

西安市北郊污灌区土壤中抗铅链霉菌的多样性分析

唐 静, 林雁冰, 段晓丹, 梁建强, 韦革宏

(西北农林科技大学生命科学学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨陵 712100)

摘 要:从西安市北郊污灌区采集土样,用添加 $K_2Cr_2O_7$ $75 \mu g \cdot mL^{-1}$ 和青霉素 $2 \mu g \cdot mL^{-1}$ 的高氏 1 号、HV 和 SC 固体培养基分离到 120 株具有链霉菌特征的放线菌。采用浓度梯度法,用含 Pb^{2+} 培养基对分离菌株进行筛选,得到 50 株抗铅链霉菌。在抗铅能力实验结果的基础上,选取 14 株抗性较强链霉菌代表菌株进行形态培养特征、生理生化和 16S rDNA 基因序列相似性等分析。结果表明,14 株代表菌株可归为 6 个不同的颜色类群,其表型特征与生理生化性质和链霉菌相符合,在系统发育树上处于 8 个不同的进化分支。菌株 HQ0031 与已知链霉菌相似性差异较大,可能为链霉菌属内 1 个潜在新种。研究表明西安市北郊污灌区土壤中抗铅链霉菌具有丰富的多样性,可为重金属污染环境的生物修复提供有益的微生物资源。

关键词:污灌区;抗铅链霉菌;系统发育;生物多样性

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2009)06-1092-06

Diversity of Lead-resistant Strains of Streptomycetes Isolated from Soil of Sewage Irrigation Area in Xi'an Northern Suburb

TANG Jing, LIN Yan-bing, DUAN Xiao-dan, LIANG Jian-qiang, WEI Ge-hong

(College of Life Sciences, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: Totally 120 actinomycetes with cultural characteristics of *Streptomycetes* were isolated from soil samples of sewage irrigation area in Xi'an northern suburb by Gause', HV and SC medium which were added with $K_2Cr_2O_7$ $75 \mu g \cdot mL^{-1}$ and Penicillin $2 \mu g \cdot mL^{-1}$. 50 anti-lead strains were screened from the mediums which were mixed with $Pb(NO_3)_2$ through concentration gradient. Then 14 strains which had higher tolerance were selected as representative strains for morphological, physiological characteristics and 16S rDNA gene phylogenetic analysis. The results showed that they were assigned to 6 color groups and in accord with *Streptomycetes'* morphological and physiological characteristics; there were 8 distinct branches in phylogenetic tree, while strain HQ0031 was far away from the branches and it would be a new *Streptomycetes* species. It could be concluded that there were abundant microbial diversity among the anti-lead *Streptomycetes* in sewage irrigation area in Xi'an northern suburb and that would provide new resources for bioremediation of the soil that was polluted by heavy metal.

Keywords: sewage irrigation area; lead-resistant *Streptomycetes*; phylogenetic analysis; microbial diversity

西安市北郊是我国西北地区较为重要的污水灌溉区之一,由于长期采用工业和生活污水进行灌溉,原始土质已受到不同程度的污染,尤其受重金属的污染较为严重^[1]。重金属污染不仅使受污染土壤中微生物种群数量与活性降低,而且可以通过食物链进入人体,进而危及人的健康^[2]。对于重金属污染土壤的修

复,主要有化学法、物理法和生物法,前两者的最大弊端是污染物去除不彻底,往往容易导致二次污染,从而带来一定程度的环境健康风险^[3]。生物法则克服了传统方法中的缺点,具有处理费用低、对环境影响小、效率高等特点,越来越受到重视^[4]。生物修复法分为植物修复、动物修复和微生物修复,其中微生物修复技术是目前学者们比较倾向采用的方法^[5]。

链霉菌是土壤微生物重要的组成部分,具有丰富的代谢产物和特殊形态结构。在重金属污染环境中,链霉菌对不同重金属具有吸附作用,而且吸附能力存在差异^[6]。链霉菌通过改变重金属的价态来影响

