

黄芪根瘤象取食胁迫对黄芪3种防御酶活性的影响

张大为, 惠娜娜, 袁伟宁, 余海涛, 魏玉红

(甘肃省农业科学院植物保护研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 为明确黄芪根瘤象取食胁迫对黄芪叶片主要防御酶活性的影响及对黄芪药效物质的可能影响, 以黄芪根瘤象及其寄主膜荚黄芪为试验材料, 测定了不同取食诱导时间的苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(POD)和多酚氧化酶(PPO)活性变化。结果表明, 取食24、48、72 h后, 叶片PAL和POD的活性均显著增加; 取食24 h后PPO活性达到峰值, 然后有所下降。表明黄芪根瘤象的取食胁迫激活了黄芪的化学防御, 对黄芪的诱导抗性及其次生代谢物质产生一定的影响, 现有的黄芪根瘤象防治策略有待于更加科学的评估。

关键词: 黄芪; 黄芪根瘤象; 取食胁迫; 防御酶

中图分类号: S567

文献标志码: A

文章编号: 1001-1463(2022)01-0059-04

[doi:10.3969/j.issn.1001-1463.2022.01.014](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1463.2022.01.014)

Effects of *Sitona Simillimus* Korotyaev Feeding Stress on the Activities of Three Defense Enzymes of *Astragalus Membranaceus*

ZHANG Dawei, HUI Nana, YUAN Weining, YU Haitao, WEI Yuhong

(Institute of Plant Protection, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: In order to clarify the effects of *Sitonasimillimus* feeding stress on the activities of main defense enzymes in leaves and the possible effects on the active substances of *Astragalus membranaceus*, the activities of phenylalanine ammonia-lyase (PAL), peroxidase (POD), and polyphenol oxidase (PPO) were measured at different feeding induction times in the laboratory, by using *Sitonasimillimus* and its host *Astragalus membranaceus* as experimental materials. The results showed that the activities of PAL and POD in leaves increased significantly after 24, 48, and 72 hours, and the activity of PPO increased to the peak after 24 hours of feeding and then decreased. This study shows that the feeding stress of *Sitonasimillimus* activates the chemical defense of *Astragalus membranaceus* and triggers a certain effect on the induced resistance and secondary metabolites of *Astragalus membranaceus*. The existing prevention and control strategies of *Sitonasimillimus* need to be evaluated more scientifically.

Key words: *Astragalus membranaceus*; *Sitonasimillimus*; Feeding stress; Defense enzymes

黄芪(*Astragalus membranaceus*)为豆科多年生草本植物, 以根入药, 是药用价值很高的中药材^[1]。黄芪是甘肃省大宗中药材品种之一, 主要在甘肃省高寒阴湿区大面积种植, 所产黄芪产量高、品质好, 因而经济效益显著^[2-3]。黄芪根瘤象(*Sitona simillimus* Korotyaev)是近年来新发现的主要为害黄芪的专食性害虫^[4-6], 在甘肃省陇西县、临洮县、岷县等黄芪道地产区均有发生。黄芪根

瘤象以成虫取食地上叶片, 大幅削弱地上部的营养物质及光合作用能力; 幼虫在地下取食根系, 造成的伤口还会导致病原菌及线虫的侵染^[7-8], 严重影响黄芪的产量及商品价值。由于生产中缺乏有效的防治手段, 药农往往采用高毒农药拌毒土的方式进行该虫的治理, 其中不乏国家命令禁止使用的农药。

植物由于自身不能移动, 在与植食性昆虫漫

收稿日期: 2021-12-08

基金项目: 国家自然科学基金(31760520)。

作者简介: 张大为(1981—), 男, 内蒙古赤峰人, 助理研究员, 主要从事经济作物害虫综合治理研究工作。Email: zhangdawei@gsagr.cn。

通信作者: 魏玉红(1977—), 女, 甘肃兰州人, 高级农艺师, 主要从事经济作物害虫综合治理研究工作。Email: weiyuhong@gsagr.cn。

长的协同进化进程中形成了一系列的防御措施,以保证植物自身的正常生长发育^[9],最直接的体现方式是产生有毒的次生代谢产物,以抵御昆虫的进一步侵害。次生代谢不直接参与植物的生长发育,但在抵御不良环境特别是植食性昆虫的取食胁迫中发挥重要的作用^[10]。因此,植物体内强大的防御酶系是植物应对昆虫取食的防御开关,它们调控次生代谢物质的迅速合成和转运,通过有毒物质或消化酶抑制剂等方式抵御植食性昆虫的进一步取食。其中苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(POD)和多酚氧化酶(PPO)是植物响应昆虫取食胁迫的3种关键酶,也是被研究较为广泛的3种酶,但相关研究多集中在经济植物应对刺吸式口器害的取食胁迫方面^[11-14],对药用植物对害虫取食胁迫响应等的研究较少。

