

落叶松林型对其针叶内几种防御蛋白活力和 次生代谢物含量的影响

姜虹^{1,2}, 严善春¹, 薛羿¹, 姜礲¹, 李国江¹, 孟昭军^{1*}

(1. 东北林业大学林学院, 林木遗传育种教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040;

2. 黑龙江省农垦科学院, 农畜产品综合利用研究所, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要: [目的] 为明确落叶松林型对其化学防御能力的影响。[方法] 本实验以长白落叶松纯林及长白落叶松-水曲柳 4:4、2:10 带状混交林为研究对象, 分析不同林型下落叶松针叶内几种防御蛋白活力及次生代谢化合物含量的变化。[结果] 表明: 30 年生 (HJ30_(4:4)) 和 20 年生 (HJ20_(4:4)) 落叶松与水曲柳 4:4 带状混交林中, 落叶松针叶内几种防御蛋白活力和次生代谢物含量均显著高于纯林 ($P < 0.05$); 在 HJ20_(4:4) 中, 落叶松针叶中 PPO、PAL、TI 活力及黄酮和木质素含量最高, 且 PPO、PAL 活性和木质素含量显著高于 20 年生 (HJ20_(2:10)) 落叶松与水曲柳 2:10 带状混交林 ($P < 0.05$); 在 HJ20_(2:10) 中, 落叶松针叶内 CI 活性显著高于 HJ20_(4:4) ($P < 0.05$), 单宁含量也高于 HJ20_(4:4), 但差异不显著 ($P > 0.05$)。[结论] 试验发现, 长白落叶松-水曲柳带状混交林成林显著增强落叶松针叶内防御蛋白活力, 增加次生代谢物的含量, 从而提高了长白落叶松自身抗虫性; 且 HJ20_(4:4) 对落叶松的诱导防御能力强于 HJ20_(2:10), HJ20_(4:4) 混交方式比 HJ20_(2:10) 更适用于混交林营造。

关键词: 长白落叶松; 水曲柳; 针阔混交林; 防御蛋白; 次生代谢物

中图分类号: S791.22

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2018)03-0024-05

Effects of Forest Type on Activity of Several Defense Proteins and Contents of Secondary Metabolites in Larch Needles

JIANG Hong, YAN Shan-chun, XUE Yi, JIANG Dun, LI Guo-jiang, MENG Zhao-jun

(1. School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China; 2. Heilongjiang Academy of Land

Reclamation Sciences, Institute of Comprehensive Utilization of Agricultural and Livestock Products, Jiamusi 154007, Heilongjiang, China)

Abstract: [Objective] To illuminate the effects of the forest type on chemical defense of pure and mixed larch stand. [Method] Larch (*Larix olgensis*) forest and larch-ash (*Fraxinus manschurica*) mixed forest were used as the test materials, and the activity of several defense proteins and the content of secondary metabolic compounds were tested in larch needles of different forest type. [Result] The results showed that the activity of several defense proteins and the content of secondary metabolites in larch needles of 30-year-old larch-ash mixed by strips of 4:4 (HJ30_(4:4)) and 20-year-old larch-ash mixed by strips of 4:4 (HJ20_(4:4)) significantly increased, compared with that of 30-year-old *L. olgensis* pure stand (CL30) and 20-year-old *L. olgensis* pure stand (CL20) ($P < 0.05$). It was found in Zhangjiawan site that the activities of polyphenol oxidase (PPO), phenylalanine ammonia-lyase (PAL), trypsin inhibitor (TI) and the contents of flavonoids and lignin in larch needles of HJ20_(4:4) were the highest, while the activities of PPO, PAL and the content of lignin were higher than that in larch needles of 20-year-old

收稿日期: 2017-02-15

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (DL13BAX31)

作者简介: 姜虹 (1990—), 女, 东北林业大学林学院, 2014 级硕士研究生. E-mail: 646904042@qq.com

* 通讯作者: 孟昭军 (1972—), 男. 研究方向: 昆虫化学生态与害虫生物防治. E-mail: mzj-72@163.com

larch-ash mixed by strips of 2:10 (HJ20_(2:10)) ($P < 0.05$). In larch needles of HJ20_(2:10), the CI activity significantly increased ($P < 0.05$), and the tannin content added ($P > 0.05$) in contrast to that in needles of HJ20_(4:4). [Conclusion] These results indicate that larch-ash mixed forests significantly strengthen the activity of defense proteins and increase the content of secondary metabolites in larch needles, which improve the resistance to defoliators. Compared with HJ20_(2:10), the induced defense of HJ20_(4:4) is stronger, and HJ20_(4:4) is more applicable to build the mixed forest.

