

ISSN 1000-0933

CN 11-2031/Q

生态学报

Acta Ecologica Sinica



第 32 卷 第 22 期 Vol.32 No.22 **2012**

中国生态学学会
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 22 期

2012 年 11 月 (半月刊)

目 次

CO ₂ 浓度和温度升高对噬藻体 PP 增殖的联合作用	牛晓莹,程 凯,荣茜茜,等 (6917)
1956—2009 年内蒙古苏尼特左旗荒漠草原的降水格局	陈 军,王玉辉 (6925)
两个污水处理系统的能值与经济综合分析	李 敏,张小洪,李远伟,等 (6936)
退化草地阿尔泰针茅种群个体空间格局及关联性	赵成章,任 珩 (6946)
地表覆盖栽培对雷竹林凋落物养分及其化学计量特征的影响	刘亚迪,范少辉,蔡春菊,等 (6955)
福州酸雨区次生林中台湾相思与银合欢叶片的 12 种元素含量	郝兴华,洪 伟,吴承祯,等 (6964)
“雨花露”水蜜桃主要害虫与其捕食性天敌的关系	柯 磊,施晓丽,邹运鼎,等 (6972)
大兴安岭林区 10 小时滞可燃物湿度的模拟	胡天宇,周广胜,贾丙瑞 (6984)
陕北风沙区不同植被覆盖下的土壤养分特征	李文斌,李新平 (6991)
南方型杨树人工林土壤呼吸及其组分分析	唐罗忠,葛晓敏,吴 麟,等 (7000)
黑河下游土壤水盐对生态输水的响应及其与植被生长的关系	鱼腾飞,冯 起,刘 蔚,等 (7009)
树木胸径大小对树干液流变化格局的偏度和时滞效应	梅婷婷,赵 平,倪广艳,等 (7018)
外来植物紫茎泽兰入侵对土壤理化性质及丛枝菌根真菌(AMF)群落的影响	于文清,刘万学,桂富荣,等 (7027)
基于 Landsat TM 的热带精细地物信息提取的模型与方法——以海南岛为例	王树东,张立福,陈小平,等 (7036)
雪被去除对川西高山冷杉林冬季土壤水解酶活性的影响	杨玉莲,吴福忠,杨万勤,等 (7045)
不同土壤水分处理对水稻光合特性及产量的影响	王唯逍,刘小军,田永超,等 (7053)
木蹄层孔菌不同居群间生长特性、木质素降解酶与 SRAP 标记遗传多样性	曹 宇,徐 晔,王秋玉 (7061)
加拿大一枝黄花入侵对土壤动物群落结构的影响	陈 雯,李 涛,郑荣泉,等 (7072)
间作对玉米品质、产量及土壤微生物数量和酶活性的影响	张向前,黄国勤,卞新民,等 (7082)
接种 AM 真菌对玉米和油菜种间竞争及土壤无机磷组分的影响	张宇亭,朱 敏,钱岩相注,等 (7091)
大亚湾冬季不同粒级浮游生物的氮稳定同位素特征及其与生物量的关系	柯志新,黄良民,徐 军,等 (7102)
太湖水华期间有毒和无毒微囊藻种群丰度的动态变化	李大命,叶琳琳,于 洋,等 (7109)
锌胁迫对小球藻抗氧化酶和类金属硫蛋白的影响	杨 洪,黄志勇 (7117)
基于国家生态足迹账户计算方法的福建省生态足迹研究	邱寿丰,朱 远 (7124)
能源活动 CO ₂ 排放不同核算方法比较和减排策略选择	杨喜爱,崔胜辉,林剑艺,等 (7135)
基于生境等价分析法的胶州湾围填海造地生态损害评估	李京梅,刘铁鹰 (7146)
县级生态资产价值评估——以河北丰宁县为例	王红岩,高志海,李增元,等 (7156)
专论与综述	
丛枝菌根提高宿主植物抗旱性分子机制研究进展	李 涛,杜 娟,郝志鹏,等 (7169)
城市土壤碳循环与碳固持研究综述	罗上华,毛齐正,马克明,等 (7177)
基于遥感的光合有效辐射吸收比率(FPAR)估算方法综述	董泰锋,蒙继华,吴炳方 (7190)
光衰减及其相关环境因子对沉水植物生长影响研究进展	吴明丽,李叙勇 (7202)
浮游动物化学计量学稳态性特征研究进展	苏 强 (7213)
研究简报	
2010 年两个航次獐子岛海域浮游纤毛虫丰度和生物量	于 莹,张武昌,张光涛,等 (7220)
基于熵值法的我国野生动物资源可持续发展研究	杨锡涛,周学红,张 伟 (7230)
残落物添加对农林复合系统土壤有机碳矿化和土壤微生物量的影响	王意锟,方升佐,田 野,等 (7239)
人工湿地不同季节与单元之间根际微生物多样性	陈永华,吴晓芙,张珍妮,等 (7247)

期刊基本参数:CN 11-2031/Q * 1981 * m * 16 * 338 * zh * P * ¥70.00 * 1510 * 36 * 2012-11



封面图说: 水杉农田防护林中的小麦熟了——水杉曾广泛分布于北半球,第四纪冰期以后,水杉属的其他种类全部灭绝,水杉却在中国川、鄂、湘边境地带得以幸存,成为旷世奇珍,野生的水杉是国家一级保护植物。由于水杉耐水,适应力强,生长极为迅速,其树干通直挺拔,高大秀颀,树冠呈圆锥形,姿态优美,自发现后被人们在中国南方广泛种植,不仅成为了湖边、道路两旁的绿化观赏植物,更成为了农田防护林的重要树种。此图中整齐划一的水杉防护林像忠实的哨兵一样,为苏北农村即将成熟的麦田站岗。

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

DOI: 10.5846/stxb201110261597

曹宇, 徐晔, 王秋玉. 木蹄层孔菌不同居群间生长特性、木质素降解酶与 SRAP 标记遗传多样性. 生态学报, 2012, 32(22): 7061-7071.

Cao Y, Xu Y, Wang Q Y. Growth characteristics, lignin degradation enzyme and genetic diversity of *Fomes fomentarius* by SRAP marker among populations. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(22): 7061-7071.

木蹄层孔菌不同居群间生长特性、木质素降解酶 与 SRAP 标记遗传多样性

曹 宇, 徐 晔, 王秋玉*

(东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040)

摘要:以帽儿山、长白山、凉水、本溪木蹄层孔菌(*Fomes fomentarius*) 4 个居群为研究对象, 采用菌丝长度测量法比较 4 个地点木蹄层孔菌菌株在 PDA 固体培养基上的生长速度, 采用菌丝体干重法比较 4 个地点木蹄层孔菌菌株在 PDA 液体培养基中生物量的变化, 结果显示木蹄层孔菌在 23 ℃ 下生长速度显著高于 28 ℃, 说明木蹄层孔菌的生长对温度较敏感, 23 ℃ 更适合木蹄层孔菌的生长。在同一温度下培养, 4 个地点的木蹄层孔菌生长速度无显著差异。通过比色法检测 4 个地点的木蹄层孔菌木质素降解相关酶(木质素过氧化物酶, 锰过氧化物酶, 漆酶)活性差异, 结果显示同一种酶活性在 4 个地点间没有显著差异; 在不同培养基上培养时, 3 种酶在 PDA 培养基上的活性均显著高于完全培养基。同时, 采用序列相关扩增多态性(Sequence-related amplified polymorphism, SRAP)技术初探了木蹄层孔菌 4 个居群的遗传多样性和遗传分化, 结果表明木蹄层孔菌 4 个居群中多态位点比率最高的是本溪, 其次是帽儿山和凉水, 而长白山最低; AMOVA 分析结果显示, 居群间的遗传分化为 24.74%, 居群内的遗传分化为 75.26%, 木蹄层孔菌的遗传分化主要发生在居群内部。根据 Nei's 遗传距离对木蹄层孔菌 4 个居群进行 UPGMA 聚类分析, 结果显示帽儿山和本溪居群最先聚类, 其次聚类的是长白山居群, 最后是凉水居群。

