

文章编号: 100F 1498(2004) 01 0102 04

# 纵坑切梢小蠹伴生菌云南半帚孢毒素活性的生物检测

廖周瑜, 叶 辉

(云南大学生命科学学院, 云南 昆明 650091)

摘要: 比较研究了不同生物检测材料及方法在纵坑切梢小蠹伴生菌——云南半帚孢毒素的生物活性检测上的适应性, 结果表明该毒素不仅对云南松产生病害作用, 对思茅松和华山松同样产生病害作用。用切根幼苗为材料对该毒素进行生测, 所需时间虽较短, 但幼苗所产生的症状较复杂, 不易观察和确定; 以松树及其木段为材料将该毒素进行接种试验, 则在韧皮部位形成明显的反应区, 与接菌产生的反应症状一样, 容易确定, 但木段上出现反应症状的时间较短, 因此, 以木段为材料, 采用接种法进行该毒素活性检测较好。

关键词: 纵坑切梢小蠹; 云南半帚孢; 毒素; 生物检测

中图分类号: S718.81 文献标识码: A

在植物病原菌毒素的研究中, 如何对毒素进行快速、准确的检测是一个重要的环节。对植物病原菌毒素的检测有物理、化学和生物方法, 前两种方法是以对毒素的理化性质、化学组成和分子结构有较充分的了解为前提, 否则难以正确检测。生物方法简单、直观, 普遍适用于各种生物活性物质的检测, 即使不清楚毒素物质理化性质的情况下都可采用。

用于生物检测的材料很多, 寄主植物的整个植株、某个组织、细胞甚至某个特定的酶分子等都可以作为检测材料。生物检测方法有离体组织浸渍法、针刺法、涂抹法等。生物检测材料和方法众多, 各有特色, 不同的植物病原菌毒素的作用方式及部位存在着较大差异, 因此所采用的生物检测材料和方法应当不同<sup>[1, 2]</sup>。

云南半帚孢(*Leptographium yunnanense* Zhou, Jacobs K, Wingfield M J & Morelet M) 是云南纵坑切梢小蠹(*Tomicus piniperda* Linnaeus) 携带的主要伴生菌<sup>[3-6]</sup>, 在伴随小蠹虫侵入到寄主体内后, 将产生毒素对寄主进行毒害, 从而有利于小蠹虫在寄主上的成功定殖。本文比较研究了不同生物检测材料及方法在云南半帚孢毒素生物活性检测上的适应性, 以期能找出一种较好的生测方法, 为该毒素的深入研究打下良好的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 云南半帚孢 PD 培养液的产毒培养 方法见参考文献[5]。

收稿日期: 2002 11 18

基金项目: 云南省应用基础研究基金项目(1999C0012M) 资助

作者简介: 廖周瑜(1970—), 男, 四川阆中人, 博士, 现于西南林学院工作。

## 1.2 生测材料

本研究选取 3 种材料作毒素活性检测: 活体树木, 云南松 (*Pinus yunnanensis* Franch.) 样树选择同参考文献[6], 地点在西南林学院后山, 同时选择华山松 (*P. armandii* Franch.) 进行生测, 以进行比较研究; 松树离体木段, 包括云南松和华山松木段, 木段取至路南长湖林区, 制备方法同文献[6]; 松树幼苗, 培养 1 个月左右的云南松、思茅松 (*P. kesiya* var. *langbianensis* (A. Chev.) Gausson.) 和华山松幼苗(种子由云南省种苗站提供)。

## 1.3 生测方法

1.3.1 接种法 将毒素原液接种于活体树木、离体木段上进行活性检测, 用未接菌的 PD 液作对照, 在接种后第 5、10 天, 分别观测接种点韧皮反应区长度。接种及观测方法同文献[5, 7]。

1.3.2 切根幼苗法 将幼苗切根后插入装有 2 mL 毒素原液和对照液的青霉素瓶内, 置于室内进行生测, 并逐天观察幼苗反应情况; 用未接菌的 PD 液作对照。

为进一步证实毒素原液的致病活性是由于原液中存在有毒物质所致, 而不是由于毒素原液的性质如 pH 值或渗透势改变引起的, 本研究参照祁高富等<sup>[7]</sup>的有关方法, 进一步开展了下列两项研究, 以进一步证实云南半帚孢毒素的存在。

1.3.2.1 pH 值对毒素活性的影响 用 KL-009 型酸度计测得毒素原液的 pH 值为 5.1, 用  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaOH 和 HCl 溶液分别将毒素原液 pH 值调至 5、6、7。用云南松幼苗作生测材料对上述不同 pH 值的毒素溶液进行活性检测, 以相应 pH 值的蒸馏水作对照, 生测方法同上。

