



蚜虫唾液蛋白研究进展

尚哲明, 刘德广*

(西北农林科技大学植物保护学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 蚜虫属于半翅目蚜科, 多为重要的农业害虫, 通过刺吸式口器吸食植物汁液, 传播病毒, 其爆发常常造成重大经济损失。在漫长的协同进化历程中, 植物建立了高效的防御系统以应对蚜虫威胁。为了克服植物的防御反应, 蚜虫也发展了相应的反制手段, 其中蚜虫在取食过程中分泌的唾液蛋白能调控植物防御反应, 降解植物次生物质, 从而在蚜虫与植物互作中发挥着至关重要的作用。本文综述了蚜虫唾液蛋白的组分鉴定方法和相关蛋白的功能, 并对唾液蛋白在蚜虫防治的应用和今后的研究方向进行了展望。常见的蚜虫唾液蛋白组分的鉴定和分析方法包括唾液蛋白的酶活性分析、唾液蛋白组学分析、唾液腺转录组学和蛋白组学分析等。但这些方法各有利弊, 仅采取一种分析方法不能客观全面地反映蚜虫唾液蛋白分泌谱, 多种技术手段联合分析方可提供更为逼真详实的信息。蚜虫唾液蛋白种类繁多, 可分为解毒酶、保护酶、水解酶、结合功能蛋白以及分类未知的效应蛋白等。蚜虫唾液蛋白功能多样, 能参与唾液鞘的形成, 诱导植物防御反应, 促进蚜虫取食, 提高蚜虫繁殖力等。通过 RNAi 干扰唾液蛋白编码基因会显著改变蚜虫取食行为, 并降低蚜虫存活率、产蚜量和适合度。因此, 唾液蛋白是防控蚜虫的理想靶标。目前, 采用寄主诱导的基因沉默 (host-induced gene silencing, HIGS) 技术已培育了数种靶向唾液蛋白基因的高效抗蚜作物品种, 展示出了良好的应用前景。从目前研究来看, 各种蚜虫唾液蛋白谱急需采用多组学手段联合分析的方法来进行完整解析。各种唾液蛋白的具体功能方面的研究还严重缺乏, 需从蚜虫、植物、两者之间的互作等多维度探究唾液蛋白的作用及相关的分子机制, 为发展基于蚜虫唾液蛋白调控的蚜虫防治新策略打下基础。

关键词: 蚜虫; 唾液蛋白; 唾液蛋白组; 效应蛋白; 寄主防御反应; 绿色防治

中图分类号: Q965 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2019)12-1435-13

Advances in aphid salivary protein research

SHANG Zhe-Ming, LIU De-Guang* (College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Aphids (Hemiptera: Aphididae), a group of important agricultural pests, ingest plant phloem sap and transmit plant viruses with piercing-sucking mouthparts. The outbreak of aphids often causes serious economic losses. In the long history of co-evolution, plants have established effective defense systems against the threat of aphids. In order to overcome these plant defenses, aphids also have developed sophisticated countermeasures. Among them, aphids secrete salivary proteins during the feeding process, which can modulate plant defenses and degrade plant secondary metabolites. Therefore, salivary proteins play a critical role in plant-aphid interactions. In this review, we summarized recent advances in the identification of aphid salivary proteins and the functional research of associated proteins, and brought forward the prospects about application of salivary proteins in aphid control and new

directions for future research. Common methods used to identify and predict aphid salivary proteins include enzymatic activity assay of salivary proteins, proteomic analysis of aphid saliva, and transcriptomic and proteomic analysis of salivary glands. However, these methods all have their own advantages and disadvantages, and individual method may just reveal partial real information of the whole aphid secretome. The combination of different techniques can provide more realistic and detailed information. Aphid salivary proteins can be classified into various categories including detoxifying enzymes, protective enzymes, hydrolases, binding domain proteins, effector proteins of unknown function categories and so on. Aphid salivary proteins have multiple functions, such as participating in salivary sheath formation, inducing or repressing plant defenses, promoting aphid feeding and enhancing aphid fecundity. Silencing aphid salivary protein coding genes via RNAi technology can significantly affect feeding behaviors, and decrease aphid survival rate, fecundity and fitness. Therefore, aphid salivary proteins are ideal targets for manipulation in aphid control. Now, in several crops, some effective aphid-resistant lines, which can target salivary protein coding genes, have been established, via the HIGS (host-induced gene silencing) technique, and they have showed good application prospects. According to the present studies, it is urgent to analyze aphid secretomes with combination of multiple Omic techniques. There is still a serious lack of research on the specific functions of various salivary proteins. It is necessary to explore the functions and related molecular mechanisms of salivary proteins of aphids from multiple dimensions, such as aphids, plants and the interactions between them, so as to lay a foundation for the development of new aphid control strategies based on the regulation of salivary proteins in aphids.

Key words: Aphid; salivary proteins; salivary proteome; effector proteins; host defense response; green control

蚜虫是半翅目 (Hemiptera) 蚜科 (Aphididae) 刺吸式口器昆虫,生活史复杂,表型多样,吸食植物韧皮部汁液,传播植物病毒,是重要的农业害虫。蚜虫在取食时会向植物组织中分泌成分复杂的唾液,润滑、保护和引导口针并调控植物防御反应,使之能够持续进食 (Teixeira *et al.*, 2018)。蚜虫的唾液中含有多种蛋白质,这些蛋白质分属多个不同蛋白家族且功能多样,在蚜虫与寄主植物的相互作用中发挥着至关重要的作用,对蚜虫绿色防控有重要意义。因此,本文对近年来蚜虫唾液蛋白的鉴定方法、唾液蛋白功能以及唾液蛋白在蚜虫防治中的应用等方面的研究进行了综述,并对唾液蛋白在蚜虫防治的应用和今后的研究方向进行了展望。

1 蚜虫唾液的分泌

蚜虫在取食时,从位于头胸部的两对主、副唾液腺分泌唾液 (Ponsen, 1972)。蚜虫唾液是由胶状唾液 (gel saliva) 和水状唾液 (watery saliva) 组成的混合物 (Tjallingii, 2006)。当蚜虫抵达植物表面开始刺探时,胶状唾液即开始分泌。在蚜虫口针抵达植物韧皮部筛管前,其刺探会在植物细胞间隙或者细

胞壁边缘留下一个管状路径通道。在此过程中,胶状唾液会硬化并严密封堵此管状通道,从而形成唾液鞘 (saliva sheath)。唾液鞘有多种功能,可以保护、润滑、指引蚜虫口针 (Will *et al.*, 2012)。在蚜虫刺探过程中,其口针会刺穿前方的一些组织细胞 (如表皮、叶肉细胞等),受胞浆组分 (糖、氨基酸、次生物质等) 和酸碱度的诱导,蚜虫会分泌水状唾液并进行短暂进食,直到胞浆组分不适合取食,然后口针将继续向筛管部位进发 (Tjallingii and Esch, 1993; Tjallingii, 2006)。当口针刺穿维管束细胞到达筛管时,即停止前进,这时蚜虫会持续分泌水状唾液 40 ~ 60 s,并开始持续进食 (Tjallingii and Esch, 1993)。在持续取食过程中,蚜虫会有规律、间断性地分泌水状唾液至口针末端;在那里水状唾液与植物汁液混合,形成的混合物会被摄入蚜虫食窦,这些步骤不断重复直到持续取食阶段结束 (Tjallingii, 2006)。

2 蚜虫唾液蛋白的鉴定方法

唾液蛋白是蚜虫唾液的主要活性成分,其唾液蛋白由一系列功能不同、分子量差异较大的蛋白组

成,其中,许多唾液蛋白具有酶活性(van Bel and Will, 2016)。Cherqui 和 Tjallingii (2000) 分别收集豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum*、桃蚜 *Myzus persicae*、麦二叉蚜 *Schizaphis graminum* 取食后的人工饲料,通过酶比活力测定推断这 3 种蚜虫唾液中均含有酚氧化酶(phenoloxidase)、果胶酶(pectinase)和过氧化物酶(peroxidase)。郭光喜等(2006)采用相同方法收集蚜虫唾液,推测麦长管蚜 *Sitobion avenae* 的唾液中含有果胶酶、多酚氧化酶(polyphenoloxidase)和纤维素酶(cellulase)。

