DOI:10.13332/j.1000-1522.2010.03.007

一株分离自含羞草的β-根瘤菌的生物学特性研究

彭玉红[1] 焦如珍[1] 牟新涛[2]
(1 中国林业科学研究院林业研究所 2 南非比勒陀利亚大学林业与农业生物技术研究所)

摘要:从海南尖峰岭自然保护区巴西含羞草的根瘤中分离到一株根瘤菌,编号为caf324,经过16S rDNA全序列测定和系统发育分析,发现caf324与β-根瘤菌含羞草伯克霍尔德菌PAS44(AY752958)的亲缘关系很近,相似度达到99.7%。通过部分生理生化测定发现,caf324接触酶、氧化酶和硝酸盐还原试验均为阳性,不能利用明胶和淀粉,不能利用葡萄糖发酵产酸,不能水解酪素,不能产生吲哚和3-酮基乳糖;抗逆性研究表明,caf324的生长范围广,可耐2%的NaCl,耐酸碱(pH4~11),最高生长温度45℃。

关键词:β-根瘤菌;含羞草伯克霍尔德菌;16S rDNA全序列;抗逆性;生物学特性
中图分类号:S154.3 **文献标志码**:A **文章编号**:1000-1522(2010)03-0117-05

PENG Yu-hong[1]; JIAO Ru-zhen[1]; MOU Xin-tao[2]. **Biological characteristics of *Burkholderia* sp. caf324 isolated from *Mimosa invisa*.** *Journal of Beijing Forestry University* (2010) **32**(3) 117-121 [Ch, 26 ref.]

1 Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing, 100091, P. R. China;
2 Forestry and Agricultural Biotechnology Institute, University of Pretoria, 0002, South Africa.

Isolated from root nodules of *Mimosa invisa* Mart. ex Colla in the Jianfengling National Nature Reserve, Hainan Province, a representative strain, caf324, was analyzed by 16S rDNA sequencing, physical and chemical properties test. The 16S rDNA sequence was compared with related rhizobia and an unrooted phylogenetic tree was produced. The results show that caf324 is clustered together with β-rhizobia of *Burkholderia mimosarum* PAS44 (AY752958), with a similarity of 99.7%. Biological characteristics of this caf324 strain were tested, showing the following results: catalase and oxidase were positive, indole was not found, gelatin was not hydrolysed and glucose was unable to generate acid through fermentation. It can endure 2% NaCl and grow in media with pH of 4-11, under the temperatures up to 45℃.

Key words β-rhizobia; *Burkholderia mimosarum*; 16S rDNA sequence; adversity tolerance; biological characteristics

根瘤菌与豆科植物的共生是生物固氮中作用最强的体系,所固定的氮约占生物固氮总量的65%[1-3]。豆科植物在世界范围内广泛分布,按照Aliens分类系统,豆科植物可以分为3个亚科、748属、约2万种[4],其中90%具有形成根瘤的能力[5]。不同豆科植物由于其生物学特性和环境适应性的需求,与之共生的根瘤菌也具有多种性状的差异。

早期的根瘤菌分类系统是以互接种族和寄主范围以及一些简单的形态和生理性状为依据的[6]。自从异根瘤菌属(*Allorhizobium*)的建立,根瘤菌被划

收稿日期:2009-04-02
基金项目:国家科技基础条件平台项目(2005DKA21207)、"十一五"国家科技支撑计划项目(2006BAD07A13-3)。
第一作者:彭玉红。主要研究方向:土壤微生物多样性。电话:010-62889682 Email:yhpeng81@hotmail.com 地址:100091 北京市颐和园后中国林业科学研究院林业研究所。
责任作者:焦如珍,副研究员。主要研究方向:森林土壤微生物、微生物肥料研制及应用技术。电话:010-62889663 Email:jiaorzh65@sina.com.cn 地址:同上。
本刊网址:http://www.bjfujournal.cn; http://journal.bjfu.edu.cn

