西北干旱半干旱地区根瘤菌的多相分类及系统发育研究

策划编辑　潘　超
责任编辑　张庆波
封面设计　张　楠
责任绘图　朱　静
版式设计　史新薇
责任校对　朱惠芳
责任印制

需要全本请访问 www.ertongbook.com

图书在版编目(CIP)数据

西北干旱半干旱地区根瘤菌的多相分类及系统发育研究/韦革宏—北京:高等教育出版社,2003.12
ISBN 7-04-013922-7

Ⅰ.西… Ⅱ.韦… Ⅲ.①干旱区-根瘤菌-细菌分类-研究-西北地区②干旱区-根瘤菌-系统发育-研究-西北地区 Ⅳ.Q939.11

中国版本图书馆CIP数据核字(2003)第108643号

出版发行 高等教育出版社 购书热线 010-64054588
社 址 北京市西城区德外大街4号 免费咨询 800-810-0598
邮政编码 100011 网 址 http://www.hep.edu.cn
总 机 010-82028899 http://www.hep.com.cn

经 销 新华书店北京发行所
排 版 高等教育出版社照排中心
印 刷

开 本 850×1168 1/32
印 张 6.25 版 次 年 月第1版
字 数 200 000 印 次 年 月第 次印刷
插 页 4 定 价 14.30元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。
版权所有 侵权必究

内 容 提 要

本书介绍了西北干旱半干旱地区豆科植物根瘤菌资源多样性、分类及系统发育的研究成果。共分十章，包括根瘤菌分类研究的历史，现状和发展，根瘤菌的表型分析和数值分类，SDS - 全细胞可溶性蛋白电泳分析，DNA G + C 摩尔分数及 DNA 同源性分析，16 S rDNA 限制性片段长度多态性（PCR - RFLP）分析，16 S rDNA 全序列测定及系统发育分析，根瘤菌菌体及胞外多糖热分解特性研究，根瘤菌菌体的红外光谱特征分析，根瘤菌原生质体的形成，再生及融合研究等。书中重点对根瘤菌新属、新种确立的系统和方法做了详细的介绍。

本书可供高等院校、科研单位生物学、微生物学，特别是细菌分类学专业的教师和研究生参考。

前　言

根瘤菌(rhizobia) 是一类广泛分布于土壤中的革兰氏阴性细菌。它能侵染豆科植物根部形成根瘤, 将空气中的分子态氮转变成植物可以吸收利用的氨。据估计, 全球每年生物固氮量达 1. 75×10^8 t, 为世界工业氮肥产量的 4. 37 倍。根瘤菌与豆科植物的共生固氮作用是生物固氮中效率最高的体系, 因此, 研究根瘤菌与豆科植物的共生固氮作用是实现农业可持续发展的重大课题之一。根瘤菌的资源多样性及分类对于发掘新的根瘤菌种质资源, 保藏并合理利用根瘤菌基因资源库, 选育高效菌株用于农业生产有重要意义。目前世界上已知的豆科植物约 16 000 ~19 000 个种, 其中只有 15% 的种作过结瘤调查, 研究过其共生关系的仅有 0. 3% ~ 0. 4%。开展广泛的根瘤菌资源调查和进行深入的分类研究尤其显得重要。

豆科植物在防风固沙、水土保持中扮演着重要角色, 它们既具有很强的抗逆能力, 又能与根瘤菌共生, 这种独特的进化优势使它们成为最恶劣环境——极地、火山灰、荒漠及各种贫瘠土壤上的先锋植物。据报道, 在一些荒坡、荒地等没有豆科植物生长的新区, 接种相适应的根瘤菌的豆科植物抗逆性增强, 能茁壮地生长。因此, 豆科植物根瘤菌的资源多样性研究和应用对西北干旱半干旱地区生态环境的改善和经济发展起着不可低估的作用。

