

植物茸毛及其防禦物質在抗蟲上扮演的角色

廖君達

摘要

植物茸毛(trichomes)是源自於植物葉片或其他器官表皮細胞的小型突出物，區分為腺毛及非腺毛兩大類，可協助植物面對不同的生物及非生物逆境。當植物遭逢有害生物攻擊時，茸毛的密度及形狀具有防禦的功能；而且，新生葉片會增加茸毛的密度以因應後續的為害。植物葉片表面的腺毛會分泌多種具抗蟲功能的二次代謝物，可降低害蟲的生長發育及群聚偏好性。此外，具有抑制昆蟲腸道蛋白酶消化能力的蛋白酶抑制劑相對應的基因，在植物腺毛同樣出現誘發表現的情形。

前言

植物茸毛是源自於植物葉片或其他器官表皮細胞的小型突出物。茸毛的尺寸、形狀、密度及細胞數量等在不同物種間，或在個別植物相同部位或不同部位，常有極大的差異(Martin and Glover, 2007)。茸毛對於植物而言有不同的功能，高密度的茸毛可反射入射光，降低葉片過多的熱負載；並能在葉表形成邊界層(boundary layer)，使得空氣移動降低，進而減緩葉片蒸散作用，被視為植物適應乾燥環境的重要方式(Benz and Martin, 2006)。茸毛也在植物面對生物性逆境(包括細菌、真菌及植食者等)扮演積極的角色。茸毛一般區分為非腺毛(non-glandular trichomes)及腺毛(glandular trichomes)兩大類。非腺毛能夠物理性阻礙昆蟲在植物表面的移動，甚至使小型植食者陷入其中而死亡(Kavousi *et al.*, 2009)。腺毛常具有頭部，能夠合成、儲存或分泌特殊的代謝物，包括甲基酮(methyl ketones)、醯糖類(acyl sugars)、萜類(terpenes)及生物鹼(alkaloids)等，這些物質接觸到昆蟲或被昆蟲取食後，可協助植物對抗害蟲的攻擊(Schillmiller *et al.*, 2008)。此外，聚積於茸毛之蛋白酶抑制劑(proteinase inhibitor)及多酚氧化酶(polyphenol oxidase)會受到昆蟲取食的誘導而大量生成，可抑制取食昆蟲對營養的利用，降低昆蟲的體重及提高死亡率(Schillmiller *et al.*, 2008)。本專題在討論植物茸毛在新生葉片的誘發、茸毛密度的效果及茸毛內防禦相關的二次代謝物、蛋白質等，在植物面對昆蟲取食危害的調控與功能。

內容

一、植物茸毛在新生葉片的誘發

Traw and Dawson(2002)以發育階段為4片完全展開葉的黑芥菜(*Brassica nigra*)為材料，比較紋白蝶(*Pieris rapae*)幼蟲、粉斑夜蛾(*Trichoplusia ni*)幼蟲及黑芥菜葉蚤(*Phyllotreta cruciferae*)取食12小時，對於黑芥菜後續新生長葉片表面茸毛的影響。當黑芥菜植株分別生長至5、7、9、11片完全展開葉的發育階段，調查最新生長葉片的茸毛密度及葉片面積等。發現紋白蝶幼蟲取食對黑芥菜葉片茸毛的誘發最為快速，第7葉的茸毛密度相較於對照增加76%。粉斑夜蛾幼蟲取食對第9葉的茸毛密度相較於對照相同葉位葉片增加113%。植株受到紋白蝶幼蟲及黑芥菜葉蚤取食，第9葉之茸毛密度相較於對照，未達顯著性差異。至於第11個葉片的茸毛數量於昆蟲取食植株與對照間未達到顯著性差異。顯示植物受到昆蟲取食危害後，後續新生長葉片的茸毛密度會受到誘導而增加，但這些反應受到取食昆蟲種類或葉位的影響。此外，無論是第7、9、11葉位的葉片面積於受害及對照植株間未達到顯著性差異。顯示葉片茸毛密度的增加是由於產生較多的茸毛數量，而非葉片面積的減少(Traw and Dawson, 2002)。

