

番茄斑萎病毒 G_N 与西花蓟马 互作蛋白的初步筛选*

郑晓斌^{1**} 万岩然² 张友军¹ 吴青君^{1***}

(1. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; 2. 河北农业大学植物保护学院, 保定 071000)

摘要 【目的】西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (Pergande) 是番茄斑萎病毒 (Tomato spotted wilt orthotospovirus, TSWV) 的主要传播媒介, 以循环增殖方式传播 TSWV, 但在传播过程中参与的互作蛋白尚不清楚。本研究以 TSWV 的外鞘糖蛋白 G_N (Glycoprotein N) 为诱饵筛选与西花蓟马互作的蛋白, 为阐明 TSWV 与西花蓟马的互作机制提供依据。【方法】构建以 pPR3-N 为载体的西花蓟马泛素分裂酵母双杂交膜系统 cDNA 文库, 利用 Gene Ontology (GO) 通路注释互作蛋白, 分析其生物学功能。【结果】西花蓟马 cDNA 文库库容为 3.2×10^6 , 除去重复序列、载体序列和移码序列, 筛选到 74 个与 G_N 互作的蛋白, 参与了细胞过程、代谢过程、生物调节过程等 12 种生物过程。【结论】成功构建了西花蓟马酵母双杂交膜体系 cDNA 文库, 筛选到与 TSWV G_N 互作的蛋白, 为进一步研究 TSWV 与西花蓟马的互作机制奠定了基础。

关键词 西花蓟马; 番茄斑萎病毒; 酵母双杂交膜系统; 互作蛋白

Identifying proteins in western flower thrips that interact with Tomato spotted wilt orthotospovirus G_N

ZHENG Xiao-Bin^{1**} WAN Yan-Ran² ZHANG You-Jun¹ WU Qing-Jun^{1***}

(1. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

2. College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China)

Abstract [Objectives] The thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande) is the chief vector of the Tomato spotted wilt orthotospovirus (TSWV). This virus is transmitted in a cyclic and proliferative pattern, but the interactive proteins involved in this process are unclear. The G_N protein can be used as an indicator of interaction between *F. occidentalis* and TSWV, and thereby provide a way to clarify the interactions between vector, virus and plant host. [Methods] A cDNA library of the ubiquitin yeast, two-hybrid membrane system was constructed using the pPR3-N vector. Interacting proteins were annotated with the Gene Ontology (GO) pathway and their biological functions analyzed. [Results] The capacity of the cDNA library is 3.2×10^6 . After the removal of repeat sequences, vector sequences and frameshift sequences, 74 thrips proteins were found to have interacted with TSWV G_N protein. Annotation results showed that these host factors were involved in 12 biological processes via the GO pathway, including cellular, metabolic and biological regulatory processes. [Conclusion] A cDNA library of *F. occidentalis* was successfully constructed and proteins that interact with the TSWV G_N protein identified. These results provide a basis for further studies of the interaction between *F. occidentalis* and TSWV.

Key words *Frankliniella occidentalis*; Tomato spotted wilt orthotospovirus; yeast two-hybrid membrane system; interactive protein

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (31572037); 北京市叶类蔬菜创新团队 (BAIC07-2019); 蔬菜有害生物控制与优质栽培北京市重点实验室; 中国农业科学院科技创新工程 (CAAS-ASTIP-IVFCAAS)

**第一作者 First author, E-mail: 1098214700@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: wuqingjun@caas.cn

收稿日期 Received: 2019-04-01; 接受日期 Accepted: 2019-09-19

西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (Pergande), 又称苜蓿蓟马, 属缨翅目 Thysanoptera 蓟马科 Thripidae (Kirk and Terry, 2003), 是一种杂食性害虫, 其寄主植物多达 62 科 200 余种, 包括许多重要的经济作物、蔬菜和花卉等 (Lewis, 1997), 现已成为一种重要的世界性农业害虫 (Ullman *et al.*, 2002)。西花蓟马不但直接取食植物的茎、叶、花和果实, 而且还可以传播多种植物病毒造成危害, 是番茄斑萎病毒 (*Tomato spotted wilt orthotospovirus*, TSWV) 最有效的传播介体 (Ullman *et al.*, 2002), 以持久性循环增殖方式传播 TSWV。近几年, 西花蓟马在我国的发生范围和危害程度呈逐年加重趋势 (张友军等, 2003; 吴青君等, 2007; Wu *et al.*, 2017), 国内外的实际情况表明, 西花蓟马大发生之后往往伴随 TSWV 的大流行。在田间, TSWV 在植物之间的传播主要依靠其介体昆虫蓟马, 防治番茄斑萎病毒病的传播很大程度上依赖于对其介体的有效防治。

TSWV 属于布尼亚病毒科 Bunyaviridae 番茄斑萎病毒属 *Tospovirus*, 2017 年 3 月国际病毒分类委员会 (International committee on taxonomy of viruses, ICTV) 在线发布了最新的病毒分类报告, 原布尼亚病毒科升级为布尼亚病毒目 Bunyavirales, 番茄斑萎病毒属更新为番茄斑萎病毒科 Tospoviridae (Guterres *et al.*, 2017)。目前 TSWV 在欧洲、北美、南美、亚洲和大洋洲等多个国家和地区广泛分布, 中国的广东、四川、云南、北京等地也有报道 (许泽永和张宗义, 1989; 姚革, 1992; 程晓非, 2008; 李飞等, 2012)。由于 TSWV 的寄主范围广, 造成的经济损失严重而被列为全世界 10 种危害性最大的植物病毒之一 (Scholth *et al.*, 2011)。TSWV 病毒粒子直径约为 80-110 nm 的球状体或多面体颗粒, 外层由双层脂质包裹。其基因组有三分体 RNA 单链, 各个基因组片段末端序列都含有 8 个由区域互补形成锅柄状结构的保守互补碱基, 共编码 6 个蛋白, 根据分子量将其命名为 RNA-L、RNA-M 和 RNA-S, RNA-M 有 2 个开放阅读框, 编码 127.4 ku 的糖蛋白 G_N 和 G_C (Moritz *et al.*, 2004),

病毒能够成功传播的第一步依赖于 TSWV 编码的 G_N 蛋白与蓟马中肠上皮细胞表面受体的识别 (Bandla *et al.*, 1998)。关于蓟马与 TSWV 的互作蛋白目前仅有两例报道, Medeiros 等 (2000) 运用免疫共沉淀技术, 发现蓟马体内一个 50 ku 的蛋白可能是 TSWV 的受体; Kikkert 等 (1998) 发现 TSWV 病毒粒子在 western 印迹上复性之后与一个约 94 ku 的蓟马蛋白结合, 但这两个蓟马蛋白功能至今未有进一步的证明。

近年来国内外学者主要通过正向遗传学的方法对 TSWV 的功能和致病机理进行了研究, 关于 TSWV 与其介体昆虫的互作和蓟马的传毒机制也有大量的研究, 但是对于蓟马体内涉及与 TSWV 发生互作的蛋白仍知之甚少。因此本研究通过反向遗传学酵母双杂交技术, 拟首先构建西花蓟马酵母双杂交膜体系 cDNA 文库, 利用酵母双杂交技术筛选出与 G_N 可能互作的蛋白, 对候选蛋白进行注释归类, 进一步分析其可能的生物学功能, 为阐明番茄斑萎病毒与西花蓟马的互作机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试西花蓟马于 2003 年采自北京海淀区中国农业科学院蔬菜花卉研究所温室, 用四季豆 *Phaseolus vulgaris* L. 在室内饲养, 饲养温度 (25±1) °C, 光周期 16L : 8D (Zhang *et al.*, 2007)。

供试 TSWV (TSWV-YN) 病毒株系置于温度 (26±1) °C, 光周期 16L : 8D, 相对湿度 80%-90% 的人工气候培养箱内 (Zhang *et al.*, 2013), 以西花蓟马传播的方式在曼陀罗 *Datura stramonium* 植株上保存。

主要试剂: La-Taq、In-fusion HD Cloning kit、*Sfi* 1 购于日本 TaKaRa 公司, Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System、3-Amino-1,2,4-triazole (3-AT)、β-半乳糖苷酶, 购于宝生物工程 (大连) 有限公司。质粒小提中量试剂盒, 购于天根生化科技 (北京) 有限公司, DNA 凝胶回收试剂盒, 购于 New England Biolabs 公司。引物合成与测

序由北京擎科新业生物技术有限公司完成。

1.2 试验方法

1.2.1 西花蓟马酵母双杂交膜体系 cDNA 文库的构建 取西花蓟马 1 龄若虫 (6 h 内孵化) 约 500 头, 分别放于底部铺有感染 TSWV 和健康的曼陀罗叶片的培养皿 (直径为 9 cm) 中, 取食 24 h 后, 转移至四季豆上, 试虫放于人工气候培养箱内 (温度 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光周期 16L:8D, 相对湿度 80%-90%)。在西花蓟马 2 龄若虫期、蛹期及成虫期, 分别取 TSWV 处理和未处理的西花蓟马约 100 头置于 1.5 mL PE 管中, 按照 TRIzol 法提取总 RNA, 具体步骤详见说明书。使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 将 RNA 样本送上海欧易生物科技有限公司, 构建西花蓟马酵母双杂交膜体系 cDNA 文库。

1.2.2 诱饵载体 pBT3-STE-G_N 的构建 采用摩擦接种方法将 TSWV 接种于健康曼陀罗植株上, 4 周后叶片明显表现出畸形、褪绿、萎黄色轮纹、黄斑褪绿和黄绿不均的症状时, 用 TSWV 快速检测试纸条检测确认是否感染病毒。

