

茄二十八星瓢虫为害对不同基因型番茄叶内三种抗性酶活性的影响*

王国红^{1**} 曹彬¹ 黄长礼¹ 戈峰²

(1. 福建师范大学生命科学学院, 福州 350108;

2. 中国科学院动物研究所, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 【目的】研究茉莉酸合成相关基因在番茄抗茄二十八星瓢虫 *Henosepilachna vigintioctopunctata* Fabricius 中的作用, 探讨茉莉酸信号因子在植物防御过程中起到的作用。【方法】利用 3 种基因型番茄茉莉酸合成缺失突变体 *spr2*、茉莉酸合成过量表达体 *35s*、野生型番茄 *Wt* 为材料, 通过经 2 龄茄二十八星瓢虫分别取食 6、24、48 h 后, 利用分光光度计测定 3 种基因型番茄叶片内苯丙氨酸解氨酶 (Phenylalanineammonialyase, PAL)、胰蛋白酶抑制剂 (Protease inhibitors, PI) 和脂氧合酶 (Lipoxygenase, LOX) 酶活性的动态变化。【结果】*35s* 型番茄叶片内 PI 活性显著高于另两种番茄叶片, 而 *spr2* 型番茄叶片 PI 活性最低。瓢虫为害后, 3 种基因型番茄 PI 酶活性明显提高, 在 *35s* 和 *Wt* 型番茄中, PI 和 LOX 酶活性在胁迫 24 h 和 6 h 达到最高值, 而 *spr2* 型番茄没有显著变化。受到瓢虫侵染的系统叶中, PI 和 LOX 酶活性也受到了诱导, 系统叶变化趋势同危害叶相同, 但诱导的 PI 和 LOX 酶活性明显低于危害叶。在危害处理过程中, 均呈现上升-下降的趋势, 在系统叶中, 则 PAL 活性没有显著变化。番茄叶片受害后, PI 和 LOX 酶活性上升幅度大于 PAL, 说明 PI 和 LOX 对取食胁迫响应比 PAL 更敏感。【结论】*35s* 茉莉酸合成过量表达体的番茄对茄二十八星瓢虫有一定的抗虫作用, 因此, 茉莉酸在植物抗性中起了一定作用。**关键词** 茄二十八星瓢虫, 突变体番茄, 防御酶活性, 基因表达

Effects of *Henosepilachna vigintioctopunctata* Fabricius infestation on resistant enzyme activity in the leaves of tomato genotypes with different JA pathways

WANG Guo-Hong^{1**} CAO Bin¹ HUANG Chang-Li¹ GE Feng²

(1. College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China; 2. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China)

Abstract [Objectives] We examined interactions between *H. vigintioctopunctata* and three isogenic tomato (*Lycopersicon esculentum*) genotypes with different jasmonic acid (JA) pathways. [Methods] The tomato genotypes were; suppressor of prosystemin-mediated responses2 (*spr2*) mutant plants, *35s* prosystemin (*35s*) plants, and wild type (*Wt*) plants. Activity of protease inhibitors (PI) and lipoxygenase (LOX) and dynamic change in relative gene expression of the three kinds of enzymes were tested to study the defense signal pathway induced by *H. vigintioctopunctata* in tomatoes, and the role of jasmonic acid (JA) in the plant defense process. [Results] Major results were; activity and gene expression of PI and LOX in *35s* type tomatoes were significantly higher than in the other two varieties whereas the *spr2* type tomato had the lowest level of PI expression. Different periods of exposure to *H. vigintioctopunctata* showed that the highest PI and LOX activity occurred in *35s* and *wt* type tomatoes 24 h and 6 h after infestation, respectively. There was no significant temporal change in enzyme activity in *spr2* type tomatoes. There were no significant differences in PAL activity and relative gene expression in the three tomato varieties. In the process of feeding on plants by *H. vigintioctopunctata*, PAL activity initially increased then declined

* 资助项目 Supported projects: 福建省自然科学基金项目 (2013J01121); 福建省科技厅重点项目 (2015N0027)

**第一作者 First author, E-mail: guohongw@fjnu.edu.cn

收稿日期 Received: 2014-09-30, 接受日期 Accepted: 2015-02-21

after 48 h. No significant changes in PAL activity and gene expression were observed in systemic leaves. PI and LOX were more sensitive to insect herbivory than PAL. [Conclusion] 35s tomatoes are to a certain degree resistant to *H. vigintioctopunctata* and jasmonic acid (JA) plays a role in this resistance.

Key words *Henosepilachna vigintioctopunctata* Fabricius, mutant tomato, resistant enzyme activity, gene expression

