

## 松针褐斑病菌毒素 LA- I 和 LA- II 致毒活性研究\*

杨 斌<sup>1)</sup> 叶建仁<sup>2)</sup> 包 宏<sup>5)</sup> 刘吉开<sup>3)</sup> 董泽军<sup>4)</sup>

(南京林业大学 南京 210037)

(中国科学院昆明植物研究所 昆明 650204)

**摘 要:** 研究比较了松针褐斑病菌(*Lecanosticta acicola*)两个致病毒素 LA- I 和 LA- II 的热稳定性、寄主专化性和最低有效浓度以及它们间的相互关系。LA- I 和 LA- II 均具热稳定性,经沸水水浴加热 15 min 仍具活性。LA- I 和 LA- II 不仅能伤害易感寄主植物湿地松、火炬松,对云南松、华山松、紫茎泽兰等也有伤害作用,说明 LA- I 和 LA- II 均为非寄主专化性毒素。LA- I 和 LA- II 配成不同浓度溶液生测,显示 LA- I 对湿地松幼苗的最低有效浓度为  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , LA- II 的最低有效浓度为  $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , LA- I 活性较 LA- II 的活性高 4~5 倍。LA- I 和 LA- II 混合液生测表明,2 个活性物质对寄主植物的伤害作用没有明显的相互促进或相互抑制作用。

**关键词:** 松针褐斑病菌, 毒素, 致毒活性

STUDIES ON THE PHYTOTOXIC ACTIVITIES OF LA - I AND LA - II PRODUCING BY BROWN SPOT NEEDLE BLIGHT FUNGUS (*LECANOSTICTA ACICOLA*)Yang Bin<sup>1)</sup> Ye Jianren<sup>2)</sup> Bao Hong<sup>5)</sup>Liu Jikai<sup>3)</sup> Dong Zejun<sup>4)</sup>

(Nanjing Forestry University Nanjing 210037)

(Kunming Institute of Botany, The Chinese Academic of Science Kunming 650204)

**Abstract:** Brown spot needle blight of pine was an important disease in South China, which was caused by *Lecanosticta acicola*. The pathogen could produce two kinds of toxin, LA- I and LA- II. The toxin activities and basic properties of LA- I and LA- II were studied in the way of bioassay. The results indicated that LA- I and LA- II could not only injure the seedlings of host pine (*Pinus elliotii*, *P. taeda*) but also make the seedlings of other plants (*P. yunnanensis*, *P. armandii* and *Eupatorium* sp.) wilt. So both of the two toxins were non-host specific toxins (NHST). LA- I and LA- II could keep their toxic activities for 15 minutes after boiling. The minimal effective concentrations of LA- I and LA- II were  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}$  and  $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}$  respectively and their activities were not very strong. LA- I and LA- II could not affect their activities each other when they were mixed.

**Key words:** *Lecanosticta acicola*, Toxins, Toxic activity

一种病原菌产生多种致毒性活性物质是常有的现象。这些活性物质可能因化学组成或化学结构的不同,而在理化性质以及致病过程中的地位和作用存在明显差异(海蒂弗斯,1991;章元寿,1996;Pringle,1967)。菊池链格孢菌(*Alternaria kikuchiana*)能产生 3 种毒素物质,AK I、AK II 和 TA。AK I、AK II 是寄主专化性毒素(HST),TA 为非寄主专化性毒素(NHST)。TA 活性弱,但在水稻上,TA 可增强瘟病菌(*Pyricularia oryzae*)侵染力,使病斑数目增加一倍,病斑面积增大 30%。由此可见,TA 有增强稻瘟病菌其他毒素活性的作用(Daly,1983)。盘长孢刺盘菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)能产生曲霉肽 A 和曲霉肽 B(aspergillomarasmin A、B)两种毒素。曲霉肽 A 可引起蕃茄萎蔫并不具热稳定性;曲霉肽 B 引起蕃茄叶斑,具热稳定性。说明二者在作用机理和作用方式上明显不同(Ballio,1972;Sharma,1969)。正是由于多种毒素物质复杂的协同作用才造成对寄主植物的伤害。海蒂弗斯曾认为,在植物病害过程中 1 种毒素很少单独起作用,它多少总是与病原物的其他代谢产物或酶联合产生最终的致病作用(海蒂弗斯,1991)。

