

棉铃虫持续取食对棉花三种防御酶活性的作用^{*}

沙品洁 仝永凤 吕超 李秀霞 史雪岩^{**} 高希武

(中国农业大学农学与生物技术学院 北京 100193)

摘 要 昆虫取食作为一种关键的生物胁迫因子对棉花防御机制产生了重要影响。植物对昆虫取食产生的防御响应,在昆虫与植物的生态关系中具有重要作用。为了明确棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 取食与棉花防御性之间的动态互作关系,本文研究了棉铃虫持续取食下及停止取食后,棉花中3种防御相关酶活性变化的时间效应。在明确了棉花受损程度与棉铃虫取食时间关系的基础上,分别考察了棉铃虫持续取食2、6、12、18和24 h,对棉花中苯丙氨酸解氨酶(PAL)、脂氧合酶(LOX)和多酚氧化酶(PPO)活性的影响。针对棉铃虫持续取食棉叶12 h后停止取食,研究了去除虫害胁迫后0、6、12、24和36 h,棉花体内PAL、LOX、PPO活性的变化。结果表明:在棉铃虫持续取食棉叶24 h内,棉花中3种防御酶的活性响应有所不同,其中,棉铃虫持续取食2和6 h对棉花体内PAL活性没有产生显著影响,而持续取食12 h显著诱导了PAL活性,持续取食24和36 h,均极显著诱导了PAL活性;棉铃虫持续取食2、6、12、和18 h均显著诱导了棉花体内LOX活性,持续取食24 h极显著诱导了LOX活性;棉铃虫持续取食6 h极显著诱导了棉花体内PPO活性,持续取食24 h显著诱导了PPO活性。棉铃虫取食12 h后停止取食,在去除虫害胁迫后0、6、12、24和36 h,棉花体内PAL活性均显著升高;而LOX活性则呈现出先升高后恢复正常的现象;PPO活性开始无变化,但在胁迫去除后12和24 h显著增高,到36 h恢复正常。可见,棉花体内PAL、LOX和PPO活性对棉铃虫取食产生的防御响应,与其受虫害持续取食胁迫时间的增长呈正相关,随着取食时间和受危害的程度加大而升高。并且,在虫害胁迫去除后的一定时间内,棉花体内PAL、LOX和PPO活性依然会保持较高的活性状态,而同等程度机械损伤后的棉叶内PAL、LOX、PPO活性均没有发生显著性变化。说明棉花对于棉铃虫取食胁迫的防御与棉花生理生化性质的改变有关,且具有持续性。

关键词 昆虫取食, 棉花防御, 苯丙氨酸解氨酶, 脂氧合酶, 多酚氧化酶

The effects of *Helicoverpa armigera* herbivory on the activity of phenylalanine ammonia-lyase, lipoxygenase and polyphenol oxidase in cotton seedling leaves

SHA Pin-Jie QI Yong-Feng LV Chao LI Xiu-Xia SHI Xue-Yan^{**} GAO Xi-Wu

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract Defense-related enzymes of cotton are greatly influenced by various environmental stresses, including insect herbivory. The defense response to insect herbivory plays an important part in the ecological relationship between insects and plants. In order to explore the dynamic interaction between plant defense and *Helicoverpa armigera* herbivory, the effect of *H. armigera* herbivory and the cessation of herbivory on the activity of three defense related enzymes in cotton seedlings was investigated. Changes in the activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL), lipoxygenase (LOX) and polyphenol oxidase (PPO) in the leaves of cotton seedlings were measured after these had been fed on by *H. armigera* for 2, 6, 12, 18 and 24 hours. Changes in PAL, LOX, and PPO activity were measured after removing *H. armigera* that had been feeding for 12 hours. The results indicate that the three enzymes responded differently to *H. armigera* herbivory. After 2 h and 6 h, PAL activity had not changed significantly but this increased markedly after 12, 18 and 24 h. LOX activity increased significantly after 2, 6, 12, 18 and 24 h, and PPO activity increased after 6 and 24 h. After removing *H. armigera* that had been feeding for 12, PAL activity increased until 36 h, whereas LOX activity increased until 24 h

^{*} 资助项目:公益性行业(农业)科研专项(200903033)。

^{**} 通讯作者, E-mail: shixueyan@cau.edu.cn

收稿日期:2012-01-19,接受日期:2012-02-29

then returned to normal. PPO activity increased only at 12 h and 24 h. There was a positive correlation between changes in PAL, LOX and PPO activity in cotton seedling leaves and the duration of feeding by *H. armigera*. The activities of the three defense related enzymes also increased after removing *H. armigera*. In contrast, mechanical injury of leaves did not induce change in the activity of the three defense related enzymes comparing to the untreated control. This suggests that the activities of the three defense related enzymes were influenced by insect herbivory, and that this may change the physiological and biochemical properties of cotton leaves.

