

转 Bt 基因玉米叶片次生代谢物 DIMBOA 和 酚酸类物质含量的变化

聂呈荣^{1,2}, 骆世明^{1*}, 王建武^{1*}, 黄京华¹, 曾任森¹

(1. 华南农业大学热带亚热带生态研究所, 广州 510642; 2. 佛山科学技术学院作物遗传育种研究所, 佛山 528231)

摘要: 异羟肟酸和酚酸类物质是玉米植株中重要的次生代谢物, 可以帮助抵御多种病原菌、害虫、线虫和其它植物的危害。采用 HPLC 法研究了 Bt 玉米 34B24、G30、农大 61(Nongda 61) 和 1426×1482 以及部分相应的非转基因玉米叶片 DIMBOA 和酚酸类物质含量的变化。试验结果表明, 不同玉米品种之间 DIMBOA 含量的差异很大; 各 Bt 玉米品种叶片的 DIMBOA 含量普遍低于相对应的非转基因近等基因系。从不同部位的叶片看, 玉米幼嫩叶片中的 DIMBOA 含量普遍较高; 不同品种叶片 DIMBOA 含量的差异主要表现在幼叶之间, 而老叶间的差异普遍较小。无论是 Bt 玉米还是非转基因玉米, 随着生长时间的增加, 各品种玉米幼苗全株叶片的 DIMBOA 含量急剧减少; 各品种倒 1 叶的 DIMBOA 含量也都随着生长期的增加而减少, 倒 3 叶却没有这样的规律。Bt 玉米叶片的 DIMBOA 含量在单一的干旱胁迫或缺氮胁迫下的变化规律与非转基因玉米相似, 即单一的干旱胁迫或缺氮胁迫下玉米各部位叶片的 DIMBOA 含量均显著升高; 然而, 在干旱和缺氮双重胁迫下, Bt 玉米 1426×1482 在生长的中后期各部位叶片的 DIMBOA 含量却低于正常生长条件, 明显不同于非转基因玉米的变化规律。与相应的非转基因近等基因系相比, 虽然 Bt 玉米中香草酸和丁香酸的含量没有显著减少, 但阿魏酸的含量显著降低。这一结果表明, 外源 Bt 基因的导入和表达, 使得玉米原有的部分次生代谢受到了抑制, DIMBOA 和部分酚酸类物质的含量减少, 削弱了玉米原有的生化防御机制。

关键词: Bt 玉米; DIMBOA; 酚酸; HPLC

Change in concentration of secondary metabolites- DIMBOA and phenolic acids in leaves of Bt corn

NIE Cheng-Rong^{1,2}, LUO Shi-Ming^{1*}, WANG Jian-Wu^{1*}, HUANG Jing-Hua¹, ZENG Ren-Sen¹ (1.

Institute of Tropical and Subtropical Ecology, South China Agricultural University, Guangzhou, 510642, China; 2. Institute of Crop Genetics and Breeding, Foshan University, Foshan, 528231, China). Acta Ecologica Sinica, 2005, 25(4): 814~823.

Abstract: Cyclic hydroxamic acids and phenolic acids are among important secondary metabolites of corn plant. These materials and their derivatives have implications for the resistance of the plants to herbivores, pests and pathogens. The content of leaf DIMBOA (2,4-dihydroxy-7-methoxy γ -2H-1,4-benzoxazin-3-one) and phenolic acids in Bt corns 34B24, G30, Nongda 61, and 1426×1482 were quantified by HPLC. The content of leaf DIMBOA in Bt corns of 34B24 and G30 were significantly lower than that in their corresponding near isogenic lines 34B23 and G26, indicating that the introduction of Bt gene had inhibited the biosynthesis and accumulation of DIMBOA. The concentration of DIMBOA in the younger leaves at different plant ages were generally higher than that in the older leaves. The difference of DIMBOA concentration among different varieties was mainly existed in their younger leaves. The difference of DIMBOA concentration among the older leaves of different varieties was relatively smaller. No matter Bt corn and non-Bt corn, the concentration of DIMBOA in the mixed sample of the whole plant

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30270270); 广东省自然科学基金资助项目(021043 和 000569)

收稿日期: 2004-10-05; **修订日期:** 2005-02-11

作者简介: 聂呈荣(1966~), 男, 瑶族, 广西富川县人, 博士, 副教授, 主要从事农业生态、分子生态和环境生态研究。

* 通讯作者 Author for correspondence

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 30270270) and Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 021043 and 000569)

Received date: 2004-10-05; **Accepted date:** 2005-02-11

Biography: NIE Cheng-Rong, Ph. D., Associate professor, mainly engaged in agroecology, molecular ecology and environmental ecology. E-mail: niecr@126.com or niecr@scau.edu.cn

leaves decreased rapidly as the corn seedlings grew. The DIMBOA concentration in the first leaf of Bt corn or non-Bt corn from the top also decreased rapidly when the plant stages added while the third leaf from the top had not similar phenomenon. Under the single stress of drought or nitrogen, DIMBOA concentration in corn leaves was significantly higher than that of normal condition, which was similar in Bt corn and non-Bt corn. The result indicated that single stress of drought or nitrogen promoted the biosynthesis and accumulation of DIMBOA in corn leaves. But when compared with the normal condition, Bt corn leaves had lower DIMBOA concentration in medium and late stages under the coordinated stress of drought and nitrogen, which was significantly different from non-Bt corn. The content of leaf vanillic acid and syringic acid had no significant difference between Bt corns and their corresponding near isogenic lines, while the content of leaf ferulic acid in Bt corns were significantly lower than their corresponding near isogenic lines. This suggested that some phenolic acids in corn leaves could also be affected greatly by the introduction of Bt gene.

Key words:Bt corn; DIMBOA; Phenolic acids; HPLC

文章编号:1000-0933(2005)04-0814-10 中图分类号:S513.01;Q946.8 文献标识码:A

酚酸类物质、异羟肟酸及其衍生物是玉米等禾本科作物的广谱抗性物质^[1~5]。20 世纪 50 年代以来,国内外学者对异羟肟酸开展了一系列的研究^[2,6]。随着转基因植物生物安全性问题的提出,植物本身的抗性物质受到越来越多的重视;特别是随着全球范围内 Bt 玉米种植面积的逐年增加,生物安全问题更加突出。为了充分发挥 Bt 玉米的抗虫优势,如何协调利用外源 Bt 抗虫资源与玉米内源抗虫物质如 DIMBOA (2,4-二羟基-7-甲氧基-2H-1,4-苯并恶嗪-3-酮, 2,4-dihydroxy-7-methoxy -2H-1,4-benzoxazin-3-one)和酚酸类物质已成为一个亟待解决的课题。外源 Bt 杀虫蛋白的表达对玉米体内原有次生代谢物质的积累有何影响,目前尚未见报道。为此,本研究采用高效液相色谱法(HPLC)对 Bt 玉米及其相应的非转基因玉米叶片中的酚酸类物质含量进行了比较,对不同生长时期 Bt 玉米及其相应的非转基因玉米不同部位叶片中的 DIMBOA 含量进行了动态分析,对 Bt 玉米叶片中外源 Bt 杀虫蛋白和 DIMBOA 的相互关系进行相关分析,以便为玉米抗虫品种的培育和玉米害虫综合治理方案的制定提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 供试品种

