

# 基于黄酮合成通路基因表达特性的木薯对二斑叶螨防御机理初探

乔 阳<sup>1,2,3</sup>, 梁 晓<sup>2,3</sup>, 陈 青<sup>2,3\*</sup>, 伍春玲<sup>2,3</sup>, 刘 迎<sup>2,3</sup>, 刘小强<sup>2,3</sup>, 税 军<sup>1,2,3</sup>, 姚晓文<sup>1,2,3</sup>

1. 海南大学植物保护学院, 海南海口 570228; 2. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所/农业农村部热带作物有害生物综合治理重点实验室/海南省热带作物病虫害生物防治工程技术研究中心, 海南海口 571101; 3. 中国热带农业科学院三亚研究院/海南省南繁生物安全与分子育种重点实验室, 海南三亚 572000

**摘 要:** 木薯是全球重要的粮食作物和经济作物。二斑叶螨 (*Tetranychus urticae* Koch) 是重要的外来入侵生物和我国木薯主产区的四大有害生物之一。抗螨品种的选育与利用是实现害螨绿色综合防控的重要手段, 作物中具有抗螨功能的次生代谢物质和其调控基因的挖掘与利用是培育抗性品种的有效途径。黄酮类次生代谢物质在作物抵御虫害中发挥重要作用, 但其合成通路基因在木薯抗二斑叶螨中的功能尚不清楚。基于此, 本研究分析抗、感螨木薯品种被二斑叶螨取食不同时间 (1、4 d) 后, 黄酮合成通路关键基因表达量的变化情况。结果表明: 与螨害前相比, 感螨木薯品种面包、SC9 和 BAR900 的 *CHS*、*PGT1*、*F3H*、*FLS*、*LAR*、*C3'H* 和 *CYP93B\_16* 基因的相对表达量总体呈先降低 (1 d) 再升高 (4 d) 至螨害前 (0 d) 水平的趋势, 而抗螨木薯品种 C1115、SC9 和缅甸中的上述基因相对表达量总体呈先显著升高 (1 d) 再降低 (4 d) 的趋势, 但均显著高于螨害前 (0 d) 的水平。进一步比较螨害前后抗、感螨木薯品种黄酮合成通路基因表达量的差异发现, 二斑叶螨为害 1 d 后, 抗螨木薯品种中 *CHS*、*PGT1*、*FLS* 和 *C3'H* 的表达量显著高于感螨木薯品种。相关性分析表明, 这 4 个基因的表达量与木薯抗螨性呈显著正相关。螨害前 (0 d) 和螨害 4 d 后, 抗螨木薯品种中上述基因的表达量总体也高于感螨木薯品种。该研究结果表明, 抗螨木薯品种受螨害后, 可能通过诱导黄酮合成基因的上调, 从而增加具有抗虫功能的黄酮类代谢物含量以抵御二斑叶螨为害。该研究为深入阐明木薯抗螨分子机理、选育和创制抗螨木薯品种提供理论基础。

**关键词:** 二斑叶螨; 抗、感螨木薯品种; 黄酮合成通路; 基因表达

中图分类号: S435.33 文献标识码: A

## A Preliminary Study on the Defense Response of Cassava Cultivars to *Tetranychus urticae* Based on Gene Expression Pattern of Flavonoid Pathway

QIAO Yang<sup>1,2,3</sup>, LIANG Xiao<sup>2,3</sup>, CHEN Qing<sup>2,3\*</sup>, WU Chunling<sup>2,3</sup>, LIU Ying<sup>2,3</sup>, LIU Xiaoqiang<sup>2,3</sup>, SHUI Jun<sup>1,2,3</sup>, YAO Xiaowen<sup>1,2,3</sup>

1. College of Plant Protection, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Pests Comprehensive Governance for Tropical Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Hainan Engineering Research Center for Biological Control of Tropical Crops Diseases and Insect Pests, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Sanya Research Academy, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Hainan Key Laboratory for Biosafety Monitoring and Molecular Breeding in Off-Season Reproduction Regions, Sanya, Hainan 572000, China

收稿日期 2022-07-12; 修回日期 2022-10-11

基金项目 国家木薯产业技术体系虫害防控岗位科学家专项 (No. CARS-11-HNCQ); 国家重点研发计划项目 (No. 2020YFD1000603); 农业农村部农业资源调查与保护利用专项 (No. NFZX-2021)。

作者简介 乔 阳 (1997—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 抗虫种质资源挖掘与创新利用。\*通信作者 (Corresponding author): 陈 青 (CHEN Qing), E-mail: chqingztq@163.com。

**Abstract:** Cassava is an important food crop and economic crop in the world. *Tetranychus urticae* is one of the important alien invasive pests and one of the four major cassava pests in China. Breeding and utilization of mite resistant varieties is an important means to realize green integrated pest control. The exploitation and utilization of secondary metabolites with mite resistance function and their regulation genes can effectively breed mite resistant varieties in crops. Flavonoid play an important role in plant defense against phytophagous pests, however, there is little knowledge about the function of flavonoid pathway genes in cassava resistance to mite. Based on this, this study used mite-resistant and mite-susceptible cassava cultivars were used to analyze the flavonoid pathway genes related to plant insect resistance and to analyze the difference of gene expression after mites fed for 1 d and 4 d, respectively. The results showed that, compared with before those mites fed, the relative expression of *CHS*, *PGT1*, *F3H*, *FLS*, *LAR*, *C3'H* and *CYP93B\_16* genes in the cassava cultivars of BREAD, SC9 and BAR900 showed a trend of first decreasing (1 d) and then increasing (4 d) to the levels before the mites feed (0 d), while the relative expression of the above genes in the mites-resistant cassava cultivars C1115, SC9 and Myanmar showed a trend of first significantly increasing (1 d) and then decreasing (4 d). However, they were all significantly higher than those of the levels before the mites feed (0 d). Further comparison of the differences in the expression of the flavonoids synthesis pathway gene in the mites-resistant and sensitive tapioca cultivars before and after mites was infested, it was found that after the pest of the two-spotted spider mites was harmed for 1 d, the expression of *CHS*, *PGT1*, *FLS* and *C3'H* in the mites-resistant cassava cultivars was significantly higher than that in the sensitive mites cassava varieties. Correlation analysis showed that the expression of the four genes was significantly and positively correlated with cassava mite resistance. Before mites (0 d) and 4 days after mites infestation, the expression of the above genes in mites-resistant cassava varieties was generally higher than that of the tapioca cultivars. The results speculated that mite-resistant cassava cultivar could activate flavonoid pathways to defend *T. urticae* infestation. This study would lay a theoretical foundation for further elucidating the molecular mechanism of cassava resistance to mite, and for breeding and creating mite-resistant cassava cultivars.

