

绿萝叶斑病原菌鉴定及外源水杨酸对其影响

孙华山,陈 阳,金一锋,苏 蔚,李 晨,王玉书

(齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院,黑龙江 齐齐哈尔 161001)

摘要:为探明绿萝患病叶片的病原菌,采用形态学鉴定及分子生物学方法鉴定其病原菌来源,进一步探究外源物质对于此病原菌的影响。并采用施加外源水杨酸观测病原菌菌落生长情况、抑菌率及病原孢子萌发情况。结果表明:绿萝病害为叶斑病,此病原菌为枝孢杆菌;在不同浓度外源水杨酸配置的 PDA 培养基菌落增长速度观察中,低浓度 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA 会促使菌落增长,而随着水杨酸浓度增加,菌落生长速度降低, $2.0 \sim 10.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的测试组始终对病原菌有极高的抑制作用,并没有菌丝体产生。病原孢子数量在不同浓度的水杨酸影响下有着明显的变化。低浓度水杨酸对叶斑病病原孢子生长有促进作用,而 $0.3, 0.5, 1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水杨酸对病原菌孢子萌发有着较好的抑制性。

关键词:绿萝;叶斑病;水杨酸

中图分类号:S682.39 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2017)03-0064-04 **DOI:**10.11942/j.issn1002-2767.2017.03.0064

绿萝(*Epipremnum aureum*),天南星科麒麟叶属植物,阴性植物,易于室内养殖。绿萝不仅具有良好的观赏价值,而且可以改善室内环境质量,深受花卉消费者喜爱^[1-3]。齐齐哈尔地区花卉市场中绿萝病害频发,出现叶片变黄,黑色斑块,叶片萎蔫等情况,严重影响花卉经销商及消费者的利益。因此,鉴定绿萝病害,提出防治建议尤为重要。水杨酸(salicylic acid(SA))即邻羟基苯甲酸,是植物体内普遍存在的天然活性物质,参与众多生理调节过程^[4]。它不仅仅是植物系统获得抗性(SAR)和产生过敏反应(HR)所必需的物质,也是病原体侵染植物过程中活化一系列防卫反应的信号传递过程中的重要组成成分之一。本试验以绿萝为研究对象,水杨酸为外源物质,通过对绿萝病害鉴定以及外源水杨酸处理病原菌,初步得出外源水杨酸对绿萝叶斑病的最佳施用浓度,对未来绿萝育种推广具有重要的理论和实践意义。

1 材料与方法

1.1 材料

供试绿萝叶斑病病叶于 2016 年 6 月在黑龙

江省齐齐哈尔市花卉大市场采集。

1.2 方法

1.2.1 病样采集及病原菌的分离 将采集到的具有典型特征的绿萝患病叶片分别记录病害症状,表面清洗干净,置于超净工作台,在病健交界处用灭菌的刀片切取 4 mm 染病组织,依次用 75%酒精灭菌 10 s、10%次氯酸钠消毒 30 s、无菌水连续漂洗 3 次,将患病组织小块移放至 PDA 培养基上,采用常规组织分离法对患病叶片进行病菌分离和纯化,并经单孢分离获得病菌纯培养。

1.2.2 病菌培养性状观察和致病性测定 将分离获得的纯培养分别移接于 PDA 平板培养基上,25℃培养,记载菌落生长性状及病菌特征。将 PDA 平板培养 4 d 后的病原菌菌落,用无菌水配制成浓度为 1×10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的孢子悬浮液,喷雾接种于绿萝叶片,在 25~27℃保湿 48 h,设蒸馏水为对照组。观察并记录植株的发病情况。

1.2.3 病原菌分子生物学鉴定 利用植物基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根公司 DP305)由绿萝患病叶片标本提取绿萝患病叶片 DNA。提取的 DNA 保存于 -20℃ 备用。分别采用 rDNA-ITS 通用引物 ITS5:5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'和 ITS6:5'-GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG-3'进行 PCR 扩增。将所测结果在 GenBank 中利用 Blastn 软件进行序列分析。

