

江汉平原及其周边地区花生根瘤菌的遗传多样性

杨江科, 谢福莉, 周俊初*

(华中农业大学农业部农业微生物重点实验室, 武汉 430070)

摘要:采用 RAPD 分析技术和 16S-23S rRNA 间隔区段(IGS) RFLP 分析, 分别对分离自江汉平原及其周边地区的花生根瘤菌进行了遗传多样性和系统发育研究。结果表明, 全部供试菌株分别在 48% 和 50% 的相似性水平分为 I、II 两群。供试花生根瘤菌与参比菌株 *B. japonicum* 和 *B. elkanii* 聚在群 I, 参比菌株 *Rhizobium Sinorhizobium*、*Mesorhizobium* 和 *Agrobacterium* 聚在群 II。供试花生根瘤菌的遗传多样性及其在系统发育中的地位主要受地域因素的影响, 来自江汉平原中心地带天门和潜江的菌株在 76% 以上的相似性水平上聚在一起。处于周边地带的武汉和荆州, 由于其特定的地理因素的影响, 菌株的多样性更为丰富, 部分菌株在分类上与其它地域的菌株相互融合, 并在较高的相似水平存在一定摆动性。来自外缘随州的菌株, 表现了明显的地理分隔作用, 其在系统演化中的地位相对独立。总体上从平原腹地到外缘地区, 根瘤菌地理分隔作用逐渐明显, 在平原外缘的交接地带, 根瘤菌的多样性最为丰富。

关键词:花生根瘤菌; RAPD; 16S-23S; IGS PCR-RFLP; 遗传多样性

Genetic diversity of peanut rhizobia isolated from Jiangnan Plain and the adjacent area

YANG Jiang-Ke, XIE Fu-Li, ZHOU Jun-Chu (Key Laboratory of Agro-Microbiology, Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan, 430070, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(3): 504~511.

Abstract: Genetic diversity of rhizobia from peanut on Jiangnan Plain and adjacent area was studied by the methods of Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and 16S-23S rRNA Intergenic Spacer (IGS) PCR RFLP. The results showed that all strains were divided into 2 groups at the similarity 48% or 50% respectively. Peanut rhizobia and representatives of *B. japonicum* and *B. elkanii* were clustered into group I and the reference strains of *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* and *Agrobacterium* were clustered into group II, which means that all peanut rhizobia belong to the genus of *Bradyrhizobium*. Peanut rhizobia showed some genetic diversity and were subdivided into four subgroups, A, B, C and D, at the similarity of 65% and 70% by RAPD and IGS PCR RFLP measures respectively. Strains isolated from Tianmen and Qianjiang, central area of Jiangnan Plain, showed high homology and less divergence. They were clustered into the largest cluster, subgroup A, by both measures. Some strains from Wuhan were

基金项目:国家“973”重点基础研究资助项目(001CB1089); 欧盟 RTD 合作计划(ICA4-2000-10137)资助项目

收稿日期:2002-03-13; **修订日期:**2002-07-14

作者简介:杨江科(1974~), 男, 湖北天门人, 博士, 主要从事微生物系统发育及多样性、菌植互作的分子遗传学研究。

* **通讯作者** Author for correspondence

Foundation item: This work was granted by Chinese “973” key Basic Research Program(No. 00CB1089) and European commission INCO-DC Project(No. ICA4-2000-10137).

Received date: 2001-03-13; **Accepted date:** 2001-07-14

Biography: YANG Jiang-Ke, Ph. D., main research interesting focus on the diversity and phylogeny of the microbiology, and the molecular genetics of plant-microbiology interaction.

also in subgroup A. Strains from the margin of the plain, Wuhan and Jingzhou, showed more abundant genetic diversity and were clustered into subgroup B and C by RAPD analysis or C and B by IGS PCR RFLP. Strains from an area adjacent to the plain, Suizhou, showing geographical isolation in systematic development and molecular evolution, were clustered into subgroup D independently by both measures. Reference strains of *B. japonicum* and *B. elkanii* were clustered into subgroup E; together with subgroups A, B, C and D, they form group I, which means peanut rhizobia are phylogenetically adjacent to *B. japonicum* and *B. elkanii*.

