进境菜豆种子中普通细菌性疫病菌的分离和鉴定

文朝慧[1*]， 何苏琴[2]， 左佳妮[1]， 王溪桥[1]， 尤 佳[1]

(1. 甘肃出入境检验检疫局，兰州 730010；2. 甘肃省农业科学院植物保护研究所，兰州 730070)

摘要 对经甘肃口岸进境的30批菜豆 *Phaseolus vulgaris* 种子进行了普通细菌性疫病菌的检测，利用选择性培养基MT从波兰进境菜豆种子上分离到1株细菌597，对该分离物进行菌落形态特征观察、致病性测定、16S rDNA及16S-23S rDNA ITS序列分析和特异性PCR检测。结果表明，该分离物在MT培养基上菌落呈黄色、圆形、黏稠、表面光滑向外隆起、菌落周围有水解圈。分离物597接种菜豆幼苗后导致叶片枯萎，接种点干枯。结合菌落形态、16S-23S rDNA ITS序列、特异性PCR检测结果，将分离物597鉴定为地毯草黄单胞杆菌菜豆致病变种 *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*。

关键词 菜豆种子； 地毯草黄单胞杆菌菜豆致病变种； 普通细菌性疫病； 鉴定

中图分类号： S 436.43，S41.31 **文献标识码**： A **DOI**： 10.16688/j.zwbh.2018101

Isolation and identification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in imported bean seed lots

WEN Zhaohui[1]， HE Suqin[2]， ZUO Jiani[1]， WANG Xiqiao[1]， YOU Jia[1]

(1. *Gansu Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau*, *Lanzhou* 730010, *China*;
2. *Institute of Plant Protection*, *Gansu Academy of Agricultural Sciences*, *Lanzhou* 730070, *China*)

Abstract A bacterial strain 597 was intercepted in bean seeds imported from Poland with semi-selective media milk tween agar (MT), and detected by the morphological characteristics, pathogenicity, 16S rDNA sequence analysis, 16S-23S rDNA ITS sequence analysis and PCR detection. Colonies of the bacterium were yellow, mucoid and convex on MT medium and zones of hydrolysis formed around them. The pathogenicity test showed that the strain 597 caused typical leaf wilting of bean by artificial inoculation. 16S-23S rRNA ITS sequence analysis indicated that the strain shared 100% sequence identity with *X. axonopodis* pv. *phaseoli* in GenBank. The result of PCR showed that the strain 597 could be detected by *X. axonopodis* pv. *phaseoli*-specific primers X4c/X4e, XA5F/XA5R, XC9F/XC9R, XC12F/XC12R, and XO4F/XO4R. The strain 597 was identified as *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

Key words bean seed; *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*; common bacterial blight; identification

菜豆普通细菌性疫病1893年首次被报道[1]，引起该病害的病原物有多种，其中一些菌株在培养基上可以产生褐色素，称为褐色致病菌株[2]，褐色和非褐色致病菌株作为菜豆普通细菌性疫病的致病菌曾被统称为 *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*[3]。随着研究的深入，Vauterin 等[4-5]发现非褐色菌株不同于褐色菌株，因此将非褐色菌株归于 *X. axonopodis*，成为一个新的变种，而褐色菌株也作为一个新的变种被称为褐色黄单胞菌褐色亚种 *X. fuscans* subsp. *fuscans* (Xff)[6]。目前普遍认为菜豆普通细菌性疫病是由地毯草黄单胞杆菌菜豆致病变种 *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap)和褐色黄单胞菌褐色亚种 *X. fuscans* subsp. *fuscans* (Xff)所引起的。

带菌种子是菜豆普通细菌性疫病最重要的初侵染源[7-9]，10 000粒种子中有1粒带菌种子即可引起菜豆普通细菌性疫病的发生流行[10]。病原菌通常寄生于菜豆种子的种皮或者胚中，寄生于胚中的病原菌在种子处理中难以去除[9-11]，易感菜豆品种的

