

# 若尔盖高原产甲烷菌数量的时空差异性

汤博 唐杰 吴俐莎 杨志荣 张杰\*

(四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室 四川 成都 610064)

**摘要:** 应用实时荧光定量 PCR 法, 构建了总甲烷菌实时荧光绝对定量 PCR 的标准品以及标准曲线, 用于总甲烷菌的定量测定, 所构建的质粒 DNA 浓度为 160 mg/L, 标准曲线相关性为 0.992, 扩增效率为 98.6%。研究表明, 若尔盖花湖地区 4 月草地生态系统和湿地生态系统甲烷菌含量相当, 湿地生态系统 9 月甲烷菌含量高于 7 月, 7 月甲烷菌含量高于 4 月, 在 7 月和 9 月随着深度的增加甲烷菌含量也增加, 而草地生态系统的甲烷菌含量并未表现出明显的季节和深度上的规律性。

**关键词:** 若尔盖高原, 实时荧光定量 PCR, 甲烷菌

## Time-space Change of Methanogen Amount from Zoige Plateau

TANG Bo TANG Jie WU Li-Sha YANG Zhi-Rong ZHANG Jie\*

(College of Life Sciences, Key Laboratory of Bio-resource and Bio-environment, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China)

**Abstract:** To quantify the population size of total methanogens changing with environments, season and depths of Zoige plateau, the plasmids and standard curves of species were constructed by using real-time absolute quantitative PCR. The concentration of the standard plasmids was 160 mg/L, with the coefficient being 0.992, and the amplification efficiency was 98.6%. The results showed that in April the population size of total methanogens in wetland ecosystem and grassland ecosystem were nearly the same. In wetland ecosystem, the population size of total methanogens decreased in the order of September, July, and April, while increased with the sampling depth in September and July. In grassland ecosystem, however, the population size of total methanogens did not change significantly with season and depth.

**Keywords:** Zoige plateau, Real-time PCR, Methanogens

目前全球气候变暖问题已经引起了全世界的广泛关注, 甲烷是仅次于二氧化碳的最重要的温室气体, 单分子甲烷的温室效应作用是二氧化碳的 25 倍<sup>[1]</sup>, 甲烷不仅由于对全球气候变暖的显著作用而倍受科学界关注, 同时参与一系列的化学反应, 从而影响对流层以及平流层臭氧浓度, 这也成为甲烷倍受

关注的原因之一<sup>[2]</sup>。目前对水稻田和牛胃甲烷菌的研究很多, 而对高原地区的研究较少, 我国是湿地分布面积较大的国家, 仅次于加拿大和俄罗斯, 居世界第 3 位, 且具有独特的高原湿地。若尔盖高原位于青藏高原北部平, 均海拔 3400 m, 总面积为 4038 km<sup>2</sup>, 是一个完整的高原盆地自然地理区。高原

湖泊和沼泽高度发达, 该地区早期的研究指出若尔盖高原是青藏高原甲烷排放中心之一<sup>[3-5]</sup>。

MCR 是甲烷产生过程中的一个关键酶, 唯一存在于甲烷菌中, MCR 存在 2 种形式, MCR I 和 MCR II, 其中 MCR I 存在于所有甲烷菌中, MCR I 复合体的一个肽段被 *mcrA* 基因编码, 这个基因被当作利用 PCR 技术检测甲烷菌的一个有效而稳定的方法<sup>[6]</sup>。利用以 *mcrA* 基因为目的片段的 PCR 技术已被广泛应用在稻田<sup>[6]</sup>、泥炭沼泽<sup>[7-9]</sup>、白蚁肠道<sup>[10]</sup>和海洋<sup>[11]</sup>中甲烷菌的检测。Springer E 等<sup>[12]</sup>在 1995 年利用 PCR 方法成功地分析、鉴定了 5 个已知的甲烷八叠球菌中的 1 个。Luton PE 等<sup>[13]</sup>改进了 *mcrA* 基因 PCR 的引物, 成功地对垃圾场内甲烷菌的种类进行了检测, 证实了利用 *mcrA* 基因检测甲烷菌的可靠性和稳定性, 是鉴定甲烷菌的一种非常适用的手段。本文通过将 *mcrA* 基因的 PCR 产物进行纯化后克隆到载体上, 通过抽提质粒测定其浓度, 梯度稀释模板进行 PCR 扩增, 建立标准曲线, 通过同时扩增标准品和目标产物, 来准确定量样品中甲烷菌的含量。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试验地简介:** 本试验设置在若尔盖湿地国家级自然保护区境内花湖地区(33°56'N, 102°52'E), 海拔高度约为 3430 m。该地区东北为山坡, 并沿东北-西南方向从山坡到花湖湖滨形成缓坡, 具有明显的环境格局和水分梯度差异。区内土壤以高原沼泽土为主, 主要植被优势种包括木里苔草(*Carex muliensis*)、刚毛草(*Elocharis valleeuLose*)、藏篙草(*Kobresia tibetica*)、侧茎垂头菊(*Cremanthodium pleurocaule*)、二裂委陵菜(*Potentilla bifurca*)、马先蒿属(*Pedicularis* sp.)、水甜茅(*Glyceria aquatica*)及两栖蓼(*Polygonum amphibium*)等<sup>[14-15]</sup>。