近年来,核酸测序技术与蛋白质组学技术的发展极大地推动了蚜虫唾液蛋白研究。Harmel 等(2008)用液相色谱-串联质谱仪(LC-MS/MS)分析桃蚜取食后的蔗糖溶液(内含蚜虫唾液),发现桃蚜唾液中存在葡萄糖氧化酶(glucose oxidase)、葡萄糖脱氢酶(glucose dehydrogenase)、NADH 脱氢酶(NADH dehydrogenase)、 α -淀粉酶(α -amylase)和 α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase) 5 种蛋白酶。Carlson 等(2009)对豌豆蚜取食后的人工饲料进行蛋白质组学分析(双向电泳和质谱),鉴定到 9 种唾液蛋白,其中 4 种得到了同源注释,分别是血管紧张素转化酶(angiotensin-converting enzyme, ACE)、M1 锌离子依赖型金属蛋白酶(M1 zinc-dependent metalloprotease)、GMC 氧化还原酶[glucose-methanol-choline (GMC)-oxidoreductase]、钙调素(regucalcin),未注释的蛋白中一种表达丰度较高的蛋白被认为参与豌豆蚜唾液鞘形成。Carolan 等(2011)对豌豆蚜的唾液腺进行 cDNA 文库和蛋白组分析,总共预测到 324 个外分泌蛋白。Boulain 等(2018)采用高通量测序技术对豌豆蚜唾液腺进行转录组测序,经预测分析发现 3 603 个蛋白具有信号肽,即该虫可能有 3 603 个唾液蛋白,极大扩展了豌豆蚜唾液蛋白分泌谱。

Atamian 等(2013)通过对马铃薯长管蚜 *Macrosiphum euphorbiae* 唾液腺转录组测序,预测了 163 个唾液蛋白。Chaudhary 等(2015)让马铃薯长管蚜取食含有间二苯酚(可刺激虫体分泌唾液)的蒸馏水,然后收集蚜虫唾液进行质谱分析,通过与蒸馏水及人工饲料所收集的蚜虫唾液蛋白质组学分析结果比较分析,预测了 102 个唾液蛋白。然而,在所预测到的唾液蛋白中半数没有信号肽,这可能与真核生物外分泌蛋白特殊的分泌机制有关。此外,通过收集蚜虫取食后的人工饲料进行质谱分析,在麦双尾蚜 *Diuraphis noxia*、麦二叉蚜、麦长管蚜、麦无网长管蚜 *Metopolophium dirhodum*、巢菜修尾蚜

Megoura viciae 等蚜虫中分别发现 34, 32, 12, 7 和 87 种唾液蛋白(表 1)。

虽然多种技术手段已被用于鉴定预测蚜虫唾液蛋白组成,但是这些方法各有利弊。高通量测序技术的发展极大推动了生物学的发展,由此衍生的转录组测序为非模式昆虫(特别是无参考基因组的昆虫)的研究创造了空前有利的条件(Oppenheim *et al.*, 2015)。蚜虫唾液腺转录组分析是预测蚜虫唾液蛋白组成的一种常用方法,但存在缺陷:(1)该方法通常根据预测的氨基酸序列中是否包含特征信号肽来鉴定唾液蛋白,但是并非所有具备分泌信号肽特征的蛋白都会被蚜虫分泌到植物组织中,并且有些唾液蛋白没有经典的外分泌信号肽序列,因此,该方法预测的唾液蛋白数量会大于实际被分泌到植物组织内的唾液蛋白数量(Chaudhary *et al.*, 2015; Boulain *et al.*, 2018);(2)仅对蚜虫唾液腺进行转录组分析,难以准确鉴定其胶状唾液组分和水状唾液组分,例如豌豆蚜的唾液腺转录组虽经多次分析,但是其胶状唾液组分仍不明确(Carolan *et al.*, 2009, 2011; Boulain *et al.*, 2018);(3)当前主流的高通量测序技术为第二代测序技术,常常会丢失 mRNA 末端信息,导致序列残缺,如麦长管蚜唾液腺转录组测序虽预测 526 个唾液蛋白,但有部分序列开放阅读框残缺(Gao *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017)。从蚜虫的唾液腺中提取蛋白后进行蛋白质组学分析,也是鉴定蚜虫唾液蛋白的常用方法之一,该方法的缺点与唾液腺转录组分析相似,同样容易导致假阳性结果的出现(Carolan *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2018)。对蚜虫取食后的人工饲料进行质谱分析,虽然可以较为客观地反映蚜虫唾液分泌谱,并且可以区分水状唾液和胶状唾液组分(目前仅鉴定桃蚜和马铃薯长管蚜的胶状唾液),但是人工饲料理化性质与蚜虫口针所接触的植物体内微环境相差较大,且该方法花费较高、操作繁琐、样品制备困难,难以检测到低丰度的唾液蛋白,最终导致分析结果假阴性。例如马铃薯长管蚜取食后的人工饲料进行蛋白组学分析虽然发现了 94 个唾液蛋白,但这需收集约 100 000 头蚜虫取食过的饲料,工作量极为惊人(Chaudhary *et al.*, 2014; Boulain *et al.*, 2018)。

唾液蛋白在蚜虫与寄主植物相互作用中发挥关键作用,解析蚜虫唾液蛋白分泌谱是研究“植物-蚜虫”系统互作机制的关键步骤(Zhang *et al.*, 2017)。鉴于预测蚜虫唾液蛋白的方法各有利弊,采用多组学技术和多种手段联合分析蚜虫唾液蛋白组的方法,

表 1 不同蚜虫中唾液蛋白的鉴定方法和数量

Table 1 Identification approaches and numbers of salivary proteins in different aphids

蚜虫种类 Aphid species	鉴定方法 Identification approaches	唾液蛋白数量 Number of salivary proteins	参考文献 References
豌豆蚜 <i>Acyrtosiphon pisum</i>	GE-LC-MS/MS, LC-MS/MS	70 ^a	Carolan <i>et al.</i> , 2009
	GE	9	Cooper <i>et al.</i> , 2011
	RNA-Seq, GE-LC-MS/MS, GE-MALDI-TOF/MS	324	Carolan <i>et al.</i> , 2009
	RNA-Seq	3 603	Boulain <i>et al.</i> , 2018
麦双尾蚜 <i>Diuraphis noxia</i>	RT-PCR	17	Cui <i>et al.</i> , 2012
	GE-LC-MS/MS	34 ^a	Nicholson <i>et al.</i> , 2012
小麦短体蚜 <i>Diuraphis tritici</i>	GE	10 ^a	Cooper <i>et al.</i> , 2011
巢菜修尾蚜 <i>Megoura viciae</i>	LC-ESI-MS/MS	14	Vandermoten <i>et al.</i> , 2014
	MALDI-TOF/MS	61 ^a	
麦无网长管蚜 <i>Metopolophium dirhodum</i>	GE-LC-MS/MS	7 ^a	Rao <i>et al.</i> , 2013
桃蚜 <i>Myzus persicae</i>	GE-LC-MS/MS, LC-MS/MS	80 ^{a, b}	Harmel <i>et al.</i> , 2008
麦二叉蚜 <i>Schizaphis graminum</i>	GE	6 ^a	Cooper <i>et al.</i> , 2011
	LC-MS/MS	32 ^a	Nicholson and Puterka, 2014
麦长管蚜 <i>Stionbion avenae</i>	GE-LC/MS	12 ^a	Rao <i>et al.</i> , 2013
	RNA-Seq	526	Zhang <i>et al.</i> , 2017
马铃薯长管蚜 <i>Macrosiphum euphorbiae</i>	RNA-Seq	163	Atamian <i>et al.</i> , 2013
	LC-MS/MS	102 ^{a, b}	Chaudhary <i>et al.</i> , 2014
	NanoLC-ESI-MS/MS	73 ^a	Chaudhary <i>et al.</i> , 2015
角倍蚜 <i>Schlechtendalia chinensis</i>	LC-MS/MS	155 ^a	Yang <i>et al.</i> , 2018
禾谷缢管蚜 <i>Rhopalosiphum padi</i>	LC-MS/MS	56	Thorpe <i>et al.</i> , 2016
樱桃瘤额蚜 <i>Myzus cerasi</i>	LC-MS/MS	19	Thorpe <i>et al.</i> , 2016

GE: 凝胶电泳 Gel electrophoresis; RT-PCR: 反转录 PCR Reverse transcription PCR; RNA-Seq: 蚜虫唾液腺转录组测序 RNA sequencing analysis of aphid salivary gland; LC: 液相色谱 Liquid chromatography; MS: 质谱 Mass spectrometry; MALDI-TOF: 基质辅助激光解析电离-飞行时间 Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight; NanoLC-ESI: 纳升级液相色谱-电喷雾离子源 Nano liter liquid chromatography electronic spray ion. ^a唾液腺中的蛋白质,部分分泌到唾液中 Proteins in salivary glands, not necessarily secreted in the saliva; ^b从蚜虫人工饲料中获得的非水溶性唾液蛋白残基 Non-soluble saliva fraction from aphids feeding on diet designed to mimic the sieve element environment.

