

DOI: 10.5846/stxb201305171100

王祎,张月玲,苏建伟,李慧,王宜伦,苗玉红,谭金芳,韩燕来.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,2014,34(10):2539-2547.

Wang Y, Zhang Y L, Su J W, Li H, Wang Y L, Miao Y H, Tan J F, Han Y L. Potassium application for increased jasmonic acid content and defense enzyme activities of wheat leaves infested by aphids. Acta Ecologica Sinica 2014, 34(10): 2539-2547.

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

王 祎^{1,2},张月玲²,苏建伟³,李 慧^{1,2},王宜伦^{1,2},苗玉红^{1,2},谭金芳^{1,2},韩燕来^{1,2,*}

(1. 河南省粮食作物协同创新中心, 郑州 450002; 2. 河南农业大学资源与环境学院, 郑州 450002;

3. 中国科学院动物研究所, 农业虫鼠害综合治理国家重点实验室, 北京 100101)

摘要: 研究表明, 施钾能够提高作物对蚜虫的抗性, 但其机理尚不明确。试验采用营养液培养的方法, 设置 2 mmol/L 和 0.005 mmol/L KCl 两个钾浓度, 分析不同钾水平培养下的小麦植株在蚜虫为害后, 体内茉莉酸(JA)和水杨酸(SA)的含量和脂氧合酶(LOX)、多酚氧化酶(PPO)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)和过氧化物酶(POD)等防御酶活性的变化。结果表明, 低钾胁迫显著降低了小麦体内 JA 和 SA 的含量, 并且诱导 LOX 和 POD 酶活性增强, 但是对 PPO 和 PAL 酶活性没有显著影响。蚜虫为害 48 h 后, 高钾小麦体内 JA 含量显著高于低钾植株, 而 SA 含量没有明显变化。高钾显著提高了蚜虫为害后小麦叶片中的 LOX、PAL、PPO 和 POD 酶活性, 而低钾小麦体内 4 种酶的活性在整个虫害调查期间均没有显著变化。研究表明, 充足供钾能够显著提高小麦受到蚜虫为害后体内茉莉酸含量, 激活其体内的 JA 信号传导途径, 从而提高防御酶活性, 增强其对蚜虫的抵御能力。

关键词: 钾; 小麦; 蚜虫; 茉莉酸; 水杨酸; 防御酶

Potassium application for increased jasmonic acid content and defense enzyme activities of wheat leaves infested by aphids

WANG Yi^{1,2}, ZHANG Yueling², SU Jianwei³, LI Hui^{1,2}, WANG Yilun^{1,2}, MIAO Yuhong^{1,2}, TAN Jinfang^{1,2}, HAN Yanlai^{1,2,*}

1 Collaborative Innovation Center of Food Crops in Henan, Zhengzhou 450002, China

2 College of Resource and Environment Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

3 State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: Wheat is the second most planted crop in the world and plays an important role in China and the world's food security. Aphids are a serious insect pest group for the worldwide wheat growing area and pose a critical threat to wheat yield. It is known that in modern agriculture crop yield largely depends upon fertilizer input, whereas the occurrence of insect herbivores is closely related to the nutrient status in the plant tissues supplied by soil fertility. The prevailing view is that a high potassium level in plant tissues supplied by the soil decreases the occurrence of many pests. Our previous research showed that potassium-deficient wheat had the largest aphid population, whereas the presence of sufficient potassium significantly reduced the aphid population in wheat. So, understanding the relationship between fertilization and the incidence of insect pests is essential for the management of chemical fertilization and insect pests in the modern agroecosystem. In this paper, the effects of potassium supply on signal molecular contents and defense enzymes activities of

基金项目: 黄淮南部小麦玉米两熟持续丰产高效技术集成创新与示范项目(2011BAD10B07); 粮食作物资源节约型高产技术体系研究项目(2011BAD16B15)

收稿日期: 2013-05-17; 网络出版日期: 2014-02-20

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: hyanlai@126.com

<http://www.ecologica.cn>

wheat leaves infested by aphids (*Sitobion avenae*) were investigated. Solution culture was used in the experiment and two potassium (K) levels were applied, 2 mmol/L and 0.005 mmol/L KCl, respectively. After 20 d, wheat seedlings were infested by aphids and the signal molecular contents and defense enzymes activities were analyzed over different infestation times. The results showed that K deficiency significantly reduced jasmonic acid (JA) and salicylic acid (SA) content in wheat leaves and increased lipoxygenase (LOX) and polyphenoloxidase (PPO) activities, whereas it had no effects on phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and peroxidase (POD) activities. After 48 h aphid infestation, JA content in wheat grown in 2 mM KCl was significantly increased, 32.2% higher than the no aphid infested control and 50.0% higher than the K-deficient wheat. SA content in K-deficient wheat was significantly increased after aphid infestation, whereas there was no significant change in K-sufficient wheat. High levels of potassium significantly increased the activity of LOX after 24 h aphid infestation and reached the highest activity at 48 h which was 3.6-fold higher than the control. After 72 h aphid infestation, PPO activity in K-sufficient wheat was increased by 25.8% greater than the control. PAL activity in K-sufficient wheat was significantly increased after 24 h aphid infestation and was 69.9% higher than the control. Aphid infestation significantly increased POD activity of K-sufficient wheat and the activity was 3.0-fold higher than the control at 72 h. However, there were no striking changes in those four enzymes activities in K-deficient wheat infested by aphids. It is indicated that appropriate K applied can significantly increase the content of jasmonic acid, activate JA-signalling transduction pathway, as well as improve defense enzymes activities in wheat after aphid infestation, thereby enhancing the resistance of wheat to aphids. Since PAL, the first and key enzyme in the phenylpropanoid metabolic pathway, catalyzes phenylalanine into cinnamic acid which is the substrate of SA synthesis. We could not determine whether K-sufficient wheat activated the SA-signalling pathway or not after aphid infestation on the basis that PAL activity significantly increased after aphid infestation. With the presence of crosstalk between the JA and SA-signalling transduction pathway, we speculated that the JA and SA-signalling pathway in K-sufficient wheat were activated at different aphid infestation times, respectively. However, further analysis needed to elucidate. Our results showed that K-deficient wheat susceptibility to aphids might be due to K-deficient wheat could not initiate the signaling transduction effectively or activate the defense system after aphid infestation.

