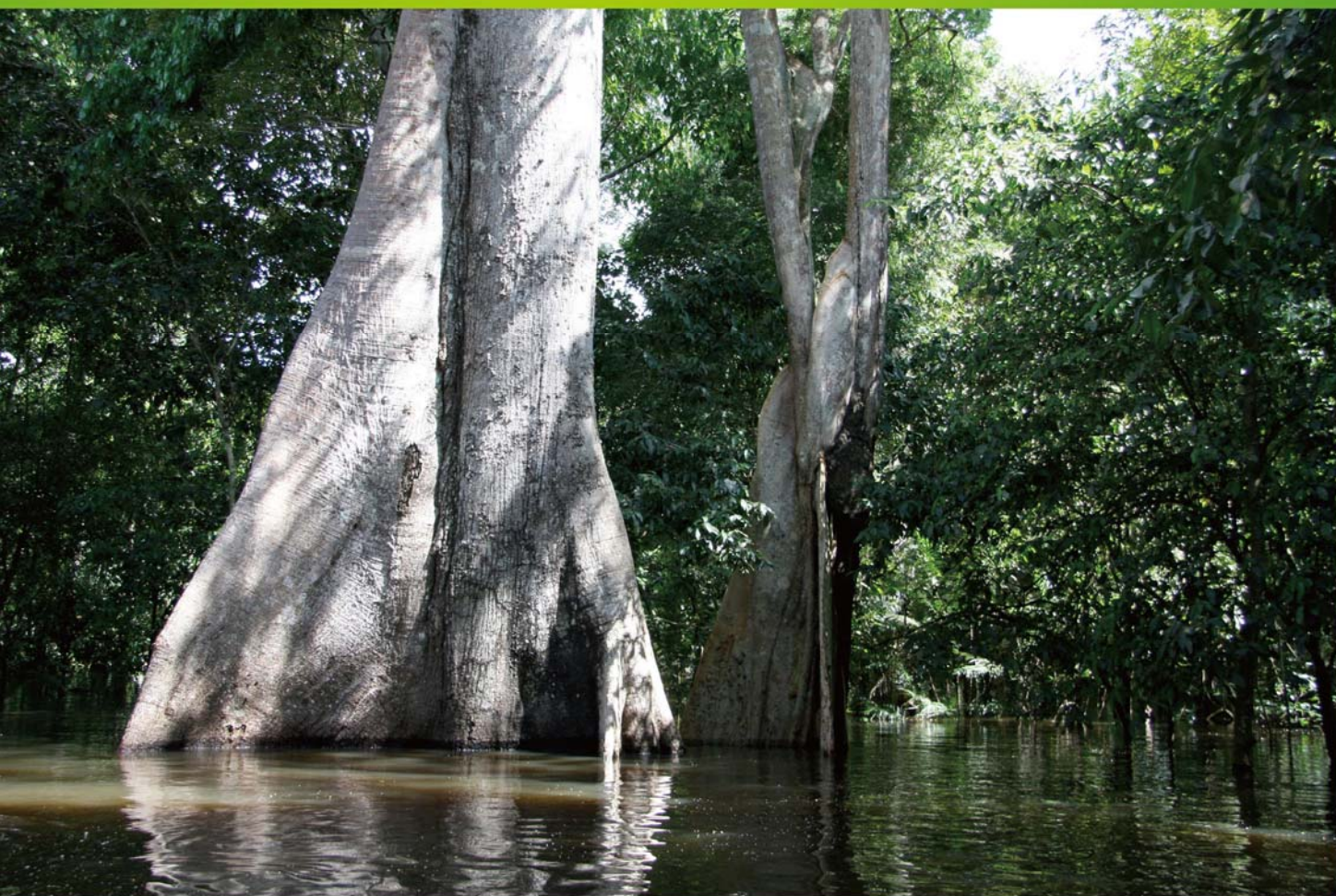


ISSN 1000-0933  
CN 11-2031/Q

# 生态学报

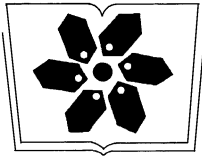
## Acta Ecologica Sinica



第31卷 第8期 Vol.31 No.8 **2011**

中国生态学学会  
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 31 卷 第 8 期

2011 年 4 月 (半月刊)

## 目 次

|                                        |                       |
|----------------------------------------|-----------------------|
| 塔里木河下游胡杨径向生长与地下水的关系·····               | 安红燕,徐海量,叶 茂,等 (2053)  |
| 冲积平原区高程因子对土壤剖面质地构型的影响——以封丘县为例·····     | 檀满枝,密术晓,李开丽,等 (2060)  |
| 臭氧胁迫对大豆叶片抗坏血酸-谷胱甘肽循环的影响·····           | 王俊力,王 岩,赵天宏,等 (2068)  |
| 重要理化因子对小球藻生长和油脂产量的影响·····              | 张桂艳,温小斌,梁 芳,等 (2076)  |
| 北亚热带马尾松净生产力对气候变化的响应·····               | 程瑞梅,封晓辉,肖文发,等 (2086)  |
| 亚热带沟叶结缕草草坪土壤呼吸·····                    | 李熙波,杨玉盛,曾宏达,等 (2096)  |
| UV-B 辐射对马尾松凋落叶分解和养分释放的影响·····          | 宋新章,张慧玲,江 洪,等 (2106)  |
| 干旱胁迫下内生真菌感染对羽茅的生理生态影响·····             | 韩 荣,李 夏,任安芝,等 (2115)  |
| 蜜环菌对锌的耐性和富集特性·····                     | 朱 林,程显好,李维焕,等 (2124)  |
| 干旱荒漠区狭叶锦鸡儿灌丛扩展对策·····                  | 张建华,马成仓,刘志宏,等 (2132)  |
| 黄土高原区不同植物凋落物搭配对土壤微生物量碳、氮的影响·····       | 王春阳,周建斌,夏志敏,等 (2139)  |
| 内蒙古典型草原克氏针茅与冰草的生存策略·····               | 孙 建,刘 苗,李胜功,等 (2148)  |
| 荒漠沙柳根围 AM 真菌的空间分布·····                 | 贺学礼,杨 静,赵丽莉 (2159)    |
| 开放式昼夜不同增温对单季稻影响的试验研究·····              | 董文军,邓艾兴,张 彬,等 (2169)  |
| 醉马草免培养内生细菌的多样性·····                    | 张雪兵,史应武,曾 军,等 (2178)  |
| 河南生态足迹驱动因素的 Hi-PLS 分析及其发展对策·····       | 贾俊松 (2188)            |
| 禹城市耕地土壤盐分与有机质的指示克里格分析·····             | 杨奇勇,杨劲松,余世鹏 (2196)    |
| 旋覆花提取物对朱砂叶螨的生物活性及酶活性的影响·····           | 段丹丹,王有年,成 军,等 (2203)  |
| 白洋淀湖滨湿地岸边带氨氧化古菌与氨氧化细菌的分布特性·····        | 叶 磊,祝贵兵,王 雨,等 (2209)  |
| 干旱胁迫条件下 6 种喀斯特主要造林树种苗木叶片水势及吸水潜能变化····· | 王 丁,姚 健,杨 雪,等 (2216)  |
| 桉树人工林物种多样性变化特征·····                    | 刘 平,秦 晶,刘建昌,等 (2227)  |
| 海河流域湿地生态系统服务功能价值评价·····                | 江 波,欧阳志云,苗 鸿,等 (2236) |
| 芦苇在微咸水河口湿地甲烷排放中的作用·····                | 马安娜,陆健健 (2245)        |
| 云南不同土壤铅背景值下大叶茶种群对铅的吸收积累特征及其遗传分化·····   | 刘声传,段昌群,李振华,等 (2253)  |
| 长江口和杭州湾凤鲚胃含物与海洋浮游动物的种类组成比较·····        | 刘守海,徐兆礼 (2263)        |
| 江西大岗山地区 7—9 月降水量的重建与分析·····            | 乔 磊,王 兵,郭 浩,等 (2272)  |
| 山核桃免耕经营的经济效益和生态效益·····                 | 王正加,黄兴召,唐小华,等 (2281)  |
| 基于 GIS 的广州市中心城区城市森林可达性分析·····          | 朱耀军,王 成,贾宝全,等 (2290)  |
| <b>专论与综述</b>                           |                       |
| 土壤呼吸温度敏感性的影响因素和不确定性·····               | 杨庆朋,徐 明,刘洪升,等 (2301)  |
| 植物代谢速率与个体生物量关系研究进展·····                | 程栋梁,钟全林,林茂兹,等 (2312)  |
| 耕地生态补偿实践与研究进展·····                     | 马爱慧,蔡银莺,张安录 (2321)    |
| <b>问题讨论</b>                            |                       |
| 元谋干热河谷三种植被恢复模式土壤贮水及入渗特性·····           | 刘 洁,李贤伟,纪中华,等 (2331)  |
| <b>研究简报</b>                            |                       |
| 中微量元素和有益元素对水稻生长和吸收镉的影响·····            | 胡 坤,喻 华,冯文强,等 (2341)  |

