

野大豆等宿主根瘤菌表型及 16S rDNA PCR-RFLP 研究

王 静, 刘 磊, 梁 芳, 欧明丽, 刘少佳, 胡玉莹, 杨 帆, 韩素贞*

(首都师范大学生命科学学院, 北京 100048)

摘 要: 采用数值分类和 16S rDNA PCR-RFLP 对分离自北京部分地区野大豆(*Glycine soja sieb*)、大豆(*Glycine max*)、菜豆(*Phaseolus vulgaris*)和长萼鸡眼草(*Kummerowiae stipulacea*)等宿主的 60 株菌及 10 株根瘤菌参比菌株进行了研究。数值分类结果表明, 在 70.5% 相似性水平上, 所有的菌株可分为 3 群: 群 I 为未知菌群, 群 II 为快生和中慢生菌, 群 III 为慢生菌群。依据 16S rDNA PCR-RFLP 分析建立的树状图, 在 69% 的相似性水平上所有的供试菌株可以分为 9 个系统发育分支。分支 I、V、VI、VII、VIII 和 IX 没有参比菌, 数值分类中群 I 的供试菌株基本上都处于这些分支。分支 II 为 *Sinorhizobium-Mesorhizobium-Rhizobium*, 分支 III 为 *Agrobacterium* 分支, 分支 IV 为 *Bradyrhizobium* 分支。

关键词: 根瘤菌; 数值分类; 16S rDNA; PCR-RFLP

中图分类号: Q939.11

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2012)02-0273-07

Phenotypic analysis and 16S rDNA PCR-RFLP of rhizobial strains isolated from *Glycine max* etc.

WANG Jing, LIU Lei, LIANG Fang, OU Ming-li, LIU Shao-jia, HU Yu-ying, YANG Fan, HAN Su-zhen
(Life Science College, Capital Normal University, Beijing 100048)

Abstract: Sixty strains obtained from root nodules of *Glycine soja sieb*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris* and *Kummerowiae stipulacea* of Beijing were studied with numerical taxonomy and 16S rDNA PCR-RFLP. Results of numerical taxonomy indicated that all strains included 10 rhizobium reference strains were divided into 3 groups at 70.5% similarity. Group I is an unknown group with no reference strains. Group II belongs to fast and middle-slow-growing type, and group III belongs to slow-growing kind. The dendrogram derived from 16S rDNA PCR-RFLP showed that all strains divided into nine phylogenetic branches at the similarity of 69%. They are branches I, V, VI, VII, VIII and XI with no reference strains, II (*Sinorhizobium-Mesorhizobium-Rhizobium*), III(*Agrobacterium*) and IV (*Bradyrhizobium*).

Key words: Rhizobium; numerical taxonomy; 16S rDNA; PCR-RFLP

我国是大豆(*Glycine max*)的起源和分布中心, 能与大豆结瘤的根瘤菌资源也十分丰富。野大豆(*Glycine soja sieb*)与大豆是近缘种, 因其抗逆性强, 农业上利用它培育优良的大豆品种, 但其根瘤菌国内外研究不多。长萼鸡眼草(*Kummerowiae stipulacea*)为一年生草本, 全草入药, 有清热解毒、健脾利湿等功效, 其根瘤菌的研究国内外尚未见报道。为此, 作者对分离自北京部分地区的大豆、野大豆和长萼鸡眼草等宿主的 60 株菌进行了数值分

类和 16S rDNA PCR-RFLP 研究, 目的主要是考察这些宿主根瘤菌的表型和遗传多样性特征, 丰富和保存根瘤菌多样性的基因库, 发掘新的、优良的根瘤菌种质资源。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

