

## 乙烯对番茄与烟粉虱互作的调节作用

李思祺<sup>1</sup> 李姣<sup>1</sup> 郭洪刚<sup>2</sup> 戈峰<sup>2</sup>

(1. 湖南人文科技学院 农业与生物技术学院 湖南 娄底 417000;

2. 中国科学院 动物研究所 北京 100101)

[摘要] 采取室内测定与室外试验相结合的方法, 测定野生型 AC 及乙烯不敏感型 NR 不同品种的番茄上 Q 型烟粉虱种群数量及在接种与不接种 Q 型烟粉虱下植物信号途径中乙烯途径相关基因 EFR1, ERF2, ETR1, ACO-1 表达量、植物抗性物质胍蒴质含量和植毛体表达基因表达量。结果表明, 野生型 AC 及乙烯不敏感型 NR 两个番茄品种未接种 Q 型烟粉虱的番茄乙烯途径相关基因 EFR1, ERF2, ETR1, ACO-1 表达量、植物抗性物质胍蒴质含量和植毛体表达基因表达量均显著高于接种 Q 型烟粉虱的番茄; NR 番茄的种群数显著高于 AC 番茄, AC、NR 两个番茄品种外喷施 ACC 的种群数均显著低于未喷施的种群数。结果显示, 番茄产生乙烯对 Q 型烟粉虱种群的扩增有抑制作用, 该抑制作用与乙烯产量正相关; Q 型烟粉虱可通过降低乙烯产量来增加种群适合度, 即乙烯可以调节番茄与烟粉虱的相互作用关系。

[关键词] 乙烯; Q 型烟粉虱; NR 番茄; 互作

[中图分类号] G642 [文献标志码] A [文章编号] 1673-0712(2016)05-0115-07

烟粉虱为不完全变态昆虫, 目前全世界已知的烟粉虱生物型至少有 24 个, 主要包括 B 型、Q 型和非 B/Q 型; 作物危害以 B 型烟粉虱危害为主, 但由于 Q 型烟粉虱的耐药性比其他生物型烟粉虱更强, 在我国北方地区温室中的 Q 型有取代 B 型烟粉虱的趋势<sup>[1]</sup>。烟粉虱寄主植物范围广泛, 蔬菜作物是其重要的寄主, 但烟粉虱对寄主有一定的偏好性, 烟粉虱成虫喜欢在烟草上取食, 却更喜好在番茄上产卵<sup>[2]</sup>。我国烟粉虱危害逐年加重, 给作物生产造成的经济损失巨大, 尤其是 2006—2010 年中国部分地区爆发了 TYLCV 病毒病, 该病由烟粉虱传播, 导致我国番茄总产量下降甚至局部绝收<sup>[3-5]</sup>。目前该病已成为我国保护地番茄生产的头号病害, 每年的夏秋季是该病的高发期, 全国多个地区都会爆发。

植物被昆虫取食后会产生诱导型的防御反应, 相应的防御基因会发生相应变化, 导致昆虫难以进一步取食。只有遇到机械损伤、病原菌侵染或植食性昆虫取食等外界胁迫时才会开启<sup>[6]</sup>。刺吸式昆虫烟粉虱取食后会激活水杨酸和茉莉酸/乙烯途径, 在调控植物对逆境胁迫的响应中这些激素作为信号

分子起着极其重要的作用。植物在抵抗各种生物逆境时, SA、JA 和 ET 等激素会大量合成, 通过调节这些内源激素含量水平、防御反应基因的表达以及不同防御反应信号途径之间复杂的相互作用激活自身对各种病原菌和昆虫侵染的防御反应<sup>[7]</sup>。其中乙烯在植物的防御反应中发挥着重要作用, 目前大量关于乙烯的研究在果实成熟及品质方面, 或是研究茉莉酸与乙烯交互作用对植物抗性的影响。一般而言, 在植物应对死体营养型病原菌和植食性昆虫的反应中 JA 和 ET 起重要作用<sup>[8]</sup>。例如, 乙烯信号转导途径参与拟南芥中病程相关蛋白(PR) 基因的表达, 并且与植物体内的茉莉酸信号转导途径在调控植物对病虫害的防御反应中起协同或拮抗作用<sup>[9]</sup>。乙烯的产生也将会导致植物营养成分及理化性质的改变。一般认为, 乙烯利的诱导作用是其释放内源激发子乙烯产生诱导作用的结果。而乙烯利在一定的浓度范围内, 均能诱导大豆叶片内防御蛋白如 PAL 活性、总多酚含量、总黄酮含量和几丁质酶活性的提高<sup>[10]</sup>。外用乙烯利处理可以降低拟南芥对埃及棉铃虫的抗性, 但不降低对菱形蛾的抗性。在拟

[收稿日期] 2016-04-22.