由于近等基因系(Near isogenic lines, NIL)具有相近的遗传背景,因此,本研究采用美国先锋种子公司培育的 Bt 玉米品种 34B24、G30 及与它们相对应的非转基因近等基因系 34B23(34B24 的近等基因系)、G26(G30 的近等基因系)为材料,比较它们次生代谢物质的差异,揭示 Bt 玉米内外源抗性的相互关系。除了没有外源 Bt 基因外,Bt 玉米品种的近等基因系具有与 Bt 玉米品种基本相同的遗传基因。另外,为了解 Bt 玉米品种与玉米生产当家优良品种的差异,本研究还选用了由中国农业大学培育的 Bt 玉米品种农大 61(Nongda 61)和 1426×1482 与目前在中国北方玉米产区大面积推广种植的非转基因玉米品种农大 3138(Nongda 3138)进行比较。试验选用的所有 Bt 玉米所导入的基因均为 Cry1A 调控基因,但外源基因结构有所不同。供试品种中,农大 61、1426×1482 和农大 3138 由中国农业大学戴景瑞提供,其余品种由美国普渡大学农学系 Cindy Nakatus 惠赠。

1.2 试验设计

盆栽实验 1 以上述 7 个玉米品种为材料,每品种种植 4 盆(即 4 次重复),每盆种 2 株;各盆随机排列。在播种后 11 d 每盆各取 1 整株的幼苗叶片为材料,测定其中的 DIMBOA 和酚酸类等抗性物质的含量。在播种后 20 d 长有 6~7 叶时,每盆各取 1 整株幼苗为材料,分别测定倒 1 叶、倒 3 叶和倒 5 叶的 DIMBOA 含量和 Bt 蛋白含量,并分析两者之间的相关关系。

盆栽实验 2 以农大 3138、1426×1482 和农大 61 三个玉米品种为材料,每品种种植 4 盆(即 4 次重复),每盆种 20 株;各盆随机排列。分别在播种后 6 d、9 d、12 d 和 15 d 时取样,每盆取样时各取 1~5 个整株的幼苗叶片为材料,测定其中的 DIMBOA 含量。

盆栽实验 3 以农大 3138 和 1426×1482 两个玉米品种为材料,进行品种、水分胁迫和营养胁迫的 3 因子盆栽试验。用来进行盆栽试验的塑料桶规格为 30 cm×60 cm。每个因子设 2 个水平,水分胁迫设正常淋水和基本不淋水(出现萎蔫时才淋少许水)2 个水平,营养胁迫设施肥(每隔 2 周施 20 g 复合肥)和不施肥 2 个水平,共有 8 种处理组合。各处理组合设 3 次重复(即 3 盆),每盆种植 4 株,在播种后 19 d 开始进行水分胁迫和营养胁迫处理,然后每隔 1 周取样 1 次,测倒 1 叶、倒 3 叶和倒 5 叶 3 个部位叶片中的 DIMBOA 含量。

温室小区实验 以 Bt 玉米品种 34B24、1426×1482 以及它们相对应的非转基因玉米品种 34B23 和农大 3138 为材料,在玻璃温室里进行随机区组实验,每个品种设 4 个重复小区,每个小区种植 10 株。实验材料于 2002 年 10 月 12 日播种,按常规方法进行田间管理。分别在播种后 39 d、53 d 和 67 d 共 3 个时期随机取样,测定倒 1 叶和倒 3 叶的 DIMBOA 含量,了解其分布的

时空动态。

以上所有试验土壤均取自水稻田 0~20 cm 表土层,质地为粘壤土,pH 值 6.1,有机质含量 1.81%,全氮 0.09%,全磷(P%)0.16%,全钾(K₂O)0.56%。

1.3 测试方法

1.3.1 DIMBOA 标准样品的制备与检测 DIMBOA 的标准样品从玉米黄化幼苗(品种为粤农 19 号,由广东省农科院作物所提供)中提取,其抽提与纯化根据 Larsen 的方法修改进行^[7]。DIMBOA 的 HPLC-MS 检测在华南农业大学实验中心进行,所用仪器为 Finnigan LCQ^{DECA} 高效液相色谱-质谱联用仪。色谱条件为:大连依利特反相 C18 柱,250mm×4.0mm,5μm;流动相为甲醇:2.5%冰醋酸水溶液=20:80;检测波长 262nm。质谱使用 APCI。DIMBOA 的 NMR 检测在中国科学院广州化学研究所完成。所用仪器为 DRX-400 型 400 兆超导核磁共振仪,分别测定了氢谱和碳谱,使用 TMS 外标法,溶剂为氘代丙酮(CD₃COCD₃)。

DIMBOA 的结构鉴定 在 Angilen-1100 高效液相色谱仪上经 DAD 检测所得晶体的紫外吸收光谱。将紫外吸收光谱、质谱和¹HNMR 及¹³CNMR 图谱进行解析并与文献对照验证。经分析,所得晶体的 HPLC-MS 图谱、¹HNMR 及¹³CNMR 图谱与文献基本吻合^[8~10],因此,根据上述结果可以确定所提取的晶体就是 DIMBOA。

1.3.2 玉米组织中 DIMBOA 和酚酸类物质的分离提取 参照刘保川等^[11]的方法加以改进。具体方法为:取玉米叶片 1 g,加入少许蒸馏水匀浆,室温下静置 15 min,用 0.1 mol/L 的 H₃PO₄ 调节 pH 至 3.0,转入 10 ml 离心管在 12000 g 下离心 20 min;取上清液,用等体积乙醚萃取 3 次,彻底蒸干乙醚,溶于色谱纯甲醇中,过 0.45 μm 滤膜,-20℃冰箱中保存以备 HPLC 测定。

1.3.3 DIMBOA 和酚酸类物质的 HPLC 色谱分析条件

酚酸标样 原儿茶酸(Protocatechuric acid)、对羟基苯甲酸(p-Hydroxybenzoic acid)、香草酸(Vanillic acid)、咖啡酸(Caffeic acid)、丁香酸(Syringic acid)、对羟基肉桂酸(香豆酸,p-Hydroxycinnamic acid)和阿魏酸(Ferulic acid)均购自美国 ACROS 公司。

主要仪器设备 Angilent 1100 高效液相色谱仪,配二极管阵列检测器(DAD),由美国安捷伦公司(Angilent)制造;日本产 Yamato 旋转蒸发仪。

色谱条件 采用 Angilent 1100 高效液相色谱仪进行检测,配备二极管阵列检测器。色谱柱为 Hypersil ODS C18 柱,250mm×4.0mm,5μm;柱温为室温(20℃);流动相为 25%甲醇:75%pH2.6 冰醋酸水溶液,流速 1ml/min;检测波长 280nm;进样量 10μl。标样和样品均在此条件下检测,将样品峰的保留时间和紫外光谱与标样的进行对照,并采用标准样品叠加法进行样品峰的归属。以外标法进行定量,以不同浓度标样的吸收峰面积作出标准曲线,确定各处理玉米叶片中 DIMBOA 和不同酚酸类物质的含量。

