

不同生境中沼泽红假单胞菌基因型多样性分析

冯有智^{1,2} 武敬^{1,2,3} 王一明^{1,2} 林先贵^{1,2*}

- (1. 中国科学院南京土壤研究所土壤与农业可持续发展国家重点实验室 江苏 南京 210008)
(2. 中国科学院南京土壤研究所 香港浸会大学土壤与环境联合开放实验室 江苏 南京 210008)
(3. 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要: 沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*, *R. palustris*)是一种分布广泛的紫色非硫细菌, 代谢方式的多样性赋予了它们重要的生态学意义和应用价值。从湖泊、池塘和河流的 11 个底泥样品中富集培养紫色非硫细菌, 利用基于 *pufM* 基因的 PCR-DGGE 技术鉴定为 *R. palustris*, 再利用 rep-PCR 技术进行基因型指纹图谱分析。结果发现相近生境, 即湖泊中的菌株基因型相似度较高, > 80%, 而差异越大的生境中菌株基因型指纹图谱差异也越大。这种基因型差异性分析不仅可以帮助研究者更全面地了解不同环境中 *R. palustris* 基因型多样性, 也为进一步揭示其生态学意义和进化过程提供基础。

关键词: 沼泽红假单胞菌, 紫色非硫细菌, PCR-DGGE, rep-PCR

The Genotype Diversity of *Rhodopseudomonas palustris* in Different Habitats

FENG You-Zhi^{1,2} WU Jing^{1,2,3} WANG Yi-Ming^{1,2} LIN Xian-Gui^{1,2*}

- (1. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing, Jiangsu 210008, China)
(2. Joint Open Laboratory of Soil and the Environment, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences and Hongkong Baptist University, Nanjing, Jiangsu 210008, China)
(3. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: *Rhodopseudomonas palustris* (*R. palustris*) is a common type of purple phototrophic bacteria found in a wide variety of environments. As a result of the diverse metabolism mechanisms, they are ecologically important and have valuable applications. In this study, we collected eleven sediment samples from lakes, ponds and streams. Samples were cultivated for purple nonsulfur bacteria enrichment. With PCR-DGGE based on *pufM* gene fraction, the enriched bacteria were phylogenetically identified as *R. palustris*. Genotypes from these bacteria were differentiated with rep-PCR for cluster analysis. We found that *R. palustris* from similar habitats, eg. lakes, can be categorized into a group with > 80% fingerprinting similarity. On the contrary, the genotypes of *R. palustris* from distinct habitats are distant. Our results suggest a relationship between the genotype diversity of *R. palustris* and their habitat variances. This finding allows a foundation for further studies on the ecological importance and evolu-

tion pathway of such purple nonsulfur bacteria.

Keywords: *Rhodopseudomonas palustris*, purple nonsulfur bacteria, PCR-DGGE, rep-PCR

紫色光合细菌是不产氧光合细菌的一个重要分支^[1], 包括紫色非硫细菌和紫色硫细菌。前者主要以小分子有机物为碳源和电子供体异养生长, 而后者主要利用还原性的硫化物为电子供体自养生长。紫色非硫细菌具有极其丰富的代谢模式, 可进行光能异养、光能自养和化能异养生长^[2]。代谢的多样性使得它们广泛存活于不同的生态系统中, 如土壤、湖泊、海洋及底泥等^[2-3], 并具有重要的生态学意义, 如作为初级生产力加快环境中物质和能量的循环^[4], 促进水稻增产^[5]等。代谢方式的多样性也使得其不同环境中表现出不同的表型和相应的基因型, 因此具有不同的应用价值, 如降解芳香类化合物^[6]和生物制氢^[7]。

沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*, *R. palustris*)是紫色非硫细菌中一类重要的微生物, 系统分类学上位于变形菌门(Proteobacteria)的 alpha 分支。传统培养方法^[8]和现代分子生物学技术^[9]揭示 *R. palustris* 是水稻土中主要的紫色光合细菌。接种 *R. palustris* 到土壤中可以使得水稻增产 29%^[5], 它可以降解多种碳源包括多种芳香类化合物^[10], 这些重要的生态学意义和应用价值使得 *R. palustris* 越来越被重视。

