

山蚂蝗慢生根瘤菌的遗传多样性及系统发育

谷峻^{1,2}, 张静苗¹, 贾瑞宗², 陈文新^{2*}

¹ 华南师范大学生命科学学院, 广州 510631

² 中国农业大学生物学院, 北京 100094

摘要: 【目的】研究我国亚热带和温带地区与山蚂蝗共生的慢生根瘤菌遗传多样性和系统发育。【方法】采用 BOX-PCR 和多位点基因序列分析 (*nifH*, *nodC* 和 *recA* 基因) 方法对分离自我国不同地区的 29 株山蚂蝗慢生根瘤菌进行遗传多样性和系统发育分析。【结果】BOX-PCR 分析表明供试的山蚂蝗慢生根瘤菌形成 25 个基因遗传型, 具有丰富的基因组多样性。多位点基因序列分析发现代表菌株位于慢生根瘤菌的 3 个分支上, 分别与埃氏慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium elkanii*), 大豆慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) 和圆明慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium yuanmingense*) 亲缘关系近。【结论】我国山蚂蝗慢生根瘤菌具有丰富的遗传多样性, 共生基因系统发育分析表明它们多与持家基因共同进化, 并以垂直进化为主。

关键词: 山蚂蝗慢生根瘤菌, BOX-PCR, 多位点基因序列分析, 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 (2011) 10-1310-08

根瘤菌是土壤中常见的有益微生物类群, 能够与豆科植物结瘤共生固氮, 为宿主植物生长提供必需的氮素营养。豆科植物和根瘤菌建立的这一共生体系, 固氮能力强、固氮量大, 在农业的可持续发展中占有重要的地位。山蚂蝗属于豆科 (*Leguminosae*), 蝶形花亚科 (*Papilionoideae*), 山蚂蝗族 (*Desmodiinae*) 的植物。全世界共有 350 - 450 种, 是一年或多年生草本或灌木。我国约有 27 个种 5 个变种。已发现该属植物可以分成两个不同的系统发育群, 一个分布于热带美洲地区, 另一个位于亚洲地区^[1]。山蚂蝗属中的各种植物生活力很强, 具有抗旱、抗寒、耐贫瘠、耐干热的特点, 一些种也是重要的中药材。目前国际上对与山蚂蝗共生的根瘤菌已有少量报道^[2-3], 但是对与山蚂蝗共生的慢生根

瘤菌的遗传多样性和系统发育缺乏更深入的认识。

根瘤菌的遗传多样性主要包括生物种群间、种内及个体间的基因多样性。BOX 是广泛存在于细菌基因组中的短重复序列, 在细菌基因组中具有保守性和随机分布的特点。BOX-PCR 技术则根据其保守性设计引物来扩增位于重复序列之间不同的片段, 可在不同的菌株间易产生清晰的特异性条带, 是一项可靠的、相对稳定的基于基因组水平的指纹图谱分析手段, 近年来已被广泛用于商业化的根瘤菌接种剂的标记及高效根瘤菌菌株田间筛选研究中^[4]。该技术虽然不适合用于细菌分类中种群的划分, 但是能够在基因组水平上揭示菌株间染色体基因组存在的遗传差异。多位点基因序列分析由多位点基因序列分型 (Multi-Locus Sequence Typing,

基金项目: 国家自然科学基金 (31000002)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-10-62374008; E-mail: wenxin@cau.edu.cn

作者简介: 谷峻 (1976 -), 女, 辽宁大连人, 博士, 主要从事有益微生物资源调查与应用研究。E-mail: gujun@scun.edu.cn

收稿日期: 2011-04-13; 修回日期: 2011-05-20

MLST)技术发展而来,也是细菌种或种内水平基因组相关性研究的新手段。目前已被用于根瘤菌种群划分及种内遗传多样性和系统发育分析^[5-6]。由于慢生根瘤菌的16SrDNA基因的序列相似性很高,无法很好的区分慢生根瘤菌属中的不同种,本研究选取持家基因 *recA* 为代表,研究已表明该基因反映的细菌的系统发育关系与16SrDNA基因的结果一致。同时为考察供试的慢生根瘤菌中共生基因的进化规律,也扩增了共生基因 *nodC* 和 *nifH* 基因进行系统发育比较分析。本研究在我们前期研究的基础

上^[2],选取 BOX-PCR 和多位点基因序列分析技术从不同侧面研究山蚂蝗慢生根瘤菌的遗传多样性和系统发育关系,为进一步揭示山蚂蝗慢生根瘤菌的亲缘关系和进化奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:供试菌株29株,均为与山蚂蝗共生的慢生根瘤菌^[2](表1)。