1.3.4 Bt 蛋白含量的测定 Bt 蛋白含量的测定采用 ELISA 法,用美国 EnviroLogix 公司生产的 AP003 ELISA 定量试剂盒测定^[12]。试剂盒中包括 1 块包埋好抗体的 96(12×8)孔平板及配套的试剂,4 个 Cry1A(b)标样,其浓度分别为:0、0.5、2.5 和 5.0 ng/g。测定步骤参考试剂盒说明书。在 1.5ml 的离心管中加入 20~30 mg 的鲜叶,捣碎后加入 1×Cry1A(b)提取/稀释缓冲液 0.5 ml,离心 2 min 使之充分混匀,稀释 101 倍。待测样品孔中各分别加入 100 μl 样品提取液,保鲜膜覆盖,200 r/min 下振荡 15min;每个微孔中加入 100 μl Cry1A(b)-enzyme conjugate,保鲜膜覆盖,200 r/min 下振荡 1h;去膜,Wash Buffer 冲洗 3 次;每一个微孔中加入 100 μl 的反应底物,保鲜膜覆盖,200 r/min 下振荡 30 min;最后加入 100 μl 终止液,使之充分混匀。30 min 内在波长 450nm 下用酶标仪(Sunrise Remote)测定其 OD 值,根据标准曲线求出 Bt 蛋白的含量。

1.4 数据分析

所有数据统计均用 Excel 进行整理,SAS6.12 统计软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 玉米叶片中 DIMBOA 的 HPLC 图谱

说明按照刘保川等^[11]的方法加以改进可以得到玉米叶片 DIMBOA 的 HPLC 图谱(图 1),图 1 显示杂峰较少,DIMBOA 与其它各峰间保留时间的差异较明显。说明本方法能有效地分析玉米叶片中的 DIMBOA。

2.2 不同玉米品种叶片中 DIMBOA 的时空分布

2.2.1 不同玉米品种幼苗植株叶片 DIMBOA 含量比较 以盆栽实验 1 播种后 11 d 的幼苗全株叶片为材料,测定其中的 DIMBOA 含量(表 1)。结果表明,在各组近等基因系中,Bt 玉米品种 34B24 和 G30 的 DIMBOA 含量都显著低于相应的非转基因近等基因系 34B23 和 G26。与目前中国北方玉米产区大面积推广的非转基因玉米品种农大 3138 相比,国内 Bt 玉米品种 1426×1482 的 DIMBOA 含量显著升高,而另一 Bt 玉米品种农大 61 却显著降低。

从两对近等基因系的情况来看,Bt 玉米的 DIMBOA 含量显著低于相应的非转基因玉米,外源 Bt 杀虫蛋白的表达有使玉

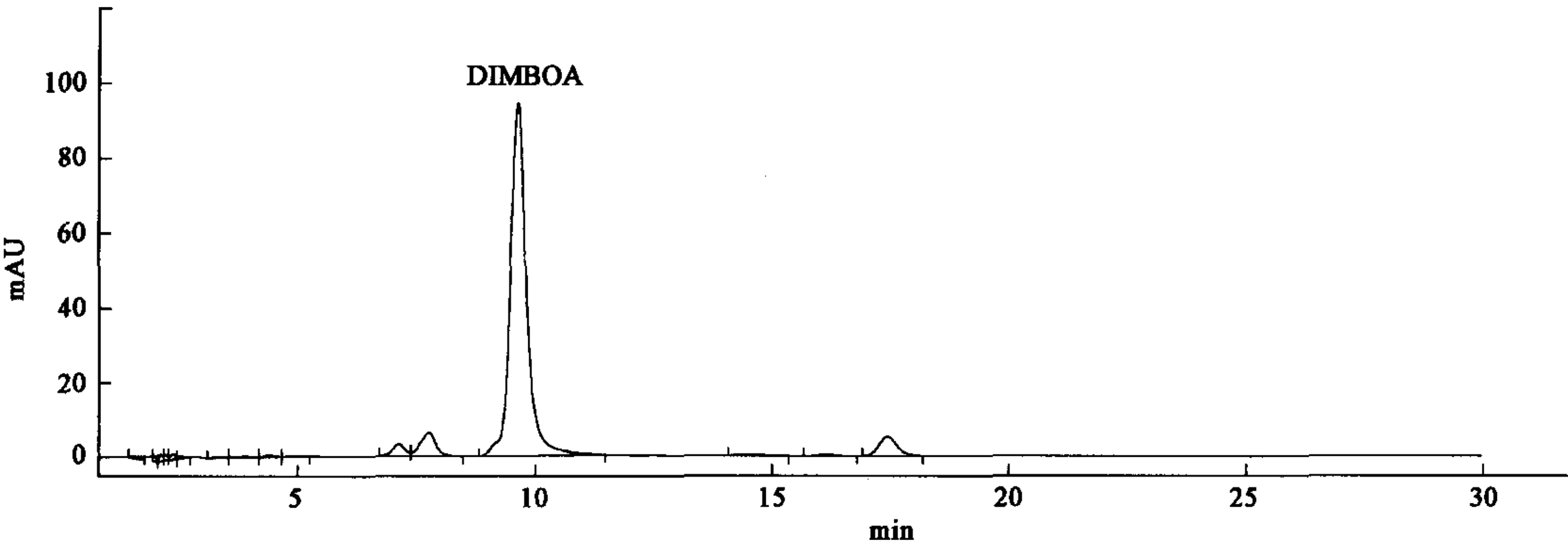


图 1 玉米叶片 DIMBOA 的 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC profiles of DIMBOA in corn leaves

米原有的 DIMBOA 生物合成受抑制的趋势。与中国北方玉米产区大面积推广的非转基因玉米品种相比,目前国内培育的 Bt 玉米品种,其植株叶片 DIMBOA 含量有高有低,并不呈现出一致性的规律;由于这 3 个品种没有亲缘关系,缺乏相同的遗传基础,因而它们之间的差异只反映了品种的特性。

2.2.2 不同植株部位叶片中的 DIMBOA 含量 用盆栽实验 1 播种后 20 d 幼苗(6.5~7 叶龄)的倒数第 1 片、第 3 片和第 5 片展开叶为材料,测定其中的 DIMBOA 含量(表 2)。方差分析表明,在这些品种中,除了农大 61 和 1426×1482 外,其余 5 个品种倒数第 1 片展开叶的 DIMBOA 含量均显著高于倒数第 3 片和第 5 片展开叶;34B23 和农大 3138 倒数第 3 片展开叶中的 DIMBOA 含量均显著高于倒数第 5 片展开叶。农大 61 和 1426×1482 这两个品种所测定的 3 片展开叶间的 DIMBOA 含量差异不显著。结果表明,供试品种无论是 Bt 玉米品种还是非转基因玉米品种,基本表现出相同的趋势:上部叶片(幼叶)的 DIMBOA 含量高于下部叶片(老叶)。

在两组近等基因系中,Bt 玉米品种 34B24 和 G30 上部叶片(倒 1 叶和倒 3 叶)的 DIMBOA 含量都显著低于相应的非转基因玉米品种 34B23 和 G26,这种规律在倒 1 叶更为明显。Bt 玉米下部叶片(倒 5 叶)的 DIMBOA 含量与相应的非转基因玉米差异较小;两组近等基因系 34B23 和 34B24 以及 G30 和 G26 倒 5 叶间的 DIMBOA 含量差异不显著。这些结果表明,Bt 玉米显著降低了植株上部叶片的 DIMBOA 含量,但对下部叶片的 DIMBOA 含量影响不显著。

表 1 不同玉米品种 11d 幼苗全株叶片的 DIMBOA 含量

Table 1 The level of DIMBOA in the mixed leaves of 11d-old corn seedlings

玉米品种 Corn lines	DIMBOA 含量 DIMBOA level (μg/g fresh wt.)
34B23(Bt ⁻)	57.83±0.76d
34B24(Bt ⁺)	29.88±0.74e
G26(Bt ⁻)	71.36±0.58c
G30(Bt ⁺)	58.90±0.82d
Nongda 3138(Bt ⁻)	216.33±4.13b
Nongda 61(Bt ⁺)	69.60±0.58c
1426×1482(Bt ⁺)	234.80±5.18a

* 表中数据为均值±标准误;各列中标有不同字母的表示在 5%水平上差异显著,下同;Bt⁺和 Bt⁻分别表示转 Bt 基因品种和非转 Bt 基因品种(对照)The data in the table were shown as “mean±S. E. M”; Means with the same letter within the column were not significantly different (*p*>0.05) using REGWQ multiple test (SAS Institute, 1989),the same below; Bt⁺ and Bt⁻ indicated Bt corn and Non-Bt corn, respectively

表 2 生长 20 d 各玉米品种不同部位叶片中的 DIMBOA 含量(μg/g FW)

Table 2 Levels of DIMBOA in the differently locatied leaves of 20d-old corn seedlings(μg/g fresh wt.)

