

# 引起梨花枯和芽枯的 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 病原细菌鉴定

邱文<sup>1</sup>, 徐福寿<sup>2</sup>, 谢关林<sup>1</sup>, 徐丽慧<sup>1</sup>, 怀雁<sup>1</sup>, 李斌<sup>1</sup>, 余山红<sup>1</sup>, 钱军<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>浙江大学生物技术研究所, 杭州 310029; <sup>2</sup>杭州市植保土肥总站, 杭州 310020)

**摘要:** 【目的】明确在中国发生的梨花枯和芽枯的确切病原菌。【方法】用普通细菌学方法、电镜观察、Koch氏病原假说测定、Biolog、脂肪酸分析、PCR及与标准对照菌株的比较。【结果】从16个病样中分离获得12菌株,6株代表菌株显示出与*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 3株标准对照菌株相似的致病反应,它们的Biolog和脂肪酸分析的相似度分别为0.57~0.86和0.58~0.81,PCR和序列测定结合上述结果证实了*P. syringae* pv. *syringae*为该病的病原菌。【结论】首次证实了中国梨树上的花枯和芽枯可由*P. syringae* pv. *syringae*引起。

**关键词:** 梨花枯; 梨芽枯; *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*; 证实

## Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Causing Pear Blossom and Bud Blast in China

QIU Wen<sup>1</sup>, XU Fu-shou<sup>2</sup>, XIE Guan-lin<sup>1</sup>, XU Li-hui<sup>1</sup>, HUAI Yan, LI Bin<sup>1</sup>, YU San-hong<sup>1</sup>, QIAN Jun<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029; <sup>2</sup>Hangzhou Plant Protection Station, Hangzhou 310020)

**Abstract:** 【Objective】 This study was made to determine the causal organism of pear blossom and bud blast in China. 【Method】 The causal organism was identified by bacteriological test, electro-microscopic observation, Koch's postulation test, Biolog, fatty acid methyl esters (FAMES) and PCR test and compared with the standard strains. 【Result】 Six representative strains out of 20 pathogenic bacterial isolates from 16 diseased samples showed characteristics similar to 3 standard strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from Belgium. They were identified as *P. syringae* pv. *syringae* with Biolog similarity of 0.57-0.86 and FAMES similarity of 0.58-0.81. The bacterium was reisolated from symptomatic plants and blossoms. Identification as *P. syringae* pv. *syringae* was confirmed by using PCR primers and sequences test and combined with the above results. 【Conclusion】 It has been confirmed that the pear blossom and bud blast in China may caused by *P. syringae* pv. *syringae*.

**Key words:** Pear blossom blast; Pear bud blast; *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*; Confirmation

## 0 引言

【研究意义】*Erwinia amylovora* 引起的梨火疫病是世界上第一个被报道的植物细菌病害,而且也是果树上迄今为止最严重的病害之一,中国和许多国家都把它列入植物检疫名单,纷纷开展该病的检测与防控研究<sup>[1,2]</sup>。然而,梨火疫病的一些初期症状与梨树上的另一种细菌性病害—花枯病(pear blossom blast)很相似。到目前为止,中国有记载的梨细菌性病害只有3

种,即由 *Agrobacterium tumefaciens* 引起的梨根癌病、*Erwinia* spp.引起的锈水病和梨果腐病,尚无确切的梨火疫病发生报道,但存在梨花枯和芽枯病症状,而有关花枯病的病原国内至今尚无研究。【前人研究进展】Barker等首次在英国发现并描述了梨花枯病<sup>[3]</sup>,以后相继在意大利、法国、西班牙、美国、加拿大、智利、南非、新西兰、澳大利亚等地有报道<sup>[4,5]</sup>。梨花枯病原 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 引起的症状较多,除了梨花枯和芽枯外,还有芽枯、叶斑和溃疡等<sup>[6,7]</sup>。

收稿日期: 2008-01-22; 接受日期: 2008-04-03

基金项目: 国家高技术研究与发展计划(“863”计划, 2006AA10A211); 国家自然科学基金(30671397); 杭州市农业发展基金(2007-4)