1.2.4 不同浓度水杨酸对病原菌活性的影响 ①不同浓度水杨酸对病原菌生长的影响及抑菌率的测定。本试验采用 PDA 培养基测量不同浓度的水杨酸下菌落生长大小。在 PDA 培养基中加入

收稿日期:2017-02-23

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31501785);黑龙江省大学生创新创业资助项目(201510221019、201610221018);黑龙江省高等教育学会“十三五”高等教育科研课题资助项目(16Q154)

第一作者简介:孙华山(1993-),男,黑龙江省北安市人,在读学士,从事园林植物逆境生理研究。E-mail:478592528@qq.com。

通讯作者:陈阳(1986-),女,博士,讲师,从事园林植物抗逆分子生物学研究。E-mail:chenyang8368215@126.com。

不同浓度的 SA 试剂,SA 试剂分别为 0.1、0.3、0.5、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、3.0、5.0、7.0、10.0 mmol·L⁻¹。在 PDA 培养基上接种直径为 0.2 cm 的菌落圆片,每组重复 3 次,放置于 25℃ 恒温箱中培养。分别于 2、4、6、8 d 用十字交叉法测定菌落直径大小。观察记录。并按照公式计算不同浓度水杨酸下的抑菌率。

抑菌率(%)=
$$\frac{(\text{对照菌落直径}-0.2)-(\text{处理菌落直径}-0.2)}{(\text{对照菌落直径}-0.2)}$$

②不同浓度的水杨酸中的产孢量测定。将病原菌挑至不同浓度水杨酸的 PDA 培养基中培养 4 d,然后将 10 mL 的无菌水导入培养皿中,用灭菌后的三角涂棒在培养基表面顺时针涂抹刮下分生孢子,并在显微镜下观察孢子形态并用血球计数器计算其数量。重复 3 次,取平均值。

2 结果与分析

2.1 绿萝叶斑病病菌形态学特征及致病性

显微镜观察发现,绿萝叶斑病病菌分生孢子为长条杆状,黑色,略弯曲,其形态特征见图 1。试验中,将病原菌分离纯化得到的绿萝叶斑病病原菌生长较快,转接 2 d 后病原菌块附近出现白色菌丝,接种 4 d 后出现圆形黑色菌落,随着时间的推移,病菌菌落直径逐渐增大。菌落上层有白色菌丝体,下层为黑色菌落,菌落形态见图 2。如图 3 所示,叶片在接种病菌后 4~5 d 时开始侵染叶片并出现病症,出现褐色不规则斑点,随着时间的推移,病斑开始扩大,颜色变为黑褐色,叶片边缘也开始发黄。

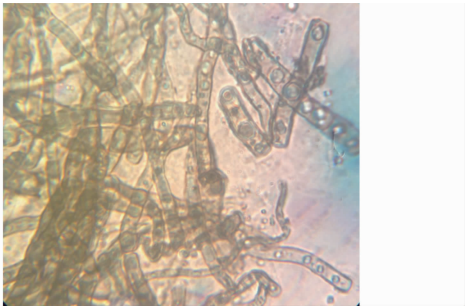
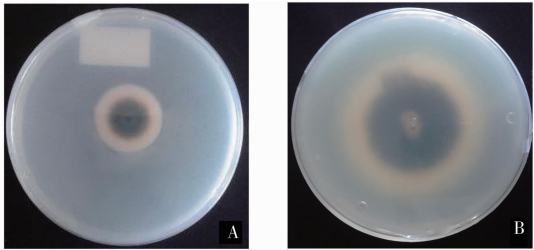


图 1 分生孢子形态
Fig. 1 Conidial morphology

2.2 病原菌分子生物学鉴定结果

采用 ITS5 和 ITS6 引物对扩增 rDNA-ITS 区序列,得到片段长度 602 bp 的 ITS 序列(见图 4),测序结果与 NCBI 上的基因序列进行比对,结果表明,分离获得的绿萝叶斑病菌,其 ITS 序列与枝孢菌 *Cladosporium. sp* 的 ITS 序列同源性

