

水稻品种对褐飞虱不同生物型抗性的 HPLC 分析

赵颖^{1,3}, 黄凤宽², 童晓立³, 庞雄飞³

(1 华南农业大学 理学院, 广东 广州 510642; 2 广西农业科学院 植物保护研究所, 广西 南宁 530007;

3 华南农业大学 昆虫学系, 广东 广州 510642)

摘要: 借助高效液相色谱检测了对褐飞虱 2 种生物型具有不同抗性水平的 2 类水稻品种中的 13 个次生化合物色谱峰的差异, 并运用多元回归分析法, 分别建立了水稻品种对褐飞虱 2 种生物型的抗性级别与这些次生化合物含量之间的回归模型。结果表明, 被测的 13 个组分中, 峰 1、峰 2、峰 8、峰 12 是影响水稻对褐飞虱生物型 II 抗性水平的主要抗原次生化合物; 峰 3、峰 4、峰 5、峰 9、峰 11、峰 12 则是水稻抗褐飞虱孟加拉型的主要抗原次生化合物。提出了以抗原次生物质为标记的快速分析、鉴定、预测水稻对褐飞虱生物型 II、孟加拉型抗性水平的新途径。

关键词: 水稻; 褐飞虱; 生物型; 高效液相色谱(HPLC)

中图分类号: Q946.8

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2005)02-0052-04

HPLC analysis of rice variety resistance to different biotypes of *Nilaparvata lugens*

ZHAO Ying^{1,3}, HUANG Feng-kuan², TONG Xiao-li³, PANG Xiong-fei³

(1 College of Sciences, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2 Institute of Plant Protection, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China;

3 Dept. of Entomology, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The chromatographic peak distinction of 13 secondary compounds from two types of rice varieties were investigated by using high-performance liquid chromatography (HPLC). The result of multiple regression analysis was showed that peak 1, peak 2, peak 8 and peak 12 were major secondary compounds to affect the variety resistance to brown planthopper (BPH, *Nilaparvata lugens*) biotype II, whereas peak 3, peak 4, peak 5, peak 9, peak 11 and peak 12 were major secondary compounds to Bangladesh biotype of BPH. Two regression equations among the area values of the chromatographic peaks and the BPH-resistant level of rice variety to different biotypes were obtained. It was demonstrated that the resistant activity of rice varieties to different BPH biotypes was closely associated with qualitative and quantitative combinations of the secondary compounds. These secondary compounds were suggested to be used as the marks to evaluated and identified the rice variety resistance to different biotypes of BPH.

Key words: rice; *Nilaparvata lugens*; biotype; HPLC

抗性品种的应用和推广一直是控制褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål) 种群发展最有效的措施之一^[1]。但褐飞虱生物型的分化变异问题, 使抗褐飞虱不同生物型水稻品种资源的筛选、评价受虫源的影响变得更为艰巨^[2,3], 难以大量鉴定。这就需要建立一个

更为快速、简捷、准确、稳定的抗虫性鉴定新方法。抗源品系特有的次生代谢产物——抗原次生化合物是其抗性的重要物质基础^[4,5]。本研究借助高效液相色谱(HPLC)技术, 分别检测了对褐飞虱生物型 II 和孟加拉型具有不同抗性水平的 2 类水稻品种的高效

液相色谱图, 并比较分析了其中 13 个次生物质的组合和含量的差异, 运用多元回归分析了这种差异与品种抗性之间的关系, 探讨以抗原次生化合物作为标记, 分析鉴定水稻品种对褐飞虱不同生物型抗性水平的可能性, 为建立以抗原次生化合物为标记的、直观、定量、快速、简捷、准确、稳定的抗性鉴定技术体系提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

19 个对褐飞虱生物型 II、13 个对褐飞虱孟加拉型具有不同抗性级别的水稻品种, 均由广西农业科学院植保所抗虫育种课题组提供(表 1)。其中包括了生物型 II 感虫对照品种 TN1、Mudgo, 抗虫对照品种 ASD7、IR36、Ptb33; 孟加拉型感虫对照品种 TN1、IR36, 抗虫对照品种 Rathu Heenati (RHT)、Ptb33 以及它们的一些中抗品种。药用野生稻品种由华南农业大学植物分子育种研究中心提供。品种苗期抗性级别鉴定参照韦素美等^[6]的方法进行。

