

玉米苯丙烷类次生代谢物与 玉米对茎腐病抗性的关系*

龙书生¹, 李亚玲¹, 段双科¹, 张宇宏¹, 李 强¹, 王 炜¹, 李武高²

(1 西北农林科技大学 植物保护学院 教育部植保资源与害虫管理重点实验室, 陕西 杨凌 712100;

2 郑州市蔬菜研究所, 河南 郑州 450015)

[摘 要] 对抗病玉米品种陕单931和感病玉米品种西农11号在抽雄初期接种禾谷镰刀菌孢子悬浮液, 于接种后测定茎秆髓部组织内苯丙烷类次生代谢物木质素和绿原酸的变化。结果表明, 玉米植株原生木质素与玉米对茎腐病的抗性无关, 仅诱导产生的木质素在玉米的抗病性中起作用。并证实玉米植株受到镰刀菌侵染后可产生对镰刀菌有抑制作用的物质。

[关键词] 玉米茎腐病; 抗性; 木质素; 绿原酸

[中图分类号] S432.2⁺3; S435.131.4⁺9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2004)09-0093-04

玉米品系(自交系和杂交种)对玉米茎腐病的抗性差异十分明显^[1]。到目前为止, 国内外有关玉米品种对茎腐病抗性的生理生化机制研究已有一些报道, 但由于引起该病的病原菌在不同地区有所不同或完全不同^[2~6], 所以已有抗性机制方面的研究结果也不完全一致或完全不同, 甚至相反^[6,7]。为了明确苯丙烷类次生代谢物与玉米对茎腐病抗性的关系, 探讨玉米对茎腐病的抗病机制及其在玉米抗病性鉴定中的应用, 作者在2000年进行了本研究, 现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 供试品种

供试玉米品种为抗病品种陕单931(茎腐病平均发病率为4.55%)和感病品种西农11号(茎腐病平均发病率为45.00%)。供试菌种为陕西省玉米茎腐病的主要致病菌禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum* Schwabe)。以麦粒培养基繁殖禾谷镰刀菌并在黑光灯下诱导产孢。

1.2 田间试验设计

大田试验在西北农林科技大学农科院校区试验田进行。种植区规格: 5行区, 行长3m, 行距0.67m, 株距0.33m(4.5株/m²)。采用随机区组设计, 3次重复。

1.3 接种和取样

于抽雄初期在玉米茎基第2节间中部针刺注射接种 3×10^7 mL⁻¹禾谷镰刀菌孢子悬浮液, 接菌量为1 mL/株。另设健康对照。分别在接种后1, 2, 3, 4, 5 d, 取处理和对照茎秆髓部组织进行测定, 各取样6次。

1.4 木质素含量的测定

按杨家书等^[8]的方法。准确称取脱脂后的风干样品1 g, 倒入250 mL烧瓶底部, 加15 mL体积分数72%硫酸溶液, 摇匀, 于室温下(24~25℃)放置2.5 h。加水至200 mL, 装上冷凝管, 在电炉上回流煮沸1 h。将回流完毕的溶液倒入已于105℃烘过3 h并称至恒重的砂芯坩埚中, 过滤, 用70~75℃热水洗涤残留物, 直至滤液为中性。将砂芯坩埚取下, 置于105℃烘箱烘4 h, 取出放入干燥器中冷却30 min, 称重, 直至恒重。

$$\text{木质素}/(\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}) = \frac{(\text{坩锅} + \text{残渣})\text{重} - \text{空坩锅重}}{\text{样品重}} \times 100,$$

式中, 样品重应换算成脱脂前风干样品重(g)。

1.5 绿原酸含量的测定

按杨家书等^[8]的方法, 并略有改动。取3 g鲜重髓部组织, 置于60℃烘至恒重, 加50倍重量的体积分数95%乙醇提取1 h。取提取液1 mL加4 mL体积分数95%乙醇后, 加入0.5 g活性碳脱色, 之后于分

* [收稿日期] 2004-02-12

[基金项目] 陕西省自然科学基金项目(96SM22)

