

我国主要生态区域绿豆慢生根瘤菌的遗传多样性和系统发育研究

袁天英¹, 杨江科², 张伟涛¹, 周俊初^{1*}

(¹ 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室 武汉 430070)

(² 华中科技大学生命科学技术学院 武汉 430070)

摘要 利用 16S rRNA PCR-RFLP、16S rRNA 序列分析以及 16S-23S rRNA IGS(Intergenetic Spacer)PCR-RFLP 技术对分离自中国主要生态区域的 44 株慢生型绿豆根瘤菌和 5 株参比菌株进行了遗传多样性和系统发育研究。16S rRNA PCR-RFLP 分析表明:在 76% 的相似水平上,所有供试菌株可分为三大类群:群 I 由 LYG1 等 13 株慢生根瘤菌组成,该群在系统发育上与 *B. japonicum* 和 *B. liaoningense* 的参比菌株存在一定的差异;群 II 由 XJ1 等 21 株供试菌株、*B. japonicum* 和 *B. liaoningense* 的代表菌株组成;群 III 由 10 株来自广东和广西的菌株和 *B. elkanii* 的代表菌株组成。16S-23S rRNA IGS PCR-RFLP 分析将供试菌株分为 A、B 两大群。群 A 由 34 株供试菌株、*B. japonicum* 和 *B. liaoningense* 的代表菌株组成。在 85% 的相似性水平上,可再分为 A I、A II 和 A III 3 个亚群。群 B 由 10 株分离自广西和广东的菌株和 *B. elkanii* 的代表菌株组成。在 85% 的相似性水平上,可再分为 BI 和 B II 两亚群,表现出一定的多样性。与 16S rRNA PCR-RFLP 相比,16S-23S rRNA IGS PCR-RFLP 具有更高的解析度,供试菌株表现出更加丰富的遗传多样性。分离自中国新疆、广东和广西等地的菌株在分群上具有较为明显的地域特征。

关键词:慢生型根瘤菌;16S rRNA PCR-RFLP;16S-23S rRNA IGS PCR RFLP

中图分类号:Q93 **文献标识码**:A **文章编号**:0001-6209(2006)06-0869-06

我国绿豆(*Vigna radiate* L.)栽培历史悠久,种植范围广,总产量居世界前列。绿豆富含蛋白质、氨基酸、胡萝卜素和其它矿质元素(特别是铁、磷元素)且低脂肪,是集营养保健与药用于一身的保健食品。绿豆根瘤菌通过与绿豆相互作用形成根瘤固定空气中的氮气,供给植物氮素营养,并可使绿豆能在贫瘠的土地中良好生长,对绿豆的产量和品质也有显著的影响。因此研究绿豆根瘤菌的遗传多样性与系统演化具有重要的理论意义和明显的应用前景。

国内外对慢生型根瘤菌遗传多样性和系统发育的研究已有较长的历史,迄今为止已报道了 6 个种。1982 年, Jordan^[1]将能够在大豆上有效结瘤的慢生型根瘤菌定名为 *Bradyrhizobium japonicum*。在 Hollis 等^[2]对慢生型大豆根瘤菌 DNA 同源性研究的基础上, Kuykendall 等^[3]报道了第二个种 *B. elkanii*。1995 年, Xu 等又报道了超慢生大豆根瘤菌 *B. liaoningense*^[4]。此后,又有人相继报道了 *B. yuanmingense*、*B. betae* 和 *B. canariense*^[5~7]。虽然慢生型根瘤菌具有广泛的生态适应性及丰富的遗传多

样性,但与根瘤菌科其它属的分类状况相比,对慢生型根瘤菌的研究仍较为滞后^[8]。

已知细菌的 16S rRNA 序列高度保守,并与 23S 和 5S rRNA 基因处于同一个 *rrn* 操纵子之中,其排列顺序为 5'-16S rRNA-tRNA-23S rRNA-5S-3'。由于 16S rRNA 序列变异速度异常缓慢,其核苷酸序列是分析细菌系统发育关系的“分子钟”。tRNA 基因常位于 16S 和 23S rRNA 基因之间并与其邻近序列组成基因间隔序列(Intergenetic Spacer, IGS)。IGS 区段受自然选择压力相对较小,具有丰富的变异。该区段 RFLP 图谱能够较好地反映出属、种和亲缘关系很近的菌株间的差异。因而,近年来许多研究者已将 IGS-RFLP 分析用于微生物多样性研究^[9]。

