

β -根瘤菌及特殊 α -根瘤菌的研究概况

刘晓云^{1,2}, 陈文新², 张斌³

(¹河北大学生命科学学院, 保定 071002) (²中国农业大学生物学院, 北京 100094)

(³西南林学院保护生物学学院, 昆明 650224)

摘要: 隶属于 β -变形杆菌纲 (proteobacteria) 的根瘤菌, 人们简称为 β -根瘤菌。本文通过对分离自含羞草根瘤隶属于 *Burkholderia* 和 *Cupriavidus* 的 β -根瘤菌及归于 *Blastobacter*、*Ochrobactrum* 和 *Phyllobacterium* 等特殊 α -根瘤菌的研究总结, 介绍了根瘤菌生物多样性研究的新进展。同时, 简述了根瘤菌共生基因的进化研究, 并对该研究领域存在的问题进行了分析, 对未来相关研究方向做了展望。

关键词: β -根瘤菌; α -根瘤菌; 含羞草; 共生基因

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 10-1408-05

根瘤菌是一类重要的固氮微生物, 它与豆科植物形成共生关系, 将空气中分子态氮转化为植物可利用的化合态氮; 这一共生关系使结瘤豆科植物成为自然生态系统中生物N源的主要贡献者。根瘤菌的分类研究已有100多年历史, 随着异根瘤菌属 (*Allorhizobium*) 的建立, 根瘤菌被划分在细菌门 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 (*Allorhizobium*)、慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*) 和固氮根瘤菌属 (*Azorhizobium*) 等6个属。

2001年, 法国科学家发现分离自猪屎豆类植物 (*Crotalaria glaucoides*, *Crotalaria perrottetii* 和 *Crotalaria podocarpa*) 的11株菌株隶属甲基杆菌属 (*Methylobacterium*), 通过固氮活性、交叉结瘤试验和结瘤基因检测研究验证为根瘤菌。甲基杆菌属 (*Methylobacterium*) 隶属于 α -变形杆菌纲, 是以非共生细菌建立的属, 以前未发现有根瘤菌类群的存在^[1]。同年, 隶属于 β -变形杆菌纲 (proteobacteria) 的根瘤菌菌株 STM678 和 STM815 以及诺尔斯通根瘤菌 (*Ralstonia taiwanensis*) 的报道^[2], 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。研究者将隶属于 α -变形杆菌纲 (proteobacteria) 和 β -变形杆菌纲的根瘤菌, 分别称为 α -根瘤菌和 β -根瘤菌。此外, 根瘤菌菌株也被发现尚隶属于非共生细菌建立的 α -变形杆菌纲 *Devosia*、*Herbaspirillum*、*Blastobacter*、*Ochrobactrum* 和 *Phyllobacterium* 等属^[3-7]。

这些新近发现存在 α -根瘤菌和 β -根瘤菌的细菌属群, 其共同特点是属内包括的细菌种群不全是根瘤菌, 属分类单元也不是以根瘤菌为模式种建立的; 而已有的6个根瘤菌属所包括的细菌种类基本上都是根瘤菌 (*Bradyrhizobium betae* 例外^[8]), 也均是以根瘤菌为模式种建立的属分类单元。因此, 与已有6个根瘤菌属的类群相比, 这些新发现的根瘤菌类群较为特殊, 在该综述中将其暂称为特殊根瘤菌。以下将展开对这些研究的介绍和分析总结。

1 β -根瘤菌的研究

1.1 有关含羞草的 β -根瘤菌的研究

菌株 STM678 和 STM815 为首次报道的 β -根瘤菌。分离自植物 *Aspalathus* (来自于南非的一种豆科

灌木)和军刀豆属植物(*Machaerium* spp.)的根瘤,经研究,归于细菌变形杆菌门 β -变形杆菌纲伯克霍尔德菌属(*Burkholderia*),并经回接试验及结瘤基因*nodA*突变检测证实为根瘤菌菌株,具有固氮活性^[1];台湾诺尔斯通菌(*Ralstonia taiwanensis*)是分离自含羞草植物的根瘤菌,经过序列分析确定的隶属于 β -变形杆菌纲的新种^[9]。为了进一步证实*Ralstonia taiwanensis*菌株共生的有效性,研究者进行了该菌株的荧光蛋白(GFP)标记侵染试验和固氮酶活的测定,证实了菌株的共生固氮和结瘤特性^[10]。菌株 STM678 和 STM815 后被确定为*Burkholderia*的2个新种—瘤状伯克霍尔德菌*B. phymatum* STM815 和肿块伯克霍尔德菌*B. tuberum* STM678^[11]。