**1.1.2 样品采集:** 土壤样品采集于国家级自然保护区境内花湖地区湿地、草地 2 种不同生境, 采集时间为 4、7、9 月, 采集深度为 20 cm、40 cm、60 cm。土壤样品采集好后, 放于液氮罐中保存备用。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** PCR 仪: PTC-200 (美国), 定量 PCR 仪: IQ5 购于 Bio-Rad 公司, 氨苄青霉素 (Amp)、5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷(X-gal)、异丙基-β-D 硫代半乳糖苷 (IPTG)、感受态细胞

(*Escherichia coli* DH5α)、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒和 T-Vector 载体, 质粒小提试剂盒, RealMaster-Mix (SYBR Green I) 荧光染料均购自天根生化科技(北京)有限公司。土壤 DNA 提取试剂盒购于 MP Biomedical 公司, PCR 引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

### 1.2 方法

**1.2.1 样品总 DNA 提取:** 利用 MP Biomedical 公司的 FastDNA SPIN Kit for Soil 试剂盒提取基因组 DNA, 如果提取出的 DNA 含有杂质, 再用酚-氯仿抽提 2 次, 再用 0.75% 的琼脂糖凝胶电泳检查提取 DNA 的质量和片段大小, 用紫外分光光度计测定其核酸浓度纯度, -20°C 保存, 备用。

**1.2.2 目的片段扩增:** 以提取的土壤总 DNA 为模板, 用甲烷菌 *mcrA* 特异性引物进行 PCR 反应。PCR 反应体系为 25 μL, 其中 Master mix 12.5 μL, 引物 P1、P2 (10 μmol/L) 各 1 μL, 引物设计参照 Luton PE 等<sup>[13]</sup>甲烷菌 *mcrA* 基因通用引物, 序列为 P1 (5'-GGTGGTGTMGATTACACARTAYGCWACAGC-3'), P2 (5'-TTCATTGCRTAGTTWGGRTAGTT-3')。引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。适当稀释的 DNA 模板 1 μL, 用 ddH<sub>2</sub>O 补充至总体积 25 μL。PCR 热循环参数: 94°C 3 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s, 30 个循环; 72°C 5 min; 4°C 保温。PCR 反应结束后取 5 μL PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

**1.2.3 重组标准质粒制备:** 按照琼脂糖凝胶 DNA 片段回收纯化试剂盒说明对 PCR 产物进行纯化、回收。按照 pBS-T 载体试剂盒的说明书将纯化的 PCR 产物与 pBS-T 载体连接。连接体系为 10 μL, 其中 pBS-T 载体 1 μL、纯化 PCR 产物 3 μL、连接酶 5 μL、灭菌双蒸去离子水 1 μL, 于 16°C 过夜反应后热击转化, 加入 1 mL 37°C 预热的 SOC 液体培养基, 37°C、180 r/min 振荡 1 h。取 200 μL 菌液涂于加有氨苄、IPTG 和 X-gal 的 LB 培养基平板上, 37°C 培养过夜直至可观察到菌落为止。挑选单个白色菌斑至 3 mL 含氨苄 LB 培养基, 37°C 进行培养直至培养液变混浊。按照质粒 DNA 提取试剂盒的操作要求提取质粒 DNA, 以原有 PCR 引物对质粒 DNA 进行扩增, 根据扩增特异条带的大小鉴定重组子后再进行测序鉴定。测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。根据测序结果在 GenBank 上利用 BLAST 进行

