

华北及西北地区岩黄芪根瘤菌的表型及遗传多样性

刘 洋, 隋新华*, 陈文新

(中国农业大学生物学院, 农业部农业微生物资源及其应用重点开放实验室, 北京 100094)

摘要: 选用分离自河北、内蒙古等 5 省区的岩黄芪根瘤菌 30 株及 17 株已知参比菌株, 进行了营养利用、抗生素抗性、耐逆性及生理生化反应等 125 项表型性状研究, 所得数值分类树状图表明不同宿主及不同地域的岩黄芪根瘤菌的表型多样性。通过对其中部分菌株进行 16S rDNA PCR-RFLP 及 BOX-PCR 指纹图谱分析, 聚类结果表明供试岩黄芪根瘤菌具有遗传多样性。

关键词: 岩黄芪根瘤菌; 多样性; 数值分类; 16S rDNA PCR-RFLP; BOX-PCR 指纹图谱

文章编号: 1000-0933(2005)05-1088-07 **中图分类号:** Q938, Q939.11 **文献标识码:** A

Phenotypic and genetic diversity of rhizobia isolated from root modules of *Hedysarum* spp. grown in the northern and northwestern regions of China

LIU Yang, SUI Xin-Hua*, CHEN Wen-Xin (College of Biological Sciences, China Agriculture University, Key Laboratory of Agro-Microbial Resource and Application, Ministry of Agriculture, Beijing 100094, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(5): 1088~1094.

Abstract: The legume species within the genus *Hedysarum* are deep-rooted annual or perennial herbs, and they are well distributed in the temperate zones. About 40 species of *Hedysarum* are native to China and they are potential foliages and are used as resources of herbal medicine. These legumes are pioneers plants, but its geographic distribution may be determined by the existence of proper rhizobia. Aiming at understanding the diversity of rhizobia associated with them, we isolated thirty rhizobial strains from root nodules of *Hedysarum* spp. grown in the northern and northwestern regions of China and characterized them in this study.

The phenotypic characterization of the strains showed that most of the rhizobial strains isolated from *Hedysarum* spp. had high stress resistance. For instance, all of them grew from pH 5.0 to pH 11.0. Over 80% of these strains grew well in YMA medium at 37°C and several of them even grew at 4°C or were resistant to 60°C. Some strains have a tolerance to high concentration of erythromycin or streptomycin ($300\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) and of NaCl (3%, w/v). The resistance of these strains to the reverse conditions might be the results of their adaptation to the environments because these bacteria were obtained from hosts grown in the soils that are dry, alkaline-saline, and poor in organic materials. Based upon the numerical taxonomy using 125 phenotypic characteristics, the strains isolated from *Hedysarum* plants were clustered into three phena at the similarity level of 73%, and cluster I could be divided into *Sinorhizobium*, *Agrobacterium* and *Rhizobium* branches. These grouping results were generally confirmed by the 16S rDNA PCR-RFLP and by BOX-PCR fingerprinting. It seems clear that the *Hedysarum* species grown in the northern and northwestern regions of China nodulate with diverse rhizobia in the genera *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, and *Sinorhizobium*.

Key words: *Hedysarum* rhizobia; diversity; numerical taxonomy; 16S rDNA PCR-RFLP; BOX-PCR fingerprinting

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目 (2001CB108905); 国家高技术研究发展计划资助项目 (2003AA241150); 国家自然科学基金资助项目 (30270001)

收稿日期: 2004-05-11; **修订日期:** 2005-01-20

作者简介: 刘洋 (1981~), 女, 黑龙江密山人, 硕士生, 主要从事根瘤菌多相分类及其多样性研究。E-mail: lywq8179@126.com

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: suixh@cau.edu.cn

Foundation item: National Key Basic Research and Development Plan of China (No. 2001CB108905), National High-tech Research and Development Plan of China (No. 2003AA241150), National Natural Science Foundation of China (No. 30270001)

Received date: 2004-05-11; **Accepted date:** 2005-01-20

Biography: LIU Yang, Master candidate, mainly engaged in taxonomy and diversity of rhizobia. E-mail: lywq8179@126.com

