

苹果树腐烂病菌致病因子及其与菌株致病性的关系

李 超, 李保华, 李桂舫, 王彩霞

(青岛农业大学 农学与植物保护学院, 山东省植物病虫害综合防控重点实验室, 山东 青岛 266109)

摘 要:以苹果树腐烂病菌强致病菌株 LXS080601 和弱致病菌株 LXS081501 为试材, 采用二硝基水杨酸(DNS)法和高效液相色谱法(HPLC)测定酶活性和毒素的差异, 以期探寻苹果树腐烂病菌不同致病力菌株产生酶和毒素的差异及其与菌株致病性的关系。结果表明: LXS080601 在树皮培养基和离体枝条中均产生 5 种毒素, 而 LXS081501 接种后仅检测到 3~4 种毒素, 且除培养基中产生的间苯三酚外, 其余毒素量均显著低于 LXS080601; 2 株菌株均可分泌 5 种细胞壁降解酶, 但酶活性存在显著差异, LXS080601 产生的酶活性显著高于 LXS081501, 且酶活性达到高峰时间较短; 说明腐烂病菌产生的酶活性、毒素种类和数量与菌株的致病性强弱呈正相关。

关键词:苹果树腐烂病菌; 毒素; 细胞壁降解酶; 致病性

中图分类号:Q 939.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)13-0118-05

苹果树腐烂病菌(*Valsa mali* var. *mali*)引起的腐烂病是苹果树上的一种毁灭性病害, 该病可造成果树主干及整树死亡, 甚至毁园, 造成了严重的经济损失^[1-2]。国家苹果产业体系 2008 年调查结果显示, 我国苹果树腐烂病的总体发病率为 52.7%, 部分地区发病率高达 85% 以上, 且病情呈不断蔓延的趋势^[3]; 该课题组成员 2011 年对烟台苹果产区腐烂病发生情况进行了调查, 发现旺盛结果期的苹果树具有新病疤的病株率为 68.20%, 且旧病斑复发率高达 60.29%, 严重威胁着当地苹果产业的发展^[4]。

植物病原菌产生的对寄主有害的物质统称为致病因子, 主要包括毒素、酶、激素及一些小分子物质等, 已有研究表明, 病原菌致病因子的量及其活性影响其致病力, 酶和毒素作为导致植物病害发生的重要因子越来越受到广泛关注^[5-8]。刘福昌等^[6]和王娟等^[7]研究发现, 苹果树腐烂病菌在寄主体内和活体外均可产生果胶酶, 且该酶液对番茄幼苗具有一定的浸解作用; 随后, 陈晓林等^[8]对腐烂病菌侵染致病过程中产生的酶类物质进行

了系统测定, 证实该病菌可分泌 5 种类型的细胞壁降解酶, 分别为纤维素酶、 β -葡萄糖苷酶、多聚半乳糖醛酸酶、果胶甲基半乳糖醛酸酶和木聚糖酶。日本学者 Natsume 等^[9]从腐烂病菌产毒素培养基和发病枝条中分离鉴定出 5 种化合物, 分别为对羟基苯甲酸、原儿茶酸、间苯三酚、对羟基苯丙酸和对羟基苯乙酮。目前, 对于腐烂病菌致病因子及其与菌株致病性的关系尚鲜见报道。

该研究以苹果树腐烂病菌不同致病力菌株为试材, 对其产生的细胞壁降解酶活性、毒素种类和数量进行测定, 旨在探寻不同菌株产生酶和毒素的差异及其与菌株致病力之间的关系, 以期对苹果树腐烂病菌致病机制研究和寻找新的病害防治方法提供有价值的参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

苹果树腐烂病菌强致病力菌株 LXS080601 采自山东栖霞商品“富士”苹果园, 弱致病力菌株 LXS081501 采自新疆乌鲁木齐“海棠”苹果, 由该课题组成员进行单菌丝分离后鉴定并保存^[8,10]。

生长健壮、长势一致的 1~2 年生“富士”秋季枝条, 采集自青岛农业大学胶州市示范园。

苹果树皮培养基^[9]: 1~2 年生“富士”枝条树皮组织 150 g, 蔗糖 40 g, 酵母提取物 2 g, pH 5.8, 定容至 1 000 mL, 按 100 mL/250mL 的装量瓶进行分装, 121℃ 灭菌 20 min, 备用。

高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); 超纯水仪(美国密里博); 旋转蒸发仪(瑞士 BUCHI 公司); 电子天平(美国梅特勒-托利多公司)。

主要试剂: 间苯三酚、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、对

第一作者简介:李超(1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向为果树真菌病害。E-mail: 547617964@qq.com.

