

陈 文 新

(北京农业大学微生物专业, 北京)

## 一、传统的根瘤菌分类系统及存在的问题

早期对豆科植物-根瘤菌共生的研究只涉及一些农业上重要的一年生种, 很快就注意到了根瘤菌共生的“专一性”及相互接种的关系, 即一个植物的分离物只与本属植物或少数其他属植物共生结瘤, 反之亦然。以一个根瘤菌将一些植物联系起来成为一个族群, 这

就导出了“互接种族”的概念。Fred<sup>[1]</sup> 等按“互接种族”的关系列出了 22 个植物属, 分为 7 个互接种族, 每族结瘤的菌按其优势寄主命名, 这是根瘤菌最早分类系统(表 1)。这系统一直沿用至今。

表 1 中的豇豆族主要是热带豆科结瘤的慢生根瘤菌, 没有定名。它象一个“大口袋”, 全部不能列入其他

表 1 豆科植物的几个互接种族及根瘤菌种

| 种族名称 | 代表寄主                     | 根瘤菌名称                             |
|------|--------------------------|-----------------------------------|
| 豌豆族  | 豌豆属, 山豆属, 兵豆属, 蚕豆属, 鹰嘴豆属 | 豌豆根瘤菌 ( <i>R. leguminosarum</i> ) |
| 菜豆族  | 菜豆属                      | 菜豆根瘤菌 ( <i>R. phaseoli</i> )      |
| 三叶草族 | 三叶草属                     | 三叶草根瘤菌 ( <i>R. trifolii</i> )     |
| 苜蓿族  | 苜蓿属, 草木樨属, 胡卢巴属          | 苜蓿根瘤菌 ( <i>R. meliloti</i> )      |
| 羽扇豆族 | 羽扇豆属, 鸟足豆属               | 羽扇豆根瘤菌 ( <i>R. lupini</i> )       |
| 大豆族  | 大豆属                      | 大豆根瘤菌 ( <i>R. japonicum</i> )     |
| 豇豆族  | 豆科中很多不同的属                | ( <i>R. spp.</i> )                |

种族的专一的、非专一的根瘤菌均放在这个族里。

在 Bergey<sup>[2]</sup> 的细菌鉴定手册第八版中将根瘤菌 (*Rhizobium*) 及土壤杆菌 (*Agrobacterium*) 同放在根瘤菌科中, 根瘤菌属再分为两个群: 快生型群, 具 2—6 根周生鞭毛, 在含碳水化合物培养基上产酸反应,  $G + Cm$  为 59—64 ( $T_m$ )。包括表 1 中列举的前 4 个种。慢生型群, 具一根极生或亚极生鞭毛, 在含碳水化合物培养基上产碱反应。  $G + Cm$  为 61—65 ( $T_m$ )。包括表 1 列的后两个种及豇豆杂群。在伯捷的第七版中把 *Chromo-bacterium* (色杆菌属) 也放在根瘤菌科中。

以“互接种族”为基础的分类系统在 40—50 年代间遭到了很大挑战, 因为对豆科结瘤情况研究越广泛、越深入, 就越发现豆科植物与根瘤菌的关系大大突破了“互接种族”的界线, 显得非常混乱。Wilson<sup>[3]</sup> 采用八十多个豆科植物种及其分离物进行相互接种, 得到五百多个排列组合。因此, 他说有五百多个理由废除豆科植物的“互接种族”。随后很多人都发现羽扇豆-大豆-豇豆族间可相互接种结瘤; 豌豆-三叶草族间交叉结瘤; 慢生型根瘤菌可以在四季豆上结瘤等<sup>[4]</sup>。特别是 Trinick<sup>[5]</sup> 发现慢生型豇豆根瘤菌能在非豆科的 *Parasponia* sp. 上有效结瘤。他也发现豇豆也与快生的银合欢-含羞草-田菁族的根瘤菌结瘤。另外不少人发现“互接种族”内的植物及共生菌之间的高度专一

