

杧果细菌性角斑病菌粗毒素的生物活性、理化特性及致病作用

张大智^{1,2}, 詹儒林¹, 柳凤^{1*}, 赵艳龙¹, 何衍彪¹, 常金梅¹

(¹中国热带农业科学院南亚热带作物研究所·农业部热带果树生物学重点实验室, 广东湛江 524091;

²海南大学环境与植物保护学院, 海口 570228)

摘要:【目的】探讨杧果细菌性角斑病菌粗毒素的生物活性、理化特性及其在致病过程中的作用, 以期明确该病菌的致病机制及病害防控提供有效依据。【方法】以‘台农一号’杧果叶片为试验材料, 利用离体叶片针刮法对其粗毒素生物活性进行了研究, 通过测定杧果叶片防御酶活性、可溶性蛋白含量、总糖含量和叶绿素含量的变化分析其对杧果的致病生理机制; 同时以不同培养液、培养时间、培养温度及培养液 pH 为条件, 对该菌产毒条件进行了优化。【结果】在 Watanabe 培养滤液中得到淡黄色粗毒素, 是一类具有热稳定性的非蛋白类物质。毒素对杧果叶片有浸解作用, 随着浓度的上升, 对杧果叶片的损伤程度不断加重, 形成的病斑与病原菌症状一致。生理生化研究发现粗毒素侵染杧果叶片后, 能激活杧果体内过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)、过氧化氢酶(CAT)和苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性。POD、PPO、CAT 与 PAL 分别在接种病菌 48、72、36 h 后达到顶峰, 酶活性分别是 965.33、8 456、1 341.13 和 4.02×10^4 U·g⁻¹·min⁻¹, 是健康叶片的 1.35、2.20、1.08 和 4.19 倍。可溶性蛋白含量、总糖含量随着处理时间的延长而显著升高, 叶绿素含量呈现相反的变化趋势, 随着处理时间的延长不断降低。毒素通过摇瓶震荡培养, 优化出病菌的最佳产毒条件是: Watanabe 培养液(pH 7~8), 24 °C 培养 120 h。【结论】因该粗毒素对杧果叶片产生明显的浸解作用, 表明其能改变细胞膜的通透性, 导致杧果叶片组织电解质的渗漏, 对叶片细胞膜具有损伤作用, 最终导致病害的发生。由此推断, 毒素可能属于非寄主专化性毒素(NHST), 同时可能是杧果细菌性角斑病菌的致病因子之一。

关键词: 杧果; 细菌性角斑病; 毒素; 酶活性; 致病作用

中图分类号: S667.7

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2017)06-0723-12

Biological activity, physical and chemical properties and pathogenic effect of crude toxic produced by pathogen causing mango bacterial leaf spot

ZHANG Dazhi^{1,2}, ZHAN Rulin¹, LIU Feng^{1*}, ZHAO Yanlong¹, HE Yanbiao¹, CHANG Jinmei¹

(¹South Subtropical Crop Research Institute, CATAS·Key Laboratory of Tropical Fruit Biology, Ministry of Agriculture, Zhanjiang 524091, Guangzhou, China; ²College of Environment and Plant Protection, Haikou University, Haikou 571737, Hainan, China)

Abstract: 【Objective】Mango (*Mangifera indica* L.) fruit is a popular and economically important fruit grown worldwide throughout the tropics and subtropics, due to its excellent qualities such as bright color, sweet taste and luscious flavor, and nutritional composition such as vitamins, minerals, fiber, and other phytochemical compounds. Mango bacterial leaf spot, a bacterial disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *Mangiferaeindicae*, is very difficult to control, and it usually becomes a limiting factor for mango industries while fungal disease and other pests can be managed at acceptable levels. It affects all aerial parts of the mango plant and can be very destructive in areas where high temperatures and rainfalls occur concomitantly. The bacterial pathogen can infect wounds and natural openings. Leaf and fruit symptoms

收稿日期: 2017-01-04 接受日期: 2017-03-28

基金项目: 海南省自然科学基金(20163109); 中央级非盈利性研究机构基本科研业务费研究专项(1630062014007); 农业行业科研专项(201203092-3)

作者简介: 张大智, 男, 硕士, 研究方向为植物细菌病害。Tel: 18789769058, E-mail: zhangdazhi102@163.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 13729009837, E-mail: liufengneau@163.com

are most common, but twig and branch cankers may occur when infection is severe. Leaf symptoms begin as small water-soaked spots delineated by veins, becoming raised, black, sometimes with a chlorotic halo. Several months after infection, leaf lesions dry and turn light brown ash-gray. In addition, fruit symptoms appear as small water-soaked spots on the lenticels. These spots later become star-shaped, erumpent and exude an infectious gum. Often, a “tear stain” infection pattern is observed on the fruit. Severe fruit infections will cause premature fruit drop. Less severe infections reduce fruit quality and allow entry of other pathogens. The mango bacterial leaf spot pathogen virulence factors include the cell wall degrading enzymes (CWDEs), toxins, extracellular polysaccharide and hormones, etc. The toxins are secreted by the plant pathogens outward role in plant cell walls or plant tissue. The purpose of this experiment was to explore the biological activities, physical and chemical properties of the crude toxin produced by pathogens and their pathogenic effects were studied during the disease developing based on the characteristics of the pathogen with the decomposition of the host tissue. This study aims to reveal the pathogenic mechanisms of toxin in the mango bacterial leaf spot, providing the basic theory of evidence for effective disease control. **【Methods】** ‘Tainong No.1’ mango leaves for the test material, the method of *in vitro* leaves needle scraping was used for the toxin biological activity assay. By measuring the change of mango leaves defense enzyme, soluble protein, total sugar and chlorophyll contents and analyzing it to the mango pathogenic physiological mechanisms. At the same time in different mediums, time, temperature and pH of the culture medium conditions were optimized. **【Results】** The filtrate liquid which was extracted in the Watanabe culture, was not a kind of toxin of protein substance which showed the most abilities. Under the 185–800 nm wavelength ultraviolet scanning, when the toxin concentration was 35%, the absorbance at 264 nm was the highest, OD_{264} was 2.933. Using fumaric acid (FUA) and succinic acid (SUA) as the prototypes, the samples in the 302 nm and 302 nm UV light have three yellow spots, the measured Rf value of FUA was 0.361, SUA was 0.944, the samples were 0.074, 0.097 and 0.542, and the contrast (methanol) was 0. What we learn from this is that the toxins have more than three types of organic acids, but not FUA and SUA. The mango bacterial leaf spot pathogen secretes crude toxin on the mango leaf cell membrane causing damage, with the increase of crude toxin concentration, the permeability of the mango leaf after retting reductive monosaccharide and relative conductivity also gradually rises. The assay of biological activity of the liquid showed it could induce the symptoms of mango bacterial leaf spot. Studies on the physiological and biochemical indexes of the crude toxin, showed that mango leaves were inoculated by crude toxin. The results also showed that the activities of peroxidase (POD), polyphenoloxidase (PPO), cate-lase (CAT) and phenylalanineammonialyase (PAL) were increased in the inoculated leaves. The POD activity increased significantly within 12 to 48 h after inoculation, POD reached its maximum level activity at $965.33 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ after inoculation for 48 h, while the control, inoculation mango leaves with culture medium without pathogen, the inoculation activity value was 1.35 times that of the control. PPO reached its maximum level activity at $5\ 354$ and $8\ 456 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ after inoculation for 24 and 72 h, which were 1.96 and 2.20 times that of the control. CAT and PAL reached their maximum level activity at $1\ 341.13$ and $4.02 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ after inoculation for 36 h, which were 1.08 and 4.19 times that of the control. After being sharply lower, PAL again reached its maximum level activity at $2.06 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ after inoculation for 60 h, which was 2.84 times that of the control. And the soluble protein and sugar content were significantly increased, while the content of chlorophyll decreased. After shaking the culture, the optimum conditions of producing toxin were as follows: Watanabe filtrate culture, pH value 7 to 8, 24 °C, 120 h. **【Conclusion】** The crude toxin obviously produced retting on the mango leaves, which shows that it can change cell membrane permeability, lead to the organization of mango leaf electrolyte leakage, and cause the damage effects of blade

cell membrane, eventually giving rise to the occurrence of diseases. The results indicate that the crude toxin is maybe one of the pathogenicity factors of mango bacterial leaf spot pathogen, which may belong to non-host specific toxins (NHST).

