

## 甜菜夜蛾和茉莉酸甲酯处理对棉花茉莉酸合成途径关键基因及萜类合酶基因表达的影响

吕丽敏, 张帅, 雒珺瑜, 王春义, 王丽, 朱香镇, 张利娟, 李春花, 崔金杰\*

棉花生物学国家重点实验室/中国农业科学院棉花研究所, 河南安阳455000

**摘要:** 本文以陆地棉(*Gossypium hirsutum*) ‘石远321’为实验材料, 采用实时荧光定量PCR技术, 研究了经甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)取食诱导和茉莉酸甲酯(MeJA)处理的茉莉酸(JA)合成途径中关键基因及萜类合酶基因的时间表达模式。甜菜夜蛾取食陆地棉后, JA合成途径脂氧合酶基因(*GhLOX1*和*GhLOX2*)、丙二烯氧化物合酶基因(*GhAOS*)、丙二烯氧化物环化酶基因(*GhAOC*)随处理时间变化均有不同程度的上调表达, 其中*GhLOX2*表达量上调最明显, 处理后12和72 h表达量分别上升64.4和118.7倍; 5个萜类合酶基因*GhTPS1*、*GhTPS2*、*GhTPS3*、*GhTPS4*、*GhTPS5*随处理时间变化表达模式明显不同, *GhTPS4*和*GhTPS5*表达量明显升高。外源MeJA处理后, *GhLOX2*表达量急剧上升, 变化最大; 5个萜类合酶基因均受MeJA诱导表达, 但表达量在处理后有不同时间有明显差异, *GhTPS4*处理后各时间点的表达量均高于对照。这些结果表明JA合成途径的*GhLOX2*和萜类合酶基因*GhTPS4*是响应甜菜夜蛾取食诱导和MeJA处理最为重要的基因。

**关键词:** 甜菜夜蛾; 茉莉酸甲酯; 萜类合酶; 棉花

20世纪80年代以前, 甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)在中国仅是一种偶发性害虫, 很少造成危害, 自1986年以来, 甜菜夜蛾在中国发生危害范围逐渐扩大, 目前已遍及全国20多个省市, 且爆发呈波浪式上升趋势(张斌等2008; 文礼章和张友军2010)。该虫属多食性害虫, 据报道可取食35个科108个属138种植物, 其中大田作物28种, 蔬菜32种, 除危害甜菜和多种十字花科蔬菜外, 还危害棉花(*Gossypium hirsutum*)、玉米(*Zea mays*)、大豆(*Glycine max*)、花卉等(张斌等2008; 周海霞2002)。甜菜夜蛾不是已经商业化*CryIac/Ab*基因抗虫棉的靶标害虫, 随着我国种植制度的改变及其抗药性的上升, 已成为我国棉田的重要害虫之一(石宏等2006; 夏敬源等2000)。

在植物和昆虫的长期协同进化过程中, 受到昆虫危害的植物启动相关信号途径激活防御基因的表达, 从而提高植物的抗虫性。研究表明茉莉酸(jasmonic acid, JA)类物质在响应昆虫取食激活植物防御反应中发挥着重要作用(Browse和Howe 2008), 起始于 $\alpha$ -亚麻酸( $\alpha$ -linolenic acid)的JA合成途径, 在脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)、丙二烯氧化物合酶(allene oxide synthase, AOS)、丙二烯氧化物环化酶(allene oxide cyclase, AOC)等系列酶的催化下, 最终生成JA (Gfeller等2010)。据报道, 烟草天蛾(*Manduca sexta*)取食烟草(*Nicotiana tabacum*)

叶片后, 叶片中AOS转录水平开始增加, 同时JA含量明显增加(Ziegler等2001; 刘庆霞等2012); 将大豆中的AOS在烟草中过表达后, 转基因烟草受斜纹夜蛾(*Prodenia litura*)危害的程度明显低于对照, 表明转基因烟草提高了对斜纹夜蛾的抗性(Wu等2008); 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)受菜青虫(*Pieris rapae*)取食后也能明显检测到*AtLOX2*和*AtAOS*的表达升高(Van Poecke等2001)。上述结果表明, 虫害胁迫激活了JA合成途径相关基因的表达。JA的生物合成还受正反馈的调节, 实验表明, 茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)处理拟南芥幼苗可明显诱导JA合成途径*LOX2* (AT3G45140)的显著上调(Mao等2017); 用不同浓度的MeJA处理唐菖蒲(*Gladiolus hybridus*)球茎, 能够诱导其JA合成途径中*GhAOS*、*GhAOC*、12-氧-植物二烯酸还原酶3 (12-oxo-phytodienoic acid reductase 3, *GhOPR3*)基因的上调表达, 表达水平随MeJA浓度的升高而升高(Lian等2013)。

昆虫的取食在激活植物JA信号途径过程中, 导致挥发性有机物(volatile organic compounds, VOCs)释放或有毒化合物产生等(Zebelo和Maffei

收稿 2017-11-01 修定 2018-03-30

资助 现代农业产业技术体系(CARS-15-20)。

\* 通讯作者(cuijinjie@126.com)。

2012), 从而达到防御害虫、保护植物不受伤害的目的。菜青虫取食拟南芥24 h, 拟南芥萜类合酶(terpene synthase, TPS)基因*AtTPS03*和产生罗勒烯的*AtTPS10*被诱导表达, 产生的萜类化合物罗勒烯在植物抗虫防御中发挥重要作用(Van Poecke等2001)。Schnee等(2006)从玉米中克隆得到倍半萜合酶TPS10能够催化法尼基二磷酸(farnesyl diphosphate, FPP)产生*E*- $\beta$ -法尼烯等11种不同的挥发性萜类化合物, 在拟南芥中超表达该基因后, 转基因拟南芥对寄生性天敌缘腹绒茧蜂(*Cotesia marginiventris*)雌虫有明显的吸引作用。

