

柳树黄化病植原体的分子分类

魏婷, 吴云锋*, 侯伟, 武科科, 李毅然, 张珏, 孙润红

(西北农林科技大学植保学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 植保资源与病虫害治理教育部重点实验室, 杨凌 712100)

摘要 【目的】柳树黄化病是一种重要的植原体病害, 本研究旨在明确柳树黄化病植原体(Willow Yellow phytoplasma, WY)的分类地位, 为进一步开展致病性和防治研究奠定基础。【方法】采用植原体特异引物通过 PCR 方法从患病植株 DNA 中扩增植原体 16S rDNA 基因和核糖体蛋白基因(ribosomal proteins gene, *rp*), 对所得的序列进行分析, 构建同源进化树, 并用限制性片段长度多态性(RFLP)对巢式 PCR 产物进行分析。【结果】首次从柳树黄化病植原体中分离出了 16S rDNA 基因和 *rp* 基因, 大小分别为 1246 bp 和 1212 bp。通过对植原体 16S rDNA 和 *rp* 基因的核苷酸同源性比较和 RFLP 分析, 发现该分离物与 16SrI 组的核苷酸同源性均在 99% 以上, 与 16SrI-C 亚组中的小麦蓝矮病植原体同源性高达 99.8% (16SrI DNA) 和 99.6% (*rp*), 且 RFLP 分析与 16SrI-C 亚组的植原体有相同的酶切条带。【结论】柳树黄化植原体应划分于 16SrI-C 亚组。

关键词: 柳树黄化, 植原体分类, RFLP 分析; 16S rDNA, 核糖体蛋白, 巢式 PCR

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2009)03-0389-06

柳树(*Salix babylonica* Linn)是我国重要的阔叶树种, 是防护林、水土保持林、风景林及用材林的重要组成部分, 集观赏价值、生态价值和经济价值于一体^[1-3]。并且分布广, 用途多, 各省、市、自治区都有自然分布^[4]。柳树黄化病由柳树黄化植原体(Willow Yellow Phytoplasma, WY)引起的病害, 由过去的零星发病逐渐蔓延开来, 近年来在华北、西北地区成片发生, 柳树感病后叶片发黄树干逐渐枯死, 造成了巨大的经济损失。由于柳树黄化植原体严格寄生于韧皮部, 不能进行人工培养, 因而, 对病原的特性、本质及其病原的分类地位都研究的很少。到目前为止, 除田国忠对该病害的发生情况及防治对策的文献报道^[5]以及 16S rDNA 的带病检测的报道外, 对 16S rDNA 和 *rp* 基因的序列尚无正式报道, 对病

原的分类地位尚不明确。

本研究首次对我国柳树黄化病病株的 16S rDNA 基因和 *rp* 基因进行克隆和序列测定, 并进行了 RFLP 分析, 首次确定了该植原体的分类地位。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要材料 柳树黄化病病株和健康柳树采自陕西杨凌, 阳性对照泡桐丛枝病(PaWB)及小麦蓝矮病株(WBD)为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器: *Taq* DNA 聚合酶、dNTP、DNA 标准分子量、Tris-苯酚等均购自北京鼎国生物技术有限责任公司; 限制性内切酶 *Taq* I、*Kpn* I、*Hha* I、*Hinf* I 等购自 MBI 公司。H. Q. & Q. 质粒

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30871625), 教育部长江学者和创新团队发展计划(200558); 高等学校创新引智计划(B07049)

