

# 水杨酸甲酯、苯骈噻唑及茉莉酸甲酯对合作杨防御物质的影响

高海波<sup>1</sup>, 沈应柏<sup>2\*</sup>

(1. 临沂师范学院 生命科学院, 山东 临沂 276005; 2. 北京林业大学 生物科学与技术学院, 北京 100083)

**摘要:**采用熏蒸的方法,研究了3种人工合成挥发性物质对合作杨防御物质的诱导能力。结果表明:水杨酸甲酯和苯骈噻唑对合作杨植株体内产生于茉莉酸信号转导途径的萜烯类挥发物的释放具有抑制作用;而用茉莉酸甲酯对合作杨植株萜烯类挥发物的释放具有明显的促进作用。结合植物体内的直接防御物质多酚氧化酶和过氧化物酶活性的测定,表明茉莉酸信号转导途径在诱导合作杨间接和直接防御能力的过程中起着关键作用。

**关键词:**合作杨;水杨酸甲酯;苯骈噻唑;茉莉酸甲酯

**中图分类号:**S792.119.01

**文献标识码:**A

**文章编号:**1001-7461(2007)06-0032-04

## Effects of BTH, MeSA and MeJA on Defensive Components of *Populus simonii* × *P. pyramidalis*

GAO Hai-bo<sup>1</sup>, SHEN Ying-bai<sup>2</sup>

(1. College of Life Science, Linyi Normal University, Linyi, Shandong 276005, China;

2. College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** The present article studied the effects of three synthesized volatiles on the induction of defensive components of *Populus simonii* × *P. pyramidalis* c. v. by the method of fumigation. Treatment of plants with gaseous BTH and MeSA suppressed the productions of terpenoids which involved in jasmonate-signal transduction pathways. However, MeJA could not only prompted the release of volatile signals, but also enhanced enzyme activity of PPO and POD in the leaves. The results indicated that jasmonate-signal transduction pathway played crucial role in the induction of direct and indirect defense of *P. simonii* × *P. pyramidalis* c. v.

**Key words:** *Populus simonii* × *P. pyramidalis*; methyl salicylic acid (MeSA); benzothiadiazole (BTH); methyl jasmonate (MeJA)

水杨酸(salicylic acid)是植物体内重要的内源信号物质,在植物诱导抗病性以及系统获得抗病性过程中起到信号转导作用。水杨酸可以诱导植物抗病相关防御基因的表达以及相应防御物质的产生<sup>[1]</sup>,也可能在植物虫害防御、植株间伤害信息的传递方面起着传递信号作用<sup>[2]</sup>。苯骈噻唑(benzothiadiazole)是一种在功能上与水杨酸甲酯类似的物质,苯骈噻唑熏蒸过的利马豆植株降低了害虫二点叶螨的产卵率<sup>[3]</sup>。研究表明,苯骈噻唑对棉花<sup>[4]</sup>、小麦<sup>[5]</sup>系统抗病性的产生、抗病基因的表达起着关键的作用。茉莉酸(jasmonic acid)及茉莉酸甲酯(methyl jasmonate)作为与损伤有关的信号分子广泛存在于

植物体中,在植株间伤害信息的信号转导过程中具有重要作用<sup>[6]</sup>。通过比较上述3种外源挥发性信号物质对合作杨植株防御物质的诱导能力,为杨树病虫害防治提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与处理

以1a生合作杨(*Populus simonii* × *P. pyramidalis*)扦插苗为试验材料,其扦插枝条采自北京林业大学实验苗圃内9a生合作杨植株。3月份在北京林业大学实验苗圃将合作杨茎段扦插于盛有果园土的塑料盆中,定期浇水和5%Hoagland营养液,试

收稿日期:2007-01-15 修回日期:2007-03-28

基金项目:国家自然科学基金(30170764)

