

文章编号: 1001-1498(2002)04-0387-07

肉桂枝枯病菌毒素的研究

王 军, 李若英

(华南农业大学, 广东 广州 510642)

摘要: 本文是对肉桂枝枯病病原菌毒素研究的首例报道。生物活性测定显示, 病菌在液体培养基中可产生导致肉桂嫩梢萎蔫和叶盘褐变坏死的致病毒素。改良 Fries 液体培养基振荡培养和 PD 液体培养基静止培养为较好的产毒培养方式。病原菌毒素为非寄主专化性毒素, 除肉桂外, 还对香樟、马尾松、薇甘菊、卤地菊和番茄等植物具有致萎活性。毒素为弱酸性 (pH5.4), 对冷、热稳定性强, 极性较大, 易溶于水、乙醇、丙酮、正丁醇 + 丙酮及乙酸乙酯, 部分溶于氯仿, 基本不溶于乙醚。研究表明毒素为非蛋白质、多糖及核酸类大分子物质。含毒滤液可能含有糖醛类物质, 其致毒活性经乙醇和丙酮纯化后有所增强, 经 HPLC 分离出的组份 I 可能为毒性成份。肉桂叶盘经毒素处理后, 其相对电导率较对照大幅度增加, 感病的本地桂比抗病的大叶青化桂增加更为明显。

关键词: 肉桂; 可可球二孢菌; 毒素

中图分类号: S763.1

文献标识码: A

可可球二孢菌 (*Botryodiplodia theobromae* Pat.) 侵染肉桂 (*Cinnamomun cassia* Presl) 树冠上部枝条, 引起树皮开裂, 并导致枝枯, 是目前肉桂生产的一大危害。研究表明枝枯病的发生与泡盾盲蝽 (*Pseudodoniella chinensis* Zheng) 等昆虫活动^[1,2], 与气候变化、土壤缺硼及栽培管理等因素有关^[3]。肉桂枝条的树皮相对含水量与病害程度呈显著相关, 枝条失水愈多, 发病程度愈严重^[4]。在病菌致病性研究方面, 岑炳沾等^[5]报道病菌存在 A、B 两种培养类型的菌株, 且致病力具有差异。苏海等^[6]指出病菌的不同菌株在培养类型、地理区域、致病力及酯酶同工酶电泳图谱上都存在较大的变异。然而对于病菌的致病机理, 目前还知之甚少。

了解病原物的致病机制是林木病理学研究的一个重要内容, 是寻求对病害进行有效控制的理论基础之一。近十几年来, 在对一些重要的林木病害如榆树枯萎病 (*Ophiostoma ulmi* (Buisman) Nannf.)^[7]、松针褐斑病 (*Scirrhia acicola* (Dearn.) Siggers)^[8]、杨树溃疡病 (*Dothiorella gregaria* Sacc.)^[9] 等进行研究的过程中, 相继发现了一批林木病原真菌毒素, 并且其理化性质和对寄主林木的致病作用在一定程度上得到了揭示。毒素是植物病原物致病的 3 大因素之一, 对于产生坏死及枯萎症状的病原真菌尤其如此。肉桂枝枯病菌是否产生毒素? 其毒素对肉桂的作用如何? 其理化性质是什么? 这些问题迄今还无人知晓。本试验拟对这些问题进行探讨, 以求从生化角度深入地了解 *B. theobromae* 对肉桂的致病机理。