Key words *Helicoverpa armigera* herbivory, plant defense, phenylalanine ammonia-lyase, lipoxygenases, polyphenol oxidase

昆虫与植物的关系,构成了生态系统中最重要生态学关系(钦俊德,1980)。在植食性昆虫与植物的协同进化中,植物会产生一系列的直接防御和间接防御反应来抵御昆虫的危害(钦俊德和王琛柱,2001;秦秋菊和高希武,2005;Piesik *et al.*, 2011)。其中昆虫取食和机械损伤可以诱导植物体内多种防御相关酶及抗氧化酶活性的变化(Tscharntke *et al.*, 2001;Kessler and Baldwin, 2002),如苯丙氨酸解氨酶(PAL)、脂氧合酶(LOX)、多酚氧化酶(PPO)等。1961年,Koukol和Conn首次从绿色植物中发现苯丙氨酸解氨酶,随着对苯丙氨酸解氨酶的深入研究,人们了解到PAL是连接生物初级代谢和苯丙烷类代谢、催化苯丙烷类代谢的关键酶和限速酶,其形成的诸多苯丙烷类次生代谢物质,如香豆酸、阿魏酸、芥子酸、黄酮、异黄酮、木质素、生物碱、苯甲酸酯糖苷等,均在植物生长发育以及抗虫性方面发挥重要作用(Jones, 1984; Morkunasa *et al.*, 2011)。滕涛等(2007)发现松材线虫侵染使PAL活性先增加后下降,松树内酚类物质的积累也与PAL活性升高有关。Su等(2011)研究了机械损伤对成熟苹果中 H_2O_2 、PAL、SOD、CAT及POD活性的影响,结果表明:机械损伤在短时间之内诱导了这些防御相关酶活性的增加,诱导程度与收获时间密切相关。脂氧合酶(lipoxygenase, linoleate oxygen oxidoreductas, LOX, EC 1.13.11.12)是植物中一种含非血红素铁蛋白的氧合酶,催化不饱和脂肪酸的加氧反应,形成创伤激素与茉莉酸。其中,创伤激素参与植物对伤害的反应(Hwang and Hwang, 2010),而茉莉酸及其甲酯是种子萌发、植物生长、发育、衰老和抗性物质转化过程以及植物遭受机械损伤或植食性昆虫为害后产生防御反应的信号物质(Bell and Mullet, 1993; Heitz *et al.*, 1997; Xue and Zhang, 2007)。JA产生的具有挥发

性作用的茉莉酮可以在植物间传递信号以抵制食草动物的侵害并吸引食草动物的天敌从而起到间接防御的作用(李清清等,2010)。

植物在遭受水分、温度、农药等逆境胁迫时,细胞中会产生大量的活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS),这些活性氧会直接或间接启动膜脂的过氧化作用,导致膜的损伤和破坏,从而对植物造成伤害,严重时会导致植物细胞死亡。为减轻活性氧的伤害作用,植物中进化了多种活性氧清除的酶促系统和非酶促系统,使植物体内的活性氧代谢处于正常的动态平衡状态(Agarwal and Pandey, 2004; Agarwal, 2007)。植物体内的活性氧代谢酶主要有多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、过氧化物酶(POD)等。其中,多酚氧化酶是自然界中分布极广的一种金属蛋白酶,催化酚类物质氧化为更具有毒性的醌类物质,从而降低昆虫的可食性(Felton *et al.*, 1989),对植物起到保护作用。

目前有许多研究考察了植物对昆虫取食的防御响应,其中对于昆虫取食达到一定程度之后,植物体内防御相关酶的时间变化动态有较多报道。胡增辉等(2009)研究发现,经杨扇舟蛾幼虫取食后,合作杨的受损叶及邻近叶中PAL、LOX、PPO的活性在0.5、2、6 h后均显著高于对照。秦秋菊和高希武(2005)报道棉蚜取食24、48和72 h后,棉叶中LOX活性显著高于对照。Felton等(1994)研究了棉铃虫取食对大豆叶片LOX的影响,发现经棉铃虫取食72 h后,大豆叶片中脂氧合酶的活性在pH 7.0和pH 8.5时显著高于对照。

但目前,对于昆虫在植物上取食程度的时间动态,及其与相应的植物防御相关酶活性变化的关系,以及在昆虫取食胁迫去除后,植物防御相关酶活性的时间变化动态均没有详细的研究报道。

植物对昆虫取食产生的防御响应,在昆虫与植物的生态关系中具有重要作用。为了明确棉铃虫取食与棉花防御性之间的动态互作关系,本文选用 PAL、LOX、PPO 3 种植物防御相关酶为考察指标,研究了棉铃虫持续取食下及停止取食后,棉花中 3 种防御相关酶活性变化的时间效应。

因此,本文系统研究了棉铃虫持续取食棉叶 24 h 的时间范围内,昆虫对棉叶取食程度的时间动态,以及棉叶中 3 种防御相关酶活性的相应变化,同时,还研究了棉铃虫持续取食棉叶 12 h 后,去除棉铃虫取食胁迫,棉花防御相关酶在取食胁迫去除后 36 h 内的活性变化动态。通过研究,掌握了棉花在应对不同程度的昆虫取食(持续取食 2、6、12、18 及 24 h)造成的胁迫下,防御酶的变化动态,以及取食 12 h 后,防御酶的恢复动态。为明确昆虫与植物相互作用的动态关系提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试棉花:中棉 35,由中国农业大学昆虫毒理实验室提供,于中国农业大学科学园温室种植,待长至四片真叶期用于实验。

