

植物病原棒形细菌的分类研究进展*

郭坚华 蔡永健** 陈永芳 葛云英

(南京农业大学植保学院植保系 南京 210095)

摘要: 植物病原棒形细菌从棒杆菌属中独立出来之后, 对于其中各菌分类地位的确立一直有较多争议。近年来已分别归入棒形杆菌属 (*Clavibacter*)、短小杆菌属 (*Curtobacterium*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*)、红球菌属 (*Rhodococcus*) 和拉氏杆菌属 (*Rathayibacter*) 5 个属中。但此后又有人提出有些属中仍有异质性。这些分类上的变化主要是由于分类手段逐渐由传统的形态学分类方法向分子生物学方法和多相分类法过度。新的方法还在不断的完善之中。此外, 植物病原棒形细菌分类系统的完善还有赖于植物病理学家和微生物学家等多学科科学家的合作。

关键词: 植物病原棒形细菌, 分类

中图分类号: S432.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 01-0074-06

TAXONOMY OF PLANT PATHOGENIC CORYNEFORM BACTERIA

GUO Jian-Hua CAI Yong-Jian CHEN Yong-Fang GE Yun-Ying

(Development of Plant Pathology Department, College of Plant Protection,

Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: There are many different opinions about the taxonomy of plant pathogenic coryneform bacteria since they were departed from genus of *Corynebacteria*. In recent years, they were classified into 5 genus, including *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus* and *Rathayibacter*. Some new points of view about their taxonomy have been published thereafter. The changing of taxonomy is mainly because of the methods altering from old to new molecular and polyphasic taxonomy, and the latter is in continuously development. Taxonomy of plant pathogenic coryneform bacteria somehow depends on the cooperation of phytopathologists, microbiologists and other scientists.

Key words: Plant pathogenic coryneform bacteria, Taxonomy

革兰氏阳性的植物病原细菌除包括少数能够形成孢子的细菌如 *Bacillus* spp. 外, 大部分属于植物病原棒形细菌 (Plant Pathogenic Coryneform Bacteria, PPCB)。

1 植物病原棒形细菌的概念

1.1 棒形细菌 “棒形细菌”一词最初是由 Jensen (1952) 开始使用的。Cure 和 Keddie (1973) 以 Jensen 的描述为基础, 对棒形细菌的特征作了如下概述: “在复合培养基上培养至对数生长期, 细菌为不规则的杆状, 大小、形状均不相同, 有直的、弯的、卷曲的、楔形的或棍棒状的。杆菌的一部分排列成 V 形或其它多角形, 可以出现初级分枝, 尤其在丰富培养基上, 但不产生真正的菌丝。培养至静止期的细菌一般较短、较为规则, 一些变异为球形。杆菌运动或不运动, 不形成内生孢子。革兰氏阳性, 但容易褪

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39570476)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39570476)

** 现工作于江苏省启东市惠萍镇人民政府

收稿日期: 2000-08-07, 修回日期: 2000-10-15

色,褪色后只显示革兰氏阳性的粒状物,不抗酸”。这一描述已被普遍接收,但其中大多数属在组成上是异质的。数值分析和化学组成分析也表明,棒形组群的许多细菌在分类学上是不相关的。

1.2 植物病原棒形细菌 一般将原先属于棒杆菌属的植物病原细菌称为植物病原棒形细菌,现今分别属于节杆菌属、棒形杆菌属、短小杆菌属、拉氏杆菌属和红球菌属^[1,2]。红球菌属细菌本不属于“棒形细菌”的概念范畴,但由于该属中唯一对植物致病的带化红球菌(*Rhodococcus fascians*)最初属于棒杆菌属,所以一般所称“植物病原棒形细菌”也包括该细菌在内^[3]。