**Keywords:** *Tetranychus urticae*; mite-resistant and mite-susceptible cassava cultivars; flavonoid pathway; gene expression

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.08.018

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 是大戟科 (Euphorbiaceae) 木薯属 (*Manihot*) 作物, 原产于亚马逊南部盆地, 目前广泛种植于全球亚热带和热带地区<sup>[1]</sup>, 具有高产、高淀粉含量、耐贫耐旱等特点<sup>[2]</sup>, 为世界上 100 多个国家近 10 亿人口提供碳水化合物来源<sup>[3]</sup>。木薯还是重要的工业原料、能源作物、饲料作物和救荒作物, 在淀粉糖合成、医药、化工、造纸和食品等领域发挥重要作用<sup>[4-5]</sup>。

二斑叶螨 (*Tetranychus urticae* Koch) 是世界危险性害螨, 是危害木薯最严重的四大有害生物之一<sup>[6]</sup>, 其严重为害会使木薯减产 50%~70%, 甚至绝收<sup>[7]</sup>。目前, 化学杀螨剂依然是控制二斑叶螨最常用的方法, 但该螨于木薯种植后 6~8 个月暴发成灾, 而此时木薯地已封行, 不仅导致药剂的有效利用率降低, 还将造成害螨抗药水平上升, 产品和产地环境安全风险加剧等问题<sup>[8-9]</sup>。因此, 寻求绿色、高效、环境友好的害虫防治策略才能够有效支撑木薯产业的可持续发展。

抗虫品种的选育与利用是实现害虫绿色综合防控的重要手段<sup>[10-11]</sup>, 研究作物抗虫机理能为抗虫品种的选育提供重要的理论依据。研究表明,

植物能产生多种次生代谢物来防御生物和非生物胁迫<sup>[12-13]</sup>, 其中, 黄酮类化合物在作物形成抗虫性中发挥重要作用<sup>[14]</sup>, 它可以抑制昆虫的摄食、发育和产卵<sup>[15]</sup>, 黄酮类化合物及其合成调控基因的抗虫作用已见于玉米抗棉铃虫 (*Helicoverpa armigera* Hübner)、茶树抗茶尺蠖 (*Ectropis obliqua* Prout)、水稻抗褐飞虱 (*Nilaparvata lugens* Stal) 等相关研究<sup>[16-18]</sup>。然而迄今为止, 尚未见黄酮合成通路基因在木薯抗二斑叶螨中的功能报道。因此, 本研究拟分析比较二斑叶螨取食不同抗性水平木薯品种前后黄酮合成通路基因的表达量差异, 以初步明确与木薯抗二斑叶螨相关的黄酮合成通路关键基因, 为深入开展基于黄酮代谢通路的抗螨木薯新种质的创制与分子设计育种提供重要的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试二斑叶螨 参考伍牧锋等<sup>[19]</sup>的方法进行二斑叶螨的室内饲养。选择发育历期相同、大小一致的雌成螨进行试验。

1.1.2 供试木薯 遗传稳定的抗螨木薯品种 C1115、缅甸 (Myanmar)、SC9, 感螨木薯品种 SC205、面包 (Bread)、BRA900<sup>[20]</sup>由中国热农业科学院热带作物品种资源研究所国家木薯种质资源圃提供。参考韩志玲等<sup>[21]</sup>的方法进行木薯的室内种植, 待木薯生长约 60 d 后, 选择长势一致的健康木薯植株进行害螨接种。

1.1.3 候选黄酮合成通路基因 根据KEGG网站

(<https://www.kegg.jp/kegg/>) 中已发布的黄酮类代谢物合成通路, 绘制木薯黄酮类代谢物合成通路示意图 (图 1), 选取植物黄酮合成调控研究中最广泛的 7 个基因作为候选基因, 分别为 *CHS* (查尔酮合酶)、*PGT1* (根皮苷合酶)、*C3'H* (5-O-香豆酰基-D-喹啉 3'-单加氧酶)、*FLS* (黄酮醇合酶)、*F3H* (柚皮素 3-双加氧酶)、*LAR* (白花青素还原酶)、*CYP93B\_16* (黄酮合酶 II)。

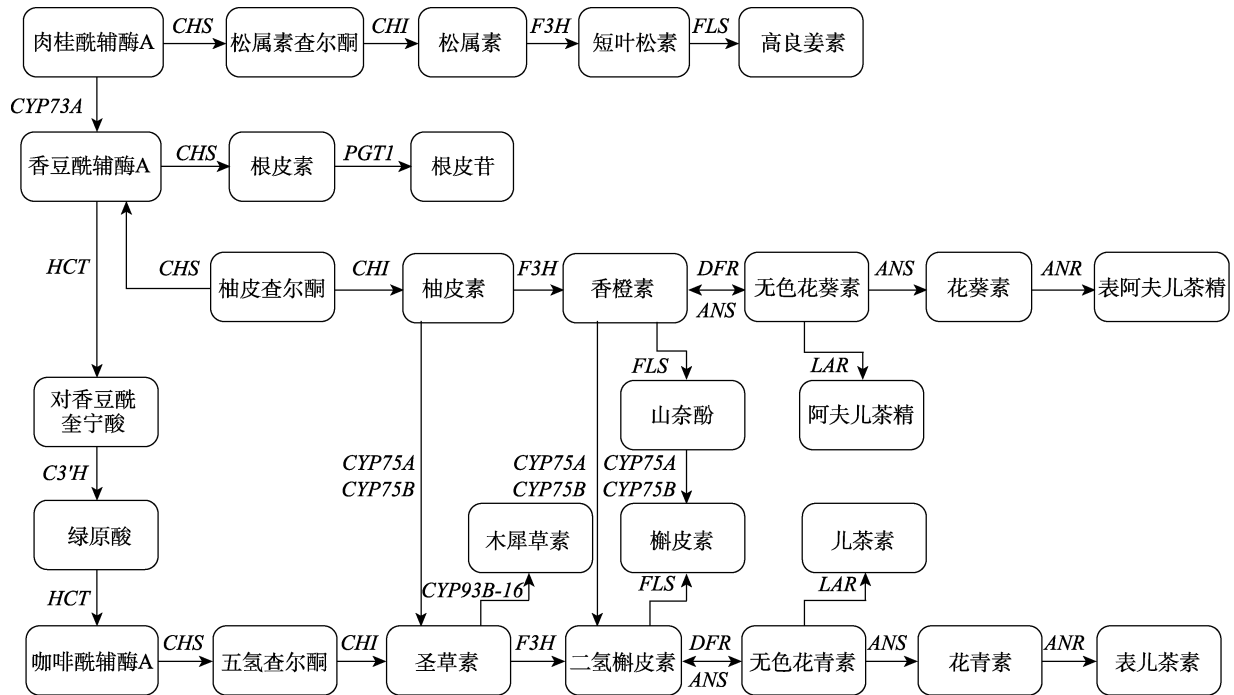


图 1 木薯黄酮类代谢物合成通路示意图  
Fig. 1 Flavonoid biosynthesis pathway in cassava

1.2 方法

1.2.1 二斑叶螨接种与取样 分别选取室内种植 60 d, 长势一致, 健康的抗螨木薯品种 C1115、缅甸 (Myanmar)、SC9, 感螨木薯品种 SC205、面包 (Bread)、BRA900 进行害螨接种。每株木薯分别选取中部的 3 张叶片, 用实验室自制的吸尘器小心吸取发育一致的二斑叶螨雌成螨, 接种于叶背面 (50 头/片), 并以羊毛脂涂抹在叶柄基部以防止二斑叶螨逃逸。采集未受螨害 (0 d)、螨害 1、4 d 后的叶片用于 RNA 提取。不同木薯品种不同螨害时间处理均设置 3 个生物学重复。

