

四川松针上散斑壳菌致病毒素的确定及其致病性差异研究

骆 军, 刘应高*, 黄晓丽, 徐明庆

(四川农业大学林学院森林保护省重点实验室,四川 雅安 625014)

摘要:生物活性测定表明,针叶树散斑壳真菌、松针散斑壳真菌、四川散斑壳真菌及二郎山散斑壳真菌在液体培养基中均可产生导致其寄主针叶枯死的致病毒素。研究表明4种散斑壳真菌毒素均为非蛋白质类组分,结合电导率的测定,发现4种毒素对其来源寄主松针及其他几种松针的毒性存在着差异,其中四川散斑壳真菌所分泌的毒素致病性相对最强。通过对3种不同科属杂草和雪松针叶的生物测定,得出4种毒素均为非寄主专化性毒素。

关键词:针叶树散斑壳真菌;松针散斑壳真菌;四川散斑壳真菌;二郎山散斑壳真菌;致病毒素;毒性差异

中图分类号:S791.24

文献标识码:A

Pathotoxin Determination of *Lophodermium* on Pines in Sichuan Province and Their Differences in Pathogenicity

LUO Jun, LIU Ying-gao, HUANG Xiao-li, XU Ming-qing

(Forestry college of Sichuan Agricultural University; Key Laboratory of Forest Protection of Sichuan Province, Ya'an 625014, Sichuan, China)

Abstract: The bioassay results showed that *Lophodermium conigenum*, *L. pinastri*, *L. sichuanense* and *L. erlangshanense* fungi could produce pathotoxin that might have led to their host dying in the liquid medium. Study showed that the four mycotoxins were non-proteins components, and there were different toxicity between host needles and other several kinds of pine needles by combining with the determination of conductivity, especially the mycotoxin of *L. sichuanense* fungus had the strongest toxicity. The bioassay of three kinds of weeds from different family and *Cedrus deodara* showed that the four toxins were non-host specific.

Key word: *Lophodermium conigenum*; *Lophodermium pinastri*; *Lophodermium sichuanense*; *Lophodermium erlangshanense*; pathotoxin; toxicity difference

松落针病是一种世界性病害,散斑壳属(*Lophodermium* Chev.)真菌是被公认的落针病病原菌。该属真菌可危害松(*Pinus* L.)、冷杉(*Abies* Mill.)、云杉(*Picea* Dietr.)、落叶松(*Larix* Mill.)等属树木,受害木针叶脱落,树高、胸径、材积生长均受到影响,造成严重的损失^[1]。

许多植物病原真菌能产生对其寄主有毒性的物质,即病原真菌毒素,它能够破坏植物细胞膜体系,严重影响植物的代谢过程及能量转变,对寄主蛋白、

核酸、酶等引起一系列不良反应,导致生理失调、细胞死亡甚至整个植株枯亡。近十几年来,在对一些重要的林木病害如松针褐斑病(*Lecanosticta acicola* (Deam.) Siggers 松针座盘孢菌)、松赤枯病(*Pestalotiopsis funereal* (Desm.) Stey. 枯斑拟盘多毛孢)、杨树溃疡病(*Dothiorella gregaria* Sacc. 聚生小穴壳菌)等进行研究的过程中^[2-4],相继发现了一批林木病原真菌毒素,并对其理化性质和对寄主的致病作用在一定程度上得到了揭示^[5]。

收稿日期:2009-09-01

基金项目:四川省科技厅和四川省教育厅基础研究项目“四川松落针病的病原学及其分子生物学特性研究”资助

作者简介:骆 军(1980—),男,安徽合肥人,硕士,从事植物病理学方面的研究。

* 通讯作者:刘应高(1964—),男,四川彭州人,教授,博士,长期从事林木病理教学和科研。

关于散斑壳属病原真菌的致病毒素国内外都无相关报道。本文对 4 种不同散斑壳病原真菌所产毒素进行了初步探讨,并对其致病性差异及专化性作了相关研究。同时本文将传统的生物测定和电导率生化测定相结合,使毒素对宿主的伤害状况更直观和精准,对今后植物病原菌毒素相关研究提供一定参考。

