

溃疡病菌 *Botryosphaeria dothidea* 粗毒素

产生的条件及特性

梁 军^{1,2}, 魏淑花³, 叶建仁³, 张星耀^{1,2}

(1. 国家林业局 森林生态环境与保护重点实验室, 北京 100091; 2. 中国林业科学研究院 森林生态环境与保护研究所, 北京 100091; 3. 宁夏回族自治区农林科学院 植物保护研究所, 宁夏 银川 750002)

摘要: 为了研究溃疡病菌的致病机制, 以葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea* 产生的毒素对北京杨 *Populus ×beijingensis* 愈伤组织的褐化程度为评价指标, 对溃疡病菌产生粗毒素的条件和粗毒素的基本特性进行了初步研究。结果表明, 溃疡病菌在改良 Fries No.3 液体培养基, 25 ℃ 温度, 光照, 振荡培养, 21 d 后所得的粗毒素毒性最强; 该病原菌在偏酸性和中性条件(pH 5.60 和 7.00)下易于产毒; 产生的粗毒素对热不稳定, 经 121 ℃ 高温, 0.11 MPa 压力处理 15 min 后, 其生物活性丧失; 这种粗毒素对酸碱具有一定的稳定性, pH 4.69 及 8.69 时, 粗毒素的生物活性虽有一定程度的下降, 但与自然 pH 条件下的粗毒素的生物活性差异不显著。图 5 表 3 参 18

关键词: 森林保护学; 北京杨; 溃疡病; 毒素; 葡萄座腔菌; 愈伤组织

中图分类号: S763.1 文献标志码: A 文章编号: 1000-5692(2008)05-0559-06

Crude toxin production of *Botryosphaeria dothidea*: initial conditions and characteristics

LIANG Jun^{1,2}, WEI Shu-hua³, YE Jian-ren³, ZHANG Xing-yao^{1,2}

(1. Key Laboratory of Forest Ecology and Environment Protection, State Forestry Administration, Beijing 100091, China; 2. Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, The Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 3. Institute of Plant Protection, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan 750002, Ningxia, China)

Abstract: To study pathogenic mechanisms, initial conditions and characteristics of crude toxins produced from *Botryosphaeria dothidea* (Moug. ex Fr.) Ces. & de Not. were first analyzed using the degree of browning on callus of *Populus ×beijingensis* as the appraisal index. Results showed that with light, shaking, being cultured in a modified Fries No.3 liquid medium at 25 ℃ for 21 days, and a pH of 5.60 (acidic) and 7.00 (neutral), was the optimum condition for crude toxins production by *B. dothidea*. Additionally, produced more toxin. When treated with high temperature(121 ℃) and high pressure(0.11 MPa) for 15 minutes, the toxins exhibited thermal instability and lost their bioactivity. However, with acidity and alkalinity they did remain active. Although toxicity decreased slightly, activity with this higher temperature and pressure was similar ($P > 0.05$) to toxins with pH of 4.69 and 8.69. [Ch, 5 fig. 3 tab. 18 ref.]

Key words: forest protection; *Populus ×beijingensis*; canker disease; toxin; *Botryosphaeria* spp; callus

葡萄座腔菌属 *Botryosphaeria* 真菌是世界广布的病原真菌, 由它引起的植物病害在 20 多个国家流

收稿日期: 2007-11-20; 修回日期: 2007-12-17

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD08A11); 国家自然科学基金资助项目(30671682); 国家林业局重点项目(2005-10)

作者简介: 梁军, 研究员, 从事森林保护学研究。E-mail: liangjun@caf.ac.cn。通信作者: 张星耀, 研究员, 博士, 从事森林保护学研究。E-mail: xy Zhang@caf.ac.cn

