

# $\beta$ -葡萄糖苷酶处理与褐飞虱为害激活水稻类似的信号转导途径

王霞\* 周国鑫\* 向才玉 杜孟浩 程家安 刘树生 娄永根†

( 浙江大学昆虫科学研究所, 杭州 310029; 温州医学院健康与环境生态研究所, 温州 325035.

\* 同等贡献. † 联系人, E-mail: [yglou@zju.edu.cn](mailto:yglou@zju.edu.cn))

**摘要** 已有研究表明,  $\beta$ -葡萄糖苷酶处理植株能诱导其产生与植食性昆虫为害类似的挥发物, 然而其诱导产生的机理至今尚不明确. 水杨酸、茉莉酸、乙烯和过氧化氢是植物诱导防御反应中发挥重要作用的信号分子. 为此, 本文对 $\beta$ -葡萄糖苷酶处理后水稻体内这4种信号分子的含量进行了测定, 并与褐飞虱为害稻株进行了比较, 以明确 $\beta$ -葡萄糖苷酶处理与褐飞虱为害是否激活了水稻类似的信号转导途径. 结果表明, 与相应的对照相比, 机械损伤并经 $\beta$ -葡萄糖苷酶处理能明显提高水稻水杨酸、乙烯和过氧化氢的浓度, 但却降低了茉莉酸的含量.  $\beta$ -葡萄糖苷酶对这些信号分子含量影响的总体趋势与褐飞虱为害的基本一致, 尽管两者所诱导的信号分子的绝对含量与时间动态存在一定差异, 表明 $\beta$ -葡萄糖苷酶处理能激活与褐飞虱为害相类似的水稻信号转导途径. 这一结果可以用于解释为什么两种处理能诱导水稻产生类似的挥发物并对稻虱缨小蜂具有同等的引诱作用.

**关键词** 水稻 褐飞虱 信号转导途径 茉莉酸 水杨酸 乙烯 过氧化氢 三营养层相互作用

已有大量的研究结果表明, 植物在受植食性昆虫为害时能释放对天敌具引诱作用的特异性挥发物. 近年来通过研究其产生机理发现, 来自植食性昆虫的特异性激发子及其所激活的植物体内的茉莉酸、水杨酸、乙烯等防御信号途径在虫害诱导的植物挥发物的合成中发挥着重要作用<sup>[1]</sup>. 目前, 已经从植食性昆虫的口腔分泌物中分离和鉴定了几类激发子, 如从大菜粉蝶(*Pieris brassicae*)幼虫口腔分泌物中分离和鉴定的 $\beta$ -葡萄糖苷酶、从鳞翅目昆虫口腔分泌物中鉴定的挥发物诱导素(volicitin)及其类似物-脂肪酸与氨基酸形成的酰胺类化合物(fatty acid-amino acid conjugates). 在烟草上, 挥发物诱导素及其类似物能诱导烟草体内茉莉酸含量和一些防御相关基因表达水平上升, 并同时导致烟草释放特异性挥发物<sup>[2]</sup>. 然而,  $\beta$ -葡萄糖苷酶是否能激活植物体内的防御信号途径以及能激活哪些防御信号途径, 则至今尚不清楚.

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae)是世界上重要的水稻害虫, 它主要通过吸食水稻的韧皮部汁液产生危害. 稻虱缨小蜂