[作者简介] 李思祺(1994—), 女, 湖南长沙人, 湖南人文科技学院农业与生物技术学院 2016 届本科毕业生; 李姣(1980—), 女, 湖南岳阳人, 湖南人文科技学院农业与生物技术学院讲师, 硕士, 本文指导老师, 研究方向: 昆虫生态、有害生物防控。

南芥 JA 和 ET 组成型激活突变体 *cev1* 上 桃蚜和 B 型烟粉虱的种群增长速率明显降低<sup>[9]</sup>。

烟粉虱是世界性大害虫,它的传播对农作物的影响很大。其中 Q 型烟粉虱侵入我国后便迅速蔓延至我国北方许多地区,且有替代其他生物型烟粉虱的趋势。植物信号转导途径在植物抗病虫害及外界胁迫中起着重要作用,乙烯途径作为信号转导途径之一,其在植物抗虫方面的作用相关研究较少。本研究以模式植物番茄的野生型 AC 及乙烯不敏感型 NR 为材料,研究乙烯调节番茄与 Q 型烟粉虱互作,其研究结果不但将有助于深入了解乙烯途径在番茄与 Q 型烟粉虱互作中的作用,而且为 Q 型烟粉虱的防御提供理论依据。

一 材料与方法

(一) 试验材料

本试验的室外试验在北京市昌平区小汤山香屯村试验基地的 OTC(开顶式气室)内进行,室内试验在中国科学院动物研究所内进行。试验材料为乙烯不敏感型番茄 NR 野生型番茄 AC,用于本次试验的 Q 型烟粉虱种群由中国农业科学院蔬菜花卉研究所张友军研究员研究组提供。

(二) 试验设计

试验在 4 个 OTC 内进行。2015 年 5 月 29 日将 AC、NR 番茄各 30 株移入 4 个 OTC 内。6 月 12 日

接种 Q 型烟粉虱,每个 OTC 中 AC、NR 各接 6 株,每株 20 只。6 月 13 日取接种 24h 和未接种番茄叶片样品,做好标记放置液氮中保存,用于胍胍质含量,乙烯信号通路相关基因表达量的测定。6 月 23 日给番茄接种 Q 型烟粉虱,每个 OTC 中 AC、NR 各接 10 株,每株 10 只。7 月 16 日统计烟粉虱种群。8 月 25 日移 AC、NR 各 45 株,每个品种 15 株用于外援喷施 ACC(乙烯合成前体),15 株用于外援喷施 1-MCP(乙烯合成抑制剂)<sup>[11]</sup>,15 株用于外援喷施表面活性剂作为对照,对喷施番茄做上标记,每隔 3 天喷施一次。8 月 26 日给番茄接种 Q 型烟粉虱,每个 OTC 中 AC、NR 各接 10 株,每株 10 只。25 天后统计烟粉虱种群。9 月 15 日接种 Q 型烟粉虱,每个 OTC 中 AC、NR 两个品种选 ACC,1-MCP,CK 各 1 株,每株接种 20 只。9 月 16 日取接种 24h 和未接种番茄叶片样品,做好标记放置液氮中保存。继续接种 Q 型烟粉虱,每个 OTC 中 AC、NR 两个品种选 ACC,1-MCP,CK 各 1 株,每株接种 20 只。9 月 17 日取接种 24h 和未接种番茄叶片样品,做好标记放置液氮中保存。继续接种 Q 型烟粉虱,每个 OTC 中 AC、NR 两个品种选 ACC,1-MCP,CK 各 1 株,每株接种 20 只。9 月 18 日取接种 24h 和未接种番茄叶片样品,做好标记放置液氮中保存,用于植毛体合成基因,基因 ERF1 表达量的测定(图 1)。