在传统的分类研究中,绿豆根瘤菌被划分于豇豆杂族,分类地位模糊。绿豆根瘤菌以慢生根瘤菌占优势,但包含了部分快生根瘤菌^[10,11]。我国绿豆品种及栽培环境的多样性决定了与之相互作用的绿豆根瘤菌在分布上具有丰富的多样性。本研究利用 16S rRNA RFLP 分析、16S rRNA 序列分析和 16S-23S

基金项目:国家'973'重点基础研究项目(001CB1089);国家微生物资源平台建设项目(2005DKA21208-6);农业微生物学国家重点实验室开放基金资助

* 通讯作者。Tel 86-27-87281685;E-mail:zhoujunchu@mail.hzau.edu.cn

作者简介:袁天英(1978-),女,河南安阳人,硕士研究生,主要从事根瘤菌多样性和生物固氮遗传学方面的研究。E-mail:yuanty0924@tom.com

收稿日期:2006-03-16;接受日期:2006-05-31;修回日期:2006-06-04

rRNA IGS PCR-RFLP 分析技术 ,系统考察了分离自我国主要生态区域绿豆根瘤菌的遗传多样性及其在根瘤菌系统发育中的地位及相互关系。本研究不仅丰富了慢生根瘤菌的种质资源 ,而且为进一步确定绿豆根瘤菌的系统分类地位提供了科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 :在我国具有典型生态特征的区域采用五点取样法采集土壤样品。以绿豆为捕获植物 ,以

土样悬液为接种剂 ,无菌砂培绿豆来捕获根瘤菌。采集根瘤用 95% 酒精浸泡 5min ,再用 0.1% 的升汞灭菌 5min ,无菌水洗涤 7 ~ 10 次后用平板划线法分离、并进一步纯化菌株 ,挑取单菌落 ,转接并保存于 YMA 斜面。根瘤菌的回接试验在双层砂钵中进行。本研究通过比较接种供试根瘤菌植株与对照植株地上部分干重来确定供试菌株的固氮有效性。具体操作参照 Yang 等^[12]的方法。选取 44 个供试菌株及 5 株参比菌株进行研究见表 1。

表 1 供试绿豆根瘤菌和参比菌株

Table 1 *Vigna radiata* rhizobia and reference strains

Strains	Host plant	Geographical origin	16S rRNA genotype ^a	16S rRNA RFLP patterns ^b	IGS RFLP patterns ^a
LYG1	<i>Vigna radiata</i>	Lianyungang ,Jiangsu , China	I	ABAC	1
LYG2	<i>Vigna radiata</i>	Lianyungang ,Jiangsu , China	I	ABAC	11
LYG3 ,LYG4 ,LYG12	<i>Vigna radiata</i>	Lianyungang ,Jiangsu , China	I	ABAC	12
LYG5	<i>Vigna radiata</i>	Lianyungang ,Jiangsu , China	I	ABAC	14
LYG6	<i>Vigna radiata</i>	Lianyungang ,Jiangsu , China	I	ABAC	4
LYG7	<i>Vigna radiata</i>	Lianyungang ,Jiangsu , China	I	ABAC	13
LYG8	<i>Vigna radiata</i>	Lianyungang ,Jiangsu , China	I	ABAC	6
LYG9 ,LYG10	<i>Vigna radiata</i>	Lianyungang ,Jiangsu , China	II	AAAA	7
LYG11	<i>Vigna radiata</i>	Lianyungang ,Jiangsu , China	II	AAAA	8
XJ1 ,XJ2 ,XJ3 ,XJ4 ,XJ5 ,XJ6 ,XJ7 ,XJ8 , XJ9 ,XJ10 ,XJ11 ,XJ12	<i>Vigna radiata</i>	Shihezi ,Xinjiang , China	II	AAAA	9
HD1 ,HD2 ,HD3	<i>Vigna radiata</i>	Handan ,Hebei , China	II	AAAA	6
HD4	<i>Vigna radiata</i>	Handan ,Hebei , China	I	ABAC	15
SC2	<i>Vigna radiata</i>	Yaan ,Sichuan China	I	ABAC	3
SC1 ,SC3	<i>Vigna radiata</i>	Yaan ,Sichuan China	II	AAAA	10
GX1 ,GX3 ,GX4	<i>Vigna radiata</i>	Guilin ,Guangxi , China	III	ACAA	17
GX2	<i>Vigna radiata</i>	Guilin ,Guangxi , China	IV	ACCA	5
GX5	<i>Vigna radiata</i>	Guilin ,Guangxi , China	IV	ACCA	16
GZ1 ,GZ2 ,GZ3 ,GZ4 ,GZ5	<i>Vigna radiata</i>	Guangzhou ,Guangdong , China	IV	ACCA	16
SJZ1 ,SJZ2 ,SJZ3	<i>Vigna radiata</i>	Shijiazhuang ,Hebei , China	I	ABAC	2
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>					
USDA110	<i>Glycine max</i>	United States	II	AAAA	18
<i>Bradyrhizoibum elkanii</i>					
USDA46 ,USDA76T	<i>Glycine max</i>	United States	IV	ACCA	19
USDA86	<i>Glycine max</i>	United States	IV	ACCA	20
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>					
2281 ^T	<i>Glycine max</i>	China	II	AAAA	21