1.2 样品处理

选取 3 叶期健壮水稻植株的第 2 片叶, 剪碎、混匀、四分法反复缩分后, 称取鲜样(106.7 ± 0.2) mg, 用 5 mL 甲醇浸泡 12 h, 取其上层清液, 待溶剂挥发干后, 加入 5 mL 体积分数为 50% 的甲醇水溶液重新溶解, 作为测试样品, 用 HPLC 进行测定。每品种 5 个重复, 每重复 5 株稻苗。

1.3 HPLC 测定的色谱条件

样品在 HP1100 高效液相色谱仪上采用 C₁₈反相柱(Hypersil ODS 5 μm, 4.0 mm × 250 mm), 以 φ 为

1% 的乙酸水溶液(A)和乙腈(B)的二元混合溶剂为梯度洗脱的流动相进行测定。色谱条件主要参照 Mattice 等^[7]和孔垂华等^[8]的方法。为提高各谱峰分离度, 本研究对他们的方法作了改进, 将流动相梯度调整为: 在 1.5 mL·min⁻¹流速下, 以 φ 为 8% 的 B 洗脱 3 min 后, 在 22 min 内提高到 φ 为 35% 的 B, 再在 4 min 内继续提高到 φ 为 80% 的 B, 最后在 11 min 内降回 φ 为 8% 的 B, 共运行 40 min。采集前 30 min 的色谱数据, 确定相应色谱峰的保留时间和面积积分。进样量 10 μL, 紫外检测波长为 320 nm。

1.4 数据分析

运用多元回归分析对谱峰的峰面积值与品种抗性级别值之间的关系进行研究。谱图中保留时间 10.0 ~ 14.6 min 区间内的 13 个谱峰的峰面积值用于数据分析。采用 SAS 统计软件(6.12 版)进行统计分析和统计检验。

2 结果与分析

2.1 褐飞虱 2 种生物型典型抗—感品种的 HPLC 谱图比较

在本研究的色谱条件下, 测得褐飞虱 2 种生物型典型抗—感品种的 HPLC 谱图在保留时间 10.0 ~ 14.6 min 区间内的 13 个峰如图 1。

HPLC 谱图中, 峰 1、峰 8 含量较高的水稻品种对生物型 II 抗性较高, 如 ASD7、IR36(图 1a、图 2)等; 峰 4 和峰 9 特别低的品种对褐飞虱孟加拉型有较强的抗性, 如 RHT、Ptb33(图 1b、图 2); 而峰 4 和峰 9 特别低、峰 1 和峰 8 含量较高的品种则同时抗生物型 II 和孟加拉型如 RHT、Ptb33(图 1b、图 2)。

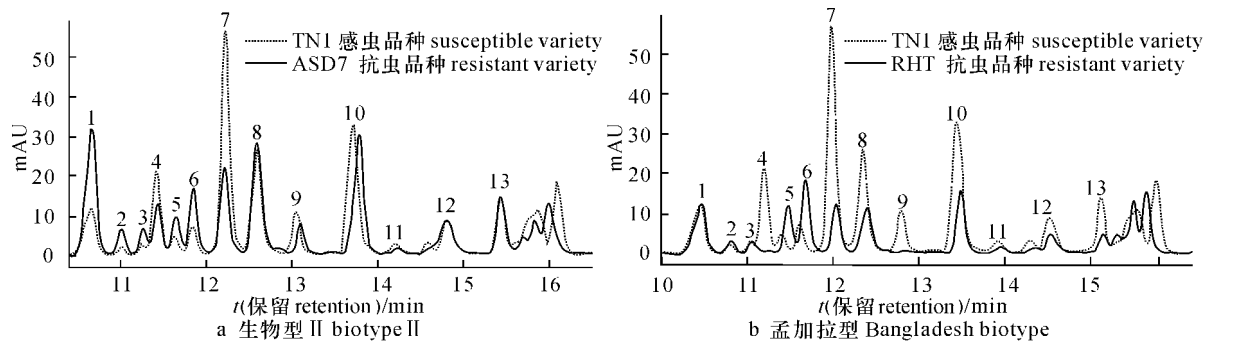


图 1 褐飞虱 2 种生物型抗—感水稻品种的 HPLC 谱图比较

Fig. 1 HPLC chromatograms of resistant and susceptible varieties to BPH two biotypes