Keywords: *Larix olgensis*; *Fraxinus mandschurica*; mixed broadleaf-conifer forest; defense protein; secondary metabolic compounds

植物诱导抗性是指植物在遭到植食者攻击、病菌入侵或外来因子破坏时,通过改变自身理化特性而表现出来的一种防御特性^[1-2],主要包括诱导抗虫性和诱导抗病性^[3]。植物诱导抗虫性主要表现为提高防御酶活力以及增加次生代谢产物含量等,如单宁及酚类等次生化合物含量的变化,来影响昆虫的生长发育、取食等行为^[4]。多酚氧化酶(PPO)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)是植物体内主要防御性酶,胰蛋白酶抑制剂(TI)、胰凝乳蛋白酶抑制剂(CI)是植物体内2种主要的蛋白酶抑制剂(Pis),它们都是植物体内重要的防御蛋白^[5];黄酮、单宁、木质素为植物次生代谢产物,通过莽草酸代谢途径形成的,与植物抗性密切相关^[6]。

已有研究证明,能够激发植物诱导抗虫性的方法很多,包括植食者啃食与机械损伤^[7]、光照强度^[8]、外源激素处理^[9]以及林分结构^[10]等,其中,针阔混交林可以诱导针叶内次生物质含量发生改变。长白落叶松(*Larix olgensis*)是东北地区主栽树种,大多数人工林树种单一,结构简单,易发生森林病虫害,造成重大的经济损失^[11]。在实践中人们认识到,林分多样性和稳定性与森林病虫害的发生密切相关,将营造混交林作为森林病虫害防治中的一项治本措施。黄金塔^[12]对不同林分类型木麻黄蛀干害虫发生情况调查发现,木麻黄与湿地松、桉树混交可以减轻星天牛(*Anoplophora chinensis*)、多纹豹蠹蛾(*Zeuzera multistrigata*)等蛀干害虫对木麻黄的危害。刘巧红等^[10]对自然状态下油松纯林和油松-山杏混交林内的油松针叶中的生化物质含量进行测定,发现不同时间混交林和纯林油松针叶内的蛋白质、可溶性糖、还原糖、粗脂肪、单宁、总酚含量有所差异;也有学者发现,落叶松混交林能够提高土壤微生物总量,使土壤中过氧化氢酶、蛋白酶、多酚氧化酶和蔗糖酶活性增强^[13];同时,落叶松枝叶的挥发性萜烯类能够明显抑制水曲柳的生长^[14],这些植

物间的生化作用被称为植物化感作用。植物的化感作用在自然界中普遍存在,对林木生长发育具有非常重要的影响;然而,在针阔混交林中,这种化感作用对不同林型、树龄林木中抗虫性化合物的影响如何?还鲜见报道。为此,本试验以落叶松纯林、落叶松-水曲柳林混交林为试验对象,研究不同混交林分类型对长白落叶松针叶内防御蛋白活性及次生代谢物质含量的影响,探讨不同混交林型诱导长白落叶松抗虫性的差异,为林业造林合理营造混交林防治害虫提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 长白落叶松与水曲柳混交林型及落叶松针叶的采集

2015年7月在东北林业大学帽儿山实验林场选取2个试验地点:

1.1.1 尖砬沟森林培育试验站 地理位置为127°36'~127°39' E, 45°23'~45°26' N,平均海拔390 m。平均降水量为723 mm,无霜期120~140 d,≥10℃的积温为2 526℃。试验地落叶松纯林和落叶松与水曲柳混交林营造于1987年,纯林和混交林同处于东坡的中下部,坡度为6°~15°,土壤是典型暗棕壤,林下植被主要有错草、毛边苔草等。

