

野生甘蓝表皮毛对菜青虫的抗性机理

李 魁¹ 马 骁¹ 王志敏¹ 钱 伟² 梅家琴² 汤青林^{1*} 魏大勇^{1*}

(1. 西南大学园艺园林学院, 南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆 400715;

2. 西南大学农学与生物科技学院, 重庆 400715)

摘要: 为明确一种全身覆盖表皮毛的野生甘蓝 *Brassica incana* (编号 C01) 是否具有抗虫性, 通过测定菜青虫 *Pieris rapae* 对野生甘蓝 C01 和无毛甘蓝 *B. alboglabra* (编号 C41) 的拒食、取食和产卵行为进行抗性分析, 同时通过测定两者的内源激素含量、表皮毛发育相关基因表达量和防御酶活性探讨野生甘蓝 C01 对菜青虫的抗性机理。结果显示, 生长至 8~10 叶期, 无毛甘蓝 C41 叶片被菜青虫啃食严重, 但野生甘蓝 C01 叶片未被啃食; 菜青虫对无毛甘蓝 C41 和剪除表皮毛的野生甘蓝 C01 叶片取食面积差异不显著, 但均显著大于对野生甘蓝 C01 叶片的取食面积; 着卵的无毛甘蓝 C41 植株显著多于野生甘蓝 C01。野生甘蓝 C01 叶片中茉莉酸和茉莉酸甲酯含量都显著高于无毛甘蓝 C41 叶片, 而两者中水杨酸和水杨酸甲酯的含量差异不显著。 *BolJAZ1* 基因在无毛甘蓝 C41 叶片中高表达, 而 *BolGL3* 和 *BolGL2* 基因在野生甘蓝 C01 叶片中高表达; 且野生甘蓝 C01 叶片中多酚氧化酶、过氧化物酶和苯丙氨酸解氨酶 3 种防御酶的活性均显著高于无毛甘蓝 C41。表明野生甘蓝 C01 叶片的表皮毛会影响菜粉蝶产卵, 对菜青虫表现出显著抗性, 同时野生甘蓝 C01 叶片中内源激素茉莉酸和茉莉酸甲酯的增加以及 *BolGL3/BolGL2* 基因的高表达显示茉莉酸途径可能参与了甘蓝表皮毛的分化。

关键词: 甘蓝; 表皮毛; 菜青虫; 激素; 抗性

The mechanism of trichome resistance in wild *Brassica oleracea* to cabbage white butterfly *Pieris rapae*

Li Kui¹ Ma Xiao¹ Wang Zhimin¹ Qian Wei² Mei Jiaqin² Tang Qinglin^{1*} Wei Dayong^{1*}

(1. Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions of Ministry of Education, College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: To determine whether a wild type of *Brassica incana* (coded as C01) covered with trichomes was insect-resistant, the insect resistance analysis of C01 and hairless *B. alboglabra* (coded as C41) was performed by measuring the antifeeding effect, feeding effect and the spawning behavior of cabbage white butterfly *Pieris rapae*. Meanwhile, to explore the mechanism of C01 resistance to *P. rapae*, the endogenous hormone content, gene expression patterns related to trichome development and the activity of defense enzymes in C01 and C41 were further determined. The results showed that the leaves of C41 were more seriously eaten than C01 by *P. rapae* during the 8- to 10-leaf stage. There was no significant difference in the areas eaten by *P. rapae* between the leaves of C41 and C01 with trichomes cut off, but the leaf area of C41 eaten by *P. rapae* was significantly larger than that of wild C01. The number of eggs in C41 was significantly greater than that in C01. In addition, the average contents of jasmonic ac-

基金项目: 重庆市自然科学基金 (Cstc2019jcyj-msxmX0335, Cstc2019jcyj-zdxmX0022)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: swutql@163.com, swuwdy@swu.edu.cn

收稿日期: 2020-07-04

id (JA) and methyl jasmonate (MeJA) in C01 leaves were significantly higher than those in C41 leaves, while the average contents of salicylic acid and methyl salicylate had no significant difference between the two types of leaves. Gene expression analysis indicated that *BolJAZ1* was highly expressed in C41 leaves, while *BolGL3* and *BolGL2* were highly expressed in C01 leaves. The activities of polyphenol oxidase, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in C01 leaves were significantly higher than those in C41 leaves. In brief, the trichome of C01 affected the spawning of the butterfly, and thus showed significant resistance to *P. rapae*. Meanwhile, the increase of endogenous JA and MeJA in C01 leaves and the high expression of *BolGL3/BolGL2* genes suggested that the JA pathway might be involved in the differentiation of trichome in *B. oleracea*.

Key words: *Brassica oleracea*; trichome; *Pieris rapae*; hormone; resistance

甘蓝 *Brassica oleracea* (基因组为 CC, $2n=18$) 为十字花科芸薹属的一年生或多年生草本植物, 野生甘蓝起源于地中海沿岸, 栽培甘蓝存在很多变种, 如羽衣甘蓝 *B. oleracea* var. *acephala*、结球甘蓝 *B. oleracea* var. *capitata*、紫甘蓝 *B. oleracea* var. *capitata rubra*、花椰菜 *B. oleracea* var. *botrytis*、青花菜 *B. oleracea* var. *italica* 和芥蓝 *B. alboglabra* 等 (Liu et al., 2014)。甘蓝类蔬菜是我国主要的十字花科蔬菜, 但在生长过程中常遭遇虫害, 严重影响其品质和产量; 化学防治不仅会增加生产成本, 还会污染环境, 威胁人体健康, 因此培育抗虫品种是解决该问题的治本之道。然而我国栽培甘蓝种质资源有限, 遗传背景狭窄, 缺乏抗虫优质资源, 使得甘蓝类蔬菜的抗虫育种受到很大限制 (方智远, 2008; 杨丽梅等, 2016)。野生种质资源对于栽培作物的遗传改良具有重要价值, Mei et al. (2011) 早前收集的野生甘蓝资源中有一种野生甘蓝 *B. incana* (编号为 C01), 具有全身覆盖表皮毛的显著特点, 研究发现其存在显著的抗蚜特性, 对改良栽培甘蓝的抗虫特性有较大利用潜力。张继伟等 (2018) 也综述了植物表皮毛在保护植物免受昆虫和病原体侵害方面的功能, 对生物和非生物胁迫具有防御作用。