收稿日期： 2018-03-07 **修订日期**： 2018-05-02
基金项目： 甘肃省自然科学基金(1506RJZA183)；甘肃出入境检验检疫局科技计划项目(2015GK001)；草地农业生态系统国家重点实验室开放课题(SKLGAE201508)
* 通信作者 E-mail：wzhhli@163.com

带菌种子发芽后在种苗期即表现症状[12]，抗性强的菜豆品种即使在种苗期不表现症状，所结种子也会被感染[13]，因此带菌种子在菜豆普通细菌性疫病的流行中起着重要作用。本研究通过对进境菜豆种子中菜豆普通细菌性疫病病原菌进行检测和鉴定，以期明确进境菜豆种子中菜豆普通细菌性疫病病原菌的种类，为进出境检验检疫和制定病害防治策略提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试种子样品

30 份供试菜豆种子为 2015 年经甘肃口岸进境的菜豆种子。

1.2 培养基及主要试剂

MT 选择性培养基：蛋白胨 10.0 g，氯化钙 0.25 g，酪氨酸 0.5 g，琼脂粉 18.0 g，脱脂奶粉 10.0 g，放线菌酮 200.0 mg，氨苄 80.0 mg，盐酸万古霉素 10.0 mg，吐温-80 10.0 mL，蒸馏水 1 000 mL。

NA 培养基：氯化钠 5.0 g，牛肉膏 3.0 g，蛋白胨 10.0 g，琼脂粉 18.0 g，蒸馏水 1 000 mL，调节 pH 为 6.6～7.2。

LB 液体培养基：胰蛋白胨 10.0 g，酵母提取物 5.0 g，氯化钠 10.0 g，蒸馏水 1 000 mL。

PCR 及电泳相关试剂：PCR buffer、dNTPs、r*Taq* 聚合酶、loading buffer 购自宝生物(大连)工程有限公司，新型植物基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司，引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.3 病原菌的分离与培养

每份菜豆种子取 100 粒浸泡在 300 mL 0.8% 无菌生理盐水中，加入 300 μL 1%吐温-20，4℃静置过夜后在摇床上 180 r/min 室温振荡 30 min。用纱布将种子滤除，10 000 r/min 离心 30 min，将沉淀用 0.8%无菌生理盐水悬浮，1 000 r/min 离心3 min，取上清液 12 000 r/min 离心 5 min，得到的沉淀用无菌生理盐水悬浮即为测定菌液。取 10 μL 菌液依次稀释为 10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}，均匀涂布在 MT 平板培养基上，置于 28℃培养箱中培养 4～5 d 后，挑取有双水解圈的黄色菌落划线接种到新的 NA 培养基上纯化，挑取单菌落获得纯培养。

1.4 致病性测定

分别采用喷雾接种法和茎节接种法[14]将纯培养分离物接种到菜豆幼苗上进行致病性测定。

营养土经高温高压灭菌后装在塑料花盆(24 cm×16 cm×18 cm)中，浇透水静置 24 h 后播种菜豆。播种后的花盆置于温度 25℃，L∥D=11 h∥13 h，相对湿度 85%～95%的人工气候箱中培养，待长出 2 片真叶后接种。

挑取长势良好的菜豆幼苗分为 2 组，每组 4 盆苗，每盆 2 株苗，1 组采用喷雾接种，另 1 组采用茎节接种。每处理 3 次重复，对照幼苗用无菌水接种处理。采用喷雾接种时，先将培养于 NA 培养基 48～72 h 的分离物用无菌水冲洗至无菌离心管，配制成 1×10^8 cfu/mL 的菌悬液，用无菌喷壶将菌悬液喷洒到菜豆植株表面至有菌液滴落。采用茎节接种时，用灭菌牙签蘸取培养于 NA 培养基上 48～72 h 的分离物刺穿菜豆植株第一茎节，牙签与菜豆植株茎秆保持 45°，刺穿后将牙签旋转两周后缓慢拔出。将接种后的菜豆苗置于人工气候箱中继续培养，每天观察植株发病情况，记录症状特点。待植株出现明显病状后，根据柯赫氏法则，取病健交界处叶片或茎秆组织进行病菌分离，将分离菌与接种物进行形态特征比较，并用 PCR 进行检测，完成致病性测试程序。