豆科植物分布范围广泛,种类繁多,与豆科植物共生的根瘤菌表现出极大的遗传和表型多样性,根瘤菌的分布与地理区域的关系使这种多样性显得更为复杂。岩黄芪(*Hedysarum* Linn.),草本,稀为灌木或半灌木,150 余种,分布于北温带,我国已知有 41 种,主要分布于内陆干旱和高寒地区以及喜马拉雅山地。本属植物具有重要的经济价值。岩黄芪是较好的饲用植物,有些种可作为绿肥;多数种抗逆性强,是西部的先锋植物,可作为水土保持和防风固沙树种;*H. Scoparium*、*H. multijugum* 等种花多,花期长,是极好的蜜源,也可作为观赏植物进行栽培,美化环境;*H. Multijugum* 和 *H. polybotrys* 等种具药用价值,根可入药^[1~3]。可见,对岩黄芪根瘤菌进行研究,以充分利用其宿主植物是十分必要的。

本研究从表型和遗传型水平对岩黄芪根瘤菌的多样性进行研究,作为良好的种质资源用于西部大开发。

1 材料与方法

1.1 供试菌及其培养条件

供数值分类分析的菌株共 45 株,其中未知菌 30 株,参比菌 15 株;用于 16S rDNA PCR-RFLP 分析的菌株共 23 株,其中未知菌株 16 株,参比菌株 7 株;用于 BOX-PCR 指纹图谱分析的菌株共 34 株,其中未知菌株 28 株,参比菌株 6 株。供试根瘤菌的宿主植物、来源及研究方法参见表 1。供试菌株均用 YMA(yeast-mannitol)培养基^[4]培养,菌体收集时用液体 TY 培养基^[5],培养温度为 28℃。

表 1 供试根瘤菌
Table 1 Strains tested

菌株 Strain	宿主 Host	国家或地区 Origin	研究方法 Method	菌株 Strain	宿主 Host	国家或地区 Origin	研究方法 Method
CCBAU05055A	<i>H. alpinum</i>	河北	a,c	CCBAU01213A	<i>H. fruticosum</i> . var. <i>laeve</i>	内蒙古	a,c
CCBAU05055B	<i>H. alpinum</i>	河北	a,b,c	CCBAU01213B	<i>H. fruticosum</i> . var. <i>laeve</i>	内蒙古	a,b,c
CCBAU05069A	<i>H. alpinum</i>	河北	a,c	CCBAU01212	<i>H. fruticosum</i> . var. <i>lignosum</i>	内蒙古	a,c
CCBAU05069B	<i>H. alpinum</i>	河北	a,b,c	CCBAU01380	<i>H. fruticosum</i> . var. <i>lignosum</i>	内蒙古	a,b,c
CCBAU05073	<i>H. alpinum</i>	河北	a,b,c	CCBAU01056	<i>H. fruticosum</i> . var. <i>lignosum</i>	内蒙古	a,b,c
CCBAU05102A	<i>H. alpinum</i>	河北	a,c	CCBAU01054	<i>H. fruticosum</i> . var. <i>mongolicum</i>	内蒙古	a,c
CCBAU05102B	<i>H. alpinum</i>	河北	a,c	CCBAU05101A	<i>H. gmelimi</i>	河北	a,b,c
CCBAU05107	<i>H. alpinum</i>	河北	a,c	CCBAU05101B	<i>H. gmelimi</i>	河北	a,c
CCBAU05131A	<i>H. alpinum</i>	河北	a,c	CCBAU81081A	<i>H. multijugum</i>	青海	a,b,c
CCBAU05131B	<i>H. alpinum</i>	河北	a,c	CCBAU81081B	<i>H. multijugum</i>	青海	a
CCBAU05170	<i>H. alpinum</i>	河北	a,c	CCBAU71164	<i>H. polybotrys</i>	陕西	a,b,c
CCBAU01211	<i>H. fruticosum</i>	内蒙古	a,c	CCBAU01251	<i>H. scoparium</i>	内蒙古	a,b,c
CCBAU01055	<i>H. fruticosum</i>	内蒙古	a,b,c	CCBAU75033	<i>H. scoparium</i>	宁夏	a,b,c
CCBAU75034A	<i>H. fruticosum</i>	宁夏	a,b,c	CCBAU71092	<i>H. scoparium</i>	陕西	a,b,c
CCBAU75034B	<i>H. fruticosum</i>	宁夏	a,b,c	CCBAU71069	<i>H. scoparium</i>	陕西	a,b,c
<i>Rhizobium</i>				<i>Mesorhizobium</i>			
<i>R. leguminosaru</i> USDA2370	<i>Pisum sativum</i>	美国	a,b,c	<i>M. loti</i> NZP2213	<i>Lotus corniculatus</i>	新西兰	a,b,c
<i>R. sullae</i> IS123	<i>Hedysarum coronarium</i>	意大利	a,b,c	<i>M. loti</i> NZP2227	<i>Lotus</i> sp	新西兰	a
<i>R. loessense</i> CCBAU7190B	<i>Astragalus complanatus</i>	中国	a,b,c	<i>M. tianshanense</i> CCBAU3306	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>	中国	a,b,c
<i>R. loessense</i> CCBAU7190A	<i>Astragalus complanatus</i>	中国	a	<i>M. tianshanense</i> 6	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	中国	a
<i>Sinorhizobium</i>				<i>Agrobacterium</i>			
<i>S. fredii</i> USDA205	<i>Glycine soja</i>	中国	a,b,c	<i>A. tumefaciense</i> IAM13129		日本	a,b,c
<i>S. fredii</i> 2048	<i>Glycine soja</i>	中国	a	<i>A. tumefaciense</i> C58			a
<i>Bradyrhizobium</i>				<i>Bradyrhizobium</i>			
<i>B. japonicum</i> USDA6	<i>Glycine max</i>	日本	a,b,c	<i>B. yuanmingense</i> CCBAU10071	<i>Lespedeza</i>	中国	a,b,c
<i>B. japonicum</i> B15	<i>Glycine max</i>	日本	a	<i>B. yuanmingense</i> CCBAU10073	<i>Lespedeza</i>	中国	a