收稿日期: 2001-06-25

基金项目: 广东省林业厅 1997-2000 年“肉桂枝枯病综合防治技术研究”的部分内容

作者简介: 王军 (1962-), 男, 浙江嘉兴人, 教授, 博士。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试病原菌从广东德庆采回之新鲜发病的肉桂病枝分离,置 PDA 斜面培养。植物材料包括:(1)10 cm 长肉桂新抽未木质化嫩梢;(2)幼嫩和成熟肉桂叶片;(3)香樟(*Cinnamomum camphora* (Linn.) Presl)当年生 10 cm 长嫩梢;(4)马尾松(*Pinus massoniana* Lamb.)当年生长约 10 cm 枝梢;(5)卤地菊(*Wedelia prostrata* (Hook. et Arn.) Hems1.)长约 10 cm 顶梢;(6)番茄(*Lycopersicon esculentum*. Mill.)长 15—20 cm 顶梢;(7)薇甘菊(*Mikania micrantha* Kunth.)长 10—15 cm 顶梢。肉桂采自华南农业大学经济林果园及华南植物园,薇甘菊采自广东深圳,其余材料均采自华南农业大学校园。

1.2 病菌的产毒培养

从 PDA 平板上培养 7 d 的菌落边缘用打孔器取直径 0.6 cm 的菌饼,分别接种到内含 350 mL pH 值为 6 的 PD 及改良 Fries '3 培养液的 500 mL 三角瓶中。PD 培养液:马铃薯 200 g,葡萄糖 17 g,蒸馏水 1 000 mL;改良 Fries '3 培养液:蔗糖 20 g,酒石酸铵 5 g, NH_4NO_3 1 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, NaCl 0.1 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.13 g,酵母浸膏 1 g,蒸馏水 1 000 mL,每瓶接入 5 块菌饼,于 28 ℃ 下分别进行摇床振荡培养和恒温培养箱静止(每天摇荡 3 min)培养;培养时间为 7、14、30 d。所得菌液先用双层纱布过滤,再用双层滤纸过滤,滤液 4 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 20 min,上清液即为病菌的含毒滤液。

1.3 毒素的生物活性测定

将肉桂嫩梢插入 5 mL 含毒液滤液,叶片不接触液体,每管插 1 枝,设 8 个重复。用培养 7、14、30 d 的含毒滤液分别对嫩梢进行处理,以空白的 PD 和改良的 Fries '3 培养液,以及蒸馏水作对照,于室内观察萎焉情况。

另用打孔器将幼嫩和成熟的肉桂叶片打成直径为 0.6 cm 的叶盘,用 75% 的酒精及 0.1% 的升汞进行表面消毒,蒸馏水冲洗,放入含毒滤液中浸泡 1.5 h 后取出。将叶盘正面朝下置于培养皿内,皿底铺含毒滤液浸润的滤纸。每皿 8 个叶盘,对照用空白的 PD、改良 Fries '3 培养液及无菌水浸泡,置室内观察。

1.4 毒素的专化性试验

取含毒滤液 500 mL,在 60 ℃ 水浴锅中恒温蒸发浓缩至干,得到少许棕褐色的油状粘稠物质,即为粗毒素。粗毒素称质量 (M_1) 后加入 50 mL 蒸馏水溶解,溶液经 4 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,上清液即为粗毒素液,沉淀物经烘箱干燥后再称质量 (M_2)。毒素的溶解度 = $(M_1 - M_2) / M_1 \times 100\%$ 。

将粗毒素加入 200 mL 蒸馏水溶解,用粗毒素液对香樟、番茄、马尾松、卤地菊和薇甘菊进行生物测定;采用嫩梢插条浸渍法:将待测材料插入 30 mL 毒素液中,置于室内观察萎焉情况,蒸馏水作对照。

1.5 毒素的理化性质鉴定

1.5.1 毒素的稳定性试验 将含毒滤液用精密 pH 试纸测其 pH 值,与空白培养液的 pH 值对比,得出含毒滤液的酸碱度。再将含毒滤液分别作如下处理,(1)将其 pH 值调节到 6.4(与蒸馏水对照一致),(2)在 120 ℃ 下高压灭菌 20 min;(3)在 5 ℃ 冰箱中放置 45、60 d,对各处理用叶

盘浸渍法进行生物测定。

1.5.2 毒素的透析试验 取粗毒素水溶液 20 mL 装入透析袋内,置于 200 mL 蒸馏水中,在室温下透析 48 h,磁力棒搅拌。将透析液用蒸馏水稀释至 200 mL,与透出液一起,用肉桂及薇甘菊嫩梢作生物测定,以蒸馏水处理为对照。