期刊基本参数:CN 11-2031/Q \* 1981 \* m \* 16 \* 296 \* zh \* P \* ¥ 70.00 \* 1510 \* 33 \* 2011-04



封面图说:巴西热带雨林——美丽的巴西北部玛瑙斯热带雨林景观。位于南美洲的亚马逊河是世界上流域最广、流量最大的河流,孕育了世界面积最大的热带雨林,雨林中蕴藏着极丰富的生物资源。

彩图提供:中国科学院生态环境研究中心徐卫华博士 E-mail: xuweihua@rcees.ac.cn

## 醉马草免培养内生细菌的多样性

张雪兵<sup>1,2</sup>, 史应武<sup>1</sup>, 曾 军<sup>1</sup>, 娄 恺<sup>1,\*</sup>

(1. 新疆农业科学院微生物应用研究所, 乌鲁木齐 830091; 2. 新疆农业大学食品学院, 乌鲁木齐 830052)

**摘要:** 为了解醉马草内生细菌的组成和多样性, 采用液氮研磨法提取醉马草总 DNA, 利用内生细菌 16S rRNA 基因特异性引物对醉马草总 DNA 进行 16S rRNA 基因扩增, 构建醉马草内生细菌 16S rRNA 基因文库。对筛选到 249 个克隆进行 *Hae* III 酶切分析, 得到 57 个操作分类单元 (OTUs)。系统发育分析将其归为 4 个门: 变形杆菌门 (Proteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes)、放线菌门 (Actinobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 以及 1 个未知类群。其中 74% 的克隆与可培养细菌中的 37 个属具有高的 16S rRNA 基因序列相似性 (97%—100%), 其中芽孢杆菌属 (*Bacillus* spp.)、红球菌属 (*Rhodococcus* spp.)、黄杆菌属 (*Flavobacterium* spp.)、黄单胞杆菌属 (*Xanthomonas* spp.) 最为丰富。另外 26% 的克隆序列与 GenBank 中已存细菌 16S rRNA 基因序列相似性小于 96%。研究结果表明, 醉马草中可培养内生细菌丰富, 多样并且可能存在一些潜在新物种或新类群。

**关键词:** 醉马草; 内生细菌; 免培养法; 生物多样性

## Endophytic bacterial diversity in *Achnatherum inebrians* by culture-independent approach

ZHANG Xuebing<sup>1,2</sup>, SHI Yingwu<sup>1</sup>, ZENG Jun<sup>1</sup>, LOU Kai<sup>1,\*</sup>

1 Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences Urumqi 830091, China

2 College of Food Science of Xinjiang Agricultural University Urumqi 830052, China

**Abstract:** *Achnatherum inebrians* (Hance) Keng, which is belonged to genus *Achnatherum* Beauv, Gramineae family, also known as *Oxytropis glabra*, is one of poisonous perennial herbs on grassland and is widely distributed in Inner Mongolia, Ningxia, Gansu, Qinghai and Xinjiang province of northwest China. It is toxic to hoofed mammals of the genus *Equus*, however, they are hardy and easy to grow in arid and semi-arid areas and played active role in improving ecological environment. The toxic ingredients extracted from the plant are usually used as anti-cancer drugs, immune modulators; such as Swainsonine, one of well studied anti-cancer drugs that often used to stimulate bone marrow cell proliferates. Therefore, the plant is worth of fully usage and utilizing it rationally. In this study, a culture-independent of analysis were chosen to investigate the endophytic bacterial composition and diversity associated in *Achnatherum inebrians*. Total community DNA were extracted by modified CTAB-SDS DNA extraction protocol from plant stem, leaf and root which were grinded up using liquid nitrogen grinding method after strictly surface-sterilization. To construct 16S rDNA clone libraries, endophytic bacterial specific primer pair 799F and 1492R were selected to amplify bacterial 16S rDNA partial gene, and then PCR products were ligated into a PMD18-T Vector and transformed into *Escherichia coli* DH 5 $\alpha$ . Transformants were selected by blue and white selection. Positive clones were analyzed by Restriction Fragment length polymorphism (RFLP), and clones with unique RFLP patterns were selected for sequencing, alignment and constructing 16S rRNA gene phylogenetic tree. In total 249 clones were screened, which could be grouped into 57 operational taxonomic units (OTUs), based on *Hae* III digestion. These were divided into four phyla (Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroides) and one unknown group by phylogenetic analysis. Of them, 74% of clones classified into 37 genera of bacteria phylum were highly related to cultivable species with high 16S rRNA gene similarity (>96% sequence similarity); and among them genera *Bacillus* spp.,

**基金项目:** 973 计划前期研究专项 (2008CB417214); 新疆特殊环境微生物实验室开放课题 (XJYS0203-2009-02)

**收稿日期:** 2010-04-08; **修订日期:** 2010-07-27

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: loukai02@mail.tsinghua.edu.cn

*Rhodococcus* spp., *Flavobacterium* spp., *Xanthomonas* spp., were most abundant; In addition, 26% of clones showed less than 96% of 16S rRNA gene identity with bacterial sequences deposited in GenBank database. Besides, rarefaction curve reaches clear saturation and its Coverage C value is 93%, indicating that most of the estimated endophytic bacterial diversity was sampled and 249 positive clones for enzyme digestion were enough good to the community investigation. These results suggest that *Achnatherum inebrians* harbors a diversity of cultivable endophytic bacteria and maybe existence of some potential novel species or lineages.

**Key Words:** *Achnatherum inebrians*; endophytic bacterial; culture-independent; biodiversity

醉马草[*Achnatherum inebrians* (Hance) Keng.]为禾本科(Gramineae)芨芨草属(*Achnatherum* Beauv.),多年生草本植物,原产于欧亚两洲,在我国主要分布于甘肃、新疆、内蒙古等地。醉马草具有抗高寒、耐干旱等优势,所以分布广、适应性强。醉马草是我国北方主要的烈性毒草之一,主要危害马属动物(马、驴、骡),尤其是近些年来由于过度放牧造成草场退化,而醉马草乘机蔓延成为畜牧业一大危害。在新疆醉马草广泛分布于天山南北,覆盖度最高可达85%,有重要的生态价值<sup>[1]</sup>。

近年来,研究发现醉马草内生真菌带菌率几乎达到100%<sup>[2-3]</sup>,利用内生菌防治作物病虫害、开发有益内生菌以提高作物产量和品质,对农业可持续发展具有重要意义。研究醉马草内生菌多样性,有助于阐明内生菌与醉马草共生过程中功能和潜在作用。目前对于植物内生菌的研究主要采用培养的方法,然而培养的方法仅能分离到很少的植物内生菌,不足以反映植物内生菌多样性。非培养方法可以补充培养方法的不足,较为完整的解析植物内生菌种类,但是目前利用非培养方法对醉马草内生菌多样性研究未见报道。1994年G. W. Bruch等从醉马草幼苗中分离到内生菌<sup>[4]</sup>,本课题组前期采用组织和研磨分离法从醉马草中分离到89株内生细菌,与拟杆菌门(Bacteroidetes),厚壁菌门(Firmicutes),放线菌门(Proteobacteria),放线菌门(Actinobacteria)中的8个属的16S rRNA基因相似性达到97%—100%,主要优势种群为芽孢杆菌属(*Bacillus*)。本文通过构建16S rRNA基因文库对醉马草内生细菌的组成及多样性进行分析,为深入研究醉马草内生菌生态系统的功能微生物奠定基础,从而也为发挥醉马草积极作用等方面提供理论依据和基础资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

样品采于2008年5月和7月,采样地位于乌鲁木齐南山,海拔1074—1700 m,东经87°21'31",北纬43°36'49"。采用间隔10m的5点取样法(东、南、西、北、中),每点选取供试草1株,每株草取根、茎、叶、种子(成熟期),每种器官取样2个。将样品装入无菌食品保鲜袋,带回实验室4℃保藏。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

PCR仪为Eppendorf AG 22331 Hamburg;PCR引物、TaqDNA聚合酶和PMD19-T Vector载体购自TaKaRa公司;凝胶成像系统GK-330C购自美国联合生物科技有限公司。

### 1.2 醉马草的表面消毒<sup>[5]</sup>

分离前,将采回的样本用自来水洗净,并用无菌纸吸干水分,切取根、茎、叶成1.0 cm长的小段,将种子粒从植株上剥离开再进行组织表面消毒。分别取等量的根、茎、叶、种子先用自来水冲洗干净,再用无菌水冲洗1次;在75%的乙醇浸泡30s,然后在0.1%的升汞中浸泡1min;无菌水淋洗5次,在无菌条件下晾干;取最后一次淋洗水分别涂于LB平板上,28℃培养72h,检测表面灭菌效果。