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

分在细菌门 α-变形杆菌纲的根瘤菌属(*Rhizobium*)、中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)、中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)、异根瘤菌属、慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)和固氮根瘤菌属(*Azorhizobium*)等属中[7],此后研究者们普遍认为根瘤菌只属于 α-变形杆菌纲。然而 Moulin 等[8]发表了 β-变形杆菌纲伯克霍尔德菌属(*Burkholderia*)的 *Burkholderia* sp. STM678 和 STM815 也属于根瘤菌的报道,此两菌株经回接试验及结瘤基因 *nodA* 突变检测证实为根瘤菌,具有固氮活性,揭示了根瘤菌不仅存在于 α-变形杆菌纲,还存在于 β-变形杆菌纲中。

海南尖峰岭自然保护区位于 18°42′N、108°52′E,保存有较完整的热带天然林和次生林,物种资源十分丰富。巴西含羞草(*Mimosa invisa*)又名美洲含羞草,原产于巴西,其生命力顽强,与之共生的根瘤菌也具有对抗不良环境的能力,通过对其进行分类、生物学特性、抗逆性研究,为优良根瘤菌菌株的筛选、研究和应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 主要仪器与试剂

主要仪器有:生化培养箱、恒温摇床、高速冷冻离心机、PCR 仪、凝胶成像系统等。DNA Marker 和 PCR 扩增试剂盒购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 供试菌株

采样时间为 2006 年 4 月。从海南尖峰岭国家自然保护区海拔 800 m 处采集到巴西含羞草植株的根瘤,选择肉红色活性高的根瘤,分离纯化后得到一批菌株,caf324 是从固氮酶活性高的根瘤中分离得到。

1.2 16S rDNA 的克隆与序列测定

以 caf324 作为供试菌株。基因克隆中的大肠杆菌菌株为 DH5α(博大泰恒),质粒载体为 pMD18-T(Trans 公司)。

1.2.1 供试菌株总 DNA 的提取

菌株用 LB 培养基 28℃ 振荡培养至对数生长期,12 000 r/min 离心收集菌体,用 TE(pH8.0)悬浮细胞,溶菌酶破壁,蛋白酶 K 去除蛋白质,轻轻混匀,37℃ 水浴 1 h。CTAB/NaCl 65℃ 盐析 20 min,800 μL 氯仿/异戊醇(体积比为 24∶1)抽提,取上清液转移至新的离心管,加入异丙醇沉淀 DNA。离心后乙醇洗脱,去上清液,无菌风干,最后溶于 TE(pH8.0)中备用[9-11]。

1.2.2 16S rDNA 的 PCR 扩增、克隆及测序

以总 DNA 为模板,正向引物 27f: 5′-gagatttgatcctggctcag-3′,反向引物 1 495r: 5′-ctacggctaccttgttacga-3′(上海生工合成)[12-13],经 PCR 扩增出 16S rDNA。扩增体系为: ddH_2O 15.0 μL,10×Buffer 2.0 μL,dNTPs(10 mmol/L)0.5 μL,引物 1(10 μmol/mL) 0.5 μL,引物 2(10 μmol/mL) 0.5 μL,模板 DNA (100 μg/mL) 1.0 μL,*Taq* DNA 聚合酶 (2.5 U/μL) 0.5 μL。扩增条件为:94℃ 预变性 5 min,35 个循环的扩增(94℃、45 s,52℃、45 s,72℃、1 min),最后 72℃ 延伸 10 min。对 PCR 产物纯化回收后与质粒 PMD18-T 载体进行连接,转化大肠杆菌 DH5α,筛选阳性转化子。提取质粒 DNA 验证后,送上海生工测序。

1.3 生理生化试验

柠檬酸盐生长试验、产氨试验、葡萄糖氧化产酸、葡萄糖发酵产酸、水解酪素、吲哚试验、硝酸盐还原、苯丙氨酸脱氢酶、乙酰甲基甲醇试验、甲基红试验、接触酶、氧化酶、3-酮基乳糖、明胶液化、淀粉水解、石蕊牛奶试验。试验方法均参考文献[14-15]。

