

根瘤菌数值分类

陈文新 祁幼林 李季伦 俞大拔

(北京农业大学农业生物学院, 北京)

对 56 株根瘤菌及 3 株土壤杆菌进行了 200 个形态、生理、生化及生物学性状测定, 根据 S_{sim} 相似性系数及最短距离聚类公式, 用电子计算机进行数值分类。试验结果, 将快生型根瘤菌、慢生型根瘤菌和土壤杆菌在属的水平上分开, 豌豆根瘤菌、三叶草根瘤菌和菜豆根瘤菌三者的相似性很高, 合并为一个种。以上结果与《伯杰系统细菌学手册》第一卷中 Jordan 的根瘤菌科分类系统相一致。此外, 紫云英根瘤菌自成一群, 包括在根瘤菌属 (*Rhizobium*) 中。柱花草根瘤菌独立成群, 包括在慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*) 中。

关键词 根瘤菌; 数值分类

自 Fred 1932 年提出根瘤菌分类系统至 1975 年 Allen 和 Jordan^[1]编写的根瘤菌科, 根瘤菌属、种的划分均以“互接种族”为基础, 除大豆根瘤菌外均以互接种族中代表寄主植物的属名作根瘤菌种名。但近 20 年来的深入研究结果表明: 原定的“互接种族”已被突破, 交叉结瘤的情况层出不穷, 甚至豇豆与榆科的 *Parapometum* 植物的根瘤菌可以互接, 而不同地区的同一种植物却不能互接。所以, 以“互接种族”为准则的分类系统既不符合一般细菌分类原则, 也不反应自然界实际情况。

1964 年 Graham^[2]对根瘤菌及其相近或关系较远的细菌进行了数值分类, 对根瘤菌提出以表观群为依据的新的分类建议。20 年来, 很多学者从数值分类、G+Cmol%, DNA 同源性, 核糖核酸顺反子相似性、血清学、细胞化学成分分析、噬菌体及抗生素敏感性等方面对根瘤菌分类作了研究。Jordan^[1]在《伯杰系统细菌学手册》第一卷中发表了根瘤菌新的分类系统。这个以细菌属生为基础并照顾到与寄主的关系的系统显然是比较合理的。但此分类系统的建立所用根瘤菌的数量和种类均很

不够。根据 Allen 等^[3]统计, 研究过与根瘤菌共生关系的豆科植物的种数还不足 0.5%, 绝大部分豆科植物的根瘤菌尚未进行过分离和研究, 有些已经研究过的根瘤菌在新的分类系统中也还未安排适当地位, 所以要建立完善的根瘤菌分类系统还需做大量的工作。作者用数值分类法对我国部分地区某些寄主植物的根瘤菌进行了研究, 考察其分类地位, 以及地区性和寄主植物与根瘤菌分类的关系。

材料和方法

(一) 菌株

共用 59 株菌, 其中豆科植物根瘤菌 56 株, 土壤杆菌 3 株。菌株编号、来源及寄主名称见表 1。

将菌株均划线接种在酵母汁甘露醇琼脂 (YMA) 斜面上, 加石蜡油, 胶塞封口, 4℃ 保存, 试验前及使用一定时间后在 YMA 平板上划线及牛肉膏蛋白胨培养基液中培养, 检查菌种纯度。