### 1.3 醉马草总DNA的提取

总DNA的提取方法参见文献<sup>[5]</sup>并稍做修改:(1)将表面灭菌处理后的实验材料各取1g放入无菌研钵中,适量添加液氮用力将醉马草组织研成粉末;(2)将1g粉末转移至无菌离心管中,加入9mL CTAB抽提缓冲

液 (2% CTAB; 100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0; 1.4 mol/L NaCl; 20 mmol/L EDTA; 1.5% Polyvinyl-pyrrolidone, PVP; 0.5% 2-mercaptoethanol) 颠倒混匀; (3) 60℃ 水浴 45 min, 期间颠倒混匀数次; (4) 加入等体积的氯仿: 异戊醇 (24:1), 彻底混匀, 4℃, 12000 r/min 离心 10 min; (5) 上清转移至无菌离心管, 重复步骤 4 一次; (6) 将上清转移至无菌离心管, 加入 2/3 体积预冷异丙醇混匀, -20℃ 放置 2h; (7) 4℃, 12000 r/min 离心 10 min, 弃上清。 (8) 沉淀用 70% 乙醇洗涤脱盐, 离心, 弃上清; (9) 干燥 DNA, 加适量无菌水或 TE (pH 8.0) 溶解; (10) 加入 RNase (使用前 100℃ 煮沸 10 min 以灭活残留的 DNase) 使终浓度达 50 μg/mL, 37℃ 水浴 30 min; 取出储存于 -20℃ 备用。

#### 1.4 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

分别以制得的 DNA 和醉马草表面消毒时的最后一次淋洗水作为 PCR 扩增的模板, 使用细菌通用引物 799f<sup>[6]</sup>: 5'-AACAGGATTAGATACCCTG-3' 和 1492r<sup>[7]</sup>: 5'-GGTTACCTTGTTCACGAC TT-3'。PCR 反应体系 (25 μL): 25 μL Premix Taq, 各 0.5 μL 引物 (10 μmol/L), 1 μL DNA (100 ng), 23 μL ddH<sub>2</sub>O。PCR 反应条件: 95℃ 4 min; 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 30 个循环; 72℃ 8 min。

#### 1.5 16S rRNA 基因文库的构建

扩增后将 730 bp 的条带用 PCR 产物纯化试剂盒回收和纯化, 并与 PMD19-T Vector 载体连接, 转化 *E. coli* DH 5α 感受态细胞。以氨苄青霉素 (100 μg/mL) 抗性和蓝白斑筛选阳性转化子。选择的阳性转化子进行扩增, 扩增引物, 正向 Primer M13F (-47) 5'-CgCCAgggTTTCCCAgTCACgAC-3'; 反向 Primer M13R (-48) 5'-AgCggATAACAATTTACACAggA-3'。PCR 扩增条件: 95℃ 8 min; 94℃ 40 s, 55℃ 40 s, 72℃ 1.5 min, 共 30 个循环; 72℃ 7 min。通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳进一步验证插入的外源片段应大约为 750 bp 左右。

#### 1.6 酶切分析及 16S rRNA 基因的序列测定

取 17.5 μL 的 16S rRNA 基因的菌落 PCR 产物, 加入 0.5 μL *Hae* III、2 μL 相应的 10×M Buffer, 使反应体系为 20 μL。37℃ 恒温过夜酶切。酶切产物用 2.5% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。选取酶切图谱不同的克隆送到上海生工生物技术有限公司进行 16S rRNA 基因的直接测序 (以 M13—47 为正向引物, M13—48 为下游引物)。

#### 1.7 多样性指数分析

采用覆盖率 (Coverage value, *C*), 香农多样性指数 (Shannon Index, *H'*), 辛普森指数 (Simpson Index, *D*) 对 16S rRNA 基因克隆文库进行微生物多样性评价分析。*C* 值理论上表示 16S rRNA 基因克隆文库中所包含的微生物种类 (OTU) 占样品中全部微生物种类的比例。 $C = 1 - n1/N$ , *N* 代表 16S rRNA 克隆文库的库容, *n1* 代表在 16S rRNA 克隆文库仅出现一次的 OTU 的数量<sup>[8]</sup>。香农多样性指数和辛普森指数的计算通过 Biodap (BIODIVERSITY DATA ANALYSIS PACKAGE) 软件进行分析<sup>[9]</sup>。

#### 1.8 基于 16S rRNA 基因的系统发育树构建

通过 NCBI 的 VECTER SCREEN 去除测序所得的 16S rRNA 基因的载体片段, 用 Blast 搜索程序从 GenBank 数据库中调出相似性较高的相关菌株的 16S rRNA 基因序列, 用 CLUSTSL X 进行多序列比对<sup>[10]</sup>, 系统进化距离矩阵根据 Kimura 模型估算, 用 MEGA 4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 软件包采用邻接法构建系统进化树<sup>[11]</sup>。重复取样 1000 次进行自展值分析来评估系统进化树的拓扑结构的稳定性<sup>[12]</sup>。本研究得到的序列已提交 GenBank 数据库, 收录号分别为 GU942752-GU942808。

## 2 结果

### 2.1 样品总 DNA 提取和 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

提取的醉马草总 DNA 片段较为完整, 基因组片段大于 23 kb (图 1-A)。通过细菌 16S rRNA 基因特异性 PCR 扩增, 得到大小为 750 bp 左右的目的片段, 同时还扩增出 1000 bp 左右的片段, 推测可能是醉马草线粒体 18S rRNA 的部分序列, 以醉马草表面消毒时的最后一次淋洗水作为 PCR 扩增的模板没有扩增出基因组的片段, 如图 1-B。

## 2.2 16S rRNA 基因克隆文库阳性转化子的筛选与酶切分析

从所构建的 16S rRNA 基因文库中随机选择了 249 个阳性克隆,用质粒上的通用引物进行菌落 PCR 扩增,扩增产物以六碱基限制性内切酶 *Hae* III 对大约 900bp 的阳性克隆插入片段(包括载体片段)进行酶切。部分酶切图谱检测结果如图 2。

由图 2 可见酶切产物得到片段大小在 100—700bp 之间,其总和都接近于未消化的 PCR 产物全长。得到了 57 个酶切图谱不同的克隆,送到上海生工生物技术有限公司进行外源 PCR 产物的直接测序。根据酶切图谱和克隆测序结果的不同,将 249 个克隆分为 57 个 OTUs。

## 2.3 基因文库多样性指数分析

采用 coverage value, Shannon Index, Simpson Index 进行克隆文库的细菌多样性评价分析。根据公式经计算得到克隆文库的多样性指数。克隆文库包含 249 个克隆,覆盖率(Coverage *C*)为 93.17%,有 57 种 16S rRNA 基因型,香农多样性指数为 2.96,均匀度为 0.91,

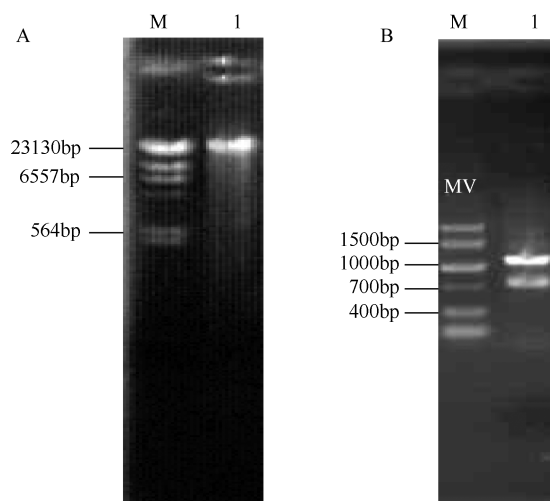


图 1 醉马草基因组 DNA (A) 和醉马草内生细菌 16S rRNA 的基因片段的 PCR 扩增结果(B)

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total DNA of *Achnatherum inebrians* (A) and the results of 16S rRNA amplification (B)

A: M: Lambda DNA Marker; Lane 1: 醉马草基因组 DNA 电泳图. B: M: Marker V, Lane 1: 醉马草内生细菌 16S rRNA 基因片段的 PCR 扩增