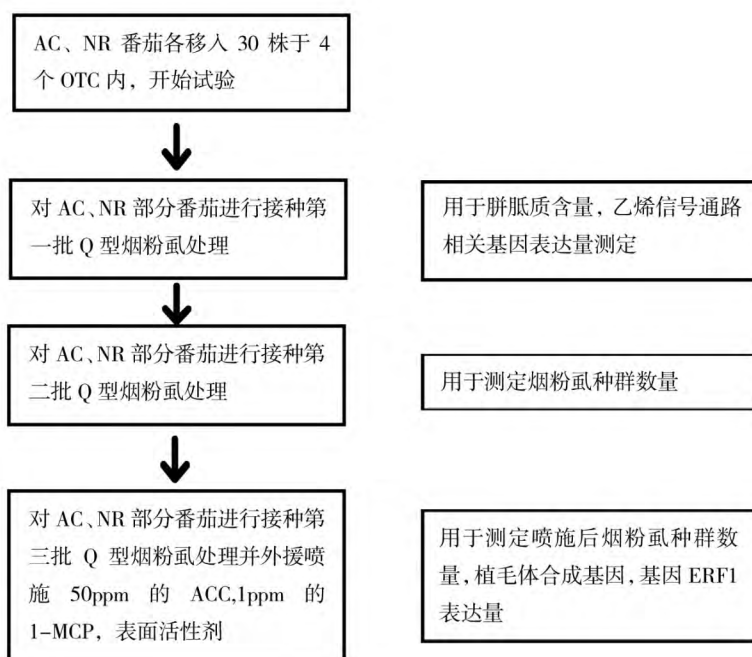


图 1 试验设计

### (三) 测定项目与方法

#### 1. 种群的测定

用自制适合大小的纱网用于套住接种的叶片, 接种的 Q 型烟粉虱放入网后 25d 后先观察统计烟粉虱数目, 再取网统计叶片上的产卵数。

#### 2. 外援喷施种群试验

8 月 25 日对喷施番茄做上 1-MCP, ACC, NONE 标记每隔 3 天喷施 1 次, 其中 ACC 浓度为 50ppm, 1-MCP 浓度为 1ppm。给番茄接种 Q 型烟粉虱, 每个 OTC 中 AC, NR 各接 10 株, 每株 10 只。25 天后统计烟粉虱种群。用自制纱网用于套住接种的叶片, 接种的 Q 型烟粉虱放入网后 25d 后先观察统计烟粉虱数目, 再取网统计叶片上的产卵数。

#### 3. 乙烯信号通路相关基因及植毛体合成基因表达量的测定

试验样品为未经过外援喷施处理接种 Q 型烟粉虱 24h 番茄叶片和经过外援喷施处理接种 Q 型烟粉虱 24h 番茄叶片。0.5g 新鲜番茄叶片置冰上, 加入 2000ul 萃取液(2:1:0.005, 异丙醇: 水: 氯化氢) 研磨成为匀浆, 转移至 5ml 的离心管中。加入内标样品 d4-SA (40 ng), d5-JA (15 ng), 和 d6-ABA。将样品放在低温摇床上摇 30 分钟后, 加入 1.5ml 二氯甲烷, 放在低温摇床摇 30 分钟, 然后高速离心, 13 000g, 离心 5 分钟。样品分为 3 层, 弃上层和残渣, 用注射器吸取下层约 1.5ml 液体转移至新的 2ml 离心管内。放置于吹干仪上吹干, 或者自然晾干。晾干后, 用 200ul 甲醇水溶液重溶吹干后的样品(如果重溶后样品有沉淀可以再次离心, 13 000g, 3min), 吸取离心后溶液, 150ul 溶液转移至内衬管内, 5ul 上样。使用 Trizol 方法提取 RNA<sup>[12]</sup>, 50-70mg 新鲜的植物样品液氮研磨, 加入 1ml Trizol 细胞破裂液, 转移入离心管进行, 然后用涡流振荡器充分匀浆 1-2 分钟, 得到匀浆液。室温放置 5min, 使其充分裂解。进行高速离心, 12 000rpm, 5min, 放弃沉淀。按照 200ul 氯仿/ml Trizol 的比例加入三氯甲烷, 轻微振荡混匀样品, 室温静置 15min。进行高速低温离心, 4℃, 12 000g, 15min。样品分层, 吸取上层水相, 移入到新的离心管中, 根据每 0.5ml 异丙醇/ml Trizol 的比例加入异丙醇充分混匀, 室温放置 10min。然

