

受害马尾松木质素含量及其过氧化物酶活性

任 琴^{1,2}, 胡永建¹, 李镇宇^{1,3}, 金幼菊^{1,*}

1. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083 2. 内蒙古集宁师专化学系, 集宁 012000 ;

3. 北京林业大学森林培育与保护教育部重点实验室, 北京 100083)

摘要 木质素是植物防御植食性昆虫危害的重要物质。对林间马尾松针叶进行接虫咬食处理后,测定了不同时间内木质素含量、过氧化物酶活性及其同功酶谱带的变化。结果表明 与对照相比,虫害针叶 1h 木质素含量就略有升高,而系统针叶木质素含量 10h 才开始升高,24h 两种处理的木质素含量及过氧化物酶活性均显著提高 受害后所取时间点内,其差异逐渐加大,这种差异在于表达量不同。F 检验的结果显示,虫害及系统针叶木质素含量、过氧化物酶活性及同工酶谱带变化一致,均在 24h 达到显著差异 ($P < 0.05$)。

关键词 马尾松 ; 木质素含量 ; 过氧化物酶活性 过氧化物酶同功酶

文章编号 1000-0933 (2007)11-4895-05 中图分类号 Q143 文献标识码 A

Content variation of Lignin and peroxidase activities from Damaged *Pinus massoniana*

REN Qin^{1,2}, HU Yong-Jian¹, LI Zhen-Yu^{1,3}, JIN You-Ju^{1,*}

1 College of Biology Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

2 Department of Chemistry, Inner Mongolia Jining Teachers Advanced College, Jining 012000, China

3 Beijing Forestry University Key Laboratory of Forest Silviculture and Conservation. Beijing 100083, China

Acta Ecologica Sinica, 2007, 27 (11) 4895 ~ 4899.

Abstract : Lignin is an important substance in defense attacks of herbivore in plants. After *Pinus massoniana* trees were damaged by *Dendrolimus punctatus* Walker, lignin contents, peroxidase activity and its isoenzyme were analyzed respectively at different times. Results indicated that lignin contents compared with the control, increased slightly at 1h from insect-damaged leaves (DL). Instead of systemic leaves (SL) enhanced after 10 hrs. Lignin contents and peroxidase activities reached their maximum after 24hrs. Furthermore, their differences gradually enhanced with times, which were reflected in expression quantities. F test showed that lignin content corresponded with peroxidase activity and peroxidase isoenzyme changes in damaged *P. massoniana* needles and displayed difference significantly in 24h ($P < 0.05$).

Key Words : *Pinus massoniana* ; lignin content ; peroxidase activity ; peroxidase isoenzyme

木质素 (lignin) 是维管植物中仅次于纤维素的一类重要大分子有机物质,在细胞中合成且成为输导组织,能够填充于纤维素构架中,增强植物体的机械强度,利于输导组织的水分运输和抵抗不良外界环境的侵袭。

基金项目 国家自然科学基金重点资助项目 (30330490)

收稿日期 2007-02-22 ; 修订日期 2007-10-29

作者简介 任琴 (1962 ~), 女, 山西省人, 博士, 教授, 主要从事化学生态学研究. E-mail : renq1962@163.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail : youjujin@bjfu.edu.cn

Foundation item The project was financially supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30330490)

Received date 2007-02-22 ; Accepted date 2007-10-29

Biography REN Qin, Ph. D., Professor, mainly engaged in chemical ecology. E-mail : renq1962@163.com

许多研究表明,植株在受到病菌感染或诱导抗性时,木质素含量明显增加。如野萝卜 (*Raphanus raphanistrum*) 的子叶、叶子和茎 新疆大蒜芥 (*Sisymbrium loeselii*) 的子叶接种黑腿病菌 (*Leptosphaeria maculans*) 后均表现出组织褐变、木质素沉积等明显的抗病特征^[1]。在与病原菌相互作用中,寄主细胞壁木质化是抗病反应的特征之一。木质素作为植物体内一种重要的物理防御物质,沉积于细胞壁富含羟脯氨酸的糖蛋白 (HRGP) 上而作为结构屏障,加固细胞壁,而且木质素的低分子量酚类前体以及多聚作用时产生的游离基可以钝化真菌的膜、酶和毒素,保护细胞免受病原菌的进一步侵袭。

