类型以及种植方式的改变均对土壤氨氧化古菌群落产生了较大影响。

根据 Canoco 的 forward 分析,所有的 8 个环境因子中,土壤 NO_3^- -N 含量与氨氧化古菌群落的相关性最强,但并未达到显著水平($P < 0.05$),土壤 pH 值、 NH_4^+ -N 以及有效磷含量与 AOA 的相关性也大于其他环境因子,因此选入这 4 个环境因子进行分析。从图 4 中可以看出,土壤 pH 值与第一排序轴具负相关性,而速效磷以及矿质态氮均与第一排序轴呈正相关,其中,速效磷与第二排序轴呈显著正相关($P < 0.05$)。由样点与环境变量上的投影可以发现,CK 以及 4 a 样地中 AOA 种群对于较高的 pH 值具有较强的适应性,而 11 a 和 15 a 样地中的 AOA 种群则对于较高的速效氮、磷养分积累较为适应。CCA 分析结果显示,第一排序轴(Axis1)解释了样本中 33.9% 的变异,第二排序轴(Axis2)解释了样本 25.8% 的变异,两者合并解释了样本 59.7% 的总变异(表 2)。

3 讨论

近年来,环境基因组学研究发现地球环境中大量存在的泉古菌含有氨氧化关键功能基因(*amoA*),具有氨氧化能力,这群微生物迅速引起了人们的关注,成为研究的热点。通过荧光定量 PCR 手段研究自然环境中氨氧化微生物关键功能基因 *amoA* 拷贝数,发现 AOA 数量通常高于 AOB,且相差好几个数量级^[7]。Leininger 等^[15]首次报道了细菌和古菌关键功能基因 *amoA* 的相对丰度,发现多数土壤中硝化古菌数量多于细菌数量;最近的研究也表明农田土壤硝化古菌 *amoA* 基因约为细菌 *amoA* 数量的几十到上千倍^[16]。但是在森林土壤中目前相关研究不多,本研究结果显示,在长期集约种植的雷竹林土壤中,古菌 *amoA* 基因拷贝数处于 1.79×10^7 — 3.93×10^7 拷贝/g 干土之间,总体高于土壤中细菌 *amoA* 数量(0.52×10^7 — 1.88×10^7 拷贝/g 干土)^[11],但在数量级上并没有差异。Boyle-Yarwood 等^[17]也发现在不同的林分下,土壤 AOA 及 AOB 种群数量比较相近,均处于 2.3×10^6 — 6.0×10^6 拷贝/g 干土范围内。由此可以看出,与氨氧化细菌相比,氨氧化古菌在森林土壤中并没有显示出明显的优势,这可能与森林土壤中泉古菌的丰度有较大关系。Kemnitz 等^[18]研究表明,在酸化森林土壤中,尽管泉古菌在土壤总基因数量中占有相当比例(12%—38%),但是其总数却低于细菌数量。