后 4℃, 12 000g, 离心 10min, 弃上清, RNA 沉于管底。按 1ml 75% 乙醇/ml Trizol 加入 75% 的用 DEPC 水稀释的乙醇, 温和振荡离心管, 悬浮沉淀。清洗 RNA 沉淀, 反复重复两次, 4℃, 8 000g, 离心 5min, 弃上清。晾干沉淀, 然后用 DEPC 水重溶, 55-60℃, 5-10min, 得到 RNA, 用于后期测定。

#### 4. 胍胍质含量测定

苯胺蓝混合液配制: A 液 0.1% 苯胺蓝, 称取 0.1g 苯胺蓝溶于 1M HCl 溶液中, 定容至 100ml; B 液 1M 甘氨酸缓冲液, 称取 75.07g 甘氨酸, 溶于 800ml 超纯水中, NaOH 调至 pH 9.5, 定容至 1L; 将 A 液与 B 液按 1:3 的比例混合, 即为苯胺蓝混合液。苯胺蓝空白液配制: 将 1M HCl 溶液与 B 液按 1:3 得比例混合, 即为苯胺蓝空白混合液。(提取胍胍质时用的是 1M NaOH, 那么标线的配置也需要用 1M NaOH。)切取约 50mg 的根尖, 立即用 98% 乙醇将其固定在 1.5ml 的离心管中, 过夜后弃掉乙醇, 加入 400 $\mu$ l 1M NaOH 后, 用微量研磨杵将根系充分研磨; 匀浆在 85℃ 下加热 15min 后, 在 1000g 下离心 10min。提取液中的胍胍质按以下方法测定: 71 $\mu$ l 的上清液, 142 $\mu$ l 的苯胺蓝混合液, 75 $\mu$ l 1M HCL 和 210 $\mu$ l 1M 甘氨酸-NaOH 缓冲液(1mol/L, pH9.5) 充分混均匀, 在 50℃ 下加热 20min 后冷却至室温, 用荧光分光光度计(F-4500GL 荧光分光光度计上测定荧光强度, 测定的激发波长为 400nm, 发射波长为 500nm, 夹缝宽度为 5nm) 比色鉴定<sup>[13]</sup>。

#### (四) 数据处理

原始数据输入 Excel (Microsoft 2003, USA), 通过 SPSS (SPSS 13.0, USA) 对不同处理之间的差异显著性进行分析(新复极差检验,  $P < 0.05$ )。烟粉虱种群动态数据采用 one-way ANOVA 分析, 植物的相关基因表达量采用裂区(split-split plot) 分析方法。

### 二 结果与分析

#### (一) 乙烯途径对烟粉虱种群数量的影响

通过对野生型 AC 及乙烯不敏感型 NR 这 2 个番茄品种上种群数量调查分析, 结果如图 2 所示, 乙烯不敏感型 NR 种群数量明显高于野生型 AC, 说明乙烯途径产生的乙烯不利于 Q 型烟粉虱种群增长。