选取从北京海淀区、门头沟区和顺义县采集的豆科植物野大豆(*Glycine soja sieb*)、大豆(*Glycine*

收稿日期: 2011-01-04

基金项目: 北京市教委基金 (KM200510082008) 资助。

作者简介: 王 静, 女, 硕士研究生。E-mail: wangjing2007hehe@sina.com

* 通讯作者: 韩素贞, 女, 副教授。E-mail: hansuzhen@vip.sina.com

max)、菜豆 (*Phaseolus vulgaris*) 和长萼鸡眼草 (*Kummerowia stipulacea*) 等的新鲜根瘤, 用无菌水洗涤后放入 95% 酒精浸泡 5 min, 再用 0.1% 升汞消毒 5 min, 最后用无菌水冲洗 6 次。采用平板划线法分离纯化菌株, 挑取单菌落, 选取 60 株革兰氏染色阴性的杆菌和 10 株根瘤菌参比菌进行研究。参比菌分属 *Agrobacterium*、*Bradyrhizobium*、*Mesorhizobium*、*Rhizobium* 和 *Sinorhizobium* 5 个属。菌株及其宿主和来源见表 1。所有菌株都用 YMA^[1] 培养基培养, 培养温度为 28℃。

1.2 表型测定与数值分类

测试了 60 个菌株 80 个表型特征, 包括碳源和氮源的利用、对抗生素和染料的抗性、pH 范围和 NaCl 耐受浓度以及一些酶活性^[1]。将测定结果转换为二进制数据, 根据单匹配系数法 (Ssm) 考察它们的相似性, 采用无加权平均连锁法 (UPGMA) 进行聚类, 聚类的结果用树状图表示^[2]。

1.3 16S rDNA PCR-RFLP

按文献^[3]提取所有菌株总 DNA 作模板, 选用位于 *E.coli* 16S rRNA 基因序列保守区域 8~27 和 1524~1540 的两段序列为引物 (P1 和 P6)^[4], 进行 16S rDNA 扩增^[5]。10~15 μL 扩增产物用限制性内切酶 *Msp* I、*Hinf* I、*Rsa* I 和 *Hae* III 消化^[6], 酶切片段用 3% (w/v) 琼脂糖凝胶电泳检测^[7]。对应每一个酶切电泳图谱照片, 凡是电泳图谱上不同菌株间迁移速率相同的带被认为是同个性状; 相应的, 对应于每一个菌株, 在此位置上有带的编码为“1”, 无带的编码为“0”, 这样使所有酶切图谱带的数字转换为计算机能接受的数值, 输入 MINTS 分析软件进行分析, 得树状图。

2 结果与分析

2.1 表型测定与数值分类

根据生长速度, 可将供试菌分为快生型 (培养 3 d 菌落直径大于 3 mm 以上) 和慢生型 (培养 7 d 菌落直径小于 1 mm) 2 种类型。60 株未知供试菌中, 有 43 株是快生型, 17 株是慢生型。所有菌株均能在 pH11.0 的 YMA 培养基上生长, 有 6 株菌 (3 株快生和 1 株慢生菌, 分离自野大豆; 2 株慢生菌, 分离自鸡眼草) 能在 pH12.0 的 YMA 培养基上生长。38 株菌能在 40℃ 生长, 其中快生菌 30 株, 慢生菌 8 株。快生菌中有 20 株能耐 5% 的 NaCl, 慢生菌中只有 5 株能耐 5% NaCl。在 24 种测试碳源中, 快生菌和慢生菌均能利用其中的蔗糖、L-精氨酸、D-山梨酸、肌醇、半乳糖、D-果糖、乳糖和 DL-脯氨酸

等 8 种。33 株快生菌对红霉素的抗性达 300 μg·mL⁻¹, 其中有 18 株对青霉素的抗性达 300 μg·mL⁻¹; 14 株慢生菌对红霉素的抗性达 300 μg·mL⁻¹, 11 株对氯霉素的抗性达 300 μg·mL⁻¹。

对 60 株分离自野大豆、大豆、菜豆和鸡眼草的供试菌和 10 株参比菌株进行的 80 项表型性状数据, 采用无加权平均连锁法进行聚类分析, 获得了供试菌的树状图 (图 1)。

从图 1 可以看出, 在 70.5% 相似水平上, 所有的供试菌分为 3 个群, 群 I 为未知群, 群 II 由 *Agrobacterium*、*Mesorhizobium*、*Sinorhizobium* 和 *Rhizobium* 组成, 群 III 由慢生根瘤菌属 *Bradyrhizobium* 组成。在 80.5% 的相似水平上, 除了 *Bradyrhizobium* 的种, 参比菌株基本能够按不同的种彼此分开。