Key Words: potassium; wheat; aphid; jasmonic acid; salicylic acid; defense enzyme

小麦是世界上种植面积仅次于水稻的粮食作物,在世界和我国粮食安全中起着非常重要的作用。蚜虫是小麦产区常发性害虫之一,具有分布广,发生量大等特点,严重威胁小麦生产^[1]。杨益众^[2]等人曾报道,麦蚜危害后可使小麦穗粒数减少 18.60%,千粒重下降 45.24%,秕粒数达到 30.19%。目前对小麦蚜虫的防治多采用化学农药,不仅加重农民负担、造成环境污染,还会使蚜虫产生抗药性^[3]。植物的耐虫性受多种因素的影响,土壤中的氮、磷、钾等营养状况是其中的重要因子之一^[4]。关于钾与作物抗蚜性的关系,国内外在小麦^[5-8]、大豆^[9-11]、棉花^[12]、百合^[13]、大麦^[14]等作物中均有报道。但是,目前对施钾增强植物抗蚜性的机理研究尚不深入。

植物遭受昆虫攻击时,不同植物会通过诱导不同的信号途径来抵御其侵食,信号分子在植物化学信号传导过程中对抗虫反应起着非常重要的作

用^[15]。目前研究较多的信号分子主要是茉莉酸 (JA)、水杨酸 (SA)、乙烯 (ET) 和活性氧。JA 和 SA 是植物诱导防御反应的重要信号分子,在代谢调控、防御反应、信号交互等方面发挥着重要的作用。植物受到植食性昆虫危害后,能够导致内源茉莉酸水平的增加,并且改变防御途径关键酶的活力或者产生大量防御蛋白来保护自身^[16]。脂氧合酶 (LOX) 不仅是 JA 合成的关键酶,同时也是植物诱导防御的重要物质。而 JA 合成后与膜上的受体相结合而启动防御基因的转译以及其他由 JA 介导的反应,并由此产生防御蛋白或防御酶如多酚氧化酶 (PPO)、过氧化物酶 (POD)、几丁质酶等^[17],增强植物对虫害的诱导抗性。苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 是苯丙烷代谢途径的关键酶和限速酶,在酚类化合物合成中起关键作用^[18]。诸多研究表明,LOX、PPO、PAL 和 POD 等防御酶在作物诱导的抗蚜反应中发挥着重要作

用,其活性的高低与抗蚜性有直接关系^[19-23]。

Mayer^[9]等和 Walter^[11]等研究发现,充足供钾可抑制大豆蚜虫的发生。本课题组前期研究发现充足供钾可以增强小麦对蚜虫的抗性^[8],本试验通过研究钾对蚜虫取食后小麦叶片内源茉莉酸和水杨酸含量的变化以及防御性酶活性的动态变化,探讨钾影响小麦抗蚜性的效应机制,以期作为钾肥的合理施用和小麦蚜虫的综合防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试小麦品种为河南省主栽品种郑麦 9023。

1.2 方法

1.2.1 试验设计

采用营养液培养小麦植株,设置低钾 0.005 mmol/L 和高钾 2 mmol/L 两个钾水平。选取颗粒饱满的小麦种子经 0.5% 的次氯酸钠溶液消毒 10 min,蒸馏水冲洗 3—4 次后,浸水吸胀 12 h,将浸泡后的种子放入高温杀菌过的细沙中培养,7 d 后选取长势一致的麦苗,洗净后转移到含 3 L 营养液的小桶中于 25 ℃、12 h 光照条件下继续培养,20 d 后分别进行接虫和不接虫处理。营养液配方(杨振明营养液, mmol/L): Ca(NO₃)₂·4H₂O (0.6), NH₄NO₃ (0.8), CaCl₂ (2.6), MgSO₄·7H₂O (0.3), (NH₄)₂HPO₄ (0.28), NH₄H₂PO₄ (0.64), 钾用 K₂SO₄ 提供。微量元素配方(mmol/L): CuSO₄·5H₂O (0.001), ZnSO₄·7H₂O (0.001), H₃BO₃ (0.033), MnSO₄ (0.01), (NH₄)₆Mo₇O₂·4H₂O (0.0002), EDTA-Fe²⁺ (0.05)。每两天更换 1 次营养液。

1.2.2 蚜虫接种

接虫前,在郑州郊区大田捕捉麦长管蚜虫 *Sitobion avenae* (Fabricius) 若虫,参照鲁艳辉^[24]的饲喂条件,在人工气候箱内饲喂,光照 17 h/7 h(昼/夜),温度 20 ℃,湿度 60%,待长至成虫后,挑选个体大小一致的蚜虫进行接种,每株小麦接种蚜虫 20 头。

1.2.3 样品的采集与处理

分别于接虫后 0、12、24、48、72、96 h,采集小麦最新展开叶,放入液氮罐中保存,用于 POD、LOX、PAL、PPO 活性的测定。采集接虫 48 h 的新鲜小麦叶片用于茉莉酸和水杨酸含量的测定。

1.2.4 酶液的提取与测定

(1) 脂氧合酶活性测定 参照姚锋先^[25]的方法,略有改动。取 0.2 g 新鲜小麦样品,加 7 mL 经 4 ℃ 预冷的 0.1 mol/L (pH 值 7.6) 的 Tris-HCl 缓冲液冰浴上研磨。4 ℃、12000 r/min 离心 25 min,上层清液即为 LOX 酶提取液。以 2.4 mL 0.1 g/L 亚油酸作为底物,加入 0.1 mL 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 OD 作为一个酶活力单位。

(2) 多酚氧化酶活性测定 参照吕敏^[26]的方法,略有改动。称取新鲜小麦样品 0.5 g 放入预冷过的瓷研钵中,加入 6 mL 0.1 mol/L (pH 值 6.8) 磷酸缓冲液,加入适量石英砂,冰浴研磨。4 ℃、10000 r/min 离心 20 min,取上清液即为酶提取液。反应体系中加入 2.9 mL 含 0.02 mol/L 邻苯二酚的磷酸缓冲液(0.1 mol/L pH 值 6.8 磷酸缓冲液),加入 0.1 mL 酶液于 30 ℃ 水浴反应 30 min 后,记录 410 nm 处的吸光度变化,以不加酶液而加相同体积缓冲液为空白对照。PPO 酶活性以每小时在 410 nm 处吸光度变化 0.01 OD 作为一个活力单位。

