

植物病原棒形杆菌属分类最新进展

王 丽¹ 田 茜² 王溪桥³ 赵文军^{2*} 孙现超^{1*}

(1. 西南大学植物保护学院, 重庆 400715; 2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176;

3. 甘肃出入境检验检疫局检验检疫综合技术中心, 兰州 730000)

摘要: 植物病原棒形杆菌属 *Clavibacter* 的分类随着研究的深入和鉴定技术水平的不断进步一直在发生着变化, 之前普遍认可的观点为该属仅含有 1 个种, 即密执安棒形杆菌 *C. michiganensis*, 种下又分为 5 个亚种, 分别为密执安亚种 *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*、诡橘亚种 *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*、尼布拉斯加亚种 *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*、环腐亚种 *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* 和花叶亚种 *C. michiganensis* subsp. *tessellarius*。最近几年又有 4 个新亚种陆续被报道, 分别为菜豆亚种 *C. michiganensis* subsp. *phaseoli*、辣椒亚种 *C. michiganensis* subsp. *capsici*、加利福尼亚亚种 *C. michiganensis* subsp. *californiensis* 和智利亚种 *C. michiganensis* subsp. *chilensis*。随着全基因组分析和多基因分析技术在细菌分类上的应用, 之前被广泛认可的 4 个亚种(诡橘亚种、尼布拉斯加亚种、环腐亚种和花叶亚种)及新亚种辣椒亚种也曾被建议定义为种, 即 *C. insidiosus*、*C. nebraskensis*、*C. sepedonicus*、*C. tessellarius* 和 *C. capsici*。为便于研究人员了解该属最新的分类研究现状, 本文对植物病原棒形杆菌属的分类历史及最新分类现状进行了系统梳理, 期望为该属病原菌的风险评估、检测鉴定等研究提供分类学参考。

关键词: 棒形杆菌属; 亚种; 分类; 最新进展

Advances in taxonomy of the plant pathogen *Clavibacter*

Wang Li¹ Tian Qian² Wang Xiqiao³ Zhao Wenjun^{2*} Sun Xianchao^{1*}

(1. College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Chinese Academy of Inspection

and Quarantine, Beijing 100176, China; 3. Gansu Entry-Exit Inspection and Quarantine Technical Center,

Lanzhou 730000, Gansu Province, China)

Abstract: The classification of plant pathogen *Clavibacter* keeps changing with the deepening of the research on plant pathogenic bacteria, as well as new classification proposals reported in recent years. Until now *Clavibacter michiganensis* is the only species in *Clavibacter*, which contains five subspecies: *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*, *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*, *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* and *C. michiganensis* subsp. *tessellarius*, respectively. Recently, four new subspecies named as *C. michiganensis* subsp. *phaseoli*, *C. michiganensis* subsp. *capsici*, *C. michiganensis* subsp. *californiensis* and *C. michiganensis* subsp. *chilensis* were reported. According to the genome analysis and multilocus sequence analysis, the four previously widely accepted subspecies and *C. michiganensis* subsp. *capsici* were proposed to be reclassified as *C. insidiosus*, *C. nebraskensis*, *C. sepedonicus*, *C. tessellarius* and *C. capsici*, respectively. In this paper, the taxonomy of and recent advances in *Clavibacter* were reviewed based on the latest research. We hope it can provide useful information for the study of risk analysis and pathogen detection of *Clavibacter*.

基金项目: “十三五”国家重点研发计划(2018YFF0214902), 国家自然科学基金(31870147)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: wenjunzhao@188.com, sunxianchao@163.com

收稿日期: 2018-11-19

Key words: *Clavibacter*; subspecies; taxonomy; recent advances

棒形杆菌属 *Clavibacter* 细菌是重要的植物病原,该属细菌可系统性侵染番茄 *Lycopersicon esculentum*、马铃薯 *Solanum tuberosum*、苜蓿 *Medicago*、小麦 *Triticum aestivum*、玉米 *Zea mays* 等多种作物,导致寄主产生溃疡、萎蔫、腐烂、花叶等症状,引起的常见病害有番茄溃疡病、马铃薯环腐病、苜蓿萎蔫病、玉米内州萎蔫病等(任欣正,1994)。在分类上该属仅有密执安棒形杆菌 *C. michiganensis* 一个种,其下分为5个亚种,分别为密执安亚种 *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*、诡橘亚种 *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*、尼布拉斯加亚种 *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*、环腐亚种 *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* 和花叶亚种 *C. michiganensis* subsp. *tessellarius* (Eichenlaub & Gartemann, 2011)。近几年,随着科学技术的不断发展,特别是分子生物学的迅速发展,新技术和新方法越来越多地被用于棒形杆菌的分类研究,因此棒形杆菌属陆续又有4个新亚种被报道,分别为菜豆亚种 *C. michiganensis* subsp. *phaseoli*、辣椒亚种 *C. michiganensis* subsp. *capsici*、加利福尼亚亚种 *C. michiganensis* subsp. *californiensis* 和智利亚种 *C. michiganensis* subsp. *chilensis* (González & Trapiello, 2014; Yasuhara-Ball & Alvarez, 2015; Oh et al., 2016)。

