

冷杉梢斑螟化学感受蛋白 DabiCSP8 的配体结合特性分析

朱垚龙, 王政全, 吴 春, 尹宁娜, 刘乃勇*

(西南林业大学, 云南省森林灾害预警与控制重点实验室, 昆明 650224)

摘要 采用分子生物学和荧光竞争性结合测定等技术,研究了冷杉梢斑螟 *Dioryctria abietella* 雌虫性腺和雌、雄成虫足中高表达的化学感受蛋白 *DabiCSP8* 基因的表达特征和功能。定量分析结果表明,*DabiCSP8* 基因在雌虫性腺中显著高表达,表达量分别是雌、雄虫触角的 1 232.27 倍和 3 130.64 倍;此外,该基因在雌、雄成虫足中表达量也较高。通过原核表达系统及亲和层析技术获得了 13.64 kD 的目的蛋白 *DabiCSP8*。结合测定结果表明,*DabiCSP8* 与探针 *N*-苯基-1-萘胺(1-NPN)具有强的结合能力,结合常数(K_{1-NPN})为 $(1.61 \pm 0.02) \mu\text{mol/L}$ 。 β -紫罗兰酮是 *DabiCSP8* 的最佳结合配基,解离常数(K_d)为 $(11.43 \pm 0.62) \mu\text{mol/L}$ 。*DabiCSP8* 结合腔内的极性氨基酸精氨酸 46 (Arg46)能够与 β -紫罗兰酮形成两个氢键,暗示 Arg46 在该化合物的结合中起着重要作用。此外,*DabiCSP8* 与部分杀虫剂具有中等强度的结合能力。

关键词 冷杉梢斑螟; 化学感受蛋白; 结合测定; β -紫罗兰酮; 分子对接

中图分类号: S 763.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2022171

Ligand binding property of chemosensory protein 8 (DabiCSP8) of *Dioryctria abietella*

ZHU Yaolong, WANG Zhengquan, WU Chun, YIN Ningna, LIU Naiyong*

(Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control of Yunnan Province, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract In this study, the expression profiles of *DabiCSP8* and binding properties of *DabiCSP8* enriched in female pheromone glands and female and male legs of *Dioryctria abietella* were characterized using molecular biological methods and fluorescence competitive binding assays. Quantitative real-time PCR results revealed that the expression of *DabiCSP8* was significantly higher in female pheromone glands compare to other tissues, which was 1 232.27- and 3 130.64-fold higher than that in female and male antennae, respectively. In addition, the high expression of *DabiCSP8* was also detected in female and male legs. By prokaryotic recombinant expression and affinity chromatography, *DabiCSP8* was expressed and purified with the expected size of 13.64 kD. Binding assays showed that *DabiCSP8* could strongly bind to *N*-phenyl-1-naphthylamine (1-NPN) with a binding constant (K_{1-NPN}) of $(1.61 \pm 0.02) \mu\text{mol/L}$. Among the 100 tested compounds, β -ionone was the best ligand for *DabiCSP8* with a dissociation constant (K_d) of $(11.43 \pm 0.62) \mu\text{mol/L}$. In the binding cavity of *DabiCSP8*, the polar amino acid residue arginine 46 (Arg46) was able to form two hydrogen bonds with β -ionone, suggesting the importance of Arg46 in the binding of *DabiCSP8* to β -ionone. In addition, *DabiCSP8* exhibited moderate binding affinities to some insecticides.

Key words *Dioryctria abietella*; chemosensory protein; binding assay; β -ionone; molecular docking

梢斑螟属 *Dioryctria* 害虫多以幼虫钻蛀针叶树 球果和嫩梢为害,造成枝梢枯死和种子减产,严重影

收稿日期: 2022-04-01

修订日期: 2022-07-01

基金项目: 云南省应用基础研究面上项目(202001AT070100);云南省“高层次人才培养支持计划”青年拔尖人才项目(YNWR-QNBJ-2019-057)

* 通信作者 E-mail: Naiyong_2013@163.com

响林木的生长和木材质量。近年来,该属害虫呈扩散和为害加重的趋势,已由一般害虫逐步上升为松科重要害虫,在局部地区造成巨大损失。目前,国内梢斑螟类害虫的防治主要以化学防治和营林技术为主,生物防治和物理防治为辅。由于梢斑螟属害虫个体小、钻蛀性强、生活隐蔽、成虫飞翔能力强以及松树植株树势高等特点,导致此类害虫的防治难度较大^[1-2]。针对蛾类昆虫的生理和行为特点,研发基于嗅觉的行为调控剂是监测和防治梢斑螟属害虫的一种重要策略^[3-4]。

化学感受蛋白(chemosensory proteins, CSPs)是一类在昆虫嗅觉感受过程中起重要作用的蛋白,在雌雄虫触角、足、跗节、胸、腹、翅和雌虫性腺等多个组织中均有表达,暗示昆虫 CSPs 具有多种功能^[5]。在梨小食心虫 *Grapholita molesta* 中,成虫触角和翅中高表达的 GmolCSP8 与 1-己醇具有较强的结合能力^[6]。类似地,CSPs 参与嗅觉感受在其他鳞翅目昆虫中也有报道,如黏虫 *Mythimna separata* 的 MsepCSP8 和 MsepCSP14^[7-8]、稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* 的 CmedCSP33^[9]、家蚕 *Bombyx mori* 的 BmorCSP1 和 BmorCSP2^[10]。除能够结合普通气味分子外,昆虫 CSP 还能通过结合杀虫剂来提高害虫的抗药能力。冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 足中高表达的 AgamSAP2(sensory appendage protein 2)被证实能与拟除虫菊酯类杀虫剂结合,提高蚊子的抗性^[11]。在鳞翅目昆虫中,SlitCSP18 能提高斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 对毒死蜱的抗性^[12];用阿维菌素处理家蚕后,多个 CSP 基因在雌虫触角、足、肠道、脂肪体、性腺等组织中的表达水平显著上调或下调^[13]。此外,研究发现鳞翅目昆虫 CSP 基因在雌虫性腺中有表达,很可能参与性信息素的转运和释放。然而,目前对雌虫性腺中高表达 CSPs 的功能研究仍较少。甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* 雌虫性腺中高表达的 MbraCSP-A 和 MbraCSP-B 能够与性信息素组分顺 11-十六碳烯乙酸酯和顺 11-十八碳烯乙酸酯结合,并将其释放到环境中^[14]。

冷杉梢斑螟 *Dioryctria abietella* 是一种为害松科植物球果和嫩梢的钻蛀性害虫;与梢斑螟属其他昆虫类似,防治该种害虫的各种方法不易实施^[1-2]。先前,冷杉梢斑螟的性信息素组分已被鉴定,分别为顺 9,反 11-十四碳二烯乙酸酯(Z9,E11-tetradecadi-

enyl acetate, Z9,E11-14:OAc)和(Z3,Z6,Z9,Z12,Z15)-pentacosapentaene^[15-16]。基于性信息素和寄主植物挥发物在冷杉梢斑螟生理和行为中的重要性,采用以性信息素或植物挥发物为诱芯或驱避剂的方法可以很好地监测和控制害虫种群,提高防治效果和降低防治成本。然而,冷杉梢斑螟雌雄虫间、其与寄主或非寄主植物间互作的分子机制研究仍较少。本研究以冷杉梢斑螟为对象,采用分子生物学、结合测定和分子对接等技术研究了雌虫性腺和雌雄成虫足中高表达 DabiCSP8 的功能,初步明确了与冷杉梢斑螟 DabiCSP8 结合能力较强的配基,旨在为后续该种害虫引诱剂或驱避剂的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 昆虫和组织收集