1.4 抗逆性试验

1.4.1 菌株活化及接种母液的配制

将待测菌株活化 3 次后接入灭菌的 YMA 培养液中,置于 28℃ 摇床培养(48±6)h,根瘤菌在培养液中的繁殖数量采用分光光度计比色法测定,测定指标用 600 nm 波长的光密度值($OD_{600\ nm}$),将菌株培养液均加无菌水调释至 $OD_{600\ nm}$ 为 0.5 的菌液浓度,作为其他处理培养的接种母液[16]。

1.4.2 耐酸碱试验

用 HCl 和 NaOH 调释 YMA 培养液,分装试管,每管 4 mL,灭菌后制成 pH 分别为 3、4、5、7、9、10、11 和 12 的 YMA 培养液。取接种母液分别接至不同 pH 梯度处理的 YMA 培养液中,将初始浓度调整到 $OD_{600\ nm}$ 为 0.1,3 次重复。置于 28℃ 摇床,培养 72 h (160 r/min),用分光光度计测其 $OD_{600\ nm}$ 值。以培养基中菌体生长的光密度 $OD_{600\ nm} \geqslant 0.1$ 所对应的 pH 值为该菌株所能耐受的酸碱度。

1.4.3 耐盐试验

配制 7 个不同 NaCl 浓度的 YMA 培养液:0.01%、0.4%、1%、2%、3%、4%、5%,分装试管,灭菌。将菌株接种母液分别接至不同 NaCl 浓度的 YMA 培养液中,接种及培养方法同 1.4.2 节。以培养基中菌体生长的光密度 $OD_{600\ nm} \geqslant 0.1$ 所对应的 NaCl 浓度作为该菌株所能耐受 NaCl 浓度。以不接种根瘤菌为对照,测其 $OD_{600\ nm}$ 值,3 次重复。

1.4.4 温度试验

选用 NaCl 浓度 0.01%、pH7 的 YMA 培养液作为基础培养基,分装试管,灭菌。调整温度分别为 10、20、28、37、45、50 和 60℃。接种方法同 1.4.2

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

节，置于不同温度的水浴锅中培养 7 d，其中 50℃ 高温处理 20 min、60℃ 高温处理 10 min 之后，放置于 28℃ 水浴培养以测其对短时高温的耐受性。测其 $OD_{600\ nm}$ 值，记录。

