

松针

褐斑病菌

(*Lecanosticta acicola*)

毒素的研究与应用

STUDIES AND APPLICATION OF PATHOTOXINS FROM
LECANOSTICTA ACICOLA CAUSING BROWN SPOT
NEEDLE BLIGHT OF PINES

杨斌 著

云南科技出版社

松针褐斑病菌 (*LECANOSTICTA ACICOLA*) 毒素的研究与应用

STUDIES AND APPLICATION OF PATHOTOXINS FROM
LECANOSTICTA ACICOLA CAUSING BROWN SPOT NEEDLE
BLIGHT OF PINES

国家自然科学基金、云南省自然科学基金和教育部重点项目
资助研究和出版



云南科技出版社
昆明

图书在版编目 (CIP) 数据

松针褐斑病菌毒素的研究与应用 / 杨斌著. —昆明:
云南科技出版社, 2004.10

ISBN 7-5416-2041-6

I .松... II .杨... III .褐斑病 - 真菌毒素 - 研究
IV .S432.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 094528 号

云南科技出版社出版发行

(昆明市环城西路 609 号云南新闻出版大楼 邮政编码: 650034)

云南福保东陆印刷股份有限公司印刷 全国新华书店经销

开本: 787×1092mm 1/16 印张: 12.75 字数: 300 千字

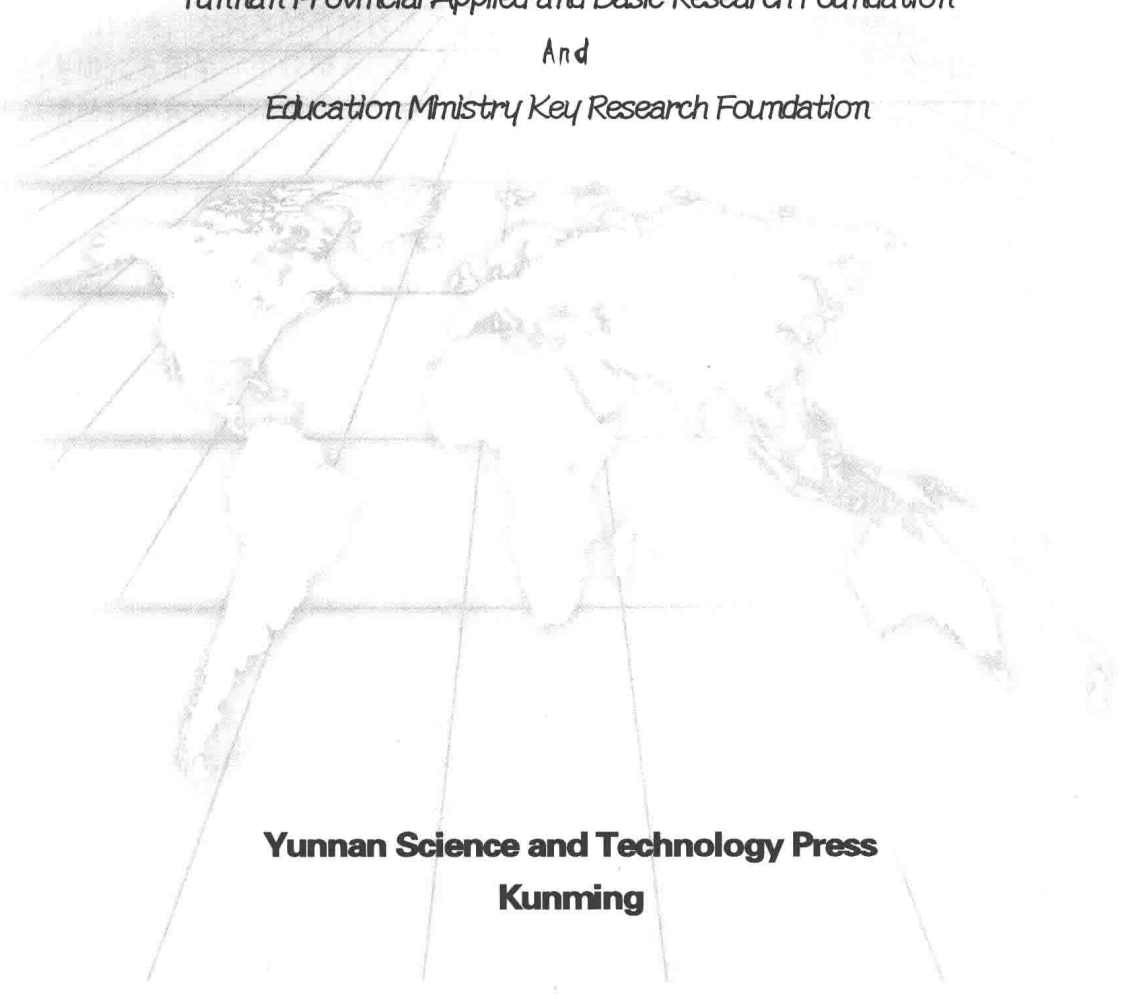
2004 年 9 月第 1 版 2004 年 9 月第 1 次印刷

印数: 1-1000 定价: 38.00 元

STUDIES AND APPLICATION OF PATHOTOXINS FROM *LEGANOSTICTA ACICOLA* CAUSING BROWN SPOT NEEDLE BLIGHT OF PINES

BY
YANG BIN

*Supported to Study and publish by
China National Natural Science Foundation
Yunnan Provincial Applied and Basic Research Foundation
And
Education Ministry Key Research Foundation*



**Yunnan Science and Technology Press
Kunming**

前言

