

灰斑病菌对大豆叶片总多酚和总黄酮的诱导研究^{*}

徐兆飞¹ 刘亚光²

(1. 黑龙江省泰来县农业技术推广中心, 泰来 162400; 2. 东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030)

摘要 利用大豆灰斑病菌不同致病力的生理小种接种抗感不同的大豆品种, 结果表明: 大豆叶片内总黄酮类物质的含量与品种的抗病性呈明显正相关; 感病品种叶片内总多酚含量变化显著降低, 抗病品种总体变化不大。接种致病力强的生理小种能够大幅度提高抗病品种体内总黄酮含量, 这一结果可以作为筛选和鉴定抗病品种的一种生化指标; 大豆灰斑病菌弱毒菌株能够诱导感病品种体内总黄酮含量提高, 进而提高大豆的抗病性, 这一结果为大豆灰斑病的生物防治提供了依据。

关键词 大豆灰斑病菌; 总多酚; 总黄酮; 诱导

中图分类号 S 565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2006)03-0234-05

0 前言

大豆灰斑病(*Cercospora sojina* Hara)作为一种世界性的重要病害, 受到了国内外植物病理学家与遗传育种界的普遍关注, 并对此开展了大量研究, 如在大豆灰斑病的生物学特性、抗性遗传、抗源筛选和抗病育种、大豆灰斑病抗病基因分子标记以及大豆灰斑病的组织抗性和生化抗性等诸多方面, 取得了不少有意义的结果, 但对诱导抗性机制的研究还未见报道。

植物一旦受到病菌侵染或非病原菌侵染之后, 能在侵染点或附近组织细胞中产生或积累具有抗菌作用的一些物质: 如酚类物质、植物保卫素、木质素等。类黄酮化合物有很强的抗菌作用, 其中绝大多数的植保素为类黄酮化合物(章元寿, 1996)。酚类化合物的积累, 能阻止病原菌的生产、抑制孢子萌发和菌丝生长, 还可抑制病原物毒素及酶的产生或使其钝化(王金生, 1995), 被称为酚类植保素。因此, 诱导大豆体内类黄酮和酚类物质增多, 对提高其抗病性具有重要作用。国外利用病原物非亲和小种、病原物弱致病株系以及植物自身的病原菌作为诱导

因子的报道主要是针对马铃薯、菜豆、烟草、水稻、黄瓜、西瓜、甜瓜和番茄等作物上(Kue, 1982; Hedrick SA, et. al, 1998), 而对大豆进行诱导抗性方面没有见到报道, 尤其利用大豆灰斑病菌作为诱导因子诱导大豆抗性方面的研究更未见报道。

目前, 总黄酮和多酚类物质与大豆抗灰斑病之间的关系还不清楚。本研究用大豆灰斑病菌诱导抗性不同的大豆品种, 分析总多酚和总黄酮的动态变化, 旨在明确这两类物质与大豆抗病性的关系, 从而对揭示大豆灰斑病的生化抗性机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

抗病品种东农 9674 和东农 1572(高抗-抗 10 个生理小种), 感病品种东农 1330、黑农 39 和东农 95-165(高感-感 10 个生理小种); 大豆灰斑病菌 1 号、2 号、6 号和 7 号生理小种, 以上材料均由东北农业大学大豆研究所提供。

1.2 诱导处理

在盆栽大豆第四片复叶完全展开时, 将浓度为 1.5×10^4 个/ml 不同生理小种的孢子悬浮液, 喷雾

^{*} 收稿日期: 2006-03-20

基金项目: 哈尔滨市科技局, 学科后备带头人基金(2004AFXXJ049), 大豆生物学教育部重点实验室主任基金项目资助

作者简介: 徐兆飞(1963-), 男, 高级农艺师, 主要从事农业技术推广工作, Tel: 0452-8223265

通讯作者: 刘亚光(1968-), 女, 博士, 副教授, E-mail: liuyaguang@sina.com

法接种于大豆叶片上。对照喷洒 3%蔗糖溶液, 保湿 48h, 所有处理均设 5 次重复。

1.3 取样方法

于接种后的第 1~10 天连续取样各处理的第三片复叶, 5 次重复, 保存在 -20℃冰柜中备用。

1.4 总多酚提取与含量测定参考藤冰等(1999)和唐宇等(1989)人的方法。

1.5 总黄酮提取与含量测定参考藤冰等(1999)、邬建敏等(1998)、庄炳昌等(1993)、宋凤鸣等 1996)人的方法。

1.6 用 SAS 软件对数据进行统计和差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 大豆叶片内总多酚含量的动态变化

