

应用全细胞蛋白SDS-PAGE分子标记技术验证 含羞草根瘤菌的结瘤能力*

刘晓云^{1**} 张斌² 吴伟³ 李乔仙⁴

⁽¹⁾河北大学生命科学学院, 河北省微生物多样性研究与应用实验室 保定 071002)

⁽²⁾西南林学院资源学院, 西南地区生物多样性保育国家林业局重点实验室 昆明 650224)

⁽³⁾西南林学院保护生物学院 昆明 650224)

⁽⁴⁾云南省草地动物科学研究院 昆明 650212)

摘要 对云南省热带及亚热带地区的含羞草根瘤菌进行了分离, 选择其中40株菌为接种菌株, 通过结瘤试验并采用全细胞蛋白SDS-PAGE分子标记方法研究了其结瘤能力. 经过结瘤试验, 发现除菌株SWF66075和SWF66093没有结瘤外, 其它38株菌株均与含羞草植物结瘤, 结瘤率为95%. 从结瘤试验所获根瘤中, 分离得到结瘤菌株, 采用全细胞蛋白SDS-PAGE分子标记对结瘤菌株与接种菌株进行了比较研究. 蛋白图谱及聚类分析显示, 26株接种菌株与其结瘤菌株的全细胞蛋白分子图谱完全相同, 在100%的相似水平上与其结瘤菌株聚在一起, 说明宿主植物所形成的根瘤确系接种菌株侵入所致, 因而可将这些菌株确认为根瘤菌菌株; 而SWF66012、SWF66029、SWF66044和SWF66058等12株菌株的结瘤菌株与其各自接种菌株的全细胞蛋白图谱存在较大差异, 推测这12株接种菌株与其结瘤菌株可能不是同一菌株, 尚不能确定它们与含羞草植物的结瘤能力, 这些菌株是否为根瘤菌菌株仍需进一步验证. 研究表明, 全细胞蛋白SDS-PAGE分子标记技术是一种快速、准确地验证根瘤菌结瘤能力的方法. 该方法进一步完善了结瘤试验, 并初步揭示了根瘤菌的竞争结瘤能力, 适用于对大量根瘤内分离菌株进行根瘤菌的证实研究. 图2 参28

关键词 含羞草; 根瘤菌; 分子标记; 全细胞蛋白; SDS-PAGE

CLC S154.381

Verification of Nodulation Ability of Strains Isolated from *Mimosa* spp. Nodules Using Whole Cell Protein SDS-PAGE Molecular Marker Method*

LIU Xiaoyun^{1**}, ZHANG Bin², WU Wei³ & LI Qiaoxian⁴

⁽¹⁾College of Life Sciences, Hebei University, Key Laboratory of Microbial Diversity Research and Application of Hebei Province, Baoding 071002, Hebei, China)

⁽²⁾College of Resources, Southwest Forestry College, Key Laboratory of Biodiversity Conservation in Southwest China of State Forestry Administration, Kunming 650224, China)

⁽³⁾College of Conservation Biology, Southwest Forestry College, Kunming 650224, China)

⁽⁴⁾Academy of Grassland and Animal Science of Yunnan, Kunming 650212, China)

Abstract The nodules of *Mimosa* spp. were collected from some areas in Yuanjiang and Xishuangbanna, Yunnan, China. Bacteria were isolated from these nodules with modified medium, and 40 strains were selected to carry out the nodulation test. The result showed that 38 strains could nodulate *M. pudica*. The nodulation rate was approximately 95%. 38 re-isolated strains and their whole cell protein profiles were obtained. The clustering analysis demonstrated that 26 re-isolated strains had a protein pattern identical to that of their original strains at the similarity of 100%, indicating that these 26 strains could establish symbiosis with *M. pudica*. The whole cell protein profiles of 12 strains were different from those of the re-isolated strains, indicating that the nodules were not formed by them and further research is needed. This study shows that the whole cell protein SDS-PAGE can be used in inoculation test, and it is a time-saving and accurate molecular marker to identify rhizobia, especially for characterizing plenty of isolates from nodules of various plants. Also, this study preliminarily reveals that the competitive nodulation ability differs among rhizobial strains. Fig 2, Ref 28