冷杉梢斑螟幼虫和蛹采自云南省楚雄市紫溪山风景区(101°22'E,25°00'N)。将被冷杉梢斑螟为害的华山松球果带回实验室,用尼龙网套住。在成虫羽化当天将其全部移出,根据腹部外生殖器特征鉴别雌雄成虫,并将其分别放入不同的饲养笼中,饲以 10% 的蜂蜜水。饲养温度为(25±1)℃,相对湿度为(60±5)%,光周期为 L//D=12 h//12 h。

为了研究冷杉梢斑螟 *DabiCSP8* 基因的表达谱,分别收集 3 日龄雌雄成虫触角(30 头)、喙(50 头)、头(不含触角和喙,10 头)、胸(4 头)、腹(雌虫不含性腺、雄虫不含味刷,4 头)、足(20 头)、翅(30 头)、雄虫味刷(30 头)和雌虫性腺(含产卵器,30 头),每个组织收集 3 套生物学模板,液氮速冻后保存于-80℃用于 RNA 的提取。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 的合成

采用 TRIzol 试剂(TaKaRa,大连,中国)提取各组组织总 RNA,经琼脂糖凝胶电泳和 NanoPhotometer® 分光光度计(IMPLEN,美国)检测 RNA 质量和浓度后,采用 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser(TaKaRa,大连,中国)合成 cDNA。其中,RNA 样品中的基因组 DNA 用试剂盒中的 gDNA Eraser 去除,反应程序为:42℃ 孵育 2 min。cDNA 储存于-20℃。

1.3 *DabiCSP8* 基因的表达谱分析

根据已发表的 *DabiCSP8* 基因的核苷酸序列^[17]设计特异引物(上游引物:5'-TGGAGAGGA-CACATAACAG-3';下游引物:5'-GCCT-

TCAGGGTCATACTT-3′)。采用实时荧光定量 PCR 研究 *DabiCSP8* 基因在不同组织中的相对表达量。反应体系为 20 μL , 包括 Bestar[®] SybrGreen qPCR Mastermix (DBI[®] Bioscience, 德国) 10 μL , cDNA 2 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 上、下游引物各 0.5 μL , ddH₂O 7 μL 。反应程序为: 95℃ 预变性 2 min; 95℃ 变性 10 s, 58℃ 退火 31 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 40 个循环。反应结束后采集循环阈值 (cycle threshold, *Ct*)。利用 Q-Gene 法计算 *DabiCSP8* 基因在不同组织的相对表达量^[18-19]。以冷杉梢斑螟核糖体蛋白 S4 (ribosomal protein S4, *DabiRPS4*) 和 L8 (*DabiRPL8*) 作为内参基因^[17]。定量分析中每个组织采用 3 套生物学模板, 每套模板 3 次重复。

采用 IBM SPSS Statistics 21.0 (SPSS Inc., 美国) 软件中的 Fisher 最小显著差异检验 (Fisher's least significant difference test, LSD) 比较基因在不同组织间的表达水平。当 $P < 0.05$ 时, 基因在两个组织间的表达水平被认为具有显著差异。

1.4 *DabiCSP8* 表达载体的构建

基于 *DabiCSP8* 基因的开放阅读框, 首先利用 SignalP 4.1 预测 *DabiCSP8* 的信号肽序列^[20]。其次, 根据预测结果移除 *DabiCSP8* 的 N 端前 18 个氨基酸的信号肽序列, 设计基因特异性引物, 并在引物 5′ 端加入酶切位点和保护碱基 (上游引物: 5′-CGG-GATCCCTCCCTAAGGAGTACTACACAGACA-3′; 下游引物: 5′-CCCAAGCTTTTAGGAGCTAC-CGGTGAAGAGT-3′, 其中下划线分别为上游引物 *Bam*H I 和下游引物 *Hind* III 的酶切位点)。第三, 以雌性性腺 cDNA 为模板, 采用高保真酶 Prime-STAR[®] Max DNA 聚合酶 (TaKaRa, 大连, 中国) 扩增 *DabiCSP8* 基因, 程序为: 98℃ 预变性 2 min; 98℃ 变性 10 s, 60℃ 退火 10 s, 72℃ 延伸 50 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。最后, 采用 HiPure Gel Pure DNA Mini Kit (Magen, 广州, 中国) 纯化目的基因的 PCR 产物。

分别用 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切纯化的 PCR 产物和原核表达载体 pET-30a (+), 在 16℃, 用 T4 DNA 连接酶连接 30 min 构建重组质粒 pET-30a (+)/*DabiCSP8*, 将连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞, LB 固体平板培养基涂板, 挑取单克隆进行测序验证。

1.5 *DabiCSP8* 的表达和纯化

将测序验证正确的重组质粒 pET-30a (+)/*DabiCSP8* 转化到 BL21 (DE3) 感受态细胞中。挑取单克隆至 LB 液体培养基 (Kan⁺, 50 $\mu\text{g/mL}$) 中, 37℃, 200 r/min 振荡培养过夜; 将活化的菌液按 1:50 的比例接入新鲜的 LB 液体培养基中进行扩大培养 (1 L), 当 OD₆₀₀ $\approx$ 0.6 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG) 继续诱导培养 6~7 h。取 1 mL 诱导菌液, 采用全自动样品快速研磨仪进行机械破碎, 破碎 3 次, 每次 5 min, 破碎结束后离心取上清和沉淀, 用 SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白的可溶性表达情况, 剩余诱导菌液用于目的蛋白的纯化。

根据电泳检测结果, *DabiCSP8* 主要以包涵体的形式表达, 因此采用蛋白变性和复性的方法纯化蛋白。首先, 根据 Ni Sepharose High Performance (GE Healthcare) 说明书, 采用亲和层析技术纯化重组蛋白。其次, 利用尿素浓度梯度递减的缓冲液 (6、4、3、2、1、0 mol/L) 进行透析复性。而后, 采用肠激酶切除重组蛋白的 His 标签, 再次利用亲和层析技术纯化目的蛋白。最后, 目的蛋白经透析除盐, 浓缩至合适浓度后存于 -80℃。

1.6 *DabiCSP8* 与不同化合物的结合测定

用于结合测定的荧光探针 *N*-苯基-1-萘胺 (*N*-phenyl-1-naphthylamine, 1-NPN)、植物源挥发性信息素和杀虫剂购自 Aladdin 或 Sigma-Aldrich 公司, 为分析标准品或纯度大于 90%。所有化合物均用色谱级甲醇溶解, 配成 100 mmol/L 的储存液, 保存于 -20℃, 待使用时稀释至 1 mmol/L。