供试昆虫:棉铃虫由中国农业大学昆虫毒理实验室提供,饲养条件为温度 26~27℃,相对湿度 75%,取 5 龄棉铃虫用于实验。

试验药剂:聚乙烯吡咯烷酮(PVPP,北京欣经生物技术有限公司);乙二胺四乙酸二钠(EDTA- Na_2 ,北京化工厂);考马斯亮蓝 G-250(Fluka 公司进口,上海化学试剂公司分装);牛血清白蛋白(BSA,南京生兴生物公司);L-苯丙氨酸(L-phenylalanine,国药集团化学试剂有限公司);反式肉桂酸标准品(trans-Cinnamic acid,上海贺宝化工有限公司);乙腈(色谱纯,Fisher 公司);重蒸水;亚油酸(Sigma 公司);邻苯二酚(catechol,国药集团化学试剂有限公司)。

实验仪器:高效液相色谱仪(美国安捷伦 1100 型,Agilent 公司);紫外分光光度计(日本岛津 UV 2550 型,Shimadzu 公司);高速离心机(日立 CR-22E 型)。

1.2 实验方法

1.2.1 棉花处理 棉铃虫对棉叶的取食程度实验:将饥饿 8 h 的 5 龄棉铃虫置于长势一致,同一

位置的叶片(第 3 片真叶)上,并进行套袋处理固定棉铃虫的取食范围,考察棉铃虫对棉叶的取食程度。于取食 2、4、6、9、12、15 和 24 h 时,记录被取食的叶片面积。取食程度用边长 2 cm 的正方形小方格的数目表示。

棉铃虫持续取食棉叶,对棉叶中防御相关酶活性的影响:用饥饿 8 h 的 5 龄棉铃虫分别持续取食棉花叶片(第 3 片真叶)2、6、12、18 及 24 h,并于取食后立即收集被取食的棉叶,用于测定棉叶中 PAL、LOX、PPO 的活性变化。

去除棉铃虫取食胁迫后,棉叶中防御相关酶活性的变化:用饥饿 8 h 的 5 龄棉铃虫取食棉花 12 h 后,除去棉铃虫,并于去除虫害胁迫后 0、6、12、24 及 36 h 分别考察受伤棉花叶片中 PAL、LOX、PPO 的活性。

机械损伤对棉叶防御相关酶活性的影响:用灭菌的枪头($D=3\text{ mm}$)在健康的棉花叶片(第 3 片真叶)上仿棉铃虫取食状打孔,使受害面积达到 35%(与棉铃虫取食叶片 12 h 的危害面积一致),考察受伤棉叶 36 h 内防御相关酶活性的变化。

上述实验均采用同期长势一致、同一位置的健康棉叶作为对照。实验设 3 次重复。

1.2.2 酶液提取 苯丙氨酸解氨酶酶液的提取与测定方法。参照 Koukol 和 Conn(1961)的方法。取棉花叶片 1 g 在液氮中研磨,加 0.1 g PVPP 和 4 mL 0.05 mol/L pH 8.8 的硼酸缓冲液(含 20 mmol/L β -巯基乙醇和 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟 PMSF),4℃ 下 12 000 g 离心 30 min,取上清液作为酶液待测。3 mL 反应体系含 0.05 mol/L pH 8.8 硼酸缓冲液,0.02 mol/L L-苯丙氨酸和酶液。空白对照不加 L-苯丙氨酸(由缓冲液代替)。30℃ 水浴 1 h,100 μL 6 mol/L HCl 终止反应,反应液用 HPLC 测定。

脂氧合酶和多酚氧化酶酶液提取方法。参照 Hatton 等(1996)的方法。取棉花叶片 1 g 在液氮中研磨,加 0.1 g PVPP 和 3 mL 0.05 mol/L pH 7.5 的磷酸缓冲液(含 0.1 mmol/L EDTA- Na_2),4℃ 10 000 g 离心 30 min,取上清液作为酶液待测。

1.2.3 酶活性测定 苯丙氨酸解氨酶酶活性测定。用 HPLC 法测定反应液中反式肉桂酸含量,参照 Ferrarese 等(1987)方法,稍加改进。液相色谱条件:

色谱柱:Agilent eclipse XDB-C18, 4.6 mm

ID × 150 mm (5 μm); 检测器: 二极管阵列检测器 (DAD); 流动相: 乙腈: 水 (43:57); 柱温: 30℃; 波长: 275 nm; 流速: 0.5 mL/min; 进样量: 20 μL。

脂氧合酶比活力测定。参照 Qin 等 (2005) 的方法, 稍加改进。反应缓冲液为 pH 3.5 的甘氨酸-盐酸缓冲液。底物配制和活性测定参考 Axelord 等 (1981) 方法。(亚油酸钠配制方法: 称取 70 mg 亚油酸, 与等质量的吐温 20 混合, 加入 4 mL 无氧蒸馏水并混匀避免产生气泡。逐滴加入 0.5 mol/L 的氢氧化钠直至溶液变为澄清, 定容至 25 mL, 分装保存于 -80℃。) 反应体系包括 pH 3.5 的甘氨酸-盐酸缓冲液 950 μL, 亚油酸钠 50 μL, 加入稀释 10 倍的酶液 100 μL 后, 于波长 234 nm ($\epsilon = 25\,000\text{ L}/\text{mmol}\cdot\text{cm}$) 处, 用时间驱动程序监测其吸光值在 2 min 内的变化。