*Anagrus nilaparvatae* Pang et Wang (Hymenoptera: Mymaridae)是稻飞虱, 包括褐飞虱的重要卵期寄生蜂. 先期的研究表明, 褐飞虱若虫和雌成虫为害所诱导的水稻挥发物对稻虱缨小蜂具有同等的引诱作用, 并且两者的挥发物组成相类似<sup>[3]</sup>. 褐飞虱为害能导致水稻体内水杨酸、 $H_2O_2$ 和乙烯含量增加, 但不引起茉莉酸含量上升; 水杨酸和乙烯信号途径在褐飞虱为害诱导的水稻挥发物释放中起着重要作用<sup>[4,5]</sup>. 水稻经机械损伤并涂抹 40  $\mu$ L 350  $\mu$ g/mL  $\beta$ -葡萄糖苷酶(存在于褐飞虱唾液腺中的一种酶<sup>[6]</sup>, 提取自杏树, 1.4 U/mg蛋白; Sigma, USA), 能释放与褐飞虱为害稻株相类似的挥发物, 并且两者对稻虱缨小蜂具相同的引诱作用<sup>[4]</sup>. 这些结果表明, 褐飞虱为害诱导的水稻挥发物主要是由褐飞虱取食引起的, 并且褐飞虱唾液中的 $\beta$ -葡萄糖苷酶可能是诱导水稻挥发物合成中的一个重要激发子. 为了进一步明确 $\beta$ -葡萄糖苷酶处理和褐飞虱为害是否激活了水稻体内相同的信号转导途径, 本研究测定了 $\beta$ -葡萄糖苷酶处理后水稻体内四种信号分子水杨酸、 $H_2O_2$ 、茉莉酸和乙烯含量的时序变化, 并与褐飞虱为害稻株进行了比较.

2007-06-17 收稿, 2007-11-22 接受

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2006CB102005)、国家自然科学基金(批准号: 30270233)、浙江省科技厅项目(批准号: 2006C30040)、教育部新世纪优秀人才支持计划(批准号: NCET-04-0534)和教育部创新团队(批准号: IRT0355)项目资助

## 1 材料与方法

( ) 水稻品种. 供试品种为 TN1, 对褐飞虱表现为敏感<sup>[4]</sup>. 在温室培养箱催芽后, 分期播种于室外网室内. 当秧龄 20 d 时, 分别将稻苗移栽到小 (直径 8 cm × 高 10 cm, 1 株/盆) 或大 (直径 15 cm × 高 15 cm, 15 株/盆) 的塑料盆钵中. 每天浇水, 并分别在移栽后的 10, 20 和 30 d 各施一次尿素, 每次每盆施尿素 0.1 g. 移栽后 30~40 d 的稻苗供实验用.

( ) 虫源. 褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae) 虫源由中国水稻研究所 (浙江富阳) 提供, 以温室内的 TN1 稻苗进行群体饲养. 为了获得年龄一致的褐飞虱雌成虫用于实验, 分别定期从温室中捕捉褐飞虱高龄若虫, 饲养于放置在人工气候室 (温度  $(28 \pm 2)$ , 相对湿度 70%~80%, 光照 12 h) 内, 并罩有透明塑料罩 (直径 11 cm × 高 40 cm) 的盆栽 TN1 稻苗上. 然后, 每天将盆栽稻苗上初羽化的褐飞虱成虫转移到新的 TN1 稻苗上, 并按不同的年龄分开饲养.

( ) 水稻的处理. (1)  $\beta$ -葡萄糖苷酶处理. 以解剖针在水稻茎秆上部和下部各刺 200 下, 并在各损伤部位涂抹 20  $\mu$ L 浓度为 50  $\mu$ g/mL 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶 (提取自杏树, 1.4 U/mg 蛋白; Sigma, USA) 溶液 (溶于 0.1 mol/L 的氢氧化钠/柠檬酸缓冲液, pH 6.0). 每株水稻的  $\beta$ -葡萄糖苷酶用量为 0.02 U. 以水稻在各损伤部位各涂抹 20  $\mu$ L 的 0.1 mol/L 氢氧化钠/柠檬酸缓冲液作为对照. (2) 褐飞虱为害. 在每株稻苗茎秆上、下两个部位固定两个 Parafilm 膜做成的小袋 (长 6 cm × 宽 5 cm, 每个小袋上用解剖针刺 60 个小孔), 内接怀卵褐飞虱雌成虫 7 或 8 头, 每株水稻共接 15 头. 以在相同部位固定两个空的 Parafilm 小袋的水稻苗作为对照. 上述处理后的水稻均置于  $(28 \pm 2)$ 、光照 12 h、相对湿度 70%~80% 的人工气候室内, 并分别在处理后各时间点 (具体见下面各实验所述) 取样.