责任作者:王彩霞(1977-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为果树病理学和分子植物病理学。E-mail: cxwang@qau.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31000891, 31272001); 国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS-28); 国家农业行业公益性资助项目(201203034-02); 山东省科技攻关计划资助项目(2010GNC10918); 山东省“泰山学者”建设工程专项经费资助项目。

收稿日期:2014-03-20

羟基苯丙酸和对羟基苯乙酮毒素的标准品,细胞壁降解酶底物橘皮果胶、木聚糖和羧甲基纤维素钠,纯度均大于 99.0%,购自美国 Sigma 公司。乙酸、甲醇、乙腈和乙酸乙酯等均为色谱纯(Fisher 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 细胞壁降解酶和毒素的体外诱导与提取 以苹果树腐烂病菌菌丝为初始状态进行接种。将保存的腐烂病菌菌株 LXS080601 和 LXS081501 接种于 PDA 培养基上,25℃暗培养 3 d 后,在菌落边缘打取直径 6 mm 的菌饼,接种于树皮液体培养基中,每瓶接种 6 个菌饼,25℃、150 r/min 条件下恒温振荡培养 15 d。粗酶液的提取参考陈晓林等^[8]的方法,培养液于 4℃条件下 12 000 r/min 离心 10 min,以所得上清液进行酶活性测定。毒素提取方法参考文献^[9]、^[11],取离心后的上清液用 1 mol/L HCl 调节 pH 至 3.0,加入等体积乙酸乙酯萃取 3 次,将有机相合并后置于 60℃下减压浓缩。待乙酸乙酯蒸干后用甲醇溶解蒸馏物,定容至 50 mL,样品经 0.22 μm 的有机相滤膜过滤后供 HPLC 测定分析。每试验设置 3 次重复。

1.2.2 苹果离体枝条的接种及致病因子的提取 选择长势良好且粗细一致的 1~2 年生“富士”苹果枝条,剪成 30~40 cm 的枝段,每枝条用电烙铁烫伤 4 处,将腐烂病菌 LXS080601 和 LXS081501 按 1.2.1 中描述的方法进行活化并打取直径 6 mm 的菌饼,以菌丝面贴在伤口处进行接种,密封保湿 48 h,于 25℃恒温 95%相对湿度下暗培养^[12]。定期观察枝条发病情况,并切取发病及病健交界处组织,每 5 g 发病组织作为 1 个重复,样品用液氮速冻后于 -80℃超低温冰箱保存。以接种 PDA 培养基的树皮组织作为对照,每试验设置 3 次重复。发病组织用液氮进行研磨,按 1:10 (w/v)加入预冷的酶提取液(50 mmol/L Tris-HCl,100 mmol/L KCl,pH 7.2),冰浴振荡 30 min 离心,上清液即为粗酶液^[8]。样品研磨后按 1:10 (w/v)加入 70%甲醇溶液进行毒素的提取,具体方法同 1.2.1 中描述。

1.3 项目测定

1.3.1 细胞壁降解酶活性测定 细胞壁降解酶活性测定采用紫外-可见分光光度法进行,具体步骤参考 Douaiher 等^[13]和 Siah 等^[14]报道,利用二硝基水杨酸(DNS)在 540 nm 处测定反应混合物的消光值,根据释放的还原糖量计算酶活性。其中,纤维素酶和 β-葡萄糖苷酶活性测定底物为 1%的羧甲基纤维素钠,木聚糖酶所用底物为 0.5%木聚糖,多聚半乳糖醛酸酶和果胶甲基半乳糖醛酸酶底物是 1%的橘皮果胶。酶活性单位为 50℃下每分钟每毫升酶液(每毫克酶蛋白)催化底物释放 1 μmol 还原糖(U/mL 或 U/mg 总蛋白质)。

1.3.2 毒素的 HPLC 测定 采用该课题组建立的高效

液相色谱法,对 5 种毒素同时进行测定。色谱条件为 RP-C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm),流动相:水溶液(A)、乙腈(B)、甲醇(C)和 0.1%乙酸(D);流速:0.5 mL/min;柱温:25℃;进样量:20 μL,采用梯度洗脱法进行洗脱。