玉米品种 Corn lines	叶位 Leaf location		
	倒 1 First leaf from the top	倒 3 Third leaf from the top	倒 5 Fifth leaf from the top
34B23(Bt ⁻)	74.73±2.11c	38.10±1.35b	29.65±2.54b
34B24(Bt ⁺)	49.88±0.76d	32.00±0.83c	31.67±0.72b
G26(Bt ⁻)	89.90±4.25b	39.72±1.75b	38.99±1.31a
G30(Bt ⁺)	48.84±0.96d	34.80±2.49c	38.24±1.59a
Nongda 3138(Bt ⁻)	152.23±8.23a	66.10±2.64a	21.25±2.18c
Nongda 61(Bt ⁺)	17.91±0.69e	17.37±0.99e	18.09±0.81d
1426×1482(Bt ⁺)	17.41±1.28e	20.97±1.02d	14.39±1.08e

2.2.3 不同生长时期玉米幼苗全株叶片 DIMBOA 含量的变化动态 用盆栽实验 2 的农大 61、1426×1482 和农大 3138 幼苗

的全株叶片为材料,在 4 个不同生长时期测定幼苗期玉米植株叶片 DIMBOA 含量动态(表 3)。方差分析表明,无论是 Bt 品种还是非 Bt 品种,4 个时期之间玉米全株叶片 DIMBOA 含量差异均达到显著水平,大小顺序依次为:6 d > 9 d > 12 d > 15 d。在播种后 15 d 各品种玉米全株叶片的 DIMBOA 含量只有播种后 6 d 的 1.78%~5.79%。以非转基因玉米品种农大 3138 的 DIMBOA 含量随着植株生长推移下降的速度最快,在播种后 9 d 全株叶片内的 DIMBOA 含量就下降到播种后 6 d 的 36.88%。结果表明,随着生长的推移,各品种玉米幼苗全株叶片的 DIMBOA 含量急剧减少,这与 Cambier 等^[13]的实验结果一致。

表 3 各玉米品种幼苗全株叶片播种后不同天数的 DIMBOA 含量(μg/g FW)

Table 3 Levels of DIMBOA in the whole corn leaves at different days after sowing (μg/g fresh wt.)

播种后天数(d) Days after sowing	Nongda 3138(Bt ⁻)	Nongda 61(Bt ⁺)	1426×1482(Bt ⁺)
6	2539.84±26.75a	1627.24±34.56a	3504.51±86.23a
9	936.70±32.66b	1297.37±45.11b	2167.40±56.25b
12	216.85±10.25c	69.67±6.32c	235.21±10.18c
15	45.07±2.26d	48.05±3.65d	202.90±11.17d

不同品种之间,前期以 1426×1482 和农大 3138 幼苗植株 DIMBOA 含量较高,农大 61 较低;随后,各品种玉米幼苗植株叶片的 DIMBOA 含量以不同速度急剧下降;播种后 15 d,农大 61 和农大 3138 幼苗植株叶片的 DIMBOA 含量都比较低,均显著低于 1426×1482。

2.2.4 不同生长时期玉米植株上部叶片 DIMBOA 含量的变化 为了进一步了解 Bt 玉米植株上部叶片 DIMBOA 含量的变化,本试验分别以国内外两对品种为材料,采用小区实验测定了不同生长时期玉米植株倒 1 叶和倒 3 叶的 DIMBOA 含量(表 4)。方差分析表明,除了 34B24 倒 1 叶的 DIMBOA 含量在播种后 53 d 与 67 d 之间差异不显著外,各玉米品种倒 1 叶的 DIMBOA 含量在 3 个测定时期间均达到差异显著水平;随着生长时间的推移,各玉米品种倒 1 叶的 DIMBOA 含量都逐渐减少;并且,Bt 玉米 34B24 在各生长时期倒 1 叶的 DIMBOA 含量均小于其非转基因近等基因系 34B23。倒 3 叶没有这种规律。这说明 Bt 玉米受影响的主要是倒 1 叶等幼嫩叶片的 DIMBOA 含量。

表 4 各玉米品种倒 1 叶和倒 3 叶在不同生长时期的 DIMBOA 含量(μg/g FW)

Table 4 Levels of DIMBOA in the first and the third leaf from the top of corn plants at different days after sowing (μg/g fresh wt.)

品种 Lines	倒 1 叶播种后不同天数(d) First leaf from the top at different days after sowing			倒 3 叶播种后不同天数 Third leaf from the top at different days after sowing		
	39	53	67	39	53	67
34B23(Bt ⁻)	123.71±10.26a	71.20±8.51a	44.01±6.18a	55.19±6.87a	13.01±2.78a	32.41±3.75a
34B24(Bt ⁺)	77.98±6.76b	13.24±5.15c	10.35±2.78c	53.67±5.68a	ND	20.13±3.46b
Nongda 3138(Bt ⁻)	146.02±17.61a	47.95±6.78b	22.02±3.56b	26.37±2.78b	ND	ND
1426×1482(Bt ⁺)	30.63±4.51c	17.33±3.56c	10.94±1.32c	17.02±2.10c	15.68±2.55a	18.53±2.75b

* ND 表示未检测到,下同 ND means not detectable, the same below

2.3 Bt 玉米中 Bt 蛋白含量与 DIMBOA 含量的相关关系

用盆栽实验 1 播种后 20 d Bt 玉米幼苗(6.5~7 叶龄)的倒数第 1、第 3 和第 5 片展开叶为材料,测定其中的 DIMBOA 与 Bt 蛋白含量,这两者的分布均与叶位相关,DIMBOA 含量随叶片年龄增加而减少(见 2.2.2),Bt 蛋白含量随叶片年龄增加而增加。进一步地分析两者的相互关系,34B24、G30、农大 61 和 1426×1482 等品种的相关系数分别为-0.7326**、-0.8509**、-0.9720** 和 0.3179(当 n=12 时,r_{0.05}=0.576, r_{0.01}=0.708)。除了 1426×1482 外,其余 3 个品种叶片中 Bt 蛋白含量与 DIMBOA 含量之间均呈极显著负相关。结果表明,在这 3 个 Bt 玉米品种中,外源 Bt 基因表达的 Bt 蛋白量越高,玉米原有抗性物质 DIMBOA 的表达受抑制越大。玉米原有的内在抗性物质与所导入的外源抗性表现出拮抗关系。