Thus the genetic diversity of the strains from the plain and the adjacent area was mainly determined by geographical factors. Strains from the center of the plain have high similarity and little divergence, but strains from the marginal area have the highest genetic diversity and the strains from the adjacent area show geographical isolation and phylogenetic independence.

Key words:peanut rhizobia; RAPD; 16S-23S IGS PCR-RFLP; genetic diversity

文章编号:1000-0933(2003)03-0504-08 中图分类号:Q939.11 文献标识码:A

花生(*Arachis hypogaea*)是世界上种植面积最大的油料作物,由于营养丰富而在食品、饲料等领域有着广泛的用途。在长江流域春、夏花生交作区,花生是种植面积仅次于油菜的第二大油料作物。由于花生具有耐旱、抗瘠等优点,已在汉水和长江交汇的江汉平原广泛地种植。与花生共生固氮的花生根瘤菌(*Bradyrhizobium* sp (*Arachis*))在分类上属于变形菌门 α -亚门慢生根瘤菌属,它与花生形成的根瘤共生体能固定空气中的氮气,提供给植物氮素营养对花生的产量、品质等都有显著的影响,可使花生在贫瘠的环境中能良好生长。因此研究花生根瘤菌分布上的遗传多样性及系统演化具有重要的理论意义和一定的应用前景。

RAPD 技术是 Williams^[1]等提出并首先采用的一种多态性分析技术,它运用多个 8~10 碱基的随机引物对基因组进行随机扩增,通过对 PCR 产物的计算机辅助分析来反映基因组 DNA 的多态性。由于 RAPD 具有简便、快捷和灵敏度高等优点,它在遗传多样性和系统发育研究中广泛采用^[2]。已知细菌存在高度保守的 rRNA 序列,它们同处于一个 rrn 操纵子之中,其排列顺序为 5'-16S-23S-5S-3'。已知 rRNA 基因与 tRNA 基因相间排列,tRNA 基因常位于 rRNA 基因之间,但在种类、数量和定位方面没有固定的模式,存在着丰富的多样性。由于细菌 16S-23S rDNA 间隔区段(IGS)受自然选择压力相对较小,其变异幅度比 rRNA 大。因而近年来许多研究者已将 IGS-RFLP 分析运用于微生物多样性研究,其 RFLP 分析结果能够反映出亲缘关系很近的菌株间的差异^[3~5]。

本研究采用 RAPD 和 16S-23S rRNA IGS PCR-RFLP 技术从基因组水平上系统考察了江汉平原及其周边地区花生根瘤菌的遗传多样性以及不同地域的菌株在系统发育中的地位和相互关系。

1 材料和方法

1.1 花生植株和根瘤样品的采集

采样地选取江汉平原腹地的天门张洪和渔薪、潜江泽口和竹根滩的油沙土区,汉水和长江交汇处及其周边地区的武昌洪山黄壤土和东西湖油沙土区,外缘的荆州江陵和暨南城的汕沙土区和远缘的随州洛河黄壤地和淅河油沙土地。每一采样地用 5 点取样,每点分单株随机采取花生植株,并立即用冰盒保存。对周边地区如随州的采样先摘取根部的根瘤放入内置有无水 CaCl₂ 和硅胶的螺口玻璃瓶中带回实验室后分菌。

1.2 引物

表 1 给出供试引物。

1.3 供试根瘤菌

供试 54 株花生根瘤菌和 16 株代表种属于的参比菌株见表 2。

1.4 根瘤菌的分离、纯化、回接与有效性试验

将经过表面灭菌处理的根瘤夹破,在含有 0.001% 结晶紫的 YMA 固体平板上划线培养。3~10d 后挑取长出的分离物,经过稀释涂皿纯化,挑取单菌落,用革兰氏染色法进行显微观察并接种于 LB 液体培养基中于 37℃ 震荡培养不生长者初步确定为根瘤菌。将分离物回接原宿主植物用双层钵法进行植物盆栽的方法如下:含有 Fahraeus 无氮植物营养液的砂玻经过 121℃ 灭菌 1h 后,每钵播种 1 粒已经催芽的种子,播种 3d 后于根系接种 1ml 代试菌悬液(约 10^7 /ml)。每一处理设 3 个重复。根据结瘤与否确定是否为根瘤菌。并通过比较供试接种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^[6]。

