

胡枝子属根瘤菌的多相分类研究*

姚竹云¹ 陈文新

(中国农业大学生物学院 北京 100094)

摘 要 采用了数值分类、全细胞可溶性蛋白电泳分析、DNA G + C mol% 和 DNA 相关性的测定以及 16S rDNA PCR-RFLP 分析等多相分类技术对来源于不同地区的 16 种寄主的胡枝子根瘤菌进行了系统的分类研究。数值分类的结果表明,在 67% 的相似性水平上,全部供试菌可以分为快生型根瘤菌和慢性型根瘤菌两大群,在 80% 的相似性水平上又可分为四个亚群。在此基础上,对各亚群的胡枝子根瘤菌进行了 DNA 相关性的测定,以进一步证实和确定它们的分类地位,并通过 16S rDNA PCR-RFLP 分析对各亚群的系统发育关系进行了初步研究。

关键词 胡枝子根瘤菌, 多相分类, 数值分类, DNA 相关性, 16S rDNA PCR-RFLP

分类号 Q939.11 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)04-0287-95

胡枝子属(*Lespedeza*)为灌木、半灌木或草本植物,约 100 种,分布于北美洲、亚洲、欧洲及大洋洲。我国约 70 种,广泛分布于全国各地。胡枝子属植物多数均能耐干旱,为良好的水土保持植物及固沙植物,嫩枝叶可作饲料和绿肥,又为蜜源植物和药用植物,在工业、农业、林业、畜牧业、医药保健等方面具有重要的应用价值^[1,2]。目前,对与其共生固氮的根瘤菌研究不多,尚未见过有关其性状分析和分类研究的报道。本实验选用了分离自北京、吉林、内蒙、山西、陕西、甘肃及美国部分地区的 16 种胡枝子的根瘤菌共 58 株,连同已知的根瘤菌一起进行了 125 项表型性状的数值分类、全细胞可溶性蛋白电泳分析、DNA 相关性及 16S rDNA PCR-RFLP 等多相分类研究。

1 材料和方法

1.1 菌株

选用新分离、纯化并经回接原寄主结瘤的胡枝子根瘤菌 58 株与已知参比菌 15 株进行了分析。各菌株编号、来源、寄主等情况参见表 1。

1.2 性状测定

对 70 株根瘤菌进行了唯一碳源利用、唯一氮源利用、抗生素敏感性、对染料和化学药物的耐受性、耐盐性、生长温度范围、生长 pH 范围及多种生理生化反应共 125 项表型性状的测定。测定方法及内容参考文献[3]。

1.3 数值分类

性状编码、相似性计算、聚类分析、中心株的确定参考文献[4]。用简单匹配系数法

* 国家自然科学基金重点资助项目(No. 39130010)

¹ 现在中日食品流通开发委员会工作(北京 100081)