1.5.3 毒素的萘酮及茛三酮试验 参照陈耀祖等^[10]的方法。在 5 mL 试管内装入 1 mL 粗毒素水溶液,沿管壁加入 2 mL 0.2% 的萘酮 95% 硫酸溶液。温和摇动试管,如在 30 s 内不出现绿色环带,则摇动混合物并温热之。观察试管内溶液的颜色变化情况。

参照陈贻文等^[11]的方法。分别在 5 mL 试管内装入 1 mL 粗毒素水溶液,然后各加入 0.2% 茛三酮溶液 2~3 滴,摇匀,在沸水中加热 5 min,冷却后观察试管内颜色变化。

1.5.4 毒素的纯化和萃取 取病原菌在改良 Fries '3 培养液中经过振荡培养后的滤液 200 mL,4 000 r·min⁻¹离心 20 min 后取上清,稍加浓缩至 180 mL 后,再经高压灭菌后分为 3 部分:一部分不作任何处理(毒素原液);一部分加入 3 倍体积的无水乙醇,于冰箱中在 5℃ 下静置 24 h,过滤去除絮状沉淀后再蒸发浓缩除去乙醇至原体积(乙醇纯化液);将絮状沉淀溶于少量蒸馏水中(乙醇沉淀液);一部分加入 4 倍体积丙酮,置于冰箱中在 5℃ 下静置 36 h 后,蒸发浓缩除去丙酮至原体积(丙酮纯化液)。用上述 4 种溶液处理肉桂的成熟叶盘,以改良 Fries '3 空白培养液及无菌水处理叶盘作对照,观察叶盘变褐坏死情况。

参照张利辉等^[12]的方法。将 100 mL 毒素培养滤液 60℃ 下蒸发浓缩至原体积的 1/5,分别用等体积氯仿,乙酸乙酯,正丁醇+丙酮(1:1)以及乙醚进行萃取,将得到各有机相蒸发除去有机溶剂后,再加蒸馏水溶解至原体积作生物测定,未经过萃取的毒素原液及蒸馏水作对照。

另将经萃取后得到的乙酸乙酯相用高效液相色谱法(HPLC)进行分析,检测各组分的吸收峰及保留时间。HPLC 的分离条件为:固定相,C₁₈(2.1 mm×150 mm);流动相,H₂O:甲醇=70:30;流速,0.3 mL·min⁻¹,紫外检测;190-800 Total Scan;进样量,10 μL。

1.6 肉桂叶盘电导率的测定

参照朱广廉等^[13]的方法。将粗毒素液 60 mL 溶于 3 倍体积的无水乙醇中,除去沉淀后,再经蒸发浓缩除去无水乙醇,得到毒素的乙醇纯化液。以此作为浓度 100%,加入蒸馏水分别将乙醇纯化液稀释,配制成 10%、30%、50% 3 种浓度。分别取本地桂和大叶青化桂(*Cinnamomum cassia* BL. var. *macrophyllum* Chu)的成熟叶盘,用上述各浓度毒素液进行浸泡,对照用蒸馏水。40 h 后,将叶盘取出,蒸馏水冲洗 3 遍,将叶盘分别置于内装 20 mL 蒸馏水的小烧杯中,充分振荡 2 h 后再静置 12 h,用 DDS-11A 型电导仪在室温下测定其电导率(S₁);然后用塑料薄膜将小烧杯封口置于沸水中 10 min 以杀死植物组织细胞,取出小烧杯,使之冷却至室温,静置 20 min,摇匀后测定电导率(S₂),相对电导率 = S₁/S₂ × 100%。

