

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2012.05.024

## 黑斑病对甘薯叶酚类物质含量、 PPO 及 PAL 活性的影响

王景景<sup>1</sup>, 刘美艳<sup>1</sup>, 谢逸萍<sup>2</sup>, 孙厚俊<sup>2</sup>, 张健<sup>1\*</sup>

(1. 徐州师范大学 生命科学学院, 江苏 徐州 221116; 2. 中国农科院 甘薯研究中心, 江苏 徐州 221121)

**摘要:** 选用对甘薯黑斑病抗性不同的品种南京-92(高抗)和烟台-252(高感)的叶片为材料, 研究黑斑病对甘薯叶总酚含量、绿原酸含量、类黄酮含量以及苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性和酚氧化酶(PPO)活性的影响。结果表明: 在未受黑斑病侵染时, 南京-92 叶片中类黄酮含量、绿原酸含量、PAL 活性显著或极显著高于烟台-252, 可以作为选育和鉴定抗黑斑病品种的生理指标, 但总酚含量和 PPO 活性差异不显著。接种后 2~8 d 内, 南京-92 叶片内总酚含量和 PPO 活性增加迅速, 与烟台-252 达到显著或极显著差异, 总酚含量和 PPO 活性的上升速度快、保持时间长, 有利于提高对黑斑病的抵抗能力。

**关键词:** 甘薯; 黑斑病; 总酚; 绿原酸; 类黄酮; 苯丙氨酸解氨酶; 酚氧化酶

中图分类号: S435.31 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2012)03-0406-04

## Effects of *Ceratocystis fimbriata* on phenolics content, PPO and PAL activity in sweet potato

WANG Jing-Jing<sup>1</sup>, LIU Mei-Yan<sup>1</sup>, XIE Yi-Ping<sup>2</sup>,  
SUN Hou-Jun<sup>2</sup>, ZHANG Jian<sup>1\*</sup>

(1. School of Life Sciences, Xuzhou Normal University, Xuzhou 211116, China; 2. Sweet Potato Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Xuzhou 221121, China)

**Abstract:** Two varieties of sweet potato including high resistance-Nanjing-92 and high susceptible-Yantai-252 to *Ceratocystis fimbriata* were used for detection the content of total phenol, chlorogenic acid, flavonoid and the activity of PPO and PAL in sweet potato leaves. The results showed that flavonoid content, chlorogenic acid content and PAL activity of Nanjing-92 were higher than that of Yantai-252 and even reached significant or extremely significant difference in normal condition, which could be regarded as physiological indices of identifying and selecting resistant variety. It was also found that total phenol content and PPO activity of two varieties were not significant different in normal condition, however, when infected by *C. fimbriata*, total phenol content and PPO activity of Nanjing-92 increased sharply and significant or extremely significant higher than that of Yantai-252 within 2th to 8th day. The total phenol content and PPO activity raised speedily and maintained long period which could increase the resistance ability to *C. fimbriata* of sweet potato.

**Key words:** sweet potato; *Catalysts fimbriata*; total phenol; chlorogenic acid; falconoid; phenylalanine ammonia lyase; polyphenol oxidase

\* 收稿日期: 2011-12-23 修回日期: 2012-04-08

基金项目: 中央公益性行业(农业)科研专项 (nyhyzx07-012-01); 国家甘薯产业技术体系协作课题 (CARS-11-B-09-A) [Supported by Special Agro-Scientific Research Fund for the Public Interests (nyhyzx07-012-01); the National Coordination Task of Sweet Potato Industry Technology System (CARS-11-B-09-A)]

作者简介: 王景景(1967-), 女, 江苏徐州人, 硕士研究生, 从事生物化学与分子生物学的研究, (E-mail) zzzwangjing@126.com。

\* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: zhangjian@xznu.edu.cn)