目前, 关于陆地棉中JA类物质调节挥发性萜类释放的研究还很有限。在NCBI上搜索到陆地棉JA合成途径的关键基因有*GhLOX1* (AF361893.4)、*GhLOX2* (JF967645.1)、*GhAOC* (KF383427.1)、*GhAOS* (KM265132.1); 报道的陆地棉萜类合酶基因有*GhTPS1* (KC878726.1; AFQ23183)、*GhTPS2* (KC878727.1)、*GhTPS3* (KC878728.1; AFQ23190)、*GhTPS4* (KF860865.1)、*GhTPS5* (KF860866.1) (Yang等2013; Huang等2013; 吕丽敏等2014)。*GhTPS1*催化底物FPP生成的主要产物为 $\beta$ -石竹烯和 $\alpha$ -蛇麻烯, 两者比例为2:1; *GhTPS2*催化FPP产物主要是guaia-1(10),11-diene; *GhTPS3*是单萜合酶, 催化底物牻牛儿基焦磷酸(geranyl diphosphate, GPP)生成 $\alpha$ -蒎烯、 $\beta$ -蒎烯、 $\beta$ -水芹烯( $\beta$ -phellandrene)和其他痕量单萜(Yang等2013; Huang等2013)。将*GhTPS4*和*GhTPS5*与棉花中催化产生 $\alpha$ -蒎烯的*GhTPS3*序列进行比对, 相似性分别为58%和67%, 与拟南芥桉树脑合酶基因相似性达到64%和62% (Roos等2015), 推测其产物可能是1,8-桉树脑(1,8-cineole)。*GhTPS1*和*GhTPS2*在MeJA处理棉花幼嫩叶片、中部叶片等不同组织16 h后表达量明显升高, *GhTPS2*受绿盲蝽取食的显著诱导, *GhTPS1*和*GhTPS4*受棉铃虫的取食诱导(黄欣蒸等2012; 吕丽敏等2014)。此外, *GhTPS1*、*GhTPS2*和*GhTPS3*还受机械损伤、大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)或MeJA处理的诱导(Yang等2013; Huang等2013)。众所周知, 棉花中重要的倍半萜棉酚在抗虫过程中起到重要作用, 参与棉酚合成的关键萜类合酶基因家族在棉花中已有报道(陈晓亚等2015), 本研究主要针对棉花中棉酚合成途径外的萜类合酶基因在昆虫防御中的作用进行了分析。

在上述工作的基础上, 本文研究了经甜菜夜蛾取食诱导和MeJA处理后的陆地棉4个JA合成途径中关键基因及5个萜类合酶基因的时间表达模式变化, 以期为研究JA信号途径及萜类代谢在抗虫反应中的作用提供相关实验证据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫

棉花的取食诱导用甜菜夜蛾[*Spodoptera exigua* (Hübner)]一龄幼虫, 为人工饲料饲养的室内品系, 由中国农业科学院棉花研究所植物保护研究室保存。

### 1.2 棉花材料种植

实验采用的陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.)品种‘石远321’来源于中国农业科学院种质资源中期库。种子用35°C温水浸种过夜, 然后播种于装有土、蛭石、营养土(2:1:1, V/V)的花盆(直径15 cm)中, 放置在全自动温控植物培养室。温度控制在28~30°C, 光/暗周期为16 h/8 h, 相对湿度60%, 每3 d浇一次水, 控制长势一致。待棉花长到6片真叶时进行实验。

### 1.3 棉花材料的接虫处理

#### 1.3.1 接虫及取样

在接虫前将甜菜夜蛾幼虫饥饿处理12 h。取长势一致的棉花幼苗, 用毛笔轻触甜菜夜蛾, 将反应灵敏的幼虫轻轻接到叶片上, 每株棉花接虫10头, 每个重复5株棉花, 3次重复。接虫完毕用100目纱网罩住棉株, 防止甜菜夜蛾逃逸和其他昆虫进入。待试虫全部接完稳定后开始计时。

接虫后6、12、24、48、72 h取样, 收集不同时间点甜菜夜蛾取食过的棉花叶片, 以不接虫植株叶片为对照。将收集的叶片用锡箔纸包好, 液氮速冻后置于-80°C超低温冰箱保存备用。

#### 1.3.2 MeJA喷施处理

定量MeJA先溶于1 mL无水乙醇, 之后用无水乙醇稀释至终浓度为0.5 mmol·L<sup>-1</sup>, 对照为1 mL无水乙醇按照同倍数稀释(楚博2016)。将配制好的MeJA溶液用手持喷壶均匀喷洒于长势一致的棉花幼苗, 于处理后3、6、12、24、48、72 h取样, 取样方法与上述1.3.1节相同。

### 1.4 总RNA提取及cDNA合成

将研钵和研杵预先进行去RNase处理, 从-80°C冰箱取出样品, 加入液氮研磨成粉末。RNA提取

按照TIANGEN公司的多糖多酚植物总RNA提取试剂盒(DP441)说明书的步骤进行。然后用Nano-Drop 2000 (Gene)检测其浓度及RNA质量,并用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测完整性。

提取的RNA直接进行反转录或放置 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存备用。反转录操作步骤按照Promega公司的Reverse Transcription System (A3500)说明书进行。将以上处理各时间点及对照的棉花叶片总RNA反转录成cDNA。

### 1.5 实时荧光定量PCR

用实时荧光定量PCR分析陆地棉JA合成途径中4个关键基因*GhLOX1*、*GhLOX2*、*GhAOC*、*GhAOS*及5个萜类合酶基因*GhTPS1*、*GhTPS2*、*GhTPS3*、*GhTPS4*、*GhTPS5*,选用*GhUBQ7* (DQ-116441.1)为内标基因。根据NCBI公布的基因序列,用Vector NTI 10设计荧光定量PCR的引物(表1)。

实时荧光定量PCR在Mastercycler<sup>®</sup> ep real-plex4荧光定量PCR仪(Eppendorf)上进行,操作按Promega试剂盒GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix说明书。反应体系20  $\mu\text{L}$ ,含10  $\mu\text{L}$ 的2 $\times$ GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix、正向和反向引物各1  $\mu\text{L}$ 、cDNA 1  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu\text{L}$ 。

