苜蓿、草木樨、锦鸡儿根瘤菌的 表型多样性分析*

阎爱民 陈文新

(中国农业大学生物学院 , 北京 100094)

摘 要 选用 48 株分离自新疆和内蒙的苜蓿属、草木樨属、锦鸡儿属植物的根瘤菌菌株 , 进行了营养利用、抗生素抗性、耐逆性和酶活性测定等 133 个表型性状分析。发现分离自同种寄主植物的根瘤菌由于地理来源的不同而存在着较大的多样性。通过数值分类 , 各已知种分别聚群 , 41 株未知菌在 85% 的相似水平上分为 3 个不同于已知种的群。群 1 的菌株主要分自苜蓿 , 群 2 的菌株主要分自草木樨 , 群 3 的菌株分自锦鸡儿 , XJ96 333(寄主为 *Melilotus*) 作为 1 个单株在 84% 的相似水平上和群 1 聚在一起。NM 020(寄主为 *Caragana*) 在 88% 的相似水平上和 *R. leguminosarum* 聚在一起 ; NM 183、NM 218(寄主为 *Caragana*) 在 86% 的相似水平上和 *S. fredii* 聚在一起 ; 在 67% 的相似水平上 , XJ96 482(寄主为 *Medicago sativa*) 和其它所有供试菌株聚群。群 1、2、3 的所有菌株能在含 2.0%(340 mM) NaCl 的 YMA 培养基上、pH 9.0 的 YMA 培养基、40℃ 的高温下生长 ; 群 3 的所有菌株还能在含 3.0%(510 mM) NaCl 的 YMA 培养基上生长 , 群 1 中 90% 的菌株和群 2、3 的所有菌株能在 10℃ 的低温下生长。表明群 1、2、3 的菌株具有较强的耐盐碱、耐高低温的特性。和已知种 *S. meliloti* 具有相同寄主的群 1、群 2 在 85% 相似水平上未和 *S. meliloti* 聚群 , 表现了这两群菌在表型上的多样性。

关键词 根瘤菌 , 表型性状 , 多样性

Phenotypic feature diversity of Rhizobia isolated from *Medicago* sp. , *Melilotus* sp. and *Caragana* sp. /
YAN Ai-Min , CHEN Wen-Xin

Abstract 133 phenotypic features (nutrition utilization , antibiotic resistance , tolerance to NaCl and alkali , enzyme activity) of 48 strains isolated from *Medicago* sp. , *Melilotus* sp. , *Caragana* sp. , growing in arid regions , were analyzed. The result shows that there are great diversities among strains isolated from the the same hosts growing in different geographic origin. Through the numerical taxonomy , 41 unknown strains are clustered into three new groups , at the similarity level of 85% . The main host plant of strains in group 1 is *Medicago* , the main host plant of strains in group 2 is *Melilotus* , the host plant of strains in group 3 is *Caragana* . XJ96 333(the host plant is *Melilotus*) was clustered with group 1 at the similarity level of 84% . NM 020(the host plant is *Caragana*) was clustered into *R. leguminosarum* at the similarity level of 88% . NM 183 and NM 218 (the host plant is *Caragana*) were clustered into *S. fredii* at the similarity level of 86% . XJ96 482 (the host plant is *Medicago sativa*) was clustered with other examined strains at the similarity of 67% . Strains in group 1 2 and 3 can grow on YMA with 2.0% (340 mM) NaCl pH 9.0 and in 40℃ . Strains in group 3 can also grow on YMA with 3.0% (510 mM) NaCl. 90% of strains in group 1 and all strains in group 2 3 can grow at 10℃ , which shows that all examined strains of group 1 2 3 are resistant to NaCl and alkali , low temperature and high temperature. Group 1 and Group 2 shared a similarity of lower than 85% with *S. melioti*. This shows phenotypic feature diversity of strains in the group 1 and group 2.

