

苜蓿细菌性病害研究进展

张振粉, 南志标*

(草地农业生态系统国家重点实验室 兰州大学草地农业科技学院, 甘肃 兰州 730020)

摘要:综述了国内外在苜蓿细菌性病害方面的研究概况。全世界现已报道 9 种苜蓿细菌性病害, 它们是由 8 种细菌病原引起的, 这些细菌分属于 6 个属。其中由革兰氏阳性细菌引起的病害 1 种, 即苜蓿细菌性萎蔫病(*Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*); 革兰氏阴性菌引起的病害有 8 种, 即细菌性芽萎蔫病(*Erwinia persicina*), 细菌性芽腐烂病(*Erwinia chrysanthemi*), 根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*), 冠腐和根腐综合病(*Pseudomonas viridiflava*), 细菌性叶斑病和细菌性猝倒病为同一病原(*Xanthomonas campestris* pv. *alfalfae*), 细菌性茎疫病(*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*)和矮化病(*Xylella fastidiosa*)。我国已报道危害较轻的细菌性叶斑病(*X. campestris* pv. *alfalfae*)和细菌性茎疫病(*P. syringae* pv. *syringae*)以及 2012 年新报道的细菌性芽萎蔫病(*E. persicina*)。本文归纳了苜蓿细菌性病害的种类及其特征; 列举了病害的分布及其寄主范围; 详述了它们的症状识别与病原表型特征; 介绍了当前常见的苜蓿细菌病原鉴定方法, 即形态、生理和生化表型特征鉴定, 系统发育如 16S rRNA 序列分析以及自动化数值分析如 Biolog 自动鉴定系统。

关键词:苜蓿; 细菌病害; 病原特征; 症状特征; 鉴定方法; 种带细菌

中图分类号:S816; S435.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-5759(2014)04-0330-13

DOI:10.11686/cyxb20140440

苜蓿(*Medicago sativa*)是最重要的多年生豆科牧草, 在我国用作农作物的耕作历史已有两千多年^[1]。苜蓿产量高, 具有保持水土和改善土壤结构的功能, 是北半球温带地区最主要的牧草和草品产业化、草田轮作的首选豆科牧草, 在农牧业生产中有着不可替代的作用^[2]。病害(真菌、细菌、病毒、线虫和寄生性种子植物)是苜蓿生产的主要限制因素之一^[3-5]。目前关于苜蓿病害的研究工作多集中于苜蓿真菌性病害^[6-12], 而对于苜蓿细菌性病害的研究则较少。据美国植物病理学会 2010 年统计结果, 苜蓿真菌性病害国际报道 37 种, 病毒性病害 12 种, 线虫病害 12 种, 而苜蓿细菌性病害只有 7 种。国外关于苜蓿细菌性病害的研究主要包括苜蓿细菌性萎蔫病(*Clavibacter michiganense* subsp. *insidiosus*)^[13]、细菌性茎疫病(*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*)^[14]、细菌性芽腐烂病(*Erwinia chrysanthemi*)^[15]、细菌性叶斑病(*Xanthomonas campestris* pv. *alfalfae*)^[16]、根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)、冠腐和根腐综合病(*Pseudomonas viridiflava*)和矮化病(*Xylella fastidiosa*)^[17]; 国内关于苜蓿细菌性病害的研究仅有 Zhang 和 Nan^[18]于 2012 年新报道的苜蓿细菌性芽萎蔫病(*Erwinia persicina*)以及俞大绂和方中达^[19]、方中达与任欣正^[20]、刘若^[21]、南志标和员宝华^[7]等报道的危害程度较轻的细菌性茎疫病和细菌性叶斑病。

自 1925 年 Jones^[22]报道的苜蓿细菌性萎蔫病害, 之后世界不同国家陆续在不同苜蓿种植区发现细菌性萎蔫病。据 Nyvall^[17]报道, 苜蓿细菌性萎蔫病可在所有苜蓿种植区发生。随着苜蓿种植在世界范围越来越普及的同时, 各个国家对苜蓿细菌性萎蔫病保持高度警惕, 并且苜蓿上其他细菌性病害也逐渐受到植物病理学工作者的重视。目前尤其是国内对苜蓿细菌性病害的认识还不是很深入, 对病害种类及其特征、防治方法等方面也需要全面的总结以往的工作, 同时, 开展包括防治方法在内的新的内容。本文着重综述了国内外苜蓿细菌性病害研究情况, 明白其分布及寄主范围; 详述其症状和病原识别特征; 归纳室内常见鉴定手段和有效的防治方法; 提出了我国目前急需开展的苜蓿细菌性病害研究的几点建议; 旨在为防止苜蓿细菌性病害在国内爆发及流行提供理论基础,

收稿日期: 2012-06-14; 改回日期: 2012-07-09

基金项目: 973 项目课题(2014CB138704)和国家牧草产业技术体系(病虫害防控室主任、病害防控岗位科学家)资助。

作者简介: 张振粉(1984-), 男, 福建霞浦人, 博士。E-mail: zhangzf_10@lzu.edu.cn

* 通讯作者。E-mail: zhibiao@lzu.edu.cn

为苜蓿细菌性病害的防治提供基础资料。

1 病害种类及其特征

1.1 细菌性芽萎蔫病

症状:细菌性叶斑病主要发生于芽上。初为苜蓿芽脱水、黄化;在 24~48 h 内芽停止生长、萎蔫、变褐和伴有菌脓溢出。

病原:桃色欧文氏菌(*E. persicina*)。菌体杆状,大小为 $(0.5\sim1.0)\mu\text{m}\times(1.0\sim3.0)\mu\text{m}$ 。革兰氏阴性,无芽孢,无荚膜,兼性厌氧型,能运动。营养琼脂上菌落小,表面微凸,半透明,边缘整齐。最适生长温度为 28~30℃,36℃也能生长,可在 5% NaCl 营养肉汤中生长。发酵型,能从葡萄糖、阿拉伯糖、乳糖、棉籽糖、鼠李糖、甘露醇、蔗糖、甘油产酸,不能从木糖、肌醇、松三糖、苦杏仁苷产酸。氧化酶阴性,接触酶阳性。还原硝酸盐。不能液化明胶,不产生吡啶、精氨酸双水解酶、苯丙氨酸脱氨酶以及脲酶。V-P 反应阳性,ONPG 反应阳性。水解酪蛋白。利用柠檬酸盐。可存活于植物种子^[18]。此属细菌多为植物致病菌。

1.2 细菌性芽腐烂病

症状:主要发生于芽上。种子刚萌发的根上出现半透明的黄色色斑,24~48 h 之内种子变黄,停止生长紧接着黄化,芽上附着大量细菌,散出气味。该病害可通过种子接触迅速传播,可以毁坏苜蓿芽整个生产^[15]。高湿及适合的生长温度(28℃)常使腐烂加重,当气温将至 21℃时,发病率明显降低。

病原:菊欧文氏菌(*E. chrysanthemi*),现为菊果胶杆菌(*Pectobacterium chrysanthemi*)。菌体杆状,大小为 $(0.5\sim1.0)\mu\text{m}\times(1.0\sim3.0)\mu\text{m}$,圆形末端,单生或对生。革兰氏阴性菌。以周生鞭毛运动。可发酵,兼性厌氧。最适生长温度为 27~30℃,最高生长温度 40℃。氧化酶阴性,接触酶阳性。可降解蔗糖,水解明胶和果胶,不能降解淀粉。可于 5% 的 NaCl 中微弱生长。可产生吡啶。可使马铃薯软腐,对红霉素过敏。卵磷脂酶和磷酸酶阳性,脲酶阴性。可以从葡萄糖中产气。不能从麦芽糖、 α -甲基-D-葡萄糖苷、乳糖、卫矛醇、海藻糖和帕拉金糖产酸。此属细菌可引起植物病害类型有,疫病,溃疡,顶梢枯死,叶斑,萎蔫病,植物组织变色,根腐,茎腐,冠腐和果实腐烂等。Pierce 和 Mc Cain^[15]报道,该菌不能在苜蓿种子上存活超过 14 d。菊欧文氏菌在菊花(*Dendranthema morifolium*)上造成的菊基腐病是我国重要检疫性病害之一。