1 材料和方法

1.1 菌种

本实验所采用的菌种为四川农业大学林木真菌标本室(FMSAU)散斑壳属中的 5 号、9 号、19 号和 20 号。5 号菌种为针叶树散斑壳菌(*Lophodermium conigenum* (Brunaud) Hilitz.)^[6],分离自四川蒲江石象湖的马尾松(*Pinus massoniana* Lamb.);9 号菌种为松针散斑壳菌(*L. pinastri* (Schrad.) Chévallier)^[6],分离自四川泸定二郎山林场高山松(*P. densata* Mast.);19 号菌种为四川散斑壳菌(*L. sichuanense* Qiu et Liu)^[7],分离自四川泸定二郎山林场云南松(*P. yunnanensis* Franch.);20 号菌种为二郎山散斑壳菌(*L. erlangshanense* Y. G. Liu sp. nov.)^[8],分离自四川泸定二郎山林场华山松(*P. armandi* Franch.)。

1.2 培养基与仪器

平板培养基为 PDA 培养基,液体培养基为 PD 培养液。

旋转蒸发仪 RE-52(上海亚荣生化仪器厂)、台式离心机(北京医用离心机厂)、电导率仪 DDS-307(上海雷磁仪器厂)。

1.3 生测材料

高山松、云南松、华山松松针均采自四川泸定二郎山林场海拔为 2 580 ~ 2 780 m 的指定健康松树。马尾松松针采自四川农业大学老板山植物园内的指定健康马尾松。

1.4 产毒培养

分别挑取经 PDA 平板培养 15 天的 4 种散斑壳真菌菌丝圆片($\Phi = 5$ mm)8 片到装有 100 mL PD 培养液的三角瓶中,23 °C 下,暗光静止培养 25 天。先用 8 层纱布过滤去除菌丝和孢子等物体,再于 4 000 r · min⁻¹离心 5 min,得上清液约 90 mL,即为粗菌液。

1.5 蛋白质分离方法

在 0 °C 下,向 90 mL 粗菌液中加入 270 mL 无水冻乙醇,使其中的蛋白质充分沉淀,于 4 °C 低温 5 000 r · min⁻¹,离心 10 min。获得上清液和沉淀部

分。沉淀的蛋白质部分加 30 mL 蒸馏水充分溶解后再用 5 000 r · min⁻¹离心 5 min 去除沉淀,得蛋白质部分分离液。

对照液:不接菌的液体培养基用无水冻乙醇提取,制备方法同上。

1.6 非蛋白质部分粗提液的制备

取上一步骤的上清液,用旋转蒸发器在 40 ~ 50 °C 条件下旋转蒸发蒸去乙醇和水至还剩余 10 mL 左右,加入原上清 1.5 倍体积的甲醇充分振荡,40 °C 下萃取半小时,再 3 000 r · min⁻¹离心去除沉淀得甲醇提取液;蒸去甲醇至干,用无菌水溶解到 30 mL 即得非蛋白质部分粗提液。

对照液:不接菌的液体培养基用甲醇提取,制备方法同上。

1.7 生物测定

对粗菌液、粗提液蛋白质部分以及非蛋白质部分等各组进行生物测定。方法是先将 4 种去除针鞘的整条松针统一称取 0.5 g(4 ~ 15 枝,每种松针之间由于构造和粗细导致数目不等),先用 75% 酒精消毒 10 s,再用无菌水清洗 3 次,然后在用保鲜膜封口的无菌 1.5 mL 离心管中加入 1 mL 粗菌液或分离液,分别插入上述几种生测材料,使其基部或根部浸入其中。同时设无菌水和空白作为对照。23 °C 处理 3 天,共做 3 组重复,观察记载。