1.4 数据分析

采用 SAS 8.0 对数据进行统计分析,用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性分析($P < 0.05$),利用 Sigma Plot 10.0 进行作图。

2 结果与分析

2.1 腐烂病菌在树皮培养基中产毒量比较

强致病菌 LXS080601 和弱致病菌 LXS081501 在富士树皮培养基中均可生长,但 LXS081501 菌丝生长速率快且生长量较大,培养 15 d 时,每 100 mL 培养基中平均菌丝干重为 2.23 g,而 LXS080601 的菌丝干重仅为 1.01 g。由表 1 毒素测定结果可知,接种 PDA 的树皮培养基中未检测到毒素,接种 LXS080601 后可检测到原儿茶酸、对羟基苯甲酸、对羟基苯乙酮、对羟基苯丙酸和间苯三酚 5 种毒素,而接种 LXS081501 检测到了除对羟基苯丙酸外的其它 4 种毒素,所检测到的毒素量均在培养 15 d 时达最大值。LXS080601 在树皮培养基中产生的毒素以间苯三酚量最大,为 3.29 mg/g,其次为原儿茶酸、对羟基苯丙酸、对羟基苯乙酮,而对羟基苯甲酸量最少,仅为 86.43 μg/g;LXS081501 产生的毒素也是间苯三酚量最多,高达 12.01 mg/g,原儿茶酸次之,对羟基苯乙酮和对羟基苯甲酸量较低。两菌株产生的毒素,除间苯三酚外,LXS080601 产生的毒素量均显著大于 LXS081501,前者产生原儿茶酸、对羟基苯甲酸和对羟基苯乙酮量分别是后者的 1.91、2.79 和 2.95 倍。由此可见,腐烂病菌不同致病力菌株在树皮培养基中产毒素种类和数量存在显著差异。

表 1 苹果树腐烂病菌 LXS080601 和 LXS081501 在树皮培养中产生的毒素(15 d)

Table 1 Toxins produced by *Valsa mali* strain LXS080601 and LXS081501 in apple bark medium(15 d)

毒素 Toxins	LXS080601 /μg·g ⁻¹ 菌丝酶	LXS081501 /μg·g ⁻¹ 菌丝酶
原儿茶酸 Protocatechuic acid	2 588.69±268.41 a	1 354.58±148.39 b
对羟基苯甲酸 <i>p</i> -hydroxybenzoic acid	86.43±16.48 a	31.02±1.72 b
对羟基苯乙酮 <i>p</i> -hydroxyacetophenone	217.28±30.84 a	73.64±8.42 b
对羟基苯丙酸 <i>p</i> -hydroxybenzene propanoic acid	1 165.51±113.79	—
间苯三酚 Phloroglucinol	3 294.68±412.36 b	12 012.34±935.67 a

注:表中数据为平均值±标准差。同行数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著,表中数据为菌丝干重所含的毒素量。

Note: Datas in the table are mean±SD. Different letters in the same line indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test. Datas in the table are toxins that was contained by the dry weight of mycelium.

2.2 腐烂病菌在树皮培养基中分泌细胞壁降解酶活性比较

由表 2 可知,菌株 LXS080601 和 LXS081501 在树皮培养基中均可产生 5 种细胞壁降解酶,且所有酶活性均呈现先升高后降低的单峰曲线,但达到酶活性高峰的时间存在一定差异,LXS080601 产生的细胞壁降解酶达到高峰时间较短仅需 3 d。2 株菌株产生细胞壁降解酶最大酶活性依次为木聚糖酶、多聚半乳糖醛酸酶、果胶甲

基半乳糖醛酸酶、 β -葡萄糖苷酶和纤维素酶;除活性最小的纤维素酶外,LXS080601 产生的其它细胞壁降解酶均显著大于 LXS081501,是后者酶活性的 1.14~3.34 倍。说明腐烂病菌不同致病力菌株在树皮培养基中产生的细胞壁降解酶最大活性存在显著差异,4 种酶活性较高的细胞壁降解酶与菌株致病性强弱存在一定的对应关系,菌株致病性越强,最大酶活性越高。

