

黄土高原地区大豆根瘤菌的遗传多样性和系统发育

张红侠, 冯瑞华*, 李俊, 关大伟, 曹凤明

(中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081)

摘要:【目的】研究黄土高原地区大豆根瘤菌的遗传多样性和系统发育。【方法】采用 BOX-PCR、16S rDNA PCR-RFLP、16S-23S IGS PCR-RFLP 和 16S rRNA 基因序列分析方法对分离自我国黄土高原地区 4 个省的 15 个地区的 130 株大豆根瘤菌及部分参比菌株进行了遗传多样性和系统发育分析。【结果】BOX-PCR 反映的菌株多样性最丰富,形成的遗传群最多,16S rDNA PCR-RFLP 方法在属、种水平上聚群较好,16S-23S IGS PCR RFLP 反映的多样性介于 BOX-PCR 和 16S rDNA PCR-RFLP 之间,能够较好地反映出属、种和亲缘关系很近的菌株间的差异,3 种方法聚类分析结果基本一致,可将所有供试菌株分为两大类群,中华根瘤菌属 (*Sinorhizobium*) 和慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*)。从系统发育来看,供试的快生大豆根瘤菌为费氏中华根瘤菌 (*Sinorhizobium fredii*),慢生大豆根瘤菌为日本慢生大豆根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) 和辽宁慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium liaoningense*)。【结论】我国黄土高原地区大豆根瘤菌具有较丰富的遗传多样性,*S. fredii* 优势种,慢生大豆根瘤菌仅占 10%,同时,分离到 2 株 *B. liaoningense*。

关键词: 大豆根瘤菌; BOX-PCR; 16S rDNA PCR-RFLP; 16S-23S rDNA IGS PCR-RFLP; 遗传多样性; 系统发育

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 11-1466-08

空气中约 80% 的氮气不能被植物直接利用,只有固氮微生物具有将氮气转化成氨的能力,人们称为生物固氮。据统计,全球每年生物固氮量达 1.75×10^8 t,为世界工业氮肥产量的 4.37 倍^[1],生物固氮在促进可持续农业发展中具有重要作用,而根瘤菌与豆科植物形成的共生固氮体系是生物固氮中的主要组成部分。大豆是世界上种植面积最大的豆科作物之一,我国又是大豆的起源中心,大豆根瘤菌的资源十分丰富,因此研究不同地区大豆根瘤菌的遗传多样性及其系统发育具有重要的理论意义和应用价值。黄土高原位于太行山以西、青海湖以东、长城以南、秦岭以北,是一个大部分为深厚的黄土覆盖的丘陵和高原,该地处于中国东南季风湿润区向西北干旱区过渡地带,具明显的冬季寒冷、干燥的大

陆性气候。山西、陕西、甘肃及宁夏 4 省是我国黄土高原地区的主要省份,也是我国大豆的主要产区之一,大部分地区气候比较干燥,年降雨量少,十分干旱。虽然国内外对大豆根瘤菌有不少的研究^[2-6],但应用多种分子生物学方法对这一地区的大豆根瘤菌资源进行综合的考察和研究尚未见报道。

根瘤菌遗传多样性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,需要测定各遗传群的代表菌株的保守基因 16S rRNA 序列,进一步确定菌株的系统发育地位。本研究利用 BOX-PCR 指纹图谱、IGS PCR-RFLP 分析、16S rDNA PCR-RFLP 分析和 16S rRNA 基因序列分析,综合考察黄土高原地理环境条件下分离的大豆根瘤菌的多样性及其系统发育地位,对

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资助项目(nycytx-004);中央级公益性科研院所科研业务费专项资助项目(2010-34)

* 通信作者。Tel: +86-10-82108675; Fax: +86-10-82108702; E-mail: rhfeng@caas.ac.cn

作者简介:张红侠(1982-),女,济宁人,硕士研究生,从事农业微生物及生物固氮的研究。E-mail: zhanghongxia2004@126.com

收稿日期: 2010-03-31; **修回日期:** 2010-05-24

丰富和合理利用大豆根瘤菌基因资源, 筛选适合当地土壤环境条件下高效结瘤固氮大豆根瘤菌, 应用大豆根瘤菌剂以提高该地区的大豆产量具有重要的意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: PCR 试剂及各种限制性内切酶均购自大连宝生物公司。PCR 扩增仪 (Eppendorf, 美国), 高速冷冻离心机 Eppendorf

5417R (Eppendorf, 美国)。

1.1.2 供试菌株: 从黄土高原 4 个省区 15 个地区的大豆主产区采集根瘤, 在实验室条件下采用微生物学的方法分离、纯化土著大豆根瘤菌, 分离菌株间接于无菌蛭石中, 经结瘤盆栽试验, 确定为大豆根瘤菌菌株 [7]。130 个供试菌株及 4 个参比菌株用于 BOX-PCR 指纹图谱、IGS PCR-RFLP 和 16S rDNA PCR-RFLP 分析, 最后用于本文的聚类分析树状图均为供试菌株的 50 个代表株见表 1。

