

苹果蠹蛾瞬时感受器离子通道基因的克隆及温度胁迫表达分析

梁 林^{1,2}, 吕志创², 武 强², 刘 怀¹, 刘万学², 万方浩^{2*}

(1. 西南大学植物保护学院, 重庆 400715; 2. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要 瞬时感受器离子通道(transient receptor potential, TRP)是影响昆虫温度感知系统的关键组成。为探讨苹果蠹蛾温度感知和温度适应的机理,本研究以苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* 为研究对象,通过分子克隆获得 TRPA 家族中的 *CpPainless* 和 *CpWater_witch* 基因,进行生物信息学分析,并利用实时荧光定量 PCR 技术分析靶基因在高低温胁迫后的表达。结果表明,*CpPainless* 基因编码 938 个氨基酸,N 端有 8 个锚蛋白重复序列。*CpWater_witch* 基因编码 980 个氨基酸,N 端有 10 个锚蛋白重复序列,二者编码产物均有 6 个跨膜结构,具瞬时感受器离子通道家族成员结构典型特征。表达分析结果显示,和对照 26℃ 相比,高低温胁迫 1 h 后,*CpPainless* 在 5 龄幼虫雌虫体内的表达量显著下调,而 5 龄幼虫雄虫经低温胁迫 1 h 后 *CpPainless* 表达量显著上调,但高温胁迫 1 h 后表达差异不显著;*CpWater_witch* 在雌雄虫体内均没有显著变化。研究结果为研究瞬时感受器离子通道在苹果蠹蛾温度感知中的作用奠定基础。

关键词 苹果蠹蛾; 瞬时感受器离子通道; 温度感知; 温度胁迫; 表达量

中图分类号: S 436.611.29 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2019564

Cloning and expression analysis of transient receptor potential gene in *Cydia pomonella* under temperature stress

LIANG Lin^{1,2}, LÜ Zhichuang², WU Qiang², LIU Huai¹, LIU Wanxue², WAN Fanghao^{2*}

(1. College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract TRP (transient receptor potential) is a key component of the temperature sensing system in insects. To understand the mechanism of temperature perception and temperature adaptation in *Cydia pomonella*, *CpPainless* and *CpWater_witch*, which belong to TRPA subfamily, were cloned by RT-PCR (reverse transcription PCR). After conducting bioinformatics analysis, quantitative real-time PCR was applied to characterize the relative expression levels of two genes at different temperature stresses. *CpPainless* and *CpWater_witch* were successfully predicted and cloned, which encoded 938 amino acids and 980 amino acids, respectively. Protein structure analysis indicated that *CpPainless* and *CpWater_witch* had 8 ankyrin repeats and 10 ankyrin repeats, respectively. Both of the genes had 6 transmembrane domains, which is the structural signature of TRP. The RT-PCR analysis showed that the expression level of *CpPainless* was significantly decreased in female 5th-instar larvae 1 h after temperature stress, but significantly increased in male 5th-instar larvae 1 h after low-temperature stress, whereas there was no significant difference in male larvae 1 h after high-temperature stress; besides, *CpWater_witch* did not show significant difference in both male and female 5th-instar larvae after temperature stress. The results laid a foundation for further understanding of the role of transient receptor channels in temperature perception of *C. pomonella*.

Key words *Cydia pomonella*; TRP channel; temperature sensing; temperature stress; expression

收稿日期: 2019-10-21

修订日期: 2020-02-04

基金项目: 国家自然科学基金(31672088); 国家重点研发计划(2016YFC1200603)

* 通信作者 E-mail: wanfanghao@caas.cn

苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* (L.) 属鳞翅目 Lepidoptera 小卷蛾科 Olethreutidae, 是最重要的世界性检疫性害虫之一, 其以幼虫蛀食果实为害, 严重降低果实品质^[1], 并导致果实成熟前腐烂和脱落^[2], 给世界各地苹果、沙果、梨、桃、杏、石榴等水果的生产带来了毁灭性危害^[3]。苹果蠹蛾原产于欧亚大陆南部, 现已广泛分布于除南极洲外其他各大洲的各大苹果产区^[4]。在我国, 苹果蠹蛾也具有广泛的适生区域, 其中中高度适生区主要包括黑龙江、内蒙古、北京、新疆等省(市、自治区)的大部分地区, 以及辽宁西部、青海北部、云南北部、及山东沿海等地区^[6], 而最佳适生区几乎包括了我国苹果、梨等水果的全部主产区^[7], 提示其具有广泛的温度适应性。为更好地理解苹果蠹蛾温度适应能力, 研究苹果蠹蛾怎样感知外界温度并将其传递至体内具有重要意义。

瞬时感受器离子通道(transient receptor potential, TRP)是一种阳离子通道, 可允许包括钙离子在内的阳离子进行跨膜运输, 最早发现于黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 视觉信号通路^[8]。之后发现 TRP 通道是多种感觉机制中的关键因子, 如视觉、听觉、化学感受、机械感受和温度感受^[9]。1989 年 Montell 等^[10]成功克隆了 TRP 基因。迄今为止, 在生物中已鉴定出 30 多个 TRP 通道^[11], 经研究, TRP 蛋白包含 6 个跨膜域结构(S1~S6)^[12]。根据基因的功能及同源性, 可将 TRP 基因家族分为 7 个主要亚家族^[13]: TRPC(canonical)、TRPV(vanilloid)、TRPM(melastatin)、TRPML(mucolipin)、TRPP(polycystin)、TRPA(ankyrin transmembrane protein)和 TRPN(NomPC-like)。对温度敏感且参与生物体环境温度感知的 TRP, 称为 thermo-TRP^[14]。

