

Q型烟粉虱对番茄斑萎病毒的获取、保持及在非传毒寄主棉花上的适合度

The acquisition and retention of tomato spotted wilt virus by Q biotype
Bemisia tabaci and its fitness on cotton蔡朝晖^{1,2} 王超¹ 焦晓国^{1*} 张友军^{3*}

(1. 湖北大学生命科学学院, 生物催化与酶工程国家重点实验室, 武汉 430062; 2. 湖北科技学院核技术与化学生物学院, 咸宁 437100; 3. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

CAI Chaohui^{1,2} WANG Chao¹ JIAO Xiaoguo^{1*} ZHANG Youjun^{3*}

(1. State Key Laboratory of Biocatalysis and Enzyme Engineering, School of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei Province, China; 2. School of Nuclear Technology and Chemistry & Biology, Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100, Hubei Province, China; 3. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

番茄斑萎病毒(tomato spotted wilt virus, TSWV)可使花生、番茄、辣椒和曼陀罗等多种植物致病,西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* 是其媒介昆虫,而烟粉虱 *Bemisia tabaci* 并不能高效传播 TSWV,为非媒介昆虫(Pan et al., 2013)。植物病毒不仅可以与媒介昆虫发生相互作用,还可以直接或间接修饰非媒介昆虫的行为,导致非媒介昆虫适合度的改变(Chen et al., 2017)。田间自然条件下, Q型烟粉虱在感染 TSWV 的寄主上取食, TSWV 可能对携毒 Q型烟粉虱的寄主选择及适合度产生影响。本研究拟分析 Q型烟粉虱获取并保持 TSWV 的能力,探讨携带 TSWV 对其在非传毒寄主棉花上的适合度的影响,以期为 TSWV 与非媒介昆虫烟粉虱的互作研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫及植物: Q型烟粉虱于 2009 年采集于北京市花卉市场一品红上,于自然光照、26±2℃温室中在一品红上继代饲养获得实验种群,采用 *COI* 基因检测烟粉虱生物型,每代随机选择 15 头进行检测,确保 Q型烟粉虱种群纯度。棉花品种 DP99B、感染和未感染 TSWV 的曼陀罗由中国农业科学院蔬菜花卉研究所植物保护研究室昆虫组提供,一品红购自北京市花卉市场。采用填有营养土的 1.5 L 营养钵种植植物,每种植物单株种植,于上述温室中培养至 6~7 片真叶时供试。

试剂及仪器: Es Taq Mix 扩增试剂、Trizol 总 RNA 提取试剂盒、SuperReal PreMix Plus 荧光定量专用

试剂、ROX Reference Dye 荧光定量 PCR 参比染料,北京天根生化科技有限公司;反转录试剂盒,日本 TaKaRa 公司。Bio-RAD S1000 PCR 仪、Gel Doc EQ 凝胶成像系统,美国 Bio-Rad 公司;Quantstudio 3 荧光定量 PCR 仪,美国 Thermo Fisher 公司;M205C 体式显微镜,德国徕卡仪器有限公司;RXZ 型光照培养箱,宁波江南仪器厂。

1.2 方法

Q型烟粉虱对 TSWV 的获取能力测定:从一品红上收集 Q型烟粉虱成虫,让其在感染 TSWV 的曼陀罗上取食,分别于 4、8、12、24、48 和 72 h 后取样,每个时间点随机收集 90 头,3 个重复,每个重复 30 头,液氮处理后于 -80℃ 保存备用。利用 Trizol 总 RNA 提取试剂盒分别提取收集样品的 RNA,根据反转录试剂盒操作说明书将提取的 RNA 反转录为 cDNA。以 *Actin* 为内参基因(引物序列: F: 5'-CGCTGCCTC-CACCTCATT-3', R: 5'-ACCGCAAGATTCCATACC-C-3'),以 TSWV 特异性引物(F: 5'-CTTGCCATAAT-GCTGGGAGGTAG-3', R: 5'-ATCCCGAGGTCTTT-GTATTTTGC-3')进行 PCR 检测。20 μL 扩增体系: 2×SuperReal PreMix Plus 7.6 μL、上下游引物各 0.5 μL、50×ROX Reference Dye 0.4 μL、cDNA 模板 1 μL,用 ddH₂O 补足至 20 μL。反应程序: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 40 个循环; 72℃ 再延伸 5 min。采用 2^{-ΔΔC_t} 法对 TSWV 的 cDNA 进行定量分析。

Q型烟粉虱对 TSWV 的保持能力测定:从一品

红上收集Q型烟粉虱成虫,让其在感染TSWV的曼陀罗上取食48 h后再转接到非传毒寄主DP99B棉花上饲养,分别于5、10、15和20 d后取样,以在未感染TSWV的曼陀罗上取食48 h后再转接到DP99B棉花上饲养10 d的Q型烟粉虱为阴性对照,每次随机收集90头,3个重复,每个重复30头,液氮处理后加入1 mL Trizol,于-80℃保存备用。20 d后去除棉花上的成虫,待其所产卵发育为子代成虫后,随机收集90头,3个重复,每个重复30头。采用上述方法检测采集样品体内是否存在TSWV,分析Q型烟粉虱对TSWV的保持能力。