为了确定 1-NPN 是否能够用于 *DabiCSP8* 的荧光竞争性结合测定, 在比色皿中加入 20 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4) 和终浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 的 1-NPN, 检测发射波长 460 nm 附近的荧光峰值。然后, 加入终浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 纯化的 *DabiCSP8*, 观察荧光峰值的变化情况。如果荧光峰发生蓝移, 且荧光强度成倍增加, 说明 1-NPN 能够与 *DabiCSP8* 结合。在结合测定中, 首先测定 *DabiCSP8* 与 1-NPN 的结合情况, 即在 20 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4) 和终浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 的目的蛋白混合液中分别加入不同终浓度的 1-NPN (2、4、5、8、12、16 $\mu\text{mol/L}$)。如果 1-NPN 与目的蛋白的结合具有饱和效应, 则可用于后续的荧光竞争性结合试

验。参数设定:激发光波长 $E_x=337\text{ nm}$, 激发和发射狭缝分别为 3 nm 和 5 nm , 发射光波长 $E_m=350\sim 500\text{ nm}$ 。

在竞争性结合测定中,将 20 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4), 终浓度分别为 $2\text{ }\mu\text{mol/L}$ DabiCSP8 和 1-NPN 加入比色皿中混合均匀。然后,分别加入不同浓度的供试化合物使其终浓度为 $2, 4, 5, 8, 12, 16, 20\text{ }\mu\text{mol/L}$, 记录发射波长在 398 nm 处的荧光峰值变化。在化合物终浓度为 $20\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时,对于荧光取代率[荧光取代率=(1-荧光下降值/起始荧光值) $\times 100\%$]在 45% 以上的化合物,试验重复 3 次。DabiCSP8 与 1-NPN 的结合常数 (binding constant, $K_{1\text{-NPN}}$) 采用 GraphPad Prism 7.0 进行计算。然后,根据 IC_{50} (替换 50% 的 1-NPN 时竞争化合物的浓度) 计算 DabiCSP8 与化合物的解离常数 (dissociation constant, K_d)。 $K_d=IC_{50}/(1+[1\text{-NPN}]/K_{1\text{-NPN}})$, 其中 $[1\text{-NPN}]$ 为游离的 1-NPN 浓度^[21]。

1.7 DabiCSP8 的同源模拟和分子对接

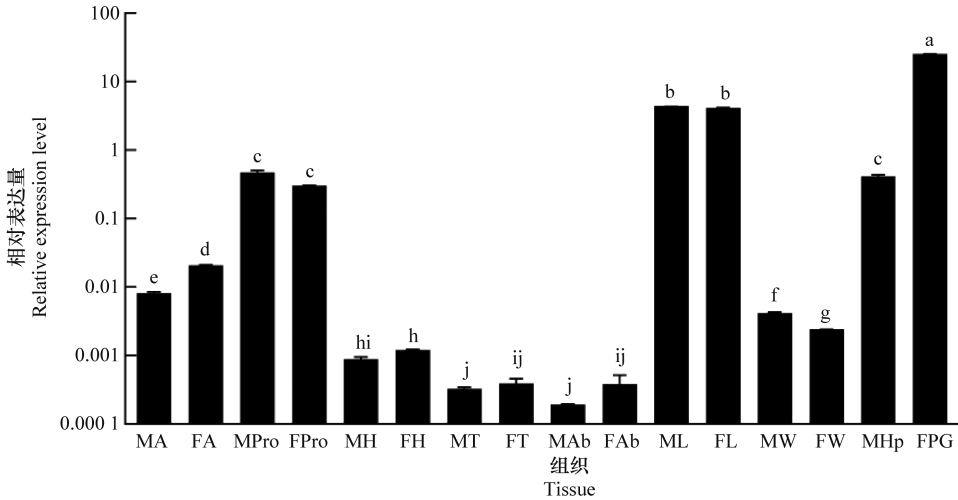
DabiCSP8 的三级结构建模采用 SWISS-MODEL 在线软件 (<https://swissmodel.expasy.org/>) 完成。首先,用去除信号肽的 DabiCSP8 氨基酸序列搜索同源建模的晶体模板,发现其与沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* 的 SgreCSP4 序列具有较高的氨基

酸一致性。然后,以 SgreCSP4 的晶体结构作为模板 (PDB ID: 2GVS)^[22], 构建 DabiCSP8 的三级结构。采用 AutoDock Vina 1.1.2 软件进行 DabiCSP8 与化合物的分子对接^[23]。三级结构的可视化和编辑采用 PyMOL 1.7.2.1 软件完成 (<https://pymol.org/2/>)。

2 结果与分析

2.1 DabiCSP8 基因的组织表达谱分析

根据转录组测序获得的 FPKM (fragments per kilobase of transcript sequence per millions base pairs sequenced) 值和化感基因半定量的结果, *DabiCSP8* 基因在雌虫性腺中表达量最高,其次是雌虫足,2 个组织间 FPKM 值相差 5.65 倍^[17]。本研究中定量分析表明, *DabiCSP8* 基因在雌虫性腺中显著高表达,表达量分别是雄虫足、雌虫足、雄虫喙、雄虫味刷和雌虫喙的 5.77、6.14、54.30、61.50 倍和 83.94 倍。与转录组测序结果基本一致。此外,该基因在雌雄虫触角和其他组织中也有微弱表达,且在雌虫触角的表达量显著高于雄虫,但雌、雄虫触角表达量分别仅为雌虫性腺的 $1/1\ 250$ 和 $3/10\ 000$ 。在雌雄虫足、喙、头、胸或腹间, *DabiCSP8* 基因的表达水平无显著差异;而在雄虫翅中的表达量显著高于雌虫 (图 1)。



不同小写字母表示 *DabiCSP8* 基因在不同组织间的表达水平差异显著 ($P<0.05$, ANOVA, LSD)。MA: 雄虫触角; FA: 雌虫触角; MPro: 雄虫喙; FPro: 雌虫喙; MH: 雄虫头, 不含触角和喙; FH: 雌虫头, 不含触角和喙; MT: 雄虫胸; FT: 雌虫胸; MAb: 不含味刷的雄虫腹; FAb: 不含性腺的雌虫腹; ML: 雄虫足; FL: 雌虫足; MW: 雄虫翅; FW: 雌虫翅; MHP: 雄虫味刷; FPG: 雌虫性腺。
Different lowercase letters indicate significant differences in gene expression levels among different tissues ($P<0.05$, ANOVA, LSD). MA: Male antenna; FA: Female antenna; MPro: Male proboscis; FPro: Female proboscis; MH: Male head without antenna and proboscis; FH: Female head without antenna and proboscis; MT: Male thorax; FT: Female thorax; MAb: Male abdomen without hairpencil; FAb: Female abdomen without pheromone gland; ML: Male leg; FL: Female leg; MW: Male wing; FW: Female wing; MHP: Male hairpencil; FPG: Female pheromone gland.

