

杨翠芳,高轶静,黄海荣,等.基于HPLC的轮枝镰刀菌侵染后甘蔗叶片内源激素含量分析[J].华中农业大学学报,2025,44(4):150-159.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2025.04.015

基于HPLC的轮枝镰刀菌侵染后 甘蔗叶片内源激素含量分析

杨翠芳¹,高轶静¹,黄海荣¹,黄冬梅¹,杨海¹,申垚阳¹,李翔²,王泽平¹

1. 广西壮族自治区农业科学院/农业农村部广西甘蔗生物技术与遗传改良重点实验室/
广西甘蔗遗传改良重点实验室,南宁530007;

2. 广西壮族自治区亚热带作物研究所/广西亚热带特色水果质量安全控制重点实验室,南宁530001

摘要 为明确甘蔗内源激素与梢腐病抗性的关系,以我国甘蔗梢腐病主要致病菌轮枝镰刀菌*Fusarium verticillioides*为病原菌,以高抗梢腐病品种粤糖94-128(YT94-128)和感病品种桂糖37号(GT37)为材料,应用高效液相色谱(HPLC)方法检测病原菌接种处理后不同抗性甘蔗品种叶片中5种内源激素含量,并探究其变化规律。结果显示,HPLC法测定甘蔗叶片中赤霉素(gibberellin, GA)、茉莉酸(jasmonic acid, JA)、柠檬酸(citric acid, CA)、苹果酸(malic acid, MA)、水杨酸(salicylic acid, SA),平均回收率分别达99.61%、99.12%、97.36%、96.74%、99.90%,精密度RSD值范围为0.033%~4.220%,表明该方法快速可靠、分离度高,稳定性与重现性良好。对感病品种GT37和抗病品种YT94-128进行病原菌接种处理后发现,GA含量在两品种中均随甘蔗生长而降低,且GT37的下降趋势更显著;JA含量先升后降,GT37的下降幅度更大;YT94-128的CA含量持续增加,而GT37合成CA能力显著下降;MA含量在YT94-128中持续上升并趋于稳定,GT37在接种4 d时出现峰值后下降并稳定;SA含量在两品种中均先升后降,YT94-128的变化趋势更为明显。研究表明,甘蔗感染梢腐病后,内源激素的含量差异及变化幅度可作为反映不同品种抗病能力的重要指标。

关键词 甘蔗;梢腐病;轮枝镰刀菌;内源激素;HPLC

中图分类号 S435.661 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2025)04-0150-10

甘蔗(*Saccharum officinarum*)是我国最重要的糖料作物,蔗糖占我国食糖总产量92%。然而,生产上各种病害限制了甘蔗的优质高效生产,其中甘蔗梢腐病是主要病害之一。甘蔗梢腐病(pokkah boeng disease)是由镰刀菌(*Gibberella fujikuroi*)引起的,在我国蔗区其主要病原为轮枝镰刀菌*Fusarium verticillioides*^[1]。该病无季节性流行,导致甘蔗表现出不同程度受害,已给蔗糖业可持续性生产造成严重影响^[2]。

植物生长发育进程以及对病害的应答反应中,植物激素均发挥着关键的调控功能^[3]。在正常生理条件下,植物体内不同激素的含量及其比例始终维持着动态平衡的状态;当受到病原菌侵染时,这种平衡被破坏,植物激素含量发生变化,进而调整植物生

长和防御过程中的能量分配,以提升植物抵御病害胁迫的能力^[4-5]。这也说明,在病原菌胁迫下,内源激素参与抗性反应,其含量差异可以反映不同品种的抗病能力^[6-9]。有研究表明甘蔗受黑穗病菌侵染后,其吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)、赤霉素(gibberellin, GA)、脱落酸(abscisic acid, ABA)、水杨酸(salicylic acid, SA)含量及IAA/ABA值变化与品种抗性相关^[10];而宋奇琦等^[11]也发现不同甘蔗品种在与黑穗病菌长期互作过程中,不同时期生理生化反应存在差异,感病与抗病品种防御机制或有不同。

甘蔗在受到梢腐病病原侵染时也会产生一系列的防御反应,在与病原菌的互作过程中,蔗株内源激素的含量和活性发生变化,由此影响甘蔗正常生理

收稿日期: 2024-03-19

基金项目: 广西自然科学基金项目(2024GXNSFAA010174);国家自然科学基金项目(32260715);国家糖料产业技术体系甘蔗宿根栽培岗位科学家项目(CARS-17);蔗糖产业省部共建协同创新中心项目(201812639);南宁市科学与技术研发项目(2023060)

杨翠芳,E-mail:547036616@qq.com

通信作者: 王泽平,E-mail:yaheng830619@163.com;李翔,E-mail:raise0818@163.com

生化进程^[12]。因此,高效、精确检测甘蔗梢腐病叶片内源激素含量对研究其介导甘蔗梢腐病病原菌胁迫应答的生化机制具有非常重要的意义。

高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)是一种高效分离纯化技术,具有分辨率、灵敏度高,重现性好和专一性强等优点,被广泛用于水稻^[13]、油菜^[14]、枣^[15]、玉米^[16]、蚕豆^[17]、小麦^[18]、香蕉^[19]等植物激素测定,而利用HPLC法对甘蔗梢腐病病原侵染后甘蔗叶片内源激素含量进行检测的研究尚未见报道。因此,本研究通过建立HPLC法来检测甘蔗受梢腐病病原侵染后叶片的5种内源激素含量,研究内源激素在防御甘蔗梢腐病侵染甘蔗中的作用,旨在为揭示甘蔗梢腐病抗性机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要仪器、试剂与供试材料

主要仪器:ARigol L3000高效液相色谱仪、Agilent 1100高效液相色谱仪、Kromasil C18反相色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、CST C18反相色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)均购自苏州江东精密仪器有限公司。

试剂:甲醇(色谱纯)、石油醚(分析纯)、丙酮(色谱纯)、柠檬酸(分析纯)、乙酸乙酯(纯度≥99.8%)、石墨化碳黑、PSA硅胶吸附剂、乙醚(分析纯)、三甲基硅烷化重氮甲烷(纯度98%)、正己烷(色谱纯)、冰乙酸(色谱纯)、甲酸(分析纯)、磷酸二氢钠(分析纯)、磷酸(分析纯),均购自国药集团化学试剂有限公司;赤霉素标准品(98.8%,BePure)、茉莉酸标准品(97.5%,BePure)、柠檬酸标准品(99.8%,BePure)、苹果酸标准品(98.7%,BePure)、水杨酸标准品(99.1%,BePure)均购自北京振翔科技有限公司;试验用水为超纯水。

