

ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

生态学报

Acta Ecologica Sinica



第32卷 第15期 Vol.32 No.15 **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 15 期

2012 年 8 月 (半月刊)

目 次

放牧对青藏高原东部两种典型高寒草地类型凋落物分解的影响.....	张艳博, 罗 鹏, 孙 庚, 等 (4605)
北京地区外来入侵植物分布特征及其影响因素.....	王苏铭, 张 楠, 于琳倩, 等 (4618)
温带混交林碳水通量模拟及其对冠层分层方式的响应——耦合的气孔导度-光合作用-能量平衡模型	施婷婷, 高玉芳, 袁凤辉, 等 (4630)
洞庭湖景观格局变化及其对水文调蓄功能的影响	刘 娜, 王克林, 段亚锋 (4641)
大辽河口水环境污染生态风险评估.....	于 格, 陈 静, 张学庆, 等 (4651)
标准化方法筛选参照点构建大型底栖动物生物完整性指数	渠晓东, 刘志刚, 张 远 (4661)
不同年龄段大连群体菲律宾蛤仔 EST-SSR 多样性	虞志飞, 闫喜武, 张跃环, 等 (4673)
基于地统计分析西印度洋黄鳍金枪鱼围网渔获量的空间异质性	杨晓明, 戴小杰, 朱国平 (4682)
广东罗坑自然保护区鳄蜥生境选择的季节性差异.....	武正军, 戴冬亮, 宁加佳, 等 (4691)
甘肃兴隆山森林演替过程中的土壤理化性质.....	魏 强, 凌 雷, 柴春山, 等 (4700)
短轮伐期毛白杨不同密度林分土壤有机碳和全氮动态.....	赵雪梅, 孙向阳, 康向阳, 等 (4714)
放牧对呼伦贝尔草地植物和土壤生态化学计量学特征的影响.....	丁小慧, 官 立, 王东波, 等 (4722)
UV-B 辐射增强对抗除草剂转基因水稻 CH ₄ 排放的影响	娄运生, 周文麟 (4731)
基于核磁共振波谱的盐芥盐胁迫代谢组学分析.....	王新宇, 王丽华, 于 萍, 等 (4737)
广西甘蔗根际高效联合固氮菌的筛选及鉴定.....	胡春锦, 林 丽, 史国英, 等 (4745)
不同稻蟹生产模式对土壤活性有机碳和酶活性的影响.....	安 辉, 刘鸣达, 王耀晶, 等 (4753)
大兴安岭火烧迹地恢复初期土壤微生物群落特征.....	白爱芹, 傅伯杰, 曲来叶, 等 (4762)
川西北冷杉林恢复过程中土壤动物群落动态.....	崔丽巍, 刘世荣, 刘兴良, 等 (4772)
内生真菌角担子菌 B6 对连作西瓜土壤尖孢镰刀菌的影响	肖 逸, 戴传超, 王兴祥, 等 (4784)
西江颗粒直链藻种群生态特征.....	王 超, 赖子尼, 李跃飞, 等 (4793)
大型人工湿地生态可持续性评价.....	张依然, 王仁卿, 张 建, 等 (4803)
孢粉、炭屑揭示的黔西高原 MIS3b 期间古植被、古气候演变	赵增友, 袁道先, 石胜强, 等 (4811)
树干径流对梭梭“肥岛”和“盐岛”效应的作用机制	李从娟, 雷加强, 徐新文, 等 (4819)
豆科作物-小麦轮作方式下旱地小麦花后干物质及养分累积、转移与产量的关系	杨 宁, 赵护兵, 王朝辉, 等 (4827)
一次陆源降雨污水引起血红哈卡藻赤潮的成因.....	刘义豪, 宋秀凯, 靳 洋, 等 (4836)
盐城国家级自然保护区景观格局变化及其驱动力.....	王艳芳, 沈永明 (4844)
城市屋顶绿化资源潜力评估及绿化策略分析——以深圳市福田区为例.....	邵天然, 李超骥, 曾 辉 (4852)
黄河三角洲区域生态经济系统动态耦合过程及趋势.....	王介勇, 吴建寨 (4861)
重庆市生态功能区蝴蝶多样性参数	李爱民, 邓合黎, 马 琦 (4869)
专论与综述	
干旱半干旱区不同环境因素对土壤呼吸影响研究进展.....	王新源, 李玉霖, 赵学勇, 等 (4890)
土壤呼吸的温度敏感性——全球变暖正负反馈的不确定因素.....	栾军伟, 刘世荣 (4902)
森林土壤甲烷吸收的主控因子及其对增氮的响应研究进展.....	程淑兰, 方华军, 于贵瑞, 等 (4914)
湖泊氮素氧化及脱氮过程研究进展	范俊楠, 赵建伟, 朱端卫 (4924)
研究简报	
刈割对人工湿地风车草生长及污水净化效果的影响.....	吕改云, 何怀东, 杨丹菁, 等 (4932)
学术信息与动态	
全球气候变化与粮食安全——2012 年 Planet Under Pressure 国际会议述评	安艺明, 赵文武 (4940)

期刊基本参数: CN 11-2031/Q * 1981 * m * 16 * 338 * zh * P * ¥ 70.00 * 1510 * 35 * 2012-08



封面图说: 水杉是中国特有种, 国家一级保护植物, 有植物王国“活化石”之称, 是 1946 年由中国的植物学家在湖北的利川磨刀溪发现的。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, 水杉确在中国川、鄂、湘边境地带得以幸存, 成为旷世奇珍。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, 枝叶繁茂, 入秋后叶色金黄。自发现后被人们在中国南方广泛种植, 成为著名的绿化观赏植物, 现在中国水杉的子孙已遍及中国和世界 50 多个国家和地区。

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

DOI: 10.5846/stxb201111021653

肖逸,戴传超,王兴祥,刘付燕,王宏伟.内生真菌角担子菌 B6 对连作西瓜土壤尖孢镰刀菌的影响.生态学报,2012,32(15):4784-4792.

Xiao Y, Dai C C, Wang X X, Liu F Y, Wang H W. The effects of the endophytic fungus *Ceratobasidium stevensii* B6 on *Fusarium oxysporum* in a continuously cropped watermelon field. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(15): 4784-4792.

