

ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

生态学报

Acta Ecologica Sinica



第34卷 第10期 Vol.34 No.10 **2014**

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 34 卷 第 10 期 2014 年 5 月 (半月刊)

目 次

前沿理论与学科综述

- 景观可持续性与景观可持续性科学..... 赵文武,房学宁 (2453)
- 生态系统服务付费的诊断框架及案例剖析 朱文博,王 阳,李双成 (2460)
- 湿地植物根表铁膜研究进展..... 刘春英,陈春丽,弓晓峰,等 (2470)
- 水生生态环境中捕食信息素的生态学效应..... 覃光球,卢豪良,唐振柱,等 (2481)
- 脊椎动物传播植物肉质果中的次生物质及其生态作用 潘 扬,罗 芳,鲁长虎 (2490)

个体与基础生态

- 中亚热带天然林土壤 CH_4 吸收速率对模拟 N 沉降的响应 陈朝琪,杨智杰,刘小飞,等 (2498)
- 塔里木盆地南缘早生芦苇生态特征与水盐因子关系..... 贡 璐,朱美玲,塔西甫拉提·特依拜,等 (2509)
- 黄刺玫叶片光合生理参数的土壤水分阈值响应及其生产力分级..... 张淑勇,夏江宝,张光灿,等 (2519)
- 亚热带杉木和米老排人工林土壤呼吸对凋落物去除和交换的响应..... 余再鹏,万晓华,胡振宏,等 (2529)
- 施钾提高蚜害诱导的小麦茉莉酸含量和叶片相关防御酶活性..... 王 伟,张月玲,苏建伟,等 (2539)
- 高浓度 O_3 及太阳辐射减弱对冬小麦 PS II 光合活性及光能耗散的影响 孙 健,郑有飞,吴荣军,等 (2548)
- 蜡样芽孢杆菌 B3-7 在大田小麦根部的定殖动态及其对小麦纹枯病的防治效果 黄秋斌,张 颖,刘凤英,等 (2559)
- 有限供水下冬小麦全程耗水特征定量研究..... 张兴娟,薛绪掌,郭文忠,等 (2567)
- 抗真菌转基因水稻生态适合度评价..... 李 伟,郭建夫,袁红旭,等 (2581)
- 花生叶片蛋白组对 UV-B 辐射增强的响应 杜照奎,李钧敏,钟章成,等 (2589)
- 南海南部悬浮颗粒物脂肪酸组成..... 刘华雪,柯常亮,李纯厚,等 (2599)
- 年龄、集群、生境及天气对鄱阳湖白鹤越冬期日间行为模式的影响..... 袁芳凯,李言阔,李凤山,等 (2608)
- [树]麻雀羽再生的能量预算和水代谢散热调节 杨志宏,吴庆明,杨 渺,等 (2617)
- 低剂量杀虫剂对星豹蛛捕食效应的影响及其机理 李 锐,李 娜,刘 佳,等 (2629)
- 空心莲子草叶甲对越冬保护的响应与控害效能..... 刘雨芳,王秀秀,李 菲,等 (2638)

种群、群落和生态系统

- 气候变化对鄱阳湖白鹤越冬种群数量变化的影响..... 李言阔,钱法文,单继红,等 (2645)
- 不同退耕年限下菜子湖湿地土壤磷素组分特征变化..... 刘文静,张平究,董国政,等 (2654)

查干湖湿地浮游植物与环境因子关系的多元分析	李然然,章光新,张 蕾 (2663)
闽江河口区淡水和半咸水潮汐沼泽湿地土壤产甲烷菌多样性.....	曾志华,杨民和,余晨兴,等 (2674)
环境及遗传背景对延河流域植物叶片和细根功能性状变异的影响.....	郑 颖,温仲明,宋 光,等 (2682)
衡阳紫色土丘陵坡地植被恢复阶段土壤特性的演变.....	杨 宁,邹冬生,杨满元,等 (2693)
海平面上升影响下广西钦州湾红树林脆弱性评价.....	李莎莎,孟宪伟,葛振鸣,等 (2702)
中国南方 3 种主要人工林生物量和生产力的动态变化.....	杜 虎,曾馥平,王克林,等 (2712)
杉木人工林土壤真菌遗传多样性.....	何苑擘,周国英,王圣洁,等 (2725)
科尔沁固定沙地植被特征对降雨变化的响应.....	张腊梅,刘新平,赵学勇,等 (2737)
黄土丘陵区退耕还林地刺槐人工林碳储量及分配规律.....	申家朋,张文辉 (2746)
景观、区域和全球生态	
南亚热带森林演替过程中小气候的改变及对气候变化的响应.....	刘效东,周国逸,陈修治,等 (2755)
黄淮海平原典型站点冬小麦生育阶段的干旱特征及气候趋势的影响.....	徐建文,居 辉,刘 勤,等 (2765)
资源与产业生态	
基于 GIS 的山西省矿产资源规划环境影响评价	刘 伟,杜培军,李永峰 (2775)
基于效益分摊的水电水足迹计算方法——以密云水库为例	赵丹丹,刘俊国,赵 旭 (2787)
学术信息与动态	
全球土地计划第二次开放科学大会 (GLP 2 nd Open Science Meeting) 会议述评	段宝玲,卜玉山 (2796)
期刊基本参数:CN 11-2031/Q * 1981 * m * 16 * 348 * zh * P * ¥ 90.00 * 1510 * 36 * 2014-05	



封面图说: 鄱阳湖越冬的白鹤群——白鹤为国家一级保护动物,世界上白鹤东部种群的迁徙路线是从俄罗斯西伯利亚的雅库特,向南迁飞 5100km 到中国长江下游的鄱阳湖越冬,其中途经俄罗斯的雅纳河、印迪吉尔卡河和科雷马河流域,进入中国后主要停歇地有扎龙、林甸、莫莫格以及双台河口、滦河口、黄河三角洲和升金湖等地。多年的监测表明,世界 90% 以上的白鹤种群都在鄱阳湖越冬。越冬初期和末期是白鹤补充能量的关键阶段,因此,研究鄱阳湖国家级自然保护区越冬白鹤种群数量和当地气候变化的相关性具有重要意义。

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

DOI: 10.5846/stxb201307221929

黄秋斌, 张颖, 刘凤英, 王森, 王刚. 蜡样芽孢杆菌 B3-7 在大田小麦根部的定殖动态及其对小麦纹枯病的防治效果. 生态学报, 2014, 34(10): 2559-2566.