随着对含羞草类植物根瘤菌的研究, β -根瘤菌不断被揭示^[12-16]。通过对含羞草类植物(*M. pudica*、*M. diplotricha*、*M. bimucronata*、*M. scabrella*、*M. casta*和*M. pigra*)的研究,发现根瘤菌大多数归属于*Burkholderia*,有些与*Cupriavidus taiwanensis*亲缘关系比较近,个别分离物被确认为是已知种*B. caribensis*,而该种以前被记载是没有结瘤特性的。在这些研究中,对分离的根瘤菌菌株普遍进行了结瘤基因*nodA*和固氮基因*nifH*检测以及根瘤菌侵入植物根部试验,对共生关系进行了验证。经进一步的分类研究,Chen等将分离自巴西的含羞草植物的根瘤菌确认为根瘤伯克霍尔德菌*Burkholderia nodosa*^[17],将分离自台湾和南非的含羞草类入侵植物*M. pigra*的根瘤菌确认为含羞草伯克霍尔德菌*Burkholderia mimosarum*^[18](*Ralstonia*后被正名为*Cupriavidus*^[19])。此外,Parker的研究发现^[20],分离自澳大利亚的入侵植物—*Mimosa pigra*根瘤的菌株与来自于其原始分布地中美洲、分离自其原始分布地中美洲该植物根瘤的菌株都归于*Burkholderia*。

1.2 有关菜豆 β -根瘤菌的研究

草螺菌属(*Herbaspirillum*)是以固氮细菌*Herbaspirillum seropedicae*建立的属,属内包括的类群大多数是固氮细菌,隶属 β -变形杆菌纲,是植物内生菌,多见于禾本科植物和豆科植物。Valerde等^[4]从葡萄牙的菜豆根瘤中分离到了隶属这个属的6株细菌,经研究发现与该属其它细菌种类具有区别,并确定为新种*Herbaspirillum lusitanum*。通过回接试验该菌株可以结瘤,但缺乏对根瘤再分离菌株的验证研究,也缺乏固氮特性及结瘤基因检测的研究,所以,

这类菌株还有待做进一步的根瘤菌验证研究。

2 特殊 α -根瘤菌的研究

2.1 结瘤甲基杆菌(*Methylobacterium nodulans*)

结瘤甲基杆菌(*Methylobacterium nodulans*)是目前唯一能与豆科植物结瘤的甲基杆菌属的种。甲基杆菌属(*Methylobacterium*)构成了根瘤菌系统发育的第四分支。

2.2 戴沃斯菌属新种*Devosia neptuniae*

*Neptunia natans*是一种水生假含羞草属的植物,对其根瘤菌的研究建立了异根瘤菌属(*Allorhizobium*)^[21]。Rivas再次对该植物的新采集根瘤样品进行研究时,发现其根瘤分离菌株归于戴沃斯菌属(*Devosia*),后经*nodD*和*nifH*研究验证了与植物的共生关系,并经分类地位的研究,将结瘤共生固氮的菌株,确定为新种*D. neptuniae*^[3,22]。

2.3 脱氮芽生杆菌(*Blastobacter denitrificans*)

脱氮芽生杆菌(*Blastobacter denitrificans*)与慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium*),阿菲波菌属(*Afipia*),硝化杆菌属(*Nitrobacter*)和红假单胞菌属(*Rhodopseudomonas*)等位于变形杆菌门的一个系统分支,只有慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium*)可以共生结瘤固氮。根据van Berkum等^[5]的研究发现,一些从植物合萌(*Aeschynomene indica*)上分离的细菌与脱氮芽生杆菌(*Blastobacter denitrificans*)关系密切,发现该属的模式菌株脱氮芽生杆菌(*Blastobacter denitrificans*)能够共生结瘤固氮,通过ITS序列研究发现,回接试验结瘤菌株与接种菌株图谱是一致的。

2.4 羽扇豆苍白杆菌(*Ochrobactrum lupini*)

羽扇豆是小型的灌木和禾本类植物,以往发现的羽扇豆根瘤菌与大豆慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)亲缘关系近。最近研究发现^[6],分离自羽扇豆(*Lupinus honoratus*)根瘤的两株菌株归于为苍白杆菌属(*Ochrobactrum*),并发现该菌具有3个质粒,共生基因*nodD*,*nifH*基因位于这些质粒上。苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)属隶属于布鲁氏菌科(*Brucellaceae*)、根瘤菌目、与根瘤菌科的亲缘关系较近。

