

紫云英根瘤菌的系统发育多样性*

张晓霞¹ 马晓彤¹ 曹卫东¹ 韦善君² 蔡建辉² 姜瑞波^{1**}

(¹中国农业科学院农业资源与农业区划研究所中国农业微生物菌种保藏中心 北京 100081)

(²中央民族大学生命与环境科学学院 北京 100081)

摘要 在筛选根瘤菌与不同紫云英品种高效结瘤的基础上,通过16S rRNA基因序列分析,对13株共生结瘤效果好的菌种进行了系统发育研究.结果表明,13株菌属于3个主要聚类群,分别与*Mesorhizobium*、*Agrobacterium*和*Stenotrophomonas*亲缘关系最为接近,种类多样性较为丰富;其中编号为ACCC13065株的菌株与*S. rhizophila* 16S rDNA序列相似性为100%,位于 γ -变形菌纲,这是除 α -变形亚纲、 β -变形亚纲外所发现的一类新的根瘤菌类型.图4 表3 参28

关键词 紫云英根瘤菌; 16S rDNA; 系统发育; 多样性; γ -变形菌纲

CLC Q939.114.03

Phylogenetic Diversity of Rhizobial Bacteria Isolated from *Astragalus sinicus**

ZHANG Xiaoxia¹, MA Xiaotong¹, CAO Weidong¹, WEI Shanjun², CAI Jianhui² & JIANG Ruibo^{1**}

(¹Agricultural Culture Collection of China, Institute of Agricultural, Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

(²College of Life and Environment Sciences, Central University for Nationalities, Beijing 100081, China)

Abstract Taxonomic and phylogenetic characteristics of 13 rhizobial strains were studied by 16S rRNA gene sequence comparisons based on during a study of screening high symbiotic matching combinations of rhizobia and *Astragalus sinicus* varieties. The results showed that the 13 strains could be divided into 3 clusters, belonging to three genera *Mesorhizobium*, *Agrobacterium* and *Stenotrophomona*, respectively. The results also indicated that rhizobia species diversity and phylogenetic diversity were abundant in the *A. sinicus* nodules. The 16S rRNA gene sequence of strain ACCC13065 was 100% similar to type strain of *S. rhizophila*, within γ -proteobacteria. It was the first time to report the legume-nodulating γ -proteobacteria besides α - and β -rhizobia. Fig 4, Tab 3, ref 28

Keywords *Astragalus sinicus* rhizobia; 16S rRNA gene; phylogenetics; diversity; γ -proteobacteria

CLC Q939.114.03

紫云英 (*Astragalus sinicus* L.) 是能形成共生固氮体系的豆科植物,在我国长江中下游和华南地区广泛种植,在日本、越南、朝鲜半岛等国家和地区也有生长.紫云英主要用作水稻绿肥,对于提高中低产田土壤有机质含量、改善土壤的物理性状和增加土壤肥力具有明显的效果.20世纪40年代,陈华癸院士首次从紫云英根瘤中分离发现根瘤菌,当时根据与豆科植物互接种族关系将其定名为紫云英根瘤菌 (*Rhizobium astragali*)^[1]; Chan等研究了从中国南京和日本 Otaki等地采集的11个菌株,将其归于 *Bradyrhizobium*^[2]; 1991年,陈文新院士采用数值分类法,重新命名为华癸根瘤菌 (*R. huakuii*)^[3]; 1997年又并入 *Mesorhizobium*属,称为华癸中生根瘤菌 (*Mesorhizobium huakuii*)^[4].随着现代分子生物技术的应用和对紫云英根瘤菌分类研究的不断深入,发现其遗传多样性较为丰富,除 *Mesorhizobium*属的几个种外,紫云英根瘤菌还分布在 *Agrobacterium*、*Mesorhizobium*、*Rhizobium*和 *Sinorhizobium*属中^[5].

在紫云英绿肥的培育过程中,接种与品种相匹配的根瘤菌尤为重要.本研究在筛选根瘤菌与不同品种紫云英高效结瘤的基础上,通过16S rRNA基因序列分析,对部分结瘤效果好的菌种进行了进一步鉴定和系统发育研究.