松针褐斑病菌(*Lecanosticta acicola*)可产生毒素(海蒂弗斯,1991)。祁高富(1999)、叶建仁(1999)曾

收稿日期:2001-05-08。

基金项目:国家自然科学基金项目“松针褐斑病菌致病毒素的研究”(批准号 39870627)。

\* 叶建仁为通讯作者。1)、2)、3)、4)、5)为作者排序。

对松针褐斑病菌毒素基本性质作过较深入研究,认为松针褐斑病菌毒素无寄主专化性,但不同寄主之间仍存在敏感性差异。通过半定量试验研究认为松针褐斑病菌毒素对湿地松愈伤组织的最低有效浓度为  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (叶建仁,1998;祁高富,1999)。由于当时还没有分离出致病毒素,这种试验和定量只是以松针褐斑病菌毒素粗提液全部组分为基础的。目前已经从松针褐斑病菌发酵液中分离到2个致毒活性物质 LA-I 和 LA-II。根据过去其他毒素的研究结果,LA-I 和 LA-II 表现出的性质和活性不一定与松针褐斑病菌毒素整体表现出来的性质与活性完全一致。在对 LA-I 和 LA-II 的分离纯化过程中,为了避免丢失某些活性弱的物质,在生测时将各分离组分均配成浓度为  $2 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的生测液进行生测(杨斌,2001),祁高富(1999)研究认为松针褐斑病菌毒素粗提液的致萎活性浓度应为  $2 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  以下,而目前对 LA-I 和 LA-II 的最低有效活性浓度还不清楚,也不知 LA-I 和 LA-II 之间是否存在协同作用?二者在致病过程中地位如何?因此,必需对 LA-I 和 LA-II 这2种致病毒素的基本性质进行研究,比较二者活性大小,研究二者的互作关系等,为今后进一步深入研究致病毒素的致病机理奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 毒素样品

根据杨斌等(2001)的方法培养、提取分离纯化获得松针褐斑病菌毒素 LA-I 和 LA-II,并经高效液相色谱检验确为纯物质。

### 1.2 生测方法

采用针刺法(叶建仁,1998;祁高富,1999),以蒸馏水作为对照。生测植物材料为湿地松(*Pinus elliotii*)4月生幼苗(种子由南京林业大学种子中心提供),火炬松(*P. taeda*)、云南松(*P. yunnanensis*)、华山松(*P. armandii*)、思茅松(*P. kesiya*)和辐射松(*P. radiata*)1月生幼苗(种子由云南省种苗站吴翕赠送),紫茎泽兰(*Eupatorium* sp.)采自西南林学院校园。

### 1.3 LA-I 旋光性

用旋光仪测定 LA-I 旋光性,仪器条件:光源波长  $\lambda = 589 \text{nm}$ ,待测样品浓度为  $0.00947 \text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,盛液管长度  $20 \text{mm}$ ,温度  $13.7^\circ\text{C}$ ,测定时先调节棱镜晶柱,使其相互平行,作为零度,将被测样品溶液(以  $\text{CH}_3\text{OH}$  作溶剂)放入盛液管,测量旋光度。

### 1.4 LA-I、LA-II 热稳定性

LA-I、LA-II 配成浓度为  $1 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  溶液,置于沸水中加热  $15 \text{min}$ ,冷却后生测,以不加热的 LA-I 和 LA-II 为对照,生测材料为湿地松幼苗、紫茎泽兰叶片。

### 1.5 LA-I、LA-II 专化性

将 LA-I、LA-II 配成浓度为  $2 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  水溶液,用不同松树幼苗、紫茎泽兰叶片为生测材料。

### 1.6 LA-I、LA-II 最低有效浓度

将 LA-I、LA-II 配在浓度为  $2 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $1 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  水溶液,进行生测,生测材料为湿地松幼苗,以蒸馏水为对照(最低有效浓度指出现明显伤害症状的最低毒素浓度)。

### 1.7 LA-I、LA-II 相互关系

用  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  LA-I +  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  LA-II (体积比为 1:1),  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  LA-I +  $1 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  LA-II (体积比为 1:1),  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  LA-I,  $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  LA-II 溶液进行生测,观察 LA-I、LA-II 之间是否有相互促进或相互抑制的现象,以水为对照,生测材料为湿地松幼苗。

## 2 结果与分析

松针褐斑病菌毒素 LA-I 的分子结构为  $\text{HOOCCH}(\text{CH}_3)\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{COOH}$ ,具2个手性碳原子<sup>1)</sup>。旋

1) 杨斌,松针褐斑病菌致病毒素的研究.南京林业大学.博士学位论文,2002,6.