表 1 供试引物

Table 1 The primers tested			
引物 Primers	序列 Sequence	引物 Primers	序列 Sequence
pHr	5'-TGCGGCTGGATCACCTCCTT-3'	p23SR01	5'-GGCTGCTTCTAAGCCAAC-3
P5	5'-TCGGAGTGGCP-3'	P25	5'-CGGAGAGTAC-3'
P14	5'-TCCCGACCTC-3'	P30	5'-CGAAGCCCT-3'
P16	5'-CCTGGCGAGC-3'	P58	5'-CGGGAGACC-3-
P23	5'-GGCTCGTACC-3'	P59	5'-GCATGGAGCT-3'
P24	5'-ACCCATGCGG-3'	P64	5'-CCAGGCGCAA3'

表 2 供试花生根瘤菌和其它参比菌株

Table 2 Peanut rhizobia and reference strains tested		
菌株 Strains	宿主 Original host	分离地和来源 Origin or source
SZ1,2,3,4,5	<i>Arachis hypogaea</i>	Xihe, Suizhou
SZ6,7,8,9,10	<i>Arachis hypogaea</i>	Luohe,Suizhou
TM1,2,3,4,5	<i>Arachis hypogaea</i>	Zhanggang, Tianmen
TM6,7,8,9,10	<i>Arachis hypogaea</i>	Yuxin, Tianmen
QJ1,2,3,4,5	<i>Arachis hypogaea</i>	Zhugentan, qianjiang
QJ7,8,9,10	<i>Arachis hypogaea</i>	Zekou, Qianjiang
JZ1,2,3,4,5,6,	<i>Arachis hypogaea</i>	Jinan, Jingzhou
JZ7,8,9,10,11	<i>Arachis hypogaea</i>	Jiangling, Jingzhou
WC1,2,3,4,5,6,7	<i>Arachis hypogaea</i>	Hongshan, Wuhan
WC8,9,10,11,12,13	<i>Arachis hypogaea</i>	East and west lake, Wuhan
Reference strains		
<i>B. japonicum</i>		
USDA6,110,122	<i>Glycine max</i>	Conserved in this lab
<i>B. elkanii</i>		
USDA46,76,86	<i>Glycine max</i>	Conserved in this lab
<i>S. fredii</i> USDA205	<i>Glycine max</i>	Conserved in this lab
<i>S. xinjiangensis</i> CCBAU110	<i>Glycine max</i>	Prof Chen Wenxin
<i>S. meliloti</i> USDA1002	<i>Medicago sativa</i>	Prof Chen Wenxin
<i>M. hankuii</i> USDA4779	<i>Astragalus sinicus</i>	Prof Chen Wenxin
<i>M. Tianshanense</i> USDA3592	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>	Prof Chen Wenxin
<i>M. loti</i> NZP2213	<i>Lotus cormiculatus</i>	Prof Chen Wenxin
<i>R. mongolense</i> USDA1844	<i>Medicago ruthenica</i>	Prof Chen Wenxin
<i>R. galegae</i> USDA4128	<i>Galega orientalis</i>	Prof Chen Wenxin
<i>A. tumefaciense</i> IAM13129		Prof Chen Wenxin
<i>A. rhizogense</i> IAM13570		Prof Chen Wenxin

1.5 根瘤菌总方数据的提取

将菌株在 TY 液体培养基中培养至对数期,离心收集菌体并用 STE 缓冲液洗涤两次后用 STE 液混合

均匀后加入溶菌酶使终浓度为 0.5mg/ml,37℃保温 30min 后加入 10%SDS 使其终浓度为 1%,反复倒转离心管使菌体裂解,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-氯仿提取,至界面无蛋白后取上清液,加入预冷的 2 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA。离心收集沉淀,用 70%乙醇洗涤、干燥后溶解在低浓度 TE 中并通过 Beckman DU-70 分光光度计定量。

1.6 RAPD 扩增及其多态性分析

本研究共使用 10 个随机引物进行 RAPD 扩增,引物名称及序列见表 1。反应总体积为 25μl。反应程序为:初始变性 94℃ 4 min;反应为 35 个循环,每个循环 94℃ 变性 1min,38℃ 退火 1min,72℃ 延伸 1min。最后 72℃ 延伸 6min。PCR 反应在美国 PE 公司热循环仪上进行。扩增产物以 100bp DNA Ladder Plus 作分子量标准,在 2.0% 琼脂糖凝胶上水平电泳后,用自动凝胶成像系统拍照。详细过程见参考文献^[7]。