灰毛柳(*Salix cinerea*)葉片以柳金花蟲(*Phratora vulgatissima*)成蟲連續取食9天，約消耗10%的葉片面積，另以直徑1 mm穿孔器模擬柳金花蟲取食及未傷害為對照。供試植株生長22天後，各處理分別調查5片上位葉及下位葉的茸毛數量。另將柳金花蟲幼蟲接於不同處理植株的上位葉，連續取食48小時後移除幼蟲，調查幼蟲重量、消耗葉片面積及葉片食孔面積等。預先柳金花蟲取食可造成灰毛柳新生長葉片有最高的茸毛密度，機械性傷害次之，對照最低。下位葉的茸毛密度於各處理間，未達到顯著性差異(Dalin and Bjorkman, 2003)。幼蟲取食後體重的變化，於各處理間未達到顯著性差異。對照組葉片被幼蟲取食量最高，預先機械性傷害處理次之，預先成蟲取食之植株葉片被取食面積最小。幼蟲平均食孔面積比較，以預先成蟲取食為最小，對照為最大。然而，預先成蟲取食有最多的食孔(8.9 ± 1.2 /葉)，預先機械性傷害次之(6.6 ± 1.3 /葉)，對照最少(4.9 ± 0.5 /葉)。預先柳金花蟲成蟲取食可誘發新葉產生較多的茸毛，使得柳金花蟲幼蟲減少對新葉的取食，顯示植物茸毛在新葉的誘發，可提供灰毛柳面對後續昆蟲危害的防禦能力(Dalin and Bjorkman, 2003)。

昆蟲取食或機械性傷害阿拉伯芥(*Arabidopsis*)葉片，均會促使葉片的茉莉酸(jasmonic acid)快速增加，進而啟動後續防禦相關基因的表現(Reymond *et al.*, 2000)。Traw and Bergelson(2003)為瞭解機械性傷害及茉莉酸對於茸毛的誘發作用，以19天株齡，生長6~8片葉的阿拉伯芥為材料，試驗處理分別為使用有鋸齒狀的鑷子擠壓最大的三片葉子1或2次，或以0.1及1 mM茉莉酸處理葉片，並以未處理為對照。當阿拉伯芥植株長出第2片新葉，測定各處理植株該葉片的茸毛密度及數量。3個供試阿拉伯芥品系經過機械性傷害後，新葉茸毛密度及數量均高於對照25%~117%不等。而且，阿拉伯芥葉片經過茉莉酸處理，新葉茸毛密度及數量均顯著地高於對照。顯示機械性傷害及茉莉酸均可顯著誘發阿拉伯芥葉片茸毛的產生。

二、植物茸毛形態及二次代謝物對昆蟲的影響

番茄屬(*Lycopersicum*)植物有7種不同型式的茸毛，第II、III、V型為非腺毛，第I、IV、VI、VII型為具有腺體的腺毛。Kang et al. (2010) 選擇一個無茸毛(hairless, hl)的番茄隱性突變株與野生型株(wild-type, WT)相比較，分別調查2者的茸毛形態、數量及密度。以光學顯微鏡及冷凍電子顯微鏡觀察hl突變株及WT之莖、葉及胚軸的茸毛形態，hl突變株的第I型茸毛無法與植物表面呈直角挺立，呈現高度的彎曲及膨脹；WT之第VI型茸毛具有多細胞的短柄及1個具有4個細胞的腺體頭部，而hl突變株第VI型茸毛呈現不規則的形狀，腺體頭部就像放倒在葉片表面。第VI型茸毛是番茄葉片表面最主要的茸毛。hl突變株葉片表面的第I型及第VI型茸毛密度降低為WT的57%及70%。然而，第VII型茸毛在hl突變株及WT之葉片未達到顯著性差異。顯示hl突變株主要是改變茸毛的形態，其次為茸毛密度的改變(Kang et al., 2010)。

將菸草夜蛾(*Manduca sexta*)幼蟲連續8或10天飼養於hl突變株及WT後，紀錄幼蟲的重量。發現飼養於hl突變株的菸草夜蛾幼蟲的重量顯著高於飼養於WT的個體。顯示hl突變株葉片茸毛在形態的變異可能會影響到番茄植株面對昆蟲取食的交互作用，增加對菸草夜蛾的感受性(Kang et al., 2010)。

