

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2020.01.005

# 伴生细菌在入侵种桉树枝瘿姬小蜂 克服桉树抗性中的作用

寇冀蒙<sup>1+</sup>, 刘芳华<sup>2+</sup>, 刘一澎<sup>3</sup>, 马玲<sup>1\*</sup>, 鲁敏<sup>2,4\*</sup>

<sup>1</sup>东北林业大学林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; <sup>2</sup>中国科学院动物研究所, 北京 100101;

<sup>3</sup>安徽大学物质科学与信息技术研究院, 安徽 合肥 230039; <sup>4</sup>中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193

**摘要:**【目的】桉树枝瘿姬小蜂是我国近年来发现的一种主要危害桉属树种的外来有害生物。本研究旨在通过探究中国桉树枝瘿姬小蜂主要伴生细菌在桉树枝瘿姬小蜂成功定殖中的作用。【方法】测定不同抗性品系桉树的次生代谢物质黄酮和单宁的含量以及易感品系桉树在枝瘿姬小蜂危害前后的含量变化。通过体外抑菌和化学物质降解实验,探究桉树枝瘿姬小蜂主要伴生细菌对抗虫物质黄酮和单宁的耐受性及降解能力。【结果】抗性品系桉树的黄酮和单宁的含量明显高于易感品系,易感品系在桉树枝瘿姬小蜂危害后黄酮和单宁的含量显著提高;高浓度的黄酮和单宁会抑制桉树枝瘿姬小蜂伴生细菌的生长,在中低浓度黄酮和单宁的条件下,主要伴生细菌能够适应,并继续繁殖;桉树枝瘿姬小蜂伴生细菌具有一定的降解黄酮和单宁的能力,其中细菌 *Staphylococcus cohnii* 降解黄酮的能力比 *Pseudomonas geniculata* 稍强,而 *Bacillus wiedannii*、*Serratia marcescens* 对单宁具有较强的降解能力。【结论】桉树枝瘿姬小蜂侵染桉树后,可以诱导桉树产生抗性,桉树产生大量的次生代谢物质来抵御桉树枝瘿姬小蜂的危害,而桉树枝瘿姬小蜂部分伴生细菌可降解桉树次生代谢物质来帮助小蜂克服植物抗性完成定殖。



开放科学标识码  
(OSID 码)

**关键词:** 桉树枝瘿姬小蜂; 桉树; 伴生细菌; 次生代谢物质; 寄主抗性

## The associated bacteria of *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) facilitate their host to overcome eucalyptus chemical defense

KOU Jimeng<sup>1+</sup>, LIU Fanghua<sup>2+</sup>, LIU Yipeng<sup>3</sup>, MA Ling<sup>1\*</sup>, LU Min<sup>2,4\*</sup>

<sup>1</sup>School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040, China; <sup>2</sup>Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; <sup>3</sup>Institute of Material Science and Information Technology, Anhui University, Hefei, Anhui 230039, China; <sup>4</sup>Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

**Abstract:** 【Aim】 *Leptocybe invasa* is an emerging invasive pest, which causes galls and reduces seedling growth of *Eucalyptus* spp. The purpose of this study was to investigate the role of associated bacteria in the adaptation of *L. invasa* to its host plant. 【Method】 First, we measured the content of flavonoids and tannins of eucalyptus in response to damage by *L. invasa*. Furthermore, the inhibition of flavonoids and tannins on the growth of the main *L. invasa*-associated bacteria and the ability of bacteria to degrade flavonoids and tannins were studied. 【Result】 Flavonoid and tannin content in the resistant eucalyptus species was significantly higher than in susceptible ones. *Staphylococcus cohnii* and *Pseudomonas geniculata* were resistant to higher concentrations of flavonoids, whereas *Bacillus wiedannii*, *Serratia marcescens* and *Klebsiella quasipneumoniae* were more resistant to tannins. Correspondingly, all of these resistant bacteria were able to degrade these allelochemicals. Base on that, *Staphylococcus cohnii* had a stronger ability to degrade flavonoids than *Pseudomonas geniculata*, and *B. wiedannii* and *Serratia marcescens* had stronger abilities to degrade tannins than *Kleb-*

收稿日期 (Received): 2019-04-18 接受日期 (Accepted): 2019-09-21

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划)

作者简介: 寇冀蒙, 男, 硕士研究生。研究方向: 微生物化学生态。E-mail: 1753578748@qq.com; 刘芳华, 女, 博士研究生。研究方向: 入侵生物学与化学生态学。E-mail: liufanghua5@163.com

+ 同等贡献作者 (The two authors contributed equally to this work)

\* 通信作者 (Author for correspondence), 马玲, E-mail: maling63@163.com; 鲁敏, E-mail: lumin@caas.cn

*siella quasipneumoniae*. 【Conclusion】 Flavonoids and tannins are the key allelochemicals in *Eucalyptus* in response to the infection by *L. invasa*. Furthermore, the associated bacteria might contribute to the adaptation of *L. invasa* to its host, by degrading these allelochemicals.

