# 吲哚诱导对茶树抗茶小绿叶蝉的影响

吕晓彤! 周孝森! 邹佳婷! 辛肇军! 蔡晓明! 罗学平2 蔡红兵3 边 磊!\*

(1. 中国农业科学院茶叶研究所,农业农村部特种经济动植物生物学与遗传育种重点实验室,杭州 310008; 2. 宜宾职业技术学院,四川 宜宾 644003; 3. 四川省茶业集团股份有限公司,宜宾 644002)

摘要: 为明确吲哚处理对茶树抗茶小绿叶蝉 Empoasca onukii 的影响,以龙井43为材料,使用吲哚诱导茶树作为处理,以未处理茶树作为对照,于室内测定茶小绿叶蝉对不同茶树的选择趋向,利用昆虫刺探电位图谱分析茶小绿叶蝉的取食行为,通过气相色谱-质谱联用仪分析吲哚处理对茶树挥发物的影响,并利用实时荧光定量PCR技术测定茶树防御相关基因的表达量。结果表明,在所有时间段茶小绿叶蝉成虫更趋向于取食对照组茶树,至48h时对照组茶树上的成虫数量是处理组的2.45倍;茶小绿叶蝉3龄幼虫在吲哚处理组茶树上的非取食波(NP波)持续时间占总取食时间的72.15%,在对照组茶树上的非取食波(NP波)持续时间占比则为33.07%,且在对照组茶树上的主要取食波 E2波的持续时间是处理组茶树上的3.58倍。相较于对照组茶树,吲哚处理组茶树释放出的挥发物总量显著增加,其中α-法尼烯可以趋避害虫并对天敌有吸引力,且吲哚处理组茶树的防御基因表达量显著升高。表明吲哚处理茶树后,茶小绿叶蝉对其的取食量下降,茶树的挥发物释放量增加且抗性防御基因表达量提高,增强了茶树对茶小绿叶蝉的抗性。

关键词: 茶树; 茶小绿叶蝉; 吲哚; 诱导防御; 取食行为; 抗性; 挥发物

### Effect of indole treatment on the resistance to tea tree tea leafhopper Empoasca onukii

Lü Xiaotong<sup>1</sup> Zhou Xiaosen<sup>1</sup> Zou Jiating<sup>1</sup> Xin Zhaojun<sup>1</sup> Cai Xiaoming<sup>1</sup> Luo Xueping<sup>2</sup> Cai Hongbing<sup>3</sup> Bian Lei<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Biology, Genetics and breeding of Special Economic Animals and Plants, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Tea Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310008, Zhejiang Province, China; 2. Yibin Vocational and Technical College, Yibin 644003, Sichuan Province, China;

3. Sichuan Tea Industry Group Co., Ltd., Yibin 644002, Sichuan Province, China)

**Abstract:** In order to clarify the effect of indole treatment on the resistance of tea tree to tea green leaf-hopper *Empoasca onukii*, the cultivar Longjing 43 was used for indole induction, and the selection of *E. onukii* for different tea trees was measured in the laboratory. The electrical penetration graph (EPG) technique was used to analyze the feeding behavior of *E. onukii*. The effects of indole treatment on the volatiles of tea trees were analyzed with gas chromatography-mass spectrometry, and the expression levels of defense-related genes were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The results showed that, during all periods, *E. onukii* adults tended to feed on tea trees in the control group, and the number of adults in the control group was 2.45 times of that in the indole-treated group. The duration of third instar nymph's non-feeding wave (NP wave) on indole-treated tea trees accounted for 72.15% of the total feeding time, and the duration of non-feeding wave (NP wave) in the control group accounted for 33.07%. The duration of main feeding wave E2 in the control group was 3.58 times of that in the in-

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFD1002100)

<sup>\*</sup>通信作者 (Author for correspondence), E-mail: bianlei@tricaas.com

dole-treated group. Compared with the control group, the total amount of volatiles released by indole-treated tea trees was significantly increased, among which  $\alpha$ -farnesene can deter pests but attract natural enemies. Moreover, the expression level of defense genes in indole-treated tea trees was significantly increased. The results indicated that the tea trees treated with indoles decreased food intake, increased the amount of volatiles and the expression level of resistance genes, which help to enhance the resistance of tea tree to E. onukii.

Key words: tea tree; Empoasca onukii; indole; induced defense; feeding behavior; resistance; volatile

茶树是我国重要的经济作物,半翅目叶蝉科害虫茶小绿叶蝉 Empoasca onukii 是为害茶树最严重的害虫之一(秦道正,2003; Xin et al.,2019a),其若虫和成虫均可刺吸茶树汁液,导致茶树叶片变黄、干燥,严重影响茶叶的品质和产量。目前,茶小绿叶蝉主要以化学农药防治为主,随着环境和食品安全问题日益突出,急需开发高效无公害的防治方法。

茶树受到植食性昆虫为害后能产生明显的抗 性,一些植物自身产生的化合物就可以诱导这种抗 虫性,如茉莉酸和水杨酸等信号物质,其中茉莉酸在 平衡植物生长发育和响应外界胁迫过程中发挥着重 要作用,因此利用植物的诱导抗虫性可作为控制害 虫的一条有效途径(Cheng et al., 2007; 李永华等, 2021)。为了高效获得抗虫化合物,本实验室前期对 茶树挥发物进行了研究,建立了一套可快速筛选能 诱导茶树抗茶小绿叶蝉的挥发物的技术体系(陈升 龙,2020),利用该体系筛选出了吲哚,并通过在茶树 上的试验初步确定了吲哚的诱抗活性。Erb et al. (2015)研究也发现吲哚可参与植物对植食性昆虫的 防御,如利用吲哚处理玉米后可以激活其防御系统, 增强对植食性昆虫的抗性。Ye et al. (2019)研究发 现吲哚诱导水稻后可以促进早期防御信号基因 OsMPK3和OsWRKY70的表达,并且还可以激活荣 莉酸合成途径的关键基因,促进茉莉酸和茉莉酸-异亮氨酸的积累,从而提高水稻对植食性昆虫的抗 性。Ye et al. (2021)后期研究还发现,拟南芥 Arabidopsis thaliana 和苜蓿 Medicago 的种子经吲哚诱导 处理后,也会提高自身的抗虫性,从而影响植食性昆 虫的取食行为。