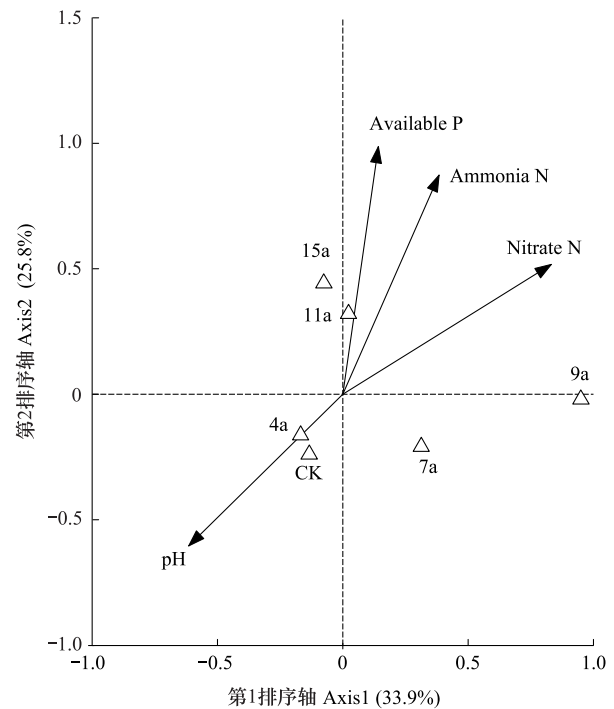


图4 雷竹林土壤氨氧化古菌群落结构的典范对应分析

Fig.4 CCA on DGGE band data in soils of *Phyllostachys praecox* stands

表2 土壤氨氧化古菌群落结构组成的典范对应分析

Table 2 CCA of soil AOA community compositions

典范对应分析指标 Index of CCA	第一排序轴 Axis 1	第二排序轴 Axis 2	第三排序轴 Axis 3	第四排序轴 Axis 4
特征值 Eigenvalues	0.548	0.417	0.284	0.185
样本-环境关联度 Species-environment correlation	1.000	1.000	0.999	0.992
物种累积关联度百分数 Cumulative percentage correlation of species data	33.9	59.7	77.3	88.7
物种-环境关系累积百分数 Cumulative percentage correlation of species-environment relation	38.2	67.3	87.1	100.0

长期集约种植过程中雷竹林土壤硝化势与 AOB 数量呈显著正相关关系($P < 0.01$),而本研究发现 AOA 与土壤硝化势之间的相关性并不显著。与此结果相类似的是,Di 等^[19]发现在含氮量丰富的草地土壤中,尽管 AOA 数量众多,但与土壤硝化势之间没有显著相关性,而 AOB 丰度与土壤硝化势显著相关,因此推断 AOB 是此类土壤中硝化作用的主要驱动者。已有的大量研究表明,在养分丰富,特别是氮源丰富的土壤中,AOB 是土壤硝化过程的主要驱动者^[16, 20]。雷竹林在长期的集约经营过程中土壤养分大量积累,氮素含量远远高于一般农田土壤,这也可能是导致 AOA 与土壤硝化潜力相关性不显著的原因之一。但是在不同的环境条件下土壤 AOA 和 AOB 所发挥的作用也不尽相同,AOA 一般在营养缺乏的生境中发挥更大的作用^[21],因此推测在水稻田刚改种雷竹以及雷竹林集约种植的初期,AOA 可能发挥着较大作用,但是随着土壤养分的快速积累,AOA 无论是数量还是活性都随之逐渐下降,最终趋于稳定。

土壤氨氧化古菌 PCR-DGGE 分析结果表明,雷竹林土壤中氨氧化古菌与已发现的不同生境,如旱地、水稻土以及湿地系统中的不可培养古菌较为相近。作为对照的稻田土壤其 AOA 种群与已发现的沉积物中的 AOA 类似,而在雷竹成林过程中逐渐发生种群更替,4 a 处理中出现了一些不同的种群,如条带 5 与已知的农田土壤中的种群类似,而条带 19 和 20 则与水稻土以及沉积物中的 AOA 种群类似。实施集约经营措施以后,由于 pH 值的快速下降,土壤中出现了新的条带如 14—15 以及 17—18 等,聚类分析表明其都与酸性红壤中发现的 AOA 克隆较为接近,说明此时的 AOA 群落已经由适应较低 pH 值的物种所组成。同样的结果也可以在对比土壤 AOB 和 AOA 的拷贝数后发现,在长期集约经营后土壤 AOB 的丰度逐渐下降而 AOA 则保持稳定^[11],这也与 He 等^[8]发现的在酸性土壤中 AOA 拷贝数高于 AOB 一致。