性, 如中非的三叶草根瘤菌与欧洲的三叶草根瘤菌的专一性有明显差别。更复杂的是在羽扇豆-百脉根族中既有快生型根瘤菌, 也有慢生型根瘤菌。因此, Vincent<sup>[6]</sup> 强调寄主与他们共生体分群的困难性。但他仍建议在“选择寄主”的基础上考查分群。Broughton<sup>[4]</sup> 提议不要限制根瘤菌种的数量, 要协同努力在相同的基础上考核可用的数据, 并研究可能产生种、群的其他特殊寄主-菌的共生。他认为极端混杂性及高度专一性都是存在的, 必须承认这些特征。根瘤菌分类应指出不同根瘤菌种间相互关系, 也要对它们的寄主范围给予更多的信息。他认为是否可将已知的豆科植物及其共生菌的分群列出一个更长的单子。

## 二、近年来对根瘤菌分类的新进展

鉴于原有根瘤菌分类系统的不合理, 不适用。六十年代以来很多人采用不同的分类鉴定方法进行了不少工作。

Graham<sup>[7]</sup> 用特征等重原则的数值分类法, 采用了 83 株根瘤菌及 38 个属于 *Agrobacterium*、*Chromobacterium*、贝氏固氮菌 (*Beijerinckia*) 及芽孢杆菌 (*Bacillus*) 的菌株, 测定了 100 个特征。根据得出的结果, 他建议将根瘤菌及土壤杆菌分类作重要改变: ① *Rhizobium trifolii*, *R. leguminosarum* 及 *R. phaseoli* 性状一致, 并作为一个种, 保留 *R. leguminosarum* 的种名; ②

*R. meliloti* 保留不变; ③放射土壤杆菌(*Agrobacterium radiobacter*)及根瘤土壤杆菌(*A. tumefaciens tumefaciens*)联合,列于根瘤菌属中,叫*R. radiobacter*; ④*R. japonicum*, *R. lupini*及豇豆族根瘤菌联合成一个群,这些菌与快生型菌有明显差别,建议进一步研究成立一个新属,定名 *Phytomyxa*。

Heberlein 等<sup>[8]</sup>用 DNA 同源性方法得出根瘤菌分类的结果与 Graham 数值分类的结果惊人地一致,支持了 Graham 对根瘤菌及土壤杆菌的分类方案,并建议将另外几个土壤杆菌(*A. pseudotsugae*, *A. gypsophilace*及*A. stellulatum*)及色杆菌从根瘤菌科中移走。

Mannetje<sup>[9]</sup>用不同的方法分析 Graham 的数据,结果表明快生型和慢生型根瘤菌是分立的,他不赞成在属的水平上将两群分开;也不赞成将土壤杆菌放在根瘤菌属中。

一些研究说明用根瘤菌 DNA 的 G + Cmol% 在分群方面界线不很清楚,方法不敏感,但指明了 *Rhizobium*、*Azotobacter*、*Azomonas* 及 *Pseudomonas* 关系相近。

Vincent<sup>[10]</sup>用免疫扩散法研究根瘤菌内抗原,得出很有价值的分类信息。他用血清学分析方法对根瘤菌分类与数值分类及 DNA 同源性法分类结果很相一致。他还发现慢生型根瘤菌与从非豆科的 *Parasponia* sp. 的分离菌有相同的带,而老通草(*Lotononis bainerisii*)既不与快生型也不与慢生型根瘤菌的抗血清反应。

Jarvis<sup>[11]</sup>等考查对百脉根根瘤菌所做的比较研究,说明从百脉根分离的快生型根瘤菌在寄主专一性、

噬菌体关系、可溶性蛋白图谱及 DNA 碱基序列同源性方面可与目前公认的根瘤菌各个种相区分,他们建议成立一个新种,定名为 *Rhizobium loti*。该种的模式菌株是由牛角花(*Lotus corniculatus*)根瘤中分离的 NIP2213(ATCC 33669)。这个种有一个较大的寄主范围,包括羽扇豆属(*Lupini*),百脉根属(*Lotus*),锦鸡儿属(*Caragara*),黄芪属(*Astragalus*),鸟足豆属(*Ornithopus*),绒毛花属(*Anthyllis*),芒柄花属(*Ononis*),染料木属(*Genista*)及含羞草属(*Mimosa*)等。与以上这些植物结瘤的慢生型根瘤菌不包括在这种中。