2 结果与分析

2.1 毒素的生物活性

病原菌在 PD 培养液中振荡培养从第 1 d 开始菌丝就从菌块上长出,菌丝呈丝状逐渐伸长,然后缠绕着菌块呈疏松团状,3 d 后菌丝开始断碎,使培养液呈粘稠状很难过滤;在静止培养条件下,菌丝生长较慢,交织成紧密的圆饼状,浮在培养液的表面。病菌在生长过程中未见产孢。培养液为澄清的浅黄绿色。病原菌在改良 Fries '3 培养液中振荡培养时,菌丝生长也

较快,但菌丝呈较为紧密的团状且不易破碎,培养液为澄清的浅黄绿色;在静止培养条件下,菌丝生长极为缓慢,生长量很小。病菌在生长过程中也未见产孢。根据上述情况,在以后的产毒试验中,均采用改良 Fries '3 培养液振荡培养或 PD 培养液静止培养。

肉桂嫩梢测定显示基部经含毒滤液浸渍 8 h 后,即开始表现出萎蔫症状:枝条下弯,叶片卷曲、下垂。随着时间的推移,含毒滤液处理的嫩梢全部出现萎蔫,基部缢缩、褐变,最终坏死;叶面开始时出现少量点状或块状黑斑,最后连成大片整叶干枯,至 72 h,嫩梢完全倒伏枯死。PD 及改良 Fries '3 培养液分别培养了 7、14、30 d 的滤液均对测试材料具有致萎活性,但两种培养液所得的含毒滤液及各培养时间所引起的致萎程度基本一致(表 1)。

肉桂幼嫩叶盘经含毒滤液浸渍 8 h 后,在叶盘中心即出现明显的淡褐色水渍状圆形病斑,并逐渐向叶盘的外缘扩展,褐变颜色加深,至 36 h 后,整个叶盘变为褐色,叶背向上凸起。而成熟叶盘经含毒滤液浸渍 12 h 后,沿着叶缘开始出现明显的水渍状褪绿晕圈,后逐渐变成褐色的圆形病斑并向叶盘中心扩展,但褐斑占据整个叶盘的 3/4 面积后便不再扩大(表 2)。

2.2 毒性的专化性

试验结果表明,粗毒素液对所有的植物材料均具有致毒活性。香樟在被毒素液浸渍后,叶片褪绿干枯,最终整个嫩梢枯死变成褐色;马尾松被浸渍针叶部分逐渐褪绿变黄,而未被浸渍的针叶部分则出现褪绿的黄色斑点;薇甘菊的茎部出现坏死,嫩梢最后倒伏、枯萎至死;番茄叶片出现较轻的萎蔫和轻度褪绿,枝条下弯;卤地菊叶片下垂、褪绿变为黄色,最后枯萎。在测试的 5 种植物中,香樟、薇甘菊、卤地菊对肉桂枝枯病原菌毒素较为敏感,马尾松次之,番茄敏感性最低(表 3)。

表 1 病原菌含毒滤液对肉桂嫩梢的致萎程度

处理	时间/h					
	8	24	36	48	72	
PD 培养液	培养 7 d	+	+	++	+++	++++
	培养 14 d	+	++	+++	+++	++++
	培养 30 d	+	++	+++	+++	++++
改良 Fries '3 培养液	培养 7 d	+	++	++	+++	++++
	培养 14 d	+	++	++	+++	++++
	培养 30 d	+	+	++	+++	++++
空白 PD 培养液	-	-	-	-	+	
空白改良 Fries '3 培养液	-	-	-	-	+	
对照	-	-	-	-	-	

注:“-”无萎蔫;“+”轻度萎蔫;“++”中度萎蔫;“+++”高度萎蔫;“++++”倒伏枯死

表 2 病原菌含毒滤液对肉桂叶盘的致褐程度 %

处理	时间/h				
	8	12	16	24	36
幼嫩叶盘	30	50	70	90	100
成熟叶盘	10	25	50	75	75
对照	-	-	-	-	-

注:“-”叶盘无褪绿症状。

表 3 病原菌粗毒素对几种植物的致萎程度

处理	时间/d				
	2	3	4	5	6
香樟	-	+	++	+++	++++
马尾松	-	-	+	++	+++
薇甘菊	-	-	++	+++	++++
卤地菊	-	+	+	+++	++++
番茄	-	-	+	++	++
对照	-	-	-	-	-

