

松针褐斑病菌致病机制的研究*

叶建仁 解春霞 王永银 程淑婉

摘要 用小麦粒固体培养基和马铃薯液体培养基培养松针褐斑病菌,其培养物粗提液可以使湿地松、马尾松和黑松针叶褪绿,使蕃茄苗、烟草苗萎焉。说明松针褐斑病菌在生长过程中能产生并分泌出对植物组织有毒害作用的物质。这种有毒物质(毒素)可能是松针褐斑病菌致病的重要因素。研究表明该毒素物质具有非寄主专化特性。应用乙醇脱水沉淀法将其分为非蛋白质部分和蛋白质部分,仅非蛋白质部分能使松针褪绿,使蕃茄苗、烟草苗萎焉,可见毒素物质是非蛋白质。将非蛋白质部分进一步层析分离,应用3种溶剂系统,每系统下都可分出3~4个组分,且都有一个组分能使湿地松针叶褪绿。在几种松针中对毒素最敏感的是湿地松的针叶,其次是马尾松的针叶,再次为黑松的针叶。

关键词 松针褐斑病 致病机制 毒素 松树

松针褐斑病[*Lecanosticta acicola* (Thüm.) Sydow]是松树上的一种重要病害,可危害湿地松(*Pinus elliottii* Engelm.)、火炬松(*P. taeda* L.)和黑松(*P. thunbergii* Parl.)等20多种松树。病害在我国南方的福建、广东、江西、安徽、广西和浙江等省普遍发生,在严重发病的地区可造成幼林成片毁灭^[1]。目前国内外对该病的研究结果都表明,防治的根本途径在于抗性选育^[2]。研究松针褐斑病菌的致病机制不仅对于该病的研究具有重要理论价值,而且对于抗性选育工作也具有重要的实践意义。

松针褐斑病主要危害10年生以下的幼树,典型症状是在针叶上产生直径1~3mm大小的圆形褐色斑点,潜育期约20~30d^[1]。关于其致病机制过去的研究报告几乎没有。根据植物病理学的现有理论,真菌致病作用可通过3个方面:酶、激素、毒素^[3]。松针褐斑病菌致病的特点表明其致病作用极有可能是表现为毒素的作用,作者在研究工作中曾应用松针褐斑病菌的培养液处理针叶后发现其对针叶组织有伤害作用。Huang等曾摘要报道应用小麦粒培养基培养松针褐斑病菌所获得的培养物粗提液对针叶有致毒活性,且该粗提液的致毒活性具有热稳定性,因此分析认为致毒物质可能是一种非蛋白质^[4]。本文即是在这样一个基础上进一步从对松针褐斑病菌致病毒素的分析来研究病害的致病机制。

1 材料和方法

1.1 松针褐斑病菌的培养及毒素粗提液的提取

1.1.1 病菌的培养 在小麦粒固体培养基、马铃薯蔗糖培养液(PD)和查彼(Czapek)培养液中分别接种松针褐斑病菌,混匀。小麦粒固体培养基置25℃温箱中培养,液体培养基置摇床

1997—09—09 收稿。

叶建仁教授,王永银,程淑婉(南京林业大学森林资源与环境学院 南京 210037);解春霞(江苏省林业科学研究所)。

* 本研究为霍英东教育基金会高等学校青年教师基金资助项目和国家自然科学基金课题“中国南方主要松树抗松针褐斑病机理研究”(1996~1998年)的部分内容。

25 下振荡培养。

1.1.2 毒素粗提液的提取 病菌在培养基中生长1个月后,分别用下述两种方法提取毒素粗提液:

(1) 毒素粗提液 : 在小麦粒固体培养基中加无菌水浸泡(以没过培养基为宜)过夜,过滤取清液,浓缩备用。

(2) 毒素粗提液 : 液体培养基直接离心取上清液,浓缩备用。

1.2 蛋白质分离方法

在毒素粗提液中加入2~3倍的无水乙醇,使其中的蛋白质充分沉淀,分别取上清液和沉淀部分。上清液蒸去乙醇,浓缩至原体积的1/10,得非蛋白质部分分离液。沉淀的蛋白质部分加蒸馏水充分溶解浓缩得蛋白质部分分离液。