[作者简介] 龙书生(1964-), 男, 陕西靖边人, 副研究员, 主要从事玉米病害研究。

光光度计 324 nm 处测定光吸收值,以 3 g 髓部薄壁组织的 A_{324} 表示绿原酸含量。

1.6 诱导物质的提取及对病原菌的抑制性能测定

按李冠等^[9]的方法。取经诱发接种的玉米节间髓部组织 5 g,剪碎后加 10 mL 体积分数 75% 乙醇,经 10 000 ×g 离心,上清液在 75~ 80 ℃下浓缩,将浓缩提取液和培养基按一定比例混合,灭菌后倒成平板,取长势一致的镰刀菌菌饼(直径 0.4 cm)接种于培养皿中央,置 28 ℃下培养。以健康植株组织的提取液为对照。所有处理重复 5 次。

培养 72 h 后将培养皿取出,用卡尺测量菌落直径(十字交叉测量两次,取平均值)。以 5 次重复的平均值计算抑制率。计算公式为

抑制率/% =
$$\frac{\text{对照生长直径} - \text{处理生长直径}}{\text{对照生长直径} - 0.4} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 不同抗性玉米品种茎秆内木质素含量的变化

表1 不同抗性玉米品种茎秆内木质素含量的变化

Table 1 Changes of lignin in pith tissue of corn stalk inoculated with *Fusarium*

品种 Variety	处理 Treatment	木质素含量/(g · kg ⁻¹) Content of lignin				
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
陕单 931 Shandan 931	接种 Inoculated	6.44	7.97	9.30	10.89	11.06
	健康 Healthy	4.92	5.01	5.05	5.06	5.08
	净增加值 Net content	1.52	2.96	4.25	5.83	5.98
西农 11 号 Xinong 11	接种 Inoculated	9.25	11.44	11.78	11.10	10.25
	健康 Healthy	7.75	7.78	7.81	7.80	7.79
	净增加值 Net content	1.54	3.66	3.97	3.30	2.46

注:净增加值=接种植株木质素含量-健康植株木质素含量。

Note: Net content= lignin content of inoculated plant- lignin content of healthy plant

2.2 不同抗性玉米品种茎秆内绿原酸含量的变化

接种后抗、感病品种茎秆髓部组织内绿原酸含量测定结果见表2。由表2可见,接种后抗、感病品种茎秆内绿原酸含量不同。抗病品种接种后绿原酸含量急剧增高,到第3天达到峰值后开始下降,第4天

由表1可见,健康的抗、感病玉米品种茎秆髓部组织内木质素含量在测试期内基本保持在一个稳定的水平上,抗病品种陕单931在5 g/kg左右,感病品种西农11号在7.8 g/kg左右;感病品种西农11号的木质素含量大于抗病品种陕单931。接种禾谷镰刀菌后1~3 d,抗、感病品种的木质素含量都持续增加;接种后4~5 d,抗病品种的木质素含量继续增加,直到测试完成,而感病品种的木质素含量从第4天开始持续下降。为了更好说明接种后木质素在抗、感病品种茎秆内的变化,以处理植株木质素含量减去健康植株的木质素含量,得出接种后茎秆内的木质素净增加值(表1)。从表1可以看出,接种后抗病品种茎秆内木质素的净增加值远远大于感病品种。

下降到一个谷值,第5天又升高。而感病品种接种后前4 d 绿原酸含量缓慢增加,到第4天达到峰值,且峰值比抗病品种第一峰值低很多,仅是其1/6左右。之后开始下降。

表2 不同抗性玉米品种茎秆内绿原酸含量的变化

Table 2 Changes of chlorogenic acid in pith tissue of corn stalk inoculated with *Fusarium* $A_{324}/3\text{ g FW}$

品种 Variety	绿原酸含量 Content of chlorogenic acid				
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
陕单 931 Shandan 931	0.25	1.71	3.63	0.95	1.33
西农 11 号 Xinong 11	0.13	0.23	0.24	0.62	0.36

注:试验中抗、感病品种对照(健康植株)的绿原酸含量均在感量以外,故视为水平相当。

Note: The contents of chlorogenic acid in both resistant and susceptible healthy corn plant was regarded in a same level because they were all out of the measurement of spectrophotometer

2 3 诱导物对禾谷镰刀菌生长的影响

玉米植株茎秆接种禾谷镰刀菌后(经72 h 又一次加强接种)髓部组织提取液对禾谷镰刀菌的抑制试验结果见表3。表3 结果表明, 抗、感病品种的髓部

组织诱导提取液对禾谷镰刀菌均有一定的抑制作用。抗病品种提取液对禾谷镰刀菌的抑制率远大于感病品种。

表3 禾谷镰刀菌诱导后玉米植株提取液对禾谷镰刀菌生长的抑制效果

Table 3 Effect of extractives from the pith tissue of corn stalk inoculated with *Fusarium* on the growth of *Fusarium* in Petri dishes