为 94%(登录号 KP70 1958.1)。



A: 生长 2 d; B: 生长 4 d
A: growth for 2 d; B: growth for 4 d

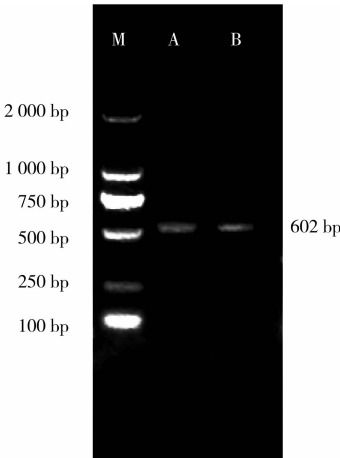
图 2 病菌菌落生长形态

Fig. 2 The morphology of the bacteria colony



图 3 绿萝叶片感染病原菌

Fig. 3 Pathogen infection of *Epipremnum aureum* leaf



M: Marker2 000;A、B: PCR产物
M: Marker2 000;A, B: PCR products

图 4 PCR 产物电泳图

Fig. 4 PCR products of electrophoresis figure

2.3 外源物水杨酸对病原菌的生长及抑菌率的影响

由图 5、图 6、图 7 可知,外源物水杨酸对该病原菌在一定程度上有抑制作用,但低浓度 SA 有促进作用。在第 2 天,浓度为 0.1~1.0 mmol·L⁻¹

的 SA 处理下的病原菌菌落直径大于 CK 组,其中 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 最大; $0.1 \sim 1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抑菌率分别为 -4% 、 -3.55% 、 -3.21% 、 -71.05% ,呈现出强促进菌落生长的情况; $1.4 \sim 10.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的测试组并没有产生菌丝,在病菌侵染初期展现出了一定的抗病性。第 4 天,CK 组处理下的病原菌菌落直径突然增加,说明其菌落正在加速,大致反映出绿萝叶斑病病原菌的爆发期易发生于侵染叶片后的 $3 \sim 4 \text{ d}$; 1.4 、 $1.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA 测试组第 4 天开始出现菌丝,对病原菌的抑制开始减弱, $2.0 \sim 10.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 依旧没有菌丝体产生。在第 6 天时, $0.3 \sim 1.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 测试组对病原菌的抑制率开始减弱,说明随着时间增加,水杨酸对病菌的抑制能力逐渐下降,但浓度为 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA 依然对病原菌没有任何抑制作用。第 8 天, $2.0 \sim 10.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的测试组始终保持着对病原菌极高的抑制作用,并没有菌丝体产生。抑制此病原菌最佳浓度为 $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。浓度为 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SA 始终促进病菌的生长,说明低浓度水杨酸可能提升促进植株感病的能力。

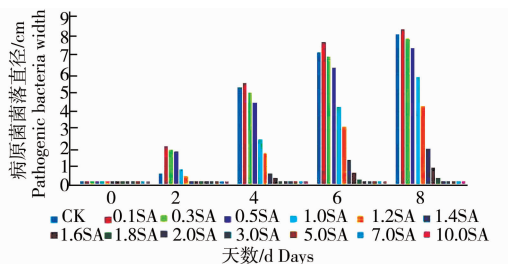


图 5 不同浓度水杨酸对病原菌生长的影响

Fig. 5 The effect of different concentration of salicylic acid on pathogenic bacteria growth

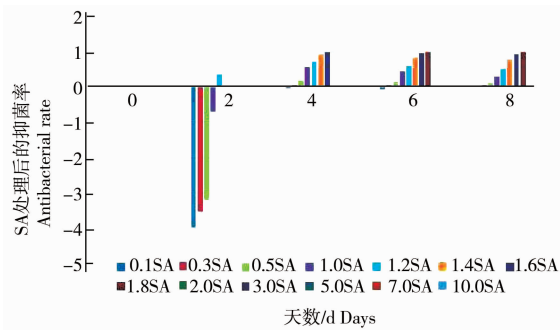


图 6 不同浓度水杨酸对病原菌的抑菌率

Fig. 6 Antibacterial rate of different concentration of salicylic acid on the pathogenic bacteria