内生真菌角担子菌 B6 对连作西瓜土壤 尖孢镰刀菌的影响

肖逸¹, 戴传超¹, 王兴祥^{2,3,*}, 刘付燕¹, 王宏伟¹

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏省微生物资源产业化工程技术研究中心, 江苏省微生物与功能基因组学重点实验室, 南京 210046;

2. 中国科学院土壤环境与污染修复重点实验室(南京土壤研究所), 南京 210008;

3. 江西省红壤生态研究重点实验室, 中国科学院红壤生态实验站, 鹰潭 335211)

摘要:建立了快速定量检测土壤中角担子菌(*Ceratobasidium stevensii*) B6 的实时定量 PCR 方法,同时跟踪了土壤中尖孢镰刀菌数量的动态变化,以及不同的发酵组分对开花期西瓜土壤微生物区系的影响。PCR 扩增分析表明引物 Cfl/Cr1 有很好的特异性,能对角担子菌 B6 特异性扩增得到 371bp 的条带,对其它 10 株真菌不能有效扩增。使用荧光定量 PCR 对施加角担子菌 B6 的土壤总 DNA 扩增,结果表明将活菌 B6 固体发酵物施加到土壤 1 周后, B6 的数量有一定的增殖,达到 7.4 log(pg DNA/g 干土),随着时间推移,数量逐渐减少,在第 5 周的时候低于检测限;而液体发酵液处理从一开始施加到土壤后, B6 的数量就开始逐渐减少,在第 4 周的时候就低于检测限。施加活的 B6 菌 4 周内能够有效地控制尖孢镰刀菌的数量(尖孢镰刀菌数量维持在 5×10^3 CFU/g 干土左右),之后随着 B6 数量的减少尖孢镰刀菌数量大量增加。活菌 B6 在土壤中能够存活 1 个月左右,不会过度影响土著微生物区系,是一株环境友好型菌株,对土壤微环境的干扰较小。

关键词:西瓜;角担子菌 B6;尖孢镰刀菌(FO);实时定量 PCR; DGGE

The effects of the endophytic fungus *Ceratobasidium stevensii* B6 on *Fusarium oxysporum* in a continuously cropped watermelon field

XIAO Yi¹, DAI Chuanchao¹, WANG Xingxiang^{2,3,*}, LIU Fuyan¹, WANG Hongwei¹

1 Jiangsu Engineering and Technology Research Center for Industrialization of Microbial Resources, Jiangsu Key Laboratory for Microbes and Functional Genomics, College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China

2 Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China

3 Jiangxi Key Laboratory of Ecological Research of Red Soil, Experimental Station of Red Soil, Chinese Academy of Sciences, Yingtan 335211, China

Abstract: Serious obstacles exist for the continuous cropping of watermelon (*Citrullus lanatus*). It has previously been shown that following application of living *Ceratobasidium stevensii* B6 mycelia, the quantity of *Fusarium oxysporum* (FO) in continuously cropped soil at the harvest stage decreased by 29.9%, while the total yield and soluble sugar content of the fruit increased by 103.8% and 35.1% compared with the control. Here we further discuss the mechanisms by which B6 may alleviate watermelon cropping problems. We developed a real-time polymerase chain reaction (PCR) assay to detect and quantify B6 in soil, and monitored the dynamics of the FO population in the soil. We also evaluated the effects of different fermentation components on the soil microflora, using Denatured Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). B6-specific DNA primers were designed based on the internal transcribed spacer (ITS) sequence. Amplification of B6 DNA

基金项目:国家科技支撑计划资助项目(2009BAD6B05);中国科学院知识创新工程重大资助项目(KSCX 1-YW-09);江苏省高校优势学科建设工程资助项目

收稿日期:2011-11-02; 修订日期:2012-06-14

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: xxwang@issas.ac.cn

using Cfl/Cr1 primers yielded a single 371 bp-long product; no product was obtained in the other ten fungal species tested. The detection limit of the system was 100 fg/ μ L of B6 genomic DNA. To replicate the watermelon cropping system as closely as possible, a surface layer (5—20 cm depth) of an Ultisol was sampled from a 3-year old continuously cropped upland watermelon site, at the Red Soil Experimental Station, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Yongzhou, Hunan Province (N26°45', E111°53'). Pot experiments were conducted in the botanical garden of Nanjing Normal University; these were a control (A), an inactivated B6 liquid broth (B), an activated B6 liquid broth (C), an inactivated B6 solid fermentation (D), and an activated B6 solid fermentation (E). When the solid fermentation of B6 was inoculated into soil, the level of genomic DNA reached its highest at 7.4 log (pg/g dry soil) after one week, but decreased below the detection limit after 5 weeks. When liquid broth of B6 was inoculated into soil, the level of genomic DNA decreased immediately, and was below the detection limit after 4 weeks. B6 was not detected in other treatments, meaning that B6 was low in the natural environment. The population of FO was effectively controlled by treatments C and E during the first 4 weeks (FO was about 5×10^3 CFU/gDM), and then from the fifth week FO increased rapidly. DGGE fingerprinting of bacterial cluster analysis showed that treatments A and B clustered in one class (with 57.5% similarity), and treatments C, D, and E clustered in another class (with 55.2% similarity). DGGE fingerprinting of fungal cluster analysis showed that treatments A, B, and C clustered in one class (with 66.0% similarity). Treatments D and E exhibited significant differences. Except for treatments C and E, there was little difference between the bacterial or fungal Shannon diversity indices, or evenness between the treatments. Our results suggest that B6 survived in the soil for about one month under these experimental conditions, and that the strain tested was environmentally friendly and interfered little with the soil microenvironment.

Key Words: watermelon; *Ceratobasidium stevensii*; *Fusarium oxysporum*; real time PCR; DGGE

西瓜(*Citrullus lanatus* (Thunb) Matsum & Nakai)是一种重要的经济作物,西瓜连作后易产生的枯萎病是世界范围内西瓜减产的重要因素。西瓜枯萎病病原菌是尖孢镰刀菌西瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)^[1],它能够穿透植物的维管组织、分泌毒素、导致西瓜的茎产生坏死斑,诱发细胞凋亡,叶片随后出现枯萎症状、几周内死亡。连作土壤病原菌的防治目前有化学防治,抗性品种选育、间作套作等。化学防治虽然效果显著但长期使用化学药品易导致土壤生物功能退化、质量下降^[2-3];抗性品种选育是防治土壤病原菌感染发病的经济有效的措施,但是选育品种的抗性难以持久^[4];间作套作受农作物生长习性以及当地耕作习惯的限制;而生物菌剂作为一种较为安全、绿色的防治措施越来越受到人们的重视。

张丽萍等发现 T₄₂ 木霉与枯草芽孢杆菌 Bs-6 对尖孢镰刀菌有明显的拮抗作用,田间实验表明,这个组合的生物制剂能显著增加连作西瓜的茎长和茎粗,经济产量、生物产量分别增加 50.9%、66.7%,对连作障碍的防效可达 75%^[5]。但是,由于目前生产上应用的木霉制剂多为活孢子,常受到田间的温度、湿度、雨水、土著微生物以及化学农药的影响,大田的防治效果并不稳定^[6]。而杜黎黎等人的研究表明,在平板对峙实验中,内生细菌的发酵液对西瓜枯萎病孢子萌发有一定的抑制作用,孢子萌发率仅为 7.86%^[7],但其缺少盆栽和大田实验对其结果进行验证。

