



下调烟粉虱 MED 隐种 *BtabCSP6* 表达 对番茄黄化曲叶病毒传播的影响

魏 艳^{1,2}, 刘 勇², 叶 倩^{1,2}, 卢丁伊慧², 张战泓³,
张 卓², 张德咏², 章松柏^{1,*}, 史晓斌^{2,*}

(1. 长江大学, 农林病虫害预警与调控湖北省工程技术研究中心, 湖北荆州 434025;
2. 湖南省农业科学院植物保护研究所, 长沙 410125; 3. 湖南省农业科学院蔬菜研究所, 长沙 410125)

摘要:【目的】番茄黄化曲叶病毒(tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)是对农业生产造成威胁的主要病毒之一,自然条件下通过媒介昆虫烟粉虱 *Bemisia tabaci* 传播。已有研究表明烟粉虱雌成虫比雄成虫具有更强的获毒与传毒能力。本研究旨在探明烟粉虱化学感受蛋白(chemosensory protein, CSP)基因 *BtabCSP6* 表达对病毒传播的影响,为控制病毒发生寻找新途径。【方法】使用 TYLCV 侵染性克隆方法获得带毒番茄植株,微虫笼收集不带毒烟粉虱 MED 隐种成虫固定在感染 TYLCV 的番茄植株叶片获毒 48 h;利用 RT-qPCR 技术测定分别取食感染和未感染 TYLCV 番茄植株的烟粉虱 MED 隐种雌雄成虫体内 *BtabCSP1–8* 基因表达量变化;通过饲喂法利用 RNAi 对烟粉虱 MED 隐种雌成虫 *BtabCSP6* 基因进行干扰 48 h 后饲喂 TYLCV 感染的番茄植株,测定烟粉虱 MED 隐种雌成虫的获毒率和传毒率。【结果】RT-qPCR 检测结果表明,与未侵染的烟粉虱 MED 隐种雌成虫相比,侵染 TYLCV 的雌成虫体内 *BtabCSP3* 和 *BtabCSP6* 基因的表达量变化最为显著。同样地,在侵染 TYLCV 的雄成虫体内,*BtabCSP4* 和 *BtabCSP6* 表达量的变化最为明显。饲喂 ds*BtabCSP6* 48 h 后,烟粉虱 MED 隐种雌成虫体内 *BtabCSP6* 表达量降低;取食感染 TYLCV 番茄植株不同时间烟粉虱 MED 隐种雌成虫的获毒率和不同数量雌成虫对未感染 TYLCV 的番茄植株的传毒率与对照相比均显著降低。【结论】下调烟粉虱 MED 隐种雌成虫体内 *BtabCSP6* 基因的表达,可显著降低烟粉虱 MED 隐种雌成虫的获毒率和传毒率,说明 *BtabCSP6* 可能影响 TYLCV 传播。

关键词: 烟粉虱; 番茄黄化曲叶病毒; 化学感受蛋白; RNA 干扰; 基因表达

中图分类号: Q965.8 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2022)10-1287-08

Influence of down-regulating the expression of *BtabCSP6* in *Bemisia tabaci* MED (Hemiptera: Aleyrodidae) on the transmission of Tomato yellow leaf curl virus

WEI Yan^{1,2}, LIU Yong², YE Qian^{1,2}, LU Ding-Yi-Hui², ZHANG Zhan-Hong³, ZHANG Zhuo², ZHANG De-Yong², ZHANG Song-Bai^{1,*}, SHI Xiao-Bin^{2,*} (1. Hubei Engineering Research Center for Pest Forewarning and Management, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China; 2. Institute of Plant Protection, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, China; 3. Institute of Vegetable, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, China)

Abstract: 【Aim】Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) is one of the main viruses that threaten agricultural production and transmitted by the insect vector *Bemisia tabaci* under natural conditions.

Studies have shown that female adults of *B. tabaci* have stronger ability to acquire and transmit virus than male adults. The objective of this study is to investigate the influence of the expression of the chemosensory protein (CSP) gene *BtabCSP6* in *B. tabaci* on virus transmission, and to find a new way to control the occurrence of virus. 【Methods】 Infected tomato plants were obtained by the TYLCV infectious clone, and uninfected *B. tabaci* MED adults were collected in micro-cages and fixed on leaves of the TYLCV-infected tomato plants for 48 h. RT-qPCR technology was used to measure the changes in the expression levels of *BtabCSP1* – 8 in female and male adults of *B. tabaci* MED fed with TYLCV-infected and uninfected tomato plants, respectively. The *BtabCSP6* gene in female adults of *B. tabaci* MED was suppressed by RNAi for 48 h through feeding method followed by feeding with TYLCV-infected tomato plants, and the virus acquisition and transmission rates of female adults of *B. tabaci* MED were determined. 【Results】 The RT-qPCR results showed that the expression levels of *BtabCSP3* and *BtabCSP6* in TYLCV-infected female adults of *B. tabaci* MED changed most significantly as compared to those in the uninfected female adults. Similarly, the expression levels of *BtabCSP4* and *BtabCSP6* in TYLCV-infected male adults of *B. tabaci* MED changed most significantly as compared to those in the uninfected male adults. After being fed with ds*BtabCSP6* for 48 h, the expression level of *BtabCSP6* in female adults of *B. tabaci* MED decreased. The virus acquisition rates of female adults of *B. tabaci* MED after feeding with TYLCV-infected tomato plants for different time and the virus transmission rates of female adults of *B. tabaci* MED in different numbers to uninfected tomato plants were significantly decreased as compared to those of the control. 【Conclusion】 Down-regulating the expression of *BtabCSP6* in female adults of *B. tabaci* MED can significantly reduce their virus acquisition and virus transmission rates, suggesting that *BtabCSP6* may affect the transmission of TYLCV.

