

西北部分重金属矿区天蓝苜蓿根瘤菌生理生化特性及 16S rDNA PCR-RFLP 分析

位秀丽,付芸芸,韦革宏

(西北农林科技大学生命科学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 对分离自西北地区 6 个矿区采样点的 68 株天蓝苜蓿根瘤菌进行了生理生化特性和 16S rDNA PCR-RFLP 分析。唯一碳源利用结果表明:供试菌株均能利用丁二酸钠等 7 种碳源,均不能利用马尿酸钠等 4 种碳源。在苯酚作为唯一碳源的培养基上生长试验表明:所有菌株可以在 400 mg/L 的苯酚培养基上生长;5 株菌可以在 700 mg/L 浓度下生长;所有菌株都不能在 800 mg/L 浓度以上的苯酚培养基上生长。重金属耐受性结果表明:供试菌株对重金属有不同程度耐受性,筛选出 1 株具有优良重金属耐受性的菌株 CCNWGS0037。16S rDNA PCR-RFLP 分析结果表明:所有菌株可以分为 3 种类型,全序列测定结果分析表明分别属于中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)和土壤杆菌属(*Agrobacterium*)。综合分析,矿区天蓝苜蓿根瘤菌多样性比较单一。

关键词: 天蓝苜蓿;根瘤菌;生理生化;16S rDNA PCR-RFLP
中图分类号: S154.34 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2009)02-0223-04

天蓝苜蓿,别名黑荚苜蓿,什花苜蓿,米粒苜蓿。是一年生或越年生豆科草本植物,分布广泛,生长迅速,对环境适应性强,是一种优良的牧草植物,全草可入药,可治毒蛇咬伤及蜂螫。同时也是少数几个能在尾矿呈局部密集生长的豆科植物之一,成为废弃地植被形成的先锋种或建群种,在废弃地植被形成过程中起着十分重要的作用^[1]。各种矿床在开采过程中,使地下一定深度的矿物暴露于地表环境,经过选矿、冶炼等过程,产生了多种污染物,对矿区及其周边地区造成严重的污染^[2]。有关矿业废弃地生态修复问题已刻不容缓。而矿业废弃地生态修复的最重要的限制因子之一是重金属毒性和养分不足,而 N 素的极端不足又是养分不足中的核心问题^[3]。研究与其共生的根瘤菌特性,有利于为天蓝苜蓿在矿区的应用提供理论基础。

本文对采自西北地区六个重金属矿区的天蓝苜蓿根瘤菌进行了生理生化特性测定及 16S rDNA PCR-RFLP 分析,确定了其系统发育地位,为天蓝苜蓿根瘤菌的应用提供了重要的种质资源和理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

菌株:来源于陕西、甘肃 6 个采样点的 68 株根瘤菌,见表 1。

6 个采样点分别为:甘肃省成县城关镇邵总村铅锌矿;甘肃徽县柳林镇青阳村铅锌矿;陕西省凤县唐藏镇庞家河村金矿;陕西省宁强代家坝镇张家坝村铁矿;陕西省略阳郭镇铍厂沟村金矿;陕西省太白尾矿金矿区金矿。

铅锌矿引起的污染主要是开采过程中产生的一些粉尘污染,铅和锌是主要的污染源;金矿和铁矿多为伴生矿,产生的污染多为伴生金属污染和开采过程中使用的一些试剂污染;综合这些矿区污染特点,选择较为常见的铅、锌、铜、铬四种金属离子进行特性测定。

1.2 生理生化特性测定

采用 Chen WX 等^[4]的方法对供试菌株进行了 92 项生理生化性状测定,包括唯一碳源利用、脲酶、过氧化氢酶、耐盐性、生长温度范围、对抗生素、染料、重金属的抗性、以及对苯酚的利用^[5]。

其中唯一碳源包括:L-树胶醛糖、丁二酸钠、鼠李糖、D-果糖、半乳糖、丙酮酸钠、马尿酸钠、L-阿拉伯糖、L-山梨糖、L-山梨醇、D-木糖、赤丝草醇、糖原、柠檬酸三钠、乙酸钠、葡萄糖、蔗糖、淀粉、海藻糖、肌醇、棉籽糖、酒石酸钠,终浓度均为 0.1%。