1.1.2 张家湾实验站 127°30'~127°34' E, 45°20'~45°25' N,平均海拔300 m。年平均降水量780 mm,无霜期120~140 d,有效积温2 636℃。该试验地落叶松纯林和落叶松与水曲柳混交林营造于1997年。纯林和混交林同处于东坡的中下部,坡度为6°~10°,土壤为黑土壤,林下植被主要为小叶樟等居多。

2个试验地均选取2年生水曲柳苗木造林,落叶松为3年生苗木造林,株行距均为1.5 m×2 m,林分类型见表1。

1.1.3 落叶松针叶的采集 分别选取长势一致的3株落叶松针叶为1次重复,每种林型3次重复,每个

重复采摘 50 g 针叶。将针叶置于冰箱冷冻保存,用于测定针叶内相关蛋白酶活性和防御性化合物含量的变化。

表 1 不同样地的林分类型

Table 1 Forestry type of different sample stands

试验样地 Sample stands	林龄 Forest age/a	林分类型 Forestry type	标记编号 Tag number	林分密度 Forestry density /(tree · hm ⁻²)
尖砬沟	30	落叶松纯林	CL30	2 886
		落叶松 4 行 - 水曲柳 4 行混交	HJ30 _(4:4)	2 315
张家湾	20	落叶松纯林	CL20	2 409
		落叶松 4 行 - 水曲柳 4 行混交	HJ20 _(4:4)	1 825
		落叶松 2 行 - 水曲柳 10 行混交	HJ20 _(2:10)	1 950

1.2 测定方法

1.2.1 防御酶活性测定 每个样品准确称取 0.5 g 针叶鲜样放于研钵内,加入液氮,在冰浴条件下研磨用于测定防御酶活性。参照杨世勇等^[15]人的方法对 PPO 进行提取和酶活性测定,加入 0.5 mL 酶液,以 0.5 min 内 OD_{420} 变化 0.01 为 1 个酶活单位($U \cdot g^{-1}$),重复 5 次。参照王燕芳等^[16]的方法对 PAL 进行提取和酶活性测定,加入 0.2 mL 酶液,以单位时间(h)内 OD_{290} 增加 0.01 为 1 个酶活性单位($U \cdot g^{-1}$)。

1.2.2 蛋白酶抑制剂活性测定 TI 和 CI 活力的测定参照石蕾^[17]的方法,并略作修改。酶活性测定时,酶液和抑制剂加入量分别为 100 mL 和 20 mL、80 mL 和 40 mL,每个重复测定 5 次。

1.2.3 次生物质含量的测定 参照武予清等^[18]的方法测定单宁的含量;参照杨帆^[19]的方法测定黄酮含量;木质素含量的测定参照任琴等^[20]和林葵等^[21]的方法,均重复测定 5 次。

1.3 数据分析

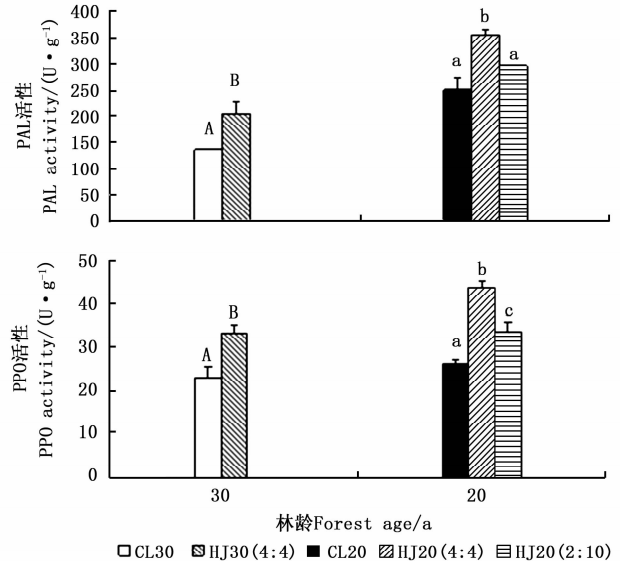
利用 SPSS17.0 软件对张家湾落叶松林型中的落叶松针叶内防御酶活性及次生物质含量进行 One-Way ANOVA 方差分析,以 LSD(最小显著法)法进行多重比较分析;以独立样本 *T* 检验对尖砬沟落叶松林型中落叶松针叶内防御酶活性及次生物质含量变化进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同混交类型对落叶松针叶内防御酶活性的影响