Key words: *Bemisia tabaci*; Tomato yellow leaf curl virus; chemosensory proteins; RNA interference; gene expression

番茄黄化曲叶病毒 (tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) 是威胁番茄生长的主要病毒之一 (刘馨等, 2015), 隶属于双生病毒科 (Geminiviridae) 菜豆金黄花叶病毒属 (*Begomovirus*) (刘佰明等, 2021), 是具有孪生颗粒形态的单链环 DNA 病毒。TYLCV 的发病症状主要表现为新叶先发病, 叶片皱缩变小并向上卷曲, 叶缘黄化, 植株生长缓慢, 无法正常开花结实并且影响果实色泽、口感和营养成分, 使番茄的品质大大降低 (王贤等, 2021), 素有“番茄癌症”之称。TYLCV 在田间极易与番茄褪绿病毒 (tomato chlorosis virus, ToCV) 复合侵染 (汪怡蓉等, 2019), 造成更严重的致病性, 加速宿主植物死亡, 不及时防治将会给农业生产造成重大损失 (廖锦钰等, 2021)。自然条件下 TYLCV 只能通过烟粉虱 *Bemisia tabaci* 传播, 病毒泛滥往往伴随着烟粉虱的大暴发, 因此控制烟粉虱种群数量可以有效减缓病毒传播。

烟粉虱属于半翅目 (Hemiptera) 粉虱科 (Aleyrodidae), 是危害番茄、黄瓜、辣椒、茄子、甘蓝等农业经济作物生长的主要害虫之一, 其繁殖周期

短、速率快, 适应环境能力强, 可以全年繁殖 (李英梅等, 2020)。烟粉虱可以携带并传播的植物病毒超过 200 种, 为害 600 多种寄主植物 (陈文斌等, 2021), 吸食植物汁液的同时传播植物病毒, 造成寄主植物生长缓慢、无法正常结实, 严重时导致植物死亡 (刘国霞等, 2021)。烟粉虱以持久性的传毒特性传播 TYLCV: 吸食带毒番茄植株后, 病毒粒子通过唾液管和消化系统释放到血淋巴, 最后再次回到唾液腺, 在体内长时间保留。当带毒烟粉虱在未感染 TYLCV 番茄植株上取食时, 体内的病毒粒子随着唾液通过口针一起进入植物体内, 导致未感染 TYLCV 的番茄染病。此外, 烟粉虱取食过程中分泌的蜜露会附着在叶片表面诱发煤污病 (刘国霞等, 2021)。因此, 在防御手段上应该做好媒介昆虫的防治, 切断传播途径 (苑丽彩等, 2016)。

化学感受蛋白 (chemosensory proteins, CSPs) 是一类小分子的可溶性蛋白, 有 4 个保守的半胱氨酸形成两个非连锁的二硫键, 能识别并结合周围环境中的信号分子 (Calvello *et al.*, 2005), 再传递给相应的受体, 帮助昆虫感应外界信号。这类蛋白最初在

美洲大蠊 *Periplaneta americana* 的再生足上检测到, 随后发现于黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的触角, 之后苜蓿盲蝽 *Adelphocoris lineolatus* 的不同感觉器官包括触角、唇须和喙等部位也发现了这类蛋白 (Gu *et al.*, 2012), 甚至少量分布于非感觉器官中。从病毒传播的角度出发, 探究影响病毒传播时发挥作用的昆虫化学感受蛋白, 发掘潜在的分子机制, 可以有效控制病毒传播。因此, 研究化学感受蛋白可以作为设计和开发新型害虫管理策略的重要分子靶标 (Zhang *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2019)。本研究旨在探明烟粉虱的化学感受蛋白基因在雌雄成虫传毒过程中的表达差异, 探明差异基因对病毒传播的影响, 为控制病毒发生寻找新途径。

1 材料与方法

1.1 供试烟粉虱 MED 隐种

本实验使用的烟粉虱 MED 隐种成虫由湖南省农业科学院植物保护研究所提供, 饲喂在棉花植株上, 并用纱笼隔绝。养虫室温度保持在 $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 相对湿度控制为 $60\% \pm 10\%$, 光周期设定 14L: 10D。番茄 (钻红美娜) 种植的温室条件: 温度 $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 $75\% \pm 5\%$, 光周期 16L: 8D。

1.2 烟粉虱 MED 隐种成虫获毒

使用 TYLCV 侵染性克隆方法获得带毒番茄植株: TYLCV 侵染性克隆是由浙江大学生物技术研究所周雪平教授课题组构建并提供, 为上海 TYLCV 分离株 (TYLCV-SH2)。将含有 TYLCV 侵染性克隆的农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 菌液在 YEP 固体培养基上进行划线操作, 28°C 恒温培养箱 (冠森生物科技有限公司, 上海) 倒置培养 48 h; 挑取单菌落, 接种于含有卡那霉素 ($50 \mu\text{g}/\text{mL Kan}^{+}$) 和利福平 ($25 \mu\text{g}/\text{mL Rif}^{+}$) 的 YEP 液体培养基中, 28°C 恒温摇床 200 r/min 过夜培养, 收集农杆菌菌液至 50 mL 无菌离心管中, 离心机 (Eppendorf, 德国) 转速调至 4 000 r/min, 室温离心 10 min, 去除上清液, 底部菌体用无菌去离子水重新悬浮, 使用分光光度计调节 OD_{600} 为 1.0, 室温静置 4 h 后进行接种。用一次性无菌注射器吸取 1 mL 接种液注射至番茄真叶及茎秆中, 8 h 黑暗处理后转至温室继续培养, 约 3 周后观察发病症状并通过 PCR 检测感染情况。

微虫笼收集未感染病毒的烟粉虱 MED 隐种成虫, 夹在已感染 TYLCV 的番茄植株叶背面饲喂 48 h, 收集取食后的烟粉虱, 使用蛋白酶 K、树脂溶液提取单头烟粉虱 MED 隐种 DNA。根据 Taq DNA