^a The 16S rRNA genotype and IGS RFLP patterns represent combination of restriction patterns obtained by enzymes used. ^b Each letter refers to a restriction pattern obtained with enzymes *Hae* III , *Hha* I , *Hinf* I and *Msp* I , respectively , and the restriction pattern of *B. japonicum* USDA 110 was assigned AAAA pattern.

1.1.2 主要试剂和仪器 :*Taq* 酶、限制性内切酶、pMD18-T 载体 (日本 TaKaRa 公司);引物合成(上海赛百盛基因技术有限公司);胶回收试剂盒(上海华舜生物工程有限公司);PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);PCR 测序(北京三博远志生物有限责任公司)。

1.2 根瘤菌总 DNA 的提取

供试菌株在 YMA 液体培养基中培养至对数期

后 ,离心收集菌体 ,经 STE 缓冲液洗涤后 ,用 TE 缓冲液悬浮菌体 ,经 10% SDS 裂解菌体后 ,加入蛋白酶 E 至终浓度为 50μg/mL ,37℃ 保温至菌液透明 ;加入 5mol/L NaClO₄ 至终浓度为 1mol/L ,混匀后加入等体积苯酚-氯仿反复抽提至界面无蛋白 ;取上清液 ,经乙醇沉淀、洗涤、干燥并溶解在低浓度 TE 中 ,通过 Beckman DU-800 分光光度计定量后贮存备用。具体

操作参照 Yang 等^[10]的方法。

1.3 16S rRNA 基因 PCR-RFLP 分析及序列分析

每 20 μ L 扩增反应体系为:10 \times buffer 2 μ L, MgCl₂ (25mmol/L) 1 μ L, dNTP(10mmol/L) 0.3 μ L, 引物 fD1 (5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 50 μ mol/L) 0.5 μ L, 引物 rD1 (5'-CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3', 50 μ mol/L) 0.5 μ L, 模板 DNA 50ng, Taq 酶(5U/ μ L) 2U, 加超纯水补足。PCR 产物分别用 Hae III、Hha I、Hinf I 和 Msp I 等限制性内切酶在 37℃ 下酶切, 酶切产物经电泳、染色后, 采用 Kodak 凝胶成像系统记录 RFLP 指纹图谱。根据 16S rRNA 基因 RFLP 聚类分析结果, 选取代表菌株, PCR 扩增其 16S rRNA 基因, 将扩增产物克隆在 pMD18-T 载体上, 转化大肠杆菌 DH5 α , 并测定其全序列。代表菌株 LYG10 和 GZ1 在 GenBank 的序列登录号分别为: DQ442912 和 DQ442913。

1.4 16S-23S rRNA IGS PCR-RFLP 分析

利用特异性引物 pHr (5'-TGCGGCTGGATCACC TCCTT-3') 和 p23SR01 (5'-GGCTGCTTCTAAGCC AAC-3') 对供试菌株 16S rRNA 基因与 23S rRNA 基因间的 IGS 区段进行 PCR 扩增。其反应体系、扩增程序和检测方法均与 16S rRNA PCR-RFLP 分析相同。PCR 扩增产物分别用 Hae III、Hha I、Hinf I 和 Msp I 等限制性内切酶酶切。酶切产物经 2.0% 琼脂糖凝胶水平电泳后, 用 Kodak 凝胶成像系统记录数据。具体操作参照 Yang 等^[12]的方法进行。