* 通信作者。Tel: +86-29-87092716; Fax: +86-29-87091389; E-mail: wuyf@nwsuaf.edu.cn

作者简介: 魏婷(1983-), 女, 陕西眉县人, 硕士研究生, 主要从事植物病毒方面的研究工作。E-mail: weiting029@yahoo.cn

收稿日期: 2008-09-30; 修回日期: 2008-11-21

微量抽提试剂盒购于 U-gene 生物工程有限公司。

1.2 样品总 DNA 的提取与 PCR 反应条件

采用 CTAB 法从病株和健康柳树叶片中提取基因组 DNA,参照顾沛雯等^[6]的方法。

参照 Lee 和 Gundersen^[7-8]所报道的植原 16S rDNA 基因通用引物 R16mF2/R16mR1 进行 PCR 扩增,然后以此扩增产物为模板用 R16F2/R16R2 进行巢式 PCR。引物序列如下 R16mF2/R16mR1: 5'-CATGCAAGTCCGACCGA-3'/5'-CTTAACCCC AATCATCGAC-3', R16F2/R16R2: 5'-GAAACGAC TGCTAAGACTGG-3'/5'-CGGTGTGTACAAACCCCG-3'。反应条件为 94℃ 3 min,变性温度 94℃,复性温度 52℃,延伸温度 72℃,共 30 次循环。其中前 5 个循环变性 1 min,复性 1 min,延伸 2 min;后 25 个循环变性 30 s,复性 1 min,延伸 2 min,最后 72℃ 延伸 10 min。nested-PCR 和直接 PCR 反应条件相同。

根据 Lim 和 Sears^[9]报道的用于检测 16S rDNA 核糖体蛋白基因的引物对 *rp*F1/*rp*R1, *rp*(I)F1/*rp*(I)R1, 分别进行 PCR 扩增和 nested-PCR 扩增。引物对序列如下: *rp*F1/*rp*R1: 5'-GGACATAAGTTAGG TGAATTT-3'/5'-ACGATATTTAG TTCTTTTTGG-3', *rp*(I)F1/*rp*(I)R1: 5'-TTT TCCCCTACACGTACTTA-3'/5'-GTTCTTTTTGGCATTAACAT-3'。反应条件为 94℃ 10 min;94℃ 1 min;50℃ 2 min,72℃ 3 min,共 35 个循环,最后 72℃ 延伸 7 min。将 PCR 扩增产物稀释 30 倍后分别作为 DNA 模板进行 nested-PCR 反应。反应条件同上。

以上引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶中电泳分析。

1.3 基因的克隆与序列分析

将 PCR 产物回收后与 pMD18-T 连接,连接产物转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞,挑取筛选平板上的白色菌落培养、提取质粒、经 PCR 和酶切鉴定为阳性的重组质粒送上海英骏生物技术有限公司测序。将所得 DNA 序列输入 GenBank 进行 Blast 检索,采用 DNAMAN 软件对所得到的核苷酸序列与 GenBank 中收录的相应基因的核苷酸序列进行比较和分析,并构建同源进化树。

1.4 病原 16S rDNA 基因与 *rp* 基因的 RFLP 分析

将 16S rDNA 基因与 *rp* 基因的巢式扩增产物分别进行 RFLP 分析,选用的酶为 16S rDNA (*Kpn* I, *Hae* III, *Eco*R I, *Hinf* I, *Dra* I, *Hha* I, *Taq* I),

rp(*Alu* I, *Taq* I),酶切反应在 10 μL 体系中进行,加 7 μL(含 400~800 ng DNA)PCR 产物,在 37℃(*Taq* I 65℃)冰浴中酶切 4~6 h。酶切产物在 8% 聚丙烯酰胺凝胶和 1×TBE 缓冲体系中电泳,每孔上样 5 μL,电泳后在紫外灯下观察并摄影记录。Marker 为 DL2000(购自鼎国生物有限公司)。

2 结果和分析

2.1 柳树黄化植原体 16S rDNA 和 *rp* 基因的扩增与核苷酸序列分析

用 16S rDNA 基因通用引物对 R16F2/R16R2 进行了巢式 PCR 扩增,从陕西杨凌的柳树黄化病样品中均扩增出了约 1.2 kb 左右的特异性片段,用 *rp* 引物对 *rp*(I)F1/*rp*(I)R1 也扩增出了约 1.2 kb 的片段,片段大小与 Lee 等^[10-11]报道的植原体 16S rDNA 和 *rp* 基因相符,而健康柳树总 DNA 未扩增出 16S rDNA 和 *rp* 基因(图 1)。