Key words *Rhizobium* , phenotypic feature diversity

Author 's address China Agriculture University , Biological College , Beijing 100094

根瘤菌是一类能侵染豆科植物根部形成根瘤进行生物固氮的革兰氏阴性细菌。由于其与豆科植物的共生固氮作用,对根瘤菌资源和其固氮机理的研究逐步广泛和深入。特别是在根瘤菌资源研究方面,新的属、种不断被发现。到目前为止,已发表的根瘤菌由 1984 年的 2 属 4 种增至 6 属 20 种。近年来的研究表明许多分离自相同寄主植物的根瘤菌表现出很大多样性。如苜蓿根瘤菌,早在 1932 年 Fred 就以互接种族为基础将能在苜蓿、草木樨、胡卢巴属植物间实现互接的根瘤菌定为苜蓿族^[1]。1964 年,Graham 首先用数值分类的方法分析根瘤菌,苜蓿根瘤菌为 1 个独立的表观群,为 1 个独立的种,命名为 *R. meliloti*。1988 年陈文新对主要在中国分离的快生型大豆根瘤菌进行研究,确定了一个新属 *Sinorhizobium*^[2]。1994 年 de Lajudie 根据系统发育分析将 *R. meliloti* 更名为 *Sinorhizobium meliloti*^[3]。近年来,对苜蓿根瘤菌进行了广泛和深入的研究。Eardly B D 等得到了能在豌豆上结瘤的苜蓿根瘤菌^[4,5],1990 年,他们利用多位点酶电泳法对 232 株苜蓿根瘤菌进行了分类研究。通过对 15 种酶的电泳分析,并用其中 13 种酶的电泳结果作了聚类分析,将 *S. meliloti* 分为 A 和 B 2 个群^[6]。Rome S 等利用表型和 16Sr DNA 序列分析对分离自不同地理来源的几种一年生苜蓿植物的根瘤菌进行了分类研究,建立了 1 个新种 *S. medicae*^[7]。苜蓿和草木樨是新疆重要的牧草和绿肥,抗旱、抗寒、耐瘠薄、对土壤条件要求不严,目前在新疆广泛种植的苜蓿属植物有 6 种,草木樨属植物有 3 种^[8]。锦鸡儿属植物有 100 余种,我国产 62 种、9 变种、12 变型^[9]。在新疆本属植物有 26 种,已调查结瘤的有 9 种。本属植物的固沙、保水性能都很强。枝、叶、花、果实含有丰富的营养物质,也具有较高药用价值^[8]。对此属植物根瘤菌的研究少有报导。本文以采自新疆、内蒙干旱地区的苜蓿、草木樨、锦鸡儿根瘤菌为材料,对菌株的表型性状进行了分析,并采用数值分类的方法进行了聚群。以期发现具有特异表型性状的种群。

1 材料和方法

1.1 选用从我国新疆、内蒙的苜蓿属、草木樨属、锦鸡儿属植物根瘤新分离纯化并经回接原寄主结瘤的菌株 48 株与已知参比菌 22 株,共 70 株菌进行分析。参比菌株部份来自 USDA, CNPBS, NZP, CCBAU, HAMBI。

1.2 性状测定:

对 70 株菌进行了耐盐性,生长温度,生长的 pH 值范围,过氧化氢酶、脲酶、L-苯丙氨酸脱氨酶、氧化酶,YMA 培养基上产酸、产碱反应,3-酮乳糖产生,石蕊牛奶反应、亚甲蓝还原,尼儿蓝还原,硝酸盐还原,肉汤生长等项测定。唯一碳源利用试验选用已二酸,D-苦杏仁苷,D-阿拉伯糖,D(+)阿糖醇,葡萄糖酸钙,丙二酸钙,糊精,半乳糖醇,内消旋赤藓糖、果糖,D(+)半乳糖,葡萄糖,肌醇,菊糖,乳糖,苹果酸盐,麦芽糖,D-甘露糖,松三糖,密二糖,丙酮酸盐,棉子糖,鼠李糖,D-核糖,水杨苷,乙酸钠,柠檬酸钠,甲酸钠,葡萄糖酸钠,马尿酸钠,琥珀酸钠,D-山梨糖醇,山梨糖,淀粉,蔗糖,丁香酸,酒石酸盐,海藻糖,香草酸,木糖,D-精氨酸,DL-天冬酰胺,甘氨酸,L-甲硫氨酸,DL-脯氨酸,L-苏氨酸等 46 种含碳化合物。唯一氮源利用试验选用 DL-丙氨酸,L-精氨酸,L(-)天冬氨酸,L-胱氨酸,D-谷氨酸、L-谷氨酸,L-异亮氨酸,L-赖氨酸,L-甲硫氨酸,L-苯丙氨酸,D-苏氨酸,D-缬氨酸等 12 种含氮化合物。碳氮源的浓度均为 0.1%。抗生素敏感性选用氨苄青霉素,杆菌肽,氯霉素,红霉素,卡那霉素,新霉素,多粘菌素,链霉素共 8 种,均采用 5、50、100、300μg/ml 浓度试验。对染料和化学药物的耐受性采用盐酸丫啶,俾士麦棕,溴百里酚蓝,刚果红,藻红,龙胆紫,亚甲蓝,甲基绿,中性红,脱氧胆酸钠,亚硝酸钠等 9 种染料和 2 种化学药物,以 0.1%(W/V)的