当食草动物攻击植物时,植物会释放虫害诱导挥发物。这些挥发物可以启动植物的完整防御体系并诱导植物产生系统抗性,其中的芳香族化合物吲哚在草本植物中被认为是诱导防御的关键启动信号。而虫害诱导挥发物是如何在长寿木本植物中启动防御反应的尚不清楚,Ye et al.(2021)研究了吲哚处理茶树后,防御相关途径早期信号表达、植物激素

积累和次生代谢产物生物合成对其抗食草性昆虫的影响,将虫害诱导挥发物诱导的防御启动的分子基础从草本植物扩展到木本植物茶树上,这为本研究的开展提供了依据和参考。本研究在该基础上以茶树和茶小绿叶蝉为对象,以抗虫性为突破口,分析吲哚诱导对茶树抗茶小绿叶蝉的影响,以期为茶小绿叶蝉的防控提供新思路。

# 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试昆虫:茶小绿叶蝉成虫采自中国农业科学院茶叶研究所附近的茶园中,带回室内置于75 cm×75 cm×75 cm养虫笼中,并用从茶园采集的新鲜健康茶梢进行饲养,茶梢1周更换2次,室内温度(25±2)℃、光照14 h/黑暗10 h、相对湿度70%~75%。

供试茶树:品种为龙井43,为3年生盆栽苗,于中国农业科学院茶叶研究所茶园培养。选择长势良好、叶片生长发育一致、健康无病虫害的健康茶苗转至温度(26±2)℃、光照12 h/黑暗12 h、相对湿度75%的人工气候室内隔离培养,每隔2 d浇1次水。

试剂:色谱纯吲哚(纯度>99.0%),上海韶远试剂有限公司;RNAprep Pure 植物总RNA试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;PrimeScript™RT Master Mix 反转录试剂盒,日本 TaKaRa公司; ChamQ SYBR qPCR Master Mix Q311 荧光定量试剂盒,南京诺唯赞生物科技股份有限公司;其余试剂均为国产分析纯或色谱纯。

仪器: Model GIGA-8 刺探电位图谱仪,荷兰Wageninggen大学;QP2010气相色谱-质谱联用仪,日本Shinadzu公司;5424R台式冷冻离心机,德国Eppendorf公司;NanoDrop One 微量分光光度计、Veriti高通量PCR仪,美国Thermo公司;CFX96荧光定量PCR仪,美国Bio-Rad公司;SZ61体视显微镜,日本Olympus公司;粒径为0.150~0.178 mm的SuperQ 吸附剂和长20 cm、内径4 mm的吸附柱,美国Altech Associates公司;DOA-P504-BN隔膜真空泵,

美国GAST公司。

### 1.2 方法

### 1.2.1 茶小绿叶蝉的寄主趋向选择试验

为探究茶小绿叶蝉成虫对吲哚处理茶树的取食选择性,参照Ye et al. (2019)方法进行吲哚处理,并略有修改。试验开始前将人工气候室中隔离培养的茶树叶片和枝干用清水冲洗干净并自然晾干备用。将单株茶树放入被动通风良好的边长为40cm的透明亚克力方形箱中,然后放入吲哚释放装置,即装有20mg吲哚的1mL棕色玻璃瓶,在人工培养室中暴露处理12h后,取出吲哚释放装置。对照组为未经任何处理的正常茶树。从吲哚处理组和对照组茶树上分别取一根长势良好、大小相似且健康的枝条放置在1个直径25cm、高65cm的透明亚克力箱中,里面放入20头提前饥饿2h的茶小绿叶蝉成虫,在1、12、24、36和48h分别记录每根茶枝上茶小绿叶蝉的数量。每个处理5次重复。

### 1.2.2 茶小绿叶蝉的取食行为测定

利用刺吸电位仪记录茶小绿叶蝉的取食行为, 并观察取食波验证其行为。寄主植物为未做任何处 理的茶树以及1.2.1中吲哚暴露处理12h的茶树。 选取健康有活力的3龄若虫,将刺吸电位仪昆虫电 极的金丝末端用导电银胶粘在幼虫的前胸背板上, 饥饿处理2h后将其置于盆栽茶树芽下第3叶的背 面,将植物电极插入土壤形成闭合回路,持续记录 6 h。每个处理重复试验30次,选取有效重复15次 以上数据进行统计分析。参考金珊(2012)的方法对 茶小绿叶蝉3龄幼虫的刺吸电位图谱(electrical penetration graph, EPG)进行分析,使用昆虫刺吸电位数 据分析软件Stylet+a对3龄幼虫的取食波形进行整 理,分析NP波(非取食波)、E1波(刺探植物组织 波)、E2波(在维管東鞘或叶肉的取食波)、E3波(在 维管束的取食波)和E4波(在叶肉组织的取食波)等 参数。茶小绿叶蝉的取食波形从NP波开始,NP波 表示此时茶小绿叶蝉尚未取食,可能在寻找合适的 取食位置。E1波表示茶小绿叶蝉的口针在表皮细 胞间或者是细胞内进行刺探、分泌唾液等生理行 为。E2波表示茶小绿叶蝉在叶肉组织及其维管束 鞘细胞中进行主动取食,E2波是茶小绿叶蝉取食过 程最常见的一种波形,且持续时间最长。E3波可能 出现在茶小绿叶蝉取食维管束薄壁细胞时,但也有 可能出现在主动取食木质部汁液时。茶小绿叶蝉主 动取食时的波形主要为E2波和E3波,E4波可能是 茶小绿叶蝉在叶肉中取食时的波形(金珊,2012)。