供试甘蔗品种为甘蔗抗病品种YT94-128和感病品种GT37;供试菌种为甘蔗梢腐病病原菌轮枝镰刀菌*Fusarium verticillioides*,来源于农业农村部广西甘蔗生物技术与遗传改良重点实验室。

1.2 标准溶液配制

1)茉莉酸标准溶液配制。称取茉莉酸标准品8.0 mg,加入10 mL水溶解,配置成800 μg/mL的标准溶液母液;再用标准溶液母液依次稀释成质量浓度分别为80、8、0.8、0.1 μg/mL的标准溶液。

2)柠檬酸、苹果酸准溶液配制。分别称取柠檬

酸、苹果酸标准品2.5 mg,加入10 mL水溶解,配置成250 μg/mL的标准溶液母液;再依次稀释成质量浓度分别为50、25、10、5、1 μg/mL的标准溶液。

3)赤霉素、水杨酸标准溶液配制。分别称取赤霉素、水杨酸标准品1.25 mg,加入10 mL水溶解,配置成125 μg/mL的标准溶液母液;赤霉素标准母液依次稀释成25、12.5、1.25 μg/mL的标准溶液,水杨酸标准母液依次稀释成25、12.5、1.25、0.625、0.25 μg/mL的标准溶液。

1.3 甘蔗叶片内源激素提取

1)赤霉素、水杨酸的提取。以甘蔗梢腐病病原侵染的叶片(2 g)作为待测样品,经液氮冷冻研磨后,采用10 mL预冷4 °C的80%甲醇-水混合液(V/V)密封浸提16 h(4 °C)。初次离心(8 000 r/min, 10 min, 4 °C)分离上清液,残渣经5 mL同温预冷甲醇溶液二次浸提2 h后离心取液。合并上清液于40 °C减压浓缩至甲醇完全挥发(残余水相约0.3 mL)。经15 mL石油醚三次萃取脱色(弃有机相),水相组分40 °C减压干燥。残留物以0.5 mL HPLC流动相溶解并定容至2 mL,过0.45 μm滤膜后移入内衬管样品瓶,即得待测样品溶液。

2)茉莉酸的提取。在吕桂珍^[20]方法基础上作修改。将丙酮与50 mmol/L柠檬酸水溶液按7:3(V/V)比例混合,置于4 °C预冷。称取2 g感染甘蔗梢腐病的甘蔗病叶样品。加入10 mL预冷的提取溶剂和液氮,充分研磨至匀浆。向匀浆中加入10 mL乙酸乙酯,振荡混合3 min后超声提取30 min。8 000 r/min离心10 min,收集上清液(上清液A)。向残渣中加入3 mL预冷的提取溶剂,再次超声提取30 min。相同条件离心(8 000 r/min, 10 min),收集上清液(上清液B)。合并上清液A和B至50 mL离心管。加入0.6 g石墨化碳黑和0.6 g PSA硅胶吸附剂,振荡混合5 min。4 000 r/min离心5 min。取上清液转移至10 mL刻度离心管。冰水浴条件下氮气吹干,得到叶片茉莉酸粗提物。

将乙醚与甲醇按体积比9:1混合均匀。取1 mL此混合液与40 μL 2 mmol/L三甲基硅烷化重氮甲烷正己烷溶液溶解茉莉酸提取物,混匀后于25 °C放置30 min进行甲酯化反应。加入40 μL 2 mol/L冰乙酸正己烷溶液混匀,放置30 min终止反应。冰水浴氮气吹干后,用溶解试剂(0.1%甲酸水溶液:甲醇=3:1, V/V)定容至1 mL。定容液经0.22 μm水相滤膜过滤后,收集于样瓶中作为待测样品溶液。

3) 柠檬酸、苹果酸的提取。选取感染甘蔗梢腐病病原的甘蔗叶片待测样品2 g,加入4 mL预冷至4 °C的体积分数为80%的甲醇水溶液,加入液氮研磨成浆,用超净水定容至10 mL,4 °C浸提1 h,超声提取2 h,10 000 r/min离心10 min,取上清液;残渣再加入2 mL预冷至4 °C的体积分数为80%甲醇水溶液超声提取30 min,10 000 r/min离心10 min,离心后取上清液;合并上清液,用体积分数为80%甲醇水溶液定容至8 mL,取适量定容后的溶液用针头式过滤器过滤于带有内衬管的样品瓶内,作为样品溶液备用。

1.4 HPLC色谱检测条件

1) 通用条件。柱温:35 °C;流速:0.8 mL/min;走样时间:20 min;进样体积:10 μL。

2) 色谱仪与色谱柱的选择。赤霉素、水杨酸检测,采用ARigol L3000高效液相色谱仪,配备Kromasil C18反相色谱柱;柠檬酸、苹果酸检测,采用ARigol L3000高效液相色谱仪,配备CST C18反相色谱柱;茉莉酸含量检测,采用Agilent 1100高效液相色谱仪,配备Kromasil C18反相色谱柱。

3) 检测波长及流动相。赤霉素:检测波长306 nm,流动相为200 mL甲醇、300 mL超纯水混合后加入3 mL乙酸;茉莉酸:检测波长230 nm,流动相为甲醇、超纯水、乙酸按体积比200:300:3混合;柠檬酸、苹果酸:检测波长214 nm,流动相为12.5 mmol/L磷酸二氢钠水溶液800 mL,加入16 mL甲醇,用0.5 mol/L磷酸水溶液调节pH至2.8;水杨酸:检测波长306 nm,流动相为甲醇与乙酸按体积比1:99混合。

1.5 标准曲线绘制

采用本文“材料与方法1.4”的色谱条件检测标准溶液母液和标准溶液,然后以各激素浓度为横坐标(*x*)、色谱峰峰面积为纵坐标绘制标准曲线,计算相关系数(*R*²)。

1.6 专属性考察

125 μg/mL的赤霉素、水杨酸标准溶液母液和样品溶液、800 μg/mL的茉莉酸标准溶液母液和样品溶液、250 μg/mL的柠檬酸、苹果酸标准溶液母液和样品溶液各取10 μL,注入液相色谱仪中,按照本文“材料与方法1.4”的色谱条件进行检测,确认各目标峰是否具有良好的峰形和特征保留时间,且样品溶液中目标峰位置无杂峰干扰。

1.7 加标回收试验

分别向同一样品溶液中添加1 mL质量浓度分别为10、20、30、40、50 μg/mL的各激素标准溶液,按照本文“材料与方法1.4”的液相色谱条件检测,计算回收率。