终浓度加入 YMA 培养基中。测定方法均同文献^[10]。

1.3 聚类分析性状编码,聚类方法按以前描述^[2]。类平均连锁法(UPGMA)聚类。

图 1 数量分类树系图
Fig. 1 Phenogram

2 结果与讨论

2.1 供试未知菌株的一般性状分析

本研究共使用未知菌 48 株 ,其中分自苜蓿的根瘤菌 27 株 ,分自草木樨的根瘤菌 14 株 ,分自锦鸡儿的根瘤菌 7 株 ,未知菌株均进行了纯化和回接试验。全部供试菌株均为革兰氏阴性、无芽孢、小杆状、大小为 $0.5 \sim 0.8 \times 1.5 \sim 3.0 \mu\text{m}$ 。在 YMA 平板上 3 天左右长出单菌落 ,菌落呈圆形、乳白色或半透明、边缘整齐、表面凸起、菌体产粘液。回接试验证明 ,供试菌株均能在相应原寄主上结瘤。苜蓿、草木樨上结的瘤子为圆形、长棒状、分枝状 ,长 $5 \sim 6 \text{ mm}$ 左右 ,颜色为红褐色 ,结瘤时间不等 ,最早 9 天结瘤 ,锦鸡儿上结的瘤子为椭圆形 ,长 8 mm ,颜色为白色 ,菌株的最适生长温度是 $25 \sim 30^{\circ}\text{C}$ 。最适生长的 pH $6.8 \sim 7.2$ 。

2.2 数值分类结果及各群菌株的一般性状分析

对所测定的 133 项表型性状数据 ,去除 29 项全同性状 ,采用平均连锁法进行聚类分析。在 85% 的相似性水平上 ,已知菌株基本按种分群 ,未知菌中有两株分自锦鸡儿的菌 NM 183、NM 218 在 86% 的相似水平上和 *S. fredii* 聚在一起 ;NM 020 在 88% 的相似水平上和 *R. leguminosarum* 聚在一起 ;NM 178 在 84% 的相似水平上和群 3 聚在一起 ;XJ96 333 在 84% 的相似水平上和群 1 聚在一起 ;XJ96 557 在 82% 的相似水平上和群 3 聚在一起 ;在 67% 的相似水平上 ,XJ96 482 和其它所有供试菌株聚群。其余 41 株菌分别聚为 3 个不同于已知种的群 1 ,2 ,3 (见图 1)。

2.3 鉴别特征的选择

从已分好群的菌株中找出出现频率 $\geq 95\%$ 的特征为鉴别特征 ,即该群 95% 以上的成员均表现为正反应的特征记为“ + ” ,均表现为负反应的特征记为“ - ” ,出现频率介于 $6\% \sim 94\%$ 的特征记为“ d ”(表 1)。

表 1 各已知种和新群的鉴别特征
Table 1 Distinctive characteristics of new groups and known rhizobium species

性状特征 \ 种 名	1	2	3	I	F	G	H	A	E	C	D	B	M	L	J	K
碳源利用																
D-Amygdalin	d	-	d	-	-	+	+	d	+	-	-	-	+	-	-	-
D-Arabinose	+	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	d
Calcium gluconate	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	d	-	+	-	-	-
Calcium malonate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Dulcitol	d	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Meso-erythritol	+	d	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-
Fructose	+	d	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	d
D(+)-galactose	+	d	+	-	d	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Glucose	+	d	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	d
Inositol	d	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-
Lactose	d	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Malate	d	-	d	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
Maltose	d	d	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
D-mannose	d	d	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	d
Melibiose	d	-	+	-	-	+	-	d	+	-	+	+	-	-	+	-

表 1(续) Table 1 (continued)

