

RNA 干扰在昆虫中的作用机理及应用进展

施秀珍, 吴青君*, 王少丽, 徐宝云, 谢文, 张友军

中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081

摘要: RNA 干扰(RNAi) 是生物体内源基因发生转录后特异性降解的一种生理现象, 作为抵抗病毒的免疫机制, 广泛存在于生物体内。RNAi 在秀丽隐杆线虫中的发生机制已明确, 但昆虫的系统性 RNAi 不同于线虫, 在昆虫中尚未发现线虫跨膜蛋白 SID-2 的同源蛋白, 且果蝇中不存在依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶(RdRP), 但存在具有相似活性的物质。昆虫发生 RNAi 的效率不仅与靶标基因自身及双链 RNA 的选择有关, 而且与虫体的发育状态及摄入双链 RNA 的剂量相关。随着 RNAi 在昆虫中作用特点的阐明, RNAi 的应用价值也逐渐体现。近年来, 通过 RNAi 沉默靶标基因, 不但促进了昆虫基因功能研究的发展, 而且被广泛用于重要农业害虫抗药性基因的研究。最新研究表明, RNAi 结合第 2 代测序技术, 针对非模式昆虫, 能迅速找到具有致死效应的靶标序列, 加快了利用 RNAi 技术生产生物农药的步伐。

关键词: RNA 干扰; 小干扰 RNA; 双链 RNA; 基因功能; 生物农药

The mechanism and application progress of RNA interference in insects

Xiu-zhen SHI, Qing-jun WU*, Shao-li WANG, Bao-yun XU, Wen XIE, You-jun ZHANG

Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: RNA interference (RNAi) is a physiological phenomenon that endogenous gene occurs specific degradation after transcription, which widely exists as an immune mechanism against the viruses in organisms. The core mechanism of RNAi in *Caenorhabditis elegans* has been determined, but there exists an alternative systematic RNAi pathway in insects which is distinct from *C. elegans*. The homologous proteins of transmembrane SID-2 have not been found in insects yet, in addition, the RNA-dependent RNA Polymerase (RdRP) doesn't locate in *Drosophila melanogaster* instead of other enzymes with similar function. The efficiency of RNAi varies not only with the target genes and the choice of double-strand RNA (dsRNA), but also with the insects' developmental state and the dose of dsRNA intake. With the identification of the characteristics of RNAi in insects, the application value of RNAi has been gradually showing. In recent years, silencing the target gene by means of RNAi technology facilitates the development of gene function research. Additionally, RNAi is also widely used for the research on resistant genes in notorious pests. The latest study suggests that RNAi combining with the second generation sequencing technology can screen a lethal sequence to non-model insects, which speeds up the pace of producing biopesticides used for agricultural insect pests control by RNAi technology.

Key words: RNAi; siRNA; dsRNA; gene function; biopesticide

Napoli *et al.* 于 1990 年首次发现引入外源基因能够引起矮牵牛 *Petunia hybrida* Vilm 内源同源基因的沉默, 称此现象为共抑制 (co-suppression)。Cogoni *et al.* (1996) 发现在粗糙脉孢菌 *Neurospora crassa* 中发生的转基因后沉默现象是由细胞质内部因子引发, 称为基因压制 (quelling)。Fire *et al.* (1998) 阐述了基因沉默现象的本质, 将由双链 RNA (double strand RNA, dsRNA) 引发生物体同源

序列 mRNA 降解而最终导致特异性基因转录后沉默的效应命名为 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi)。RNAi 作为研究功能基因组学的一个技术平台, 促进了昆虫基因功能研究的革命 (Heckel, 2003)。本文主要介绍 RNAi 在昆虫中的作用机理, 以及 RNAi 技术在基因功能、抗药性研究和害虫防治中的应用进展, 并展望了 RNAi 技术的应用前景。

收稿日期 (Received): 2012-07-10 接受日期 (Accepted): 2012-08-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31071709, 31171876)