* a 数值分类^[6];b 16S rDNA PCR-RFLP 分析^[8];c Box-PCR 指仪图谱分析^[9]

1.2 研究方法

- (2)PCR 扩增 25 μ l 反应体系中含 Taq DNA 聚合酶 2.5U,KCl 10mmol $\cdot$ L $^{-1}$, (NH $_4$) $_2$ SO $_4$ 8mmol $\cdot$ L $^{-1}$, Tris-HCl (pH9.0) 10mmol $\cdot$ L $^{-1}$,Mg $^{2+}$ 7.6mmol $\cdot$ L $^{-1}$,100%DMSO 2.5 μ l,BSA 0.08mg $\cdot$ ml $^{-1}$,dNTP 0.2mmol $\cdot$ L $^{-1}$,BOXAIR 50ng,模板 DNA 50ng,用 ddH $_2$ O 补足 25 μ l。PCR 扩增条件:93 $^{\circ}$ C 预变性 4min,93 $^{\circ}$ C 1min,52 $^{\circ}$ C 1min,65 $^{\circ}$ C 8min,30 个循环后于 65 $^{\circ}$ C 保温 16min。
- (3)电泳 取 4~8 μ lPCR 产物与 2 μ l 上样缓冲液混匀后点样,3%琼脂糖 75V 电泳 6h。
- (4)电泳图谱分析 同上,见图 3。

