

77-83

14

第20卷 第4期
1992年11月西北农业大学学报
Acta Univ. Agric. Boreali-occidentalisVol.20 No.4
Nov. 1992

玉米植抗素研究进展

唐德志

(甘肃省农科院植物保护研究所, 甘肃兰州·730070)

S512.034

摘要 报道了玉米植抗素的化学成分、研究方法、化学特性及其对病虫害的效应等研究进展。提出了在玉米植抗素方面存在的问题和今后的研究方向。

关键词 玉米植抗素, 抗病育种, 玉米

中图分类号 S432.23, S435.13, S332.2

随着植物化学、生物化学的飞跃发展, 玉米植抗素这个新的学科领域日益受到国内外越来越多的生物化学、植物病理学、农业昆虫学、作物育种学等多种学科的科学工作者的关注。目前在探明玉米抗病虫的生物化学本质和在抗病虫育种的作用诸方面已取得了可喜的进展。

1 玉米植抗素的名称

在查阅文献^[1-4]过程中看到: 丁布(DIMBOA、氧肟酸(Hydroxamic acid)、环状氧肟酸(Cyclic Hydroxamic acids)、葡萄糖配体(Aglucone)等多种名称, 这些名称均属玉米植抗素 2, 4-二羟基-7-甲氧基-1, 4-苯骈恶嗪 3-酮(2,4-dihydroxy-7-methoxy-1, 4-benzoxazin-3-one)的简称。而 6-甲氧基苯骈恶嗪酮(6-methoxy-benzoxazolinone)是玉米植抗素(DIMBOA)经酶的作用转化的物质, 简称门布(MBOA)。

2 玉米植抗素的研究方法

2.1 提取

2.1.1 直接从玉米苗或叶片中提取 Wahlroos 报道^[3], 压取玉米苗汁液, 用乙醚提取, 硫酸钠盐析, 最后用甲醇和醚-环己烷进行重结晶; Tipton 等^[5]用玉米黄化苗加水捣成匀浆, 在 65℃ 下凝结蛋白质, 滤液分别用乙醚、硫酸镁提取, 再用三氯甲烷-甲醇、丙酮、己烷进行重结晶; Long^[1]是将玉米叶片进行冷冻处理, 然后加 95% 乙醇捣碎, 石油醚提取, 在纤维素薄板上层析, 用 95% 乙醇和 0.1 mol/L 盐酸液洗下植抗素。

2.1.2 从病叶中提取 Lim^[6]介绍的有两种方法: ①液滴扩散技术 将玉米大斑病菌孢子悬浮液滴于玉米叶片上, 经过一定时间, 收集溶液, 用蒸馏水透析, 残渣在 70% 甲醇中溶解、浓缩, 在华托门 3 号层析纸上层析, 再用 70% 丙酮洗下植抗素。②从病叶中提取 在玉米 5~6 叶期, 人工接菌大斑病菌, 10~20 d 后取病叶, 放于煮沸而

文稿收到日期: 1991-12-24.

冷却到室温的水中抽提 12 h, 过滤, 滤液加丙酮抽提, 再用乙醚萃取, 然后柱层层析, 收集液体, 在华托门 3 号层析纸上层析, 获得植抗素。

2.2 含量测定

Long 等^[1]采用的方法是: 取浓缩到抽提液的 1/10 溶液, 点于纤维素薄板上进行层析, 然后用洗液洗下 Rf 0.8 处的斑块, 再加 0.1 mL、0.1 mol/L 三氯化铁液, 在贝克曼分光光度计中 570 nm 处读数测定光密度, 与纯的植抗素标准曲线换算植抗素含量。

2.3 玉米组织处理技术对测定植抗素量的影响

唐德志等^[7]研究证实: ①玉米组织在不同低温、不同冷冻时间下对葡萄糖甙转化成丁布有一定影响, 低温-21℃比-10℃处理对玉米组织破坏大, 因而转化成丁布的量也多; 冷冻处理时间越长, 玉米组织冻结越坚实, 而解冻时间长短不一, 如冻结的组织未能全部解冻, 玉米组织中的酶还没有全部活动, 甙没有全部被酶转化成丁布, 测定的含量将有所下降。②玉米组织冷冻后, 解冻时间长短直接影响葡萄糖甙转化成丁布的量, 在一定时间内, 丁布随着解冻时间的延长而增加, 解冻时间超过 30 min, 丁布的量开始下降。