1.5 病原物的分子生物学鉴定

1.5.1 病原菌 DNA 的提取

将供试菌株接种到 NA 培养基上，28℃培养 48 h 后，用接种环挑取少量菌体接种于 LB 液体培养基中，28℃条件下 150 r/min 振荡培养 48 h 后收集菌体。提取方法参照新型植物基因组 DNA 提取试剂盒的提取方法并略作改进(将第一步的裂解时间延长到 30 min)。

1.5.2 16S rDNA 序列测定

根据已发表的细菌 16S rDNA 通用引物 27F/1492R[15]对分离物基因组 DNA 进行 PCR 扩增，PCR 反应总体积为 50 μL：10×PCR buffer 5.0 μL，25 mmol/L $MgCl_2$ 5.0 μL，2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μL，10 μmol/L 引物 27F、1492R 各 1.0 μL，5 U/μL r*Taq* DNA 聚合酶 0.5 μL，DNA 模板 3.0 μL，ddH_2O 32.5 μL。PCR 反应条件为：94℃预变性 3 min；94℃变性 30 s，57℃退火 45 s，72℃延伸 2 min，35 个循环；72℃延伸 10 min。扩增产物在 1.5%琼脂糖凝胶上进行电泳检测，测序工作委托金唯智生物科技有限公司完成。将测序结果在 NCBI 网站利用 BLAST 与 GenBank 上已经发表的基因进行序列一致性比对。

1.5.3 16S-23S rDNA ITS 序列测定

根据已发表的细菌 16S-23S rDNA ITS 通用引物 1493F/23R[16]对分离物基因组 DNA 进行 PCR

扩增,反应总体积为 25 μL:10×PCR buffer(Mg^{2+} plus)2.5 μL,2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μL,10 μmol/L 引物 1493F、23R 各 1.0 μL,5 U/μL r*Taq* 0.5 μL,DNA 模板 5.0 μL,ddH_2O 13.0 μL。反应条件为:95℃预变性 4 min;95℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,35 个循环;72℃延伸 7 min。扩增产物在 1.5%琼脂糖凝胶上进行电泳检测,测序工作委托金唯智生物科技有限公司完成。将测序结果在 NCBI 网站利用 BLAST 与 GenBank 上已经发表的基因进行序列一致性比对,选取同源性较高的模式菌株的 16S-23S rDNA ITS 基因序列作为参比对象,采用 ClustalX (1.83)软件进行多序列匹配排列,用系统发育分析软件 MEGA 6.0 的邻接法(neighbor-joining)构建系统发育树,进行 1 000 次 Bootstrap 检验计算系统树中节点的置信度。

1.5.4 特异性分子鉴定

利用对地毯草黄单胞菌菜豆变种和褐色黄单胞菌褐色亚种具有特异性的引物 X4c/X4e、褐色黄单胞菌褐色亚种特异性检测引物 Xf1/Xf2 以及根据黄单胞菌属结构域蛋白序列设计的特异性引物 XA3F/XA3R、XA5F/XA5R、XC9F/XC9R、XC12F/XC12R、XO4F/XO4R(表 1)对分离的病原菌进行 PCR 检测,PCR 反应总体积 25 μL:10×PCR buffer(Mg^{2+} plus)2.5 μL,2.5 mmol/L dNTP 2.0 μL,上游引物 1.0 μL,下游引物 1.0 μL,5 U/μL r*Taq* 0.5 μL,DNA 模板 8.0 μL,ddH_2O 10.0 μL。PCR 反应条件为:95℃预变性 4 min,95℃变性 30 s,Tm 退火 30 s,72℃延伸 30 s,35 个循环;72℃延伸 7 min。其中 X4c/X4e Tm=65℃,Xf1/Xf2 Tm=55℃,XA3F/XA3R、XA5F/XA5R、XC9F/XC9R、XC12F/XC12R、XO4F/XO4R Tm=59℃。