(二) 性状测定

1. 每个菌株进行了 200 项特征测定 (全同特征

本文于 1986 年 1 月 3 日收到。
计算机程序由中国科学院微生物研究所赵玉峰同志提供并协助上机分析, 特此致谢。

表 1 供试菌种目录
Table 1 List of strains

No.	菌 号	原 寄 主 植 物 Hosts	来 源 Source	提供单位 Donor
1	UZF 48	紫花苜蓿 <i>Medicago sativa</i>	美国	加州 Davis 分校
2	H ₁	白草木樨 <i>Melilotus albus</i>	黑龙江	本试验室***
3	U	白草木樨 <i>Melilotus albus</i>	黑龙江	本试验室
4	M ₁	苜蓿 <i>Medicago</i> sp.	湖北	中国农科院油料所
5	ATCC 9930*	(<i>Rhizobium meliloti</i>)**	美国	美国农业部
6	TA ₁	白三叶草 <i>Trifolium repen</i>	澳大利亚	中国农科院油料所
7	8101	白三叶草 <i>Trifolium repen</i>	广西	中国农科院土肥所
8	T ₁₀	地三叶草 <i>Trifolium subterraneum</i>	湖北	华中农业大学
9	162×68	(<i>R. irifolii</i>)	美国	美国农业部
10	1-2	野豌豆 <i>Vicia sepium</i>	北京	本试验室
11	1-3	野豌豆 <i>Vicia sepium</i>	北京	本试验室
12	03-3	蚕豆 <i>Vicia faba</i>	新疆	本试验室
13	S ₁₁	苕子 <i>Vicia villosa</i>	湖北	华中农业大学
14	128 C 53	(<i>R. leguminosarum</i>)	美国	加州大学
15	ATCC 1004*	(<i>R. leguminosarum</i>)	美国	美国农业部
16	F 48	(<i>R. phaseoli</i>)	阿根廷	中国农科院土肥所
17	127 K 17	(<i>R. phaseoli</i>)	美国	美国农业部
18	F ₁₁	(<i>R. phaseoli</i>)	阿根廷	中国农科院土肥所
19	440	大豆 <i>Glycine max</i>	上海	美国农业部
20	6-1	豇豆 <i>Vigna sinensis</i>	北京	本试验室
21	131	野大豆 <i>Glycine soja</i>	黑龙江	本试验室
22	T	直立黄耆 <i>Astragalus adsurgens</i>	黑龙江	本试验室
23	1	椴麻 <i>Crotalaria juncea</i>	黑龙江	本试验室
24	1-6	大猪豆 <i>Macrotyloma axillare</i>	广西	中国农科院土肥所
25	Tb 2201	花生 <i>Arachis hypogaea</i>	美国	中国农科院土肥所
26	1035	花生 <i>Arachis hypogaea</i>	广西	中国农科院土肥所
27	K	湿地黄耆 <i>Astragalus stipitatus</i>	黑龙江	本试验室
28	A 106	紫云英 <i>Astragalus sinicus</i>	湖北	华中农业大学
29	1-8	大猪豆 <i>Macrotyloma axillare</i>	广西	中国农科院土肥所
30	S 52	紫云英 <i>Astragalus sinicus</i>	湖北	华中农业大学
31	BS-12	紫云英 <i>Astragalus sinicus</i>	湖北	华中农业大学
32	PL 52	紫云英 <i>Astragalus sinicus</i>	湖北	华中农业大学
33	B13-106-26	紫云英 <i>Astragalus sinicus</i>	湖北	华中农业大学
34	U19-40	紫云英 <i>Astragalus sinicus</i>	湖北	华中农业大学
35	38	紫云英 <i>Astragalus sinicus</i>	南京	南京农业大学
36	7304	紫云英 <i>Astragalus sinicus</i>	南京	南京农业大学
37	103	紫云英 <i>Astragalus sinicus</i>	南京	南京农业大学
38	6-27	田菁 <i>Scribania</i> sp.	南京	南京农业大学
39	b1	野大豆 <i>Glycine soja</i>	黑龙江	本试验室
40	112-3	野大豆 <i>Glycine soja</i>	湖北	中国农科院油料所
41	105	野大豆 <i>Glycine soja</i>	湖北	中国农科院油料所
42	B ₁₁	大豆 <i>Glycine max</i>	辽宁	中国农科院油料所
43	2135	大豆 <i>Glycine max</i>	美国	中国农科院土肥所
44	2110	大豆 <i>Glycine max</i>	美国	中国农科院土肥所
45	Y 11	野大豆 <i>Glycine soja</i>	湖北	中国农科院油料所

