

王燕芳, 吴 瑛. 外源水杨酸对棉花相关抗虫酶活性诱导的时间和浓度效应[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(4): 138–140.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.04.049

# 外源水杨酸对棉花相关抗虫酶活性诱导的时间和浓度效应

王燕芳<sup>1,2</sup>, 吴 瑛<sup>1</sup>

(1. 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室, 新疆阿拉尔 843300; 2. 塔里木大学植物科技学院, 新疆阿拉尔 843300)

**摘要:**采用喷雾方法, 初步探讨外源水杨酸对棉叶总酚和抗虫酶活性的诱导作用, 结果表明, 在适度浓度和时间范围内, 水杨酸(SA)能明显诱导棉叶中总酚含量、苯丙氨酸解氨酶(PAL)、多酚氧化酶(PPO)活性和胰蛋白酶抑制力(TI)活性的增加; 5 mmol/L 水杨酸处理后 4 d 对棉叶总酚含量、PAL 活性和胰蛋白酶抑制力的诱导作用最为显著, 水杨酸 5 mmol/L 处理后 2 d 和 0.5 mmol/L 处理后 4 d 对棉叶 PPO 活性的诱导效果最优; 随着水杨酸处理时间的延长, 水杨酸诱导棉叶总酚含量和抗虫酶(PAL、PPO、TI)活性具有先升高后降低随后又升高的特点。这说明外源水杨酸能在一定程度上提高棉花抗虫相关的物质和酶活性以达到抗虫目的。

**关键词:**水杨酸; 棉花; 总酚; 抗虫酶; 总酚含量; 苯丙氨酸解氨酶; 多酚氧化酶

**中图分类号:** S562.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)04-0138-03

水杨酸(SA)作为植物的一种重要信号分子, 能激活植物超敏反应, 诱导病程相关蛋白基因(PR)的表达, 使植物产生系统性防御, 增强其抗病能力。有研究表明, 水杨酸在诱导抗虫方面也有重要作用<sup>[1-2]</sup>, 如杨扇舟蛾取食受水杨酸甲酯

(MeSA)熏蒸后的黑杨叶片后, 成虫对食物的消化吸收降低、发育历程延长、死亡率增加<sup>[3]</sup>; 利马豆遭二斑叶螨取食后, 会释放一种含有 MeSA 的挥发物以吸引二斑叶螨的天敌智利捕食螨, 从而起到间接抗虫作用<sup>[4]</sup>。植物体内次生代谢产物含量和防御酶活性的变化是植物抗虫过程中的重要表现, 具有重要的防卫功能<sup>[5]</sup>。目前, 关于棉花在外源水杨酸诱导作用下的相关抗虫生理生化防御研究比较少, 本试验从植物生理生化防御角度出发, 探讨外源水杨酸不同浓度和作用时间下棉花体内相关抗虫酚类次生代谢产物和蛋白酶活性的变化, 以明确外源水杨酸对棉花的抗虫诱导作用机制, 为水杨酸在棉花生产上的科学利用提供理论依据。

收稿日期: 2014-09-25

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 20867005)。

作者简介: 王燕芳(1989—), 女, 山西忻州人, 硕士, 从事外源激素对棉花病虫害防治研究。E-mail: 819710681@qq.com。

通信作者: 吴 瑛, 教授, 从事化学教学与研究。E-mail: wuyingyuan@163.com。

资助率达到了 90.43%, 其中 65 篇文献被国家级基金项目资助, 可见随着双生病毒在国内蔓延, 相关研究得到国家高度重视, 在众多重大科技计划中都给予了专项支持, 这对快速积累该领域的研究成果发挥了重要作用。结合资助方向分析, 今后可适当增加对双生病毒发病机制方面的研究支持。(3) 双生病毒研究成果产出机构集中度偏高。国内双生病毒文献相对集中于少数科研机构, 中国科学院、浙江大学共发表相关论文 44 篇, 占文献总量的 38.26%。各个研究团队的规模较小, 地域发展不均衡, 发文主要集中在以周雪平、刘玉乐、蔡健和为主的 3 个研究团队。上述 3 个团队之间虽有一定的合作关系, 但从全国范围来看, 对于双生病毒的研究合作还不充分, 特别是优势团队和普通团队之间的合作尚不紧密。

通过对 CSCD 数据库中收录的双生病毒研究文献的统计分析, 在展示国内双生病毒研究成果的同时也揭示了该领域的薄弱环节, 有关研究的深度、广度等方面有待加强。为了更好地识别双生病毒领域的研究热点与前沿, 未来还可基于“Web of Science”核心合集集中的文献数据进行分析, 与现有结果对比分析, 可能对双生病毒领域的发展更具参考性。