1.5　数据处理

数据处理采用 Excel 和 Mega4.0 软件进行分析。系统发育分析采用 MEGA version 4.0 UPGMA 法。

2　结果与分析

2.1　16S rDNA 序列

图 1 为菌株 caf324 的 16S rDNA 全序列（1 496 bp）。

将所测序列与根瘤菌已知种及相关种进行比较，得出 16S rDNA 相似性矩阵（表 1）。

```
1      GAGATTTGAT CCTGGCTCAG ATTGAACGCT GGCGGCATGC CTTACACATG CAAGTCGGAC
61     GGCAGCGCGG GCTTCGGCCT GGCGGCGAGT GGCGAACGGG TGAGTAATAC ATCGGAACAT
121    GTCCAGTAGT GGGGGATAGC CCGGCGAAAA CCGGATTAAT ACCGCATACG ATCTTTGGAT
181    GAAAGCGGGG GACCGAAAGG CCTCGCGCTA TTGGGGTGGC CGATGGCGGA TTAGCTAGTT
241    GGTGGGGTAA AGGCCTACCA AGGCGACGAT CCGTAGCTGG TCTGAGAGGA CGACCAGCCA
301    CACTGGGACT GAGACACGGC CCAGACTCCT ACGGGAGGCA GCAGTGGGGA ATTTTGGACA
361    ATGGGCGCAA GCCTGATCCA GCAATGCCGC GTGTGTGAAG AAGGCCTTCG GGTTGTAAAG
421    CACTTTTGTC CGGAAAGAAA TCCTCTGGGT TAATACCCCG GGGGGACGAC GGTACCGGAA
481    GAATAAGCAC CGGCTAACTA CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGTAGGGT GCGAGCGTTA
541    ATCGGAATTA CTGGGCGTAA AGCGTGCGCA GGCGGTGATG TAAGACCGAT GTGAAATCCC
601    CGGGCTTAAC CTGGGAACTG CATTGGTGAC TGCATCGCTG GAGTATGGCA GAGGGGGGTA
661    GAATTCCACG TGTAGCAGTG AAATGCGTAG AGATGTGGAG GAATACCGAT GGCGAAGGCA
721    GCCCCCTGGG CCAATACTGA CGCTCATGCA CGAAAGCGTG GGGAGCAAAC AGGATTAGAT
781    ACCCTGGTAG TCCACGCCCT AAACGATGTC AACTGGTTGT CGGGCCTTCA TTGGCTTGGT
841    AACGTAGCTA ACGCGTGAAG TTGACCGCCT GGGGAGTACG GTCGCAAGAT TAGAACTCAA
901    AGGAATTGAC GGGGACCCGC ACAAGCGGTG GATGATGTGG ATTAATTCGA TGCAACGCGA
961    AAAACCTTAC CTACCCTTGA CATGGACGGA ATCCTGGTGA GAGCCGGGAG TGCCCGAAAG
1 021  GGAGCCGTCA CACAGGTGCT GCATGGCTGT CGTCAGCTCG TGTCGTGAGA TGTTGGGTTA
1 081  AGTCCCGCAA CGAGCGCAAC CCTTGTCCCT AGTTGCTACG CAAGAGCACT CCAGGGAGAC
1 141  TGCCGGTGAC AAACCGGAGG AAGGTGGGGA TGACGTCAAG TCCTCATGGC CCTTATGGGT
1 201  AGGGCTTCAC ACGTCATACA ATGGTCGGAA CAGAGGGTTG CCAAGCCGCG AGGTGGAGCC
1 261  AATCCCAGAA AACCGATCGT AGTCCGGATC GCAGTCTGCA ACTCGACTGC GTGAAGCTGG
1 321  AATCGCTAGT AATCGCGGAT CAGCATGCCG CGGTGAATAC GTTCCCGGGT CTTGTACACA
1 381  CCGCCCGTCA CACCATGGGA GTGGGTTTTG CCAGAAGTGG CTAGTCTAAC CGCAAGGAGG
```

图 1　菌株 caf324 的 16S rDNA 全序列

Fig. 1　Full-length 16S rDNA sequence of strain caf324

表 1　菌株 caf324 与高同源性已知菌株的 16S rDNA 相似性矩阵表

Tab. 1　Similarity of caf324 and *Burkholderia* spp. based on 16S rDNA sequences　　%

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 caf324	100.0								
2 *B. mimosarum* PAS44（AY752958）	99.7	100.0							
3 *B. cepacia* LMG1222（M22518）	95.0	95.4	100.0						
4 *B. kururiensis*（AB024310）	96.7	96.8	94.9	100.0					
5 *B. phenazinium*（U96936）	95.3	95.6	96.0	94.8	100.0				
6 *B. phymatum* STM815（AJ302312）	95.7	96.0	95.2	96.8	96.7	100.0			
7 *B. sacchari*（AF263278）	97.9	98.3	95.8	97.1	95.0	95.7	100.0		
8 *B.* sp. Br3470 STM678（AY773198）	96.9	98.0	94.6	95.5	94.6	95.8	97.0	100.0	
9 *B. tuberum* STM678（AJ302311）	96.3	96.5	94.6	96.8	95.7	96.9	96.6	96.3	100.0

通过系统发育学分析得出各菌株间相似性及系统发育树状图（图 2），caf324 与 β-变形杆菌纲伯克霍尔德属的含羞草伯克霍尔德菌（*B. mimosarum*）、洋葱伯克霍尔德菌（*B. cepacia*）、鼻疽伯克霍尔德菌（*B. kururiensis*）、*B. phenazinium*、*B. phymatum*、*B. sacchari*、*B.* sp. 和瘤状伯克霍尔德菌（*B. tuberum*）聚为一群，与该分支内其他已知种模式菌株的 16S rDNA 相似性均在 95% 以上。根据 Martinez-Romero 等[17]建议的分类标准，caf324 所在的这个分支应属于伯克霍尔德菌属。学者们通过对含羞草类植物（*M. pudica*、*M. diplotricha*、*M. bimucronata*、*M. scabrella*、*M. casta* 和 *M. pigra*）根瘤菌的研究，也发现其根瘤菌大多数归属于 β-根瘤菌的伯克霍尔德菌[18-24]。caf324 与含羞草伯克霍尔德菌 PAS44 菌株的亲缘关系最近，相似度为 99.7%，可初步确定该菌株为含羞草伯克霍尔德菌[18]。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