2.4 不同胁迫条件下 Bt 玉米的 DIMBOA 含量

2.4.1 干旱胁迫对叶片 DIMBOA 含量的影响 以盆栽实验 3 的玉米叶片为材料检测 DIMBOA 含量。无论是 Bt 玉米还是非 Bt 玉米,凡是能检测到 DIMBOA 的,干旱胁迫下叶片的 DIMBOA 含量均高于正常生长条件,并且绝大多数达到显著水平(表 5)。干旱胁迫促进了玉米叶片 DIMBOA 的合成和积累;这与 Richardson 等^[14]的结果相一致。Bt 玉米叶片 DIMBOA 含量在干旱胁迫下的变化规律与非 Bt 玉米相似。

2.4.2 营养胁迫对叶片 DIMBOA 含量的影响 与干旱胁迫相类似,无论是 Bt 玉米还是非 Bt 玉米,在能检测到 DIMBOA 含量的情况下,营养胁迫下倒 1 叶的 DIMBOA 含量均高于正常生长条件,并且绝大多数达到显著水平(表 5)。因此,一定程度的营养胁迫也会促进玉米叶片 DIMBOA 的合成和积累。Bt 玉米叶片 DIMBOA 含量在营养胁迫下的变化规律与非 Bt 玉米相似。

2.4.3 干旱和营养双重胁迫对叶片 DIMBOA 含量的影响 与单一胁迫相比,在大多数情况下干旱和营养双重胁迫的叶片 DIMBOA 含量没有显著增加,有的甚至反而下降,没有表现出累加效应(表 5)。方差分析结果表明,在播种后 33 d 以前,无论是 Bt 玉米还是非 Bt 玉米,在能检测到 DIMBOA 含量的情况下,干旱和营养双重胁迫下各部位叶片的 DIMBOA 含量均显著高于正常生长条件。在播种后 40 d 以后,非 Bt 玉米农大 3138 在干旱和营养双重胁迫下各部位叶片的 DIMBOA 含量仍显著高于正常生长条件,而 Bt 玉米 1426×1482 在干旱和营养双重胁迫下各部位叶片能检测到的 DIMBOA 含量却低于正常生长条件。这说明在生长的中后期,干旱和营养双重胁迫已经影响到 Bt 玉米叶片 DIMBOA 的合成和积累。

表 5 不同胁迫条件下各玉米品种不同部位叶片 DIMBOA 含量变化动态(μg/g FW)

Table 5 Levels of DIMBOA in different leaves of corn plants under different stress conditions (μg/g fresh wt.)

品种 Lines	营养胁迫 Nitrogen	干旱胁迫 Water	植后 26d 26 d after sowing			植后 33d 33 d after sowing		
			倒 1 叶	倒 3 叶	倒 5 叶	倒 1 叶	倒 3 叶	倒 5 叶
			1 st LFT	3 rd LFT	5 th LFT	1 st LFT	3 rd LFT	5 th LFT
Nongda 3138(Bt ⁻)	正常 Normal	正常 Normal	122.80d	ND	ND	8.00e	ND	ND
Nongda 3138(Bt ⁻)	正常 Normal	干旱 Stress	203.20b	79.81c	ND	14.68d	ND	ND
Nongda 3138(Bt ⁻)	缺氮 Stress	正常 Normal	164.48c	ND	ND	21.51b	ND	ND
Nongda 3138(Bt ⁻)	缺氮 Stress	干旱 Stress	158.57c	150.15a	101.85a	22.82b	9.99a	9.03a
1426×1482(Bt ⁺)	正常 Normal	正常 Normal	118.90d	59.53d	ND	11.12d	ND	ND
1426×1482(Bt ⁺)	正常 Normal	干旱 Stress	149.37c	108.02b	91.32a	18.49c	ND	ND
1426×1482(Bt ⁺)	缺氮 Stress	正常 Normal	150.07c	66.82cd	ND	18.56c	ND	ND
1426×1482(Bt ⁺)	缺氮 Stress	干旱 Stress	272.28a	125.96a	72.05b	39.32a	12.59a	ND

品种 Lines	营养胁迫 Nitrogen	干旱胁迫 Water	植后 40d 40 d after sowing			植后 47d 47 d after sowing			植后 61d 61 d after sowing		
			倒 1 叶	倒 3 叶	倒 5 叶	倒 1 叶	倒 3 叶	倒 5 叶	倒 1 叶	倒 3 叶	倒 5 叶
			1 st LFT	3 rd LFT	5 th LFT	1 st LFT	3 rd LFT	5 th LFT	1 st LFT	3 rd LFT	5 th LFT
Nongda 3138(Bt ⁻)	正常 Normal	正常 Normal	ND	ND	ND	9.89e	ND	ND	7.69d	7.40d	ND
Nongda 3138(Bt ⁻)	正常 Normal	干旱 Stress	ND	ND	ND	13.86c	11.50c	ND	20.37c	10.73c	10.26c
Nongda 3138(Bt ⁻)	缺氮 Stress	正常 Normal	ND	ND	ND	21.22b	15.72b	13.14b	10.44c	ND	ND
Nongda 3138(Bt ⁻)	缺氮 Stress	干旱 Stress	ND	ND	ND	22.23b	16.40b	15.93a	39.66a	33.59a	31.35a
1426×1482(Bt ⁺)	正常 Normal	正常 Normal	40.21b	ND	ND	15.00c	54.69a	ND	5.43e	ND	ND
1426×1482(Bt ⁺)	正常 Normal	干旱 Stress	70.01a	ND	ND	79.21a	58.54a	8.75c	27.27b	16.40b	13.69b
1426×1482(Bt ⁺)	缺氮 Stress	正常 Normal	ND	ND	ND	18.29b	ND	ND	8.00d	ND	ND
1426×1482(Bt ⁺)	缺氮 Stress	干旱 Stress	21.60c	ND	ND	11.07d	9.13d	ND	5.13e	4.55e	ND

* 播种后 19 d 开始实施营养胁迫和干旱胁迫 Water stress and nitrogen stress treatments started 19 days after sowing; LFT=leaf from the top

2.5 酚酸标样的 HPLC 检测图谱

为了对玉米叶片中的酚酸类物质进行定性和定量,分别单独检测了每种酚酸的 HPLC 图谱和紫外吸收光谱,并测定了 7 种酚酸混合标样的 HPLC 图谱(图 2)。

2.6 Bt 玉米中酚酸类物质含量的变化

以盆栽实验 1 播种后 11 d 的整株玉米幼苗叶片为材料检测酚酸类物质。检测结果表明(表 6),幼苗期不同玉米品种的叶片中能检测到的酚酸类物质有 3 种:香草酸、丁香酸和阿魏酸。

香草酸以农大 3138、农大 61 和 1426×1482 含量最高;34B23 与 34B24 这一对近等基因系的香草酸含量显著低于其它玉米品种。在每对近等基因系内,Bt 玉米与非转基因玉米叶片香草酸的含量差异不显著,表明 Bt 玉米叶片香草酸的含量主要是受受体本身原有的基因组决定。

丁香酸也以农大 3138、农大 61 和 1426×1482 等品种含量最高;34B23 与 34B24 这一对近等基因系的丁香酸含量显著低于其它玉米品种。在来自中国农业大学的 3 个品种之间,Bt 玉米品种农大 61 和 1426×1482 的叶片丁香酸的含量显著高于非转基因玉米品种农大 3138。在各对近等基因系的 Bt 玉米与非转基因玉米品种之间,叶片丁香酸的含量差异不显著,表明 Bt 玉米叶片丁香酸的含量主要是受受体本身原有的基因组决定。