从 20 世纪 80 年代 Jewell F. F. 通过组织病理学方法间接推测松针褐斑病可能产生毒素物质以来,松针褐斑病菌致病毒素的研究经过了一个非常漫长的过程。在这个过程中,国内不少研究者,特别是南京林业大学叶建仁教授领导的研究小组,对该病原菌产生的毒素物质作了大量细致的研究工作,基本弄清了毒素的基本性质,为毒素的分离纯化奠定了良好的基础。正是前人扎实的研究基础,才使得该病原真菌毒素的研究在最近几年有较大的突破,取得了比较重要的阶段性的研究成果,使本书的编写和出版成为可能。

决定出版这本书还基于几个重要原因:首先,松针褐斑病菌是我国国外松上的一种重要病原菌,该病害扩展蔓延迅速,危害大,从致病毒素方面研究有助于深入了解该病害的作用机理,为病害的可持续治理奠定理论基础。其次,该病原菌致病毒素是我国林木病害研究方面第一个较深入研究,并获得单体和阐明结构的新天然毒素物质,阶段性的总结松针褐斑病菌毒素的研究成果对其他病原真菌毒素的研究有积极的借鉴意义。第三,最近发现松针褐斑病菌毒素物质具有明显的除草活性,是一种值得深入研究和开发的活性物质,而植物病原菌毒素除草剂的研究和应用是新型除草剂研究中极具潜力的方向之一,及时总结本研究成果可能有助于推动致病毒素在除草剂方面的开发和应用研究。第四,该毒素物质对抗病性不同的松树和不同抗病无性系的伤害活性有明显差异,而且毒素的这种选择性与病原菌的选择性有明显的正相关性。这预示,在一定程度上可以利用毒素进行抗病无性系的初步筛选和鉴定,这将有助于加快抗病育种的进程。因此,对松针褐斑病菌毒素的深入研究不仅对植物病理学理论的研究有积极意义,而且对病害的治理和杂草的控制都有重要的作用,及时总结研究工作是十分必要的。

本书首次就松针褐斑病菌毒素的研究进行系统的总结和报道,是国内第一本关于林木病原真菌毒素研究的著作。作者在本书中试图构建关于植物病原菌毒素研究的一般规律和方法体系,但是,限于研究内容的深度和广度,本书内容只能包括:林木病原真菌毒素的研究概况、松针褐斑病的研究概况、松针褐斑病菌毒素的发现与确定、松针褐斑病菌毒素的基本性质、松针褐斑病菌毒素的生物检测、松针褐斑病菌的发酵和产毒培养、松针褐斑病菌毒素的初步分离、松针褐斑病菌毒素 LA-I 的分离、纯化及化学结构研究、松针褐斑病菌毒素 LA-II 的分离、纯化及化学结构研究、松针褐斑病菌毒素 LA-I, LA-II 的致毒活性及基本特征、松针褐斑病菌毒素对寄主植物细胞膜的伤害活性、松针褐斑病菌毒素对寄主保护酶系统的伤害作用、松针褐斑病菌毒素对紫茎泽兰的伤害作用、松针褐斑病菌毒素在湿地松抗病无性系筛选中的应用研究、松针褐斑病菌毒素对紫茎泽兰控制作用、松针褐斑病菌毒素与泽兰尾孢协同控制紫茎泽兰的研究、研究结果和展望。这些内容大部分是作者近年在松针褐斑病菌毒素研究方面获得的结果。但是,