Jordan<sup>[12]</sup>1982年根据一系列研究分析,如数值分类;DNA 碱基比,DNA 杂交,核糖体的核糖核酸顺反子相似性,血清学,胞外胶成分,碳水化合物利用及代谢,噬菌体及抗菌素敏感性,蛋白质成分及类菌体内细胞内含物类型等,提出慢生型、不产酸的根瘤菌应与快生型、产酸的根瘤菌分开,成为一个新属,建议新属定名慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium*),并建议将 *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 转到新属 *Bradyrhizobium* 中,作为新属的典型种,改名为 *Bradyrhizobium japonicum* (Buchanan 1980)。

三、根瘤菌最新分类系统

1980年12月在澳大利亚召开国际生物固氮会议期间,举行了讨论根瘤菌及土壤杆菌的国际小组会,专家们对这些菌近年来分类方面的研究成果进行了讨论。在此基础上 D. C. Jondan 对根瘤菌,土壤杆菌分类进行了重新修订,现发表于伯捷细菌分类手册<sup>[13]</sup>第九版上。

新的分类系统将根瘤菌科(*Rhizobiaceae* Conn 1938)分四个属:

表 2 *Rhizobium* 与其他形态、生理相似的属的辨别特征

| 特 征                | <i>Rhizobium</i> | <i>Bradyrhizobium</i> | <i>Agrobacterium</i> | <i>Phyllobacterium</i> | <i>Pseudomonas</i> |
|--------------------|------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|--------------------|
| 鞭毛排列单鞭毛            | D <sup>a</sup>   | +                     | -                    | D                      | D <sup>b</sup>     |
| 丛生鞭毛               | -                | -                     | -                    | D                      | D                  |
| 周生鞭毛               | D                | -                     | D                    | -                      | -                  |
| 产生根瘤               | +                | +                     | - <sup>c</sup>       | -                      | -                  |
| 产生叶瘤               | -                | -                     | -                    | +                      | -                  |
| 固氮酶活性              | +                | +                     | - <sup>c</sup>       | - <sup>d</sup>         | -                  |
| 引起肥大能力             | -                | -                     | +                    | -                      | -                  |
| 产 3-酮基乳糖           | -                | -                     | D                    | -                      | -                  |
| YMA 上快生            | +                | -                     | +                    | +                      | +                  |
| 含糖培养基上产碱           | -                | +                     | -                    | -                      | -                  |
| 产 H <sub>2</sub> S | D                | -                     | -                    | -                      | -                  |
| 需生物素               | +                | +                     | -                    | -                      | D                  |
| 胞外胶中有 β-2-葡聚糖      | +                | +                     | +                    | -                      | -                  |
| DNA 的 mol%G + C    | 59—64            | 61—65                 | 57—63                | 60—61                  | 58—70              |

a. D 表示情况不一。 b. 一般有一个极生鞭毛,但有些种有多个极生鞭毛。 c. 自然界存在的不结瘤,但经遗传学改造的可产瘤,且有固氮酶活性。 d. 有争议。 f. 某些种的菌株间不相同。

I. *Rhizobium*. 主要感染温带豆科植物,结瘤固氮,在 YMA 培养基上生长快,一般在矿质盐-甘露醇培养基上产酸, G + C mol% 为 59—64( $T_m$ )。

II. *Bradyrhizobium*. 引起热带地区及某些温带地区豆科植物结瘤固氮,在 YMA 培养基上生长慢,在矿质盐-甘露醇培养基上通常产酸。G + C mol% 为 61—65( $T_m$ ) (*Lotonis* 上分离的菌株例外)。