阿魏酸以来自中国农业大学的 3 个品种含量最低,显著低于其它玉米品种。在每对近等基因系的不同品种之间,Bt 玉米叶片中的阿魏酸含量均显著低于相应的非转基因玉米品种。试验结果表明,玉米叶片阿魏酸的含量既由受体本身原有的基因组决定,也受外源 Bt 基因导入的显著影响。

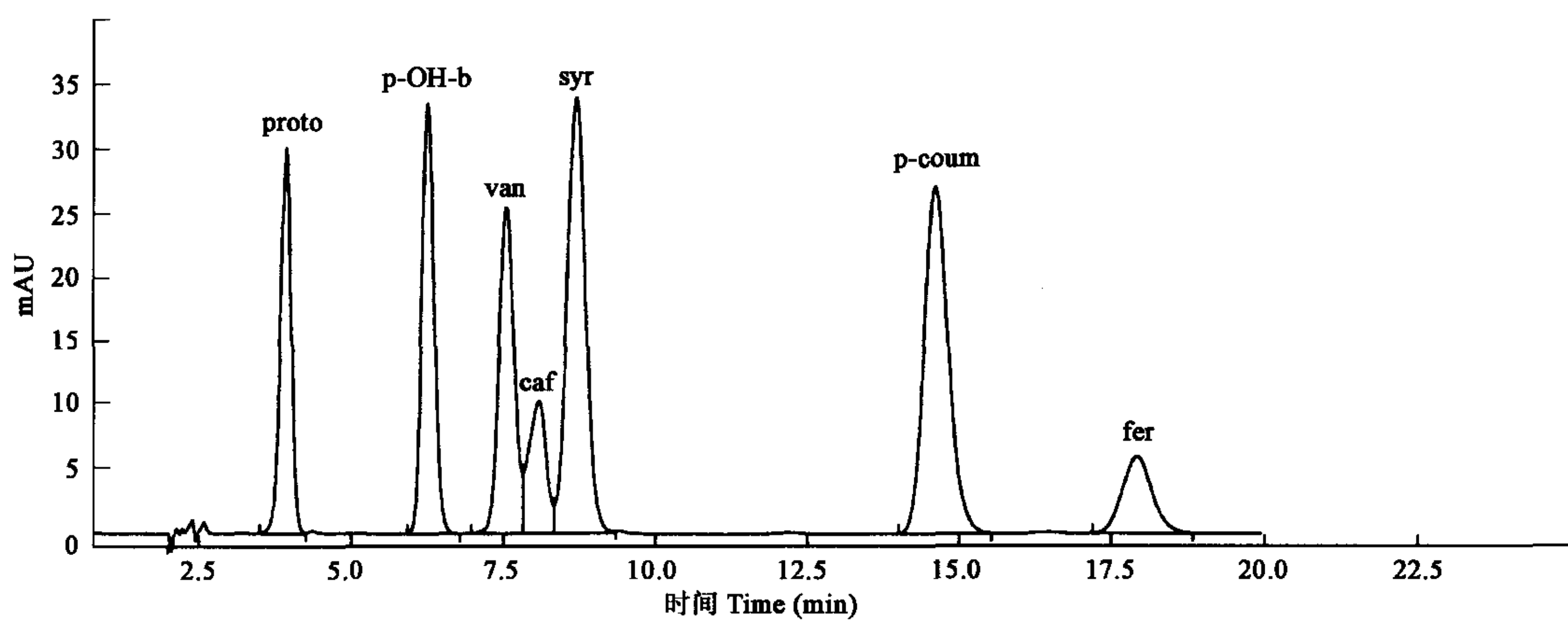


图 2 7 种酚酸(proto-原儿茶酸、p-OH-b-对羟基苯甲酸、van-香草酸、caf-咖啡酸、syr-丁香酸、p-coum-对羟基肉桂酸和 fer-阿魏酸)标样的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC profiles of a mixture of 7 standard phenolic acids. Proto, Protocatechuric acid; p-OH-b, p-Hydroxybenzoic acid; van, Vanillic acid; caf, Caffeic acid; syr, Syringic acid; p-coum, p-Hydroxycinnamic acid; fer, Ferulic acid.

表 6 不同玉米品种幼苗叶片的酚酸类物质含量(μg/g FW)

Table 6 Concentrations of phenolic acids in the leaves of Bt corn and non-Bt corn seedlings (μg/g fresh wt.)

品种 Lines	香草酸 Vanillic acid	丁香酸 Syringic acid	阿魏酸 Ferulic acid
34B23(Bt ⁻)	16.67±2.76c	5.06±0.63d	49.00±12.25a
34B24(Bt ⁺)	13.80±3.85c	4.81±0.69d	24.65±3.87c
G26(Bt ⁻)	21.36±4.36b	8.32±1.21c	53.82±11.31a
G30(Bt ⁺)	23.18±3.25b	8.69±0.66c	34.17±6.51b
Nongda 3138(Bt ⁻)	81.94±10.81a	13.84±2.38b	7.37±1.28d
Nongda 61(Bt ⁺)	77.30±11.83a	19.24±4.36a	4.65±0.79e
1426×1482(Bt ⁺)	90.04±11.25a	20.35±2.30a	4.94±0.67e

3 讨论

3.1 玉米植株内的异羟肟酸及外界生长条件对 Bt 玉米叶片 DIMBOA 含量影响

异羟肟酸和相关的苯并恶唑啉酮是禾本科植物重要的次生代谢物^[2,4]。作为主要的苯并恶唑啉类物质,DIMBOA(2,4-二羟基-7-甲氧基-2H-1,4-苯并恶唑-3-酮,2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3-one)是玉米抗欧洲玉米螟(*Ostrinia nubilalis*)、亚洲玉米螟(*O. furnacalis*)、巨座玉米螟(*Diatraea grandiosella*)、玉米蚜(*Rhopalosiphum maidis*)、玉米幼芽切根叶甲(*Diabrotica virgifera*)和西非大螟(*Sesamia nonagriodes*)等玉米害虫和玉米大斑病(*Helminthosporium turcicum*)、茎腐病(*Diploida maydis*)、软腐病(*Erwinia*)和玉米丝黑穗病(*Sphacelotheca reiliana*)等病害的主要抗性物质^[1,2]。在植物体内,异羟肟酸是由它们的内酰胺前体衍生而来的^[15,16]。在完整的植物细胞中,异羟肟酸以其(2R)-2-β-D-葡萄糖苷的形式被螯合而稳定存在;当组织受损或遭受病原侵袭时,液泡里的β-葡萄糖苷在水解酶作用下释放出异羟肟酸。异羟肟酸具有较强的生理活性,在一定的温度下很容易分解^[17]。

玉米植株异羟肟酸的含量受外界生长条件影响显著,有多种因素可诱导玉米植株异羟肟酸的产生。在紫外辐射^[18]和水分胁迫^[19]下,异羟肟酸的含量明显增加;黑暗条件下生长的玉米幼苗中 DIMBOA 含量大约是自然光照下生长的 2 倍^[7];玉米组织受损伤时,DIMBOA 含量也会大量增加^[20]。本试验结果表明,干旱和营养胁迫下 Bt 玉米叶片的 DIMBOA 含量也显著升高,其变化规律与非 Bt 玉米相似;但在生长的中后期,干旱和营养双重胁迫已经影响到 Bt 玉米叶片 DIMBOA 的合成和积累,这与非 Bt 玉米明显不同。

