臭氧浓度升高对不同品种小麦根际细菌种群的影响*

晏 培[1,2] 王秀娟[1] 孙 健[1] 宋 宇[3] 张惠文[1] 李新宇[1**]

([1]中国科学院沈阳应用生态研究所, 森林与土壤生态国家重点实验室, 沈阳 110164; [2]中国科学院大学, 北京 100049; [3]辽东学院, 辽宁丹东 118003)

摘 要 利用臭氧 FACE (Free-Air Ozone Concentration Enrichment)实验平台, 研究 4 个小麦品种"扬麦 15"、"扬麦 16"、"扬幅麦 2 号"、"烟农 19"根际细菌在拔节期和成熟期对臭氧浓度升高的响应;采用变性梯度凝胶电泳(DGGE)和荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR) 方法,分别对细菌种群结构和数量进行了测定。结果表明:臭氧浓度升高仅显著降低了拔节期"扬幅麦 2 号"小麦品种根际细菌数量, 对成熟期各品种小麦根际细菌数量影响不显著;多样性指数和主成分分析表明,"扬麦 15"和"扬幅麦 2 号"根际细菌多样性和种群结构分别在拔节期和成熟期发生明显变化;臭氧对"扬幅麦 2 号"品种根际细菌种群的影响较持久,可能会产生累积效应。

关键词 臭氧增高; 小麦品种; PCR-DGGE; 荧光定量 PCR

中图分类号 S963 **文献标识码** A **文章编号** 1000-4890(2014)4-1015-06

The effects of elevated O_3 on rhizosphere bacterial communities of different wheat cultivars. YAN Pei[1,2], WANG Xiu-juan[1], SUN Jian[1], SONG Yu[3], ZHANG Hui-wen[1], LI Xin-yu[1**] ([1]*State Key Laboratory of Forest and Soil Ecology, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang* 110164, *China*; [2] *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100049, *China*; [3] *Eastern Liaoning University, Dandong* 118003, *Liaoning, China*). *Chinese Journal of Ecology*, 2014, **33**(4): 1015-1020.

Abstract: Based on a Free-Air Ozone Concentration Enrichment facility, we studied the responses of bacterial communities in the rhizosphere of four wheat cultivars-Yangmai 15, Yangmai 16, Yangfumai 2, Yannong 19 (Y15, Y16, Y2, Y19) to elevated O_3 at jointing and ripening stages. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and real-time quantitative PCR were conducted to reveal community structure and abundance of rhizosphere soil bacteria. The results showed that the elevation of O_3 concentration significantly reduced the rhizosphere bacterial abundance of cultivar Y2 at the jointing stage, but had no significant effects on the rhizosphere bacterial abundance of four wheat cultivars at the ripening stage. Diversity index and principal component analyses indicated that the rhizosphere bacterial diversities and community structures of wheat cultivars Y15 and Y2 were obviously changed respectively at the jointing and ripening stages under the treatment of elevated O_3 compared with the control. The results suggested that elevated O_3 might have a longer effect on the rhizosphere bacterial community of wheat cultivar Y2 than on the other wheat cultivars, which would cause a cumulative effect.

Key words: elevated ozone; wheat cultivars; PCR-DGGE; real-time quantitative PCR.

自工业革命以来,由于工业生产等人类活动,近地层大气臭氧浓度一直升高,每年以 0.5% ~2.5% 的速率增长,已由无工业时代的 10 nmol · mol^{-1} 发展到现在的 40 ~60 nmol · mol^{-1} (Vingarzan, 2004)。而模型模拟结果显示,到 2030 年全球近 1/4 的国家和地区大气臭氧浓度将超过 60 nmol · mol^{-1},中国南方大部分地区也将受到 60 ~70 nmol · mol^{-1} 的高浓度臭氧胁迫(Fuhrer & Booker, 2003)。