1.3 薄层层析法分离毒素粗提液非蛋白质部分

1.3.1 点样 用毛细管将毒素粗提液非蛋白质部分浓缩液点在硅胶层析板上,样点间距约2.5 cm,样点总用量100 μL 。

1.3.2 溶剂系统 筛选展层所用的溶剂系统时要根据层析的类型,考虑溶剂极性的大小和对分离物质的溶解度或分配系数以及pH值等,以提高分离的效果。本试验比较了3种溶剂系统。苯 冰醋酸 甲醇=1 1 3,氯仿 甲醇 水=65 25 4,乙醇 乙酸 水=8 3 1。

1.3.3 展层 在密闭的层析缸中进行。溶剂倒入层析缸中,将点好样的层析板在层析缸中饱和12 h,然后将板下端浸入溶剂展层。待溶剂扩散到距板前沿2~3 cm时取出,记录推进时间及距离等。

1.3.4 分离 展开样的层析板在紫外光下观察荧光反应,分离出的各组分因其在溶析中的扩散速度不同,在层析板上展成了距原点远近不同的范围带,勾划各组分范围,计算 R_f 值:

$$R_f = \frac{\text{原点到组分点中心距离}}{\text{原点到溶剂前沿距离}}$$

按照勾划的范围线将各组分析附着的硅胶层分别刮下,置试管中,各加蒸馏水浸泡,离心取上清液,浓缩至5 mL。

1.4 生物测定

对毒素粗提液、粗提液蛋白质部分、非蛋白质部分以及层析分离出的各组分进行生物测定。生测材料为当年生除去叶鞘的马尾松、黑松、湿地松针叶,以及1个月龄的蕃茄苗和烟草苗。方法是先在每个大试管中加入1 mL毒素粗提液或分离液,然后分别插入上述几种材料,使其基部或根部浸入其中,同时设水对照,在25℃下培养、逐日观察记载。

2 试验结果

2.1 3种不同培养基上松针褐斑病菌生长情况比较

松针褐斑病菌在3种不同的培养基中培养30 d后,生长情况明显不同。在小麦粒固体培养基中病菌长势旺盛,且后期可见在小麦粒表面产生有大量黑色的子实体;在PD培养液中则产生大量白色的菌丝团,逐渐变大且变成黑色;在Czapek培养液中病菌生长不好,仅产生很少量的菌丝团。

2.2 两种培养基上病菌培养粗提液的毒性表现

小麦粒培养基上病菌培养粗提液 和 PD 培养液中病菌培养粗提液 分别在几种不同的植物材料上进行毒力生物测定。结果(表 1)表明, 两种粗提液均能使湿地松、马尾松和黑松 3 种针叶褪绿, 使蕃茄苗、烟草苗萎焉。两种粗提液所表现出来的毒力基本相近, 其中 PD 培养液中的培养粗提液毒性略强些。

表 1 松针褐斑病菌培养粗提液毒性生物测定结果

植物材料	病菌培养粗提液	处 理 天 数 (d)					
		1	2	3	4	5	6
湿 地 松	粗提液	-	+++	+++	+++	+++	+++
	粗提液	-	+++	+++	+++	+++	+++
	水(对照)	-	-	-	-	-	-
马 尾 松	粗提液	-	++	+++	+++	+++	+++
	粗提液	-	+	++	++	+++	+++
	水(对照)	-	-	-	-	-	-
黑 松	粗提液	-	-	-	-	+	+
	粗提液	-	-	+	+	+	+
	水(对照)	-	-	-	-	-	-
蕃 茄 苗	粗提液	-	+	+	+	++	+++
	粗提液	+	++	++	++	+++	+++
	水(对照)	-	-	-	-	-	-
烟 草 苗	粗提液	-	-	+	+	+	++
	粗提液	-	+	+	+	+	+
	水(对照)	-	-	-	-	-	-

注: 生测试验中感病程度的分级标准: “-”代表生测材料无反应; “+”代表生测材料有轻微反应, 针叶 1/4 以下基部褪绿或苗略显萎焉; “++”代表针叶 1/4 ~ 1/2 褪绿, 或苗中等程度萎焉; “+++”代表针叶 1/2 以上褪绿, 或苗严重萎焉。表 2、3 符号内容同。

松针褐斑病菌培养粗提液既能使松针产生不良反应, 又能使蕃茄苗、烟草苗产生不良反应, 这说明培养液中有毒性物质存在, 而且这种毒性物质是非寄主专化性的。3 种松树的针叶中, 湿地松最为敏感, 马尾松较为敏感, 黑松较不敏感; 蕃茄苗较敏感, 烟草苗较不敏感。

