

## 金沙江干热河谷区田菁根瘤菌多样性与系统发育

黄昌学<sup>1</sup>, 张小平<sup>1\*</sup>, 彭贤超<sup>1</sup>, K. Lindstrom<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 四川农业大学资源环境学院, 雅安 625000)

(<sup>2</sup> Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki, Helsinki -00014, Finland)

摘要:【目的】揭示金沙江干热河谷区这一特殊地理环境下田菁根瘤菌的多样性和系统发育地位。

【方法】采用了数值分类、16S rDNA PCR-RFLP、16S rDNA 和 GS 序列分析方法。【结果】数值分类结果表明:在 93%的水平上,待测菌株分布于 6 个群,其中 4 个群分别与 *R.tropici*、*R.etli*、*S.saheli*、*A.rubi* 的参比菌株聚在一起,两个群没有参比菌株与之聚群。16S rDNA PCR-RFLP 结果与数值分类基本一致,只有两个独立群有所差异。16S rDNA 序列分析表明:两独立群中心菌株 SCAU176 和 SCAU144 与 *R.huautlense* 聚在一起,与该种同源性分别为 100%和 98.9%。GS 序列分析中 SCAU176 和 SCAU144 单独聚在一起,与最近的参比菌株 *R.tropici* 的同源性系数在 90%以下。【结论】金沙江干热河谷区田菁根瘤菌具有较为丰富的多样性,在系统发育地位上分布于 *Sinorhizobium*、*Agrobacterium* 和 *Rhizobium* 三个属。

关键词:田菁;根瘤菌;多样性;系统发育;数值分类;16S rDNA;GS;序列分析

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:0001-6209 (2008) 06-0725-08

四川西南部的金沙江干热河谷区,由于横断山脉深切河谷形成特殊的气候。这一地区暖冬长,气温日差大,年降雨量少,形成特殊的干热河谷景观。该地区水土流失十分严重,土壤贫瘠,裸地面积大,其植被大部分为耐旱耐贫瘠的豆科草本和木本植物,是固沙、固土和保水的先锋或伴生植物。

田菁(*Sesbania cannabina*)又名碱青、蒾豆、田菁草,耐盐耐碱、耐瘠耐涝、生长迅速。它既是改良盐碱地的先锋作物,又是很好的夏季绿肥,也可作为饲料,茎秆表皮纤维可剥制麻,茎秆是造纸的原料,种子含有丰富的半乳甘露聚糖胶,可供多种工业利用。

Lajudie 从塞内加尔田菁根瘤菌分离,经研究发现为中华根瘤菌属的一个新种 *S. saheli*<sup>[1]</sup>; Dreyfus 从毛萼田菁(*Sesbania rostrata*)的茎瘤中分离出 *Azorhizobium*

*caulinodans*<sup>[2]</sup>。Wang 对墨西哥胡奥特拉(Huautla)的田菁根瘤菌进行研究,定种为 *R.huautlense*<sup>[3]</sup>。

根瘤菌的表型多样性(phenotypic diversity)是指根瘤菌在形态结构、化学组成、血清学反应及其生理功能等方面的特异性。而遗传多样性(Genetic diversity)是指生物种内基因的多样性,包括种群间和个体间的遗传变异。在多样性研究的基础上,常常需要测定根瘤菌各遗传群的代表菌株的保守基因片段序列,进一步确定菌株的系统发育地位。由于 16S rRNA 序列变异速度异常缓慢,目前的根瘤菌系统发育关系主要是建立在 16S rRNA 基因序列基础上。谷氨酰胺合成酶基因(Glutamine synthetase)是编码催化合成谷氨酰胺的酶的基因,主要有两种形式:GS<sup>-</sup>和 GS<sup>+</sup>,具有高度的保守性,也是研究生物发育和进化的理想“分子钟”基因。此外,根瘤菌的结瘤基因(*nod*)和固氮

基金项目:国家自然科学基金(30570062)

\*通讯作者。Tel: +86-835-2882710; Fax: +86-0835-2883166; E-mail: aumdwbsb@sicau.edu.cn

作者简介:黄昌学(1982-),男,四川都江堰人,硕士研究生,研究方向为生物固氮。Tel: +86-835-2882538; E-mail: hcx5678@163.com

收稿日期:2007-11-27; 修回日期:2008-03-28

基因(*nif*)的分布特性和序列分析也可以揭示根瘤菌的遗传多样性。

本研究利用数值分类(Numerical Taxonomy)、16S rDNA PCR-RFLP 分析、16S rDNA 序列分析、GS 序列分析考察了分离自金沙江干热河谷区这一特殊地理环境下田菁共生根瘤菌的多样性及其在根瘤菌系统发育中的地位,旨在发掘金沙江干热河谷区的根瘤菌资源,了解该地区根瘤菌的系统发育地位及主要类群的分布情况,为田菁根瘤菌接种剂的筛选奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品采集:** 采样地点为攀枝花东区、攀枝花西区、盐边县、米易县。

