

植原体的最新分类研究动态

赖帆 李永 徐启聪 田国忠*

(中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所 国家林业局森林保护学重点实验室
北京 100091)

摘要: 简要介绍了植原体分类研究历史与现状, 综述了最新的植原体分类方法和植原体候选种的描述规则, 指出了我国在植原体分类鉴定方面与当今世界先进水平的差距及今后发展方向。

关键词: 植原体, 分类, 候选种

The Present Status on Classification of Phytoplasmas

LAI Fan LI Yong XU Qi-Cong TIAN Guo-Zhong*

(Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Key Laboratory of Forest Protection, State Forestry Administration, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091)

Abstract: The history and present status of phytoplasma classification are introduced briefly in this paper. The newly classification methods and rules for the description of *Candidatus* species are reviewed. The key problems and direction on the classification and identification of phytoplasmas in China are discussed.

Keywords: Phytoplasma, Classification, *Candidatus* species

植原体 (phytoplasma), 原称类菌原体 (mycoplasma-like organism, MLO), 为单细胞原核生物, 无细胞壁, 由生物膜包围, 隶属于细菌界 (Bacteria), 硬壁菌门 (Firmicutes), 柔膜菌纲 (Mollicutes)(又称软球菌纲), 非固醇菌原体目 (Acholeplasmatales), 非固醇菌原体科 (Acholeplasmataceae)。定殖于植物韧皮部筛管以及刺吸式介体昆虫的肠道、淋巴、唾腺等组织内; 对四环素类的抗生素敏感, 而对青霉素不敏感; 对洋地黄苷有抵抗力, 且对低渗的盐溶液敏感, 与非固醇的柔膜菌成员较为相似^[1]。目前已经发现此类微生物与植物上发生的 1000 多种病害有联系, 常引起如丛枝、小叶、花变绿(叶)等典型或特有症状。我国大陆也已

报道了 100 余种与之相关的植物病害。

植原体基因组大小在 530 kb-1350 kb 之间。目前测定了两个完整的基因组序列: 洋葱黄化植原体和翠菊黄化植原体, 大小分别为 860631 bp 和 706569 bp。植原体 16S rRNA 基因在所有测定的植原体中都是相对保守的。植原体以 UGA 作为终止密码子, 而不是如其它的菌原体是以 UGA 作为色氨酸密码子。迄今为止, 所研究的植原体都有两个 rRNA 操纵子, 在 16S 和 23S rRNA 基因间区多有一个单独的 tRNA^{Ile} [2]。

1 植原体分类研究历史沿革

从形态上看, 植原体与动物的菌原体 (mycoplasma) 类似, 但由于植原体一直无法人工培

养,不能像其它的原核生物一样进行系统的分类鉴定,不同植物上的植原体之间在形态上和代谢上也无法鉴别。所以早期的植原体名称都是沿用引起病害的植物加上病害的典型症状来命名的。比如泡桐丛枝病植原体、榆树黄化病植原体,但这种命名方法不能反映微生物的系统进化和遗传变异规律,因而一直未能产生被细菌学工作者广为接受的科学分类方法和系统。作为一类原核生物,虽然早被归在了 Bergey's 系统细菌学手册的柔膜菌纲中,但却一直无明确分类地位。

随着DNA克隆、分子杂交、PCR以及DNA测序等技术被广泛应用和植原体分子生物学信息的积累,植原体的分类鉴定也逐渐从根据其表型特征及血清学关系比较转到以基因和分子特征为主要依据的系统分类研究上,植原体的系统发育及亲缘关系研究得以加强。从而,进一步确定了植原体属于柔膜菌纲内一个大的单元;在系统进化中,属于 *Anaeroplasma* 进化枝的一个独立的进化分枝,与 *Acholeplasma* 是相似群,与无胆甾原体 *Acholeplasma* sp. st J-233 株系的亲缘关系最近,而与动物菌原体的亲缘关系相对较远^[3]。

