

# 二斑叶螨刺吸胁迫对白三叶叶绿素含量和两种保护酶的影响\*

张廷伟\*\* 沈慧敏 钱秀娟 刘长仲\*\*\*

(甘肃农业大学草业学院 草业生态系统教育部重点实验室 甘肃省草业工程实验室  
中-美草地畜牧业可持续研究中心 兰州 730070)

**摘要** 本文采用室内人工接螨法,研究了二斑叶螨 *Tetranychus urticae* Koch 不同虫口密度和不同为害时间对白三叶生理的影响。结果表明:在 0.5 和 10 头/小叶 3 个虫口密度下,二斑叶螨取食为害 2、4、6 和 8 d 后白三叶植株体内叶绿素含量、过氧化物酶(POD)和多酚氧化酶(PPO)活性有不同程度的变化。二斑叶螨为害后,在同一虫口密度下,随着为害天数的增加白三叶植株体内叶绿素含量呈下降的趋势,而 POD 和 PPO 活性呈上升趋势;在同一为害时间内,虫口密度越高,叶绿素含量下降的幅度越大,酶活力增加幅度越明显;方差分析表明,3 个虫口密度下白三叶体内叶绿素含量、POD、PPO 活性差异显著( $P < 0.05$ )。

**关键词** 二斑叶螨,白三叶,叶绿素,过氧化物酶,多酚氧化酶

## Effects of *Tetranychus urticae* feeding on the chlorophyll content and two kinds of protective enzyme of white clover

ZHANG Ting-Wei\*\* SHEN Hui-Min QIAN Xiu-Juan LIU Chang-Zhong\*\*\*

(College of Grassland Science, Gansu Agricultural University, Key Laboratory of Grassland Ecosystem of Education Ministry, Pratacultural Engineering Laboratory of Gansu Province, Sino-US Center for Grazingland Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China)

**Abstract** The relationship between feeding by *Tetranychus urticae* Koch and certain biochemicals in white clover was investigated. Clover plants were examined 2-8 days after inoculation with mites in the lab and changes in their chlorophyll content and POD and PPO activity measured. Chlorophyll content decreased and POD and PPO activity increased significantly in mite-infested leaves. Variation in these parameters increased compared to the control with the number of days after inoculation. An analysis of variance showed that the population density of *T. urticae* had a significant effect on the chlorophyll content and POD and PPO activity ( $P < 0.05$ ).

**Key words** *Tetranychus urticae*, white clover, POD, PPO

生物种群之间种间关系复杂多样,而偏害作用是自然界最常见的一种负相互作用(柳劲松等, 2003)。二斑叶螨 *Tetranychus urticae* Koch 是世界性的多食性害螨,不仅为害农作物、蔬菜、果树和花卉(刘长仲, 2000; 马俐等, 2005),而且为害城市绿地植物白三叶(李师昌等, 2002)。随全球气候变暖,二斑叶螨对城市绿地植物白三叶的危害

有逐渐加重的趋势,但国内至今鲜有报道。大量的植物与昆虫协同进化研究表明,植物受到害虫的胁迫后,会积极主动地产生一系列生理生化反应来抵御害虫的侵害(康乐, 1995; 娄永根和程家安, 1997; 张璞和严福顺, 1998),为植物抗虫性育种奠定了理论基础。近年来,有关苜蓿、小麦、黄瓜、水稻、棉花等作物的研究结果证实害虫的胁迫

\* 资助项目:公益性行业(农业)科研专项(201103020)。

\*\* E-mail: zhangtw@gsau.edu.cn

\*\*\* 通讯作者, E-mail: liuchzh@gsau.edu.cn

收稿日期: 2012-12-06, 接受日期: 2012-12-28

能引起植物的叶绿素含量变化,以及过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)等植物防御酶活力的变化(吴凤芝等,2002;蔡双虎等,2003;张金锋和薛庆中,2004;刘长仲和兰金娜,2009;张廷伟和刘长仲,2011)。