**1.1.2 供试菌株:** 供试菌株 63 株,其中待测菌株 48 株,参比菌株 15 株(由四川农业大学微生物实验室保存),分属于 *Rhizobium*、*Agrobacterium*、*Sinorhizobium*、*Mesorhizobium*、*Azorhizobium* 和 *Allobacterium* 6个属(见表 1)。

表 1 供试菌株

Table 1 Bacterial Strains Used

Strains	Host	Origin	Elevation	Soil type	Soil pH
SCAU131	<i>Sesbania cannabina</i>	East District, Panzhihua (攀枝花东区)	1440	Red-yellow soil	5.5
SCAU132-140	<i>Sesbania cannabina</i>	Yanbian, Panzhihua (盐边县, 攀枝花)	1080	Yellow soil	6
SCAU141-142	<i>Sesbania cannabina</i>	Yanbian, Panzhihua (盐边县, 攀枝花)	1100	Yellow soil	6
SCAU143-150	<i>Sesbania cannabina</i>	Yanbian, Panzhihua (盐边县, 攀枝花)	1085	Dry-red soil	6
SCAU151-161	<i>Sesbania cannabina</i>	Miyi, Panzhihua (米易县, 攀枝花)	1085	Dry-red soil	6
SCAU162-163	<i>Sesbania cannabina</i>	West District, Panzhihua (攀枝花西区)	1250	Red-yellow soil	5.5
SCAU164-170	<i>Sesbania cannabina</i>	East District, Panzhihua (攀枝花东区)	1080	Yellow soil	6
SCAU171-173	<i>Sesbania cannabina</i>	Yanbian, Panzhihua (盐边县, 攀枝花)	1150	Yellow soil	6
SCAU174	<i>Sesbania cannabina</i>	Miyi, Panzhihua (米易县, 攀枝花)	1040	Yellow soil	6.5
SCAU175-176	<i>Sesbania cannabina</i>	Miyi, Panzhihua (米易县, 攀枝花)	1110	Purple soil	6
SCAU177-178	<i>Sesbania cannabina</i>	Miyi, Panzhihua (米易县, 攀枝花)	1250	Red soil	6
<i>Azorhizobium caulinodans</i> USDA4892 <sup>T</sup>	<i>Sesbania cannabina</i>	USA			
<i>Mesorhizobium ciceri</i> USDA3378 <sup>T</sup>	<i>Cicer arietinum</i>	USA			
<i>M. huakuii</i> CCBAU2609 <sup>T</sup>	<i>Astragalus sinicus</i>	CCBAU			
<i>M. loti</i> NZP2234	<i>Lotus corniculatus</i>	New Zealand			
<i>M. phurifarium</i> LMG11892 <sup>T</sup>	<i>Acacia senegal</i>	Belgium			
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 <sup>T</sup>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Colombia			
<i>R. etli</i> CFN42 <sup>T</sup>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Mexico			
<i>R. leguminosarum</i> 127K17	<i>Phaseolus vulgaris</i>	USA			
<i>R. mongolense</i> USDA1844 <sup>T</sup>	<i>Medicago ruthenica</i>	USA			
<i>Sinorhizobium saheli</i> USDA4102 <sup>T</sup>	<i>Sesbania pachycarpa</i>	USA			
<i>S. fredii</i> USDA205 <sup>T</sup>	<i>Glycine max</i>	Henan China			
<i>S. meliloti</i> USDA1002 <sup>T</sup>	<i>Medicago sativa</i>	USA			
<i>S. meliloti</i> 102F28	<i>Medicago sativa</i>	USA			
<i>Allorhizobium undicola</i> LMG11875 <sup>T</sup>	<i>Neptunia nantans</i>	Belgium			
<i>Agrobacterium rubi</i> IAM13569 <sup>T</sup>		Japan			

**1.1.3 主要试剂:** Taq DNA 聚合酶、dNTP 和内切酶均购自北京天根生化科技有限公司 (Tiangen)。

## 1.2 菌株分离, 纯化与回接

灭菌后用无菌玻棒压破根瘤, 挑取根瘤悬液在 YMA 平板上划线分离, 28 °C 下培养; 根瘤菌菌落表面光滑、突起、有多糖产生, 纯化后革兰氏染色镜检阴性、无芽孢、短杆状, YMA 斜面接种保藏; 回接实验在无菌的 250 mL 输液瓶中进行。操作参照 Yang 等方法<sup>[4]</sup>。

## 1.3 表型多样性分析

本研究对 32 种碳源、13 种氮源和其它 70 项生理生化指标进行了测定。包括 6 种抗生素( 头孢霉素、氨卞青霉素、链霉素、林可霉素、庆大霉素、卡拉霉素) 四个浓度 (5 µg/mL、50 µg/mL、100 µg/mL 和 300 µg/mL) 的抗性测定, 7 种染料 (溴酚蓝、俾士麦棕、亚甲蓝、中性红、亚甲绿、溴甲酚紫、甲基红) 和两种化学物质 (脱氧胆酸钠和亚硝酸钠) 两个浓度 (0.1% 和 0.2%) 的抗性测定, 不同生长温度 (4 °C、10 °C、37 °C、60 °C 处理 10 min) 和 pH (pH4、pH5、pH9 和 pH10) 范围, 不同 NaCl 浓度 (1%、2%、3%、4% 和 5%) 的耐受性, 以及脲酶、L-苯丙氨酸脱氨酶、氧化酶活性测定, BTB 产酸产碱反应, 产 3-酮基乳糖反应, 石蕊牛奶反应, 肉汤利用, 亚甲蓝反应测定, 具体方法见参考文献<sup>[5]</sup>。