Polymerase (Mg^{2+} Plus Buffer) 试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 南京) 的操作说明书, 使用 TYLCV 特异性引物 (廖锦钰等, 2021) (表 1), 进行 PCR 扩增, 反应体系: $10 \times \text{Taq Buffer}$ (Mg^{2+} plus) $2.5 \mu\text{L}$, TYLCV 正反向引物 ($10 \mu\text{mol}/\text{L}$) 各 $1 \mu\text{L}$, dNTP Mix ($10 \text{ mmol}/\text{L}$ each) $0.5 \mu\text{L}$, Taq DNA Polymerase ($5 \text{ U}/\mu\text{L}$) $0.5 \mu\text{L}$, 模板 DNA $1 \mu\text{L}$, ddH₂O $18.5 \mu\text{L}$ 。扩增程序: 95°C 3 min; 95°C 15 s, 56°C 15 s, 72°C 1 min 30 s, 35 次循环; 72°C 5 min。扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 检测结果正确的 PCR 产物送至公司测序并进行序列比对, 鉴定 TYLCV。

从饲养的烟粉虱 MED 隐种中随机抽取 20 头进行种群鉴定, 首先使用蛋白酶 K、树脂溶液提取单头烟粉虱 MED 隐种 DNA, 使用 $2 \times \text{Taq Plus Master Mix II}$ (Dye Plus) 试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 南京) 并结合特异性引物 (刘微等, 2019) (表 1) 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: $2 \times \text{Taq Plus Master Mix II}$ (Dye Plus) $10 \mu\text{L}$, 上下游引物 ($10 \mu\text{mol}/\text{L}$) 各 $1 \mu\text{L}$, 模板 DNA $1 \mu\text{L}$, ddH₂O $7 \mu\text{L}$ 。扩增程序: 95°C 5 min; 95°C 15 s, 53°C 45 s, 72°C 1 min, 35 次循环; 72°C 10 min。扩增产物进行酶切, Ase I 酶可将烟粉虱 MED 隐种的 PCR 产物酶切成两条链, 烟粉虱 MEAM1 隐种的 PCR 产物则不能被切开 (刘微等, 2019)。

1.3 烟粉虱 MED 隐种成虫体内 CSP 基因相对表达量测定

人工自制吸虫管分别收集 50 头未感染和感染 TYLCV 的烟粉虱 MED 隐种雌雄成虫并提取 RNA, 根据 HiScript[®] II Q RT SuperMix for qPCR (+ gDNA Wiper) 试剂盒的说明书 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 南京) 逆转录合成 cDNA 并定量至 200 ng, 使用 AceQ[®] qPCR SYBRGreen Master Mix 试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 南京) 参考 CSP 基因序列 (Zeng *et al.*, 2019), 使用 Primer Premier 5 软件设计 qBtabCSP1-8 特异性引物 (表 1), 于 qTOWER³G 荧光定量 PCR 仪 (耶拿, 德国) 进行 RT-qPCR。PCR 反应体系: Nuclease-free Water $8.2 \mu\text{L}$, 正反向引物 ($10 \mu\text{mol}/\text{L}$) 各 $0.4 \mu\text{L}$, cDNA $1 \mu\text{L}$, $5 \times \text{HiScript II qRT SuperMix II}$ $10 \mu\text{L}$ 。扩增程序: 95°C 5 min; 95°C 10 s, 60°C 30 s, 95°C 15 s, 40 次循环; 60°C 1 min, 95°C 15 s。以未感染 TYLCV 的雌雄成虫体内 *BtabCSP1-8* 基因表达量为参照, 采用比较周期阈值法 ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) 计算烟粉虱

MED 隐种雌雄成虫体内 *BtabCSP1* – 8 基因的相对表达量。

1.4 RNAi 效果测定

取 100 头未感染 TYLCV 的烟粉虱 MED 隐种成虫 RNA 为模板,按照 1.3 节的方法逆转录合成 cDNA。合成 ds*GFP* (GenBank 登录号: U70496.1) (对照组)的正反向引物 (Lu *et al.*, 2021),使用 Primer Premier 5 软件设计合成 ds*BtabCSP6* (处理组)的正反向引物 (表 1),使用 Phanta[®] Max Super-Fidelity DNA Polymerase 试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司,南京)进行扩增,反应体系: ddH₂O 10 μL, 2 × Phanta Max Buffer 12.5 μL, dNTP Mix (10 mmol/L each) 0.5 μL, 正反向引物 (10 μmol/L)各 0.5 μL, cDNA 0.5 μL, Phanta[®] Max Super-Fidelity DNA Polymerase 0.5 μL。扩增程序同

1.2 节,扩增产物纯化回收后使用 pEASY[®]-T1 Cloning Kit 试剂盒 (北京全式金生物技术股份有限公司,北京)连接到 pEASY-Blunt 克隆载体获得重组子,转化到 *Trans1*-T1 感受态细胞 (北京全式金生物技术股份有限公司,北京)中得到转化子,提取克隆质粒。用 T7 RiboMAX[™] Express RNAi System 试剂盒 [普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司] 将目标 DNA 片段合成为 dsRNA。纳米滴分光光度计 [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司,上海] 测定 dsRNA 的浓度和纯度。合成的 dsRNA 与 15% 的蔗糖混合配制成为饲喂液 (dsRNA 定量 400 ng/μL,每管 200 μL 饲喂液),吸 50 头烟粉虱 MED 隐种雌成虫饲喂 ds*GFP* (对照组)和 ds*BtabCSP6* (处理组),48 h 取样进行 RT-qPCR,检测 *BtabCSP6* 的表达量 (方法同 1.3 节),技术重复 3 次,生物学重复 3 次。

