

花生根瘤菌的数值分类*

曹凤明 徐玲玫 李力 李俊 樊蕙

(中国农业科学院土壤肥料研究所 北京 100081)

摘要: 从我国 11 个省、16 种土壤类型、20 多个花生 (*Arachis hypogaea* L.) 品种上分离到的花生根瘤菌 [*Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*)] 中选取 50 个代表菌株, 并与从津巴布韦引进的 4 株花生根瘤菌及 7 株慢生根瘤菌常用的参比菌株共 61 株菌进行了 128 项表型特征的测定。数值分类的结果表明, 全部菌株在 75% 水平上相聚, 并在 76% 和 77% 的水平上分别聚成两大群 (群 I、群 II), 每大群以较高的相似性 (85%~94%) 各聚成 6 个亚群。所用数值分类方法不能将花生根瘤菌和大豆根瘤菌在属的水平上分开, 但亚群和未归入亚群的菌株可能暗示亚种或种存在, 同时本文结果还表现出花生根瘤菌的地域分布差异及其多样性。

关键词: 花生根瘤菌, 数值分类, 多样性

中图分类号: Q939.11 **文献标识码:** B **文章编号:** 0253-2654(1999)-06-0421-05

NUMERICAL TAXONOMY OF *BRADYRHIZOBIA* ISOLATED FROM PEANUT NODULES

CAO Fengming XU Lingmei LI Li LI Jun FAN Hui

(Soils and Fertilizers Institute, CAAS, Beijing 100081)

Abstract: 50 strains of peanut rhizobia [*Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*)], which were isolated from root nodules of over 20 peanut cultivars in 16 types of soil in 11 provinces of China, were compared with 4 strains of peanut rhizobia from Zimbabwe and 7 strains known species of *Bradyrhizobium* (*B. liaoningense*, *B. japonicum*, *B. elkanii*) by performing a numerical analysis of 128 phenotypic features. The result showed that all of the strains were clustered at the similarity level of 75%, and group I and group II were gathered at the level of 76% and 77%, respectively. Each group further was respectively separated into 6 subgroups at the level of 85% and 87%. The result suggested that peanut rhizobia from china could not be differentiated from the three known species of *Bradyrhizobium*, but there probably existed new species or subspecies in the subgroups and those strains not belonging to any subgroup, and existed significant genetic diversity.

Key word: *Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*), Numerical taxonomy, Diversity

随着生物技术的发展和应用, 加速了根瘤菌分类研究的深入和发展。从 1974 年的一个根瘤菌属, 发展到现在的 5 个属 20 多个种^[1~4]。而花生根瘤菌 [*B. sp.* (*Arachis*)] 至今没有进行系统的研究, 无明确的分类地位。目前花生根瘤菌仍属于传统的互接种族中的豇豆

族, 显然是不合理的。近几年对花生根瘤菌的研究日益

* 欧盟合作课题资助 (NO. ERB3514PL950967)

E. C. FUNDED PROJECT (NO. ERB3514PL950967)

收稿日期: 1998-09-15, 修回日期: 1999-01-11

得到重视,已有一些文献报道。Van. Rossum等^[5]和张小平等^[6]对花生根瘤菌用多相分类、数值分类、PCR-RFLP和16S rRNA部分碱基序列等方法测定的结果都说明花生根瘤菌属于慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)。但目前研究的花生根瘤菌菌株的数量较少,分布范围较窄。本研究即是对来自我国11个省、市的花

生主产地广泛分布的花生根瘤菌代表菌株进行数值分类研究,为花生根瘤菌分类地位的确立提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