为了使本书更具系统性和参考价值,作者也引用和编入了其他一些研究者在该领域公开发表的研究数据、重要的方法和结果。在此,向提供部分数据和研究结果的叶建仁教授、祁高富博士、蒋继宏博士表示感谢。

本书研究内容从 1998 年至今得到国家自然科学基金、云南省应用基础研究基金、教育部重点研究项目基金的部分资助。作者向资助“松针褐斑病菌致病毒素研究”的国家自然科学基金委员会,资助“松针褐斑病菌杀草毒素研究”的云南省应用基础研究基金委员会,资助“杂草病原菌与毒素协同控制杂草机理研究”的教育部科学研究基金委员会表示谢意。

本书的研究内容是在南京林业大学、中国科学院昆明植物所、西南林学院完成的。研究期间得到叶建仁教授、刘吉开研究员、包宏教授、吴小芹教授、刘剑锋硕士等人的支持和帮助。作者向提供实验条件和帮助的上述单位和个人表示衷心的感谢;同时向参与研究的陈勃、泽桑梓、柳成益、郑金镇、姚金鹏、司建伟等人表示感谢。

本书的编写和出版过程得到庄辉副研究员、胡平副社长、黄晓园同志、蔡顺同学以及西南林学院科技处全体同志的支持和帮助,在此,表示衷心的感谢。同时还要感谢那些曾经为本书研究和出版付出艰辛劳动,而在此又不能一一列举的同事们和朋友们。

Preface

It has been a long time, since Jewell F. F. in 80's years, speculated on the existence of toxins possibly produced by *Lecanosticta acicola* through histopathological methods. A lot of domestic researchers, especially the research group led by professor Ye Jianren in Nanjing Forestry University, contributed a lot to the studies on this toxin produced by the pathogen (*Lecanosticta acicola*) causing brown spot needle blight. These researchers clarified basic properties of the toxin and laid a good foundation for separating and purifying the toxin. Basing on anterior achievements, the author and his colleagues made some progresses in this field and this book summed up the recent progresses.

To decide to publish this book mainly bases on the following reasons. Firstly, *Lecanosticta acicola* is one of the most important pathogens on exotic pines in China; this disease spread quickly and cause a lot of loss on the growth of exotic pine; studies on the toxin producing from the pathogen will benefit for understanding the role mechanism of the pathogen and offer theoretic basis for controlling the disease. Secondly, it is the first toxin separated and purified from woods pathogen in China, and the new achievements would be used as references by researchers working on the toxin produced by woods pathogens. Thirdly, the toxin separated from *Lecanosticta acicola* has weeding activity and can be used as natural herbicide. Summing up the results would speed the development and exploitation toxin herbicide. Fourthly, Although the toxin is non-specific toxin, it indicates some selectivities in hurting slash pine clones with different resistances and the selectivity of toxin is highly correlative to the selectivity of pathogen. Consequently, the toxins could be used in the resistance selection and breeding of pines to brown spot needle blight. Therefore, studies on toxins have theoretic value and practical value.

It is the first book on one mycotoxin produced by wood pathogen and it systemically reported the achievements succeed on the toxin of *Lecanosticta acicola*. In this book the author tried to structure a common method of studying pathotoxins. However, limited by the deepness and width of study, this book can only include the following chapters: summarization of mycotoxin produced by wood pathogens; general situation of studies on brown spot needle blight caused by *Lecanosticta acicola*; the discovery and determinations of pathotoxin produced by *Lecanosticta acicola* causing brown spot needle blight; basic properties of the toxin from *Lecanosticta acicola*; bioassay of the LA - toxins; the ferment and producing toxin culture of *Lecanosticta acicola*; preliminary separation of the LA - toxins; studies on separation, purification and chemical structure of LA - II; studies on separation, purification and chemical structure of LA - I; bioactivities and basic properties of the toxin LA - I and LA - II; role mechanism of the crude toxin from *L. acicola* to the cell membrane of

slash pine; the effect of toxin to the activities of protection enzyme of host; studies on effects of the toxin to notorious weed *Eupatorium adenophorum*; studies on the role mechanisms of toxin to *Eupatorium adenophorum*; application studies on selecting resistant clones of slash pine by using crude toxin of *Lecanosticta acicola*; studies on the control roles of *Cercospora eupatorii* – *odorati*, cooperated with crude toxin of *Lecanosticta acicola*, to the eupatorium weed; and results and expectations of studies on the toxin from brown spot needle blight fungus. Most of these contents are results gained by the author in recent years. In order to make this book more systematically and more referable, the author cited and compiled some published data, methods, and results. Therefore, special thanks are given to professor Ye Jianren, Dr. Qi Gaofu, and Dr. Jiang Jihong for offering the materials needed in writing this book.