甘薯 (*sweet potato, Ipomoea batataslam*) 是我国重要粮食之一, 而甘薯黑斑病 (*Ceratocystis fimbriata* Ellis. et Halst) 是甘薯栽培和贮藏中的重要病害之一(周茂繁等, 1992)。据统计, 我国每年由该病造成的产量损失为 5%~10%, 危害严重时造成的损失为 20%~50%, 甚至更高。我国已将该病列为国内检疫对象, 筛选、种植抗病品种是最重要的综合防治措施。近年来对甘薯黑斑病的研究主要集中在抗性资源筛选和品种选育、抗性遗传和抗性鉴定方法研究, 抗病基因分子标记、药剂防治等方面, 甘薯抗黑斑病生理生化机制研究较少。甘薯抗黑斑病的生理过程相当复杂, 抗病性的高低受植株体内多种抗性生理进程的综合影响。植物酚类化合物是植物次生代谢物的主要类型之一(Balasundram 等, 2006), 是苯丙烷类代谢的途径的产物, 该途径中催化苯丙烷类代谢第一步反应的酶—苯丙氨酸解氨酶(PAL), 是酚类物质、植保素、黄酮和木质素等抗菌物质合成过程中关键酶和限速酶(Dixon 等, 2002)。酚类物质对于植物抗病性有着重要的作用, 而这些物质的含量总是与 PAL 的活性密切相关, 因此 PAL 被认为是植物中重要的防御酶。酚类化合物本身对病原物具有毒害作用(Ndubizu, 1976), 而酚类植保素如绿原酸和黄酮类植保素等在阻碍入侵病原菌丝的正常发育的同时对植物也起到一定的保护作用。酚类物质氧化产物较酚类物质的杀菌能力强许多倍, 例如, 绿原酸酶促氧化产物的杀菌力比本身提高了 30%。有些酚类物质原来不具备杀菌能力, 酚氧化酶氧化后转化成杀菌物质, 因此多酚氧化酶(PPO)也被认为与植物的抗病性关系密切(陈伟等, 1997)。甘薯抗黑斑病的酚类物质代谢研究未见报道。本试验以甘薯叶为材料, 通过人工接种黑斑病菌, 研究酚类物质与甘薯黑斑病抗性之间的关系, 以期对鉴定和选育抗黑斑病品种提供可靠的抗性指标和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试甘薯品种及黑斑病菌悬浮液的制备

供试甘薯品种: 南京-92(高抗黑斑病)和烟台-252(高感黑斑病)。甘薯黑斑病病原物由江苏省徐州市农科院中国甘薯研究中心提供。在 PDA 平板培养基上接种甘薯黑斑病菌, 26 °C 培养箱倒置培养, 当整个平板长满菌丝, 孢子呈黑色时, 向平板内

加入无菌水, 用接种环剥离孢子, 制成孢子悬液, 用血球计数板在显微镜下计数, 配成每 1 mL 为  $1 \times 10^7$  孢子的悬浮液备用。

### 1.2 试验方法

剪生长一致的甘薯心叶下 6 个茎节的薯苗, 将薯苗茎基部剪口对齐后浸入菌液 3~5 cm 深, 20 min 后取出, 以此作为处理组, 以浸入清水 20 min 为对照组, 将处理组和对照组薯苗栽在无病蛭石里, 栽后浇水保湿, 每 2 d 取长势基本相同的第二、三完全展开的功能叶进行各项指标测定, 3 次重复取样。

总酚含量的测定参照林植芳等(1988)的方法。绿原酸含量的测定: 取待测样品 0.2 g 加入无水乙醇(1:5 W/V)室温下提取 1 h, 取上清液, 用 752 紫外及可见分光光度计于 324 nm 下测定 OD 值, 以  $OD_{324}/g^{-1} FW/mL^{-1}$  表示甘薯叶片中绿原酸的相对含量。类黄酮含量的测定参照庄炳昌等(1993)的方法。苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的测定参照王敬文等(1982)的方法。酚氧化酶(PPO)活性的测定参照李忠光等(2005)的方法并加以改进, 取 0.1 g 样品于研钵中, 加 500  $\mu$ L pH5.8 柠檬酸—磷酸缓冲液冰浴上研磨, 然后转移到离心管中, 再加 500  $\mu$ L 缓冲液定容至 1 mL, 摇匀。在冷冻离心机上 10 000  $r/min^{-1}$  离心 15 min, 取上清液测定酶的活性, 反应液为 3 mL 邻苯二酚和 0.1 mL 酶提取液, 用 0.1 mL 蒸馏水代替酶提取液作空白对照, 于波长 410 nm 下测定反应液光密度值(OD)的变化, 把每 1 min 光密度值变化 0.01 定义为一个酶活性单位(U)。

