

专论与综述

根瘤菌分类的最新进展

汪恩涛 陈文新

(北京农业大学生物学院, 北京 100080)

根瘤菌分类是生物固氮与细菌分类学两个科研领域的结合点, 其发展与这两个领域的发展有着直接的关系。随着人们对生物固氮的重视, 也随着细菌分类学中新概念、新技术的发展, 根瘤菌分类也得到了迅速发展。近年来发表了大量有关文章, 分类系统有了较大变化。1984年 Jordan 提出了根瘤菌分类的新系统, 将根瘤菌分成两个属, 即根瘤菌 (*Rhizobium*) 和慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium*)。对此, 陈文新 (1985)^[1] 曾做过详细的介绍。在这个系统发表之后, 根瘤菌分类又有了较大的进展, 建立了一些新的属和种, 也提出了一些新的问题, 现综述如下。

(一) 新属、种的建立

1. 中华根瘤菌属 (*Sinorhizobium*): Keyser 等 (1982)^[2] 首先发表了快生型大豆根瘤菌。此后, 人们从生理生化, 共生效应, 遗传特性和血清学等方面对其进行了广泛的研究。葛诚 (1985)^[3] 就此做过综述。

1984年, Scholla & Elkan^[4] 依据少数快生大豆根瘤菌菌株的 DNA-DNA 杂交结果及其它一些特性, 将其定为根瘤菌属的一个新种, 种名为 *Rhizobium fredii*。后来陈文新等 (1988)^[5] 以 33 株快生大豆根瘤菌菌株的数值分类为基础, 结合 DNA-DNA 杂交, 可溶性蛋白凝胶电泳图谱, 胞外多糖和脂多糖研究, 噬菌体关系, 血清学关系, 结瘤试验等结果, 将它们改定为一个新属。因其菌株当时只发现于中国, 故命名为中华根瘤菌 (*Sinorhizobium*), 下面分两个种, 即弗氏中华根瘤菌 (*S. fredii*) 和新疆中华根瘤菌 (*S. xinjiangensis*)。后者的菌株全部来自新疆。

该属根瘤菌的宿主范围为大豆 (*Glycine max*)、野大豆 (*G. soja*)、木豆 (*Cajanus cajan*)

和一种豇豆 (*Vigna unguiculata*)。此外, 还在环辐豇豆 (*Vigna radiata*)、田菁 (*Sesbania cannabina*) 及 *Macroptilium* 属的两个种 (*M. atropurpureum*, *M. lathyroides*) 上形成无效瘤。该属的许多菌株具有大质粒, 固氮基因 (*nif*) 与结瘤基因 (*nod*) 在同样一大质粒上。

该属菌的 DNA G + C mol% 为 60—64。模式种为 *S. fredii*, 模式菌株为 ATCC 35423 (USDA205)。另一种 *S. xinjiangensis* 的模式菌株为 CCBAU 110。

葛诚等 (1990)^[6] 研究快生大豆根瘤菌的 DNA-DNA 杂交及 DNA G + C mol% 的结果, 亦证明该菌群与原有的 *Rhizobium* 和 *Bradyrhizobium* 两属 DNA 同源性很低, 而菌群内部存有种水平的差异。这一结果支持了 Chen 等 (1988)^[5] 的建议。

2. 固氮根瘤菌属 (*Azorhizobium*): Drefus & Dommergues (1981)^[7] 从生长在热带的毛萼田菁 (*Sesbania rostrata*) 上分离到能在该植物根上和茎上结瘤的根瘤菌。Drefus 等 (1984)^[8] 发现该植物上有两类根瘤菌, 一类只能在其根上结瘤, 另一类既能在根上结瘤, 又能在茎上结瘤。经过数值分类, 植物侵染试验和固氮酶活性分析, 全细胞可溶性蛋白凝胶电泳, DNA 碱基比, DNA-DNA 杂交, rRNA-DNA 杂交等系统的分类研究, Drefus 等 (1988)^[9] 发现田菁的茎瘤根瘤菌在各方面均明显不同于已有的 *Rhizobium* 和 *Bradyrhizobium* 两属, 而自成一个独立的群。他们将该群菌确定为一个新属。因其具有自生固氮能力而命名为固氮根瘤菌 (*Azorhizobium*), 下设一个种, 即 *A. caulinodans*。该属菌的 DNA G + C mol% 为 66—68, 模式菌株为 ORS571。

3. 山羊豆根瘤菌 (*Rhizobium galegae*):