植物表皮毛由表皮细胞发育而来, 是生长在植物表皮组织的一种特化结构 (Balkunde et al., 2010)。表皮毛处于植物表皮层与环境之间, 增加了植物表皮厚度, 为植物提供了一道天然的物理屏障; 有些植物表皮毛还会分泌一些次生代谢物质, 提高其对生物与非生物胁迫 (如紫外线、寒冷等) 的抗性 (Schuurink & Tissier, 2020; Tang et al., 2020)。比如, 番茄 *Solanum lycopersicum* 叶片表皮毛能有效抑制三叶斑潜蝇 *Liriomyza trifolii* 的侵害及产卵 (Rakha et al., 2017); 李勇等 (2003) 利用显微观察和电镜扫描发现 21 个番茄品种叶片表面上表皮毛的长

度和密度对美洲斑潜蝇 *Liriomyza sativae* 的取食选择起主要作用。毛状体密度的增加可以有效减少昆虫胁迫, 这种现象也广泛存在于其他物种, 如野生二粒小麦 *Triticum turgidum* var. *dicoccoides* 的毛状体密度显著高于驯化小麦, 对禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi* 有着更强的物理防御能力 (Batyrschina et al., 2020)。在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 群体中, 昆虫种类及数量与其毛状体密度呈显著负相关, 表明表皮毛的抗虫性不单作用于单一昆虫; 拟南芥突变体 *gll* 毛状体密度相较于野生型显著减少, 导致其对黄曲条跳甲 *Phyllotreta striolata* 和芜菁叶蜂 *Athalia rosae* 的抗性显著降低 (Sato et al., 2019)。在其他十字花科植物中, 甘蓝型油菜 *B. napus* 叶片表面浓密且长的毛状体可以阻碍蚜虫的探查吸食 (Hao et al., 2019)。过量表达 *AtGL3* 的甘蓝型油菜叶片长出表皮毛, 与无毛非转基因甘蓝型油菜相比, 其对跳甲取食和小菜蛾 *Plutella xylostella* 产卵的抗性显著提升 (Gruber et al., 2018)。

植物表皮毛的发育受到环境和植物激素的综合调控。Qi et al. (2011; 2014) 发现赤霉素 (gibberellin, GA) 和茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 协同正向调控表皮毛的发生, 两者分别通过诱导 GA 途径抑制因子 DELLA 蛋白和 JA 途径抑制因子 (jasmonate ZIM-domain, JAZ) 的降解, 解除它们与 MYB/bHLH/WD-repeat (MBW) 复合物之间的相互作用, 激活表皮毛的形成。在一些分泌型表皮毛中也发现了 JA 调控途径, 如黄花蒿 *Artemisia annua* 和番茄的表皮细胞中, JA 可以通过 JAZ 调控 GL1-GL3-TTG1 复合体, 进而作用于 GL2 调控表皮毛的启动 (刘金秋等, 2016; Yan et al., 2017)。此外, 表皮细胞中的细胞分裂素 (cytokinins, CK) 和 GA 还可以作用于 *GIS2*, 再由 *GIS2* 调控 *GL2* 的表达, 从而指导花序表皮毛的发育 (Gan et al., 2007)。而水杨酸 (salicylic acid, SA)

对表皮毛的形成具有负调控作用(Traw & Bergelson, 2003), 同时会减弱 JA 的作用(Bowling et al., 1997; Maes et al., 2008; War et al., 2013)。例如, 对番茄植株外部喷施 GA、JA 可以提高内源 GA、JA 和生长素的含量, 降低内源细胞分裂素(cytokinin, CTK) 和 SA 的含量, 促进 IV 型和 VI 型表皮毛的形成(刘金秋等, 2016)。激素代谢途径产物众多, 多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO) 作为 JA 代谢途径的重要产物, 在植物抵御植食性昆虫和病原体入侵方面扮演着重要角色(Cao et al., 2014), 同时植物体内防御酶也会受外源激素调控改变其对昆虫的抗性, 例如外源 JA 诱导菜豆体内 PPO 与过氧化物酶(peroxidase, POD) 活性升高, 抑制美洲斑潜蝇的取食与产卵(田旭涛等, 2013)。为明确野生甘蓝 C01 对菜青虫的抗性, 了解其表皮毛与抗虫性的关系, 本研究采用多种方式分析野生甘蓝的抗虫性, 并进一步通过测定内源激素含量、表皮毛发育相关基因表达量和防御酶活性探究野生甘蓝表皮毛与抗虫性的关系, 以期对甘蓝类蔬菜的抗虫育种提供有效的备选种质。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料: 野生甘蓝 C01, 不结球, 全身覆盖表皮毛; 无毛甘蓝 C41, 属于芥蓝, 不结球, 无表皮毛, 由本课题组繁育保存。秋越甘蓝, 属于结球甘蓝, 结球, 无表皮毛, 购自重庆三千种业有限公司, 所有材料于 2019 年 8 月底定植于西南大学蔬菜试验基地, 9 月底移栽, 整个生育期不施用任何化肥和农药, 按照常规栽培方式管理, 生长至 8~10 叶期供试。菜粉蝶 *Pieris rapae* 卵收集于上述试验基地, 置于人工气候箱中在 27℃ 下孵化, 选取 3 龄幼虫(菜青虫) 和羽化 1 d 的成虫供试。

试剂: RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒(DP441), 北京天根生化科技有限公司; 反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Reagent Kit, 北京宝日生物技术有限公司; Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix, 南京诺唯赞生物科技有限公司; JA、SA、茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA) 和水杨酸甲酯(methyl salicylate, MeSA) 标准品, 美国 Sigma 公司; 氘代水杨酸、二氢茉莉酸和二氢茉莉酸甲酯标准品, 捷克斯洛伐克 Olchemim 公司; 色谱级甲醇, 美国 Tedia 公司; 其余试剂均为国产分析纯。

仪器: 安捷伦 1290 高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; 串联 Qtrap6500 质谱仪, 美国 AB 公司;

CFX96 荧光定量 PCR 仪、T100™ Thermal Cycler 型 PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司; 752N Plus 紫外可见分光光度计, 上海仪田精密仪器有限公司; 5910R 高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; CX43 体视显微镜, 日本 Olympus 公司。