## 参考文献:

- [1] 张 彤. 双生病毒卫星 DNA 的复制及介导的病毒—介体互惠机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- [2] 刘启元, 叶 鹰. 文献题录信息挖掘技术方法及其软件 SATI 的实现——以中外图书情报学为例[J]. 信息资源管理学报, 2012(1): 50–58.
- [3] 邱均平. 信息计量学[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 2007: 44–45.
- [4] 靳慧慧, 周 岚, 王姬娟. 基于文献计量分析的国内高校图书馆企业信息服务研究[J]. 科技情报开发与经济, 2014, 24(3): 105–108.
- [5] 刘思琼. 基于 CSCD 的我国菌根真菌研究文献计量分析[J]. 情报探索, 2013(12): 22–27.
- [6] 丁学东. 文献计量学基础[M]. 北京: 北京大学出版社, 1993: 220–232.
- [7] 黎 敏, 钟辉新. 近五年国际国内云计算研究进展对比[J]. 科技管理研究, 2013(3): 187–191.
- [8] 邱均平, 温芳芳. 近五年来图书情报学研究热点与前沿的可视化分析——基于 13 种高影响力外文源刊的计量研究[J]. 中国图书馆学报, 2011, 37(2): 51–60.



## 1 材料与方法

### 1.1 材料与处理

试供棉花种子中棉 40, 由新疆维吾尔自治区阿拉尔市农业科学研究所提供。将大小均匀且饱满的种子撒播于  $10\text{ cm} \times 15\text{ cm}$  的塑料花盆中, 每盆播种 10 粒, 放置于重点实验室组培室中培养, 试验用土为黄壤、蛭石、草木灰, 按照 2:2:1 配比, 经高温灭菌、晾晒。棉花生育期确保有适宜的湿度和温度、无病虫害, 光照时间为  $18\text{ h/d}$ 。棉花 1~2 片真叶期间苗, 留苗 4 株/盆; 待长至 4~5 片真叶期, 叶面喷施含有 1% Tween20 和 6% 乙醇的不同浓度水杨酸, 分别为 0.05、0.5、5 mmol/L, 以含 1% Tween20、6% 乙醇的水溶液为对照 (CK), 直至水珠落下为准, 透明塑料袋套袋, 12 h 后摘除; 在喷施后 0、2、4、6、8 d 分别剪取真叶叶片, 液氮封存, 待测。每处理重复 3 次。

### 1.2 测定方法

酚酸含量的测定<sup>[6]</sup>: 称取 0.1 g 鲜叶, 加入 3 mL 95% 乙醇研磨成匀浆; 加入 5 mL 乙醇润洗, 定容至 10 mL,  $2\ 500\text{ r/min}$  离心 5 min, 取上清液得粗提液; 移取 1.25 mL 粗提液到 10 mL 具塞试管中, 加 1 mL 福尔马林试剂摇匀, 静置 4~5 min; 加 2 mL 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 置  $75\text{ }^\circ\text{C}$  水浴锅中保温 10 min, 分光光度计于 765 nm 处比色。

多酚氧化酶 (PPO) 活性的测定<sup>[7]</sup>: 称取鲜叶 0.1 g, 加入含 7% PVP、浓度为 0.1 mmol/L、pH 值为 7.4 的磷酸缓冲液 2.5 mL, 于冰浴中研磨成匀浆;  $4\text{ }^\circ\text{C}$  下  $5\ 500\text{ r/min}$  离心 10 min, 上清液即为酶液; 移取 0.1 mmol/L 邻苯二酚 1.5 mL、酶液 0.5 mL 和磷酸缓冲液 1 mL,  $420\text{ nm}$  处比色, 测定 2 min 内吸光度的变化。

苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性的测定<sup>[8]</sup>: 称取 0.1 g 鲜叶, 加 2.5 mL 预冷的 0.05 mmol/L、pH 值为 7.8 的 Tris-HCl 缓冲液和 0.02 g PVP, 于冰浴中研磨;  $4\text{ }^\circ\text{C}$  下  $5\ 500\text{ r/min}$  离心 10 min; 取 0.2 mL 上清液于 5 mL 试管中, 加入 3.8 mL Tris-HCl 缓冲液和 1 mL 0.6 mmol/L 苯丙氨酸,  $40\text{ }^\circ\text{C}$  水浴 1 h; 加 0.2 mL 6 mmol/L HCl 终止反应,  $290\text{ nm}$  处测吸光度。