### 1.2.3 茶树挥发物的收集和分析

为探究吲哚处理后茶树挥发物组分及含量的差 异,并分析挥发物对茶树抗茶小绿叶蝉的作用,对茶 树进行吲哚处理,收集其挥发物并进行分析。将 1.2.1 吲哚处理后的部分茶树放入挥发物收集装置 中,该装置主要部分是两端无底的外径18 cm、高 25 cm、壁厚 0.8 cm 的玻璃筒,将供试茶苗放置在玻 璃筒中,玻璃筒顶部和底部用磨砂玻璃板密封,顶部 玻璃板中间开1个小孔,孔径为4.5 cm,底部玻璃板 劈成两半,中心有1个孔,孔径为5.5 cm。连好进气 管和出气管后将顶部玻璃板塞紧,茶树放好之后将 底部玻璃板的中间用脱脂棉塞紧。用PET塑料包 裹装置中的橡皮塞。通过隔膜真空泵使气流经过硅 胶干燥剂、活性炭、转子流量计和活性炭之后进入玻 璃筒,再流经填装35 mg SuperQ吸附剂的吸附柱。 进气流量为1360 mL/min; 出气流量为1040 mL/min。 整个装置之间所有部件均用 Teflon 管进行连接(王 国昌,2010),试验前先静置2d,使茶树适应这种环 境。以未经任何处理的茶树作为对照组。采用气相 色谱-质谱联用仪来检测吸附柱中收集的茶树挥发 物组分及含量。色谱柱长60 m、内径0.25 mm、膜厚 0.25 μm, 载气为氦气, 流速1 mL/min, 无分流进样。质 谱条件:EI电子源,70 eV轰击电压,扫描频率2次/s, 检测器温度250 ℃。茶树挥发物组分通过标准样品 保留时间或科瓦茨指数比对和NIST147质谱库检索 进行定性分析。使用癸酸乙酯作为内标,通过色谱 峰面积进行定量分析。

### 1.2.4 吲哚诱导下茶树防御基因表达量的测定

参照1.2.1 方法于吲哚处理茶树后0.5、1、2、4和 8h分别选取芽下第3片叶片,以未将任何处理的茶 树为对照组。利用RNAprep Pure 植物总RNA 试剂 盒参照说明书分别提取茶叶样品的总RNA。使用 PrimeScript™ RT Master Mix 反转录试剂盒将总 RNA反转录合成cDNA,作为模板备用。采用Primer Premier 5 软件设计引物(表1),并委托南京金斯 瑞生物科技公司合成。通过实时荧光定量 PCR 仪 测定丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、WRKY转录因子、超氧化物歧 化酶(superoxide dismutase, SOD)、抗坏血酸过氧化 物酶(ascorbate peroxidase, APX)、苯丙氨酸转氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL)、脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)和酰基辅酶 A 氧化酶(acyl-CoA oxidase, ACX)的 mRNA 表达量变化特征,以茶树 GADPH基因为内参基因(表1)。20 μL 反应体系:

SYBR 10 μL、上下游引物各 0.8 μL、cDNA 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足至 20 μL。反应程序:95 ℃预变性 30 s; 95 ℃变性 5 s, 不同引物在相应退火温度下退火 30 s,

共40个循环。采用2<sup>-AAC</sup>法计算各基因的相对表达量,其中SOD、APX、PAL、LOX和ACX基因仅测定处理4 h的相对表达量(Chen et al., 2020)。

### 表1 实时荧光定量PCR检测引物

Table 1 Primers used for real-time quantitative PCR

基因名称	引物名称	引物序列(5′-3′)	退火温度
Gene name	Primer name	Primer sequence (5′–3′)	Annealing temperature/ $^{\circ}$ C
GADPH	GADPH-F	ATACCACGTCATCCTCGGT	51.9
	GADPH-R	ACTTATGATGAAATCAAAGCTGC	49.5
CsMAPK	CsMAPK-F	TTCATTCAACACAACATATTC	44.3
	CsMAPK-R	AGCAGACAATTCCATAAG	44.5
CsWRKY	CsWRKY-F	GCAGGAGAGTATGTCGGTGA	52.9
	CsWRKY-R	ACACTCGTCCGTGATAGCAT	52.9
LOX	LOX-F	GCTGACTGGACAACCGATGA	50.5
	LOX-R	CAACATATGCTTCTATGAAAATGC	50.1
SOD	SOD-F	GATGACGGAACTGCTTGCTT	51.6
	SOD-R	ATCAGGGTCTGCATGGACAA	51.2
APX	APX-F	GCCTCATCGCTGAGAAGAAC	49.3
	APX-R	AAGTACCAGCAGAGTGCCAT	49.8
PAL	PAL-F	GAATGCCGGTCTTATCCACT	52.2
	PAL-R	CGGTGAACACCTTGTCAAAC	52.9
ACX	ACX-F	CCTTCAAAGTCTCGCACCAC	51.6
	ACX-R	TGAATGAGTCAGTCGTGCCT	52.1

### 1.2.5 吲哚诱导茶树后H,O,的测定和分析

使用二氨基联苯(diamino benzidine, DAB)来定位茶树叶片中的 $H_2O_2$ ,分析吲哚诱导茶树后茶树叶片中 $H_2O_2$ 变化情况。采用Xin et al.(2019b)方法进行染色试验,即取1.2.1吲哚处理1h茶树叶片或对照组茶树叶片插入到由pH7.8、50 mmol/L Tris-HCl缓冲液制备的pH3.8、0.1%的3,3′-二氨基联苯溶液中,在光照条件下孵育至出现棕色斑点,即约5~6h,检测 $H_2O_2$ 的积累情况,并通过显微镜观察叶片表面的棕色斑点数量,并统计斑点面积。