表1 实时荧光定量PCR的引物序列

Table 1 Primer sequences of real-time qPCR

基因	引物名称	引物序列(5'→3')
<i>GhLOX1</i>	GhLOX1-F	CATAAGCCATTGGTTGAACA
	GhLOX1-R	CGGAAGTGAGGATAGAGAAG
<i>GhLOX2</i>	GhLOX2-F	TCTCTGGATGACCTTGAC
	GhLOX2-R	CTGTAGTAGAATGAGCAGTAAT
<i>GhAOS</i>	GhAOS-F	AATCATCTGGTTCCATCAAG
	GhAOS-R	CTCCGTTGCTAATCTATTGTG
<i>GhAOC</i>	GhAOC-F	ATCAAACCTCCAACACTTTCTC
	GhAOC-R	CTCTCATTCAACTCATACACAT
<i>GhTPS1</i>	GhTPS1-F	GACAAGAATACGAAGAACTGA
	GhTPS1-R	TCTGTAAAGCATCCTCTATCT
<i>GhTPS2</i>	GhTPS2-F	TTCCTTCCATCTCCAACAA
	GhTPS2-R	CTCATCATCCATCACTACTCT
<i>GhTPS3</i>	GhTPS3-F	GGCTTCATACCACTTAGTAGA
	GhTPS3-R	CAACCTTAACATCCTCCAATG
<i>GhTPS4</i>	GhTPS4-F	GCTAATTACCATCCTCTACT
	GhTPS4-R	TCTCAAGCATCATTCTCACT
<i>GhTPS5</i>	GhTPS5-F	AAGGAAGAAGTGAGGATGA
	GhTPS5-R	TGATAGGACAAGCCAAGT
<i>GhUBQ7</i>	GhUBQ7-F	GGAATCCACTCTACACCTT
	GhUBQ7-R	GCTTGACCTTCTTCTTCTG

cDNA模板分别是甜菜夜蛾一龄幼虫诱导处理和MeJA处理的棉花材料,未处理材料作为对照。设3次重复,空白对照以ddH<sub>2</sub>O代替cDNA。定量PCR反应采用两步法,程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性2 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性15 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 退火及延伸1 min,40个循环。

### 1.6 数据分析

实时荧光定量PCR数据处理采用相对定量法,依据各处理样品对应的目的基因C<sub>T</sub>值,用*GhUBQ7*内标法校正处理数据,然后用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法进行计算(Livak和Schmittgen 2001)。运用SPSS 19.0分析软件独立样本T检验进行差异显著性分析。

## 2 实验结果

### 2.1 甜菜夜蛾取食后JA合成途径关键基因的表达分析

植食性昆虫的取食危害可以激活植物的防御反应,通过激活关键的激素信号途径,比如JA合成途径,从而诱导防御基因的表达。本实验研究了甜菜夜蛾取食危害陆地棉中已报道的JA合成途径关键基因*GhLOX1*、*GhLOX2*、*GhAOS*、*GhAOC*的表达变化。由图1可以看出,甜菜夜蛾诱导后上述4个基因在各时间点的表达量均呈上升趋势,但在不同时间点表达量明显不同。

*GhLOX1*在甜菜夜蛾取食后12和48 h相对表达量分别升高9.1和6.0倍,与对照相比差异均达极显著水平(图1-A);*GhLOX2*在甜菜夜蛾取食后变化剧烈,处理后6、12、48、72 h相对表达量分别升高17.2、60.4、25.7、118.7倍,与对照相比差异均达极显著水平(图1-B);*GhAOS*和*GhAOC*在甜菜夜蛾取食后12 h相对表达量上升明显,分别升高2.2和4.0倍,与对照相比差异达显著和极显著水平,两个基因在其他时间点的表达量也有所升高(图1-C和D)。可见,JA合成途径的4个基因在转录水平上均受甜菜夜蛾的取食诱导。

### 2.2 甜菜夜蛾取食后5个萜类合酶基因的表达分析

由图2可以看出,在甜菜夜蛾取食诱导后*GhTPS4*和*GhTPS5*表达量明显上调,*GhTPS1*、*GhTPS2*、*GhTPS3*的表达量没有明显升高,反而有所降低。*GhTPS4*表达量在处理后的各时间点均高于对照,在诱导后12和48 h相对表达量分别升高14.6和5.2倍,与对照相比差异均达极显著水平(图2-D);