PCR-DGGE 虽然能直观的研究土壤 AOA 群落结构的变化,但是难以揭示特定环境因子和微生物群落的内在联系,因此有必要利用统计学方法对试验结果进行分析,如典范对应分析(CCA)^[22]、主成分分析(PCA)^[23]、冗余分析(RDA)^[24]等。本研究采用 CCA 方法探讨了 8 个环境因子对土壤 AOA 群落结构的影响,发现土壤 NO₃-N 含量与氨氧化古菌群落变化的相关性最强,但并未达到显著水平($P < 0.05$),说明雷竹林土壤硝化作用是 AOB 和 AOA 共同作用的过程,AOA 在其中也发挥了重要作用。土壤 pH 值对 AOA 群落结构的影响较大,这已经被很多研究证明。董莲华等^[25]研究发现 HA 的加入可以稳定土壤 AOA 数量,主要是由于 HA 能够缓冲土壤 pH 值,从而间接影响了土壤 AOA 群落。CCA 分析结果同时表明,土壤中速效养分如有效磷的累积与 AOA 群落结构的变化也具有较强的相关性,可能是由于大量速效养分的累积对土壤 AOA 产生了胁迫作用,影响了优势种群的分布,具体的机理目前还没有明确,有待于进一步研究。集约经营的雷竹林作为一个高强度施肥的特殊生态环境,在更大的时间尺度上研究其土壤氨氧化古菌群落结构及其活性将是今后的重点工作,这对于评价生态系统稳定性,提高肥料利用率,减少氨的损失以及环境保护等方面均具有重要的意义。

References:

- [1] Qin H, Xu Q F, Cao Z H. Soil microbial biomass in long-term and intensively managed *Phyllostachys praecox* stands. Journal of Zhejiang Forestry College, 2010, 27(1): 1-7.
- [2] Qin H, Li G D, Ye Z Q, Xu Q F, Cao Z H. Evolvement of soil bacterial community in intensively managed *Phyllostachys praecox* stand and related affecting factors. Chinese Journal of Applied Ecology, 2010, 21(10): 2645-2651.
- [3] Wu J S, Jiang P K, Xie B L, Sheng W X. Role of buffer strips in reducing nutrient leaching loss from intensively-managed *Phyllostachys praecox*. Acta Pedologica Sinica, 2010, 47(4): 794-797.
- [4] Kowalchuk G A, Stephen J R. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. Annual Review of Microbiology, 2001, 55(1): 485-529.
- [5] Treusch A H, Leininger S, Kletzin A, Schuster S C, Klenk H P, Schleper C. Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. Environmental Microbiology, 2005, 7(12): 1985-1995.
- [6] Jia Z J, Weng J H, Lin X G, Conrad R. Microbial ecology of archaeal ammonia oxidation: a review. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(4): 431-437.
- [7] Herrmann M, Saunders A M, Schramm A. Archaea dominate the ammonia-oxidizing community in the rhizosphere of the freshwater macrophyte *Littorella uniflora*. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(10): 3279-3283.
- [8] He J Z, Shen J P, Zhang L M, Zhu Y G, Zheng Y M, Xu M G, Di H J. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. Environmental Microbiology, 2007, 9(9): 2364-2374.
- [9] He J Z, Zhang L M. Advances in ammonia-oxidizing microorganisms and global nitrogen cycle. Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(1): 406-415.
- [10] Hao Y J, Wu S W, Wu W X, Chen Y X. Research progress on the microbial ecology of aerobic ammonia-oxidizing bacteria. Acta Ecologica Sinica, 2007, 27(4): 1573-1582.
- [11] Qin H, Xu Q F, Cao Z H, Wong M H. Population size and nitrification activity of soil ammonia-oxidizing bacteria in long-term intensive managed *Phyllostachys praecox* stands. The Botanical Review, 2011, 77(3): 313-319.
- [12] Lu R K. Analysis Methods for Soil and Agrochemistry. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 1999.