科学准确的分类系统是研究生物类群异同,阐明生物间的亲缘关系、进化过程和发展规律的基础。棒形杆菌属不同亚种之间的亲缘关系比较近,种及种下阶元的分类也在不断变化。棒形杆菌属原有的5个亚种除花叶亚种外均为我国进境植物检疫性有害生物(赵文军和冯建军,2017)。这些病原菌的准确鉴定是保障农业健康生产、货物正常流通和防止外来有害生物入侵的关键。因此,不论是从植物病原细菌学研究,还是从外来有害生物防控的角度分析,明确棒形杆菌属准确的分类情况都具有十分重要的意义。

1 植物病原棒形杆菌分类简史

植物病原棒形杆菌在《伯杰氏细菌手册》前7版中都被归为棒杆菌属 *Corynebacterium*, 该属由 Lehmann 和 Neumann 于 1896 年创立,其模式种为白喉棒杆菌 *Co. diphtheria* (王金生, 2000)。棒形杆菌虽与白喉棒杆菌在鉴定特征上存在诸多相似之处,如同为革兰氏阳性好氧菌、不产孢、形状不规则等,

但之后的研究结果表明其与动物病原棒形杆菌在基因组 G+C 含量、细胞壁组分、16S rRNA 基因序列等多个方面均存在差异。植物病原细菌学家通过多年的实践研究,认为把植物病原棒形杆菌归于棒杆菌属并不合适(Davis et al., 1984)。《伯杰氏细菌手册》(Krieg & Holt, 1984)最终把植物病原棒形杆菌重新划分为节杆菌属 *Arthrabacter*、红球菌属 *Rhodococcus*、短小杆菌属 *Curtobacterium* 和棒杆菌属。Davis et al. (1984) 提出建立一个新属,即棒形杆菌属 *Clavibacter*, 将胞壁肽聚糖中含有 2,4-二氨基丁酸的 6 个棒杆菌种划入其中,分别为密执安棒形杆菌 *C. michiganensis*、小麦棒形杆菌 *C. tritici*、伊朗棒形杆菌 *C. iranicum*、鸭茅草棒形杆菌 *C. rathayi*、木质部棒形杆菌 *C. xyli* 和产毒棒形杆菌 *C. toxicus*。随后,基于 DNA-DNA 杂交水平和甲基萘醌结构等分类指标,伊朗棒形杆菌、鸭茅草棒形杆菌、产毒棒形杆菌和小麦棒形杆菌被重新划分入拉氏杆菌属 *Rathayibacte* (Zgurskaya et al., 1993), 而木质部棒形杆菌被划入赖氏菌属 *Leifsonia* (Evtushenko et al., 2000)。因此,目前棒形杆菌属仅保留了密执安棒形杆菌 1 个种。

2 棒形杆菌属概述

棒形杆菌属细菌为革兰氏阳性好氧细菌,具有棒状形态,无菌丝体,不产生孢子,在大多数培养基上生长较为缓慢,并且营养要求严格,外加葡萄糖或蔗糖能促进生长。菌落形态为圆形、全缘、突起且不透明,适宜生长温度为 21~26℃,最高生长温度为 35℃ (Evtushenko et al., 2000)。除环腐亚种外的其它亚种的菌落多呈黄色黏稠状 (Eichenlaub & Gartemann, 2011)。植物病原棒形杆菌可通过伤口、水孔或者带菌种子侵染植株,引起寄主植物的系统性萎蔫症状 (Gartemann et al., 2008)。目前公认的该种内包含有 5 个亚种,每个亚种都有很高的寄主专化性,能够侵染番茄、马铃薯、苜蓿、玉米、小麦以及一些茄科杂草等;病原菌也可以通过菌落颜色、形态特征以及理化性质等进行区分 (Eichenlaub et al., 2006)。

2.1 密执安棒形杆菌密执安亚种

密执安棒形杆菌密执安亚种因其能引起番茄溃疡病,故又称番茄溃疡病菌,在中国和欧盟被列为检疫性有害生物 (EPPO, 2013)。番茄溃疡病是番茄等

茄科作物生产中最严重的病害之一,已逐渐发展成为世界性病害(Eichenlaub et al., 2006)。番茄溃疡病是一种典型的维管束系统病害,病害症状可以表现为系统症状和局部症状,病株从幼苗期到座果期都可发生萎蔫和死亡,大田定植后易造成缺株断垄。该病菌是一种典型的种传病菌,种子内外均可带菌,受污染的种子是其远距离传播的主要途径,在田间或温室,病原菌由伤口、气孔及其它自然孔口进入植物组织,也可通过灌溉水和修剪刀等进行传播(Gleason et al., 1993; Jahr et al., 1999)。

番茄溃疡病菌为革兰氏阳性菌,无鞭毛,无芽孢,有荚膜,无运动性,严格好氧,短杆状或棒状。大小为 $0.3\sim 0.4\ \mu\text{m}\times 0.6\sim 1.2\ \mu\text{m}$,多以V、Y形或栅栏状排列,最适生长温度为 $24\sim 27^\circ\text{C}$,最高可耐受温度为 35°C ,最适生长pH 7.5~8.5。该菌在523培养基上培养3 d后可形成圆形菌落,淡黄色至黄色,全缘,不透明,表面光滑,呈黏稠状,直径为2~3 mm(Fatmi & Schaad, 1988)。