Huang Q B, Zhang Y, Liu F Y, Wang M, Wang G. Colonization dynamics of *Bacillus cereus* B3-7 on wheat roots and control efficiency against sharp eyespot of wheat. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(10): 2559-2566.

蜡样芽孢杆菌 B3-7 在大田小麦根部的定殖动态 及其对小麦纹枯病的防治效果

黄秋斌¹, 张颖¹, 刘凤英¹, 王森¹, 王刚^{1,2,3,*}

(1. 河南大学生命科学学院, 开封 475004; 2. 棉花生物学国家重点实验室, 开封 475004;

3. 河南大学生物工程研究所, 开封 475004)

摘要:为了阐明蜡样芽孢杆菌 B3-7 在大田条件下的生态适应性以及对于小麦纹枯病的生防效果, 通过利用绿色荧光蛋白编码基因 *gfp* 标记生防菌株 B3-7, 室内比较了 GFP 标记菌株和原始出发菌株在菌落形态、生长特性、生物薄膜产生以及在小麦根部定殖等方面的特性, 结果发现 GFP 标记菌株和出发菌株在上述特性方面无明显差别。在此基础上, 大田条件下测定了 GFP 标记菌株在小麦根部的定殖动态和对于小麦纹枯病的生防效果。结果发现, GFP 标记菌株在小麦根部能够长期定殖, 其存在量在小麦分蘖期最大, 每克根重达到 10^5 CFU, 拔节期后, 该细菌数量一直维持在 10^4 CFU 之上。同时发现, 生防菌株能够有效降低小麦纹枯病的严重度和提高罹病小麦的产量。小麦分蘖期、孕穗期和灌浆期生防菌对于小麦纹枯病的防治效果分别达到 60%、34%、34%, 小麦成熟后产量提高 13%—15%。结果表明, B3-7 在大田条件下具有较好的生态适应性和防治小麦纹枯病的能力。
关键词:定殖; 生物防治; 小麦纹枯病; 蜡样芽孢杆菌

Colonization dynamics of *Bacillus cereus* B3-7 on wheat roots and control efficiency against sharp eyespot of wheat

HUANG Qiubin¹, ZHANG Ying¹, LIU Fengying¹, WANG Miao¹, WANG Gang^{1,2,3,*}

1 College of life sciences, Henan University, Kaifeng 475004, China

2 State Key Laboratory of Cotton Biology, Henan University, Kaifeng 475004, China

3 Institute of Bioengineering, Henan University, Kaifeng 475004, China

Abstract: Sharp eyespot of wheat is caused by the fungus *Rhizoctonia cerealis* and is an important soil-borne disease of wheat worldwide. At present, no commercially cultivated disease resistant varieties are available to efficiently protect wheat against infection by this pathogen. Control of the plant disease sharp eyespot currently relies on application of pesticides such as Triadimefon and Validamycin; however, pesticides are expensive and pose serious health and environmental hazards. Persistent application of pesticides can cause selection of pesticide resistant pathogenic fungi. Biological control is an environmentally sound and effective means of reducing or mitigating plant diseases and the effects of plant pathogens through the use of natural microorganisms. In the rhizosphere (on the plant root or in close vicinity to the root) bacteria are abundant, most often organized in microcolonies. Bacteria in the rhizosphere, known as rhizobacteria, not only benefit from the nutrients secreted by the plant root but also beneficially influence the plant in a direct or indirect way, resulting in stimulation of plant growth. Among the beneficial microorganisms isolated from the rhizosphere, *Bacillus* spp. offer several

基金项目: 国家自然科学基金 (30771435, 30971952, 31200069); 棉花生物学国家重点实验室开放课题 (CB2013A27)

收稿日期: 2013-07-22; 修订日期: 2014-03-27

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: wangg@henu.edu.cn

advantages over fluorescent pseudomonads and other Gram-negative bacteria as seed inoculants for protection against root pathogens. *Bacillus* spp. have a long shelf life because of their ability to form endospores and their unique mechanisms of action as they can produce broad-spectrum antibiotics and compete for ecological niches against plant pathogenic fungi.

Bacillus cereus B3-7, a biological control strain isolated from the wheat rhizosphere, shows potential for control of sharp eyespot and for efficient yield increase in wheat. To elucidate the ecological adaptability of B3-7 and its efficacy for biological control of sharp eyespot of wheat under field conditions, the green fluorescent protein (*gfp*) gene was inserted into the B3-7 genome and a GFP-tagged B3-7 strain was constructed. Colony shape, growth rate, biofilm formation and colonization dynamics on wheat roots were analyzed with B3-7 and the GFP-tagged strain in our laboratory. No significant differences were obtained for any of the characteristics tested between the two strains. Colonization ability of the B3-7 GFP-tagged strain on wheat roots was assessed under field conditions. The results indicated that the GFP-tagged strains could persistently colonize the roots of wheat. The number of colonizing bacteria was highest during the tillering period at 10^5 CFU/g roots. The colonization number decreased to 10^4 CFU/g roots in the heading period, and persisted through the milking period. Efficacy of B3-7 and the GFP-tagged strain as biological control agents against sharp eyespot of wheat was also evaluated under field conditions. The results revealed that the two strains could reduce disease severity and effectively increase the yield of wheat. The disease control efficacy of the two strains for sharp eyespot of wheat reached 60% to 62%, 34% to 39%, and 34% to 38% during the tillering, heading, and milking periods, respectively. The yield of wheat treated with the biological control strain increased 13% to 15% compared with that of the untreated control. The results indicated that *Bacillus cereus* B3-7 has the capacity for environmental adaptability and the potential to act as a biological control agent against sharp eyespot of wheat under field conditions.

Key Words: colonization; biological control; sharp eyespot of wheat; green fluorescent protein

小麦纹枯病 (sharp eyespot of wheat) 是由植物病原真菌禾谷丝核菌 (*Rhizoctonia cerealis*) 侵染引起一种分布广泛、危害严重的土壤传播病害。病菌以菌丝或菌核在土壤和病残体上越冬或越夏。播种后开始侵染为害^[1]。在田间发病过程可分 5 个阶段即冬前发病期、越冬期、横向扩展期、严重度增长期及枯白穗发生期。一般使小麦减产 10%—20%, 严重地块减产 50% 左右, 个别地块甚至绝收。由于目前尚缺乏高抗小麦纹枯病的小麦品种, 生产上对于该病的防治主要通过施用化学农药如井冈霉素和粉锈宁等方法, 不仅提高了小麦生产成本, 而且容易导致抗药性菌株的出现, 进一步降低化学药剂的防治效果^[2]。因此, 寻找一种有效的小麦纹枯病防治方法成为小麦生产上的当务之急。