Keywords *Mimosa*; rhizobia; molecular marker; whole cell protein pattern; SDS-PAGE

CLC S154.381

在根瘤菌资源研究和保藏中, 研究者往往以结瘤试验来验证根瘤内分离菌是否为根瘤菌, 却忽视了对结瘤试验所

收稿日期: 2008-10-27 接受日期: 2008-12-25

*国家自然科学基金项目 (No. 30570001) 和国家林业局重点实验室开放基金 (No. KL200703) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30570001) and the Fund of Key Laboratory of the State Forestry Administration—Laboratory for Biodiversity Preservation in Southwest China (No. KL200703)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: liuxiaoyunly@126.com)

形成根瘤的菌株即结瘤菌株进行研究. 在根瘤菌的分离过程中, 也分离到了土壤杆菌, 并且土壤杆菌菌株也能与植物形成了根瘤, 但经过对结瘤菌株的分离, 发现结瘤菌株不是接种的土壤杆菌, 而是植物种子所带的根瘤菌菌株^[1]. 因此, 仅依靠结瘤试验来验证根瘤分离菌株是否为根瘤菌是片面的, 不准确的.

含羞草 (*Mimosa* sp.) 原产热带美洲, 在我国分布于广东、海南、台湾、云南等地. 与含羞草植物共生结瘤的根瘤

菌种类较其它豆科植物多样、复杂且特殊,到目前为止,已报道的能与含羞草植物结瘤的根瘤菌一共有7种,分别为菜豆根瘤菌(*Rhizobium etli*)^[2]、台湾贪铜菌(*Cupriavidus taiwanensis*) [原台湾诺尔斯通菌(*Ralstonia taiwanensis*)^[3]]、加勒比伯克霍尔尔德菌(*Burkholderia caribensis*)^[4]、瘤状伯克霍尔尔德菌(*B. phymatum*)^[5]、含羞草伯克霍尔尔德菌(*B. mimosarum*)^[6]、根瘤伯克霍尔尔德菌(*B. nodosa*)^[7]和萨比亚伯克霍尔尔德菌(*B. sabiae*)^[8],其中除了菜豆根瘤菌*R. etli*属于 α -变形杆菌纲外,其他6种较为特殊,隶属于 β -变形杆菌纲,因此对含羞草根瘤分离菌的检测非常重要。

对含羞草根瘤菌的验证已突破了传统的结瘤试验,有研究者采用菌株特异性引物对23S-5S rRNA基因间隔区(IVS)进行扩增和序列分析并以此作为分子标记准确地对含羞草结瘤菌株进行了检测验证^[9];也有研究者将绿色荧光蛋白基因(*gfp*)转入接种根瘤菌菌株中,直接观察到了根瘤菌对含羞草根瘤侵染及根瘤形成的全过程^[5, 10-12]。但是这两种方法均存在操作烦琐、实验过程较长、不够快捷的缺点,仅适用于对少数菌株进行标记研究,对大量菌株进行检测尚存在不足。

本研究采用全细胞蛋白SDS-PAGE指纹图谱方法对含羞草根瘤菌进行了结瘤能力的验证,旨在提供一种快速验证根瘤分离菌是否为根瘤菌的分子标记方法,比上述方法及16S-23S rRNA基因间隔区(IGS)分析^[13-14]、RAPD^[15]及AFLP^[16]等标记方法更为简单、快速^[17],可以满足对大量菌株进行快速检测的要求。

1 材料与方 法

1.1 含羞草根瘤采集及菌株分离

含羞草根瘤采自云南省西双版纳傣族自治州景洪、勐海、勐腊县及玉溪市的元江县。采集并剪下健康饱满的根瘤存入装有变色硅胶的5 mL冻存小管干燥。干燥的根瘤在分离之前,于蒸馏水中浸泡复苏过夜后参照Vincent的方法进行分离^[18],经稀释纯化得到纯培养物后,保存于YMA斜面4℃短期备用,并用15%甘油作为保护剂于-80℃超低温冰箱中长期保藏^[19]。对结瘤菌株进行分离时,挑选个大、饱满的根瘤,用上述方法进行分离、纯化及保存。