植物受到外界胁迫诱导后会产生多种防御性蛋白, 主要有蛋白酶抑制剂、代谢酶类、氧化酶类和病程相关蛋白等 (Bari *et al.*, 2009)。植物因植食性昆虫为害胁迫导致叶片内茉莉酸含量增加, 茉莉酸进而会诱导防御蛋白基因的表达, 导致体内多种酶类和蛋白含量水平的提高, 如脂氧合酶、多酚氧化酶等, 从而对入侵植食性昆虫产生直接防御效应 (Thaler *et al.*, 2002)。植物通常采取以茉莉酸信号途径为主的诱导抗性策略抵抗咀嚼式口器昆虫的为害 (Reymond *et al.*, 2000), 如斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 幼虫取食能导致油菜体内茉莉酸和蛋白酶抑制剂 (Proteinase inhibitors, PIs) 含量系统性上升 (胡留成等, 2010)。外用 JAs 同样能诱导植物增强抗虫性。如外源茉莉酸甲酯喷雾法或暴露法处理茶树, 都能够诱导茶树叶片脂氧合酶、多酚氧化酶和蛋白酶抑制素活性增加 (桂连友等, 2005)。植物不仅能在受伤位点诱导出 PI (称为局部反应), 还能产生特定的信号分子, 移动到未受伤的叶片中激活 PI 的表达 (称为系统反应) (Zheng *et al.*, 2007)。普遍认为茉莉酸 (Jasmonic acid, JA) 是植物诱导抗性中重要的信号物质之一, 其甲酯 (Methyl-jasmonic acid, MeJA) 则介导了长距离运输的信号, 并确立了茉莉酸在调控植物对昆虫抗性反应中的核心地位 (Li *et al.*, 2002; Ryan and Moura, 2002)。

茄二十八星瓢虫 *Henosepilachna vigintioctopunctata* Fabricius 是多种茄科和葫芦科植物的主要害虫之一 (王国红和涂小云, 2005)。它可以造成茄子、马铃薯、番茄、豆科、十字花科等多种农作物干枯、萎蔫和大量死亡。番茄是茄科植物的一种, 且是生物学领域的模式生物, 中国科学院遗传与发育研究所的科学家与国外合作, 通过遗传工程的方法, 成功地获得了茉莉酸合成缺失突变体 (Suppressor of prosys-

temin-mediated response 2, *spr2*)、茉莉酸过量表达突变体 (35s: prosystemin) (Li *et al.*, 2002)。茉莉酸合成缺失突变体在茉莉酸生物合成和信号转导方面发生了缺陷, 因而都丧失了受伤诱导的 PIs 基因的表达能力。为研究茉莉酸在诱导植物抗性的功能方面提供了理想的模式材料 (李常保等, 2005)。有关茉莉酸类在番茄防御反应中的作用近来已有一些报道 (Cooper and Goggin, 2005), 茉莉酸合成缺陷番茄突变体对害虫敏感, 在拟南芥中也有同样的报道, 外源茉莉酸甲酯有利于诱导相关基因表达水平的提高, Cooper 和 Goggin (2005) 研究表明外源茉莉酸喷施可以提高番茄对线虫的抗性, 表明茉莉酸等可以直接诱导防御基因。但目前对于茄二十八星瓢虫与茄科植物互作关系研究并不清楚, 茄二十八星瓢虫是咀嚼式口器植食性昆虫, 其对植物产生危害所产生的防御反应与 JA 有关具体作用机制又是如何? 针对以上问题, 本文利用 3 种基因型番茄: 茉莉酸途径突变体番茄: 茉莉酸合成突变体 (*spr2*)、茉莉酸过量表达突变体 (35S:PS) 与野生型番茄 (*Wt*) (Li *et al.*, 2002) 为材料, 通过经茄二十八星瓢虫取食后, 测定 3 种基因型番茄叶片内苯丙氨酸解氨酶 (Phenylalanineammonialyase, PAL)、胰蛋白酶抑制剂 (Protease inhibitors, PI) 和脂氧合酶 (Lipoxygenase, LOX) 活性来探明茄二十八星瓢虫取食后引起的番茄体内防御信号转导途径, 为进一步探明茄二十八星瓢虫取食诱导番茄防御反应的机理和茄二十八星瓢虫的综合治理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫 在野外抓取一定数量茄二十八星瓢虫带回室内置于塑料盒中饲养, 将塑料盒置于光照培养箱中, 用 3 种基因型番茄叶片饲

养,实验温度均为 25℃,光照强度为 500~700 lx。

1.1.2 供试植株 实验材料为茄二十八星瓢虫和 3 种基因型番茄: *Wt*, 野生型番茄; *spr2*, 茉莉酸合成缺失突变体; *35s*, 茉莉酸过量表达体, 均取自中科院遗传与发育研究所李传友研究员研究组。供试番茄均同期播种在花盆中, 并置于温室防虫网中培养(温度 25℃, 相对湿度 50%~70%, 自然光照)。约 4 周后用于实验。

1.2 方法

1.2.1 番茄叶片的诱导处理 每种基因型各取 12 盆, 1 h 后用毛笔轻轻挑取幼虫放置于番茄叶片上, 每株番茄选 3 片叶, 每片叶片接 4 头同一批次孵化已蜕皮 48 h 的茄二十八星瓢虫 2 龄幼虫。用 4 号自封袋(苹果牌, 用针扎孔以透气)所制虫笼套住幼虫及其所在叶片, 在密封袋口与叶柄相接处用脱脂棉缠绕分枝防止瓢虫逃走。每个基因型番茄 0 h 不做虫害处理为对照, 其余 9 盆分别做 6、24、48 h 虫害处理, 每个时间点实验处理重复 3 盆, 其中虫害直接取食的叶片作为为害叶, 取为害叶上方相邻健康叶片作为系统叶。每个实验处理重复 3 盆。