表 1 引物信息
Table 1 Primer information

引物 Primers	引物序列 (5' – 3') Primer sequences	用途 Purpose
TYLCV-F	GTTCACGGATTTCGTTGTATG	TYLCV 的检测 Detection for TYLCV
TYLCV-R	AGAGGGACTGGCAAAGCAACA	
C1-J-2195	TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT	烟粉虱种群鉴定 Population identification of <i>Bemisia tabaci</i>
R-BQ-2819	CTGAATATCGAGGCATTCC	
Actin-F	CGCTGCCTCCACCTCATT	RT-qPCR
Actin-R	ACCGCAAGATTCCATACCC	
EF-1 α-F	TAGCCTTGTGCCAATTTCCG	
EF-1 α-R	CCTTCAGCATTACCGTCC	
qBtabCSP1-F	CGTGGTTGTCTCTGGTCT	
qBtabCSP1-R	TTTTTCAGGATGCTCTC	
qBtabCSP2-F	TCGAATTGGTAATCGGTCAT	
qBtabCSP2-R	ATTGGAAAGGCTCTCGTTGT	
qBtabCSP3-F	GCTGATGTGGCTTGGTTCT	
qBtabCSP3-R	TTCTGGTCATAGGGCGTTT	
qBtabCSP4-F	TCCTTTTCGTTTCGTCGTC	
qBtabCSP4-R	TCACTCCGTGGCATTATTTT	
qBtabCSP5-F	ATAGTGATTGGCGTATTCG	
qBtabCSP5-R	TTGGAGTTTTCGCAAACCC	
qBtabCSP6-F	CGTTTGGGCGTCTTGATG	
qBtabCSP6-R	GCAACTCAGACCGGGGAC	
qBtabCSP7-F	ATTTCCTGGGAGCGTCTT	
qBtabCSP7-R	CCTCCGTCGTAGAGCATC	
qBtabCSP8-F	TTGCCGCTTCGTTGTCTATCC	
qBtabCSP8-R	CCCGTGCCCTCCAGTCTTATT	
dsBtabCSP6-F	ATTCTCTAGAAGCTTAATACGACTCACTATAGGGTTTTTTAGTTATCCTCG	RNAi
dsBtabCSP6-R	ATTCTCTAGAAGCTTAATACGACTCACTATAGGGTTCTCATTATTTCTGGT	
dsGFP-F	TAATACGACTCACTATAGGGTTCAGTGAGAGGGTGAAGGT	
dsGFP-R	TAATACGACTCACTATAGGGTGTGTGGACAGGTAATGGTTG	

1.5 *BtabCSP6* RNAi 后烟粉虱 MED 隐种获毒率和传毒率的测定

1.5.1 获毒率的测定:选择未感染 TYLCV 的雌成虫,按照 1.4 节的步骤饲喂 *dsGFP* (对照组) 和 *dsBtabCSP6* (处理组),参考 1.1 节的方法获毒不同时间(6, 12, 18, 24, 48 和 72 h),每个时间段各 30 头,检测不同时间段单头雌成虫获毒情况,根据每个时间段获毒雌成虫数量计算获毒率。获毒率 = 感染 TYLCV 烟粉虱总数/每组用于实验烟粉虱总数 (30 头) × 100%。生物学重复 3 次。

1.5.2 传毒率的测定:吸取 1.4 节饲喂 *dsGFP* (对照组) 和 *dsBtabCSP6* (处理组) 后 48 h 的烟粉虱 MED 隐种雌成虫,参考 1.1 节的方法获毒后,每组分别吸取 1, 5, 10, 25 和 50 头烟粉虱,共 5 组,置于不同微虫笼中,微虫笼夹在长势相同的未感染 TYLCV 的 5 株番茄植株上传毒。每组实验番茄总数为 25 株,一周后移去微虫笼,番茄植株继续培养两周,使用 1.1 节的方法检测感染 TYLCV 番茄植株数量,计算对照组与处理组的传毒率。传毒率 = 感染 TYLCV 番茄植株数量/每组用于实验的番茄植株总数 (25 株) × 100%。生物学重复 3 次。

1.6 数据分析

用 IBM SPSS Statistics 21 (SPSS Inc., Chicago, IL, 美国) 进行统计分析,采用独立样本 *T* 检验分析

方法比较感染 TYLCV 的雌性与雄性成虫之间 *BtabCSP* 基因表达量差异显著性,RNAi 处理前后不同时间段之间获毒率、不同数量级传毒率的差异显著性;使用作图软件 SigmaPlot 12.50 和 Graph Pad Prism 8 作图。

2 结果

2.1 感染 TYLCV 后烟粉虱 MED 隐种体内 *BtabCSP1* – 8 基因表达量变化

RT-qPCR 结果表明,与未获毒成虫相比,获毒雌成虫中 *BtabCSP3* 和 *BtabCSP6* 表达量变化最为明显;雄成虫中 *BtabCSP4* 和 *BtabCSP6* 表达量变化最为明显,均可考虑为与 TYLCV 相关的差异表达基因。与获毒烟粉虱 MED 隐种雄成虫相比,获毒烟粉虱 MED 隐种雌成虫有 4 个基因 (*BtabCSP2*, *BtabCSP5*, *BtabCSP6* 和 *BtabCSP8*) 表达显著上调 ($P < 0.05$);与获毒烟粉虱 MED 隐种雌成虫相比,雄成虫有 3 个基因 (*BtabCSP1*, *BtabCSP3* 和 *BtabCSP7*) 表达显著上调 ($P < 0.05$),其中 *BtabCSP3* 与 *BtabCSP6* 表达量在雌雄成虫间差异极显著 ($P < 0.001$)。*BtabCSP6* 在雌成虫中的表达量显著高于在雄成虫中的 ($P < 0.001$),且与未侵染 TYLCV 的雌雄成虫相比,在侵染 TYLCV 的雌雄成虫体内均表达量差异显著 ($P < 0.05$),最终挑选 *BtabCSP6* 进行后续实验 (图 1)。