作者简介: 施秀珍, 女, 硕士研究生。研究方向: 昆虫毒理学。E-mail: shxzh87@sina.com

* 通讯作者 (Author for correspondence), E-mail: wuqj@mail.caas.net.cn

1 昆虫 RNAi 的作用机制

果蝇 *Drosophila melanogaster* Meigen 作为模式昆虫,是第一个用于 RNAi 研究的昆虫,一些重要的 RNAi 相关元件是在果蝇中发现的。Zamore *et al.* (2000) 用 dsRNA 转染果蝇细胞系,发现 dsRNA 首先被切割为 21 ~ 23 nt 的短链。Elbashir *et al.* (2001) 通过体外合成的方法,证实 3' 端具有悬伸结构 (overhanging) 的 RNA 短链能高效地介导靶 mRNA 的切割,将这种能引发后续 RNAi 效应的活性短链称为小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)。随后,根据 siRNA 的 3' 端有 2 个碱基突出的结构特征, Bernstein *et al.* (2001) 推测 dsRNA 是被一种 RNase III 切割,因此,利用 RNAi 抑制果蝇细胞 RNase III 蛋白的表达,首次确认了这种 RNase III,即 Dicer 酶是果蝇细胞中将长链 dsRNA 降解为 siRNA 的酶,明确了 RNAi 的引发过程。

Hammond *et al.* (2000) 在发生 RNAi 后的果蝇胚胎提取物中分离核酶时,发现了 RNA 诱导的沉默复合体 (RNA induced silencing complex, RISC)。在 RISC 诱导下, siRNA 中的反义链与靶 mRNA 通过碱基互补配对而结合,利用 ATP 供能, RISC 中核酸内切酶 slicer 切割靶 mRNA,引起靶基因转录后水平的沉默 (Martinez *et al.*, 2002)。Saleh *et al.* (2009) 发现,利用带有 GFP 标记的 Sindbis 病毒能抑制果蝇自身 GFP 的表达量,且吸收 dsRNA 是生物体高效抑制病毒侵染所必需的,证明 RNAi 实质上是生物体抵抗病毒的一种免疫机制,因而广泛存在于生物体内。Tomoyasu *et al.* (2008) 研究表明,昆虫 RNAi 的核心机制与秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 相似,如二者都是由 Dicer 酶完成 dsRNA 的切割,但某些 RNAi 组分及其作用存在差异。

2 昆虫的系统性 RNAi

昆虫的 RNAi 分为细胞自治式和非自治式 (Whangbo & Hunter, 2008)。细胞自治式 RNAi 的转录后基因沉默效应只限于引入或表达 dsRNA 的细胞自身,无细胞间传递性;若沉默效应可以传递到不同的细胞或组织中,则称为非细胞自治式 RNAi。非细胞自治式 RNAi 包括环境性 RNAi 和系统性 RNAi 2 种形式,环境性 RNAi 发生在能够从环境中吸收 dsRNA 的单细胞生物中,而系统性 RNAi 只特定于多细胞生物,从而包括沉默信号在细胞或

组织间的传递过程 (Huvenne & Smaghe, 2010)。

Winston *et al.* (2002) 研究线虫的系统性 RNAi 时,发现 SID-1 发生突变的秀丽隐杆线虫只能发生细胞自治性 RNAi。而果蝇的 S2 细胞系表达 SID-1 后能够从培养基中吸收 dsRNA,表明 SID-1 是细胞膜门控 dsRNA 的蛋白通道 (Feinberg & Hunter, 2003; Joseph & Hunter, 2011)。位于线虫肠壁的跨膜蛋白 SID-2,是发生环境性 RNAi 所必需的 (Winston *et al.*, 2007)。目前,在昆虫中尚未发现 SID-2 同源蛋白。SID-1 同源蛋白在鞘翅目 [赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (Herbst)]、鳞翅目 [家蚕 *Bombyx mori* L.、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (Hübner)]、膜翅目 [意大利蜜蜂 *Apis mellifera* (L.)、丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* (Walk.)]、半翅目 [棉蚜 *Aphis gossypii* (Glover)、禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi* (L.)、麦长管蚜 *Sitobion avenae* (L.)、豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* (Harris)]、直翅目 [美国沙漠蝗 *Schistocerca americana* (Drury)] 和虱科 [人体虱 *Pediculus humanus corporis* (DeGeer)] 中均有发现。研究表明,意大利蜜蜂发生 RNAi 时,靶标基因沉默前 SID-1 同源蛋白表达量会明显增加 (Aronstein *et al.*, 2006)。而 Tomoyasu *et al.* (2008) 分析发现,同时沉默 3 个 SID-1 同源蛋白时,赤拟谷盗仍然能发生系统性 RNAi,且这些 SID-1 同源蛋白与秀丽隐杆线虫发生 RNAi 时无关的蛋白 tag-130 关系更相近,表明 SID-1 不是赤拟谷盗发生系统性 RNAi 所必需的物质。系统进化树分析表明,昆虫的 SID-1 同源蛋白具有很长的进化历史 (Xu & Han, 2008),但昆虫 SID-1 同源蛋白在系统性 RNAi 中的作用仍不明确。