将测定的生理生化性状结果按阳性记为“1”, 阴性记为“0”, 不能确定记为“N”进行编码后, 输入计算机。按照文献<sup>[6]</sup>的方法采用平均连锁法进行聚类分析。

## 1.4 16S rDNA PCR-RFLP 指纹图谱分析

总 DNA 的提取参照 Little 的方法<sup>[7]</sup>。

以总 DNA 为模板, 选用来源于大肠杆菌 16S rRNA 基因序列保守区域的两段引物 P1 和 P6 来扩增 16S rDNA。正向引物 P1 : 5'-CGAGAGTTTGATCCTGGC-TCAGAACGAACGCT-3'; 反向引物 P6 : 5'-CGTACGCTACCTTGTACGACTTCACCCC-3'。反应体系为 50 µL, PCR 反应条件: 92 °C, 3 min; 94 °C, 1 min, 58 °C, 1 min, 72 °C, 2 min, 30 个循环; 72 °C, 8 min。

16S rDNA PCR-RFLP 选用了 4 种限制性内切酶, 分别为 *Hae* III、*Msp* I、*Hinf* I 和 *Taq* I。酶切反应体系: 6 µL PCR 扩增产物, 5 U 内切酶, 10×酶切缓冲液 1 µL, 双蒸水补足至 10 µL; 37 °C (*Taq* I 为 65 °C) 水浴保温 6~10 h, 在含 EB 的 2% 浓度的琼脂糖凝胶板上水平电泳 (80 V, 4 h), 使用凝胶成像系统记录

成像。

## 1.5 16S rDNA 序列分析

根据前面聚类分析的结果, 选取中心菌株作为研究对象, 按 1.4 的方法扩增 16S rDNA, 送上海英骏生物技术有限公司 (Invitrogen) 测序。

## 1.6 GS II 序列分析

供试菌株与 16S rDNA 序列分析所用菌株相同。以总 DNA 为模板, 选用一对引物 GS -1 和 GS -2 来扩增 GS II, 正向引物 GS -1 : 5'-AACGCAGATCAAGGAATTCG-3'; 反向引物 GS -2 : 5'-ATGCCCCGAGCCGTTCCAGTC-3'。反应采用 50 µL 体系, PCR 反应条件: 92 °C, 2 min; 92 °C, 1 min, 55 °C, 1 min, 72 °C, 1.5 min, 30 个循环; 72 °C, 10 min。扩增产物送上海英骏生物技术有限公司 (Invitrogen) 测序。

# 2 结果和分析

## 2.1 表型多样性分析

本研究中待测的 48 株菌能利用较广泛的碳氮源, 大部分菌株对碱和高温有很好的耐性, 对林可霉素具有很好的抗性, 部分菌株能在色氨酸培养基上显黄色, 所有菌株在 BTB 培养基上产酸。

采用平均连锁法 (UPGMA) 对 48 株待测菌株和 15 株参比菌株进行聚类分析 (图 1), 从图 1 可以看出, 参与数值分类的所有菌株在 73% 相似水平上按 *Azorhizobium*、*Rhizobium*、*Mesorhizobium*、*Sinorhizobium*、*Allorhizobium*、*Agrobacterium* 6 个属分为 6 个分支。在 93% 相似水平上参比菌株按种全部分开, 待测田菁根瘤菌分布于 6 个群中。群 1 中来自攀枝花东区兰山矿区的 SCAU131 与 *Rhizobium tropici* CTAT899 聚在一起, 群 2 由分离自攀枝花西区和米易县各 2 株菌构成, 与 *Retli* CFN42 聚为一类; 群 3 由来自 5 个地区的 35 株田菁根瘤菌独立成群, 该群在所有群中丰度最大, 在 95% 的水平上, 分为 3 和 3 两个亚群; 群 4 由盐边和米易的 5 株菌组成, 该群也无参比菌株与之聚群; 群 5 为两株分离自盐边县桐子林镇 (雅砻江和安宁河交会处) 的菌株, 与 *Sinorhizobium saheli* USDA4102 聚群; 群 6 为米易县小得石镇二滩电站的一个菌株, 与 *Agrobacterium rubi* IAM13569 聚群。

## 2.2 16S rDNA PCR-RFLP 酶切图谱分析

利用 *Msp* I、*Hinf* I、*Hae* III 和 *Taq* I 4 种限制性内切酶分别对 16S rDNA 进行酶切, 分别产生 12、11、8 和 10 种酶切带型 (部分菌株 *Msp* I 酶切带型见图 2)。