作者简介: 邱文(1984-),女,山东泰安人,硕士研究生,研究方向为植物细菌学。Tel: 0571-86971412; E-mail: qwuyuyi@163.com。通讯作者谢关林(1951-),男,浙江绍兴人,教授,博士,研究方向为植物细菌学。Tel: 0571-86971412; E-mail: glxie@zju.edu.cn

由于梨花枯病和梨火疫病症状易混淆, 英美等国曾开展不少有关症状鉴别和病原的鉴定研究<sup>[5-8]</sup>。中国存在的梨花枯和芽枯病是否也由该病原引起, 有待明确。

【本研究切入点】2006年春, 笔者在杭州郊区一果园发现梨花枯和芽枯, 经对嫩枝的显微镜观察, 发现有喷菌现象, 被确证为细菌病害, 其初期症状很象梨火疫病, 但未发现梨病枝上典型的梨火疫病症状“牧羊鞭”。【拟解决的关键问题】本研究拟通过植物病原细菌的细菌学特征、电镜观察、Kock氏病原假说测定、分子生物学测定, 明确中国首次发现的梨花枯和芽枯病病原。

## 1 材料与方法

### 1.1 标准菌株

*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 标准菌株 LMG5570, LMG2230 和 LMG 2231 均由比利时根特大学国家菌种保藏中心 Swings J 教授等提供; 番茄青枯病标准菌株 *Ralstonia solanacearum* Rp-1 由福建省农业科学院刘波研究员提供。其它试验材料来自本所植物细菌实验室。

### 1.2 样本采集与病原细菌分离

从病区获得花枯和芽枯样本 16 份, 对镜检有喷菌现象的嫩枝, 首先用自来水冲洗表面, 用消毒吸水纸吸干, 然后用 70% 酒精表面消毒, 将嫩枝切碎后放入等量消毒无菌水中浸泡 30 min, 在 NA 培养基上划线分离, 平皿于 30℃ 下培养 3 d, 挑取代表性单菌落, 在 KMB 培养基上纯化后置 365 nm 波长紫外光下观察菌落是否产生荧光。

### 1.3 病原的常规细菌学及 Koch 氏病原假说测定

菌落形态、培养性状及烟草过敏性反应测定按 Klement 等<sup>[9]</sup>方法; 生理生化测定按 Schaad 等<sup>[10]</sup>方法。离体致病性测定参照 Yessad 等<sup>[5]</sup>的方法进行。Koch 氏病原假说测定的梨品种为“翠冠”, 将所测菌株浓度调节到  $10^8$  cfu·ml<sup>-1</sup>, 采用针刺法在梨苗的小枝上接种, 10 d 后开始记录发病情况; 花和叶的接种采用喷雾法, 3 d 后观察病情。接种后放置 26℃ 的人工气候箱内培养。冰核活性测定采用小液滴冻结法<sup>[11]</sup>, 在 -2、-3、-4 和 -5℃ 下进行。

### 1.4 病原的电镜观察

将培养 24 h 的病原细菌用无菌水制成菌悬液并过滤, 在滤液中加入几滴固定液 (pH 7.2, 0.15% 的戊二醛磷酸缓冲液), 离心收集菌体, 制成菌悬液, 加几滴新鲜的戊二醛, 在 4℃ 冰箱内固定过夜, 次日离心,

收集菌体, 再用无菌水制成菌悬液, 并调整菌液浓度为  $10^8$  cfu·ml<sup>-1</sup>。取等量的最终菌悬液与等量的 2% 的钨酸水溶液混合染色, 制成混合菌染色液。用无菌毛细吸管吸取混合菌悬液滴在铜网膜上, 经 4 min 后, 用滤纸吸去余水, 待样品干燥后, 置透射电子显微镜 (TEM, KYKY-1000B, Japan) 下观察。

### 1.5 病原的 Biolog 鉴定

选取 6 株有代表性的菌株, 用 Biolog 进行证实, 在含 95 个碳源的 Biolog 阴性 (GN) 微孔板中, 每孔加入 150 μl 所测细菌悬浮液 (OD 值 0.3)。在 30℃ 下培养 24 h 后由 Biolog 读数机测得反应结果, 并直接进入 Biolog 专用细菌鉴定程序 (4.1 版本)。具体操作参照谢关林<sup>[12]</sup>的方法。