线虫和植物发生系统性 RNAi 必须具备依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRP) (Harmon, 2002), 仅需引入少量的 dsRNA 就能发生显著的基因沉默效应。但在昆虫中一直未发现 RdRP 的存在 (Gordon & Waterhouse, 2007)。Lipardi *et al.* (2001) 发现,果蝇胚胎能以 GFP 标记的 siRNA 为特异性引物,将 mRNA 转变为 dsRNA,表明果蝇中存在具有 RdRP 活性的物质。而 Duan *et al.* (2010) 发现, RdRP 活性抑制剂 *Amanita phalloides* 并不能抑制 D-elp1 的活性;同时,其将秀丽隐杆线虫的 2 个基因 *rnf-1* 和 *ego-1* 分别克隆到表达载体 pUAST-DEST 上,将重组质粒显微注射到果

蝇胚胎中,构建了转基因的果蝇品系,结果发现,引入的外源基因没有影响转基因果蝇的表型及形态发育,且转基因果蝇沉默外源基因的能力显著增强。有关昆虫发生 RNAi 的信号放大机制还需进一步研究。

3 昆虫 RNAi 的敏感度

针对不同昆虫 RNAi 的差异性,研究者将引发基因沉默时生物体每毫克组织所需的 dsRNA 作为 RNAi 敏感度的衡量指标。将北美天蚕蛾 *Hyalophora cecropia* (L.)、柞蚕 *Antheraea pernyi* Guérin-Mèneville、烟草天蛾 *Manduca sexta* L. 注射少量 dsRNA ($10 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$),就会引发高水平的基因沉默;但棉贪夜蛾 *Chrysodeixis includens* (Walker) 等注射大量 dsRNA ($1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$) 也未观察到明显的 RNAi 效果(Terenius *et al.*, 2011)。

同种昆虫不同靶标基因的 RNAi 敏感度有较大差异。分别注射等量的 dsRNA 沉默褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stal) 3 个基因,发现其对中枢神经系统表达的基因 *Nlb2* 沉默效果最差,但 2 次注射 dsRNA 后,其 RNAi 效果明显增强(Liu *et al.*, 2010)。Cabrera *et al.* (2010) 研究表明,注射和饲喂草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (Smith) 幼虫丝蛋白酶基因 dsRNA,能够显著降低丝蛋白酶转录后水平。但也有关于草地贪夜蛾发生 RNAi 沉默效率低的报道(Terenius *et al.*, 2011)。此外,同种基因不同 dsRNA 片段也会产生 RNAi 效率的差异。Li *et al.* (2011) 设计了 3 个针对褐飞虱 V-ATP 合成酶类 E 亚基(V-ATPase-E)的 dsRNA,发现 dsRNA 片段位于 5'端编码区时沉默效率最低,而包含 3'端编码区和非编码区的 dsRNA 沉默效率最高。以上研究表明,昆虫发生 RNAi 的效率受到与自身靶标基因相关因素的影响。除此之外,注射或饲喂前饥饿处理能降低昆虫中肠消化 dsRNA 的酶活性,从而增加虫体对 dsRNA 的敏感度(Cabrera *et al.*, 2010)。同时,高剂量的 dsRNA 具有更大的沉默靶标基因的可能性。Liu *et al.* (2010) 采取 2 种注射量(25 和 50 nL)的 dsRNA 沉默褐飞虱 *cathepsin-B* 基因,转录后水平分别下降了 13.9% 和 43.8%。