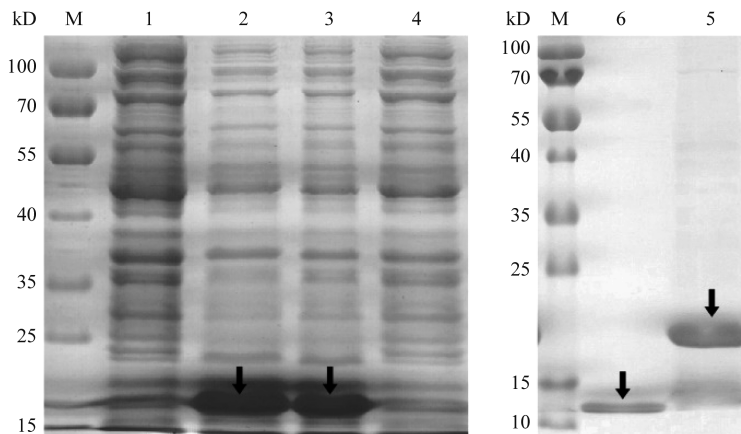
图 1 *DabiCSP8* 基因在冷杉梢斑螟不同组织的相对表达水平

Fig. 1 Relative expression levels of *DabiCSP8* gene in different tissues of *Dioryctria abietella*

2.2 DabiCSP8 的表达和纯化

SDS-PAGE 分析结果表明,经 IPTG 诱导后的重组蛋白 pET-30a (+)/DabiCSP8 在约 20 kD 处具有一条明显加粗的条带,与预测的分子量大小

(19.64 kD)一致。对 IPTG 诱导后的菌液机械破碎后发现 DabiCSP8 主要以包涵体的形式表达。对重组蛋白进行纯化和切除 His 标签后,得到 13.64 kD 的单一目的蛋白条带(图 2)。



泳道1和2: IPTG诱导前后的细菌粗提物;泳道3和4: 破碎后的沉淀和上清;泳道5和6: 纯化后的重组蛋白pET-30a (+)/DabiCSP8和切除His-tag的DabiCSP8。M: 蛋白分子量标准。箭头指示重组蛋白pET-30a (+)/DabiCSP8和切除His-tag后的DabiCSP8。

Lane 1 and 2: Bacterial crude extracts before and after IPTG induction, respectively; Lane 3 and 4: Bacterial pellets and supernatant after mechanical break-up, respectively; Lane 5 and 6: Purified recombinant protein pET-30a (+)/DabiCSP8 and the target protein DabiCSP8 without His-tags, respectively. M: Protein molecular weight marker. Arrows indicate the recombinant protein pET-30a (+)/DabiCSP8 and purified DabiCSP8 without His-tags.

图2 冷杉梢斑螟 DabiCSP8 的表达和纯化

Fig. 2 Expression and purification of *Dioryctria abietella* DabiCSP8

2.3 DabiCSP8 与不同化合物的结合特性

1-NPN 能够很好地与 DabiCSP8 结合,结合常数 K_{1-NPN} 为 $(1.61 \pm 0.02) \mu\text{mol/L}$ (图 3a)。随着 1-NPN 浓度的增加,DabiCSP8 与其结合接近饱和,采用 Scatchard 线性化后发现 DabiCSP8 蛋白与 1-NPN 的结合具有较好的线性关系(图 3a,3b)。

竞争性结合测定结果表明,DabiCSP8 与大部分化合物的结合能力较低。在测试的 100 种化合物中, β -紫罗兰酮是 DabiCSP8 的最佳配基,解离常数 K_d 为 $(11.43 \pm 0.62) \mu\text{mol/L}$;而其他化合物的荧光取代率均在 50% 以下(图 3c,表 1)。在测试的 7 类化合物中,酯类化合物中 2,4-癸二烯酸乙酯与 DabiCSP8 结合能力最强,荧光取代率为 30.61%;醇类化合物中 3-甲基-2-丁烯-1-醇和庚醇的荧光取代率分别为 38.53% 和 32.30%;醛类化合物中丁香醛和十二醛的荧光取代率在 30% 以上;而烯烃类和烷烃类化合物与 DabiCSP8 结合能力均较弱(荧光取代率小于 30%);此外,DabiCSP8 与杀虫剂辛硫磷和毒死蜱的结合能力较强,荧光取代率分别为 47.74% 和 37.87%(图 3d,表 1)。

2.4 DabiCSP8 与 β -紫罗兰酮互作的关键位点预测

同源搜索结果表明,冷杉梢斑螟 DabiCSP8 与沙漠蝗的 SgreCSP4 的氨基酸一致性最高,为 47.71%。DabiCSP8 的二级结构主要由 6 个 α -螺旋组成: $\alpha 1$ (位点 15—20)、 $\alpha 2$ (位点 22—33)、 $\alpha 3$ (位点 40—54)、 $\alpha 4$ (位点 62—78)、 $\alpha 5$ (位点 80—90)和 $\alpha 6$ (位点 97—103),其中两个 CSP 间 $\alpha 1$ 高度保守,除丝氨酸(S)外,其余氨基酸完全一致; $\alpha 2$ 、 $\alpha 5$ 和 $\alpha 6$ 的一致性也较高,分别为 50.00%、63.64% 和 60.00%;剩余的两个 α 螺旋一致性在 50% 以下,其中 $\alpha 4$ 的一致性仅为 35.29%(图 4a)。

根据结合测定结果,选取与 DabiCSP8 结合能力最好的配基 β -紫罗兰酮进行分子对接,鉴定与该化合物结合的关键氨基酸。结果表明,DabiCSP8 结合腔 4 Å 内有 9 个氨基酸与 β -紫罗兰酮结合,包括 8 个非极性氨基酸:异亮氨酸 29(Ile29)、色氨酸 45(Trp45)、Ile49、Ile72、甲硫氨酸 75(Met75)、Trp83、Ile86 和 Trp90;1 个极性氨基酸:精氨酸 46(Arg46)。其中, β -紫罗兰酮的氧(O)能够与 Arg46 形成两个氢键,氢键距离分别为 3.08 和 3.15(图 4b)。