2　结果与分析

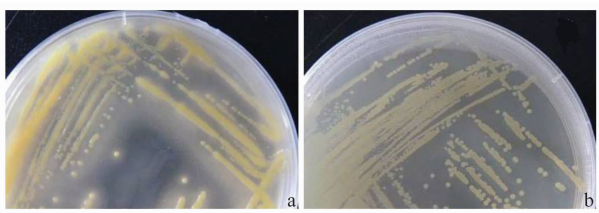
2.1　病原菌分离

从波兰进境的菜豆种子浸泡液中分离获得分离物 597(图 1),菌株 597 在 MT 培养基上(图 1a)菌落呈黄色,圆形,黏稠,表面光滑向外隆起,菌落周围有 1 个小而模糊的吐温 80 水解圈和 1 个大而明显的酪蛋白水解圈。在 NA 培养基上(图 1b)菌落呈淡黄色,不规则的圆形,黏稠而光滑。

表 1　扩增基因组特异片段的引物

Table 1　Primers for amplifying segments of genomes

引物对 Primer pair	序列(5′→3′) Sequence	文献 Reference	退火温度/℃ Annealing temperature
X4c	GGCAACACCCGATCCCTAAAACAGG	[17]	65
X4e	CGCCGGAAGCACGATCCTCGAAG		
Xf1	ACGCAAGACCCATCGTCATTC		55
Xf2	ATGGCTCAAGGAAAAACTTTCAGG		
XA3F	CCGGAGCCGACATCAATCTTTGGG	[18]	59
XA3R	AGTGACGTAACCGTCCTGGGTGGA		
XA5F	AATGCGAATGCCTTGGCTTT		59
XA5R	TTCGCGGGCGCATTTCTATT		
XC9F	CAAGGATTCCAAGCTGGGGACCT		59
XC9R	GGTCTTGAAGCTCAGCTGGAACTT		
XC12F	CGGACTGGGACCCGGTGTATTACCA		59
XC12R	AATGCCACACCAGCTCGTCCCACA		
XO4F	AGGCTACCGTGTCCGGCTTGAAAC		59
XO4R	CGCAACTTGCCAGACATCATCCTTG		



a: 菌株597在MT培养基上的形态; b: 菌株597在NA培养基上的形态
a: Strain 597 on MT; b: Strain 597 on NA

图 1　菌株 597 的菌落形态

Fig. 1　Cultural characteristics of bacterial strain 597

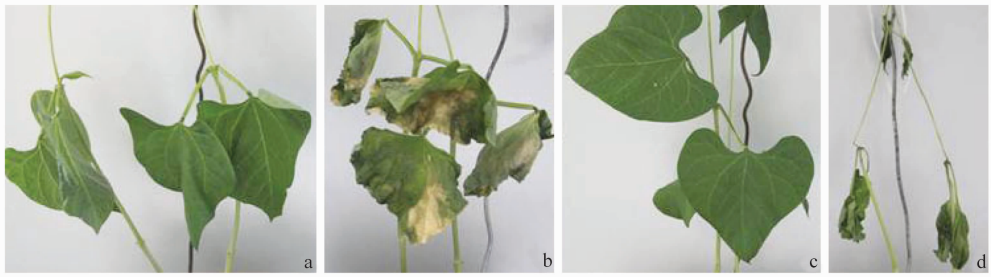
2.2　致病性测定

经喷雾接种和茎节接种的菜豆植株发病情况如图 2 所示,喷雾接菌植株接菌 5 d 后叶片出现坏死斑,随着接种时间延长坏死斑逐渐扩大,接种 10 d 后(图 2b)叶片大面积枯死,植株萎蔫。经茎节接种的菜豆植株在接种 4 d 后,茎节处变为淡褐色,叶片开始萎蔫,接种 10 d 后(图 2d)植株茎节变为深褐色,茎开始干枯,叶片也全部枯萎。从发