续表 1

No.	菌 号	寄 主 植 物 Hosts	来 源 Source	提供单位 Donor
46	ATCC 10302*	大豆 <i>Glycine max</i>	美国	美国农业部
47	71-7	合欢 <i>Albizia sp.</i>	西双版纳	中国农科院油料所
48	23-4	山马蝗 <i>Desmodium canum</i>	西双版纳	中国农科院油料所
49	4	桂花草 <i>Stylosanthes gracilis</i>	广西	中国农科院土肥所
50	4-1	桂花草 <i>Stylosanthes gracilis</i>	广西	中国农科院土肥所
51	7-1	桂花草 <i>Stylosanthes gracilis</i>	广西	中国农科院土肥所
52	5-1	桂花草 <i>Stylosanthes gracilis</i>	广西	中国农科院土肥所
53	C	鸡眼草 <i>Kummerowia striata</i>	黑龙江	本实验室
54	09-23	山马蝗 <i>Desmodium canum</i>	新疆	本实验室
55	ATCC 10318*	羽扇豆 <i>Lupinus sp.</i>	美国	美国农业部
56	35	刺槐 <i>Erythrina sp.</i>	广东	本实验室
57	B 6 S3	(<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)	—	中国科学院植物所
58	C 35	(<i>A. tumefaciens</i>)	—	中国科学院植物所
59	11, 150	(<i>A. radiobacter</i>)	—	中国科学院微生物所

* 引自美国农业部模式种 ** 凡带括号的为已知菌种名 *** 本实验室分离的菌株均经周德惠等主培养

不计在内), 碳源试验有 D-半乳糖、甜醇、L-鼠李糖、D-甘露糖、山梨糖、L-阿拉伯糖、纤维二糖、海藻糖、松二糖、岩藻糖、山梨醇、棉子糖、乳糖、丙二酸酐、D-葡萄糖酸钠、蜜二糖、水杨酸钠、D-葡萄糖醛酸钠、酒石酸铵、丙酮酸钠、马尿酸钠、柠檬酸钠、丁氨酸、阿魏酸、蔗糖、甲酸钠、苯甲酸钠、对羟基苯甲酸、 β -丙氨酸、DL-天冬氨酸、L-半胱氨酸、L-谷氨酸; 氮源试验有尿素、DL-酪氨酸、DL-谷氨酸、D-亮氨酸、DL-精氨酸、DL-天冬氨酸、D-甲硫氨酸、L-甲硫氨酸、DL-丝氨酸、L-胱氨酸、DL-瓜氨酸、DL-鸟氨酸、水杨酸、氨基乙酸、DL-丙氨酸; 维生素需求试验有: 硫胺素、核黄素、烟酰胺、生物素、泛酸钙。此外还有硝酸盐还原, 亚硝酸盐还原, 尼罗蓝还原, 石蕊牛奶生长, 酚盐浓度, 生长 pH 范围, 39°C 下生长, 对不同浓度抗生素敏感性, 对不同浓度染料敏感性和鞭毛形态观察等。

2. 根据不同实验要求采用了不同培养基: 碳源试验采用 White^[12] 培养基配方; 氮源试验及维生素需求试验采用周俊初等^[13] 的培养基; 硝酸盐还原试验采用修改过的 Pohlmann^[14] 的方法; 尼罗蓝还原用 Skinner^[15] 的方法; 石蕊牛奶生长用“一般细菌常用鉴定方法”^[16] 中的方法; 抗生素敏感性测定参考 Autoum^[17] 的方法; 鞭毛染色用银盐沉积

法。

3. 接种及培养方法: 固体培养采用 Josey^[11] 的多点接种器接种, 接种量控制在接种器上每个点有 10⁴ 个左右细胞; 将快、慢生型菌株分别接种在不同平板上, 每个处理两个重复, 28°C 培养; 快生型菌株菌 3—7 天后观察结果, 慢生型菌株菌 7—10 天观察结果。

(三) 数值分析方法

1. 编码方法: 测定结果为两态特征, 则正反应用“+”记录, 负反应用“-”记录, 资料缺失用“NC”表示, 将全部测定结果中排除掉全为“+”或全为“-”的性状特征, 输入计算机时将“+”、“-”“NC”相应变成“1”、“0”和“3”, 多态特征则采用加权编码法^[11]。

2. 相似性系数: 两态性状和定量多态特征采用 Sneath^[11] 的简单符合系数 (Sim), 定性多态特征采用 Jaccard 系数^[11] (Sj)。

3. 聚类方法: 采用单连锁法, 即最短距离法^[11]。

4. 鉴定特征的选取: 从已分好的群中寻找出现频率 > 95% 的特征为该群的鉴定特征, 即群内 95% 以上的成员均表现为正反应的特征记为“+”, 反之记为“-”, 处于两者之间的记为“±”。