取大约 10 mg 曼陀罗叶片按照 TRIzol 法提取叶片总 RNA, 用 PrimeScript™ II^{1st} strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒按照说明书反转成 cDNA。设计带 In-fusion 接头序列的 G_N 基因的引物 (表 1)。以感染 TSWV 的曼陀罗叶片 cDNA 为模板扩增 G_N 基因, 胶回收纯化基因片段。用 *Sfi*I 酶切 pBT3-STE 载体, 酶切产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后, 胶回收纯化载体片段。G_N 基因连接线性化 pBT3-STE 载体, 转化 DH5 α 感受态细胞, 涂布于硫酸卡那霉素抗性 LB 平板上, 挑斑测序。待测序无误后, 用小提中量试剂盒提取 pBT3-STE-G_N 质粒, 储存于 -20°C 待用。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

引物名称 Primer name	序列 Sequence
pBT3-STE-G _N -F	GTAATGGCCATTACGGCCAAAGT AGAAATAATTCTGTGG
pBT3-STE-G _N -R	AGTACATTCATGTGTGATTGCAG ATGGCCGACGCGGCC

1.2.3 pBT3-STE-G_N 诱饵载体 在酵母菌株 NYM51 中的功能性检测取酵母菌株 NYM51 单克隆接种到 2×YPDA 液体培养基中, 30°C 下 220 r/min 摇晃震荡, 待 OD₅₄₆ 值为 0.6-0.8 时收集菌液, 用 Yeast transformation system 试剂盒制备感受态, 共转化 4 种组合 (每组样品质粒按 1.5 μg 计算): ①pBT3-STE-G_N 和 pPR3-N; ②pBT3-STE-G_N 和 pOst1-NubI; ③pTSU2-APP 和 pPR3-N; ④pTSU2-APP 和 pNubG-Fe65。每组样品按照说明书转化到酵母感受态中, 涂布到直径为 9 cm 的选择性固体培养基上 (SD/-Trp/-Leu (DDO), SD/-Trp/-Leu/-Ade (TDO) 和 SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His (QDO)), 每个平板用封口膜封住, 30°C 倒置培养 3-4 d。

1.2.4 筛库条件优化 将 pBT3-STE-G_N 转化到酵母感受态细胞 (感受态制备方法如 1.2.3 所述), 涂布在直径为 9 cm 的选择性固体培养基上 (SD/-Leu), 每个平板用封口膜封住, 30°C 培养 3-4 d。长出单克隆后, 取其接种到 SD/-Leu 的液体培养基中, 30°C 条件下, 220 r/min 摇晃震荡, 待 OD₅₄₆ 值为 0.1-0.15 时离心培养液, 重新转入 30°C 预热的 2×YPDA 液体培养基中, 30°C 条件下, 220 r/min 摇晃震荡, OD₅₄₆ 值为 0.6-0.7, 制备带有 pBT3-STE-G_N 质粒的酵母感受态细胞, 将空质粒 pPR3-N (质粒按 7 μg 计算) 转化到酵母感受态细胞, 涂布到 3-AT 浓度分别为 0、1、2.5、5、7.5、10、25、50 和 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 QDO 直径为 15 cm 的选择性固体培养基上, 取剩余液体稀释 100、1 000、10 000 倍后, 涂布在 DDO 直径为 9 cm 的选择性固体培养基上, 每个平板用封口膜封住, 30°C 倒置培养 3-4 d。

1.2.5 pBT3-STE-G_N 诱饵筛库 将西花蓟马 cDNA 文库质粒 (质粒按 7 μg 计算) 转化到带有 pBT3-STE-G_N 质粒的酵母感受态细胞 (方法如 1.2.4 所述), 涂布到带有 3-AT 浓度为 7.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 QDO 直径为 15 cm 的选择性固体培养基上, 每个平板用封口膜封住, 30°C 倒置培养 6-7 d。

长出的单菌落重新划线到相同筛选强度的 QDO/3-AT (浓度为 7.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 直径为 9 cm

的选择性平板上, 30 °C 倒置培养 3-4 d。取长势比较好的单菌落进行 PCR 测序, 对测序得到的核苷酸进行 Blastn 搜索, 注释基因的功能, 去掉重复序列的质粒。共转化猎物质粒和诱饵质粒、pTSU2-APP 和 pPR3-N(阴性对照)、pTSU2-APP 和 pNubG-Fe65 (阳性对照), 转化产物涂布在 QDO 直径为 9 cm 的选择性固体培养基上, 每个平板用封口膜封住, 30 °C 倒置培养 3-4 d, 长出单克隆后, 用酵母 β -半乳糖苷酶试剂盒定性检测。

2 结果与分析

2.1 西花蓟马酵母双杂交膜体系 cDNA 文库构建

1% 琼脂糖凝胶电泳图显示, 西花蓟马总 RNA 的 28 S 和 18 S 条带较为完整, 5 S 带较弱, 且 28 S 条带的宽度约为 18 S 的 2 倍 (图 1)。以上结果表明, 提取的西花蓟马总 RNA 基本没有降解、完整性较好, 其纯度和质量满足构建西花蓟马 cDNA 文库的要求。

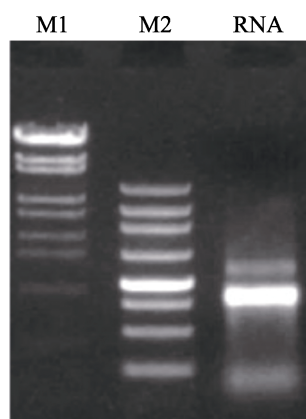


图 1 西花蓟马总 RNA 电泳图

Fig. 1 The electrophoretogram of total RNA of *Frankliniella occidentalis*

M1: DNA marker Lambda EcoT14 I ;

M2: DNA marker 250。

M1: Lambda EcoT14 I digest; M2: 250 bp DNA ladder.

将总 RNA 合成 cDNA, 纯化后的 cDNA 与线性化文库载体 pPR3-N 连接后转化大肠杆菌中, 转化的西花蓟马文库库容为 3.2×10^6 (图 2), 随机挑取 16 个单克隆做菌液 PCR, 结果如图 3

显示, 该文库重组率为 100%, 插入片段平均长度为 1 000 bp, 均一化程度大于 2^5 , 符合文库筛选条件, 可进行下游筛库实验。

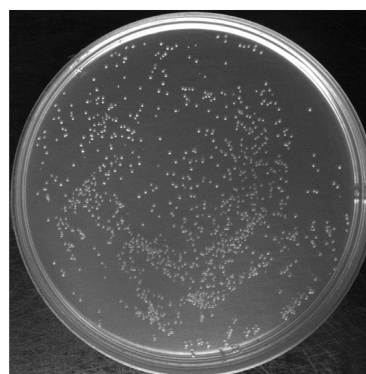


图 2 西花蓟马文库库容

Fig. 2 Library storage capacity of *Frankliniella occidentalis*

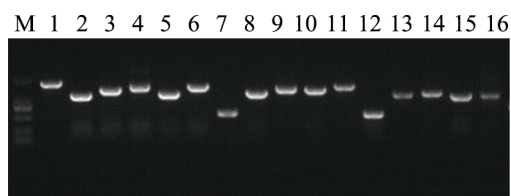


图 3 西花蓟马初级 cDNA 文库插入片段检测电泳图

Fig. 3 The electrophoretogram of amplification products of cDNA library of *Frankliniella occidentalis*

M: DNA marker 250; 1-16:

西花蓟马 cDNA 文库的扩增产物。

M: 250 bp DNA ladder; 1-16: The amplification products of cDNA library of *Frankliniella occidentalis*.

2.2 诱饵载体构建

通过 2% 的琼脂糖凝胶电泳图显示, 特异性条带约为 1 200 bp, 片段大小与预期结果相符 (图 4: A)。将此特异性条带克隆并送擎科生物公司测序, 经双酶切鉴定、PCR 鉴定、测序分析表明, 构建的 pBT3-STE-G_N 质粒大小和理论值相符 (图 4: B), 说明插入的目的片段在重组质粒上读码框正确, 诱饵载体构建成功, 可进行后续试验。

2.3 诱饵载体的功能验证

酵母菌落的生长情况见图 5 所示, 阳性对照组中, 由于 pTSU2-APP 蛋白与 pNubG-Fe65 所表达的蛋白发生强烈的相互作用, 故能够在 DDO、TDO 和 QDO 选择平板上生长的很好。阴

性对照组中, pTSU2-APP 蛋白与空库质粒 pPR3-N 所表达的蛋白 NubG 没有发生相互作用, 故只能在 DDO 选择平板上生长。处理组诱饵质粒 pBT3-STE- G_N 和 pOst1-NubI 能够在 DDO、

TDO 和 QDO 选择平板上生长, 空白对照组中, 诱饵蛋白 pBT3-STE- G_N 和 pPR3-N 也仅能在 DDO 选择平板上生长, 说明诱饵载体能在酵母菌株中正确表达且不会与空库质粒互作。

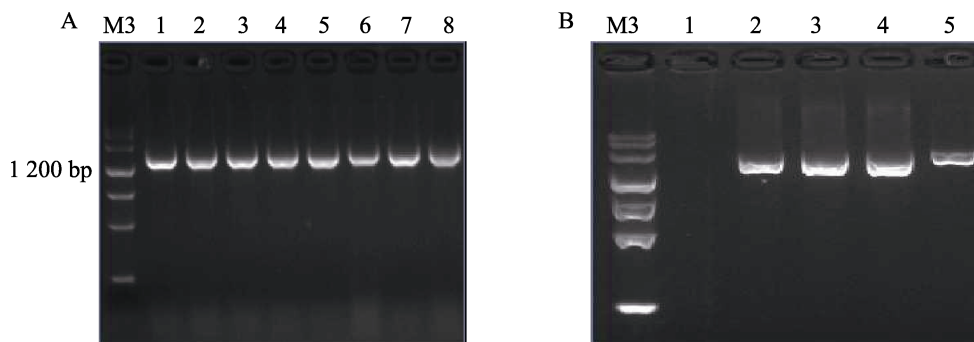


图 4 TSWV G_N 基因 (A) 和 pBT3-STE- G_N 质粒 (B) 的凝胶电泳图

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of TSWV G_N gene (A) and pBT3-STE- G_N plasmid (B)