1.3 冠瘿病

症状:冠瘿病又称根癌病,主要发生于苜蓿的根部。在苜蓿较大的次生根上形成分枝的瘤状结构。在交叉的瘿上,有褐色不规则结构的大片区域。

病原:根癌土壤杆菌(*A. tumefaciens*),有 3 个变种^[23]。菌体杆状,单个或成对排列。不形成芽孢。革兰氏阴性,以 1~6 根周毛运动。严格好氧,以氧分子为末端电子受体。最适生长温度为 25~28℃。菌落通常凸起。全缘光滑,无色至浅灰黄色。接触酶阳性,通常氧化酶和脲酶阳性。可产生 3-酮基乳糖。可广泛利用碳水化合物、有机酸盐和氨基酸作为碳源,但不能利用纤维素、淀粉、琼脂糖和半乳糖等。未见种传报道,多为土壤传播。此属细菌多可以引致植物细胞的自发增生而成为肿瘤细胞^[23]。

1.4 细菌性冠腐和根腐综合病

症状:细菌性冠腐和根腐综合病可为害各个生长期的苜蓿植株。该病初发生时,在种植地零散地出现。感病植株的一系列病变为,黄化,褪绿,并表现为萎蔫状,进而萎蔫,坏死,植株矮化和叶子畸形。

病原:苜蓿细菌性冠腐和根腐综合病的病原为绿黄假单胞菌(*P. viridiflava*)。菌体杆状,大小为 $(0.5\sim1.0)\mu\text{m}\times(1.5\sim5.0)\mu\text{m}$ 。革兰氏阴性,极生鞭毛运动。严格需氧菌,进行严格的呼吸型代谢,以氧为最终电子受体。5%蔗糖营养琼脂上,菌落常黄色;在含酵母膏和甘油培养基上,菌落为橄榄绿到金黄色。有些菌株可产生蓝色色素。氧化酶阴性。可以利用酒石酸盐,丙酮酸酯和山梨醇;不能利用棉籽糖,延胡索酸酯戊二酸盐和蔗糖。此菌在高湿和下雨条件下最为活跃,可随雨流传播,多为植物致病菌。

1.5 细菌性叶斑病和猝倒病

症状:细菌性叶斑病主要发生于叶片上。初为小而圆的水渍状病斑、黄色、分散;后期呈不规则形,淡褐色。叶片背面水渍状边缘明显。病部中心干枯呈纸状,有发亮的淡黄至棕褐色半透明菌膜。此病害引起植株严重落

叶,易被真菌病害病斑掩盖。

症状:猝倒病主要发生于苜蓿生长的苗期。幼苗大多从茎基部感病,初为水渍状,并很快扩展、溢缩变细如“线”样,病部不变色或呈黄褐色,病势发展迅速,在子叶仍为绿色、萎蔫前即从茎基部(或茎中部)倒伏而贴于床面。

病原:苜蓿细菌性叶斑和猝倒病的病原均为野油菜黄单胞菌苜蓿致病变种(*X. campestris* pv. *alfalfae*)^[16]。菌体杆状,大小为(0.4~0.6) $\mu\text{m} \times$ (0.8~2.0) μm ,单生,对生或呈短链状。革兰氏阴性,单极生鞭毛运动。严格需氧菌,进行严格的呼吸型代谢,以氧为最终电子受体。营养琼脂上,菌落常黄色,光滑呈奶油状,类粘蛋白或具粘性。其色素系具特色的溴化芳基多烯酶,一般称之为黄单胞菌色素(Xanthomonadins)。没有硝化作用或反硝化作用的发生。常可产生 H_2S ,不产吡嗪。可存活于植物种子。此属细菌多为植物致病菌。

1.6 细菌性茎疫病

症状:细菌性茎疫常发生于早春直至第1个收获期,通常在茎的第5节以下发病。发病初期水渍状并且在叶茎连接点、叶中脉和叶柄处褪绿。病斑成线形,由淡褐色转褐色并最终呈黑色。病斑逐渐向下发展,延至老根中。细菌渗出物可出现在叶表面,与病处接触可使叶子褪色且死亡。发病茎秆薄而脆,普遍短于正常植株^[14,19]。

病原:丁香假单胞菌萨氏致病变种(*P. syringae* pv. *syringae*)。菌体杆状,大小为(0.7~1.2) $\mu\text{m} \times$ 1.5 μm 。没有菌柄也没有鞘。不产芽孢。革兰氏阴性,以数根极毛运动。需氧,进行严格的呼吸型代谢,以氧为最终电子受体。不产生黄单胞菌素。不能在酸性条件下生长。在营养琼脂上,圆形和白色的菌落缓慢生长,直径2~3 mm。氧化酶阴性。从蔗糖产果聚糖,不能使果胶凹陷。不能积累聚- β -羟基丁酸盐为储藏物质。不能反硝化,精氨酸双水解酶阴性。能在甘露醇、甜菜碱、肌醇、山梨糖醇、胡芦巴碱、奎尼酸盐、赤藓糖醇和L-乳酸盐中生长。不能在L-酒石酸盐、氨基苯甲酸盐和高丝氨酸中生长。该属细菌可存活于植物种子,存在多种致病变种,对多种植物致病。

1.7 细菌性萎蔫病

症状:此病明显的症状是植株矮化,丛枝,颇似由病毒引致的“鬼帚病”。但在水肥等条件不良,牧草普遍长势欠佳时,该症状就不明显。发病植株叶绿素含量下降^[24],故色泽浅淡,多呈浅绿,黄色,天气炎热时或呈淡褐色。病株叶片细小,卷缩。天气干热时,株顶萎垂、干枯,甚至全株枯萎。刈割后再生草的矮化尤其显著。每刈之后,植株愈益纤弱。病株常在越冬时死亡。以致草地逐年稀疏,牧草甚或绝迹。

病株的根部和茎部的维管束发生病变。主根和侧根的木质部变为黄色,橙色,褐色,有时还杂以深色斑点。病变在横切面上极为明显。此病所引致的木质部变色,不限于根颈和主根上部,可一直延伸到根梢。与冻害引致的木质部变色有所区别。病根表面有时出现棕红色或褐色溃疡状病斑。由于根、茎维管束系统破坏,病株地上部分常部分或全部凋萎。

病原:密执安诡异棍状杆菌(*C. michiganense* subsp. *insidiosus*)。菌体杆状,末端圆形,单生或成对,但不成链状。大小为(0.4~0.5) $\mu\text{m} \times$ (0.7~1.0) μm 。无鞭毛,不运动。不产芽孢。革兰氏阳性。琼脂培养基上的菌落圆形,扁平或稍隆起,光滑,具光泽,粘稠。在马铃薯上或马铃薯蔗糖琼脂培养基上渐变为蓝色或淡紫色^[24]。可发酵葡萄糖、蔗糖、乳糖和半乳糖,但不产气。不产生 H_2S 和氨。不能还原硝酸盐,缓慢水解淀粉。最适生长温度23℃,致死温度51~52℃。此菌有很多菌系,毒力差异很大。可在种子和植物残体中长期存活并传播。密执安棍状杆菌存在多个亚种,可致使多种农作物萎蔫病。