( ) 水杨酸和茉莉酸含量测定. 将盆栽水稻苗 (1 株/盆) 随机分成 4 组处理, 分别为  $\beta$ -葡萄糖苷酶处理及其对照缓冲液处理、褐飞虱为害处理及其对照无虫害处理. 对于  $\beta$ -葡萄糖苷酶和缓冲液处理稻株, 分别在处理后 0, 0.5, 1, 2, 4 和 8 h 取样; 对于褐飞虱为害和无虫害处理稻株, 则分别在处理后 0, 1, 2, 4 和 8 h 取样. 取样部位均为处理部位的水稻叶鞘, 取样量为每样品 0.2~0.3 g. 样品收获后迅速放入液氮中冷冻, 并置于 -80 保存备用. 各处理每个时间点重复 4~6

次. 样品在液氮中充分研磨后, 按照 Lou 和 Baldwin<sup>[7]</sup> 的方法, 利用标记内标法 ( $D_3$ -茉莉酸, 由德国 Max Planck Institute of Chemical Ecology 的 Ian T. Baldwin 教授馈赠;  $D_6$ -水杨酸, Cambridge Isotope Laboratory, USA) 对茉莉酸和水杨酸进行提取, 并用 GC-MS 进行分析.

( )  $H_2O_2$  含量测定. 水稻处理、取样部位和取样量同茉莉酸和水杨酸含量测定, 但取样时间不同. 在  $H_2O_2$  含量测定中, 分别在各处理后的 0, 0.5, 1, 4 和 8 h 取样. 各处理每个时间点重复 4~5 次. 各样品在液氮中充分研磨后, 加入 1 mL 双蒸水充分混合, 经 4, 13600  $\times$  g 离心 10 min 后, 取上清液. 利用 Amplex<sup>®</sup> Red hydrogen peroxide/Peroxidase Assay kit (Molecular Probes, OR, USA), 按照试剂盒中所描述的方法对  $H_2O_2$  浓度进行测定.

( ) 乙烯含量测定. 将盆栽稻苗 (15 株/盆) 随机分成 4 组处理, 分别为  $\beta$ -葡萄糖苷酶处理及其对照缓冲液处理、褐飞虱为害处理及其对照无虫害处理. 每盆稻苗均罩一密闭的透明塑料罩 (直径 13 cm × 高 48 cm), 并置于  $(28 \pm 2)$ 、光照 12 h、相对湿度 70%~80% 的人工气候室内. 分别在褐飞虱开始取食后 0, 2, 4, 6 和 8 h, 测定各塑料罩内的乙烯浓度. 测定时, 每次从密闭的罩子中用注射器取出 2 mL 气体. 各处理均重复 4 次. 样品的分析在配有 Hayesep Q (80/100 目) 不锈钢柱 (长 1.8 m, 外径 3.17 mm, 内径 2.1 mm, Supelco, 美国) 的气相色谱 (HP6890) 上进行. 进样口温度、柱温和检测器温度分别为 110, 70 和 250. 以  $N_2$  为载气, 流速 30 mL/min. FID 检测器. 以进样 2 mL 乙烯标准气体 (浓度 20.5  $\mu$ L/L, 北京北分气体有限公司) 对样品中的乙烯进行定性与外标法定量.

( ) 数据处理与分析. 为了满足正态分布的要求, 对过氧化氢的数据在统计分析前先进行对数转换. 比较  $\beta$ -葡萄糖苷酶处理与其对照缓冲液处理或褐飞虱处理与其对照无虫害处理之间各个时间点的水杨酸、茉莉酸、乙烯及  $H_2O_2$  含量的差异, 采用两向 (两个因子分别为处理和处理时间) 方差分析. 当某一因子或两个因子互作的方差分析达到显著水平 ( $P < 0.05$ ) 时, 对各平均数进行 Duncan's 新复极差法多重比较. 数据分析利用 Statistica 软件进行 (Statistica, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

