

资料

建立根—茎瘤菌新属、种的最低标准

近年来,能够与豆科植物共生固氮的根—茎瘤菌分类有了很大的发展。陆续建立了一些新属、种。但是,随着研究工作的深入,也暴露出了分类标准不统一带来的某些混乱。1991年,国际系统细菌学委员会根瘤菌—土壤杆菌分委员会,依据国际系统细菌学委员会特设协调委员会的有关建议,结合根瘤菌的特点,提出了根—茎瘤菌新属、种描述的最低标准。其中包括菌落及培养特征的数值分类;代表菌株的DNA:DNA同源性和16S rRNA测序;以及能使该领域工作者准确鉴定这类微生物的一些性状。该标准体现了以系统发育为主、系统分类与表型性状相结合的原则,代表了细菌分类发展的大方向。具体规定为:

(一) 菌株

该分委员会认为,一个根—茎瘤菌新属或种的建立(1)应以各自独立的一组分离物为基础。(2)供试菌株应包括来自不同地理区域,特别是寄主豆科的发源中心的菌株;以及有待测定菌株有关的模式菌株及代表菌株。(3)模式菌株应保存在国际公认的菌库中,并可提供给其它工作者。

(二) 分析项目

1. 与选定寄主共生结瘤:与一定范围的豆科植物结瘤共生能力是根瘤菌的必要特征。除报告待测菌株的原寄主外,还要报告与其他指定寄主的结瘤能力。包括(1)已建立的根瘤菌种的寄主:*Medicago sativa*, *Pisum sativum*, *Phaseolus vulgaris*, *Trifolium repens*, *Lotus corniculatus*, *Glycine max*, *Vigna unguiculata*, *Leucaena leucocephala*, *Macroptilium atropurpureum*, *Galega officinalis*, 和(2)能被待测菌株结瘤的其他寄主。结瘤实验中用传统的莱顿(Leonard)瓶培养植物。也可用生长袋法(Vaughn Seed Company, Downer's Grove, II)。

2. 培养和形态特征的描述

(1) YMA上的生长速度和菌落特征。迄今公认的*Rhizobium*属的菌株在YMA上代时为2—4小时,3—5天内菌落直径一般为2—4mm;*A. caulinodans*的生长速率更快些。大部分*Bradyrhizobium*代时为6—8小时,5—7天内菌落直径不超过1mm。然而,已有报告表明*R. meliloti*和*Bradyrhizobium*的菌落直径有变异。

(2) NADP-6-磷酸葡萄糖脱氢酶存在与否以及利用葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、阿拉伯糖、琥珀酸盐或己二酸作唯一碳源的能力。迄今所分离的根瘤菌在碳代谢方面及基质利用方面有明显差异。快生型根瘤菌有NADP-6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性,比*Azorhizobium*能代谢更广范围的碳水化合物。相反,*Bradyrhizobium*缺乏NADP-6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性,但能代谢一系列芳香族化合物。利用葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、阿拉伯糖、琥珀酸盐及己二酸的能力可作为当今公认根瘤菌科的鉴别特征。

此外,血清学方法,细胞脂多糖分析,以及SDS-PAGE蛋白质图谱也可用于根瘤菌的特征描述。

测定了足够的培养、形态及其它特性后,必需用数值分类法聚类分群。O'Brien和Colwell提出了一些常用的试验形状。Sackin描述了用于细菌数值分类的各种程序。

3. DNA-DNA 同源性:必须用已经确定的方法测定新建议种的代表菌株间的,它们与已知根—茎瘤菌种的代表菌株间的,以及它们与那些至今尚未定种的根瘤菌(例如*Acacia*及*Astragalus*的共生菌)间的DNA-DNA同源性。种的系统分类标准为,种内全部菌株间的DNA同源性应 $\geq 70\%$,且 ΔT_m 值 $\leq 5^\circ\text{C}$ 。*Rhizobium*属中各种的G+C mol%在59—64,*Azorhizobium*在66—68,*Bradyrhizobium*为61—65。

4. rRNA:DNA杂交或16S rRNA测序:新确定的根—茎瘤菌菌群的代表菌株必须经过rRNA:DNA杂交或16S rRNA序列分析。分析方法参照De Smedt和De Ley、Lane等及Young等的详细描述。使用国际通用的数据库,可将新菌群的序列分析数据与其他菌的进行相互比较。其差异可用树状图来表示。

5. DNA限制性片段长度的多型性(RFLP):这种方法已广泛用于根瘤菌,但主要是研究结瘤(nod)和固氮(nif)基因的杂交。在分类中,这个方法无疑是对结瘤能力的强调。不过,该方法对于莱豆的I型和II型菌株的区分及*Bradyrhizobium*的两个亚群的区分有所帮助。近来Wheatcroft及Watson鉴定了*R. meliloti*中的插入序列IS*Rm1*,证明它存在于该种的近80%的菌株中。看来,有必要从其它单拷贝或重复的染色体DNA序列中,及其它菌株中寻找更多的DNA探针。

6. **多位点酶电泳**: 多位点酶电泳是区分根瘤菌等土壤细菌中不同类群的一种有用方法。很多供试的酶基因都位于染色体上。所以, 多位点酶电泳资料可以平衡传统上对质粒编码的共生性质的重视。多位点酶研究的方法由 Selander 等做过总结。用于根瘤菌分类研究的酶包括: 磷酸葡萄糖异构酶、异柠檬酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶、3-磷酸甘油醛脱氢酶、亮氨酸丙氨酸胺酶、己糖激酶、腺苷酸磷酸变位酶、6-磷酸葡萄糖酸盐脱氢酶、羟基丁酸盐脱氢酶、(顺) 乌头酸酶、NAD 苹果酸脱氢酶、吡啶-酚氧化酶及谷氨酸脱

氢酶。

(三) 发表

分委员会认为, 一个新属或新种的建立, 应以一系列文章为基础, 是一系列研究的最终结果。同时, 建议国际系统细菌学杂志 (IJSB) 为合格发表新的或改变的种的杂志。

Int. J. Syst. Bacteriol., **41**: 582-587, 1991.

(汪恩涛 编译)