多酚氧化酶比活力测定。参照 Sugumaran 和 Nellaippan (2000) 方法, 稍加改进。反应体系含 0.05 mol/L pH 5.9 磷酸缓冲液 (含 1 mmol/L EDTA- Na_2), 5 mmol/L 邻苯二酚, 加入酶提取液

后于 420 nm 波长处, 用时间驱动程序自动监测其吸光值在 2 min 内的变化。

以上 3 种酶每次重复平行测定 3 次。

1.2.4 蛋白含量测定 参照 Bradford (1976) 考马斯亮蓝 G-250 方法。以牛血清白蛋白作标准曲线, 计算酶液中蛋白质含量。

1.2.5 数据统计方法 计算所得酶活性值用 GraphPad Instat 3.00 数据处理软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 棉铃虫对棉叶的取食程度与取食时间的关系

由表 1 可知, 随着取食时间的增长, 棉铃虫对棉叶的取食程度也逐渐增加, 其中在取食 6 h 时, 取食面积达到叶片总面积的 10% 左右, 取食 12 h, 取食面积达到总面积的 1/3, 取食 24 h, 取食面积已超过叶片总面积的一半。

表 1 取食 24 h 内棉铃虫对棉叶的取食程度

Table 1 The damage degree of cotton leaves feeding by *Helicoverpa armigera* within 24 h

	取食时间 Feeding time(h)						
	2	4	6	9	12	15	24
取食叶片面积 (2 mm 方格数) Feeding area (number of 2 mm grid)	16.3	34.4	74.8	151.13	268.54	318.33	497.45
取食面积占叶片面积的百分比 (%) Feeding area accounts for the percentage of leaf area (%)	2.08	4.42	9.64	19.76	35.07	42.35	65.71

2.2 棉铃虫持续取食对棉花 PAL、LOX、PPO 活性的影响

用饥饿 8 h 的 5 龄棉铃虫分别取食棉花叶片 2、6、12、18 及 24 h, 并于取食后立即采摘棉叶, 用于测定受损棉叶中的 PAL、LOX、PPO 活性, 结果见图 1。

由图 1 可知, 与正常未受虫害损伤的棉叶相比, 在棉铃虫持续取食棉叶 2 及 6 h 时, 受伤棉花叶片中 PAL 活性均未发生显著性变化, 棉铃虫持续取食棉叶 12 h, 显著诱导了棉花叶片中 PAL 的活性 ($P < 0.05$), 随着持续取食时间增长到 18 和 24 h, 棉花叶片中 PAL 的活性极显著增加 ($P < 0.01$)。

棉铃虫持续取食 2、6、12 和 18 h 时, 受损棉叶

中的 LOX 活性均显著高于对照 ($P < 0.05$), 而棉铃虫持续取食棉叶 24 h, 极显著诱导了棉花叶片中 LOX 的活性 ($P < 0.01$); 棉铃虫持续取食棉叶 6 h, 极显著诱导了棉花叶片 PPO 的活性 ($P < 0.01$), 并且在棉铃虫持续取食棉叶 24 h 时, 棉叶中 PPO 的活性也显著高于对照叶片中的 PPO 活性 ($P < 0.05$)。但是, 在棉铃虫持续取食棉叶 2、12 和 18 h 时, 棉花叶片中的 PPO 活性均未产生明显变化。