关键词:白腐菌; 木质素过氧化物酶; 锰过氧化物酶; 漆酶; 分子标记; 遗传分化

Growth characteristics, lignin degradation enzyme and genetic diversity of *Fomes fomentarius* by SRAP marker among populations

CAO Yu, XU Ye, WANG Qiuyu*

College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040, China

Abstract: The four populations of *Fomes fomentarius* from Maoer Mountain, Changbai Mountain, Liangshui and Benxi were studied. The growth rates of *F. fomentarius* from four locations were compared by measuring the hypha growth in the PDA plate at 23℃ and 28℃, as well as the biomass by means of the mycelium dry weight in the PDA liquid medium at 23℃. The results displayed that the average growth rate of the fungi from four locations was 0.9cm/d at 23 ℃, and 0.64cm/d at 28 ℃. The growth rate of *F. fomentarius* at 23℃ was notably faster than that at 28℃ in the PDA plate, which indicated that the growth of this fungal species was sensitive to the temperature, for that 23℃ was more appropriate. *F. fomentarius* from different locations had no significant difference in growth rate at the same incubation temperature. So did the biomass of the fungi. The activities of three main lignin degradation enzymes (laccase, lignin peroxidase, manganese peroxidase) produced by *F. fomentarius* were detected by colorimetry. The results showed that the activity of three lignin enzymes produced by *F. fomentarius* increased gradually during 12 day incubation. There was significant differences in the enzyme activities cultured in different media, in which the activity of three enzymes in the PDA medium were significantly higher

基金项目: 黑龙江省科技攻关重大项目(GA06B301)

收稿日期: 2011-10-26; 修订日期: 2012-03-07

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: wqyll@sina.com

than that in complete medium. And also the activity of laccase was in the highest, manganese peroxidase in the second and lignin peroxidase in the lowest. The activity of the same enzyme from different locations had no significant differences. The sequence-related amplified polymorphism (SRAP) was used to evaluate genetic diversity and genetic differentiation among four populations of *F. fomentarius*. The results showed that Benxi population had the highest genetic diversity among the four populations, followed by Maoer Mountain and Liangshui, Changbai Mountain was the lowest. AMOVA analysis revealed that the genetic differentiation was 24.74% among populations, and 75.26% within population, that meant the genetic differentiation of *F. fomentarius* came up intra-populations mainly. Cluster analysis by UPGMA dendrogram based on Nei's genetic distance revealed that the populations from Maoer Mountain and Benxi clustered first, Changbai Mountain population was in the second, and Liangshui population was the last. This study will provide useful information for the further research and utilization of lignin enzyme from the wood rot fungi, as well as lay the foundations of developing the engineering strains of *F. fomentarius* in the future.

Key Words: white rot fungi; LiP; MnP; Lac; molecular marker; genetic differentiation

木材的腐朽大多数是由侵蚀木材的真菌所造成^[1]。木蹄层孔菌 *Fomes fomentarius* (L.) J.J. Kickx 是一种白腐菌,常寄生在阔叶树上,以桦树、杨树最为常见,造成树木心材腐朽,是一种重要的森林病原菌^[2-4]。

然而,白腐菌因其特殊的代谢类型及其独有的细胞外降解特质,能降解各种难生物降解的有机污染物而成为近年来国内外研究热点,其过氧化物酶系应用于工业上预处理某些原料以降低工业能耗实现清洁生产,利用其对底物的非专一性降解污染物而应用于环境污染治理等^[5]。刘欣等^[6]研究发现木蹄层孔菌具有改造造纸业原料处理的工程菌的潜在优势。而且,木蹄层孔菌也是一种传统中药,可用于治疗消积、化淤^[7-8],木蹄层孔菌乙醇提取物 (EEF) 对肿瘤细胞有很强的抑制作用^[9]。因此,木蹄层孔菌是一种具有重要应用价值的真菌。

序列相关扩增多态性 (SRAP) 是一种基于 PCR 的新型标记系统^[10],该标记通过独特的引物设计对开放读码对话框 (ORFs) 进行扩增,是一种简便且高效的分子标记方法,应用于图谱构建^[10]、比较基因组学^[11]和遗传多样性^[12]等一系列不同目的的研究。

本文以帽儿山、长白山、凉水、本溪 4 个木蹄层孔菌居群为研究对象,对比其木质素降解相关酶活性,并利用 SRAP 技术分析不同木蹄层孔菌居群的遗传多样性,为后续对木腐菌的进一步研究和木质素降解相关酶的合理有效利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

木蹄层孔菌 *Fomes fomentarius* 子实体样品于 2007 年 9 月采自帽儿山、凉水、长白山、本溪 4 个地点,每个地点随机采集 5 个菌株。

1.2 菌株的分离纯化

采用组织分离法,即利用有生命力的子实体组织分离获得纯菌丝。将实验所需器具提前紫外灭菌 30 min。超净台无菌操作,切去木蹄层孔菌菌管部分,用 75% 酒精将木蹄层孔菌子实体表面擦拭干净,解剖刀切取小块干净的部分,分离出菌孢子实体里面污染较少且生长旺盛的菌块 (约 0.5 cm),放入 75% 酒精中浸泡 1 min,用无菌蒸馏水清洗 3 次,滤纸吸干后接种于 PDA 培养基上,在 23 °C 人工气候箱中试管斜面培养。待菌丝长满斜面,选择试管内无杂菌污染的菌株进行 2 次转接,获得纯菌株,4 °C 保存备用。

1.3 PDA 培养基与完全培养基的配制

PDA 培养基,完全培养基的配制参见李慧蓉^[13]和吕世翔^[14]。

1.4 4 个地点间木蹄层孔菌的生长特性比较

1.4.1 菌丝生长速度的测定

经预实验发现,同一地点不同菌株的生长特性无显著差异,故每个地点随机选定 1 个菌株进行生长测定。

将来自 4 个地点的菌株组织分离获得的纯菌丝,分别接种到 PDA 培养基上的圆心位置平板(90 mm)培养,每个菌株做 6 个平行试验,其中 3 个置于 23 ℃ 气候箱中培养,另 3 个于 28 ℃ 气候箱中培养,每 24 h 测量菌落直径^[15]。

1.4.2 菌丝体干重的测定

将来自 4 个地点的菌株组织分离获得的纯菌丝,每个地点 5 个菌株,每个菌株设置 42 个平行试验,分别接种到 PDA 液体培养基中 23 ℃ 150 r/min 振荡培养。每 24h 每菌株各取出 3 个平行样进行菌丝体干重测定,用滤纸过滤,蒸馏水冲洗 3 次,放入 100℃ 烘箱中烘至恒重^[15],共测定 14 次。

