

# 松针褐斑病菌毒素活性的生物检测\*

叶建仁,杨 斌\*,包 宏

(南京林业大学,江苏 南京 210037)

**摘要:**松针褐斑病菌毒素不仅能伤害湿地松、火炬松等寄主植物的幼苗、针叶、根及愈伤组织,对非寄主植物水花生、紫茎泽兰的叶片也有伤害作用。在试验的几种生测材料中,湿地松愈伤组织对毒素伤害最敏感,湿地松幼苗、幼针叶,火炬松幼针叶和紫茎泽兰叶片次之,湿地松幼根、老针叶,火炬松老针叶,水花生和小麦叶片最不敏感。根据生测材料的敏感程度及表现症状的特异性分析可知,用湿地松、火炬松幼苗和幼针叶作生测材料较好。比较针刺法、浸渍法和涂抹法等几种生测方法表明,用针刺法接种毒素效果最好,其反应速度快,用量少,症状明显。因此建议在松针褐斑病菌毒素的生物检测中,以湿地松或火炬松幼苗或幼针叶作为材料,采用针刺法。

**关键词:**松树病害;松针褐斑病菌;真菌毒素;松针褐斑病

中图分类号:S763.1

文献标识码:A

文章编号:1000 - 2006(2002)01 - 0027 - 05

## Studies on the Bioassay of Toxins from *Lecanosticta acicola* Causing Brown Spot Needle Blight of Pines

YE Jian-ren , YANG Bin ,BAO Hong

(Nanjing Forestry University ,Nanjing 210037 ,China)

**Abstract :**Brown spot needle blight of pines is one of important pine diseases ,which is caused by *Lecanosticta acicola*. It is confirmed that the fungi can produce toxic substances in its culture filtrate. The toxic substances were called LA-toxins. LA-toxins could not only poison pine needles also the leaves of weeds. Various bioassay materials were treated with crude LA-toxin to select sensitive material for the future study. The results indicated that seedlings and young needles of sensitive host (slash pine ,loblolly pine) were selected as bioassay materials for their sensitivities and reaction of the typical necrotic and yellow bands on needles. Such symptoms were similar to the symptoms of natural infection in the field and were different from other injuries. Old needles of pines and weed leaves were not sensitive to LA-toxins. Compared with other two bioassay methods(soaking and smearing) ,the acupuncture bioassay is the most suitable method because it just needs less toxin and can cause the evident symptom rapidly.

**Key words :**Pine disease ; *Lecanosticta acicola* ; Fungi toxins ; Brown spot needle blight of pine

在植物病原菌毒素的研究中,如何对毒素进行快速、准确的检测是至关重要的一个环节。植物病原菌毒素的检测方法很多,可分为物理方法、化学方法和生物方法,其中前二类方法是要以对毒素物质的理化性质、化学组成、分子结构有较充分的了解为前提,否则难以实现正确检测。生物检测简单、直观、普遍适用于各种生物活性物质的检测,即使不知毒素物质任何理化性质的情况下也可采用这种方法。

\* 收稿日期:2001 - 04 - 23

修回日期:2001 - 11 - 20

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870627)

作者简介:叶建仁(1958 - ),男,浙江宁波人,南京林业大学森林保护学科教授,博士生导师。

\*杨 斌:南京林业大学2000年博士毕业生,现为中国科学院昆明植物研究所博士后。

生物检测材料很多,大至寄主植物的整个植株、某个器官、组织,小至单个细胞、原生质体、细胞器甚至某个特定的酶分子也可作为检测材料。有时,寄主植物受伤害产生的某个特殊的中间产物(如 $O_2$ )和终产物(如丙二醛 MDA)均可作为检测对象研究毒素的存在。生物检测方法很多,有离体器官浸渍法、针刺法、涂抹法、点滴法、根生长测定法、花粉萌发抑制法等等。1984年 Hawes 报道用于玉米小斑病菌 T 小种毒素的生物测定方法达 40 种之多<sup>[1]</sup>。生物检测材料、方法众多,各有特色,各种不同植物病原菌毒素的作用机理、作用方式、作用部位存在较大差异,所采用的生物测定材料和方法也应当不同。笔者将比较不同的生测材料和生测方法在松针褐斑病菌毒素生物检测上的适应性,以求能发现一种较好的检测方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