Ceratobasidium stevensii B6 为角担子菌属真菌,具有驱杀菜青虫^[8]、降解菲^[9]等功能,可作为生物菌剂使用。前文研究表明,连作西瓜土壤添加 B6 菌后,西瓜枯萎病的主要致病菌尖孢镰刀菌的数量减少 29.9%,病情指数下降 38.3%,西瓜单果重和总产量分别增加 44.8% 和 103.8%,可溶性糖含量增加 35.1%,西瓜连作障碍得到了一定程度缓解^[10]。但 B6 在土壤中存活时间、对土著微生物的影响及其缓解西瓜连作障碍的机理尚有待进一步研究。

实时定量 PCR 技术定量检测土壤中某种特定的微生物的特异性和灵敏度都很高,目前已经被作为一种成熟的技术手段用于微生物生态学研究^[11-13],其中引物的设计至关重要,选择合适的靶序列将决定 PCR 检测

的特异性和灵敏度,从而保证能够快速准确测定某种特定微生物的含量^[14-16]。本文根据 B6 rDNA-ITS 区序列设计了一对特异性引物,建立快速定量检测土壤中角担子菌 B6 的实时定量 PCR 方法;研究添加 B6 对土壤中微生物,尤其是尖孢镰刀菌数量的影响;探索合适的发酵组分和施加方式,为缓解连作西瓜枯萎病提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

土壤 土壤采集于湖南省永州市中国农业科学院衡阳红壤实验站孟公山示范基地的第四纪红黏土发育的红壤(5—20 cm),连续种植西瓜 3 a(第 1 年是西瓜实生苗,第 2—3 年是西瓜嫁接苗)。有机质含量 11.60 g/kg,pH 值 4.82(1:2.5H₂O),全氮 0.89 g/kg,碱解氮 77.32 mg/kg,全磷 0.50 g/kg,速效磷 25.17 mg/kg,全钾 13.88 g/kg,速效钾 588.31 mg/kg。

内生真菌 菌种为南京师范大学江苏省微生物与功能基因组学重点实验室保藏菌株,编号 B6,为角担子菌属真菌 *Ceratobasidium stevensii*^[8],分离自大戟科重阳木(*Bischofia polycarpa*)茎内皮。内生真菌 B6 从葡萄糖马铃薯固体培养基(PDA)斜面上转接至新鲜 PDA 培养基 28 ℃ 培养 7 d,倒入 5 mL 无菌水,用接种铲将菌丝轻轻刮起,转移入灭过菌的液体马铃薯葡萄糖培养基(PD),250 mL 三角瓶中装入 50 mL PD 培养基,28 ℃,180 r/min 培养 6 d,备用。

固体发酵物的制备 在 500 mL 的锥形瓶中加入 50 g 的固体培养基(麸皮:糠:稻壳=6:3:1),然后再加入 60 mL 的水,加入 0.5 g 的硫酸铵,搅拌均匀,121 ℃ 灭菌 20 min。每瓶加入 15 mL 的 B6 种子液,搅拌均匀,静置培养 14 d 备用(28 ℃)。

1.2 实验设计

盆栽试验地点在南京师范大学植物园温室。试验共设 5 个处理,各 6 次重复,分别为空白对照(A)、施加灭活的 B6 发酵液 300 g(B)、施加 300 g 活菌 B6 发酵液(C)(折合干菌丝 1.5 g)、施加 100 g 灭活的 B6 固体培养基(D)、施加 100 g 活菌 B6 固体培养基(E)(折合干菌丝 1.5 g)。2010 年 4 月 15 日育苗:营养钵 12(直径)cm×10(高)cm;营养土是轻型有机栽培基质(镇江兴农有机肥有限公司),准备装满土的营养钵 60 个。栽种西瓜种子到营养钵,每钵一颗种子,种子品种为礼品瓜黑美人(珠海市农之友种子有限公司)。4 月 21 日布置试验,实验盆钵直径 28 cm,高 28 cm,每盆用风干土 15 kg,分别施用尿素 4 g,磷酸二氢钾 4 g,硼砂 0.55 g,碱渣 60 g,有机肥 500 g。盆钵埋入土壤,盆口距地面 2 cm,随机区组排列。4 月 27 日,在施加各处理前 1 h 取土,记为-1 h 土样,然后在盆钵中加入液体发酵液或固体发酵物与 0—10 cm 深的土壤拌匀,1 h 后再次取土,记为 1 h 土样,随即移栽营养钵中的西瓜幼苗至盆栽中,每盆 1 株,常规管理。之后每隔 7 d 取 1 次土样,连续取土至第 6 周(开花期)。取土时采用 2 cm 内径的土钻,取 0—15 cm 的混合土样。样品分为两部分:用于测定土壤尖孢镰刀菌数量的样品 4 ℃ 保藏;用于 PCR 定量分析和 DGGE 分析的土壤样品冻干后-20 ℃ 保藏。

1.3 分析方法

1.3.1 DNA 提取

本试验中所用的真菌使用马铃薯葡萄糖液体培养基,28 ℃,180 rpm 培养 6 d,滤纸过滤后获得菌丝,使用无菌的去离子水清洗 3 次后备用;大型食用真菌购买自当地市场。菌株基因组 DNA 提取方法:将菌丝加入到提取缓冲液(0.5 mol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl(pH 值 7.5), 10 mmol/L EDTA, 1% SDS)中,使用球磨破碎仪(Bio-Spec Products, Bartlesville, OK, USA)提取,提取方法参照 Shishido 等^[17]。提取获得的 DNA 使用试剂盒纯化,纯化后的 DNA 浓度使用核酸检测仪(SmartSpec™ 3000;BioRad, Oakland, CA, USA)在 260 nm 下检测 DNA 浓度。每株菌的基因组 DNA 样品稀释 10 倍以减少 PCR 扩增的抑制物。

使用 UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit (Mo BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA)从 0.5 g 土壤中提取土壤总基因组 DNA,提取步骤严格按照试剂盒中的说明书进行。最后的 DNA 用 50 μL 的灭菌的 ddH₂O

溶解用于后续的 PCR 反应。

1.3.2 B6 特异性引物的设计

使用引物 ITS1 和 ITS4 扩增 B6 菌的一段 ITS 序列,测序后,上传到 NCBI 数据库,使用数据库的 Primer designing tool 初步设计 B6 的特异性引物(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>),使用 Primer 5.0 软件检测引物的二聚体和发卡结构。另外使用其它 10 种真菌基因组 DNA 来验证引物的特异性:1 *Pleurotus eryngii*(杏鲍菇),2 *Flammulina velutipes*(金针菇),3 *Lentinus edodes*(香菇),4 *Pleurotus ostreatus*(白蘑菇),5 *Auricularia auricula*(黑木耳),6 *Tremella fuciformis*(银耳),7 *Hypsizygus marmoreus*(白玉菇),8 *Absidia* sp.(梨头霉),9 *Aspergillus niger*(黑曲霉),10 *Trichoderma viride*(绿色木霉)。选择的引物为 Cf1(5'-GCCGGCAGACCTCCAAGTC-3')/Cr1(5'-GGGCATGTGCACGCCTGTCT-3')。