1.5 木质素降解相关酶活性的检测

1.5.1 粗酶液的制备

将来自 4 个地点的各菌株组织分离获得的纯菌丝,分别接种到装有 40 mL 完全培养液和 40 mL PDA 液体培养液的 100 mL 三角瓶中,然后分别加入 1 g 白桦木屑^[15],23℃ 150 r/min 下振荡培养 4 d,8 d,12 d 时取出,取得细胞外液^[16] 4 mL,15000 r/min 离心 10 min,4 ℃ 下操作,去除菌丝和孢子的污染,取其上清液^[17]测定酶活。

1.5.2 木质素降解相关酶活性检测

木质素过氧化物酶(LiP)和锰过氧化物酶(MnP)活性测定参见文献^[16],漆酶(Lac)活性测定参见文献^[18]。

1.6 木蹄层孔菌居群间 SRAP 标记检测

1.6.1 木蹄层孔菌 DNA 的提取

参见文献^[19]提木蹄层孔菌菌丝体基因组 DNA。0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测提取产物,UPS 凝胶成像系统照相。

1.6.2 PCR 程序

PCR 程序参见文献^[20];94 ℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min,35 ℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 2 min,扩增 5 个循环;将退火温度升至 50 ℃,其他条件不变,扩增 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 5 min。扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,140V 恒压,70 min,UPS 凝胶成像系统照相。

1.6.3 木蹄层孔菌 SRAP-PCR 反应体系优化及引物的筛选

(1) 单一因素变量优化 SRAP-PCR 反应体系

实验选取引物、Mg²⁺、dNTP 3 个因素作为变量,以 dNTP 的浓度变化为体系 I,Mg²⁺ 浓度变化为体系 II,引物为体系 III,其中每个体系设置 3 个水平,共 9 个组合,其他因素含量依次为模板 DNA:20 ng,10×PCR buffer:2.5 μL,Taq 酶(5 U/μL):0.25 μL,ddH₂O 补齐体系 25 μL。实验所用的引物组合为 me1—em4,所用的 DNA 模板来自本溪菌株。

(2) 正交设计优化 SRAP-PCR 反应体系

实验所采用的正交设计表为 L₉(3³),即 3 因素 3 水平的正交设计表(表 1)。实验所用的引物组合为 me4—em17,DNA 模板来自本溪菌株。

表 1 PCR 反应的因素水平 L₉(3³) 正交设计

Table 1 L₉(3³) orthogonal design for the factors and levels of PCR reaction

编号 No.	Mg ²⁺ /(25mmol/L)	dNTP /(2.0mmol/L)	引物 Primer /(4μmol/L)	编号 No.	Mg ²⁺ /(25mmol/L)	dNTP /(2.0mmol/L)	引物 Primer /(4μmol/L)
1	2.0μL	2.0μL	1.5μL	2	2.0μL	1.8μL	1.0μL
3	2.0μL	1.6μL	2.0μL	4	1.8μL	2.0μL	1.0μL
5	1.8μL	1.8μL	2.0μL	6	1.8μL	1.6μL	1.5μL
7	1.6μL	2.0μL	2.0μL	8	1.6μL	1.8μL	1.5μL
9	1.6μL	1.6μL	1.0μL				

(3) 引物筛选

用于 SRAP 的正向引物^[18] 序列代号为 me1—me7, me9; 反向引物^[21] 序列代号为 em1—em10, em12—em17, 组成 8×16 对引物组合, 试验采用来自本溪的木蹄层孔菌基因组 DNA 为模板, 分别对 8×16 对引物组合用优化后的 SRAP-PCR 反应体系进行 SRAP-PCR, 筛选出分辨力高、重复性好、多态性丰富的 10 对引物组合用于后续试验。

1.6.4 数据处理与统计分析方法

SRAP 分子标记是显性标记, 不同样品同一引物扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为是共有带。电泳图谱中的每一条带均为一个分子标记, 并代表一个引物结合位点。根据各分子标记的迁移率及其条带的有无统计得到所有位点的二元数据: 有带(显性)记为 1, 无带(隐性)记为 0, 强带和弱带赋值均为 1, 最后人工将得到的 SRAP 位点形成 0/1 表型数据矩阵, 利用 PopGene32 软件计算观测等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、Shannon(H') 指数等能够反映木蹄层孔菌居群遗传多样性水平的遗传参数; ARLEQUIN2.000 软件中的 AMOVA 程序分析居群的遗传分化程度; 根据 PopGen32 生成的 Nei's 遗传距离, 利用分子进化遗传分析软件 Mega 4.0 对 4 个木蹄层孔菌居群进行 UPGMA 聚类分析。

1.6.5 常用遗传参数

(1) 多态位点比率(PPB)

$$P = \frac{\text{多态位点数}}{\text{检测到的位点总数}} \times 100\%$$

(2) 遗传一致度(I)

$$I = J_{xy} / \sqrt{J_x \cdot J_y}$$

式中, $J_x = (1/n) \sum \sum X_{ij}^2$, X_{ij} 为 X 群体第 i 个位点第 j 个等位基因的频率; $J_y = (1/n) \sum \sum Y_{ij}^2$, Y_{ij} 为 Y 群体第 i 个位点第 j 个等位基因的频率。

(3) Nei's 遗传距离(D)

$$D = -\ln I$$

I 为 X 和 Y 两个群体在所有位点上的一致度。 $I = 1, D = 0$ 时, 表明两个群体间在所有检测到的基因位点完全一致; $I = 0, D = \infty$ 时, 表明两个群体间在所有检测到的基因位点完全不同。

2 结果与分析

2.1 4 个地点木蹄层孔菌生长速度的比较

2.1.1 PDA 固体培养基中菌落直径的测定

23 °C 培养条件下, 2—3 d 开始形成白色圆形菌落, 菌丝在培养基表面呈直线扩展, 9—10 d 菌丝表面开始出现褐色斑块。不同温度下, 4 个地点的木蹄层孔菌菌株生长速度(图 1) 显示, 来自于 4 个地点的木蹄层孔菌菌株在同一温度下培养时, 生长趋势基本一致, 长白山菌株生长速度稍快于其他 3 个地点菌株。对比不同温度下同一地点菌株生长速度时, 4 个地点的菌株在 23 °C 下生长速度均很快, 菌落直径 10 d 左右就可达到 9 cm, 平均生长速度为 0.9 cm/d; 而在 28 °C 下培养 14 d, 菌落直径才可长至 9 cm, 平均生长速度为 0.64 cm/d。4 个地点的木蹄层孔菌在 23 °C 下生长速度均较 28 °C 培养时快, 说明木蹄层孔菌的生长对温度较敏感。各菌株生长速度的方差分析表明在同一培养温度下, 不同地点的木蹄层孔菌生长速度无显著差异。

2.1.2 PDA 液体培养基中菌丝体干重的测定

PDA 液体培养基中 23 °C 培养时, 4 个地点的木蹄层孔菌菌株生长趋势具有一致性(图 2), 在最开始的 3 d 内属于生长延迟期, 菌株在液体培养基中生长缓慢, 处于孢子的萌发阶段; 培养 5 d 左右菌丝体可生长至 0.2 g, 进入对数期, 菌丝体生长迅速; 凉水菌株生长一直较快, 其他 3 个地点的菌株在开始 8 d 内生长无明显差异, 从第 9 天开始, 长白山菌株生长快于帽儿山和本溪菌株。在经历了生物量的迅速提升之后, 由于培养基中营养物质被大量消耗, 在 11 d 左右进入平台期, 生物量短暂维持一段时间, 从图中可以看到, 生长平台期 4

