

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2011)01-0050-05

综 述

青 枯 病 菌 研 究 进 展

赫莲香¹, 郭 晓², 张新永³, 樊颖伦⁴, 刘生祥¹, 杨 煜², 郭华春^{3*}, 李广存²

(1. 宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021; 2. 山东省农业科学院高新技术研究中心, 山东 济南 250100;
3. 云南农业大学农学院, 云南 昆明 650201; 4. 聊城大学农学院, 山东 聊城 252059)

摘 要: 细菌性青枯病是由茄科雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的一种世界范围的细菌性土传病害, 广泛分布于热带、亚热带及部分温带地区。青枯病菌寄主广泛, 可侵染 50 多个科的 200 余种植物, 给作物生产带来巨大损失。充分了解青枯病菌是进行青枯病防治的重要前提。本文从青枯病菌的菌群分类、基因组结构、致病机制与致病途径、病菌检测等方面做了系统的阐述, 并对基于青枯病菌及寄主植物基因组序列信息, 研究和探讨青枯病菌致病机制与青枯病防治进行了展望。

关键词: 青枯病菌; 基因组结构; 致病机制; 检测

Research Progress on *Ralstonia solanacearum*

HE Lianxiang¹, GUO Xiao², ZHANG Xinyong³, FAN Yinglun⁴, LIU Shengxiang¹, YANG Yu², GUO Huachun^{3*}, LI Guangcun²

(1. College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China; 2. High-tech Research Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan, Shandong 250100, China; 3. College of Agronomy, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China; 4. College of Agriculture, Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252059, China)

Abstract: Bacterial wilt (BW) caused by *Ralstonia solanacearum* (*Rs*) is an important soil-borne disease that spreads worldwide especially in tropical, subtropical, and some temperate regions. It infects hundreds of plant species of more than 50 families and results in huge losses in crop production. Fully understanding *Ralstonia solanacearum* is very important for controlling bacterial wilt in crop. Therefore, the classification, genomic structure, pathogenesis mechanisms and pathogen detection of *Rs*, etc. were reviewed in this paper. Moreover, how to control bacterial wilt and study pathogenesis mechanisms of *Rs* was expected on the base of genomic sequences of the pathogen and its host in the future.

Key Words: *Ralstonia solanacearum*; genome structure; pathogenesis mechanism; detection

青枯病菌是一种毁灭性的土传性病原菌, 寄主范围广, 从单子叶植物、双子叶植物到树木和灌木, 可侵染 50 多个科的 200 余种植物。该病原菌从寄主植物的根部, 入侵木质部导管, 通过维管束系统迅速扩张到植物的地上部分, 病菌的大量定殖引起导管功能丧失, 进而引发植物萎蔫, 导致植物死亡^[1]。青枯病在作物的整个生长期都有可能发生, 现蕾开花期症状最明显, 特别是在温暖潮湿、雨水充沛的

环境中发病尤为严重。受病原菌侵害的植株茎基部和根维管束变褐色。感病的马铃薯块茎剖开后, 切面可见白色菌脓溢出^[2]。青枯病难以防治, 目前尚没有很好的防治办法, 作物一旦感病, 将会造成大量减产^[3]。

近年来由于“温室效应”所引起的全球气候变暖, 该病原菌呈现出向高纬度地区蔓延的趋势, 给作物生产带来极大的危害^[4]。因此, 深入了解青枯病菌的种

收稿日期: 2010-12-06

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金资助(nycytx-15); 山东省自然科学基金(ZR2010CQ025, Y2006D21); 山东省农科院青年基金(2007YQN002)。

作者简介: 赫莲香(1983-), 女, 硕士研究生, 研究方向为作物遗传育种。

* 通信作者(Corresponding author): 郭华春, 教授, 主要从事马铃薯栽培生理研究, E-mail: ynghe@126.com。

群分类、致病机制对有效防治青枯病具有重要意义。

1 青枯病菌的分类

国际上普遍认同的有两个亚分类系统。一是根据不同的寄主范围将青枯病菌划分为不同的生理小种(Race), 另一个亚分类系统是根据不同菌株对3种双糖(麦芽糖、乳糖和纤维二糖)和3种己醇(甘露醇、山梨醇和卫矛醇)氧化产酸能力的差异将青枯病菌分为不同的生化变种。生理小种和生化变种之间并没有严格的对应关系。小种3号是危害我国马铃薯的优势菌系^[5]。