(1) 生测材料。湿地松、火炬松松针(采自南京林业大学树木园);培养 1 个月的湿地松、火炬松幼苗(种子由南京林业大学种子中心提供);紫茎泽兰叶片(采自西南林学院校园);水葫芦、水花生(采自西南林学院附近池塘);小麦幼苗(采自西南林学院后山农田);湿地松愈伤组织(由南京林业大学森林资源与环境学院病理组提供);云南松幼针叶(采自昆明植物研究所)。

(2) 松针褐斑病菌产毒培养和毒素原液。病菌在 MS 培养基中于 25 ℃ 下振荡培养 25 d,经真空过滤得毒素原液<sup>[2]</sup>。

(3) 毒素粗提液。取 200 mL 毒素原液,用旋转蒸发仪在 60 ℃ 下抽真空蒸发至干,分 3 次加入 150 mL 氯仿甲醇混合溶剂(氯仿 甲醇 = 2 3),在 35 ℃ 下振荡提取 2 h,合并氯仿甲醇溶液;用旋转蒸发仪在 40 ℃ 下抽真空充分蒸发至干,得松针褐斑病菌毒素粗提物;加蒸馏水溶解,恢复至 200 mL 即得毒素粗提液,置于冰箱中保存备用<sup>[2]</sup>。

### 1.2 试验方法

(1) 寄主植物不同材料对毒素的反应采用浸渍法,即将湿地松、火炬松切根幼苗,湿地松愈伤组织,湿地松、火炬松老针叶(一年生针叶,长约 15~18 cm),幼嫩针叶(当年针叶,长约 3~5 cm)插入底部装有毒素粗提液的试管(依生测材料的不同而大小不同)中生测,生测条件:22 ℃,每天 12 h 光照。以不接菌的 MS 培养液作为对照。观察针叶及愈伤组织变化。

(2) 不同非寄主植物对毒素的反应测定中,将紫茎泽兰、水葫芦、水花生、小麦叶片放入底部盛有毒素的试管或小烧杯中(叶柄茎部伤口浸入毒素液)生测,生测条件:22 ℃,每天 12 h 光照,观察毒素对非寄主植物的伤害。

伤害级别分 0~4 级,0 表示生测材料无明显反应;1/4 以下植物叶片有反应,伤害值为 1;1/4~1/2 叶片有反应,伤害值为 2;1/2 以上叶片有反应,但还没有在整个叶片上有反应,伤害值为 3;整个叶片均有反应,生测材料完全枯黄、萎蔫,伤害值为 4。

(3) 测定不同浓度毒素伤害作用时,将毒素粗提液分别稀释 1、2、3、4、5 倍,用上述方法处理湿地松切根幼苗、紫茎泽兰、湿地松愈伤组织、火炬松针叶,观察伤害情况。以不接菌的 MS 培养液为对照。

(4) 采用的生测方法有 浸渍法:将湿地松幼针叶,火炬松幼针叶,云南松幼针叶,湿地松幼苗,紫茎泽兰叶片浸入底部装有毒素粗提液的试管或小烧杯中生测; 针刺法:用 50 μL 微量注射器针尖在松针束茎部或紫茎泽兰叶片基部造成 3 个小伤口,在伤口处滴加 5~10 μL 生测液,置于放有湿滤纸的培养皿中保湿培养,待生测液干后再加 5~10 μL 生测液,一共加 3 次; 涂抹法:用脱脂棉蘸毒素粗提液涂于松针和紫茎泽兰叶表面,每 2 h 涂一次,共 3 次,置于有滤纸保湿的培养皿中生测。以上生测条件均为 22 ℃,每天 12 h 光照。

## 2 结果与分析

### 2.1 寄主植物不同材料对毒素的反应

不同寄主组织对毒素伤害的敏感程度不同。愈伤组织最敏感,生测 6 h 即可见愈伤组织部分细胞变褐色,呈老化状态,生测 2 d 后几乎所有愈伤组织块都变黑褐色死亡。湿地松幼针叶和切根幼苗对毒

