

研究报告 Original Papers

不同甘蔗在梢腐病菌侵染下氮代谢相关指标的变化

王泽平, 李毅杰, 梁强, 李长宁, 韦金菊, 刘璐, 林善海*

广西农业科学院甘蔗研究所/中国农业科学院甘蔗研究中心/农业部广西甘蔗生物技术与遗传改良重点实验室, 南宁530007

摘要: 本文以甘蔗‘粤糖94/128’(YT 94/128)和‘桂糖37号’(GT 37)作为研究材料, 采用针刺接种法, 分析了不同甘蔗在梢腐病菌侵染下氮代谢相关指标的变化。结果表明, 未接种状态下, YT 94/128叶片的核糖核酸(RNA)、可溶性蛋白(SP)、硝态氮(NO_3^- -N)、铵态氮(NH_4^+ -N)含量和叶片硝酸还原酶(NR)、谷氨酰胺合成酶(GS)、谷氨酸合成酶(GOGAT)活性都要高于GT 37, 且都表现出稳中有升的变化规律。受到梢腐病菌侵染后, GT 37叶片RNA含量显著下降, GS、GOGAT活性以及SP含量下降速度显著快于YT 94/128。数据显示两类材料中氮代谢各类指标存在不同程度相关性, 也存在氨基酸组分差异。由此可见, 梢腐病菌侵染可直接导致甘蔗叶片RNA降解, NR、GS以及GOGAT活性下降, SP下降, 游离氨基酸(AA)总量上升。

氨基酸不同组分与甘蔗建立抗梢腐病菌侵染机制密切相关。

关键词: 甘蔗; 梢腐病; *Fusarium verticillioides*; 氮代谢; 互作

自1896年韦克和温特在爪哇首先介绍甘蔗梢腐病(Pokkah boeng disease)以来(朱秀峰1976), 其在我国糖料蔗主产区广西已经逐渐成为仅次于黑穗病的主要叶片病害(王泽平等2016a, b)。氮代谢作为植物基本物质代谢之一, 其体内硝酸还原酶、谷氨酰胺合成酶、谷氨酰胺合酶、天冬酰胺转氨酶等关键酶不仅直接参与氮代谢同化过程, 与植物的碳代谢等协调统一, 共同成为植物生命活动的基本过程(许振柱和周广胜2004), 同时与植物抗生物或非生物胁迫(麦维军和张明永2005; 李蕾2006)息息相关。前人研究发现不同甘蔗品种的氮代谢能力存在很大差异(邢永秀等2008), 不同生长时期的氮代谢关键酶活性及相关活性物质含量也发生显著变化(张艳梅等2015), 且不同氮源环境对梢腐病菌侵染性产生直接影响(Lin等2016)。近年来, 生长调节物质处理对作物氮代谢(李健忠等2015), 氮素形态及配比对作物品质的影响(李娟娟等2016)研究屡见报道。禾本科作物不同基因型品种在不同胁迫条件下硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)、谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)和谷氨酸合成酶(glutamate synthase, GOGAT)等氮代谢相关酶活性以及蛋白质含量变化的研究也较多(赵鹏等2009; 罗凤等2012; 黄维等2015; 蔡宏亮等2016), 但有关梢腐病菌侵染对甘蔗氮代谢变化及其关键酶活性影响的研究尚未见报道。因此, 在选育高产高糖抗性强甘蔗品种的主要目标下, 研究逆境下不同基因型材料的氮代谢生理机制,

对甘蔗产业健康可持续性发展具有重要意义。本试验选用对梢腐病菌表现不同抗性甘蔗品种为材料, 探讨其在梢腐病菌侵染与未侵染处理下氮代谢关键酶活性及氨基酸组分变化, 以为全面解析甘蔗与病原菌分子互作机制提供科学依据和理论指导。

材料与amp;方法

1 材料与试验设计

试验选用甘蔗(*Saccharum officinarum* L.)高抗梢腐病品种‘粤糖94/128’(YT 94/128)和高感品种‘桂糖37号’(GT 37)作为研究材料, 以梢腐病菌(*Fusarium verticillioides*)作为接种病原, 于2016年5月至8月在广西农业科学院甘蔗研究所温室大棚内进行。所用塑料桶型号为上部直径×下部直径×高=40 cm×25 cm×40 cm。取农田耕层壤土过筛后与干净河沙按3:1 (体积比)混匀, 土壤养分为碱解氮43.58 mg·kg⁻¹, 速效磷30.75 mg·kg⁻¹, 速效钾105.42 mg·kg⁻¹。每个品种分别种植60桶, 对照(CK)与接种处理(tr)各30桶, 每桶摆放4节单芽段蔗茎。待甘蔗长至5~6叶时, 进行病原菌接种侵染, 并遮阴保湿, 保持大棚温度20~35°C, 湿度80%~85%。

收稿 2017-03-28 修定 2017-11-01

资助 广西自然科学基金(2016GXNSFBA380046、2015jjBA-30013)、广西农业科学院科技发展基金(桂农科2017YM01)和广西重点研发计划项目(桂科AB16380126、桂科AB16380157)。