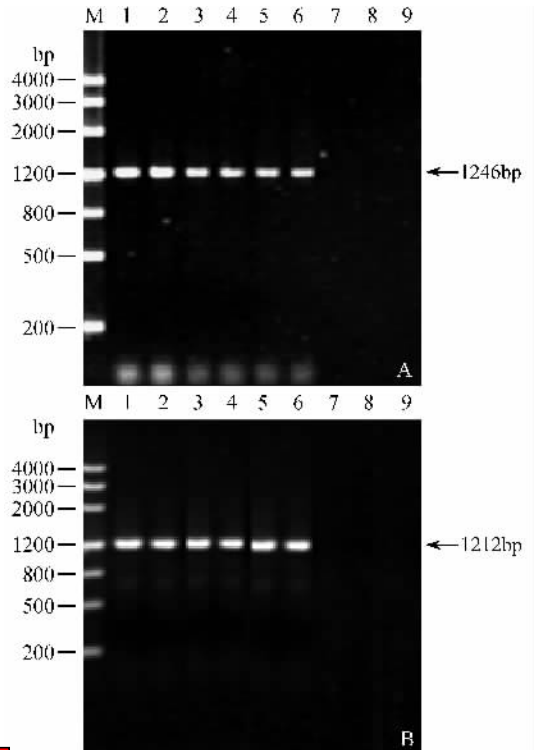


图 1 柳树黄化病植原体 16S rDNA(A)和 *rp* 基因(B)的 nested-PCR 扩增结果

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of nested-PCR products of 16S rDNA (A) and *rp* gene(B) amplified from willow yellow phytoplasma 16S rDNA. M. Marker 3; 1-5. willow yellow; 6 Paulownia witches' broom; 7-8. Healthy willow; 9. ddH₂O.

测序结果表明,陕西杨凌的柳树黄化病植原体(WY-YL)16S rDNA 扩增片段长 1246 bp,G+C 的含

量为 46.74%, 符合植原体 16S rDNA 基因 G + C 含量(45%(49%))。通过同源性比较可知, 我国 WY-YI (GenBank 登录号 FJ179166) 与 16S rI 植原体 16S rDNA 基因序列的同源性均达 99% 以上(表 1), 其中与 16Sr-C 亚组的同源性最高, 与小麦蓝矮植原体(WBD)同源性达 99.8%。而与其它组的同源性均低于 92%。*rp* 基因扩增片段长 1212 bp (GenBank

登录号 FJ179167)。用 BLAST 在 GenBank 中搜索同源序列, 通过同源性比较可知, 柳树黄化植原体 WY-YL 与 16S rI 组中的各亚组代表植原体 *rp* 基因核苷酸同源性均达到 96% 以上, 其中与 16S rI-C 亚组 WBD 序列亲缘关系最近, 核苷酸同源性达 99.6% (表 1)。故将柳树黄化植原体归属于翠菊黄化 16S rI-C 亚组。

表 1 柳树黄化植原体与 16Sr I 组相关植原体的 16S rDNA 与核糖体蛋白基因的同源性比较

Table 1 Homology comparisons of nucleotide sequences of 16S rDNA and *rp* gene between WY and related phytoplasmas in 16S rI group

