华山松大小蠹危害与寄主华山松营养物质和抗性成分的关系*

蒲晓娟, 陈 辉
(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 对秦岭林区遭受华山松大小蠹危害不同阶段的被害华山松韧皮部内的营养物质含量和酶活性变化进行了测定。结果表明, 在华山松大小蠹和共生蓝变真菌危害初期, 华山松韧皮部内的苯丙氨酸解氨酶(PAL)、多酚氧化酶(PPO)、超氧化物歧化酶(SOD)活性均显著提高, 丙二醛(MDA)含量明显增加; 但随着华山松大小蠹种群数量的增加和蓝变真菌对华山松韧皮部和木质部组织危害的加剧, 韧皮部组织内的 PAL、PPO 和 SOD 活性逐渐降低, 在枯立木阶段降至最低; 与此同时, 华山松韧皮部内的水分及蛋白质、糖类、粗脂肪、淀粉等营养物质含量, 则随华山松大小蠹和共生蓝变真菌危害的加剧而不断减少。华山松大小蠹的入侵危害降低了华山松韧皮部的生理生化抗性, 加速了其营养的分解。

[关键词] 华山松; 韧皮部; 华山松大小蠹; 蓝变真菌; 抗性; 营养物质
[中图分类号] S763.380 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2007)03-0106-05

Relations between attacking of Dendroctonus armandi and nutrition and resistance material of host trees (Pinus armandi)

PU Xiao-juan, CHEN Hui
(College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: This paper focused on the nutrient and enzyme of phloem in different attacking stages host trees, *Pinus armandi*, in pine ecosystem of Qinling Mountains. The results showed that at the beginning stage of being attacked by Chinesis white pine beetle (*Dendroctonus armandi*) and their symbiotic blue-stain fungus (*Leptographium qinlingensis*), PAL, PPO, SOD activities and MDA content significantly increased in the phloem of *P. armandi*, and decreased with the increase of the number of *D. armandi* and the attacking on the xylem and phloem of *P. armandi* from blue-stain fungus, then reached the minimum level in withering stage of *P. armandi*. But the contents of nutrition materials in the phloem, such as water, protein, glucide, fat, amylum and so on, declined with the infestation of *D. armandi* and symbiotic fungus. In summary, the resistance of physiology and biochemistry in the phloem of *P. armandi* was decreased, the reduction of nutrition was accelerated by the attacking of *D. armandi*.

Key words: *Pinus armandi*; phloem; *Dendroctonus armandi*; blue-stain fungus; resistance; nutrient

华山松大小蠹(*Dendroctonus armandi* Tsai et Li)是我国秦岭巴山林区优质针叶树种华山松(*Pinus armandi* Fr.)的毁灭性先锋害虫, 主要选择入侵 30 年生以上的健康华山松, 并在共生蓝变真菌的

* [收稿日期] 2006-09-05
[基金项目] 国家自然科学基金项目(30471401)
[作者简介] 蒲晓娟(1981-), 女, 陕西渭南人, 在读硕士, 主要从事森林昆虫学研究。
[通讯作者] 陈 辉(1961-), 男, 甘肃酒泉人, 教授, 博士生导师, 主要从事森林昆虫学研究。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

协同作用下, 导致被害寄主树木树势迅速衰弱, 从而诱发次生性小蠹虫的大量入侵危害, 给秦岭巴山森林生态环境和社会经济带来巨大损失, 也影响了森林生态系统的可持续发展[1]。

国内外研究表明[1-4], 许多韧皮部小蠹虫在入侵寄主树木时, 都将体内外携带的致病性真菌或酵母菌接种于寄主树木韧皮部和木质部组织内, 通过其胞外酶分泌和转化, 有效降低寄主树木树脂等的生理生化抗性, 并显著提高小蠹虫对寄主树木营养的利用率。小蠹虫和共生真菌入侵定居过程中, 在抵御寄主树木原生性抗性的同时, 必须能够克服寄主树木所产生的诱导性抗性。随着小蠹虫种群数量的增加和共生真菌对寄主树木抗性物质分解作用的提高, 寄主树木的生理生化等抗性迅速衰退[4-8]。