1.2.2 防御酶活性测定 粗酶液提取: 取约 0.5 g 番茄叶片样品, 先加入预冷的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7.8, 含 7% 聚乙烯吡咯烷酮(Polyvinyl pyrrolidone, PVP)) 约 1 mL, 加入少许石英砂, 冰浴研磨, 加入 0.4 mL 10% TritonX-100, 并继续加入缓冲液至最终体积为 4 mL。混匀后将匀浆液于 10 000 g (4℃) 离心 10 min, 弃沉淀, 上清液为待测粗酶液, 于 4℃ 保存。

LOX 活性测定参照姚锋先等(2006)方法, 略有改动。以 2.4 mL 0.1 g/L 亚油酸作为底物, 加入 0.1 mL 粗酶液, 在 234 nm 处测定吸光度值, 每隔 30 s 读数 1 次, 共测 5 min。LOX 酶活性以每分钟在 234 nm 处吸光度变化 0.01 作为一个酶活力单位。

PAL 活性测定参照邹志燕和王振中(2006)方法进行测定, 略有改动。在 2.80 mL 含有 L-苯丙氨酸(20 mmol/L)的 Tris-HCL 缓冲液(0.05 mol/L, pH 值 8.8)中加入 20 μ L 粗酶液,

混匀后于 290 nm 处测 2 min 内吸光度值的变化。以每分钟吸光度值变化 0.01 表示 1 个酶活力单位。

PIs 活性根据 Stout (2011) 的方法进行测定。称取番茄叶片 0.1~0.2 g 冰浴研磨, 加入提取液 900 μ L。提取液为 pH 7.8 Tris HCL 缓冲液(50 mmol/L), 内含 7% PVP, 在提取液中加入 1.67 mmol/L 苯基硫脲(Phenylthiourea), 0.3 mol/L 氯化钾和 0.4 mmol/L 抗坏血酸。研磨液置于 4℃ 离心机 13 000 g 离心 10 min, 吸取上清液作为粗酶液用于 PI 活性测定。吸取 25 μ L 粗酶液加入 25 μ L 0.001 mol/L HCL 中, 内含 0.001 mg 胰凝乳蛋白酶, 37℃ 混合保温 10 min。向保温后的混合液中加入 1 mL 0.5 mmol/L BTEE 溶液, 吸取 200 μ L 加至酶标板, 于 256 nm 条件下比色, 测定 10 min 内吸光度的变化值。空白对照不加酶液。单位时间内吸光度值变化 0.01 代表生成了一个单位的 PIs。

1.2.3 数据统计分析 以防御酶活性为自变量, 以番茄基因型, 虫害处理时间和为害类型为固定因子, 采用单变量多因素方差分析, 对数据进行处理, 并进行 Tukey 比较(SPSS15.0, $P=0.05$)。之后酶活用一维方差分析进行检测。

2 结果与分析

2.1 番茄叶片内茉莉酸对于植物防御途径中 PI 酶活性影响

结果显示: 番茄茉莉酸过量表达突变体(35S:PS)酶活性显著高于 *spr2* 型和野生番茄, *spr2* 型番茄叶片 PI 活性比野生番茄明显低。以野生型为害叶为对照, 虫子胁迫后的 48 h 内都能诱导植株发挥酶活性, 但诱导的酶的活性在不同植株中有明显的变化, 其中在 35s 过表达植株中, 诱导 PI 酶的活性均高于野生型植株, 而在 *spr2* 缺陷型植株中诱导的酶的活性均低于野生型植株(图 1), 差异显著, 显示瓢虫胁迫后, 在胁迫侵染的部位能激发胁迫部位茉莉酸的合成并发挥功能。

以 0 时间处理组为对照, 在 3 种植株中, 诱发的 PI 酶活随着瓢虫胁迫时间的延长而增加, 胁迫后 24 h 两者达到最高, 之后开始下降。瓢

虫胁迫植株时,在同植株没有受到瓢虫侵染的系统叶中,PI 酶的活性也受到了诱导,在 *35s* 过表达植株中诱导的酶活性也高于野生型植株,在 *spr2* 缺陷型植株中诱导的酶活性也低于野生型植株(图 2);而且以 0 时间处理组为对照,在 3 种植株中,诱发的 PI 酶的活性也随着瓢虫胁迫时间的延长而增加。但是,在系统叶中诱导的 PI 酶活性明显低于为害叶,茄二十八星瓢虫胁迫后,在非侵染部位也激发部分茉莉酸的合成。

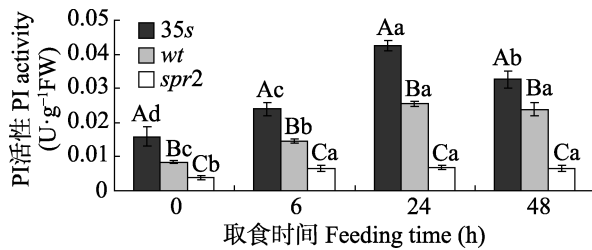


图 1 3 种基因型番茄受到茄二十八星瓢虫幼虫取食后为害叶 PI 的活性

Fig. 1 PI activities of damaged leaves in three genotypes tomatoes infected by larvae of *Henosepilachna vigintioctopunctata*

图中数据为平均值±标准差,柱上标有不同的小写字母表示同一基因型不同取食时间之间的差异显著,不同大写字母表示同一时间不同基因型之间的差异显著 ($P < 0.05$)。下图同。

Data in the figure are mean±SD. Histograms with different lowercase letters indicate significant differences among feeding time in the same genotype; while different uppercase letters indicate significant differences among treatments of the genotype in the same time ($P < 0.05$). The same blow.