Key words: Mango; Bacterial leaf spot; Toxin; Enzyme activity; Pathogenic effect

芒果 (*Mangifera indica* L.) 为漆树科芒果属植物, 广泛种植于印度、中国、墨西哥、泰国、巴基斯坦及菲律宾等热带及亚热带国家(地区)^[1]。芒果细菌性角斑病(mango bacterial leaf spot) 1915年在南非首次报道, 随后在印度、巴基斯坦、巴西等国均有发生, 该病主要危害芒果叶片、枝条、花和果实等部位, 出现明显的“十字交叉”病斑^[2]。在我国被称为中国芒果之乡的田东县, 芒果细菌性角斑病造成的损失较为严重^[3], 在田东县新州芒果场, 凯特芒果的发病率为80.2%^[4]。植物病原细菌的致病因子主要包括酶、毒素、胞外多糖和激素等, 其中毒素(toxin)又称为攻击素(aggresins)、毒性物质(toxin substances)及植物毒素(phytotoxin), 是由植物病原菌分泌, 干扰寄主正常生理功能的一类化合物^[5]。引起植物症状的细菌毒素主要有2类, 一类是由假单胞菌引起的褪绿症状, 另一类是由欧文氏菌属、黄单胞菌属及棒形杆菌属引起的萎蔫症状。黄单胞菌属毒素分为水稻白叶枯病菌毒素和甘蔗白纹枯病菌毒素2类。毒素可导致寄主叶片组织内具有清除活性氧作用的防御酶系如过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)、过氧化氢酶(CAT)和苯丙氨酸解氨酶(PAL)的活性发生变化, 这是致病毒素入侵寄主后的明显反应之一^[6]。目前, 国内外学者在芒果细菌性角斑病病原菌的病原学^[7-8]、发病条件^[9]、致病因子^[10]、检测技术及防治方法^[11]上取得一些研究进展, 但并不能根除病害, 主要原因之一是病原菌的致病机制尚不清楚。芒果细菌性角斑病菌是否分泌的毒素以及毒素在病原菌致病过程中的作用目前尚无人探讨。笔者以‘台农一号’芒果叶片为试验材料, 初步探索芒果细菌性角斑病菌毒素的活性、产生条件和基本理化性质, 同时通过人工接种病菌毒素后, 比较接种与健康芒果叶片体内防御酶系活性变化的差异, 旨在阐明芒果细菌性角斑病菌毒素的生物活性、理化性质及作用机制, 为明确该病害的致病机制及病害防控提供有效依据。

1 材料和方法

1.1 材料

病原菌: 芒果细菌性角斑病菌野油菜黄单胞菌芒果致病变种 (*Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*), 为本试验分离获得, 编号为XCM07, 科赫氏法则验证其对芒果具有致病性。

主要培养基: 改良 Watanabe 培养液^[12]、Wakimoto 培养液^[13]、种子培养液和发酵培养液^[14]用于毒素的诱导。

植物材料: ‘台农一号’, 叶龄接近中期的健康植株。

1.2 病原菌培养及毒素的提取

菌株接种于100 mL Watanabe 液体培养基, 此时的液体培养基作为种子液, 28 ℃、130 r·min⁻¹恒温振荡培养, 48 h后按照3%的接种量转接于1 500 mL Watanabe 液体培养基, 28 ℃、130 r·min⁻¹恒温摇床振荡培养72 h, 8 000 r·min⁻¹离心20 min后取上清液。取6倍体积的丙酮浸泡浓缩液, 此浓缩液经50 ℃旋转蒸发为原体积的1/10, 摇均匀后放置过夜, 经46 ℃旋转蒸发除去浸泡液。将得到的液体pH调至7.0后加入等体积的氯仿, 抽提3次, 取水相, 将水相pH调至3.0后加入等体积的乙酸乙酯, 抽提3次, 收集乙酸乙酯相, 合并后于46 ℃旋转蒸发, 取2 mL无水乙醇溶解残留物得到粗毒素^[15]。

1.3 粗毒素生物活性的测定

用无菌水清洗新鲜芒果叶片, 消毒针轻刮叶片造成伤口, 取20 μL浓缩后的粗毒素(1.12 g·L⁻¹)接种于伤口处^[16], 以培养液和无水乙醇为对照, 置于28 ℃光照培养箱中培养, 24 h后观察叶片处理部位的发病情况。

1.4 芒果细菌性角斑病菌毒素的基本性质

芒果细菌性角斑病菌毒素的热稳定性、非蛋白和蛋白部分测定参考伏颖^[17]的方法, 生物活性检测采用离体叶片针刮法, 每处理3次重复, 3 d后观察叶片症状, 测量病斑直径(用直尺测量病斑扩展的宽度, 而不是指刮伤的长度), 比较病菌毒素热稳定性、非蛋白和蛋白部分的生物活性。取微量毒素稀释于95%(φ)乙醇中, 浓度分别为5%、15%、25%和35%, 对照采用95%乙醇, 用UV-1700(日本岛津)紫外分

光光度计于185~800 nm波长下进行紫外扫描。参考冯云程等^[12]的方法对病菌毒素组分进行分析。

1.5 毒素对杧果组织的浸解作用

选取0.5 g健康无病杧果叶片,用半径6.0 mm打孔器,沿其中脉两侧进行打孔,叶片饼用无菌水洗净后用无菌滤纸将其吸干,分别选取6个叶片饼置于装有5 mL毒素稀释液(质量浓度为0.07、0.14、0.28、0.56和1.12 g·L⁻¹)的6个试管中,减压抽气20 min后保温于28 ℃,在不同时间(0、12、24、36、48、60和72 h)取样测定,每个处理2次重复。对照采用无菌水,其余处理同上。参考杨媚等^[18]的方法,对叶片细胞膜的损伤率进行计算并记录。

1.6 杧果细菌性角斑病菌毒素对杧果组织生理指标的影响

1.6.1 植物材料处理 用无菌水洗净新鲜杧果叶片,用消毒针划伤杧果组织,将稀释毒素液接种其上,每个处理3次重复。以灭菌水为对照,于处理12、24、36、48、60和72 h后取样测定。

1.6.2 防御酶活性测定 参考伏颖^[17]的方法,对过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)、过氧化氢酶(CAT)和苯丙氨酸解氨酶(PAL)进行提取和酶活性测定,测定3次重复。POD活性以每min吸光度变化(ΔOD_{470})0.01为1个酶活力单位(U);PPO活性以 OD_{398} 每min增加0.01表示1个酶活力单位(U);CAT活性以 OD_{240} 每min减少0.01表示1个酶活力单位(U);PAL活性以 OD_{290} 每min增加0.01表示1个酶活力单位(U)。

1.6.3 可溶性蛋白质含量、总糖含量和叶绿素含量测定 可溶性蛋白质标准曲线制作采用Bradford^[19]的方法,用考马斯亮蓝G-250显色,标准蛋白质为牛血清白蛋白,595 nm处测紫外吸光值,记录并绘制标准曲线。参考高俊凤^[20]的方法,对样品可溶性糖进行提取和含量测定。以葡萄糖溶液为标样,取其稀释成一系列0~100 mg·L⁻¹的不同质量浓度溶液,用蒽酮硫酸比色法在625 nm处测定,然后绘制标准曲线。参考张志良等^[21]的方法对样品可溶性糖进行提取和含量测定。参考伏颖^[17]的方法,对杧果叶片叶绿素含量进行测定。