2.3 棉铃虫取食 12 h 后停止取食, 考察虫害胁迫去除后 36 h 内, 棉花叶片 PAL、LOX、PPO 活性的变化

用饥饿 8 h 后的 5 龄棉铃虫取食棉花叶片 12 h, 去除棉铃虫, 并于去除虫害胁迫后 0、6、12、24

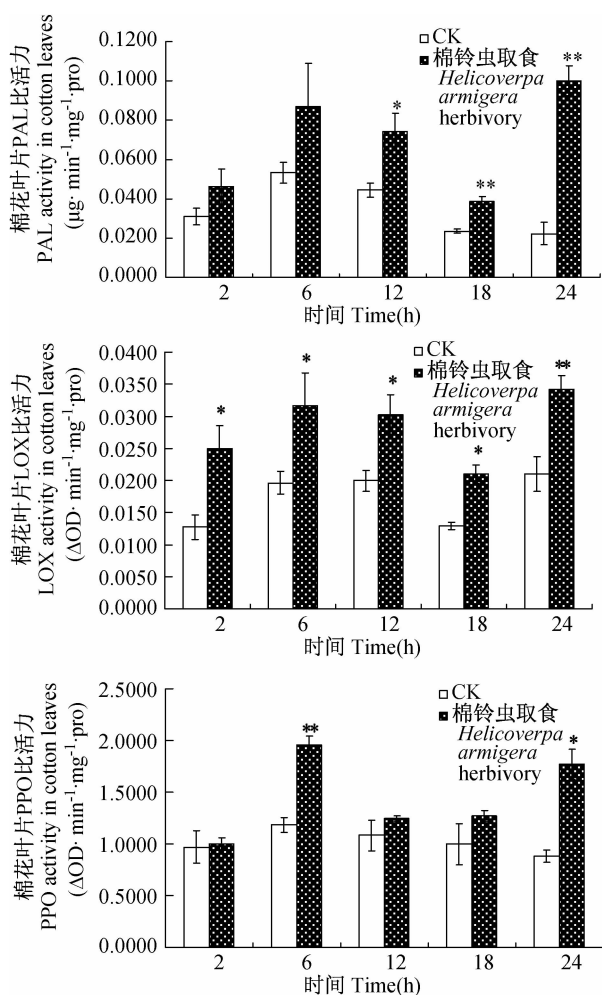


图1 棉铃虫持续取食对棉花 PAL、LOX、PPO 活性的影响

Fig.1 The activities of PAL, LOX, PPO in *Helicoverpa armigera* herbivore-wounded cotton seedlings leaves

注: * 表示 t -检验差异显著 ($P < 0.05$);

**表示 t -检验差异极显著 ($P < 0.01$)。下同。

Histograms with * indicate significantly different at 0.05 level by t -test, ** indicate extremely significantly different at 0.01 level by t -test. The same below.

和 36 h 考察棉叶中的 PAL、LOX、PPO 活性, 结果见图 2。

图 2 表明, 棉铃虫持续取食棉叶 12 h 后停止取食, 在虫害胁迫去除后 24 h 内, 棉花受损叶片 PAL 活性均显著高于对照 ($P < 0.05$), 并且, 在去除虫害胁迫 36 h 时, 受损叶片中 PAL 活性仍极显著高于对照 ($P < 0.01$); 对于受损棉花叶片 LOX 活性, 在去除虫害胁迫后 24 h 内, 仍显著高于对照 ($P < 0.05$), 但在去除胁迫后 36 h 时, 棉花叶片

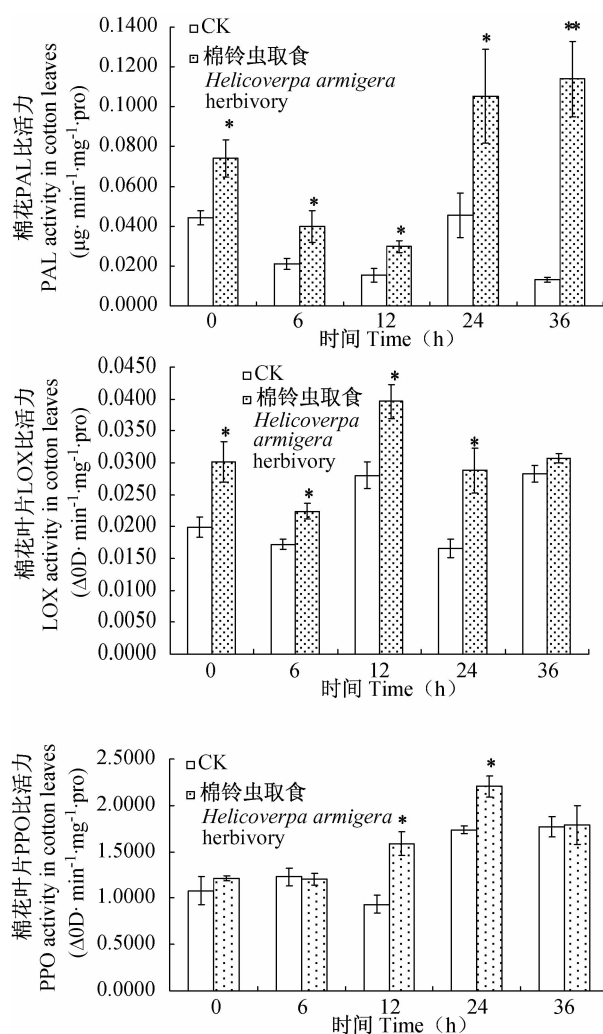


图2 棉铃虫取食 12 h 后停止取食, 在去除虫害胁迫后 36 h 内, 棉叶 PAL、LOX、PPO 活性的变化
Fig.2 The activities of PAL, LOX, PPO in cotton seedlings leaves during 36 h after *Helicoverpa armigera* herbivory for 12 h

LOX 活性与对照相比没有显著差异; 受损棉花叶片中 PPO 活性, 在去除虫害胁迫后 6 h 内与对照相比没有显著差异, 但是在去除虫害后 12 和 24 h 时, 棉花叶片内 PPO 活性显著高于对照 ($P < 0.05$), 在去除虫害胁迫后 36 h 时, 棉花叶片内 PAL 与对照相比不再有显著性差异。

2.4 机械损伤后, 棉花叶片 PAL、LOX、PPO 活性的变化

用灭菌的枪头 ($D = 3 \text{ mm}$) 在健康的棉花叶片上仿棉铃虫取食状打孔, 使受害面积达到 35% (与棉铃虫取食棉叶 12 h 所造成的损伤程度接近), 并于机械损伤后 0、6、12、24 和 36 h, 分别考察机械