1.2 方法

1.2.1 田间表型观察

对种植于西南大学蔬菜试验基地的不同甘蓝材料进行观察, 样地长 10 m×宽 2 m, 株行距 35 cm×55 cm, 共 45 株野生甘蓝 C01 和 45 株无毛甘蓝 C41, 待植株长至 8~10 叶期, 观察供试材料叶片遭受菜青虫的啃食情况(是否存在虫洞、虫卵) 以及菜青虫的附着情况, 并各取 3 份不同甘蓝的代表性材料于体式显微镜下观察。

1.2.2 菜青虫拒食试验

取 8~10 叶期的野生甘蓝 C01 和无毛甘蓝 C41 新鲜叶片各 8 g, 在 80 mL 95% 乙醇中充分研磨, 4 000 Hz 超声波水浴 0.5 h, 过滤, 重复 1 次; 置于旋转蒸发仪去除乙醇, 用 10% 乙醇定容至 100 mL, 制成野生甘蓝 C01 和无毛甘蓝 C41 粗提液, 4℃ 冰箱冷藏待用。用直径 2 cm 打孔器将 8~10 叶期秋越甘蓝叶片制成大小一致的叶碟, 将叶碟分别在上述 2 种甘蓝粗提液中浸泡 15 s 后取出, 自然晾干, 放入长 20 cm×宽 15 cm×高 10 cm 的盒子中, 使用滤纸保湿, 每个盒子放置 20 片已处理的叶碟, 并接入饥饿 4 h 且大小一致、生长健康的菜青虫 10 条, 5 次重复。用 10% 乙醇处理和未做任何处理的叶碟作为阴性对照和空白对照, 利用坐标纸统计饲喂 3、6、12、24、36 和 48 h 后菜青虫对秋越甘蓝的取食面积(Morita et al., 2007; Afzal et al., 2019; Zou et al., 2019)。

1.2.3 菜青虫取食试验

取 8~10 叶期大小一致、无病虫害的野生甘蓝 C01 与无毛甘蓝 C41 叶片放置于长 60 cm×宽 30 cm×高 15 cm 的同一纸箱中, 保持环境一致。将采集的叶片分为 3 组, 每组 10 片, 重复 5 次, 其中第 1 组为野生甘蓝 C01, 第 2 组为无毛甘蓝 C41, 第 3 组为剪除表皮毛的野生甘蓝 C01。然后在每个叶片上接入 3 条大小一致、生长健康且饥饿处理 4 h 的 3 龄菜青虫, 用坐标纸统计饲喂 3、6、12 和 24 h 后菜青虫对各组甘蓝的取食面积(Desneux & Ramirez-Romero, 2009)。

1.2.4 菜粉蝶产卵试验

分别将盆栽的 20 株野生甘蓝 C01 和 20 株无毛甘蓝 C41 放入长 10 m×宽 6 m×高 3 m 的试验小区, 间隔排列, 每盆 1 株, 1 个试验小区作为 1 个重复, 试

险设3次重复,每种甘蓝共计60株。用0.425 mm孔径的防虫网覆盖,待植株长到10叶期时,放入羽化1 d的菜粉蝶30只,雌雄比为1:1,用10%糖水棉球放在周围,给菜粉蝶补充营养,分别统计释放3 d和6 d时2种甘蓝叶片上的着卵情况(Larranaga et al., 2019; Griese et al., 2020)。

1.2.5 植物内源激素含量的测定

以异丙醇/水/盐酸缓冲液提取植物内源激素,用高效液相色谱仪与串联质谱仪(high performance liquid chromatography-mass spectrum/mass spectrum, HPLC-MS/MS)对植物内源激素SA、JA、MeSA和MeJA进行定量分析。称取野生甘蓝C01与无毛甘蓝C41的8~10叶期叶片各0.5 g,于液氮中研磨至粉碎装入玻璃试管中;向粉末中加入10 mL异丙醇/盐酸提取缓冲液,同时加入1 μ g/mL内标溶液(氘代水杨酸、二氢茉莉酸和二氢茉莉酸甲酯)8 μ L,4℃振荡30 min;再加入20 mL二氯甲烷后于4℃继续振荡30 min;将混合液在4℃、13 000 r/min条件下离心5 min,取下层有机相;避光,以氮气吹干有机相,以400 μ L甲醇(含0.1%甲酸)溶解;过0.22 μ m滤膜,进行HPLC-MS/MS检测,3次重复。以甲醇(含0.1%甲酸)为溶剂分别配制浓度梯度为0.1、0.2、0.5、2、5、20、50和200 ng/mL的SA、JA、MeSA和MeJA标准溶液,并加入终浓度为20 ng/mL的内标溶液,通过标准曲线法对野生甘蓝C01与无毛甘蓝C41叶片中的内源激素SA、JA、MeSA和MeJA进行定量。色谱柱为Poroshell 120 SB-C18反相色谱柱(内径2.1 mm×长150 mm,填充物粒径2.7 μ m),流动相A为甲醇(含0.1%甲酸),流动相B为水(含0.1%甲酸),洗脱梯度:0~1 min, A=20%;1~9 min, A递增至80%;9~10 min, A=80%;10~10.1 min, A递减至20%;10.1~15 min, A=20%,柱温为30℃,进样体积为2 μ L。

1.2.6 JA通路关键基因的定量检测

模式植物拟南芥表皮毛发育的调控模型基本被阐明,超过30个基因已被证实参与表皮毛的形成和发育(马骁等,2020)。其中一条途径是JA通路,该通路首先作用于抑制因子JAZ蛋白,进而调控GL1-GL3-TTG1复合体,最后作用于GL2基因,调控表皮毛的启动。所以本研究拟克隆野生甘蓝C01与无毛甘蓝C41叶片中调控表皮毛发育的JA途径上游、中游和下游的3个关键基因*BolJAZ1*、*BolGL3*和*BolGL2*。使用植物组织总RNA提取试剂盒参照说明书分别提取8~10叶期野生甘蓝C01和无毛甘蓝C41叶片的总RNA,逆转录合成cDNA。以*Bol-*