试验总菌株为61株,所用的菌号、寄主、分离地或来源以及分离的土壤类型见表1。所选取的50株花生

表1 供试菌株的寄主、土壤类型和分离地或来源

菌号	寄主品种	土壤类型	分离地	菌号	寄主品种	土壤类型	分离地
2502	花生87-77	潮沙土	湖北,沙洋	2695	花生粤油5号	红壤	江西,南昌
2519	花生中花4号	潮沙土	湖北,沙洋	2697	花生冀油2号	潮土	河北,卢龙
2524	花生中花2号	石灰冲积土	湖北,武昌	2774	花生冀油3号	草甸土	河北,旺县
2538	花生中花4号	石灰冲积土	湖北,武昌	2717	花生海花1号	褐土	山东,泰安
2547	花生中花4号	石灰冲积土	湖北,武昌	2720	花生海花1号	褐土	山东,泰安
2553	花生鲁花9号	褐土	山西,猗县	2722	花生白沙1013	褐土	山东,泰安
2556	花生鲁花9号	褐土	山西,猗县	2726	花生大白沙	棕壤	山东,泰安
2576	花生海花2号	浅草甸土	山西,猗县	2731	花生小白沙	棕壤	山东,泰安
2584	花生晋花1号	草甸褐土	山西,汾阳	2749	花生海花1号	潮土	山东,郓城
2592	花生晋花2号	草甸褐土	山西,汾阳	2752	花生海花1号	潮土	山东,郓城
2642	花生吕花1号	淡黑钙土	吉林,松原	2750	花生海花1号	潮土	山东,郓城
2644	花生吕花1号	淡黑钙土	吉林,松原	2755	花生8130	黑土	山东,即墨
2652	花生粤油79号	红壤	广东,广州	2760	花生鲁花10号	黑土	山东,郓城
2655	花生粤油79号	红壤	广东,广州	2764	花生8130	棕壤	山东,郓城
2656	花生粤油79号	红壤	广东,东莞	2767	花生8130	棕壤	山东,郓城
2660	花生粤油54号	沿海冲积土	广东,东莞	2698	花生95-5029	水稻土	湖南,长沙
2663	花生粤油54号	沿海冲积土	广东,东莞	2707	花生湘花生4号	水稻土	湖南,长沙
2664	花生粤油59号	赤红壤	广东,东莞	2710	花生湘花生4号	水稻土	湖南,长沙
2672	花生粤油59号	赤红壤	广东,东莞	2714	花生长沙土子	水稻土	湖南,长沙
2679	花生粤油59号	沿海冲积土	广东,东莞	2737	花生农家品种	潮土	北京,平谷
2682	花生粤油59号	沿海冲积土	广东,东莞	2739	花生农家品种	潮土	北京,平谷
2685	花生粤油5号	沙质土	江西,上饶	2741	花生海花1号	湿潮土	陕西,南郑
2688	花生粤油5号	红壤	江西,南昌	2746	花生海花1号	湿潮土	陕西,南郑
2691	花生粤油5号	红壤	江西,南昌	Spr1-2	花生天府3号		四川,梅山
2692	花生粤油5号	红壤	江西,南昌	Spr5-2	花生地方品种		四川,简阳

参照菌株	来源	引进菌株	寄主	来源
ATCC10324 ⁷	<i>B. japonicum</i>	USDA	MAR471 花生品种	B. sp. 津巴布韦
USDA110	<i>B. japonicum</i>	USDA	MAR1445 花生品种	B. sp. 津巴布韦
61A76	<i>B. elkanii</i>	USDA	MAR253 原始山蚂蝗	B. sp. 津巴布韦
USDA4362	<i>B. sp</i>	USDA	MAR1510 非洲硬皮豆	B. sp. 津巴布韦
USDA76	<i>B. elkanii</i>	USDA		
2281 ⁷	<i>B. liaoningense</i>	CAAS		
2044	<i>B. liaoningense</i>	CAAS		

根瘤菌代表菌株分别是来自我国的山东、山西、广东、湖北、吉林等11个省花生主产地,16种土壤类型和20个

花生品种的根瘤中分离并在原寄主上回接确认。同时对来自津巴布韦的4株花生根瘤菌和包括慢生根瘤菌

属3个已知种在内的7个参比菌株也进行分析和比较。

1.2 试验方法及培养基

试验所用培养基配方、测试方法及聚类软件按文献[7]、[8]进行。选择碳、氮源利用, 抗生素, NaCl, pH、温度、染料等耐受性和酶活性共128项表型特征进行测定。

2 结果与讨论

对61株供试菌株共测定128项表型特征, 除去44项全同外, 用平均链锁法对测试结果进行聚类分析, 结果见图1。

从图看出, 全部供试菌株在75%相似性水平上相聚, 并分别在76%和77%相似性水平上聚成两大群(群I, 群II), 两群的鉴别特征见表2。

群1包括19株花生根瘤菌和5株慢生大豆根瘤菌属的已知种 *B. elkanii* USDA76、61A76、*B. japonicum* USDA110 和超慢生大豆根瘤菌 *B. liaoningense* 2281、2044^[8-11]。群1内的菌株平均相似性为86.4%, 中心菌株为USDA110。该群在相似性85%水平上分成6个独立的亚群(1~6)和不入亚群的津巴布韦菌株 *B. sp.* MAR253。亚群1为已知种超慢生大豆根瘤菌(*B. liaoningense*), 慢生大豆根瘤菌参比菌株 *B. elkanii* USDA76、61A76 和 *B. japonicum* USDA110 分别在亚群6和亚群3中, 与慢生根瘤菌属的分类相符; 其它亚群由供试花生根瘤菌菌株组成。