目前微生物多样性研究主要集中在微生物群落结构水平, 但是对于具有多种代谢模式的微生物, 其在不同的生境中会表现出不同的基因型和表型, 有不同的生态学意义和应用价值, 因此基因型多样性研究是一个不可或缺的部分^[11]。rep-PCR (Repetitive sequence-based PCR)是一种基于随机扩增片段长度多样性的基因多样性研究方法, 可以将微生物多样性研究精确到菌株水平。该技术已被广泛应用于以人、畜和植物为宿主的细菌基因型(菌株)多样性研究中, 如 *Escherichia coli*^[12]、*Helicobacter pylori*^[13]、*Bradyrhizobium* sp.^[14]、*Pseudomonas syringae*^[15]、*Rhizobium* sp.^[16]和 *Xanthomonas*^[17], 但很少应用于微生物生态研究中。将该技术引入代谢方式多样的紫色非硫细菌研究中可以帮助我们更全面地了解环境变化对紫色非硫细菌的影响, 进而有助于我们充分了解其生态学意义和进化的过程^[18]。

在本实验中, 我们结合传统方法和现代分子生

物学技术, 对 11 个不同生境样品, 首先利用特异性培养基富集纯化紫色非硫细菌, 然后用基于 *pufM* 基因片段的 PCR-DGGE (Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis)技术鉴别为 *R. palustris*, 再利用 rep-PCR 技术分析不同生境中的菌株基因型差异, 以期揭示其基因型差异和生境差异之间的联系, 同时也为紫色非硫细菌在不同水平的多样性研究方面打下方法和理论基础。

1 材料与方法

1.1 底泥采集

底泥样品采用德国 HYDRO-BIOS 自动采集器收集。采样后的底泥用自封袋密封, 回实验室后放置 4°C 保存。不同采样点的编号如表 1 所示。玄武湖的各采样点之间至少相隔 500 m。

编号 Number	采样地点 Sites	编号 Number	采样地点 Sites
1	南京玄武湖 1	7	南京玄武湖 7
2	南京玄武湖 2	8	浙江德清虾塘
3	南京玄武湖 3	9	盱眙龙虾塘
4	南京玄武湖 4	10	市售光合细菌菌剂
5	南京玄武湖 5	11	浙江德清河
6	南京玄武湖 6		

1.2 主要试剂和仪器

细菌 DNA 提取试剂盒为 Bacterial DNA Kit (Omega Bio-Tek, USA)。PCR 反应的 *rTaq* 聚合酶和克隆所需的 pMD 18-T 载体均购自于 TaKaRa 公司, 氨苄青霉素购自于 Sigma 公司, 引物由上海生工公司合成。PCR 仪为 MyCycler™ PCR (Bio-Rad, Hercules, Calif.); 基因突变仪为 Dcode 通用突变检测系统 (Bio-Rad, Hercules, Calif.)。垂直板电泳仪为 Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, Calif.)。

1.3 富集和纯化

富集培养在采样后一周内开始。培养基如下^[19]: Na₂H₂PO₄ 5.5 g, NaC₂O₄ 2.0 g, NH₄Cl 1.0 g, MgCl₂ 0.25 g, CaCl₂ 0.05 g, D,L-苹果酸 1.5 g, 添加以下微

量元素: VB₁ (1 g/L) 1 mL, 烟碱酸 (0.1 g/L) 1 mL, 生物素 (0.05 g/L) 1 mL, H₃BO₄ (10 g/L) 0.3 mL, Na₂MoO₄ (16 g/L) 0.05 mL, ZnSO₄ (2.4 g/L) 0.1 mL, MnSO₄ (8 g/L) 0.2 mL, CuSO₄ (0.2 g/L) 0.2 mL。灭菌前 pH 调节到 7.0, 定容至 1 L。