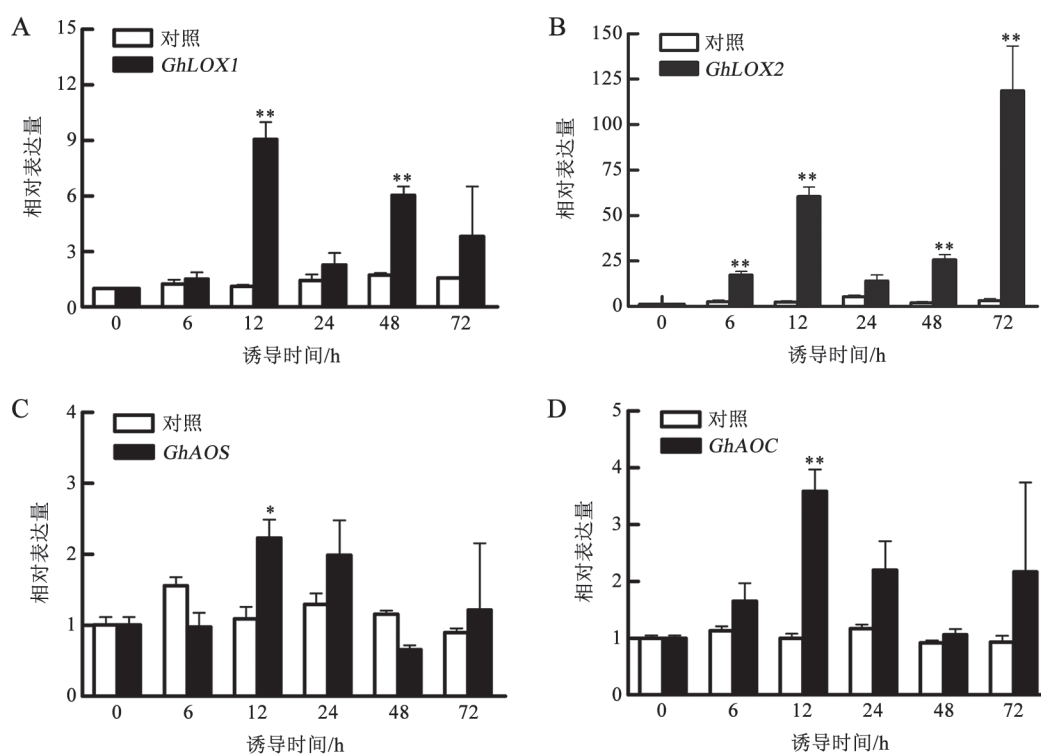


图1 甜菜夜蛾取食诱导后JA合成途径基因的表达水平

Fig. 1 Expression levels of genes in JA biosynthesis pathway induced by *S. exigua*\*和\*\*分别表示处理和对照相比在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 水平差异显著;下同。

*GhTPS5*表达量在处理后的不同时间点均高于对照,在诱导后48 h该基因的表达量与对照相比升高了2.5倍,差异达极显著水平(图2-E)。由此可见,5个萜类合酶对甜菜夜蛾诱导处理的响应模式明显不同。

### 2.3 MeJA处理后JA合成途径关键基因的表达分析

JA作为内源激素在植物防御过程中发挥着重要作用。在JA代谢途径中,茉莉酸羧基甲基转移酶(jasmonic acid carboxyl methyltransferase, JMT)催化修饰JA生成MeJA, MeJA是JA信号转导途径中重要的中间产物。本实验研究了外源MeJA处理对JA合成途径关键基因表达水平的影响。结果显示, *GhLOX2*在处理3、6、12、24、48 h表达变化明显,其表达量分别升高484.7、42.3、15.3、117.0、31.9倍,差异达极显著和显著水平(图3-B); *GhAOS*的表达量在处理3和12 h分别升高3.2和3.9倍,与对照相比差异达极显著水平(图3-C); *GhAOC*表达量在处理3、6、12 h分别升高2.9、19.9和10.8倍,与对照相比差异达极显著水平; *GhLOX1*表达量在处理略有升高,但不明显(图3-

A)。由此可以看出,上述4个JA合成途径的基因均响应了MeJA的诱导,表现出正反馈,其中*GhLOX2*反应最剧烈。

### 2.4 MeJA处理后陆地棉5个萜类合酶基因的表达分析

从图4中可以看出,5个萜类合酶基因均受MeJA诱导表达,但在处理后不同时间点的表达量明显不同。*GhTPS1*在MeJA处理后24和48 h表达量分别升高2.5和2.0倍,与对照有极显著差异(图4-A); *GhTPS2*在处理3 h表达上调,可快速响应MeJA处理,表达量升高3.5倍,与对照相比差异达极显著水平(图4-B); *GhTPS3*在处理3、6、24 h表达量分别升高4.8、7.8、12.6倍,与对照相比差异均极显著(图4-C); *GhTPS4*在处理各时间点的表达均极显著高于对照,其中,处理后24 h的表达量最高达8.7倍(图4-D); *GhTPS5*表达量在处理6和12 h分别升高2.2和4.8倍,与对照相比差异达显著和极显著水平(图4-E)。以上结果表明,5个萜类合酶基因在MeJA处理后均有不同程度的上调表达,但在处理后不同时间点的表达模式并不相同。