1.5 数据分析和处理

凝胶扫描成像系统摄取的凝胶图像经均一化处理后, 按有条带处以“1”表示、无条带处以“0”表示将其转化为“0”和“1”数字符, 再通过 NTSYS Applied Biostatistics 软件进行相似性分析, 并利用平均连锁法(UPGMA)进行聚类分析, 并将结果转化为树状图谱。利用 BioEdit 软件对供试菌株和参比菌株 16S rRNA 基因序列进行 Alignment 分析, 再利用 Mega 软件进行 Neighbor-joining 分析, 并生成系统发育树。

2 结果和分析

2.1 16S rRNA PCR-RFLP 聚类分析

本研究以 fD1 和 rD1 为引物, 对供试 44 株绿豆慢生根瘤菌和 5 株参比菌株的 16S rRNA 区段进行特异性地扩增, 扩增产物的大小均约 1.5kb。利用 Hae III、Hha I、Hinf I 和 Msp I 4 种限制性内切酶分别对扩增的 1.5kb 片段进行了酶切分析, 经电泳产生了较丰富的谱带类型。利用 UPGMA 法进行聚

类分析生成的树状图谱(图 1)。由图 1 可见: 所有供试菌株在 76% 的相似性聚为 3 个类群。群 I 由 LYG1 等 13 株供试绿豆慢生根瘤菌组成, 该群菌株在系统发育上相对独立, 其 RFLP 图谱明显不同于其它供试菌株和参比菌株, 而单独聚为一群, 属于 16S rRNA RFLP 基因型 I。群 II 由 XJ1 等 21 株绿豆慢生根瘤菌、*B. japonicum* USDA110 和 *B. liaoningense* 2281^T 组成, 属于基因型 II。群 III 在相关系数为 0.865 时再分为亚群 1 和亚群 2 两个亚群。亚群 1 中包含 GX1 等 3 株菌株, 属于基因型 III。亚群 2 由自广州和广西分离的 GX3 等 7 个菌株、*B. elkanii* USDA46、USDA76 和 USDA86 等组成, 属于基因型 IV。

2.2 16S rRNA 基因序列分析

在 16S rRNA 基因 RFLP 聚类分析的基础上, 选取 GZ1 和 LYG10 为代表菌株, 测定了 16S rRNA 全长约 1.5kb 的 DNA 序列。代表菌株 LYG10 和 GZ1 在 GenBank 的序列登录号分别为: DQ442912 和 DQ442913。经 BioEdit 软件对代表菌株和参比菌株的 16S rRNA 序列进行 Neighbor-joining 分析生成的反映供试菌株与参比典型菌株间系统发育关系的聚类图见图 2。

由图 2 可见, 供试绿豆慢生根瘤菌与参比菌株在系统发育上分为两大类群, 代表菌株 GZ1 和 LYG10 序列的 16S rRNA 差异明显, 其中代表菌株 LYG10 与参比菌株 *B. japonicum* 和 *B. liaoningense* 聚为一大群, 它们的 16S rRNA 序列高度相似, 序列间差异小于 1%, 表明 16S rRNA RFLP 基因型 I 和 II 所属的菌株在系统发育地位上与 *B. japonicum* 和 *B. liaoningense* 相近。代表菌株 GZ1 与参比菌株 *B. elkanii* 聚为另一类, 其序列差异小于 1%。表明 16S rRNA RFLP 基因型 III 和 IV 所属的菌株在系统发育上属于 *B. elkanii*。

2.3 16S-23S rRNA IGS PCR-RFLP 分析

以 pHr 和 p23SR01 为引物对供试菌株和参比菌株的 16S-23S rRNA IGS 进行了 PCR 扩增, 所有供试绿豆根瘤菌和参比菌株的 IGS 大小均为 1.8kb 左右。分别用限制性内切酶 Hae III、Hha I、Hinf I 和 Msp I 对 PCR 产物进行酶切分析, 再按 UPGMA 法进行聚类分析, 生成的树状图谱见图 3。由图可见: 在 80% 的相似性水平上, 供试菌株可以分为 A 和 B 两群, 群 A 包括 34 株来自不同地域的供试菌株与参比菌株 *B. japonicum* USDA110 和 *B. liaoningense* 2281^T。在 85% 的相似性水平上, A 群可再分为 A I、

