

根瘤菌系统学研究进展与展望

陈文峰*

(中国农业大学生物学院暨中国农业大学根瘤菌研究中心 北京 100193)

摘要: 根瘤菌(Rhizobia)原指能与豆科植物共生固氮的革兰氏阴性细菌, 归属于变形杆菌门的 α -变形杆菌纲和 β -变形杆菌纲。近年来, 细菌系统学研究方法及大量新菌株的研究, 大大改变了根瘤菌的分类方法和分类系统。最新的分类体系中, 对 α -纲内的根瘤菌属(*Rhizobium*)进行了重新划分: 一部分种仍保留在根瘤菌属内, 新增了副根瘤菌属(*Pararhizobium*)和新根瘤菌属(*Neorhizobium*), 恢复并修订了土壤杆菌属(*Agrobacterium*)和其它根瘤菌属(*Allorhizobium*), 且所有属中都包括了共生和非共生的细菌。 α -纲内的中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)学名虽已被剑菌属(*Ensifer*)取代, 但在研究共生的细菌时, 前者的名称仍被广泛使用。在分类方法方面, 最重要的进展是全基因组序列测定及平均核苷酸一致性(ANI)已取代传统的DNA同源性分析。由于16S rRNA基因序列在根瘤菌系统发育中的保守性, 目前它多用于确定系统发育中属的分类地位, 而多基因序列分析、全基因组序列比较来确定种的分类地位已成为确定根瘤菌基因种的“黄金标准”。加上生理生化特性、脂肪酸、醌等的快速测定获得表型和化学分类数据, 使得近十年来根瘤菌的系统学快速发展。可以期待, 未来基于全基因组序列分析的根瘤菌分类系统将更趋稳定, 但大量的新种仍有待描述, 而这仍会导致建立一些新属, 或在原本不包括根瘤菌的细菌属内分离到一些共生固氮的种或菌株。另外, 药用豆科植物苦参与含有不同结瘤基因型的多种根瘤菌共生混杂性的发现, 突破了原来对共生专一性的认识, 为豆科植物与根瘤菌之间共生关系的研究开拓了新思路。

关键词: 根瘤菌, 豆科植物, 系统学, 生物固氮, 共生

Progress and perspective of systematics of rhizobia

CHEN Wen-Feng*

(College of Biological Sciences and Rhizobium Research Center, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: Originally, rhizobia refer to the legume-nodulating symbiotic Gram-negative bacteria, belonging to Class Alpha- and Beta-proteobacteria in Phylum Proteobacteria. Recently, the developments in systematic technology of bacteria and the studies of more novel isolates have greatly changed the taxonomy of rhizobia. In the newest classification, some species in the genus *Rhizobium* within Class Alphaproteobacteria have been reclassified: several species were maintained in

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31270052); Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 2016TC001)

*Corresponding author: Tel: 86-10-62734009; Fax: 86-10-62734008; E-mail: chenwf@cau.edu.cn

Received: December 01, 2015; **Accepted:** December 31, 2015; **Published online** (www.cnki.net): January 04, 2016
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31270052); 高等学校基本业务科研费(No. 2016TC001)

*通讯作者: Tel: 86-10-62734009; Fax: 86-10-62734008; E-mail: chenwf@cau.edu.cn

收稿日期: 2015-12-01; 接受日期: 2015-12-31; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-01-04

