

虫害挥发物对邻近枣树直接防御反应的激发作用

范艳玲, 李新岗, 韩 颖, 张学武

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】 **【目的】**研究自然条件下, 虫害枣树挥发物对邻近枣树直接防御反应的激发作用。**【方法】**以生长健壮、长势一致的枣树(*Ziziphus jujuba* Mill.) 和 3 龄枣镰翅小卷蛾(*Ancylis Sativa* Liu, 又名枣粘虫)为试验材料, 测试虫害枣树、邻近枣树及对照枣树叶片中蛋白酶抑制剂(Plant protease inhibitors, PI)、多酚氧化酶(Polyphenoloxidase, PPO)和脂氧合酶(Lipoxygenase, LOX)3 种直接防御酶活性的变化。**【结果】**枣树在受到枣镰翅小卷蛾幼虫危害 24 h 后, 虫害株和邻近株的 PI、PPO 和 LOX 3 种酶活性均显著高于对照株, 邻近株的 PI、PPO 和 LOX 活性分别较对照株高 11.93%, 19.91% 和 17.0%。枣镰翅小卷蛾幼虫危害 3 d 后, 虫害株和邻近株 3 种酶活性均显著高于对照株, 且邻近株 PI 活性呈曲折型下降, PPO 活性呈“W”形变化, LOX 活性则呈“N”形变化。从防御反应持续时间上看, 邻近株 PI 高活性(与对照株相比)可持续 5 d, PPO 和 LOX 高活性可持续 5 d 以上; 虫害株 3 种酶的高活性持续时间更长, 强度更大。**【结论】**虫害枣树挥发物激发了邻近枣树的直接防御反应, 显著提高了邻近株的防御水平, 防御状态持续时间在 5 d 以上。

【关键词】 虫害挥发物; 枣树; 防御反应; 激发作用

【中图分类号】 Q143⁺.3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)05-0106-05

Direct defense responses of healthy jujube primed by herbivore-induced plant volatiles

FAN Yan-ling, LI Xin-gang, HAN Ying, ZHANG Xue-wu

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** Priming of direct defense responses in neighboring unattacked jujube induced by herbivore-induced plant volatiles was determined in nature. **【Method】** Taking Jujubes (*Ziziphus jujuba* Mill.) and jujube armyworms (*Ancylis sativa* Liu) as materials, we mainly detected activities of three direct defense enzymes, plant protease inhibitor (PI), polyphenol oxidase (PPO) and lipoxygenase (LOX) in armyworm-attacked jujube and its nearby healthy plants. **【Result】** The results demonstrated that the activities of three direct defense enzymes in both attacked and neighboring jujubes were significantly increased after 24 h infested by armyworms, and the activities of PI, PPO and LOX in induced plant were 11.93%, 19.91% and 17.0% higher than control respectively. After infested for 3 days, the activities of the defense enzymes in both jujube trees also significantly increased in nature. And the changes of PI, PPO and LOX activity were wavelike over 5 days. The activity of PI lasted 5 days in induced jujube while those of PPO and LOX persisted more than 5 days in infested plants. **【Conclusion】** Herbivore-induced plant volatiles primed direct defense responses in nearby jujube, remarkably increased plant defenses which persisted more than 5 days.

* [收稿日期] 2009-10-02

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD01A1701); 农业部公益性行业专项(200803006)

[作者简介] 范艳玲(1983—), 女, 河南开封人, 在读硕士, 主要从事植物资源利用与保护研究。E-mail: yl5210202@163.com

[通信作者] 李新岗(1963—), 男, 陕西富平人, 教授, 博士生导师, 主要从事虫害诱导的植物防御研究。

E-mail: xingangle@nwsuaf.edu.cn

Key words: herbivore-induced plant volatile; jujube; defense response; priming

虫害挥发物(Herbivore-Induced Plant Volatiles, HIPVs)调节着植物与昆虫关系的多个方面,如诱导植物的直接防御和间接防御^[1-3]。虫害挥发物作为植物间的防御或报警信号,一直是现代生态学中最引人注目和最有争议的研究课题之一^[4-6]。Rhoades^[7]最早研究发现,损伤柳树(*Salix sitchensis*)和红桤木(*Alnus rubra*)的虫害挥发物,可增强邻近柳树和红桤木的抗虫性,影响天幕毛虫(*Malacosoma disstria*)幼虫的发育,并降低幼虫的质量。Baldwin等^[4]在研究虫害赤杨(*Populus* × *Euroamericana*)和糖槭(*Acer saccharum* March)时发现,虫害挥发物能够提高邻近树木的防御水平。随后20多年的研究结果均证明,虫害挥发物不仅能引起植物自身的防御反应,还可激发(prime)邻近植物的直接防御和间接防御反应^[6,8-11]。