表1 供试的慢生根瘤菌菌株

Table 1 Tested bradyrhizobial strains in this study

CCBAU No. of isolates and reference strains	Host	Geographic origin	BOX type
<i>Bradyrhizobium</i> spp.			
35095	<i>D. caudatum</i>	Fujian	1
51017	<i>D. caudatum</i>	Guangdong	2
51021	<i>D. heterocarpon</i>	Guangdong	3
51187	<i>D. heterocarpon</i>	Guangdong	4
51317	<i>D. heterocarpon</i>	Guangdong	5
51410	<i>D. heterocarpon</i>	Guangdong	6
41039	<i>D. racemosum</i>	Hunan	7
41134	<i>D. racemosum</i>	Hunan	7
41139	<i>D. racemosum</i>	Hunan	7
41142	<i>D. racemosum</i>	Hunan	7
41153	<i>D. sequax</i>	Hunan	8
33179	<i>D. elegans</i>	Jiangxi	9
33221	<i>D. racemosum</i>	Jiangxi	10
33229	<i>D. elegans</i>	Jiangxi	11
23010	<i>D. elegans</i>	Anhui	12
23013	<i>D. microphyllum</i>	Anhui	13
23174	<i>D. microphyllum</i>	Anhui	14
23230	<i>D. fallux</i>	Anhui	15
23238	<i>D. heterocarpon</i>	Anhui	16
43063	<i>D. elegans</i>	Hubei	17
43082	<i>D. elegans</i>	Hubei	17
43139	<i>D. racemosum</i>	Hubei	18
43140	<i>D. racemosum</i>	Hubei	19
43169	<i>D. elegans</i>	Hubei	20
43174	<i>D. racemosum</i>	Hubei	21
65184	<i>D. gangeticum</i>	Yunnan	22
65199	<i>D. sequax</i>	Yunnan	23
65200	<i>D. sequax</i>	Yunnan	24
65222	<i>D. triflorum</i>	Yunnan	25
Reference strains			
<i>B. elkanii</i> USDA76 ^T	<i>Glycine max</i>	U SA	26
<i>B. japonicum</i> USDA6 ^T	<i>Glycine max</i>	JP	27
<i>B. japonicum</i> USDA110	<i>Glycine max</i>	JP	
<i>B. japonicum</i> B15	<i>Glycine max</i>	JP	
<i>B. yuanmingense</i> CCBAU10071 ^T	<i>Lespedeza</i> sp.	BJ	
<i>B. yuanmingense</i> CCBAU10073	<i>Lespedeza</i> sp.	BJ	28
<i>B. liaoningense</i> USDA3622 ^T	<i>Glycine max</i>	LN	29

1.1.2 主要试剂和仪器:PCR 试剂和转化试剂购于大连宝生物公司,凝胶回收试剂盒购自天根生化科技公司(北京)。PCR 扩增仪(Eppendorf 美国)。本研究使用的引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成,引物序列见表 2。

表 2 本研究所用的引物
Table 2 Primers used for PCR

Primer	Sequence(5'→3')
nifHF ^[7]	TACGGNAARGGSGGNATCGGCAA
nifHI ^[7]	AGCATGTCTCSAGYTCNTCCA
nodCI ^[7]	CGYACAGCCANTCKCTATTG
nodCFn ^[7]	AGGTGGTYGAYGACGGTTC
recA41F ^[8]	TTCGGCAAGGGMTCGRTSATG
recA640R ^[8]	ACATSACRCCGATCTTCATGC
BOXAIR ^[9]	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG

* Y = C or T; H = A, C or T; R = A or G; K = G or T; B = C, T or G; N = A, C, G, or T

1.2 BOX-PCR 指纹图谱分析

总 DNA 提取和 PCR 扩增,具体步骤见文献^[10]。电泳及图谱分析见文献^[11]。电泳结束后,在凝胶成像仪中扫描凝胶,将指纹图谱用 TIFF 文件保存。图像信息利用 GelcomparII(version 3.5)分析软件,采用平均连锁法(UPGMA)聚类,最后得到供试菌株和参比菌株的聚类树状图。

1.3 nifH、nodC 和 recA 基因扩增和系统发育树构建

1.3.1 PCR 扩增:采用 50 μ L 反应体系。(1) *nifH* 基因扩增程序:95 $^{\circ}$ C 4 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,57 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min。(2) *nodC* 基因扩增程序:95 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 40 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 6 min。(3) *recA* 基因扩增程序:95 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min。

1.3.2 基因的测序:琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物长度和产量后,经凝胶回收纯化后,与载体 pMD18-T 连接,采用热激法转化到大肠杆菌 DH5 α 中,采用蓝白斑法和 PCR 法检测阳性克隆。将获得的阳性克隆送至北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

1.3.3 系统发育树构建:将测序所得序列及 GenBank 中获得的参比菌株的相应基因序列经 Clustal X 软件序列比对后,采用 Mega4.0 软件中的邻接法(Neighbor-joining)进行系统发育树的构建,自展值(bootstrap)为 1000。