为明确引起 RNAi 时所需的最低 dsRNA 浓度,以减少过多的 dsRNA 造成的脱靶效应(off-target effects),需建立虫体 dsRNA 摄入量和沉默程度的剂量反应曲线(Terenius *et al.*, 2011)。在未来的

RNAi 研究中,通过剂量反应关系,选择既有显著沉默效果,又无脱靶效应的 dsRNA 浓度,是 RNAi 由定性到定量发展的一种趋势,这对 RNAi 应用于害虫防治时,准确掌握 RNAi 制剂用量具有重大意义。

4 RNAi 在昆虫中的应用

截至 2009 年 7 月,已有 50 种昆虫的基因组公布或正在测序中,不久昆虫分类中的每个目中将至少有 1 种昆虫具有完整的基因组序列信息(Xavier, 2010)。随着对昆虫 RNAi 生化途径的阐明,逐渐形成了 RNAi 应用研究的分支科学。

4.1 昆虫功能基因的研究

利用传统遗传学方法进行昆虫功能基因组的研究,增加了我们对模式生物的发育、生理、病理学等方面的了解,但受限于鉴定突变基因的繁琐工作及基因自身对突变剂的偏好性,急需高效的研究方法, RNAi 成为昆虫功能基因和功能基因组研究的得力工具。

近年来,昆虫中一些基因的重要功能由 RNAi 鉴定所得。Kumar *et al.* (2009) 通过 siRNA 沉默棉铃虫 *Helicoverpa armigera* Hübner 乙酰胆碱受体,其幼虫正常的生长发育和生活史受到严重影响。Zhang *et al.* (2010) 首次鉴定了东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) 几丁质合成酶 LmCHS1 的 2 个可变剪辑体,并利用 RNAi 技术进一步探究该基因可变剪辑体对发育的影响,发现其 2 龄幼虫注射 LmCHS1B 的 dsRNA 后,虫体表皮褶皱,不能够正常蜕皮,证明可变剪辑体对东亚飞蝗正常生长的重要性。Hua *et al.* (2010) 通过微距阵鉴定了鞣化激素受体 Tcrk 被干扰后表达发生显著变化的 24 个基因,发现其中的一个基因 TC004091 被沉默后,导致末龄幼虫不能正常羽化,表明此基因可能参与了鞣化激素信号传导的生化过程,有助于探究鞣化激素的分子作用机制。整联蛋白 Integrin 是由 α 和 β 异质二聚体组成的一种细胞表面蛋白,能够介导细胞间的相互作用。Surakasi *et al.* (2011) 将整联蛋白 β 链的 dsRNA 注射甜菜夜蛾幼虫,发现处理过的虫体感染细菌时更易形成肿瘤,血淋巴循环能力降低,表明 Integrin 不仅在甜菜夜蛾幼虫发育中起作用,而且在细胞免疫反应中发挥功能。通过 RNAi 还能研究杀虫剂的作用靶标, Sivakumar *et al.* (2007) 用 dsRNA 繁育表达棉铃虫胺

肽酶 HaAPN1 的 Sf21 细胞系时,发现 HaAPN1 的表达量及转录水平均显著降低,与体内注射 dsRNA 引起棉铃虫 HaAPN1 转录后沉默的结果一致,结合 dsRNA 注射后虫体对苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry1Ac 抗性的增强,首次明确了 HaAPN1 是 Bt Cry1Ac 毒素的功能受体。

Dietzl *et al.* (2007) 利用 RNAi 研究果蝇的功能基因组学,即以二价 *GAL4/UAS* 转基因系统表达反向重复序列,转录形成发夹环结构 RNA (hairpin RNA),作为内源性 dsRNA,建立果蝇基因组水平转基因 RNAi 文库,形成了 22270 个转基因系,覆盖了果蝇基因组中预测的 88% 的蛋白质编码基因。此基因组水平转基因 RNAi 文库为系统性分析果蝇各个组织及发育阶段的基因功能打开了广阔的前景,也为 RNAi 应用于其他昆虫功能基因组学的研究奠定了基础。