**Key words:** *Leptocybe invasa*; *Eucalyptus*; associated bacteria; secondary metabolites; host adaptation

桉树 *Eucalyptus* 属桃金娘科 Myrtaceae, 原产于澳大利亚和印度尼西亚及其附近岛屿, 是世界上著名的速生丰产树种之一(祁述雄, 2002)。我国自 1890 年起先后引进 300 多个树种(含变种和杂交种), 广泛分布在全国的 20 多个省市以及 600 多个自治区、县, 总种植面积 170 万  $\text{hm}^2$  (王豁然等, 1999; 徐建民等, 2001)。桉树枝瘿姬小蜂 *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle 是近年来新发现的一种主要危害桉属树种外来有害生物, 隶属于膜翅目 Hymenoptera 小蜂总科 Chalcidoidea 姬小蜂科 Eulophidae 啮小蜂属 *Tetrastichinae*, 原产于大洋洲的澳大利亚昆士兰州(Aytar, 2006)。2007 年桉树枝瘿姬小蜂首次扩散到中国, 并给广西壮族自治区东兴县的桉树资源造成了危害, 随后该虫开始陆续出现在广西、广东、海南、福建、江西、湖南、云南等省(自治区)的桉树商品林区, 严重影响了桉树产业的正常发展, 仅广西, 从 2007 年首次发现至 2009 年就有 6500  $\text{hm}^2$  桉树受害(常润磊和周旭东, 2010)。

植物在面对昆虫进攻时, 可以通过很多防御手段对其抵抗。植物的抗虫性可分为组成抗性和诱导抗性。前者是植物的固有特性, 因基因型的不同而有差别, 始终存在于植物体内并起作用, 但会因环境条件的改变而改变抗性程度; 而后者则是在遇到外界伤害, 如机械损伤、植食者取食和病原菌侵染时植物影响植食者行为或降低其嗜好性的反应(Kang *et al.*, 2018a; Thibout *et al.*, 1993), 是一种类似于免疫反应的抗性现象(Agrawal *et al.*, 1999)。虽然植物具有强大复杂的防御体系, 但是植食性昆虫在与植物的长期协同进化中演化出多种反防御措施来维持种群的发展。除了在同种昆虫不同个体间的协同作用中出现外, 植食性昆虫的反防御还出现在不同种昆虫之间的交互作用中(Bruinsma & Dicke, 2008; Kang *et al.*, 2018b; Kessler *et al.*, 2004), 包括行为防御(Bernay, 1998)、生理防御与生物化学防御机制等(刘芳华等, 2017; Qngsma *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 2005)。昆虫伴生细菌是指栖息在昆虫肠道、体表、口腔等部位的一些与昆虫关系密切的微生物, 它们在昆虫的生活史中扮演着重

要的角色(Engel & Moran, 2013)。如红脂大小蠹肠道细菌可以帮助昆虫降解寄主油松的单萜(Xu *et al.*, 2016), 肠道细菌可以促进玉米根虫对植物的适应力(Chu *et al.*, 2013)。

近年来, 有关桉树与桉树枝瘿姬小蜂的互作研究取得了一些突破性进展, 但主要集中在桉树抗虫生理生化机理方面(刘慧清, 2012; 吕文玲等, 2012; 王伟等, 2012; 吴耀军等, 2010)。这些研究结果表明, 在遭受桉树枝瘿姬小蜂危害后, 桉树能够通过大量合成植物防御性次生代谢物和激活防御酶活性来抵御桉树枝瘿姬小蜂的持续危害。而桉树枝瘿姬小蜂如何克服寄主桉树抗性的研究还未见报道。

现已报道的植食性昆虫克服寄主抗性主要集中在以下 2 个方面: 自身解毒酶系统和伴生微生物代谢系统(Jeschke *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2013; Zou *et al.*, 2016)。本研究拟测定桉树次生代谢物质黄酮和单宁的含量, 研究分离得到的桉树枝瘿姬小蜂伴生细菌对桉树抗性物质的耐受性和代谢能力进行分析, 旨在揭示桉树枝瘿姬小蜂伴生细菌在其寄主定殖过程中是否有协同作用, 是否可帮助其寄主克服桉树次生代谢物质的毒害作用, 进而为桉树枝瘿姬小蜂的微生物生态研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试植物和细菌

供试桉树: DH201-2(巨园桉 *Eucalyptus grandis* × *E. tereticornis*) 和 A107(*E. urophylla*) 来自广西林业科学研究所和广西东口林场。

供试细菌: B1(*Staphylococcus cohnii*)、B2(*Curvobacterium oceanosedimentum*)、B3(*Bacillus wiedmannii*)、B4(*Pseudomonas geniculata*)、B5(*Serratia marcescens*) 和 B6(*Klebsiella quasipneumoniae*) 来自中国科学院动物研究所森林化学生态实验室。

