

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/stxb201201100053

胡春锦, 林丽, 史国英, 汪茜, 王钱崧, 李杨瑞. 广西甘蔗根际高效联合固氮菌的筛选及鉴定. 生态学报, 2012, 32(15): 4745-4752.

Hu C J, Lin L, Shi G Y, Wang Q, Wang Q S, Li Y R. Screening and identification of associative nitrogen fixation bacteria in rhizosphere of sugarcane in Guangxi. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(15): 4745-4752.

广西甘蔗根际高效联合固氮菌的筛选及鉴定

胡春锦¹, 林 丽³, 史国英¹, 汪茜¹, 王钱崧⁴, 李杨瑞^{2,3,4,*}

(1. 广西农业科学院微生物研究所, 南宁 530007; 2. 广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 南宁 530007;

3. 中国农业科学院甘蔗研究中心, 南宁 530007; 4. 广西大学, 南宁 530005)

摘要:对广西主要甘蔗产区的根际联合固氮细菌进行了收集和评价, 拟筛选获得对甘蔗具有潜在促生性能的联合固氮菌, 为甘蔗生产节肥减耗提供依据。结合 *nifH* 基因扩增和固氮酶活性分析方法筛选获得 36 个固氮细菌菌株; 进一步对所获得固氮菌株的固氮能力、溶磷性、分泌植物生长素 IAA 的特性等促进植物生长潜能进行评价, 获得了 5 个同时具有较强固氮能力、降解无机磷和分泌植物生长激素 IAA 的功能菌株; 通过 Biolog 鉴定系统和 16S rRNA 序列分析对 5 个具有较好应用潜力的固氮菌进行分类鉴定。结果表明这 5 个菌株分别属于 *Klebsiella* sp.、*Bacillus megaterium*、*Pseudomonas* sp.、*Pantoea* sp. 和 *Burkholderia* sp.。本研究结果表明广西甘蔗根际联合固氮菌具有较大的开发利用潜力。

关键词:甘蔗; 联合固氮菌; 筛选; 鉴定

Screening and identification of associative nitrogen fixation bacteria in rhizosphere of sugarcane in Guangxi

HU Chunjin¹, LIN Li³, SHI Guoying¹, WANG Qian¹, WANG Qiansong⁴, LI Yangrui^{2,3,4,*}

1 Microbiology Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China

2 Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Laboratory, Nanning 530007, China

3 Sugarcane Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China

4 Guangxi University, Nanning 530005, China

Abstract: Sugarcane is one of the most important crops for sugar and energy production, and the Guangxi region is the major sugarcane and sugar producing area in China, producing about 60% of China's sugarcane and sugar. Nitrogen fertilizer input for sugarcane production in China is very high. It is essential to reduce nitrogen fertilizer input and thus cultivation cost while achieving a high yield for sustainable and environmentally friendly sugarcane production. Research on biological nitrogen fixation has increased significantly because of its potential importance to the economy and the environment. Sugarcane plants can obtain nitrogen from biological nitrogen fixation via diazotrophs, and ¹⁵N isotope assays have demonstrated that some Brazilian sugarcane varieties are able to obtain considerable nitrogen from biological nitrogen fixation. The aim of this work was to screen and identify nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of sugarcane cultivated in the diverse geographical region of Guangxi, investigate their diversity and predominant affiliation, and to demonstrate their potential for associative nitrogen fixation with sugarcane as well as plant growth promotion. One hundred and forty eight bacterial isolates associated with sugarcane were isolated from 20 soil samples collected from 10 major production areas over the Guangxi region using Ashby nitrogen deficient minimal media. Thirty six of these isolates were found to have N₂ fixing ability as demonstrated by the acetylene reduction assay. All 36 isolates also yielded a polymerase chain reaction product

基金项目:国家自然科学基金项目(31171504, 31101122); 广西自然科学基金项目(2011GXNSFF018002)

收稿日期:2012-01-10; **修订日期:**2012-05-29

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: liyr@gxaas.net

with primers targeting the *nifH* gene, which encodes a key enzyme in the nitrogen fixation process. Further screening and selection indicated that five efficient isolates (GX0703, GX0798, GX07104, GX08125, and GX0797) were obtained which possessed multiple plant growth promoting traits such as higher N_2 fixing, phosphate solubilization and IAA production, and all of the isolates with these attributes may well be valuable for agriculture. To demonstrate their potential for associative nitrogen fixation with sugarcane and growth promotion activities, the five isolates were inoculated into micropropagated sugarcane seedlings, and the seedlings were then incubated in a growth cabinet for 50 d at 28°C. The results indicated that all five isolates significantly promoted the growth of the micropropagated sugarcane seedlings. They also increased the dry weight and nitrogen contents by 29.15 to 57.61% and 29.35 to 45.04%, respectively, compared with the uninoculated controls. Based on phenotypic tests, biologi microplate tests and 16S rRNA gene sequence analysis, the five efficient isolates, GX0703, GX0798, GX07104, GX08125, and GX0797 were identified as *Klebsiella* sp., *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas* sp., *Pantoea* sp. and *Burkholderia* sp., respectively. These promising associative nitrogen fixation bacteria isolates from the rhizosphere of micropropagated sugarcane showed potential to promote sugarcane production via nitrogen fixation and other plant growth promoting functions. This will improve sugar production efficiency in China and reduce the environmental pollution that results from sugarcane production.