Thermo-TRP 的活性与温度密切相关^[15]。果蝇体内已鉴定出 13 个 TRP 通道^[9], 有 6 个 thermo-TRP^[16], 其中 *TRPA1*、*Painless*、*Pyrexia* 均属于 TRPA 亚家族。研究表明, 果蝇体内的 *painless* 基因是伤害性高温激活其感觉神经过程中所必需的^[17]。此外, 膜翅目昆虫中同样属于 TRPA 亚家族的 *Water_witch*, 在复制过程中形成的 *HsTRPA* 也参与了温度感知^[18]。因此, 本文选取 TRPA 亚家族中的 *painless* 和 *Water_witch* 两个基因, 对其在苹果蠹蛾体内是否参与温度感知过程进行探讨。

本研究克隆了苹果蠹蛾中的 2 个 TRP 通道基因, 并进行了生物信息学和温度胁迫下靶基因表达

的分析, 以期为其在苹果蠹蛾温度调节机制中的作用研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

苹果蠹蛾以人工饲料饲养于中国农业科学院植物保护研究所 P2 实验室。饲养条件为: 温度(25±1)℃, 相对湿度(75±5)%, 光周期 L//D=14 h//10 h。

1.2 总 RNA 提取及第一链 cDNA 的合成

取一头 5 龄幼虫, 采用 TRIzol (Invitrogen, USA), 参照其说明书进行 RNA 提取, 采用 Implen 超微量紫外可见分光光度计(NanoPhotometer™ P-Class)和 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的纯度和完整度。采用 Super Script First-Strand Synthesis System 试剂盒反转录合成第一链 cDNA, 并于-20℃保存备用。

1.3 TRP 基因 cDNA 序列片段的克隆

通过生物信息学的方法, 分别以黑腹果蝇 TRPA 亚家族中 *Painless* 和 *Water_witch* 两个基因序列作为参考序列, 用 tBlastn 从苹果蠹蛾转录组数据库中检索 *CpPainless* 和 *CpWater_witch* 的基因序列, 之后根据检索结果, 使用 Primer premier 5.0 设计引物, 使用 RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction)方法从苹果蠹蛾 cDNA 中克隆 *CpPainless* 和 *CpWater_witch* 的序列。

表 1 扩增 TRP 的 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for amplifying the TRP cDNA sequence using PCR

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	产物长度/bp Expected size
CpPainlessF	GACGTCTCAGTCGCACACGA	3 100
CpPainlessR	CTGACTCATGAAACTCTGCGGA	
CpWater_witchF	GCCATGCGAGCAAGTGAACA	3 000
CpWater_witchR	GCCATGCGAGCAAGTGAACA	

PCR 扩增反应体系(25 μL): 2.5 μL 10× PCR buffer, 0.5 μL dNTPs, 上下游引物各 1 μL, 0.5 μL TransStart Taq DNA 聚合酶, 19 μL ddH₂O, 0.5 μL cDNA 模板。反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 3 min 10 s, 35 个循环; 72℃ 10 min。

PCR 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳进行鉴定, 经琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化后, 与 TransGen

pEASY-T1 Cloning Vector 连接,转化至 Trans1-T1 感受态细胞中,接种至含 Ampicillin、X-gal 和 IPTG 的 LB 固体培养基 37℃ 培养 12 h。挑取白色单菌落于含 Amp 的 LB 液体培养基中摇床培养 10 h,选出重组克隆,送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.4 苹果蠹蛾 TRP 基因生物信息学分析

1.4.1 TRP 基因 cDNA 序列分析

应用 MEGA 5 软件对预测序列与克隆序列进行比对,确定克隆序列与预测序列一致后,采用 DNAMAN 软件对所得基因 cDNA 序列进行分析;

利用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 工具鉴定 cDNA 的开放阅读框;使用在线工具 SMART (simple modular architecture research tool) 对克隆得到的 *CpPainless* 和 *CpWater_witch* 进行蛋白结构预测,分析其序列 N 端的锚蛋白重复序列及跨膜结构域。

1.4.2 TRP 基因系统发育分析

检索 GenBank 等数据库中已报道同源 TRP 基因序列,并采用 MEGA 5 软件,选用邻接法重复 1 000 次,构建系统进化树。进化树构建所用序列的序列号见表 2。

