

土壤杆菌属的数值分类

杨国平 任欣正 方中达

(南京农业大学, 南京 210014)

对我国不同寄主植物上分离的 77 株土壤杆菌, 5 个标准菌株和 4 个根瘤菌菌株进行了 102 项表型特征测定, 并用计算机进行数值分析。结果表明, 这些菌株可归为 5 个群, 其中 4 个群分别相当于《伯杰系统细菌学手册》第一卷中所记述的生物变型(biovar)1, 2, 3 和悬钩子土壤杆菌 (*A. rubi*)。另外一个群与它们均不相同, 是该属的一个新生物变型。本研究获得的 *A. rubi* 菌株是近 50 年来全世界重新发现这类菌株的唯一报道。

关键词 土壤杆菌属; 数值分类; 新生物变型

《伯杰细菌鉴定手册》第八版将致病性作为土壤杆菌属内划分种的主要依据, 然而一些研究结果^[2,7]表明, 分别归入 *A. tumefaciens* 和 *A. radiobacter* 的很多菌株, 除了致病性不同外, 其生理生化性状极其相似。此外, 一些归于同一种内的菌株, 其生理生化性状却可能存在较大差异。这表明, 以致病性作为主要分类依据似不能反映土壤杆菌相互间的关系。

Keane 等(1970)^[2]以生理生化特性为依据, 提出了在土壤杆菌属内直接划分生物型 (biotype) 的建议, 并将所研究的菌株分为 2 个生物型。White (1972)^[9]用数值分类法将土壤杆菌分为 2 个组 (group)。Kerstens 等(1973)也用数值分类方法将土壤杆菌分为 2 类 (cluster)。以上的“组”或“类”均与生物型相当。Kerr 和 Panagopoulos (1977)^[3]对来自葡萄的一些菌株进行研究后, 为土壤杆菌属增添了一个新的生物型——生物型 3。Kerstens^[9]在《伯杰系统细菌学手册》第一卷中对土壤杆菌属的分类采取了一个折衷的方案, 属下仍分 4 个种, 种下分生物变型 (biovar, 与 biotype 相当), 但生物变型交叉出现在不同种里。由此可见, 土壤杆菌属的分类结

构尚不够完善。作者从我国不同地区的不同寄主植物上, 分离到大量土壤杆菌, 并对其数值分类研究, 以期为新分类方案的产生提供依据。

材料和方法

(一) 菌株

大部分菌株系本实验室从我国寄主植物病组织内分离得到, 并接种番茄、落地生根、桃、葡萄等植物测定致病性。5 株土壤杆菌参考菌由 PDDCC 提供; 4 株根瘤菌由本校农业微生物研究室提供 (表 1)。

(二) 表型特征测定

共获取 102 项有效特征 (即不包括全同特征), 利用碳水化合物、有机酸盐和氨基酸为唯一碳源和氮源的试验按 Kersters^[4]的方法进行。测定的有机物包括: D(+) 赤藓醇、D-纤维二糖、D-阿东糖醇、L-阿拉伯糖、丙三醇、D-海藻糖、蔗糖、D-葡萄糖、D-果糖、甘露醇、D-山梨醇、L(+) 鼠李糖、D(+) 松三糖、D(+)