| Associated phytoplasma strains of 16S rI | Subgroup classification | | Homology | | GenBank accession No. |
|--|-------------------------|-------------------|--------------|-------------------|-----------------------|
| | 16S rI group | <i>rp</i> I group | 16S rI group | <i>rp</i> I group | |
| Chrysanthemum yellows (CHRYM) | A | A | 99.0 | 96.4 | AY264869 |
| Chrysanthemum yellows (CHRY) | A | A | 99.3 | 96.3 | AY183696 |
| Grey dogwood stunt (GDI) | A | M | 99.1 | 96.8 | AY264864 |
| Hydrangea phyllody (HYDP) | A | A | 99.3 | 96.2 | AY264868 |
| Tomato big bud (TBB) | B | A | 99.2 | 96.3 | AY183686 |
| Cabbage proliferation (CabD3) | B | B | 99.0 | 97.1 | AY183717 |
| Maize bushy stunt (MBS) | B | L | 99.4 | 98.7 | AY264858 |
| Prim rose virescence (PRIVC) | B | B | 99.2 | 97.0 | AY264854 |
| Clover phyllody (CPh) | C | C | 99.7 | 99.4 | AY264862 |
| Clover phyllody (KVG) | C | C | 99.6 | 99.5 | AY264860 |
| Clover phyllody (KVE) | C | C | 99.6 | 99.3 | AY264861 |
| Wheat blue dwarf (WBD) | C | C | 99.8 | 99.6 | DQ489535 |
| Paulownia witches broom (PaWB) | D | D | 98.7 | 96.9 | AY264857 |
| Blueberry stunt (BBS3) | E | E | 99.4 | 96.7 | AY264863 |
| Apricot chlorotic leaf roll (ACLR) | F | N | 98.7 | 96.4 | AY264866 |
| Strawberry decline (STRAWB2) | K | J | 99.1 | 97.1 | PSU96617 |
| Aster yellows (AV2192) | L | B | 99.3 | 97.2 | AY183708 |
| Aster yellows (AVUT) | M | B | 99.4 | 97.1 | AY264855 |
| Ipomoeaobscura witches broom (IOWB) | N | F | 99.3 | 96.4 | AY264859 |

2.2 柳树黄化病植原体同源进化关系

利用 DNAMAN 5.2.2 软件对柳树黄化病植原体 16S rDNA 和 *rp* 序列进行分析, 构建柳树黄化病植原体(WY)与其他相关植原体株系的同源进化树状图(图 2、图 3)。由图可知, 柳树黄化病植原体与 16S rI-C 亚组 WBD 关系最近, 其次为三叶草变叶植原体 KVE 株系、CPh 株系和 KVG, 所以应与这几种植原体同属 16S rI-C 亚组。

2.3 RFLP 分析结果

柳树黄化植原体 16S rDNA 巢式 PCR 扩增片段的 7 种限制性内切酶酶切图谱结果表明(图 4-A): 柳树黄化植原体和 16S rI-C 亚组的 WBD^[12]的酶切图谱都一致, 且与 Lee 等^[10]对 34 种植物的植原体 16S rDNA RFLP 分析图谱进行比对, 发现与 Lee 酶切结果中的 16S rI-C 亚组条带完全一致, 说明 WY 应属于 16S rI-C 亚组。而与 16S rI-D 亚组泡桐丛枝植

原体^[13]用 *Hae* III 和 *Hha* I 酶切的结果不同, 说明柳树黄化植原体与泡桐丛枝植原体分属于不同亚组。

Alu I 和 *Taq* I 对 *rp* 基因的酶切条带显示(图 4-B) WY 与 WBD 的酶切结果一致, 且与 *Lee* 酶切结果中的 16S rI-C 亚组条带完全一致, 但与 PaWB 不同, 也说明了 WY 为 16S rI-C 亚组植原体。

3 讨论

20 世纪 50 年代以来, 我国许多研究单位先后采用生物学、电镜观察方法初步确定了柳树黄化病的病原, 观察了症状演变过程与发病规律, 探索了防治对策, 但是从分子水平上对柳树黄化病的研究国内外还比较少, 国内的研究只是停留在柳树黄化病树木的分子检测研究上。