病的叶片和茎节的病健交界处，取小块病样组织分离致病菌，获得的细菌分离物与接种的病菌特征一致。

2.3 16S rDNA 序列分析

分离物 597 提取 DNA 后利用 16S rDNA 通用引物 27F/1492R 进行扩增，PCR 扩增产物约 1.5 kb，产物双向测序后拼接获得部分 16S rDNA 序列。GenBank 中 BLAST 分析表明，分离物 597 的 16S rDNA 序列（GenBank 登录号：KT374004.1）与 GenBank 中 *Xanthomonas* 属多个变种（包括 *X. axonopodis* pv. *phaseoli*）的 16S rDNA 序列（CP023285.1，CP020975.1，CP017188.1，KX257179.1，CP014347.1，KM593178.1，JN109173.1，FR839635.1，AE008923.1，NR_026383.1）相似性为 100%。



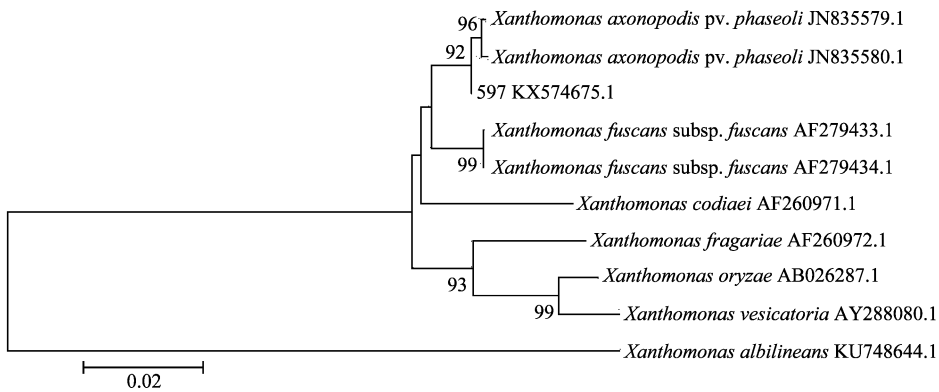
a：喷雾接种对照；b：喷雾接种发病症状；c：茎节接种对照；d：茎节接种发病症状
a: CK (spray inoculation); b: Symptoms on leaf using spray inoculation; c: CK (toothpick method); d: Symptoms on inoculated plant using toothpick method

图 2 接种 10 d 后菜豆植株发病情况

Fig. 2 The symptoms of bean plants at 10 d after inoculation by strain 597

2.4 16S-23S rDNA ITS 序列分析

分离物 597 提取 DNA 后利用 16S-23S rDNA ITS 通用引物 1493F/23R 进行扩增，PCR 扩增产物约 500 bp，产物双向测序后拼接获得部分 16S-23S rDNA ITS 序列。GenBank 中 BLAST 分析表明，分离物 597 的 16S-23S rDNA ITS 序列（GenBank 登录号：KX574675.1）与 GenBank 中 *X. axonopodis* pv. *phaseoli*（CP020975.1、CP020971.1 和 CP020967.1）的 ITS 区序列相似性为 100%。利用 MEGA 6.0 软件对 GenBank 中已登录的 *Xanthomonas* 属相关种的序列进行分析，采用邻接法（N-J）构建分离物 597 和 *Xanthomonasa* 属相关种的系统发育树（图 3）。由系统发育树可见，分离物 597 和 *X. axonopodis* pv. *phaseoli* 位于同一个分支，两者亲缘关系最近。



自展支持值(Bootstrap)＞50%的显示在各个进化分支节点上。*X. albilineans* (KU748644.1)作为外群
Only bootstrap values over 50% are shown at the node. *X. albilineans* (KU748644.1) is defined as the outgroup