注:“-”无萎蔫;“+”轻度萎蔫;“++”中度萎蔫;“+++”高度萎蔫;“++++”枯萎至死(下同)

2.3 毒素的理化性质

空白 PD 培养液及改良 Fries '3 培养液的 pH 值均为 5.8,病菌的产毒培养滤液 pH 值均为 5.4,说明病菌产生的毒素可能为弱酸性物质。将含毒滤液的 pH 调到 6.4(与蒸馏水对照一致)后仍能使肉桂嫩梢在 8 h 内萎蔫,而对照无此现象。毒素滤液经高温高压处理后变为橙红色,散发出较刺鼻的气味,但毒性经叶盘浸渍法测定非但未丧失,而且还稍有加强;毒素滤液在 5℃ 的冰箱内放置 45 d 后,其毒性有所下降,至 60 d 时毒性丧失。

粗毒素的水溶液经过 48 h 透析后,透析液及透出液均具有致萎活性,透析液的活性稍大于透出液(表 4)。

萘酮与毒素滤液反应时溶液先产生深绿色环带,随后变为棕褐色。此反应显示毒素滤液中可能含有糖醛类物质。毒素液加入 0.2% 的茛三酮溶液后由黄褐色变为深紫色,表明含有蛋白质或氨基酸衍生物。

500 mL 含毒滤液蒸干得 1.705 g 棕褐色物质,该物质溶解于蒸馏水中所得沉淀蒸干后得 0.452 g,据此计算毒素的水溶解率为 73%。乙醇加入含毒滤液后产生絮状沉淀,但沉淀不具有致毒活性,丙酮纯化含毒滤液时不产生沉淀,乙醇和丙酮的纯化液毒性有所加强(表 5)。

毒素的萃取试验结果(表 6)显示,乙酸乙酯相、正丁醇+丙酮相的毒性较高,被测香樟嫩梢严重萎蔫,最后枯死;氯仿相的致萎活性较小,叶面有少量黑斑,甚至没有出现叶尖枯,乙醚相基本无致萎活性。

表 5 几种毒素液对肉桂叶盘的致萎程度 %

处理	时间/h				
	8	16	24	36	48
毒素原液	25	50	75	75	75
乙醇纯化液	30	60	90	100	100
乙醇沉淀液	-	-	-	-	-
丙酮纯化液	25	50	75	80	100
改良 Fries '3	-	-	-	-	-
空白培养液	-	-	-	-	-
对照	-	-	-	-	-

用 HPLC 分离乙酸乙酯相萃取物后得到 4 个主要的峰,保留时间分别为 1.27、1.70、2.25、3.30 min,分别记为组分 1、2、3、4,最大的吸收峰是保留时间为 1.27 min 的组分 1,该组分有可能是具有毒性的成分。

2.4 肉桂叶盘的相对电导率

测定结果(表 7)显示,毒素浸渍使肉桂叶盘的相对电导率较对对照明显增大。当毒素浓度在 0%~30%

表 4 毒素的透析液及透出液对肉桂及薇甘菊的致萎程度

处理	树种	时间/h				
		72	12	24	36	48
透析液	肉桂	+	++	+++	++++	++++
	薇甘菊	-	-	+	++	+++
透出液	肉桂	-	+	++	+++	++++
	薇甘菊	-	-	-	+	++
对照	肉桂	-	-	-	-	-
	薇甘菊	-	-	-	-	-

表 6 毒素经几种有机溶剂萃取后各相对香樟嫩梢的致萎情况

处理	时间/h				
	12	24	36	48	72
毒素原液	-	+	++	+++	++++
正丁醇+丙酮	-	+	++	+++	++++
乙酸乙酯	-	+	++	+++	++++
氯仿	-	-	+	+	+
乙醚	-	-	-	-	-
对照	-	-	-	-	-