个地点菌株的菌丝体生物量差别不大。随着营养物质的消耗殆尽、有毒代谢产物的不断积累,菌丝体生长受到抑制,菌丝体开始代谢自身的结构物质,细胞死亡率增加,导致菌丝体干重在衰亡期开始下降。方差分析表明 4 个地点的木蹄层孔菌在 PDA 液体培养基中 23 ℃ 培养,生物量积累无明显差异。

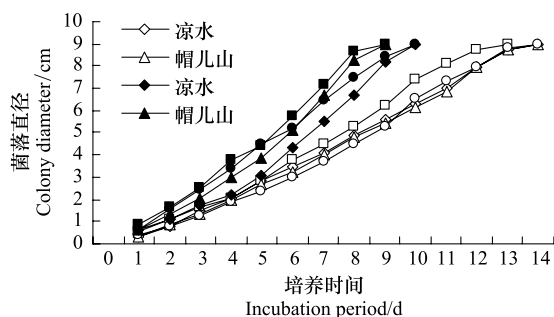


图 1 4 个地点的木蹄层孔菌菌落在 PDA 固体培养基中生长

Fig. 1 Extension of the colony of *Fomes fomentarius* from four locations

实心标记是在 23℃ 培养条件下测定,空心标记是在 28℃ 培养条件下测定

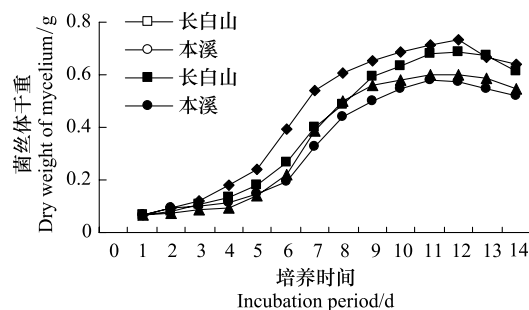


图 2 4 个地点的木蹄层孔菌在 PDA 液体培养基中生长

Fig. 2 Growth of *Fomes fomentarius* from four locations in PDA on PDA plate liquid medium

2.2 木蹄层孔菌木质素降解相关酶活性的比较

4 个地点的木蹄层孔菌漆酶(Lac)、木质素过氧化物酶(Lip)、锰过氧化物酶(Mnp)活性比较见图 3—图 8。4 个地点的木蹄层孔菌的 3 种酶活性在 12 d 内均逐渐增高。在完全培养基中培养 12 d 内,只有本溪木蹄层孔菌漆酶活性与其他 3 地点木蹄层孔菌漆酶活性存在一定差异;在 PDA 培养基中,4 个地点木蹄层孔菌的 3 种酶在培养的 12 d 内酶活性均无显著差异。从培养基类型来看:由纵坐标轴酶活性数值的范围可以很直观的看到,PDA 培养基中 4 个地点木蹄层孔菌的 3 种酶活性均明显高于完全培养基,特别是漆酶和锰过氧化物酶,其酶活性相差 2 倍左右。原因可能在于 PDA 培养基的营养较完全培养基丰富,所以 3 种酶在 PDA 培养基上的活性均远大于完全培养基。方差分析(表 2)表明,在完全培养基和 PDA 培养基中,因培养时间不同导致木蹄层孔菌 3 种酶活性存在极显著差异。但对不同地点间同种酶活性比较时,只有漆酶活性存在一定差异,而木质素过氧化物酶,锰过氧化物酶活性在不同地点间差异不显著。

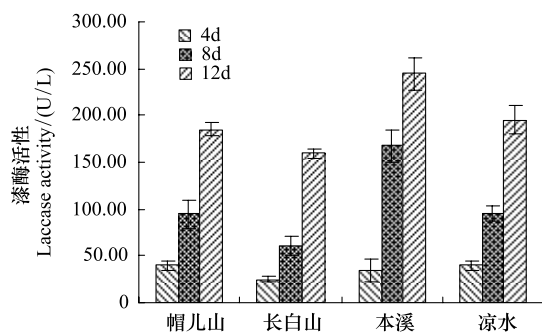


图 3 4 个地点的木蹄层孔菌 Lac 在完全培养基中活性

Fig. 3 The activities of laccase produced by *Fomes fomentarius* from four locations in complete medium

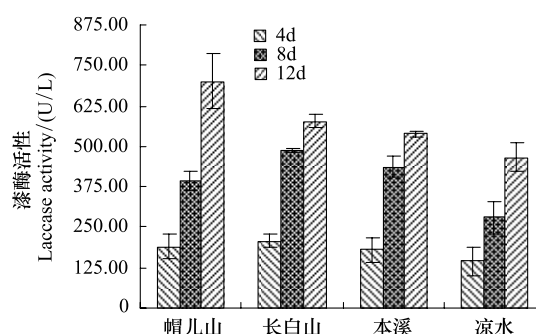


图 4 4 个地点的木蹄层孔菌 Lac 在 PDA 培养基中活性

Fig. 4 The activities of laccase produced by *Fomes fomentarius* from four locations in PDA medium

2.3 木蹄层孔菌居群间 SRAP 标记遗传多样性

2.3.1 木蹄层孔菌 SRAP-PCR 反应体系优化及引物筛选

(1) 单一因素变量优化 SRAP-PCR 反应体系(图 9)

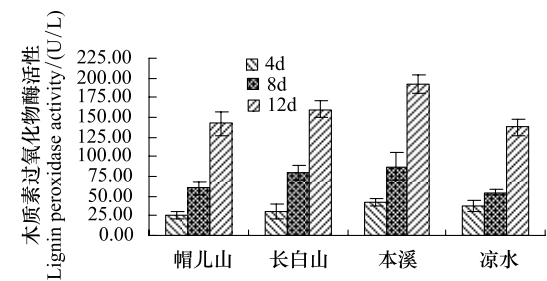


图 5 4 个地点的木蹄层孔菌 Lip 在完全培养基中活性
Fig. 5 The activities of lignin peroxidase produced by *Fomes fomentarius* from four locations in complete medium

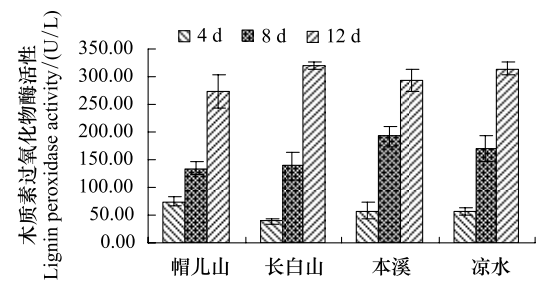


图 6 4 个地点的木蹄层孔菌 Lip 在 PDA 培养基中活性
Fig. 6 The activities of lignin peroxidase produced by *Fomes fomentarius* from four locations in PDA medium

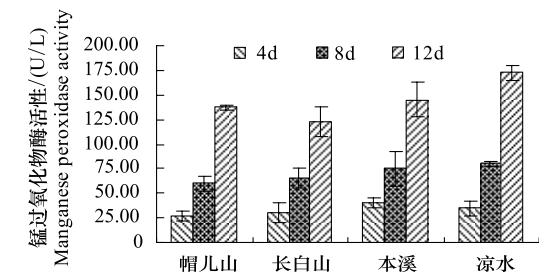


图 7 4 个地点的木蹄层孔菌 Mnp 在完全培养基中活性
Fig. 7 The activities of manganese peroxidase produced by *Fomes fomentarius* from four locations in complete medium