序列的同源性分析。

**1.2.4 实时荧光定量 PCR:** 抽提经 PCR 及测序鉴定为阳性克隆的重组质粒 DNA, 用紫外分光光度计测定其浓度(mg/L), 根据质粒的分子质量与质量浓度计算拷贝数, 制得标准品。将标准品按 10 倍梯度稀释, 用作模板在实时定量 PCR 仪上进行扩增, 建立循环数与质粒浓度对应关系的定量标准曲线。以 RealMasterMix (SYBR Green I)试剂建立 20  $\mu$ L 反应体系, 其中 SYBR Green I 荧光染料预混试剂 9  $\mu$ L, 根据测序结果设计上、下游引物 P3、P4 (10  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, 根据测序结果后由 Bio-Rad 公司设计英骏公司合成, 序列为 P3 (5'-TGCGTAGTTAGGGTAGTTGGG-3'), P4 (5'-GCAGGATCAGTGCGGTGC-3')。质粒 DNA 模板 1  $\mu$ L 和双蒸去离子水 8  $\mu$ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 20 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 30 s (采集荧光信号), 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。按仪器操作说明选择熔解曲线分析, 55 $^{\circ}$ C 升至 95 $^{\circ}$ C, 梯度为 0.5 $^{\circ}$ C, 每个梯度保温 10 s, 自动采集荧光。在获得稳定的标准曲线后, 将待测样品 DNA 稀释 10 倍后和标准品同时扩增, 根据建立的标准曲线来计算出未知样品中甲烷菌的浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 目标片段扩增

以样品总 DNA 为模板进行 PCR 扩增后的总甲烷菌目标片段经凝胶回收, 由图 1 可见, 扩增大小与设计时的大小结果一致, 约为 470 bp。目标片段扩增的成功与否取决于反应体系、扩增参数、引物设计等的正确与否, 试验成功扩增出了目标片段, 说明上述条件都符合甲烷菌特异片段扩增的要求。

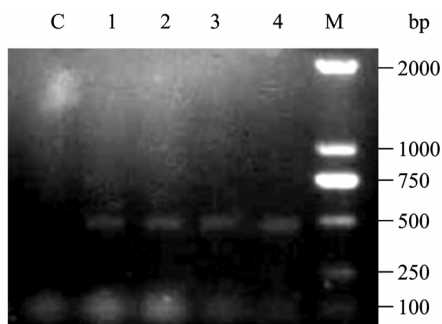


图 1 目的片段 PCR 凝胶回收后电泳图谱  
Fig. 1 Electrophoresis of target fragment via gel recovered  
注: C: 空白对照; M: DL2000 marker; 1-4: 样品。  
Note: C: Control; M: DL2000 marker; 1-4: Samples.

### 2.2 扩增产物克隆

将上述回收 PCR 产物目的片段与 pBS-T 载体连接后转化入感受态细胞, 再经含有 IPTG、X-gal 和氨苄的选择性培养基培养, 通过蓝白斑筛选, 选出白色的菌落进行扩增, 再提取质粒 DNA 进行 PCR 扩增, 进一步对阳性克隆进行验证。结果(图 2)表明, 所挑选甲烷菌 *mcrA* 基因阳性克隆插入的 DNA 片段是目的片段。

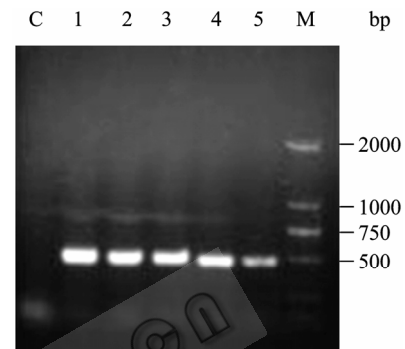


图 2 阳性克隆质粒 DNA PCR 鉴定电泳图谱  
Fig. 2 Identification of recombinant plasmid  
注: C: 空白对照; M: DL2000 marker; 1-5: 样品。  
Note: C: Control; M: DL2000 marker; 1-5: Samples.