### 1.3 数据分析

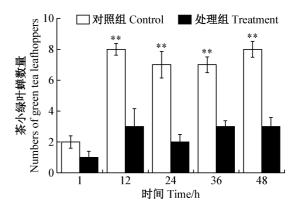
使用 SPSS 26.0 软件对数据进行统计分析,采用 Student's t 检验法进行对照与处理间的差异显著性 检验,通过单因素方差分析中的最小显著差数(least significant difference, LSD)法对茶树挥发物含量进行差异显著性检验,使用 Origin 2018 软件作图。

# 2 结果与分析

### 2.1 茶小绿叶蝉的寄主选择性

通过在取食不同时间观察茶小绿叶蝉成虫在不同处理茶树上的数量,发现不同处理之间茶小绿叶蝉的取食选择差异显著(图1)。与吲哚处理组茶树相比,茶小绿叶蝉对未处理茶树有更强的选择偏好(P<0.01),自12 h起,对照组茶树上的茶小绿叶蝉数

量极显著多于吲哚处理组茶树上的数量(P<0.01),处理后48 h时,前者是后者的2.45 倍(P<0.01;图1)。



### 图1 茶小绿叶蝉在吲哚处理及未处理茶树上取食的数量

Fig. 1 Numbers of green tea leafhoppers feeding on indole-treated and untreated tea plants

图中数据为平均数±标准误。\*\*表示处理组与对照组之间经 Student's t 检验法检验差异显著(P<0.01)。Data are mean±SE. \*\* indicates significant difference between the treatment group and control group by Student's t test (P<0.01).

### 2.2 茶小绿叶蝉的取食行为分析

利用EPG技术对茶小绿叶蝉在不同处理茶树上的取食行为进行记录,对取食茶树时产生的NP、E1、E2、E3和E4这5个波形参数(图2)进行统计分析。

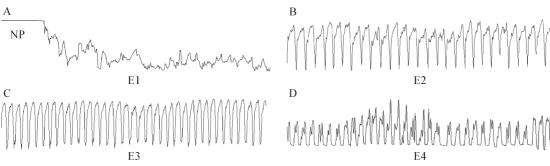


图2 茶小绿叶蝉取食茶树的EPG波形

Fig. 2 EPG waveforms of tea tree green leafhoppers feeding on tea plants

茶小绿叶蝉3龄幼虫在吲哚处理组茶树上取食 时,NP波的持续时间为254.13 min,极显著长于在 对照组茶树上取食时的持续时间 134.89 min(P< 0.01,图3),幼虫在吲哚处理组茶树上的NP波持续 时间占总取食时间的72.15%,而在对照组茶树上的 NP波持续时间仅为总取食时间的33.07%。对照组 茶树上茶小绿叶蝉取食时的 E1 波持续时间显著长 于在吲哚处理组茶树上取食时的持续时间(P<0.05, 图 3)。 茶小绿叶蝉在对照组茶树上主动取食的 E2 波持续时间为105.19 min,极显著长于在吲哚处理组 茶树上的持续时间29.41 min(P<0.01,图3),其中E2 波是主要取食波,在对照组茶树上取食时的持续时 间是在吲哚处理组茶树上取食时持续时间的3.58倍, 初步推断相较于对照组,茶小绿叶蝉对吲哚处理茶 树有一定排斥性。茶小绿叶蝉在对照组茶树和吲哚 处理组茶树上均有木质部取食行为的发生(E3波), 其中在对照组茶树上的木质部取食时间显著长于在 吲哚处理组茶树上的木质部取食时间(P<0.01,图3)。 E4 波一般发生在 E2 波和 E3 波之后,可能是在叶肉 中取食的波形, E4波持续时间为86.67 min, 极显著 长于在吲哚处理茶树上的38.84 min(P<0.01,图3)。

### 2.3 吲哚处理对茶树挥发物释放的影响

与对照组茶树相比,经过吲哚处理后可以增加茶树挥发物的种类,在处理6h时,对照组茶树收集到5种挥发物,吲哚处理组茶树收集到15种挥发物;处理24h时,对照组茶树收集到6种挥发物,吲哚处理茶树收集到13种挥发物(表2)。

与对照组茶树相比,吲哚处理组茶树释放的挥发物总量也显著增加。处理6h时,处理组茶树释放的15种挥发物中有5种与对照组茶树挥发物相同,其中仅水杨酸甲酯的释放量较对照组显著升高(P<0.05),其他4种挥发物的释放量虽与对照组相比也有增加,但差异不显著。处理24h时,两者释放的挥发物中有6种相同,其中苯甲醛、癸醛和雪松醇的释放量较对照组显著升高(P<0.05),其他3种挥发物

的释放量虽也均较对照组有所增加,但差异不显著。只有吲哚处理茶树组释放的挥发物包括绿叶挥发物顺式-3-己烯醇、萜烯类化合物α-水芹烯、柠檬烯和α-法尼烯以及芳香类化合物苯甲醇、苯乙醇、桉油醇、芳樟醇和苄腈。

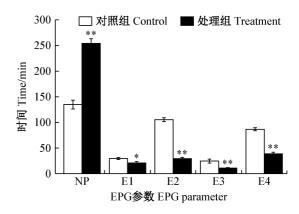


图3 茶小绿叶蝉取食茶树的EPG参数

Fig. 3 EPG parameters of tea tree green leafhoppers feeding on tea tree plants

图中数据为平均数±标准误。\*和\*\*分别表示处理组与对照组之间经 Student's t检验法检验差异显著(P<0.05)和极显著(P<0.01)。Data are mean±SE. \* or \*\* indicates significant difference between the treatment group and control group by Student's t test (P<0.05 or P<0.01), respectively.