1.3.3 实时定量 PCR

实时定量 PCR 扩增使用 Rotor-Gene Q(Qiagen, Valencia, CA, USA)定量 PCR 仪。荧光定量标准曲线使用梯度稀释的 B6 基因组 DNA(10^{-7} pg— 10^4 pg)为模板。PCR 扩增反应为 20 μ L 体系:1.0 μ L DNA 模板,上下游引物各 1 μ L,10 μ L SYBR Premix Ex Taq (Bio-Rad), H_2O 7 μ L。扩增反应程序:94 $^{\circ}C$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}C$ 30 s,60 $^{\circ}C$ 50 s,40 个循环。所有的荧光定量 PCR 反应条件和体系完全一致。

1.3.4 尖孢镰刀菌计数

用稀释平板法分离土壤中的尖孢镰刀菌,然后计数,培养基是 PDA+硫酸链霉素 0.3 g/L^[18]。

1.3.5 PCR-DGGE 分析

使用引物 357f-GC(CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG)和 517r(ATT ACC GCG GCT GCT GG)扩增细菌 16S rDNA V3 区^[19]。使用引物 FF390(CGA TAA CGA ACG AGA CCT)和 FR1-GC(CCC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GCC GAI CCA TTC AAT CGG TAI T)扩增真菌 18S rDNA V7 和 V8 区^[20]。细菌 16S rDNA 和真菌 18S rDNA PCR 反应都为 50 μ L 体系:10 $\times$ PCR buffer 5 μ L,MgCl₂ 3.5 μ L(20mmol/L),dNTP 1.5 μ L(10 mmol/L),上下游引物各 1 μ L(10 nM),Taq DNA 聚合酶(Takara Biotechnology Co., Ltd, Dalian, CHN)0.3 μ L(1.5U),DNA 模板 2 μ L(15 ng),无菌超纯水 35.7 μ L。16S rDNA 扩增反应使用 touch-down PCR 程序:94 $^{\circ}C$ 预变性 4 min;94 $^{\circ}C$ 变性 40 s,58 $^{\circ}C$ 退火 1.5 min,每个循环下降 1 $^{\circ}C$ (6 个循环);72 $^{\circ}C$ 延伸 2 min;94 $^{\circ}C$ 变性 40 s,52 $^{\circ}C$ 退火 1.5 min,72 $^{\circ}C$ 延伸 2 min(28 个循环);72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min。18S rDNA 扩增条件:94 $^{\circ}C$ 预变性 3 min;40 个循环,94 $^{\circ}C$ 变性 1 min,50 $^{\circ}C$ 退火 50 s,72 $^{\circ}C$ 延伸 1.5 min;72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min。PCR 产物凝胶电泳检测:5 μ L PCR 产物,1.5% 琼脂糖,120 V,拍照(UVP BioImaging Systems;UVP, Inc., Upland, CA, USA)。

细菌 DGGE 使用 8% 丙烯酰胺(37.5:1)凝胶,变性梯度从 35% 到 65%(100% 的变性剂溶液含 7 mol/L 的尿素和 40% 甲酰胺);真菌 DGGE 使用 7% 丙烯酰胺凝胶,变性梯度从 25% 到 60%。使用 CBS-DGGE 系统(CBS Scientific Co., Inc., Del Mar, CA, USA),电泳缓冲液为 0.5 $\times$ TAE(40 mmol/L Tris base, 40 mmol/L 冰醋酸, 1mmol/L EDTA),PCR 产物上样量为 500 ng,60 $^{\circ}C$,100 V,电泳 16 h,EB 染色 20 min,拍照(UVP BioImaging Systems;UVP, Inc., Upland, CA, USA)。

1.4 数据处理

实验结果用算术平均数 $\pm$ 标准误表示,应用 SPSS 13.0 软件进行方差分析(One-Way ANOVA)检验处理间差异显著性,并用 Duncan 法进行多重比较,当 $P \leq 0.05$ 时,各个处理间存在显著差异。使用 Excel 2003 进行作图。

DGGE 指纹图谱分析使用 Gelcompar II (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium)软件。其中聚类分析使用 UPGMA(unweighted pair-group method with arithmetic averages)方法。用于计算群落生物多样性的指标有:(i) Shannon 指数(H) $H = -\sum (ni/N) \ln(ni/N)$,式中 ni 为单一条带的峰面积, N 为所有峰的总面积;(ii) 均匀度指数(e) $e = H/\ln S$,式中 S 为所在泳道的条带总数目。

2 结果与分析

2.1 B6 特异性引物设计及验证

通过对 B6 的扩增效果以及特异性验证筛选了一对合适的引物 Cf1 (5'-GCCGGCAGCAGCTCCAAGTC-3')/Cr1 (5'-GGGCATGTGCACGCCTGTCT-3')。从图 1 可以看出,使用引物 Cf1/Cr1 进行常规 PCR 反应,只有 B6 得到特异性 371 bp 扩增条带,其余真菌如杏鲍菇、金针菇、香菇、白蘑菇、黑木耳、银耳、白玉菇、梨头霉、黑曲霉、绿色木霉等都无明显扩增条带。

2.2 B6 荧光定量标准曲线制备

荧光定量 PCR 扩增反应使用梯度稀释的 B6 基因组 DNA 做模板,引物为 Cf1/Cr1。图 2 为 B6 荧光定量标准曲线,横坐标(x)为模板质量,纵坐标(y)为达到荧光阈值的循环数量($y = -3.7237x + 22.338$)。标准曲线的相关系数($R > 0.99$),这表明 B6 基因组 DNA 质量在 $10^0 - 10^4$ pg 间能够进行很好地线性定量扩增。同时,将 B6 基因组 DNA 继续稀释至 10^{-1} pg、 10^{-2} pg、 10^{-3} pg、 10^{-4} pg、 10^{-5} pg、 10^{-6} pg、 10^{-7} pg,用 1 μ L 超纯水作对照进行扩增,进行该方法检测限初步研究,10 fg/ μ L B6 基因组 DNA 为模板及 1 μ L 超纯水代替模板 DNA 作为阴性对照均未能起始扩增,表明该体系的检测下限为 100 fg/ μ L B6 基因组 DNA 质量,能够满足一般检测需要。