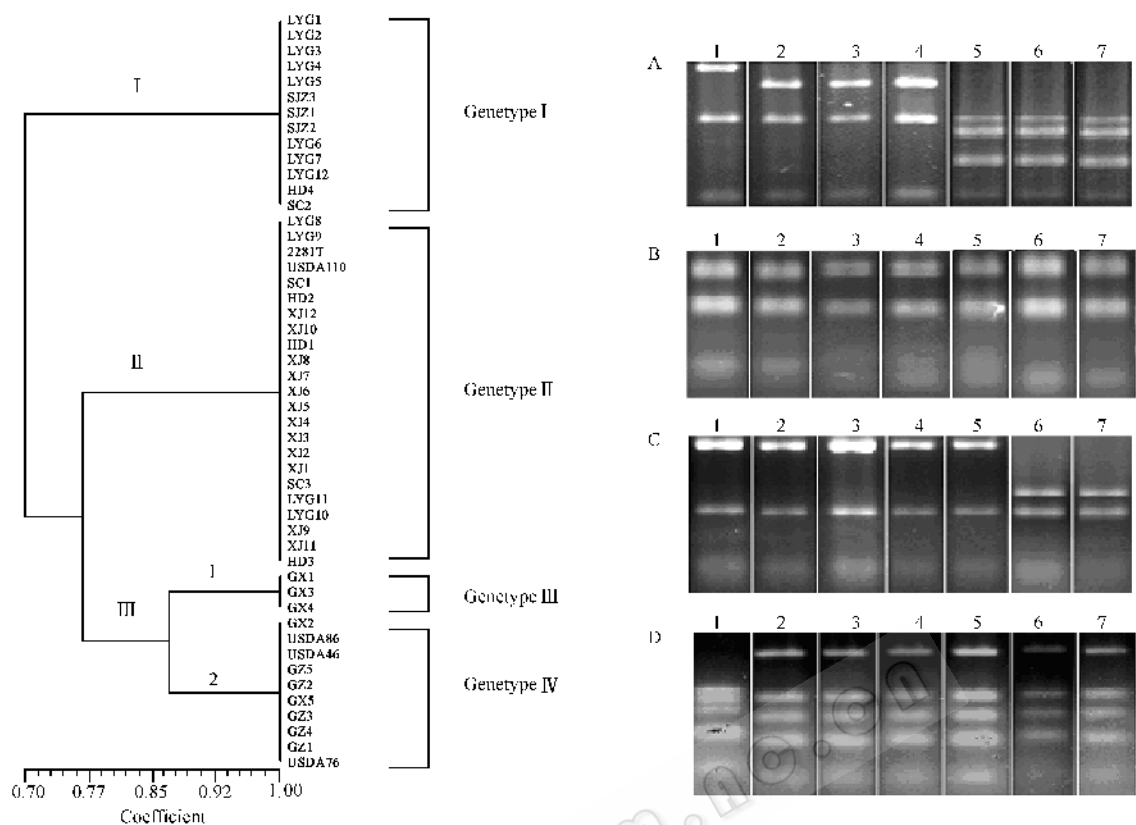


图 1 供试菌株 16S rRNA 基因 RFLP 分析树状图和酶切图谱

Fig.1 UPGMA dendrogram generated from the 16S rRNA gene RFLP fingerprints and the 16S rRNA PCR-RFLP patterns of the representatives produced by four enzymes. A : *Hinf* I ; B : *Hae* III ; C : *Hha* I ; D : *Msp* I . Line 1 : LYG1 ; 2 : 2281^T ; 3 : USDA110 ; 4 : XJ1 ; 5 : GX1 ; 6 : GX2 ; 7 : USDA76.

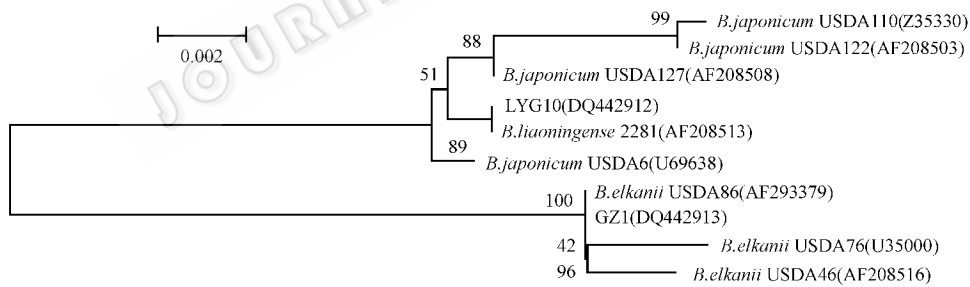


图 2 供试菌株 16S rRNA 基因序列聚类图

Fig.2 Dendrogram of strains generated by Neighbor-joining method. Kimura-2 distances were derived from a distance matrix to construct an optimal unrooted tree using the Neighbour-joining method. Numbers in the parenthesis are the GenBank accession number of the sequences.