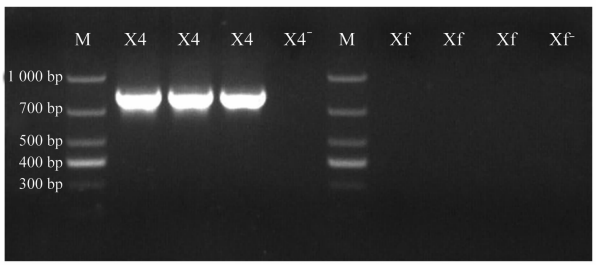
图 3 基于 16S-23S rDNA ITS 区序列构建的菌株 597 的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S-23S rDNA ITS sequences showing the relationship between strain 597 and other *Xanthomonas* strains

2.5 特异性分子鉴定

利用特异性检测引物 X4c/X4e、Xf1/Xf2 对分离物 597 的基因组 DNA 进行 PCR 扩增（图 4），引物 X4c/X4e 产生 730 bp 左右的特异性片段；而引物 Xf1/Xf2 未产生目标片段。利用特异性引物 XA3F/XA3R、XA5F/XA5R、XO4F/XO4R、XC9F/XC9R、XC12F/XC12R 对菌株 597 的基因组 DNA 进行 PCR 扩增（图 5），引物 XA3F/XA3R 未产生目标片

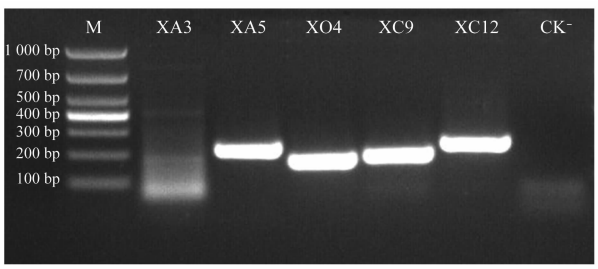
段,而引物 XA5F/XA5R、XO4F/XO4R、XC9F/XC9R、XC12F/XC12R 均产生特异性片段。由于特异性检测引物 X4c/X4e 对 *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap)和 *X. fuscans* subsp. *fuscans* (Xff)均具有特异性,引物 Xf1/Xf2 仅对 Xff 具有特异性[17];引物 XA5F/XA5R、XO4F/XO4R、XC9F/XC9R、XC12F/XC12R 对 Xap 具有特异性,引物 XA3F/XA3R 对 Xff 具有特异性[18],由此可初步判断分离物 597 为地毯草黄单胞菌菜豆变种。



M: DL2000 DNA Marker; X4: X4c/X4e; X4⁻: 水; Xf: Xf1/Xf2; Xf⁻: 水
M: DL2000 DNA Marker; X4: X4c/X4e; X4⁻: Water; Xf: Xf1/Xf2; Xf⁻: Water

图 4　特异性引物 X4c/X4e、Xf1/Xf2 对菌株 597 的 PCR 检测结果

Fig. 4　PCR detection of strain 597 with primers X4c/X4e and Xf1/Xf2



M: DL2000 DNA Marker; XA3: XA3F/XA3R; XA5: A5F/XA5R; XO4: XO4F/XO4R; XC9: XC9F/XC9R; XC12: XC12F/XC12R; CK⁻: 水
M: DL2000 DNA Marker; XA3: XA3F/XA3R; XA5: A5F/XA5R; XO4: XO4F/XO4R; XC9: XC9F/XC9R; XC12: XC12F/XC12R; CK⁻: Water

图 5　特异性引物 XA3F/XA3R、XA5F/XA5R、XO4F/XO4R、XC9F/XC9R、XC12F/XC12R 对菌株 597 的 PCR 检测结果

Fig. 5　PCR detection of strain 597 with primers XA3F/XA3R, XA5F/XA5R, XO4F/XO4R, XC9F/XC9R, and XC12F/XC12R