4.2 昆虫抗药性的研究

大量农药的长期使用,导致农业害虫的行为及生化机制的改变,从而形成抗药性。昆虫表皮穿透力降低、体内代谢酶系活性增强和靶标位点敏感性下降是害虫抗药性的主要机理。深入探索昆虫的抗性机制,有助于抗性的有效治理,RNAi 为抗性机制的探究提供了一种有效的途径。

生物体内代谢途径的增强是形成抗性的重要机制之一。Turner *et al.* (2006) 通过饲喂苹浅褐卷蛾 *Epiphyas postvittana* (Walker) 羧酸酯酶 EposCXE1 的 dsRNA,引发 EposCXE1 转录后水平降低 50%,为研究苹浅褐卷蛾与羧酸酯酶的相关抗性奠定了基础。Bautista *et al.* (2009) 发现,氯菊酯抗性种群小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 4 龄幼虫细胞色素 P450 基因 CYP6BG1 过量表达,且室内饲养的敏感幼虫经过氯菊酯诱导后,CYP6BG1 表达量也会显著增高,推测 CYP6BG1 的过量表达与小菜蛾氯菊酯抗性有关。进一步通过饲喂小菜蛾幼虫 CYP6BG1 dsRNA 进行验证,荧光定量检测发现,CYP6BG1 转录水平显著降低;同时对处理后的幼虫进行氯菊酯生物测定,发现 CYP6BG1 沉默后 LC_{50} 显著降低,证明小菜蛾对氯菊酯形成抗性与细胞色素氧化酶 CYP6BG1 活性增强有关。

马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* (Say),已经对常见农药的 50 多种有效成分产生抗性(Jiang *et al.*, 2010)。Revuelta *et al.* (2011) 克隆并测序了

马铃薯甲虫的 2 种乙酰胆碱酯酶 *Ldace1* 和 *Ldace2*,通过分别注射 dsRNA 特异性干扰 *Ldace1* 和 *Ldace2* 的方法探究了 2 种酯酶在抗性中的贡献率。结合 RNAi 后的酶谱分析表明,*Ldace1* 在所观测到的总酶活中起决定性作用,以有机磷农药毒死蜱处理注射后 7 d 仍存活的成虫,*Ldace1* dsRNA 处理的死亡率(75.6%)高于 *dsLdace2* (50.6%) 和对照组(40.3%),表明 *Ldace2* 是马铃薯甲虫产生有机磷农药抗性的主要机制。

4.3 害虫防治研究

近几年,RNAi 技术在田间作物保护中的应用成为研究热点。一方面,通过转基因作物自身转录合成害虫靶标基因的 dsRNA,当有害生物取食转基因作物时,引发害虫体内发生 RNAi,降低害虫的取食能力。Mao *et al.* (2007) 通过转基因技术使棉花表达昆虫细胞色素 P450 基因的 dsRNA,幼虫取食后出现发育迟缓症状。Baum *et al.* (2007) 将有害玉米根部的西方甲虫 *Diabrotica virgifera* (LeConte) 饲喂表达 ATP 酶 dsRNA 的转基因植物,导致玉米甲虫发育迟缓和死亡率升高。Zha *et al.* (2011) 将褐飞虱中肠中高表达的 3 个基因(*NlHT1*、*Nlcar*、*Nltry*)转入水稻中,当若虫取食这种转基因水稻时,靶标基因的转录水平下降,但未产生致死效应。另一方面,以化学合成 siRNA 作为生物农药。目前,很多研究者致力于筛选具有致死效应的 siRNA,大多数来源于生物体内重要生化途径的候选基因。例如,线粒体呼吸电子传递链生成 ATP 过程中,RISP 是细胞色素氧化酶复合体 bc1 的一个亚基,Gong *et al.* (2011) 针对序列已公布的小菜蛾 RISP (Pxyl-RISP),设计了 3 种特异性 siRNA,与饲料混合后分别饲喂小菜蛾幼虫,发现幼虫死亡率最高达 73%;荧光定量 PCR 检测发现,死亡幼虫 RISP 转录水平显著降低,存活幼虫 ATP 水平低于对照组,首次证明了将化学合成的 siRNA 作为线粒体电子传递抑制剂,具有新一代生物农药的潜力。Zhou *et al.* (2008) 针对等翅目害虫白蚁 *Reticulitermes flavipes* (Kollar) 消化木质纤维素的葡聚糖酶 cell-1 和调节白蚁等级分化的蛋白 Hex-2 2 个基因,分别进行注射 siRNA 和喂食 dsRNA 试验。结果表明,cell-1 沉默后导致白蚁种群适合度降低和死亡率显著升高,喂食 Hex-2 dsRNA 能显著增加种群中兵蚁(无取食能力)的分化,并且下调幼虫表皮蛋白 LCP 的表达