2.2 密执安棒形杆菌诡谲亚种

密执安棒形杆菌诡谲亚种因其能引起苜蓿细菌性萎蔫病,故又称苜蓿细菌性萎蔫病菌。苜蓿细菌性萎蔫病是苜蓿上一种广泛传播的种传细菌性病害,也是苜蓿生产上最严重的病害之一(Bach et al., 2003)。苜蓿受该病菌侵染后会迅速衰弱甚至死亡,产草量锐减,甚至绝产,种子产量也显著下降。该病害在美国和加拿大等多个国家和地区发生,我国尚未见报道(赵文军和冯建军, 2017)。苜蓿染病后根部和茎部木质部变为黄色和黄褐色,有时还混杂有深色斑点,病变在横切面上极为明显,主根剖面的变色是判断此病的主要依据。该病菌主要通过带菌苜蓿种子、干草及混杂于种子中的植物残体进行远距离传播,病菌在种子和干草上能存活10年以上(Cormack, 1961; Németh et al., 1991)。在干燥和凉爽的条件下病菌在苜蓿根组织和土壤中可存活数月(Fahy & Persley, 1983)。近距离传播则主要通过收割工具、工作人员、灌溉水、雨水等媒介。另外,鳞茎茎线虫*Ditylenchus dipsaci*及北方根结线虫*Meloidogyne hapla*也可传播此病(Hunt et al., 1971)。

苜蓿细菌性萎蔫病菌为好气性革兰氏阳性菌,短杆状,末端圆,大小为 $0.4\sim 0.5\ \mu\text{m}\times 0.7\sim 1.0\ \mu\text{m}$,单生或对生,不形成链状,无鞭毛,不游动,不产孢,有荚膜,不抗酸。该病菌生长缓慢,在营养琼脂(nutrient agar, NA)培养基上形成初为白色后为淡黄色的

菌落,圆形或不定形,扁平或稍隆起,边缘光滑并具有光泽;在高糖培养基上培养7~14 d,病菌能产生蓝色色素颗粒——靛蓝素(Close & Mulcock, 1972)。

2.3 密执安棒形杆菌尼布拉斯加亚种

密执安棒形杆菌尼布拉斯加亚种因其能引起玉米内州萎蔫病,故又称玉米内州萎蔫病菌。该病害自1969年在内布拉斯加州道森县被首次发现以来,已经蔓延到许多新的地区(Biddle et al., 1990)。该病害无论在症状、发展、传播途径还是对玉米的产量影响上均与玉米细菌性枯萎病相似,引起这2种病的病原菌均为我国进境植物检疫性有害生物,对我国的玉米生产构成很大威胁(Malvick et al., 2010; 赵文军和冯建军, 2017)。玉米内州萎蔫病是一种维管束系统侵染病害,病菌可以从根、茎、叶侵染玉米的幼苗和成株,可导致植株在整个生长季节的任何阶段发病。该病害的典型特征是玉米叶片具有灰绿色至黑色的水浸状条纹及波浪状边缘。在大的叶枯病斑中,有较小的、深色的水渍状病斑,当太阳光从叶片背面照射时会发亮。病菌主要通过受侵染的种子或植株残体进行传播,病菌在种子中至少能够存活1年。病害的田间近距离扩散则主要依靠流水传播(Schuster et al., 1983; Smidt & Vidaver, 1986)。

玉米内州萎蔫病菌为革兰氏阳性菌,好氧,不产孢,无运动性。大小为 $0.6\sim 0.7\ \mu\text{m}\times 0.7\sim 0.12\ \mu\text{m}$,大部分为楔形,也存在球形,为直或弯的杆状菌体,栅栏状或不规则排列。病菌在营养肉汤酵母膏琼脂(nutrient broth-yeast extract agar, NBY)培养基或玉米内州萎蔫病菌选择性(*C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* selective medium, CNS)培养基上形成杏红色或橘红色菌落,圆形、黏稠、凸起、发亮且边缘整齐,25℃培养6 d后菌落直径约为4 mm。在马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基上,菌落为白色至奶油色(Vidaver & Mandel, 1974)。

2.4 密执安棒形杆菌环腐亚种

密执安棒形杆菌环腐亚种因其能引起马铃薯环腐病,故又被称为马铃薯环腐病菌。马铃薯环腐病是一种世界性分布的细菌性病害,最早发生于19世纪晚期的德国,是马铃薯生产上最严重的病害之一,目前已遍及我国各大马铃薯产区(Pastrik, 2000; 何云霞等, 2004)。马铃薯环腐病是典型的维管束病害,常造成植株严重萎蔫,块茎腐烂,基部维管束变成浅黄色或黄褐色,甚至死亡。该病害主要通过染病种薯或受污染的马铃薯处理设备传播。病菌能够