行危害,其中在美国、新西兰、南非、日本和中国引起严重危害,造成巨大损失^[1]。我国自1955年首次在北京市德胜门苗圃发现后的50余年以来,由该属真菌引起的树木溃疡病广泛分布于东北、华北、华东和西北等地区,几乎遍布我国杨树 *Populus* 分布区,危害总计达200余个杨树种、杂交种和无性系,发生严重地区林分的发病率可高达96.1%~100%,感病指数达68.7~95.8^[2]。该属真菌还侵染多种树木,被认为是我国人工林,尤其是杨树人工林的重大生物灾害之一^[3]。国内外众多学者从病原学、病理学、流行病学、防治学以及森林生态学等方面对其进行了大量的研究^[4-7],对其致病机制、遗传分化进行了RFLP, RAPD, ISSR以及ITS序列研究和种内遗传一致性RAMs-PCR研究^[3,8-12]。然而,关于该病原菌毒素的致病作用与机制的研究较少。笔者在前人研究工作的基础上,试图对病原菌产生致病毒素的条件及其基本性质进行研究,旨在为进一步深入了解该毒素致病组分和结构鉴定,揭示杨树溃疡病菌的致病机制,并为利用毒素进行抗原筛选等打下基础。

1 材料和方法

1.1 研究材料

实验所用材料为北京杨 *Populus × beijingensis*, 来自中国林业科学研究院内;菌种为葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea*, 来自中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所病理实验室 CXY507 菌株。

1.2 北京杨愈合组织诱导和继代

诱导培养基成分:MS(Murashige and Skoog)培养基,加2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸)2.0 mg·L⁻¹和LH(水解乳蛋白)500 mg·L⁻¹,琼脂7 g·L⁻¹,蔗糖20 g·L⁻¹,pH为5.8;继代培养基与诱导培养基相比,只将2,4-D减半,其他不变。

取北京杨2年生健康枝条,剪成5 cm长的段,经体积分数为75%乙醇30 s和1.0 g·kg⁻¹升汞6~8 min消毒,用无菌水冲洗3~5次后,去表皮韧皮部(含形成层),并将其切成6 mm×4 mm大小的块^[13],然后接种到装有50 mL诱导培养基的接种瓶中,形成层紧贴培养基,每瓶接种4~5块。10 d后即可诱导出愈合组织。然后在继代培养基上继代,连续继代3次及以上用于生测。

1.3 病原菌培养及产毒条件试验设计

CXY507菌株经PDA扩繁4 d后,用灭菌的打孔器,打取直径为4 mm的菌饼接种于装有灭菌的150 mL改良Fries No.3培养液的容量为250 mL的三角瓶中,每瓶接种10块,将其设置成以下不同的培养条件。

1.3.1 培养方式 黑暗静止(简称黑静)、黑暗振荡(黑摇)、黑暗+振荡12 h+静止12 h(摇交)、光照振荡(光摇)、振荡+黑暗12 h+光照12 h(光交)等5种。培养温度为25℃,培养时间为21 d。

1.3.2 培养时间 在25℃,黑暗振荡培养的天数设计为6,11,16,21,26,31,36 d。

1.3.3 pH值 将改良Fries No.3培养液在灭菌前用1.0 mol·L⁻¹氯化氢和1.0 mol·L⁻¹氢氧化钠分别调成pH 3.33, 5.33(自然pH值), 7.33和9.33共4种。灭菌后对应的pH值分别是3.45, 5.60, 7.00, 9.42。培养温度为25℃,黑暗振荡培养21 d。

以上振荡培养,摇床转速均为110 r·min⁻¹。

1.4 病原菌粗毒素原液及粗毒素制备

取各处理培养液(镜检无孢子)无菌过滤,滤液即为粗毒素原液,其主要组分是病菌的代谢产物,包括各种胞外水解酶和病菌粗毒素等,在4℃冰箱储藏待用。

将不同培养条件下获得的粗毒素原液(原液)各取100 mL,用旋转蒸发器在38~40℃下真空旋转蒸发至干,分3次加入150 mL丙酮,在室温下振荡萃取1 h,移出丙酮,剩下的不溶部分挥发去除丙酮后(通常至少2 h),用无菌水溶解定容至100 mL,即得粗毒素(丙沉)。置于4℃冰箱中储藏待用。