表 1 供试大豆根瘤菌

Table 1 Tested soybean rhizobial strains in this study

Strains	Host	Origins	16S rDNA types	IGS groups
4373	Jindou 23	Fenyang, Shanxi (山西汾阳)	I	I a
4783, 4784	Fendou 56	Fenyang, Shanxi (山西汾阳)	I	I a
4788, 4789	Liaodou 15	Linxian, Shanxi (山西临县)	I	I a
4792	Jindou 25	Linxian, Shanxi (山西临县)	I	I a
03090	<i>Glycine max</i>	Shanxi (山西)	I	I a
71034	<i>Glycine max</i>	Huanglong, Shanxi (陕西黄龙)	I	I a
4451, 4453, 4460	Jindou 29	Huaying, Shanxi (陕西华阴)	I	I a
4766	Fendou 56	Fenyang, Shanxi (山西汾阳)	I	I b
4345	Jindou 34	Fenyang, Shanxi (山西汾阳)	I	I b
4334	jindou 25	Fenyang, Shanxi (山西汾阳)	II	II a
4380	jindou 34	Fenyang, Shanxi (山西汾阳)	II	II a
4350	Jindou 59	Fenyang, Shanxi (山西汾阳)	II	II a
4780	Jindou 56	Linxian, Shanxi (山西临县)	II	II a
4787	liaodou15	Linxian, Shanxi (山西临县)	II	II a
4791	jindou 25	Linxian, Shanxi (山西临县)	II	II a
4768	<i>Glycine max</i>	Taiyuan, Shanxi (山西太原)	II	II a
4480	<i>Glycine Soja</i>	Xiangyuan, Shanxi (山西襄垣)	II	II a
SR2a	<i>Glycine max</i>	Shouyang, Shanxi (山西寿阳)	II	II a
2078, 2090	<i>Glycine max</i>	Shanxi (山西)	II	II a
4413	jindou 19	Yongning, Ningxia (宁夏永宁县)	II	II a
4426	Jindou 78	Yanan, Shanxi (陕西延安)	II	II a
4455	jindou 29	Huaying, Shanxi (陕西华阴)	II	II a
4729	jindou 19	Ningxian, Gansu (甘肃宁县)	II	II a
4734, 4735	jindou 1	Ningxian, Gansu (甘肃宁县)	II	II a
4749	Jinda 74	Zhenyuan, Gansu (甘肃镇原)	II	II a
4761	dongda 3	Zhenyuan, Gansu (甘肃镇原)	II	II a
4699	chengdou 6	Qukou, Ningxia (宁夏渠口)	II	II a
4717, 4720	chengdou 6	Yongning, Ningxia (宁夏永宁)	II	II a
4721	Landraces	Yongning, Ningxia (宁夏永宁)	II	II a
4394	jindou 25	Huangling, Shanxi (陕西黄陵)	II	II b
4415	jindou 19	Yanan, Shanxi (陕西延安)	II	II b
4462, 4796	jindou 23	Fenyang, Shanxi (陕西凤阳)	II	II d
4393	jindou 23	Huangling, Shanxi (陕西黄陵)	II	II d
4397	jindou 25	Huangling, Shan xi (陕西黄陵)	II	II d
4774	fendou 56	Linxian, Shanxi (山西临县)	II	II d
4753	jindou 23	Zhenyuan, Gansu (甘肃镇原)	II	II c
4793	jindou 21	Linxian, Shanxi (山西临县)	II	II c
4723, 4725	Landraces	Yongning, Ningxia (宁夏永宁)	II	II c
4450	jindou 29	Huaying, Shanxi (陕西黄陵)	II	II c
4798	jindou 23	Huangling, Shanxi (陕西黄陵)	II	II c
<i>B. japonicum</i> USDA110	<i>Glycine max</i>	USA	I	I a
<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T	<i>Glycine max</i>	USA	IV	IV
<i>S. meliloti</i> USDA 1002 ^T	<i>Medocagp sativa</i>	USA	III	III
<i>S. fredii</i> USDA 205 ^T	<i>Glycine max</i>	USA	II	II a

^aStrains 03090, 71034 and SR2a were provided by Chinese Agricultures University. ^bThe strains marked in bold were sequenced for 16S rRNA genes.

1.1.3 引物及限制性内切酶:采用细菌通用引物 27F 和 1492R 进行 16S rDNA 片段 PCR 扩增;IGS 扩增引物 FGPS1490 和 FGPS132,参照文献[8];BOX-PCR 采用引物 BOXAIR,见表 2。BOX-PCR 采用引物 BOXAIR,见表 2。5 种限制性内切酶分别为 *Hae*III, *Hinf* I, *Msp* I, *Hha* I, *Mbo* I,参照文献[3,9]。

表 2 本研究所用的引物
Table 2 The primers of this study

Primer	Sequence(5→3')	Size/bp
27F	AGAGTTTGATCTCGGCTCAG	20
1492R	GGTTACCTTGTACGACTT	19
FGPS1490	CCGGGTTTCCCATTCCGG	18
FGPS132	TGCGGCATCACCTCCTT	17
BOXAIR	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	22

1.2 总 DNA 的提取

供试菌株经 YMA 斜面活化后,然后接种于 5 mL YMA 液体培养基中,28℃,180 r/min 摇床培养 2-3 d,取 1.5 mL 菌液于 EP 管中,15000 × g 收集菌体,按照参考文献[10]的方法提取总 DNA,并用已知浓度的 λ-DNA 进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳估测所提取的 DNA 浓度,使用前调至 50 mg/L。