A II 和 A III 3 个亚群。A I 和 A III 亚群分别由 6 株来自连云港和石家庄以及 7 株来自连云港和邯郸的菌株组成,系统发育分析表明,A I 和 A III 亚群与 *B. japonicum* 和 *B. liaoningense* 在系统发育上具有一定的差异。A II 亚群由 21 株来自我国新疆等地的菌株以及 *B. japonicum* 和 *B. liaoningense* 的参比菌株组成。本结果与依 16S rRNA PCR-RFLP 的分群一致,A 群菌株由 16S rRNA-RFLP 分群中的群 I 和群 II 组成。B 群为分离自我国南方广西和广东的菌株,它们在 84.7% 的相似水平上仍然与参比菌株 *B.*

elkanii 的代表菌株 USDA46、USDA76 和 USDA86 聚为一类,与 16S rRNA PCR-RFLP 分类基本相一致。供试菌株的分群具有较为明显的地域特征:属于 *B. elkanii* 的菌株均分离自我国南部的广西和广东,来自新疆的绿豆慢生根瘤菌也在 94.9% 的相似水平上全部聚在一起,而自华北平原地带的邯郸和连云港等地分离的菌株在亲缘关系上接近。与依 16S rRNA PCR-RFLP 的分群相比,IGS RFLP 的聚类结果表现出更丰富的遗传多样性。