* 通讯作者(E-mail: 745784546@qq.com)。

2 测定指标与方法

病原菌孢子悬浮液培养及针刺接种处理参照Wang等(2017)方法进行;在接种24 h后开始检测各处理梢腐病病情指数(disease index, DSI= $[\sum(n_i \times v_i)/5N] \times 100$)。高抗: DSI ≤ 1.0 ;抗病: DSI=1.1~5.0;中抗: DSI=5.1~10.0;中感: DSI=10.1~15.0;感病: DSI=15.1~20.0;高感: DSI ≥ 20.1 。同时剪取接种后0、7、14及21 d的甘蔗+1叶片(含对照)来提取RNA及酶液。

RNA提取采用Trizol试剂法(吴凯朝等2012)。硝酸还原酶(NR)、谷氨酰胺合成酶(GS)以及谷氨酸合成酶(GOGAT)活性测定参考袁红梅(2011)的方法。可溶性蛋白质(soluble protein, SP)含量测定参考陆思思(2012)的方法。硝态氮(NO_3^- -N)和铵态氮(NH_4^+ -N)含量测定采用刘晓霞(2014)的方法。用日立L-8800氨基酸分析仪叶片中的氨基酸(amino acid, AA),将样品与5%磺基水杨酸按1:1混合并摇匀, $10\ 000 \times g$ 离心15 min,上清液采用0.25 μm 水相针式过滤器过滤后测定。

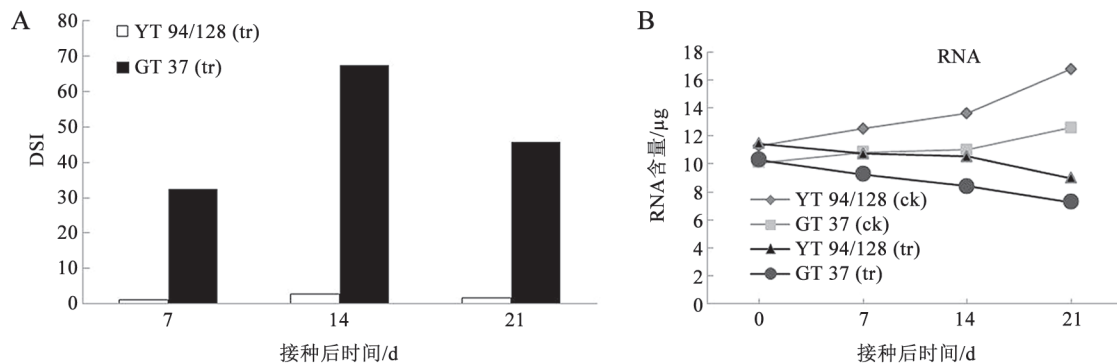


图1 梢腐病菌侵染后不同品种甘蔗的DSI和RNA含量变化

Fig.1 Change in DSI and RNA contents of different sugarcane varieties after inoculation

2 梢腐病菌侵染对甘蔗叶片氮代谢生理指标的影响

图2表明,在正常生长状态下,蔗株YT 94/128叶片NR、GS、GOGAT活性和SP、 NO_3^- -N、 NH_4^+ -N含量都要高于GT 37,且都表现出一种稳中有升的变化规律。在受到侵染后7~21 d,GT 37和YT 94/128的NR、GS、GOGAT活性及SP含量随着DSI的加剧,其代谢水平明显低于正常条件,其中YT 94/128下降的速率要明显平缓,而GT 37从接种后7 d便急剧下降。GT 37叶片的 NO_3^- -N和 NH_4^+ -N含量上升,在接种后14 d达到一个峰值,随之急剧下降,且接种后21 d含量趋于低于接种前含量;而YT 94/128的

3 数据处理及统计分析

采用SPSS 22.0软件和Excel 2007进行数据处理、绘图和统计分析,结果以3次测量的算术平均值表示, Duncan's法进行显著性差异检验($P < 0.05$)。不同小写字母表示显著性。

实验结果

1 梢腐病菌侵染后不同品种甘蔗的叶片氮代谢相关指标变化

感病品种GT 37在受到病原菌侵染后,叶片表现出黄化萎蔫、皱缩撕裂等症状,严重者导致梢部腐烂伴随产生孢子粉,其DSI急剧升高,在14 d达到最大值。抗病品种YT 94-128在整个接种阶段的感病程度并不严重,病情指数较低(图1-A),只产生褐色斑点或条纹。正常生长状态下,2个品种的甘蔗叶片RNA含量不断增加,而接种处理的叶片RNA含量则表现出不断减少趋势,其中以感病品种GT 37下降更为明显(图1-B)。

NO_3^- -N和 NH_4^+ -N含量则表现出缓慢增长的趋势。

3 氮代谢生理指标与病情指数相关性分析

对氮代谢指标与梢腐病DSI进行相关性分析。结果(表1)发现,抗病和感病品种叶片的GS、GOGAT与NR呈极显著正相关。抗病品种 NH_4^+ -N与NR、GS、GOGAT呈极显著负相关,感病品种的 NH_4^+ -N与NR、GS、GOGAT呈负相关,但未达到显著水平。不同品种中 NO_3^- -N含量与其他指标的相关性都不显著。抗病品种SP与NR显著负相关,与 NH_4^+ -N显著正相关;感病品种SP与 NH_4^+ -N、 NO_3^- -N显著正相关。抗病品种中,AA与NR、GS极显著负相关、与