### 2.3 阳性克隆测序与比对

通过对阳性克隆的插入片段进行测序, 结果表明所得到的阳性克隆片段大小与预期结果一致。通过在 GenBank 上利用 BLAST 进行序列同源性分析, 结果发现总甲烷菌 *mcrA* 基因的阳性克隆序列 (HQ203079) 与 GenBank 上已知甲烷菌的菌种序列相似性为 96% 以上, 而且与许多未培养的甲烷菌菌种的序列相似性更是达到 99%, 因此可将这些克隆质粒浓度转换成拷贝数, 进而制作标准曲线用以精确定量。

### 2.4 分光光度计检测质粒的浓度

利用紫外分光光度计对送出测序的质粒检测, 稀释 10 倍后, 在 260 nm 处值为 0.32, 通过公式换算, 待测质粒浓度为 160 mg/L。

### 2.5 荧光定量 PCR 目的片段检测

以所提取的质粒为模板, 根据转入的序列扩增用于荧光定量 PCR 的目的条带见图 3, 由图 3 可见, 扩增大小与设计时的大小结果一致, 约为 100 bp。表明可用引物设计正确, 满足后续实验要求。

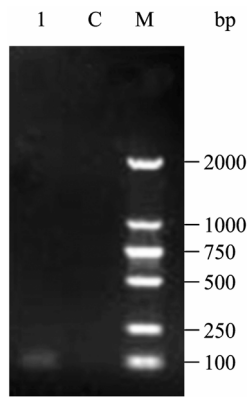


图3 荧光定量 PCR 目的片段电泳图谱  
**Fig. 3 Electrophoresis of target fragment of real-time PCR**  
 注: C: 空白对照; M: DL2000 marker; 1: 样品.  
 Note: C: Control; M: DL2000 marker; 1: Sample.

2.6 标准曲线

利用已知浓度的质粒为标准品, 经过梯度稀释后, 实时荧光定量 PCR 反应所得到的总甲烷菌的标准曲线, 该标准曲线稳定,  $R^2 = 0.992$  满足绝对定量要求。

2.7 待测样品甲烷菌含量分析

由图 4 可以看出各点均在标准曲线的定量检测范围, 由对数输入和循环阈值产生的标准曲线显示二者的线性关系, 这表明该曲线和产生该标准曲线的体系完全符合本试验的要求。根据该标准曲线, 样品定量范围大约在  $1.6 \times 10^{-5}$ –16 mg/L。

在样品测定中, 以 Ct 值和由不同浓度的标准 DNA 基因质量数的对数纵坐标和横坐标产生的标准曲线(图 4), 二者的回归方程为:  $Ct = -3.9231\lg C + 48.560$ , 相关系数为 0.992, PCR 扩增效率为 98.6%, 同时发现被测样品的 Ct 值重复性好, 说明用该曲线对未知浓度样品的定量结果十分可靠。

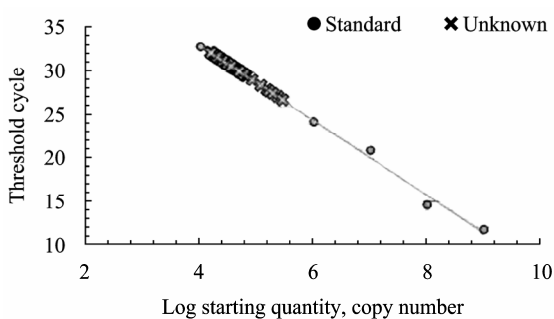


图4 荧光定量 PCR 扩增样品总甲烷菌曲线图  
**Fig. 4 DNA curves for quantitative real-time PCR amplifications for gene of methanogen**

采用已经优化好的 Real-time PCR 条件, 对未知样品中甲烷菌定量检测, 研究甲烷菌在不同的生境、不同季节及不同深度下甲烷菌 DNA 含量的变化, 不同样品 *mcrA* 基因的拷贝数结果如表 1 所示。对于湿地生态系统, 总体来说 4 月甲烷菌 DNA 含量最低, 7 月甲烷菌 DNA 含量高于 4 月低于 9 月, 9 月甲烷菌 DNA 含量最高, 7 月与 9 月随深度的加深, 甲烷菌 DNA 含量也增加。对于草地生态系统, 各月甲烷菌的含量并无明显的差异, 各月甲烷菌 DNA 含量并没有随深度的变化呈规律性变化。

表 1 荧光定量 PCR 检测若尔盖地区不同生境不同层次总甲烷菌含量所对应的基因拷贝数( $10^4$ )  
**Table 1 The copy number of detected quality for enviroment methanogen of Zoige Wetland in different environment and different type**

类型 Type	深度 Depth (cm)	4 月 April	7 月 July	9 月 September
湿地 Wetland	20	3.719	5.776	9.854
	40	2.663	8.072	27.043
	60	1.861	8.460	47.509
草地 Grassland	20	3.655	2.663	5.447
	40	3.029	5.197	3.288
	60	5.259	3.212	3.288