1.2.2 RNA 提取及 cDNA 第一条链的合成 参照多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (TIANGEN, 美国) 说明书提取木薯叶片 RNA, 取去除 gDNA 后的 RNA 样品 1.0 μg 进行 cDNA 第一链的合成, 合成方法参照 RT EasyMix for qPCR 试剂盒

(TOLOBIO, 中国)。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 分析 根据 GenBank 中已经发布的木薯黄酮类代谢物合成通路 7 个关键基因序列设计 qPCR 引物 (表 1)。cDNA 样品经 RNase-free ddH<sub>2</sub>O 稀释 160 倍后作为 qPCR 的模板, 以木薯 *Meactin* 为内参基因<sup>[7]</sup>。qPCR 反应体系的配制参照 2×Q3 SYBR qPCR Master Mix 试剂盒 (TOLOBIO, 中国)。qPCR 反应条件为 95 °C 30 s; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。使用 LightCycler<sup>®</sup> 96 仪器 (Roche, 瑞士) 默认溶解曲线程序采集溶解曲线。根据 LIVAK 等<sup>[22]</sup>的 2<sup>-ΔΔCt</sup> (ΔΔCt=ΔCt<sub>2</sub>-ΔCt<sub>1</sub>, ΔCt<sub>1</sub> 为 2 个样本内参基因 Ct 值的差值, ΔCt<sub>2</sub> 为 2 个样本目的基因 Ct 值的差值) 方法计算而得, 每个处理均设置 3 个重复, 目的基因在 2 个样本间的相对表达量为 3 个重复的平均值。

表 1 本研究所用引物  
Tab. 1 Primers used in this study

基因 Gene	基因登录号 Gene ID	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	退火温度 Tm/°C	产物大小 Product size/bp
<i>CHS</i>	MANES_03G150000	F: GGTGGTCCAGCCATTCTCG	60.7	171
		R: GGTGGTGACTTCCCTTCCTC	59.9	
<i>PGTI</i>	MANES_18G104600	F: GCATACTCCTCAACAAGCCTAA	57.6	172
		R: CGAAAGACAACCAGCACCAGAA	60.3	
<i>F3H</i>	MANES_02G104700	F: TTATCCATAGCCACATTCCA	58.9	133
		R: CCTTGCTCATCTTCCCTCCT	59.2	
<i>FLS</i>	MANES_18G074900	F: GTTCAAGGTCTTCAGGCTTCTAG	60.3	113
		R: TACTTCCGTTGCTCAATATCTC	60.9	
<i>C3'H</i>	MANES_08G063400	F: TAGATTCCGATGCTACGCC	56.2	150
		R: CGATGTCGATCAGCCAACCT	56.2	
<i>LAR</i>	MANES_06G072400	F: ACGGTTGATTCAGGAGTATGG	56.6	94
		R: TTCCGAAGGGTGATTATTGTT	56.6	
<i>CYP93B_16</i>	MANES_04G030000	F: GAATGGGCACCTGCAGAA	56.9	174
		R: CATAGGGATTGGTGGGTGTAG	57.2	
<i>Actin</i>	XM_021777064.2	F: GAAGTCTGTTCACCATCT	54.4	154
		R: AACCACCGCTAAGCACTATGT	64.4	

### 1.3 数据处理

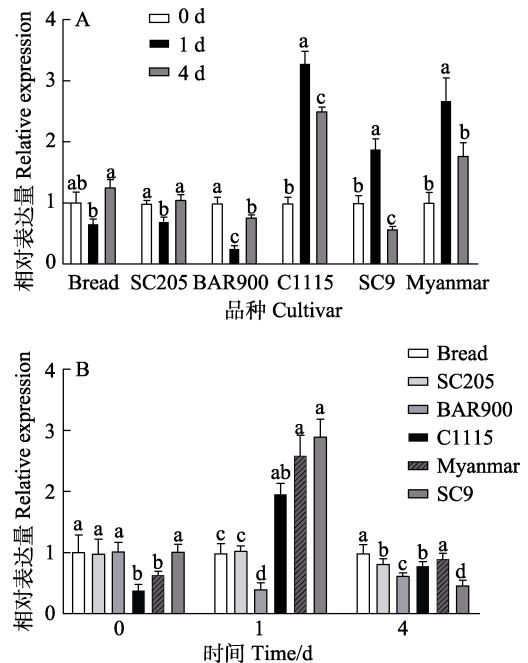
采用 Excel 和 Gradphad Prism 软件进行数据汇总整理, 使用 SPSS Statistics 24 软件进行数据分析, 采用 Duncan's 新复极差法进行数据间的多重比较, 采用皮尔逊相关性分析 (Person's correlation analysis) 方法分析基因表达量和木薯品种螨害指数间的相关性, 其中螨害指数用于表征木薯品种的抗螨水平, 前期研究结果表明, 抗螨木薯品种 C1115、SC9 和 Myanmar 的螨害指数分别为 12.50、26.60 和 14.40, 感螨木薯品种 Bread、SC205 和 BRA900 的螨害指数分别为 95.40、93.60 和 95.70<sup>[20]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 二斑叶螨取食前后抗、感螨木薯品种叶组织中 *CHS* 基因表达差异分析

比较螨害前后同一木薯品种的 *CHS* 基因相对表达量发现, 与螨害前相比, 感螨木薯品种 Bread、SC205 和 BAR900 的 *CHS* 基因表达量呈先显著降低再显著升高的趋势, 而抗螨木薯品种 C1115、SC9 和 Myanmar 的 *CHS* 相对表达量呈先显著升高再显著降低的趋势 (图 2A)。

比较螨害前后抗、感螨品种间 *CHS* 的表达量发现, 螨害 4 d 后, 抗螨木薯品种中 *CHS* 的表达量总体上高于感螨木薯品种, 而螨害 1 d 后, 抗螨木薯品种中 *CHS* 的表达量均显著高于感螨木薯品种 (图 2B)。进一步相关性分析表明 (以螨害 1 d 后数据进行分析), 螨害后 *CHS* 基因的相对表达量与木薯品种抗螨性呈正相关 ( $r=0.8684$ ,  $P=0.012$ )。



A: 螨害前后各品种内基因表达量变化; B: 螨害前后同一时间品种间基因表达量变化。不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。A: Changes of gene expression in various cultivars before and after mite infestation; B: Changes of gene expression between cultivars at the same time before and after mite infestation. Different lower-case letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