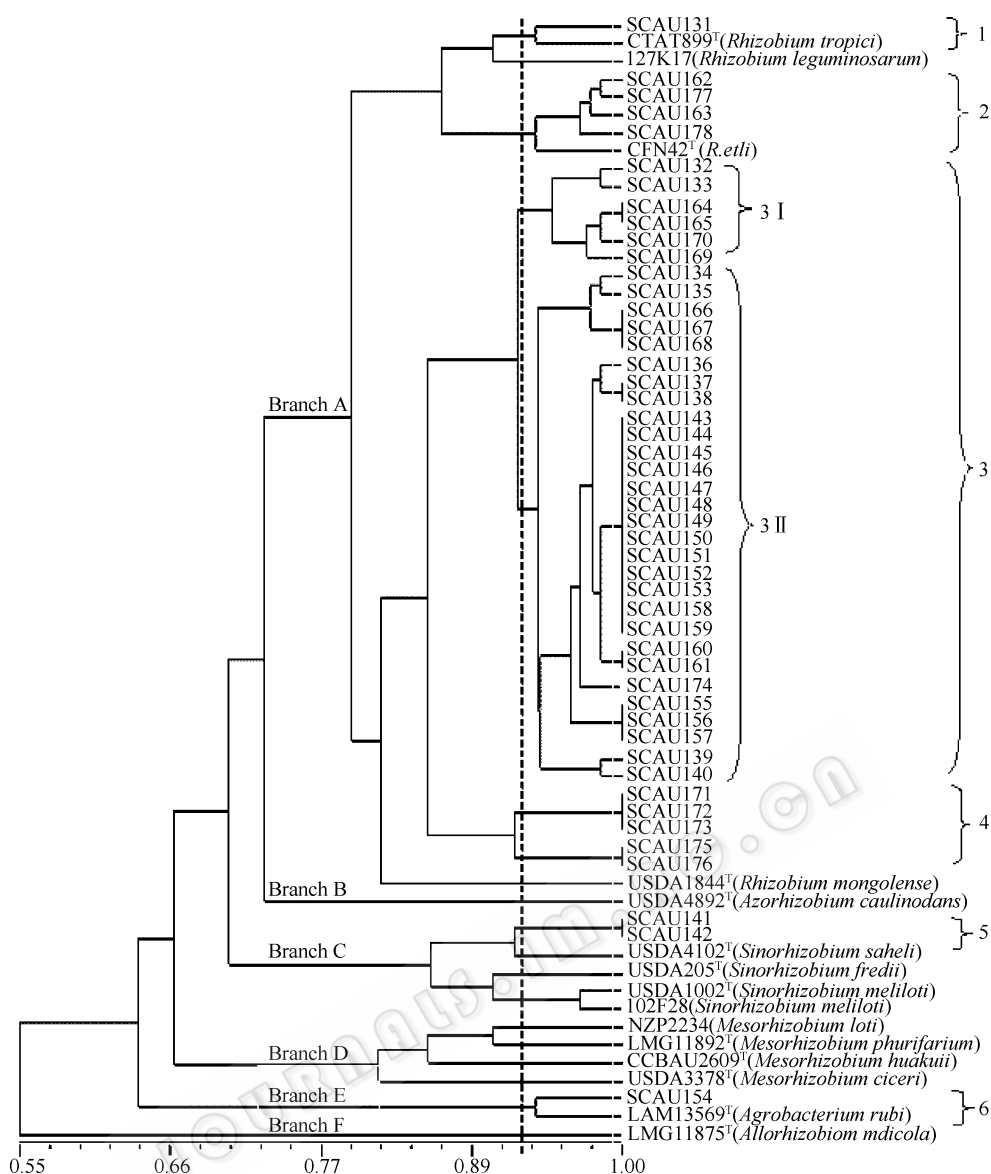


图 1 数值分类树状图

Fig. 1 Dendrogram by numerical taxonomy.