1.7 16S-23S rDNA IGS PCR-RFLP 分析

本研究所使用的特异性引物这 pHr 和 p23SR01。其反应体系、扩增程序和检测方法均与 RAPD 相同,PCR 扩增产物分别利用限制性切酶 *Msp* I、*Hha* I、*Hinf* I 和 *Hae* III 酶切。PCR 扩增仪为 Thermolyne 公司的 Amplitron II。扩增产物以 100bpDNA Ladder Plus 作分子量标准,在 2.0% 琼脂糖凝胶上水平电泳后,用自动凝胶成像系统拍照。详细过程参照文献^[3]。

1.8 数据分析和处理

凝胶图像先经计算机凝胶扫描成像系统摄取,经过均一化处理并将其转化为“0”和“1”数字符,即有条带处以“1”表示、无条带处以“0 表示”。再通过 NTSYS Applied Biostatistics 软件进行相似性分析,并利用平均连锁法(UPGMA)进行聚类分析将结果转化为树状图谱。

2 结果分析

2.1 RAPD 分析

本研究选用了 10 个随机引物对供试菌株在全基因组水平上进行了比较分析。各引物分别产生了 2~10 条带,表现出明显的扩增谱带的多态性(图 1)。经数据处理后的聚类分析结果见图 2。由图 2 可见,供试根瘤菌在 48% 的相似性水平上分为两群。群 I 包括 54 株花生根瘤菌和参比菌株 *B. japonicum* 和 *B. elkanii*,参比快生菌 *Sinorhizobium*、*Rhizobium* 和 *Mesorhizobium* 则聚为群 II,可见供试的快生根瘤菌与慢生根瘤菌在系统发育上有显著的差异。所有供试花生根瘤菌都应归于慢生根瘤菌属,其系统发育地位应归属于大豆慢生根瘤菌或与之相近的种属。群 I 在 62%~65% 的相似性水平上可再分为 A、B、C、D 和 E 等 5 个亚群。来自天门、潜江以及武汉东西湖的部分菌株在 A 亚群中相互交叉,菌株间的相似程度较高。来自武昌洪山和东西湖的部分菌株聚为亚群 B,并在 69% 的水平上又可分为两个小群。C 亚群主要由荆州的菌株组成,在 68% 的相似性水平上该群同样可分为两个小群。本结果表明荆州和武汉作为冲积平原边缘的交接带其菌株的遗传多样性较为丰富。D 亚群主要由分离自随州的菌株组成,它们在系统发育的位置上相对独立。E 亚群主要为供试慢生参比菌株 *B. japonicum* 和 *B. elkanii*,它们在 62% 的相似水平上能明显地与供试花生根瘤菌分开。

2.2 16S-23S IGS PCR-RFLP 分析

以 pHr 和 p23SR01 为引物对供试菌株的 16S-23S IGS 进行了 PCR 扩增,所有供试快生根瘤菌和慢生根瘤菌的 IGS 大小为 1.8~2.1 kb 之间。并分别利用限制性内切酶 *Msp* I、*Hha* I、*Hinf* I 和 *Hae* III 对 PCR 产物进行了酶切分析部分代表性菌株的酶切图见 3,由图 4 可见所有供试菌株在 50% 这一较低的相



图 1 以 P5 为引物部分菌株的 PCR 扩增产物电泳图谱
Fig. 1 RAPD fingerprint patterns of tested strains through PCR with the primer 5
M: PCR Marker, 1-12 *Bradyrhizobia*, 13-20 fast-grow rhizobia