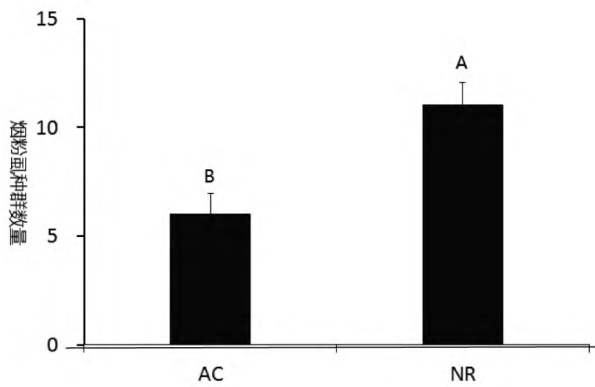


图 2 AC、NR 番茄上烟粉虱种群数量

(二) 外援喷施 ACC、1-MCP 对种群数量的影响

进一步对外援喷施试验下种群差异进行分析，

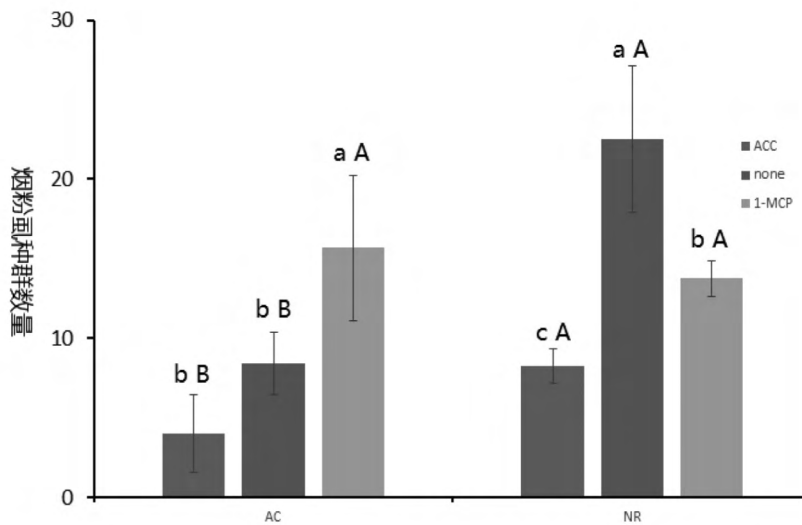


图 3 不同喷施处理下 Q 型烟粉虱种群数量

注: 不同的小写字母表示同一品种不同喷施处理间差异达到了显著水平; 不同的大写字母表示同一喷施处理下不同品种处理间差异达到了显著水平(新复极差检验  $P < 0.05$ )。

(三) 乙烯信号通路相关基因表达量差异

EFR1 和 ERF2 作为番茄乙烯信号转录因子,是在蛋白水平单独或和其它蛋白质协同与启动子或增强子相结合发挥其调控功能<sup>[14]</sup>,ETR1 为乙烯受体基因, NR 表型是由于 ETR1 相关的乙烯受体家族成员突变引起。ACO-1 是 ACC 氧化酶编码基因之一, ACC 经过 ACC 氧化酶氧化合成乙烯。总而言之,以

结果(如图 3)表明 野生型 AC 及乙烯不敏感型 NR 品种间, NR 喷施表面活性剂种群数量显著高于 AC, NR 喷施乙烯合成前体 ACC 的种群数量显著高于 AC。AC 品种中, 喷施乙烯合成前体 ACC 的种群数量显著高于喷施表面活性剂种群数量和喷施乙烯合成抑制剂 1-MCP 的种群数量。NR 品种中, 喷施表面活性剂的种群数量显著高于喷施乙烯合成抑制剂 1-MCP 的种群数量, 喷施乙烯合成抑制剂 1-MCP 的种群数量显著高于喷施乙烯合成前体 ACC 的种群数量。说明乙烯产生的多少影响 Q 型烟粉虱种群数量, 试验结果也进一步表明, 乙烯产生多对 Q 型烟粉虱种群不利, 乙烯产生少对 Q 型烟粉虱种群有利。

上四种基因与乙烯最终产生量有关。对乙烯信号通路相关基因表达量差异进行分析, 结果(如图 4)表明, 不论是品种 AC 还是 NR, 不接种 Q 型烟粉虱的基因表达量都显著高于接种 Q 型烟粉虱的基因表达量。这说明 Q 型烟粉虱可能通过降低乙烯信号通路相关基因表达量从而降低乙烯的产量来增加种群适合度。