损伤的棉叶中 PAL、LOX、PPO 活性,结果见图 3。

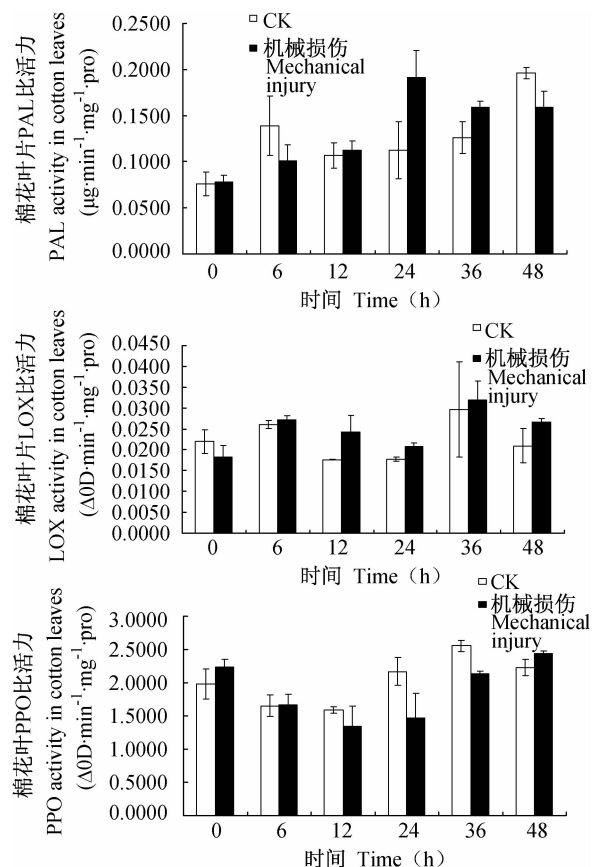


图 3 机械损伤对棉叶 PAL、LOX、PPO 活性的影响

Fig. 3 Effect of mechanical injury on activities of PAL, LOX, PPO in cotton seedlings leaves

图 3 表明,由机械损伤造成 35% 棉叶面积受损后,在 36 h 内,机械损伤的棉花叶片中 PAL、LOX、PPO 活性与对照相比均没有显著性差异。

3 讨论

本研究首先考察了棉叶受损程度与棉铃虫持续取食时间的动态关系。表 1 的结果表明,棉铃虫对棉叶的取食伤害程度与取食时间呈正相关,其中在棉铃虫持续取食棉叶 12 h 时,棉叶受损面积达叶片面积的 35% 左右,在持续取食 24 h 时,受损面积已达叶片面积的 65% 左右。在此基础上进一步研究了不同受损程度的叶片中防御相关酶活性的变化。

图 1~3 的结果表明,与健康棉叶相比,随着棉铃虫取食时间和取食程度的增加,受损棉叶中 3 种防御相关酶的活性发生了一定变化。其中棉叶 PAL 活性在棉铃虫持续取食棉叶 2 和 6 h 时,没有

发生显著变化,但在棉铃虫持续取食叶片 12 和 24 h 时,受损叶片的 PAL 活性显著增加;而受损棉叶中 LOX 活性,在棉铃虫取食棉叶 2 h 时就显著高于对照,并且在棉铃虫持续取食棉叶的 24 h 内,受损棉叶中 LOX 活性均显著高于正常叶片中 LOX 活性;棉叶中 PPO 活性仅在棉铃虫取食棉叶 6 和 24 h 时,明显增加,在其余取食时间,棉叶 PPO 则未发生显著变化。可见,棉叶中 LOX 活性变化与棉铃虫取食胁迫密切相关,对棉铃虫的取食伤害,受损棉叶中 LOX 活性响应迅速并敏感。而棉叶 PAL 活性对棉铃虫取食伤害的响应,则与棉铃虫取食程度,即棉叶的受损程度有关;PPO 活性则容易受多种因素的影响,变化无规律性。其中,在棉铃虫持续取食棉叶 12、24 及 36 h 时,亦即棉叶受损面积达到叶片面积的三分之一以上时(表 1,图 1),受损棉叶中 PAL 活性,才显著高于对照;而棉叶 PPO 活性,在棉铃虫取食程度达到十分之一时,即显著被诱导,随后不再变化,在受损 24 h 时,又再次增加。

针对棉铃虫持续取食棉叶 12 h 时,已经显著诱导了棉叶中 3 种防御酶活性的现象,继续考察了棉铃虫取食棉叶 12 h 后停止取食,在虫害胁迫去除后 36 h 内,棉叶中 3 种防御相关酶活性的变化。图 2 的结果表明,去除虫害胁迫后,棉铃虫取食对棉叶中 3 种防御相关酶活性的影响可以持续一定时间,其中,棉叶中 PAL 活性在虫害胁迫去除后的 0 至 24 h 内,仍然显著高于对照,在 36 h 时,极显著高于对照;LOX 活性在胁迫去除后 24 h 内也显著高于对照,但在胁迫去除后 36 h 时,LOX 活性恢复至正常状态;PPO 活性在虫害胁迫去除后的 36 h 内,呈现出先增加后稳定的趋势。可见,在虫害胁迫去除后,棉叶中 3 种防御酶活性的恢复趋势有所不同,这应与这 3 种防御酶对虫害的响应与防御机制不同有关。