M3: DNA marker DL 4500; A. 1-8: G_N 基因的扩增产物; B. 1-5: pBT3-STE- G_N 的菌液扩增产物。

M3: 4500 bp DNA ladder; A. 1-8: The amplification products of G_N gene;

B. 1-5: The microbial amplification products of pBT3-STE- G_N .

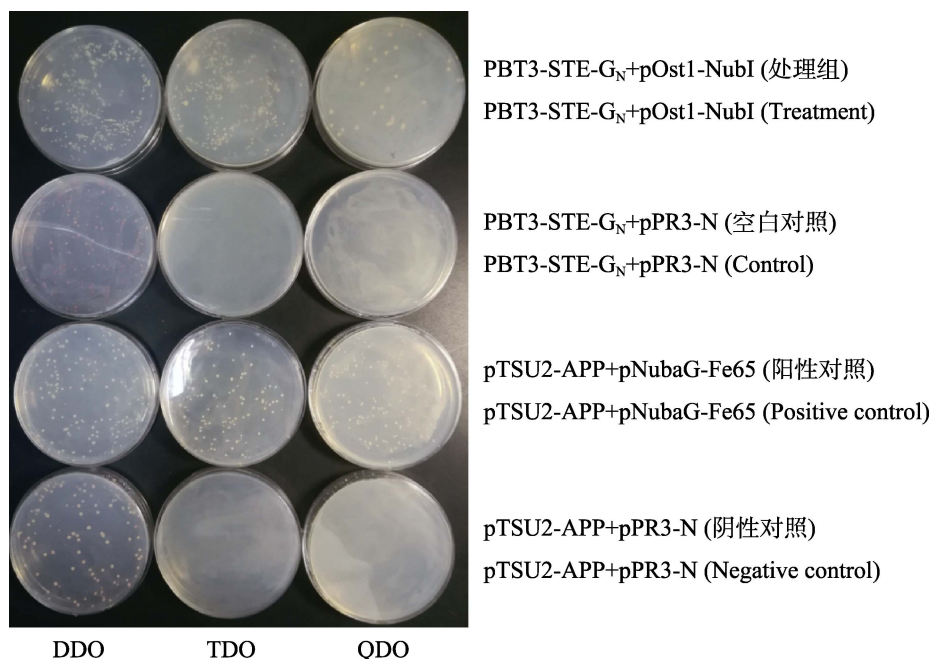


图 5 诱饵载体 pBT3-STE- G_N 的功能验证

Fig. 5 Functional assay of pBT3-STE- G_N bait protein

DDO: SD/-Leu/-Trp 培养基; TDO: SD/-Leu/-Trp/-His 培养基; QDO: SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade 培养基。

DDO: SD/-Leu/-Trp; TDO: SD/-Leu/-Trp/-His; QDO: SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade.

2.4 西花蓟马 cDNA 文库筛选互作蛋白

根据 pBT3-STE- G_N 和 pPR3-N 共转化在 DDO 选择性平板上的单菌落数, 得到总菌落数大于 8×10^5 cfu, 转化效率大于 1×10^5 菌落数/ μ g

DNA, 满足预筛库条件, 并且确定了 3-AT 最终浓度为 $7.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在 QDO/3-AT 培养基上筛选到 216 个生长状况良好的单菌落, 对 216 个猎物物质粒与诱饵质粒共转化 QDO 选择性平板, 只

有阳性对照和 85 个猎物物质粒能够在 QDO 选择性平板上正常生长, 而另外 131 个猎物物质粒与阴性对照不能在 QDO 选择性平板上正常生长, 菌落会衰退且变红。表明这 85 个膜蛋白在酵母双杂交系统中是真正能与诱饵质粒 pBT3-STE-G_N 表达的 G_N 发生互作 (图 8)。对 85 个蛋白质再次经过 β-半乳糖苷酶颜色反应检测, 阳性对照和筛

选的 85 个蛋白质均呈现黄色, 而阴性对照呈现无色透明状 (图 9), 进而获得 85 个候选互作蛋白。

2.5 候选蛋白测序分析

通过 NCBI Blast 对这 85 个基因进行序列比对, 除去重复序列、载体序列和移码序列, 得到 74 个可能与 G_N 发生互作的蛋白 (表 2)。

表 2 西花蓟马中 74 个与 TSWV G_N 发生互作的蛋白质
Table 2 Proteins in *Frankliniella occidentalis* interacted with TSWV G_N protein

编号 Number	登录号 Accession number	基因注释 Gene annotation	物种 Species
1	XP_026275397	ATP 依赖的 RNA 解旋酶 ATP-dependent RNA helicase p62-like isoform X2	西花蓟马 <i>Frankliniella occidentalis</i>
2	XP_012278228	肿瘤成盘因子 Protein tumorous imaginal discs, mitochondrial isoform X2	<i>Orussus abietinus</i>
3	AHB12466	60S 核糖体蛋白质 60S ribosomal protein L19	黄蜻 <i>Pantala flavescens</i>
4	AAR12009	组织蛋白酶 Cathepsin B	骚扰锥蝽 <i>Triatoma infestans</i>
5	XP_014469383	碱性肌球蛋白轻链 Myosin light chain alkali	方头恐猛蚁 <i>Dinoponera quadriceps</i>
6	XP_015517462	40S 核糖体蛋白质 40S ribosomal protein SA	松叶蜂 <i>Neodiprion lecontei</i>
7	XP_003245615	DNA 修复蛋白 DNA repair protein REV1	豌豆蚜 <i>Acyrtosiphon pisum</i>
8	XP_014252987	蛋白酶体泛素受体 Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1	温带臭虫 <i>Cimex lectularius</i>
9	O65353	60S 核糖体蛋白质 60S ribosomal protein L5	
10	XP_023721497	液泡蛋白 Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog	堆砂白蚁 <i>Cryptotermes secundus</i>
11	XP_024867547	免疫球蛋白结合蛋白 Immunoglobulin-binding protein 1b	切胸蚁 <i>Temnothorax curvispinosus</i>
12	PSN46355	60S 核糖体蛋白质 60S ribosomal protein L13	德国小蠊 <i>Blattella germanica</i>
13	XP_012282429	转运相关蛋白质 Translocon-associated protein subunit gamma	<i>Orussus abietinus</i>
14	ODM92633	Cornichon 蛋白 Protein cornichon homolog isoform X1	环带长角长虫兆 <i>Orchesella cincta</i>
15	XP_017845558	GILT 蛋白 GILT-like protein	苍蝇 <i>Drosophila busckii</i>
16	XP_026291008	延长因子 Elongation factor 1-alpha-like	西花蓟马 <i>Frankliniella occidentalis</i>
17	XP_015177460	CD63 抗原 CD63 antigen	造纸胡蜂 <i>Polistes dominula</i>
18	BAN20354	60S 核糖体蛋白质 60S ribosomal protein L12	点蜂缘蝽 <i>Riptortus pedestris</i>
19	XP_018910308	肌钙蛋白 Troponin C isoform X2	烟粉虱 <i>Bemisia tabaci</i>
20	XP_026283913	跨膜蛋白酶丝氨酸 Transmembrane protease serine 4-like	西花蓟马 <i>Frankliniella occidentalis</i>

续表 2 (Table 2 continued)

编号 Number	登录号 Accession number	基因注释 Gene annotation	物种 Species
21	XP_023719305	麦芽糖酶 Maltase A3-like	堆砂白蚁 <i>Cryptotermes secundus</i>
22	AEY99651	翻译延伸因子 Translation elongation factor 2	苜蓿盲蝽 <i>Adelphocoris lineolatus</i>
23	XP_008469540	琥珀酰辅酶 Succinyl-CoA ligase[ADP/AGP-forming] subunit alpha, mitochondrial	柑橘木虱 <i>Diaphorina citri</i>
24	XP_017786965	FK506 结合核蛋白 46 ku FK506-binding nuclear protein	大红葬甲 <i>Nicrophorus vespilloides</i>
25	XP_019529929	ATP 合成酶 ATP synthase subunit b, mitochondrial	白纹伊蚊 <i>Aedes albopictus</i>
26	KRX85891	假设蛋白质 Hypothetical protein T4E_5434	旋毛虫 <i>Trichinella pseudospiralis</i>
27	XP_013175830	腺苷酸激酶 Adenylate kinase	柑橘凤蝶 <i>Papilio xuthus</i>
28	PSN45665	细胞色素 b-c1 复合物 Cytochrome b-c1 complex subunit rieske	德国小蠊 <i>Blattella germanica</i>
29	XP_026274537	胱硫醚-γ-裂解酶 Cystathionine gamma-lyase-like	西花蓟马 <i>Frankliniella occidentalis</i>
30	XP_022816380	超长链脂肪酸蛋白 Elongation of very long chain fatty acids protein AAEL008004	斜纹夜蛾 <i>Spodoptera litura</i>
31	XP_021951359	ATP 合成酶 ATP synthase subunit d, mitochondrial	土壤跳虫 <i>Folsomia candida</i>
32	XP_026277482	组织蛋白酶 Cathepsin L1-like	西花蓟马 <i>Frankliniella occidentalis</i>
33	XP_019881862	琥珀酰辅酶:3-酮酸辅酶 a 转移酶 Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme a transferase 1, mitochondrial	小蜂窝甲虫 <i>Aethina tumida</i>
34	KMR04260	富马酰乙酰乙酸水解酶 Fumarylacetoacetase	黑蚁 <i>Lasius niger</i>
35	XP_009263902	孢子壁和锚盘复合蛋白 Spore wall and anchoring disk complex protein EnP1	<i>Encephalitozoon romaleae</i>
36	XP_016915744	钙/钙调素依赖蛋白激酶 II 型 α 链状 PREDICTED: calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II alpha chain-like	中华蜜蜂 <i>Apis cerana</i>
37	XP_014211456	丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶 Serine/threonine-protein kinase 10	多胚跳小蜂 <i>Copidosoma floridanum</i>
38	XP_021914377	Peflin 蛋白 Peflin	内华达古白蚁 <i>Zootermopsis nevadensis</i>
39	XP_011295725	α-生育酚转移蛋白 Alpha-tocopherol transfer protein-like	家蝇 <i>Musca domestica</i>
40	XP_015592012	细胞色素 C 型血红素溶解酶 Cytochrome c-type heme lyase	麦茎蜂 <i>Cephus cinctus</i>
41	XP_021925248	墨蝶呤还原酶 Sepiapterin reductase	内华达古白蚁 <i>Zootermopsis nevadensis</i>