### 1.2 桉树次生代谢物质黄酮和单宁的含量测定

1.2.1 黄酮含量测定 选取不同品系和易感品系危害前后的桉树枝条, 烘干至恒重, 粉碎过 40 目筛

备用。

测定方法: 使用植物类黄酮含量检测试剂盒 (Solarbio, China) 测定桉树枝条中黄酮的含量。

1.2.2 单宁含量测定 选取不同品系和易感品系危害前后的桉树枝条, 烘干至恒重, 粉碎过 60 目筛备用。

测定方法: 称取样品 0.05 g (3 个重复), 放入 5 mL 离心管内, 加水 4 mL, 摇匀, 放置在 80 °C 水浴上提取 30 min, 每隔约 10 min 摇匀一次。然后迅速置于冷水浴中冷却, 加水定容到 5 mL, 摇匀, 过滤。若滤液浑浊, 重复过滤一次。吸取滤液 0.1 mL 到试管中, 加入 4.9 mL 的水稀释, 然后加入 0.2 mL 福林酚试剂, 摇匀, 5 min 后加 1 mL 的饱和碳酸钠溶液, 摇匀, 此时溶液显示蓝色。室温静置 30 min, 用酶标仪于 760 nm 处测定其光密度。同时以蒸馏水作空白调零。

### 1.3 黄酮和单宁对桉树枝瘿姬小蜂伴生细菌的生长影响

1.3.1 黄酮和单宁对伴生细菌的毒性 黄酮和单宁最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 测定实验用来检验次生代谢物质黄酮和单宁是否对桉树枝瘿姬小蜂伴生细菌有利。2 种化学物质的最低抑菌浓度实验参考 Cosentino *et al.* (1999) 的培养基液体微稀释法。具体操作如下: (1) 所有待测的 6 株细菌在 LB 培养基中过夜培养; (2) 将黄酮和单宁分别溶解于二甲基亚砷和无菌水中, 并加到含有 LB 培养基的 96 孔板 (Greiner, Germany) 中, 黄酮按照 20、40、60、80、100、120、140、160 ng · μL<sup>-1</sup> 的浓度稀释, 单宁按照 500、1000、1500、2000、3000、4000、5000、6000 ng · μL<sup>-1</sup> 的浓度稀释; (3) 过夜培养的 6 株细菌调整其  $D_{600\text{nm}}$  为 0.5, 并稀释 100 倍于 96 孔板中; (4) 将 96 孔板放于 25 °C 恒温培养箱中培养 12 h; (5) 12 h 后, 检查每个孔, 看是否有菌长出 (肉眼观察), 可以抑制细菌生长的浓度为最低抑菌浓度。以上每种细菌的每个浓度做 3 个重复。

1.3.2 黄酮和单宁对伴生细菌的生长影响 黄酮对伴生细菌的生长影响: 2 种细菌 (B1 和 B4) 在 MRS 肉汤培养基上培养。首先, 30 °C 恒温摇床 180 r · min<sup>-1</sup> 条件下培养 24 h, 调整细胞密度  $D_{600\text{nm}} = 0.5$  左右, 并将菌液稀释 100 倍至 4 mL MRS 肉汤培养基。然后将黄酮溶解于二甲基亚砷 (dimethyl

sulfoxide, DMSO) 中, 每只摇菌管中加入 40 μL 黄酮/DMSO 溶液于培养基内, 最终使微生物悬浮液浓度分别为 10、30、50、60、70、80 ng · μL<sup>-1</sup>, 每一浓度设置 5 个重复。然后在 30 °C 恒温摇床 180 r · min<sup>-1</sup> 条件下培养 24 h。之后在 600 nm 可见光条件下检测不同黄酮浓度条件下细菌悬浮液的光密度。对照组中不含黄酮, 只含有等量的 DMSO, 每种细菌都设置一个对照, 对照也设置 5 个重复。

单宁对伴生细菌的生长影响: 3 种细菌 (B3、B5 和 B6) 在 M9 矿物质盐培养基上培养。首先, 30 °C 恒温摇床 180 r · min<sup>-1</sup> 条件下培养 24 h, 调整细胞密度  $D_{600\text{nm}} = 0.5$  左右, 将菌液稀释 100 倍至 4 mL M9 矿物质盐培养基。然后将单宁溶解于无菌水中, 每只摇菌管中加入 40 μL 单宁水溶液于培养基内, 使微生物悬浮液浓度分别为 1000、2000、3000、4000、5000、6000 ng · μL<sup>-1</sup>, 每一浓度设置 5 个重复。在 30 °C 恒温摇床 180 r · min<sup>-1</sup> 条件下培养 24 h。在 600 nm 可见光条件下检测不同单宁浓度条件下细菌悬浮液的光密度。对照组中不含单宁, 每种细菌都设置一个对照, 对照也设置 5 个重复。