以上各项计算及数值分析均在 TRS-80 处

理机上用 Basic 语言进行。

结果和讨论

全部分群结果表现为相似性矩阵阴影图(略)及树状图(图1)。

从图1看出: 在66%的相似性水平上全部试验菌株归为一群, 在75%的相似性水平上分成明显的两个大群, 即全部快生型根瘤菌为一群: 全部慢生型根瘤菌为另一大群。在77%的相似性水平上, 全部菌株分为四个群, 第一群为快生型根瘤菌, 相当于 Jordan^[1] 的 *Rhizobium*; 第二群为 *Agrobacterium*; 第三群为快生型大豆根瘤菌; 第四群为慢生型根瘤菌, 相当于 *Bradyrhizobium*。

下面对这四大群内的亚群进行分析:

1. *Rhizobium* 群: 该群包括30个菌株, 在84%的相似性水平上分三个亚群。亚群的鉴定特征列于表2。

亚群 I: 包括10个菌株, 其中9株是紫云英根瘤菌, 分别来自武汉、南京, 1株分离自黑龙江的湿地黄芪。这10株黄芪属

植物的根瘤菌在89%的相似性水平上聚集成群。

全部黄芪根瘤菌在 YMA 平板上生长速度中等, 多在5天左右出现单菌落, 具有极生或亚极生鞭毛, 该群的生活能力较强, 营养范围较广, 生长的 pH 范围为 4.9—9.5。因此, 这10株菌是一群不同于其他根瘤菌的菌群, 我们拟进一步对这些菌作基因型分析, 以肯定其分类地位。

亚群 II: 包括12个菌株, 分别来自我国广西、湖北、新疆和北京等地的三叶草、豌豆及菜豆寄主, 即分别属于以前的三叶草根瘤菌、豌豆根瘤菌和菜豆根瘤菌三个种, 包括豌豆根瘤菌的模式菌株 15号(ATCC 10004)。其相似性为85%。我们的结果支持 Jordan^[1] 的观点, 即过去的三叶草根瘤菌、豌豆根瘤菌和菜豆根瘤菌三个种合并为一个种, 以 *R. leguminosarum* 命名。

亚群 III: 包括三株苜蓿根瘤菌, 1号菌株引自美国, 2号菌株系本试验室自黑龙江分离, 5号菌株为模式菌株(ATCC

表2 根瘤菌属中三个群的鉴定特征
Table 2 Differential characteristics of three species of *Rhizobium*

性 状 特 征 Characters	<i>R. sp.</i> (<i>Astragalus</i>)	<i>R. leguminosarum</i>	<i>R. meliloti</i>
乳酸钠利用	+	±	—
DL-酪氨酸利用	±	—	+
L-半胱氨酸利用	—	±	+
DL-色氨酸利用	±	—	+
DL-苏氨酸利用	±	—	+
抗 10 ϵ /m: 庆大霉素	±	—	+
抗 10 μ g/ml: 多粘菌素	+	+	—
抗 30 μ g/ml: 巴龙霉素	±	—	+
耐 pH 4.9	+	±	+
耐 pH 9.5	+	—	+
39℃ 下生长	—	±	+
强烈吸收 0.01% 桔红	+	+	—
强烈吸收 0.1% 碱性品红	+	+	—
鞭毛寄生	慢生和亚慢生	周 生	周 生
肉汁琼中生长	—	—	+
次甲基蓝还原	+	±	±

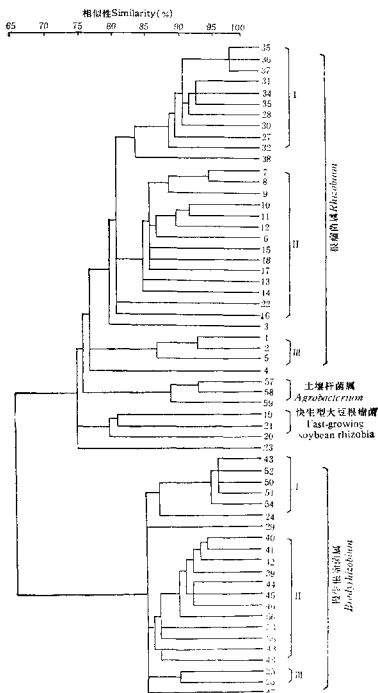


图 1 单连接聚类分析树状图
Fig. 1 Dendrogram (Simple linking mode)
(图中右侧数字为菌株序号)

