

# 玉米灰斑病抗性反应中酚类物质代谢作用的研究

郭红莲<sup>1</sup>, 程根武<sup>1</sup>, 陈捷<sup>1, 2\*</sup>, 冯晶<sup>1</sup>, 崔澍<sup>1</sup>, 唐树戈<sup>1</sup><sup>1</sup>沈阳农业大学植保学院, 沈阳 110161; <sup>2</sup>上海交通大学农业与生物学院, 上海 201101

**摘要:** 研究了玉米灰斑病菌 (*Cercospora zeae-maydis*) 侵染前后的 4 个玉米品种苯丙氨酸解氨酶、过氧化物酶、多酚氧化酶及木质素含量的变化。3 种酶比活性在病菌侵染后都发生明显的先增后降的变化, 而抗病品种的变化要明显大于感病品种的变化, 尤其是苯丙氨酸解氨酶最大增加活性与品种抗病性呈现极显著的相关性。4 个品种的木质素含量在病菌侵染的第 9 d 时增加到最大值, 以后略下降, 而且抗病品种的木质素含量峰值高于感病品种的峰值。

**关键词:** 玉米灰斑病; 抗病机制; 酚类代谢

## The function of phenolic metabolism in resistant mechanism of gray leaf spot of corn

GUO Hong-lian<sup>1</sup>, CHENG Gen-wu<sup>1</sup>, CHEN Jie<sup>1, 2\*</sup>, FENG Jing<sup>1</sup>, CUI Shu<sup>1</sup>, TANG Shu-ge<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China; <sup>2</sup>Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201101, China)

**Abstract:** The activities of three enzymes related to phenolic metabolism and lignin biosynthesis were studied in four corn cultivars with different level of resistance to the pathogen of gray leaf spot (*Cercospora zeae-maydis* Tehon & Daniels). The phenylalanine ammonia-lyase (PAL), peroxidase (POD) and polyphenoloxidase (PPO) showed the induced activity peaks following the inoculation. The increasing of these enzymes was more significant in resistant cultivars than in susceptible cultivars. Especially, the increase of PAL activity in different cultivars was positively related with their level of resistance to the pathogen. Lignin, one product from phenolic metabolism pathway, increased in four cultivars and had its maximum 9 days after inoculation. The resistance cultivars showed higher level of lignin content than that in susceptible cultivars.

**Key words:** corn gray leaf spot; resistant mechanism; phenolic metabolism

中图分类号: S435.131.4; S432.23

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2003)04-0342-05

玉米灰斑病 (*Cercospora zeae-maydis*) 是近几年流行于我国东北地区的一种主要叶部病害, 为害极为严重<sup>[1]</sup>。该病暴发流行的一个主要原因是目前主栽的品种很多为高油、高淀粉的品种, 品种资源遗传基础窄, 缺少对该病的抗性基因, 因此选育抗性品种是最终解决该病害的主要途径。目前国内外尚未开展玉米灰斑病抗病机制的系统研究<sup>[2, 3]</sup>, 限制了选育抗病品种时生理、生化指标的确定和对抗性资源的合理利用。

植物体内绝大多数酚类物质合成的共同前体物质都是苯丙氨酸, 因而其代谢的关键酶—苯丙氨酸解氨酶(PAL)对植物生长发育及代谢调控的作用是尤其重要的。人们已发现酚类物质及其氧化产物醌类

是对病原物有很高毒性的物质, 一方面可以钝化病菌产生的毒素, 一方面可能是植保素合成的前体, 参与植物对病原物的生化和物理防御; PAL 基因是植物的防卫反应基因<sup>[4]</sup>, 多酚氧化酶(PPO)是酚类物质氧化的主要酶, 参与植物体内酚类物质氧化产生醌类和参与木质素的合成, 以杀死和抑制病原菌的繁殖而起到抗病作用。部分过氧化物酶(POD)可以催化酚类物质的氧化及木质素前体松柏醇的形成, 木质素作为酚类物质的代谢产物, 除对病菌起到屏蔽外, 还是植物细胞壁的组成成分<sup>[5]</sup>。近年来国内外对酚类物质的研究十分活跃, 在一定程度上对揭示植物抗病机制起到了积极作用。作者所在实验室通过对一系列主栽玉米品种叶部病害抗性生理的系统研究, 已经明确了

收稿日期: 2002-11-12 修回日期: 2003-04-29

基金项目: 国家“九五”攻关项目(96-005-01-03-03)