苯酚浓度为:400、500、600、700、800 和 900 mg/L。

收稿日期:2008-09-04
基金项目:国家自然科学基金(30670372);霍英东青年教师基金(101029);高等学校博士点基金(20050712013);西北农林科技大学拔尖人才支持计划
作者简介:位秀丽(1981-),女,硕士,主要从事根瘤菌多样性及其应用研究。
通讯作者:韦革宏。E-mail: weigehong@yahoo.com.cn。
(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 供试菌株及 16S rDNA PCR-RFLP 图谱类型

Table 1 Tested strains and the types of 16S rDNA PCR-RFLP fingerprint patterns

菌株 Strains	地理来源 Geographic sources	16S rDNA 图谱类型 16S rDNA types
CCNWGS0026 CCNWGS0030-1 CCNWGS0034-2 CCNWGS0027 CCNWGS0032 CCNWGS0036-1 CCNWGS0028-1 CCNWGS0033 CCNWGS0037 CCN- WGS0029 CCNWGS0034-1	甘肃成县 Chengxian Gansu	I
CCNWGS0040-1 CCNWGS0045 CCNWGS0050-1 CCNWGS0041 CCNWGS0046 -2 CCNWGS0051-1 CCNWGS0042-1 CCNWGS0047-1 CCNWGS0052-1 CCNWGS0043-1 CCNWGS0048 CCNWGS0053-1 CCNWGS0044	甘肃徽县 Huixian Gansu	I
CCNWSX0016 CCNWSX0018-1 CCNWSX0019-1 CCNWSX0017-1 CCN- WSX0018-2 CCNWSX0020 CCNWSX0017-2 CCNWSX0019-1	陕西凤县 Fenixian Shaanxi	I
CCNWSX0021 CCNWSX0023-1 CCNWSX0024-1 CCNWSX0022 CCNWSX0023 -2 CCNWSX0024-2	陕西宁强 Ningqiang Shaanxi	I
CCNWSX0025-1 CCNWSX0026	陕西略阳 Lueyang Shaanxi	I
CCNWSX0028-1 CCNWSX0031-1 CCNWSX0036-2 BTB02-1 BTB51-1 BTB58-2 CCNWSX0028-2 CCNWSX0032 CCNWSX0037-2 BTB02-2 BTB52 -1 BTB100-2 CCNWSX0029 CCNWSX0033-2 CCNWSX0038-1 BTB03-1 BTB53-2 BTB101-1 CCNWSX0030 CCNWSX0035-1 CCNWSX0038-2 BTB50-1 BTB55-1 BTB101-2	陕西太白 Taibai Shaanxi	I
CCNWGS0031-1 CCNWGS0035 CCNWGS0038	甘肃成县 Gansu Chengxian	II
CCNWSX0025-2	陕西略阳 Lueyang Shaanxi	III

抗生素种类:青霉素、链霉素、庆大霉素、卡那霉素、氯霉素和阿奇霉素,设 4 个浓度梯度:5、50、100 和 300 $\mu\text{g/mL}$ 。

重金属盐种类和浓度:氯化铜(0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mmol/L)、硝酸铅(0.8、1.3、1.8、2.3、2.8 mmol/L)、硫酸锌(1.4、1.8、2.2、2.6、3.0 mmol/L)、硫酸铬(0.1、0.6、1.2、1.8、2.4 mmol/L)。

菌体制备:将供试菌株接入 5 mL TY 培养基,28℃,130 r/min 振荡培养 3 天。4℃ 12 000 rpm 离心 5 min,收集菌体,弃去上清液,双蒸水洗涤 3 次。加入 600 μL 双蒸水,混匀待用,多点接种器接于待测指标平板,3 d 后观察结果。

1.3 16S rDNA PCR-RFLP 分析

将供试菌株接入 5 mL TY 培养基,28℃,130 r/min振荡培养 3 d;4℃下 12 000 rpm 离心 5 min,收集菌体。参照 Laguerre G. 等的方法^[6]提取总 DNA,进行 PCR 扩增,1.0%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。扩增用引物:

正向引物 P₁:5'-CGGGATCCAGAGTTTGAT CCTGGCTCAGAACGAACGCT-3'