2.3 土壤中 B6 数量的定量跟踪检测

从 A、B、C、D、E 5 个处理中分别提取土壤总 DNA,进行 qPCR。在所有的采样时间点,A、B、D 处理中都没有检测到 B6 的存在,说明在空白对照和灭活对照中,土壤中原本存在的角担子菌 B6 的数量微乎其微,在检测下限以下,对本实验没有影响。而在施加活菌 B6 发酵液和发酵物的处理中,土壤中有较多的角担子菌 B6 存在;与活菌 B6 发酵液处理(C)相比,活菌 B6 固体发酵物处理(E)土壤中 B6 菌的数量更多,在 1 周后达到 $7.4 \log(\text{pg DNA/g 干土})$,而此时 C 处理土壤中 B6 数量已经开始下降($4.4 \log \text{pg DNA/g 干土}$);活菌 B6 发酵液处理(C)的土壤中的 B6 在第 4 周已经基本消失,而固体发酵物处理(E)的土壤中的 B6 在第 4 周还有 $2.7 \log(\text{pg DNA/g 干土})$,在第 5 周才开始低于检测限(图 3)。这说明与发酵液相比,固体发酵物更加有利于 B6 在土壤中的定殖。

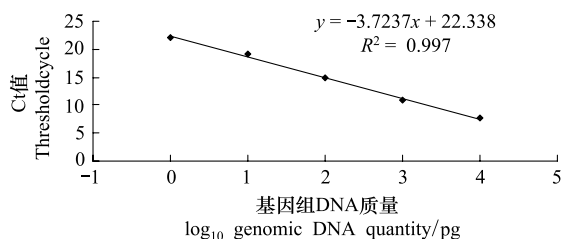


图 2 实时定量 PCR 扩增标准曲线

Fig. 2 Standard curve from real-time PCR by plotting the threshold cycle (Ct) vs the $\log_{10}$ quantity of template DNA (in pg) for B6 amplified with the primer Cf1/Cr1

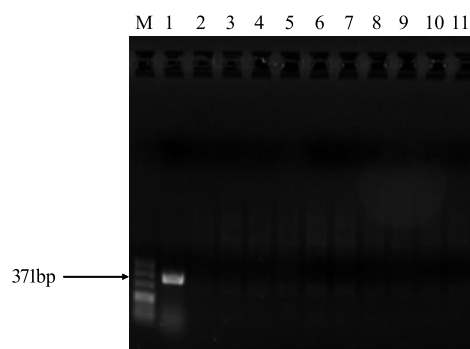


图 1 使用引物 Cf1/Cr1 扩增产物的电泳图谱

Fig. 1 PCR products using primer Cf1/Cr1

泳道:1 角担子菌 B6 *Ceratomyces stevensii* B6; 2 杏鲍菇 *Pleurotus eryngii*; 3 金针菇 *Flammulina velutipes*; 4 香菇 *Lentinus edodes*; 5 白蘑菇 *Pleurotus ostreatus*; 6 黑木耳 *Auricularia auricula*; 7 银耳 *Tremella fuciformis*; 8 白玉菇 *Hypsizygus marmoreus*; 9 梨头霉 *Absidia* sp.; 10 黑曲霉 *Aspergillus niger*; 11 绿色木霉 *Trichoderma aviride*

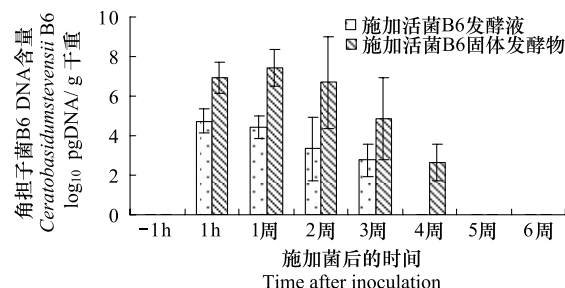


图 3 土壤中 B6 菌 DNA 含量变化

Fig. 3 Population dynamics of *Ceratomyces stevensii* B6 in soil measured by qPCR

C: 施加活菌 B6 发酵液; E: 施加活菌 B6 固体发酵物。-1h, 1h, 1 周, 2 周, 3 周, 4 周, 5 周, 6 周分别表示在接菌前 1h, 接菌后 1h, 1, 2, 3, 4, 5, 6 周采集土样

2.4 施加 B6 对土壤中尖孢镰刀菌数量的影响

对照和施加灭活菌处理从第 3 周开始,土壤中尖孢镰刀菌的数量就逐渐增加(图 4)。与对照和施加灭活菌处理相比,施加活菌 B6 的处理 C 和 E 的土壤中的尖孢镰刀菌的数量从第 2 周开始就显著降低,分别比对照减少了 41.6% 和 48.6%,此趋势一直保持到第 4 周。从第 5 周开始,处理 C 和 E 土壤中尖孢镰刀菌的数量也开始增加,这可能是由于此时土壤中的活菌 B6 的数量大量减少,失去了对尖孢镰刀菌的生防作用。

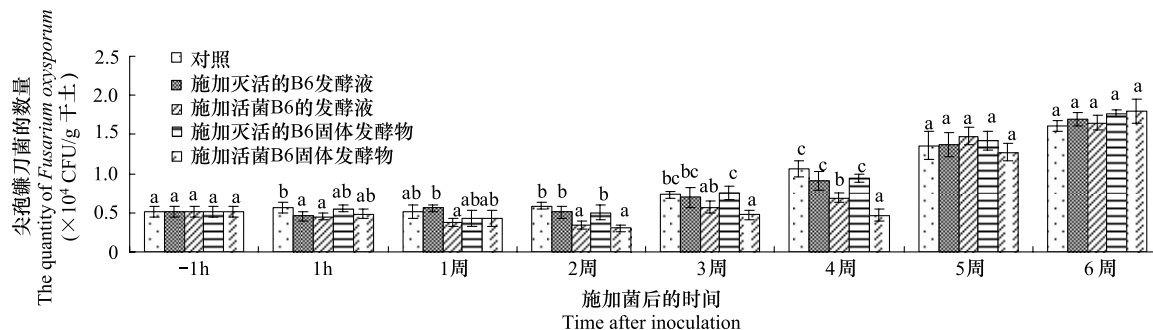


图 4 土壤尖孢镰刀菌数量变化

Fig. 4 Population dynamics of *Fusarium oxysporum* in soil measured by plate counting

处理间数据比较,不同字母表示在 0.05 水平上差异显著 ($P \leq 0.05$)

2.5 开花期土壤 DGGE 分析

开花期处于西瓜植株生长最旺盛的时期,西瓜生长进入关键时期,所以选择开花期研究施加内生真菌 B6 对西瓜土壤微生物群落结构的影响。细菌的 DGGE 指纹图谱聚类分析表明(图 5),5 个处理分为两类,A 和 B 聚为一类,两者相似度达到 57.5%;C、D 和 E 聚为一类,三者的相似度达到 55.2%,这其中 D 和 E 的相似度达到 72.4%。真菌 DGGE 指纹图谱聚类分析表明(图 5),A、B、C 处理聚为一类,相似度达到 66.0%;D 和 E 各为一支,真菌群落结构差异很大。