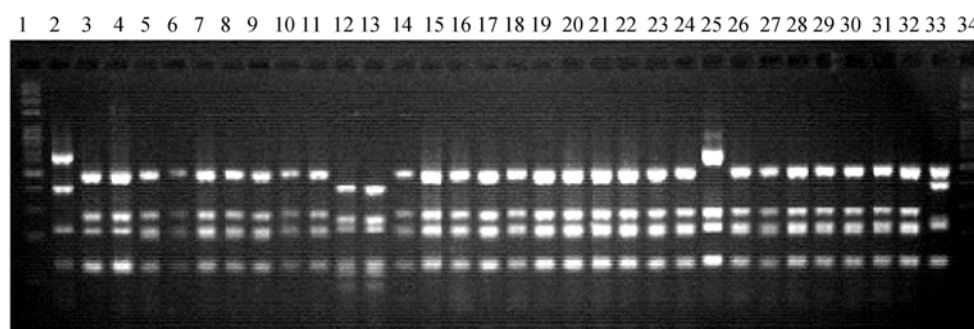
图 2 供试菌株的 *Msp* 酶切图谱

Fig. 2 Fingerprints of 16S rDNA PCR-RFLP digested by *Msp*. 1. Marker(50bp), 2. SCAU131, 3. SCAU132, 4. SCAU133, 5. SCAU134, 6. SCAU1357, 7. SCAU136, 8. SCAU137, 9. SCAU138, 10. SCAU139, 11. SCAU140, 12. SCAU141, 13. SCAU142, 14. SCAU143, 15. SCAU144, 16. SCAU145, 17. SCAU146, 18. SCAU147, 19. SCAU148, 20. SCAU149, 21. SCAU150, 22. SCAU151, 23. SCAU152, 24. SCAU153, 25. SCAU154, 26. SCAU155, 27. SCAU156, 28. SCAU157, 29. SCAU157, 30. SCAU158, 31. SCAU160, 32. SCAU161, 33. SCAU162, 34. Marker(50bp).

将电泳图谱条带均一化处理后转化成计算机可以识别的数值“1”和“0”，通过 NTSYS2.1 计算各菌株间的相似性，采用平均连锁聚类法 (UPGMA) 将结果转化为树状图，得到 16S rDNA PCR-RFLP 聚类树状图(图 3)。

由图 3，所有供试菌株在 67%水平上按 6 个属分为 6 个分支，供试田菁根瘤菌分别聚在 *Rhizobium*、*Sinorhizobium*、*Agrobacterium*3 个属中。在 91%相似

水平上，所有参比菌株按种分开，供试未知菌株属于 6 个群。

群 1、4、5、6 分别与数值分类中的群 1、2、6、5 相同。群 2 由 11 株未知菌株独立成群，由数值分类中群 3 的 3I 亚群和群 4 构成。群 3 的 29 株菌独立成群，丰度最大，且相似度都在 100%的水平上，该群与数值分类中群 3 的 3II 亚群菌株相同。

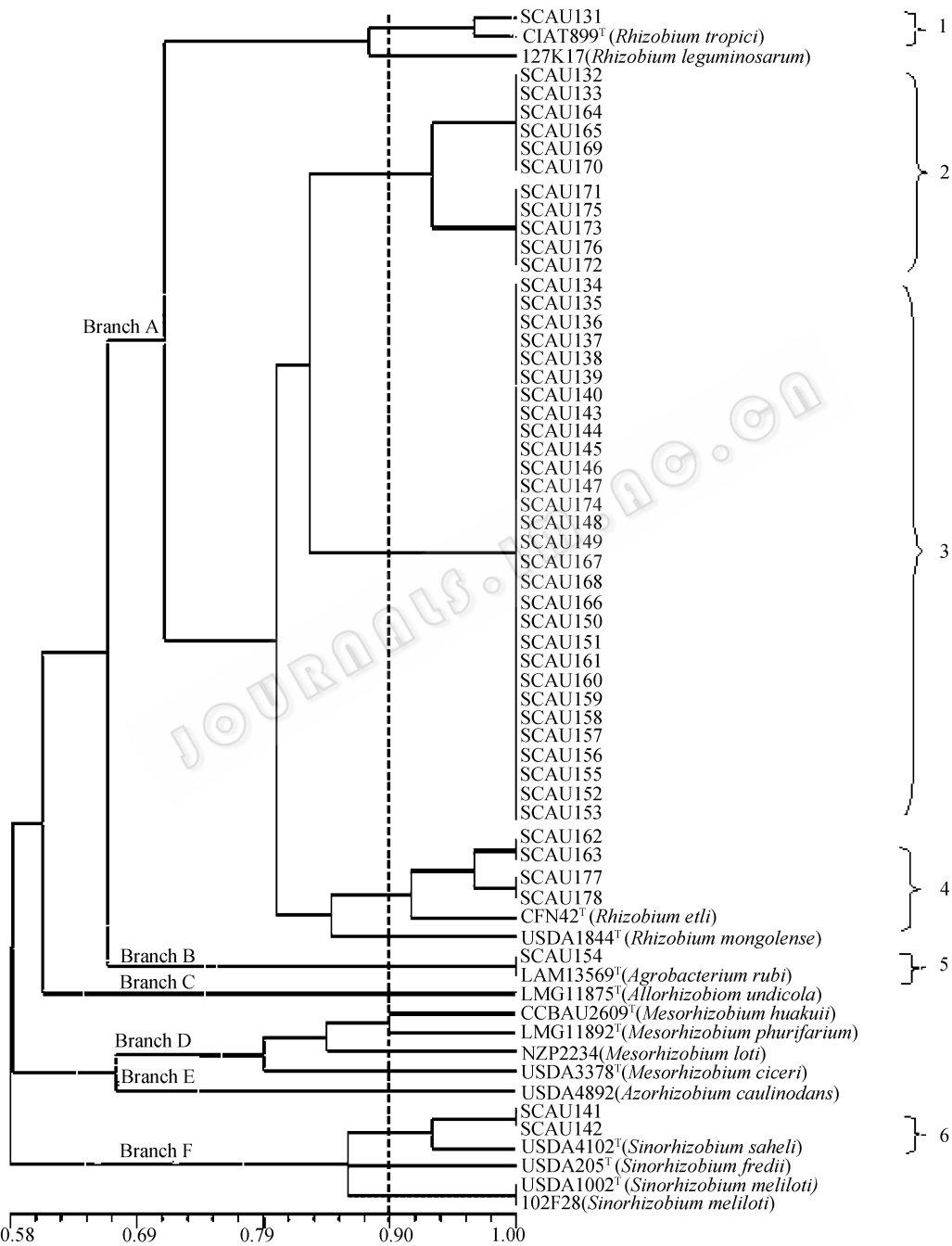


图 3 16SrDNA-RFLP 分析树状图

Fig. 3 Dendrogram obtained from 16SrDNA PCR-RFLP.