## 2 结果与讨论

与 Du<sup>[4]</sup> 和 Lu 等人<sup>[5]</sup> 先期报道的结果一样, 与无

虫害的对照植株相比,水稻在褐飞虱为害后除了茉莉酸的含量不增加外,水杨酸、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和乙烯的含量都显著增加(图1)。水杨酸、乙烯和茉莉酸的含量也受到处理时间的影响。水杨酸含量在处理后的1和8h较高;乙烯则由于在密闭塑料罩中的累积作用,随着处理时间的延长浓度逐步升高;而茉莉酸含量随处理时间延长有一定程度的下降(图1)。过氧化氢含量在处理后的1和8h相对较高,但处理时间对过氧化氢含量的影响只是接近显著水平( $P = 0.071$ )(图1)。褐飞虱为害对水稻水杨酸和乙烯含量的影响受处理时间的影响。与对照相比,褐飞虱为害株中水杨酸含量只在为害后1和8h显著高于对照;乙烯的浓度则只在4,6和8h高于对照(图1)。

与褐飞虱为害株中类似,β-葡萄糖苷酶处理株中水杨酸、乙烯和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量比相应对照株中的显著增加,但茉莉酸含量却显著降低(图2)。水杨酸、茉莉酸、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和乙烯含量均随处理时间发生变化。水杨酸含量在处理后的4h最高;过氧化氢含量在1和8h相对较高;乙烯含量与在褐飞虱为害或无虫害处理株中一样,随着处理时间延长浓度升高。β-葡萄糖苷酶

和缓冲液处理稻株中的茉莉酸含量均在处理后2h达到最高,表明机械损伤、缓冲液或两者的结合能诱导水稻茉莉酸含量的上升(图2)。β-葡萄糖苷酶对水稻水杨酸和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量的影响依赖于处理时间。在β-葡萄糖苷酶处理稻株中,水杨酸含量只在处理后4h显著高于对照中的;过氧化氢含量则只在处理后1h显著高于对照(图2)。

上述结果表明,β-葡萄糖苷酶和褐飞虱为害激活了水稻类似的防御信号转导途径,尽管两者所激活的信号分子在含量和动态变化方面存在差异(图1和2)。植食性昆虫为害诱导的植物防御反应是植物体内多条信号途径,如茉莉酸途径、乙烯途径、ABA途径和水杨酸途径等相互作用的结果。各种特异性信号途径的组合可能启动植物针对某一植食性昆虫的特异性防御反应。已有研究表明茉莉酸、水杨酸和乙烯信号途径在植食性昆虫为害诱导的植物挥发物合成中起重要作用<sup>[4]</sup>。因此,β-葡萄糖苷酶处理和褐飞虱为害激活水稻类似的防御信号途径可以用于解释为什么两者能诱导水稻产生类似的挥发物以及对稻虱诱小蜂具相同的引诱作用<sup>[4]</sup>。