反向引物 P₆:5'-CGGGATCCTACGGCTACC TTGTTACGACTTCACCCC-3'

RFLP 分析选用 *Hae* III、*Hinf* I、*Msp* I 三种限制性内切酶消化^[7],2.0%凝胶电泳,Bio-Rad 凝胶

成像系统照相。分析其酶切图谱类型,选择代表菌株进行全序列测定,并构建系统发育树。

2 结 果

2.1 唯一碳源利用

唯一碳源利用测试结果表明所有供试菌株均可以利用丁二酸钠、L-阿拉伯糖、D-木糖、蔗糖、葡萄糖、肌醇、海藻糖 7 种碳源;均可以在 400 mg/L 的苯酚作为唯一碳源的培养基上生长;均不能利用马尿酸钠、酒石酸钠、淀粉和糖原;均不能利用 800 mg/L 和 900 mg/L 的苯酚;5 株菌可以利用 700 mg/L 的苯酚。

分别有 5 株、6 株、7 株、12 株、12 株、22 株不能利用 L-山李糖、赤丝草醇、丙酮酸钠、棉籽糖、柠檬酸三钠和乙酸钠。

CCNWSX0026 不能利用半乳糖和 D-果糖;CCNWSX0025-2 和 BTB02-1 不能利用 L-树胶醛糖;CCNWGS0047-1 和 CCNWSX0026 不能利用鼠李糖;CCNWGS0047-1 和 CCNWGS0052-1 不能利用 L-山梨醇。CCNWGS0047-1、CCNWSX0026、CCNWGS0052-1 和 CCNWSX0025-2 共 4 株菌的碳源利用范围较窄,仅能利用 22 种碳源的 12 种、13 种、14 种和 15 种。

2.2 抗生素抗性

55 株菌能在 300 μg/mL 的青霉素下生长;半数的菌株能耐受 5 μg/mL 的庆大霉素和链霉素;19 株菌可以耐受 100 μg/mL 的氯霉素。

2.3 重金属耐受性

6 株菌可以耐受浓度高达 2.8 mmol/L 的硝酸铅;3 株菌可以耐受浓度为 3.0 mmol/L 的硫酸锌;4 株菌能耐受 1.2 mmol/L 的氯化铜;1 株菌可以耐受 1.2 mmol/L 硫酸铬。

菌株 CCNWGS0037 表现出良好的重金属耐受性,能分别耐受 3.0 mmol/L 的硫酸锌、1.2 mmol/L 的氯化铜、0.6 mmol/L 的硫酸铬以及 2.8 mmol/L 的硝酸铅,并能在 700 mg/L 的苯酚为唯一碳源的培养基上生长。