2.2 抗不同生物型品种中抗原次生化合物的分析

经邓肯氏新复极差检验表明, 13 个对褐飞虱孟加拉型和 19 个对褐飞虱生物型 II 具有不同抗性级别的水稻品种(表 1)中, 13 种抗原次生物质的含量

(峰面积)存在种间差异。抗原次生物质的不同组合使有些品种只抗生物型 II, 有些品种则可同时抗生物型 II 和孟加拉型。

为探讨水稻品种抗褐飞虱不同生物型的相关抗

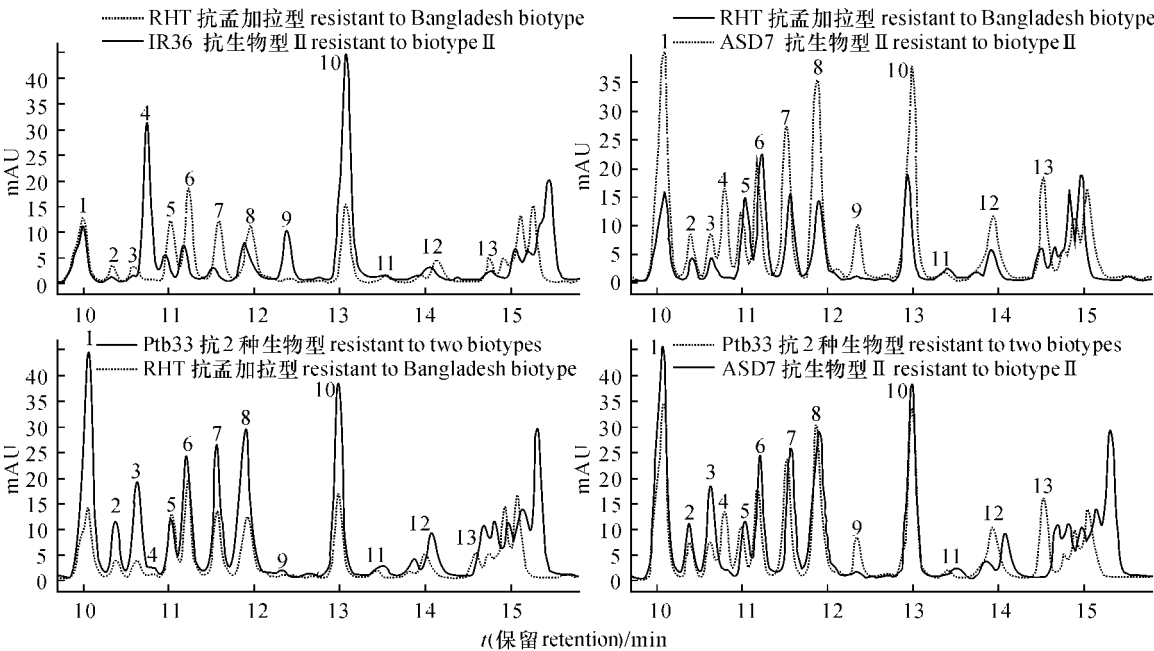


图 2 褐飞虱 2 种生物型的抗虫对照品种 HPLC 谱图比较
Fig. 2 HPLC chromatograms of resistant varieties to two biotypes

表 1 供试 2 类水稻品种的抗性级别

Tab. 1 Scales of rice varieties resistant to BPH biotype II or Bangladesh biotype