植物根际细菌 (rhizobacteria) 作为一类存在于植物根际, 对于植物生长发育具有重要作用的一类微生物^[3]。大量的研究表明, 根际细菌中存在包括荧光假单胞菌、枯草芽孢杆菌、和蜡样芽孢杆菌等多种能够控制植物病害发生的细菌类型^[4-5]。不同的微生物可以通过产生抗菌物质、生态位与营养竞争以

及诱导植物产生抗性等多种机制发挥作用^[6-7]。利用根际细菌防治植物病害, 对于替代或者减少化学农药的使用, 促进农业的可持续发展具有重要价值。植物病害生物防治的本质是植物、病原菌以及生防微生物之间的相互作用, 通过三者的互作, 减少病原菌对于植物的危害。因此, 利用根际微生物防治植物病害的前提是这些微生物能够在植物根部有效定殖并具有较好的环境适应性。研究生防细菌的环境适应性和在植物根部的定殖能力, 有助于认识生防细菌的作用机制, 提高生防细菌的防治效果。蜡样芽孢杆菌 B3-7 菌株是作者前期研究过程中从健康小麦根际分离得到的 1 株生防菌株^[8-9]。该菌株能够产生多种抗菌物质, 可以在固体基质表面产生大量的有助于其存在的生物膜 (biofilm), 在温室测定中能够在小麦根部稳定定殖且对于小麦纹枯病和小麦全蚀病具有较好的生防效果。该生防菌株在大田条件下是否能够在小麦根部长期待定殖以及是否对于病害具有防治效果, 有待于进一步研究。因此, 本研究通过利用绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 标记菌株, 利用标记菌株测定了其在大田小区

中在小麦根部的定殖和对小麦纹枯病的生物防治。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试菌株、质粒和培养条件

本研究供试植物病原真菌、生防细菌及其衍生菌株和质粒的特征及来源见表 1。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和生防细菌蜡样芽孢杆菌

(*Bacillus cereus*) 常规培养采用 LB 培养基,生物薄膜测定采用 Standard succinate medium (SSM) 培养基^[6]。试验用抗生素浓度为氨苄青霉素 (Ampicillin, Amp) 100 μg/mL、红霉素 (Erythromycin, Erm) 10 μg/mL、利福平 (Rifampin, Rfp) 100 μg/mL。凝胶回收试剂盒、内切酶、T₄ DNA 连接酶, Taq 酶等均购自 Fermentas 公司。

表 1 本研究使用的细菌、真菌和质粒
Table 1 Bacterial, fungal strains and plasmids used in this study

菌株和质粒 Strain and plasmid	相关性状 Relevant characteristics	来源 Source
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i> GM2163	甲基化酶缺陷菌株,具有链霉素抗性。	Fermentas 公司
蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i> B3-7 B3-7 (Δ <i>amy</i> :: <i>gfp</i>)	小麦纹枯病生防菌株,具有利福平抗性。 <i>amy</i> 基因缺失菌株,具有绿色荧光蛋白编码基因	本实验室保存 本研究
禾谷丝核菌 <i>Rhizoctonia cerealis</i>	小麦纹枯病致病菌	本实验室保存
质粒 Plasmid pMAD pAD123 pMAD-Δ <i>amY</i>	含有温度敏感复制子的穿梭载体。 不含 <i>gfp</i> 基因启动子的穿梭载体 <i>gfp</i> 插入到 <i>amy</i> 基因的 pMAD 质粒	[10] [11] 本研究

1.1.2 农田土壤条件和小麦品种

选用的农田为河南省夏邑县太平村的麦田,种植制度为多年小麦-玉米轮作,土壤呈弱碱性 (pH, 7.7),有机质 7—9 g/kg,全氮含量 0.7—0.85g/kg,全磷含量 0.5—0.6g/kg,全钾含量 19.8—20.2g/kg,速效磷 2 mg/kg,速效钾,137 mg/kg。小麦品种为当地大面积种植的矮抗 58。

1.2 生防菌株 B3-7 绿色荧光蛋白 (GFP) 标记菌株的构建

根据 B3-7 菌株 α-淀粉酶编码基因 *amY* 的核苷酸序列设计设计引物,上游的一对引物分别是 *amY*-up-S (CCCAGGATCCTTTAAAAAGAATAACAATAGTC, 划线部分为 *BamH* I 位点) 和 *amY*-up-A (CCAA AAGCTTCAAAATCAAGATCCGCATACA,划线部分为 *Hind* III 位点),下游的一对引物分别是 *amY*-down-S (CCCAAAGCTTTGCGAATGAAATGAAAAAATG,划线部分为 *Hind* III 位点) 和 *amY*-down-A (CAAA GTCGACCTGCTGAACATATATGGAAC,划线部分为 *Sal* I 位点)。利用引物 *amY*-up-S 和 *amY*-up-A 扩增

出 *amY* 基因上游片段,利用 *amY*-down-S 和 *amY*-down-A 扩增出 *amY* 基因下游片段,然后用内切酶 *Hind* III 分别酶切后,与同样用 *Hind* III 酶切质粒 pAD123 得到的绿色荧光蛋白编码基因 *gfp* 片段等浓度混合,经 T4 连接酶连接后,用 *amY*-up-S 和 *amY*-down-A 扩增出插入 *gfp* 基因的 *amY* 基因片段,将此片段用 *BamH* I 和 *Sal* I 双酶切后,插入到穿梭载体 pMAD 的对应位点内,构建 *amY* 基因的敲除载体 pMAD-Δ*amY*,将此敲除载体转化进入生防菌 B3-7 的电击转化感受态细胞,根据 Maryvonne 等^[9] 的方法获得产淀粉酶缺陷并在蓝光照射下发出绿色荧光的突变株。

1.3 生防菌株 B3-7 及其 GFP 标记突变株生物学性状比较

1.3.1 菌落形态和群体生长特性比较

分别将野生型 B3-7 及其 GFP 标记突变株接种于液体 LB 培养基中,于 30 ℃ 振荡 (200 r/min) 培养 24 h 后,离心收集细菌,加入新鲜的 LB 液体培养基中,调整浓度 *OD*₆₀₀ = 0.1,用移液器分别取 2 μL 点接

到 LB 平板上,于 30℃ 培养箱中培养 5 d,观察 B3-7 及其 GFP 标记突变株菌落形态是否存在差别。同时,分别取 $OD_{600} = 0.1$ 的菌液 300 μ L 加入深孔培养板中,然后将培养板至全自动生长曲线分析仪 (Bioscreen C),进行生长曲线测定(参数设置为:振荡温度,30℃;振荡时间,57 h;测定时间间隔,1 h;测定吸光度 $OD_{(530-580)}$),比较 B3-7 及其 GFP 标记突变株群体生长曲线是否存在差别。