2.4 抗菌作用的研究

Lim 等^[6]对植抗素进行了生物测定, 他们的方法是, 在树脂玻璃载玻片上放上孢子悬浮液, 待孢子沉淀后, 用吸管将液滴内的水吸掉, 再放上被测的植抗素溶液。在室温下保湿过夜, 用碘化钾碘液(在 20 mg/mL KI 溶液中加入 2 mg I₂)将孢子杀死和染色, 测定孢子萌发率(用蒸馏水作对照)。Calub 等^[8]对玉米叶片渗出的植抗素进行了生物测定, 对不摘下的玉米叶片用具有 25 mm² 大小孔的塑料箱作接种室, 将上部叶片塞进孔内, 平铺在一橡皮筛上, 此筛放在潮湿的多孔棉上, 防止悬液干燥; 对摘下的叶片用无孔的塑料箱, 用含有 20 μg/mL 的 N⁶ 苯甲基氨基嘌呤(N⁶ benzy-lódenine)+5%蔗糖溶液使多孔棉饱和, 从基部摘除幼嫩叶片直接与溶液接触, 以免早衰。摘下与不摘下的叶片都滴孢子悬浮液接种。防止干燥需每天在原来接种液滴上, 加入一滴新鲜孢子悬液, 用蒸馏水作对照。从接种后 24 h 开始每天用吸管吸取 5~10 滴悬浮液, 在 20 000 × g 下离心 10 min, 除去孢子及芽管。取 0.2 mL(4 滴)放在凹载片上, 各加入 0.1 mL 新鲜孢子悬浮液, 载片放在塑料箱内过夜, 用碘-碘化钾杀死孢子和染色, 测定发芽率及芽管长度。

3 影响玉米植抗素含量的因素

唐德志等^[7]研究表明, 给玉米植株施用 NH₄NO₃ 能够促进玉米植株中植抗素含量的增加; 用⁶⁰Co 10 000、20 000 剂量辐射玉米种子然后种植, 能够增加玉米植抗素的含量。

4 玉米植抗素的化学特性

Virtanen 和 Wahlroos^[2]首先报道了玉米植株中的 6-甲氧基苯骈恶唑啉酮的抗病作用, 后来 Wahlroos、Brendenberg^[3,4]证实了玉米植株中含有一种葡萄糖甙, 在病菌

侵入或机械损伤后,经酶的作用转化成葡萄糖甙的配糖体 2,4-二羟基-7-甲氧基-1,4-苯骈恶嗪-3-酮,再分解成 6-甲氧基苯骈恶嗪-3-酮。Wahlroos 等^[3]验证了玉米植株中的 2,4-二羟基-7-甲氧基-1,4-苯骈恶嗪-3-酮的特性:熔点 156~157℃;在水中 10 mg/mL 时,紫外光吸收谱最大值 267 nm($K=34.7$)和 292 nm($K=32.5$),最小值 237 nm($K=5$)和 280 nm($K=29.4$);分子量=214,计算 $C_9H_9O_5N=2110$,甲氧基计算是 207;氧含量 6.91%,计算 $C_9H_9O_5N$ 为 6.63%;甲氧基含量 15.01%;在 25%氨水中,几分钟内变成黄褐色,30 min 后溶液成绿色,约 2 h 时成暗褐色;加三氯化铁液呈兰紫色。

5 玉米植抗素对病、虫的效应

5.1 对玉米大斑病菌(*Helminthosporium turcium*)的作用

Lim 等^[6]研究了植抗素剂量反应后指出,显著抑制孢子萌发的植抗素剂量在 300 $\mu\text{g/mL}$ 和更高的浓度。用相同剂量比较了植抗素 A_1 和植抗素 A_2 的抑菌作用,结果前者比后有更强的抑制作用。