2 结果

2.1 BOX-PCR 指纹图谱及聚类分析

BOX-PCR 指纹图谱分析表明 29 株供试的山蚂蝗慢生根瘤菌产生了 25 种遗传型(表 1)。BOX-PCR 聚类分析树状图中可以看出(图 1),供试的 29 个菌株和 4 株慢生根瘤菌的参比菌株在 48% 的相似水平上聚类。在 67% 的相似水平上,供试的 33 株菌分成了 7 个遗传群,有 4 株供试菌未聚群。其中群 1 由 1 株参比菌株 *B. yuanmingense* CCBAU10071^T 和分别分离自湖北省和安徽省的 2 株慢生根瘤菌组成,这 2 株菌在 16S rDNA PCR RFLP 和 IGS RFLP 分析中也聚在一起^[2]。群 2 由 1 株分离自广东省的慢生菌 CCBAU51017 和 1 株参比菌株 *B. liaoningense* USDA3622^T 组成;群 3 由 15 株组成,包括慢生菌参比菌株 *B. elkanii* USDA76^T 和 14 株待测菌。在约 57% 的相似水平上群 4 与群 1、群 2、群 3 形成的大分支聚在一起,群 5、群 6 和群 7 也聚类成一个遗传群,参比菌株 *B. japonicum* USDA6^T 位于此遗传群中,这与我们前期 16S rDNA PCR RFLP 和 IGS RFLP 的分析结果很相似。从聚类树中可以看出,仅有个别供试菌的基因指纹图谱与已知的参比菌株的指纹图谱相似,进而表明供试菌株在基因组水平上具有极大的多样性。

2.2 基于 recA、nifH 和 nodC 基因的多位点基因序列分析

recA 基因是编码细菌 DNA 重组蛋白的 α 亚基,与细菌修复系统行使功能相关。本研究在供试菌株中选取部分代表菌株,并对其相应的 *recA* 基因的部分序列进行了克隆和测序,测序后得到的部分基因序列长度均大于 500bp,采用邻接法构建系统发育树,结果见图 2。

测序的供试 6 株代表慢生根瘤菌主要分布在 3 个系统发育分支上,分离自亚热带地区云南省的慢生根瘤菌 CCBAU65199 与 *B. japonicum* 的亲缘关系近,与分离自墨西哥 Morelos 地区羽扇豆的 *B. japonicum* bv. *genistearum* 的序列相似性达 98.4%。分离自温带安徽省的代表菌株 CCBAU23230 位于慢生根瘤菌 *B. yuanmingense* 系统发育分支上,与 *B. yuanmingense* CCBAU10071^T 的序列同源性为 96.2%。其余的 4 株供试慢生根瘤菌均位于 *B.*