表 7 肉桂经毒素处理 40 h 后的相对电导率 %

品种	毒素浓度/ %				
	0(对照)	10	30	50	100
本地桂	8.4	9.6	13.2	27.9	43.2
大叶青化桂	8.4	8.6	11.5	25.5	38.3

之间时,本地桂和大叶青化桂的相对电导率变化呈相似的平行缓慢上升,当浓度从30%增大到100%时,两个品种的相对电导率都有较大幅度的上升,但本地桂的电导率上升趋势比大叶青化桂更大。当浓度在100%时,两个品种之间及它们各自与对照之间的相对电导率差异达到最大值。

4 结论与讨论

本研究显示肉桂枝枯病原菌在液体培养基中的代谢产物对寄主植物具有强烈的生物毒性,导致肉桂嫩梢萎蔫和叶盘褐变、坏死;*B. theobramae*可在活体外产生植物毒性物质(毒素),这还是国内外的首次报道。除肉桂外,毒素还可导致香樟、马尾松、番茄、薇甘菊、卤地菊等植物的嫩梢萎蔫,表明其为非寄主专化性毒素。

*B. theobramae*毒素具有极强的热、冷稳定性,经过120℃高温高压处理20 min后其活性并不丧失,而且还有所加强;毒素在5℃中放置45 d,其活性仍然保持。毒素滤液测得pH值为5.4,调节其与对照一致(pH值6.4)后毒性仍未丧失,说明毒性物质对寄主产生的毒性并非其本身的pH值影响所致。

毒素易溶于水(溶解度为73%)、乙醇这类极性较大的物质,也溶于丙酮、正丁醇+丙酮,乙酸乙酯等中等极性的物质中,部分溶于氯仿等极性较弱的物质,基本不溶于乙醚,说明毒素是一类极性较大的物质。

试验表明*B. theobramae*毒素为非蛋白质、多糖及核酸类大分子物质。透析试验表明毒素的成分复杂,有大分子物质也有小分子物质。茚三酮试验含毒滤液呈深紫色,表明含毒滤液含有蛋白质或氨基酸衍生物,但毒素经过高温处理后其活性并未丧失,说明在含毒滤液中起毒性作用的并非蛋白类物质。乙醇可沉淀蛋白质、核酸及多糖等一些大分子物质,但沉淀物无致毒活性,进一步排除了起毒性作用的物质是蛋白质、核酸或糖类的可能性。含毒滤液经乙醇和丙酮纯化后其致毒活性有所增强,这与祈高富等^[8]在对松针褐斑病菌毒素的研究中得到的结果类似。蒽酮试验结果表明含毒滤液中可能含有糖醛类物质,但该物质是否为毒素的成分之一及其与HPLC分析中组分有无关联,这些还需要更进一步的研究。

在室温自然光下,用改良Fries'3培养基振荡培养和PD液体培养基静止培养两种培养方式培养7、14、30 d都可促使*B. theobramae*产生毒素,两种培养方式以及培养时间的长短在产毒能力上并无显著的差异。在毒素的两种生物活性测定方法中,肉桂嫩梢浸渍法可导致嫩梢萎蔫、叶片出现黑斑及嫩梢基部缢缩、坏死;叶盘浸渍法可引起叶盘的褪绿、褐变及坏死。两种生物测定方法均表现出对毒素敏感性高,出现症状的时间短,症状明显、直观等特点,而嫩梢插条浸渍法比叶盘浸渍法简便易行,但嫩梢的获得受季节限制。所以在本试验中,这两种生物测定方法都得到了应用。

肉桂叶盘经毒素处理后,其电导率较对照大幅度增加,表明毒素对植物细胞膜造成了严重的伤害。而嫩梢出现的萎蔫症状,可能与含毒滤液中的某些物质干扰寄主植物的维管系统,妨碍水分的正常运输有关;被含毒滤液浸渍的嫩梢茎部出现严重的缢缩和褐变,可能是毒素破坏了寄主植物组织的细胞结构,导致了细胞的解体 and 坏死。在相同的毒素浓度下,本地桂比大叶青化桂对毒素更为敏感,这一结果与岑炳沾等^[3]报道的在肉桂的不同品种中,大叶青化桂比本地桂抗病性强的情况相一致,因此对于今后肉桂品种的抗病性筛选具有重要启示。