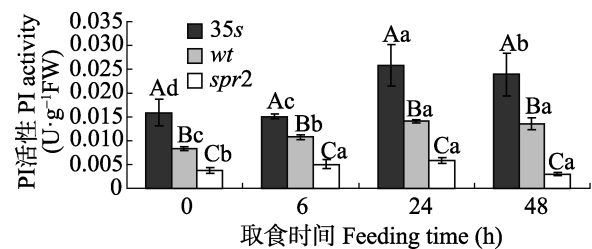


图 2 3 种基因型番茄受到茄二十八星瓢虫幼虫取食后系统叶 PI 的活性

Fig. 2 PI activities of systemic leaves in three genotypes tomatoes infected by larva of *Henosepilachna vigintioctopunctata*

2.2 番茄叶片内茉莉酸对于植物防御途径中 LOX 酶活性的影响

图 3 和图 4 可以看出, LOX 酶活性表明,

番茄茉莉酸过量表达突变体 (*35S:PS*) 酶活性显著高于 *spr2* 型和野生番茄, *spr2* 型番茄叶片 PI 活性比野生番茄明显低。瓢虫为害后, 3 种基因型番茄 LOX 酶活性明显提高, 但诱导的量在不同植株中有明显的变化, 在为害叶中, *35s* 型番茄 LOX 活性分别是 *Wt* 型和 *spr2* 型番茄的 1.36 倍和 3.9 倍。在取食 6 h 后, *35s* 型番茄内 LOX 活性与 *spr2* 型番茄具有显著性差异, 为后者的 6.65 倍, 此时达到最高值, *Wt* 型番茄被取食 6 h 后 LOX 活性同样被诱导, 但低于 *35s* 型番茄, 高于 *spr2* 型番茄。取食 24 h 后, *35s* 型番茄叶片内 LOX 活性有所降低, *Wt* 型番茄为害叶内酶活性与健康叶相比被显著诱导升高。随取食时间延长至 48 h, 3 种基因型番茄叶片内 LOX 活性开始下降, 其中 *35s* 和 *Wt* 型番茄 LOX 活性与 24 h 相比降低明显。在系统叶中, *35s* 型番茄叶片 LOX 活性同样在 6 h 达到最高值, 随后降低, *Wt* 型则在 24 h 达到最高值, *spr2* 型番茄叶片 LOX 活性没有变化。LOX 酶活性变化表明受到取食为害后, *Wt* 型番茄叶片内 LOX 酶表达升高现象的发生要滞后于 *35s* 型番茄叶片, *spr2* 型番茄则无明显变化, 系统叶变化趋势同为害叶相同。

结果显示:茉莉酸过量表达体 *35s* 植株中受到茄二十八星瓢虫胁迫后的叶片及健康叶片中的 LOX 酶活性显著高于 *spr2* 型茉莉酸缺失体番茄和野生番茄, *spr2* 型番茄叶片内 LOX 酶活性最低。以野生型为害叶为对照, 瓢虫胁迫后的 48 h 内, 3 种番茄均呈现先升后降的趋势, 但酶活性的变化在不同基因型植株之间差异较大, 这可能是由于瓢虫取食后, 在为害叶部位产生诱导了茉莉酸合成, 进而提高了 LOX 酶的合成表达。

以 0 h 健康叶片为对照, 3 种植株 LOX 酶活随胁迫时间延长而发生变化。其中 *35s* 过量表达体为害和系统叶片 LOX 酶活性均在 6 h 即达到最大值, 而 *Wt* 型和 *spr2* 型植株在 24 h 达到最大值, *Wt* 型番茄叶片内 LOX 酶表达升高现象的发生要滞后于 *35s* 型番茄叶片, *spr2* 型番茄在 24 h 内 LOX 酶活性有升高, 但诱导的酶的活性均低于 *35s* 和野生型植株。说明 *35s* 过量表达的茉莉酸可能导致了 LOX 酶的快速积累和表达(图 3)。

在系统叶中 LOX 酶活性变化趋势类似于为害叶, 茄二十八星瓢虫胁迫后 (图 4), 在为害部位附近的系统叶中叶诱导了茉莉酸的合成, 进而影响了叶片内 LOX 酶活性的改变。

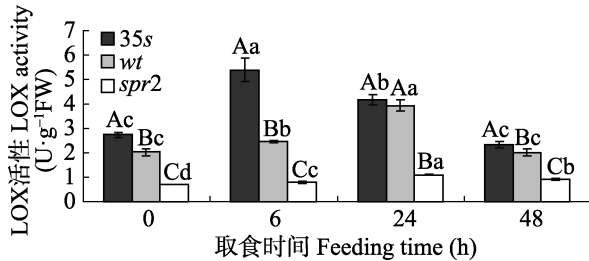


图 3 3 种基因型番茄受到茄二十八星瓢虫幼虫取食后为害叶 LOX 的活性

Fig. 3 LOX activities of damaged leaves in three genotypes tomatoes infected by larva of *Henosepilachna vigintioctopunctata*