1.3 PCR 扩增

所有 PCR 扩增反应按文献[11-12]的要求加入 PCR 各个组分,按 PCR 循环程序进行扩增。取 3 μL PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖电泳检查扩增效果。

1.4 RFLP 分析

用 4 种限制性内切酶 *Mbo* I、*Hinf* I, *Hha* I 和 *Msp* I 分别对 16S rDNA-PCR 产物进行酶切;用 3 种限制性内切酶 *Hae*III、*Mbo* I、和 *Msp*I 对 IGS-PCR 产物进行酶切。每个酶切反应中加入 10 μL PCR 产物,5 U 酶,37℃ 酶切 3 h,酶切产物与 2 μL 上样缓冲液混匀后点样,2% (含 EB) 琼脂糖凝胶 80-100 V 电泳 2-3 h。电泳结束后,用紫外凝胶扫描仪扫描、照相,以 TIFF 格式保存。图象信息采用 GelcomparII (Version3.5) 软件分析,用平均连锁法聚类,最后绘成供试菌株的 UPGMA 树状图。

1.5 16S rDNA 序列测定

5 株大豆根瘤菌代表菌株的 16S rDNA 产物扩增同 1.3,采用 PCR 产物直接测序,由上海生工生物工程技术有限公司完成测序。从 GenBank 中获取参比菌株的 16S rDNA 序列,序列的比对和系统发育树的构建都通过 Mega4.0 软件完成。序列比对用 Clustal W,系统发育树的构建采用 Neighbour-Joining 和 Jukes-Cantor 模型。自展分析基于 1000 次重复。

2 结果

2.1 BOX-PCR 的聚类分析

各供试菌株经过 BOX-PCR 后,获得了较多的遗传谱带,条带数在 10-15 之间(图 1)。分子量大小分布在 0.2-5.0 kb,菌株之间的差异能够被区分开;图 1 显示,供试菌株及参比菌株在 75.5% 的相似性水平上聚为一群;在 77.5% 的相似性水平上,供试菌株分为快生和慢生大豆根瘤菌两个群 A 和 B;在 86% 的相似性水平上,供试快生大豆根瘤菌分为 7 个遗传群,群 A1、A2、A3、A4、A5、A6 和 A7;群 A1 与费氏中华根瘤菌 (*Sinorhizobium fredii* USDA 205) 聚为一群,且所占比例最大,包括了山西、陕西、甘肃和宁夏 4 个省区的 14 株供试菌株;其次为群 A5;群 A3、A4、A6 和 A7 均包括 3 株供试菌株,群 A3 由分离自山西临县、山西寿阳和甘肃镇原的 3 株菌组成,群 A4 由分离自山西、陕西和甘肃的菌聚在一起,群 A6 包括陕西黄陵的 2 株菌和山西临县的 1 株菌;群 A7 由分离自山西汾阳的 3 株菌组成;群 A2 由山西的 2 株菌聚在一起;参比菌株苜蓿中华根瘤菌 (*Sinorhizobium meliloti* USDA 1002) 单独成为一个分支。慢生大豆根瘤菌在 87% 的水平分为两个遗传群,群 B1 和 B2。群 B1 由 11 株来自陕西和山西的慢生菌组成,且和参比菌株日本慢生大豆根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum* USDA 110) 聚在一起;群 B2 由分离自山西汾阳的 2 株菌组成,参比菌株埃尔坎慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium elkanii* USDA 76) 在 79% 的相似性水平和供试慢生大豆根瘤菌分开。群 A2、群 A7 和群 B2 聚在一起的都是地理分布很近的菌株,但大豆品种不完全相同;其余各群包括了不同地理来源和不同大豆品种的菌株。除一部分供试菌株与参比菌株聚在一起外,其余都独自成群,表明了供试菌株在基因组上差异很大。

2.2 IGS PCR - RFLP 的聚类分析

供试菌株 IGS 扩增结果出现一条带谱,大小约为 900-1300 bp 之间。快生大豆根瘤菌谱带大小约为 1250 bp,慢生大豆根瘤菌约为 1000 bp。用 3 种限制性内切酶对 PCR 产物酶切,酶切图谱的聚类分析形成树状图(图 2),分群结果见表 1。全部菌株在 53% 的相似性水平分为两大遗传群,分支 I 是慢生大豆根瘤菌群,包括了 13 株供试菌株,与慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*) 参比菌株聚在一起;分支 I 在 81% 相似水平处又进一步分成 2 个遗传群 I a 和 I b,群 I a 包括 11 株分离自山西和陕西不同地