群II内的菌株平均相似性为88.9%, 中心菌株为 *B. sp.* 2764。该群在相似性85%水平上可进一步划分为6

表2 群间的鉴别性特征^{*}

分群 特征	群 1						群 2					
	亚群 1	亚群 2	亚群 3	亚群 4	亚群 5	亚群 6	亚群 7	亚群 8	亚群 9	亚群 10	亚群 11	亚群 12
苦杏仁苷	-	±	+	-	+	+	-	-	-	-	±	+
丙二酸钙	±	+	+	+	+	-	±	-	+	-	±	±
糊精	+	+	+	-	+	±	-	-	+	-	-	-
半乳糖酶	±	±	+	±	±	±	-	-	-	-	-	-
内消旋蔗糖醇	-	+	+	±	+	+	-	-	-	±	-	+
乳糖	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	±
麦芽糖	-	+	+	±	+	+	-	-	-	±	-	±
鼠李糖	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
水杨苷	-	±	+	-	+	-	-	-	-	-	-	±
柠檬酸钠	+	+	+	+	±	+	-	+	-	+	+	+
马尿酸钠	+	-	+	±	+	+	+	+	-	-	±	±
D-山梨糖	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	±
酒石酸钠	+	+	+	±	+	+	-	-	-	-	±	±
海藻糖	+	+	+	±	+	±	-	-	-	-	-	-
L-甲硫氨酸	+	+	+	±	+	-	-	-	-	-	-	-
DL-脯氨酸	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
氯苄青霉素50µg/mL	-	-	±	±	+	+	±	-	+	-	±	-
氯霉素300µg/mL	+	-	-	-	-	+	+	±	±	+	±	+
卡钠霉素100µg/mL	±	-	+	+	+	-	-	-	-	+	±	-
链霉素50µg/mL	-	±	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
0.8%NaCl	-	-	-	-	±	±	±	+	+	-	-	-
pH5	-	-	±	-	-	+	+	+	-	±	±	-
pH10	-	-	-	±	-	±	+	+	±	+	±	-
40℃	-	-	-	±	-	±	+	-	±	+	+	-