2 植物病原棒形细菌分类简史

Corynebacterium 属是 1896 年 Lehmann 和 Neumann 为容纳白喉杆菌而创建的,模式种即 *C. diphtheriae* (Kruse) Lehmann & Neumann 1896。后来又将一些动物寄生种类纳入。因为当时认为形态学上的相似性标志着菌株之间的相关性,其它细菌包括植物病原细菌都被归入这一属中。《伯杰细菌鉴定手册》第六版(1948)正式将革兰氏阳性的植物病原细菌归入棒杆菌属, Yamada & Komagata 等^[4]许多研究者对棒形细菌的形态、生理、血清学、细胞化学成分分析及 DNA G+C 摩尔百分含量等的研究证实,植物病原棒形细菌与人和动物致病的以及腐生的棒杆菌属细菌都无密切的相关性,提议归入其它属中。同时指出植物病原棒形细菌内部也存在着异质性。《伯杰细菌鉴定手册》第八版(1974)明确提出“植物病原棒形细菌的分类地位是一个应考虑的问题,为了解决植物病原、人和动物病原以及非致病性棒杆菌之间的异质性问题,应将它们分作 3 个部分进行描述。”

到 1986 年《伯杰系统细菌手册》将当时确定的 13 种植物病原棒形细菌中的 6 个种归到当时公认的其它 3 个属中,即 *C. flaccumfaciens*、*C. poinsettiae*、*C. betae* 和 *C. oortii* 属于 *Curtobacterium*, *C. ilicis* 属于 *Arthrobacter*, *C. fascians* 属于 *Rhodococcus*。而其余 7 种虽然已承认不应该放在棒杆菌属,但为了方便和实用的目的依旧保留在 *Corynebacterium* 属下^[5]。

至《伯杰细菌鉴定手册》第九版^[1], *Corynebacterium* 属内已经不再包含植物病原细菌。植物病原棒形细菌被归入 *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Arthrobacter* 和 *Rhodococcus* 4 个属中。

3 植物病原棒形细菌属的概述

3.1 节杆菌属 节杆菌属属名是一个古老的名称 (Fisher, 1895), 当时下面并没有命名种。直到 1947 年, Conn 和 Dimmick 又起用了这一名称,并对其内涵进行了修订,修订时除模式种 *Arthrobacter globiformis* (Conn) Conn & Dimmick 外,还包括两个种。

Conn 等 (1947) 提出 *C. insidiosum* 放在 *Arthrobacter* 属中更合适。Starr (1942) 提出 *C. poinsettiae* 也应归入该属。Lelliott (1966) 据血清学反应,认为 *C. flaccumfaciens*, *C. betae*, *C. poinsettiae* 和 *C. ilicis* 与 *Arthrobacter* 属的关系更近。Jones (1975) 则根据其数值分类结果提议将 *C. michiganense* 和 *C. rathayi* 归入该属。

但到目前为止,美国冬青节杆菌 (*A. ilicis*) 是该属中公认的唯一植物病原细菌,引起美国冬青疫病。这种病原菌是 1961 年由 Mardel 等报道的,当时定名为 *Corynebacterium ilicis*, Collins 等 (1981) 进行胞壁肽聚糖类型分析和甲基萘醌分析,发现它与 *Arthrobacter* 属相同,从而建议转入这一属中^[6]。

节杆菌属的主要特征是在复合培养基上有明显的杆状——球形生长循环,一般 2~

7d 的培养物全部为球形细胞, 将这种球形细胞转移至新鲜的复合培养基上, 由于球形细胞长大, 并产生一至数个突出物形成不规则杆状。杆状细胞继续生长, 变短, 呈球形。杆状和球形细胞均为革兰氏阳性反应, 但较易褪色。不抗酸, 杆状细菌不运动或偶有运动^[3]。与其他属的主要区别见表 1。