2.1.1 抗性不同大豆未接种处理的叶片内总多酚含量比较

抗性不同的大豆品种体内均含有一定量的酚类物质, 随着植株的生长发生相应的变化。从图 1 来看, 当植株未感染病菌时, 抗病品种(东农 9674 和东农 1572)和感病品种(黑农 39 和东农 95-165)体内总多酚含量没有明显的高低之分, 抗感品种总多酚变化量在 0.01 水平没有显著差异。

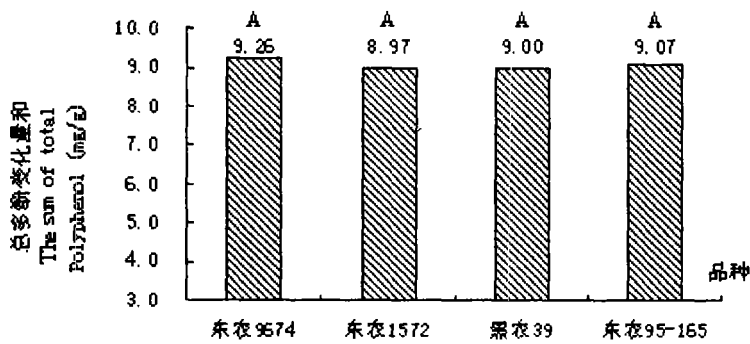


图 1 未接种的不同抗性大豆对照叶片内总多酚含量 10 天变化量和

Fig. 1 The sum of content of total polyphenol in control leaves of different resistance varieties from 1 to 10-day

2.1.2 接种后叶片内总多酚含量的动态变化

与未接种的对照相比, 抗感不同的大豆品种叶片内总多酚的含量发生了明显的变化。接种的 24 小时后抗病品种总多酚含量高于对照, 而感病品种总多酚含量均明显下降, 比对照低 1.065mg/g。总体来看, 抗病品种东农 9674 除第 4、第 8 天时测定的总多酚含量低于对照外, 其他时间总多酚含量均处高于对照的水平, 并于接种的第 8 天后总多酚含量呈明显的上升趋势; 而感病品种东农 95-165 除第 2

天、第 6 天外, 其他时间总多酚含量均处低于对照的水平, 并于接种的第 6 天后总多酚含量呈明显的下降趋势。如果将各品种接种 1~10 天内总多酚含量的变化量取平均值, 则感病品种平均下降了 0.3156mg/g, 而抗病品种只下降了 0.04mg/g, 感病品种下降的幅度是抗病品种 7.8 倍(见图 2)。经过差异显著性分析, 二者在 0.05 水平表现出显著差异。这一结果表明: 经过 6 号小种诱导后 10 天内, 感病品种大豆叶片内总多酚类含量下降显著, 而抗

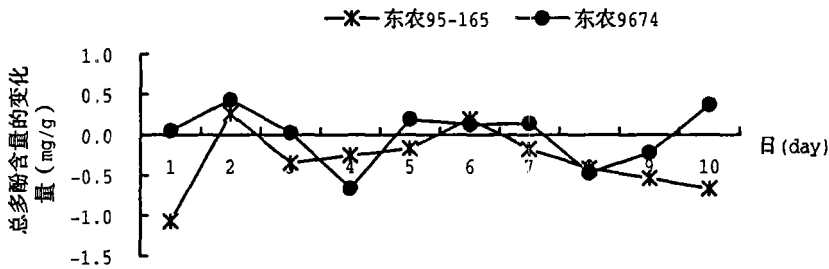


图 2 抗性不同品种接种 6 号生理小种后体内总多酚含量的动态变化

Fig. 2 The dynamic changes of total polyphenol in leaves of different resistant varieties inoculated by No. 6 races of *C. sojina*