在马铃薯块茎中潜伏很长时间而不引起症状(Pastrik, 2000),进而能够随其远距离传播,而播种时切薯块所用切刀往往会引起病菌的进一步扩散传播,此外,灌溉水或雨水等亦可将病薯腐烂释放出的细菌传到健康薯块或健康植株根茎上。

马铃薯环腐病菌的菌体呈棍棒状、球形或卵圆形,单生或偶成对呈V形排列,有时排列成栅栏状,大小为0.4~0.6 μm ×0.8~1.2 μm 。该病菌不产生芽孢,无荚膜,无鞭毛,不能运动,为革兰氏阳性菌,而老龄菌易变成革兰氏阴性菌。该病菌最低生长温度为1~2 $^{\circ}\text{C}$,最高生长温度为31~32 $^{\circ}\text{C}$,55 $^{\circ}\text{C}$ 条件下处理10 min可致死,最适生长pH 8.0~8.4(Firrao & Locci, 1994)。

2.5 密执安棒形杆菌花叶亚种

密执安棒形杆菌花叶亚种因其能引起小麦花叶病,故又称为小麦花叶病棒形杆菌。小麦花叶病最初由Carlson & Vidaver(1982)在内布拉斯加州首次发现并报道,该病广泛发生在小麦上,病状表现为叶片布满小黄斑,与病毒花叶症状相似(尹燕妮等, 2006)。该病菌除与密执安棒形杆菌种的基本特征相同外,在NBY培养基上,菌落呈橙黄色、隆起状,黏质,且为全缘菌落。能在CNS和氯化三苯基四氮唑(triphenyltetrazolium chloride, TTC)琼脂培养基上生长,适宜生长温度为24~28 $^{\circ}\text{C}$,不能在37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下生长(Carlson & Vidaver, 1982)。

3 棒形杆菌新报道亚种

近些年,多位点序列分析(multilocus sequence analysis, MLSA)和全基因组序列分析等技术越来越多地用于细菌分类研究,随着植物病原细菌分离鉴定技术水平的提高,以及基因组测序及序列分析等技术的普遍应用,一些新的棒形杆菌亚种得以被陆续分离鉴定,例如密执安棒形杆菌菜豆亚种被鉴定为大豆细菌性叶枯病的病原菌(González & Trapiello, 2014),密执安棒形杆菌辣椒亚种被鉴定为辣椒细菌性溃疡病的病原菌(Oh et al., 2016),此外还从美国加利福尼亚州和智利生产的辣椒*Capsicum annum*种子上分离到了非致病性亚种——密执安棒形杆菌加利福尼亚亚种和密执安棒形杆菌智利亚种(Yasuhara-Ball & Alvarez, 2015)。

3.1 密执安棒形杆菌菜豆亚种

Trapiello & González(2012)从保存于西班牙国家农业和食品研究与技术研究所植物遗传资源中心

(the Centre of Plant Genetic Resources of the National Institute for Agricultural and Food Research and Technology, CRF-INIA)的9个当地菜豆*Phaseolus vulgaris*种子中分离得到1株疑似棒形杆菌,通过序列比对分析发现,该分离菌株的16S rRNA基因序列(登录号HE608962)与密执安棒形杆菌其它亚种有99%的相似性,因此将其鉴定为密执安棒形杆菌。González & Trapiello(2014)随后又从西班牙种质库储存10年的菜豆种子中重新分离到该菌株,并对其进行了系统发育分析、核糖体DNA扩增片段限制性内切酶分析(amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA)、限制性内切酶片段长度多态性分析(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、MLSA及生化和表型特征分析等。*recA*、*rpoB*和*gyrB*基因的系统发育分析结果显示菜豆中分离所得菌株与密执安棒形杆菌聚在一个大的类群中,且与马铃薯环腐病菌和苜蓿细菌性萎蔫病菌的亲缘关系最近;而ARDRA、RFLP分析及生理生化测试结果显示该菌株与其它密执安棒形杆菌已知亚种均不相同;此外,该菌株对菜豆具有致病性,会引起叶子卷曲变形,在接种寄主植物20 d后,叶片逐渐出现褐斑、黄化,最终维管束萎蔫,腐烂并坏死,是一种以前在豆类作物中从未报道过的病害;基于上述分析结果,最终将该菌株鉴定为1个新的亚种,命名为密执安棒形杆菌菜豆亚种*C. michiganensis* subsp. *phaseoli*,其典型菌株为LPPA 982^T(=5CECT 8144^{T5}=LMG 27667^T)(González & Trapiello, 2014)。

3.2 密执安棒形杆菌加利福尼亚亚种和智利亚种

近些年的研究发现,番茄种子上经常会携带有非致病性的密执安棒形杆菌密执安亚种类似菌株,这些菌株与密执安亚种非常相似,一些该亚种常用检测方法如PCR和免疫胶体金试纸条均能检测出这些密执安亚种类似菌株,常会导致检测结果出现假阳性(Zinniel et al., 2002; Kaneshiro et al., 2006)。研究发现密执安亚种类似菌株在番茄上无致病性(Kaneshiro & Alvarez, 2001; Zaluga et al., 2011),并且在烟草*Nicotiana tabacum*、本氏烟*Nicotiana benthamiana*和紫茉莉*Mirabilis jalapa*上也不引起过敏性坏死反应,与密执安亚种相比,密执安亚种类似菌株缺少*ppaJ*、*pat-1*、*chpC*、*tomA*、*ppaA*和*ppaC*等致病性相关基因(Jacques et al., 2012; Yasuhara-Ball et al., 2013)。