素比较敏感,生测3 d即可见非常明显的段斑,生测5 d大部分幼针叶和切根幼苗枯萎死亡,相比之下幼嫩针叶对毒素反应比切根幼苗稍快一些,生测第2天即可见部分幼针叶上出现较为明显的段斑,此时,切根幼苗仅少数有一点反应。湿地松一年生针叶对毒素敏感程度不高,5 d之内几乎没有老针叶整个枯黄。根要在第3天才会有反应,根受毒素作用后,幼嫩的根尖细胞由白色变黑褐色,呈现一种老化状态,没有在根上看见象针叶上一样明显的段斑,5 d后,根尖部分颜色变化大,其他部分颜色变化不大,依然为黄白色;湿地松、火炬松的各个部分组织对毒素反应敏感程度类似,但在生测过程中感觉湿地松要更敏感一些,而相应对照无反应(表1)。

表1 寄主植物不同材料对毒素的反应

Table 1 Reaction of different pine tissues treated with LA-toxin

材 料	时间/d	湿地松					火炬松					湿地松(对照)				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
老针叶	1	-	-	+	+	++	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
	2	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	3	-	-	+	+	++	-	-	+	+	++	-	-	-	-	-
幼针叶	1	-	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	-	-	-	-	
	2	-	+	++	+++	+++	-	+	++	+++	-	-	-	-	-	
	3	-	+	++	+++	+++	-	+	++	+++	-	-	-	-	-	
切根苗	1	-	-	+	++	+++	-	-	+	++	++	-	-	-	-	
	2	-	-	+	++	+++	-	+	+	++	+++	-	-	-	-	
	3	-	-	+	+	+++	-	-	+	++	++	-	-	-	-	
根	1	-	-	+	+	++	-	-	-	+	+	-	-	-	-	
	2	-	+	+	+	+	-	-	+	++	-	-	-	-	-	
	3	-	-	+	+	+	-	-	+	++	++	-	-	-	-	
愈伤组织	1	+	+++	+++							-	-	-	-	-	
	2	+	+++	+++							-	+	+	+	+	
	3	+	++	+++							-	-	-	-	-	

注: - 表示生测无明显反应; + 表示 1/4 以下针叶有反应(针叶组织变黄、萎蔫或出现水渍状斑); ++ 表示 1/4 ~ 1/2 针叶有反应; +++ 表示 1/2 以上针叶有反应。

## 2.2 不同非寄主植物对毒素的反应

非寄主植物对毒素也有反应,在紫茎泽兰叶片上,毒素作用表现出两种症状,一种症状是在叶片上出现许多红褐色小点,另一种症状是出现近圆形水渍状斑点,随后病斑扩大,变黑色。其他两种水生杂草水葫芦、水花生叶片上均出现褐色小点。在小麦叶片上则出现类似松针上的段斑,段斑初为水渍状,后变黄色。在这几种非寄主植物中,紫茎泽兰对毒素的伤害表现最敏感,5 d后几乎整个叶片上都出现伤害症状,叶片变黄,枯萎。小麦次之,能见到明显段斑。水葫芦和水花生最不敏感,除少数几个小褐点外,整个叶片仍然鲜活如初,对照无任何反应。由此可见,不同非寄主植物对毒素伤害反应也存在差异。不同植物对松针褐斑病菌毒素的反应特点和敏感程度是不同的(图1)。

## 2.3 不同浓度毒素的伤害作用

毒素粗提液稀释2倍后,除湿地松愈伤组织仍有较强的反应外,其他生测材料反应明显减弱,毒素稀释3倍后,湿地松切根苗、紫茎泽兰、火炬松幼针叶等生测材料几乎不出现伤害症状,但对愈伤组织仍有较明显的毒伤作用,稀释4倍后愈伤组织伤害症状不明显(表2)。说明愈伤组织对毒素伤害的敏感程度最高,毒素对生测材料的伤害需要一定浓度,浓度过低,无法引起伤害症状,可能会造成毒素不存在的假象。因此,在今后以生测为导向进行毒素追踪,分离纯化时一定要注意浓度问题,以免在分离过程中失活性组分。