1.3.2.2 溶液渗透势对毒素活性的影响 根据冰点降低法<sup>[8]</sup>, 测得毒素原液的渗透势为 120 kPa。根据公式  $PV = nRT$  计算出配制 1、2、4、6 和 8 倍于毒素原液渗透势的溶液所需蔗糖量, 配制上述系列渗透势蔗糖溶液, 用云南松幼苗对毒素原液和系列蔗糖溶液进行活性检测, 方法同上。

## 2 结果与分析

### 2.1 接种法生测结果

活树及离体木段上接种毒素点均产生了明显的反应区(表 1), 表明该毒素对这两种松树均可产生致病作用。但无论是在华山松活树上还是在其木段上, 所形成的反应区都比相应云南松的小, 仅约其 1/2。由于反应区的长短既可以反映出伴生菌的致病力大小, 又可以反映寄主树木抗性的强弱<sup>[9]</sup>, 这表明华山松对该毒素的抗性较云南松的大。该结果为深入阐释云南省境内纵坑切梢小蠹主要蛀害云南松, 而很少蛀害华山松提供了部分证据。

接种 5 d 后云南松就已形成了明显的韧皮反应区(表 1)。因此可进一步缩短生测时间。

表 1 用松树及其木段进行毒素原液生测结果

生测材料	接种 5 d 后的反应区长度/cm		接种 10 d 后的反应区长度/cm	
	毒素原液	对照	毒素原液	对照
云南松样树	2.2 ± 0.011	0.36 ± 0.010	4.5 ± 0.014	0.4 ± 0.001
华山松样树	1.1 ± 0.012	0.30 ± 0.001	2.0 ± 0.011	0.32 ± 0.010
云南松木段	5.4 ± 0.010	0.45 ± 0.011	9.0 ± 0.014	0.68 ± 0.010
华山松木段	2.1 ± 0.013	0.42 ± 0.011	4.3 ± 0.012	0.6 ± 0.011

### 2.2 切根幼苗法生测结果

用松树的切根幼苗进行毒素活性生测, 幼苗所表现的症状很复杂, 不如在活树或木段上接

种后所形成韧皮反应区的症状明显,难以观察。在毒素作用一段时间后,幼苗的茎先是表现出萎缩症状,后逐渐枯缩并变成褐色,期间,幼苗针叶也逐渐枯萎,针叶失绿症状不明显;对照液中幼苗仅出现的叶逐渐枯萎的症状,而且出现的时间很晚(表2)。

表 2 用切根幼苗对毒素生测的结果

生测材料	试验观测时间(d)及结果													
	毒素原液							对照						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
云南松幼苗	-	-	-	+	++	++	++++	-	-	-	-	-	-	+
思茅松幼苗	-	-	-	+	++	++	++++	-	-	-	-	-	-	+
华山松幼苗	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

注:表中“-”表示幼苗还未出现任何症状;“+”表示幼苗的茎已出现萎缩;

“++”表示幼苗茎已开始枯缩并变色,叶也逐渐枯萎;“++++”表示整株幼苗已枯死,下同。

对照处理的切根幼苗反应不明显,仅在第7天才产生反应。三种松树的切根幼苗对毒素原液的作用都在不同时间内不同程度上发生了反应,这说明溶液中存在着毒素物质的作用,而且该毒素对这三种松树均具有致病作用(表2)。云南松、思茅松的幼苗在短时间内(约4d)就产生了反应,而华山松的幼苗在第7天才产生反应,表明思茅松同云南松一样,对毒素的抗性都较弱;华山松幼苗发生反应的时间较晚,这一方面由于华山松的幼苗比同月龄的云南松和思茅松幼苗粗壮,其抗逆性本身较强;另一方面,这也再次说明华山松对该毒素的抗性较强。

### 2.3 毒素原液的 pH 值和渗透势对其毒性的影响

毒素原液的 pH 值为 5.1,由云南松幼苗进行的生测结果(表3)表明,pH 值 5~6 对毒素的致病活性影响不大,pH 值为 7 时其活性似乎有些降低;对照溶液对生测幼苗无明显影响,该结果排除了毒素原液的毒性是由溶液的酸度变化所致的可能性。

系列渗透势溶液在云南松幼苗上的生测结果(表4)表明,需4倍于毒素原液渗透势以上的蔗糖溶液才有使幼苗表现出渗透胁迫的伤害症状。但渗透伤害所引起的症状与毒素原液作用所引起的症状不一样,渗透伤害的幼苗茎和针叶同时萎缩并变褐色。因此该结果又排除了毒素原液的毒性是由其本身的渗透所致