From 1998 to now, three projects correlated with the toxin of *Lecanosticta acicola* have been supported by several foundation committees. The author thanks Yunnan Provincial Applied and Basic Research Foundation Committee, China National Natural Science Foundation Committee, Education ministry Key Project Foundation Committee for supporting “Weeding Active Compounds from Brown Spot Needle Blight Fungus”, “Studies on the Pathotoxins of Brown Spot Needle Blight Fungus (*Lecanosticta acicola*)” and “Cooperative Control Roles of Pathotoxin from *Lecanosticta acicola* and *Cercospora eupatorii* – *odorati* to the eupatorium grass” respectively.

Most of the contents are finished in Nanjing Forestry University, Chinese Academy of Science Kunming Botany Institute, and Southwest Forestry College. During the research, Professor Ye Jianren, Professor Bao Hong, Professor Liu Jikai, Professor Wu Xiaojin, and Liu Jianfeng give a lot of helps and supports. The author thanks these units and persons for offering experiment qualifications, supports, and helps. At the same time, special thanks are given to the following persons for participating the research projects. They are Chen Bo, Liu Chengyi, Yao Jingpeng, Zhen Jinzheng, Si Jianwei, and Ze Sangzi et al.

At last the author gives thanks to associate professor Zhuang Hui, Hu Ping, Huang Xiaoyuan, Cai Sun, and my Colleagues in Science and Technology Department for their helps in the period of studying and writing of the book. The author also appreciates the editors for their excellent work in compiling this book.

目 录

第一部分 概 述	(1)
1 林木病原菌毒素研究概况	(3)
1.1 林木病原菌毒素化学性质	(3)
1.2 林木病原菌毒素作用机理的研究	(5)
1.3 林木病原菌毒素的应用	(9)
2 松针褐斑病研究概述	(12)
2.1 症状与病原	(12)
2.2 病原菌的传播和侵染	(13)
2.3 病害流行	(14)
2.4 松针褐斑病的防治措施	(15)
2.5 抗病选育和抗病机理	(16)
2.6 松针褐斑病菌致病毒素初步研究	(17)
第二部分 松针褐斑病菌致病毒素的确定与性质	(19)
1 松针褐斑病菌毒素的发现与确定	(21)
1.1 松针褐斑病菌毒素的发现	(21)
1.2 松针褐斑病菌毒素的确定	(22)
1.3 分析与讨论	(28)
2 松针褐斑病菌毒素的基本性质	(30)
2.1 试验材料	(30)
2.2 试验方法、内容与结果	(31)
2.3 分析与讨论	(36)
3 松针褐斑病菌毒素的生物检测	(38)
3.1 寄主植物不同组织对毒素的检测	(38)
3.2 不同非寄主植物对毒素的检测	(40)
3.3 不同浓度毒素的生测效果	(41)
3.4 不同生测方法的生测效果	(41)
3.5 分析与讨论	(43)
4 松针褐斑病菌的产毒培养与毒素物质的粗提	(45)
4.1 产毒培养	(45)
4.2 病原菌在不同培养基上的产毒能力	(46)
4.3 毒素物质的粗提	(50)

4.4 毒素粗提物的高效液相检测	(50)
4.5 病原菌产毒能力的退化与复壮	(52)
4.6 分析与讨论	(53)