青枯病菌是一种易变的种群, 近年来人们对于青枯病菌的分类又进行了新的研究和探讨, 以16S和23S rRNA、多聚半乳糖醛酸酶和内切葡聚糖酶序列分析为依据, 用限制性片段长度多态性(RFLP)方法进行分析, 从地理起源来划分, 将其分为两大组, 分别为“亚洲组”和“美洲组”, “美洲组”又分为两个亚组a和b(包括印尼菌株)^[6]。2005年, Fegan和Prior^[7]提出了一种能反应青枯病菌复杂性和多样性的新分类体系, 该分类体系将病菌分为4个水平: 种、亲缘型、序列型和克隆。Remenant等^[8]用16S-23S内转录间隔(ITS)、*egl*和*hrpB*基因、比较基因组杂交(Comparison genome hybridization, CGH)对青枯病菌进行分析, 将其分为四种亲缘型(Phylotype): 亚洲型(亲缘型)、美洲型(亲缘型A和B)、非洲型(亲缘型)和印尼型(亲缘型), 每一个亲缘型可进一步亚分类为序列型(Sequevar)。如已知基因组序列的青枯病菌菌株GMI1000, 按起源它属于亲缘型、序列型18, 这种分类方法可反映出青枯病菌的起源。

2 青枯病菌的基因组结构特点

2002年, Salanoubat等^[9]从番茄中分离到青枯病菌菌株GMI1000, 并以其为材料完成了基因组测序, 这为了解青枯病菌的基因组结构和其致病机制奠定了基础。

2.1 青枯病菌的双向基因组结构

青枯病菌基因组大小约为5.8 Mb, 包含两个复制子, 即3.7 Mb的染色体(大复制子)和2.1 Mb的巨质粒(小复制子)。这两个复制子的C+G含量几乎相同, 分别为67.04%和66.86%, 预测基因组共编码5129个蛋白。大复制子携带有*rnpA*、*dnaA*、

*dnaN*和*gyrAB*基因, 相当于DNA结合框, 具有细菌染色体复制起点的特征; 并且细菌所有的必需持家基因也都位于大复制子上, 这些持家基因包括DNA复制、DNA修复、细胞分裂、转录和翻译所需的基因等^[9]。相反, 小复制子的复制起点的侧翼是*repA*基因和一些RepA-结合框, 其上携带有与新陈代谢有关的若干必需基因, 这些基因包括带有2个tRNA基因的完整拷贝rDNA、编码DNA聚合酶 α -亚基基因和蛋白质延长因子*G*基因。小复制子上还编码一些特有的控制初生代谢的酶类, 包括氨基酸、核苷酸和辅酶。对小复制子基因组分析表明, 其上编码的蛋白质对青枯病菌适应不同环境起着重要作用, 同时也与该病原菌的致病性有关, 如小复制子上携带的*hrp*基因簇为青枯病菌致病所必需。此外, 一些编码组成鞭毛及控制胞外多糖合成的基因也在小复制子上^[10]。

这种双向基因组结构是青枯病菌特有的, 在大多数青枯病菌菌株中均发现有巨质粒。利用小种1号菌株GMI1000的研究表明: 即使删除巨质粒也得不到其衍生物, 这个复制子能否作为质粒尚需进一步研究^[11]。

2.2 青枯病菌基因组的镶嵌结构

青枯病菌基因组中存在可替换的密码使用域(Alternative codon usage regions, ACUR), 该区域约占基因组的7%。大多ACUR没有明显的不同, 整个基因组的平均C+G含量为67%, 变化范围为50%~70%。在93个ACUR中, 有44个与噬菌体或转座序列有关。除ACUR外, GMI1000菌株还具有其他的遗传不稳定性和基因组快速进化功能的成分。青枯病菌的镶嵌结构有潜在进化的基本信号, 在其大质粒上发现的约31 kb重复区域具有遗传重排现象, 这种基因组的不稳定性在青枯病菌中是常见的现象, 而且这种不同种基因的多样性可能与适应性、不同宿主环境等因素有关^[12]。