JAZ1、*BolGL3*和*BolGL2*基因的cDNA为模板,利用Oligo 7.0软件设计实时荧光定量PCR引物q*BolJAZ1*-F(5'-TCAATCAACAGCAACAACAACA-3')/q*BolJAZ1*-R(5'-GGCTTCGGAGGATAATGATGAC-3')、q*BolGL3*-F(5'-GGAACCGCATCAATCGTAGC-A-3')/q*BolGL3*-R(5'-CCCAGCCACTGGTGAATCC-AA-3')和q*BolGL2*-F(5'-GTTGAAAGCGGAGTTA-GAGAAG-3')/q*BolGL2*-R(5'-CTTCCTCCTCCTCC-TCCTC-3'),以甘蓝*Actin*基因为内参基因(qRT-*actin*-F: 5'-CAATCTACGAGGGTTACGCTCTTCG-3'/qRT-*actin*-R: 5'-GTGGTGAACATGAACCTCTCTC-GG-3'),引物均由华大基因公司合成。20 μ L PCR反应体系:2×*Taq* Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μ L、上下游引物各1 μ L、模板cDNA 2 μ L、RNase-Free ddH₂O 6 μ L。PCR反应程序:94℃预变性5 min;94℃变性20 s,56℃退火20 s,72℃延伸20 s,共41个循环;72℃再延伸5 min;采集熔解曲线:将温度调至60℃保持90 s进行预熔解,再以1.0℃/s速度升温,每升温1℃保温5 s,直至95℃。采用2^{- $\Delta\Delta C_T$} 法分析3个基因的相对表达量(Lin et al., 2015; Han et al., 2020)。

1.2.7 植物防御酶活性的测定

分别选取8~10叶期野生甘蓝C01和无毛甘蓝C41的第4片真叶,放入液氮中冷冻并研磨成粉末,放入-80℃冰箱保存备用。分别取0.2 g甘蓝叶片粉末,置于预冷的5 mL离心管中,加入4℃预冷的提取液1 mL,测定PPO、POD和苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)活性时所用提取液分别为pH 7.0的0.05 mol/L磷酸缓冲液(含0.7%聚乙烯吡咯烷酮)、pH 8.0的0.05 mol/L磷酸缓冲液(含0.7%聚乙烯吡咯烷酮)和pH 8.8的0.05 mol/L硼酸缓冲液(含0.5%聚乙烯吡咯烷酮)。用漩涡振荡仪充分混匀,浸提5 min。在4℃、8 000 r/min条件下离心5 min,取上清液冰浴,即为粗酶液。

PPO活性测定:在2.5 mL相应磷酸缓冲液中加入0.02 mol/L邻苯二酚1 mL与粗酶液0.5 mL,15 s后在紫外分光光度计中测定波长234 nm处1 min内的吸光度值变化,计算PPO活性。

POD活性测定:取粗酶液1.0 mL、1 g/L愈创木酚1.0 mL、蒸馏水6.9 mL和0.18%过氧化氢溶液1.0 mL混匀,10 min后加入0.5 mol/L偏磷酸终止反应,测定波长470 nm处的吸光度值,计算POD活性。

PAL活性测定:取2.0 mL相应硼酸缓冲液加入0.02 mol/L苯丙氨酸1 mL与粗酶液0.5 mL,30℃水浴30 min后测定波长290 nm处的吸光度值,计算

PAL活性。上述所有试验均设3次重复。

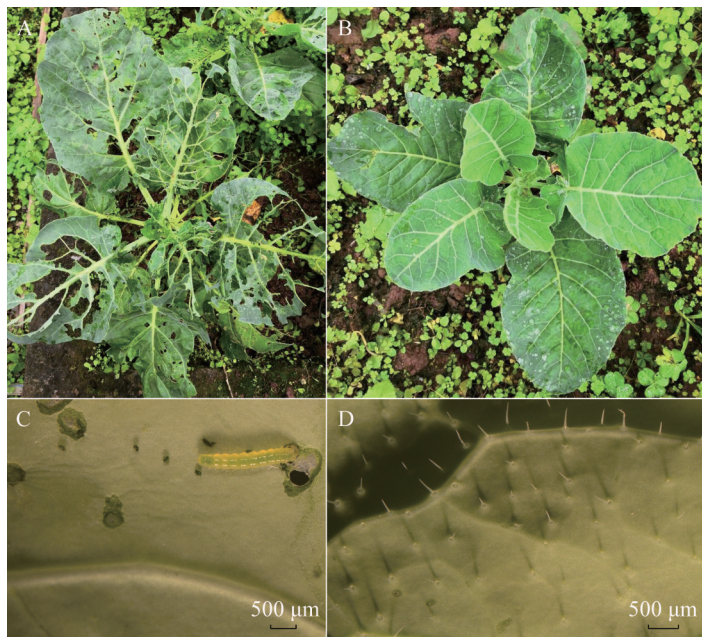
1.3 数据分析

采用SPSS 25.0软件对试验数据进行方差分析,通过Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 田间表型观察结果

在田间自然状态下,8~10叶期无毛甘蓝C41和野生甘蓝C01对菜青虫的抗性存在明显差异,其中无毛甘蓝C41叶片被菜青虫啃食严重(图1-A),但野生甘蓝C01叶片未被啃食(图1-B)。进一步观察发现,无毛甘蓝C41叶片背面有很多菜粉蝶的卵及正在啃食的幼虫(图1-C),但野生甘蓝C01背面未发现菜粉蝶的卵及幼虫,而是密集直立的茸毛(图1-D)。



A~B: 分别为田间自然生长的无毛甘蓝C41和野生甘蓝C01; C~D: 分别为体视显微镜下C41无毛甘蓝和野生甘蓝C01的叶背。A~B: Glabrous *Brassica alboglabra* C41 and hairy *B. incana* C01 in the field, respectively; C~D: the reverse sides of C41 and C01 leaves under stereoscopic microscope, respectively.