在 125 mL 磨口三角瓶中放入 10 g 底泥, 用灭菌后的培养液加满三角瓶, 随后密封瓶体。放置在强度为 2400 lux 的白炽灯下照射, 于 30°C ± 2°C 培养 3 周。

3 周后, 将 10 mL 菌液移至新三角瓶中, 加入 115 mL 灭菌培养液, 继续厌氧光照培养。如此反复 10 次以获得较纯的紫色非硫细菌。

1.4 细菌总 DNA 提取

取紫色非硫细菌扩大液 2 mL, 利用试剂盒 Bacterial DNA Kit 提取细菌总 DNA。具体步骤请参照该试剂盒使用手册。

1.5 PCR 扩增

1.5.1 紫色光合细菌 *pufM* 基因扩增: 利用紫色光合细菌光反应中心蛋白 M 亚基编码基因片段 *pufM* 基因的特异性引物对 *pufM557F* (5'-CGCACCTGGACTGGAC-3')和 *pufM750R* (5'-CCCATGGTCCA GCGCCAGAA-3')进行 *pufM* 基因扩增^[9]。PCR 反应应用试剂盒 Premix *Taq*[®] Version 2.0 Kit (TaKaRa), 50 μL 的 PCR 体系添加 50 ng 的 DNA 模板量。PCR 反应条件: 94°C 3 min; 94°C 0.5 min, 56°C 0.5 min, 72°C 0.5 min, 30 个循环; 72°C 10 min。PCR 扩增产物在 1.2% (W/V) Tris-acetate-EDTA (TAE) 琼脂糖凝胶中电泳验证。

1.5.2 rep-PCR 基因扩增: 利用 BOX A1R primer (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3')进行 rep-PCR 扩增^[20]。rep-PCR 反应用 *Taq*Tm Hot Start Version Kit (TaKaRa)。25 μL 反应体系中含有 2.5 μL 的 10 × PCR Buffer (Mg²⁺ Plus), 2 μL 的 dNTPs Mixture (Each 2.5 mmol/L), 1 μL 的 BOX A1R primer (20 μmol/L), 0.125 μL 的 TaKaRa *Taq* HS (5 U/μL), 0.5 μL 的 BSA (20 g/L) 和 50 ng 的 DNA 模板量。反应条件如下: 95°C 2 min; 94°C 3 s, 92°C 30 s, 50°C 1 min, 65°C 8 min, 35 个循环; 65°C 8 min。

1.6 DGGE 电泳分析

基因突变仪用于 *pufM* 基因的 DGGE 分析。使用 8% 聚丙烯酰胺凝胶, 电泳缓冲液为 1 × TAE, 变性梯度 45%–75%; PCR 产物上样量为 200 ng DNA;

电压 80 V, 60°C, 电泳 13 h; 用 SYBR Green I (Invitrogen) (1:10000, V/V) 染色 30 min, 后用 Gel DocTM EQ imager (Bio-Rad) 成像拍照^[9]。

将 DGGE 特征条带割胶, 放入含有 40 μL 去离子水的 1.5 mL 离心管中, 置于 4°C 冰箱过夜。以此溶液为模板, 再次使用 *pufM* 基因引物对进行扩增。PCR 扩增体系和反应条件如上。将扩增后的 PCR 产物进行 DGGE 验证, 以确定各个 *pufM* 基因型的位置和纯度。如不符, 继续切带、扩增、验证。

1.7 克隆测序以及基因序列比对

将验证后的 *pufM* 基因扩增产物连接到 pMD 18-T vector (TaKaRa), 并转化到 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞中, 在含有 X-gal、IPTG 和氨苄青霉素的 LB 培养基上培养过夜。挑取具有氨苄青霉素抗性的白色转化子, 采用 T 载体通用引物 M13 进行菌落 PCR, 扩增产物经 1.2% (W/V) 琼脂糖凝胶电泳检测是否为阳性克隆。将含有正确克隆子的细胞扩大液交由上海 Invitrogen 公司进行测序。将测序得到的序列在 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 网站上 BLAST 比对, 进行同源性检索。本实验获得的序列已提交 GenBank, 登录号为 AB588740 和 AB588741。