- [13] Shen J P, Zhang L M, Zhu Y G, Zhang J B, He J Z. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(6): 1601-1611.
- [14] ter Braak C J F, Smilauer P. CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination (Version 4.5). US: Microcomputer Power, 2002.
- [15] Leininger S, Urlich T, Schlöter M, Qi J, Nicol G W, Prosser J I, Schuster S C, Schleper C. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 2006, 442(7104): 806-809.
- [16] Jia Z J, Conrad R. Bacteria rather than archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(7): 1658-1671.
- [17] Boyle-Yarwood S A, Bottomley P J, Myrold D D. Community composition of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in soils under stands of red alder and Douglas fir in Oregon. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 2956-2965.
- [18] Kemnitz D, Kolb S, Conrad R. High abundance of Crenarchaeota in a temperate acidic forest soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 60(3): 442-448.
- [19] Di H J, Cameron K C, Shen J P, Winefield C S, O'Callaghan M, Bowatte S, He J Z. Nitrification driven by bacteria and not archaea in nitrogen-rich grassland soils. *Nature Geoscience*, 2009, 2(9): 621-624.
- [20] Andert J, Wessén E, Borjesson G, Hallin S. Temporal changes in abundance and composition of ammonia-oxidizing bacterial and archaeal communities in a drained peat soil in relation to N₂O emissions. *Journal of Soils and Sediments*, 2011, 11(8): 1399-1407.
- [21] Erguder T H, Boon N, Wittebolle L, Marzorati M, Verstraete W. Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea. *FEMS Microbiology Review*, 2009, 33(5): 855-869.
- [22] Wallis P D, Haynes R J, Hunter C H, Morris C D. Effect of land use and management on soil bacterial biodiversity as measured by PCR-DGGE. *Applied Soil Ecology*, 2010, 46(1): 147-150.
- [23] Sakurai M, Suzuki K, Onodera M, Shinano T, Osaki M. Analysis of bacterial communities in soil by PCR-DGGE targeting protease genes. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(11): 2777-2784.
- [24] Marschner P, Kandeler E, Marschner B. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35(3): 453-461.
- [25] Dong L H, Córdova-Kreylos A L, Yang J S, Yuana H L, Scow K M. Humic acids buffer the effects of urea on soil ammonia oxidizers and potential nitrification. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(8): 1612-1621.

参考文献:

- [1] 秦华, 徐秋芳, 曹志洪. 长期集约经营条件下雷竹林土壤微生物量的变化. *浙江林学院学报*, 2010, 27(1): 1-7.
- [2] 秦华, 李国栋, 叶正钱, 徐秋芳, 曹志洪. 集约种植雷竹林土壤细菌群落结构的演变及其影响因素. *应用生态学报*, 2010, 21(10): 2645-2651.
- [3] 吴家森, 姜培坤, 谢秉楼, 盛卫星. 缓冲带在减少集约经营雷竹林养分渗漏流失中的作用. *土壤学报*, 2010, 47(4): 794-797.
- [6] 贾仲军, 翁佳华, 林先贵, Conrad R. 氨氧化古菌的生态学研究进展. *微生物学报*, 2010, 50(4): 431-437.
- [9] 贺纪正, 张丽梅. 氨氧化微生物生态学与氮循环研究进展. *生态学报*, 2009, 29(1): 406-415.
- [10] 郝永俊, 吴松维, 吴伟祥, 陈英旭. 好氧氨氧化菌的种群生态学研究进展. *生态学报*, 2007, 27(4): 1573-1582.
- [12] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 1999.

ACTA ECOLOGICA SINICA Vol. 32, No. 19 October, 2012 (Semimonthly)