Hauke-Pacewiczowa (1952)^[10] 和 Proctor (1963)^[11] 最先对高加索山羊豆 (*Galega orientalis*) 和山羊豆 (*Galega officinalis*) 的快生根瘤菌进行了研究, 并认为它们属于豌豆根瘤菌 (*R. leguminosarum*) 和快生的羽扇豆-豇豆根瘤菌群(即现在的 *R. loti*)。此后, Lindström 等 (1983)^[12] 研究了它们的 DNA 同源性、噬菌体关系和共生关系。Wedlock & Jarvis (1986)^[13] 分析了快生型大豆根瘤菌, 山羊豆根瘤菌与其它快、慢生根瘤菌间的 DNA 同源性及其共生关系和噬菌体敏感性。这些研究均表明, 山羊豆快生根瘤菌是不同于其它根瘤菌的一个独立类群。近几年, Lindström 及其同事又系统地研究了该群菌的代谢特性及数值分类, 最高生长温度, 侵染专一性, 侵染和结瘤方式, 脂多糖和蛋白质图谱等。在上述工作的基础上, 结合了 Jarvis 等 (1986)^[14] 的 rRNA-DNA 杂交结果, Lindström (1989)^[15] 将山羊豆快生根瘤菌确定为 *Rhizobium* 属的一个新种, 种名为 *R. galegae*, 即山羊豆根瘤菌。

该种菌为短杆状细胞, 亚极生单根鞭毛。从高加索山羊豆和山羊豆上分离的菌株能在各自的原宿主上形成有效瘤, 而在对方宿主上形成无效瘤。其 DNA G + C mol% 为 63。模式菌株定为 HAMBI 540。

4. 华癸根瘤菌 (*Rhizobium huakuii*): 紫云英是黄芪属的一个种 (*Astragalus sinicus*), 仅分布于我国、日本和朝鲜。在我国南方, 紫云英是一种重要的稻作绿肥和蜜源植物。陈华癸等 (1944)^[16] 最先研究了紫云英根瘤菌的共生专一性, 发现它们为一独立的互接种族。陈华癸等 (1981)^[17] 曾将其列为 *Rhizobium* 属的一个种, 种名为 *R. astragali*。近年来, 国内学者对紫云英根瘤菌进行了广泛的研究, 涉及生理、生态和类菌体特性, 质粒特征和结瘤固氮能力等。

1984 年以来, 陈文新的研究小组先后对紫云英根瘤菌分类作了一系列研究, 包括数值分类(陈文新等, 1987)^[18], 全细胞蛋白质电泳图谱(汪恩海等, 1987)^[19], G + C mol% 测定和

DNA-DNA 杂交, 及宿主专一性试验等。这些研究表明, 紫云英根瘤菌是一独立的群而不同于已有的根瘤菌各种, 也不同于黄芪属一些其它种植物的根瘤菌。从数值分类及 DNA-DNA 杂交结果看, 它们与 *Rhizobium* 属的成员关系较近。陈文新等 (1991)^[20] 总结了有关材料, 将紫云英根瘤菌正式确定为 *Rhizobium* 属的一个新种, 名为华癸根瘤菌 (*R. huakuii*)。借以纪念陈华癸对紫云英根瘤菌的开拓性研究, 并使之与黄芪属的其它根瘤菌相区别。

该种菌为短杆状细胞, 单根亚极生鞭毛。其 DNA G + C mol% 为 59—64。模式菌株为 103。

(二) 其它进展

除上述新属、种外, 近年来的一系列研究中还发现有些根瘤菌群与已有的属、种有区别。有些研究结果则对现有分类系统提出了疑问。

1. 关于慢生型根瘤菌: 慢生根瘤菌目前只定了一个属, 一个种, 即大豆慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum*)。在一系列数值分类研究中, 该种内均表现出较高的相似性。然而, 在生理和共生特性上, *B. japonicum* 种内菌株间却有许多差异^[21-24]。DNA-DNA 杂交结果则将该种的菌株分为三个同源群, 从而对其是否为一个种提出怀疑 (Hollis 等, 1981)^[25], 在该研究中, 包含了 28 株大豆慢生根瘤菌和 12 株其它根瘤菌。在慢生根瘤菌的三个同源群内, 各自包含了一些互不重叠的血清群。生理研究中发现, 三个 DNA 同源群的菌株间有相互区别的生长底物谱, 胞外多糖组分和固氮酶活性分析也可将其中一群与另两群明确区分 (Parke & Ornston, 1984)^[26]。Elkan (1971)^[26] 所做的 DNA 同源性分析也将 26 个 *R. japonicum* 菌株分成三个有重叠的, 但统计学上有显著差异的同源群。Stanly 等 (1985)^[27] 利用 *nifDH* 基因、*nod* 基因、*GlnA* 基因和克隆化的 *R. japonicum* DNA 片段做探针, 检测了大豆慢生根瘤菌菌株间的差异, 结果将供试菌分成差异明显的两群。上述资料表明, 虽然在数值分类中大豆慢生根瘤菌群内有较高的相似性,