3 讨论

3.1 季节变化对甲烷菌含量的影响

通过研究表明, 湿地生态系统 4 月甲烷菌含量最低, 7 月甲烷菌含量高于 4 月低于 9 月, 9 月甲烷菌含量最高, 温度是影响甲烷菌含量一个重要的因素, 土壤温度直接影响土壤微生物的活动, 包括甲烷产生和氧化过程中所涉及的一系列微生物菌群的数量、结构和活性, 产甲烷菌产甲烷的最佳温度在 30°C–40°C, 低温会导致产甲烷菌以及参与甲烷发酵过程的其他微生物活性降低从而减少甲烷通量, 若尔盖高原属青藏高原寒冷气候区与大陆季风气候区的交汇地带, 主要特征表现为寒冷潮湿、冬季漫长而无夏季、霜冻期极长、没有明显的四季而仅可分出冷暖二季、降水丰富。整个若尔盖高原地势高寒, 多年平均气温为 0.6°C–1.2°C, 4 月温度极低, 只有极少数的嗜冷产甲烷菌能存活, 7 月与 9 月伴随着温度的升高, 不仅提高了甲烷古菌的活性, 同时也增加了好氧微生物的活性, 从而导致氧浓度的降低, 同时伴随着降水量的增大, 地表水的覆盖为湿地生

态系统提供了更好的厌氧条件,所以4月甲烷菌含量相比7月与9月含量低。9月温度稍低于7月温度,但9月湿地生态系统甲烷菌含量却高于7月,根据监测9月地表水位比7月地表水位高约10 cm,产甲烷菌的生长所需的厌氧条件在很大程度上取决于地表水的状况,地表水位越高厌氧条件越好,更有利于产甲烷菌的生长,甲烷产生势增加<sup>[16]</sup>。若尔盖高原植物生长主要集中在6-9月,伴随植物生物量的增加,物根系的分泌物增多和脱落物的质量增加,以及植物死根增多,为甲烷菌的生长提供了更多的营养基质和碳源<sup>[16]</sup>。同时根据Strom<sup>[17]</sup>对于冻土湿地的研究指出,一些维管植物可将固定碳分配到根,从而影响产甲烷菌生长所需的底物量。因此9月湿地生态系统甲烷菌含量高于7月。草地生态系统未有地表水的覆盖,未能达到一个良好的厌氧程度,而产甲烷菌需要严格的厌氧条件才能生长,因此草地生态系统的甲烷菌含量并未表现出明显的季节变化。

### 3.2 深度变化对甲烷菌含量的影响

若尔盖地区7月到9月降水强度最大,地表水的覆盖为湿地生态系统提供了良好的厌氧条件,随着深度的增加,厌氧程度越高;而随着深度的增加,植物根系的分泌物和脱落物沉积越多也为产甲烷菌的生长提供了更多的营养基质。因此在7月和9月随着深度增加湿地生态系统甲烷菌含量也增加,在4月由于降水量减少,地表大部分被冰层和覆雪所覆盖,根据研究表明,在非生长季节,基质同大气的气体交换能够透过冰层和覆雪<sup>[18-19]</sup>,在加上4月若尔盖高原温度过低,甲烷菌生长受抑制,所以湿地生态系统甲烷菌含量在4月并未表现深度上的差异。草地生态系统不论是在4月还是在7月和9月均未有地表水覆盖,在深度上未表现明显的厌氧程度的差异,因此甲烷菌含量未表现出深度上的差异。

### 3.3 不同生境对甲烷菌含量的影响

通过研究表明,在7月和9月湿地生态系统甲烷菌含量最高,这与先前的研究结果一致,水淹条件为湿地生态系统提供了良好的厌氧条件,有益于甲烷菌的生长,草地生态系统由于并未有地表水的覆盖,未能为产甲烷菌的生长提供良好的厌氧环境,所以产甲烷菌含量不高。产甲烷菌是厌氧发酵过程

中的最后一个环节,所有产甲烷菌都只能以少数几种简单有机物和无机物为基质,它们利用基质的范围很窄<sup>[20]</sup>。在4月由于降水量减少,地表大部分被冰层和覆雪所覆盖,两类生态系统在厌氧程度上并没有出现明显的差异,碳同位素研究发现,植物体在有氧的条件下能产生甲烷,虽然植物体产生甲烷的机理还不清楚,Keppler等<sup>[21]</sup>研究证实植物体产甲烷量与果胶含量有关,同时植物根系的呼吸作用可能在局部形成一个厌氧环境,从而有利于小部分嗜冷产甲烷菌的生长,所以4月湿地生态系统和草地生态系统甲烷菌含量相当。