第三部分 松针褐斑病菌致病毒素的分离、纯化与化学结构研究

.....	(55)
1 松针褐斑病菌毒素的柱层析分离与紫外吸收特性	(57)
1.1 毒素柱层析分离	(57)
1.2 柱层析活性组分 d、e 的薄层层析分离	(62)
1.3 活性组分 m、p 的紫外吸收特性及高效液相色谱检验	(66)
1.4 分析与讨论	(69)
2 毒素 LA - II 的纯化和化学结构研究	(71)
2.1 毒素物质 LA - II 的分离、纯化	(71)
2.2 LA - II 的纯化及纯度检验	(75)
2.3 LA - II 的化学组成及分子结构研究	(76)
2.4 分析与讨论	(77)
3 毒素 LA - I 的分离纯化及化学结构研究	(85)
3.1 LA - I 的分离	(85)
3.2 活性组分 A 的纯度检验及 HPLC 分离	(88)
3.3 LA - I 的化学组成及分子结构研究	(92)
3.4 分析与讨论	(98)
4 LA - I、LA - II 的致毒活性及基本性质	(99)
4.1 LA - I 旋光性研究	(100)
4.2 LA - I、LA - II 热稳定性研究	(100)
4.3 LA - I、LA - II 专化性研究	(102)
4.4 LA - I、LA - II 最低有效浓度研究	(103)
4.5 LA - I、LA - II 相互关系	(105)
4.6 分析与讨论	(106)

第四部分 松针褐斑病菌致病毒素的作用机理

1 松针褐斑病菌毒素对湿地松细胞膜系统的伤害作用	(111)
1.1 毒素处理后湿地松超氧阴离子自由基的变化	(112)
1.2 毒素处理后湿地松膜脂肪酸组成变化	(114)
1.3 毒素处理后湿地松细胞膜丙二醛含量的变化	(115)
1.4 毒素处理后湿地松细胞电导率的变化	(117)
1.5 毒素作用后寄主细胞显微结构的变化	(118)
1.6 分析与讨论	(119)
2 松针褐斑病菌毒素对寄主抗病相关酶的影响	(121)
2.1 毒素粗提物对湿地松针叶过氧化物酶的影响	(122)
2.2 毒素处理后湿地松针叶多酚氧化酶活性变化	(124)

2.3 毒素处理后湿地松针叶 6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性变化	(125)
2.4 毒素处理后湿地松针叶苯丙氨酸解氨酶活性变化	(127)
2.5 分析与讨论	(128)
第五部分 松针褐斑病菌致病毒素的应用研究	(131)
1 松针褐斑病菌对寄主抗病性的筛选和鉴定	(133)
1.1 病原菌人工接种	(134)
1.2 毒素处理离体松针	(136)
1.3 毒素接种结果与病原菌接种结果的相关性分析	(138)
1.4 分析与讨论	(138)
2 松针褐斑病菌毒素的除草活性	(139)
2.1 松针褐斑病菌对几种杂草的人工接种试验	(139)
2.2 毒素粗提物对几种杂草种子萌发的影响	(141)
2.3 毒素粗提物对几种杂草根的抑制作用	(142)
2.4 毒素粗提物对几种杂草叶的伤害作用	(143)
2.5 毒素粗提物对杂草幼苗的伤害作用	(145)
2.6 毒素粗提物与几种常见除草剂的活性比较	(146)
2.7 松针褐斑病菌毒素粗提物与镰刀菌和链格孢菌毒素粗提物除草活性的比较	(147)
2.8 分析与讨论	(148)
3 松针褐斑病菌毒素对紫茎泽兰的作用机制	(150)
3.1 毒素对紫茎泽兰叶片细胞膜和电解质渗漏的影响	(151)
3.2 毒素处理后紫茎泽兰渗漏电解质对泽兰尾孢菌孢子萌发和菌丝生长的影响	(152)
3.3 毒素对紫茎泽兰抗病相关酶的影响	(155)
3.4 分析与讨论	(163)
4 松针褐斑病菌毒素与泽兰尾孢菌协同控制紫茎泽兰的初步研究	(164)
4.1 泽兰尾孢菌对紫茎泽兰的致病性	(165)
4.2 毒素对紫茎泽兰的伤害作用	(167)
4.3 毒素粗提液和泽兰尾孢孢子悬浮液混合接种对紫茎泽兰的伤害作用	(168)
4.4 毒素对泽兰尾孢孢子萌发的影响	(169)
4.5 毒素对泽兰尾孢菌丝生长的影响	(170)
4.6 分析与讨论	(171)
5 松针褐斑病菌毒素研究结论与展望	(173)
5.1 松针褐斑病菌毒素研究结论	(173)
5.2 讨 论	(176)
主要参考文献	(179)