### 1.4 桉树枝瘿姬小蜂伴生细菌对黄酮和单宁的降解能力测定

1.4.1 伴生细菌对黄酮的降解能力 黄酮降解实验在 14 mL 摇菌管内进行。向每只摇菌管中加入 4.9 mL 的 MRS 肉汤培养基, 加入 50 μL 的黄酮/DMSO 溶液 (终浓度为 50 ng · μL<sup>-1</sup>), 各用 50 μL 的细菌 B1 和 B4 接种, 37 °C 恒温摇床 180 r · min<sup>-1</sup> 恒温摇床培养。在 0、2、12 和 24 h 分别吸取混合液 400 μL, 12000 g 离心 5 min, 弃上清, 用 400 μL 的甲醇溶解沉淀, 涡旋混匀后, 12000 g 离心 5 min, 取上清液 100 μL 于样品瓶内, 储存于 -20 °C 用于 HPLC 上机检测。每种细菌设置 6 组重复, 空白对照未接种细菌, 只加入黄酮/DMSO 溶液, 也设置 6 组重复。使用 Agilent 1100 series 高效液相色谱仪检测样品中黄酮的含量。具体方法如下: 流动相 A 色谱级甲醇; 流动相 B 2% 乙酸水溶液。流动相以 0.8 mL · min<sup>-1</sup> 的流速运行, 20 min 甲醇上升至 5% ~ 30%, 5 min 内甲醇上升至 30% ~ 50%, 5 min 内甲醇上升至 50% ~ 65%, 65% 的甲醇保持 5 min, 甲醇在 7 min 内上升至 65% ~ 100%。色谱分离柱为 Agilent C30 柱 (250 min × 4.6 mm L.D.), 每次进样 20 μL, 每次在样品检测前先运行同样体积的标准品,

做出标准曲线用于计算样品浓度。

1.4.2 伴生细菌对单宁的降解能力 单宁降解实验在摇菌管内进行。向每只摇菌管中加入 4.9 mL 的 M9 矿物盐培养基,加入 50 μL 的单宁水溶液(终浓度为 1000 ng · μL<sup>-1</sup>),各用 50 μL 的细菌 B3、B5 和 B6 接种后,28 °C 恒温摇床 180 r · min<sup>-1</sup> 培养。在 0、12、24 和 48 h 各吸取混合液 1 mL,加入 2.4 mL 乙醇洗涤,手动摇匀 5 min,然后 5000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min,重复洗涤一次,将 2 次提取液混合在一起,放入超声浴液中 30 min,充分溶解沉淀,吸取上清液于样品瓶中储存于 -20 °C 用于 HPLC 上机检测。每种细菌设置 6 组重复,对照组只加入单宁,不接菌,也设置 6 组重复。使用 Agilent 1100 series 高效液相色谱仪检测样品中单宁的含量。具体方法如下:流动相 A2%乙酸水溶液;流动相 B(超纯水/乙腈/乙酸,78/20/2,V/V/V);流动相以 1 mL · min<sup>-1</sup> 的流速运行,0~55 min 内乙腈/乙酸水溶液增加至 80%,55~57 min 内乙腈/乙酸水溶液增加至 80%~90%,55~57 min 内乙腈/乙酸水溶液保持 90%,70~80 min 内乙腈/乙酸水溶液增加至 90%~95%,甲醇在 10 min 内增加至 95%~100%,90~120 min 使用甲醇清洗。色谱分离柱为 Agilent C30 柱(250 min×4.6 mmL.D.),每次样品进样 20 μL,每次在样品检测前先运行同样体积的标准品,做出标准曲线用于计算样品浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 桉树次生代谢物质黄酮和单宁的含量

实验结果显示,不同品系(A107 和 DH201-2)健康的桉树次生代谢物质黄酮和单宁的含量与健康品系(DH201-2)桉树遭受小蜂危害后黄酮和单

宁的含量差异显著。在高抗品系 A107 中类黄酮和单宁含量均显著高于高感品系 DH201-2(独立样本 *t* 检验, $P<0.001$ )。其中,A107 中黄酮、单宁含量分别为(4.32±0.12)、(62.62±1.57) mg · g<sup>-1</sup>;DH201-2 中黄酮、单宁含量分别为(1.43±0.23)、(45.75±2.42) mg · g<sup>-1</sup>。高感品系桉树 DH201-2 在遭受桉树枝瘿姬小蜂危害前后体内黄酮和单宁含量发生明显变化,危害后黄酮、单宁含量分别为(4.11±0.07)、(82.06±1.76) mg · g<sup>-1</sup>。

### 2.2 桉树次生代谢物质黄酮和单宁对伴生细菌的毒性

最低抑菌实验结果显示,黄酮的抑菌范围从 40 ng · μL<sup>-1</sup> 到 80 ng · μL<sup>-1</sup>,而单宁的抑菌范围则从 1000 ng · μL<sup>-1</sup> 到 6000 ng · μL<sup>-1</sup>(表 1 和表 2)。6 株细菌对黄酮和单宁的耐受存在差异:B2、B3、B5 和 B6 对黄酮比较敏感,而 B1 和 B4 对黄酮耐受能力较强;B1、B2 和 B4 对单宁较为敏感,而 B3、B5 和 B6 对单宁耐受能力较强。

表 1 6 株伴生细菌对黄酮和单宁的最低抑菌浓度 (ng · μL<sup>-1</sup>)

Table 1 Minimum inhibitory concentrations (ng · μL<sup>-1</sup>) of flavonoids and tannins against the six bacterial isolates

菌株代号 Isolate numbers	种 Species	黄酮 Flavonoid	单宁 Tannin
B1	<i>Staphylococcus cohnii</i>	80	1500
B2	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	40	1000
B3	<i>Bacillus wiedannii</i>	40	5000
B4	<i>Pseudomonas geniculata</i>	80	1000
B5	<i>Serratia macescens</i>	40	>6000
B6	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i>	40	6000