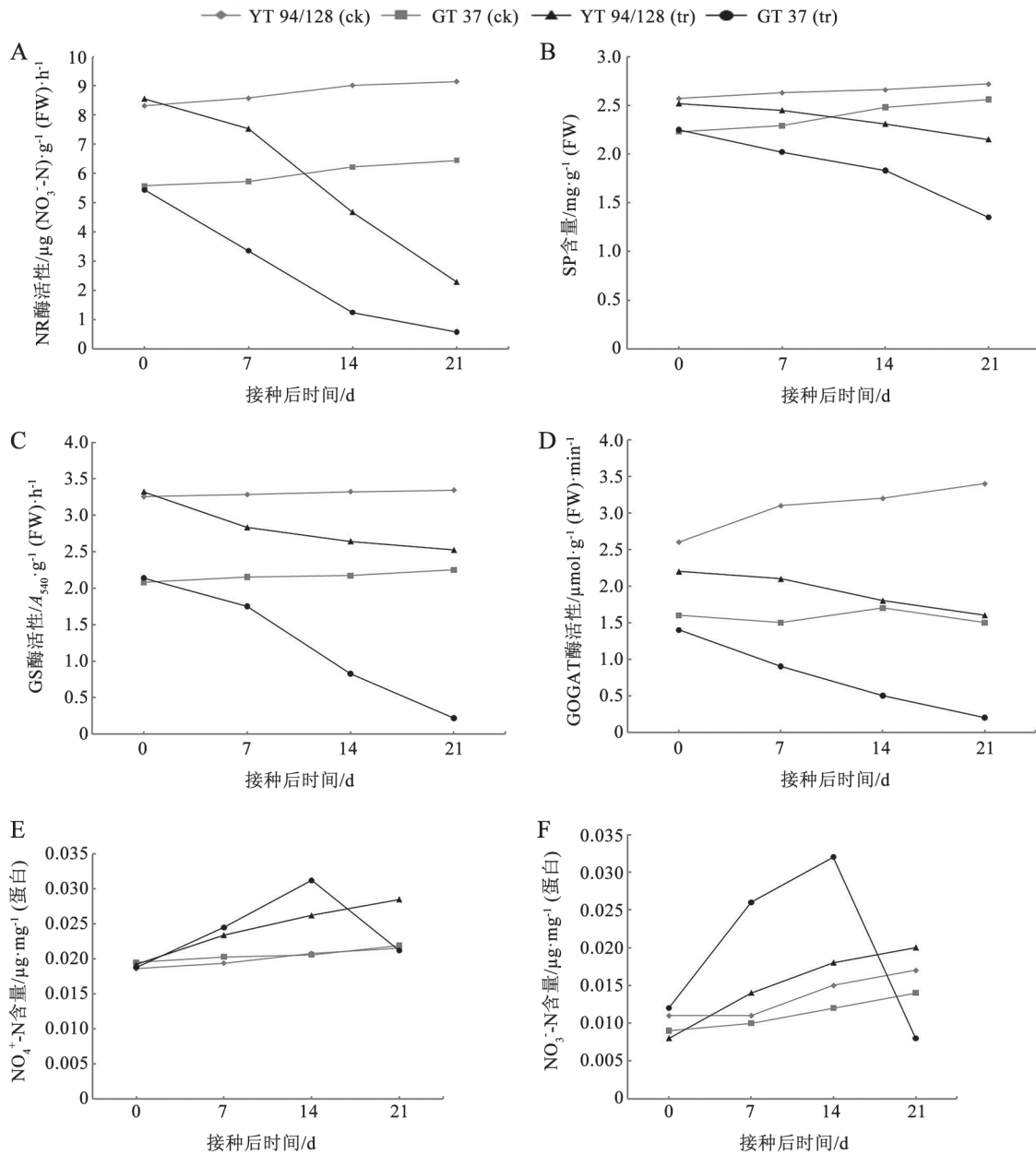


图2 梢腐病菌侵染后不同品种甘蔗的氮代谢指标变化

Fig.2 Change in nitrogen metabolic parameters of different sugarcane varieties after inoculation

NH₄⁺-N、SP极显著正相关; 感病品种中AA与NH₄⁺-N、NO₃⁻-N、SP也呈极显著正相关。在不同品种中, DSI与NR、GS、GOGAT都呈极显著负相关, 而与NH₄⁺-N、NO₃⁻-N、SP以及AA呈不同程度正相关。