由图 1 可知:与落叶松纯林(CL30)相比,尖砬沟 30 年生(HJ30_(4:4))落叶松-水曲柳带状混交林

落叶松针叶内的 PPO 活性升高 33.0%,且差异显著($P < 0.05$);HJ30_(4:4) 针叶内的 PAL 活性也显著高于 CL30($P < 0.05$)。与落叶松纯林(CL20)相比,张家湾 20 年生(HJ20_(4:4) 和 HJ20_(2:10))落叶松-水曲柳带状混交林落叶松针叶内 PPO 活性分别升高 41.2% 和 18.1%,且差异显著($P < 0.05$);PPO、PAL 活性在 HJ20_(4:4) 针叶内活性最强,显著高于 CL20 和 HJ20_(2:10) ($P < 0.05$);HJ20_(2:10) 针叶内 PAL 活性与 CL20 相比也有所增高,但差异不明显($P > 0.05$)。



注:图中数据为平均值 ± 标准误;不同大写字母表示尖砬沟地域内相同树龄、不同混交方式之间差异显著($P < 0.05$),不同小写字母表示张家湾地域内相同树龄、不同混交方式之间差异显著($P < 0.05$)。

Note: data in the figure are mean ± standard deviation. Different capital letters in the same age histogram mean significant difference between different treatments with the same tree age in Jianlagou ($P < 0.05$). Different lowercase letters in the same age histogram mean significant difference between different treatments with the same tree age in Zhangjiawan ($P < 0.05$).

图 1 落叶松-水曲柳不同混交林型内落叶松针叶内 PPO 和 PAL 活性的变化

Fig. 1 Changes of the activity of PPO and PAL in larch needles of different larch-ash mixed forests

2.2 不同混交类型对落叶松针叶内蛋白酶抑制剂活性的影响

图 2 表明:与 CL30 相比,HJ30_(4:4) 落叶松针叶内 CI、TI 活性分别增高 37.0%、17.8% ($P < 0.05$)。与(CL20)相比,HJ20_(4:4) 和 HJ20_(2:10) 落叶松针叶内 CI 活性分别增加 26.0% 和 62.0%,且差异明显;在 HJ20_(2:10) 落叶松针叶内 CI 活性最高,并显著高于 HJ20_(4:4) ($P < 0.05$);在 HJ20_(4:4) 和 HJ20_(2:10) 落叶松针叶内 TI 的活性均显著高于 CL20 ($P < 0.05$),但

HJ20_(4:4) 中 TI 活性与 HJ20_(2:10) 差异不显著 ($P > 0.05$)。

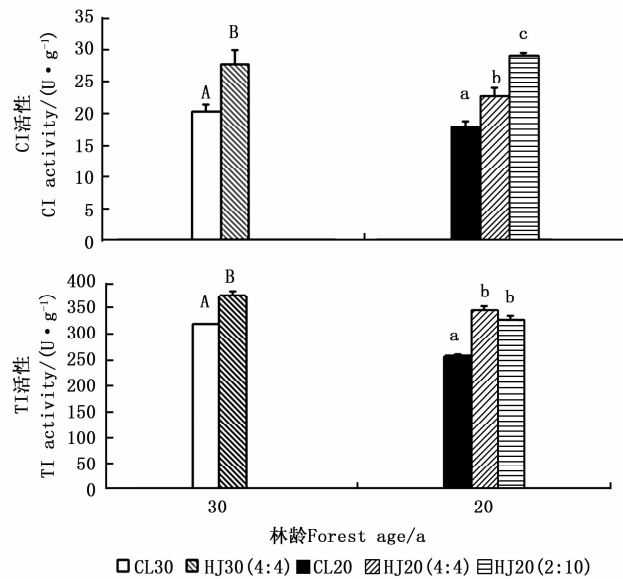


图2 落叶松-水曲柳不同混交林型落叶松针叶内 CI 和 TI 活性的变化

Fig. 2 Changes of the activity of CI and TI in larch needles of different larch - ash mixed forests