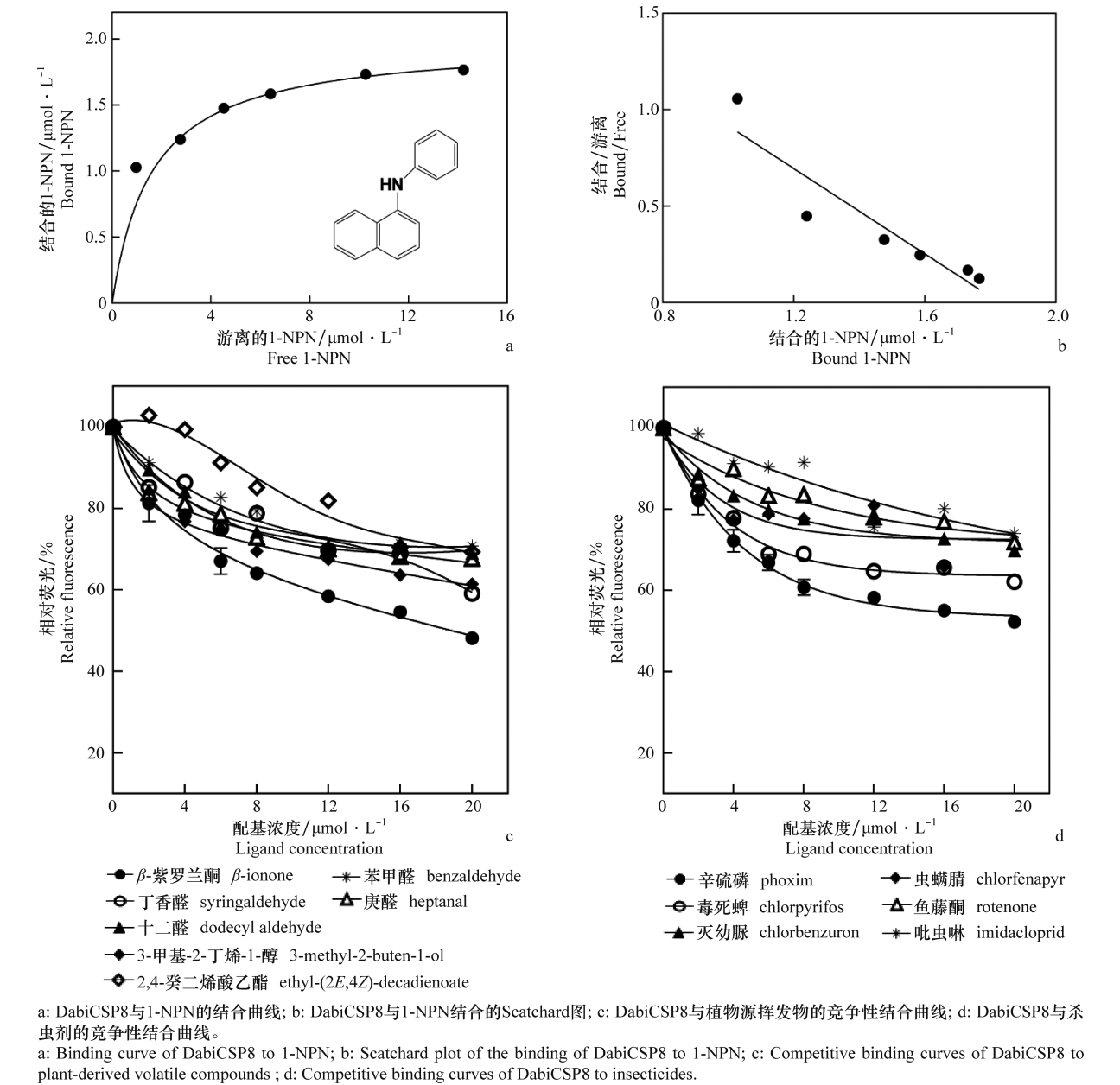


图 3 离体表达的冷杉梢斑螟 DabiCSP8 与不同化合物结合测定

Fig. 3 Binding assays of *Dioryctria abietella* DabiCSP8 expressed *in vitro* with various compounds

表 1 离体表达的冷杉梢斑螟 DabiCSP8 与 100 种化合物的结合能力¹⁾

Table 1 Binding affinities of *Dioryctria abietella* DabiCSP8 expressed *in vitro* with 100 compounds

配基 Ligand	荧光取代率/% Fluorescence displacement ratio	解离常数(K _d)/ μmol · L ⁻¹ Dissociation constant	配基 Ligand	荧光取代率/% Fluorescence displacement ratio	解离常数(K _d)/ μmol · L ⁻¹ Dissociation constant
酯类 Esters			乙酸己酯 hexyl acetate	17.47	—
乙酸甲酯 methyl acetate	8.70	—	乙酸庚酯 heptyl acetate	20.50	—
乙酸乙酯 ethyl acetate	20.39	—	乙酸辛酯 octyl acetate	20.79	—
乙酸丙酯 propyl acetate	16.45	—	乙酸壬酯 nonyl acetate	16.29	—
乙酸丁酯 butyl acetate	13.29	—	乙酸癸酯 decyl acetate	NB	—
乙酸戊酯 amyl acetate	21.24	—	乙酸香叶酯 geranyl acetate	1.29	—

续表 1 Table 1(Continued)

配基 Ligand	荧光取代率/% Fluorescence displacement ratio	解离常数(K _d)/ μmol·L ⁻¹ Dissociation constant	配基 Ligand	荧光取代率/% Fluorescence displacement ratio	解离常数(K _d)/ μmol·L ⁻¹ Dissociation constant
顺 3-己烯乙酸酯 Z3-hexenyl acetate	17. 11	—	苯乙醇 phenethyl alcohol	27. 53	—
顺 3-己烯丁酸酯 Z3-hexenyl butyrate	6. 53	—	2-甲基-1-丁醇 2-methyl-1-butanol	24. 39	—
丁酸乙酯 ethyl butyrate	24. 19	—	3-甲基-2-丁烯-1-醇	38. 53	—
苯甲酸甲酯 methyl benzoate	17. 46	—	3-methyl-2-buten-1-ol		
苯甲酸乙酯 ethyl benzoate	22. 38	—	十六醇 hexadecanol	22. 22	—
苯甲酸苯酯 phenyl benzoate	24. 12	—	1-辛烯-3-醇 1-octen-3-ol	25. 12	—
苯甲酸苄酯 benzyl benzoate	16. 85	—	反 2-己烯醇 E2-hexen-1-ol	21. 35	—
2,4-癸二烯酸乙酯 ethyl-(2E,4Z)-decadienoate	30. 61	—	α-松油醇 α-terpineol	19. 58	—
己酸乙酯 ethyl hexanoate	18. 62	—	6-甲基-5-庚烯-2-醇	23. 58	—
月桂酸甲酯 methyl laurate	1. 63	—	6-methyl-5-hepten-2-ol		
顺 9,反 11-十四碳二烯乙酸酯 Z9,E11-tetradecadienyl acetate	11. 70	—	醛类 Aldehydes		
烯烃类 Alkenes			己醛 hexanal	20. 90	—
罗勒烯 ocimene	25. 75	—	庚醛 heptanal	27. 99	—
α-蒎烯 α-pinene	16. 67	—	辛醛 octanal	22. 29	—
法尼烯 farnesene	6. 33	—	壬醛 nonanal	20. 10	—
α-石竹烯 α-caryophyllene	NB	—	癸醛 decanal	23. 10	—
β-石竹烯 β-caryophyllene	NB	—	十一醛 undecanal	25. 13	—
1-十一烯 1-undecene	12. 28	—	十二醛 dodecyl aldehyde	30. 92	—
月桂烯 myrcene	13. 09	—	顺 2-己烯醛 Z2-hexenal	23. 23	—
角鲨烯 squalene	18. 41	—	反 2-己烯醛 E2-hexenal	26. 21	—
3-萜烯 3-carene	21. 58	—	丁香醛 syringaldehyde	40. 89	—
γ-松油烯 γ-terpinene	11. 58	—	β-环柠檬醛 β-cyclocitral	17. 97	—
α-水芹烯 α-phellandrene	19. 91	—	柠檬醛 citral	21. 48	—
α-萜品烯 α-terpinene	14. 61	—	苯甲醛 benzaldehyde	29. 17	—
柠檬烯 limonene	17. 37	—	苯乙醛 phenylacetaldehyde	25. 98	—
酮类 Ketones			烷烃类 Alkanes		
2-己酮 2-hexanone	18. 64	—	庚烷 heptane	17. 16	—
3-己酮 3-hexanone	22. 45	—	辛烷 octane	13. 22	—
2-庚酮 2-heptanone	20. 05	—	壬烷 nonane	0. 87	—
2-十三烷酮 2-tridecanone	12. 93	—	癸烷 decane	2. 54	—
苯乙酮 acetophenone	20. 76	—	十一烷 undecane	NB	—
β-紫罗兰酮 β-ionone	51. 82	11. 43±0. 62	十二烷 dodecane	8. 33	—
6-甲基-5-庚烯-2-酮	19. 90	—	十三烷 tridecane	0. 77	—
6-methyl-5-hepten-2-one			十四烷 tetradecane	5. 05	—
醇类 Alcohols			十八烷 octadecane	7. 42	—
己醇 hexanol	27. 16	—	十九烷 nonadecane	19. 40	—
庚醇 heptanol	32. 30	—	杀虫剂 Insecticides		
2-庚醇 2-heptanol	25. 65	—	阿维菌素 abamectin	NB	—
辛醇 octanol	26. 74	—	吡虫啉 imidacloprid	25. 99	—
壬醇 nonanol	23. 56	—	除虫脲 diflubenzuron	15. 34	—
癸醇 decanol	20. 46	—	灭幼脲 chlorbenzuron	30. 19	—
十一醇 undecanol	NB	—	溴氰菊酯 deltamethrin	10. 60	—
十二醇 dodecanol	20. 78	—	毒死蜱 chlorpyrifos	37. 87	—
顺 3-己烯醇 Z3-hexen-1-ol	25. 76	—	辛硫磷 phoxim	47. 74	—
芳樟醇 linalool	29. 04	—	氟虫腓 fipronil	19. 53	—
法尼醇 farnesol	22. 16	—	虫螨腈 chlorfenapyr	29. 41	—
香叶醇 geraniol	21. 13	—	鱼藤酮 rotenone	28. 12	—
橙花叔醇 nerolidol	17. 28	—	苦参碱 matrine	19. 77	—
			蛇床子素 osthole	NB	—