表 1 植物病原棒形细菌 5 个属的主要区别

各属特征	棒形杆菌属 <i>Clavibacter</i>	短小杆菌属 <i>Curtobacterium</i>	节杆菌属 <i>Arthrobacter</i>	红球菌属 <i>Rhodococcus</i>	拉氏杆菌属 <i>Rathayibacter</i>
菌体形态	不规则杆状	不规则杆状	典型的杆/球循环	杆状至大量的分枝基菌丝	不规则的短杆状
运动性	-	+	+	-	-
在 NA 培养基上的生长速度	特别缓慢	正常	正常	正常	正常
胞壁肽类型	B ₂₇	B ₂₈	A ₃₀	A ₁₇	B ₂₇
特征性肽双碱基氨基酸 ^b	DAB	meso-DAP	L-Lys	D-Orn	DAB
胞壁阿拉伯糖	-	-	-	+	-
枝菌酸	-	-	-	30-60 个碳原子	-
脂肪酸 ^c	S. A. I.	S. A. I.	S. A. I.	S. U. T.	S. A. I.
主要甲基萘醌	MK-9, MK-10	MK-9	MK-9	MK-9 (H ₂)	MK-10
极性脂 ^d	DPG, PG,	DPG, PG, G	DPG, PG, PI, DMDG, DGDG, MGDG	DPG, PE, PI, PG, DPG, PIM, G	
G + C mol %	67 ~ 78 mol %	67 ~ 75 mol %	59 ~ 66 mol %	60 ~ 69 mol %	63 ~ 72 mol %

a *Arthrobacter ilicis* 可运动, 但此属多不运动, b DAB: 二氨基丁酸, meso-DAP, 内消旋二氨基庚二酸, L-Lys, L-赖氨酸, D-Orn, D-鸟氨酸, c S: 直链饱和, A: 反异 (anteiso)-甲基分枝, I: 异 (iso)-甲基分枝, U: 单键不饱和, T: 10-甲基分枝, d DPG: 双磷脂酰甘油, PG: 磷脂酰甘油, G: 未知结构的糖基甘油二酯, PI: 磷脂酰肌醇, DMDG: 双甘露糖甘油二酯, DGDG: 双半乳糖基甘油二酯, MGDG: 单半乳糖基甘油二酯, PIM: 磷脂酰肌醇甘露糖苷, PE: 磷脂酰乙醇胺

3.2 棒形杆菌属 棒形杆菌属建立于 1984 年, 是 Davis 等通过对当时已肯定的 14 个种 (亚种) 的植物病原棒形细菌胞壁肽聚糖类型的研究提议的^[7]。《伯杰系统细菌手册》虽未正式将其作为属名, 但已承认这种划分, 到《伯杰细菌鉴定手册》第九版^[1]即接受了 Davis 建议的 *Clavibacter* 属下分 5 个种、7 个亚种的方案。1992 年, Riley 等报道了引起黑麦草毒性的 *Cl. toxicus*, 使该属下又增加一个种。

DNA G + C mol % 至今没有做到采用同样方法、同样条件对所有植物病原棒形细菌进行测定, 上述划分便无法得到这方面的证实。

1987 年, Oleson 发现 *Cl. m. subsp. sepedonicum* 和 *Cl. m. subsp. insidiosum* 具有其它棒形细菌种和亚种所没有的 DNA 重复序列。

1991 年, Henningson 和 Gudmestad 根据脂肪酸分析和生物测定结果提出, *Clavibacter* 这个属的分类并未完全解决, 尤其是 *Cl. michiganense* 的种下分类。

棒形杆菌属的主要特征见表 1。该属中为革兰氏阳性短杆菌, 菌体多形态, 直或微弯, 杆状, 也可见到楔形或球形。细胞以单生为主, 也常排列成 V、Y 和栅栏状, 不抗酸, 不运动。对营养苛求。

模式种是密执安棒形杆菌 *Clavibacter michiganense* (Smith) Davis。

拉氏杆菌属正式成立后, *Clavibacter* 属中仅有两个种, 即 *Clavibacter michiganense*

(下分 *Cl. m. subsp. michiganense*、*Cl. m. subsp. nebraskense*、*Cl. m. subsp. insidiosum*、*Cl. m. subsp. sepedonicum*、*Cl. m. subsp. tesquilarius* 5 个亚种) 和 *Cl. xyli* (下分 *Cl. xyli. subsp. cynodontis* 和 *Cl. xyli subsp. xyli* 两个亚种)。此外, 郭坚华等 (1996) 报道了一个新种 *Cl. fangii* (方氏棒形杆菌)^[9]。