1.7 杧果细菌性角斑病菌产毒条件优化

将病菌接种于装有100 mL蔗糖蛋白胨液体培养基的三角瓶中作为种子液,28 ℃/130 r·min⁻¹恒温振荡培养,培养48 h的种子液按3%的接种量转接于

100 mL改良Watanabe、Wakimoto和发酵培养液(pH为7.0)中,于28 ℃、130 r·min⁻¹恒温振荡培养72 h,4 ℃下8 000 r离心20 min。上清液即为毒素滤液,对照为空白培养液。选用改良Watanabe培养液,将培养时间设为24、48、72、96、120和144 h。将培养温度设为20、24、28、32和36 ℃。用0.1 mol·L⁻¹盐酸和氢氧化钠将培养液pH值分别调至为5、6、7、8、9。分别收集毒素滤液,在杧果叶片上进行生物活性测定,每个处理3次重复,3 d后观察叶片症状,测量病斑直径(mm),对比不同培养液、培养时间、培养温度及不同培养液pH值对病菌产毒的影响。

1.8 统计分析

试验数据采用Excel2013软件作图,SAS 9.1.3软件进行数据统计分析,数据均3次重复,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义即有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 病原菌粗毒素生物活性

经过丙酮浸泡、氯仿和乙酸乙酯抽提蒸发,加入无水乙醇溶解,得到淡黄色粗毒素液体(图1)。通



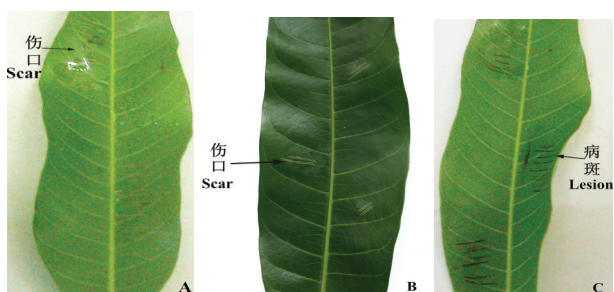
图1 液状毒素

Fig. 1 Liquid toxin

过离体叶片针刮法测定粗毒素生物活性,结果表明,杧果细菌性角斑病菌毒素可使叶片出现明显病斑,与病原菌所致病状相似,即处理的杧果叶片出现不同程度的水渍状黑褐色病斑,而以培养液和无水乙醇为对照,无明显病斑产生(图2)。

2.2 杧果细菌性角斑病菌毒素的基本性质

2.2.1 热稳定性测定 杧果细菌性角斑病菌毒素经60、80和100 ℃分别处理30、60、120和180 min后的毒素活性变化不明显,通过叶片针刮法测定病斑的直径为0.97~1.61 mm,与对照均无显著差异(表1)。



A. 培养液; B. 无水乙醇; C. 粗毒素。

A. Culture solution; B. Absolute alcohol; C. Crude toxin.

图2 对照和粗毒素处理针刮创伤杧果叶片的症状
Fig. 2 Needle row trauma symptoms of mango leaves treated with the control and crude toxin treatment

表1 毒素的热稳定性

Table 1 Thermal stability of toxin

温度 Temperature/°C	处理时间 Treatment time/min	病斑直径 Lesion diameter/mm
60	30	1.24
	60	1.61
	120	1.61
	180	1.45
80	30	0.91
	60	1.51
	120	1.42
	180	0.97
100	30	1.42
	60	1.33
	120	1.61
	180	1.10
对照 Control		1.61

蛋白类物质受热变性活性减弱,而杧果细菌性角斑病菌毒素经加热处理后活性没有降低,说明其具有热稳定性。

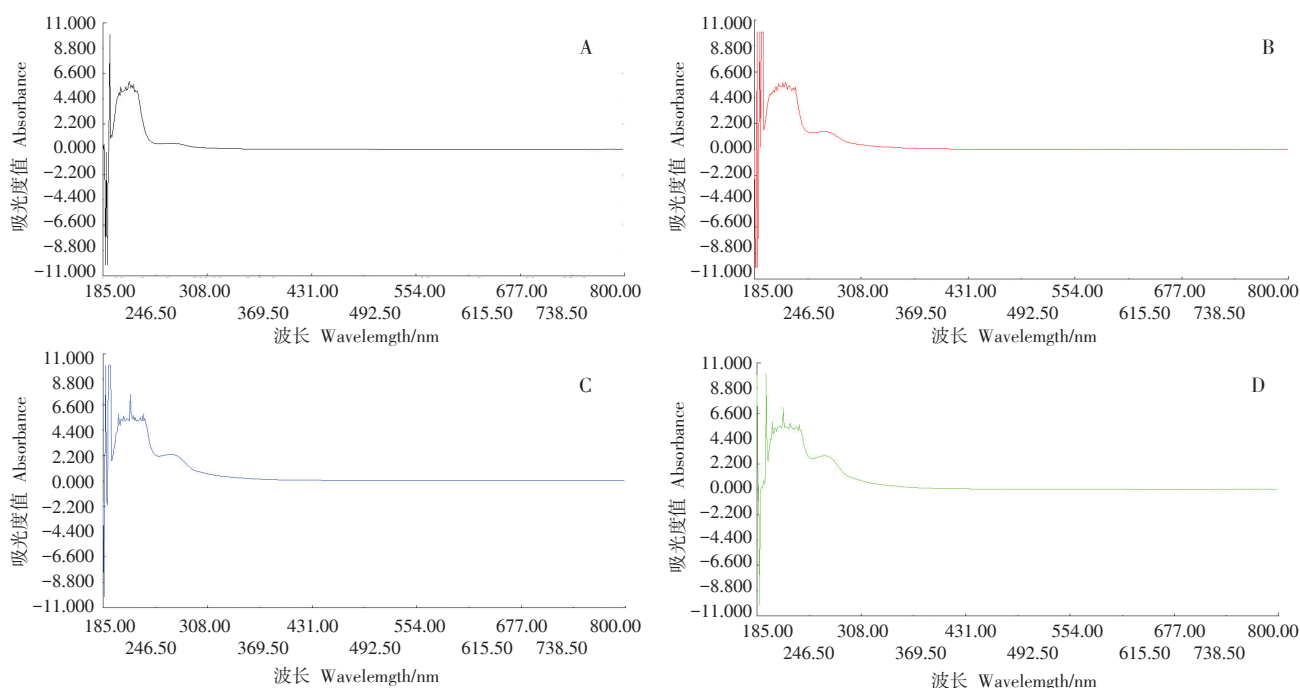
2.2.2 非蛋白和蛋白部分病菌毒素测定 杧果细菌性角斑病菌毒素的非蛋白部分测定的病斑直径为1.28 mm,与对照测定的活性接近,但蛋白部分活性较低,测定的病斑直径仅为0.94 mm(表2)。从而得知该病菌毒素是非蛋白类物质。

表2 毒素的非蛋白和蛋白部分活性测定

Table 2 Activity determination of protein and nonprotein components of toxin

样品处理 Sampling treatment	病斑直径 Lesion diameter/mm
蛋白部分 Protein part	0.94
非蛋白部分 Nonprotein part	1.28
对照 Control	1.61

2.2.3 紫外吸收光谱扫描 杧果细菌性角斑病菌毒素浓度5%、15%、25%和35%分别在185~800 nm波长下进行紫外扫描,试验结果见图3。随着毒素浓度的增加,在264 nm处的吸收峰逐渐上升。但毒素浓度为35%时,264 nm处的吸收峰最大,OD₂₆₄=2.933。



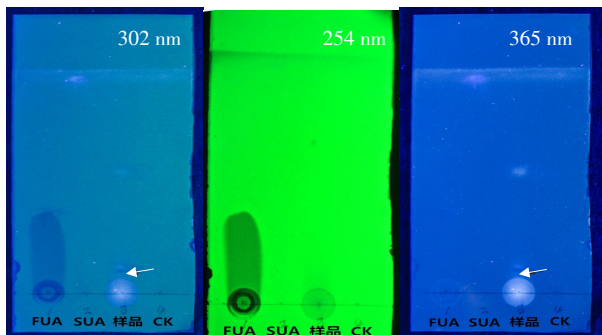
A. 毒素浓度5%; B. 毒素浓度15%; C. 毒素浓度25%; D. 毒素浓度35%。

A. Toxin concentration 5%; B. Toxin concentration 15%; C. Toxin concentration 25%; D. Toxin concentration 35%.

图3 病菌毒素紫外吸收光谱

Fig. 3 Ultraviolet absorption spectrum of toxins

2.2.4 粗毒素组成分分析 以延胡索酸(FUA)和琥珀酸(SUA)作为标样, 芒果细菌性角斑病菌毒素通过薄层层析, 点样板依次在紫外302、254和365 nm下进行检测, 样品在302和365 nm紫外光下有3个呈黄色的斑点(图4)。测得的Rf值FUA为0.361, SUA为0.944, 样品为0.074、0.097和0.542, 对照为0。因此推断出, 芒果细菌性角斑病菌毒素有3种以上的有机酸类, 但并非延胡索酸和琥珀酸。



箭头表示淡黄斑。The arrows indicate light macular.