与其他经济作物不同,药用植物的次生代谢物质往往是其发挥药效的活性物质。黄芪根瘤象是为害黄芪的重要害虫,其取食胁迫对黄芪次生代谢的影响及机制尚不清晰。我们通过研究黄芪根瘤象成虫取食诱导后黄芪叶片内 PAL、POD 和 PPO 活性的动态变化,以探明黄芪应对黄芪根瘤象取食胁迫的防御反应,分析取食诱导对黄芪次生代谢物质的影响的可能效应,为黄芪根瘤象的综合治理提供更为科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试黄芪种苗为膜荚黄芪种苗,购自定西市渭源县会川镇,移栽至甘肃省农业科学院植物保护研究所日光温室内,所有种苗均罩尼龙纱网以防昆虫取食,管理措施一致,定苗后 21 d,挑选长势一致的植株用于试验。

黄芪根瘤象采自定西市陇西县首阳镇黄芪地,带回实验室后放入人工气候箱,用新鲜黄芪叶片饲养,饲养条件为温度(25±1)℃,湿度 50%±10%,光周期 12:12(L:D),用于后续试验。

1.2 试验方法

将黄芪苗用直径 10 cm 的玻璃筒罩住,每株接入 3 头黄芪根瘤象成虫,分别在取食 0、24、

48、72 h 后收获植物材料,测定黄芪叶片内防御酶 PAL、POD 和 PPO 的活力变化,每处理均重复 3 次。

采用试剂盒法测定黄芪叶片的 PAL、POD 和 PPO 酶活,试剂盒购自南京建成生物工程研究所,按照说明书进行测定。PAL 活力以 1 g 鲜样在反应体系中 1 min 使 290 nm 吸光度变化 0.1 OD₂₉₀ 值为 1 个酶活力单位;在 37℃ 条件下,1 mg 鲜样中蛋白 1 min 催化 1 μg 底物的酶量为 1 个 POD 酶活力单位;PPO 活力以 1 g 鲜样组织在 1 mL 反应体系中 1 min 使在 420 nm 处吸光度值变化 0.01 为 1 个酶活力单位。

1.3 数据分析

防御酶活力数据分析利用 SPSS 21 软件和 Excel 2019 软件进行。采用单因素 ANOVA 进行方差分析,LSD 多重比较法比较不同处理间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 黄芪根瘤象取食对黄芪叶片 PAL 活性的影响

通过对叶片 PAL 活性的测定结果(图 1)可以看出,随着取食时间的增加 PAL 活性呈现出先增加后降低的趋势。由于黄芪根瘤象的取食诱导,黄芪叶片中 PAL 的活性迅速增加,取食 48 h 后达到峰值 52.62 U/g,取食 24 h(50.74 U/g)和 48 h 的叶片内 PAL 活力值显著高于未取食前的 29.99 U/g ($P<0.05$)。取食 72 h 时 PAL 活性(40.95 U/g)仍高于取食前,但差异不显著($P<0.05$)。

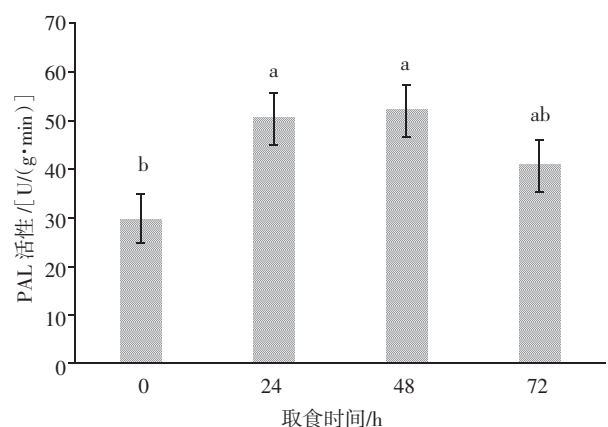


图 1 黄芪根瘤象不同取食诱导时间对叶片 PAL 酶活的影响

2.2 黄芪根瘤象取食对黄芪叶片 POD 活性的影响

对叶片 POD 活性的测定结果(图 2)显示,黄芪根瘤象取食诱导对黄芪叶片的 POD 活性具有显著的影响。未取食前叶片 POD 活力为 8.78 U/(g·min), 取食 24 h 后为 41.07 U/(g·min), 48 h 后为 44.38 U/(g·min), 72 h 后为 41.72 U/(g·min), 均比未取食时增加了 5 倍以上。取食 24、48、72 h 后, 叶片的 POD 活性均显著高于未接虫取食前, 取食胁迫对叶片 POD 的活性的影响显著 ($P < 0.05$)。