### 1.6 病原的脂肪酸 (FAME) 鉴定

FAME 鉴定采用美国 Agilent 6890 型气相色谱系统。参照 MIDI 公司说明书及 Xie<sup>[13]</sup>的方法进行。所有纯化的参试菌株先在 NA 培养基上于 30℃ 生长 24 h 后, 转入 TSBA 固体培养基上再培养 24 h。然后用无菌塑料接种环挑取一环培养菌放入有螺帽的试管中, 提取脂肪酸。鉴定结果通过微生物鉴定系统软件-美国 MIDI 公司开发的基于细菌细胞脂肪酸成分鉴定细菌的 MIS4.5 (microbial identification system) 和 LGS4.5 (library generation software) 获得。把分析结果与数据库中标准菌种的脂肪酸信息进行比对。

### 1.7 病原的 PCR 分析与 ITS 序列测定

根据已发表的植物病原细菌 ITS 区的通用引物<sup>[14,15]</sup>对分离的致病细菌进行 PCR 扩增, 正反向引物分别为: P1 (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') 和 P2 (5'-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3')。扩增反应体积 20 μl [DNA 模板 1 μl; P1 (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 0.5 μl; P2 (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 0.5 μl; 2×Taq PCR StarMix 10 μl, 双蒸水补足至 20 μl]。反应条件为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 25 s, 65℃ 退火 25 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min。最后 4℃ 保存。PCR 反应在 PTC-200 型热循环仪上进行, 取 5 μl 反应液在 1.0% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测, 得到 1.5 kb 大小的条带。将 PCR 产物送上海泽衡生物技术责任公司克隆并测序。将得到的测序结果在 GenBank (登录 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 网址) 进行 blast 比对。

## 2 结果与分析

### 2.1 病原形态与培养性状

6 个梨树分离菌的菌体均为短杆状, 能游动, 好

气性，不产生芽孢。菌体大小为 0.8~1.5 μm×1.5~4.0 μm，着生 2~4 根极生鞭毛，在电镜下观察到的菌体多为 3 根鞭毛（图 1-A），但也发现两极各生 1 鞭毛的菌（图 1-B）。这表明该菌的鞭毛着生具有 *Pseudomonas* 属的典型特征。可由蔗糖形成果聚糖，

能液化明胶，产丁香霉素和细胞色素氧化酶，在 KMB 培养基上产生荧光色素。在 41℃ 下不能生长，淀粉水解、硝酸盐还原、β-葡糖苷酶反应为阴性（表 1）。表明该菌具有典型的 *P. syringae* 种的特征。在所测的 6 株菌株中有 3 株表现出冰核活性。

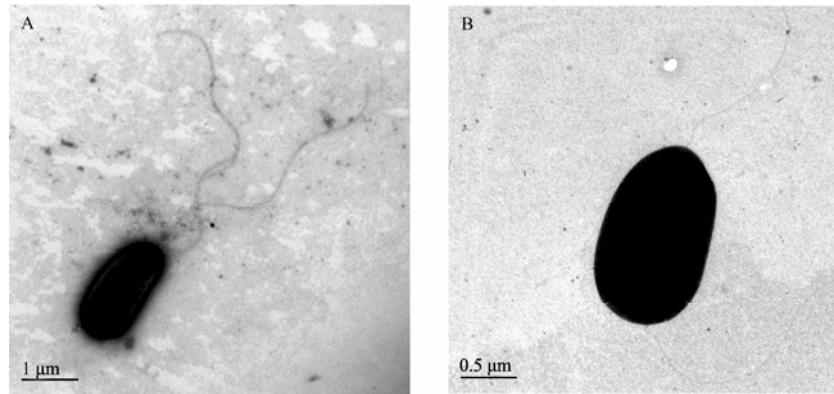


图 1 梨花枯病菌的形态及鞭毛着生位置（透射电镜图，A 为 20000 倍，B 为 40000 倍）

Fig. 1 Morphology and flagellum type of the bacterial pathogen of pear blossom blast (transition electro-microscope images. A=20000x, B=40000x)