2.5 三叶草叶瘤杆菌(*Phyllobacterium trifolii*)

三叶草根瘤菌在应用方面的研究较多,作者近期的研究结果发现^[23],分离自三叶草的根瘤菌归于慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*),中慢根瘤菌属(*Mesorhizobium*)及中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*),而西班牙学者Valerde^[7]分离得到一株来自三叶草根瘤的菌株,经研究隶属叶瘤

菌属 (*Phyllobacterium*), 并扩增得到了 *nodD* 基因序列, 发现该基因序列与羽扇豆共生的菌株羽扇豆苍白杆菌 (*Ochrobactrum lupini*) 的基因序列相似。而且, 后经交叉结瘤实验, 发现也能与羽扇豆 (*Lupinus albus*) 共生结瘤, 并确定了新种三叶草叶瘤杆菌 (*Phyllobacterium trifolii*)。

3 特殊根瘤菌形态特点及共生基因研究

3.1 形态

根瘤菌一般是革兰氏阴性的, 形状为杆状, 细胞内具有 β -羟丁酸颗粒。新近发现的这些特殊根瘤菌的形态与已有 6 个属的根瘤菌有所不同, 如羽扇豆苍白杆菌 (*Ochrobactrum lupini*) 细菌个体形状是宽椭圆形, 极生鞭毛; 而草螺菌属新种 *Herbaspirillum lusitanum* 的个体细胞弯曲, 细胞也较小; 脱氮芽生杆菌 (*Blastobacter denitrificans*) 的个体细胞是芽殖型的, 细胞上还有一附属物, 可形成一个簇状的结构。由特殊根瘤菌的研究现状可知, 根瘤菌的生存环境和种类也是十分复杂多样的, 据报道隶属根瘤菌属 (*Rhizobium*) 的根瘤菌菌株尚发现存在于罗汉松根瘤内^[24], 这个发现打破了根瘤菌与豆科或榆科植物共生的宿主范围, 该菌株已被证实具有和原宿主共生的特性。所以在进行根瘤菌分离研究时, 不要被已有根瘤菌 6 个属的类群特点所束缚, 应对根瘤中出现的所有细菌类群进行详细而深入的研究, 这样才能有新的发现。

3.2 共生基因

在这些特殊根瘤菌中, 对隶属 *Burkholderia* 属根瘤菌类群的共生基因研究较多, 发现 *Burkholderia* 根瘤菌的固氮基因 *nifH* 和结瘤基因 *nodA* 同时位于一个 0.5 mb 的质粒上^[12]。来自南非的含羞草植物根瘤菌的研究结果发现^[13], β -根瘤菌与已知的 α -根瘤菌的 *nodA* 基因序列同源性高, 即亲缘关系较近; 经过对根瘤菌所有属结瘤基因 *nodA* 的扩增和序列研究比较发现, 在 *nodA* 序列所反映的系统发育关系上, 也发现 β -根瘤菌与 α -根瘤菌关系颇为密切, 支持 *nodA* 是在两种根瘤菌间进行转移的假设; 并发现菌株 *R.taiwanensis* LMG19424 与 *B.caribensis* TJ182 的 *nodA* 序列相似性很大, 达到 97.4%, 推测 *nodA* 也同时可能在 β -根瘤菌间进行转移^[13]。

由 *nifH* 序列所构成的系统发育关系反映出, β -根瘤菌与自生固氮菌亲缘关系较近, 而与 *nodA* 所揭示的亲缘关系有所不同。譬如, 菌株 *B.tuberum* 在 *nodA* 序列构建的系统发育树中与 α -根瘤菌 *M.nodulans* 聚在

一起, 但是在 *nifH* 序列构建的系统发育树中, 与其它 β -根瘤菌集聚在一起, 说明 *nifH* 和 *nodA* 基因可能具有不同的进化起源。在豆科植物出现 (70~130 万年) 以前, α -变形杆菌和 β -变形杆菌已分化成独立的分支, 有假设认为, 在根瘤菌分化时, 只有一支根瘤菌的类群获得了结瘤能力^[25, 26], 因此, β -根瘤菌的结瘤基因可能是通过水平基因转移获得的。虽然推断结瘤基因在 α -变形杆菌纲和 β -变形杆菌纲间的细菌转移或在 β -根瘤菌的菌株间转移, 但是, 尚不能证实结瘤基因是从 α -变形杆菌纲的根瘤菌菌株转移到 β -纲的根瘤菌菌株; 由结瘤和固氮基因同位于一个质粒上的事实推测, 这两个基因可能来源于共同转移。