光测定结果显示 LA-I 旋光度  $\alpha = +0.0010^\circ$ , 按公式  $[\alpha] \frac{T}{\chi} = \frac{\chi}{l \times C}$  (其中  $\alpha$  为旋光度,  $l$  为盛液管长度 (cm),  $C$  为待测液浓度  $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 计算, LA-I 比旋光度为  $+0.53$ , 由此可见 LA-I 基本无旋光性, 为分子内消化化合物。松针褐斑病菌毒素 LA-II 的分子结构为  $\text{CH}_3\text{COSCOCH}_3$ , 无手性碳原子(杨斌, 2001), 且镜像对称, 因此也无旋光性。高温加热处理后, LA-I 和 LA-II 对湿地松幼苗、紫茎泽兰叶片的致毒活性没有明显变化, 说明 LA-I 和 LA-II 具热稳定性(表 1)。

表 1 高温处理后 LA-I 和 LA-II 致毒活性变化的生测结果

Tab.1 Infection of high temperature to the activities of LA-I and LA-II

处理 Treatment	重复 Repeat	植物 Plant type									
		湿地松幼苗 (Slash pine seedling)					紫茎泽兰叶片 ( <i>Eupatorium</i> leaves)				
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
LA-I	1	-	-	+	++	+++	-	+	++	+++	
	2	-	+	+	++	+++	-	+	++	+++	
Toxin-1	3	-	-	+	++	++	-	+	++	+++	
	1	-	+	+	++	+++	-	+	++	+++	+++
加热 LA-I 后 Hot toxin-1	2	-	-	+	++	+++	-	+	++	+++	+++
	3	-	-	+	++	+++	-	-	+	++	+++
LA-II	1	-	-	+	++	++	-	+	+	++	+++
	2	-	-	+	+	++	-	+	+	++	++
Toxin-2	3	-	-	+	+	++	-	+	+	++	++
	1	-	-	+	++	++	-	+	+	++	+++
加热 LA-II 后 Hot toxin-2	2	-	-	+	+	++	-	+	+	++	++
	3	-	-	+	+	++	-	-	+	++	++
CK	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表 2 LA-I 和 LA-II 对不同植物毒害情况

Tab.2 Virulences of LA-I and LA-II

植物 Plant type	重复 Repeat	处理 Treatment														
		LA-I					LA-II					CK				
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
湿地松	1	-	-	+	++	+++	-	-	+	+	++	-	-	-	-	-
<i>P. elliotii</i>	2	-	-	+	+	++	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
火炬松	1	-	-	+	++	+++	-	-	+	+	++	-	-	-	-	-
<i>P. taeda</i>	2	-	-	+	++	+++	-	-	+	+	++	-	-	-	-	-
云南松	1	-	-	+	+	++	-	-	+	+	++	-	-	-	-	-
<i>P. yunnanensis</i>	2	-	-	+	++	+++	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
华山松	1	-	-	+	+	++	-	-	-	+	++	-	-	-	-	-
<i>P. armandii</i>	2	-	-	+	++	+++	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
辐射松	1	-	-	+	++	+++	-	-	+	+	++	-	-	-	-	-
<i>P. radiata</i>	2	-	-	+	++	+++	-	-	+	+	++	-	-	-	-	-
思茅松	1	-	-	+	++	+++	-	-	+	+	++	-	-	-	-	-
<i>P. kesiya</i>	2	-	-	+	+	++	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
紫茎泽兰	1	-	+	++	++	+++	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Eupatorium</i>	2	-	+	++	+++	+++	-	-	+	+	++	-	-	-	-	-