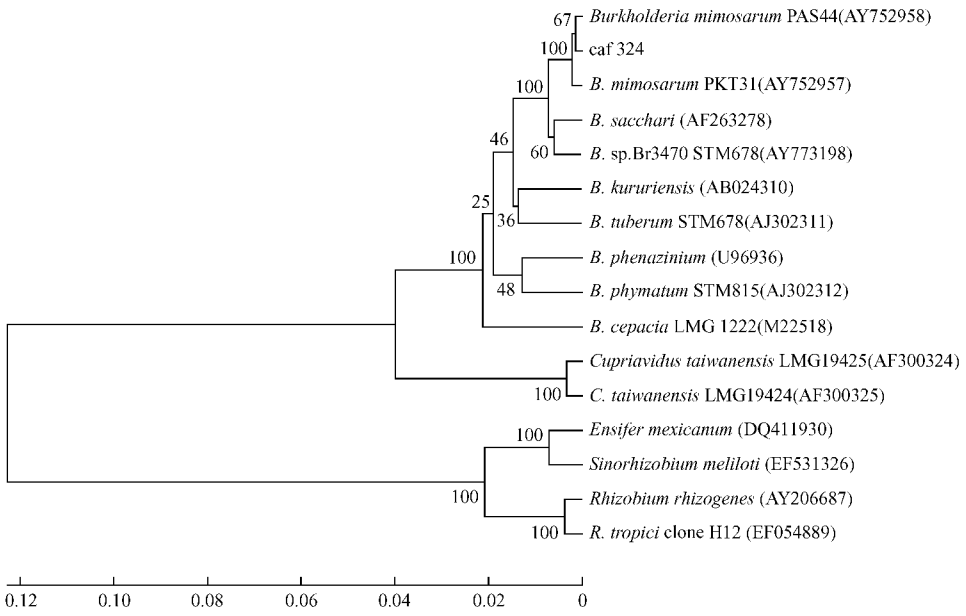

图2 菌株 caf324 16S rDNA 序列系统发育树状图

Fig. 2 Phylogenetic tree of caf324 strain derived from 16S rDNA sequences

注:分支数字代表 Bootstrap 值,即计算 100 次出现同种结果的频次;比例尺代表演化距离。

此外,由诺尔斯通根瘤菌(*Ralstonia taiwanensis*)更名后的 *Cupriavidus taiwanensis* 的 LMG19425 和 LMG19424[25] 2 株 β-变形杆菌纲根瘤菌菌株聚为一分支。α-变形菌纲的发根根瘤菌(*Rhizobium rhizogenes*)、热带根瘤菌(*R. tropici*)、墨西哥剑菌(*Ensifer mexicanum*)和苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)聚为一群(图2)。

2.2 生长特性

菌株 caf324 为革兰氏阴性菌,杆状。菌落半透明,边缘光滑,突起,黏性大,易挑起,培养 3 d 后菌落直径为 0.9 mm。

2.3 生理生化结果

由表2可以看出,菌株 caf324 接触酶和氧化酶均为阳性,不能将蛋白胨中的色氨酸分解为吲哚,不能液化明胶,不能利用葡萄糖发酵产酸,这均与含羞草伯克霍尔德菌 PAS44 (AY752958)相关报道相符[18]。进一步确定 caf324 为含羞草伯克霍尔德菌。硝酸盐还原试验中,加入 Griss A 液和 B 液后,caf324 的培养液颜色立刻由淡黄色变为粉红色,表示硝酸盐被还原为亚硝酸盐,反应为阳性。此外,caf324 不能进行 3-酮基乳糖的反应,不能利用淀粉和水解酪素,这与一般根瘤菌的特性相同。caf324 在石蕊牛奶中培养 2 d 后产碱,使培养基的颜色由紫色变为蓝色;培养 5 d 后又发生了还原反应,培养基褪色为淡蓝色。菌株 caf324 使柠檬酸钠斜面培养基由淡粉红变为玫瑰红,说明该菌株能利用柠檬酸盐。

