

药用野生稻与栽培稻抗褐飞虱 HPLC 指纹图谱的比较*

赵颖¹, 黄凤宽^{2,3}, 童晓立²

(1 华南农业大学理学院应用化学系, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学昆虫学系, 广东 广州 510642;
3 广西农业科学院植物保护研究所, 广西 南宁 530007)

摘要 应用高效液相色谱技术, 研究比较了栽培稻与广西药用野生稻的抗褐飞虱 HPLC 指纹图谱。结果表明, 药用野生稻指纹图谱中既含有与栽培稻抗褐飞虱生物型 II 相关的峰 1、峰 2、峰 8, 又含有与栽培稻抗褐飞虱孟加拉型相关的峰 3、峰 5、峰 9、峰 11, 但药用野生稻中的峰 1、峰 2、峰 3、峰 5 的含量特别高。前期的结果表明, 峰 4 与栽培稻对褐飞虱孟加拉型的抗性呈负相关, 峰 12 与栽培稻对褐飞虱两种生物型的抗性均呈负相关, 但广西药用野生稻却几乎不含峰 4 和峰 12。广西药用野生稻的这种既与栽培稻相似, 又有它自己鲜明特点的 HPLC 指纹图谱特征, 使它对褐飞虱具有广谱抗性。

关键词 植物保护学; 栽培稻; 药用野生稻, 褐飞虱; 抗性

中图分类号 S 435 112 3

A comparative study of the HPLC fingerprint chromatograms of medical *Oryza officinalis* and *Oryza sativa* resistant to brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål)

ZHAO Ying¹, HUANG Feng-kuan^{2,3}, TONG Xiao-li²

(1 *Department of Applied Chemistry, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China*;
2 *Department of Entomology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China*;
3 *Institute of Plant Protection, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China*)

Abstract By using high-performance liquid chromatography, the HPLC fingerprint chromatograms of *Oryza officinalis* and *Oryza sativa* resistant to brown planthopper (BPH) were compared and analyzed in this paper. The results demonstrated that peak1, peak2 and peak8 correlated with the rice resistance to BPH biotype II and peak3, peak5, peak9 and peak11 correlated with the rice resistance to BPH biotype Bangladesh were both existed in the HPLC fingerprints of *Oryza officinalis*. But peak1, peak2, peak3 and peak5 of *Oryza officinalis* were much higher than that of *Oryza sativa*. The earlier work has shown that peak4 was negatively correlated with the rice resistance to Bangladesh biotype, whereas peak12 was negatively correlated with the resistance of *Oryza sativa* to two biotypes of BPH. However, there were almost no peak4s and peak12s in *Oryza officinalis*. The HPLC fingerprints of *Oryza officinalis* shared some common features with that of *Oryza sativa*, though some unique characteristics exist. It may explain why *Oryza officinalis* has a broad spectrum of resistance to BPH.

Key words plant protection; *Oryza sativa*; *Oryza officinalis*; brown planthopper; resistance of pest insects

指纹图谱技术是 20 世纪 80 年代末根据中药 化学成分的复杂性或模糊性和有效成分的整体

收稿日期: 2005-01-11 修订日期: 2005-05-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(39930120), 华南农业大学校长基金资助项目(2002047)

* 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野生药用稻品种, 特此致谢。

性,而提出的从整体上综合分析评价中药质量的方法。中药 HPLC 指纹图谱,本质上就是中药材中依赖于不同提取方法所得的活性化学组分(大都为药用动植物的次生代谢物)的相对浓度谱,它体现了中药的整体化学特征,可以在不了解各化学成分结构的情况下,通过全面反映中药所含内在化学成分的种类、数量及其相对含量,进而反映中药的质量^[1-5]。

作物的化学抗性也是多种次生物质共同作用的结果^[6]。由于微量成分分离和鉴定存在的困难,其中许多活性成分也未被阐明,要在这种情况下直观、定量、快速、简捷、准确地鉴定品种抗性, HPLC 指纹图谱不失为一个好的选择。药用野生稻(*Oryza officinalis*)对褐飞虱的全部生物型均表现高抗性^[7-8]。这种高抗性的内在化学特征可以在 HPLC 指纹图谱中得到反映。本研究通过比较广西药用野生稻与栽培稻的 HPLC 指纹图谱,以期了解广西药用野生稻的这种内在化学特征,为更好地利用药用野生稻,简化抗性鉴定程序提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