The *nifH* and 16S rDNA sequences of the N fixing bacterial isolates GX0703, GX0798, GX07104, GX08125 and GX0797 were deposited in the GenBank, and the accession numbers were FJ822998, FJ823001, EU938523, FJ822992 and EU938522 for *nifH*, and FJ823041, FJ823003, FJ823047, FJ823045 and FJ823002 for 16S rDNA sequences, respectively.

Key Words: sugarcane; associative nitrogen fixation bacteria; screening; identification

近年来,大量施用化肥造成的肥料浪费及土壤、地下水体污染已引起了世界各国的广泛重视。减少化肥施用、提高氮肥利用率是当前农业生产中需解决的重要问题。利用生物固氮是减少氮肥施用量最为有效的途径,生物固氮资源的研究、开发和利用在我国农业可持续发展中占有重要地位^[1]。联合固氮效率虽不及共生固氮高,但其分布广,受益作物多,因而是一类不可忽视的固氮体系。目前已发现甘蔗、水稻、小麦、玉米、牧草等禾本科植物均可与固氮菌进行联合固氮作用^[2-6]。通常有 1 种以上的固氮菌与同一植物联合,而且随着地域的不同固氮菌的分布和频率有相当大的差别^[7-8]。联合固氮菌除了能为宿主提供氮素以外,还同时具有分泌生长素、溶磷、增强植株抗病性、抗逆境等多方面的促进植物生长的作用^[9-11]。针对长期单一施用化学肥料带来的土壤肥力下降、农产品品质下降和农业环境污染加剧等一系列对农业可持续发展的负面影响,积极发掘和利用联合固氮作用的潜力对农业可持续发展更具特殊的意义。

广西是我国最大的蔗糖生产产区,甘蔗及蔗糖产量占全国 60% 以上。但是,一直以来我国甘蔗生产成本高,缺乏国际竞争力。在甘蔗生产的各项农资投入中,化肥尤其是氮肥所占比重最大,其对甘蔗产量的影响也最为显著。此外,我国甘蔗主产区蔗地 90% 以上为旱坡地,土壤保水、保肥能力差,化肥利用率很低^[12]。因此,充分发挥蔗地生态系统中联合固氮菌的固氮促生潜力,对提高我国甘蔗的生产能力,保护和改善甘蔗的生态环境,促进我国甘蔗产业的可持续发展具有重要的经济和社会意义。本研究旨在分离筛选具有促进植物生长作用的甘蔗根际联合固氮菌,为利用生物固氮在甘蔗生产上实现节肥减耗、加强甘蔗生态系统的良性循环提供科学基础和技术支持。

1 材料和方法

1.1 培养基

本文所用的培养基参考相关文献配制: Ashby 无氮蔗糖培养基^[13]; LB 培养基^[9]; Pikovaskaia' s 培养基^[14]; L-色氨酸生长培养基^[15]。

1.2 根际联合固氮菌株的分离

根际土壤联合固氮菌分离:称取附着在甘蔗根上的土 5 g 放入 45 mL 无菌水中,28 ℃ 恒温、180 r/min 振荡 30 min 分散微生物细胞,静置 10 min,即得 10^{-1} 稀释液,用无菌水 10 倍系列稀释,各取 100 μ L 涂在 Ashby 平板上,在 28 ℃ 培养 2—3 d 至长出单菌落。用接种针挑取不同单菌落,在 Ashby 平板上划线纯化 3 次得到单一菌落。将纯化后的单菌落接种于 LB 平板上,4 ℃ 存放,供近期使用;另取纯化的单菌落接种于 LB 液体培养至对数生长期,取一定量的菌液与甘油混合,-80 ℃ 冰箱长期保存。

1.3 细菌分离物的 *nifH* 基因检测

细菌基因组 DNA 的制备:菌株活化以后以 LB 培养基培养 1 d,收集菌体用于 DNA 提取。利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司提供),按产品说明书提取各菌株的基因组 DNA,保存于-20 ℃ 备用。

nifH 基因的扩增采用引物为 PolyF(TGCGAYCCSAARGCBGACTC)和 PolyR(ATSGCCATCATYTCRCCGGA)^[16],PCR 反应体系总体积 20 μ L,分别为 10 $\times$ PCR buffer 2.0 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 0.8 μ L,10 mmol/L dNTP 0.5 μ L,10 μ mol/L PolyF 0.6 μ L,10 μ mol/L PolyR 0.6 μ L,Taq 酶(5 U/ μ L) 0.2 μ L,20 ng/ μ L 模板 1.0 μ L,最后加 ddH₂O 补至 20 μ L。反应程序为:94 ℃ 3 min 预变性,然后进行 94 ℃ 1 min,55 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,30 个循环,最后 72 ℃ 10 min。PCR 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。以固氮葡萄糖醋酸杆菌 *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 菌株^[17]为阳性对照,以大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 菌株为阴性对照。将 *nifH* 扩增产物回收以后克隆到 T 载体上,按宝生物工程(大连)有限公司(简称 TaKaRa)的 pMDTM18-T Vector 克隆试剂盒说明来操作。经 PCR 验证的阳性克隆送上海生工生物工程技术有限公司测序,测序结果在 GenBank 登录和比对分析。