4 总结与展望

4.1 总结

共生结瘤固氮是根瘤菌重要的生物学特性, 传统的根瘤菌验证方法是通过回接试验和固氮酶活的测定来检验, 由于所测菌株数量大, 重复性好, 所以作为根瘤菌的验证方法一直被沿用。但是 β -根瘤菌 (除 *Burkholderia* 和 *Cupriavidus* 类群外) 及特殊 α -根瘤菌的菌株数量存在较少, 有些甚至仅存在单个菌株, 而且常常与隶属根瘤菌属的根瘤菌类群共生, 以传统的验证方法进行检验, 存在重复性不足, 菌株不纯等问题。

我国对根瘤菌六个属外的特殊根瘤菌类群研究较为欠缺, 已报道的仅见作者研究发现的一株分离自我国云南含羞草植物上的一株隶属 β -变形杆菌纲的根瘤菌菌株, 该菌株是经过回接结瘤试验、回接试验的结瘤菌株与待验证菌株的全细胞蛋白分子图谱对比等研究而确定为根瘤菌。在此基础上, 我们从云南省版纳及德宏等地区大量采集含羞草根瘤, 经过分离获得的细菌类群大多数隶属于 β -变形杆菌纲, 现已经过结瘤和固氮基因研究, 回接试验及蛋白图谱的检测试验, 初步确定为根瘤菌, 并拟采用 GFP 分子标记的菌株进行植物的侵染过程研究。由于作者一直从事于该方面的研究工作, 较为关注分离自植物根瘤的特殊细菌类群的研究, 也发现了一些问题, 在此提出以供探讨。

自根瘤内分离的菌株有些可能是根瘤菌, 有些不是根瘤菌; 对于可能为根瘤菌的菌株, 需要经过可靠的验证研究加以证实。因此, 如何进行有效验证根瘤菌是应该解决的关键问题。根据现今发表的文章报道来看, 令人信服的根瘤菌验证方法包括两个主要方面:

首先, 验证菌株的结瘤特性及验证结瘤后再分离

菌株与待验证菌株的一致性。待验证菌株经过回接试验验证结瘤后,对结瘤固氮的根瘤进行再分离,通过获得的再分离菌株与待验证菌株进行遗传图谱或DNA分子序列的映证研究;或者对待验证菌株进行分子标记,通过侵染植物的研究,观察其侵入途径和在根瘤内的定殖,以证实是该菌株与植物建立的共生关系,并形成共生结构—根瘤;

第二,验证菌株的固氮特性,即对固氮酶活的测定或对固氮基因 *nifH* 的检测研究,以证实菌株的固氮功能。这些新发表的根瘤菌菌株普遍被进行了结瘤基因 *noda* 的检测,这是对菌株的共生结瘤特征作进一步的验证。

在已总结分析的特殊根瘤菌中, *Burkholderia* 和 *Cupriavidus* 类群的菌株对植物的共生感染过程得到了研究证实,并对其共生基因也进行了较详细研究;脱氮芽生杆菌 (*Blastobacter denitrificans*) 是经过回接试验,对分离的回接结瘤菌株与待验证菌株进行 ITS 图谱一致性检验证实的;而隶属戴沃斯菌属 (*Devosia*) 的根瘤菌、结瘤甲基杆菌 (*Methylobacteria nodulans*)、羽扇豆苍白杆菌 (*Ochrobactrum lupini*) 和三叶草叶瘤杆菌 (*Phyllobacterium trifolii*) 均经过共生基因的检测而确定为根瘤菌;但草螺菌属的根瘤菌新种 *Herbaspirillum lusitanum* 仍是沿用传统的回接试验确定为根瘤菌的,应进行较完整的根瘤菌证实研究,以解除研究者的疑惑。