## 参考文献

- [1] Rodhe H. A comparison of the contributions of various gases to the greenhouse effect. *Science*, 1990(248): 1217-1219.
- [2] 王德宣,吕宪国,丁维新,等. 若尔盖高原沼泽湿地CH<sub>4</sub>排放研究. *地球科学进展*, 2002, 17(6): 878-880.
- [3] 杨福明,董昭林. 若尔盖高原沼泽草地环境生态研究. *四川草原*, 1993(3): 1-7.
- [4] Ding WX, Cai ZC. Methane emission from natural wetland in China: summary of years 1995-2004 studies. *Pe-dosphere*, 2007(17): 475-486.
- [5] Ding WX, Cai ZC. Preliminary budget of methane emissions from natural wetlands in China. *Atmospheric Environment*, 2004, 38(5): 751-759.
- [6] Lueders T, Chin K J, Conrad R, et al. Molecular analyses of ethyl-coenzyme M reductase alpha-subunit (mcrA) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage. *Environ Microbiol*, 2001, 3(3): 194-204.
- [7] Hales BA, Edwards C, Ritchie DA, et al. Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996(62): 668-675.
- [8] Lloyd D, Thomas KL, Hayes A, et al. Microecology of peat: minimally invasive analysis using confocal laser scanning microscopy, membrane inlet mass spectrometry and PCR amplification of methanogen-specific gene sequences. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998(25): 179-188.
- [9] Nercessian D, Upton M, Lloyd D, et al. Phylogenetic analysis of peat bog methanogen populations. *FEMS Microbial Letters*, 1999(173): 425-429.
- [10] Ohkuma M, Noda S, Horikoshi K, et al. Diversity and molecular analyses of Yet2-uncultivated microorganisms. *Intestinal Microorganisms of Termites and Other Inverte-*

- brates, 1995(134): 45-50.
- [11] Bidle KA, Kastner M, Bartlett DH. A phylogenetic analysis of microbial communities associated with methane hydrate containing marine fluids and sediments in the Cascadia margin (ODP site 892B). *FEMS Microbial Letter*, 1999(177): 101-108.
- [12] Springer E, Sachsm S, Woese CR, *et al.* Partial gene sequences for the A subunit of methyl-coenzymeM reductase (mcrI) as a phylogenetic tool for the family Methanosarcinaceae. *International Journal Systematic Bacteriology*, 1995, **45**(3): 554-559.
- [13] Luton PE, Jonathanmw RI, Chard J, *et al.* The mcrA gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology*, 2002(148): 3521-3530.
- [14] 杨福明, 董昭林. 若尔盖高原沼泽植被主要类型于营养成分季节动态研究. *四川草原*, 1993(3): 8-17.
- [15] Guishan Zhang, Na Jing, Xiaoli Liu, *et al.* Methanogenesis from methanol at low temperatures by a novel psychrophilic methanogen, "*Methanobus psychrophilus*" sp. nov., Prevalent in Zoige Wetland of the Tibetan Plateau. *Applied and Environment Microbiology*, 2008, **74**(19): 6114-6120.
- [16] 陈槐, 高永恒, 姚守平, 等. 若尔盖高原湿地甲烷排放的时空异质性. *生态学报*, 2008, **28**(27): 3426-3436.
- [17] Strom LA, Ekberg M, Mastepanov M, *et al.* The effete of vascular Plants on carbon turnover and methane emissions from a tundra wetland. *Global Change Biology*, 2003(9): 1185-1192.
- [18] Alm J, Saarni OS, Nykanen H, *et al.* Winter CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O fluxes on some natural and drained boreal peatlands. *Biogeochemistry*, 1999(44): 163-186.
- [19] DiseN B, Gorham E, Verry ES. Environmental factors controlling methane emissions from peatlands in northern Minnesota. *Journal of Geophysical Research*, 1993, **98**(10): 583-594.
- [20] 祖波, 组建, 周富春, 等. 产甲烷菌的生理生化特征. *环境科学与技术*, 2008, **31**(3): 5-9.
- [21] Keppler F, Hamilton JT, Brass M, *et al.* Methane emissions from terrestrial plant under aerobic conditions. *Nature*, 2005(439): 187-191.

**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