量;用 JHⅢ(保幼激素衍生物)和 *Hex-2* 的 dsRNA 同时处理后,幼虫不能正常蜕皮,死亡率极高。以上研究表明,基于 RNAi 技术开发新型的杀虫剂具有巨大的潜力。

RNAi 防治害虫的效果依赖于高效的干扰片断和简便的导入方法。筛选大量具有致死效应的干扰片断是 RNAi 应用于害虫防治的基础。最新研究表明,利用 RNAseq 和数字基因表达谱 DGE-tag 技术筛选有效的 RNAi 片断是可行的,尤其对于缺少基因序列信息的害虫更有价值。Wang *et al.* (2011)以亚洲玉米螟 *Ostrinia furnalis* (Guenée) 为研究对象,获得了 14690 个阶段性(卵、幼虫、蛹、成虫)特异表达的基因,选择了幼虫阶段 DGE-tag 拷贝数最高的 10 个基因合成相应的 dsRNA,喷洒到幼虫和人工饲料上,发现幼虫发育迟缓且死亡率升高;通过 qRT-PCR 分析,表明幼虫死亡率和靶基因表达沉默程度具有相关性,并通过荧光标记 dsRNA,使虫体吸收 dsRNA 的过程可视化,首次验证了 dsRNA 可以穿透鳞翅目昆虫的体壁和卵壳,为 dsRNA 可直接喷洒用于害虫防治提供了依据。

5 小结

从模式生物发生 RNAi 的机理着手,RNAi 在非模式昆虫中的作用机制也逐渐明确,昆虫系统性 RNAi 得到了进一步研究。RNAi 的应用价值也越来越受到重视,大量研究表明,化学合成的 siRNA 和 dsRNA,以及通过转基因体内合成的发夹结构 RNA 都具有致死效应,这暗示将 RNAi 技术应用于害虫防治具有开发潜力。目前,已有针对鳞翅目、鞘翅目和半翅目害虫的 RNAi 转基因植物(Baum *et al.*, 2007; Mao *et al.*, 2007; Zha *et al.*, 2011)。最新研究表明,RNAi 结合 RNAseq、DGE-tag 等先进的生物技术,可以快速、简易地找到未知基因的序列信息,使筛选引发 RNAi 的靶标序列不再局限于已知的基因。近期,关于 siRNA 可以加工成稳定的剂型及 dsRNA 能够穿透鳞翅目幼虫体壁的报道,更加快了 RNAi 应用于害虫防治的步伐(Wang *et al.*, 2011)。

目前,RNAi 在田间的实际应用面临挑战,不仅由于转基因植物的社会认可度和安全评价问题,而且取决于大量致死效应基因序列的筛选和有害生物对 RNAi 的敏感程度,若将 siRNA 或 dsRNA 开发成生物农药,则需要明确控制害虫为害水平的制剂

用量,而针对 RNAi 敏感度的剂量反应鲜有报道。但 RNAi 技术无疑为防护农业害虫进而保护农作物提供了新的思路(Gatehouse & Price, 2011),RNAi 的巨大潜力决定了其将成为近 10 年的研究热点。

参考文献

Aronstein K, Pankiw T and Saldivar E. 2006. SID-1 is implicated in systemic gene silencing in the honey bee. *Journal of Agricultural Research*, 45: 20 – 24.