臭氧浓度升高会对植物产生负面影响,改变植物的生理机制,降低植物的光合作用,影响植物的生长,降低多种粮食作物,如小麦、大豆、水稻等的产量

* 国家自然科学基金项目(41071202)资助。

** 通讯作者 E-mail: xyli@iae.ac.cn

收稿日期: 2013-10-20 接受日期: 2014-01-09

(王春乙等,2004;胡莹莹等,2008;Feng & Kobayashi,2009)。近地层大气臭氧浓度升高也会对植物地下部分产生影响,如降低植物向根系的碳输入(Andersen,2003),根/茎(Grantz *et al.*,2006),改变根系分泌物(McCrady & Andersen,2000),进而可能引起土壤微生物数量和结构的变化,但影响的程度因为臭氧实验浓度高低、处理时间、植物种类等因子条件的不同而不同(陈展等,2007;李果梅等,2008;Li *et al.*,2013)。臭氧对生态系统地下部分的影响研究意义重大,不仅因为地下部分直接关系到植物的水分利用、养分吸收以及生态系统的物质循环,更重要的是该影响具有累积效应(Kasurinen *et al.*,2004)。目前国内外开展了较多的关于大气 O_3 增高胁迫下不同作物土壤微生物特征研究(李全胜等,2010;Chen *et al.*,2010;余永昌等,2012)。

土壤中的细菌和真菌大约占土壤微生物总量的90%,是土壤有机质最主要的分解者。它们不仅参与C、N、P、S等物质的循环(Six *et al.*,2006;Van Der Heijden *et al.*,2008;White & Rice,2009),而且还是食物网中的重要部分(Treonis *et al.*,2010;Sánchez-Moreno *et al.*,2011)。本研究采用土壤宏基因组16S rRNA扩增片段变性凝胶梯度电泳(PCR-DGGE,PCR-denaturing gradient gel electrophoresis)和实时定量PCR技术,研究近地层大气臭氧浓度升高对不同品种小麦根际土壤细菌种群结构和数量的影响,以便系统了解近地层大气 O_3 浓度增高对麦田生态系统的影响,为应对臭氧增高胁迫提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 实验设计及样品采集

试验地点位于江苏省江都市臭氧FACE平台(32°35′5″N,119°42′0″E)。平台于2007年3月开始运行,设增高(FACE圈)和当前大气(Ambient圈)2个臭氧浓度处理,每个处理3个重复圈(直径12.5 m的正八边形),6个圈随机排列,间隔>90 m,以避免交叉污染。FACE圈采用反映对流层臭氧浓度实情的日变化熏蒸方式,置于作物灌层上方50~60 cm处的8根放气管道于每天9:00—18:00向圈内释放臭氧,使2012年小麦生长季节FACE圈的臭氧浓度(平均约70 nmol·mol^{-1})始终比Ambient圈(平均约45 nmol·mol^{-1})高50%,其他环境条件与Ambient圈完全一致。每个圈种植4个小麦品种,为扬幅麦2号(Y2)、烟农19(Y9)、扬麦15(Y15)和扬麦16(Y16)。分别在2012年3月(拔节期)和6月(成熟期)采集土壤样品。每次每个试验圈里每个小麦品种随机选取5株小麦,将小麦连根挖出,轻轻抖掉根系外围土,用毛刷轻轻刷粘附在根表面的土壤作为根际土,将5株小麦的根际土壤混合均匀,作为1个样品。所有样品用无菌的封口袋包扎密封,置于冰盒中带回实验室,冷冻干燥后-20 ℃保存。