PAL 的活性变化缓慢且稳定,应与其在植物次生物质的合成中的作用有关,一旦产生,恢复缓慢。烟草受烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)侵染(Legrand *et al.*, 1976)、小麦受白粉病菌侵染(Green *et al.*, 1975)后,PAL 活性均提高,并出现木质素的积累。当用 PAL 抑制剂 L-2-氨基基-3-苯丙酸和 α -氨基基-乙酸处理植物幼苗,植物体内植保素合成和累积受到抑制(Moesta and Grisebach, 1982)。LOX 反应灵敏迅速,应与其具

有一定的防御信号功能有关,在植物受伤后,传递信号及挥发物质,调动防御。Snoeren 等(2011)研究了菜粉蝶取食诱导拟南芥的防御反应,结果显示,茉莉酸途径是昆虫取食诱导的植物主要的信号转导途径,它调控植物防御相关基因 LOX2 基因、OPR3 基因、ACX1 基因和 PAL1 基因的表达。PPO 的活性呈波动性变化,很不稳定,应与其容易受到多种因素的影响,容易恢复等有关。

此外,棉叶中 3 种防御酶活性对于昆虫取食的响应及恢复趋势不同,还应与植物能量的分配,即用于生长还是用于防御有关。每一种防御酶的变化需要消耗能量,耗能大的变化大,反应缓慢;易变易恢复的,响应迅速。

本文针对棉铃虫取食棉叶 12 h 后,以及类似损害程度的机械损伤后,棉叶中 3 种防御酶活性的变化进行比较研究,发现棉铃虫取食棉叶 12 h 后,在 36 h 内均可以显著诱导棉叶中 3 种防御酶的活性增加,而同等程度机械损伤的棉叶,在受伤后 48 h 内,3 种防御酶的活性均没有发生显著变化,说明棉叶中 3 种防御酶对棉铃虫取食的响应更为敏感,这可能与棉铃虫分泌的唾液中具有有一些生物活性物质,引起了棉花体内相关生理生化反应,并最终导致 3 种防御相关酶活性的增加有关(Miles, 1998, 1999)。Mccloud 和 Baldwin (1997)研究表明,植物对植食性昆虫的识别起始于昆虫唾液中的特异性激发子,特异性激发子诱导植物体内产生特异的信号传递,诱导防御基因的表达,引起植物体内有毒代谢产物和防御蛋白的积累。但 Stodolak 等(2003)研究发现,胡萝卜会合成酚类物质以应对机械损伤,并且机械损伤后,胡萝卜 PAL 活性也显著增加。而在本研究中发现,同等程度的机械损伤未能引起棉花防御相关酶的变化,这可能与植物种类、植物的受损程度等均有关。

通过系统研究棉铃虫取食程度及取食之后对棉花防御相关酶活性的影响,发现棉叶 PAL、LOX、PPO 活性的变化与昆虫对棉叶的取食程度密切相关,并且在昆虫取食胁迫去除后的一段时间内,3 种防御酶的活性仍可以持续一段时间。这对于明确昆虫与植物相互作用的动态关系,具有一定的价值。但本研究未涉及昆虫取食后,叶片内植物次生物质的变化,因此,对于虫害胁迫后,植物的抗虫性还有待进一步考察。同时,虫害胁迫下,受

损叶片对邻近健康的叶片信号传递以及植物间的信号传递也有待进一步研究。

参考文献 (References)

- Agarwal S, 2007. Increased antioxidant activity in *Cassia* seedlings under UV-B radiation. *Biol. Plantarum*, 51(1): 157—160.
- Agarwal S, Pandey V, 2004. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Biol. Plantarum*, 48(4): 555—560.
- Axelrod B, Cheesbrough TM, Laakso S, 1981. Lipoxygenase from soybeans. *Method. Enzymol.*, 7: 411—451.
- Bell E, Mullet JE, 1993. Characterization of an *Arabidopsis* lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiol.*, 103(4): 1133—1137.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of proteindye binding. *Anal. Biochem.*, 72(1/2): 248—254.
- Felton GW, Bi JL, Summers CB, Mueller AJ, Duffey SS, 1994. Potential role of lipoxygenases in defense against insect herbivory. *J. Chem. Ecol.*, 20(3): 651—666.
- Felton GW, Donato K, Del Vecchio RJ, Duffey SS, 1989. Activation of plant foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. *J. Chem. Ecol.*, 22(15): 2667—2694.
- Ferrarese MLL, Rodrigues JD, Ferrarese-Filho O, 1987. Phenylalanine ammonia-lyase activity in soybean roots extract measured by reverse-phase high performance liquid chromatography. *Plant Biol.*, 2(2): 152—153.
- Green NE, Hadwiger LA, Graham SO, 1975. Phenylalanine ammonia-lyase, tyrosine ammonia-lyase, and lignin in wheat inoculated with *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. *Phytopathology*, 65(10): 1071—1074.
- Hatton PJ, Dixon D, Cole DJ, Edwards R, 1996. Glutathione transferase activities and herbicide selectivity in maize and associated weed species. *Pestic. Sci.*, 46(3): 267—275.
- Heitz T, Bergey DR, Ryan CA, 1997. A gene encoding a chloroplast targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiol.*, 114(3): 1085—1093.
- Hu ZH, Zhang W, Shen YB, Fu HJ, 2009. Activities of lipoxygenase and phenylalanine ammonia lyase in poplar leaves induced by insect herbivory and volatiles. *J. Forestry Res.*, 20(4): 372—376.
- Hwang IS, Hwang BK, 2010. The pepper 9-lipoxygenase gene