4 梢腐病菌侵染后不同品种甘蔗的氨基酸组分变化

如表2所示, YT 94/128和GT 37叶片中的苯丙氨酸、赖氨酸、脯氨酸及谷氨酸表达量丰富, 在受到梢腐病菌侵染后其含量变化差异显著; 在YT

94/128接种前后差异显著的游离氨基酸还有丙氨酸、甘氨酸、甲硫氨酸、酪氨酸及亮氨酸, 在GT 37中接种前后差异显著的游离氨基酸还有精氨酸、缬氨酸、丝氨酸、苏氨酸及组氨酸。值得注意的是, 天冬氨酸在2个甘蔗品种的表达量虽都很丰富, 但在接种与未接种之间的含量差异并不显著。此外, YT 94/128中并没有检测到丝氨酸、苏氨酸、异亮氨酸以及组氨酸成分。

表1 氮代谢指标与病情指数相关性分析

Table 1 Correlation analysis among nitrogen metabolic parameters and disease index of pokkah boeng

	品种	NR	GS	GOGAT	NH ₄ ⁺ -N	NO ₃ ⁻ -N	SP	AA	DSI
NR	YT 94/128	1							
	GT 37	1							
GS	YT 94/128	0.934**	1						
	GT 37	0.967**	1						
GOGAT	YT 94/128	0.880**	0.873**	1					
	GT 37	0.985**	0.959**	1					
NH ₄ ⁺ -N	YT 94/128	-0.915**	-0.935**	-0.745*	1				
	GT 37	-0.613	-0.496	-0.585	1				
NO ₃ ⁻ -N	YT 94/128	-0.110	-0.390	-0.150	0.337	1			
	GT 37	-0.022	0.114	0.009	0.500	1			
SP	YT 94/128	-0.763*	-0.598	-0.407	0.784*	-0.177	1		
	GT 37	-0.068	0.103	-0.033	0.801*	0.980**	1		
AA	YT 94/128	-0.868**	-0.847**	-0.667	0.958**	0.202	0.850**	1	
	GT 37	-0.225	-0.094	-0.199	0.901**	0.974**	0.965**	1	
DSI	YT 94/128	-0.874**	-0.936**	-0.881**	0.894**	0.567	0.542	0.783*	1
	GT 37	-0.976**	-0.969**	-0.983**	0.529	0.077	0.049	0.121	1

*和**分别表示在0.05和0.01水平上的差异显著性。

图2 梢腐病菌侵染后不同品种甘蔗氨基酸组分的变化

Table 2 The change of amino acid composition in different sugarcane varieties after inoculation

氨基酸组分	mg·L ⁻¹					
	YT 94-128 (抗病)			GT 37 (感病)		
	未接种	接种14 d	变化值/%	未接种	接种14 d	变化值/%
天冬氨酸(Asp)	5.234±0.012 ^{ab}	5.767±0.014 ^a	10.20	4.316±0.012 ^{ab}	4.652±0.025 ^a	7.78
苯丙氨酸(Phe)	3.025±0.010 ^b	4.088±0.008 ^a	35.14	2.682±0.005 ^a	2.045±0.021 ^b	-23.75
赖氨酸(Lys)	3.105±0.008 ^b	5.328±0.010 ^a	71.59	2.982±0.004 ^b	4.224±0.034 ^a	41.65
精氨酸(Arg)	2.438±0.005 ^a	2.267±0.013 ^{ab}	-7.01	2.708±0.002 ^b	2.228±0.005 ^a	17.73
丙氨酸(Ala)	2.256±0.004 ^b	6.273±0.042 ^a	178.06	2.634±0.003 ^a	2.725±0.008 ^a	3.45
甘氨酸(Gly)	2.304±0.001 ^b	2.862±0.012 ^a	24.22	2.374±0.002 ^a	2.525±0.006 ^a	6.36
脯氨酸(Pro)	1.725±0.007 ^b	2.082±0.002 ^a	20.70	1.395±0.003 ^b	3.248±0.003 ^a	132.83
谷氨酸(Glu)	1.673±0.001 ^a	1.039±0.008 ^b	-37.90	1.329±0.002 ^a	1.038±0.002 ^b	-21.90
甲硫氨酸(Met)	0.062±0.002 ^b	0.078±0.005 ^a	25.81	0.045±0.001 ^a	0.049±0.001 ^a	8.89
酪氨酸(Tyr)	0.056±0.002 ^b	0.132±0.002 ^a	135.71	0.066±0.001 ^{ab}	0.072±0.001 ^a	9.09
亮氨酸(Leu)	0.051±0.001 ^b	0.068±0.002 ^a	33.33	0.064±0.001 ^a	0.055±0.002 ^{ab}	-14.06
缬氨酸(Val)	0.035±0.001 ^a	0.037±0.004 ^a	5.71	0.054±0.001 ^a	0.042±0.001 ^b	-22.22
半胱氨酸(Cys)	0.028±0.001 ^b	0.034±0.001 ^a	21.43	0.034±0.001 ^a	0.037±0.002 ^a	8.82
丝氨酸(Ser)	—	—	—	0.025±0.001 ^b	0.031±0.001 ^a	24.00
苏氨酸(Thr)	—	—	—	0.018±0.001 ^b	0.024±0.001 ^a	33.33
异亮氨酸(Ile)	—	—	—	0.027±0.001 ^{ab}	0.028±0.001 ^a	3.70
组氨酸(His)	—	—	—	0.003±0.001 ^b	0.004±0.001 ^a	33.33
总量	21.992±0.005 ^b	30.055±0.012 ^a	36.66	20.756±0.006 ^b	23.027±0.004 ^a	10.94