植物葉片表面茸毛的分泌液包括多種具抗蟲功能的二次代謝物(Schilmiller et al., 2009)。Kang et al. (2010)使用葉片浸洗法(leaf dip method)及分離第VI型茸毛來取得hl突變株及WT之葉片表面分泌液，再應用氣相層析質譜儀(GC-MS)分析萜類化合物。hl突變株葉片表面包括 α -蒎烯(α -pinene)、2-萜烯(2-carene)、 β -水芹烯(β -phellandrene)等的單萜類，維持與WT相近的含量；然而，包括 δ -欖香烯(δ -elemene)、 β -丁香烯(β -caryophyllene)及 α -葎草烯(α -humulene)在內的3種倍半萜類均顯著地降低。分析第VI型茸毛取得的萃取物得到相近的結果，hl突變株之倍半萜類含量為WT的20%。液相層析質譜儀(LC-MS)分析非萜類的化合物，發現hl突變株葉片表面的芸香苷(rutin)、山奈酚-鼠李糖苷(kaempferol-rhamnoside)及槲黃素-三糖(querctin-trisaccharide)的含量介於WT的46~72%；hl突變株第VI型茸毛之3-O-甲基楊梅黃酮(3-O-methylmyricetin)含量約為WT的25%。顯示hl突變株葉片之第VI型茸毛維持正常含量的單萜類，但缺乏多種倍半萜類化合物(Kang et al., 2010)。此外，由於飼養於hl突變株的菸草夜蛾幼蟲的重量顯著高於飼養於WT的個體。顯示hl突變株葉片茸毛化學組成的變異同樣可能會影響到番茄對菸草夜蛾的感受性(Kang et al., 2010)。

西柏三烯一醇(cembratriene-ol, CBT-ol)及西柏三烯二醇(cembratriene-diol, CBT-diol)是菸草(*Nicotiana tabacum*) cv. T. I. 1068葉片表面分泌液主要的雙萜類(diterpenes) (Wanger, 1999)。甘油醛-3-磷酸丙酮酸(glyceraldehyde-3-phosphate-pyruvate)途徑提供雙萜類先驅物的四異戊二烯焦磷酸(geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP)，並透過細胞色素P450羥化酶(cytochrome P450 hydroxylase)催化CBT-ol轉換為CBT-diol。將編號為1-31的腺毛專一細胞色素P450羥化酶基因的cDNA

轉殖到菸草(*Nicotiana tabacum*) cv. T. I. 1068，分別得到反義抑制(antisense suppression)轉植株1-31-2Q及協同抑制(co-suppression)轉植株FA3及FA4。P450 mRNA的量在1-31-2Q及FA3及FA4轉植株分別降至約為對照的25及10%。此外，1-31-2Q轉植株葉片茸毛分泌液的CBT-diol由原先對照總分泌液重量的60%降至約41%，而CBT-ol的量增加19倍，即為由原先總分泌液重量的1.4%提高到27%。至於FA3及FA4轉植株的CBT-ol的量增加至分泌液總量的29及43%。顯示1-31-2Q、FA3及FA4轉植株大幅提升CBT-ol的濃度，相對降低了CBT-diol的濃度，同時對應到P450 mRNA在轉植株腺毛含量的降低(Wang *et al.*, 2001)。

Wang *et al.* (2001)測試1-31-2Q 菸草轉植株及對照葉片茸毛分泌液對菸蚜(*Myzus nicotiana*)的劑量反應，顯示分泌物對蚜蟲的半致死劑量(50% lethal dose)於1-31-2Q轉植株及對照分別為20.8及32.2 μg / 蚜蟲。進一步比較菸蚜在菸草葉片的群集(colonization)反應，將蚜蟲接於1-31-2Q、FA4轉植株及對照葉片3週，發現1-31-2Q、FA4轉植株葉片僅有少量的個體。顯示轉植株茸毛分泌物含有高濃度的CBT-ol，具有較高的殺蚜蟲能力及大幅降低蚜蟲的群聚反應(Wang *et al.*, 2001)。

