

刘佳妮, 胡 昞, 尹利方, 等. 马铃薯块茎蛾取食对马铃薯防御基因表达的诱导作用[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(21): 112–114.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.21.030

# 马铃薯块茎蛾取食对马铃薯防御基因表达的诱导作用

刘佳妮<sup>1</sup>, 胡 昞<sup>2</sup>, 尹利方<sup>1</sup>, 张瑜瑜<sup>1</sup>, 徐胜光<sup>1</sup>, 张永福<sup>1</sup>, 陈泽斌<sup>1</sup>, 余 磊<sup>1</sup>

(1. 昆明学院农学院/云南省都市特色农业工程技术研究中心, 云南昆明 650214; 2. 昆明学院实习实训基地管委会, 云南昆明 650214)

**摘要:**为探讨马铃薯对马铃薯块茎蛾(*Phthorimaea operculella*)取食的防御反应分子机制,在室内条件下测定马铃薯块茎蛾取食、机械损伤、外源水杨酸甲酯和外源茉莉酸诱导处理后马铃薯叶片中苯丙氨酸解氨酶(PAL)基因(*pal*)、过氧化物酶(POD)基因(*pod*)和过氧化氢酶(CAT)基因(*cat*)的相对表达量,同时以健康植株为对照。结果表明:*pal*、*pod*和*cat*基因表达量变化趋势存在差异,说明马铃薯块茎蛾取食既激活了水杨酸介导的防御信号转导途径,也激活了茉莉酸介导的信号转导途径,并且2个通路间存在交互作用。

**关键词:**马铃薯块茎蛾;取食;防御酶;基因表达

**中图分类号:** S433.4    **文献标志码:** A    **文章编号:** 1002-1302(2017)21-0112-03

植物与植食性昆虫长期的相互作用形成了多种防御机制。在植物对昆虫的化学防御体系中,除了利用体内的次生代谢物质进行直接防御外,其间接防御也起着相当重要的作用。植物体在受到害虫取食危害后,会释放包括茉莉酸(jasmonic acid,简称JA)、水杨酸(salicylic acid,简称SA)和乙烯(ethene,简称ET)等挥发性气体的信号物质。研究表明,JA介导的信号转导途径是虫害和创伤诱导的主要途径,对植物抵御咀嚼式昆虫危害非常重要,咀嚼式昆虫咬食植物,其唾液分泌物能够在取食位点直接产生几丁质或多聚糖,作为信号途径的诱导因子。而这一系列变化同样能够被水杨酸甲酯(methyl salicylic,简称MeSA)诱导产生。MeSA、JA作为与植物损伤相关的信号分子,共同参与植物防御反应的诱导,一方面可以减弱防御反应中活性氧等对细胞的损伤,另一方面可以增强协同抗性<sup>[1]</sup>。Berenbaum的研究也发现,JA处理的植物与对照相比造成的昆虫死亡率大大提高,害虫危害程度减轻,植物对害虫胁迫的抗性增强<sup>[2-3]</sup>。

马铃薯块茎蛾[*Phthorimaea operculella* (Zeller)]别称烟草潜叶蛾、马铃薯蛾,隶属鳞翅目(Lepidoptera)双孔亚目(Ditrysia)麦蛾总科(Gelechioidea)麦蛾科(Gelechiidae)。该虫最早记载于1854年,在澳大利亚发现该虫危害烟草;国内对马铃薯块茎蛾的记载最早始于1937年,陈金壁报道该害虫在广西柳州危害烟草,现已广泛分布于云南、贵州、广西、湖南、湖北及台湾地区等,且发生较为普遍,是一种重要的国际国内检疫性害虫。该虫寄主种类很多,主要危害茄科植物,其中以马铃薯、烟草、茄子等受害最重<sup>[4]</sup>。目前对于马铃薯块茎蛾的报道不多,并且还只是一些关于其发生规律、生理生殖