III. *Agrobacterium*. 不引起豆科植物结瘤,但大多数种能在很多植物根上产生另外类型的肿大体,不能固氮。G + C mol% 为 57—63( $T_m$ )。

IV. 叶瘤细菌 (*Phyllobacterium*) 在紫金牛科及茜草科的某些种的叶子上感染结瘤,固氮能力尚有争议。G + C mol% 为 60—61( $T_m$ )。

以上四属的辨别特征列于表 2。

1. *Rhizobium* Frank 1889. 这属的主要特征是:细胞杆状,  $0.5—0.9 \times 1.2—3.0 \mu m$ ; 在不良生长环境中常为多形态;常含聚-B-羟基丁酸颗粒,在光学显微镜下折光强;无芽孢;G<sup>-</sup>;由一个极生或亚极生或 2—6 个周生鞭毛运动;一般为好气,在氧压低于 1.0KPa 条件下常能很好生长;最适温度是 25—30℃;最适 pH 6—7;菌落为圆形,凸起,半透明且多粘质;在 YMA 培养基中 3—5 天内一般菌落直径 2—4mm;摇床液体培养基中 2—3 天变浑浊;化能有机营养型,利用广泛范围的碳水化合物及有机酸盐作碳源,不产气,不利用纤维素及淀粉;在矿盐-甘露醇或其他碳水化合物培养基上产生酸性反应;生长在碳水化合物培养基上常产丰富的胞外多糖粘质;铵盐、硝酸盐、亚硝酸盐及大部分氨基酸能作氮源;某些菌株能生长在简单的无维生素矿质培养基上,以酪素水解物作唯一的碳源及氮源;蛋白胨不好利用;酪素及琼脂不水解,某些菌株要求生物素或其他水溶性维生素;不产 3-酮基糖苷;这些微生物的特点是能侵入温带地区及某些热带地区豆科植物的根毛,产生根瘤;所有菌株都表现寄主“专一性”,细菌在根瘤中为多形态(类菌体),正常地固定大气中的 N<sub>2</sub> 成为氨,供寄主植物利用。G + C mol% 是 59—64 ( $T_m$ )。

典型种为 *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889。

*Rhizobium* 属中包括三个种,种间的辨别见表 3。各种的特点分述如下:

① *R. leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889. 其特征除属中描述及表 3 指出的外,这个种的细胞具 2—6 根周生鞭毛,根瘤中的类菌体一般不规则,为 x、y 状,星状及一端较粗的棍棒状,菜豆的类菌体例外,具有少数分枝状;它包含三个生物型 (biovars): *trifolii*, *Phaseoli* 及 *viciae*。

这个种正常是与以下植物(不一定全部)形成根瘤:豌豆 (*Pisum*),山黧豆 (*Lathyrus*),野豌豆 (*Vi-*

表 3 *Rhizobium* 三个种的辨别特征

| 特 征  | <i>R. legum-<br/>inosarum</i> | <i>R. meliloti</i> | <i>R. loti</i> |
|--|-------------------------------|--------------------|----------------|
| 鞭毛排列单鞭毛                                      | —                             | —                  | d <sup>a</sup> |
| 周鞭毛  | +                             | +                  | —              |
| 与 <i>R. meliloti</i> 的<br>抗血清凝集 <sup>b</sup> | —                             | +                  | —              |
| 2% NaCl 中生长                                  | —                             | d                  | —              |
| 39—40℃ 生长                                    | —                             | d                  | —              |
| 需 VB <sub>1</sub>                            | d                             | —                  | —              |
| 需泛酸  | +                             | —                  | —              |
| 产 H <sub>2</sub> S                           | —                             | d                  | —              |
| 在甘油磷酸盐培养<br>基上沉淀                             | —                             | d                  | —              |
| 石蕊牛奶中酸反应                                     | —                             | d                  | —              |

a. d 表示情况不一; b. 体细胞或鞭毛抗原的抗血清。

*cia*), 兵豆 (*Lens*), 温带地区的菜豆 (*Phaseolus vulgaris*, *P. angustifolius* 和 *P. multiflorus*) 及三叶草 (*Trifolium*)。该种的 G + C mol% 为 59—63( $T_m$ )。典型菌株 ATCC 10004。

② *Rhizobium meliloti* Dangeard 1926. 其特征除在属中及表 3 中描述的外,根瘤中的类菌体为一端较粗的棍棒状及分枝状;细胞具 2—6 个周生鞭毛。这个种正常与以下(不是全部)植物形成根瘤:草木樨 (*Melilotus*),苜蓿 (*Medicago*),及胡卢巴 (*Trigonella*) G + C mol% 为 62—63( $T_m$ )。典型菌株 ATCC9930。