表 2 6 株伴生细菌对黄酮和单宁的最低抑菌浓度 (ng · μL<sup>-1</sup>) 的描述性统计

Table 2 Descriptive statistics of minimum inhibitory concentrations (ng · μL<sup>-1</sup>) of flavonoids and tannins against the six bacterial isolates

抗菌剂 Antibacterial agent	<i>n</i>	最低抑菌浓度的中位数 Median	抑制待测菌株数 50% 的最低抑菌浓度 MIC <sub>50</sub>	抑制待测菌株数 90% 的最低抑菌浓度 MIC <sub>90</sub>	出现次数最多的最低抑菌浓度 Mode <sup>*</sup>	最低抑菌浓度范围 MIC range	敏感性 Susceptibility/%
黄酮 Flavonoid	6	40	40	80	40	20~180	100
单宁 Tannin	6	3250	1500	5000	1000	500~>6000	83.33

### 2.3 桉树次生代谢物质黄酮和单宁对伴生细菌的生长影响

7 种浓度 0、10、30、50、60、70 和 80 ng · μL<sup>-1</sup> 的黄酮对桉树枝瘿姬小蜂伴生细菌 B1 和 B4 的生长

影响见图 1A。其中,10 ng · μL<sup>-1</sup> 的黄酮对 2 种细菌均无明显的抑制作用,在其余浓度下,随着黄酮浓度的升高,其对细菌的抑制作用越明显。在高浓度 80 ng · μL<sup>-1</sup> 黄酮的条件下,2 种细菌生长受到完

全抑制。

7 种浓度 0、1000、2000、3000、4000、5000 和 6000  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  的单宁对桉树枝瘿姬小蜂伴生细菌 B3、B5 和 B6 的生长影响见图 1B。在低浓度 1000  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  单宁条件下,3 种细菌生长均不受影响;在

单宁浓度超过 2000  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  开始,各种细菌的生长均会受到抑制,细菌 B3 在超过 5000  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  单宁条件下则完全不能生长,细菌 B6 在 6000  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  单宁条件下生长受到完全抑制。

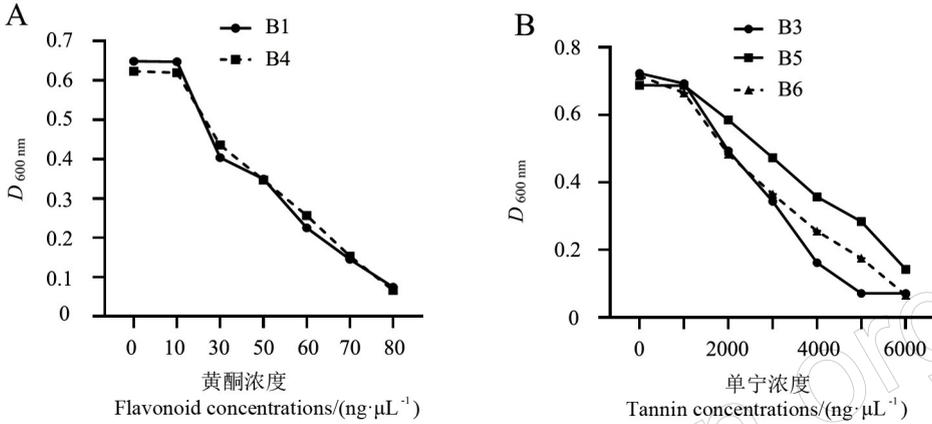


图 1 伴生细菌在不同浓度黄酮和单宁条件下的生长情况

Fig.1 Growth of different bacteria at different concentrations of eucalyptus flavonoids and tannins

### 2.4 伴生细菌对黄酮和单宁的降解能力

2 种细菌 B1 和 B4 在不同时间降解黄酮的能力见图 2A。其中,在 24 h 处 2 种细菌对黄酮的降解率分别达到了 27.35% 和 21.14%, 说明 2 种细菌具有一定的降解黄酮的能力。

能力见图 2B。其中,B6 在 12、24 和 48 h 单宁浓度没有显著差异,说明该细菌对单宁降解能力一般。而 B3、B5 在 48 h 时单宁的降解率分别达到了 44.82% 和 48.36%,2 种细菌均具有较强的降解单宁的能力(单因素方差分析, $P < 0.05$ )。

3 种细菌 B3、B5 和 B6 在不同时间降解单宁的

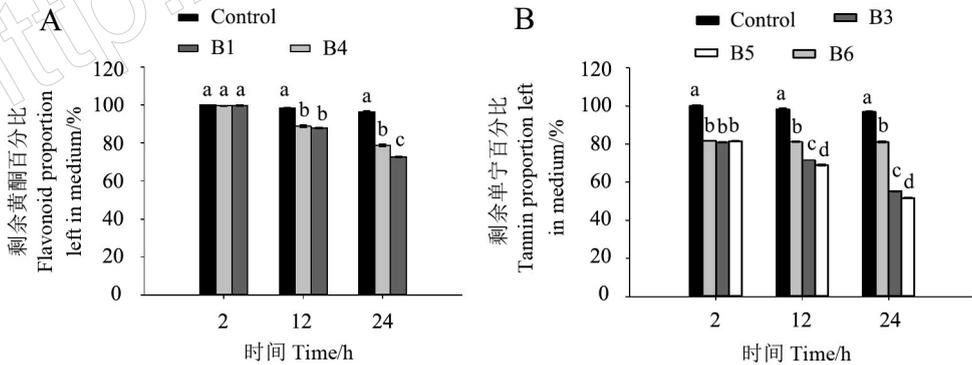


图 2 伴生细菌在不同时间降解黄酮和单宁的浓度变化

Fig.2 Changes of flavonoid degradation concentration of two bacteria B1 and B4 at different times

不同小写字母表示在 5% 水平上差异显著。

Different letters indicate significant differences at 5% level.