表 2 进化分析中所用到的 TRP 通道的蛋白序列号

Table 2 Accession numbers for the protein sequences of TRP channels used in phylogenetic analysis			
蛋白 Protein	序列号 Accession no.	蛋白 Protein	序列号 Accession no.
DmelTRPA1	NP_648263.5	ApisTRPP	XP_003242767.1
DmelPyrexia	NP_612015.1	AgamWater_witch	XP_310750.5
DmelWater_witch	NP_731193.1	DmelTRP	AAA28976.1
DmelPainless	NP_611979.1	DmelTRPgamma	CAB96204.1
BmorTRPA1	XP_004932880.1	DmelTRPL	NP_476895.1
BmorPainless	XP_004927828.1	DmelNompC	NP_523483.1
TcasTRPA1	EFA01253.1	DmelTRPM	NP_001036548.1
TcasPainless	NP_001164308.1	DmelNanchung	NP_648696.2
TcasWater_witch	XP_966629.1	DmelInactive	NP_572353.1
TcasPyrexia	EFA07512.1	DmelTRPML	NP_649145.1
ApisTRPA1	XP_001944501.2	DmelTRPP	AAR24077.1
ApisPainless	XP_001950177.2	TcasNompC	EFA10730.1
AgamTRPA1	ACC86138.1	TcasTRPML	XP_966660.1
AgamNanchung	XP_320300.4	TcasPKD2	XP_969891.2
AgamPyrexia	XP_311043.5	TcasInactive	EFA10736.1
AgamPainless	XP_003436057.1	TcasTRPM	XP_974857.2
ApisTRPM	XP_003245193.1	AmelNompC	XP_392309.1
ApisInactive	XP_001950096.1	ApisNanchung	XP_001947907.2
ApisTRP	XP_003240303.1	BmorTRPM	XP_021208493.1

1.5 苹果蠹蛾 TRP 基因表达分析

研究表明,5 龄为最耐热的幼虫阶段^[5],因此本研究选取 5 龄幼虫作为试验材料,分别对 5 龄幼虫的雌、雄虫进行 0、10、35、40℃ 胁迫 1 h,以常温(26℃)饲养品系作为对照。将试虫迅速置于液氮致死,提取其总 RNA,反转录 1 μg 总 RNA 获得 cDNA,稀释 10 倍备用。根据测序正确的 *CpPainless* 和 *CpWater_witch* 序列,分别设计特异性扩增引物,选用 *tub*^[1] 作为内参基因,引物序列见表 3。

qRT-PCR 反应采用 ABI 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, USA) 进行。反应体系 20 μL,包括 1.0 μL 的 cDNA 模板,10.0 μL 的 Hieff qPCR SYBR Green Master Mix (Low Rox),1.0 μL 上游引物(10 μmol/L),1.0 μL 下游引物(10 μmol/L),

表 3 qPCR 引物序列

Table 3 Primer sequences for qPCR		
引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence	产物长度/bp Expected size
CpPainless-qF	ACGTGTTTCGGGTGAGACCATGAGA	114
CpPainless-qR	CGCCGTTGACAGGTTCTGAATAAGG	
CpWater_witch-qF	ACTGCTAGCAGAAGGTGCGAAGGC	86
CpWater_witch-qR	TCCAAACTTCCGCACATGGCAG	
Cptub-qF	GCGGGAACCAGATTGGAGCTAA	267
Cptub-qR	ACTGGCCGAACACGAAGTTGTC	

DEPC 水补足至 20 μL。反应程序为:95℃ 5 min;95℃ 10 s,60℃ 30 s,40 个循环。所有样品均为 3 个重复。PCR 反应结束后,根据 Ct 值采用 2^{-ΔΔCt} 法进行统计分析^[19]。real-time PCR 结果通过相对定量 Ct 阈值方法进行相对定量分析^[20],不同温度处理下

CpPainless 和 *CpWater_witch* 相对表达量的差异显著性应用 SAS 9.4 统计软件的单因素方差分析 (One-way ANOVA) 法进行分析。显著性测定采用 Tukey's HSD 法, 显著性检验水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 苹果蠹蛾 *CpPainless* 基因序列及结构分析

利用从苹果蠹蛾转录组预测的 *CpPainless* 序

列设计一对引物 (*CpPainless* F 和 *CpPaninless* R), 通过 PCR 扩增得到约为 3 100 bp 的特异性条带, 对扩增条带回收测序后, 将测序结果与预测序列进行比对, 确认所得片段为苹果蠹蛾 *CpPainless* 基因的 cDNA 序列。使用 DNAMAN 软件对序列进行分析, 结果显示, 序列的开放阅读框长 2 817 bp, 编码 938 个氨基酸 (图 1), 预测分子量大小为 106.5 kDa, 且存在 8 处 AATAA(A) 加尾信号。