1.8 方法精密度检验

分别取质量浓度为1.25 μg/mL的赤霉素、茉莉酸、水杨酸标准溶液和5 μg/mL柠檬酸、苹果酸的标准溶液,按照本文“材料与方法1.4”的色谱条件检测,连续进样5针观察保留时间与峰面积。

1.9 样品含量的测定

将本文“材料与方法中1.3”制备的样品溶液,采用“材料与方法1.4”的色谱条件检测,重复测定3次,获得样品中各激素的含量。

1.10 甘蔗品种感染梢腐病后的抗性差异试验

1) 接种体的制备。将甘蔗梢腐病病原菌接种于PDA培养基上活化3 d,挑取培养基边缘菌丝接种在灭菌的马铃薯葡萄糖水培养基中振荡培养3 d,离心、用灭菌的脱脂棉过滤、收集所获得的菌体,用无菌水与菌体配制成浓度为1×10⁶ CFU/mL的甘蔗梢腐病病原菌孢子悬浮液。

2) 接种材料的处理。选取甘蔗抗病品种YT94-128、感病品种GT37为接种材料,温室条件下每个品种种植30桶,每桶4个芽,播种前用0.3%多菌灵浸种20 min,出苗后正常管理,长出5~6片完全叶时进行接种。

3) 注射接种。取长势相同的甘蔗品种YT94-128、GT37的幼苗各30株,使用1 mL医用注射器分别将100 μL甘蔗梢腐病病原菌孢子悬浮液到甘蔗+1叶位,作为甘蔗接种样品;另取长势相同的甘蔗YT94-128、GT37的幼苗各30株,以注射无菌水为对照,作为甘蔗对照样品;甘蔗接种结束后保持室内温度28~30 °C,湿度80%。

4) 样品选取。选择相同株龄+1叶位上相同位置有近似病症的甘蔗叶片,在冰盒上将其剪成1 cm×1 cm的叶片进行备样。

5) 激素的提取与测定。分别取各生长阶段(2、4、8、16 d)的甘蔗接种样品YT94-128、GT37和对照样品YT94-128、GT37叶片2 g,依照本文“材料与方法1.3”的方法提取激素,按本文“材料与方法1.9”的步骤进行测定。

1.11 数据分析

数据处理和分析均采用Microsoft Excel 2007软件及SPSS软件进行。

2 结果与分析

2.1 HPLC检测梢腐病菌侵染后甘蔗叶片内源激素的可行性

1)线性关系分析。利用HPLC检测植物激素赤霉素(GA)、茉莉酸(jasmonic acid, JA)、柠檬酸(citric acid, CA)、苹果酸(malic acid, MA)和水杨酸(salicylic acid, SA)标准品,通过设置不同质量浓度梯度绘制标准曲线(表1),回归方程中 x 为标准品质量浓度与内标标准品质量浓度的比值, y 为标准品峰面积与内标标准品峰面积的比值。各回归方程相关系数 r 均大于0.99,标准曲线质量较好。

2)精密度。由表2可知5种内源激素对应的保留时间、峰面积的相对标准偏差(relative standard deviation, RDS)分别介于0.108%~1.329%、0.033%~4.220%范围内,均不超过5%,这表明所采用的分析方法具有良好的精密度。

表1 内源激素标准品的标准曲线

Table 1 The standard curve about reference standards of endogenous hormone

内源激素 Endogenous hormones	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	检测范围/($\mu\text{g}/\text{mL}$) Detection range
GA	$y=-0.4175x-1.2383$	0.997 1	1.25~125
JA	$y=2.9424x-0.9008$	1.000 0	0.10~800
CA	$y=0.9448x+0.4263$	0.999 6	1.00~250
MA	$y=1.3723x-0.9876$	0.997 6	1.00~250
SA	$y=46.469x-23.645$	0.999 8	0.25~125

表2 各内源激素的色谱保留时间与峰面积及其RDS值

Table 2 The values and RDS of chromatographic retention times and peak areas for each endogenous hormone

内源激素 Endogenous hormones	保留时间 Retention time		峰面积 Peak area	
	(Mean±SD)/min	RDS/%	(Mean±SD)/(mAU·min)	RDS/%
GA	7.752±0.049	0.629	1.339±0.024	1.801
JA	12.747±0.171	1.329	9.385±0.143	1.538
CA	8.731±0.018	0.959	7.715±0.204	2.677
MA	5.263±0.025	0.469	4.702±0.196	4.220
SA	20.750±0.022	0.108	53.161±0.017	0.033

3)加标回收率。GA、JA、CA、MA、SA平均回收率分别为99.61%、99.12%、97.36%、96.74%、99.90%;其RSD值分别为0.79、0.96、1.15、1.69、0.07,均小于5%,表明方法回收率较好、准确度高。

4)专属性分析。在相应色谱条件下,GA、JA、CA、MA和SA样品溶液和标准溶液出峰时间吻合,分别为7.77、12.93、8.75、5.27、20.77 min,峰型良好(图1~4),说明本研究建立的GA、JA、CA、MA和SA的HPLC检测方法专属性良好。

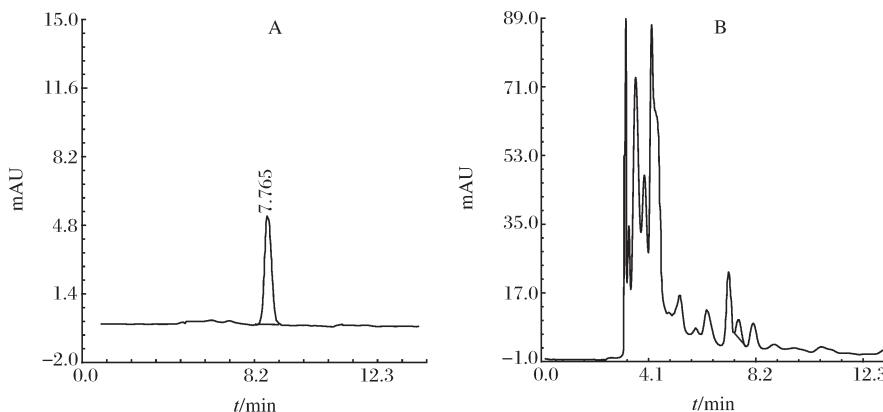


图1 赤霉素标准品(A)和样品(B)色谱图

Fig. 1 Chromatogram of gibberellin standard (A) and sample (B)