另设2个对照,其一为Fries No.3培养基做同样的处理,所得的Fries No.3丙沉称“F沉”,另一为无菌水处理(水)。

1.5 粗毒素热稳定性处理

以改良 Fries No.3 液体培养基和 25 ℃ 条件下, 光照振荡培养, 21 d 后所得的粗毒素, 在 121 ℃, 0.11 MPa 压力下处理 15 min 后得“热稳”, 接种北京杨愈合组织进行粗毒素毒性的热稳定性评价。

1.6 粗毒素酸碱稳定性处理

以改良 Fries No.3 液体培养基, 在 25 ℃, 光照, 振荡培养条件下, 21 d 后所得的粗毒素, 用 1 mol·L⁻¹ 氯化氢和 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠调成 pH 4.69, 6.69 (自然 pH 值) 及 8.69, 与自然 pH 粗毒素分别接种北京杨愈合组织, 以“F 沉”和无菌水作对照进行粗毒素毒性的酸碱稳定性评价。

1.7 粗毒素毒性的测定

将愈合组织置于不同培养条件下制备的粗毒素处理的滤纸上, 滤纸置于培养皿(直径为 90 mm)中(在接种前就将滤纸置于培养皿中灭菌), 每一培养皿中接种 4 块愈合组织, 每一种处理接种 3 个培养皿, 总共接种 12 块愈合组织。接种后, 分别在 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 h 观察记录愈伤组织的褐化程度。根据愈合组织的不同褐化程度将它们分为 5 个等级(表 1), 分级标准参照张立钦等^[14]的方法。计算褐化指数, 此值即代表某一培养条件下的粗毒素毒性。

表 1 愈合组织褐化程度分级标准

Table 1 A referent system for browning degrees of callus

级别	代表值	褐化面积
0		正常
1		< 1/4S _总
2		1/4S _总
3		< 1/3S _总
4		1/3S _总
		< 1/2 S _总
		1/2 S _总

说明: S 为愈合组织块的面积。褐化指数的计算方法如下: 褐化指数 = (i × 第 i 级褐化愈合组织块数) / (最高褐化级数 × 总接种愈合组织块数) × 100 [其中 i 为褐化级别代表值(0, 1, 2, 3, 4), 分别代表 , , , , 等 5 个褐化级别]。

2 结果与分析

2.1 最佳培养方式

从图 1 可以看出, 在 5 种培养方式中, 全天 24 h 光照振荡培养获得的粗毒素对北京杨愈合组织开始致病时间短且伤害程度加重快, 在 12 h 后 5 种培养方式所得褐化指数差别不大, 但在 24 h 后, 全天 24 h 光照振荡培养方式所得褐化指数直线上升到 89.58%, 比位于第 2 位的全天 12 h 黑暗振荡加 12 h 光照振荡培养的褐化指数高出 33.33%, 而到 36 h 后 24 h 光照振荡培养的褐化指数就已达到 100%。也就是说, 所有接种的愈合组织均达到最高级别受害程度。再者, 从图 1 还可看出, 光照和振荡均有利于溃疡病菌产毒。因此, 全天 24 h 光照振荡培养是杨树溃疡病菌产毒的最佳培养方式。

2.2 产毒高峰期

从图 2 可以看出, 杨树溃疡病菌在改良 Fries No.3 液体培养基中培养时, 21 d 以前其产毒量随着培养天数的增加而逐渐增加, 到 21 d 时产毒达到高峰, 但 21 d 以后产毒量逐渐减少甚至不再增加。可见, 杨树溃疡病菌在改良 Fries No.3 液体培养基上培养 21 d 时产毒量最大, 为产毒的高峰期。