三、蛋白酶抑制劑基因在植物茸毛的表現

植物葉片受到傷害時，蛋白酶抑制劑(proteinase inhibitor, PIN)會被誘發生成，可以抑制昆蟲腸道蛋白酶的消化能力(Koiwa *et al.*, 1997)。Liu *et al.* (2006)將光果龍葵(*Solanum americanum*)的一個PIN2基因家族成員—SaPIN2b啟動子與報導基因(*GUS*)融合，轉殖到光果龍葵及菸草(*Nicotiana tabacum*)，以組織化學測定SaPIN2b: *GUS*在轉殖植物的表現情形。發現轉殖SaPIN2b: *GUS*的光果龍葵葉片短腺毛可偵測到*GUS*的表現，非腺毛及葉片細胞沒有偵測到*GUS*的活性，而菸草轉植株的短腺毛及高腺毛均顯現強的*GUS*表現。此外，未傷害處理的光果龍葵葉片僅在茸毛部分有*GUS*的染色；至於，光果龍葵轉植株經過機械性傷害後，整片葉片出現廣泛的*GUS*活性，特別在傷口周邊受到顯著地誘導。而且，以機械性傷害及茉莉酸甲酯(methyl jasmonate)處理轉植株葉片，*GUS*活性在光果龍葵及菸草轉植株均顯著地增加。Liu *et al.* (2006)推論SaPIN2b除了是重要的防禦蛋白質外，可能在茸毛的化學防禦上扮演重要的角色。

結語

植物遭逢生物或非生物因子的傷害時，會誘導新生長葉片產生較多的茸毛，以因應後續面臨的持續傷害。較高的茸毛密度可提升植物對昆蟲的抗性。茸毛除了物理性阻礙昆蟲的移動外，具有腺體的腺毛透過合成、儲存或分泌防禦性物質，包括多種二次代謝物及蛋白質等，可以協助植物提升對昆蟲直接防禦的能力。此外，透過基因工程技術來調節植物茸毛內特定物質的產生，有極大的發展潛力及利用性。

參考文獻

1. Benz, B. W., and C. E. Martin. 2006. Foliar trichomes, boundary layer, and gas exchange in 12 species of epiphytic *Tillandsia* (Bromeliaceae). *J. Plant Physiol.* 163: 648-656.
2. Dalin, P., and C. Bjorkman. 2003. Adult beetle grazing induces willow trichome defence against subsequent larval feeding. *Oecologia* 134: 112-118.
3. Kang, J. H., F. Shi, A. D. Jones, M. D. Marks, and G. A. Howe. 2010. Distortion of trichome morphology by the *hairless* mutation of tomato affects leaf surface chemistry. *J. Exp. Bot.* 61: 1053-1064.
4. Kavousi, A., H. Chi, K. Talebi, A. Bandani, A. Ashouri, and V. H. Naveh. 2009. Demographic traits of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) on leaf discs and whole leaves. *Ecol. Behav.* 102: 595-601.
5. Koiwa, H., R. A. Bressan, and P. M. Hasegawa. 1997. Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends Plant Sci.* 2: 379-384.
6. Liu, J., K. F. Xia, J. C. Zhu, Y. G. Deng, X. L. Huang, B. L. Hu, X. Xu, and Z. F. Xu. 2006. The nightshade proteinase inhibitor II b gene is constitutively expressed in glandular trichomes. *Plant Cell Physiol.* 47: 1274-1284.
7. Martin, C., and B. J. Glover. 2007. Functional aspects of cell patterning in aerial epidermis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 70-82.
8. Reymond, P., H. Weber, M. Damond, and E. E. Farmer. 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 707-720.
9. Schilmiller, A. L., R. L. Last, and E. Pichersky. 2009. Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds. *Plant J.* 54: 702-711.
10. Traw, M. B., and T. E. Dawson. 2002. Differential induction of trichomes by three herbivores of black mustard. *Oecologia* 131: 526-532.
11. Traw, M. B., and J. Bergelson. 2003. Interactive effects of jasmonic acid, salicylic acid, and gibberellins on induction of trichomes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133: 1367-1375.
12. Wang, E., R. Wang, J. DeParasis, J. H. Loughrin, S. Gan, and G. J. Wagner. 2001. Suppression of a P450 hydroxylase gene in plant trichome glands enhances natural-product-based aphid resistance. *Nat. Biotechnol.* 19: 371-374.
13. Wanger, G. J. 1999. Tobacco surface chemistry. In *Tobacco production, chemistry and technology.* (eds Davis, D. L. and M. T. Nielsen) p.292-303.