9930)。本亚群相似性也是 85%。这群菌能力强,能在 39℃ 生长,耐 pH 9.5; 周生能在肉汁蛋白胨中生长,营养范围广,抗逆鞭毛,在 YMA 上迅速生长并产酸,这亚群

应为 *R. meliloti*。

此外, 4号菌株自湖北的苜蓿根瘤中分离。从相似性三角矩阵阴影图中看出, 该菌株与上述亚群 III 关系较近, 相似性为 72.2—80.0%。另外, 从蛋白质电泳素外扫描图谱(待发表)看, 它和 1号菌株非常相似, 它应归为 *R. meliloti*。3号菌株是自黑龙江白花草木樨根瘤中分离, 但该菌在牛肉蛋白胨中不生长, 在石蕊牛奶中产碱, 此两项不同于一般苜蓿根瘤菌, 从相似性三角矩阵阴影图中看, 该菌株介于亚群 II 与亚群 III 之间, 为中间型。

16号菌株是从阿根廷引入的紫豆根瘤菌, 它未能归入亚群 II, 从相似性矩阵图中看, 它与亚群 II 关系仍最密切。

22号菌株分离自黑龙江直立黄芪, 它是 11株黄芪属根瘤菌中唯一没能归入亚群 I 的, 但从相似性三角矩阵图看, 它与亚群 I 的菌株相似性在 75—80%。

2. *Agrobacterium* 群: 包括 57、58 和 59 号三菌株, 57 号和 58 号菌株为已知的 *A. tumefaciens*; 59 号菌株为 *A. radiobacter*。三菌株的相似性在 88% 以上。它们与 *Rhizobium* 的关系较近, 与 *Bradyrhizobium* 的关系较远。我们采用这三株菌一方面看看它们与两个根瘤菌属的关系, 另外也起一个“内标记”的作用, 从而看出本研究所用的聚类方法和计算机程序的可信程度。

3. 快生型大豆根瘤菌群: 该群中只有 19 号、20 号和 21 号三菌株, 19 号和 21 号菌株是从大豆根瘤菌中分离出的快生型根瘤菌, 20 号菌株是从苕豆中分离的快生型根瘤菌。三菌株相似性在 79% 以上。我们只采用三菌株, 只初步看出它们既不属于 *Rhizobium* 群, 也不属于 *Bradyrhizobium* 群, 需扩大菌株数以确定它们的分类地位。

4. *Bradyrhizobium* 群: Jordan^[3] 将

全部慢生型根瘤菌归为 *Bradyrhizobium*, 以 *B. japonicum* 为模式种, 该属只有这一个种, 我们的这一群共 22 个菌株, 其相似性为 85%, 在 86% 的相似性水平上又分三个亚群。

亚群 I, 共有 6 株菌。其中 4 株自广西黔江牧场桂花草根瘤中分离, 1 株分离自山蚂蝗, 这 5 株菌相似性为 96%; 另一株自大结豆, 它们在形态、营养要求和抗生素敏感性方面与其它慢生型根瘤菌有较明显的差别。在 YMA 平板上产生的粘液较少, 菌落稍扁平, 易被挑散, 与大豆根瘤菌有明显差别。例如: 该亚群全部菌株利用岩藻糖、苹果酸盐、柠檬酸盐、香草酸、阿魏酸和水杨醇作碳源, 而 *B. japonicum* 则全不能利用这些碳源。它们全部能抗 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 四环素、抗 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 万古霉素和抗 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 新生霉素, 且在 0.1% 俾士麦棕和 0.1% 孔雀绿上生长, 而 *B. japonicum* 则不能在上列物质上生长。该亚群在慢生型根瘤菌中为一个独立的群, 值得扩大菌株进一步研究, 它可能为 *Bradyrhizobium* 中的另一个种。