图 2 螨害前后不同时间、不同品种 *CHS* 基因表达量变化

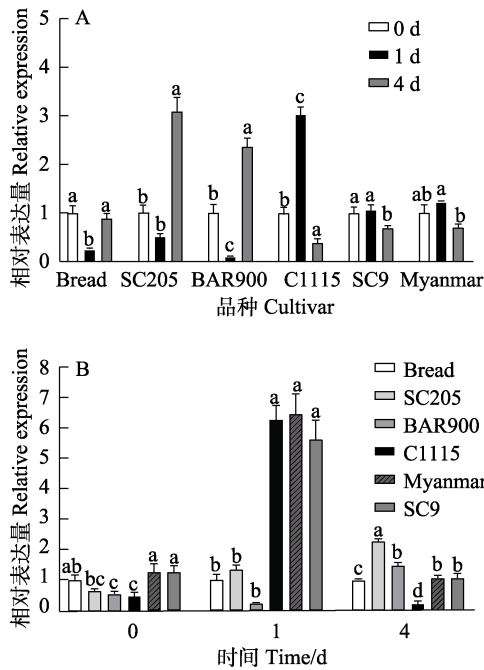
Fig. 2 Changes of *CHS* gene expressions in different cultivars at different time before and after mite infestation

### 2.2 二斑叶螨取食前后抗、感木薯品种叶组织中的 *PGTI* 基因表达差异分析

比较螨害前后同一木薯品种的 *PGTI* 基因相对表达量发现, 与螨害前相比, 感螨木薯品种 Bread、SC205 和 BAR900 的 *PGTI* 基因表达量呈先显著降低再显著升高的趋势, 而抗螨木薯品种

C1115、SC9 和 Myanmar 的 *PGT1* 相对表达量呈先升高再显著降低的趋势 (图 3A)。

比较螨害前后抗、感螨品种间 *PGT1* 的表达量发现, 螨害前 (0 d), 抗螨木薯品种中 *PGT1* 的表达量总体上高于感螨木薯品种, 而螨害 1 d 后, 抗螨木薯品种中 *PGT1* 的表达量均显著高于感螨木薯品种 (图 3B), 进一步相关性分析结果表明(以螨害 1 d 后数据进行分析), 螨害后 *PGT1* 基因相对表达量与木薯品种抗螨性呈正相关 ( $r=0.9891, P=0.0001$ )。



A: 螨害前后各品种内基因表达量变化; B: 螨害前后同一时间品种间基因表达量变化。不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。A: Changes of gene expression in various cultivars before and after mite infestation; B: Changes of gene expression between cultivars at the same time before and after mite infestation. Different lower-case letters indicate significant difference ( $P<0.05$ ).

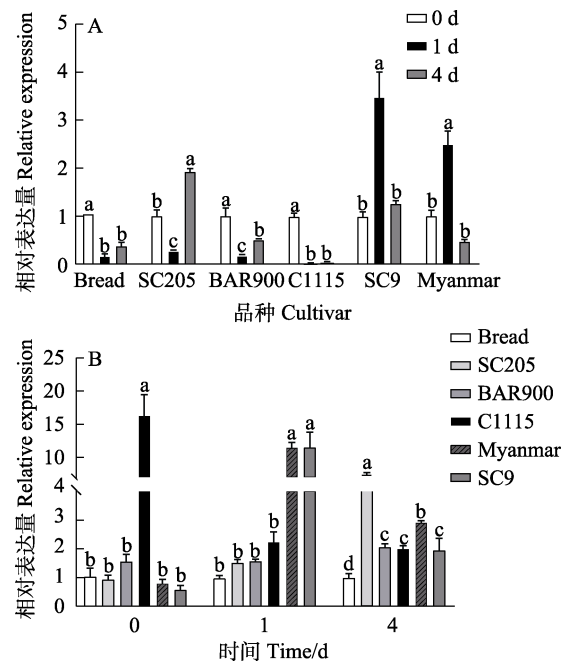
图 3 螨害前后不同时间、不同品种 *PGT1* 基因表达量变化

Fig. 3 Changes of *PGT1* gene expressions in different cultivars at different time before and after mite infestation

### 2.3 二斑叶螨取食前后抗、感木薯品种叶组织中的 *F3H* 基因表达差异分析

比较螨害前后同一木薯品种的 *F3H* 基因相对表达量发现, 与螨害前相比, 感螨木薯品种 Bread、SC205 和 BAR900 的 *F3H* 基因表达量呈先显著降低再升高的趋势, 而抗螨木薯品种 SC9 和 Myanmar 的 *F3H* 基因相对表达量呈先显著升高再显著降低的趋势, C1115 的 *F3H* 基因相对表达量则呈显著降低的趋势 (图 4A)。

比较螨害前后抗、感螨品种间 *F3H* 的表达量发现, 螨害前 (0 d), 抗、感木薯品种间 *F3H* 基因表达量差异不显著, 但抗螨木薯品种 C1115 的 *F3H* 表达量显著高于其他品种, 螨害 4 d 后, 抗螨木薯品种中 *F3H* 的表达量总体上高于感螨木薯品种。而螨害 1 d 后, 抗螨木薯品种 C1115、SC9 和 Myanmar 的 *F3H* 表达量均显著高于感螨木薯品种 (图 4B)。进一步相关性分析结果表明 (以螨害 1 d 后数据进行分析), 螨害后 *F3H* 基因相对表达量与木薯品种抗螨性呈正相关 ( $r=0.6438, P=0.084$ )。



A: 螨害前后各品种内基因表达量变化; B: 螨害前后同一时间品种间基因表达量变化。不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。A: Changes of gene expression in various cultivars before and after mite infestation; B: Changes of gene expression between cultivars at the same time before and after mite infestation. Different lower-case letters indicate significant difference ( $P<0.05$ ).

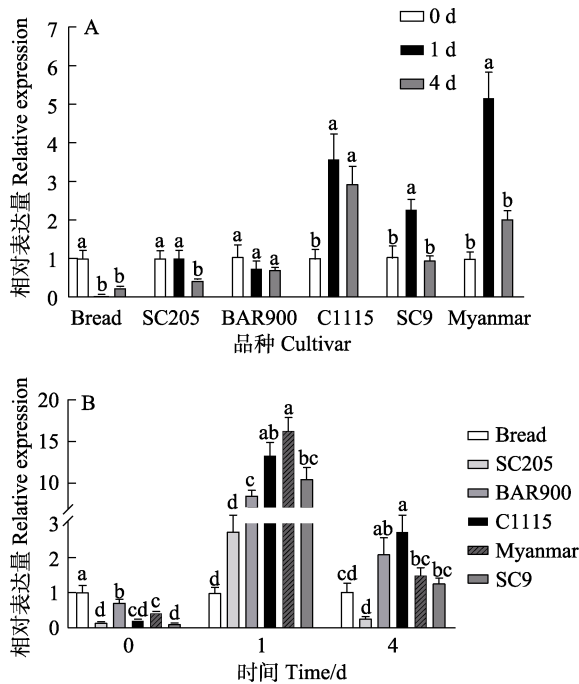
图 4 螨害前后不同时间、不同品种 *F3H* 基因表达量变化

Fig. 4 Changes of *F3H* gene expressions in different cultivars at different time before and after mite infestation