1.2 种子来源及处理

试验所用含羞草种子采自于云南省西双版纳自治州勐海县。种子先用浓硫酸处理5~10 min,再用无菌水漂洗5~10次,将处理过的种子置于湿润无菌滤纸的培养皿中28℃萌发2 d,待胚根长至0.5~1 cm时即可栽种。

1.3 结瘤试验方法

试验采用水培法,在试管(30 mm×350 mm)内放置约为1/2试管高度的滤纸使其形成一个可支持含羞草小苗的斜面,并于试管内装入1/3试管高度的Fahraeus无氮培养液^[20],121.3℃灭菌30 min,冷却后备用。将萌发好的含羞草种苗在菌悬液中浸泡10 min后种于滤纸斜面上,并将剩余的菌液浇在种苗周围,每株接种菌株设3个重复,同时设5个不接种菌液的重复作为对照。置于人工气候箱中28℃,80%湿度,7 000~8 000 lx每天16 h光照培养;植物生长过程中,视培养液多少补加无菌水,并注意防止污染,其间观察结瘤情况,

培养40 d后停止培养并收集根瘤。

1.4 SDS-PAGE蛋白指纹图谱检测及聚类分析

将接种菌株及结瘤菌株接种于同一批次的YMA斜面培养基,28℃培养3~4 d后,用10 mmol L⁻¹ Tris-HCl(pH 7.0)从斜面上洗下菌体并离心洗涤3次,调节菌体浓度至10 mg L⁻¹,与2×样品缓冲液^[21]按1:1混匀后沸水浴20 min,-20℃保存备用。SDS-PAGE为不连续电泳,浓缩胶浓度为3%,分离胶浓度15%,上样前先将样品沸水浴10 min,之后迅速上样,起始电压为80 V,待溴酚兰前沿进入分离胶时加大电压至250 V电泳7.5 h,按郭尧君的方法进行银染色^[21],染色结束后将凝胶短期保存于10%甘油中,并用凝胶成像系统扫描,保存图像以备分析。

将蛋白图谱条带的有无转换为“1”和“0”,数据输入MVSP(版本3.1)软件包中,采用非加权算术平均双组分(UPGMA)算法,聚类生成蛋白图谱相似性表及树状聚类图。

2 结果与分析

2.1 含羞草根瘤菌分离结果

本研究采用改进的YMA培养基,即将培养基中氮及维生素B源加大至普通YMA培养基的7.5倍。共分离获得菌株177株,根据菌落特征、菌体显微形态及采集地点的差异选择了40株菌作为接种菌株进行结瘤试验。

2.2 结瘤试验及结瘤菌株的分离

对40株接种菌株进行了结瘤试验,接种10 d后,观察到部分含羞草植物根部有瘤状突起;15 d后,根瘤形成,随后根瘤逐渐增大;生长40 d后,接种的40株菌中,除菌株SWF66075和SWF66093未结瘤外,其余菌株全部结瘤,所结根瘤形状为椭球形,颜色为白色至粉红色,平均结瘤个数2~10个,结瘤率为95%,对照组5个重复均未结瘤,植株矮小,生长缓慢。依照1.1的方法对结瘤试验所结根瘤进行了分离,获得了38株原接种菌株的结瘤菌株。