1.3.2 生物薄膜形成能力比较

分别挑取野生型 B3-7 菌株及其 GFP 标记菌株,接种于液体 LB 培养基中,30℃、200 r/min 的摇床中培养至对数期,用 LB 培养基分别稀释菌液至 $OD_{600} = 0.1$,取 20 μ L 菌液加入到含有 2 mL 培养基的玻璃管中(直径 $D = 0.8$ cm),轻轻混匀后于 22℃ 静止培养 5 d,观察不同菌株在玻璃管内壁生物薄膜的形成情况。之后,轻轻吸去每个管中的菌液(注意不要触碰管壁),向玻璃管中加入 1.5 mL 的蒸馏水,轻轻晃动,再用枪头将蒸馏水吸出,反复清洗 3 次,去除管底菌体,加入 2.5 mL 0.1% (w/v) 的结晶紫溶液,室温染色 20 min,吸去染色液,加入蒸馏水轻轻冲洗 3 次,直到水变为无色。加入 2.5 mL 10% SDS,反复晃动试管溶解生物薄膜,用 10% SDS 稀释 5 倍,吸取 2.5 mL 至比色皿中,以 2.5 mL 10% SDS 作为对照,测定 OD_{590} 的光吸收值。每个处理设置 8 个重复,试验重复 3 次。

1.3.3 室内条件下测定 B3-7 及其 GFP 标记菌株在小麦根部的定殖状况

利用 LB 液体培养基培养 B3-7 及其 GFP 标记菌株,离心去除上清后,加入 1% 的羧甲基纤维素钠(carboxymethyl cellulose, CMC),调整浓度至 $OD_{600} = 1.5$,将已经催芽的小麦种子(品种为中国春)浸入菌液中 1 h,播种至盛有无菌土的一次性塑料杯中,每个杯子中央播种 3 粒种子。将各个处理随机放入 22℃ 培养室内培养,待小麦出苗后,每隔 5 d 取样,轻轻抖掉麦苗所带的泥土并剪去地上部,分别称重后将根放入定量的 0.1% Tween-20 溶液中,剧烈振荡 3 min 后梯度稀释并涂布含有利福平的 LB 平板,30℃ 培养 24 h 后,统计平板菌落数,同时,在蓝光下观察 GFP 标记菌株的荧光菌落并计数,计算单位根重含有的菌落数(CFU/g 根)。每个处理设置 15 个重复,试验重复 3 次。

1.4 GFP 标记菌株在大田小麦根部的定殖情况及其对小麦纹枯病的防治效果

利用上年小麦纹枯病严重发病的麦田,从中选取 15 m×12 m(长×宽)的区域设置试验小区,共设 9 个试验小区(纵横各 3 个小区)。每个小区为 6 m² (3m×2m,长×宽),小区与小区之间间隔 2 m,用于保护行,小区的外侧设置 1 m 的距离用作保护行。试验设置 B3-7、GFP 标记菌株和阴性对照 3 个处理,每个处理设置 3 个重复,即每个小区为 1 个重复。播种时间为 10 月上旬,播种前,利用 LB 液体培养基培养细菌,经离心后,将细菌悬浮于 1% CMC 溶液中,调整细菌浓度约至 10⁹ CFU/mL,将麦种浸入菌液 1h,捞出麦种晾干后进行播种,播种量为 10 kg/666.7m²。阴性对照和保护行小麦处理时,仅在不含有细菌的 1% CMC 浸种。小麦出苗后,分别于冬前分蘖期、越冬期、拔节期、孕穗期和灌浆期取样调查。调查小麦发病情况时,每个小区随机调查 100 株小麦,根据 Clarkson 和 Cook^[12] 的方法进行调查,统计病害的严重度。同时计算出不同时期的病害防治效果。

测定生防菌株的定殖数量时,从 GFP 标记菌株处理的小区五点取样(3 个小区共 15 个取样点)。每个取样点取 20 株小麦,轻轻地连根挖出小麦植株,带土分别放入无菌牛皮纸袋中带回实验室,根据 1.3.3 所述的方法统计小麦根部 GFP 菌株的数量。为了证实分离出的荧光菌株就是接种的 GFP 标记菌株,从分离得到的荧光菌落中随机挑取部分菌落,利用根据 B3-7 基因组序列设计的两对特异引物进行进行菌落 PCR,根据扩增结果判断分离菌落的正确性。

2 结果与分析

2.1 生防菌 B3-7 绿色荧光蛋白标记菌株的构建

为了测定 B3-7 菌株在大田小麦根系的定殖动态,需要构建能够区分土著微生物的标记菌株。为此,将绿色荧光蛋白(GFP)的编码基因 *gfp* 插入到生防菌的基因组中。利用 PCR 对 α -淀粉酶编码基因 *amY* 阅读框内的上游和下游片段进行,成功扩增出上游 711 bp 的片段和下游 840bp 片段,经过序列测定正确后,分别利用 *Hind* III 酶切上述两个片段,然后与同样用 *Hind* III 酶切的 *gfp* 基因及其启动子片段混合,经 T₄ 连接酶连接后扩增出 2.5 kb 的片段,将

此片段插入穿梭载体 pMAD 中,构建成功 *amY* 基因敲除载体 pMAD- ΔamY (图 1)。在此基础上,将敲除载体 pMAD- ΔamY 转化进入 B3-7 菌株,通过热处理和蓝白斑筛选等一系列步骤,获得基因双交换白色