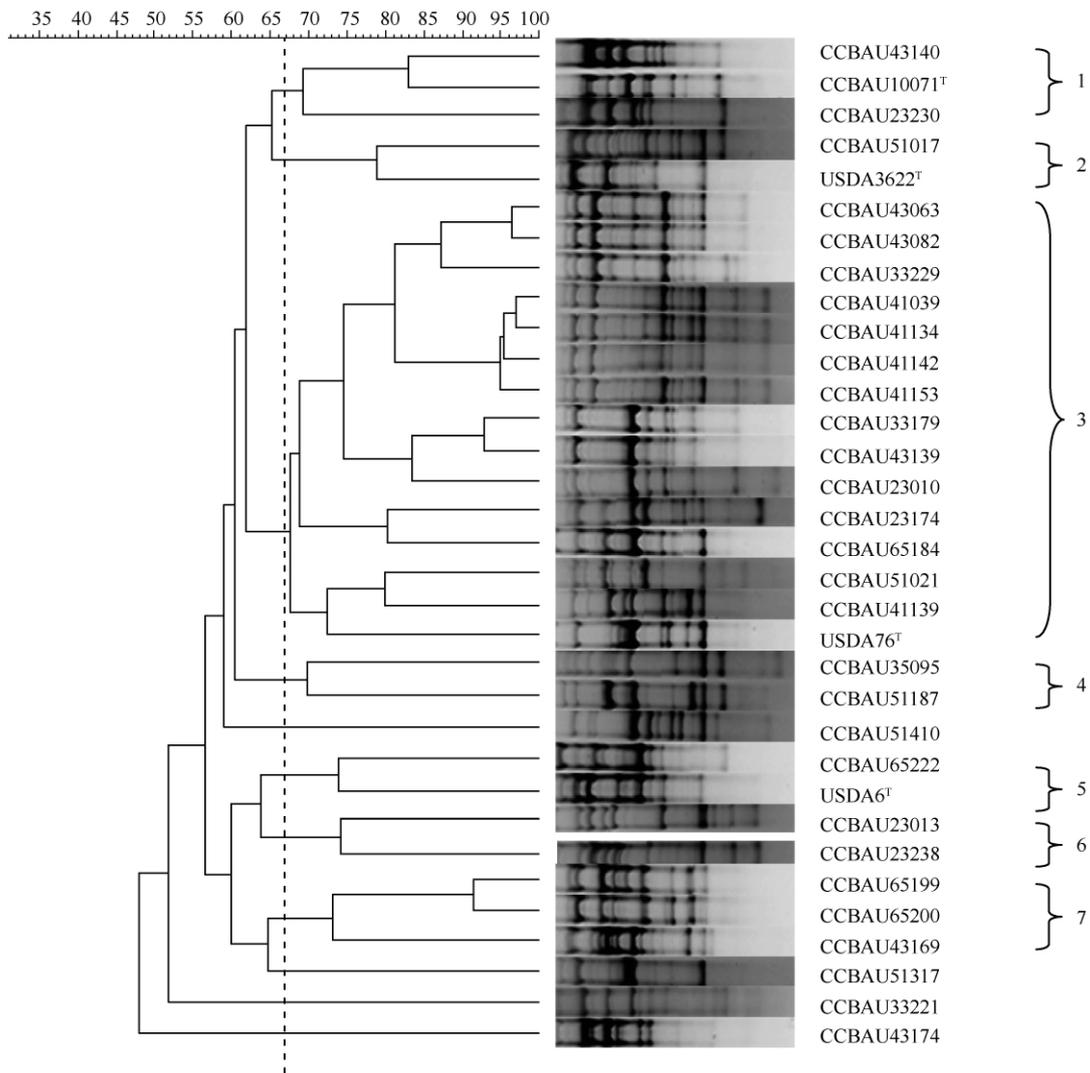


图1 山蚂蝗慢生根瘤菌 BOX-PCR 聚类分析树状图

Fig. 1 Analysis of BOX-PCR fingerprinting for Bradyrhizobia of *Desmodium*.

elkanii 的系统发育分支上,它们的序列同源性为 94.3% - 99.2%,其中分离自安徽省的 CCBAU23010 和 CCBAU23174 的序列同源性最高为 99.2%。选取的 6 株代表菌株中没有位于慢生根瘤菌参比菌株 *B. canariense* 的系统发育分支上。

nifH 和 *nodC* 基因是根瘤菌共生固氮直接相联系的基因,其中 *nifH* 基因主要编码根瘤菌固氮酶的组分 II 中的铁蛋白,*nodC* 基因则编码 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶,参与根瘤菌结瘤因子的合成。本研究克隆了 6 株供试的代表慢生根瘤菌进行 *nifH* 基因的系统发育分析,测序后的部分基因序列长度均约 780bp,采用邻接法构建系统发育树(图 3)。

由图 3 可以看出 *nifH* 基因构建的系统发育树反映出的供试慢生根瘤菌代表菌株的系统发育关系与 *recA* 基因所反映的系统发育关系很相似。CCBAU65199 和 CCBAU23230 分别与已知参比菌 *B. japonicum* 和 *B. yuanmingense* 亲缘关系近。而其它 4 株供试的慢生根瘤菌菌株均位于 *B. elkanii* 的系统发育分支上,其中 CCBAU23010 与 CCBAU41134 同源性最高达到 98.7%,它们与分离自我国四川省的胡枝子慢生根瘤菌 CCBAU61184 构成一个小的系统发育亚分支。而 CCBAU23174 和 CCBAU51317 则与分离自大豆的慢生根瘤菌参比菌 USDA76^T 形成另一个系统发育亚分支。