栽培稻(*Oryza sativa*)由广西农业科学院植物保护研究所抗虫育种课题组提供,其中包括褐飞虱生物型 I 抗虫对照品种 Mudgo;生物型 II 抗虫对照品种 IR36、ASD7;孟加拉型抗虫对照品种 Ptb33、RHT 和感虫对照品种 TN1。药用野生稻(*Oryza officinalis*)由华南农业大学植物分子育种研究中心提供,包括广西倒水药稻、广西华堂药稻、广西夏鄂药稻、广西蒙江药稻、广西横江药稻和广西石桥药稻。

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、经四分法反复缩分后,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。

1.3 HPLC 测定的色谱条件

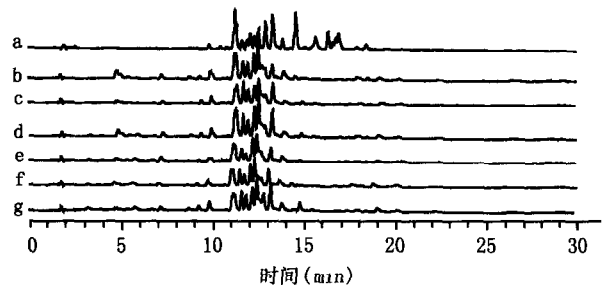
测试样品采用赵颖等的方法在 HP1100 高效液相色谱仪上进行检测分析^[9,10]。色谱条件为:

采用 C₁₈ 反相柱(Hypersil ODS 5 μ m, 4.0 mm × 250 mm),以 1% 乙酸水溶液和乙腈的混合溶剂为梯度洗脱的流动相。流动相梯度是:在 1.5 mL/min 流速下,以 8% 乙腈洗脱 3 min 后,接着在 22 min 内提高到 35% 乙腈,再在 4 min 内继续提高到 80% 乙腈,最后在 11 min 内降回 8% 乙腈,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 μ L,紫外检测 OD₃₂₀ 值。

2 结果与分析

2.1 水稻品种的 HPLC 指纹图谱

在上述色谱条件下,测得各样品的谱峰均主要集中在 10~17 min 内(图 1)。广西野生药稻的 HPLC 指纹图谱非常相似;而栽培稻的却相对复杂,在保留时间 10~16 min 区间内有 13 个分离较好的谱峰,将其作为分析的指纹图谱特征峰群。与栽培稻特征峰群对应的药用野生稻的指纹图谱如图 2~图 4。