1) NB 表示 DabiCSP8 与该化合物没有结合。荧光取代率为最大配基浓度 20 μmol/L 时的值。K_d 表示 DabiCSP8 与不同配基的解离常数。“—”表示化合物的 IC₅₀ 和 K_d 值无法计算。DabiCSP8 与 β-紫罗兰酮的解离常数用平均值±标准误差表示。
NB; No binding. Fluorescence displacement ratios were determined at the maximal ligand concentration of 20 μmol/L. K_d; Dissociation constants of DabiCSP8 to various ligands. “—” indicates that the IC₅₀ and K_d values of the compounds can’t be calculated. K_d value was showed as mean±standard error.

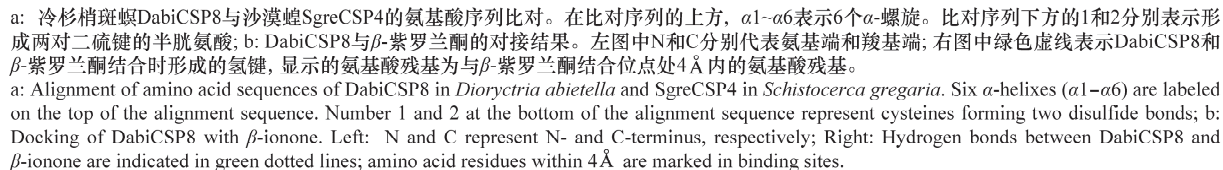


Fig. 4 Molecular docking of *Dioryctria abietella* DabiCSP8 with β -ionone

在定量分析中, *DabiCSP8* 基因的定量结果与转录组测序得到的 FPKM 值结果一致, 即该基因在雌虫性腺中显著高表达, 是性腺中具有最高 FPKM 值的 *CSP* 基因, 其中雌虫性腺与雌虫足、雌虫性腺与雌虫触角间的表达量差异倍数与已发表结果基本一致^[17]。Xing 等^[26]对冷杉梢斑螟雌虫性腺进行了转录组测序, 但是仅鉴定到 1 个 *CSP* 基因 (*DabiC-*

SP1),未发现本研究中的 *DabiCSP8* 基因。综合已发表的转录组测序和半定量结果^[17]以及本研究中定量 PCR 结果,认为 *DabiCSP8* 基因在雌虫性腺中有表达。而 Xing 等^[26]的雌虫性腺转录组未鉴定到该基因很可能是由于组装错误或者鉴定遗漏导致。为了验证以上猜测,我们用 *DabiCSP8* 基因的核苷酸序列作为靶标,采用 MEGA BLAST 同源搜索的方法在 NCBI SRA(national center for biotechnology information sequence read archive)序列数据库搜索冷杉梢斑螟的雌虫性腺转录组(登录号:SRX4329669)^[26],结果发现在该转录组中有 *DabiCSP8* 基因的核苷酸序列,证实了该性腺转录组中 *DabiCSP8* 基因组装错误或者鉴定遗漏的假设。

蛾类雌虫的性腺是产生性信息素的重要器官,研究发现雌虫性腺中的 CSP 蛋白可能参与性信息素的转运和释放,是雌虫性腺中一类重要的运载蛋白^[3, 14]。本研究中 *DabiCSP8* 与雌虫性信息素组分 Z9,E11-14:OAc 的结合能力很弱(在 20 $\mu\text{mol/L}$ 时的荧光取代率为 11.70%),说明 *DabiCSP8* 可能结合其他性信息素,如(Z3,Z6,Z9,Z12,Z15)-pentacosapentaene^[16]。*DabiCSP8* 与多种杀虫剂的结合测定显示,辛硫磷和毒死蜱与该蛋白的亲合力最高。在禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi* 中,*RpadCSP5* 和 *RpadCSP10* 基因的沉默导致了吡虫啉处理的蚜虫死亡率显著增加;*RpadCSP4* 和 *RpadCSP6* 基因的沉默则同时引起吡虫啉和高效氯氰菊酯处理的蚜虫死亡率显著增加^[27]。棉蚜 *Aphis gossypii* 的 *AgosCSP5*^[28]、中华蜜蜂 *Apis cerana* 的 *AcerCSP1*^[29] 和小菜蛾 *Plutella xylostella* 的 *PxyICSP8*^[30] 基因与其对吡虫啉的抗性有关。除吡虫啉外,其他有机磷类杀虫剂也与化学感受相关蛋白具有较强的结合能力,如二点委夜蛾 *Athetis lepigone* 的 *AlepGOBP2*、*AlepPBP2* 和 *AlepPBP3* 与毒死蜱和辛硫磷^[31-32]。而冈比亚按蚊足中高表达的一个 CSP 基因(*AgamSAP2*)被证实与其对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性有关^[11]。根据 *DabiCSP8* 基因在足中高表达,并且其与有机磷类杀虫剂的结合能力较强,推测冷杉梢斑螟可能通过足高表达 *DabiCSP8* 降低害虫对杀虫剂的敏感性。