图1 田间无毛甘蓝C41和野生甘蓝C01被菜青虫啃食情况

Fig. 1 The feeding behavior of *Pieris rapae* on *Brassica alboglabra* C41 and *Brassica incana* C01 in the field

2.3 菜青虫对甘蓝C01和C41离体叶片的取食性

离体叶片取食结果显示,饲喂3 h时,野生甘蓝C01、无毛甘蓝C41和剪除表皮毛的野生甘蓝C01的叶片均出现不同程度的孔洞,单个孔洞最大面积为 2.45 cm^2 ,野生甘蓝C01和剪除表皮毛野生甘蓝C01的叶片被菜青虫取食的面积差异不显著,但两者均显著低于无毛甘蓝C41叶片被取食面积。饲喂6~24 h,3组离体叶片被菜青虫取食的面积逐渐增大,从孔洞变为缺刻,无毛甘蓝C41叶片和野生甘蓝

2.2 甘蓝C01和C41粗提液对菜青虫的拒食作用

拒食试验结果显示,饲喂0~3 h,野生甘蓝C01和无毛甘蓝C41粗提液处理叶碟被菜青虫取食面积差异不显著,均小于 5 cm^2 ,但均显著小于阴性对照和空白对照;饲喂6~36 h,2种甘蓝粗提液处理叶碟被菜青虫取食的面积逐渐增大,其中无毛甘蓝C41粗提液处理叶碟被取食面积显著大于野生甘蓝C01粗提液处理叶碟,但两者被取食面积均显著小于阴性对照和空白对照;饲喂48 h,4组叶碟被菜青虫取食面积差异不显著,平均有96.7%的叶碟面积被菜青虫取食(图2-A),试验过程中菜青虫均处于存活状态。表明相对于无毛甘蓝C41,野生甘蓝C01的叶片粗提液在处理早期(6~36 h)对菜青虫有一定的趋避作用,但两者对菜青虫均无毒害作用。

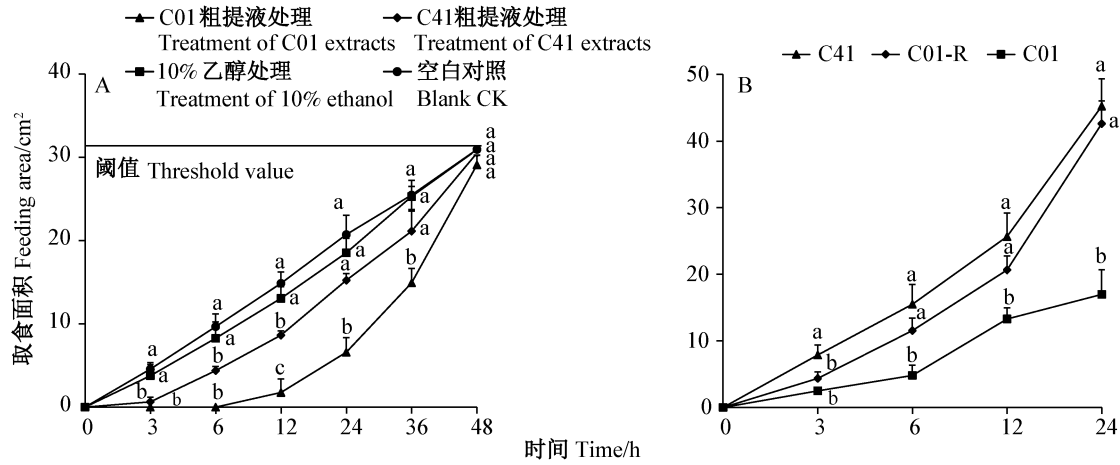
C01剪除表皮毛叶片被取食面积差异不显著,但均显著高于野生甘蓝C01叶片被取食面积(图2-B),说明表皮毛的存在显著削弱了菜青虫对野生甘蓝C01叶片的取食。

2.4 甘蓝表皮毛对菜粉蝶产卵的影响

接入菜粉蝶3 d后,所有野生甘蓝C01植株上均未见着卵,而平均有7.7株无毛甘蓝C41植株上有着卵,占供试无毛甘蓝植株的38.5%。接入菜粉蝶6 d后,平均有1.3株野生甘蓝C01植株上有着卵,且均

集中在最外层老叶(表皮毛数量及密度低于幼嫩叶片)上,而无毛甘蓝 C41 有着卵植株的比例从 38.5% 增加到了 73.5%,即平均约有 15 株植株上有着卵,显

著高于野生甘蓝 C01 着卵植株的数量(图 3-A),表明野生甘蓝 C01 植株叶片的表皮毛结构可抑制菜粉蝶产卵。

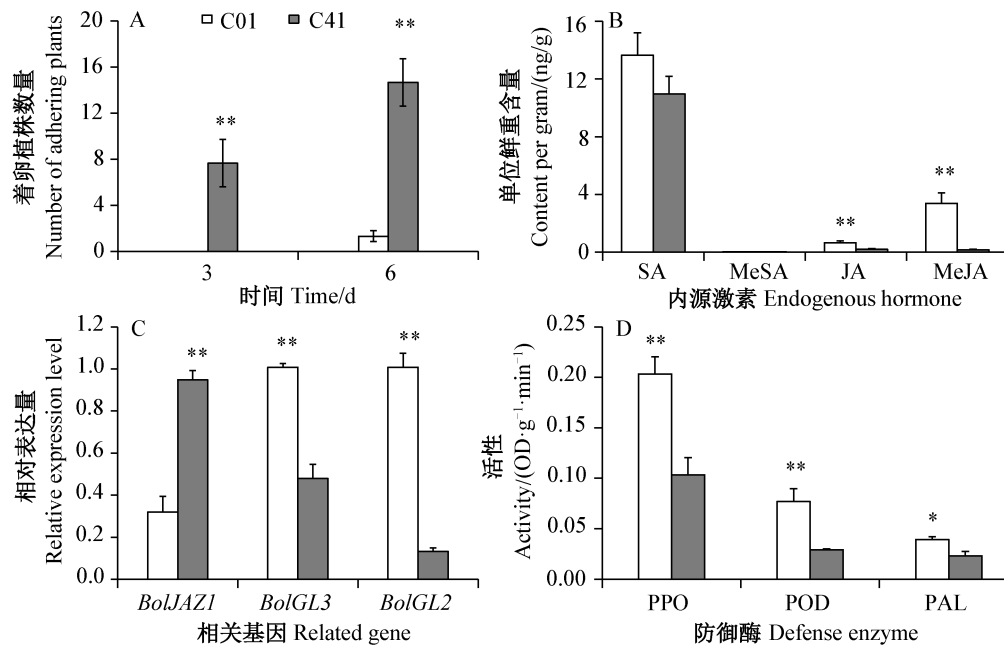


A: 取食阈值为 31.4 cm^2 ; B: C01-R 为剪除表皮毛的野生甘蓝 C01 叶片。A: Threshold value of feeding areas is 31.4 cm^2 ; B: C01-R is the leaf of C01 with trichomes removed.