有利于克服采用单一方法和技术的缺陷。例如,褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 是半翅目的一种严重威胁水稻的害虫,和蚜虫相仿,该虫唾液组分包括胶状唾液和水状唾液。Huang 等(2016)采用“鸟枪法”对褐飞虱的胶状唾液和水状唾液进行了蛋白组学分析,结合褐飞虱唾液腺转录组数据和基因组数据,发现了大量在唾液腺特异表达的唾液蛋白,并准确鉴定了其水状唾液和胶状唾液组分。因此,笔者认为,鉴定蚜虫唾液蛋白组成既需要分析蚜虫唾液腺转录组,也有必要收集蚜虫取食后的人工饲料进行蛋白组学分析,将不同技术手段获得的数据相互佐证,可以获得更为详实的蚜虫唾液蛋白分泌谱。近年来,基于单分子实时测序(single molecular real-time sequencing)技术的全长转录组已实现 10 kb 以上的读长,有效避免了第二代测序技术的缺陷,几乎可以完整地保留 mRNA 信息(Gao *et al.*, 2016)。此外,

同位素标记相对和绝对定量蛋白组(isobaric tags for relative and absolute quantification, iTRAQ)技术是一种优于“鸟枪法”蛋白组学的技术,具有高通量、高灵敏度、高重复性的特点(孔汉金等, 2014)。笔者认为,若将这些新技术用于蚜虫唾液蛋白预测鉴定,可获得更为丰富、逼真和完整的信息。

3 蚜虫唾液蛋白功能

在漫长的进化历程中,植物演化出多种防御手段以应对蚜虫取食。面对植物的防御体系,蚜虫也发展了一系列反防御措施,唾液蛋白正是其中之一。蚜虫在取食过程中会分泌多种唾液蛋白到植物组织内,调控植物防御反应,从而持续获得营养物质(Kettles and Kaloshian, 2016; Nalam *et al.*, 2019)。蚜虫唾液,根据其形态可分为胶状状唾液和水状唾

液,不同唾液的蛋白组成不同,功能各异。

3.1 胶状唾液

蚜虫的胶状唾液由主唾液腺分泌,一经脱离口针末端即硬化形成包围口针的唾液鞘(van Bel and Will, 2016; Chaudhary *et al.*, 2019)。蚜虫的胶状唾液含多种唾液蛋白,如在马铃薯长管蚜唾液中发现 7 种唾液蛋白为胶状唾液所特有,44 种唾液蛋白在胶状唾液和水状唾液中均有发现(Chandhary *et al.*, 2014)。研究发现,豌豆蚜鞘蛋白(sheath protein, SHP)ACYPI009881 参与唾液鞘的形成,在麦长管蚜和麦无网长管蚜的唾液中也鉴定到了与 ACYP1009881 同源的鞘蛋白(Carolan *et al.*, 2009, 2011; Rao *et al.*, 2013)。豌豆蚜 SHP 可被其唾液中的其他蛋白催化,形成二硫桥,产生交联的 SHP,最终形成唾液鞘主要结构(Carolan *et al.*, 2011; Will *et al.*, 2012)(表 2)。Will 和 Vilcinskas(2015)发现沉默豌豆蚜 *ApShp* 基因可抑制唾液鞘的形成,导致唾液鞘硬度下降,降低豌豆蚜的氮元素获取能力,表明 SHP 是豌豆蚜唾液鞘的重要成分。在麦长管蚜中 SHP 也发挥重要作用,研究发现,干扰麦长管蚜鞘蛋白编码基因 *SaShp* 可导致麦长管蚜唾液鞘

形状畸形,存活率下降,产蚜量减少(Abdellatef *et al.*, 2015)。这些结果表明 SHP 对维系蚜虫正常取食至关重要。

完整的唾液鞘对胸喙亚目昆虫的取食至关重要。与蚜虫相似,褐飞虱的唾液鞘主要由胶状唾液蛋白构成,干扰其鞘蛋白编码基因 *Nlshp* 和 *NlMulp* 都会导致褐飞虱取食困难,显著降低褐飞虱在抗性水稻品种上的适合度;此外, *NlMulp* 也出现在褐飞虱水状唾液中,参与对水稻免疫反应的调控(Huang *et al.*, 2015, 2016, 2017; Shangguan *et al.*, 2018)。然而,至今仍不清楚蚜虫胶状唾液中的组分是否参与调控寄主植物免疫反应。

3.2 水状唾液

蚜虫水状唾液中含有多种蛋白质,在蚜虫与寄主植物的互作中发挥重要作用(表 2)。研究发现,向寄主植物注射蚜虫取食过的人工饲料或虫体提取物均能引发寄主植物防御反应的上调、蚜虫繁殖力的下降、植物对蚜虫天敌吸引作用的增强等(Lapitan *et al.*, 2007; De Vos and Jander, 2009; Ma *et al.*, 2010; Takemoto and Takabayashi, 2012; Zhang *et al.*, 2017)。

表 2 已知蚜虫唾液效应子蛋白的功能
Table 2 Functions of the known salivary effector proteins in aphids

种名 Species	唾液蛋白 Salivary proteins	唾液蛋白功能 Functions of salivary proteins	参考文献 References
豌豆蚜 <i>Acyrtosiphon pisum</i>	C002	促进蚜虫取食 Facilitating aphid feeding	Mutti <i>et al.</i> , 2008
	ACE1/2	促进蚜虫取食 Facilitating aphid feeding	Wang <i>et al.</i> , 2015b
	Armet	促进蚜虫取食 Facilitating aphid feeding	Wang <i>et al.</i> , 2015a
	ACYPI009881	参与形成唾液鞘 Participating in formation of saliva sheath	Carolan <i>et al.</i> , 2009, 2011; Will <i>et al.</i> , 2015
	ACYPI139568	促进蚜虫取食 Facilitating aphid feeding	Guo <i>et al.</i> , 2014
	ACYPI006346	促进蚜虫取食 Facilitating aphid feeding	Pan <i>et al.</i> , 2015
桃蚜 <i>Myzus persicae</i>	MpC002	提高蚜虫繁殖力 Increasing aphid fecundity	Bos <i>et al.</i> , 2010
	Mp1/2	提高蚜虫繁殖力 Increasing aphid fecundity	Pitino and Hogenhout, 2013
	Mp10	引起寄主植物防御反应 Triggering host plant defense	Bos <i>et al.</i> , 2010
	Mp42	引起寄主植物防御反应 Triggering host plant defense	Bos <i>et al.</i> , 2010
	Mp55	抑制寄主植物防御 Suppressing host plant defense	Elzinga <i>et al.</i> , 2014
	MIF1	抑制寄主植物免疫反应 Repressing host plant immune response	Naessens <i>et al.</i> , 2015
马铃薯长管蚜 <i>Macrosiphum euphorbiae</i>	Me10	提高蚜虫繁殖力 Increasing aphid fecundity	Atamian <i>et al.</i> , 2013
	Me23	提高蚜虫繁殖力 Increasing aphid fecundity	Atamian <i>et al.</i> , 2013
	Me47	调控寄主植物防御反应 Modulating host plant defense response	Kettles and Kaloshian, 2016
麦长管蚜 <i>Sitobion avenae</i>	SaC002	促进蚜虫取食 Facilitating aphid feeding	李雪峰等, 2014
	SaLac1	适应抗性小麦 Adaption to resistant wheat	Zhang <i>et al.</i> , 2018
禾谷缢管蚜 <i>Rhopalosiphum padi</i>	RpC002	提高蚜虫繁殖力	Escudero-Martinez <i>et al.</i> , 2019
	Rp1	Increasing aphid fecundity	

3.2.1 保护酶与解毒酶:蚜虫取食对植物合成有毒次生物质有诱导作用。为了克服植物的防御,蚜虫进化出了抑制植物防御和分解植物有毒次生物质的能力,其唾液具有这样的功能 (Kettles and Kaloshian, 2016)。目前,已对豌豆蚜、桃蚜、和马铃薯

薯长管蚜等蚜虫的唾液蛋白开展系统研究,在这 3 种蚜虫唾液中均检测到了多酚氧化酶、过氧化物酶和氧化还原酶(oxidoreductase)(表 3)。这些氧化还原酶可能有助于蚜虫代谢来自寄主植物的有毒次生物质或抑制活性氧的产生。

表 3 3 种蚜虫唾液蛋白组成和数量
Table 3 Composition and number of salivary proteins in three aphids

唾液蛋白 Salivary proteins		豌豆蚜 <i>Acyrtosiphon pisum</i>	马铃薯长管蚜 <i>Macrosiphum euphorbiae</i>	桃蚜 <i>Myzus persicae</i>
酶类 Enzyme	细胞色素 P450 单加氧酶	9	1	7
	Cytochrome P450 monooxygenase			
	酯酶 Esterase	27	1	9
	葡萄糖脱氢酶 Glucose dehydrogenase	16	4	5
	谷胱甘肽-S-转移酶 Glutathione-S-transferase	5	1	17
	过氧化物酶 Peroxidase	20	2	18
	尿苷二磷酸葡萄糖转移酶 UDP-glucuronosyltransferase	5	–	5
	血管紧张素转换酶 Angiotensin-converting enzyme	3	–	3
	金属蛋白酶 Metalloproteinase	8	1	3
	β-葡萄糖醛酸酶 β-Glucuronidase	1	–	–
	羧肽酶 Carboxypeptidase	13	–	3
	组织蛋白酶 Cathepsin	23	–	7
	氨肽酶 N Aminopeptidase-N	47	–	5
	脂肪酶 Lipase	37	2	8
	麦芽糖酶 Maltase	10	1	1
	丝氨酸蛋白酶 Serine protease	15	–	3
	海藻糖酶 Trehalase	4	2	1
	半胱氨酸富集蛋白 Cysteine-rich protein	12	–	–
	钙离子结合蛋白 Calcium binding protein	21	1	23
	气味结合/感受蛋白 Odorant binding/sensory protein	16	–	6
	锌指蛋白 Zinc finger protein	73	1	27
	巨噬细胞转移抑制因子 Macrophage migration inhibitory factor	1	1	1
	表皮蛋白 Cuticle protein	59	1	15

本表所列的蚜虫唾液蛋白种类都来自相应的唾液腺转录组数据。Salivary gland transcriptomes of corresponding aphid species were used to identify different categories of aphid salivary proteins listed in this table.