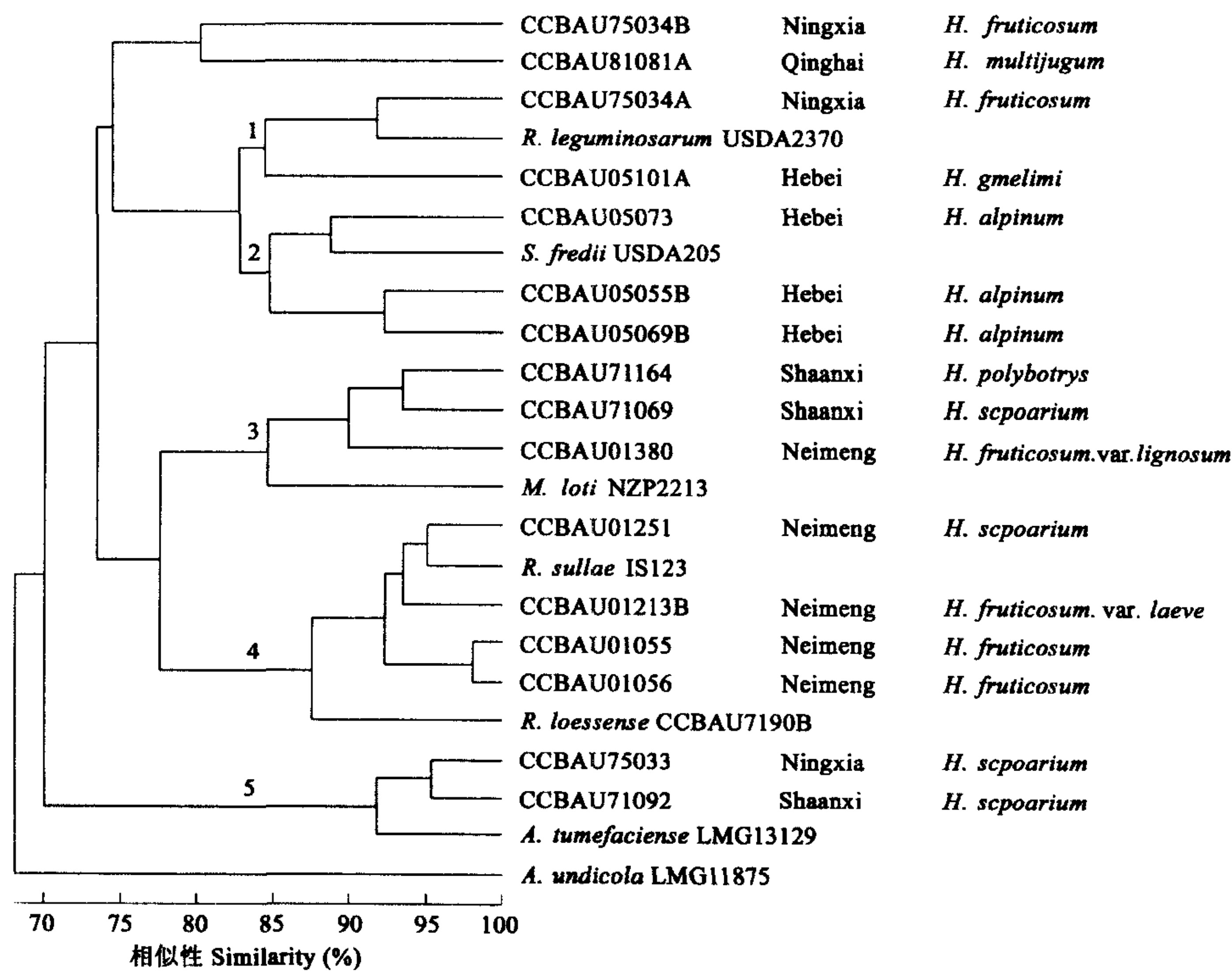


图 2 16S rDNA PCR-RFLP 聚类树状图

Fig. 2 Dendrogram derived from 16S rDNA PCR-RFLP demonstrating the phylogenetic relationships among the rhizobia isolated from *Hedysarum* spp.

2 结果与分析

2.1 数值分类聚类分析

从图 1 中可以看出,全部供试菌株在 73%的相似性水平上分成快生、慢生和中生 3 个群,其中群 I 包括 *Sinorhizobium*、*Agrobacterium* 和 *Rhizobium* 属的 7 株快生参比菌株和 27 株待定菌株;群 II 为 *Bradyrhizobium* 属的 4 株参比菌株;群 III 包括 *Mesorhizobium* 属的 4 株参比菌株和 3 株待定菌株。

在 82.5%的相似性水平上,群 I 可分出 A、B 两个亚群,群 I (A)包括 *Sinorhizobium fredii* 的 2 株参比菌株,9 株分离自河北 *H. alpinum* 的菌株和 1 株分离自内蒙古 *H. fruticosum*. var. *mongolicum* 的菌株,群 I (B)包括 *Agrobacterium tumefaciense* 的 2 株参比菌株和 2 株分离自宁夏和陕西、宿主均为 *H. scoparium* 的菌株;在 78%的相似性水平上,群 I 中另外的 14 株待定菌株和 3 株 *Rhizobium* 属的参比菌株聚为群 I (C)。此外,分离自宁夏菌株 CCBAU75034B 未与其它菌株聚成群。

2.2 鉴别特征的选择

从上述聚类结果各群中找出出现频率 $\geq$ 95%的特征作为该群的鉴别特征,即该群中 95%以上的菌株表现为阳性反应的记为“+”、表现为阴性反应的记为“-”,出现频率介于 6%~94%的记为“d”(表 2)。