* 80~100生长为+, 21%~79%生长为±, 20%生长为-

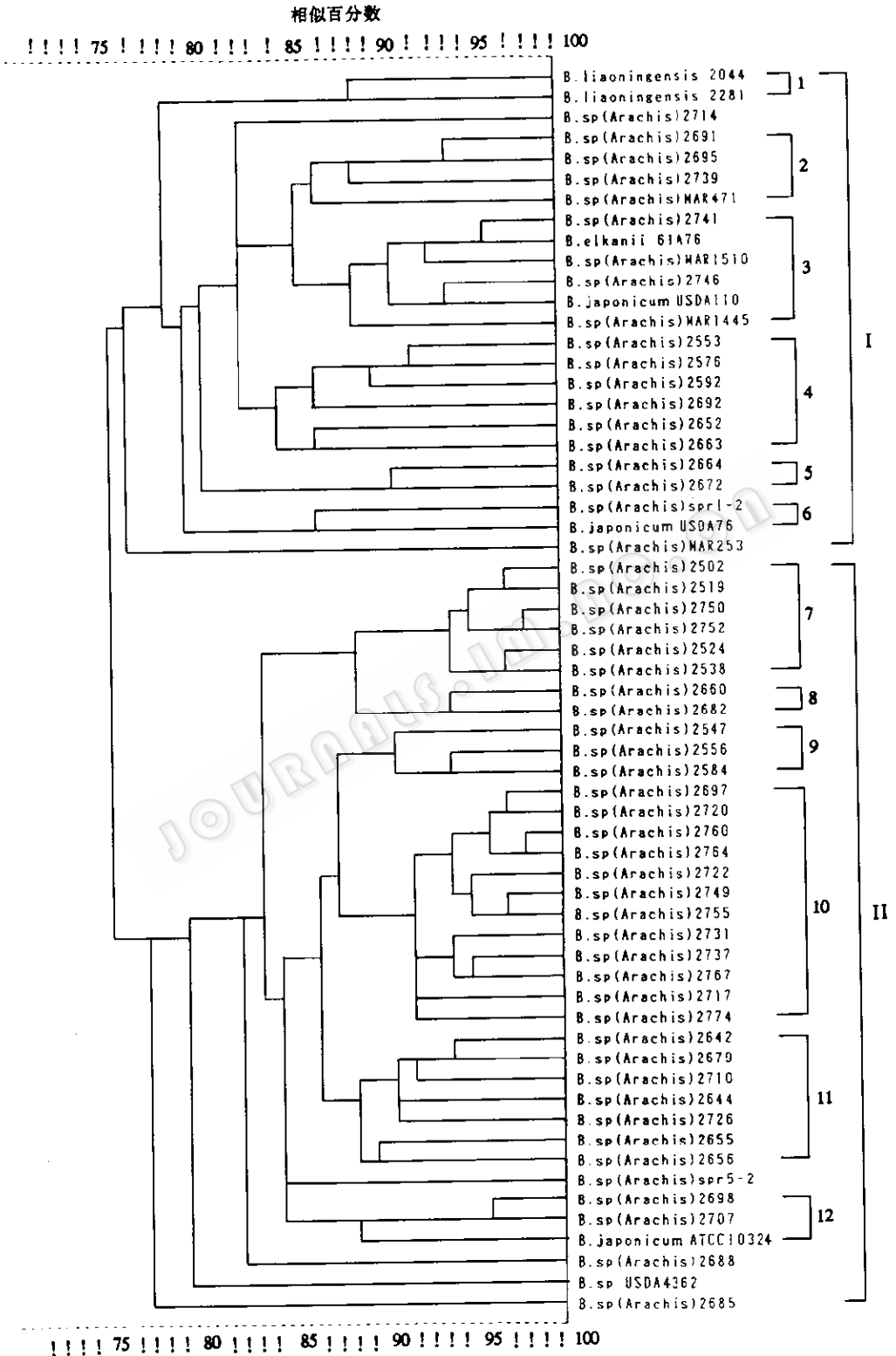


图1 花生根瘤菌平均链锁聚类分析树状图谱

个亚群(7~12)和三株不归任何亚群的菌株 *B. sp.* 2688、2685 和 *B. sp.* USDA4362。其中的7~11亚群由供试的花生根瘤菌组成, *B. japonicum* 的模式菌株 ATCC10324 在亚群12中,未定种的菌株 USDA4362不在任何亚群内。

由图1看出,已知分类地位的3个种(*B. elkanii*, *B. japonicum* *B. liaoningense*)及未定种的 USDA4362 分布在两个大群中,相似性高达80%,达到种的分类水平与文献报道相符。

群I中分离自山蚂蝗又能与花生有效结瘤的津巴布韦菌株 MAR253 和群II中 *B. sp.* 2685 分别以76%和77%的相似性与群I、群II相聚,低于超慢生大豆根瘤菌(*B. liaoningense*)与群I的相似性水平。亚群和未归入亚群的菌株有可能暗示亚种和种的存在。

本研究结果还表明参试的山东、湖北、湖南(除1株外)、河北、吉林、津巴布韦菌株分别聚在一起,表现出地理来源的差异。但也发现广东、江西的菌株较分散。聚类结果说明花生根瘤菌 [*B. sp.*] 在分类上表现出复杂性和多样性。

本文结果表明,所用数值分类不能将花生根瘤菌(*B. sp.*)和慢生大豆根瘤菌(*B. japonicum*和*B. elkanii*)及超慢生大豆根瘤菌(*B. liaoningense*)在属的水平上分开,花生根瘤菌与 *B. japonicum* 和 *B. elkanii* 种的菌株彼此混杂,但与 *B. liaoningense* 种的菌株截然分开。这与 Van Rossum 等^[5] 的研究结果及张小平等^[6] 以 16S

rRNA 部分序列进行的系统分类结果相一致。这两类不同寄主的根瘤菌在表型、基因型特征和系统发育方面都表现出高度的相似性,暗示两者可能有相同起源。很有必要深入进行 16S rRNA 全序列和 23S rRNA 或这两个基因间隔区域(IGS)的分析,揭开花生根瘤菌的起源、进化及系统发育关系。

参 考 文 献

- [1] Jordan D C. *Int Syst Bacteriol*, 1982, **32**:136~139.
- [2] 王素英. *微生物学通报*, 1997, **24**(1):44~47.
- [3] 高俊莲, 段 勇, 陈文新. *微生物学通报*, 1998, **25**(3):125~129.
- [4] Jarvis B D W, Beikum P Va, Chen W X *et al.* *Int Syst Bacteriol*, 1997, **47**:895~898.
- [5] Van Rossum D, Schuurmans F P, Gillis M *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**:1599~1690.
- [6] 张小平, 陈 强, 李登煜. *微生物学报*, 1996, **36**(3):227~233.
- [7] White L O. *J Gen Microbiol*, 1972, **72**:565~574.
- [8] Xu L M, Ge C, Cui Z *et al.* *Int Syst Bacteriol*, 1995, **45**:706~711.
- [9] Kuykendall L D Saxena B, Devine T E, *et al.* *J. Microbiol*, 1992, **38**:501~505.
- [10] Jordan D C. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 1982, **32**:136~139.
- [11] Sneath P H A Bergeys manual of systematic bacteriology, 1984, 1:5~7.