马尾松毛虫 (*Dendrolimus punctatus* Walker) 是我国南方主要松树马尾松 (*Pinus massoniana* Lamb.) 的重要害虫,也是我国林业上发生面积最大、危害最重的食叶害虫,在我国周期性爆发成灾。李镇宇^[2]、王燕^[3]、戈峰^[4]及马尾松抗松毛虫抗性研究组等^[5]对马尾松针叶中非挥发物的诱导抗性研究显示,受害马尾松针叶单宁、酚酸等非挥发物的含量明显升高,但木质素与植物抗虫的关系未见报道。本试验对虫害和马尾松系统针叶木质素含量、过氧化物酶活性及其同工酶进行了研究,试图探明虫害后马尾松的物理防御机理,为马尾松毛虫的防治提出新的对策,这在森林害虫与树木相互关系的研究中具有特殊的意义和作用。

1 实验材料与方法

1.1 马尾松针叶的采集

2005 年 6 月在江西省高安市荷岭林场马尾松林中选择树龄相同、长势一致的 6 株 8 年树龄马尾松做标记。其中 3 株分别接入一定量的马尾松毛虫 5 龄幼虫 (将虫放入笼中,罩在选定所危害枝条上),危害一天后造成轻度受害 (针叶损失量达 25% ~ 40%),去掉虫,所采针叶为虫害叶,其上一轮枝未受害叶即系统叶;另取 3 株松树作为健康对照 (距受害松树约 25m)。分别采集受害后第 1、3、6、10、24、48、72h 的马尾松针叶和其邻枝针叶,所采样品用于木质素含量、过氧化物酶活性及其同工酶的测定。

采样均匀、随机,采样后立即放入液氮罐中,然后置于 -80℃ 冰箱中保存备用。

1.2 木质素含量的测定

木质素含量采用比色法进行测定。具体方法参见文献^[6],并加以修改。马尾松针叶提取后的干燥物溶于 25% 溴乙酐冰醋酸溶液中,70℃ 恒温水浴加塞保温 30min,然后加 0.9ml 2mol/L NaOH 终止反应,再加 3ml 冰醋酸和 0.1ml 7.5mol/L 的羟氨盐酸,1000g 离心 10min,取上清液稀释 (200ul 样品提取液中加入 5ml 蒸馏水),在 280nm 处测吸收值,以 $OD \cdot g^{-1} \cdot FW^{-1}$ 表示木质素的含量。实验重复 4 次。

1.3 过氧化物酶活性及其同工酶的测定

用比色法测定过氧化物酶活性。具体方法参见^[7],并加以修改。取不同处理的马尾松针叶约 0.5g 于研钵中,加适量的磷酸缓冲液 (pH5.5) 冰浴中研磨成匀浆。将匀浆液全部转入 25ml 容量瓶中,定容至刻度。静置后,取上层溶液加入 PVPP (polyvinyl polypyrrolidone) 抽滤,滤液即为粗酶提取液。酶活性测定的反应体系包括:1.0ml 2% H_2O_2 ;1.0ml 0.05% 愈创木酚和 3ml 酶液。用加热煮沸 5min 的酶液为对照。反应体系加入酶液后,立即于 34℃ 水浴中保温 3min,迅速在 470nm 的波长下比色。以过氧化物酶的比活表示其活性。实验重复 4 次。

木质素含量和过氧化物酶活性数据用 SPSS10.0 软件进行分析。

通过电泳对过氧化物酶同工酶进行测定,方法参见^[8]。实验重复 10 次。

2 实验结果与分析

2.1 受害马尾松针叶木质素含量随时间的快速诱导抗性

如图 1 所示,受害马尾松针叶及其系统针叶木质素含量随时间变化的研究表明:与对照相比,虫害针叶木质素含量 1h 略有升高,24h 显著增加,48h 降至低于对照,但 72h 含量达到最高。系统针叶木质素含量 10h 开始升高,一直持续到 72h,只是与对照相比,增加幅度有所差异。 F 检验的结果表明,只有 24h 虫害及其系统针叶与对照差异显著 ($P < 0.05$)。这与氧化物酶活性及其同工酶的变化相一致 (后详述)。