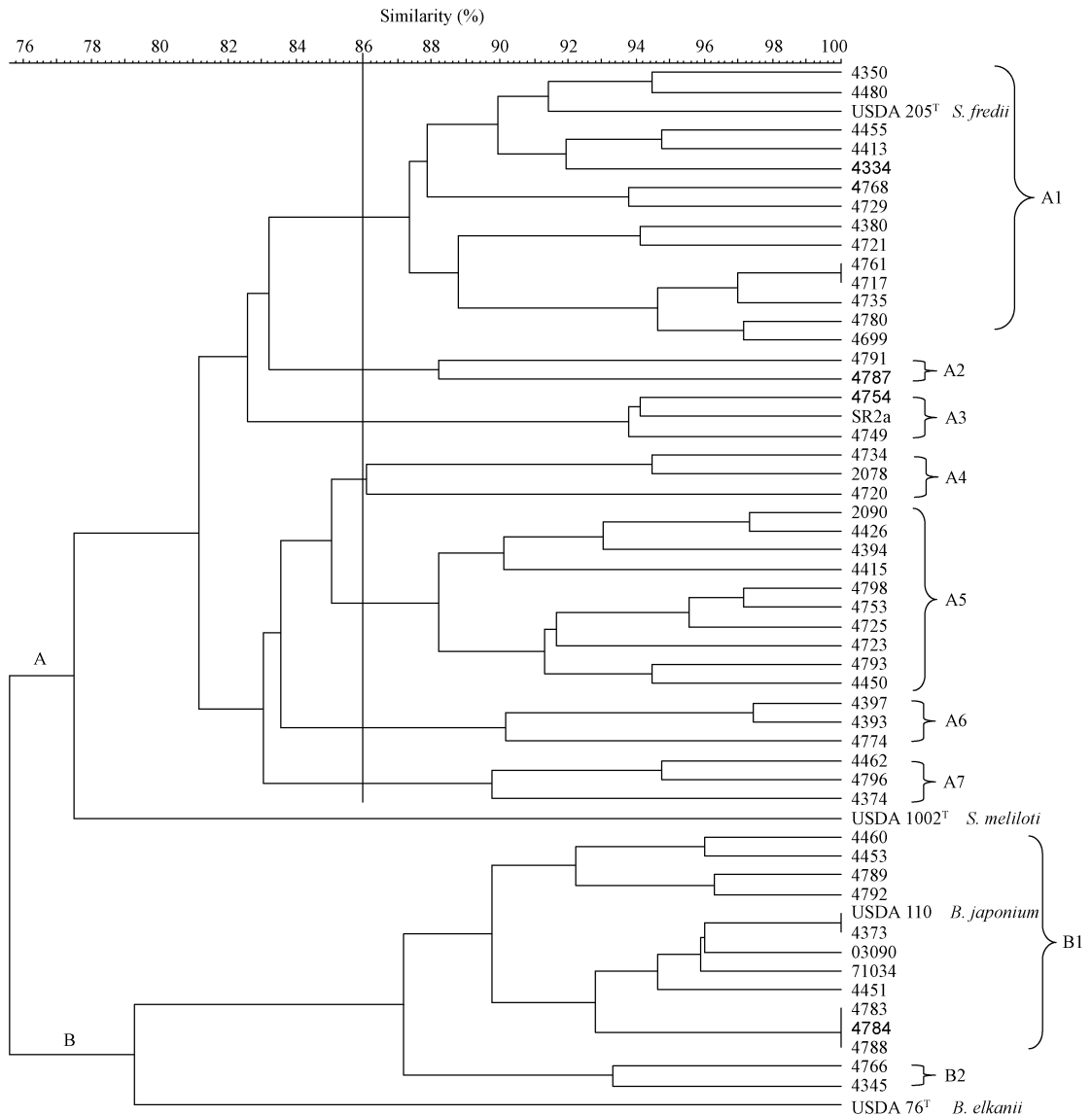


图1 BOX-PCR 指纹图谱聚类分析树状图

Fig. 1 Analysis of BOX-PCR fingerprinting.

区的供试菌,和参比菌株 *B. japonium* USDA 110 聚在一起;相当于 BOX 遗传群的 B1;群 I b 包括两株分离自山西汾阳的供试菌,相当于 BOX 遗传群的 B2,而参比菌株 *B. elkanii* USDA 76^T 独立成群;分支 II 包括了 37 株供试菌,它们与中华根瘤菌属 (*Sinorhizobium*) 参比菌株聚在一起,在 85% 的相似水平上进一步又分为 4 个遗传群,群 II a 相当于 BOX 遗传群的 A1、A2、A3 和 A4,群 I a 中的菌 2090 位于 A5 分支,和参比菌株 *S. fredii* USDA 205 聚在一起,群 II b 和 II c 相当于群 A5 的其它菌株,群 II d 相当于群 A6 和 A7,而参比菌株 *S. meliloti* USDA 1002 独立成群。

2.3 16S rDNA PCR - RFLP 的聚类分析

16S rDNA PCR 扩增结果,所有供试菌株及参比

菌株均产生大小约 1.5 kb 的片段。用 4 种限制性内切酶对 PCR 产物酶切,酶切分析后共得到 4 种酶切图谱(见表 1),酶切图谱聚类分析树状图如下(图 3)。由图 3 可见,在 64.8% 的相似水平所有大豆根瘤菌聚为一群,在 80.5% 的相似性水平分为中华根瘤菌属和慢生根瘤菌属。其中,全部供试快生大豆根瘤菌(37 株)和中华根瘤菌属模式种 *S. fredii* USDA 205 相似性达 100%,与参比菌株 *S. meliloti* USDA 1002 的亲缘关系较远;供试慢生大豆根瘤菌(13 株)也全部与 *Bradyrhizobium* 属参比菌株 *B. japonium* USDA 110 相似性达 100%,与参比菌株 *B. elkanii* USDA 76 在 88% 的相似水平聚在一起。