试验数据用 SPSS17.0 软件进行统计分析,  $P < 0.05$  为显著性差异,  $P < 0.01$  为极显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 黑斑病对两种不同抗性薯叶中总酚含量变化的影响

黑斑病对甘薯叶片总酚含量的影响见图 1。未接菌前, 高抗品种南京-92 与高感品种烟台-252 总酚含量 3 次取样平均值分别为 10.91 mg/gFW 和 9.01 mg/gFW, 差异不显著。接种病原菌后南京-92 叶片内总酚含量迅速上升, 在第 6 天达到峰值, 随后开始逐渐下降。烟台-252 总酚含量变化曲线与南京-92 趋势一致, 但是增加速度较慢。分析表明, 接种病原菌后 2~8 d 时, 南京-92 叶片内总酚含量极显著高于烟台-252。高抗品种在接菌初期总酚

含量迅速达到较高水平,在较长一段时间内保持高浓度,这对于抵抗病原菌的入侵有着积极的意义。

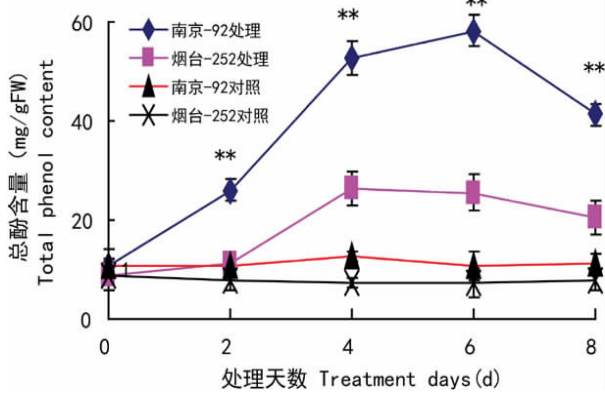


图1 黑斑病对甘薯叶片总酚含量的影响

Fig. 1 Effects of *Ceratocystis fimbriata* on total phenol content of leaves of sweet potato

\*  $P < 0.05$ , 表示南京-92 处理组与烟台-25 处理组差异达显著水平; \*\*  $P < 0.01$ , 表示南京-92 处理组与烟台-252 处理组差异达极显著水平。下同。

\*  $P < 0.05$ , significant difference between NanJing-92 and Yan-Tai-252; \*\*  $P < 0.01$ , extremely significant difference between NanJing-92 and YanTai-252. The same below.

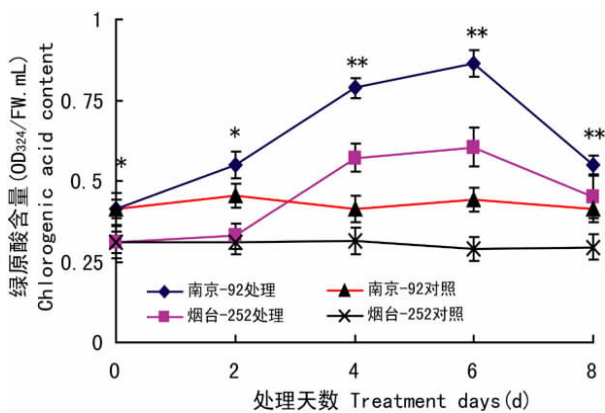


图2 黑斑病对甘薯叶片绿原酸含量的影响

Fig. 2 Effects of *Ceratocystis fimbriata* on chlorogenic acid content of leaves of sweet potato