1 材料与方法

1.1 菌种来源

在筛选与不同品种紫云英高效结瘤的根瘤菌过程中,将中国农业微生物菌种保藏中心库藏的60余株分离自紫云英的根瘤菌与7个紫云英推广品种进行结瘤匹配试验,初步得到13株结瘤固氮效果好的菌株.对这13株菌进行了系统发育分析,菌种的具体编号、来源等相关信息见表1.

1.2 供试菌种与紫云英的结瘤试验

采用试管栽培的方法:将Jensen无氮植物培养基分装到试管(18 mm×210 mm)中,加入折叠好的滤纸条,以121℃湿热灭菌30 min;选取籽粒饱满的紫云英种子经75%酒精和0.1%酸性升汞各处理5 min,用无菌水洗涤10次,于28℃催芽.将催芽成功的种子放入菌悬液中浸泡30 min,每管2粒播入试管中,并设不接种对照.光照培养箱内培养2 mo后记录结瘤情况.

1.3 根瘤菌DNA模板制备

采用菌落裂解法提取菌体总DNA^[6]:取适量菌体,煮沸10 min,冷却裂解后,以10 000 r/min离心5 min,取上清3 μ L作

收稿日期: 2009-06-30 接受日期: 2009-09-30

*公益性行业(农业)科研专项经费(No.200803029-01)、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(No. 2009-10)和国家自然科学基金项目(No. 30900001)资助 Supported by the Special Scientific Research Fund for Commonweal Agricultural Industry of China (No. 200803029-01), the Special Foundation for Central Academies of China (No. 2009-10) and the National Natural Science Foundation of China (No. 30900001)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: acce@caas.ac.cn)

表1 菌种来源
Table 1 Sources of the tested strains

ACCC编号 ACCC number	原始编号 Origin number	菌种来源 Sources	分离地 Locality
13004	38D	← ISF ← IM	
13036	F6/WIV	← ISF ← WIV	
13040	紫81 Zi 81	← ISF ← NAU	
13052	14	← ISF	广西玉林石南镇 Shinan Town, Yulin City, Guangxi Province
13057	22	← ISF	广西玉林雅桥 Yaqiao Town, Yulin City, Guangxi Province
13058	24	← ISF	广西玉林宁明 Ningming Town, Yulin City, Guangxi Province
13059	26	← ISF	广西玉林宁明 Ningming Town, Yulin City, Guangxi Province
13060	33	← ISF	广西玉林宁明 Ningming Town, Yulin City, Guangxi Province
13061	48	← ISF	广东梅县 Mei County, Guangdong Province
13069	49	← ISF	广东梅县 Mei County, Guangdong Province
13065	C14	← ISF	安徽宣州 Xuanzhou County, Anhui Province
13161	F4	← ISF	安徽宣州 Xuanzhou County, Anhui Province
13162	F8	← ISF	安徽宣州 Xuanzhou County, Anhui Province

ISF: 中国农业科学院土壤肥料研究所; IM: 浙江农业科学院微生物研究所; WIV: 中国科学院武汉病毒研究所; NAU: 南京农业大学
ISF: Institute of Soil Fertilizers, Chinese Academy of Agricultural Sciences; IM: Institute of Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences; WIV: Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences; NAU: Nanjing Agricultural University

为模板。

1.4 16S rRNA基因序列扩增及测定

采用引物799f: 5'-AACAGGATTAGATACCCTG-3', 27f: 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3'; 1492r: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'^[7]。反应体系为50 μL, 反应条件如下: 95 ℃, 5 min; 95 ℃, 45 s, 55 ℃, 60 s, 72 ℃, 60 s, 30个循环; 72 ℃, 8 min; 取PCR产物3 μL与适量的上样缓冲液混合, 1%琼脂糖凝胶电泳, 100 V电压30 min, EB溶液染色, 凝胶成像仪观察拍照, PCR产物于-20 ℃保存。测序工作委托上海英骏生物工程技术有限公司用ABI3730型自动测序仪完成。

1.5 序列分析

获得序列经校对后与GenBank数据作相似性分析, 获得同源性相近的菌种序列, 通过CLUSTAL_X (Version 1.83) 程序多重比对^[8], 采用Mega 4.0软件, 分别用邻接法 (Neighbor-joining)、最小进化距离法 (Minimum-evolution) 及最大简约法 (Maximum-parsimony) 3种方法进行聚类分析, 构建进化树, 系统进化矩阵根据Kimura two-parameter模型估计。采用1 000次自展值 (Bootstrap value) 分析来评估系统进化树拓扑结构的稳定性^[9]。