另外对非蛋白质部分选用与马尾松同一生境的旋花科(Convolvulaceae)马蹄金(*Dichondra repens* Forst.)、豆科(Leguminosae)白花三叶草(*Trifolium repens* Linn.)、唇形科(Labiatae)瘦风轮(*Clinopodium gracile* (Benth.) Matsum.)3 种杂草和雪松(*Cedrus deodara* (Roxb.) G. Don)针叶进行生物测定,取灭过菌的西林瓶,各加入 1 mL 4 种散斑壳真菌的非蛋白质部分粗提液,分别插入 3 种杂草和雪松针叶各 3 枝,做 3 个重复,记录表现伤害程度。

生测伤害级别设为 5 级(0 ~ 4),数值越大表示所受伤害越严重。

生测材料无明显反应,伤害级别值 0;

1/4 以下的针叶出现症状,伤害级别值 1;

1/4 至 1/2 的针叶出现症状,伤害级别值 2;

1/2 至 2/3 的针叶出现症状,伤害级别值 3;

2/3 以上的针叶出现症状,伤害级别值 4。

1.8 细胞膜伤害的测定

由于生测过程中经常受到一些不确定因素的影响,所以采用同时结合对细胞膜伤害的测定,以期准

确了解散斑壳病原真菌对松针针叶的伤害状况。

对于细胞膜伤害的测定是采用电导率法:将生物测定的松针统计后取出,用蒸馏水及去离子水洗涤3次后剪成0.5 cm小段,然后置于20 mL的蒸馏水中,静止30 min,测其电导率,记录为 E_1 ;然后于23 ℃ $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速下振荡2 h,测其电导率,记录为 E_2 ;最后于沸水浴中加热10 min,冷却至室温,测其电导率,记录为 E_3 。针叶伤害率 $\% = (E_2 - E_1) / E_3^{[9]}$ 。

2 结果与分析

2.1 代谢产物组分的生物活性

通过对粗菌液、粗提液蛋白质部分以及非蛋白

质部分等各组分进行生物测定,3天后测定其电导率,计算伤害率,结果如表1。

在表1中可以看出4种散斑壳真菌粗提液中蛋白质部分基本上没有活性。蛋白质组分对少数生测材料上有轻微伤害现象,产生一定的干蔫现象,但电导率测定发现其对细胞膜的伤害不明显。

4种散斑壳真菌粗提液非蛋白质部分在3天对松针的伤害明显,是其致病物质的主要成分。同时,由于经过粗提后,毒素中所含有的核酸、多糖类物质也大大减少,表现出了很强的致病活性,比粗菌液的毒性更强。

表1 4种真菌代谢产物不同组分的生物测定

组分	生测材料	伤害级别	伤害率/%	组分	生测材料	伤害级别	伤害率/%
水	高山松	0	2.62	水	云南松	0	2.96
粗菌液 CK	高山松	0	2.98	粗菌液 CK	云南松	0	3.01
5号粗菌液	高山松	0	11.76	5号粗菌液	云南松	0	3.25
9号粗菌液	高山松	0	6.73	9号粗菌液	云南松	0	4.93
19号粗菌液	高山松	0	5.91	19号粗菌液	云南松	0	5.97
20号粗菌液	高山松	0	5.45	20号粗菌液	云南松	0	4.76
蛋白液 CK	高山松	0	3.87	蛋白液 CK	云南松	0	5.43
5号蛋白液	高山松	1	4.05	5号蛋白液	云南松	0	6.86
9号蛋白液	高山松	0	4.03	9号蛋白液	云南松	0	6.12
19号蛋白液	高山松	1	4.96	19号蛋白液	云南松	0	5.77
20号蛋白液	高山松	0	5.18	20号蛋白液	云南松	0	5.95
非蛋白 CK	高山松	0	6.10	非蛋白 CK	云南松	1	6.92
5号非蛋白	高山松	4	30.98	5号非蛋白	云南松	2	15.29
9号非蛋白	高山松	4	28.54	9号非蛋白	云南松	4	18.58
19号非蛋白	高山松	4	25.50	19号非蛋白	云南松	4	20.95
20号非蛋白	高山松	3	18.52	20号非蛋白	云南松	2	10.67
水	华山松	0	4.23	水	马尾松	0	0
粗菌液 CK	华山松	1	7.98	粗菌液 CK	马尾松	0	0.21
5号粗菌液	华山松	2	13.76	5号粗菌液	马尾松	0	4.23
9号粗菌液	华山松	3	14.55	9号粗菌液	马尾松	0	0.58
19号粗菌液	华山松	4	21.79	19号粗菌液	马尾松	0	2.33
20号粗菌液	华山松	4	15.16	20号粗菌液	马尾松	0	1.53
蛋白液 CK	华山松	1	4.65	蛋白液 CK	马尾松	0	3.14
5号蛋白液	华山松	1	4.86	5号蛋白液	马尾松	0	4.00
9号蛋白液	华山松	1	7.32	9号蛋白液	马尾松	0	3.59
19号蛋白液	华山松	1	7.25	19号蛋白液	马尾松	0	3.62
20号蛋白液	华山松	1	7.34	20号蛋白液	马尾松	0	3.41
非蛋白 CK	华山松	1	14.09	非蛋白 CK	马尾松	0	5.45
5号非蛋白	华山松	3	27.42	5号非蛋白	马尾松	2	11.26
9号非蛋白	华山松	4	35.45	9号非蛋白	马尾松	1	7.18
19号非蛋白	华山松	4	38.46	19号非蛋白	马尾松	1	8.32
20号非蛋白	华山松	4	37.96	20号非蛋白	马尾松	2	10.06