表 2 苹果树腐烂病菌 LXS080601 和 LXS081501 在树皮培养中产生细胞壁降解酶的活性

Table 2 Maximal activities of cell wall-degrading enzymes produced by *Valsa mali* strain LXS080601 and LXS081501 in apple bark medium

细胞壁降解酶 Cell wall degrading enzyme	LXS080601		LXS081501	
	最大酶活性 Maximal enzyme activities/mU · mL ⁻¹	时间 Time/d	最大酶活性 Maximal enzyme activities/mU · mL ⁻¹	时间 Time/d
纤维素酶 Cellulase	92.05±2.52 a	3	91.18±0.97 a	7
β -葡萄糖苷酶 β -glucosidase	105.45±2.61 a	3	92.19±2.36 b	5
果胶甲基半乳糖醛酸酶 polymethylgalacturonase	271.24±3.54 a	3	106.39±1.46 b	5
多聚半乳糖醛酸酶 polygalacturonase	401.58±6.13 a	3	120.00±4.03 b	5
木聚糖酶 Xylanase	557.36±13.81 a	3	178.48±9.43 b	5

2.3 腐烂病菌在苹果离体枝条中产毒素的差异

菌株 LXS080601 和 LXS081501 接种“富士”离体枝条后 7 d 和 15 d,所有接种枝条均可发病,但病斑面积存在显著差异,弱致病菌造成的病斑面积分别为 0.10 cm² 和 1.57 cm²,而强致病菌造成的病斑面积较大,分别达到 2.63 cm² 和 6.43 cm²。接种 PDA 对照枝条均未发病且未检测到毒素。由表 3 可知,LXS080601 在致病过程中可产生 5 种毒素,在接种后 7 d 和 15 d 均以对羟基苯

丙酸量最高,每克组织干重达 704.82 μ g 和 806.48 μ g,分别是其它 4 种毒素量的 10.65~231.85 倍和 10.26~231.08 倍。弱致病菌 LXS081501 接种后 15 d,仅检测出原儿茶酸、对羟基苯丙酸和对羟基苯甲酸,且毒素量显著低于接种 LXS080601 的处理。说明腐烂病菌不同致病力菌株在离体枝条中产生的毒素种类和毒素量均与菌株致病性强弱成对应关系,致病性强的菌株产生毒素种类多且毒素量大。

表 3 腐烂病菌 LXS080601 和 LXS081501 在苹果离体枝条中产生毒素的变化

Table 3 Time course of toxins produced by *Valsa mali* strain LXS080601 and LXS081501 in detached apple branches

毒素 Toxins	LXS080601/ μ g · g ⁻¹ DW		LXS081501/ μ g · g ⁻¹ DW	
	接种后 7 d 7 d after inoculation	接种后 14 d 14 d after inoculation	接种后 7 d 7 d after inoculation	接种后 14 d 14 d after inoculation
原儿茶酸 Protocatechuic acid	6.88±0.73 b	9.54±0.25 c	4.50±0.12 a	7.36±0.30 b
对羟基苯甲酸 <i>p</i> -hydroxybenzoic acid	3.18±0.68 b	13.10±0.10 c	—	1.24±0.13 a
对羟基苯乙酮 <i>p</i> -hydroxyacetophenone	3.04±0.04 a	3.49±0.45 a	—	—
对羟基苯丙酸 <i>p</i> -hydroxybenzene propanoic acid	704.82±37.21 c	806.48±39.48 d	62.52±1.31 a	158.66±4.26 b
间苯三酚 Phloroglucinol	66.16±1.32 a	78.60±3.42 b	—	—

2.4 腐烂病菌在苹果离体枝条中分泌细胞壁降解酶活性的差异

接种 PDA 的对照枝条组织中,均可检测到 5 种细胞壁降解酶,但活性较低且随接种时间的延长酶活性变化不明显,由图 1 可知,接种 LXS081501 后,除纤维素酶和 β -葡萄糖苷酶外,其它 3 种酶活性表现出不同程度的升高,而接种 LXS080601 后,5 种细胞壁降解酶均有不同程度的升高。强致病菌 LXS080601 接种后 7 d,除纤维素酶外,其它酶活性相比对照开始显著升高,接种后 15 d,5 种细胞壁降解酶活性相比接种后 7 d 均显著升高,其中以木聚糖酶活性最高为 468.25 U/mg 总蛋白质,多聚

