

南美斑潜蝇为害对黄瓜叶片中蛋白酶抑制剂活性及葫芦素 B 含量的影响*

孙兴华 周晓榕 庞保平** 孟庆玖

(内蒙古农业大学农学院 呼和浩特 010019)

摘要 【目的】蛋白酶抑制剂和葫芦素是两类在植物中具有抗虫活性的化合物，在植食性昆虫与其寄主植物相互作用中起着重要的作用。本文在室内研究了南美斑潜蝇 *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard) 为害对黄瓜叶片中蛋白酶抑制剂活性及葫芦素 B 含量的影响，以期揭示南美斑潜蝇与其寄主植物相互作用的机理以及为利用诱导抗性控制南美斑潜蝇的为害奠定必要的基础。【方法】用分光光度法和高效液相色谱法，分别测定了南美斑潜蝇幼虫为害后黄瓜叶片中蛋白酶抑制剂活性和葫芦素 B 含量的变化。【结果】在北美斑潜蝇幼虫为害期间 (1~9 d)，黄瓜叶片中胰蛋白酶抑制剂和胰凝乳蛋白酶抑制剂活性及葫芦素 B 含量与健康对照相比显著上升，但上升幅度并不与为害强度和为害持续时间相一致，其中对胰蛋白酶抑制剂具有系统诱导作用，而对胰凝乳蛋白酶抑制剂和葫芦素 B 的系统诱导作用不明显。【结论】南美斑潜蝇幼虫为害可诱导寄主植物体内蛋白酶抑制剂活性和葫芦素 B 含量上升，培育蛋白酶抑制剂或葫芦素含量高或易诱导的黄瓜品种可能是控制南美斑潜蝇为害的有效途径。

关键词 南美斑潜蝇，胰蛋白酶抑制剂，胰凝乳蛋白酶抑制剂，葫芦素 B，诱导作用

Effects of *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard) larval infestation on trypsin and chymotrypsin activity and cucurbitacin B content in cucumber leaves

SUN Xing-Hua ZHOU Xiao-Rong PANG Bao-Ping** MENG Qing-Jiu

(College of Agriculture, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, China)

Abstract [Objectives] Protease inhibitors and cucurbitacins are two kinds of insect-resistant compounds in plants that are important in the interactions between herbivorous insects and their host plants. We studied the effects of *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard) larval infestation on the activities of protease inhibitors and cucurbitacin B content in cucumber leaves in order to investigate the mechanisms of interaction between the leaf miner and its host plants, and to build a necessary foundation for use of inducible resistance to control the leaf miner. [Methods] Spectrophotometry was used to determine the changes of the activities of protease inhibitors and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) to determine the cucurbitacin B content in cucumber leaves. [Results] The activities of trypsin and chymotrypsin inhibitors, and the cucurbitacin B content in cucumber leaves increased during larval infestation (1-9 d), compared to control plants, but the

* 资助项目：国家自然科学基金 (30960219)

**通讯作者，E-mail: pangbp@imau.edu.cn

收稿日期：2013-08-04，接受日期：2013-10-06

magnitudes of these increases were not consistent with the infestation levels and durations. Induction of the trypsin inhibitor was systemic while induction of the chymotrypsin inhibitor and cucurbitacin B were not. **[Conclusion]** Larval infestation can induce an increase in protease inhibitor activity and cucurbitacin B, and the breeding of cucumber varieties with inducible protease inhibitor and/or cucurbitacin B may be an effective approach for controlling the leaf miner.

Key words *Liriomyza huidobrensis*, trypsin inhibitor, chymotrypsin inhibitor, cucurbitacin B, induction

蛋白酶抑制剂 (Protease inhibitors, PIs) 是一类在许多植物中具有抗虫活性的化合物 (Ryan, 1990)。由于昆虫不能合成大量的氨基酸, 它们必须依靠蛋白酶和植物蛋白满足其营养需要 (Zavala *et al.*, 2008)。PIs 是一类分子量较小的多肽或蛋白质, 能与昆虫消化道内的蛋白消化酶相互作用, 形成酶抑制剂复合物, 削弱或阻断消化酶对食物中的蛋白质的水解消化作用, 并刺激昆虫消化酶的过度分泌, 使昆虫产生厌食反应。因此, 蛋白酶抑制剂成为植食性动物获取蛋白质难以克服的屏障, 可以作为植食性动物为害后产生诱导抗性的重要标志 (Thaler, 1999)。室内外实验表明, PIs 能抑制鳞翅目和鞘翅目幼虫的消化酶及减缓其生长发育 (Johnson *et al.*, 1989; Broadway, 1995; McManus and Burgess, 1995; Heath *et al.*, 1997)。损伤、昆虫取食、病原菌感染和应用植物激素 (如茉莉酸、脱落酸或乙烯) 或昆虫口腔分泌物均能诱导产生 PIs (Green and Ryan, 1972; Peña-Cortes *et al.*, 1988; Geoffroy *et al.*, 1990; Farmer *et al.*, 1992; Jongsma *et al.*, 1994; van Dam *et al.*, 2001; Casaretto *et al.*, 2004)。目前, 在植物中发现的蛋白酶抑制剂有丝氨酸蛋白酶抑制剂、半胱氨酸蛋白酶抑制剂、天门冬氨酸蛋白酶抑制剂和金属蛋白酶抑制剂四类 (王琛柱和钦俊德, 1997)。丝氨酸蛋白酶抑制剂与抗虫关系最为密切, 其中研究最多的为胰蛋白酶抑制剂 (Trypsin inhibitors, TI) 和胰凝乳蛋白酶抑制剂 (Chymotrypsin inhibitors, CI) (Bhattacharyya *et al.*, 2007; 王琪等, 2008; 王洪