第一部分 概述



PART I **SUMMARIZATION**

1

林木病原菌毒素研究概况

病原菌在长期进化和与林木复杂的互作过程中,逐渐形成对林木的寄生性和致病性,病原物的致病性同寄主的抗病性一起决定着病害的发生和严重程度。探讨和揭示林木病原的致病机理是林木病理学研究的热点之一。现有的研究认为:病原菌的致病力大小与致病因子多少及其活性的大小有关。植物病原菌致病因子主要包括:酶、毒素、激素三大类。表现出萎蔫、组织坏死症状的病害大多与病原物产生的毒素或病原与寄主协同作用产生的有毒物质有关。因此,研究林木病原菌毒素及其作用机理对于理解林木与病原的相互作用,丰富林木病理学理论有十分重要的意义。同农业植物病原菌毒素研究相比,林木病原菌毒素研究起步虽晚,但其发展却较迅速,近十几年就发现上百种重要的林木病原菌毒素,并在毒素分子结构、作用机理、毒素应用及分子生物学等领域取得了令人鼓舞的成就。本部分拟就以上几个方面总结林木病原菌毒素的研究进展,以期为今后林木病原菌毒素的研究提供一点思路及借鉴。

1.1 林木病原菌毒素化学性质

经过多年研究,现已查明并弄清化学结构的林木病原菌毒素有几十种。这些毒素按其化学性质和结构大致可以分为以下几类。

1.1.1 大分子的蛋白质和多糖类毒素

该类毒素分子量一般超过 5,000Da,其致病作用主要表现为阻塞寄主输导组织而致萎蔫。从榆长喙壳菌 [*Ceratocystis ulmi* (Buism.) C. Morean] 发酵液中提取到的一种诱发榆树 (*Ulmus sp.*) 萎蔫的毒素是一分子量超过 30,000Da 的糖蛋白,其蛋白质部分大约由 75 个氨基酸残基组成。山毛榉长喙壳菌 (*Ceratocystis fagacearum* Buism.) 产生的 CF 毒素是一分子量超过 160,000Da 的多糖。一种侵染橡胶 [*Hevea brasiliensis* (H. B. K.) M. A.] 叶片的真菌 (*Corynespora cassicola* Bres.) 产生的毒素为一糖肽,其分子量为 7,500Da,该化合物在叶脉中聚集造成橡胶叶片输导组织堵塞而致萎。1974 年证实梨火疫病菌 (*Erwinia amylovora*) 产生的毒素 amylovorin 为多糖类毒素,该毒素分子量 165000~168000Da,主要成分为半乳聚糖 (98%),还有微量蛋白质,酸解可使毒素失活。这些大分子物质多数是蛋白质和多糖的复合体,不溶于有机溶剂,耐高温能力弱。

1.1.2 肽及氨基酸衍生物

林木苗圃中的一种重要病原链格孢菌 [*Alternaria alternata* (Fr.) Keissler] 产生的 AA - II 毒素为一环状四肽。假单胞杆菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) 在核果类、梨等果树上寄生的致病菌系主要产生丁香菌素 (syringomycin SR), 而在柑橘类树木上寄生的菌系主要产生丁香毒素 (syringotoxin, ST)。这两种毒素都无寄主专化性, 分子量较小, 为多肽结构。组成 SR 的氨基酸主要包括丝氨酸、苯丙氨酸、精氨酸和未知氨基酸衍生物; ST 肽的主要成分为苏氨酸、丝氨酸、甘氨酸、鸟氨酸和一种未肯定的氨基酸。盘长孢状刺盘菌 (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) 产生的 CG 毒素 (aspergillomarumin A) 为氨基酸衍生物, 可引起桂花 (*Osmanthus* sp.) 叶斑。尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum* Schlecht) 产生的 lycoramin (N - 乳酸基氨酰天冬酰胺) 也是一种氨基酸衍生物, 该化合物与西蒙得木 [*Simmondsia chinensis* (Link) Schreider] 萎蔫有关。