漆酶(laccase)是昆虫中广泛存在的一种酚氧化酶,该酶可氧化多种酚类物质(Wang *et al.*, 2018)。研究发现,麦长管蚜唾液腺特异表达 1 型漆酶编码基因 *Lac1*,干扰该基因导致麦长管蚜在富含酚类物质的抗性小麦 *Triticum aestivum* 上的存活率显著下降,表明 SaLac1 可能参与该虫对小麦中次生物质的代谢,在麦长管蚜的取食中发挥重要作用(Zhang *et al.*, 2018)。在烟粉虱 *Bemisia tabaci* MED 隐种的唾液中也含有同源的漆酶,干扰其编码基因 *LAC1* 导致烟粉虱在寄主植物上的存活率显著下降(Yang *et al.*, 2017)。这些结果表明,漆酶作为多铜氧化酶家

族的一员,在半翅目胸喙亚目昆虫与植物的互作中可能发挥着普遍而重要的作用。

蚜虫的唾液中含有谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-transferase, GST)(表 3),该酶通常参与蚜虫解毒代谢(Huang *et al.*, 2018)。研究发现,马铃薯长管蚜的唾液蛋白 Me47 属于 GST 家族,在番茄 *Solanum lycopersicum* 中表达 Me47 可显著提高马铃薯长管蚜的繁殖力,在本生烟中表达 Me47 也能提高桃蚜的繁殖力,然而,在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中表达 Me47 却显著降低了桃蚜的繁殖力,表明 Me47 是一种寄主依赖型效应蛋白(Kettles and

Kaloshian, 2016)。

此外,在多种蚜虫的唾液中也鉴定到谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase)、细胞色素 P450 单加氧酶(cytochrome P450 monooxygenase)、尿苷二磷酸葡萄糖转移酶(UDP-glucuronosyltransferase, UGT)等解毒酶(表3),这些解毒酶可能与蚜虫代谢寄主植物次生物质有关,也可能在蚜虫与寄主植物互作中发挥效应蛋白的作用(Carolan *et al.*, 2011; Chaudhary *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017)。

3.2.2 蛋白水解酶:鉴于蚜虫的消化道中存在蛋白水解酶,人们推测蚜虫的唾液中可能含有多种蛋白水解酶。研究发现,豌豆蚜唾液中含有 M2 金属蛋白酶(M2 metalloprotease),该蛋白酶又叫血管紧张素转换酶(angiotensin-converting enzyme, ACE),是一种锌离子金属蛋白酶;其基因 *ApACE1* 与 *ApACE2* 在豌豆蚜唾液腺中的相对表达量显著高于其他组织中的表达量,干扰 *ACE1* 和 *ACE2* 能显著降低豌豆蚜在蚕豆 *Vicia faba* 上的存活率,并导致其在蚕豆上的刺探时间和被动取食时间显著延长,表明 *ApACE* 是一类效应蛋白,在豌豆蚜取食中发挥重要作用(Carolan *et al.*, 2009, 2011; Wang *et al.*, 2015b)。金属蛋白酶并非为豌豆蚜所特有,在麦长管蚜的唾液腺转录组中也发现有与豌豆蚜 *ApACE* 同源的唾液蛋白(Zhang *et al.*, 2017)。此外,蚜虫唾液中还含有胰蛋白酶(trypsin)、组织蛋白酶(cathepsin)、丝氨酸蛋白酶(serine protease)等,可识别不同的氨基酸作用位点,具有不同的蛋白水解活性,功能上可能互为补充(表3)。

蚜虫唾液的蛋白水解活性已在豌豆蚜和马铃薯长管蚜中得到验证。Furch 等(2015)分别将豌豆蚜和马铃薯长管蚜的唾液与南瓜 *Cucurbita maxima* 的筛管蛋白(phloem protein)混合孵育,发现筛管蛋白被降解,表明蚜虫唾液的蛋白酶活性有助于扰乱寄主植物防御,增加额外的氨基酸摄入。

3.2.3 钙离子结合蛋白:蚜虫取食植物能引发包括胼胝质沉积等在内的多种防御反应(Nalam *et al.*, 2019)。植物筛管胼胝质沉积会导致筛管阻塞以及蚜虫取食中断,这一过程与植物细胞质和液泡膜间的钙离子流动有关(Vincent *et al.*, 2017)。Will 等(2007)发现,巢菜修尾蚜 *Megoura viciae* 的唾液可阻止蚕豆叶片中人工诱导的筛管阻塞反应,使之能够持续进食;钙同位素离子标记蛋白免疫印迹试验表明,巢菜修尾蚜的唾液蛋白具备钙离子结合结构域。这些结果表明,巢菜修尾蚜可以通过唾液蛋白和钙

离子的相互作用阻止植物筛管阻塞反应。后续研究表明,蚜虫的唾液普遍具备阻止胼胝质沉积的作用(Will *et al.*, 2009)。

豌豆蚜能分泌唾液蛋白 Armet (arginine-rich, mutated in early stage of tumors),该蛋白富含精氨酸,有两个钙离子结合结构域。对豌豆蚜 Armet 基因 *ApArmet* 进行基因干扰,导致豌豆蚜在蚕豆的韧皮部取食时间显著缩短、水状唾液分泌频率变高、路径刺探时间延长;将 *ApArmet* 蛋白在本生烟 *Nicotiana benthamiana* 中表达,发现转基因植物的许多抗病信号通路被激活,导致水杨酸积累(Carolan *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2015a; Cui *et al.*, 2019)。这些结果表明,*ApArmet* 是一种效应蛋白。此外,在棉蚜 *Aphis gossypii* 唾液中也预测到了 Armet 蛋白 *AgArmet*,其表达量在不同生物型间没有差异,但是在寄主转换前后有显著差异,表明该蛋白在棉蚜与其寄主植物的互作中可能有重要作用(任柯昱等, 2018a)。

3.2.4 效应蛋白:部分蚜虫唾液蛋白中在现有数据库中无法检索到同源蛋白,但是这些唾液蛋白对蚜虫的取食至关重要,对寄主植物的形态结构和生理生化过程都会产生影响,故仍将之划分为效应蛋白(Hogenhout *et al.*, 2009; Elzinga *et al.*, 2013)。豌豆蚜唾液蛋白 *ApC002* 是蚜虫中第一个被鉴定的效应蛋白。Mutti 等(2006)发现豌豆蚜唾液蛋白编码基因 *ApC002* 有极高的表达丰度,而且该序列为蚜虫所特有。干扰 *ApC002* 会导致饲养在蚕豆植株上的蚜虫个体死亡,但不影响豌豆蚜在人工饲料上的存活率。后续的研究发现,在豌豆蚜取食后的蚕豆叶片中与人工饲料中均发现唾液蛋白 *ApC002*,表明豌豆蚜在取食时会将该蛋白分泌到寄主植物中;昆虫刺探电位图谱试验结果表明,干扰 *ApC002* 能显著缩短豌豆蚜在韧皮部的取食时间,导致其进食困难而死亡(Mutti *et al.*, 2008; Carolan *et al.*, 2009)。上述结果表明,唾液蛋白 *ApC002* 在豌豆蚜取食过程中发挥着重要作用。

在其他蚜虫的唾液蛋白中,也相继发现了与 *C002* 直系同源的蛋白编码基因,如桃蚜的 *MpC002* (Bos *et al.*, 2010)、麦二叉蚜 *SgC002* (Zhang *et al.*, 2015)、麦长管蚜 *SavC002* (李雪峰等, 2014)、棉蚜 *AgoC002* (任柯昱等, 2018b)、禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi RpC002* (Escudero-Martinez *et al.*, 2019)。系统发育分析表明,该蛋白只存在于蚜科昆虫中,不属于任何已知蛋白家族。然而,不同种蚜

虫的 C002 虽然特征序列高度保守,有较高的同源性,但功能并不完全相同。例如,与野生型相比,桃蚜在表达 *MpC002* 的转基因拟南芥上有更高的繁殖力,而在表达豌豆蚜 *ApC002* 的转基因拟南芥上其繁殖力并没有显著提高 (Pitino and Hogenhout, 2013)。然而,至今仍不清楚 C002 蛋白在植物中的靶标以及怎样调控植物防御反应。