3 青枯病菌的致病机制

青枯病菌进入寄主细胞有多种方式, 一是植物感病组织的渗出物(病原菌)进入土壤, 经过土壤入侵寄主; 二是土壤中的病原菌随灌溉传播给寄主; 以及通过带菌的农业机械在耕作过程中将病原菌带入土壤, 进而侵染植物^[13]。

3.1 青枯病菌对植物的侵染过程

通常情况下, 青枯病菌从植物根部伤口或次生

根的自然裂口侵入,随后在细胞间隙和内皮层迅速繁殖引起植物发病^[14]。植物生长时,次生根的根冠和主根的表皮之间形成鞘,青枯病菌能穿过这层鞘侵入到皮层细胞间隙,破坏细胞之间的中胶层,使细胞壁分离、变形、形成空腔,继而侵染木质部薄壁组织,使导管附近的小细胞受到刺激形成侵填体并移入其中,侵填体破裂后病原菌被释放出来进入导管,在导管内大量繁殖和扩张,从而引起植株萎蔫死亡^[15]。病原菌作用植物和趋氧性有直接关系,病原菌利用一种趋氧性运动感受特定环境的刺激,并移动到对自己有利的环境处^[16]。Yao 等^[17]从青枯病菌 K 60 中鉴定出两个突变趋氧性受体蛋白 Aer1 和 Aer2,它们在大肠杆菌和青枯病菌中具有趋氧传感器的功能。实验结果发现,青枯病菌的全部毒性和快速定殖都需要趋氧性。趋氧性行为在青枯病菌的生命周期中是非常重要的,可以调节病原菌在不同生境之间的迁移。

3.2 青枯病菌致病的生化途径

青枯病菌的致病性是重叠复杂的,因此青枯病菌具有十分复杂的调控系统来控制病菌在不同环境都能适应生存。这个调控的核心是 Phc (Phenotype conversion 表性转化)系统^[18],该系统对 3-羟基棕榈酸甲酯有特定的反应^[19]。现已证实这些调控系统因子包括胞外多糖、一些植物细胞壁降解酶和一些型分泌因子;细菌的运动包括鞭毛的泳动和纤毛的搔动,这些都是青枯病菌致病性所必须的^[20]。对于这些因素的研究有助于了解青枯病菌与寄主植物的相互作用,从而为控制青枯病的发生和危害提供理论依据。青枯病菌分泌的胞外蛋白能形成一个分子集合体,具有适应生境、入侵寄主和躲避寄主防御的功能。植物细胞壁降解酶系是由欧文氏软腐菌产生并由型分泌系统分泌,这也是植物病原菌与细菌分泌系统如何互作的一个实例^[21]。型分泌系统包括植物细胞壁降解酶(*PehA*, *PehB*, *PehC*, and *Pme*)、内切葡聚糖酶(*Egl*)和胞外多糖(EPS),这些对病原菌的成功定殖和病原的发展都有贡献^[22]。在青枯病菌中,多数细胞壁降解酶类(CWDEs)是通过 T₃SS 输出膜外。T₃SS 的钝化导致分泌蛋白积累在细胞质中,T₃SS 的突变则导致菌株不能分泌 CWDEs,菌株的繁殖速度也比野生型的慢,且不能致病。对 GMI 1000 的 T₃SS 突变体的研究也表明 T₃SS 与植物细胞壁的降解有直接关系^[23]。协

同分泌蛋白在植物病原菌的致病性中也是非常重要的。Gonza'lez 等^[24]利用突变的多精氨酸移位分泌系统(Tat)的关键组成成分 *tatC* 来鉴定青枯病菌的致病性。青枯病菌的 *tatC* 突变体具有多效性,其表型包括:细胞分裂的缺陷、硝酸盐的利用、多聚半乳糖醛酸酶的活性、质膜的稳定性和植物组织的生长。通过对青枯病菌 GMI 1000 基因组的生化分析发现这种病原菌通过 Tat 系统能分泌 70 种蛋白质,进一步的实验结果表明 Tat 分泌体的成分是青枯病菌的新致病因子。