收稿日期:2008-11-26

基金项目:国家自然科学基金(30670372);科技部农业微生物菌种资源整理、整合及共享试点子项目(2005DKA21201)

作者简介:唐 静(1982—),女,硕士生,主要从事放线菌研究。

通讯作者:韦革宏 E-mail:weigehong@yahoo.com.cn

金属的生态毒性,它产生的具有絮凝活性的代谢物,分泌到细胞外能使水中的胶体悬浮物互相凝聚沉淀,从而达到去除重金属离子的目的^[7]。2006年,姚斌等^[8]对柴河铅锌尾矿区复垦土壤的微生物区系调查研究结果表明,对重金属污染的耐受程度:真菌>放线菌>细菌,这说明放线菌对重金属的耐受性可高于细菌。Amoroso M J等^[9]报道了生长在污染环境中的放线菌普遍具有金属抗性和生物降解能力,而链霉菌是其中的优势菌群。另外研究还发现,链霉菌可以与植物共同作用,促进寄主植物对重金属离子的吸附和富集^[10]。因此,研究污灌区土壤中抗铅链霉菌的多样性,进而发现新的具有重金属抗性能力的菌株,可为生态修复提供微生物资源。

本研究从西安市北郊污灌区土壤中分离得到一批抗铅链霉菌,通过形态培养特征、生理生化和系统发育分析来揭示抗铅链霉菌的生物多样性,以期探讨重金属污染土壤中微生物的多样性并为重金属污染土壤的生物修复提供潜在的微生物资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器

PCR试剂购自TaKaRa公司;PCR引物由上海Sangon公司合成;其余试剂均为国产或进口分析纯;PCR仪器为美国Bio-rad(MJ)公司产品。

1.1.2 培养基

选择分离培养基:高氏1号、HV和SC固体培养基^[11];抗重金属筛选培养基:高氏1号培养基;培养特征培养基:高氏1号、营养琼脂、葡萄糖-天门冬酰胺、酵母膏-麦芽膏和Bennet固体培养基^[12];生理生化分析培养基:牛奶石蕊、明胶液化、淀粉水解、纤维素分解、产H₂S、产黑色素和普戈二氏培养基^[12]。

1.2 土壤样品和菌株分离

从西安市北郊污灌区,采用“蛇形法”^[13]取5点采集土样,每个采样点面积约为0.25 m²,取0~25 cm土样,混匀,磨细,自然风干。55℃处理12 h,按土壤稀释法^[13]制成浓度为10⁻³ g·mL⁻¹土样悬液。以高氏1号、HV和SC固体培养基为基础培养基,配成含有K₂Cr₂O₇ 75 μg·mL⁻¹和青霉素2 μg·mL⁻¹的分离培养基。取0.2 mL的土样悬液,涂布平板,于28℃培养7~15 d。挑取单菌落进行划线纯化,所得纯培养物制成斜面于4℃保藏备用。

1.3 抗性菌株的初筛

采用浓度梯度法,将分离纯化后的菌株点接于含

Pb²⁺的高氏1号平板上,调配至Pb²⁺的终浓度分别为0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0和3.5 mmol·L⁻¹。

1.4 抗性菌株的复筛

将初筛所得菌株,以5%的接种量接入重金属抗性筛选液体培养基培养96 h。Pb²⁺浓度依次为4.0、4.5、5.0、5.5和5.6 mmol·L⁻¹。

1.5 形态与培养特征观察

在高氏1号培养基上埋片^[14],光学显微镜观察,记录气丝、基丝和孢子丝特征,并记录平板上菌落形态特征,菌落颜色参照文献[15]的色谱进行描述。根据以形态和培养特征为主、生理生化特征为辅的原则将供试放线菌鉴定到属^[12]。