群 I 分为 4 个亚群 (亚群 1-4)。亚群 1 包括 8 个菌株, 3 株分离自大豆, 5 株分离自野大豆。亚群 2 包括 3 株菌, 2 株分离自鸡眼草, 1 株分离自野大豆。亚群 3 共 13 株菌, 1 株分离自大豆, 其余 12 株均分离自野大豆。亚群 4 包括 2 株菌, 分离自野大豆。群 I 各亚群均没有与参比的已知菌聚在一起, 其分类地位需要用其它分类学方法进一步确认。

群 II 分为 7 个亚群 (亚群 5-11)。亚群 5 包括 5 株菌, 4 株分离自大豆, 1 株为参比菌 *M. loti* NZP2213。亚群 6 包括 2 个分离自野大豆的 2 个菌株。亚群 7 有 4 株菌, 3 株菌分离自野大豆, 1 株为参比菌 *M. huakuiense* CCBAU 2609^T。亚群 8 包括 2 株菌, 1 株分离自野大豆, 1 株为参比菌 *A. tumefaciens* IAM 13129^T。亚群 9 包括 4 株菌, 1 株菌分离自野大豆, 1 株菌分离自鸡眼草, 2 株为参比菌 *S. meliloti* USDA 1002^T 和 102F28。亚群 10 中, *R. leguminosarum* USDA 2370 与 1 株分离自鸡眼草和 1 株分离自野大豆的供试菌聚在一起。亚群 11 包括 2 株菌, 1 株分离自鸡眼草, 1 株分离自野大豆。群 II 的 3 个亚群 5、6 及 11 没有与参比菌聚在一起, 它们有可能是根瘤菌新的分类单元, 可以通过看家基因序列分析、DNA-DNA 杂交等分子生物学方法进一步确定。

群 III 分为 3 个亚群 (亚群 12-14)。亚群 12 包括 3 株菌, 2 株分离自野大豆, 1 株分离自鸡眼草。亚群 13 有 8 株菌, 4 株分离自鸡眼草, 1 株分离自野大豆, 3 株为参比菌 *B. japonicum* USDA 6^T 和 B15 及 *B. yuanmingyuanense* 10073。亚群 14 包括 2 株菌, 1 株分离自野大豆, 1 株分离自鸡眼草。群 III 的 2 个亚群 12 和 14 没有与参比菌聚在一起, 它们是否