③ *Rhizobium loti* Jarvis, Paukhurst and Patel 1982. 其特征除属中及表 3 所描述外,在根瘤中类菌体是一端略粗的棒状及分枝状。这个种的细胞主要是 1 根极生或亚极生鞭毛。这个种在以下(不是全部)寄主植物上结瘤:牛角花 (*Lotus corniculatus*),细叶百脉根 (*Lotus tenuis*),密花羽扇豆 (*Lupinus densiflorus*),绒毛花属的一种 (*Anthyllis vulneraria*),紫花鸟足豆 (*Ornithopus sativus*),鹰嘴豆 (*Cicer arietinum*),蒙古锦鸡儿 (*Caragana arborescens*),银合欢 (*Leucaena leucocephala*) 及含羞草 (*Mimosa*) 等。G + C mol% 是 59—64( $T_m$ )。模式菌株 ATCC33669。

此外,与 *R. loti* 结瘤固氮的小冠花 (*Coronilla*),驴食豆 (*Onobrychis*) 及槐 (*Sophora*) 三个植物属中分离到的一小群根瘤菌似乎可组成一个与 *R. loti* 区分的菌群,虽然这些菌株与 *L. leucocephala* 及 *Phaseolus vulgaris* 结瘤固氮,但它们与典型菌株 DNA/DNA 同源性 & 寄主植物专一性均很不相同。这群菌的分类地位必须等待更大量的菌株研究结果再定。

2. *Bradyrhizobium* Jordan 1982. 该属主要特征:细胞杆状,  $0.5—0.9 \times 1.2—3.0 \mu m$ ; 在不良环境中常

为多形态;含有聚- $\beta$ -羟基丁酸,在光学显微镜下折光强;无芽孢;G<sup>-</sup>;靠一根极生或亚极生鞭毛运动;好气;最适温度 25—30℃;最适 pH6—7;菌落圆形、不透明,少数半透明,白色,凸起;在 YMA 培养基上生长 5—7 天菌落直径不超过 1mm;在 *Lotononis batnesii* 上分离的某些菌株菌落为红色;摇床液体培养,3—5 天后中度浑浊;很少有较快生长的菌株;化能有机营养型;用一系列碳水化合物及有机酸作碳源,不产气;喜欢利用五碳糖,不利用纤维素及淀粉;在含甘露醇或其他碳水化合物的矿盐培养基上产碱反应;生长在碳水化合物培养基上常产胞外多糖粘质;某些菌株在有 H<sub>2</sub> 及 CO<sub>2</sub> 及 O<sub>2</sub> 量低时能行化能自养;铵盐、硝酸盐及某些氨基酸作氮源;利用蛋白胨不好(从 *Lotononis* 分离的菌株例外);不水解酪素及琼脂;一般不要求维生素(生物素略有例外);不产生 3-酮基糖苷。这菌的特征是能侵入热带及其某些温带地区豆科植物根毛,形成根瘤,进行共生。所有菌株具寄主“专一性”;在根瘤中的细菌膨大;能正常固定空气中的 N<sub>2</sub>,供寄主植物利用;某些菌株在特殊条件下能自生固氮。G+C mol% 为 61—65(T<sub>m</sub>)。模式种 *Bradyrhizobium japonicum*。B. *japonicum* 的细胞具一个极生或亚极生鞭毛。这个种正常是与大豆 (*Glycine*) 及大翼豆 (*Macroptilium atropurpureum*) 结瘤。G+C mol% 为 61—65(T<sub>m</sub>)。模式菌株 ATCC10324。

*Bradyrhizobium* 代表一个极混杂的根瘤菌群,其中分类关系还不很清楚。近来由 DNA/DNA 杂交研究提出现在定为 B. *japonicum* 的种至少可分为三个 DNA 同源型。待更多的信息可利用时,很可能 B. *japonicum* 将产生一系列种或小种。

在伯捷鉴定细菌学手册第八版中, Jordan 及 Allen 订的 *R. lupini* 种,这次没有被放在 *Bradyrhizobium* 属中,因为它仅有一个主要鉴别特征与 *Ornithopus* 及 *Lupinus* 高度亲和结瘤。草原豆科 *Lotononis* 上分离的菌的分类地位也未定,这些菌和其他慢生型菌一样,是单鞭毛,生长慢,产碱反应,在石蕊牛奶上无血清环,但是它们的培养细胞增大,具椭圆带状,抗紫外线能力比其他慢生及快生根瘤菌均大,且利用蛋白胨。它的细胞既不与其它慢生菌也不与 *Rhizobium* 的种的抗血清反应,并且其 G+C mol% 是 68—69(T<sub>m</sub>)。这些菌株极端专一性,仅与 *Lotononis* ssp. 及 *Macroptilium atropurpureum* 有效结瘤。