图2 野生甘蓝 C01 和无毛甘蓝 C41 离体叶片对菜青虫的拒食(A)和取食(B)作用

Fig. 2 Antifeeding (A) and feeding (B) effects of *Brassica incana* C01 and *B. alboglabra* C41 on *Pieris rapae*

图中数据为平均数 $\pm$ 标准差。同一时间点各处理间的不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean $\pm$ SD. Different letters among different treatments at the same time indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.



SA: 水杨酸; MeSA: 水杨酸甲酯; JA: 茉莉酸; MeJA: 茉莉酸甲酯; PPO: 多酚氧化酶; POD: 过氧化物酶; PAL: 苯丙氨酸解氨酶。SA: Salicylic acid; MeSA: methyl salicylate; JA: jasmonic acid; MeJA: methyl jasmonate; PPO: polyphenol oxidase; POD: peroxidase; PAL: phenylalanine ammonia-lyase.

图3 野生甘蓝 C01 和无毛甘蓝 C41 叶片上菜粉蝶的产卵量以及内源激素和茉莉酸途径相关基因表达量的变化

Fig. 3 The spawning of *Pieris rapae* on the leaves of *Brassica incana* C01 and *B. alboglabra* C41 and the change of gene expression related to endogenous hormone and jasmonic acid pathway

图中数据为平均数 $\pm$ 标准差。*和**分别表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平差异显著。Data are mean $\pm$ SD. * or ** indicates significant difference at $P<0.05$ or $P<0.01$ level by Duncan's new multiple range test.

2.5 甘蓝 C01 和 C41 叶片内源激素含量分析

内源激素测定结果显示,每种激素都检测到2种碎片离子,将其中离子响应值高且结果稳定、重复性好,杂质干扰也较少的选为定量离子,以该离子检测响应值分别对样品中JA、MeJA、SA和MeSA定量。结果表明,野生甘蓝C01叶片中SA含量平均为13.66 ng/g,与无毛甘蓝C41叶片中SA含量10.96 ng/g无显著差异,且MeSA在野生甘蓝C01和无毛甘蓝C41叶片中含量都极少,平均为0.03 ng/g。但是,野生甘蓝C01叶片中JA和MeJA的含量都极显著高于无毛甘蓝C41叶片中的,分别为后者的3.5倍和21.1倍(图3-B)。

2.6 JA通路关键基因表达和防御酶活性分析

在野生甘蓝C01和无毛甘蓝C41叶片中分别克隆了JA调控表皮毛发育途径上、中和下游的3个关键基因*BolJAZ1*、*BolGL3*和*BolGL2*,荧光定量表达分析发现,*BolJAZ1*基因在无毛甘蓝C41叶片中的表达量显著高于在野生甘蓝C01中的表达量,*BolGL3*和*BolGL2*基因的表达趋势与*BolJAZ1*正好相反,在野生甘蓝C01叶片中显著高表达,在无毛甘蓝C41叶片中微表达(图3-C)。酶活性测定结果显示,在野生甘蓝C01叶片中PPO、POD和PAL活性分别平均为0.20、0.08和0.04 OD·g⁻¹·min⁻¹,均显著高于无毛甘蓝C41叶片中对应的酶活性(图3-D)。

3 讨论

田间自然状态下,8~10叶期的无毛甘蓝C41叶片被菜青虫大面积啃食,而野生甘蓝C01叶片未被啃食,室内拒食和取食试验结果显示,接入菜青虫6~36 h,野生甘蓝C01和无毛甘蓝C41粗提液处理叶碟被菜青虫取食的面积存在显著差异,推测野生甘蓝C01的某些内含物对菜青虫有一定的趋避性,而接入菜青虫48 h,2种叶碟被取食面积相近,可能源于试虫的“饥不择食”。利用离体叶片喂食菜青虫,发现剪除表皮毛的野生甘蓝C01叶片与无毛甘蓝C41叶片被菜青虫取食面积差异不显著,但显著大于被取食的野生甘蓝C01叶片,说明叶片表皮毛对菜青虫的取食有显著影响。十字花科植物的表皮毛不具备分泌功能,因此推测野生甘蓝C01表皮毛影响菜青虫取食的原因是其表皮毛的物理结构妨碍了菜青虫的附着。进一步采用田间独立网棚的菜粉蝶产卵试验发现,着卵的野生甘蓝C01植株比例显著少于无毛甘蓝C41植株着卵比例,且卵多附着在野生甘蓝C01的老叶上,而老叶上的表皮毛退化,密

度降低,证实了表皮毛的物理结构对菜粉蝶的附着产卵具有显著影响。表皮毛结构影响植物抗虫性具有广泛性,不仅仅存在于非分泌型腺毛植物拟南芥和本研究的野生甘蓝C01上,在番茄等分泌型腺毛植物中也有较多报道(Rakha et al., 2017; Gruber et al., 2018; Sato et al., 2019)。左香君等(2021)研究也证实野生甘蓝C01的表皮毛对蚜虫具有显著抗性,即表皮毛结构对昆虫抗性并非是单一特异的。基于以上研究结果,说明通过提高表皮毛密度来培育甘蓝抗虫品种具有可行性,并且这种抗虫性可能具有一定的广谱性。

表皮毛分化与植物内源激素水平密切相关,其中JA和SA在拟南芥表皮毛起始复合物的形成中分别起正向和负向调控作用(Traw & Bergelson, 2003; Chini et al., 2007; Thines et al., 2007),这与本研究测定结果一致,说明野生甘蓝C01中JA在调控表皮毛发育机制中的作用可能与拟南芥、番茄等相似。另外,野生甘蓝C01叶片中PPO等防御酶活性均显著高于无毛甘蓝C41中对应防御酶活性。Cao et al. (2014)也证实PPO作为JA信号转导途径的重要产物,与其他植物防御性酶POD与PAL共同保护植物免受生物与非生物胁迫。本研究对野生甘蓝C01与无毛甘蓝C41叶片中JA类物质含量进行测定,发现野生甘蓝C01叶片中JA和MeJA的含量显著高于无毛甘蓝C41叶片中的,与刘金秋等(2016)在番茄中的观察结果一致,内源JA含量的升高导致其表皮毛数量增加。说明JA作为重要的信号转导因子可能参与野生甘蓝C01的表皮毛发育,对JA调控表皮毛发育途径的研究具有重要意义。JA途径调控植物表皮毛发育的分子机制在拟南芥、番茄中已有较多报道,其中JA信号通过降解抑制蛋白JAZ来维持引起毛状体形成的激活因子GL1-GL3-TTG1复合体的稳定转录,进而激活GL2的表达,调控表皮毛的启动(Qi et al., 2014; Gruber et al., 2018)。本研究对JA途径3个重要基因*BolJAZ1*(上游)、*BolGL3*(中间)、*BolGL2*(下游)进行了定量表达分析,发现*BolJAZ1*在野生甘蓝C01叶片中低表达,在无毛甘蓝C41叶片中高表达,而*BolGL3*、*BolGL2*与*BolJAZ1*的表达趋势正好相反。该现象与拟南芥中*JAZ1*、*GL3*和*GL2*的表达模式一致(Qi et al., 2014),说明野生甘蓝中JA在调控表皮毛发育机制中的作用可能与拟南芥和番茄等相似。