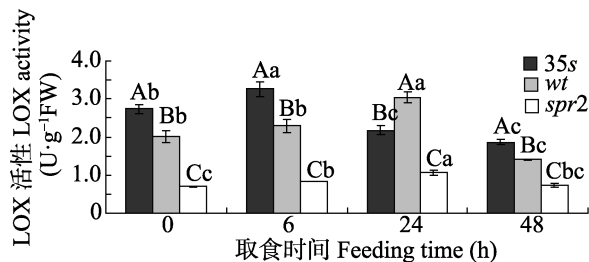


图 4 3 种基因型番茄受到茄二十八星瓢虫幼虫取食后系统叶 LOX 的活性

Fig. 4 LOX activities of systemic leaves in three genotypes tomatoes infected by larva of *Henosepilachna vigintioctopunctata*

2.3 番茄叶片内茉莉酸对于植物防御途径中 PAL 酶活性和基因表达的影响

图 5 和图 6 表明, 3 种植株的健康叶以及为害叶片 PAL 酶活之间没有显著差异, 表明瓢虫胁迫后, 引起的茉莉酸合成表达并不能诱导 PAL 酶活的显著变化。

以未受胁迫的植株叶片作为对照, 3 种植株受到瓢虫取食胁迫后, 诱导的 PAL 酶表达随着胁迫时间的延长而增加, 并在 24 h 时 3 种植株的 PAL 酶活达到最大值, 之后开始降低 (图 5)。说明, 昆虫取食胁迫会引起 PAL 酶的诱导表达, 但与茉莉酸关联度不高。3 种植株的健康叶部位, PAL 酶活也会产生变化, 其中在 35s 过表达植株中诱导的 PAL 酶呈先升后降的趋势, spr2 缺失

体植株和 wt 野生植株 PAL 酶活性呈现上升趋势。但变化趋势平稳 (图 6), 说明茄二十八星瓢虫胁迫后, 在为害叶片附近的健康叶中也引起了 PAL 酶的表达。

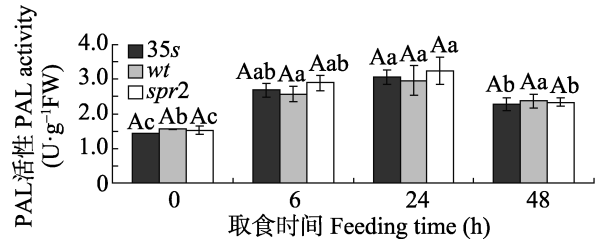


图 5 3 种基因型番茄受到茄二十八星瓢虫幼虫取食后为害叶 PAL 的活性

Fig. 5 PAL activities of damaged leaves in three genotypes tomatoes infected by larva of *Henosepilachna vigintioctopunctata*

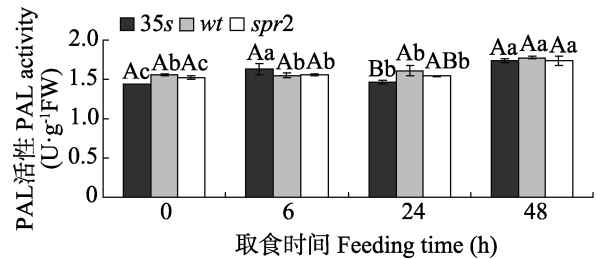


图 6 3 种基因型番茄受到茄二十八星瓢虫幼虫取食后系统叶 PAL 的活性

Fig. 6 PAL activities of systemic leaves in three genotypes tomatoes infected by larva of *Henosepilachna vigintioctopunctata*

3 讨论

茉莉酸诱导防御在植物诱导害虫和病原体损伤的过程中起着重要作用 (杨世勇等, 2013), 植物不仅能在受伤位点诱导出防御性物质 (称为局部反应), 还能产生特定的信号分子, 移动到未受伤的叶片中激活防御性物质的表达 (称为系统反应) (Zheng *et al.*, 2007)。茉莉酸作为研究较为广泛的信号分子可以诱导植物体内多种防御性物质的合成及相关基因的表达, 从而进一步体现在植物自身对于外界胁迫的抗性增强。

研究表明, 与茉莉酸缺失突变体 *spr2* 和野生型番茄 *Wt* 相比, 茉莉酸途径加强型番茄 (35S:PS) 对瓢虫有高抗性; 35s 植株由于 *LePrs* 过量表达能随时随地产生大量茉莉酸, 促进了

PI 等抗性蛋白的合成,引起更强的植物抗性。而野生型番茄 *Wt* 对于瓢虫的抗性,与茉莉酸缺失突变体 *spr2* 相比,PI 和 LOX 酶活有差异但基因表达量却没有达到显著差异。*spr2* 是通过筛选系统素信号传导的抑制子突变 (Suppressor) 获得的一个茉莉酸合成缺失突变体,*spr2* 植物丧失了受伤以及系统素诱导的抗性相关基因的表达,对植物抗性较弱。这与孙玉诚等 (2010) 研究根结线虫和不同基因型番茄的相互作用中结果类似,说明茉莉酸途径能够加强植物对害虫的抗性,但不是参与植物抵抗害虫唯一的防御机制。