1.2 实验方法

1.2.1 样品DNA的提取 采用Fast DNA® SPIN Kit For Soil(MP Biomedicals,Santa Ana,CA)试剂盒从0.5 g冻干土中提取土壤基因组DNA,溶于50 μL水中,置于-20 ℃保存。细菌16S rRNA基因片段的拷贝数采用荧光定量PCR进行测定。扩增引物为341F/758R(341F:CCTACGGGAGGCAGCAG,758R:CTACCAGGGTATCTAATCC)(Lee *et al.*,1993)。使用ABI prism 7000型荧光定量PCR仪(Applied Biosystems)和SYBR Green试剂盒(TaKaRa)对细菌16S rRNA片段进行PCR扩增。25 μL反应体系中包括12.5 μL的2×SYBR Premix Ex TaqⅡ(TaKaRa),1 μL前引物和1 μL后引物(10 pmol·μL^{-1}),0.5 μL 50×ROX Reference Dye(TaKaRa),1 μL DNA模板和9 μL水。扩增程序为95 ℃预变性5 min,95 ℃变性10 s,60 ℃退火30 s,72 ℃延伸30 s,共40个循环。

1.2.2 标准曲线的制作 用于16S rRNA基因标准曲线制作的模板为土壤样品克隆子,具体方法如下:将上述试剂盒提取的土壤总DNA,用引物341F/758R按上述反应体系及程序进行扩增,PCR产物经切胶纯化后连接到pMD18-T载体(TaKaRa Bio Inc.,Japan),然后克隆到大肠杆菌JM109(TaKaRa),选取插入目标基因的阳性克隆提取质粒。质粒DNA的浓度用NanoDropND 1000微量核酸蛋白分析仪(NanoDrop Technologies)进行测定。目的基因的拷贝数通过质粒DNA的浓度进行计算。将质粒DNA进行10倍梯度系列稀释,选取5个合适梯度稀释的质粒DNA为模板,每个梯度3个重复,与待测样品一起进行荧光定量PCR,根据质粒DNA拷贝数与Ct值建立标准曲线,根据所得标准曲线计算出样品中的基因拷贝数,并换算成每克干土的基因拷贝数进行分析。

1.2.3 PCR-DGGE 以341 F+GC/518 R(341F+

GC: CgCCCgCCgCgCCCCgCgCCCggCCCgCCgCCCCCg-CCCCCTACGGGAGG CAGCAG; 518 R: ATTAC-CGCGGCTGCTGG)为引物对土壤总 DNA 进行扩增(Muyzer *et al.*,1993)。反应体系为 50 μL,包括 5 μL 的 10×PCR 缓冲液,4 μL dNTP,1 μL 引物(10 pmol·μL^{-1}),0.4 μL Taq DNA 聚合酶(5 U·μL^{-1})(TaKaRa BioInc.,Japan),36.5 μL ddH_2O 和 2 μL 模板,产物用 1% 琼脂糖电泳检测。变性梯度凝胶电泳(DGGE)用 D-Code system (Bio-Rad Laboratories,CA)进行,细菌采用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶,变性梯度为 40% ~70%(100% 变性相当于 7 mol·L^{-1}尿素和 40% 去离子甲酰胺)。PCR 产物上样量为 40 μL,电泳在 60 ℃,1 ×TAE(40 mmol·L^{-1} Tris,20 mmol·L^{-1}冰乙酸,1 mmol·L^{-1} Na_2-EDTA),70 V 电压条件下进行 16 h。电泳后,用 GeneFinder(BIO-V)染料染色 30 min。采用 Bio-Rad 凝胶成像分析系统观察样品的电泳条带并拍照。

1.3　数据处理

细菌拷贝数值先 log 对数转换后再进行分析和作图,数据统计分析用 SPSS 19.0 软件,绘图采用 OriginPro 8 软件。使用 Quentity One(Bio-Rad)软件分析 DGGE 图谱,计算各样品 Shannon 多样性指数($H=-\sum P_i \ln P_i$,其中 $P_i=n_i/N$,n_i为某个带的峰强度,N 为该带所在泳道所有谱带峰强度之和)。根据 DGGE 图谱,在条带出现的地方定义为 1,未出现的地方记为 0,得到 DGGE 胶中条带的数字化矩阵,导入 CANOCO 4.5 进行主成分分析(Principal Component Analysis,PCA)。