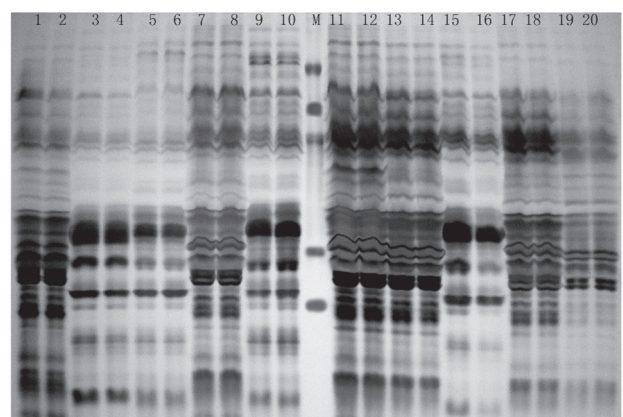


图1 部分菌株SDS-PAGE蛋白指纹图谱

Fig. 1 SDS-PAGE protein patterns of some related strains

1, SWF65027R; 2, SWF65027T; 3, SWF66001R; 4, SWF66001T; 5, SWF66074R; 6, SWF66074T; 7, SWF66109R; 8, SWF66109T; 9, SWF66117R; 10, SWF66117T; M, Marker; 11, SWF66166R; 12, SWF66166T; 13, SWF66174R; 14, SWF66174T; 15, SWF66225R; 16, SWF66225T; 17, SWF66256R; 18, SWF66256T; 19, SWF66316R; 20, SWF66316T.

菌株名称后“R”为结瘤菌株,“T”为接种菌株 “R” for re-isolated strain, “T” for original strain. The same below