- CaLOX1 functions in defense and cell death responses to microbial pathogens. *Plant Physiol.*, 152(2):948—967.
- Jones DH, 1984. Phenylalanine ammonia-lyase; Regulation of its induction, and its role in plant development. *Phytochemistry*, 23(7):1349—1359.
- Kessler A, Baldwin IT, 2002. Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53:299—328.
- Koukol J, Conn EE, 1961. The metabolism of aromatic compounds in higher plant. *J. Biol. Chem.*, 236(10):2692—2698.
- Legrand M, Fritig B, Hirth I, 1976. Enzymes of the phenylpropanoid pathway and the necrotic reaction of hypersensitive tobacco to tobacco mosaic virus. *Phytochemistry*, 15(9):1353—1359.
- Mccloud ES, Baldwin IT, 1997. Herbivory and caterpillar regurgitants amplify the wound-induced increases in jasmonic acid but not nicotine in *Nicotiana. s. y. lvestris*. *Planta*, 203(4):430—435.
- Miles P, 1998. Aphid salivary functions; the physiology of deception// Nieto Nafría JM, Dixon AFG(eds.). Aphids in Natural and Managed Ecosystems. Universidad de León. 255—263.
- Miles PW, 1999. Aphid saliva. *Biol. Rev.*, 74(1):41—85.
- Moesta P, Grisebach H, 1982. L-2-aminoxy-3-phenylpropionic acid inhibits phytoalexin accumulation in soybean with concomitant loss of resistance against *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Physiol. Plant Pathol.*, 21(1):65—70.
- Morkunasa I, Narozna D, Nowak W, Samardakiewicz S, Remlein-Starosta D, 2011. Cross-talk interactions of sucrose and *Fusarium oxysporum* in the phenylpropanoid pathway and the accumulation and localization of flavonoids in embryo axes of yellow lupine. *J. Plant Physiol.*, 168(5):424—433.
- Piesik D, Pańka D, Delaney KJ, Skoczek A, Lamparski R, Weaver DK, 2011. Cereal crop volatile organic compound induction after mechanical injury, beetle herbivory (*Oulema* spp.), or fungal infection (*Fusarium* spp.). *J. Plant Physiol.*, 168(9):878—886.
- Qin QJ, Shi XY, Liang P, Gao XW, 2005. Induction of phenylalanine ammonia-lyase and lipoxygenase in cotton seedlings by mechanical wounding and aphid infestation. *Prog. Nat. Sci.*, 15(5):419—423.
- Snoeren TAL, Broekgaarden C, Dicke M, 2011. Jasmonates differentially affect interconnected signal-transduction pathways of *Pieris rapae*-induced defenses in *Arabidopsis thaliana*. *Insect Sci.*, 18(3):249—258.
- Stodolak B, Leja M, Mareczek A, 2003. Some aspects of metabolism of phenolics in carrot root slices. *J. Food Agr. Environ.*, 1(3/4):88—94.
- Su J, Tu K, Cheng L, Tu SC, Wang M, Xu HR, Zhan G, 2011. Wound-induced H₂O₂ and resistance to *Botrytis cinerea* decline with the ripening of apple fruit. *Postharvest Biol. Technol.*, 62(1):64—70.
- Sugumaran M, Nellaiappan K, 2000. Characterization of a new phenoloxidase Inhibitor from the cuticle of *Manduca sexta*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 268(2):2379—2383.
- Tscharntke T, Thiessen S, Dolch R, Boland W, 2011. Herbivory, induced resistance, and interplant signal transfer in *Alnus glutinosa*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 29(10):1025—1047.
- Xue RG, Zhang B, 2007. Increased endogenous methyl jasmonate altered leaf and root development in transgenic soybean plants. *Genet. Genom.*, 34(4):339—346.
- 胡增辉,沈应柏,王宁宁,王金凤,周艳超,张志毅,2009. 虫咬及挥发物诱导后合作杨叶片中多酚氧化酶活性的变化. *生态学报*, 29(10):5265—5270.
- 李清清,李大鹏,李德全,2010. 茉莉酸和茉莉酸甲酯生物合成及其调控机制. *生物技术通报*, 1:53—57.
- 钦俊德,1980. 植食性昆虫食性的生理基础. *昆虫学报*, 23(1):106—121.
- 钦俊德,王琛柱,2001. 论昆虫与植物的相互作用和进化的关系. *昆虫学报*, 44(3):360—365.
- 秦秋菊,高希武,2005. 昆虫取食诱导的植物防御反应. *昆虫学报*, 48(1):125—134.
- 滕涛,曹福祥,王猛,龙绛雪,2007. 松材线虫侵染对松树苯丙氨酸解氨酶及酚类物质的影响. *中南林业科技大学学报*, 27(3):124—127.