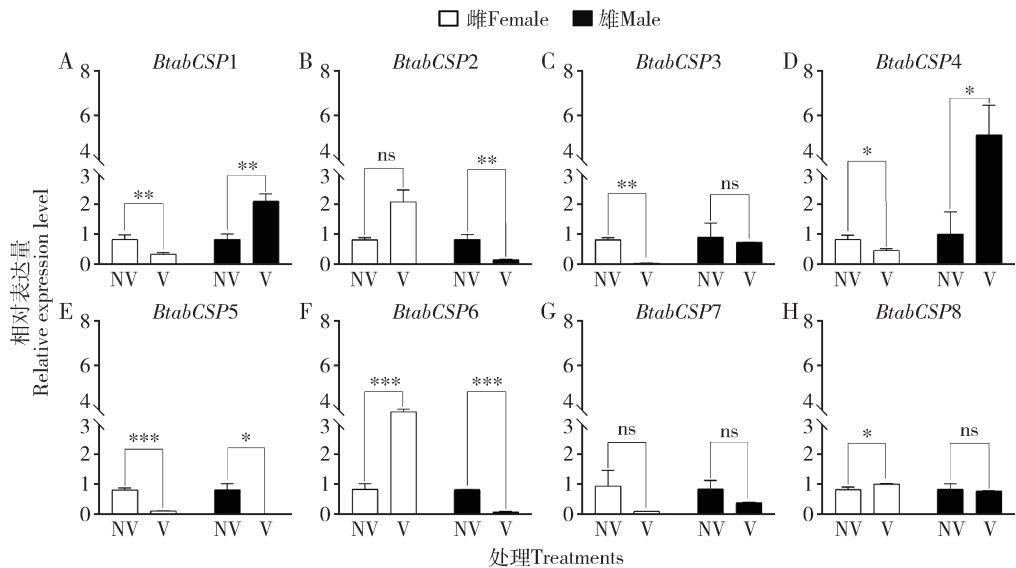


图 1 TYLCV 侵染后 *BtabCSP1* – 8 (A – H) 在烟粉虱 MED 隐种雌雄成虫中的相对表达量

Fig. 1 Relative expression levels of *BtabCSP1* – 8 (A – H) in female and male adults of *Bemisia tabaci* MED after TYLCV infection NV; TYLCV 未侵染烟粉虱 TYLCV-noninfected *B. tabaci*; V; TYLCV 侵染烟粉虱 TYLCV-infected *B. tabaci*. 图中数据为平均值 ± 标准误; 柱上符号表示两组间的差异显著性 (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns $P > 0.05$) (独立样本 *T* 检验)。下图同。Data in the figure are mean ± SE. Symbols above bars indicate significance of difference between two groups (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns $P > 0.05$) (Independent samples *T*-test). The same for the following figures.

2.2 RNAi 干扰 *BtabCSP6* 后基因表达量变化

结果显示,与饲喂 *dsGFP* 的对照组比较,饲喂 *dsBtabCSP6* 48 h 后雌成虫体内 *BtabCSP6* 的表达量显著下降($P < 0.001$) (图 2),证明 RNAi 实验成功降低了基因的表达,干扰效果良好。

2.3 RNAi 干扰 *BtabCSP6* 对烟粉虱 MED 隐种雌成虫获毒率和传毒率的影响

结果显示,与饲喂 *dsGFP* 的对照组比较,饲喂 *dsBtabCSP6* 18–72 h 的烟粉虱 MED 隐种雌成虫获毒率(图 3: A)与传毒率(图 3: B)均显著降低($P < 0.05$),其中,获毒率随着时间的延长呈上升趋势,对照组从 48 h 获毒率 75% 到 72 h 获毒率 82%,RNAi 干扰 *BtabCSP6* 后 48 h 获毒率为 53%,比对照组 24 h 的获毒率高 4%,在 72 h 后烟粉虱获毒率为 59%,相比对照显著降低了 23% ($P < 0.05$)。传毒率随着番茄植株上烟粉虱 MED 隐种雌成虫数量的增多呈上升趋势。使用 1 头烟粉虱传毒时,对照组和处理组传毒率均低于 10%;用 5 头烟粉虱传毒时,对照组和处理组传毒率分别为 29% 和 16%;用 10 头烟粉虱传毒时,处理组的传毒率比对照组低 23%;用 25 头烟粉虱进行传毒时,对照组传毒率达到

92%,相比处理组的高出 25%,二者差异极显著($P < 0.01$);用 50 头烟粉虱传毒时对照组传毒率几乎可达到 100%,而处理组传毒率仅为 80%,二者差异显著($P < 0.05$)。

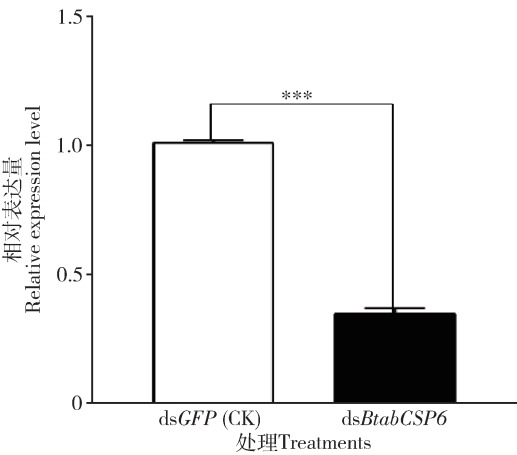


图 2 饲喂 *dsGFP* 和 *dsBtabCSP6* 后 48 h 烟粉虱 MED 隐种雌成虫中 *BtabCSP6* 相对表达量

Fig. 2 Relative expression level of *BtabCSP6* in female adults of *Bemisia tabaci* MED at 48 h after feeding *dsGFP* and *dsBtabCSP6*