植物遭受虫害后,产生的直接防御物质主要是抗消化蛋白(如蛋白酶抑制剂 Plant protease inhibitors, PI)、抗营养酶类(如多酚氧化酶 Polyphenol-oxidase, PPO)和一些毒素化合物。蛋白酶抑制剂(PI)作为抗消化酶类,能够与昆虫消化道内的蛋白消化酶形成复合物,阻断或削弱蛋白酶对食物中蛋白质的水解,从而使昆虫厌食或消化不良而致死;而多酚氧化酶(PPO)为抗营养酶类,植食性昆虫危害或外源茉莉酸甲酯(MJA)处理,均可增强植物组织中的PPO活性,降低植物组织的营养,PPO在植物细胞中可共价修饰昆虫消化蛋白并与之交连,降低昆虫中肠蛋白酶的水解能力^[12]。昆虫取食也可引起植物脂氧合酶(Lipoxygenase, LOX)、羟基过氧化氢酶(HPL)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)基因的表达和活性增加,其中LOX是十八烷途径中重要的酶,参与茉莉酸途径的启动^[13-14],而虫害诱导的植物PPO和LOX会加剧昆虫的营养不良^[15]。因此,本试验在研究虫害枣树对邻近植株直接防御反应的激发作用时,选择PI、PPO和LOX作为直接防御反应物质进行测试。

植物能够“偷听”(eavesdrop)到邻近虫害植物的“报警”信号(signal cascade),激活自身的防御系统^[6],但是许多科学家对植物间防御信号的普遍性仍存有怀疑,国内也未见该领域的研究报道。为此,本试验以田间枣树(*Ziziphus jujuba* Mill.)和枣镰翅小卷蛾(*Ancylis sativa* Liu, 又名枣粘虫)为对象,研究虫害枣树及其邻近植株中PI、PPO和LOX活

性的变化及持续时间,探讨自然条件下虫害枣树对邻近枣树直接防御反应的激发作用。

1 材料与方法

1.1 材料

供试枣树为无虫、长势一致的1年生枣树嫁接苗,砧木为酸枣实生苗,株高40 cm,株距50 cm。枣镰翅小卷蛾采自陕北清涧县某枣园,带回实验室在温度(28±1)℃(昼)/(18±1)℃(夜)、空气相对湿度85%的人工气候箱(江南仪器厂)中饲养,3龄时进行接虫试验。

主要仪器有UV-1700型紫外分光光度计、冷冻离心机(Sigma公司)、QC-1 B型气体采样仪(北京市劳动保护科学研究所)、硅胶管(北京市房山区黎明橡胶制品厂)、微波炉专用塑料袋(40 cm×50 cm)等。

1.2 田间试验处理及样品采集

1.2.1 枣镰翅小卷蛾幼虫危害24 h后枣树的防御反应 试验于2009-06在陕西杨凌示范区五泉镇毕公村红枣苗圃中进行。在同一种植行中依次选取3株生长健壮、长势一致的无虫幼苗,分别设为对照株、虫害株和邻近株,株距50 cm。将10头3龄枣镰翅小卷蛾幼虫饥饿24 h后转接到虫害株上取食,并用塑料袋套住该株,上下各留1个通气孔。24 h后移走塑料袋,将枣镰翅小卷蛾幼虫取下并清理虫粪,然后换干净的塑料袋分别套住该虫害株及邻近株,用硅胶管将二者连通,用气体采样仪将虫害株气体抽送到邻近株上,气泵流速100 mL/min(下同);为保持试验条件一致,对照株也用塑料袋罩住,并保证袋内空气自由流通。通气3 d后采集虫害株、邻近株和对照株的叶片,并立即放入液氮中,然后转入-70℃超低温冰箱保存。每处理重复3次。