2 结果与分析

用1492r为引物测定了13株紫云英根瘤菌的的16S rRNA基因部分序列(约700 bp左右), 并用Mega 4.0软件进行聚类分析, 构建进化树并计算各菌株间的进化距离, 所构建的进化树和试验菌株间的进化距离分别见图1 (N-J法) 和表2。从图1可以看出, 13个试验菌种分为3个类群, ACCC13004和ACCC13065各形成一个类群, 其他11株菌聚为一类。从表2可知, ACCC13004与其他菌种的相似性最高为93.4%, ACCC13065与其他试验菌株的相似性最高仅为82.8%, 因此对这两株菌进行单独分析, 并对ACCC13004和ACCC13065的16S rDNA全序列进行了测定。所有获得序列用Blast搜索软件从GenBank公共数据库中进行相似性搜索, 调出相似性最高的相关菌株的16S rRNA基因序列, 再次用Mega 4.0软件进行序列比对、相似性计算、进化距离矩阵计算、聚类分析和

系统进化树构建等系统发育分析, 结果表明, 这13个菌株分别与3个不同的属聚为一类, 其中11株菌与*Mesorhizobium*属的多个种位于同一进化分支, 其他两株菌中ACCC13004与*Agrobacterium*属的菌株亲缘关系最为接近, ACCC13065与*Stenotrophomonas*属聚为一类, 所构建的进化树 (N-J法) 分别见图2、图3和图4。

从图2可以看出, 位于中慢生根瘤菌 (*Mesorhizobium*) 分支的11株菌分别属于两个不同的类群, 其中8株菌与华葵中慢生根瘤菌 (*M. huakuii*) 聚为一类, 与华葵中慢生根瘤菌模式菌株IAM 14158^T的相似性为99.7%~100%; 其他3株与*M. mediterraneum*及*M. temperatum*聚为一类, 与两个种的模式菌UPM-Ca36^T、SDW 018^T 16S rDNA的序列相似性均为99.5%~100%。*M. huakuii*是最初分离自紫云英并命名的根瘤菌类群, 后来又陆续报道了*M. septentrionale*、*M. temperatum*中慢生根瘤菌类型^[10]以及*Agrobacterium*、*Rhizobium*和*Sinorhizobium*属可与紫云英结瘤的根瘤菌菌株^[5]。ACCC13161、ACCC13162和ACCC13061与*M. temperatum*、*M. mediterraneum*均有较高的相似性, 其中*M. mediterraneum*为已报道可与紫云英共生结瘤的根瘤菌类型, 而*M. temperatum*

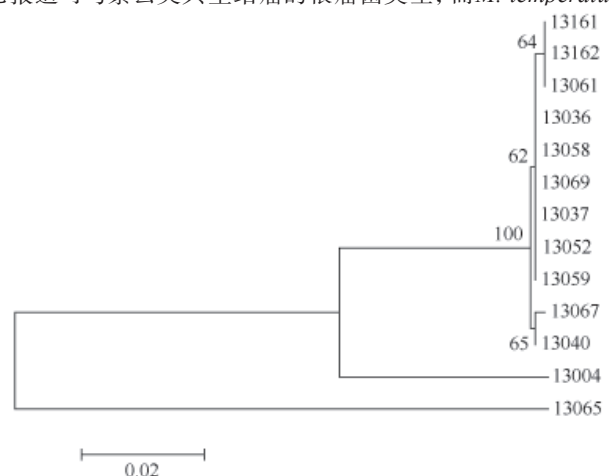


图1 供试菌株16S rDNA部分序列聚类图 (Neighbor joining法)
Fig. 1 Phylogenetic tree of 13 tested strain based on comparison of the 16S rRNA gene partial sequences (Neighbor joining method)

表2 试验菌株间的进化距离 (Mega 4.0软件计算, Kimura模型)
Table 2 Pairwise distances of the tested strains computed by Mega 4.0 based on Kimura model