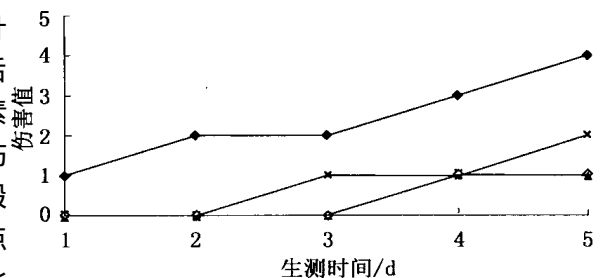


图1 几种非寄主植物对毒素的伤害反应

Fig. 1 Reaction of different non host plants treated with LA-toxin

— 紫茎泽兰; — 水花生; — 水葫芦; — x — 小麦叶

表2 不同稀释倍数毒素对生测材料的伤害

Table 2 Bioassay results of different concentration LA-toxin

材料	时间/d	湿地松切根苗					紫茎泽兰					湿地松愈伤组织					火炬松幼针叶					
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
1倍	1	-	-	+	++	+++	+	+	++	+++		+	++	+++			-	-	+	++	+++	
	2	-	-	+	+	++	-	+	++	+++		+	+++	+++			-	+	++	+++	+++	
	3	-	-	+	++	+++	++	++	+++	+++		+	+++	+++			-	+	+	+++	+++	
2倍	1	-	-	-	-	+	-	-	+	++	++	+	+	++	+++		-	-	-	+	+	
	2	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	++	+++		-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	+	++	-	-	+	+	+	+	+	++	+++		-	-	-	+	+	
3倍	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++		-	-	-	-	
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++		-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++		-	-	-	-
4倍	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+		-	-	-	-	
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5倍	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CK	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注: - 表示生测无明显反应; + 表示 1/4 以下针叶有反应(针叶组织变黄、萎蔫或出现水渍状斑); ++ 表示 1/4 ~ 1/2 针叶有反应; +++ 表示 1/2 以上针叶有反应。

#### 2.4 不同生测方法的生测效果

生测方法对生测结果影响较大,采用浸渍法处理生测材料一般要 3 d 才可见明显的症状,而用针刺法处理,在生测第 2 天即可见症状,生测 4 d 后大部分材料都枯萎(表 3)。涂抹法效果最差,即使涂抹多

表3 不同生测方法的生测结果

Table 3 The comparison of different bioassay methods

材料	时间/d	浸渍法					针刺法					涂抹法				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
湿地松幼针叶	1	-	-	+	++	+++	-	+	+	++	+++	-	-	-	-	+
	2	-	+	+	++	+++	-	+	++	+++	+++	-	-	-	+	+
	3	-	-	+	+	++	-	-	+	++	+++	-	-	-	-	-
火炬松幼针叶	1	-	-	+	++	+++	-	+	++	+++		-	-	-	-	-
	2	-	-	+	++	+++	-	+	++	+++		-	-	-	+	+
	3	-	-	+	++	+++	-	+	++	+++		-	-	-	+	+
云南松切根苗	1	-	-	+	+	++	-	+	++	+++	+++	-	-	-	-	+
	2	-	-	+	++	++	-	+	++	+++	+++	-	-	-	-	+
	3	-	-	-	+	+	-	-	+	++	++	-	-	-	-	+
湿地松幼苗	1	-	-	+	++	+++	-	+	+	++	+++	-	-	-	+	+
	2	-	-	+	++	+++	-	+	++	+++	+++	-	-	-	-	+
	3	-	-	+	+	+++	-	+	+	+	++	-	-	-	-	-
紫茎泽兰叶片	1	-	-	+	++	+++	+	++	+++			-	-	+	++	++
	2	-	+	++	+++	+++	+	++	+++			-	-	+	++	+++
	3	-	-	+	++	+++	+	++	+++			-	+	++	+++	+++

注: - 表示生测无明显反应; + 表示 1/4 以下针叶有反应(针叶组织变黄、萎蔫或出现水渍状斑); ++ 表示 1/4 ~ 1/2 针叶有反应; +++ 表示 1/2 以上针叶有反应。

次,生测松针和生测松苗也只表现出轻微的伤害症状,且表现伤害症状的时间延长(4 ~ 5 d),对紫茎泽兰,涂抹法效果还可以,3 d 即出现明显伤害症状,4 ~ 5 d 整个叶片枯萎,但也还没有针刺法效果好。不同生测方法,影响生测效果的主要原因可能是与毒素进入生测材料组织内的量和速度有关。毒素通过伤口进入植物体,并在植物体细胞和组织内迅速扩散,伤害植物组织细胞。因此浸渍法和针刺法症状明显,而涂抹法处理时毒素是通过植物表皮自然孔口(如气孔)进入植物体,在培养皿中保湿状态下,气孔保卫细胞吸水,气孔关闭,毒素难以渗入,故伤害作用表现不明显。尽管如此,试验中还是显示毒素能通