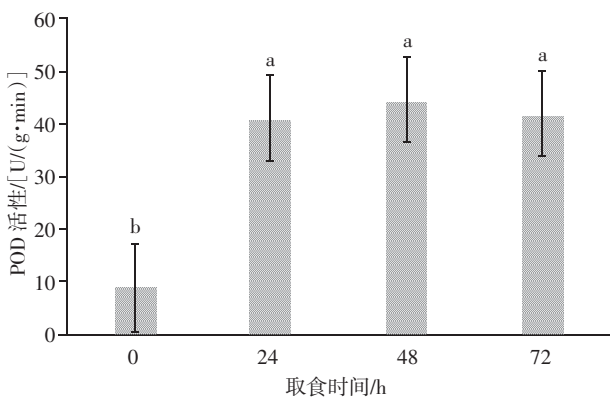


图 2 黄芪根瘤象不同取食诱导时间对叶片 POD 酶活的影响

2.3 黄芪根瘤象取食对黄芪叶片 PPO 活性的影响

由图 3 可以看出,黄芪应对黄芪根瘤象的取食胁迫, 迅速提升体内 PPO 的活性, 24 h 达到峰值 30.22 U/(g·min), 其后 PPO 活性有所回落, 取食 48 h [16.44U/(g·min)]和取食 72 h [19.11U/(g·min)]时的叶片 PPO 活性虽高于未接虫取食处理, 但三者之间差异不显著 ($P < 0.05$)。

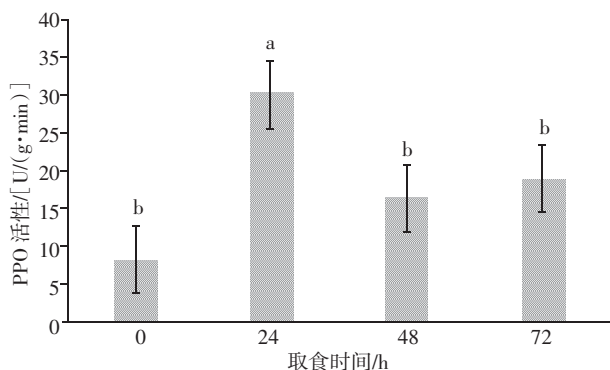


图 3 黄芪根瘤象不同取食诱导时间对叶片 PPO 酶活的影响

3 结论与讨论

次生代谢是植物抵御病虫害等外界不良条件的重要生命活动^[15], 控制次生代谢活动的酶是植物应对昆虫取食胁迫的关键单元, 也是药用植物活性物质生物合成的关键环节。本研究显示, 黄芪根瘤象取食胁迫诱导了黄芪的化学防御, 黄芪体内 PAL、POD 和 PPO 3 种重要的防御酶活性均相应的发生了变化。

PAL 是植物初生代谢和次生代谢转化的枢纽^[16], 是苯丙烷类代谢的关键酶和限速酶, 在调控植物体内黄酮类、类黄酮及木质素合成中发挥关键作用^[17], 而黄酮类物质也是黄芪的药效物质主要成分。此外, 木质素的合成对于黄芪根系的生长及增加细胞壁厚度提升抗性也有促进作用。本研究发现, 黄芪根瘤象取食胁迫 24、48、72 h 后的叶片 PAL 活性较未取食时叶片显著提升, 表明适当的取食胁迫可能更利于黄芪药效物质的积累及品质形成。

POD 是植物体内与活性氧代谢有关的酶, 是维持植物体内自由基在正常水平的重要保护酶, 还可参与木质素的合成, 提升作物的抗性^[18]。以往的研究发现, 植物在应对病原菌及刺吸式害虫取食胁迫后, 会显著提升体内 POD 的活性以增加对害虫的抗性。本研究发现, 被咀嚼式口器害虫黄芪根瘤象取食胁迫后, 黄芪叶片 POD 活性也大幅提升, 表明黄芪在受到外来侵害时做出及时而积极的响应, 且这种响应是持续的。

PPO 广泛存在于植物体内, 是可将酚类物质氧化成毒性更强的醌类或其衍生物的抗营养酶类^[19], 常见于植物应对广食性害虫采取的质量防御策略^[20]。本研究中, 被黄芪根瘤象取食胁迫后, 黄芪叶片内 PPO 活性急速增加, 24 h 即达峰值, 表明黄芪对昆虫取食胁迫的快速响应。同时, PPO 的增加意味着体内酚类物质合成增多, 而黄芪的药效物质毛蕊异黄酮和黄芪皂苷均属于酚类物质, 因此, 黄芪根瘤象的取食胁迫也能相应的增加黄芪体内药效物质的含量。