## 2.2 黑斑病对两种不同抗性甘薯叶片绿原酸含量的影响

未受黑斑病菌侵染时,高抗品种南京-92 与高感品种烟台-252 叶片绿原酸含量差异显著 ( $P = 0.042 < 0.05$ ),因此可以把叶片绿原酸含量作为甘薯对黑斑病抗性大小的判断指标(图2)。两品种对照组绿原酸含量在测量期间变化不明显,南京-92 处理组叶片绿原酸含量高于烟台-252,差异显著性分析表明,两品种试验组绿原酸含量在 0~2 d 内显著差异,4~8 d 内达到极显著差异。

## 2.3 黑斑病对两种不同抗性甘薯叶片类黄酮含量的影响

黑斑病对不同抗性甘薯叶片类黄酮含量的影响见图3。从图3中可以看出,未受黑斑病侵染时,南京-92 和烟台-252 叶片中类黄酮含量分别为 1.158 和 0.871 ( $P = 0.001 < 0.01$ ),差异极显著,所以可以把薯苗内类黄酮含量的差异作为抗性选育的指标。接菌后,南京-92 和烟台-252 叶片中类黄酮含量均有上升,并且都在第6天达最大值。在 0~8 d 处理期间,南京-92 叶片内类黄酮的含量均高于烟台-252,差异分析表明,两者差异均达到极显著水平。

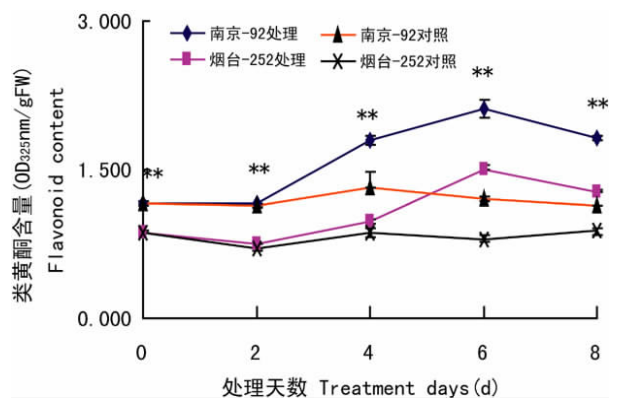


图3 黑斑病对甘薯叶片类黄酮含量的影响

Fig. 3 Effects of *Ceratocystis fimbriata* on flavonoid content of leaves of sweet potato

## 2.4 黑斑病对两种不同抗性甘薯叶片 PAL 活性的影响

未感染黑斑病菌时,南京-92 和烟台-252 叶片中 PAL 活性分别为  $322 \text{ U/g}^{-1} \text{FW}$  (高抗) 和  $220 \text{ U/g}^{-1} \text{FW}$  (高感),分析表明二者差异达显著水平(图4),说明供试两个甘薯品种叶片在正常状态下 PAL 活性存在差异,可以作为选育抗性品种的指标。受黑斑病侵染后,高抗品种与高感品种叶片 PAL 活性变化趋势相同,但是高抗品种叶片 PAL 活性增加明显大于高感品种。分析表明,两品种 PAL 活性在 2~6 d 时差异极显著。

## 2.5 黑斑病对两种不同抗性甘薯叶片 PPO 活性的影响

黑斑病对两种不同抗性甘薯叶片 PPO 活性的影响见图5。从图5中可以看出,未接种黑斑病菌时,南京-92 和烟台-252 叶片 PPO 活性分别为  $18 \text{ U/mg}$  和  $13 \text{ U/mg}$ ,差异不显著。接菌后两品种甘薯叶片 PPO 活性迅速上升,于第6天达到最大值,而高抗品种 PPO 活性增加的速度要快于高感品种,

差异分析表明,接种后 2~6 d 两品种甘薯叶片 PPO 活性差异显著。

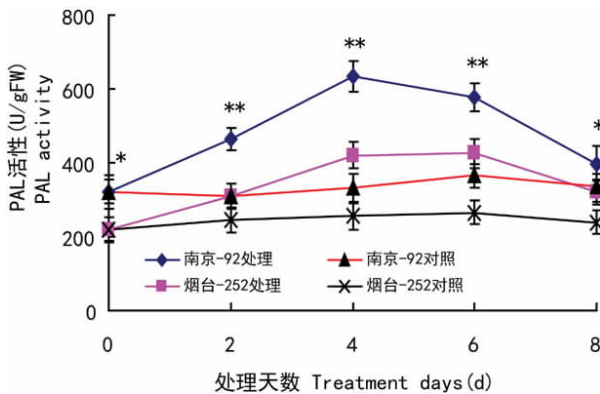


图 4 黑斑病对甘薯叶片 PAL 活性的影响

Fig. 4 Effects of *Ceratocystis fimbriata* on PAL activity of leaves of sweet potato