Rhizobium, while two novel genera, *Pararhizobium* and *Neorhizobium*, were proposed. In addition, two genera *Agrobacterium* and *Allorhizobium* were restored and re-amended. Both symbiotic and nonsymbiotic bacteria were included in these genera. Though the name of *Sinorhizobium* in Class Alphaproteobacteria has been replaced by *Ensifer*, the former is still being used widely especially in the studying of symbiotic bacteria. In relation to the systematic methodology, the most important development in the last decade is that whole genomic sequencing and average nucleotide identity (ANI) have been applied to replace the traditional DNA relatedness. Because of the higher conservation of 16S rRNA gene sequence in rhizobial phylogeny, it is usually used in determining the phylogenetic position in the level of genus. Combination of multilocus sequence analysis (MLSA) and whole genome sequencing ANI is now the “Gold Standard” for the definition of bacterial genospecies. Together with the rapid determination of phenotypic features, including biochemical characters, fatty acids and quinones, the systematics of rhizobia developed rapidly in the last decade. In future, the classification system of rhizobia based upon the sequence analysis of whole genome will be more stable, while novel species in some defined genera or corresponding to some new genera will be described when more nodule isolates are studies. Furthermore, the finding of symbiotic promiscuity between *Sophora flavescens*, a kind of medicinal legume, and various rhizobia harboring distinct nodulation genes, completely broke the knowledge of symbiotic specificity, facilitating the reconsideration of the symbiotic relationship between legumes and rhizobia.

Keywords: Rhizobia, Legumes, Systematics, Biological nitrogen fixation, Symbiosis

根瘤菌是一类革兰氏阴性细菌，其主要特征是与豆科植物共生固氮，但近年来的研究发现，许多非共生的细菌根据系统发育分析也归属到根瘤菌的范围内，使得根瘤菌既包括了共生固氮的细菌，也包括了非共生固氮的细菌。2001年，Moulin等^[1]发现分离自含羞草的根瘤菌的分类地位与传统观念上认为的归属于 α -变形杆菌纲的根瘤菌属(*Rhizobium*)、慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)、中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)等不同，而是归属到 β -变形杆菌纲的伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)和贪铜菌属(*Cupriavidus*)。近几年，随着DNA测序技术的进步，多基因序列分析和全基因组序列测定已广泛应用于包括根瘤菌在内的原核生物系统学研究当中。之前曾发现一株根瘤菌——*Sinorhizobium* sp. NGR234能与120个属的豆科植物共生；而最新的研究表明，一种药用豆科植物——苦参(*Sophora flavescens*)能与 α -纲和 β -纲的6个属超过30个种的根瘤菌共生，彻底改变了之前人们认为根瘤菌与豆科植物共生专一性认识。本文对近些年根瘤菌的系统学和分类学方面的研究做一综合分析和讨论，并展望未来的发展趋势。

1 根瘤菌的系统发育地位

根瘤菌归属于原核生物细菌域、变形杆菌门下的 α -变形杆菌纲和 β -变形杆菌纲。在 α -纲和 β -纲内，分别包括了1个目，总共17个属(表1)。查找某个属的分类纲要，可通过NCBI Taxonomy网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>)进行查找。在该网站上，输入关键词，如“*Rhizobium*”，就能查到它的分类谱系(Lineage)为：Root (根)→Cellular organisms (细胞生物)→Bacteria (细菌域)→Proteobacteria (变形杆菌门)→Alphaproteobacteria (α -变形杆菌纲)→Rhizobiales (根瘤菌目)→Rhizobiaceae (根瘤菌科)→*Rhizobium/Agrobacterium* group (根瘤菌属/土壤杆菌属类群)。

α -变形杆菌纲的根瘤菌在世界范围内都有分布，且是与多属种豆科植物共生固氮的优势根瘤菌。归属于 β -变形杆菌纲的伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)和贪铜菌属(*Cupriavidus*)，之前称为*Ralstonia*的根瘤菌，最初于2001年由Moulin等^[1]及Chen等^[2]提出，分离自热带地区的含羞草属植物，后来在菜豆属植物也发现有 β -变形杆菌纲根瘤

表 1 根瘤菌的系统发育地位及分类谱系
Table 1 Phylogenetic position and taxonomical lineage of rhizobia

纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus
Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	<i>Bradyrhizobium</i>
		Brucellaceae	<i>Ochrobactrum</i>
		Hyphomicrobiaceae	<i>Devosia</i>
		Methylobacteriaceae	<i>Methylobacterium, Microvirga</i>
		Phyllobacteriaceae	<i>Mesorhizobium, Phyllobacterium</i>
		Rhizobiaceae	<i>Rhizobium/Agrobacterium, Shinella, Sinorhizobium/Ensifer, Neorhizobium, Pararhizobium</i>
Betaproteobacteria	Burkholderiales	Xanthobacteraceae	<i>Azorhizobium</i>
		Burkholderiaceae	<i>Burkholderia, Cupriavidus</i>