类型 ¹⁾ type	水稻品种 variety	生测抗性级别 bioassay score	类型 ¹⁾ type	水稻品种 variety	生测抗性级别 bioassay score
A	IR9828-41-2-1	3.0	A	S512B-199	5.3
	IR36	3.0		Mudgo	8.0
	ASD7	3.0		TN1	9.0
	Ptb33	3.0	B	RP1015-2-11-1	2.8
	IR13240-39-3-3-3	3.0		RP1015-2-348-85-1	3.0
	IR13427-69-1-2-21	3.5		Rathu Heenati (RHT)	3.0
	IR21567-9-2-2-2-1	3.5		RP1015-15-117-1	3.0
	KAU1675	3.6		IR49707-1-3-2-3	3.1
	IR9828-94-3	3.8		IR9708-51-1-2	3.5
	IR39379-190-2-2-3-1	3.9		IR13240-39-3-3-3-P1	3.6
	IR42015-83-3-2-2	4.4		RP1015-39-89-1	3.6
	KANNAGI	4.5		IR13240-39-3	4.5
	IR9129-209-2-2-2-3	4.6		IR13240-108-2-2-3	4.6
	IR19728-9-3-2	4.8		IR56	5.4
	IR15795-151-2-3-2-2	4.8		IR36	8.0
	IR15529-256-1	4.8		TN1	9.0

1) A 指抗生物型 II, B 指抗孟加拉型

原次生化合物与品种抗性的定量关系,对表 1 中抗褐飞虱生物型 II 的 19 个品种共 96 份样品,抗褐飞虱孟加拉型的 13 个品种共 64 份样品的抗性级别与被测 13 个次生物质的峰面积,进行了多元回归分析,同时考虑因子之间的交互作用,得出水稻品种对褐飞虱生物型 II 的抗性回归模型为:

$$y = 3.4593 - 0.0249x_1 + 0.0848x_2 - 0.0423x_8 + 0.1174x_{12} (r^2 = 0.84, P < 0.01);$$

水稻品种对褐飞虱孟加拉型的抗性回归模型为:

$$y = -0.0676x_3 + 0.0090x_4 + 0.0306x_5 + 0.0432x_9 - 0.2964x_{11} + 0.1094x_{12} (r^2 = 0.95, P < 0.01).$$

式中, y 为抗性级别值, x_1 、 x_2 、 x_3 、 x_4 、 x_5 、 x_8 、 x_9 、 x_{11} 、 x_{12} 分别为峰 1、峰 2、峰 3、峰 4、峰 5、峰 8、峰 9、峰 11、峰 12 的峰面积值。

拟合结果表明,水稻品种对褐飞虱不同生物型

的抗性表现与其中抗原次生化合物种类和含量的组合密切相关. 在被测的 13 个组分中, 峰 1、峰 2、峰 8、峰 12 是影响水稻对褐飞虱生物型 II 抗性水平的主要抗原次生化合物; 峰 3、峰 4、峰 5、峰 9、峰 11、峰 12 则是水稻抗褐飞虱孟加拉型的主要抗原次生化合物. 这些次生物质对水稻抗性水平的贡献各不相同. 因此, 利用拟合模型, 通过检测对应组分的 HPLC 谱峰面积值将有可能分析、鉴定、预测水稻对褐飞虱生物型 II、孟加拉型的抗性水平.

应用此方法对待测的褐飞虱生物型 II 抗性品种: 广东推广品种佛山油粘、广西推广品种国粳 4 号、药用野生稻; 孟加拉型抗性品种: BG367-2、IR62 进行了抗性预测, 结果表明拟合抗性级别值与实测值基本吻合.

3 讨论

随着高效液相色谱仪的普及, HPLC 技术也开始应用于作物抗虫次生物质的研究, 但都只是利用标样对某种单一的抗虫组分进行定性、定量的分析^[9, 10]. 作物的化学抗性往往是多种次生物质共同作用的结果^[7, 8], 由于微量成分分离和鉴定存在困难, 其中许多活性成分并未被阐明. 因此, 仅对某一有效成分或指标性成分进行定性、定量分析, 还不能全面、系统地体现其中起抗性作用的物质成分, 也难以将其研究结果应用于抗性筛选. 事实上, 利用 HPLC 技术来实际评价水稻品种对褐飞虱抗性水平的研究, 到目前为止都鲜见报道.