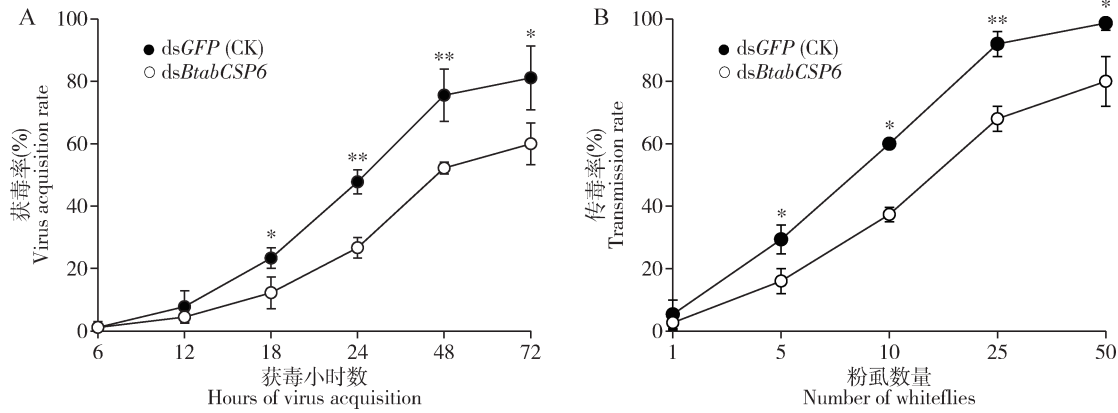


图 3 饲喂 *dsGFP* 和 *dsBtabCSP6* 后 48 h 烟粉虱 MED 隐种雌成虫的获毒率(A) 和传毒率(B)

Fig. 3 Virus acquisition rate (A) and transmission rate (B) of female adults of *Bemisia tabaci* MED at 48 h after feeding *dsGFP* and *dsBtabCSP6*

3 讨论

本研究采用 RT-qPCR 检测烟粉虱 MED 隐种成虫感染 TYLCV 后体内 *BtabCSP* 基因表达量,结果显示不同 *BtabCSP* 基因的表达量差异较大(图 1),这可能是不同基因参与不同功能造成的。例如,*CSP* 在烟粉虱触角中表达与其参与挥发物的识别和检测有关,在胸部、足以及腹部的表达与觅食场所选择有关(Zeng *et al.*, 2019);此外,RNAi 实验证明 *CSP* 除

了参与昆虫嗅觉感知外还与昆虫发育有关,并且可以作为效应蛋白触发植物生理防御反应、作为润湿剂降低溶液表面张力(Liu *et al.*, 2016; Zeng *et al.*, 2019)。本研究还发现不同 *BtabCSP* 基因在雌雄成虫之间差异较大(图 1),这种差异首先会被认为是生殖因素的影响所致,因为雌成虫具备生殖产卵的特点且为二倍体,相比单倍体的雄成虫来说,核 DNA 含量也更加丰富,转录组分析结果也证明了较多功能性基因会在雌成虫中高表达(Guo *et al.*, 2014),但本研究结果更倾向于感染 TYLCV 后 *BtabCSP* 基因表

达量的变化。已有研究表明,烟粉虱雌成虫在叶背面的刺探时间高于雄成虫(卢少华等, 2015),且无论是 MED 或 MEAM1 隐种,雌成虫的摄食能力均优于雄成虫,从而造成烟粉虱 MED 隐种雌成虫在 TYLCV 的获得和传播方面也更加有效(Guo *et al.*, 2014)。因此,本研究以未感染 TYLCV 的烟粉虱雌雄成虫中 *BtabCSP* 基因的表达量作为参照,分析感染后 *BtabCSP* 基因表达量的差异(图 1),确定感染 TYLCV 后雌成虫体内表达明显上调,且与雄成虫之间也有差异表达的基因,探明其对病毒传播是否造成影响。结果显示 *BtabCSP6* 在雌雄成虫之间的表达量具有显著差异,且在雌成虫中高表达(图 1),因此推测 *BtabCSP6* 更可能成为烟粉虱 MED 隐种雌成虫获得与传播 TYLCV 过程中发挥作用的关键基因。烟粉虱雌成虫在生存能力、传毒效率、寄主适应性等方面均优于雄成虫,且个体数量会直接影响种群密度,这也是 TYLCV 会随着烟粉虱种群数量上升而大暴发的重要原因。探究雌成虫传播病毒过程中发挥作用的关键基因,并对其进行干扰,从而减少烟粉虱种群数量,阻碍病毒传播并减缓病毒蔓延,为防治番茄病害提供新的思路 and 理论依据,但其内在的分子机制仍需要深入研究。

本研究合成 *dsGFP* 和 *dsBtabCSP6* 并与 15% 的蔗糖混配为饲喂液饲喂烟粉虱 MED 隐种雌成虫,干扰靶标基因 *BtabCSP6* 的表达(图 2),分析干扰前后烟粉虱对 TYLCV 的获毒率(图 3: A)与传播率(图 3: B)的结果可知,烟粉虱 MED 隐种雌成虫在不同获毒时间段的获毒率均比饲喂 *dsGFP* 的对照组低,且在 48 h 存在显著差异,不仅如此,获毒的烟粉虱 MED 隐种雌成虫在饲喂 *dsBtabCSP6* 48 h 后,不同数量烟粉虱的传毒率相比对照也大大降低,虽然干扰 *BtabCSP6* 并不能完全阻断病毒传播,但仍然考虑 *BtabCSP6* 对传毒获毒造成了一定影响,实验结果符合预期,证明 *BtabCSP6* 可以影响 TYLCV 的传播, *BtabCSP6* 可能是与 TYLCV 传毒获毒相关的基因,但不一定是最关键的基因。之前研究表明, TYLCV 侵染烟粉虱后,病毒粒子可以在体内循环至血淋巴,且存在于整个生命周期,植物感染 TYLCV 后防御反应被抑制,营养条件的改变反而更利于烟粉虱种群增长,因此,烟粉虱获毒 2 d 再传毒,侵染率基本可以达到 100%(丁天波等, 2021)。采用相同的 RT-qPCR 分析方法发现,烟粉虱 MED 隐种尤其是雌成虫,获得和传播 TYLCV 的能力均显著高于 MEAM1 隐种,表明病毒传播能力的差异不仅与生物型相关,