2.4 16S rDNA PCR-RFLP

经 16S rDNA PCR-RFLP 分析,供试菌株可分为 I、II 和 III 共 3 种类型(见表 1),全序列测定结果及系统发育树见图 1。

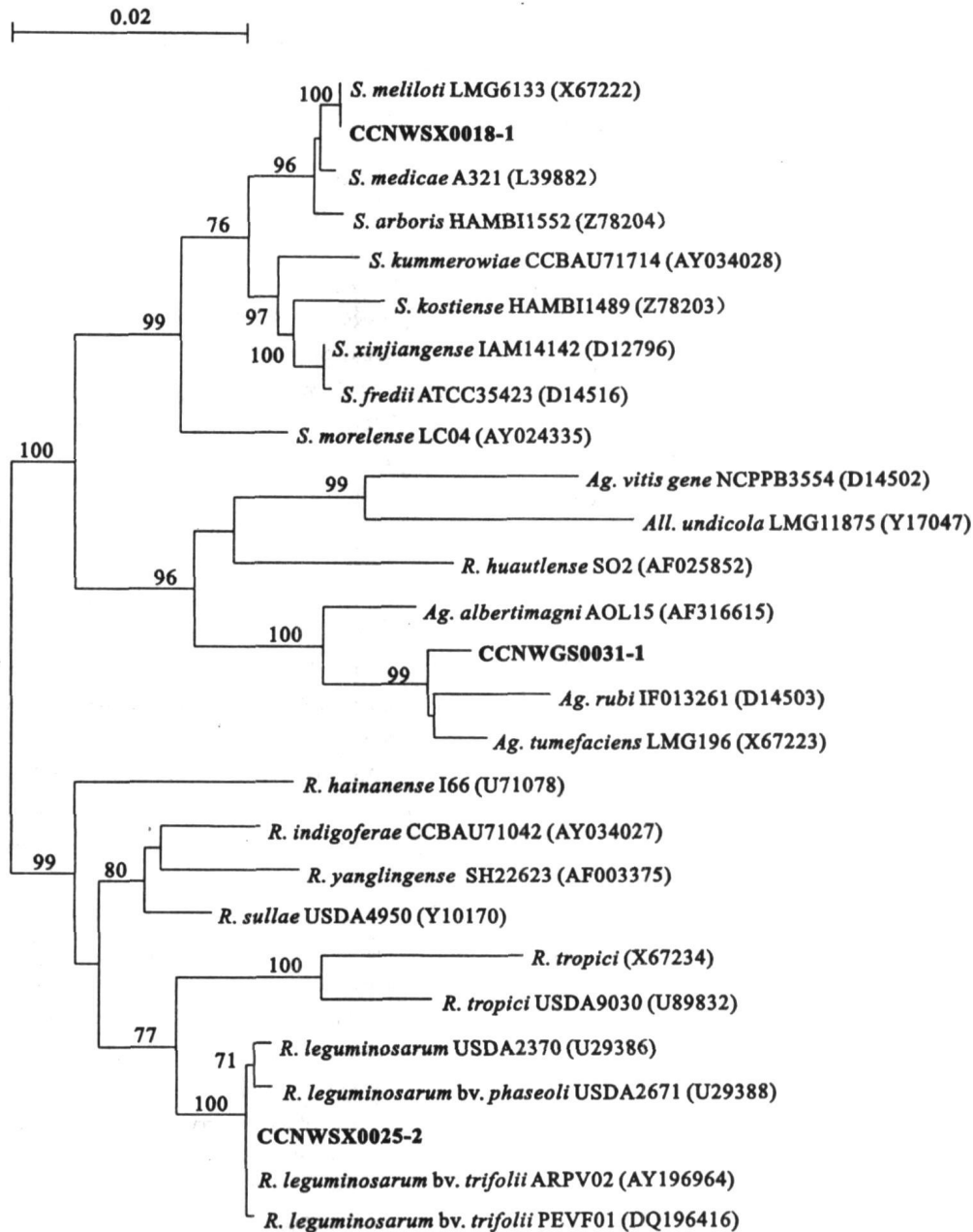


图 1 依据 16S rDNA 全序列构建的系统发育树

Fig.1 Phylogenic tree based on the 16S rDNA sequences

从表 1 和图 1 可以看出,类型 I 共 64 株菌,占所有供试菌株的 94%;其代表菌株 CCNWSX0018-1 在系统分类地位上属于中华根瘤菌属(Sinorhi-

zobium),与草木樨根瘤菌(S. meliloti)亲缘关系最近,序列相似性达到 100%。与中华根瘤菌属内各已知种的模式菌株 16S rDNA 相似性最小为 97.8%,

大于划分属的标准(95%)^[8];研究表明天蓝苜蓿根瘤菌比较单一,与陈文新等的研究结果一致^[9]。

类型Ⅱ的代表菌株 CCNWGS0031-1 与根癌农杆菌 *Ag. tumefaciens* 的亲缘关系最近,序列相似性达到 99.1%,属于土壤杆菌属(*Agrobacterium*)分支。

类型Ⅲ的代表菌 CCNWSX0025-2 序列测定分析结果表明,该菌株属于根瘤菌属(*Rhizobium*),和豌豆根瘤菌三叶草生物型的相似性为 100%,可认为是同种菌。