但其遗传上却有较大的异质性。

1979年, Gross^[28]等从美国内布拉斯加州高 pH 值的土壤生境中分离出超慢生型大豆根瘤菌, 其代时为 20 多个小时。徐玲玫等 (1987)^[29] 从辽宁盐碱土生境中分离到 13 株超慢生大豆根瘤菌。最近, 徐玲玫等 (1990)^[30] 又从形态、碳源利用、抗菌素敏感性、细胞成分中碳氮含量分析、血清学分析及共生特性等方面进行了研究, 结果表明, 其宿主范围与 *Bradyrhizobium japonicum* 及 *Sinorhizobium* 相同, 但在其它方面均与二者不同, 其分类归属和系统进化均有待进一步研究。

陈文新的研究小组自 80 年代初对新疆根瘤菌资源做了全面调查, 并对部分菌株做了数值分类研究, 结果发现, 从百脉根、树锦鸡儿、盐木豆、苦马豆、甘草及苦豆子上分离到的 9 株慢生型根瘤菌构成一个既不同于 *Rhizobium*, 也不同于 *Bradyrhizobium* 的独立的群 (陈文新等, 1987)^[31]。新疆的这群慢生菌在 YMA 培养基上的生长速度介于快生型和慢生型根瘤菌之间, 其中 8 株在 YMA 上产酸, 一株树锦鸡儿的分离物则先产碱, 后产酸。该群根瘤菌的分类地位有待进一步研究确定。

2. 其它快生型根瘤菌: 银合欢 (*Luceana*) 是热带、亚热带木本豆科植物, 有较高的经济价值。银合欢根瘤菌有快生型和慢生型两类, 二者的分类地位不同。Trinick (1968)^[32] 发现合欢、含羞草、田菁、木豆等植物的快生根瘤菌能在银合欢上结瘤, 而快生的银合欢根瘤菌只能结瘤于慢生型根瘤菌的宿主植物。血清学研究表明, 快生型银合欢根瘤菌与其它快生型和慢生型根瘤菌没有共同的血清反应 (Trinick 1980)^[33]。依据 DNA-DNA 杂交结果, Wedlock & Jarvis (1986)^[34] 将其列为几个公认的 DNA 同源群之一。

怪麻 (*Crotalaria juncea*) 是一种优质绿肥, 且有一些其它用途。以前分离到的怪麻根瘤菌多为慢生型。近年来, 在我国山西等地陆续分离到一些快生型怪麻根瘤菌。陈文新的研究小组经数值分类及 DNA-DNA 杂交证明, 慢

生型怪麻根瘤菌属于 *Bradyrhizobium japonicum*, 而快生型怪麻根瘤菌具有独立的分类地位 (李广善等 1991^[35], 陈文新等 1987^[31])。

Elwan 等 (1983)^[35] 曾提出将来自埃及的田菁根瘤菌定为一个新种, 名为 *Rhizobium sesbani*, 主要依据为该菌的侵染性、有效性、抗原性和培养特征等。该菌抗原性专一, 生长速度快, 菌落有大量粘液。其菌株只在 *Sesbania sesban* 上结瘤, 而该植物又不为其它根瘤菌感染结瘤。但是, 该种名未经生效发表, 即未在国际系统细菌学杂志 (International Journal of Systematic Bacteriology) 上发表, 因此, 它仍是一个没有确定分类地位的根瘤菌群。