Baum J A, Bogaert T, Clinton W, Heck G R, Feldmann P and Ilagan. 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology*, 25: 1322 – 1326.

Bautista M A M, Miyata T, Miura K and Tanaka T. 2009. RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39: 38 – 46.

Bernstein E, Caudy A A, Hammond S M and Hannon G J. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409: 363 – 366.

Cabrera R L, Trujillo-Bacallao D, Borrás-Hidalgo O, Wright D J and AyraPardo C. 2010. RNAi-mediated knockdown of a *Spodoptera frugiperda* trypsinlike serine-protease gene reduces susceptibility to a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca1 protoxin. *Environmental Microbiology*, 12: 2894 – 2903.

Cogoni C, Irelan J T, Schumacher M, Schmidhauser T J, Selker E U and Macino G. 1996. Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *The Embo Journal*, 15: 3153 – 3163.

Dietzl G, Chen D, Schnorrer F, Barinova Y, Fellner M, Gasser B, Kinsey K, Oppel S, Scheiblauer S, Couto A, Marra V, Keleman K and Dickson B J. 2007. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature*, 448: 151 – 156.

Duan G W, Robert B S, Chris A H, Carolyn A B, Peter M W and Karl H J G. 2010. Expression of *Caenorhabditis elegans* RNA-directed RNA polymerase in transgenic *Drosophila melanogaster* does not affect morphological development. *Transgenic Research*, 19: 1121 – 1128.

Elbashir S M, Lendeckel W and Tuschl T. 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes and Development*, 15: 188 – 200.

- Feinberg E H and Hunter C P. 2003. Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science*, 301: 1545 – 1547.
- Fire A, Xu S, Montgomery M K, Kostas S A, Driver S E and Mello C C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391: 806 – 811.
- Gatehouse J A and Price D R G. 2011. Protection of crops against insect pests using RNA interference. *Insect Biotechnology*, 2: 145 – 168.
- Gong L, Yang X Q, Zhang B, Zhong G H and Hu M Y. 2011. Silencing of Rieske iron-sulfur protein using chemically synthesised siRNA as a potential biopesticide against *Plutella xylostella*. *Pest Management Science*, 65: 514 – 520.
- Hammond S M, Bernstein E, Beach D and Hannon G J. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404: 293 – 296.
- Harmon G J. 2002. RNA interference. *Nature*, 418: 244 – 251.
- Heckel D G. 2003. Genomics in pure and applied entomology. *Annual Review of Entomology*, 48: 235 – 260.
- Hua B and Subba R P. 2010. Functional characterization of bursicon receptor and genome-wide analysis for identification of genes affected by bursicon receptor RNAi. *Developmental Biology*, 344: 248 – 258.
- Huvenne H and Smaghe G. 2010. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *Journal of Insect Physiology*, 56: 227 – 235.
- Jiang W H, Wang Z T, Xiong M H, Lu W P, Liu P, Guo W C and Li G Q. 2010. Insecticide resistance status of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) adults in Northern Xinjiang Uygur Autonomous Region. *Journal of Economic Entomology*, 103: 1365 – 1371.
- Joseph D S and Hunter C P. 2011. SID-1 is a dsRNA-selective dsRNA-gated channel. *RNA*, 17: 1057 – 1065.
- Kumar M, Gupta G P and Rajam M V. 2009. Silencing of acetylcholinesterase gene of *Helicoverpa armigera* by siRNA affects larval growth and its life cycle. *Journal of Insect Physiology*, 55: 273 – 278.
- Li J, Chen Q B, Lin Y J, Jiang T G, Wu G and Hua H X. 2011. RNA interference in *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) based on dsRNA ingestion. *Pest Management Science*, 67: 852 – 859.
- Lipardi C and Paterson B M. 2010. Identification of an RNA-dependent RNA polymerase in *Drosophila* establishes a common theme in RNA silencing. *Fly*, 4: 1 – 6.
- Lipardi C, Wei Q and Paterson B M. 2001. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell*, 107: 297 – 307.
- Liu S H, Ding Z P, Zhang C W, Yang B J and Liu Z W. 2010. Gene knockdown by intro-thoracic injection of double-stranded RNA in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40: 666 – 671.
- Mao Y B, Cai W J, Wang J W, Hong G J, Tao X Y and Wang L J. 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology*, 25: 1307 – 1313.
- Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Luhrmann R and Tuschl T. 2002. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*, 110: 563 – 574.
- Napoli C, Lemieux C and Jorgensen R. 1990. Introduction of a chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, 2: 279 – 289.
- Revuelta L, Ortego F, Díaz-Ruiz J R, Castañera P, Tenllado F and Crespo P H. 2011. Contribution of *Ldace1* gene to acetylcholinesterase activity in Colorado potato beetle. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41: 795 – 803.
- Saleh M C, Tassetto M, van Rij R P, Goic B, Gausson V, Berry B, Jacquier C, Antoniewski C and Andino R. 2009. Antiviral immunity in *Drosophila* requires systemic RNA interference spread. *Nature*, 458: 346 – 351.
- Sivakumar S, Rajagopal R, Venkatesh G R, Srivastava A and Bhatnagar R K. 2007. Knockdown of aminopeptidase-N from *Helicoverpa armigera* larvae and in transfected Sf21 cells by RNA interference reveals its functional interaction with *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein Cry1Ac. *Journal of Biological Chemistry*, 282: 7312 – 7319.
- Surakasi V P, Mohamed A A M and Kim Y. 2011. RNA interference of $\beta 1$ integrin subunit impairs development and immune responses of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Journal of Insect Physiology*, 57: 1537 – 1544.
- Terenius O, Papanicolaou A, Garbutt J S, Eleftherianos I and Huvenne H. 2011. RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *Journal of Insect Physiology*, 57: 231 – 245.