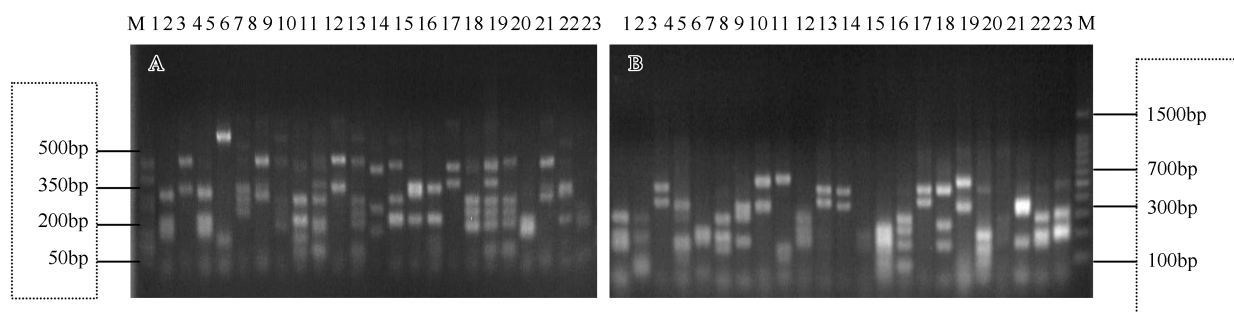


图 2 醉马草内生细菌 16S rDNA 克隆文库 RFLP 分析

Fig. 2 RFLP analysis of 16S rDNA clone library

A: M: 50bp markerladder; 2—23: 16S rDNA PCR 产物 *Hae* III 酶切图谱. B: M: 100bp markerladder; 16S rDNA PCR 产物 *Hae* III 酶切图谱

辛普森指数为 0.11,基本可以代表本醉马草样品的内生细菌多样性。从稀有度曲线和文库覆盖率 Coverage *C* 为 93.17% 可以看出,文库已很接近饱和,表明这些克隆代表了文库中大多数细菌的多样。

## 2.4 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析

选择 16S rRNA 基因的不同酶切带型所对应的阳性克隆进行测序,序列比对表明 249 个阳性克隆序列分别归属于细菌域的 4 个类群:变形菌门(Proteobacteria),厚壁菌门(Firmicutes),放线菌门(Actinobacteria),拟杆菌门(Bacteroidetes);分别归属于 25 个不同科,布鲁氏菌科(Brucellaceae),柄杆菌科(Caulobacteraceae),莫拉菌科(Moraxellaceae),地杆菌科(Geobacteraceae),芽孢杆菌科(Bacillaceae),草酸杆菌科(Oxalobacteraceae),丛毛单胞菌科(Comamonadaceae),黄色单胞菌科(Xanthomonadaceae),火色杆菌科(Flammeovirgaceae),泉发菌科(Crenotrichaceae),间孢囊菌科(Intrasporangiaceae),生丝微菌科(Hyphomicrobiaceae),黄杆菌科(Flavobacteriaceae),微单胞菌科(Micromonosporaceae),多囊菌科(Polyangiaceae),根瘤菌科(Rhizobiaceae),粘细菌科(Myxobacterium),微球菌科(Micrococcaceae),嗜甲基菌科(Methylophilaceae),假单胞菌科(Pseudomonadaceae),诺卡氏菌

科 (Nocardiaceae), 假单胞杆菌科 (Pseudomonadaceae), Ginsengiterrae, Cyclobacteriaceae, Cryomorphaceae。文库中 65% 的克隆分别与苍白杆菌属 (*Chrobactrum*), 芽孢杆菌属 (*Bacillus*), 红球菌属 (*Rhodococcus*), 黄杆菌属 (*Flavobacterium*) 等 31 个属的细菌 16S rRNA 基因相似性大于 96%; 有 15% 的克隆序列与 *Promicromonospora*, *Nocardia*, *Legionella* 和 *Novosphingobium* 属的细菌的相似性分别在 93%—95% 之间; 还有约 8% 的克隆序列与 Uncultured bacteria 的相似度较高, 结果表明醉马草内生菌中还存在新的分类单元。变形杆菌门 (Proteobacteria) 是该克隆文库中的优势类群, 包含了 143 个克隆, 占克隆文库的 57%; 而其中  $\alpha$ -proteobacteria 占克隆文库的 16%,  $\gamma$ -proteobacteria 占克隆文库的 8%,  $\delta$ -proteobacteria 占克隆文库的 2%,  $\varepsilon$ -proteobacteria 占克隆文库的 3%, 而  $\beta$ -proteobacteria 的克隆最多为 70 个, 约占克隆文库的 28%。厚壁菌门是该克隆文库的第二大优势类群, 占克隆文库的 12%, 包含了 31 个克隆子。这些克隆子与 *Bacillus* 的细菌序列相似性在 98% 以上, *Bacillus* 为该克隆文库中的最优势菌属, 与前期对醉马草内生菌可培养的研究结果一致。放线菌门的细菌占克隆文库的 7%。拟杆菌门的细菌占克隆文库的 11%。具体结果见表 1。

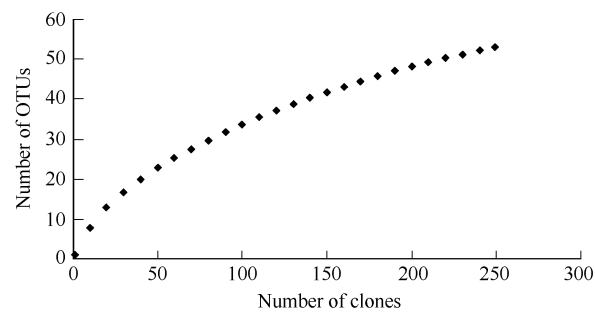


图3 醉马草内生细菌 16S rDNA 克隆文库稀有度曲线  
Fig. 3 Rarefaction curves generated for 6S rDNA of endophytic bacterial in clone library

表 1 醉马草内生细菌 16S rRNA 基因序列分析结果

Table 1 Distribution of 16S rRNA detected from endophytes in Achnatherum inebrians