### 2.4 吲哚处理对茶树抗性分子机制的影响

与对照组茶树相比,吲哚处理茶树后显著提高了其早期防御信号基因 MAPK 和 WRKY的表达水平,吲哚处理 0.5 h时就极显著提高了这 2 种防御基因的相对表达量(P<0.01,图4)。而吲哚处理茶树 4 h时,茶树茉莉酸途径合成的关键酶基因 LOX 和 ACX、抗性防御酶基因 SOD 和 APX 以及木质素合成途径关键酶基因 PAL 的相对表达量均较对照组茶树极显著升高(P<0.01,图5)。

DAB染色结果表明,在吲哚处理茶树叶片上有明显的褐色沉淀斑点,在未处理茶树叶片上未发现(图6),表明经过吲哚处理后茶树叶片中有H,O,积累。

#### 表2 不同处理茶树挥发物的定性和定量比较

Table 2 Qualitative and quantitative comparison of tea tree volatiles under different treatments

ng/h

		1			
序号	化合物	6 h		24 h	
No.	Compound	对照组 Control	处理组 Treatment	对照组 Control	处理组 Treatment
1	顺式-3-己烯醇 (Z)-3-hexen-1-ol	ND	$0.22 \pm 0.02$	ND	$0.16\pm0.01$
2	苯乙烯Styrene	ND	$0.46 \pm 0.05$	ND	$6.70\pm0.58$
3	α-水芹烯 α-phellandrene	ND	$0.02 \pm 0.01$	ND	ND
4	苯甲醛Benzaldehyde	1.19±0.16 a	$1.50\pm0.07$ a	0.69±0.12 b	1.41±0.21 a
5	桉油醇 Eucalyptol	ND	$0.42 \pm 0.04$	ND	$0.86 \pm 0.03$
6	柠檬烯Limonene	ND	$0.32 \pm 0.03$	$0.16\pm0.03~a$	$0.33 \pm 0.07$ a
7	苯甲醇Benzyl alcohol	ND	$0.77 \pm 0.18$	ND	$0.87 \pm 0.17$
8	芳樟醇Linalool	ND	$0.17 \pm 0.02$	ND	$0.24 \pm 0.02$
9	壬醛 Nonanal	$1.48\pm0.30~a$	1.67±0.31 a	1.09±0.05 b	1.43±0.09 ab
10	苯乙醇Phenylethyl alcohol	ND	$0.28 \pm 0.04$	ND	$0.50\pm0.09$
11	苄腈 Benzyl nitrile	ND	$0.27 \pm 0.08$	ND	ND
12	水杨酸甲酯Methyl salicylate	$0.37 \pm 0.07 \text{ b}$	1.62±0.21 a	$0.90\pm0.13~a$	0.99±0.13 a
13	癸醛 Decanal	1.21±0.31 a	1.39±0.22 a	0.96±0.05 b	1.79±0.24 a
14	α-法尼烯 α-farnesene	ND	$3.79\pm0.30$	ND	$0.78 \pm 0.09$
15	雪松醇Cedrol	1.51±0.32 a	$1.66\pm0.08~a$	$0.83\pm0.09 \text{ b}$	1.35±0.18 a
	总量 Total	4.76 b	14.56 a	4.63 b	10.55 a

ND表示未检测到。表中数据为平均数±标准误。同行不同字母表示同一时间处理组与对照组之间经LSD法检验差异显著 (P<0.05)。 ND indicates not detected. Data are mean±SE. Different letters in the same row indicate significant difference between the treatment group and control group at the same time by LSD test (P<0.05).

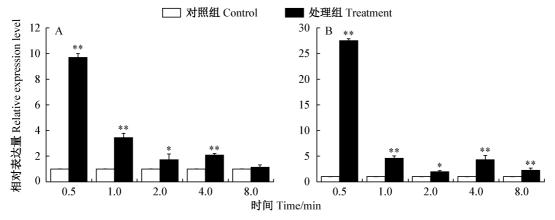


图 4 吲哚诱导调节茶树 MAPK(A)和 WRKY(B)基因的相对表达量

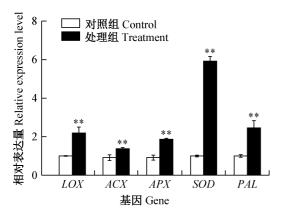
Fig. 4 Indole induction regulates the relative expression levels of MAPK (A) and WRKY (B) genes in tea trees 图中数据为平均数±标准误。\*和\*\*分别表示处理组与对照组之间经 Student's t 检验法检验差异显著(P<0.05)和极显著(P<0.01)。Data are mean±SE. \* or \*\* indicates significant difference between the treatment group and control group by Student's t test (P<0.05 or P<0.01), respectively.

## 3 讨论

刺吸电位技术是测定刺吸式昆虫在叶片组织内取食行为的重要方法(George et al., 2020),已被广泛用于寄主植物互作、病原传播与获取、寄主植物抗性和植食性昆虫诱导的植物抗性研究等诸多方面。茶小绿叶蝉取食茶树产生的EPG波形已被鉴定,本试验记录到的EPG波形与金珊(2012)的研究结果一致。刺吸式昆虫取食植物时记录的EPG波形均从NP波开始(Xu et al., 2020)。当茶小绿叶蝉开始

刺探时,电路的电压发生变化,出现E1波,此时口器会渗透到角质层,分泌唾液(金珊,2012)。E2波和E3波均为主动取食时产生的波形(Jin et al.,2012),在许多昆虫取食植物的EPG记录中都可以观察到与E3波相似的波形,如在蚜虫和粉虱取食中的G波(Prado & Tjallingii,2011),在褐飞虱 Nilaparvata lugens 中的N5波(Seo et al.,2009)等,这些波形都与刺吸式昆虫取食木质部或主动取食叶肉相关(Trębicki et al.,2012)。本研究结果表明,茶小绿叶蝉在吲哚处理茶树上取食时的NP波持续时间增