前期间调查显示,黄芪根瘤象为害的地块其他害虫发生量较少,可能与黄芪根瘤象取食诱导的植物抗性相关。而作为专食性害虫,黄芪根瘤象在与寄主黄芪的长期协同进化过程中也形成了相应的对策适应植物的化学防御。本研究表明,黄芪根瘤象的取食胁迫全面激活了黄芪的化学防御,而且适度的取食胁迫有可能促进黄芪药效物质的积累。本研究仅设置了3头/株的接虫密度,其他取食压力对黄芪防御酶活的影响有待进一步研究。黄芪根瘤象取食胁迫对黄芪次生代谢物质含量的影响,有待于结合多组学技术进行定性定量分析,以期全面评估黄芪根瘤象与黄芪的互作关系,为黄芪根瘤象的科学治理提供可靠的理论依据。针对黄芪根瘤象应改变现有的害虫治理策略,因地因时制定科学的害虫管理对策,本研究也可为药用植物的害虫治理策略提供新的视角及思考。

参考文献:

- [1] 陈健,孙旭春,赵庆芳.渭源县黄芪根腐病原菌的分离与鉴定[J].甘肃农业科技,2020(10):21-27.
- [2] 曹占凤,孙雪艳,潘飞,等.移栽方式对黄芪新品种西芪1号生长及产量的影响[J].甘肃农业科技,2021,52(2):58-60.
- [3] 刘润萍,曹占凤,郎建军,等.高寒阴湿区黄芪新品种西芪1号露头栽培技术[J].甘肃农业科技,2021,52(3):92-94.
- [4] 魏玉红,罗进仓,刘月英,等.黄芪新害虫—黄芪根瘤象的鉴别特征[J].植物保护,2020,46(2):169-171.
- [5] 刘月英,张大为,魏玉红,等.黄芪根瘤象甲发生规律及生物学特性[J].植物保护学报,2021,48(3):577-584.
- [6] 李建军,周天旺,张新瑞,等.黄芪根瘤象的生物学特性[J].西北农业学报,2014,23(8):205-209.
- [7] 张新瑞,李继平,李建军,等.黄芪麻口病的成因及防治技术研究[J].植物保护,2013,39(6):137-142;152.
- [8] 李建军,李继平,周天旺,等.黄芪麻口病发生原因探析[J].西北农业学报,2013,22(8):112-117.
- [9] 高微微,佟建明,郭顺星.植物次生代谢产物的生态学功能研究进展[J].中国药学杂志,2006(13):961-964.
- [10] MICHAEL W. Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites[J]. Medicines, 2015, 2(3): 251-286.
- [11] 谭永安,柏立新,肖留斌,等.绿盲蝽危害对棉花防御性酶活性及丙二醛含量的诱导[J].棉花学报,2010,22(5):479-485.
- [12] 毛红,陈瀚,刘小侠,等.绿盲蝽取食与机械损伤对棉花叶片内防御性酶活性的影响[J].应用昆虫学报,2011,48(5):1431-1436.
- [13] 刘裕强,江玲,孙立宏,等.褐飞虱刺吸诱导的水稻一些防御性酶活性的变化[J].植物生理与分子生物学学报,2005(6):643-650.
- [14] 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[J].生态学报,2007(6):2177-2183.
- [15] 杨欣,徐艳红,魏建和,等.几种重要植物次生代谢防御反应物质的生物合成途径及分子调控机制研究进展[J].生物技术通讯,2013,24(2):285-289.
- [16] 程水源,陈昆松,刘卫红,等.植物苯丙氨酸解氨酶基因的表达调控与研究展望[J].果树学报,2003(5):351-357.
- [17] 董艳珍.植物苯丙氨酸解氨酶基因的研究进展[J].生物技术通报,2006(S1):31-33.
- [18] 田国忠,李怀方,裘维蕃.植物过氧化物酶研究进展[J].武汉植物学研究,2001(4):332-344.
- [19] 程璐,贺春贵,胡桂馨,等.苜蓿斑蚜为害对5种苜蓿品种(系)PAL、POD、PPO酶活性的影响[J].植物保护,2009,35(6):87-90.
- [20] HARTMANN T. Plant-derived secondary metabolites as defensive chemicals in herbivorous insects: a case study in chemical ecology[J]. Planta, 2004, 219(1): 1-4.