本文于 1991 年 1 月 21 日收到。

本研究为国家自然科学基金资助项目。

陈文新教授审阅全文; 王业勤赠送 72 (原菌号 702) 菌株; 66-71, 77-80 号菌株系罗灿辉分离, 特此致谢。

表 1 供试菌株及来源

Table 1 Strains used and their origin

菌株及编号 Strain and code No.	种名 Species	来源 Origin	寄主植物 Host plant
Po136(13), Po137(14), Po150(15), Po168(16), Po175(17), Po187(18), Po188(19), Po122(9), Po110(21), Po55(22), Po56(23), Po57(24), Po58(25), Po59(26), Po60(50)	<i>A. radiobacter</i>	南京 Nanjing	毛白杨 <i>Populus tomentosa</i>
Po9(27), Po10(28)	<i>A. tumefaciens</i>	山东 Shandong	
V29(29), V30(30), V31(31), V32(32), V33(33), V34(34)	<i>A. tumefaciens</i>	北京 Beijing	
V35(35), V36(36), V37(37), V38(38), V39(39), V40(40), V41(41), V42(42), V43(43), V44(44), V45(45), V46(46), V47(47), V48(48), V49(49)	<i>A. tumefaciens</i>	山东 Shandong	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>
V51(51), V52(52), V53(53), V54(54), V55(55), V56(56)	<i>A. tumefaciens</i>	内蒙古 Nei Mongol	
A17(57), A18(58), A19(59), A10(60)	<i>A. radiobacter</i>	南京 Nanjing	桂花 <i>Osmanthus</i> sp.
Mp1(61) Mp2(62), Mp3(63), Mp4(64), Mp5(65)	<i>A. tumefaciens</i> <i>A. radiobacter</i>	郑州 Zhengzhou	苹果 <i>Malus pumila</i>
Ba1(66) Ba5(67), Ba8(68)	<i>A. rubi</i> <i>A. tumefaciens</i>	哈尔滨 Harbin	甜菜 <i>Beta vulgaris</i>
H4(69), H20(70), H22(71)	<i>A. tumefaciens</i>	浙江 Zhejiang	啤酒花 <i>Humulus lupulus</i>
702(72)	<i>A. tumefaciens</i>	云南 Yunnan	櫻桃 <i>Prunus pseudocerasus</i>
P1(73), P2(74), P3(75), P6(76)	<i>A. tumefaciens</i>	苏州 Suzhou	桃树 <i>Prunus persica</i>
M7, 77, M10(78), Ar2(92)	<i>A. tumefaciens</i>	山东 Shandong	苹果 <i>Malus pumila</i>
Vb5(79)	<i>A. tumefaciens</i>	沈阳 Shenyang	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>
P4(80)	<i>A. tumefaciens</i>	山东 Shandong	梨 <i>Pyrus</i> sp.
紫 58(81), 紫电力(82)	<i>R. astragalus</i>	江苏 Jiangsu	紫云英 <i>Astragalus sinicus</i>
CM7309(83)	<i>R. meliloti</i>	江苏 Jiangsu	苜蓿 <i>Medicago sativa</i>
83-7(84)	<i>R. trifolii</i>	江苏 Jiangsu	白三叶草 <i>Trifolium repen</i>
Ar4(85), Ar19(89), Ar20(90) Ar6(86) Ar8(87), Ar10(88), Ar1(91), Ar3(93)	<i>A. radiobacter</i> <i>A. rhizogenes</i>	山东 Shandong	苹果 <i>Malus pumila</i>
5794(94)	<i>A. rhizogenes</i>	美国 U. S. A.	
6428(95)	<i>A. rubi</i>	美国 U. S. A.	覆盆子 <i>Rubus ursinus</i>
5856(96) 728(97)	<i>A. tumefaciens</i> <i>A. tumefaciens</i>	美国 U. S. A. 苏格兰 Scotland	苹果 <i>Malus pumila</i>
5785(98)	<i>A. radiobacter</i>	荷兰 Holland	不详 Unknown