续表 2 (Table 2 continued)

编号 Number	登录号 Accession number	基因注释 Gene annotation	物种 Species
42	PNF42439	假定细胞色素 P450 Putative cytochrome P450 301a1, mitochondrial	堆砂白蚁 <i>Cryptotermes secundus</i>
43	XP_023709592	细胞色素 b-c1 复合物 Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	堆砂白蚁 <i>Cryptotermes secundus</i>
44	XP_023705208	谷胱甘肽过氧化物酶 Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase isoform X1	西花蓟马 <i>Frankliniella occidentalis</i>
45	XP_026284803	过敏原 Allergen Cr-PI-like	西花蓟马 <i>Frankliniella occidentalis</i>
46	XP_026273203	高尔基体膜相关蛋白 6 样蛋白 Golgin subfamily A member 6-like protein 22	西花蓟马 <i>Frankliniella occidentalis</i>
47	KYM81647	SWI/SNF 复合体亚基 SMARCC2 SWI/SNF complex subunit SMARCC2	切叶蚁 <i>Atta colombica</i>
48	XP_022185228	蛋白酶体 α 亚基 2 Proteasome subunit alpha type-2	褐飞虱 <i>Nilaparvata lugens</i>
49	XP_026273128	表皮蛋白 Larval cuticle protein 65Ag1-like	西花蓟马 <i>Frankliniella occidentalis</i>
50	XP_026282023	过敏原 Allergen Cr-PI-like	西花蓟马 <i>Frankliniella occidentalis</i>
51	XP_026288554	核糖核苷二磷酸还原酶 Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	西花蓟马 <i>Frankliniella occidentalis</i>
52	XP_023702975	胸腺素 β Thymosin beta isoform X1	堆砂白蚁 <i>Cryptotermes secundus</i>
53	XP_023718205	琥珀酸脱氢酶 Succinate dehydrogenase [ubiquinone] cytochrome b small subunit, mitochondrial isoform X2	堆砂白蚁 <i>Cryptotermes secundus</i>
54	XP_018917858	ATP 合成酶 ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	烟粉虱 <i>Bemisia tabaci</i>
55	XP_021917512	水解酶结构域蛋白 Protein ABHD13	内华达古白蚁 <i>Zootermopsis nevadensis</i>
56	XP_011190039	烯醇酶 Enolase	寡毛实蝇 <i>Zeugodacus cucurbitae</i>
57	PSN52885	40 S 核糖体蛋白 40S ribosomal protein S6	德国小蠊 <i>Blattella germanica</i>
58	XP_021940367	醛糖还原酶 Aldose reductase-like	内华达古白蚁 <i>Zootermopsis nevadensis</i>
59	XP_022191770	SDA1 蛋白同源物 Protein SDA1 homolog	褐飞虱 <i>Nilaparvata lugens</i>
60	XP_026289525	过敏原 Allergen Cr-PI-like	西花蓟马 <i>Frankliniella occidentalis</i>
61	XP_022091931	环素结合蛋白 Cyclin-D1-binding protein 1 homolog isoform X1	刺冠海星 <i>Acanthaster planci</i>
62	XP_003699712	细胞色素 C1, 血红素蛋白 Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial isoform X2	苜蓿切叶蜂 <i>Megachile rotundata</i>
63	XP_022197388	膨突特定的蛋白质 LOW QUALITY PROTEIN: puff-specific protein Bx42	褐飞虱 <i>Nilaparvata lugens</i>

续表 2 (Table 2 continued)

编号 Number	登录号 Accession number	基因注释 Gene annotation	物种 Species
64	XP_026281820	分裂蛋白 Protein split ends-like	西花蓟马 <i>Frankliniella occidentalis</i>
65	XP_003887308	蛋白酶体调控复合物 Putative proteasome regulatory complex component	微孢子虫 <i>Encephalitozoon hellem</i>
66	XP_013106549	NADH 脱氢酶 NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 5, mitochondrial	厩螫蝇 <i>Stomoxys calcitrans</i>
67	XP_026284870	40S 核糖蛋白 40S ribosomal protein S6	西花蓟马 <i>Frankliniella occidentalis</i>
68	XP_026279544	肌钙蛋白 I Troponin I isoform X2	西花蓟马 <i>Frankliniella occidentalis</i>
69	KMQ89676	Pol 类蛋白 Pol-like protein	黑蚁 <i>Lasius niger</i>
70	XP_014235391	过氧化物酶 Peroxiredoxin 1	短管赤眼蜂 <i>Trichogramma pretiosum</i>
71	XP_018576852	延长因子 Elongation factor 1-gamma	光肩星天牛 <i>Anoplophora glabripennis</i>
72	XP_003701602	谷胱甘肽-S-转移酶 Glutathione-S-transferase 1-like isoform X3	苜蓿切叶蜂 <i>Megachile rotundata</i>
73	AIA77265	细胞色素 C 氧化酶亚基 I Cytochrome c oxidase subunit I (mitochondrion)	西花蓟马 <i>Frankliniella occidentalis</i>
74	XP_018334183	内表皮结构糖蛋白 Endocuticle structural glycoprotein SgAbd-2-like	白蜡窄吉丁 <i>Agrilus planipennis</i>

利用 Blast2GO 软件和在线网站 WEGO 的 GO 通路对 74 个蛋白进行注释,共参与了 12 种生物过程:定位、细胞组成、细胞过程、代谢过程、生物过程、生物调节过程、免疫系统过程、刺激物响应、解毒、生物过程正调控、细胞增殖、生长发育过程。分子功能有 6 种:运输活性、分子结构活性、结合活性、催化活性、抗氧化活性和分子功能调控。细胞组成有 9 种:细胞膜、细胞膜部分、细胞器、细胞器部分、细胞、细胞部分、蛋白复合物、超分子复合物和膜包围内腔(图 6)。

通过已知蛋白对未知序列进行 KOG 功能注释,从而推导特定的代谢途径,确定保守位点,分析其进化关系。在具有功能分类的主要数据库中,对 74 个筛选的互作蛋白进行功能归类分析,主要参与了能量的生成与储存、翻译、翻译后的修饰,蛋白质折叠、信号转导和细胞骨架的改变(图 7)。

3 讨论

本实验成功构建了西花蓟马泛素分裂酵母双杂交膜文库以及能够在酵母系统中正确表达的番茄斑萎病毒 G_N 蛋白诱饵载体,并成功筛选到了 74 个可能与番茄斑萎病毒互作的西花蓟马蛋白。经过基因注释发现这 74 个寄主因子中,核糖体蛋白和表皮蛋白筛选丰度最高。

核糖体蛋白是一种广泛存在的可与核糖体 RNA 结合的蛋白。该蛋白除了能够组成核糖体外,还在细胞的调控、增殖、凋亡、分化中起着重要的作用(Chen and Ioannou, 1999; Hui *et al.*, 2006; Wanzel *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2016)。在果蝇 C 病毒(*Drosophila C virus*)中,对感染病毒的果蝇细胞进行全基因组的 RNAi 筛选,得到了 66 个对果蝇 C 病毒增殖起着重要作用的核糖体蛋白(Cherry *et al.*, 2005)。Li 等(2011)在灰飞虱 *Laodelphax striatellus* Fallen 体内,发