菌存在^[3]。在 γ -变形纲内曾有人报道 *Pseudomonas* 能结瘤固氮^[4-5]，但还未被广泛公认。2014 以来，新提出的两个属为：新根瘤菌属(*Neorhizobium*)^[6]和副根瘤菌属(*Pararhizobium*)^[7]，均属于 α -变形杆菌纲。之前被归入到根瘤菌属的土壤杆菌属(*Agrobacterium*)和其它根瘤菌属(*Allorhizobium*)得以恢复^[6]。

当前要确认某个菌株究竟属于哪个纲、哪个属的根瘤菌的分类依据 16S rRNA 基因的系统发育。获得菌株的 16S rRNA 基因序列后，在 NCBI 网站(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)上进行序列比对，如果与某已知属的菌株的 16S rRNA 基因相似性大于及等于 97%以上，可初步确定供试菌株与已知菌种为同一个属；如果低于 97%，则可能代表一个新属^[8]。

2 根瘤菌结瘤基因的有无及根瘤菌的范畴

传统观念认为，根瘤菌要与豆科结瘤，必需具有结瘤基因，如 *nodABC* 基因等，以及能够合成结瘤因子^[9]。但 2007 年 Giraud 等的研究却发现，有两株光合慢生根瘤菌 BTAi1 和 ORS278，其基因组上没有常规的 *nodABC* 基因，也不能合成结瘤因子，但却能在一种热带豆科植物合萌属(*Aeschynomene*)上结瘤固氮^[10]。这一现象目前没有在更多的根瘤菌及豆科植物中发现，而且大多数根瘤菌仍然是依赖于结瘤基因才能与豆科植物建立共生关系^[11]。

没有结瘤基因但能结瘤的根瘤菌归属于根瘤菌的范畴是可以被理解的，而目前发现的一些细菌

没有结瘤基因且不能结瘤，但它们在系统发育地位上，仍然可归属于根瘤菌的范畴。这是因为根瘤菌的分类学和系统学不以结瘤固氮基因作为定属、定种的标准，而只是作为共生基因型。属种的分类地位依据是 16S rRNA 基因及持家基因分析。没有结瘤基因的根瘤菌，多数是从土壤或根际土壤内分离得到的，如土壤根瘤菌(*Rhizobium soli*)^[12]、恒河平原硫自养中慢生根瘤菌(*Mesorhizobium thioganicum*)^[13]等；也有从根瘤内分离到的，但不能结瘤的根瘤菌，如中国农大根瘤菌(*Rhizobium cauense*)^[14]等。

3 *Ensifer* 和 *Sinorhizobium* 的属名之争及使用建议

Ensifer 和 *Sinorhizobium* 的中文译名分别为“剑菌属”和“中华根瘤菌属”^[15]。*Ensifer* 最初是从土壤内分离到的能捕食其它细菌的细菌，以 *Ensifer adhaerens* 为模式种，不能与豆科植物结瘤固氮，于 1982 年提出^[16]；*Sinorhizobium* 由 Chen 等在 1988 年提出^[17]，分离自大豆的根瘤，是快生型的大豆根瘤菌，与之前研究者们发现的大豆慢生型根瘤菌不同，以 *Sinorhizobium fredii* 为模式种，能与大豆有效共生固氮，不能捕食其它细菌。2003 年时，Willems 等的研究发现，*Sinorhizobium* 和 *Ensifer* 的不同菌种之间的 16S rRNA 基因序列相似性范围为 97.9%–99.9%，因此，建议合并为一个属^[18]。根据细菌命名法规，*Ensifer* 发表的早，理应用此属名，