2.3 16S rDNA PCR-RFLP 聚类分析

如图 2 所示,16 株待定菌株和 7 株参比菌株在 84%的相似性上分成 5 群,与数值分类树状图相比较,16S rDNA PCR-RFLP 聚类树状图中的第 2 群相当于数值分类树状图中的群 I (A),第 3 群相当于群 III,第 5 群相当于群 I (B),而第 1 群和第

表 2 数值分类鉴别特征

Table 2 Distinctive characteristics of numerical taxonomy

鉴别特征 Distinctive characteristics	I(A)	I(B)	I(C)	II	III	A	B	C	鉴别特征 Distinctive characteristics	I(A)	I(B)	I(C)	II	III	A	B	C
唯一碳源利用 Application of sole carbon source									抗生素 Antibiotics *								
葡萄糖酸钙 Calcium gluconate	+	+	+	+	d	+	+	+	红霉素 Erythromycin ^[b]	+	+	d	d	+	+	+	+
丙二酸钙 Calcium malonate	+	+	+	+	d	+	+	+	红霉素 Erythromycin ^[c]	d	+	-	-	d	-	+	-
糊精 Dextrin	+	+	+	+	-	+	+	+	红霉素 Erythromycin ^[d]	-	d	-	-	-	-	-	-
内消旋赤藓醇 Meso-erythritol	+	+	+	d	+	+	+	+	链霉素 Streptomycin ^[a]	+	+	d	d	d	+	+	+
麦芽糖 Maltose	+	+	+	d	+	+	+	+	链霉素 Streptomycin ^[b]	+	+	d	+	d	+	+	+
松三糖 Melezitose	+	+	d	+	d	+	+	+	链霉素 Streptomycin ^[c]	d	+	d	+	d	+	+	-
蜜二糖 Melibiose	+	+	+	+	d	+	+	+	链霉素 Streptomycin ^[d]	d	+	d	-	d	-	+	-
丙酮酸盐 Pyruvate	+	+	+	+	d	+	+	+	链霉素 Streptomycin ^[e]	-	d	d	-	-	-	+	-
棉子糖 Raffinose	+	+	+	d	d	+	+	+	耐盐性 salt tolerance								
水杨苷 Salicin	+	+	+	+	d	+	+	+	NaCl (1%)	+	+	d	-	-	-	-	-
柠檬酸钠 Sodium Citrate	+	+	+	d	d	+	+	+	NaCl (2%)	+	+	d	-	-	-	-	-
甲酸钠 Sodium formate	+	+	+	+	d	+	+	+	NaCl (3%)	-	+	-	-	-	-	-	-
D-葡萄糖酸钠 D-Sodium Citrate	+	+	+	+	d	+	+	+	生长 pH								
马尿酸钠 Sodium Hippurate	+	+	+	+	-	+	+	+	pH5.0	-	d	d	-	d	-	-	+
D-山梨糖醇 D-Sorbitol	+	+	+	d	+	+	+	+	pH9.0	+	+	d	d	d	-	+	+
山梨糖 Sorbose	d	+	d	+	d	+	-	-	pH10.0	+	+	d	-	-	-	-	-
淀粉 Starch	d	+	d	+	-	+	-	-	pH11.0	d	+	-	-	-	-	-	-
丁香酸 Syringic acid	d	+	d	+	-	+	-	+	生长温度 Temperature								
酒石酸钠 Sodium Tartaric	+	+	d	+	-	+	+	-	4 C	-	+	d	-	-	+	-	-
香草酸 Vanillic acid	d	+	d	+	-	+	+	-	10 C	d	+	d	d	-	+	-	-
木糖 Xylose	+	+	+	d	d	+	+	+	37 C	+	+	d	d	d	+	-	+