本研究是在朱铭莪教授和中国农业大学陈文新院士的悉心指导和热情鼓励下完成的。整个研究过程无不凝聚着两位恩师的心血和汗水,她们严谨的学风、渊博的知识以及为科学事业献身的敬业精神使我终身受益。张一平教授、袁锋教授、郭蔼光教授、李生秀教授、薛泉宏教授、王益权教授、曲东教授等提出了不少好的建议,汪恩涛博士和谭志远博士协助进行了数据分析。在此,表示衷心的感谢。同时,感谢我的夫人孙玉瑗女士对我的全力支持和照顾,使我全身心地投入到研究工作中。

本研究得到国家自然科学基金重点项目(39130010)、国家自然科学基金(30000005)和973课题(G2000018605)资助,本书的出版得到教育部、国务院学位委员会和高等教育出版社的大力支持,在此表示感谢!

因本人学识和水平有限,错漏之处在所难免,敬请批评指教。

韦革宏

2003年10月19日于杨凌

需要全本请访问 www.ertongbook.com

目　录

第 1 章　根瘤菌分类研究的历史、现状和发展 …… 1
一、根瘤菌的发现 …… 2
二、根瘤菌分类研究的历史 …… 3
三、根瘤菌分类研究的现状 …… 9
四、根瘤菌分类研究的技术体系 …… 19
五、确定根瘤菌新属, 新种的最低标准 …… 32
六、现代分析仪器在根瘤菌分类中应用的理论依据及现状 …… 33
第 2 章　根瘤菌的表型分析和数值分类 …… 37
一、材料与方法 …… 38
二、结果与讨论 …… 52
第 3 章　SDS - 全细胞可溶性蛋白电泳分析 …… 57
一、材料与方法 …… 57
二、结果与讨论 …… 60
三、小结 …… 67
第 4 章　DNA G + C 摩尔分数及 DNA 同源性分析 …… 68
一、材料与方法 …… 68
二、结果与讨论 …… 72
三、小结 …… 78
第 5 章　16 S rDNA 限制性片段长度多态性(PCR - RFLP)
分析 …… 79
一、材料与方法 …… 79

二、结果与讨论 …… 82
三、小结 …… 88
第 6 章 16 S rDNA 全序列分析及 3 个新种的描述 …… 90
一、材料与方法 …… 90
二、结果与讨论 …… 94
三、新种的确定及描述 …… 103
四、小结 …… 106
第 7 章 根瘤菌菌体及胞外多糖热分解特性研究 …… 108
一、材料与方法 …… 108
二、结果与讨论 …… 111
三、小结 …… 120
第 8 章 根瘤菌菌体的红外光谱特征分析 …… 123
一、材料与方法 …… 123
二、结果与讨论 …… 125
三、小结 …… 133
第 9 章 原生质体的融合研究 …… 135
第一节 微生物原生质体的融合及其应用 …… 135
一、原生质体融合的特点 …… 135
二、融合子的选择方法 …… 137
三、原生质体融合技术的发展和应用 …… 140
第二节 根瘤菌原生质体的形成,再生及融合研究 …… 141
一、材料与方法 …… 142
二、结果与讨论 …… 145
三、小结 …… 162
第 10 章 结论 …… 164
参考文献 …… 170
ABSTRACT …… 185

第1章

根瘤菌分类研究的历史、现状和发展

根瘤菌(rhizobia) 是一类能侵染豆科植物根部形成根瘤, 可进行生物固氮的革兰氏阴性细菌。它与豆科植物共生是已知固氮能力最强的生物固氮体系之一, 并在农业生产中起着重要作用[130, 174]。从分离纯培养至今, 根瘤菌的研究已有 100 多年的历史。由于根瘤菌与豆科植物的共生固氮具有重大的理论意义和应用前景, 近 1 个世纪以来吸引了许多学者在固氮生物学、固氮生理学、固氮生物化学、固氮遗传学及应用方面开展了大量的研究工作, 并取得了一系列的进展[33]。根瘤菌的分类作为根瘤菌理论和应用研究的基础具有十分重要的意义, 这主要表现在以下几个方面[131]: ① 有利于人类保护根瘤菌基本的生态过程, 保证其物种、生态系统的永续利用, 合理管理好宝贵的根瘤菌资源。② 有利于认识根瘤菌与生态系统之间的关系、根瘤菌与其他有关物种的亲缘关系及其自身的演化、系统发育过程。③ 为固氮生物学的研究提供物质基础。④ 获得的优良菌株可直接为农业生产服务。然而, 根瘤菌分类的研究还明显不够全面和深入, 目前世界上已知的豆科植物约 750 个属, 16 000 ~19 000 个种, 我国已知有 127 个属, 12 000 多个种。在这些豆科植物中