2.4 16S rRNA 基因序列分析

根据 IGS PCR-RFLP 聚类分析结果,测定了慢

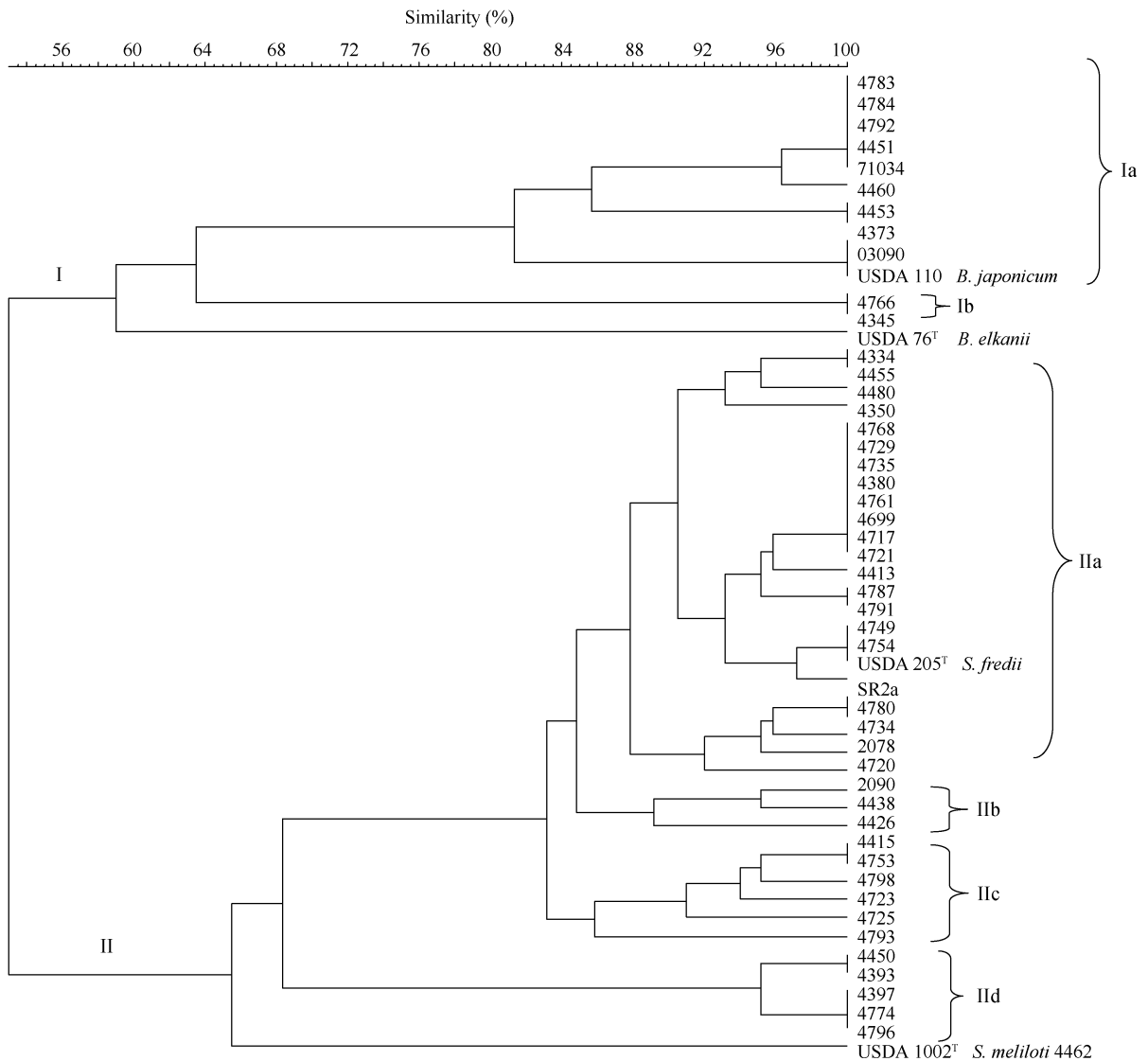


图 2 供试菌株 16S-23S rRNA IGS 的 RFLP 聚类图

Fig. 2 UPGMA dendrogram obtained from IGS PCR-RFLP. The strains marked in bold were used in 16S rRNA gene sequencing.

生菌群代表菌株 I a (4373) 和 I b (4345) 及快生菌群代表菌株 II a (4753)、II b (SR2a)、和 II d (4393) 的 16S rDNA 的序列,其 GenBank 序列登录号分别为 HM014138、HM014137、HM014139、HM014136 和 HM036104。利用 MEGA4.0 软件对 5 株代表菌株和参比典型菌株的 16S rDNA 序列进行 Neighbor-Joining 分析,图 4 为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。由图 4 可见:所有供试快生菌和慢生菌在系统发育上分为两大分支,供试 2 株慢生大豆根瘤菌 4373 和 4345 在系统发育上分别与代表菌株 *B. japonicum* 和辽宁慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium liaoningense*) 以 100% 的相似性聚在一起,说明 IGS 群 I a 与 *B. japonicum* 的亲缘关系更近,IGS 群 I b 与 *B. liaoningense* 的亲缘关系