基于*dnaA*基因的系统发育分析结果显示,非致

病性的密执安亚种类似菌株形成一个单独的分支,而不与棒形杆菌属的其它亚种聚在一起(Yasuhara-Ball et al., 2013; Zaluga et al., 2013)。为明确密执安亚种类似菌株的分类地位, Yasuhara-Ball & Alvarez (2015)对6株密执安亚种类似菌株进行了生物学及基因组学特征分析,包括生理生化测试、细胞壁分析、Biolog测试、单基因及多位点序列分析等。基于 *atpD*、*dnaK*、*gyrB*、*ppK*、*recA* 和 *rpoB* 基因的多序列分析以及基于 *dnaA* 基因的系统发育分析结果发现,来自美国加利福尼亚的密执安亚种类似菌株单独形成一个分支,与密执安亚种菌株亲缘关系较近;而来自智利和印度的密执安亚种类似菌株与 Jacques et al. (2012)报道的大多数密执安亚种类似菌株聚在一起,形成另一个分支。生理生化测试结果也显示这些密执安亚种类似菌株不同于密执安亚种,而且密执安亚种类似菌株的2个类群彼此间也存在差异,如棒形杆菌属细菌的胞壁糖成分主要有鼠李糖、半乳糖和甘露糖,而分离于美国加利福尼亚的密执安亚种类似菌株还含有岩藻糖,分离于智利的密执安亚种类似菌株含有半乳糖、甘露糖和核糖,但没有鼠李糖。此外,棒形杆菌属的主要脂肪酸为14-甲基十六烷酸、12-甲基十四烷酸和14-甲基十五烷酸,而密执安亚种类似菌株虽然含有棒形杆菌属的主要脂肪酸,但却都不含有十八碳烯酸(C_{18:1})。另外,密执安亚种菌株含有大量饱和直链脂肪酸十二烷酸(C_{12:0})和十六烷酸(C_{16:0}),而密执安亚种类似菌株均只含有C_{16:0},而不含C_{12:0}。Yasuhara-Ball & Alvarez (2015)最终将上述密执安亚种类似菌株分为2类非致病性菌,并鉴定为新的亚种,其中来自美国加利福尼亚的密执安亚种类似菌株被命名为密执安棒形杆菌加利福尼亚亚种 *C. michiganensis* subsp. *californiensis*,来自智利及印度的密执安亚种类似菌株被命名为密执安棒形杆菌智利亚种 *C. michiganensis* subsp. *chilensis*,代表菌株分别为 C55^T (=ATCC BAA-2691^T =CFBP 8216^T) 和 ZUM3936^T (=ATCC BAA-2690^T =CFBP 8217^T) (Yasuhara-Bell & Alvarez, 2015)。

3.3 密执安棒形杆菌辣椒亚种

早在20世纪90年代,研究者们就从甜椒 *Capsicum annum* 和灯笼椒 *C. frutescens* 上分离培养出疑似密执安棒形杆菌,并被鉴定为密执安亚种,证实了细菌性溃疡病在韩国、美国和荷兰等国家均有发生(Latin et al., 1995; Lewis Ivey & Miller, 2000)。Yim et al. (2012)研究发现,这些辣椒上分离到的菌株在

菌落颜色形态、基因指纹图谱以及对番茄和辣椒的致病性等方面均与密执安亚种不同。这些菌株对辣椒具有较强的致病性,可引起严重的茎枯及叶枯症状,但在番茄上的致病性较弱,仅引起较弱的茎溃疡,而不引起萎蔫。相反,密执安亚种菌株在番茄上能够引起严重的溃疡和萎蔫症状,但对辣椒的致病性较弱。

为进一步明确分离自辣椒上菌株的分类地位, Oh et al. (2016)收集了来自韩国多个地区的53株辣椒分离物以及9株番茄分离物,对其进行了系统发育、多位点序列分析、生理生化及表型特征分析等,与番茄上的密执安棒形杆菌密执安亚种菌株相比,辣椒上分离所得菌株的菌落为橙色、黏稠状;能够产生果聚糖,不能够利用甲基 α -D-吡喃葡萄糖苷、D-岩藻糖和5-酮葡萄糖酸钾,对甲基 α -D-吡喃甘露糖苷和D-海藻糖的利用能力增强,缺乏萘酚-AS-BI-磷酸水解酶活性,碱性磷酸酶活性增强, α -甘露糖苷酶活性则相对减弱。基于16S rRNA序列的系统发育分析结果显示,从辣椒上得到的菌株单独形成了一个分支,明显与包括密执安亚种在内的所有密执安棒形杆菌其它亚种区分开来。同样,多基因分析结果也显示辣椒上分离菌株与所有已知棒形杆菌其它亚种均不同(Oh et al., 2016)。