2.3 松针褐斑病菌培养粗提液两大组分的毒性表现

Huang 等曾报道松针褐斑病菌培养粗提液煮沸 10 min 后仍然表现有致毒活性, 后推测毒性物质可能是一种非蛋白质。但高温失活的蛋白质部分原本是否有致毒活性呢? 本研究应用乙醇脱水沉淀法将病菌培养粗提液分为蛋白质和非蛋白质两部分, 然后再分别进行生物测定。结果(表 2)显示, 在 3 种松针叶上以及蕃茄苗和烟草苗上都只有非蛋白质部分表现有毒性, 而蛋白质部分都不表现毒性。而且从毒力表现的情况看, 去除了蛋白质部分后的非蛋白质部分的毒力比原来的培养粗提液的毒力表现得更快、更强, 其在湿地松、马尾松和黑松针叶上, 于生物测定的当天即表现出毒害作用。

表2 松针褐斑病菌培养粗提液两大组分毒性的生物测定结果

植物材料	生测液	处理天数 (d)				
		1	2	3	4	5
湿地松	非蛋白部分	++	+++	+++	+++	+++
	蛋白质部分	-	-	-	-	-
	水(对照)	-	-	-	-	-
马尾松	非蛋白部分	++	+++	+++	+++	+++
	蛋白质部分	-	-	-	-	-
	水(对照)	-	-	-	-	-
黑松	非蛋白部分	+	++	+++	+++	+++
	蛋白质部分	-	-	-	-	-
	水(对照)	-	-	-	-	-
蕃茄苗	非蛋白部分	-	++	++	++	+++
	蛋白质部分	-	-	-	-	-
	水(对照)	-	-	-	-	-
烟草苗	非蛋白部分	-	+	+	+	+
	蛋白质部分	-	-	-	-	-
	水(对照)	-	-	-	-	-

2.4 培养粗提液中非蛋白质组分的初步分离

针对有致毒活性的培养物粗提液中的非蛋白质组分进行薄层层析分离,并对分离出的各组分用湿地松松针进行生物测定。3种不同的溶剂系统对非蛋白质组分的初步分离和各分离组分的毒性生物测定试验结果见表3。可知在3种溶剂系统中,非蛋白质组分均可被一次层析分离为3~4个组分,其中在苯-冰醋酸-甲醇(1:1:3)的系统中分离为4个组分,在另外2个系统中各分离为3个组分。从对各分离组分的生测结果来看,3种溶剂系统下分离的各组分中都只有一个组分能使湿地松针叶褪绿,表现有致毒活性。其中苯-冰醋酸-甲醇系统中分离的 R_f 为0.91的组分和乙醇-乙酸-水系统中分离的 R_f 为0.85的组分均表现出有较强的致毒活性。因此,从组分分离情况和毒性生测大小的结果来看,3种溶剂系统相比似以苯-冰醋酸-甲醇的溶剂系统为好。以上分析说明具有致毒活性的非蛋白质中的毒素物质是可以被继续分离并保持毒性的。

表3 3种不同的溶剂系统对非蛋白质组分的初步分离和各分离组分的毒性生物测定结果

溶剂系统	推进时间	荧光结果				生测结果					
		序号	宽度	迁移距(cm)	R_f	1~2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
苯-冰醋酸- 甲醇=1:1:3	6.25 h (原点到溶剂前沿 距离 10.1 cm)	1	1.5	1.2	0.12	-	-	-	-	-	-
		2	3	3.9	0.39	-	-	-	-	-	-
		3	2.1	6.65	0.66	-	-	-	-	-	-
		4	1.4	9.2	0.91	-	+	+++	+++	+++	+++
氯仿-甲醇- 水=65:25:4	6.25 h (原点到溶剂前沿 距离 13.7 cm)	1	1.7	1.4	0.10	-	-	-	-	-	-
		2	1.3	3.3	0.24	-	-	+	+	+	+
		3	1.2	13.0	0.95	-	-	-	-	-	-
乙醇-乙酸- 水=8:3:1	7 h (原点到溶剂前沿 距离 7.3 cm)	1	0.95	2.75	0.38	-	-	-	-	-	-
		2	1.0	3.9	0.53	-	-	-	-	-	-
		3	2.1	6.2	0.85	-	++	+++	+++	+++	+++