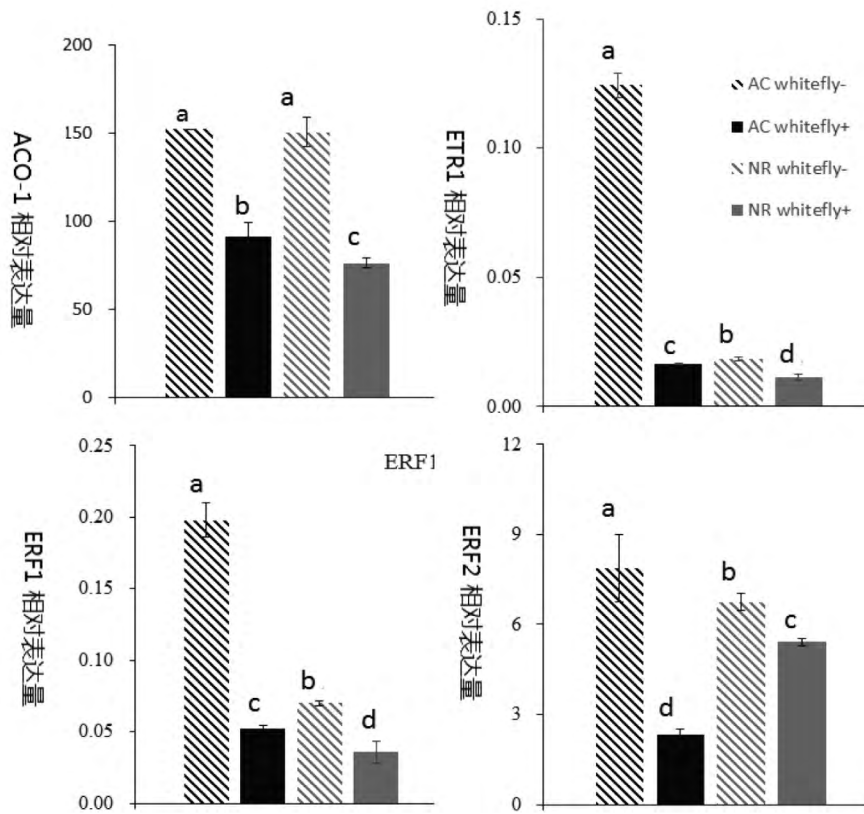


图 4 乙烯信号通路相关基因表达量

(四) 外喷施 ACC、1-MCP 对 ERF1 基因表达量的影响

进一步对外喷施试验下乙烯信号通路相关基因表达量差异进行分析 结果(如图 5)表明,外喷施 ACC 后 不论是品种 AC 还是 NR 不接种 Q 型烟粉虱的基因表达量都显著高于接种 Q 型烟粉虱的基

因表达量。外援喷施表面活性剂后,AC 品种不接种 Q 型烟粉虱的基因表达量都显著高于接种 Q 型烟粉虱的基因表达量。而外援喷施 1-MCP 后,不同处理间无显著差异。说明 Q 型烟粉虱可能通过降低 ERF1 相对表达量从而降低乙烯的产量来增加种群适合度。

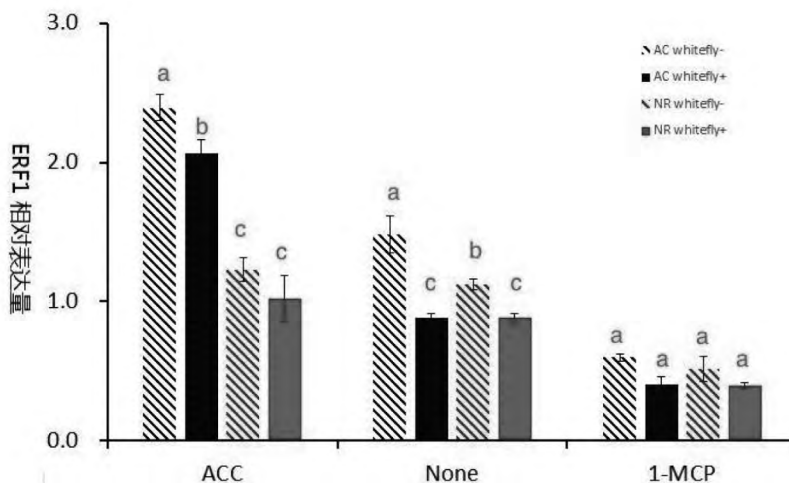


图 5 不同喷施处理下的番茄 ERF1 基因表达量

(五) 乙烯途径对胼胝质含量的影响

胼胝质的沉积是植物的防御反应,其在植物生长发育或响应生物和非生物胁迫过程中具有非常重要的作用<sup>[15]</sup>。结果(如图6)表明,无论是品种AC还是NR,不接种Q型烟粉虱胼胝质含量都显著高于接种Q型烟粉虱的胼胝质含量。且AC品种胼胝质含量都高于NR品种,并且AC品种处理间的差异要比NR品种更明显。乙烯信号途径可能与胼胝质产生与积累存在一定联系,可能Q型烟粉虱可能通过降低乙烯产量从而降低胼胝质的含量来增加种群适合度。