编号 Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	13037												
2	13069	0.000											
3	13036	0.000	0.000										
4	13058	0.000	0.000	0.000									
5	13067	0.003	0.003	0.003	0.003								
6	13052	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003							
7	13040	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002						
8	13059	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002					
9	13161	0.002	0.002	0.002	0.002	0.005	0.002	0.003	0.002				
10	13061	0.002	0.002	0.002	0.002	0.005	0.002	0.003	0.002	0.000			
11	13162	0.002	0.002	0.002	0.002	0.005	0.002	0.003	0.002	0.000	0.000		
12	13004	0.066	0.066	0.066	0.066	0.066	0.066	0.067	0.066	0.067	0.067	0.067	
13	13065	0.172	0.172	0.172	0.172	0.170	0.172	0.174	0.174	0.174	0.174	0.174	0.174

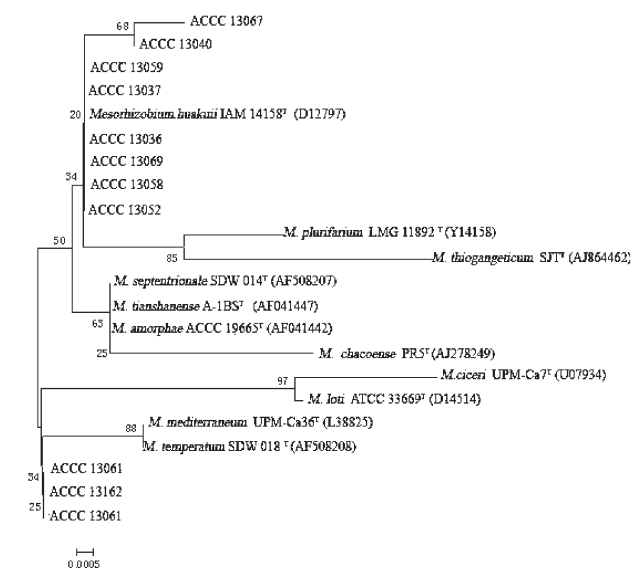


图2 11株位于Mesorhizobium属分支的根瘤菌与相近属根据16S rRNA基因构建的系统进化树 (Neighbor joining法)

Fig. 2 Phylogenetic relationship of 11 strains and related genus of Mesorhizobium based on 16S rRNA gene sequences (Neighbor joining method)

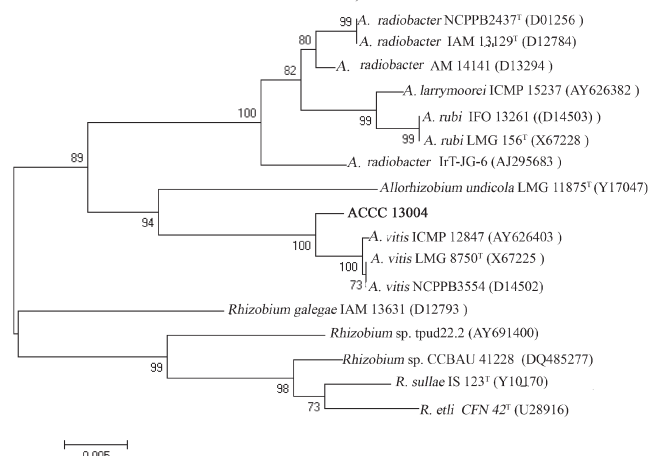


图3 ACCC13004与相近属根据16S rRNA基因构建的系统进化树 (Neighbor joining法)

Fig. 3 Phylogenetic relationship of ACCC13004 and species of related genera based on comparison of the 16S rRNA gene sequences (Neighbor joining method)