青枯病菌在植物体内可产生大量的粘性物质,阻碍导管中液体的流动,从而阻塞维管束引起萎蔫。青枯病菌粘性物质的主要成分为酸性胞外多糖(EPSI)。通过对 EPSI 缺陷型突变菌系与 EPSI 的野生型菌系的致病性比较发现:导致植物萎蔫的主要原因是因为以酸性胞外多糖为主要成分的粘性物质堵塞导管,产生过度流体静压力而使导管破裂,并促进细菌在植物体内的移动、扩散和定殖^[25]。

青枯病菌的型分泌系统(Type secretion system, TTSS)是由编码它的大基因簇 *hrp / hrc* 和控制它表达的 AraC 型转录激活子 *HrpB* 组成^[26],该基因簇具有 5 个转录单位,编码 20 多种多肽^[27]。

型分泌系统是病菌对植物致病所必需的^[28],被认为是致病因子进入植物的分子通道^[29]。Turner 等^[30]对完好无损的根尖进行了研究,发现青枯病菌在入侵根尖时需要两种不同的型因子 *Gala 7* 和 *AvrA*,且 *Gala 7* 是入侵皮层细胞的主要决定因素。进一步研究发现 *AvrA* 的突变体在入侵的整个过程中都表明能减少致病性,*AvrA* 因子在早期侵染中是非常重要的,而 *Gala 7* 则在后期侵染中起关键性的作用。型分泌系统和 T3E (Type effector) 基因受 *HrpB* 基因的调控,*Hrp* 基因是 AraC 家族的一个调节子,它的这一特性首先是在 GMI 1000 的含有 *HrpB* 效应成分的启动子中发现的^[31]。GMI1000 的 T3E 区域的一个新特点是含有多个基因家族,其中的 3 个基因家族至少包含 5 个成员,而在其他物种的菌株中却保持不变。同时还发现有相当多的 T3Es 含多种内部重复,如蛋白质-蛋白质互作(锚蛋白重复和不同类型的富含亮氨酸重复)或 DNA/RNA 结合(分别有 *AvrBs3* 重复、三角状五肽重复)。

4 青枯病菌的检测方法

目前用于青枯病菌的检测方法很多,如选择性分离鉴定技术、免疫检测技术、分子生物学检测技术等,这些检测方法已被广泛应用于植物、土壤和水样的青枯病菌检测,对及时发现和消除病菌,防止其蔓延扩散提供了有力帮助。

4.1 常规检测方法

常规检测方法中的组织病理切片法是比较理想的方法,它是根据组织细胞内细菌的有无来判断。Kelman^[32]研究出专门用于分离青枯病菌的红四氮唑培养基,该培养基中所含的2,3,5-氯化三苯基四氮唑可与青枯病菌发生生化反应,使之在培养基上呈现出典型的内红外白流动状的菌落,这一培养基可用于区别青枯病菌和其他细菌。常规测定法的优点在于简单易行,缺点是检测周期长,难以达到“快速、准确”的要求。

4.2 血清学方法

血清学检测方法是目前较为灵敏、简便和实用的方法。Janse^[33]首先创立了间接免疫荧光染色法(IFAS)用于检测植物组织中的青枯病菌,这种方法是目前用于检测寄主中青枯病菌潜伏侵染最为直接的血清学方法,可以检测出 1×10^3 cfu / mL的病原菌。李广存等^[34]报道利用快速PE-ELISA对马铃薯青枯病菌进行检测,该方法较普通NCM-ELISA灵敏度提高100万倍,同双抗体夹心ELISA一样灵敏,且更为简单。

4.3 分子生物学检测方法

分子生物学技术检测主要包括分子杂交、聚合酶链式反应(PCR)以及在PCR技术基础上扩展的RAPD、RFLP和RT-PCR等技术,这些分子生物学方法具有快速灵敏等特点,大大提高了植物青枯病菌的检测效率。Wullings等^[35]根据已知青枯病菌16S rRNA和23S rRNA的序列设计特异探针RSOLA和RSOLB,采用荧光原位杂交结合间接免疫荧光技术成功检测到马铃薯中的青枯病菌,灵敏度可达 1×10^4 cfu / mL。Kawasaki等^[36]在丝状噬菌体RSS1中构建一个绿色荧光蛋白(GFP)-表达型质粒pRSS12,该质粒可用于转化青枯菌株不同的生理小种和生化变种,且插入后该质粒能保持稳定。利用pRSS12转化的青枯病菌细胞发出的强绿色荧光可很容易监测到受感染的番茄组织(茎、叶

