

根瘤菌的系统发育及其分类研究进展*

刘晓云 陈文峰 陈文新

(中国农业大学生物学院 北京 100094)

摘要: 根瘤菌与豆科植物这一共生体系的突出特点是固氮量大、抗逆能力强和为人畜提供高蛋白质营养,在农业生产及固氮生态系统中占有重要地位。对根瘤菌系统发育研究作一概述并描述了1997年后正式发表的根瘤菌新属种。

关键词: 根瘤菌,系统发育,分类

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2002)05-0073-04

根瘤菌与豆科植物这一共生体系的突出特点是固氮量大、抗逆能力强和为人畜提供高蛋白质营养,在农业生产及固氮生态系统中占有重要地位。现代分类技术尤其是分子生物学技术的应用,使根瘤菌分类发展到今天的以系统发育为中心,结合表型特征分析、遗传物质分析的多相分类体系。在即将正式出版的伯杰系统细菌学手册第二版(网络版见 <http://www.cme.msu.edu/Bergeys>)中,根瘤菌科(Rhizobiaceae)上升为目(Order),六个属的根瘤菌分别位于根瘤菌目(Rhizobiales)的四个科(Family)中:根瘤菌科 Rhizobiaceae (*Rhizobium*、*Agrobacterium*、*Allorhizobium*、*Sinorhizobium*)、叶瘤菌科 Phyllobacteriaceae (*Mesorhizobium*、*Phyllobacterium*)、丝微菌科 Hyphomicrobiaceae (*Azorhizobium*)、慢生根瘤菌科 Bradyrhizobiaceae (*Bradyrhizobium*)。而结瘤甲基杆菌(*Methylobacterium nodulans*)独立于上述六属,是唯一能利用甲醇且与豆科植物结瘤种。

1 根瘤菌的系统发育研究

根瘤菌在细菌的系统发育体系中位于变形杆菌门(Proteobacteria)中的 α -纲。16S rRNA(或其基因 rDNA)序列分析技术的推广和应用,使根瘤菌系统发育的研究取得了重大突破。1996年 Young^[1]等利用已知根瘤菌种的16S rRNA全序列资料,构建了根瘤菌属种的系统发育树(天山根瘤菌和地中海根瘤菌未包括在内),各个属种在系统发育树的位置与已往的分类结果相一致。该系统发育树揭示了根瘤菌属与中慢生根瘤菌属

* 国家自然科学基金“九五”重点项目(No.39730010)

收稿日期:2001-09-03, 修回日期:2001-11-05

及中华根瘤菌属的亲缘关系近；而固氮根瘤菌属与慢生根瘤菌属亲缘关系近。之后，根瘤菌新属种不断发表，一般都进行 16S rDNA 全序列的测定，同时与其它相关参比菌株构建系统发育树，确定新种在系统发育中的位置。

DNA 测序技术的不断发展使得 23S rDNA 全序列分析也被用作根瘤菌系统发育的指标。23S rDNA 分子大小约是 16S rDNA 分子的两倍，包含的信息量更大。高俊莲^[2]通过应用 16S rDNA 和 23S rDNA PCR-RFLP 对斜茎黄芪根瘤菌进行比较分析，结果表明两种方法具有较好的一致性，而 23S rDNA 所揭示的系统发育信息更灵敏，更可靠。谷氨酰胺合成酶基因（GS II）有望发展为系统发育研究的指标，因为谷氨酰胺合成酶基因在生物体进化中变化不大，是一种稳定的“分子钟”。利用 GS II 基因序列，Wernegreen 等^[3]构建了根瘤菌及相关属种的系统发育树，结果表明与 16S rDNA 的基本一致。

Young^[4]认为，建立在单基因基础之上的系统发育分析是不充分的，未考虑远源物种之间的基因转移会影响系统发育分析的结果。因此，他建议，进行系统发育研究时，应结合多种指标。因为尽管 16S rDNA 高度保守，但对亲缘关系较近的种分辨率不够高。因此，在确定种的分类地位和系统发育地位时，16S rDNA 全序列分析要结合 DNA-DNA 同源性分析。