1.6 生理生化分析

生理生化测定主要包括牛奶凝固和胨化、明胶液化、淀粉水解、纤维素分解、产H₂S、产黑色素、硝酸盐还原、碳源利用、氮源利用、最适温度和最适pH等试验,具体参照阮继生所介绍的方法^[12]。

采用由美国应用生物统计公司(Applied Biostatistics Inc1)开发的NTSYS软件(2.11f版),对测试菌株的所有生理生化特性进行数值分类,并由此生成树状图^[16]。

1.7 16S rDNA 基因序列测定和系统发育分析

总DNA提取参照Terefework^[17]的提取方法,提取的总DNA用琼脂糖凝胶电泳检测后作为PCR扩增的模板。用细菌通用引物(8-27f:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1523-1504r:5'-AAGGAGGT-GATCCAGCCGCA-3')进行扩增。PCR反应条件:95℃预变性5 min,95℃变性1 min,56℃复性1 min,72℃延伸2 min,36个循环。将所测序列与NCBI数据库中的已有序列进行BLAST比对,获取相近菌种的16S rDNA序列。利用Clustal X和Treecon W软件包分析,构建系统发育树,无根进化树的拓扑分析为1 000次重复取样。

2 结果与分析

2.1 抗性菌株的分离和初筛

从高氏1号、HV和SC固体培养基中分别分离得到84、20和16株具有链霉菌培养特征的放线菌(图1)。高氏1号琼脂培养基对于放线菌的分离效果最好,HV和SC固体培养基分离效果次之。在含有不同浓度Pb(NO₃)₂高氏1号初筛平板上,共获得50株能耐受3.5 mmol·L⁻¹ Pb²⁺且生长旺盛的链霉菌。

2.2 抗性菌株的复筛

在复筛试验中,有35株菌能在4.0 mmol·L⁻¹ Pb²⁺

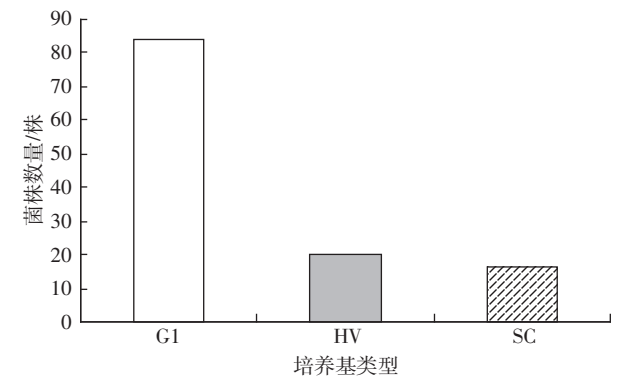


图 1 放线菌数量与培养基类型的关系

Figure 1 The relationship of medium and number of actinomycetes isolate

的高氏 1 号液体培养基中生长良好;在 $4.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Pb}^{2+}$ 中除 4 株菌不生长外,其余 31 株菌均明显生长;在 $5.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Pb}^{2+}$ 中有 20 株菌生长较好,其余均不生长;在 $5.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Pb}^{2+}$ 中有 18 株菌可以生长;在 $5.6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Pb}^{2+}$ 中仅有 14 株菌能够生长。根据耐受 Pb^{2+} 浓度范围,确定了 14 个抗铅性较高的链霉菌为代表菌株。

2.3 代表菌株的形态与培养特征

14 个链霉菌代表菌株,根据气丝、基丝和可溶性色素将其初步归为 6 个不同的颜色类群,其中 6 株菌为白孢类群:即 HQ0008、HQ0021、HQ0028、HQ0029、HQ0031 和 HQ0054;4 株菌为金色类群:即 HQ0011、HQ0015、HQ0047 和 HQ0058;淡紫灰类群、蓝色类群、绿色类群和黄色类群各 1 株,分别为:HQ0065、HQ0033、HQ0002 和 HQ0010。根据显微形态观察结果,这些代表菌株基丝发达,不易断裂,气丝成熟分化成直、波曲和螺旋状孢子丝,符合链霉菌特征。