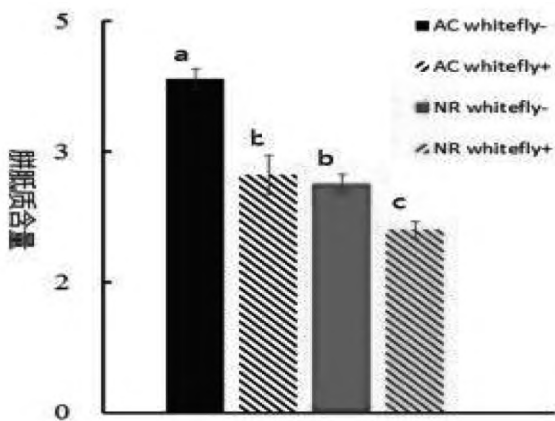


图6 胼胝质含量

(六) 植毛体合成基因表达量的差异

叶片植毛体可以通过分泌次生代谢物及蛋白阻止昆虫取食,是植物的防御机制。结果(如图7)表明,无论是品种AC还是NR,不接种Q型烟粉虱植毛体合成基因表达量都显著高于接种Q型烟粉虱

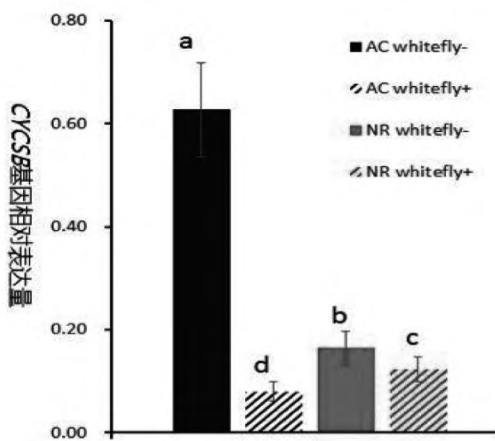


图7 植毛体合成基因表达量

的植毛体合成基因表达量。并且AC品种处理间的差异要比NR品种更明显,乙烯信号途径可能与植毛体合成基因表达量存在一定联系。说明Q型烟粉虱可能通过降低乙烯产量从而降低植毛体合成基因表达量来增加种群适合度。

三 结论与讨论

随着生活质量水平的提高,人们对营养质量高的食物要求提高,番茄作为一种高营养的经济作物,其种植范围必然会得到进一步扩大。怎样良好地防止病虫害,以提高番茄的产量和质量,是本试验的重要出发点。通过种群试验和外援喷施后种群试验测定,结果显示,乙烯的产生降低了Q型烟粉虱种群数量,且乙烯产量多会大大降低Q型烟粉虱种群数量。说明乙烯产量对Q型烟粉虱种群数量有直接影响,产量多则对Q型烟粉虱不利。通过对植物信号途径乙烯途径相关基因 EFR1,ERF2,ETR1,ACO-1 表达量和植物抗性物质胼胝质含量、植毛体表达基因表达量的测定显示,无论是品种AC还是NR,不接种Q型烟粉虱乙烯途径相关基因 EFR1,ERF2,ETR1,ACO-1 表达量和植物抗性物质胼胝质含量、植毛体表达基因表达量都显著高于接种Q型烟粉虱的,且AC品种都高于NR品种。说明Q型烟粉虱可能通过降低乙烯产量来增加种群适合度。而Q型烟粉虱通过何种途径来降低乙烯产量以保证种群适合度还有待进一步研究。

通过乙烯对番茄与烟粉虱的调节作用的试验发现,在乙烯产量增多时,出现了烟粉虱种群扩增受抑制的现象,和先前的研究相符,由此可以通过对乙烯方面来调节植物对烟粉虱的抵抗能力,由于喷施乙烯合成前体 ACC 可以限制烟粉虱种群扩增,因此可以考虑通过喷施乙烯合成前体 ACC 来有效限制烟粉虱种群扩增,从而在一定程度上降低作物被虫害后的损失。

参考文献:

[1]潘慧鹏.在北京和河北局部地区Q型烟粉虱取代了B型烟粉虱[J].植物保护,2010(6):74-77.  
 [2]高建昌.野生多毛番茄对B型烟粉虱的影响及抗烟粉虱QTL分析[D].北京:中国农业科学院,2011.  
 [3]王冬生,匡开源,张穗,等.上海温室番茄黄化曲叶病病毒的发生与防治[J].长江蔬菜,2006(10):25-26.