胰蛋白酶抑制力 (TI) 活性的测定<sup>[9]</sup>: 称取 0.1 g 鲜叶, 加 2 mL Tris-HCl 缓冲液, 冰浴研磨成匀浆;  $4\text{ }^\circ\text{C}$  下  $5\ 000\text{ r/min}$  离心 10 min; 取 0.1 mL 上清液和 0.02 mL 胰蛋白酶抑制液混合,  $25\text{ }^\circ\text{C}$  水浴 30 min; 取 0.1 mL 水浴后的混合液与 2.9 mL BAEE 进行反应,  $256\text{ nm}$  处测定吸光度的变化。

### 1.3 数据处理

采用 SPSS 20 软件单因素多重比较法, 分析水杨酸对棉叶相关抗虫酶活性诱导效应的差异性。

## 2 结果与分析

### 2.1 水杨酸对棉叶总酚含量的诱导效应

由图 1 可见, 随着处理后时间的延长, 棉叶总酚含量呈现上升趋势, 处理后 4 d 时棉叶总酚含量达到最大值, 显著高于对照, 其中, 5 mmol/L 水杨酸处理的棉叶总酚含量均显著高于其他浓度处理 ( $P < 0.05$ ), 是 CK 的 1.55 倍; 处理后 6 d, 总酚含量降到最低, 除 5 mmol/L 水杨酸外, 各浓度处理均低于对照; 处理后 8 d, 棉叶总酚含量迅速回升, 0.5 mmol/L 和

5 mmol/L 水杨酸处理的棉叶总酚含量均显著高于 CK。经单因素多重比较分析可得, 除处理后 0 d 和 2 d 之间无显著性差异 ( $P = 0.087$ ) 外, 处理后其他时间的总酚含量均差异显著; 0.05 mmol/L 水杨酸与 CK 处理后的总酚含量无显著性差异 ( $P = 0.763$ )。水杨酸能明显诱导棉叶总酚物质的产生, 处理后 4 d, 5 mmol/L 水杨酸处理对棉叶总酚含量的诱导作用最大。

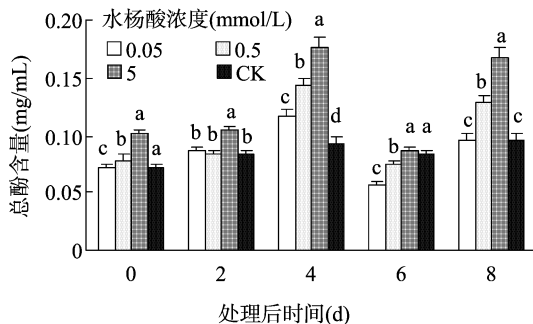


图1 水杨酸对棉叶总酚含量的诱导作用

### 2.2 水杨酸对棉叶 PAL 活性的诱导效应

由图 2 可见, 水杨酸处理后的棉叶, 体内 PAL 活性在 0~4 d 内迅速增大, 4~6 d 骤降, 6~8 d PAL 活性又大幅回升; 处理后 4 d, 随着水杨酸处理浓度的升高, 棉叶 PAL 活性不断增大, 且均显著高于 CK ( $P < 0.05$ ), 其中, 5 mmol/L 水杨酸处理的棉叶 PAL 活性最大, 是 CK 的 2 倍; 水杨酸处理后 6~8 d, 0.5 mmol/L 处理的棉叶 PAL 活性迅速升高, 8 d 时 PAL 活性最大, 与其他处理均有显著性差异, 较 CK 增加 40.65%。经单因素多重比较分析可得, 棉叶 PAL 活性的时序变化差异显著 ( $P < 0.05$ ), 各处理浓度间棉叶 PAL 活性差异显著, 均高于 CK。