只有15%的种做过结瘤调查,并且只有0.3% ~0.4%研究过其共生关系。同时,结瘤研究通常倾向于农业上意义较大的一些豆科植物。因此开展广泛的根瘤菌资源调查和进行深入的分类研究尤其显得重要[132]。

随着科学的不断发展和新技术的不断应用,新的根瘤菌资源不断被挖掘和发现。根瘤菌的分类也从过去以互接种族为依据的传统分类逐步过渡到了以系统发育关系为依据的现代系统分类。特别是近十几年来,rRNA基因测序技术的发展和应用使得根瘤菌的分类及其系统发育研究有了突破性进展,根瘤菌的分类学和系统发育学的研究也由于相互渗透变得越来越不可分割。现在对根瘤菌系统发育地位的研究已经成为其分类研究中必不可少的一部分内容[107]。

根瘤菌分类的另一个重要发展是多相分类技术的应用。“多相分类”一词是由Colwell(1970)[13]首先提出的,主要是对微生物的表型、遗传型以及系统发育等各个方面的特征进行研究并加以综合分析,从而获得既系统全面又能客观反映其自然本质的结果。多相分类和系统发育的不断发展形成了现代细菌分类的一个新的里程碑[107],根瘤菌的分类也由于多相分类方法的应用有了很大的进展[124]。

一、根瘤菌的发现

1838年,法国学者J. B. Bousingault根据田间试验结果指出,豆科植物的营养生理和禾本科植物不同,三叶草和豌豆可以从空气中获得氮素营养。后来Lachamann(1858)和M. C. Воронин(1886)发现豆科植物根瘤中含有微生物,并且指出根瘤的形成是微生物侵入植物的结果,但当时未把根瘤的形成和固氮联系起来。1886年9月,德国学者H. Hellriegel在柏林的一次科学大会上发表研究报告,断言豆科植物只有形成根瘤才能固定大气中的氮素。两年后他和合作者H. Wilfarth就这一问题发

表了长达200多页的详尽报告,以丰富的试验资料确证了他的结论,自此澄清了他们的前辈从19世纪初以来关于豆科植物氮素营养来源的分歧见解[133]。这期间法国学者J. B. Bousingault的长期研究工作也为阐明豆科植物氮素营养来源做出了积极努力。1888年,荷兰学者M. W. Beijerinck用植物叶片汁加入天冬酰胺、蔗糖和明胶缓冲液配制的培养基从豌豆根瘤中第一次成功地分离得到了根瘤菌的纯培养并将其命名为*Bacillus radicicola*[4]。一年后,波兰学者Prazmowski用根瘤菌纯培养接种豆科植物,形成了根瘤,并将之改称为*Bacterium radicicola*。1889年,Frank建议将可在豆科植物根上结瘤的细菌属名改为*Rhizobium*[27],并一直沿用至今。当时Frank认为感染所有豆科植物根瘤的都是同一种根瘤菌,并取名为豆类根瘤菌(*R. leguminosarum*)。后来知道不止一种,它们有不同的宿主专一性,形态和生理特性也有差异[178]。