### 2.3 16S rDNA 序列分析

在综合以上聚类分析的基础上, 选取 16S rDNA PCR-RFLP 中独立成群的群 3、群 2 代表菌, 测定了 16S rDNA 的部分序列 (SCAU144 为 1332 bp, SCAU176 为 1351bp)。其 GenBank 序列登录号依次为 EU252029, EU252030。利用 DNAMAN 软件对 SCAU144、SCAU176 和参比菌株的 16S rDNA 序列进行 Neighbor-joining 分析, 生成反映待测菌株与典型参比菌株系统发育关系的聚类

图 (图 4)。所有根瘤菌及其相关土壤根瘤杆菌在系统发育中基本分成 *Rhizobium*、*Sinorhizobium*、*Agrobacterium*、*Mesorhizobium*、*Azorhizobium* 和 *Bradyrhizobium* 6 个分支。其中群 2 中心菌株 SCAU176 与 *R. huautlense* SO2 同源性为 100%, 可以认定为同一种。群 3 代表菌株 SCAU144 也与以上两株菌聚在一起, 但遗传距离较远, 与 *R. huautlense* 同源性系数为 98.9%, 可能为 *Rhizobium* 发育分支中的新种。

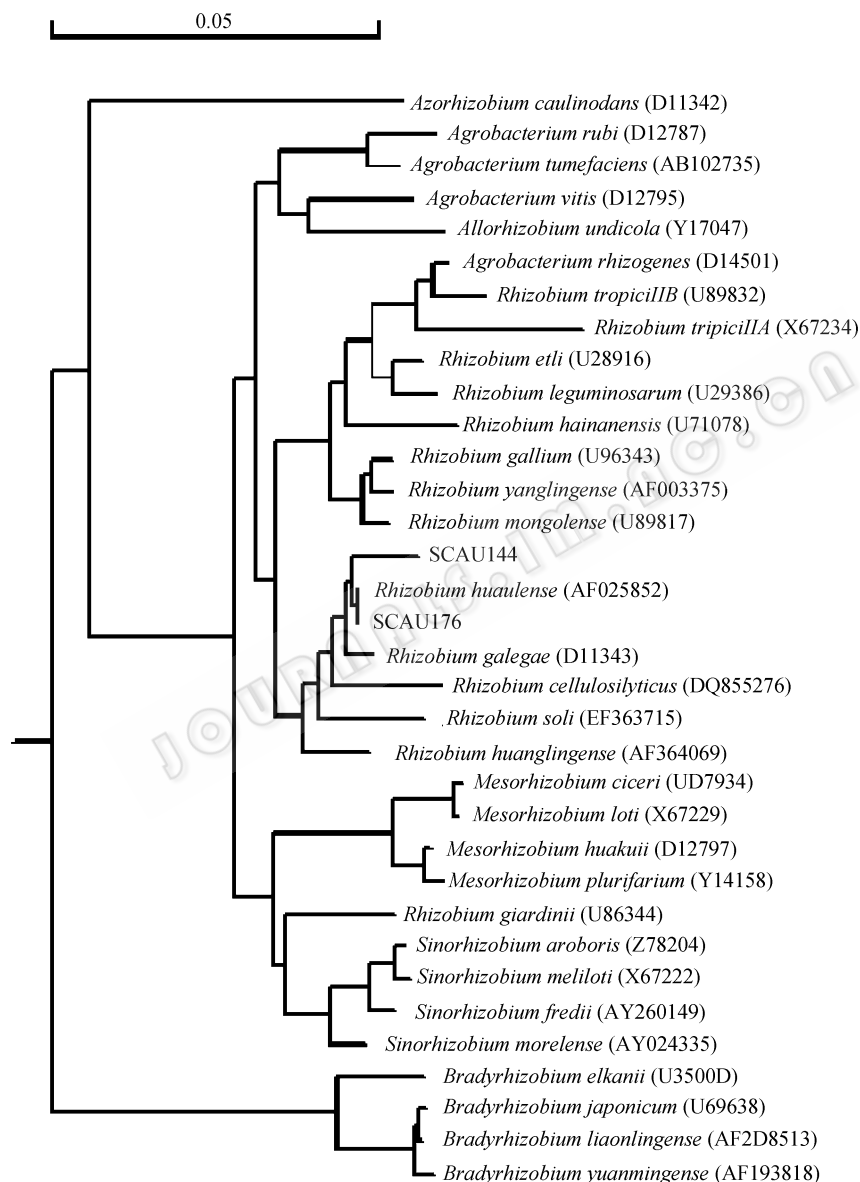


图 4 供试菌株 16S rDNA 序列聚类图

Fig. 4 Dendrogram of tested strains by 16S rDNA sequences. Sequence accession numbers are shown in parenthesis. The scale bar represents 0.05 substitutions per base position.