1.8 rep-PCR 电泳分析

垂直板电泳仪用于 rep-PCR 分析。使用 6% 聚丙烯酰胺凝胶, 电泳缓冲液为 1 × TAE, PCR 产物上样量 4 μL, 电压 70 V, 20°C, 电泳 13 h; 用 SYBR Green I (Invitrogen) (1:10000, V/V) 染色 30 min, 后用 Gel DocTM EQ imager (Bio-Rad) 成像拍照。

1.9 数据统计分析

应用 Quantity One 4.4.0 (Bio-Rad) 对 rep-PCR 电泳图谱进行聚类分析, 比较不同生境中的基因型差异; 聚类分析用 UPGMA 算法计算。

2 结果与分析

2.1 *pufM* 基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

紫色光合细菌高度分散在变形菌门 (Proteobacteria) 的 α、β 和 μ 3 个分支上, 故无法在 16S rRNA 上研究其多样性^[21]。但是, 紫色光合细菌保留了相同的光吸收系统, 包括编码光反应中心蛋白的 *pufM* (M 亚基)。*pufM* 基因具有高度保守性, 被广泛应用于紫色光养细菌多样性研究。从图 1 可以看出, 对不同环境中富集获得的紫色非硫细菌,

pufM 557F/750R 引物对都可以很好地进行扩增, PCR产物片段大小为229 bp, 与预计条带大小一致。琼脂糖电泳上无引物二聚体和拖尾, 说明引物特异性很好, PCR扩增效率很高。

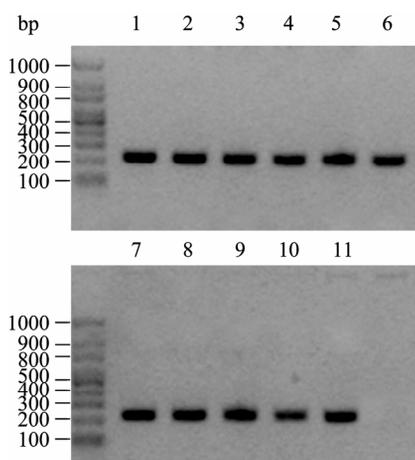


图1 *pufM* 基因 PCR 产物琼脂糖电泳图

Fig. 1 Agarose electrophoresis of PCR products of *pufM* gene

2.2 基于 *pufM* 基因的 DGGE 电泳

微生物遗传多样性研究是生态学研究的一个重要组成部分。目前, 微生物遗传多样性研究多集中在整体微生物群落水平上, 如 16S rRNA 或者 18S rRNA^[22], 或者功能微生物群落水平上, 如固氮微生物^[23]。基于 *pufM* 基因的 PCR-DGGE 指纹图谱技术也已应用于不同生态系统中紫色光合细菌的多样性研究^[9,24]。从图 2 可以看出, 利用紫色非硫细菌富集培养基, 从 11 个不同生境中获得了相同且单一的 *pufM* 基因型条带。9 号泳道中有一个较弱的 DGGE 条带, 可能该富集液中还存在另一种紫色光合细菌。但是与条带 1 相比, 条带 2 的丰度非常低。

将 DGGE 中的特征条带割胶、验证、克隆和测序, 获得的序列在 GenBank 中进行同源性检索(表 2), 发现各生境中富集获得的紫色非硫细菌(条带 1)的 *pufM* 基因序列与沼泽红假单胞菌(*Rhodospseudomonas palustris*, *R. palustris*)的 *pufM* 基因序列同源性最高; 而与条带 2 最高的是红假单胞菌(*Rhodospseudomonas* sp.)。由于 *pufM* 基因具有很高的保守性, 且得到的系统发育分析结果与 16S rRNA 结果相一致^[21], 所以我们认为从不同环境中富集到的紫色非硫细菌都是 *R. palustris*, 且 *R. palustris* 可能是一种分布广泛的紫色非硫细菌。