CONTENTS

Assessment of monitoring methods for population abundance of Amur tiger in Northeast China	5943
..... ZHANG Changzhi, ZHANG Minghai, JIANG Guangshun (5943)	
Changes of residents nitrogen consumption and its environmental loading from food in Xiamen	5953
..... YU Yang, CUI Shenghui, ZHAO Shengnan, et al (5953)	
Analysis of the meiobenthic community in the Pearl River Estuary in summer	5962
..... YUAN Qiaojun, MIAO Suying, LI Hengxiang, et al (5962)	
Community characteristics of phytoplankton in the coastal area of Leizhou Peninsula and their relationships with primary environmental factors in the summer of 2010	5972
..... GONG Yuyan, ZHANG Caixue, SUN Xingli, et al (5972)	
Morphological differences in statolith and beak between two spawning stocks for <i>Illex argentinus</i>	5986
..... FANG Zhou, CHEN Xinjun, LU Huajie, et al (5986)	
Relationships between coastal meadow distribution and soil characteristics in the Yellow River Delta	5998
..... TAN Xiangfeng, DU Ning, GE Xiuli, et al (5998)	
Variation analysis about net primary productivity of the wetland in Panjin region	6006
..... WANG Liwen, WEI Yaxing (6006)	
Mobilization of potassium from Soils by <i>rhizobium phaseoli</i>	6016
..... ZHANG Liang, HUANG Jianguo, HAN Yuzhu, et al (6016)	
Autotoxicity of aqueous extracts from plant, soil of peanut and identification of autotoxic substances in rhizospheric soil	6023
..... HUANG Yuqian, HAN Lisi, YANG Jinfeng, et al (6023)	
Effects of shading on the photosynthetic characteristics and anatomical structure of <i>Trollius chinensis</i> Bunge	6033
..... LV Jinhui, WANG Xuan, FENG Yanmeng, et al (6033)	
Short-term effects of fire disturbance on greenhouse gases emission from sedge and shrubs forested wetland in Lesser Xing'an Mountains, Northeast China	6044
..... GU Han, MU Changcheng, ZHANG Bowen, et al (6044)	
Plant species diversity and community classification in the southern Gurbantunggut Desert	6056
..... ZHANG Rong, LIU Tong (6056)	
Effects of mixing leaf litter from <i>Pinus sylvestris</i> var. <i>mongolica</i> and <i>Larix principis-rupprechtii</i> with that of other trees on soil properties in the Loess Plateau	6067
..... LI Qian, LIU Zengwen, MI Caihong (6067)	
Effects of long-term intensive management on soil ammonia oxidizing archaea community under <i>Phyllostachys praecox</i> stands	6076
..... QIN Hua, LIU Borong, XU Qiufang, et al (6076)	
Hydrogen peroxide participates symbiosis between AM fungi and tobacco plants	6085
..... LIU Hongqing, CHE Yongmei, ZHAO Fanggui, et al (6085)	
Relationships between dominant arbor species distribution and environmental factors of shelter forests in the Beijing mountain area	6092
..... SHAO Fangli, YU Xinxiao, ZHENG Jiangkun, et al (6092)	
Analysis of rhizosphere microbial community structure of weak and strong allelopathic rice varieties under dry paddy field	6100
..... XIONG Jun, LIN Huifeng, LI Zhenfang, et al (6100)	
Root distribution in the different forest types and their relationship to soil properties	6110
..... HUANG Lin, WANG Feng, ZHOU Lijiang, et al (6110)	
Effect of silicon application on antioxidant system, biomass and yield of soybean under ozone pollution	6120
..... ZHAN Lijie, GUO Liyue, NING Tangyuan, et al (6120)	
Effect of landfill leachate irrigation on soil physiochemical properties and the growth of two herbaceous flowers	6128
..... WANG Shuqin, LAI Juan, ZHAO Xiulan (6128)	
Nitrous oxide emissions affected by tillage measures in winter wheat under a rice-wheat rotation system	6138
..... ZHENG Jianchu, ZHANG Yuefang, CHEN Liugen, et al (6138)	
Effects of different fertilizers on soil enzyme activities and CO ₂ emission in dry-land of maize	6147
..... ZHANG Junli, GAO Mingbo, WEN Xiaoxia, et al (6147)	
The response of agro-ecosystem productivity to climatic fluctuations in the farming-pastoral ecotone of northern China: a case study in Zhunger County	6155
..... SUN Tesheng, LI Bo, ZHANG Xinshi (6155)	
The relationship between energy consumption and carbon emission with economic growth in Liaoning Province	6168
..... KANG Wenxing, YAO Lihui, HE Jienan, et al (6168)	
Spatial distribution characteristics of potential fire behavior in Fenglin Nature Reserve based on FARSITE Model	6176
..... WU Zhiwei, HE Hongshi, LIANG Yu, et al (6176)	
Chill conservation of natural enemies in maize field with different post-crop habitats	6187
..... TIAN Yaojia, LIANG Guangwen, ZENG Ling, et al (6187)	
Effect of population of <i>Kerria yunnanensis</i> on diversity of ground-dwelling ant	6195
..... LU Zhixing, CHEN Youqing, LI Qiao, et al (6195)	
Response of <i>Parnassius apollo</i> population and vertical distribution to climate warming	6203
..... YU Fei, WANG Han, WANG Shaokun, et al (6203)	
Review and Monograph	
Integrated assessment of marine aquaculture ecosystem health: framework and method	6210
..... PU Xinming, FU Mingzhu, WANG Zongling, et al (6210)	
Seagrass meadow ecosystem and its restoration: a review	6223
..... PAN Jinhua, JIANG Xin, SAI Shan, et al (6223)	
Nutri-toxicological effects of cyanobacteria on fish	6233
..... DONG Guifang, XIE Shouqi, ZHU Xiaoming, et al (6233)	
Effect of environmental stress on non-structural carbohydrates reserves and transfer in seagrasses	6242
..... JIANG Zhijian, HUANG Xiaoping, ZHANG Jingping (6242)	
Advances in ecological immunology	6251
..... XU Deli, WANG Dehua (6251)	
Scientific Note	
The causes of spatial variability of surface soil organic matter in different forests in depressions between karst hills	6259
..... SONG Min, PENG Wanxia, ZOU Dongsheng, et al (6259)	
Characteristics of seed rain of <i>Haloxylon ammodendron</i> in southeastern edge of Junggar Basin	6270
..... LÜ Chaoyan, ZHANG Ximing, LIU Guojun, et al (6270)	