从表 1 可以看出,除了处理 C,其余处理细菌的香农指数与对照 A 相比都有一定提高,均匀度相差不大;处理 E 的真菌的香农指数与对照 A 相比提高了 11.0%,而均匀度相差不大。

表 1 开花期土壤细菌、真菌群落结构多样性指数

Table 1 Structure diversity index of soil bacteria and fungi in flowering stage

处理 Treatment	细菌 Bacteria		真菌 Fungi	
	香农多样性指数 Shannon diversity index	均匀度 Evenness	香农多样性指数 Shannon diversity index	均匀度 Evenness
A	3.15±0.13b	0.90±0.01b	3.36±0.20a	0.84±0.02ab
B	3.35±0.09b	0.91±0.01b	3.52±0.17ab	0.88±0.02b
C	2.25±0.21a	0.77±0.01a	3.63±0.26ab	0.87±0.02ab
D	3.36±0.08b	0.90±0.01b	3.34±0.16a	0.83±0.01a
E	3.20±0.10b	0.90±0.01b	3.73±0.14b	0.88±0.03b

3 讨论

建立了一种使用 SYBR Green I 荧光染料快速检测土壤中 B6 的数量的方法。SYBR Green I 的特异性主要依靠设计的 PCR 引物的特异性。根据 B6 的 ITS 序列设计了一对特异性引物 Cf1/Cr1,并且使用其他 10 种真菌对其特异性进行验证。将活菌 B6 固体发酵物施加到土壤中 1 周后,B6 的数量有一定的增殖,然后随着时间推移,数量逐渐减少,在第 5 周的时候位于检测水平以下;而发酵液处理从一开始施加到土壤中后,B6 的数量就开始逐渐减少,在第 4 周的时候位于检测水平以下。这主要是由于固体发酵物能够作为一个有机底物^[21],为 B6 在土壤中的生长提供营养物质。在之前的研究曾报道,*Phomopsis liquidambari* B3 在土壤中能够

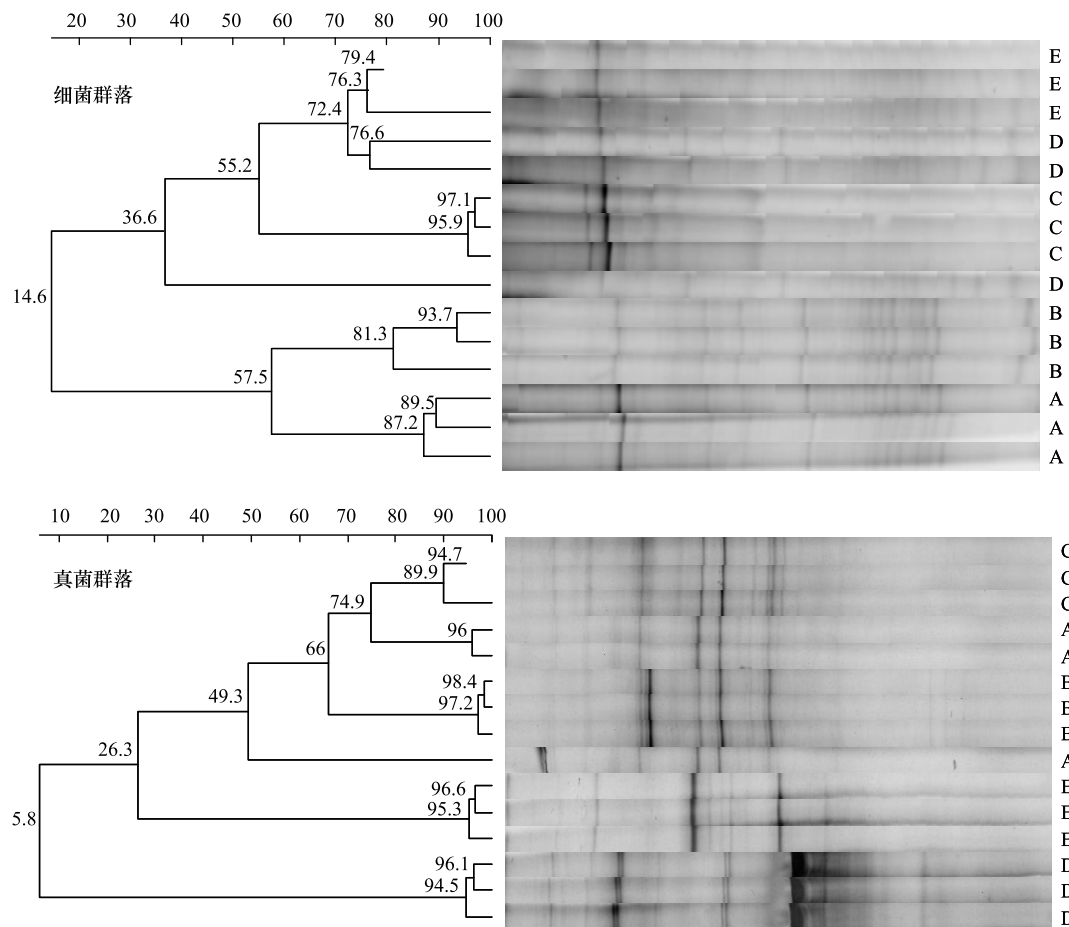


图5 开花期土壤细菌群落和真菌群落 DGGE 指纹图谱聚类分析

Fig. 5 DGGE cluster analysis (UPGMA) of 16S rDNA profiles of soil bacterial communities and 18S rDNA profiles of soil fungal communities in flowering phase

存活 30 d^[22], 本实验中活菌 B6 固体发酵物处理的土壤中 B6 能够存活 4 周左右, 说明 B6 和 B3 一样, 至少在 30d 内能够被大量的检测出, 内生真菌在特定的营养条件下, 可以长期存在达 1 个月之久。

西瓜枯萎病的主要致病菌是尖孢镰刀菌, 施加 B6 菌后的 4 周内能够有效地控制尖孢镰刀菌的数量, 随后尖孢镰刀菌数量大量增加。这主要是由于 4 周后土壤中 B6 菌的数量下降, 解除了对病原菌的养分和生存空间的竞争作用。但是, 西瓜苗的育苗期大概在 1 个月左右, 这段时期是各种病害的高发期, B6 菌如果在育苗期就开始使用, 可以有效地降低病害的发病率, 提高西瓜苗的存活率。