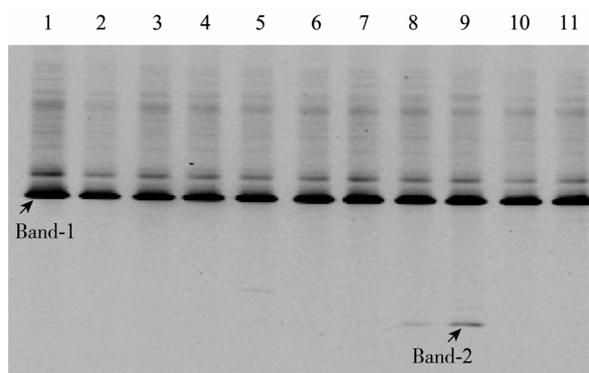


图 2 从不同生境中富集的紫色非硫细菌 *pufM* 基因 DGGE 指纹图谱

Fig. 2 *PufM* gene-based DGGE fingerprinting profiles of the strains enriched from different habitats

条带 Band	物种 Species	登录号 Accession number	同源性 Max identity (%)
Band-1	<i>R. palustris</i>	AY177968	100
Band-2	<i>Rhodospseudomonas</i> sp.	AB498862	100

R. palustris 代谢方式的多样性使得其在不同的环境中表现出不同的表型及相应的基因型, 如 Oda 等^[6]发现不同生境中分离出的 4 株野生型 *R. palustris* 具有不同光吸收能力、耐氧能力、固氮能力和厌氧发酵能力; 通过全基因组测序发现, 它们的全基因组只有 70% 相同, 而大约 10%–18% 的基因组具有个体特异性。因此, 尽管获得的紫色非硫细菌都是 *R. palustris*, 但是由于来自不同的生境, 它们的基因型可能存在差异, 我们需要进一步了解不同生境中的 *R. palustris* 基因型差异。

2.3 紫色非硫细菌 *R. palustris* 的 rep-PCR 电泳

PCR-DGGE 技术是分析微生物群落结构的有效手段之一, 但是其分辨率只能到种或亚种水平^[18]。为了更深入了解环境的影响, 我们应用 rep-PCR 技术在更高分辨率(菌株水平)下研究各生境之间 *R. palustris* 菌株基因型差异及推测其成因。rep-PCR 共有 3 套引物对, BOX A1R、ERIC 和 REP^[18]。本实验中我们采用了 BOX-PCR, 因为 BOX A1R 能够产生最复杂的指纹图谱, 对于菌株的区分具有最高的分辨率。从图 3 可以看出, 尽管 DGGE 指纹图谱显示均为 *R. palustris*, 但其 rep-PCR 指纹图谱并不相同, 即说明来自不同生境的 *R. palustris* 菌株具有不同的基因型, 而这种基因型的差异可能是所处的生境不同而导致。