Long 等^[1]证实玉米植抗素的含量与大斑病菌侵染率成负相关,同时证明品种间株高 60~75 cm 时含量的差异与抽雄期含量的差异是一致的。后来 Long 等^[9]又进一步采用 14 个经常作为杂交种的亲本自交系,在田间玉米挂丝期进行植抗素与大斑病菌关系的研究,证明玉米植抗素浓度与大斑病菌侵染率成负相关。

Calub 等^[10]证实多基因抗病自交系(H_{49} , H_{55} , C_{103} , C_{138B} , C_{147A} , C_{166})的植抗素含量多于单基因抗病自交系(Rw_{15} , RHt , $RW_{64}Aht$),而且叶侵染率也显著低。多基因自交系加进基因 Ht 基因($RH_{49}Ht$, $RH_{55}Ht$),减弱了多基因自交系(H_{49} , H_{55})植抗素的产生。

Calub 等^[10]认为接种高浓度病菌孢子的叶片比接种低浓度的叶片产生较多的植抗素;提早将温度控制在 21℃ 均比 27~32℃ 植抗素的作用显著;在玉米 5~6 叶期接菌比植株较大时接菌植抗素产生的作用大。

5.2 对镰刀菌(*Fusarium nivale*)的作用

Virtanen 等^[2]研究了 2(3)-苯骈恶嗪-3-酮和 6-甲氧基苯骈恶嗪-3-酮对 *Fusarium nivale* 的抑制作用。后来 Wahlroos 等^[3]进一步研究证实, *F. nivale* 在燕麦葡萄糖甘油培养基(pH 6.5~6.8)上生长 6 d, DIMBOA 0.0 mg/mL 的菌落直径是 29 mm, 浓度 0.5 mg/mL 的菌落直径是 22 mm, 浓度 1.0 mg/mL 的菌只能生长;浓度在 1.5 mg/mL 时菌不能生长。

5.3 对软腐病菌的作用

Whitney, Hartman, Laey, Woodward, Corcuera 等^[11-15]先后报道了他们研究 DIMBOA 对软腐病菌的作用;来自玉米上的菌株 *Erwinia chrysanthemi* 比来自其他寄主上的菌株 *E. chrysanthemi* 和 *E. carotovora* 菌株对 DIMBOA 有更高的抗性。来自玉米上的 34 个菌株有 80%(27 株)对 DIMBOA 是抗的,他们的抑制面积小于 175 mm²。在对比中,来自其他寄主的 *E. chrysanthemi* 25 个菌株中只有一个菌株与来自其他寄主的 *E. carotovora* 9 个菌株中的一个菌株对 DIMBOA 的抗性是相同水平,其余的菌株是很

敏感的, 抑制生长面积的范围是 $175 \sim 885 \text{mm}^2$ 。利用含有 DIMBOA 的自交系 BxBx(1552)和缺乏 DIMBOA 自交系 bxbx(1455)接种 SR-78(对 DIMBOA 敏感), SR-120 和 R₈₀(对 DIMBOA 抗)。病原菌稀释成 11 个浓度(在 SR-120 7.7×10^7 ; SR-80 8.2×10^7 ; SR-78 78×10^7 浓度的基础上, 分别再稀释成 5×10^1 , 5×10^2 , 5×10^3 , 5×10^4 , 5×10^5 , 5×10^6 , 5×10^7 , 5×10^8 , 5×10^9 , 5×10^{10}), 分别接菌, 结果是 SR-120 菌株病原菌最多, SR-79 菌株居中, SR-80 菌株最少。在 BxBx 和 bxbx 玉米植株上接种 SR-120 或 SR-80 菌株在软腐损伤上无明显差异。但是 SR-120 在 11 个病菌浓度中的第 4 个浓度, SR-80 的第 6 个浓度中 bxbx 比 BxBx 损伤大。接种 SR-78 菌株损伤大的是第 9 个浓度, 然而, 仅有三个浓度差异显著。在这三个菌株试验中, 在 bxbx 比 BxBx 玉米上接种 SR-78 菌株有损伤大的趋势。