\*通讯作者

作者简介: 郭红莲(1971—), 女, 黑龙江省人, 现为中科院大连化学物理所博士后, 从事植物诱抗机理研究。

玉米对真菌性病害主要通过结构抗性和生理生化抗性共同起作用, 本文选用了遗传背景明确、抗病性不同的 4 个玉米品种, 测定它们在灰斑病菌侵染过程中 PAL、PPO、POD 酶比活性及木质素含量的变化, 阐述酚类物质代谢在灰斑病抗性机制中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试品种

抗、感性不同的 4 个品种: 抗病品种沈试 30 和沈试 29 (东亚种苗公司提供), 感病品种掖单 13 和铁单 9 (丹东农科院提供)。

### 1.2 供试病原菌

玉米灰斑病亲和菌株 G-6 (*Cercospora zeae-maydis*), 本实验室提供。病菌在 V8 培养基上培养 15 d 后, 用无菌水冲洗, 配成浓度为  $2 \times 10^6$  mL<sup>-1</sup> 的孢子悬浮液备用。

### 1.3 玉米种植与接种

供试玉米种子, 经温水浸种 (55 °C, 15 min) 消毒后, 播种于温室花盆中, 花盆直径 25 cm, 高 15 cm, 每盆 3 株。营养土取自沈阳农大试验田。在 8~10 叶期叶面喷雾接种, 保湿 3 d, 以清水喷雾处理的叶片为空白对照, 分别在接种后第 0、3、5、7、9、11、13 d 取样, 选取生长势一致的第 5、6 叶片, 每次取 3 株, 重复取样 3 次。其中一部分用于测定木质素含量, 另外部分于液氮中速冻后, 装入封口塑料袋中, 置 -40 °C 冰柜

中保存, 用于测定各酶比活性。花盆中植株一般于接种 14 d 后出现病斑, 在接种 25 d 后调查病害发生情况。

### 1.4 发病情况调查

分别调查第 4~8 叶的病斑面积。调查方法是在第 4~8 叶截去叶尖和叶基各 2 cm, 测出剩余部分叶面积与病斑叶面积后, 算出每平方厘米叶面的病斑面积百分比。

### 1.5 酶比活性测定

1.5.1 PAL 比活性测定 参考薛应龙<sup>[6]</sup>的方法, 以 0.02 mol/L L-苯丙氨酸为底物, 酶活性单位定义为 OD<sub>290</sub> 改变 0.01 为比活性单位 U。

1.5.2 POD 比活性测定 根据张宪政等<sup>[7]</sup>的方法, 底物中含 2.5% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 137 μL, 愈创木酚 83 μL, 反应总体积 3 mL。以 OD<sub>470</sub> 值增加 0.1 为 1 个酶比活性单位。

1.5.3 PPO 比活性测定 参照谭兴杰等<sup>[8]</sup>的方法, 以 0.02 mol/L 邻苯二酚为底物, 酶比活性单位 U 定义为 398 nm 波长下吸光值改变 0.001 所需的酶量。

### 1.6 蛋白质含量测定

按 Bradford<sup>[9]</sup>法。

### 1.7 木质素含量测定

参照波钦诺克<sup>[10]</sup>的碘量法测定, 取 10 mL 0.25 mol/L 的预先用同样数量水稀释后的硫酸-重铬酸钾装入三角瓶中作为对照滴定。

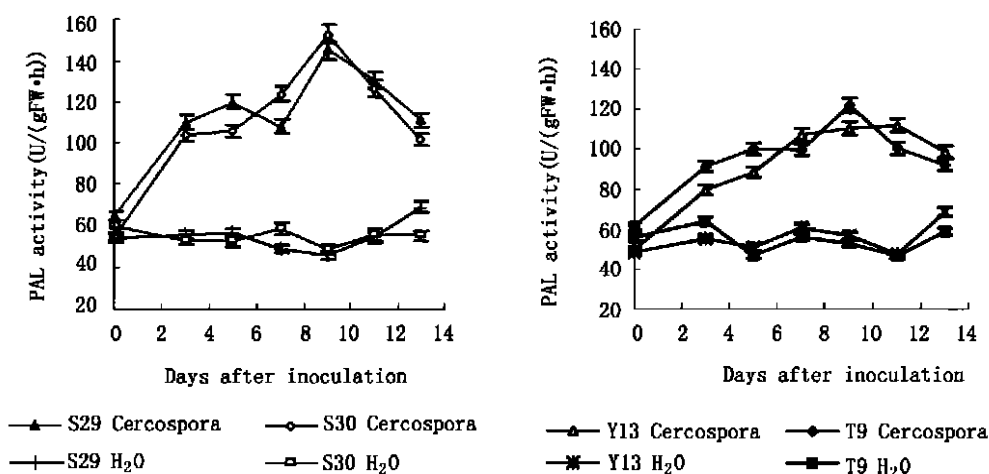


图 1 不同玉米品种接种玉米灰斑病菌后 PAL 酶活性的变化

Fig. 1 Time course of PAL activities in different maize cultivars after inoculation with *C. zeae-maydis*