基于上述分析结果, Oh et al. (2016)最终将辣椒上分离菌株鉴定为一个新的亚种,并命名为密执安棒形杆菌辣椒亚种 *C. michiganensis* subsp. *capsici*, 模式菌株是 PF008^T (=KACC 18448^T =LMG 29047^T), 该病菌能够引起辣椒细菌性溃疡病。

4 棒形杆菌属最新分类情况变化

随着基因组测序等技术的快速发展,基因组序列数据的大量累积为解决复杂的分类学问题提供了丰富的参考信息,植物病原细菌的传统分类也面临着新的挑战,许多新的分类建议被不断提出。针对棒形杆菌属, Li et al. (2018)基于全基因组序列信息,利用平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)分析、数字DNA-DNA杂交(digital DNA-DNA hybridization, dDDH)以及MLSA等方法对棒形杆菌进行了分析,发现密执安棒形杆菌现有亚种间的ANI值为89.18%~95.01%,普遍低于Richter & Rosselló-Móra (2009)所建议的用于描述种的临界值96.00%,而且同一亚种不同菌株之间的ANI值为99.17%~99.98%,均大于99.00%。dDDH分析结果

显示不同亚种之间的 dDDH 值为 37%~60%，均低于描述种的临界值 70% (Meier-Kolthoff et al., 2013)，而同一亚种不同菌株之间的 dDDH 值则高于 93%。此外，Li et al. (2018) 基于 *acnA*、*gapA*、*lcdA*、*mdh*、*mtlD*、*pgi* 和 *proA* 这 7 个看家基因的 MLSA 分析发现，之前被广泛认可的 5 个亚种的菌株清晰地形成了 5 个不同的集群。

基于上述分析数据，Li et al. (2018) 建议将密执安棒形杆菌的 5 个亚种升级为种，即将 *C. michiganensis* subsp. *capsici*、*C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*、*C. michiganensis* subsp. *insidiosus*、*C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* 和 *C. michiganensis* subsp. *tessellarius* 重新命名为 *C. capsici*、*C. nebraskensis*、*C. insidiosus*、*C. sepedonicus* 和 *C. tessellarius*，以前亚种的模式菌株仍为新种的模式菌株 (Li et al., 2018)。2018 年国际原核生物分类委员会对近期报道的原核生物新命名种类进行评议，认为该建议不符合国际原核生物命名准则而未被采纳 (Oren & Garrity, 2018)。

5 展望

植物病原细菌的分类学研究是一个复杂且争议不断的过程，传统的植物病原细菌分类主要依靠生物学特性及理化性质等指标，而最近 20 年的细菌分类研究更强调了基因序列信息的作用。核糖体 16S rRNA 序列被认为是细菌分类的金标准，同源性大于 95.0% 的菌株为一个属，大于 97.0% 则为同一个种 (Stackebrandt & Goebel, 1994)，后来区分种的标准又调整为 98.7% (Stackebrandt & Ebers, 2006)。然而 Rossi-Tamisier et al. (2015) 验证认为目前报道的很多细菌属和种并不符合该标准。随着基因测序技术的快速发展，细菌全基因组序列分析在细菌分类中开始广泛应用。ANI 是基于物种全基因组序列，通过分析比较同源基因序列来判定物种间的遗传关联性的重要参数。由于 ANI 的计算涉及大量基因，与单基因如 16S rRNA 相比，其亲缘关系计算中不受单个基因或少数基因变化的遗传速率和基因水平转移的影响 (Chan et al., 2012)。Richter & Rosselló-Móra (2009) 建议将 ANI 作为划分细菌种的指标，区分种的临界值为 95%~96%。但是，无论是 16S rRNA 同源性还是 ANI 指标都更适合细菌属的分类，而对于不同属内种的划分则需要采取不同的临界值标准。

植物病原细菌的分类具有自己独有的特点，在分类鉴定过程中既要符合细菌分类规则，也要考虑致病性等生物学特性。目前植物病原菌中常见的亚种、致病变种等的分类鉴定还缺乏基因序列同源性分类划分标准，而更多地考虑了生物学特性。当前，在棒形杆菌细菌研究中也发现了多个与原有亚种基因序列差异明显的菌株，具有命名为新亚种的可能性，预计将来会有更多的亚种被报道。虽然 Li et al. (2018) 提出的利用 ANI 指标将 5 个密执安棒形杆菌亚种上升为种的建议未被采纳，但笔者认为从细菌基因组分析角度看该建议具有一定的合理性，随着新的分类方法的不断被认可和细菌全基因组序列信息的快速增加，相信该属的分类也将会逐渐变得更加科学和完善。

参考文献 (References)