综上所述,推测野生甘蓝C01对菜青虫的抗性一方面源于内在物质对菜青虫的趋避作用,另一方

面源于其表皮毛结构对虫体及菜粉蝶附着的物理障碍,而表皮毛结构的形成可能源于其内源JA和Me-JA含量的增加,使得JAZ蛋白降解,*BolJAZ1*的表达量降低,从而促进了*BolGL3*和*BolGL2*的表达。基于此特性,如果将表皮毛性状转入甘蓝等十字花科作物中,可望实现如花椰菜、苤蓝等非叶用型作物抗虫性的提升。而是否可以通过外源JA等激素调控甘蓝等十字花科作物表皮毛的发育,增强植物对菜青虫的抵御能力,则需要进一步对此调控途径进行深入研究。

参 考 文 献 (References)

- Afzal M, Farman M, Rasib KZ, Qureshi NA. 2019. Biocidal action of silver oak (*Grevillea robusta*) leaf extract on the termite *Heterotermes indicola* Wasmann (Blattodea: Rhinotermitidae). International Biodeterioration & Biodegradation, 139: 1–10
- Balkunde R, Pesch M, Hülkamp M. 2010. Trichome patterning in *Arabidopsis thaliana*: from genetic to molecular models. Current Topics in Developmental Biology, 91: 299–321
- Batyrshina ZS, Yaakov B, Shavit R, Singh A, Tzin V. 2020. Comparative transcriptomic and metabolic analysis of wild and domesticated wheat genotypes reveals differences in chemical and physical defense responses against aphids. BMC Plant Biology, 20(1): 1–20
- Bowling SA, Clarke JD, Liu Y, Klessig DF, Dong X. 1997. The cpr5 mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. The Plant Cell, 9(9): 1573–1584
- Cao HH, Wang SH, Liu TX. 2014. Jasmonate- and salicylate-induced defenses in wheat affect host preference and probing behavior but not performance of the grain aphid, *Sitobion avenae*. Insect Science, 21(1): 47–55
- Chini A, Fonseca S, Fernández G, Adie B, Chico JM, Lorenzo O, García-Casado G, López-Vidriero I, Lozano FM, Ponce MR, et al. 2007. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. Nature, 448(7154): 666–671
- Desneux N, Ramirez-Romero R. 2009. Plant characteristics mediated by growing conditions can impact parasitoid's ability to attack host aphids in winter canola. Journal of Pest Science, 82(4): 335–342
- Fang ZY. 2008. Production and marketing changes and the breeding countermeasures of cabbage in China. China Vegetables, (1): 1–2 (in Chinese) [方智远. 2008. 我国甘蓝产销变化与育种对策. 中国蔬菜, (1): 1–2]
- Gan YB, Liu C, Yu H, Broun P. 2007. Integration of cytokinin and gibberellin signalling by *Arabidopsis* transcription factors GIS, ZFP₈ and GIS₂ in the regulation of epidermal cell fate. Development, 134(11): 2073–2081
- Griese E, Pineda A, Pashalidou FG, Iradi EP, Hilker M, Dicke M, Fa-tours NE. 2020. Plant responses to butterfly oviposition partly explain preference-performance relationships on different brassicaceous species. Oecologia, 192(2): 463–475
- Gruber M, Alahakoon U, Taheri A, Nagubushana N, Zhou R, Aung B, Sharpe A, Hannoufa A, Bonham-Smith P, Hegedus DDD. 2018. The biochemical composition and transcriptome of cotyledons from *Brassica napus* lines expressing the AtGL3 transcription factor and exhibiting reduced flea beetle feeding. BMC Plant Biology, 18(1): 1–19
- Han GL, Wei XC, Dong XX, Wang CF, Sui N, Guo JR, Yuan F, Gong ZZ, Li XZ, Zhang Y, et al. 2020. *Arabidopsis* zinc finger protein1 acts downstream of GL2 to repress root hair initiation and elongation by directly suppressing bHLH genes. The Plant Cell, 32(1): 206–225
- Hao ZP, Zhan HX, Wang YL, Hou SM. 2019. How cabbage aphids *Brevicoryne brassicae* (L.) make a choice to feed on *Brassica napus* cultivars. Insects, 10(3): 75
- Larranaga N, Baguette M, Calvez O, Legrand D. 2019. Mobility affects copulation and oviposition dynamics in *Pieris brassicae* in semi-natural cages. Insect Science, 26(4): 743–752
- Li Y, Deng WX, Wei XK. 2003. On the selection behavior and mechanism of *Liriomyza sativae* Blanchard in choosing tomato varieties. Journal of Plant Protection, 30(1): 25–29 (in Chinese) [李勇, 邓望喜, 韦新葵. 2003. 美洲斑潜蝇对番茄的选择性行为及其机制. 植物保护学报, 30(1): 25–29]
- Lin Q, Ohashi Y, Kato M, Tsuge T, Gu HY, Qu LJ, Aoyama T. 2015. GLABRA2 directly suppresses basic helix-loop-helix transcription factor genes with diverse functions in root hair development. The Plant Cell, 27(10): 2894–2906
- Liu JQ, Chen K, Zhang ZZ, Chen XL, Wang AX. 2016. Effects of exogenous GA, MeJA, IAA, SA and KT on trichome formation in tomato. Acta Horticulturae Sinica, 43(11): 2151–2160 (in Chinese) [刘金秋, 陈凯, 张珍珠, 陈秀玲, 王傲雪. 2016. 外施GA、MeJA、IAA、SA和KT对番茄表皮毛发生的作用. 园艺学报, 43(11): 2151–2160]
- Liu SY, Liu YM, Yang XH, Tong CB, Edwards D, Parkin IAP, Zhao MX, Ma JX, Yu JY, Huang SM, et al. 2014. The *Brassica oleracea* genome reveals the asymmetrical evolution of polyploid genomes. Nature Communications, 5: 3930
- Ma X, Li K, Wang ZM, Wei DY, Tang QL. 2020. Research progress in regulation model in different types of plant trichome. Chinese Journal of Biotechnology, 36(10): 2051–2065 (in Chinese) [马骁, 李魁, 王志敏, 魏大勇, 汤青林. 2020. 植物不同类型表皮毛调控模型研究进展. 生物工程学报, 36(10): 2051–2065]
- Maes L, Inzé D, Goossens A. 2008. Functional specialization of the TRANSPARENT TESTA GLABRA1 network allows differential hormonal control of laminal and marginal trichome initiation in *Arabidopsis* rosette leaves. Plant Physiology, 148(3): 1453–1464
- Mei J, Qian L, Disi JO, Yang X, Li Q, Li J, Frauen M, Cai D, Qian W. 2011. Identification of resistant sources against *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica* species with emphasis on *B. oleracea*.