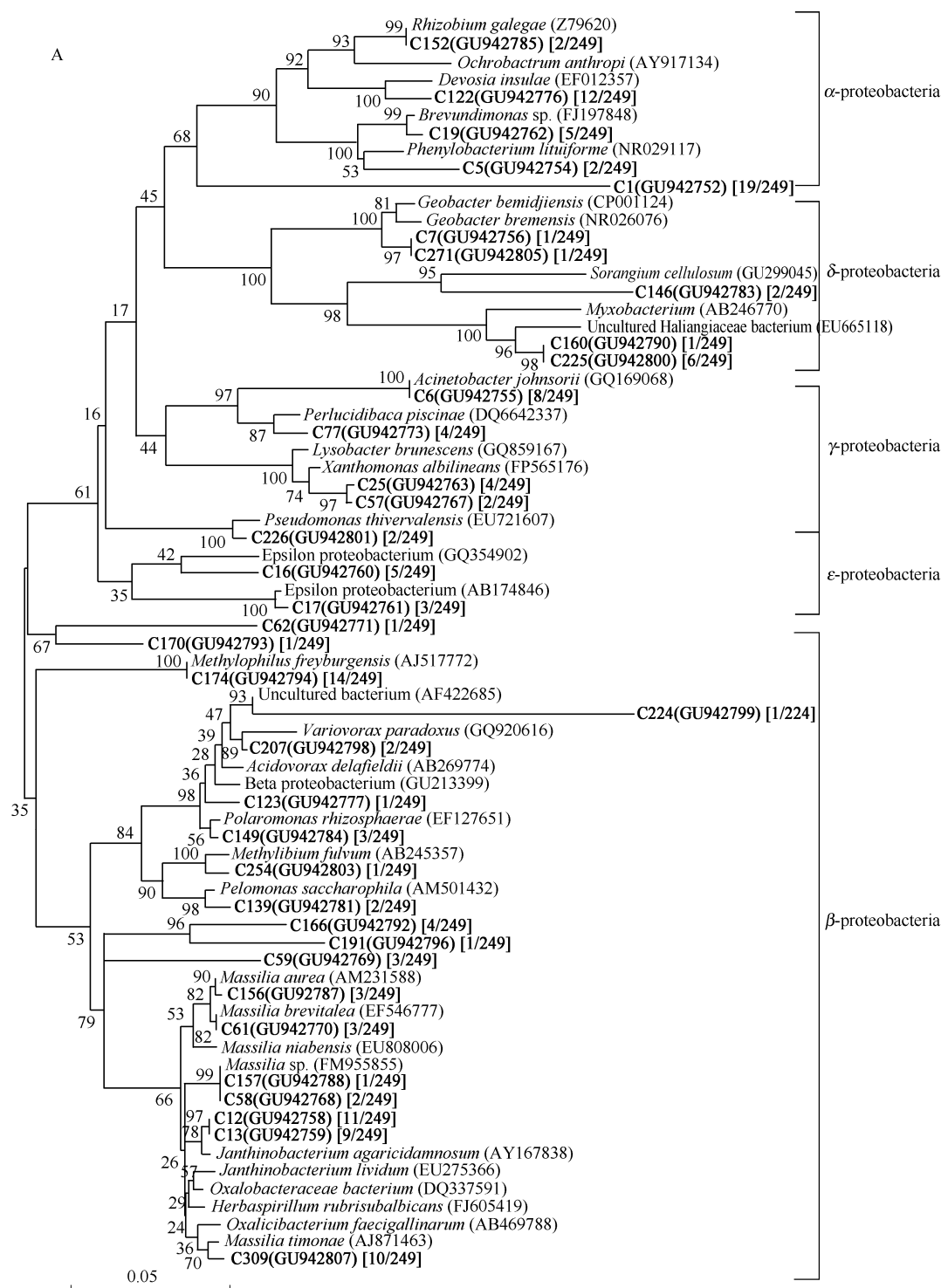
| 分类<br>Group          | OUT 数/个<br>Number<br>of OUTs | 克隆子数/个<br>Number<br>of clones | 克隆子百分比<br>% Total<br>Clones | 比对结果<br>Closest NCBI match                           | 相似性<br>% Identity |
|----------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------------|-------------------|
| Alpha-proteobacteria | 5                            | 40                            | 0.16                        |                                                      |                   |
|                      | C1                           | 19                            | 0.08                        | <i>Ochrobactrum anthropi</i> ( AY917134)             | 90                |
|                      | C5                           | 2                             | 0.01                        | <i>Phenylobacterium lituiforme</i> ( NR_029117)      | 96                |
|                      | C19                          | 5                             | 0.02                        | <i>Brevundimonas</i> sp. ( FJ197848)                 | 99                |
|                      | C122                         | 12                            | 0.05                        | <i>Devosia insulae</i> ( EF012357)                   | 97                |
|                      | C152                         | 2                             | 0.01                        | <i>Rhizobium galegae</i> ( Z79620)                   | 100               |
| Beta-proteobacteria  | 18                           | 70                            | 0.29                        |                                                      |                   |
|                      | C12                          | 11                            | 0.04                        | <i>Janthinobacterium agaricidamnosum</i> ( AY167838) | 99                |
|                      | C13                          | 9                             | 0.04                        | <i>Acidovorax delafieldii</i> ( AB269774)            | 100               |
|                      | C58                          | 2                             | 0.01                        | <i>Massilia</i> sp. ( FM955855)                      | 99                |
|                      | C59                          | 3                             | 0.01                        | <i>Massilia brevitalea</i> ( EF546777)               | 93                |
|                      | C61                          | 3                             | 0.01                        | <i>Massilia aurea</i> ( AM231588)                    | 99                |
|                      | C62                          | 1                             | 0.01                        | <i>Oxalicibacterium faecigallinarum</i> ( AB469788)  | 90                |
|                      | C123                         | 1                             | 0.01                        | <i>Beta proteobacterium</i> ( GU213399)              | 97                |
|                      | C139                         | 2                             | 0.01                        | <i>Pelomonas saccharophila</i> ( AM501432)           | 98                |
|                      | C149                         | 3                             | 0.01                        | <i>Polaromonas rhizosphaerae</i> ( EF127651)         | 99                |
|                      | C156                         | 3                             | 0.01                        | <i>Massilia niabensis</i> ( EU808006)                | 99                |
|                      | C157                         | 1                             | 0.01                        | <i>Janthinobacterium</i> sp. ( D84590.2)             | 98                |
|                      | C166                         | 4                             | 0.02                        | <i>Oxalobacteraceae bacterium</i> ( DQ337591)        | 90                |
|                      | C170                         | 1                             | 0.01                        | <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> ( FJ605419)   | 94                |
|                      | C174                         | 12                            | 0.05                        | <i>Methylophilus freyburgensis</i> ( AJ517772)       | 99                |
|                      | C191                         | 1                             | 0.01                        | <i>Janthinobacterium lividum</i> ( EU275366)         | 90                |

续表

| 分类<br>Group            | OUT 数/个<br>Number<br>of OUTs | 克隆子数/个<br>Number<br>of clones | 克隆子百分比<br>% Total<br>Clones | 比对结果<br>Closest NCBI match                            | 相似性<br>% Identity |
|------------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------|
| Gamma-proteobacteria   | C207                         | 2                             | 0.01                        | <i>Variovorax paradoxus</i> ( GQ920616 )              | 100               |
|                        | C254                         | 1                             | 0.01                        | <i>Methylibium fulvum</i> ( AB245357 )                | 98                |
|                        | C309                         | 10                            | 0.04                        | <i>Massilia timonae</i> ( AJ871463. 1 )               | 98                |
|                        | 5                            | 20                            | 0.08                        |                                                       |                   |
|                        | C6                           | 8                             | 0.03                        | <i>Acinetobacter johnsonii</i> ( GQ169068 )           | 100               |
|                        | C25                          | 4                             | 0.02                        | <i>Lysobacter brunescens</i> ( GQ859167 )             | 97                |
|                        | C57                          | 2                             | 0.01                        | <i>Xanthomonas albilineans</i> ( FP565176 )           | 97                |
| Delta-proteobacteria   | C77                          | 4                             | 0.02                        | <i>Perluclidibaca piscinae</i> ( DQ664237 )           | 98                |
|                        | C226                         | 2                             | 0.01                        | <i>Pseudomonas thivalensis</i> ( EU721607 )           | 100               |
|                        | 4                            | 5                             | 0.02                        |                                                       |                   |
|                        | C7                           | 1                             | 0.01                        | <i>Geobacter bremsensis</i> ( NR_026076. 1 )          | 97                |
|                        | C146                         | 2                             | 0.01                        | <i>Sorangium cellulosum</i> ( GU299045. 1 )           | 95                |
|                        | C160                         | 1                             | 0.01                        | <i>Myxobacterium</i> ( AB246770 )                     | 95                |
|                        | C271                         | 1                             | 0.01                        | <i>Geobacter bemidjensis</i> ( CP001124 )             | 98                |
| Epsilon-proteobacteria | 2                            | 8                             | 0.03                        |                                                       |                   |
|                        | C16                          | 5                             | 0.02                        | <i>Epsilon-proteobacterium</i> ( GQ354902 )           | 94                |
|                        | C17                          | 3                             | 0.01                        | <i>Epsilon-proteobacterium</i> ( AB174846 )           | 100               |
| Flavobacteria          | 5                            | 17                            | 0.12                        |                                                       |                   |
|                        | C3                           | 8                             | 0.09                        | <i>Algoriphagus</i> ( AB197852 )                      | 93                |
|                        | C108                         | 1                             | 0.03                        | <i>Phycococcus jejuensis</i> ( DQ345443 )             | 93                |
|                        | C138                         | 1                             | 0.01                        | <i>Flavobacterium segetis</i> ( AY581115 )            | 99                |
|                        | C155                         | 5                             | 0.02                        | <i>Flavisolibacter ginsengiterrae</i> ( AB267476 )    | 93                |
|                        | C159                         | 2                             | 0.01                        | <i>Algoriphagus locisalis</i> ( AY835923 )            | 93                |
| Sphingobacteria        | 5                            | 12                            | 0.05                        |                                                       |                   |
|                        | C34                          | 6                             | 0.02                        | <i>Cyclobacteriaceae bacterium</i> ( FJ798610 )       | 92                |
|                        | C55                          | 2                             | 0.01                        | <i>Niastella koreensis</i> ( DQ244077 )               | 97                |
|                        | C69                          | 1                             | 0.01                        | <i>Terrimonas ferrugineum</i> ( AM230484 )            | 97                |
|                        | C132                         | 2                             | 0.01                        | <i>Algoriphagus hitonicola</i> ( EF488486 )           | 99                |
|                        | C133                         | 1                             | 0.01                        | <i>Sphingobacteriales bacterium</i> ( AB540003 )      | 97                |
| Bacilli                | 3                            | 31                            | 0.12                        |                                                       |                   |
|                        | C11                          | 29                            | 0.11                        | <i>Bacillus subtilis</i> ( GQ980239 )                 | 98                |
|                        | C204                         | 1                             | 0.01                        | <i>Bacillus niacini</i> ( EU221338 )                  | 99                |
|                        | C315                         | 1                             | 0.01                        | <i>Bacillus licheniformis</i> ( GU323372 )            | 99                |
| Actinobacteridae       | 5                            | 17                            | 0.07                        |                                                       |                   |
|                        | C144                         | 1                             | 0.01                        | <i>Actinoplanes nipponensis</i> ( AB047498 )          | 94                |
|                        | C161                         | 4                             | 0.02                        | <i>Arthrobacter sulfonivorans</i> ( FM955888 )        | 100               |
|                        | C268                         | 5                             | 0.02                        | <i>Rhodococcus</i> sp. ( DQ337546 )                   | 99                |
|                        | C286                         | 5                             | 0.02                        | <i>Actinobacterium</i> ( GU167988 )                   | 99                |
|                        | 5                            | 19                            | 0.08                        |                                                       |                   |
| Uncultured bacteria    | C30                          | 3                             | 0.01                        | Uncultured marine bacterium clone( FJ826007 )         | 99                |
|                        | C88                          | 2                             | 0.01                        | Uncultured actinobacterium clone( EF220368 )          | 99                |
|                        | C182                         | 7                             | 0.03                        | Uncultured prokaryote clone( GU208351 )               | 97                |
|                        | C224                         | 1                             | 0.01                        | Uncultured bacterium clone( AF422685 )                | 93                |
|                        | C225                         | 6                             | 0.02                        | Uncultured Haliangiaceae bacterium clone ( EU665118 ) | 96                |