但作者又认为：*Sinorhizobium* 包含多个种，*Ensifer* 只包含一个种；*Sinorhizobium* 从字面上能体现出根瘤菌(*Rhizobium*)的范畴；*Sinorhizobium meliloti* 已广泛使用，是与苜蓿结瘤的高效固氮根瘤菌，据此，建议使用 *Sinorhizobium*，而不用 *Ensifer*^[18]。但新西兰的学者 J. M. Young 不同意，从而引发 *Ensifer* 和 *Sinorhizobium* 两个属名之争。最终由国际细菌分类委员会裁定，认为 *Ensifer* 为合法属名，*Sinorhizobium* 为同物异名，但 *Ensifer* 有优先权^[19-20]。目前在官方的分类学杂志——“International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology” (IJSEM) 上，发表归属于这两个属的系统发育分支的新种时，必须使用 *Ensifer* 作为属名，如 *Ensifer soya* sp. nov.^[21]；而在其它非官方的非分类学杂志上，则根据自己的喜好，选择使用 *Ensifer* 或 *Sinorhizobium*，但以使用 *Sinorhizobium* 的居多数^[22-23]。本文作者认为，如果所研究的菌株确实与 *Ensifer adhaerens* 关系十分接近，且不能结瘤固氮，那么就应该使用 *Ensifer* 这个属名；如果分离自根瘤内，且能与豆科植物结瘤固氮，又与 *Sinorhizobium* 内的一些种接近，那么最好使用 *Sinorhizobium* 这个属名。并且，为避免混淆，在研究与结瘤固氮相关的工作时，发表的非 IJSEM 杂志的论文时，则最好要使用 *Sinorhizobium*，以使读者更容易理解论文内容，不产生歧义^[18]。

4 ANI 值取代 DNA 杂交

70%的 DNA 同源性值曾是确定细菌之间是否为同一种的“黄金标准”之一。大于及等于 70%的为同一种，低于 70%的则为不同种。传统上的 DNA 同源性分析常采用液相复性速率法、膜杂交法等。由于这些方法可重复性低，不同实验室的结果没法直接比较等弊端，现在已被快速发展的全基因组测序技术所取代。ANI 是指 Average nucleotide identity，即平均核苷酸一致性。两株细菌的全基因组的 ANI 比较值以 94%为阈值，它相当于 DNA 同源性的 70%这个值^[24]。当 ANI 值大于等于 95%时，为同一个菌种；反之，低于 95%，则为不同的菌

种^[25]。目前使用 JSpecies 软件计算 ANI 值是一个优选的方法^[26]，推荐使用。

虽然全基因组测定方便快捷，但还是需要一定的时间分析和注释。对于一个未知菌株，想快速判断其是否是一个新种，可以采用只测定一些持家基因的方法。如 Zhang 等采用多基因序列(如 *SMc00019-truA-thrA*)分析的 ANI 值比较，以 94%或 96%作为区分不同种的阈值标准，可以很好地将不同根瘤菌物种区分开来^[27]，此方法与其它持家基因及全基因组分析结果有很好的一致性。结合 16S rRNA 基因序列分析确定属的系统发育地位，以持家基因 ANI 比较，确定种间关系，就能确定未知根瘤菌的分类地位了。

5 表型和化学成分分析的快速化

根瘤菌的表型分析，包括对不同碳源和氮源等的利用情况、抗生素抗性、不同盐浓度的适应性、不同生长温度耐受性，以及氧化酶、硝酸还原酶、BTB 产酸或产碱判定等^[28]。目前 Biolog 系统广泛应用于根瘤菌的生理生化表型测定，可以快速获得根瘤菌对不同碳源的利用情况，再补充其它的表型分析，即可得到根瘤菌的表型数据。虽然有学者指出，表型数据不稳定，重复性不是很好，建议用基因组数据代替表型分析，但就当前的情况看，根瘤菌的表型分析仍然是根瘤菌分类鉴定及发表新种的必需条件^[29]。本文作者认为，表型数据对根瘤菌的分类鉴定仍然很重要，加上利用 Biolog 系统，可以短期内获得菌株的生理生化特征，要比测序、注释、比较等更快速。