### 3 讨论

在植物与昆虫的长期协同进化过程中,植物为避免植食性昆虫的危害,形成或诱导产生多种特有的次生化合物,这些化合物对大多数昆虫起着化学防御作用(洗继东等,2003)。这些植物次生物质虽非营养物质,但具有防御和保护植物免受昆虫危害

的功能。有研究表明,植物在抵御病虫害中,次生代谢产物比任何其他自然因素都更为重要和有效。随着植食性昆虫的取食,许多次生代谢产物在昆虫体内不断积累,从而使昆虫生长发育减缓或繁殖率降低,甚至导致昆虫死亡(吕蕾,2010;薛英伟等,2009;张彦广等,2001;周丹丹,2008)。桉叶中

黄酮类化合物的研究较早,20 世纪 60 年代 Hillis (1966) 研究了 200 余种桉叶中的黄酮类化合物,发现大多含有槲皮素、杨梅素和山奈酚。近年来,研究者从桉属植物中得到了 38 个黄酮类化合物,其结构为黄酮或黄酮醇及其苷类、二氢黄酮或者二氢黄酮醇及其苷类 (Amakura *et al.*, 2009)。Hou *et al.* (2000) 从桉叶中分离出一种没食子单宁酸成分和 4 种可水解的单宁酸、没食子酸及儿茶酚等。张华峰 (2013) 发现,桉树枝瘿姬小蜂产卵能明显影响桉树叶黄酮、单宁和总酚等次生代谢物质的含量。而戴沿海 (2006) 也发现,松树通过增加黄酮的合成量来抵御松突圆蚧的危害。此外,落叶松针叶中单宁等物质含量与松毛虫危害程度呈负相关,说明了单宁是一类可作为树种抗性的标志的化学防御物质 (王燕等, 2001)。石媛媛等 (2017) 通过对混交林和纯林中油松不同处理,发现松毛虫取食可诱导增加油松针叶内的缩合单宁和黄酮含量,进而增强油松的抗虫性。本研究发现,高抗品系和被桉树枝瘿姬小蜂危害后的高感品系中黄酮和单宁的含量显著性高于健康高感品系。以上结果表明,黄酮和单宁是桉树低于桉树枝瘿姬小蜂危害的主要防御性代谢物质。

在植物与植食性昆虫协同进化过程中,植物在不断完善其防御反应,同时植食性昆虫也在选择压下不断适应植物防御反应。在植食性昆虫适应植物防御反应的反防御策略也呈现多样性。如昆虫利用其唾液及伴生微生物抑制植物防御反应和降解其次生代谢物等 (Engel & Moran, 2013; Hammer & Bowers, 2015; Hansen & Woran, 2014; Lin *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016; Mason *et al.*, 2014)。黄酮类化合物经人体摄入后,大部分不经降解而进入大肠,经由肠道菌群酶的生物转化成简单酚酸后被吸收或排泄 (Serra *et al.*, 2012)。周锡钦等 (2009) 研究发现,从黄芩中提取的黄酮类化合物能够显著抑制白色念珠菌 *Monilia albican* 的生长。黄酮类化合物对金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、大肠埃希杆菌 *Escherichia coli* 和枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 等的抑制作用较为明显。单宁能够抑制多种革兰氏阳性菌 (如金黄色葡萄球菌、链球菌等) 和革兰氏阴性菌 (如沙门菌、螺杆菌、大肠杆菌、梭菌、弯曲杆菌和芽孢杆菌等) 的生长,并且革兰氏阳性菌通常比革兰氏阴性菌更敏感 (Daglia, 2012)。黄文和

石碧 (2003) 和吕远平等 (2003) 分别从堆放橡椀的土壤中分离到能降解单宁的黑曲霉、内孢霉和假丝酵母。黄文等 (2003) 从内孢霉菌丝体中不但检测出单宁酶活性,还检测到多酚氧化酶 (PPO) 活性,并证实单宁的降解不仅与单宁酶有关,还与多酚氧化酶有关。本研究发现,一些桉树枝瘿姬小蜂伴生细菌具有对黄酮和单宁的高耐受性和代谢能力。进而推测其可能在桉树枝瘿姬小蜂克服桉树抗性的过程中扮演了重要作用。但其在自然环境中的实际能力还需后续研究证明,同时其降解的机制也值得进一步研究。