1.4 菌株固氮酶活性及固氮能力的测定

采用乙炔还原乙烯法(ARA)测定固氮酶活性。将在 Ashby 液体培养基中生长 48 h 的菌液,取 1 mL 接种于灭菌的含 10 mL Ashby 液体培养基的 60 mL 磨口小口瓶中,培养 24 h 后从瓶内抽出 5 mL 气体,然后再注入 5 mL 乙炔气体,继续培养 24 h,用气相色谱仪检测固氮酶活性^[18]。

采用微量凯氏定氮法测定菌株的固氮量。菌株活化后在无氮液体培养基上生长,根据菌株的生长量每个菌株取定量菌体加入装有 50 mL 无氮液体培养基的三角瓶中,置于 28 ℃,180 r/min 摇床上培养 7 d,分别以加等量灭活菌体 and 无菌水的培养液作为对照。培养结束后利用微量凯氏定氮法测定各处理的全氮含量。含氮量根据以下公式进行计算^[19]:

$$EA2 = [(V1 - V2) \times 14 \times 1000] V \quad (\text{mg/L})$$

式中, V1 为样品滴定时用去的 0.005 mol/L 标准硫酸溶液毫升数; V2 为空白滴定时用去的 0.005 mol/L 标准硫酸溶液毫升数; 14 为每毫摩尔氮的毫克数; V 为菌株培养液样品毫升数。

1.5 菌株降解无机磷特性的测定

将供试菌株点接种于盛有 Pikovaskaia's 培养基^[14]的培养皿中,每一菌株重复 4 次,置于 28 ℃ 下培养 3 d。观察接种菌株周围有无透明圈形成,测量透明圈直径(D)与菌落直径(d)的大小,根据溶磷圈 D/d 的比值大小判断细菌解磷能力强弱。

1.6 菌株分泌植物生长激素(IAA)的特性

采用 Salkowski 比色法测定菌株分泌植物生长激素(IAA)的性能。将 100 μ L 供试菌株的悬浮液(1×10^7 个/mL)接种到 5 mL 的 L-色氨酸生长培养基中,于 28 ℃ 暗培养 2 d;取 1 mL 菌液于 10000 r/min 离心 5 min,上清液作为待测样。将 1 g/L 的 IAA 母液稀释为 0, 20, 40, 60, 80 和 100 μ g/mL 的 IAA 系列标准样。取标准样和待测样 150 μ L 分别加入 Costar 96 孔板,然后立即在所有加样孔中加入 100 μ L Salkowski's 试剂(0.5 mmol/L FeCl₃, 35% HClO₄),在 30 ℃ 下显色 30 min,观察显色反应结果,用 SpectraMax 分光光度计测定吸光值 OD₅₃₀,根据标准曲线得到各菌株 IAA 的分泌量。

1.7 菌株的分类鉴定

1.7.1 菌株 16S rDNA 的序列分析

PCR 扩增模板的制备与 1.3 相同。

利用细菌 16S 通用引物 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) 和 1492R (GGTTACCTTGTACGACTT) 扩增细菌的 16S rRNA 基因^[20]。PCR 反应体系总体积 20 μL , 分别为 10 $\times$ PCR buffer 2.0 μL , 25 mmol/L MgCl_2 0.8 μL , 10 mmol/L dNTP 0.5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 27F 0.6 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 1492R 0.6 μL , Taq 酶 (5 U/ μL) 0.2 μL , 20 ng/ μL 模板 1.0 μL , 最后加 ddH₂O 补至 20 μL 。反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min 预变性, 然后进行 94 $^{\circ}\text{C}$ 55 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 扩增产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物回收和纯化直接送上海生工生物工程技术有限公司测序, 测序结果在 GenBank 登录和比对分析。

1.7.2 菌株的 Biolog 鉴定

参照文献^[21], 用 Biolog 微生物自动鉴定系统 (美国 Biolog 公司) 进行鉴定: 在 LB 平板活化供试菌株, 挑取单菌落至 BUG 琼脂培养基 (Biolog 微生物鉴定专用培养基) 平板, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16—24 h。用无菌棉签将 BUG 琼脂培养基平板上的菌体悬浮于 0.85% NaCl 溶液, 调节菌悬液 OD₆₀₀ 为 0.2, 取 150 μL 菌液加入 Biolog-GN2 板的 96 孔, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养。分别在 4—6 h 和 16—24 h 用 BIOLOG 微生物自动鉴定仪检测显色反应, 应用 Biolog Microstation 4.20.05 进行数据分析。

1.8 联合固氮菌株对甘蔗组培苗生长的促进作用

供试菌株分别活化后在 LB 液体培养基上培养过夜, 离心收集菌体, 用无菌水悬浮并稀释到每毫升 10^8 — 2×10^8 个细胞。将炼苗后生长一致的甘蔗组培苗移栽到以蛭石为栽培基质的塑料盆中, 每盆种 5 株, 每个处理 4 盆。移栽后每盆浇入上述供试菌株的菌悬液 100 mL, 置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、光周期 14 h 光—10 h 暗光照培养箱培养。10 d 后再以 100 mL 同样浓度的菌悬液灌根接种, 继续在限菌条件下培养。以接种等量同样浓度的巴西甘蔗联合固氮菌模式菌株 *G. diazotrophicus* PAL5 菌株的菌悬液为阳性对照, 空白对照接种等量无菌水。50 d 后对甘蔗组培苗的生长情况进行记录, 收获植株并洗净栽培基质, 冷冻干燥后测定植株的干重及含氮量。