根瘤菌的化学成分分析包括脂肪酸的测定、醌的分析和极性脂分析等^[30]。它们的测定都有相应的快速分析方法，如气相色谱法、HPLC 法、TCL 法。在测定这些化学成分时，要保证供比较的多个菌株采用同样的培养方法、培养时间、培养基等，以使数据结果具有可比性。由于根瘤菌的醌在属及其以上水平有一致性，因此，醌的分析有时并非必需指标。

6 根瘤菌与宿主的共生专一性与混杂性

根瘤菌与豆科宿主的共生关系通常分为以下两类: (1) 一种根瘤菌对应于一种或一个互接种族的植物, 如 *Sinorhizobium meliloti* 只能与苜蓿、草木樨、葫芦巴结瘤固氮, 不能与其它植物结瘤固氮^[31-32], 这称为共生专一性; (2) 一种根瘤菌可以与多属种豆科植物结瘤固氮, 如 *Sinorhizobium* sp. NGR234, 它可与 120 个属的豆科植物结瘤固氮^[33], 这称为根瘤菌的宿主混杂性。

最新的研究表明^[34], 自然条件下, 与药用豆科植物苦参(*Sophora flavescens*)共生的根瘤菌可归属到 5 个属中; 实验室条件下的交叉结瘤研究进一步发现, 苦参能与来自 α -变形杆菌纲和 β -变形杆菌纲的超过 30 个种的根瘤菌结瘤固氮。特别是相互之间不能在对方的宿主上交叉结瘤的根瘤菌也都能与苦参结瘤固氮, 如来自苜蓿、大豆、花生、紫云英、菜豆、豌豆的根瘤菌, 除个别菌种外, 都能与苦参结瘤固氮^[34]。这一研究结果说明, 苦参是极其混杂性的豆科宿主植物, 能与很多根瘤菌共生固氮, 我们称之为豆科植物的根瘤菌混杂性。这一发现彻底打破了根瘤菌与豆科植物之间的共生专一性认识, 这项研究将促进人们重新考虑并研究豆科植物与根瘤菌之间的分子识别与信号交流的关系。

7 总结与展望

本文对 2001 年 β -变形杆菌纲的根瘤菌发现以来的根瘤菌系统学、根瘤菌分类学上的争议, 以及根瘤菌与豆科植物关系等方面的研究做了总结和讨论。基因组测序技术和根瘤菌表型特征、化学特征快速测定, 加速了根瘤菌的分类鉴定和系统学研究。

未来根瘤菌的系统学研究中, 将向更多的豆科宿主结瘤调查发展。国内的根瘤菌系统学研究中, 分离自花生的根瘤菌新种将不断涌现(个人通讯)。而国外的根瘤菌系统学研究中, 则偏重于从没有调查过的豆科植物中发现新的根瘤菌物种, 特别是从非洲地区的豆科植物根瘤中发现新的根瘤菌物种。大量的新种仍有待描述, 而这仍会导致建立一些新

属, 或在原本不包括根瘤菌的细菌属内分离到一些共生固氮的种或菌株。对于苦参这种混杂性宿主, 还有可能从不同的生态区发现新的根瘤菌物种。目前, 国内报道的分离自苦参的根瘤菌归属于根瘤菌属^[35]和叶杆菌属^[36], 国外报道了分离自与苦参同属的槐属(*Sophora*)中的其它树种根瘤分离到的根瘤菌新种^[37], 槐属植物的根瘤菌还可能有更多的新种出现。