a 栽培稻 ASD7, b 广西华堂药稻, c 广西蒙江药稻,
d 广西倒水药稻, e 广西夏鄂药稻;
f 广西横江药稻; g 广西石桥药稻

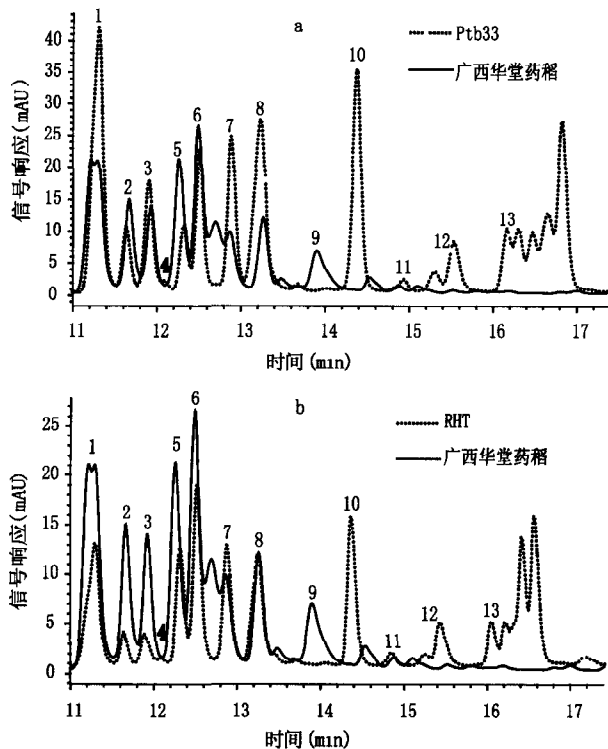
图 1 水稻品种的典型 HPLC 图谱

2.2 药用野生稻与栽培稻的 HPLC 指纹图谱比较

前期研究分析确定了 HPLC 指纹图谱中的峰 1、峰 2、峰 8、峰 12 对应的次生化合物是影响栽培稻对褐飞虱生物型 II 抗性水平的主要抗原次生化合物^[9],而峰 3、峰 4、峰 5、峰 9、峰 11、峰 12 则是栽培稻抗褐飞虱孟加拉型的主要抗原次生化合物^[10]。

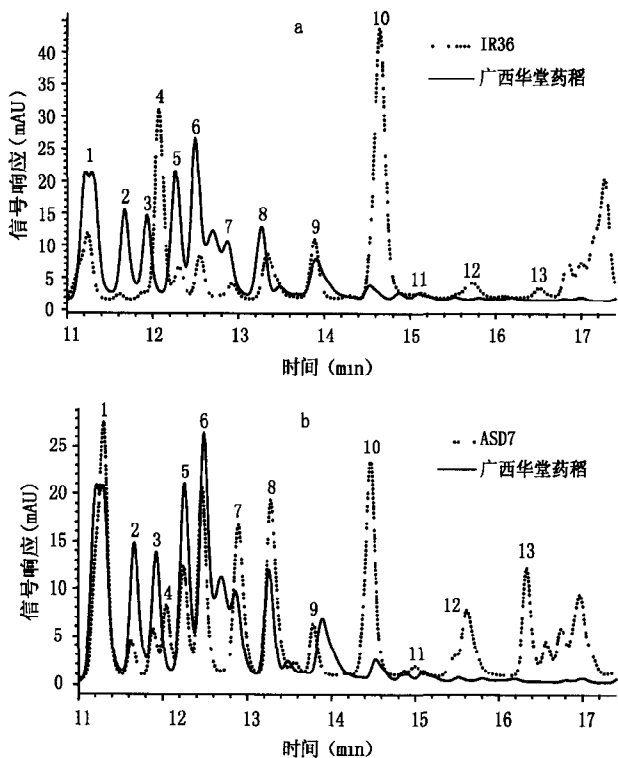
从药用野生稻与栽培稻的 HPLC 指纹图谱特征峰群比较可见,广西药用野生稻中次生物质种类和含量的组合,与栽培稻有相似之处:其 HPLC 指纹图谱中既含有水稻抗褐飞虱生物型 II 的抗原次生物质谱峰——峰 1、峰 2、峰 8(图 2),又含有

水稻抗褐飞虱孟加拉型的谱峰——峰3、峰5、峰9、峰11(图3)。同时又有它鲜明的特点:药用野生稻中峰1、峰2、峰3、峰5的含量比大部分栽培稻品种都高,但却几乎不含峰4、峰12(图2~图4)。峰4含量与栽培稻对褐飞虱孟加拉型的抗性呈负相关关系,即峰4含量降低可提高品种对褐飞虱孟加拉型的抗性,褐飞虱孟加拉型的抗虫对照品种RHT、Ptb33中就几乎不含峰4(图3),药用野生稻与此相似;而褐飞虱孟加拉型的感虫品种IR36、ASD7及TN1中峰4含量均较高(图2,图4b);褐飞虱生物型I的抗虫对照品种Mudgo也明显含有峰4(图4a),但比IR36、ASD7(图2)和TN1(图4b)低得多。峰12则与栽培稻对褐飞虱两种生物型的抗性均呈负相关关系,即峰12含量降低将可同时提高品种对褐飞虱生物型II和褐飞虱孟加拉型的抗性,栽培稻各品种中均可明显地检测到峰12(图2~图4),药用野生稻不含此峰有利于提高其对褐飞虱两种生物型的抗性水平。感虫对照品种TN1中峰4、峰12都较高(图4b),因此对褐飞虱两种生物型都是高感。具有特别抗性的国外抗源品种Ptb33(抗褐飞虱孟加拉型、生