### 2.4 GS 序列分析

测定了两中心菌株的 GS 基因序列 (SCAU144

为 620 bp, SCA176U 为 608 bp)。其 GenBank 序列登录号分别为 EU252031, EU252032。利用 DNAMAN

软件对 SCAU144、SCAU176 和参比菌株的 GS 序列进行 Neighbor-joining 分析,生成反映待测菌株与参比菌株系统发育关系的聚类图 5。

所有根瘤菌及其相关土壤根癌杆菌在系统发育中主

要分成 *Sinorhizobium*、*Rhizobium*、*Mesorhizobium* 和 *Bradyrhizobium* 4 个分支,与 16S 聚类情况有所差异。其中代表菌株 SCAU176 与 SCAU144 单独聚在一起,同源性系数为 95.9%,它们与参比菌株的同源性系数都在 90% 以下。

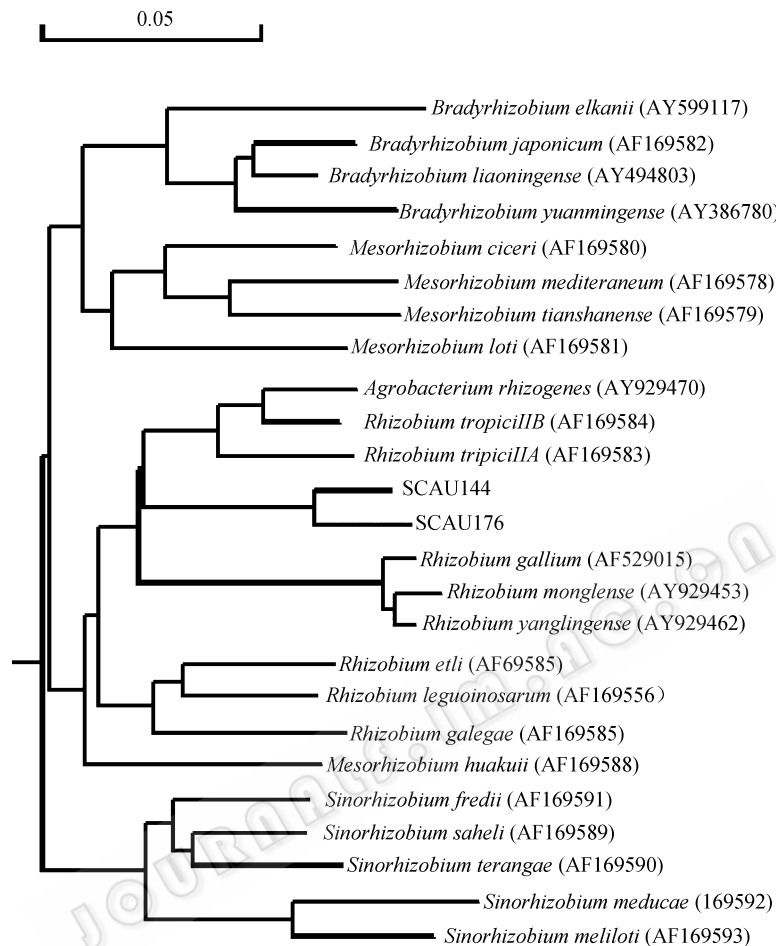


图 5 供试菌株 GS 基因序列聚类图

Fig. 5 Dendrogram of tested strains by GS sequences.

### 3 讨论

本研究通过数值分类、16S rDNA PCR-RFLP、16S rDNA 序列分析和 GS 序列分析共同对金沙江干热河谷这一特殊地理环境下田菁根瘤菌的多样性和系统发育地位做了系统研究。

表型性状研究充分表明了环境对根瘤菌的选择性:由于干热的特殊气候,该地区的田菁根瘤菌对高温有很强的耐性;另一方面,虽然田菁为耐盐碱植物,但由于该地区并非典型的盐碱地,所以供试菌株并未表现出高抗盐的特性,这就要求在今后的研究中,在盐碱地中种田菁必须用从类似的土壤中分离的菌进

行接种;另外,在该地区分离的根瘤菌中,海拔 1440、1250、1110、1100 的根瘤菌都独立聚群,表现出与海拔的相关性。

16S rDNA PCR-RFLP 聚类情况与数值分类共同研究田菁的多样性的结果表明:两种方法结果基本一致,待测菌株都主要分布于 *Sinorhizobium saheli*、*Agrobacterium rubi*、*Rhizobium tropici*、*Rhizobium etli* 和两个独立群。16S rDNA 序列分析和 16S rDNA-RFLP 聚类结果与数值分类结果有所差异,且数值分类具有更大的多样性充分说明了根瘤菌的表型性状是其自身基因与环境共同作用的结果。