2　结果与分析

2.1　细菌数量

采用荧光定量 PCR 技术对不同品种小麦根际细菌数量进行检测,在拔节期细菌 16S rRNA 基因拷贝数 log 值为(10.23±0.031) ~ (10.34±0.06) g^{-1}干土,O_3 浓度升高显著降低了小麦品种 Y2 的根际细菌数量,对其他小麦品种根际细菌数量无显著影响(图 1)。在成熟期,细菌 16S rRNA 基因拷贝数 log 值为(9.78±0.29) ~ (10.86±0.28) g^{-1}干土,4 个品种之间根际细菌数量差异较大,但 O_3 浓度升高对 4 个品种小麦根际细菌数量的影响都不显著(图 1)。小麦根际细菌数量的变化也受小麦生育期的影响,不同品种之间小麦根际细菌数量在拔节期无显著差别,而在成熟期有显著差异($P<0.05$)。

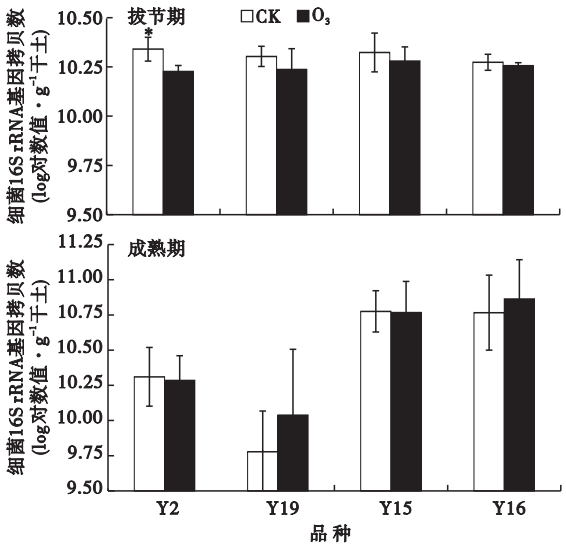


图 1　不同处理下 4 个品种小麦拔节期和成熟期根际细菌数量

Fig. 1　Rhizosphere bacterial abundances of four wheat cultivars under different treatments at jointing and ripening stages

误差线表示标准偏差。* 表示同一小麦品种同一生育期根际土壤细菌数量在 O_3 增高与对照之间的显著性差异($P<0.05$)。

2.2　细菌种群多样性

将细菌 16S rRNA 部分片段进行 PCR-DGGE 分析(图 2)。通过 DGGE 图谱上的条带信息,对各品种小麦根际细菌多样性指数进行分析。在拔节期,细菌多样性指数为 2.51±0.28 ~ 3.31±0.15,各品种根际细菌多样性指数差异较大,O_3 处理极显著增加了小麦品种 Y15 根际细菌的多样性指数,但对其他品种根际细菌的多样性指数无显著影响(图 3)。在成熟期,细菌多样性指数为 3.11±0.16 ~ 3.48±0.02,O_3 处理显著增高了小麦品种 Y2 的根际细菌多样性指数,对其他品种小麦根际细菌的多样性指数无显著影响(图 3)。

2.3　细菌种群结构

将 DGGE 谱带类型所代表的各品种根际细菌种群进行主成分分析(图 4),所有处理样品在轴 1 上被分为 2 大类群,分别是拔节期各处理样品和成熟期各处理样品,表明无论是对照还是臭氧增高处理,小麦不同生育时期对细菌种群结构有一定影响。在轴 2 的变化上,可以看出拔节期,小麦品种 Y15 和 Y19 根际细菌种群结构在 O_3 增高和对照处理间有明显变化,而成熟期仅小麦品种 Y2 根际细菌种群结构在 2 个处理间有差别。