1.8 矮化病

症状:该病最明显的症状为植株矮化。病株常有蓝绿色小叶和短小的茎。主根大小正常,但切开后,维管束黄化,伴随着暗色条状死组织。在新感染的植株中黄化一般出现在皮下的一圈。病株矮化并最终死亡。

病原:苛求木杆菌(*X. fastidiosa*)。该菌对营养条件有严格要求。革兰氏阴性,为木质部栖息菌。菌体杆状,单生,大小为(0.25~0.5) $\mu\text{m} \times$ (1.0~4.0) μm 。不运动。需氧,进行严格的呼吸型代谢,以氧为最终电子受体。菌落奶油色至白色。凸起呈垫状,光滑,整个边缘呈乳白光和脐状凸起粗糙的具波纹状的边缘。氧化酶阴性,接触酶阳性。最适生长温度26~28℃,最适 pH 值 6.5~6.9。苛求木杆菌在葡萄(*Vitis vinifera*)上可造成严重的 Pierce's 病。该病原未见种传报道。

2 病害分布及寄主范围

苜蓿细菌性病害在世界多个国家不同程度的危害苜蓿的生产,并且伴随苜蓿的各个不同生长期。苜蓿芽腐烂病,猝倒病,茎疫病,叶斑病,冠瘿病,冠腐和根腐综合病,苜蓿矮化病以及在苜蓿 3 年以上种植区可以发生毁灭性危害的细菌性萎蔫病。所以,详细了解苜蓿细菌性病害的分布有助于我们综合评价引进苜蓿品种和选择苜蓿产地。苜蓿细菌性病害广泛分布于世界各个苜蓿种植区(表 1),主要集中在美洲,欧洲和亚洲。大部分病原菌

表 1 苜蓿细菌性病害的分布及其病原寄主范围
Table 1 Distribution and host range of alfalfa bacterial diseases

苜蓿细菌性病害 Alfalfa bacterial disease	分布 Distribution	病原寄主范围 Host of pathogen
细菌性芽萎蔫病(<i>E. persicina</i>) Bacterial sprout wilt	中国兰州 Lanzhou, China ^[18] .	苜蓿 <i>Medicago sativa</i> , 菜豆 <i>Phaseolus vulgaris</i> ^[25] , 豌豆 <i>Pisum sativum</i> ^[26] .
细菌性芽腐烂病(<i>P. chrysanthemi</i>) Bacterial sprout rot	美国加利福尼亚 California, America, 贝兹维尔 Batesville ^[17] .	苜蓿 <i>Medicago sativa</i> , 菊 <i>Dendranthema morifolium</i> ^[27] .
冠瘿病(<i>A. tumefaciens</i>) Crown gall	广泛分布 Widespread ^[20] .	广泛寄生 Wide range ^[16,23] .
冠腐和根腐综合病(<i>P. viridiflava</i>) Crown and root rot complex	未知 Unknown ^[17] .	苜蓿 <i>Medicago sativa</i> , 油菜 <i>Brassica campestris</i> ^[28] , 豌豆 <i>Pisum sativum</i> ^[29] , 婆婆纳 <i>Hebe</i> spp. ^[30] , 西瓜 <i>Citrullus lanatus</i> ^[31] , 猕猴桃 <i>Actinidia</i> spp. ^[32] , 洋葱 <i>Allium cepa</i> ^[33] , 金盏花 <i>Calendula officinalis</i> ^[34] .
细菌性茎疫病(<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>) Bacterial stem blight	美国西北部 North-western of America ^[17] , 伊朗西部 West of Iran ^[14] , 中国东北(沙尔图)畜牧场 A farm in northeast of China ^[19] .	苜蓿 <i>Medicago sativa</i> , 豇豆 <i>Vigna unguiculata</i> ^[16] , 蚕豆 <i>Vicia faba</i> ^[16] , 丁香 <i>Syringa</i> spp. ^[16] , 三叶草 <i>Trifolium repens</i> ^[16] , 小麦 <i>Triticum aestivum</i> ^[16] , 葡萄 <i>Vitis vinifera</i> ^[16] , 高粱 <i>Sorghum bicolor</i> ^[16] , 梅花 <i>Prunus mume</i> ^[16] , 梨 <i>Pyrus</i> spp. ^[35] , 紫丁香 <i>Syringa oblata</i> ^[36] , 哈密瓜 <i>Cucumis melo</i> var. <i>saccharinus</i> ^[37] , 西红柿 <i>Lycopersicon esculentum</i> ^[38] , 火棘 <i>Pyracantha coccinea</i> ^[39] .
细菌性叶斑病(<i>X. campestris</i> pv. <i>alfalfae</i>) Bacterial leaf spot; 细菌性猝倒病(<i>X. campestris</i> pv. <i>alfalfae</i>) Damping off	美国堪萨斯 Kansas, America ^[40] , 澳大利亚昆士兰 Queensland, Austria ^[41] , 中国江苏 Jiangsu Province, China ^[19] , 北京 Beijing, China ^[42] , 新疆 Xinjiang Province, China ^[7,43] , 及湿润温暖的种植区 Wherever alfalfa is grown under warm, wet conditions ^[17] .	苜蓿 <i>Medicago sativa</i> , 三叶草 <i>Trifolium repens</i> ^[16] .
细菌性萎蔫病(<i>C. michiganense</i> subsp. <i>insidiosus</i>) Bacterial wilt	美国 America, 加拿大 Canada, 墨西哥 Mexico, 捷克 Czech, 希腊 Greece, 爱尔兰 Ireland, 意大利 Italy, 波兰 Poland, 罗马尼亚 Romania, 俄罗斯 Russian, 英国 England, 南斯拉夫 Yugoslavia, 突尼斯 Tunisia, 南非 South Africa, 巴西 Brazil, 智利 Chile, 沙特阿拉伯 Saudi Arabia, 土库曼斯坦 Turkmenistan, 澳大利亚 Australia, 新西兰 New Zealand, 印度 India ^[44] .	苜蓿 <i>Medicago sativa</i> .
矮化病(<i>X. fastidiosa</i>) Dwarf	美国(加利福尼亚州, 乔治亚州等) America (California, Georgia, et al.) ^[17] .	苜蓿 <i>Medicago sativa</i> , 桑树 <i>Morus alba</i> ^[45] , 葡萄 <i>Vitis vinifera</i> ^[46] , 夹竹桃 <i>Nerium indicum</i> ^[47] , 桃树 <i>Amygdalus persica</i> ^[48] , 咖啡 <i>Coffea</i> spp. ^[49] , 杏仁 <i>Amygdalus communis</i> ^[50] , 橡树 <i>Quercus palustris</i> ^[51] , 鳄梨 <i>Persea americana</i> ^[52] , 柑橘 <i>Citrus reticulata</i> ^[53] .