3　讨论

菜豆又称四季豆,是我国重要的豆科蔬菜作物,在蔬菜的周年供应中起着重要作用。菜豆普通细菌性疫病在世界各地主要菜豆产区均有发生,在美国[7-8]、加拿大[12]、欧洲[9,19]、亚洲[14]、非洲[13]均有报道。种子传播是该病害最主要的传播方式[7-11]。近年来,甘肃作为对外繁育种子原种进口大省,从美国、法国、德国、捷克、匈牙利、意大利、荷兰、波兰、罗马尼亚、西班牙、土耳其、俄罗斯、日本、韩国、越南、泰国、中国台湾等国家和地区进口菜豆种子数量增长迅速,种子携带细菌性病原物的几率增大。病原菌通过种子传带形成异地扩散和蔓延,将严重影响作物产量和品质,正确进行细菌性病原物的鉴定,是种子健康检测、保护育种基地安全的需要。

本研究对 2015 年甘肃口岸进境的 30 批菜豆种子进行菜豆普通细菌性疫病菌的检测,在 1 批波兰进境的菜豆种子中检出菜豆普通细菌性疫病菌。

目前,菜豆普通细菌性疫病主要病原菌有两种,即地毯草黄单胞杆菌菜豆致病变种 *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap)和褐色黄单胞菌褐色亚种 *X. fuscans* subsp. *fuscans* (Xff),2 种病原菌具有相同的寄主范围和流行学特征[19],除褐色黄单胞菌褐色亚种在培养条件下能够产生褐色素外,两者具有相似的生化表型[20]。利用 16S rDNA 和 16S-23S rDNA ITS 序列分析及构建系统发育树是鉴定细菌的通用技术,本研究中菌株 597 的 16S rDNA 序列和 16S-23S rDNA ITS 序列,与 GenBank 中地毯草黄单胞杆菌菜豆致病变种的相应序列具有 100%的一致性。结合病原菌形态学特征、致病性测定、特异性 PCR 检测,证实了进境菜豆种子上的分离物 597 为地毯草黄单胞杆菌菜豆致病变种 *X. axonopodis* pv. *phaseoli*,为防止病原物的传播危害提供了依据。

参考文献

[1] ZAUMEYER W J. The bacterial blight of beans caused by *Bacterium phaseoli* [J]. USDA Technical Bulletin, 1930, 186: 1-36.

[2] GOODWIN P H, SOPHER C R. Brown pigmentation of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* associated with homogentistic acid [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1994, 40(1): 28-34.

[3] DYE D W, DRADBURY J F, GOTO M, et al. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains [J]. Review of Plant Pathology, 1980, 59(4): 153-168.

[4] VAUTERIN L, HOSTE B, KERSTERS K, et al. Reclassification of *Xanthomonas* [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1995, 45(3): 472-489.

[5] VAUTERIN L, RADEMAKER J, SWINGS J. Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas* [J]. Phytopathology, 2000, 90(7): 677-682.

[6] SCHAAD N W, POSTNIKOVA E, LACY G H, et al. Re-

classification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp *smithii* nov. comb. nov nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and — var. *fuscans* ‖ of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2005, 28: 494 - 518.

[7] CAFATI C R, SAETTLER A W. Transmission of *Xanthomonas phaseoli* in seed of resistant and susceptible *Phaseolus* genotypes [J]. Phytopathology, 1980, 70(7): 638 - 640.

[8] ARNAUD-SANTANA E, PENA-MATOS E, COYNE D P, et al. Longevity of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in naturally infested dry bean (*Phaseolus vulgaris*) debris[J]. Plant Disease, 1991, 75(9): 952 - 953.

[9] DARRASSE A, BUREAU C, SAMSON R, et al. Contamination of bean seeds by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* associated with low bacterial densities in the phyllosphere under field and greenhouse conditions[J]. European Journal of Plant Pathology, 2007, 119(2): 203 - 215.

[10] WELLER D M, SAETTLER A W. Evaluation of seedborne *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* as primary inocula in bean blights [J]. Phytopathology, 1980, 70(2): 148 - 152.

[11] BURKHOLDER W H. The bacterial blight of bean: a systemic disease [J]. Phytopathology, 1921, 11(2): 61 - 69.