二斑叶螨是绿地植物白三叶的主要有害叶螨,主要以成螨和若螨刺吸叶片汁液,被害处呈失绿斑点,危害严重时叶片由黄变白而脱落,影响城市绿地的景观效果。当前对二斑叶螨的防治研究中,主要采用阿维菌素、哒螨灵、克螨特等化学药剂防治,而且往往导致二斑叶螨产生抗药性(相建业等,2003;高新菊和沈慧敏,2011;张志刚等,2011)。因此在绿地植物保护中,培育具有抗螨性的绿地白三叶对保证环境和人类安全有很重要的意义,但是国内外关于二斑叶螨刺吸胁迫对白三叶生理的影响研究甚少。本文对城市绿地植物白三叶受二斑叶螨刺吸为害后植株内叶绿素、过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)含量的动态变化情况进行测定,探讨这些物质在外界刺吸胁迫下的生理变化以及在防御二斑叶螨为害中的作用,为城市绿地环境保护和二斑叶螨的持续控制,筛选和培育抗螨性白三叶品种提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

二斑叶螨采自甘肃农业大学校园;白三叶(*Trifolium repens*)种子由甘肃省种子市场购买。将提前育苗的未受侵染的白三叶移栽在营养钵中,在室温( $24 \pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ 条件下培育 20 d 至株高达到 10 cm 时,选取长势相同的三叶草叶片按照 5、10 头/小叶两个虫口密度进行接螨,以不接螨为对照。接螨后 2、4、6、8 d 分别剪取叶片,清除叶螨后进行测定。重复 3 次。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 叶绿色含量测定** 叶绿素含量测定采用丙酮法(蔡双虎等,2003),用 80% 的丙酮作对照分别测定  $A_{663}$ 、 $A_{645}$  的原始数据按照下式计算叶绿素 a、叶绿素 b 及总叶绿素的含量: $C_a = 12.7A_{663} - 2.69A_{645}$ ,

$$C_b = 22.9A_{645} - 4.68A_{663},$$

$$C_{a+b} = 20.2A_{645} + 8.02A_{663},$$

含量 =  $C \cdot V / \text{FW}$  (单位:mg/g FW)。

**1.2.2 酶活力测定** 过氧化物酶(POD)活性测定,采用愈创木酚法(哈尔滨工业大学,2004),酶活性用每克鲜重叶片 1 min 内  $A_{470}$  变化 0.01 为一个过氧化物酶活性单位。多酚氧化酶(PPO)酶液提取和测定采用邻苯二酚法(薛应龙,1985),酶活性用每克鲜重叶片 1 min 内  $A_{495}$  变化 0.01 为一个过氧化物酶活性单位。

### 1.3 数据处理

以上各实验处理所测得的实验数据,在 Excel 和 SPSS16.0 分析统计软件中进行统计分析。不同处理对白三叶体内叶绿素含量、POD 和 PPO 活性变化的差异性用各组样本数据之间的  $t$  测验进行比较(显著水平均为  $P < 0.05$ ),图、表中所出现的误差处理方式均为平均值  $\pm$  标准误(mean  $\pm$  SE)。

## 2 结果与分析

### 2.1 二斑叶螨刺吸胁迫对白三叶叶绿色含量的影响

从表 1 可以看出,5 头/小片和 10 头/小片两个处理的叶绿素 a、叶绿素 b 及总叶绿素含量随着为害时间的延长均下降,而对照组的叶绿素 a、叶绿素 b 及总叶绿素含量随生长天数的延长都有所增加;同时,在同一虫口密度下为害时间越长,叶绿素含量越低,而且在同一时间下虫口密度越大,叶绿素含量越低。在试验接螨后 2~8 d 内,5 头/小叶处理植株叶绿素 a、叶绿素 b 及总叶绿素含量分别由第 2 天时的 ( $1.44 \pm 0.08$ )、( $0.51 \pm 0.17$ ) 和 ( $1.98 \pm 0.06$ ) mg/g 下降到第 8 天时的 ( $1.30 \pm 0.13$ )、( $0.48 \pm 0.17$ ) 和 ( $1.65 \pm 0.21$ ) mg/g; 而 10 头/小叶处理植株叶绿素 a、叶绿素 b 及总叶绿素含量分别由第 2 天时的 ( $1.39 \pm 0.06$ )、( $0.49 \pm 0.05$ ) 和 ( $1.93 \pm 0.11$ ) mg/g 下降到第 8 天时的 ( $1.14 \pm 0.06$ )、( $0.45 \pm 0.05$ ) 和 ( $1.39 \pm 0.16$ ) mg/g。而试验期内对照组叶绿素 a、叶绿素 b 及总叶绿素含量分别由第 2 天时的 ( $1.53 \pm 0.12$ )、( $0.53 \pm 0.14$ ) 和 ( $2.09 \pm 0.14$ ) mg/g 增加到第 8 天时的 ( $1.59 \pm 0.21$ )、( $0.57 \pm 0.18$ ) 和 ( $2.34 \pm 0.03$ ) mg/g。在试验期内无论在第 2 天、第 4 天还是第 8 天时,5 头/小叶和 10 头/小叶处理与同期对照相比差异均达显著水平 ( $P < 0.05$ )。