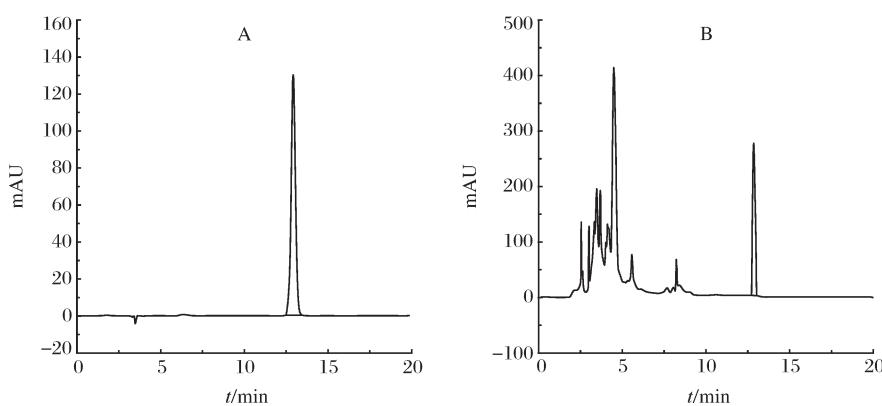


图2 茉莉酸标准品(A)和样品(B)色谱图

Fig. 2 Chromatogram of jasmonic acid standard (A) and sample (B)

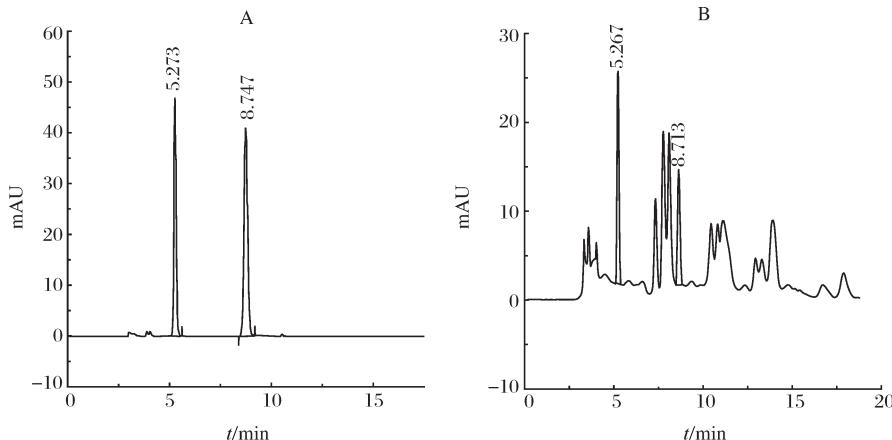
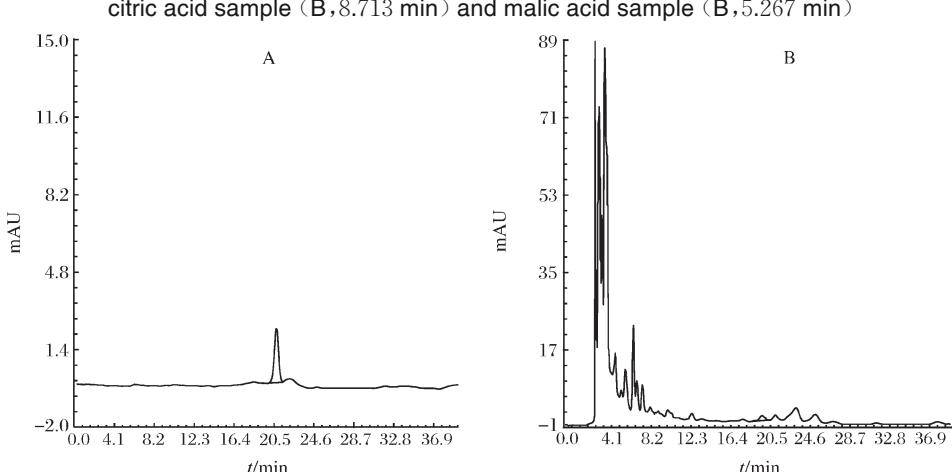
图3 柠檬酸(A, 8.747 min)和苹果酸标准品(A, 5.273 min)及柠檬酸(B, 8.713 min)和苹果酸样品(B, 5.267 min)色谱图
Fig. 3 Chromatogram of citric acid standard sample (A, 8.747 min) and malic acid standard sample (A, 5.273 min), citric acid sample (B, 8.713 min) and malic acid sample (B, 5.267 min)

图4 水杨酸标准品(A)和样品(B)色谱图

Fig. 4 Chromatogram of salicylic acid standard (A) and sample (B)

2.2 梢腐病菌侵染后甘蔗叶片内源激素含量

1)甘蔗叶片中赤霉素含量的变化。如表3所示,对照样品中的赤霉素含量随甘蔗生长而逐渐上升,感病品种GT37的赤霉素含量变化趋势高于抗病品种YT94-128;病原菌接种处理的甘蔗叶片中赤霉素

含量随甘蔗生长而不断降低,感病品种GT37的赤霉素含量降低的趋势要高于YT94-128;接种后,蒸馏水接种处理的赤霉素含量差异均不显著,但接种后8~16 d,病原菌接种处理的赤霉素含量相比接种后2~4 d达到显著水平。

2)甘蔗叶片中茉莉酸含量的变化。如表3所示,对照样品中的茉莉酸含量随甘蔗生长而逐渐上升,抗病品种YT94-128的茉莉酸含量变化趋势高于感病品种GT37;病原菌接种处理的甘蔗叶片中茉莉酸含量表现出先增长后降低的趋势,感病品种GT37的茉莉酸含量降低的趋势要高于YT94-128;其中,抗病品种YT94-128在接种蒸馏水2~16 d内茉莉酸含量差异显著,而病原菌接种处理样品在接种4 d时茉莉酸含量上升达到显著水平;感病品种GT37接种蒸馏水在2~8 d内茉莉酸的含量差异并不显著,病原菌接种处理样品在2~16 d内茉莉酸含量差异显著。

3)甘蔗叶片中柠檬酸含量的变化。如表3所示,对照样品中的柠檬酸含量随甘蔗生长而缓慢上升,抗病品种YT94-128的柠檬酸含量变化趋势高于感病品种GT37;病原菌接种处理的甘蔗叶片中柠檬酸含量表现出随甘蔗生长而不断增加并不断趋于稳定的趋势;抗病品种YT94-128在接种蒸馏水4~16 d内柠檬酸含量差异不显著,病原菌接种处理样品在2~8 d内柠檬酸含量差异显著;感病品种GT37在接种蒸馏水8 d时柠檬酸含量上升达到显著水平,而病原菌接种处理样品2~16 d内柠檬酸含量差异显著。