表 1 梨细菌性花枯病原与标准菌株的主要细菌学特性比较

Table 1 The major bacteriological characteristics of causal organism of pear blossom blast compared with the standard strains

细菌学测定 Bacteriological test	标准菌株 <sup>1)</sup> Standard strains				测试菌株 <sup>2)</sup> Strains tested					
	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6
革兰氏染色 Gram staining	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
41℃ 下生长 Growth at 41℃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
细胞色素氧化酶 Cytochrome oxidase	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+
淀粉水解 Starch hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
硝酸盐还原 Nitrate reduction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β-葡糖苷酶 β-glucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
由蔗糖形成果聚糖 Levan formation from sucrose	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
荧光色素产生 Fluorescent pigment	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
冰核活性 Ice-nucleation-active	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-
产丁香霉素 Syringomycin production	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+

<sup>1)</sup> “+、-、W”分别表示阳性、阴性和弱阳性。标准菌株分别为 LMG5570、LMG2230、LMG 2231 和 *R. solanacearum* Rp-1; <sup>2)</sup> 测试菌株分别为 L1-L6  
<sup>1)</sup> “+、-、W”means positive, negative and weak, respectively. Reference strains are LMG 5570、LMG2230、LMG 2231 and *R. solanacearum* Rp-1; <sup>2)</sup> Strains tested are L1-L6

2.2 病原菌的致病性

将 6 株花枯和芽枯的分离细菌、3 株 *P. syringae* pv. *syringae* 标准菌株及 1 株青枯标准菌株的菌液浓度调

至 10<sup>8</sup> cfu·ml<sup>-1</sup> 的菌悬液接种烟草，观察其过敏性反应。结果发现所有菌株在接种后 24 h 均产生明显的过敏性反应，呈灰色晕圈，而无菌水对照无过敏性反应。

Koch 氏测定表明,该病在梨花上的枯萎症状始于萼片、花梗和花托的表面,枯斑可在整个花簇中蔓延直至枝梢,最终导致整个枝梢枯死。花的离体接种(26℃)发病时间在3~4 d,因不同菌株而异(图2)。在果实形成时期,如果坏死斑扩展,则整个果实及花梗将会变黑褐色,许多未成熟的梨果因此脱落,部分残留在树上的梨果也带有凹陷的坏死斑。梨果的离体发病时间在7~9 d(图3),因不同梨品种和不同菌株有所差异。当梨树幼叶被病原菌感染时,叶表面会出现细小,不易发现的叶斑和穿孔,严重时可以导致全叶枯死。被感染的枝条表面可出现树皮疱斑状的溃疡斑,在离体接种枝条上产生溃疡斑在10 d左右。



1-4 分别为 *P. syringae* pv. *syringae* LMG5570、无菌水、L4 和 L1  
1-4 are *P. syringae* pv. *syringae* LMG5570, sterilized distilled water, L4 and L1, respectively

图2 梨花枯病菌接种梨花离体发病5 d后症状

Fig. 2 Pear blossom blast symptoms induced by spraying inoculation *in vitro* 5 days after inoculation

### 2.3 Biolog 鉴定结果

Biolog 测定结果显示,3株 *P. syringae* pv. *syringae* 标准菌的 Biolog 相似度在 0.463~0.880, *R. solanacearum* Rp-1 在 0.871。6株梨花枯代表菌株均被鉴定为丁香假单胞菌丁香致病种 (*P. syringae* pv. *syringae*), 它们的 Biolog 相似度接近或超过标准菌,具有很高的可信度(表2)。

### 2.4 病原菌的脂肪酸(FAME)鉴定结果

FAME 鉴定结果匹配程度遵循 Buyer 等<sup>[16]</sup>的原则:相似性系数<0.2,结果不可用;相似性系数≥0.5,鉴定到种。4个标准菌株和6株梨花枯致病细菌的 FAME 鉴定结果与 Biolog 鉴定完全一致(表3),其中3株 *P. syringae* pv. *syringae* 标准菌株的 FAME 相似度在 0.582~0.671,6株梨花枯致病细菌的 FAME 相似度在