### 2.4 二斑叶螨取食前后抗、感木薯品种叶组织中的 *FLS* 基因表达差异分析

比较螨害前后同一木薯品种的 *FLS* 基因相对表达量发现, 与螨害前相比, 感螨木薯品种 Bread、SC205 和 BAR900 的 *FLS* 基因表达量呈逐渐降低的趋势, 而抗螨木薯品种 C1115、SC9 和 Myanmar 的 *FLS* 相对表达量呈先显著升高再降低的趋势 (图 5A)。

比较螨害前后抗、感螨品种间 *FLS* 的表达量发现, 螨害 4 d 后, 抗螨木薯品种中 *FLS* 的表达量总体上高于感螨木薯品种, 而螨害 1 d 后, 抗螨木薯品种的 *FLS* 表达量均显著高于感螨木薯品种 (图 5B)。进一步相关性分析结果表明 (以螨害 1 d 后数据进行分析), 螨害后 *FLS* 基因相对表达量与木薯品种抗螨性呈正相关 ( $r=0.8073, P=0.026$ )。



A: 螨害前后各品种内基因表达量变化; B: 螨害前后同一时间品种间基因表达量变化。不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。A: Changes of gene expression in various cultivars before and after mite infestation; B: Changes of gene expression between cultivars at the same time before and after mite infestation. Different lower-case letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

图 5 螨害前后不同时间、不同品种 *FLS* 基因表达量变化

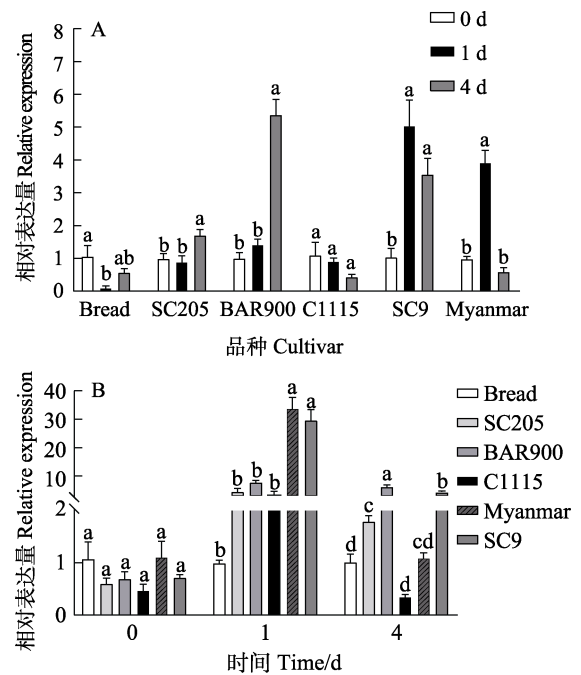
Fig. 5 Changes of *FLS* gene expressions in different cultivars at different time before and after mite infestation

### 2.5 二斑叶螨取食前后抗、感木薯品种叶组织中的 *LAR* 基因表达差异分析

比较螨害前后同一木薯品种的 *LAR* 基因相对表达量发现, 与螨害前相比, 感螨木薯品种 Bread 和 SC205 的 *LAR* 基因表达量呈先降低再升高的趋势, BAR900 的 *LAR* 基因相对表达量呈升高的趋势。抗螨木薯品种 SC9 和 Myanmar 的 *LAR* 基因相对表达量呈先显著升高再降低的趋势, 而 C1115 的 *LAR* 基因相对表达量呈降低趋势 (图 6A)。

比较螨害前后抗、感螨品种间 *LAR* 的表达量

发现, 螨害 1 d 后, 抗螨木薯品种 SC9 和 Myanmar 的 *LAR* 基因相对表达量均显著高于各感螨木薯品种, 而 C1115 的 *LAR* 基因相对表达量与感螨木薯之间无显著差异 (图 6B)。进一步相关性分析结果表明 (以螨害 1 d 后数据进行分析), 螨害后 *LAR* 基因相对表达量与木薯品种抗螨性呈正相关 ( $r=0.5722, P=0.118$ )。



A: 螨害前后各品种内基因表达量变化; B: 螨害前后同一时间品种间基因表达量变化。不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。A: Changes of gene expression in various cultivars before and after mite infestation; B: Changes of gene expression between cultivars at the same time before and after mite infestation. Different lower-case letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

图 6 螨害前后不同时间、不同品种 *LAR* 基因表达量变化

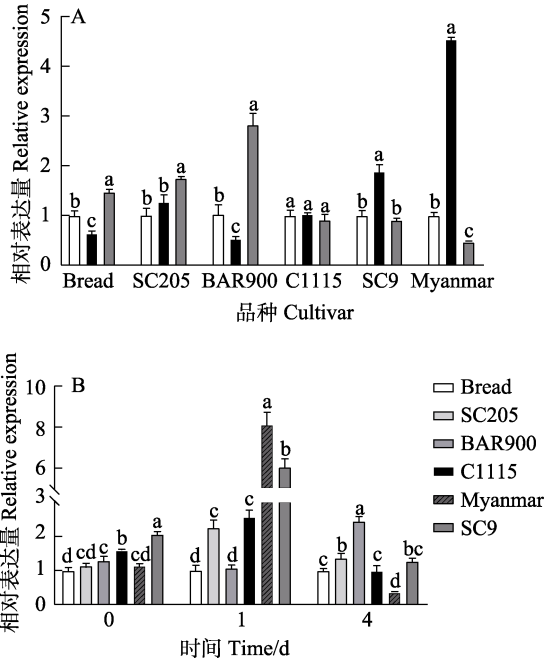
Fig. 6 Changes of *LAR* gene expressions in different cultivars at different time before and after mite infestation

### 2.6 二斑叶螨取食前后抗、感木薯品种叶组织中的 *C3'H* 基因表达差异分析

比较螨害前后同一木薯品种的 *C3'H* 基因相对表达量发现, 与螨害前相比, 感螨木薯品种 Bread 和 BAR900 的 *C3'H* 基因相对表达量呈先显著降低再显著升高的趋势, SC205 的 *C3'H* 基因相对表达量呈升高趋势, 抗螨木薯品种 SC9 和 Myanmar 的 *C3'H* 基因相对表达量呈先显著升高再显著降低的趋势, 而 C1115 的 *C3'H* 基因相对表达量无显著变化 (图 7A)。

比较螨害前后抗、感螨品种间 *C3'H* 的表达量发现, 螨害前 (0 d), 抗螨木薯品种中 *C3'H* 的表

达量总体高于感螨木薯品种，而螨害 1 d 后，抗螨木薯品种中 *C3'H* 的表达量均高于感螨木薯品种（图 7B）。进一步相关性分析结果表明（以螨害 1 d 后数据进行分析），螨害后 *C3'H* 基因相对表达量与木薯品种抗螨性呈正相关（ $r=0.7704$ ,  $P=0.037$ ）。



A: 螨害前后各品种内基因表达量变化; B: 螨害前后同一时间品种间基因表达量变化。不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。A: Changes of gene expression in various cultivars before and after mite infestation; B: Changes of gene expression between cultivars at the same time before and after mite infestation. Different lower-case letters indicate significant difference ( $P<0.05$ ).