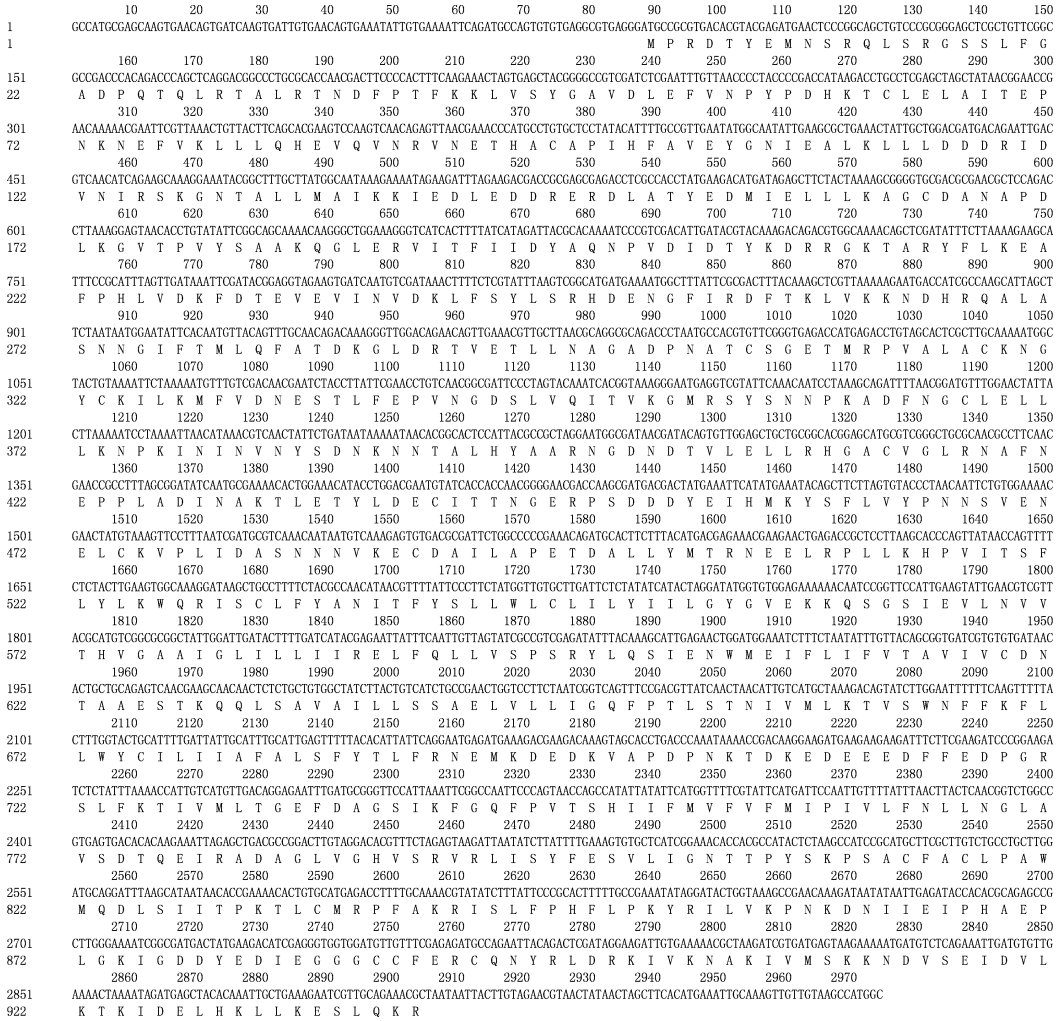


图 1 苹果蠹蛾 *CpPainless* 基因 cDNA 序列及氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *CpPainless* cDNA of *Cydia pomonella*

将苹果蠹蛾 *CpPainless* 基因蛋白质序列提交至 NCBI 的 SMART 数据库, 结构预测结果显示, 推导的氨基酸序列具有 8 个锚蛋白重复序列 (图 2),

在线工具 TMpred 预测苹果蠹蛾 *CpPainless* 基因具有 6 个跨膜的结构域, 具备 TRP 家族基因的典型特征。

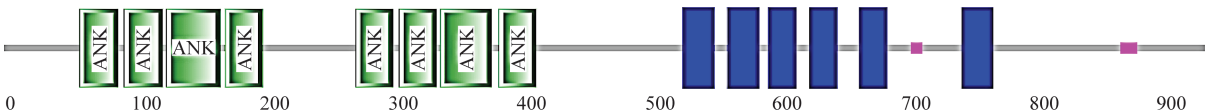


图 2 苹果蠹蛾 *CpPainless* 基因推导的结构域特征

Fig. 2 The predicted domains of *CpPainless* of *Cydia pomonella* analyzed by SMART

2.2 苹果蠹蛾 *CpWater_witch* 基因序列及结构分析

利用从苹果蠹蛾转录组预测的 *CpWater_witch* 序列设计一对引物(*CpWater_witch* F 和 *CpWater_witch* R),通过 PCR 扩增得到约为 3 000 bp 的特异性条带,对扩增条带回收测序后,将测序结果与预测

序列进行比对,确认所得片段为苹果蠹蛾 *CpWater_witch* 基因的 cDNA 序列。使用 DNAMAN 软件对序列进行分析,结果显示,序列的开放阅读框长 2 943 bp,编码 980 个氨基酸(图 3),预测分子量大小为 109.8 kDa,且存在 3 处 AATAA (A) 加尾信号。