菌落,该菌落在蓝光下发绿色荧光,经过多次传代后菌落的荧光特性不发生改变,表明 GFP 标记菌株构建成功(图 1)。

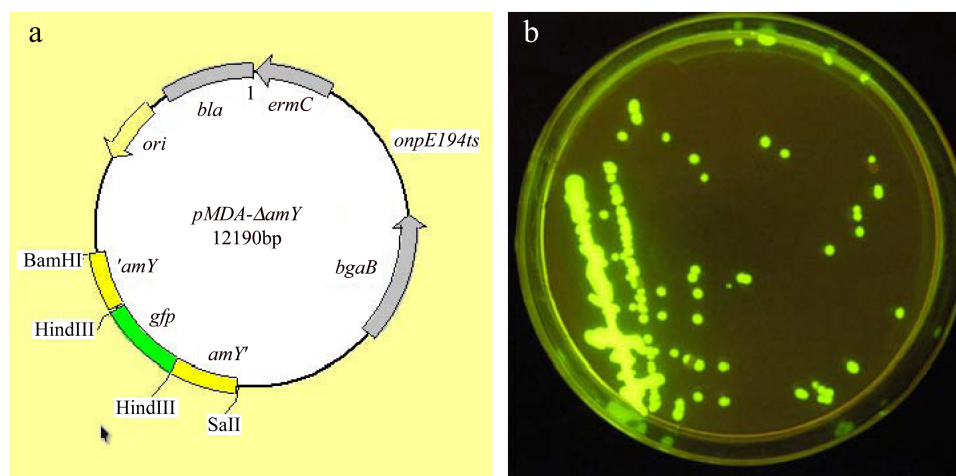


图 1 生防细菌 B3-7 绿色荧光蛋白(GFP)标记突变菌株的构建

Fig.1 Construction of green fluorescence protein (GFP) tagging mutant of biocontrol strain B3-7

a: 基因敲除载体图谱;绿色荧光蛋白编码基因 *gfp* 插入到 α -淀粉酶编码基因 *amY* 之间 Map of gene knockout vector with green fluorescence protein encoding gene *gfp* insertion within alpha-amylase encoding gene *amY*; b: GFP 标记菌株 GFP tagging strains

2.2 生防菌株 B3-7 及其 GFP 标记突变株生物学性状比较

2.2.1 菌落形态和群体生长状态比较

通过测定生防菌株 B3-7 及其 GFP 标记菌株在 LB 培养基平板上菌落形态,发现两者之只是菌落颜色方面存在差别,GFP 标记菌株呈现淡绿色,而野生型 B3-7 菌株为乳白色。只有由于标记菌株 GFP 表达的结果,其它形态特征如生长速度、菌落形态和菌落大小等方面没有明显差别。通过测定上述两个菌

株在 LB 液体培养基内的群体生长,发现二者不存在差别,在生长过程中表现出相同的迟缓期,对数生长期和稳定期(图 2)。上述结果表明 GFP 标记不影响该细菌在固体基质和液体基质内的生长。

2.2.2 生防菌 B3-7 及其 GFP 标记菌株的生物膜形成能力

采用定性和定量测定相结合的方法测定了 B3-7 及其 GFP 标记衍生菌株在固体基质表面(试管内壁)形成生物膜的能力,结果发现两者没有明显差异(图 3)。生物膜作为自然状态下微生物存在的方式,微生物通过形成生物膜附着在固体基质表面,提高对于环境胁迫的抗性,上述两个菌株在生物膜形成方面不存在差异,表明 GFP 标记菌株可能与其野生型具有相似的定殖能力。

2.2.3 室内条件下生防菌 B3-7 及其 GFP 标记菌株在小麦根部的定殖能力

室内限菌条件下测定了生防菌 B3-7 及其 GFP 标记菌株在小麦根部的定殖能力,结果发现二者均能高效地在小麦根部定殖。在测定的 30 d 内,随着时间的延长,定殖数量总体呈现下降趋势,但是保持在每克根重 10^5 菌落形成单位(CFU)之上。测定的两个菌株之间无显著差异,表明 GFP 标记后至少在

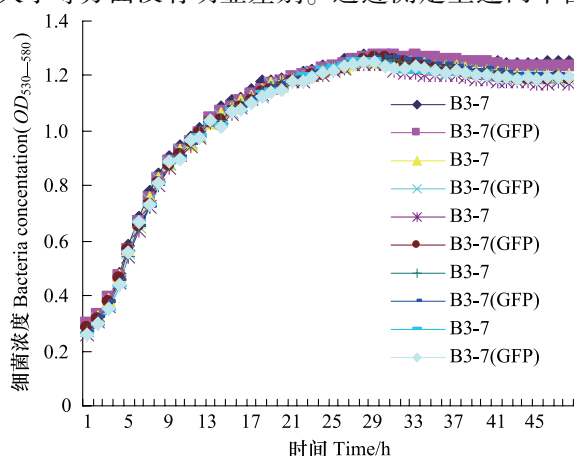


图 2 生防细菌 B3-7 及其 GFP 标记突变株的群体生长曲线

Fig.2 Growth curves of biocontrol bacteria B3-7 and its GFP tagging mutant

室内条件下不影响生防菌的定殖。综合上述 GFP 标记菌株的菌落形态、群体生长、生物膜形成以及在小

麦根部的定殖动态测定结果,认为 GFP 标记不影响菌株的生物学特性。

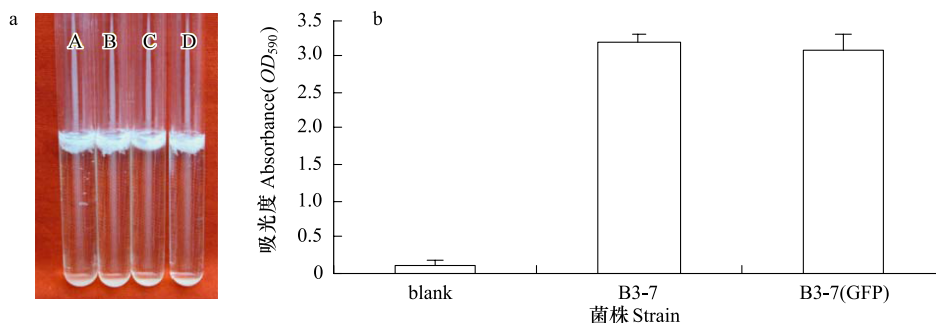


图3 生防细菌 B3-7 及其 GFP 标记突变株的生物薄膜形成

Fig 3 biofilm formation of biocontrol strain B3-7 and its GFP tagging mutants

a: 菌株在试管内壁形成的生物薄膜; A, B 为 B3-7 菌株, C, D 为 B3-7(GFP) 菌株 Biofilm formation on inner wall of glass tubes: A, B strains of B3-7, C, D strains of B3-7(GFP); b: 生物薄膜的定量测定 Quantitative measure for biofilm formation

2.3 GFP 标记菌株在大田小麦根部的定殖动态

在室内测定生防菌 B3-7 菌株的 GFP 标记突变体基本生物学特性的基础上,于 2002—2003 年测定了该标记菌株在大田小区条件下在小麦根系的定殖能力和对小麦纹枯病的生物防治效果。结果发现,小麦的整个生育期均能在小麦根部分离出发绿色荧光的菌株,利用 PCR 方法对发光菌株进行特异性扩增,证明其为施用的 GFP 标记菌株(图 4)。GFP 标记菌株在小麦根部的定殖数量呈现明显的规律性,