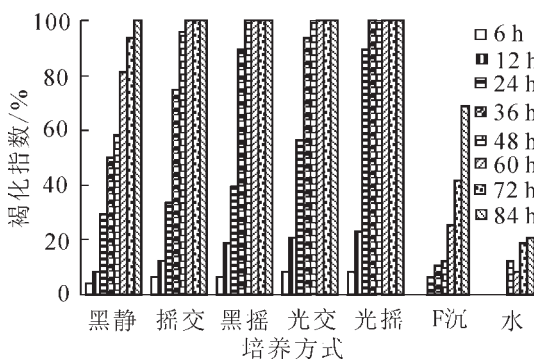


图 1 不同培养方式下获得粗毒素对北京杨愈合组织作用的褐化指数

Figure 1 Browning indexes of callus of *Populus x beijingensis* treated by toxins under different cultivations

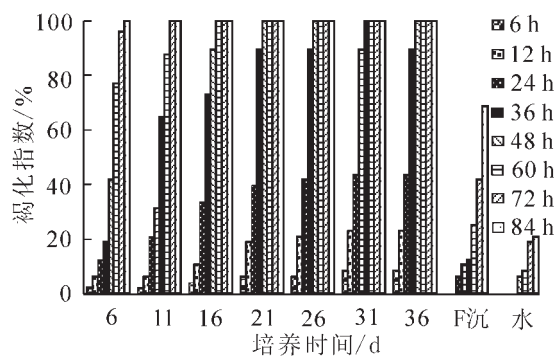


图 2 不同培养时间获得的粗毒素对北京杨愈合组织作用的褐化指数

Figure 2 Browning indexes of callus of *P. x beijingensis* treated by toxins under different time intervals

2.3 产毒最适 pH

从图3可以看出,在4个酸度梯度中,pH 5.60和7.00培养基培养获得的粗毒素对北京杨愈合组织毒伤作用接近且伤害严重,pH 3.45和9.42培养获得的粗毒素对北京杨愈合组织毒伤作用接近且伤害轻。在整个测定过程中均有相似的结果。由此可以得出杨树溃疡病菌易于在偏酸性和中性条件下产毒或得到的粗毒素活性较强。

2.4 热稳定性

从图4可以看出,粗毒素经过高温高压灭菌处理后所获得的粗毒素(热稳),处理北京杨愈合组织,在不同生测时间内计算所得的褐化指数比粗毒素和粗毒素原液减小了很多,而与用丙酮处理培养基所获得的对照(F沉)的褐化指数接近。再者,在整个生测过程中,热稳、对照F沉和无菌水处理的褐化指数随生测时间变化趋势线相似。

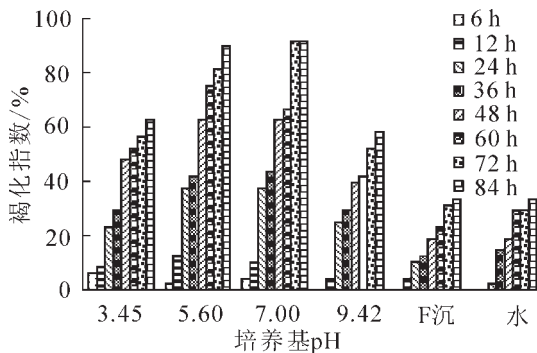


图3 培养基不同 pH 值下获得的粗毒素对北京杨愈合组织作用的褐化指数

Figure 3 Browning indexes of callus of *Populus x beijingensis* treated by toxins under different pH conditions

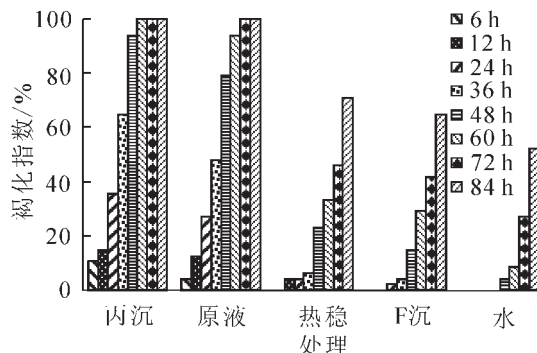


图4 高温处理后的粗毒素对北京杨愈合组织作用的褐化指数

Figure 4 Browning indexes of callus of *P. x beijingensis* treated by toxins under high temperatures