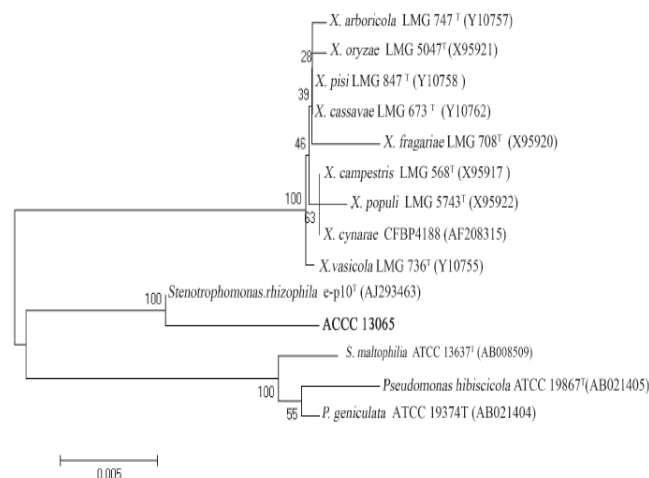


图4 ACCC13065与相近属根据16S rRNA基因构建的系统进化树 (Neighbor joining法)

Fig. 4 Phylogenetic relationship of 13065 and species of related genera based on comparison of the 16S rRNA gene sequences (Neighbor joining method)

与鹰嘴豆共生结瘤的根瘤菌类群, 未见到与紫云英共生结瘤的报道; 另一方面, 在早期的根瘤菌分类系统中, 紫云英根瘤菌在互接种族中独属一族, 综合以上两个因素考虑, 这3株菌可能与*M. mediterraneum*亲缘关系更为接近, 但确切的分类地位还需对菌种进行进一步的多相分类研究。

菌株ACCC13004与*A. vitis* LMG8750^T的16S rDNA同源性分别为99.3%, 利用Mega软件提供的3种不同方法聚类分析, 不同聚类的方法与*A. vitis*菌株聚为一类, 且有较高的自展值 (Bootstrap value) 作为支持。

菌株ACCC13065与*S. rhizophila* e-p10^T的16S rDNA的同源性为99.2%, 利用Mega 4.0软件, 采用3种不同的计算方法, 均与*S. rhizophila* e-p10^T稳定地聚为一类。*S. rhizophila*为2002年发现的一类菌种, 分离自植物 (土豆、油菜) 的根际及根内^[11], 迄今未在豆科植物内发现, 其分类地位为γ-变形亚纲 (Gamma-proteobacteria) 黄单胞菌目 (Xanthomonadales) 黄单胞菌科 (Xanthomonadaceae)。通过与不同品种的紫云英结瘤试验结果表明, ACCC 13065具有较强的结瘤固氮能力。

通过滤纸桥法, 对供试菌种与紫云英的共生性状进行了研究。结果表明, 供试菌株可与不同品种的紫云英共生结瘤

表3 试验菌株在不同品种紫云英根部形成的根瘤状况
Table 3 Formation of root nodules by the tested strains in different varieties of *A. sinicus*

ACCC编号 ACCC number	宁波大桥种 Ningbodaqiao variety	丰城青杆种 Fengchengqinggan variety	奉化大桥 Fenghuadaqiao variety	闽紫6 Minzi 6 variety	弋江籽 Yijiaozi variety	余江大叶 Yujiangdaye variety	新特早 Xintezao variety
13004	+++	+++	+++	+++	+-	+++	+++
13036	+++	+++	+++	+++	+++	+++	///
13040	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
13052	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
13057	+++	+++	+++	+++	+++	+++	///
13058	+++	+++	+++	+++	+++	+++	///
13059	+++	-++	+++	+++	+++	+++	///
13060	+++	+++	+++	+++	+++	+++	///
13061	+++	+++	+++	+++	+++	+++	///
13069	++/	+++	+++	+++	++/	+++	///
13065	+++	+++	+++	+++	+++	+++	///
13161	+++	+++	+++	+++	+++	+++	///
13162	+++	+++	+++	++/	+++	+++	///

+: 结瘤; -: 未结瘤; /: 无数据 +: Nodulation; -: Non-nodulation; /: Absent

(表3), 为筛选不同品种紫云英高效共生及广谱共生的根瘤菌提供了菌种资源及科学依据。

3 讨论

通过16S rRNA基因序列分析发现, 所研究的13株分离自紫云英根瘤的菌株属于3个不同的类群, 分别为 *Mesorhizobium*、*Agrobacterium* 和 *Stenotrophomonas*。这类菌株在以传统的互接种族为分类的系统中, 统一为紫云英根瘤菌且独属一族。随着多相分类系统在细菌分类中的应用, 新种不断被发现, 根瘤菌的多样性得以丰富, 根瘤菌的分类系统也不断地被修改和完善^[12]。Gao等对95株紫云英根瘤菌多样性进行了系统分析, 发现这些菌株分别归为 *Mesorhizobium*、*Agrobacterium*、*Rhizobium* 和 *Sinorhizobium* 属^[5], 在此基础上, 报道了两个紫云英根瘤菌的新种 *M. septentrionale* 和 *M. Temperatum*^[10]。结合本研究结果, 可以确定紫云英根瘤菌具有丰富的种类多样性。