在测定的化合物中, β -紫罗兰酮是 *DabiCSP8* 的最佳配基,说明该种化合物可能在冷杉梢斑螟的行为调控中起作用。 β -紫罗兰酮是植物花分泌的重要

挥发性成分,中华蜜蜂的 *AcerCSP3* 与该化合物具有强结合能力,说明其可能在蜜蜂寻找蜜源的过程中发挥重要作用^[33-34]。气相色谱-质谱联用技术检测到云南松及其近缘种中含有 β -紫罗兰酮^[35]。鉴于本研究在收集雌虫性腺时也包含了产卵器,加之雌虫产卵器上具有嗅觉感受器及化学感受相关的基因^[36-37],冷杉梢斑螟雌虫产卵器中是否存在 *DabiCSP8* 基因以及其在感受 β -紫罗兰酮中的作用值得深入研究。

参考文献

- [1] 宋玉双,李娟,周艳涛,等.我国梢斑螟属害虫研究及其防治进展[J].中国森林病虫,2020,39(6):29-41.
- [2] TANG Xiaoqin, GAO Tan, LU Jie, et al. Relationship between volatile compounds of *Picea likiangensis* var. *linzhiensis* cone and host selection of *Dioryctria abietella* [J/OL]. Archives of Insect Biochemistry Physiology, 2020, 105(3): e21733. DOI: 10.1002/arch.21733.
- [3] DEBARR G L, HANULA J L, NIWA C G, et al. Synthetic pheromones disrupt male *Dioryctria* spp. moths in a loblolly pine seed orchard [J]. Canadian Entomologist, 2000, 132: 345-351.
- [4] SVENSSON G P, WANG Honglei, JIRLE E V, et al. Challenges of pheromone-based mating disruption of *Cydia stro-bilella* and *Dioryctria abietella* in spruce seed orchards [J]. Journal of Pest Science, 2018, 91(2): 639-650.
- [5] PELOSI P, IOVINELLA I, ZHU Jiao, et al. Beyond chemoreception: diverse tasks of soluble olfactory proteins in insects [J]. Biological Reviews, 2018, 93(1): 184-200.
- [6] LI Guangwei, CHEN Xiulin, CHEN Lihui, et al. Functional analysis of the chemosensory protein GmolCSP8 from the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) [J/OL]. Frontiers in Physiology, 2019, 10: 552. DOI: 10.3389/fphys.2019.00552.
- [7] YOUNAS A, WARIS M I, TAHIR UL QAMAR M, et al. Functional analysis of the chemosensory protein MsepCSP8 from the oriental armyworm *Mythimna separata* [J/OL]. Frontiers in Physiology, 2018, 9: 872. DOI: 10.3389/fphys.2018.00872.
- [8] YOUNAS A, WARIS M I, SHAABAN M, et al. Appraisal of MsepCSP14 for chemosensory functions in *Mythimna separata* [J]. Insect Science, 2022, 29(1): 162-176.
- [9] DUAN Shuanggang, LI Dongzhen, WANG Manqun. Chemosensory proteins used as target for screening behaviourally active compounds in the rice pest *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. Insect Molecular Biology, 2019, 28(1): 123-135.
- [10] QIAO Huili, DENG Peiyuan, LI Dandan, et al. Expression a-

- analysis and binding experiments of chemosensory proteins indicate multiple roles in *Bombyx mori* [J]. Journal of Insect Physiology, 2013, 59(7): 667–675.
- [11] INGHAM V A, ANTHOUSI A, DOURIS V, et al. A sensory appendage protein protects malaria vectors from pyrethroids [J]. Nature, 2020, 577(7790): 376–380.
- [12] LIN Xinda, MAO Yiwu, ZHANG Ling. Binding properties of four antennae-expressed chemosensory proteins (CSPs) with insecticides indicates the adaption of *Spodoptera litura* to environment [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2018, 146: 43–51.
- [13] XUAN Ning, GUO Xia, XIE Hongyan, et al. Increased expression of CSP and CYP genes in adult silkworm females exposed to avermectins [J]. Insect Science, 2015, 22(2): 203–219.
- [14] JACQUIN-JOLY E, VOGT R G, FRANÇOIS M C, et al. Functional and expression pattern analysis of chemosensory proteins expressed in antennae and pheromonal gland of *Mamestra brassicae* [J]. Chemical Senses, 2001, 26(7): 833–844.
- [15] LÖFSTEDT C, VAN DER PERS J N C, LÖFQVIST J, et al. Sex pheromone of the cone pyralid *Dioryctria abietella* [J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 1983, 34(1): 20–26.
- [16] LÖFSTEDT C, SVENSSON G P, JIRLE E, et al. (3Z,6Z,9Z,12Z,15Z)-pentacosapentaene and (9Z,11E)-tetradecadienyl acetate: sex pheromone of the spruce coneworm *Dioryctria abietella* (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. Journal of Applied Entomology, 2012, 136: 70–78.
- [17] WANG Zhengquan, WU Chun, LI Genceng, et al. Transcriptome analysis and characterization of chemosensory genes in the forest pest, *Dioryctria abietella* (Lepidoptera: Pyralidae) [J/OL]. Frontiers in Ecology and Evolution, 2021, 9: 748199. DOI: 10.3389/fevo.2021.748199.
- [18] MULLER P Y, JANOVJAK H, MISEREZ A, et al. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR [J]. Biotechniques, 2002, 32(6): 1372–1374.
- [19] SIMON P. Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data [J]. Bioinformatics, 2003, 19(11): 1439–1440.
- [20] PETERSEN T N, BRUNAK G, VON HEIJNE G, et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions [J]. Nature Methods, 2011, 8(10): 785–786.
- [21] CALVELLO M, GUERRA N, BRANDAZZA A, et al. Soluble proteins of chemical communication in the social wasp *Polistes dominulus* [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2003, 60(9): 1933–1943.
- [22] TOMASELLI S, CRESCENZI O, SANFELICE D, et al. Solution structure of a chemosensory protein from the desert locust *Schistocerca gregaria* [J]. Biochemistry, 2006, 45(35): 10606–10613.
- [23] TROTT O, OLSON A J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. Journal of Computational Chemistry, 2010, 31(2): 455–461.
- [24] 臧楠. 吉林省梢斑螟属 *Dioryctria* spp. 及其为害红松的 4 种梢斑螟生物学研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2007.
- [25] RAINA A K, WERGIN W P, MURPHY C A, et al. Structural organization of the sex pheromone gland in *Helicoverpa zea* in relation to pheromone production and release [J]. Arthropod Structure & Development, 2000, 29(4): 343–353.
- [26] XING Ya, THANASIRUNGKUL W, ASLAM A, et al. Genes involved in the type I pheromone biosynthesis pathway and chemoreception from the sex pheromone gland transcriptome of *Dioryctria abietella* [J/OL]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 2021, 40: 100892. DOI: 10.1016/j.cbd.2021.100892.
- [27] PENG Xiong, QU Mingjing, WANG Suji, et al. Chemosensory proteins participate in insecticide susceptibility in *Rhopalosiphum padi*, a serious pest on wheat crops [J]. Insect Molecular Biology, 2021, 30(2): 138–151.
- [28] LI Fen, VENTHUR H, WANG Shang, et al. Evidence for the involvement of the chemosensory protein AgosCSP5 in resistance to insecticides in the cotton aphid, *Aphis gossypii* [J/OL]. Insects, 2021, 12(4): 335. DOI: 10.3390/insects12040335.
- [29] LI Hongliang, TAN Jing, SONG Xinmi, et al. Sublethal doses of neonicotinoid imidacloprid can interact with honey bee chemosensory protein 1 (CSP1) and inhibit its function [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 486(2): 391–397.
- [30] BAUTISTA M A M, BHANDARY B, WIJERATNE A J, et al. Evidence for trade-offs in detoxification and chemosensation gene signatures in *Plutella xylostella* [J]. Pest Management Science, 2015, 71(3): 423–432.
- [31] ZHANG Yanan, ZHANG Xiaochun, ZHU Rui, et al. Computational and experimental approaches to decipher the binding mechanism of general odorant-binding protein 2 from *Athetis lepigone* to chlorpyrifos and phoxim [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(1): 88–100.
- [32] ZHANG Yanan, XU Jiwei, ZHANG Xiaochun, et al. Organophosphorus insecticide interacts with the pheromone-binding proteins of *Athetis lepigone*: implication for olfactory dysfunction [J/OL]. Journal of Hazardous Materials, 2020, 397: 122777. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.122777.
- [33] KNUDSEN J T, TOLLSTEN L, BERGSTRÖM L G. Floral scents - a checklist of volatile compounds isolated by headspace techniques [J]. Phytochemistry, 1993, 33(2): 253–280.
- [34] LI Hongliang, ZHANG Linya, NI Cuixia, et al. Molecular recognition of floral volatile with two olfactory related proteins in the eastern honeybee (*Apis cerana*) [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 56: 114–121.