《生态学报》2013 年征订启事

《生态学报》是中国生态学学会主办的生态学专业性高级学术期刊,创刊于 1981 年。主要报道生态学研究原始创新性科研成果,特别欢迎能反映现代生态学发展方向的优秀综述性文章;研究简报;生态学新理论、新方法、新技术介绍;新书评介和学术、科研动态及开放实验室介绍等。

《生态学报》为半月刊,大 16 开本,300 页,国内定价 90 元/册,全年定价 2160 元。

国内邮发代号:82-7,国外邮发代号:M670

标准刊号:ISSN 1000-0933 CN 11-2031/Q

全国各地邮局均可订阅,也可直接与编辑部联系购买。欢迎广大科技工作者、科研单位、高等院校、图书馆等订阅。

通讯地址:100085 北京海淀区双清路 18 号 电 话:(010)62941099; 62843362

E-mail: shengtaixuebao@rcees.ac.cn 网 址: www.ecologica.cn

编辑部主任 孔红梅 执行编辑 刘天星 段 靖

生 态 学 报

(SHENGTAI XUEBAO)

(半月刊 1981 年 3 月创刊)

第 32 卷 第 19 期 (2012 年 10 月)

ACTA ECOLOGICA SINICA

(Semimonthly, Started in 1981)

Vol. 32 No. 19 (October, 2012)

编 辑	《生态学报》编辑部 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085 电话:(010)62941099 www.ecologica.cn shengtaixuebao@rcees.ac.cn	Edited by	Editorial board of ACTA ECOLOGICA SINICA Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China Tel:(010)62941099 www.ecologica.cn Shengtaixuebao@rcees.ac.cn
主 编	冯宗炜	Editor-in-chief	FENG Zong-Wei
主 管	中国科学技术协会	Supervised by	China Association for Science and Technology
主 办	中国生态学学会 中国科学院生态环境研究中心 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085	Sponsored by	Ecological Society of China Research Center for Eco-environmental Sciences, CAS Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China
出 版	科 学 出 版 社 地址:北京东黄城根北街 16 号 邮政编码:1000717	Published by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印 刷	北京北林印刷厂	Printed by	Beijing Bei Lin Printing House, Beijing 100083, China
发 行	科 学 出 版 社 地址:东黄城根北街 16 号 邮政编码:100717 电话:(010)64034563 E-mail:journal@cspg.net	Distributed by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China Tel:(010)64034563 E-mail:journal@cspg.net
订 购	全国各地邮局	Domestic	All Local Post Offices in China
国外发行	中国国际图书贸易总公司 地址:北京 399 信箱 邮政编码:100044	Foreign	China International Book Trading Corporation Add:P. O. Box 399 Beijing 100044, China
广告经营 许 可 证	京海工商广字第 8013 号		



ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

国内外公开发行

国内邮发代号 82-7

国外发行代号 M670

定价 70.00 元