和化学防治等层面的初步研究,还没有更深层次的关于其生化及分子生物学等方面的相关研究。云南省地处西南山区,是国内马铃薯和烟草主要的种植产区,随着种植业的发展,马铃薯连作面积逐年增加,加上云南省近年来受全球气候的影响,持续干旱的天气也为该虫的生存繁殖提供了适宜的气候条件,使其病虫害危害逐年加重。本研究探讨马铃薯块茎蛾取食马铃薯后,植物苯丙氨酸解氨酶(PAL)基因(*pal*)、过氧化物酶(POD)基因(*pod*)和过氧化氢酶(CAT)基因(*cat*)3种防御酶基因表达的变化,并与外源信号物质诱导的变化作对比,以期探讨马铃薯块茎蛾取食诱导激活的防御酶基因表达的动态变化,为进一步探究马铃薯块茎蛾取食诱导马铃薯防御反应的机制和为害虫治理、抗虫植物的培育提供新的思路,为农业可持续发展提供必要的理论保障。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫和供试植物

马铃薯块茎蛾:马铃薯块茎蛾饲养于养虫室内,温度控制在(27±2)℃,相对湿度为80%~90%。在散射光照储藏条件下的马铃薯块茎上进行饲养,光—暗周期为12 h—12 h<sup>[5]</sup>。

马铃薯植株:供试马铃薯植株均同期栽种于花盆中,并置于防虫网室内培养,待马铃薯幼苗生长至4叶期时用于试验。

### 1.2 植株处理

设置4种处理:(1)马铃薯块茎蛾取食诱导(*Phthorimaea operculella* feeding,简称POF):每株马铃薯幼苗接种5头马铃薯块茎蛾成虫(羽化后3 d未交配成虫,接种前饥饿处理12 h)放入防虫网内,取食24 h后取出成虫。(2)机械损伤处理(mechanical acid,简称MD):用已消毒的注射器针头(Φ=1 mm)在健康的马铃薯叶背面刺40次。以同期健康未受危害的马铃薯幼苗为对照(CK)。(3)外源茉莉酸诱导:以0.1 mmol/L外源茉莉酸叶面喷施马铃薯叶片。(4)外源水杨酸甲酯诱导,以0.5 mmol/L外源水杨酸甲酯叶面喷施马铃薯叶片。

每种处理盆栽马铃薯均分别置于不同的封闭玻璃容器中,分别在24、48、72、96 h取样。以健康、未受伤的马铃薯植

收稿日期:2016-05-30

基金项目:云南省科技厅应用基础研究计划(编号:2012FD044)。

作者简介:刘佳妮(1983—),女,云南昆明人,博士,副教授,主要从事昆虫生态学和分子生物学方面的研究。E-mail:ljn0131@163.com。

通信作者:余 磊,博士,教授,主要从事分子生物学和蛋白质组学方面的研究。E-mail:47067521@qq.com。

株作为对照(CK),取样时间同上。取样后放入  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用,每个处理重复 3 次,每次重复使用 1 株马铃薯植株,本试验中所有的马铃薯植株都保持相同的生理状态。

### 1.3 总 RNA 提取

马铃薯叶片总 RNA 的提取采用 TRIzol 试剂 (Invitrogen),按照操作说明进行提取。本试验中各处理和对照的叶片总 RNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,用紫外-可见分光光度计检测 RNA 的纯度与浓度。

### 1.4 cDNA 合成

按照 RevertAid First-Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) 的操作方法,将以上各处理时间点的马铃薯叶片总 RNA 进行反转录合成第 1 链 cDNA。获得的 cDNA 产物直接用于 PCR 或于  $-80^{\circ}\text{C}$  贮藏备用。

表 1 荧光定量 PCR 反应中使用的基因及特异性引物

基因	GenBank 登录号	引物序列(5'→3')	目的片段大小(bp)
$\beta$ -Actin	GQ339765.1	F:CTGAAGCACCTCTCAACCCT;R:ACCATCACCAGAGTCCAACAC	158
<i>cat</i>	AY442179.2	F:TCGCCATGCTGAGGTGTATC;R:CGTTCTTGTCTGTCGGGTGT	135
<i>pod</i>	DQ925471.1	F:CCGTAGTTGCGGTGCGTAT;R:AGTTCACCTTCCCATGTTGGT	137
<i>pal</i>	KC631948.1	F:GCCACATTCAGCAACAAGGGR;GCAAACACGGGTGATGTTG	131