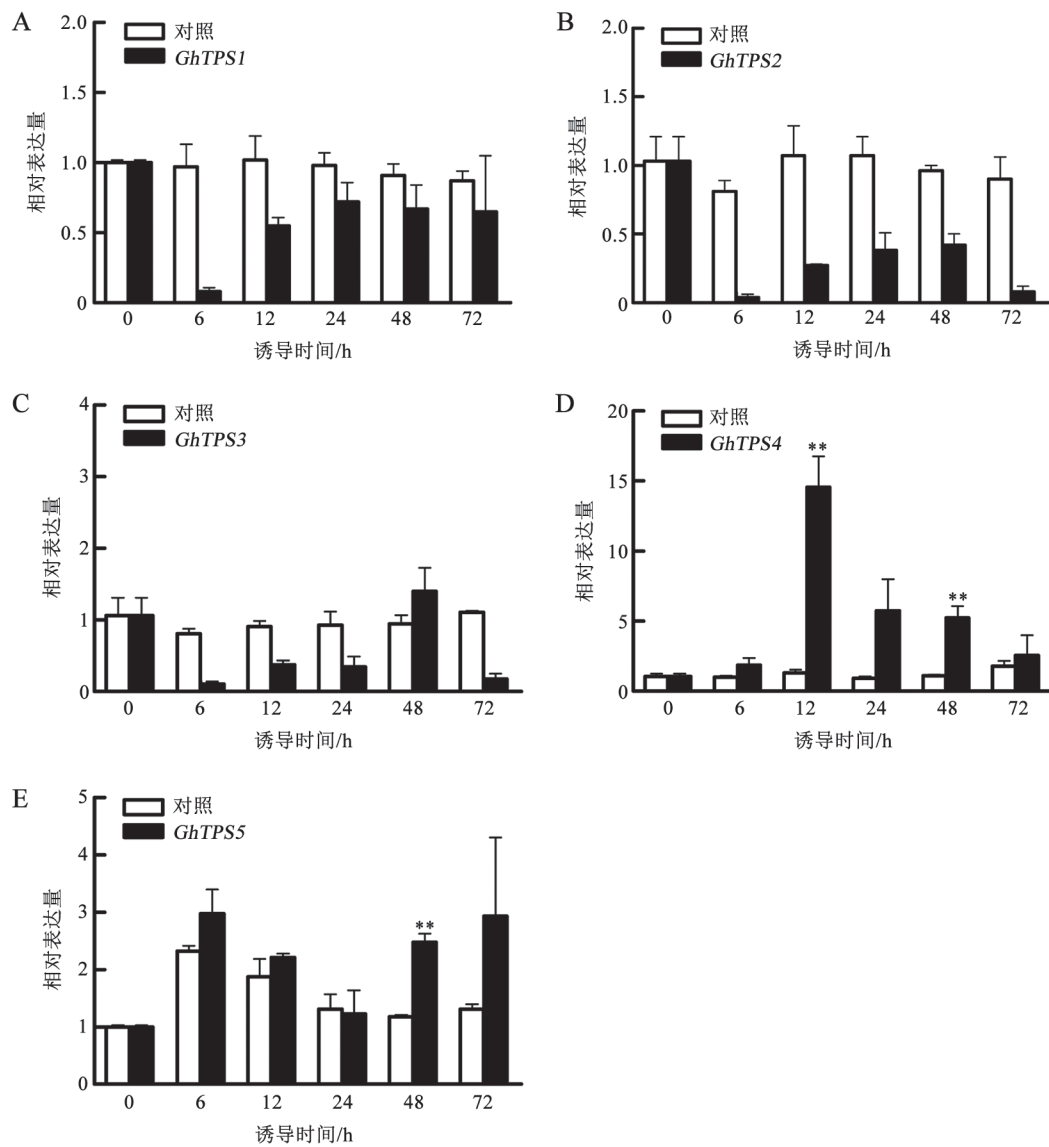


图2 甜菜夜蛾取食诱导后萜类合酶基因的表达水平

Fig.2 Expression levels of terpene synthase genes induced by *S. exigua*

### 3 讨论

甜菜夜蛾严重影响棉花叶片的光合作用。目前转*Bt*棉花商业化的基因是*Cry1Ac/Ab*, 该基因对甜菜夜蛾几乎没有作用。*Cry1C*能有效防治甜菜夜蛾(吕丽敏等2016), 但有关*Cry1C*的转基因棉花目前还没有商业化的转化体, 需要科学家们不断寻找新的途径来控制棉花上甜菜夜蛾的发生。

通过研究植物激素的信号转导途径, 挖掘受激素调节的重要次生代谢物质是防治害虫的途径之一。在植物-昆虫相互作用的过程中, JA信号途

径一直起到了关键和核心信号的作用(Erb等2012), 因此, 本文对甜菜夜蛾取食棉花后JA合成途径的关键基因进行了研究。结果发现, 棉花受甜菜夜蛾取食危害后, JA合成途径关键基因*GhLOX1*、*GhLOX2*、*GhAOS*、*GhAOC*在不同时间点均出现转录水平的升高, 表明定位于叶绿体的JA合成途径关键基因积极响应了甜菜夜蛾的取食诱导过程。同时, 我们用JA的衍生物MeJA喷施棉花幼苗, 用实时荧光定量PCR检测到上述4个基因在处理后不同时间点的表达量均呈上升趋势, 其中*GhLOX2*和*GhAOC*表达量上升极显著, 表明外施MeJA对JA

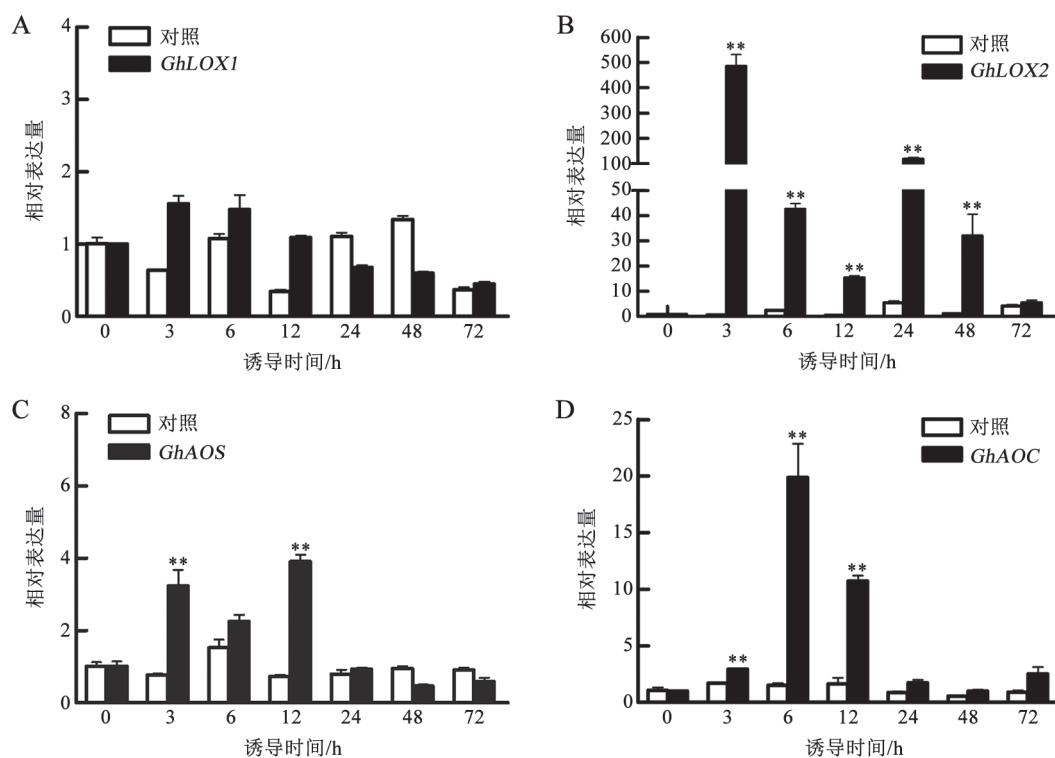


图3 MeJA诱导下JA合成途径基因的表达水平

Fig.3 Expression levels of genes in JA biosynthesis pathway induced by MeJA

的合成可能起到正反馈的调节作用。Wasternack (2007)的研究表明,有关JA合成途径的相关基因均受JA类物质的诱导,JA的生物合成受正反馈调节。因此,我们推测甜菜夜蛾危害可能会诱导棉花启动JA信号传导途径,从而激活棉花防御机制的产生。