注: S29 为沈试 29, S30 为沈试 30, Y13 为掖单 13, T9 为铁单 9; *Cercospora* 表示接种孢子悬液  $2 \times 10^6$  mL, H<sub>2</sub>O 表示喷清水做对照。每样品重复 3 次。

Note: Shenshi 29 (S29), Shenshi 30 (S30), Yedan13 (Y13) and Tiedan 9 (T9) were inoculated with  $2 \times 10^6$  spores/mL of *C. zeae-maydis* (*Cercospora*) or water (H<sub>2</sub>O) as a control. Samples were harvested as the indicated time and PAL activity was measured. The same experiments were repeated three times.

## 2 结果与分析

### 2.1 接种致病菌后, 酚类物质代谢有关酶比活性的动力学变化

2.1.1 PAL 酶比活性的变化 4 个供试品种在接种尾孢菌后 PAL 酶活性发生较大的变化, 品种抗性不同, 其 PAL 酶比活性被激发的程度也不同。未接种的各品种在测定时间内酶比活性变化不大, 而接种后抗病品种沈试 29 和沈试 30 及感病品种掖单 13 和铁

单 9 的 PAL 酶比活性在第 3 d 已经上升, 至第 9~11 d 时增加到峰值, 而且抗病品种的 PAL 酶比活性比感病品种的酶比活性峰值略大(如图 1)。

2.1.2 POD 酶比活性的变化 如图 2 所示, 接种后各品种间 POD 酶比活性变化差异明显。供试 4 个品种的 POD 酶比活性都呈先增后降趋势, 而且抗病品种沈试 29 和沈试 30 的酶比活性最大值明显高于另 2 个感病品种的 POD 酶比活性最大值。

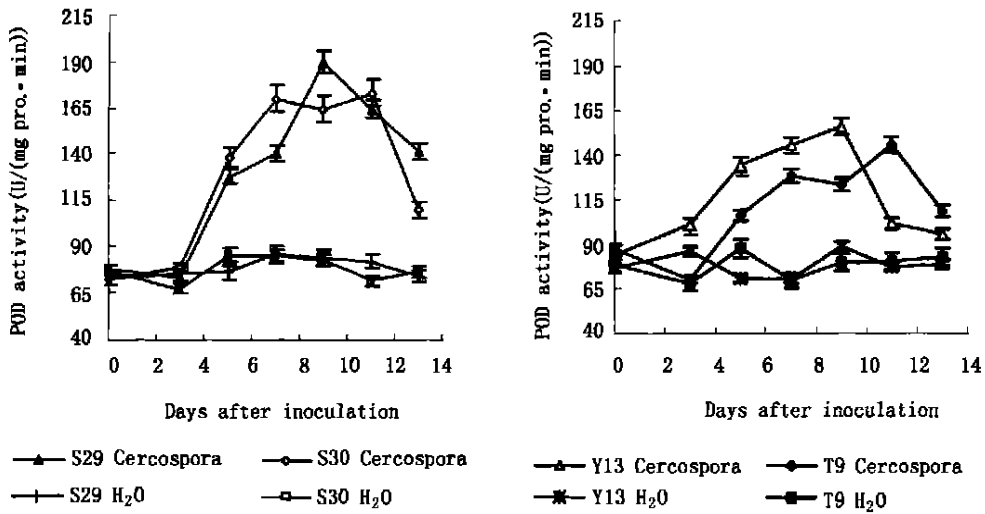


图 2 不同玉米品种接种玉米灰斑病菌后 POD 酶活性的变化

Fig. 2 Time course of POD activities in different maize cultivars after inoculation with *C. zeae-maydis*

图注: 同图 1。 Note: The same as Fig. 1.