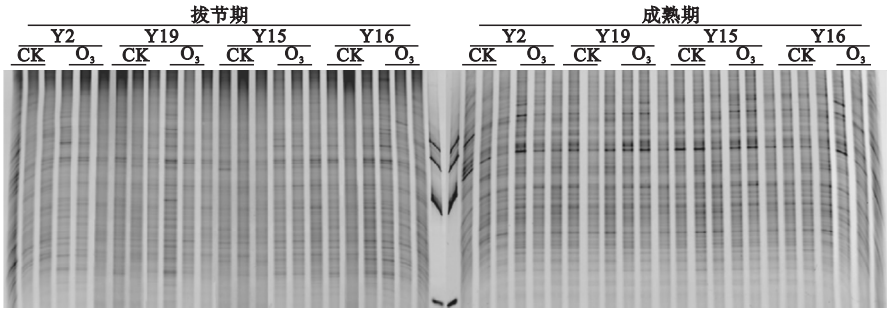


图 2 各样品细菌 DGGE 图谱

Fig. 2 DGGE profile of bacterial communities of the soil samples

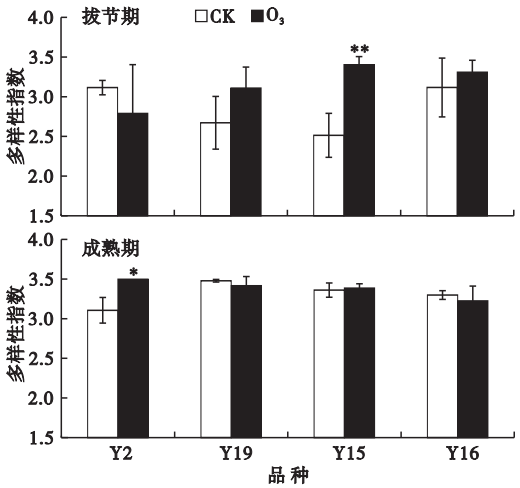


图 3 不同处理下 4 个品种小麦根际细菌在拔节期和成熟期的多样性指数

Fig. 3 Diversity indices of soil bacterial communities in the rhizophere of four wheat cultivars under different treatments at jointing and ripening stages

误差线表示标准偏差。* 和 * * 分别表示同一小麦品种根际细菌数量在 O_3 增高和对照处理间有显著性差异（$P< 0.05$）和极显著差异（$P< 0.01$）。

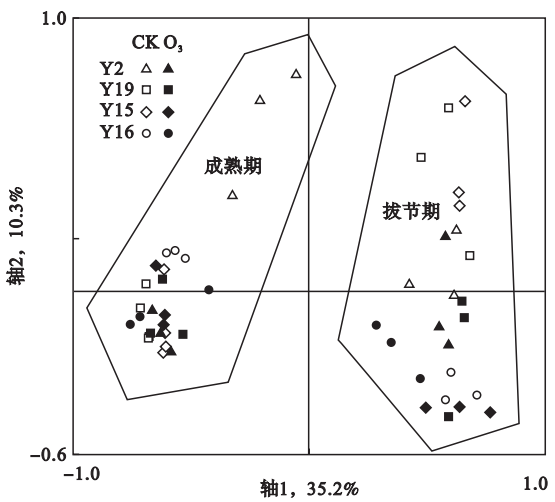


图 4 各样品细菌种群主成分分析图

Fig. 4 PCA analysis of bacterial communities of the soil samples

3 讨 论

3.1 O_3 浓度升高对不同品种小麦根际细菌数量的影响

本研究表明，在拔节期 O_3 增高处理使 4 个品种小麦根际细菌数量都低于对照，而且对 Y2 品种根际细菌数量有显著影响，这种抑制作用可能是来源于 O_3 对地上小麦的伤害作用。很多研究表明，O_3 浓度增加使敏感植物叶片受害、叶绿素含量下降，叶片气孔关闭，光合作用受到抑制，造成生物量降低（白月明等，2002；王云霞等，2011）。同时降低了有机物向根系的分配，因此植物根系生物量（Kelting *et al.*，1995；Scagel & Andersen，1997）和根系分泌物的总量也减少（Andersen，2003）。根系分泌物可为土壤微生物提供碳源和能源，它的降低会引起土壤微生物的数量和生物量的降低。相关研究也表明，O_3 增高处理使植物地下微生物数量和生物量降低（Islam *et al.*，2000；Kanerva *et al.*，2008）。