是慢生根瘤菌属 *Bradyrhizobium* 的新种, 有待其他 分类方法来确定。

表 1 供试菌株一览表
Table 1 List of strains studied

菌株 Strain	宿主 Host	来源 Origin	菌株 Strain	宿主 Host	来源 Origin
bhs01003	<i>Glycine max</i>	北京市门头沟区	sd01051	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县
bhs01010	<i>Glycine max</i>	北京市门头沟区	sd01052	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县
Bhs01012	<i>Glycine max</i>	北京市门头沟区	sd01060	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县
bhs01014	<i>Glycine max</i>	北京市门头沟区	sd01067	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县
bhs01015	<i>Glycine max</i>	北京市门头沟区	sd01071	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县
bhs01020	<i>Glycine max</i>	北京市门头沟区	sd01107	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县
bhs01031	<i>Glycine max</i>	北京市门头沟区	sd01108	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县
bhs01040	<i>Glycine max</i>	北京市门头沟区	sd01109	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县
bhs01062	<i>Glycine max</i>	北京市门头沟区	sd01120	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县
bws0101	<i>Kummerowia striata</i>	北京市门头沟区	sd01152	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县
bws0104	<i>Kummerowia striata</i>	北京市门头沟区	sd01155	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县
bws0112	<i>Kummerowia striata</i>	北京市门头沟区	sd01160	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县
bws0114	<i>Kummerowia striata</i>	北京市门头沟区	sd01185	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县
bws0115	<i>Kummerowia striata</i>	北京市门头沟区	sd01188	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县
bws0117	<i>Kummerowia striata</i>	北京市门头沟区	sd01241	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县
bws0126	<i>Kummerowia striata</i>	北京市门头沟区	sd010721	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县
bws0129	<i>Kummerowia striata</i>	北京市门头沟区	sd010722	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县
bws0130	<i>Kummerowia striata</i>	北京市门头沟区	sd010723	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县
bws0132	<i>Kummerowia striata</i>	北京市门头沟区	sd011111	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县
bws0134	<i>Kummerowia striata</i>	北京市门头沟区	sd011352	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县
bws0141	<i>Kummerowia striata</i>	北京市海淀区	sd011482	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县
bws0146	<i>Kummerowia striata</i>	北京市海淀区	sd011541	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县
bws0148	<i>Kummerowia striata</i>	北京市海淀区	sd011781	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县
sd01003	<i>Glycine sojasieb</i>	北京市顺义县	sd011782	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县
sd01013	<i>Glycine sojasieb</i>	北京市顺义县	sd011783	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县
sd01017	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县	sd01193	<i>Phaselous vulgaris</i>	北京市顺义县
sd01020	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县	<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA2370	<i>Pisum satium</i>	美国
Sdo1021	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 102F28 USDA 1002 ^T	<i>Medicago sativa</i>	美国
sd01025	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> IAM 13129 ^T	<i>Neptunia natans</i>	日本
sd01036	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县	<i>Mesorhizobium ciceri</i> USDA 3378 ^T	<i>Cicer arietinum</i>	美国
sd01046	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6 ^T B15	<i>Glycine max</i>	美国
sd01047	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县	<i>B. yuanmingyuanense</i> USDA 10073	<i>Glycine max</i>	美国
sd01048	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县	<i>Mesorhizobium huakuii</i> CCBAU2609	<i>Astragalus sinicus</i>	中国
sd01049	<i>Glycine soja sieb</i>	北京市顺义县	<i>Mesorhizobium loti</i> NZP2213	<i>Lotus corniculatus</i>	新西兰

T: Type strain; CCBAU: Culture Collection of Beijing Agricultural University, China; NZP: Division of Scientific and Industrial Research, Palmerston, New Zealand; USDA: The United States Department of Agriculture, USA; IAM: Institution of Applied Microbiology, the University of Tokyo, Japan.

2.2 16S rDNA PCR-RFLP

对 60 株待测菌进行了 16S rDNA 的扩增, 扩

产物分别用 4 种限制性内切酶 *Alu* I、*Hae* III、*Hinf*

I 和 *Msp* I 酶切, 酶切产物用 3% 琼脂糖凝胶电泳

分离，得到的不同大小分子量的限制性内切酶片段总和接近于未消化 PCR 产物的全长(1.5 kb)。电泳图谱经 MINTS 软件分析、聚类，得到树状图(图 2)。从图 2 可以看出，在 69%的相似性水平上所有的供试菌可以分为 9 个系统发育分支。分支 I、V、VI、

VII、VIII 和 IX 没有参比菌，数值分类中的群 I 的供试菌基本上都处于这些分支。分支 II 为 *Sinorhizobium-Mesorhizobium-Rhizobium*，分支 III 为 *Agrobacterium* 分支，分支 IV 为 *Bradyrhizobium* 分支。