图4 薄层层析紫外显色

Fig. 4 TLC ultraviolet coloring

2.3 芒果细菌性角斑病菌毒素对芒果组织生理指标的影响

2.3.1 防御酶系活性测定 (1) 病菌毒素对过氧化物酶(POD)活性的影响。芒果叶片组织经过病菌毒素处理后过氧化物酶活性的动态变化见图5-A。接种病菌毒素后芒果叶片组织内的POD酶在12~48 h显著上升, 并于处理48 h时达到酶活性高峰, 酶活为 $965.33 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 此时的酶活性是健康叶片的1.35倍。健康叶片在12 h时POD酶活性为 $340.66 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 此时活性略高于处理, 但之后的整个测定期间酶活性始终低于接种处理的POD活性。

(2) 病菌毒素对多酚氧化酶(PPO)活性的影响。PPO酶活性于接种后开始上升(图5-B)。接种24和72 h时达到酶活性高峰分别为 5354 和 $8456 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 是健康叶片的1.96和2.2倍。在处理36 h时PPO活性略低于对照, 但差异不明显。在48~72 h内酶活性上升, 处理显著高于健康叶片。

(3) 病菌毒素对过氧化氢酶(CAT)活性的影响。接种病菌毒素后CAT活性变化显著(图5-C),

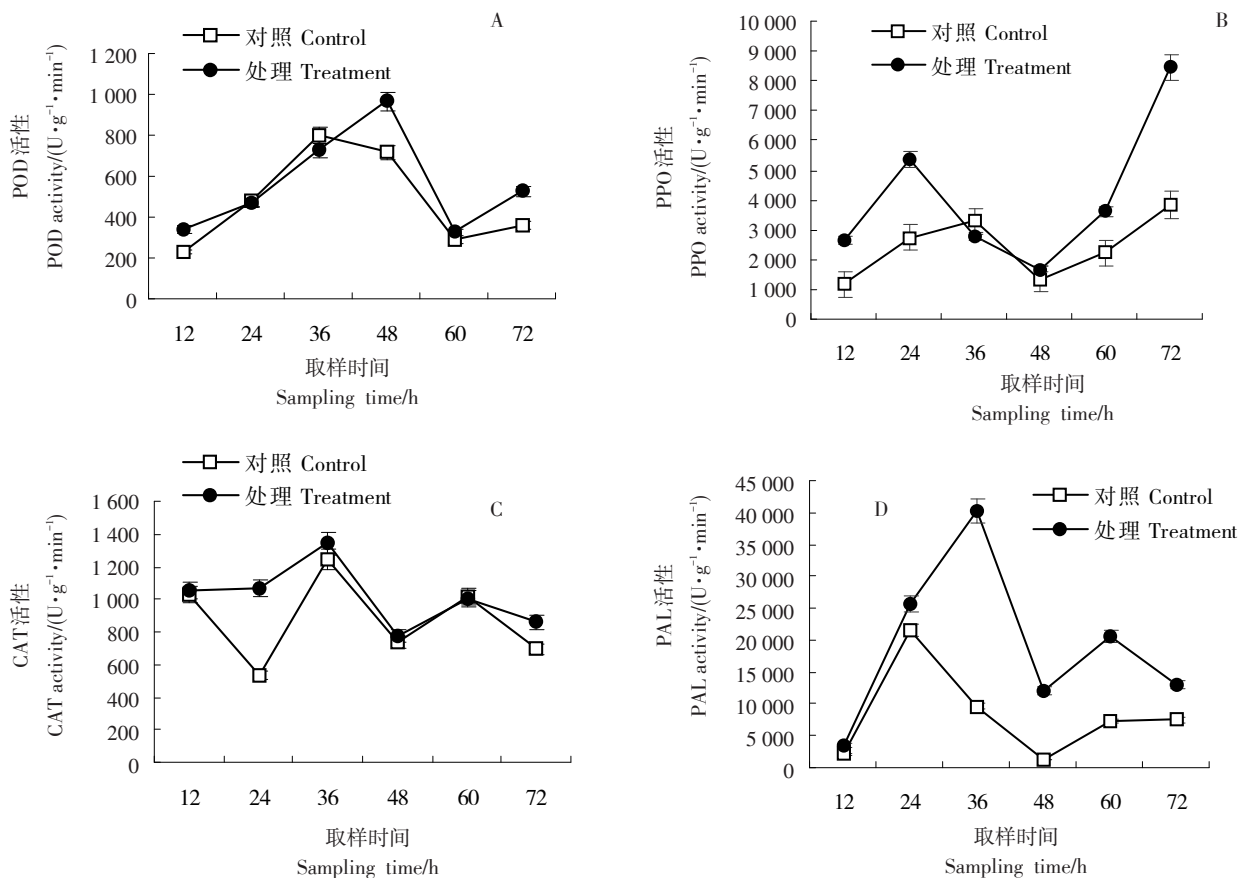


图5 毒素对芒果叶片防御酶系活性的影响

Fig. 5 Effect of toxins on defensive enzymes activity of mango leaves

杧果组织内的CAT酶显著上升,在36 h时达到酶活性高峰,酶活性值为 $1\,341.13\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$,是健康叶片的1.08倍。之后酶活性逐渐降低,在60 h时与健康叶片无显著差异性,在整个测定期间,CAT酶活性变化不稳定。

(4)病菌毒素对苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的影响。PAL酶活性变化的测定结果见图5-D。接种病菌毒素后PAL酶活性显著升高,在36和60 h时出现酶活性高峰,分别为 4.02×10^4 和 $2.06\times 10^4\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$,是健康叶片的4.19和2.84倍,之后酶活性逐渐降低,由此可见,病菌毒素能引起寄主体内的PAL活性上升,PAL能产生一系列的过敏性反应,使病菌毒素对寄主的伤害降到最低。

2.3.2 可溶性蛋白质含量测定 采用Bradford的方法测得牛血清白蛋白标准曲线(图6),可用于蛋白含量测定,其相关系数为0.994 5。病菌毒素接种杧果叶片后体内可溶性蛋白质含量变化见图7。在处理12~48 h内,可溶性蛋白含量显著上升,到48 h时

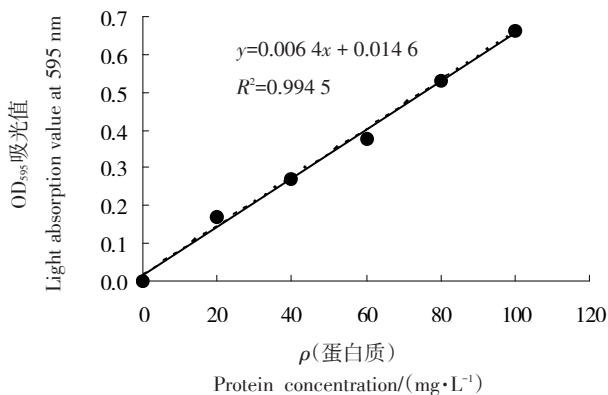


图6 可溶性蛋白质标准曲线
Fig. 6 Standard curves of soluble protein

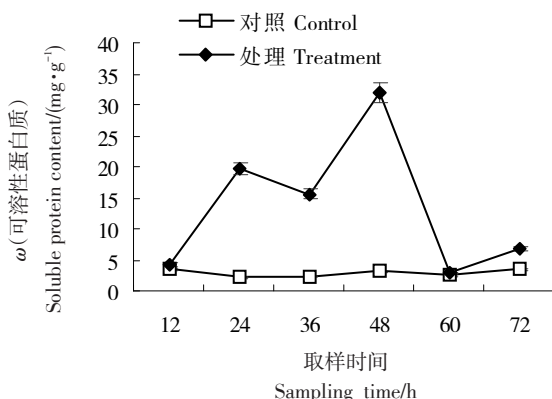


图7 毒素对杧果叶片可溶性蛋白质含量的影响
Fig. 7 Effect of toxin on soluble protein content of mango leaves