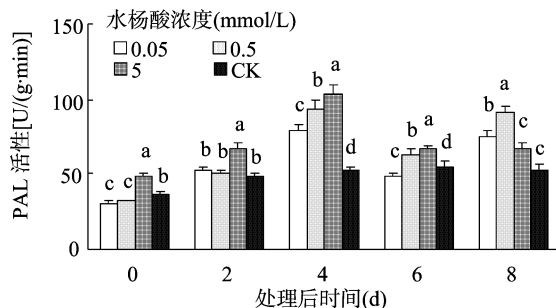


图2 水杨酸对棉叶PAL活性的诱导作用

### 2.3 水杨酸对棉叶 PPO 活性的诱导效应

由图 3 可见, 不同浓度水杨酸处理的棉叶, 体内 PPO 活性在 0~4 d 迅速升高, 4~6 d 活性骤降, 而后稍有回升; 处理后 2 d, 除 0.05 mmol/L 水杨酸处理外, 其他浓度处理均显著高于 CK, 其中 5 mmol/L 水杨酸处理的棉叶 PPO 活性最大, 是 CK 的 1.63 倍; 处理后 4 d, 各处理棉叶 PPO 活性均显著高于 CK, 0.5 mmol/L 水杨酸处理的棉叶, 其 PPO 活性显著高于其他浓度, 0.05 mmol/L 与 5 mmol/L 水杨酸处理的棉叶 PPO 活性无显著差异 ( $P > 0.05$ ); 处理后 6 d, 棉叶体内 PPO 活性均明显低于 CK; 处理后 8 d, 0.5 mmol/L 和 5 mmol/L 水杨酸处理的棉叶体内 PPO 活性均显著高于 CK。经单因素多重比较可得, 水杨酸处理后 2~4 d, 棉叶 PPO 活性无显著性差异



( $P=0.087$ ), 处理后 0 d 和 6 d, 棉叶内 PPO 活性也无明显差异( $P=0.163$ ); 0.05 mmol/L 水杨酸与 CK 处理对棉花 PPO 活性的诱导作用无明显差异( $P=0.838$ )。5 mmol/L 水杨酸处理后 2 d 和 0.5 mmol/L 水杨酸处理后 4 d 对棉叶 PPO 活性的诱导效果最为明显。

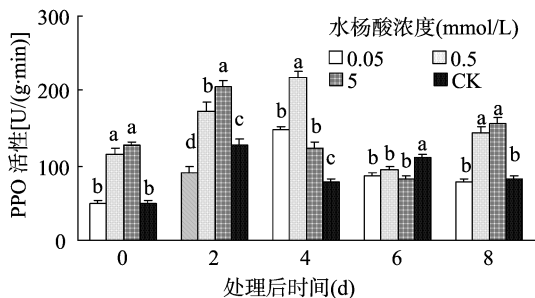


图3 水杨酸对棉叶 PPO 活性的诱导作用

#### 2.4 水杨酸对棉叶 TI 的诱导效应

由图 4 可见, 不同浓度水杨酸处理后, 棉叶中 TI 活性在 0~2 d 缓慢增加, 均显著高于 CK, 但各浓度间对棉叶 TI 的诱导效果无明显差异; 处理后 4 d, 各浓度处理对棉叶体内 TI 活性的诱导效应最为明显, 其中, 5 mmol/L 水杨酸处理对棉叶 TI 活性的诱导效果优于 CK 和其他浓度处理, 但 0.05 mmol/L 和 0.5 mmol/L 水杨酸处理间无明显差异( $P>0.05$ ); 处理后 4~6 d, 水杨酸对棉叶 TI 活性的诱导效应降低, 除 0.05 mmol/L 外, 其他浓度处理的棉叶 TI 浓度均显著高于 CK; 处理后 8 d, 水杨酸对棉叶 TI 活性的诱导效应有所回升, 0.05、0.5 mmol/L 水杨酸处理对 TI 活性的诱导效果最为明显, 5 mmol/L 水杨酸处理的棉叶体内 TI 活性与 CK 无显著差异。经单因素多重比较分析可得, 处理后不同时间对棉叶体内 TI 活性的诱导效应差异显著, 处理后 4 d 对 TI 的诱导效应最为明显; 不同浓度的水杨酸处理, 对棉叶 TI 活性的诱导效应明显高于 CK, 5、0.5 mmol/L 水杨酸处理对棉叶 TI 活性的诱导效果最为明显, 且两者无显著差异( $P=0.405$ )。

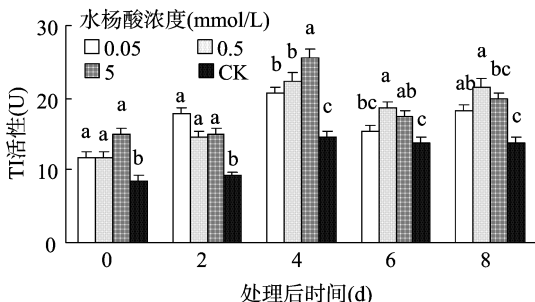


图4 水杨酸对棉叶 TI 的诱导作用

### 3 结论与讨论

Thulke 等报道认为, 水杨酸能激活植物局部几种防御反应, 诱导植物体内苯酚类有毒物质的积累, 而且还会诱导植物体内 POD 和甘露醇脱氢酶基因的表达<sup>[10]</sup>。周莹等研究结果表明, 水杨酸在抵御生物胁迫过程中, 会激发植物体内细胞壁的交联和木质化, PPO、PAL、POD 等酶活性的表达<sup>[11]</sup>。另有