除 C002 外,蚜虫唾液中为数众多的效应蛋白都对寄主植物防御反应有影响。如 De Vos 和 Jander (2009) 发现向拟南芥叶片注射桃蚜唾液,诱导产生的局部抗性与桃蚜取食导致的局部抗性相似。后续研究发现,在本生烟中过表达桃蚜的 *Mp10* 和 *Mp42*,可导致叶片萎黄、局部细胞坏死,降低取食转基因植株上桃蚜繁殖力,表明这两种唾液蛋白引发了寄主植物的免疫防御反应;其中 *Mp10* 具备经典化学感受蛋白 (chemosensory protein, CSP) 的结构域,而 *Mp42* 不属于任何已知蛋白家族 (Bos *et al.*, 2010)。*Mp10* 与 *Mp42* 都能被分泌到植物组织中,然而,二者在植物细胞中的定位不同,二者可能通过不同的信号通路和寄主植物发生互作 (Rodriguez *et al.*, 2014)。在本生烟中和拟南芥中,唾液蛋白 *Mp10* 会被分泌到植物细胞质中,能抑制由细菌鞭毛蛋白 *flg22* 诱导或蚜虫取食诱导产生的活性氧,对植物防御呈现一定的负调控 (Bos *et al.*, 2010; Mugford *et al.*, 2016)。此外,也有研究发现,*Mp10* 与 *Mp42* 在感染马铃薯卷叶病毒 (potato leafroll virus, PLRV) 的桃蚜唾液腺中的表达量显著低于对照,表明 *Mp10* 与 *Mp42* 可能协助桃蚜传播 PLRV (刘英杰, 2017)。

蚜虫唾液中的部分效应蛋白,如桃蚜的 *Mp1*, *Mp2*, *Mp55* 和 *MpMIIF1* 够抑制寄主植物的防御反应,有利于桃蚜在寄主植物上取食繁殖 (Pitino *et al.*, 2011; Pitino and Hogenhout, 2013; Elzinga *et al.*, 2014; Naessens *et al.*, 2015)。然而,蚜虫效应蛋白与寄主植物的互作机制多数仍然未知,仅发现 *Mp1* 在取食过程中被分泌到植物组织内且集中在唾液鞘内,在蚜虫口针刺探过程中包围着口针,液泡蛋白分选关联蛋白 52 (vacuolar protein sorting associated protein 52, VPS52) 是 *Mp1* 在植物组织内的作用靶标 (Mugford *et al.*, 2016; Rodriguez *et al.*, 2017)。马铃薯长管蚜唾液中也存在功能类似的效应蛋白。研究发现,马铃薯长管蚜唾液蛋白 *Me10* 和 *Me23* 有抑制寄主植物防御和提高蚜虫繁殖力的功能,然而,其他物种中的同源序列尚未报道

(Atamian *et al.*, 2013)。免疫共沉淀和酵母双杂试验表明,番茄 TFT7 是马铃薯长管蚜 *Me10* 及棉蚜同源蛋白 *Ag10k* 的作用靶标;双分子荧光互补试验表明, *Me10* 与 TFT7 的互作发生在细胞质中 (Chaudhary *et al.*, 2019)。此外,亦有研究表明,番茄的体细胞胚胎受体激酶 (somatic embryogenesis receptor kinases, SERKs) 和抗性基因 *Mi-1.2* 参与对马铃薯长管蚜唾液蛋白效应子的识别 (Peng *et al.*, 2016)。

蚜虫的唾液中含有种类众多的蛋白质,除上述几类蛋白外,在蚜虫的唾液腺转录组中还鉴定到了麦芽糖酶 (maltase)、海藻糖酶 (trehalase)、葡萄糖氧化酶 (glucose oxidase)、葡萄糖脱氢酶 (glucose dehydrogenase)、脂肪酶 (lipase)、组织蛋白酶、气味结合蛋白 (odorant binding protein)、化学感受蛋白、表皮蛋白等 (cuticle protein) (表 3)。虽然这些唾液蛋白的具体功能尚未明确,但是多数蛋白是外分泌蛋白,功能可能存在冗余,可能在蚜虫取食的不同阶段分别或协同发挥作用。

4 蚜虫唾液蛋白的基因表达模式及在防治中的应用

4.1 蚜虫唾液蛋白基因表达模式

蚜虫以植物为食,寄主植物的变化常常会给蚜虫造成选择压力 (Dres and Mallet, 2002)。为了更好地适应环境,蚜虫会进行寄主转换以便找到合适的食物和栖境 (Cui *et al.*, 2017)。然而,不同寄主植物的营养水平、物理结构和防御体系均存在差异,因此,蚜虫的寄主转换过程涉及许多基因,唾液蛋白编码基因也是其中之一 (Simon and Peccoud, 2018)。将饲养在蚕豆上的豌豆蚜分别转移到长毛野豌豆 *Vicia villosa*、蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula*、紫花苜蓿 *Medicago sativa* 上仅 5 h, 30 个唾液蛋白基因即发生差异表达,这些差异表达基因可编码热激蛋白、细胞色素 P450 单加氧酶、碱性磷酸酯酶 (alkaline phosphatase) 等唾液蛋白 (Lu *et al.*, 2016)。桃粉蚜 *Haylopterus persikonis* 在不同季节的寄主植物不同,该虫在夏寄主与冬寄主上群体间有 110 个唾液蛋白编码基因存在差异表达,这些唾液蛋白包括解毒酶、抗氧化酶、钙调素、鞘蛋白、葡萄糖脱氢酶等 (Cui *et al.*, 2017)。

多数蚜虫是寡食性,寄主植物构成了蚜虫独有的栖境,因此,寄主植物营养质量和防御的改变常常

会给蚜虫种群带来较大的选择压力,从而驱动适应新寄主种群的发生,即产生新的生物型(Simon and Peccoud, 2018)。同种蚜虫不同生物型间唾液蛋白基因表达谱存在差异,研究发现,取食蚕豆的豌豆蚜不同生物型间,其唾液蛋白表达谱存在显著差异,这种差异可能驱动豌豆蚜产生寄主型分化,形成生物型(Jaquiéry *et al.*, 2012; Eyres *et al.*, 2016; Nouhaud *et al.*, 2018)。麦双尾蚜和麦二叉蚜也存在适应特性小麦品种的生物型,研究发现,饲养在同一小麦品种上的麦双尾蚜不同生物型间存在 14 个差异表达的唾液蛋白,而取食同种小麦的麦二叉蚜不同生物型间仅有 6 个差异表达的唾液蛋白(Nicholson *et al.*, 2012; Nicholson and Puterka, 2014)。

取食同种植物不同抗性品种的蚜虫,其唾液蛋白表达模式也不一样。研究发现,饲养在抗性大豆 *Glycine max* 品系上的大豆蚜 *Aphis glycinivore* 相比饲养在普通大豆上的大豆蚜,有 6 个唾液蛋白基因表达量显著下调,包括锌离子金属蛋白酶、钙调素、海藻糖酶、二硫化物异构酶(disulfide isomerase)基因等(Bansal *et al.*, 2014)。与之相似,取食抗虫小麦的麦长管蚜比取食感虫小麦的麦长管蚜的唾液蛋白基因 *Lac1* 表达量显著上升(Zhang *et al.*, 2018)。

4.2 蚜虫唾液蛋白在防控中的应用

蚜虫是分布广泛的重要农业害虫,其暴发经常会造成重大经济损失。虽然有多种防治方法可供选择,杀虫剂仍是当前主要的蚜虫防治手段,然而,杀虫剂的过度使用带来了一系列问题,包括产生抗药品系蚜虫、杀伤非靶标生物(特别是天敌和其他有益生物)、环境污染等(Yu *et al.*, 2016)。大量研究表明,基于 RNAi 的防治技术有助于解决这些问题,如寄主诱导的基因沉默(host-induced gene silencing, HIGS)具有防治效果好、靶标特异性强和对环境友好的优势,该方法有望替代问题日益突出的化学防治手段和效果不稳定的生防措施(Liu *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2019)。

运用 HIGS 防控蚜虫,鉴定高效的 RNAi 靶标是首要任务(Bhatia and Bhattacharya, 2018)。目前,豌豆蚜、桃蚜和马铃薯长管蚜中已有部分唾液蛋白功能获得解析,这些分属不同蛋白家族,对蚜虫的取食都有不可或缺的作用。大量研究表明, RNAi 技术对蚜虫的唾液蛋白编码基因有较好的干扰效果,并且干扰唾液蛋白相关基因常常导致蚜虫适合度下降(Yu *et al.*, 2016)。例如, Pitino 等(2011)率先构建