最适的生长条件一致,22~27℃,相对湿度 100%等,但不同病害的病原对寄主生长部位要求存在差异,如欧文氏菌属的两种菌寄生于苜蓿芽上,根癌土壤杆菌引起根部细胞增生,苛求木杆菌为木质部栖息菌,对生境要求苛刻等,这可能与某些组织具有特殊的营养物质有关。因此同一病原可能在不同作物上表现出不同的症状,也可能在不同地理环境的同一植物上表现出不同危害现象。阴性致病细菌的寄主范围比较广泛,而诡异密执安棒状杆菌寄主窄,目前仅见它侵染苜蓿。各致病菌的寄主范围详见表 1。

3 病原细菌常用鉴定方法

苜蓿细菌性病害病原的分类结合了表型特征和遗传学特征鉴定手段,如研究较深入的密执安诡异棍状杆菌(*C. michiganense* subsp. *insidiosus*)^[54]。表型是指由于基因与环境因素相互作用所引起的,在细胞、器官和整体水平上可检测到和观察到的特征。细菌的表型分类依据主要为细菌的形态学特征和不同实验条件的生长能力及代谢特征等,可区分不同的菌种,但不能区分不同的菌株^[55]。遗传型信息主要为菌体内核酸(DNA 和 RNA),当前较为常用的是 rRNA 测序,它是细菌分类的系统发育框架之基础。此技术同样存在缺点,即同种 rRNA 操纵子是多拷贝的,不同拷贝间 16S rRNA 有 0~5%的差异,不同菌株间亦有 0~16%的差异,因此在评价结果时应谨慎处理。应用多相鉴定方法可使鉴定结果更为可靠,是现代细菌分类中的主流。在此我们简要地列出了细菌分类学中常用的分类依据和特征(表 2)。

表 2 细菌分类学中应用的类别和特征^[56]
Table 2 Categories and characters applied in bacterial systematics^[56]

类别 Categories	实例 Examples
培养特性 Cultural	<u>菌落形态 Colony morphology</u> ;菌落的颜色 Color of colonies;子实体 Fruiting bodies;菌丝 Mycelia.
<u>形态特性 Morphological</u>	细胞形态 Cell morphology;细胞大小 Cell size;运动性 Motility;鞭毛类别 Flagellation type;储存物质 Reserve materials;革兰氏染色 Gram stain;抗酸染色 Acid-fast stain.
<u>生理特性 Physiological</u>	温度范围 Temperature range;pH 范围 pH range;耐盐性 Salinity tolerance.
<u>生化特征 Biochemical</u>	碳源利用 Carbon source utilization;糖类的氧化作用 Oxidation of carbohydrates;糖类发酵 Fermentation of carbohydrates;酶 Enzyme profile.
抑制测试 Inhibitory tests	选择性培养基 Selective media; <u>抗生素 Antibiotic</u> ;染料 Dyes.
血清学特征 Serological	凝集作用 Agglutination;免疫扩散 Immunodiffusion.
化学分类 Chemotaxonomic	<u>脂肪酸 Fatty acids</u> ;极性油脂 Polar lipids; <u>枝菌酸 Mycolic acids</u> ;脂多糖成分 Lipopolysaccharide composition; <u>脂多糖聚丙酰胺凝胶电泳 PAGE of lipopolysaccharide</u> ;细胞壁二氨基酸 Cell wall diaminoacids;细胞壁氨基酸成分 Cell wall aminoacids composition;全细胞糖 Whole cell sugars;细胞壁糖 Cell wall sugars; <u>细胞色素 Cellular pigments</u> ; <u>醌类系统 Quinone systemi</u> ;多胺含量 Polymine content;全细胞蛋白质聚丙酰胺凝胶电泳 Whole cell protein PAGE.
基因型特征 Genotypic	<u>脱氧核糖核酸碱基比[(G+C)%] DNA base ratio (G+C-content)</u> ;随机扩增脱氧核糖核酸多态性分析 Random amplified polymorphic DNA(RAPD);限制性片段长度多态性分析 Restriction fragment length polymorphism(RFLP);脱氧核糖核酸片段脉冲凝胶电泳 Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) of DNA fragments;脱氧核糖核酸探针 DNA probes.
系统发育 Phylogenetic	脱氧核糖核酸与脱氧核糖核酸杂交 DNA;DNA hybridization;脱氧核糖核酸与核蛋白糖核酸杂交 DNA;rRNA hybridization; <u>16S rRNA 序列 16S rRNA sequence</u> ;23S rRNA 序列 23S rRNA sequence;ATP 合成酶的 β 亚基序列 Sequence of the β-subunit of ATP-synthase;伴侣蛋白序列 GroEL (Chaperonin) sequence.

下划线表示应用在苜蓿细菌性病害病原的表型鉴定中的类别。Characters correspondent to alfalfa bacterial diseases are shown underline.

3.1 表型特征鉴定

细菌的表型分类技术包括形态学特征、生理生化特征、抗生素的敏感性、噬菌体分型、血清学分析、蛋白质分析等,在细菌分类中具有重要意义。形态学特征始终被用作细菌分类和鉴定的重要依据之一,而且也往往是系统发育相关性的一个标志。在细菌系统分类中众多传统的生化、营养和生理特征测试业已建立,例如氧化发酵^[57]、

细胞色素氧化酶^[58-60]、接触酶^[61]、氨肽酶^[62-63]和 KOH 测试^[64-66]等试验。一般情况下这些试验是在固体或液体培养基中进行的,耗时耗力,常常也难以标准化和诠释^[55]。但是值得强调的是传统的这些测试存在重要意义,尤其是这些表型特征对于分类单位的划定具有重要作用。实际上,在现代细菌分类中,任何能稳定地反映细菌种类特征的资料都有分类学意义,都可以作为分类鉴定的依据。在苜蓿细菌性病害病原的鉴定中形态学特征等表型特征仍然扮演着不可或缺的角色。现将几种苜蓿细菌性病害病原的表型鉴定特征列出,以飨植物病理工作者(表 3)。

表 3 几种苜蓿细菌性病害病原鉴定特征^(a)

Table 3 Phenotypic characters of pathogens of alfalfa bacterial diseases^(a)

特征 Characteristic	菊欧文氏菌 <i>Erwinia chrysanthemi</i> ^(b)	特征 Characteristic	桃色欧文氏菌 <i>Erwinia persicina</i> ^(c)
最适温度 Temperature optimum (℃)	27~30	粉红色素 Pink diffusible pigment	+
接触酶 Catalase	+	氧化酶 Oxidase	—
休加利夫森 Hugh-Leifson	+	接触酶 Catalase	+
生长于 37℃ Growth at 37℃	+	硝酸盐还原 Nitrate reduction	+
蔗糖降解 Sucrose reduction	+	V-P 反应 V-P reaction	+
生长于 5% NaCl Growth in 5% NaCl	Weak+	七叶灵水解 Hydrolysis of aesculin	+
产吲哚 Indole production	+	利用柠檬酸 Citrate utilization	+
卵磷脂酶 Lecithinase	+	产吲哚 Indole production	—
磷酸酶 Phosphatase	+	产生乙偶姻 Production of acetoin	+
红霉素 Erythromycin	Sensitive	精氨酸脱羧酶 Arginine dihydrolase	—
马铃薯软腐 Potato soft rot	+	产酸 Acid from:	
产气自葡萄糖 Gas from glucose	+	核糖 D-ribose	+
果胶降解 Pectate degradation	+	麦芽糖 Maltose	+
明胶水解 Gelatin liquefaction	+	蔗糖 Sucrose	+
脲酶 Urease	—	阿拉伯糖 L-arabinose	—
产酸 Acid from:		卫矛醇 Dulcitol	—
麦芽糖 Maltose	—	甘油 Glycerol	—
α-甲基-D-葡萄糖苷 α-Methyl-D-glucoside	—	来苏糖 Lyxose	—
乳糖 Lactose	—	淀粉 Starch	—
海藻糖 Trehalose	—		
卫矛醇 Dulcitol	—		
帕拉金糖 Palatinose	—		

特征 Characteristic	密执安诡异棍状杆菌 <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>insidiosus</i> ^(d)	特征 Characteristic	丁香假单胞菌 <i>Pseudomonas syringae</i> ^(e)
葡萄糖氧化发酵 O/F metabolism of glucose	O	色素 Pigment:	
接触酶 Catalase	+	脓青素(绿脓菌素) Pyocyanin	—
细胞色素氧化酶 Cytochrome oxidase	—	绿针菌素 Chlororaphin	—
七叶灵水解 Aesculin hydrolysis	+	吩嗪单羧酸盐 Phenazine-1-carboxylate	—
马铃薯淀粉水解 Hydrolysis of potato starch	+	氧化酶 Oxidase	—
产酸 Acid from:		PHB 积累 Polyhydroxybutyrate accumulation	—
甘露糖 Mannose	+	从蔗糖产果聚糖 Levan from sucrose	+