采用 SPSS 11.5 软件根据第 48 小时观察获得的各愈合组织褐化指数进行方差分析, F 检验差异极显著(表 2), 用LSD法进行多重比较, 粗毒素与粗毒素原液的试验结果差异不显著, 而两者均与热稳、F 沉和无菌水的试验结果差异显著; 热稳、F 沉和无菌水两两之间试验结果差异均不显著。因此, 粗毒素不具有热稳定性。

2.5 酸碱稳定性

在酸性和碱性条件下褐化指数都比自然 pH 值下减小了很多。而其褐化指数比“F沉”高很多(图5)。再者, 在整个生测过程中, pH 4.69和8.69粗毒素和自然 pH 粗毒素褐化指数随生测时间变化趋势线相似。

用第 84 小时观察获得的褐化指数进行方差分析, F 检验差异极显著(表 3), 用 LSD 法进行多重比较, 分析毒伤效果差异状况。结果 pH 为 6.69, 4.69 以及 8.69 的粗毒素对北京杨愈合组织伤害两两之间差异不显著, 而三者均与“F沉”和无菌水间的试验结果差异显著; “F沉”和无菌水之间的试验结果差异不显著。因此, 粗毒素具有一定的酸碱稳定性。

3 结论与讨论

杨树溃疡病菌在改良 Fries No.3 液体培养基中培养时, 21 d 以前粗毒素产量随培养时间的延长而增加, 尤其是从 11 d 到 16 d, 粗毒素产量大幅度增加, 21 d 后随时间的延长不再增加甚至下降。所

表 2 高温处理后的粗毒素对北京杨愈合组织作用的褐化指数方差分析

Table 2 Variant analysis on browning indexes of callus of *P. x beijingensis* treated by toxins under high temperatures

差异源	平方和	自由度	平均平方和	F	F _{0.05}	F _{0.01}
组间	126.77	5 - 1 = 4	31.69	46.58**	2.54	3.68
组内	37.42	60 - 5 = 55	0.68			
总计	164.19	60 - 1 = 59				

说明: ** 表示为 0.01 水平显著。

以, 杨树溃疡病菌在 Fries No.3 液体培养基中培养 21 d 时达到产毒高峰。

已有的研究表明: 黑暗条件对杨树溃疡病菌孢子萌发和菌丝的生长均有利, 光照对子囊孢子的萌发几乎没有影响^[15]。本试验研究结果, 光照和振荡均有利于溃疡病菌产毒, 杨树溃疡病菌在全天 24 h 光照振荡培养条件下最易于产毒, 生测获得的褐化指数始终最大。由此可以得出光照和振荡都易于杨树溃疡病菌产毒, 且全天 24 h 光照振荡培养是溃疡病菌最佳产毒培养方式。

杨树溃疡病菌在 pH 3.5 ~ 9.0 均能生长, 以 pH 6.0 生长最好^[16]。本试验结果显示: pH 5.33 和 7.33 在整个生测过程中褐化指数变化趋势相似且大小相近, 都比 pH 3.33 和 9.33 高的多, 且 pH 3.33 和 9.33 褐化指数大小也相近。由此可以得出, 杨树溃疡病菌在偏酸性或中性条件下易于产毒, 酸性或碱性太强都不易于杨树溃疡病菌产毒。与菌丝最适生长 pH 值相近。

许多植物病原真菌毒素都具有一定的热稳定性^[17, 18]。试验结果表明, 粗毒素经高温高压处理后对北京杨愈合组织的毒伤作用明显比未经高温高压处理粗毒素和粗毒素原液明显减弱, 而与对照“F 沉”对愈合组织的伤害作用接近。方差分析与多重比较结果表明: 粗毒素与粗毒素原液对北京杨愈合组织毒伤作用差异不显著, 而两者均与经过高温高压处理后的粗毒素热稳、F 沉和无菌水间的试验结果差异显著; 热稳、F 沉和无菌水两两之间的差异均不显著。因此, 高温高压处理对毒素粗提液的致毒活性有明显的影