研究表明, 外源水杨酸会明显提高拟南芥叶片 POD 和 PAL 活性, 同时也能诱导番茄幼苗叶片中 PPO 活性的升高<sup>[12-13]</sup>。本试验结果表明, 棉花经水杨酸处理后, 在一定作用时间和浓度范围内, 会明显诱导棉叶中总酚含量、PAL 活性、PPO 活性和 TI 活性的增加, 这与前人研究结论<sup>[10-13]</sup>吻合。

随着水杨酸处理时间的延长, 棉叶中总酚含量、防御酶活性(PAL、PPO)和 TI 活性具有先升高后降低随后又有所回升的特点; 高浓度水杨酸处理对棉叶防御功能的诱导效果优于低浓度, 总体表现为 5 mmol/L 水杨酸处理的棉叶, 4 d 后对棉叶次生代谢、防御酶活性和蛋白酶抑制剂活性的诱导效果最好, 这与张永军等的研究结果<sup>[14]</sup>类似, 这可能与植物在防御过程中的“阈值”有关。可见, 外源水杨酸适宜的浓度和处理时间, 能明显提高棉叶防御物质的含量和防御酶活性。

#### 参考文献:

- [1] 龙亚芹, 王万东, 王美存, 等. 水杨酸(SA)诱导植物对病虫害产生抗性及其作用机制研究[J]. 热带农业科学, 2009, 29(12): 46-50.
- [2] 苗进, 李国平, 韩宝瑜. 水杨酸和水杨酸甲酯在植物抗虫中的作用及机制研究进展[J]. 热带作物学报, 2007, 28(1): 111-114.
- [3] 赵玲, 胡增辉, 赵凤君, 等. 水杨酸甲酯诱抗黑杨对杨扇舟蛾生长发育的影响[J]. 北京林业大学学报, 2005, 27(1): 75-78.
- [4] Hountondji F C, Hanna R, Sabelis M W. Does methyl salicylate, a component of herbivore-induced plant odour, promote sporulation of the mite-pathogenic fungus neozigites tanajoae? [J]. Experimental & Applied Acarology, 2006, 39(1): 63-74.
- [5] 杨帆. 水杨酸、茉莉酸甲酯诱导黄瓜对西花蓟马(缨翅目: 蓟马科)的抗性[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- [6] 王华磊, 冯建荣, 樊新民, 等. 新疆 17 个杏品种的抗氧化指标与总酚含量的测定[J]. 果树学报, 2008, 25(6): 828-831.
- [7] 章金明. MeSA、叶蝉为害和机械刺伤对茶芽挥发物及 PAL、PPO 酶活性影响[D]. 北京: 中国农业科学院, 2006.
- [8] 张晓玉, 张温典, 田兰, 等. 不同毒性玉米大斑病菌侵染对感病玉米叶片 PAL 活性的影响[J]. 玉米科学, 2014, 22(1): 154-158.
- [9] 张健, 严善春, 王琪. 落叶松结实量对其防御酶和蛋白酶抑制剂活力的影响[J]. 林业科学, 2009, 45(8): 96-100.
- [10] Thulke O, Conrath U. Salicylic acid has a dual role in the activation of defence-related genes in parsley [J]. The Journal of Plant, 1998, 14(1): 35-42.
- [11] 周莹, 寿森炎, 贾承国, 等. 水杨酸信号转导及其在植物抵御生物胁迫中的作用[J]. 自然科学进展, 2007, 17(3): 305-312.
- [12] 王媛, 杨红玉, 程在全. 水杨酸诱导拟南芥对灰霉病的抗性与木质素含量的关系[J]. 植物保护, 2007, 33(4): 50-54.
- [13] 胡彦江, 张茹琴, 王瑞荣, 等. 水杨酸、乙酰水杨酸对番茄幼苗叶片中 PPO 和 POD 的诱导作用[J]. 西北植物学报, 2007, 27(2): 262-266.
- [14] 张永军, 郭予元, 吴孔明, 等. 化学调节剂诱导转 Bt 基因棉花杀虫蛋白和主要抗虫次生物的变化[J]. 棉花学报, 2002, 14(3): 131-133.