甘氨酸 Gly	+	+	d	-	-	+	+	+	60 C (10min)	d	-	d	-	-	-	-	-
L-甲硫氨酸 L-Met	d	+	d	+	-	+	+	-	化学药物 Chemical reagents								
DL-脯氨酸 DL-Pro	+	+	d	d	+	+	-	+	亚硝酸钠 Sodium Nitrite	+	+	+	+	d	+	+	+
L-苏氨酸 L-Thr	d	+	d	+	d	-	-	-	脱氧胆酸钠 Sodium deoxfcholic acid	+	+	d	+	d	+	+	+
唯一氮源利用 Application of sole nitrogen source									化学染料 Chemical dyes								
L-天冬氨酸 L-Asp	d	+	d	+	d	-	-	+	溴百里酚蓝 Bromothymol blue	d	+	d	-	d	+	-	-
L-胱氨酸 L-Cystine	d	+	d	+	+	-	-	+	中性红 Neutral Red	d	-	d	-	-	-	-	-
D-谷氨酸 D-Glu	+	+	+	d	+	+	+	+	甲基绿 Netyly Green	d	+	d	-	-	-	-	-
L-苯丙氨酸 L-Phe	d	+	+	+	+	+	+	+	其它 Others								
D-苏氨酸 D-Thr	d	+	+	+	+	+	+	+	石蕊牛奶产酸 Litmus Milk Acid Production	d	+	d	-	d	-	-	+
D-缬氨酸 D-Val	d	+	d	d	d	-	+	-	石蕊牛奶产碱 Litmus Milk Alkali Production	+	+	d	+	+	+	+	-
抗生素 Antibiotics *									石蕊牛奶胨化 Litmus Milk Peptonization	+	+	+	-	d	+	+	+
氨苄青霉素 Ampicillin ^[b]	+	+	d	+	d	+	+	+	石蕊牛奶还原 Litmus Milk Reduction	+	+	d	d	d	+	+	+
氨苄青霉素 Ampicillin ^[c]	d	d	d	d	-	-	-	+	石蕊牛奶酸凝 Litmus Milk Acid Cure	d	d	-	-	-	-	-	-
氨苄青霉素 Ampicillin ^[d]	d	d	-	-	-	-	-	-	B. T. B 产酸 Acid Production	+	+	+	-	d	+	+	+
卡那霉素 Kanamycin ^[b]	d	d	d	d	-	-	-	-	B. T. B 产碱 Alkali Production	d	-	-	+	d	-	-	+
卡那霉素 Kanamycin ^[c]	-	d	-	d	-	-	-	-	硝酸盐还原 Nitrate Reduction	d	+	d	+	d	+	+	+
氯霉素 Chloramphenicol ^[a]	+	+	+	+	d	+	+	+	亚甲蓝还原 Methylene Blue Reduction	d	+	d	d	d	+	+	+
氯霉素 Chloramphenicol ^[b]	+	+	d	+	d	+	+	+	耐尔蓝还原 Nile Blue Reduction	+	+	+	d	d	+	+	+
氯霉素 Chloramphenicol ^[c]	d	d	-	d	-	-	-	-	3-酮基乳糖产生 3-keto-Lactose Production	-	+	-	-	-	-	-	-
新霉素 Neomycin ^[a]	+	+	d	+	d	+	+	-	L-Phe 脱氨酶 L-Phenylalaninase	d	+	-	-	-	-	-	-
新霉素 Neomycin ^[b]	+	+	d	+	+	+	+	-	脲酶 Urease	+	+	d	+	d	+	-	-
红霉素 Erythromycin ^[a]	+	+	d	+	+	+	+	+	肉汤生长 Growth in Peptone Broth	d	+	-	-	-	-	-	-