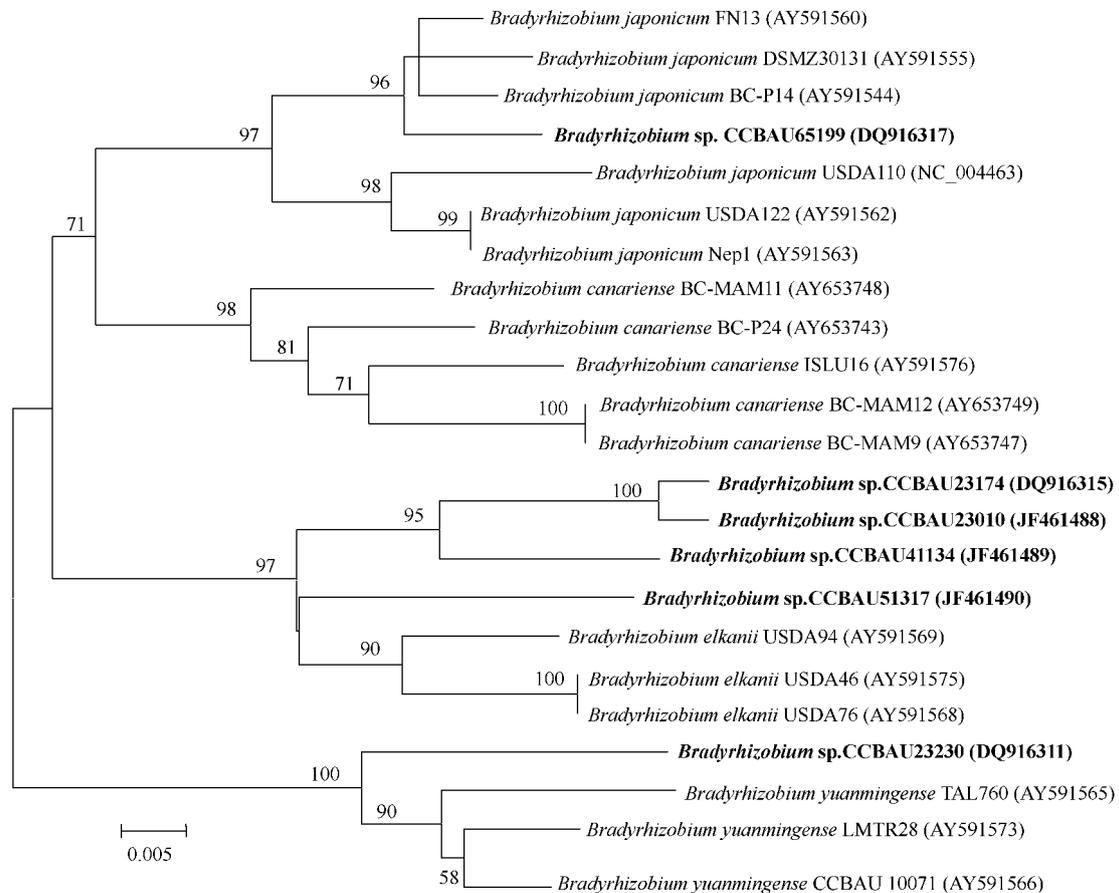


图 2 以 *recA* 基因部分序列构建的慢生根瘤菌系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *recA* gene showing the relationships among the bradyrhizobial isolates and the related species. The tree was reconstructed using the neighbor-joining method. Bootstrap confidence levels greater than 50% are indicated above the nodes. GenBank accession numbers are shown in parentheses. The scale bar indicates 0.5% substitutions per site.

在以 *nodC* 基因构建的系统发育树中(图 4), 克隆测序的 8 株供试的代表菌株在种水平上反映的系统发育关系与 *recA* 基因和 *nifH* 基因相同。在种内反映的系统发育关系略有差异。

3 讨论

山蚂蝗属中的植物生活力强,具有抗旱、抗寒、耐贫瘠、耐干热的特点。可作饲料、绿肥、堤岸防护草种等用,是固沙、保土、保水和改良土壤的优良植物^[12]。此外,该属中的多种植物具有不同的药用活性,近年来研究发现不同种的山蚂蝗植物中具有许多生物活性和生理功能的活性组分^[13,14]。根瘤菌与具有药用活性作用的豆科植物建立共生关系后,不但为植物生长提供必需的氮素营养,其抗逆性也

能够明显提高,且宿主的药用价值也得到显著改善。以前的研究表明与山蚂蝗共生的根瘤菌中,多以慢生型根瘤菌占主体,只有少部分菌株位于快生型根瘤菌菌属中^[2,15],然而对山蚂蝗慢生根瘤菌缺乏更为深入的研究,尤其是遗传多样性和系统发育关系。本研究采用 BOX-PCR 技术对山蚂蝗慢生根瘤菌的在基因组指纹图谱进行了分析,一方面揭示了与山蚂蝗共生的慢生根瘤菌在基因组水平上的遗传多样性,同时还为下一步高效共生菌株的筛选奠定了基础。在根瘤菌中已有研究表明 BOX-PCR 技术是一项快速、稳定的手段,可以用作田间高效菌株筛选实验的标记,但是它不适用于种群划分及种属的界定中^[16]。尽管如此,在研究中供试的 29 株慢生根瘤菌和 4 株标准菌株的基因指纹图谱聚类分析结果表明,多数供试菌株在 57% 的相似水