### 2.2 二斑叶螨刺吸胁迫对白三叶 PPO 活性的影响

由图 1 可知,白三叶在接二斑叶螨后,5 头/小片和 10 头/小片两个处理的 PPO 活性随刺吸时间的延长而升高,而对照组的 PPO 活性基本保持不变;与同期试验处理相比,10 头/小片处理的 PPO 活性最高,而对照组的 POD 活性最低。由表 2 可

知,在试验期间随刺吸胁迫时间的延长,5 头/小叶处理的 PPO 活性由第 2 天的 (2.90 ± 0.12) U/g FW 上升到第 8 天的 (3.39 ± 0.17) U/g FW;而 10 头/小叶处理的 POD 活性由第 2 天的 (3.00 ± 0.18)U/g FW 上升到第 8 天的 (3.62 ± 0.14) U/g FW。方差分析表明,不同虫口密度间白三叶植株体内 POD 活性达到显著性差异 ( $P < 0.05$ , 表 2)。

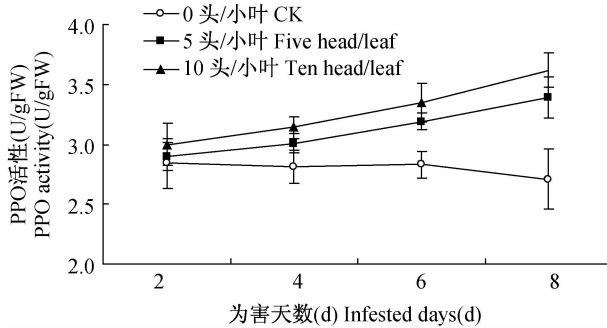


图 1 二斑叶螨为害后白三叶 PPO 活性变化

Fig. 1 Changes of the PPO activity infested by the two-spotted spider mite in white clover

表 2 二斑叶螨刺吸胁迫对白三叶 PPO 活性 (U/g FW) 的影响

Table 2 Influence of the PPO activity infested by the two-spotted spider mite in white clover

虫口密度(头/小叶) Population density (head / leaf)	为害天数(d) Infested days(d)			
	2	4	6	8
0	2.84 ± 0.21a	2.81 ± 0.14a	2.83 ± 0.11a	2.71 ± 0.25a
5	2.90 ± 0.12ab	3.01 ± 0.08b	3.19 ± 0.07b	3.39 ± 0.17b
10	3.00 ± 0.18b	3.14 ± 0.09c	3.35 ± 0.16c	3.62 ± 0.14c

### 2.3 二斑叶螨刺吸胁迫对白三叶 POD 活性的影响

由图 2 可知,白三叶在接二斑叶螨后,5 头/小片和 10 头/小片两个处理的 POD 活性随刺吸时间的延长而升高,而对照组的 POD 活性基本保持不变;与同期试验处理相比,10 头/小片处理的 POD

活性最高,而对照组的 POD 活性最低。由表 3 可知,在试验期间随刺吸胁迫时间的延长,5 头/小叶处理的 POD 活性由第 2 天的 (72.64 ± 2.56) U/g FW 上升到第 8 天的 (102.60 ± 3.27) U/g FW;而 10 头/小叶处理的 POD 活性由第 2 天的 (85.96 ±

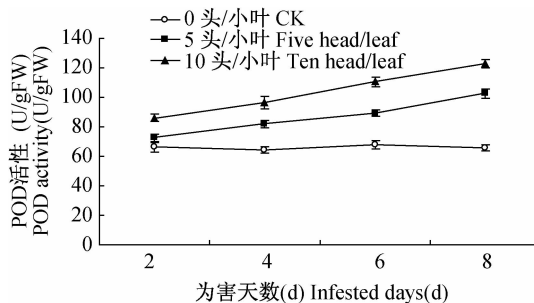


图 2 二斑叶螨为害后白三叶 POD 活性变化

Fig. 2 Changes of the POD activity infested by the two-spotted spider mite in white clover

2.67) U/g FW 上升到第 8 天的 ( $122.75 \pm 2.62$ ) U/g FW。方差分析表明,不同虫口密度间白三叶植株体内 POD 活性达到显著性差异 ( $P < 0.05$ , 表 3)。