本研究中，小麦根际细菌数量的变化也受小麦生育期的影响，而且成熟期小麦根际细菌数量在品种间有很大差异。小麦根际细菌数量在小麦整个生育期会有一定的波动，通常表现为先升高，后降低，在灌浆期左右达到顶峰。但不同品种小麦细菌数量变化的程度有差异，表现为有的小麦其成熟期根际细菌的数量会高于拔节期（胡锋等，1998），而有的小麦则成熟期根际细菌数量低于拔节期（周陈等，2008）。本研究中，Y19 品种根际细菌数量在成熟期低于拔节期，而 Y15 和 Y16 品种则表现为成熟期高于拔节期，由于小麦品种的不同，其本身根际细菌在小麦生育期的变化规律不同，有可能造成成熟期小麦细菌数量在品种间出现很大差异。

3.2 O_3 浓度升高对不同品种小麦根际细菌种群多样性及群落结构的影响

本研究中,小麦品种 Y15 和 Y2 根际细菌多样性分别在拔节期和成熟期在 O_3 增高处理显著增加,而多样性指数增加的同时,细菌种群结构也发生了改变。主成分分析结果表明,小麦品种 Y15 和 Y19 根际细菌种群在拔节期发生一定改变,而成熟期是 Y2 的根际细菌种群发生明显改变。微生物多样性和结构的改变可能与臭氧增高处理后植物根系分泌物的改变有关系。有研究表明,O_3 增高处理后植物会分泌更高浓度的保护性化合物,如酚酸物质(Saleem *et al.*,2001;Liu *et al.*,2005),而且植物土壤可溶性碳(DOC)中高环,高分子量的有机物含量比重增加(Jones *et al.*,2009)。对小麦根际微生物可利用碳源(BIOLOG)研究表明,对照土壤根际微生物主要利用的碳源是聚合物(Polymers),而 O_3 增高处理根际微生物主要利用的碳源是羧酸类(carboxylic acids),表明 O_3 处理后微生物在代谢水平上的差异(Chen *et al.*,2009)。根系分泌物的改变影响了微生物种群多样性和结构,而且变化的程度与小麦品种和生长期有关。

从多样性指数和 PCA 分析图可以看出,O_3 增高处理对小麦品种 Y2 根际细菌多样性和结构的影响与其他小麦品种有明显不同。研究表明,O_3 升高对这 4 个小麦品种成熟期各器官生物量的影响有显著差异,Y2 的秸秆生物量在 O_4 增高处理下显著降低,而 Y19 是籽粒生物量显著降低,Y15 和 Y16 的秸秆和籽粒生物量都没有发生显著变化(寇太记等,2013)。本团队对成熟期各小麦品种千粒重的研究也表明,仅 Y19 的产量显著降低(数据未发表)。从本研究结果来看,成熟期小麦产量的高低与地下微生物种群的改变程度没有明显相关性,但与其他地上作物生长指标之间的关系还有待研究。从对 O_3 的耐受性看,小麦 Y16 对 O_3 的耐受性要高于 Y19(曹际玲等,2009)和 Y2 品种(Feng *et al.*,2010),表现在叶片光合作用羧化酶含量(Rubisco)和抗坏血酸含量的变化上。本研究中,Y16 品种根际细菌多样性和种群结构的变化较小,可能与其 O_3 耐受性较高有关。研究表明,植物品种对 O_3 的耐受程度越高,对地下微生物种群的扰动越小(王曙光等,2011)。因为目前还没有对这 4 个小麦品种叶片抗氧化能力的系统研究,小麦对 O_3 耐受性及地上作物生长指标与地下微生物种群之间的变化规律还需进一步研究。

尽管不同品种小麦根际细菌在 O_3 处理后有不同的反应,但只有小麦品种 Y2 根际细菌种群多样性和结构在成熟期仍发生显著改变,表明 O_3 对小麦品种 Y2 根际细菌的影响较为持久,可能会产生累积效应。

参考文献

白月明, 郭建平, 王春乙, 等. 2002. 水稻和冬小麦对臭氧的反应及其敏感性试验研究. 中国生态农业学报, **10**(1): 13-16.