参考文献:

- [1] 刘建峰, 杨五烘, 李敦松, 等. 肉桂新害虫泡盾盲蝽的生物学特性及防治研究[J]. 广西农业科学, 1995, (1): 36-39
- [2] 文新, 宋力, 黎启枪, 等. 肉桂枝枯病原研究[J]. 微生物学报, 1995, 35(3): 181-185
- [3] 岑炳沾, 甘文友, 邓瑞良. 肉桂枯梢病的发生与防治研究[J]. 华南农业大学学报, 1994, 15(4): 63-66
- [4] 王军, 苏海, 李若英, 等. 致伤类型与树皮含水量对肉桂枝枯病发病程度的影响[J]. 中国森林病虫, 2001, 20(1): 5-7
- [5] 岑炳沾, 邓瑞良. 肉桂枯梢病的病原鉴定[J]. 华南农业大学学报, 1994, 15(3): 28-34
- [6] 苏海, 王军, 伍慧雄, 等. 肉桂枝枯病原菌致病性分化研究[J]. 林业科学研究, 2000, 13(专刊): 91-96
- [7] Bowden C G, Hint W E, Jeng R, et al. Isolation and characterization of the cerator-ulmi toxin of the Dutch elm disease pathogen, *Ophiostoma ulmi* [J]. Current Genetics, 1994, 25(4): 323-329
- [8] 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的研究[J]. 南京林业大学学报, 1999, 23(4): 17-21
- [9] 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. 溃疡病菌代谢产物对寄主的影响[J]. 西北林学院学报, 1997, 12(3): 1-6
- [10] 陈耀祖. 有机分析[M]. 北京: 高等教育出版社, 1983. 355
- [11] 陈贻文, 李庆宏, 黄文亮. 有机仪器分析[M]. 长沙: 湖南大学出版社, 1996. 130
- [12] 张利辉, 邢继红, 董金皋. 玉米大斑病菌 2 号小种毒素的生物测定与组分分析[J]. 河北农业大学学报, 2001, 24(1): 42-45
- [13] 朱广廉, 钟海文, 张爱琴. 植物生理学实验[M]. 北京: 北京大学出版社, 1990. 252-254

Studies on Toxin Produced by *Botryodiplodia theobromae*

WANG Jun, Li Ruoying

(College of Forestry, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China)

Abstract: A toxic substance produced by *Botryodiplodia theobromae* in liquid culture, its physical and chemical properties and effects on *Cinnamomum cassia* were studied. Bioassay indicated that the metabolites of *B. theobromae* caused wilt on *C. cassia* new sprouts and necrosis on leaf discs. The toxin is non-host specific and toxic to plants other than *C. cassia* such as *Cinnamomum camphora*, *Pinus massoniana*, *Wedelia prostrata*, *Lycopersicon esculentum* and *Mikania micrantha*. The toxin was weakly acidic, heat and cold stable, dissolved easily in water, ethanol, acetone, n-butanol + acetone, moderately dissolved in acetic ester, slightly in chloroform and not in ether. The toxin did not belong to proteins, nucleic acids and polysaccharides. However, the toxic filtrate contained aldose. The toxicity was increased after ethanol and acetone treatment. High performance liquid chromatography from ethyl acetate extract of the toxin revealed four major fractions. After treated with the toxin, the relative electrical conductivity of *C. cassia* leaf discs increased dramatically in comparison to that of the control. When exposed to the same level of toxin concentration, the electrical conductivity of susceptible *C. cassia* is higher than that of resistant *C. cassia* var. *macrophyllum*.

Key words: *Cinnamomum cassia*; *Botryodiplodia theobromae*; toxin