讨 论

1 梢腐病病原菌侵染对甘蔗叶片RNA含量的影响

不同甘蔗品种对梢腐病菌侵染表现出不同抗

性(Wang等2017),且甘蔗叶冠形态与抗梢腐病性显著相关(王泽平等2017),这说明甘蔗叶片积累RNA含量的能力受其遗传背景的影响。正常情况下,健康蔗株叶片能有效积累RNA,表现出缓慢增

长的趋势。本处理中感病植株叶片的RNA含量不断下降, 这表明病原菌侵染导致甘蔗叶片褪绿黄化、萎蔫或撕烂, 不仅降低了水分传输能力, 加剧了水分丧失, 而且抑制RNA合成的同时, 也可能抑制了RNA的翻译活性, 进而限制了蛋白质的合成。当然, 这需要进一步实验来验证哪一部分RNA(包括mRNA、tRNA、rRNA)的减少更为明显。

2 梢腐病病原菌侵染对甘蔗叶片氮代谢生理指标的影响

硝酸还原酶(NR)作为调节氮代谢速度和同化限制的关键酶, 对环境条件反应十分敏感。梢腐病菌侵染导致甘蔗叶片NR活性受到抑制, 使得 NO_3^- -N还原以及 NH_4^+ -N同化受阻, 从而降低了GS和GOGAT活性, 一方面致使 NH_4^+ 积累, 而 NH_4^+ 被植物体吸收可直接被利用于氨基酸合成, 导致游离氨基酸总量上升; 另一方面导致SP含量下降或发生变化, 使甘蔗积累一系列含氮渗透调节物质。当然, 哪一种方式起主导作用尚需进一步验证。根据前人经验(陆俊杏等2013), 这些化合物累积可反映病原菌胁迫程度, 是甘蔗主动防御侵染以及增强抗病性的重要方式。为了使植物免于 NH_4^+ 浓度过高对植物产生毒害, GS/GOGAT途径在 NH_4^+ -N同化中起主要作用(莫良玉等2001)。相关性分析结果表明抗病品种中GS、GOGAT与 NH_4^+ -N的相关性要显著高于感病品种, 说明甘蔗为免于 NH_4^+ 浓度过高对其产生毒害, 其会主动调节关键酶活性, 改善病原菌胁迫条件下的氮代谢状况, 提高其抗病能力。

3 梢腐病病原菌侵染对甘蔗叶片氨基酸含量的影响

氨基酸是多种天然产物的前体, 在植物生长和发育中起着至关重要的作用, 包括对生物和非生物胁迫的反应(Zeier等2013)。它们还能有效地分解小分子有机物参与三羧酸(TCA)循环, 以产生植物生长所需的细胞能量, 尤其是积极响应外界环境胁迫所导致的能量丧失(Kirma等2012; Less和Galili 2009)。因此, 精准比较抗病和感病甘蔗植株中氨基酸水平对于探讨其抗病性强弱显得至关重要。表2显示2个品种中天冬氨酸虽含量较为丰富, 但接种前后差异并不显著, 而其他氨基酸大多是天冬氨酸通过分支调节途径产生的, 这说明甘蔗叶片产生的可溶性天冬氨酸直接参与其他氨基酸的相互转化来间接影响甘蔗响应梢腐病菌侵染。

植物抗逆机制可以通过在外界环境胁迫下抑制蛋氨酸合成得到部分解释, 因为一种特殊的天冬氨酸激酶对高浓度赖氨酸的不灵敏性可使植物获得生长必需蛋氨酸(Bright等1978)。本试验中甘蔗叶片赖氨酸表达丰富, 以及蛋氨酸虽微量表达却在接种后显著增加可以验证这一观点。据报道, 如果二氢吡啶二羧酸合成酶(DHDPS)保持正常调节水平, 赖氨酸是不会增长的(Mazelis等1977)。有趣的是, 在本研究这批接种的材料中, 感抗品种的赖氨酸含量较对照显著增长, 这说明蛋氨酸和赖氨酸的表达可能与甘蔗建立防御梢腐病菌侵染机制有关。

甘蔗在受到梢腐病菌侵染后, 脯氨酸和谷氨酸含量显著增加, 这两者不仅作为鸟氨酸和精氨酸合成的前体物, 同时反过来又进入聚胺生物合成途径。精氨酸在精氨酸酶催化下可以转化为鸟氨酸或通过长距离反应转化为胍基丁胺(Beckmann等2013), 然而, 本文结果中甘蔗样品精氨酸并没有表现出明显增加或减少。这说明, 甘蔗体内应该同时存在一套合成或分解精氨酸平衡体系, 其作为中间代谢产物参与抗病反应是非常活跃的。