病品种整体变化不大。

2.2 大豆叶片内总黄酮含量的动态变化

2.2.1 未接种抗感品种叶片内总黄酮含量的比较

抗性不同的大豆品种体内均含有一定量的黄酮类化合物,随着植株的生长发生相应的变化。当植

株未接种病菌时,抗感品种体内总黄酮含量没有明显的高低之分,总黄酮变化量在 0.01 水平没有显著差异,这一结果与总多酚含量一致(见图 3)。

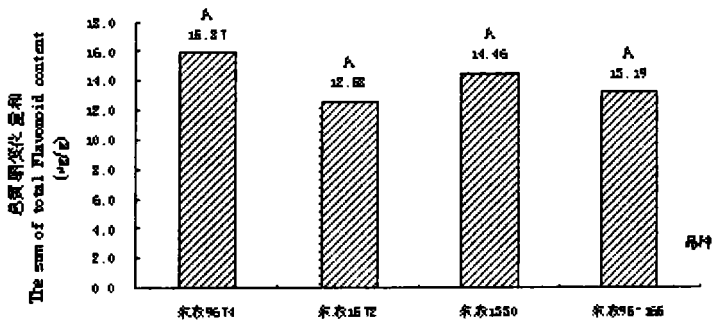


图 3 不同抗性品种未接种叶片内总黄酮 10 天内变化量和

Fig. 3 The sum of the content of total flavonoid in control leaves of different resistant varieties from 1 to 10 day

2.2.2 抗性不同的品种接种灰斑病菌后叶片内总黄酮含量的变化

与未接种的对照相比,接种 3 天后,抗感品种叶片内的总黄酮含量有了明显的差异,即抗病品种东农 1572 的总黄酮含量均处于高于对照的水平,平均比对照高出 $0.4366\mu\text{g/g}$;而感病品种东农 1330 的总黄酮含量则是略高于对照,且于接种 8 天后总黄

酮含量开始下降并远远低与对照,至第 10 天时总黄酮含量比照低 $0.549\mu\text{g/g}$ 。抗病品种于接种后 1~10 天内总黄酮含量增加幅度大且明显高于对照,而感病品种则呈下降趋势且低于对照(见图 4),抗感品种之间差异达 0.01 水平显著。这一结果表明:大豆叶片内总黄酮含量与品种的抗病性呈明显的正相关关系。

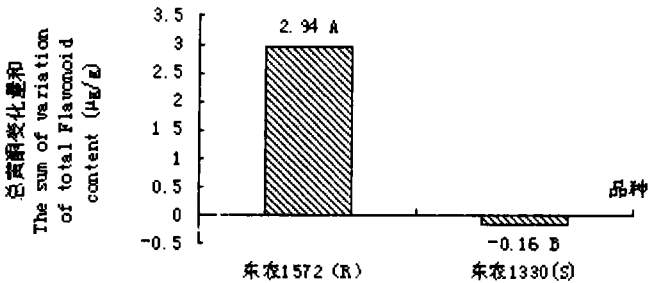


图 4 抗性不同的大豆品种感染 6 号小种后叶片内总黄酮变化量 10 天之和

Fig. 4 The sum of the variation of total flavonoid in leaves of different resistant varieties inoculated by No.6 races of *C. sojina* from 1 to 10 day

2.2.3 致病力不同的生理小种对大豆体内总黄酮含量的影响

感病品种黑农 39 在接不同生理小种的灰斑病菌后,叶片内总黄酮含量的变化规律也基本一致,均是在第 3 天总黄酮含量比对照低,从第 4 天到第 8 天总黄酮含量都比对照高,从第 7 天开始显著下降(除 1 号小种外),在第 10 天时仅接 1 号生理小种的总黄酮含量比对照高,接其他各小种的均比对照低,其中接 2 号、6 号、7 号的叶片内总黄酮含量下降程度明显强于 1 号小种。另外,不同生理小种对大豆叶片总黄酮含量影响不同,诱导感病品种黑农 39 总黄酮变化量之间的差异达到 0.01 水平显著,接种致病力越弱的小种诱导叶片内总黄酮含量增加的幅度

越大(见图 5)。

这说明总黄酮含量的变化与生理小种的致病力密切关系,致病力弱的 1 号生理小种能够诱导感病品种体内总黄酮含量显著提高,这一发现为利用弱毒菌株诱导来提高大豆的抗病性,开展生物防治的研究提供了依据。

抗病品种东农 1572 接不同生理小种的灰斑病菌后叶片内总黄酮含量的变化,除在接种后第 5 天(接 1、2 号小种的处在波峰、而接 6、7 号小种的处在波谷)外,其他时间总黄酮含量的变化大体趋势是一致的,即接种后第 1 天开始下降至第 3 天达到最低,从第 3 天起处于上升趋势,在 4~8 天时现平稳且基本处在高于对照的水平,第 8 天起呈上升至第 9 天