来稿日期:1997-12-13, 修回日期:1998-07-24

(Ssm)比较菌株间的相似性、用平均连锁法(UPGMA)进行聚类,用 MINTS 数值分类系统生成树状谱^[3,4]。

1.4 全细胞可溶性蛋白电泳

采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶不连续电泳系统。方法参考文献^[5]。

表 1 供试的根瘤菌

Table 1 Strains used in this test

种名/菌号 Species/Strain	宿主 Host	地理来源 Origin
<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA2370	<i>Pisum sativum</i>	United States
<i>R. tropici</i> type B CIAT899	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Columbia
<i>R. tropici</i> type A CFN299	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Brazil
<i>R. etli</i> CFN42	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Mexico
<i>Sinorhizobium meliloti</i> USDA1002	<i>Medicago sativa</i>	United States
<i>S. fredii</i> USDA205	<i>Glycine soja</i>	Henan, China
<i>S. saheli</i> USDA4102	<i>Sesbania cannabina</i>	Senegal
<i>S. teranga</i> USDA4101	<i>Acacia laeta</i>	Senegal
<i>Mesorhizobium loti</i> NZP2213	<i>Lotus corniculatus</i>	New Zealand
<i>M. huakuii</i> CCBAU2609	<i>Astragalus sinicus</i>	Nanjing, China
<i>M. ciceri</i> USDA3383	<i>Cicer arietinum</i> L.	Spain
<i>M. tianshanense</i> A-IBS	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>	Xinjiang, China
<i>R. galegae</i> HAMBI540	<i>Galega orientalis</i>	Finland
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA6	<i>Glycine max</i>	United States
<i>B. elkanii</i> USDA76	<i>Glycine max</i>	United States
USDA3202, USDA3203	<i>Lespedeza capitata</i>	United States
USDA3204, USDA3205	<i>L. stipulacea</i>	United States
USDA3208	<i>L. sp.</i>	United States
USDA3211, USDA3212	<i>L. juncea</i> var. <i>sericea</i>	United States
USDA3215, USDA3198, USDA3199	<i>L. striata</i>	United States
USDA3219	<i>L. juncea</i> var. <i>serpens</i>	United States
USDA3220	<i>L. procumbens</i>	United States
USDA3222	<i>L. bicolor</i>	United States
USDA3197	<i>L. hirta</i>	United States
USDA3399	<i>L. juncea</i> var. <i>sericea</i>	United States
USDA3651, USDA3652	<i>L. daurica</i>	United States
USDA3654, USDA3638	<i>L. juncea</i>	United States
YH012-YH163	<i>L. inschanica</i>	Beijing, China
A201, D241, D301	<i>L. daurica</i>	Beijing, China
B30-B073	<i>L. cuneata</i>	Beijing, China
JL8, JL132	<i>L. bicolor</i>	Jiling, China
JL72, JL74	<i>L. davurica</i>	Jiling, China
JL143	<i>L. hedysaroides</i>	Jiling, China
JL145	<i>L. tomentosa</i>	Jiling, China
JL146	<i>L. cyrtobotrya</i>	Jiling, China
SH055	<i>L. davurica</i>	Shanxi, China
SH3082	<i>L. bicolor</i>	Shanxi, China
NM104	<i>L. bicolor</i>	Neimeng, China
G041	<i>L. formosa</i>	Gansu, China
SX208, SX216	<i>L. floribunda</i>	Shanxi, China
SX220, SX248	<i>L. daurica</i>	Shanxi, China

1.5 DNA G + C mol%含量和 DNA 相关性的测定

DNA G + C mol%测定采用热变性法^[6],以 *E. coli* K-12 作为参考菌株,按 Johnson^[7]

的公式进行计算。DNA 相关性的测定采用复性速率法^[6],根据 De ley^[8]的公式计算。

1.6 16S rDNA PCR-RFLP 分析

按 Laguerre 描述的方法^[9]对供试菌株的 16S rDNA 进行 PCR 扩增。分别用四种限制性内切酶(Hae III, Hinf I, Msp I, Rsa I)对扩增产物进行消化,37℃ 2 h,按文献^[9]的方法进行电泳检测和成像。将酶切图谱转换成数据“1”和“0”,用简单匹配系数法(Ssm)计算各菌株间的相似性,平均连续法(UPGMA)生成聚类图^[4]。

2 结果和讨论

2.1 数值分类结果

对所测定的 125 项表型性状数据进行聚类分析得到树状谱(图 1)。

全部供试菌在 67% 的相似性水平上分成两大群。群 I 为快生和中慢生菌群,包括 *Rhizobium*、*Sinorhizobium* 和 *Mesorhizobium* 中的参比菌株和快生型的胡枝子根瘤菌。群 II 为慢生菌群,包括 *Bradyrhizobium japonicum* 的参比菌株和慢生型的胡枝子根瘤菌。所有的已知根瘤菌除 *M. ciceri* (USDA3383)和 *M. huakuii* (CCBAU2609)在 83% 的相似性水平上分开以外,其余的已知菌在 80% 的相似性水平上可以分开,这与 Sneath 建议的以 80% 的相似性水平为确定种的表观群的依据基本吻合^[4]。