萜类化合物是植物中一类重要的次生代谢物。科学家们已经从40多种植物中克隆了200多个单萜和倍半萜合酶基因,萜类合酶的多样性决定了萜类化合物种类的丰富程度(Degenhardt等2009)。在植物与昆虫的长期协同进化过程中,萜类物质在植物直接或间接防御中发挥了重要作用,并一直是国内外学者关注的热点问题。研究表明,棉酚是棉花中一种重要的倍半萜,尤其对棉铃虫的防治作用显著, $\delta$ -杜松烯合酶则是合成倍半萜棉酚的关键酶(陈晓亚等2015)。本文研究了陆地棉中报道的棉酚合成途径之外的5个萜类合酶基因受甜菜夜蛾取食诱导后不同时间点的表达水平,从定量PCR结果可以看出,甜菜夜蛾取食诱导12和48 h陆地棉*GhTPS4*的表达量升高14.6和5.2倍,这与已报道该基因在棉铃虫取食24和36 h表达量分

别升高15.6和15.9倍的结果类似(吕丽敏等2014)。上述结果初步表明*GhTPS4*在转录水平上响应了甜菜夜蛾的取食诱导,关于进一步的响应调节机制仍需深入研究。另外,*GhTPS5*在甜菜夜蛾取食48 h后表达量升高2.5倍,这与前期研究中棉铃虫取食后该基因表达量表现下调并不一致(吕丽敏等2014)。昆虫口腔分泌物作为外源的激发子是诱导植物产生防御反应的效应子,不同的激发子会激活植物不同的防御信号途径,使植物产生相应的防御反应(Wu和Baldwin 2010),因此推测该基因对甜菜夜蛾和棉铃虫取食胁迫产生不同结果的原因可能是由于二者口腔分泌物成分的差异所致。

陆地棉5个萜类合酶基因对喷施MeJA处理均有不同程度的响应,其中*GhTPS4*在处理各时间点变化比较强烈,这与甜菜夜蛾取食诱导实验中该基因的变化趋势基本一致,推测该基因可能通过JA途径调控了*GhTPS4*的表达,从而响应甜菜夜蛾的取食诱导。*GhTPS1*、*GhTPS2*、*GhTPS3*在MeJA处理后表达量也有不同程度的升高,这与Yang等(2013)报道的MeJA处理陆地棉‘中棉所12’后上述基因表达的结果基本一致。