图 7 螨害前后不同时间、不同品种 *C3'H* 基因表达量变化

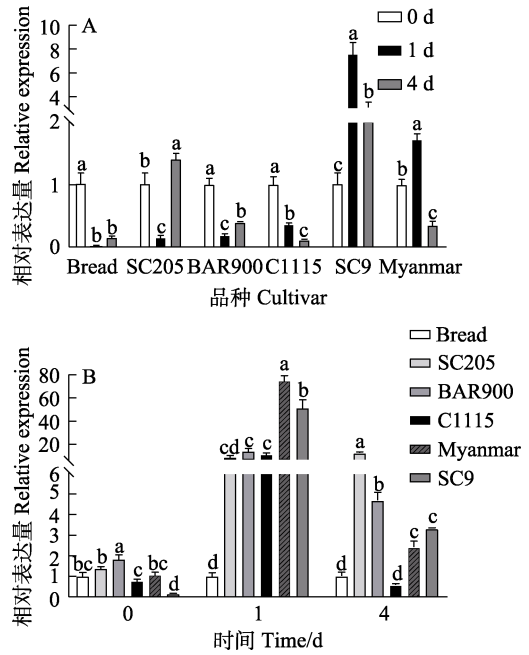
Fig. 7 Changes of *C3'H* gene expressions in different cultivars at different time before and after mite infestation

### 2.7 二斑叶螨取食前后抗、感木薯品种叶组织中的 *CYP93B\_16* 基因表达差异分析

比较螨害前后同一木薯品种的 *CYP93B\_16* 基因相对表达量发现，与螨害前相比，感螨木薯品种 Bread、SC205 和 BAR900 的 *CYP93B\_16* 基因表达量呈先显著降低再显著升高的趋势，而抗螨木薯品种 SC9 和 Myanmar 的 *CYP93B\_16* 相对表达量呈先升高再显著降低的趋势，C1115 的 *CYP93B\_16* 基因相对表达量呈显著下降的趋势（图 8A）。

比较螨害前后抗、感螨品种间 *CYP93B\_16* 的表达量发现，螨害 1 d 后，抗螨木薯品种 SC9 和 Myanmar 的 *CYP93B\_16* 基因相对表达量均显著

高于各感螨木薯品种，而 C1115 的 *CYP93B\_16* 基因相对表达量与感螨木薯之间无显著差异（图 8B）。进一步相关性分析结果表明（以螨害 1 d 后数据进行分析），螨害后 *CYP93B\_16* 基因相对表达量与木薯品种抗螨性呈正相关（ $r=0.6250$ ,  $P=0.092$ ）。



A: 螨害前后各品种内基因表达量变化; B: 螨害前后同一时间品种间基因表达量变化。不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。A: Changes of gene expression in various cultivars before and after mite infestation; B: Changes of gene expression between cultivars at the same time before and after mite infestation. Different lower-case letters indicate significant difference ( $P<0.05$ ).

图 8 螨害前后不同时间、不同品种 *CYP93B\_16* 基因表达量变化

Fig. 8 Changes of *CYP93B\_16* gene expressions in different cultivars at different time before and after mite infestation

### 3 讨论

黄酮类化合物广泛存在于植物体内，并且在抵御虫害胁迫中发挥着重要作用<sup>[23]</sup>。体内分析研究表明，植物中的黄酮类化合物，如儿茶素、山奈酚和芦丁可以影响害虫的取食偏好和产卵<sup>[24-26]</sup>。落葵中的芹菜素和牡荆素可以抑制斜纹夜蛾（*Spodoptera litura* Fabricius）幼虫的生长发育<sup>[27]</sup>。绿原酸、槲皮素和阿魏酸等提高了花生对棉铃虫（*Helicoverpa armigera*）和蚜虫（*Aphis craccivora* Koch）的抗性<sup>[28]</sup>。紫杉叶素和儿茶素在云杉防御树皮甲虫（*Ips typographus*）中发挥重要作用<sup>[29]</sup>。槲皮素和芦丁可以影响蚜虫的口针刺吸植物的汁

液<sup>[30]</sup>。通过对 39 个水稻品种对褐飞虱的抗性分析结果表明, 黄酮类化合物含量的提高与水稻抗褐飞虱能力的增强有关<sup>[31]</sup>。体外分析结果表明, 在人工饲料中掺入黄酮类化合物也会极大地影响昆虫的生长和发育。如在较高浓度的槲皮素和绿原酸的饲喂处理下, 美国白蛾 (*Hyphantria cunea*) 的死亡率分别达到了 70.00% 和 67.50%<sup>[32]</sup>。将柚皮素和槲皮素添加到豌豆蚜 (*Acyrtosiphon pisum*) 的人工饲料中, 显著降低了蚜虫的繁殖力, 并显著增加了其发育历期和成虫的死亡率<sup>[33]</sup>。

黄酮类化合物在植物体内的积累及转化受其合成基因的调控, 因此, 黄酮合成通路基因的表达与植物抗虫性有关。黄酮合成通路基因 *F3H*、*C4H* 和 *F3'5'H* 在马尾松被松茸毒蛾 (*Dasychira axutha* Collenette) 和松毛虫 (*Dendrolimus*) 为害时快速表达, 提高了马尾松的抗虫性<sup>[34]</sup>。拟南芥的花青素和黄酮醇的合成受 *MYB* 转录因子的调控, 在拟南芥中过表达 *MYB75* 导致花青素和黄酮醇水平增加, 可以增强拟南芥对鳞翅目害虫的抗性<sup>[15]</sup>。转 *F3H* 基因水稻对褐飞虱 (*Nilaparvata lugens*) 和白背飞虱 (*Sogatella furcifera* Horváth) 的抗性显著高于野生型水稻, 遗传分析发现 *F3H* 基因可以通过影响 *FLS* 和 *DFR* 的表达量, 调控山奈酚、槲皮素和花青素的含量进而影响水稻的抗虫性<sup>[35]</sup>。前期研究发现, 二斑叶螨为害后, 抗木薯中黄酮合成基因 *MeLAR* 和 *MeANR* 的表达量, *LAR* 和 *ANR* 酶活以及缩合单宁含量均显著高于感木薯品种, 进一步在感木薯野生型木薯中过表达 *MeLAR* 和 *MeANR* 基因, 可以显著提高木薯对二斑叶螨的抗性, 从分子水平证明了这 2 个黄酮合成基因的抗木薯功能<sup>[36]</sup>。然而, 木薯中涉及黄酮合成的基因有多个, 筛选并验证具有调控黄酮类化合物含量的关键基因及其功能, 能够有效支撑抗木薯种质分子精准设计育种工作, 而明确抗、感木薯品种中黄酮合成通路基因的表达差异, 能够为候选基因的筛选提供理论依据。

本研究初步揭示了较短的木薯受害时间内, 木薯黄酮类代谢物合成通路调控基因 *CHS*、*PGT1*、*F3H*、*FLS*、*LAR*、*C3'H* 和 *CYP93B\_16* 在感木薯品种中, 受木薯受害后黄酮合成基因的表达量总体呈先降低 (1 d) 再升高 (4 d) 至木薯受害前 (0 d) 水平的趋势, 其木薯受害期间的基因表达水平较木薯受害前并未提高, 而抗木薯品种中黄酮合成基因的表达量总体呈先显著升高 (1 d) 再降低 (4 d) 的