响。粗毒素经酸碱处理后对北京杨愈合组织还具有毒伤作用, 虽比自然 pH 值下有所下降但比对照“F 沉”作用高很多。方差分析与多重比较结果表明: 经过酸碱处理的粗毒素与自然 pH 值下的粗毒素对北京杨愈合组织毒伤作用差异不显著, 而三者均与对照差异极显著。由此判断杨树溃疡病菌粗毒素对酸碱具有一定的稳定性。

参考文献:

[1] 王金利, 秦国夫, 何伟, 等. 葡萄座腔菌属及其相关真菌的系统学研究进展[J]. 中国森林病虫, 2003, 22 (3): 32 - 36.

[2] 向玉英, 花晓梅. 杨树水疱型溃疡病的病原菌鉴定[J]. 微生物学报, 1979, 19 (1): 57 - 63.

[3] 张星耀, 赵仕光, 吕全, 等. 树木溃疡病病原真菌类群分子遗传多样性研究() *Botryosphaeria* 属 28S-DNA-PCP-RFLPH 和 RAPD 的解析[J]. 林业科学, 2000, 36 (2): 75 - 81.

[4] SMITH C O. Inoculations showing the wide host range of *Botryosphaeria ribis*[J]. J Agric Res, 1934, 49: 467 - 476.

[5] 李传道. 树木的溃疡病[J]. 南京林学院学报, 1979, 3 (2): 22 - 24.

[6] 向玉英. 杨树病害及其防治[M]. 北京: 中国林业出版社, 1987: 55 - 60.

[7] 赵仕光, 景耀, 王颖, 等. 杨树溃疡病测报技术的研究[J]. 西北林学院学报, 1997, 12 (3): 45 - 51.

[8] JACOBS K A, REHNER S A. Comparison of culturaleal and morphological characters and its sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa[J]. Mycologia, 1998, 90 (4): 601 - 610.

[9] 张星耀, 赵仕光, 朴春根, 等. 树木溃疡病病原真菌类群分子遗传多样性研究() 小穴壳菌属、壳孢属、壳囊孢

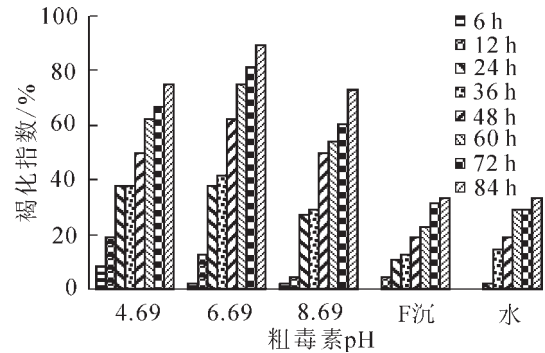


图 5 酸碱处理后获得的粗毒素对北京杨愈合组织作用的褐化指数

Figure 5 Browning indexes of callus of *P. xbeijingensis* treated by toxins under acid or alkaline conditions

表 3 酸碱处理后的粗毒素对北京杨愈合组织褐化指数效果的方差分析

Table 3 Variant analyses on browning indexes of callus of *P. xbeijingensis* treated by toxins under acid or alkaline conditions

差异源	平方和	自由度	平均平方和	F	F _{0.05}	F _{0.01}
组间	51.57	5 - 1 = 4	12.89	11.22**	2.54	3.68
组内	63.17	60 - 5 = 55	1.15			
总计	114.74	60 - 1 = 59				