1.2.2 枣镰翅小卷蛾幼虫危害3 d后枣树的防御反应 在田间苗圃同一种植行中选择生长健壮、长势一致的枣树幼苗18株,分为6组,每组3株,依次为对照株、虫害株和邻近株。为避免组间信号相互影响,组距保持5 m以上。将10头饥饿24 h的3龄枣镰翅小卷蛾幼虫接种到虫害株上取食3 d,取食期间用塑料袋罩住虫害株和邻近株,硅胶管连通,用气体采样仪将虫害株气体抽送到邻近株上。通气3 d后,将枣镰翅小卷蛾幼虫、塑料袋和硅胶管取下,清理虫粪,并于当天作为起始日开始采样。随后在自然条件下,于第1,2,3,4,5天采集虫害株、邻近株

和对照株叶片并立即放入液氮中,然后转入-70 ℃超低温冰箱保存。每处理重复 3 次。

1.3 测定项目及方法

枣树叶片中 PI 和 PPO 的活性参考桂连友等^[16]的方法测定。PI 活性在 406 nm 波长下测定,以每 g 鲜样每 min OD 值变化 1 为 1 个酶活性单位;PPO 活性在 460 nm 波长下测定,以每 g 鲜样每 min E_{460} 增加 0.1 为 1 个酶活性单位。LOX 活性参考 Grayburn 等^[17]的方法测定,取 0.25 g 叶片,加 1.5 mL pH 8.04 的磷酸缓冲液(含少量蔗糖)和 0.06 g PVPP 于液氮中研磨,4 000 r/min 离心 20 min,上清液即为酶液。以亚麻酸为底物,测定 234 nm 波长处的 OD 值,酶活性以每 g 鲜样每 min E_{234} 增加 0.1 为 1 个酶活性单位。

1.4 数据处理

试验数据用“平均值±标准差($A\pm SE$)”表示,

表 1 枣镰翅小卷蛾幼虫危害 24 h 后不同处理枣树 PI、PPO 和 LOX 活性的比较			
Table 1 Comparision of PI,PPO and LOX activities in herbivore-induced and neighboring jujubes 24 h after being damaged by lavare <i>A. sativa</i>			
U/(g·min)			
处理 Treatment	PI	PPO	LOX
对照株 Control	1.081±0.013	1.557±0.078	6.472±0.258
邻近株 Neighboring plant	1.210±0.055 *	1.867±0.101 *	7.572±0.301 *
虫害株 Infested plant	1.244±0.018 *	1.990±0.017 * *	9.272±0.087 * *

注:数据后标 * 或 * * 分别表示在 $P=0.05$ 或 $P=0.01$ 水平上与对照株差异显著或极显著。图 1~3 同。
Notes:Data with * or * * represent significant difference compared with control at 0.05 or 0.01 level respectively. The same as follows.

2.2 枣镰翅小卷蛾幼虫危害 3 d 后枣树 3 种酶活性的变化

2.2.1 PI 活性 图 1 显示,未接虫的对照株 PI 活性随时间变化不明显,而枣镰翅小卷蛾幼虫取食 3 d 后的虫害株和邻近株,PI 活性均显著升高。虫害后 5 d 内,虫害株的 PI 活性呈现波浪式变化,且 5 d 内始终与对照株差异显著;邻近株 PI 活性呈曲折型下降趋势,第 1 天 PI 活性极显著下降,第 2 天稍有升高,第 3 天又开始下降,第 5 天显著下降至对照株水平。从防御持续时间来看,邻近株较高水平的 PI 活性可持续 5 d,而虫害株较高水平的 PI 活性可持续 5 d 以上。

2.2.2 PPO 活性 图 2 显示,枣镰翅小卷蛾幼虫危害 3 d 后,虫害株和邻近株的 PPO 活性均明显高于对照株,且呈“W”形变化。虫害株 PPO 活性在第 2 天达到高峰(2.104 U/(g·min)),与对照株差异极显著,第 3~4 天迅速下降,第 5 天又逐渐升高。邻近株 PPO 活性也在第 2 天达到最高,与对照株差异极显著,第 3 天又显著下降,之后保持较高活性,并显著高于对照株。以上结果表明,虫害株和邻

用 SAS/ Win(v8)统计软件进行分析,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)比较不同处理间的差异显著性,用软件 Sigma Plot 10.0 做图。