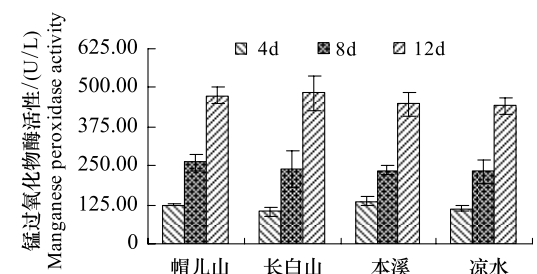


图 8 4 个地点的木蹄层孔菌 Mnp 在 PDA 培养基中活性
Fig. 8 The activities of manganese peroxidase produced by *Fomes fomentarius* from four locations in PDA medium

表 2 木质素酶活性双因素方差分析

木质素降解酶 Lignin degradation enzyme	完全培养基 Complete medium		PDA 培养基 PDA medium	
	F_{time}	F_{location}	F_{time}	F_{location}
Lac	52.13 **	4.66 Δ	43.44 **	3.251 Δ
Lip	43.44 **	3.25	113.13 **	0.534
Mnp	125.59 **	3.26	493.69 **	1.359

* $\alpha < 0.01$, * $\alpha < 0.05$, $\Delta < 0.1$

在体系 I 中,随着 dNTP 浓度的降低,编号 3 的背景颜色较深,且条带较少,编号 1 和 2 背景颜色浅、条带较清晰,说明 dNTP(2.0mmol/L) 2.0 μL ,1.8 μL 时都较合适;在体系 II 中,随着 Mg^{2+} 浓度的减少,背景颜色加深,条带丰富度减少,说明 Mg^{2+} (25 mmol/L) 2.0 μL 时电泳效果最佳;在体系 III 中,随着引物浓度的降低条带清晰度下降,编号 7 的浓度较适宜,即引物(4 $\mu\text{mol/L}$)2.0 μL 时电泳效果较好。

(2) 正交设计优化 SRAP-PCR 反应体系(图 10)

根据条带整齐、条带丰富、清晰度高、背景颜色浅的原则,确立木蹄层孔菌 SRAP-PCR 最佳反应体系为编号 7 的组合: Mg^{2+} (25 mmol/L)1.6 μL ,dNTP(2.0 mmol/L)2.0 μL ,引物(4 $\mu\text{mol/L}$)2.0 μL ,DNA 20 ng,10 $\times$ PCR buffer(含 K^+)2.5 μL ,Taq(5 U/ μL)0.25 μL ,ddH₂O 补齐体系 25 μL 。

(3) 引物筛选

分别对 8 $\times$ 16 对引物组合用该反应体系进行 SRAP 电泳,筛选出多态性好的 10 对引物组合,分别为:me1—em2,me2—em7,me2—em9,me2—em12,me2—em13,me3—em14,me3—em16,me4—em6,me5—em13,me9—em17。

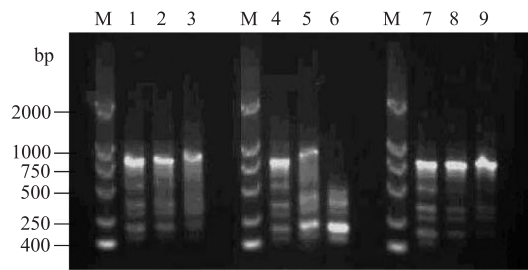


图9 单一变量 SRAP-PCR 电泳检测

Fig. 9 SRAP-PCR profile of single factor variable

泳道编号与设计表中编号相对应。M 为 DL2000 DNA Marker,泳道 1—3 是 dNTP 浓度变化梯度,泳道 4—6 是 Mg²⁺ 浓度变化梯度,泳道 7—9 是引物浓度变化梯度

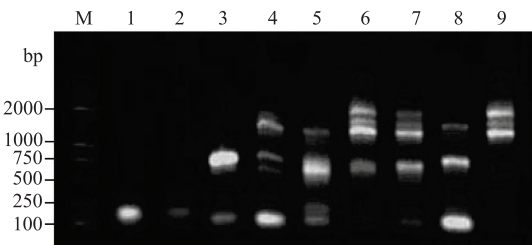


图10 正交设计 SRAP-PCR 电泳检测

Fig. 10 SRAP-PCR profile of orthogonal design

2.3.2 木蹄层孔菌遗传多样性

采用筛选出的 10 对 SRAP 引物扩增 4 个居群共 20 个样品,共扩增得到 906 条带,平均每对引物扩增的条带数为 90.6 条,位点分子量范围均在 100—1800 bp 之间(图 11)。共检测 252 个位点,其中多态位点 163 个,总多态位点比率(PPB)为 64.68%(表 3)。所谓多态位点是指在该位点上扩增 DNA 片断出现的频率小于 0.99 的位点,而多态位点百分率是衡量物种遗传变异水平高低的一个重要指标,是度量遗传多样性的重要参数。通过对 4 个地点木蹄层孔菌居群的 SRAP-PCR 电泳图谱中多态位点和总位点数目的谱带计数和计算得出 4 个木蹄层孔菌居群间遗传多样性比较,4 个居群间的多态位点百分率介于 58.33%—69.70%,说明各居群内的遗传多态性水平较高,居群间的多态性差异不大,其中本溪最高,长白山最低(表 4)。另外,木蹄层孔菌各居群间等位基因数、有效等位基因数和 Shannon 指数由大到小排列顺序与多态位点比率也基本相同,均为本溪、帽儿山、凉水和长白山。

表 3 10 对引物扩增的多态位点数

Table 3 The number of polymorphic loci amplified from ten pairs of primers					
引物对序号 Code of primer pairs	多态位点数 The number of polymorphic loci	总位点数 Total number of polymorphic loci	引物对序号 Code of primer pairs	多态位点数 The number of polymorphic loci	总位点数 Total number of polymorphic loci
me1—em2	12	25	me2—em7	15	26
me2—em9	13	21	me2—em12	18	28
me2—em13	14	27	me3—em14	15	21
me3—em16	7	21	me4—em6	24	29
me5—em13	22	28	me9—em17	23	26
总计	163	252			

表 4 4 个木蹄层孔菌居群的遗传多样性比较

Table 4 Comparison of genetic diversity of <i>Fomes fomentarius</i> from four populations						
居群 Population	位点总数 Number of loci	多态位点总数 Number of polymorphic loci	多态位点比率 Percentage of Polymorphic/%	等位基因数 Number of alleles	有效等位基因数 Effective number of alleles	Shannon 指数 Shannon's information index
本溪	66	46	69.70	1.1423	1.1358	0.2856
帽儿山	62	42	67.74	1.1367	1.1302	0.2471
凉水	64	40	62.50	1.1226	1.1174	0.2389
长白山	60	35	58.33	1.1169	1.1054	0.2037