(3) 苯丙氨酸解氨酶活性测定 参照李合生^[27]的方法,略有改动。称取新鲜小麦样品 0.5 g 放入预冷过的瓷研钵中,加入 6 mL 0.1 mol/L (pH 值 8.8) 硼酸钠-硼酸缓冲液,加入适量的石英砂,冰浴研磨后转入离心管中。混匀后在 4 ℃ 冰箱中浸提 4 h。4 ℃、10000 r/min 离心 20 min,取上清液即为酶提取液。吸取酶液 0.2 mL,加入 1 mL 由硼酸钠缓冲溶液配制的 0.1 mol/L L-苯丙氨酸,2.8 mL 蒸馏水,摇匀,在 40 ℃ 水浴上反应 30 min,冰浴中止反应,测定 OD_{290nm} 值,以相同体积缓冲液代替酶液进行同样的反应为对照。PAL 酶活性以每小时在 290 nm 处吸光度变化 0.01 OD 作为 1 个活力单位。

(4) 过氧化物酶活性测定 参照李合生^[27]的方法,采用愈创木酚法进行测定,略作改进。称取新鲜小麦样品 0.5 g 放入预冷的瓷研钵中,加入预冷的 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 值 8.5),研磨成匀浆,转入离心管中,4 ℃ 浸提 4 h,10000 r/min 离心 20 min,取上清液即为酶提取液。POD 酶活性测定:取酶液 0.1 mL,加入 3.5 mL 含 0.5 mol/L 愈创木酚的磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 值 5.8),50 μL 2.5%

H₂O₂ 在 30 ℃ 水浴保温 15 min 后,以不加酶液而加相同体积的缓冲液为空白对照,470 nm 处测定吸光值,每隔 30 s 记录 1 次吸光度,共测 4 min。POD 酶活性以每分钟在 470 nm 处吸光度变化 0.01 OD 作为 1 个酶活力单位。

1.2.5 茉莉酸含量的测定

参照任琴^[28]的方法,略作修改。

(1) 茉莉酸样品的制备 取小麦新鲜叶片约 0.5 g,加入少量 80% 预冷甲醇冰浴研磨,浸泡过夜。分别加入 8 μL 25 ng/μL 内标 9,10-二氢茉莉酸 (DHJA),对样品进行抽滤,弃残渣,将滤液加 1—2 滴氨水后浓缩至水相,反复冻融 3 次,10000 r/min 离心 10 min,上清液用聚乙烯吡咯烷酮搅浆,摇匀后放 10 min,抽滤。调 pH 值至 2.5—3.0 后用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次,合并萃取液,加 1 滴氨水,35—40 ℃ 下真空浓缩至干。用 0.1 mol/L 的醋酸溶解蒸发瓶内的残留物,过 C₁₈ 小柱 (Part No. WAT051910) 进行纯化、浓缩处理后转入毛细管封存,用于 GC/MS 测定。

(2) 茉莉酸的定性和定量分析 用 GC (Agilent Technologies, 6890N Network GC System) /MS (Agilent Technologies, 5973 Network, Mass selective Detector) 对内源茉莉酸进行定性分析。气相色谱柱为 HP-5-MS 石英毛细管柱 (30 m×0.25 mm×0.25 μm)。GC 程序升温条件:仪器初始温度为 50 ℃,速率 20 ℃/min 升至 180 ℃后,保持 4 min,再以 10 ℃/min 升至 290 ℃,保持 15 min。GC 进样口温度 280 ℃,进样体积 2 μL。MS 仪器接口温度为 250 ℃,离子源温度及轰击源分别为 200 ℃,70 eV。以 0.4 s/次扫描速度进行全扫描,扫描范围为 m/z 29—450。

内标 DHJA (Dihydro-Jasmonic acid, Sigma, 纯度 > 95%) 的选择特征离子 (m/z) 为: 153、226; Me-JA 的选择特征离子 (m/z) 为: 151、224。叶中内源茉莉酸的含量 $N_{JA}(\text{ng/g}) = S/S_s \times M_s / W/6$, 计算公式中, S 是内源峰面积; S_s 是内标峰面积; M_s 是加入的内标量; W 是小麦称样量。

1.2.6 水杨酸含量的测定^[28]

(1) 水杨酸样品的制备 称取新鲜小麦叶片约 0.5 g,加入 4 mL 90% 甲醇冰上研磨后转移到 10 mL 离心管中, -20 ℃ 静置过夜。7500 r/min 离心 20 min,上清液移入新的离心管中,沉淀加入 2 mL

100% 甲醇重悬、离心。合并上清,通风橱中 65 ℃ 水浴风干水相。加入 5% 三氯乙酸 (TCA) 1.5 mL,摇匀,7500 g 离心 15 min,取上清。加 3 mL 环己烷:乙酸乙酯 (1:1) 萃取 3 次。上层有机相 60 ℃ 水浴风干 (游离 SA)。用乙腈 500 μL 溶解,过 0.2 μm 滤膜。

(2) 水杨酸的定量分析 采用高效液相色谱 HPLC (Agilent 公司 HP 1100) 测定 SA。色谱柱为 Agilent-C₁₈ 反相色谱柱 (5 μm, 250 mm×4.6 mm)。梯度洗脱为 5 min 100% 醋酸水,30 min 乙腈:醋酸水 (60:40),35 min 乙腈:醋酸水 (80:20),40 min 乙腈:醋酸水 (0:100),流速 0.7 mL/min,吸收光 405 nm,激发光 295 nm,上样量为 20 μL。采用外标法进行定量,SA 标准品 SALICYLIC ACID (P) 购自 Chromadex,纯度 99.1%。叶中水杨酸的含量 $N_{SA}(\text{ng/g}) = N \times V \times n / W$, 计算公式中, N 是样品的浓度; V 是上样体积; n 是分取倍数; W 是小麦称样量。