柄和根),因此pRSS12可以充当简单实用的青枯病菌GFP标签工具。

5 展望

5.1 简单序列重复(SSR)在青枯病菌种群分类中的应用

青枯病菌种群复杂,要彻底弄清其分类和它们之间的关系尚需进一步研究。SSR标记在青枯病菌的鉴定和分类中已有报道。该分子标记的优点在于:均匀、随机、在基因组中广泛分布,且SSR两侧序列保守,呈共显性,因而对个体鉴定具有特殊意义。本文作者正在试图利用SSR标记对青枯病菌进行检测和分类,以期获得简单可用的SSR。

5.2 青枯病菌致病机制与青枯病的防治

通过对已完成基因组测序的青枯病菌菌株的序列分析,一系列可能的新致病(相关)基因得到了确定^[8,9],这些基因包括编码降解植物细胞壁的水解酶基因、编码抗氧化蛋白的基因等^[9],并发现这些编码抗氧化蛋白的基因可能与受感染植物产生的活性氧解毒有关,而活性氧类物质被认为是防止病原菌入侵的第一道防线^[13]。青枯病菌基因组序列的完成,为人们深入了解和探讨青枯病菌奠定了坚实的基础,对研究其致病机制及病原菌与植物的互作机理也具有重要意义。目前马铃薯基因组测序已经完成,基于马铃薯和青枯病菌的基因组序列,结合生物信息学方法分析马铃薯抗病和病原菌致病之间的内在联系,达到“知己知彼”,将可快速、便捷的预测和克隆更多的病原致病基因和马铃薯抗病基因,实现分子设计育种,克服马铃薯青枯病的病害。

[参 考 文 献]

- [1] Hayward A C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* [J]. Annu Rev Phytopathol, 1991, 29: 65-87.
- [2] 李映. 马铃薯体细胞杂种的青枯病抗性鉴定[D]. 武汉: 华中农业大学, 2004.
- [3] Swanson J K, Yao J, Tans-Kersten J, et al. Behavior of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 during latent and active infection of geranium[J]. Phytopathology, 2005, 95(2): 136-143.
- [4] Hayward A C, Elphinstone J G, Caffier D, et al. Round table on bacterial wilt (Brown Rot) of potato [M]//Prior P H, Allen C, Elphinstone J G. Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1998: 420-430.
- [5] 李广存, 金黎平, 谢开云, 等. 马铃薯青枯病研究进展[J]. 中国