此外,菌株 HQ0031 的培养特征有特殊之处(表1)。它在高氏 1 号固体培养基上气丝和基丝极细且发达,基丝分枝少,无横隔,不断裂,孢子丝螺旋状,孢子椭圆状;在培养特征培养基上生长良好,气丝颜色为晴

山蓝、大理石灰或冰山蓝;但在营养琼脂培养基上不产生气丝;在葡萄糖-天门冬酰胺-酵母膏-麦芽膏和 Bennet 培养基均无可溶性色素产生。

2.4 代表菌株的生理生化性状数值分类

14 个代表菌株共完成了 29 项生理生化性状测定,采用 NTSYS 软件进行数值分类,并得到树状图(图 2)。由图可见,全部代表菌株在 0.86 的水平上聚在一起。在 0.94 的水平上,它们可形成 8 个表观群:第 i 群包括 4 株菌,即 HQ0058、HQ0054、HQ0011 和 HQ0015。第 ii 群包括 1 株菌,即 HQ0002。第 iii 群包括 1 株菌,即 HQ0033。第 iv 群包括 3 株菌,即 HQ0008、HQ0029 和 HQ0021。第 v 群包括 1 株菌,即 HQ0028。第 vi 群包括 2 株菌,即 HQ0065 和 HQ0010。第 vii 群包括 1 株菌,即 HQ0047。第 viii 群包括 1 株菌,即 HQ0031。

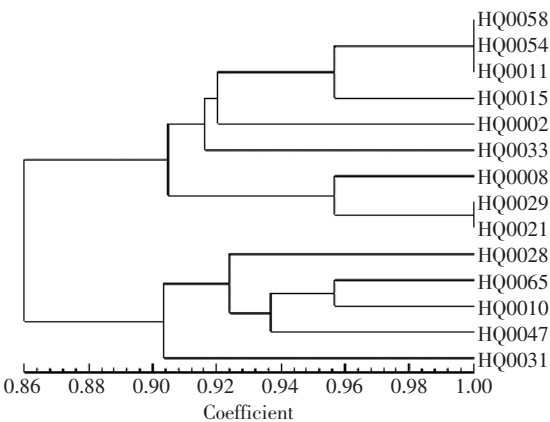


图 2 数值分类树状图

Figure 2 Dendrogram of numerical taxonomy of *Streptomyces*

同时,对 14 株代表菌的生理生化结果进行比较,发现所属白孢类群 6 株菌均能有效利用所提供的碳氮源,其中菌株 HQ0028 的利用率高达 94.7%;金色类群中除 HQ0058 利用率较低外(36.8%),其余 3 株菌利用率都在 57.9% 以上;菌株 HQ0065、HQ0033、HQ0002 和 HQ0010 的碳氮源利用能力基本相同(89.4%)。在其他理化实验中,菌株 HQ0031 表现出较为突出的特性:它可以在 pH12 和 35℃ 的环境中生长,能使明胶液化,可产生 H_2S 、黑色素和淀粉水解酶。

2.5 系统发育分析

在 NCBI 中选取与抗性菌株 16S rDNA 亲缘关系最近的菌株序列构建系统发育树(图 3)。14 个代表菌株分布于系统发育树的 8 个菌群内,菌株 HQ0058、HQ0054、HQ0011 和 HQ0015 从属菌群 I,其中 HQ0054

表 1 菌株 HQ0031 的培养特征

Table 1 Cultural characteristics of strain HQ0031

培养基	培养特征		
	气生菌丝	基内菌丝	可溶性色素
高氏 1 号	晴山蓝	靛青	云水蓝
营养琼脂	无	浅黄褐色	深黄褐色
葡萄糖-天门冬酰胺	大理石灰泛白	黄昏灰	无
酵母膏-麦芽膏	莲子白	象牙黄	无
Bennet 培养基	冰山蓝	笋皮棕泛黑	无