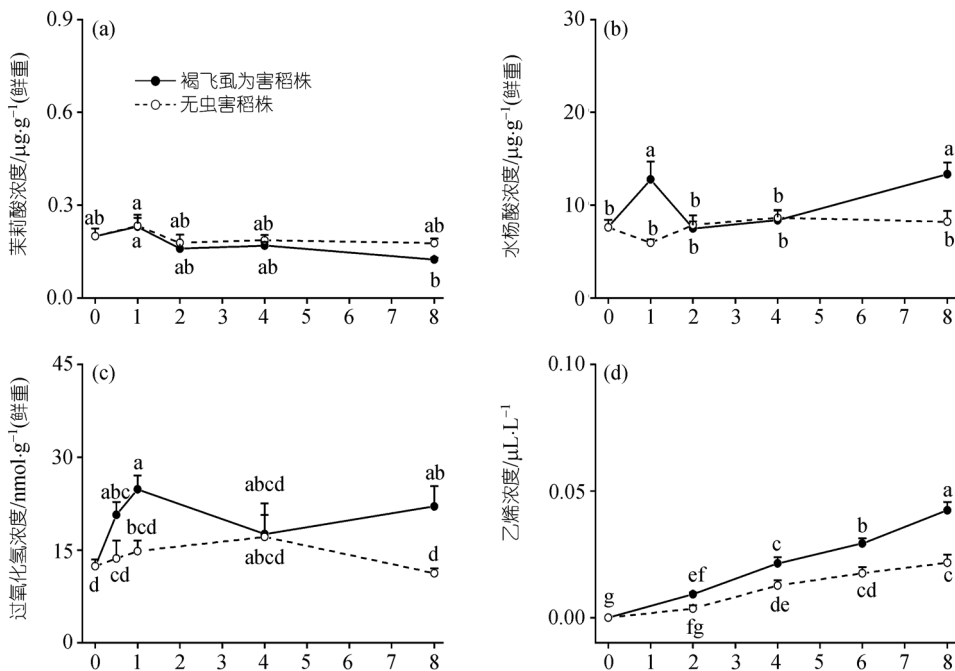


图1 褐飞虱为害稻株与无虫害稻株不同时间点茉莉酸(a)、水杨酸(b)、过氧化氢(c)和乙烯(d)浓度的比较

双向方差分析结果。茉莉酸:  $F_{\text{处理}} = 1.48, df = 1,39, P = 0.230; F_{\text{时间}} = 3.48, df = 4,39, P = 0.016; F_{\text{处理}\times\text{时间}} = 0.41, df = 4,39, P = 0.800$ 。水杨酸:  $F_{\text{处理}} = 9.62, df = 1,39, P = 0.004; F_{\text{时间}} = 2.67, df = 4,39, P = 0.047; F_{\text{处理}\times\text{时间}} = 4.48, df = 4,39, P = 0.005$ 。过氧化氢:  $F_{\text{处理}} = 11.25, df = 1,38, P = 0.002; F_{\text{时间}} = 2.35, df = 4,38, P = 0.071; F_{\text{处理}\times\text{时间}} = 1.99, df = 4,38, P = 0.116$ 。乙烯:  $F_{\text{处理}} = 51.39, df = 1,30, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 77.04, df = 4,30, P < 0.001; F_{\text{处理}\times\text{时间}} = 6.96, df = 4,30, P < 0.001$ 。标有不同字母者表示显著差异( $P < 0.05$ , Duncan's 新复极差法)