作者简介:高海波(1970-),男,山东临沂人,副教授,主要从事木本植物间伤害信息传递的研究。

\* 通讯作者:沈应柏(1958-),男,教授,博士,从事木本植物间气体信号转导的研究。

验前一个月经常挪动塑料盆以免根系扎根于土壤而造成损伤。

熏蒸试验所用玻璃气室(60 cm×80 cm×150 cm)体积为 720 L,空气通过底部开口进入气室,开口处装有经过高温活化的活性炭以过滤空气中的杂质,内部放置一小型风扇促使气室内空气循环,促进熏蒸所用试剂的迅速挥发。试验采用 3 种挥发性化合物对健康合作杨植株进行熏蒸:水杨酸甲酯(浓度为 99%)、苯腈噻唑(浓度为 90%)和茉莉酸甲酯(浓度为 95%),均为 Sigma-Aldrich 公司产品。试验前,将 3 种试剂分别用二氯甲烷稀释至  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,待用。

将长势良好、生长一致的 2 株合作杨分别放入 2 个气室后,用微量移液器将配制好的上述试剂吸取 360  $\mu\text{L}$ ,移入放置在气室底部的培养皿中的脱脂棉球上,使所用试剂在气室内的挥发浓度为  $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。熏蒸 12 h 后,将处理过的植物材料 1 株取出,进行挥发物的采集,挥发物采集 2 h 后,把叶片摘取下来,并烘干称重;另 1 株摘取叶片,用锡纸包好后立即投入液氮,保存于  $-70^\circ\text{C}$  冰箱中,用作酶活性测定。以移入放置在气室底部的培养皿中的脱脂棉球蘸取  $60 \mu\text{L}$  二氯甲烷处理的合作杨植株为溶剂对照。每个处理重复 3 次。

## 1.2 挥发物的采集

挥发性气体用 QC-1 型大气采样仪(北京劳动保护研究所生产)采集,采样管为 Chrompack 公司生产的热脱附专用采样管,吸附管内担体为迪玛公司生产的 Tenax-GR 吸附剂(100 mg, 60~80 目)。不同处理的植物材料熏蒸 12 h 后,从气室中取出,套上 Reynolds 微波炉袋(44.3 cm×55.8 cm,该袋子在高温和高光强下挥发物的释放量很低),构成密闭环境。安装吸附管前,先将袋内抽空,补充经过活性炭和硅胶过滤后的新鲜空气后,在进气口端加上吸附管,抽气时间为 2 h,气体流量为  $100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,采集挥发物后的吸附管置于干燥冷藏处备用。

## 1.3 挥发物的分析与鉴定

1.3.1 样品分析 收集了气体挥发物的吸附管通过热脱附—低温捕集装置与气相色谱质谱连用对样品进行分析。气相色谱质谱连用中,气相色谱为 Cei-instrument 公司的 TRACETM,质谱为 Finstrument 公司生产的 VOYAGER Mass Spectrometer,热脱附仪采用 Chrompack 公司生产的 CP-4010 PTI/TCT。TCT 操作条件为:载气压力 20 kPa,进样口温度  $250^\circ\text{C}$ ,冷阱温度为  $-120^\circ\text{C}$ ,热脱附温度  $250^\circ\text{C}$  (10 min),进样时冷阱温度  $260^\circ\text{C}$ 。GC 分析条件为:色谱柱 CP-Sil18 Low Bleed/MS (60 m×

0.25 mm×0.25  $\mu\text{m}$ ),不分流进样,载气压力为 20 kPa,初始温度为  $40^\circ\text{C}$  (3 min),以  $6^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  程序升温至  $250^\circ\text{C}$  (3 min)。MS 工作条件为:EI 离子源,电离能 70 eV,GC/MS 接口温度  $250^\circ\text{C}$ ,离子源温度  $200^\circ\text{C}$ ,灯丝为 150  $\mu\text{A}$ 。

1.3.2 数据分析 通过核对谱库(NIST98)与标准化合物的质谱图,对挥发物各组分进行定性分析,然后选取特征离子进行进一步的定量分析。挥发物定量方法采用单位采样时间内单位叶片干重所释放出的挥发物的特征离子强度。单位为  $\text{E}3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

## 1.4 酶活性的测定

称取 0.5 g 保存的植物叶片,用液氮研磨,在液氮挥发完全前将其转移到 3 mL 的离心管,加入 1.5 mL 聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)磷酸钾缓冲液( $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钾缓冲液, pH7, 加入 7% 的聚乙烯吡咯烷酮),振荡混匀;冰浴条件下加入 0.6 mL 10% 的 Triron X-100,振荡混匀后离心(10 000 g, 10 min),吸取上清液即为粗酶液,每处理 3 次重复。