3.1 内源性茉莉酸对 PI 和 LOX 的诱导

茉莉酸途径是植物防御咀嚼式昆虫的主要途径,植物受昆虫为害后,其内源茉莉酸水平增加,进而诱导多酚氧化酶 (Polyphenol oxidase, PPO)、过氧化物酶 (Peroxidase, POD)、胰蛋白酶抑制剂 (PI) 和脂氧合酶 (LOX) 防御相关蛋白表达 (王祎等, 2014)。PI 和 LOX 是植物抗性领域中的标志性蛋白,其中脂氧合酶是茉莉酸合成过程中第一个关键酶,当植物受到植食性昆虫伤害时,会激活脂氧合酶基因的表达,从而诱导茉莉酸的分泌和积累,而生成的茉莉酸又能反馈调节脂氧合酶的合成,激活其基因表达,促进了更多的茉莉酸的合成。在受到植食性昆虫为害后 PI 同样可以显著被诱导。落叶松毛虫取食处理 1~20 d,苗木针叶内 PI 活性产生显著变化 (王琪等, 2008)。同样有研究表明,斜纹夜蛾取食为害后的水稻叶片内 LOX 活性被显著提高 (徐涛等, 2003)。石延霞等 (2008) 则通过在黄瓜上喷施脂氧合酶抑制剂和添加茉莉酸的实验表明了 LOX 与 JA 呈显著正相关。PI 和 LOX 是 JA 诱导的重要防御酶。

spr2 植物丧失了受伤以及系统素诱导的抗性相关基因的表达,而外源茉莉酸可以恢复其抗性相关基因的表达。番茄突变体 *def-1* 受到植食性昆虫伤害后,不能诱导茉莉酸和防御蛋白的积累 (Ament *et al.*, 2004),但正常番茄 *def-1* 植株茉莉酸含量与野生型相似,当被蜘蛛螨取食 2 d 后,野生型植株茉莉酸含量增加了 3 倍,但 *def-1*

没有变化 (刘丽艳等, 2005)。用外源茉莉酸处理番茄后,则能诱导其系统防御增加,使蚜虫的生存受到负面影响 (Cooper and Goggin, 2005),并且导致茉莉酸诱导的基因如 PIN2mRNA 在叶中积累 (Bücking *et al.*, 2004)。Bolter 和 Jongsma (1995) 通过喷施外源 MeJA 处理马铃薯,诱导了其叶片内 PI 活性的升高。研究人员通过外源茉莉酸处理野生型番茄后发现其多酚氧化酶活性提高 4 倍左右,可以显著降低蓟马、蚜虫等害虫的危害程度。Redman 等 (2000) 通过用经外源茉莉酸处理过的处于不同生长时期的番茄来饲喂烟草天蛾,番茄中多酚氧化酶的活性也大量提高。在拟南芥突变体中有类似报道,茄二十八星瓢虫取食为害可以显著诱导叶片中 PI 和 LOX 的合成,随着取食为害程度加深,PI 活性逐渐增大,在 24 h 达到最大值,随后下降,而 35S 型番茄叶片中 LOX 活性在 6 h 就达到最大值,随后下降,茉莉酸过量表达体诱导的 PI 和 LOX 活性与另两种番茄具有显著性差异。张立宁等 (2011) 研究表明番茄茉莉酸过量表达突变体 (35S:PS) 提高了植株对根结线虫的抗性。瓢虫为害后,在 *spr2* 缺陷型植株中诱导的酶活性及基因表达量在 24 h 时增加明显,瓢虫为害激活了其体内的 JA 信号传导途径,增强了相关防御酶的表达。番茄叶片内 PI、LOX 对咀嚼式口器害虫茄二十八星瓢虫的取食胁迫敏感性和变化趋势具有相似性。系统叶中 PI 和 LOX 变化趋势同危害叶类似,茉莉酸也可以诱导系统叶 PI 和 LOX 活性的变化。因此,茉莉酸在植物抗性中起了一定作用。

3.2 内源性茉莉酸对 PAL 的诱导

PAL 是 SA 途径和多种次生物质代谢合成中的关键酶,通常受到刺吸式口器和病原菌感染后 PAL 活性会显著提高,如棉蚜为害棉花时,棉花内 PAL 活性得到升高 (姜涛等, 2009)。Loschke 和 Hadwiger (1981) 用豌豆进行试验表明,致病性病原菌诱导的豌豆体内 PAL 活性高出非致病性病菌 50% 左右。然而,同样有实验证明,茉莉酸同样会引起植物体内 PAL 的表达,如杨英等 (2008) 用不同浓度茉莉酸对悬浮培养的胀果

甘草进行 PAL 基因表达测定证明, PAL 基因表达量随茉莉酸浓度的增大而上升。研究表明, 基因型之间受到取食胁迫后差异不显著, 这可能是由于茄二十八星瓢虫属于咀嚼式口器害虫, 主要诱导了 JA 信号途径, 而 3 种基因型番茄在 SA 途径中没有区别, 所以与 SA 途径密切相关的 PAL 表达同样没有产生显著性差异, 同样 3 种基因型番茄叶片受到取食胁迫后, PAL 活性及表达均被诱导升高, 这一结果与马晓乾等 (2012) 通过损伤红皮云杉幼苗后测定其根部 PAL 活性, 发现被显著诱导具有一定的相似性。