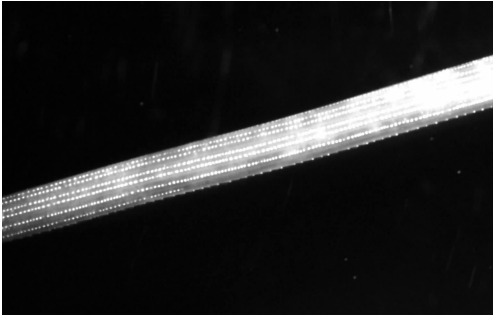


图1 空白样品处理松针的表现

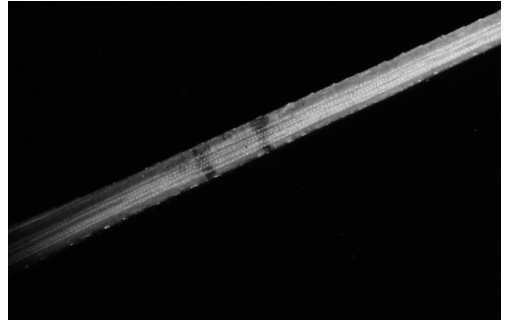


图2 毒素样品处理松针的表现

用空白对生测材料处理后,未发现针叶发生表现变化(图1)。而用粗菌液及毒素做生物测定3天后,松针即表现出肉眼清晰可见的典型受害症状,从叶顶端至基部出现不连续黄色段斑,有时为水渍状,随后发展成多个段斑相互连接为一体,整个针叶枯死(图2)。并且在华山松、云南松及高山松上,还会产生黑色的环状线纹,与自然发病的症状极为相似。

2.2 4种散斑壳病原真菌致病毒素的致病性差异

通过生物测定和电导率测定(表1),发现4种散斑壳真菌毒素对于4种寄主植物的致病性不同。5号针叶树散斑壳(*L. conigenum*)真菌所分泌的毒素对高山松和马尾松的致病性相对最强,19号四川散斑壳(*L. sichuanense*)真菌毒素对云南松和华山

松的致病性相对最强,9号松针散斑壳(*L. pinastri*)真菌毒素对高山松和云南松的致病性相对较强,而20号二郎山散斑壳(*L. erlangshanense*)真菌毒素则对华山松和马尾松的致病性较强。综合毒素对4种松针的伤害情况,19号四川散斑壳 *L. sichuanense* 的致病性最强。

2.3 4种散斑壳病原真菌毒素的专化性

对与马尾松同一生境下3种不同科属杂草的生物测定结果表明,4种散斑壳真菌毒素对于3种杂草均有致枯作用,在第3天时4种毒素能使其全部枯死,并且与前文中所得结果类似:19号四川散斑壳 *L. sichuanense* 的致病性较强于其他3种散斑壳病原真菌。