早在 1992 年的第九届国际菌原体组织(International Organization for Mycoplasmaology, IOM)大会上,首次提出了用植原体(phytoplasma)作为这类原核生物的新名称和暂定的属名(*Phytoplasma* sp.)。之后,众多研究者陆续根据 16S rDNA 序列测定结果将植原体划分为若干 16Sr 组和亚组,并根据核糖体蛋白(*rp*)基因操纵子序列同源性在亚组内进行精细分组。在 1994 年 7 月召开的国际系统细菌学会议上同意将原来的 16Sr 组中每个组的代表植原体用候选种(*Candidatus*, 简称 *Ca.*)的形式作为过渡期的种类划分。2000 年在日本召开的 IOM 国际会议上国际比较菌原体研究计划(International Research Programme of Comparative Mycoplasmaology, IRPCM)植原体/螺原体工作小组建议规定 16S rDNA 序列同源性 $\leq 97.5\%$ 的植原体可以被划为不同的候选种(*Candidatus* species), Zreik 等(1995)最早报道的候选种为 *Candidatus* *Phytoplasma aurantifolia*, 引起酸橙小果病。在 2000 年之前,先后有 5 个候选种发表,14 个 16Sr 组被描述;至 2004 年则又有 10 余个植原体候选种发表,并发表了比较详细的植原体候选种的描述规则^[2]。2006 年在英国剑桥召开的国际原核生

物系统学委员会柔膜菌纲分类委员会(International Committee on Systematics of Prokaryotes, Subcommittee on the Taxonomy of *Mollicutes*)统计新命名的候选种有 13 种,至少有 7 个候选种还有待命名^[4]。截止 2007 年 5 月份已有近 30 个候选种被命名(表 1)^[5~9]。

2 植原体研究现状

2.1 分类鉴定方法和依据

在整个柔膜菌纲的分类鉴定中,16S rDNA 是系统发育的首选标记。特别是像植原体这类尚不能人工培养的微生物,分子标记尤其重要。因而准确测定 16S rDNA 序列是确定一种植原体的分类地位和命名新的植原体候选种的基础和必需步骤之一。所测定的序列要保证 5' 末端 1400 bp 左右的长度,小于 1200 bp 的序列不作为分类鉴定的依据。在 1995 年关于此纲内的微生物新种的修定标准中指出,新种内的菌株在形态上和生物学上要有 70% 以上的相关性。而根据细菌系统学研究结果,16S rDNA 序列达到 97.5% 的一致性即能反映整个基因组 70% 以上的序列同源性^[10]。

越来越多的研究发现,有时仅根据 16S rDNA 序列不足以做到对植原体种类的科学划分。用相对不及 16S rDNA 保守的其它基因或区域,例如 16S-23S rDNA 间区, *rp* 和延伸因子(*tuf*)基因等,能将同一 16Sr 组内成员进一步区分为不同的亚组。植原体在 16S rDNA 序列上的差异不超过 14%,而 16S-23S rDNA 间区序列差异却高达 22%,同一植原体组内成员间的 *tuf* 基因序列相似性约 96%-99%,因此可以设计出特异性引物在亚组(或种以下)水平上对其做进一步的分类^[1]。

经 PCR 扩增后的 16S rDNA 及其它 DNA 扩增产物的 RFLP 分析,可以作为区分和鉴定植原体的一种简便、可靠、实用的方法,有助于揭示植原体之间的同源性和系统发育关系及遗传相关性^[11]。异源双链迁移率分析(heteroduplex mobility assay, HMA)也是一种简单而又迅速精确检测 DNA 序列差异的方法,可在更细微的亚组水平上分析植原体的基因变异^[11-12]。DNA 探针杂交以及用寡核苷酸生物芯片(oligonucleotide microarray)等技术都将有助于促进植原体的系统分类鉴定问题的解决^[13]。