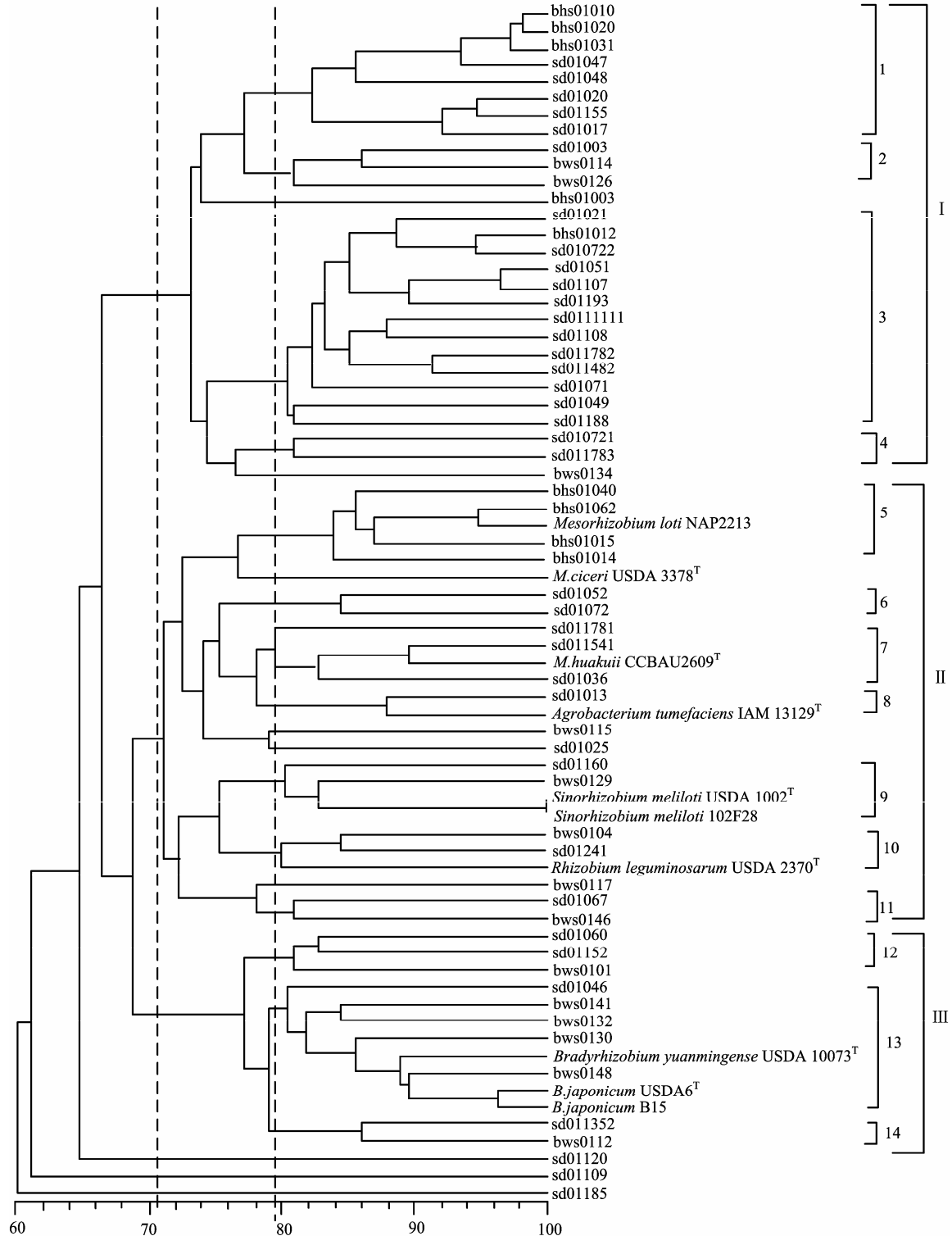


图 1 供试菌的数值分类树状图

Figure 1 Dendrogram showing the phenotypic similarities among the isolates and strains