表2 4种真菌毒素粗体液对杂草和雪松的伤害

真菌毒素	第1天		第2天		第3天	
	3种杂草	雪松针叶	3种杂草	雪松针叶	3种杂草	雪松针叶
蒸馏水	---	---	---	---	---	---
CK	---	---	---	---	---	---
5号 <i>L. conigenum</i>	---	---	+++	---	+++	---
9号 <i>L. pinastri</i>	---	---	--+	---	+++	---
19号 <i>L. sichuanense</i>	--+	---	+++	---	+++	---
20号 <i>L. erlangshanense</i>	---	---	--+	---	+++	---

注:“—”表示无表观伤害;“+”表示有表观伤害。

对雪松的生物测定结果表明,4种散斑壳真菌毒素,尤其是5号针叶树散斑壳真菌毒素对于与其寄主生境相同的雪松没有明显致病作用。林英任等^[10]曾报道在陕西、河南等地发现有雪松散斑壳(*Lophodermium cedrinum* Marie)真菌寄生于雪松并致病,本实验结果表明,实验所用4种散斑壳菌所产毒素对雪松均无致病作用,这可能是散斑壳真菌对其寄主的选择性和雪松对散斑壳病原菌具有一定抗性的具体表现,因至今没有这4种散斑壳真菌在雪松上有发现的报道。

通过表1和表2的结果,可以得知4种散斑壳

真菌所产毒素对高山松、云南松、华山松、马尾松及三种杂草均有致病作用,因此均为非寄主专化性毒素,但对寄主植物还是有一定的选择性。

3 结论与讨论

本研究证明4种散斑壳真菌在液体培养基中的代谢产物对寄主植物具有强的致病性,导致松针上产生黄色段斑、整个针叶枯死,并且在华山松、云南松及高山松上,还会产生黑色的环状线纹,与自然发病的症状极为相似。除了本身的寄主植物外,4种散斑壳真菌所产代谢产物还对其他松属植物、杂草

有致病、致枯作用,表明它们均为非寄主专化性毒素。

大多数真菌毒素属于低分子量的次生代谢产物,主要包括有:环状肽类、脂类化合物、低聚糖和聚乙醇酯等类别^[11]。研究表明4种散斑壳真菌代谢产物中致病物质均为非蛋白质类毒素成分。通过有机溶剂沉淀法收集了蛋白质等大分子组分,经过检测,几乎没有毒性。而非蛋白质组分通过甲醇的抽提,其致病性较粗菌液更强,这与叶建仁、祁高富等^[12-13]在对松针褐斑病菌毒素的研究中得到的结果类似。对于非蛋白质组分毒素组分的分析通常采用的有分馏法、重结晶法和色谱分析法^[14]等。其中利用吸附薄层层析法可以对吸附能力有差别的不同组分进行分离,从而进行进一步的性质研究和致病机制的研究。

同时在生物测定中表明,4种散斑壳真菌毒素对于4种寄主植物的致病性是不同的。5号 *L. conigenum* 毒素对高山松和马尾松的致病性相对最强,19号 *L. sichuanense* 毒素对云南松和华山松的致病性相对最强,9号 *L. pinastri* 毒素对高山松和云南松的致病性相对较强,而20号 *L. erlangshanense* 毒素则对华山松和马尾松的致病性较强。这一现象与4种散斑壳真菌的寄生习性有一定关联(5号 *L. conigenum* 是分离自马尾松,19号 *L. sichuanense* 分离自云南松,它们对马尾松和云南松的致病性分别是最强的,而9号 *L. pinastri* 和20号 *L. erlangshanense* 对其分离寄主——高山松和华山松的致病性也是相对较强的。*L. conigenum*、*L. pinastri* 及 *L. erlangshanense* 一般都是在落针上才产生子囊盘,而 *L. sichuanense* 则是寄生于云南松的2年生针叶上^[7],其中次生活叶上的子实体最多),4种真菌所分泌毒素都对其来源寄主具有强的致病性。其中19号 *L. sichuanense* 的寄生性最强,其所分泌的毒素也是致病性最强的。