2.3 不同混交类型对落叶松针叶内次生物质的影响

由图3可知:HJ30_(4:4)落叶松针叶内单宁、黄酮和木质素含量均显著高于 CL30 ($P < 0.05$)。与对照 (CL20) 相比, HJ20_(4:4)落叶松针叶内各次生物质的含量均显著增加 ($P < 0.05$); HJ20_(4:4)针叶内单宁含量低于 HJ20_(2:10), 黄酮含量略高于 HJ20_(2:10), 但二者差异均不显著 ($P > 0.05$); HJ20_(4:4)落叶松针叶内木质素含量最高, 并显著高于 HJ20_(2:10) 和 CL20 ($P < 0.05$), HJ20_(2:10) 高于 CL20, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。

3 讨论

2种植物可以通过它们之间的相互作用以及在生长发育过程中产生的初生和次生代谢产物来调节各自的防御指标, 使植物防御能力发生改变^[22-23]。陈晨等^[24]研究了油松纯林和油松-山杏混交林对油松毛虫生长发育的影响发现, 与油松纯林相比, 混交林油松针叶延长了油松毛虫的发育历期, 抑制了油松毛虫的生长发育。郑丽等^[25]研究不同浓度的黄顶菊茎、叶浸提液对白菜、水稻幼苗的化感作用, 结果表明黄顶菊茎、叶浸提液对这2种植物的 POD、CAT、SOD 的活性均有显著的抑制作用, 使受体对外界不良环境

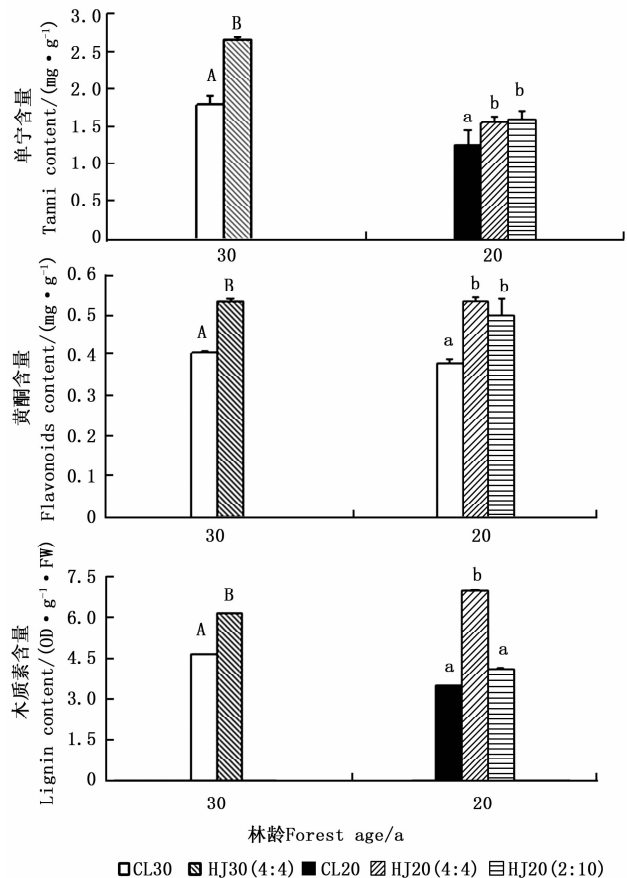


图3 落叶松-水曲柳不同混交林型落叶松针叶内单宁、黄酮和木质素含量的变化

Fig. 3 Changes of the content of tannin, flavonoids and lignin in larch needles of different larch - ash mixed forests