来自白孢类群,其余 3 株菌均为金色类群;菌株 HQ0021、HQ0029 和 HQ0008 从属菌群 II,都来自白孢类群;菌株 HQ0002 和 HQ0033 从属菌群 III,其分别来自绿色类群和蓝色类群;菌株 HQ0065、HQ0010、HQ0031、HQ0047 和 HQ0028 分别从属于菌群 IV、V、VI、VII 和 VIII,它们各来自淡紫灰类群、黄色类群、白孢类群和金色类群,其中 HQ0031 和 HQ0028 属于同一颜色类群。

通过系统发育分析来看(图 3),菌群 I 中, HQ0058、HQ0054、*S. werraensis*、HQ0011、HQ0015、*S. erythrogriseus*、*S. labedae* 的 16S rDNA 序列相似性为 99.3%~99.8%,但它们之间在表型特征、生理生化特

性等方面存在差异,可能为不同链霉菌基因种;菌群 II 中, HQ0021、HQ0029、HQ0008 与 *S. iakyrus* 的序列相似性大于 99.4%;菌群 III 中, HQ0002 和 *S. viridochromogenes*、HQ0033 和 *S. viridis* 分别以 99.87%和 99.84% 的相似性聚在一起;菌群 IV 中, HQ0065、*S. setonensis*、*S. naraensis* 的相似性为 99.86%~99.89%;菌群 V 中, HQ0010 和 *S. roseoviolascens* 的相似性为 99.89%;菌群 VII 中, HQ0047 和 *S. virginiae* 以 99.87%相似性聚在一起;菌群 VIII 中, HQ0028 与 *S. corchorusii*、*S. canarius*、*S. olivaceoviridis* 序列相似性为 99.73%~99.75%;菌群 VI 中, HQ0031 与 *S. viridochromogenes sub sp. komabensis* 的系统发育关系最为密切,它们之间的序列相似性为