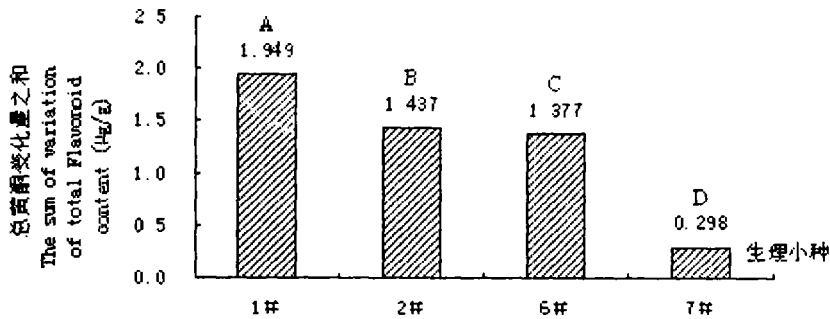


图5 不同生理小种诱导黑农39总黄酮变化量10天内之和

Fig.5 The sum of variation of total flavonoid content in leaves of HN-39(S) inoculated by different races of *C. sojina* during 1 to 10 days

时接不同小种的均处在最高峰值,峰值由高到低的顺序为7、6、2和1号生理小种,其总黄酮含量分别比对照高出 $1.348\mu\text{g/g}$ 、 $0.912\mu\text{g/g}$ 、 $0.880\mu\text{g/g}$ 和 $0.686\mu\text{g/g}$,至第10天时仍高于对照。结果说明总黄酮含量的变化与生理小种的致病力有着密切关系,无论其致病力的强弱均使抗病品种的总黄酮含

量于接种10天内处在高于对照的水平。总体来看,生理小种的致病力越强,其诱导抗病品种体内总黄酮含量增高的幅度就越大,而且差异达到0.01水平显著(见图6)。这可能是东农1572对灰斑病菌10个不同致病力的生理小种均表现抗病的机理之一。

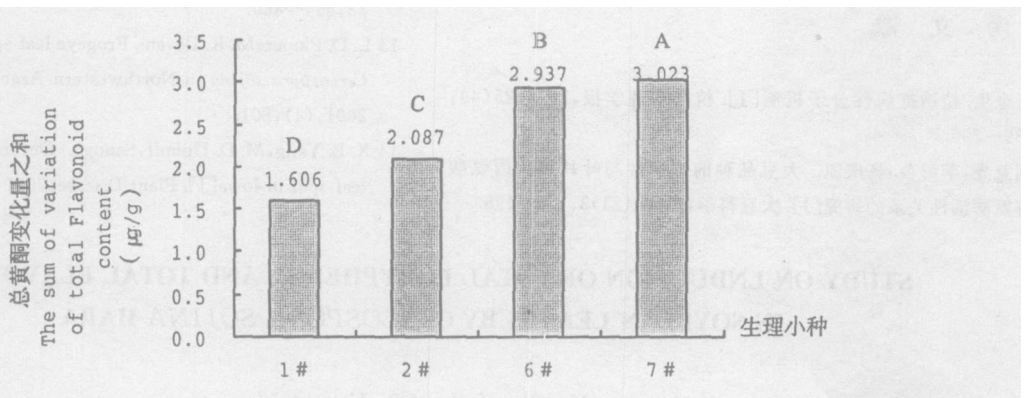


图6 不同生理小种诱导抗病品种东农1572总黄酮变化量10天内之和

Fig.6 The sum of variation of total flavonoid content in leaves of DN-1572(R) inoculated by different races of *C. sojina* during 1 to 10 days

3 结论

3.1 总多酚含量与品种的抗病性呈明显的正相关

未经接种灰斑病菌的抗感品种之间总多酚含量没有表现出明显的差异。接种后,抗病品种总多酚含量基本处在高于对照的水平,而感病品种总多酚含量基本处在低于对照的水平,感病品种下降的幅度是抗病品种7.8倍。经6号小种诱导后的10天内,感病品种大豆叶片内总多酚类含量下降显著,而抗病品种整体变化不大。

3.2 总黄酮含量与大豆品种的抗病性呈明显的正相关

未接种病菌时,抗感品种之间的总黄酮含量没有表现出明显的差异。抗病品种于接种后10天内

总黄酮含量增加幅度大且明显高于对照,而感病品种则呈下降趋势且低于对照;致病力弱的1号生理小种能够诱导感病品种体内总黄酮含量显著提高,这一发现为利用弱毒生理小种诱导大豆的抗病性提供了可能;总黄酮含量的变化与生理小种的致病力有着密切关系,生理小种的致病力越强,其诱导抗病品种体内总黄酮含量增高的幅度就越大。因此,说明总黄酮类化合物是大豆产生抗灰斑病性机制中的一类重要生物物质。