二、根瘤菌分类研究的历史

(一) 早期的根瘤菌分类研究系统

早期的根瘤菌分类一直是以互接种族为主要依据的。所谓互接种族的概念是指在同一类群豆科植物中可以互相利用其根瘤菌形成根瘤,称这一类群植物为互接种族(cross - inoculation group)。1926年,Dangeard主要根据宿主的种类和互接种族的关系,结合一些形态和生理性状,将根瘤菌分为若干种[178]。1932年,Fred等人又在此分类基础上,列出了16属豆科植物,分为6个互接种族,将其根瘤菌定为6个种,以其代表植物属的学名作为追加词。另外有一群慢生根瘤菌能与豇豆、山蚂蝗、柱花草等大量热带豆科植物共生结瘤的未给予定名。这样,Fred(1932)首次提出了下列根瘤菌分类系统[46]:

三叶草根瘤菌(*R. trifolii*)
豇豆根瘤菌(*R. leguminosarum*)
菜豆根瘤菌(*R. phaseoli*)
苜蓿根瘤菌(*R. meliloti*)
大豆根瘤菌(*R. japonicum*)
羽扇豆根瘤菌(*R. lupini*)
其他与豇豆族豆科植物结瘤的根瘤菌(*R.* spp.)

根瘤菌科 *Rhizobiaceae*
根瘤菌属 *Rhizobium*
色杆菌属 *Chromobacterium*
土壤杆菌属 *Agrobacterium*

上述分类系统中各种的主要特征见表 1.1。

表 1.1 Fred(1932 年)根瘤菌分类系统中根瘤菌属各种的主要特征

种	石蕊牛奶 血清环	石蕊牛奶 产酸	生长速度	宿主	互接种族
R. trifolii	+	-	快	*Trifolium*	三叶草族
R. leguminosarum	+	-	快	*Pisum lens* *Lathyrus Vicia*	豌豆族
R. phaseoli	+	-	快	*Phaseols vulgaris*	菜豆族
R. meliloti	+	+	快	*Medicago* *Melilotus*	苜蓿族
R. japonicum	-	-	慢	*Glycine max*	大豆族
R. lupini	-	-	慢	*Lupinus* *Ornithopus*	羽扇豆族
R. spp.	不定	不定	慢	*Vigna Desmodium* *Arachis Centrosema* *Stylosanthes* 等	豇豆族

注:豇豆族根瘤菌主要是结瘤于热带豆科植物的慢生型根瘤菌。

需要全本请访问 www.ertongbook.com

对 Fred 的分类系统，人们提出了许多不同的意见。Krasilnikov 等(1949)将根瘤菌分为 10 个种；Dorosinski(1965)把它们分为 11 个种；陈华癸(1959)曾认为所有豆类根瘤菌都应归为 1 属 1 种，定为 *R. leguminosarum*，然后按其宿主专一性不同分为 8 个种型(Formae)；Tesie 和 Todorovic 等(1963)根据单生鞭毛与周生鞭毛根瘤菌的形态及生理特征的不同，又把它们分为两个种。每个种下再分若干型[178]。后来 Graham(1964)[30]、Moffet 和 Colwell(1968)[71]用数值分类法，依其表型特征的差异将根瘤菌分为两大群，并建议定为两个属，但当时未被接受。直到 1974 年，在《伯杰细菌鉴定手册》第八版中，Jordan 和 Allen 根据互接种族，生长速度及鞭毛类型将根瘤菌分为两个相互区别的类群，并与土壤杆菌属一起构成根瘤菌科，如下所示[44]。

根瘤菌科 Rhizobiaceae	根瘤菌属 *Rhizobium*	群 I（快生型）	豌豆根瘤菌(*R. leguminsoarum*)
			菜豆根瘤菌(*R. phaseoli*)
			三叶草根瘤菌(*R. trifolii*)
			苜蓿根瘤菌(*R. meliloti*)
			大豆根瘤菌(*R. japonicum*)
		群 II（慢生型）	羽扇豆根瘤菌(*R. lupini*)
			其他与豇豆族豆科植物结瘤的根瘤菌(*R.* spp.)
	土壤杆菌属 *Agrobacterium*		