1-4 分别为无菌水、*P. syringae* pv. *syringae* LMG5570、L1 和 L4  
1-4 are sterilized distilled water, *P. syringae* pv. *syringae* LMG5570, L1 and L4, respectively

图3 梨花枯病菌接种梨果离体发病8 d后症状

Fig. 3 Symptoms of pear blossom blast induced by needle inoculation on Pear fruit *in vitro* 8 days after inoculation

表2 6株梨花枯致病细菌与标准菌的 Biolog 鉴定结果

Table 2 Biolog identity of 6 pathogenic bacteria of pear and the standard reference strains

菌株 Strain	原鉴定结果 Original Identity	Biolog 当前鉴定结果 Biolog identify at present	
		相似度 Similarity	鉴定结果 Identify
LMG5570	丁香假单胞丁香致病种 <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	0.880	丁香假单胞丁香致病种 <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>
LMG2230	丁香假单胞丁香致病种 <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	0.463	丁香假单胞丁香致病种 <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>
LMG2231	丁香假单胞丁香致病种 <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	0.665	丁香假单胞丁香致病种 <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>
Rp-1	茄劳尔氏菌 <i>R. solanacearum</i>	0.871	茄劳尔氏菌 <i>R. solanacearum</i>
L1	-	0.639	丁香假单胞丁香致病种 <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>
L2	-	0.710	丁香假单胞丁香致病种 <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>
L3	-	0.839	丁香假单胞丁香致病种 <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>
L4	-	0.740	丁香假单胞丁香致病种 <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>
L5	-	0.644	丁香假单胞丁香致病种 <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>
L6	-	0.644	丁香假单胞丁香致病种 <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>

0.584~0.701,均接近或超过标准菌,表明本次 FAME 鉴定结果真实可靠。

### 2.5 病原菌的 PCR 鉴定

登录 GenBank 进行序列比较,结果表明,6株检测菌株与 *P. syringae* pv. *syringae*、*P. syringae* pv. *glycinea*

表 3 6 株梨花枯致病细菌与标准菌的脂肪酸鉴定结果

Table 3 FAME identity of 6 pathogenic bacteria of pear and the standard reference strains

菌株 Strain	原鉴定结果 Original identity	FAME 当前鉴定结果 FAME identify at present	
		相似度 Similarity	鉴定结果 Identify
LMG5570	丁香假单胞丁香致病种 <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	0.582	丁香假单胞丁香致病种 <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>
LMG2230	丁香假单胞丁香致病种 <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	0.671	丁香假单胞丁香致病种 <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>
LMG2231	丁香假单胞丁香致病种 <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	0.670	丁香假单胞丁香致病种 <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>
Rp-1	茄劳尔氏菌 <i>R. solanacearum</i>	0.690	茄劳尔氏菌 <i>R. solanacearum</i>
L1	-	0.645	丁香假单胞丁香致病种 <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>
L2	-	0.678	丁香假单胞丁香致病种 <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>
L3	-	0.701	丁香假单胞丁香致病种 <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>
L4	-	0.616	丁香假单胞丁香致病种 <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>
L5	-	0.584	丁香假单胞丁香致病种 <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>
L6	-	0.663	丁香假单胞丁香致病种 <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>

(*P. savastanoi* pv. *glycinea*, 大豆细菌性疫病菌)、*P. syringae* pv. *phaseolicola* (*P. savastanoi* pv. *phaseolicola*, 菜豆晕疫病菌) 等的同源性均高达 99%, 但根据上述的细菌学特征、Biolog 和 FAME 分析鉴定及其在梨树上的致病性测定 (后两种病原在梨树上不致病), 可以排除后两种病原细菌的可能性。