根据 16S rRNA 基因序列构建细菌系统发育树(图 4A), 归属于  $\alpha$ -proteobacteria 类群的 40 个克隆序列与相应的已知细菌具有相近亲缘关系, 包括 5 个 OTUs。其中 19 个克隆序列与 *Ochrobactrum anthropi* 的细菌的序列相似性为 90%; 2 个克隆与 *Phenylobacterium lituiforme* 序列相似性为 96%; 2 个克隆聚在 *Rhizobium galegae* 簇, 与 *Rhizobium galegae* 的序列相似性高达 100%; 7 个克隆与 *Devosia insulae* (EF012357) 的序列相似性为 97%; 有 5 个克隆序列 *Brevundimonas* sp. 的细菌序列相似性分别为 99%。

$\beta$ -proteobacteria 是该文库中的最优势类群, 包含 70 个克隆, 代表了 18 个 OTUs。其中有 11 个克隆序列与 *Janthinobacterium agaricidamnorum* (AY167838) 的序列相似性高达 99%, 是该克隆文库中第二大优势菌属。有



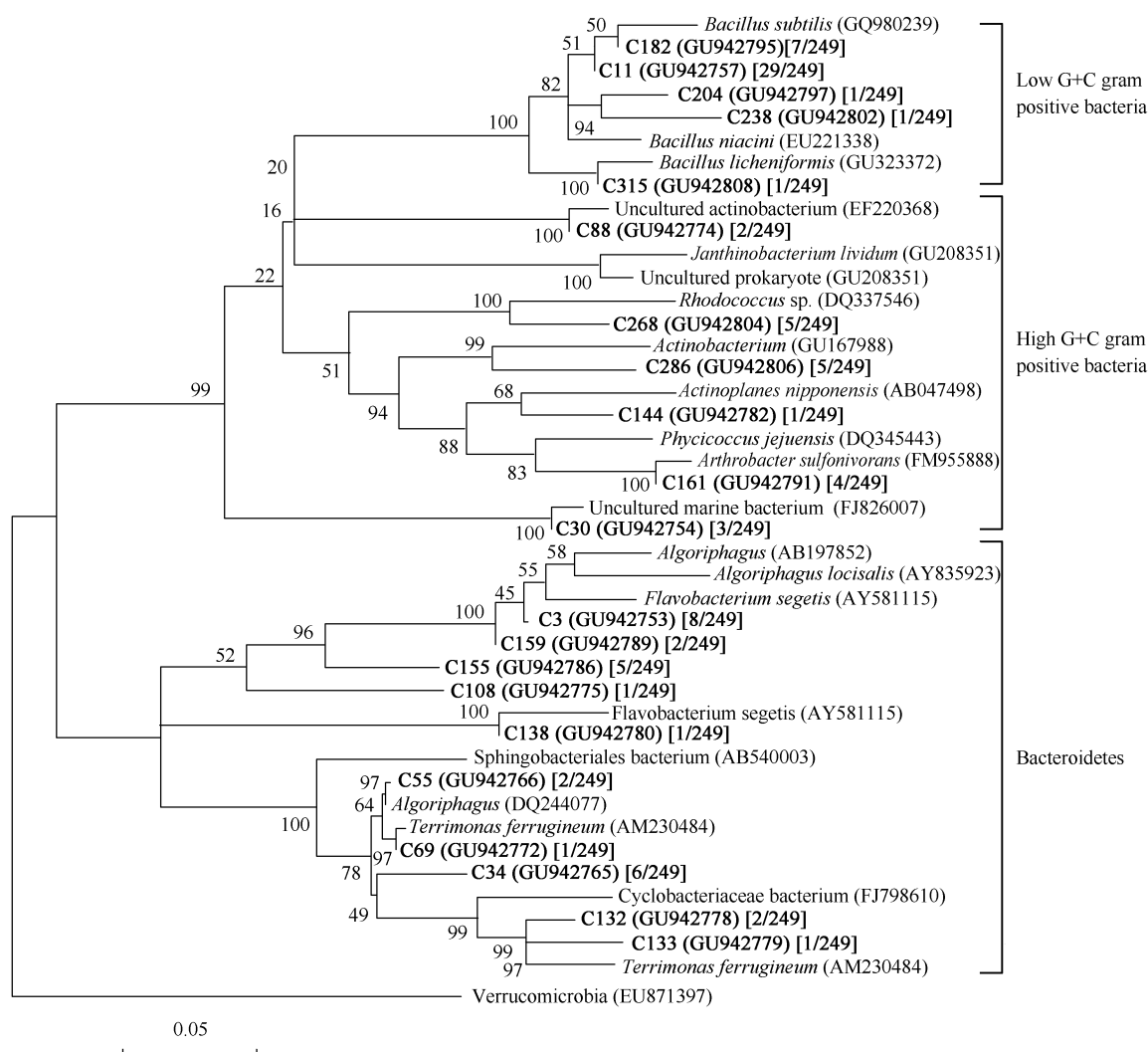


图4 Neighbor-joining 法构建醉马草内生细菌 16S rDNA 克隆文库系统发育树

Fig. 4 Neighbor-joining phylogenetic tree based on bacterial 16S rRNA gene clone library from *Achnatherum inebrians*

A:  $\alpha$ -变形菌门,  $\beta$ -变形菌门,  $\gamma$ -变形菌门,  $\delta$ -变形菌门,  $\epsilon$ -变形菌门, B: 高 G+C 革兰氏阳性菌, 拟杆菌门, 低 G+C 革兰氏阳性菌

1 个克隆序列与 *Oxalicibacterium faecigallinarum* (AB469788) 的序列相似性较低, 为 90%。5 个克隆序列分别与 *Oxalobacteraceae bacterium* (DQ337591) 和 *Janthinobacterium lividum* (EU275366) 的序列相似性较低, 均为 90%。有 29 个克隆分别与食酸菌属 *Acidovorax delafieldii* (AB269774)、*Massilia aurea* (AM231588)、*Polaromonas rhizosphaerae* (EF127651)、嗜甲基菌属 *Methylophilus freyburgensis* (AJ517772)、*Massilia niabensis* (EU808006)、*Janthinobacterium* sp. (D84590)、*Pelomonas saccharophila* (AM501432) 的相似性均在 97% 以上。

克隆文库中的 20 个克隆子聚在  $\gamma$ -proteobacteria 簇, 与其中的 5 个已知属的相似性在 97% 以上。各有一个克隆子分别与  $\delta$ -proteobacteria 中的 *Geobacter bremensis* (NR\_026076)、*Myxobacterium* (AB246770)、*Geobacter bemidjensis* (CP001124) 相似性在 95% 以上。 $\epsilon$ -proteobacteria 是本克隆文库中占 OUTs 数最少的种群。

17 个克隆与放线菌门 (Actinobacteria) 系统发育关系密切, 其中的 4 个克隆序列与 *Arthrobacter sulfonivorans* 的细菌序列相似性为 100%, 还有 10 个克隆序列与 *Rhodococcus* sp. (DQ337546) 和 *Actinobacterium* (GU167988) 的序列相似性为 99%。1 个克隆序列与 *Actinoplanes nipponensis* (AB047498) 的细菌的序列相似性为 94%。

21 个克隆与 *Bacillus subtilis* (GQ980239) 聚在一起, 其中有 29 个克隆序列与厚壁菌门的枯草芽孢杆菌属

*Bacillus subtilis* (GQ980239) 的序列相似性高达 98%, 是该克隆文库中第一大优势菌属。29 个克隆分别属于拟杆菌门 (Bacteroidetes) 的黄杆菌纲 (Flavobacteria) 和鞘脂杆菌纲 (Sphingobacteria)。