涛等, 2011)。

葫芦素 (Cucurbitacins) 是一类高度氧化的四环三萜类植物次生物质, 是葫芦科 30 多属 100 多种植物的特征化合物 (Metcalf, 1986), 自然界中最普遍存在的是葫芦素 B (Metcalf *et al.*, 1982)。葫芦素不仅气味难闻、味道苦, 而且对大多数的植食性昆虫有毒 (Deheer and Tallamy, 1991)。葫芦素组合的多样性对防御植食性昆虫具有重要意义, 能有效地抵抗多种害虫对其适应性的发展 (凌冰等, 2010)。寄主植物子叶中葫芦素含量与叶甲 (*Diabroticina beetles*) 的取食为害程度有密切的关系 (Ferguson *et al.*, 1983)。葫芦素 B 对甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 1 龄幼虫有拒食作用, 对成虫产卵有抑制作用 (董易之等, 2005); 对日本花金龟 *Popillia japonica* 成虫、马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 4 龄幼虫和黄粉虫 *Tenebrio molitor* 5 龄幼虫等昆虫有拒食作用, 对欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis* 和甜菜夜蛾成虫有产卵忌避作用 (Douglas *et al.*, 1997)。张茂新等 (2004) 研究表明, 葫芦素 B 是影响美洲斑潜蝇 *Liriomyza sativae* 寄主选择性的的重要因素之一。凌冰等 (2006) 在对葫芦素 B 对美洲斑潜蝇成虫产卵和取食的抑制作用的研究中发现, 采用一定浓度的葫芦素 B 作用时, 会对美洲斑潜蝇成虫的产卵和取食均能起到一定的抑制作用。

南美斑潜蝇 *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard) 是一种危害多种蔬菜和观赏植物的检疫性害虫 (Scheffer, 2000)。自 1993 年传入我国

以来,南美斑潜蝇在我国南北方各地区已经迅速取代了美洲斑潜蝇成为优势种,给我国农业生产造成巨大的损失(陈兵和康乐,2002)。目前研究表明,寄主植物叶片表皮毛、挥发物、营养物质和次生物质含量影响南美斑潜蝇寄主选择性(庞保平等,2006;高俊平等,2006,2007;闫丽英等,2008;麻旭东等,2009),南美斑潜蝇幼虫为害诱导寄主植物叶片内营养物质含量下降而次生物质含量上升(孙兴华等,2012)。然而,南美斑潜蝇幼虫为害是否引起寄主植物体内 PIs 活性及葫芦素 B 含量的变化?目前还未见有过报道。因此,本文研究了南美斑潜蝇幼虫取食诱导后黄瓜叶片中 TI 和 CI 活性及葫芦素 B 含量的变化,以期深入了解南美斑潜蝇与其寄主植物相互作用的机理,并从植物诱导抗性角度探索南美斑潜蝇的防控方法,为制订新的害虫综合防治策略提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试植物

实验选用我国北方地区温室内普遍种植的黄瓜品种津春 4 号。精选饱满的种子,种子催芽后种于钵中,每钵种 1 粒种子。待植株长到一片真叶时,定植于花盆中,置于温室中培养,待长到 7~8 片真叶时,去掉顶端以防其徒长,备用。

1.2 供试虫源

南美斑潜蝇的成虫和蛹采自呼和浩特市东郊金河镇根堡村无公害蔬菜基地黄瓜和菜豆植株上,将成虫饲养于有盆栽菜豆的养虫笼内,将蛹群集饲养于装有含相对含水量 70%的蛭石和细沙土混合的烧杯中,分别置于人工智能光照培养箱中(光周期 16L:8D,温度 25℃,相对湿

度 70%~80%)。在盆栽菜豆上繁殖 1 代后,将第 2 代蛹挑出,单头饲养于试管中,管口用湿棉球塞住,以防成虫羽化后逃逸。将试管放于底部铺有吸水纱布的不锈钢托盘中,然后置于上述条件的人工智能光照培养箱中,培养至羽化,备用。

1.3 不同受害程度黄瓜叶片的获得

以 3 盆健康苗为 1 组放入养虫笼(40 cm×40 cm×50 cm)内,将养虫笼放于与上述条件一致的人工智能光照培养箱中。在轻度受害和重度受害处理的植株中选取从上至下每隔一片叶作为系统受害对照,然后用防虫网套住叶片,以防止斑潜蝇产卵。在轻度受害和重度受害处理的养虫笼中分别接入 20 和 30 对同一天羽化的南美斑潜蝇成虫,从出现潜道的第 1 天开始算起,分别于第 1、3、5、7 和 9 天获取 5 种不同时间处理的黄瓜受害苗,进行蛋白酶抑制剂活性和葫芦素 B 含量的测定。以不接虫黄瓜苗和受害处理中邻近受害叶片的未受害叶片分别作为健康对照和系统对照。每处理重复 3 次。

1.4 南美斑潜蝇为害程度的划分

南美斑潜蝇为害程度(%) = $\frac{\text{虫道面积}(\text{cm}^2)}{\text{叶片总面积}(\text{cm}^2)} \times 100$ 。

分级标准如下:

健康对照:未接虫健康苗;

系统对照:邻近轻度和重度受害叶片的未受害叶片;

轻度受害:潜食叶面积小于叶面积的 10%;