A: *R. leguminosarum* (USDA2370); B: *R. sulae* (IS123); C: *R. loessense* (CCBAU7190B); +: $\geq 95\%$ strains with distinctive characteristics; -: $\leq 5\%$ strains with distinctive characteristics; d: 6% ~ 95% strains with distinctive characteristics; * [a] = $3\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$; [b] = $5\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$; [c] = $50\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$; [d] = $100\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$; [e] = $300\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$

4 群在数值分类中在 78% 的相似性水平上聚为 I (C)。可见 16S rDNA PCR-RFLP 聚类结果与数值分类聚类结果较为一致,证实了本研究的可靠性。

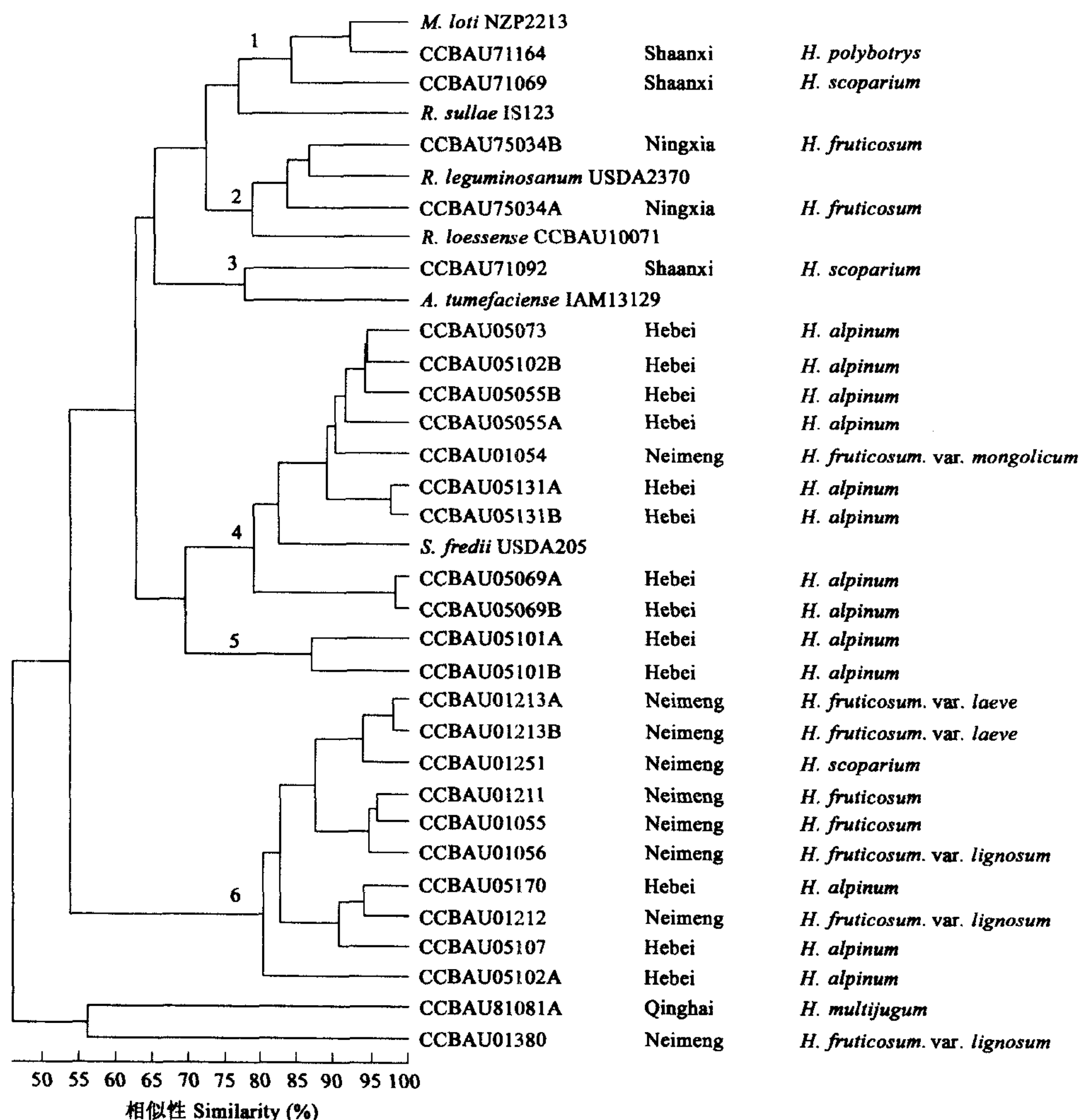


图 3 BOX-PCR 指纹图谱聚类树状图

Fig. 3 Dendrogram derived from BOX-PCR fingerprinting demonstrating the genetic relationships among the rhizobia isolated from *Hedysarum* spp.

2.4 BOX-PCR 指纹图谱聚类分析

如图 3 所示,28 株待测菌株与 6 株参比菌株在 77% 的相似性水平上分成 5 个群,与 16S rDNA PCR-RFLP 的聚类情况较为一致,其中第 1 群相当于数值分类中的群 II,第 3 群相当于群 I (B),第 4 群相当于群 I (A),第 2 群、第 5 群和第 6 群相当于群 I (C),而与 16S rDNA PCR-RFLP 中的第 1 群和第 4 群相对应。

3 讨论

3.1 本研究从表型及遗传型两方面对来自 5 省岩黄芪 9 个不同种的 30 株根瘤菌进行了比较分析,根据表型特征,全部菌株可分为 4 群,而在遗传型上,供试菌株可分为 5 或 6 群。由此可见,表型与遗传型分群不完全一致,说明表型特征相一致的菌群可能具有不同的遗传型。