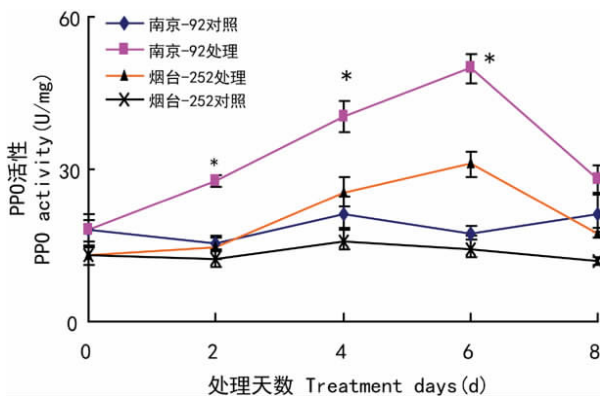


图 5 黑斑病对甘薯叶片 PPO 活性的影响

Fig. 5 Effects of *Ceratocystis fimbriata* on PPO activity of leaves of sweet potato

### 3 结论与讨论

酚类物质被认为与植物抗病性有较密切的关系(庄炳昌等,1993)。植物体内酚类物质的来源有两个主要的途径,一是植物原始酚类物质的积累,二是在受病原菌侵染后,宿主细胞作出反应,酚类物质迅速积累。特别是抗病品种在受侵染时,会积累从莽草酸或乙酸途径合成的大量酚类物质。酚类物质的抗病过程中重要的的一个机制是多酚氧化酶(PPO)的氧化作用使酚类物质转变为具有高毒性的醌类物质,这些醌类物质对于病原菌磷酸化酶的活性具有很强的抑制作用,它们作为氧化磷酸化非共扼剂而进一步对病原物的果胶分解酶、纤维素分解酶等活性强烈的抑制作用。

本试验结果显示,未受黑斑病浸染时,高抗品种南京-92 甘薯叶片内类黄酮含量、绿原酸含量、PAL 活性就显著或极显著高于高感品种烟台-252,这与在香蕉受枯萎病菌侵染(胡玉林等,2011)以及甘蔗受黑穗病菌侵染(龚得明等,1995)的研究结果一致,由此可以把甘薯叶片内类黄酮含量、绿原酸含量、PAL 活性作为选育和鉴定抗黑斑病品种的生理指标。王涛等(2011)研究不同抗性的黄瓜被白粉虱侵染后发现,抗性品种的 PAL 活性显著高于感性品种。本试验结果显示受黑斑病浸染后,高抗品种南京-92 叶片内类黄酮含量、绿原酸含量、PAL 活性要高于烟台-252,从而提高了甘薯对黑斑病的抵抗能力。在接种溃疡病菌前不同抗性的杨树之间酚类含量差异都很明显(理永霞等,2011),而不同抗性品种的小麦受白粉菌侵染前 PPO 活性无明显差异(王宏梅等,2009)。本试验结果显示未感染黑斑病时,虽然总酚含量和 PPO 活性差异不显著,但染菌后抗病品种叶片内总酚含量和 PPO 活性比感病品种的积累速度快、保持较高浓度时间长,从而有利于抵抗病原菌的侵害。

本试验测定了甘薯感染黑斑病初期,叶片内几种次生代谢物质和酶活性的变化,以期探讨它们和甘薯黑斑病抗性之间的关系,随着黑斑病病情的进一步扩展和发病级别的升高,相应生理指标和酶活性的变化规律是需要进一步研究的内容。