亚群 II, 包括 12 株菌, 它们在 87% 的相似水平上聚在一起, 其中有 8 株菌分离自大豆根瘤(39 号、40 号、41 号、42 号、43 号、44 号、45 号和 46 号菌株), 46 号菌株为 *B. japonicum* 的模式菌株, 56 号菌株分离自刺桐, 53 号菌株分离自鸡眼草、48 号菌株分离自山蚂蝗。这个群的绝大部分菌株为大豆根瘤菌, 我们认为这一亚群可属于 *B. japonicum*。48 号与 54 号菌株是自不同地区的两株山蚂蝗根瘤, 却分散在两个亚群里, 需进一步研究。

亚群 III, 包括 25 号和 26 号菌株, 分离自花生根瘤, 两株菌的相似性为 90%。从相似性矩阵看, 它们介于亚群 I、II 之间。

另外, 23 号菌株分离自椴麻根瘤, 在 *Rhizobium* 中独立存在; 47 号菌株自合萌根瘤中分离, 在 *Bradyrhizobium* 中独立存在, 它们均只有一株菌, 无法讨论, 但可看出它们有特殊性。

参 考 文 献

- [1] Jordan, D. C. et al.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., Buchanan, R. E. et al. (ed.), Baltimore, pp. 261—264, 1974.
- [2] Graham, P. H.: *J. Gen. Microbiol.*, 35: 511—517, 1964.
- [3] Jordan, D. C.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 10th ed., Vol. 1, Krieg, N. et al. (ed.), Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 234—244, 1984.
- [4] Allen, O. N. et al.: The Leguminosae—A Source Book of Characteristics, Uses, and Nodulation, Wisc., 1981.
- [5] White, L. O.: *J. Gen. Microbiol.*, 72: 505—574, 1972.
- [6] 周俊初等: 华中农学院学报, (3): 44—56, 1981.
- [7] Pohlman, C. C.: *Soil Sci.*, 31: 385, 1931.
- [8] Skinner, F. A. et al.: *J. Appl. Bacteriol.*, 43: 287—297, 1977.
- [9] 中国科学院微生物研究所细菌分类组: 《--细菌常用鉴定方法》, 科学出版社, 北京, 1978.
- [10] Antoun, H. et al.: *Plant and Soil*, 66: 45—50, 1981.
- [11] Josey, D. P. et al.: *J. Appl. Bacteriol.*, 46: 343—350, 1979.
- [12] Sneath, P. H. A. et al.: The Numerical Taxonomy, The Principles and Practice of Numerical Classification, San Francisco, p. 137, 1973.

NUMERICAL TAXONOMY OF ROOT NODULE BACTERIA

Chen Wenxin Qi Youlin Li Jilun Yu Dafu

(College of Agricultural Biology of Beijing Agricultural University, Beijing)

The application of numerical taxonomy to study 59 strains of rhizobia collected from various sources and 3 known agrobacteria are described. 200 coded features including vitamin, carbon, and nitrogen nutrition, antibiotic sensitivities, pH reactions, tolerance to sodium chloride of different concentration in media, flagella, dyes reactions and other physiological characters were used to determine the relationship between these organisms.

Overall similarities of these strains for 200 unit characters were determined by the simple matching coefficient (Sm). clustering was made by the single linkage method with computer "TRS-80".

The result obtained confirmed Jordan's (1984) idea on the separation of fast- and slow-growing rhizobia at the generic level, they are *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, respectively. This paper also supported the fusion of the species *R. phaseoli* and *R. trifolii* with *R. leguminosarum* and the retention of *R. meliloti* as a separate species.

The rhizobia isolated from plant *Astragalus* were more closely related to *R. leguminosarum* than other fast-growing rhizobia, but they formed a separate phenons in which there are a high similarity. They should probably be a new species.

The fast-growing soybean rhizobia appear to be the median type between *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, but to be more related to the *Rhizobium*. *Bradyrhizobium* sp. (sylvanthes) is an independent group in genus *Bradyrhizobium*.

From the frequency of occurrence of features computed for each of the clusters, these tables were prepared providing correlating characteristics which are suitable for identification of the clusters.

Key words

Root nodule bacteria; Numerical taxonomy