1.3 数据统计分析

文中所有试验均设 3 个生物学重复,试验数据采用 DPS v7.05 和 SPSS11.5 软件进行双因子可重复方差分析。

2 结果与分析

2.1 施钾对蚜虫取食后茉莉酸和水杨酸含量的影响

从表 1 可以看出,不接虫时,高钾小麦叶片茉莉酸含量显著高于低钾处理 ($P < 0.05$)。虫害 48 h 后,低钾条件下,茉莉酸的含量没有明显变化,而在高钾 (2 mmol/L) 条件下,茉莉酸含量比不接虫处理增加了 32.2%,比低钾胁迫小麦增加了 50.0%,均达到了极显著差异 ($P < 0.01$)。表 1 显示,不接虫时,低钾导致小麦体内水杨酸含量极显著降低,比充足供钾小麦叶片水杨酸含量降低 18.5%。接虫 48 h 后,低钾小麦叶片水杨酸含量显著上升,而高钾小麦水杨酸含量没有显著变化,钾水平间差异也不显著 ($P > 0.05$)。

2.2 施钾对蚜虫为害后小麦叶片 LOX 酶活性的影响

不同钾水平培养的小麦植株接种蚜虫后叶片 LOX 酶活性变化如图 1。试验结果表明,不接虫处理下,低钾小麦的 LOX 酶活性显著高于高钾小麦植株。接种蚜虫后,低钾小麦植株 LOX 酶活性,与不接虫对照相比没有显著差异。高钾 (2 mmol/L) 处理

的小麦植株在接种蚜虫 24 h 后 LOX 酶活性增加, 在 48 h 达到最高值, 是不接虫对照酶活性的 3.6 倍。之后, 随着接虫时间的延长, LOX 酶活性降低, 但仍然显著高于不接虫处理。

表 1 施钾对蚜虫取食后小麦茉莉酸和水杨酸含量 (ng/g) 的影响
Table 1 Effect of K levels on JA and SA contents of wheat after aphid infested

| 处理 Treatment | 茉莉酸含量 JA content/ (ng/g) | 水杨酸含量 SA content/ (ng/g) |
|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| K1 不接虫 no aphid infested | 63.64±0.89a (b) | 142.69±3.85a (b) |
| 接虫 aphid infested for 48 h | 71.48±5.88a (b) | 167.49±6.94a (a) |
| K2 不接虫 no aphid infested | 81.11±5.53b (a) | 175.09±4.95a (a) |
| 接虫 aphid infested for 48 h | 107.25±0.70a (a) | 174.76±10.04a (a) |

表中数据为 3 个重复的平均值±SE; 数据后括号外小写字母表示同一钾水平下, 不同接虫处理之间的 JA 或 SA 含量差异达 $P<0.05$ 的显著水平; 括号内小写字母表示相同接虫处理下, 不同钾水平之间的 JA 或 SA 含量差异达 $P<0.05$ 的显著水平

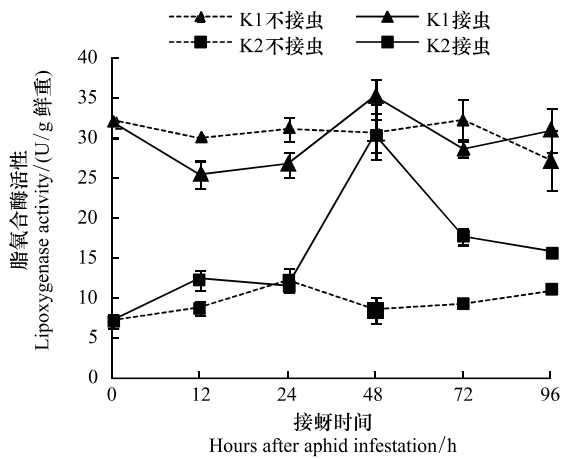


图 1 不同处理小麦叶片 LOX 酶活性变化
Fig.1 Changes of LOX activities in wheat leaves under different treatments

2.3 施钾对蚜虫为害后小麦叶片 PPO 酶活性的影响

接种蚜虫后, 不同钾水平培养的小麦叶片多酚氧化酶活性变化如图 2。试验结果表明, 不接虫时, 低钾处理的小麦叶片 PPO 酶活性与高钾小麦植株没有显著差异。接种蚜虫后, 低钾小麦的 PPO 酶活性与对照没有显著差异。接蚜 72 h 后, 高钾处理的小麦叶片 PPO 酶活性显著高于不接虫对照, 活性增加了 25.8%, 但是其它时间点上与对照没有显著差异。

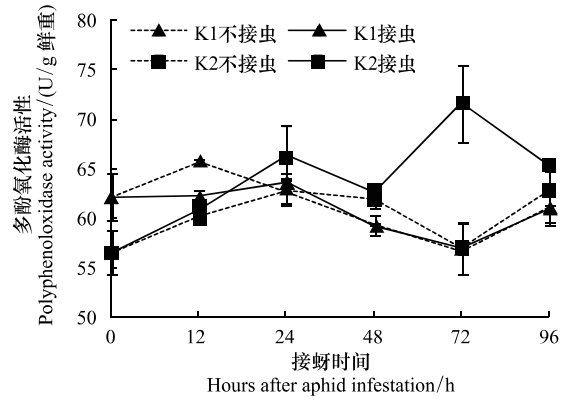


图 2 不同处理小麦叶 PPO 活性动态变化
Fig.2 Changes of PPO activities in wheat leaves under different treatments

2.4 施钾对蚜虫为害后小麦叶片 PAL 酶活性的影响

接种蚜虫后, 不同钾水平培养的小麦叶片苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性变化如图 3。试验结果表明, 不接虫时, 低钾处理的小麦叶片 PAL 酶活性与高钾小麦没有显著差异。接种蚜虫后, 低钾小麦叶片 PAL 酶活性与不接虫对照相比没有显著差异。接虫 12 h 后, 高钾小麦叶片 PAL 酶活性增加, 并且在接虫 24 h 时活性增加了 69.9%, 极显著高于不接虫处理。其他时间点上接虫处理对 PAL 酶活性没有显著影响。