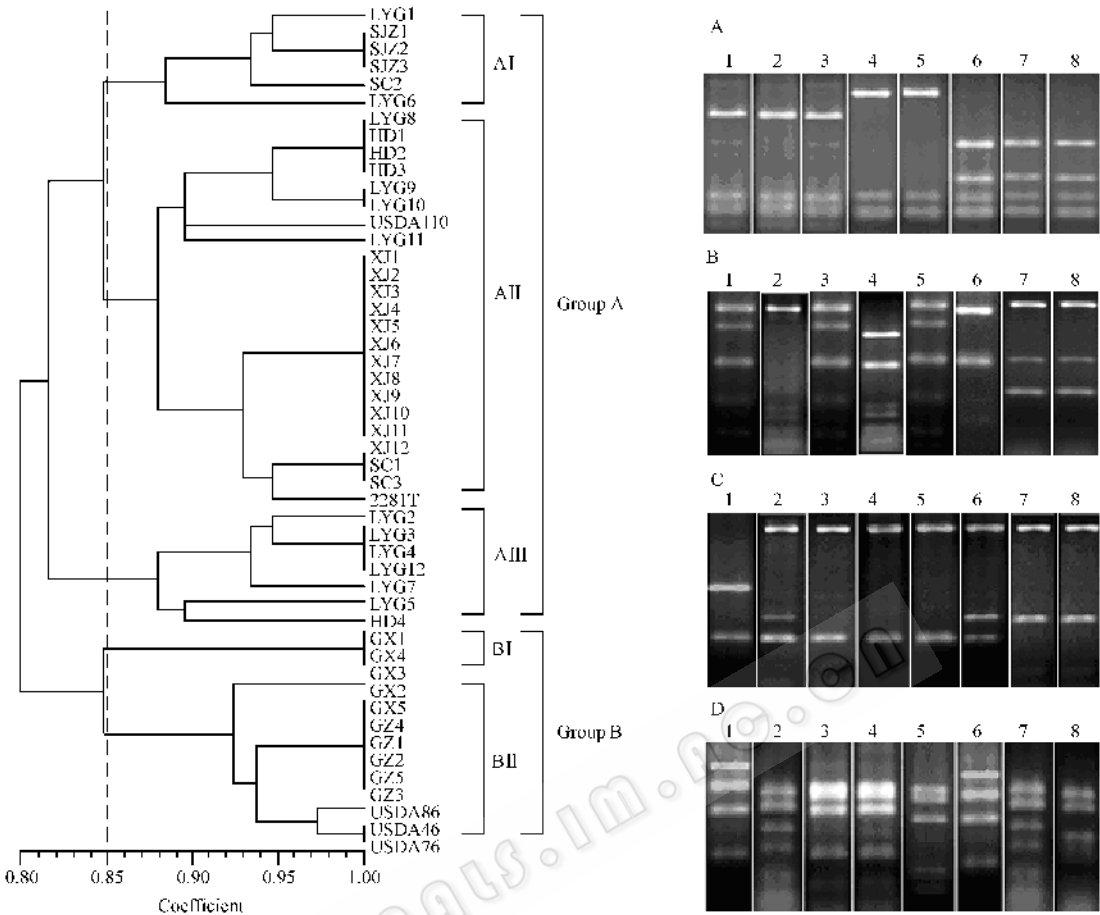


图3 供试菌株 16S-23S rRNA IGS RFLP 分析的树状图和酶切图谱

Fig.3 UPGMA dendrogram generated from the 16S-23S rRNA IGS RFLP fingerprints and the 16S-23S rRNA IGS RFLP patterns of the representatives produced by four enzymes. A : *Hae* I ; B : *Hha* I ; C : *Hinf* I ; D : *Msp* I ; Line 1 : LYG1 ; 2 : USDA110 ; 3 : XJ1 ; 4 : 2281T ; 5 : LYG ; 6 : GX1 ; 7 : GZ1 ; 8 : USDA76.

3 讨论

传统上,对根瘤菌多样性和分类的研究大都建立在形态、生理生化等表型特征基础上。与表型变异相比,作为分子时钟的 16S rRNA 序列更稳定、精确地记录着生物体的进化史^[13]。随着现代生物技术的发展,以分子生物学为主要手段、以基因型和遗传多态性为基础的系统发育法正被广泛采用^[14]。本研究采用 16S rRNA RFLP 和序列分析技术、16S-23S rRNA RFLP 技术对供试菌株的遗传多样性和系统发育进行了系统研究。

本研究的 16S rRNA PCR-RFLP 分析结果表明:供试绿豆慢生根瘤菌分为三大群,属于群 I 的菌株主要来自连云港和石家庄;群 II 的菌株包括分离自新疆的所有菌株和其他地方的部分菌株,它们在系统发育上与 *B. japonicum* 和 *B. liaoningense* 亲缘关系较近;群 III 为分离自我国南方广东与广西的菌株和 *B. elkanii* 的代表菌株,在 86.5% 相似性水平下又

可以分为两个亚群。

由 16S-23S rRNA IGS PCR RFLP 分析结果可见:供试菌株的聚类与 16S rRNA PCR-RFLP 分析大体一致,与 *B. elkanii* 的代表菌株聚在一起的 B 群供试菌株均分离自南方如广西和广东,群 A 包括 *B. japonicum* USDA110、*B. liaoningense* 2281^T。和其余供试菌株,相当于 16S rRNA PCR-RFLP 中的群 I 和群 II。但由聚类结果可以看出:与 16S rRNA PCR-RFLP 相比,IGS PCR RFLP 提供了更高的解析度,供试菌株和参比菌株共分为 21 种 IGS RFLP 型,在系统发育上表现出更加丰富的遗传多样性。

地理位置和气候环境是影响根瘤菌多样性的重要因素,我国新疆属于典型的干旱和半干旱气候特征^[15],每一绿洲农业生态系统相对独立,不同地区根瘤菌间很少有机会接触,由于受长期的地域隔离,很少有机会与其他地区的根瘤菌接触,也很难有遗传物质的交换。形成了分离自该地区的根瘤菌的遗传相似性很高,而与其它地区的菌株远缘的特

点^[16]。由 16S rRNA RFLP 和 16S-23S rRNA RFLP 树状图谱可知:分离自新疆的根瘤菌分别聚在 16S rRNA 基因型 II 和 IGS RFLP 基因型 9。分离自广西和广东的菌株,同样由于我国南部丘陵地带的地理隔离因素,在两类分型中均分别独立地聚为一群。而其它地理来源的菌株多样性较为丰富,如分离自四川和河北菌株的遗传型特征较其它地区菌株的差异较大。