本研究系统分析了华山松健康木和衰弱木(包括新侵木、枯萎木、枯立木 3 个危害阶段)的抗性酶活性, 及健康华山松和被害华山松韧皮部组织内氮、磷、淀粉等营养物质含量的变化, 旨在进一步探索华山松大小蠹和共生真菌间营养利用的内在联系, 及华山松大小蠹和共生蓝变真菌致死寄主华山松的机制, 以期为秦岭巴山林区华山松大小蠹的综合治理提供科学依据。

1　材料与方法

1.1　采样地概况

采样地火地塘林场位于秦岭南坡宁陕县境内, 地理坐标为北纬 33°25′～33°29′, 东经 108°25′～108°30′, 海拔 1 500～2 450 m, 属于秦岭南坡山地温带气候。主要成林树种有华山松(*Pinus armandi*)、油松(*Pinus tabulaeformis*)、落叶松(*Larix gmelinii*)、锐齿栎(*Quercus aliena* var. *acuteserrata*)、红桦(*Betula albo-sinensis*)和牛皮桦(*Betula utilis*)。其中华山松多以点、片状与油松、锐齿栎、红桦和牛皮桦构成混交林或形成华山松纯林。

1.2　研究材料

2006-05 在火地塘林区海拔 2 000～2 200 m 的华山松林内, 随机选择华山松健康木和不同危害阶段的华山松各 3～5 株(树龄在 30 年以上, 胸径 25～30 cm)。在胸高处采集韧皮部组织(每个样品采集量不少于 1 kg), 将采集的韧皮部装入塑料袋内密存, 置冰箱中保存。

华山松危害阶段划分标准如下:

健康木。针叶全部为绿色, 树干表面较光滑、没有漏斗状凝脂, 韧皮部和木质部颜色正常, 均无蓝变现象, 木质部有大量的树脂流出。

新侵木。针叶部分失绿, 树干表面有少许凝脂漏斗, 韧皮部和木质部颜色正常, 部分侵入孔有蓝变现象, 树干有侵入孔的地方有树脂流出。

枯萎木。部分针叶变黄或呈黄褐色, 树干上有褐色或暗褐色大型漏斗状凝脂, 树势衰弱, 韧皮部和木质部之间有大量的小蠹虫坑道, 并有蓝变现象出现, 木质部有少量树脂流出且流速缓慢。

枯立木。针叶全部干枯, 呈红褐色或灰褐色, 树势极度衰弱, 树木接近死亡, 树干上凝脂干缩或剥落, 木质部没有树脂流出, 韧皮部和木质部蓝变现象严重。

1.3　研究方法

1.3.1　样品处理　样品分为干样和鲜样 2 种类型, 其中干样是将采集的韧皮部样品在除去外皮后置于 105 ℃下烘干 0.5 h, 再转入 80 ℃烘干 8 h, 然后粉碎获得。鲜样是将冷冻的新鲜样品除去外皮, 迅速剪取(未与空气接触变色的韧皮部材料)获得。

1.3.2　韧皮部水分含量测定　用常压加热干燥法测定(70 ℃恒温烘至恒重)[9]。

1.3.3　韧皮部淀粉、糖、蛋白质和粗脂肪含量测定　用 3, 5-二硝基水杨酸法测定还原性糖含量; 蒽酮法测定可溶性总糖和淀粉含量[9-10]; 用考马斯亮蓝 G-250 染色法测定蛋白质含量[10], 以电泳纯牛血清蛋白作标准曲线; 用索氏抽提法测定粗脂肪含量[9]。

1.3.4　韧皮部总氮和总磷含量测定　用半微量凯氏定氮法测定总氮含量[9], 钒钼黄比色法测定总磷含量。

1.3.5　苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性测定　参照 Koukol 等[11]的方法并略加改进。随机取韧皮部样品 1 g(鲜重), 加 0.15 g 不溶性 PVP 和 0.2 mol/L 硼酸缓冲液少量(内含巯基乙醇 2 mmol/L, pH 为 8.8), 经冰浴研磨匀浆, 4 层纱布过滤, 在 0 ℃以 12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 并用上述缓冲液定容至 10 mL, 用于酶活力测定, 每处理重复 3 次。待测液总体积 5 mL, 内含 0.2 mol/L 硼酸缓冲液(pH 8.8) 3 mL、1 200 μmol/L 的 L-苯丙氨酸和酶液各 1 mL。对照不加 L-苯丙氨酸溶液, 以硼酸缓冲液(pH 8.8)代替。在 30 ℃恒温水浴中保温 60 min, 加入 3 滴 6 mol/L HCl 终止反应, 用 721 型分光光度计在 290 nm 处测定 OD 值变化, 以 OD 值每增加 0.01 为一个酶活力单位。