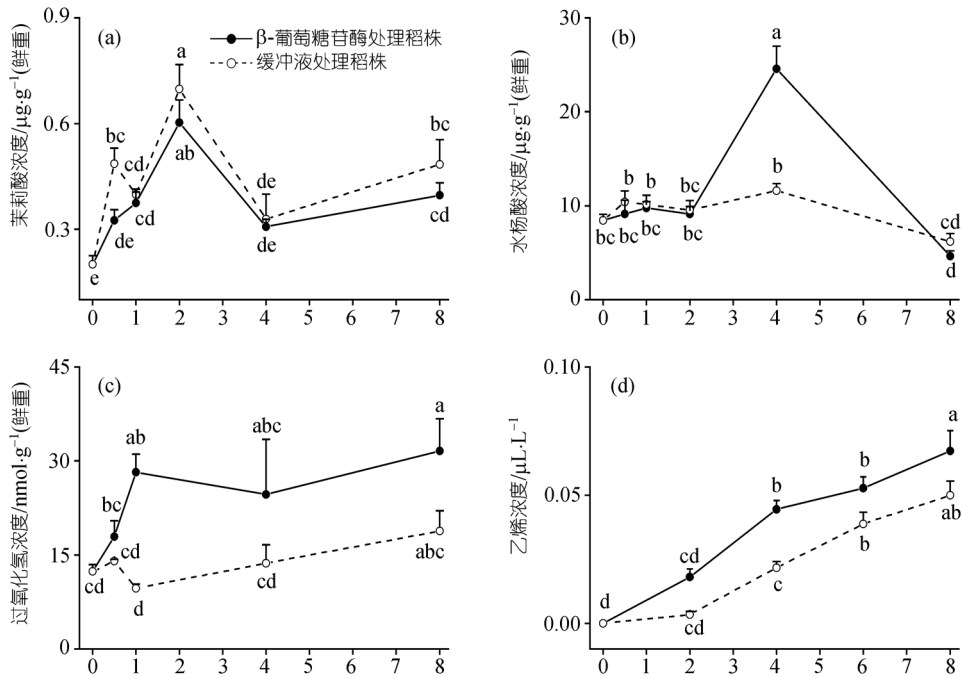


图 2  $\beta$ -葡萄糖苷酶处理稻株与缓冲液处理稻株不同时间点茉莉酸(a)、水杨酸(b)、过氧化氢(c)和乙烯(d)浓度的比较  
 双向方差分析结果。茉莉酸:  $F_{\text{处理}} = 5.89, df = 1,46, P = 0.019; F_{\text{时间}} = 22.68, df = 5,46, P < 0.001; F_{\text{处理}\times\text{时间}} = 0.84, df = 5,46, P = 0.530$ 。水杨酸:  $F_{\text{处理}} = 5.52, df = 1,47, P = 0.023; F_{\text{时间}} = 25.08, df = 5,47, P < 0.001; F_{\text{处理}\times\text{时间}} = 11.16, df = 5,47, P < 0.001$ 。过氧化氢:  $F_{\text{处理}} = 15.99, df = 1,38, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 3.81, df = 4,38, P = 0.011; F_{\text{处理}\times\text{时间}} = 2.70, df = 4,38, P = 0.045$ 。乙烯:  $F_{\text{处理}} = 10.61, df = 1,30, P = 0.003; F_{\text{时间}} = 35.83, df = 4,30, P < 0.001; F_{\text{处理}\times\text{时间}} = 0.85, df = 4,30, P = 0.504$ 。标有不同字母者表示显著差异( $P < 0.05$ , Duncan's 新复极差法)

$\beta$ -葡萄糖苷酶处理和褐飞虱为害所诱导的信号分子在含量和时间动态上存在差异,尤其是水杨酸和茉莉酸两类信号分子(图 1 和 2)。如褐飞虱为害株中水杨酸含量是在处理后 1 和 8 h 显著高于无虫害稻株中的,而 $\beta$ -葡萄糖苷酶处理稻株中则是在 4 h 时显著高于对照(图 2);在 $\beta$ -葡萄糖苷酶或缓冲液处理稻株中的茉莉酸含量显著高于褐飞虱为害稻株或无虫害处理稻株中的(图 1 和 2)。这些差异可能来自于两者在处理方法上的不同。 $\beta$ -葡萄糖苷酶处理水稻是一次性的快速机械损伤和 $\beta$ -葡萄糖苷酶处理,而褐飞虱为害稻株则是遭受褐飞虱持续而缓慢的机械损伤及其所分泌化学物质(包括 $\beta$ -葡萄糖苷酶)的刺激。一个有趣的现象是, $\beta$ -葡萄糖苷酶处理和褐飞虱为害都不引起水稻茉莉酸含量的增加,甚至下降(图 1 和 2)。Lee 等人 [8] 发现,在水稻早期的损伤反应中,茉莉酸和水杨酸含量存在相互拮抗的负相关性。 $\beta$ -葡萄糖苷酶处理和褐飞虱为害导致水稻茉莉酸含量下降或不增加是否是由于两者诱导的水杨酸含量增加对茉莉酸产生了拮抗作用,尚需进一步证实。

本研究没有对褐飞虱唾液腺中的 $\beta$ -葡萄糖苷酶

含量进行测定。但据 Mattiacci 等人 [9] 报道,大菜粉蝶 (*P. brassicae*) 幼虫头部提取物中 $\beta$ -葡萄糖苷酶的量(为  $0.017 \pm 0.001$ ) U/头,这为估算褐飞虱唾液中的 $\beta$ -葡萄糖苷酶提供了一个参考。褐飞虱在每株水稻上的虫量可在几头到几十头之间。因此,我们在每株水稻上所用的 $\beta$ -葡萄糖苷酶的量(每株水稻 0.02 U)与褐飞虱为害株中褐飞虱分泌到水稻中的 $\beta$ -葡萄糖苷酶的量是相当的。