- Tomoyasu Y, Miller S C, Tomita S, Schoppmeier M, Grossmann D and Bucher G. 2008. Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium* genome. *Trends Plant Science*, 13: 317 – 328.
- Turner C T, Davy M W, MacDiarmid R M, Plummer K M, Birch N P and Newcomb R D. 2006. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Molecular Biology*, 15: 383 – 391.
- Wang Y, Zhang H, Li H and Miao X. 2011. Second-generation sequencing supply an effective way to screen RNAi targets in large scale for potential application in pest insect control. *PLoS ONE*, 6: e18644.
- Whangbo J S and Hunter C P. 2008. Environmental RNA interference. *Cell*, 24: 297 – 305.
- Winston W M, Molodowitch C and Hunter C P. 2002. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science*, 295: 2456 – 2459.
- Xavier B. 2010. Beyond *Drosophila*: RNAi in vivo and functional genomics in insects. *Annual Review of Entomology*, 25: 111 – 128.
- Xu W N and Han Z J. 2008. Cloning and phylogenetic analysis of sid-1-like genes from aphids. *Journal of Insect Science*, 30: 1536 – 2442.
- Zamore P D, Tuschl T, Sharp P A and Bartel D P. 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101: 25 – 33.
- Zha W, Peng X, Chen R, Du B and Zhu L. 2011. Knockdown of midgut genes by dsRNA-transgenic plant-mediated RNA interference in the Hemipteran insect *Nilaparvata lugens*. *PLoS ONE*, 6: e20504.
- Zhang J Z, Enbo M, Kun Y Z, Liu X J, Zhang J Q, Li D Q, Yi S and Guo Y P. 2010. Silencing of two alternative splicing-derived mRNA variants of chitin synthase1 gene by RNAi is lethal to the oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40: 824 – 833.
- Zhou X G, Marsha M W, Faith M O and Michael E S. 2008. RNA interference in the termite *Reticulitermes flavipes* through ingestion of double-stranded RNA. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38: 805 – 815.

(责任编辑:杨郁霞)

