

# 入境马蹄莲细菌性软腐病菌的分离鉴定

厉艳\*, 魏晓棠, 甘琴华, 纪瑛, 邵秀玲, 王英超

(山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 青岛 266002)

**摘要:** **目的** 在参展青岛世界园艺博览会的荷兰进口马蹄莲植株上, 发现叶片有明显褐色软腐症状, 为明确引起马蹄莲软腐病的病原, 对叶片进行病菌的分离鉴定。**方法** 采用组织分离法, 从荷兰入境马蹄莲植株的病变叶片中分离纯化到2株致病性细菌菌株(MTL1、MTL2), 对该菌株进行鉴定和生物学特性研究。**结果** 形态及培养特征、生理生化特性的研究结果表明该菌株在NA培养基上能形成白色圆形单菌落, 薄而平滑、边缘整齐, 光滑不透明, KB培养基上划线培养后可产生明显的绿色的荧光。显微镜下菌体呈杆状, 具多根极生鞭毛, 革兰氏阴性菌。**结论** 经形态鉴定、培养特征、生理生化及16S rDNA序列分析和致病性测定实验, 确认引起马蹄莲细菌性软腐病的病原为边缘假单胞菌(*Pseudomonas marginalis*)。

**关键词:** 马蹄莲; 细菌性软腐病; 病原鉴定; 边缘假单胞

## Isolation and identification of soft rot bacteria on imported *Zantedeschia*

LI Yan\*, WEI Xiao-Tang, GAN Qin-Hua, JI Ying, SHAO Xiu-Ling, WANG Ying-Chao

(Technical Center of Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China)

**ABSTRACT: Objective** To know the pathogens of brown soft rot bacteria of *Zantedeschia* imported from Holland. **Methods** Two pathogenic bacterial strains were isolated from imported *Zantedeschia* leaves by tissue isolation method. The strains were identified and their biological characteristics were studied. **Results** Morphological characteristics, culture patterns and physiological and biochemical reactions results indicated that all strains formed white, glossy, opaque, thin and smooth, round single colony on nutrient agar (NA) while produced green fluorescence in the KB medium. The bacterial cells were gram-negative rods with several polar flagellum under the microscope. **Conclusion** According to the pathogenicity, staining reactions, morphological characteristics, culture patterns, physiological and biochemical reactions, and 16S rDNA gene sequences analysis results, the isolated strain was identified as *Pseudomonas marginalis*.

**KEY WORDS:** *Zantedeschia*; soft rot bacteria; pathogen identification; *Pseudomonas marginalis*

## 1 引言

2014年5月, 在参展青岛世界园艺博览会的荷兰进口马蹄莲植株上, 发现叶片有明显褐色软腐症

状。起初从叶柄基部到整个叶片的边缘都发生明显的褪绿变色, 最外缘黄褐色并变薄向内卷曲, 叶片病健交界处呈半透明的黄色, 随后病叶变色腐烂。为确定导致叶片褐色腐烂的病原, 实验室对病叶进行了病

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2010IK270)、国家自然科学基金项目(31401705)

**Fund:** Supported by the Scientific and Technological Project of the General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China (2010IK270) and the National Natural Science Foundation of China (31401705)

\*通讯作者: 厉艳, 高级农艺师, 主要研究方向为植物检疫。E-mail: standciq@163.com

\*Corresponding author: LI Yan, Senior Agronomist, Technical Center of Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.70, Qutangxia Road, Shinan District, Qingdao 266002, China. E-mail: standciq@163.com

菌分离, 通过形态特征、培养特征、生理生化与 Biolog 鉴定、致病性测定及 16S rDNA 序列分析, 确认引起马蹄莲细菌性软腐病的病原为边缘假单胞菌 (*Pseudomonas marginalis*)。

## 2 材料与方 法

### 2.1 材料与试剂

材料: 从荷兰进口的新鲜马蹄莲植株。

仪器与试剂: BIOLOG 全自动微生物鉴定仪(美国 Biolog 公司); 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司); 革兰氏染色试剂盒(北京陆桥公司)。

### 2.2 病菌分离和纯培养

采用平板划线分离法<sup>[1]</sup>进行病菌分离。切取叶片病健交界处, 经表面消毒, 灭菌水洗 3 次后移至灭菌培养皿, 于灭菌水中浸泡 45 min, 在 NA 培养基上划线, 28 °C 培养 72 h, 将平板上大多数表现为同一形态的菌落, 挑取出其中 2 株, 编号为 MTL1、MTL2, 进行多次纯化。