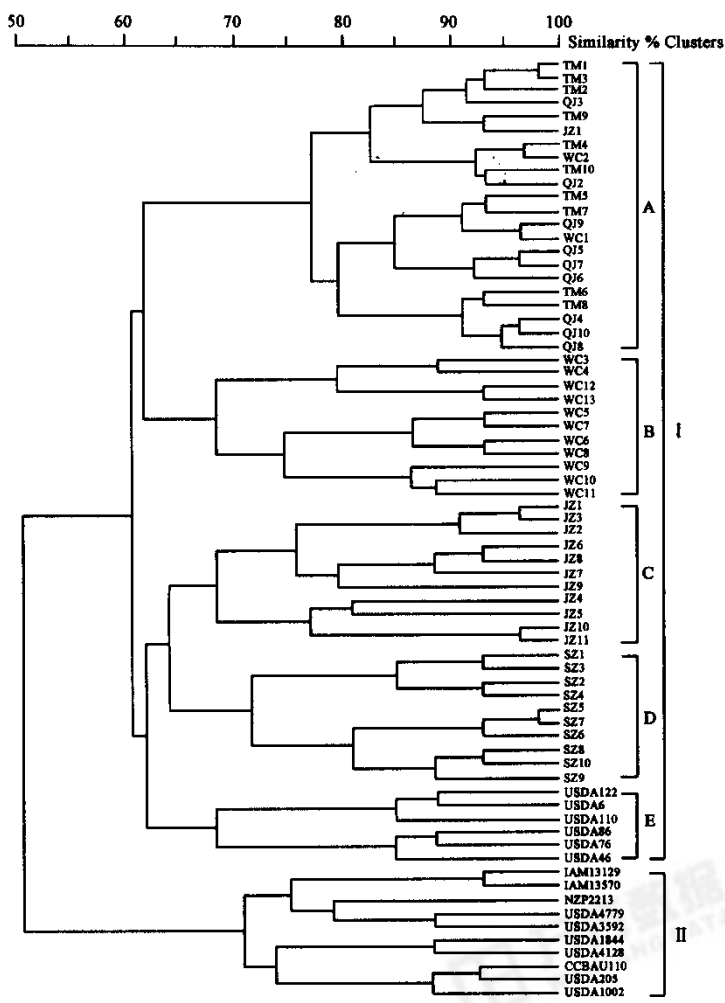


图 2 供试菌株 RAPD 分析 UPGMA 树状图

Fig. 2 UPGMA dendrogram generated from the RAPD fingerprints

似性水平被分为 I 和 II 两群,再次证明了所有供试花生根瘤菌在系统发育上应归属于 *Bradyrhizobium* 或与之相近的种属。群 I 在 62%~70% 的相似性水平上同样可分为 A、B、C、D 和 E 5 个亚群。亚群 A 中来自天门和潜江的菌株之间的交叉更为明显,代表菌株 TM1 和 QJ2 的相似性达 79.2%,部分来自武汉东西湖的菌株也聚于该亚群。来自荆州的菌株和部分来自武汉的菌株聚为 B 亚群,而 C 亚群由来自武昌的菌株组成。随州菌株在 63% 的水平上同样被聚为单独的亚群 D。

与 RAPD 相比,IGS PCR-RFLP 分析同样能对供试菌株的多样性和系统发育进行深入的分析,且花生根瘤菌间的交叉进一步加大。两者之间较为明显的区别在于来自荆州和武昌的部分菌株在较高相似性水平上的聚类地位发生了一定程度的摆动。从而在一定程度上反映了作为江汉平原和江汉冲积地周缘地区的菌株在多样性和系统演化上的渐进性,同时也反映出地域上的交接性对菌株分类地位的影响。

根瘤菌的分布和多样性是环境因素和自身遗传特性相互作用共进化的结果,其中地域因素是主要的影响因素之一^[8,9]。在河流冲积地及其周边地区花生根瘤菌的分布,主要受环境条件的影响。本研究结果表明平原腹地和河流交汇处花生根瘤菌的趋同性较高,各采样点根瘤菌的多样性程度较低,代表菌株 TM1 和 QJ2 的相似性可以高达 79.2%。随着从腹地和交汇处向周边地区的逐渐扩展,花生根瘤菌的多样性逐渐丰富,达到平原外缘时的花生根瘤菌的多样性最为丰富,如来自荆州和武昌的菌株能在较低的水平上分为不同的亚群,其代表性菌株 WC1、JZ2 和 JZ6 与来自其它地域的菌株相似性可以在 54.2%~75.0 % 的较大区域内变化(表 3)。来自平原远缘及其邻近区域的根瘤菌随机扩