- 马铃薯, 2004, 18(6): 350–354.
- [6] Melanie L, Lewis Ivey, Brian B, et al. Diversity of *Ralstonia solanacearum* infecting eggplant in the Philippines [J]. *Phytopathology*, 2007, 97(11): 1467–1475.
- [7] Fegan M, Prior P. How complex is the "*Ralstonia solanacearum* species complex?" [M] // Allen C, Prior P, Hayward A C. Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. St. Paul, MN: APS Press, 2005: 449–461.
- [8] Remenant B, Coupat–Goutaland B, Guidot A, et al. Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 379–395.
- [9] Salanoubat M, Genin S, Artiguenave F, et al. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* [J]. *Nature*, 2002, 415: 497–502.
- [10] Boucher C, Barberis P, Arlat M. Acridine orange selects for deletion of *hrp* genes in all races of *Pseudomonas solanacearum* [J]. *Mol Plant–Microbe Interact*, 1998, 1: 282–288.
- [11] Boucher C, Martinel A, Barberis P, et al. Virulence genes are carried by a megaplasmid of the plant pathogen *Pseudomonas solanacearum* [J]. *Mol Gen Genet*, 1986, 205: 270–275.
- [12] Bertolla F, Van Gijsegem F, Nesme X, et al. Conditions for natural transformation of *Ralstonia solanacearum* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 4965–4968.
- [13] van Elsas J D, Kastelein P, van Bekkum P, et al. Survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, the causative agent of potato brown rot in field and microcosm soils in temperate climates [J]. *Phytopathology*, 2000, 90(12): 1358–1366.
- [14] Vasse J, Frey P, Trigalet A. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum* [J]. *Mol Plant–Microbe Interact*, 1995, 8: 241–251.
- [15] 杨玉红. 茄科植物青枯菌病害研究进展[J]. *江西农业学报*, 2008, 20(5): 54–55.
- [16] Dharmatilake A J, Bauer W D. Chemotaxis of rhizobium meliloti toward nodulation gene–inducing compounds from alfalfa roots [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58: 1153–1158.
- [17] Yao J, Allen C. The plant pathogen *Ralstonia solanacearum* needs Aerotaxis for normal biofilm formation and interaction with its tomato host [J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(17): 6415–6424.
- [18] Schell M A. Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory array [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2000, 38: 263–292.
- [19] Clough S, Lee K E, Schell M, et al. A two–component system in *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* modulates the production of *PhcA*–regulated virulence factors in response to 3–hydroxypalmitic acid methyl ester [J]. *Bacteriol*, 1997, 179: 3639–3648.
- [20] Gonzalez E T, Allen C. Characterization of a *Ralstonia solanacearum* operon required for polygalacturonate degradation and uptake of galacturonic acid [J]. *Mol Plant–Microbe Interact*, 2003, 16: 536–544.
- [21] Hugouvieux–Cotte–Pattat N, Condemine G, Nasser W. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi* [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1996, 50: 213–257.
- [22] Cornelis G R, VanGijsegem F. Assembly and function of type III secretion systems [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2000, 54: 735–774.
- [23] Denny T P. Plant pathogenic *Ralstonia* species [M] // Gnanamankam S S. Plant–associated bacteria. Dordrecht, the Netherlands: Springer Publishing, 2006: 573–644.
- [24] Gonza'lez E T, Brow D G, Swanson J K., et al. Using the *Ralstonia solanacearum* Tat secretome to identify bacterial wilt virulence factors [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (12): 3779 –3786.
- [25] 王军. 青枯菌对植物的致病机制及其调节[J]. *林业科学*, 2005, 41(3):142–147.
- [26] Mukaihara T, Tamura N. Identification of novel *Ralstonia solanacearum* type effector proteins through translocation analysis of *hrpB*–regulated gene products [J]. *Microbiology*, 2009, 155: 2235–2244.
- [27] Kanda A, Yasukohchi M, Ohnishi K, et al. Ectopic expression of *Ralstonia solanacearum* effector protein PopA early in invasion results in loss of virulence [J]. *Mo Plant–Microbe Interact*, 2003, 16: 447–455.
- [28] He S Y, Nomura K, Whittam T S. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1694: 181–206.
- [29] Nomura K, Melotto M, He S Y. Suppression of host defense in compatible plant *Pseudomonas syringae* interactions [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8: 361–368.
- [30] Turner M, Jauneau A, Genin S. et al. Dissection of bacterial wilt on *Medicago truncatula* revealed two type secretion system effectors acting on root infection process and disease development [J]. *Plant Physiology*, 2009, 150: 1713–1722.
- [31] Cunnac S, Boucher C, Genin S. Characterization of the cisacting regulatory element controlling *HrpB*–mediated activation of the type III secretion system and effector genes in *Ralstonia solanacearum* [J]. *Bacteriol*, 2004, 186: 2309–2318.
- [32] Kelman A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tert razolium medium [J]. *Phytopathology*, 1954, 64: 293 – 295.
- [33] Janse J D. A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity [J]. *Bull OEPP*, 1988, 18: 343 – 351.
- [34] 李广存, 王秀丽, 杨元军, 等. 马铃薯青枯病菌的 PE–ELISA 检测[J]. *中国马铃薯*, 2002, 16(1): 18–20.
- [35] Wullings B A, Beuning A R, Janse J D, et al. Detection of *Ralstonia solanacearum*, which cause brown rot of potato by fluorescent in situ hybridization with 23SrRNA targeted probes [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64 (11): 4546 – 4554.
- [36] Kawasaki T, Satsuma H, Fujie M, et al. Monitoring of phytopathogenic *Ralstonia solanacearum* cells using green fluorescent protein–expressing plasmid derived from bacteriophage RSS1 [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2007, 104(6): 451–456.