还受性别的影响(Guo *et al.*, 2014)。本研究中 *BtabCSP6* 对传毒获毒造成了一定影响,据报道,在昆虫味觉感受器中高度表达的 *CSP* 在摄食中可以作为疏水性营养物质的增溶剂以及口器表面活性剂,减少吮吸过程中的压力(Sánchez-Gracia *et al.*, 2009),考虑本实验获毒率和传毒率的降低,其原因可能是干扰 *BtabCSP6* 后烟粉虱刺吸次数减少造成的。另有研究表明,在斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 中肠中高表达的 *CSP* 可能在特化和适应不同生态系统中发挥功能(Yi *et al.*, 2017),中肠是病毒在体内运输的一道重要屏障,也是病毒能否在昆虫体内存留的关键,因此 *BtabCSP6* 也可以考虑是否在中肠高表达,进而影响昆虫的获毒与传毒。本实验推测 *BtabCSP6* 是与 TYLCV 传毒获毒相关的基因,其抑制病毒传播的机理还有待深入挖掘。*BtabCSP6* 有望成为减缓病毒传播的新靶标基因, RNAi 也可以考虑用做控制烟粉虱 MED 种群的新方法,成为杀虫剂的替代品且对植物无毒害作用。

现在已经筛选出烟粉虱 MED 隐种中的许多基因可能成为 RNAi 的作用靶标,如 *Hormone-receptor-like in 78 (BtabHR78)*, *Ultraspiracle (USP)*, *Nuclear receptor subfamily 5 group A member 1 (NR5A1)*, *Hormone receptor-like in 39 (HR39)*, *Estrogen-related receptor (ERR)* 和 *Pannier (PNR)*(He *et al.*, 2020); 很多基因成为 RNAi 的靶标候选基因:乙酰胆碱受体 α 亚基、 α 葡萄糖苷酶、水通道蛋白、热休克蛋白、海藻糖酶和海藻糖转运蛋白基因等(Vyas *et al.*, 2017)。干扰 *BtabCSP6* 表达可以从传播过程阻碍病毒获取和扩散,因此化学感受蛋白除了可以识别并结合周围环境中的信号分子使机体做出相应的反应外,还可以与烟粉虱体内相应的受体相互作用控制病毒在体内的传导。本实验发现 *BtabCSP6* 影响了 TYLCV 的传播,未来可以定位与 *BtabCSP6* 相互作用的受体,阐明 CSPs 与病毒之间相互作用的分子机制,开发新的生物杀虫剂来防治烟粉虱。

参考文献 (References)

- Calvello M, Brandazza A, Navarini A, Dani FR, Turillazzi S, Felicioli A, Pelosi P, 2005. Expression of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in some Hymenoptera. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35(4): 297–307.
- Chen WB, Liu Z, Liu ZQ, Qiu BH, Yang YZ, 2021. The selection behavior of *Bemisia tabaci* on three host plants in the field and indoor cage. *Xinjiang Agric. Sci.*, 58(11): 2049–2055. [陈文斌, 刘喆, 刘宗泉, 仇保华, 杨益众, 2021. 烟粉虱对 3 种寄主植物的田间和室内趋性. 新疆农业科学, 58(11): 2049–2055]