茄二十八星瓢虫取食胁迫后 3 种基因型番茄叶片 PI、PAL 及 LOX 酶活性的变化说明了茉莉酸在植物自身抗性中起到的重要作用, 叶片内茉莉酸浓度显著提高了与 JA 途径相关的防御蛋白活性及表达的升高, 从而增强了番茄对茄二十八星瓢虫的诱导抗性。这一结果为将来在茄二十八星瓢虫的生物防治领域奠定了一定基础。至于茉莉酸在植物抗性相关的其他酶及次生物质方面的作用, 还需进行深入分析和了解加以明确。

参考文献 (References)

- Ament K, Kant MR, Sabelis MW, Haring MA, Schuurink RC, 2004. Jasmonic acid is a key regulator of spider mite-induced volatile terpenoid and methyl salicylate emission in tomato. *Plant Physiology*, 135(4): 2025–2037.
- Bari R, Jones JD, 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, 69(4): 473–488.
- Bolter CJ, Jongsma MA, 1995. Colorado potato beetles (*Leptinotarsa decemlineata*) adapt to proteinase inhibitors induced in potato leaves by methyl jasmonate. *Journal of Insect Physiology*, 41(12): 1071–1078.
- Bücking H, Fournier H, Stenzel I, Miersch O, Hause B, 2004. Applied jasmonates accumulate extracellularly in tomato, but intracellularly in barley. *FEBS Letters*, 562(1/3): 45–50.
- Cooper W, Goggin FL, 2005. Effects of jasmonate-induced defenses on the feeding behavior, fecundity, and mortality of the potato aphid, *Macrosiphum euphorbiae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 115(1): 107–115.
- Gui LY, Chen ZM, Liu SS, 2005. Effect of exogenous MJA treatment of tea plants on the growth of geometrid larvae. *Scientia Agricultura Sinica*, 38(2): 302–307. [桂连友, 陈宗懋, 刘树生, 2005. 外源茉莉酸甲酯处理茶树对茶尺蠖幼虫生长的影响. 中国农业科学, 38(2): 302–307.]
- Hu LC, Cui W, Wang X, Lou YG, 2010. Herbivore resistance induced by *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) and its relation to the JA signaling pathway in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L.). *Acta Entomologica Sinica*, 53(9): 1001–1008. [胡留成, 崔巍, 汪霞, 姜永根, 2010. 斜纹夜蛾幼虫诱导的油菜抗性及其与茉莉酸信号途径的关系. 昆虫学报, 53(9): 1001–1008.]
- Jiang T, Zhu D, Jiang DF, Tao YL, Liu GX, Fan ZX, 2009. Activity dynamics of phenylalanine ammonia-lyase and protective enzymes in transgenic Bt+CpTI cotton induced by *Bemisia tabaci* feeding. *Shandong Agricultural Sciences*, (10): 48–53. [姜涛, 褚栋, 姜德锋, 陶云荔, 刘国霞, 范仲学, 2009. 烟粉虱刺吸诱导转 Bt+CpTI 基因棉苯丙氨酸解氨酶和氧保护酶系活性变化. 山东农业科学, (10): 48–53.]
- Li CB, Sun JQ, Jiang HL, Wu XY, Li CY, 2005. Signal transduction in systemic resistance responses of tomato. *Chinese Science Bulletin*, 50(16): 1677–1683. [李常保, 孙加强, 蒋红玲, 吴晓燕, 李传友, 2005. 番茄系统抗性反应的信号转导. 科学通报, 50(16): 1677–1683.]
- Li L, Li C, Lee GI, Howe GA, 2002. Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(9): 6416–6421.
- Liu YL, Li CY, Li ZG, Li XC, Li T, Ma FM, 2005. Genetic analysis on defense signaling of wound response pathway in tomato. *Journal of Northeast Agricultural University*, 36(1): 23–27. [刘丽艳, 李传友, 李柱刚, 李希臣, 李铁, 马凤鸣, 2005. 番茄受伤反应防御信号的遗传解析. 东北农业大学学报, 36(1): 23–27.]
- Loschke DC, Hadwiger LA, 1981. Effects of light and of *Fusarium solani* on synthesis and activity of phenylalanine ammonia-lyase in peas. *Plant Physiology*, 68(3): 680–685.
- Ma XQ, Hua S, Song XS, Zhao HY, Yu WJ, Fan HJ, 2012. Effects of simulating insect feeding on enzyme activity in roots of *Picea koraiensis* seedling: changes of protective and defense enzyme activity. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 32(9): 37–40. [马晓乾, 滑莎, 宋小双, 赵红盈, 遇文静, 范海娟, 2012. 模拟昆虫取食对红皮云杉幼苗根部酶活性的影响——根部中保护性酶和防御酶活性的变化情况. 中南林业科技大学学报, 32(9): 37–40.]
- Redman AM, Cipollini Jr DF, Schultz JC, 2001. Fitness costs of jasmonic acid-induced defense in tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Oecologia*, 126(3): 380–385.
- Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE, 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 12(5): 707–720.
- Ryan CA, Moura DS, 2002. Systemic wound signaling in plants: A new perception. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(10): 6519–6520.
- Shi YX, Yu Y, Fu JF, Li GJ, 2008. Relationship between LOX activity and JA accumulations in cucumber leaves induced by pathogen. *Acta Phytophylacica Sinica*, 35(6): 29–34. [石延霞, 于洋, 傅俊范, 李宝聚, 2008. 病原菌诱导后黄瓜叶片中脂氧合酶活性与茉莉酸积累的关系. 植物保护学报, 35(6): 29–34.]