脯氨酸作为植物响应生物或非生物胁迫时的一种主要渗透调节物, 其参与各种代谢通路也是非常积极的, 尽管目前关于脯氨酸积累是一种适应性反应, 还是一种胁迫症状的解释尚无定论。表2结果中, GT 37叶片的脯氨酸含量显著高于YT 94/128。基于梢腐病发病特征, 我们认为脯氨酸的大量积累是甘蔗受到梢腐病菌胁迫的一种生理性失调所致。

值得注意的是, 在YT 94/128对照和接种叶片中并未检测到丝氨酸、苏氨酸、异亮氨酸和组氨酸的存在, 而在GT 37中, 这几种氨基酸不仅被检测到, 而且在接种后含量都有显著增加, 这表明这两个典型材料在利用和合成氨基酸方面是存在很大遗传背景差异的, 而病原菌胁迫诱导并不能导致甘蔗叶片中这四种氨基酸的有效或长时间积累。在抗性植物中可能是某些调节因子通过反馈抑制回路限制这些必需氨基酸的合成, 反过来, 这些积累的氨基酸又抑制其生物合成通路中酶的活性(Galili等2016)。然而, 这四种氨基酸的差异积累, 以及它们是否与甘蔗抗病机制有关, 尚需进一步验证。

本文首次从生理学水平初步解析叶片氮代谢指标与甘蔗抗梢腐病相关性, 可为寻找重要抗病通路和发掘抗病基因提供参考意见, 但要深入揭示甘蔗氮代谢抗病相关机制还需要结合差异基因转录本和差异蛋白表达谱进行。