2 结果与分析

2.1 枣镰翅小卷蛾幼虫危害 24 h 后枣树 3 种酶活性的变化

由表 1 可以看出,10 头 3 龄枣镰翅小卷蛾幼虫对虫害株取食 24 h 并与邻近株通气 3 d 后,虫害株和邻近株 PI、PPO、LOX 活性均明显增加,与对照株差异均达显著水平,其中虫害株的 PPO 和 LOX 活性与对照株差异达极显著水平,邻近株 PI、PPO、LOX 3 种酶活性分别比对照株高 11.93%,19.91%和 17.0%。表明虫害挥发物激发了邻近枣树的直接防御反应。

近株高水平的 PPO 活性持续时间均在 5 d 以上。

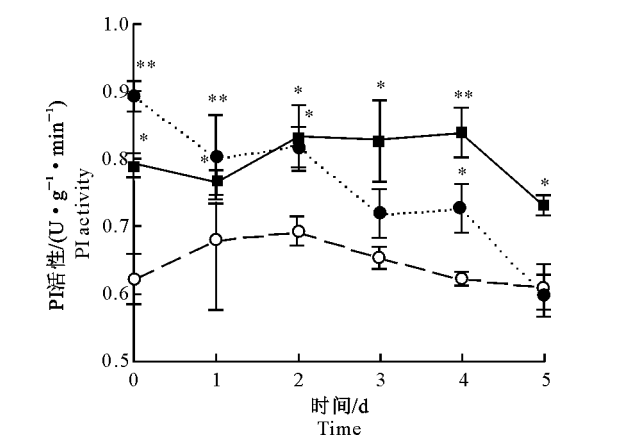


图 1 枣镰翅小卷蛾幼虫危害 3 d 后不同处理枣树 PI 活性的变化
--○-- 对照株;...●...邻近株;—■—虫害株
Fig.1 Dynamics of PI activities in herbivore-induced and neighboring jujubes after beingdamaged for 3 days by lavare *A. sativa*
--○-- Control; ...●...Neighboring plant; —■—Infested plant

2.2.3 LOX 活性 由图 3 可知,对照株 LOX 活性随时间的延长变化幅度不大,而枣镰翅小卷蛾幼虫危害 3 d 后,虫害株和邻近株 LOX 活性的变化趋势基本一致,均呈“N”形变化,但虫害株的 LOX 活性变化幅度更大。虫害株的 LOX 活性第 1~2 天显著升高,之后迅速下降,到第 4 天降到最低,第 5 天又

有所增加,其中第 2~5 天 LOX 活性均与对照株差异极显著。邻近株第 2 天 LOX 活性与对照株差异极显著,但第 3 天降至与对照株相近的水平,第 4~5 天略有增加,但与对照株差异不显著。这表明,虫害株和邻近株较高水平的 LOX 活性持续时间均在 5 d 以上,并且虫害株的 LOX 活性更高。

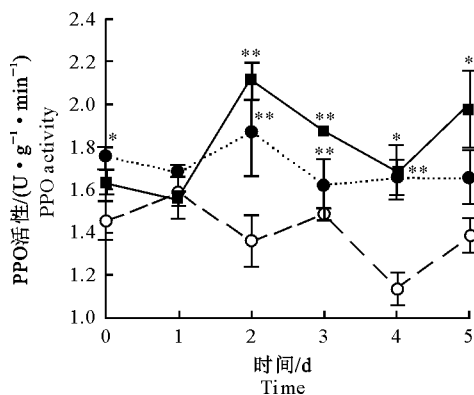


图 2 枣镰翅小卷蛾幼虫危害 3 d 后不同处理枣树 PPO 活性的变化
--○-- 对照株; ····●··· 邻近株; —■— 虫害株

Fig. 2 Dynamics of PPO activities in herbivore-induced and neighboring jujubes 3 days after being damaged by larvae *A. sativa*
--○-- Control; ····●··· Neighboring plant; —■— Infested plant