群 I 在 82% 的相似性水平上分成独立的亚群 I,包括 16 株菌。它们与 *Sinorhizobium saheli* 的模式菌株 USDA4102 聚在一起。而其它快生型菌则较为分散,三两成群。群 II 在 80% 的相似性水平上分为三个亚群,分别为亚群 II、亚群 III 和亚群 IV。亚群 II 包括 7 株菌,均来源于北京,寄主为截叶铁扫帚(*L. cuneata*),群内相似性为 83%,中心株为 B071;亚群 III 包括 6 株菌,均来自于美国农业部,它们与 *Bradyrhizobium japonicum* 的模式菌株 USDA6 在 80% 的相似性水平上构成独立的一个亚群;亚群 IV 包括 8 株菌,均来自于美国农业部,群内相似性为 80%,中心株为 USDA3204。其它的 5 株慢生型菌与以上各亚群的相似性较低,没有达到种的表观群相似性水平。

另外,数值分类的结果也证明胡枝子根瘤菌的分类与寄主之间无明显确定关系。为了进一步明确各表观群的分类位置和它们之间的相互关系,又采用了 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳分析方法对各亚群菌株进行了分析,得到了与数值分类较为一致的结果。

2.2 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“+”,反之记为“-”,处于两者之间的记为“±”(表 2)。

亚群 I 中的菌株除了在利用糊精、果糖作为碳源,利用甘氨酸作为氮源以及硝酸还原反应等特征上与 *S. saheli* 不同外,其它的鉴别特征与 *S. saheli* 相同;亚群 III 中的菌株除了对多粘菌素(300 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、NaCl(1%)、pH10.0 的耐受性以及硝酸还原反应等特征上与 *B. japonicum* 不同外,其它的鉴别特征与 *B. japonicum* 相同。

另外生长速度和在 YMA 上产酸/产碱是区分快生型根瘤菌和慢生型根瘤菌的两个重要特征^[10]。一般说来,快生型根瘤菌在 YMA 上产酸,慢生型根瘤菌产碱。但慢生型的亚群 II 中除菌株 B30 以外均为产酸,说明这一亚群具有较明显的特殊性。