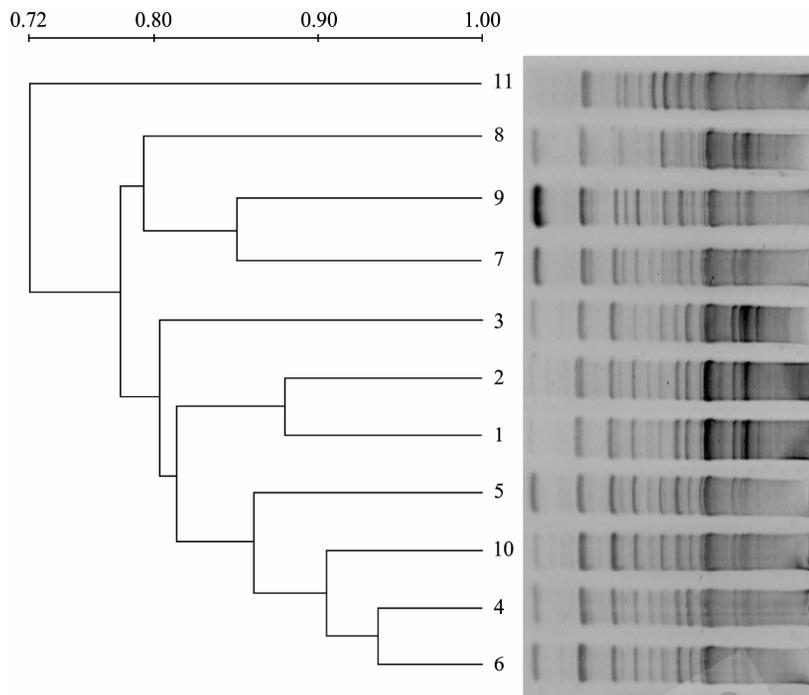


图3 从不同生境中富集的 *R. palustris* 菌株 BOX-PCR 指纹图谱和聚类分析

Fig. 3 BOX-PCR fingerprinting profiles and cluster analysis of *R. palustris* strains enriched from different habitats

基于 UPGMA 算法的聚类分析数字化显示了不同生境中 *R. palustris* 菌株基因型差异程度(图 3)。不同生境中 *R. palustris* 基因型形成了不同的组。从人造湖泊中富集出来的 *R. palustris* 菌株聚在一起, 形成了一个组(样品 1、2、3、4、5、6 和 10), 并与来自池塘的 *R. palustris* 菌株分开(样品 8 和 9), 而河流中的 *R. palustris* 基因型差异最大(样品 11)。欧式距离 ≥ 0.80 的菌株被认为是同一个基因型^[11], 因此, 来自玄武湖的菌株具有相同的基因型。由于水生生态系统具有较高的均一性, 不同采样点的理化性质较为相似, 故其中的 *R. palustris* 菌株基因型也具有很高的相似度(≥ 0.78), 甚至只有单一的基因型, 这说明高均一性环境中的 *R. palustris* 基因型也高度一致^[19]。市售光合细菌菌剂(10 号样)是中国科学院水生生物研究所从武汉东湖中筛选出来的 *R. palustris*。武汉东湖和南京玄武湖都是著名的城中湖, 具有类似的自然环境, 故聚类分析显示生长在两者中的 *R. palustris* 基因型高度相似。湖泊与池塘和河流中的 *R. palustris* 基因型差异较大, 如 8、9 和 11 号样。9 号样虽然是龙虾塘, 但是其实际是由洪泽湖围建而成, 并且围建时间不长。洪泽湖与玄武湖(7 号样)都是湖泊, 其自然环境可能较为相似, 所以生长在其中的 *R. palustris* 基因型也聚在一起, 形成了一

个小组。8 号样是 3 年前由水稻田改建成的虾池。水稻田是一种人工湿地, 由于不断耕作使得其环境的理化性质与湖泊差异较大, 如有机质含量等。因此, 生长在其中的 *R. palustris* 基因型与湖泊中的 *R. palustris* 基因型差异较大。11 号样品中的 *R. palustris* 基因型与其他样品差异最大。水的流量和流速直接影响水生生态系统的理化性质和生物生境。与玄武湖、东湖和洪泽湖相比, 河水的流量和流速都要远远大于前三者, 进而导致 *R. palustris* 所处生境与前三者差异较大, 所以在聚类分析图上 11 号样的 *R. palustris* 基因型远离其他样品。