2 近年来根瘤菌分类研究进展

随着根瘤菌资源的不断挖掘和新技术的使用，根瘤菌分类研究取得了新的进展，已由原来的 2 属 4 种增加到 7 属 33 种。图 1 为根据 16S rRNA 基因全序列做出的系统发育树状图，该图中未包括 *Bradyrhizobium liaoningense*。

2.1 新属的建立

2.1.1 *Mesorhizobium* (中慢生根瘤菌属): 早在 1985 年，陈文新等发现分离自新疆不同寄主的一群根瘤菌，其生长速度介于快生和慢生之间，在 YMA 培养基上产酸。后经扩大菌株并

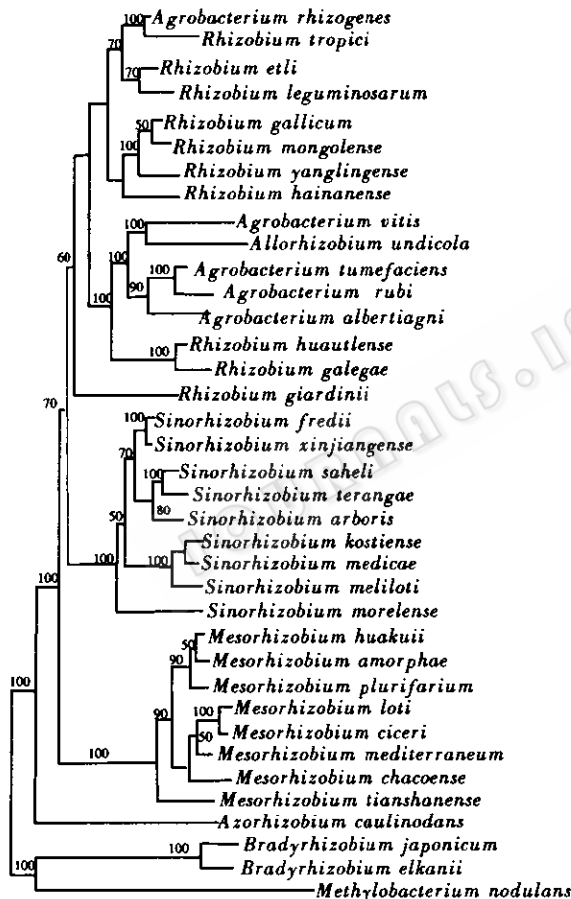


图 1 根瘤菌及相关细菌的系统发育树状图

进行大量表型性状、遗传学分析及部分 16S rRNA 序列分析发现，该群与百脉根根瘤菌（*R. loti*）、华癸根瘤菌（*R. huakuii*）和鹰嘴豆根瘤菌（*R. ciceri*）构成同一系统发育分支，并称为 meso-growing 根瘤菌，当时确定属名为中慢生根瘤菌属（*Mesorhizobium*）。由于当时未测定 16S rRNA 全序列，同行建议先不定新属。后经多次 16S rDNA 全序列分析表明，*R. loti* 与 *R. huakuii*、*R. ciceri*、*R. mediterraneum* 和 *R. tianshanense* 构成一群，该群

表型和系统发育学特征均与 *Azorhizobium* 和 *Bradyrhizobium* 有区别, 与 *Rhizobium* 同源性小。鉴于此, 1997 年, Jarvis 与陈文新等^[5] 共同著文发表该属, 并应用 *meso-growing* 的名称, 即 *Mesorhizobium*。将上述五种: *R. loti* 与 *R. huakuii*、*R. ciceri*、*R. mediterraneum* 和 *R. tianshanense* 归于该属, 并以 *M. loti* 为模式种。

2.1.2 *Allorhizobium* (其他根瘤菌属): 1998 年, de Lajudie^[6] 对来自湿地的 *Neptunia natans* (一种水生假含羞草属的植物) 上的 6 株根瘤菌进行了研究, 结果表明, 这些根瘤菌不同于根瘤菌属和慢生根瘤菌属, 与 *Agrobacterium vitis* 的亲缘关系近, 它们构成同一系统发育分枝, 从而提出建立新属, 属下仅设有一种即水生其它根瘤菌 *A. undicola*, 该种为快生型根瘤菌, 并立为模式种。