表2 菌株 caf324 与含羞草伯克霍尔德菌 PAS44 部分生理生化特性比较

Tab. 2 Comparison of physical and chemical characteristics between caf324 and *Burkholderia mimosarum* PAS44

试验项目	caf324	含羞草伯克霍尔德菌 PAS44	试验项目	caf324	含羞草伯克霍尔德菌 PAS44
接触酶	+	+	柠檬酸盐生长试验	+	
氧化酶	+	+	产氨试验	+	
苯丙氨酸脱氢酶	-		葡萄糖发酵产酸	-	-
硝酸盐还原	+		葡萄糖氧化产酸	-	-
水解酪素	-		石蕊牛奶还原	+	
吲哚试验	-	-	石蕊牛奶胨化	-	
3-酮基乳糖	-		石蕊牛奶产酸	-	
明胶液化	-	-	石蕊牛奶产碱	+	
乙酰甲基甲醇试验	-		石蕊牛奶酸凝	-	
甲基红试验	-		石蕊牛奶酶凝	-	
淀粉水解	-				

注:"-"表示不生长,"+"表示生长。

2.4 抗逆性

由表3可以看出,根瘤菌 caf324 的最适温度为 28℃,对高温耐受性强:在 37℃ 下能正常生长,45℃ 时生长微弱。试验证明 caf324 对短时高温有一定的耐受性:在水浴 50℃、20 min 和 60℃、10 min 分别处理后均能在 28℃ 的培养条件下生长。耐盐能力强,在 2% 的 NaCl 培养基中仍能生长,最适盐浓度为 0.4% ~1%,而一般的根瘤菌培养基 NaCl 浓度为 0.01%[26]。pH 生长范围宽:pH4 ~11 的培养基条件下均能不同程度的生长,而且在 pH5 ~9 均能生长良好。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 3　菌株 caf324 抗逆性试验结果

Tab. 3　Tolerance test of strain caf324

温度/℃	结果	盐度(NaCl)/%	结果	pH	结果
10	-	0.01	+	3	-
20	+	0.4	++	4	+
28	++	1	++	5	++
37	+	2	+	7	++
45	+-	3	-	9	++
50(20 min)	+	4	-	10	+
60(10 min)	+-	5	-	11	+-

注："-"表示不生长；"+-"表示微弱生长；"+"表示生长；"++"表示生长良好。

3　结　　论

1)根瘤菌菌株 caf324 为含羞草伯克霍尔德菌，目前国内外还没有相关的报道。

2)根瘤菌菌株 caf324 最适温度为 28℃，临界温度为 45℃。

3)根瘤菌菌株 caf324 最适 NaCl 浓度为 0.4% ~1%，最高可耐 2% NaCl。

4)根瘤菌菌株 caf324 生长适应 pH 为 4 ~11，在 pH 5 ~9 范围内生长良好，生长适应 pH 范围广。

5)根瘤菌菌株 caf324 是具有耐高温(45℃)、高盐(2% NaCl)、酸(pH4)、碱(pH11)，具有多重抗性的优良根瘤菌菌株。

参　考　文　献

[1] 陈丹明，曾昭海，隋新华，等. 紫花苜蓿高效共生根瘤菌的筛选[J]. 草业科学，2002，19(6)：27-31.

[2] ZABRAN H H. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe condition and in arid climate [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1999, 63: 968-989.

[3] DENARIE J, ROCHE P. Rhizobium nodulation signals [M] // VERMA D P S. *Molecular signals in plant-microbe communications*. London: CRC Press, 1991: 296-324.

[4] DOYLE J J. Phylogeny of the legume family: An approach to understanding the origins of nodulation [J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1994, 25: 325-349.

[5] SUBBA RAO N S. *Soil microbiology (fourth edition of soil microorganisms and plant growth)* [M]. New York: Science Publishers, Inc, 1999: 167.