### 3 讨论

笔者的研究表明, 发生在浙江杭州的梨花枯和芽枯是由 *P. syringae* pv. *syringae* 引起。病原接种后在梨上可产生花枯、芽枯、叶斑、梨果腐烂和枝条溃疡斑。特别是其初期的花枯、芽枯症状很象由 *E. amylovora* 引起的梨火疫病<sup>[17]</sup>, 两者镜检均可见喷菌现象; 但发病后期后者的梨嫩枝条上会产生典型的“牧羊鞭”症状, 湿度较高时病斑处会溢出菌脓<sup>[18]</sup>, 而前者就没有这种特征。然而, 两种病原均可产生溃疡斑, 只是梨火疫病的较常见, 而前者所产生的溃疡斑较少见<sup>[19]</sup>。笔者在梨枝干上接种 *P. syringae* pv. *syringae*, 发现溃疡斑的产生受多种因素影响<sup>[20]</sup>, 首先是接种浓度和接

种方法, 以  $10^8$  cfu·ml<sup>-1</sup> 浓度和伤口接种最佳, 浓度低于  $10^6$  cfu·ml<sup>-1</sup> 和喷雾接种不产生溃疡斑, 其次是接种部位, 靠近芽部梨枝干处接种易产生溃疡斑。然而, 在果园自然发病情况下, 溃疡斑的发生与梨的品种及春季受冻关系密切<sup>[6,7]</sup>, 同时伤口感染也起了很大作用。

国外的研究表明, *P. syringae* pv. *syringae* 除引起的梨的多种症状外<sup>[21]</sup>, 还可引起苹果的细菌性树皮疱斑病 (bacterial blister bark of apple), 但病原在致病性上有所不同, 目前苹果疱斑病只在南非有报道<sup>[22]</sup>。笔者报道的梨花枯和芽枯病原, 是否也能感染苹果或产生苹果疱斑病有待明确。国内方中达等<sup>[23]</sup>报道 *P. syringae* pv. *syringae* 是引水稻细菌性褐斑病的病原, 病斑主要发生在叶片上, 叶鞘、穗茎及谷粒均可受害, 该病主要在东北发生, 但由于该病的病原研究是在 1960 年, 而且国内尚无保存该病原。致使笔者研究的梨花枯和芽枯病原无法与它作一比较, 而且国外也未见这方面的报道。但国外报道 *P. syringae* pv. *syringae* 具有广泛的生态多样性, 它可附着在其它果树上, 一些菌株具有冰核活性, 在有霜冻的早春可使果园遭受严重损失<sup>[24]</sup>, 并象其它病原细菌一样在土壤和非寄主上渡过不良环境<sup>[25]</sup>, 由 *P. syringae* pv. *syringae* 引起的梨花枯和芽枯病在中国的侵染循环及病菌的来源有待深入研究。

### 4 结论

- 4.1 通过分离和 Kock 氏病原假说测定从梨花枯和芽枯的样本上获得病原细菌。
- 4.2 经表型和分子鉴定证实了中国的梨花枯和芽枯是由 *P. syringae* pv. *syringae* 引起。
- 4.3 这一新发现为鉴别中国尚未发生的外来危险性有害生物梨火疫病提供了有用的诊断信息。

致谢: 浙江大学电镜室黎军英老师协助拍摄电镜照, 浙江大学生物技术研究所王笑、方媛、楼妙苗、朱勃参加部分试验, 比利时根特大学 Swings J 及福建省农业科学院刘波研究员提供标准菌株, 特此致谢。

### References

- [1] Stoger A, Schaffer J, Ruppitsch W. A rapid and sensitive method for direct detection of *Erwinia amylovora* in symptomatic and asymptomatic plant tissues by polymerase chain reaction. *Journal of Phytopathology*, 2006, 154: 469-473.
- [2] 陈 晨, 陈 娟, 胡白石, 白艺珍, 姜英华, 刘凤权. 梨火疫病菌