即冬前分蘖期最多,每克根重的细菌数量达到 10^5 CFU,之后随着温度的降低,小麦进入越冬期,分离出的 GFP 菌株数量达到最低,仅为 10^2 CFU,越冬后小麦进入拔节期时,细菌数量虽然有所增加,但是与越冬期没有明显的差别。之后,随着温度的进一步升高,小麦进入抽穗期和灌浆期,分离出的 GFP 标记细菌迅速增加,到灌浆期时单位根重(g)的细菌数量达到 10^4 CFU(图 5)。

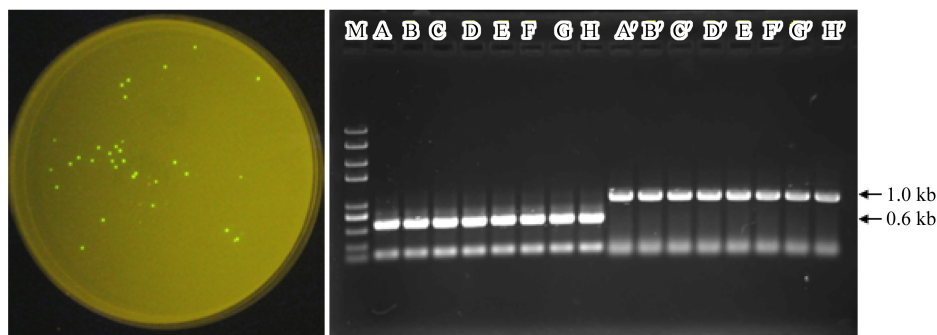


图4 大田小麦根部分离获得的 GFP 标记菌株及其 PCR 鉴定

Fig.4 PCR identification to GFP tagging strains isolated from roots of wheat grown in field

a: 绿色荧光菌落 Green fluorescent colonies; b: 绿色荧光菌落的 PCR 鉴定,泳道 A 和 A', B3-7 的 GFP 标记菌株扩增出的 2 个特征片段; Identification to green fluorescent colonies by PCR: Lanes A and A' refer to two specific fragments amplified with GFP tagging mutant of strain B3-7; 泳道 B—H 和 B'—H', PCR 鉴定随机挑选的 7 个的荧光菌落 Lanes B to H and B' to H' refer to two specific fragments amplified with 7 strains chosen randomized

2.4 GFP 标记菌株对大田小麦纹枯病的防治效果

分别于小麦冬前分蘖期、拔节期、孕穗期和灌浆期调查大田不同小区施用生防菌 B3-7 及其 GFP 标记菌株后小麦纹枯病的发病率和严重度,结果发现,与不施用任何菌株的对照相比,施用 B3-7 及其 GFP

标记菌株后小麦纹枯病的发病率没有差别。病害的严重度除了在拔节期差别不明显外,在分蘖期、孕穗期和灌浆期差异显著。B3-7 及其 GFP 标记菌株在分蘖期、孕穗期和灌浆期对于小麦纹枯病的防治效果分别为 60%—62%、34%—39%和 34%—38%,两

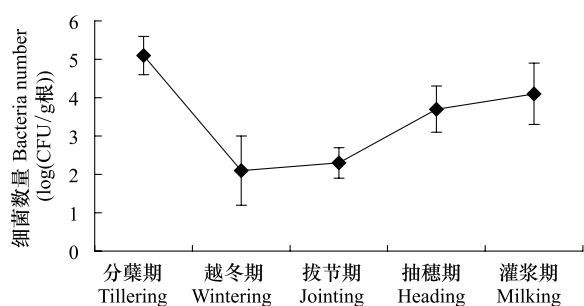


图5 GFP 标记菌株在不同生育期小麦根部的定殖动态

Fig.5 Colonization dynamic of GFP tagging strain on roots of different growth stages wheat

个菌株之间防病效果无明显差异。病田通过施用生防菌能够提高产量,B3-7 菌株及其 GFP 标记菌株能够提高产量 13%—15%(表 2)。

上述结果表明,GFP 标记后不改变生防菌 B3-7 对于小麦纹枯病的防病效果,B3-7 通过降低病害的严重程度,增加小麦的产量,具有一定的应用前景。

3 讨论

植物在生长过程中,通过其根系向周围环境中分泌大量的有机物,营造了适于微生物生长繁殖的

表 2 生防菌对于小麦纹枯病的防治效果

Table 2 Control efficacy to sharp eyespot of wheat by biocontrol bacteria

处理 Treatment	严重度 Severity				产量 Yield/(kg/6m ²)
	分蘖期 Tillering period	拔节期 Jointing stage	抽穗期 Heading period	灌浆期 Milking period	
B3-7	7.9 a	12.3 a	15.2 a	20.6 a	4.05±0.22
B3-7(GFP)	7.5 a	13.1 a	16.7 a	19.5 a	4.11±0.41
对照 Control	19.8 b	14.2 a	25.2 b	31.4 a	3.56±0.20

数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),产量为 3 个试验小区产量的平均数±标准差

环境,导致大量微生物存活于植物根部。其中某些根部细菌一方面利用根系分泌物获取营养,另一方面通过其本身的代谢活动促进植物生长,这些细菌被称为根际促生细菌(plant growth-promoting rhizobacteria,PGPR)。有研究表明,PGPR 可以通过多种机制促进植物生长。这些机制主要包括:1)促生作用,某些种类的 PGPR 能够通过生物固氮、产生植物激素和解磷解钾等方式促进植物生长^[6];2)抑制有害生物对于植物的危害,PGPR 可以通过产生抗菌物质或者利用生态位和营养竞争作用减少包括植物病原真菌在内的有害生物对于植物的危害,间接促进植物生长^[13];3)诱导植物产生对于逆境胁迫的抗性,有些 PGPR 本身的细胞成分或者细胞分泌物能够激发植物产生抗性,提高植物的对于逆境胁迫的抗性^[14]。利用 PGPR 防治植物病害,尤其是土壤传播病害对于替代化学农药的使用、减少抗药性病原菌的产生、减少病害造成的损失和改善作物品质具有重要价值。国内外已有多种利用 PGPR 开发的生物农药实现商业化应用^[15]。