3. 合萌茎瘤根瘤菌: Subba Rao 等 (1980)^[36] 发现了能在生长于浅水中的粗糙田皂角 (*Aeschynomene aspera*) 的根和茎上同时结瘤的根瘤菌, 且该菌只在其同源宿主上结瘤。一般认为合萌属植物的根瘤菌为慢生型, 但从田皂角 (*A. indica*) 茎瘤中分离的菌株 *Rhizobium* BTA:1 是介于快生型和慢生型之间的中间型, 与两种类型均有共同的生理和营养特征 (Stowers & Eaglesham 1983^[37])。1986 年, Chakrabarti^[38] 等从粗糙田皂角的茎瘤中分离了一株快生型根瘤菌, 并研究了它与其它根瘤菌间碳源利用谱, 代谢关键酶和 DNA 同源性诸方面的关系。结果表明, 其生理特性与豌豆根瘤菌相似, 而其与已有各根瘤菌种的 DNA 同源性均很低, 因此认为该菌可能代表了 *Rhizobium* 属的一个新种。遗憾的是, 没能将这些菌株与 *Azorhizobium* 做比较。

(三) 根瘤菌的系统分类

根瘤菌在细菌系统进化中的地位在 De Ley (1978)^[39], Fox 等 (1980)^[40] 及 Woese (1987)^[41] 等的文章中都有阐述。De Ley (1978)^[39] 依据 rRNA-DNA 杂交结果将革兰氏阴性细菌分为 4 个超科, 根瘤菌属于第四超科。周生鞭毛的快生型根瘤菌及极生鞭毛的慢生型根瘤菌间的 rRNA 同源性较低。De Ley (1978)^[39] 的这一结果与 Fox 等 (1980)^[40] 总结的 rRNA 序列分析资料相一致。Hennecke

等(1985)^[42]用固氮酶基因产物的氨基酸序列分析和16s rRNA 寡核苷酸编目法研究了根瘤菌和其它固氮菌的系统进化,两种方法均揭示出 *Rhizobium* 与 *Bradyrhizobium* 之间的远缘关系。

De Smedt & De Ley (1977)^[43], Jarvis 等(1986)^[44],及 Drefus 等(1988)^[9]先后分析了根瘤菌科有关属、种间的 rRNA 同源性。据此可得出根瘤菌科的系统进化关系(图1)。

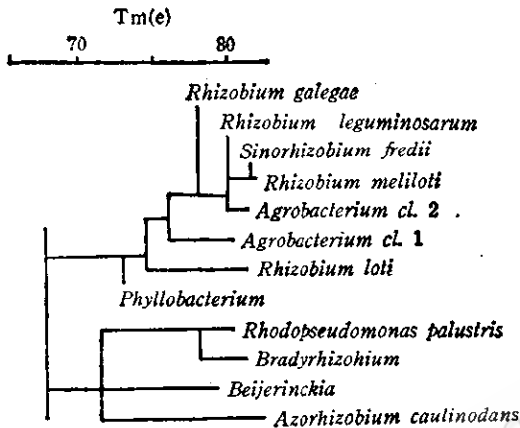


图1 根瘤菌科的 rRNA 同源性

由图1可见,根瘤菌科的几个属中, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Agrobacterium* 与 *Phyllobacterium* 构成一个亚群。而 *Bradyrhizobium* 和 *Azorhizobium* 两属却与其它科的两个属 (*Rhodopseudomonas*, *Beijerinckia*) 构成另一亚群。 *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, 和 *Agrobacterium* 三属的几个种从 rRNA 同源性上不能相互区分。因此,如果按照 rRNA 同源群来划分, *Bradyrhizobium* 和 *Azorhizobium* 两属不应放在根瘤菌科,而 *Rhizobium*, *Sinorhizobium* 和 *Agrobacterium* 三属也要进行调整。

根瘤菌的现有分类系统与 rRNA 同源群的划分显然有矛盾,这与目前细菌分类总的现状相一致,有待细菌分类学的进一步发展来解决。由现有根瘤菌各属都归在第四超科这一点来看,可能根瘤菌具有共同起源,在长期的进化过程中,它们保留了在豆科植物上结瘤固氮的

能力,但在其它方面(如生理特性等)却分别向不同方向进化,造成根瘤菌在分类上的多样性。

(四) 小结

近年来,根瘤菌分类无论从分类方法上还是从分类系统上都得到很大发展,经历了从按互接种族分类到按表观群和遗传群分类的转变和从单属向多属发展的过程。目前正式建立的有4个属,9个种,即:

1. *Rhizobium*: *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. loti*, *R. galegae*, *R. huakuii*
2. *Bradyrhizobium*: *B. japonicum*
3. *Azorhizobium*: *A. caulinodans*
4. *Sinorhizobium*: *S. fredii*, *S. xinjiangensis*