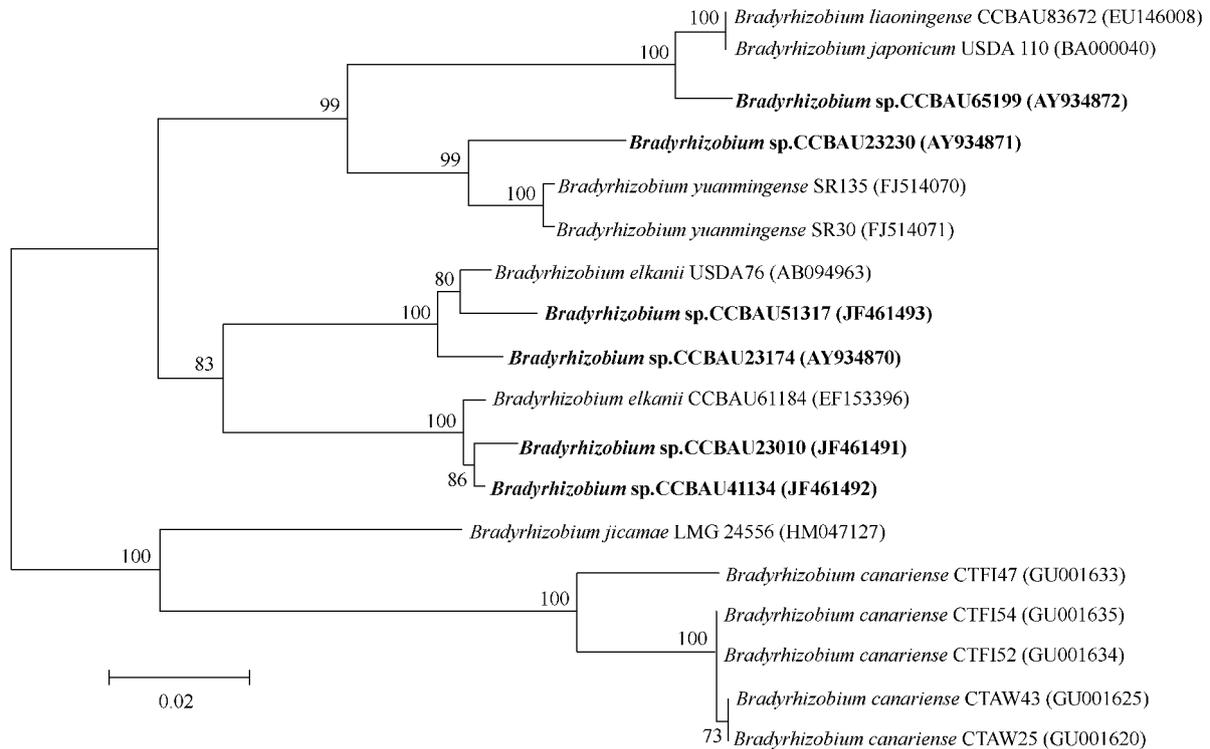


图3 以 *nifH* 基因部分序列构建的慢生根瘤菌系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *nifH* gene showing the relationships among the bradyrhizobial isolates and the related species. The tree was reconstructed using the neighbor-joining method. Bootstrap confidence levels greater than 50% are indicated above the nodes. GenBank accession numbers are shown in parentheses. The scale bar indicates 2% substitutions per site.

平上按照不同种聚群,而个别菌株如:分离自广东省的菌株 CCBAU51017 在 BOX-PCR 聚类分析中与辽宁慢生根瘤菌的基因指纹图谱相似,但是我们前期的研究结果表明它跟埃氏慢生根瘤菌的亲缘关系近^[2]。此外,本研究选取了部分代表菌株进行多位点基因序列分析发现,与 BOX-PCR 指纹图谱聚类的结果多数一致,只有分离自广东省的菌株 CCBAU51317 不同,在 *recA*、*nifH* 和 *nodC* 基因的系统发育分析中,它与埃氏慢生根瘤菌近缘,但是其基因组的指纹图谱较独特,没有与参比菌株聚在一起。

多位点基因序列分析技术是伴随着基因测序技术发展起来的,目前已被用于各种微生物类群的种群及群体遗传学分析。许多学者选取了不同的基因序列对分离自不同地区和宿主的慢生根瘤菌进行了遗传多样性和系统发育分析^[17-19],并将此技术与 DNA-DNA 杂交技术进行比较,一方面来确认这一技

术的可靠性,另一方面试图找到这一技术与 DNA 同源性分析技术之间联系,以期取代操作繁琐的 DNA-DNA 杂交,并克服其不同实验室之间杂交结果无法进行比较的弊端。本研究选取了 *recA*、*nifH* 和 *nodC* 基因对部分山蚂蝗慢生根瘤菌进行了多位点基因序列分析,结果表明这 3 个基因反映出的种水平的系统发育关系与 16S rDNA 基因序列获得的结果是一致的,但是在种群内不同菌株间的系统发育关系略有不同,说明在山蚂蝗慢生根瘤菌的共生基因与持家基因是共同进化的,并在其不同种群中以垂直进化为主要方式。此外,本研究中山蚂蝗慢生根瘤菌的多位点基因序列分析结果与 DNA-DNA 杂交同源性分析结果的对应关系还有待进一步深入研究。