半乳糖醛酸酶、果胶甲基半乳糖醛酸酶、 β -葡萄糖苷酶次之,纤维素酶活性最低仅为 58.25 U/mg 总蛋白质。弱致病菌 LXS081501 在致病过程中分泌的 5 种细胞壁降解酶活性显著低于接种 LXS080601 的处理,接种后 7 d,酶活性相比对照无显著差异,接种后 15 d,木聚糖酶、多聚半乳糖醛酸酶和果胶甲基半乳糖醛酸酶活性相比对照显著升高,其中也以木聚糖酶活性最高为 75.36 U/mg 总蛋白质。由此可见,不同致病力腐烂病菌菌株在对离体枝条的致病过程中分泌细胞壁降解酶活性存在显著差异,其酶活性与菌株致病性强弱呈正相关。

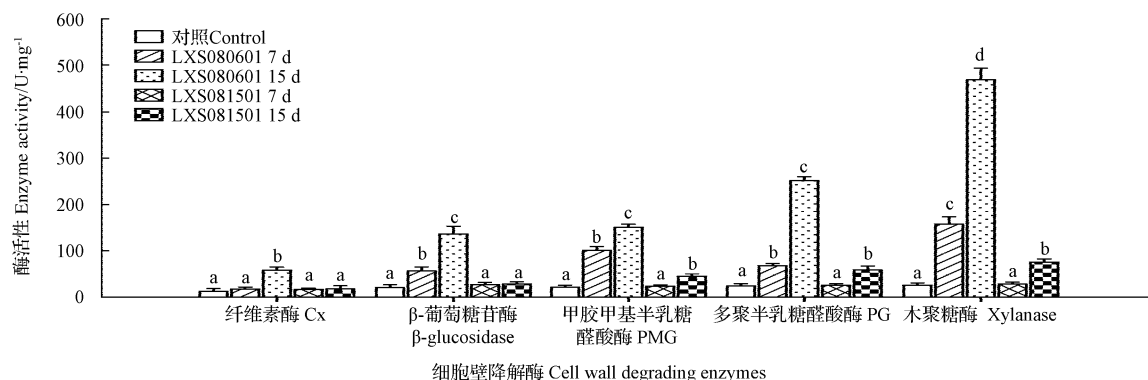


图1 腐烂病菌 LXS080601 和 LXS081501 在苹果离体枝条中产生细胞壁降解酶的活性变化

注:Control-接种 PDA 对照;7 d、15 d-接种后天数;图中不同字母表示在 $P < 0.05$ 水平下处理间差异显著。

Fig. 1 Time course of enzyme activities in detached apple branches inoculated by *Valsa mali* strain LXS080601 and LXS081501

Note:Control-inoculating PDA;7 d,15 d-Days post-inoculation;Different letters on the figure indicate significant differences between treatments at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

3 讨论

研究表明,多种植物真菌病害是在酶和毒素等致病因子及其它因素综合影响、协同作用下发生发展的,致病因子是植物病原菌与寄主相互识别、相互作用过程中的产物,能够使寄主产生特定的病症反应^[8,15-16]。研究植物病原菌产生致病因子的种类、生物活性及其与菌株致病性的关系,对于明确病原菌的致病机制及其与寄主的相互作用,寻找新的病害防控途径具有十分重要的意义^[17-18]。

腐烂病菌强致病菌 LXS080601 和弱致病菌 LXS081501 均可在树皮培养基内产生毒素,但毒素种类和水平存在显著差异,LXS080601 可产生 5 种毒素,而 LXS081501 仅检测到 4 种,且除间苯三酚外,前者产生的毒素量均显著高于后者。此外,2 株菌株对离体枝条致病过程中产生的毒素差异更显著,强致病菌接种后 7 d 已可检测到 5 种毒素,随病斑面积扩展,从接种后 7 d 的 2.63 cm² 增加至接种后 15 d 的 6.43 cm²,毒素量也不断增加;而弱致病菌仅产生 3 种毒素,且其毒素量相对较低。尽管树皮培养基中 LXS081501 产生的间苯三酚量显著高于 LXS080601,但前者接种离体枝条后并未检测到间苯三酚。该结果进一步证实,腐烂病菌产毒素量和毒素种类与菌株致病性强弱存在明显的相关性,致病性越强的菌株产生毒素种类和毒素量越多;同时,研究表明,腐烂病菌不同致病力菌株在树皮培养基中产生的毒素量差异与离体枝条中结果并不完全吻合,但后者能更好的反应菌株致病能力,这与冯云程等^[5]的研究结果不一致,可能是因为他们分析的是混合毒素量,并未对毒素各成分进行定量分析。据报道,腐烂病菌的 5 种毒素均为根皮苷的代谢产物,而根皮苷是一种糖苷,在苹果叶片、树皮等器官中含量非常高^[9,19-20],但腐烂病菌不同致病力菌株诱导代谢根皮苷的机制尚需进一步研究。