2.2 新种的确定

2.2.1 *Rhizobium hainanense* (海南根瘤菌): 陈文新等^[7] 对采自海南省热带豆科作物上的根瘤菌进行数值分类和 DNA-DNA 杂交等研究发现, 快生根瘤菌呈现多样性: 一些属于根瘤菌属 (*Rhizobium*) 的已知种, 另一些则形成几个亚群, 其中亚群 4 表现出特异性。经 16S rRNA 序列分析和寄主共生性等项研究后, 确立为一个新种, 模式种为 CCBAU57015 (= I66)。

2.2.2 *Rhizobium gallicum* 和 *Rhizobium giardinii* (高卢根瘤菌和贾氏根瘤菌): Amarger 等^[8] 对分离自法国菜豆的根瘤菌进行了研究, 确定了二个新种: *R. gallicum* (Callia 为法国地名) 和 *R. giardinii* (Giardini 为巴西根瘤菌生物学家 Roberto Giardini, 为纪念其首次分离出该根瘤菌)。

2.2.3 *Rhizobium mongolense* (内蒙古根瘤菌): 1998 年, 内蒙草原研究所和美国农业部 (USDA) 从内蒙温带草原和沙漠干草原共同采集紫花苜蓿 (*Medicago ruthenica*) 的种子和根际土壤, 土壤作为种子的培养基质。从培养 60d 的植物根瘤中获得 106 个培养物。确定一新种为 *R. mongolense*, 模式种为 USDA1844^[9]。

2.2.4 *Rhizobium huautlense* (瓦乌特拉根瘤菌): 汪恩涛等^[10] 从墨西哥的 Huautla 地区的田菁 (*Sesbania herbacea*) 根瘤中分离 104 株菌, 对其中 66 株菌进行多位点酶电泳及质粒图谱分析, 电泳结果分为 3 群, 群 III 被确定为新种 *R. huautlense*。该新种与山羊豆根瘤菌和其它模式菌株 DNA 同源性特别低, 为 9% ~ 22%。

2.2.5 *Rhizobium yanglingense* (杨凌根瘤菌): 2001 年, Tan 等^[11] 对中国西北干旱半干旱地区的小冠花、三籽两型豆、米口袋的根瘤菌进行了研究, 提出新种 *R. yanglingense*, 模式种为 CCBAU71623。

2.2.6 *Sinorhizobium medicae* (苜蓿中华根瘤菌): Rome^[12] 从一年生苜蓿植物上获得 9 个菌株, 与 *S. meliloti* 的基因型有区别, 16S rRNA 序列与 *S. meliloti* 的相似性为 99.7%。但数值分析和生物化学测试明显不同于 *S. meliloti*, 且能与南苜蓿 (*Medicago polymorpha*) 结瘤, 而 *S. meliloti* 不能与该寄主有效结瘤。在此基础上, 命名为新种——苜蓿中华根瘤菌。(建议将原 *Sinorhizobium meliloti* 改译为草木樨中华根瘤菌)。

2.2.7 *Sinorhizobium arboris* & *Sinorhizobium kostense* (木本中华根瘤菌和柯斯梯中华根瘤菌): 张小平等^[13] 从苏丹和塞内加尔豆科植物金合欢和牧豆属植物 *Prosopis chilensis* 上采集 60 株根瘤菌, 和采自不同地区的木本豆科植物的根瘤菌一起作了分析, 定为两个新种, 命名为 *S. arboris* 和 *S. kostense* (*Kosti* 为苏丹的一个地区名)。

2.2.8 *Mesorhizobium mediterraneum* (地中海中慢生根瘤菌): 1994 年, Nour (IJSB, 44:

511-522) 将分离自鹰嘴豆上的根瘤菌菌株分为两群, 其中 B 群定为鹰嘴豆根瘤菌, 与 A 群有明显差异。之后通过进一步研究, 确定 A 群中基因型 III UPM-ca36 为一新种, 命名为地中海根瘤菌 (*Rhizobium mediterraneum*) (分离自西班牙), 模式种为 UPM-ca36。1997 年, 随着中慢生根瘤菌属的确定, 此种更名为地中海中慢生根瘤菌。