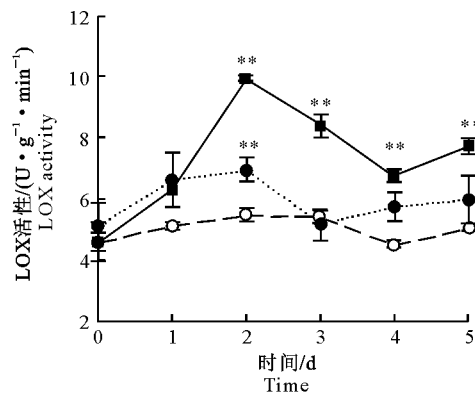


图 3 枣镰翅小卷蛾幼虫危害 3 d 后不同处理枣树 LOX 活性的变化
--○-- 对照株; ····●··· 邻近株; —■— 虫害株

Fig. 3 Dynamics of LOX activities in herbivore-induced and neighboring jujubes 3 days after being damaged by larvae *A. sativa*
--○-- Control; ····●··· Neighboring plant; —■— Infested plant

3 讨 论

激发(prime)一词最早是为阐明植物与病害互作关系而提出的^[18],是指以前的诱导刺激显著加速或加强了植物对后来病害防御的过程,这种防御可以降低植物防御(代谢)的成本。“激发”即准备防御。在植物防御中,激发作用(priming)是植物的一种生理过程,在此过程中,植物可以更加快速或活跃地应对后来害虫的危害^[11]。激发作用使植物获得的准备状态,称为“激发状态”(primed state)^[19-20],凡能预示植物可能面临的虫害信号,均能引起植物的激发作用。Ton 等^[9]研究发现,被斜纹夜蛾(*Spodoptera littoralis*)取食后,虫害玉米挥发物虽不能直接激活防御相关基因,但可以更早、更强地激发一连串的防御相关基因,并且斜纹夜蛾取食后释放的植物挥发物,可以激发邻近植株芳香类和萜类化合物的大量释放,且能够吸引天敌寄生蜂以达到间接防御的目的。本研究中,被枣镰翅小卷蛾幼虫危害后,邻近枣树体内 PI、PPO 和 LOX 3 种酶活性迅速增加,证明虫害株激发了邻近枣树的直接防御

反应,且这种防御反应主要是通过空气中的虫害枣树挥发物进行信号传导的,这与该领域多数研究结果一致^[4,8,9-11]。作为虫害挥发物(对邻近植物)作用的滞后效应(residual effect),激发状态还可持续一段时间^[11],这一现象过去称为“延迟诱导抗性”(delayed induced resistance)^[20]。本试验结果显示,邻近枣树的激发状态(防御反应)持续时间在 5 d 以上,而虫害枣树诱导防御持续的时间会更长,强度也更大。

本研究结果还显示,虫害株 PI 活性呈波浪式变化、而邻近株 PI 活性呈曲折型下降,PPO 活性呈“W”形变化,LOX 活性呈“N”形变化,推测植物用于防御的物质和能量是有限的,受害后植物的防御反应并不是持续的,而是以快速、间断的方式被调节,反映了植物防御反应的时空动态变化(Temporal and spatial dynamics)^[21]。

为了模拟自然条件,本试验采用循环通气的方法^[9-10],以免造成塑料袋内试验材料(枣树枝叶)释放的挥发物过量聚集^[22];而在枣镰翅小卷蛾连续虫害 3 d 的试验中,虫害枣树与邻近健康枣树通气结

束后,所有试验枣树恢复到自然状态,并连续采样 5 d,结果显示,在自然条件下,虫害枣树能激发邻近枣树 3 种直接防御酶的活性,使邻近枣树保持在激发状态。现已发现,引起邻近枣树直接防御反应的虫害挥发物主要是绿叶挥发物、萜类等(待发表资料),但关于枣镰翅小卷蛾不同危害程度对邻近枣树直接防御反应的影响,以及虫害挥发物的作用距离,还有待于进一步研究。

4 结 论

在田间条件下,枣镰翅小卷蛾幼虫危害后,虫害枣树及邻近株 PI、PPO 和 LOX 活性均显著增加,随着持续时间的推移,邻近株 PI 活性呈曲折型下降、PPO 活性呈“W”形变化,LOX 活性呈“N”形变化,邻近枣树体内的 3 种直接防御酶被显著激活,表明虫害枣树激发了邻近枣树的直接防御反应。从直接防御反应持续的时间看,邻近株 PI 的高活性可持续 5 d,而 PPO 和 LOX 的高活性持续时间长于 5 d;相比之下,虫害枣树 3 种酶的高活性持续时间更长,强度更大。

[参考文献]

[1] Turlings T C J, Tumlinson J H, Lewis W J. Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps [J]. *Science*, 1990, 250: 1251-1253.