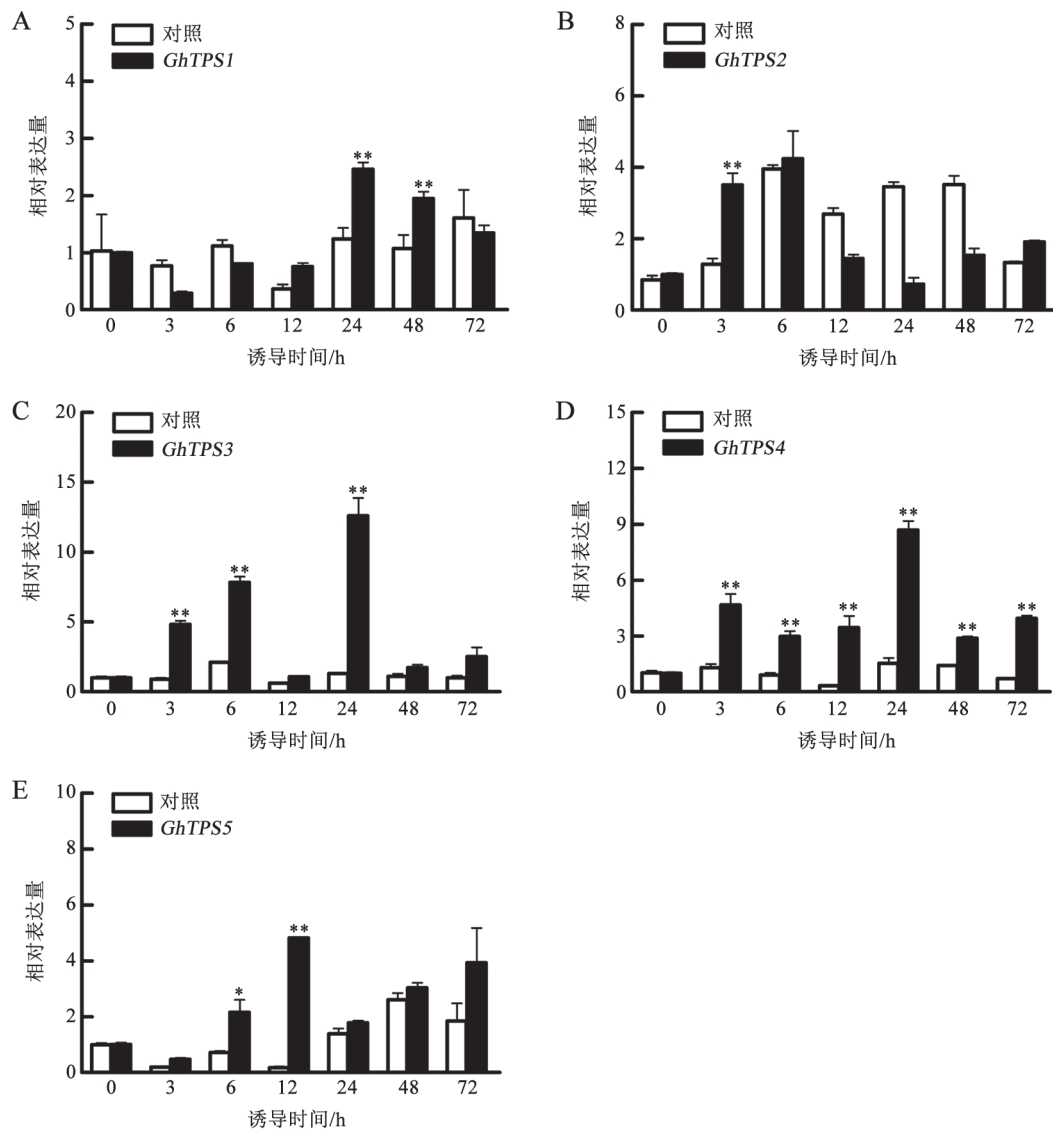


图4 MeJA诱导下萜类合酶基因的表达水平

Fig.4 Expression levels of terpene synthase genes induced by MeJA

研究陆地棉JA合成途径中*GhLOX1*、*GhLOX2*、*GhAOS*、*GhAOC*在甜菜夜蛾取食诱导和MeJA处理后的表达模式,为利用激素调节的方式防治甜菜夜蛾提供了理论支撑。同时,研究5个陆地棉萜类合酶基因在甜菜夜蛾取食及MeJA处理后的表达变化,推测*GhTPS4*可能是主要响应甜菜夜蛾取食的萜类合酶基因,但是*GhTPS4*催化产生的具体萜类物质如何响应甜菜夜蛾的取食诱导机制仍需进一步研究。从5个萜类合酶基因对MeJA处理在转录水平上均呈现不同程度的上调结果来看,JA类物质在催化植物中重要次生物质萜类的合成及代谢方面发挥着重要作用。由此推测可能的调

控路径为:甜菜夜蛾取食棉花—诱导防御信号物质(JA类物质)合成—调节合成次生代谢物(萜类物质)以吸引天敌,从而达到防御甜菜夜蛾的目的。

#### 参考文献(References)

- Browse J, Howe GA (2008). New weapons and a rapid response against insect attack. *Plant Physiol*, 146: 832–838
- Chen XY, Chen Y, Heinstein P, et al (1995). Cloning, expression, and characterization of (+)- $\delta$ -cadinene synthase: a catalyst for cotton phytoalexin biosynthesis. *Arch Biochem Biophys*, 324: 255–266
- Chen XY, Wang LJ, Mao YB, et al (2015). Plant terpenoids: biosynthesis, regulation and plant-insect interactions. *Chin Bull Life Sci*, 27 (7): 813–818 (in Chinese with En-

- glish abstract) [陈晓亚, 王凌健, 毛颖波等(2015). 植物萜类生物合成与抗虫反应. 生命科学, 27 (7): 813–818]
- Chu B (2016). The expression and function of polyphenol oxidase Ghppo1 in cotton defense (dissertation). Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (in Chinese with English abstract) [楚博(2016). 多酚氧化酶Ghppo1在棉花防御中的表达及功能分析(学位论文). 北京: 中国农业科学院]
- Degenhardt J, Köllner TG, Gershenzon J (2009). Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, 70 (15-16): 1621–1637
- Erb M, Meldau S, Howe GA (2012). Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends Plant Sci*, 17 (5): 250–259
- Gfeller A, Dubugnon L, Liechti R, et al (2010). Jasmonate biochemical pathway. *Sci Signal*, 3 (109): cm3
- Huang XZ, Wu J, Xu QX, et al (2012). Molecular cloning of the sesquiterpene synthase gene *GhTPS1* of *Gossypium hirsutum* and its induction by the feeding activity of cotton bollworm larvae. *Chin J Appl Entomol*, 49 (4): 831–838 (in Chinese with English abstract) [黄欣蒸, 武娟, 徐绮霞等(2012). 棉花倍半萜合成酶基因*GhTPS1*的克隆及棉铃虫取食诱导表达谱分析. 应用昆虫学报, 49 (4): 831–838]
- Huang XZ, Xiao YT, Köllner TG, et al (2013). Identification and characterization of (*E*)- $\beta$ -caryophyllene synthase and  $\alpha/\beta$ -pinene synthase potentially involved in constitutive and herbivore-induced terpene formation in cotton. *Plant Physiol Bioch*, 73 (8): 302–308
- Lian QL, Xin HB, Li XX, et al (2013). Isolation, characterization and expression analysis of the genes—*GhAOS*, *GhAOC* and *GhOPR3*: encoding the key enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis in *Gladiolus hybridus*. *Sci Hortic*, 154 (2): 88–95
- Liu QX, Li MS, Guo J (2012). Regulation of jasmonic acid biosynthesis and jasmonic acid signaling pathway. *Plant Physiol J*, 48 (9): 837–844 (in Chinese with English abstract) [刘庆霞, 李梦莎, 国静(2012). 茉莉酸生物合成的调控及其信号通路. 植物生理学报, 48 (9): 837–844]
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. *Methods*, 25 (4): 402–408
- Lv LM, Zhang S, Luo JY, et al (2014). Cloning of *GhTPS4* and *GhTPS5* encoding monoterpene synthase and analysis of gene expression induced by cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) in *Gossypium hirsutum* L. *Cotton Sci*, 26 (6): 513–520 (in Chinese with English abstract) [吕丽敏, 张帅, 雒珺瑜等(2014). 陆地棉单萜合酶基因*GhTPS4*和*GhTPS5*的克隆及棉铃虫诱导的基因表达分析. 棉花学报, 26 (6): 513–520]
- Lv LM, Zhang S, Luo JY, et al (2016). The controlling effect of Cry1C protein on four species of cotton insect pest. *J Biosafety*, 25 (2): 148–152 (in Chinese with English abstract) [吕丽敏, 张帅, 雒珺瑜等(2016). Cry1C蛋白对4种棉花害虫的致死效果研究. 生物安全学报, 25 (2): 148–152]
- Mao YB, Liu YQ, Chen DY, et al (2017). Jasmonate response decay and defense metabolite accumulation contributes to age-regulated dynamics of plant insect resistance. *Nat Commun*, 8: 13925
- Roos J, Bejai S, Mozūraitis R, et al (2015). Susceptibility to *Verticillium longisporum* is linked to monoterpene production by TPS23/27 in *Arabidopsis*. *Plant J*, 81 (4): 572–585
- Schnee C, Köllner TG, Held M, et al (2006). The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103 (4): 1129–1134
- Shi H, Zhang LF, Hua BZ, et al (2006). The insecticidal activity of Bt protein at second trophic level. *Chin Sci Bull*, 51 (5): 546–550 (in Chinese with English abstract) [石宏, 张立富, 花保祯等(2006). 二级营养级水平上Bt蛋白的杀虫活性. 科学通报, 51 (5): 546–550]
- Thaler JS, Stout MJ, Karban R, et al (2001). Jasmonate-mediated induced plant resistance affects a community of herbivores. *Ecol Entomol*, 26 (3): 312–324
- Van Poecke RM, Posthumus MA, Dicke M (2001). Herbivore-induced volatile production by *Arabidopsis thaliana* leads to attraction of the parasitoid *Cotesia rubecula*: chemical, behavioral, and gene-expression analysis. *J Chem Ecol*, 27 (10): 1911–1928
- Wasternack C (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot*, 100 (4): 681–697
- Wen LZ, Zhang YJ (2010). Modelling of the relationship between the frequency of large-scale outbreak of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) and the wide-area temperature and rainfall trends in China. *Acta Entomol Sin*, 53 (12): 1367–1381 (in Chinese with English abstract) [文礼章, 张友军(2010). 我国甜菜夜蛾大尺度暴发频度与广域温度和广域降雨量关系的预测模型. 昆虫学报, 53 (12): 1367–1381]
- Wu J, Baldwin IT (2010). New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. *Annu Rev Genet*, 44 (1): 1–24
- Wu J, Wu Q, Wu Q, et al (2008). Constitutive overexpression of *AOS*-like gene from soybean enhanced tolerance to insect attack in transgenic tobacco. *Biotechnol Lett*, 30 (9): 1693–1698
- Xia JY, Cui JJ, Chang RQ (2000). Studies on resistance of beet armyworm *Spodoptera exigua* (Hübner) to transgenic cotton. *China Cotton*, 27 (9): 10–11 (in Chinese with English abstract) [夏敬源, 崔金杰, 常蕊芹(2000). 转基因