过植物表皮或自然孔口直接渗入植物体内,对寄主造成伤害。

### 3 结 论

寄主(湿地松)愈伤组织对毒素反应最灵敏,这可能与愈伤组织处于幼嫩状态抗逆境机制不健全、抗逆能力差有关。松针褐斑病菌毒素能引起松针产生段斑,其症状与自然感病产生的症状极为相似,过去研究也报道了这一现象<sup>[3]</sup>。褐色段斑的产生是判断松针受到毒素伤害的一个重要依据,它可把毒素伤害与其他伤害(如渗透势过大,pH 过高过低引起的伤害)区分开来。松树愈伤组织对毒素的反应不表现这种症状,因此,若用愈伤组织进行生测,容易把其他的伤害因素当成是毒素伤害。

寄主松树的幼嫩针叶和幼苗对毒素作用反应较快,也相对较灵敏,且能产生典型症状,是理想的生测材料。幼嫩针叶有发达的维管系统,吸收和运输毒素能力强,速度快,因此幼嫩针叶比幼苗对伤害反应快。老针叶虽然维管系统发达,但细胞抗逆性相对较强,且老针叶较长,故毒素对老针叶的伤害值相对幼叶较低。当然实际上毒素在老针叶上同样也产生数量可观的段斑,只是出现的时间略迟些。在紫茎泽兰叶片上还观察到毒素沿叶脉传导的现象(具体表现为叶脉周围叶组织先受伤,然后距叶脉较远的叶肉组织才受伤害)。几种生测方法相比较,针刺法不仅反应速度快,而且用量少。在浸渍法中,即使用最小离心管(1.5 mL)盛装毒素溶液每处理也要 0.5~1 mL 才能满足生测要求,而针刺法每处理仅要 15~30  $\mu$ L 相同浓度的毒素粗提液即可,后者用量仅为前者的 1/30;涂抹法虽然也较节约毒素溶液,但与针刺法相比毒素用量还是要大得多,毒素物质本身含量就比较少,如果把毒素样品大量用在分离过程中的生测上,则每分离一次即消耗大量毒素,到最后还未分离到纯物质,毒素就可能被生测消耗殆尽。特别是到了分离后期,毒素样品尤为珍贵。此外,由于待分离毒素粗提液含多种有机物质,易被杂菌污染,用浸渍法生测时,22 条件下,5 d 内就可长出霉菌;而针刺法所用生测液大都被植物材料吸入,不易长霉菌。因此,松针褐斑病菌毒素的生测方法采用寄主松树(湿地松、火炬松)幼嫩针叶和切根幼苗进行针刺接种是比较直观和灵敏的。

松针褐斑病菌毒素能伤害杂草植物<sup>[4]</sup>。毒素对空心莲子草和稗草有伤害作用,空心莲子草受毒素伤害后表现红褐色斑点,稗草表现为黑褐色斑点<sup>[4]</sup>。该研究选用的几种杂草都或多或少地表现出对毒素的敏感性,表明毒素具非专化性的特点,特别是该毒素对中国西部地区的恶性杂草紫茎泽兰有伤害作用,且紫茎泽兰对毒素较敏感。这表明松针褐斑病菌毒素有可能作为除草剂进行开发利用。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Hawes M C . Technique for using isolated corn root loop cells in a simple, quantative bioassay for the pathotoxin produced by *Helminthosporium maydis* Race T[J]. *Phytopathology*, 1983, 73:1 184 - 1 187.
- [ 2 ] 叶建仁,杨 斌,包 宏,等. 松针褐斑病菌的产毒培养和毒素粗提方法[J]. *南京林业大学学报*, 2001, 25(5):6 - 10.
- [ 3 ] 祁高富,叶建仁. 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.
- [ 4 ] 叶建仁,祁高富. 松针褐斑病菌毒素的寄主专化性研究[J]. *南京林业大学学报*, 1999, 23(6):1 - 4.
- [ 5 ] 叶建仁,祁高富. 松针褐斑病菌毒素对寄主细胞膜伤害机理的研究[J]. *林业科学*, 2000, 36(2):82 - 86.
- [ 6 ] 杨 斌,叶建仁. 松针褐斑病菌毒素 LA<sup>-</sup> 的分离纯化及其化学结构[J]. *南京林业大学学报*, 2001, 25(3):21 - 25.

(责任编辑 朱 凯)