4)甘蔗叶片中苹果酸含量的变化。如表3所示,对照样品中的苹果酸含量随甘蔗生长而逐渐上升,抗病品种YT94-128的苹果酸含量变化趋势高于感病品种GT37;病原菌接种处理的YT94-128叶片苹果酸含量随甘蔗生长而不断上升并趋于稳定,GT37在接种处理4 d时出现波峰然后随之下降并趋于稳定;其中,抗病品种YT94-128接种蒸馏水和病原菌接种处理样品分别在16 d和8 d时含量上升达到显著水平;感病品种GT37接种蒸馏水2~16 d内苹果酸的含量差异显著,病原菌接种处理样品在接种4 d时苹果酸的含量上升达到显著水平,而在16 d时含量下降显著。

5)甘蔗叶片中水杨酸含量的变化。如表3所示,对照样品中的水杨酸含量随甘蔗生长而逐渐上升,抗病品种YT94-128的水杨酸含量变化趋势高于感病品种GT37;病原菌接种处理的甘蔗叶片中水杨酸含量均表现出先上升后下降的规律,变化规律几近一致;抗病品种YT94-128接种蒸馏水和接种病原菌样品水杨酸的含量差异均不显著;感病品种GT37接种蒸馏水16 d时水杨酸的含量上升达到显著水平,病原菌接种处理样品在接种4 d时水杨酸的含量上升达到显著水平,而后在16 d时含量下降显著。

表3 不同接种时间下不同品种甘蔗内源激素含量的变化
Table 3 Changes of GA, JA, CA, MA, SA content of different sugarcane varieties under varying inoculation times

内源激素 Endogenous hormones	接种 时间/d Inoculat- ed time	YT94-128		GT37	
		对照 Control	接种处理 Inoculated treatment	对照 Control	接种处理 Inoculated treatment
GA	2	2.824± 0.362a	2.456± 0.653a	3.112± 0.236a	2.763± 0.365a
		3.002± 0.281a	2.346± 0.231a	3.331± 0.113a	2.657± 0.420a
	8	3.567± 0.232a	1.763± 0.058b	3.975± 0.205a	1.600± 0.238b
		3.814± 0.135a	1.479± 0.354b	4.065± 0.142a	1.509± 0.004b
	16	3.167± 0.284d	3.069± 0.254b	2.535± 0.624b	2.929± 1.384c
		3.465± 0.259c	8.455± 1.362a	2.780± 0.531ab	5.720± 0.326a
	JA	4.539± 0.852b	6.558± 3.624a	3.030± 0.125ab	3.374± 1.355b
		5.571± 1.324a	4.967± 2.068ab	3.576± 0.842a	1.219± 0.771d
CA	2	32.315± 2.458b	33.898± 2.362c	30.313± 2.435b	35.796± 1.395b
		43.954± 3.023ab	60.347± 8.325b	45.849± 2.002a	59.094± 5.256a
	4	47.331± 4.321a	94.568± 6.314a	57.554± 3.428a	33.668± 2.862c
		59.876± 4.845a	97.875± 5.752a	63.648± 3.624a	31.084± 2.345d
	8	29.057± 2.322c	34.221± 3.262c	32.158± 1.038d	32.995± 1.345c
		69.822± 6.384b	119.434± 8.326b	37.551± 3.426c	71.219± 6.962a
	16	70.346± 4.365b	153.117± 6.348a	67.095± 8.126b	68.714± 2.586a
		96.004± 8.291a	159.578± 2.365a	83.961± 6.847a	58.463± 4.325b
SA	2	3.385± 0.695a	3.224± 0.126a	2.805± 0.426b	2.790± 0.862c
		3.920± 0.642a	3.749± 0.234a	2.922± 0.387ab	3.643± 0.647a
	4	4.262± 0.558a	3.580± 0.064a	3.036± 0.624ab	3.450± 1.230a
		4.452± 0.358a	3.246± 0.245a	4.115± 0.343a	3.157± 0.268b
	8	4.452± 0.358a	3.246± 0.245a	4.115± 0.343a	3.157± 0.268b
		4.452± 0.358a	3.246± 0.245a	4.115± 0.343a	3.157± 0.268b
	16	4.452± 0.358a	3.246± 0.245a	4.115± 0.343a	3.157± 0.268b
		4.452± 0.358a	3.246± 0.245a	4.115± 0.343a	3.157± 0.268b

注:同一激素的同列数据后不同小写字母表示差异有显著性($P<0.05$)。Note: Different lowercase letters after data in the same column for the same hormone indicate significant differences ($P<0.05$).

3 讨 论

3.1 甘蔗叶片内源激素HPLC检测方法的建立

目前,植物内源激素测定常用的方法为酶联免

疫法与HPLC法。与HPLC法相比,酶联免疫法尽管操作简便,但存在重复性欠佳、准确度有限的弊端^[21];而HPLC技术具有高灵敏度、良好选择性及数据解析优势,其应用日益普及。因此,建立适用于植物内源激素的简便快速高效液相检测方法,对深化相关研究具关键作用。本研究建立的HPLC条件下,标准品与样品的色谱峰出峰位置高度吻合,且目标峰峰形既无拖尾现象,也未出现分叉,各组分间分离效果极佳,说明高效液相色谱法能将GA、SA、JA、CA、MA从其他物质中较好地分离出来。精密度试验结果显示各内源激素的保留时间、峰面积的相对标准偏差(RDS)均不超过5%,加标回收试验结果显示各内源激素的回收率的RSD均小于5%,说明该方法其准确度和精密度都较好,能满足内源激素定量测定的要求,可为进一步检测甘蔗生长过程中内源激素的变化与甘蔗生长、衰老、抗性等相关性研究提供技术支持。

3.2 植物内源激素与甘蔗梢腐病抗性

作为重要的植物内源激素,GA参与抗病过程的调控机制已在多种植物-病原互作体系中得到验证。如莫凤连等^[10]研究表明,GA含量的变化与不同甘蔗品种对甘蔗黑穗病的抗性密切相关,可作为甘蔗对黑穗病抗性的生理指标。在本研究中,梢腐病菌侵染后抗病品种YT94-128的GA含量动态变化呈现显著特征:尽管接种后两品种GA均显著降低,但抗病品种在病程后期(7~10 d)正常叶与病叶间的GA含量差异较感病品种GT37小,这进一步证实了GA含量的变化与植物抗病性密切相关,这一现象与南方水稻黑条矮缩病毒侵染会导致GA含量及相关生物合成基因表达量显著下降^[22]具有一致性。此外,研究发现外施GA可有效缓解甜菜坏死黄脉病毒及水稻矮缩病毒对寄主植物侵染后造成的伤害^[23-25],这为本研究发现提供了反向佐证。在甜菜坏死黄脉病毒和水稻矮缩病毒体系中,外源GA可通过补偿内源激素失衡减轻病症,而本研究发现抗梢腐病品种在病原压力下能自主维持较高的GA水平(较感病品种高),说明内源GA的主动调控可能是植物抗病机制的重要组成部分。这种内源调控优势与品种抗性等级的强相关性,提示可将GA代谢稳定性作为甘蔗抗梢腐病育种的筛选指标。