除此之外, 自土壤中分离到的不能在豆科植物上结瘤固氮的, 但系统发育地位在根瘤菌范畴之内的根瘤菌新种将会不断出现, 这将丰富根瘤菌的系统学研究, 也有助于人们更好地认识共生和非共生的根瘤菌系统发育、物种进化及与豆科宿主的关系。再者, 苦参这种混杂性极高的植物, 将成为豆科植物中的“NGR234”, 激发人们去研究为什么苦参这种植物对根瘤菌选择性这么低, 是不是有其独特的结瘤因子受体结构? 还有, 一个正在越来越热的研究领域——根瘤菌的试验进化^[38-39], 结合前面提到的全基因组测序比较、表型快速分析技术, 以及最近发展起来的甲基化组测定等手段, 将有助于人们认识根瘤菌是如何进化的, 进化的方向是什么, 结瘤固氮基因是如何起源及进化的等科学问题。再结合大数据分析, 开源协作分析系统(如 R 语言^[40]及 BioConductor^[41]等)的应用, 根瘤菌的系统学和进化学正向着一个崭新的方向前进!

参 考 文 献

- [1] Moulin L, Munive A, Dreyfus B, et al. Nodulation of legumes by members of the β -subclass of *Proteobacteria*[J]. *Nature*, 2001, 411(6840): 948-950
- [2] Chen WM, Laevens S, Lee TM, et al. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51(5): 1729-1735
- [3] Talbi C, Delgado MJ, Girard L, et al. *Burkholderia phymatum* strains capable of nodulating *Phaseolus vulgaris* are present in Moroccan soils[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(13): 4587-4591
- [4] Benhizia Y, Benhizia H, Benguedouar A, et al. Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2004, 27(4): 462-468
- [5] Shiraishi A, Matsushita N, Hougetsu T. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp.[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2010, 33(5): 269-274
- [6] Mousavi SA, Österman J, Wahlberg N, et al. Phylogeny of the *Rhizobium-Allorhizobium-Agrobacterium* clade supports the