将菌株 MTL1、MTL2 在 NA(牛肉汁蛋白胨培养基)和 KBA(金氏 B 培养基)上培养, 观察菌落形态及色素产生情况。

### 2.3 致病性测定

#### 2.3.1 病菌回接马蹄莲

新鲜培养的浓度为  $10^8$  CFU/mL 的 MTL1、MTL2 菌悬液, 分别针刺接种健康无病马蹄莲叶片的叶柄中部, 以无菌水为对照, 28 °C 保湿培养。

#### 2.3.2 烟草过敏反应和马铃薯软腐实验

新鲜培养的浓度为  $10^8$  CFU/mL 的 MTL1、MTL2 菌悬液作为接种物, 接种烟草叶片。

将马铃薯洗净, 75%的乙醇擦洗, 通过火焰干燥, 切成 1~2 cm 组织薄片, 直接滴加菌悬液接种, 薄片置于灭菌培养皿中 28 °C 保湿培养。

### 2.4 形态特征及生理生化测试

将菌株 MTL1、MTL2 在 NA 培养基上培养 24 h 后, 用革兰氏染色试剂盒进行常规革兰氏染色试验, 显微镜观察菌体形态。参考东秀珠等<sup>[2]</sup>的方法, 对分离菌株进行生理生化测试。采用美国 Biolog 公司的 Biolog GENIII 全自动微生物鉴定系统进一步测试菌株 MTL1、MTL2 对碳源的利用情况。

### 2.5 16S 序列测定

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取分离菌基因组 DNA, 用细菌 16S 通用引物 PF: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' 和 PR: 5'-ACGGTTACCTTGTACGACTT-3' 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 25  $\mu$ L: 10 $\times$ PCR 缓冲液(含  $Mg^{2+}$ ) 2.5  $\mu$ L、2.5 mmol/L dNTP 1  $\mu$ L、5 U/ $\mu$ L *Taq* DNA 酶 0.2  $\mu$ L、5 mmol/L 正反向引物 各 1  $\mu$ L、DNA 模板 1  $\mu$ L, 双蒸水补足至 25  $\mu$ L。PCR 扩增程序为: 94 °C 2 min; 94 °C 45 s, 57 °C 45 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物经纯化后, 由北京华大基因公司青岛分部测序, 双向测序, 引物分别为 PF 和 PR。将测得的基因序列与 GenBank 中核酸数据库进行序列比对分析。

## 3 结果与分析

### 3.1 革兰氏染色及形态特征

菌株 MTL1、MTL2 均为革兰氏染色阴性, 菌体杆状, 极生多根鞭毛, 短链生、具荚膜、无芽孢, 大小(0.42~1.25)  $\mu$ m $\times$ (0.83~2.08)  $\mu$ m。

### 3.2 培养性状及生理生化特征

在 NA 培养基上单菌落圆形白色, 薄而平滑, 边缘整齐; 在 KBA 培养基上产生明显的绿色荧光。

细菌生长最适生长温度为(25~26) °C, 最高为 38 °C, 致死温度为(52~53) °C。不积累聚- $\beta$ -羟基丁酸盐(PHB), 氧化酶反应阳性, 能利用葡萄糖, 能使明胶水解, 能从蔗糖形成果聚糖, 有精氨酸双水解酶, 不能利用果糖、乳糖、肌醇。

### 3.3 致病性测定

分离菌株 MTL1、MTL2 接种马蹄莲叶片后引起的病害症状同世园会参展马蹄莲的症状相同, 初为黄褐色褪绿, 后发展为腐烂。

分离菌株 MTL1、MTL2 接种烟草均无枯斑反应。接种马铃薯片, 48 h 内观察到明显的软腐症状。腐烂部分表面稍凹陷, 初呈水渍状, 后组织崩解, 淌出黏液。

### 3.4 微生物鉴定仪鉴定结果

经 Biolog GEN 全自动微生物鉴定系统碳源分析后, 菌株 MTL1、MTL2 与标准菌株的 SIM 值分别为 0.795、0.741, PROB 值分别为 0.795、0.741, 仪器分析显示 MTL1、MTL2 鉴定结果为 *Pseudomonas marginalis*。