致谢 感谢华南师范大学生命科学院冯启理教授课题组在试验过程中给予的无私帮助。

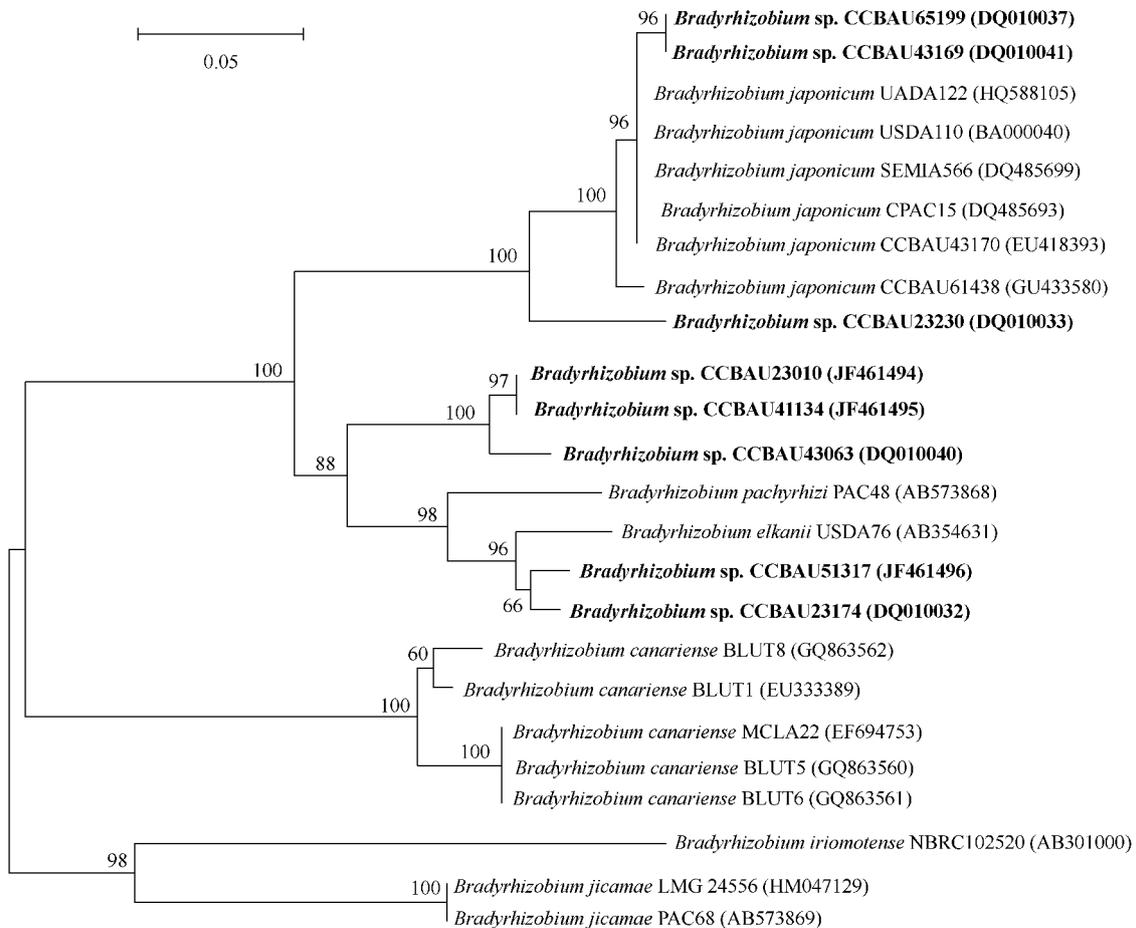


图 4 以 *nodC* 基因部分序列构建的慢生根瘤菌系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of *nodC* gene showing the relationships among the bradyrhizobial isolates and the related species. The tree was reconstructed using the neighbor-joining method. Bootstrap confidence levels greater than 50% are indicated above the nodes. GenBank accession numbers are shown in parentheses. The scale bar indicates 5% substitutions per site.