不同生境产生不同基因型的原因是 *R. palustris* 具有多种代谢方式。人造湖泊和天然湖泊是寡营养环境, 生长在其中的 *R. palustris* 主要以光能自养生长; 而对于水稻土, 人类的不断耕作和作物的生长使得其成为富营养环境, 故生长在其中的 *R. palustris* 主要以光能异养生长。长期不同的代谢方式使得 *R. palustris* 表型和基因型都发生了相应的变化, 并导致其基因型指纹图谱的不同。水流量和流速的不同使得河流和湖泊产生很大的环境差异, 也使得生长在河流中的 *R. palustris* 基因型与后者差异最大。此外, 聚类分析还表明生境的改变对 *R. palustris* 基因型的影响可能需要较长的时间, 如样品 8, 虽已

改建为水塘, 但由于时间不长, 其中的 *R. palustris* 基因型仍反映出以前的生境。

3 结论

(1) 利用紫色非硫细菌富集培养基和基于 *pufM* 基因的 PCR-DGGE 指纹图谱技术发现 *R. palustris* 是一种分布十分广泛的紫色非硫细菌。

(2) rep-PCR 技术揭示了来自不同生境的 *R. palustris* 菌株具有不同的基因型; 相似生境中的 *R. palustris* 菌株基因型高度相似, 如玄武湖和东湖; 反之亦然, 如水稻土、河流和湖泊。

(3) 本实验在基因型水平上揭示了不同生境中 *R. palustris* 基因型的差异, 为紫色非硫细菌多样性研究开辟了新的方向, 建立了方法和理论基础。

参考文献

- [1] Overmann J, Garcia-Pichel F. The Phototrophic Way of Life.//Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, et al. The Prokaryotes. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 2006: 32–85.
- [2] Imhoff JF, Trüper HG. The genus *Rhodospirillum* and related genera//Balows A, Trüper HG, Dworkin M, et al. eds. The Prokaryotes: 2nd. New York: Springer-Verlag, 1992: 2141–2155.
- [3] Hiraishi A, Ueda Y. *Rhodoplanes* gen. nov., a new genus of phototrophic bacteria including *Rhodopseudomonas rosea* as *Rhodoplanes roseus* comb. nov. and *Rhodoplanes legans* sp. nov.. *Int J Syst Bacteriol*, 1994, **44**(4): 665–673.
- [4] Eiler A. Evidence for the ubiquity of mixotrophic bacteria in the upper ocean: implications and consequences. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**(12): 7431–7437.
- [5] Harada N, Nishiyama M, Otsuka S, et al. Effects of inoculation of phototrophic purple bacteria on grain yield of rice and nitrogenase activity of paddy soil in a pot experiment. *Soil Sci Plant Nutr*, 2005, **51**(3): 361–367.
- [6] Oda Y, Larimer FW, Chain PSG, et al. Multiple genome sequences reveal adaptations of a phototrophic bacterium to sediment microenvironments. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(47): 18543–18548.
- [7] Basak N, Das D. Photofermentative hydrogen production using purple non-sulfur bacteria *Rhodobacter sphaeroides* OU001 in an annular photobioreactor: a case study. *Biomass Bioenerg*, 2009, **33**(6/7): 911–919.
- [8] Harada N, Otsuka S, Nishiyama M, et al. Characteristics of phototrophic purple bacteria isolated from a Japanese paddy soil. *Soil Sci Plant Nutr*, 2003, **49**(4): 521–526.
- [9] Feng YZ, Lin XG, Wang YM, et al. Free-air CO₂ enrichment (FACE) enhances the biodiversity of purple phototrophic bacteria in flooded paddy soil. *Plant Soil*, 2009, **324**(1/2): 317–328.
- [10] Sasikala C, Ramana CV. Biodegradation and metabolism of unusual carbon compounds by anoxygenic phototrophic bacteria. *Adv Microb Physiol*, 1998, **39**(3): 339–377.
- [11] Bent SJ, Gucker CL, Oda Y, et al. Spatial distribution of rhodopseudomonas palustris ecotypes on a local scale. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(9): 5192–5197.
- [12] Dombek PE, Johnson LK, Zimmerley ST, et al. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(6): 2572–2577.
- [13] Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, et al. DNA diversity among clinical isolates of helicobacter-pylori detected by PCR-based rapid fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 1992, **20**(19): 5137–5142.
- [14] Vinuesa P, Rademaker JLW, de Bruijn FJ, et al. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S–23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**(6): 2096–2104.
- [15] Little EL, Bostock RM, Kirkpatrick BC. Genetic characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from stone fruits in California. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**(10): 3818–3823.
- [16] Laguerre G, vanBerkum P, Amarger N, et al. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(12): 4748–4758.
- [17] Rademaker JLW, Hoste B, Louws FJ, et al. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: Xanthomonas as a model system. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, **50**(2): 665–677.
- [18] Ishii S, Sadowsky MJ. Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution. *Environ Microbiol*, 2009, **11**(4): 733–740.
- [19] Oda Y, Wanders W, Huisman LA, et al. Genotypic and phenotypic diversity within species of purple nonsulfur bacteria isolated from aquatic sediments. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(7): 3467–3477.
- [20] Rademaker JLW, Louws FJ, de Bruijn FJ. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting//Akkermans ADL, van Elsas JD, de Bruijn FJ, eds. Molecular Microbial Ecology Manual. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1997: 1–26.