此外,还有一些类群经研究表明不同于上述已确定的属或种,分类地位有待进一步确定。

目前根瘤菌分类中存在的问题是:(1)已研究过的菌株的代表性仍不够广泛,即不同地域不同宿主的根瘤菌资源仍有待进一步开发;(2)有些明显具有独立分类地位的菌群有待进一步研究以确定其分类地位;(3)系统分类与目前的分类系统间存在矛盾,有待合理解决。

依据上述问题,今后根瘤菌分类的发展方向应是:(1)结合生物固氮资源的调查和开发利用,进一步广泛收集不同地域,不同宿主的根瘤菌株,用各种现代分类手段加以研究,以完善根瘤菌分类系统。(2)对目前已发现的独特类群进一步研究以尽快确定其分类地位。(3)关注整个细菌分类学的发展,以合理的方式解决或解释系统分类与目前分类系统间的矛盾。

参考文献

1. 陈文新:微生物学通报,12: 28—32,1985。
2. Keyser H H et al.: *Science*, 215:1631—1632,1982。
3. 葛诚:大豆科学,4: 159—163,1985。
4. Scholla M H & Elkan G H: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34:484—486, 1984。
5. Chen W X et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 38:392—397, 1988。
6. 葛诚等:中国农业科学,23: 45—50,1990。
7. Drefus B & Dommergues Y R: *FEMS Microbiol. Lett.*, 10:313—317, 1981。

8. Drefus B et al.: In M. C. Klug and C.E. Reday (eds). Current perspectives in microbial ecology. Am. Soc. Microbiol. Washington DC. pp. 161—169. 1984.
9. Drefus B et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **38**: 89—98, 1988.
10. Hauke-Paciewiczowa T: *Acta Microbiol. Pol.*, **1**: 37—39. 1952.
11. Proctor M H: *N.Z.J. Bot.*, **1**: 419—425, 1963.
12. Lindström K et al.: *Can. J. Microbiol.*, **29**: 781—789, 1983.
13. Wedlock D N & Jarvis B D W: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **36**: 550—558. 1986.
14. Jarvis B D W et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **36**: 129—138, 1986.
15. Lindström K: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **39**: 365—367, 1989.
16. Chen H K & Shu M K: *Soil Sci.*, **58**: 291—293.
17. 陈华癸等: 土壤微生物学, 上海科学技术出版社, 1981.
18. 陈文新等: 微生物学报, **28**: 102—108, 1988.
19. 汪恩涛等: 微生物学通报, **14**: 86—89, 1987.
20. Chen W X et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, (in press).
21. Fuller F & Verman D P S: *Plant Mol. Biol.*, **3**: 21—28, 1984.
22. Huber T A et al.: *J. Bacteriol.*, **158**: 116—117, 1984.
23. Keyser H H et al.: *Plant Physiol.*, **70**: 1626—1630, 1982.
24. Parke D & Ornston, L N: *J. Gen. Microbiol.*, **130**: 1743—1745, 1984.
25. Hollis, A. B. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **123**: 215—222, 1981.
26. Elkan G H: *Plant Soil*, Special vol. **85**—104, 1971.
27. Stanly J et al.: *J. Bacteriol.*, **163**: 148—154, 1985.
28. Gross D C et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **114**: 257—266, 1979.
29. 徐玲孜等: 大豆科学, **6**: 127—131, 1987.
30. 徐玲孜等: 微生物学报, **30**: 193—200, 1990.
31. 陈文新等: 中国农业科学, **20**: 22—27, 1987.
32. Trinick M J: *Expl. Agric.*, **4**: 243—253, 1968.
33. Trinick M J: *J. Appl. Bacteriol.*, **49**: 39—53, 1980.
34. 李广善等: 微生物学报(待发表).
35. Elwan S H et al.: *J. Coll. Sci., King Sand Univ.*, **14**: 239—252, 1983.
36. Subba Rao N S et al.: *Plant Soil*, **56**: 491—494, 1980.
37. Stowers M D & Eaglesham A K J: *Gen. Microbiol.*, **129**: 3651—3655, 1983.
38. Chakrabarti S K et al.: *J. Appl. Bacteriol.*, **60**: 463—468, 1986.
39. De Ley J: In Proceedings of the Fourth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. I. N. R. A. Angers, P. 347—357, 1978.
40. Fox G E et al.: *Science*, **209**: 457—463, 1980.
41. Woese C R: *Microbiol. Rev.*, **51**: 221—271, 1987.
42. Hennecke H et al.: *Arch. Microbiol.*, **142**: 347—348, 1985.
43. De Smedt J & De Ley J: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **27**: 222—240, 1977.