参考文献

- [1] Allen ON, Allen EK. The *Leguminosae*: a source book of Characteristics, Uses, and Nodulation. Madison: The University of Wisconsin Press. 1981.
- [2] Gu J, Wang ET, Chen WX. Genetic diversity of rhizobia associated with *Desmodium* species grown in China. *Letters in Applied Microbiology*, 2007, 44: 286-292.
- [3] Gao JL, Sun JG, Li Y, Wang ET, Chen WX. Numerical taxonomy and DNA relatedness of tropical rhizobia isolated from Hainan province, China. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1994, 44: 151-158.
- [4] Jia RZ, Gu J, Tian CF, Man CX, Wang ET, Chen WX. Screening of high effective alfalfa rhizobial strains with a comprehensive protocol. *Annals of Microbiology*, 2008, 58: 731-739.
- [5] Rivas R, Martens M, de Lajudie P, Willems A. Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 2009, 32: 101-110.
- [6] Vinuesa P, Rojas-Jiménez K, Contreras-Moreira, Mahna SK, Prasad BN, Moe H, Selvaraju SB, Heidemarie T, Werner D. Multilocus Sequence Analysis for Assessment of the Biogeography and Evolutionary Genetics of Four *Bradyrhizobium* Species That Nodulate Soybeans on the Asiatic Continent. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74: 6987-6996.
- [7] Laguerre G, Nour SM, Macheret V, Sanjuan J, Drouin P, Amarger N. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology*, 2001, 47: 981-993.
- [8] Vinuesa P, Silva C, Lorite MJ, Izaguirre-Mayoral ML, Bedmar EJ, Martínez-Romero E. Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of Sesbania microsymbionts from Venezuelan wetlands. *Systematic and Applied Microbiology*, 2005, 28: 702-716.
- [9] Versalovic JM, Schmeider FJ, de Buijn, Lupski J. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive

- sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 1994, 5: 25-40.
- [10] Terefework Z, Kaijalainen S, Lindström K. AFLP fingerprinting as a tool to study the genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolated from *Galega orientalis* and *Galega officinalis*. *Journal of Biotechnology*, 2001, 91: 169-180.
- [11] 谷峻, 陈文新. 中国北方地区甘草根瘤菌表型及遗传多样性研究. *中国农业科学*, 2006, 39: 1321-1327.
- [12] 陈默君, 贾慎修. 中国饲用植物. 北京: 中国农业出版社, 2002, 489-499.
- [13] Kurian GA, Suryanarayanan S, Raman A, Padikkala J. Antioxidant effects of ethyl acetate extract of *Desmodium gangeticum* root on myocardial ischemia reperfusion injury in rat hearts. *Chinese Medicine*, 2010, 5: 3-9.
- [14] Kurian GA, Yagnesh N, Kishan RS, Paddikkala J. Methanol extract of *Desmodium gangeticum* roots preserves mitochondrial respiratory enzymes, protecting rat heart against oxidative stress induced by reperfusion injury. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2008, 60: 523-530.
- [15] Chen WX, Tan ZY, Gao JL, Li Y, Wang ET. *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1997, 47: 870-873.
- [16] Binde DR, Menna P, Bangel EV, Barcellos FG, Hungria M. rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on the sequencing of the 16S rRNA gene of 54 elite commercial rhizobial strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 83: 897-908.
- [17] Vinuesa P, Rojas-Jiménez K, Contreras-Moreira B, Mahna SK, Prasad BN, Moe H, Selvaraju SB, Heidemarie T, Werner D. Multilocus Sequence Analysis for Assessment of the Biogeography and Evolutionary Genetics of Four *Bradyrhizobium* Species That Nodulate Soybeans on the Asiatic Continent. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74: 6987-6996.
- [18] Rivas R, Martens M, de Lajudie P, Willems A. Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 2009, 32: 101-110.
- [19] Vinuesa P, León-Barrios M, Silva C, Willems A. *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 α and *Bradyrhizobium* genospecies β . *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55: 569-575.

Genetic diversity and phylogeny of bradyrhizobia associated with *Desmodium* spp.

Jun Gu^{1,2}, Jingmiao Zhang¹, Ruizong Jia², Wenxin Chen^{2*}

¹School of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

²Department of Microbiology and Immunology, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China

Abstract: [Objective] Genetic diversity and phylogeny of bradyrhizobial strains associated with *Desmodium* spp. in subtropic and temperate regions of China were analyzed. [Methods] We studied 29 desmodia isolates from different regions with BOX-PCR fingerprinting and multilocus sequence analysis (*nifH*, *nodC* and *recA* gene) to describe the genotypic characteristics and phylogenetic relationships. [Results] We achieved 25 genotypes with BOX-PCR genomic fingerprinting analysis, indicating that the tested strains had a great diversity at genomic level. The representative bradyrhizobial strains were located in three phylogenetic branches with multilocus sequence analysis (*nifH*, *nodC* and *recA* gene), that was closely related to *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium yuanmingense*, respectively. [Conclusion] The desmodia bradyrhizobia had abundantly diversity. Diverse symbiotic genes including *nifH* and *nodC* genes were also found in these strains that indicated that the symbiotic genes were mainly maintained by vertical transfer in these bradyrhizobial populations and coevolved with housekeeping genes.

Keywords: desmodia bradyrhizobia, BOX-PCR, multilocus sequence analysis, genetic diversity, phylogeny

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31000002)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-62374008; E-mail: wenxin@cau.edu.cn, gujun@scun.edu.cn

Received: 13 April 2011 / Revised: 20 May 2011