### 参考文献:

- 邱永祥. 2004. 甘薯抗蔓割病的酚类物质代谢的研究[D]. 福建农林大学硕士学位论文
- 周茂繁,朱兰宝. 1992. 甘薯病害及其防治[M]. 上海:上海科学技术出版社:140
- Balasuandram N, Sundram K, Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses[J]. *Food Chem*, **99**(1):191-203
- Chen W(陈伟), Ye MZ(叶明志), Zhou J(周洁). 1997. Advances on plant phenolics(植物酚类物质研究进展)[J]. *J Fujian Agric Univ*(福建农业大学学报), **25**(4):502-504
- Dixon RA, Achine L, Kota P, et al. 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective [J]. *Mol Plant Pathol*, **3**:371-390
- Gong DM(龚得明), Chen RK(陈如凯), Lin YQ(林彦铨), et al. 1995. Relation between phenylpropanoid metabolism in sugarcane and resistance to smut(甘蔗受黑穗病菌侵染后苯丙烷类代谢变化及与其抗性的关系)[J]. *J Fujian Agric Univ*(福建农业大学学报), **24**(4):394-398
- Hu YL(胡玉林), Zuo XD(左雪冬), Bu JJ(步佳佳), et al. 2011. Changes of three phenol compounds content during the interaction of banana and *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense(香蕉与(下转第 418 页 Continue on page 418))

51.4(C-243)、32.3(C-25)、21.3(C-26)、19.2(C-27)、25.6(C-28)、12.5(C-29)。上述数据与任风芝等(2001)报道的豆甾醇碳氢谱数据基本一致,故鉴定化合物 5 为豆甾醇(Stigmasterol)。

化合物 6 白色针状晶体,mp 283~285 °C,溶于丙酮、吡啶、氯仿,难溶于甲醇。该化合物在 TLC 上喷洒 5% 硫酸-乙醇液后烤板显红色的斑点,且有拖尾现象,在展开剂中加少量酸后,拖尾现象消失,说明该化合物含有羧基。Liebermann-Burchard 反应阳性,<sup>1</sup>H-NMR(300 MHz,CDCl<sub>3</sub>)δ:5.14(1H,t,J=3.6 Hz,H-12),3.20(1H,dd,J=12.0,5.0 Hz,H-3),3.53(q,J=9.3 Hz,CH<sub>2</sub>OH),1.26(3H,s,29-CH<sub>3</sub>),1.10(3H,s,27-CH<sub>3</sub>),1.02(3H,s,23β-CH<sub>3</sub>),1.01(3H,s,24α-CH<sub>3</sub>),1.00(3H,s,30-CH<sub>3</sub>),0.95(3H,s,26-CH<sub>3</sub>),0.93(3H,s,25-CH<sub>3</sub>);<sup>13</sup>C-NMR(125 MHz,pyridine-d<sub>5</sub>)δ:38.3(C-1)、27.0(C-2)、79.0(C-3)、39.9(C-4)、56.8(C-5)、19.7(C-6)、34.1(C-7)、40.3(C-8)、49.0(C-9)、38.3(C-10)、24.7(C-11)、123.5(C-12)、145.7(C-13)、42.9(C-14)、28.9(C-15)、24.7(C-16)、47.6(C-17)、43.1(C-18)、47.4(C-19)、31.9(C-20)、35.1(C-21)、34.1(C-22)、29.3(C-23)、16.5(C-24)、16.5(C-25)、17.4(C-26)、27.0(C-27)、181.1(C-28)、34.1(C-