5.4 对玉米蚜虫(*Rhopalosiphum maidis*)的作用

Long 等^[6]报道, 在人工饲料中加进 DIMBOA-0.1, 0.25, 0.5 mg/g 饲料, 饲养 12 d, 对照蚜虫存活率 86.6%, 含 DIMBOA 的蚜虫存活率依次为 82.2%, 75.5%, 68.1%; 死亡率依次为 5.1%, 12.8%, 20.8%。12 个玉米自交系 C_{131A}, B₄₉, N₁₀₁, N₁₀₃, Bx, R₁₀₁, OH₄₅, OH₄₃, Hy, By₇, WF₉ 和 bx 的 DIMBOA 含量分别为 1.48, 1.26, 1.21, 0.94, 0.92, 0.91, 0.69, 0.47, 0.42, 0.35, 0.32 和 0.08 mg/g 鲜重; 蚜虫侵染率依次为 126, 180, 147, 119, 238, 218, 130, 380, 189, 298, 300, 358。其中 OH₄₃ 显示出高的侵染率, N₁₀₃ 显示出低侵染率。然而自交系含氧蒽酸酯低的 bx, B₃₇, WF₉ 和 OH₄₃ 比含量高的自交系 N₁₀₁, N₁₀₃, C_{131A} 有更明显的侵染率。自交系含氧蒽酸酯中等的显示中等侵染值。18 个杂交玉米对蚜虫的反应是: 自交系亲本含 DIMBOA 高的 $\times$ 含量高的亲本获得的杂交种, 叶蚜轻度侵染; 含 DIMBOA 低的亲本 $\times$ 含量低的亲本获得的杂交种是严重侵染; DIMBOA 含量中等亲本 $\times$ 含量中等的获得的杂交种是中等侵染; DIMBOA 含量高的 $\times$ 含量低的获得的杂交种, 侵染值是高的; 含 DIMBOA 高的 $\times$ 中等含量的和中等 $\times$ 低等的获得的杂交种, 是高度侵染的。从上述数据可见, 玉米抗蚜是多基因遗传。他的结论是 DIMBOA 是玉米抗玉米蚜的一种活性物质, 选择 DIMBOA 含量高的玉米品种将会增加玉米抗多种病虫害的能力。

5.5 对欧洲玉米螟的作用

早期的工作者认为抗第一代玉米螟(食心叶)是玉米组织中含有 6-甲氧基苯骈恶唑啉酮(6MBOA 门布)的化合物, 后来 Klun 和 Brindley^[17] 认为 6MBOA 在玉米抗玉米螟中不是主要成分, 提出抗螟物质是 6-MBOA 前身的一种物质。Klun 等^[18] 提出 2, 4-二羟基-7-甲氧基-(2H)-1, 4-苯骈恶唑-3-酮(丁布 DIMBOA)是玉米抗第一代螟虫的生化物质。Klun 和 Robinson^[19] 测定了 6 个自交系叶片(株高 84 cm)输导组织 6-甲氧基-2-苯骈恶唑啉酮的浓度, 认为自交系亲缘关系与 MBOA(门布)浓度 Log 之间不规则变化和 6 个自交系叶片饲养抗螟的不规则变化有关。同样, Klun 等^[20] 断定叶输导组织 DIMBOA 浓度与抗第一代螟(食心叶)有明显的相关性, 11 个自交系相关系数是 -0.89, 55 个杂交种是 -0.74。Klun 等^[19] 提出, 用化学分析植物组织的 DIMBOA 来选择抗第一代欧洲螟的品种。Russell 等^[21] 对 3 个玉米杂交后代抗玉米螟的效应进行研究后认为, 玉米抗玉米螟除 DIMBOA 外还有其他因素。Scriber 等^[22] 利用