说明: ** 表示 0.01 水平显著。

- 属、盾壳霉属分类地位的分子证明[J]. 林业科学, 1999, 35 (3): 34 - 40.
- [10] 张星耀, 赵嘉平, 梁军, 等. 树木溃疡病菌主要类群系统地位及茶蔗子葡萄座腔菌的种内一致性[J]. 林业科学, 2006, 42 (11): 63 - 68.
- [11] SMITH H, CROUS P W, WINGFIELD M J, et al. *Botryosphaeria eucalytorum* sp. Nov., a new species in the *B. dothidea* complex on Eucalytus in South Africa[J]. Mycologia, 2001, 93 (2): 505 - 515.
- [12] ZHOU S, SMITH D R, STANOSZ G R, et al. Diffention of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using Inter-simple or short sequence repeat(ISSR) fingerprinting[J]. Mycol Res, 2001, 105 (8): 919 - 926.
- [13] 胡锦涛, 景耀. 过氧化物酶和多酚氧化酶与杨树溃疡病抗性的关系[J]. 西北林学院学报, 1990, 5 (1): 46 - 51.
- [14] 张立钦, 李传道, 黄敏仁. 杨树组织培养愈伤组织对水泡型溃疡病的抗性[J]. 南京林业大学学报, 1989, 13 (4): 9 - 15.
- [15] 向玉英, 花晓梅. 杨树主要品种对溃疡病抗性及其影响因子的研究[J]. 森林病虫通讯, 1981, 1 (1): 1 - 5.
- [16] 花晓梅, 向玉英. 杨树水泡型溃疡病菌病原菌生物学特性的研究[J]. 林业科学, 1980, 16 (4): 141 - 144.
- [17] 董金皋, 康绍兰, 王艳霞, 等. 玉米大斑病菌 *Helminthosporium turcicum* 致病毒素产生的条件及其特性[J]. 河北农业大学学报, 1993, 16 (2): 13 - 17.
- [18] 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[J]. 安徽农业科学, 1999, 27 (5): 466 - 469.



浙江省副省长金德水来浙江林学院视察

2008年7月2日,浙江省副省长金德水在省政府办公厅副主任孟刚、省科技厅厅长蒋泰维、科技厅副厅长邱飞章、省经贸委副主任郑一方以及省委办公厅工业处、省发改委高技术处、省财政厅科教文处等有关单位的领导陪同下,来浙江林学院视察科技创新工作。校党政班子成员陈敬佑、方伟、鲍滨福、汪志银、汪士华以及临安市委书记邵毅、市长王宏陪同金德水副省长一行视察。

金德水一行先后视察了林工科技楼和智能实验大楼,并详细了解森林培育省重中之重学科、竹产业与木材加工产业两个省级科技创新服务平台的建设情况。在林工科技楼,金德水询问了各种板材的研究现状、市场行情和使用性能,并详细了解了竹材家具、新型板材的价格等方面的情况;在智能实验大楼,他对浙江林学院在竹子组织培养上取得的成就表示肯定,并详细了解了学校在竹子开花等领域研究进展。

在智能实验大楼会议室,金德水一行听取了陈敬佑关于浙江林学院在科学研究、科技服务等方面的情况汇报。金德水说,浙江林学院不仅有优美的校园,也有自己优势的学科,还培养了一大批优秀的学生,结出了优异的成果。取得这些成绩,靠的就是强班子的有力领导和一大批高素质教师的共同努力。在省委省政府的领导下,按照科学发展观的要求,按照“创业富民创新强省”总战略的步伐,浙江林学院正结合学校的实际,克服各种困难,开拓创新,积极奉献,实现又好又快发展。

金德水对浙江林学院提出了殷切期望:一要坚持办校宗旨,发挥优势学科,立足浙江,服务三农,更重要的是培养一大批优秀的高素质学生。学校要在社会上有影响,除了有高素质教师队伍以外,更重要的是要有一大批在这里学有所成、在社会上有所建树的学生,他们一辈子都会对母校心怀感恩。二要切实增强科研能力。浙江林学院已经有很多优势学科,还有两个科技创新服务平台及其他一些组织,但是要真正增强科研能力,科研成果还要进一步推进产业化,实现产学研集合,多争取省和国家的实验室在学校设立。三要加强人才的引进,要引进领军人物,切实加强科研队伍建设,提高大家的科研水平。

金德水表示,浙江林学院正在积极申报浙江农林大学,相信学校前景一定会更好,省里将全力支持学校的发展。