加,且E2波持续时间显著降低,说明吲哚提高了茶树应对茶小绿叶蝉取食的抗性。吲哚会诱导茶叶内某些结构产生抗性因子,但抗性因子的位置尚未明确,且茶树不同部位叶片对茶小绿叶蝉取食行为也会有不同影响。如果植物的抗性因子在表皮层,口器很难刺入,刺探开始时会有高频率的中断;如果抗性因子在叶肉组织中,则路径波会发生变化(胡想顺等,2008)。茶小绿叶蝉在不同处理茶树上表现出不同的取食行为,在取食吲哚处理茶树时通常会有72.15%的时间用在非取食行为上,而在未处理茶树上其在叶肉组织中的取食时间较长。



### 图5 吲哚处理茶树4h时体内防御相关基因的相对表达量

Fig. 5 Relative expressions of defense-related genes in tea trees treated with indole for 4 h

图中数据为平均数±标准误。\*\*表示处理组与对照组之间经 Student's t 检验法检验差异显著(P<0.01)。Data are mean±SE. \*\* indicates significant difference between the treatment group and control group by Student's t test (P<0.01).



图 6 吲哚处理茶树叶片 1 h 时 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的积累 Fig. 6 Accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in tea leaves treated with indole for 1 h

吲哚会改变茶树体内的特定物质,使茶树叶片组织发生氧化,吲哚处理后茶叶表面有褐色沉淀斑点,表明叶片受到一定程度的氧化,而H,O,是吲哚

处理茶树前后检测到含量有明显差异的物质,该物质通常在植物被病原体侵染或者受到茉莉酸等化学物质刺激时被检测到。Zhou et al.(2009)研究表明,它可以激活植物防御相关基因,在植物对刺吸式口器害虫的抗性中发挥作用。本研究中被吲哚处理过的茶树叶片会释放H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,结合其对刺吸式口器害虫的抗性作用,推测这可能是茶小绿叶蝉对吲哚处理茶叶的趋向选择性低的重要原因,可能也是刺探之前NP波持续时间延长的原因。

利用化学激发子控制植物挥发物的释放来吸引 天敌是一种有效的生物防治策略(Xin et al., 2019a)。 如施用茉莉酸、茉莉酸甲酯或2,4-二氯苯氧乙酸均 会提高水稻中虫害诱导挥发物的释放,增强水稻对 褐飞虱卵寄生蜂的吸引能力(Lou et al., 2005; Cheng et al.,2007)。对葡萄施用水杨酸甲酯和茉莉酸甲酯 后,缨小蜂等寄生蜂在葡萄园里的数量显著增加 (James & Grasswitz, 2005; 陈宗懋, 2013)。在棉花 上施用苯并噻二唑可以促进植株释放大量高萜类化 合物,显著提高了对寄生蜂的吸引力(Sobhy et al., 2014)。释放挥发性有机物是植物重要的生理特征 和信息传递方式(边磊,2014)。植物受到外界攻击 时会释放挥发性有机物,其中一些可以作为防御信 号激活植物未受损组织以及邻近植物的抗性反应 (Chen et al., 2020)。植物挥发性有机物既可以直接 驱避植食性昆虫,也可以通过吸引天敌来进行间接 防御。本研究结果表明,吲哚诱导处理后,茶树会释 放芳樟醇、α-法尼烯和雪松醇等挥发物。这些挥发 物当中包含了具有驱避作用的物质,如法尼烯能够 刺激叶蝉远离水稻及玉米等植物,并可以进一步增 强荼树对虫害的直接和间接抗性(Calumpang et al., 2014; Ye et al., 2018)。水杨酸甲酯作为一种虫害诱 导挥发物可以吸引天敌,并且还可以作为预警信号 使周围未受损的茶树提前感知危险,释放挥发物吸 引天敌进行间接防御。在本研究中,吲哚处理后水 杨酸甲脂释放量相较于未处理茶树显著增加,故可 以推测吲哚处理茶树后诱导其释放水杨酸甲脂对茶 小绿叶蝉进行间接防御,而且吲哚处理后释放的挥 发物可能还会对邻近植物产生影响,提前向周边植 物传递防御信号,诱发其产生防御反应,从而提高邻 近植物对植食性昆虫的抗性。

Bigeard & Hirt(2018)研究结果表明植物体内的MAPK级联反应和WRKY转录因子在激活植物防御早期信号过程中发挥着重要作用。它们可通过协同或拮抗作用调控植物的早期防御信号,诱导防

御相关物质的合成(Shen et al., 2012);同时还参与 生物胁迫的感知,进而诱导植物产生抗性(Schweiger et al., 2014)。如在水稻中, 防御诱导合成的化合 物2,4-二氯苯氧乙酸增强了OsMPK3、OsMPK6、Os-MEK3和OsWRKY53基因的转录,从而增强了水稻 对褐飞虱的抗性(Xin et al., 2012)。本研究结果显 示,吲哚可以快速诱导茶树内MAPK和WRKY3的表 达,而这2个基因在茶树对挥发性有机化合物的感 知和反应过程中发挥着重要作用;而且吲哚处理后 显著增加了茶树中LOX和ACX基因的转录水平。 LOX和ACX是茉莉酸途径中的关键酶,茉莉酸途 径是植物的主要抗虫途径,在植物的生长、发育和防 御中起着至关重要的调节作用(Xin et al., 2019b), LOX还与绿叶挥发物的合成密切相关(Picazo-Aragonés et al., 2020)。植物在生长发育过程中受到各 种因素的胁迫,这可能导致植物细胞产生活性氧,大 量积累时会对细胞造成氧化胁迫,严重时可导致细 胞死亡(王星等,2014)。SOD和APX是植物抗氧化 系统中的关键酶,其功能是清除植物体内过量的氧 化物质,保证植物的正常生长发育(马旭俊和朱大 海,2003;李泽琴等,2013)。吲哚诱导后,茶树中 SOD和APX这2个基因的表达量显著提高,表明吲 哚诱导可以激活茶树的抗氧化系统进而提高茶树的 抗性。PAL是催化苯丙烷类代谢途径的关键酶之 一,促进与植物抗性密切相关的木质素、植保素和某 些黄酮类物质的产生(Huang et al., 2010)。植物遭 到植食性昆虫为害后会激活受害部位的PAL,促进 木质素的积累,增强植物的物理防御屏障,从而阻止 入侵者进入叶片组织(Santiago et al., 2013)。本研 究发现吲哚处理后茶树中的PAL基因表达量显著增 加,说明吲哚正向调节木质素的生物合成,理论上木 质素的积累有助于提高茶树对茶小绿叶蝉的抗性。 综上所述,推测吲哚可以通过影响害虫取食行为以 及调控MAPK信号通路、植物防御相关酶和H,O,等 防御相关化学物质,直接或间接增强茶树对茶小绿 叶蝉的抗性。