虫害后 24h 木质素含量显著提高,说明受害针叶细胞壁木质化开始,木质素渗入到细胞壁中填充于细胞

壁构架内,加大细胞壁的硬度,增强细胞的机械支持力或抗压强度,促进了针叶机械组织的形成。坚硬的细胞壁有助于抗拒昆虫和动物的进一步采食,即使被采食也难以消化,同时由于木质素的化学特性,如不溶性和复杂的酚类聚合物使得木质部的细胞壁疏水性增强,提高抗病虫能力。

2.2 受害马尾松针叶过氧化物酶活性及其同工酶的快速诱导抗性

受害马尾松针叶过氧化物酶活性随时间的变化结果表明:与对照相比,虫害针叶的酶活性 24h 升至最高,到 48h 仍然维持较高水平,虫害邻枝 10h 酶活性升高,并一直到 72h 维持在较高水平(见图 2)。F 检验的结果表明,10h 虫害邻枝与对照差异不显著,但 24h 和 48h 虫害及其邻枝与对照差异显著 ($p < 0.05$)。

过氧化物酶同工酶谱带的差异是基因表达差异的结果。通过电泳对健康针叶、虫害及邻枝针叶 1、6、24h 过氧化物同工酶谱带的差异进行了比较,结果显示在受害后不同时间内随着过氧化物酶活性的提高,酶带着色变深,而且差异随时间而逐渐加大。对照针叶过氧化物酶同工酶谱带在 1、6、24h 表达量没有变化,而 24h 虫害及其邻枝同工酶谱带着色明显增加,与 1、6h 的谱带有明显的差异,这种差异在于表达量的不同,如图 3 所示。由于虫害的结果使马尾松体内生理生化过程迥然有异,所以,酶谱的差异从分子水平上揭示了马尾松的一些遗传特异性和基因型的差异^[1],这一变化与木质素的变化形成相一致。

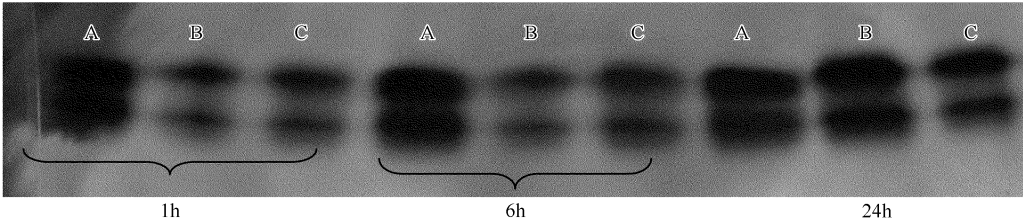


图 3 受害马尾松过氧化物酶同工酶比较

Fig. 3 Comparison of peroxidase isoenzyme from damaged *P. massoniana*
A. 对照 ctrl B. 虫害 feeding C. 虫害邻枝叶 systemic leaves

蛋白质是生物机体中参与一系列生理生化活动所必须的物质。植物受到胁迫时会产生各种不同的响应,因而会从代谢的不同层次和水平上做出相应的应答。蛋白质(包括酶蛋白)是基因表达的直接产物,并参与代谢的调节。各种胁迫下的蛋白质表达取决于胁迫诱导基因的开启和抑制基因的关闭,在电泳图谱上表现为一些谱带的消失和增加或各条带的相对活性。

3 结论与讨论

虫害马尾松针叶及邻枝针叶木质素含量、过氧化物酶活性及同工酶谱带变化一致,均在 24h 达到最高。木质素在植物抗病中的作用已经得到普遍公认。不少学者研究过黄瓜、小麦、萝卜等作物的木质化与抗病性的关系^[1]。用茉莉酸甲酯处理后,烟草 K326 和 BZ 品种的木质素含量增加,而且烟草的抗病力与木质素