LA-I 和 LA-II 不仅能为害湿地松、火炬松和辐射松幼苗, 而且对云南松、思茅松和华山松幼苗也有伤害作用。在浓度为  $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  条件下生测, LA-I 和 LA-II 对以上几种松树幼苗的伤害程度无明显差异。伤害症状多为松苗出现萎蔫, 有时可见明显水渍状段斑和黄色段斑。而用毒素原液或毒素粗提液

生测时,几乎每个生测材料上均出现段斑。LA- I 和 LA- II 对杂草紫茎泽兰也有伤害,其伤害症状与毒素粗提液处理时一致,即在叶片上出现红褐色小点或出现近圆形水渍状斑。LA- I 和 LA- II 为非寄主专化性毒素,供试的几种松树的松苗对这两种毒素敏感性差异不明显(见表 2)。

表 3 不同浓度 LA- I 和 LA- II 对湿地松幼苗生测结果

Tab.3 Bioassay results of slash pine seedlings treated with different concentrations of LA- I and LA- II

浓度 Concentration	重复 Repeat	毒素 Toxin									
		LA- I (toxin-1)					LA- II (toxin-2)				
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
2 mg·mL <sup>-1</sup>	1	-	-	+	++	+++	-	-	+	++	++
	2	-	+	+	++	+++	-	-	+	++	++
1 mg·mL <sup>-1</sup>	1	-	-	+	++	+++	-	-	+	+	++
	2	-	-	+	++	+++	-	-	+	+	++
500 μg·mL <sup>-1</sup>	1	-	-	+	+	++	-	-	-	+	+
	2	-	-	+	++	+++	-	-	-	+	+
250 μg·mL <sup>-1</sup>	1	-	-	+	+	++	-	-	-	-	+
	2	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
100 μg·mL <sup>-1</sup>	1	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
50 μg·mL <sup>-1</sup>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
10 μg·mL <sup>-1</sup>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
5 μg·mL <sup>-1</sup>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CK	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表 4 LA- I 和 LA- II 相互作用生测结果<sup>①</sup>

Tab.4 Bioassay results of interaction between LA- I and LA- II

处理 <sup>①</sup> Treatment	重复 Repeat	植物 Plant type									
		湿地松幼苗(Slash pine seedling)					紫茎泽兰叶片( <i>Eupatorium</i> leaves)				
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
A	1	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
	2	-	-	+	+	+	-	+	+	++	++
B	1	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
	2	-	-	-	+	+	-	-	+	+	++
C	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	1	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
	2	-	-	-	+	+	-	+	+	+	++
E	1	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
	2	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
CK	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>①</sup>A: 200 μg·mL<sup>-1</sup> LA- I + 50 μg·mL<sup>-1</sup> LA- II (V: V = 1:1), B: 50 μg·mL<sup>-1</sup> LA- I + 1 mg·mL<sup>-1</sup> LA- II (V: V = 1:1), C: 50 μg·mL<sup>-1</sup> LA- I + 50 μg·mL<sup>-1</sup> LA- II (V: V = 1:1), D: 100 μg·mL<sup>-1</sup> LA- I, E: 500 μg·mL<sup>-1</sup> LA- II, CK: 蒸馏水 Distilled water.

研究表明 LA- I 最低有效浓度为 100 μg·mL<sup>-1</sup>, LA- II 最低有效浓度为 500 μg·mL<sup>-1</sup>。LA- I 的活性比 LA- II 高 5 倍左右。100 μg·mL<sup>-1</sup> 的 LA- I 在 5 d 内可使生测材料有明显枯斑,但不能使整个针叶全部枯死或萎蔫;而当浓度为 500 μg·mL<sup>-1</sup> 时,在 5 d 内就可使大部分生测材料枯死或萎蔫。LA- II 活性弱一些,

浓度要在  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时才可使生测材料在 5 d 内全部枯死(见表 3)。

为了灵敏地观察 LA-I 和 LA-II 之间的相互作用,试验选择了最低有效浓度作为生测浓度。研究发现,在含量低于有效浓度的 LA-I 和 LA-II 中分别加入少量 LA-I 和 LA-II,生测活性均无明显变化;低于最低有效浓度的 LA-I 和 LA-II 混合对生测材料没有伤害作用。由此可见,LA-I 和 LA-II 之间不存在明显相互增强或削弱活性的情况(表 4)。