2.2 植原体候选种的描述规则

IRPCM(2004)植原体/螺原体工作小组提出植原

表 1 已命名和发表的候选种
Table 1 The named and published *Candidatus* Phytoplasma species

编号 Number	候选种 <i>Candidatus</i> species	引起植物病害 The plant diseases	16Sr 组 16Sr groups	作者(年份) Authors(the year)
1	<i>Candidatus</i> Phytoplasma aurantifolia	Acid lime witches' broom	16SrII	Zreik <i>et al</i> (1995)
2	<i>Candidatus</i> phytoplasma australiense	Australian grapevine yellows	16SrXII	Davis <i>et al</i> (1997)
3	<i>Candidatus</i> Phytoplasma australasia	Dieback, yellow crinkle and mosaic of papaya	16SrII	White <i>et al</i> (1998)
4	<i>Candidatus</i> Phytoplasma fraxini	Ash yellows and lilac witches' broom	16SrVII	Griffiths <i>et al</i> (1999)
5	<i>Candidatus</i> Phytoplasma japonicum	Japanese Hydrangea phyllody	16SrI	Sawayanagi <i>et al</i> (1999)
6	<i>Candidatus</i> Phytoplasma brasiliense	Hibiscus witches' broom	16SrXV	Montano <i>et al</i> (2001)
7	<i>Candidatus</i> Phytoplasma castaneae	Chestnut witches' broom	16SrVI	Jung <i>et al</i> (2002)
8	<i>Candidatus</i> Phytoplasma ziziphi	Jujube witches' broom	16SrV	Jung <i>et al</i> (2003)
9	<i>Candidatus</i> Phytoplasma oryzae	Rice yellow dwarf	16SrXI	Jung <i>et al</i> (2003)
10	<i>Candidatus</i> Phytoplasma phoenicium	Lethal disease of almond trees	16SrIX	Verdin <i>et al</i> (2003)
11	<i>Candidatus</i> Phytoplasma cynodontis	Bermuda grass white leaf	16SrXIV	Marcone <i>et al</i> (2004)
12	<i>Candidatus</i> Phytoplasma asteris	Aster yellows group	16SrI	Lee <i>et al</i> (2004)
13	<i>Candidatus</i> Phytoplasma mali	Apple proliferation	16SrX	Seemüller <i>et al</i> (2004)
15	<i>Candidatus</i> Phytoplasma prunorum	European stone fruit yellows	16SrX	Seemüller <i>et al</i> (2004)
16	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani	Stolbur(pepper, tomato)	16SrXII	Firrao <i>et al</i> (2004)
17	<i>Candidatus</i> Phytoplasma trifolii	Clover proliferation	16SrVI	Hiruki <i>et al</i> (2004)
18	<i>Candidatus</i> Phytoplasma ulmi	Elm yellows	16SrV	Lee <i>et al</i> (2004)
19	<i>Candidatus</i> Phytoplasma spartii	Spartium witches' broom	16SrX	Marcone <i>et al</i> (2004)
20	<i>Candidatus</i> Phytoplasma rhamni	Buckthorn witches' broom	16SrX	Marcone <i>et al</i> (2004)
21	<i>Candidatus</i> Phytoplasma allocasuarinae	Allocasuarina yellows	16SrX	Marcone <i>et al</i> (2004)
22	<i>Candidatus</i> Phytoplasma graminis	Sugarcane yellow leaf	16SrXII	Arocha <i>et al</i> (2005)
23	<i>Candidatus</i> Phytoplasma caricae	Papaya buchey top-like disease	16SrXII	Arocha <i>et al</i> (2005)
24	<i>Candidatus</i> Phytoplasma pini	<i>Pinus silvestris</i> and <i>Pinus halepensis</i> abnormal shoot branching, dwarfed needles	未分组	Schneider <i>et al</i> (2005)
25	<i>Candidatus</i> Phytoplasma vitis	Grapevine <i>Flavescence dorée</i>	16SrV	Marzorati <i>et al</i> (2006)
26	<i>Candidatus</i> Phytoplasma fragariae	Strawberry stunting and yellowing	未分组	Valiunas <i>et al</i> (2006)
27	<i>Candidatus</i> Phytoplasma americanum	Potato purple top wilt disease complex	未分组	Lee <i>et al</i> (2006)

体候选种的描述规则包括如下 7 条^[2]:

1. “*Ca.*Phytoplasma” 种的描述应该提供唯一一条 16S rRNA 基因序列信息(大于 1200 bp)。用于候选种命名的植原体株系为“参考株”(reference strain)而不是“模式株”(type strain)。即使与“参考株”的 16S rRNA 基因序列差别再小,也不能将其归“属于”此候选种,而只是与它相关。
2. 一般而言,如果某一植原体株系的 16S rRNA 基因序列与已经命名的植原体候选种的同源性小于 97.5%,则可以描述成一个新的候选种。
3. 虽然某些植原体的 16S rRNA 基因序列同源性大于 97.5%,但却代表了生态学上的隔离,则可将其描述为另一个种。这种情况下,要描述两个完全不同的种需满足以下 3 个条件: 1) 传播介体不

同; 2) 天然寄主植物不同(或者至少它们在同一植物寄主上的表现有重大差别); 3) 通过 DNA 探针的分子杂交、血清学反应或 PCR 等获得的实验数据证实两者间存在明显的分子差异。

4. 不用于亚组的归类。
5. 相关种要在科学团体上被确认。
6. 对新种的描述最好应该被 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM) 接收发表。

7. *Candidatus* 的缩写是 *Ca.* (如 “*Ca.*Phytoplasma japonicum”代表‘*Candidatus* Phytoplasma japonicum”)。

2.3 迄今命名的植原体候选种种类

迄今已在 IJSEM(原名称为 International Journal of Systematic Bacteriology)上发表的植原体候选种

表 2 我国已完成 16S rDNA 序列测定的植原体
Table 2 The phytoplasmal 16S rDNA sequenced in China

编号 Number	病害名称 The names of diseases	16S rDNA 序列长度(kb) The length of 16S rDNA sequences(kb)	16Sr 组 16Sr groups	相关候选种 The related <i>Candidatus</i> species	作者(年份) Authors(the year)
1	泡桐丛枝	1.5, 1.2	16SrI	<i>Candidatus</i> Phyto-plasma asteris	廖永兰等(2003); 蔡红等(2004); 吴玉峰等(2006)
2	枣疯	1.5, 1.2	16SrV	<i>Candidatus</i> Phyto-plasma ziziphi	朱水芳等(1997); 吴玉峰等(2006)
3	桑树萎缩	1.4	16SrI	<i>Candidatus</i> Phyto-plasma asteris	夏志松等(2004); 刘清神等(2006)
4	樱桃致死性黄化	1.5	16SrV		朱水芳等(1997)
5	苦楝丛枝	1.5	16SrI		李永等(2005)
6	国槐带化	1.5	16SrI		李永等(2003)
7	桉树丛枝	1.5	16SrI		周国辉等(2005)
8	猪屎豆丛枝	1.5	16SrII		李永等(2006)
9	长春花黄化	1.3	16SrI		蔡红等(2003)
10	仙人掌丛枝	1.5	16SrII		陈海如等(2001)
11	竹丛枝	1.2	16SrI		蔡红等(2005)
12	小麦蓝矮	1.4	16SrI		顾沛雯等(2005)
13	花生丛枝	1.5	16SrII		李永等(2007)
14	香蕉束顶	1.2	16SrI		李横虹等(1999)
15	梨衰退	1.5	16SrX	<i>Candidatus</i> Phyto-plasma pyri	刘秀玲等(2007)(台湾)
16	丝瓜丛枝	1.5	16SrVIII		Hsyu 等(2002)(台湾)
17	桃红叶	1.2	16SrI		张华明等(2005)
18	重阳木丛枝	1.5	16SrV		赖帆等(2007)
19	臭矢菜丛枝	1.5	16SrII		李永等(2007)
20	灰叶丛枝	1.5	16SrII		李永等(2007)
21	香石竹黄化	1.2	16SrI		蔡红等(2005)
22	黄槐丛枝	1.2	16SrV		蔡红等(2005)