本研究检测了抗褐飞虱不同生物型的 2 类水稻品种的 HPLC 谱图, 运用多元回归分析, 同时考虑可分析的 13 个次生物质组分对水稻抗性的影响, 使分析结果可以较全面地反映品种所含化学成分的组合和含量, 以及它们对品种抗性的综合影响. 由于 HPLC 样品未经传统繁杂的分离、提纯等前处理过程, 更能保证测得的次生物质不被分解, 与活体植株中的存在形式相一致, 使分析结果更客观. 本研究结果表明, 尽管还未确定其中的化合物结构, 但通过建立品种抗性级别与抗原次生物质含量(峰面积值)的回归模型已经可以分析、鉴定和预测水稻品种对不同褐飞虱生物型的抗性水平. 借助 HPLC 技术, 只需极少量的叶片组织, 以不损害水稻植株的方式即可完成谱峰检测和抗性鉴定, 因此, 该方法还有可能用于水稻单植株抗虫能力的评价, 进一步扩展到辅助水稻抗虫品种的选育上. 但将其应用于实践还需大

量分析已知抗性品种的次生物质信息, 建立更可靠的分析鉴定模型.

对比抗草品种的 HPLC 谱图^[8]初步确定, 峰 5、峰 8、峰 9、峰 11、峰 12 分别可能是间糖甙长链烃基苯酚(峰 5 和峰 8)、糖甙黄酮(峰 9 和峰 11)和糖甙氧肟酸(峰 12), 它们可能同时与水稻化感潜力有关. 但峰 1、峰 2、峰 3、峰 4 还鲜见相关报道. 各相关组分的分离、鉴定及其抗虫作用机制有待进一步研究.

致谢: 国际水稻研究所 (IRRI) 基因资源中心和 Edwin L. Javier 博士提供了部分水稻种子, 华南农业大学植物分子育种研究中心刘向东教授为本研究提供了所有供试药用野生稻品种, 特此致谢!

参考文献:

[1] 李汝铎, 丁锦华, 胡国文, 等. 褐飞虱及其种群管理 [M]. 上海: 复旦大学出版社, 1996. 1—331.

[2] 吕仲贤, 俞晓平, 陈建明, 等. 田间发生与室内驯化的褐飞虱生物型 2 的特性比较 [J]. 中国水稻科学, 2002, 16(1): 89—92.

[3] 邓望喜, 周小尼, 李绍勤, 等. 我国褐飞虱不同地理种群的生物学比较 [J]. 植物保护学报, 2000, 27(2): 131—135.

[4] 周明. 作物抗虫性原理及应用 [M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1992. 1—359.

[5] 庞雄飞. 植物保护剂与植物免害工程 [J]. 世界科技研究与发展, 1999, 21(2): 24—28.

[6] 韦素美, 罗善昱, 黄凤宽, 等. 广西水稻新品种对稻褐飞虱不同生物型的抗性评价 [J]. 广西农业科学, 1998, (5): 238—239.

[7] MATTICE J D, DILDAY R H, GBUR E E, et al. Banyard-grass growth inhibition with rice using high-performance liquid chromatography to identify rice accession activity [J]. Agronomy Journal, 2001, 93: 8—11.

[8] 孔垂华, 徐效华, 胡 飞, 等. 以特征物质为标记评价水稻品种及单植株的化感潜力 [J]. 科学通报, 2002, 47(3): 203—206.

[9] GUTIERREZ C, CASTANERA P, TORRES V. Wound-induced changes in DIMBOA (2, 4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1, 4-benzoxazin-3(4H)-one) concentration in maize plants caused by *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. Ann Appl Biol, 1988, 113: 447—454.

[10] BARRIA B N, COPAJA S V, NIEMEYER H M. Occurrence of DIMBOA in wild *Hordeum* species and its relation to aphid resistance [J]. Phytochemistry, 1992, 31(1): 89—91.

【责任编辑 周志红】