本试验测定了茶小绿叶蝉对吲哚处理茶树的取食偏好性,初步表明吲哚可以干扰茶小绿叶蝉在茶树上的取食行为,缩短其在茶树叶片上的取食时间。吲哚处理后增加了茶树释放的挥发物种类和总量,增强了茶树间接防御茶小绿叶蝉的能力。并且在分子层面证实吲哚处理后可以激活茶树抗性防御基因的表达,即吲哚处理能激活茶树对茶小绿叶蝉的防御相关信号转导机制,证明外源吲哚的诱导能

够提高茶树的抗虫水平。

### 参考文献(References)

- Bian L. 2014. Chemical ecological and physical regulation of *Empo-asca vitis* Göthe based on long-range host location. PhD thesis. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (in Chinese) [边磊. 2014. 基于远程寄主定位机理的假眼小绿叶蝉化学生态和物理调控. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院]
- Bigeard J, Hirt H. 2018. Nuclear signaling of plant MAPKs. Frontiers in Plant Science, 9: 469
- Calumpang SMF, Navasero MM, Burgonio GAS, Navasero MV. 2014.
  Repellency of volatile organic chemicals of kakawate, *Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp., to rice green leafhopper, *Nephotettix virescens* (Distant) (Hemiptera: Cicadellidae). The Philippine Agricultural Scientist, 97(2): 148–154
- Chen SL. 2020. Establishment of screening system for volatiles that induces tea plant defense against tea green leafhopper and preliminary study on (E)-nerolidol induction mechanism. Master thesis. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (in Chinese) [陈升龙. 2020. 诱导茶树抗茶小绿叶蝉挥发物筛选体系的建立及反式-橙花叔醇诱抗机制初探. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院]
- Chen SL, Zhang LP, Cai XM, Li X, Bian L, Luo ZX, Li ZQ, Chen ZM, Xin ZJ. 2020. (*E*)-nerolidol is a volatile signal that induces defenses against insects and pathogens in tea plants. Horticulture Research, 7: 52
- Chen ZM. 2013. Chemical ecology of tea pests. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers (in Chinese) [陈宗懋. 2013. 茶树害虫化学生态学. 上海: 上海科学技术出版社]
- Cheng AX, Xiang CY, Li JX, Yang CQ, Hu WL, Wang LJ, Lou YG, Chen XY. 2007. The rice (*E*) -beta-caryophyllene synthase (OsTPS3) accounts for the major inducible volatile sesquiterpenes. Phytochemistry, 68(12): 1632–1641
- Erb M, Veyrat N, Robert CAM, Xu H, Frey M, Ton J, Turlings TCJ. 2015. Indole is an essential herbivore-induced volatile priming signal in maize. Nature Communications, 6: 6273
- George J, Kanissery R, Ammar ED, Cabral I, Markle LT, Patt JM, Stelinski LL. 2020. Feeding behavior of Asian citrus psyllid [*Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae)] nymphs and adults on common weeds occurring in cultivated citrus described using electrical penetration graph recordings. Insects, 11(1): 48
- Hu XS, Zhao HY, Hu ZQ, Li DH, Zhang YH. 2008. EPG comparison of *Sitobion avenae* (Fab.) feeding behaviors on three wheat varieties. Scientia Agricultura Sinica, 41(7): 1989–1994 (in Chinese) [胡想顺, 赵惠燕, 胡祖庆, 李东鸿, 张宇红. 2008. 麦长管蚜在3个小麦品种上取食行为的EPG比较. 中国农业科学, 41(7): 1989–1994]
- Huang JL, Gu M, Lai ZB, Fan BF, Shi K, Zhou YH, Yu JQ, Chen ZX. 2010. Functional analysis of the *Arabidopsis* PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. Plant Physiology, 153(4): 1526–1538
- James DG, Grasswitz TR. 2005. Synthetic herbivore-induced plant