2 株菌株接种树皮培养基和离体枝条后,均可检测到 5 种细胞壁降解酶,但酶活性水平和达到高峰时间存在显著差异。在树皮培养基中,除纤维素酶外,LXS080601 分泌的其它酶活性均显著高于 LXS081501,且前者到达酶活性高峰的时间早于后者。同毒素类似,两菌株在对离体枝条致病过程中,分泌的细胞壁降解酶活性差异更显著,LXS080601 接种后 7 d,仅纤维素酶活性与对照相比未显著升高,而 LXS081501 分泌的 5 种细胞壁降解酶活性均未显著升高;接种后 15 d,前者分泌的 5 种细胞壁降解酶活性相比之前均显著升高,而后者仅木聚糖酶、多聚半乳糖醛酸酶和果胶甲基半乳糖醛酸酶活性相比对照有所显著增加,且增幅较小。两菌株分泌的细胞壁降解酶,均以木聚糖酶活性最高,多聚半乳糖醛酸酶和果胶甲基半乳糖醛酸酶次之。已有大量研究发现,植物病原菌分泌的木聚糖酶与其菌株致病性存在密切相关性^[14,21],Bitro 等^[21]证实灰霉病菌的木聚糖酶基因 *xyn11A* 缺失后,其致病力下降了 70%,Siah 等^[14]的研究显示,壳针孢菌的菌株致病性强弱与其分泌木聚糖酶活性呈正相关性,与该研究结果相一致。此外,有关病原菌分泌多聚半乳糖醛酸酶和果胶甲基半乳糖醛酸酶活性与菌株致病性相关的报道也很多^[13,22],有关腐烂病菌分泌上述细胞壁降解酶活性与菌株致病性的关系,作者将从分子水平进行分析。

总体而言,苹果树腐烂病菌产生的致病因子(毒素和细胞壁降解酶)与菌株致病性强弱呈正相关性,菌株致病性越强产生的细胞壁降解酶活性越高,毒素种类越多且毒素量越大,但各致病因子如何协调作用值得进一步研究。

参考文献

- [1] 陈策. 苹果树腐烂病发生规律和防治研究[M]. 北京:中国农业科技出版社,2009.
- [2] 陈策,李美娜,史秀琴,等. 苹果树腐烂病(*Valsa mali* Miyabe et

Yamada) 侵染时期研究[J]. 植物病理学报, 1987, 17(2): 65-68.

[3] 曹克强, 国立耘, 李保华, 等. 中国苹果树腐烂病发生和防治情况调查[J]. 植物保护, 2009, 35(2): 114-117.

[4] 王彩霞, 董向丽, 张振芳, 等. 2011 年烟台苹果产区腐烂病发病情况调查与原因分析[J]. 植物保护, 2012, 38(3): 136-138.

[5] 冯云程, 阿新祥, 刘自单. 云南高原粳稻白叶枯病菌毒素及其与致病性关系[J]. 植物病理学报, 2013, 46(3): 622-629.

[6] 刘福昌, 李美娜, 王永淦. 苹果树腐烂病菌致病因素-果胶酶的初步探讨[J]. 中国果树, 1980(3): 45-48.

[7] 王娟, 马强, 庄霞, 等. 苹果树腐烂病病原菌分泌物中果胶酶的测定[J]. 内蒙古农业科技, 2009(4): 39-40.

[8] 陈晓林, 牛程旺, 李保华, 等. 苹果树腐烂病菌产生细胞壁降解酶的种类及其活性分析[J]. 华北农学报, 2012, 27(2): 207-212.

[9] Natsume H, Seto H, Haruo S, et al. Studies on apple canker disease. The necrotic toxins produced by *Valsa ceratosperma* [J]. Agriculture Biology Chemistry, 1982, 46(8): 2101-2106.