达到最大值,蛋白质质量分数为 $32.03\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,是健康叶片的10.37倍。在48~60 h内,蛋白质质量分数急剧下降,到60 h时仅为 $2.90\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,此时与健康叶片无显著性差异。

2.3.3 可溶性总糖含量测定 采用蒽酮硫酸法测得葡萄糖标准曲线如图8,可用于可溶性总糖含量测定,其相关系数为0.997。病菌毒素接种杧果叶片后体内可溶性总糖含量动态变化见图9。处理12 h后可溶性总糖含量显著升高,在24~36 h内总糖含量下降,之后上升到与对照含量差异不显著的水平。在60 h后总糖含量缓慢下降,在整个测定过程中,对照的含量始终高于病菌毒素处理的。

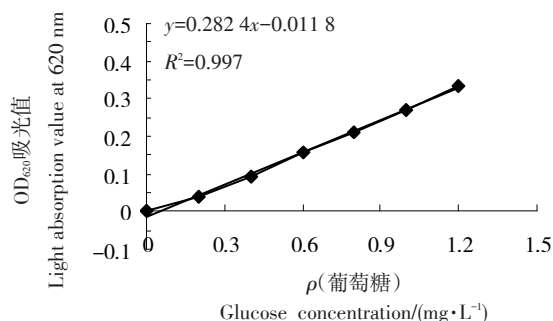


图8 葡萄糖标准曲线
Fig. 8 Standard curves of glucose

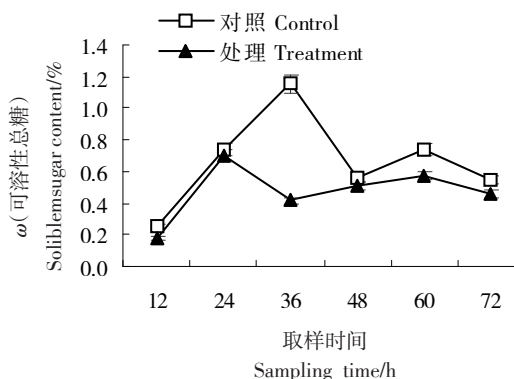


图9 毒素对杧果叶片可溶性总糖含量的影响
Fig. 9 Effect of toxin on soluble sugar content of mango leaves

2.3.4 叶绿素含量测定结果 病菌毒素接种杧果叶片后叶绿素含量的动态变化见图10。在12~36 h内叶绿素含量有缓慢上升,但与健康叶片差异不显著。处理36 h后,叶绿素质量分数急剧降低,仅为 $1.17\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,此时是健康叶片的0.9倍。由此说明,病菌毒素能抑制寄主叶绿素的合成或对叶绿体有破坏作用。处理48 h后叶绿素含量缓慢上升至与健康叶片一致水平。

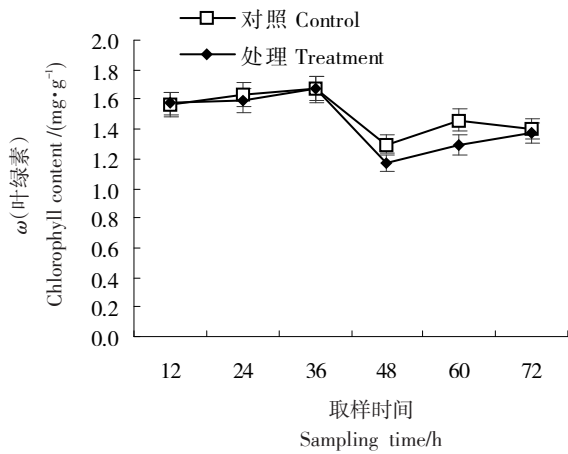


图 10 毒素对杧果叶片叶绿素含量的影响

Fig. 10 Effect of toxin on chlorophyll content of mango leaves

2.3.5 病菌毒素对杧果叶片的浸解作用测定 为进一步研究病菌毒素对杧果叶片组织的破坏作用,将毒素原液稀释成5个质量浓度梯度,分别为0.07、0.14、0.28、0.56和1.12 g·L⁻¹,分别测定了叶片浸解后的相对电导率。叶片经质量浓度为1.12 g·L⁻¹的病菌毒素处理后,在12 h时其相对电导率为71.32%,与其他处理和对照有区别。经质量浓度为0.07 g·L⁻¹的病菌毒素处理后,其相对电导率为23%,与健康叶片接近(图11)。说明随着病菌毒素浓度的增加,其相对电导率也逐渐上升,对杧果叶片组织的破坏程度加重。

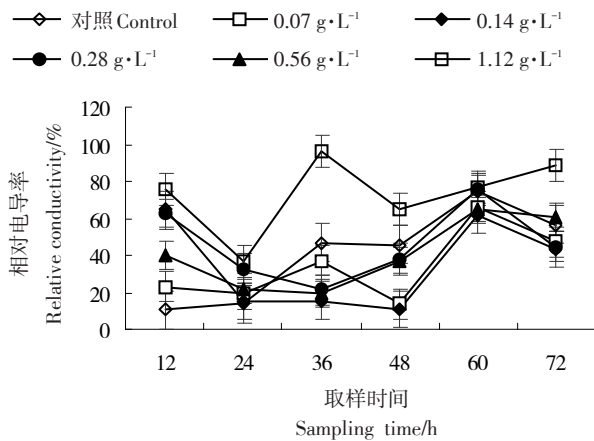


图 11 毒素对杧果叶片的浸解作用

Fig. 11 Maceration effects of cell wall degrading enzymes on mango leaves

2.4 杧果细菌性角斑病菌产毒条件的优化

培养液对病菌产毒影响见图12-A,病菌在3种培养液中均能产生毒素,其中改良的Watanabe培养液产毒能力最强,通过叶片针刮法测定病斑直径为

4.22 mm, Wakimoto 培养液和发酵培养液测定的病斑直径分别为2.08 mm和2.55 mm。因此,Watanabe培养液对病菌产毒效果最好。

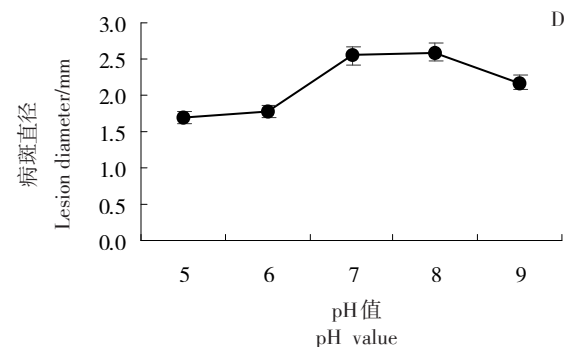
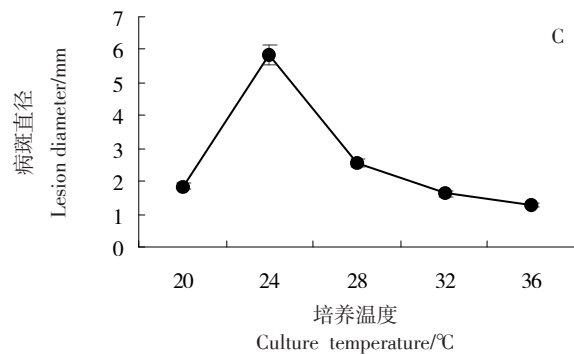
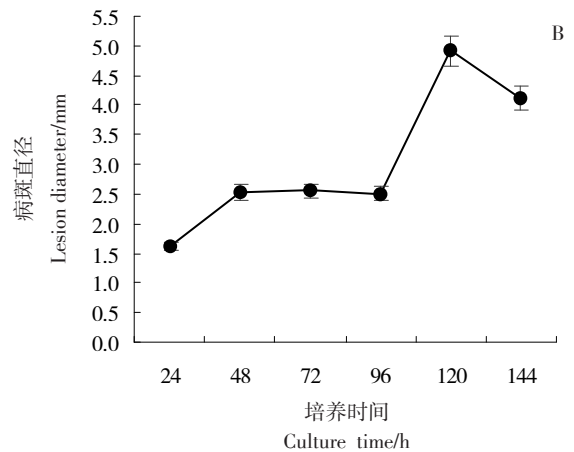
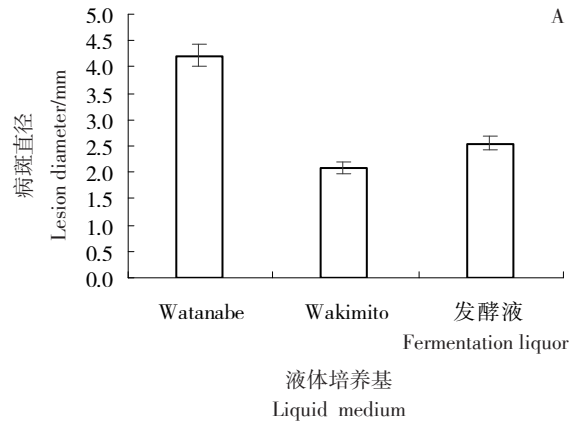