随着对根瘤菌研究的细化和深入,根瘤内发现了许多非根瘤菌的细菌类群,有些研究者误以为这些细菌类群也是根瘤菌。这些细菌类群不是由分离污染或根瘤腐败所致,而是一类根瘤内的微生物类群,常见为肠杆菌,研究者将其暂且归于内生菌的范畴^[27]。这方面, Benhizia 等^[28]的研究工作更加系统一些,他们发现分离自岩黄芪属植物根瘤的细菌类群隶属于 γ -变形杆菌纲的肠杆菌 (*Enterobacteri*),埃希氏菌 (*Escherichia*) 及假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) 等属群。后续研究揭示,这些非根瘤菌类群不能成功进行结瘤,用扩增 16S rDNA 的方法检测到了根瘤菌的存在,但是这些根瘤菌不能培养存活。此外,在前人的研究中,不难发现根瘤内存在有较多种类的内生细菌, Muresu 等^[29]对这方面的研究做了文献总结,他们认为根瘤内的这些细菌类群是内生菌。我们在进行根瘤菌的分离研究中也发现了大量非根瘤菌细菌的存在,而且,经过初步研究有些菌株具有固氮基因(结果未发表),同时,我们也发现这些细菌类群分离自成熟或健康的根瘤,说明这些类群不是因为根瘤的衰败而进入植物根瘤。

在进行根瘤菌分离研究中,也出现了大量的土壤杆菌。有研究发现^[30],土壤杆菌是在根瘤菌侵染植物的过程中,随根瘤菌的侵染而进入植物根部的,并随着植物根瘤的发育而定植在根瘤内。但是有关肠杆菌是如何进入到植物根瘤的,尚未进行专门的研究,猜测可能与土壤杆菌类似,是随着根瘤菌的侵染而进入植物根部,并最后出现在植物根瘤内。

4.2 展望

经过以上的研究分析,我们可知在植物根瘤内,不仅存在着能够结瘤固氮的根瘤菌,也存在相当数量的非根瘤菌细菌类群,有些为内生菌,有些研究者认为是内生共生菌。所以对根瘤菌的验证和对这些非根瘤菌细菌类群的认识有助于深入研究植物和微生物的互作机制。

特殊根瘤菌的发现,使根瘤菌的分类范围扩大到了 β -变形杆菌纲,也扩大了根瘤菌生存的环境范围。这些特殊的根瘤菌与已有根瘤菌6个属群的亲缘关系密切,其同属的其它种类多数也能够固氮,有些也是环境污染物降解的菌群。早在 β -根瘤菌被发现以前,根瘤菌在环境污染物降解方面的研究已有报道,这些无疑给特殊根瘤菌在这方面的研究提供了理论借鉴和依据;由于特殊根瘤菌的特殊分类地位,其共生基因的转移和获得机制是研究者颇为感兴趣的问题,阐明这些问题将为构建工程根瘤菌菌株提供理论借鉴和科学方法。因此, β -根瘤菌的发现,对于基因转移、细菌适应进化机制及根瘤菌的工程菌菌株构建等研究具有重要意义。为此,国际上已开展对两个 β -根瘤菌菌株 *B. phymatum* STM815 和 *Cupriavidus Taiwanensis* MG19424[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>] 的全基因组测序研究。此外,这些特殊根瘤菌的研究将深化根瘤菌在分子遗传学方面的研究探索,尤其 β -根瘤菌的共生基因的组织结构及物理图谱等遗传学基础研究在国际上尚未启动,如果我们国家在该领域能够给与支持,首先展开研究,将有可能提升我国根瘤菌在国际上的研究水平和地位。

参 考 文 献

- [1] Sy A, Giraud E, Jourand P, et al. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183: 214–220.
- [2] Moulin L, Munive A, Dreyfus B, et al. Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. *Nature*, 2001, 411: 948–950.
- [3] Rivas R, Willems A, Subba-Rao NS, et al. Description of *Devosia neptunia* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. *Syst Appl Microbiol*, 2003, 26: 47–53.