- 因抗虫棉对甜菜夜蛾的抗性研究. 中国棉花, 27 (9): 10–11]
- Yang CQ, Wu XM, Ruan JX, et al (2013). Isolation and characterization of terpene synthases in cotton (*Gossypium hirsutum*). *Phytochemistry*, 96 (12): 46–56
- Zebelo SA, Maffei ME (2012). Signal transduction in plant-insect interactions: from membrane potential variations to metabolomics. In: Volkov A (ed). *Plant Electrophysiology*. Berlin: Springer-Verlag, 143–172
- Zhang B, Liu H, Wang JJ, et al (2008). Advance in the research on *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Chin Agric Sci Bull*, 24 (10): 427–433 (in Chinese with English abstract) [张彬, 刘怀, 王进军等 (2008). 甜菜夜蛾研究进展. 中国农学通报, 24 (10): 427–433]
- Zhou HX (2002). Studies on the developmental effects, physiological and biochemical mechanisms of transgenic *Cry1Ac* and *Cry1A+CpTI* cottons on beet armyworm *Spodoptera exigua* (Hübner) (dissertation). Taian: Shandong Agricultural University (in Chinese with English abstract) [周海霞(2002). 转*Cry1Ac*和*Cry1A+CpTI*基因棉花对甜菜夜蛾生长发育的影响及生理生化机制研究(学位论文). 泰安: 山东农业大学]
- Ziegler J, Keinänen M, Baldwin IT (2001). Herbivore-induced allene oxide synthase transcripts and jasmonic acid in *Nicotiana attenuata*. *Phytochemistry*, 58: 729–738

## Effects of beet armyworm feeding and methyl jasmonate treatment on transcription levels of key genes involved in the biosynthesis pathway of jasmonic acid and terpene synthase in cotton

LÜ Li-Min, ZHANG Shuai, LUO Jun-Yu, WANG Chun-Yi, WANG Li, ZHU Xiang-Zhen, ZHANG Li-Juan, LI Chun-Hua, CUI Jin-Jie\*

State Key Laboratory of Cotton Biology/Institute of Cotton Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Anyang, Henan 455000, China

**Abstract:** In this study, ‘Shiyuan 321’, a variety of upland cotton (*Gossypium hirsutum*), was used to investigate the impact of *Spodoptera exigua* feeding and methyl jasmonate (MeJA) treatment on the expression profiles of genes involved in the biosynthesis of jasmonic acid (JA) and terpene. Feeding damage inflicted by *S. exigua* caused the increased expression levels of *GhLOX1*, *GhLOX2*, *GhAOS* and *GhAOC*. Specially, the expression levels of *GhLOX2* were 64.4-fold and 118.7-fold higher than the control cotton by 12 and 24 hours after feeding. In addition, five terpene synthase (TPS) genes, named as *GhTPS1*, *GhTPS2*, *GhTPS3*, *GhTPS4* and *GhTPS5*, exhibited distinct expression profiles after feeding, of which *GhTPS4* and *GhTPS5* were up-regulated by *S. exigua* feeding. MeJA induced a significant increase in *GhLOX2* transcript levels, and also promoted terpene synthase expression at different stages after treatment. Treating *in vitro* with MeJA induced the significantly different expression of *GhTPS4* during various later stages. In conclusion, our data demonstrate that *GhLOX2* and *GhTPS4* are the most important genes induced by *S. exigua* feeding and MeJA treatment in *G. hirsutum*.

**Key words:** beet armyworm; MeJA; terpene synthase (TPS); cotton

Received 2017-11-01 Accepted 2018-03-30

This work was supported by the Modern Agricultural Industry Technology System (CARS-15-20).

\*Corresponding author (cuijinjie@126.com).