图 12 不同因素对病菌产毒的影响

Fig. 12 Effect of different factors on production of toxin

培养时间对病菌产毒能力有一定的影响,在培养0~144 h时,杧果细菌性角斑病菌产生的毒素均能使杧果叶片致病。病菌在改良的Watanabe培养液中28℃培养24 h后测得的病斑直径为1.62 mm。随着培养时间的延长,产毒能力逐渐加强,测得的病斑直径也逐渐增加。当培养时间为120 h时,病菌产毒能力达到最大,测得的病斑直径为4.91 mm,之后随着反应时间的延长产毒能力逐渐降低(图12-B)。由此可见,病菌产毒最适培养时间为120 h。

培养温度对病菌产毒能力的影响也有所差异,病菌在20~36℃内均有毒素产生(图12-C)。在20℃时测得的病斑直径为1.62 mm,随着培养温度的上升,病斑直径逐渐增加,当培养温度达到24℃时,病菌产毒能力最强,病斑直径为5.87 mm。随后产毒能力开始下降,在28℃时测得的病斑直径为2.55 mm,但培养温度达至36℃时测得的病斑直径仅为1.26 mm。因此,培养温度在24~28℃范围内适合病菌产毒。

病菌在培养液pH为5~9时均有毒素产生。培养液pH为5~6时病菌产毒能力较弱,病斑直径分别为1.70和1.78 mm;当pH上升为7~8时,病菌产毒能力最大,病斑直径分别为2.55和2.59 mm。随着pH的上升,病菌产毒能力逐渐减弱,在培养液pH为9时,测得的病斑直径仅为2.19 mm(图12-D)。由此可见,在试验的pH范围内,病菌产毒最适的培养液pH为7~8。

上述结果说明,杧果细菌性角斑病菌在Watanabe培养液、pH 7~8,24℃培养120 h后产毒能力最强。

3 讨论

本试验通过将杧果细菌性角斑病菌在Watanabe培养液72 h后,取滤液经丙酮浸泡,氯仿和乙酸乙酯抽提,再经过旋转蒸发去除有机相,残留物加入无水乙醇溶解,获得淡黄色粗毒素液体,此粗毒素可使健康杧果叶片产生不同程度的水渍状黑褐色病斑。赵艳琴等^[22]研究发现,烟草靶斑病菌(*Rhizoctonia solani*)粗毒素可使烟草叶片组织坏死,产生具有同心轮纹并伴有退绿色晕圈的病斑。Vidhyasekaran等^[23]和徐敬友等^[24]报道水稻纹枯病菌毒素可引起水稻叶片组织坏死,形成典型纹枯症状。黄秀萍^[25]采用离体叶圆片浸渍法和针刺法均证明雷公藤角斑病

菌(*Pseudocercospora elaeodendri*)毒素对寄主有毒害作用。史洁^[26]用离体叶片针刺法对马铃薯早疫病病菌(*Alternaria solani*)毒素滤液进行生物测定,发现处理48 h后马铃薯叶片产生了与标样菌株(NE0807)感染后类似的病斑。纪兆林等^[27]用小麦纹枯病菌(*Rhizoctonia cerealis*)毒素处理的叶鞘出现与病斑非常相似的症状,且能使处理的叶鞘褪绿黄化。本试验结果与前人研究一致,共同说明植物病原菌毒素能使寄主产生特定症状反应,在植物病害发生、发展过程中具有明显的致毒作用,是一类重要的致病因子。

植物病原菌毒素按对寄主植物特异性作用的不同可分为2类^[28]。第一类为寄主专化性毒素(HST),是指只对感病寄主表现毒性,而对抗性寄主或非寄主植物不表现毒性。目前,已有9个属的21种植物病原菌产生此类毒素,已有15种毒素的化学结构被确定。主要产生的种类有AK、AM、AF和ACT等毒素,分别由链格孢属(*Alternaria*)中菊链格孢、苹果链格孢、草莓黑斑病菌的簇生链格孢和柑橘链格孢橘致病变种产生。另外,HV、HC、HS、HMT等毒素分别由长蠕孢属(*Helminthosporium*)中维多利亚长蠕孢菌、炭色长蠕孢1号小种、甘蔗长蠕孢霉和玉米长蠕孢霉T小种等产生^[29]。第二类为非寄主专化性毒素(NHST),是指对寄主影响表现为非选择性。NHST对寄主植物的作用强度与品种抗性有关,没有特异性的靶位点,一部分NHST不破坏整个膜体系而引起胞内电解质渗漏;另一部分则破坏线粒体、叶绿体等细胞器和亚细胞器结构,引起一系列超微结构的变化;还有一部分毒素虽为非寄主专化性的,但对抗感品种的差异也很明显。迄今为止,已发现60多种NHST,主要有镰刀菌毒素、长蠕孢菌毒素、交链孢菌毒素、尾孢菌毒素等^[30]。郑磊等^[31]以感抗杧果品种‘红杧6号’(抗病品种)、“贵妃杧”(感病品种)为材料,测定结果发现杧果叶片感染杧果细菌性角斑病菌后,其体内超氧阴离子(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)、可溶性总糖含量、还原糖含量、游离氨基酸含量的变化与杧果抗性呈正相关。本试验通过杧果细菌性角斑病菌粗毒素处理‘台农一号’(抗病品种)后,测定相关抗性酶活性的动态变化,从而明确其对杧果生理生化指标的影响。从试验结果看来,杧果叶片POD活性表现出先上升后下降的趋势,在整个测定期间普遍高于健康叶片水平;而PPO和CAT活性高于健康叶片水平,并表现出波动性。这表明病菌粗毒素