本研究中发现了与 *A. vitis* 缘关系相近的一株菌。对于 *Agrobacterium* 属的分类地位, 一直以来存在争议。依据16S rDNA序列分析, Young等建议将 *Agrobacterium*、*Allorhizobium* 两个属统一归为 *Rhizobium* 属^[13-14]; 但以 Farrand 为代表的一部分科学家则强烈反对上述意见, 希望保留原来的命名系统^[15]。国际系统细菌学委员会根瘤菌分类委员会分会则采取了折衷的办法, 同时承认两个分类系统, 研究者可以根据自己的喜好和习惯判断并选择相应的分类系统^[16-17]。 *Agrobacterium* 属与豆科植物的共生固氮能力至今存在争议, 已有报道 *Agrobacterium* 属的一些菌株可与豆科植物结瘤, 如 *A. radiobacter* 与菜豆 (*Phaseolus vulgaris*)、杭子梢属 (*Campylotropis* spp.)、决明属 (*Cassia* spp.)^[19]、紫藤 (*Wisteria sinensis*)^[20] 结瘤, 但目前尚未得到直接的证据, 有观点认为 *Agrobacterium* 是作为伴生菌进入根瘤中^[21-22]。具有 Sym 质粒的 *A. rhizogenes* 菌株可与 *P. vulgaris* 形成根瘤和瘤组织^[23]。本研究通过与不同紫云英品种的回接试验, 证实 ACCC13004 具有结瘤固氮功能, 如需进一步证实, 需采用基因标记等方法检测与紫云英结瘤状况, 并检测其结瘤及固氮基因是否存在。

在目前已发现的根瘤菌中, 绝大部分种类分布在 α -变形亚纲, 近年来报道了在 β -变形亚纲中的一些类群如 *Burkholderia*^[24]、*Cupriavidus*^[25]、*Herbaspirillum*^[26] 3个属中的部分种类也具有结瘤固氮功能^[27-28]。截止目前, 尚未发现在 γ -变形亚纲发现能与豆科植物结瘤的菌株, 因而对 ACCC13065 固氮结瘤功能特性及其分类地位的进一步研究将具有十分重要的意义。

References

- Chen HK (陈华葵). Microbiology. Beijing, China: China: Higher Education Press (北京: 高等教育出版社), 1959
- Chan CL, Lumpkin TA, Root CS. Characterization of *Bradyrhizobium* sp. (*Astragalus sinicus* L.) using serological agglutination, intrinsic antibiotic resistance, plasmid visualization and field performance. *Plant & Soil*, 1988, **109**: 58-59
- Chen WX, Li GS, Qi YL, Wang ET, Yuan HL, Li JL. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *Int J Syst Bacteriol*, 1991, **41**: 275-280
- Jarvis BDW, van Berkum P, Chen WX, Nour SM, Fernandez MP, Cleyet-Marel JC, Gillis M. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gem nov. *Int J Syst Bacteriol*, 1997, **47**: 895-898
- Gao J, Terefework Z, Chen W, Lindström K. Genetic diversity of rhizobia isolated from *Astragalus adsurgens* growing in different geographical regions of China. *J Biotechnol*, 2001, **91**: 155-168
- Zhang XX, Sun L, Qiu F B, McLean RJC, Jiang RJ and Song W. *Rheinheimera tangshanensis* sp. nov., a novel rice root-associated bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2008, **58**: 2420-2424
- Chelius MK, Triplett EW. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microb Ecol*, 2001, **41**: 252-263
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**: 4876-4882