续表 3 Continued

特征 Characteristic	密执安诡异棍状杆菌 <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>insidiosus</i> ^(d)	特征 Characteristic	丁香假单胞菌 <i>Pseudomonas syringae</i> ^(e)
甘露醇 Mannitol	—	果胶凹陷 Pectate gel pitting	—
鼠李糖 Rhamnose	—	β-葡萄糖苷酶 β-glucosidase	—
半乳糖 Galactose	+	胞外 PHB 水解 Extracellular polyhydroxybutyrate hydrolysis	—
木糖 Xylose	+	反硝化 Denitrification	—
山梨糖醇 Sorbitol	—	精氨酸双水解酶 Arginine double-hydrolase	—
利用 Utilization of:		利用 Utilization of:	
乙酸钠 Sodium acetate	—	葡萄糖 Glucose	+
琥珀酸钠 Sodium succinate	—	甘露醇 Mannitol	+
乳酸 Lactate	—	甜菜碱 Betaine	+
生长于 6% NaCl Growth at 6% NaCl	—	肌醇 Inositol	+
从蛋白胨产 H ₂ S H ₂ S from peptone	—	山梨糖醇 Sorbitol	+
甲基红 Methyl red	+	赤藓糖醇 Erythritol	+
		胡芦巴碱 Trigonelline	+
		奎尼酸盐 Quinate	+
		L-乳酸 L-lactate	+

特征 Characteristic	野油菜黄单胞菌 <i>Xanthomonas campestris</i> ^(e)	特征 Characteristic	苛求木杆菌 <i>Xylella fastidiosa</i> ^(e)
鞭毛根数 Number of flagella	1	最适温度 Temperature optimum (℃)	28
硝酸盐还原 Nitrification	—	硝酸盐还原 Nitrate reduction	—
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	—	七叶灵水解 Esculin hydrolysis	—
产黄单胞菌色素 <i>Xanthomonadins</i> production	+	抗生素敏感性 Susceptibility to:	
明胶水解 Gelatin liquefaction	d	氨苄青霉素 Ampicillin	+
七叶灵水解 Esculin hydrolysis	+	青霉素 Penicillin G	—
淀粉水解 Starch hydrolysis	d	卡那霉素 Kanamycin	+
牛奶解脲 Milk protein solution	+	链霉素 Streptomycin	—
由胨产 H ₂ S H ₂ S from peptone	+	优势脂肪酸 Predominant fatty acid:	
最高生长温度 Maximum growth temperature (℃)	35~39	C _{15:0 anteiso}	+
产酸 Acid from:		C _{16:1}	+
阿拉伯糖 Arabinose	+	C _{17:0}	+
甘露糖 Mannose	+	羟基脂肪酸 Hydroxy fatty acid;C _{10:0 2OH}	+
半乳糖 Galactose	+		
海藻糖 Trehalose	+		
纤维二糖 Cellobiose	+		
果糖 Fructose	+		

^(a): +, ≥90% 菌株为阳性; —, ≥90% 菌株为阴性; d, 11%~89% 菌株为阳性; Weak+, ≥90% 菌株为弱阳性; Sensitive, ≥90% 菌株为过敏。+, positive reaction for all or more than 90% of the strains tested; —, negative reaction for all or less than 10% of the strains tested; d, positive reaction for 11% to 89% of the strains tested; Weak+, weak positive reaction for all or more than 90% of the strains tested; Sensitive, sensitive reaction for all or more than 90% of the strains tested. ^(b): 资料来自 Pierce 和 McCain^[15]。Data from Pierce and McCain^[15]. ^(c): 资料来自 Zhang 和 Nan^[18]。Data from Zhang and Nan^[18]. ^(d): 资料来自 OEPP/EPPO Bulletin (40: 353—364, 2010)^[54]和《常见细菌系统鉴定手册》^[23]。Data from OEPP/EP-PO Bulletin (40: 353—364, 2010)^[54]and from Manual of Systematic Identification of Common Bacteria^[23]. ^(e): 资料来自《Bergey’s Manual of Syte-matic Bacteriology》(Second Edition) (Volume 2, Part B)^[67]和《常见细菌系统鉴定手册》^[23]。Data from Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology (Second Edition) Volume 2 Part B^[67] and Manual of Systematic Identification of Common Bacteria^[23].

3.2 16S rRNA 序列分析

20 世纪 70 年代初, Woese 和 Coworkers 开始将 16S rRNA 序列分析应用于原核生物的系统发育^[55]。由于 16S rRNA 在生物进化过程中变异频率较低, 大小适中(约 1.5 kb), 既含有保守序列又含可变序列, 携带了足够的遗传信息, 而且其序列变化与进化距离相适应, 因此是合适的系统发育指标, 已成为细菌分类和鉴定的一个有力工具^[54,68]。16S rRNA 序列主要通过寡核苷酸编目、克隆序列的测定、反转录直接测序、对 PCR 扩增产物的直接测序等方法获得后, 用一些必要的计算机分析软件将所得序列与基因数据库中序列进行同源性比较, 进而绘制系统进化树^[69-72]。16S rDNA 序列分析鉴定方法已在苜蓿细菌性萎蔫病菌的研究中得到应用^[54,73]。

3.3 Biolog 自动鉴定系统

Biolog 自动快速微生物鉴定系统是 1984 年美国安普中心生产的, 此系统的商品化开创了细菌鉴定史上新的一页。它的鉴定原理为微生物利用碳源进行新陈代谢时, 产生的酶能使显色物质(如 TV: Tetrazolium Violet; INT: ρ -iodonitrotetrazolium Violet)发生颜色反应; 微生物利用碳源代谢不断增殖, 浊度也会发生改变; Biolog 基于以上原理建立了每种微生物的特征代谢指纹数据, 即与微生物种类相对应的数据库, 检测时通过智能软件将待鉴定微生物的碳源指纹图谱与数据库参比, 即可得出鉴定结果。它的核心技术为鉴定板和数据库。革兰氏阴性(GN)和革兰氏阳性(GP)鉴定板中含 95 种不同碳源、胶质和四唑类显色物质。根据 2006 年的数据库显示, Biolog 能鉴定革兰氏阴性菌 524 种(106 个属)和革兰氏阳性菌 351 种(55 个属), 包括几乎全部人类病原菌, 190 种动、植物病原菌以及部分与环境有关的细菌等。Biolog 技术具有数据库容量大, 种类齐全; 鉴定结果准确率高; 鉴定周期短, 最快 4 h 出结果; 操作简单, 对操作者技术要求不高等特点。已在临床、食品、植物病理、微生物生态、兽医等领域得到广泛应用^[74-75]。

4 防治方法

4.1 植物检疫

植物检疫是一项传统植物保护措施, 苜蓿种带病原物的检疫, 是病害防治的第一道卡, 应给予高度重视。植物检疫其内容涉及植物保护中的预防、杜绝或铲除的各个方面, 也是最有效和最经济, 而且是一种具有法律强制性的一项具体措施。细菌性萎蔫病是苜蓿的一种毁灭性病害, 在美国、加拿大、澳大利亚、新西兰和日本等世界各地均有发生。苜蓿细菌性萎蔫病可以随种子和植物残体传播, 是我国出入境进出口植物检疫检验病害。菊欧文氏菌在菊花上造成的菊基腐病亦是我国重要检疫性病害之一。本文综述的苜蓿细菌性病害, 希望能在某一侧面为国内苜蓿细菌病害的检疫工作提供有益参考。