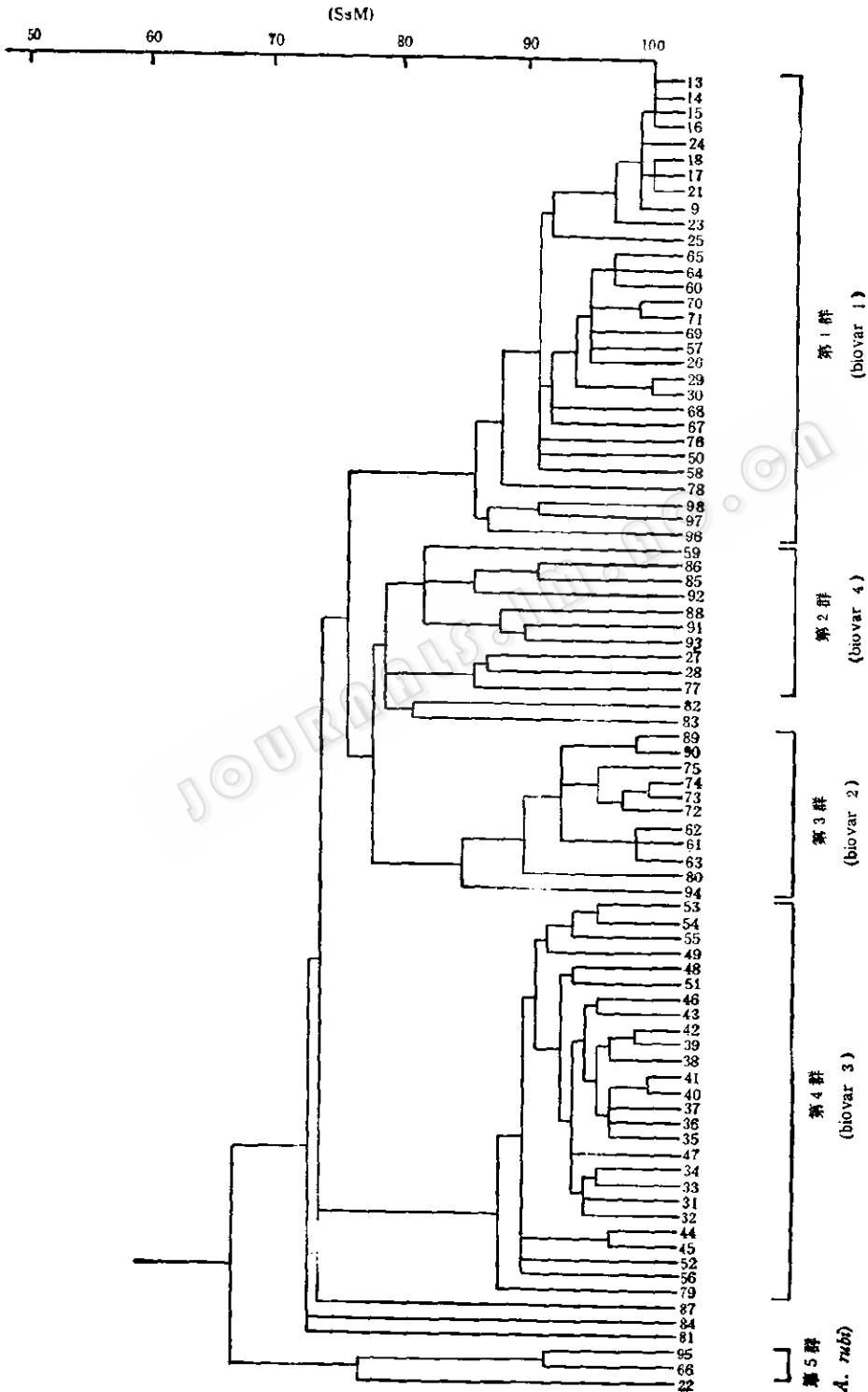


图1 树状图 Fig. 1 Dendrogram

蜜二糖、水杨苷、麦芽糖、乙醇、甲醇、甜醇、 α -肌醇、棉子糖、乳糖、L-木糖、L-墨角藻糖、D-半乳糖、对氨基丙酸、葡糖酸钠、葡糖酸内酯、苯甲酸、柠檬酸钠、对羟基苯甲酸、L-酒石酸、戊二酸、泛酸钙、D-异抗坏血酸、草酸铵、乳酸钠、巴比妥钠、羟基丁酸、丙酸钙、丙二酸钠、乙酸钠、琥珀酸钠、甜菜碱、维生素 B₆、奎宁酸、甘油酸、L-谷氨酸、L-精氨酸、L-组氨酸、L-羟脯氨酸、L-天冬酰胺、L-苯丙氨酸、L-瓜氨酸、L-缬氨酸、L-肌氨酸、L-赖氨酸、L-胱氨酸、L-亮氨酸、L-甘氨酸、高丝氨酸、DL-酪氨酸、L-丝氨酸、L-天冬氨酸、L-色氨酸。测定了对下列抗生素的敏感性：氯霉素 (30 $\mu\text{g/ml}$)、庆大霉素 (10 $\mu\text{g/ml}$)、卡那霉素 (30 $\mu\text{g/ml}$)、青霉素 (10 单位/ml)、链霉素 (10 $\mu\text{g/ml}$)、四环素 (30 $\mu\text{g/ml}$)、噻啉酮酸 (5 $\mu\text{g/ml}$)、利福霉素 (10 $\mu\text{g/ml}$)、黄连素 (300 $\mu\text{g/ml}$)、短杆菌素 (1 $\mu\text{g/ml}$)、放线酮 (250 $\mu\text{g/ml}$)、红霉素 (15 $\mu\text{g/ml}$)。其他主要试验：3-酮基乳糖、石蕊牛乳、产 H₂S、从柠檬酸铁铵产表膜、耐盐、温度生长试验、硝酸盐还原等均参照文献 [1] 进行。