了可介导桃蚜唾液蛋白基因沉默的转基因拟南芥和转基因本生烟,转基因植物的叶片中含有大量靶向桃蚜 *MpC002* 的 dsRNA,在转基因拟南芥和转基因本生烟上生活的桃蚜的 *MpC002* 表达水平和繁殖力均显著降低。后续的研究表明,桃蚜离开转基因植物以后,这种由寄主植物介导的 RNAi 效果仍持续 6 d,并且呈现出明显的 RNAi 传代效应;田间试验表明,转基因拟南芥上的桃蚜种群下降了 60%,呈现出理想的防治效果(Coleman *et al.*, 2015)。Abdellatef 等(2015)培育了靶向麦长管蚜鞘蛋白基因 *SaShp* 的 RNAi 转基因大麦 *Hordeum vulgare*,发现与取食野生型的大麦的蚜虫相比,在该转基因大麦上生活的麦长管蚜 *SaShp* 基因表达水平、存活率和繁殖力显著下降;将转基因植株上的麦长管蚜转移到野生型大麦之后,其后代发育历期变长、有翅蚜率显著上升,并且这种对麦蚜的不利影响持续了 7 代,表明该转基因大麦对麦长管蚜有较好的防控效果。

此外,蚜虫的许多唾液蛋白为蚜科昆虫所特有,不同蚜虫间一些唾液蛋白基因较为保守,因此,可以针对唾液蛋白编码基因的保守序列设计干扰载体,进行 HIGS,既可以避免杀伤非靶标生物,又可以保证植物对多种蚜虫的抗性(Abdellatef *et al.*, 2015; van Bel and Will, 2016)。可见,蚜虫唾液蛋白是理想的防治靶标。随着蚜虫唾液蛋白研究的深入,必将为培育寄主介导的 RNAi 抗蚜虫植物提供更多的理想靶标,这将有助于实现蚜虫绿色防控。

5 小结与展望

迄今为止,只有少数几种蚜虫的唾液蛋白分泌谱被详细解析,如豌豆蚜、桃蚜、马铃薯长管蚜等,这些蚜虫的唾液蛋白谱呈现一定的物种特异性(表 1)。其他严重威胁农业生产的蚜虫的唾液蛋白分泌谱仍有待深入解析,这些蚜虫包括棉蚜、麦二叉蚜、大豆蚜等。即使是已有详细唾液蛋白分泌谱的蚜虫,仅少数几种唾液蛋白的功能得到解析,绝大多数唾液蛋白功能仍然未知。以豌豆蚜为例,其唾液蛋白 ApC002, ApMIF1, ApArmet, ApACE1/2 和 ACYPI009881 等在豌豆蚜取食中的功能已基本清楚(van Bel and Will, 2016),但是这些唾液蛋白在豌豆蚜与各种寄主如蚕豆互作中的作用等仍有待深入研究。

利用植物表达系统,在植物中表达蚜虫唾液蛋白,是研究唾液蛋白功能的有效手段(Guy *et al.*,

2016)。目前,在经典的模式植物(拟南芥和本生烟)中已建立了完善的土壤农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 转染体系,因此,可在拟南芥或本生烟中稳定表达蚜虫唾液蛋白。利用这两种经典的模式植物,通过土壤农杆菌介导法在寄主植物中表达唾液蛋白,桃蚜和马铃薯长管蚜的数个唾液蛋白在“蚜虫-植物”互作中的机制已获得一定程度的解析。然而,土壤农杆菌侵染法的效率并不稳定,取决于所用农杆菌的株系和植物品种,其他重要或重大农作物(如小麦)中还没有建立上述技术体系(Wroblewski *et al.*, 2005; Guy *et al.*, 2016)。因此,在各种重要(或重大)农作物中建立上述技术体系以深入探讨唾液蛋白在“蚜虫-植物”互作中的具体功能,并阐明相关的分子机制,是相关领域的重要研究方向和前沿课题。

Xu 等(2019)通过在烟草中瞬时表达烟粉虱效应蛋白,发现唾液蛋白 Bt56 有助于提高烟粉虱的产卵量;接着,运用 qPCR 技术、荧光原位杂交、蛋白免疫印迹、荧光免疫发现该蛋白主要在唾液腺表达并可分泌到植物内;然后,对该基因进行干扰,发现对烟粉虱取食行为和取食诱导的植物防御反应有显著影响;通过酵母双杂交、蛋白互作、双分子荧光互补试验,最终确认烟草的 NTH202 转录因子为唾液蛋白 Bt56 的作用靶标。烟粉虱与蚜虫同属半翅目昆虫,植物对不同半翅目昆虫的取食可能有着相近的应答模式。因此,烟粉虱唾液蛋白的研究思路值得参考借鉴。对蚜虫唾液蛋白功能的探索是昆虫学与植物学研究的交叉领域,还可借鉴植物病理学中的病原菌效应子和寄主植物互作的研究方法,同时从蚜虫的角度和植物的角度探究问题,多角度揭示蚜虫唾液蛋白在蚜虫-寄主植物互作中的功能。这将推动新型转基因抗虫植物的培育,有助于发展化学防治的绿色替代手段,对农业的可持续发展具有重要意义。

参考文献 (References)

Abdellatif E, Will T, Koch A, Imani J, Vilcinskas A, Kogel KH, 2015. Silencing the expression of the salivary sheath protein causes transgenerational feeding suppression in the aphid *Sitobion avenae*. *Plant Biotechnol. J.*, 13(6): 849–857.

Atamian HS, Chaudhary R, Cin VD, Bao E, Grike T, Kaloshian I, 2013. In planta expression or delivery of potato aphid *Macrosiphum euphorbiae* effectors Me10 and Me23 enhances aphid fecundity. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 26(1): 67–74.

Bansal R, Mian MAR, Mittapalli O, Michel AP, 2014. RNA-Seq

reveals a xenobiotic stress response in the soybean aphid, *Aphis glycines*, when fed aphid-resistant soybean. *BMC Genomics*, 15(1): 972.

Bhatia V, Bhattacharya R, 2018. Host-mediated RNA interference targeting a cuticular protein gene impaired fecundity in the green peach aphid *Myzus persicae*. *Pest Manag. Sci.*, 74(9): 2059–2068.

Bos JIB, Prince D, Pitino M, Maffei ME, Win J, Hogenhout SA, 2010. A functional genomics approach identifies candidate effectors from the aphid species *Myzus persicae* (green peach aphid). *PLoS Genet.*, 6(11): e1001216.

Boulain H, Legeai F, Guy E, Morlière S, Douglas NE, Oh J, Murugan, Smith M, Jaquiere J, Peccoud J, White FF, Carolan JC, Simon JC, Sugio A, 2018. Fast evolution and lineage-specific gene family expansions of aphid salivary effectors driven by interactions with host-plants. *Genome Biol. Evol.*, 10(6): 1554–1572.

Carolan JC, Caragea D, Reardon KT, Mutti NS, Dittmer N, Pappan K, Cui F, Castaneto M, Poulain J, Dossat C, Tagu D, Reese JC, Reeck GR, Wilkinson TL, Edwards OR, 2011. Predicted effector molecules in the salivary secretome of the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*): a dual transcriptomic/proteomic approach. *J. Proteome Res.*, 10(4): 1505–1518.

Carolan JC, Fitzroy CIJ, Ashton PD, Douglas AE, Wilkinson TL, 2009. The secreted salivary proteome of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* characterised by mass spectrometry. *Proteomics*, 9(9): 2457–2467.

Chaudhary R, Atamian HS, Shen Z, Briggs P, Kaloshian I, 2015. Potato aphid salivary proteome: enhanced salivation using resorcinol and identification of aphid phosphoproteins. *J. Proteome Res.*, 14(4): 1762–1778.

Chaudhary R, Atamian HS, Shen Z, Briggs SP, Kaloshian I, 2014. GroEL from the endosymbiont *Buchnera aphidicola* betrays the aphid by triggering plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111(24): 8919–8924.

Chaudhary R, Peng HC, He J, MacWilliams J, Teixeira M, Tsuchiya T, Chesnais Q, Mudgett MB, Kaloshian I, 2019. Aphid effector Me10 interacts with tomato TFT 7, a 14-3-3 isoform involved in aphid resistance. *New Phytol.*, 221(3): 1518–1528.

Cherqui A, Tjallingii WF, 2000. Salivary proteins of aphids, a pilot study on identification, separation and immunolocalisation. *J. Insect Physiol.*, 46(8): 1177–1186.

Coleman AD, Wouters RHM, Mugford ST, Hogenhout SA, 2015. Persistence and transgenerational effect of plant-mediated RNAi in aphids. *J. Exp. Bot.*, 66(2): 541–548.

Cooper WR, Dillwith JW, Puterka GJ, 2011. Comparisons of salivary proteins from five aphid (Hemiptera: Aphididae) species. *Environm. Entomol.*, 40(1): 151–156.

Cui F, Michael Smith C, Reese J, Edwards O, Reeck G, 2012. Polymorphisms in salivary-gland transcripts of Russian wheat aphid biotypes 1 and 2. *Insect Sci.*, 19(4): 429–440.