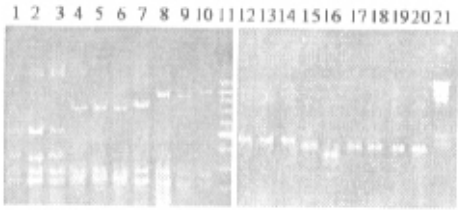


图 3 16S-23S IGS PCR 扩增产物及 *Msp* I 酶切产物电泳图

Fig. 3 RFLP fingerprint patterns of 16S-23S IGS digested by *Msp* I and the products amplified 11, 21: Marker, 1-10 products digested by *Msp* I, 12-20 IGS

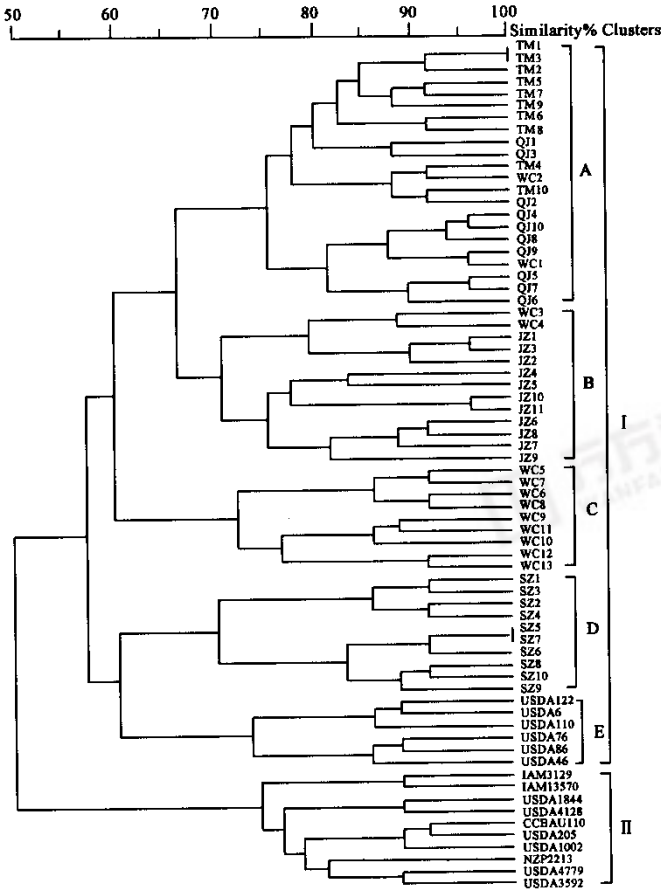


图 4 供试菌株 IGS PCR RFLP 分析 UPGMA 树状图

万方数据
Fig. 4 UPGMA dendrogram generated from the IGS PCR RFLP fingerprints

增产物的 RFLP 分析也表现了明显的地理分隔作用,并在系统演化中与其它地域的菌株分离开。江汉平原的年降雨量较高,夏季的强降雨经常引发区域性洪水泛滥,再加上传统的漫灌式灌溉使冲积地表土层和耕作层相对不稳定,土著根瘤菌有可能发生较大范围的水平移动,相邻地域的菌群间易于发生交换,导致系统演化上趋于一致。从系统发育树(图 1 和图 4)和相似性矩阵(表 3)上亦不难看出,整个河流冲积地根瘤菌的相似性较高而变异较低。但在边缘地区,根瘤菌就表现出较大的多样性和较高的变异性。

表 3 以 16S-23S IGS PCR-RFLP 为依据的代表性菌株的相似性

Table 3 Similarity of the representative strains from the 16S-23S IGS PCR-RFLP analysis

菌株 Strains	TM1	QJ2	WC6	JZ2	JZ6	SZ5	SZ10	USDA6	IAM13129	USDA205
TM1	1.000									
QJ2	0.792	1.000								
WC1	0.708	0.750	1.000							
JZ2	0.750	0.625	0.625	1.000						
JZ6	0.583	0.708	0.625	0.750	1.000					
SZ5	0.625	0.583	0.750	0.708	0.792	1.000				
SZ10	0.500	0.542	0.708	0.667	0.667	0.708	1.000			
USDA6	0.583	0.542	0.542	0.583	0.583	0.542	0.667	1.000		
IAM13129	0.542	0.500	0.500	0.625	0.625	0.583	0.375	0.375	1.000	
USDA205	0.375	0.417	0.417	0.375	0.542	0.500	0.458	0.458	0.750	1.000