(三) DNA 碱基组成测定

采用 Marmur (1962)^[6] 的融解温度 (T_m) 法。

(四) 数值分类

两态性状用“1”、“0”编码；递增(减)的有序多态性状，如耐盐浓度的高低，采用加权递增编码法；无序多态性状采用加权非递增编码法。对于石蕊牛乳这样的多态性状，则视其逻辑关系采用加权递增和非加权递增混合编码。缺失性状编为“9”。相似性计算采用修改的 Sokal 和 Michener 符合系数^[6]。用单连锁法进行聚类分析，聚类分析在 IBM 微机上进行，运算程序用 BASIC 语言编写。

结果与讨论

聚类分析结果用树状图表示 (图 1)。从图中可以看出，全部菌株在 68% 的相似水平上归为一群，在 79% 相似水平上分为 5 个群。

第一群包括了生物变型 1 的参考菌株和全部 3-酮基乳糖阳性菌株。其主要特征是：石蕊牛乳产碱并部分还原石蕊；从柠檬酸铁铵产褐色表膜；能利用广泛的有机物生长。这些都与生物变型 1 的典型特征相符，该群为生物变型 1。本研究中有几个 3-酮基乳糖阴性菌株也归在该群中。

第二群来自苹果发根病样品的 *A. rhizogenes* 和 *A. radiobacter* 菌株以及 2 个毛白杨菌株和 1 个苹果菌株 (均为 *A. tumefaciens*) 组成。该群成员在石蕊牛乳中大量产碱，使培养基变为深蓝色；从赤藓醇产酸；不能还原硝酸，与其他群的相似性在 80% 以下。虽然与第三群比较接近，但它们在石蕊牛乳、硝酸还原、生长温度及 G+C mol% 含量等方面有明显差异 (表 2, 3)。该群为土壤杆菌属的一个新生物变型 (biovar 4)。另外有两株根瘤菌 (82, 83) 与该群关系较密切。

第三群来自苹果、梨、桃的菌株组成，生物变型 2 的参考菌株 5794 也在其中。该群的主要特点是在石蕊牛乳中大量产酸使培养基变红和凝固，生长温度较其他生物变型低，G+C 含量也较低，与已报道的生物变型 2 一致。

第四群的 26 个菌株均来自葡萄根癌，它们在石蕊牛乳反应中产碱并使石蕊还原；对黄连素敏感。这类菌株组成一个与其他群差异明显的独立群，是该属的生物变型 3。生物变型 3 已正式定名为葡萄土壤杆菌 (*A. vitis*)^[7]。

第五群严格来讲只有 2 个成员，一个

表 2 土壤杆菌属 5 个群的鉴别性状

Table 2 Diagnostic characteristics among five clusters of *Agrobacterium*

性 状 Characteristics		生物变型 1 Biovar 1	生物变型 2 Biovar 2	生物变型 3 Biovar 3	生物变型 4 Biovar 4	悬钩子土壤杆菌 <i>A. rubi</i>
石蕊牛奶 Litmus milk	产酸/碱	碱 alkali	酸 acid	碱 alkali	碱 alkali	碱 alkali
	还 原	部分还原 partial reduction	+	+	-	-
	凝 固	-	+	-	-	-
3-酮基乳糖 3-ketolactose		+	-	-	-	-
耐盐(3%) Tolerance of NaCl		+	-	-	-	-
产 H ₂ S H ₂ S production		+	-	-	-	-
产褐色表膜 Formation of surface membrane		+	-	-	-	-
硝酸盐还原 Reduction of nitrate		+	+	+	-	-
从下列物质产酸: Acids from:						
丙三醇 Glycerol		+	+	+	-	+
海藻糖 Trehalose		+	V*	+	-	-
纤维二糖 Cellobiose		+	+	-	-	-
从下列物质产碱: Alkali from:						
L-酒石酸钠 L-Tartrate		-	+	+	-	-
丙二酸 Malonate		-	+	+	-	-
甲酸盐 Formate		+	+	-	V	-
氨基酸利用: Growth on						
L-瓜氨酸 L-Citrulline		+	+	-	-	-
L-肌氨酸 L-Sarcosine		+	+	-	-	-
L-色氨酸 L-Tryptophan		+	-	-	+	-