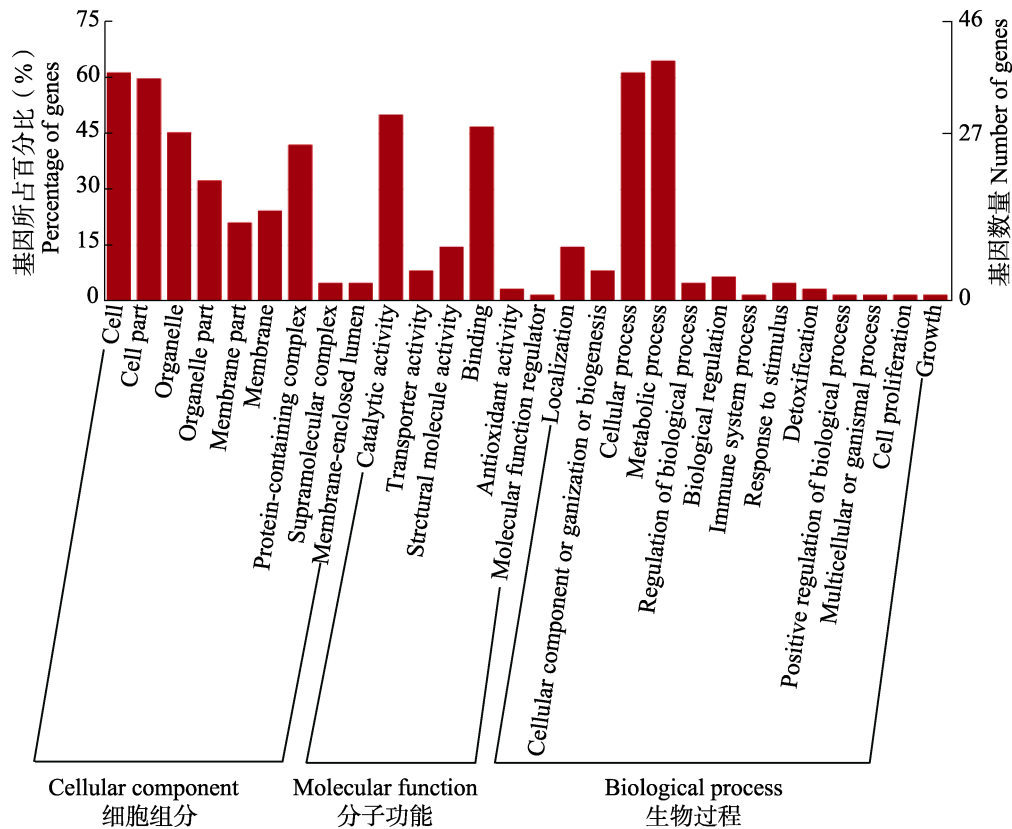


图 6 GO 分类

Fig. 6 Classification by gene ontology

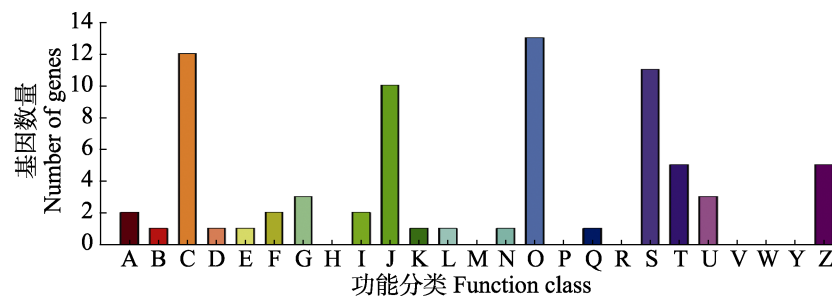
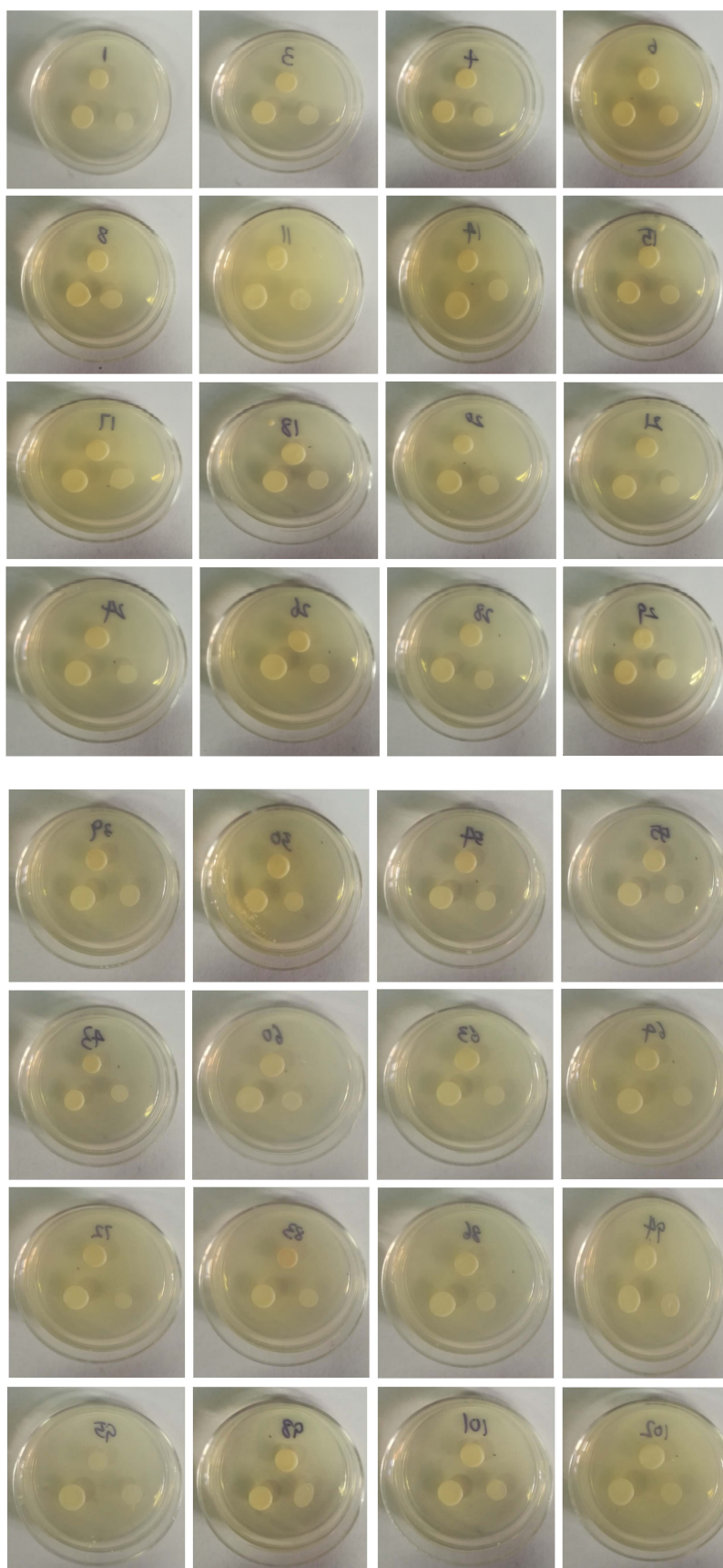


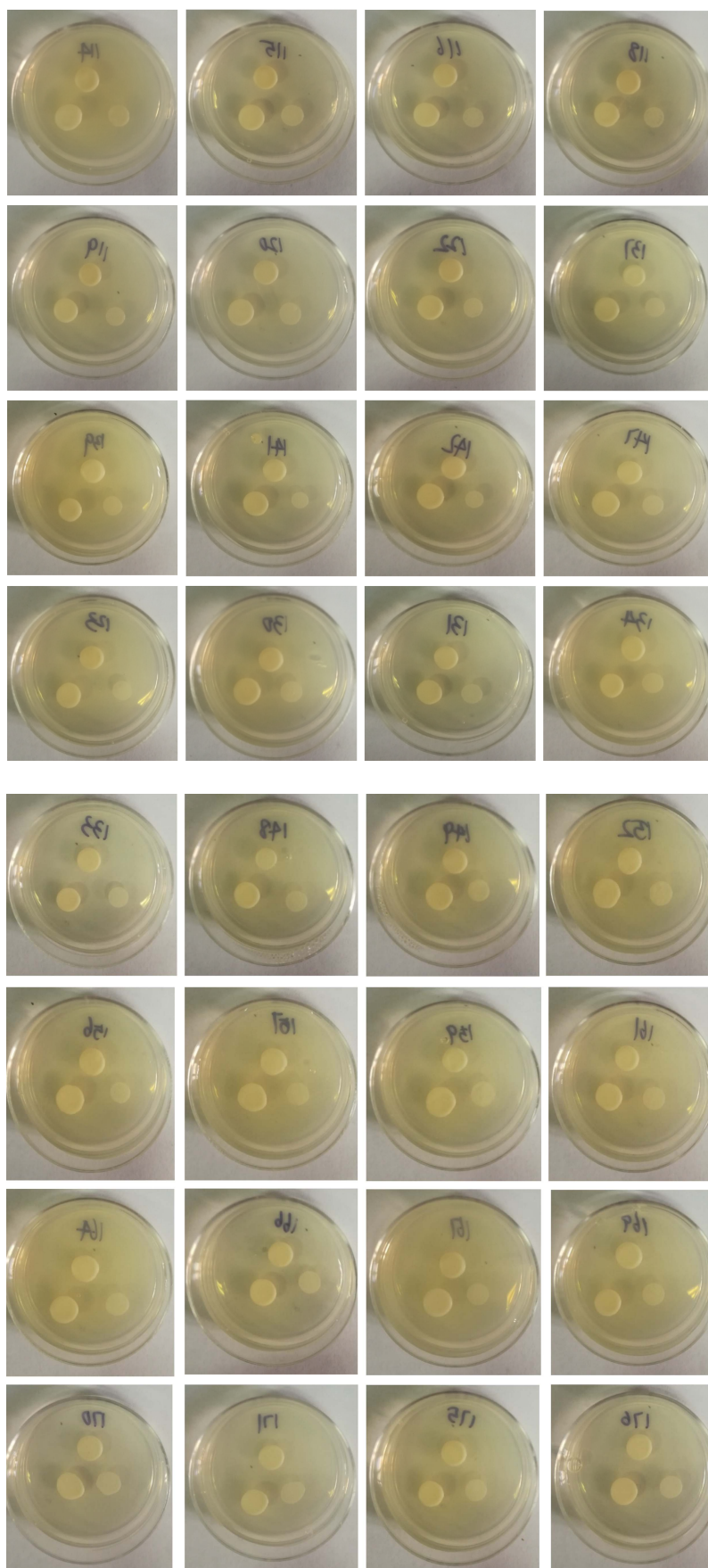
图 7 KOG 分类

Fig. 7 KOG function classification

A: RNA 加工和修饰; B: 染色质结构和动态; C: 能量生产和转换; D: 细胞周期控制, 细胞分裂, 染色体分裂;
 E: 氨基酸转运和代谢; F: 核苷酸转运和代谢; G: 碳水化合物运输和代谢; H: 辅酶转运和代谢; I: 脂质转运和代谢;
 J: 翻译、核糖体结构和生物起源; L: 复制、重组和修复; M: 细胞壁/细胞膜/包膜的生物发生; N: 细胞运动;
 O: 翻译后蛋白质修饰、蛋白质交换、伴侣; P: 无机离子转运和代谢; Q: 次生代谢物合成、运输和分解代谢;
 R: 一般功能预测; S: 未知功能; T: 信号转导机制; U: 细胞内运输、分泌和囊泡运输; V: 防御机制;
 W: 细胞外结构; Y: 核酸结构; Z: 细胞骨架。