1.3.6　多酚氧化酶(PPO)和超氧化物歧化酶(SOD)活性测定　PPO 活性用抗坏血酸滴定法测

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

定[9]。超氧化物歧化酶(SOD)活性采用氮蓝四唑(NBT)还原法测定[9],以(OD无酶- OD有酶)/OD无酶表示酶活单位。

1.3.7 丙二醛(MDA)含量测定 MDA 含量采用硫代巴比妥酸法测定[9]。

2 结果与分析

2.1 华山松大小蠹和共生真菌危害与华山松韧皮部含水量的关系

图 1 表明,华山松健康木韧皮部的含水量((3.495±0.088)%)显著($P<0.05$)高于华山松被害木,华山松大小蠹和共生真菌危害使华山松韧皮部内的水分含量迅速降低,但随着华山松大小蠹和共生真菌危害的加剧,被害华山松韧皮部组织内含水量下降速度逐渐变缓。

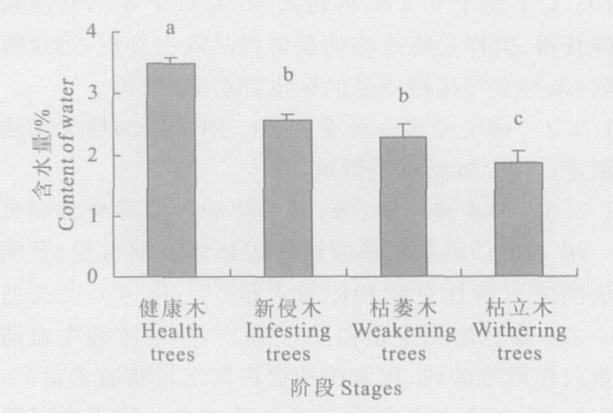

图 1 华山松在华山松大小蠹不同危害阶段韧皮部的含水量变化

Fig. 1 Change of water content in the phloem of different attacking stages of *Pinus armandi*

以上结果说明小蠹在韧皮部内大量繁殖和横向取食危害,使树木韧皮部遭到环割,破坏了形成层细胞的输导能力。同时,小蠹携带的共生真菌菌丝在管胞细胞内和细胞间不断扩展,使树木管胞细胞的水分输导作用受到严重抑制和阻碍,从而导致健康华山松水分代谢紊乱,韧皮部含水量不断减少。

2.2 华山松大小蠹和共生真菌危害与华山松韧皮部营养物质含量的关系

由表 1 可以看出,华山松健康木韧皮部组织内还原糖、可溶性糖、淀粉和粗脂肪含量均最高,分别为(102.41±5.71),(32.27±2.54),(111.75±10.25)和(83.07±2.11) mg/g。各营养物质含量随小蠹的入侵和发育,呈明显下降趋势,其中在华山松新侵木阶段降幅最大,在枯立木阶段降至最低,分别降为(30.90±1.86),(22.14±1.47),(15.80±1.30)和(31.67±0.30) mg/g。这一方面主要是由于小蠹在华山松韧皮部、木质部间大量取食和繁殖,加之共生真菌蔓延,使得华山松的物质合成和代谢受阻,特别是光合作用产物的运输严重受阻,从而使华山松韧皮部碳水化合物等储备物减少;另一方面,小蠹和真菌的入侵危害,引起健康华山松树势衰弱、针叶失水枯萎脱落等,势必导致华山松光合能力逐步下降,进而引起碳水化合物合成和代谢发生变化,导致韧皮部营养物质含量降低。