本研究用植原体 16S rDNA 基因的通用引物, 通过巢式 PCR 的方法从柳树黄化病的感病植株中扩

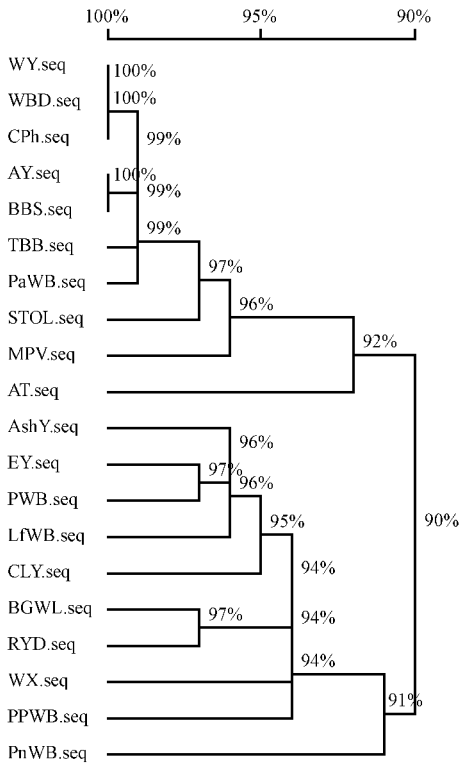


图2 基于已报道的19种植原体16S rDNA基因片段核苷酸序列分析的同源进化树状图

Fig. 2 Dendrogram obtained by analysis of 16S rDNA nucleotide sequences from 19 phytoplasmas. The scale bar represents the homology from 90% to 100% and the numbers on the branches are homology values. Phytoplasmas and GenBank accession numbers are as follows: WY: Willow yellow phytoplasma (FJ179166), WBD: Wheat blue dwarf (DQ078304), CPh: Clover phyllod (AF222066), AY: Aster yellows (AY265206), TBB: Tomato big bud (AF222064), BBS: Blueberry stunt (AY265220), PaWB: Paulownia witches' broom (AY647461), STOL: Stolbur (AY725230), MPV: Mexican periwinkle virescence (AF248960), AT: Apple proliferation (AJ430067), AshY: Ash yellows (L33759), EY: Elm yellows (AY197655), PWB: Potato witches' broom (DQ256089), LfWB: Loofah witches' broom (L33764), CLY: Coconut lethal yellowing (U18747), BGWL: Bermuda grass white leaf (Y16388), RYD: Rice yellow dwarf (D12581), WX: Western X (DQ350774), PPBW: Pigeon pea witches' broom (L33735), PnWB: Peanut witches' broom (L33765).