综上所述,本研究发现高抗品系 (A107) 桉树体内次生代谢物质黄酮和单宁的含量均显著性高于高感品系 (DH201-2) 桉树。同时,高感品系桉树遭受桉树枝瘿姬小蜂危害后,体内次生代谢物质黄酮和单宁的含量显著提高,2 种物质是桉树抵御桉树枝瘿姬小蜂侵害的主要防御物质,说明桉树枝瘿姬小蜂诱导桉树产生了抗性,高浓度的黄酮和单宁会抑制桉树枝瘿姬小蜂伴生细菌的生长。在低浓度情况下,伴生细菌可以适应,并继续繁殖;在高浓度情况下,主要伴生细菌会被毒杀,而且黄酮的抑制作用更为明显。桉树枝瘿姬小蜂主要伴生细菌在一定浓度的次生代谢产物黄酮和单宁条件下能够生存,并且具有降解黄酮和单宁的能力。在一定的时间内,可以降解大部分次生代谢物质,帮助宿主桉树枝瘿姬小蜂解除和适应桉树的黄酮和单宁防御。

## 参考文献

- 常润磊, 周旭东, 2010. 桉树枝瘿姬小蜂国外研究现状. 中国森林病虫, 29(1): 22-25.
- 戴沿海, 2006. 松突圆蚧为害对马尾松针叶主要次生物质的影响. 华东昆虫学报, 15(2): 103-106.
- 祁述雄, 2002. 中国桉树. 2 版. 北京: 中国林业出版社.
- 黄文, 石碧, 2003. 橡椀单宁降解酶特性的研究. 北京大学学报(自然科学版), 39(4): 579-582.
- 刘芳华, 康志伟, 胡想顺, 张战凤, 刘同先, 2017. 小麦叶片营养物质与抗麦长管蚜的相关性分析. 植物保护学报, 44(2): 305-311.
- 吕蕾, 2010. 杨树对天牛抗性的研究进展. 现代农业科技, 35(8): 170-172.
- 吕文玲, 李诺, 杨振德, 玉舒中, 徐丽, 赵岩岩, 2012. 桉树枝瘿姬小蜂危害对桉树化学成分的影响. 安徽农业科学,

- 40(12): 7137-7139.
- 吕远平, 姚开, 何强, 谭敏, 2003. 橡椀单宁的生物降解. 四川大学学报(工程科学版), 35(3): 104-106.
- 石媛媛, 冯金周, 于连海, 高宝嘉, 2017. 昆虫取食和剪叶刺激对油松针叶内部分防御物质的诱导效应. 河北农业大学学报, 40(1): 81-86.
- 刘慧清, 2012. 不同桉树种质对桉树枝瘿姬小蜂的抗性研究. 硕士学位论文. 海口: 海南大学.
- 王豁然, 郑勇奇, 臧道群, 张泽, 黄永祥, 1999. 单萜盖亚属桉树引种及其生物地理学意义. 林业科学(2): 5-9.
- 王伟, 徐建民, 李光友, 韩超, 吴世军, 陆钊华, 2012. 24个桉树品种遭受桉树枝瘿姬小蜂危害后保护酶活性变化. 中南林业科技大学学报(自然科学版), 32(6): 55-59.
- 王燕, 戈峰, 李镇宇, 2001. 马尾松诱导化学物质变化的时空动态. 生态学报, 21(8): 1256-1261.
- 吴耀军, 常明山, 李德伟, 秦元丽, 盛双, 2010. 桉树枝瘿姬小蜂危害对桉树类黄酮、花色苷含量的影响. 广西林业科学, 39(1): 119-123.
- 洗继东, 庞雄飞, 曾玲, 2003. 异源次生化合物对美洲斑潜蝇种群控制作用的田间试验. 应用生态学报, 14(1): 97-100.
- 徐建民, 白嘉雨, 陆钊华, 2001. 华南地区桉树可持续遗传改良与育种策略. 林业科学研究, 14(6): 587-594.
- 薛英伟, 2009. 柘叶 [*Cudrania tricuspidata* (Carr.) Bur.] 饲养对家蚕抗性生理影响的研究. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学.
- 张彦广, 王志刚, 黄大庄, 2001. 桑天牛羧酸酯酶和谷胱甘肽S-转移酶与杨树次生代谢物质相关性研究. 林业科学, 37(3): 106-111.
- 周丹丹, 2008. 棉花对烟粉虱刺吸胁迫的生理响应. 硕士学位论文. 兰州: 甘肃农业大学.
- 张华峰, 2013. 桉树枝瘿姬小蜂侵害机理及寄主桉树化学防御研究. 硕士学位论文. 福州: 福建农林大学.
- 周锡钦, 梁鸿, 路新华, 蔡少青, 王邠, 赵玉英, 2009. 中药黄芩主要黄酮类成分及其生物活性研究. 北京大学学报(医学版), 41(5): 578-584.
- AGRAWAL A A, STRAUSS S Y, STOUT M J, 1999. Costs of induced responses and tolerance to herbivory in male and female fitness components of wild radish. *Evolution*, 53(4): 1093-1104.
- AMAKURA Y, YOSHIMURA M, SUGIMOTO N, YAMAZAKI T, YOSHIDA T, 2009. Marker constituents of the natural antioxidant *Eucalyptus* leaf extract for the evaluation of food additives. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(5): 1060-1065.
- AYTAR F, 2006. Natural history, distribution and hosts of eucalyptus gall wasps in Turkey. *European Congress of Entomology*, 8: 17-22.
- BERNAYS E A, 1998. Evolution of feeding behavior in insect herbivores: success seen as different ways to eat without being eaten. *Bioscience*, 48: 35-44.
- BRUINSMA M, DICKE M, 2008. *Herbivore-induced indirect defence: from induction mechanisms to community ecology*// SCHALLER A. Induced plant resistance to herbivory. Berlin: Springer Publishers: 31-60.
- CHU C, SPENCER J, CURZI M, ZAVALA J, SEUFFERHELD M, 2016. Gut bacteria facilitate adaptation to crop rotation in the western corn rootworm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110: 11917-11922.
- COSENTINO S, TUBEROSO C I G, PISANO B, SATTÀ M, MASCIA V, ARZEDI E, PALMAS F, 1999. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29(2): 130-135.
- DAGLIA M, 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion of Biotechnology*, 23(2): 174-181.
- ENGEL P, MORAN N A, 2013. The gut microbiota of insects: diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37: 699-735.
- HAMMER T J, BOWERS M D, 2015. Gut microbes may facilitate insect herbivory of chemically defended plants. *Oecologia*, 179: 1-14.
- HANSEN A K, MORAN N A, 2014. The impact of microbial symbionts on host plant utilization by herbivorous insects. *Molecular Ecology*, 23: 1473-1496.
- HILLIS W E, 1966. Variation in Polyphenol composition within Species of *Eucalyptus L'herit.* *Phytochemistry*, 54: 541-556.
- HOU A, LIU Y, YANG H, LIN Z W, SUN H D, 2000. Hydrolysable tannins and related polyphenols from *Eucalyptus globulus*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2(3): 205-212.
- JESCHKE V, GERSHENZON J, VASSÃO D G, 2016. Insect detoxification of glucosinolates and their hydrolysis products. *Advances in Botanical Research*, 80: 199-245.
- KANG Z W, LIU F H, TAN X L, ZHANG Z F, ZHU J Y, TIAN H G, LIU T X, 2018a. Infection of powdery mildew reduces the fitness of grain aphids (Sitobionavenae) through restricted nutrition and induced defense response in wheat. *Frontiers in Plant Science*, 9: 778.
- KANG Z W, LIU F H, ZHANG Z F, TIAN H G, LIU T X, 2018b. Volatile  $\beta$ -ocimene can regulate developmental performance of peach aphid *Myzus persicae* through activation of