1.1.3 芳香类化合物

Oku 认为与松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus* Steiner&Buhner) 伴生的细菌 (*Bacillus* spp.) 产生对松树有伤害作用的化合物邻苯二酚 (CA)、苯乙酸 (PA)、苯甲酸 (BA) 等几种苯酚类化合物, 并认为松材线虫对松树的致萎作用与伴生细菌产生的这些酚类毒素有密切关系。栗疫菌 {*Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr [*Endothia parasitica* (Murr.) P. J. et H. W. Anders]} 产生的蒽醌栗疫菌素 anthraquinone skyrin 即为醌类化合物。梨黑斑病菌 (*Alternaria kikuchiana*) 产生的 AK 毒素具有苯环结构, 能引起寄主组织坏死。苹果轮斑病菌 (*Alternaria mali*) 能够合成 AM 毒素, AM 毒素具有 3 种组分, 这 3 种组分的差异在于苯环上对位取代基的不同, 不同的取代基导致生物活性的重大差异。AM 类毒素和 AK 类毒素是林木病原菌产生的, 是目前已知的为数较少的寄主专化性毒素。引起苗木病害的立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 常产生多种带有苯环的芳香酸类毒素, 包括苯乙酸、羟基苯乙酸、羟基苯甲酸等。危害桑树 (*Morus alba* L.) 的桑卷担菌 (*Helicobasidium mompa* Tanaka) 产生的 HM 毒素也是醌类化合物。

1.1.4 聚酮类化合物

落叶松叶斑病菌 [*Guignardia loricata* (Sawada) Yamamoto et K. Ito] 产生的 GL 毒素, *Mycosphaerella astroma* Aderh. 产生的紫苑苷 (asterontine) 和 *Neocosmospora vasinfecta* E. F. Smith 产生的 eovasinia 均为聚酮类化合物, 这些病原菌常引起针叶树叶斑病。

1.1.5 萜烯类和甾类化合物

由引起木材腐朽的多年层孔菌 (*Fomes annosus* Karst.) 产生的多年层孔菌素是一种倍半萜类化合物。过去曾报道从白杨 (*Populus alba* L.) 上寄生的一种真菌 *Hypoxyylon*

mammatum (Wahlenb.) Miller 中分离到的致病毒素是一种二萜类化合物。扁桃壳梭孢菌 (*Fusicoccum amygdali*) 产生的壳梭孢素, 长蠕孢菌产生的长蠕孢腔菌素均为倍半萜类化合物。尾孢菌 (*Cercospora* sp) 尾孢毒素是苯甙衍生物类化合物。引起林木枯萎病的常见病原菌 (*Fusarium oxysporum*) 的一些专化性菌株或者变形菌株中常常能够分离到菲醌类和非酚类毒素。

1.1.6 其他

大多数植物病原真菌 (包括林木病原菌) 都可以产生草酸毒素, 这种草酸毒素常常造成寄主植物组织坏死。引起梨 (*Pyrus serotina* Rehder) 和苹果 (*Malus pumila* Mill.) 叶斑病的 *Alternaria* spp. 产生的交链孢酸 (Alternaric acid) 为有机酸类化合物。日本梨黑斑病菌 *Alternaria kikuchiana* Tanaka 产生的毒素为脂类化合物。松树针叶和枝干的一种致病菌 *Phomopsis* sp. 产生的 OPT 毒素为一种海松烯内酯, 它在松树体内转化为另一结构的异海松烯内酯而起致病作用。毛壳菌 *Chaetomium* sp. 产生的 oosoporein 为一多聚内酯类化合物。

林木病原菌毒素种类多, 结构复杂, 现已明确结构的毒素涉及到了大多数有机物的化学类别, 随着研究的深入, 分离技术的进步, 将会有更多的新毒素被阐明, 那时人们可能就难以把林木病原菌毒素归为哪几类化合物。正是由于毒素结构的千差万别, 才造成了其作用机制的多样性。同时毒素化合物的结构多样性也为我们利用毒素提供了一个广阔的空间。

1.2 林木病原菌毒素作用机理的研究

林木病原菌毒素结构的多样性导致了其作用机理的复杂性。毒素对寄主的伤害主要通过一系列的链环反应而起作用。包括对寄主的识别, 参与调控植物生理生化反应, 破坏植物细胞超微结构, 引起细胞非正常死亡, 最终导致整个植株在生理、生化和形态结构上发生异常变化。目前国内外致病机理研究主要集中在作用位点和作用方式两个方面。

1.2.1 毒素作用位点的研究

1.2.1.1 毒素的受体

毒素作用位点通常是指毒素与寄主细胞最初结合的部位。Akimitsu 在研究由菊池链格孢菌 (*Alternaria kikuchiana* Tanaka) 产生的 AK 毒素对日本梨 (*Pyrus* sp.) 叶细胞和柠檬 (*Citrus limonia* Osbeck) 叶细胞作用时发现, AK 毒素与梨感病品种的细胞质膜上的一种 -SH 蛋白质有特异性结合而与抗病品种的 -SH 蛋白不结合。后来证实感病品种的 -SH 蛋白为 AK 毒素的受体, 抗病品种的 -SH 蛋白由于构象的差异, 不存在该毒素的结