2.4 不同浓度水杨酸对病原孢子萌发的影响

由图 8 可以看出,病原孢子数量在不同浓度的水杨酸影响下有着明显的变化。病原菌接种第

4 天时对浓度为 0.1 、 0.3 、 0.5 、 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PDA 培养基进行病原孢子测定。结果发现,浓度为 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水杨酸影响下的病原孢子数量是所有测试组中最多的,充分证明了低浓度水杨酸对叶斑病病原菌的生长有促进作用。而浓度为 0.3 、 0.5 和 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水杨酸影响下病原菌数量逐渐减少,证明高浓度的水杨酸对病原菌有着较好的抑制性。

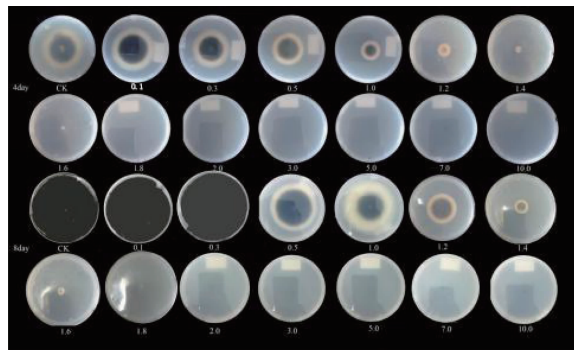


图 7 4 d 与 8 d 时不同浓度水杨酸对病原菌生长影响

Fig. 7 The effect of different concentration of salicylic acid on pathogenic bacteria growth in the fourth and eighth day

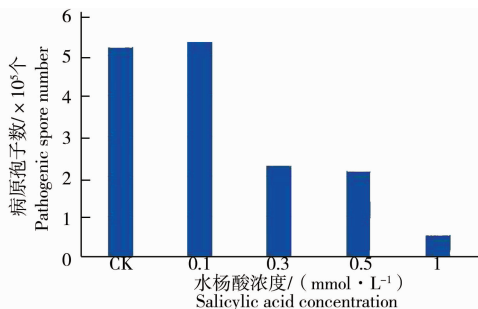


图 8 第 4 天不同浓度水杨酸对病原孢子萌发的影响

Fig. 8 The effect of different concentration of salicylic acid on pathogenic spore germination in the fourth day

3 结论与讨论

近年来,对于绿萝研究主要集中于净化水体、甲醛污染净化、光合特性研究、扦插繁殖等^[5-7],绿萝净化空气和水体方面有良好的景观效应与治理修复功能,易扦插成活,水培绿萝景观效果好,绿萝生态景观与室内绿化都有较好成果^[8-10]。但在绿萝繁殖、商品化销售、家庭养护中发生不同病害易造成相应损失,对于其病害研究尤为重要。我国绿萝病害方面研究处于起步阶段,绿萝根腐病、绿萝炭疽病的病原菌已初步鉴定,但针对绿萝病害的预防及治理研究甚少。试验在当地花卉市场采集患病叶片,采用形态学与分子生物学双重方式对该病害进行鉴定。分子生物学鉴定采用提取

患病植物叶片 DNA,利用 rDNA-ITS 通用引物对其进行 PCR 鉴定,本试验筛选了多对 rDNA-ITS 通用引物,最终 ITS5/ITS6 成功得到序列,并 NCBI 中 Blastn 比对该病原菌为枝孢菌 *Cladosporium*. sp. 但利用 ITS1/ITS4 成功鉴定牡丹枝孢菌,本试验 rDNA-ITS 通用引物筛选中 ITS1/ITS4 却未得到序列,不适于本试验材料的病原菌鉴定。水杨酸在诱导植物抗病性方面作用已备受人们的关注,研究者^[11-13]利用外源水杨酸作为诱导因子可诱导烟草等多种作物产生对真菌等病害的局部和系统抗性;一定浓度和时间范围内水杨酸能显著提高桉树苗对青枯病的抗病性,但是不同作物对水杨酸的最佳诱导浓度不同;研究者以水杨酸、草酸等作诱抗剂,对玉米灰斑病的诱导抗病结果表明水杨酸诱抗效果最好,草酸诱抗效果最差。本试验利用外源物水杨酸对病原菌进行诱导观测其绿萝枝孢菌菌落生长、抑菌率、病原孢子萌发情况,筛选适宜处理病原菌的水杨酸浓度,为后续针对绿萝本体进行植物诱导抗性研究提供一个适宜的水杨酸浓度筛选范围。