自然状况下,植物根际是一个复杂的生态环境,不仅存在温度、湿度等环境因子的变化,而且不同微生物之间存在营养和生态位竞争。PGPR 生防菌株

发挥作用的前提是能够在植物根际长期定殖并形成数量优势,这就需要生防菌株具有良好的生态适应性。芽孢杆菌作为一类在自然界中广泛存在的微生物类型,其可以分泌多种胞外水解酶和抗菌物质,有助于在竞争中获得优势^[16]。尤其重要的是,芽孢杆菌可以在逆境胁迫下产生特殊的休眠结构芽孢,有助于该类细菌在低温、高温和干旱等逆境条件下环境中长期存在,待条件适宜时,芽孢萌发并快速分裂形成大量个体,形成优势种群,促进其生防作用的发挥。本研究利用的 B3-7 菌株是一株蜡样芽孢杆菌,前期研究中发现室内对于小麦纹枯病和小麦全蚀病具有较好的生防效果。该菌株已经授权国家发明专利。为了进一步解析该菌株在大田中的作用效果,本研究利用广泛使用的标记蛋白 GFP 对其进行标记。通过比较标记菌株与 B3-7 的生物学特性,发现 GFP 标记不改变生防菌的生物学特性和对于小麦纹枯病的生防特性。大田小区实验不仅证明了生防菌株具有较强的适应性,而且证明了生防菌株 B3-7 在大田条件下也对病害具有防治效果,为进一步开发生防制剂奠定了基础。本研究仅仅是单点小区试验,对于 B3-7 在其它不同气候条件下的生态适应性和对病害的防治效果,有待进一步研究。

References:

- [1] Han Y P, Chen X L, He Z T, Wang J R, Yang H F. Progress, problem and prospect of wheat sharp eyespot research. *Journal of Triticeae Crops*, 2001, 21(1): 81-84.
- [2] Wen C Y, Wang K X, Wang M, Wang N, Wu Z. Colonization trends of endophytic bacteria EBS05 in wheat and its control effect on wheat sharp eyespot. *Acta Phytopythologica Sinica*, 2011, 38(6): 481-486.
- [3] Jetyanon K, Fowler W D, Kloepper J W. Broad-spectrum protection against several pathogens by PGPR mixtures under field conditions in Thailand. *Plant Disease*, 2003, 87(11): 1390-1394.
- [4] Raupach G S, Kloepper J W. Biocontrol of cucumber diseases in the field by plant growth-promoting rhizobacteria with and without methyl bromide fumigation. *Plant Disease*, 2000, 84(10): 1073-1075.
- [5] Myoungsu P, Chungwoo K, Jinchul Y, Hyoungseok L, Wansik S, Seunghwan K, Tongmin S. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Research*, 2005, 160(4): 127-133.
- [6] Jos M R, Maria V, Jorge T. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2002, 81(1): 537-547.
- [7] Niranjana R S, Chaluvajuru G, Amruthesh K N, Shetty H S, Reddy M S, Kloepper J W. Induction of growth promotion and resistance against downy mildew on pearl millet (*Pennisetum glaucum*) by rhizobacteria. *Plant Disease*, 2003, 87(4): 380-384.
- [8] Wang G, Liu F Y, Wang M, Peng L. Motility of endophytic bacteria strain B3-7 involved in endophytic colonization of wheat roots and biological control of wheat take-all. *Acta Phytopythologica Sinica*, 2011, 41(5): 526-533.
- [9] Sun Y N. Construction of transposon inserted mutant library with wheat endophytic bacillus and selection of mutants antagonism against *Rhizoctonia cerealis* [D]. Kai Feng: Henan University, 2010.
- [10] Maryvonne A, Arnaud C, Michel D. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(11): 6887-6891.
- [11] Dunn A K, Handelsman J. A vector for promoter trapping in *Bacillus cereus*. *Gene*, 1999, 226(2): 297-305.
- [12] Clarkson J D, Cook R J. Effect of sharp eyespot (*Rhizoctonia cerealis*) on yield loss in winter wheat. *Plant Pathology*, 1983, 32(4): 421-428.
- [13] Handelsman J, Stabb E V. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The Plant Cell*, 1996, 8(10): 1855-1869.
- [14] Dutta S, Mishra A K, Kumar B S. Induction of systemic resistance against fusarial wilt in pigeon pea through interaction of plant growth promoting rhizobacteria and rhizobia. *Soil Biology & Biochemistry*, 2008, 40(2): 452-461.
- [15] Borneman J, Becker J O. Identifying microorganisms involved in specific pathogen suppression in soil. *Annual Review of Phytopathology*, 2007, 45: 153-172.
- [16] Viviana Y, Houda Z, Inmaculada V, Rosario T, Josep U, Antonio V, Alejandro P, Neus T. Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. *European Journal of Plant Pathology*, 2012, 132(11): 609-619.

参考文献:

- [1] 韩月澎, 秀兰, 何震天, 王锦荣, 杨鹤峰. 小麦纹枯病研究现状, 问题与展望. *麦类作物学报*, 2001, 21(1): 81-84
- [2] 文才艺, 王凯旋, 汪敏, 王努, 武哲. 内生细菌 EBS05 在小麦体内的定殖动态及其对小麦纹枯病的防治作用. *植物保护学报*, 2011, 38(6): 481-486.
- [8] 王刚, 刘凤英, 王淼, 彭玲. 内生细菌 B3-7 的运动性参与其在小麦根系的内生定殖和对小麦全蚀病的生物防治. *植物病理学报*, 2011, 41(5): 526-533.
- [9] 孙勇娜. 小麦内生芽孢杆菌插入突变体库的构建及其对禾谷丝核菌拮抗能力变异突变体的筛选 [D]. 开封: 河南大学, 2010.

ACTA ECOLOGICA SINICA Vol.34, No.10 May, 2014 (Semimonthly)

CONTENTS

Frontiers and Comprehensive Review

- Landscape sustainability and landscape sustainability science ZHAO Wenwu, FANG Xuening (2453)
- A diagnostic framework of payments for ecosystem services and associated case studies
..... ZHU Wenbo, WANG Yang, LI Shuangcheng (2460)
- Progress in research of iron plaque on root surface of wetland plants
..... LIU Chunying, CHEN Chunli, GONG Xiaofeng, et al (2470)
- Ecological effects of predator chemical cues in aquatic ecosystem QIN Guangqiu, LU Haoliang, TANG Zhenzhu, et al (2481)
- Secondary substances and their ecological effects on seed dispersal in vertebrate-dispersed fleshy fruit plants
..... PAN Yang, LUO Fang, LU Changhu (2490)