DIMBOA 低含量和高含量遗传型玉米, 分别在树脂玻璃管笼、人造丝笼以及把两个 DIMBOA 不同含量的品种放在一个笼中, 让玉米螟选择取食等方法进行研究, 认为 DIMBOA 含量高的品种对玉米螟有抑制作用。Guthrie 等^[23] 研究了马齿型玉米自交系在田间和温室条件下, 对玉米螟(*Ostrinia nubilalis*)取食的抗性和丁布(DIMBOA)含量的关系。结果是 C_{131A}, B₇₅, B₈₅ 生长在田间几乎对第一代玉米螟虫取食是免疫, 但生长在温室则易染虫; WF₉ 在田间和温室均易染虫, 在温室中叶片被取食更为严重。4 个自交系玉米生长在温室的丁布(DIMBOA)含量比生长在田间的高, 说明生长在温室的玉米自交系丁布(DIMBOA)含量高不抗欧洲玉米螟。

6 结 语

研究表明, 玉米植抗素 2, 4-二羟基-7-甲氧基-1, 4-苯骈恶嗪-3 酮(丁布)是植物植抗素中比较典型的一种植抗素, 通过对玉米植抗素的了解, 有助于开展其他植物植抗素的研究。

已经证实玉米植抗素(DIMBOA)是玉米抗大斑病、玉米镰刀菌、玉米软腐细菌、玉米叶蚜、欧洲玉米螟等病虫的生化物质, 这就有助于我们在进行玉米抗病虫育种工作中, 利用玉米植抗素(DIMBOA)作为抗病虫育种的生化指标, 也有助于进一步利用玉米植抗素的含量测定品种的抗病虫特性。还可利用影响玉米植抗素含量的因素解决: ①抗病虫品种在不利因素下降低品种自身的植抗素含量而失去抗性。②利用影响植抗素含量增加的因素提高植抗素的含量, 进而达到抗病虫的目的。

7 存在问题和今后研究方向

玉米植抗素的研究至今已有 30 多年的历史, 尽管做了广泛而深入的研究, 但仍存在一些问题有待进一步研究: ①由于玉米植抗素(DIMBOA)是病菌、害虫危害损伤玉米组织后产生的一种抑制病虫的物质, 而玉米体内哪些因素与这种抑制物质的产生有关还不清楚, 所以这种植抗素在抗病虫鉴定中的应用还有待进一步研究。②玉米植株体内积累丁布(DIMBOA)的遗传性还不完全明了, 有待进一步澄清。③还需进一步研究真菌的菌丝、孢子或他们的代谢产物中具有能诱导植物形成植抗素的诱导体、诱导体的化学本质以及诱导植物形成植抗素的机制等。

参 考 文 献

- 1 Long B J, Dunn G M, Routley D G. Relationship of hydroxamic acid content in maize and resistance to northern corn leaf blight. *Crop Sci*, 1975; 15: 333~335
- 2 Virtanen A L, Wahlroos Ö. 6-methoxy-benzoxazolinone(MBOA) and benzoxazolinone(BOA) which were earlier isolated from wheat and maize plants(MBOA) and from rye plants(BOA). were formed from precursors in these plants. *Suomen Kemistilehti B*, 1958; 31: 402
- 3 Wahlroos O, Virtanen A L. The precursors of 6-methoxyben-zoxazolinone in maize and wheat plant, their isola-