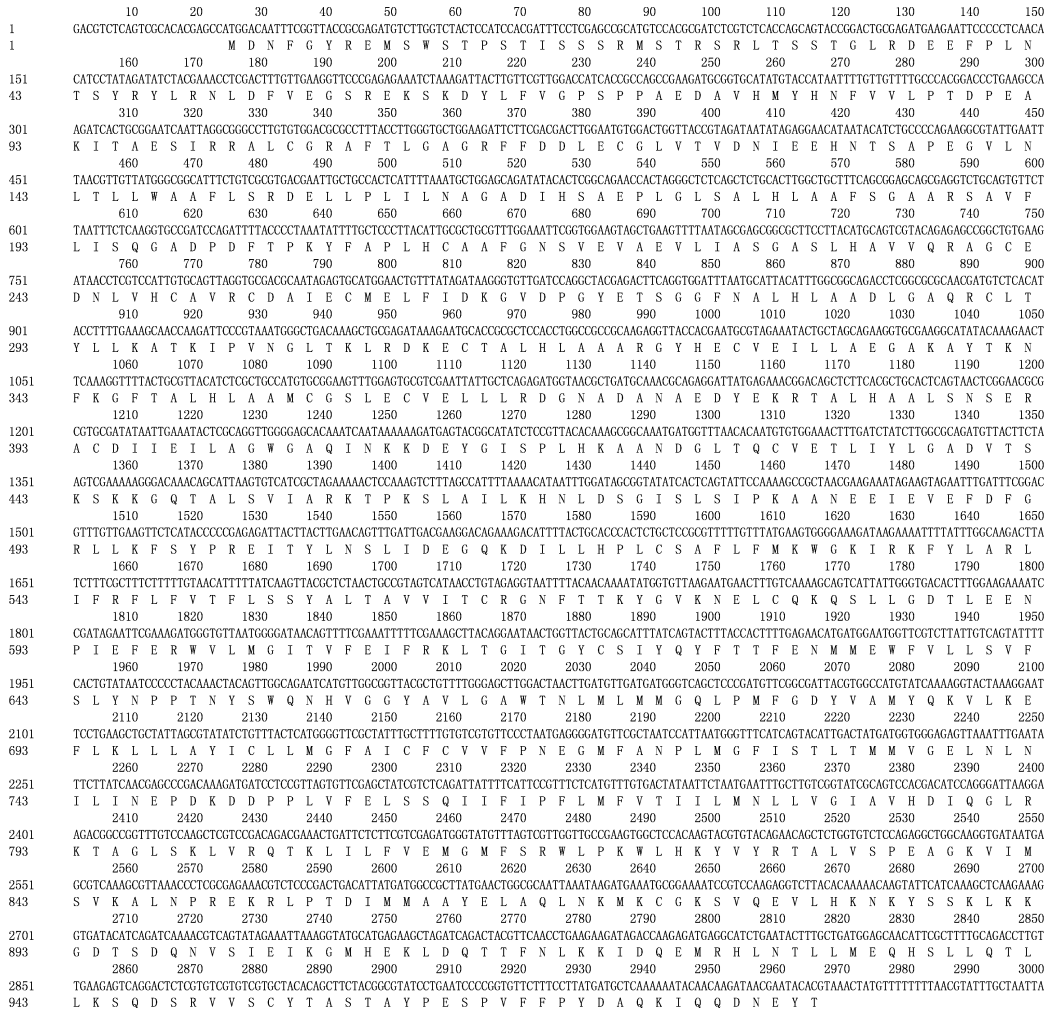


图 3 苹果蠹蛾 *CpWater_witch* 基因 cDNA 序列及氨基酸序列

Fig. 3 Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *CpWater_witch* cDNA of *Cydia pomonella*

将苹果蠹蛾 *CpWater_witch* 基因蛋白质序列提交至 NCBI 的 SMART 数据库,结构预测结果显示,推导的氨基酸序列具有 10 个锚蛋白重复序列

(图 4),在线工具 TMpred 预测苹果蠹蛾 *CpWater_witch* 基因具有 6 个跨膜的结构域,具备 TRP 家族基因的典型特征。



图 4 苹果蠹蛾 *CpWater_witch* 基因推导的结构域特征

Fig. 4 The conserved domains of *CpWater_witch* of *Cydia pomonella* analyzed by SMART

为研究苹果蠹蛾 *Painless* 和 *Water_witch* 与其他昆虫 TRP 家族成员的进化关系,选取果蝇、冈比亚按蚊、意大利蜜蜂、家蚕、赤拟谷盗这 5 种已经完

成基因组测序的昆虫的 TRP 序列构建进化树。通过昆虫 TRP 进化树分析,TRP 超家族在昆虫中各家族成员之间分支清晰,进化关系保守。由进化树

可见,苹果蠹蛾 *CpPainless* 基因与已知昆虫的 *painless* 聚为一支,*CpWater_witch* 基因与已知昆

虫的 *Water_witch* 聚为一支,且二者均归结到 TR-PA 亚家族所在的簇。(图 5)