3.2 分离自我国中西部地区的岩黄芪根瘤菌在系统发育地位上存在较大的差异。在 30 株未知菌株中,有 10 株归属于 *Sinorhizobium*,2 株归属于 *Agrobacterium*,3 株归属于 *Mesorhizobium*,另外 15 株菌与 *Rhizobium* 的亲缘关系较近。本研究采用的 3 种方法可以很好的将未知菌株归属,但是要进一步定种还要做其它的工作。BOX-PCR 指纹图谱聚群的总体相似性水平较低,更适合用于菌群的多样性研究。

3.3 宿主和地理来源对菌株的多样性具有一定的影响。分离自河北、宿主为 *H. alpinum* 的菌株,无论在表型、还是在遗传型

上都具有较高的相似性;分离自内蒙、宿主为 *H. fruticosum* 及其变种的大部分菌株具有一定的相似性;宿主分别为 *H. scoparium*、*H. polybotrys* 和 *H. fruticosum* var. *lignosum* 的 3 株菌 CCBAU71069、CCBAU71164 和 CCBAU01380, 生长速度较慢, 在表型和遗传型上与其它菌株存在很大的差异, 聚类分析结果表明这 3 株菌与 *Mesorhizobium* 属的参比菌株具有一定的相似性;其它不同宿主及地理来源的菌株多样性极其丰富, 如分离自青海、宿主为 *H. multijugum* 的菌株表型及遗传型特征较其它菌株的差异均很大。

3.4 数值分类的研究结果表明, 我国中西部地区岩黄芪根瘤菌的碳、氮源利用范围很广, 抗逆性很强。大部分菌株在供试 42 种唯一碳源和 12 种唯一氮源的培养基中生长良好; 对抗生素的抗性较强, 个别菌株可抗 $300\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的链霉素; 53.3% 的菌株在含有 2% NaCl 的 YMA 培养基上生长良好, 个别菌株可耐 3% 的 NaCl; 供试菌株的生长 pH 范围很广, 高达 90% 的菌株可生长在 pH9.0 的培养基中, 40% 的菌株可以在 pH11.0 的培养基上生长, 20% 的菌株可生长在 pH5.0 的培养基中; 供试菌株的生长温度范围较宽, 86.7% 的菌株在 37℃ 生长良好, 个别菌株可耐 4℃ 低温, 有些可忍受 60℃ 高温。这些具有表型和遗传型多样性的菌株为我国西部大开发中更好的利用豆科植物提供了种质资源和理论依据。

References:

- [1] Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences. Graphic Description of Main Plant in China • Leguminosae. Beijing: Science Press, 1994. 444~451.
- [2] Chen M J, Jia S X. *Chinese Forage Plant*. Beijing: China Agriculture Press, 2002. 518~532.
- [3] Commission Editorial of Chinese Flora, Chinese Academy of Sciences. *Flora of China*. Beijing: Science Press, 1998, 42(2): 177~193.
- [4] Vincent J M. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. In: *International Biological Programme Handbook No. 15*. Oxford: Blackwell Science Publications. 1970.
- [5] Beringer J E. R-factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.*, 1974, 84: 188~198.
- [6] Chen W X, Yan G L, Li J L. Numerical taxonomic study of fast growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1988, 38: 392~397.
- [7] White L O. The taxonomy of the crown-gall organism *Agrobacterium tumefaciens* and its relationship to Rhizobia and other *Agrobacteria*. *J. Gen. Microbiol.*, 1972, 72: 565~574.
- [8] Gao J L, Chen W X, Terefework Z, et al. 16S rDNA and 23S rDNA PCR-RFLP comparative analysis of rhizobia isolated from *Astragalus adsurgens*. *Microbiology*, 1999, 26(2): 120~125.
- [9] Martin B O, Humbert M C, Amara, et al. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Rev.*, 1992, 20: 3479~3483.

参考文献:

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国主要植物图说 • 豆科. 北京: 科学出版社, 1994. 444~451.
- [2] 陈默君, 贾慎修. 中国饲用植物. 北京: 中国农业出版社, 2002. 518~532.
- [3] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志. 北京: 科学出版社, 1998, 42(2): 177~193.
- [8] 高俊莲, 陈文新, Terefework Z, 等. 斜茎黄芪根瘤菌 16S 和 23S rDNA PCR-RFLP 的比较分析. 微生物学通报, 1999, 26(2): 120~125.