- [4]蔡健和,秦碧霞,朱桂宁,等. 番茄黄化曲叶病毒病在广西爆发的原因和防治策略[J]. 中国蔬菜, 2006(7): 47-48.
- [5]纠敏,周雪萍,刘树生. 烟粉虱传播双生病毒研究进展[J]. 昆虫学报, 2006, 49(3): 513-520.
- [6]娄永根,程家安. 植物的诱导抗性[J]. 昆虫学报, 1997, 40(3): 320-321.
- [7]ZARATE S I, LAI K. Silver leaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses[J]. Plant Physiology, 2007(143): 866-875.
- [8]KOORNNEEF A C M, J. Pieterse. Cross talk in defense signaling[J]. Plant Physiology, 2008(146): 839-844.
- [9]鲁玉杰,王霞,娄永根,等. 乙烯信号转导途径在褐粉虱诱导的水稻挥发物释放中的作用[J]. 科学通报, 2006(18): .
- [10]刘亚光,李海英,杨庆凯. 乙烯利对大豆抗性生化物质的诱导作用[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2004, 8(36): 1015-1016.
- [11]张正科, HUBER D, LEE J H, 饶景萍. 内源乙烯与 1-MCP 互作对番茄成熟和细胞壁物质代谢的影响[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2010, 38(11): 95-102.
- [12]吴凯朝,黄诚梅,李杨瑞,等. Trizol 试剂法快速高效提取 3 种作物不同组织总 RNA[J]. 南方农业学报, 2012, 43(12): 1934-1939.
- [13]孙成亮. 过氧化氢与一氧化氮互作调控小麦耐铝性的生理与分子机制[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [14]郑铁松. 番茄乙烯受体基因 LeETR1 和 LeETR2 的分子生物学研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2001.
- [15]张慧. 铝诱导甜高粱根尖胼胝质积累机制的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2014.

## Moderating Effects of Ethylene on the Interaction Between Tomatoes and *Bemisia tabaci*

LI Si-qi<sup>1</sup>, LI Jiao<sup>1</sup>, GUO Hong-gang<sup>2</sup>, GE Feng<sup>2</sup>

(1. College of Agriculture and Biotechnology, Hunan University of Humanities, Science and Technology, Loudi 417000, China; 2 Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:** Using laboratory and outdoor experiments, the authors of this paper have measured the population of *Bemisia tabaci* biotype Q on the wild type AC tomatoes and the ethylene-insensitive NR tomatoes. They have also measured, through treatments with inoculation of *Bemisia tabaci* biotype Q and those without, 1) the expression level of the ethylene-related genes such as EFR1, ERF2, ETR1 and ACO-1, 2) the content of the plant resistance material callose, 3) the expression quantity of the plant body hair expression genes, in the plant signaling pathways. The results show that 1) when inoculated with *Bemisia tabaci* biotype Q, the wild type AC tomatoes and the ethylene-insensitive NR tomatoes have higher expression level of the ethylene-related genes such as EFR1, ERF2, ETR1 and ACO-1, higher content of the plant resistance material callose, and larger expression quantity of the plant body hair expression genes, than the tomatoes without being inoculated with *Bemisia tabaci* biotype Q, 2) the population of *Bemisia tabaci* biotype Q on NR tomatoes is significantly larger than AC tomatoes, 3) the population of *Bemisia tabaci* biotype Q is much smaller when the tomatoes were sprayed on ACC than when they were not. According to the experiments, ethylene produced by the tomatoes can inhibit the growth of *Bemisia tabaci* biotype Q population, and the inhibiting effect is directly related to the amount of ethylene; *Bemisia tabaci* biotype Q can improve the population fitness by reducing the production of ethylene, namely, the ethylene can moderate the interaction between tomatoes and the *Bemisia tabaci*.

**Key words:** ethylene; *Bemisia tabaci* biotype Q; NR tomato; interaction

(责任编辑: 李传熹)