修改后的上述分类系统仍是以互接种族为基础的，这主要是因为长期以来，对根瘤菌的研究重点在于菌株与寄主植物的共生效应上，研究范围也只集中于农、牧业生产中的少数豆科植物。随着研究工作的广泛和深入及结瘤豆科植物的不断发现，互接种族的概念陷入了混乱。族间越界结瘤的报道越来越多[104,105,117]，有些根瘤菌可以与很多种不同的豆科植物共生结瘤，而有些根瘤菌却不能在其互接种族的全部宿主上结瘤，有些

根瘤菌可以与非豆科植物结瘤,而有些根瘤菌却只能与具有品种和地区特异性的豆科植物结瘤[40]。遗传学的研究也证明了根瘤菌的寄主专一性受质粒控制[3, 81],而且这种质粒可在不同的菌株之间转移[44,106]。大量的事实从根本上动摇了以互接种族为依据的分类系统。另外,按照生长速度和鞭毛类型对根瘤菌分类也是不合适的,快生的百脉根根瘤菌、紫云英根瘤菌便具有亚极生鞭毛;同时也发现有些根瘤菌的生长速度并无明显的快慢界限。所有这些发现使早期的根瘤菌分类系统受到了极大的挑战和冲击。

鉴于原有根瘤菌分类系统的不合理性,自 20 世纪 60 年代以来,许多学者应用现代分类技术对根瘤菌分类进行了较广泛的研究,积累了许多新的信息,获得了一些有价值的结果。在数值分类[14]、DNA 碱基组成[15]、DNA 同源性分析[25,45]、血清学分析[39]、胞外多糖成分分析[112,126]、全细胞可溶性蛋白电泳分析[90]和 rRNA - DNA 杂交[18]等大量分析研究的基础上,Jordan 在 1984 年出版的《伯杰系统细菌学手册》第一卷中将根瘤菌科进行了修订,提出了新的根瘤菌分类系统[50]:

根瘤菌科 Rhizobiaceae	根瘤菌属 *Rhizobium*	豌豆根瘤菌*(R. leguminosarum)*
		苜蓿根瘤菌*(R. meliloti)*
		百脉根根瘤菌*(R. loti)*
	慢生根瘤菌属 *Bradyrhizobium*	慢生大豆根瘤菌*(B. japnicum)*
	土壤杆菌属 *Agrobacterium*	
	叶瘤菌属 *Phyllobacterium*	

上述系统中各属的主要特征见表 1.2,根瘤菌属中各种的主要特征见表 1.3[50,129]。

表 1.2　根瘤菌科各属的鉴别特征(1984)

特征	根瘤菌 *Rhizobium*	慢生根瘤菌属 *Bradyrhizobium*	土壤杆菌属 *Agrobacterium*	叶瘤菌属 *Phyllobacterium*
极生鞭毛	D	+	-	D
丛生鞭毛	-	-	-	D
周生鞭毛	D	-	D	-
形成根瘤	+	+	-[b]	-
形成叶瘤	-	-	-	+
固氮酶活性	+	+	-[b]	-[c]
引起肥大能力	-	-	+	-
3 - 酮乳糖产生	-	-	D	
YMA 上生长快[d]	+	-	+	+
含糖培养基上产碱	-	+	-	-
产 H_2S	D	-	-	
需生物素	+[c]	+	-	
胞外胶中有 β- 2 - 葡聚糖	+	+	+	
DNA G + C 摩尔分数 /%	59 ～64	61 ～65	57 ～63	60 ～61

注: . D 表示情况不一;

b. 自然界存在的不结瘤, 但经遗传修饰的菌株可形成根瘤并固氮;

c. 有争议;

d. 28℃, 2 ～3 d, 菌落直径达 2 ～4 mm;

e. 某些种的菌株间有差异。

表 1.3　根瘤菌属各种的鉴别特征(1984)