参考文献

- Beckmann N, Schaffner L, Schrettl M, Binder U, Talasz H, Lindner H, Haas H (2013). Characterization of the link between ornithine, arginine, polyamine and siderophore metabolism in *Aspergillus fumigatus*. PLoS ONE, 8 (6): e67426
- Bright SWJ, Wood EA, Mifflin BJ (1978). The effect of aspartate-derived amino acids (lysine, threonine, methionine) on the growth of excised embryos of wheat and barley. Planta, 139 (2): 113–117
- Cai HL, Wang LD, Sha HJ, Liu HL, Zhao HW (2016). Effects of nitrogen fertilizing levels on nitrogen metabolism and grain protein content of *Japonica* rice in cold region under cold water stress at tillering stage. Gen Appl Biol, 35 (9): 2486–2493 (in Chinese with English abstract) [蔡宏亮, 王力冬, 沙汉景, 刘化龙, 赵宏伟(2016). 分蘖期冷水胁迫下施氮量对寒地粳稻氮代谢和籽粒蛋白质含量的影响. 基因组学与应用生物学, 35 (9): 2486–2493]
- Galili G, Amir R, Fernie AR (2016). The regulation of essential amino acid synthesis and accumulation in plants. Ann Rev Plant Biol, 67 (1): 153
- Huang W, Peng JW, Gong R, Tuo HB, Fan YM (2015). Effects of cadmium stress on key enzymes involved in nitrogen metabolism and nitrogen, phosphorus and potassium accumulation of different varieties of rice. J Anhui Agric Sci, 43 (2): 1204–1208 (in Chinese with English abstract) [黄维, 彭建伟, 龚蓉, 虞海波, 范艳咪(2015). 镉胁迫对不同水稻品种氮代谢关键酶活性和植株氮磷钾积累的影响. 安徽农业科学, 43 (2): 1204–1208]
- Kirma M, Araújo WL, Fernie AR (2012). The multifaceted role of aspartate-family amino acids in plant metabolism. J Exp Bot, 63 (14): 4995–5001.
- Less H, Galili G (2009). Coordinations between gene modules control the operation of plant amino acid metabolic networks. BMC Sys Biol, 3 (1): 1–18
- Li JJ, Wang YM, Pan CX, Xiao YH, He JM (2016). Effects of different nitrogen forms and ratio on the content and the quality of peppermint essential oil. Plant Physiol J, 52 (2): 150–156 (in Chinese with English abstract) [李娟娟, 王羽梅, 潘春香, 肖艳辉, 何金明(2016). 不同氮素形态及配比对薄荷精油含量和品质的影响. 植物生理学报, 52 (2): 150–156]
- Li JZ, Xue LX, Zhu JF, Xu Y, Jin L, Hao HH, Su Q, Xu ZC (2015). Interaction effect of gibberelin and NAA on growth, carbon and nitrogen metabolism and leaf quality in flue-cured tobacco. Plant Physiol J, 51 (9): 1473–1481 (in Chinese with English abstract) [李健忠, 薛立新, 朱金峰, 许仪, 金磊, 郝浩浩, 苏谦, 许自成(2015). 赤霉素和萘乙酸互作对烤烟生长、碳氮代谢及烟叶品质的影响. 植物生理学报, 51 (9): 1473–1481]
- Li L (2006). Isolation and characterization analysis of pathogen-related CaWRKY transcription factors in hot pepper [Master's thesis]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (in Chinese with English abstract) [李蕾(2006). 辣椒抗病相关CaWRKY转录因子基因的分离及特性研究(硕士论文). 北京: 中国农业科学院]
- Lin Z Y, Wang JH, Bao YX, Guo Q, Powell CA, Xu SQ, Chen BS, Zhang MQ (2016). Deciphering the transcriptomic response of *Fusarium verticillioides* in relation to nitrogen availability and the development of sugarcane pokkahboeng disease. Sci Rep, 6: 29692
- Liu XX (2014). Effects of nitrogen nutrition on oxalate accumulation in different spinach genotypes and corresponding [PhD thesis]. Hangzhou: Zhejiang University (in Chinese with English abstract) [刘晓霞(2014). 氮营养对不同菠菜基因型草酸积累的影响及其机理研究(博士论文). 杭州: 浙江大学]
- Lu JX, Lu QF, Zhang K, Chai, YR, Li JN, Qian W, Lv J, Lu K, Liang Y (2013). Expression features of *BnMAPK1* in wound and pathogenetic fungi stress. Sci Agric Sin, 46 (20): 4388–4396 (in Chinese with English abstract) [陆俊杏, 陆奇丰, 张凯, 柴友荣, 李加纳, 钱伟, 吕俊, 卢坤, 梁颖 (2013). 甘蓝型油菜MAPK1在损伤和病原菌胁迫下的表达模式分析. 中国农业科学, 46 (20): 4388–4396]
- Lu SS (2012). Analysis of physiological and biochemical characteristics and protein expressions in internodes of sugarcane with different cold resistance under low temperature [Master's thesis]. Nanning: Guangxi Universtiy (in Chinese with English abstract) [陆思思 (2012). 低温胁迫下不同耐寒性甘蔗节间生理生化特性及蛋白表达分析(硕士论文). 南宁: 广西大学]
- Luo F, Lu YE, Yang M, Lian XM (2012). Effects of nitrogen deficiency on nitrogen metabolism and expression of genes related during vegetable growth stage of rice. J Huazhong Agri Univ, 1 (1): 16–22 (in Chinese with English abstract) [罗凤, 卢永恩, 杨猛, 练兴明(2012). 氮胁迫对水稻营养生长期氮代谢及相关基因表达量的影响. 华中农业大学学报, 31 (1): 16–22]
- Mai WJ, Zhang MY (2005). Glutathione in higher plant. Bull Biol, 40 (6): 4–5 (in Chinese) [麦维军, 张明永(2005). 高等植物体内的谷胱甘肽. 生物学通报, 40 (6): 4–5]
- Mazelis M, Whatley FR, Whatley J (1977). The enzymology of lysine biosynthesis in higher plants the occurrence, characterization and some regulatory properties of dihydrodipicolinate synthase. FEBS Lett, 84 (2): 236–240
- Mo LY, Wu LH, Tao QN (2001). Research advances on GS/GOGAT cycle in higher plants. Plant Nut Fer Sci, 7 (2): 223–231 (in Chinese with English abstract) [莫良玉, 吴良欢, 陶勤南(2001). 高等植物GS/GOGAT循环研究进展. 植物营养与肥科学报, 7 (2): 223–231]
- Wang ZP, Chen Y, Sun HJ, Li Y J, Duan WX, Zhou ZG, Zhang MQ, Lin SH (2016a). Preliminary evaluation of resistance on pokkahboeng disease of major sugarcane varieties in the field of Guangxi. Chin J Tropic Crops, 37 (5): 952–957 (in Chinese with English abstract) [王泽平, 陈奕, 孙海军, 李毅杰, 段维兴, 周主贵, 张木清, 林善海(2016a). 广西甘蔗主栽品种梢腐病田间抗性初步评价. 热带作物学报, 37 (5): 952–957]
- Wang ZP, Duan WX, Li YJ, Liang Q, Zhou ZG, Zhang MQ, Lin SH