3.3 短小杆菌属 1972 年, Yamada 和 Komagata 建议成立 *Curtobacterium* 属, 以包容一些有鞭毛的短杆菌和植物病原细菌 *C. flaccumfaciens* 和 *C. poinsettiae*。Schleifer KH 等, 同年根据细菌细胞壁肽聚糖结构将上述各种细菌及 *C. betae* 归为一组, 它们均为 B2 β 型, 与真正棒杆菌属细菌的 A₁₇ 型不同。

Jones (1975) 的数值分类研究发现, *C. flaccumfaciens*、*C. betae* 和 *C. poinsettiae* 相关紧密, 提出它们适合于 *Curtobacterium* 属。

Collins 等 (1980) 研究 *Curtobacterium* 属及相关分类元细菌细胞脂类的结果也支持将 *C. flaccumfaciens*、*C. betae* 和 *C. poinsettiae* 重新划分到短小杆菌属, 并提出 *C. oortii* 也应该归到这一属中。

Dopfer 等 (1982) 对胞壁肽聚糖的分析也支持这种划分, 他们还发现, *C. flaccumfaciens*、*C. betae*、*C. poinsettiae*、*C. oortii* 与短小杆菌属模式种 *Cur. citream* 具有较高的 DNA 同源值 (47% ~ 56%), 而它们互相之间的 DNA 同源值更高, 达 71% ~ 104%, 这是它们属于 *Curtobacterium* 属同一个种的有力证据。

1982 年, Calson RR, 和 Vidaver, A K^[8] 根据细菌蛋白质电泳结果认为应该将这 4 个植物病原细菌放在同一个种下, 但因为它们之间一些生理生化特性及细菌素的产生有区别, 且根据 Starr, M. P. (1975) 的 DNA 同源值测定结果建议在 *C. flaccumfaciens* 种下设立 4 个亚种。他们仍将这些细菌保留在棒杆菌属, 只是由于当时还没有合适的可以容纳它们的另外的属。

1983 年, Collins 和 Jones 认为寄主专化性和细菌素产生的不同不足以在亚种水平上区分细菌, 强调 Dopfer H 等所测得的 DNA 同源值, 提议将 *C. betae*、*C. poinsettiae*、*C. oortii* 和 *C. flaccumfaciens* 作为 *Curtobacterium* 属的一个种: *Cur. flaccumfaciens*, 且为了实用和检疫的目的, 将它们分别作为 *Cur. flaccumfaciens* 下不同的致病变种。这一分类被《伯杰系统细菌学手册》第二卷 (1986) 和《伯杰细菌鉴定手册》第九版 (1994) 采用。

属的特征及其与他属的区别见表 1。该属菌为革兰氏阳性短杆菌, 呈小而不规则的杆状, 杆状—球形生长循环不如节杆菌属细菌那样明显。一般都可以侧生鞭毛运动。不抗酸。无异染粒。

模式种为 *Curtobacterium citream* (Komagata & Iizuka 1964) Yamada & Komagata。

该属中只有一个植物病原细菌种, 即 *Cur. flaccumfaciens*, 其中包括 4 个致病变种: *Cur. pv. flaccumfaciens*, *Cur. pv. betae*, *Cur. pv. oortii*, *Cur. pv. poinsettiae*。此外, 陈永芳等 (2000) 又报道了一个新的致病变种 *Cur. pv. basellae* (萎蔫短小杆菌落葵致病变种)^[10]。

3.4 拉氏杆菌属 1993 年, Zgurskaya 等^[11] 提议建立拉氏杆菌属, 以囊括 *Cl. rathayi*、*Cl. tritici* 及 *Cl. iranicus* 这 3 种以线虫为媒介的细菌, 还部分地依据细胞甲基萘醌、糖的组成、细胞壁成分、碳源利用、细菌素的产生及对细菌素的抗性等, 这 3 个种的