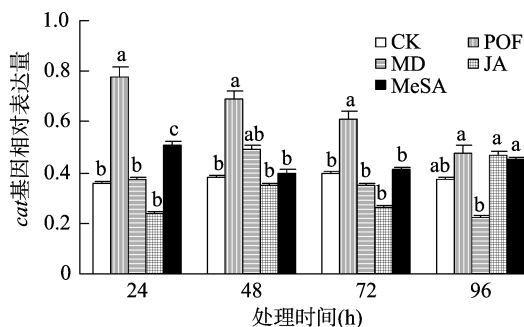
### 1.6 数据统计分析

数据分析利用 SPSS 18.0 软件。方差分析采用 LSD 多重比较法检验处理间的差异显著性( $\alpha=0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同处理对马铃薯过氧化氢酶基因 *cat* 相对表达量的影响

由图 1 可见,与健康植株相比,4 种处理下马铃薯叶片中 *cat* 基因表达量均有不同程度的变化。马铃薯块茎蛾取食诱导 24 h 后,*cat* 的表达量显著升高,96 h 后基本恢复至对照水平;机械损伤处理后,*cat* 表达量在 24~96 h 几乎与对照水平相当,没有显著变化;外源茉莉酸处理后,*cat* 基因表达量先显著低于对照水平,然后逐渐升高,仅在 96 h 时高于对照水平;外源水杨酸甲酯处理后,*cat* 基因表达量的变化与马铃薯块茎蛾取食基本相似。



不同处理间标有不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。下图同  
图 1 不同处理后马铃薯叶片中 *cat* 基因相对表达量的变化

### 2.2 不同处理对马铃薯过氧化物酶基因 *pod* 相对表达量的影响

由图 2 可知,与健康植株相比,4 种处理后马铃薯叶片中 *pod* 基因表达量均有不同程度的变化。马铃薯块茎蛾取食诱导 24 h 后,*pod* 的表达量略有升高,48 h 后达到最大值,72 h

### 1.5 防御基因荧光定量 PCR

实时荧光定量 PCR 采用 20  $\mu\text{L}$  反应体系,按照 iTaqUniversal SYBR GreenSupermix 试剂盒说明进行操作。各反应成分的含量为 10.0  $\mu\text{L}$  iTaqUniversal SYBR GreenSupermix( $2\times$ ),各 0.5  $\mu\text{L}$  正向、反向引物,1  $\mu\text{L}$  合成的 cDNA 模板,加水至 20  $\mu\text{L}$ ,混匀、微离心后放入 PCR 仪内扩增。反应程序:94  $^{\circ}\text{C}$  2 min;94  $^{\circ}\text{C}$  20 s,60  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  40 s,40 个循环。反应中设置空白对照,分别使用 DNA 和水为模板,每个样品重复 3 次。反应结束后分析荧光值变化曲线。荧光定量引物见表 1,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。采用相对定量法检测不同处理条件下基因表达量的差异。

后比对照稍低,96 h 后基本恢复至 24 h 的水平;机械损伤处理后,*pod* 表达量在 24~96 h 始终高于对照水平,48 h 后达到最大值;外源茉莉酸处理后,*pod* 基因表达量呈现先升高再降低再升高的趋势,在 96 h 达最大值;外源水杨酸甲酯处理后,*pod* 基因表达量变化与马铃薯块茎蛾取食的基本相似。

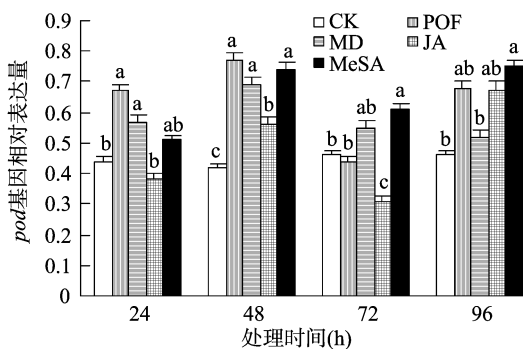


图 2 不同处理后马铃薯叶片中 *pod* 基因相对表达量的变化

### 2.3 不同处理对马铃薯苯丙氨酸解氨酶基因 *pal* 相对表达量的影响

由图 3 可见,与健康植株相比,4 种处理后马铃薯叶片中 *pod* 基因表达量均有不同程度的变化。马铃薯块茎蛾取食诱导 24 h 后 *pal* 的表达量显著升高,随后呈现出降低-升高的变化趋势;机械损伤处理后,*pal* 的表达量在 24 h 后升高,随后一直降低,96 h 时显著低于对照水平;外源茉莉酸处理后,*pal* 基因的表达量与对照相比变化不大;外源水杨酸甲酯处理后,48 h 后 *pal* 基因表达量略有升高,96 h 时达到最大值。