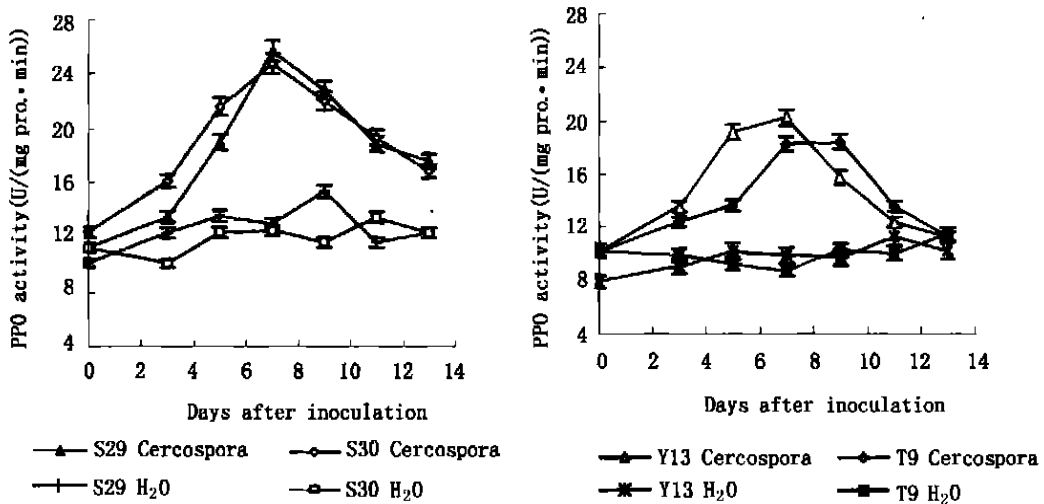


图 3 不同玉米品种接种玉米灰斑病菌后 PPO 酶活性的变化

Fig. 3 Time course of PPO activities in different maize cultivars after inoculation with *C. zeae-maydis*

图注: 同图 1。 Note: The same as Fig. 1.

2.1.3 PPO 酶比活性的变化 如图 3 所示, 所有品种在未接种时, PPO 酶比活性变化趋势不明显, 波动范围都不大。接种灰斑病菌后, 各品种的 PPO 酶比活性都呈明显的先增后降的变化趋势, 在接种后第 7 d 左右时 4 个品种的 PPO 酶比活性都达到最大值。

2.2 各酶比活性变化与发病程度的相关性分析

把酶比活性的最大增加值(酶比活性的峰值与该品种对照酶比活性均值之差)与发病程度做相关性分析, 结果见表。

品种发病程度与 PAL 酶比活性的最大增加值的相关系数达到了  $P=0.05$  水平的显著度, 表明 PAL 活性与抗病性有密切的关系。PAL 是植物体内酚类物质代谢的限速酶, 因而也表明酚类物质代谢与抗病

性密切相关。

2.3 木质素含量的变化

未接种的健叶组织中, 多数品种木质素的含量随生育期的增加略呈增加的趋势, 但增加的范围不大。从接种的第 3 d 起, 4 个供试品种的木质素含量都明显增加, 并在接种后第 9 d 时达到增长的高峰, 此时抗病品种沈试 30 的增长幅度最大, 比初始接种时的叶片木质素含量增加了 2.96 倍。在第 9 d 以后 4 个品种的木质素含量都有不同程度的下降, 到接种第 13 d 时 4 个品种的木质素含量仍均高于同期的空白对照。抗病品种的木质素含量最大值高于感病品种的最大值(图 4)。

表 发病程度与最大酶比活性增加值的相关性分析

Table Analysis of the correlation between disease level and the largest increase of enzyme activities

品 种 Cultivars	发病程度 Disease level	酶比活性最大增加值 The largest increase of enzyme activities		
		PAL	POD	PPO
掖单 13 Yedan13	7.48	56.09	80.07	10.51
铁单 9 Tiedan 9	6.94	67.35	57.12	8.42
沈试 30 Shershi 30	4.33	97.97	102.72	12.77
沈试 29 Shershi 29	5.04	90.67	114.52	13.03
Correlation coefficient	—	—0.99	—0.79	—0.82
$r_{0.1}$		Sg	Un	Un