的抵抗力降低。王杰等^[26]利用外源茉莉酸喷施长白落叶松和王琪等^[27]剪叶损伤及昆虫取食落叶松针叶, 可以系统的增强其防御蛋白的活性, 本研究也得出了与之相一致结果, 这说明混交林处理产生的化感作用也能够提高长白落叶松针叶内的防御化合物浓度, 并对落叶松具有较强的诱导效应。

落叶松与水曲柳比较适宜的混交方式通常为行间和带状混交, 带状混交经营管理方便, 种间关系协调, 容易获取成功^[28]; 同时, 不同带状混交对混交林的生长发育也起着重要作用, 并对落叶松针叶内防御化合物的含量或活性产生不同的影响^[10]。以往许多学者在混交林造林技术上建议采用3~5行的混交方式^[29], 本研究发现落叶松-水曲柳4:4带状混交林中长白落叶松的抗性最强, 此结果与之相类似。

4 结论

在本研究所选取的落叶松3种林型中, 落叶松-水曲柳混交林针叶内 PAL、PPO、CI、TI 活性及单

宁、木质素和黄酮含量均高于落叶松纯林;落叶松-水曲柳 4:4 和 2:10 带状混交林落叶松针叶内 PAL、PPO 和 TI 的活性以及次生代谢产物木质素和黄酮含量均较高,同时 CI 活性和单宁含量也显著高于对照,表明植物抗性与混交林分类型有关。这种种间的效应表明,落叶松-水曲柳 4:4 带状混交林中长白落叶松的抗性最强。基于本研究结果,笔者建议在营造落叶松-水曲柳人工混交林时,为了充分发挥混交的优越性、便于管理的同时,又能增强植物自身的化学防御,最好采取针阔树种混交均匀的带状混交方式行营造。

随着人们对生态环境保护意识的提高,对害虫的防治工作已从化学防治为主的综合防治措施向以营林措施为基础的自然控制方向发展^[30]。营造混交林是林业有害生物防治的一种重要手段,也是生态控制害虫的一种措施^[31]。混交林与单纯林相比,在林分稳定性、抗御病虫害以及发挥森林多种效益等方面表现出明显的优势^[32-33]。

参考文献:

- [1] Haukioja E. Induction of defenses in trees [J]. *Annual Review of Entomology*, 1991, 36(1): 25-42.
- [2] Löf M, Isacson G, Dan R, et al. Herbivory by the pine weevil (*Hylobius abietis*, L.) and short-snouted weevils (*Strophosoma melanogrammum*, Forst. and *Otiorynchus scaber*, L.) during the conversion of a wind-thrown Norway spruce forest into a mixed-species plantation [J]. *Forest Ecology & Management*, 2004, 190(2-3): 281-290.
- [3] Odjakova M, Hadjiivanova C. The complexity of pathogen defense in plants [J]. *Bulg J Plant Physiol*, 2001, 27(1-2): 101-109.
- [4] 石蕾,严善春,金虎. 杂种落叶松子代针叶内单宁质量分数及防御性酶活性的变化 [J]. *东北林业大学学报*, 2013, 41(1): 100-105.
- [5] 鲁艺芳,石蕾,严善春. 不同光照强度对兴安落叶松几种主要防御蛋白活力的影响 [J]. *生态学报*, 2012, 32(11): 3621-3627.
- [6] 孙多鑫. 几种与抗性有关的生物物质和酶在春小麦对麦长管蚜抗性作用的研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2006.
- [7] 袁红娥,严善春,佟丽丽,等. 剪叶损伤与昆虫取食对兴安落叶松 (*Larix gmelinii*) 针叶中缩合单宁诱导作用的差异 [J]. *生态学报*, 2009, 29(3): 1415-1420.
- [8] 鲁艺芳,严俊鑫,李霜雯,等. 不同光照强度下兴安落叶松对舞毒蛾幼虫生长发育及防御酶的影响 [J]. *生态学报*, 2013, 33(22): 7125-7131.
- [9] 姜徽,王杰,姜虹,等. 茉莉酸甲酯局部诱导长白落叶松对舞毒蛾生长发育的影响 [J]. *北京林业大学学报*, 2016, 38(6): 67-71.
- [10] 刘巧红,高宝嘉,陈晨. 不同林分类型油松针叶内生物物质的变化 [J]. *西北农业学报*, 2012, 21(10): 132-136.
- [11] Yan Q, Gang Q, Zhu J, et al. Variation in survival and growth