Cui N, Lu H, Wang TZ, Zhang WH, Kang L, Cui F, 2019. Armet, an aphid effector protein, induces pathogen resistance in plants by

- promoting the accumulation of salicylic acid. *Philos. Trans. R. Soc. B*, 374(1767): 20180314.
- Cui N, Yang PC, Guo K, Kang L, Cui F, 2017. Large-scale gene expression reveals different adaptations of *Hyalopterus persikonus* to winter and summer host plants. *Insect Sci.*, 24(3): 431–442.
- De Vos M, Jander G, 2009. *Myzus persicae* (green peach aphid) salivary components induce defence responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.*, 32(11): 1548–1560.
- Dres M, Mallet J, 2002. Host races in plant-feeding insects and their importance in sympatric speciation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B*, 357(1420): 471–492.
- Elzinga DA, De Vos M, Jander G, 2014. Suppression of plant defenses by a *Myzus persicae* (green peach aphid) salivary effector protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 27(7): 747–756.
- Escudero-Martinez C, Rodriguez P, Santos P, Jennifer S, Jorunn IBB, 2019. A cereal aphid effector promotes barley susceptibility in a species-specific manner through suppression of defence gene expression. *bioRxiv*, 2019(7): 639476.
- Eyres I, Jaquière J, Sugio A, Duvaux L, Gharbi K, Zhou JJ, Legeai F, Nelson M, Simon JC, Smadja CM, Butlin R, Ferrari J, 2016. Differential gene expression according to race and host plant in the pea aphid. *Mol. Ecol.*, 25(17): 4197–4215.
- Furch ACU, van Bel AJE, Will T, 2015. Aphid salivary proteases are capable of degrading sieve-tube proteins. *J. Exp. Bot.*, 66(2): 533.
- Gao S, Ren YP, Sun Y, Wu ZF, Ruan JH, He BJ, Zhang T, Yu X, Tian XX, Bu WJ, 2016. PacBio full-length transcriptome profiling of insect mitochondrial gene expression. *RNA Biol.*, 13(9): 820–825.
- Guo GX, Liu Y, Yang JJ, Ma XZ, 2006. Identification, activity and function determination of several salivary enzymes secreted by *Macrosiphum avenae*. *Acta Entomol. Sin.*, 49(5): 768–774. [郭光喜, 刘勇, 杨景娟, 马向真, 2006. 麦长管蚜唾液中几种酶的鉴定、活力测定与功能分析. 昆虫学报, 49(5): 768–774]
- Guo K, Wang W, Luo L, Chen J, Guo Y, Cui F, 2014. Characterization of an aphid-specific, cysteine-rich protein enriched in salivary glands. *Biophys. Chem.*, 189: 25–32.
- Guy E, Boulain H, Aigu Y, Pennec CL, Chawki K, Morliere S, Kunert G, Siomon JC, Suigo A, 2016. Optimization of agroinfiltration in *Pisum sativum* provides a new tool for studying the salivary protein functions in the pea aphid complex. *Front. Plant Sci.*, 7: 1171.
- Harmel N, Létocart E, Cherqui A, Giordanengo P, Mazzucchelli, Guillonnet F, Pauw ED, Haubruge E, Francis F, 2008. Identification of aphid salivary proteins: a proteomic investigation of *Myzus persicae*. *Insect Mol. Biol.*, 17(2): 165–174.
- Hogenhout SA, Van der Hoorn RAL, Terauchi R, Kamoun S, 2009. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 22(2): 115–122.
- Huang HJ, Liu CW, Cai YF, Zhang MZ, Bao YY, Zhang CX, 2015. A salivary sheath protein essential for the interaction of the brown planthopper with rice plants. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 66: 77–87.
- Huang HJ, Liu CW, Huang XH, Zhou X, Zhou JC, Zhang CX, 2016. Screening and functional analyses of *Nilaparvata lugens* salivary proteome. *J. Proteome Res.*, 15(6): 1883–1896.
- Huang HJ, Liu CW, Xu HJ, Bao YY, Zhang CX, 2017. Mucin-like protein, a saliva component involved in brown planthopper virulence and host adaptation. *J. Insect Physiol.*, 98: 223–230.
- Huang XL, Liu DG, Zhang RF, Shi XQ, 2018. Transcriptional responses in defense-related genes of *Sitobion avenae* (Hemiptera: aphididae) feeding on wheat and barley. *J. Econ. Entomol.*, 112(1): 382–395.
- Jaquière J, Stoeckel S, Nouhaud P, Mieuzet L, Mahéo F, Legeai F, Bernard N, Bonvoisin A, Vitalis R, Simon JC, 2012. Genome scans reveal candidate regions involved in the adaptation to host plant in the pea aphid complex. *Mol. Ecol.*, 21(21): 5251–5264.
- Kettles GJ, Kaloshian I, 2016. The potato aphid salivary effector Me47 is a glutathione-S-transferase involved in modifying plant responses to aphid infestation. *Front. Plant Sci.*, 7: 1142.
- Kong HJ, Zhang KS, Liu YJ, Shang YJ, Wu B, Liu XT, 2014. Advances in isobaric tags for relative and absolute quantitation techniques research. *Lett. Biotechnol.*, 25(2): 295–300. [孔汉金, 张克山, 刘永杰, 尚佑军, 吴斌, 刘湘涛, 2014. 同位素标记相对和绝对定量蛋白组技术研究进展. 生物技术通讯, 25(2): 295–300]
- Lapitan NLV, Li YC, Peng J, Botha AM, 2007. Fractionated extracts of Russian wheat aphid eliciting defense responses in wheat. *J. Econ. Entomol.*, 100(3): 990–999.
- Li XF, Fan J, Sun YW, Wang GP, Chen HM, Yan T, Du WM, Xia LQ, 2014. Cloning and RNA interference analysis of the *Sitobion avenae* salivary protein C002 gene. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 51(6): 1479–1487. [李雪峰, 范佳, 孙永伟, 王根平, 陈红梅, 闫婷, 杜文明, 夏兰琴, 2014. 麦长管蚜唾液蛋白 C002 的基因克隆与 RNA 干扰研究. 应用昆虫学报, 51(6): 1479–1487]
- Liu S, Jauannet M, Dempsey DMA, Imani J, Coustau C, Kogel KH, 2019. RNA-based technologies for insect control in plant production. *Biotechnol. Adv.*, 107463.
- Liu YJ, 2017. PLRV-Mediated Physiological Responses, Feeding and Defense Behaviors of *Myzus persicae*. PhD Dissertation, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong. [刘英杰, 2017. 马铃薯卷叶病毒介导的桃蚜生理应答、取食与防御行为研究. 山东泰安: 山东农业大学博士学位论文]
- Lu H, Yang PC, Xu YY, Luo L, Zhu JJ, Cui N, Kang L, Cui F, 2016. Performances of survival, feeding behavior, and gene expression in aphids reveal their different fitness to host alteration. *Sci. Rep.*, 6: 19344.
- Ma R, Chen JL, Cheng DF, Sun JR, 2010. Activation of defense mechanism in wheat by polyphenol oxidase from aphid saliva. *J. Agric. Food Chem.*, 58(4): 2410–2418.
- Mugford ST, Barclay E, Drurey C, Findlay KC, Hogenhout SA, 2016. An immuno-suppressive aphid saliva protein is delivered into the cytosol of plant mesophyll cells during feeding. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 29(11): 854–861.
- Mutti NS, Louis J, Pappan LK, Pappan K, Begum K, Chen S, Park Y,