[10] 赵红, 王彩霞, 陈晓忍, 等. 苹果腐烂病菌诱导产孢方法[J]. 中国农学通报, 2012, 28(10): 151-154.

[11] 严吉明, 叶华智. 巢豆油壶菌与蚕豆相互作用下植物内源激素的动态[J]. 植物病理学报, 2013, 43(3): 328-332.

[12] 王彩霞, 张清明, 李桂舫, 等. 苹果树腐烂病拮抗细菌菌株 BJ1 鉴定及其抑菌作用[J]. 植物保护学报, 2012, 39(5): 431-437.

[13] Douaiher M N, Nowak E, Durand R, et al. Correlative analysis of *Mycosphaerella graminicola* pathogenicity and cell wall degrading enzymes

produced *in vitro*; the importance of xylanases and polygalacturonases [J]. Plant Pathology, 2007, 56: 79-86.

[14] Siah A, Deweera C, Duymec F, et al. Correlation of in planta endo-beta-1,4-xylanase activity with the necrotrophic phase of the hemibiotrophic fungus *Mycosphaerella graminicola* [J]. Plant Pathology, 2010, 59: 661-670.

[15] 章元寿. 植物病理生理学[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1996.

[16] 胡颖慧, 龚束芳, 李彩华, 等. 枯萎病菌毒素培养滤液对唐菖蒲幼苗毒性的初步研究[J]. 植物病理学报, 2012, 42(5): 497-504.

[17] 徐娇, 许文超, 康占海, 等. 瓜果腐霉毒素对多年生黑麦草的致病作用机理初步研究[J]. 草业学报, 2009, 18(4): 181-186.

[18] Zheng L, Lv R J, Huang J B, et al. Isolation, purification, and biological activity of a phytotoxin produced by *Stemphylium solani* [J]. Plant Disease, 2010, 94: 1231-1237.

[19] Gosch C, Halbwirth H, Stich K. Phloridzin: Biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants [J]. Phytochemistry, 2010, 71: 838-843.

[20] Schieber A, Keller P, Carle R. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2001, 910: 265-273.

[21] Brito N, Espino J J, González C. The Endo- β -1,4-Xylanase Xyn11A is required for virulence in *Botrytis cinerea* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2006, 19(1): 25-32.

[22] Reignault Ph, Valett-Collet, Boccara M. The importance of fungal pectinolytic enzymes in plant invasion, host adaptability and symptom type [J]. European Journal of Plant Pathology, 2008, 120(1): 1-11.

Pathogenic Factors Produced by *Valsa mali* var. *mali* and Their Relationship With Pathogenicity of Different Strains

LI Chao, LI Bao-hua, LI Gui-fang, WANG Cai-xia

(College of Agronomy and Plant Protection, Key Lab of Integrated Crop Pest Management of Shandong Province, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109)

Abstract: Taking *Valsa mali* var. *mali* of strain LXS080601 with high virulence and strain LXS081501 with weak virulence as materials, the enzyme activities and toxins were analyzed using dinitrosalicylic acid (DNS) and high performance liquid chromatography (HPLC) methods, to explore the difference of cell wall degrading enzymes and toxins produced by different strains of *Valsa mali* and the relationship between pathogenic factors and pathogenicity. The results showed that 5 kinds of toxins were all detected in 'Fuji' bark medium and detached branches inoculated with strain LXS080601 including protocatechuic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, *p*-hydroxybenzene propanoic acid, *p*-hydroxyacetophenone and phloroglucinol, however, only 3~4 kinds of toxins were produced by strain LXS081501 in two treatments, respectively. The amount of the toxins produced by LXS081501 was significantly lower than that produced by LXS080601, except for phloroglucinol produced in 'Fuji' bark medium. In addition, two strains could produce 5 kinds of cell wall degrading enzymes including cellulase, β -glucosidase, polymethylgalacturonase, xylanase and polygalacturonase, but the enzyme activities were significantly difference. The enzyme activities produced by LXS080601 were higher than that produced by LXS081501, and the corresponding days were shorter when maximum enzyme activities were detected. The results in this research indicated that a positive relationship existed between enzyme activities, amount and kinds of toxins produced by *V. mali* and pathogenicity of different strains.

Key words: *Valsa mali* var. *mali*; toxins; cell wall degrading enzymes; pathogenicity