1.4.1 多酚氧化酶的活性测定 在比色杯中加入 3 mL 咖啡酸—磷酸钾缓冲液( $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钾缓冲液, pH8, 加入  $2.92 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咖啡酸),加入 40  $\mu\text{L}$  粗酶液,混匀,于 470 nm 波长下测定光密度(OD),每 30 s 记录 1 次,共 3 min<sup>[7]</sup>。

1.4.2 过氧化物酶的活性测定 在比色杯中加入 3 mL 愈创木酚—磷酸钾缓冲液( $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钾缓冲液, pH8, 加入  $2.92 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 愈创木酚, 1  $\mu\text{L}$  过氧化氢),加入 40  $\mu\text{L}$  粗酶液,混匀,于 470 nm 波长下测定光密度,每 30 s 记录 1 次,共 3 min<sup>[7]</sup>。酶活性( $\Delta\text{OD} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )= $\Delta\text{OD} \cdot \text{min}^{-1}/(\text{叶重}(\text{g})/2.1 \text{ mL}) \times 0.04 \text{ mL}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同处理对合作杨挥发物的诱导作用

合作杨植株经过 3 种试剂熏蒸后,释放的挥发物种类和数量都发生明显的变化,挥发物主要来源于脂氧合酶途径的绿叶性气味物质、异戊二烯途径的萜烯类物质、莽草酸途径的苯系物和一些含氮化合物<sup>[8]</sup>。比较不同处理的合作杨挥发物发现,各处理植株挥发物种类均少于水杨酸处理的植株,但是挥发物种类的差异均集中在桉油精、A(E)-2-己烯醛、苯酚和二甲基酰胺各处理中释放量都很少的挥发性组分上(表 1)。

研究表明(表 1),不同处理的合作杨植株释放的挥发物在绝对释放量上,尤其是相对含量较高的组分存在明显差异。在苯腈噻唑处理的植株中, $\alpha$ -蒎烯、6-甲基-5-庚烯-2-酮、 $\beta$ -蒎烯、反式-香叶基丙酮、

柠檬烯、桉油精等 6 种萜烯类化合物,己醛、1-己烯-3-醇 2 种绿叶性气体,苯甲醛、苯乙酮等苯系物和含氮化合物吡啶的绝对释放量低于对照植株,这些化合物在水杨酸甲酯处理的样品中也表现出同样的规律。与对照相比,苯腈唑啉和水杨酸甲酯处理对合作杨的挥发物的释放具有抑制作用,尤其对来自异戊二烯途径的健康合作杨植株本身就大量释放 6-甲基-5-庚烯-2-酮、反式-香叶基丙酮等萜烯类物质释放具有显著的抑制作用( $P<0.05$ )。

合作杨植株经茉莉酸甲酯诱导后,挥发物的释

放规律上与苯腈唑啉和水杨酸甲酯处理的植株不同(表 1)。茉莉酸甲酯处理未能诱导合作杨植株释放出苯系物和含氮化合物,却诱导来自异戊二烯途径的萜烯类物质的大量释放,其中 6-甲基-5-庚烯-2-酮、反式-香叶基丙酮的释放量与其他处理相比均达到了显著水平,分别为对照的 4.5 倍和 3.7 倍,说明 6-甲基-5-庚烯-2-酮、反式-香叶基丙酮可能在合作杨植株间起到传递伤害信息,具有直接防御以及间接防御的重要生理生态功能,尚需进一步研究。

表 1 不同处理合作杨挥发物的化学组成<sup>①</sup>

Table 1 The constituents of volatiles from different treatments of *Populus simonii*×*P. pyramidalis* ( $E3 \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ )

挥发物组分		健康植株	苯腈唑啉 处理植株	水杨酸甲酯 处理植株	茉莉酸甲酯 处理植株
萜烯类	$\alpha$ -蒎烯	7.04±1.55 a	1.06±0.35 c	6.42±2.30 a b	2.64±0.51 b
	6-甲基-5-庚烯-2-酮	14.63±3.01 b	6.68±3.09 c	5.08±2.52 c	66.3±19.84 a
	$\beta$ -蒎烯	22.09±2.59 a	6.73±2.61 b	5.01±1.51 b	7.94±2.45 b
	反式-香叶基丙酮	49.61±9.76 b	20.25±12.35 c	15.47±5.02 c	183.60±44.28a
	柠檬烯	0.20±0.58 b	0.40±0.09 b	0.80±0.25 a	0.45±0.02 b
	桉油精	0.96±0.20 a	ND b	0.28±0.02 b	0.17±0.01 b
	薄荷醇	0.44±0.01 c	1.64±0.49 b	3.88±0.53 a	2.70±0.59 a b
绿叶性气体	己醛	7.70±1.21 a	4.86±1.45 b	4.63±1.57 b	8.20±2.15 a
	(E)-2-己烯醛	0.36±0.01 b	ND d	0.23±0.02 c	0.39±0.01 a
	1-己烯-3-醇	1.73±0.31 a	0.65±0.21 b	0.26±0.01 b	0.68±0.15 b
苯系物	苯酚	ND b	ND -b	0.81±0.15 a	ND b
	苯甲醛	14.26±2.48 a	1.70±0.35 b	1.26±0.25 b	2.10±0.40 b
	苯乙酮	4.10±0.81 a	1.15±0.60 b	0.80±0.15 b	1.05±0.21 b
含氮化合物	吡啶	3.86±1.06 a	1.25±0.15 b	0.56±0.05 b	0.91±0.16 b
	二甲苯酰胺	ND c	1.71±0.23 b	3.54±0.52 a	ND c

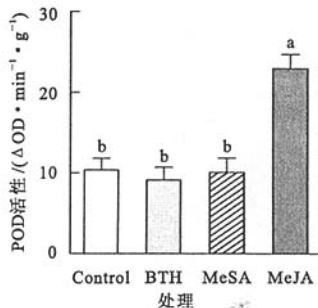
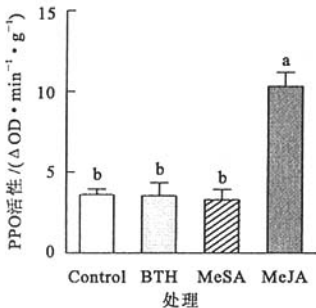
①表中数值是 3 次重复的平均值;同行不同字母表示差异显著( $P<0.05$ );“ND”表示未检测到。

2.2 不同处理对合作杨多酚氧化酶及过氧化物酶的诱导作用

在昆虫取食过程中,多酚氧化酶与酚类底物混合在一起,导致醌将食物蛋白中的必需氨基酸烷基化,使昆虫不能利用其营养<sup>[9]</sup>。过氧化物酶是植物体中重要的抗氧化蛋白,可以通过促进细胞的木质化

而实现对机械伤害的直接防御作用<sup>[10]</sup>。

合作杨植株用 3 种试剂熏蒸处理 12 h 后,茉莉酸甲酯处理的植株与对照及其他处理相比,多酚氧化酶和过氧化物酶的活性明显增加,均达到差异显著水平( $P<0.05$ ),而对照植株、苯腈唑啉与水杨酸甲酯处理植株间 2 种酶的活性无显著差异(图 1)。



Control—对照植株; BTH— $0.5 \mu mol \cdot L^{-1}$ 苯腈唑啉处理植株; MeSA— $0.5 \mu mol \cdot L^{-1}$ 水杨酸甲酯处理植株; MeJA— $0.5 \mu mol \cdot L^{-1}$ 茉莉酸甲酯处理植株;同种酶不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

图 1 不同处理合作杨多酚氧化酶(PPO)及过氧化物酶(POD)的活性

Fig. 1 Enzyme activities of polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POD) in different treatment of *Populus simonii*×*p. pyramidalis*

### 3 结论与讨论

合作杨植株经水杨酸甲酯处理后,对合作杨植株体内通过茉莉酸信号转导途径产生萜烯类化合物和绿叶性气味物质的合成与释放具有抑制作用;而茉莉酸甲酯处理对合作杨体内茉莉酸信号转导途径增强有显著的促进作用,使合作杨植株释放出大量的萜烯类挥发性化合物,这些挥发性物质在植株间伤害信息的传递、吸引植食性昆虫天敌以及驱避植食性昆虫等方面具有潜在的功能,同时茉莉酸甲酯处理对直接抗虫物质多酚氧化酶和过氧化酶的活性提高有显著的促进作用。