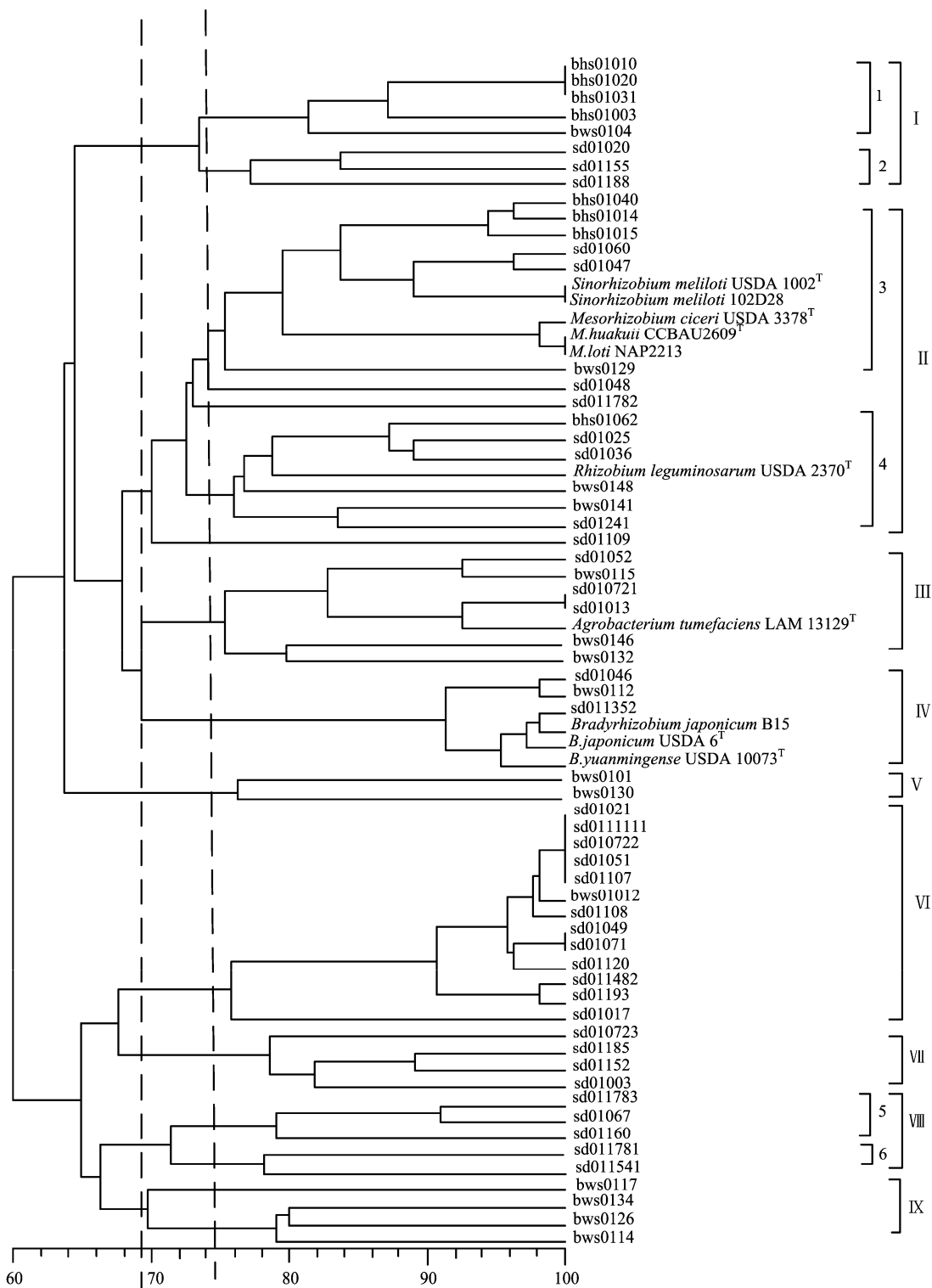


图 2 供试菌的 16S rDNA PCR-RFLP 树状图

Figure 2 Dendrogram showing the preliminary phylogenies of four groups from PCR-RFLP data of 16S rRNA gene

在 74% 的相似性水平上, 分支 I 可以分为 2 个亚分支 (亚分支 1-2), 这 2 个分支的菌株包括了数值分类中群 1 和群 2 的所有菌株; 分支 II 可以分为 2 个亚分支 (亚分支 3-4), 亚分支 3 为 *Sinorhizobium-Mesorhizobium* 分支, 该分支的菌株

包括数值分类群 5 和群 9 的菌株以及 *Sinorhizobium* 和 *Mesorhizobium* 属的参比菌株; 分支 VIII 包括 2 个亚分支 (亚分支 5-6), 这 2 个分支包括数值分类群 4 (1 株)、群 7 (2 株) 和群 9 (1 株) 的菌株。分支 III 相当于数值分类的群 8, 但增加了群 6 和群

13的4个菌株,与参比菌 *A. tumefaciens* IAM 13129^T 聚在一起。分支 IV 包括数值分类群 13 和群 14 的菌株,与数值分类的结果部分一致。分支 V 包括数值分类群 12 和群 13 各 1 个菌株,这 2 株菌在数值分类中属于慢生菌群。分支 VI 包括的菌株与数值分类中群 3 基本一致。分支 VII 包括的菌株分散在数值分类的群 1、群 2 群 3 和群 4。分支 IX 包括的菌株与数值分类中的群 2 基本一致。