更近,2 株菌与圆明慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium yuanmingense*) 的相互序列差异小于 1%,亲缘关系密切;而与 *B. elkani* 的亲缘关系较远,遗传距离均大于 2.5%。3 株快生大豆根瘤菌在系统发育上与 *S. fredii* 聚在一起,相似性达 100%,与新疆中华根瘤菌 (*Sinorhizobium fredii xinjiangense*) 的相似性为 99.9%,但是与 *S. meliloti* 1002 的序列差异均大于 1%。系统发育研究结果与 IGS PCR-RFLP 的分析结果具有很好的一致性。

3 讨论

大豆是世界上最重要的广泛栽培的豆科作物,大豆根瘤菌是最重要的固氮共生体,多年来大豆根瘤菌的多样性一直是人们研究的重点。根瘤菌遗传

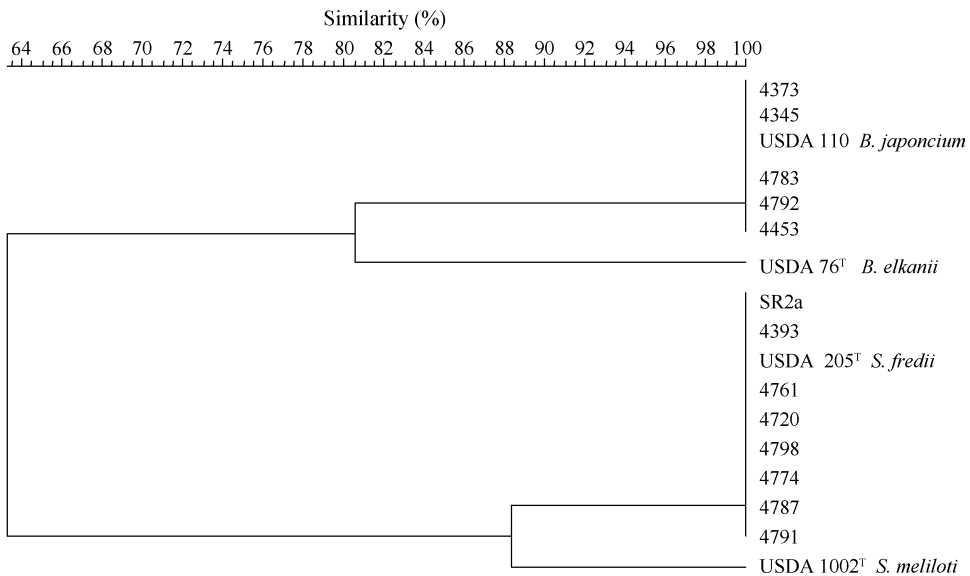


图3 16S rDNA PCR-RFLP 聚类结果

Fig. 3 UPGMA dendrogram obtained from 16S rDNA PCR-RFLP.

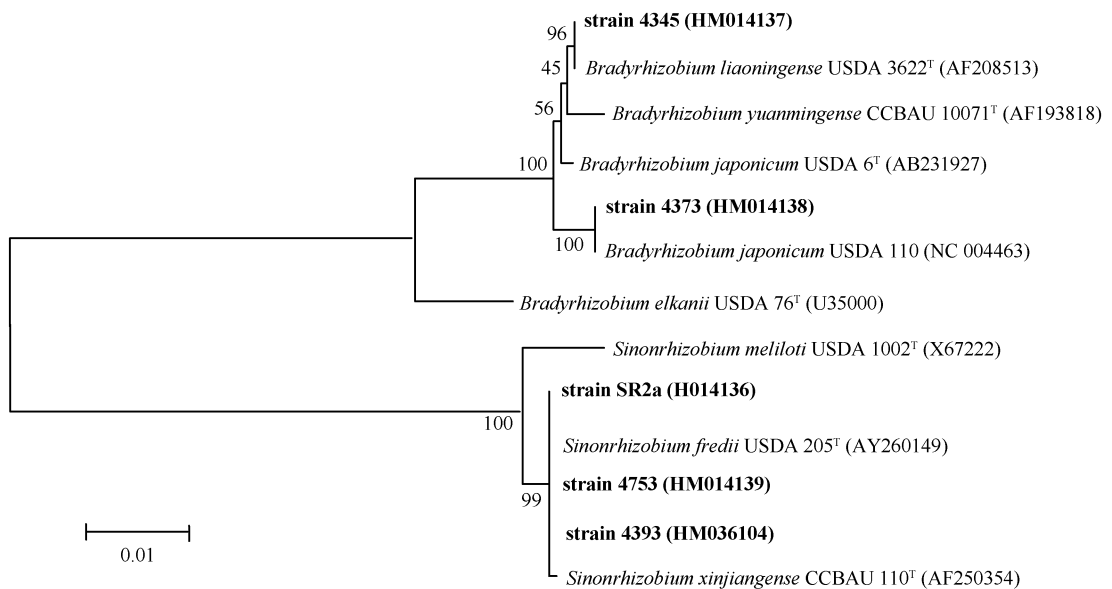


图4 根瘤菌代表菌株和参比菌株的16SrRNA序列同源性的Neighbour-joining聚类图

Fig. 4 Phylogenetic relationship between the representatives of isolated soybean rhizobia and the reference strains based on aligned sequences of 16S rRNA. The tree is bootstrapped with 1,000 subreplicates and the confidence levels are indicated at the internodes. The scale bar represents 1% substitutions per site. The sequence accession numbers are presented in parentheses.