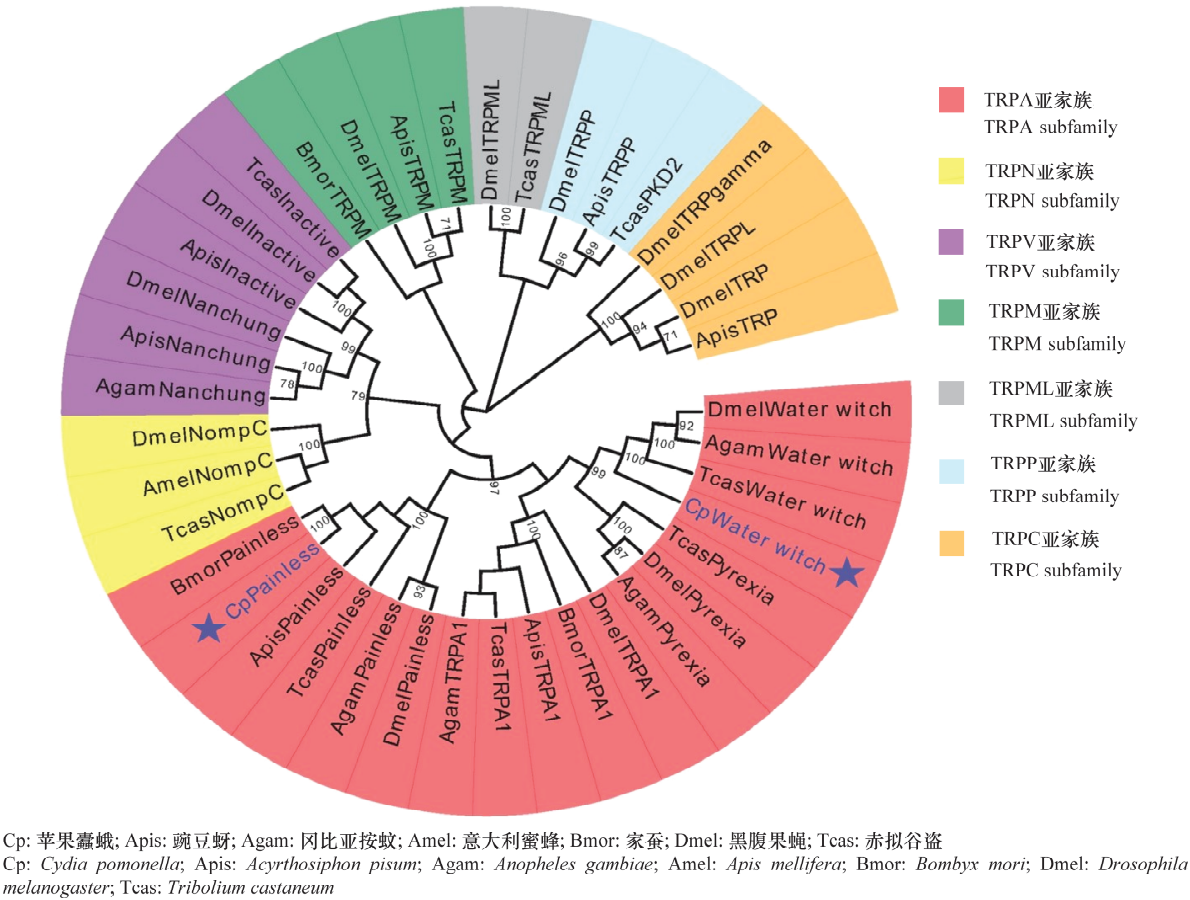


图 5 苹果蠹蛾与其他昆虫 TRP 基因的系统发育分析

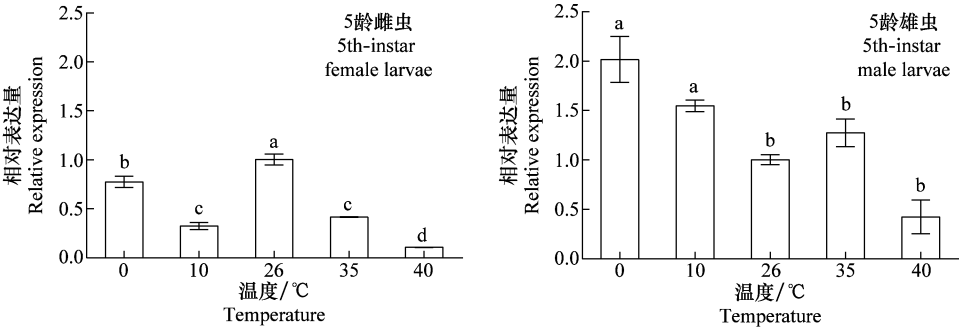
Fig. 5 Phylogenetic analysis of *Cydia pomonella* and other insects based on TRP sequences

2.3 苹果蠹蛾 *CpPainless* 和 *CpWater_witch* 基因表达分析

对 *CpPainless* 的定量结果分析后发现,经高温胁迫 1 h 后,5 龄雌虫体内的 *CpPainless* 表达量均显著下调,而 5 龄雄虫经高温胁迫 1 h 后体内的

CpPainless 表达量无显著变化,低温胁迫 1 h 后 *CpPainless* 表达量均显著上调(图 6)。

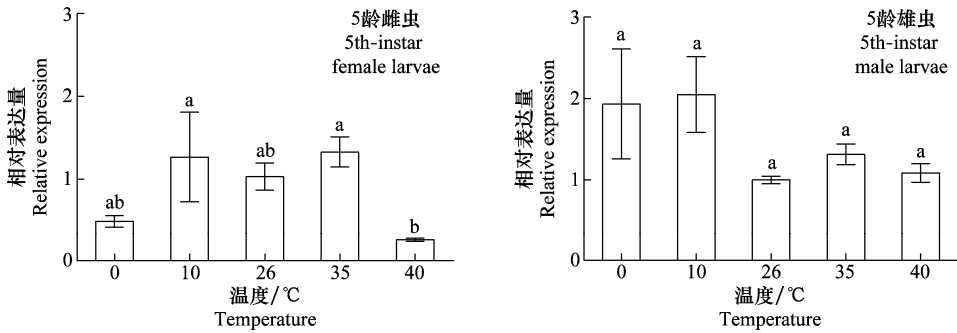
对 *CpWater_witch* 的定量结果分析后发现,高低温胁迫 1 h 后,5 龄幼虫体内 *CpWater_witch* 的表达量均无显著性变化(图 7)。



图中数值为平均值±标准误;不同小写字母代表经Tukey's HSD多重比较在 $\alpha=0.05$ 水平差异显著。下同
Values are mean±SE; different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 by Tukey's HSD. The same applies below