- [12] 金京, 谢榕, 李霞, 等. 3 种不同寄主植物对黄脊竹蝗取食偏好性和生长发育的影响[J]. 浙江农林大学学报, 2020, 37(6): 1143–1148.
- [13] 张守科, 张威, 舒金平, 等. 黄脊竹蝗趋泥行为激发与氮素收支的关系[J]. 生态学杂志, 2019, 38(10): 228–234.
- [14] FACKNATH S, LALLJEE B. Effect of soil-applied complex fertiliser on an insect-host plant relationship: *Liriomyza trifolii* on *Solanum tuberosum* [J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 2005, 115(1): 67–77.
- [15] 吕茂翠, 阮永明, 王媛媛, 等. 寄主植物对扶桑绵粉蚧生长发育和繁殖的影响[J]. 浙江师范大学学报(自然科学版), 2013, 36(2): 213–216.
- [16] SALGADO A L, SAASTAMOINEN M. Developmental stage-dependent response and preference for host plant quality in an insect herbivore [J]. Animal Behaviour, 2019, 150: 27–38.
- [17] JU Ruiting, WANG Feng, WAN Fanghao, et al. Effect of host plants on development and reproduction of *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) [J]. Journal of Pest Science, 2011, 84(1): 33–39.
- [18] 沈登荣, 何超, 张睿, 等. 6 种寄主对异迟眼蕈蚊生长发育和繁殖力的影响[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2021, 46(2): 62–66.
- [19] HASSELL M P, SOUTHWOOD T R E. Foraging strategies of insects [J]. Annual Review of Ecology and Systematics, 1978, 9(1): 75–98.
- [20] COCROFT B, RODRIGUE R L, HUNT R E. Host shifts and
- signal divergence: mating signals covary with host use in a complex of specialized plant-feeding insects [J]. Biological Journal of the Linnean Society, 2010, 99(1): 60–72.
- [21] SHOBANA K, MURUGAN K, KUMAR A N. Influence of host plants on feeding, growth and reproduction of *Papilio polytes* (the common mormon) [J]. Journal of Insect Physiology, 2010, 56(9): 1065–1070.
- [22] TATE C D, HELLMICH R L, LEWIS L C. Evaluation of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) neonate preferences for corn and weeds in corn [J]. Journal of Economic Entomology, 2006, 99(6): 1987–1993.
- [23] ZALUCKI M P, CLARKE A R, MALCOLM S B. Ecology and behavior of first instar larval Lepidoptera [J]. Annual Review of Entomology, 2003, 47(1): 361–393.
- [24] 张娜, 郭建英, 万方浩, 等. 甜菜夜蛾对不同寄主植物的产卵和取食选择[J]. 昆虫学报, 2009, 52(11): 1229–1235.
- [25] 袁志华, 郭井菲, 王振营, 等. 亚洲玉米螟幼虫对不同寄主植物的取食选择性[J]. 植物保护学报, 2013, 40(3): 205–210.
- [26] GRIPENBERG S, MAYHEW P J, PARNELL M, et al. A meta-analysis of preference-performance relationships in phytophagous insects [J]. Ecology Letters, 2010, 13(3): 383–393.
- [27] SHIKANO I, AKHTAR Y, ISMAN M B. Relationship between adult and larval host plant selection and larval performance in the generalist moth, *Trichoplusia ni* [J]. Arthropod-Plant Interactions, 2010, 4(3): 197–205.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 18 页)

- [44] RODRIGUEZ E, TELLEZ M M, JANSSEN D. Whitefly control strategies against tomato leaf curl New Delhi virus in greenhouse zucchini [J/OL]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2019, 16(15): 2673. DOI: 10.3390/ijerph16152673.
- [45] PRASANNA H C, SINHA D P, RAI G K, et al. Pyramiding *Ty-2* and *Ty-3* genes for resistance to monopartite and bipartite tomato leaf curl viruses of India [J]. Plant Pathology, 2015, 64(2): 256–264.
- [46] SHARMA N, SAHU P P, PRASAD A, et al. The *Su5a* gene

confers resistance to ToLCNDV and triggers an HR response after direct AC4 effector recognition [J/OL]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2021, 118(33): e2101833118. DOI: 10.1073/pnas.2101833118.

- [47] SHARMA N, PRASAD A, PRASAD M. Role of the *Su5* gene cluster in the fight against plant viruses [J/OL]. Journal of Virology, 2022, 96(5): e0208421. DOI: 10.1128/jvi.02084–21.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 59 页)

- [35] 张晓龙. 云南松及其近缘种树皮挥发性成分及原花青素分布式样研究[D]. 昆明: 云南大学, 2015.
- [36] XIA Yihan, ZHANG Yanan, HOU Xiaoqing, et al. Large number of putative chemoreception and pheromone biosynthesis genes revealed by analyzing transcriptome from ovipositor-pheromone glands of *Chilo suppressalis* [J/OL]. Scientific Reports, 2015, 5: 7888. DOI: 10.1038/srep07888.

- [37] KLINNER C F, CHRISTOPHER K, CHRISTINE M, et al. Functional olfactory sensory neurons housed in olfactory sensilla on the ovipositor of the hawkmoth *Manduca sexta* [J/OL]. Frontiers in Ecology and Evolution, 2016, 4: 130. DOI: 10.3389/fevo.2016.00130.

(责任编辑: 杨明丽)