[2] De Moraes C M, Mescher M C, Tumlinson J H. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females [J]. *Nature*, 2001, 410: 577-580.

[3] Kost C, Heil M. Increased availability of extrafloral nectar reduces herbivory in Lima bean plants (*Phaseolus lunatus*, Fabaceae) [J]. *Basic Appl Ecol*, 2005, 6: 237-248.

[4] Baldwin I T, Schultz J C. Rapid changes in tree leaf chemistry induced by damage: evidence for communication between plants [J]. *Science*, 1983, 221: 277-279.

[5] Farmer E E, Ryan C A. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 7713-7716.

[6] Baldwin I T, Halitschke R, Paschold A, et al. Volatile signaling in plant-plant interactions: “Talking Trees” in the genomics era [J]. *Science*, 2006, 311: 812-815.

[7] Rhoades D F, Hedin P A. Responses of alder and willow to attack by tent caterpillars and webworms: evidence for pheromonal sensitivity of willows [C]. *Plant resistance to insects*. Washington D C: American Chemical Society, 1983: 55-68.

[8] Engelberth J, Alborn H T, Schmelz E A, et al. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(6): 1721-1725.

[9] Ton J, D’Alessandro M, Jourdie V, et al. Priming by airborne signals boosts direct and indirect resistance in maize [J]. *Plant J*, 2006, 49: 16-26.

[10] Frost C J, Appel H M, Carlson J E, et al. Within-plant signaling via volatiles overcomes vascular constraints on systemic signalling and primes responses against herbivores [J]. *Ecology Letters*, 2007, 10: 490-498.

[11] Frost C J, Mescher M C, Carlson J E, et al. Plant defense priming against herbivores: Getting ready for a different battle [J]. *Plant Physiol*, 2008, 146: 818-824.

[12] 李新岗, 刘惠霞, 黄建. 虫害诱导植物防御的分子机理研究 [J]. *应用生态学报*, 2008, 19(4): 893-900.

Li X G, Liu H X, Huang J. Molecular mechanisms of insect pests-induced plant defense [J]. *Chin J Appl Eco*, 2008, 19(4): 893-900. (in Chinese)

[13] Tscharrantke T, Thiessen S, Dolch R, et al. Herbivory, induced resistance, and interplant signal transfer in *Alnus glutinosa* [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2001, 29(10): 1025-1047.

[14] Kessler A, Baldwin I T. Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2002, 53: 299-328.

[15] Felton G W. Indigestion is a plant’s best defense [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(52): 18771-18772.

[16] 桂连友, 陈宗懋, 刘树生. 外源茉莉酸甲酯处理茶树对茶尺蠖幼虫生长的影响 [J]. *中国农业科学*, 2005, 38(2): 302-307.

Gui L Y, Chen Z M, Liu S S. Effect of exogenous MJA treatment of tea plants on the growth of geometrid larvae [J]. *Chi Agri Sci*, 2005, 38(2): 302-307. (in Chinese)

[17] Grayburn W S, Schneider G R, Hamilton-Kemp T R, et al. Soybean leaves contain multiple lipooxygenases [J]. *Plant Physiol*, 1991, 95: 1214-1218.

[18] Conrath U, Pieterse C M J, Mauch-Mani B. Priming in plant-pathogen interactions [J]. *Trends Plant Sci*, 2002, 7: 210-216.

[19] Conrath U, Beckers G J M, Flors V, et al. Priming: getting ready for battle [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2006, 19: 1062-1071.

[20] Haukioja E. Induction of defenses in trees [J]. *Annu Rev Entomol*, 1990, 36: 25-42.

[21] De Bruxelles G L, Roberts M R. Signals regulating multiple responses to wounding and herbivores [J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2001, 20(5): 487-521.

[22] Preston C A, Laue G, Baldwin I T. Plant-plant signaling: Application of *trans*- or *cis*-methyl jasmonate equivalent to sagebrush releases does not elicit direct defenses in native tobacco [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2004, 30(11): 2193-2214.