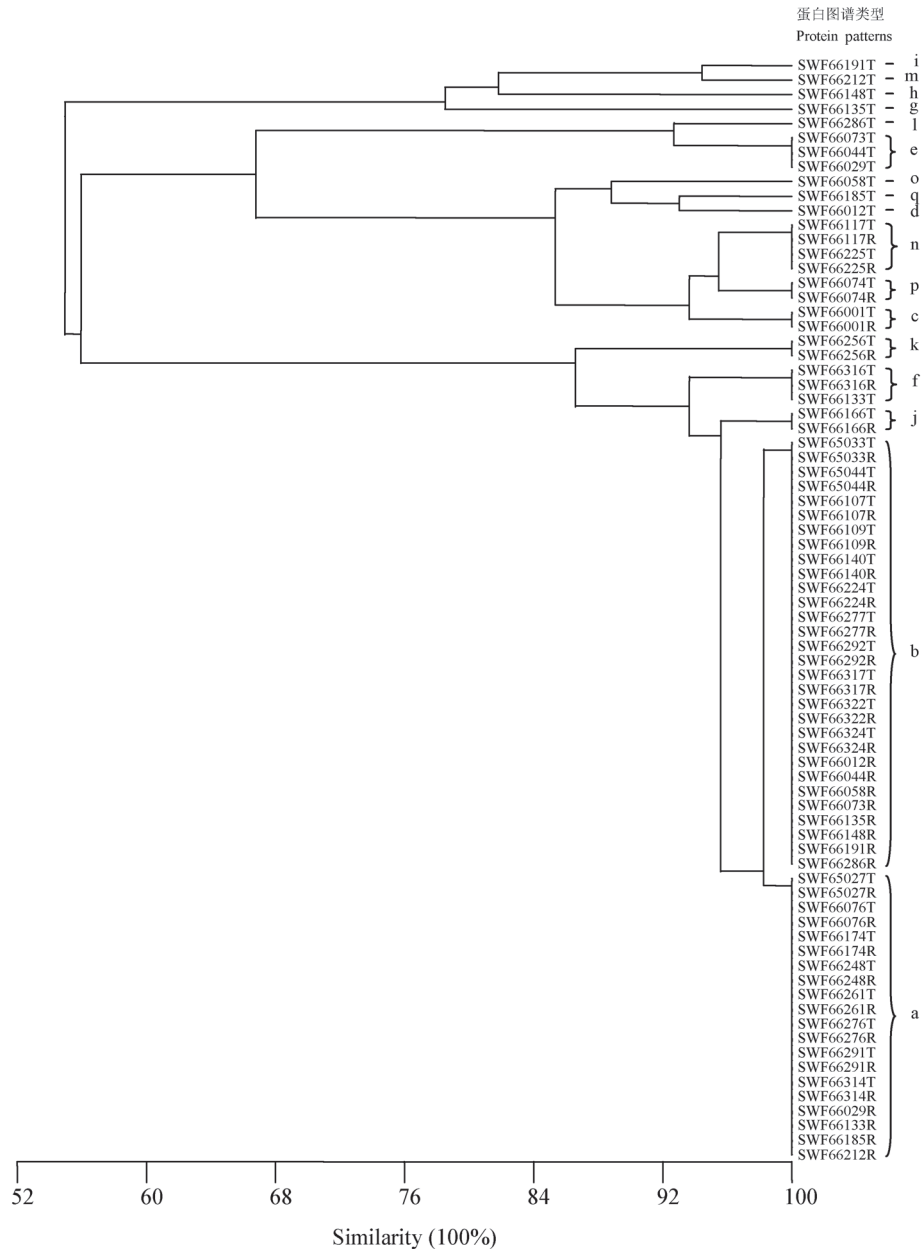


图2 SDS-PAGE蛋白指纹图谱聚类分析树状图
Fig. 2 Clustering dendrogram of SDS-PAGE protein patterns

2.3 SDS-PAGE蛋白指纹图谱检测及聚类分析结果

经过对结瘤菌株与接种菌株全细胞可溶性蛋白SDS-PAGE指纹图谱的分型,发现接种菌株的蛋白图谱类型共有17种,其中为a型、b型的菌株数目最多,分别具有8株、11株,其余15种图谱类型的菌株较少,数量在1~3株之间;结瘤菌株的有a、b、c、j、k、n和p共7种. SWF65027、SWF65033、SWF65044和SWF66001等26株接种菌株的蛋白图谱与其结瘤菌株的完全相同(部分菌株SDS-PAGE蛋白指纹图谱见图1),各接种菌株及其结瘤菌株的蛋白图谱类型见图2.

在蛋白图谱聚类树状图(图2)中,这26株菌在100%的相似水平上与其结瘤菌株聚在一起,表明与含羞草植物形成根瘤的结瘤菌株与接种菌株为同一菌株,因而验证了它们的

结瘤特性. SWF66012、SWF66029、SWF66044和SWF66058等12株接种菌株的蛋白图谱与它们的结瘤菌株差异较大,除SWF66133与其结瘤菌株的蛋白图谱相似性较高外,其余11株接种菌株的蛋白图谱与其结瘤菌株的相似性均在50%~70%之间,在树状图中接种菌株没有在100%的相似性水平上与结瘤菌株聚在一起,表明这12株接种菌株与其结瘤菌株可能不是同一菌株,尚不能确定它们与含羞草植物的结瘤能力,因此这些接种菌株是否为根瘤菌仍需进一步验证.

3 讨论

采用全细胞蛋白指纹图谱作为分子标记,可以快速、简单、稳定地对大量结瘤菌株进行鉴定. 在本研究中,从菌株

的培养到获得 SDS-PAGE 蛋白指纹图谱仅耗时 5~7 d, 而且菌体的收集、洗涤、细胞的破碎等都较为容易. 在相同的培养条件下, 26 株接种菌株的蛋白分子图谱类型在 100% 的相似性水平上与其结瘤菌株聚群, 表明全细胞蛋白 SDS-PAGE 方法对含羞草根瘤内分离菌株的鉴定稳定可靠. Liu 和 Wang 等在进行结瘤菌株检测时, 也采用了全细胞蛋白 SDS-PAGE 指纹图谱作为分子标记, 并且达到了预期结果^[1, 22].

在根瘤菌的结瘤试验中, 可能会出现未接种菌株的对照植物也发生结瘤的现象, 排除了外界污染因素后, 这通常是由于植物种子内携带的根瘤菌导致的. 在本研究中结瘤能力未得到证实的 12 株接种菌株的蛋白图谱类型与其结瘤菌株存在差异, 它们的结瘤现象可能是由于种子内携带的根瘤菌引起的. 关于豆科植物种子携带根瘤菌的现象, 陈丹明^[23]、祁娟^[24]等已有报道.