曹际玲, 王　亮, 曾　青, 等. 2009. 开放式臭氧浓度升高条件下不同敏感型小麦品种的光合特性. 作物学报, **35**(8): 1500-1507.

陈　展, 王效科, 段晓男, 等. 2007. 臭氧浓度升高对盆栽小麦根系和土壤微生物功能的影响. 生态学报, **27**(5): 1803-1808.

胡　锋, 李辉信, 史玉英, 等. 1998. 两种基因型小麦根际土壤生物动态及根际效应. 土壤通报, **29**(3): 133-135.

胡莹莹, 赵天宏, 徐　玲, 等. 2008. 臭氧浓度升高对小麦光合作用和产量构成的影响. 农业现代化研究, **29**(4): 498-502.

寇太记, 于伟伟, 刘德鸿, 等. 2013. 臭氧污染对不同品种小麦养分吸收与分配的影响. 环境科学学报, **33**(2): 644-649.

李果梅, 王殳屹, 史　奕, 等. 2008. O_3 浓度升高及温度对麦田土壤酶活性及酚酸类物质含量的影响. 农业环境科学学报, **27**(1): 121-125.

李全胜, 林先贵, 胡君利, 等. 2010. 近地层臭氧浓度升高对麦田土壤氨氧化与反硝化细菌活性的影响. 生态与农村环境学报, **26**(6): 524-528.

王春乙, 白月明, 郑昌玲, 等. 2004. CO_2 和 O_3 浓度倍增对作物影响的研究进展. 气象学报, **62**(6): 875-881.

王曙光, 宫文亮, 王效科, 等. 2011. 大气 O_3 浓度升高对 2 种基因型矮菜豆根际微生物的影响. 环境科学, **32**(10): 3033-3039.

王云霞, 王晓莹, 周晓冬, 等. 2011. 近地层臭氧(O_3)浓度升高对水稻武运粳 21 抗倒性的影响. 江苏农业学报, **27**(6): 1167-1173.

余永昌, 林先贵, 张　晶, 等. 2012. 近地层臭氧浓度升高对麦田土壤微生物群落功能多样性的影响. 应用与环境生物学报, **18**(2): 309-314.

周　陈, 李许滨, 杨明开, 等. 2008. 冬小麦不同生育期土壤微生物及养分动态变化. 西北农业学报, **17**(3): 113-116, 128.

Andersen CP. 2003. Source-sink balance and carbon allocation below ground in plants exposed to ozone. *New Phytologist*, **157**: 213-228.

Chen Z, Wang XK, Feng ZZ, *et al*. 2009. Impact of elevated O_3 on soil microbial community function under wheat crop. *Water, Air, and Soil Pollution*, **198**: 189-198.

Chen Z, Wang XK, Yao FF, *et al*. 2010. Elevated ozone changed soil microbial community in a rice paddy. *Soil Science Society of America Journal*, **74**: 829–837.

Feng ZZ, Kobayashi K. 2009. Assessing the impacts of current and future concentrations of surface ozone on crop yield with meta-analysis. *Atmospheric Environment*, **43**: 1510–1519.

Feng ZZ, Pang J, Nouchi I, *et al*. 2010. Apoplastic ascorbate contributes to the differential ozone sensitivity in two varieties of winter wheat under fully open-air field conditions. *Environmental Pollution*, **158**: 3539–3545.

Fuhrer J, Booker F. 2003. Ecological issues related to ozone: Agricultural issues. *Environment International*, **29**: 141–154.