- 在中国的潜在分布及入侵风险分析. *中国农业科学*, 2007, 40(5): 940-947.
- Chen C, Chen J, Hu B S, Bai Y Z, Jiang Y H, Liu F Q. Potential distribution of *Erwinia amylovora* in China and invasion risk assessment. *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, 40(5): 940-947. (in Chinese)
- [3] Barker B P, Grovo O. A bacterial disease of fruit blossom. *Annals of Applied Biology*, 1914, 1: 85-97.
- [4] Clara F M. A new bacterial disease of pears. *Sciences*, 1932, 75: 111.
- [5] Yessad S, Manceau C, Luisetti J. A detached leaf assay to evaluate virulence and pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on pear. *Plant Disease*, 1992, 76: 370-373.
- [6] Wilsom E E. A bacterial canker of pear trees new to California. *Phytopathology*, 1934, 24: 534-537.
- [7] Spotts R A, Cervantes L A. Factors affecting the severity of bacterial canker of pear caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Pathology*, 1995, 44: 325-331.
- [8] Billing E, Crosse J E, Garrett C M E. Laboratory diagnosis of fire blight and bacterial blossom blight of pear. *Plant Pathology*, 1960, 9: 19-25.
- [9] Klement Z, Rudolph K, Sands D C. *Methods in phyto bacteriology*. Budapest: Akademiai Kiado, 1990.
- [10] Schaad N W, Jones J B, Chun W. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria* (3rd ed): Minnesota USA: APS Press, 2001.
- [11] Lindow S E. Bacterial ice nucleation: a factor in frost injury to plants. *Plant Physiology*, 1982, 70: 1084-1089.
- [12] Xie G. Comparison of the methods for identification of pathogenic bacteria of rice. *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Science)*, 2000, 26(4): 253-258.
- [13] Xie Guanlin, Soad A, Swings J, Mew T W. Diversity of gram negative bacteria antagonistic against major pathogens of rice seed in the tropic environment. *Journal of Zhejiang University (Science)*, 2003, 4(4): 463-468.
- [14] Edward U, Rogall T, Blocker H, Ernde M, Bottger E C. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17: 7843-7853.
- [15] Li B, Xie G L, Zhang J Z, Janssens D, Swings J. Identification of the bacterial leaf spot pathogen of poinsettia in China. *Journal of Phytopathology*, 2006: 154, 711-715.
- [16] Buyer J S, Roberts D P, Russek C E. Soil and plant effects on microbial community structure. *Canadian Journal of Microbiology*, 2002, 48(11): 955-964.
- [17] Aldwinckle H S, Beer S V. Fire blight and its control. *Horticulture Review*, 1979, 1: 423-474.
- [18] Jones A L, Aldwinckle H S. *Compendium of Apple and Pear Diseases*. St Paul, MN, USA: APS Press, 1990.
- [19] Doidge E M. A bacterial blight of pear blossom occurring in South Africa. *Annals of Applied Biology*, 4: 50-74.
- [20] Whitesides S K, Spotts R A. Induction of pear blossom blast caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Pathology*, 1991, 40(1): 118-127.
- [21] Panagopoulos C G, Crosse J E. Blossom blight and related symptoms caused by *Pseudomonas syringae* van Hall on pear trees. *Annals Reporter East Malling Research Station Kent*, 1963, 47: 119-122.
- [22] Mansvelt E L, Hatting M J. Bacterial blister bark and blight of fruit spurs of apple in South Africa. *Plant Disease*, 1986: 70403-70405.
- [23] 方中达, 任欣正. 中国植物病原细菌名录. *南京农业大学学报*, 1992, 15(4): 1-6.  
Fang Z D, Ren X Z. Notes on list of bacterial plant pathogens in China. *Journal Nanjing Agricultural University*, 1992, 15(4): 1-6. (in Chinese)
- [24] Gross D C, Cody Y S, Proebsting E L, Rademaker G K, Spotts R A. Distribution, population dynamics, and characteristics of ice nucleation-active bacteria in deciduous fruit tree orchards. *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, 46: 1370-1379.
- [25] Wang G F, Praphat K, Xie G L, Li Bin, Zhu B, Liu B, Zhou Q. Bacterial wilt of mulberry (*Morus alba*) caused by *Enterobacter cloacae* in China. *Plant Disease*, 2008, 92(3): 483.

(责任编辑 毕京翠)