西瓜开花期(移栽后 6 周左右)的细菌 DGGE 指纹图谱的聚类分析表明, D 和 E 的细菌群落相似度极高, 但是真菌群落结构各为一支。原因有三方面: 从实验设计本身来看, 300 g 液体培养物含有的营养物质只达到固体培养基的 6% 左右, 因此细菌 D、E 聚为一支, 说明 B6 菌是否存在, 对细菌的扰动没有培养基自身影响大; 真菌 DGGE 聚类 D 和 E 各为一支, 说明施加固体培养基对真菌扰动大, 固体培养基加入, 由于营养物的改变, 直接带来土壤真菌的巨大变化, 而 B6 菌的加入, 进一步促进了土壤中真菌群落的改变, 因此真菌聚类图显示为 3 支。相对液体培养基, 固体培养基对土壤真菌群落的影响较大, 其抑制尖孢镰刀菌效果也较好。在施加少量液体培养基的情况下, 培养基对细菌多样性影响不大, C 处理由于 B6 菌丝直接作用于土壤, 因此对细菌产生了一定的抑制作用。E 处理的香农指数和均匀度均高于对照, 说明施加的固体培养基适合真菌生长, 同时相对于 D 处理, E 中含有的 B6 菌在前期抑制了尖孢镰刀菌的生长, 使同生态位的其他真菌得到了更多的养分和生存空间。由于土壤 DGGE 分析采样时间有点偏晚(这时候 B6 菌影响逐渐减弱), 在一定程度上影响其与尖孢镰刀菌数据的对应分析。

在大田种植中,西瓜施肥是穴施的,本实验中一盆西瓜相当于一穴西瓜,每盆的接种量是 300 g 的液体或 100 g 的固体,如果按照西瓜行距 2 m,株距 1 m 计算,每公顷的使用量是 1500 kg 液体或者 500 kg 固体,使用量稍微偏多,其应用条件还有待于进一步优化。

研究表明,施加活菌 B6 到土壤中的效果能维持 1 个月左右,不会过度影响土著微生物区系。这说明 B6 菌是一株环境友好型菌株,对土壤微环境的干扰较小。B6 固体剂型效果优于液体剂型,这是由于固体发酵物中的有机物能够提供 B6 生长所需的营养物质,利于 B6 存留在土壤中,与病原菌竞争养分和生存空间。采用营养缓释和内生菌菌丝固定化措施可能能够延长 B6 在土壤中的存活时间,进一步控制病原菌的数量,达到使其长期在土壤中发挥作用的目的。

References:

- [1] Wu H S, Liu D Y, Ling N, Bao W, Ying R R, Shen Q R. Influence of root exudates of watermelon on *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. Soil Science Society of America Journal, 2009, 73(4): 1150-1156.
- [2] Huo X F, Li F C. Effects of inorganic fertilizers and pesticides on soil microbes. Journal of Microbiology, 2008, 28(2): 101-103.
- [3] Zhao G F. Effects of chemical pesticides on environment and research progress of new pesticides. Journal of Hebei Agricultural Sciences, 2010, 14(8): 56-57, 98-98.
- [4] Zeng S M. The estimation of durability of disease resistance. Acta Phytopathologica Sinica, 1999, 26(3): 193-203.
- [5] Zhang L P, Huang Y L, Cheng H C, Zhang G W, Dong C, Tian L S, Li S S. Study on control watermelon replant disease by mixed animalcules. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2006, (5): 59-61.
- [6] Huang Y L, Zhang L P, Li S S, Zhang G W, Cheng H C, Tian L S. Study on the biocontrol of peanut replant disease by *T. viride* agent. Modern Agrochemicals, 2006, 5(6): 35-37, 39-39.
- [7] Du L L, Ma H Y, Wang X Z, Luan F S. Antagonistic effects of endophytic bacteria strain Mg15 on *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in watermelon. China Vegetables, 2010, (8): 56-60.
- [8] Dai C C, Yu B Y, Wang X F, Jiang J H, Shi Y. Identification of endophytic fungi killing *Pieris rapae* and primary determination of its chemical matter. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2006, 34(4): 694-697.
- [9] Dai C C, Tian L S, Zhao Y T, Chen Y, Xie H. Degradation of phenanthrene by the endophytic fungus *Ceratobasidium stevensii* found in *Bischofia polycarpa*. Biodegradation, 2010, 21(2): 245-255.
- [10] Xiao Y, Wang X X, Wang H W, Liu F Y, Dai C C. The effects of the addition of *Ceratobasidium stevensii* B6 and its growth on the soil microflora at a continuously cropped watermelon (*Citrullus lanatus*) site in China. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(4): 1185-1192.
- [11] Shishido M, Sato K, Yoshida N, Tsukui R, Usami T. PCR-based assays to detect and quantify *Phomopsis sclerotoides* in plants and soil. Journal of General Plant Pathology, 2010, 76(1): 21-30.
- [12] Luo Y, Gao W, Doster M, Michailides T J. Quantification of conidial density of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in soil from almond orchards using real-time PCR. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106(5): 1649-1660.
- [13] Kuan C P, Wu M T, Huang H C, Chang H. Rapid detection of *Colletotrichum lagenarium*, causal agent of anthracnose of cucurbitaceous crops, by PCR and real-time PCR. Journal of Phytopathology, 2011, 159(4): 276-282.
- [14] Li M Z, Senda M, Komatsu T, Suga H, Kageyama K. Development of real-time PCR technique for the estimation of population density of *Pythium intermedium* in forest soils. Microbiological Research, 2010, 165(8): 695-705.
- [15] Kang Z H, Huang J L. Detection of *Thielaviopsis basicola* in soil with real-time quantitative PCR. Acta Phytopathologica Sinica, 2010, 40(2): 210-213.
- [16] Li F L, Li X Z, Min F X, Han F, Wei Q, Feng Y Z, Guo M. Application of real-time quantitative PCR on detection of fungal plant disease. Journal of Northeast Agricultural University, 2010, 41(4): 151-155.
- [17] Shishido M, Yoshida N, Usami T, Shinozaki T, Kobayashi M, Takeuchi T. Black root rot of cucurbits caused by *Phomopsis sclerotoides* in Japan and phylogenetic grouping of the pathogen. Journal of General Plant Pathology, 2006, 72(4): 220-227.
- [18] Nishimura N. Selective media for *Fusarium oxysporum*. Journal of General Plant Pathology, 2007, 73(5): 342-348.
- [19] Muyzer G, de Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695-700.
- [20] Okubo A, Sugiyama S I. Comparison of molecular fingerprinting methods for analysis of soil microbial community structure. Ecological Research, 2009, 24(6): 1399-1405.

- [21] Yang X M, Chen L H, Yong X Y, Shen Q R. Formulations can affect rhizosphere colonization and biocontrol efficiency of *Trichoderma harzianum* SQR-T037 against fusarium wilt of cucumbers. *Biology and Fertility of Soils*, 2011, 47(3): 239-248.
- [22] Chen Y, Dai C C, Wang X X, Zhang B, Ju Q. Effects of endophytic fungus (*phomopsis* sp.) on decomposition of plant (*Atractylodes lancea* (thunb) dc) litters and activity of degrading enzymes in soil. *Acta Pedologica Sinica*, 2010, 47(3): 537-544.