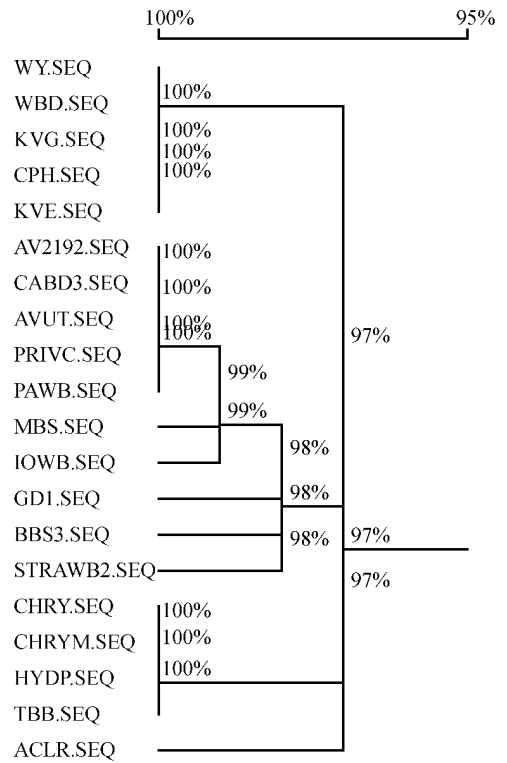


图3 基于已报道的19种16S rI组植原体rp基因片段核苷酸序列分析的同源进化树状图

Fig. 3 Dendrogram obtained by analysis of *rp* nucleotide sequences from 19 phytoplasmas. The scale bar represents the homology from 95% to 100% and the numbers on the branches are homology values. Phytoplasmas and GenBank accession numbers are as follows: WY: Willow yellow phytoplasma (FJ179167), WBD: Wheat blue dwarf (DQ489535), KVG: Clover phyllody (AY264860), CPh: Clover phyllody (AY264862), KVE: Clover phyllody (AY264861), AV2192: Aster yellows (AY183708), CabD3: Cabbage proliferation (AY183717), AVUT: Aster yellows (AY264855), PRIVC: Prim rose virescence (AY264854), PaWB: Paulownia witches' broom (AY264857), MBS: Maize bushy stunt (AY264858), IOWB: *Ipomoea obscura* witches' broom (IOWB), GDI: Grey dogwood stunt (AY264864), BBS3: Blueberry stunt (AY264863), STRAWB2: Strawberry decline (PSU96617), CHRY: Chrysanthemum yellows (AY183696), CHRYM: Chrysanthemum yellows (AY264869), HYDP: Hydrangea phyllody (AY264868), TBB: Tomato big bud (AY183686), ACLR: Apricot chlorotic leaf roll (AY264866).

增到了的16S rDNA片段,长1246 bp,通过对植原体16S rDNA基因的核苷酸同源性分析,发现该分离物与16S rI-C亚组中的小麦蓝矮病植原体同源性高达99.8%,与其它组的同源性均低于92%。核糖体蛋白基因的扩增片段长1212 bp,与16S rI组中的各亚组代表植原体 rp 基因核苷酸同源性均达到96%以上,其中与16S rI-C亚组的小麦蓝矮病植原体(WBD)序列亲缘关系最近,核苷酸同源性达99.6%。故将柳树黄化植原体归属于翠菊黄化16S rI组。

16S rDNA和 rp 基因都是原核生物染色体基因组中的rDNA编码区序列,在进化中高度保守,常

作为原核生物系统发育及分类研究的标准方法。基于这一方法, Lee等^[10]根据植原体16S rDNA的全长或近全长序列设计引物,并对扩增的PCR产物进行RFLP分析,形成了一个包括14个组及41个亚组的分类系统,建立了RFLP的模式图谱,通过与RFLP的模式图谱进行比较,可以对未知的植原体进行初步鉴定和分类。对柳树黄化的16S rDNA和核糖体蛋白基因进行RFLP分析,这在国内尚属首次报道。本文的酶切图与模式图谱比对的结果显示其与16S rI-C条带完全一致。可以判定柳树黄化植原体属于16S rI-C亚组。