- Euphytica, 177(3): 393–399
- Morita M, Ueda T, Yoneda T, Koyanagi T, Haga T. 2007. Flonicamid, a novel insecticide with a rapid inhibitory effect on aphid feeding. *Pest Management Science*, 63(10): 969–973
- Qi TC, Huang H, Wu DW, Yan JB, Qi YJ, Song SS, Xie DX. 2014. *Arabidopsis* DELLA and JAZ proteins bind the WD-repeat/BHLH/MYB complex to modulate gibberellin and jasmonate signaling synergy. *The Plant Cell*, 26(3): 1118–1133
- Qi TC, Song SS, Ren QC, Wu DW, Huang H, Chen Y, Fan M, Peng W, Ren CM, Xie DX. 2011. The jasmonate-ZIM-domain proteins interact with the WD-repeat/BHLH/MYB complexes to regulate jasmonate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 23(5): 1795–1814
- Rakha M, Zekeya N, Sevgan S, Musembi M, Ramasamy S, Hanson P. 2017. Screening recently identified whitefly/spider mite-resistant wild tomato accessions for resistance to *Tuta absoluta*. *Plant Breeding*, 136(4): 562–568
- Sato Y, Shimizu-Inatsugi R, Yamazaki M, Shimizu KK, Nagano AJ. 2019. Plant trichomes and a single gene GLABRA1 contribute to insect community composition on field-grown *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 19(1): 1–12
- Schuurink R, Tissier A. 2020. Glandular trichomes: micro-organs with model status? *New Phytologist*, 225(6): 2251–2266
- Tang T, Li CH, Li DS, Jing SX, Hua J, Luo SH, Liu Y, Li SH. 2020. Peltate glandular trichomes of *Colquhounia vestita* harbor diterpenoid acids that contribute to plant adaptation to UV radiation and cold stresses. *Phytochemistry*, 172: 112285
- Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu YJ, Mandaokar A, Liu GH, Nomura K, He SY, Howe GA, Browse J. 2007. JAZ repressor proteins are targets of the SCF COI₁ complex during jasmonate signalling. *Nature*, 448(7154): 661–665
- Tian XT, Zhang J, Li D, Cheng WN. 2013. Effects of exogenous jasmonic acid on resistance of kidney bean to *Liriomyza sativae*. *Journal of Plant Protection*, 40(4): 345–349 (in Chinese) [田旭涛, 张箭, 李丹, 成卫宁. 2013. 茉莉酸处理菜豆对美洲斑潜蝇抗性的影响. *植物保护学报*, 40(4): 345–349]
- Traw MB, Bergelson J. 2003. Interactive effects of jasmonic acid, salicylic acid, and gibberellin on induction of trichomes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 133(3): 1367–1375
- War AR, Hussain B, Sharma HC. 2013. Induced resistance in groundnut by jasmonic acid and salicylic acid through alteration of trichome density and oviposition by *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *AoB Plants*, 5: plt053
- Yan TX, Chen MH, Shen Q, Li L, Fu XQ, Pan QF, Tang YL, Shi P, Lv Z, Jiang WM, et al. 2017. HOMEODOMAIN PROTEIN 1 is required for jasmonate-mediated glandular trichome initiation in *Artemisia annua*. *New Phytologist*, 213(3): 1145–1155
- Yang LM, Fang ZY, Zhuang M, Zhang YY, Lü HH, Liu YM, Li Zs. 2016. Advances of research on cabbage genetics and breeding during “the twelfth five-year plan” in China. *China Vegetables*, (11): 1–6 (in Chinese) [杨丽梅, 方智远, 庄木, 张扬勇, 吕红豪, 刘玉梅, 李占省. 2016. “十二五”我国甘蓝遗传育种研究进展. *中国蔬菜*, (11): 1–6]
- Zhang JW, Zhao JC, Zhou Q, Chen GX. 2018. Progress in research of plant trichome. *Chinese Bulletin of Botany*, 53(5): 726–737 (in Chinese) [张继伟, 赵杰才, 周琴, 陈国雄. 2018. 植物表皮毛研究进展. *植物学报*, 53(5): 726–737]
- Zou CS, Wang YJ, Zou H, Ding N, Geng NN, Cao CW, Zhang GC. 2019. Sanguinarine in *Chelidonium majus* induced antifeeding and larval lethality by suppressing food intake and digestive enzymes in *Lymantria dispar*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 153: 9–16
- Zuo XJ, Fang PP, Li JN, Qian W, Mei JQ. 2021. Characterization of aphid-resistance of a hairy wild *Brassica oleracea* taxa, *B. incana*. *Acta Agronomica Sinica*, 47(6): 1109–1113 (in Chinese) [左香君, 房朋朋, 李加纳, 钱伟, 梅家琴. 2021. 有毛野生甘蓝 (*Brassica incana*) 抗蚜虫特性研究. *作物学报*, 47(6): 1109–1113]

(责任编辑:李美娟)