重度受害:潜食叶面积大于叶面积的 40%。

1.5 蛋白酶抑制剂活性的测定

1.5.1 胰凝乳蛋白酶抑制剂活性的测定 采用张健等(2009)的方法进行提取和测定。

提取液制备:首先配制 0.05 mol/L、pH 8.0

的 Tris-HCl 缓冲液, 然后分别称取 0.128 g 苯基硫脲、0.35 g PVP、0.036 g Vc 和 1.11 g CaCl₂, 置于 500 mL 容量瓶中, 用上述缓冲液进行定容。于 4℃ 冰箱冷藏保存。

底物溶剂(0.05 mol/L、pH 8.0 的磷酸缓冲液)制备: 准确称取 Na₂HPO₄ 17.907 g 于 500 mL 容量瓶中, 蒸馏水定容至刻度。准确称取 7.8005 g NaH₂PO₄ 于 500 mL 容量瓶中, 用蒸馏水定容。分别取配好的 NaH₂PO₄ 溶液 26.5 mL 和 Na₂HPO₄ 溶液 437.5 mL 置于另一 500 mL 容量瓶中, 用蒸馏水定容。至此为 0.05 mol/L、pH 8.0 的磷酸缓冲液, 再用 40% 的甲醇溶液与配好的磷酸缓冲液 1:1 进行混合。

底物制备: 准确称取 0.04851 g BTEE 于 300 mL 容量瓶中, 用底物溶剂定容。于 4℃ 冰箱冷藏保存。

酶液制备: 准确称取胰凝乳蛋白酶 (Sigma) 0.01851 g, 置于 100 mL 容量瓶中, 用 0.05 mol/L、pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液定容。于 4℃ 冰箱冷藏保存。

抑制剂的提取: 剪取各处理黄瓜叶片 1 片, 准确称取 0.5 g, 洗净, 剪碎, 放入研钵中, 加入少量石英砂, 加入 3 mL 提取液, 冰浴下迅速研磨, 再加入 3 mL 提取液清洗, 在 4℃ 下 12 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为胰蛋白酶抑制剂的粗提液。

酶抑制力测定: 取已知活力的酶液 50 μL 与抑制剂提取液 80 μL 进行混合, 在 25℃ 恒温水浴锅中反应 20 min。在石英比色皿中加入 100 μL 的混合反应液和 2.9 mL 的底物 BTEE, 室温下静置 1 min。于 253 nm 波长处测定吸光度的变化值, 每隔 60 s 读一次, 共读 3 次。

酶抑制力计算: 抑制力 = $E_{253}/(0.964 \times V \times E_w)$, 式中: E₂₅₃: 253 nm 每分钟内吸光度变

化值;

0.964: 1 mmol BTEE 的吸光度;

V: 反应酶液的总体积(mL);

E_w: 所用酶液中含酶量(g)。

1.5.2 胰蛋白酶抑制剂活性的测定 采用张健等 (2009) 的方法进行提取和测定。

提取液制备: 准确称取 Tris 0.605 g 于 100 mL 容量瓶中, 用蒸馏水定容至刻度。量取 HCl 0.45 mL 置于 100 mL 容量瓶中, 用蒸馏水定容。分别取配好的 Tris 的溶液 100 mL、HCl 溶液 69 mL 和 CaCl₂ 0.444 g 于 200 mL 容量瓶中, 蒸馏水定容。

底物制备: 准确称取 BAEE 0.06856 g 于 200 mL 容量瓶中, 用 0.05 mol/L、pH 7.8 的 Tris-HCl 缓冲液定容至刻度, 于 4℃ 冰箱冷藏保存。

酶液制备: 准确称取胰蛋白酶(Amresco) 1.6 g 于 200 mL 容量瓶中, 用 0.05 mol/L、pH 7.8 的 Tris-HCl 缓冲液定容至刻度, 于 4℃ 冰箱冷藏保存。

胰蛋白酶抑制力测定: 取已知活力的酶液 100 μL 与抑制剂提取液 20 μL 混合, 在 25℃ 恒温水浴锅中反应 60 min。在石英比色皿中加入 2.9 mL 的底物 BAEE 和 100 μL 的混合反应液, 室温下静置 1 min。于 256 nm 波长处测定吸光度的变化值, 每隔 60 s 读一次, 共读 3 次。

胰蛋白酶抑制力计算: 胰蛋白酶抑制力 = $E_{256}/(0.01 \times V \times E_w)$,

式中: E₂₅₆: 256 nm 每分钟内吸光度变化值;

0.01: 一个酶单位每分钟吸光度变化值;

V: 反应系统溶液的总体积(mL);

E_w: 100 μL 所用酶液中含酶量(g)。

1.6 葫芦素 B 含量的测定

采用张茂新等 (2004) 的高效液相色谱法

(HPLC)测定。每个处理选取相同受害程度的黄瓜叶片 1 片, 冲洗表面杂质晾干, 准确称取 1 g 植物样品放入 20 mL 的广口瓶中, 加 10 mL 甲醇浸泡 30 h 后, 过滤, 备测。样品进行 HPLC 测定前须经过 4.5 μm 滤膜处理。HPLC 条件: 以 70% 的甲醇和 30% 水混合溶剂为流动相, 流速是 0.5 mL/min, 检测波长 228 nm, 进样量 10 μL 。准确称取葫芦素 B 标准品 1 mg (Sigma, 纯度>97%), 用 10 mL 的甲醇溶解成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 再用逐步稀释法分别配制 10、5、2.5、1.25 及 0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的葫芦素 B 甲醇溶液, 并测定相应色谱峰的保留时间和峰面积(Y), 计算 Y 与葫芦素 B 浓度(X)之间的回归方程。用此回归方程分别计算出不同处理中的葫芦素 B 含量。每个处理重复 3 次。高效液相色谱仪为日本岛津 LC-20AT。