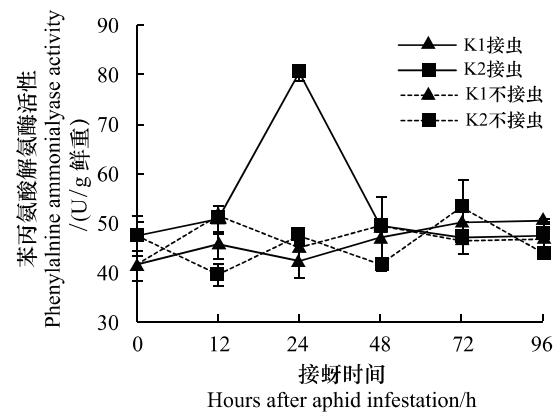


图 3 不同处理小麦叶 PAL 活性动态变化
Fig.3 Changes of PAL activities in wheat leaves under different treatments

2.5 施钾对蚜虫为害后小麦叶片 POD 酶活性的影响

接种蚜虫后, 不同钾水平培养的小麦叶片过氧化物酶 (POD) 活性变化如图 4。试验结果表明, 不

接虫时,低钾处理的小麦叶片 POD 活性显著高于高钾小麦植株。接种蚜虫后,低钾小麦叶片 POD 酶活性与不接虫对照相比没有显著差异。但是,接虫后高钾小麦叶片的 POD 酶活性显著提高,在 72 h 时达到最高,其酶活性是不接虫对照的 3.0 倍,并且活性增加持续较长时间,保持到接虫后 96 h。

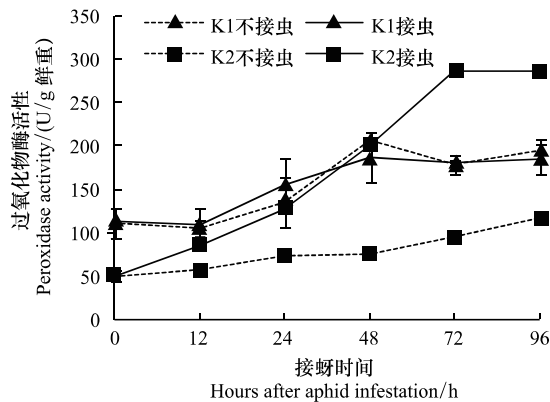


图 4 不同处理小麦叶 POD 活性动态变化

Fig. 4 Changes of POD activities in wheat leaves under different treatments

3 讨论与结论

3.1 钾对蚜虫取食诱导的防御反应途径的影响

植物受到害虫侵害后,细胞会产生一系列信号物质传输到其它未受损伤组织,使整个植株对随后虫害的抗性增加。但是昆虫取食方式不同,诱发的防御反应的类型也不同。一般认为,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 PPO、POD、几丁质酶等防御相关蛋白表达^[17];而水杨酸介导的信号传导途径对植物防御刺吸式昆虫起重要作用,植物受虫害后,体内 SA 含量增加,激活与植物抗性有关基因的表达^[29]。但是赵丽艳研究^[30]发现,蚜虫取食小麦既激活了茉莉酸介导的信号传导途径,也激活了水杨酸介导的信号传导途径。本文结果显示,接虫对高钾小麦体内水杨酸含量没有显著影响,而接虫 24 h 后高钾小麦 LOX 酶活性显著提高,并且在 48 h 达到最高,从而使得高钾小麦体内 JA 含量升高(表 1)。PPO 和 POD 是 JA 诱导的重要防御酶。本文结果表明,接虫 48 h 后高钾小麦 PPO 酶活性升高,并于 72 h 达到最高,而蚜虫为害后高钾小麦体内 POD 酶活性持续增加,接虫 72 h 后活性达到最高,

两者活性均显著高于未接虫对照和低钾小麦(图 2、图 4)。这些结果说明,麦长管蚜取食高钾小麦激活了其体内的 JA 信号传导途径,增强了相关防御酶的表达。此外,高钾小麦在接虫 12 h 后体内 PAL 酶上升,在 24 h 时达到最高(图 3),而 PAL 酶是类苯丙烷途径的第一个关键酶也是限速酶,它催化苯丙氨酸生成肉桂酸,而肉桂酸即为 SA 生物合成的原料。因此,并不能断定高钾小麦在受到蚜虫为害时是否也启动了 SA 信号传导途径。目前也有研究发现,JA 和 SA 之间也存在协同作用^[31]。由此,供钾充足的小麦在蚜虫为害后,JA 和 SA 信号传导途径可能分别在不同时间段内起主导作用。

越来越多的研究表明,SA、JA 依赖性的防御途径中的元件能够相互影响其它的途径,并且大多数的研究表明 JA 和 SA 之间存在拮抗作用。Engelberth 等^[32]用丙甲菌素处理后的利马豆叶片导致了 SA 的逐渐积累,而 SA 的积累却阻碍了 13s-氢过氧-亚麻酸(13s-HPLA)向 12-氧合植物二烯酸(12-oxo-PDA)的转化,降低了 JA 的生物合成速度,并最终抑制了所有与 JA 有关的挥发物的合成。此外,SA 及其类似物 NIA、BTH 也能够抑制 JA 依赖性的防御基因的表达^[30]。Thaler 等^[34]也认为 SA-JA 信号传导途径之间存在拮抗串扰。本研究发现,低钾小麦在接虫 48 h 后体内水杨酸含量显著高于未接虫小麦,而茉莉酸含量却没有显著变化(表 1)。但是,低钾小麦体内的 LOX 酶活性显著高于高钾小麦(图 1)。LOX 酶是 JA 合成的关键酶之一。这可能是由于 SA 含量的增加阻碍了低钾小麦体内 JA 合成途径中其他重要物质的合成,进而导致 LOX 酶活性的增加不能提高 JA 的含量,无法激活低钾小麦体内的 JA 信号传导途径。此外,也有可能是低钾胁迫显著提高 LOX 酶活性,导致脂质氧化反应加剧,对低钾植株造成伤害,从而使得蚜虫取食时无法启动体内防御体系。虽然低钾小麦在接种蚜虫 48 h 后体内 SA 含量有显著升高,但是与高钾小麦没有显著差异,这可能是低钾小麦受到虫害时的一种应激反应。至于蚜虫取食是否激活了低钾小麦体内的 SA 信号转导途径,就需要对类丙烷途径的其他关键酶的基因表达或酶活性进行分析。