蛋白质含量降低与植物衰老密切相关,也是逆境对植物的一种伤害。已有大量研究证实,逆境抑制蛋白质合成并诱导蛋白质降解,从而使植株体内的总蛋白质含量降低[12-13]。华山松健康木韧皮部可溶性蛋白质含量最高((158.45±8.14) mg/g),但随着华山松体内小蠹的入侵和发育,呈明显下降趋势,至枯立木阶段达到最低((38.5±2.55) mg/g),在新侵木阶段可溶性蛋白的递减幅度最大。

表 1 华山松在华山松大小蠹不同危害阶段韧皮部内营养物质含量变化

Table 1 Change of nutrient contents in the phloem of different attacking stages of *Pinus armandi* mg/g

阶段 Stages	还原糖含量 Reductive sugar	可溶性糖含量 Dissolved sugar	淀粉含量 Starch	可溶性蛋白质含量 Soluble protein	粗脂肪含量 Ether extract
健康木 Health trees	102.41±5.71 a	32.27±2.54 a	111.75±10.25 a	158.45±8.14 a	83.07±2.11 a
新侵木 Infesting trees	65.04±3.23 b	29.39±1.22 b	33.45±5.16 b	74.80±2.79 b	52.17±1.33 b
枯萎木 Weakening trees	38.02±4.08 c	23.52±1.83 b	19.45±7.78 b	41.71±3.25 c	39.70±1.08 c
枯立木 Withering trees	30.90±1.86 c	22.14±1.47 c	15.80±1.30 c	38.5±2.55 c	31.67±0.30 d

注:表中同列数据后标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下表同。

Note: Values with different small letters within the same column differ significantly ($P<0.05$). Same in the following tables

2.3 华山松大小蠹和共生真菌危害与华山松韧皮部氮、磷含量的关系

由图 2 可以看出,华山松从健康木至枯萎木阶段,其韧皮部内总磷含量有所下降,但各被害阶段差异不显著($P>0.05$);在枯立木阶段时,总磷含量明显减少($P<0.05$),并降至最低水平(0.642±0.01) mg/g。

图 3 表明,华山松健康木韧皮部内的总氮含量

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

最低((5.51±0.46) mg/g); 在华山松大小蠹和共生真菌危害初期(新侵木阶段), 韧皮部总氮含量明显升高, 达到(8.04±0.06) mg/g; 之后随着小蠹和真菌危害的加剧, 总氮含量又逐渐减少。Matthew 等[14]研究表明, 小蠹虫贮菌器携带入侵的真菌能提高受害木韧皮部的氮浓度; 在受到小蠹虫危害前, 韧皮部氮浓度均匀且相对于小蠹虫体内的氮浓度来说很低; 而在感染期间, 韧皮部的氮浓度全面升高。氮浓度的升高可能与树木受伤后的活性修补过程相关。树木在逆境条件下通过增加可溶性氮的合成, 直接参与其适应逆境的过程[14]。另外, 受害木韧皮部内总氮含量的升高, 也可能与小蠹的排泄物有关, 因小蠹排泄物、蛀屑等物质中氮浓度相对较高[14]。

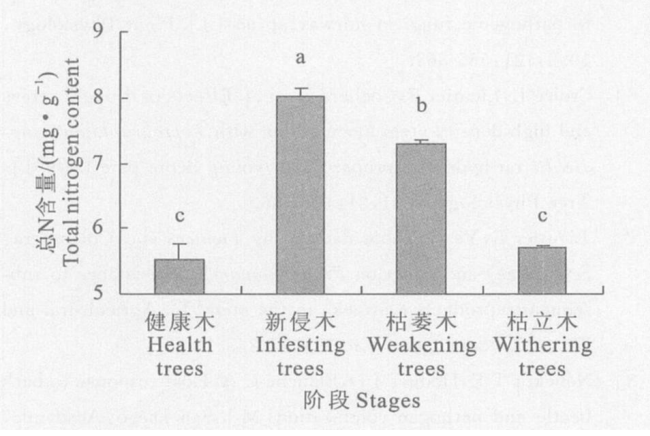

图 2　华山松大小蠹不同危害阶段华山松韧皮部总磷含量

Fig. 2　Total phosphorus content in the phloem of different stages of *Pinus armandi*