- Bach HJ, Jessen I, Schloter M, Munch JC. 2003. A TaqMan-PCR protocol for quantification and differentiation of the phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subspecies. *Journal of Microbiological Methods*, 52(1): 85-91
- Biddle JA, McGee DC, Braun EJ. 1990. Seed transmission of *Clavibacter michiganense* subsp. *nebraskensis* in corn. *Plant Disease*, 74(11): 908-911
- Carlson RR, Vidaver AK. 1982. Bacterial mosaic, a new corynebacterial disease of wheat. *Plant Disease*, 66(1): 76-79
- Chan JZM, Halachev MR, Loman NJ, Constantinidou C, Pallen MJ. 2012. Defining bacterial species in the genomic era: insights from the genus *Acinetobacter*. *BMC Microbiology*, 12: 302
- Close R, Mulcock AP. 1972. Bacterial wilt, *Corynebacterium insidiosum* (McCulloch, 1925) Jensen, 1934 of lucerne in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 15(1): 141-148
- Cormack MW. 1961. Longevity of the bacterial wilt organism in alfalfa hay, pod debris, and seed. *Phytopathology*, 51(4): 260-261
- Davis MJ, Gillaspie AGJ, Vidaver AK, Harris RW. 1984. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov. subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov. pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34(2): 107-117
- Eichenlaub R, Gartemann KH. 2011. The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 49: 445-464
- Eichenlaub R, Gartemann KH, Burger A. 2006. *Clavibacter michiganensis*, a group of Gram-positive phytopathogenic bacteria. // Gnanamanickam SS. *Plant-associated bacteria*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 385-421

- EPPO. 2013. PM 7/42 (2) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. OEPP/EPPO Bulletin, 43(1): 46–67
- Evtushenko LI, Dorofeeva LV, Subbotin SA, Cole JR, Tiedje J. 2000. *Leifsonia poae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of ‘*Corynebacterium aquaticum*’ Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (ex Leifson 1962) gen. nov., nom. rev., comb. nov. and *Clavibacter xyli* Davis et al. 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis et al. 1984) gen. nov., comb. nov. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 50(1): 371–380
- Fahy PC, Persley GJ. 1983. Plant bacterial diseases: a diagnostic guide. Sydney: Academic Press, pp. 51–54
- Fatmi M, Schaad NW. 1988. Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* from tomato seed. Phytopathology, 78(1): 121–126
- Firrao G, Locci R. 1994. Identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* using polymerase chain reaction. Canadian Journal of Microbiology, 40(2): 148–151
- Gartemann KH, Abt B, Bekel T, Burger A, Engemann J, Flügel M, Gaiagalat L, Goesmann A, Gräfen I, Kalinowski J, et al. 2008. The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. Journal of Bacteriology, 190(6): 2138–2149
- Gleason ML, Gitaitis RD, Ricker MD. 1993. Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in eastern North America. Plant Disease, 77(11): 1069–1076
- González AJ, Trapiello E. 2014. *Clavibacter michiganensis* subsp. *phaseoli* subsp. nov., pathogenic in bean. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 64(5): 1752–1755
- He YX, Zhang RX, Bai YJ, Lü DQ, Hu LS, Yu DC, Li XZ. 2004. Progress in diagnosis for potato ring rot. Chinese Potato Journal, (3): 159–162 (in Chinese) [何云霞, 张儒喜, 白艳菊, 吕典秋, 胡林双, 于德才, 李学湛. 2004. 马铃薯环腐病菌鉴定检测技术研究进展. 中国马铃薯, (3): 159–162]
- Hunt OJ, Griffin GD, Murray JJ, Pederson MW, Peadar RN. 1971. The effects of root knot nematodes on bacterial wilt in alfalfa. Phytopathology, 61(3): 256–259
- Jacques MA, Durand K, Orgeur G, Balidas S, Fricot C, Bonneau S, Quillévéré A, Audusseau C, Olivier V, Grimault V, et al. 2012. Phylogenetic analysis and polyphasic characterization of *Clavibacter michiganensis* strains isolated from tomato seeds reveal that nonpathogenic strains are distinct from *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Applied and Environmental Microbiology, 78(23): 8388–8402
- Jahr H, Bahro R, Bruger A, Ahlemeyer J, Eichenlaub R. 1999. Interactions between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. Environmental Microbiology, 1(2): 113–118
- Kaneshiro WS, Alvarez AM. 2001. Specificity of PCR and ELISA assays for hypovirulent and avirulent *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Phytopathology, 91(S): 46
- Kaneshiro WS, Mizumoto CY, Alvarez AM. 2006. Differentiation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from seed-borne saprophytes using ELISA, Biolog and 16s rDNA sequencing. European Journal of Plant Pathology, 116(1): 45–56
- Krieg NR, Holt JG. 1984. Bergey’s manual of systematic bacteriology. Volume 1: the Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria. London: Williams & Wilkins, pp. 964
- Latin R, Tikhonova I, Rane K. 1995. First report of bacterial canker of pepper in Indiana. Plant Disease, 79(8): 860
- Lewis Ivey ML, Miller SA. 2000. First report of bacterial canker of pepper in Ohio. Plant Disease, 84(7): 810
- Li X, Tambong J, Yuan K, Chen W, Xu HM, Lévesque CA, De Boer SH. 2018. Re-classification of *Clavibacter michiganensis* subspecies on the basis of whole-genome and multi-locus sequence analyses. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 68(1): 234–240
- Malvick D, Syverson R, Mollov D, Ishimaru CA. 2010. Goss’s bacterial blight and wilt of corn caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* occurs in Minnesota. Plant Disease, 94(8): 1064
- Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP, Göker M. 2013. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. BMC Bioinformatics, 14(1): 60
- Németh J, Laszlo E, Emödy L. 1991. *Clavibacter michiganensis* ssp. *insidiosus* in lucerne seeds. EPPO Bulletin, 21(4): 713–718
- Oh EJ, Bae C, Lee HB, Hwang IS, Lee HI, Yea MC, Yim KO, Lee S, Heu S, Cha JS, et al. 2016. *Clavibacter michiganensis* subsp. *capsici* subsp. nov., causing bacterial canker disease in pepper. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 66(10): 4065–4070
- Oren A, Garrity GM. 2018. Notification that new names of prokaryotes, new combinations, and new taxonomic opinions have appeared in volume 68, part 1, of the IJSEM. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 68(4): 979–981
- Pastrik KH. 2000. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. European Journal of Plant Pathology, 106(2): 155–165
- Ren XZ. 1994. Classification and identification of plant pathogenic bacteria. Beijing: China Agriculture Press, pp. 198–203 (in Chinese) [任欣正. 1994. 植物病原细菌的分类和鉴定. 北京: 中国农业出版社, pp. 198–203]
- Richter M, Rosselló-Móra R. 2009. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(45): 19126–19131
- Rossi-Tamisier M, Benamar S, Raoult D, Fournier PE. 2015. Cautionary tale of using 16S rRNA gene sequence similarity values in identification of human-associated bacterial species. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 65(6): 1929–1934