1.7 数据统计与分析

本实验所有数据均采用 DPS 数据处理系统进行统计分析, 不同为害时间及不同受害处理之间的差异显著性采用 Duncan 氏多重比较 (唐启义, 2010)。

表 1 南美斑潜蝇幼虫为害后黄瓜叶片中 CI 活性的变化 (U)

Table 1 Changes of CI activity in cucumber leaves after *Liriomyza huidobrensis* larval infestation

处理 Treatment	为害时间 (d) Infestation time				
	1	3	5	7	9
CK	3.38±0.09(bB)aA	3.43±0.31(cD)aA	3.24±0.25(cC)aA	3.54±0.49(dC)aA	3.44±0.35(cC)aA
L	4.50±0.23(aA)cC	6.38±0.18(aA)bB	4.83±0.16(bB)cC	8.21±0.16(aA)aA	6.66±0.11(aA)bB
SL	4.38±0.30(aAB)cC	4.82±0.15(bBC)cC	6.45±0.07(aA)aA	5.72±0.05(cB)bB	6.74±0.08(aA)aA
S	4.78±0.19(aA)bB	3.56±0.16(cCD)cC	4.70±0.13(bB)bB	7.12±0.28(bA)aA	4.95±0.03(bB)bB
SS	4.40±0.23(aAB)dC	5.34±0.48(bAB)bcBC	6.06±0.20(aA)bAB	6.96±0.25(bAB)aA	5.02±0.02(bB)cdBC

注: 表中数据均为平均值±标准误。数据后括号内字母表示相同受害期内不同受害处理间的差异显著性, 数据后括号外字母表示相同受害处理在不同受害期的差异显著性; 根据邓肯氏新复极差检验方法, 小写和大写字母不同者分别表示差异显著 ($P<0.05$) 和极显著 ($P<0.01$)。

The data in the table are mean \pm SE. The letters inside bracket indicate different significance among different treatments at the same time and the letters outside bracket indicate different significance among different times in the same treatment. According to Duncan's multiple range test, different lowercase and capital letters indicate significant difference at $P=0.05$ and $P=0.01$, respectively.

2 结果与分析

2.1 南美斑潜蝇为害对黄瓜叶片中胰凝乳蛋白酶抑制剂 (CI) 活性的影响

由表 1 可知, 在不同受害期内, 4 种不同程度的受害处理中 CI 活性均显著高于健康对照 ($P<0.05$); 除健康对照外, 同一受害程度处理在不同受害时间内 CI 活性也在整体上差异极显著 ($P<0.01$)。轻度受害处理 CI 活性在第 7 天达最高值, 其次为第 3 天和 9 天, 最低为第 1 天和第 5 天。轻度受害系统对照在第 9 天和第 5 天达最高值, 其次为第 7 天, 最低为第 1 天和第 3 天。重度受害处理 CI 活性在第 7 天时达到最高值, 第 3 天时最低, 其他 3 个处理时间之间差异不显著 ($P>0.05$)。重度受害系统对照 CI 活性也在第 7 天达最高值, 第 1 天和 9 天最低。轻度受害处理 CI 活性在第 3 天、7 天和 9 天显著高于重度受害处理 ($P<0.05$), 而在第 1 天和第 5 天差异不显著 ($P>0.05$)。轻度受害系统对照 CI 活性在第 7 天显著低于重度受害系统对照 ($P<0.05$), 而在第 9 天显著高于重度受害系统

CK: 健康对照; L: 轻度受害; S: 重度受害; SL: 轻度受害的系统对照; SS: 重度受害的系统对照。下表同。

CK: Intact control; L: Light damage; S: Severe damage; SL: Systematic control for light damage; SS: Systematic control for severe damage. The same below.

对照 ($P < 0.05$), 在其他 3 个受害处理内差异不显著 ($P > 0.05$)。上述结果表明, 南美斑潜蝇幼虫为害可诱导黄瓜叶片中 CI 活性上升, 而且具有系统性诱导作用, 但诱导强度与受害程度并不完全一致。

2.2 南美斑潜蝇为害对黄瓜叶片中胰蛋白酶抑制剂 (TI) 活性的影响

由表 2 可知, 在不同受害期内, 轻度受害和重度受害处理中 TI 活性显著高于健康对照 ($P < 0.05$), 而 2 个系统对照 TI 活性虽然高于健康对照, 但未达到显著水平 ($P > 0.05$); 除重度受害系统对照外, 同一受害程度处理在不同受害期内 TI 活性在整体上差异显著 ($P < 0.05$)。健康对照第 5 天时, TI 活性显著高于其他处理时间 ($P < 0.05$), 而其他 4 个处理时间 TI 活性差异不显著 ($P > 0.05$)。轻度受害处理 TI 活性在第 7 天达最高值, 但仅与第 9 天差异显著 ($P < 0.05$), 与第 1 天、3 天及 5 天差异不显著 ($P > 0.05$)。轻度受害系统对照 TI 活性在第 5 天时达最大值, 但与第 7 天差异未达到显著水平 ($P > 0.05$)。重度受害处理 TI 活性在第 5 天达到最大值, 但与第 1 天差异不显著 ($P > 0.05$)。轻度受害与重

度受害处理 TI 活性只有在第 7 天差异显著 ($P < 0.05$), 其他处理时间内差异均未达到显著水平 ($P > 0.05$); 2 个系统受害对照在不同的受害时间内 TI 活性均与健康对照差异不显著 ($P > 0.05$)。上述结果表明, 南美斑潜蝇幼虫为害可诱导黄瓜叶片中 TI 活性上升, 但诱导不具有系统性, 而且诱导强度与受害程度并不一致。