结瘤能力未得到证实的 12 株菌, 也可能不是根瘤菌. 现有研究表明, 根瘤内分离出的菌株不全都是根瘤菌, 从根瘤内经常分离出属于肠杆菌 (*Enterobacter*)、泛菌 (*Pantoea*)、埃希氏菌 (*Escherichia*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*)、芽孢杆菌 (*Bacillus*) 及土壤杆菌 (*Agrobacterium*) 等属群^[1, 25~27]的非根瘤菌菌株, 这些菌株并不是由于分离过程的污染菌所致, 也不是由根瘤衰老腐败引起, 它们属于内生菌的范畴, 因此在结瘤试验中不能与原宿主植物结瘤.

此外, 接种菌株和植物种子内源根瘤菌间可能存在竞争结瘤的关系, 当接种菌株与种子内源根瘤菌同时存在时, 若接种菌株的结瘤竞争力弱于种子内源根瘤菌, 便不能侵入含羞草植物根部形成根瘤, 就会表现出结瘤菌株蛋白图谱与接种菌株不相同的情况. 试验中具有 F 型蛋白图谱的接种菌株 SWF66133, 其蛋白图谱类型与结瘤菌株不相同, 结瘤能力未能得到确认, 而同样具有 F 型蛋白图谱的菌株 SWF66316 的结瘤能力却得到了验证, 这说明菌株 SWF66133 的竞争结瘤能力可能弱于菌株 SWF66316 及种子内源根瘤菌.

研究者认为, 现今令人信服的根瘤菌验证方法有两类, 除了对结瘤菌株与原接种菌株进行对比验证外, 还可以直接验证菌株的结瘤固氮特性, 即对固氮基因 (*nif*)、结瘤基因 (*nod*) 等共生基因进行检测及序列分析^[28]. 在本研究中, 尚有 12 株菌的结瘤能力未得到结瘤试验的证实, 不能据此认为它们不能与含羞草结瘤, 应该进行多次结瘤试验, 或直接检测它们的共生基因并研究其系统发育地位, 以判断它们是否为根瘤菌.

References

- 1 Wang LL, Wang ET, Liu J, Li Y, Chen WX. Endophytic occupation of root nodules and roots of *Melilotus dentatus* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbial Ecol*, 2006, **52**: 436~443
- 2 Wang ET, Rogel MA, Garcia-de los Santos A, Martinez-Romero J, Cevallos MA. *Rhizobium etli* bv. mimosae, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 1999, **49**: 1479~1491
- 3 Chen WM, Laevens S, Lee TM, Coenye T, De Vos P, Mergeay M, Vandamme P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, **51**: 1729~1735
- 4 Chen WM, Moulin L, Bontemps C, Vandamme P, Bena G, Boivin-Masson C. Legume symbiotic nitrogen fixation by β -proteobacteria is widespread in nature. *J Bacteriol*, 2003b, **185** (24): 7266~7272
- 5 Elliott GN, Chen WM, Chou JH, Wang HC, Sheu SY, Perin L, Reis VM, Moulin L, Simon MF, Bontemps C, Sutherland JM, Bessi R, De Faria SM, Trinick MJ, Prescott AR, Sprent JI, James SEK. *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogenfixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen ex planta. *New Phytol*, 2007, **173**: 168~180
- 6 Chen WM, James EK, Coenye T, Chou JH, Barrios E, De Faria SM, Elliott GN, Shih YS, Sprent JI, Vandamme P. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, **58**: 1847~1851
- 7 Chen WM, De Faria SM, James EK, Elliott GN, Lin KY, Chou JH, Sheu SY, Cnockaert M, Sprent JI, Vandamme P. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, **57**: 1055~1059
- 8 Chen WM, De Faria SM, Chou JH, James EK, Elliott GN, Sprent JI, Bontemps C, Young JP, Vandamme P. *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpinifolia*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2008, **58**: 2174~2179
- 9 Parker MA, Wurtz AK, Payter Q. Nodule symbiosis of invasive *Mimosa pigra* in Australia and in ancestral habitats: A comparative analysis. *Biol Inv*, 2007, **9**: 127~138
- 10 Chen WM, James EK, Prescott AR, Kierans M, Sprent JI. Nodulation of *Mimosa* spp. by the β -proteobacterium *Ralstonia taiwanensis*. *Mol Pl Micro Interact*, 2003a, **16**: 1051~1061
- 11 Chen WM, De Faria SM, Stralioetto R, Pitard RM, Simoes-Araujo 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. *Appl Environ Microbiol*, 2005a, **71** (11): 7461~7471
- 12 Chen WM, James EK, Chou JH, Shih YS, Yang SZ, Sprent JI. β -rhizobia from *Mimosa pigra*, a newly discovered invasive plant in Taiwan. *New Phytol*, 2005b, **168**: 661~675
- 13 Tan ZY, Hurek T, Vinuesa P, Muller P, Ladha JK, Reinhold-Hurek B. Specific detection of *Bradyrhizobium* and rhizobium strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots by 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer-targeted PCR. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67** (8): 3655~3664
- 14 Pan F (潘峰), Wang P (王平), Hu ZJ (胡正嘉), He SJ (何绍江), Feng XM (冯新梅). Phylogenetic study of rhizobia strains isolated from rice bean (*Vigna bellata* L.) in Hubei by 16S-23S rDNA RFLP and 16S rRNA gene sequencing. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2007, **13** (1): 78~82
- 15 Zeng ZH (曾昭海), Chen WX (陈文新), Hu YG (胡跃高), Sui XH (隋新华), Chen DM (陈丹明). Study on competitive nodulation ability of *Rhizobium melilotii* field test by using RAPD Molecular Marker Method. *Acta Ecol Sin* (生态学报), 2004, **24** (7): 1341~1345
- 16 Gao JL (高俊莲), Chen WX (陈文新), Kristina L, Terefework Z. Study on genotypic diversity of the rhizobia isolated from *Astragalus*