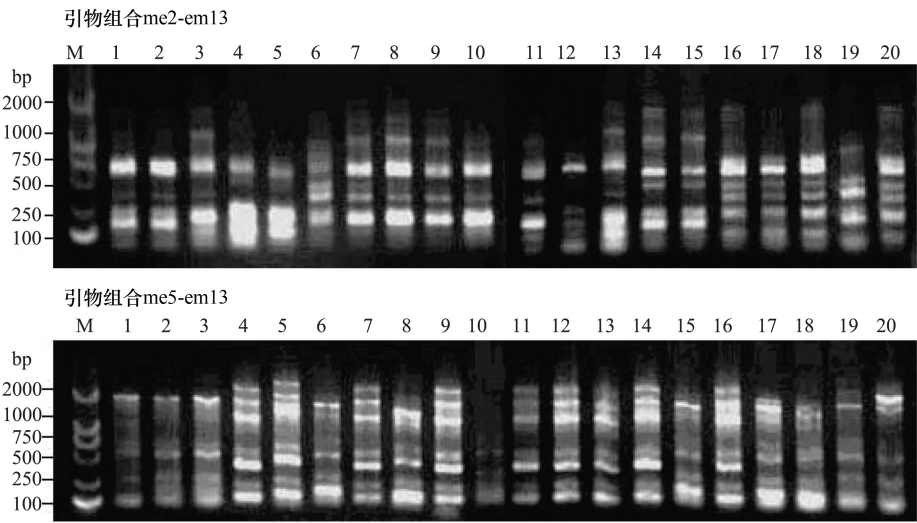


图 11 SRAP-PCR 电泳图

Fig. 11 SRAP-PCR profiles of the four populations generated with primers me2—em13 and me5—em13
M 为 DL2000 DNA Marker,泳道 1—5 为凉水居群,泳道 6—10 为长白山居群,泳道 11—15 帽儿山居群,泳道 16—20 为本溪居群

2.3.3 木蹄层孔菌种群间的遗传分化

运用 AMOVA 对木蹄层孔菌居群的遗传分化分析结果表明(表 5),居群内方差分量的贡献率占 75.26%,而群体间方差分量的贡献率占 24.74%。这一结果与多态位点比率分析的情况相吻合。由此可见,木蹄层孔菌的遗传分化主要存在于居群内部。

表 5 居群遗传分化的 AMOVA 分析

Table 5 AMOVA analysis of genetic differentiation of the populations			
变异来源 Source of variation	自由度 df	变异分量 Variance components	变异贡献率 Percentage of variation/%
群体间 Among populations	3	3.14	24.74
群体内 Within populations	16	9.55	75.26
总和 Total	19	12.69	
遗传分化指数 Fst	0.247		

2.3.4 4 个木蹄层孔菌居群间遗传关系

遗传一致度常用来判断居群之间的亲缘关系。居群间遗传距离是遗传变异的尺度。遗传一致度和遗传距离从不同角度反映不同居群之间的遗传分化程度。由表 6 可知,4 个木蹄层孔菌居群间的遗传一致度介于 0.5342—0.7376 之间,遗传距离介于 0.2628—0.4654 之间,表明 4 个木蹄层孔菌居群之间存在一定的遗传变异。由 Nei's 距离聚类结果(图 12)可判断,帽儿山、本溪、长白山的木蹄层孔菌居群与凉水木蹄层孔菌居群存在较大遗传分化。

表 6 4 个木蹄层孔菌居群间遗传一致度和遗传距离

Table 6 Identity of gene and genetic distance of <i>Fomes fomentarius</i> among the four populations				
居群 Location	帽儿山 Maoer Mountain	凉水 Liangshui	长白山 Changbai Mountain	本溪 Benxi
帽儿山 Maoer Mountain	* * * *	0.6216	0.6836	0.7376
凉水 Liangshui	0.4281	* * * *	0.5379	0.5342
长白山 Changbai Mountain	0.3135	0.4623	* * * *	0.5716
本溪 Benxi	0.2628	0.4654	0.3787	* * * *

右上角为遗传一致度(I),左下角为遗传距离(D)

3 讨论

周绪申等^[22]报道木蹄层孔菌营养菌丝生长最适培养温度为 28 ℃,而本研究结果表明木蹄层孔菌在 23 ℃ 下培养生长更快,与刘欣等^[23]研究结论相一致,原因可能与本实验菌株生长在东北地区,长期适应于较低温度,因而后续试验所用待测菌株均采用 23 ℃ 的培养温度进行培养。

Persson 等^[24]研究表明居群内的基因多样性与取样的数目成正比。由于本研究取样数目较少,每一地点取 5 个样品,这在一定程度上可能影响居群的多样性水平。但是,由于真菌的繁殖特点有别于高等植物,加大居群的取样数量是否能增加多样性水平还有待于进一步研究。

遗传多样性随着海拔的增加发生显著的变化^[25]。在利用 SRAP 标记研究木蹄层孔菌 4 个居群的遗传多样性和遗传变异时,得到多态位点比率最高的是本溪,长白山最低,这一结果可能与海拔有关,由于在四个地点中,长白山的海拔最高,而高海拔居群受到低温和紫外线胁迫等影响^[25],并且长白山也已到了木蹄层孔菌分布的最极限,其种群分布相对隔离。但具体的木蹄层孔菌遗传变异是否与海拔等环境因素有关,还有待进一步研究。

居群间的地理距离往往影响种群间遗传分化的分布^[26]。由 Nei's 遗传距离生成的聚类图(图 12)可知,来自帽儿山和本溪的木蹄层孔菌首先聚在一起,然后与来自长白山的菌株聚为一大类,最后才与凉水菌株聚类。这一结果与它们的地理分布格局不相吻合,可能与它们之间的生境隔离和繁殖方式有关,更深入的研究还有待于进行。

不同生物材料所适合的 SRAP 体系不同,李严和张春庆^[27]利用 SRAP 技术对不同西瓜杂交种的 DNA 进行检测,对 PCR 反应体系中 dNTPs、Mg²⁺、酶用量等因素进行优化并筛选得到适宜的 SRAP 反应体系。本研究也对 SRAP-PCR 体系进行了优化,在进行单一因素变量优化试验时,发现当 Mg²⁺, dNTP, 引物均为 2.0 μL 时 PCR 电泳检测效果最好,但是通过正交试验发现若 3 个因素都选择 2.0 μL,却不是反应的最佳体系,说明各因素间有交互作用,所以后续正交设计优化体系是有必要的。

SRAP 一般除用 6% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳外,也可用 2.0% 的琼脂糖凝胶分析多态性^[28],但分辨的条带较少,分辨率较低^[29]。本研究结果显示,由筛选出的 10 对 SRAP 引物扩增 4 个居群的 20 个样品,1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测到 906 条带,条带丰富,可分辨差异条带,所以无需使用聚丙烯酰胺凝胶电泳来分离检测,这样既减少了工作量又能同时分析多个样品,并且还减少了毒性和环境污染。

本文研究了东北地区 4 个地点的木蹄层孔菌的木质素降解酶活性、4 个木蹄层孔菌居群的遗传多样性水平,因本研究所调查的 4 个研究地点的木蹄层孔菌居群具有一定的典型性和代表性,可以代表整个东北地区森林生态系统中的木蹄层孔菌,所以本研究结果为该地区木蹄层孔菌的进一步研究和利用提供重要依据。

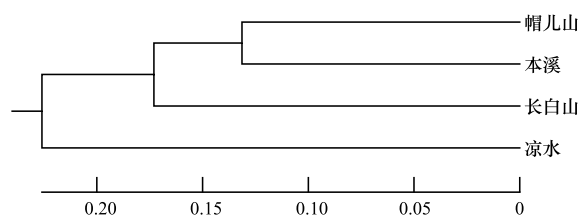


图 12 4 个木蹄层孔菌居群遗传距离聚类图

Fig. 12 UPGMA dendrogram for the four populations of *Fomes fomentarius* based on Nei's genetic distance