### 3.5 16S 序列测定及 BLAST 比对结果

以 2 株分离菌的基因组 DNA 为模板分别进行 16S rDNA PCR, 均获得一条 1.4 kb 左右的特异性片段。PCR 产物测序, 将序列与 GenBank 中序列进行 BLAST 比对分析, 结果表明, 该序列与 *Pseudomonas marginalis* (GenBank: KJ127246.1) 相似性最高, 达到 99%。

## 4 讨 论

边缘假单胞菌 *Pseudomonas marginalis* 是假单胞菌科、假单胞菌属的植物病原细菌, 属于荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)生物变种 II。边缘假单胞菌最初只限于引起莴苣和少量植物的叶缘坏死的病原菌, 后发现该病菌有 3 个致病变种, 且具有广泛的致病性, 据报道<sup>[1,3,4]</sup>能引发苜蓿变色病、防风细菌根腐病<sup>[1]</sup>、百合软腐病<sup>[3]</sup>、草莓花疫病、番茄细菌性髓部坏死病<sup>[4]</sup>、马蹄莲块茎软腐病<sup>[5]</sup>等, 此外, 该病菌还会引发洋葱、中国白菜、大蒜、姜、花椰菜、水稻等发生软腐病。2007 年在我国甘肃省发现由边缘假单胞菌边缘致病变种引发的马铃薯腐烂病<sup>[5]</sup>。边缘假单胞菌之所以具有广泛的宿主致病性是由其生理特点决定的, 尤其是该菌在 0 °C 仍能生长良好, 5 °C 下能大量繁殖等特点<sup>[6]</sup>。澳大利亚生物安全进口风险分析(IRA)工程期间, 将边缘假单胞菌列为检疫性植物病害<sup>[7]</sup>。

2014 年世界园艺博览会自 2014 年 4 月 18 日至 10 月 18 日在青岛举行, 在 2.41 平方千米的园区内通过 110 个室外展园和主题馆、植物馆、园艺文化中心等室内展馆, 来自世界各国的牡丹、洋兰、月季、荷兰、盆景、插花花艺、组合盆栽、肉质多浆植物和菊花等参展植物共进行了 10 项花卉国际竞赛, 展期 184 d, 接待国内外游客约 3000 万人次。本次研究的感病植株为参展 2014 年青岛世界园艺博览会的荷兰进口马蹄莲植株, 叶片因感染了边缘假单胞菌而发

生细菌性软腐病, 边缘假单胞菌最适合的发病温度为 25 °C, 正是世园会参展植物馆的适宜温度, 如果没有此次疫情的及时发现与截获, 该病菌极易在众多参展花卉植株中扩散侵染, 对世园会造成负面影响。此次进境马蹄莲细菌性软腐病菌的疫情截获, 有效地确保了 2014 年世园会的顺利运行, 保证了我国国内农业生产安全。

### 参考文献

- [1] Ren XZ. Taxonomy and identification of plant pathogenic bacteria [M]. Beijing: Agriculture Press, 1994.
- [2] Dong XZ, Cai MY. Manual of systematically determinative bacteriology [M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [3] Hahn SS, Han KS, Shim MY, et al. Occurrence of bacterial soft rot of lily bulb caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Pseudomonas marginalis* in Korea [J]. Plant Pathol J, 2003, 19(1): 43–45.
- [4] Bella P, Catara V. Occurrence of tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas marginalis* in Italy [J]. Plant Pathol, 2010, 59: 402.
- [5] Krejzar V, Mertelik J, Pankova I, et al. *Pseudomonas marginalis* associated with soft rot of *Zantedeschia* spp [J]. Plant Prot Sci, 2008, 44: 85–90.
- [6] Li JH, Chai ZX, Yang HT, et al. First report of *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* as a cause of soft rot of potato in China [J]. Australas Plant Dis Notes, 2007, 2: 71–73.
- [7] Gan QH, Li Y, Shao XL, et al. Isolation and identification of *Pseudomonas marginalis* and its biological characterization [J]. Plant Protect J, 2011, 38(2): 183–184.

(责任编辑: 张宏梁)

### 作者简介



厉 艳, 高级农艺师, 主要研究方向是植物检疫。

E-mail: standciq@163.com