A: RNA processing and modification; B: Chromatin structure and dynamics; C: Energy production and conversion; D: Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning; E: Amino acid transport and metabolism; F: Nucleotide transport and metabolism; G: Carbohydrate transport and metabolism; H: Coenzyme transport and metabolism; I: Lipid transport and metabolism; J: Translation, ribosomal structure and biogenesis; L: Replication, recombination and repair; M: Cell wall/membrane/envelope biogenesis; N: Cell motility; O: Posttranslational modification, protein turnover, chaperones; P: Inorganic ion transport and metabolism; Q: Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism; R: General function prediction only; S: Function unknown; T: Signal transduction mechanisms; U: Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport; V: Defense mechanisms; W: Extracellular structures; Y: Nuclear structure; Z: Cytoskeleton.





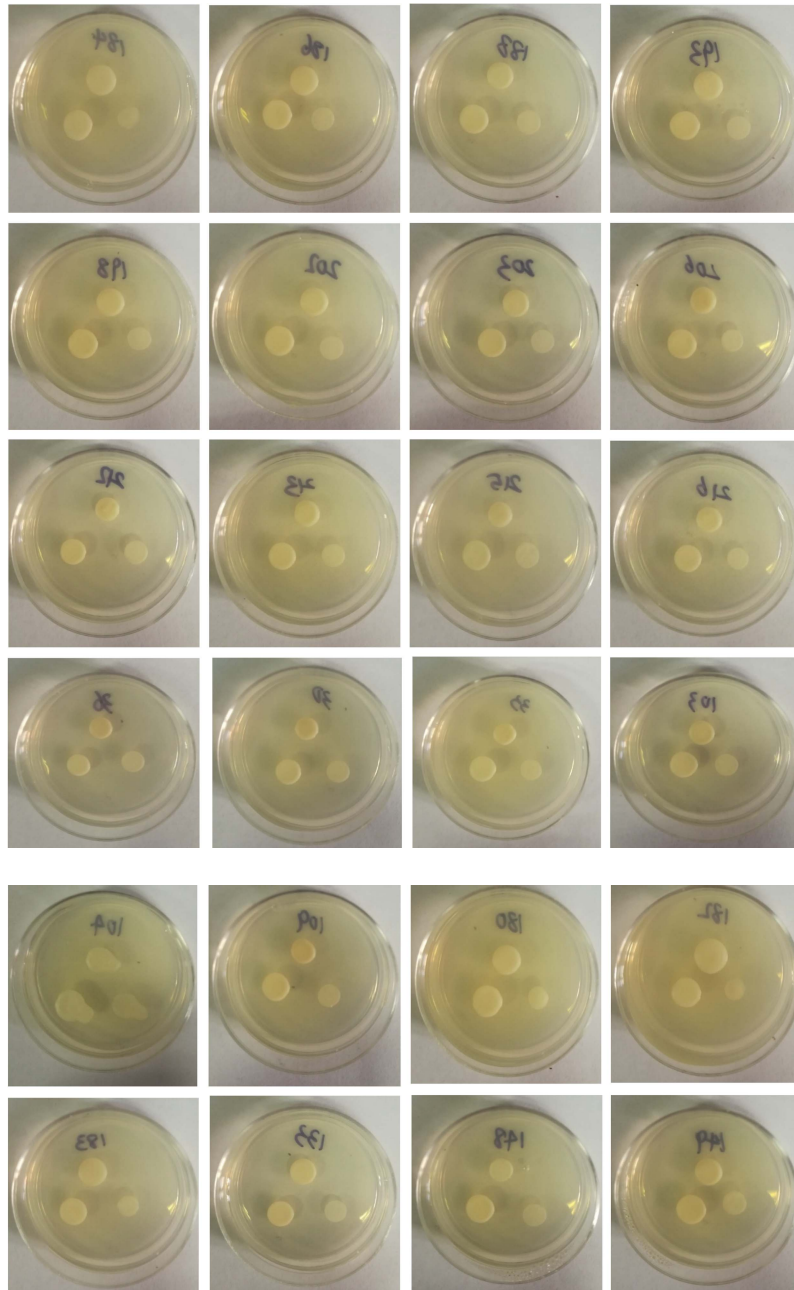


图 8 酵母双杂交再次验证互作蛋白

Fig. 8 Verification of interacted proteins by co-transformation assay of yeast two hybrid