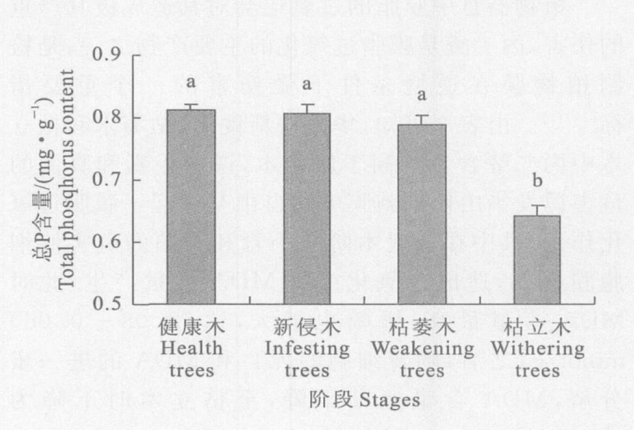

图 3　华山松大小蠹不同危害阶段华山松韧皮部总氮含量

Fig. 3　Total nitrogen content in the phloem of different stages of *Pinus armandi*

2.4　华山松大小蠹和共生真菌危害与华山松韧皮部酶代谢的关系

SOD 是植物细胞的保护酶之一, 主要清除超氧阴离子自由基 O_2^- 酶, 是防御细胞膜脂过氧化的主要酶, 与植物的抗逆性和抗衰老作用密切相关[15]。PPO 与植物的愈伤反应有密切关系, 能促进植物伤口的快速愈合, 还有抗病虫害侵染的功能, 与酚类物质代谢和植物抗病性有关[15-16]。苯丙烷代谢途径与植物的抗病反应密切相关, 类黄酮植保素、木质素以及多种次生酚类抗病物质都是通过苯丙烷代谢途径合成的。PAL 是苯丙烷代谢途径的第一个关键酶, 其活性与植物的抗病反应直接相关。有研究发现, 所有植物受病原菌侵染后, 其 PAL 活性均明显升高[16], 因此 PAL 活性常被用作植物抗病性的生化指标。

表 2　华山松在华山松大小蠹不同危害阶段韧皮部的酶活性和丙二醛含量变化

Table 2　Change of enzyme activities and MDA content in the phloem of different stages of *Pinus armandi*

阶段 Stage	SOD/ (U·g⁻¹·h⁻¹)	PAL/ (U·g⁻¹·h⁻¹)	PPO/ (mg·g⁻¹·min⁻¹)	MDA/ (mmol·g⁻¹)
健康木 Health trees	1 500.21±5.62 a	350.52±3.43 b	49.66±0.72 b	0.77±0.05 c
新侵木 Infesting trees	1 556.84±27.45 a	457.87±10.03 a	102.44±2.71 a	2.08±0.06 a
枯萎木 Weakening trees	1 418.90±7.08 b	355.94±0.17 b	44.67±3.74 b	1.58±0.11 b
枯立木 Withering trees	1 289.95±13.97c	269.41±6.23 c	15.93±1.91 c	0.93±0.03 c

由表 2 可以看出, 在华山松大小蠹和真菌危害的新侵木阶段, 华山松韧皮部抗性酶的活性显著升高(SOD 活性变化不太明显), 具有最高的 SOD、PAL 和 PPO 酶活性。随着华山松大小蠹入侵数量的增多和对树木危害的加剧, SOD、PAL 和 PPO 的活性又逐渐降低, 至枯立木时活性降至最低, 分别为(1 289.95±13.97) U/(g·h), (269.41±6.23) U/(g·h) 和(15.93±1.91) mg/(g·min)。这是因为华山松在遭受华山松大小蠹和真菌的入侵及危害后, 树体迅速产生愈伤组织, 并诱导 PPO、SOD 和 PAL 活性迅速提高, 以抵御华山松大小蠹和真菌对树木的进一步危害。但是, 随着华山松大小蠹入侵数

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

量的不断增加及其共生真菌在树木组织内的不断蔓延危害,华山松产生愈伤组织的能力逐渐衰弱,加之真菌分泌的漆型酚氧化酶使树木酚类物质代谢受到抑制,抗性系统遭到不断破坏,导致树木抗性酶合成能力降低,最终在枯立木阶段完全丧失抗性酶的活性。