3.2 钾对蚜虫取食所诱导的防御酶活性的影响

作物诱导抗蚜性是作物在受到蚜虫侵害时做出的一种本能反应。研究表明 LOX 和 PPO 在植物抵御虫害和病原体侵入中起着非常重要的作用^[35-37]。对棉株的研究发现, PPO 的活性与棉花的抗蚜性呈正相关^[38]。陈青等^[39]研究发现, 辣椒受到蚜虫侵害后, 叶片中 PPO、POD 和 AsA-POD 的活性明显提高, 并且酶活性的增强与辣椒抗蚜性显著相关。对小麦和苜蓿的研究发现, 蚜虫取食后抗蚜品种的 POD 和 PAL 酶活性高于感蚜品种^[40-41]。LOX 是植物诱导防御的重要物质, 同时也是 JA 合成的关键酶, JA 合成后与膜上的受体相结合而启动防御蛋白或酶的表达, 例如 PPO、POD 和几丁质酶等。PPO 主要参与酚类氧化为醌以及木质素前体的聚合作用, 醌对昆虫有毒害作用, 木质素可促进细胞壁和组织的木质化, 提高对病虫害的防御作用; POD 不仅参与了木质素的聚合过程, 也是细胞内重要的内源活性氧清除剂; 而 PAL 酶催化苯丙氨酸脱氨基后产生肉桂酸并最终转化为木质素, 是与细胞内木质素生成和沉积有关的防御酶^[35-37]。目前关于钾对 POD、PPO 和 PAL 等防御酶活性的影响结论不一。鲁剑巍等^[42]研究表明钾素缺乏和过量均可导致油菜叶片 POD 活性上升。段榕琦等^[43]研究发现施钾有利于小麦体内 PAL、PPO 和 POD 活性的提高。目前关于钾对 LOX 酶活性的影响鲜见报道。本研究发现, 低钾处理显著提高了小麦叶片中的 LOX 和 POD 酶活性(图 1, 图 4), 但是蚜虫取食却没有改变低钾小麦体内这两种酶的活性, 并且对 PPO 和 PAL 酶活性也没有显著影响(图 2, 图 3)。这表明低钾胁迫使得小麦在受到蚜虫危害时不能有效地激活体内的防御体系, 提高防御性酶活性。高钾能够显著提高小麦受到虫害后 48 h 叶片中的 LOX 酶活性, 利于 JA 的合成, 促进其他防御蛋白的合成。高钾小麦 PAL、PPO 和 POD 酶活性在蚜虫为害后不同时期内显著提高, 并且高于缺钾植株。这些结果说明高钾能够提高小麦虫害后 LOX、PPO、PAL 和 POD 等防御酶活性, 从而利于酚类和醌类物质的合成, 提高植株的抗虫性。而低钾小麦的四种防御酶活性在整个虫害调查时期均没有显著变化, 说明缺钾条件抑制了小麦受到蚜虫为害后防御性蛋白的合成, 从而降低其抗虫性。

总之, 本研究表明充足供钾能够显著提高小麦

受到蚜虫为害后体内茉莉酸含量, 激活 JA 信号传导途径, 提高防御蛋白的活性, 从而增强小麦对蚜虫的诱导抗性。至于是否启动了 SA 信号传导途径, 需要进行深入分析加以明确。

致谢: 河南农业大学闫凤鸣教授对本文写作给予帮助, 农业资源与环境专业 2008 级郭腾飞、李仟同学完成部分工作, 特此致谢。

References:

- [1] Wang M F, Yuan G H, Chen J L, Lei Z S, Wu Z Q. Research advances of occurrence pattern, damage characteristics of wheat aphid and resistance identification of wheat. *Journal of He'nan Agricultural Sciences*, 2006, (7): 58-60.
- [2] Yang Y Z, Dai Z Y, Huang D L, Han J, Chen X B. Studies on effects of cereal aphids on wheat yields and quality at various wheat growth stages. *Entomological Knowledge*, 1995, 32(1): 10-13.
- [3] Cao Y Z, Yin J, Li K B, Zhang K C, Li X Q. Exploration of the factors causing the outbreak of wheat aphids and the control strategies. *Plant Protection*, 2006, 32(5): 72-75.
- [4] Chen J M, Yu X P, Cheng J A, Zheng X S, Xu H X, Lü Z X, Zhang Y F, Chen L Z. Plant tolerance against insect pests and its mechanisms. *Acta Entomologica Sinica*, 2005, 48(2): 262-272.
- [5] Wang D P. Effects of different fertilization modes on the metabolism of wheat aphids. *Journal of Southwest Agricultural University*, 2001, 23(3): 255-256.
- [6] Havlickova H, Smetankova M. Effect of potassium and magnesium fertilization on barley preference by the bird cherry-oat aphid (*Rhopalosiphum padi*). *Rostlinna Vyroba-UZPI*, 1998, 44(8): 379-383.
- [7] Zhou Y D, Meng Q L, Ma F, Huang S X, Hu L J. Relationship between chemical compositions of "8455" wheat plant and population dynamics of *Schizaphis graminum* and *Macrosiphum avenae*. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 1994, 5(3): 276-280.
- [8] Li L J, Wang Q, Han Y L, Tan J F. Study of effects of potassium levels on phenolic and lignin metabolism of wheat and dynamic of aphid population. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2009, 25(17): 143-148.
- [9] Myers S W, Gratton C, Wolkowski R P, Hogg D B, Wedberg J L. Effect of soil potassium availability on soybean aphid (Hemiptera: Aphididae) population dynamics and soybean yield. *Journal of Economic Entomology*, 2005, 98(1): 113-120.
- [10] Myers S W, Gratton C. Influence of potassium fertility on soybean aphid, *Aphis glycines* Matsumura (Hemiptera: Aphididae), population dynamics at a field and regional scale. *Environmental Entomology*, 2006, 35(2): 219-227.