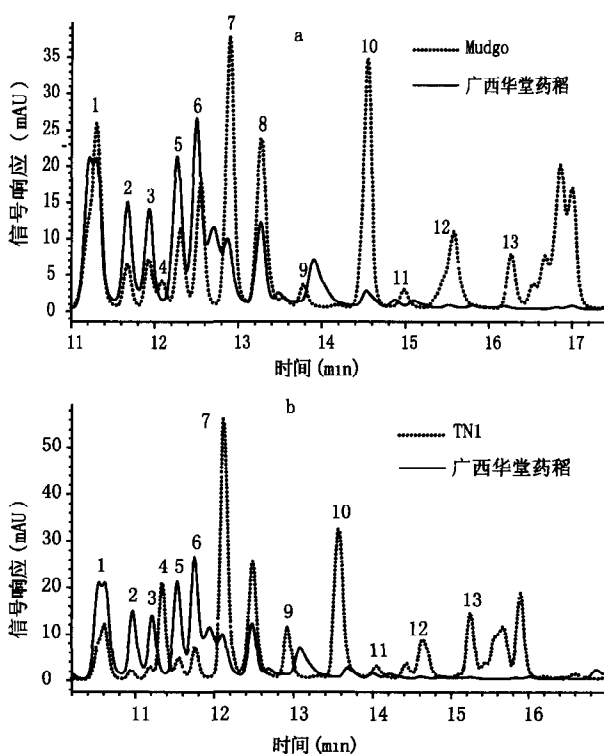
a 孟加拉型抗虫对照品种为Ptb33, b 孟加拉型抗虫对照品种为RHT

图3 药用野生稻与抗褐飞虱孟加拉型栽培稻的HPLC指纹图谱



a 生物型II抗虫对照品种为IR36, b 生物型II抗虫对照品种为ASD7

图2 药用野生稻与抗褐飞虱生物型II栽培稻的HPLC指纹图谱



a 褐飞虱生物型I抗虫对照品种为Mudgo, b 感虫栽培对照品种为TN1

图4 药用野生稻与抗褐飞虱生物型I、感虫栽培稻品种的HPLC指纹图谱

物型 II, 又抗褐飞虱九龙江型^[11]) 中峰 1、峰 2、峰 3、峰 5 的含量特别高(图 3a), 药用野生稻也有与它相似的这一特点。除此之外, 在栽培稻 HPLC 指纹图谱中的峰 6 与峰 7 之间的对应位置上, 药用野生稻还多一个谱峰(图 2~图 4), 它对药用野生稻抗褐飞虱性能的作用仍不清楚。药用野生稻的这种化学特征使它对褐飞虱两种生物型都具有高抗性。

3 讨论

药用野生稻对褐飞虱具有广谱高抗性, 是水稻品种改良的重要种质资源之一^[7,8,12,13]。如何利用药用野生稻资源中的这种优异性状一直是育种家们感兴趣的问题。由于药用野生稻与栽培稻的基因组型不同, 亲缘关系较远, 杂交存在不少困难, 杂交后代疯狂分离是其中之一^[7,12,15], 因此育种过程的抗性鉴定是一项艰巨的工作。研究表明, 植物化学成分的变化与 DNA 多态有极强的关联性, 基因控制着植物次生物质的合成与变异, 遗传物质的差异也会反映在化学成分的含量与组合的差异上^[16,17]。如果将 DNA 图谱与反映抗性化学成分变化的化学指纹图谱相结合, 对于水稻品种的抗性鉴定、优良品种的选育都具有重要的意义。