2.3 南美斑潜蝇幼虫为害对黄瓜叶片中葫芦素 B (CuB) 含量的影响

由表 3 可知, 除了轻度受害系统对照外, 同一受害程度处理在不同受害时期内葫芦素 B 含量差异显著 ($P < 0.05$)。在受害第 1 天时, 4 种受害处理葫芦素 B 含量均显著高于健康对照 ($F_{4,14}=57.92, P < 0.0001$), 此时重度受害系统对照即已达到最大值, 为健康对照的 2.51 倍。第 3 天时, 轻度受害处理葫芦素 B 含量显著高于健康对照及其他 3 个受害处理 ($P < 0.05$)。第 5 天时, 重度受害处理葫芦素 B 含量显著高于健康对照及其他 3 个受害处理 ($P < 0.05$)。第 7 天时, 5 个受害处理间差异不显著 ($P > 0.05$)。第 9 天时,

表 2 南美斑潜蝇幼虫为害后黄瓜叶片中 TI 活性的变化 (U)

Table 2 Changes of TI activity in cucumber leaves after *Liriomyza huidobrensis* larval infestation

处理 Treatment	为害时间 (d) Infestation time				
	1	3	5	7	9
CK	23.39±0.61(bc)bB	24.10±0.39(cC)bAB	26.51±1.10(cC)aA	24.56±0.50(cC)abAB	22.54±0.34(cB)bB
L	32.83±2.41(aAB)abA	34.26±0.30(aA)abA	33.71±2.29(bAB)abA	38.50±0.84(aA)aA	29.86±4.37(abAB)ba
SL	24.75±1.49(bc)bA	23.65±1.18(cC)bA	28.22±0.11(cBC)aA	26.50±1.05(cC)abA	23.43±0.73(bcB)ba
S	35.92±1.13(aA)abA	32.39±2.27(aAB)ba	39.03±1.30(aA)aA	32.49±0.77(bB)ba	33.90±1.37(aA)ba
SS	26.94±1.35(bBC)aA	28.44±0.72(bBC)aA	30.44±1.27(bcBC)aA	26.35±1.50(cC)aA	27.28±1.25(abcAB)aA

表 3 南美斑潜蝇幼虫为害后黄瓜叶片中葫芦素 B 含量的变化 (mg/g)
Table 3 Changes of CuB content in cucumber leaves after *Liriomyza huidobrensis* larval infestation

处理 Treatment	为害时间 (d) Infestation time				
	1	3	5	7	9
CK	0.10±0.01(dC)bA	0.15±0.01(bB)aA	0.12±0.01(bB)abA	0.12±0.02(aA)abA	0.10±0.01(abA)bA
L	0.15±0.01(cC)bB	0.31±0.02(aA)aA	0.15±0.03(bB)bB	0.14±0.03(aA)bB	0.11±0.01(abA)bB
SL	0.13±0.02(cdC)aA	0.15±0.02(bB)aA	0.10±0.01(bB)aA	0.14±0.02(aA)aA	0.09±0.01(bA)aA
S	0.36±0.02(aA)aA	0.13±0.03(bB)cB	0.36±0.07(aA)aA	0.18±0.01(aA)bcB	0.14±0.01(aA)cB
SS	0.26±0.01(bB)abAB	0.10±0.02(bB)cB	0.16±0.02(bB)bB	0.12±0.01(aA)bcB	0.12±0.02(abA)bcB

重度受害处理葫芦素 B 含量显著高于轻度受害系统对照 ($P<0.05$), 但与其他 3 个受害处理差异不显著 ($P>0.05$)。重度受害处理葫芦素 B 含量在第 1 天和第 5 天时显著高于轻度受害处理 ($P<0.05$), 而在第 3 天显著低于轻度处理 ($P<0.05$), 在第 7 天和第 9 天差异不显著 ($P>0.05$)。重度受害系统对照葫芦素 B 含量只在受害第 1 天显著高于轻度受害系统对照 ($P<0.05$), 其他 4 个处理时间差异不显著 ($P>0.05$)。上述结果表明, 南美斑潜蝇幼虫为害也可诱导黄瓜叶片中葫芦素 B 含量上升, 但系统诱导作用不明显。

3 讨论

3.1 植食性昆虫为害对寄主植物蛋白酶抑制剂活性的影响

植物在生长过程中, 经常会受到一些植食性昆虫的攻击, 而在其长期的进化过程中, 植物会主动地形成复杂的防卫体系, 以寻求最适合自身生长的防御策略(Karban and Myers, 1989)。本文研究表明, 南美斑潜蝇幼虫为害诱导寄主叶片内蛋白质抑制剂 (CI 和 TI) 活性显著上升, 但诱导强度与受害程度并不完全一致。其他研究者也获得了与本文类似的结果。例如, 落叶松毛虫

Dendrolimus superans 取食及剪叶可诱导兴安落叶松产生系统性防御反应, 处理后的 1~20 d, 苗木针叶内 TI 和 CI 两种抑制剂活性产生显著变化, 诱导产生的 TI 和 CI 的活性与损伤程度无显著相关性 (王琪等, 2008)。王洪涛等 (2011) 在研究 B 型烟粉虱 *Bemisia tabaci* 取食诱导的烟草对斜纹夜蛾 *Prodenia litura* 生长发育和繁殖的影响及机制时发现, B 型烟粉虱为害烟草后, 虫体叶、中间叶和系统白脉叶中 TI 含量较相应对照显著升高。