特征	豌豆根瘤菌 *R. leguminosarum*	苜蓿根瘤菌 *R. meliloti*	百脉根根瘤菌 *R. loti*
极生鞭毛	+	+	D[a]
周生鞭毛	+	+	-
与 *R. meliloti* 的抗血清凝集反应[b]	-	+	-
2% NaCl 中生长	-	D	-
39 ～40℃生长	-	D	-
对 VB_1 的需要	D	-	
对泛酸的需要	+	-	
产 H_2S	-	D	-
在甘油磷酸盐培养基上沉淀	-	D	-
石蕊牛奶产酸	-	D	-
主要寄主	*Pisum sativum* *Vicia hirsute* *Vicia sativa* *Trifolium repens* *Phaseolus vulgaris*	*Medicago sativa*	*Lotus corniculatus* *M. sativa* *P. vulgaris*

注: a. D 表示情况不一;

b. 体细胞或鞭毛抗原的抗血清。

在《伯杰系统细菌学手册》第一卷中, *Bradyrhizobium* 只有一个模式种: 慢生大豆根瘤菌——*B. japonicum*, 同时也提出 *Bradyrhizobium* 代表一个极混杂的根瘤菌群, 许多菌株因缺乏系统性研究, 故未给它们确定适当的种名。

Jordan 提出的系统是对根瘤菌分类工作的一个阶段性总结, 它是以菌株的遗传特征和表型特征为基础进行种属划分的, 同时也考虑了它们与寄主的共生关系, 因此比以前的分类系统更合理、也更符合实际, 较为客观地反映了根瘤菌间的亲缘关系, 但由于所研究过的菌株覆盖面有限, 还有很多菌株没能确定分类地位, 所以该系统仍很不完善。

(二) 早期分类研究中根瘤菌的分类地位

关于根瘤菌的分类地位也曾有许多不同的看法。Fred(1932)将根瘤菌与色杆菌属(*Chromobacterium*)和土壤杆菌属(*Agrobacterium*)归为一科[26]。Kluyver 等(1936)[55]认为根瘤菌在分类系统上靠近假单胞菌科(Pseudomonaceae)。Jensen(1958)同意这一看法, 并认为与土壤杆菌属(*Agrobacterium*)的亲缘关系更接近, 根瘤菌可能是从土壤杆菌演化而来的。De Ley 等(1966)认为根瘤菌与固氮菌(*Azotobactria*)及假单胞菌在分类位置上靠近。Hill(1966)[41]指出节杆菌属(*Arthrobacter*)也与它们有较近的亲缘关系。Jordan 等(1974)在《伯杰系统细菌学手册》第 8 版中将根瘤菌科与假单胞菌科及固氮菌科并列, 并将土壤杆菌与根瘤菌同归于根瘤菌科。这期间也有一些不同的看法, 如 Bisset(1952)认为根瘤菌与芽孢杆菌属(*Bacillus*)接近, Jacobs(1949)及 Jensen(1952)认为根瘤菌科与棒杆菌科(Corynebacteriaceae)有亲缘关系[69], Nowak(1966)则认为与色杆菌科(Chromobacteriaceae)亲近[178]。这些结果表明, 早期的根瘤菌分类地位的研究是零星的、不系统的。随着科学研究的不断发展和深入, 对根瘤菌分类地位的研究也势必随着根瘤菌分类系统的不断补充与完善而得以系统化、科学化。

三、根瘤菌分类研究的现状

Jordan(1984)提出的新的分类系统开辟了根瘤菌现代系统分类的新纪元。随着研究范围的不断扩大和分类技术的不断革新,根瘤菌的分类又有了较大的进展。特别是多相分类研究方法的应用,使人们对 *Rhizobium* 和 *Bradyrhizobium* 属内和属间的复杂关系有了更深入的了解。在这些多相分类研究的方法中,数值分类为大量菌株提供了生理学、形态学、血清学等各个表型方面的综合信息,分子技术的应用如 DNA 杂交、蛋白电泳以及其他以 DNA 为基础的分析方法为根瘤菌提供了多种分类依据,而 rRNA 的基因序列的分析则成为确定根瘤菌属、种系统发育地位的最有效途径[31,125]。这样,在原来 2 属 4 种的基础上又增加了大量新的属、种。