3.2 外源 Bt 基因插入对玉米叶片 DIMBOA 含量影响

对于受体玉米而言,外源 Bt 基因的插入也可以看成是一种诱导因素;但这种诱导不仅没有使受体玉米 DIMBOA 含量增加,本试验中,Bt 玉米叶片中的 DIMBOA 含量尤其是幼嫩叶片的 DIMBOA 含量普遍低于相对应的非转基因近等基因系,说明外源 Bt 基因的导入和表达会影响到玉米原有抗性物质 DIMBOA 的合成与积累。外源 Bt 杀虫蛋白的表达,必然会消耗植株的一部分能量和物质,使得玉米原有的部分次生代谢受到了抑制,DIMBOA 的合成也可能因此受阻,含量减少。

Bt 玉米品种 34B24、G30 和农大 61 叶片中的 Bt 蛋白含量与 DIMBOA 含量呈极显著负相关,表明 Bt 玉米外源抗性与内源抗性呈不协调状态。除了 Bt 玉米外,转 Bt 基因抗虫棉中缩合单宁和总酚的含量也显著低于其对照亲本^[21]。这一现象在使用转 Bt 基因抗虫作物时必须给以充分的重视;因为次生代谢物质是作物抵抗有害生物入侵的重要生化机制,外源 Bt 基因导入对作物原有次生代谢的抑制作用将会深刻地影响到作物与其它有害生物之间的相互关系,并可能影响整个农田生态系统。

3.3 Bt 玉米幼叶和老叶可能具有各不同的防御机制

本试验结果表明,在玉米植株下部的叶片中,DIMBOA 含量普遍较低,并且各品种之间的差异也不大。相对来说,玉米的幼嫩叶片应该比其它组织更需要保护。在长期的进化过程中,玉米的幼嫩叶片除了有较旺盛的初级代谢如氮代谢外,也具有比其它组织更强的次生代谢过程,能合成更多的异羟肟酸物质^[13],以便防治有害生物的入侵。老叶由于含有较多的纤维组织和机械组织,具有较好的抵御有害生物的形态解剖机制,因而不需要太多的生化抗虫机制。这说明 DIMBOA 的主要作用是帮助玉米幼嫩叶片防御有害生物的侵入。

另一方面,玉米幼嫩叶片主要依靠自身的 DIMBOA 等次生代谢物质来防御害虫。外源 Bt 基因的插入,使玉米植株下部叶片具有较高的 Bt 蛋白含量,而幼嫩叶片中 Bt 蛋白含量相对较低。因此,Bt 玉米通过表达 Bt 蛋白而对有害生物的抵御作用,可能主要是作为玉米下部叶片机械抵御的一种补充。玉米幼嫩叶片虽然也表达 Bt 蛋白,但由于它本身已有足够的 DIMBOA 含量,因而 Bt 蛋白对玉米幼嫩叶片的保护作用比不上老叶。这一方面的问题仍值得深入研究。

3.4 Bt 玉米中酚酸类物质含量的变化

玉米中的次生代谢物除了 DIMBOA 及其衍生物,还含有各种酚酸类化合物;这些化合物都是作物抗虫抗病的物质基础,并且大多具有化感作用^[3]。玉米和高粱的叶片被病菌 *Peronosclerospora sorghi* 侵染后,叶片中酚酸类物质的含量会发生变化;随着侵染的加重,酚酸类物质的浓度会增加。在玉米和高粱等作物的抗性品种中,肉桂酸、氯原酸和阿魏酸的浓度增加得最为显著^[5]。

与相应的非转基因玉米品种相比,虽然 Bt 玉米中香草酸和丁香酸的含量没有显著减少,但阿魏酸的含量却显著降低。这一结果表明,外源 Bt 基因的导入和表达,使得玉米原有的部分次生代谢受到了抑制,某些酚酸类物质的含量减少,削弱了玉米原有的生化防御机制。如前所述,外源 Bt 基因导入对玉米原有次生代谢的限制作用,既有可能是耗植株体内能量和物质再次分配的结果,也有可能是 Bt 基因表达对玉米植株代谢的影响所造成的。

3.5 转基因抗虫植物的生物安全问题中应考虑次生代谢问题

在害虫的选择压力之下,植物在长期的进化过程中形成了形式多样的防御系统。这是大自然留给人类的一笔宝贵财富。深入地研究它们的防御机理、有效地挖掘和利用次生防御物质,有助于更好地控制害虫^[22]。在转基因抗虫植物的生物安全问题受到越来越广泛重视的情况下,在分析转基因抗虫植物外来抗性与内源抗性的相互关系时,以下几个方面的研究尤其值得关注:①Bt 玉米及其同源常规玉米异羟肟酸和酚酸类化合物的分离、鉴定、定量和比较;②模拟病虫害和信号物质对异羟肟酸和酚酸类化合物产生的诱导作用,以及对玉米病原菌和害虫选择行为的影响;③在分子水平上,深入了解玉米外源抗虫基因(Bt 基因)导入后原有异羟肟酸和酚酸类化合物调控基因的表达。通过这些方面的研究,为协调利用玉米自身抗性与基因工程改良,为如何兼顾以植物次生代谢物质为基础的品种抗性与转基因技术培育抗虫品种提供新的理论依据。本文对第一个问题进行了初步的探索,后两个问题值得今后深入研究。

3.6 Bt 玉米内在抗性与转基因导入的外源抗性之间的相互关系

在长期的进化过程中,植物形成了一整套有利于其自身生长发育的基因体系。当外源 Bt 基因被导入玉米植株内部后,必将打破其自身固有的基因连锁群,对其生长性状和生理代谢产生影响,其中也包括对玉米受体内在抗性的影响,如保护酶活性、胼胝质含量以及异羟肟酸和酚酸类化合物的含量。关于作物内在抗性与转基因导入的外源抗性之间的相互关系有可能出现 3 种不同的情况:①协同效应;②拮抗作用;③互不相干。

本研究结果表明,外源 Bt 基因导入的抗性与保护酶活性在正常水培和 PEG 胁迫条件下既有拮抗关系也有协同关系。外源 Bt 基因导入后,玉米植株体内原有具抗性作用的次生代谢物质发生了变化,转 Bt 基因抗虫玉米异羟肟酸类化合物及酚酸类物质的含量较其非转基因近等基因系玉米明显减少。当作为多种病虫害抗性物质基础的异羟肟酸和酚酸类化合物受到影响后,有可能会进一步影响玉米植株与有害生物之间的关系。由于玉米体内异羟肟酸和酚酸类化合物与玉米对玉米螟、玉米大斑病等病虫害的抗性密切相关^[1,14,23~24],这种变化将对玉米与这些有害生物的相互关系乃至整个玉米田生态系统产生某些重要的影响。

目前在抗虫植物基因工程的研究中,利用基因的直接表达产物——杀虫蛋白质作为抗虫效应物几乎是所有研究者采用的策略。在植物化学防御系统中,特别是在抗虫方面占主导地位的是次生代谢产物,如:生物碱、甾类化合物和某些氨基酸的衍生物。通过基因工程方式强化植物原有次生代谢产物途径以达到抗虫目的的研究难度较大,目前尚未见到成功报道,然而,仍不失为未来植物抗虫基因工程研究的一个重要方向^[25]。一些植物如胜红蓟本身可产生类似昆虫蜕皮激素或保幼激素的化学物质,

如将此类物质的合成机制转移到受体植物中,有可能使受体植物获得相应的抗虫特性。通过基因工程方式调动植物内在的防御机制,已经在抗病方面取得进展,是另一条值得尝试的途径。