2 结果与分析

2.1 甘蔗根际联合固氮菌的分离筛选

从广西 10 个甘蔗产区收集的 20 份根际土壤和甘蔗根样品中分离获得能在 Ashby 培养基上生长的细菌分离物 148 株。通过 PCR 扩增 *nifH* 基因以及 ARA 分析固氮酶活性, 最终获得具有稳定固氮酶活性同时又能扩增到大小约为 360 bp *nifH* 基因的细菌分离物 36 个, 证明为固氮菌。固氮菌株的 *nifH* 基因扩增结果见图 1; 对部分菌株的 *nifH* 扩增片段进行了克隆测序, 分析结果表明供试菌株的 *nifH* 扩增片段确为 358—342 bp 的 *nifH* 基因序列。部分菌株的 *nifH* 基因序列已在 GenBank 登录, 登录号见表 1。

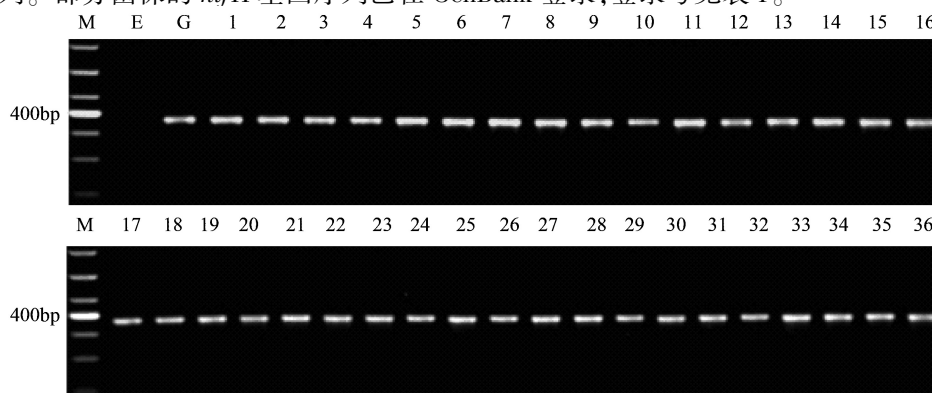


图 1 36 个固氮菌株 *nifH* 基因扩增结果电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis for *nifH* PCR products of 36 nitrogen-fixing isolates

泳道 E 为阴性对照菌株 *E. coli* DH5 α , 泳道 G 为阳性对照菌株 *G. diazotrophicus* PAL5, 泳道 1—36 分别为 36 个甘蔗根际固氮菌株的扩增结果

不同菌株间固氮酶活性存在较大差异(表2)。利用微量凯氏定氮法能测定固氮菌株的固定氮量,部分菌株表现较强的固氮能力,培养7 d 固定氮量达到 50 mg/L 以上,菌株间的固氮能力存在显著差异(表2)。

表 1 部分固氮菌株的分类鉴定结果
Table 1 Identification and Classification of the tested isolates

供试菌株 Isolates	菌株所隶属 Genus affiliation	ni/H 序列登录号 ni/H sequence accession No.	16S rRNA 序列登录号 16S rRNA sequence accession No.
GX0703	<i>Klebsiella</i> sp.	FJ822998	FJ823041
GX0798	<i>Bacillus megaterium</i>	FJ823001	FJ823003
GX07104	<i>Erwinia</i> sp.	EU938523	FJ823047
GX08125	<i>Pantoea</i> sp	FJ822992	FJ823045
GX0797	<i>Burkholderia</i> sp.	EU938522	FJ823002

表 2 部分联合固氮菌株的固氮及植物促生特性测定结果
Table 2 Potential capacity of nitrogen fixation, IAA production and phosphate solubilization of the tested isolates

供试菌株 Isolates	固氮酶活性 Nitrogenase activity /(nmolC ₂ H ₄ ·h ⁻¹ ·mL ⁻¹)	固定氮量 Quantification of nitrogen fixed /(mg/L)	分泌 IAA 能力 IAA production /(μg/mL)	降解无机磷特性 Phosphate solubilization (D/d)
GX0703	1143.39aA	56.2aA	4.63dD	1.52cC
GX0798	421.36dD	39.0cdCD	14.32aA	2.21bB
GX07104	321.85eE	36.4dD	7.34cC	2.82aA
GX08125	817.32bB	51.5bB	12.55bB	1.64cC
GX0797	534.26cC	42.3cC	3.65dD	1.36cC

数据分析由统计软件 DPSv13.01 完成,小写字母表示差异显著($P<0.05$),大写字母表示差异极显著($P<0.01$)

2.2 固氮菌株降解无机磷以及分泌 IAA 的特性

供试 36 株固氮菌中,可在 Pikovaskaia's 平板培养基上形成透明圈的菌株有 22 个,说明这些菌株可分泌一些酸性物质,并向周围的培养基扩散,使菌落周围的磷酸盐[Ca₃(PO₄)₂]溶解,即这些菌株具有溶磷性(图2);部分菌株的溶磷圈直径 D(菌落+透明圈)与菌落直径(d)的比值(D/d)大于 1.5,菌株间的 D/d 值存在显著差异(表2)。