当植物遭受病原菌侵时,茉莉酸(JA)起到重要的保护作用。本研究发现,甘蔗品种感染梢腐病后,叶片JA含量与抗病性呈显著正相关,这一结果与

前人关于JA在植物-病原互作中保护作用的研究^[26]一致。Kovač等^[27]研究发现,在受马铃薯Y病毒侵染之后,JA含量表现出瞬时大量激增,最终诱导植物对病毒的抗病能力,与本研究中甘蔗JA含量的动态变化模式相似,说明JA的快速响应可能是不同植物对抗病毒和真菌病原的共同策略。王淑敏等^[28]针对芜菁花叶病毒(TuMV)侵染不结球白菜的研究发现,JA含量越低,植株病症越严重,从反向验证了JA含量与植物抗病能力的正相关关系,而本研究则从正向角度补充了这一结论——JA持续高水平的甘蔗品种表现出更强的梢腐病抗性,两者共同构建了JA含量与抗病能力的含量效应关系。

CA、MA作为三羧酸循环的关键中间物质,其在植物体内的代谢水平与生长发育及抗病性密切相关。周丹丹等^[29]在杏果黑斑病研究中发现,CP和1-MCP处理通过维持较高水平的CA和MA含量,有效抑制了病害发生,表明二者含量的稳定对植物抗病性具有积极作用。本研究中,病原菌接种处理的YT94-128叶片CA、MA含量随甘蔗生长而不断上升并趋于稳定,与周丹丹等^[29]关于CA含量与抗病性关联的结论一致,进一步印证了CA在植物抗病过程中的重要作用。而张显等^[30]针对西瓜抗枯萎病的研究指出,MA含量与抗病性相关关系不明显,而CA含量则与抗病性呈显著正相关,这可能是不同作物或病害中,CA和MA可能发挥着不同的作用。本试验结果明确了CA和MA在甘蔗梢腐病抗性中的具体作用,可为深入研究二者的抗逆性生理生化机制、科学筛选抗病品种以及指导甘蔗抗病育种提供重要的技术参考。

SA作为植物生命活动的重要调控物质,广泛参与基因表达、衰老进程以及病害防御等关键生理过程^[31]。已有研究从生理生化层面深入揭示了SA的抗病机制,如:苜蓿花叶病毒和白三叶草花叶病毒复合侵染本氏烟时,叶片SA含量会在一定时间内显著提升^[32];番茄环纹斑点病毒侵染辣椒后,感病植株在24~240 h内SA含量持续高于对照^[33];大豆在接种3个株系的大豆花叶病毒24 h后,SA含量亦出现明显升高^[34];大麦感染大麦黄矮病毒(BYDV)后,同样触发SA的快速积累^[35]。这些研究都表明,在病毒侵染的胁迫下,SA能够迅速累积,成为植物抵御病害的重要防线。本研究中,病原菌接种处理的甘蔗叶片中水杨酸含量2~4 d内表现出明显上升的趋势,且接种处理后的抗病品种YT94-128的SA含量显著高于

感病品种GT37,这与上述研究发现的SA含量与植物抗病性呈正相关的结论高度契合。

综上,本研究通过建立HPLC法检测甘蔗受梢腐病侵染后叶片的5种内源激素的含量变化,研究结果表明,5种内源激素通过调控甘蔗生理生化过程参与防御梢腐病病原菌侵染机制,该发现可为深入探究甘蔗抗梢腐病抗性机制提供理论依据,但其生理生化机制有待进一步解析。

参考文献 References

- [1] LIN Z Y, XU S Q, QUE Y X, et al. Species-specific detection and identification of fusarium species complex, the causal agent of sugarcane pokkah boeng in China [J/OL]. PLoS One, 2014, 9 (8) : e104195 [2024-03-19]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104195>.
- [2] 王泽平,陈奕,孙海军,等.广西甘蔗主栽品种梢腐病田间抗性初步评价[J].热带作物学报,2016,37(5):952-957.
WANG Z P, CHEN Y, SUN H J, et al. Preliminary evaluation of resistance to pokkah boeng disease of major sugarcane varieties in the field of Guangxi [J]. Chinese journal of tropical crops, 2016, 37 (5) : 952-957 (in Chinese with English abstract).
- [3] NAVARRO L, BARI R, SEILANIANTZ A, et al. Roles of plant hormones in plant resistance and susceptibility to pathogens [M]//GUSTAFSON J P, TAYLER J, STACEY G. Genomics of disease. New York: Springer New York, 2008: 1-10.
- [4] DENANCÉ N, SÁNCHEZ-VALLET A, GOFFNER D, et al. Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs [J/OL]. Frontiers in plant science, 2013, 4: 155 [2024-03-19]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00155>.
- [5] BARI R, JONES J D G. Role of plant hormones in plant defence responses [J]. Plant molecular biology, 2009, 69 (4) : 473-488.
- [6] 姚全胜,郑磊,柳凤,等.芒果细菌性角斑病病菌侵染对芒果内源激素含量的影响[J].中国植保导刊,2020,40(11):19-22.
YAO Q S, ZHENG L, LIU F, et al. Effects of *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* on endogenous hormone contents in mango [J]. China plant protection, 2020, 40 (11) : 19-22 (in Chinese with English abstract).
- [7] 杨志晓,王轶,谢升东,等.不同抗性烟草品种内源激素对赤星病胁迫的响应差异[J].中国烟草科学,2021,42(2):56-61.
YANG Z X, WANG Y, XIE S D, et al. Difference of endogenous hormones in tobacco resistant and susceptible cultivars in response to brown spot infection [J]. Chinese tobacco science, 2021, 42 (2) : 56-61 (in Chinese with English abstract).
- [8] 何圣贤,万瑶,覃雪梅,等.水稻细菌性条斑病菌侵染后抗、感近等基因系内源激素含量的变化[J].广东农业科学,2020, 47(3): 90-96. HE S X, WAN Y, QIN X M, et al. Changes of endogenous hormone content in resistant and susceptible near-isogenic lines of rice after infection with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* [J]. Guangdong agricultural sciences, 2020, 47 (3): 90-96 (in Chinese with English abstract).
- [9] 张兆辉,田守波,杨晓峰,等.白粉病病菌对不同抗性瓠瓜生理生化指标的影响[J].分子植物育种,2024,22(9):3028-3035.
ZHANG Z H, TIAN S B, YANG X F, et al. Effects of powdery mildew pathogen on physiological and biochemical indexes of different resistance to *Lagenaria siceraria* [J]. Molecular plant breeding, 2024, 22 (9) : 3028-3035 (in Chinese with English abstract).
- [10] 莫凤连,杨丽涛,潘如科,等.甘蔗黑穗病菌胁迫对甘蔗内源激素含量的影响[J].南方农业学报,2012,43(11):1676-1681.
MO F L, YANG L T, PAN R K, et al. Changes of endogenous hormone content in sugarcane under smut pathogen stress [J]. Journal of southern agriculture, 2012, 43(11): 1676-1681 (in Chinese with English abstract).
- [11] 宋奇琦,Singh Pratiksha, Singh Rajesh Kumar,等.甘蔗应答黑穗病菌侵染相关酶活性和内源激素含量的变化[J].南方农业学报,2018,49(4):650-655.
SONG Q Q, SINGH P, SINGH R K, et al. Changes of related enzyme activity and endogenous hormone content in sugarcane response to smut fungus infection [J]. Journal of southern agriculture, 2018, 49(4): 650-655 (in Chinese with English abstract).
- [12] 林生,周明,陈婷,等.*Gibberella fujikuroi* 侵染果蔗叶片病程相关蛋白编码基因的表达分析[J].热带亚热带植物学报,2012,20(2):141-148.
LIN S, ZHOU M M, CHEN T, et al. The expression analysis of Pathogenesis-related protein encoding genes in chewing cane leaves infected by *Gibberella fujikuroi* [J]. Journal of tropical and subtropical botany, 2012, 20(2): 141-148 (in Chinese with English abstract).
- [13] 尚蓉霞,余欣,石鸿宇,等.HPLC法测定孕穗期水稻剑叶中多种内源激素的含量[J].中国稻米,2020,26(1):37-40.
SHANG R X, YU X, SHI H Y, et al. Determination of multiple endogenous hormone in rice flag leaves during booting stage by HPLC [J]. China rice, 2020, 26 (1) : 37-40 (in Chinese with English abstract).
- [14] 刘志勇,汪军,岳霞丽,等.高效液相色谱切换波长法测定油菜内源激素[J].光谱实验室,2006,23(2):285-288.
LIU Z Y, WANG J, YUE X L, et al. Determination of plant hormones in rape by HPLC with changing UV-vis wavelength [J]. Chinese journal of spectroscopy laboratory, 2006, 23(2): 285-288 (in Chinese with English abstract).
- [15] 刘英翠.高效液相色谱法同时测定枣叶片、果实中4种内源激素实验[J].宁夏农林科技,2018,59(5):23-25.
LIU Y C. Determination of four endogenous hormones in fruits and leaves of jujube by reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) [J]. Ningxia journal of agriculture