基因图谱也可说明它们属于一个组,而与 *Cl. michiganense* 及其亚种相区别。

拉氏杆菌属的特征:菌体为不规则,多型性的短杆状,细胞通常为单生,有时也会有V型或短链状排列,无明显的杆/球循环。不运动,革兰氏阳性,不抗酸,绝对好氧。化能有机营养,氧化型代谢,接触酶阳性。营养需氨基酸。合适的生长温度为24℃~28℃(见表1)。

该属细菌与 *Clavibacter* spp. 的表型区别有71%(根据简单匹配系数),DNA-DNA同源率为7%~9%。大多数 *Rathayibacter* 菌株与 *Anguina* 属的线虫有明显的联系。该属菌株主要从一年生杂草上分离得到。

模式种为 *R. rathyi*。目前包括3个种: *R. rathyi* VKM Ac-1601 (= ICMP 2574), *R. iranica* VKM Ac-1602 (= ICMP 3496), 和 *R. tritici* VKM Ac-1603 (= ICMP 2626)。

该属成立之后又有些不同的看法。Lee I M等(1997)^[11]通过部分16S rDNA基因序列所进行的RFLP分析显示, *Clavibacter* 和 *Rathayibacter* 的种和亚种形成了一个独立的进化枝,而不同于 *Corynebacterium* 种。在 *Clavibacter* 和 *Rathayibacter* 组成的这一进化枝内部,又可分出4个主要的系统发育组群(亚进化枝): (1) *C. michiganensis*; (2) *C. xyli*; (3) *R. iranica* 和 *R. tritici*; (4) *R. rathyi*。在他们的研究中,前3个组群形成了一个同源簇,明显区别于 *R. rathyi*。

3.5 红球菌属 红球菌属是1891年 Zopf 建立的,有很长一段时间该属曾被取消,尽管此期间有人建议对一些细菌使用这一属名,但得不到支持。Goodfellow(1977)根据自己及许多学者对一些细菌菌株表型、化学、遗传学性状的研究,将该属的定义作了很大程度的修改,并包含10个种。Goodfellow(1984)^[12]又提出将 *Corynebacterium fascians* 重新分类,因为它含有磷脂酰乙醇胺(PE)和结核硬脂酸(tuberculostearic acid),DNA G+C mol %为61~67.6mol%,并且表型数值分类结果与 *Rhodococcus* 属的菌归于同一个分类簇。此外, *C. fascians* 细胞壁含有内消旋二氨基庚二酸(meso-DAP)和阿拉伯糖,还含有霉菌酸,这都是它不属于棒杆菌属的证据。

该属细菌形态复杂,球形细胞可萌芽变成短杆状,可形成侧面突出的丝状体或产生大量分支菌丝,杆状细胞、丝状体和菌丝体的片段形成下一代的球形和短杆状细胞。有些菌丝产生微弱的气生菌丝,在显微镜下可观察到,并有分枝,不运动,不形成分生孢子或内孢子。

Rhodococcus fascians 为该属唯一的植物病原细菌。

4 植物病原棒形细菌分类中存在的问题及研究趋势

植物病原棒形细菌的分类研究60年代从表观水平深入到了细胞水平,70年代又进入了化学分类时期。80年代以来,随着分子生物学和遗传学研究的深入开展,诸如DNA G+C mol%, DNA-DNA 体外分子杂交,16S rRNA 核苷酸序列分析等分子分类的内容也逐渐成为革兰氏阳性细菌分类学中不可缺少的分类指征。现在通常认为rRNA是研究进化关系最好的选择。由于16S rRNA的分子大小适中,又有一定的信息量,所以很多研究者以此作为研究对象^[13]并在此基础上发展了多种分析方法。Felske A等(1999)^[14]将种专化性的16S rRNA基因扩增后,利用温度梯度凝胶电泳(TGGE)法对115个棒形细菌菌株进行了分析,发现3个已知的 *Curtobacterium* 菌株存在着基因异质性。这一结论得到了化学分析法的证实。由此可见,传统的形态和生理生化方法得出