TSWV对Q型烟粉虱在棉花上适合度的影响测定:设感染与未感染TSWV的Q型烟粉虱2个处理,每处理30头,试验在相对湿度70%、温度26℃、光周期16 L:8 D的光照培养箱内进行。分别取2个处理的Q型烟粉虱成虫在体式显微镜下鉴别雌雄,把雌成虫转接到夹在6~7片真叶期棉花中部叶片的内径1.5 cm微虫笼中,每笼1头,每株棉花夹4个微虫笼。逐日观察并记录雌成虫存活情况,直至其死亡,以存活天数计其寿命;饲养7 d后转移微虫笼中的雌成虫到1株新棉花上,在体式显微镜下观察记录之前叶片上所产卵粒数,累计2周内的产卵量,以此衡量其生殖力。另取2个处理的雌、雄成虫各10对,每对置于1个微虫笼中,夹在6~7片叶期棉花中部叶片上,每株棉花夹4个微虫笼,待产卵24 h后去除所有成虫,于体式显微镜下统计每笼中的产卵量,15 d后逐日观察卵及若虫的发育进度,记录羽化数量,直至全部若虫羽化。分别统计Q型烟粉虱子代由卵发育至成虫的历期和存活率,并随机取30头刚羽化的雌、雄成虫,测量其体长。

1.3 数据分析

采用SPSS 16.0对试验数据进行统计分析,应用最小显著差数(LSD)法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 Q型烟粉虱对TSWV的获取能力

Q型烟粉虱在感染TSWV的曼陀罗上取食4~48 h,其体内TSWV相对含量随取食时间延长呈线性上升,48 h后达到饱和($F_{5,17}=116.978, P<0.001$,图1)。

2.2 Q型烟粉虱对TSWV的保持能力

Q型烟粉虱在感染TSWV的曼陀罗上取食48 h后转接到棉花上饲养5、10、15、20 d后,均能在其体内检测到TSWV,而其子代体内未检测到TSWV。

2.3 TSWV对Q型烟粉虱在棉花上适合度的影响

感染和未感染TSWV的Q型烟粉虱在棉花上饲养后,其产卵量分别为85.9、111.4粒,雌成虫寿命

分别为19.2、21.4 d,前者均极显著低于后者($P<0.01$);其后代发育历期(21.2、21.6 d)、若虫存活率(80.7%、84.2%)、雌成虫体长(0.731、0.730 cm)和雄成虫体长(0.658、0.659 cm)均无显著差异。

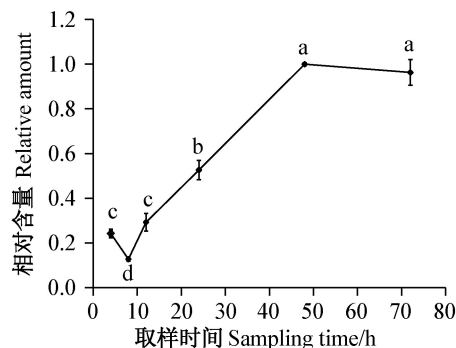


图1 Q型烟粉虱在感染TSWV曼陀罗上取食不同时间其体内病毒含量

Fig. 1 TSWV content in the Q biotype whitefly feeding on TSWV-infected *Datura stramonium*

图中数据为平均数±标准误。不同小写字母表示经LSD法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different letters indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD test.

3 讨论

Q型烟粉虱不是TSWV的传播媒介,但其在感染TSWV的曼陀罗上取食4 h后,体内即能检测到TSWV,可见该虫能在短时间内获取TSWV,且其携带TSWV后在非传毒寄主棉花上持续取食20 d后仍能检测到TSWV,表明其一旦获毒可终生持毒。TSWV对Q型烟粉虱在棉花上的适合度有一定影响,能显著降低雌成虫的寿命与生殖力,这与Q型烟粉虱在携带TSWV辣椒上的寿命与生殖力下降的结果(Pan et al., 2013)一致;而感染TSWV和未感染TSWV的Q型烟粉虱所产子代在棉花上的发育历期、若虫存活率、雌雄成虫体长间均无显著差异,这与本研究后续发现感染TSWV的Q型烟粉虱转接到棉花后,母体携带的TSWV不能通过生殖垂直传递给后代的结论相吻合。

参考文献 (References)

- CHEN G, SU Q, SHI XB, LIU X, PENG ZK, ZHENG HX, XIE W, XU BY, WANG SL, WU QJ, et al. 2017. Odor, not performance, dictates *Bemisia tabaci*'s selection between healthy and virus infected plants. *Frontiers in Physiology*, 8: 146
- PAN HP, CHEN G, LI F, WU QJ, WANG SL, XIE W, LIU BM, XU BY, ZHANG YJ. 2013. Tomato spotted wilt virus infection reduces the fitness of a nonvector herbivore on pepper. *Journal of Economic Entomology*, 106(2): 924-928

(责任编辑:李美娟)