- and forestry science and technology, 2018, 59(5) : 23-25 (in Chinese with English abstract).
- [16] 未晓巍, 勾畅, 徐民泽, 等. 高效液相色谱法测定玉米内源激素方法的改进研究 [J]. 玉米科学, 2013, 21(3) : 144-148.
- WEI X W, GOU C, XU M Z, et al. Study on the improvement of HPLC method for analyzing endogenous hormone in maize [J]. Journal of maize sciences, 2013, 21(3) : 144-148 (in Chinese with English abstract).
- [17] 王萌, 张海惠, 刘琪, 等. 蚕豆中5种内源激素的高效液相色谱测定 [J]. 甘肃农业大学学报, 2015, 50(6) : 58-61. WANG M, ZHANG H H, LIU Q, et al. Stimutaneous determination of five endogenous hormones in *Vicia faba* by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2015, 50(6) : 58-61 (in Chinese with English abstract).
- [18] 张玉琼, 仲延龙, 高翠云, 等. 高效液相色谱法分离和测定小麦中的5种内源激素 [J]. 色谱, 2013, 31(8) : 800-803. ZHANG Y Q, ZHONG Y L, GAO C Y, et al. Determination of five endogenous hormones in wheat by high performance liquid chromatography [J]. Chinese journal of chromatography, 2013, 31(8) : 800-803 (in Chinese with English abstract).
- [19] 张显, 王鸣. 西瓜枯萎病抗性及其与体内一些生化物质含量的关系 [J]. 西北农业学报, 2001, 10(4) : 34-36. ZHANG X, WANG M. Relations between contents of some biochemicals in seedling and *Fusarium* wilt disease resistance in watermelon [J]. Acta agriculturae boreali-occidentalis sinica, 2001, 10(4) : 34-36 (in Chinese with English abstract).
- [20] 吕桂珍. 茉莉酸信号途径在小麦抗白粉病反应中的作用 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2013. LÜ G Z. The role of jasmonic acid signal pathway in wheat powdery mildew resistance [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2013 (in Chinese with English abstract).
- [21] 冷怀琼, 袁永凯, 徐瑞林. 苹果潜隐病毒的研究: III. 茎沟槽病毒对苹果内源激素的影响 [J]. 四川农业大学学报, 1991, 9(2) : 190-194. LENG H Q, YUAN Y K, XU R L. A study on the apple latent virus: III. The effect of SGV on apple auxin [J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 1991, 9(2) : 190-194 (in Chinese with English abstract).
- [22] 杨行海, 夏秀忠, 农保选, 等. 水稻苗期感染SRBSDV后赤霉素相关基因表达量及赤霉素含量的变化 [J]. 植物保护学报, 2017, 44(6) : 1033-1039. YANG X H, XIA X Z, NONG B X, et al. Analysis of the expression levels of the genes involved in gibberellin biosynthesis and gibberellin contents in rice during seedling stage after being infected by southern rice black-streaked dwarf virus [J]. Journal of plant protection, 2017, 44(6) : 1033-1039 (in Chinese with English abstract).
- [23] SATOH K, YONEYAMA K, KONDOH H, et al. Relationship between gene responses and symptoms induced by rice grassy stunt virus [J/OL]. Frontiers in microbiology, 2013, 4: 313 [2024-03-19]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00313>.
- [24] SHIMIZU T, SATOH K, KIKUCHI S, et al. The repression of cell wall- and plastid-related genes and the induction of defense-related genes in rice plants infected with rice dwarf virus [J]. Molecular plant-microbe interactions, 2007, 20(3) : 247-254.
- [25] FAN H Y, SUN H W, WANG Y, et al. Deep sequencing-based transcriptome profiling reveals comprehensive insights into the responses of *Nicotiana benthamiana* to beet necrotic yellow vein virus infections containing or lacking RNA4 [J/OL]. PLoS One, 2014, 9(1) : e85284 [2024-03-19]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085284>.
- [26] 鲁秀梅, 张宁, 夏美玲, 等. 同抗性甜瓜接种蔓枯病菌后内源激素含量变化及其相关基因的表达分析 [J]. 南京农业大学学报, 2018, 41(2) : 248-255. LU X M, ZHANG N, XIA M L, et al. Changes of endogenous hormone contents and expression analysis of related genes in melon with different resistance after inoculated with *Didymella bryoniae* [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2018, 41(2) : 248-255 (in Chinese with English abstract).
- [27] KOVÁČ M, MÜLLER A, JARH D M, et al. Multiple hormone analysis indicates involvement of jasmonate signalling in the early defence of potato to potato virus YNTN [J]. Biologia plantarum, 2009, 53(1) : 195-199.
- [28] 王淑敏, 侯喜林, 李英, 等. 芫菁花叶病毒对不结球白菜内源激素含量及代谢相关基因转录水平的影响 [J]. 南京农业大学学报, 2011, 34(5) : 13-19. WANG S M, HOU X L, LI Y, et al. Effects of Turnip mosaic virus (TuMV) on endogenous hormones and transcriptional level of related genes in infected non-heading Chinese cabbage [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2011, 34(5) : 13-19 (in Chinese with English abstract).
- [29] 周丹丹, 刘强, 梁辉, 等. 低温等离子和1-甲基环丙烯调控糖酸代谢增强杏果对黑斑病的抗性研究 [J]. 林业工程学报, 2023, 8(6) : 100-107. ZHOU D D, LIU Q, LIANG H, et al. Cold plasma and 1-MCP treatment induced resistance to black spots by regulating metabolisms of sugars and organic acids in apricots [J]. Journal of forestry engineering, 2023, 8(6) : 100-107 (in Chinese with English abstract).
- [30] 张显, 王鸣. 西瓜枯萎病抗性与西瓜幼苗根系中某些有机酸含量关系的研究 [J]. 中国西瓜甜瓜, 1990, 3(2) : 18, 31. ZHANG X, WANG M. Study on the relationship between watermelon *Fusarium* wilt resistance and some organic acids content in watermelon seedling root system [J]. China cucurbits and vegetables, 1990, 3(2) : 18, 31 (in Chinese).
- [31] VLOT A C, DEMPSEY D A, KLESSIG D F. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease [J]. Annual review of phytopathology, 2009, 47 : 177-206.
- [32] 岳阳, 梁巧兰, 魏列新, 等. 莴苣花叶病毒和白三叶草花叶病毒复合侵染对本氏烟中5种激素含量的影响 [J]. 草业科学, 2021, 38(11) : 2255-2265. YUE Y, LIANG Q L, WEI L X, et al. Effects of alfalfa mosaic virus and white clover mosaic virus