d. f. = 2,  $r_{0.1}=0.900$ ,  $r_{0.05}=0.950$

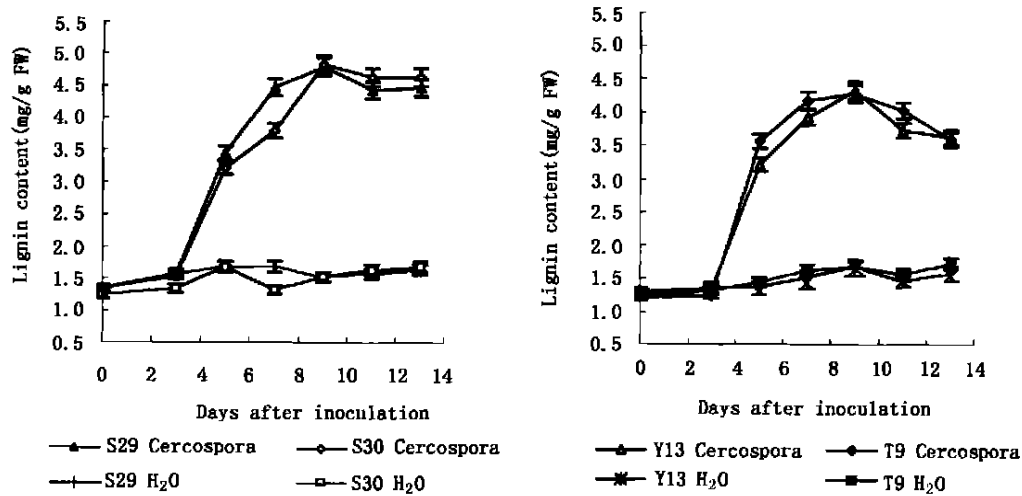


图 4 不同玉米品种接种玉米灰斑病菌后木质素含量的变化

Fig. 4 The content of lignin in different maize cultivars after inoculation with *C. zeae-maydis*

图注: 同图 1. Note: The same as Fig. 1.

### 3 讨论

抗病性不同的品种接种灰斑病菌时, 酚类物质代谢都发生了明显的变化。其中酚类代谢的关键酶与抗性的关系极为密切。陈捷等<sup>[11]</sup>在研究玉米弯孢菌叶斑病抗性机制中发现, 抗病品种 PPO、PAL、POD 及木质素含量上升较感病品种快, 与本研究结果基本一致。说明玉米对叶部病原菌侵染引起的变化可能存在共同的抗性机制, 即酚类物质代谢的变化是引起抗病机制的重要基础。

木质素作为植物细胞壁的基本组成成分之一, 不仅对病原微生物的侵害起到屏障作用, 而且木质素的低分子量酚类前体以及多聚作用时产生的游离基可以钝化病原真菌的细胞<sup>[7]</sup>, 据报道, 植物诱导抗病过程中会增加木质素的含量, 本实验中木质素含量增加与 PAL、POD 活性增高表现出一致性, 表明在灰斑病菌侵染过程中, 通过 PAL 活性提高进而引起木质素含量增加这一途径在植物抗性机制中发挥重要作用。

### 参考文献

[1] 王桂清, 陈捷. 玉米灰斑病抗病性研究进展[J]. 沈阳农业大学学

报, 2000, 31(5): 418—422.

- [2] 高增贵, 陈捷, 薛春生, 等. 玉米灰斑病发生和流行规律及其发病条件的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2000 31(5): 460—464.
- [3] 吴纪昌, 马丽君, 王作英. 玉米抗尾孢菌叶斑病鉴定与抗病材料利用[J]. 辽宁农业科学, 1997, (5): 25—29.
- [4] 余叔文, 汤章城. 植物生理与分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 770—783.
- [5] 何晨阳. 双核丝核菌诱导水稻增强广谱抗病性和防卫酶系活性[J]. 植物病理学报, 2001, 31(3): 208—212.
- [6] 薛应龙. 植物生理学实验手册[M]. 上海: 上海科技出版社, 1985. 191—192.
- [7] 张宪政, 谭桂茹, 黄元极, 等. 植物生理学实验技术[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1989. 99—100.
- [8] 谭兴杰, 李月标. 荔枝(*Litchi chinensis*)果皮多酚氧化酶的部分纯化及性质[J]. 植物生理学报, 1984, 10(4): 339—345.
- [9] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal. Biochem., 1976, 72: 243—254.
- [10] Починок(波钦诺克)X H. 荆家海, 丁钟荣译. 植物生物化学分析方法[M]. 北京: 科学出版社, 1981. 178—181.
- [11] 陈捷, 蔺瑞明, 高增贵, 等. 玉米弯孢叶斑病菌毒素对寄主防御酶系活性的影响及诱导抗性效应[J]. 植物病理学报, 2002, 32(1): 43—48.

责任编辑 林春芽