Ping 等<sup>[11]</sup>在桉叶桉(*Acer negundo*)研究中发现,植株遭受机械伤、舞毒蛾幼虫(*Lymantria dispar*)取食后,大量释放出的苯腈噻唑对邻近健康同种植株体内直接抗虫物质(酚酸)含量的增加具有显著的诱导作用,具有在同种株间传递伤害信息的功能。但在对合作杨的研究中,却未发现类似的现象,一方面和对照相比,苯腈噻唑处理对合作杨直接抗虫物质 PPO 和 POD 的活性没有显著的诱导作用,表明不同研究对象的抗虫机理不同。Boughton 等<sup>[12]</sup>对番茄的研究表明,茉莉酸处理可以诱导番茄植株新生叶片上叶表毛状体的形成,使番茄植株的物理防御能力增强,茉莉酸处理可以诱导番茄植株叶表毛状体的形成,表明植株间伤害信息的传递具有多样性和特异性,这种多样性和特异性与植物的种类、损伤的类型有直接关系。

本研究从挥发物和直接抗虫物质多酚氧化酶及过氧化物酶活性的角度,分析了水杨酸甲酯、苯腈噻唑及茉莉酸甲酯处理对合作杨植株直接和间接防御能力的诱导作用,以后将通过昆虫行为学试验及电生理学实验,进一步研究所检测的几种大量挥发性物质在合作杨抗虫生理生态中的具体作用。

#### 参考文献:

[1] Van Poecke R M P, Dicke M. Signal transduction downstream of salicylic and jasmonic acid in herbivory-induced parasitoid attraction by *Arabidopsis* is independent of JAR1 and

- NPRI[J]. *Plant Cell and Environment*, 2003, 26(9): 1541-1548.
- [2] Bi J L, Murphy J B, Felton G W. Antinutritive and oxidative components as mechanisms of induced resistance in cotton to *Helicoverpa zea*[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1997, 23(1): 97-117.
- [3] Abou-Mandour A A, Binder G. Effect of exogenous growth regulators on plant regenerates from tissue cultures of *Mentha spicata* and production of volatiles[J]. *Journal of Applied Botany-Angewandte Botanik*, 1998, 72(5-6): 233-243.
- [4] Inbar M, Doostdar H, Gerling D, et al. Induction of systemic acquired resistance in cotton by BTH has a negligible effect on phytophagous insects[J]. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 2001, 99(1): 65-70.
- [5] Goriach J, Volrath S, Knaufbeiter G, et al. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat[J]. *Plant Cell*, 1996, 8(4): 629-643.
- [6] Miller B, Madilao L L, Ralph S, et al. Insect-induced conifer defense. White pine weevil and methyl jasmonate induce traumatic resinosis, de novo formed volatile emissions, and accumulation of terpenoid synthase and putative octadecanoid pathway transcripts in Sitka spruce[J]. *Plant Physiology*, 2005, 137(1): 369-382.
- [7] Thaler J S, Stout M J, Karban R, et al. Exogenous jasmonates simulate insect wounding in tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in the laboratory and field[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1996, 22(10): 1767-1781.
- [8] 高海波, 沈应柏. 植物株间报警信号的传递[J]. 西北林学院学报, 2006, 21(1): 60-63.
- [9] 徐伟, 严善春. 茉莉酸在植物诱导防御中的作用[J]. 生态学报, 2005, 25(8): 2074-2082.
- [10] Tscharnkte T, Thiessen S, Dolch R, et al. Herbivory, induced resistance, and interplant signal transfer in *Alnus glutinosa*[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2001, 29(10): 1025-1047.
- [11] Ping L Y, Shen Y B, Jin Y J. Volatiles released in succession from artificially damaged ashleaf maple leaves[J]. *Australian Journal of Plant Physiology*, 2001, 28(6): 513-517.
- [12] Boughton A J, Hoover K, Felton G W. Methyl jasmonate application induces increased densities of glandular trichomes on tomato, *Lycopersicon esculentum*[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2005, 31(9): 2211-2216.