* V: 部分菌株出现不同反应。

Some strains may give variant reaction in the test.

是 *A. rubi* 参考菌株(95), 另一个是本实验室从甜菜根癌中分离到的致病菌(66)。它们之间的相似性在 90% 以上, 与之邻近的 22 号菌株因不致病、相似性也较低而难以确定。此外, 本实验室还有 2 株致病菌与

66 菌株极其相似。 *A. rubi* 的特点是生化反应多为阴性, 其原因有待进一步探讨。

另外 2 株根瘤菌(81, 84) 间的相似性不高, 与土壤杆菌的关系不甚密切, 因此,

表 3 部分土壤杆菌 G + Cmol% 含量
Table 3 The G + Cmol% content of some
agrobacteria

菌株 Strain	生物变型 Biovar	G + C mol% 含量 G + C mol%
5856	1	61.4
H4	1	61.2
P1	2	57.7
P2	2	58.3
V39	3	60.3
Po9	4	61.8
M7	4	61.5
Arl	4	64.1

土壤杆菌与根瘤菌的关系不能笼统地讲较近或较远, 而应进一步弄清究竟哪些种的根瘤菌与土壤杆菌的哪些种(或生物变型)关系密切。本研究用的菌株太少, 难以得出明确的结论。

蛋白质凝胶电泳结果表明, 生物变型 4 的菌株具有非常一致的电泳图谱, 并且

与生物变型 2 菌株的电泳图谱明显不同(待发表)。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所细菌分类组: 一般细菌常用鉴定方法, 科学出版社, 北京, 1978。
- [2] Keane, P. J. et al.: *Aust. J. Biol. Sci.*, **23**: 585—595, 1970.
- [3] Kerr, A. et al.: *Phytopathol. Z.*, **90**: 172—179, 1977.
- [4] Kersters, K. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **78**: 227—239, 1973.
- [5] Kersters, K. and J. DeLey: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, ed. Krieg, N. R. and J. G. Holt. Williams and Wilkins, Baltimore, Vol. 1, pp. 244—254, 1984.
- [6] Marmur, J.: *J. Mol. Biol.*, **5**: 109—118, 1962.
- [7] Ophel, K. and A. Kerr: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **40**: 236—241, 1990.
- [8] Sokal, R. R. et al.: *Univ. Kansas Sci. Bull.*, **38**: 1409—1438, 1958.
- [9] White, L. O.: *J. Gen. Microbiol.*, **72**: 565—574, 1972.

NUMERICAL TAXONOMY OF AGROBACTERIUM IN CHINA

Yang Guoping Ren Xinzheng Fang Zhongda

(Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014)

Seventy-six strains of *Agrobacterium* were isolated from peach, hop, grapevine, sugar beet, apple, pear, cherry and Chinese white poplar in China during last few years. 102 biochemical, physiological and nutritional characteristics of eighty-one *Agrobacterium* strains (five type strains of *Agrobacterium* provided by PDDCC were included) and four representatives of the genus *Rhizobium* were subjected to computer analysis. Most agrobacteria fell into four major clusters. Three of them correspond to biovar 1, 2 and 3 respec-

tively. The other is a new biovar, designated as biovar 4. A tumor-initiating strain from sugar beet shared a high similarity with *A. rubi* type strain and they form a very small but tight cluster. This result showed that *A. rubi* did not merely come from the cane gall of *Rubus* spp. The relationship between *Agrobacterium* and some species of *Rhizobium* was discussed.

Key words

Agrobacterium; Numerical taxonomy; New biovar