- tion and some of their properties. *Acta Chem Scand.* 1959; 13: 1 906~1 908
- 4 Brendenberg J B, Honkanen E, Virtanen A I The kinetics and mechanism of decomposition of 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one. *Acta Chem Scand.* 1962; 16: 135~141
 - 5 Tipton C L, Klun J A, Husted R R *et al.* Cyclic hydroxamic acids and related compounds from maize. *Biochemistry*, 1967; 6: 2 866~2 870
 - 6 Lim S M, Hooker A L, Paxton J D. Isolation of phytoalexins from corn with monogenic resistance to *helminthosporium thricum*. *Phytopathology*, 1970; 60(7): 1 071~1 075
 - 7 唐德志, 葛永红. 关于玉米植抗素的研究——影响植抗素含量的因素和测定技术. 植物保护, 1981; (4): 2~4
 - 8 Calub A G, Dunn G M, Routley D G *et al.* Genetic and environmental effects on production of inhibitory compound in corn resistant to *Helminthosporium turcicum*. *Crop Science*, 1974; 14(3): 359~361
 - 9 Long B J, Dunn G M, Routley D G. Relationship hydroxamate concentration in maize and field reaction to *Helminthosporium turcicum*. *Crop science*, 1978; 18(4): 573~575
 - 10 Calub A G, Long B J, Dunn G M. Production of inhibitory compounds in corn inbreds with monogenic and multigenic resistance to *Helminthosporium turcicum*. *Crop Science*, 1974; 14;(2): 303~304
 - 11 Whitney N J, Mortimore C G. Effect of 6-methoxybenzoxazolinone on the growth of *xanthomonas stewartii* (E. F. Smith) Dowson and its presence in sweet corn (*zea mays* var. *Saccharata* Bailey). *Nature*, 1961; 189: 596~597
 - 12 Hartman J R, Kelman A, Upper C D. Differential inhibitory activity of a corn extract to *Erwinia* spp. causing soft-rot. *Phytopathology*. 1975; 65: 1 082~1 088
 - 13 Lacy G H, Hrano S S, Victoria J I *et al.* Relative inhibition of soft-rotting *Erwinia* strains by DIMBOA in relation to host origin and pathogenicity to corn (Abstr.). *Proc Am Phytopathol Soc*, 1977; 4: 140~141
 - 14 Woodward M D, Corcuera L J, Helgeson J P *et al.* Factors that influence the activity of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3-(4H)-one on *Erwinia* species in growth assays. *Plant Physiol*, 1978; 61: 803~805
 - 15 Corcuera L J, Woodward M D, Helgson J P *et al.* Dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3-(4H)-one, an inhibitor from *zea mays* with differential activity against soft-rotting *Erwinia* species. *Plant Physiol*, 1978; 61: 791~795
 - 16 Long B J, Dunn C M, Bowmdn J S *et al.* Corn and resistance to the corn leaf aphid. *Crop Sci*, 1977; 17: 55~58
 - 17 Klun J A, Brindley T A. Role of 6-methoxybenzoxazolinone in inbred resistance of host plant (maize) to first-brood larvae of European corn borer. *J Econ Entomol*, 1966; 59: 711~718
 - 18 Klun J A, Tipton G L, Brindley T A. 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA), an active agent in the resistance of maize to European corn borer. *J Econ Entomol*, 1967; 60: 1 529~1 533
 - 19 Klun J A, Robinson J F. Concentration of two 1-4-benzoxazinones in dent corn at various stages of development of the plant and its relation to resistance of the host plant. *Entomol*, 1969; 62: 214~220
 - 20 Klun J A, Guthrie W D, Hallauer A R *et al.* Genetic nature of the concentration of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one and resistance to the European corn borer in a diallel set of eleven maize inbreds. *Crop Sci*, 1970; 10: 87~90
 - 21 Russell W A, Guthrie W D, Klun J A *et al.* Selection for resistance in maize to first-brood European corn borer

- by using leaf-feeding damage of the insect and chemical analysis for DIMBOA in the plant. *Journal of Economic Entomology*, 1975; 68(1): 31 ~ 34
- 22 Scriber J M, Tingey W M, Granon V E *et al* Leaf-feeding resistance to the European corn borer in genotypes of tropical (low-DIMBOA) and U S inbred(High-DIMBOA) maize. *Journal of Economic Entomology*, 1975; 68(6): 823 ~ 826
- 23 Guthrie W D, Wilson R L, Cants J R *et al* European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) leaf-feeding resistance and DIMBOA content in inbred lines of dent maize grown under field versus greenhouse condition. *J Econ Entomol*, 1986; 79(6): 1 492 ~ 1 496

New Progress in Study of Corn Phytoalexin

Tang Dezhi

(Institute of Plant Protection, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu, 730070)

Abstract This paper describes the chemical composition, research method and effects on chemical properties on plant disease and insect pest of corn phytoalexin in details. Also, suggests the existing problems and future research directions of corn phytoalexin.

Key words corn phytoalexin, disease resistant breeding, corn