- Schuster ML, Smith CC, Smith DJ. 1983. Population trends of epiphytic *Corynebacterium nebraskense* on leaves of popcorn genotypes. *Fitopatologia Brasileira*, 8(2): 237–242
- Smidt M, Vidaver AK. 1986. Population dynamics of *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskense* in field-grown dent corn and popcorn. *Plant Disease*, 70(11): 1031–1036
- Stackebrandt E, Ebers J. 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today*, 33: 152–155
- Stackebrandt E, Goebel BM. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(4): 846–849
- Trapiello E, González AJ. 2012. Diversity of culturable bacteria and occurrence of phytopathogenic species in bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.) preserved in a germplasm bank. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59(8): 1597–1603
- Vidaver AK, Mandel M. 1974. *Corynebacterium nebraskense*, a new, orange-pigmented phytopathogenic species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 24(4): 482–485
- Wang JS. 2000. Plant pathogen bacteriology. Beijing: China Agriculture Press, pp. 87–56 (in Chinese) [王金生. 2000. 植物病原细菌学. 北京: 中国农业出版社, pp. 87–56]
- Yasuhara-Bell J, Alvarez AM. 2015. Seed-associated subspecies of the genus *Clavibacter* are clearly distinguishable from *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 65(3): 811–826
- Yasuhara-Bell J, Kubota R, Jenkins DM, Alvarez AM. 2013. Loop-mediated amplification of the *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* *micA* gene is highly specific. *Phytopathology*, 103(12): 1220–1226
- Yim KO, Lee HI, Kim JH, Lee SD, Cho JH, Cha JS. 2012. Characterization of phenotypic variants of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolated from *Capsicum annuum*. *European Journal of Plant Pathology*, 133(3): 559–575
- Yin YN, Zhang XM, Guo JH. 2006. Bacterial diseases of winter wheat. *Jiangsu Agricultural Sciences*, (6): 159–162 (in Chinese) [尹燕妮, 张晓梅, 郭坚华. 2006. 小麦的细菌性病害. *江苏农业科学*, (6): 159–162]
- Zaluga J, Heylen K, van Hoorde K, Hoste B, van Vaerenbergh J, Maes M, de Vos P. 2011. *GyrB* sequence analysis and MALDI-TOF MS as identification tools for plant pathogenic *Clavibacter*. *Systematic & Applied Microbiology*, 34(6): 400–407
- Zaluga J, van Vaerenbergh J, Stragier P, Maes M, de Vos P. 2013. Genetic diversity of non-pathogenic *Clavibacter* strains isolated from tomato seeds. *Systematic & Applied Microbiology*, 36(6): 426–435
- Zgurskaya HI, Evtushenko LI, Akimov VN, Kalakoutskii LV. 1993. *Rathayibacter* gen. nov., including the species *Rathayibacter rathayi* comb. nov., *Rathayibacter tritici* comb. nov., *Rathayibacter iranicus* comb. nov., and six strains from annual grasses. *International Journal of Systematic Systematic Bacteriology*, 43(1): 143–149
- Zhao WJ, Feng JJ. 2017. Imported plant quarantine pests in China: bacteria volume. Beijing: China Agriculture Press, pp. 53–75 (in Chinese) [赵文军, 冯建军. 2017. 中国进境植物检疫性有害生物: 细菌卷. 北京: 中国农业出版社, pp. 53–75]
- Zinniel DK, Lambrecht P, Harris NB, Feng ZY, Kuczmariski D, Higley P, Ishimaru CA, Arunakumari A, Barletta RG, Vidaver AK. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5): 2198–2208

(责任编辑:李美娟)