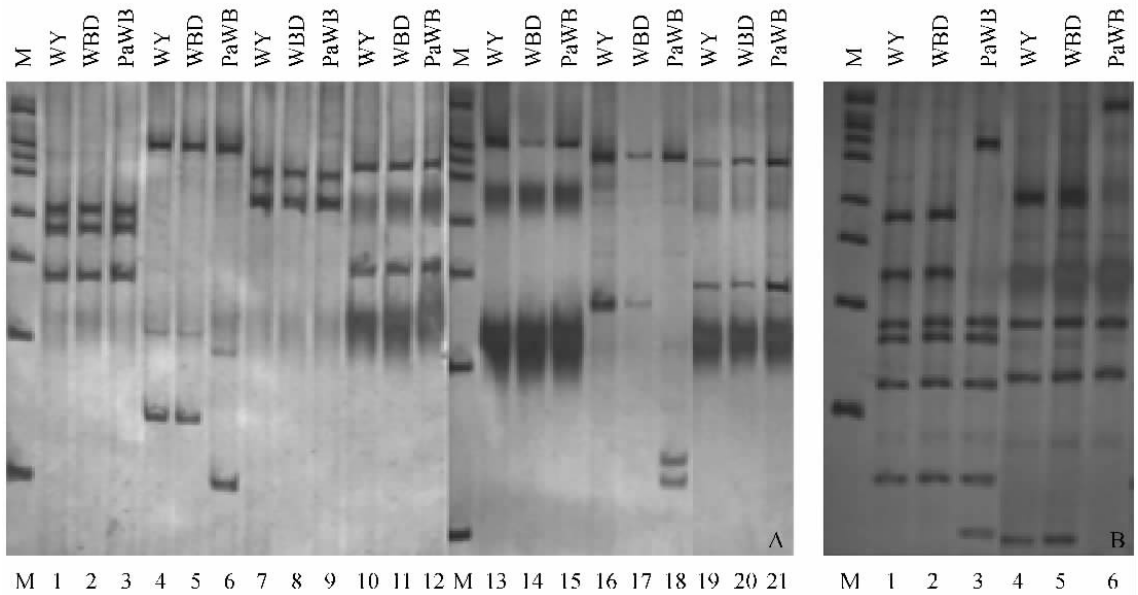


图4 柳树黄化病植原体 16S rDNA 和 *rp* 基因产物的 RFLP 分析

Fig.4 RFLP analyses of willow yellow phytoplasma 16S rDNAs and *rp* gene. A: restriction patterns of 16S rDNA, the nested PCR products were digested with *Kpn* I (1.2.3), *Hae* III (4.5.6), *Eco*R I (7.8.9), *Hinf* I (10.11.12), *Dra* I (13.14.15), *Hha* I (16.17.18), *Taq* I (19.20.21); B: restriction patterns *rp* gene, the nested PCR products were digested with *Alu* I (1.2.3), *Taq*I (4.5.6), M. DL 2000 (the Marker size from bottom to top are 125, 250, 375, 500, 750, 1000, 1250 and 2000 bp).

参考文献

- [1] 涂忠虞, 沈熙环. 中国林木遗传育种进展. 第一版. 北京: 科学技术文献出版社, 1993: 142-188.
- [2] 涂忠虞. 柳树育种与栽培. 第一版. 南京: 江苏科学技术出版社, 1982.
- [3] 王战, 方振富. 中国植物志(第20卷2分册). 第一版. 北京: 科学出版社, 1984: 75-116.
- [4] 中国科学院植物研究所. 第一版. 北京: 中国植物志, 2005.
- [5] 田国忠. 北京地区木本植物植原体病害发生及防治对策. 北京农业科学(*Beijing Agricultural Sciences*), 1999 (6): 26-29.
- [6] 顾沛雯, 安凤秋, 吴云锋, 等. 小麦蓝矮病植原体 16S rDNA 基因片段的比较分析. 植物病理学报(*Acta Phytopathologica Sinica*) 2005(5): 403-409.
- [7] Lee IM, Hammond RW, Davis RE, et al. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*, 1993, 83(8): 834-842.
- [8] Gundersen DE, Lee IM, Schaff DA, et al. Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in the 16S rRNA group (aster yellow s and related phytoplasmas) and III (X-disease and related phytoplasma). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1996, 46: 641-642.
- [9] Lim PO, Sears BB. (1992). Evolutionary relationships of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism and *Acholeplasma laidlawii* deduced from two ribosomal protein gene sequences. *Journal of Bacteriology*, 174, 2606-2611.
- [10] Lee IM, Gundersen-Rindal DE, Davis RE, et al. Revised classification scheme of phytoplasma based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1998, 48: 1153-1169.
- [11] Lee IM, Gundersen DE, Davis RE, et al. Candidatus *Phytoplasma asteris*, a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2004, 54(4): 1037-1048.
- [12] 顾沛雯, 吴云锋, 安凤秋. 小麦蓝矮植原体寄主范围的鉴定及 RFLP 分析. 植物病理学报(*Acta Phytopathologica Sinica*) 2007(4): 390-397.
- [13] 史英姿, 吴云锋, 顾沛雯, 等. 泡桐丛枝植原体 16S rDNA 和延伸因子基因序列分析. 微生物学通报(*Microbiology*), 2007, 34(2): 291-295.