合部位, 导致 AK 毒素无法识别抗病品种。Jones 等人在研究引起辐射松 (*Pinus radiata* D. Don) 针叶病害 *Dothistroma pini* Funk et Parker 产生的 DOTH 毒素时, 应用组织免疫学和电镜发现并定位 DOTH 毒素的受体在细胞质膜上, 其受体蛋白的分子量为 40, 000Da。应用荧光抗体技术对榆枯萎病菌毒素 (CU 毒素) 作用位点定位表明: 其作用位点在榆树 (*Ulmus* sp.) 细胞质膜的一个凹陷处。由扁桃壳梭孢 (*Fusicoccum amygdali* Delaer.) 产生的壳梭孢素 (fusicochin) 在扁桃 (*Prunus* sp.) 的细胞质膜上有一分子量为 80, 000Da 的受体蛋白。已有的研究显示大部分毒素受体蛋白存在于细胞膜上, 因此植物细胞膜常常是毒素物质结合的部位和攻击的第一个位点。毒素与植物细胞识别和结合后将导致一系列的异常反应。

1.2.1.2 毒素的分子结构及活性基团

植物病原菌毒素常有特定的化学结构和化学基团, 当毒素的分子结构或活性基团发生变化, 其致毒活性就削弱或加强。一个明显的例子就是松树针叶和枝干的致病真菌 *Phomopsis* sp. 产生的 OPT 毒素, OPT 毒素为一海松烯内酯, 本身毒性较弱, 但 OPT 进入松树体内后可转化为异海松烯内酯, 后者活性更强, 这种转变是通过把 (位羟基氧化为酮基。虽然仅一个基团变化, 但致病活性却迥然不同。梨黑斑病菌 (*Alternaria kikuchiana*) 产生的 AK 毒素具 I、II 两个组分, AK-I 与 AK-II 之间的差别在于 C-12 上的基团不一样, AK-I 为 $-\text{CH}_3$, AK-II 为 $-\text{H}$ 。这种微小差异使 AKI 具有较高活性, 浓度为 $5 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 时仍可诱使梨叶脉坏死, AK-II 要在 10^{-7} mol/L 时才可引起梨叶脉坏死, 两者活性相差 50~100 倍。水稻稻瘟病菌 (*Pryricularia aryzne*) 毒素的主要成分为细氮杂酸, 如果该物质 C-3 和 C-5 上的氢被丙基或丁基取代, 其致毒活性就丧失。这就是我们常说的结构决定功能, 有什么样的结构就有什么样的功能与之适应。因此, 在毒素研究中确定毒素物质活性基团和活性部位十分重要, 这对毒素的合成、改性和作用机理研究十分有利。

1.2.2 毒素对寄主生理生化反应的影响

1.2.2.1 使寄主细胞膜透性发生改变

透性变化几乎是感病树木组织对毒素伤害的一种普遍反应。膜透性变化通常表现为电解质渗漏, 质膜电势能去极化和超极化。FC 毒素 (扁桃壳梭孢素) 的主要作用就是活化寄主膜表面的 ATP 酶质子泵 (H^+), 使 H^+ 从膜内泵出, K^+ 、 R_b^+ 吸入, 引起跨膜电势差 (PD) 和超极化。FC 在 30min 内即可使桃树 [*Prunus* sp.] 组织电势差提高 50~60mv, 这种超极化作用是其他一系列非正常生理生化反应的基础。Moyssset L 等人在研究 *Albizia lophatha* (Linn.) Benth 叶片用 fusicochin 处理后气孔关闭情况时也发现在 2~3h 内, 毒素激活膜上质子泵, 使质子从膜内泵出, 其他阳离子泵入, 保卫细胞吸收水分而使气孔处于开放状态。近年来, 叶建仁等在松针褐斑病菌 [*Lecanosticta acicola* (Thum.) Sydow et Petrak] 致病机理的研究中发现: 松针褐斑病菌能产生致萎毒素, 这种毒素具分子量小, 极性大, 热稳定性等特点。用 ESR 波谱仪和气相色谱仪研究松针愈伤组织细胞膜对毒素的反应, 结果表明: 松针褐斑病菌毒素 (LA-toxin) 诱使寄主细胞 4~7h 产生大量超氧阴离子自由基, 引发膜脂过氧化反应造成膜脂伤害。膜脂过氧化终