的分类结果, 可能在基因水平上不能得到证实。而植物病原棒形细菌的现行分类体系, 仍然有相当一部分仍是沿用着过去的名称, 而缺少科学家对之进行分子水平上的分类研究。与此同时, 植物病原棒形细菌的分子检测工作已经有了飞速发展。Li 和 De Boer (1995) 确定了 5 种不同的 *Clavibacter* 亚种的 16S 和 23S rDNA 之间的 ITS 序列, 根据其设计了单个的引物通过 PCR 方法, 得到 *Cl. m. subsp. sepedonicus* 的特异的 215bp 的 ITS 片段; Louwsd 等 (1998) 利用 Rep-PCR 介导的基因步迹法对 *Cl. michiganensis* 的各亚种进行了快速有效的鉴定。

虽然许多方法同样可用于分类研究, 而且在植物病原细菌的其他领域中已经有了一些进展。例如 Janssen P. 等 (1996) 用 AFLP 方法对黄单胞菌属的 7 个种 36 个不同致病变种进行指纹图谱分析, 发现每个种甚至每个致病变种之间都有多态性, 可将其区别开来^[15]。此结论表明, 如果建立一个完善全面的植物病原细菌的 AFLP 指纹图谱数据库, 再加上计算机辅助分析系统, 将可以实现细菌分类的快速和自动化。但是由于分类研究难度更大, 加上政策导向、经费限制和实验菌株的不足等种种原因, 植物病原棒形细菌分类研究的进程远远落后于其检测工作, 同时也相对落后于其他的植物病原细菌。

棒形细菌的分类研究是一个跨学科的大规模的工作, 微生物学家和植物病理学家应该密切协作, 打破学科限制, 将重点包括分子生物学方法的多相分类手段应用到所有棒形细菌 (包括植物病原棒形细菌) 的分类研究中。多相分类法的完善, 多学科科学家的合作, 将使植物病原棒形细菌的分类有一个飞跃性的发展, 新的系统将更为全面, 更符合其自身的亲缘关系。

参 考 文 献

- [1] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, et al. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, ed. 9, Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
- [2] Zgurskaya H J, Evtushenko L I, Akimov V N, et al. *Int J Syst Bacteriol*, 1993, 43: 143 ~ 149.
- [3] 任欣正. 植物病原细菌的分类和鉴定. 北京: 农业出版社, 1994, 191 ~ 211.
- [4] Yamada K, Komagata K. *J Gen Appl Microbiol*, 1972, 18: 417 ~ 431.
- [5] Sneath Peter H A. *Bergey's manual of systematic bacteriology Vol. 2*. Baltimore, Hongkong, London et al. Williams & Wilkins, 1986.
- [6] Collins M D, Jones D J, Kroppenstedt R M. *Zentralbl Bakteriell Parasitenkd, Infektionskr Hyg 1 Orig Reihe*. 1981, C2: 318 ~ 323.
- [7] Davis M J, Gillaspie A G, Vidaver A K, et al. *Int J Syst Bacteriol*, 1984, 34: 107 ~ 117.
- [8] Carlson R R, Vidaver A K. *Int J Syst Bacteriol*, 1982, 32: 315 ~ 326.
- [9] 郭坚华, 刘庆都, 任欣正. 南京农业大学学报, 1996, 19 (2): 26 ~ 30.
- [10] 陈永芳, 郭坚华, 方中达. 植物病理学报, 2000, 30 (2): 171 ~ 175.
- [11] Lee I M, Bartoszyk I M, Gundersen-Rindal D E, et al. *Applied and Environmental Microbiology* (1997) 63 (7): 2631 ~ 2636.
- [12] Goodfellow M. *System Appl Microbiol*, 1984, 5: 225 ~ 229.
- [13] 王意敏, 刘志恒. 微生物学通报, 1999, 26 (2): 137 ~ 140.
- [14] Felske A, Vancanneyt M, Kersters K, et al. *Int J Syst Bacteriol* 1999, 49: 113 ~ 121.
- [15] Janssen P, Coopman R, Huys G, et al. *Microbiology*. 1996, 142: 1881 ~ 1893.