参考文献:

- [1] 樊超,唐立娜,姚洪泉,等. 绿萝的应用价值及发展前景[J]. 黑龙江农业科学,2015(8):156-158.
- [2] 兰丽娟,李晓强,张宏,等. 植物对室内空气中甲苯的净化能力研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(9):5191-5192.
- [3] 孟雪,王志英,吕慧. 绿萝和常春藤主要挥发性成分及其对

- 5 种真菌的抑制活性[J]. 园艺学报,2010,37(6):971-976.
- [4] 孟雪娇,邸昆,丁国华. 水杨酸在植物体内的生理作用研究进展[J]. 中国农学通报,2010,26(15):207-214.
- [5] Zhao Jietang, Zhang Qian, Xie Jiahua, et al. Plant regeneration via direct somatic embryogenesis from leaf and petiole explants of *Epipremnum aureum* 'Marble Queen' and characterization of selected variants[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2012, 34(4):1461-1469.
- [6] Zhao Jietang, T Li Zhijian, Cui Jin, et al. Efficient somatic embryogenesis and Agrobacterium-mediated transformation of pothos (*Epipremnum aureum*) 'Jade' [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2013, 114(2):237-247.
- [7] 刘英,郭沛涌,廖纪华. 美人蕉和绿萝在修复富营养化水体过程中对 Cr(VI)胁迫的生理生化响应[J]. 浙江大学学报, 2011, 38(1):78-84.
- [8] 杨银科,王文科,邓红章,等. 枯草芽孢杆菌与绿萝对富营养化水体的净化[J]. 中国农学通报,2012,28(27):209-212.
- [9] 令狐昱慰,黎斌,李思锋,等. 3 种观赏植物对室内甲醛污染的净化及生长生理响应[J]. 西北植物学报,2011,31(4):776-782.
- [10] 赵兰枝,郑树景,郭瑞珍,等. 水培与土培绿萝的根系形态及结构比较 [J]. 广东农业科学,2010(11):51-54.
- [11] 江厚龙,李鹏,李钠钾,等. 外源诱抗剂对烟草青枯病的诱抗效果研究[J]. 中国农学通报,2014,30(28):286-290.
- [12] 王媛,杨红玉,程在全. SA 诱导拟南芥对灰霉病的抗性与木质素含量的关系[J]. 植物保护,2007,33(4):50-54.
- [13] 郭红莲,陈捷,高增贵,等. 不同诱抗剂诱导玉米对灰斑病的抗性及其与 PAL 的关系[J]. 沈阳农业大学学报,2000,31(5):465-467.

Pathogen Identification for *Epipremnum aureum* Leaf Spot and the Effect of Exogenous Salicylic Acid

SUN Hua-shan, CHEN Yang, JIN Yi-feng, SU Wei, LI Chen, WANG Yu-shu

(College of Life Science and Agriculture Forestry, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161001)

Abstract: Methods of morphological and molecular biological identification were adopted to ascertain the pathogens of *Epipremnum aureum* leaf spot. To go a step further on the effect of exogenous factors on pathogens, exogenous salicylic acid was used in the study to observe the growing conditions of pathogen colony, bacteriostatic rate and the germination situation of the pathogen spores. It was found that the *Epipremnum aureum* had been infected with leaf spot, which fell into *Bacillus clausii*. For bacterial colony cultured by PDA medium produced with exogenous salicylic acid of different concentrations, it was noticed that the low concentration of salicylic acid for $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ would facilitate the growth of bacterial colony. With the growth of salicylic acid concentration, the growth of bacterial colony decelerated. The testing group, experimented with the concentration of $2.0 \sim 10.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, exerted constantly high inhibiting effects on pathogens, without mycelium generated. With the change in salicylic acid concentration, the number of pathogenic spores varied significantly. Low salicylic acid concentration would facilitate the pathogenic spore growth of leaf spot. However, the salicylic acid concentration for $0.3 \sim 1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ had a negative effect on the reproduction of pathogenic spores. It exerted a significantly inhibiting effect on the growth of pathogenic spores.

Keywords: *Epipremnum aureum*; leaf spot; salicylic acid