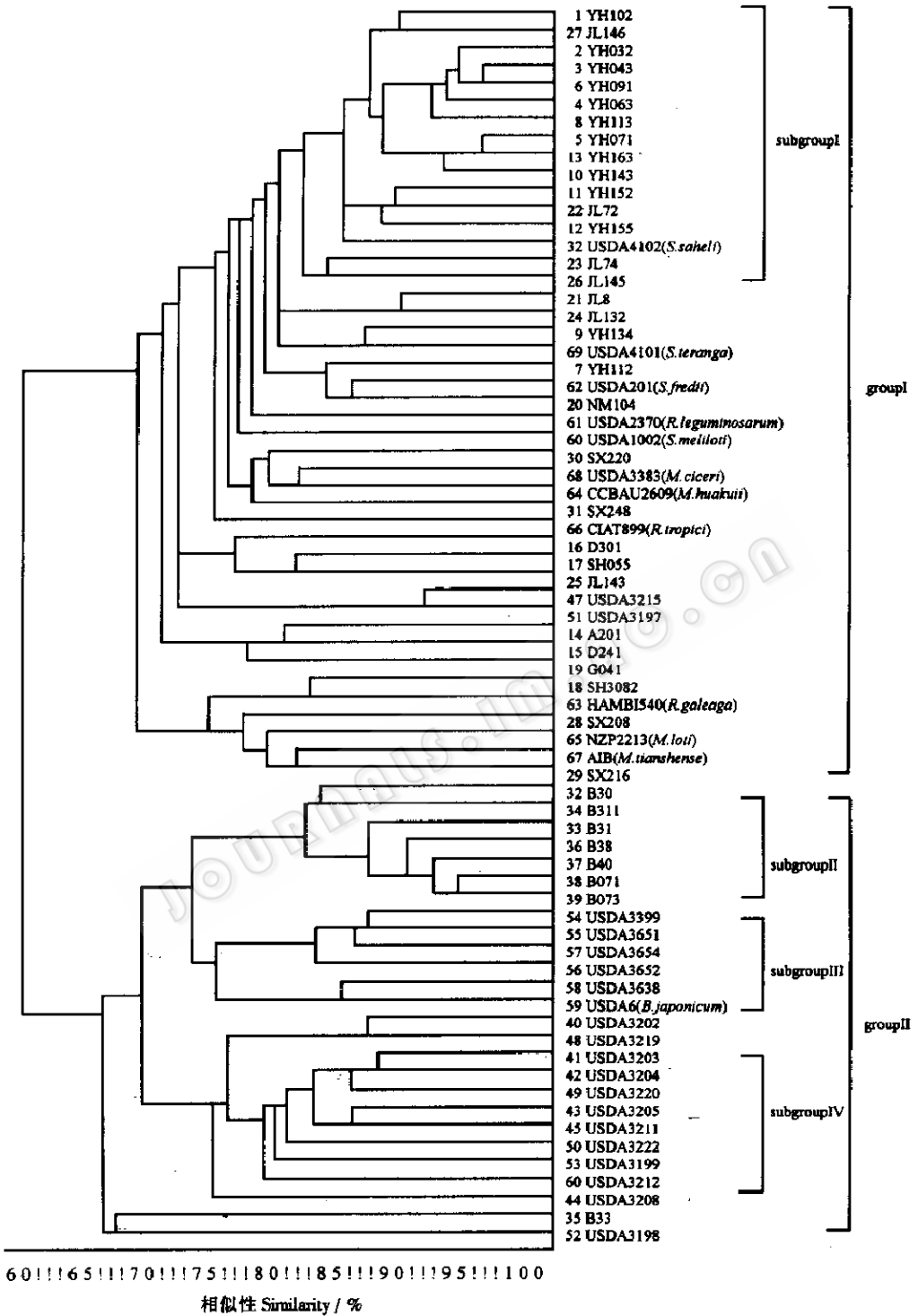


图 1 胡枝子根瘤菌数值分类树状谱

Fig.1 The numerical classification dendrogram of the tested strains

表 2 胡枝子根瘤菌各亚群与已知根瘤菌各种的鉴别特征

Table 2 The identity characteristics of the tested strains

鉴别特征 Differential characteristics	亚群 I	亚群 II	亚群 III	亚群 IV	<i>R. leguminosarum</i>	<i>R. tropici</i>	<i>R. galegae</i>	<i>S. meliloti</i>	<i>S. freilii</i>	<i>S. saheli</i>	<i>S. teranga</i>	<i>M. loti</i>	<i>M. huakuii</i>	<i>M. ciceri</i>	<i>M. tianshanense</i>	<i>R. japonicum</i>
	Sub-group I	Sub-group II	Sub-group III	Sub-group IV												
糊精 Dextrin	-	-	-	-	±	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
果糖 Fructose	+	-	±	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
葡萄糖 Glucose	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
肌醇 Inositol	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+
菊糖 Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
乳糖 Lactose	+	-	±	±	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
海藻糖 Trehalose	+	±	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
木糖 Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+
L(+)-冬氨酸 Aspartic acid	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
甘氨酸 Glycine	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
红霉素(100μg/mL) Erythromycin	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
多粘菌素(300μg/mL) Polymyxin	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
溴百里酚蓝 Bromothymol blue	+	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
甲基绿 Methyl green	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
脱氧胆酸钠 Sodium deoxycholate	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
NaCl(1%)	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH= 5.0	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
pH= 10.0	+	-	-	±	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
BTB 产酸 Acid production	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
硝酸还原 Nitrate reduction	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-

2.3 供试菌株的 T_m (°C)、DNA G + C mol% 含量和 DNA 相关性

2.3.1 供试菌株的 T_m 和 DNA G + C mol% 含量: 从各亚群菌株的 T_m (°C) 值及 DNA G + C mol% 值(表 3)来看, 各亚群内的 G + C mol% 变化不超过 3%, 属于种内差异^[12], 其含量均分布于相应的根瘤菌属范围内。

表 3 供试菌株的 T_m (°C) 值、DNA G + C mol% 及 DNA 相关性测定结果Table 3 The T_m (°C), DNA G + C contents and DNA relatedness of the tested strains