References:

- [1] Chi Y J. Wood Decay and Wood Rot Fungi. Beijing: Science Press, 2003: 21-130.
- [2] Dai Y C, Qin G F, Xu M Q. The forest pathogens of root and butt rot in Northeast China. Forest Research, 2000, 13(1): 15-22.
- [3] Dai Y C. Species diversity of wood-decaying fungi in Northeast China. Mycosystema, 2010, 29(6): 801-818.
- [4] Dai Y C. A checklist of polypores in China. Mycosystema, 2009, 28(3): 315-327.
- [5] Huang D L, Zeng G M, Huang G H, Hu T J, Chen Y N, Shi J G. Recent research on white-rot fungi and its expected application in composting. Microbiology, 2004, 31(2): 112-116.
- [6] Liu X, Wang Q Y, Yang C P. Comparison of the decaying ability to white birch wood among four wood rot fungi. Scientia Silvae Sinicae, 2009, 45(8): 179-182.
- [7] Ying J Z, Mao X L, Ma Q M. Illustration of Medicinal Fungi in China. Beijing: Science Press, 1987: 210-211.

- [8] Dai Y C, Yang Z L. A revised checklist of medicinal fungi in China. *Mycosystema*, 2008, 27(6): 801-824.
- [9] Liu L, Zhou S B, Zheng W F. Inhibition of tumor cells by ethanol extract of *Fomes Fomentarius*. *Carcinogenesis, Teratogenesis and Mutagenesis*, 2005, 17(2): 104-106.
- [10] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 103(2/3): 455-461.
- [11] Li G, Gao M, Yang B, Quiros C F. Gene for gene alignment between the *Brassica* and *Arabidopsis* genomes by direct transcriptome mapping. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 107: 168-180.
- [12] Sun S J, Gao W, Lin S Q, Zhu J, Xie B G, Lin Z B. Analysis of genetic diversity in *Ganoderma* population with a novel molecular marker SRAP. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72(3): 537-543.
- [13] Li H R. *White Rot Fungi Biology and Biotechnology*. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 158-158.
- [14] Lü S X. Wood degradation enzymes of three wood-rotting fungus and relevant gene variation of the fungus by TRAP marker[D]. Haerbin: Northeast Forestry University, 2010.
- [15] Liu X, Zhao M, Wang Q Y. The Selection of Resistant and Sensitive Populations of White Birch by Four Wood Rot Fungi and the Fungi's Culture Characters [D]. Sciencepaper Online, 2006. <http://www.paper.edu.cn>.
- [16] Li C Z, Wen X H. Characterization of growth and ligninolytic enzymes production of a white rot fungus F2. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2005, 25(2): 226-231.
- [17] Li H R. *White Rot Fungi Biology and Biotechnology*. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 33-33.
- [18] Fu S Y, Zhou P D. Fungal laccase and its application of polymerization of 4-phenylphenol. *Chemistry*, 2005, 68(3): 225-228.
- [19] He Y Q. An improved protocol for fungal DNA preparation. *Mycosystema*, 2000, 19(3): 434-434.
- [20] Ferriol M, Picó B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 107(2): 271-282.
- [21] Lin Z, He D, Zhang X, Nie Y, Guo X, Feng C, Stewart J McD. Linkage map construction and mapping QTL for cotton fibre quality using SRAP, SSR and RAPD. *Plant Breeding*, 2005, 124(2): 180-187.
- [22] Zhou X S, Li J, Dai Y C. Cultural study of *Fomes fomentarius*. *Journal of Northwest Forestry University*, 2008, 23(5): 127-129.
- [23] Liu X, Zhao M, Wang Q Y. Biological characters of five species of wood rot fungi and decay capacity to *Betula platyphylla*. *Journal of Northeast Forestry University*, 2008, 36(3): 41-44.
- [24] Persson H A, Lundquist K, Nybom H. RAPD analysis of genetic variation within and among populations of Turk's-cap lily (*Lilium martagon* L.). *Hereditas*, 1998, 128(3): 213-220.
- [25] Chen G J. Genetic Diversity of Hippophae Rhamnoides Subsp. Sinensis Populations at Varying Altitudes in the Wolong Natural Reserve of China. Chengdu: Chengdu Biological Research Institute of the Chinese Academy of Sciences, 2007.
- [26] Nybom H, Bartish I V. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 2000, 3(2): 93-114.
- [27] Li Y, Zhang C Q. A molecular marker-SRAP technique optimization and application analysis. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2005, 21(5): 108-112.
- [28] Ferriol M, Picó M B, Nuez F. Genetic diversity of some accessions of *Cucurbita maxima* from Spain using RAPD and SBAP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2003, 50(3): 227-238.
- [29] Liu L W, Gong Y Q, Huang H, Zhu X W. Novel molecular marker systems-SRAP and TRAP and their application. *Hereditas*, 2004, 26(5): 777-781.

参考文献:

- [1] 池玉杰. 木材腐朽与木材腐朽菌. 北京: 科学出版社, 2003: 21-130.
- [2] 戴玉成, 秦国夫, 徐梅卿. 中国东北地区的立木腐朽菌. *林业科学研究*, 2000, 13(1): 15-22.
- [3] 戴玉成. 中国东北地区木材腐朽菌的多样性. *菌物学报*, 2010, 29(6): 801-818.
- [4] 戴玉成. 中国多孔菌名录. *菌物学报*, 2009, 28(3): 315-327.
- [5] 黄丹莲, 曾光明, 黄国和, 胡天觉, 陈耀宁, 时进钢. 白腐菌的研究现状及其在堆肥中的应用展望. *微生物学通报*, 2004, 31(2): 112-116.
- [6] 刘欣, 王秋玉, 杨传平. 4 种木材腐朽菌对白桦木材降解能力的比较. *林业科学*, 2009, 45(8): 179-182.
- [7] 应建浙, 卯晓岚, 马启明. 中国药用真菌图鉴. 北京: 科学出版社, 1987: 210-211.
- [8] 戴玉成, 杨祝良. 中国药用真菌名录及部分名称的修订. *菌物学报*, 2008, 27(6): 801-824.

- [9] 刘量,周守标,郑维发. 木蹄层孔菌乙醇提取物对肿瘤细胞的抑制作用. 癌变·畸变·突变, 2005, 17(2): 104-106.
- [13] 李慧蓉. 白腐真菌生物学和生物技术. 北京: 化学工业出版社, 2005: 158-158.
- [14] 吕世翔. 三种木腐菌木材降解相关酶以及相关基因 TRAP 标记的变异[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2010.
- [15] 刘欣,赵敏,王秋玉. 四种木材腐朽菌的生物学特性及对白桦易腐和抗腐群体的筛选[D]. 中国科技论文在线, 2006. <http://www.paper.edu.cn>.
- [16] 李翠珍,文湘华. 白腐真菌 F2 的生长及产木质素降解酶特性的研究. 环境科学学报, 2005, 25(2): 226-231.
- [17] 李慧蓉. 白腐真菌生物学和生物技术. 北京: 化学工业出版社, 2005: 33-33.
- [18] 付时雨,周攀登. 真菌漆酶及其催化对苯基苯酚聚合条件的研究. 化学通报, 2005, 68(3): 225-228.
- [19] 何月秋. 真菌菌丝体培养和提取 DNA 方法的改进. 菌物系统, 2000, 19(3): 434-434.
- [22] 周绪申,李娟,戴玉成. 木蹄层孔菌培养条件的研究. 西北林学院学报, 2008, 23(5): 127-129.
- [23] 刘欣,赵敏,王秋玉. 5 种木材腐朽菌的生物学特性及对白桦木材腐朽能力的分析. 东北林业大学学报, 2008, 36(3): 41-44.
- [25] 陈国娟. 卧龙自然保护区不同海拔的中国沙棘 (*Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis*) 天然群体的遗传多样性分析 [D]. 成都: 中国科学院成都生物研究所, 2007.
- [27] 李严,张春庆. 新型分子标记——SRAP 技术体系优化及应用前景分析. 中国农学通报, 2005, 21(5): 108-112.
- [29] 柳李旺,龚义勤,黄浩,朱献文. 新型分子标记——SRAP 与 TRAP 及其应用. 遗传, 2004, 26(5): 777-781.