- (2016b). Establishment of an evaluation system for field resistance against sugarcane pokkahboeng. *J South Chin Agric Univ*, 37 (3): 67–72 (in Chinese with English abstract) [王泽平, 段维兴, 李毅杰, 梁强, 周主贵, 张木清, 林善海(2016b). 甘蔗梢腐病田间抗性评价体系的建立. 华南农业大学学报, 37 (3): 67–72]
- Wang ZP, Lin SH, Liang Q, Li YJ, Li CN, Duan WX, He TG (2017). Effect of sugarcane canopy structure on pokkah boeng disease resistance. *J Chin Agri Univ*, 22 (7): 40–46 (in Chinese with English abstract) [王泽平, 林善海, 梁强, 李毅杰, 李长宁, 段维兴, 何铁光(2017). 甘蔗叶冠形态与抗梢腐病相关性探讨. 中国农业大学学报, 22 (7): 40–46]
- Wang ZP, Sun HJ, Guo Q, Xu SQ, Wang JH, Lin SH, Zhang MQ (2017). Artificial inoculation method of pokkahboeng disease of sugarcane and screening of resistant germplasm resources in subtropical China. *Sugar Tech*, 19 (3): 283–292
- Wu KC, Huang CM, Li YR, Yang LT, Wu JM (2012). Fast and effective total RNA extraction from different tissues in 3 crops through the Trizol reagent method. *J Southern Agric*, 43 (12): 1934–1939 (in Chinese with English abstract) [吴凯朝, 黄诚梅, 李杨瑞, 杨丽涛, 吴建明(2012). Trizol试剂法快速高效提取3种作物不同组织总RNA. 南方农业学报, 43 (12): 1934–1939]
- Xing YX, Yang LT, Li YR (2008). The compararion of different nitrogen metabolism between sugarcane varieties introduced from Brazil and cultivate in Guangxi. *J Anhui Agric Sci*, 36 (21): 9003–9007 (in Chinese with English abstract) [邢永秀, 杨丽涛, 李杨瑞(2008). 巴西固氮甘蔗品种和广西主栽甘蔗品种氮代谢差异比较. 安徽农业科学, 36 (21): 9003–9007]
- Xu ZZ, Zhou GS (2004). Research advance in nitrogen metabolism of plant and its environmental regulation. *Chin J Appl Ecol*, 15 (3): 511–516 (in Chinese with English abstract) [许振柱, 周广胜(2004). 植物氮代谢及其环境调节研究进展. 应用生态学报, 15 (3): 511–516]
- Yuan HM (2011). Effect of nutrient forms on nutrient absorption and enzymes activity of wheat seedlings [Master's thesis]. Jinan: Shandong University, 43–47 (in Chinese with English abstract) [袁红梅(2011). 氮素形态对小麦矿质营养吸收和氮素代谢相关酶类活性的影响(硕士论文). 济南: 山东大学, 43–47]
- Zeier J (2013). New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. *Plant Cell Environ*, 36 (12): 2085–2103
- Zhang YM, Yang LT, Li X, Li YR (2015). Effects of different nitrogen levels on key enzymes of nitrogen metabolism and contents of related active substances for three sugarcane varieties. *J Southern Agric*, 46 (5): 766–771 (in Chinese with English abstract) [张艳梅, 杨丽涛, 李翔, 李杨瑞(2015). 不同氮水平对三个甘蔗品种氮代谢关键酶活性及相关活性物质含量的影响. 南方农业学报, 46 (5): 766–771]
- Zhao P, Xiong SP, Li L, Ma XM (2009). Effect of soil moisture levels on activity of nitrogen assimilation enzymes in post-anthesis flag leaves and grain protein content of different gluten content of wheat. *J Triti Crops*, 29 (3): 447–452 (in Chinese with English abstract) [赵鹏, 熊淑萍, 李琳, 马新明(2009). 土壤水分对不同筋力型小麦花后旗叶氮素同化酶活性和籽粒蛋白质含量的影响. 麦类作物学报, 29 (3): 447–452]
- Zhu XF (1976). Sugarcane pokkahboeng disease. *Sugarcane Cane Sugar*, (8): 63–66 (in Chinese) [朱秀峰(1976). 甘蔗梢腐病(Pokkahboeng). 甘蔗糖业, (8): 59–62]

Change of nitrogen metabolic indexes in different sugarcane varieties inoculated with pokkah boeng disease pathogen

WANG Ze-Ping, LI Yi-Jie, LIANG Qiang, LI Chang-Ning, WEI Jin-Ju, LIU Lu, LIN Shan-Hai*

Sugarcane Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences/Sugarcane Research Center, Chinese Academy of Agricultural Science/Key Laboratory of Sugarcane Biotechnology and Genetic Improvement (Guangxi), Ministry of Agriculture, Nanning 530007, China

Abstract: This experiment used two sugarcane (*Saccharum officinarum*) varieties YT 94/128 and GT 37 as tested materials with syringe inoculation to study the physiological changes of nitrogen metabolism under pokkah boeng disease (PBD). The results showed that under non inoculated condition, the contents of RNA, soluble protein (SP), NO_3^- -N, NH_4^+ -N and the activities of nitrate reductase (NR), glutamine synthetase (GS) and glutamate synthase (GOGAT) in YT 94/128 were much higher than those in GT 37, and all showed a steady rise. After infection the contents of RNA in GT 37 leaves decreased significantly, and the decrease rates of GS, GOGAT activities and SP content were faster than those in YT 94/128. And the data showed there were different degrees of correlation among various indicators of nitrogen metabolism, and there were also differences in amino acid components in the two sugarcane varieties. The infection of PBD pathogen lead to degradation of RNA, the decrease of NR, GS, GOGAT activities and SP content, and the increase of free amino acid in sugarcane leaves. Different components of amino acids were closely related to the establishment of resistance mechanism of sugarcane against PBD pathogen.

Key words: sugarcane; pokkah boeng disease; *Fusarium verticillioide*; nitrogen metabolism; interaction

Received 2017-03-28 Accepted 2017-11-01

This work was supported by the Guangxi Natural Science Funding (Grant Nos. 2016GXNSFB380046 and 2015jjBA30013), Science and Technology Funds from Guangxi Academy of Agricultural Sciences (Grant No. Guinongke 2017YM01), Guangxi Key Research and Development Program (Grant Nos. Guike AB16380126 and Guike AB16380157).

*Corresponding author (E-mail: 745784546@qq.com).