亚群 Subgroup	菌株 Strain	T_m /°C	G + C mol%	DNA 相关性 Homology with strains/%			
				YH091 ^b	USDA6 ^a	USDA76 ^a	USDA3204 ^b
亚群 I Subgroup I	YH032	76.1	60.4	80.0			
	YH043	77.5	61.0	91.0			
	YH063	77.0	59.9	100			
	YH071	77.4	60.8	100			
	YH091 ^b	77.0	59.9	100			
	YH113	77.6	61.2	100			
	YH143	77.0	59.9	72.2			
	YH152	77.0	59.5	100			

续表 3

亚群 Subgroup	菌株 Strain	T _m /℃	G + C mol%	DNA 相关性 Homology with strains/%			
				YH091 ^b	USDA6 ^a	USDA76 ^a	USDA3204 ^b
	YH163	77.0	60.2	76.5			
	JL72	76.4	59.7	100			
	JL74	77.5	60.9	92.5			
	JL145	77.0	50.0	100			
	JL146	76.6	59.1	89.6			
	USDA4102 ^a	76.8	59.5	90.0			
亚群 III Subgroup III	USDA3399	78.0	62.0		88.6	20.0	
	USDA3638	79.0	63.9		87.0		
	USDA3651	78.8	63.7		72.0		
	USDA3652	78.0	62.2		71.4		
	USDA3654 ^b	77.9	61.8		79.8	0	
	USDA6 ^a	78.6	63.3		100		
亚群 IV Subgroup IV	USDA3203	78.8	63.8		0		94.5
	USDA3204 ^b	79.0	63.9	0			100
	USDA3205	79.2	64.5				78.0
	USDA3211	78.9	63.9				79.6
	USDA3212	78.4	62.8				100
	USDA3220	78.4	62.9				86.6
	USDA3222	79.0	63.9				72.0
	USDA3199	78.0	62.1				80.3
	USDA76 ^a	78.9	63.9			100	91.1

a 为已知的模式菌株 Type strain

b 为该亚群的中心株 Center strain of the subgroup

2.3.2 供试菌株的 DNA 相关性测定: 由于亚群 I、亚群 III、亚群 IV 中均包含已知菌, 所以将这三个亚群内的中心菌株同已知的模式菌株进行了 DNA 相关性测定, 亚群内其它菌株也分别同中心株进行了 DNA 相关性的测定(表 3)。亚群 II 为一独立的慢性型根瘤菌新群, 除进行了群内菌株间的 DNA 相关性测定外, 还将它们同已知的 2 株慢生根瘤菌进行了 DNA/DNA 杂交(表 4)。亚群 I 中各菌株与中心株的 DNA 相关性 $\geq 72.2\%$, 中心株 YH091 与 *S. saheli* 的模式菌株 USDA4102 的 DNA 同源性为 90%, 达到了种内菌株间的相关性水平, 说明亚群 I 的菌株属于 *S. saheli* (USDA4102); 亚群 III 的各菌株与 *B. japonicum* 的模式菌株 USDA6 的 DNA 同源性均 $\geq 71.4\%$, 中心株 USDA3654 与 *B. elkanii* 的模式菌株 USDA76 没有相关性, 说明亚群 III 的菌株属于 *B. japonicum* (USDA6); 亚群 IV 中各菌株与中心株 USDA3204 的 DNA 相关性均 $\geq 72\%$, 其中心株与 *B. elkanii* 的模式菌株 USDA76 的 DNA 相关性为 91.1%, 而与 *B. japonicum* 的模式菌株 USDA6 没有相关性, 说明亚群 IV 的菌株属于 *B. elkanii* (USDA76)。

亚群 II 中除个别菌株外(B31 与 B40 的 DNA 同源性为 68.9%, B30 与 B073 的 DNA 同源性为 69.2%), 其余各菌株之间的 DNA 相关性均大于 70%, 为同一个 DNA 同源群。它们与 *B. japonicum* 的模式菌株 USDA6 的 DNA 同源性均不超过 35%, 中心株 B071 与

B. elkanii 的模式菌株 USDA76 的 DNA 相关性也很低,只有 8.6%,说明亚群 II 不同于已知的慢生型菌,应该是一个独立的新种群。

表 4 亚群 II 中各菌株间的 DNA 相关性/%

Table 4 The DNA relatedness between subgroup II strains

	B30	B31	B311	B38	B40	B071	B073	USDA6	USDA76
B30	100							10.0	
B31	74.8	100						28.6	
B311	72.0	92.6	100					0	
B38	75.2	80.3	83.6	100				33.7	
B40	83.5	68.9	70.6	92.5	100			10.5	
B071	72.6	75.4	72.8	81.0	90.2	100		0	8.6
B073	69.2	72.2	76.4	86.6	100	90.6	100	35.0	