CONTENTS

The combined effects of elevated CO ₂ and elevated temperature on proliferation of cyanophage PP	NIU Xiaoying, CHENG Kai, RONG Qianqian, et al (6917)
Precipitation pattern of desert steppe in Inner Mongolia, Sunite Left Banner: 1956—2009	CHEN Jun, WANG Yuhui (6925)
Emergy and economic evaluations of two sewage treatment systems	LI Min, ZHANG Xiaohong, LI Yuanwei, et al (6936)
Individual spatial pattern and spatial association of <i>Stipa krylovii</i> population in Alpine Degraded Grassland	ZHAO Chengzhang, REN Heng (6946)
Litter characteristics of nutrient and stoichiometry for <i>Phyllostachys praecox</i> over soil-surface mulching	LIU Yadi, FAN Shaohui, CAI Chunju, et al (6955)
Characteristics of leaf element concentrations of twelve nutrients in <i>Acacia confusa</i> and <i>Leucaena glauca</i> in secondary forests of acid rain region in Fuzhou	HAO Xinghua, HONG Wei, WU Chengzhen, et al (6964)
Relationships between main insect pests and their predatory natural enemies in “Yuhualu” juicy peach orchard	KE Lei, SHI Xiaoli, ZOU Yunding, et al (6972)
Simulating 10-hour time-lag fuel moisture in Daxinganling	HU Tianyu, ZHOU Guangsheng, JIA Bingrui (6984)
Soil nutrient characteristics under different vegetations in the windy and sandy region of northern Shaanxi	LI Wenbin, LI Xinpeng (6991)
Partitioning of autotrophic and heterotrophic soil respiration in southern type poplar plantations	TANG Luozhong, GE Xiaomin, WU Lin, et al (7000)
Soil water and salinity in response to water deliveries and the relationship with plant growth at the lower reaches of Heihe River, Northwestern China	YU Tengfei, FENG Qi, LIU Wei, et al (7009)
Effect of stem diameter at breast height on skewness of sap flow pattern and time lag	MEI Tingting, ZHAO Ping, NI Guangyan, et al (7018)
Invasion of exotic <i>Ageratina adenophora</i> Sprengel. alters soil physical and chemical characteristics and arbuscular mycorrhizal fungus community	YU Wenqing, LIU Wanxue, GUI Furong, et al (7027)
Models and methods for information extraction of complex ground objects based on LandSat TM images of Hainan Island, China	WANG Shudong, ZHANG Lifu, CHEN Xiaoping, et al (7036)
Effects of snow pack removal on soil hydrolase enzyme activities in an alpine <i>Abies faxoniana</i> forest of western Sichuan	YANG Yulian, WU Fuzhong, YANG Wanqin, et al (7045)
Effects of different soil water treatments on photosynthetic characteristics and grain yield in rice	WANG Weixiao, LIU Xiaojun, TIAN Yongchao, et al (7053)
Growth characteristics, lignin degradation enzyme and genetic diversity of <i>Fomes fomentarius</i> by SRAP marker among populations	CAO Yu, XU Ye, WANG Qiuyu (7061)
Effects of the invasion by <i>Solidago canadensis</i> L. on the community structure of soil animals	CHEN Wen, LI Tao, ZHENG Rongquan, et al (7072)
Effects of intercropping on quality and yield of maize grain, microorganism quantity, and enzyme activities in soils	ZHANG Xiangqian, HUANG Guoqin, BIAN Xinmin, et al (7082)
Influence of mycorrhizal inoculation on competition between plant species and inorganic phosphate forms	ZHANG Yuting, ZHU Min, XIAN Yanxiangwa, et al (7091)
The stable nitrogen isotope of size-fractionated plankton and its relationship with biomass during winter in Daya Bay	KE Zhixin, HUNG Liangmin, XU Jun, et al (7102)
Dynamics of toxic and non-toxic <i>Microcystis</i> spp. during bloom in the large shallow hypereutrophic Lake Taihu	LI Daming, YE Linlin, YU Yang, et al (7109)
Activities of antioxidant enzymes and Zn-MT-like proteins induced in <i>Chlorella vulgaris</i> exposed to Zn ²⁺	YANG Hong, HUANG Zhiyong (7117)
Ecological footprint in Fujian based on calculation methodology for the national footprint accounts	QIU Shoufeng, ZHU Yuan (7124)
The comparison of CO ₂ emission accounting methods for energy use and mitigation strategy: a case study of China	YANG Xiai, CUI Shenghui, LIN Jianyi, et al (7135)
Ecological damage assessment of Jiaozhou Bay reclamation based on habitat equivalency analysis	LI Jingmei, LIU Tieying (7146)
The value assessment of county-level ecological assets: a case in Fengning County, Hebei Province	WANG Hongyan, GAO Zhihai, LI Zengyuan, et al (7156)
Review and Monograph	
Molecular basis for enhancement of plant drought tolerance by arbuscular mycorrhizal symbiosis: a mini-review	LI Tao, DU Juan, HAO Zhipeng, et al (7169)
A review of carbon cycling and sequestration in urban soils	LUO Shanghua, MAO Qizheng, MA Keming, et al (7177)
Overview on methods of deriving fraction of absorbed photosynthetically active radiation (FPAR) using remote sensing	DONG Taifeng, MENG Jihua, WU Bingfang (7190)
Research progress on influencing of light attenuation and the associated environmental factors on the growth of submersed aquatic vegetation	WU Mingli, LI Xuyong (7202)
The framework of stoichiometry homeostasis in zooplankton elemental composition	SU Qiang (7213)
Scientific Note	
Abundance and biomass of planktonic ciliates in the sea area around Zhangzi Island, Northern Yellow Sea in July and August 2010	YU Ying, ZHANG Wuchang, ZHANG Guangtao, et al (7220)
Research of wildlife resources sustainable development based on entropy method in China	YANG Xitao, ZHOU Xuehong, ZHANG Wei (7230)
Influence of residue composition and addition frequencies on carbon mineralization and microbial biomass in the soils of agroforestry systems	WANG Yikun, FANG Shengzuo, TIAN Ye, et al (7239)
Seasonal changes in microbial diversity in different cells of a wetland system constructed for municipal sewage treatment	CHEN Yonghua, WU Xiaofu, ZHANG Zhenni, et al (7247)

《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 22 期 (2012 年 11 月)

ACTA ECOLOGICA SINICA

(Semimonthly, Started in 1981)

Vol. 32 No. 22 (November, 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