4 讨论

当灰斑病菌感染大豆叶片后,使苯丙烷类代谢途径的关键酶-PAL活性的增强(刘亚光,2002),促进了酚类物质的合成,加之多酚氧化酶的氧化作

用,从而使抗病品种对灰斑病表现出了抗病性。这可能是大豆对灰斑病菌产生抗性的重要机制之一。本研究还发现:致病力强的生理小种比致病力弱的生理小种对感病品种体内的总黄酮含量诱导作用弱,这可能是导致感病品种抵制致病力强的生理小种能力弱、容易感病的原因之一;而致病力强的生理小种(7号)比致病力弱的生理小种(1号)使抗病品种体内总黄酮含量提高的幅度大,这可能是抗病品种具有的生化抗性机制之一。

接种致病力强的生理小种能够大幅度提高抗病品种体总黄酮含量,这一结果可以作为筛选和鉴定抗病品种的一个参考生化指标;大豆灰斑病菌弱毒菌株能够诱导感病品种体内总黄酮含量提高,进而提高大豆的抗病性,这一结果为进一步研究大豆灰斑病的生物诱导抗性提供了一条思路。

参 考 文 献

- 1 王金生.植物抗病性分子机制[J].植物病理学报,1995,25(4):289~295
- 2 刘亚光,李海英,杨庆凯.大豆品种的抗病性与叶片内苯丙氨酸解氨酶活性关系的研究[J].大豆科学,2002,(21)3:195~198
- 3 刘忠堂.大豆灰斑病的危害与抗病育种工作回顾[J].大豆科学,

1991,10(2):157~161.

- 4 庄炳昌,王玉民.抗性不同大豆品种感染灰斑后若干生化反应[J].作物学报,1993,19(6):567~569
- 5 邬建敏,贾之慎.竹类黄酮化合物总量及芦丁含量的测定[J].浙江农业大学学报,1998,24(4):425~428
- 6 宋凤鸣,郑重.绿原酸和阿魏酸与棉花对枯萎病抗性的关系[J].浙江农业大学学报,1996,23(3):236~240
- 7 杨庆凯,张晓刚.大豆抗灰斑病的遗传分析及其在抗病育种中的应用[J].中国农业科学,1996,29(4):33~38
- 8 唐宇,赵钢.荞麦中总黄酮和芦丁含量的变化[J].植物生理学通讯,1989(1):33~35
- 9 章元寿主编.植物病理生理学[M].南京:江苏科学技术出版社,1996,214~219
- 10 滕冰,吴宗璞.大豆种粒中总多酚含量的分析方法[J].大豆科学,1999,18(3):265~268
- 11 Hedrick SA, Bell JN, Boller T, et al. Chitinase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding, and infection[J]. Plant Physiol., 1998, 96: 182~186
- 12 Kue J. Induced immunity to plant disease[J]. Bioscience, 1982, 32: 854~860
- 13 L. D. Ploper, M. R. Devani. Frogeye leaf spot of soybean caused by *Cercospora soja* in Northwestern Argentina[J]. Plant Disease, 2001, (4): 801.
- 14 X. B. Yang, M. D. Uphoff, Sanogo. Outbreaks of soybean Frogeye leaf spot in Iowa[J]. Plant Disease, 2001, (4): 443.

STUDY ON INDUCTION OF TOTAL POLYPHENOL AND TOTAL FLAVONOID IN SOYBEAN LEAVES BY *CERCOSPORA SOJINA* HARA

Xu Zhao-fei¹ Liu Ya-guang²

(1. Agriculture Technique Popularize Center, Tailai County 162400;
2. Agriculture College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract After inoculated soybeans of different resistance with different pathogenic races of *Cercospora soja* Hara, the results showed that there was a positive correlation between total flavonoid content and the resistance of soybean variety to frogeye leaf spot. Total polyphenol content in sensitive soybean cultivars was under the control, that also was markedly lower than in resistant cultivars. Total flavonoid content rose highly in resistant soybeans that were inoculated with strong pathogenic races, which was served as a biochemical indicator screening and identifying resistant variety. The weak pathogenic race could increase the total flavonoid content, then enhanced soybean resistance. These offered a feasible basis to biocontrol of frogeye leaf spot.

Key words *Cercospora soja* Hara; Total polyphenol; Total flavonoid; Induction resistance