3 讨论

从数值分类和 16S rRNA PCR-RFLP 的结果来看,分离自大豆和野大豆等宿主根瘤的菌株有很多是根瘤菌,但这些根瘤菌的分类地位如何,还需要更多的试验来证实;也有的菌株没有与根瘤菌的参比菌聚在一起,如数值分类中的群 1 所包括的菌株,它们的分类地位有待其他实验进一步验证。

3.1 分离自大豆等宿主的根瘤菌具有复杂的共生特性

长期以来一直认为根瘤菌分类与宿主密切相关,从某一或某些宿主分离的根瘤菌应属同一个种,该类宿主也只与该种根瘤菌结瘤固氮,即“宿主专一性”。但这种传统分类依据的“互接种族”(即一种根瘤菌只与一种或数种植物共生)关系逐渐被遗传物质的交换重组、基因横向转移等现象的发现而否定。根瘤菌与豆科植物共生关系的建立是细菌、植物及环境三方相互作用的结果^[8]。根瘤菌分布的多样性不只是细菌与植物间的简单交流,更是环境因素与自身遗传特性相互作用共进化的结果^[9]。

本研究中再一次表明了根瘤菌复杂的共生特性。从数值分类的结果看,从同一宿主分离到的根瘤菌可以聚到不同的群里,如分离自大豆的根瘤菌,有 4 株菌聚在慢生菌群,有 1 株与 *R. leguminosarum* 聚在一起(相似性达到 79%),有 1 株菌与 *S. meliloti* 的相似性达到 80%,有 3 株菌与 *M. loti* 聚在同一个群,相似性达 84%,这个结果与以往报道是一致的^[10]。从不同宿主分离的根瘤菌也可聚在同一群里,如群 II 的亚群 9 是由分离自野大豆、长萼鸡眼草鸡眼根瘤菌和参比菌 *S. meliloti* 组成的。

3.2 数值分类的结果与 16S rDNA-RFLP 结果部分相似

分支 I、V、VI、VII、VIII 和 XI 中没有参比菌,它们所包括的菌株与数值分类中的群 1 的菌株一致。分支 III 中,菌株 sd01013 以 92% 的相似性与 *A. tumefaciens* IAM13129^T 聚在一起,与数值分类结果一致,因此可以初步确认它是土壤杆菌属的菌种。

分支 VI 和分支 IX 包括的菌株分别与数值分类中的群 3 和群 2 基本一致。但是,2 种分析方法也有不一致的地方,如分支 V 包括数值分类群 12 和群 13 各 1 个菌株,这 2 株菌在数值分类中属于慢生菌群。

两种方法结果差异主要有以下原因:首先,每种分析方法都有其适用范围,各有优点和局限性:数值分类对众多的表型性状进行统计学分析有优势,16S rDNA-RFLP 则是直接依据核酸分子携带的遗传水平信息进行分析;表型数值分类与 16S rDNA-RFLP 遗传分析的结果若互相验证,则结论的可靠性增强,可进一步进行 16S rDNA 序列测定分析系统发育关系或通过 DNA-DNA 杂交定种等。其次,由于每种分析都含有人为操作的外在因素,如数值分类,许多性状差异都是人为判定,而某些表型性状的出现呈过渡状态,时机掌控不好会增加结果分析时的统计学差异;相比之下,依据基因的遗传分析相对客观,因此近年来较为流行。但是,目前发现并确认了遗传基因交换重组和基因横向转移等现象,如侯卫国等人^[11]通过研究结瘤基因的进化分析,证明慢生根瘤菌的结瘤基因主要是通过直系遗传的,同时可能因适应宿主及环境需要进行一定程度的平行转移。基因横向转移使研究者对遗传基因分子标记的选择、数量以及结果的评判标准逐渐出现分歧,又降低了遗传分析的可靠性。