- delineation of *Neorhizobium* gen. nov.[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2014, 37(3): 208-215
- [7] Mousavi SA, Willems A, Nesme X, et al. Revised phylogeny of Rhizobiaceae: proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2015, 38(2): 84-90
- [8] Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 44(4): 846-849
- [9] Relić B, Perret X, Estrada-García MT, et al. Nod factors of *Rhizobium* are a key to the legume door[J]. Molecular Microbiology, 1994, 13(1): 171-179
- [10] Giraud E, Moulin L, Vallenet D, et al. Legumes symbioses: absence of *nod* genes in photosynthetic bradyrhizobia[J]. Science, 2007, 316(5829): 1307-1312
- [11] D'Haeze W, Holsters M. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development[J]. Glycobiology, 2002, 12(6): 79R-105R
- [12] Yoon JH, Kang SJ, Yi HS, et al. *Rhizobium soli* sp. nov., isolated from soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(Pt 6): 1387-1393
- [13] Ghosh W, Roy P. *Mesorhizobium thioangeticum* sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph from rhizosphere soil of an Indian tropical leguminous plant[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56(1): 91-97
- [14] Liu TY, Li Jr Y, Liu XX, et al. *Rhizobium cauense* sp. nov., isolated from root nodules of the herbaceous legume *Kummerowia stipulacea* grown in campus lawn soil[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2012, 35(7): 415-420
- [15] Yang RF, Tao TS, et al. Dictionary of Bacterial Names with English Explanation and Chinese Translation[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2011 (in Chinese)
- 杨瑞馥, 陶天申, 等. 细菌名称双解及分类词典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2011
- [16] Casida Jr LE. *Ensifer adhaerens* gen. nov., sp. nov.: a bacterial predator of bacteria in soil[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1982, 32(3): 339-345
- [17] Chen WX, Yan GH, Li JL. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1988, 38(4): 392-397
- [18] Willems A, Fernández-López M, Muñoz-Adelantado E, et al. Description of new *Ensifer* strains from nodules and proposal to transfer *Ensifer adhaerens* Casida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an opinion[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(4): 1207-1217
- [19] Young JM. *Sinorhizobium* versus *Ensifer*: may a taxonomy subcommittee of the ICSP contradict the Judicial Commission[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(7): 1711-1713
- [20] Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes. The genus name *Sinorhizobium* Chen et al. 1988 is a later synonym of *Ensifer* Casida 1982 and is not conserved over the latter genus name, and the species name '*Sinorhizobium adhaerens*' is not validly published. Opinion 84[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(8): 1973
- [21] Li QQ, Wang ET, Chang YL, et al. *Ensifer sojae* sp. nov., isolated from root nodules of *Glycine max* grown in saline-alkaline soils[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(8): 1981-1988
- [22] Blanquet P, Silva L, Catrice O, et al. *Sinorhizobium meliloti* controls nitric oxide-mediated post-translational modification of a *Medicago truncatula* nodule protein[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2015, 28(12): 1353-1363
- [23] Ghnaya T, Mnassri M, Ghabriche R, et al. Nodulation by *Sinorhizobium meliloti* originated from a mining soil alleviates Cd toxicity and increases Cd-phytoextraction in *Medicago sativa* L.[J]. Front Plant Science, 2015, 6: 863
- [24] Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, et al. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57: 81-91
- [25] Arahal DR. Whole-genome analyses: average nucleotide identity[J]. Methods in Microbiology, 2014, 41: 103-122
- [26] Richter M, Rosselló-Móra R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(45): 19126-19131
- [27] Zhang YM, Tian CF, Sui XH, et al. Robust markers reflecting phylogeny and taxonomy of rhizobia[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e44936
- [28] Gao JL, Sun JG, Li Y, et al. Numerical taxonomy and DNA relatedness of tropical rhizobia isolated from Hainan Province, China[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 44(1): 151-158
- [29] Ormeño-Orrillo E, Martínez-Romero E. Phenotypic tests in *Rhizobium* species description: an opinion and (a sympatric speciation) hypothesis[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2013, 36(3): 145-147
- [30] Zhang JJ, Liu TY, Chen WF, et al. *Mesorhizobium muleiense* sp. nov., nodulating with *Cicer arietinum* L.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(Pt 11): 2737-2742
- [31] Yan AM, Wang ET, Kan FL, et al. *Sinorhizobium meliloti* associated with *Medicago sativa* and *Melilotus* spp. in arid saline soils in Xinjiang, China[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50(5): 1887-1891
- [32] He YR, Wang JY, Wang ET, et al. *Trigonella arcuata*-associated rhizobia-an *Ensifer* (*Sinorhizobium*) *meliloti* population adapted to a desert environment[J]. Plant and Soil, 2011, 345(1/2): 89-102
- [33] Pueppke SG, Broughton WJ. *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1999, 12(4): 293-318
- [34] Jiao YS, Liu YH, Yan H, et al. Rhizobial diversity and nodulation characteristics of the extremely promiscuous legume *Sophora flavescens*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2015, 28(12): 1338-1352
- [35] Jiao YS, Yan H, Ji ZJ, et al. *Rhizobium sophorae* sp. nov. and *Rhizobium sophoriradicis* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of the medicinal legume *Sophora flavescens*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(Pt 2): 497-503
- [36] Jiao YS, Yan H, Ji ZJ, et al. *Phyllobacterium sophorae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of *Sophora flavescens*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(Pt 2): 399-406
- [37] de Meyer SE, Tan HW, Heenan PB, et al. *Mesorhizobium waimense* sp. nov. isolated from *Sophora longicarinata* root nodules and *Mesorhizobium cantuariense* sp. nov. isolated from *Sophora microphylla* root nodules[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(10): 3419-3426
- [38] Marchetti M, Capela D, Glew M, et al. Experimental evolution of a plant pathogen into a legume symbiont[J]. PLoS Biology, 2010, 8(1): e1000280
- [39] Sachs JL, Russell JE, Hollowell AC. Evolutionary instability of symbiotic function in *Bradyrhizobium japonicum*[J]. PLoS One, 2011, 6(11): e26370
- [40] Ihaka R, Gentleman R. R: a language for data analysis and graphics[J]. Journal of Computational and Graphical Statistics, 1996, 5(3): 299-314
- [41] Gentleman R, Carey VJ, Huber W, et al. Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor[M]. New York: Springer, 2005