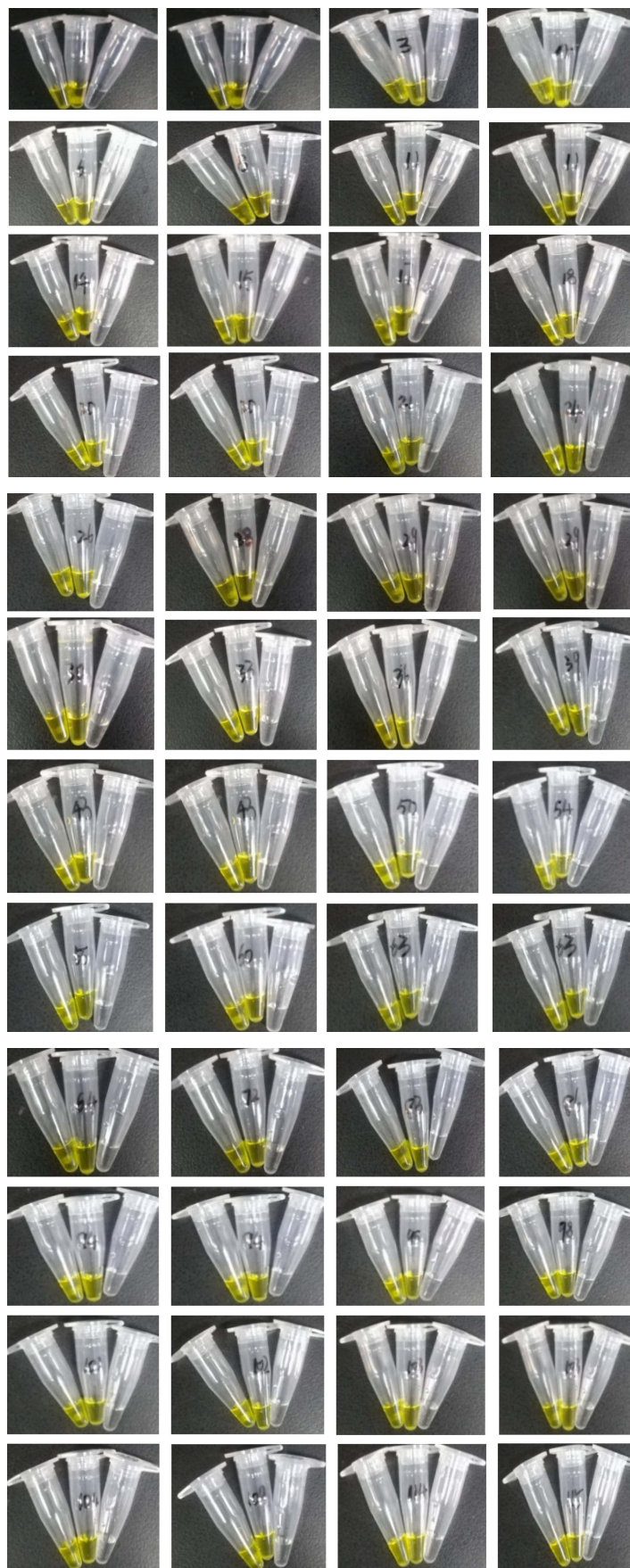
顶点代表互作蛋白，左下角代表阳性对照，右下角代表阴性对照。

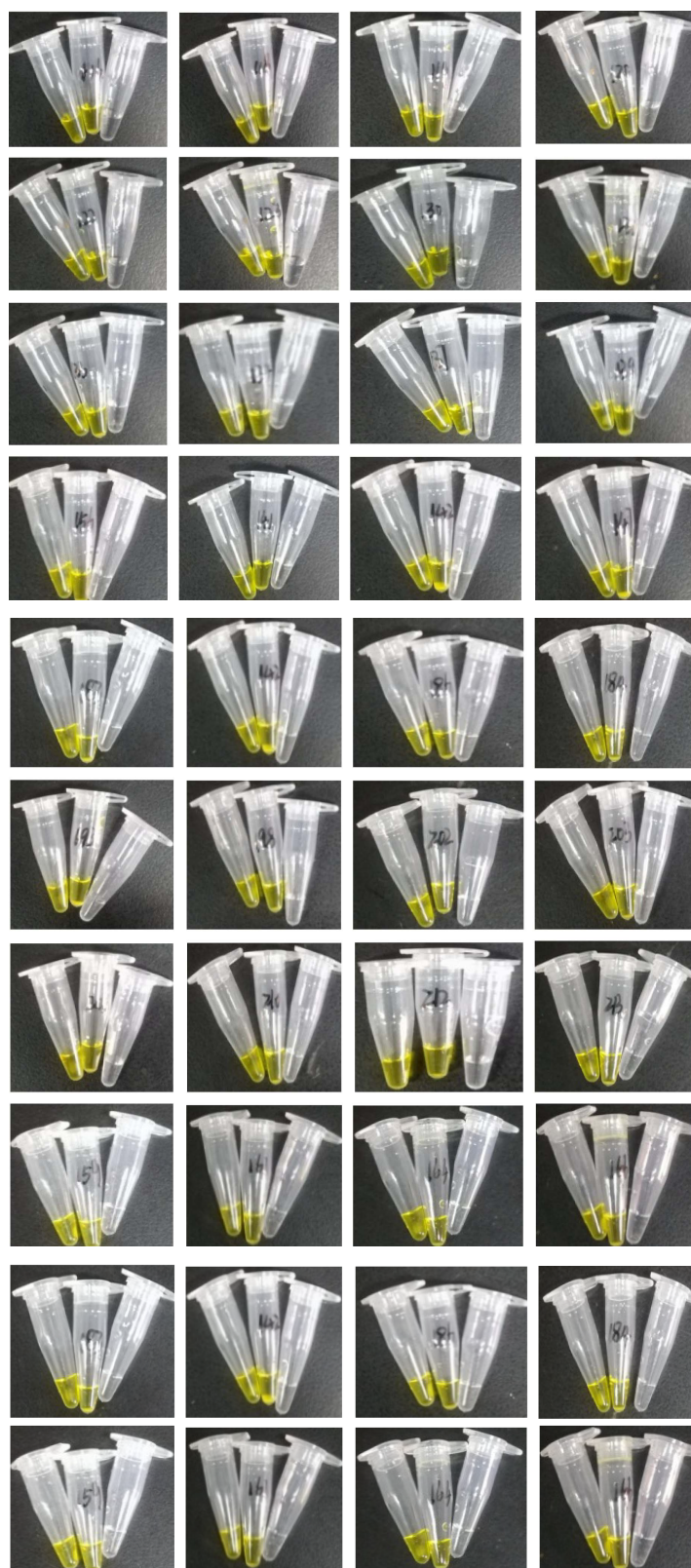
The top one represents interaction protein, the left represents positive control, the right represents negative control.

现有 3 个核糖体蛋白与水稻条纹病毒(*Rice stripe virus*, RSV) 有较强的互作关系, 推测这些核糖体蛋白参与了水稻条纹病毒在灰飞虱体内的增殖。徐秋芳等(2013) 在研究水稻黑条矮缩病毒过程中, 发现核糖体蛋白参与病毒在灰飞虱体内的复制。TSWV 病毒粒子进入蓟马中肠细胞的细

胞质后, 通过“抢帽机制”(Specific cap donors) 盗取宿主 mRNA5'帽子和复制 RNA 基因组(Van Poelwijk *et al.*, 1996; Duijsings *et al.*, 2001), 推测核糖体蛋白可能在这个过程中协助 TSWV 在西花蓟马体内复制和增殖。

角质层由表皮蛋白和几丁质组成, 主要功能



图 9 β -半乳糖苷酶检测结果Fig. 9 β -galactosidase detect 85 interacting proteins

左侧代表阳性对照，中间代表交互蛋白，右侧代表阴性对照。

The left one represents positive control, the middle represents interaction protein, the right represents negative control.

是组成外骨骼, 抵御外界的不良环境, 比如药剂、干燥、高渗高压以及季节性光周期等 (Andersen *et al.*, 1995; Gilbert *et al.*, 2005)。由于昆虫表皮系统比较复杂, 所以昆虫的表皮蛋白种类也很丰富 (Soares *et al.*, 2007)。秦发亮 (2014) 利用酵母双杂交技术和化学发光 Co-IP 技术, 在体内和体外验证了灰飞虱表皮蛋白与 RSV CP 蛋白间存在较强的互作关系, 该蛋白可能通过与水稻条纹病毒的互作将病毒结合到血细胞上, 可能与病毒在灰飞虱肠道中的传播和突破肠道屏障发挥着重要的作用。Cilia 等 (2011) 利用遗传学和蛋白质组学, 在麦二叉蚜 *Schizaphis graminum* 内鉴定了几种与禾谷黄矮病毒 *Cereal yellow dwarf virus* 互作的蛋白质, 这些蛋白可能参与了病毒突破麦二叉蚜肠道屏障的过程。TSWV 病毒进入蓟马内到成功传毒, 需要跨越六道膜屏障, 第一道屏障是病毒进入蓟马中肠刷状细胞的刷状缘, 病毒粒子要突破肠道屏障这个过程, 可能需要表皮蛋白的参与 (Nagata *et al.*, 1999; Filho *et al.*, 2002)。

此外, 在西花蓟马体内还筛出一些其它的蛋白质, 如易位相关蛋白和肌钙蛋白等, KOG 功能注释结果分析, 这些蛋白主要参与了信号转导和细胞骨架的改变。易位相关蛋白是一种位于真核生物内质网上的膜蛋白, 包含四个亚基 (α , β , γ 和 δ), 能够选择性的识别信号序列 (Rapoport *et al.*, 1996; Ménétret *et al.*, 2005)。本研究筛到一种易位相关蛋白 γ 亚基, 该 γ 亚基跨越内质网膜 4 次, 是亚基的主要组成部分。在柞蚕核型多角体病毒 (*Occlusion-derived virus*) 包膜蛋白感染研究中发现, 其病毒包膜蛋白会整合到甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 细胞中的内质网膜上, 并将其运输到病毒内核膜上 (Hong *et al.*, 1997)。在巴贝斯虫 *Babesia bovis* 感染的南方牛蜱 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 中肠组织中, 该易位相关蛋白参与了信号传导的过程 (Rachinsky *et al.*, 2008)。病毒能够成功传播的第一步依赖于 TSWV 编码的 G_N 蛋白与蓟马中肠上皮细胞表面受体的识别 (Bandla *et al.*, 1998), 当受体在识别相应配体并与之结合后, 细胞内环

磷酸腺苷 (cAMP)、环磷酸鸟苷 (cGMP) 和钙离子等物质增加, 参与细胞的生物调控过程, 易位相关蛋白可能将获得信息传递到细胞内, 才能使病毒蛋白与蓟马受体成功识别并结合。

本研究筛选到肌钙蛋白亚基 I 和 C。肌钙蛋白是一种由 3 种亚基组成的复合物, 包括肌钙蛋白 C (TnC)、肌钙蛋白 I (TnI) 和肌钙蛋白 T (TnT) (Farah and Reinach, 1995)。肌钙蛋白 C 不但可以通过结合 Ca²⁺ 调节肌肉活动, 还可间接调控细胞骨架系统 (Lehman *et al.*, 1974; Lehman and Szentgyorgyi, 1975)。肌钙蛋白在昆虫的生长发育过程中起着重要的作用, 如肌钙蛋白基因在松墨天牛 *Monochamus alternatus* 幼虫、蛹和成虫中都有表达 (吴华俊, 2015); 植物病毒蛋白和寄主的互作中, 这些病毒以及蛋白通过在细胞内表达可以改变细胞的骨架, 以便病毒能够在寄主上复制 (Reichel and Beachy, 1998; Camilo *et al.*, 2012)。病毒在复制过程中, 通过细胞质到核孔复合体后, 核孔复合体会将病毒的遗传物质释放出来, 在这个过程中, 简单的扩散是不可能达到的 (Lyman and Enquist, 2009), 但在西花蓟马体内筛到的肌钙蛋白, 可能会协助高度动态且适应性很强的细胞骨架, 通过改变结构以完成 TSWV 的复制。

本研究基于泛素分裂酵母双杂交系统构建了酵母文库及诱饵质粒, 并在此基础上通过后期的筛库实验筛选到 74 个西花蓟马与 TSWV 互作的候选蛋白。通过酵母双杂交系统筛选的蛋白可能存在一定假阳性, 需要通过其他方法进一步确认其互作关系, 如双分子荧光互补技术 (BiFC), 免疫共沉淀 (Co-IP) 技术以及 Pull-down 检测等方法。番茄斑萎病毒与其传毒寄主西花蓟马在协同进化过程中形成了其独特的获毒传毒机制, 筛选到两者之间的互作蛋白, 可为明确 TSWV 与西花蓟马的互作机制, 从而为西花蓟马和 TSWV 的防治提供新思路和新途径。

参考文献 (References)

- Andersen SO, Hojrup P, Roepstorff P, 1995. Insect cuticular proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 25(2): 153–176.