## 3 讨论

在自然系统中,植食性昆虫取食诱导植物产生防御反应,而植食性昆虫通过改变自身来适应植物的变化,两者始终处于一种平衡状态。之前的研究表明,PAL、POD、CAT 3 种保护酶与植物的抗虫能力密切相关。本研究通过马铃薯块茎蛾取

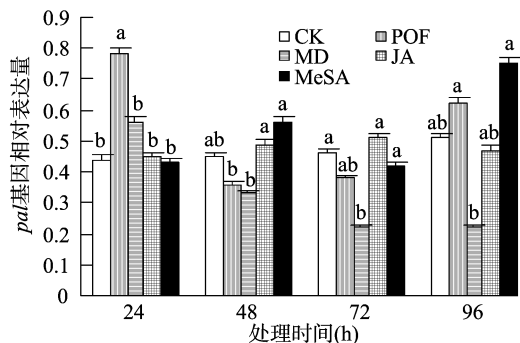


图3 不同处理后马铃薯叶片中 *pal* 基因相对表达量的变化

食、机械损伤、外源水杨酸甲酯和外源茉莉酸诱导处理后分析马铃薯叶片中苯丙氨酸解氨酶基因(*pal*)、过氧化物酶基因(*pod*)和过氧化氢酶基因(*cat*)的相对表达量。结果表明,马铃薯叶片中3种酶基因在不同诱导条件和时间下的相对表达量均发生不同的变化。

过氧化氢酶是植物体内的抗氧化物质,普遍存在于能呼吸的生物体内,主要存在于植物的叶绿体、线粒体、内质网、动物的肝和红细胞中,其酶促活性为机体提供了抗氧化防御机理。前人的研究发现,*cat* 的表达量不仅与植物的发育时期、组织和器官有关,还与环境有很大关系<sup>[6]</sup>。本研究中马铃薯块茎取食和外源茉莉酸诱导后,马铃薯中 *cat* 的表达量先升高后基本恢复至对照水平,外源水杨酸甲酯处理后, *cat* 基因表达量在 96 h 时高于对照水平。外源信号物质水杨酸甲酯诱导与马铃薯块茎取食一样,可增加马铃薯叶片中 *cat* 的表达量。毛红等研究发现, *cat* 基因表达量仅在 48 h 时均低于对照水平,且变化较酶活性变化明显<sup>[7]</sup>,这可能与 CAT 活性由多种 *cat* 基因调控有关。

过氧化物酶是植物保护酶系的重要保护酶之一<sup>[8]</sup>,它可以与超氧化物歧化酶、过氧化氢酶相互协调配合,清除过剩的自由基,使体内自由基维持在正常的动态水平,以提高植物的抗逆性。曾淑华等在对烟草的研究中发现,伤害处理能使过氧化物酶基因 *pod* 的转录水平迅速提高,但是对 SA 却无明显反应,而 MeJA 则抑制其表达<sup>[9]</sup>。在棉花中已经报道了 12 个编码第三类过氧化物酶的基因。*pod* 基因表达结果与 POD 活性测定结果相比可知,它们的变化趋势恰好相反,在酶活性测定中,毛红等研究发现,绿盲蝽取食、外源水杨酸和外源茉莉酸甲酯诱导处理后 POD 的活性仅在 72 h 时出现稍低于对照的情况,而 *pod* 基因表达仅在 72 h 时稍高于对照水平<sup>[7]</sup>,这可能是由于所测的 *pod* 基因的表达只是 *pod* 基因家族中的一种,POD 的活性变化不是完全由该基因调控的,而是由其他 *pod* 基因或者多个 *pod* 基因共同调控的结果。本研究中马铃薯块茎取食和外源水杨酸甲酯诱导后,24 h 后 *pod* 的表达量略有升高,48 h 后达到较大值;机械损伤处理后 *pod* 在 24~96 h 始终高于对照水平,48 h 后达到最大值;外源茉莉酸处理后, *pod* 基因表达量呈现出先升高再降低再升高的趋势,在 96 h 达最大值。外源信号物质水杨酸甲酯和茉莉酸诱导与马铃薯块茎取食一样,可增加马铃薯叶片中 *pod* 的表达量。