有 20 余个。其余几个有待确认的候选种包括 *Candidatus* Phytoplasma rubi, *Candidatus* Phytoplasma persicae, *Candidatus* Phytoplasma lycopersici, *Candidatus* Phytoplasma fragariae, *Candidatus* Phytoplasma pini, *Candidatus* Phytoplasma luffae, *Candidatus* Phytoplasma cocosnigeriae, *Candidatus* Phytoplasma cocostanzaniae 等。

3 问题与展望

3.1 植原体分类上存在的问题

虽然目前已经初步形成了植原体系统分类鉴定体系,但与其它可培养细菌相比仍有很大差距。仅依据 16S rDNA 等少数信息进行的分类鉴定难免存在片面和不足,这也是国际细菌分类鉴定委员会认为像命名普通细菌那样命名植原体新种的条件尚不成熟而暂时启用候选种的主要原因之一^[14]。在其它生物学信息如形态、生理生化指标、血清学等尚难以被广泛应用的情况下,对 16S-23S rDNA 间区、*rp*、*tuf*、*ftsZ*、 β -操纵子和热休克蛋白基因等多达 50 余个相对保守基因开展深入的比较研究尤显重要;具

体筛选确定应该用哪些基因作为进一步分类鉴定的主要依据尚无定论。

全基因组的信息能够准确反映生物系统发育和进化的整个面貌,但由于不同植原体间的基因组大小差异很大,要获得更多的基因序列信息并在全基因组的基础上对其进行分子水平上的比较分类鉴定尚存在技术、经费和条件上的困难。但随着研究的深入,特别是生物芯片等高通量基因分析技术的应用,植原体的分类鉴定水平会有大的提高。

目前虽然确定了近 30 个候选种,但绝大部分报道的植原体因缺乏必要信息而仍暂时列入 16Sr 组中。比如现在被划分到翠菊黄化组(16SrI)中引起 100 余种植物病害的植原体,无论在地理分布、生态环境、介体传毒、致病性等方面都有很大的差别,如果都被笼统地划归为候选种 *Candidatus* Phytoplasma asteris 的株系可能并不一定客观和科学^[15]。又如候选种 *Candidatus* Phytoplasma mali 和 *Candidatus* Phytoplasma pyri 都属于苹果簇叶组(16SrX)且同时分布在欧洲。可见,原来认为 16Sr 组内成员可能具有相同种

地位的观点不能作为候选种划分的主要依据。

在植原体候选种以下暂不进行亚种的划分应该是谨慎的做法。因为对候选种内不同株系间的生物学、血清学和核酸杂交等信息了解很有限的前提下, 对不同的分离物用株系、血清型、致病型、生物型等概念, 比直接划分亚种要更有余地。

随着植原体生物学和分子生物学研究的深入和信息的积累, 预计不久的将来会有更多新的候选种被命名和发表, 对候选种内亚分类单元的研究也会被重视和加强, 植原体的系统分类与命名方法也将会不断被修订和完善。一旦植原体分类鉴定标准趋于客观与成熟, 最终建立起类似普通细菌的种类型别标准和科学的命名规则就为时不远了。

3.2 我国在植原体分类鉴定上的差距与对策

在我国大陆地区已报道的百余种植原体病害中, 已测定了 16S rDNA 序列的植原体有 20 余个, 不到已知植原体的 1/5。根据测序结果都被划归到现有的 16Sr 分组体系中, 其中以 16SrI 组成员最多, 其次是 16SrII 和 16SrV 组成员, 迄今未发现不能被划分到现有组的新类型, 也未有我国学者发表新的候选种的研究报道。而且有些研究仅依据巢式 PCR(nested-PCR)扩增产物进行的序列测定结果, 可能会比用直接 PCR 产物进行序列测定的准确性和可靠性低。

日本命名的候选种 (*Candidatus* Phytoplasma ziziphi) 与我国引起枣疯病病害的植原体应该是相同的, 泡桐丛枝病和桑树萎缩病植原体也可暂时作为候选种 *Candidatus* Phytoplasma asteris 的株系之一。从其分布范围、介体昆虫、寄主范围及分子生物学信息来分析, 作为新的候选种命名也不是不可能的, 但这需要更多 DNA 序列测定与比较信息的支持。