4.2 利用抗病或耐病品种

抗病或耐病品种的利用在牧草病害管理中是经济且有效的措施, 其在牧草病害可持续管理体系中居于核心与主导地位^[3]。培育抗病品种, 更是防治苜蓿细菌性病害的主要方法, 如耐寒品种可减少霜害, 从而减少侵染率进而降低细菌性茎疫病发生; 维管束数目较少, 导管较短, 皮层较厚的苜蓿品种较抗细菌性萎蔫病。

4.3 农业防治

细菌的繁殖与水分有着密切关系, 水分是细菌流动传播的载体亦是菌体大量繁殖的供体。苜蓿苗期细菌性病害的防治应注意采获种子的前期晾晒, 注重种子的储存环境, 阴凉通风不利于细菌的滋生, 注重保洁, 用 0.5% 的次氯酸钠或次氯酸钙溶液浸泡 2 h 有助防治苜蓿芽细菌腐烂病。合理的田间管理措施亦能有效防止病害侵染和流行传播。比如: 于春季播种能有效地防治细菌性叶斑病, 在霜冻期后收获或刈割, 可减轻细菌性茎疫病侵染; 提高土壤肥力, 尤其是增加磷钾肥, 可以增加苜蓿对此病的抗性, 使损失减轻; 注意地下害虫的防治; 刈割活动, 应在天气干燥, 牧草表面无液态水时进行; 新播草地应远离老龄草地, 并且安排在老龄草地的上游或地势较高; 病情较重的草地, 应翻耕轮作; 控制禾本科杂草。

4.4 生物防治

生物防治即利用自然界中生物间的“相克”作用, 从而达到有害生物的防治^[76]。南志标^[3]指出抗病品种的利用和草地的合理放牧均可属于广义的生物防治范畴。苜蓿细菌性病害的工作在国内开展还较为有限, 因此相应

的生物防治的研究工作近乎空白。毫无疑问,在生态环境日益恶化的背景下,牧草在生态环境保护及治理方面的作用将日益凸显。众所周知,化学防治中农药直接作用于牧草而残留,污染草地和整个牧草生产,通过食物链最终影响人类健康。由此更加显现出生物防治在苜蓿细菌性病害防治中具有光明的前景,应是我国亟待加强的研究领域之一。

总而言之,关于苜蓿细菌性病害的防治应以种带病原物检疫,预防为主;重视生态环境的保护,以发展生物防治为辅;培育抗病品种,加强种子采后等综合管理措施,从而达到提高苜蓿生产力。

5 展望

苜蓿细菌性病害与真菌性病害及其他类病害的研究存在较大差异,我国在此方面的研究工作也远远滞后于其他苜蓿种植国家。在 9 种已知的苜蓿细菌性病害中,对于它们的研究程度是与病害的危害程度呈正比的,尤其对于苜蓿细菌性萎蔫病的研究较其他深入。但是病害的危害程度是会随寄主、地域或特发的气候条件等而转变的。所以我们不能就因某些病害经济危害程度较轻,而对其不予足够重视。地球上 90% 左右的食用作物是以种子繁殖的,种带病原是很多农作物病害的重要初侵染源之一,是引起作物在田间和在贮藏期发病的祸根。种子携带并传播病害是很多地区发生新病害的原因。理论上任何植物病原细菌都有可能由种子传播。细菌性病害的传播形式多样,种子由于其丰富的营养条件及理想的含水量,使其成为病原寄生和再传播最为理想及隐蔽的媒介。Neergaard^[77]报道,细菌在植物种子表皮可存活 2~3 年不等,但是它们却可在种子内长久的存活。Nemeth 等^[13]指出,细菌可随苜蓿种子对原本无病区域进行生物入侵。据世界贸易图集统计结果显示,我国自 2007 年从外进口苜蓿 2160 t,并逐年剧烈增长,直至 2010 年上半年进口苜蓿量达 95079 t。一方面,世界贸易和世界气候变化全球化的同时,生物入侵对各国都是一个严峻的考验,苜蓿上细菌性病原的入侵可对苜蓿生产造成不可估量的重大经济损失,如苜蓿细菌性萎蔫病等;另一方面,目前关于苜蓿细菌性病害的调查及研究工作在我国近乎空白,一旦一些不为我们所熟悉的细菌性病害流行爆发,将对苜蓿的生产是一个严峻的考验。所以,如何用最简便的方法快速准确的识别和鉴定出病害及其病原,是植物病理工作者及所有检疫人员共同追求的目标。一方面,一些先进技术的诞生,为我们提供了解决这些问题的不同手段;另一方面,全面客观的了解一种病害及其病原特征,却不是只能靠某些先进技术就能解决的简单问题。所以在病害和病原的识别和鉴定中,结合病理工作者积累的田间经验和室内分子鉴定,自动数值鉴定(Biolog)和传统的表型特征鉴定等方法,是细菌病害及其病原鉴定方法呈现多样化形势下的趋势。综上所述,首先详尽了解苜蓿存在的细菌性病害,对我国苜蓿的进口将是一个防患于未然的有效策略;其次苜蓿种带细菌区系也是衡量种子健康的重要指标之一,随着种子进口贸易量的增加,我们有必要对苜蓿种带细菌进行详尽的探明;最后随着苜蓿种植量在国内的稳步提升,开展全面客观的存在于我国的苜蓿细菌性病害调查工作势在必行。

苜蓿品质优良、适口性好、饲用形式多样、饲用价值高和良好的生态效应,被冠以“牧草之王”的美誉。苜蓿除可以作为牧草外,近年来随着人们对苜蓿营养的不断认识,苜蓿芽正在作为一种食品被人们所接受。随之而来的苜蓿食源性中毒事件也屡有发生。民众食品安全意识的提高,将人们的眼光聚焦于食源性致病菌的最新动态。因此植物上人体致病细菌的研究将是病理研究方向的热点之一,尤其是苜蓿上的人体致病细菌。如桃色欧文氏菌不仅可以引起苜蓿芽萎蔫病,还可以引起人类尿道感染^[78],而且它是一种苜蓿种传病害,但是对于它是否可引起食源性中毒还未可知?我国草原面积辽阔,草原类型丰富,农牧交错带明显和管理程度参差不齐等因素,使得以苜蓿为主等牧草病害在时间与空间分布上呈现差异化和病害种类上呈现多样化。综合考虑,我们急需开展以下几个方面的工作:1)分离和鉴定不同苜蓿品种种带细菌,探明它们的致病性或有益作用;2)全国范围内调查天然草地与管理型草地和农牧交错带草原与农田种植草原苜蓿细菌性病害的种类及危害程度,分析它们的相互关系;3)全国范围内调查苜蓿细菌性病害的种类及其分布,初步建立苜蓿细菌性病害病原资源库;4)探索对苜蓿细菌性病害行之有效的生物等防治手段。

致谢:在论文写作过程中承蒙甘肃农业大学的陈秀蓉教授和杨成德副教授以及兰州大学草地农业科技学院副教

授段廷玉给予的建设性意见,谨此一并致谢。

参考文献:

- [1] Chen W, Shen Y Y, Robertson M J, *et al.* Simulation analysis of lucerne-wheat crop rotation on the Loess Plateau of Northern China[J]. *Field Crops Research*, 2008, 108: 179-187.
- [2] 郭玉霞, 南志标, 王成章, 等. 苜蓿根部入侵真菌研究进展[J]. *草业学报*, 2009, 18(5): 243-249.
- [3] 南志标. 建立中国的牧草病害可持续管理体系[J]. *草业学报*, 2000, 9(2): 1-9.
- [4] 南志标. 我国的苜蓿病害及其综合防治体系[J]. *动物科学与动物医学*, 2001, 18(4): 1-4.
- [5] 李春杰, 南志标. 苜蓿种带真菌及其致病性测定[J]. *草业学报*, 2000, 9(1): 27-36.
- [6] 南志标. 锈病对紫花苜蓿营养成分的影响[J]. *中国草原与牧草*, 1985, 2(3): 33-36.
- [7] 南志标, 员宝华. 新疆阿勒泰地区苜蓿病害[J]. *草业科学*, 1994, 11(4): 14-18.
- [8] Couture L, Dhont C, Chalifour F P, *et al.* *Fusarium* root and crown rot in alfalfa subjected to autumn harvests[J]. *Canadian Journal Plant Science*, 2002, 82: 621-624.
- [9] Pratt R G, Mc Laughlin M R, Pederson G A, *et al.* Pathogenicity of *Macrophomina phaseolinato* mature plant tissues of alfalfa and white clover[J]. *Plant Disease*, 1998, 82(9): 1033-1038.
- [10] 李敏权. 苜蓿根和根颈腐烂病原致病性及品种抗病性研究[J]. *中国草地*, 2003, 25(1): 39-43.
- [11] 侯天爵, Huang H C, Fraser J. 两种轮枝菌对 15 种豆科牧草的致病性[J]. *植物病理学报*, 1995, 25(2): 189-192.
- [12] 袁庆华. 我国苜蓿病害研究进展[J]. *植物保护*, 2007, 33(1): 6-10.
- [13] Nemeth J, Laszlo E, Emody L. *Clavibacter michiganensis* ssp. *insidiosus* in lucerne seeds[J]. *EPPO Bulletin*, 1991, 21: 713-718.
- [14] Harighi B. Occurrence of alfalfa bacterial stem blight disease in Kurdistan Province, Iran[J]. *Journal of Phytopathology*, 2007, 155: 593-595.
- [15] Pierce L, Mc Cain A H. Alfalfa sprout rot caused by *Erwinia chrysanthemi*[J]. *Plant Disease*, 1987, 71: 786-788.
- [16] Lelliott R A, Stead D E. *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*[M]. Beccles and London: William Clowes Limited, 1987: 29.
- [17] Nyvall R F. *Field Crop Disease (Third Edition)*[M]. New York: The Wiley-Black Well Press, Ltd., 1999: 3-6.
- [18] Zhang Z F, Nan Z B. First report of *Erwinia persicina* causing wilting of *Medicago sativa* sprouts in China[J]. *Plant Disease*, 2012, 96(3): 454.
- [19] 俞大绂, 方中达. 中国植物病原细菌的初步名录[J]. *农业学报*, 1956, 7(3): 359-363.
- [20] 方中达, 任欣正. 中国植物病原细菌名录[J]. *南京农业大学学报*, 1992, 15(4): 1-6.
- [21] 刘若. 草原保护学(第三分册), 牧草病理学(第二版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 1984.
- [22] Jones F R. A new bacterial disease of alfalfa[J]. *Phytopathology*, 1925, 15: 243-244.
- [23] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [24] 刘若. 苜蓿细菌性凋萎病[J]. *国外畜牧学·草原*, 1981, (1): 1-6.
- [25] González A J, Tello J C, de Cara M. First report of *Erwinia persicina* from *Phaseolus vulgaris* in Spain[J]. *Plant Disease*, 2005, 89(1): 109.
- [26] González A J, Tello J C, Rodicio M R. *Erwinia persicina* causing chlorosis and necrotic spots in leaves and tendrils of *Pisum sativum* in Southeastern Spain[J]. *Plant Disease*, 2007, 91(4): 460.
- [27] Cating R A, Hong J C, Palmateer A J, *et al.* First report of bacterial soft rot on *Vanda orchids* caused by *Dickeya chrysanthemi* (*Erwinia chrysanthemi*) in the United States[J]. *Plant Disease*, 2008, 92(6): 977.
- [28] Myung I S, Lee Y K, Lee S W, *et al.* A new disease, bacterial leaf spot of rape, caused by atypical *Pseudomonas viridiflava* in South Korea[J]. *Plant Disease*, 2010, 94(9): 1164.
- [29] Martín-Sanz A, Palomo J L, Pérez de la Vega M, *et al.* First report of bacterial blight caused by *Pseudomonas viridiflava* on pea in Spain[J]. *Plant Disease*, 2010, 94(1): 128.
- [30] González A J, Rodicio M R. *Pseudomonas viridiflava* causing necrotic leaf spots and defoliation on *Hebe* spp. in Northern

- Spain[J]. *Plant Disease*, 2006, 90(9): 1143-1149.
- [31] Mirik M, Aysan Y, Cetinkaya-Yildiz R, *et al.* Watermelon as a new host of *Pseudomonas viridiflava*, causal agent of leaf and stem necrosis, discovered in Turkey[J]. *Plant Disease*, 2004, 88(8): 907.
- [32] Balestra G M, Mazzaglia A, Rossetti A. Outbreak of bacterial blossom blight caused by *Pseudomonas viridiflava* on *Actinidia chinensis* kiwifruit plants in Italy[J]. *Plant Disease*, 2008, 92(12): 1707.
- [33] Gitaitis R, Sumner D, Gay D, *et al.* Bacterial streak and bulb rot of onion; I. A diagnostic medium for the semiselective isolation and enumeration of *Pseudomonas viridiflava*[J]. *Plant Disease*, 1997, 81(8): 897-900.
- [34] Moretti C, Fakhrand R, Buonauro R. *Calendula officinalis*: A new natural host of *Pseudomonas viridiflava* in Italy[J]. *Plant Disease*, 2012, 96(2): 285.
- [35] Xu L H, Xie G L, Li B, *et al.* First report of pear blossom blast caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in China[J]. *Plant Disease*, 2008, 92(5): 832.
- [36] Scheck H J, Canfield M L, Pscheidt J W, *et al.* Rapid evaluation of pathogenicity in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* with a lilac tissue culture bioassay and syringomycin DNA probes[J]. *Plant Disease*, 1997, 81(8): 905-910.
- [37] Langston D B, Sanders F H, Brock J H, *et al.* First report of a field outbreak of a bacterial leaf spot of cantaloupe and squash caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in Georgia[J]. *Plant Disease*, 1997, 87(5): 600.
- [38] Garibaldi A, Minuto A, Scortichini M, *et al.* First report of syringae leaf spot caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on tomato in Italy[J]. *Plant Disease*, 2007, 91(11): 1518.
- [39] Bobev S G, Baeyen S, Vaerenbergh J V, *et al.* First record of bacterial blight caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on *Pyracantha coccinea* and an *Amelanchier* sp. in Bulgaria[J]. *Plant Disease*, 2008, 92(8): 1251.
- [40] Lenssen A W, Sorensen E L, Posler G L, *et al.* Forage quality of alfalfa protected by resistance to bacterial leaf spot[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 1992, 39: 61-70.
- [41] Moffett M L, Irwin J A G. Bacterial leaf and stem spot (*Xanthomonas alfalfae*) of lucerne in Queensland[J]. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, 1975, 15: 223-226.
- [42] 王政选. 苜蓿细菌性叶斑病[J]. *微生物学杂志*, 2002, 22(3): 64.
- [43] 李春杰, 南志标. 新疆苜蓿和苏丹草病害及其防治[A]. 见: 南志标, 李春杰. 中国草类作物病理学研究[M]. 北京: 海洋出版社, 2003.
- [44] OEPP/EPPO. Data sheets on quarantine Pests No. 49, *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*[R]. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 1992: 1-4.
- [45] Hernandez-Martinez R, Pinckard T R, Costa H S, *et al.* Discovery and characterization of *Xylella fastidiosa* strains in southern California causing mulberry leaf scorch[J]. *Plant Disease*, 2006, 90(9): 1143-1149.
- [46] Smith D L, Dominiak-Olson J, Sharber C D. First report of Pierce's disease of grape caused by *Xylella fastidiosa* in Oklahoma[J]. *Plant Disease*, 2009, 93(7): 762.
- [47] Huang Q, Brlansky R H, Barnes L, *et al.* First report of oleander leaf scorch caused by *Xylella fastidiosa* in Texas[J]. *Plant Disease*, 2004, 88(9): 1049.
- [48] Randall J J, French J, Yao S, *et al.* First report of *Xylella fastidiosa* in peach in New Mexico[J]. *Plant Disease*, 2011, 95(7): 871.
- [49] Rodríguez C M, Obando J J, Villalobos W, *et al.* First report of *Xylella fastidiosa* infecting coffee in Costa Rica[J]. *Plant Disease*, 2001, 85(9): 1027.
- [50] Hernandez-Martinez R, Costa H S, Dumenyo C K, *et al.* Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* infecting grape, almonds, and oleander using a multiprimer PCR assay[J]. *Plant Disease*, 2006, 90(11): 1382-1388.
- [51] Barnard E L, Ash E C, Hopkins D L, *et al.* Distribution of *Xylella fastidiosa* in oaks in Florida and its association with growth decline in *Quercus laevis*[J]. *Plant Disease*, 1998, 82(5): 569-572.
- [52] Montero-Astúa M, Saborío-R G, Chacón-Díaz C, *et al.* First report of *Xylella fastidiosa* in avocado in Costa Rica[J]. *Plant Disease*, 2008, 92(1): 175.
- [53] Aguilar E, Villalobos W, Moreira L, *et al.* First report of *Xylella fastidiosa* infecting citrus in Costa Rica[J]. *Plant Dis-*