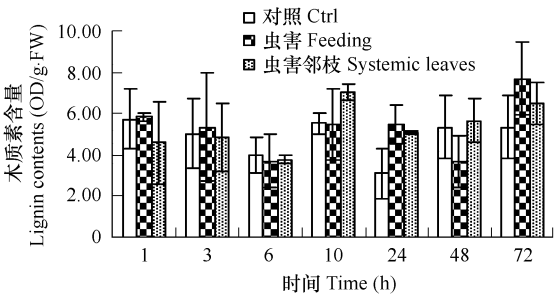


图 1 不同处理的马尾松针叶木质素含量的变化

Fig. 1 Change of lignin contents in *P. massoniana* needles with different

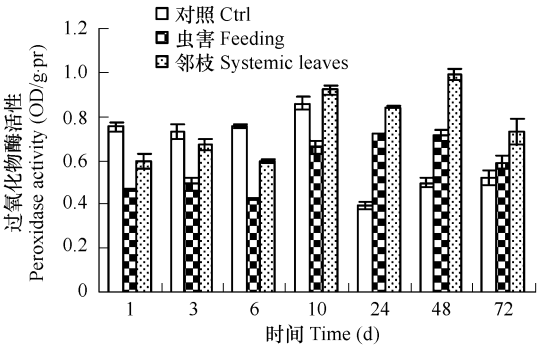


图 2 不同处理的马尾松针叶过氧化物酶活性

Fig. 2 Activity of Peroxidase in *P. massoniana* needles

含量的相关性达到显著水平^[2],这是因为木质素的累积是抗侵入的主要因素,这些物质可抑制真菌生长,干扰外多聚半乳糖醛酸的降解,并使侵入的菌丝木质化。

过氧化物酶是木质素合成过程中的关键性酶。在 H_2O_2 存在下,过氧化物酶能催化许多单酚、二酚及芳香胺反应生成对微生物具有高度毒性的醌。过氧化物酶参与许多植物的生理生化过程,在一些植物感病或抗病过程中起重要作用,可以作为某些植物抗病性的生理生化指标。一般来说,过氧化物酶活性与抗性呈正相关,抗性强的过氧化物酶活性也高。如桉树对青枯病抗性较弱的品系体内的过氧化物酶活性显著低于其它抗性品系,且桉树对青枯病不同抗病性品系之间的同工酶谱带在条带数和各条带的相对活性上有差异,与桉树对青枯病的抗性差异有关^[10]。不同抗性的番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 品种,抗病品种的过氧化物酶活性增强,酶活性曲线有两个高峰,同工酶带比感病品种多一条。番茄受到盐胁迫后,则引起过氧化物酶基因 TPX1 的表达和 TPX1 蛋白质的诱导,该基因翻译了一种过氧化物酶同工酶,使番茄的木质素含量增加^[11]。宾金华等^[2]研究了传递抗病信号——茉莉酸甲酯在烟草抗病中的诱抗机理。结果表明,3 个品种烟草幼苗抗炭疽病能力不同,经茉莉酸甲酯处理后,过氧化物酶活性显著增加。说明过氧化物酶的活性及其同工酶与植物抗性关系密切,但它们与抗虫的关系报道甚少。

本试验的结果显示,虫害后马尾松针叶过氧化物酶活性及其同工酶谱带均在 24h 达到最高,这一结果与上述抗病研究相似,说明木质素合成代谢加速,促进了细胞壁木质化及其伤口附近细胞形成木栓层,加速伤口愈合。虫害马尾松针叶所产生的酚类化合物与木质素也可以产生过敏性反应,对植食性昆虫起到毒杀作用。同时,植物细胞壁木质素含量增加,降低植食性昆虫从植物获得糖类和蛋白质的能力。同工酶谱带差异揭示其一些遗传特异性和基因型差异。虫害及邻枝针叶的过氧化物酶及其同工酶谱带的变化说明其数量和相对浓度有所差异,而这种差异是基因不同的结果。马尾松同一时间不同受害针叶对应表达的蛋白酶不同,从而有可能分出过氧化物酶及其同工酶的强度和酶谱。虽然这些部位具有相同的酶带,但它们在酶谱形态上差异较大,表达量不同,说明对虫害的反应不同。