- Bandla MD, Campbell LR, Ullman DE, 1998. Interaction of *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV) glycoproteins with a thrips midgut protein, a potential cellular receptor for TSWV. *Phytopathology*, 88(2): 98–104.
- Camilo P, Jean-François L, Zheng H, 2012. Hijack it, change it: How do plant viruses utilize the host secretory pathway for efficient viral replication and spread? *Frontiers in Plant Science*, 3(3): 308–315.
- Chen FW, Ioannou YA, 1999. Ribosomal proteins in cell proliferation and apoptosis. *International Reviews of Immunology*, 18(5/6): 429–448.
- Cheng XF, Dong JH, Fang Q, 2008. Detection of a *Tospovirus* infecting *Phalaenopsis amabilis* in Yunnan. *Acta Phytopathologica Sinica*, 38(1): 312–314. [程晓非, 董家红, 方琦, 2008. 从云南蝴蝶兰上检测到番茄斑点萎蔫病毒属病毒. 植物病理学报, 38(1): 312–314.]
- Cherry S, Doukas T, Armknecht S, 2005. Genome-wide RNAi screen reveals a specific sensitivity of IRES-containing RNA viruses to host translation inhibition. *Genes and Development*, 19(4): 445–452.
- Cilia M, Tamborindeguy C, Fish T, 2011. Genetics coupled to quantitative intact proteomics links heritable aphid and endosymbiont protein expression to circulative polerovirus transmission. *Journal of Virology*, 85(5): 2148–2166.
- Duijsings D, Kormelink R, Goldbach R, 2001. In vivo analysis of the TSWV cap-snatching mechanism: Single base complementarity and primer length requirements. *EMBO of Journal*, 20(10): 2545–2552.
- Farah CS, Reinach FC, 1995. The troponin complex and regulation of muscle contraction. *Faseb Journal*, 9(9): 755–767.
- Filho FMDA, Naidu RA, Deom CM, 2002. Dynamics of *Tomato spotted wilt virus* replication in the alimentary canal of two thrips species. *Phytopathology*, 92(7): 729–733.
- Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS, 2005. Comprehensive Molecular Insect Science. New York: Elsevier. 175–206.
- Guterres A, Oliveira RC, Fernandes J, 2017. New bunya-like viruses: Highlighting their relations. *Infection, Genetics and Evolution*, 49: 164–173.
- Hong T, Summers MD, Braunagel SC, 1997. N-terminal sequences from *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* envelope proteins ODV-E66 and ODV-E25 are sufficient to direct reporter proteins to the nuclear envelope, intranuclear microvesicles and the envelope of *Occlusion derived virus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 94(8): 4050–4055.
- Hui W, Zhao LN, Li KZ, 2006. Overexpression of ribosomal protein L15 is associated with cell proliferation in gastric cancer. *BMC Cancer*, 6(1): 91–98.
- Kikkert M, Meurs C, Fvande W, 1998. Binding of *Tomato spotted wilt virus* to a 94-kDa thrips protein. *Phytopathology*, 88(1): 63–69.
- Kirk WDJ, Terry LI, 2003. The spread of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Agricultural and Forest Entomology*, 5(4): 301–310.
- Lehman W, Bullard B, Hammond K, 1974. Calcium-dependent myosin from insect flight muscles. *Journal of General Physiology*, 63(5): 553–563.
- Lehman W, Szentgyorgyi AG, 1975. Regulation of muscular contraction. Distribution of actin control and myosin control in the animal. *Journal of General Physiology*, 66(1): 1–30.
- Lewis T, 1997. Thrips as Crop Pests. London: Cambridge Press. 1–13.
- Li F, Wu QJ, Xu BY, Xie W, Wang SL, Zhang YJ, 2012. *Tomato spotted wilt orthotospovirus* was identified in Beijing. *Plant Protection*, 38(6): 186–188. [李飞, 吴青君, 徐宝云, 谢文, 王少丽, 张友军, 2012. 北京地区发现番茄斑萎病毒. 植物保护, 38(6): 186–188.]
- Li S, Xiong R, Wang X, 2011. Five proteins of *Laodelphax striatellus* are potentially involved in the interactions between *Rice stripe virus* and vector. *PLoS ONE*, 6(10): e26585.
- Lyman MG, Enquist LW, 2009. *Herpesvirus* interactions with the host cytoskeleton. *Journal of Virology*, 83(5): 2058–2066.
- Medeiros RB, Ullman DE, Sherwood JL, 2000. Immunoprecipitation of a 50-kDa protein: A candidate receptor component for *Tomato spotted wilt tospovirus* (Bunyaviridae) in its main vector, *Frankliniella occidentalis*. *Virus Research*, 67(2): 109–118.
- Ménétret JF, Hegde RS, Heinrich SU, 2005. Architecture of the ribosome-channel complex derived from native membranes. *Journal of Molecular Biology*, 348(2): 445–457.
- Moritz G, Kumm S, Mound L, 2004. *Tospovirus* transmission depends on thrips ontogeny. *Virus Research*, 100(1): 143–149.
- Nagata T, Nagata-Inoue AK, Smid HM, 1999. Tissue tropism related to vector competence of *Frankliniella occidentalis* for *Tomato spotted wilt tospovirus*. *Journal of General Virology*, 80(1): 507–515.
- Qin FL, Liu WW, Li L, 2014. Screening of putative proteins in vector *Laodelphax striatellus* which are interacted with disease-specific protein of *Rice stripe virus* by yeast two-hybrid based on the split. *Scientia Agricultura Sinica*, 47(14): 2784–2794. [秦发亮, 刘文文, 李莉, 2014. 利用酵母双杂交技

- 术筛选介体灰飞虱中与水稻条纹病毒病害特异蛋白互作的蛋白质. 中国农业科学, 47(14): 2784–2794.]
- Rachinsky A, Guerrero FD, Scoles GA, 2008. Proteomic profiling of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* midgut responses to infection with *Babesia bovis*. *Veterinary Parasitology*, 152(3): 294–313.
- Rapoport TA, Jungnickel B, Kutay U, 1996. Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annual Review of Biochemistry*, 65: 271–303.
- Reichel C, Beachy RN, 1998. Tobacco mosaic virus infection induces severe morphological changes of the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95(19): 11169–11174.
- Scholth of KBG, Adkins S, Czosnek H, 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 12(9): 938–954.
- Soares MP, Elias-Neto M, Simões ZL, 2007. A cuticle protein gene in the honeybee: Expression during development and in relation to the ecdysteroid titer. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(12): 1272–1282.
- Ullman DE, Medeiros RB, Campbell LR, Whitfield AE, Sherwood JL, German TL, 2002. Thrips as vectors of *Tospoviruses*. *Advances in Botanical Research*, 36: 113–140.
- Van Poelwijk F, Kolkman J, Goldbach R, 1996. Sequence analysis of the 5' ends of *Tomato spotted wilt virus* N mRNAs. *Archives of Virology*, 141(1): 177–184.
- Wanzel M, Russ AC, Kleine-Kohlbrecher D, 2008. A ribosomal protein L23-nucleophosmin circuit coordinates Miz1 function with cell growth. *Nature Cell Biology*, 10(9): 1051–1061.
- Wu HJ, Xu W, Lin T, 2015. Cloning and characterization of full-length cDNA sequence of *troponin T* gene from *Monochamus alternatus*. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 44(1): 58–63. [吴华俊, 许雯, 林同, 2015. 松墨天牛肌钙蛋白 T 基因全长 cDNA 克隆及分析. 福建农林大学学报(自然科学版), 44(1): 58–63.]
- Wu QJ, Xu BY, Zhang ZJ, Zhang YJ, Zhu GR, 2007. Distribution and species of thrips in Beijing, Zhejiang, Yunnan region. *China Plant Protection*, 27(1): 32–34. [吴青君, 徐宝云, 张治军, 张友军, 朱国仁, 2007. 京、浙、滇地区植物蓟马种类及其分布调查. 中国植保导刊, 27(1): 32–34.]
- Wu S, Tang L, Zhang X, 2017. A decade of a thrips invasion in China: Lessons learned. *Ecotoxicology*, 27(7): 1032–1038.
- Xu QF, Chen QQ, Zhang JF, 2013. Screening of RBSDV p10 interacting proteins in small brown planthoppers by yeast two hybrid system. *Chinese Journal of Rice Science*, 27(6): 633–638. [徐秋芳, 陈晴晴, 张金凤, 2013. 酵母双杂交筛选灰飞虱体内水稻黑条矮缩病毒 p10 的互作蛋白. 中国水稻科学, 27(6): 633–638.]
- Xu X, Xiong X, Yi S, 2016. The role of ribosomal proteins in the regulation of cell proliferation, tumorigenesis, and genomic integrity. *Science China*, 59(7): 656–672.
- Xu ZY, Zhang ZY, 1989. Biological properties of a Guangdong isolate of *Tomato spotted wilt orthotospovirus* (TSWV). *Acta Phytopathologica Sinica*, 19(4): 198. [许泽永, 张宗义, 1989. 番茄斑萎病毒(TSWV)广州分离物生物学特性研究. 植物病理学报, 19(4): 198.]
- Yao G, 1992. *Tomato spotted wilt orthotospovirus* was identified in Sichuan sun-cured tobacco. *Tobacco Science and Technology*, (4): 2–4. [姚革, 1992. 四川晒烟上发现番茄斑萎病毒. 烟草科技, (4): 2–4.]
- Zhang YJ, Wu QJ, Xu BY, Zhu GR, 2003. The occurrence and damage of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae): A dangerous alien invasive pest in Beijing. *Plant Protection*, 29(4): 58–59. [张友军, 吴青君, 徐宝云, 朱国仁, 2003. 危险性外来入侵生物-西花蓟马在北京发生危害. 植物保护, 29(4): 58–59.]
- Zhang ZJ, Wu QJ, Li F, 2007. Life history of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysan, Thripae), on five different vegetable leaves. *Journal of Application Entomology*, 131(5): 347–354.
- Zhang ZJ, Zhang PJ, Li WD, Zhang JM, Huang F, 2013. De novo transcriptome sequencing in *Frankliniella occidentalis* to identify genes involved in plant virus transmission and insecticide resistance. *Genomics*, 101(5): 296–305.