- Ding TB, Zhou X, Yang N, Yang Y, Tang Y, Chu D, 2021. Host adaptability of *Bemisia tabaci* on tomato plants with ToCV single infection and TYLCV&ToCV co-infection and the changes in the nutrient contents and defense responses of host plants. *Acta Entomol. Sin.*, 64(3): 384–391. [丁天波, 周雪, 杨楠, 杨畅, 唐瑶, 褚栋, 2021. ToCV 单独侵染和 TYLCV&ToCV 复合侵染番茄植株上烟粉虱寄主适应性及寄主植物营养成分含量和防御反应变化. 昆虫学报, 64(3): 384–391]
- Gu SH, Wang SY, Zhang XY, Ji P, Liu JT, Wang GR, Wu KM, Guo YY, Zhou JJ, Zhang YJ, 2012. Functional characterizations of chemosensory proteins of the alfalfa plant bug *Adelphocoris lineolatus* indicate their involvement in host recognition. *PLoS ONE*, 7(8): e42871.
- Guo HF, Qu YF, Liu XD, Zhong WF, Fang JC, 2014. Female-biased symbionts and *Tomato yellow leaf curl virus* infections in *Bemisia tabaci*. *PLoS ONE*, 9(1): e84538.
- He C, Liu SN, Liang JJ, Zeng Y, Wang SL, Wu QJ, Xie W, Zhang YJ, 2020. Genome-wide identification and analysis of nuclear receptors genes for lethal screening against *Bemisia tabaci* Q. *Pest Manag. Sci.*, 76(6): 2040–2048.
- Li YM, Liu C, Wang ZP, Li XD, Zhang WB, Yang YW, Chen ZJ, 2020. Analysis of the disaster caused by *Tomato yellow leaf curl virus* in Shaanxi. *Shaanxi J. Agric. Sci.*, 66(11): 41–43. [李英梅, 刘晨, 王周平, 李晓东, 张伟兵, 杨艺炜, 陈志杰, 2020. 陕西番茄黄化曲叶病毒病成灾原因分析. 陕西农业科学, 66(11): 41–43]
- Liao JY, Huang LP, Zhang ZH, Zhang DY, Tan XQ, Liu Y, Shi XB, 2021. Influence of co-infection of *Tomato chlorosis virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* on the transmission of *Tomato chlorosis virus*. *Plant Prot.*, 47(3): 89–95. [廖锦钰, 黄莉萍, 张战泓, 张德咏, 谭新球, 刘勇, 史晓斌, 2021. 番茄褪绿病毒与番茄黄化曲叶病毒复合侵染对番茄褪绿病毒传播的影响. 植物保护, 47(3): 89–95]
- Liu BM, Wang F, Liu R, Yang ZZ, Bai YC, Gu XS, 2021. Effects of sublethal dose cyantraniliprole on feeding behavior and TYLCV transmission of *Bemisia tabaci* MED. *J. Environ. Entomol.*, 43(3): 537–544. [刘佰明, 王芳, 刘茹, 杨泽众, 白义川, 谷希树, 2021. 亚致死剂量溴氰虫酰胺对 MED 烟粉虱取食行为及传播 TYLCV 的影响. 环境昆虫学报, 43(3): 537–544]
- Liu GX, Li JJ, Zhang AS, 2021. Impact of ToCV on important biological parameters, and activities of protective and detoxification enzymes in *Bemisia tabaci* Q. *J. Environ. Entomol.*, 43(5): 1237–1243. [刘国霞, 李娇娇, 张安盛, 2021. 番茄褪绿病毒对 Q 型烟粉虱重要生物学参数及保护酶和解毒酶活力的影响. 环境昆虫学报, 43(5): 1237–1243]
- Liu GX, Ma HM, Xie HY, Xuan N, Guo X, Fan ZX, Rajashekar B, Arnaud P, Offmann B, Picimbon JF, 2016. Biotype characterization, developmental profiling, insecticide response and binding property of *Bemisia tabaci* chemosensory proteins: Role of CSP in insect defense. *PLoS ONE*, 11(5): e0154706.
- Liu W, Shi XB, Tang X, Zhang Y, Zhang DY, Zhou XG, Liu Y, 2018. Molecular identification of *Tomato chlorosis virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* in Yunnan province. *Acta Hortic. Sin.*, 45(3): 552–560. [刘微, 史晓斌, 唐鑫, 张宇, 张德咏, 周序国, 刘勇, 2018. 云南番茄褪绿病毒和番茄黄化曲叶病毒复合侵染的分子鉴定. 园艺学报, 45(3): 552–560]
- Liu X, Yan WQ, Zhang YJ, Wu QJ, Xie W, Wang SL, 2015. Cloning and relative expression of a virus-transmission related gene in *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Chin. J. Appl. Entomol.*, 52(1): 63–70. [刘馨, 闫文茜, 张友军, 吴青君, 谢文, 王少丽, 2015. 烟粉虱传毒相关蛋白基因的克隆及其表达量分析. 应用昆虫学报, 52(1): 63–70]
- Lu DYH, Yue H, Huang LP, Zhang DY, Zhang ZH, Zhang Z, Zhang YJ, Li F, Yan F, Zhou XG, Shi XB, Liu Y, 2021. Suppression of *Bta11975*, an α -glucosidase, by RNA interference reduces transmission of *Tomato chlorosis virus* by *Bemisia tabaci*. *Pest Manag. Sci.*, 77(11): 5294–5303.
- Lu SH, Li JJ, Liu MY, Bai RE, Tang QB, Yan FM, 2015. Comparative analysis of the competitiveness between B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* under laboratory conditions. *Sci. Agric. Sin.*, 48(7): 1339–1347. [卢少华, 李静静, 刘明杨, 白润娥, 汤清波, 闫凤鸣, 2015. 烟粉虱 B 型和 Q 型竞争能力的室内比较分析. 中国农业科学, 48(7): 1339–1347]
- Sánchez-Gracia A, Vieira FG, Rozas J, 2009. Molecular evolution of the major chemosensory gene families in insects. *Heredity*, 103(3): 208–216.
- Vyas M, Raza A, Ali MY, Ashraf MA, Mansoor S, Shahid A, Brown JK, 2017. Knock down of whitefly gut gene expression and mortality by orally delivered gut gene-specific dsRNAs. *PLoS ONE*, 12(1): e0168921.
- Wang X, Liu F, Wei XH, Zhu XL, Wang BQ, 2021. Study on resistance of different tomato germplasm materials to yellow leaf curl virus disease. *Acta Agric. Zhejiang.*, 33(11): 2085–2097. [王贤, 刘放, 魏小红, 朱晓林, 王宝强, 2021. 不同种质番茄材料抗番茄黄化曲叶病毒病特性研究. 浙江农业学报, 33(11): 2085–2097]
- Wang YR, Jiao XG, Chang XL, Wang C, 2019. Non-viruliferous host choice of TYLCV-infected biotypes B and Q of *Bemisia tabaci*. *J. Plant Prot.*, 46(3): 705–706. [汪怡蓉, 焦晓国, 常晓丽, 王超, 2019. 携带 TYLCV 的 B 型和 Q 型烟粉虱对非传毒寄主的选择差异. 植物保护学报, 46(3): 705–706]
- Yi X, Qi J, Zhou X, Hu MY, Zhong GH, 2017. Differential expression of chemosensory-protein genes in midguts in response to diet of *Spodoptera litura*. *Sci. Rep.*, 7: 296.
- Yuan LC, Guo WL, Wang GY, Wang SN, 2016. Effects of several prevention and control measures on tomato yellow leaf curl virus disease of plastic-protected autumn tomato. *J. Henan Agric. Sci.*, 45(11): 76–81, 154. [苑丽彩, 郭卫丽, 王广印, 王胜楠, 2016. 几种防控措施对大棚秋番茄黄化曲叶病毒病发生的影响. 河南农业科学, 45(11): 76–81, 154]
- Zeng Y, Yang YT, Wu QJ, Wang SL, Xie W, Zhang YJ, 2019. Genome-wide analysis of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*. *Insect Sci.*, 26(4): 620–634.
- Zhang M, Wu F, Wang R, Feng YL, Luo C, Li HL, 2016. Spectroscopic analysis of the interaction between β -ionone and chemosensory protein 1 (CSP1) in *Bemisia tabaci* biotype Q. *J. Plant Prot.*, 43(1): 62–69. [张萌, 吴帆, 王然, 冯一璐, 罗晨, 李红亮, 2016. 光谱分析 Q 型烟粉虱化学感受蛋白 CSP1 与 β -紫罗兰酮的相互作用. 植物保护学报, 43(1): 62–69]