虫害马尾松针叶木质素含量 1h 就略有升高,而系统针叶木质素含量 10h 开始升高,即受害针叶的反应先于系统针叶。表明受害部位能够产生信号物质且需要进行传递。已有研究表明:多于 100 种植物被昆虫咬食后,其局部和系统部位会发生反应^[3]。如棉花受害后系统叶片在 48h 才出现反应,而玉米虫害后 5~6h 系统叶片挥发物的释放即增加^[4]。这是因为叶片受到伤害后,会迅速引起细胞膜去极化、 Ca^{2+} 流入、蛋白磷酸化级联等,出现快速的基因表达,调节茉莉酸、乙烯等激素合成途径,最终引起受害叶和系统叶防御基因的表达。

马尾松受到马尾松毛虫胁迫后,其针叶中木质素含量的变化并非直线上升,这是因为植物在诱导防御中,要将有限的能量和物质资源进行最优配置,以使植物达到最佳适合度。但植物合成次生物质是要付出代价的,要有从基础代谢来的稳定的前体流,同时需要酶和能量的供应,这种消耗高于初生代谢。根据最佳防御理论,植物只有在需要的时候、需要的部位以必要的数量消耗防御的能量,而诱导抗性则代表了取得最佳效果的有效方式。所以,植物诱导防御的代价是不可避免的,同时也是减少在防御中资源分配的方式和经济上可行的策略。

植物体内木质素、酚类化合物等的合成来自于苯丙氨酸代谢途径^[5,16]。马尾松系统针叶木质素含量的增加与受害部位产生的化学信号的传递有关。在调节植物伤基因表达的信号分子中,茉莉酸是虫害诱导反应中的一种关键性信号。当植物受到虫害胁迫时,受害植物的茉莉酸含量迅速升高并通过十八烷酸途径诱导基因表达^[7],这样的基因诱导和编码苯丙氨酸代谢途径的基因例如 4-香豆酸-CoA 联结酶的 mRNA 的诱导密切相关,最终导致木质素含量的增加。用茉莉酸处理植物则苯丙氨酸途径中的基因转录会重新开始^[8]。

木质素作为植物生长发育中的次生代谢物质,在植物的生长发育和抗性方面具有重要的生物学功能。细胞壁木质化过程中,由于其硬度和疏水性的增强,提高了植物抗病虫能力。但其抗虫机理的研究有待于进一步深入。

Reference :

[1] Chen C Y, Seguin S G. Reaction of wild crucifers to *Leptosphaeria maculans*, the causal agent of blackleg of crucifers. *Can J Plant Pathol*, 1999, 21 (4) :361—367.

[2] Li Z Y, Chen H S, Yuan X H, *et al.* Induced chemical defenses of *Pinus tabulaeformis* Carr. To *Dendrolimus Spectabilis* Butler. *Scientia Silvae Sinicae*, 1998, 34 (1) :43—49.

[3] Wang Y, Ge F, Li Z Y. Spatial-tempetial trends of induced chemical change in pine *Pinus massoniana*. *Acta Ecologica Sinica*, 2001, 21 (8) :1256—1261.

[4] Ge F, Li Z Y, Xie Y P, *et al.* Some characteristics of induced resistance of China pines to pest population dynamics. *Journal of Beijing Forestry University*, 2002, 24 (1) :61—65.

[5] The research Group of the Resistance of *Massion Pine* to *Masson Pine Moth*. A study on resistance mechanism of the No. 11 *Masson Pine* tree to the Caterpillar. *Scientia Silvae Sinicae*, 1990, 26 (1) :133—140.

[6] Lin K, Huang X H, Wang L H, *et al.* The change of PAL activity and lignin content during adventitious buds formation of cotyledon in *Cucumis Melon* L. *Journal of East China Normal University (Natural Science)*, 1996, (1) :92—97.

[7] Yang Y C, Chen Y H, Song J Y, *et al.* Analysis of isoenzymes of peroxidase of insect-resistant varieties in upland cotton (*G. hirsutum* L.). *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 2003, 22 (6) :520—523.