可能诱发杧果叶片细胞活性氧爆发, POD、PPO 和 CAT 活性升高可清除机体内的活性氧, 但由于毒素处理的时间过长, 大量的活性氧导致 POD 活性开始下降, 同时对细胞具有损伤作用。这与伏颖等^[32]和史俊卿等^[33]用烟草靶斑病菌粗毒素和立枯丝核菌毒素处理烟草叶片和人参幼苗后, 测定机体内 POD、PPO 和 CAT 活性的变化, 纪兆林等^[27]测定低浓度小麦纹枯病菌(*Rhizoctonia cerealis*)毒素对寄主防御酶活性变化的结果基本一致。另外, 本次试验结果还发现, 经此病菌毒素处理的杧果叶片 PAL 活性高于健康叶片, 出现 2 个酶活性高峰, 与 Ramalingam^[34]发现水稻立枯丝核菌毒素能激发寄主体内 PAL 酶活性上升, 同时该毒素能破坏细胞膜的通透性^[35]; 马春红等^[36]采用玉米叶片被玉米小斑病菌 T 小种致病毒素处理后, 体内 PAL 酶活性显著升高的研究结果相似。以上研究共同说明了病菌毒素对寄主体内的 PAL 活性有诱导作用, 可能与细胞内大量积累的酚类物质使细胞组织遭到破坏有关。进一步研究发现, 接种病菌毒素后, 在 12~36 h 机体内可溶性蛋白质含量、可溶性总糖含量上升, 但在 36 h 后快速下降, 与台莲梅^[37]用大豆根腐病菌(*Fusarium oxysporum*)毒素处理大豆幼根, 冯洁等^[38]和王建明等^[39]用枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *niveum*)接种寄主后, 测定的结果相似。这可能是由于随着毒素作用时间的延长, 破坏了植株体内的正常代谢, 进而抑制了蛋白质的合成; 同时, 可溶性总糖被分解成单糖, 为合成某些抵抗毒素的物质提供原料, 但关于毒素可溶性糖和蛋白质种类以及对杧果致病的活性结构还需进一步研究。另外, 在 36~48 h 机体内叶绿素含量急剧降低, 与李萌^[40]和徐艳^[41]的研究结果相似, 可能是病菌毒素能抑制寄主叶绿素的合成或对叶绿体有破坏作用。同时, 杧果叶片组织浸出液的相对电导率随处理时间的延长和毒素浓度的增加而升高, 这与伏颖^[17]和赵杰等^[42]分别用烟草靶斑病菌毒素和烟草镰刀菌对寄主细胞膜透性的影响结果基本一致, 表明毒素能改变细胞膜的通透性, 导致杧果叶片组织电解质的渗漏, 对叶片细胞膜具有损伤作用, 最终导致病害的发生。由以上研究结果可以推测, 杧果细菌性角斑病菌粗毒素可能属于 NHST, 因 HST 只对感病寄主表现毒性, 而对抗性寄主或非寄主植物不表现毒性。同时, NHST 可以引起胞内电解质渗漏, 破坏线粒体、叶绿体等细胞器

和亚细胞器结构, 引起一系列寄主生理生化指标的变化。本研究证明了杧果细菌性角斑病菌粗毒素的致病性, 初步明确了该病菌的理化特性、产毒条件及致病机制, 为进一步深入研究其活性组分及利用毒素进行抗病品种筛选打下了重要基础。

参考文献 References:

- [1] GAGNEVIN L, PRUVOST O. Epidemiology and control of mango bacterial black spot[J]. Plant Disease, 2001, 85(9): 928-935.
- [2] 詹儒林. 杧果主要病虫害诊断与防治原色图谱[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011:10-12.
ZHAN Rulin. Diagnosis and treatment of the primary mango diseases and insect pests[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2011:10-12.
- [3] 刘晓妹, 刘文波, 范秀利. 杧果细菌性黑斑病生防菌的筛选及防效测定[J]. 中国生物防治, 2006(S1): 94-97.
LIU Xiaomei, LIU Wenbo, FAN Xiuli. Screening of biocontrol bacteria and measurement of control effect against mango bacterial black spot[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2006(S1): 94-97.
- [4] 岑忠保, 潘启城, 黄继庆, 阮和富, 赵伟. 田东县杧果黑斑病发生与防控措施[J]. 广西植保, 2012, 25(1): 24-25.
CEN Zhongbao, PAN Qicheng, HUANG Jiqing, RUAN Hefu, ZHAO Wei. Occurrence and prevention and control measures against mango bacterial black spot on Tiandong county[J]. Guangxi Plant Protection, 2012, 25(1): 24-25.
- [5] GOODMAN R N, WHITE J A. Xylem parenchyma plasmolysis and vessel wall disorientation caused by *Erwinia Amylovora*[J]. Phytopathology, 1981, 71(8): 844-852.
- [6] 陈利锋, 徐敬友. 农业植物病理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011.
CHEN Lifeng, XU Jingyou. Plant pathology in agriculture[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2011.
- [7] 文衍堂, 黄圣明. 杧果细菌性黑斑病症状与病原鉴定[J]. 热带作物学报, 1994, 15(1): 79-85.
WEN Yantang, HUANG Shengming. Symptoms and pathogen identification of bacterial black spot of mango (*Mangifera indica* L.) [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 1994, 15(1): 79-85.
- [8] PRUVOST O, COUTEAU A, PERRIER X, LUISETTI J. Phenotypic diversity of *Xanthomonas* sp. *mangiferaeindicae*[J]. Journal of Applied Microbiology, 1998, 84: 115-124.
- [9] 何汉生, 董春, 朱彬年, 岑湘云, 莫耀仲. 杧果细菌性黑斑病的发生与防治研究初报[J]. 广东农业科学, 1996(6):35-37.
HE Hansheng, DONG Chun, ZHU Binnian, CEN Xiangyun, MO Yaozhong. Occurrence and control of mango bacterial black spot report[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 1996(6):35-37.
- [10] 张大智, 詹儒林, 柳凤, 李国平, 赵艳龙, 常金梅. 杧果细菌性角斑病菌细胞壁降解酶的致病作用[J]. 果树学报, 2016, 33(5): 585-593.

- ZHANG Dazhi, ZHAN Rulin, LIU Feng, LI Guoping, ZHAO Yanlong, CHANG Jinmei. Pathogenic effect of cell wall degrading enzymes produced by pathogen causing mango bacterial leaf spot[J]. Journal of Fruit Science, 2016, 33(5): 585-593.
- [11] SANDERS G M, VERSCHOOR J A, WYNGAARD S V, KORTSTEN L, KOTZE J M. Production of monoclonal antibodies against different strains of *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* and detection methods and their use to investigate differences in virulence[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1994, 77(5): 509-518.
- [12] 冯云程, 阿新祥, 刘自单, 张斐斐, 董超, 杨雅云, 张恩来, 汤翠凤, 徐福荣, 戴陆园. 云南高原梗稻白叶枯病菌毒素及其与致病性关系[J]. 植物病理学报, 2013, 43(6): 622-629.
- FENG Yuncheng, A Xinxiang, LIU Zidan, ZHANG Feifei, DONG Chao, YANG Yayun, ZHANG Enlai, TANG Cuifeng, XU Furong, DAI Luyuan. Toxin produced by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* of Japonica rices in Yunnan plateau and its relationship with pathogenicity[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2013, 43(6): 622-629.
- [13] 邵敏, 王金生. 水稻白叶枯病菌毒素的分离, 生物测定及化学成分初步分析[J]. 植物病理学报, 1997, 27(4): 315-320.
- SHAO Min, WANG Jinsheng. Extraction, bioassay and composition analysis of the toxin from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1997, 27(4): 315-320.
- [14] 孙自玲. 黄单胞菌 L4 毒素抑制杂草的作用机理研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2003.
- SUN Ziling. Action mechanism of *Xanthomonas* L4 phytotoxin for weed control[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2003.
- [15] NODA T, SATO Z, KOBAYASHI H, IWASAKI S, OKUDA S. Isolation and structural elucidation of phytotoxic substances produced by *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* (Ishiyama) dye[J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 1980, 46(5): 663-666.
- [16] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 65.
- FANG Zhongda. Research methods of plant diseases[M]. Beijing: China Agricultural Press, 1998: 65.
- [17] 伏颖. 烟草靶斑病菌遗传分化、侵染特性及致病机理研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2011.
- FU Ying. Studies on the genetic differentiation, infection characteristics and pathogenic mechanism of *Rhizoctonia solani*[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2011.
- [18] 杨媚, 杨迎青, 郑丽, 李明海, 周而勋. 水稻纹枯病菌细胞壁降解酶组分分析, 活性测定及其致病作用[J]. 中国水稻科学, 2012, 26(5): 600-606.
- YANG Mei, YANG Yingqing, ZHENG Li, LI Minghai, ZHOU Erxun. Component analysis, activity measurement and pathogenic effect of cell wall degrading enzymes from rice sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani*[J]. Chinese Journal of Rice Science, 2012, 26(5): 600-606.
- [19] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1): 248-254.
- [20] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- GAO Junfeng. The experimental guide for plant physiology[M]. Beijing: Higher Education Press, 2006.
- [21] 张志良, 伟菁. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003.
- ZHANG Zhiliang, WEI Jing. The experimental guide for plant physiology[M]. Beijing: Higher Education Press, 2003.
- [22] 赵艳琴, 伏颖, 赵秀香, 陈建光, 孙浩, 吴元华. 烟草靶斑病菌 (*Rhizoctonia solani*) 粗毒素的生物活性及理化性质[J]. 烟草科技, 2013(4): 81-84.
- ZHAO Yanqin, FU Ying, ZHAO Xiuxiang, CHEN Jianguang, SUN Hao, WU Yuanhua. Biological activity, physical and chemical properties of crude toxin of *Rhizoctonia solani* [J]. Tobacco Science & Technology, 2013(4): 81-84.
- [23] VIDHYASEKARAN P, PONMALAR T R, SAMIYAPPAN R, VELAZHAHAN R, VIMALA R, RAMANATHAN A, PARANIDHARAN V, MUTHUKRISHNAN S. Host-specific toxin production by *Rhizoctonia solani* the rice sheath blight pathogen[J]. Phytopathology, 1997, 87(12): 1258-1263.
- [24] 徐敬友, 张华东, 张红, 童蕴慧, 徐艳, 陈夕军, 纪兆林. 立枯丝核菌毒素的产生及与致病力的关系[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2004, 25(2): 61-64.
- XU Jingyou, ZHANG Huadong, ZHANG Hong, TONG Yunhui, XU Yan, CHEN Xijun, JI Zhaolin. Toxin produced by *Rhizoctonia solani* and its relationship with pathogenicity of the fungus[J]. Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition), 2004, 25(2): 61-64.
- [25] 黄秀萍. 雷公藤角斑病菌的毒素提取及致病机理的初步研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
- HUANG Xiuping. Preliminary studies on production conditions and pathogenic mechanism of toxin of *Pseudocercospora elaeodendri*[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2012.
- [26] 史洁. 马铃薯早疫病菌侵染过程及其粗毒素特性研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2010.
- SHI Jie. Study on infection process to potato and crude toxin characteristics of *Alternaria solani*[D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2010.
- [27] 纪兆林, 陈景鹏, 徐敬友, 陈夕军, 张清霞, 童蕴慧. 小麦纹枯病菌毒素对小麦植株的作用[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2011, 32(3): 55-59.
- JI Zhaolin, CHEN Jingpeng, XU Jingyou, CHEN Xijun, ZHANG Qingxia, TONG Yunhui. Effect of toxin produced by *Rhizoctonia cerealis* on wheat plant[J]. Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition), 2011, 32(3): 55-59.