除 16S rDNA 序列测定外, 我国对植原体的其它基因和序列的研究明显不足, 不同地区间的菌株比较不够充分; 整个植原体研究领域力量仍较薄弱, 大多数植原体尚无任何分子生物学信息资料。从整体上看, 我国与国外研究差距很大。

今后, 我们应加强对我国重要、典型和特色植原体基因组学和功能基因的研究, 为我国植原体的系统分类与鉴定提供依据和工具; 尽快完成大多数植原体保守基因序列的测定工作, 建立起以 16S rDNA 序列为基础、其它重要保守基因为辅助的植原体系统分类和基因信息数据库; 通过国内外的协作与攻关, 将我国植原体的分类鉴定标准和技术与国际接轨, 力争能命名和发表新的候选种。

参考文献

- [1] Lee IM, Davis RE, Gundersen-Rindal DE. Phytoplasmas: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, 2000, **54**: 221–255.
- [2] The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team-Phytoplasma taxonomy group. 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, **54**(4): 1243–1255.
- [3] International Committee on Systematic Bacteriology, Subcommittee on the Taxonomy of *Mollicutes* Minutes of the Interim Meeting, 12, and 18 July 1996, Orlando, Florida, USA. *Int J Syst Bacteriol*, 1997, **47**(3): 911–914.
- [4] International Committee on Systematics of Prokaryotes, Subcommittee on the Taxonomy of *Mollicutes*. Minutes of the meetings, 8, 9 and 14 July 2006, Cambridge, UK. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, **57**(1): 192–196.
- [5] Zhao Y, Davis RE, Lee IM. Phylogenetic positions of 'Candidatus Phytoplasma asteris' and *Spiroplasma kunkei* as inferred from multiple sets of concatenated core housekeeping proteins. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, **55**(5): 2131–2141.
- [6] Schneider B, Torres E, Martín MP, et al. 'Candidatus Phytoplasma pini', a novel taxon from *Pinus silvestris* and *Pinus halepensis*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, **55**(1): 303–307.
- [7] Valiunas D, Staniulis J, Davis RE. 'Candidatus Phytoplasma fragariae', a novel phytoplasma taxon discovered in yellows diseased strawberry, *Fragaria ananassa*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, **56**(1): 277–281.
- [8] Arocha Y, López M, Piñol B, et al. 'Candidatus Phytoplasma graminis' and 'Candidatus Phytoplasma caricae', two novel phytoplasmas associated with diseases of sugarcane, weeds and papaya in Cuba. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, **55**(10): 2451–2463.
- [9] Lee IM, Bottner KD, Secor G, et al. 'Candidatus Phytoplasma americanum', a phytoplasma associated with a potato purple top wilt disease complex. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, **56**(7): 1593–1597.
- [10] International Committee on Systematic Bacteriology, Subcommittee on the Taxonomy of *Mollicutes*. Revised minimum standards for description of new species of the class *Mollicutes* (Division *Tenericutes*). *Int J Syst Bacteriol*, 1995, **45**(3): 605–612.
- [11] 李永, 田国忠, 朴春根, 等. 我国几种植物上植原体的快速分子鉴别与鉴定的研究. *植物病理学报*, 2005, **35**(4): 293–299.
- [12] Wang K, Hiruki C. Distinctions between phytoplasmas at the subgroup level detected by heteroduplex mobility assay. *Plant Pathology*, 2005, **54**(5): 625–633.
- [13] Nicolaisen M, Bertaccini A. An oligonucleotide microarray-based assay for identification of phytoplasma 16S ribosomal groups. *Plant Pathology*, 2007, **56**(2): 332–336.
- [14] International Committee on Systematic Bacteriology, Subcommittee on the Taxonomy of *Mollicutes* Minutes of the meetings, 21 and 28 July, 1998, Sydney, Australia. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, **50**(3): 1393–1397.
- [15] Lee IM, Gundersen-Rindal DE, Davis RE, et al. 'Candidatus Phytoplasma asteris', a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, **54**(4): 1037–1048.