参 考 文 献

- [1] Jordan DC. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium japonicum* gen. Nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int J Syst Bacteriol*, 1982, **32**: 136 – 139.
- [2] Hollis AB, Kloos WE, Elkan GE. DNA-DNA hybridization studies *Rhizobium japonicum* and related Rhizobiaceae. *J Genetic Microbiol*, 1981, **123**: 215 – 222.
- [3] Kuykendall LD, Sazena B, Devine TE, *et al.* Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can J Microbiol*, 1992, **38**: 501 – 505.
- [4] Xu L, Ge C, Gui Z, *et al.* *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *Int J Syst Evol Microbiol*, 1995, **45**: 212 – 217.
- [5] Yao ZY, Kan FL, Wang ET, *et al.* Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. Nov.. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2002, **52**(6): 2219 – 2230.
- [6] Rivas R, Willems A, Palomo JL, *et al.* *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, **54**: 1271 – 1275.
- [7] Vinuesa P, Leon-Barrios M, Silva C, *et al.* *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae : Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. genistearum, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005 **55**: 569 – 575.
- [8] 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.. *Int J Syst Bacteriol*, 1988, **38**: 392 – 397.
- [9] Gurrle V. The role of recombination and mutation in 16S-23S rDNA spacer rearrangements. *Gene*, 1999, **238**: 241 – 252.
- [10] 林德球, 黄 才, 王 黎. 旋扭山绿豆快生型根瘤菌不结瘤突变株的分离. *微生物学通报*, 1993, **6**: 7 – 9.
- [11] Germano MG, Menna P, Mostasso FL, *et al.* RFLP analysis of the rRNA operon of a Brazilian collection of bradyrhizobial strains from 33 legume species. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006 **56**: 217 – 229.
- [12] Yang JK, Xie FL, Zou J, *et al.* Polyphasic characteristics of bradyrhizobia isolated from nodules of peanut (*Arachis hypogaea*) in China. *Soil Biology & Biochemistry*, 2005, **37**: 141 – 153.
- [13] Zuckerkandl E, Pauling L. Molecules as documents of evolutionary history. *J Theor Biol*, 1965 **8**: 357 – 366.
- [14] 冯瑞华. 慢生型大豆根瘤菌的遗传多样性研究. *应用与环境生物学报*, 2000, **6**(2): 176 – 181.
- [15] Dowling DN. Competition for nodulation of legumes. *Annu Rev Microbiol*, 1986, **40**: 131 – 157.
- [16] 孟颂东, 关桂兰, 黄锡坚. 新疆土著大豆根瘤菌种群遗传结构的初步分析. *微生物学通报*, 2001, **28**(6): 10 – 14.

Studies on genetic diversity and phylogeny of slow-growing rhizobia isolated from *Vigna radiata* at main ecotypes of China

YUAN Tian-ying¹, YANG Jiang-ke², ZHANG Wei-tao¹, ZHOU Jun-chu^{1*}

(¹ State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

(² College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: Studies on genetic diversity and phylogeny of slow-growing rhizobia isolated from *Vigna radiata* at main ecotypes of China were conducted by using 16S rRNA gene PCR-RFLP, 16S rRNA gene sequencing and 16S-23S rRNA IGS PCR-RFLP assays. Results of 16S rRNA gene PCR RFLP analysis reveal that all the strains tested are clustered into three groups at the similarity of 76%. Group I contains 13 slow-growing rhizobia tested including LYG1; Group II consists of 21 strains tested and the type strains of *B. japonicum* and *B. liaoningense*, and 10 tested strains isolated from Guangdong, Guangxi and the type strain of *B. elkanii* compose Group III. The results of 16S-23S rRNA IGS PCR-RFLP show that strains tested could be divided into A and B groups, which could be correspondently subdivided into A I, A II, A III, BI and B II subgroups at the similarity of 85%. Compared with 16S rRNA PCR-RFLP, IGS RFLP assay show higher resolution, strains and reference strains tested can be divided into 21 IGS RFLP patterns. The strains isolated from Xinjiang, Guangdong and Guangxi regions show obvious geographical effect on genetic diversity.

Keywords: Slow-growing rhizobia; 16S rRNA PCR-RFLP; 16S-23S rRNA IGS PCR-RFLP

Foundation item: Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (001CB1089); Open Foundation of National Laboratory of Agriculture Microbiology

* Corresponding author. Tel: 86-27-87281685; Fax: 86-27-87280670; E-mail: zhoujunchu@mail.hzau.edu.cn

Received: 16 March 2006/Accepted: 31 May 2006/Revised: 4 June 2006