固氮菌株分泌植物生长素(IAA)的显色反应测定结果表明,供试 36 株联合固氮菌中具有分泌 IAA 特性的菌株有 24 株。Salkowski's 比色法测定结果显示不同菌株间分泌 IAA 的能力有较大差异,部分菌株的测定结果见表2。

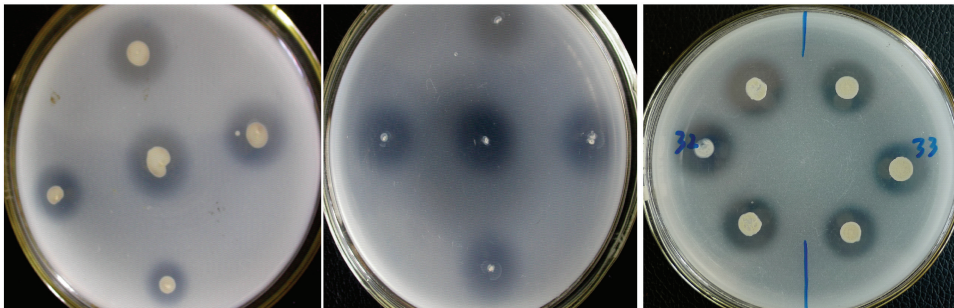


图 2 部分菌株在无机磷培养基上的生长情况
Fig. 2 Phosphate dissolution produced by phosphobacteria on Pikovaskaia's medium

2.3 固氮菌株的分类鉴定

对分离筛选获得具有较好固氮促生潜能的 5 个菌株 GX0703、GX0798、GX07104、GX08125 和 GX0797 进行了 16S RNA 的 PCR 扩增和序列分析,结果表明:所有供试菌株均扩增到约 1500 bp 的片段。直接测序分析

这些菌株分别与 *Klebsiella* sp.、*Bacillus megaterium*、*Erwinia* sp.、*Pantoea* sp. 和 *Burkholderia* sp. 细菌的 16S RNA 最相似。5 个菌株的 16S RNA 序列已在 GenBank 上登录,登录号见表 1。

用 Biolog 微生物鉴定系统检测结果显示:菌株 GX0703 能够利用糊精、淀粉和果糖等 74 种碳源,不能利用木糖醇、D-葡萄糖和 D,L-肉碱等碳源,其碳源代谢谱与 *Klebsiella* sp. 的最相似;菌株 GX0798、GX07104、GX08125 以及 GX0797 的碳源代谢谱则分别与 *Bacillus megaterium*、*Erwinia* sp.、*Pantoea* sp. 和 *Burkholderia* sp. 的最相似,与 16S RNA 序列比对分析结果比较一致。

因此,综合菌株 16 sRNA 序列分析以及 Biolog 微生物鉴定系统检测结果,菌株 GX0703、GX0798、GX07104、GX08125 和 GX0797 在分类上分别属于 *Klebsiella* sp.、*Bacillus megaterium*、*Erwinia* sp.、*Pantoea* sp. 和 *Burkholderia* sp. 细菌。

2.4 固氮菌株促进甘蔗组培苗生长的初步检测

测定了 5 个植物促生潜能较好的菌株 GX0703、GX0798、GX07104、GX08125 和 GX0797 对甘蔗组培苗的接种效应,结果见图 3。相比不接种的对照,所有供试菌株处理均显著提高甘蔗组培苗的干重,在 5% 置信水平有显著性差异,其中 GX08125 与 GX0703 菌株接种处理对植株干重的影响最为显著,接种处理的平均干重分别比无接种空白对照增加了 57.61% 和 54.35%,而阳性对照接种 PAL5 菌株处理的植株平均干重增长率为 29.35%。

接种 PAL5 菌株处理的甘蔗组培苗总氮含量平均增长率为 35.25%,其它 5 个供试菌株接种处理的甘蔗植株总氮含量平均增长率为 29.35%—45.04%,在 5% 置信水平没有显著性差异(图 3)。

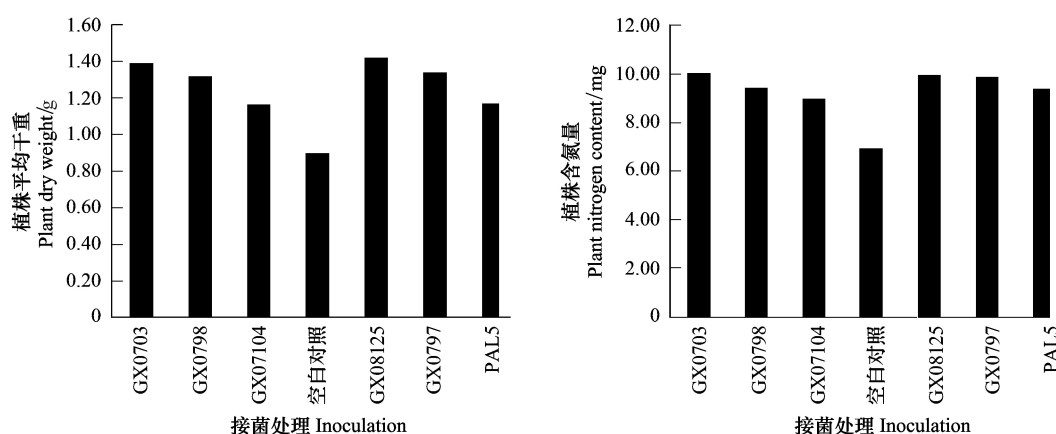


图 3 供试菌株对甘蔗组培苗的接种效应

Fig. 3 Inoculation effects of the tested isolates on micropropagated sugarcane seedlings