- Dittmer N, Marshall J, Reese JC, Reeck GR, 2008. A protein from the salivary glands of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, is essential in feeding on a host plant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(29): 9965–9969.
- Mutti NS, Park Y, Reese JC, Reeck GR, 2006. RNAi knockdown of a salivary transcript leading to lethality in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J. Insect Sci.*, 6(1): 38.
- Naessens E, Dubreuil G, Giordanengo P, Baron OL, Minet-Kebdani N, Keller H, Coustau C, 2015. A secreted MIF cytokine enables aphid feeding and represses plant immune responses. *Curr. Biol.*, 25(14): 1898–1903.
- Nalam V, Louis J, Shah J, 2019. Plant defense against aphids, the pest extraordinaire. *Plant Sci.*, 279: 96–107.
- Nicholson SJ, Hartson SD, Puterka GJ, 2012. Proteomic analysis of secreted saliva from Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia* Kurd.) biotypes that differ in virulence to wheat. *J. Proteomics*, 75(7): 2252–2268.
- Nicholson SJ, Puterka GJ, 2014. Variation in the salivary proteomes of differentially virulent greenbug (*Schizaphis graminum* Rondani) biotypes. *J. Proteomics*, 105: 186–203.
- Nouhaud P, Gautier M, Gouin A, Jaquière J, Peccoud J, Legeai F, Mieuze L, Smadja CM, Lemaitre C, Vitalis E, Simon JC, 2018. Identifying genomic hotspots of differentiation and candidate genes involved in the adaptive divergence of pea aphid host races. *Mol. Ecol.*, 27(16): 3287–3300.
- Oppenheim SJ, Baker RH, Simon S, DeSalle R, 2015. We can't all be supermodels; the value of comparative transcriptomics to the study of non-model insects. *Insect Mol. Biol.*, 24(2): 139–154.
- Pan Y, Zhu J, Luo L, Kang L, Cui F, 2015. High expression of a unique aphid protein in the salivary glands of *Acyrtosiphon pisum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 92: 175–180.
- Peng HC, Mantelin S, Hicks GR, Takken FW, Kaloshian I, 2016. The conformation of the plasma membrane-localized SIERK1-Mi-1.2 complex is altered by a potato aphid derived effector. *Plant Physiol.*, 171(3): 2211–2222.
- Pitino M, Coleman AD, Maffei ME, Ridout CJ, Hogenhout SA, 2011. Silencing of aphid genes by dsRNA feeding from plants. *PLoS ONE*, 6(10): e25709.
- Pitino M, Hogenhout SA, 2013. Aphid protein effectors promote aphid colonization in a plant species-specific manner. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 26(1): 130–139.
- Ponsen MB, 1972. The Site of Potato Leafroll Virus Multiplication in Its Vector, *Myzus persicae*: An Anatomical Study. PhD Dissertation, Wageningen University, Wageningen, Netherland.
- Rao SAK, Carolan JC, Wilkinson TL, 2013. Proteomic profiling of cereal aphid saliva reveals both ubiquitous and adaptive secreted proteins. *PLoS ONE*, 8(2): e57413.
- Ren KY, Zhang S, Luo JY, Lu LL, Cui JJ, Zhu JB, 2018a. Cloning of the gene *arnet* in the salivary gland and analysis of its expression in *Aphis gossypii*. *Plant Prot.*, 44(2): 47–52. [任柯昱, 张帅, 雒珺瑜, 吕丽敏, 崔金杰, 祝建波, 2018a. 棉蚜唾液腺蛋白 *arnet* 基因的克隆及表达特性分析. 植物保护, 44(2): 47–52]
- Ren KY, Zhang S, Luo JY, Wang CY, Lu LL, Zhang LL, Zhu XZ, Wang L, Cui JJ, Zhu JB, 2018b. Clone and expression analysis of salivary gland protein C002 in different host-specific types of *Aphis gossypii* Glover. *J. Environ. Entomol.*, 40(3): 231–241. [任柯昱, 张帅, 雒珺瑜, 王春义, 吕丽敏, 张利娟, 朱香镇, 王丽, 崔金杰, 祝建波, 2018b. 棉蚜唾液腺蛋白 C002 基因克隆及在棉蚜不同寄主专化型中的表达分析. 环境昆虫学报, 40(3): 231–241]
- Rodriguez PA, Escudero-Martinez C, Bos JIB, 2017. An aphid effector targets trafficking protein VPS52 in a host-specific manner to promote virulence. *Plant Physiol.*, 173(3): 1892–1903.
- Rodriguez PA, Stam R, Warbroek T, Bos JIB, 2014. Mp10 and Mp42 from the aphid species *Myzus persicae* trigger plant defenses in *Nicotiana benthamiana* through different activities. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 27(1): 30–39.
- Shangguan XX, Zhang J, Liu BF, Zhao Y, Wang HY, Wang ZZ, Guo JP, Rao WW, Jing SL, Guan W, Ma YH, Wu Y, Hu L, Chen RZ, Du B, Zhu L, Yu DZ, He GC, 2018. A mucin-like protein of planthopper is required for feeding and induces immunity response in plants. *Plant Physiol.*, 176(1): 552–565.
- Simon JC, Peccoud J, 2018. Rapid evolution of aphid pests in agricultural environments. *Curr. Opin. Insect Sci.*, 26: 17–24.
- Sun YW, Sparks C, Jones H, Riley M, Francis, Du WM, Xia LQ, 2019. Silencing an essential gene involved in infestation and digestion in grain aphid through plant-mediated RNA interference generates aphid-resistant wheat plants. *Plant Biotechnol. J.*, 17(5): 852.
- Takemoto H, Takabayashi J, 2012. Exogenous application of liquid diet, previously fed upon by pea aphids *Acyrtosiphon pisum* (Harris), to broad bean leaves induces volatiles attractive to the specialist parasitic wasp *Aphidius ervi* (Haliday). *J. Plant Interact.*, 7(1): 78–83.
- Teixeira MA, Sela N, Atamian HS, Bao E, Chaudhary R, MacWilliams J, He J, Mantelin S, Griek T, Kaloshian I, 2018. Sequence analysis of the potato aphid *Macrosiphum euphorbiae* transcriptome identified two new viruses. *PLoS ONE*, 13(3): e0193239.
- Thorpe P, Cock PJA, Bos J, 2016. Comparative transcriptomics and proteomics of three different aphid species identifies core and diverse effector sets. *BMC Genomics*, 17(1): 172.
- Tjallingii WF, 2006. Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. *J. Exp. Bot.*, 57(4): 739–745.
- Tjallingii WF, Esch TH, 1993. Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals. *Physiol. Entomol.*, 18(3): 317–328.
- van Bel AJE, Will T, 2016. Functional evaluation of proteins in watery and gel saliva of aphids. *Front. Plant Sci.*, 7: 1840.
- Vander moten S, Harmel N, Mazzucchelli G, Pauw ED, Haubruge E, Francis F, 2014. Comparative analyses of salivary proteins from three aphid species. *Insect Mol. Biol.*, 23(1): 67–77.
- Vincent R, Avramova M, Canham J, Higgins P, Bilkey N, Mugford ST, Pitino M, Toyota M, Gilroy S, Miller AJ, Hogenhout SA, Sanders

D, 2017. Interplay of plasma membrane and vacuolar ion channels, together with BAK1, elicits rapid cytosolic calcium elevations in *Arabidopsis* during aphid feeding. *Plant Cell*, 29(6): 1460 – 1479.

Wang W, Dai H, Zhang Y, Chandrasekar R, Luo L, Hiromasa Y, Sheng C, Peng G, Chen S, Tomich JM, Reese J, Edwards O, Kang L, Reeck G, Cui F, 2015a. Armet is an effector protein mediating aphid-plant interactions. *FASEB J.*, 29 (5): 2032 – 2045.

Wang W, Luo L, Lu H, Chen S, Kang L, Cui F, 2015b. Angiotensin-converting enzymes modulate aphid-plant interactions. *Sci. Rep.*, 5: 8885.

Wang Z, Hu R, Ye X, Huang JH, Chen XX, Shi M, 2018. Laccase 1 gene from *Plutella xylostella* (*PxLac1*) and its functions in humoral immune response. *J. Insect Physiol.*, 107: 197 – 203.

Will T, Kornemann SR, Furch ACU, Tjallingii WF, van Bel AJ, 2009. Aphid watery saliva counteracts sieve-tube occlusion: a universal phenomenon? *J. Exp. Biol.*, 212(20): 3305 – 3312.

Will T, Steckbauer K, Hardt M, van Bel AJ, 2012. Aphid gel saliva: sheath structure, protein composition and secretory dependence on stylet-tip milieu. *PLoS ONE*, 7(10): e46903.

Will T, Tjallingii WF, Thönnessen A, van Bel AJ, 2007. Molecular sabotage of plant defense by aphid saliva. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(25): 10536 – 10541.

Will T, Vilcinskas A, 2015. The structural sheath protein of aphids is required for phloem feeding. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 57: 34 – 40.

Wroblewski T, Tomczak A, Michelmore R, 2005. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol. J.*, 3(2): 259 – 273.

Xu HX, Qian LX, Wang XW, Shao RX, Hong Y, Liu SS, Wang XW, 2019. A salivary effector enables whitefly to feed on host plants by eliciting salicylic acid-signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 116(2): 490 – 495.

Yang CH, Guo JY, Chu D, Ding TB, Wei KK, Cheng DF, Wan FH, 2017. Secretory laccase 1 in *Bemisia tabaci* MED is involved in whitefly-plant interaction. *Sci. Rep.*, 7(1): 3623.

Yang Z, Ma L, Francis F, Yang Y, Chen H, Wu H, Chen X, 2018. Proteins identified from saliva and salivary glands of the Chinese gall aphid *Schlechtendalia chinensis*. *Proteomics*, 18(9): 1700378.

Yu XD, Liu ZC, Huang SL, Chen ZQ, Sun YW, Duan PF, Ma YZ, Xia LQ, 2016. RNAi-mediated plant protection against aphids. *Pest Manag. Sci.*, 72(6): 1090 – 1098.

Zhang Y, Fan J, Francis F, Chen JL, 2017. Watery saliva secreted by the grain aphid *Sitobion avenae* stimulates aphid resistance in wheat. *J. Agric. Food Chem.*, 65(40): 8798 – 8805.

Zhang Y, Fan J, Francis F, Chen JL, 2018. Molecular characterization and gene silencing of *Laccase 1* in the grain aphid, *Sitobion avenae*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 97(4): e21446.

Zhang Y, Fan J, Sun JR, Chen JL, 2015. Cloning and RNA interference analysis of the salivary protein C002 gene in *Schizaphis graminum*. *J. Integr. Agric.*, 14(4): 698 – 705.

Zhang Y, Fan J, Sun J, Francis F, Chen JL, 2017. Transcriptome analysis of the salivary glands of the grain aphid, *Sitobion avenae*. *Sci. Rep.*, 7(1): 15911

(责任编辑：赵利辉)