strategies for seedlings of broadleaved tree species in response to thinning of larch plantations: Implication for converting pure larch plantations into larch-broadleaved mixed forests [J]. *Environmental & Experimental Botany*, 2016, 129: 108-117.

- [12] 黄金塔. 不同林分类型木麻黄蛀干害虫发生情况调查 [J]. *防护林科技*, 2010(5): 50-52.
- [13] 吉艳芝,冯万忠,陈立新,等. 落叶松混交林根际与非根际土壤养分、微生物和酶活性特征 [J]. *生态环境学报*, 2008, 17(1): 339-343.
- [14] 吴俊民,礼波宁. 混交林中落叶松挥发性物质对水曲柳生长的影响 [J]. *东北林业大学学报*, 2000, 28(1): 25-28.
- [15] 杨世勇,王蒙蒙,谢建春. 茉莉酸对棉花单宁含量和抗虫相关酶活性的诱导效应 [J]. *生态学报*, 2013, 33(5): 1615-1625.
- [16] 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.
- [17] 石蕾. 杂种落叶松不同子代之间抗虫相关物质的变化 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2010.
- [18] 武予清,郭子元. 棉花植株中的单宁测定方法研究 [J]. *应用生态学报*, 2000, 11(2): 243-245.
- [19] 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.
- [20] 任琴,胡永建,李镇宇,等. 受害马尾松木质素含量及其过氧化物酶活性 [J]. *生态学报*, 2007, 27(11): 4895-4899.
- [21] 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 [J]. *华东师范大学学报: 自然科学版*, 1996(2): 92-97.
- [22] 瓮岳太,薛煜. 化感作用在林业有害生物防治中的研究现状与发展前景 [J]. *中国森林病虫*, 2015, 5(3): 38-40.
- [23] 陈晨,周国娜,刘巧红,等. 不同林分类型的油松针叶对两种色型油松毛虫生长发育的影响 [J]. *生态学杂志*, 2012, 31(10): 2573-2578.
- [24] 郑丽,冯玉龙. 紫茎泽兰叶片化感作用对 10 种草本植物种子萌发和幼苗生长的影响 [J]. *生态学报*, 2005, 25(10): 2782-2787.
- [25] 王杰,孟昭军,王琪,等. 外源茉莉酸诱导方式对长白落叶松针叶内防御蛋白活力的影响 [J]. *东北林业大学学报*, 2015, 43(5): 84-89.
- [26] 王琪,严善春,王艳军,等. 剪叶及昆虫取食对兴安落叶松蛋白酶抑制剂的影响 [J]. *昆虫学报*, 2008(8): 798-803.
- [27] 陆晓梅. 人工落叶松与水曲柳混交适宜性的研究 [J]. *科技致富向导*, 2013(3): 295-295.
- [28] 宋林,范春楠,卜文圣. 落叶松与水曲柳混交林特征研究综述 [J]. *吉林林业科技*, 2010(5): 19-22.
- [29] 邱立新. 营林技术在林业有害生物防治中的应用进展及发展趋势 [J]. *中国森林病虫*, 2014, 33(4): 28-32.
- [30] 顾茂彬,洪富文. 桉树害虫的生态控制 [J]. *林业科学研究*, 2006, 19(3): 316-320.
- [31] 彭少麟,邵华. 化感作用的研究意义及发展前景 [J]. *应用生态学报*, 2001, 12(5): 780-786.
- [32] 郭文福,蔡道雄,贾宏炎,等. 马尾松与红椎等 3 种阔叶林种营造混交林的生长效果 [J]. *林业科学研究*, 2010, 23(6): 839-845.

(责任编辑:张研)