Molecular classification of a phytoplasma associated with willow yellow disease

Ting Wei, Yunfeng Wu*, Wei Hou, Keke Wu, Yiran Li, Jue Zhang, Runhong Sun

(College of Plant Protection and Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Key Laboratory of Plant Protection Resources and Pest Management of Ministry of Education, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

Abstract [Objective] Willow Yellow is a plant disease caused by phytoplasma. We identified the taxonomic status of Willow Yellow phytoplasma (WY). **[Methods]** We used specific conservative primers amplified 16S rDNA and ribosomal proteins gene (*rp*) gene. Obtained sequences were then analyzed and homology trees were constructed. The nested-PCR products were also analyzed by restriction fragment length polymorphism (RFLP). **[Results]** We obtained 16S rDNA of 1246 bp and *rp* gene of 1212 bp, and sequence analysis showed a high identity with members of the 16SrI-C group phytoplasmas, all above 99.0%, and had the highest identity with Wheat Blue Dwarf phytoplasmas, 99.8% (16S rDNA) and 99.6% (*rp*) respectively, RFLP pattern are also the same as 16S rI-C phytoplasma. **[Conclusion]** Willow yellow phytoplasma is a member of 16S rI-C.

Keywords: willow yellow; phytoplasma classification; RFLP; 16S rDNA; ribosomal protein; Nested PCR

(本文责编 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30871625), the Program for Changjiang scholars and innovative Team in University of Education Ministry of China (200558) and the 111 project from Education Ministry of China (B07049)

*Corresponding author. Tel: +86-29-87092716; Fax: +86-29-87091389; E-mail: wuyf@nwsuaf.edu.cn

Received: 30 September 2008/Revised: 21 November 2008



科学出版社新书推介(2008-11)

《土壤与环境微生物研究法》

李振高 骆永明 滕应 编著

ISBN 978-7-03-022894-9; ¥89.00 2008年9月出版

中国科学院南京土壤研究所李振高、骆永明、滕应编著的《土壤与环境微生物研究法》一书已由科学出版社出版,该书基本涵盖了目前土壤和环境微生物研究领域所用的方法,以进一步推动土壤和环境微生物学的发展,使它更好地为解决土壤环境实际问题和提高科学理论水平服务。

本书是一本工具书,又是一本实验教材。书中除了常规方法外,对近年来国际上所采用的土壤与环境微生物学研究新方法和新技术(包括分子生物学技术)作了较为全面、系统的介绍。图文并茂,内容丰富,实用性强,主要包括实验室设置和基本设备、生物显微镜技术、洗涤与灭菌技术、培养基类别与配制、样品采集和保存处理、微生物接种和纯培养技术、土壤微生物区系分析、根圈微生物分析、土壤微生物的传统分类鉴定、土壤微生物的现代分类方法、土壤微生物分类检索系统、微生物菌种的保藏与选育、土壤微生物的原位观察和鉴别、土壤微生物生物量的测定、土壤微生物多样性分析、土壤生物化学过程强度测定、土壤酶活性的测定以及数据生物统计分析等。全书72.6万字,490页,共分十九章,每章均包括基本理论、测定原理、实验材料、操作步骤和注意事项等,其中部分项目还介绍了几种方法,供读者根据需求和具体条件选择使用。并附有常见微生物名称的拉丁对照,以便读者查阅。

本书适用于高等院校和科研院所土壤学、微生物学、环境科学、生态学、生物地球化学、农业化学、农学等专业的研究生和科研工作者的实验教材及参考用书。

科学出版社发行,各地新华书店经销

作者地址:江苏省南京市北京东路71号 中国科学院南京土壤研究所 邮政编码 210008

联系电话 025-86881531; 传真 025-86881128