3 讨论

广泛开展非豆科植物固氮菌资源调查,建立各种植物的固氮菌联合体系,扩大菌类资源,筛选和培育高效优良菌株等工作是目前联合固氮研究的重点^[22]。联合固氮菌促进植物生长的效应不单是由固氮作用产生的,还可以通过分泌植物生长激素类物质等多种途径促植物生长,同时,联合固氮菌在促进植物的营养吸收及竞争力、增强植物的生物和非生物胁迫抗性、提高其环境适应能力等方面也有着巨大的潜力^[23]。关于甘蔗联合固氮菌的研究国内外已有许多相关报道,巴西甘蔗种植成本低的一个原因是经长期不施氮肥或施少量氮肥的驯化,一些广泛种植甘蔗品种的生长得益于生物固氮而大大减少了对氮肥的需求^[24-27]。本研究从甘蔗根际分离获得的固氮菌大多数都具有固氮、分泌 IAA 和溶磷等多种促植物生长潜能,其中获得 5 株同时具有较强固氮、分泌 IAA 和溶磷能力的菌株,从整体效果来考虑,这些菌株是非常有发展前景的农业微生物资源,有望作为促甘蔗生长细菌应用于我国甘蔗生产中。

虽然自然状况下甘蔗根际存在联合固氮菌株,但是相对于庞大的根际微生物系统来说其种群数量较少,与其他微生物竞争力有限,固氮量甚微^[28]。为此,有必要将来源于甘蔗根际的高效固氮菌株扩大培养,以接

种剂的形式施入根际,提高根际固氮菌种群数量,增强种群竞争力,增加根际微生物固氮总量。本研究获得的固氮菌株大多数生长速度较快,其在土壤中存活定居的可能性大。关于这些菌株对甘蔗生长的实际促生效能、生态安全性以及最佳发酵条件等有待进一步研究。

References:

- [1] Zhang J E, Liu W G. Utilization of microbes resources and sustainable development of agriculture. *Soil and Environmental Sciences*, 2001, 10 (2): 154-157.
- [2] Lü Z X, Li J D, Zhu Z Q. Inoculation, isolation of endophytic diazotrophic bacteria and their colonization in maize root tissue under gnotobiotic condition. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2001, 7(3): 207-212.
- [3] Tian H, Zhang D G, Yao T, Xi Q L. Isolation and characteristics of nitrogen fixation bacteria in rhizosphere of turfgrass. *Grassland of China*, 2005, 27(5): 47-52.
- [4] Boddey R M, Baldani V L D, Baldani J I, Döbereiner J. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field grown wheat. *Plant and Soil*, 1986, 95(1): 109-121.
- [5] Asis C A Jr, Kubota M, Ohta H, Arima Y, Chebotar V K, Tsuchiya K I, Akao S. Isolation and partial characterization of endophytic diazotrophs associated with Japanese sugarcane cultivar. *Soil Science Plant Nutrition*, 2000, 46(3): 759-765.
- [6] Wang H R, Peng G X, Zhang G X, Hou W, Tan Z Y. Characterization of endophytic diazotrophs isolated from molasses grass. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(8): 2566-2571.
- [7] Xu J, Li J D. Associative nitrogen fixation. *Bulletin of Biology*, 1997, 32(6): 16-18.
- [8] Zhao X W, Javed C H, He Y M, Zhang Z Y, Peng G X, Tan Z Y. Diversity of associated nitrogen-fixing bacteria isolated from the pioneer plants-*Vetiver zizanioides*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(11): 1430-1437.
- [9] Xi L Q, Yao T, Yang J J, Han W X, Zhang D G. Property of associative nitrogen-fixing bacteria producing IAA and its promoting growth of oat. *Grassland and Turf*, 2005, (4): 25-29.
- [10] Bertrand H, Plassard C, Pinochet X, Touraine B, Normand P, Cleyet-Marel J C. Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). *Canadian Journal of Microbiology*, 2000, 46(3): 229-236.
- [11] Zhang G X, Mao Q, He Z Y, Tang Z Y. Detection of nitrogenase activity and phosphorus dissolving ability of endophytic isolates from *oryza rufipogon* in Lingshui. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2006, 12(4): 457-460.
- [12] Zhu Q Z, Li Y R. Effect of quantitative application of alcohol wastewater from sugarhouse on the yield of sugarcane. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2007, 35(32): 10375-10377.
- [13] Sen M, Sen S P. Interspecific transformation in *Azotobacter*. *Journal of General Microbiology*, 1965, 41(1): 1-6.
- [14] Yao T. Associative nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of *Avena sativa* in an alpine region II Phosphate-solubilizing power and auxin production. *Acta Prataculturae Sinica*, 2004, 13(3): 85-90.
- [15] Glickmann E, Dessaux Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(2): 793-796.
- [16] Pereira e Silva M C, Semenov A V, van Elsas J D, Salles J F. Seasonal variations in the diversity and abundance of diazotrophic communities across soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 77(1): 57-68.
- [17] Gillis M, Kersters K, Hoste B, et al. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *International Journal Systematic Bacteriology*, 1989, 39(3): 361-364.
- [18] Gui Y Y, Liu X H, Yang R Z, Li Y R. Detection of nitrogenase activities in different parts of sugarcane. *Plant Physiology Communications*, 2007, 43(2): 291-294.
- [19] Li Y Z, Redmann R E, Zhu Y C, Li J D. Nitrogen fixation in *Leymus chinensis* grassland in Northeast China. *Acta Agrestia Sinica*, 2002, 10 (3): 164-166.
- [20] Lane D J. 16S/23S rRNA sequencing//Stackebrandt E, Goodfellow M, eds. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. New York: John Wiley and Sons, 1991: 115-175.
- [21] Dong X Z, Cai M Y. . *Manual of Systematic Determination of Common Bacteria*. Beijing: Science Press, 2001: 365-365.
- [22] Kang Y J, Cheng J, Mei L J, Yin S X. Screening and identification of plant growth-promoting rhizobacteria. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50 (7): 853-861.
- [23] Bhattacharjee R B, Singh A, Mukhopadhyay S N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 80(2): 199-209.