品种 Variety	菌落直径/cm Colony diameter of <i>Fusarium</i> in Petri dishes		抑制率/% Rate of inhibition
	对照 Control	处理 Treatment	
陕单 931 Shandan 931	6.586	4.745	27.95
西农 11 号 Xinong 11	6.586	5.452	17.22

注: 对照和处理均为5个重复的平均值。
Note: Values of colony diameters were the average of five replications

3 讨 论

木质素是一类结构复杂的惰性聚合物, 沉积于细胞壁, 并以共价键与细胞壁结合, 通过苯丙烷类代谢途径进行其生物合成。在寄主植物和病原菌相互作用过程中, 寄主植物细胞壁在感染病原菌后的木质化作用, 即木质素含量的增加是寄主植物对感染抗性反应的一种特性, 为阻止病原菌对寄主的侵染提供了有效的保护圈。木质化作用阻碍真菌侵染的机理是: 第一, 木质素增加了细胞壁抗真菌穿透的压力; 第二, 由于病原菌不能分泌分解木质素的酶类, 木质化增强了抗酶溶解作用; 第三, 木质化限制了真菌酶和毒素从真菌向寄主扩散, 同时限制了水和营养物质从寄主向真菌扩散, 使病原菌得不到足够的营养而致死; 第四, 木质素的低分子质量酚类前体以及多聚作用时产生的游离基, 可以钝化真菌的膜酶、毒素; 第五, 在个别病害研究中还发现, 病原真菌菌丝被木质化而停止生长^[10]。

绿原酸是一种酚类化合物, 它对病原真菌、病毒都有毒性。绿原酸在植物体内是通过咖啡酸和奎尼酸酯化产生的, 是植物苯丙烷类代谢的产物。

本研究结果表明, 健康感病品种的木质素含量远大于健康抗病品种, 说明品种的原始木质素含量或者说非诱导产生的木质素含量与品种的抗病性无关, 即在玉米预存的保卫系统中, 植株原生的木质素对玉米的抗性贡献不大, 而诱导产生的木质素在玉米抗病性中起主导作用。研究发现, 接种后诱导产生的酚类物质绿原酸在抗病品种中的积累大于感病品种。抗、感病品种组织诱导提取液对禾谷镰刀菌都有一定的抑制作用, 但抗病品种提取液对禾谷镰刀菌的抑制作用远大于感病品种。说明玉米品种受病原

菌侵染后, 其组织内经过一定的生理生化代谢后会产生对病原菌有抑制作用的物质。这些物质中的一类是酚类物质绿原酸。是否还有其他物质产生还有待于进一步研究。因此可以认为, 玉米受到禾谷镰刀菌侵染后, 其体内可以产生和积累阻止病原生长、扩展的木质素以及对禾谷镰刀菌有毒性的酚类物质绿原酸和其他物质。接种后抗病品种新增的木质素积累明显高于感病品种, 这一结果与陈捷等^[6]的研究结果基本一致, 与吴纯仁等^[7]的研究结果不一致。

李亚玲等^[11]研究认为, 玉米植株受镰刀菌侵染后, 其体内POD 酶活性变化与品种对镰刀菌茎腐病的抗性存在密切关系, 即抗、感病品种接种镰刀菌后POD 酶活性都有升高, 并产生一个峰值, 但感病品种POD 酶活性峰值低, 抗病品种峰值高。本研究结果证明, 玉米植株茎秆内诱导木质素的变化与POD 活性的变化平行, 即接种后木质素的净增加值变化与POD 活性变化极相似。这说明玉米茎秆内诱导的木质素与其POD 活性有关, 或者说玉米茎秆内POD 是控制木质素代谢的关键酶。这一结果与Fukuda等^[12]、黄祥辉等^[13]的研究结果一致。但和Friend等^[14, 15]的研究结果相矛盾。

李亚玲等^[11]研究认为, 玉米植株受镰刀菌侵染后, 其体内的PAL 酶活性变化与其对茎腐病的抗性也有密切的关系, 即玉米植株接种后抗病品种的PAL 酶活性上升快, 活性强, 且形成两个活性高峰, 高活性持续时间长; 感病品种PAL 酶活性上升慢, 活性相对较弱, 且只形成一个峰, 高活性持续时间短。本研究发现, 玉米植株茎秆内的毒性酚类小分子绿原酸与PAL 活性的变化平行, 即抗病品种绿原酸含量上升高、快, 且有两个峰, 感病品种绿原酸上升相对低、慢, 且只有一个峰。绿原酸含量的变化与