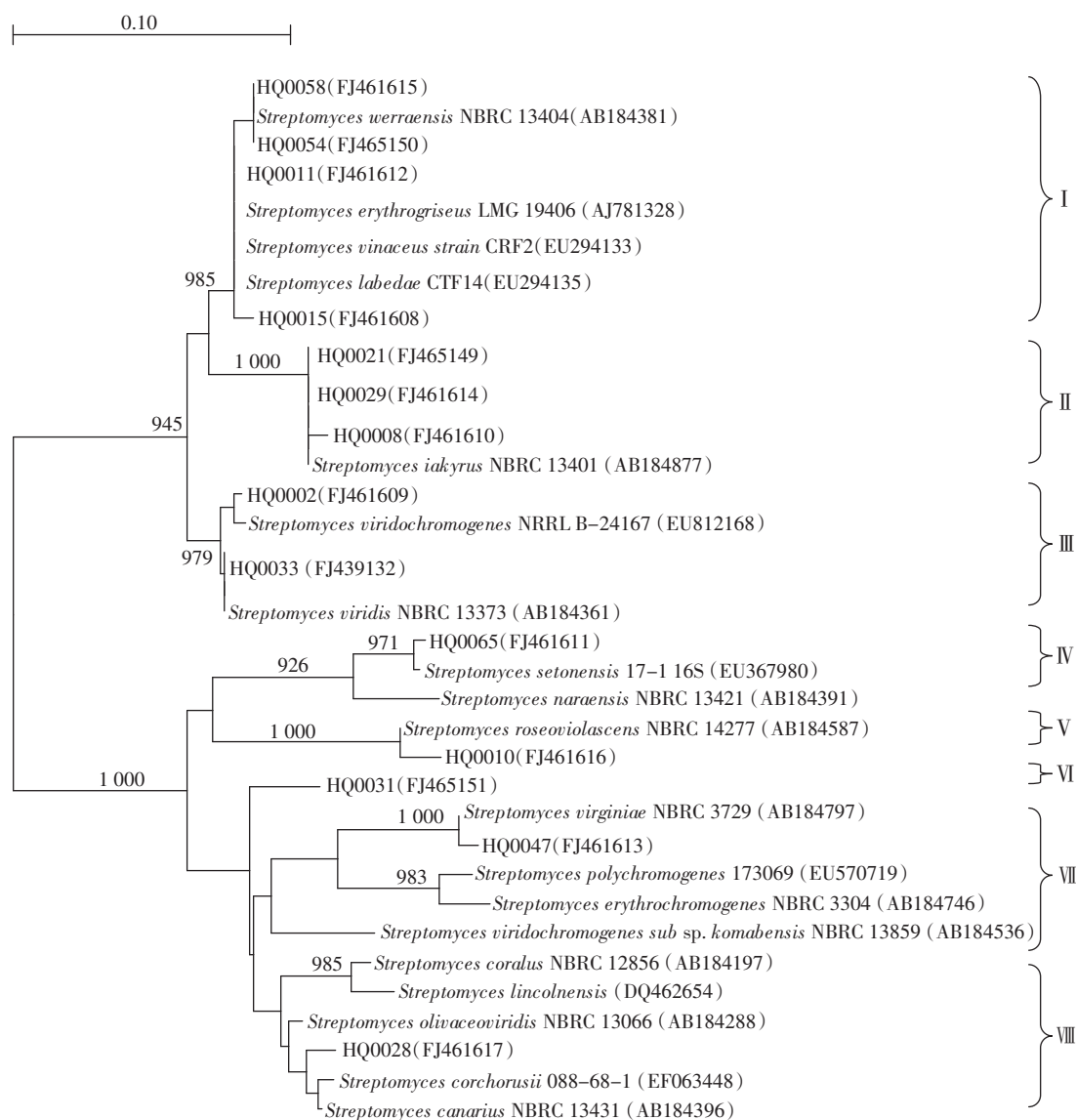


图 3 抗铅链霉菌代表菌株及相关菌株的 16S rDNA 系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree showing the relationships among representative strains of *Streptomyces* and other taxa downloaded from GenBank based on 16S rDNA sequences numbers on branch nodes are bootstrap values(1 000 samplings)

98.84%, 但该菌株在系统进化树上不与任何已知菌种相聚, 而是以较高的进化差异独立成支。所以, 菌株 HQ0031 可能为链霉菌属的 1 个潜在新种。要最终确定菌株 HQ0031 的分类地位, 除参考它在形态培养特征和生理生化分析中所表现出的有别于其他菌株的特性外, 还需要进行细胞化学组分分析、G+C mol% 含量测定以及 DNA-DNA 同源性分析等研究来证明。

3 结论与讨论

本研究采用了形态学、生理生化特征以及 16S rDNA 序列分析等多相分类技术方法对分离筛选所得的 14 株抗 Pb^{2+} 浓度为 $5.6 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 链霉菌代表菌株进行了系统的多样性研究。

经形态和培养特征观察, 具有抗重金属特性菌株全部具有典型的链霉菌特征。其中, 白孢类群菌株 HQ0008、HQ0021、HQ0054 与金色类群菌株 HQ0015、淡紫灰类群菌株 HQ0065 在酵母膏-麦芽膏、Bennet 培养基上均产生咖啡色可溶性色素, 菌落表面光滑, 直径差异较小, 而在高氏 1 号、营养琼脂和葡萄糖-天门冬酰胺培养基上各自表现特征差异较大, 丰富多样。这说明, 表型性状在属的划分上虽是重要依据, 但试图以此来解决分类中的问题已远远不够。