表 3 二斑叶螨刺吸胁迫对白三叶 POD 活性 (U/g FW) 的影响

Table 2 Influence of the POD activity infested by the two-spotted spider mite in white clover

虫口密度(头/小叶) Population density (head / leaf)	为害天数(d) Infested days(d)			
	2	4	6	8
0	66.22 ± 3.14a	64.33 ± 1.84a	67.95 ± 2.71a	65.45 ± 2.08a
5	72.64 ± 2.56b	81.92 ± 2.38b	89.23 ± 2.23b	102.60 ± 3.27b
10	85.96 ± 2.67c	96.34 ± 4.16c	110.47 ± 3.14c	122.75 ± 2.62c

### 3 讨论

在植物体中,叶绿素是叶绿体内类囊体膜中具有吸收光能进行光合作用的主要光合色素。二斑叶螨在刺吸取食植物时,大多呈黄绿色或褐绿色而寄主植物往往叶片受害部位失水失绿,正是由于二斑叶螨取食植物汁液和叶绿体之故(匡海源,1986;蔡双虎等,2003)。本试验研究结果表明:在一定时间范围内随刺吸天数的增加,二斑叶螨刺吸为害导致白三叶叶片叶绿素含量下降,而且下降的幅度与虫口密度呈正相关。蔡双虎等(2003)通过对二斑叶螨为害与寄主植物叶绿素含量变化的研究认为,二斑叶螨对植物叶片为害时叶绿素的减少量与植物种类无关,而只与二斑叶螨密度相关,这与试实验结果一致;同时认为二斑叶螨持续为害过程中有害高峰期,但本实验中受害叶片叶绿素含量都呈下降趋势,这可能与所选寄主材料以及二斑叶螨种群密度不同所致。

植物与昆虫在长期的进化中,形成了相互适应的机制,主要表现在昆虫对植物的选择性和植物对昆虫的抗虫性两个方面。就植物而言,植物对昆虫的抗性防御机制可分为组成防御和诱导防御,而且诱导防御机制在植物自我保护中发挥着重要作用(秦秋菊和高希武,2005;李新岗等,2008)。在正常情况下,细胞内的活性氧与保护酶系统之间保持着平衡(Prasad,1996),而在逆境条件下外界胁迫会诱导植物体内过氧化物酶(POD)和多酚氧化酶(PPO),超氧化物歧化酶(SOD)以及几丁质酶等保护酶活性的升高,来抵抗外界的胁迫而使植物表现出一定的抗逆性(王海波等,1994;Havlickova *et al.*,1996;刘长仲和兰金娜,2009;张廷伟和刘长仲,2011)。本试验研究结果

表明:在一定时间范围内随刺吸天数的增加,二斑叶螨刺吸为害导致白三叶体内 POD 和 PPO 活性呈上升趋势,而且上升的幅度与虫口密度呈正相关。这说明二斑叶螨刺吸取食作为一种外界胁迫能诱导白三叶体内 POD 和 PPO 活性发生生理变化,是植物诱导防御和自身抗性的内在表现;而且在同一时期内,随着虫口密度的增加 POD 和 PPO 的活性也随着增加,说明外界胁迫压力越大,植物自身保护机制在一定范围内相应增强。但是植物抗性指标的筛选和确定是一个复杂的过程,从植物诱导防御的整体性和系统性方面考虑,还需要对植物品种以及本试验中未做研究的超氧化物歧化酶和几丁质酶等其它保护酶方面做进一步的研究。

### 参考文献 (References)

- Havlickova H, Cvikrova M, Eder J, 1996. Changes in the pattern of phenolic acids induced by aphid infestation in two winter wheat cultivars. *Bulletin-Oilb-Srop*, 19(5):106 - 110.
- Prasad TK, 1996. Mechanism of chilling induce doxidative stress injury and to lerances; changesinanti oxidant system, oxidation of proteins and lipids and protease activities. *Plant J.*, 10(6):1017 - 1026.
- 蔡双虎,程立生,沙林华,2003. 二斑叶螨为害与寄主植物叶绿素含量变化的关系. *热带作物学报*, 24(3):55 - 57.
- 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.
- 高新菊,沈慧敏,2011. 二斑叶螨对甲氰菊酯的抗性选育及解毒酶活力变化. *昆虫学报*, 54(1):64 - 69.
- 哈尔滨工业大学,2004. 植物生理实验. 哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社. 46 - 49.