在目前培育 Bt 玉米为主要抗虫途径的形势下,综合利用 DIMBOA 合成的调控基因,建立多基因抗虫机制,使用 DIMBOA 和 Bt 蛋白这两种或两种以上不同的抗虫基因协调作用的转基因玉米,可以起到延缓玉米螟等昆虫耐受性产生的作用。由于目前对玉米抗虫生化机理方面已有较深的了解,特别是关于 DIMBOA 的合成与代谢途径以及它在抗虫防御系统中的作用机制已有清晰的认识^[2,26~27],通过基因工程方式调动玉米高剂量合成 DIMBOA 这一内在的抗虫防御机制,很有可能成为 Bt 玉米之后更重要、也更安全的玉米抗虫新途径。

References:

- [1] Wang Z Y. The biochemistry basic of corn resistance to pest. *World Agriculture*, 1994, (8):33~34.
- [2] Nie C R, Luo S M, Zeng R S, *et al.* Research advance in cyclic acids, main allelopathicals of *Zea mays*. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2004, **15**(6):1079~1082.
- [3] Classen D, Arnason J T, Serratos J A, *et al.* Correlation of phenolic acid content of maize to resistance to *Sitophilus zeamais*, the maize weevil, in CIMMYT'S collections. *Journal of Chemical Ecology*, 1990, **16**(2): 301~315.
- [4] Niemeyer H M. Hydroxamic acids (4-Hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defence chemicals in the gramineae. *Phytochemistry*, 1988, **27**: 3349~3358.
- [5] Anwar M N, Majumder S K, Shetty H S. Changes in phenolic acids in sorghum and maize leaves infected with *Peronosclerospora sorghi*. *Indian Phytopathology*, 1995, **48**(1): 21~26.
- [6] Yan F M. Advance on Dimboa research. *Entomological Knowledge*, 1995, **32**(3):178~180.
- [7] Larsen E, Christensen L P. Simple method for large scale isolation od cyclic arylhydroxamic acid DIMBOA from maize (*Zea mays* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, **48**: 2556~2558.
- [8] Woodward M D, Corcuera L J, Helgeson J P, *et al.* Decomposition of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one in aqueous solutions. *Plant Physiology*, 1978, **61**: 796~802.
- [9] Lyons P C, Hipskind J D, Wood K V, *et al.* Separation and quantification of cyclic hydroxamic acids and related compounds by high-pressure liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1988, **36**: 57~60.
- [10] Atkinson J, Morand P, Arnason J T, *et al.* Analogues of the cyclic hydroxamic acid 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3-one; decomposition to benzoxazolinones and reaction with β -mercaptoethanol. *Journal of Organic Chemistry*, 1991, **56**:1788~1800.
- [11] Liu B C, Chen J L, Ni H X, *et al.* Isolation, purification and structural identification of DIMBOA and its resistance to English grain aphid, *Stiobion avenae* (F.). *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2002, **8**(1): 71~74.
- [12] Wang J W, Feng Y J, Luo S M. Studies on spatial-temporal dynamics of insecticidal protein expression of Bt corn and its degradation in soil. *Scientia Agricultural Sinica*, 2003, **36**(11):1279~1286.
- [13] Cambier V, Hance T, Hoffmann. Variation of DIMBOA and related compounds content in relation to the age and plant organ in maize. *Phytochemistry*, 2000, **53**: 223~229.
- [14] Richardson M D, Bacon C W. Cyclic hydroxamic acid accumulation in corn seedlings exposed to water potentials before, during and after germination. *Journal of Chemical Ecology*, 1993, **19**: 1613~1624.
- [15] Bailey B A, Larson R L. Maize microsomal benzoxazinone-N-monooxygenase. *Plant Physiology*, 1991, **95**: 792~796.
- [16] Perez F J. Allelopathic effect of hydroxamic acids from cereals on *Avena sativa* and *Avena fatua*. *Phytochemistry*, 1991, **29**: 773~776.
- [17] Hofman J, Hofmanova O, Hanus V. 1,4-Benzoxazinone derivatives in plants. A new glucoside derivative from *Zea mays*. *Tetrahedron Letters*, 1969, **57**:5001~5002.
- [18] Bergvinson D J, Larsen J S, Arnason J T. Effect of light on changes in maize resistance against the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner). *The Canadian Entomologist*, 1995, **127**:111~122.
- [19] Morse S, Wratten S D, Edwards P J, *et al.* Changes in hydroxamic acid content of maize leaves with time and after artificial damage: implications for insect attack. *Annals of Applied Biology*, 1991, **119**:239~249.
- [20] Massardo F, Zuniga G E, Perez L M, *et al.* Effects of hydroxamic acids on electron transport and their cellular location in corn. *Phytochemistry*, 1994, **35**: 873~876.
- [21] Wu Y Q, Guo Y Y, Zeng Q L. Preliminary testing of contents of total phenolics and condensed tannins in the Bt cotton. *Journal of He'nan Agricultural University*, 2000, **34**(2): 134~138.
- [22] Li G Q, Wang Y C. Nutrition, secondary substance and pest resistance of plant. *Plant Physiology Communications*, 1997, (6):513.
- [23] Becker W N. Quantification of Onion Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae and Their Resistance to *Pyrenochaeta terrestris*, Ph. D. thesis,

University of Illinois, Urbana, 1976.

- [24] Couture R M, Routley D, Dunn G M. Role of cyclic hydroxamic acids in monogenic resistance of maize to *Helminthosporium turcicum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1971, **1**: 515~521.
- [25] Zhu Z. Genetic strategy for pest resistance of plant. In: Lin Z P, *et al.* eds. *Plant Molecular Biology toward 21th century*. Beijing: Science Press, 2000. 117~130.
- [26] Frey M, Chomet P, Glawischig E, *et al.* Analysis of a chemical defense mechanism in grasses. *Science*, 1997, **277**: 696~699.
- [27] Nomura T, Ishihara A, Imaishi H, *et al.* Molecular characterization and chromosomal iocalization of cytochrome P450 genes involed in the biosynthesis of cyclic hydroxamic acids in hexaploid wheat. *Molecular Genetics and Genomics*, 2002, **267**:210~217.

参考文献:

- [1] 王振营. 玉米抗虫的生化基础. 世界农业, 1994, (8):33~34.
- [2] 聂呈荣, 骆世明, 曾任森, 等. 玉米化感物质异羟肟酸研究进展. 应用生态学报, 2004, **15**(6):1079~1082.
- [6] 阎凤鸣. 丁布研究进展. 昆虫知识, 1995, **32**(3):178~180.
- [11] 刘保川, 陈巨莲, 倪汉祥, 等. 丁布的分离、纯化和结构鉴定及其对麦长管蚜生长、发育的影响. 应用与环境生物学报, 2002, **8**(1):71~74.
- [12] 王建武, 冯远娇, 骆世明. Bt 玉米抗虫蛋白表达的时空动态及其土壤降解研究. 中国农业科学, 2003, **36**(11): 1279~1286.
- [21] 武予清, 郭予元, 曾庆龄. 转 Bt 基因棉单宁及总酚含量的初步测定. 河南农业大学学报, 2000, **34**(2):134~138.
- [22] 李国清, 王荫长. 营养和次生物质与植物的抗虫性. 植物生理学通讯, 1997, (6):513.
- [25] 朱祯. 植物抗虫遗传操作策略. 见: 林忠平等编著. 走向 21 世纪的植物分子生物学. 北京: 科学出版社, 2000. 117~130.