对生理生化特性和 16S rDNA 序列相似性分别进行聚类分析并构建树状图, 经对比发现, 两种不同角度的菌群划分存在较多相似性。生理生化数值分类图中由 HQ0058、HQ0054、HQ0011、HQ0015 所代表的第 i 群, HQ0008、HQ0029、HQ0021 所代表的第 iv 群分别与 16S rDNA 划分的菌群 I 和菌群 II 一致, 因此可以初步认为第 i 群中的 HQ0058 和 HQ0054, 第 iv 群中的 HQ0029 和 HQ0021 为同一链霉菌菌株, 其余菌株则可能是亲缘关系高于 99%, 理化形状存在差异的不同链霉菌基因种。同时, 还发现数值分类图中菌株 HQ0028、HQ0047 和 HQ0031 各自成群, 结合 16S rDNA 进化分析结果, 其原因是这 3 株菌序列相似性较低, 处在不同进化分支上, 这也验证了生理生化性状测试实验的可靠性与准确性。

但是, 两种分析方法也存有不一致的地方, 如数值分类图中第 vi 群包括的 2 株菌, 即 HQ0065 和 HQ0010 在 16S rDNA 进化树中分别与各自的模式菌株聚在一起, 各自成群; 而第 ii 群的 HQ0002 和第 iii 群的 HQ0033 在 16S rDNA 进化树却以较高的序列相似性聚在一起。产生这种差异的原因主要有: 首先, 每种聚类分析都有其适用范围, 如数值分类对众多的表

型性状进行统计学分析有优势; 16S rDNA 序列相似性分析则是直接依据核酸分子所携带的遗传信息进行分析^[18], 两种方法互相验证和补充, 这样分析的结果更为可靠。其次, 数值分类受人为因素和外在环境因素影响较大, 而 16S rDNA 序列相似性分析较为客观, 准确性和可靠性更高, 普遍受到人们认可。此外, 环境导致同一物种发生了趋异进化, 这种进化从另一方面证实了微生物在如重金属等不利因素胁迫下, 为获取生存机会而产生丰富的表型多样性。

16S rDNA 序列系统发育分析结果最终确定了各菌株的进化位置。通过构建系统发育树, 我们发现在所选代表菌株与已知菌构成的 8 个菌群中, 菌群 I 与菌群 II 聚在一个大的进化分支上, 这个分支可能代表了链霉菌属中一个主要的抗铅菌群, 体现出其丰富的物种多样性。菌株 HQ0031 独自构成菌群 VI, 它与亲缘关系最近菌株的同源性为 98.84%, 从系统进化分析的结果来看, 它可能为链霉菌内一个潜在新种, 这既反映了西安市北郊污灌区抗铅链霉菌多样性具有自己的独特性, 又表明该地区土壤中仍有尚未被发现的抗重金属微生物。

参考文献:

- [1] 文 青, 庞奖励, 淮 态. 西安城郊污灌区菜地土壤与耕种土壤理化性质对比研究[J]. 江西农业学报, 2007, 19(9): 78-80.
WEN Qing, PANG Jiang-li, HUAI Tai. Studies on physical and chemical properties of vegetable soil and cultivated soil from sewage irrigation area in Xi'an City[J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2007, 19(9): 78-80.
- [2] McLaughlin M J, Parker D R, Clarke J M. Metals and micronutrients - food safety issues[J]. *Field Crop Res*, 1999, 60: 143-163.
- [3] 陈红艳, 王继华. 受污染土壤的微生物修复[J]. 环境科学与管理, 2008, 33(8): 144-147.
CHEN Hong-yan, WANG Ji-hua. Microbial remediation of polluted soils[J]. *Environmental Science and Management*, 2008, 33(8): 144-147.
- [4] 滕 应, 黄昌勇. 重金属污染土壤的微生物生态效应及修复研究进展[J]. 土壤与环境, 2002, 11(1): 85-89.
TENG Ying, HUANG Chang-yong. Ecological effect of heavy metals on soil microbes and research advances on the mechanisms of bioremediation[J]. *Soil and Environmental Science*, 2002, 11(1): 85-89.
- [5] 周启星, 宋玉芳. 植物修复的技术内涵及展望[J]. 安全与环境学报, 2001, 1(3): 48-53.
ZHOU Qi-xing, SONG Yu-fang. Technological implications of phytoremediation and its application in environmental protection[J]. *Journal of Safety and Environment*, 2001, 1(3): 48-53.
- [6] Marta A P, Amoroso M J, Abate C M. Chromium (VI) resistance and removal by actinomycete strains isolated from sediments[J]. *Chemosphere*, 2007, 67: 661.