(一) 新属的建立

1. 固氮根瘤菌属(*Azorhizobium*)

1988 年,Dreyfus 等人[23]对从生长在热带的毛萼田菁(*Sesbnia rostrata*)茎瘤中分离到的根瘤菌进行了表型特征及系统发育关系的研究,发现田菁的茎瘤根瘤菌在许多方面均明显不同于已有的 *Rhizobium* 和 *Bradyrhizobium* 两属,而自成一个独立的群。经 rRNA - DNA 杂交结果表明,这一类群菌与 *Xanthobacter* 的亲缘关系较近,而与 *Agrobacterium* 相距甚远,于是将该群细菌确定为一个新属 *Azorhizobium*,下设一个种 *A. caulinodans*。该群细菌既可共生固氮又可自生固氮,因而得名固氮根瘤菌属。

2. 中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)

1982 年,Keyser 等首先发表了快生型大豆根瘤菌[53],1984 年 Scholla 和 Elkan 在 5 个菌株的 DNA/DNA 杂交基础上将其定为一个新种,种名为 *Rhizobium fredii*[95]。

1988 年,陈文新等以 33 株快生型大豆根瘤菌株的数值分类为基础,结合 DNA 同源性测定、可溶性蛋白凝胶电泳、胞外多糖和

脂多糖分析、噬菌体关系、血清学关系、结瘤试验等结果,将快生型大豆根瘤菌定为一个独立的新属。因其菌株来源于中国,故命名为中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*),下设两个种:*S. fredii* 和 *S. xinjiangensis*[9]。

1992 年,Jarvis 等对该属菌株进行了 16 S rRNA 的基因部分序列分析,结果表明其序列与苜蓿根瘤菌的几乎完全一致,而 *S. xinjiangensis* 的 16 S rRNA 的基因部分序列与 *R. fredii* 完全一致,故又将其恢复命名为 *R. fredii*[47]。

1994 年,De Lajudie 等人分别从田菁和金合欢中分离到两个新种,在一系列表型特征、DNA 同源性、DNA - rRNA 杂交以及 16 S rRNA的基因全序列等分析的结果中发现,这两个新种 *R. fredii* 和 *R. meliloti* 一起构成一个独立的系统发育分支,且与其他的 *Rhizobium* 中的种有很大差异,据此将这一类群确定为一个属,恢复了原来的属名——*Sinorhizobium*。以 *S. fredii* 为模式种[19]。

3. 中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)

1985 年,陈文新等发现分离自新疆的一群根瘤菌生长速度中慢,并且独立成群,后来经过进一步扩大菌株并对其做了大量的表型性状、遗传学分析及 16 S rRNA 的基因部分序列分析之后,认为这一类群菌应列为一个新属——*Mesorhizobium*。由于只作了 16 S rRNA 的部分序列测定,此建议未被采纳。在此期间,人们也发现 *R. loti* 与其他的快生根瘤菌如 *R. leguminosarum*, *R. meliloti* 有很大差异,并且通过 16 S rRNA 的基因全序列分析证实了这一点。近年来,通过 rRNA 全序列分析证明 *R. loti*, *R. huakuii*, *R. ciceri*, *R. tianshanense* 和 *R. mediterraneum* 亲缘关系较近,均属同一个系统发育分支,并被认为同为一个新属。陈文新已与国际同行共同著文发表此新属。由于这一属中的菌株生长速度介于 *Rhizobium* 和 *Bradyrhizobium* 之间,所以命名为 *Mesorhizobium*[42, 125]。属内包括 5 个种,以 *M. loti* 为模式种。

4. *[Rhizobium]*

需要全本请访问 www.ertongbook.com