性状特征 名*	种	1	2	3	I	F	G	H	A	E	C	D	B	M	L	J	K
Pyruvate		-	-	d	-	d	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Raffinose		d	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Rhamnose		d	-	+	-	d	+	-	d	+	+	+	+	+	-	-	-
D-ribose		d	-	d	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Salicin		d	-	+	-	-	-	-	d	d	-	-	-	-	-	-	-
Sodium acetata		d	-	+	-	-	-	-	d	-	+	-	-	+	-	-	-
Sodium citrate		d	-	+	-	-	+	-	d	+	+	+	-	+	-	-	-
Sodium formate		-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Sodium gluconate		-	-	d	+	-	-	-	-	+	+	d	-	+	-	-	-
Sodium succinate		+	d	+	-	d	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
D-sorbitol		+	d	+	-	d	+	-	d	+	+	+	+	+	-	+	-
Sucrose		+	d	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
Trehalose		+	d	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
氮源利用																	
Xylose		+	d	+	-	d	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
DL-Asparacone		d	-	+	-	d	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Glycine		-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
DL-Proline		+	d	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	d
L-Cystine		+	d	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
D-Glutamic acid		d	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-iso-leucine		+	d	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
L-Lysine		+	d	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
L-Methionine		-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
L-phenylalanine		-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
D-Valine		-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
耐逆性																	
Ampicillin(5μg/ml)		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Ampicillin(50μg/ml)		d	d	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+
Ampicillin(100μg/ml)		d	d	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	d	+	+
Ampicillin(300μg/ml)		-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+
Chloramphenico(50μg/ml)		d	+	-	+	-	+	+	-	+	d	+	+	-	+	+	+
Chloramphenico(100μg/ml)		d	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	d
Erythromycin(300μg/ml)		+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Kanamycin(50μg/ml)		-	-	-	d	-	+	-	-	+	d	+	+	-	+	+	+
Polymyxin(5μg/ml)		-	-	d	+	d	+	+	+	d	d	+	+	+	+	+	+
Polymyxin(50μg/ml)		-	-	-	+	-	+	+	-	-	d	+	+	-	+	-	+
Polymyxin(100μg/ml)		-	-	-	+	-	-	+	-	-	d	+	+	-	-	-	+
Polymyxin(300μg/ml)		-	-	-	+	-	-	-	-	-	d	+	-	-	-	-	+
Streptomycin(50μg/ml)		d	-	+	d	d	-	+	+	+	d	+	+	-	+	+	+
Streptomycin(100μg/ml)		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
Streptomycin(300μg/ml)		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	d	+	-	-	-	-
Bismark Brown(0.1%)		d	-	+	-	d	+	+	+	+	d	+	+	-	+	+	+
Bromothymol Blue(0.1%)		d	d	d	d	+	+	-	+	+	d	+	+	d	+	+	+

表 1(续) Table 1 (continued)

性状特征 名*	种	1	2	3	I	F	G	H	A	E	C	D	B	M	L	J	K
Erythrosin(0.1%)		d	d	-	d	-	+	-	+	+	d	+	+	-	-	+	d
Gentian Violet(0.1%)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	+	-	d	d	-	-
Neutral red(0.1%)		-	-	+	d	-	+	-	-	+	d	+	-	-	-	+	d
Nac(2.0%)		+	+	+	d	+	-	-	+	-	d	d	-	-	+	-	-
Nac(3.0%)		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 9.0		+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
10 ℃		d	+	+	d	d	+	-	+	+	+	+	+	+	d	+	-
40 ℃		+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Urease 产生		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	+	+	+	-
Litmus milk acid coagulation		d	d	-	d	d	-	-	-	+	+	+	-	+	d	+	-
Litmus milk acid production		d	-	-	d	d	+	-	+	-	-	-	+	-	d	-	d
Litmus milk alkali production		d	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Litmus milk reduction		d	d	+	-	d	-	+	d	+	+	+	-	d	-	+	+
Methylene blue reduction		d	d	+	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Nitrate reduction		d	d	+	-	d	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Growth in peptone broth		+	+	+	d	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-

* 注 : I : *S. meliloti* , F : *S. fredii* , G : *S. teranga* , H : *S. saheli* , A : *R. leguminosarum* , E : *R. hainanense* C : *R. galegae* , D : *R. tropici* , B : *R. etli* , M : *M. huakuii* , L : *M. loti* , J : *M. ciceri* , K : *M. tianshanense* .