- defense responses in Chinese cabbage *Brassica pekinensis*. *Frontiers in Plant Science*, 9: 708.
- KESSLER A, HALITSCHKE R, BALDWIN I T, 2004. Silencing the jasmonate cascade: induced plant defenses and insect populations. *Science*, 305: 665–668.
- LU M, HULCR J, SUN J H, 2016. The role of symbiotic microbes in insect invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 47: 487–505.
- LIN X L, KANG Z W, PAN Q J, LIU T X, 2015. Evaluation of five antibiotics on larval gut bacterial diversity of *Plutellaxylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Insect Science*, 22(5), 619–628.
- LIU Y H, KANG Z W, GUO Y, ZHU G S, SHAH M M R, SONG Y, FAN Y L, JING X F, LIU T X, 2016. Nitrogen hurdle of host alternation for a polyphagous aphid and the associated changes of endosymbionts. *Scientific Reports*, 6: 24781.
- MASON C J, COUTURE J J, RAFFA K F, 2014. Plant-associated bacteria degrade defense chemicals and reduce their adverse effects on an insect defoliator. *Oecologia*, 175: 901–910.
- QNGSMA M A, BAKKER P L, PETERS J, BOSCH D, STIEKEMA W J, 1995. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 8041–8045.
- SERRA A, MACIÀ A, ROMERO M P, REGUANT J, ORTEGA N, MOTILVA M J, 2012. Metabolic pathways of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavanones) and phenolic acids. *Food Chemistry*, 130: 383–393.
- SUN J H, LU M, GILLETTE N E, WINGFIELD M J, 2013. Red turpentine beetle: innocuous native becomes invasive tree killer in China. *Annual Review of Entomology*, 58: 293–311.
- THIBOUT E, GUILLOT J F, AUGER J, 1993. Microorganisms are involved in the production of volatile kairomones affecting the host seeking behaviour of *Diadromus pulchellus*, a parasitoid of *Acrolepiopsis assectella*. *Physiological Entomology*, 18: 176–182.
- XU L, LU M, SUN J, 2016. Invasive bark beetle-associated microbes degrade a host defensive monoterpene. *Insect Science*, 23: 183–190.
- ZHU-SALZMAN K, BI J L, LIU T X, 2005. Molecular strategies of plant defense and insect counter-defense. *Insect Science*, 12: 3–15.
- ZOU X P, XU Z B, ZOU H W, LIU J S, CHEN S N, FENG Q L, ZHENG S C, 2016. Glutathione S-transferase SIGSTE1 in *Spodopteralitura* may be associated with feeding adaptation of host plants. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 70: 32–43.

(责任编辑:郭莹)