29)、24.7(C-30)。上述数据与张敦等(2001)报道的熊果酸碳氢谱数据基本一致,故鉴定化合物 6 为熊果酸(Ursolic acid)。

#### 参考文献:

- Fujirawa Y, Takaki A, Uehara Y, et al. 2004. Tomato steroidal alkaloid glycosides, esculeosides A and B, from ripe fruits[J]. *Tetrahedron*, **60**:4 915-4 920
- Fujirawa Y, Kiyota N, Hori M, et al. 2007. Esculeogenina, a new tomato sapogenol, ameliorates hyperlipidemia and atherosclerosis in ApoE-deficient mice by inhibiting ACAT [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **27**:2 400-2 406
- Li WK(李文魁), Li YH(李英和). 1996. A study on chemical constituents of polygala japonica(瓜子金化学成分的研究)[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), **8**(3):1-4
- Huang YL(黄永林), Zhu TC(朱廷春), Wang YX(王永新), et al. 2010. Isolation and identification of chemical constituents from *Blumea balsanifera* (艾纳香化学成分的分离与鉴定)[J]. *Guihaia*(广西植物), **30**(4):560-562
- Ren FZ(任风芝), Qu HH(屈会化), Luan XH(栾新慧), et al. 2001. Studies on the chemical constituents of *Callicarpa bodinieri* (紫珠叶的化学成分研究I)[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), **13**(1):33-34
- Zhang M(张敦), Chen M(陈曼), Zhang HQ(张涵庆), et al. 2010. Studies on the chemical constituents of the root bark of *Morus alba* (桑白皮的化学成分研究)[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), **22**(3):416-418
- immature apple fruits to rot[J]. *J Horticult Sci*, **51**:311-315
- Wang HM(王宏梅), Jiang XL(蒋选利), Bai CW(白春微), et al. 2009. The change of POD and PPO activity and isozyme in wheat varieties with different resistance to wheat powdery mildew before or after inoculation(不同抗性小麦品种受白粉菌侵染前后 PPO, POD 活性变化)[J]. *Seed*(种子), **28**(4):14-17
- Wang JW(王敬文), Xue YL(薛应龙). 1982. Studies on plant phenylalanine ammonia-lyase(植物苯丙氨酸解氨酶的研究)[J]. *Acta Photophysiol Sin*(植物生理与分子生物学学报), **8**(1):35-41
- Wang T(王涛), Lei GH(雷关红), Cao CX(曹辰兴), et al. 2011. Effects of whitefly damage on activities of PAL, PPO and POD of glabrous cucumber in greenhouse(温室白粉虱对无毛黄瓜叶片 PAL, PPO, POD 活性的影响)[J]. *Shandong Agric Sci*(山东农业科学), **9**:81-84, 87
- Zhuang BC(庄炳昌), Wang YM(王玉民). 1993. Changes of some biochemical characters of soybean with different resistant levels infected by *Cercospora sojina* Hara(抗性不同大豆品种感染灰斑病后若干生化变化)[J]. *Acta Agron Sin*(作物学报), **19**(6):567-569
- Ndubizu TDC. 1976. Relations of phenolic inhibitors to resistance of

(上接第 409 页 Continue from page 409)

- 枯萎病菌互作中 3 种酚类物质的含量变化研究)[J]. *Chin J Trop Crop*(热带作物学报), **32**(12):2 302-2 306
- Ja ZD(贾赵东), Xie YZ(谢一芝), Yin QH(尹晴红), et al. 2010. Study progress and perspective of black rot resistant germplasm in sweet potato(甘薯抗黑斑病种质资源的研究及育种利用)[J]. *J Plant Genet Res*(植物遗传资源学报), **11**(4):424-427
- Li YX(理永霞), Lv Q(吕全), Liang J(梁军), et al. 2011. Dynamic contents of phenolic compounds in poplars inoculated with *Botryosphaeria dothidea* (感、抗病杨树种类接种溃疡病菌后酚类物质的变化)[J]. *Fore Pest Disease*(中国森林病虫), **30**(5):1-6
- Lin ZF(林植芳), Li SS(李双顺), Zhang DL(张东林), et al. 1988. The changes of pigments, phenolics contents and activities of polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia-lyase in pericarp of postharvest litchi fruit(采后荔枝果皮色素、总酚及有关酶活性的变化)[J]. *J Integ Plant Biol*(植物学报), **30**(1):40-45
- Li ZG(李忠光), Gong M(龚明). 2005. Improvement of measurement method of polyphenol oxidase activities in plant(植物多酚氧化酶活性测定方法的改进)[J]. *J Yunnan Norm Univ*(云南师范大学学报), **25**(1):44-45