- [28] 祁高富,杨斌,叶建仁. 植物病原真菌毒素研究进展[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2000,24(2): 66-70.
 QI Gaofu, YANG Bin, YE Jianren. Research advances on the toxin of the plant pathogenic fungus[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2000, 24(2): 66-70.
- [29] 何凡,范鸿雁,华敏. 植物病原毒素[J]. 热带农业科学,2006,26(3):70-76.
 HE Fan, FAN Hongyan, HUA Min. Phytopathogenic toxin[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2006, 26(3):70-76.
- [30] 王江柱,董金皋,王玉真. 非寄主专化性植物病原真菌毒素致病机制研究现状[J]. 河北农业大学学报,1995,18(4): 99-104.
 WANG Jiangzhu, DONG Jin'ao, WANG Yuzhen. Status on pathogenic mechanism of non-host specific toxins to plants[J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 1995, 18(4): 99-104.
- [31] 郑磊,詹儒林,柳凤,李国平,赵艳龙,常金梅,何衍彪. 芒果感染细菌性角斑病菌后的生理代谢变化[J]. 广东农业科学,2016,43(4):67-72.
 ZHENG Lei, ZHAN Rulin, LIU Feng, LI Guoping, ZHAO Yanlong, CHANG Jinmei, HE Yanbiao. Physiological metabolic changes of mango infected by bacterial leaf spot pathogen[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2016, 43(4):67-72.
- [32] 伏颖,赵艳琴,陈建光,赵秀香,吴元华. 烟草靶斑病菌毒素对烟草防御酶及丙二醛含量的影响[J]. 湖北农业科学,2013,52(3): 575-577.
 FU Ying, ZHAO Yanqin, CHEN Jianguang, ZHAO Xiuxiang, WU Yuanhua. Effects of crude toxin from *Rhizoctonia solani* on defensive enzyme activity and MDA content in tobacco seedling[J]. Hubei Agricultural Science, 2013, 52(3): 575-577.
- [33] 史俊卿,张浩,于红威,葛善欣,尹春梅. 立枯丝核菌毒素对人参防御酶活性及丙二醛含量的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2010,36(4): 434-436.
 SHI Junqing, ZHANG Hao, YU Hongwei, GE Shanxin, YIN Chunmei. Effects of *Rhizoctonia solani* toxin on defensive enzyme activity and MDA content in *Panax ginseng*[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences Edition), 2010, 36(4): 434-436.
- [34] RAMALINGAM P. Involvement of *Rhizoctonia solani* toxins in phenylalanine ammonia lyase and tyrosine ammonia lyase activities of rice tissues[J]. Current Science, 1986, 55(3): 157-159.
- [35] 康霄文,龙晓波,彭绍裘,陈捷,姚健民,刘维志,宋佐衡. 水稻纹枯病菌毒素初步研究[J]. 沈阳农业大学学报,1992,23(1): 19-22.
 KANG Xiaowen, LONG Xiaobo, PENG Shaoqiu, CHEN Jie, YAO Jianmin, LIU Weizhi, SONG Zuoheng. Preliminary study on toxin of *Rhizoctonia Solani* in rice sheath blight[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 1992, 23(1): 19-22.
- [36] 马春红,翟彩霞,王立安,陈霞,郭秀林,崔四平,李广敏. 玉米小斑病菌 T 小种培养滤液对玉米抗病性的诱导[J]. 中国农业科学,2005,38(8):1578-1584.
 MA Chunhong, ZHAI Caixia, WANG Li'an, CHEN Xia, GUO Xiulin, CUI Siping, LI Guangmin. Induced resistance by the filtration of *Bipolaris maydis* race T toxin cultivation[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2005, 38(8): 1578-1584.
- [37] 台莲梅. 大豆根腐病菌 (*Fusarium oxysporum*) 毒素及其对大豆根部致病作用的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2003.
 TAI Lianmei. Studies on *Fusarium oxysporum* toxin and its effects on soybean root[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2003.
- [38] 冯洁,陈其琰. 棉株体内几种生化物质与抗枯萎病之间关系的初步研究[J]. 植物病理学报,1991,21(4): 291-296.
 FENG Jie, CHEN Qiyang. On the biochemical substances in cotton plants related to the resistance to *Fusarium wilt*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1991, 21(4): 291-296.
- [39] 王建国,郭春绒,张作刚,贺运春,李文英. 西瓜不同品种苗期感染枯萎病菌后的生理生化变化[J]. 中国农业科学,2002,35(11): 1343-1348.
 WANG Jianming, GUO Chunrong, ZHANG Zuogang, HE Yunchun, LI Wenyang. Biochemical and physiological changes of different watermelon cultivars infected by *Fusarium oxysporum*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2002, 35(11): 1343-1348.
- [40] 李萌. 稻瘟菌粗毒素相关理化性质及致病机理研究[D]. 武汉:华中农业大学,2009.
 LI Meng. Research on the relevant physical and chemical properties and the pathogenic mechanism of *Magnaporthe grisea* crude toxin[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009.
- [41] 徐艳. 水稻纹枯病菌毒素的致病机理及对寄主防御酶活性的影响[D]. 扬州:扬州大学,2006.
 XU Yan. Pathogenic mechanism of *Rhizoctonia solani* toxin and its effects on activity of defensive enzymes in rice plants[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2006.
- [42] 赵杰,王静,李乃会,孔凡玉,张成省,冯超,夏艳. 烟草镰刀菌根腐病菌致病粗毒素的研究[J]. 植物保护,2013,39(3): 61-66.
 ZHAO Jie, WANG Jing, LI Naihui, KONG Fanyu, ZHANG Chengsheng, FENG Chao, XIA Yan. A study on the pathogenic crude toxin of the tobacco root rot extracted from *Fusarium sp.*[J]. Plant Protection, 2013, 39(3): 61-66.