通过对菌株的耐逆性等表性性状的分析 ,可以看出 :群 1、2、3 的所有菌株能在含 2.0% (340 mM) NaCl 的 YMA 培养基上、pH 9.0 的 YMA 培养基、40℃ 的高温下生长 ;群 3 的所有菌株还能在含 3.0% (510 mM) NaCl 的 YMA 培养基上生长 ,群 1 中 90% 的菌株和群 2、3 的所有菌株能在 10 ℃ 的低温下生长。这些结果表明群 1、2、3 的菌株具有较强的耐盐碱、耐高低温的特性。从这些菌株的寄主植物来看 ,群 1 的 29 株菌有 22 株分离自苜蓿属植物 ,7 株分离自草木樨属植物。群 2 的 9 株菌有 3 株分离自苜蓿 ,6 株分离自草木樨属植物。而这两个群和具有相同寄主的已知种 *S. meliloti* 在 85% 的相似水平上并未聚群 ,只是在 73% 的相似水平聚在一起。群 3 的 3 株菌均分离自锦鸡儿属植物。锦鸡儿属植物为干旱地区极耐盐碱、耐高温低温的植物 ,值得一提的是所有其它供试菌株在含 3.0% (510 mM) NaCl 的 YMA 培养基上均不生长 ,而这一群的 3 株菌在含 3.0% (510 mM) NaCl 的 YMA 培养基上则能生长 ,表现出这群菌的特异性。

从这些菌株的地理来源来看 ,群 1 的 29 株菌有 17 株菌分离自吐鲁番干旱地区 ,4 株菌分离自东湾山地 ,8 株菌分离自石河子地区的沙湾、乌兰乌苏。群 2 的 9 株菌有 3 株菌分离自吐鲁番干旱地区 ,2 株菌分离自东湾山地 ,4 株菌分离自石河子地区的沙湾、乌兰乌苏。新疆吐鲁番地区海拔为 -95 ~ -76 m ,土壤 pH 为 8.6 ~ 9.1 ,最高温度 47.6 ℃ ,年平均降水量为 16.4 mm ,年平均蒸发量为 3000 mm。东湾为一山区 ,不宜农作物种植 ,石河子地区的沙湾、乌兰乌苏等地尽管现在为一重要农业垦区 ,而过去此地区土壤盐碱化非常严重 ,从以上表型分析可以看出 ,此地区分离的根瘤菌仍保持其耐盐碱、耐高温低温的“土著”特性。群 3 的 3 株菌分离自内蒙干旱地区。这些生态环境的特殊性 ,使得此环境中与豆科植物共生的根瘤菌在表型性状也表现特异。环境影响表型 ,进而导致种群的多样。这进一步证实了环境条件对根瘤菌分类地位的影响大于寄主专一性的影响。此项研究也表明 ,分离自干旱地区的苜蓿、草木樨、锦鸡儿根瘤菌在表型上具有多样性 ,对这类固氮生物资源进行研究 ,对开发利用抗逆菌株

有重要的意义。

参 考 文 献

1 Fred E B ,Baldwin I L ,McCoy E. Root nodule bacteria and leguminous plant. Madison :University of Wisconsin press ,1932

2 Chen W X ,Yan G H ,Li J L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobium and proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int. J. syst. bacteriol.* ,1988 ,**38**(4) 392 ~ 397

3 De Lajudie P A. Willems B Pot et al. Poloyphasic taxonomy of rhizobia : emendation of the genera *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. Nov , *Sinorhizobium saheli* sp. nov. , and *Sinorhizobium teranga* sp. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* ,1994 ,**44**(2) :715 ~ 733

4 Eardly B D ,Hannaway D B ,Bottomley P L J. Characterization of *rhizobium* from ineffective alfalfa nodules : ability to nodulate bean plants *phaseolus vulgaris* (L.) Savi. *Applied and Environmental Microbiol.* ,1985 ,**50** :14 ~ 22

5 Eardly B D ,Young J P W ,Selander R K. Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. strain or 191 , a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris* ,base on partial sequence of the 16 *sRNA* and *nifH* genera. *Applied and Environmental Microbiol.* ,1992 ,58 :1809

6 Eardly B D ,Materon L A ,Smith N H et al . Genetic structure of natural population of the nitrogen-fixing *Bacterium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiol.* ,1992 ,**56** :187

7 Rome S ,Fernandez M P ,Brunel B et al. *Sinorhizobium medicae* sp. nov. , isolated from annual *Medicago* spp. . *Int. J. Syst. Bacteriol.* ,1996 ,**46**(4) :972

8 关桂兰 ,王卫卫 ,杨玉锁. 新疆干旱地区固氮生物资源 ,北京 :科学出版社 ,1991. 10 ~ 19

9 傅坤俊 ,张振万 ,何善宝等. 中国植物志. 北京 :科学出版社 ,1993 ,**42**(1) :17 ~ 65

10 Chen W X ,Li G S ,Qi Y L et al. *Rhizobium huakuii* nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* ,1991 ,**41**(2) 275 ~ 280