PAL 酶活性变化相似,说明PAL 酶是绿原酸代谢 控
过程的关键酶,绿原酸在植株内的含量受PAL 调

[参考文献]

- [1] 李亚玲,马秉元,龙书生,等.玉米品种材料抗病性鉴定研究[J].西北农业大学学报,1995,23(增刊):104-110
- [2] 徐作珏.山东玉米茎基腐病原菌的初步研究[J].植物病理学报,1985,15(2):103-108
- [3] 尹志.玉米茎基腐病的研究概况[J].吉林农业科学,1988,(4):47-51
- [4] 吴晓东.玉米茎基腐病简介[J].云南农业科学,1989,(5):9-12
- [5] 龙书生,马秉元,李亚玲.玉米茎基腐病发生发展规律的探讨[J].陕西农业科学,1992,(5):34-35
- [6] 陈捷.我国玉米穗、茎腐病害研究现状与展望[J].沈阳农业大学学报,2000,31(5):393-401
- [7] 吴纯仁,王铨茂.玉米对茎腐病菌抗性的生化研究[J].植物病理学报,1988,18(4):250
- [8] 杨家书,吴畏,吴友三,等.植物苯丙酸类代谢与小麦对白粉病抗性的关系[J].植物生理学报,1986,12(3):169-174
- [9] 李冠,薛应龙,欧阳光察.诱导免疫哈密瓜植株的苯丙烷类代谢酶活力及新蛋白质的出现[J].植物生理学报,1989,15(4):360-364
- [10] 朱明华,欧阳光察.黄瓜免疫诱导过程中G6PD、PAL、4CL、POD活性和木质素含量的变化[J].上海农业学报,1990,6(2):21-26
- [11] 李亚玲,龙书生,郭军战,等.玉米感染禾谷镰刀菌后PAL、POD活性和同工酶谱的变化[J].西北植物学报,2003,23(11):1927-1931
- [12] Fukuda H, Komamine A. Lignin synthesis and its related enzymes as markers of tracheary element differentiation in single cells isolated from mesophyll of *Zinnia elegans* [J]. Planta, 1982, 155: 423
- [13] 黄祥辉,刘淑明,王隆华,等.百日草游离叶肉细胞导管分子分化过程中过氧化物酶的催化特性[J].植物生理学报,1994,20(1):61-68
- [14] Friend J, Reynolds S B, Aveyard M A. Phenylalanine ammonia-lyase Chlorogenic acid and lignin in potato tuber tissue inoculated with *Phytophthora infestans* [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1973, 3: 495-507
- [15] Friend J, Threlfall D R. Biochemical aspects of plant-parasite relationships [M]. London, New York, San Francisco: Academic Press, 1976 295-298

Relationship between metabolites of phenylpropanoid metabolism and resistance of corn to stalk rot

LONG Shu-sheng¹, LI Ya-ling¹, DUAN Shuang-ke¹, ZHANG Yu-hong¹,
LI Qiang¹, WANG Wei¹, LI Wu-gao²

(1 Key Laboratory of Plant Protection Resources and Pests Management, Chinese Ministry of Education, College of Plant Protection,
Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Zhengzhou Vegetable Institute, Zhengzhou, Henan 450015, China)

Abstract: In order to understand the relationship between metabolites of phenylpropanoid metabolism and resistance of corn to stalk rot, and to explore the resistant mechanism of corn to stalk rot, which might be used to assess the resistance to stalk rot in corn breeding, changes of metabolites of phenylpropanoid metabolism including lignin and chlorogenic acid in the pith tissue of corn stalk of resistant variety Shaandan 931 and susceptible variety Xinong 11 inoculated with *F. graminearum* were mainly studied. It was clarified that the lignin produced originally in corn plant had no relation to resistance of corn to stalk rot. It was the induced lignin produced by the corn plant after the infection of *F. graminearum* that showed contribution to the resistance only. It was proved that corn plant could produce some substances that could suppress the growth of *F. graminearum*. One of the substances was chlorogenic acid. It was postulated that resistance to stalk rot had a close relationship with the accumulation of induced lignin and chlorogenic acid in plant pith tissue of corn stalk after the infection of *F. graminearum*.

Key words: corn stalk rot; resistance; lignin; chlorogenic acid