图 6 苹果蠹蛾 *CpPainless* 基因的相对表达量

Fig. 6 Relative expression levels of *CpPainless* gene in *Cydia pomonella*

图7 苹果蠹蛾 *CpWater_witch* 基因的相对表达量Fig. 7 Relative expression levels of *CpWater_witch* gene in *Cydia pomonella*

3 结论与讨论

从苹果蠹蛾中克隆得到瞬时感受器离子通道 *CpPainless* 和 *CpWater_witch* 基因,并对其在昆虫 TRP 中的进化地位进行分析,结果表明 *CpPainless* 和 *CpWater_witch* 属于昆虫 TRPA 亚家族成员;通过表达分析发现,高低温胁迫 1 h 后, *CpPainless* 在 5 龄幼虫雌虫体内的表达量显著下调,雄虫经低温胁迫 1 h 后, *CpPainless* 表达显著上调,但高温胁迫 1 h 后表达差异不显著;而 *CpWater_witch* 在雌雄虫体内表达均没有显著变化。

TRP 基因家族因参与调控生物体对外界多种刺激的感知而受到广泛关注^[21],研究表明,其在昆虫感知温度刺激的过程中起到重要作用^[22]。在对 TRPA 亚家族成员的基序比较中发现, N 端大量串联的锚蛋白重复序列是 TRPA 亚家族的一项重要特征。有研究提出, N 端锚蛋白重复序列有可能是感知并传递热刺激的重要组成部分^[23-24]。本研究得到的 *CpPainless* 聚类到 TRPA 亚家族 *Painless* 一簇,且 N 端具有 8 个锚蛋白重复序列,与果蝇的经典 *Painless* 结构较为相似;此外,作为果蝇中鉴定出来的第 1 个 thermoTRP, *DmelPainless* 被认为是热伤害受体,能够感知高温伤害性热刺激,且该离子通道在果蝇体内能被 39~42℃ 的高温激活,这在昆虫感知疼痛从而逃避热伤害的行为过程中起重要作用。综上,推测 *painless* 很有可能在苹果蠹蛾体内参与热伤害感受。此外,从本研究 *CpWater_witch* 的表达分析结果,推测该基因未直接参与苹果蠹蛾温度感知过程。

本研究对苹果蠹蛾 TRP 在温度响应方面的探讨,有助于我们进一步研究其温度适应机制,从而为生态防控苹果蠹蛾提供新思路。后续也将利用 RNAi、电生理等技术对其进行基因功能研究,以揭示瞬时感受器离子通道在苹果蠹蛾温度适应中的作用。

参考文献

- [1] WAN Fanghao, YIN Chuanlin, TANG Rui, et al. A chromosome-level genome assembly of *Cydia pomonella* provides insights into chemical ecology and insecticide resistance [J/OL]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 4237. DOI: 10. 1038/ s41467-019-12175-9.
- [2] 申建茹, 李明福, 陈乃中, 等. 苹果蠹蛾热激蛋白 Hsp90 基因的克隆及热胁迫下的表达分析[J]. *昆虫学报*, 2011, 54(11): 1236-1248.
- [3] ISCI M, AY R. Determination of resistance and resistance mechanisms to thiacloprid in *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) populations collected from apple orchards in Isparta Province, Turkey [J]. *Crop Protection*, 2017, 91: 82-88.
- [4] 吴永美, 金彪, 谷志容, 等. 苹果蠹蛾的分布及防控[J]. *华中昆虫研究*, 2018, 14: 150-157.
- [5] 刘月英, 罗进仓, 周昭旭, 等. 不同温度下苹果蠹蛾实验种群生命表[J]. *植物保护学报*, 2012, 39(3): 205-210.
- [6] 梁亮, 余慧, 刘星月, 等. 苹果蠹蛾在中国的适生性分析[J]. *植物保护*, 2010, 36(4): 101-105.
- [7] 赵琴娃, 陈臻, 蒲崇建, 等. 苹果蠹蛾在中国的传播及其防控对策[J]. *甘肃农业科技*, 2015(11): 73-76.
- [8] COSENS D J, MANNING A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant [J]. *Nature*, 1969, 224(5216): 285-287.
- [9] FOWLER M A, MONTELL C. *Drosophila* TRP channels and animal behavior [J]. *Life Sciences*, 2013, 92(8-9): 394.
- [10] MONTELL C, RUBIN G M. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction [J]. *Neuron*, 1989, 2(4): 1313-1323.
- [11] SUN Ziling, ZHENG Yunhua, LIU Wei. Identification and characterization of a novel calmodulin binding site in *Drosophila*, TRP C-terminus [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 501(2): 434-439.
- [12] HOFMANN L, WANG Hongmei, ZHENG Wang, et al. The S4-S5 linker-gearbox of TRP channel gating [J]. *Cell Calcium*, 2017, 67: 156-165.

水稻科学, 2003, 17(增刊): 7-22.