- volatiles increase field captures of parasitic wasps. BioControl, 50(6): 871-880
- Jin S. 2012. Resistance mechanisms of tea plant cultivars to tea green leafhopper. PhD thesis. Yangling: Northwest A&F University (in Chinese) [金珊. 2012. 不同茶树品种抗假眼小绿叶蝉机理研究. 博士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学]
- Jin S, Chen ZM, Backus EA, Sun XL, Xiao B. 2012. Characterization of EPG waveforms for the tea green leafhopper, *Empoasca vitis* Göthe (Hemiptera: Cicadellidae), on tea plants and their correlation with stylet activities. Journal of Insect Physiology, 58(9): 1235–1244
- Li YH, Xiao NW, Liu YB. 2021. Mechanisms of repression and termination of jasmonate signaling in plant defense. Journal of Plant Protection, 48(3): 563–569 (in Chinese) [李永华, 肖能文, 刘勇波. 2021. 植物防御中茉莉酸信号通路抑制与终止的作用机制. 植物保护学报, 48(3): 563–569]
- Li ZQ, Li JX, Zhang G. 2013. Expression regulation of plant ascorbate peroxidase and its tolerance to abiotic stresses. Hereditas, 35(1): 45–54 (in Chinese) [李泽琴, 李静晓, 张根发. 2013. 植物抗坏血酸过氧化物酶的表达调控以及对非生物胁迫的耐受作用.遗传, 35(1): 45–54]
- Lou YG, Du MH, Turlings TCJ, Cheng JA, Shan WF. 2005. Exogenous application of jasmonic acid induces volatile emissions in rice and enhances parasitism of *Nilaparvata lugens* eggs by the parasitoid *Anagrus nilaparvatae*. Journal of Chemical Ecology, 31 (9): 1985–2002
- Ma XJ, Zhu DH. 2003. Functional roles of the plant superoxide dismutase. Hereditas, 25(2): 225-231 (in Chinese) [马旭俊, 朱大海. 2003. 植物超氧化物歧化酶(SOD)的研究进展. 遗传, 25 (2): 225-231]
- Picazo-Aragonés J, Terrab A, Balao F. 2020. Plant volatile organic compounds evolution: transcriptional regulation, epigenetics and polyploidy. International Journal of Molecular Sciences, 21(23): 8956
- Prado E, Tjallingii WF. 1994. Aphid activities during sieve element pun-ctures. Entomologia Experimentalis et Applicata, 72(2): 157–165
- Qin DZ. 2003. Taxonomy study on Chinese Empoascini (Homoptera: Cicadellidae). PhD thesis. Yangling: Northwest A&F University (in Chinese) [秦道正. 2003. 中国小绿叶蝉族分类研究(同翅目: 叶蝉科). 博士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学]
- Santiago R, Barros-Rios J, Malvar R. 2013. Impact of cell wall composition on maize resistance to pests and diseases. International Journal of Molecular Sciences, 14(4): 6960–6980
- Schweiger R, Heise AM, Persicke M, Müller C, 2014. Interactions between the jasmonic and salicylic acid pathway modulate the plant metabolome and affect herbivores of different feeding types. Plant Cell and Environment, 37(7): 1574–1585
- Seo BY, Kwon YH, Jung JK, Kim GH. 2009. Electrical penetration graphic waveforms in relation to the actual positions of the stylet tips of *Nilaparvata lugens* in rice tissue. Journal of Asia-Pacific Entomology, 12(2): 89–95
- Shen HS, Liu CT, Zhang Y, Meng XP, Zhou X, Chu CC, Wang XP.

- 2012. OsWRKY30 is activated by MAP kinases to confer drought tolerance in rice. Plant Molecular Biology, 80(3): 241–253
- Sobhy IS, Erb M, Turlings TC. 2014. Plant strengtheners enhance parasitoid attraction to herbivore-damaged cotton via qualitative and quantitative changes in induced volatiles. Pest Management Science, 71(5): 686–693
- Trębicki P, Harding RM, Rodoni BC, Powell KS. 2012. EPG monitoring of the probing behaviour of the common brown leafhopper *Orosius orientalis* on artificial diet and selected host plants. Arthropod-Plant Interactions, 6(3): 405–415
- Wang GC. 2010. Ecological functions of tea plant volatiles induced by three herbivores. PhD thesis. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (in Chinese) [王国昌. 2010. 三种害虫诱导茶树挥发物的生态功能. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院]
- Wang X, Liu XF, Zhou YJ, Zhang GF. 2014. Molecular mechanism of expression and regulation of *SOD* gene in plant. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 36(2): 275–280 (in Chinese) [王星, 刘肖飞, 周宜君, 张根发. 2014. 植物 *SOD* 基因表达调控的分子机制. 中国油料作物学报, 36(2): 275–280]
- Xin ZJ, Cai XM, Chen SL, Luo ZX, Bian L, Li ZQ, Ge LG, Chen ZM. 2019a. A disease resistance elicitor laminarin enhances tea defense against a piercing herbivore *Empoasca* (*Matsumurasca*) onukii Matsuda. Scientific Reports, 9: 814
- Xin ZJ, Chen SL, Ge LG, Li XW, Sun XL. 2019b. The involvement of a herbivore-induced acyl-CoA oxidase gene, *CsACXI*, in the synthesis of jasmonic acid and its expression in flower opening in tea plant (*Camellia sinensis*). Plant Physiology and Biochemistry, 135: 132–140
- Xin ZJ, Yu ZN, Erb M, Turlings TCJ, Wang BH, Qi JF, Liu SN, Lou YG. 2012. The broad-leaf herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid turns rice into a living trap for a major insect pest and a parasitic wasp. New Phytologist, 194(2): 498–510
- Xu CL, Lu CY, Piao J, Wang YX, Zhou T, Zhou YJ, Li S. 2020. Rice virus release from the planthopper salivary gland is independent of plant tissue recognition by the stylet. Pest Management Science, 76(9): 3208–3216
- Ye M, Glauser G, Lou YG, Erb M, Hu LF. 2019. Molecular dissection of early defense signaling underlying volatile-mediated defense regulation and herbivore resistance in rice. The Plant Cell, 31(3): 687–698
- Ye M, Liu MM, Erb M, Glauser G, Zhang J, Li XW, Sun XL. 2021. Indole primes defence signalling and increases herbivore resistance in tea plants. Plant, Cell & Environment, 44(4): 1165–1177
- Ye M, Veyrat N, Xu H, Hu LF, Turlings TCJ, Erb M. 2018. An herbivore-induced plant volatile reduces parasitoid attraction by changing the smell of caterpillars. Science Advances, 4(5): eaar4767
- Zhou GX, Qi JF, Ren N, Cheng JA, Erb M, Mao BZ, Lou YG. 2009. Silencing *OsHI-LOX* makes rice more susceptible to chewing herbivores, but enhances resistance to a phloem feeder. The Plant Journal, 60(4): 638–648

(责任编辑:李美娟)