植食性昆虫取食诱导的植物防御反应常具有系统传导性, 既能够在受害的局部叶片上表达, 也能在未受危害的上下系统叶片中表达 (Karban and Myers, 1989)。例如, 烟草天蛾 *Manduca sexta* 为害烟草后, 增强了烟草对后取食的烟草天蛾的防御, 局部被害叶和未被害的系统叶均能显著降低烟草天蛾幼虫的虫体重量 (Kessler and Baldwin, 2004)。诱导型蛋白酶抑制剂的产生通常具有系统性。B 型烟粉虱为害烟草对 TI 具有系统诱导作用 (王洪涛等, 2011)。马铃薯甲虫为害可诱导马铃薯和番茄整个植株蛋白酶抑制剂基因的表达, 从而证明了植物体内蛋白酶抑制剂的诱导合成具有系统性 (Green and Ryan, 1972)。然而, 并不是所有蛋白酶抑制剂的

诱导表达都具有系统性。例如,当麦二叉蚜 *Schizaphis graminum* 取食为害大麦叶片后,在叶片取食部位和未取食部位中诱导了 CI 活性的增加,但只在被蚜虫取食过的大麦叶片部位检测到了 TI (Casaretto *et al.*, 2004)。Jongsma 等(1994)的研究表明,通过机械损伤处理烟草和番茄老叶,在越靠近伤害部位 TI 活性越强,而在损伤叶以外叶片中 TI 活性无明显变化。本文研究也表明,南美斑潜蝇幼虫为害对 CI 活性具有系统诱导作用,而对 TI 系统诱导作用不明显。另一方面,通过对番茄机械损伤诱导产生的蛋白酶抑制剂,会随着番茄生长期的延续而逐渐减弱,说明植物蛋白酶抑制剂的系统诱导表达程度与植株的不同生育期有关(Alarcon and Malone, 1995; Botella *et al.*, 1996; van Dam *et al.*, 2001)。可见,害虫取食为害或机械损伤对蛋白酶抑制剂的诱导是否具有系统性,可能与蛋白酶抑制剂种类、为害方式和寄主植物有关。

3.2 植食性昆虫为害对寄主植物葫芦素含量的影响

本研究表明,南美斑潜蝇幼虫取食会诱导黄瓜叶片中葫芦素 B 含量上升,这与其他研究者的结果相同。例如,葫芦科植物遭到瓜植食瓢虫 *Epilachna borealis* 为害后,叶片中的葫芦素 B 和 D 含量升高,从而使其对该瓢虫的适生性降低(Tallamy, 1985);黄足黄守瓜 *Aulcophora femoralis* 为害南瓜 *Cucurbita moschata* 后,其子叶中葫芦素 B 含量升高(刘慧等, 2007)。

从表 3 可知,在南美斑潜蝇幼虫取食为害第 1 天时,轻度受害、重度受害和 2 个系统对照中葫芦素 B 含量均显著高于健康对照,而且重度受害及其系统对照极显著地高于轻度受害及其系统对照。这可能是由于植物在昆虫的突然袭击

下能够灵活地调节诱导防御,以最小的代价取得最大的防御效果(刘慧等, 2009)。由表 3 还可以看出,南美斑潜蝇幼虫重度为害诱导黄瓜产生的葫芦素 B 含量通常高于轻度为害,但葫芦素 B 含量并不完全随受害时间的延长而增加,受害处理第 7 天和第 9 天与相应健康对照无显著差异。造成这一现象的原因有待于今后进一步研究。

综上所述,南美斑潜蝇幼虫取食为害后可诱导黄瓜叶片内蛋白酶抑制剂活性和葫芦素 B 含量上升,而目前研究表明蛋白酶抑制剂和葫芦素均可抑制植食性昆虫的生长发育和存活。因此,培育蛋白酶抑制剂或葫芦素含量高或易诱导的黄瓜品种可能是控制南美斑潜蝇为害的有效途径。

参考文献 (References)

- Alarcon JJ, Malone M, 1995. The influence of plant age on wound induction of proteinase inhibitors in tomato. *Physiol. Plant*, 95(3): 423-427.
- Bhattacharyya A, Rai S, Babu CR, 2007. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from *Caesalpinia bonduc* seeds: isolation, partial characterization and insecticidal properties. *Plant Physiol. Biochem.*, 45(3/4): 169-177.
- Botella MA, Xu Y, Prabha TN, 1996. Differential expression of soybean cysteine proteinase inhibitor genes during development and in response to wounding and methyl jasmonate. *Plant Physiol.*, 112(3): 1201-1210.
- Broadway RM, 1995. Are insect resistant to plant proteinase inhibitor? *J. Insect Physiol.*, 41(2): 107-116.
- Casaretto JA, Zúñiga GE, Corcuera L, 2004. Abscisic acid jasmonic acid affect proteinase inhibitor activities in barley leaves. *J. Plant Physiol.*, 161(4): 389-396.
- Douglas WT, Jason S, Nathan PE, Gorski PM, Mason CE, 1997. Cucurbitacins as feeding and oviposition deterrents to insects. *Environ. Entomol.*, 26(3): 678-683.
- Deheer CJ, Tallamy DW, 1991. Affinity of spotted cucumber beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) larvae to cucurbitacins. *Environ. Entomol.*, 20(4): 1173-1175.
- Farmer EE, Johnson RR, Ryan CA, 1992. Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic

- acid. *Plant Physiol.*, 98(3): 995–1002.
- Ferguson JE, Metcalf ER, Metcalf RL, Rhodes AM, 1983. Influence of cucurbitacin content in cotyledons of Cucurbitaceae cultivars upon feeding behavior of diabroticite beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Chem. Ecol.*, 76(1): 47–51.
- Geoffroy P, Legrand, M, Fritig B, 1990. Isolation and characterization of a proteinaceous inhibitor of microbial proteinases induced during the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 3(5): 327–333.
- Green TR, Ryan CA, 1972. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science*, 175(4023): 776–777.
- Heath RL, McDonald G, Christeller JT, Lee M, Bateman K, West J, Vanheeswuck R, Anderson MA, 1997. Proteinase inhibitors from *Nicotiana glauca* enhance plant resistance to insect pests. *J. Insect Physiol.*, 43(9): 833–842.
- Johnson R, Narvaez J, An G, Ryan CA, 1989. Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(24): 9871–9875.
- Jongsma MA, Bakker PL, Visser B, Stiekema WJ, 1994. Trypsin inhibitor activity in mature tobacco and tomato plants is mainly induced locally in response to insect attack, wounding and virus infection. *Planta*, 195(1): 29–35.
- Karban R, Myers JH, 1989. Induced plant responses to herbivory. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 20: 331–348.
- Kessler A, Baldwin IT, 2004. Herbivore-induced plant vaccination. Part I. The orchestration of plant defenses in nature and their fitness consequences in the wild tobacco *Nicotiana attenuata*. *Plant J.*, 38(4): 639–649.
- McManus MT, Burgess EPJ, 1995. Effect of the soybean (kunitz) trypsin inhibitor on growth and digestive protease of larvae of *Spodoptera litura*. *J. Insect Physiol.*, 41(9): 731–738.
- Metcalf RL, 1986. Coevolutionary adaptations of rootworm beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) to cucurbitacins. *J. Chem. Ecol.*, 12(5): 1109–1124.
- Metcalf RL, Rhodes AM, Metcalf RA, Ferguson J, Metcalf ER, Lu PY, 1982. Cucurbitacin contents and *Diabroticite* (Coleoptera: Chrysomelidae) feeding upon *Cucurbita* spp. *Environ. Entomol.*, 11(4): 931–937.
- Peña-Cortes H, Sánchez SJ, Rocha SM, Willmitzer L, 1988. Systemic induction of proteinase inhibitor-II gene expression in potato plants by wounding. *Planta*, 174(1): 84–89.
- Ryan CA, 1990. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 28: 425–449.
- Scheffer SJ, 2000. Molecular evidence of cryptic species within the *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). *J. Econ. Entomol.*, 93(4): 1146–1147.
- Tallamy DW, 1985. Squash beetle feeding behavior: an adaptation against induced cucurbit defence. *Ecology*, 66(5): 1574–1579.
- Thaler JS, 1999. Induced resistance in agricultural crops: effects of jasmonic acid on herbivory and yield in tomato plants. *Environ. Entomol.*, 28(1): 30–37.
- van Dam NM, Horn M, Mares M, Baldwin IT, 2001. Ontogeny constrains systemic protease inhibitor response in *Nicotiana attenuata*. *J. Chem. Ecol.*, 27(3): 547–568.
- Zavala JA, Giri AP, Jongsma MA, Baldwin IT, 2008. Digestive duet: midgut digestive proteinases of *Manduca sexta* ingesting *Nicotiana attenuata* with manipulated trypsin proteinase inhibitor expression. *PLoS ONE*, 3(4): 1–10.
- 陈兵, 康乐, 2002. 南美斑潜蝇在我国发生趋势和地理差异分析. *植物检疫*, 16(3): 138–140. [Chen B, Kang L, 2002. Analysis of trends of occurrence and geographic variation of pea leafminer *Liriomyza huidobrensis*. *Plant Quarantine*, 16(3): 138–140]
- 董易之, 张茂新, 凌冰, 2005. 葫芦素 B 对甜菜夜蛾幼虫取食和成虫产卵的影响. *华南农业大学学报*, 26(2): 56–58. [Dong YZ, Zhang MX, Ling B, 2005. Influence of cucurbitacin B on feeding behavior and oviposition of *Spodoptera exigua*. *J. South China Agric. University*, 26(2): 56–58]
- 高俊平, 庞保平, 刘慧, 孟瑞霞, 2006. 南美斑潜蝇对番茄的选择性与叶毛数和营养物质含量的关系. *植物保护*, 32(2): 25–28. [Gao JP, Pang BP, Liu H, Meng RX, 2006. Relationship between hosts electivity of *Liriomyza huidobrensis* on tomatoes and leaf trichomes and nutriments. *Plant Protection*, 32(2): 25–28]
- 高俊平, 庞保平, 孟瑞霞, 王娟, 2007. 南美斑潜蝇寄主选择性与植物营养物质及叶绿素含量的关系. *应用生态学报*, 18(3): 701–704. [Gao JP, Pang BP, Meng RX, Wang J, 2007. Relationships between host preference of *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard) and nutrient and chlorophyll contents in host foliage. *Chin. J. Appl. Ecol.*, 18(3): 701–704]
- 麻旭东, 庞保平, 李艳艳, 郑楠, 曹阳, 孟庆玖, 2009. 南美斑潜蝇对寄主植物挥发物的行为反应. *内蒙古农业大学学报(自然科学版)*, 30(2): 74–77. [Ma XD, Pang BP, Li YY, Cao Y, Meng QJ, 2009. Behavioral response of *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard) adults to host plant volatile. *J. Inner Mongolia Agric. University*, 30(2): 74–77]