### 3 讨论

本研究通过对醉马草内生细菌 16S rRNA 基因克隆文库酶切图谱分析, 表明醉马草内生菌有丰富的多样性。克隆文库稀缺性曲线和 Coverage C 值同样证明新疆内生细菌 16S rRNA 基因克隆文库能较完整的反映醉马草内生细菌的组成。本课题前期采用可培养方法分离的醉马草内生细菌与 8 个已知属相似性高达 97%—100%, 而本克隆文库中内生菌分别与变形菌门 (Proteobacteria), 厚壁菌门 (Firmicutes), 放线菌门 (Actinobacteria), 与拟杆菌门 (Bacteroidetes) 四类细菌中的 31 个属相似性达 95% 以上, 由此可见醉马草内生细菌多样性比较丰富。

构建的醉马草内生细菌克隆文库中优势类群为变形菌门 (Proteobacteria), 这与其他研究报道, 水稻, 玉米, 人参和野生芥末内生细菌<sup>[13-16]</sup> 的优势类群相符; 变形菌门 (Proteobacteria) 的各个亚类在不同植物内生细菌种群中出现的几率是不同的, 其中  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ - Proteobacteria 为群落中优势类群, 然而  $\delta$ -、 $\epsilon$ -proteobacteria 亚类报道却很少。通过构建醉马草内生细菌克隆文库的方法证实醉马草内生细菌群落中同样存在  $\delta$ -和  $\epsilon$ -proteobacteria, 只是在整个内生细菌群落中所占的比例很少。与水稻和人参根部 16S rRNA 基因克隆文库的优势菌属不同, 本研究为芽孢杆菌 (*Bacillus*) 属, 与醉马草内生细菌可培养研究结果<sup>[17]</sup> 一致。这可能与两者所处环境不同有关, 醉马草生长在年降水量少、温差大以及强光照等地带, *Bacillus* 属的细菌更加适应这种生境<sup>[18]</sup>。系统发育分析表明有 8% 的克隆与不可培养细菌具有较高相似性, 还有一些克隆与已知的可培养细菌相似性较低, 为 90% 以下, 这表明醉马草内生细菌种群中存在着丰富的未培养、或存活的但不可培养的细菌, 可能代表新的分类单元, 所以研究结果表明构建细菌 16S rRNA 克隆文库的方法在研究植物内生细菌群落多样性是比较有效的。

本研究应用 16S rRNA 基因克隆文库技术构建了新疆醉马草细菌 16S rRNA 克隆文库, 进一步弄清了醉马草体内微生态环境中内生细菌群落组成的基本情况。但由于本研究只对醉马草细菌 16S rRNA 克隆文库进行了构建, 而对醉马草内其他微生物类群缺乏全面认识, 需要进一步研究。因此要全面了解醉马草内生菌多样性, 还需要考虑醉马草的生态环境, 综合分析醉马草内生菌构成, 从而为醉马草内生菌的应用奠定基础。

利用免培养方法并不能完全、真实地反映环境微生物多样性, 所以需要结合新的纯培养技术和分离方法来更全面真实的认识植物微生态系统中微生物多样性及其功能。

**致谢:** 野外采样工作得到孙健、胡蓉、朱莉、胡雯的帮助, 在此一并致谢。

### References:

- [1] Li C J, Zhang X X, Li F, Nan Z B, Schardl C L. Disease and pests resistance of endophyte infected and non-infected drunken horse grass. New Zealand Grassland Association, 2007; 111-114.
- [2] Li C J, Nan Z B, Gao J H. Detection and distribution of *Neotyphodium*-Achnatherum/brominebrans association in China. Proceedings of 5th International *Neotyphodium*/Grass Interactions Symposium, 2004; 24-27.
- [3] Nan Z B, Li C J. *Neotyphodium* in native grasses in China and observations on endophyte/host interaction // Proceedings of the 4th International *Neotyphodium*/Grass Interactions Symposium. Beijing: China Agriculture Press, 2000; 41-50.
- [4] Li B J, Zheng X H, Sa H D L, Sun S C. An investigation of endophyte. Grass-Feeding Livestock, 1996, (S1): 13-14.
- [5] Jiang L, Cai L H. A method for extracting DNA of *Ginkgo biloba*. Plant Physiology Communications, 2000, 36(4): 340-342.
- [6] Chelius M K, Triplett E W. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. Microbial Ecology, 2001, 41(3): 252-263.
- [7] Lane D J. 16S/23S rRNA sequencing // Stackenbrandt E, Goodfellow M, eds. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic. 1991; 115-175.
- [8] Good I J. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. Biometrika, 1953, 40(3/4): 237-264.
- [9] Hill T C J, Walsh K A, Harris J A, Moffett B F. Using ecological diversity measure with bacterial communities. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 43(1): 1-11.

- [10] Thompson J D, Gibosn T J, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D G. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [11] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16(2): 111-120.
- [12] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 1985, 39(4): 783-791.
- [13] Qiu F B. Exploration on endophytic bacteria in *Panax ginseng* roots with culture-dependent and culture-independent approaches. Beijing: Capital Normal University, 2007.
- [14] Sun L. Investigating Endophytic bacterial in rice with Culture- dependent and Culture-independent Approaches. Capital Normal University. Doctorial dissertation, 2006.
- [15] Qiu F, Huang Y, Sun L, Zhang X, Liu Z, Song W. *Leifsonia ginsengi* sp. nov., isolated from ginseng root. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(2): 405-408.
- [16] Idris R, Trifonova R, Puschenreiter M, Wenzel W W, Sessitsch A. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(5): 2667-2677.
- [17] Zhang X B, Shi Y W, Wang X X, Zhang W, Lou k. Study on the isolation, identification and insecticidal activity of endophyte from *Achnatherum inebrians*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(4): 530-536.
- [18] Meng X Z, Su Y H, Zhu D Z. Sustainable utilization of *Radix Glycyrrhizae* for protection of ecology environment and herbal resources. *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 2006, 4(6): 556-559.

#### 参考文献:

- [4] 李保军, 郑晓红, 萨赫都拉, 孙穗长. 醉马草植物内生菌检查. *草食家畜*, 1996, (增刊): 13-14.
- [5] 姜玲, 蔡礼鸿. 一种提取银杏中 DNA 的方法. *植物生理学通讯*, 2000, 36(4): 340 -342.
- [13] 邱服斌. 培养方法与非培养方法对人参根内生细菌的研究. 北京: 首都师范大学博士论文, 2007.
- [17] 张雪兵, 史应武, 王晓霞, 张伟, 娄恺. 醉马草内生菌的分离、鉴定及杀虫效果. *微生物学报*, 2010, 50(4): 530-536.
- [18] 孟宪泽, 苏永华, 朱德增. 科学利用甘草, 保护我国生态环境和药材资源. *中西医结合学报*, 2006, 4(6): 556-559.