3 结论和讨论

供试菌株在重金属耐受性实验中,供试菌株有不同程度的重金属耐受性。其中经 16S rDNA PCR-RFLP 结果分析鉴定为中华根瘤菌属的菌株 CCNWGS0037 的重金属抗性比较显著,该菌株来自甘肃成县铅锌矿尾矿区,能分别耐受 3.0 mmol/L 的硫酸锌、1.2 mmol/L 的氯化铜、0.6 mmol/L 的硫酸铬以及 2.8 mmol/L 的硝酸铅,并能在 700 mg/L 的苯酚为唯一碳源的培养基上生长。Carrasco 等在黄铁矿溢出污染区,分离得到 41 株耐 2.4 mmol/L Pb^{2+} 的菌株^[10]。聂湘平等发现大叶相思的根瘤菌,可以耐受小于 10.0 mmol/L 的 Zn^{2+} 离子浓度、可以耐受小于 0.80 mmol/L 的 Cu^{2+} 离子浓度^[11,12];朱毓华等^[13]从歪头菜中分离出一株根瘤菌能耐受 0.2 mmol/L 的 Cd^{2+} 。通过和前人已有的研究对比显示,该菌株对 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 的抗性比较显著,值得进一步研究。

本实验中,分离到 3 株土壤杆菌,代表菌株 CCNWGS0031-1 与根癌土壤杆菌 *Ag. tumefaciens* 的相似性为 99.1%,可以认为是同种菌。国内外学者也经常在分离根瘤菌的过程中可以分离到土壤杆菌,现在已有学者证明土壤杆菌可以在根瘤菌的存在下进入根瘤定殖,对宿主的生长和结瘤没有影响,但不能引起结瘤^[14]。土壤杆菌和根瘤菌的关系和分类一直是一个比较有争议的话题,在系统发育过程中根瘤菌属与土壤杆菌属亲缘关系紧密,其中的部分种在以 16S rDNA 序列分析为基础的系统发育树上互有交叉,形成一个分类群,故有些学者建议将两属的界限打破,重新划分^[15]。因此关于土壤杆菌和根瘤菌的分类还需要进一步研究。

类型Ⅲ的代表菌株 CCNWSX0025-2 16S rDNA 序列比对结果表明,该菌株属于根瘤菌属,与豌豆根瘤菌的相似性达到 100%。目前已知的该种根瘤菌共有豌豆、三叶草、菜豆三种生物型,尚未发现

有苜蓿生物型的报道。本课题组在来自另一采样地的天蓝苜蓿根瘤中也分离出了 1 株豌豆根瘤菌,因此判断有可能是在进化过程发生了基因水平转移。迄今未有人报道过豌豆根瘤菌可以在天蓝苜蓿上接瘤,也未有人报道过豌豆根瘤菌的寄主涉及苜蓿,因此有必要进行深入研究,如能与天蓝苜蓿回接成功,则有可能是豌豆根瘤菌的一个新的生物型。

参考文献:

- [1] 王友保,张莉,刘登义,等.铜陵铜尾矿库植被状况分析[J].生态学杂志,2004,2(1):135-139.
- [2] 廖国礼,吴超,冯巨恩.矿坑废水污灌区河流重金属离子污染综合评价实践[J].矿冶,2004,13(1):86-90.
- [3] Li R W, Daniels W L. Nitrogen accumulation and form over time in young mine soils[J]. Journal of Environmental Quality, 1994, 23(1):166-172.
- [4] Chen W X, Yan G L, Li J L. Numerical taxonomic study of fast growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen nov [J]. Int J Syst Bacteriol, 1988,38(4):392-397.
- [5] 韦革宏,聂刚,张宏昌,等.陕西部分地区胡枝子和草木樨根瘤菌的数值分类研究[J].西北植物学报,2004,24:1697-1701.
- [6] Chen W P, Kuo T T. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA[J]. Nucleic Acids Research, 1993,21(9):2260.
- [7] Laguerre G, Mavingui P, Allard M R, et al. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars[J]. Appl Environ Microbiol, 1996,62(6):2029-2036.
- [8] TAN ZH Y, CHEN W X. Sequencing the 16S rDNA of representative strain of new rhizobia group and determining of its phylogenetic relationship [J]. Acta Microbiologica Sinica, 1997, 37(6):411-416.
- [9] CHEN W X, WANG E T, CHEN W F. The relationship between the symbiotic promiscuity of rhizobia and legumes and their geographical environments[J]. Scientia Agriculture Sinica, 2004, 37(1):81-86.
- [10] Carrasco J A, Armario P, Pajuelo E, et al. Isolation and characterisation of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Anal collar pyrite mine[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2005,37:1131-1140.
- [11] 聂湘平,蓝崇钰,束文盛,等.针对大叶相思-根瘤菌共生固氮体系影响研究[J].植物生态学报,2002,26(3):264-268.
- [12] 聂湘平,蓝崇钰,束文盛,等.针对大叶相思-根瘤菌共生固氮体系影响研究[J].植物生态学报,2002,13(2):137-140.
- [13] 朱毓华,韦革宏,陈卫民,等.陕西太白尾矿区根瘤菌多样性及抗性菌株筛选[J].西北植物学报,2006,26(7):1443-1448.