根据国际系统细菌学委员会根瘤菌分会的规定, DNA 同源性在 70% 以上为定种的标准^[11]。根据这个标准,我们可以认为亚群 I、亚群 III、亚群 IV 分别属于 *S. saheli*, *B. japonicum* 和 *B. elkanii* 三个种,而亚群 II 应为一个独立的新种群,同时我们也可以看出本实验测定的结果与前面的表型分群结果基本吻合。

2.4 各亚群菌株的 16S rDNA PCR-RFLP 分析

用引物 P1、P6 对各亚群部分菌株的 16S rDNA PCR 扩增后,扩增产物分别用四种限制性内切酶进行消化,得到各个酶切图谱,用 UPGMA 将结果转化为树状谱(图 2)。

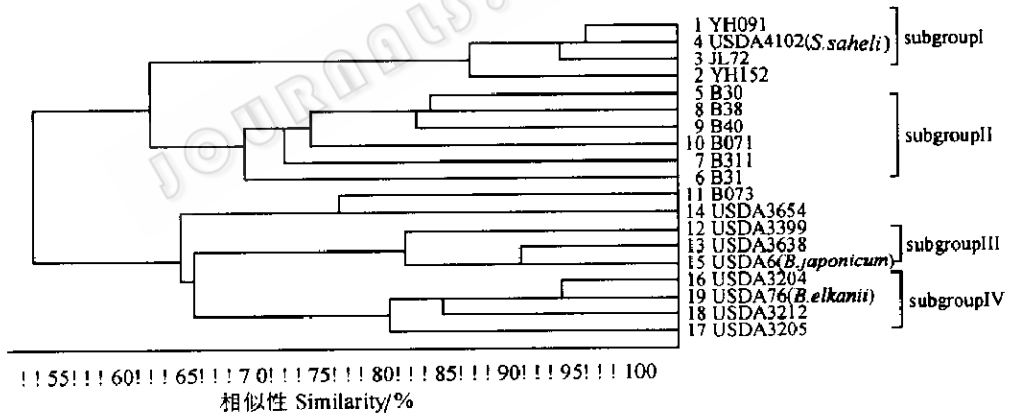


图 2 四个亚群菌株的 16S rDNA RFLP 分析树状谱

Fig. 2 Dendrogram obtained from the analysis of 16S rDNA RFLP

在 80% 的相似性水平以上,亚群 I、亚群 III、亚群 IV 都能较好地聚类,并分别与已知的参比菌株聚在一起,这与数值分类、DNA-DNA 杂交的结果是一致的。而亚群 II 在 70% 的相似性水平上聚在一起。它与快生型的亚群 I 的 16S rDNA 遗传关系要近于它与慢生型的亚群 III、亚群 IV 的遗传关系。应最终以 16S rDNA 全序列来确定其系统发育地位。

3 讨论

细菌分类学既是一个古老、传统的学科,又是一个现代化和发展的学科。随着科学技术和应用,细菌分类逐步从以形态特征和生理生化特征为依据的传统分类过渡到了以遗传特征和系统发育关系为依据的现代系统分类。然而,遗传型的分析结果常常与表型分析的结果不相吻合,建立在系统发育基础上的系统分类虽然具有稳定、客观、合理的优点,但是以此界定的分类群如果不能从表型上相区分的话,其实用性必然受到大大的影响。因此,为了使细菌的系统分类与传统的分类相协调,近年来又发展了多相分类技术,即对微生物的表型、遗传型以及系统发育等各个方面可用于鉴别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。多相分类强调的是一种综合的结果,任何一个单相的指标都不可能完全准确地反映出个体的本质和全部。表型特征为识别各个分类单元提供了许多描述特征,也是多相分类的基础,遗传学特征则直接揭示了个体之间的亲缘关系,成为多相分类的主要手段,并往往决定了菌株的分类地位。