在植物中,一些与防御相关的非活性态信号分子,如与 $\beta$ -葡萄糖苷酶结合的水杨酸和茉莉酸,是非常丰富的 [9]。机械损伤和/或 $\beta$ -葡萄糖苷酶处理可以使植物中的这些非活性态信号分子得以释放,并可能发挥生理功能。此外,作为细胞溶解酶中的一种, $\beta$ -葡萄糖苷酶可以促进细胞结构物降解成低聚糖类化合物,这些化合物可以作为激发子激活信号转导途径中的一些组分,包括离子流、NADPH 氧化酶、磷酸脂酶 A2、茉莉酸类化合物、过氧化氢、乙烯和细胞分裂素激活蛋白激酶(MAPK) [10]。这些也许可以解释我们在本研究中发现的 $\beta$ -葡萄糖苷酶处理后水稻体内信号分子含量发生变化的结果。有意思的是,

Wang等人<sup>[11]</sup>发现褐飞虱取食能导致水稻中的一个编码 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因的表达水平上升。这个水稻的 $\beta$ -葡萄糖苷酶能否激活水稻自身的防御信号传导途径,至今尚不清楚。但Mattiacci等人<sup>[9]</sup>发现,来自甘蓝的 $\beta$ -葡萄糖苷酶与来自大菜粉蝶和杏树的 $\beta$ -葡萄糖苷酶是不同的,它不能诱导甘蓝自身产生引诱寄生蜂的挥发物。对于 $\beta$ -葡萄糖苷酶或者褐飞虱为害是如何激活水稻的水杨酸、 $H_2O_2$ 和乙烯等信号途径但又不激活茉莉酸信号途径的详细机制,尚待进一步深入研究。

致谢 Wheeler E 和 Baldwin I T 为本文的修改提出了建设性意见,特此致谢。

### 参 考 文 献

- 1 van Poecke R M P, Dicke M. Indirect defence of plants against herbivores: Using *Arabidopsis thaliana* as a model plant. *Plant Biol*, 2004, 6(4): 387—401[DOI]
- 2 Halitschke R, Gase K, Hui D, et al. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. Microarray analysis reveals that most herbivore-specific transcriptional changes are mediated by fatty acid-conjugates. *Plant Physiol*, 2003, 131(4): 1894—1902[DOI]
- 3 Lou Y, Ma B, Cheng J. Attraction of the parasitoid *Anagrus nilaparvatae* Pang et Wang to rice volatiles induced by the rice brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål). *J Chem Ecol*, 2005, 31(10): 2357—2372[DOI]
- 4 杜孟浩. 褐飞虱危害诱导的水稻挥发性互益素释放机理的研究. 博士学位论文. 杭州: 浙江大学, 2004
- 5 鲁玉杰, 王霞, 姜永根, 等. 乙烯信号转导途径在褐飞虱诱导的水稻挥发物释放中的作用. *科学通报*, 2006, 51(18): 2146—2153
- 6 Sogawa K. Studies on the salivary glands of rice plant hoppers, Salivary phenolase. *Appl Entomol Zool*, 1968, 3(1): 13—25
- 7 Lou Y, Baldwin I T. Silencing of a germin-like gene in *Nicotiana attenuata* improves performance of native herbivores. *Plant Physiol*, 2006, 140(3): 1126—1136[DOI]
- 8 Lee A, Cho K, Jang Sungkuk, et al. Inverse correlation between jasmonic acid and salicylic acid during early wound response in rice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 318(3): 734—738[DOI]
- 9 Mattiacci L, Dicke M, Posthumus M A.  $\beta$ -glucosidase: An elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasps. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(6): 2036—2040[DOI]
- 10 Holley S R, Yalamanchili R D, Moura D S, et al. Convergence of signaling pathways induced by systemin, oligosaccharide elicitors, and ultraviolet-B radiation at the level of mitogen-activated protein kinases in *Lycopersicon peruvianum* suspension-cultured cells. *Plant Physiol*, 2003, 132(4): 1728—1738[DOI]
- 11 Wang X L, He R F, He G C. Construction of suppression subtractive hybridization libraries and identification of brown planthopper-induced genes. *J Plant Physiol*, 2005, 162(11): 1254—1262[DOI]