- [4] Valverde A, Vela' zquez E, Gutie' rrez C, *et al.* *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, 53: 1979–1983.
- [5] van Berkum P, Eardly BD. The Aquatic Budding Bacterium *Blastobacter denitrificans* Is a Nitrogen-Fixing Symbiont of *Aeschynomene indica*. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(3): 1132–1136.
- [6] Trujillo ME, Willems A, Abril A, *et al.* Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71: 1318–1327.
- [7] Valverde A, Vela' zquez E, Ferna' ndez-Santos, F. *et al.* *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55: 1985–1989.
- [8] Rivas R, Willems A, Palomo JL, *et al.* *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54: 1271–1275.
- [9] Chen WM, Laevens S, Lee TM, Coenye, *et al.* *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, 51: 1729–1735.
- [10] Chen WM, James EK, Prescott AR, *et al.* Nodulation of *Mimosa* spp. by the β -proteobacterium *Ralstonia taiwanensis*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2003, 16: 1051–1061.
- [11] Vandamme P, Goris J, Chen WM, *et al.* *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov. nodulate the roots of tropical legumes. *Syst Appl Microbiol*, 2002, 25: 507–512.
- [12] Chen WM, Moulin L, Bontemps C, *et al.* Legume symbiotic nitrogen fixation by β -Proteobacteria is widespread in nature. *J Bacteriol*, 2003, 185: 7266–7272.
- [13] Chen WM, de Faria SM, Straliotto R, *et al.* Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel *Mimosa*-nodulating strains from South America. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71: 7461–7471.
- [14] Chen WM, James EK, Chou JH, *et al.* β -Rhizobia from *Mimosa pigra*, a newly discovered invasive plant in Taiwan. *New Phytol*, 2005, 168: 661–675.
- [15] Barrett CF, Parker MA. Prevalence of *Burkholderia* sp. Nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado Island, Panama. *Syst Appl Microbiol*, 2005, 28: 57–65.
- [16] Barrett CF, Parker MA. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium* sp. nodule bacteria on two *Mimosa* spp. in Costa Rica. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72: 1198–1206.
- [17] Chen WM, de Faria SM, James EK., *et al.* *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57: 1055–1059.
- [18] Chen WM, James EK, Coenye T, *et al.* *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56: 1847–1851.
- [19] Vandamme P, Coenye T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54: 2285–2289.
- [20] Parker MA, Wurtz AK, Paynter Q. Nodule symbiosis of invasive *Mimosa pigra* in Australia and in ancestral habitats: a comparative analysis. *Biological Invasions*, 2007, 9: 127–138.
- [21] De Lajudie, P, Laurent-Fullele, E, Willems, A, *et al.* *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *Int J Syst Bacteriol*, 1998, 48: 1277–1290.
- [22] Rivas R, Velazquez E, Willems A, *et al.* New species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 5217–5222.
- [23] Xiao Yun Liu, En Tao Wang, Ying Li and Wen Xin Chen. 2007. Diverse bacteria isolated from root nodules of *Trifolium*, *Crotalaria* and *Mimosa* grown in the subtropical regions of China. *Archives of Microbiology*, 2007, 188(1): 1–14.
- [24] 黄宝灵, 吕成群, 武波, 等. 一株分离自裸子植物罗汉松根瘤的根瘤菌. 中国科学 C 辑: 生命科学 (*Science in China, Series C: life Sciences*), 2007, 37(1): 52–57.
- [25] Hirsch AM, Lum MR, Downie JA. What makes the rhizobia-legume symbiosis so special. *Plant Physiol*, 2001, 127(4): 1484–1492.
- [26] Turner SL, Young JPW. The glutamine synthetase of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. *Mol Biol Evol*, 2000, 17(2): 309–319.
- [27] Kan FL, Chen ZY, Wang ET, *et al.* Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from root nodules of herbaceous legumes grown in Qinghai–Tibet plateau and in other zones of China. *Archives of Microbiology*, 2007, 188(2): 103–115.
- [28] Benhizia Y, Benhizia H, Benguedouar A, *et al.* Gamma Proteobacteria Can Nodulate Legumes of the Genus *Hedysarum*. *System Appl Microbiol*, 2004, 27: 462–468.
- [29] Muresu R, Polone E, Sulas L, *et al.* Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. *FEMS Microbiology Ecology*. 2008, 63: 383–400.

β -Proteorhizobia and nonrhizobial species—A review

Xiaoyun Liu^{1,2}, Wenxin Chen², Bin Zhang³

¹College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 100072 China)

²College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094 China)

³School of Conservation Biology, Southwest Forestry University, Kunming 650224 China)

Abstract: The terms α - and β -rhizobia were proposed to distinguish the rhizobial α - and β -Proteorhizobia respectively. In this review we present recent development of rhizobial taxonomy about β -rhizobia in the genus *Burkholderia*, *Cupriavidus* isolated from *Mimosa* and α -Proteorhizobia belonging to *Methylobacterium*, *Devosia*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium* and *Blastobacter lineage*. Furthermore, we also introduced the evolution of symbiosis related genes such as *nodA* and *nifH*, and posed some questions in detecting rhizobia. Finally, we discuss the prospects of research on rhizobia in future.

Keywords: β -rhizobia; α -rhizobia; *Mimosa*; symbiosis gene