[12] SUTTON M D, Wallen WALLEN V R. Epidemiological and ecological relations of *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* on beans in southwestern Ontario, 1961 - 1968 [J]. Canadian Journal of Botany, 1970, 48(7): 1329 - 1334.

[13] MABAGALA R B. The effect of populations of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in bean reproductive tissues on seed infection of resistant and susceptible bean genotypes [J]. European Journal of Plant Pathology, 1997, 103(2): 175 - 181.

[14] 陈泓宇,徐新新,段灿星,等. 菜豆普通细菌性疫病病原菌鉴定[J]. 中国农业科学, 2012,45(13):2618 - 2627.

[15] LANE D J. 16S/23S rRNA sequencing [M]//STACKEBRANDT E, GOODFELLOW M. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. New York: John Wiley and Sons, 1991: 115 - 175.

[16] LI X, DE BOER S H. Selection of polymerase chain reaction primers from an RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *spedonicus* [J]. Phytopathology, 1995, 85(8): 837 - 842.

[17] AUDY P, LAROCHE A, SAINDON G, et al. Detection of the bean common blight bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. c. phaseoli* var. *fuscans*, using the polymerase chain reaction [J]. Phytopathology, 1994, 84(10): 1185 - 1192.

[18] ALBUQUERQUE P, CARIDADE C M, MARCAL A R, et al. Identification of *Xanthomonas fragariae*, Xap, and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* with novel markers and using a dot blot platform coupled with automatic data analysis [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(16): 5619 - 5628.

[19] BILJANA T, SVETLANA M, EMIL R, et al. Susceptibility of bean genotypes to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in greenhouse conditions [J]. Pesticides and Phytomedicine, 2008, 23: 167 - 173.

[20] ALAVI S M, SANJARI S, DURAND F, et al. Assessment of the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* as a basis to identify putative pathogenicity genes and a type III secretion system of the SPI-1 family by multiple suppression subtractive hybridizations [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(10): 3295 - 3301.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 61 页)

[12] CHI H. Life-table analysis Incorporating both sexes and variable development rates among individuals [J]. Environmental Entomology, 1988, 17(1): 26 - 34.

[13] 柴寿. 巨峰葡萄栽培[M]. 王化忠,译. 北京:中国农业出版社, 1987: 1 - 16.

[14] 潘兴,刘崇怀,郭景南,等. 红地球葡萄在河南省发展状况及前景分析[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2006(1): 38 - 41.

[15] 黄水金,秦厚国,江金林. 取食不同食料对斜纹夜蛾后代抗药性的影响[J]. 植物保护, 2007, 33(4): 60 - 64.

[16] 杨进,杨益众,刘学儒,等. 不同品种棉花对斜纹夜蛾种群增长的影响[J]. 江苏农业科学, 2010(6): 186 - 190.

[17] 吴坤君,龚佩瑜. 粘虫的年龄—发育期结构生命表[J]. 昆虫学报, 1994, 37(4): 426 - 434.

[18] MOREAU J, BENREY B, THIÉRY D. Grape variety affects larval performance and also female reproductive performance of the European grapevine moth *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae)[J]. Bulletin of Entomological Research, 2006, 96(2): 205 - 212.

[19] 孙程鹏,刘爱萍,李钢铁. 不同寄主植物对苜蓿蚜生长发育的影响[J]. 中国植保导刊, 2017, 37(12): 12 - 15.

[20] SREELAKSHMI P, MATHEW T B. Development of castor based oligidic diet for tobacco caterpillar, *Spodoptera litura* (Fabricius) and its comparative study with other artificial and natural diets [J]. Journal of Entomology and Zoology Studies, 2017, 5(3): 1040 - 1044.

[21] 姚苗苗,杨茂发,武承旭,等. 不同寄主植物对斜纹夜蛾生长发育的影响[J]. 广东农业科学, 2016, 43(1): 93 - 97.

[22] 朱俊洪,张方平,任洪刚. 四种食料植物对斜纹夜蛾生长发育及营养指标的影响[J]. 昆虫知识, 2005, 42(6): 643 - 646.

(责任编辑: 田 喆)