表 3 pH 值对云南半帚孢毒素致病活性的影响

pH 值	毒素原液	试验观测时间/d 及结果						
		1	2	3	4	5	6	7
5.1	5.1	-	-	-	+	+	++	+++
5	5	-	-	-	+	+	++	+++
6	6	-	-	-	+	++	++	++
7	7	-	-	-	-	+	++	++
对照	5	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	+	+
	7	-	-	-	-	-	+	+

表 4 溶液渗透势对云南半帚孢毒素致病活性的影响

项 目		试验观测时间/d 及结果						
		1	2	3	4	5	6	7
毒素原液		-	-	+	+	+	++	+++
蔗糖溶液(相对于	1	-	-	-	-	-	-	-
毒素原液渗透势	2	-	-	-	-	-	-	△
的不同倍数)	4	△	△	△△				
	6	△	△△					
	8	△△						

注:“△”表示松树幼苗茎和针叶已逐渐萎缩并褪变成褐色;

“△△”表示幼苗脱水枯萎致死,茎和针叶失绿变褐。

### 3 小结

本试验研究结果再次表明, 云南半帚孢在侵染过程中将产生毒素对寄主树木进行致病危害; 该毒素不仅对云南松产生病害作用, 对思茅松和华山松同样产生病害作用; 云南松和思茅松对其抗性较弱, 而华山松对其抗性较强。

比较上述毒素生物活性检测方法, 用切根幼苗检测该毒素的活性, 所需时间虽较短, 但幼苗所产生的症状较复杂, 不易观察和确定; 而采用直接接种法在寄主树木韧皮上所形成的反应区症状明显, 与接菌产生的反应症状一样, 容易确定, 而且根据试验结果, 用云南松木段生测, 检测时间可进一步缩短, 可在接种后 5 d 内进行观察。因此, 以云南松木段作生测材料, 采用接种法进行云南半帚孢毒素活性检测较好。

### 参考文献:

- [1] 杨斌, 叶建仁, 包宏. 林木病原菌毒素研究进展[J]. 林业科学研究, 2000, 13(3): 316 ~ 322
- [2] 李建庆, 张永安, 张星耀, 等. 昆虫病原真菌毒素的研究进展[J]. 林业科学研究, 2003, 16(2): 233 ~ 239
- [3] 周旭东, 叶辉, 丁骅孙. 云南松纵坑切梢小蠹蛀干期虫坑真菌类群初步研究[J]. 林业科学研究, 1999, 12(5): 556 ~ 560
- [4] Xu Dong Zhou, Karin Jacobs, Michel Morelet, et al. A new *Leptographium* species associated with *Tomicus piniperda* in South Western China[J]. Mycoscience, 2000(41): 573 ~ 578
- [5] 廖周瑜, 叶辉. 纵坑切梢小蠹伴生菌危害机理的研究[J]. 中国森林病虫, 2002, 21(3): 3 ~ 5
- [6] 廖周瑜, 叶辉, 吕军. 温度对纵坑切梢小蠹伴生菌——云南半帚孢生长的影响[J]. 林业科学研究, 2002, 15(3): 338 ~ 342
- [7] 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
- [8] 曹仪植, 宋占午. 植物生理学[M]. 甘肃: 兰州大学出版社, 1998
- [9] Krokene P, Solheim H. What do low-density inoculations with fungus tell us about fungal virulence and tree resistance? [A]. In Lieutier F, Mattson W J, Wagner M R. Physiology and Genetics of Tree-phytophage Interaction (International symposium) [C]. INRA, Paris, 1997. 353 ~ 362

## Bioassay of the Pathogenic Toxin of *Leptographium yunnanense*, A Fungus Associated with *Tomicus piniperda*

LIAO Zhou-yu, YE Hui

(School of Life Science, Yunnan University, Kunming 650091, Yunnan, China)

**Abstract:** Pathogenic toxin of *Leptographium yunnanense* associated with *Tomicus piniperda* could pathogeny not only to *Pinus yunnanensis*, but also to *P. armandii* and *P. kesiya* var. *langbianensis*. The symptoms were very complicated and not easy to be observed and determined when bioassaying the toxin with seedlings cutted roots, however, when bioassaying the toxin with sampling trees and its wood blocks, the symptoms would be observed clearly, and as the same as they were induced by inoculating the fungus to the host trees. The bioassay results would be observed sooner (about 5 days) when bioassaying the toxin with wood block, so it was better to inoculate the pathogenic toxin to the wood blocks for bioassay.

**Key words:** *Tomicus piniperda*; *Leptographium yunnanense*; phytotoxin; bioassay