趋势, 但均显著高于木薯受害前 (0 d) 的水平, 研究表明, 抗木薯中基因诱导上调表达的能力强于感木薯。进一步比较木薯受害前后抗、感木薯品种黄酮合成通路基因表达量发现, 抗木薯品种显著高于感木薯品种。害虫为害后, 抗木薯品种中黄酮合成通路基因的防御响应速度和表达量均显著高于感木薯品种的现象在大豆与二斑叶螨互作<sup>[37]</sup>、高粱与玉米蚜 (*Rhopalosiphum maidis* Fitch) 互作<sup>[38]</sup>和水稻与飞虱互作<sup>[35]</sup>的研究中均有报道, 这与本研究结果具有一致性。黄酮合成通路 *C3'H* 基因可调控绿原酸的合成, 而外施绿原酸可以提高害虫的死亡率<sup>[32]</sup>, *CHS*、*PGT1* 和 *CYP93B\_16* 基因分别调控根皮素、根皮苷和木犀草素的合成, 因此, 推测抗木薯品种受木薯受害后, 可能通过诱导上述黄酮合成基因的上调, 从而增加具有抗木薯功能的黄酮类代谢物含量以增强其抗木薯水平。后续研究可通过干预上述基因的表达, 构建转基因木薯株系, 以期直接验证上述基因及其调控的黄酮类物质在木薯抗木薯性中的功能。

本研究一方面初步阐明了木薯中黄酮合成通路基因可能具有抗木薯性功能, 另一方面表明上述基因可能具有作为鉴定评价木薯抗木薯性水平的分子指标的潜力。但必须指出的是, 本研究仅从黄酮类代谢物合成通路基因转录水平初步阐述了木薯对二斑叶螨的抗性机制, 而二斑叶螨为害前后, 不同抗木薯品种的黄酮类代谢物合成通路关键酶和类黄酮物质含量差异尚未进行测定, 其转录水平、酶学水平和代谢水平是否具有一致性, 以及其抗木薯分子功能仍需后续研究进一步证实。

## 参考文献

- [1] CHAIAREEKITWAT S, LATIF S, MAHAYOTHEE B, KHUWIJITJARU P, NAGLE M, AMAWAN S, MÜLLER J. Protein composition, chlorophyll, carotenoids, and cyanide content of cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz) as influenced by cultivar, plant age, and leaf position[J]. Food Chemistry, 2022, 372: 131173.
- [2] COCK J H. Cassava: a basic energy source in the tropics[J]. Science, 1982, 218(4574): 755-762.
- [3] HU W, JI C M, SHI H T, LIANG Z, DING Z H, YE J Q, OU W J, ZHOU G, TIE W W, YAN Y, YANG J H, YANG X Y, WEI Y X, JIN Z Q, XIE J H, PENG M, WANG W Q, GUO A P, XU B Y, GUO J C, CHEN S B, MA L M, WANG M C, ZHOU Y, LI X L, LI R X, GUO S Y, XIAO X H, WAN Z Q, AN F F, ZHANG J, LENG Q Y, LI Y, MING R, LI K M.

- Allele-defined genome reveals biallelic differentiation during cassava evolution[J]. *Molecular Plant*, 2021, 14(6): 851-854.
- [4] 欧文军, 韦卓文, 梁海波, 夏秀云, 李开绵. 推动中非木薯科技合作服务国家“一带一路”战略[J]. *中国热带农业*, 2016(4): 9-12.
- OU W J, WEI Z W, LIANG H B, XIA X Y, LI K M. Promote China-Africa cooperation in cassava technology to serve the country's "The Belt and Road" strategy[J]. *China Tropical Agriculture*, 2016(4): 9-12. (in Chinese)
- [5] 肖鑫辉, 叶剑秋, 王明, 许瑞丽, 张洁, 万仲卿. 木薯种质资源淀粉特性分析与评价[J]. *热带作物学报*, 2021, 42(2): 339-348.
- XIAO X H, YE J Q, WANG M, XU R L, ZHANG J, WAN Z Q. Analysis on starch properties in cassava germplasm resources[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2021, 42(2): 339-348. (in Chinese)
- [6] 胡展育, 鄧军锐. 二斑叶螨的研究进展[J]. *山地农业生物学报*, 2004, 23(5): 442-447.
- HU Z Y, ZHI J R. Research progress of *Tetranychus urticae*[J]. *Journal of Mountain Agricultural Biology*, 2004, 23(5): 442-447. (in Chinese)
- [7] LU F P, LIANG X, LU H, LI Q, CHEN Q, ZHANG P, LI K M, LIU G H, YAN W, SONG J M, DUAN C F, ZHANG L H. Overproduction of superoxide dismutase and catalase confers cassava resistance to *Tetranychus cinnabarinus*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 40179.
- [8] 陈青, 梁晓, 伍春玲, 刘迎. 木薯抗螨种质资源挖掘与创新利用研究进展[C]. 2019 年全国热带作物学术年会论文集, 2019: 337.
- CHEN Q, LIANG X, WU C L, LIU Y. Research progress on mining and innovative utilization of anti-mite germplasm resources of cassava[C]. The 2019 National Tropical Crops Academic Conference, 2019: 337. (in Chinese)
- [9] 蒋立奔, 曹荣祥, 童晓利, 陈月红, 韩金龙, 郭成宝. 不同杀螨剂对二斑叶螨的室内毒力及田间防效[J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(23): 116-118.
- JIANG L B, CAO R X, TONG X L, CHEN Y H, HAN J L, GUO C B. Indoor toxicity test and field efficacy of different acaricides against *Tetranychus urticae* Koch[J]. *Journal of Jiangsu Agricultural Sciences*, 2019, 47(23): 116-118. (in Chinese)
- [10] PAINTER R H. Insect resistance in crop plants[J]. *Soil Science*, 1951, 72(6): 481.
- [11] MITHÖFER A, BOLAND W. Plant defense against herbivores: chemical aspects[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2012, 63: 431-50.
- [12] 张文辉, 刘光杰. 植物抗虫性次生物质的研究概况[J]. *植物学通报*, 2003, 20(5): 522-530.
- ZHANG W H, LIU G J. Review on plant secondary substances in plant resistance to insect pests[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2003, 20(5): 522-530. (in Chinese)
- [13] BHARTI P, MAHAJAN M, VISHWAKARMA A K, BHARDWAJ J, YADAV S K. AtROS1 overexpression provides evidence for epigenetic regulation of genes encoding enzymes of flavonoid biosynthesis and antioxidant pathways during salt stress in transgenic tobacco[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(19): 5959-5969.
- [14] MAHMOOD K, XU Z, EL-KEREM A, CASARETTO J A, ROTHSTEIN S J. The *Arabidopsis* transcription factor ANAC032 represses anthocyanin biosynthesis in response to high sucrose and oxidative and abiotic stresses[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1548.
- [15] ONKOKESUNG N, REICHEL M, VAN DOORN A, SCHUURINK R C, VAN LOON J J, DICKE M. Modulation of flavonoid metabolites in *Arabidopsis thaliana* through overexpression of the MYB75 transcription factor: role of kaempferol-3,7-dirhamnoside in resistance to the specialist insect herbivore *Pieris brassicae*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(8): 2203-2217.
- [16] 王伟伟. 茶树对茶尺蠖的抗性评价及其抗性机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.
- WANG W W. Resistance evaluation and mechanism of *Camellia sinensis* response to *Ectopis obliqua*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018. (in Chinese)
- [17] REESE J C, CHAN B G, WAISS A C. Effects of cotton condensed tannin, maysin (corn) and pinitol (soybeans) on *Heliothis zea* growth and development[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1988(12): 1429-36.
- [18] TAN J Y, WU Y, GUO J P, LI H M, ZHU L L, CHEN R Z, HE G C, DU B. A combined microRNA and transcriptome analyses illuminates the resistance response of rice against brown planthopper[J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 144.
- [19] 伍牧锋, 梁晓, 陈青, 伍春玲, 刘迎, 刘小强, 韩志玲. 基于生氰糖苷降解途径基因表达特性的木薯品种对二斑叶螨的抗性机制初探[J]. *热带作物学报*, 2022, 43(4): 853-861.
- WU M F, LIANG X, CHEN Q, WU C L, LIU Y, LIU X Q, HAN Z L. A preliminary study on the resistance mechanism of cassava cultivars to *Tetranychus urticae* based on gene expression characteristics of cyanogenic glycoside degradation pathway[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2022, 43(4): 853-861. (in Chinese)
- [20] 梁晓, 陈青, 伍春玲, 刘迎, 刘小强. 不同木薯品种对二斑叶螨的抗性鉴定与评价[J]. *热带农业科学*, 2022, 42(11): 73-79.
- LIANG X, CHEN Q, WU C L, LIU Y, LIU X Q. Identifica-