综上所述,我们可以看出,多相分类研究中并没有一个简单直接的指标,研究的范围和方法的选定主要取决于问题的本身。在根瘤菌中,以数值分类进行分群、DNA-DNA 杂交用来定种、16rDNA 序列分析确定其系统发育地位构成多相分类的主干,全细胞蛋白电泳、多位点酶电泳和 RFLP 等技术与之协调构成完整的分类技术体系。本实验通过表型性状和遗传学特征的分析对胡枝子根瘤菌各亚群菌株进行了多相分类研究,确定了亚群 I 属于 *S. saheli*、亚群 III 属于 *B. japonicum*、亚群 IV 属于 *B. elkanii*。亚群 II 的菌株应为一个新种,它的系统发育关系更接近于快生型菌群。

参 考 文 献

- [1] 贺士元、邢其华、尹祖棠等编. 北京植物志(上册). 北京:北京出版社,1993,462~467.
- [2] 李树刚、杨衍晋、黄普华等编. 中国植物志. 北京:科学出版社,1995,41:131~159.
- [3] Chen W X, Wang E T, Wang S Y *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1995, **45**:153~159.
- [4] Sneath P H A, Sokal R B. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. San Francisco: W. H. Freeman and Co., 1993.
- [5] 周顺伍. 生物化学实验技术. 北京:北京农业大学出版社,1991.
- [6] 林万明. 细菌分子遗传学分类鉴定法. 上海:上海科学技术出版社,1990.
- [7] Johnson J L. Determination of DNA base composition, DNA reassociation and RNA hybridization of bacterial nucleic acid. In: Gottschalk G. *et al.* *Methods in Microbiology*. Vol 18. London: Academic Press, Inc. Ltd, 1985, 1~74.
- [8] De Ley J, Cattoir H, Reynaerts A. *Eur J Biochem*, 1970, **12**:133~142.
- [9] Laguerre G, Allard M R, Revoy F *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**:56~63.
- [10] Jordan D C. *Rhizobiaceae*. In: Krieg, N R, Holt J G ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 1. Baltimore: The Williams & Wilkins Co, 1984, 234~256.
- [11] Graham P H, Sadowsky M J, Keyser H H *et al.* *Int J Syst Bacteriol* 1991, **41**:582~587.
- [12] Stackebrandt E, Goebel B M. *Int J Syst Bacteriol*, 1994, **44**:846~849.

STUDY ON POLYPHASIC TAXONOMY OF RHIZOBIA ISOLATED FROM *LESPEDEZA* SPECIES*

Yao Zhuyun Chen Wenxin

(Department of Microbiology, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract The diversity of rhizobia isolated from *Lespedeza* spp. was determined on the basis of numerical analysis of phenotypic characteristics, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of proteins, DNA-DNA homology and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of 16S-ribosomal DNA genes. According to numerical analysis of 125 phenotypic characteristics, strains were divided into two groups at a similarity level of 67%. Group I included all the fast-growing strains, group II included all the slow-growing strains. Above the similarity level of 80%, four subgroups could be further divided. Subgroup I was fast-growing rhizobia containing representative strain of *Sinorhizobium saheli*. Subgroup II, III, IV were slow-growing rhizobia. Subgroup II composed of strains isolated from *Lespedeza cuneata* in Beijing area and these isolates produced acid in medium containing mannitol. Subgroup III included type strain of *Bradyrhizobium japonicum*. The DNA G + C contents and DNA-DNA homology of the members of above four subgroups were determined. The subgroup I shared the same DNA homologous group with *S. saheli*, subgroup III belonged to *B. japonicum*, subgroup IV belonged to *B. elkanii*, subgroup II was an unique DNA homologous group which showed low level of DNA relatedness with other slow-growing rhizobia species. RFLP analysis of 16S rDNA genes verified that the subgroup II was a distinctive gene line and showed genetic variation within the strains in it.

Key words *Lespedeza* rhizobia, Polyphasic taxonomy, Numerical classification, DNA relatedness, 16S rDNA PCR-RFLP

* Key Project of Chinese National Natural Science Fund(No. 39130010)