- co-infection on the contents of five endogenous hormones in *Nicotiana benthamiana* [J]. Pratacultural science, 2021, 38 (11):2255-2265 (in Chinese with English abstract).
- [33] 张晓林,陈永对,穆野,等.番茄环纹斑点病毒(TZSV)侵染对辣椒防御相关物质的影响[J].山东农业科学,2018,50(4):94-97. ZHANG X L, CHEN Y D, MU Y, et al. Effects of tomato zonate spot virus(TZSV) infection on related defensive substances in pepper[J]. Shandong agricultural sciences, 2018, 50(4):94-97 (in Chinese with English abstract).
- [34] 张锴,王宇,王涛,等.大豆花叶病毒引发大豆不同症状的生理特性比较[J].植物病理学报,2017,47(3):325-332.
- ZHANG K, WANG Y, WANG T, et al. Comparison of physiological property on soybean leaves showing different symptoms induced by soybean mosaic virus[J]. Acta phytopathologica sinica, 2017, 47(3): 325-332 (in Chinese with English abstract).
- [35] PAULMANN M K, KUNERT G, ZIMMERMANN M R, et al. Barley yellow dwarf virus infection leads to higher chemical defense signals and lower electrophysiological reactions in susceptible compared to tolerant barley genotypes [J/OL]. Frontiers in plant science, 2018, 9: 145 [2024-03-19]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00145>.

Analysis of endogenous hormone content in sugarcane leaves infected by *Fusarium verticillioides* based on HPLC

YANG Cuifang¹, GAO Yijing¹, HUANG Hairong¹, HUANG Dongmei¹,
YANG Hai¹, SHEN Yaoyang¹, LI Xiang², WANG Zeping¹

1. Guangxi Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Sugarcane Biotechnology and Genetic Improvement (Guangxi), Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Guangxi Key Laboratory of Sugarcane Genetic Improvement, Nanning 530007, China;

2. Guangxi Subtropical Crops Research Institute/Guangxi Key Laboratory of Quality and Safety Control for Subtropical Fruits, Nanning 530001, China

Abstract To clarify the relationship between endogenous hormones and resistance to sugarcane pokkah boeng disease, this study utilized *Fusarium verticillioides*, the primary pathogenic fungus of sugarcane pokkah boeng disease in China, as the pathogen, and employed the highly resistant cultivar YT94-128 (Yuetan 94-128) and the susceptible cultivar GT37 (Guangxi Tang 37) as experimental materials. High-performance liquid chromatography (HPLC) was applied to detect the dynamic changes of five endogenous hormones in sugarcane leaves following pathogen inoculation. The results demonstrated that the HPLC method achieved average recovery rates of 99.61%, 99.12%, 97.36%, 96.74%, and 99.90% for gibberellin (GA), jasmonic acid (JA), citric acid (CA), malic acid (MA) and salicylic acid (SA) in sugarcane leaves, respectively. The precision, indicated by relative standard deviation (RSD) values, ranged from 0.033% to 4.220%, highlighting the method's rapid analysis, high resolution, and excellent stability and reproducibility. Post-inoculation analysis revealed distinct hormonal patterns: GA content progressively decreased in both cultivars during sugarcane growth, with a more pronounced reduction in GT37. JA content initially increased before declining, showing a greater reduction amplitude in GT37. CA content continuously increased in YT94-128 but significantly decreased in GT37. MA content steadily rose and stabilized in YT94-128, whereas GT37 exhibited a peak at 4 days post-inoculation, followed by a stabilization. SA content in both cultivars displayed an initial increase followed by a decline, with more marked fluctuations in YT94-128. This study demonstrates that the differential concentrations and dynamic patterns of endogenous hormones following pathogen infection may serve as critical indicators for assessing varietal resistance to sugarcane pokkah boeng disease.

Keywords sugarcane; pokkah boeng disease; *Fusarium verticillioides*; endogenous hormones; high performance liquid chromatography

(责任编辑:边书京)