多样性研究常采用基因组水平上的指纹图谱分析法(如 BOX-PCR 和 AFLP)、特殊基因片段的酶切图谱分析(如 16S rDNA PCR-RFLP 和 16S-23S rDNA IGS PCR-RFLP)和 16S rRNA 基因序列方法。各种分析方法具有较好的一致性,故在其多样性研究工作中,多相分类手段的选取应考虑下列因素:研究目的,供试菌株的数量,实验条件等,而不必同时应用所有的遗传多样性研究方法。

能够与大豆结瘤的根瘤菌主要有慢生根瘤菌属

中的 *B. japonicum*、*B. elkanii* 和 *B. liaoningense*, 中华根瘤菌属中的 *S. fredii* 和 *S. xinjiangense*。但 Martens 等通过多位点序列分析和杂交的方法已经将 *S. xinjiangense* 归入 *S. fredii*^[13]。*B. liaoningense* 与 *B. japonicum* 的亲缘关系很近^[4,6],前者最早是从我国的辽宁分离到的,为超慢型大豆根瘤菌^[14],后来又陆续从其他国家分离到^[15-16],Han 等研究发现 *S. fredii* 和 *B. liaoningense* 为新疆大豆根瘤菌的优势种^[6]。本研究通过 BOX-PCR 指纹图谱技术、

16S rDNA PCR-RFLP、16S-23S rDNA IGS PCR-RFLP 和 16S rRNA 基因序列对黄土高原地区的山西、陕西、甘肃和宁夏 4 个省 15 个地区的 130 株大豆根瘤菌的遗传多样性和系统发育的研究结果表明,该地区大豆根瘤菌仍属于已知的 *S. fredii*、*B. japonicum* 和 *B. liaoningense*, 而没有 *B. elkanii*。快生大豆根瘤菌 *S. fredii* (117 株) 为优势种群, 其次为慢生大豆根瘤菌 *B. japonicum* (11 株) 和 *B. liaoningense* (2 株)。130 株大豆根瘤菌中慢生大豆根瘤菌仅占 10%, 主要分布在山西和陕西, 其中 2 株 *B. liaoningense* 分离自山西, 尚未有在山西发现该种的报道。甘肃和宁夏未分离到慢生大豆根瘤菌, 说明根瘤菌的分布与多样性是环境因素和自身遗传特性相互作用的结果, 其中地域因素是主要影响因素之一^[17-18]。

综合考察各种分析结果表明, 聚类结果和地理来源及大豆品种没有必然联系, 具有很大的交叉性。例如: 来自山西汾阳的大豆根瘤菌在各个聚类群均有分布, 供试快生大豆根瘤菌 4334 和 4455, 分别来源于山西汾阳和陕西华阴, 但 IGS-RFLP 图谱的相似性达 100%。同一分离地区不同大豆品种的菌株也可表现出极高的相似性, 如慢生大豆根瘤菌 4766 和 4345, 均分离自山西汾阳, 品种分别为汾豆 56 和晋豆 34, IGS-RFLP 图谱的相似性达 100%。在变形菌门 α 亚群的分类研究中 16S-23S IGS PCR 可用于快速、有效地鉴定菌种和菌株并作为遗传研究的分子标记, 因为快生型大豆根瘤菌和慢生型大豆根瘤菌的 IGS 大小明显不同。BOX-PCR 指纹图谱对基因组进行分析, 产生了大量遗传类型, 具有菌株的特异性, 与 16S rDNA PCR-RFLP 和 IGS PCR-RFLP 结果相比较, BOX-PCR 指纹图谱分析揭示的遗传信息更丰富。在 16S rDNA PCR-RFLP 中具有相同遗传类型的菌株分布于几个不同的 BOX-PCR 群中, 但除了少数供试菌株与参比菌株聚在一起外, 其它供试菌株都独自成群, 这说明 BOX-PCR 指纹图谱分析更适合于种及种以下水平上遗传多样性研究, 这与刘洋等对华北及西北地区岩黄茛根瘤菌的 BOX-PCR 分析的研究结果一致^[19]。

本研究结果表明黄土高原地区大豆根瘤菌的遗传多样性极为丰富, 多种分析方法具有较好的一致性。对丰富和合理利用大豆根瘤菌的基因资源, 为选育耐旱和抗逆性强的高效固氮大豆根瘤菌奠定了基础, 对今后大豆根瘤菌剂的应用和提高该地区的大豆产量具有重要的意义。