苯丙氨酸解氨酶是连接初级代谢和苯丙烷类代谢途径的关键酶和限速酶,广泛存在于各种植物和少数微生物中,是植物防御物质酚类化合物的关键酶,对植物生长发育以及抗逆反应有重要作用。从春蕾等研究发现, PAL 相对表达量对机械损伤的应急变化仅为对照的 1.37 倍,明显低于西花蓟马取食诱导的该基因的表达量。外源信号物质 MeSA 诱导与西花蓟马取食诱导相似,也可以增加菜豆叶片中 PAL 的表达量,且效果更为明显<sup>[10]</sup>。毛红等研究发现,绿盲蝽取食、机械损伤、外源 SA 和外源 MeJA 处理后的棉叶中 *pal* 表达量均升高,且外源信号物质诱导与绿盲蝽取食诱导相似,其结果与本研究基本一致,但基因表达变化趋势不一致<sup>[7]</sup>,可能是由于绿盲蝽与西花蓟马的取食方式及取食的寄主植物不同造成的。本研究中马铃薯块茎取食、外源水杨酸甲酯和外源茉莉酸诱导后, *pal* 的表达量均升高,机械损伤处理 *pal* 表达量与对照相比下降。外源信号物质水杨酸甲酯和外源茉莉酸诱导与马铃薯块茎取食一样,也可以增加马铃薯叶片中 *pal* 的表达量。

本试验首次对马铃薯块茎取食诱导马铃薯叶片中防御酶基因表达变化与外源信号物质诱导的结果进行比较,发现马铃薯块茎取食可诱导水杨酸、茉莉酸介导的防御信号转导途径, *pal*、*pod*、*cat* 3 个基因不完全调控相应的酶活性。这些结果为阐明马铃薯抗虫的机制提供了一定理论基础,但要真正弄清楚马铃薯的防御反应机制,还需对防御酶基因与防御酶活性的相关性作进一步的探索和研究。

#### 参考文献:

- [1] 朱俊洪,程立生. 植物次生性物质与植物抗虫性的关系及其在害虫防治中的应用前景[J]. 华南热带农业大学学报,2001,7(1): 26-32.
- [2] Berenbaum M R. Comparative processing of allelochemicals in the *Papilionidae* (Lepidoptera) [J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 1991, 17(4): 213-221.
- [3] 李周直,沈惠娟,蒋巧根,等. 几种昆虫体内保护酶系统活力的研究[J]. 昆虫学报,1994,37(4): 399-403.
- [4] 李秀军,金秀萍,李正跃. 马铃薯块茎取食研究现状及进展[J]. 青海师范大学学报(自然科学版),2005(2): 67-70.
- [5] 桂富荣,李正跃. 用马铃薯人工饲养马铃薯块茎蛾的方法[J]. 昆虫知识,2003,40(2): 187-189.
- [6] 宋新华,赵风云. 植物体内过氧化氢酶的研究进展[J]. 安徽农业科学,2007,35(31): 9824-9827.
- [7] 毛红,陈瀚,刘小侠,等. 绿盲蝽取食与机械损伤对棉花叶片内防御性酶活性的影响[J]. 应用昆虫学报,2011,48(5): 1431-1436.
- [8] 詹嘉红. 枇杷果实过氧化物酶活性的抑制[J]. 江苏农业科学,2015,43(7): 316-317,354.
- [9] 曾淑华,赵正雄,覃鹏,等. 淹水对转超氧化物歧化酶或过氧化物酶基因烟草某些生理生化指标的影响[J]. 植物生理学通讯,2005,41(5): 603-606.
- [10] 从春蕾,邳军锐,谢路飞,等. 西花蓟马取食对菜豆防御基因表达的诱导作用[J]. 昆虫学报,2013,56(10): 1174-1180.