- [2] 周国辉, 温锦君, 蔡德江, 等. 呼肠孤病毒科斐济病毒属一新种: 南方水稻黑条矮缩病毒[J]. 科学通报, 2008, 53(20): 2500-2508.
- [3] PU Lingling, XIE Guohua, JI Chuanyan, et al. Transmission characteristics of *Southern rice black-streaked dwarf virus* by rice planthoppers [J]. Crop Protection, 2012, 41(6): 71-76.
- [4] LIU Wenwen, GRAY S M, HUO Yan, et al. Proteomic analysis of interaction between a plant virus and its vector insect reveals new functions of hemipteran cuticular protein [J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2015, 14(8): 2229-2242.
- [5] THAN W, QIN Faliang, LIU Wenwen, et al. Analysis of *Sogatella furcifera* proteome that interact with P10 protein of Southern rice black-streaked dwarf virus [J/OL]. Scientific Reports, 2016, 6: 32445. DOI: 10.1038/srep32445.
- [6] JAHN R, SCHELLER R H. SNAREs-engines for membrane fusion [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2006, 7(9): 631-643.
- [7] ADVANI R J, YANG Bin, PREKERIS R, et al. VAMP-7 mediates vesicular transport from endosomes to lysosomes [J]. Journal of Cell Biology, 1999, 146(4): 765-775.
- [8] GALLI T, ZAHRAOUI A, VAIDYANATHAN V V, et al. A novel tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein in SNARE complexes of the apical plasma membrane of epithelial cells [J]. Molecular Biology of the Cells, 1998, 9(6): 1437-1448.
- [9] RAMIREZ D M O, KHVOTCHEW M, TRAUTERMAN B, et al. Vt1a identifies a vesicle pool that preferentially recycles

at rest and maintains spontaneous neurotransmission [J]. Neuron, 2012, 73(1): 121-134.

- [10] EMPERADOR-MELERO J, TOONEN R F, VERHAGE M. Vti proteins: beyond endolysosomal trafficking [J]. Neuroscience, 2019, 420: 32-40.
- [11] QIN Faliang, LIU Wenwen, WU Nan, et al. Invasion of midgut epithelial cells by a persistently transmitted virus is mediated by sugar transporter in its insect vector [J/OL]. PLoS Pathogens, 2018, 14(7): e1007201. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007201.
- [12] WANG Yajiao, Mao Qianzhao, LIU Wenwen, et al. Localization and distribution of wheat dwarf virus in its vector leafhopper, *Psammotettix alienus* [J]. Phytopathology, 2014, 104(8): 897-904.
- [13] 方敏, 黄华. 包涵体蛋白体外复性的研究进展 [J]. 生物工程学报, 2001, 17(6): 608-612.
- [14] HOGENHOUT S A, AMMAR E D, WHITFIELD A E, et al. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses [J]. Annual Review of Phytopathology, 2008, 46: 327-359.
- [15] FLOWERDEW S E, BURGOYNE R D. A VAMP7/Vt1a SNARE complex distinguishes a non-conventional traffic route to the cell surface used by KChIP1 and Kv4 potassium channels [J]. Biochemical Journal, 2009, 418(3): 529-540.
- [16] SIDDIQI S A, SIDDIQI S, MAHAN J, et al. The identification of a novel ER to Golgi SNARE complex used by the prechylomicron transport vesicle [J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(30): 20974-20982.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 54 页)

- [13] NILIUS B, OWSIANIK G. The transient receptor potential family of ion channels [J]. Genome Biology, 2011, 12(3): 218.
- [14] VRIENS J, NILIUS B, VOETS T. Peripheral thermosensation in mammals [J/OL]. Nature Reviews Neuroscience, 2014, 15(9): 573. DOI: 10.1038/nrn3784.
- [15] CASTILLO K, DIAZ-FRANULIC I, CANAN J, et al. Thermally activated TRP channels: molecular sensors for temperature detection [J/OL]. Physical Biology, 2018, 15(2): 021001. DOI: 10.1088/1478-3975/aa9abf.
- [16] 魏金金, 曹德盼, 杨婷, 等. 豌豆蚜温度受体基因 *Painless* 的克隆及时间和组织表达 [J]. 中国农业科学, 2014, 47(19): 3799-3809.
- [17] TRACEY W D, WILSON R I, LAURENT G, et al. *Painless*, a *Drosophila* gene essential for nociception [J]. Cell, 2003, 113(2): 261-273.
- [18] MATSUURA H, SOKABE T, KOHNO K, et al. Evolutionary conservation and changes in insect TRP channels [J/OL]. BMC Evolutionary Biology, 2009, 9(1): 228. DOI: 10.1186/1471-2148-9-228.
- [19] LIVAK K, SCHMITTGEN T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$

method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

- [20] GIULIETTI A, OVERBERGH L, VALCKX D, et al. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression [J]. Methods, 2002, 25(4): 386-401.
- [21] ALONSO-CARBAJO L, KECSKES M, JACOBS G, et al. Muscling in on TRP channels in vascular smooth muscle cells and cardiomyocytes [J]. Cell Calcium, 2017, 66: 48-61.
- [22] ROSENZWEIG M, KANG K, GARRITY P A. Distinct TRP channels are required for warm and cool avoidance in *Drosophila melanogaster* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105(38): 14668-14673.
- [23] LISHKO P V, PROCKO E, JIN Xiangshu, et al. The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity [J]. Neuron, 2007, 54(6): 905-918.
- [24] CORDERO-MORALES J F, GRACHEVA E O, JULIUS D. Cytoplasmic ankyrin repeats of transient receptor potential A1 (TRPA1) dictate sensitivity to thermal and chemical stimuli [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(46): 18595-18596.

(责任编辑: 田 喆)