[8] Wu C T, Ye S Y, Yu S R. Analysis of isozymes of peroxidase of insect-resistant varieties in upland cotton (*G. hirsutum* L.). *Journal of Jingdezhen College*, 2004, 19 (1) :5—7.

[9] Song C F, Wang J S, Shi Z M, *et al.* Study on peroxidase activity and isoenzyme of *Eucalyptus* with different resistance to *Pseudomonas solanacearum*. *Guangxi Forestry Science*, 2000, 29 (1) :7—10.

[10] Shi X H, Wang S Y, Wu Y C, *et al.* The Relationship Between PPO Activity. Lignine content And Tannic Content In *Vitis* Leaves And Resistance To *Sphaeloma ampelinum*. *Viticulture & Enology*, 1997 (4) :8—11

[11] Quiroga M, Guerrero C, Miguel A, *et al.* A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiology*, 2000, 122 (4) :1119—1127.

[12] BIN J H, PAN R C. The relationship of the disease resistance of tobacco seedlings induced by methyl jasmonate with peroxidase activity and lignin content. *Chin. J. Appl. Environ. Biol*, 1999, 5 (1) :160—164

[13] Karban R, Balwin IT, Baxte KJ, *et al.* Communication between plants :induced resistance in wild tabacco plants following clipping of neighboring sagebrush. *Oecologia*, 2000, 125 :66—71

[14] Turlings T C J, Tumlinson J H. Systemic release of chemical signals by herbivore-injured corn. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89 :8399—8402

[15] Dudareva N, Pichersky E. Biochemistry and molecular aspects of floral scent. *Plant Physiol*, 2000, 122 :627—634

[16] Richard S, Lapointe G, Rutledge R G, *et al.* Induction of chalcone synthase expression in white spruce by wounding and jasmonate. *Plant & Cell Physiology*, 2000, 41 :982—987.

[17] Muller MJ. Enzymes involved in Jasmonic acid biosynthesis. *Physiol Plant*, 1997, 100 :653—663.

[18] Ellard-Ivey M, Douglas C J. Role of jasmonates in the elicitor- and wound-inducible expression of defense genes in parsley and transgenic tobacco. *Plant Physiol.*, 1996, 112 :183—192.

参考文献 :

[2] 李镇宇,陈华盛,袁小环,等. 油松对赤松毛虫的诱导化学防御. *林业科学*, 1998, 34 (1) :43~49.

[3] 王燕,戈峰,李镇宇. 马尾松诱导化学物质的时空动态. *生态学报*, 2001, 21 (8) :1256~1261.

[4] 戈峰,李镇宇,谢映平,等. 我国主要松树诱导抗虫性的一些规律比较. *北京林业大学学报*, 2002, 24 (1) :61~65.

[5] 马尾松毛虫抗性研究组. 抗性植株的抗性机制研究. *林业科学*, 1990, 26 (1) :133~140.

[6] 林葵,黄祥辉,王隆华,等. 甜瓜子叶不定芽分化过程中 PAL 活性和木质素含量变化研究. *华东师范大学学报 (自然科学版)*, 1996, (1) :92~97.

[7] 杨英仓,陈于和,宋金耀,等. 陆地棉抗虫品种过氧化物酶同工酶分析. *山地农业生物学报*, 2003, 22 (6) :520~523.

[8] 吴春太,叶水英,于姝睿. 利用过氧化物酶同工酶分析抗虫棉品种. *景德镇高专学报*, 2004, 19 (1) :5~7.

[9] 宋从凤,王金生,施仲美,等. 桉树对青枯病抗性 with 过氧化物酶及同工酶关系的研究. *广西林业科学*, 2000, 29 (1) :7~10.

[10] 石雪晖,王淑英,吴艳纯,等. 葡萄叶片中单宁、木质素、PPO 活性与抗黑痘病的关系. *葡萄栽培与酿酒*, 1997 (4) :8~11.

[2] 宾金华, 潘瑞炽. 茉莉酸甲酯诱导烟草幼苗抗病与过氧化物酶活性和木质素含量的关系. *应用与环境生物学报*, 1999, 5 (1) :160~164.