3 结论与讨论

研究表明松针褐斑病菌在小麦粒固体培养基和 PD 液体培养基上生长的过程中, 均可产生对 3 种松针和蕃茄苗、烟草苗有毒害作用的物质。在两种培养基上病菌所产生的毒性物质毒力相近。从毒性物质的表现来看, 它们不仅对寄主材料松针有毒伤作用, 而且对非寄主植物蕃茄和烟草也有毒伤作用, 但其在寄主针叶上的毒伤表现比在非寄主植物上似乎更强些。在植物病理生理学研究, 一般把真菌产生的有毒物质(除酶和激素外)称之为真菌毒素, 而且把真菌毒素分为寄主专化性毒性和非寄主专化性毒素两类^[3]。松针褐斑病菌所产生的这种有毒物质更象是一种非寄主专化性毒素。3 种松中湿地松对毒素最敏感, 其次是马尾松, 黑松最不敏感。而在自然情况下湿地松和黑松都很感病, 马尾松则较抗病^[1]。这种 3 种松树对毒素和病菌的敏感性不一致的情况值得进一步深思和探讨。

成分分离和生测结果又进一步表明了松针褐斑病菌所产生的毒素是一种非蛋白质的物质, 而且当毒素粗提液被除去蛋白质后, 其表现出的毒力活性比原毒素粗提液更强。这种现象在过去的某些真菌毒素研究中有类似情况, 可能是当蛋白质被去除后, 这些毒性物质或毒性基团更易于与植物细胞直接接触而发挥毒性。松针褐斑病菌培养粗提液的蛋白质部分没有致毒活性。

对非蛋白质组分进行薄层层析分离试验表明, 3 种溶剂系统中以苯-冰醋酸-甲醇(1:1:3)的溶剂系统的分离效果最好, 其中 R_f 为 0.91 的组分显示有较强的致毒活性, 而其余组分几乎没有致毒活性。可见具有致毒活性的非蛋白质部分的毒素物质是可以被继续分离并保持毒性的。 R_f 值为 0.91 的组分中应该还包含有多种物质, 到底是何种物质或哪几种物质起着毒性作用尚需做进一步深入的研究。

本研究进一步确定了松针褐斑病菌具有产生真菌毒素的性质, 这对于认识病菌的致病机制有着非常积极的理论意义, 尽管目前尚不能说其是病菌致病的全部机制, 但至少反映了其致病的一个方面, 而且从病害的病程和症状特点来看, 很可能是极为重要的一个方面。用病菌毒素进行抗性鉴定具有时间较短, 简单易行, 便于观察, 不受外界影响等特点。因此松针褐斑病菌毒素的研究对于抗松针褐斑病的选育也有着重要的实践意义。

参 考 文 献

- 1 李传道, 朱熙樵, 韩正敏, 等. 松针褐斑病的调查和病原鉴定. 南京林学院学报, 1986, (2): 11~18.
- 2 叶建仁, 韩正敏, 李传道. 湿地松抗褐斑病无性系种子园营建技术研究. 南京林业大学学报, 1991, (2): 23~29.
- 3 章元寿主编. 植物病理生理学. 南京: 江苏科技出版社, 1995.
- 4 Huang Z Y, Smalley E B, Li C D. Isolation of a phytotoxin from *Mycosphaerella dearnessii*, the causal agent of brown spot needle blight of pine. (Abstract) Phytopathology, 1991, 81(10): 1206.

Primary Research on the Pathogenic Mechanisms of *Lecanosticta acicola*, the Causal Agent of Brown Spot Needle Blight

Ye Jianren Xie Chunxia Wang Yongying Cheng Shuwan

Abstract After the isolate of *Lecanosticta acicola* was separately cultured in wheat solid medium and potato dextrose liquid medium for 30 days, the water extract and the filtrate of the cultures could quickly make the needles of slash pine, masson pine and Japanese black pine lose green, and the seedlings of tomato and tobacco get wilt *in vitro*. It was suggested that the pathogen could yield and secrete the toxic substance and the toxin was probably an important way in the pathogenesis of *L. acicola*. The toxin had no host-specificity. The filtrate or the extract was isolated into two parts, the protein part and the non-protein part. The test showed that the toxic part was non-protein. The toxic non-protein part was further isolated into 3 ~ 4 parts in each of three different solution system, and there was always a part of each system which could show toxicity. To the toxin the slash pine needles were high sensitive, the masson pine needles medium sensitive, and the Japanese black pine needles comparatively lower sensitive.

Key words *Lecanosticta acicola* pathogenic mechanisms toxin pine

Ye Jianren, Professor, Wang Yongying, Cheng Shuwan (Nanjing Forestry University Nanjing 210037); Xie Chunxia (The Forestry Institute of Jiangsu Province).