- [7] NIES D H. Microbial heavy-metal resistance[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 51: 730-750.
- [8] 姚斌, 尚鹤, 刘成志, 等. 废弃柴河铅锌矿区土壤微生物特征调查研究[J]. 林业科学研究, 2006, 19(3): 400-403.
- YAO Bin, SHANG He, LIU Cheng-zhi, et al. Characteristics of soil microbes in reclaimed mine soil of Chai-He zinc-lead mine wasteland[J]. *Forest Research*, 2006, 19(3): 400-403.
- [9] Amoroso M J, Castro G, Carlino Federico J, et al. Screening of heavy metal-tolerant actinomycetes isolated from the Sali River[J]. *Gen Appl Microbiol*, 1998, 44: 129-132.
- [10] 曹理想, 周世宁. 植物内生放线菌研究[J]. 微生物学通报, 2004, 31(4): 93-96.
- CAO Li-xiang, ZHOU Shi-ning. A study on endophytic actinomycetes[J]. *Microbiology*, 2004, 31(4): 93-96.
- [11] 姜成林. 放线菌分离方法的新进展[J]. 国外医药(抗生素分册), 1992, 13(2): 86-88.
- JIANG Cheng-lin. New progress of actinomycetes separation[J]. *World Notes on Antibiotics*, 1992, 13(2): 86-88.
- [12] 阮继生. 放线菌分类基础[M]. 北京: 科学出版社, 1974.
- Ruan Ji-sheng. Actinomycetes classification on the basis[M]. Beijing: Science Press, 1974.
- [13] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 17-18.
- BAO Shi-dan. Soil and agricultural chemistry analysis[M]. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2000: 17-18.
- [14] 程丽娟, 薛泉宏. 微生物学实验技术[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2000.
- CHENG Li-juan, XUE Quan-hong. Microbiology experimental technique[M]. Xi'an: World Book Publishing Company, 2000.
- [15] 中科院微生物所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册[M]. 北京: 科学技术出版社, 1975.
- The Chinese Academy of Microbiology by Actinomycetes Classification Group. Streptomyces identification manual[M]. Beijing: Science and Technology Press, 1975.
- [16] 孟珍贵, 杨永平. 几种民族医药的亲缘关系初探——兼论数值分类软件 NTSYS 的使用[J]. 中国民族民间医药, 2007, 6: 347-348.
- MENG Zhen-gui, YANG Yong-ping. The study of the genetic relationship of several national medicine——Also on the use of numerical taxonomy software NTSYS [J]. *Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy*, 2007, 6: 347-348.
- [17] Terefewor Z, Kaijainen S, Lindstrom K. AFLP fingerprinting as a tool to study the genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolated from *Galega orientalis* and *Galega officinalis*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2001, 91(2-3): 169-180.
- [18] 郝云婕, 王孟兆, 刘磊, 等. 分离自补骨脂等宿主根瘤的 24 株菌的数值分类和 16S rDNA PCR-RFLP 研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(5): 754-759.
- HAO Yun-jie, WANG Meng-zhao, LIU Lei, et al. Numerical taxonomy and 16S rDNA PCR-RFLP of rhizobial strains isolated from *Psoralea corylifolia* etc[J]. *Microbiology*, 2008, 35(5): 754-759.