致谢 中国农业大学陈文新院士的实验室提供了计算机分析软件, 并在分析方法上给予了热心帮助与指导, 特致谢忱。

参考文献

- [1] 林稚兰, 黄秀梨. 现代微生物学与实验技术. 北京: 科学出版社, 2000: 9-13.
- [2] 张伟涛, 杨江科, 袁天英, 周俊初. 我国南北大豆产区慢生大豆根瘤菌的遗传多样性和系统发育研究. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2006, 46(1): 127-131.
- [3] 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 (*Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*), 2000, 6(2): 176-181.
- [4] Man ZX, Wang H, Chen WF, Sui XH, Wang ET, Chen WX. Diverse rhizobia associated with soybean grown in the subtropical and tropical regions of China. *Plant Soil*, 2008, 310: 77-87.
- [5] Camacho M, Santamaría C, Rodríguez-Navarro DN, Daza A, Zhou J, Li FD, Mateos C, Velazquez E, Vinardell JM, Ruiz-Sainz JE. Soils of the Chinese Hubei Province show a very high diversity of *Sinorhizobium fredii* strains. *Systematic and Applied Microbiology*, 2002, 25: 592-602.
- [6] Han LL, Wang ET, Han TX, Han TX, Liu J, Sui XH, Chen WF, Chen WX. Unique community structure and biogeography of soybean rhizobia in the saline-alkaline soils of Xinjiang, China. *Plant Soil*, 2009, 324: 291-305.
- [7] Vincent J M. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Oxford: Blackwell, 1970: 15.
- [8] Terefework Z, Nick G, Suomalainen S, Paulin L, Lindström K. Phylogeny of *Rhizobium galegae* with respect to other rhizobia and agrobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1998, 48: 349-356.
- [9] 李俊, 樊蕙, 李力, 曹凤明, 姜昕. 慢生根瘤菌交叉结瘤及其系统发育关系的研究. 应用与环境生物学报 (*Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*), 2003, 9(1): 59-62.
- [10] 陈强, 张小平, 李登煜, 陈文新, Kristina. 从豆科植物的根瘤中直接提取根瘤菌 DNA 的方法 微生物学通报 (*Microbiology*), 2002, 29(6): 63-67.
- [11] 陈文峰, 陈文新. 豆科树种刺槐、黄檀、合欢根瘤菌的数值分类及 16S rDNA PCR-RFLP 研究. 应用与环境生物学报 (*Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*), 2003, 9(1): 53-58.

- [12] Gürtler V, Stanisich VA. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, 1996, 142:3-16.
- [13] Martens M, Dawyndt P, Coopman R, De Vos P, Willems A. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies; a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58:200-214.
- [14] Xu LM, Ge C, Cui Z, Li J, Fan H. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov. isolated from the root nodules of soybeans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1995, 45:706-711.
- [15] Appunu C, N'Zoue A, Laguerre G. Genetic diversity of native *bradyrhizobia* isolated from soybeans (*Glycine max* L.) in different agricultural-ecological-climatic regions of India. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74:5991-5996.
- [16] Botha WJ, Jaftha JB, Bloem JF, Habig JH, Law IJ. Effect of soil *bradyrhizobia* on the success of soybean inoculant strain CB 1809. *Microbiological Research*, 2004, 159:219-231.
- [17] 覃筱婷, 万钧, Whitty P, 周俊初, 李阜棣. 用 RAPDs 研究大豆根瘤菌的遗传多样性. 农业生物技术学报 (*Journal of Agricultural Biotechnology*), 1996, 4(2): 135-140.
- [18] Virginia GS, Alcantara M, Jose M, Genetic Diversity of Fast-growing rhizobia that nodulate soybean (*glycine, max* L Merr). *Archives of Microbiology*, 2003, 180:45-52.
- [19] 刘洋, 隋新华, 陈文新. 华北及西北地区岩黄茛根瘤菌的表型及遗传多样性. 生态学报 (*Acta Ecologica Sinica*), 2005, 25(5):1088-1094.

Genetic diversity and phylogeny of soybean rhizobia isolated from the regions of Loess Plateau in China

Hongxia Zhang, Ruihua Feng*, Jun Li, Dawei Guan, Fengming Cao

(Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: [**Objective**] We investigated the genetic diversity and phylogeny of soybean rhizobia isolated from the regions of Loess Plateau in China. [**Methods**] We analyzed 130 soybean rhizobia isolated from 15 regions in 4 provinces of Loess Plateau through BOX-PCR, 16S rDNA PCR-RFLP, 16S-23S IGS PCR-RFLP and 16S rRNA gene sequencing. [**Results**] BOX-PCR, 16S rDNA PCR-RFLP and 16S-23S IGS PCR-RFLP were in good agreement with the results which showed that all strains tested ascribed to two groups; the genus of *Sinorhizobium* and *Bradyrhizobium* phylogenetically. The analysis of 16S rRNA gene of 5 representative strains indicated that they were related to type strains *S. fredii*, *B. japonicum* and *B. liaoningense*, homology coefficient with type strains was 100% respectively. [**Conclusion**] Soybean rhizobia isolated from the regions of Loess Plateau in China showed rich genetic diversity. *S. fredii* was the dominant species. *Bradyrhizobium* accounted for 10% of the strains tested only, of which, two strains were *B. liaoningense*.

Keywords: Soybean rhizobia; BOX-PCR; 16S rDNA PCR-RFLP; 16S-23S rDNA IGS PCR-RFLP; genetic diversity; phylogeny

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Special Fund for Establishment of Modern Agricultural R&D System, Ministry of Finance and Ministry of Agriculture, China (nyeytx-004) and by the Special Fund of Central-level Public Welfare Scientific Research Institutes for Basic Operations (2010-34)

* Corresponding author. Tel: +86-10-82108675; Fax: +86-10-82108702; E-mail: rhfeng@caas.ac.cn

Received: 31 March 2010 / Revised: 24 May 2010