Grantz DA, Gunn S, Vu HB. 2006. O_3 impact s on plant development: A meta-analysis of root/shoot allocation and growth. *Plant, Cell and Environment*, **29**: 1193–1209.

Islam KR, Mulchi CL, Ali AA. 2000. Interactions of tropospheric CO_2 and O_3 enrichments and moisture variations on microbial biomass and respiration in soil. *Global Change Biology*, **6**: 255–265.

Jones TG, Freeman C, Lloyd A, *et al*. 2009. Impacts of elevated atmospheric ozone on peatland below-ground DOC characteristics. *Ecological Engineering*, **35**: 971–977.

Kanerva T, Paloärvi A, Rämö K, *et al*. 2008. Changes in soil microbial community structure under elevated tropospheric O_3 and CO_2. *Soil Biology and Biochemistry*, **40**: 2502–2510.

Kasurinen A, Gonzales PK, Riikonen J, *et al*. 2004. Soil CO_2 efflux of two silver birch clones exposed to elevated CO_2 and O_3 levels during three growing seasons. *Global Change Biology*, **10**: 1654–1665.

Kelting DL, Burger JA, Edwards GS. 1995. The effects of ozone on the root dynamics of seedlings and ripening red oak (*Quercus rubra* L.). *Forest Ecology and Management*, **79**: 197–206.

Lee S, Malone C, Kemp PF. 1993. Use of multiple 16S rRNA-targeted fluorescent probes to increase signal strength and measure cellular RNA from natural planktonic bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, **101**: 193–201.

Li XY, Deng Y, Li Q, *et al*. 2013. Shifts of functional gene representation in wheat rhizosphere microbial communities under elevated ozone. *ISME Journal*, **7**: 660–671.

Liu LL, King JS, Giardina CP. 2005. Effects of elevated concentrations of atmospheric CO_2 and tropospheric O_3 on leaf litter production and chemistry in trembling aspen and paper birch communities. *Tree Physiology*, **25**: 1511–1522.

McCrady JK, Andersen CP. 2000. The effect of ozone on below-ground carbon allocation in wheat. *Environmental Pollution*, **107**: 465–472.

Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. 1993. 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*, **59**: 695–700.

Saleem A, Loponen J, Pihlaja K, *et al*. 2001. Effects of long-term open-field ozone exposure on leaf phenolics of European silver birch (*Betula pendula* Roth). *Journal of Chemical Ecology*, **27**: 1049–1062.

Sánchez-Moreno S, Ferris H, Young-Mathews A, *et al*. 2011. Abundance, diversity and connectance of soil food web channels along environmental gradients in an agricultural landscape. *Soil Biology and Biochemistry*, **43**: 2374–2383.

Scagel CF, Andersen CP. 1997. Seasonal changes in root and soil respiration of ozone-exposed ponderosa pine (*Pinus ponderosa*) grown in different substrates. *New Phytologist*, **136**: 627–643.

Six J, Frey SD, Thiet RK, *et al*. 2006. Bacterial and fungal contributions to carbon sequestration in agroecosystems. *Soil Science Society of America Journal*, **70**: 555–569.

Treonis AM, Austin EE, Buyer JS, *et al*. 2010. Effects of organic amendment and tillage on soil microorganisms and microfauna. *Applied Soil Ecology*, **46**: 103–110.

Van Der Heijden MGA, Bardgett RD, Van Straalen NM. 2008. The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, **11**: 296–310.

Vingarzan R. 2004. A review of surface ozone background levels and trends. *Atmospheric Environment*, **38**: 3431–3442.

White PM, Rice CW. 2009. Tillage effects on microbial and carbon dynamics during plant residue decomposition. *Soil Science Society of America Journal*, **73**: 138–145.

作者简介 晏 培,男,1989年生,硕士研究生,主要从事微生物生态学研究。E-mail: mxyanpei@163.com

责任编辑 李凤芹