- [21] Achenbach LA, Carey J, Madigan MT. Photosynthetic and phylogenetic primers for detection of anoxygenic phototrophs in natural environments. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(7): 2922–2926.
- [22] Tian F, Yu Y, Chen B, *et al.* Bacterial, archaeal and eukaryotic diversity in Arctic sediment as revealed by 16S rRNA and 18S rRNA gene clone libraries analysis. *Polar Biol*, 2009, **32**(1): 93–103.
- [23] Warttainen I, Eriksson T, Zheng WW, *et al.* Variation in the active diazotrophic community in rice paddy-nifH PCR-DGGE analysis of rhizosphere and bulk soil. *Appl Soil Ecol*, 2008, **39**(1): 65–75.
- [24] Karr EA, Sattley WM, Jung DO, *et al.* Remarkable diversity of phototrophic purple bacteria in a permanently frozen antarctic lake. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(8): 4910–4914.

征订启事

2011年部分生物、农林类学术期刊联合征订表(2-2)

刊物名称	邮发代号	刊期	年价(元)	网 址	E-mail
微生物学通报	2-817	月刊	576	http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn	tongbao@im.ac.cn
微生物学报	2-504	月刊	660	http://journals.im.ac.cn/actamicrocn/	actamicro@im.ac.cn
武汉植物学研究	38-103	双月刊	180	http://whzwxxyj.cn	editor@rose.whiob.ac.cn
畜牧兽医学报	82-453	月刊	360	www.xmsyxb.com	xmsyxb@263.net
遗传	2-810	月刊	600	www.chinagene.cn	yczz@genetics.ac.cn
遗传学报	2-819	月刊	600	www.jgenetgenomics.org	jgg@genetics.ac.cn
云南植物研究	64-11	双月刊	150	http://journal.kib.ac.cn	bianji@mail.kib.ac.cn
植物遗传资源学报	82-643	双月刊	120	www.zwyczy.cn	zwyczyxb2003@163.com
植物学报	2-967	双月刊	480	www.chinbullbotany.com	cbb@ibcas.ac.cn
中国实验动物学报	2-748	双月刊	120	www.calas.org.cn	A67761337@126.com
中国生态农业学报	82-973	双月刊	210	www.ecoagri.ac.cn	editor@sjziam.ac.cn
中国生物工程杂志	82-673	月刊	960	www.biotech.ac.cn	biotech@mail.las.ac.cn
中国水产科学	18-250	双月刊	180	www.fishscichina.com	zgsckx@cafs.ac.cn
中国水稻科学	32-94	双月刊	120	www.ricesci.cn	cjrs@263.net
作物学报	82-336	月刊	600	www.chinacrops.org/zwxp	xbzw@chinajournal.net.cn