- ease, 2005, 89(6): 687.
- [54] OEPP/EPPO. *Clavibacter michiganensis* ssp. *insidiosus*[J]. OEPP/EPPO Bulletin, 2010, 40: 353-364.
- [55] 陶天申, 杨瑞馥, 东秀珠. 原核生物系统学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [56] Busse H J, Denner E B M, Lubitz W. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics[J]. Journal of Biotechnology, 1996, 47: 3-38.
- [57] Hugh R, Leifson E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria[J]. Journal of Bacteriology, 1953, 66: 24-26.
- [58] Kovacs N. Identification of *Pseudomonas pyocyanae* by the oxidase reaction[J]. Nature (London), 1956, 178: 703.
- [59] Gaby W L, Hadley L. Practical laboratory test for the identification of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Bacteriology, 1957, 74: 356.
- [60] Cowan S T, Steel K J. Comparison of differentiating criteria for staphylococci and micrococci[J]. Journal of Bacteriology, 1964, 88: 804.
- [61] Gagnon M, Hunting W M. New method for the catalase determination[J]. Analytical Chemistry, 1959, 31: 144.
- [62] Cerny G. Method for distinction of the gram-negative from gram-positive bacteria[J]. European Journal of Applied Microbiology, 1976, 3: 223-225.
- [63] Manafi M, Kneifel W. Rapid methods for differentiating gram-positive from gram-negative aerobic and facultative anaerobic bacteria[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1990, 69: 822-827.
- [64] Gregersen T. Rapid method for distinction of gram-negative from gram-positive bacteria[J]. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 1978, 5: 123-127.
- [65] Halebian S, Harris B, Finegold M, *et al.* Rapid method that aids in distinguishing gram-positive from gram-negative anaerobic bacteria[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1981, 13: 444-448.
- [66] Bourgault A M, Lamothe F. Evaluation of the KOH test and the antibiotic disk test in routine clinical anaerobic bacteriology[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1988, 26: 2144-2146.
- [67] Brenner D J, Krieg N R, Staley J T. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Second Edition, Part B)[M]. East Lansing: Springer Press, 2005.
- [68] 陈秀蓉. 陇东典型草原草地退化与微生物相关性及其优势菌系统发育分析与鉴定[D]. 甘肃: 甘肃农业大学, 2003.
- [69] Leblond B, Philippe N, Mangin I, *et al.* 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter and intraspecific Bifidobacterium phylogeny[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1996, 46: 102.
- [70] Matsunaga T, Takeyama H, Nakayama H. 16S rRNA-Targeted identification of cyanobacterial genera using oligonucleotide-probes immobilized on bacterial magnetic particles[J]. Journal of Applied Phycology, 2001, 13: 389-394.
- [71] James G. Universal bacterial identification by PCR and DNA sequencing of 16S rRNA gene[J]. PCR for Clinical Microbiology, 2010, 3: 209-214.
- [72] Marcheggiani S, Iaconelli M, Dangelo A, *et al.* Microbiological and 16S rRNA analysis of sulphite-reducing clostridia from river sediments in central Italy[J]. BMC Microbiology, 2008, 8: 171.
- [73] 漆艳香, 朱水芳, 谢艺贤, 等. 苜蓿细菌性萎蔫病菌 16S rDNA 片段的克隆及序列分析(简报)[J]. 草业学报, 2006, 15(3): 123-127.
- [74] 谢关林, 朱国念, 任小平. 浙江水稻稻种病原细菌多样性研究[J]. 植物病理学报, 2002, 32(2): 114-121.
- [75] Kaneshiro W S, Burger M, Vine B G, *et al.* Characterization of *Erwinia chrysanthemi* from a bacterial heart rot of pineapple outbreak in Hawaii[J]. Plant Disease (e-Xtra), 2008, 92: 1444-1450.
- [76] 张壬午, 张彤, 许文瑛. 中国传统农业中的生态观及其在技术上的应用[J]. 生态学报, 1996, 16: 100-106.
- [77] Neergaard P. Seed Pathology[M]. London: The MacMillan Press, Ltd., 1977: 118-146.
- [78] O'Hara C M, Steigerwalt A G, Hill B C, *et al.* First report of a human isolate of *Erwinia persicinus*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1998, 36: 248-250.

Research progress on alfalfa bacterial diseases

ZHANG Zhen-fen, NAN Zhi-biao

(State Key Laboratory of Grassland Agro-ecosystems, College of Pastoral Agriculture
Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China)

Abstract: Research progress on alfalfa bacterial diseases, both in China and overseas, are reviewed. Nine bacterial diseases of alfalfa were recorded in worldwide and they were caused by 8 bacterial pathogens belonging to 6 genera. They were alfalfa bacterial wilt caused by the gram-positive bacterium (*Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*), and 8 bacterial diseases of alfalfa caused by gram-negative bacteria: bacterial sprout wilt (*Erwinia persicinus*), bacterial sprout rot (*Erwinia chrysanthemi* pv. *chrysanthemi*), crown gall (*Agrobacterium tumefaciens*), crown and root rot complex (*Pseudomonas viridiflava*), bacterial leaf spot and damping off (*Xanthomonas campestris* pv. *alfalfae*), bacterial stem blight (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) and dwarf (*Xylella fastidiosa*). Alfalfa bacterial leaf spot and bacterial stem blight were recorded, and bacterial sprout wilt, a new disease, was first reported in 2012, in China. In this paper, the types of alfalfa bacterial diseases and their characteristics, distribution and host range are summarized and listed. The symptoms distinguishing methods and pathogen phenotypic characteristics of alfalfa bacterial diseases are detailed. The frequently used phenotypic characteristic identification methods for alfalfa bacterial pathogen were used together with 16S rRNA sequence analysis and the Biolog identification system.

Key words: alfalfa; bacterial disease; symptom characteristic; pathogen characteristic; identification method; seed-borne bacteria