- tion and evaluation of cassava variety resistant to two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* [J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2022, 42(11): 73-79. (in Chinese)
- [21] 韩志玲, 陈青, 梁晓, 伍春玲, 刘迎, 伍牧锋, 徐雪莲. 二斑叶螨取食抗、感螨木薯品种对茉莉酸信号途径基因表达的影响[J]. 生物技术通报, 2022, 38(6): 10-19  
HAN Z L, CHEN Q, LIANG X, WU C L, LIU Y, WU M F, XU X L. Influence on expression of jasmonic acid signaling pathway gene while *Tetranychus urticae* fed on mite-resistant and mite-susceptible cassava cultivars[J]. Chinese Journal of Biotechnology Bulletin, 2022, 38(6): 10-19. (in Chinese)
- [22] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [23] WEN W, ALSEEKH S, FERNIE A R. Conservation and diversification of flavonoid metabolism in the plant kingdom[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2020, 55: 100-108.
- [24] SIMMONDS M. Flavonoid-insect interactions: Recent advances in our knowledge[J]. Phytochemistry, 2003, 64: 21-30.
- [25] TREUTTER D. Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis[J]. Plant Biology, 2005, 7(6): 581-591.
- [26] ONYILAGHA J C, LAZORKO J, GRUBER M Y, SOROKA J J, ERLANDSON M A. Effect of flavonoids on feeding preference and development of the crucifer pest *Mamestra configurata* Walker[J]. Journal of Chemical Ecology, 2004, 30(1): 109-124.
- [27] ABOSHI T, ISHIGURI S, SHIONO Y, MURAYAMA T. Flavonoid glycosides in *Malabar spinach* *Basella alba* inhibit the growth of *Spodoptera litura* larvae[J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2018, 82(1): 9-14.
- [28] WAR A R, SHARMA S P, SHARMA H C. Differential induction of flavonoids in groundnut in response to *Helicoverpa armigera* and *Aphis craccivora* infestation[J]. International Journal of Tropical Insect Science, 2016, 8: 55-64.
- [29] HAMMERBACHER A, KANDASAMY D, ULLAH C, SCHMIDT A, WRIGHT L P, GERSHENZON J. Flavanone-3-hydroxylase plays an important role in the biosynthesis of spruce phenolic defenses against bark beetles and their fungal associates[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 208.
- [30] STEC K, KORDAN B, GABRYŚ B. Quercetin and rutin as modifiers of aphid probing behavior[J]. Molecules, 2021, 26(12): 3622.
- [31] DAI Z Y, TAN J, ZHOU C, YANG X F, YANG F, ZHANG S J, SUN S C, MIAO X X, SHI Z Y. The OsmiR396-OsGRF8-OsF3H-flavonoid pathway mediates resistance to the brown planthopper in rice[J]. Plant Biotechnology Journal, 2019, 17(8): 1657-1669.
- [32] 潘忠玉. 3 种次生代谢物对美国白蛾幼虫生长发育及解毒酶活性的影响[D]. 北京: 北京林业大学, 2020.  
PAN Z Y. Effects of three secondary metabolites on the growth and development and detoxification enzyme activities in *Hyphantria cunea*[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2020. (in Chinese)
- [33] GOŁAWSKA S, SPRAWKA I, LUKASIK I, GOŁAWSKI A. Are naringenin and quercetin useful chemicals in pest-management strategies?[J]. Journal of Pest Science, 2014, 87(1): 173-180.
- [34] YANG Z Q, CHEN H, TAN J H, XU H L, JIA J, FENG Y H. Cloning of three genes involved in the flavonoid metabolic pathway and their expression during insect resistance in *Pinus massoniana* Lamb[J]. Genetics and Molecular Research, 2016, 15(4): 15049332.
- [35] JAN R, KHAN MA, ASAF S, LEE I J, KIM K M. Overexpression of OsF3H modulates WBPH stress by alteration of phenylpropanoid pathway at a transcriptomic and metabolomic level in *Oryza sativa*[J]. Scientific Reports, 2020(1): 14685.
- [36] 赵惠萍. 木薯单宁酸合成关键基因 *MeLAR*、*MeANR* 的克隆及其抗螨性功能研究[D]. 海口: 海南大学, 2018.  
ZHAO H P. Cloning of *MeLAR* and *MeANR* key genes for the synthesis of cassava tannin and its function in cassava resistance to *tetranychus cinnabarinus*[D]. Haikou: Hainan University, 2018. (in Chinese)
- [37] SCOTT I M, MCDOWELL T, RENAUD J B, KROLIKOWSKI S W, CHEN L, DHAUBHADEL S. Soybean (*Glycine max* L. Merr) host-plant defenses and resistance to the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch)[J]. PLoS One, 2021, 16(10): e0258198.
- [38] KARIYAT R R, GAFFOOR I, SATTAR S, DIXON C W, FROCK N, MOEN J, MORAES C M D, MESCHER M C, THOMPSON G A, CHOPRA S. Sorghum 3-deoxyanthocyanidin flavonoids confer resistance against corn leaf aphid[J]. Journal of Chemical Ecology, 2019, 45: 502-514.