- [11] Walter A J , Difonzo C D. Soil potassium deficiency affects soybean phloem nitrogen and soybean aphid populations. *Environmental Entomology* , 2007 , 36(1) : 26–33.
- [12] Ai T C , Liu Z Y , Li C R , Luo P , Zhu J Q , Jin W B , Cai Q N. Impact of fertilization on cotton aphid population in Bt-cotton production system. *Ecological Complexity* , 2011 , 8(1) : 9–14.
- [13] Cao Y , Ren J J , Sun X H. Effects of fertilization and cover on the population dynamics of *Myzus Persicae* in lily. *Hubei Agricultural Sciences* , 2005 , (4) : 62–64.
- [14] Salas M L , Corcuera L J , Argandona V H. Effect of potassium nitrate on gramine content and resistance of barley against the aphid *Schizaphis graminum*. *Phytochemistry* , 1990 , 29(12) : 3789–3791.
- [15] Zhang F J , Ren Q , Jin Y J. Signal transduction induced by herbivores. *Journal of Northwest Forestry University* , 2005 , 20(2) : 160–163 , 178–178.
- [16] Xu W , Yan S C. The function of jasmonic acid in induced plant defence. *Acta Ecologica Sinica* , 2005 , 25(8) : 2074–2082.
- [17] Maffei M E , Mithöfer A , Boland W. Insects feeding on plants: Rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. *Phytochemis* , 2007 , 68 (22/24) : 2946–2959.
- [18] Liu X Y , He P , Jin J Y. Advances in effect of potassium nutrition on plant disease resistance and its mechanism. *Plant Nutrition and Fertilizer Science* , 2006 , 12(3) : 445–450.
- [19] Wu L H , Li Q , Yang Q F , Wang H J. Resistance induced by feeding *Rhopalosiphum padi* with 5 *Aegilops* species. *Scientia Agricultura Sinica* , 2008 , 41(1) : 102–107.
- [20] Li J B , Fang L P , Zhang Y L , Yang W J , Guo Q , Li L , Bi C L , Yang Z R. The relationship between the resistance of cotton against cotton aphid , *Aphis gossypii* , and the activity of phenylalanine ammonia-lyase. *Chinese Bulletin of Entomology* , 2008 , 45(3) : 422–425.
- [21] Lan J N , Liu C Z. Physiological effects of piercing and sucking by *Therioaphis trifolii* on alfalfa seedlings. *Plant Protection* , 2007 , 33(6) : 74–77.
- [22] Jiang Y N , Wang B , Wu T L. Response of enzyme activity and secondary metabolites of different soybean genotypes to *Aphis glycines* Matsumura invasion. *Soybean Science* , 2009 , 28(1) : 103–107.
- [23] Liu C Z , Lan J N. Variations of oxidase in the seedling of three alfalfa varieties infested by *Therioaphis trifolii* Monell (Homoptera: Aphididae) . *Acta Agraria Sinica* , 2009 , 17(1) : 32–35.
- [24] Lu Y H , Gao X W. A method for mass culture of wheat aphids. *Chinese Bulletin of Entomology* , 2007 , 44(2) : 289–290 , 310–310.
- [25] Yao F X , Zeng X C , Jiang H Y , Fang J H , Wu X Y. Measurement of rice lipoxygenase activity by using linolenic acid as substrate. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis* , 2006 , 28(2) : 183–186.
- [26] Lü M , Sun H H , Gao X W. The study on the activities of polyphenol oxidase and peroxidase in cotton and corn induced by insects. *Chinese Agricultural Science Bulletin* , 2012 , 28(06) : 211–216.
- [27] Li H S. *Plant Physiology and Biochemistry Experimental Principles and Techniques*. Beijing: Higher Education Press , 2006: 167–168 , 224–225.
- [28] Ren Q , Jin Y J , Hu Y J , Chen H J , Li Z Y. Rapid changes of induced volatile organic compounds in *Pinus massoniana*. *Scientia Silvae Sinicae* , 2006 , 42(4) : 65–70.
- [29] Jayasekara T K , Stevenson P C , Belmain S R , Farman D I , Hall D R. Identification of methyl salicylate as the principal volatile component in the methanol extract of root bark of *Securidaca longepedunculata* Fers. *Journal of Mass Spectrometry* , 2002 , 37(6) : 577–580.
- [30] Zhao L Y. *Research on the biochemical and molecular mechanism of induced defense responses of wheat infested by *Sitotrojan avenae* [D]*. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences , 2006: 42–43.
- [31] Russo V M , Russo B M , Peters M , Perkins-Veazie P , Cartwright B. Interaction of *Colletotrichum orbiculare* with thrips and aphid feeding on watermelon seedlings. *Crop Protection* , 1997 , 16(6) : 581–584.
- [32] Engelberth J , Koch T , Schüler G , Bachmann N , Rechtenbach J , Boland W. Ion channel-forming alamethicin is a potent elicitor of volatile biosynthesis and tendrill coiling. Cross talk between jasmonate and salicylate signaling in lima bean. *Plant Physiology* , 2001 , 125(1) : 369–377.
- [33] van Wees S C M , Luijendijk M , Smoorenburg I , van Loon L C , Pieterse C M J. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Molecular Biology* , 1999 , 41(4) : 537–549.
- [34] Thaler J S , Humphrey P T , Whiteman N K. Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in Plant Science* , 2012 , 17(5) : 260–270.
- [35] Felton G W , Bi J L , Summers C B , Mueller A J , Duffey S S. Potential role of lipoxygenases in defense against insect herbivory. *Journal of Chemical Ecology* , 1994 , 20(3) : 651–666.
- [36] Vaughn K C , Duke S O. Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiologia Plantarum* , 1984 , 60(1) : 106–112.
- [37] Wang R , Shen W B , Liu L L , Jiang L , Liu Y Q , Su N , Wan J M. A novel lipoxygenase gene from developing rice seeds confers dual position specificity and responds to wounding and insect attack. *Plant Molecular Biology* , 2008 , 66(4) : 401–414.
- [38] Wang H L , Wang Q L. Response of cotton polyphenol oxidase to aphid damage. *Journal of He´nan Vocation-Technical Teachers*