3.3 分离自野大豆的根瘤菌与土壤杆菌同种

近年来,从豆科植物根瘤中分离出一批“根瘤菌”,分类的结果是“土壤杆菌”的现象时有发生。韩素贞^[12-13]发现从菜豆、杭子梢和决明根瘤中分离出的 88 株根瘤菌中有 33 株与悬钩子土壤杆菌 (*A. rubi*) 同种。在本研究中,从大豆根瘤中分离的 1 株菌与根瘤土壤杆菌 (*A. tumefaciens* IAM13129^T) 聚在一起。Mhamdi 等^[14]研究了从突尼斯菜豆 (*Phaseolus vulgaris*) 中分离到的 160 株根瘤菌,其中有 16% 属于 *Agrobacterium*, 从它们的 DNA 中扩增不出 *nifH* 和 *nodC* 基因片段,共生基因探针实验得不到杂交信号,结瘤试验表明它们不能和菜豆结瘤固氮。对于这些现象,有观点认为 *Agrobacterium* 是作为伴生菌进入根瘤^[15],也有研究报道具有 Sym 质粒的 *A. rhizogenes* 菌株可与 *Phaseolus vulgaris* 形成根瘤和瘤组织^[16]。

参考文献:

- [1] Gao J L, Sun J G, Li Y, et al. Numerical taxonomy and DNA relatedness of tropical rhizobia isolated from Hainan province, China [J]. Int J of Syst Bacteriology, 1994, 44(1): 151-158.

- [2] Sy A, Giraud E, Jourand P, et al. Methylobacterium bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes[J]. J Bacteriol, 2001, 183(1): 214-220.
- [3] Marmur, J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganism [J]. J Mol Biol, 1961, 3: 208-218.
- [4] Weisburg, W G, Barns S M, Pelletier D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. 1991, J Bacteriol, 173(2): 697-703.
- [5] van Berkum P, Beyene B, Eardly B D. Phylogenetic relationships among Rhizobium species nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)[J]. Int J Syst Bacteriol, 1996, 46(1): 240-244.
- [6] Laguerre G, Allard M, Revory F, et al. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes[J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60(1): 56-63.
- [7] Wang E T, van Berkum P, Beyene D, et al. *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*[J]. Int J Syst Bacteriol, 48(3): 687-699.
- [8] 陈文新. 根瘤菌资源多样性与系统发育[J]. 中国农业大学学报, 2004, 9(2): 6-7.
- [9] 杨江科, 谢福莉, 周俊初. 江汉平原及其周边地区花生根瘤菌遗传的遗传多样性[J]. 生态学报, 2003, 23 (3): 504-511.
- [10] 何庆元, 王永雄, 吴萍, 等. 安徽大豆根瘤菌遗传多样性研究[J]. 激光生物学报, 2008, 17(4): 514-519.
- [11] 侯卫国, 连宾. 慢生根瘤菌属结瘤基因的进化及遗传分析[J]. 遗传, 2007, 29(1): 118-126.
- [12] 韩素贞, 陈文新. 分离自杭子梢等 3 个宿主的根瘤菌的表型分析[J]. 微生物学通报, 2003, 30(2): 4-11.
- [13] Han S Z, Wang E T, Chen W C. Diverse bacteria isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* and species within the genera *Campylotropis* and *Cassia* grown in China [J]. System Appl Microbiol, 2005, 28(3): 265-276.
- [14] Mhamdi R, Lafuerre G, Aouani M E, et al. Different species and symbiotic genotypes of field rhizobia can nodulate *Phaseolus vulgaris* in Tunisian soils [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2002, 41(1): 77-84.
- [15] 吕飞, 蒋欣, 徐佳洁, 等. 新疆和陕西三叶草属根瘤菌 16S rDNA 多态性及系统发育研究[J]. 草业学报, 2009, 17(3): 304-309.
- [16] Velázquez E, Peix A, Zurdo-Piñero J L, et al. The coexistence of symbiosis and pathogenicity-determining genes in *Rhizobium rhizogenes* strains enables them to induce nodules and tumors or hairy roots in plants [J]. Mol Plant-Microbe Interac, 2005, 18(12): 1325-1332.