### 3 结论与讨论

植物病原菌毒素根据其对植物的特异性作用不同,可分为寄主专化性毒素(HST)和非寄主专化性毒素(NHST)。寄主专化性毒素致病的植物范围与产毒病菌的寄主范围一致。非寄主专化性毒素除能对寄主植物产生毒害作用外,对非寄主植物也有毒害作用。本研究用提纯后的毒素 LA-I 和 LA-II 进行生测,表明这两种毒素不仅对湿地松、火炬松、辐射松、云南松和华山松等有伤害作用,而且对草本植物紫茎泽兰也有伤害作用。说明 LA-I 和 LA-II 为非寄主专化性毒素。叶建仁等曾用毒素粗提液对多种植物进行生测,也显示粗毒素有非寄主专化性的特点(海劳弗斯,1991)。但不同植物对毒素粗提液的敏感性还存在种间差异。从本试验生测结果看,以 LA-I、LA-II 进行生测,这种种间差异表现不十分明显。随着对各种植物病原菌毒素的深入研究,人们逐渐发现一种病原菌往往产生多种致毒物质来适应不同寄主植物和同一寄主植物的不同抗病机制,而且多种毒素组分协同作用才对植物造成伤害。LA-I、LA-II 专化性试验结果与过去用毒素粗提液进行专化性研究的结果基本一致但并非完全相同,其原因可能是毒素粗提液中除了含有 LA-I 和 LA-II 活性组分外还有其他的化合物,影响了毒素的活性和种间选择性。

过去用半定量方法研究毒素作用的最低有效浓度表明:松针褐斑病菌毒素对湿地松愈伤组织的最低有效浓度在  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  以下。本试验用湿地松幼苗作生测材料进行最低浓度研究表明,LA-I 活性比 LA-II 活性高 4~5 倍,LA-I 作用的最低有效浓度为  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,LA-II 为  $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,若以愈伤组织为生测材料,这数字应当要小得多。同其他植物病原菌毒素的作用浓度相比,松针褐斑病菌毒素 LA-I 和 LA-II 的活性并不高,过去发现的毒素物质一般在浓度为  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  就表现出很强的致毒活性。LA-I 和 LA-II 互作关系研究表明,LA-I 和 LA-II 之间没有相互促进,也没有明显相互抑制的现象。LA-II 是一种含 S 化合物(杨斌,2001),根据 Youla 对含硫化化合物的生物活性和功能的研究,认为含 S 活性物质通常有加强或模仿其他生物活性物质的功能。松针褐斑病菌毒素中是否存在其他含量极低的活性物质与 LA-II 协同作用值得进一步研究。

### 参 考 文 献

- 海蒂弗斯 R,威廉斯 P H 主编,朱有红,宋佐衡,傅淑云等译.植物病理生理学.北京:农业出版社,1991
- 祁高富,叶建仁.松针褐斑病菌毒素的确定及其基本性质的研究.南京林业大学学报,1999,23(4):17~21
- 杨斌,刘吉开,叶建仁等.松针褐斑病菌毒素 LA-II 的分离纯化及化学结构研究.南京林业大学学报,2001,25(3):章元寿主编.植物病理生理学.南京:江苏科学技术出版社,1996
- 叶建仁,祁高富.松针褐斑病菌毒素的专化性研究.南京林业大学学报,1999,23(6):1~4
- 叶建仁,解春霞.松针褐斑病菌致病机制研究.林业科学研究,1998,11(3):243~248
- Ballio A. Phytotoxins: a exercise in the chemistry of biologically active natural products. In: Phytotoxins in Plant Disease, New York-London: Academic press, 1972
- Daly J M, Deverall B J. Toxins and plant pathogenesis. New York-London: Academic press, 1983
- Hawes M C. Technique for using isolated corn root loop cells in a simple, quantitative bioassay for the pathotoxin produced by *Helminthosporium maydis* Race T. Phytopathology 1983, 73: 1184~1187
- Pringle R B, Scheffer R P. Multiple host-specific toxins from *Periconia circinata*. Phytopathology, 1967, 57: 530~532
- Sharma M C, Sharma B C. Toxic metabolite production by *colletotrichum gloeosporioides* causing citrus die-back in India. Phytopathology, 1969, 22: 67~