在根瘤菌的主要类群或占优势的类群的形成过程中,栽培地的宿主植物和花生品种亦是影响花生根瘤菌多样性和类群分布的另一重要因素^[10,11]。已知在根瘤菌与宿主植物早期结瘤的阶段的“对话”过程中,通过植物产生的类黄酮化合物和根瘤菌表面多糖的桥梁作用,根瘤菌与宿主植物各自选择共生伙伴。表现为菌植互作的“基因对基因”特征^[12]。不同的根瘤菌对不同的宿主植物具有不同的亲合性。对于长期种植同一宿主植物的特定土壤,将会出现与宿主植物相适应的“土著的”占优势的群体^[13]。

在本研究 RAPD 和 IGS PCR-RFLP 的分析结果来自荆州和武昌的菌株在较高的相似性水平上表现出一定的亚群地位交换,在一定程度上反映了江汉平原和河汉冲积地周边地区的菌株在多样性和系统演化上的渐进性,亦表现了菌株在总 DNA 水平和 rRNA 水平上发育的不同步和两种方法研究对象的异质性。虽然不少研究者认为 RAPD 具有更高的解析度,但由于在随机扩增的过程中假阳性信号和重复性较差等因素常使所得结果的信噪比较低^[1,2]。而 IGS PCR-RFLP 一般具有较高的信噪比,其结果能够充分揭示供试菌株在遗传和系统发育上的差异^[4,9]。

References:

[1] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Uncleic Acids Research*. 1990, **58**: 1~9.

[2] Kevin V S, Russell R and Jonathan G S. Randomly amplified polymorphic DNA PCR analysis of Bovine Cryptosporidium parvum strins isolated from the watershed of the red river of the North. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998, **64**(6): 2262~2265.

[3] Florence D B, Anne W, Renata C, *et al.* Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating small senegalese legumes by 16S-23S rRNA intergenic gene spacers and amplified fragment length polymorphism fingerprint analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**: 3987~3997.

[4] Gurtler V. The role of recombination and mutation in 16S-23S rDNA spacer rearrangements. *Gene*. , 1999, **238**: 241~252.

[5] Peter van B and Jeffry J F. Evolutionary relationships among the soybean bradyrhizobia teconstructed from 16S rRNA and internally transcribed spacer region sequence divergence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, **50**: 2165~2172.

[6] Yang J K, Zhou J C. Effects of pH on nodulation of indigentfast and slow growing soybean rhizobia. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2001, **12**(4): 639~640.

[7] Yang J K, Zhou J C. Genetic diversity of indigenous soybean rhizobia isolated from soils of Weifang and Huayuankou. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2000, **6**(3): 168~173.

[8] Javier L, Brande B H, Wulff Jose M, *et al.* Rivilla. Distribution of a Population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* among different size classes of soil aggregates. *Appl. Envir. Microbiol.*, 1998, **64**: 970~975.

[9] Zhang X P, Giselle N, Seppo K, *et al.* Phylogeny and Diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from the root nodules of Peanut (*Arachis hypogaea*) in Sichuan, China. *Systematic and applied microbiology*, 1999, **22**: 378~386.

[10] Cregan P B, Keyser H H, Sadowsky M J. Host plant effects on nodulation and competitiveness of the *Bradyrhizobium japonicum* serotype strains constituting serocluster 123. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, **55**(10): 2532~2536.

[11] Hernandez L, Segovia L, Martinez-Romero E, *et al.* Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. *Appl. Envir. Microbiol.* , 1995, **61**: 2775~2779.

[12] Cregan P B, Sadowsky M J, Keyser H H. Gene for gene interaction in the legume rhizobium symbiosis. *Beltsville Symposia in Agricultural Research*, 1991, (14): 163~171.

[13] Souza L V, Eguiarte G, Avila R, *et al.* Genetic Structure of *Rhizobium etli* biovar phaseoli Associated with Wild and Cultivated Bean Plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos. *Mexico. Appl. Envir. Microbiol.* , 1994, **60**: 1260~1268.

参考文献:

[6] 杨江科,周俊初. pH 对土壤中土著快、慢生大豆根瘤菌结构的影响. *应用生态学报*, 2001, **12**(4): 639~640.

[7] 杨江科,周俊初. 潍坊花园口土样中土著大豆根瘤菌的遗传多样性研究. *应用与环境生物学报*, 2000, **6**(3): 168~173.