- College, 2001, 29(2): 1-2.
- [39] Chen Q, Zhang Y D. Correlation of oxidases with the resistance of capsicum cultivars to *Myzus persicae*. Chinese Journal of Tropical Crops, 2004, 25(3): 42-46.
- [40] Huang W, Jia Z K, Han Q F. Effects of herbivore stress by *Aphis medicaginis* Koch on the contents of MDA and activities of protective enzymes in different alfalfa varieties. Acta Ecologica Sinica, 2007, 27(6): 2177-2183.
- [41] Jiang C J, Yu Y B. Advances of studies on phenylalanine ammonialyase. Journal of Anhui Agricultural University, 2001, 28(4): 425-430.
- [42] Lu J W, Chen F, Liu D B, Wan Y F, Cao Y P. Effect of potash application on some enzyme content in rapeseed leaf. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2002, 24(1): 61-62, 66-66.
- [43] Duan R Q, Zhang Z X, Yang S H, Zheng Q L, Zhao Z R. The reducing effect of potassium on severity of wheat leaf rust and its effects on activities of several enzymes. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis: Natural Science Edition, 2000, 33(3): 89-92.
- 参考文献:**
- [1] 王美芳, 原国辉, 陈巨莲, 雷振生, 吴政卿. 麦蚜发生危害特点及小麦抗蚜性鉴定的研究. 河南农业科学, 2006, (7): 58-60.
- [2] 杨益众, 戴志一, 黄东林, 韩娟, 陈小波. 麦蚜的阶段性与对小麦产量和品质影响的研究. 昆虫知识, 1995, 32(1): 10-13.
- [3] 曹雅忠, 尹姣, 李克斌, 张克诚, 李贤庆. 小麦蚜虫不断猖獗原因及控制对策的探讨. 植物保护, 2006, 32(5): 72-75.
- [4] 陈建明, 俞晓平, 程家安, 郑许松, 徐红星, 吕仲贤, 张珏锋, 陈列忠. 植物耐虫性研究进展. 昆虫学报, 2005, 48(2): 262-272.
- [5] 王大平. 不同施肥条件对麦蚜同化率的影响. 西南农业大学学报, 2001, 23(3): 255-256.
- [7] 邹运鼎, 孟庆雷, 马飞, 黄世祥, 胡丽娟. “8455”小麦植株化学成分与麦蚜(长管蚜, 二叉蚜)种群消长的关系. 应用生态学报, 1994, 5(3): 276-280.
- [8] 李刘杰, 汪强, 韩燕来, 谭金芳. 钾水平对小麦酚类物质、木质素代谢和接种蚜虫群体动态的影响. 中国农学通报, 2009, 25(17): 143-148.
- [13] 曹毅, 任吉君, 孙秀华. 施肥与覆盖对百合桃蚜种群变动的影响. 湖北农业科学, 2005, (4): 62-64.
- [15] 张凤娟, 任琴, 金幼菊. 虫害诱导植物体内信号. 西北林学院学报, 2005, 20(2): 160-163, 178-178.
- [16] 徐伟, 严善春. 茉莉酸在植物诱导防御中的作用. 生态学报, 2005, 25(8): 2074-2082.
- [18] 刘晓燕, 何萍, 金继运. 钾在植物抗病性中的作用及机理的研究进展. 植物营养与肥料学报, 2006, 12(3): 445-450.
- [19] 吴龙火, 李庆, 杨群芳, 王海波. 禾谷缢管蚜取食5种山羊草的诱导抗性. 中国农业科学, 2008, 41(1): 102-107.
- [20] 李进步, 方丽平, 张亚楠, 杨卫娟, 郭庆, 李雷, 毕彩丽, 杨荣志. 棉花抗蚜性与苯丙氨酸解氨酶活性的关系. 昆虫知识, 2008, 45(3): 422-425.
- [21] 兰金娜, 刘长仲. 苜蓿斑蚜刺吸胁迫对苜蓿幼苗的生理影响. 植物保护, 2007, 33(6): 74-77.
- [22] 姜伊娜, 王彪, 武天龙. 蚜虫侵害对不同基因型大豆酶活性及次生代谢物含量的影响. 大豆科学, 2009, 28(1): 103-107.
- [23] 刘长仲, 兰金娜. 苜蓿斑蚜对三个苜蓿品种幼苗氧化酶的影响. 草地学报, 2009, 17(1): 32-35.
- [24] 鲁艳辉, 高希武. 一种室内饲养麦蚜的方法. 昆虫知识, 2007, 44(2): 289-290, 310-310.
- [25] 姚锋先, 曾晓春, 蒋海燕, 方加海, 吴晓玉. 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, 2006, 28(2): 183-186.
- [26] 吕敏, 孙姗姗, 高希武. 昆虫取食诱导棉花和玉米多酚氧化酶和过氧化物酶的活性研究. 中国农学通报, 2012, 28(06): 211-216.
- [27] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 2006: 167-168, 224-225.
- [28] 任琴, 金幼菊, 胡永建, 陈华君, 李镇宇. 马尾松诱导挥发性有机化合物的快速变化. 林业科学, 2006, 42(4): 65-70.
- [30] 赵雨艳. 麦长管蚜取食诱导小麦防御反应的生化及分子机制[D]. 北京: 中国农业科学院, 2006: 42-43.
- [38] 王洪亮, 王清连. 棉花多酚氧化酶对棉蚜为害的反应. 河南职业技术学院学报, 2001, 29(2): 1-2.
- [39] 陈青, 张银东. 3种氧化酶与辣椒抗蚜性的相关性. 热带作物学报, 2004, 25(3): 42-46.
- [40] 黄伟, 贾志宽, 韩清芳. 蚜虫(*Aphis medicaginis* Koch)危害胁迫对不同苜蓿品种体内丙二醛含量及防御性酶活性的影响. 生态学报, 2007, 27(6): 2177-2183.
- [41] 江昌俊, 余有本. 苯丙氨酸解氨酶的研究进展(综述). 安徽农业大学学报, 2001, 28(4): 425-430.
- [42] 鲁剑巍, 陈防, 刘冬碧, 万运帆, 曹一平. 钾素水平对油菜酶活性的影响. 中国油料作物学报, 2002, 24(1): 61-62, 66-66.
- [43] 段榕琦, 张祖新, 杨淑华, 郑巧兰, 赵仲仁. 钾对小麦叶片感染叶锈病的减轻作用及对几种酶活性的影响. 南开大学学报: 自然科学版, 2000, 33(3): 89-92.