16S rDNA 和 GS 序列分析结果有所差异,这

与 Turner<sup>[8]</sup>的研究结论相同。16S rDNA 序列分析结果基本确定 SCAU176 的分类地位为 *R.huautlense* ,与 Wang 的研究结果一致<sup>[3]</sup> ,而 SCAU144 与它们遗传距离较远,系统发育地位还不明确,还需进一步研究。虽然 GS 被证明是理想的“分子钟”基因,但在根瘤菌的进化与发育研究中,目前应用还不多,很多种属还没有测定参比菌株序列,本研究中就遇到没有 *R.huautlense* 的 GS 序列,因此还需进一步研究,以从 GS 序列分析这个层次揭示根瘤菌的遗传特性。

综上所述,金沙江干热河谷地区田菁根瘤菌具有丰富的多样性。通过该研究丰富了根瘤菌的基因库,为进一步研究该区豆科植物根瘤菌的系统分类地位奠定了基础,也为优良菌株的选育提供了种质资源。

### 参 考 文 献

- [1] De Lajudie P, Willems A, Pot B, et al. Polyphasic taxonomy of rhizobia: Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov, *Sinorhizobium saheli* sp. Nov, and *Sinorhizobium teranga* sp. Nov. *Int J Syst Bacteriol*, 1994, 44: 715–733.
- [2] Dreyfus BL, Garcia JL, Gillis M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen Nov, sp. Nov, a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J.Syst. Bacteriol*, 1988, 38: 89–98.
- [3] Wang ET, Van Berkum P, Beyene D, et al. E. *Rhizobium huautlense* sp. nov, a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. *Int J Syst Bacteriol*, 1998, 48: 687–699.
- [4] Yang J, Xie F, Zou J, et al. Polyphasic characteristics of *Bradyrhizobia* isolated from nodules of peanut(*Arachis hypogaea*)in China. *Soil Biology & Biochemistry*, 2005, 37: 141–153.
- [5] 刘杰, 陈文新. 中国中东部地区紫穗槐、紫荆、紫藤根瘤菌的数值分类及 16S rDNA PCR-RFLP 研究. *中国农业科学 (Science Agriculture Chinese)*, 2003, 36(1): 17–25.
- [6] 闫爱民, 陈文新. 三个根瘤菌新亚群的 16S rDNA-RFLP 分析. *高技术通讯(High Technology Reports)*, 1998, 8 (9): 53–57.
- [7] Little MC. Process for Purification of DNA on Diatomaceous Earth. United States Patent No.5, Rad laboratories Inc, Hercules, Calif, 1991, 5075430.
- [8] Turner SL, Young JPW. The Glutamine Synthetases of Rhizobia: Phylogenetics and Evolutionary Implications. *Mol Biol and Evol*, 2000, 17: 309–319.

## Diversity and phylogeny of rhizobia isolated from root nodules of *Sesbania cannabina* in Jinshajiang arid river valley

Huang Changxue<sup>1</sup>, Zhang Xiaoping<sup>1\*</sup>, Peng Xianchao<sup>1</sup>, K. Lindstrom<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Resource and Environment, Sichuan Agriculture University, Ya'an 625014 China)

(<sup>2</sup>Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki, Helsinki -00014, Finland)

**Abstract: [Objective]** To study the diversity and phylogeny of Rhizobia strains from *Sesbania cannabina* in Jinshajiang arid river valley in Sichuan province, China. **[Methods]** We used numerical taxonomy, 16S rDNA PCR-Restriction fragment length polymorphism(RFLP), sequences analysis of 16S rDNA and Glutamine synthetase II (GS II) genes. **[Results]** Based on the dendrograms generated from numerical taxonomy, the strains were clustered into 6 groups at the similarity of 93%. Four groups were closely related to type strains of *R. tropici*, *R. etli*, *S. saheli*, *A. rubi* respectively, and two groups were separated with type strains. The results of 16S rDNA PCR-RFLP were in good agreement with that of numerical taxonomy, only two separated groups showed some differences. SCAU176 and SCAU144 representing the strains of two separated groups were selected for sequence analysis. The results of 16S rDNA sequence indicated that SCAU176 and SCAU144 were related to type strains *R. huautlense*, and the homology coefficient with *R. huautlense* was 100% and 98.9% respectively. GS II sequence analysis revealed that SCAU176 and SCAU144 were clustered together, and the homology coefficient with the nearest type strains *R. tropici* was below 90%. **[Conclusion]** Rhizobia of *Sesbania cannabina* in Jinshajiang arid river valley are highly diverse, they are closely related to *Rhizobium*, *Sinorhizobium* and *Agrobacterium*.

**Keywords:** rhizobia; *Sesbania cannabina*; diversity; phylogeny; numerical taxonomy; 16S rDNA; GS II; sequences analysis

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30570062)

\*Corresponding author. Tel: +86-835-2882710; Fax: +86-835-2883166; E-mail: umdwsb@sicau.edu.cn

Received: 27 November 2007/ Revised: 28 March 2008