- adsurgens* by AFLP fingerprinting. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 1999, **5**(4): 387~395
- 17 Tan ZY (谭志远), Chen WX (陈文新). SDS-PAGE of whole cell protein of new rhizobial groups and 16S rDNA sequencing of their representatives. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 1998, **4** (1): 65~69
- 18 Vincent JM. A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. Edinburgh: Blackwell Scientific Publications, 1970
- 19 Gu JG (顾金刚). Rulers for the Collection Characteration Preservation Management of Microorganism Resources No. 1. Beijing, China (北京): Chinese Agricultural Press, 2005
- 20 Somasegaran P, Hoben HJ. Handbook for Rhizobia. Methods in Legume-Rhizobium Technology. New York: Springer - Verlag, 1994
- 21 Guo YJ (郭尧君). Experimental Techniques of Protein Electrophoresis. Beijing, China (北京): Science Press, 1999
- 22 Liu XY, Wang ET, Li Y, Chen WX. Diverse bacteria isolated from root nodules of *Trifolium*, *Crotalaria* and *Mimosa* grown in the subtropical regions of China. *Arch Microbiol*, 2007, **188**: 1~14
- 23 Chen DM (陈丹明). Screening and molecular labeling of highly effective symbiotic rhizobia on alfalfa: [Master's Degree Dissertation]. Beijing, China (北京): China Agricultural University, 2002
- 24 Qi J (祁娟). Screening endogenous rhizobia from alfalfa seeds and their promoting alfalfa seedlings growth property: [Master's Degree Dissertation]. Lanzhou, China (兰州): Gansu Agricultural University, 2006
- 25 Benhizia Y, Benhizia H, Benguedouar A, Muresu R, Giacomini A, Squartini A. Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Syst Appl Microbiol*, 2004, **27**: 462~468
- 26 Li JH, Wang ET, Chen WF, Chen WX. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biol Biochem*, 2008, **40**: 238~246
- 27 Muresu R, Polone E, Sulas L, Baldan B, Tondello A, Delogu G, Cappuccinelli P, Alberghini S, Benhizia Y, Benhizia H, Benguedouar A, Mori B, Calamassi R, Dazzo FB, Squartini A. Coexistence of predominantly nonculturable rhizobium with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. *Microbial Ecol*, 2008, **63**: 383~400
- 28 Liu XY (刘晓云), Chen WX (陈文新), Zhang B (张斌). β -proteorhizobia and nonrhizobial species—A review. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2008, **48** (10): 1408~1412