植物器官中膜脂的过氧化会对其造成极其严重的伤害,丙二醛是膜脂过氧化的主要产物之一,是检测植物膜在逆境条件下受伤害的一个重要指标[13,17]。由表2可知,华山松新侵木、枯萎木和枯立木中丙二醛含量均高于健康木,说明小蠹和真菌的危害诱发华山松细胞膜中的自由基引起了膜脂过氧化作用,其中在新侵木阶段小蠹和真菌的危害使细胞膜损伤,造成过氧化产物MDA大量产生,此时MDA含量最高,增幅也最大,达(2.08±0.06) mmol/g;之后,随着细胞的死亡和MDA的进一步分解,MDA含量逐渐下降,至枯立木时下降为(0.93±0.03) mmol/g。

3 结 论

1) 华山松大小蠹在华山松树木组织内的大量取食和繁殖,造成华山松的物质合成和代谢紊乱或阻断,特别是树木光合作用产物的运输严重受阻,导致被害华山松韧皮部淀粉、糖、蛋白质等营养储备物不断减少,直至枯竭死亡。

2) 在华山松大小蠹和真菌入侵危害初期,寄主华山松产生诱导性抗性以抵御侵害,但随着危害的不断加剧,寄主树木的抗性物质合成和代谢功能不断减弱,导致华山松的防御能力逐渐衰退,最终丧失。这也说明了华山松被害致死的过程是树木抗性丧失的过程。

[参考文献]

[1] 陈 辉,袁 锋. 森林生态系统中昆虫与真菌的互惠互生[J]. 西北林学院学报, 2000, 15(2): 95-101.

[2] Paine T D, Raffa K F, Harrington T C. Interactions among scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers[J]. Annu Rev Entomol, 1997, 42: 179-206.

[3] Christiansen E, Waring R N, Berryman A A. Resistance of conifers to bark beetle attack: searching for general relationships[J]. Forest Ecology and Management, 1987, 22: 89-106.

[4] 陈 辉,袁 锋. 树木抗性与小蠹虫生存策略的进化[J]. 林业科学, 2002, 38(5): 147-151.

[5] Krokene P, Christiansen E, Solheim H, et al. Induced resistance to pathogenic fungi in norway spruce[J]. Plant Physiology, 1999, 121: 565-569.

[6] Croisé L, Lieutier F, Cochard H, et al. Effects of drought stress and high density stem inoculations with *Leptographium wingfieldii* on hydraulic properties of young Scots pine trees[J]. Tree Physiology, 2001, 21: 427-436.

[7] Lieutier F, Ye H. Shoot damage by *Tomicus* sp. (Coleoptera: Scolytidae) and effect on *Pinus yunnanensis* resistance to subsequent reproductive attacks in the stem[J]. Agricultural and Forest Entomology, 2003 (5): 227-233.

[8] Nebeker T E, Hodges J D, Blanche C A. Host response to bark beetle and pathogen colonization[M]. San Diego: Academic, 1993: 157-173.

[9] 高俊凤. 植物生理学实验技术[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2000: 145-148.

[10] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 156-161.

[11] Koukol J, Conn E E. The metabolism of aromatic and properties of the phenylalamine deaminase of *Hordeum vulgare*[J]. J Biol Chem, 1961, 236(10): 2692-2698.

[12] 魏良民. 几种旱生植物碳水化合物和蛋白质变化的研究[J]. 干旱地区研究, 1991, 8(4): 38-41.

[13] 朱秀红,郝绍菊,茹广欣,等. 干旱梯度下刺槐无性系生理指标的变化与品种抗旱性的关系[J]. 山东农业科学, 2006(2): 48-50.

[14] Matthew P A, Richard T W, Maria J L, et al. Nitrogen budgets of phloem-feeding bark beetles with and without symbiotic fungi[J]. Ecology, 2000, 81(8): 2198-2210.

[15] 刘 芮,强继业,马 佶. ^{60}Co-γ射线辐射对长寿花某些酶指标的影响[J]. 青海农林科技, 2006(2): 31-33.

[16] 张继澜. 植物生理学[M]. 西安: 世界图书出版社, 1999: 404.

[17] 张亚冰,刘崇怀,潘 兴,等. 盐胁迫下不同耐盐性葡萄砧木丙二醛和脯氨酸含量的变化[J]. 河南农业科学, 2006(4): 84-86.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net