关于一群能与野大豆 (*Glycine soja*) 及北京黑豆 (*G. max* cv *Peking*) 有效结瘤的快生根瘤菌放在 *Rhizobium* 属中。

还有其他慢生根瘤菌尚未给他们分为种或生物型。这些细菌能与 *Lotus*, 豇豆 (*Uigna*), *Lupinus*, *Ornithopus*, *Cicer*, 田菁 (*Sesbonia*), *Leucaena*, *Mimosa*, 藕豆 (*Lablob*) 及金合欢 (*Acacia*) 中的某些种结瘤,

这些植物也能被快生的 *R. loti* 结瘤。这些菌株也常能与 *Macroptilium* 结瘤,有些也与 *Glycine* 结瘤。建议等到 *Bradyrhizobium* 属中进一步产生种、生物型之前,这些菌可以定为 *Bradyrhizobium* sp., 并带一个相应的寄主名在括号中,如 *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) 或 *R. sp.* (*Lupinus*)。

#### 四、结束语

由于近年来积累了不少资料,因而得出了根瘤菌新的分类系统。这个新系统是根据细菌的基因型及表型特征指明了它们之间的相互关系,又考虑了它们与植物的共生“专一性”,因此比以前的系统更合理、更符合实际。但是新的系统仍有很不完善的地方,很多菌株没有安排适当的分类地位, *Bradyrhizobium* 属还只是一个种,很多慢生型根瘤菌未做安排。这说明对已有的根瘤菌分类方面还有许多工作要做。此外,在 16,000—18,000 个豆科植物种中仅约 20% 的种有结瘤资料<sup>[14]</sup>,尚有 80% 未被研究,更未被开发利用。我国豆科植物资源丰富,为了充分发挥豆科植物在我国农、牧、林业及地面覆盖、防护林带、固沙、改土中的重要作用,必须有相适应的高效根瘤菌与之组合。因此我们有必要大力挖掘我国温带、亚热带、热带地区的根瘤资源,加以研究,既能获得更多的菌的特征信息,使根瘤菌分类臻于完善,又能充分发挥它们在农业现代化中的作用。

#### 参 考 文 献

- [1] Fred, E. B. et al.: Root Nodule Bacteria and Leguminous Plant, Matison: UNIV. of Wisconsin, 1932.
- [2] Lordan, D. C. and O. N. Allen: in R. E. Buchanan and N. E. Gibsons (ed.) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 261—264, 1974.
- [3] Wilson, J. K.: *Soil Sci.*, 58: 61—69, 1944.
- [4] Broughton, W. J.: *Nitrogen Fixation*, 2: 87, 1982.
- [5] Trinick, M. J.: *Nature*, 244: 459—460, 1973.
- [6] Vincent, J. M.: in R. W. F. Hardy and W. S. Silver (ed.), A Treatise on Denitrogen Fixation, Section III, John Wiley and Sons Inc. N. Y., 277—366, 1977.
- [7] Graham, P. H.: *J. of General Microbiology*, 35: 511—517, 1964.
- [8] Heberlein, G. T. et al.: *J. of Bacteriology*, 94: 116—124, 1967.
- [9] 't Mannetje, L.: *Antonie Van Leeuwenhoek*, 33: 477—491, 1967.
- [10] Vincent, J. M. et al.: *J. Gen. Microbiology*, 63: 379—382, 1970.
- [11] Jarvis, B. B. W. et al.: *International J. of Systematic Bacteriology*, 32: 378—380, 1982.
- [12] Jordan, D. C.: *International J. of Systematic Bacteriology*, 32: 136—139, 1982.

- [13] Jordan, D. C.: in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9ed., 234—254, 1983.
- [14] Allen, O. N. and E. K. Allen: *The Leguminosae, A Source Book of Characteristics, Uses, and Nodulation*, The Univ. of Wisconsin Press, 13—14, 1981.