Autecology & Fundamentals

- Responses of CH₄ uptake rates to simulated N deposition in a nature forest in mid-subtropical China
..... CHEN Chaoqi, YANG Zhijie, LIU Xiaofei, et al (2498)
- Ecological characteristics of *Phragmites australis* and their relationship to water-salt indicators in dry habitats of the southern
marginal zones of the Tarim Basin, China GONG Lu, ZHU Meiling, TASHPOLAT · Tiyp, et al (2509)
- Threshold effect of soil moisture on photosynthetic and physiological parameters in *Rosa xanthina* L. and its photosynthetic
productivity classification ZHANG Shuyong, XIANG Jiangbao, ZHANG Guangcan, et al (2519)
- Contrasting responses of soil respiration to litter manipulation in subtropical *Mytilaria laosensis* and *Cunninghamia lanceolata*
plantations YU Zaipeng, WAN Xiaohua, HU Zhenhong, et al (2529)
- Potassium application for increased jasmonic acid content and defense enzyme activities of wheat leaves infested by aphids
..... WANG Yi, ZHANG Yueling, SU Janwei, et al (2539)
- Combined effects of elevated O₃ concentration and reduced solar irradiance on photosynthetic activity and energy dissipation
of winter wheat SUN Jian, ZHENG Youfei, et al (2548)
- Colonization dynamics of *Bacillus cereus* B3-7 on wheat roots and control efficiency against sharp eyespot of wheat
..... HUANG Qiubin, ZHANG Ying, LIU Fengying, et al (2559)
- Quantitative study of water consumption characteristics of winter wheat under deficit irrigation
..... ZHANG Xingjuan, XUE Xuzhang, GUO Wenzhong, et al (2567)
- Assessment on the ecological fitness of anti-fungal transgenic rice LI Wei, GUO Jianfu, YUAN Hongxu, et al (2581)
- A proteomic analysis of *Arachis hypogaea* leaf in responses to enhanced ultraviolet-B radiation
..... DU Zhaokui, LI Junmin, ZHONG Zhangcheng, et al (2589)
- Composition of fatty acids from suspended particulate matter in southern South China Sea
..... LIU Huaxue, KE Changliang, LI Chunhou, et al (2599)
- The influence of age, flock size, habitat, and weather on the time budget and the daily rhythm of wintering Siberian Cranes
in Poyang Lake YUAN Fangkai, LI Yankuo, LI Fengshan, et al (2608)
- The energy budget and water metabolism heat regulation of tree sparrows *Passer montanus* of toba compensatory regeneration
..... YANG Zhihong, WU Qingming, YANG Miao, et al (2617)
- The effect of low-dose of pesticide on predation of spider and its preliminary mechanisms LI Rui, LI Na, LIU Jia, et al (2629)
- Response of the alligator weed flea beetle, *Agasicles hygrophila* (Coleoptera: Chrysomelidae) to overwintering protection and
its controlling effect on alligator weed *Alternanthera philoxeroides* (Amaranthaceae: Alternanthera)
..... LIU Yufang, WANG Xiuxiu, LI Fei, et al (2638)

Population, Community and Ecosystem

- The effect of climate change on the population fluctuation of the Siberian crane in Poyang Lake LI Yankuo, QIAN Fawen, SHAN Jihong, et al (2645)
- Characteristics of soil phosphorus fractions in wetlands with various restoration age in caizi lake, Anhui Province LIU Wenjing, ZHANG Pingjiu, DONG Guozheng, et al (2654)
- Multivariate analysis of the relations between phytoplankton assemblages and environmental factors in Chagan Lake Wetland LI Ranran, ZHANG Guangxin, ZHANG Lei (2663)
- Diversity of methanogen communities in tidal freshwater and brackish marsh soil in the Min River estuary ZENG Zhihua, YANG Minhe, SHE Chenxing, et al (2674)
- The influence of environment and phylogenic background on variation in leaf and fine root traits in the Yanhe River catchment, Shaanxi, China ZHENG Ying, WEN Zhongming, SONG Guang, et al (2682)
- Changes of soil properties in re-vegetation stages on sloping-land with purple soils in hengyang of Hunan Province, South-central China YANG Ning, ZOU Dongsheng, YANG Manyuan, et al (2693)
- Vulnerability assessment on the mangrove ecosystems in qinzhou bay under sea level rise LI Shasha, MENG Xianwei, GE Zhenming, et al (2702)
- Dynamics of biomass and productivity of three major plantation types in southern China DU Hu, ZENG Fuping, WANG Kelin, et al (2712)
- Fungal diversity in *Cunninghamia lanceolata* plantation soil HE Yuanhao, ZHOU Guoying, WANG Shenjie, et al (2725)
- Response of sandy vegetation characteristics to precipitation change in Horqin Sandy Land ZHANG Lamei, LIU Xinping, ZHAO Xueyong, et al (2737)
- Characteristics of carbon storage and sequestration of *Robinia pseudoacacia* forest land converted by farmland in the Hilly Loess Plateau Region SHEN Jiapeng, ZHANG Wenhui (2746)

Landscape, Regional and Global Ecology

- Forest microclimate change along with the succession and response to climate change in south subtropical region LIU Xiaodong, ZHOU Guoyi, CHEN Xiuzhi, et al (2755)
- Drought variations of winter wheat in different growth stages and effects of climate trend in Huang-Huai-Hai Plain, China XU Jianwen, JU Hui, LIU Qin, et al (2765)

Resource and Industrial Ecology

- A method of environment assessment of mineral resources planning for shanxi provinces base on GIS LIU Wei, DU Peijun, LI Yongfeng (2775)
- A new approach to assess the water footprint of hydropower: a case study of the Miyun reservoir in China ZHAO Dandan, LIU Junguo, ZHAO Xu (2787)

《生态学报》2014 年征订启事

《生态学报》是由中国科学技术协会主管,中国生态学学会、中国科学院生态环境研究中心主办的生态学高级专业学术期刊,创刊于 1981 年,报道生态学领域前沿理论和原始创新性研究成果。坚持“百花齐放,百家争鸣”的方针,依靠和团结广大生态学科工作者,探索生态学奥秘,为生态学基础理论研究搭建交流平台,促进生态学研究深入发展,为我国培养和造就生态学科人才和知识创新服务、为国民经济建设和发展服务。

《生态学报》主要报道生态学及各分支学科的重要基础理论和应用研究的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;新书评价和学术、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 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

本期责任副主编 祖元刚

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 34 卷 第 10 期 (2014 年 5 月)

ACTA ECOLOGICA SINICA

(Semimonthly, Started in 1981)

Vol. 34 No. 10 (May, 2014)

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	王如松	Editor-in-chief	WANG Rusong
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:100717	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

国内外公开发刊

国内邮发代号 82-7

国外发行代号 M670

定价 90.00 元