HPLC 指纹图谱不但体现了定性鉴别的特征——化学成分的数量和相对位置(保留时间), 而且还体现了量的概念——峰的高度和峰面积表征了某个化学成分的含量, 而各峰的峰高(峰面积)的比值体现了各种化学成分间的相对含量。定性和定量的结合使得指纹图谱不仅可以进行个体的“唯一性”的鉴定, 还可以将其“量”的特征和抗性级别相联系。如果直接利用这种指纹图谱, 跟踪鉴定、筛选兼具药用野生稻抗性特点和栽培稻优良性状的杂交后代, 可能比利用 RFLP 标记和 RAPD 标记等分子标记方法有更强的直观性、更低的运行成本和更高的鉴定、筛选效率^[16~18]。赵颖等借鉴中药的指纹图谱技术, 通过检测抗褐飞虱不同生物型水稻品种的 HPLC 谱图, 建立了品种抗性级别与抗原次生物质含量(峰面积值)的回归模型。利用该模型成功地鉴定了一些水稻品种对褐飞虱的抗性水平, 其中广西药用野生稻的抗性水平预测值与生测结果基本吻合^[9,10], 显示了 HPLC 指纹图谱技术在水稻抗性鉴定和育种工作

中的应用前景。

参考文献

- [1] 谢培山 中药色谱指纹图谱鉴别的概念、属性、技术与应用[J] 中国中药杂志, 2001, 26(10) 653~655
- [2] 谢培山 中药色谱指纹图谱质量控制模式的研究和应用——若干实质性问题的探讨(一)[J] 世界科学技术—中药现代化, 2001, 3(6) 28~32
- [3] 谢培山 中药色谱指纹图谱质量控制模式的研究和应用——若干实质性问题的探讨(二)[J] 世界科学技术—中药现代化, 2001, 3(3) 18~23
- [4] 罗国安, 王义明 中药指纹图谱的分类和发展[J] 中国新药杂志, 2002, 11(1): 46~51
- [5] 李晓波, 屠鹏飞 中药材指纹体系[J] 中草药, 2003, 34(5): 385~387
- [6] 周明荊 作物抗虫性原理及应用[M] 北京 北京农业大学出版社, 1992 37~41
- [7] 钟代彬, 罗利军, 应存山 种属间杂交转移药用野生稻抗褐飞虱基因研究[J] 种子, 1997, (5) 1~4
- [8] 李容柏, 秦学毅 广西野生稻抗病虫性鉴定研究的主要进展[J] 广西科学, 1994, 1(1): 83~85
- [9] 赵颖, 黄凤宽, 童晓立, 等 水稻品种中抗褐飞虱抗原次生物质的分析[J] 应用生态学报, 2004, 15(11) 2161~2164
- [10] 赵颖, 黄凤宽, 童晓立, 等 水稻品种对褐飞虱不同生物型抗性的 HPLC 分析[J] 华南农业大学学报, 2005, 26(2) 52~55
- [11] 黄凤宽, 韦素美, 罗善昱, 等 稻褐飞虱不同生物型致病特性研究[J] 广西农业生物科学, 2003, 22(2) 84~88
- [12] 钟代彬, 罗利军, 应存山 野生稻有利基因转移研究进展[J] 中国水稻科学, 2000, 14(2) 103~106
- [13] 颜辉煌, 程祝宽, 刘国庆, 等 栽培稻—药用野生稻杂种 F1 及回交后代的基因组原位杂交鉴定[J] 遗传学报, 1999, 26(2) 157~162
- [14] 胡文辉, 舒理慧, 宋运淳, 等 基因组原位杂交鉴定栽培稻与广西药用野生稻杂交后代染色体构成[J] 武汉植物学研究, 2000, 18(2), 81~84
- [15] 秦学毅, 韦素美, 武波, 等 药用野生稻抗源对褐飞虱的抗性遗传及利用研究[J] 西南农业学报, 2002, 15(4): 62~64
- [16] Sangwan R S, Sangwan N S, Jain D C, *et al* RAPD profile based genetic characterization of chemotypic variants of *Artemisia annua* L [J] Biochem Mol Biol Int, 1999, 47(6) 935~944
- [17] Baum B R, Mechanda S, Livesey J F, *et al* Predicting quantitative phytochemical markers in singer *Echinacea* plants or clones from their DNA fingerprints[J] Phytochemistry, 2001, 56(6): 543~549
- [18] 武波, 韦东, 秦学毅, 等 野生稻和栽培稻的随机多态 DNA (RAPD) 分析[J] 广西植物, 2001, 21(4) 339~343