- 庞保平, 高俊平, 周晓榕, 王娟, 2006. 南美斑潜蝇寄主选择性与植物次生化合物及叶毛的关系. 昆虫学报, 49(5): 810-815. [Pang BP, Gao JP, Zhou XR, Wang J, 2006. Relationship between host plant preference of *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard) (Diptera: Agromyzidae) and secondary plant compounds and trichomes of host foliage. *Acta Entomol. Sin.*, 49(5): 810-815]
- 凌冰, 张茂新, 王玉赞, 2010. 葫芦素的生态功能及其应用前景. 生态学报, 30(3): 780-793. [Ling B, Zhang MX, Wang YZ, 2010. Ecological function and prospects for utilization of cucurbitacins. *Acta Ecol. Sin.*, 30(3): 780-793]
- 凌冰, 向亚林, 董易之, 侯有明, 2006. 葫芦素 B 对美洲斑潜蝇成虫产卵和取食的抑制作用研究 (英文). 天然产物研究与开发, 18: 29-32. [Ling B, Xiang YL, Dong YZ, Hou YM, 2006. Oviposition and Feeding Activity of Cucurbitacin B against *Liriomyza sativae* Blachard. *Nat. Prod. Res. Dev.*, 18: 29-32]
- 刘慧, 许再福, 黄寿山, 2007. 黄足黄守瓜(*Aulcophora femoralis chinensis*)取食和机械损伤对南瓜子叶中葫芦素 B 的诱导作用. 生态学报, 27(12): 5421-5426. [Liu H, Xu ZF, Huang SS, 2007. Comparing on the inducing Cucurbitacin B content in cotyledon of squash aroused by *Aulcophora femoralis chinensis* (Coleoptera: Chrysomelidae) and mechanical damage. *Acta Ecol. Sin.*, 27(12): 5421-5426]
- 刘慧, 许再福, 黄寿山, 2009. 黄足黄守瓜取食南瓜诱导葫芦素 B 含量的变化规律. 昆虫知识, 46(4): 538-542. [Liu H, Xu ZF, Huang SS, 2009. Changes of Cucurbitacin B in pumpkin induced by *Aulcophora femoralis chinensis*. *Chin. Bull. Entom.*, 46(4): 538-542]
- 孙兴华, 周晓榕, 庞保平, 孟庆玖, 2012. 南美斑潜蝇为害对黄瓜体内主要营养物质、次生代谢物质及叶绿素含量的影响. 昆虫学报, 55(10): 1178-1184. [Sun XH, Zhou XR, Pang BP, Meng QJ, 2012. Effects of infestation of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae) on the contents of main nutrients, second metabolites and chlorophyll in cucumber leaves. *Acta Entomologica Sinica*, 55(10): 1178-1184]
- 唐启义, 2010. DPS[®]数据处理系统: 实验设计、统计分析及数据挖掘. 北京: 科学出版社. 75-88. [Tang QY, 2010. DPS[®] Data Processing System: Experimental Design, Statistical Analysis and Data Mining (Second Edition). Beijing: Science Press, 75-88]
- 王洪涛, 薛明, 李庆亮, 张晓, 周方园, 2011. B 型烟粉虱取食诱导的烟草对斜纹夜蛾生长发育和繁殖的影响及机制探讨. 中国农业科学, 44(22): 4600-4609. [Wang HT, Xue M, Li QL, Zhang X, Zhou FY, 2011. Effects of tobacco plants infested by *Bemisia tabaci* (Gennadius) B-biotype on the development and reproduction of *Spodoptera litura* (Fabricius) and related mechanisms. *Sci. Agric. Sin.*, 44(22): 4600-4609]
- 王琪, 严善春, 王艳军, 张健, 袁红娥, 2008. 剪叶及昆虫取食对兴安落叶松蛋白酶抑制剂的影响. 昆虫学报, 51(8): 798-803. [Wang Q, Yan SC, Wang YJ, Zhang J, Yuan HE, 2008. Activities of proteinase inhibitors in *Larix gmelinii* seedlings under the stresses of cutting needles and herbivore feeding. *Acta Entom. Sin.*, 51(8): 798-803]
- 王琛柱, 钦俊德, 1997. 植物蛋白酶抑制剂抗虫作用的研究进展. 昆虫学报, 40(2): 212-218. [Wang CZ, Qing JD, 1997. Protease inhibitors in plants contributing to resistance to insects: an overview. *Acta Entom. Sin.*, 40(2): 212-218]
- 闫丽英, 庞保平, 周晓榕, 张翠青, 2008. 南美斑潜蝇对不同菜豆品种的偏好性与寄主化学物质含量的关系. 中国农业科学, 41(3): 713-719. [Yan LY, Pang BP, Zhou XR, Zhang CQ, 2008. Relationship between host plant preference of *Liriomyza huidobrensis* for different *Phaseolus vulgaris* varieties and plant compound contents. *Sci. Agric. Sin.*, 41(3): 713-719]
- 张健, 严善春, 王琪, 2009. 落叶松结实量对其防御酶和蛋白酶抑制剂活力的影响. 林业科学, 5(8): 96-100. [Zhang J, Yan SC, Wang Q, 2009. Influence of the different cone grades on activities of protective enzymes and protease inhibitors in needles of *Larix* spp. *Sci. Silvae Sin.*, 5(8): 96-100]
- 张茂新, 凌冰, 曾玲, 庞雄飞, 2004. 六种植物叶片中葫芦素 B 对美洲斑潜蝇寄主选择性的影响. 生态学报, 24(11): 2564-2568. [Effect of cucurbitacin B in leaves from six plants species on plant selectivity of the leafminer, *Liriomyza sativae*. *Acta Ecol. Sin.*, 24(11): 2564-2568]