19号 *L. sichuanense*、20号 *L. erlangshanense* 虽然在自然条件下只分别对云南松和华山松有侵染,而对其他松属植物无侵染记录。但它们所分泌的毒素则对其他几种松属植物有致病作用,这说明了毒素对植物的毒性与病原菌对寄主的致病性存在着一定的相似性,但又不完全相同。寄主的抗病途径是多种多样的,既有表皮皮层等天然抗侵入屏障,又有植物本身固有的抗菌物质,同时寄主抗性既可表现为过敏反应,又可表现为植保素的合成和免疫信

息物质的产生。当用毒素直接作用时,寄主的抗侵入等机制就失去了作用而表现为对毒素敏感,这一结果与叶建仁等^[15]在对松针褐斑病菌毒素的研究类似。

任嘉红等^[16]在对利用溃疡菌毒素筛选抗病杨树品种的研究中发现毒素处理时间越长,杨树枝条受害越重,膜透性破坏越强,电导率也增加。本实验中,将直观的生物测定与数字化的电导率测定结合起来分析毒素对松树针叶的伤害情况,可以发现散斑壳真菌毒素对生测松针叶细胞膜有伤害作用,且其伤害程度与表观生物测定基本上成正比关系。这一思路对于今后研究植物病原真菌毒素生物测定的精确性有着一定的积极意义。

参考文献:

- [1] 赵树权,任广英,邹良. 樟子松病害概述[J]. 森林病虫通讯, 1999(1): 34-36
- [2] 方志蓉,黄向东. 松针褐斑病菌毒素的研究[J]. 湖南林业科技, 1996, 23(1): 68-70
- [3] 朱天辉,叶华智,罗孟军. 枯斑盘多毛孢 PF-毒素活性组分的分离纯化[J]. 植物病理学报, 2003, 33(6): 541-545
- [4] 朱玮,胡景江,马希汉,等. 杨树与溃疡病菌相互作用的生理病理化学研究 II. 溃疡病菌毒素粗提物对寄主的影响初探[J]. 西北林学院学报, 1997, 12(3): 7-13
- [5] 杨斌,叶建仁,包宏. 林木病原真菌毒素研究[J]. 林业科学研究, 2000, 13(3): 316-322
- [6] 徐梅卿,何平勋. 中国木本植物病原总汇[M]. 哈尔滨:东北林业大学出版社, 2008
- [7] 刘应高,潘欣,庄启国,等. 四川松树6种散斑壳菌记述[J]. 中国森林病虫, 2004, 23(4): 9-12
- [8] 刘应高,潘欣,杨静,等. 华山松上散斑壳属一新种[J]. 菌物学报, 2009, 28(4): 473-475
- [9] 叶建仁,祁高富,包宏,等. 松针褐斑病菌毒素对寄主细胞质膜伤害机理的研究[J]. 林业科学, 2000, 36(2): 82-86
- [10] 林英任,黎志,梁师文,等. 中国北部地区一些针叶树生斑痣盘菌[J]. 真菌学报, 1995, 14(3): 179-183
- [11] 张利辉,董金皋,刘云惠. 植物病原真菌毒素的分离与纯化技术[J]. 现代科学仪器, 2001(2): 56-62
- [12] 祁高富,叶建仁,包宏. 松针褐斑病菌毒素的确定及其基本性质研究[J]. 南京林业大学学报, 1999, 23(4): 17-21
- [13] 叶建仁,谢春霞,王永银,等. 松针褐斑病菌致病机制的研究[J]. 林业科学研究, 1998, 11(3): 243-248
- [14] 石凤梅. 植物病原真菌毒素的研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2006(2): 70-73
- [15] 叶建仁,祁高富. 松针褐斑病菌毒素的专化性研究[J]. 南京林业大学学报, 1999, 23(6): 1-4
- [16] 任嘉红,张晓明,张桂萍. 利用溃疡菌毒素筛选抗溃疡病杨树品种[J]. 山西大学学报:自然科学版, 2004, 27(1): 68-71