- Stout MJ, 2011. Signal interactions in pathogen and insect attack: systemic plant mediated interactions between pathogens and herbivores of the tomato *Lycopersicon esculentum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 54(3): 115–130.
- Sun YC, Yin J, Kang L, Ge F, 2010. Elevated CO₂ changes the interactions between nematode and tomato genotypes differing in the JA pathway. *Plant Cell and Environment*, 33(5): 729–739.
- Thaler JS, Farag MA, Paré PW, Dicke M, 2002. Jasmonate-deficient plants have reduced direct and indirect defences against herbivores. *Ecology Letters*, 5(6): 764–774.
- Xu T, Zhou Q, Chen W, Zhang GR, He GF, Gu DX, Zhang WQ, 2003. Jasmonic acid signal transduction pathway involved in the process of rice pest induced defense. *Chinese Science Bulletin*, 48(13): 1442–1446. [徐涛, 周强, 陈威, 张古忍, 何国锋, 古德祥, 张文庆, 2003. 茉莉酸信号传导途径参与了水稻的虫害诱导防御过程. 科学通报, 48(13): 1442–1446.]
- Wang GH, Tu XY, 2005. Functional responses of *Pediobius foveolatus* to *Henosepilachna vigintioctopunctata*. *Chinese Journal of Ecology*, 24(7): 736–740. [王国红, 涂小云, 2005. 瓢虫柄腹姬小蜂对茄二十八星瓢虫功能反应的研究. 生态学杂志, 24(7): 736–740.]
- Wang Q, Yan SC, Wang YJ, Zhang J, Yuan HE, 2008. Activities of proteinase inhibitors in *Larix gmelini* seedlings under the stresses of cutting needles and herbivore feeding. *Acta Entomologica Sinica*, 51(8): 798–803. [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 Y, Zhang YL, Su JW, Li H, Wang YL, Miao YH, Tan JF, Han YL, 2014. Potassium application for increased jasmonic acid content and defense enzyme activities of wheat leaves infested by aphids. *Acta Ecologica Sinica*, 34(10): 2539–2547. [王伟, 张月玲, 苏建伟, 李慧, 王宜伦, 苗玉红, 谭金芳, 韩燕来, 2014. 施钾提高蚜害诱导的小麦茉莉酸含量和叶片相关防御酶活性. 生态学报, 34(10): 2539–2547.]
- Yang SY, Wang MM, Xie JC, 2013. Induction effects of jasmonic acid on tannin content and defense-related enzyme activities in conventional cotton plants. *Acta Ecologica Sinica*, 33(5): 1615–1625. [杨世勇, 王蒙蒙, 谢建春, 2013. 茉莉酸对棉花单宁含量和抗虫相关酶活性的诱导效应. 生态学报, 33(5): 1615–1625.]
- Yang Y, Zheng H, He F, Ji JX, Yu LJ, 2008. The effects of methyl jasmonate on the flavonoids synthesis in cell suspension culture of *Glycyrrhiza inflata* (Leguminosae). *Acta Botanica Yunnanica*, 30(5): 586–592. [杨英, 郑辉, 何峰, 季家兴, 余龙江, 2008. 不同浓度茉莉酸甲酯对悬浮培养的胀果甘草细胞合成甘草总黄酮的影响. 云南植物研究, 30(5): 586–592.]
- Yao FX, Zeng XC, Jiang HY, Fang JH, Wu XY, 2006. Measurement of rice lipoxygenase activity by using linolenic acid as substrate. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 28(2): 183–186. [姚锋先, 曾晓春, 蒋海燕, 方加海, 吴晓玉, 2006. 水稻中以亚麻酸为底物的脂氧合酶活性测定. 江西农业大学学报, 28(2): 183–186.]
- Zhang LN, Cheng JH, Yang R, Sun ZH, Wu CX, Wang SH, 2011. Effects of JA synthesis-related genes Spr2 and LePrs on the resistance to root-knot nematodes in tomato. *Scientia Agricultura Sinica*, 44 (19): 4022–4028. [张立宁, 程继鸿, 杨瑞, 孙中华, 吴春霞, 王绍辉, 2011. 茉莉酸合成相关基因 Spr2 与 LePrs 在番茄抗根结线虫中的作用. 中国农业科学, 44(19): 4022–4028.]
- Zheng SJ, Van Dijk JP, Bruinsma M, Dicke M, 2007. Sensitivity and speed of induced defense of cabbage (*Brassica oleracea* L.): dynamics of BoLOX expression patterns during insect and pathogen attack. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20 (11): 1332–1345.
- Zou ZY, Wang ZZ, 2006. Effects of jasmonic acid on induced resistance of rice seedlings to *Magnaporthe grisea*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 36(5): 432–438. [邹志燕, 王振中, 2006. 茉莉酸诱导水稻幼苗对稻瘟病抗性作用研究. 植物病理学报, 36(5): 432–438.]