- 9 Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*, 2004, **5**: 150~163
- 10 Gao JL, Turner SL, Kan FL, Wang ET, Tan ZY, Qiu YH, Gu J, Terefework Z, Young JPW, Lindström K, Chen WX. *Mesorhizobium septentrionale* sp. nov. and *Mesorhizobium temperatum* sp. nov., isolated from *Astragalus adsurgens* growing in the northern regions of China. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, **54**: 2003~2012
- 11 Wolf A, Fritze A, Hagemann M, Berg G. *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal Properties. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2002, **52**: 1937~1944
- 12 Sahgal M, Johri BN. The changing face of rhizobial systematics. *Curr Sci*, 2003, **84** (1): 43~48
- 13 Young JM, Kuykendall LD, Martinez-Romero E, Kerr A, Sawada H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, **51**: 89~103
- 14 Young JM, Kuykendall LD, Martinez-Romero E, Kerr A, Sawada H. Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium*—a reply to Farrand *et al.* (2003). *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, **53**: 1689~1695
- 15 Farrand SK, Van Berkum PB, Oger P. *Agrobacterium* is a definable genus of the family Rhizobiaceae. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, **53**: 1689~1695
- 16 Lindstrom K, Martinez-Romero M E. International Committee on Systematics of Prokaryotes: Subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2002, **52**: 23~37
- 17 Young JM, Park DC, Weir BS. Diversity of 16S rDNA sequences of *Rhizobium* spp. implications for species determinations. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, **238**: 125~131
- 18 de Lajudie P, Laurent-Fulele E, Willems A, Torck U, Coopman R, Collins MD, Kersters K, Dreyfus B, Gillis M. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *Int J Syst Evol Microbiol*, 1998, **48**: 1277~1290
- 19 Han SZ, Wang ET, Chen WX. Diverse bacteria isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* and species within the genera *Campyilotropis* and *Cassia* grown in China. *Syst Appl Microbiol*, 2005, **28**: 265~276
- 20 Liu J, Wang ET, Chen WX. Diverse rhizobia associated with woody legumes *Wisteria sinensis*, *Cercis racemosa* and *Amorpha fruticosa* grown in the temperate zone of China. *Syst Appl Microbiol*, 2005, **28** (5): 465~477
- 21 Mhamdi R, Mrabet M, Laguerre G, Tiwari R and Aouani ME. Colonization of *Phaseolus vulgaris* nodules by *Agrobacterium*-like strains. *Can J Microbiol*, 2005, **51** (2): 105~111
- 22 Lü F (吕飞), Jiang X (蒋欣), Xu JJ (徐佳洁), Zhu B (朱博), Wei GH (韦革宏). 16S rDNA polymorphism and phylogeny of rhizobia isolated from *Trifolium* in Xinjiang Uygur Autonomous Region and Shaanxi Province. *Acta Agrestia Sin*, 2009, **17** (3): 304~309
- 23 Velázquez E, Peix A, Zurdo-Piñero JL, Palomo JL, Mateos PF, Rivas R, Adelantado EM, Toro N, García-Benavides P, Martínez-Molina E. The coexistence of symbiosis and pathogenicity-determining genes in *Rhizobium rhizogenes* strains enables them to induce nodules and tumors or hairy roots in plants. *Mol Plant-Microb Interact*, 2005, **18** (12): 1325~1332
- 24 Vandamme P, Goris J, Chen WM, de Vos P, and Willems A. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov. nodulate the roots of tropical legumes. *Syst Appl Microbiol*, 2002, **25**: 507~512
- 25 Vandamme P, Coenye T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, **54**: 2285~2289
- 26 Valverde A, Velázquez E, Gutiérrez C, Cervantes E, Ventosa A, Igual JM. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, **53**: 1979~1983
- 27 Chen WM, de Faria SM, Stralioetto R, Pitard RM, Simões-Araújo JL, Chou JH, Chou YJ, Barrios E, Prescott AR, Elliott GN, Sprent JI, Young JPW, James EK. Proof that *Burkholderia* Strains Form Effective Symbioses with Legumes: A Study of Novel *Mimosa*-Nodulating Strains from South America. *Syst Appl Microbiol*, 2005, **71** (11): 7461~7471
- 28 Moulin L, Munive A, Dreyfus B, Boivin-Masson C. Nodulation of legumes by members of the -subclass of proteobacteria. *Nature*, 2001, **411**: 948~950