参考文献:

- [2] 霍晓非, 李凤忱. 无机化学肥料和农药对土壤微生物的影响初探. *微生物学杂志*, 2008, 28(2): 101-103.
- [3] 赵国芳. 化学农药对环境的影响及其新型农药的研究进展. *河北农业科学*, 2010, 14(8): 56-57, 98-98.
- [4] 曾士迈. 品种抗病性持久度的估测(I). *植物病理学报*, 1996, 26(3): 193-203.
- [5] 张丽萍, 黄亚丽, 程辉彩, 张根伟, 董超, 田连生, 李书生. 复合生物制剂防治西瓜连作病害的研究. *中国土壤与肥料*, 2006, (5): 59-61.
- [6] 黄亚丽, 张丽萍, 李书生, 张根伟, 程辉彩, 田连生. 绿色木霉菌剂对花生重茬病害的防治效果研究. *现代农药*, 2006, 5(6): 35-37, 39-39.
- [7] 杜黎黎, 马鸿艳, 王学征, 栾非时. 内生细菌 Mg15 对西瓜枯萎病菌的拮抗作用. *中国蔬菜*, 2010, (8): 56-60.
- [8] 戴传超, 余伯阳, 王新风, 蒋继宏, 史央. 驱杀菜青虫的内生菌鉴定与化合物研究. *安徽农业科学*, 2006, 34(4): 694-697.
- [10] 肖逸, 王兴祥, 王宏伟, 刘付燕, 戴传超. 施加角担子菌 B6 对连作西瓜土壤微环境和西瓜生长的影响. *生态学报*, 2012, 32(4): 1185-1192.
- [15] 康振辉, 黄俊丽. 土壤中烟草根黑腐病菌的实时定量 PCR 检测技术研究. *植物病理学报*, 2010, 40(2): 210-213.
- [16] 李凤兰, 李学湛, 闵凡祥, 韩峰, 魏琪, 冯艳忠, 郭梅. 实时定量 PCR 在植物真菌病原体定量检测中的应用. *东北农业大学学报*, 2010, 41(4): 151-155.
- [22] 陈晏, 戴传超, 王兴祥, 张波, 鞠群. 施加内生真菌拟茎点霉 (*Phomopsis* sp.) 对茅苍术凋落物降解及土壤降解酶活性的影响. *土壤学报*, 2010, 47(3): 537-544.

ACTA ECOLOGICA SINICA Vol.32 ,No.15 August ,2012(Semimonthly)

CONTENTS

Effects of grazing on litter decomposition in two alpine meadow on the eastern Qinghai-Tibet Plateau	4605
Distribution pattern and their influencing factors of invasive alien plants in Beijing	4618
Simulation of CO ₂ and H ₂ O fluxes over temperate mixed forest and sensitivity analysis of layered methods: stomatal conductance-photosynthesis-energy balance coupled model	4630
Analysis on the responses of flood storage capacity of Dongting Lake to the changes of landscape patterns in Dongting Lake area	4641
Integrated water risk assessment in Daliao River estuary area	4651
Discussion on the standardized method of reference sites selection for establishing the Benthic-Index of Biotic Integrity	4661
Genetic diversity analysis of different age of a Dalian population of the Manila clam <i>Ruditapes philippinarum</i> by EST-SSR	4673
Geostatistical analysis of spatial heterogeneity of yellowfin tuna (<i>Thunnus albacares</i>) purse seine catch in the western Indian Ocean	4682
Seasonal differences in habitat selection of the Crocodile lizard (<i>Shinisaurus crocodilurus</i>) in Luokeng Nature Reserve, Guangdong	4691
Soil physical and chemical properties in forest succession process in Xinglong Mountain of Gansu	4700
Dynamics of soil organic carbon and total nitrogen contents in short-rotation triploid <i>Populus tomentosa</i> plantations	4714
Grazing effects on eco-stoichiometry of plant and soil in Hulunbeir, Inner Mongolia	4722
Effect of elevated ultraviolet-B (UV-B) radiation on CH ₄ emission in herbicide resistant transgenic rice from a paddy soil	4731
NMR spectroscopy based metabolomic analysis of <i>Thellungiella salsuginea</i> under salt stress	4737
Screening and identification of associative nitrogen fixation bacteria in rhizosphere of sugarcane in Guangxi	4745
Effects of different rice-crab production modes on soil labile organic carbon and enzyme activities	4753
The characteristics of soil microbial communities at burned forest sites for the Great Xingan Mountains	4762
Changes of soil faunal communities during the restoration progress of <i>Abies faxoniana</i> Forests in Northwestern Sichuan	4772
The effects of the endophytic fungus <i>Ceratobasidium stevensii</i> B6 on <i>Fusarium oxysporum</i> in a continuously cropped watermelon field	4784
Population ecology of <i>Aulacoseira granulata</i> in Xijiang River	4793
Evaluation of ecosystem sustainability for large-scale constructed wetlands	4803
MIS3b vegetation and climate changes based on pollen and charcoal on Qianxi Plateau	4811
The effects of stemflow on the formation of "Fertile Island" and "Salt Island" for <i>Haloxylon ammodendron</i> Bge	4819
Accumulation and translocation of dry matter and nutrients of wheat rotated with legumes and its relation to grain yield in a dryland area	4827
Occurrence characteristics of <i>akashiwo sanguinea</i> bloom caused by land source rainwater	4836
Analysis on landscape pattern change and its driving forces of Yancheng National Natural Reserve	4844
Resource potential assessment of urban roof greening and development strategies: a case study in Futian central district, Shenzhen, China	4852
Analysis of the dynamic coupling processes and trend of regional eco-economic system development in the Yellow River Delta	4861
The diversity parameters of butterfly for ecological function divisions in Chongqing	4869
Review and Monograph	
Responses of soil respiration to different environment factors in semi-arid and arid areas	4890
Temperature sensitivity of soil respiration: uncertainties of global warming positive or negative feedback	4902
The primary factors controlling methane uptake from forest soils and their responses to increased atmospheric nitrogen deposition: a review	4914
The research progresses on biological oxidation and removal of nitrogen in lakes	4924
Scientific Note	
Cutting effects on growth and wastewater purification of <i>Cyperus alternifolius</i> in constructed wetland	4932

《生态学报》2012 年征订启事

《生态学报》是中国生态学学会主办的自然科学高级学术期刊,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,280 页,国内定价 70 元/册,全年定价 1680 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 15 期 (2012 年 8 月)

ACTA ECOLOGICA SINICA
(Semimonthly, Started in 1981)
Vol. 32 No. 15 (August, 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:100071	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