(下转第 238 页)

Quantitative characteristics and germination dynamic variation of soil seed bank during the course of restoration at Loess gully region

GUO Man^{1,2}, ZHENG Fen-li^{1,2}, AN Shao-shan^{1,2}, LIU Yu^{1,2}, BAI Wen-juan²

(1. College of Resources and Environment, Northwest A & F University, Yangling Shaanxi 712100, China;

2. State Key Laboratory of Soil Erosion and Dryland Farming in Loess Plateau, Institute of Soil and Water Conservation CAS & MWR Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract: Taking the pasture zone of Loess gully region (Guyuan Area of Ningxia Hui Municipality) as a case study, this paper selected eight research sites according to the different vegetation restoration years (2, 5, 12, 24, 35, 55, 75 a and cropland control) to study quantitative characteristics and dynamic change of soil seed bank germination through field survey and a laboratory experiment of seed germination. The research results showed at the different vegetation restoration years, average amount of seed sprout was 3 542.5 seeds/m², and the amount of dicotyledon vegetation accounted for 90% of the total. The seed sprout amount in 0~5 cm soil layer varied 166.7 to 9 100.0 seeds/m² and in 5~10 cm soil layer changed 133.3 to 2 120.0 seeds/m². At the different restoration years, an order of seed germination amount was increase before and decreases after; the temporal pattern of seed germination amount was approximate unimodal. Except cropland, the peak value of seed germination for dicotyledon appeared in 4 to 6 weeks; the peak value of seed germination for monocotyledon occurred in 5 to 6 weeks. This show that seed in the soil come into being a peak value of germination under the appropriate condition of environment, climate and so on in the pasture zone of Loess gully region.

Key words: vegetation restoration years; soil seed bank; seed germination; quantitative characteristics; germination dynamic variation

(上接第 226 页)

[14] WANG L L, WANG E T, LIU J, et al. Endophytic occupation of root nodules and root of *Melilotus dentatus* by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Microbiol Ecol*, 2006, 52: 436—443.

rhizobia; emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. Nov [J]. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 1994, 44: 715—733.

[15] De Lajudie P, Willems A, Pot B, et al. Polyphasic taxonomy of

Physiological and biochemical characters and 16S rDNA PCR-RFLP of Rhizobia isolated from *Medicago lupulina* in mining regions of Northwest China

WEI Xiu-li, FU Yun-yun, WEI Ge-hong
(College of Life Science, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 68 rhizobia strains isolated from *Medicago lupulina* in mining regions of Northwest China were analyzed to study their physiological and biochemical characters and 16S rDNA PCR-RFLP, The only carbon source use results show that all the tested strains can use 7 kinds of carbon sources including sodium succinate, but cannot use 4 kinds of carbon sources including sodium hippurate. When the phenol is used as the only carbon source, all the tested strains can grow under 400 mg/L, but cann't grow under 800 mg/L or more than that, 5 strains can grow under 700 mg/L. The tested strains have different resistibility to heavy metal. One isolate, CCNWGS0037, with the best resistibility to heavy metal is obtained. All the 16S rDNA fingerprints are divided into three types, and the full-length sequences and PCR-RFLP of 16S rDNA show that the tested strains belong to *Sinorhizobium* and *Rhizobium* and *Agrobacterium* respectively. From this study, it can be concluded that the diversity of the tested strains is poor.

Key words: Rhizobia; 16S rDNA; PCR-RFLP; *Medicago lupulina*