- [24] Boddey RM, Urquiaga S, Alves BJR, Reis V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane; present knowledge and future applications. *Plant and Soil*, 2003, 252(1): 139-149.
- [25] Baldani JI, Baldani VLD. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants; special emphasis on the Brazilian experience. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 2005, 77(3): 549-579.
- [26] de Carvalho T L G, Ferreira P C G, Hemerly A S. Sugarcane genetic controls involved in the association with beneficial endophytic nitrogen fixing bacteria. *Tropical Plant Biology*, 2011, 4(1): 31-41.
- [27] Fuentes-Ramírez L E, Caballero-Mellado J, Sepúlveda J, Martínez-Romero E. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 29(2): 117-128.
- [28] Chen Q, Gao M, Hu H Y, Xu J, Zhou Y Q, Sun J G. A nitrogen-fixing bacterium *paenibacillus* sp. GD812 antagonistic against plant pathogenic fungi. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(16): 3343-3350.

参考文献:

- [1] 章家恩, 刘文高. 微生物资源的开发利用与农业可持续发展. *土壤与环境*, 2001, 10(2): 154-157.
- [2] 吕泽勋, 李久蒂, 朱至清. 玉米内生固氮菌的回接分离及限菌条件下在玉米根内的定殖. *应用与环境生物学报*, 2001, 7(3): 207-212.
- [3] 田宏, 张德罡, 姚拓, 席琳乔. 禾本科草坪草固氮菌株筛选及部分特性初步研究. *中国草地*, 2005, 27(5): 47-52.
- [6] 王华荣, 彭桂香, 张国霞, 侯伟, 谭志远. 糖蜜草 (*Melinis minutiflora* Beauv.) 内生固氮菌分离鉴定. *生态学报*, 2006, 26(8): 2566-2571.
- [7] 徐继, 李久蒂. 联合固氮. *生物学通报*, 1997, 32(6): 16-18.
- [8] 赵现伟, Javed C H, 何玉梅, 张志英, 彭桂香, 谭志远. 先锋牧草-香根草联合固氮菌多样性. *微生物学报*, 2009, 49(11): 1430-1437.
- [9] 席琳乔, 姚拓, 杨俊基, 韩文星, 张德罡. 联合固氮菌株分泌能力及其对燕麦的促生效应测定. *草原与草坪*, 2005, (4): 25-29.
- [11] 张国霞, 茅庆, 何忠义, 谭志远. 陵水普通野生稻 (*Oryza rufipogon*) 内生菌的固氮及溶磷特性. *应用与环境生物学报*, 2006, 12(4): 457-460.
- [12] 朱秋珍, 李杨瑞. 定量施用糖厂酒精废液对甘蔗增产效果研究. *安徽农业科学*, 2007, 35(32): 10375-10377.
- [14] 姚拓. 高寒地区燕麦根际联合固氮菌研究: II 固氮菌的溶磷性和分泌植物生长素特性测定. *草业学报*, 2004, 13(3): 85-90.
- [18] 桂意云, 刘昔辉, 杨荣仲, 李杨瑞. 甘蔗不同部位的固氮酶活性检测. *植物生理学通讯*, 2007, 43(2): 291-294.
- [19] 李玉中, Redmann R E, 祝廷成, 李建东. 羊草草原豆科牧草生物固氮量研究. *草地学报*, 2002, 10(3): 164-166.
- [21] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 365-365.
- [22] 康贻军, 程洁, 梅丽娟, 殷士学. 植物根际促生菌的筛选及鉴定. *微生物学报*, 2010, 50(7): 853-861.
- [28] 陈倩, 高森, 胡海燕, 徐晶, 周义清, 孙建光. 一株拮抗病原真菌的固氮菌 *Paenibacillus* sp. GD812. *中国农业科学*, 2011, 44(16): 3343-3350.