2.2.9 *Mesorhizobium plurifarum* (广布中慢生根瘤菌): 1994 年 de Lajudie (IJSB, 44: 751-733) 对分离自塞内加尔的金合欢属和田菁属植物上的 80 株分离物和 33 株来自巴西的分离物作了研究, 根据全细胞蛋白电泳将其中 52 株分为三群, 群 U 是来自不同地区的根瘤菌。1998 年将其定为一新种, 为 *M. plurifarum*。模式种是 ORS1032 (= LMG11892)。

2.2.10 *Mesorhizobium amorphae* (紫穗槐中慢生根瘤菌): 汪恩涛等 (IJSB, 49: 51-65) 从中国 3 个不同地理区域的紫穗槐上分离得到 55 株根瘤菌, 多相分类方法研究表明, 55 株根瘤菌归于 3 个根瘤菌属中, 分为 5 个 RFLP 类型, 型 I 定为新种: *M. amorphae*, 模式种为 ACCC19665。

2.2.11 *Mesorhizobium chacoense* (查克中慢生根瘤菌): Velazquez 等^[14], 对来自阿根廷的 *Prosopis alba* 上的根瘤菌分离物采用多相分类的方法进行了研究, 确定它为一个新种, 定名为 *M. chacoense* (Chaco 为阿根廷的一个地区), LMG19008 为模式种。

2.2.12 *Methylobacterium nodulans* (结瘤甲基杆菌): Sy 等^[15] 从猪屎豆 (*Crotalaria*) 上分离得到的一个新种, 通过 16S rRNA 基因序列分析, 确定为结瘤甲基杆菌 (*Methylobacterium nodulans*)。该种能利用甲醇生长, 是目前唯一能与豆科植物结瘤的甲基杆菌属的种。

3 展望

根瘤菌一直被认为只存在于变形杆菌门中的 α -纲, 但 Moulin 等人最新研究结果表明 (Nature, 41: 948-950), 根瘤菌也分布于 β -纲。另外, 随着 *S. meliloti* 1021 和 *M. loti* MAFF303099 两株根瘤菌全基因组序列测定的完成和更多微生物基因组全序列的测定, 以及人们对豆科植物根瘤菌种质资源调查的日益广泛及深入研究, 根瘤菌的系统发育和生物多样性研究将更臻完善。

参考文献

- [1] Young J P W, Hanikka K E. New Phytol, 1996, 133: 87 ~ 94.
- [2] 高俊莲, 陈文新. 微生物学通报, 1999, 26 (2): 120 ~ 125.
- [3] Wernegreen J J, Riley M A. Mol Biol Evol, 1999, 16: 98 ~ 113.
- [4] Young J M. Int J Syst Evol Microbiol, 2001, 51: 945 ~ 953.
- [5] Jarvis B D W, van Berkum P, Chen W X, et al. Int J Syst Bacteriol, 1997, 47: 895 ~ 898.
- [6] de Lajudie P, Laurent-Fulele E, Willems A, et al. Int J Syst Bacteriol, 1998, 48: 1277 ~ 1290.
- [7] Chen W X, Tan Y, Gao J L, et al. Int J Syst Bacteriol, 1997, 47: 870 ~ 873.
- [8] Amarger N, Macheret V, Lauguerre G. Int J Syst Bacteriol, 1997, 47: 996 ~ 1006.
- [9] Van berkum P, Beyene D, Bao G, et al. Int J Syst Bacteriol, 1998, 48: 13 ~ 22.
- [10] Wang E T, van Berkum P, Beyene D, et al. Int J Syst Bacteriol, 1998, 48: 687 ~ 699.
- [11] Tan Z Y, Kan F L, Peng G X, et al. Int J Syst Evol Microbiol, 2001, 51: 909 ~ 914.
- [12] Rome S, Fernandez M P, Brunel B, et al. Int J Syst Bacteriol, 1996, 46: 972 ~ 980.
- [13] Zhang X P, Harper R, Karsisto M et al. Int J Syst Bacteriol, 1991, 41: 104 ~ 113.
- [14] Velazquez E, Igual J M, Willems A, et al. Int J Syst Evol Microbiol, 2001, 51: 1011 ~ 1021.
- [15] Aboulaye Sy, Giraud E, Jourand P, et al. J Bacteriol, 2001, 183: 214 ~ 220.