# ACTA ECOLOGICA SINICA Vol. 31, No. 8 April, 2011 (Semimonthly)

## CONTENTS

|                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| The relationship between <i>Populus euphratica</i> 's radial increment and groundwater level at the lower reach of Tarim River .....                                                                                                               | AN Hongyan, XU Hailiang, YE Mao, et al (2053)             |
| Influence of elevation factor on soil profile texture configuration: a case study of the alluvial plain of Fengqiu County .....                                                                                                                    | TAN Manzhi, MI Shuxiao, LI Kaili, et al (2060)            |
| Effects of ozone on AsA-GSH cycle in soybean leaves .....                                                                                                                                                                                          | WANG Junli, WANG Yan, ZHAO Tianhong, et al (2068)         |
| The effects of physical and chemical factors on the growth and lipid production of <i>Chlorella</i> .....                                                                                                                                          | ZHANG Guiyan, WEN Xiaobin, LIANG Fang, et al (2076)       |
| Response of net productivity of masson pine plantation to climate change in North Subtropical Region .....                                                                                                                                         | CHENG Ruimei, FENG Xiaohui, XIAO Wenfa, et al (2086)      |
| Soil respiration of <i>Zoysia matrella</i> turfgrass in subtropics .....                                                                                                                                                                           | LI Xibo, YANG Yusheng, ZENG Hongda, et al (2096)          |
| Effect of UV-B radiation on the leaf litter decomposition and nutrient release of <i>Pinus massoniana</i> .....                                                                                                                                    | SONG Xinzhang, ZHANG Huiling, JIANG Hong, et al (2106)    |
| Physiological ecological effect of endophyte infection on <i>Achnatherum sibiricum</i> under drought stress .....                                                                                                                                  | HAN Rong, LI Xia, REN Anzhi, et al (2115)                 |
| Zinc Tolerance and Accumulation Characteristics of <i>Armillaria mellea</i> .....                                                                                                                                                                  | ZHU Lin, CHENG Xianhao, LI Weihuan, et al (2124)          |
| Expansion strategies of <i>Caragana stenophylla</i> in the arid desert region .....                                                                                                                                                                | ZHANG Jianhua, MA Chengcang, LIU Zhihong, et al (2132)    |
| Effects of mixed plant residues from the Loess Plateau on microbial biomass carbon and nitrogen in soil .....                                                                                                                                      | WANG Chunyang, ZHOU Jianbin, XIA Zhimin, et al (2139)     |
| Survival strategy of <i>Stipa krylovii</i> and <i>Agropyron cristatum</i> in typical steppe of Inner Mongolia .....                                                                                                                                | SUN Jian, LIU Miao, LI Shengcong, et al (2148)            |
| Spatial distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in <i>Salix psammophila</i> root-zone soil in Inner Mongolia desert .....                                                                                                                     | HE Xueli, YANG Jing, ZHAO Lili (2159)                     |
| An experimental study on the effects of different diurnal warming regimes on single cropping rice with Free Air Temperature Increased (FATI) facility .....                                                                                        | DONG Wenjun, DENG Aixin, ZHANG Bin, et al (2169)          |
| Endophytic bacterial diversity in <i>Achnatherum inebrians</i> by culture-independent approach .....                                                                                                                                               | ZHANG Xuebing, SHI Yingwu, ZENG Jun, et al (2178)         |
| Hierarchical Partial Least Squares (Hi_PLS) model analysis of the driving factors of Henan's Ecological Footprint (EF) and its development strategy .....                                                                                          | JIA Junsong (2188)                                        |
| Evaluation on spatial distribution of soil salinity and soil organic matter by indicator Kriging in Yucheng City .....                                                                                                                             | YANG Qiyong, YANG Jinsong, YU Shipeng (2196)              |
| The toxicity of lupeol of <i>Inula britannica</i> on <i>Tetranychus cinnabarinus</i> and its effects on mite enzyme activity .....                                                                                                                 | DUAN Dandan, WANG Younian, CHENG Jun, et al (2203)        |
| Abundance and biodiversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in littoral wetland of Baiyangdian Lake, North China .....                                                                                                                    | YE Lei, ZHU Guibing, WANG Yu, et al (2209)                |
| Changes of leaf water potential and water absorption potential capacities of six kinds of seedlings in Karst mount area under different drought stress intensities: Taking six forestation seedlings in karst Mountainous region for example ..... | WANG Ding, YAO Jian, YANG Xue, et al (2216)               |
| Comparison of structure and species diversity of <i>Eucalyptus</i> community .....                                                                                                                                                                 | LIU Ping, QIN Jing, LIU Jianchang, et al (2227)           |
| Ecosystem services valuation of the Haihe River basin wetlands .....                                                                                                                                                                               | JIANG Bo, OUYANG Zhiyun, MIAO Hong, et al (2236)          |
| Effects of <i>Phragmites australis</i> on methane emission from a brackish estuarine wetland .....                                                                                                                                                 | MA Anna, LU Jianjian (2245)                               |
| Genetic differentiation and the characteristics of uptake and accumulation of lead among <i>Camellia sinensis</i> populations under different background lead concentrations of soils in Yunnan, China .....                                       | LIU Shengchuan, DUAN Changqun, LI Zhenhua, et al (2253)   |
| Comparison of zooplankton lists between <i>Coilia mystus</i> food contents and collections from the Yangtze River Estuary & Hangzhou Bay .....                                                                                                     | LIU Shouhai, XU Zhaoli (2263)                             |
| Reconstruction and analysis of July-September precipitation in Mt. Dagangshan, China .....                                                                                                                                                         | QIAO Lei, WANG Bing, GUO Hao, et al (2272)                |
| Analysis on economic and ecological benefits of no-tillage management of <i>Carya cathayensis</i> .....                                                                                                                                            | WANG Zhengjia, HUANG Xingzhao, TANG Xiaohua, et al (2281) |
| GIS-based analysis of the accessibility of urban forests in the central city of Guangzhou, China .....                                                                                                                                             | ZHU Yaojun, WANG Cheng, JIA Baoquan, et al (2290)         |
| <b>Review and Monograph</b>                                                                                                                                                                                                                        |                                                           |
| Impact factors and uncertainties of the temperature sensitivity of soil respiration .....                                                                                                                                                          | YANG Qingpeng, XU Ming, LIU Hongsheng, et al (2301)       |
| The advance of allometric studies on plant metabolic rates and biomass .....                                                                                                                                                                       | CHENG Dongliang, ZHONG Quanlin, LIN Maozi, et al (2312)   |
| Practice and the research progress on eco-compensation for cultivated land .....                                                                                                                                                                   | MA Aihui, CAI Yinying, ZHANG Anlu (2321)                  |
| <b>Discussion</b>                                                                                                                                                                                                                                  |                                                           |
| Soil water holding capacities and infiltration characteristics of three vegetation restoration models in dry-hot valley of Yuanmou .....                                                                                                           | LIU Jie, LI Xianwei, JI Zhonghua, et al (2331)            |
| <b>Scientific Note</b>                                                                                                                                                                                                                             |                                                           |
| Effects of secondary, micro- and beneficial elements on rice growth and cadmium uptake .....                                                                                                                                                       | HU Kun, YU Hua, FENG Wenqiang, et al (2341)               |

# 2009 年度生物学科总被引频次和影响因子前 10 名期刊★

(源于 2010 年版 CSTPCD 数据库)

| 排序<br>Order | 期刊 Journal                              | 总被引频次<br>Total citation | 排序<br>Order | 期刊 Journal    | 影响因子<br>Impact factor |
|-------------|-----------------------------------------|-------------------------|-------------|---------------|-----------------------|
| 1           | 生态学报                                    | 11764                   | 1           | 生态学报          | 1.812                 |
| 2           | 应用生态学报                                  | 9430                    | 2           | 植物生态学报        | 1.771                 |
| 3           | 植物生态学报                                  | 4384                    | 3           | 应用生态学报        | 1.733                 |
| 4           | 西北植物学报                                  | 4177                    | 4           | 生物多样性         | 1.553                 |
| 5           | 生态学杂志                                   | 4048                    | 5           | 生态学杂志         | 1.396                 |
| 6           | 植物生理学通讯                                 | 3362                    | 6           | 西北植物学报        | 0.986                 |
| 7           | JOURNAL OF INTEGRATIVE<br>PLANT BIOLOGY | 3327                    | 7           | 兽类学报          | 0.894                 |
| 8           | MOLECULAR PLANT                         | 1788                    | 8           | CELL RESEARCH | 0.873                 |
| 9           | 水生生物学报                                  | 1773                    | 9           | 植物学报          | 0.841                 |
| 10          | 遗传学报                                    | 1667                    | 10          | 植物研究          | 0.809                 |

★《生态学报》2009 年在核心版的 1964 种科技期刊排序中总被引频次 11764 次,全国排名第 1;影响因子 1.812,全国排名第 14;第 1~9 届连续 9 年入围中国百种杰出学术期刊;中国精品科技期刊

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 31 卷 第 8 期 (2011 年 4 月)

ACTA ECOLOGICA SINICA  
(Semimonthly, Started in 1981)  
Vol. 31 No. 8 2011

|               |                                                                                                                    |                 |                                                                                                                                                                                 |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 编 辑           | 《生态学报》编辑部<br>地址:北京海淀区双清路 18 号<br>邮政编码:100085<br>电话:(010)62941099<br>www.ecologica.cn<br>shengtaixuebao@rcees.ac.cn | Edited by       | Editorial board of<br>ACTA ECOLOGICA SINICA<br>Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China<br>Tel:(010)62941099<br>www.ecologica.cn<br>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           | 中国生态学会<br>中国科学院生态环境研究中心<br>地址:北京海淀区双清路 18 号<br>邮政编码:100085                                                         | Sponsored by    | Ecological Society of China<br>Research Center for Eco-environmental Sciences, CAS<br>Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China                                 |
| 出 版           | 科 学 出 版 社<br>地址:北京东黄城根北街 16 号<br>邮政编码:100717                                                                       | Published by    | Science Press<br>Add:16 Donghuangchenggen North Street,<br>Beijing 100717, China                                                                                                |
| 印 刷           | 北京北林印刷厂                                                                                                            | Printed by      | Beijing Bei Lin Printing House,<br>Beijing 100083, China                                                                                                                        |
| 发 行           | 科 学 出 版 社<br>地址:东黄城根北街 16 号<br>邮政编码:100717<br>电话:(010)64034563<br>E-mail:journal@csppg.net                         | Distributed by  | Science Press<br>Add:16 Donghuangchenggen North<br>Street, Beijing 100717, China<br>Tel:(010)64034563<br>E-mail:journal@csppg.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<br>地址:北京 399 信箱<br>邮政编码:100044                                                                         | Foreign         | China International Book Trading<br>Corporation<br>Add:P. O. Box 399 Beijing 100044, China                                                                                      |
| 广告经营<br>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