[6] 史晓霞，师尚礼，杨晶，等. 豆科植物根瘤菌分类研究进展[J]. 草原与草坪，2006(1)：12-17.

[7] 刘晓云，陈文新，张斌. α-根瘤菌及特殊 β-根瘤菌的研究概况[J]. 微生物学报，2008，48(10)：1408-1412.

[8] MOULIN L, MUNIVE A, DREUFUS B, *et al*. Nodulation of legumes by members of the β-subclass of Proteobacteria [J]. *Nature*, 2001, 411: 948-950.

[9] 陈文峰，陈文新. 豆科树种刺槐、黄檀、合欢根瘤菌的数值分类及 16S rDNA PCR-RFLP 研究[J]. 应用与环境生物学报，2003，9(1)：53-58.

[10] 刘杰. 我国中东部地区紫穗槐、紫荆、紫藤根瘤菌的数值分类及 16S rDNA PCR-RFLP 研究[J]. 中国农业科学，2003，36(1)：17-25.

[11] ODEE D W, SUTHERLAND J M, MAKATIANI E T, *et al*. Phenotypic characteristics and composition of *Rhizobia* associated with woody legumes growing in diverse Kenyan conditions [J]. *Plant and Soil*, 1997, 188(1): 65-75.

[12] TAYLOR M J, BILO K, CROSS H F, *et al*. 16S rDNA phylogeny and ultrastructural characterization of *Wolbachia* intracellular bacteria of the filarial nematodes *Brugia malayi*, *Brugia pahangi*, and *Wuchereria bancrofti* [J]. *Exp Parasitol*, 1999, 91: 356-361.

[13] HOTI S L, SRIDHAR A, DAS P K. Presence of *Wolbachia* endosymbionts in microfilariae of *Wuchereria bancrofti* (Spirurida: Onchocercidae) from different geographical regions in India [J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2003, 98(8): 1017-1019.

[14] 中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究法[M]. 北京：科学出版社，1985：90-152.

[15] 东秀珠，蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京：科学出版社，2001：349-417.

[16] 师尚礼，刘建荣，张勃，等. 甘肃寒旱区苜蓿根瘤菌抗逆性评价[J]. 草地学报，2007，15(1)：1-6.

[17] MAITINEZ-ROMERO E, CABALLERO-MELLADO J. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity [J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1996, 15(2): 113-140.

[18] CHEN W M, JAMES E K, COENYE T, *et al*. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56: 1847-1851.

[19] CHEN W M, FARIA S M, STRALIOTTO R, *et al*. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: A study of novel Mimosa-nodulating strains from South America [J]. *Apply Environment Microbiol*, 2005, 71(11): 7461-7471.

[20] CHEN W M, JAMES E K, CHOU J H, *et al*. β-Rhizobia from *Mimosa pigra*, a newly discovered invasive plant in Taiwan [J]. *New Phytologist*, 2005, 168(3): 661-675.

[21] CHEN W M, MOULIN L, BONTEMPS C, *et al*. Legume symbiotic nitrogen fixation by β-proteobacteria is widespread in nature [J]. *Journal of Bacteriol*, 2003, 185(24): 7266-7272.

[22] BARRETT C F, PARKER M A. Prevalence of *Burkholderia* sp. nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado Island [J]. *Panama System Apply Microbiol*, 2005, 28: 57-65.

[23] BARRETT C F, PARKER M A. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium* sp. nodule bacteria on two *Mimosa* spp. in Costa Rica [J]. *Apply Environment Microbiol*, 2006, 72(2): 1198-1206.

[24] 刘晓云，陈文新. 三叶草、猪屎豆和含羞草植物根瘤菌 16S rDNA PCR-RFLP 分析和数值分类研究[J]. 中国农业大学学报，2003，8(3)：1-6.

[25] VANDAMME P, COENYE T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: A tale of lost and found [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54: 2285-2289.

[26] 周宇光. 中国菌种目录[M]. 北京：化学工业出版社，2007.

(责任编辑　董晓燕)

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net