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	ZHANG Yanbo, LUO Peng, SUN Geng, et al (4605)
Distribution pattern and their influencing factors of invasive alien plants in Beijing	WANG Suming, ZHANG Nan, YU Linqian, et al (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	SHI Tingting, GAO Yufang, YUAN Fenghui, et al (4630)
Analysis on the responses of flood storage capacity of Dongting Lake to the changes of landscape patterns in Dongting Lake area	LIU Na, WANG KeLin, DUAN Yafeng (4641)
Integrated water risk assessment in Daliao River estuary area	YU Ge, CHEN Jing, ZHANG Xueqing, et al (4651)
Discussion on the standardized method of reference sites selection for establishing the Benthic-Index of Biotic Integrity	QU Xiaodong, LIU Zhigang, ZHANG Yuan (4661)
Genetic diversity analysis of different age of a Dalian population of the Manila clam <i>Ruditapes philippinarum</i> by EST-SSR	YU Zhifei, YAN Xiwu, ZHANG Yuehuan, et al (4673)
Geostatistical analysis of spatial heterogeneity of yellowfin tuna (<i>Thunnus albacares</i>) purse seine catch in the western Indian Ocean	YANG Xiaoming, DAI Xiaojie, ZHU Guoping (4682)
Seasonal differences in habitat selection of the Crocodile lizard (<i>Shinisaurus crocodilurus</i>) in Luokeng Nature Reserve, Guangdong	WU Zhengjun, DAI Dongliang, NIN Jiajia, et al (4691)
Soil physical and chemical properties in forest succession process in Xinglong Mountain of Gansu	WEI Qiang, LING Lei, CHAI Chunshan, et al (4700)
Dynamics of soil organic carbon and total nitrogen contents in short-rotation triploid <i>Populus tomentosa</i> plantations	ZHAO Xuemei, SUN Xiangyang, KANG Xiangyang, et al (4714)
Grazing effects on eco-stoichiometry of plant and soil in Hulunbeir, Inner Mongolia	DING Xiaohui, GONG Li, WANG Dongbo, et al (4722)
Effect of elevated ultraviolet-B (UV-B) radiation on CH ₄ emission in herbicide resistant transgenic rice from a paddy soil	LOU Yunsheng, ZHOU Wenlin (4731)
NMR spectroscopy based metabolomic analysis of <i>Thellungiella salsuginea</i> under salt stress	WANG Xinyu, WANG Lihua, YU Ping, et al (4737)
Screening and identification of associative nitrogen fixation bacteria in rhizosphere of sugarcane in Guangxi	HU Chunjin, LIN Li, SHI Guoying, et al (4745)
Effects of different rice-crab production modes on soil labile organic carbon and enzyme activities	AN Hui, LIU Mingda, WANG Yaojing, et al (4753)
The characteristics of soil microbial communities at burned forest sites for the Great Xingan Mountains	BAI Aiqin, FU Bojie, QU Laiye, et al (4762)
Changes of soil faunal communities during the restoration progress of <i>Abies faxoniana</i> Forests in Northwestern Sichuan	CUI Liwei, LIU Shirong, LIU Xingliang, et al (4772)
The effects of the endophytic fungus <i>Ceratobasidium stevensii</i> B6 on <i>Fusarium oxysporum</i> in a continuously cropped watermelon field	XIAO Yi, DAI Chuanchao, WANG Xingxiang, et al (4784)
Population ecology of <i>Aulacoseira granulata</i> in Xijiang River	WANG Chao, LAI Zini, LI Yuefei, et al (4793)
Evaluation of ecosystem sustainability for large-scale constructed wetlands	ZHANG Yiran, WANG Renqing, ZHANG Jian, et al (4803)
MIS3b vegetation and climate changes based on pollen and charcoal on Qianxi Plateau	ZHAO Zengyou, YUAN Daoxian, SHI Shengqiang, et al (4811)
The effects of stemflow on the formation of "Fertile Island" and "Salt Island" for <i>Haloxylon ammodendron</i> Bge	LI Congjuan, LEI Jiaqiang, XU Xinwen, et al (4819)
Accumulation and translocation of dry matter and nutrients of wheat rotated with legumes and its relation to grain yield in a dryland area	YANG Ning, ZHAO Hubing, WANG Zhaohui, et al (4827)
Occurrence characteristics of <i>akashiwo sanguinea</i> bloom caused by land source rainwater	LIU Yihao, SONG Xiukai, JIN Yang, et al (4836)
Analysis on landscape pattern change and its driving forces of Yancheng National Natural Reserve	WANG Yanfang, SHEN Yongming (4844)
Resource potential assessment of urban roof greening and development strategies: a case study in Futian central district, Shenzhen, China	SHAO Tianran, LI Chaosu, ZENG Hui (4852)
Analysis of the dynamic coupling processes and trend of regional eco-economic system development in the Yellow River Delta	WANG Jieyong, WU Jianzhai (4861)
The diversity parameters of butterfly for ecological function divisions in Chongqing	LI Aimin, DENG Heli, MA Qi (4869)
Review and Monograph	
Responses of soil respiration to different environment factors in semi-arid and arid areas	WANG Xinyuan, LI Yulin, ZHAO Xueyong, et al (4890)
Temperature sensitivity of soil respiration: uncertainties of global warming positive or negative feedback	LUAN Junwei, LIU Shirong (4902)
The primary factors controlling methane uptake from forest soils and their responses to increased atmospheric nitrogen deposition: a review	CHENG Shulan, FANG Huajun, YU Guirui, et al (4914)
The research progresses on biological oxidation and removal of nitrogen in lakes	FAN Junnan, ZHAO Jianwei, ZHU Duanwei (4924)
Scientific Note	
Cutting effects on growth and wastewater purification of <i>Cyperus alternifolius</i> in constructed wetland	LÜ Gaiyun, HE Huaidong, YANG Danjing, et al (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: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